

从红树植物根际土壤选择性分离小双孢菌

徐小雄^{1,2} 林海鹏¹ 阮继生^{1,3} 洪葵^{1*}

- (1. 中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所 农业部热带作物生物技术重点开放实验室 海南 海口 571101)
(2. 海南大学 环境与植物保护学院 海南 儋州 571737)
(3. 中国科学院微生物研究所 北京 100101)

摘要: 从海南文昌采集 23 种红树植物的根际土壤, 采用 GA、HV 作为选择性分离培养基, 添加复合维生素、放线菌酮、制霉菌素和重铬酸钾, 结合适当的预处理: 干热 120°C 60 min 或干热 100°C 60 min 及 1% 氯胺-T 处理 30 min, 平板稀释涂布法(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3})分离其中的小双孢菌。共分离得到 199 株放线菌, 通过培养特征及显微形态观察, 发现其中有链霉菌 147 株、非链霉菌 52 株。选择 7 株链霉菌和 28 株非链霉菌进行了 16S rRNA 基因序列分析, 结果显示 19 株菌属于小双孢菌属, 7 株属于链霉菌属, 4 株属于野野村菌属, 2 株属于小单孢菌属, 1 株属于链孢囊菌属, 1 株属于阿萨诺氏菌属, 1 株属于小单孢菌科。结果表明红树林根际土壤中蕴含着丰富的小双孢菌资源。
关键词: 红树植物, 根际土壤, 分离, 小双孢菌

Selective Isolation of *Microbispora* from Rhizosphere Soil of Mangrove Plants

XU Xiao-Xiong^{1,2} LIN Hai-Peng¹ RUAN Ji-Sheng^{1,3} HONG Kui^{1*}

- (1. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou, Hainan 571101, China)
(2. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China)
(3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: To selectively isolate *Microbispora* sp. from mangrove, 23 rhizosphere soils of different mangrove plants were collected in Wenchang, Hainan, China. After pretreatments of dry heat (100°C 60 min or 120°C 60 min) and treatment with Chloramine-T (1%, 30 min at room temperature) for each sample, 100 μ L of the 10^{-1} ~ 10^{-3} dilutions of the resultant suspensions were transferred and spread onto the selective isolation media. GA and HV media were employed as the isolation media that supplemented with 0.5 mg/L multi-vitamin, 50 mg/L~100 mg/L $K_2Cr_2O_7$, 50 mg/L cycloheximide and 50 mg/L nystatin. One hundred and ninety nine actinomycetes including 147 *Streptomyces*-like isolates and 52 non-*Streptomyces*-like isolates were isolated according to their morphology on agar plates and under microscope. Seven *Streptomyces*-like isolates and 28 non-*Streptomyces*-like isolates were putatively identified to genus level based on 16S rRNA gene sequence analysis, which belong to *Microbispora*(19), *Streptomyces*(7), *Nonomuraea*(4), *Micromonospora*(2), *Streptosporangium*(1), *Asanoa*(1), and one uncertain genus under *Micromonosporaceae*. It is found

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA09Z415); 国家自然科学基金广东联合基金重点项目(No. U0633008)

* 通讯作者: Tel: 86-898-66986949; E-mail: k1022@163.net

收稿日期: 2009-02-22; 接受日期: 2009-05-20

that plenty of *Microbispora* spp. inhabit in mangrove rhizosphere soil.

Keywords: Mangrove plant, Rhizosphere soil, Isolation, *Microbispora*

小双孢菌属是由 Nonomura 和 Ohara 在 1957 年根据其气生菌丝的孢子梗上有成纵向生长的两个孢子建立的^[1], 属链孢囊菌科^[2]。小双孢菌是高 GC (71.3 mol%~73 mol%)的革兰氏阳性菌, 不抗酸, 好气, 中温和高温菌, 大多数种需要维生素, 部分需要硫胺素才能生长^[3]。从小双孢菌属中得到的抗生素已有 56 种^[4], 近几年发现小双孢菌产生如 Bispolidin^[5]和 Microbisporicin^[6]等一些新的生物活性物质。已从不同的自然环境, 如海底沉积物^[7]、温泉^[8]、植物组织^[9]、南极的土壤^[10]等分离得到小双孢菌。红树林地处热带、亚热带的潮间带, 受海水周期性浸泡, 生态环境特殊。王岳坤、阎冰等通过分子生物学的技术, 发现了海南文昌红树林中蕴含着丰富的微生物资源^[11,12]。林鹏等研究发现福建九龙江口红树林的放线菌抗菌活性高, 抗菌谱宽^[13]。目前从红树林土壤中已分离得到了包括链霉菌属、小单孢菌属、小四孢菌属、诺卡氏菌属和马杜拉菌属等大量放线菌, 这些菌株显示出了一系列的抗菌、抗肿瘤活性, 具有广阔的开发前景^[14,15], 但关于红树林小双孢菌的研究尚未见文献报道。本研究的目的是从红树植物根际土壤中选择性分离小双孢菌, 并进一步探究其中是否存在新的小双孢菌物种、是否能产生新的活性物质。

1 材料和方法

1.1 采样

23 份根际土壤样品分别采自海南文昌头苑(经纬度: N19°37' E110°47')红树林中的 23 种红树植物(表 3)。

1.2 预处理

土壤样品采集后置于阴凉处 7 d, 自然风干, 然后采用两种方法预处理。方法 1: 干热 100°C, 60 min; 1 g 土壤置于 9 mL 的 1/4 林格溶液^[16], 超声波处理 10 min; 然后用 1/4 林格溶液稀释得到 10⁻²和 10⁻³的溶液。方法 2: 干热 120°C, 60 min^[17]; 取 1 g 土壤置于 9 mL 的 1% 氯胺-T 溶液^[18], 超声波处理 10 min, 然后用 1% 氯胺-T 溶液稀释得到 10⁻²和 10⁻³的溶液, 并且在 20 min 后快速涂布。

1.3 培养基

葡萄糖天门冬酸培养基(GA)^[19]和腐殖酸培养基(HV)^[20]。GA 的主要成分: 葡萄糖 2 g, 天门冬酰胺 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 50%海水 800 mL, 土壤浸汁 200 mL, 琼脂 18 g, pH 7.2。HV 的主要成分: 腐殖酸 1.0 g, CaCO₃ 0.02 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, KCl 1.7 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 50%海水 1000 mL, 琼脂 18 g, pH 7.2。GA 和 HV 两种培养基中均添加了终浓度为 50 mg/L 的放线菌酮、制霉菌素和重铬酸钾, 复合维生素(1 L 培养基添加 V_{B2} 0.5 mg, V_{B1} 0.5 mg, V_{B6} 0.5 mg, 烟酸 0.5 mg, 肌醇 0.5 mg, 泛酸 0.5 mg, 生物素 0.25 mg, 对-氨基苯甲酸 0.5 mg)。土壤浸汁的制备: 分别称取所有的土样各 5 g, 研磨, 用水 10 倍稀释, 搅散, 28°C、200 r/min 摇床振荡 1 h, 取出过滤, 即得土壤浸汁。

1.4 菌株分离, 纯化和保藏

样品采取两种预处理得到的 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 3 个浓度的溶液, 第 1 种预处理分别涂布到 GA 和 HV 两种培养基上, 第 2 种预处理涂布到 GA 培养基上, 涂布量为 100 μL, 3 个平行, 涂布后置于 28°C 培养箱中培养 7 d~28 d。根据菌落在平板上的形态特征, 从平板挑取放线菌, 用 ISP2 培养基进行纯化, 纯化后保藏到 20%的甘油, 置-20°C 保藏。

1.5 菌株的 16S rRNA 基因序列分析

根据菌株在 ISP2 培养基上的形态特征, 对分离得到的放线菌进行分群, 再选取代表菌株, 用核酸提取仪提取菌株基因组 DNA, 用 27F 和 1492R 为引物对菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 实验过程具体步骤方法参照文献^[11], 扩增片段克隆到大肠杆菌后送上海生工测序。将测序得到的 16S rRNA 基因序列放在 GenBank 进行比对, 然后从 GenBank、EMBL、DDBJ 上下载相似率高(一般 >98%)的相关菌属的模式菌株(Type strain)的 16S rRNA 基因序列, 至少采用 2 种不同的方法构建聚类分析图, 主要软件包括 Mega 4.0、Bioedit 7.0、Phydit 2.0 和 Treecom, 初步确定菌株分类归属。

2 结果与分析

2.1 小双孢菌的选择性分离结果

本研究共分离得到 199 株放线菌(表 1), 通过菌株在 ISP2 平板上的形态特征判断其中 147 株为链霉菌, 52 株为非链霉菌。对 52 株非链霉菌进行显微形态观察, 发现有 28 株具有小双孢菌的形态特征, 如图 1 所示为菌株 211020 的显微照片。从 M1、M2、M3 三种分离方法均分离得到小双孢菌(表 1), 但是不同培养基与不同预处理组合得到的分离效果差别较大(图 2), 经显微观察: 图 2A 平板中的白色小点可能是小双孢菌, 而图 2B 平板上颜色比较深的小菌落很可能是小双孢菌, 图 2C 平板中大多为链霉菌。通过对 M2 和 M3 两种方法的分离结果比较发现, 样品经 120°C 干热处理 60 min, 1% 氯胺-T 处理 30 min, 要比单独 100°C 干热处理 60 min 更利于小双孢菌的选择性分离; 就分离培养基而言, GA 培养基更适合于选择性分离小双孢菌, 菌落特征明显(图 2B), 挑取成功率高; 而在 HV 培养基上菌落微小(图 2A), 菌落颜色和培养基颜色相近, 不易观察, 菌落也不容易挑取; 采用 M3 分离方法虽然出菌率高, 多样性好(图 2C), 但不利于小双孢菌的高效选择性分离。



图 1 菌株 211020 的显微照片($\times 1000$)

Fig. 1 Micrograph of isolate 211020 cultured on ISP3 medium for 20 days($\times 1000$)

注: 黑箭头所指处体现小双孢菌孢子特征。

Note: The arrow indicate the characteristic pair spores of *Microbispora* sp..

2.2 35 株代表菌株的初步归属

从 199 株分离菌株中挑选了 28 株非链霉菌代表菌株和 7 株链霉菌, 对其 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增和测序, 在 GenBank 中与相近菌属的模式菌株(Type strain)的 16S rRNA 基因序列进行比对, 初步确定各分离菌株的分类归属(表 2)。

2.3 19 株小双孢菌的 16S rRNA 基因序列聚类分析

从 19 株菌的 16S rRNA 基因序列聚类分析结果

表 1 不同分离培养基及相应预处理方法的分离结果
Table 1 Isolation results with different media and pretreatments

方法 Methods	培养基 Media	预处理 Pretreatments	菌株分离数 No. of isolates		
			<i>Streptomyces</i>	Non- <i>Streptomyces</i>	<i>Microbispora</i> sp.
M1	HV	Dry heat, 120°C, 60 min and 1% Chloramine-T, 30 min	2	28	14
M2	GA		1	12	11
M3	GA	Dry heat, 100°C, 60 min	144	22	3
Total			147	52	28

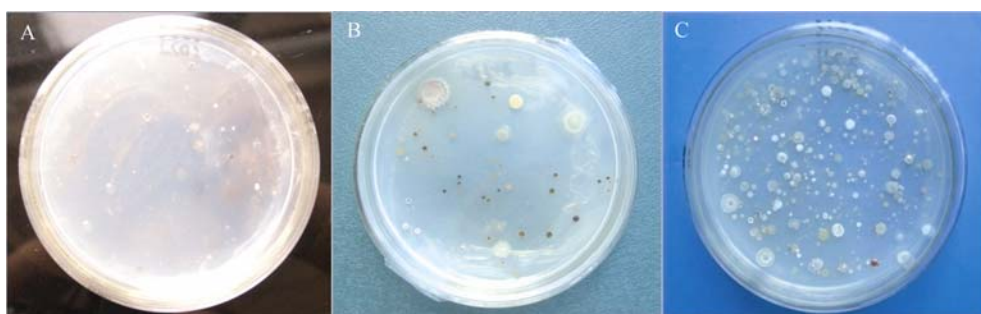


图 2 不同方法的分离平板

Fig. 2 Isolation plates with different methods

注: A: M1 方法的分离平板; B: M2 方法的分离平板; C: M3 方法的分离平板。

Note: A: Plate of M1; B: Plate of M2; C: Plate of M3. M1, M2 and M3 were showed in Table 1.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 2 35 株代表株菌的分类归属
Table 2 Taxonomic lineage of 35 representative isolates

属	科	亚目	数目
Genera	Families	Suborders	Number
<i>Asanoa</i>	Micromonosporaceae	Micromonosporineae	1
<i>Micromonospora</i>			2
Uncertain			1
<i>Microbispora</i>	Streptosporangiaceae	Streptosporangiineae	19
<i>Nonomuraea</i>			4
<i>Streptosporangium</i>			1
<i>Streptomyces</i>	Streptomycetaceae	Streptomycineae	7
Total			35

(图 3)可以看出,这 19 株菌均归于小双孢菌属,分别聚在 4 个不同的分支上(Cluster I - IV)。Cluster I 包括了菌株 212028 等 12 株菌; Cluster II 包括了菌株 210920 等 3 株菌; Cluster III 包括了菌株 212030 等 3 株菌; 而 Cluster IV 只有菌株 211020。该聚类结果与形态特征聚类结果一致: Cluster I 上的 12 株菌在 ISP2 培养基上为橙红色基丝,白色气丝; Cluster II 中的 3 株菌和 Cluster III 中的 3 株菌在 ISP2 培养基上形态特征相似,均为褐色基丝和白色气丝; Cluster IV 上的 211020 在 ISP2 培养基上是褐色基丝和粉红色气丝。

2.4 不同样品的分离结果

分离结果显示(表 3),仅从 23 份红树植物根际土壤样品中的 10 个分离得到 199 株放线菌,所分离的 28 株小双孢菌来自其中 6 种红树植物的根际土壤,而从海芒果的根际土壤分离得到的小双孢菌最多,共 17 株。

3 讨论

Hayakawa 早在 1991 年就提出土壤经干热 120°C 处理 60 min 后,再用 1%苯酚和 0.03%双氯苯双胍己烷处理,涂布到添加地衣素的 HV 培养基能高效分离得到小双孢菌^[17]。随后他在 1997 年提出了用氯胺-T 处理土壤 30 min 能有效分离得到链孢囊菌科的菌^[18],而大多数小双孢菌生长需要 B 族维生素^[3]。本实验综合了以上几种处理方法,结果显示,采用干热 120°C 60 min,及 1% 氯胺-T 30 min 的预处理,将土壤稀释液涂布在添加了复合维生素的 GA 和 HV 琼脂上,能较好地选择性分离小双孢菌,

表 3 23 种不同红树植物根际土壤及其放线菌分离结果
Table 3 Actinomycetes isolated from rhizosphere soil of 23 different mangrove plants

Mangrove plant 红树植物	A	B
<i>Acrostichum speciosum</i> (尖叶卤蕨)	23	0
<i>Acanthus ilicifolius</i> (老鼠勒)	22	0
<i>Acrostichum aureum</i> (卤蕨)	0	0
<i>Aegiceras corniculatum</i> (桐花树)	0	0
<i>Avicennia marina</i> (白骨壤)	0	0
<i>Barringtonia racemosa</i> (玉蕊)	0	0
<i>Bruguiera gymnorrhiza</i> (木榄)	0	0
<i>Bruguiera sexangula</i> (海莲)	26	1
<i>Cerbera manghas</i> (海芒果)	25	17
<i>Ceriops tagal</i> (角果木)	0	0
<i>Excoecaria agallocha</i> (海漆)	17	5
<i>Heritiera littoralis</i> (银叶树)	17	0
<i>Hibiscus tiliaceus</i> (黄槿)	24	0
<i>Kandelia candel</i> (秋茄)	0	0
<i>Lumnitzera racemosa</i> (榄李)	2	1
<i>Pongamia pinnata</i> (水黄皮)	6	3
<i>Rhizophora apiculata</i> (正红树)	35	1
<i>Scyphiphora hyduo-phyllacea</i> (瓶花木)	0	0
<i>Sonneratia alba</i> (杯萼海桑)	0	0
<i>Sonneratia casoolaris</i> (海桑)	0	0
<i>Sonneratia hainanensis</i> (海南海桑)	0	0
<i>Sonneratia paracaseolaris</i> (拟海桑)	0	0
<i>Xylocarpus granatum</i> (木果楝)	0	0
Total	199	28

注: A: 分离的放线菌数; B: 分离的小双孢菌数。

Note: A: No. of actinomycete isolates; B: No. of *Microbispora* sp..

并且在 GA 培养基上的菌落比在 HV 培养基上的菌落更明显。干热 100°C 60 min 也可以分离得到小双孢菌,但平板上的优势菌是链霉菌,同时还分离到与小双孢菌属同一个科的链孢囊菌属和野野村菌属的菌株。

通过 16S rRNA 基因序列分析,19 株小双孢菌来自 6 个根际土壤样品,在聚类分析图中聚成 4 个类群(Cluster I - IV)。在第 1 个大类群(Cluster I)中,主要包含菌株 212028 等 12 株菌的序列。这 12 株菌又分 3 个小类群: 1) 包括菌株 212028、211021 和 212023,它们与 *M. rosea* IFO14044^T 的相似率分别为 98.8%、99% 和 99%; 2) 菌株 210436、210718 和 212115,它们与 *M. rosea* IFO14044^T 的相似率分别为 98.6%、98.8% 和 99.1%; 3) 菌株 212015

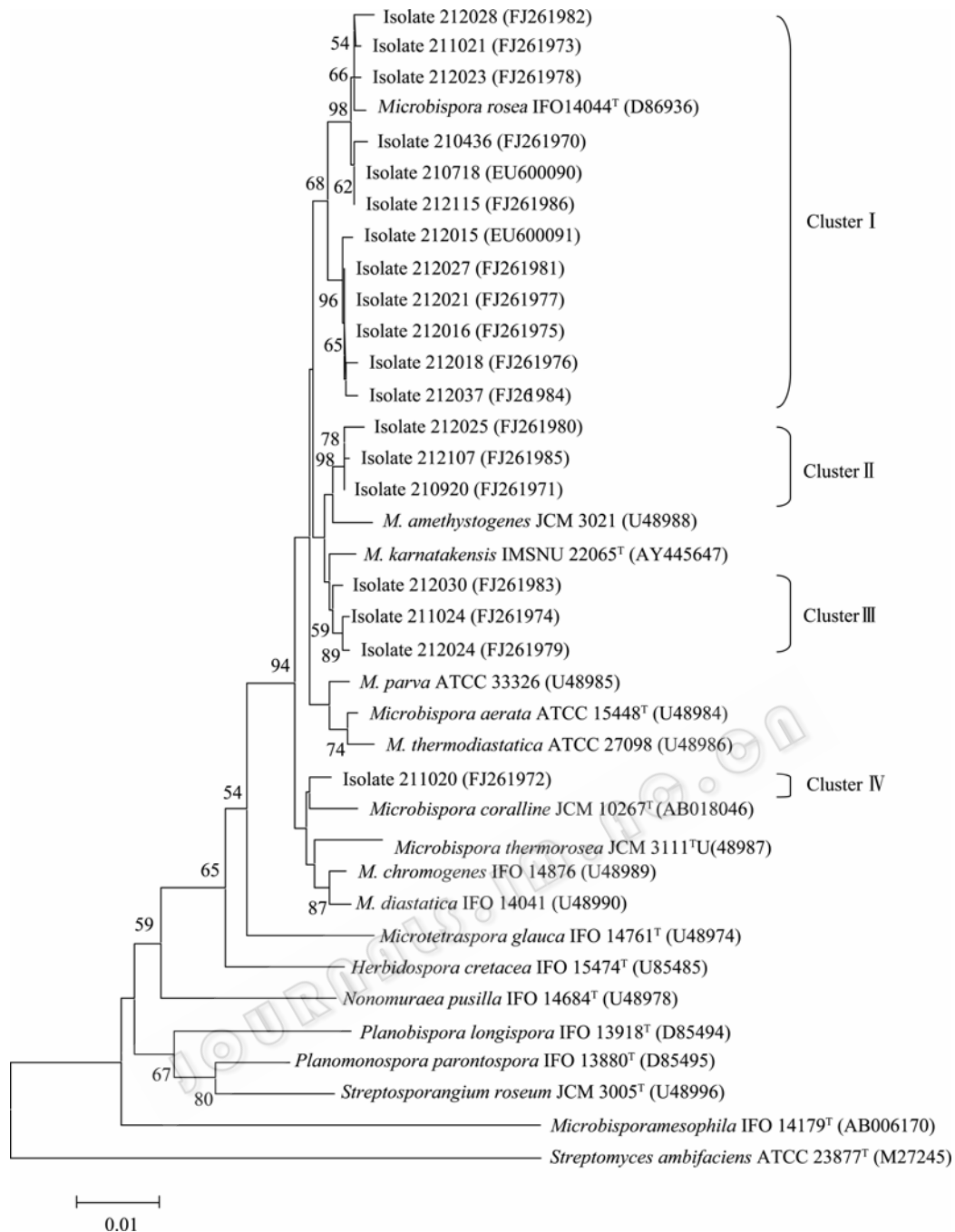


图3 基于19株分离菌株和部分已知小双孢菌的16S rRNA基因序列构建的聚类分析图

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences showing the relationship between 19 isolates and type strains of *Microbispora* species and selected organisms belonging to the family *Streptosporangiaceae*

Note: *Streptomyces ambifaciens* ATCC 23877^T (M27245) was used as the outgroup. Numbers at the nodes are percentage bootstrap values based on 1000 replicates; only values 50% or above are given. Bar, 1% sequence divergence. The tree was built by Bioedit 7.0 and Mega 4.0.

等6株菌, 它们的16S rRNA基因序列之间的相似率介于99%~99.8%, 与*M. rosea* IFO14044^T的相似率介于98%~98.5%, 是新种的可能性很大。第2个类群(Cluster)包括菌株210920、212025和212107, 它们与*M. amethystogenes* JCM 3021聚在一起, 16S rRNA基因序列相似率分别为99.2%、98.5%和

99.1%。第3个类群(Cluster)包括菌株212030、211024和212024, 它们和*M. karnatakensis* IMSNU 22065^T聚在一起, 16S rRNA基因序列相似率均为99.4%。值得注意的是, 第2、3类群中的6株菌之间的相似率都很高, 介于99%~99.9%, 形态特征和培养特征相似, 但是却和2个已知的亚种聚在2个

不同的分支。第4个类群(Cluster IV)只有菌株211020, 它和遗传距离最近的菌株 *M. corallina* JCM 10267^T 的16S rRNA 基因序列相似率仅为98.3%, 是新种的可能性非常大。其它研究结果表明, 这19株小双孢菌中有9株能在45°C 温度下生长, 具有耐热性; 菌株212030 在活性筛选中发现具有抗金黄色葡萄球菌和抗 caspase-3 活性。这19株菌之间的系统进化关系有待进一步研究, 需要通过 DNA-DNA 杂交验证是否存在新种。

本实验采集了23种红树植物的根际土壤, 均采用了相同的分离方法, 结果只从10个样品中分离得到放线菌, 其他样品预处理后的稀释液涂布平板均未发现放线菌的生长, 这可能与样品的理化性质有关, 因为没有分离到放线菌的样品含水率都比较高, 而且硫含量相对较高。只从6个样品中得到了小双孢菌, 这说明了选择性分离小双孢菌不仅受分离方法影响, 同时也受样品来源的影响。

致谢: 感谢海南省文昌市红树林保护区的工作人员李文泉在采样过程中提供的帮助, 感谢上海国家新药筛选中心李佳研究员课题组提供抗 caspase-3 活性筛选结果。

参 考 文 献

- [1] Nonomura H, Ohara Y. Distribution of actinomycetes in soil. II. *Microbispora*, a new genus of the *Streptomycetaceae*. *J Ferment Technol*, 1957, **35**: 307-311.
- [2] Nakajima Y, Kitpreechavanich V, Suzuki KI, *et al.* *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 1761-1767.
- [3] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践. 北京: 科学出版社, 2007, pp.400-402.
- [4] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*, 2005, **58**(1): 1-26
- [5] Okujo N, Inuma H, George A, *et al.* Bispolidides, novel 20-membered ring macrodiolide antibiotics from *Microbispora*. *J Antibiot*, 2007, **60**: 216-219.
- [6] Castiglione F, Lazzarini A, Carrano L, *et al.* Determining the structure and mode of action of Microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens. *Chemistry & Biology*, 2008, **15**: 22-31.
- [7] Pisano M, Sommer M, Lopez M. Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Microbiol Biotechnol*, 1986, **25**: 285-288.
- [8] Nawani NN, Kapadnis BP, Das AD, *et al.* Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **93**: 965-975.
- [9] Taechowisan T, Peberdy J, Lumyong S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2003, **19**: 381-385.
- [10] Gushterova A, Tonkova EV, Dimova E. Keratinase production by newly isolated Antarctic actinomycete strains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, **21**: 831-834.
- [11] 王岳坤, 洪葵. 红树林土壤细菌群落16S rDNA V3片段 PCR 产物的 DGGE 分析. *微生物学报*, 2005, **45**(2): 201-204.
- [12] Yan B, Hong K, Yu ZN. Archaeal communities in mangrove soil characterized by 16S rRNA gene clones. *J Microbiol*, 2006, **44**: 566-571.
- [13] 林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 等. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性. *海洋学报*, 2005, **27**(3): 133-141.
- [14] Hong K, Gao AH, Xie QY, *et al.* Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar Drugs*, 2009, **7**: 24-44.
- [15] 肖静, 许静, 谢庶洁, 等. 红树林放线菌的分离及其抗菌和抗肿瘤细胞活性. *应用与环境生物学报*, 2008, **14**(2): 244-248.
- [16] King WL, Hurst A. A note on the survival of some bacteria in different diluents. *J appl Bact*, 1963, **26**(3): 504-506.
- [17] Hayakawa M, Sadakata T, Kajiura T, *et al.* New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *J Ferment Bioengin*, 1991, **72**(5): 320-326.
- [18] Hayakawa M, Iino H, Takeuchi S, *et al.* Application of a method incorporating treatment with chloramine-T for the selective isolation of *Streptoporiaceae* from soil. *J Ferment Bioengin*, 1997, **84**: 599-602.
- [19] Takahashi Y, Matsumoto A, Seino A, *et al.* Rare actinomycetes isolated from desert soils. *Actinomycetologica*, 1996, **10**: 91-97.
- [20] Hayakawa M, Ohara Y. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol*, 1987, **65**: 501-509.