

一株具有广谱抗菌活性小单孢菌的分离和鉴定

龙中儿* 朱跃进 黄运红 付学琴

(江西师范大学生命科学学院 南昌 330022)

摘要: 从南昌瑶湖的农田土壤样品中分离到一株具有广谱抗菌活性的稀有放线菌。通过形态特征、培养特征、生理生化特性、细胞化学成分及 16S rRNA 基因序列等多相分类特征研究, 将该稀有放线菌鉴定为炭样小单孢菌。

关键词: 稀有放线菌, 分类鉴定, 16S rRNA 基因, 炭样小单孢菌

Isolation and Identification of a Strain of *Micromonospora* with Broad-spectrum Antimicrobial Activity

LONG Zhong-Er* ZHU Yue-Jin HUANG Yun-Hong FU Xue-Qin

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022)

Abstract: A rare strain of actinomycetes, with broad-spectrum antimicrobial activity, was isolated from the soil samples from the farmland in the area of Yaohu lake in Nanchang. The information about the taxonomic identification, such as the morphology, physiological properties, cell components and 16S rRNA gene sequences, suggested that the rare strain of actinomycetes was identified as *Micromonospora carbonacea*.

Keywords: Rare actinomycetes, Taxonomic identification, 16S rRNA gene, *Micromonospora carbonacea*

抗生素的一个重要来源是放线菌^[1]。随着对土壤中链霉菌属等常见放线菌的研究不断深入, 人们从中寻求到新抗生素等活性物质的概率越来越低, 很多学者都逐渐转向从海洋、火山等一些极端环境中筛选能产新抗生素的放线菌^[2-3], 并由此发现许多稀有放线菌(一般土壤的常规检出率低于 5% 的放线菌)也能产生疗效显著的抗生素, 如小单孢菌属放线菌能产生放线菌素、庆大霉素等^[4]。于是, 微生物抗生素的研发热点从链霉菌属放线菌转移到稀有放线菌^[5-8]。

本实验室从土壤中分离到一株具有广谱抗菌活性的炭样小单孢菌, 本文报道了该放线菌的分离及

其分类鉴定的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品: 来自南昌瑶湖地区农田、菜地和花生地土样各 1 份。取样时, 在取土点铲除地面植被和枯枝落叶及地表 10 cm 左右的表土, 然后切取土样, 每份 200 g 左右, 置于灭菌塑料袋中, 迅速带回实验室后平铺在灭菌培养皿内, 尽量无菌的状态下风干、研碎。

1.1.2 活性检测靶菌: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)、苏云

金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、铜绿假单孢菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)等活性检测靶菌均由江西师范大学生命科学学院微生物学实验室保存。

1.1.3 高氏 1 号培养基:按文献[9]方法配制。

1.1.4 制霉菌素——高氏 1 号培养基:取 1 片制霉菌素片(50 万单位/片,浙江震元制药有限公司产品)溶于灭菌蒸馏水中制成 45 IU/mL-55 IU/mL 的制霉菌素溶液。取该制霉菌素溶液 1 mL 于 1000 mL 灭菌高氏 1 号培养基中,即制得制霉菌素——高氏 1 号培养基^[10,11]。

1.1.5 营养琼脂培养基:天津市福晨化学试剂厂产品,按厂家说明配制。

1.1.6 发酵培养基:蔗糖 45 g, 黄豆粉 25 g, K_2HPO_4 0.2 g, NaCl 1 g, Na_2SO_4 0.1 g, $FeSO_4$ 0.01 g, $CaCO_3$ 3 g, 以蒸馏水溶解并定容至 1000 mL, pH7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 备用。

1.1.7 活性检测培养基:底层培养基:20 g 琼脂,加热溶解后以蒸馏水定容至 1000 mL, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 备用;上层培养基:检测发酵液对细菌的抗性时用添加 5 g 葡萄糖/L 的牛肉膏蛋白胨培养基,检测发酵液对真菌的抗性时使用马铃薯培养基。

1.2 方法

1.2.1 稀有放线菌的分离:将研碎土样置于无菌培养皿中,120℃ 预处理 1 h^[11],配制 1%(W/V)浓度的土壤悬浮液,取 0.2 mL 涂布于制霉菌素——高氏 1 号培养基表面,28℃ 培养 7 d,挑选经美蓝简单染色并镜检初步确定属于稀有放线菌的菌落,划线分离纯化后,营养琼脂斜面保存。

1.2.2 产抗生素稀有放线菌的筛选:以接种环从斜面保藏菌种中挑取 1 环孢子接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角烧瓶中,28℃、200 r/min 振荡培养 4 d, 4000 r/min 离心 20 min,收集上清得菌体的发酵液,4℃ 冰箱中保藏备用。然后采用管碟法^[9]进行功能筛选,能形成抑菌圈的即为产抗生素放线菌,并以游标卡尺采用十字交叉法测量抑菌圈

的直径,以抑菌圈直径的大小衡量放线菌的抗性强度。

1.2.3 形态观察:将放线菌在高氏 1 号培养基内插片培养(28℃),每天取插片观察至培养 21 d(所用显微镜为 Motic 数码显微互动教室/实验室 DM-BA200,内置 130 万像素 Motic 数码摄像系统,配 Motic Digital Class 1.1 及 Motic Images Advanced 3.1 计算机软件系统)。放线菌孢子形态及其着生方式用扫描电镜观察(日立 S-570 型扫描电镜)。

1.2.4 生长温度检测:将放线菌接种在高氏 1 号培养基中,分别于 28℃、37℃ 和 45℃ 培养 7 d-14 d,观察菌体生长情况。

1.2.5 培养特征和生理生化特性:按张纪忠^[12]等的方法进行研究。

1.2.6 细胞化学组分分析:依照文献[12,13]的方法进行。

1.2.7 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及其序列分析:参照文献[14]的方法提取基因组 DNA,然后 PCR 扩增 16S rRNA 基因。其中 PCR 扩增引物^[15]正向 Pf: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3; 反向 Pr: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACT-3。PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物送上海捷瑞公测序。

1.2.8 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析:16S rRNA 基因测序后,利用 Blast 搜索引擎从 GenBank 数据库中调出相关放线菌菌株的 16S rRNA 基因序列,用 Clustal X^[16] 软件进行多序列比对,用 PHYLIP 软件包^[17,18] 构建系统进化树,用 TreeView 应用软件^[18] 生成系统进化树,用 DNAMAN 软件分析同源性。

2 结果与分析

2.1 稀有放线菌的分离及其抗菌活性

通过稀有放线菌的分离和功能筛选,从农田土样中分离得到 1 株抗菌活性较强的稀有放线菌,编号为 JXNU-1,其抗菌谱如表 1 所示。

该放线菌发酵产物对金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌等革兰氏阳性细菌,伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、铜绿假单孢菌等革兰氏阴性细菌和真菌酿酒酵母都有强的

表 1 稀有放线菌 JXNU-1 发酵液的抗菌活性 Table 1 Antimicrobial activity of fermented broth from the rare strain of actinomycetes JXNU-1	
活性检测靶菌 Strain for activity detection	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibiting zone (mm)
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	20.8
藤黄八叠球菌(<i>Sarcina lutea</i>)	20.2
苏云金芽孢杆菌(<i>Bacillus thuringiensis</i>)	18.0
枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	19.8
伤寒沙门氏菌(<i>Salmonella typhi</i>)	21.2
福氏志贺氏菌(<i>Shigella flexneri</i>)	20.8
铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	20.2
酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	20.8
普通变形杆菌(<i>Proteus vulgaris</i>)	0
产气肠杆菌(<i>Enterobacter aerogenes</i>)	0
大肠埃希氏菌(<i>Escherichia coli</i>)	0
产黄青霉(<i>Penicillium chrysogenum</i>)	0
米根霉(<i>Rhizopus oryzae</i>)	0

抗菌活性,表明该放线菌具有广谱的抗菌活性。但其对产黄青霉,米根霉等霉菌及普通变形杆菌、产气肠杆菌、大肠埃希氏菌等革兰氏阴性菌未测出抗菌活性,其机理有待进一步研究。

2.2 形态特征

稀有放线菌 JXNU-1 在高氏 1 号培养基上培养,菌落圆形、隆起,培养基表面颜色在前 4 d 为黄色,到第 5 d 开始变为黑色,培养至 21 d 后,菌落表面全部变为黑色。油镜下观察到该放线菌的基内菌丝体很发达,在培养基内部的菌丝体茂密,菌丝连续不断裂,有分枝,有横隔;无气生菌丝;孢子球形、椭圆形,单个着生在基内菌丝体上,有的地方孢子成簇状生长(培养 7 d 后的菌丝体和孢子丝的显微形态如图 1 所示,其孢子的扫描电子显微镜观察结果如图 2 所示)。

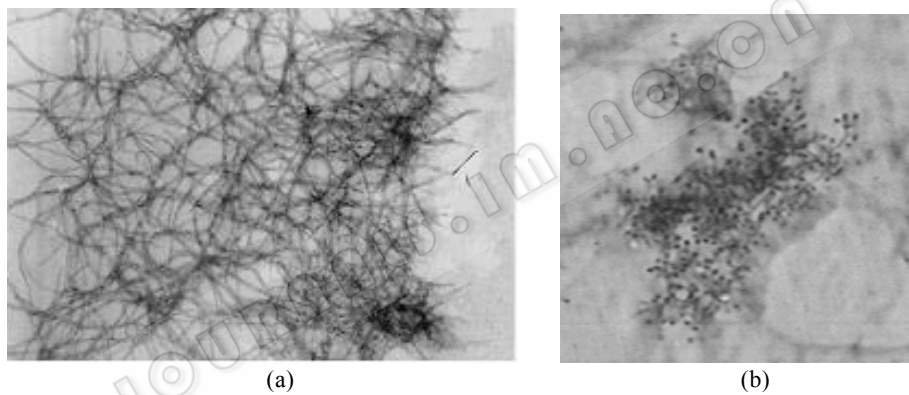


图 1 稀有放线菌 JXNU-1 的基内菌丝(a)和孢子(b)(×1000 倍)

Fig. 1 Morphological characteristics of the rare strain of actinomycetes JXNU-1 grown on Gause 1 medium for 7d at 28℃, showing the substrate mycelium (a) and spora (b) (×1000)

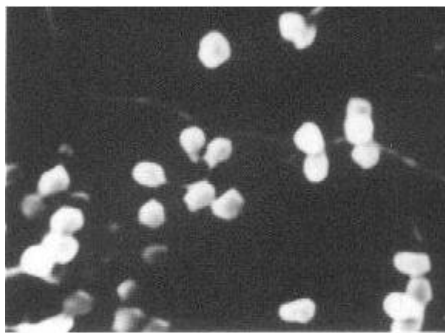


图 2 稀有放线菌 JXNU-1 孢子的扫描电镜图(×8000)

Fig. 2 Scanning electron micrograph of the spores of the rare strain of actinomycetes JXNU-1 grown on Gause 1 medium for 7d at 28℃ (×8000)

2.3 培养特征

稀有放线菌 JXNU-1 在高氏 1 号培养基上培养,28℃和 37℃时生长良好,但在 45℃不生长。在所供试的其他培养基中的生长状况(28℃)如表 2 所示:其菌丝颜色为浅黄色至深黄色,生长状况由中等至良好,孢子丝颜色由黑褐色至黑色、煤黑色等,无可溶性色素产生。

2.4 生理生化特征

稀有放线菌 JXNU-1 能分解淀粉和纤维素,能液化明胶,牛奶不凝固但胨化,硝酸盐还原为阳性,不产生黑色素和硫化氢;能利用 α-蜜二糖、L-阿拉伯糖、葡萄糖、D-半乳糖、β-乳糖、D-果糖、

表 2 稀有放线菌 JXNU-1 的培养特征
Table 2 Cultural characteristics of the rare strain of actinomycete JXNU-1

培养基 (Medium)	菌丝颜色 (Colour of mycelium)	菌丝生长状况 (Growth state of mycelium)	可溶性色素 (Soluble pigment)	孢子丝颜色 (Colour of spore-bearing mycelium)
蔗糖察氏琼脂	卵黄黄色	良好	无	煤黑色
马铃薯琼脂	卵黄黄色	良好	无	微褐沥青黑
燕麦粉琼脂	浅黄色	中等	无	煤黑色
无机盐淀粉琼脂	浅黄色	中等	无	灰黑色
葡萄糖酵母膏	黄褐色	良好	无	微褐沥青黑
伊莫松琼脂	金黄色	良好	无	煤黑色
甘油-天门冬酰胺琼脂	浅黄色	中等	无	微褐沥青黑
葡萄糖-天门冬酰胺琼脂	深黄色	良好	无	煤黑色

蔗糖、D-木糖和 D-核糖，但不能利用棉子糖、甘油和 L-鼠李糖。

2.5 细胞化学组分分析

对稀有放线菌 JXNU-1 全细胞糖型和细胞壁氨基酸组分分析，结果表明，细胞水解液中检测到葡萄糖和核糖，未检测到特征性糖；细胞壁氨基酸中含有甘氨酸和 meso-DAP，属于细胞壁 型。

2.6 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

对稀有放线菌 JXNU-1 16S rRNA 基因序列进行扩增并测序后，得到 1479 个有效碱基(提交 GenBank database 序列号为 EF583904)。将该序列与从 GenBank database 中得到的 *Micromonospora* 相关菌株的 16S rRNA 基因序列比对并建立系统发育树。所得到的进化树以自举抽样 1000 次进行分析，结果如图 3 所示。

2.7 分类鉴定结果分析

通过形态特征、培养特征和细胞化学组分分析的研究结果，同时根据《伯杰细菌鉴定手册》^[19]对小单孢菌属放线菌的描述，可将稀有放线菌 JXNU-1 归属于小单孢菌属。

16S rRNA 基因序列分析表明，稀有放线菌 JXNU-1 与目前所报道的炭样小单孢菌两个亚种 *Micromonospora carbonacea* subsp. *carbonacea* 和 *Micromonospora carbonacea* subsp. *aurantiaca* 的同源性最高，达到 99% 以上；同时，生理生化特征分析表明，除了硝酸盐还原和甘油利用特征不同之外，稀有放线菌 JXNU-1 的生理生化特征也与炭样小单孢菌的两个亚种 *Micromonospora carbonacea* subsp. *carbonacea* 和 *Micromonospora carbonacea* subsp. *aurantiaca* 极其相似(如表 3)。因此，可将稀有放线菌 JXNU-1 鉴定为炭样小单孢菌。

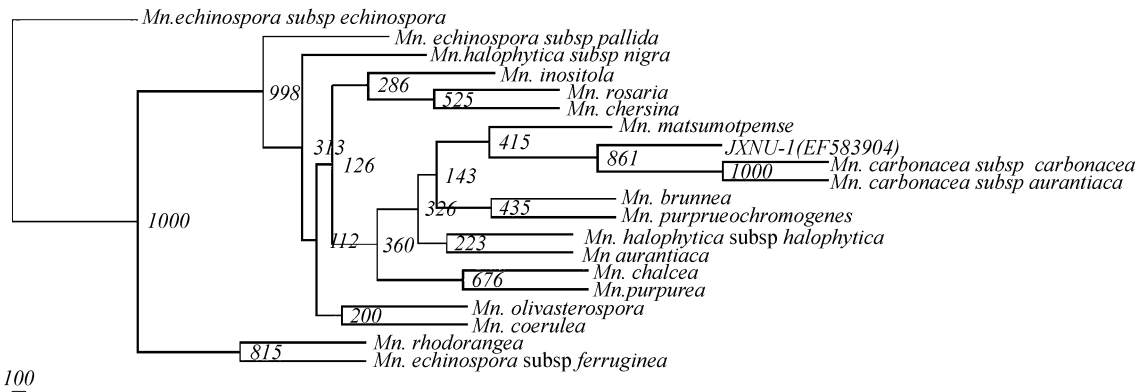


图 3 以 16S rRNA 基因序列同源性为基础的稀有放线菌 JXNU-1 系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of the rare strain of actinomycete JXNU-1 based on the sequence of 16S rRNA gene

表3 稀有放线菌 JXNU-1 与亲缘关系相近的两个菌株的生理生化特征的比较

Table 3 Comparison of physiological characteristics between the rare strain of actinomycetes JXNU-1 and sibship-similar strains

生理生化特征 (Physiological characteristics)	JXNU-1	<i>Micromonospora carbonacea</i> subsp <i>Carbonacea</i>	<i>Micromonospora carbonacea</i> subsp <i>aurantiaca</i>
明胶液化(Gelatin liquefaction)	+	+	+
淀粉水解(Amylohydrolysis)	+	+	+
牛奶凝固(Milk solidation)	—	—	—
牛奶胨化(Milk peptonization)	+	+	+
纤维素水解(Cellulose hydrolysis)	+	+	+
硝酸盐还原(Nitrate reduction)	+	+	—
黑色素产生(Melanin generation)	—	—	—
H ₂ S产生(H ₂ S generation)	—	ND	ND
-蜜二糖利用(-melibiose)	+	+	+
棉子糖利用(Raffinose)	—	—	—
L-鼠李糖利用(L-rhamnose)	—	—	—
L-阿拉伯糖利用(L-arabinose)	+	+	+
葡萄糖利用(Glucose)	+	+	+
D-半乳糖利用(D-galactose)	+	+	+
-乳糖利用(-lactose)	+	+	+
D-果糖利用(D-fructose)	+	+	+
蔗糖利用(Sucrose)	+	+	+
D-木糖利用(D-xylose)	+	+	+
甘油利用(Glycerol)	—	+	+
D-核糖利用(D-ribose)	+	+	+

+ : 阳性; - : 阴性; ND: 未检测

+ : Positive; - : Negative; ND: Not determined

3 结论

从南昌瑶湖农田土壤样品中分离到 1 株具有广谱抗菌活性的稀有放线菌。该稀有放线菌接种在高氏 1 号培养基平板上 28℃ 和 37℃ 培养时生长良好,但在 45℃ 不生长,形成的菌落圆形、隆起;基内菌丝体很发达,有分枝及横隔,无气生菌丝;孢子球形、椭圆形,单个或成簇着生于基内菌丝;菌丝颜色为浅黄色至深黄色,孢子丝颜色为黑褐色至黑色、煤黑色;能分解淀粉和纤维素,液化明胶,牛奶不凝固但胨化,硝酸盐还原阳性,不产生黑色素和硫化氢;细胞壁 II 型; 16S rRNA 基因序列与现已报道的炭样小单孢菌的两个亚种 *Micromonospora carbonacea* subsp. *carbonacea* 和 *Micromonospora carbonacea* subsp. *aurantiaca* 具有高度同源性;除了硝酸盐还原和甘油利用特征不同之外,其生理生化特征也与它们极其相似。上述结果充分表明所分离到的稀有放线菌属于炭样小单孢菌。

参考文献

- [1] 张致平. 抗菌药物研究进展. 中国抗生素杂志, 2002, 27(2): 67-79.
- [2] Fiedler HP, Bruntner C, Bull AT, *et al.* Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, 87(1): 37-42.
- [3] 刘 妍, 李志勇. 海洋放线菌研究的新进展. 生物技术通报, 2005, 21(6): 34-39.
- [4] 吴剑波, 张致平. 微生物药理学. 北京: 化学工业出版社, 2002, pp. 13-17.
- [5] Peric-Concha N, Long PF. Mining the microbial metabolome: a new frontier for natural product lead discovery. *Drug Discovery Today*, 2003, 8(23): 1078-1084.
- [6] Donadio S, Monciardini P, Alduina R, *et al.* Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, 2002, 99(3): 187-198.
- [7] Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, *et al.* Rare genera of actinomycetes as potential producers of a new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 78(3-4): 399-405.

- [8] Shomura T. Screening for new products of new species of Dactylosporangium and other actinomycetes. *Actinomycetology*, 1993, 7(2): 88.
- [9] 沈 萍. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1999, pp. 111-113, 214-215.
- [10] 胥秀英, 郑一敏, 温寿祯, 等. 土壤放线菌分离方法的初步研究. *生物学杂志*, 2000, 17(2): 16-17.
- [11] 李文均, 张忠泽, 姜成林. 几种主要稀有放线菌的选择性分离. *国外医药抗生素分册*, 2002, 23(1): 18-22.
- [12] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990, pp. 111-152.
- [13] 王 平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法. *微生物学通报*, 1986, 13(5): 228-231.
- [14] 郭天宇. 深海链霉菌 *Streptomyces* 的鉴定、发酵及其活性产物的初步分离. 中国海洋大学 2004 硕士学位论文.
- [15] Minciardini P, Sosio M, Cavaletti L, *et al.* New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *Microbiology Ecology*, 2002, 42: 419-429.
- [16] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, 1997, 25(24): 4476-4488.
- [17] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol*, 1987, 4: 406-425.
- [18] Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-rainey NL. Proposal for new hierarchic classification system, actinobacteria classis nov. *International journal of systematic bacteriology*, 1997, 47(2): 479-491.
- [19] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp. 1186-1198.

编辑部公告

中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中国科学院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 已取得北京市工商局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、医学索引(MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志(AJ)及《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器(如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材(如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜)及生化试剂(如各种酶、载体、试剂盒)等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售的各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提 示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请汇入以下新账号:

收款单位: 中国科学院微生物研究所

开户银行: 中国工商银行北京分行海淀西区支行

帐 号: 0200004509089117425

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武 文 王 闵

电子信箱: gg@im.ac.cn

网 址: <http://journals.im.ac.cn>

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

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