

中华蜂体内放线菌的分离、多样性及抗菌活性研究

刘娟¹ 刘晓飞¹ 关统伟² 陈芳敏¹ 杨雅琳¹ 张小平^{1*}

(1. 四川农业大学 资源环境学院 微生物系 四川 成都 611130)

(2. 西华大学 微生物工程学院 四川 成都 610039)

摘要:【目的】探索药用昆虫中华蜂(*Apis cerana cerana* Fabricius)体内可培养放线菌的分离方法, 研究其物种多样性及抗菌活性, 挖掘更多微生物资源。【方法】选用 7 种分离培养基对中华蜂样品体内放线菌进行分离; 通过采用 16S rRNA PCR-RFLP 和 16S rRNA 基因序列分析方法研究其多样性; 选用 4 种致病菌对菌株进行抗菌活性初探。【结果】共分离得到 180 株放线菌, 根据菌落的形态和细胞特征观察结果, 从中选取 84 株作为代表菌株, 其分属于 3 个目、4 个科中的 4 个属, 其中 6 株为潜在新种; 最适的表面消毒方法: 浓度为 0.2% 的 ClO_2 (二氧化氯) 作为消毒剂, 作用 60 s; 拮抗实验显示, 31.0%、48.8%、27.4%、16.7% 的代表菌株分别对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、玉米弯孢病菌、西瓜枯萎病菌有不同程度的抗菌活性, 71.4% 的代表菌株对至少一种病原菌有拮抗作用。【结论】分离方法的选择对昆虫体内放线菌的分离效果影响较大; 中华蜂体内放线菌具有丰富的多样性, 展现出很好的抗菌活性, 表明其在发现新型生物活性物质中具有很大的潜力。

关键词: 中华蜂, 放线菌, 分离, 物种多样性, 抗菌活性

Isolation, diversity and antibiotic activity of actinomycetes from *Apis cerana cerana* Fabricius

LIU Juan¹ LIU Xiao-Fei¹ GUAN Tong-Wei² CHEN Fang-Min¹
YANG Ya-Lin¹ ZHANG Xiao-Ping^{1*}

(1. Department of Microbiology, College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu, Sichuan 610039, China)

Abstract: [Objective] To study the diversity and antimicrobial activity of culturable actinomycetes isolated from *Apis cerana cerana* Fabricius, which will help to explore new microbial resources. [Methods] Seven media were used to isolate actinomycetes from *Apis cerana cerana* Fabricius samples. 16S rRNA PCR-RFLP analysis and 16S rRNA gene sequences analysis were utilized to study their genetic diversity. Pathogenic bacteria and fungus were used in antimicrobial test for exploring the antimicrobial activity of strains. [Results] Based on the morphology of the colonies

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2013AA102802-05)

*通讯作者: ✉: zhangxiaopingphd@126.com

收稿日期: 2014-03-05; 接受日期: 2014-05-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-30

and cells of the new isolates, 84 representative strains were selected from 180 isolated strains. They belonged to 3 orders, 4 families and 4 genera, and in which there were 6 strains identified as potential new novel species. The best surface disinfection method was by using 0.2% ClO_2 for 60 s. The results of the antimicrobial test showed that 31.0%, 48.8%, 27.4% and 16.7% of the representative strains presented antimicrobial activity to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Curvularia lunata* and *Fusarium oxysporum*, and 71.4% of the representative strains presented antimicrobial activity to at least one pathogen. [Conclusion] The choice of the isolation method has a great impact on isolation result. There are great diverse actinomycetes inside *Apis cerana cerana* Fabricius and they have great antimicrobial activity, which show a great potential for researching new bioactive compounds.

Keywords: *Apis cerana cerana* Fabricius, Actinomycetes, Isolation, Diversity, Antimicrobial activity

放线菌因能产生丰富的生物活性物质而被人类视为一类具有重大实用价值的微生物。至今发现的天然抗生素中有 2/3 由放线菌产生,它已被认为是新抗生素产生菌的主要来源,因其产生多种抗生素,放线菌在医药领域及农业病虫害防治领域起到了极大的作用;同时放线菌还能产生大量的非抗生素类代谢产物,如酶抑制剂、有机酸、维生素、免疫调节剂等,这使其在农业、食品工业、制革工业等领域都存在广泛的应用;此外在污水处理、环境保护等方面放线菌也展示出不可小觑的作用^[1]。过去,研究人员对土壤中放线菌资源,植物内生放线菌资源等都做了较为深入的探索研究,而对昆虫体内放线菌研究较少。昆虫是世界上种类最多的生物类群之一,目前已知的昆虫有 100 多万种,是植物种类的 3 倍,而与植物一样,其体内也分布着大量的微生物^[2-3],可以预见昆虫体内放线菌在种类和功能上都会具有丰富的多样性,因此有望从中获得产生良好活性物质的放线菌资源。

中华蜜蜂(*Apis cerana cerana* Fabricius),简称中华蜂,是膜翅目,蜜蜂科药用最广的药用昆虫之一,其采集物、分泌物、幼虫和成虫等被用于医疗保健和养生美容的历史已相当悠久。在医药界中华蜂常被用于治疗心脏病、胃癌、便秘、高血压、烧伤、烫伤等且效果显著^[4],同时中华蜂的相关产品都具有良好的抗菌作用。本实验以四川农业大学动物科技学院特种经济动物饲养专业提供的中华蜂为研究对象,采用不同的分离方法和选择性培养基对其体内可培养的放线菌进行分离,同时将传统形态学观察方法与现代分子生物学技术(16S rRNA

PCR-RFLP 和 16S rRNA 基因序列分析)结合起来对中华蜂体内放线菌多样性和系统发育进行研究,并对其体内放线菌的抗菌活性进行初探,为发现产生良好活性物质的放线菌资源提供依据,为开发利用中华蜂体内放线菌提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品:中华蜂样品四川农业大学动物科技学院特种经济动物饲养专业提供,数量为 60 只,采样时间为 2013 年 5 月 15 日。

1.1.2 培养基:(1)分离培养基:选择 7 种分离培养基,标号为 K1-K7,高氏一号培养基(K1)^[5]、腐殖酸 HV 培养基(K2)^[5]、改良高氏二号培养基(K3)^[6]、M7 培养基(K4)^[7]、棉子糖-组氨酸培养基(K5)^[8]、S 培养基(K6)^[9]、改良脯氨酸培养基(K7)^[6]。每种分离培养基中加入抑菌剂:25 mg/L 的萘啶酮酸+50 mg/L 的重铬酸钾。

(2)菌株纯化、活化、保藏培养基:高氏一号培养基^[10]。

(3)表面消毒检测培养基:TSA 培养基^[8]。

(4)拮抗指示菌培养基:LB 培养基^[11],马铃薯培养基(PDA)^[8]。

1.1.3 主要试剂: H_2O_2 、 ClO_2 、萘啶酮酸、重铬酸钾等化学试剂均为国产分析纯试剂;蛋白酶、PCR 扩增相关试剂、限制性内切酶及引物测序来源于上海生工生物工程有限公司。

1.1.4 指示菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、玉米弯孢病菌

(*Curvularia lunata*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)由四川农业大学植物病理实验室提供。

1.2 最适表面消毒方法的选取

中华蜂采集到后, 将其在室温放置 24 h 进行饥饿处理, 使其排空体内食物残渣, 而后立即将昆虫样品放置于 4 °C 数分钟将其冻死, 随后立即在超净工作台内对其进行表面消毒, 选用 H₂O₂、ClO₂ 两种表面消毒剂, 设置浓度梯度和处理时间梯度(表 1), 而后用无菌水清洗 3 次, 取 0.3 mL 最后一遍清洗中华蜂样品的水涂布于 TSA 培养基上, 28 °C 培养 30 d, 进行表面消毒检测。将完成表面消毒的中华蜂样品放入灭菌研钵中, 用无菌的研钵棒研磨至匀浆, 均匀涂布于高氏一号(K1)培养基上。放在 28 °C 培养箱内培养, 每 7 d 进行一次挑取单菌落用高氏一号培养基进行划线纯化的过程, 重复这一过程 5 次。最后通过分析预实验的结果, 找出中华蜂最适的表面消毒处理的方法。

1.3 中华蜂体内放线菌的分离纯化

中华蜂采集到后, 采用 1.2 中介绍的方法进行表面消毒处理, 以及分离挑菌, 选用的最适表面消毒方法为 0.2% ClO₂ 作用 60 s。最后将所得纯培养物进行高氏一号斜面保种和 30%甘油水溶液保种, 分别放置于 4 °C 和-80 °C 保存。

1.4 菌种初步鉴定

参照徐丽华等^[12]介绍的相关操作方法, 对分离得到的内共生放线菌进行形态学初步鉴定。通过观察放线菌菌丝、孢子形态, 以及培养特征, 如气生菌丝的颜色、基内菌丝的颜色、色素产生情况等

对其进行初步排重, 选取代表性菌株进行后续的多变性研究及抗菌活性检测。

1.5 代表菌株基因组 DNA 提取及 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

参照赵珂^[8]的方法提取代表菌株总 DNA 及 PCR 扩增 16S rRNA 基因。

1.6 代表菌株的 16S rRNA PCR-RFLP 分析

对 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物进行酶切, 选用 *Hae* III、*Hha* I、*Msp* I、*Hinf* I 四种限制性内切酶, 酶切体系为: *Hae* III/*Hha* I/*Msp* I/*Hinf* I 0.5 μL, 10×Buffer 1 μL, PCR 产物 5 μL, 无菌水补足至 10 μL。充分混匀酶切体系后放在 37 °C 保温 8–12 h, 将全部酶切产物点样于含 EB 的 2.5%琼脂糖凝胶板上电泳分离, 90 V 水平电泳 80 min, 使用凝胶成像系统记录成像并保存。对保存的酶切图谱进行均一化处理, 在同一位置有条带记为“1”, 无条带记为“0”, 通过 NTSYS 软件对谱带进行编码, 采用非加权平均法(UPGMA)进行聚类分析并构建树状图谱。

1.7 16S rRNA 基因测序及序列分析

综合菌株的形态特征及 16S rRNA 基因酶切图谱分析, 从代表菌株中选取若干菌株作为测序对象, 由上海生工生物工程股份有限公司进行 16S rRNA 基因序列测定, 将测序结果用 BLASTn 程序从 GenBank 等公共数据库中搜索相似度较高菌株的 16S rRNA 基因序列, 用 ClustalX 进行多序列比对后, 用 MEGA 5.0 程序以邻近法(Neighbor-Joining)构建发育树。

表 1 不同表面消毒液的筛选浓度及时间		
Table 1 Concentration gradient and time gradient of the different surface disinfectant		
表面消毒剂 Surface disinfectant	表面消毒剂浓度 Concentration (%)	表面消毒时间 Time (s)
H ₂ O ₂	1.0	60, 90, 120
	2.0	60, 90, 120
	3.0	60, 90, 120
	0.1	60, 90, 120
	0.2	60, 90, 120
	0.3	60, 90, 120
ClO ₂		

1.8 抗菌活性测定

1.8.1 细菌指示菌抗菌实验：将细菌指示菌接种至装有无菌水的试管中，旋涡振荡成悬液后取 100 μL 均匀涂布于 LB 培养基上，再将在高氏一号培养基上活化且长势良好的纯种代表菌株，用直径 6 mm 的打孔器制成小圆片，倒置于距离培养基中心 3 cm 的 4 个方向，放置于 37 °C 培养箱内培养 1 d，采用十字交叉法用游标卡尺对代表菌株透明抑菌圈直径进行测量记录，每个处理重复 3 次。

1.8.2 病原真菌指示菌抗菌实验：采用 Bascom-Slack 等^[13]使用的平板对峙法。

2 结果与分析

2.1 最适表面消毒方法的确定

对中华蜂采用不同的表面消毒剂(设置浓度梯度及消毒时间梯度)进行表面消毒处理，以不出现污染且能获得纯净内共生放线菌为判断指标，实验结果(表 2、图 1)表明：用 H₂O₂ 作为表面消毒剂时，以 2%浓度作用 90 s 的消毒方法获得的放线菌数量最多；用 ClO₂ 作为消毒剂时，以 0.2%浓度作用 60 s 处理后所分离得到的放线菌数量最多。对 H₂O₂ 及 ClO₂ 两种表面消毒剂进行比较时发现，以 ClO₂ 作为表面消毒剂，分离得到放线菌共 26 株，经 16S rRNA 测序鉴定为 2 个属(链霉菌属和小单孢菌属) 18 个种(表 3)；而以 H₂O₂ 作为消毒剂，只分离得到 8 株放线菌，经测序鉴定为 1 个属(链霉菌属) 5 个种(表 3)。

2.2 中华蜂体内放线菌分离结果

采用 7 种分离培养基从中华蜂体内分离出 180 株放线菌，从不同培养基中分离出的放线菌数量有明显差异。其中从 K3、K6、K7 分别分离得到 23、2、1 株且均属于链霉菌属；从 K1 中分离出 17 株放线菌，分属于链霉菌属和小单孢菌属，稀有菌株占其中的 11.8%；从 K2 中分出 48 株菌，分属于链霉菌属和戈登氏菌属，稀有菌株占 2.0%；从 K4、K5 中分别分出 37 株和 33 株菌，分属于 3 个属，即链霉

表 2 不同消毒剂、浓度和消毒时间处理中华蜂样品的放线菌分离与培养结果

Table 2 The isolation and cultivation results of actinomycetes in *Apis cerana cerana* Fabricius samples disinfected by two disinfectants with different concentrations and time

表面消毒剂 Type of disinfectants	表面消毒剂浓度 Concentrations (%)	表面消毒时间 Disinfection time (s)		
		60	90	120
H ₂ O ₂	1.0	▲	+	+
	2.0	▲	+	—
	3.0	+	—	—
ClO ₂	0.1	+	+	—
	0.2	+	+	—
	0.3	+	—	—

注：—：未分离得到放线菌；+：表面消毒彻底，且分离得到放线菌；▲：表面消毒不彻底。

Note: —: No colony; +: Several colonies, surface disinfection is successful; ▲: Surface disinfection is incomplete.

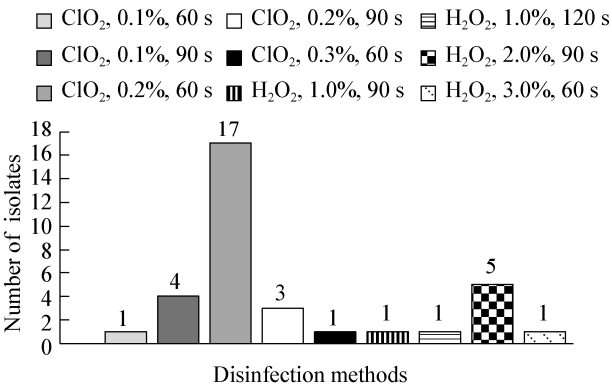


图 1 不同表面消毒剂、浓度及消毒时间处理后分离放线菌数量

Figure 1 The number of isolates in *Apis cerana cerana* Fabricius samples disinfected by two disinfectants with different concentrations and time

菌属、小单孢菌属和拟诺卡氏菌属，稀有菌株出菌率分别为 16.2%和 6.1%。由此可见，分离得到放线菌数量最多的培养基为 HV 培养基，而稀有放线菌出菌率最高的是 M7 培养基。对分离的 180 株放线菌进行初步的表型鉴定，排除重复菌株，选取 84 株放线菌为代表菌株，进行后期抗菌活性研究及多样性研究。

表 3 中华蜂经不同表面消毒方法处理后分离的放线菌的鉴定结果 Table 3 The identification results of actinomycetes in <i>Apis cerana cerana</i> Fabricius samples disinfected by different disinfection				
消毒剂 Type of disinfectants	编号 Order number	代表菌株 Representative strains (accession No.)	近缘菌株 Nearest type strain (accession No.)	相似度 Sequence identity (%)
H ₂ O ₂	1	SCAUEA2 (KJ093410)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> DSM 41471(T)	100
	2	SCAUEA5 (KJ093411)	<i>Streptomyces cellulosae</i> ATCC 25439(T)	99.4
	3	SCAUEA6 (KJ093412)	<i>Streptomyces olivaceus</i> DSM 40072(T)	100
	4	SCAUEA7 (KJ093413)	<i>Streptomyces albogriseolus</i> DSM 40003(T)	98.8
	5	SCAUEA8 (KJ093414)	<i>Streptomyces cellulosae</i> ATCC 25439(T)	99.2
	6	SCAUEA10 (KJ093415)	<i>Streptomyces cellulosae</i> ATCC 25439(T)	99.4
	7	SCAUEA11 (KJ093416)	<i>Streptomyces olivaceus</i> DSM 40072(T)	100
	8	SCAUEA12 (KJ093417)	<i>Streptomyces olivaceus</i> DSM 40072(T)	100
ClO ₂	1	SCAUEA13 (KJ093418)	<i>Streptomyces olivaceus</i> DSM 40072(T)	99.0
	2	SCAUEA14 (KJ093419)	<i>Streptomyces olivaceus</i> DSM 40072(T)	100
	3	SCAUEA15 (KJ093420)	<i>Streptomyces griseoplanus</i> DSM 40009(T)	99.7
	4	SCAUEA16 (KJ093421)	<i>Streptomyces badius</i> DSM 40139(T)	99.9
	5	SCAUEA17(KJ093422)	<i>Streptomyces fimicarius</i> DSM 40322(T)	100
	6	SCAUEA18 (KJ093398)	<i>Streptomyces fradiae</i> DSM 40063(T)	97.0
	7	SCAUEA19 (KJ093423)	<i>Streptomyces cellulosae</i> ATCC 25439(T)	99.4
	8	SCAUEA20 (KJ093424)	<i>Streptomyces cellulosae</i> ATCC 25440(T)	99.4
	9	SCAUEA21 (KJ093425)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> DSM 41471(T)	100
	10	SCAUEA22 (KJ093426)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> DSM 41471(T)	100
	11	SCAUEA23 (KJ093427)	<i>Streptomyces microflavus</i> DSM 40331(T)	100
	12	SCAUEA24 (KJ093428)	<i>Streptomyces cellulosae</i> ATCC 25439(T)	99.4
	13	SCAUEA25 (KJ093429)	<i>Streptomyces olivaceus</i> DSM 40072(T)	100
	14	SCAUEA26 (KJ093430)	<i>Streptomyces olivaceus</i> DSM 40072(T)	100
	15	SCAUEA27 (KJ093431)	<i>Streptomyces griseoplanus</i> DSM 40009(T)	99.7
	16	SCAUEA28 (KJ093432)	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455(T)	100
	17	SCAUEA29 (KJ093409)	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821(T)	100
	18	SCAUEA30 (KJ093433)	<i>Micromonospora saelicesensis</i> DSM 44871(T)	99.5
	19	SCAUEA31 (KJ093434)	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40455(T)	100
	20	SCAUEA33 (KJ093435)	<i>Streptomyces albogriseolus</i> DSM 40003(T)	100
	21	SCAUEA34 (KJ093436)	<i>Streptomyces griseorubens</i> ATCC 19909(T)	99.9
	22	SCAUEA35 (KJ093437)	<i>Streptomyces brevispora</i> KACC 21093(T)	100
	23	SCAUEA36 (KJ093438)	<i>Streptomyces microflavus</i> DSM 40331(T)	100
	24	SCAUEA37 (KJ093439)	<i>Streptomyces shenzhenensis</i> DSM 42034(T)	100
	25	SCAUEA38 (KJ093440)	<i>Streptomyces intermedius</i> DSM 40372(T)	99.8
	26	SCAUEA39 (KJ093441)	<i>Streptomyces microflavus</i> DSM 40331(T)	100

2.3 中华蜂体内放线菌多样性

2.3.1 代表菌株的 16S rRNA PCR-RFLP 分析: 经扩增, 得到代表菌株 16S rRNA 基因片段, 其大小约为 1.5 kb, 用 *Hha* I、*Hae* III、*Msp* I、*Hinf* I 四种限制性内切酶对扩增产物进行酶切, 部分酶切图谱见图 2。

由表 4 可知, 代表菌株的 16S rRNA 基因扩增产物经 *Hha* I、*Hae* III、*Msp* I、*Hinf* I 切割产生的酶切类型分别是 8 种、7 种、8 种、7 种, 所有 84 株代表菌株经 4 种限制性内切酶酶切后共形成 18 种酶切类型, 每一种酶切类型为一种 16S rRNA 基因遗传类型。其中属于 O 型的菌株最多, 共 26 株, 其次为 F 型 21 株。所有酶切类型之中, A、B、H 这 3 种类型之间及 F、K、O 三种类型之间仅有 *Hinf* I 的酶切图谱带型存在差异, C 型和 O 型之间只有 *Msp* I 的酶切图谱带型存在差异, I 型与 J 型之间及 P 型与 Q 型之间只有 *Hae* III 的酶切图谱带型存在差异, 此外 A 型与 O 型间, D 型与 M 型间, F 型与 H 型间, 及 I 型与 R 型间只有 *Hha* I 的酶切图谱带型存在差异, 其余 3 种酶的酶切图谱带型完全一致, 这表明了代表菌株间 16S rRNA 基因的碱基序列差异较小, 但选择适宜的限制性内切酶是可以将他们区别开来的。

将电泳图谱条带均一化处理后转化为计算机可识别的数值“1”和“0”, 通过 NTSYS 2.1 对谱带进

行编码, 采用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析生成树状图(图 3)。由图 3 可知, 84 株代表菌株在 57%相似水平上聚在一起成为一类, 分为 2 个分支, 由此说明菌株 B32 与其他代表菌株之间的同源性较低。代表菌株在 93%的相似水平上, 分成了 10 个遗传群。其中群 2 聚集起来的菌株最多, 一共有 50 株菌, 为优势菌群; 其次为群 1 和群 4, 分别由 13 株和 8 株代表菌株组成; 除群 6、7、9 包涵有 3 株菌外, 其余的 4 个遗传群都只有 1 株菌。

2.3.2 代表菌株 16S rRNA 基因序列分析: 综合菌株形态特征和 16S rRNA 基因酶切图谱分析, 从 10 个遗传群中选取了 16 株代表菌株测定 16S rRNA 基因序列, 进行系统发育分析, 将菌株鉴定到属(图 4、表 5)。结果表明: 84 株代表菌株分属于 3 个目、4 个科中的 4 个属, 包括链霉菌亚目(Suborder Streptomycineae)中链霉菌科(Streptomycetaceae)的链霉菌属(*Streptomyces*); 小单孢菌亚目(Suborder Micromonosporineae)中小单孢菌科(Micromonosporaceae)的小单孢菌属(*Micromonospora*); 棒杆菌亚目(Suborder Corynebacterineae)中戈登氏菌科(Gordoniaceae)的戈登氏菌属(*Gordonia*)和拟诺卡氏菌科(Nocardiopsaceae)的拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)。酶切图谱中遗传群 1、2、3、4、5 内所测序的代表菌株均为链霉菌属, 表明链霉菌属为优势类群有

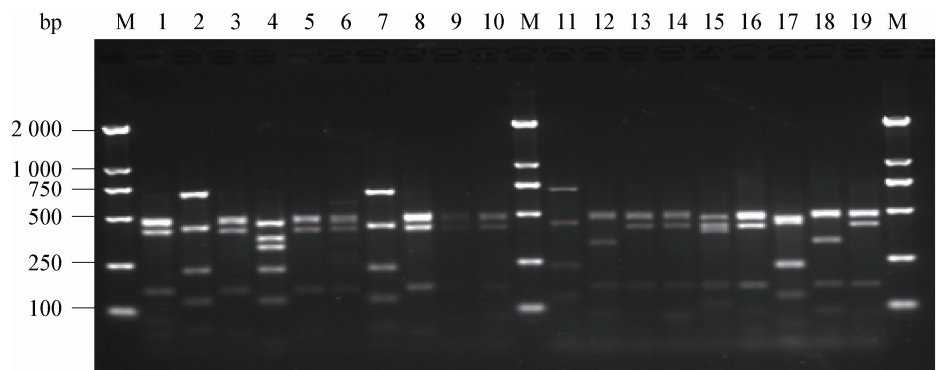


图 2 部分代表菌株 16S rRNA 基因的 *Hha* I 限制性酶切图谱

Figure 2 Electrophoresis pattern of 16S rRNA gene of representative strains digested with *Hha* I
Note: M: Marker (2 000 bp); 1–19: SCAUEC29, SCAUED22, SCAUEC22, SCAUED30(A), SCAUEB34, SCAUED20, SCAUED40, SCAUEC5, SCAUEA34, SCAUEA33, SCAUEA30, SCAUEA28, SCAUEA23, SCUAEA21, SCAUEA18, SCAUEA35, SCAUEA29, SCAUEA19, SCAUEA25.

73 株，占 86.9%；遗传群 6、7、8 中共 7 株菌，所测序代表菌株均为小单孢菌属；遗传群 9 共 3 株菌，所测序代表菌株为拟诺卡氏菌属；遗传群 10 中代表均测序后为戈登氏菌属。从系统发育树分析可以看出在链霉菌属内，不同种间形成分支，表明中华蜂体内放线菌在链霉菌属内的多样性很高；同时中华蜂体内包含了 3 个不同属的稀有放线菌，显示出了中华蜂体内放线菌具备多样性。以菌株的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库中近缘菌

株相似性小于 98.2% 作为操作分类单元 (Operational taxonomic units, OTU) 的划分界限^[14-15]，16 株测序的代表菌株中，SCAUEC6 (KJ093397)、SCAUEA18 (KJ093398)、SCAUEC4 (KJ093401)、SCAUED46 (KJ093394)、SCAUEG1 (KJ093396)、SCAUEB32 (KJ093399) 与其近缘菌株的相似性小于 98.2%，这预示着以上 6 株代表菌株很有可能为链霉菌属(*Streptomyces*)和戈登氏菌属(*Gordonia*)的新种。

表 4 16S rRNA 限制性酶切图谱类型					
Table 4 Electrophoresis pattern types of 16S rRNA PCR-RFLP					
代表菌株 Representative strains	16S rRNA 基因限制性酶切图谱类型 Fingerprint patterns				16S rRNA 基 因遗传类型 Genetic types
	<i>Hha</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Hinf</i> I	
SCAUEB45, SCAUEB36, SCAUEB31, SCAUEB53, SCAUEC24, SCAUEC4, SCAUEC23, SCAUEE14(A), SCAUEA18	a	a	a	a	A
SCAUEB37	a	a	a	d	B
SCAUEC29	b	a	g	a	C
SCAUEB10, SCAUEG1, SCAUED11, SCAUED46, SCAUED33, SCAUEB40, SCAUED34, SCAUEA28, SCAUEA19	d	c	a	a	D
SCAUEB32	c	b	b	c	E
SCAUEB12, SCAUEC11, SCAUEB26, SCAUED37, SCAUED30(B), SCAUEUB24, SCAUEB2, SCAUEB28, SCAUEC19, SCAUEB52, SCAUEB48, SCAUEB19, SCAUEB20, SCAUEB29, SCAUEC1, SCAUEC32, SCAUEC17, SCAUEE30, SCAUEB30, SCAUEA23, SCAUEA35	b	a	a	b	F
SCAUED47, SCAUEE4, SCAUED30(A)	e	d	c	e	G
SCAUEB47	a	a	a	b	H
SCAUEE13, SCAUED23	f	e	d	a	I
SCAUED7	f	a	d	a	J
SCAUED45	b	a	a	f	K
SCAUEB4	b	f	e	b	L
SCAUEC7, SCAUEE17	b	c	a	a	M
SCAUEC6	a	a	f	g	N
SCAUEB38, SCAUEB13, SCAUEB23, CAUEB6, SCAUEC26, SCAUEC10, SCAUEC28, SCAUED24, SCAUEC3, SCAUEE10, SCAUED8, SCAUEB21, SCAUEG1(A), SCAUEE14, SCAUEB40, SCAUEE15, SCAUEB46, SCAUEB51, SCAUEB25, SCAUEC22, SCAUEB34, SCAUEC5, SCAUEA34, SCAUEA33, SCAUEA21, SCAUEA25	b	a	a	a	O
SCAUED22	g	g	h	a	P
SCAUEA30, SCAUED40	g	e	h	a	Q
SCAUEA29	h	e	d	a	R
The total of electrophoresis pattern types	8	7	8	7	18

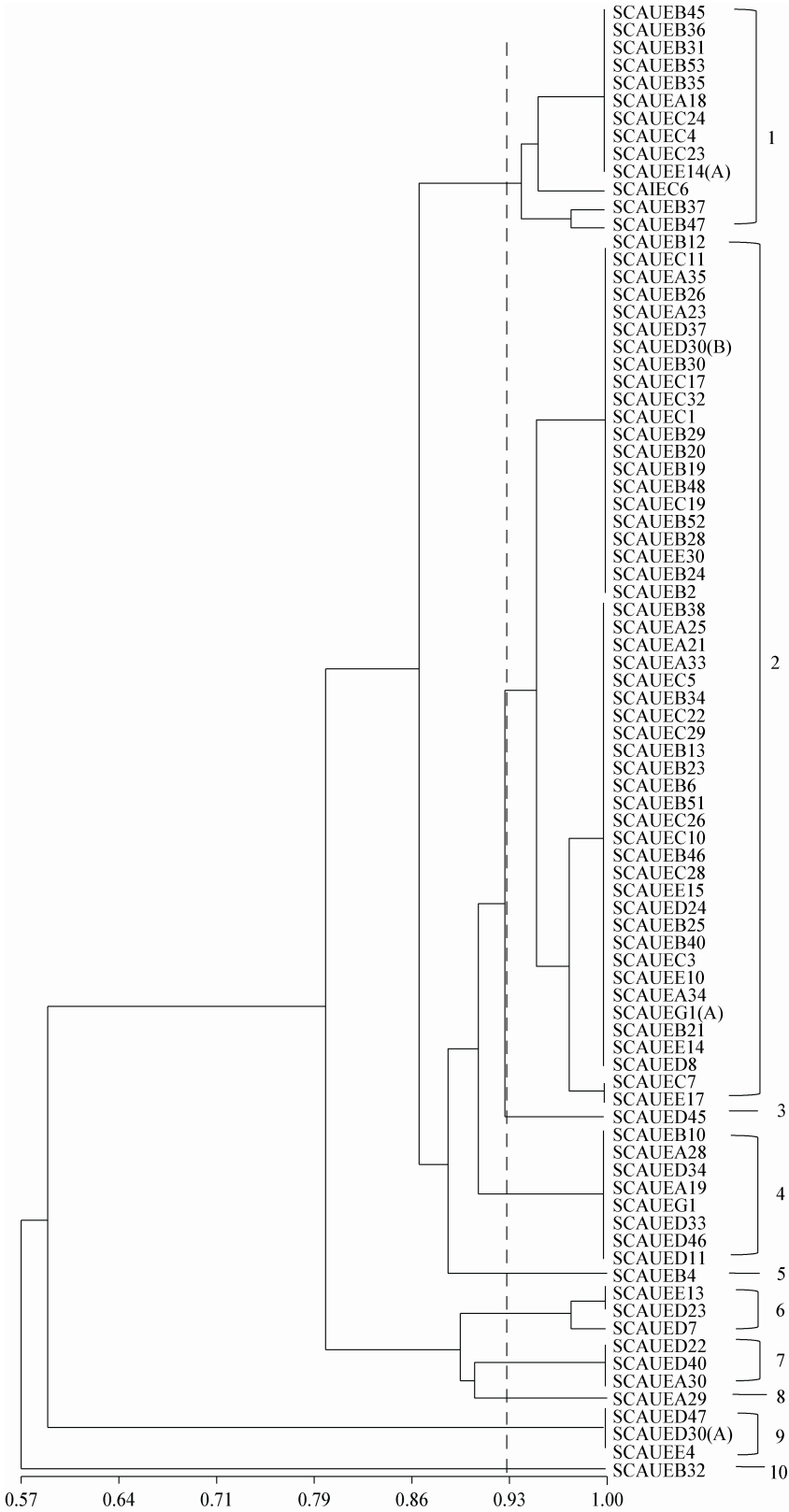


图 3 代表菌株 16S rRNA PCR-RFLP 聚类树状图

Figure 3 Dendrogram of UPGMA obtained from 16S rRNA PCR-RFLP of representative strains

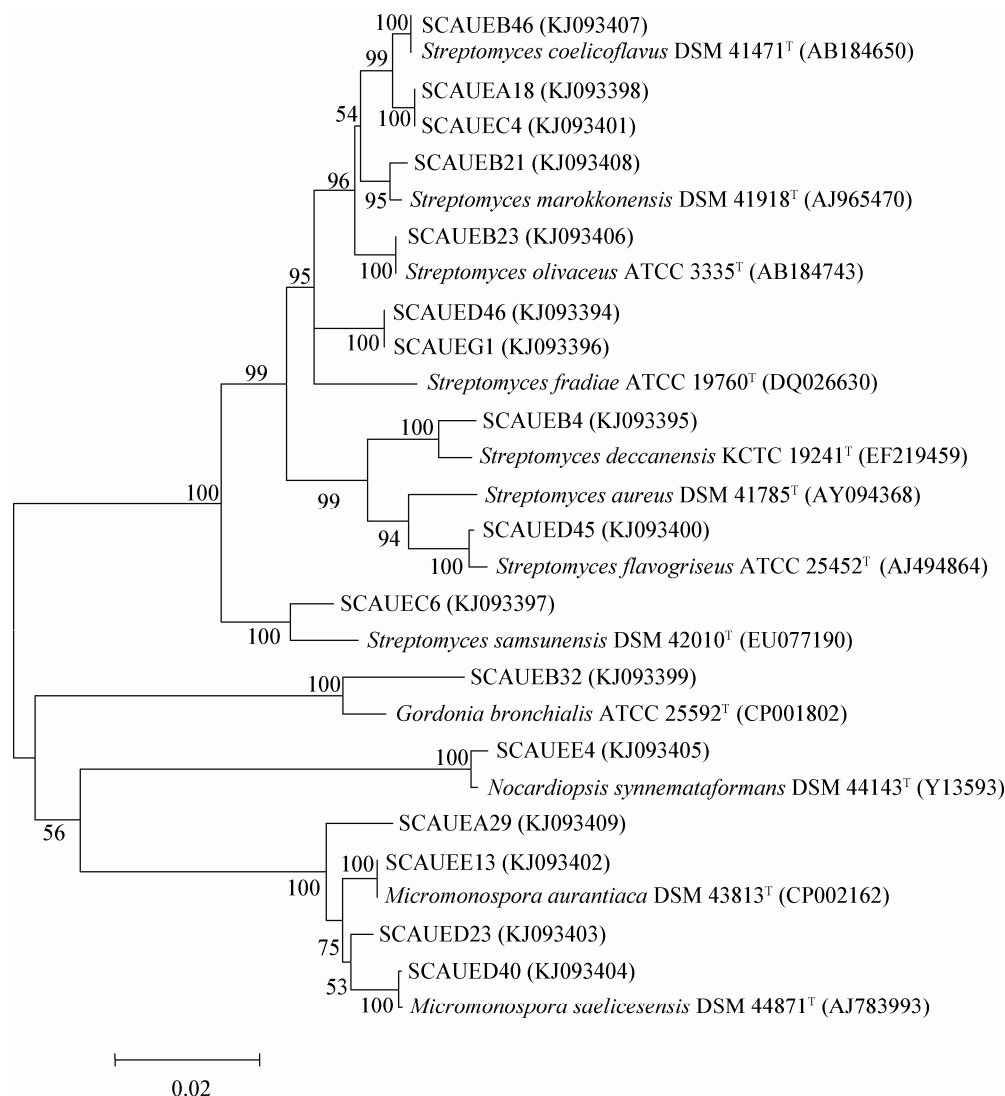


图 4 中华蜂体内放线菌 16S rRNA 基因序列 N-J 系统发育树分析

Figure 4 Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA of actinomycetes from *Apis cerana cerana* Fabricius

Note: The number at the nodes indicate the level of bootstrap support (%) based on 1 000 resampled data sets; only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank.

2.4 代表菌株的抗菌活性

对中华蜂体内放线菌抗菌活性进行检测,部分拮抗结果见图 5、6,分析结果表明(表 6),84 株代表菌株中有 60 株表现出了至少对一种病原菌有抗菌活性,占代表菌株总数的 71.4%,而其中 14.3% (12 株)对 3 种及以上的病原菌有不同程度的抑制作用,C6 对 4 种病原菌都有不同程度抑菌作用,表现出了广谱的抗菌活性。

以大肠杆菌作为指示菌,在 84 株代表菌株中,有 26 株表现出抑菌活性,占总数的 31.0%,而其中只有一株抑菌圈直径大于 15 mm,表现出了较好的抑菌效果,即 B46 抑菌圈为 17 mm;以枯草芽孢杆菌作为指示菌,所有代表菌株中有 48.8%,即 41 株表现出不同程度的抑菌作用,有 7 株放线菌产生的抑菌圈直径大于 15 mm,而其中 B21 表现出对枯草芽孢杆菌的抑制效果最为显著,抑菌圈达

22 mm；玉米弯孢病菌作为指示菌时，有 27.4%即 23 株代表菌株表现出抑菌活性，虽然数量相对两种细菌指示菌的抗性菌株较少，但这 23 株供试菌株中有 8 株有较好的抑菌效果，抑菌圈大于了 15 mm，而其中抑菌圈大于 20 mm 的有 5 株，以 C3 和 B23 抑菌活性最为显著；以西瓜枯萎病菌作为病原菌时，供试菌株中的 16.7%即 14 株具有不同的抑菌活性，其中 2 株产生抑菌圈直径大于 15 mm ,抑菌效果最好的是 C4 ,抑菌圈直径 28 mm，其次为 C6。

表 5 中华蜂体内放线菌的鉴定结果				
Table 5 The identification results of actinomycetes in <i>Apis cerana cerana</i> Fabricius samples				
代表菌株 Representative strains (accession No.)	16S rRNA 基因遗传图 谱类型 16S rRNA genotype	遗传群 Genetic groups	近缘菌株 Nearest type strain	相似度 Sequence identity (%)
SCAUEC6 (KJ093397)	N	1	<i>Streptomyces samsunensis</i> DSM 42010(T)	97.9
SCAUEA18 (KJ093398)	A	1	<i>Streptomyces fradiae</i> ATCC 19760(T)	97.0
SCAUEC4 (KJ093401)	A	1	<i>Streptomyces fradiae</i> ATCC 19760(T)	96.9
SCAUEB23 (KJ093406)	O	2	<i>Streptomyces olivaceus</i> ATCC 3335(T)	100
SCAUEB46 (KJ093407)	O	2	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> DSM 41471(T)	100
SCAUEB21 (KJ093408)	O	2	<i>Streptomyces marokkonensis</i> DSM 41918(T)	99.7
SCAUED45 (KJ093400)	K	3	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 25452(T)	99.7
SCAUED46 (KJ093394)	D	4	<i>Streptomyces aureus</i> DSM 41785(T)	96.1
SCAUEG1 (KJ093396)	D	4	<i>Streptomyces aureus</i> DSM 41785(T)	96.0
SCAUEB4 (KJ093395)	L	5	<i>Streptomyces deccanensis</i> KCTC 19241(T)	98.7
SCAUEE13 (KJ093402)	I	6	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813(T)	100
SCAUED23 (KJ093403)	I	6	<i>Micromonospora saelicesensis</i> DSM 44871(T)	98.7
SCAUED40 (KJ093404)	Q	7	<i>Micromonospora saelicesensis</i> DSM 44871(T)	99.6
SCAUEA29 (KJ093409)	R	8	<i>Micromonospora purpureochromogenes</i> DSM 43821(T)	100
SCAUEE4 (KJ093405)	G	9	<i>Nocardiosis synnemataformans</i> DSM 44143(T)	98.9
SCAUEB32 (KJ093399)	E	10	<i>Gordonia bronchialis</i> ATCC 25592(T)	97.1

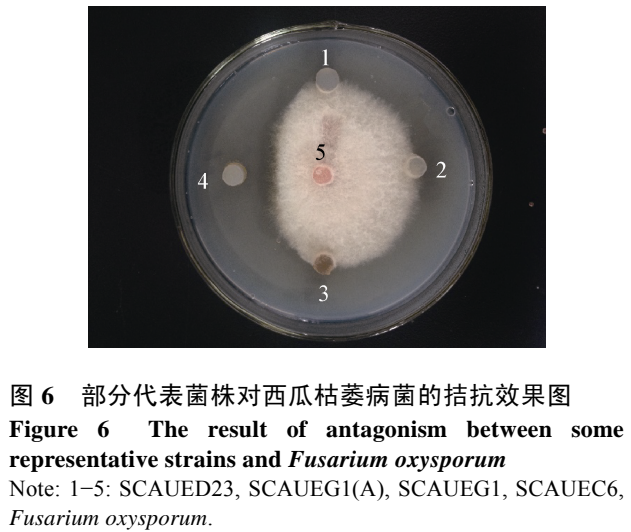
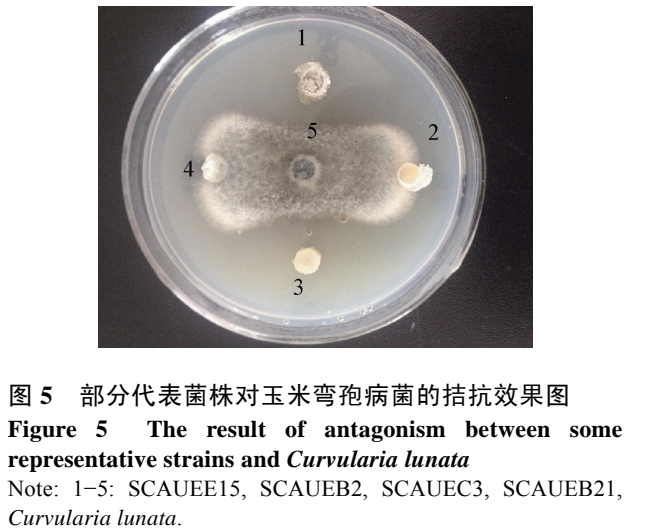


表 6 代表菌株抗菌活性
Table 6 Antimicrobial activity test of representative strains

代表菌株 Representative strains	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)				代表菌株 Representative strains	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)			
	A	B	C	D		A	B	C	D
SCAUEC22	—	—	—	—	SCAUEC5	—	—	—	—
SCAUEB51	—	—	—	—	SCAUEB31	—	8	—	—
SCAUEB53	—	—	—	—	SCAUEB38	—	10	22	—
SCAUEC26	—	9	—	—	SCAUEB53	8	—	—	7
SCAUEB35	—	7	—	—	SCAUEB45	—	—	—	—
SCAUEC3	—	14	24	—	SCAUEB36	—	—	—	—
SCAUEC28	7	8	22	—	SCAUEB47	—	—	—	—
SCAUEB21	7	22	—	—	SCAUEB48	—	—	—	—
SCAUEB26	—	—	—	—	SCAUEB4	—	—	—	—
SCAUEB2	9	8	—	—	SCAUEA18	—	8	—	—
SCAUEE13	7	—	—	7	SCAUEE10	8	—	7	8
SCAUEC11	7	—	—	—	SCAUED34	—	—	—	—
SCAUEB52	—	—	8	—	SCAUEB40	7	—	—	—
SCAUED30(B)	—	—	—	—	SCAUED11	—	—	—	—
SCAUED41	—	10	—	—	SCAUED7	7	7	—	8
SCAUEC4	—	—	—	28	SCAUEB28	7	—	8	—
SCAUED33	—	—	—	—	SCAUEB25	—	9	18	—
SCAUED37	—	7	—	—	SCAUEA33	—	—	—	—
SCAUEB37	—	16	8	14	SCAUEG1(A)	7	7	—	—
SCAUEE15	—	10	20	—	SCAUED23	—	7	—	—
SCAUEE4	—	—	—	—	SCAUEC6	9	10	12	20
SCAUED24	8	—	—	—	SCAUED8	—	9	—	—
SCAUEC10	—	7	—	—	SCAUEG1	8	7	—	—
SCAUED27	7	14	22	—	SCAUEB19	—	7	7	8
SCAUED46	7	16	10	—	SCAUEA30	7	7	—	9
SCUAEA34	—	—	—	—	SCAUED45	—	—	—	—
SCAUEA19	—	—	8	—	SCAUEE14	—	—	—	—
SCAUEA35	8	—	—	—	SCAUEE17	—	8	—	8
SCAUEC29	—	—	—	—	SCAUEE14(A)	—	8	—	—
SCAUEB6	8	—	—	—	SCAUEB24	7	—	—	—
SCAUEA21	—	10	—	—	SCAUEA23	7	—	—	—
SCAUEA28	—	16	14	10	SCAUEC30	7	—	8	8
SCAUEB29	10	16	—	—	SCAUEC17	—	—	7	—
SCAUEC19	—	10	—	—	SCAUEC1	—	18	—	8
SCAUEB23	7	12	24	—	SCAUEA29	7	7	—	—
SCAUEC24	—	7	—	—	SCAUEB34	—	7	19	8
SCAUEB12	—	7	—	—	SCAUEA25	—	—	8	—
SCAUEB46	17	26	8	—	SCAUEC32	—	—	—	—
SCAUEB13	—	8	19	—	SCAUEB30	—	—	—	—
SCAUEB32	—	7	—	—	SCAUEE30	8	10	—	—
SCAUEC7	—	—	—	—	SCAUED30(A)	11	7	—	—
SCAUEB10	—	—	7	8	SCAUED40	—	—	12	—
SCAUEC23	—	—	—	—	SCAUED22	—	—	14	—

Note: A: *Escherichia coli*; B: *Bacillus subtilis*; C: *Curvularia lunata*; D: *Fusarium oxysporum*. —: Negative.

3 讨论

分离未知微生物是利用它们的首要前提。通过分子生物学方法研究的结果表明,人们只分离出了自然界 0.1%–1.0% 的微生物,有 99% 的微生物尚未开发,之所以绝大多数包括放线菌在内的微生物还没被分离出来,其主要原因是受到分离条件和技术的限制,因此选择一些好的分离技术,改良设计出一些特殊的分离方法才能分离到更多种类的放线菌。

(1) 表面消毒方法的选用对昆虫体内放线菌分离有很大的影响。所使用的表面消毒剂类型不同、浓度不同、作用时间不同会造成分离效果截然不同。本实验比较了中华蜂最适表面消毒方法,最终结果表明以 ClO_2 作为消毒剂时,分离的内共生放线菌多样性更为丰富,且分离出了除链霉菌属外的稀有放线菌。因此对昆虫体内放线菌进行分离培养时,可以参考选用 0.2% 的 ClO_2 作用 60 s 作为表面消毒方法。

(2) 分离培养基的设计对昆虫体内放线菌的分离效果也有影响,腐殖酸 HV 培养基、M7 培养基、棉子糖-组氨酸培养基 3 种培养基中分别使用了腐殖酸和丙酸钠、碳酸钙及棉子糖、组氨酸作为碳、氮源,这些物质较难被细菌利用却不会影响放线菌的生长,因此有效地减少细菌在分离培养基上的生长,避免了因细菌生长过多过快抑制放线菌生长的情况,特别是稀有放线菌。由本实验结果可见:放线菌对无机营养成分的培养基有所偏好^[16],有机物含量低的分离培养基,在有利于分离出稀有放线菌的同时,可以防止外界真菌污染以及样品内共生真菌和细菌的疯长^[17],同时培养基选取是要尽可能使用多种类的营养成分,特别是不同的碳源、氮源,这样才可以满足不同类型放线菌的需求,分离到更多放线菌资源。

(3) 早前,Gilliam 等对西方蜜蜂(*Apis mellifera*)内共生菌进行研究,发现其体内微生物具有丰富的多样性,且许多霉菌和芽孢杆菌属的细菌对蜜

蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)这种致病菌有拮抗作用^[18-19];随后,科研人员对日本蜜蜂(*A. c. japonica*)、苜蓿切叶蜂等采自不同地域的不同种类的蜜蜂体内真菌、细菌进行研究,发现由于生活环境和饮食等外界生活条件不同,来源不同的蜜蜂体内真菌、细菌丰富多样,但种类差别较大,同样许多内共生菌有很好的抗菌活性^[20-23]。可见蜜蜂体内真菌和细菌具有很好的研究价值,且目前对其进行的相关研究已取得了较好的成果,然而蜜蜂体内放线菌的研究目前还少见报道,对中华蜂的相关研究还未见报道。本实验从中华蜂样品体内分离得到放线菌分属 3 个目、4 个科中 4 个属的 84 个种,其中链霉菌为优势种群,通过对 4 种病原菌的拮抗实验,发现 71.4% 的内共生放线菌对至少一种病原菌有抑菌效果,14.3% 对 3 种及以上的病原菌有不同程度的抑制作用,体现出了抗菌广谱性,也说明放线菌不是只能产生单一的生物活性物质对单一病原菌有抗菌活性,而是具备产生多种活性成分的能力,其中绝大部分有抗菌活性的放线菌为链霉菌属,这与国内外报道一致^[24-26],此外小单孢菌属、拟诺卡氏菌属及戈登氏菌属的菌株对不同病原菌也表现出了不同程度的抑制作用,可见除了链霉菌属外,其他稀有放线菌也应成为值得关注的产生生物活性物质的放线菌群。本实验分离得到的放线菌中有 6 株菌株 SCAUEC6 (KJ093397)、SCAUEA18 (KJ093398)、SCAUEC4 (KJ093401)、SCAUED46 (KJ093394)、SCAUEG1 (KJ093396)、SCAUEB32 (KJ093399) 因与其近缘菌株的相似性小于 98.2%,而初步推测为潜在的新菌种,这 6 株菌株都至少对一种病原菌展现出了抑菌效果,其中 SCAUEC6 (KJ093397) 和 SCAUED46 (KJ093394) 分别对 4 种和 3 种病原菌产生了良好的抑制作用,SCAUEC4 (KJ093401) 对西瓜枯萎病菌产生了极强的拮抗效果,抑菌圈直径高达 28 mm,由此可见对蜜蜂体内放线菌进行研究在挖掘新型的、能产生良好活性物质的放线菌资源上有很大的潜力。除了蜜蜂,现已

从美洲大蠊^[27]、甲壳虫^[28]、白蚁^[29]等其他昆虫体内分离出丰富多样的具有抗菌活性的放线菌,不难看出对昆虫体内放线菌的研究虽尚处于起步阶段,但已显示出诱人的研究前景。

参 考 文 献

- [1] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [2] 戈惠明, 谭仁祥. 共生菌——新活性天然产物的重要来源[J]. 化学进展, 2009, 21(1): 30-46.
- [3] 杨冠煌. 昆虫: 人类未来最大的生物资源[J]. 森林与人类, 2006(6): 6-7.
- [4] 蒋三俊. 《中国药用昆虫集成》出版发行[J]. 特种经济动植物, 2000(1): 5.
- [5] 范丽霞, 郑继平. 稀有放线菌的分离及抗菌筛选[J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2010, 23(2): 185-187.
- [6] 姜怡, 段淑蓉, 唐蜀昆, 等. 稀有放线菌分离方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 181-183.
- [7] 魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 等. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 823-828.
- [8] 赵珂. 攀西地区药用植物内生及根际放线菌的多样性与抗菌活性研究[D]. 雅安: 四川农业大学博士学位论文, 2010.
- [9] 袁红梅. 四川地道中药材内生放线菌的分离和系统发育研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2009.
- [10] 冯治翔, 栗敏, 刘洋, 等. 罗汉松及响叶杨内生放线菌的分离、活性及多样性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(4): 264-368.
- [11] 朱文勇, 李洁, 赵国振, 等. 喜树内生放线菌多样性及抗菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 211-216.
- [12] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [13] Bascom-Slack C, Ma C, Moore E, et al. Multiple, novel biologically active endophytic *Actinomycetes* isolated from upper Amazonian rainforests[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(2): 374-383.
- [14] Keswani J, Whitman WB. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(2): 667-678.
- [15] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards[J]. Microbiology Today, 2006, 33(4): 152.
- [16] Jensen PR, Mincer TJ, Williams PG, et al. Marine actinomycete diversity and natural product discovery[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2005, 87(1): 43-48.
- [17] Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM, et al. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(11): 3899-3905.
- [18] Gilliam M, Buchmann SL, Lorenz BJ, et al. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* associated with three species of solitary bees[J]. Apidologie, 1990, 21(2): 99-105.
- [19] Gilliam M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees[J]. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 1997, 155(1): 1-10.
- [20] Evans J, Armstrong T. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease[J]. BMC Ecology, 2006, 6(1): 4.
- [21] Yoshiyama M, Kimura K. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(2): 91-96.
- [22] Sabaté DC, Carrillo L, Carina Audisio M. Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples[J]. Research in Microbiology, 2009, 160(3): 193-199.
- [23] Goerzen DW. Microflora associated with the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata* (Fab) (Hymenoptera: Megachilidae) in Saskatchewan, Canada[J]. Apidologie, 1991, 22(5): 553-561.
- [24] Taechowisan T, Peberdy J, Lumyong S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(4): 381-385.
- [25] 马玥, 来航线, 韦小敏, 等. 新疆荒漠盐碱环境中抗动物病原菌的放线菌筛选与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013(3): 133-140.
- [26] 安然. 蜚蠊共附生放线菌的分离、活性筛选和次级代谢产物研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2009.
- [27] Oh D, Scott JJ, Currie CR, et al. Mycangimycin, a polyene peroxide from a mutualist *Streptomyces* sp.[J]. Organic Letters, 2009, 11(3): 633-636.
- [28] 胡松英, 张应焰, 黄娟翠, 等. 白蚁共生放线菌的抗菌活性筛选及菌株 BY02的初步鉴定[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(3): 17-20.