

研究报告

西藏仲巴五彩沙漠放线菌资源勘探及生物活性筛选

李亚美² 布合力其汗·白克力¹ 鲍洁² 高娟² 王娟娟² 李玉梅^{2*}

(1. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 新疆 阿拉尔 843300)

(2. 济南大学生物科学与技术学院 山东 济南 250022)

摘要:【背景】细菌耐药性问题日益严峻,新抗生素的研发速度远远落后于临床需要,从特殊生境中挖掘微生物药物资源有望解决以上问题。【目的】勘探西藏仲巴五彩沙漠土壤放线菌多样性并进行生物活性筛选,为发现药用放线菌资源、开发新型抗生素奠定基础。【方法】采用8种分离培养基,通过平板稀释涂布法分离放线菌;根据分离菌株的16S rRNA基因序列同源性分析放线菌多样性;采用PCR技术对分离的放线菌菌株进行II型聚酮合酶(PKS-II)酮缩酶结构域KS、非核糖体多肽合成酶(NRPS)腺苷酸化结构域A、安莎类抗生素生物合成前体3-氨基-5-羧基-苯甲酸合酶(AHBA)保守区、黄素腺嘌呤二核苷酸卤化酶(Halo)保守区抗生素生物合成基因检测;对生物合成基因检测阳性的菌株进行液体发酵,发酵液经乙酸乙酯萃取、菌体经丙酮浸提,获得提取浓缩物样品进行抑菌活性和抗氧化活性筛选。【结果】从4份土样中分离纯化到231株放线菌,分布于7个属,其中链霉菌为优势菌属。68株放线菌的生物合成基因分析显示至少具有1种生物合成基因簇,其中6株同时具有4种生物合成基因簇;进一步的抑菌活性检测显示所有检测的菌株至少表现为对1株检定菌具有抑菌活性,其中8株具有广谱抗菌活性;抗氧化活性筛选结果为13株显示总抗氧化能力阳性,10株具有较好的羟自由基清除能力,3株显示较强的氧自由基清除能力。【结论】西藏仲巴五彩沙漠土壤中含有较丰富的放线菌药用资源,具有从中发现放线菌新菌种和开发新抗生素的潜力。

关键词: 五彩沙漠, 放线菌, 生物多样性, 抗生素合成基因, 抑菌, 抗氧化

Foundation items: Open Fund of Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin (BRYB1405); Primary Research and Development Plan of Shandong Province (2016GSF121018); Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program (YE13)

***Corresponding author:** Tel: 86-531-82766825; E-mail: mls_liym@ujn.edu.cn

Received: October 17, 2017; **Accepted:** January 12, 2018; **Published online** (www.cnki.net): January 30, 2018

基金项目: 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题(BRYB1405); 山东省重点研发计划项目(2016GSF121018); 山东省高等学校科技计划项目(YE13)

***通信作者:** Tel: 86-531-82766825; E-mail: mls_liym@ujn.edu.cn

收稿日期: 2017-10-17; **接受日期:** 2018-01-12; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-01-30

Bioprospecting and bioactivity screening of culturable actinobacteria from color desert in Dengpa, Tibet

LI Ya-Mei² Buheliqihan·Baikeli¹ BAO Jie² GAO Juan²
WANG Juan-Juan² LI Yu-Mei^{2*}

(1. The Xinjiang Production and Construction Corps, Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Alar, Xinjiang 843300, China)

(2. University of Jinan, School of Biological Science and Biotechnology, Jinan, Shandong 250022, China)

Abstract: [Background] The problem of bacterial drug resistance is becoming more and more serious. The development of new antibiotics far lags behind the clinical needs. The discovery of microbial drug resources from special habitats is expected to solve this problem. [Objective] Biodiversity and bioactivity screening of actinomycetes from color desert in Dengpa, Tibet were performed, which would lay a good foundation for discovery of the resources of medicinal actinomycetes and new antibiotics. [Methods] The actinobacterial strains were cultured on 8 different media. Biodiversity of actinobacterial strains were analyzed according to 16S rRNA gene sequences. Detection of PKS-II (ketosynthase, KS), NRPS (adenylation A domain), AHBA and Halo genes was performed by PCR and agarose gel electrophoresis. Screening of antimicrobial activity was carried out by filter paper method. Antioxidant ability including total antioxidant activity, hydroxyl and oxygen free radical scavenging rate was tested by the chemical method. [Results] A total of 231 strains were isolated from four soil samples from color desert in Dengpa, Tibet. 16S rRNA gene analysis revealed these strains were affiliated with seven actinobacterial genera. *Streptomyces* was the dominant genus. Screening of biosynthetic gene clusters showed that 68 strains had at least one of four biosynthetic gene clusters and 6 strains had all the tested biosynthetic gene clusters. Furthermore, secondary metabolites produced by these strains showed antimicrobial activity against certain pathogens and antioxidant capacity towards hydroxyl and oxygen free radical scavenging. Therein, eight strains displayed broad-spectrum antimicrobial activity. Thirteen strains showed the positive total antioxidant activity. Ten strains had good hydroxyl free radical scavenging and three strains showed positive oxygen free radical scavenging. [Conclusion] These results exhibited that there are abundant actinomycetes medicinal resources in color desert in Dengpa, Tibet, which was promising for discovering new strains of actinomycetes and developing new antibiotics.

Keywords: Color desert, Actinomycetes, Biodiversity, Antibiotic biosynthetic genes, Antimicrobial, Antioxidant

近年来,“超级细菌”不断出现,抗生素耐药性问题日益严重,使人类健康面临“无药可救”的极大威胁^[1]。为攻克这一难关,寻找新型有效的抗生素刻不容缓。放线菌以其庞大的数量和巨大的抗生素生产能力一直备受全球医药研发工作者的青睐。据统计,60%以上临床抗生素来自放线菌^[2]。研究发现从普通生境中发现新颖结构药物先导化合物越来越困难,使得调查极端生境放线菌资源及其新抗生素合成潜力成为国内外研究的热点。已从氧气稀薄、盐碱、极寒、高温、干旱等特殊生境中发现了

大量具有潜在开发价值的放线菌类群^[3-4]。

沙漠作为一种干旱、高温、辐射强、营养贫瘠的极端生境不断引起微生物资源勘探研究者的注意^[5]。Harwani^[6]和 Montero-Calasanz 等^[7]从撒哈拉沙漠中分离到耐旱的地嗜皮菌目芽生球菌属和贫养杆菌属稀有放线菌;Santhanam 等^[8-9]从阿塔卡马沙漠分离到大量的嗜热耐旱链霉菌属放线菌;Kurapova 等^[10]发现蒙古沙漠土壤中存在大量的嗜温链霉菌属、耐热小单孢菌属、马杜拉放线菌属、孢子链霉菌属等放线菌类群。相关研究显示这些从干

早的沙漠生境中分离的放线菌具有代谢产物特殊、化学结构新颖、生物活性强等作为药用资源的巨大潜力。例如,从阿根廷阿塔卡马沙漠土壤中分离的链霉菌新种(*Streptomyces leeuwenhoekii* C34^T)可产生罕见的二十二元大环内酯类抗生素 Chaxalactins A-C 和新型安莎类抗生素 Chaxamycins A-D, 这些新抗生素不仅具有良好的热稳定性和溶解性,还具有强抗菌、抗肿瘤活性^[11-12];从智利高原阿塔卡马沙漠链霉菌(*Streptomyces* sp. DB634)中分离的氨基醌类衍生物(Abenquines A-D),对细菌和真菌皮肤癣具有良好的抑制活性^[13];从撒哈拉沙漠分离的糖丝菌属放线菌(*Saccharothrix* sp. SA198)中发现的2个新骨架化合物(化合物 A4 和 A5)具有广谱强抑菌活性,对丝状真菌的最小抑菌浓度低至 2 $\mu\text{g/mL}$,对细菌的最小抑菌浓度在 10–40 $\mu\text{g/mL}$ ^[14]。

西藏仲巴地处喜马拉雅山脉北面,属高原湖盆区,平均海拔 5 000 m 以上,可谓“生命禁区”。仲巴五彩沙漠土壤富含远古火山溶岩矿物质,由于天气寒冷缺氧,沙丘的表层常冰冻结霜,生境特殊。文献调查表明目前尚无西藏仲巴五彩沙漠生境放线菌资源及其生物活性勘探相关研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

2015 年 9 月采集西藏仲巴五彩沙漠不同区域、不同深度土壤样品 4 份(编号为 XZ1–XZ4),装于 50 mL 无菌离心管中,运达实验室后置于–20 $^{\circ}\text{C}$ 保藏。XZ1 为沙漠地表土样,XZ2 为植被区土样,XZ3 为沙漠地下 30 cm 层土样,XZ4 为水滩周围土样。

1.1.2 主要试剂和仪器

Nova 2 \times Taq-HS Forest Mix, 北京泰泽瑞达科技有限公司; Agarose, Andybio 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

超净工作台,苏州智净净化有限公司;恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;小型离心机, Eppendorf

AG 公司; PCR 扩增仪,杭州博日科技有限公司;摇床,天津莱玻特瑞仪器设备有限公司;超声波细胞破碎仪,上海生析超声波仪器有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;凝胶成像仪,北京赛智创业科技有限公司;旋转蒸发仪,郑州巩义予华仪器有限公司;酶标仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.3 培养基及抑制剂

(1) 分离培养基。海藻糖-天冬酰胺培养基(HT, g/L): L-天门冬酰胺 0.5, 海藻糖 5.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.6, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.000 5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.000 5, 琼脂 10.0, pH 7.5。HVG 培养基(g/L): 腐殖酸 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, CaCO_3 0.01, 维生素 B1 (Vb1) 0.002, 琼脂 10.0, pH 7.5。甘油精氨酸琼脂培养基(GA, g/L): 甘油 3.0, L-精氨酸 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 琼脂 10.0, pH 7.5。HV 腐殖酸琼脂培养基(g/L): 腐殖酸 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.25, KCl 0.85, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, CaCO_3 0.01, Vb1、核黄素、烟酸、Vb6、泛酸钙、肌醇、氨基苯甲酸各 0.005, 生物素 0.001, 琼脂 10.0, pH 7.5。酪氨酸培养基(ISP7, g/L): 甘油 7.5, L-酪氨酸 0.25, L-天冬酰胺 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, NaCl 0.25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.000 5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.000 5, 琼脂 10.0, pH 7.2–7.4。改良高氏二号培养基(SG2, g/L): 葡萄糖 0.5, 蛋白胨 0.25, NaCl 0.25, Vb1、核黄素、烟酸、Vb6、泛酸钙、肌醇、氨基苯甲酸各 0.005, 生物素 0.001, 琼脂 10.0, pH 7.2。海藻糖-脯氨酸培养基(HF, g/L): 海藻糖 2.5, 脯氨酸 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, NaCl 0.5, CaCl_2 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, Vb1、核黄素、烟酸、Vb6、泛酸钙、肌醇、氨基苯甲酸各 0.005, 生物素 0.001, 琼脂 10.0, pH 7.2。改良脯氨酸培养基(SF, g/L): 脯氨酸 2.5, 琼脂 10.0,

pH 7.2。

(2) 纯化、菌种保藏及液体发酵培养基——淀粉酪素培养基(DS, g/L): 可溶性淀粉 5.00, 干酪素 0.30, KNO_3 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2.00, CaCO_3 0.02, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, pH 7.5。

(3) 检定菌培养基——LB 培养基(g/L): 酵母浸粉 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, pH 7.2。

(4) 抑制剂(mg/mL): $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 25.0, 丙酸钙 30.0, 放线菌酮 50.0。

1.1.4 指示菌株

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 为本实验室保藏菌种, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*) ATCC 607 和白假丝酵母菌(*Candida albicans*) ATCC 90029 购自美国典型菌种保藏中心。

1.2 方法

1.2.1 样品处理与菌株的稀释平板分离

新鲜土样置无菌平皿中室温条件下自然风干, 然后用无菌研钵研磨成粉末状。取 2 g 土样加入到 18 mL MOPS 和 CaCO_3 混合溶液(1 g/L MOPS、0.2 g/L CaCO_3)中, 32 °C、180 r/min 振荡 1 h; 吸取 1 mL 土壤悬液至 9 mL 无菌水中, 连续进行 10 倍梯度稀释, 分别取 0.2 mL 涂布于 8 种分离培养基平板上, 置恒温培养箱 32 °C 培养。

1.2.2 菌株的纯化与保藏

分离平板在 32 °C 培养 2~6 周, 无菌条件下挑取单菌落, 于 DS 培养基平板上进行划线纯化, 直至得到纯培养物, 将纯化好的菌株转接至 DS 斜面培养基, 32 °C 培养生长后, 置于 4 °C 保存。

1.2.3 基于 16S rRNA 基因序列的放线菌多样性分析

(1) 放线菌菌株基因组 DNA 提取。收集菌体于 1.5 mL 离心管中, 加入 300~500 μL TE 缓冲液混匀, 用超声波细胞破碎仪使菌体破碎。加入 1/100 体积 10 mg/mL 的溶菌酶, 1/100 体积 20 mg/mL 蛋白酶 K, 颠倒混匀, 37 °C 水浴保温 30 min, 加入

1/10 体积 10% SDS 和 0.5 mol/L EDTA, 颠倒混匀, 55 °C 水浴保温 1 h。加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, 体积比)振荡, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清。加入 0.6 倍体积异丙醇, -20 °C 沉淀 30 min, 4 °C、15 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀 1~2 次, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。自然干燥后加入 50 μL 去离子水溶解沉淀。

(2) 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增。以放线菌基因组 DNA 为模板, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因序列。50 μL PCR 反应体系: 2 \times Taq-HS Forest Mix 25 μL , 引物 27F (20 $\mu\text{mol/L}$) 1.5 μL , 引物 1492R (20 $\mu\text{mol/L}$) 1.5 μL , 基因组 DNA 2 μL , 无菌水 20 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

(3) 序列分析和系统发育树的构建。将 16S rRNA 基因序列利用 NCBI BLAST 程序进行相似性比对, 以相似性较高且有效发表的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象, 用 BioEdit 软件进行多序列比对, 采用 MEGA 7.0 软件以 Neighbour-Joining 法进行聚类分析并构建系统发育树, 系统进化矩阵根据 Kimura two parameter 模型评估, 重复取样 1 000 次进行自展值分析评估进化树拓扑结构的稳定性。

1.2.4 抗生素生物合成基因簇检测

对分离获得的放线菌进行抗生素生物合成基因簇的 PCR 检测, 包括 II 型聚酮合酶(PKS-II)酮缩酶结构域 KS 基因序列、非核糖体多肽合成酶(NRPS)腺苷酸化结构域 A 基因序列、安莎类抗生素生物合成前体 3-氨基-5-羟基-苯甲酸合酶(AHBA)保守区基因序列和黄素腺嘌呤二核苷酸卤化酶(Halo)保守区基因序列。PCR 扩增以上 4 种基因序列采用的引物如表 1 所示, 反应条件如下:

PKS-II 基因: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 5 min;

表 1 抗生素生物合成基因序列的 PCR 扩增引物及其片段大小

Table 1 Primers and size of PCR amplification for antibiotic biosynthetic genes

基因 Genes		引物序列 Primers sequence (5'→3')	大小 Size (bp)
PKS-II	KS α	TSGCSTGCTTGGAYGCSATC	600
	KS β	TGGAANCCGCCGAABCCTCT	
NRPS	A3F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	700-800
	A7R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS	
AHBA	755a	AGAGGATCCTTCGAGCRSGAGTTCGC	750
	755b	GCAGGATCCGGAMCATSGCCATGTAG	
Halo	Halo-FW	TTCCSCSGSTACCASATCGGSGGAG	600
	Halo-RV	CCSACCAWGACCMWSTAGGGSG	

NRPS 基因: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 5min;

AHBA 基因: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 5 min;

Halo 基因: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 5 min。

1.2.5 菌株发酵及次级代谢产物的提取

将长势良好的平板菌株接种于 DS 培养基中, 32 °C、180 r/min 培养 7 d, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集发酵液上清, 用等体积的乙酸乙酯进行萃取; 菌体用 80%丙酮浸提; 用旋转蒸发仪将萃取液和浸提液蒸干, 加入甲醇溶解。

1.2.6 抑菌活性和抗氧化活性筛选

(1) 抑菌活性筛选: 吸取 60 μ L 甲醇溶解物置于直径为 6 mm 的圆形无菌滤纸片上, 待甲醇挥干后贴于涂布指示菌株的检定平板上, 37 °C 培养 24 h, 观察并记录抑菌圈直径。

(2) 抗氧化活性筛选。1) 总抗氧化能力测定: 总抗氧化能力采用北京索莱宝科技有限公司总抗氧化能力试剂盒测定。2) 羟自由基清除率的测定: 反应体系为 8.8 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液 1 mL, 加入样品溶液 1 mL, 再加入 H₂O₂ 启动反应, 37 °C 反应 30 min, 以蒸馏水为空白对照, 测定 OD₅₁₀, 计算样品对羟自由基的清除率。3) 氧自由基清除率的测定: 采用邻苯三酚自氧化法测定氧自由基清除率, 取 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2) 4.5 mL 置于 25 °C 水浴中保温 20 min, 分别加入 1 mL 样品溶液和 0.4 mL 25 mmol/L 邻苯三酚溶液, 混匀

后于 25 °C 水浴反应 5 min, 加入 1 mL 8 mmol/L HCl 终止反应, 测定 OD₂₉₉, 计算样品对氧自由基的清除率。

2 结果与分析

2.1 西藏五彩沙漠土壤可培养放线菌的多样性

从 4 份沙漠土样中分离纯化到 231 株放线菌, 根据菌落形态初步排重, 选择 68 株放线菌进行 16S rRNA 基因序列扩增和比对, 结果显示 68 株放线菌分布于放线菌纲的 6 个目 6 个科 7 个属(表 2), 其中链霉菌属(*Streptomyces*) 60 株, 占分离放线菌菌株的 88.2%, 是该沙漠生境的优势放线菌类群; 稀有放线菌 8 株, 包括类诺卡氏菌属(*Nocardioide*s) 2 株、伦茨氏菌属(*Lentzea*) 2 株、考克氏菌属(*Kocuria*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、动球菌属(*Kineococcus*)各 1 株。部分代表菌株及其同源菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的 Neighbour-Joining 系统进化树如图 1 所示, 优势放线菌链霉菌与 GenBank 数据库中的参考菌株相似性在 98.5%–100%, 稀有放线菌 XZ-126、XZ-1、XZ-83、XZ-165、XZ-62、XZ-46 与 GenBank 数据库中的参考菌株 *Nocardioide*s *luteus* KCTC 9575^T、*Kineosporia aurantiaca* OTS_z_A_212^T、*Saccharothrix longispora* NRRL B-16116^T、*Nocardia asiatica* NBRC 100129^T、*Lentzea albida* IFO 16102^T、*Kocuria rosea* DSM 20447^T 相似性最高分别为 99.86%、99.85%、99.43%、99.42%、98.58%、95.37%。其中, 菌株 XZ-62 和 XZ-46 的相似性比对分析显示它们与伦

茨氏菌属和考克氏菌属菌株的最高相似性分别为 98.58% 和 95.37%, 且在 N-J 进化树中都与同属菌株形成独立一支, 这提示菌株 XZ-62 可能为伦茨氏菌属(*Lentzea*)的一个新种, 菌株 XZ-46 可能为考克氏菌属(*Kocuria*)的一个新种。

不同样品和不同培养基中分离的放线菌数量见图 2 和图 3, 从样品来源来看, 4 份样品中植被区样品 XZ2 分离到的菌株最多, 沙漠地表样品 XZ1 分离到的菌株最少。从分离培养基来看, ISP7 (酪氨酸培养基)和 GA (甘油精氨酸琼脂培养基)分离得到的菌株较多。

2.2 抗生素生物合成基因的检测

对测序鉴定的 68 株放线菌菌株分别进行了 II 型聚酮合酶结构域 KS、非核糖体多肽合成酶结构域 A、安莎类抗生素生物合成前体 3-氨基-5-羟基-苯甲酸合酶(AHBA)保守区、黄素腺嘌呤二核苷酸卤化酶(Halo)保守区基因序列的 PCR 扩增。部分菌株的阳性扩增结果显示扩增长度在 600 bp 左右、700–800 bp、750 bp 左右、600 bp 左右的 DNA 片段分别为 PKS-II、NRPS、AHBA、Halo 保守区域基因的扩增条带(图 4)。所有检测菌株的 PCR 扩增结果统计显示(图 5), 68 株放线菌菌株中均至少具有 4 种抗生素生物合成基因中的一种, 其中 6 株同时具有 4 种生物合成基因, 20 株同时具有 PKS-II、NRPS、Halo 三种生物合成基因, 17 株同时具有 PKS-II、AHBA、Halo 三种生物合成基因, 这些菌株中同时具有多种生物合成基因的主要是链霉菌。

2.3 抑菌活性筛选结果

根据生物活性基因检测结果, 对筛选获得的 68 株放线菌分别进行了摇瓶发酵, 菌株发酵液乙酸乙酯萃取浓缩物或菌体的丙酮浸提液浓缩物的其中一种对检定菌具有抑菌活性, 该菌株即为抑菌阳性菌株。统计结果显示(图 6), 所有检测的菌株至少表现为对一株检定菌具有抑菌活性, 56 株链霉菌、5 株稀有放线菌有抑制革兰氏阴性铜绿假单胞菌活性, 54 株链霉菌、7 株稀有放线菌具有抑制革兰氏阳性金黄色葡萄球菌活性, 49 株链霉菌

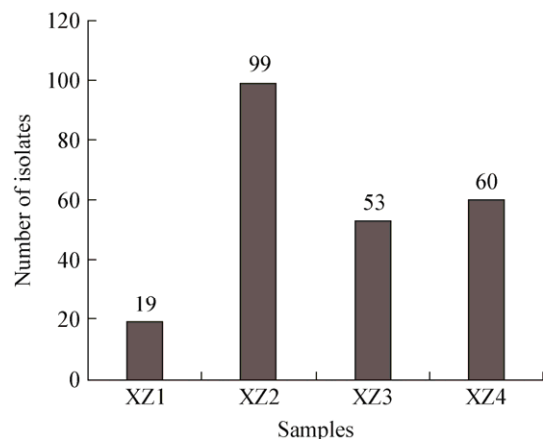


图 2 不同样品中分离到的放线菌数量

Figure 2 The amount of isolates from different samples

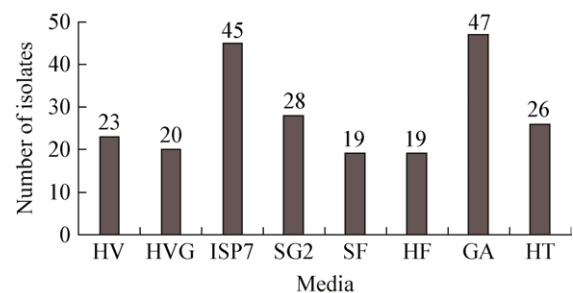


图 3 不同培养基中分离到的放线菌数量

Figure 3 The amount of isolates from different media

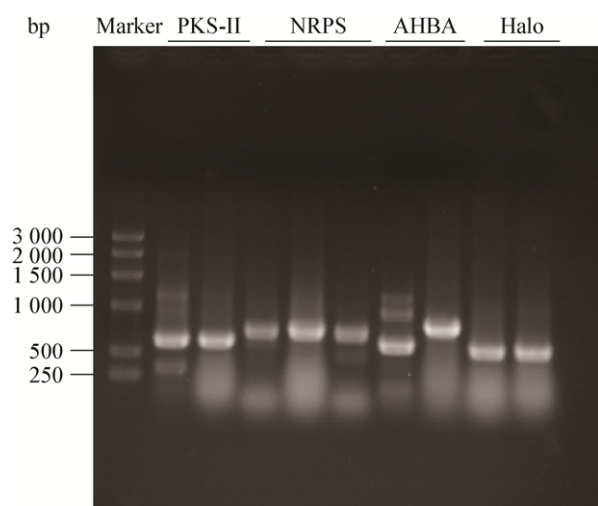


图 4 PKS-II、NRPS、AHBA 和 Halo 基因序列 PCR 扩增电泳检测

Figure 4 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification for PKS-II, NRPS, AHBA and Halo genes

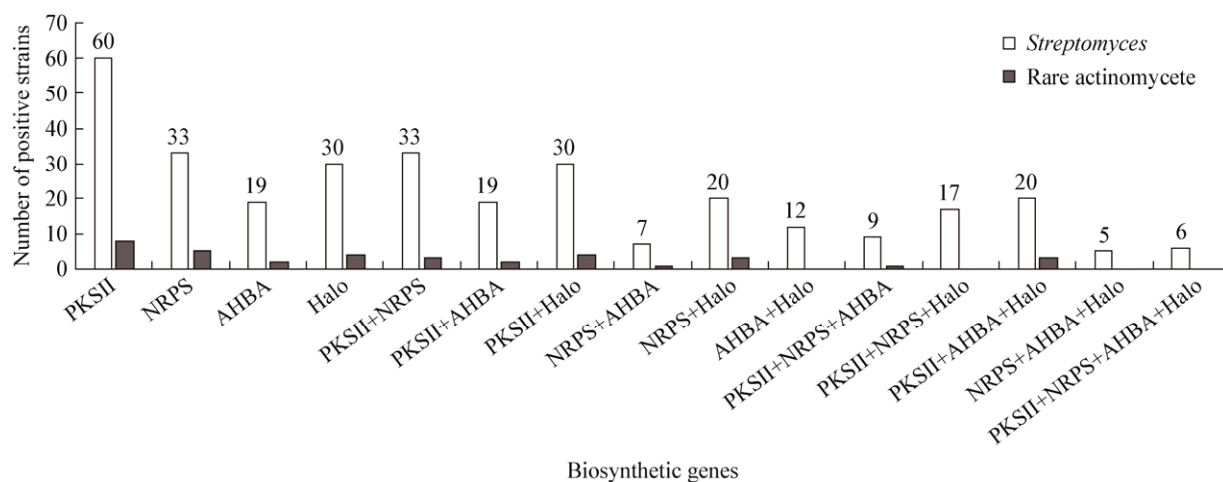


图5 抗生素生物合成基因筛选结果

Figure 5 Results of screening on antibiotic biosynthetic genes

和 7 株稀有放线菌具有抑制放线菌属耻垢分枝杆菌活性, 55 株链霉菌、3 株稀有放线菌具有抑制真菌白假丝酵母菌活性。其中 8 株具有广谱抗菌活性, 包括 6 株链霉菌和 2 株稀有放线菌(考克氏菌属和类诺卡氏菌属)。

2.4 抗氧化活性筛选结果

对抑菌阳性的 68 株菌株发酵液乙酸乙酯萃取浓缩物及其菌体的丙酮浸提液浓缩物均进行了抗氧化活性筛选, 以总抗氧化能力测定数值大于标准品维生素 C (Vc) 及羟自由基清除率、氧自由基

清除率大于 50% 的结果为抗氧化阳性。统计结果如表 3 所示, 13 株显示总抗氧化能力阳性, 9 株具有较好的羟自由基清除能力, 3 株显示较强的氧自由基清除能力。

3 讨论与结论

沙漠土壤放线菌资源丰富, 不仅具有广泛的微生物多样性, 还具有生物合成新型次生代谢产物途径的遗传多样性, 充分发掘和利用沙漠生境放线菌的丰富性、多样性和生物合成潜力及它们的功能特点意义重大。本研究从西藏仲巴五彩沙漠 4 份土壤样品中分离到了 6 目 7 个属的 231 株放线菌, 其中链霉菌属为优势菌, 还有类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、伦茨氏菌属(*Lentzea*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、动球菌属(*Kineococcus*)等稀有放线菌, 以上菌株中有 2 株为潜在新种。根据文献调查发现, 这种生物多样性结构组成兼具沙漠和青藏高原生境放线菌的特点。董艳萍等从新疆塔克拉玛干沙漠分离到 16 科 24 属放线菌, 以链霉菌属和拟诺卡氏菌属为优势菌属, 还分离到类诺卡氏菌属、库克菌属、糖单胞菌属、迪茨氏菌属等稀有放线菌^[15]; 黄娇等从青藏高原阿里、那曲和海西地区土壤中分离到 14 科 28 属的放线菌, 以链霉菌

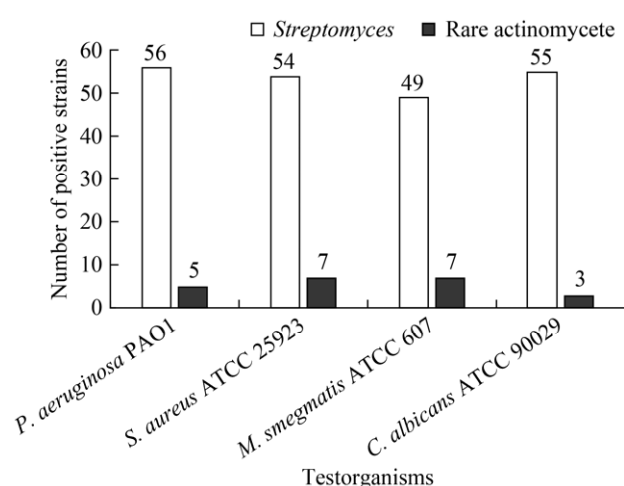


图6 抑菌活性筛选结果

Figure 6 Results of positive strains with antimicrobial activity

表 3 抗氧化活性筛选结果
Table 3 Results of screening on antioxidant activity

菌株 Strains	总抗氧化能力 Total antioxidant ability (U/mL)	羟自由基清除率 Hydroxyl free radical scavenging rate (%)	氧自由基清除率 Oxygen free radical scavenging rate (%)
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-5	—	69.70	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-6	49.53	81.62	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-35	—	57.65	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-47	—	—	52.05
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-94	19.05	87.48	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-98	34.62	—	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-100	19.28	—	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-107	13.09	—	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-108	17.49	53.34	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-110	21.38	—	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-112	13.03	68.17	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-113	13.74	60.30	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-159	20.24	59.77	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-160	15.85	—	—
<i>Streptomyces</i> sp. XZ-177	—	57.44	—
<i>Nocardia</i> sp. XZ-165	—	—	66.91
<i>Nocardiodides</i> sp. XZ-106	49.82	—	—
<i>Nocardiodides</i> sp. XZ-126	36.36	—	91.72

注：阳性对照 Vc (0.05 mg/mL) 的总抗氧化能力为 12.84 U/mL；—：抗氧化活性低于统计值。
Note: Total antioxidant ability of positive control Vc (0.05 mg/L) was 12.84 U/mL; —: Antioxidant activity was less than statistic.

属为优势菌，还分离到伦茨氏菌属、考克氏菌属、诺卡氏菌属、糖丝菌属等稀有放线菌^[16]。本研究从西藏仲巴五彩沙漠分离的放线菌也以链霉菌居多，与文献不同的是还分离到动球菌属稀有放线菌，这可能与五彩沙漠富含矿物质有关。

放线菌基因组测序表明其生物合成基因簇的数量要远大于目前已知的天然产物的数量^[17]，因此，利用 PCR 技术检测放线菌抗生素生物合成基因簇保守区可快速发现目标菌株的生物合成潜力^[18]。目前用于筛选的生物合成基因簇主要集中在聚酮合酶 PKS、非核糖体多肽合成酶 NRPS、安莎类抗生素合成酶 ABAH 和卤化酶 Halo。其中 PKS 可分为 PKS-I、PKS-II 和 PKS-III 三种类型，PKS-I 主要催化合成大环内酯类、聚烯和聚醚类化合物^[19]，PKS-II 只含一套能够循环使用的结构域——多酶复合体，每一结构域在重复反应步骤中多次催化相

同的反应^[20]，PKS-III 主要催化合成芳香环类聚酮化合物^[21]，以上 3 种类型中 PKS-II 在放线菌中广泛存在、且保守区基因序列容易 PCR 扩增^[22]。因此，本研究对分离的 68 株放线菌进行了 PKS-II、NRPS、AHBA、Halo 四种抗生素生物合成基因的筛选，结果显示每株菌至少具有被检测抗生素生物合成基因中的一种。抑菌活性筛选结果显示所检测的 68 株菌至少表现为对一株检定的指示菌抑菌阳性，其中 8 株具有广谱抗菌活性。而链霉菌属、伦茨氏菌属和类诺卡氏菌属生物合成基因和抑菌活性阳性率均在 90% 以上。此外，链霉菌属和类诺卡氏菌属放线菌还显示出良好的抗氧化活性。

综上所述表明西藏仲巴五彩沙漠土壤中存在具有巨大药用开发价值的放线菌资源，值得在本研究基础上尝试细胞微囊包埋技术、微流控技术等难培养微生物分离新策略进一步深入挖掘^[23-24]。

REFERENCES

- [1] Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century—a clinical super-challenge[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(5): 439-443
- [2] Arnold LD, Sergio S. Microbial drug discovery: 80 years of progress[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2009, 62(1): 5-16
- [3] Thumar JT, Dhulia K, Singh SP. Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(11): 2081-2087
- [4] Sánchez S, Demain AL. Antibiotics: Current Innovations and Future Trends[M]. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2015
- [5] Bull AT, Asenjo JA. Microbiology of hyper-arid environments: recent insights from the Atacama Desert, Chile[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(6): 1173-1179
- [6] Harwani D. Biodiversity of rare thermophilic actinomycetes in the great Indian Thar desert: an overview[J]. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, 3(11): 9349-9356
- [7] Montero-Calasanz MC, Göker M, Pötter G, et al. *Geodermatophilus arenarius* sp. nov., a xerophilic actinomycete isolated from Saharan desert sand in Chad[J]. *Extremophiles*, 2012, 16(6): 903-909
- [8] Santhanam R, Okoro CK, Rong XY, et al. *Streptomyces atacamensis* sp. nov., isolated from an extreme hyper-arid soil of the Atacama Desert, Chile[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt11): 2680-2684
- [9] Santhanam R, Rong XY, Huang Y, et al. *Streptomyces bullii* sp. nov., isolated from a hyper-arid Atacama Desert soil[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(2): 367-373
- [10] Kurapova AI, Zenova GM, Sudnitsyn II, et al. Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia desert steppe zone[J]. *Microbiology*, 2012, 81(1): 98-108
- [11] Rateb ME, Houssen WE, Harrison WT, et al. Diverse metabolic profiles of a *Streptomyces* strain isolated from a hyper-arid environment[J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(9): 1965-1971
- [12] Rateb ME, Houssen WE, Arnold M, et al. Chaxamycins A–D, bioactive ansamycins from a hyper-arid desert *Streptomyces* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(6): 1491-1499
- [13] Schulz D, Beese P, Ohlendorf B, et al. Abenquines A–D: Aminoquinone derivatives produced by *Streptomyces* sp. strain DB634[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(12): 763-768
- [14] Boubetra D, Sabaou N, Zitouni A, et al. Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil[J]. *Microbiological Research*, 2013, 168(4): 223-230
- [15] Dong YP, Guo L, Xugela H, et al. Study on diversity and bioactivity of actinomycetes isolated from the south edge of the Taklamakan Desert[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2013, 38(4): 241-247 (in Chinese)
董艳萍, 郭琳, 旭格拉·哈布丁, 等. 塔克拉玛干沙漠南麓土壤放线菌资源勘探及抗菌活性筛选[J]. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(4): 241-247
- [16] Huang J, Yan BF, Huang Y. Diversity of culturable actinobacteria from soils collected in Ali, Naqu and Haixi Districts on the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(9): 1342-1351 (in Chinese)
黄娇, 闫兵法, 黄英. 青藏高原阿里、那曲和海西地区土壤可培养放线菌的多样性[J]. *微生物学报*, 2017, 57(9): 1342-1351
- [17] Ju KS, Gao J, Doroghazi JR, et al. Discovery of phosphonic acid natural products by mining the genomes of 10000 actinomycetes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(39): 12175-12180
- [18] Qi FF. Isolation and functional gene screening for mangrove actinomycetes[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 (in Chinese)
齐芳芳. 红树林放线菌的分离及其功能基因筛选[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2011
- [19] Tae H, Sohng JK, Park K. MapiDB: an integrated web database for type I polyketide synthases[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2009, 32(6): 723-727
- [20] Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7(2): 285-295
- [21] Watanabe K, Praseuth AP, Wang CC. A comprehensive and engaging overview of the type III family of polyketide synthases[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, 11(3): 279-286
- [22] Yang XY, Jin J, Zhou MJ, et al. Discovery of angucyclinone polyketides from marine actinomycetes with a genomic DNA-based PCR assay targeting type II polyketide synthase[J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2017, 26(3): 173-179
- [23] Zengler K, Toledo G, Rappé M, et al. Cultivating the uncultured[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(24): 15681-15686
- [24] Cui QF, Wang LM, Liu ZH, et al. Study on diversity of acidophilic rare actinomycetes from acidic soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(5): 571-575 (in Chinese)
崔庆峰, 王黎明, 刘志恒, 等. 酸性土壤中嗜酸稀有放线菌的多样性研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(5): 571-575