

# 一株杀黄孢链霉菌 IMB-14 的分离与鉴定

邹懿 刘莉 胡昌华\*

(西南大学药学院现代生物医药研究所 重庆 400716)

**摘要:** 采用薄膜过滤法从武当山采集土壤中分离到一株具有广谱抗菌活性的链霉菌, 命名为 IMB-14。通过对其抗菌活性、形态特征、培养特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列的多相分类研究, 结合代谢产物的性质鉴定该菌株为杀黄孢链霉菌(*Streptomyces xanthocidicus*)。该杀黄孢链霉菌的分离鉴定为新型抗菌及其抗癌活性物质的筛选奠定了基础。

**关键词:** 薄膜过滤法, 多相分类, 杀黄孢链霉菌, 抗生素 FR-900148

## The Isolation and Identification of Strain *Streptomyces xanthocidicus* IMB-14

ZOU Yi LIU Li HU Chang-Hua\*

(Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** The strain *Streptomyces* sp., nominated IMB-14, was isolated from the soil sample of WuDang Mountain by the method of cellulose ester membrane filter. The studies on antibiotic activities, morphological characteristics, cultural characteristics, physiological characteristics, 16S rDNA sequence analysis and the metabolite of strain IMB-14 showed that the strain IMB-14 was accordance with *Streptomyces xanthocidicus*. The study on the isolation and identification of strain *Streptomyces xanthocidicus* establishes a foundation on screening of novel antibacterial and antitumor agents.

**Keywords:** Cellulose ester membrane filter method, Polyphasic taxonomy, *Streptomyces xanthocidicus*, Antibiotic FR-900148

自 Waksman 发现链霉素以来, 放线菌的分离及其代谢产物的研究受到微生物学家及药学家的广泛关注。作为一类具有重要经济价值的微生物资源, 放线菌所产的生物活性物质占到所有微生物生物活性物质的 70%, 其中包括抗生素、免疫抑制剂和酶抑制剂等<sup>[1]</sup>。

武当山地处中国湖北省西北部丹江口市境内, 背倚苍茫千里的神农架原始森林, 气候属于北亚热带季风。独特的气候南北过渡属性赋予了这个地区丰富的微生物资源。本文从武当山所采集的土壤样

品中, 分离到一株具有广谱抗菌活性的链霉菌, 命名为 IMB-14, 通过对其抗菌活性、形态特征、培养特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析的多相分类研究结合代谢产物的性质显示该菌株为杀黄孢链霉菌(*Streptomyces xanthocidicus*)。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品:** 采集自武当山主峰天柱峰, 采集时间为 2007 年 4 月。

\* 通讯作者: Tel: 86-23-68250520; 信箱: chhhu@swu.edu.cn  
收稿日期: 2008-06-22; 接受日期: 2008-10-22

**1.1.2 活性检测菌:**金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* CMCC 26003、大肠杆菌 *Escherichia Coli* CMCC 44102、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* CMCC 10104、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* CMCC 63501、白色假丝酵母 *Candida albicans* CMCC 98001、耻垢分枝杆菌 *Mycobacterium Smegmatis* MC2 和藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* CNCC(B) 28001 均由重庆市药品检验所提供。

**1.1.3 分离培养基:**ISP2 培养基,培养基加入放线菌酮,终浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 1.2 土壤样品分离

土壤样品风干两周,110 $^{\circ}\text{C}$ 预处理 30 min,参照 Hirsch等<sup>[2]</sup>的方法,采用 0.22  $\mu\text{m}$ 的醋酸纤维素薄膜进行分离。

## 1.3 抗菌活性测试

采用琼脂移块法。

## 1.4 形态及培养特征观察

使用ISP2 培养基和插片法。显微镜观察形态,肉眼观察培养特征,记录气丝、基丝、色素情况等<sup>[3]</sup>。

## 1.5 生理生化特征观察

参照《放线菌系统学》推荐的培养基和方法<sup>[4]</sup>。

## 1.6 基因组 DNA 的提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增

参照Chun等<sup>[5]</sup>的方法提取总DNA和PCR扩增 16S rDNA,引物为通用保守引物 27f 和 1495r。

## 1.7 16S rDNA 测序及序列分析

测序交由上海英骏生物技术有限公司完成。测序结果与 GenBank 数据库中的已知序列进行 Blast 比对,确定分离菌株的分类地位。

## 1.8 菌株的发酵与发酵产物的 TLC 鉴定

参照Kuroda<sup>[6]</sup>等所给条件,进行 3 L 发酵罐发酵实验,对甲醇提取的代谢产物及用等体积 6 mol/L HCl 100 $^{\circ}\text{C}$ 水解 6 h后得到的产物分别进行TLC分析。TLC条件为:薄层板:GF<sub>254</sub>(青岛海洋化工);展开剂:乙醇:水=6:4(V/V);显色剂:0.1% 茚三酮乙醇溶液。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离及其抗菌活性的测定

本文采用薄膜过滤法,从所采集的土壤样品中,分离出了培养及形态特征各异的放线菌 32 株。根据两轮抗菌及其抗真菌活性的筛选,所分离到的

菌株都具有一定的抗菌活性,其中发现一株菌具有广谱的抗菌活性,并对 *C. albicans* CMCC 98001 和 *M. smegmatis* MC 的抗菌活性较强,命名为 IMB-14,结果见图 1 和表 1。

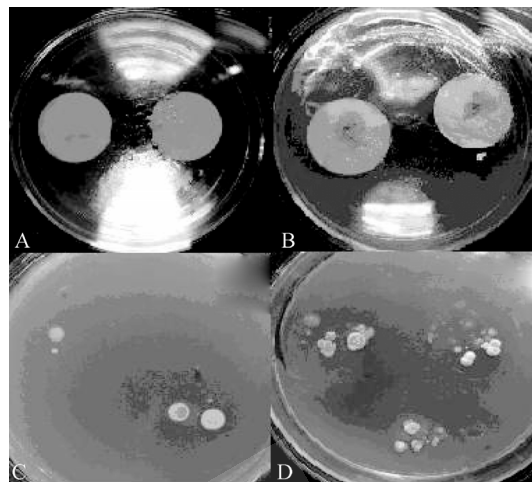


图 1 薄膜法分离放线菌流程

Fig. 1 Membrane filter isolation procedure for actinomycetes

注:A:点样后的情况;B:培养 3 d 后情况;C:揭下薄膜的情况;D:揭下薄膜后继续培养 2 d 情况。

Note:A: After spotting; B: Cultured three days; C: Unveil the membrane; D: Cultured two days after unveiling the membrane.

表 1 IMB-14 的抗菌活性结果  
Table 1 The antimicrobial activities of IMB-14

测试菌株 Test strain	初筛 Frist secreening	复筛 Second screening
<i>S. aureus</i> CMCC 26003	+	+
<i>E. coli</i> CMCC 44102	+	+
<i>P. aeruginosa</i> CMCC 10104	-	-
<i>B. subtilis</i> CMCC 63501	+	+
<i>C. albicans</i> CMCC 98001	++	++
<i>M. smegmatis</i> MC2	++	++
<i>M. luteus</i> CNCC(B) 28001	+	+

注:++:阳性;+:弱阳性;-:阴性。

Note: ++: Positive; +: Weakly positive; -: Negative.

### 2.2 形态及培养特征观察

菌株 IMB-14 在 ISP2 培养基上的形态特征及其在不同的培养基上的培养特征如图 2 和表 2 所示。从图 2 中可以看出,该菌株气生菌丝长而直或稍有柔曲,呈单分枝状。基内菌丝丰富,分枝较多,交织紧密,无横隔,不断裂。在不同培养基上的培养特征可以看出(表 2),气生菌丝和基内菌丝在不同的观察

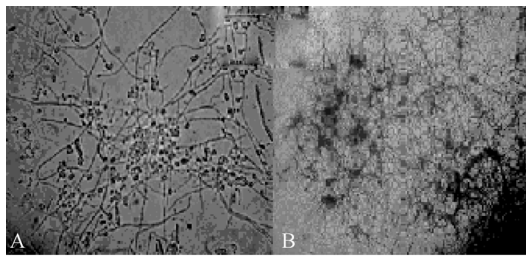


图 2 IMB-14 的气生菌丝(A)及其基内菌丝(B)的形态特征(×1000 倍)

Fig. 2 The aerial hypha (A) and basal filament (B) morphological characteristics of strain IMB-14

注: A: 气生菌丝; B: 基内菌丝.

Note: A: Aerial hypha; B: Basal filament.

时间下, 变化不明显。可溶性色素的产生有一定的培养条件限制性。

### 2.3 生理生化特性及其碳源利用情况

菌株IMB-14 的生理生化特征和碳源利用情况见表 3 所示, 从表中可以看出, 其明胶液化呈阳性, 牛奶凝固、胨化呈弱阳性或胨化缓慢, 淀粉水解呈阳性, 黑色素产生呈阳性, H<sub>2</sub>S产生呈阴性。能利用葡萄糖、木糖、果糖、阿拉伯糖、麦芽糖、甘露糖、蔗糖等作为碳源; 对乳糖的利用可疑; 不能利用肌醇、山梨醇作为碳源。IMB-14 的最适生长温度为

表 2 IMB-14 菌株在不同培养基上的培养特征  
Table 2 Cultural characteristics of the strain IMB-14 in different medium

培养基 Medium	气生菌丝 Aerial hypha		基内菌丝 Basal filament		可溶性色素 Soluble pigment	
	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d
葡糖天冬素 琼脂培养基	灰白, 丰富 粉状	浅黄色, 絮状	黑色	米黄色	无	无
酵母粉麦芽 精琼脂培养基	白色, 丰富 粉状	灰白, 丰富 粉状	黑色	黑褐色	无	无
燕麦粉琼脂 培养基	灰白, 丰富 粉状	灰白, 丰富 粉状	黑色	棕褐色	黄绿色	黄绿色
蔗糖硝酸盐 琼脂培养基	灰白, 不丰富, 粉状	灰白, 不丰富, 粉状	棕褐色	黑色	浅黄色	浅黄色
甘油天冬素 琼脂培养基	灰白, 丰富	灰白, 丰富	浅黄褐色	浅黄褐色	微黄色	微黄色
营养琼脂 培养基	无或极少, 不粉, 滑腻	无或极少, 不粉, 滑腻	不明显	乳脂色	微黄色	微黄色
无机盐淀粉 培养基	黄绿色 不丰富	黄绿色 不丰富	黄棕色	黄棕色	无	无
马铃薯块	白色	黄褐色	黑褐色	黑褐色	无	浅黑色

表 3 IMB-14 的生理生化特征及其碳源利用情况  
Table 3 The partial physiological and biochemical characteristics and the carbon utilization of strain IMB-14

生理生化特征 Physiological characteristics	IMB-14 菌株 IMB-14 strain	碳源利用 Carbon utilization	IMB-14 菌株 IMB-14 strain	
			7 d	14 d
明胶液化(Gelatin liquefaction)	+	木糖(xylose)	+	+
牛奶凝固(Milk solidation)	+	果糖(fructose)	+	+
牛奶胨化(Milk peptonization)	-	阿拉伯糖(arabinose)	+	+
黑色素产生(Melanin generation)	+	麦芽糖(maltose)	++	++
淀粉水解(Amylohydrolysis)	+	蔗糖(sucrose)	++	++
H <sub>2</sub> S产生(H <sub>2</sub> S generation)	-	甘露糖(mannose)	+	+
最适生长温度(Optimum growth temperature)	28°C~30°C	葡萄糖(glucose)	++	++
最适生长 pH(Optimum growth pH value)	7.2~7.4	肌醇(inose)	-	-
		山梨醇(sorbitol)	-	-
		乳糖(lactose)	±	±

注: ++: 阳性; +: 弱阳性; -: 阴性; ±: 利用可疑.

Note: ++: Positive; +: Weakly positive; -: Negative; ±: Doubtful.

28°C~30°C, 最适生长 pH 为 7.2~7.4。

#### 2.4 16S rDNA 的序列分析及其系统进化树的建立

由上海英骏生物技术有限公司测定, IMB-14 的 16S rDNA 序列全长 1398 bp。将整个序列提交到 GenBank 数据库中进行 BLAST, 获取与实验菌株相似的典型菌株的 16S rDNA 序列, 选定与 IMB-14 菌株核苷酸同源性达 97% 以上的菌株, 用 ClustalX 软件结合 MEGA 软件采用 neighbor-joining 法构建以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树, 用 Bootstrap analysis 方法评估系统发育树, 如图 3 所示。抽样 1000 次得到相应的置信值标于系统发育树的分支点上。测序结果分析显示, IMB-14 菌株的 16S rDNA 与北里链轮丝菌(*Streptomyces kitasatoensis*)、杀黄孢链霉菌(*Streptomyces xanthocidicus*)、津岛链霉菌(*Streptomyces tsukiyonensis*)的同源性达 99%, 在系统进化树上处于同一分支。

#### 2.5 IMB-14 菌株代谢产物的 TLC 分析

菌株 IMB-14 的发酵产物的 TLC 分析所示, 在  $R_f$  0.69 处呈现出一个和茛三酮呈特异反应的紫红色产物点, 且无其它产物点, 其盐酸水解发酵液在与缬氨酸显色斑点的水平线上出现了显色斑点, 见图 4。此代谢产物的性质与文献报道的杀黄孢链霉菌所产抗生素 FR-900148 相同<sup>[6]</sup>。

### 3 讨论

链霉菌作为土壤放线菌中的优势菌群, 长期的菌种筛选工作集中于此。但传统菌种分离技术导致了大量缺乏明确鉴定的分离菌株被重复分离和使用, 严重影响着新的生物活性物质的筛选效率<sup>[7]</sup>。本文采取了比较新颖的薄膜过滤法, 采用 0.22  $\mu\text{m}$  的醋酸纤维素薄膜作为筛选手段, 使得筛选过程中的细菌及其真菌的干扰大大降低, 从而极大地减少了工作量, 提高了筛选效率。在筛选过程中, 醋酸纤维素

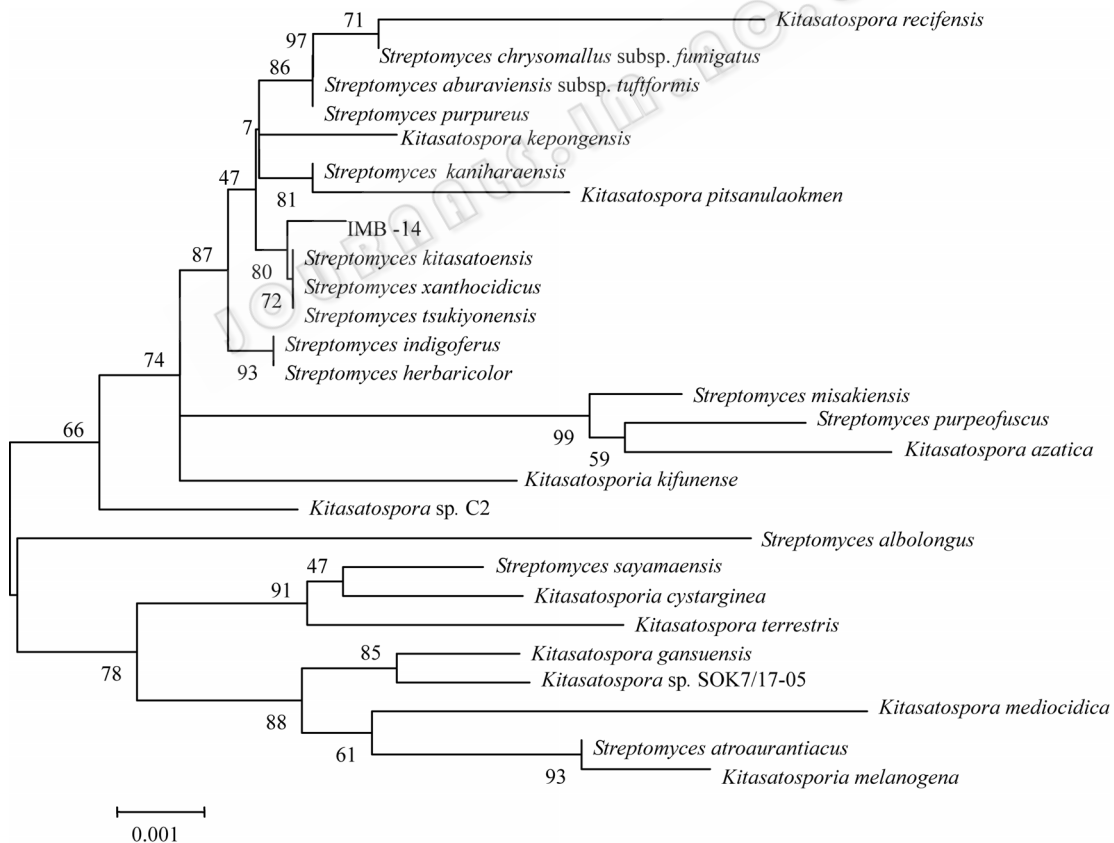


图 3 菌株 IMB-14 及其从 GenBank 数据库中调集的相关属种构建的以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树状关系图

Fig. 3 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among the strain IMB-14 and other related strains downloaded from GenBank

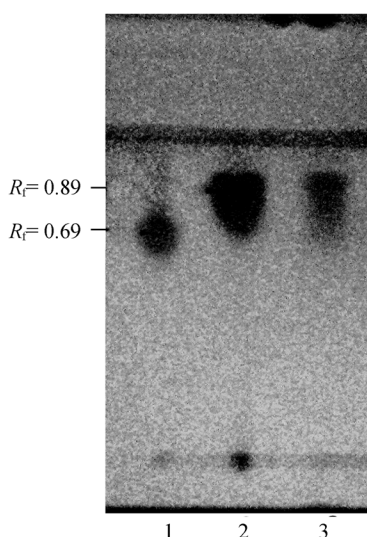


图 4 IMB-14 菌株发酵液 TLC 检测结果

Fig. 4 The TLC detect result of the IMB-14 strain

1 : 发酵液; 2 : 缬氨酸溶液; 3 : 6 mol/L 盐酸水解发酵液.

1 : Fermentation broth; 2 : Valine solution; 3 : Hydrolytic broth by 6 mol/L HCl.

薄膜的微孔大小起到了关键作用, 不同的孔径大小可能会使筛选出的放线菌的种类有所差别<sup>[2]</sup>。

本文所筛选出的菌株IMB-14 在抗菌活性、菌种形态、培养特征及其生理生化指标方面都与文献报道的杀黄孢链霉菌基本一致, 但也有细微差别, 比如菌株IMB-14 能利用甘露糖而文献报道的杀黄孢链霉菌不能利用<sup>[6]</sup>。系统进化树及其代谢产物化学性质的初步研究进一步佐证了IMB-14 为杀黄孢链霉菌。以此说明, 采用多相分类的观点进行菌种鉴定是一项复杂的系统工程。

含卤素抗生素一般具有较高的生物活性, 在抗菌和抗癌活性方面发挥着其他抗生素无法比拟的优势, 通过各种方法对天然产物进行卤化已成为目前提高生物活性的有效策略<sup>[8]</sup>。抗生素FR-900148 是由杀黄孢链霉菌产生的一种高效低毒的含氯抗生素, 由学者Yoshio Kuroda等最先发现, 分离并定义, 其通过抑制细菌细胞壁合成起作用, 能够抑制革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌, 但对铜绿假单胞杆菌无作用<sup>[6]</sup>, 这点与本文所分离的IMB-14 的抗菌活性相符。除此而外, 通过琼脂移块法, 我们发现菌株IMB-14 的分泌产物, 对真菌*C. albicans*也有较好的抑菌效果, 这样的结果类似于开环的他汀类物质所产生的抗真菌活性<sup>[9]</sup>。Kuroda等<sup>[10]</sup>通过对FR-900148

进行分子结构的测定发现, 该物质是一个含有缬氨酸的两性分子, 且具有C-Cl键, 易溶于水和甲醇, 茚三酮显色呈阳性, 这点与本文所分离的IMB-14 代谢产物的化学性质相符, 结构式如图 5 所示。后来Yasuda等<sup>[11]</sup>证明FR-900148 应该是个开环的链状化合物, 但其他理化性质和生物学活性都与先前的报道一致, 如图 6 所示。除此而外, 杀黄孢链霉菌还能产生萜环类强抗癌活性物质Respinomycins家族<sup>[12-14]</sup>, 由此说明, 杀黄孢链霉菌在生产抗菌及其抗癌活性物质方面都具有极大的开发价值。

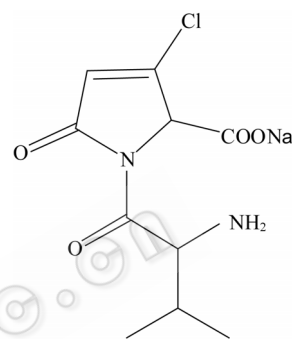


图 5 先前报道的 FR-900148 结构

Fig. 5 Previous structure of FR-900148

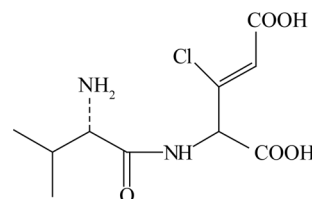


图 6 真正的 FR-900148 结构

Fig. 6 Accurate Structure of FR-900148

致谢: 感谢柳云帆同学在土壤采集中提供的帮助; 感谢冉茜同学在菌种分离过程中提供的帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*, 2005, **58**(1): 1-26.
- [2] Hirsch CF, Christensen DL. Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **46**(4): 925-929.
- [3] 周德庆. 微生物学实验教程. 北京: 高等教育出版社, 2006, pp.56-57.
- [4] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学. 北京: 科学出版社, 2007, pp.40-53.

- [5] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, **45**(2): 240–245.
- [6] Kuroda Y, Okuhara M, Goto T, *et al.* FR-900148, a new antibiotic. I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, 1980, **33**(3): 259–266.
- [7] von Bubnoff A. Seeking new antibiotics in nature's backyard. *Cell*, 2006, **127**(5): 867–869.
- [8] Neumann CS, Fujimori DG, Walsh CT. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. *Chem Biol*, 2008, **15**(2): 99–109.
- [9] Ferron MAV, Lopez JLC, Perez JAS, *et al.* Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, **21**(2): 123–125.
- [10] Kuroda Y, Okuhara M, Goto T, *et al.* FR-900148, a new antibiotic. . Structure determination of FR-900148. *J Antibiot (Tokyo)*, 1980, **33**(3): 267–271.
- [11] Yasuda N, Sakane K. Revised structure and the chemical transformations of FR900148. *J Antibiot (Tokyo)*, 1991, **44**(7): 801–802.
- [12] Ubukata M, Tanaka C, Osada H, *et al.* Respinomycin A1, a new anthracycline antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*, 1991, **44**(11): 1274–1276.
- [13] Ubukata M, Osada H, Kudo T, *et al.* Respinomycins A1, A2 B, C and D, a novel group of anthracycline antibiotics. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)*, 1993, **46**(6): 936–941.
- [14] Ubukata M, Uzawa J, Osada H, *et al.* Respinomycins A1, A2, B, C and D, a novel group of anthracycline antibiotics. . Physico-chemical properties and structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)*, 1993, **46**(6): 942–951.

## 编辑部公告

### 关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前,随着生物技术的飞速发展,微生物学涵盖的领域越来越广,交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外,基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果,以及该领域学科的热点难点问题,充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用,促进学科发展,为某个领域的科研人员提供一个交流的平台,《微生物学通报》编委会决定自2008年起,每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展,及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果,以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人,申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后,申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑,负责组织稿件、确定审稿专家,并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划,现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面,请申请者仔细阅读;
2. 提交形式:请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表;填写好之后,以E-mail附件的形式发送到编辑部信箱:tongbao@im.ac.cn, 并在邮件主题中注明:“专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问,请咨询编辑部,联系方式:邮件tongbao@im.ac.cn 或电话010-64807511。