

研究报告

欧洲疮痂链霉菌 F5 的鉴定及其抗菌活性

郑文艺^{#1}, 韩海燕^{#1}, 崔海超¹, 傅岳峰¹, 李欣悦¹, 袁肖寒^{*2}, 宋金凤³, 顾成波^{*1}

- 1 东北林业大学化学化工与资源利用学院 林业生物制剂教育部工程研究中心 森林植物生态学教育部重点实验室 黑龙江省林源活性物质生态利用重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040
- 2 东北农业大学生命科学与生物技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150030
- 3 东北林业大学林学院 森林生态系统可持续经营教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

郑文艺, 韩海燕, 崔海超, 傅岳峰, 李欣悦, 袁肖寒, 宋金凤, 顾成波. 欧洲疮痂链霉菌 F5 的鉴定及其抗菌活性[J]. 微生物学报, 2022, 49(6): 2111-2123

Zheng Wenyi, Han Haiyan, Cui Haichao, Fu Yuefeng, Li Xinyue, Yuan Xiaohan, Song Jinfeng, Gu Chengbo. Characterization and antipathogenic activity of *Streptomyces europaeiscabiei* F5 from the rhizosphere of pigeon pea[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2111-2123

摘要:【背景】木豆(*Cajanus cajan*)是一种具有多种药理活性的药用植物, 目前对其根际功能放线菌的认识和研究有限, 有必要对其应用开发潜力进行研究。【目的】从木豆根际土中筛选一株对植物病原菌和常见病原菌具有广谱拮抗活性的放线菌菌株, 鉴定菌株的分类地位、相关代谢产物及可能的生物合成途径, 为该菌株的开发应用提供数据支撑。【方法】以 7 种常见植物病原真菌及 8 种常见病原菌为指示菌, 采用平板对峙法和滤纸片扩散法筛选具有广谱抗菌活性的放线菌菌株, 基于形态观察与系统发育分析对该菌株进行分类鉴定, 并通过高分辨质谱和超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)对活性菌株的次生代谢产物进行鉴定与验证。采用 PCR 扩增菌株聚酮合成酶 I (polyketide synthase, PKS-I) 和非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)基因, 明确其活性代谢产物可能的生物合成途径。【结果】通过抑菌试验筛选得到拮抗放线菌 F5, 确定其为欧洲疮痂链霉菌(*Streptomyces europaeiscabiei*), F5 菌株基因组中含有编码 PKS-I 和 NRPS 合成的相关基因, 采用高分辨质谱和 UPLC-MS/MS 从其发酵液中鉴定并确证了格尔德霉素与大黄素

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2021C015); 中央高校基本科研业务费专项资金(2572020DP06); 黑龙江头雁创新团队计划(林木遗传育种创新研究团队); 森林生态系统可持续经营教育部重点实验室基金(KFJJ2021YB01)

[#]对本文贡献相同

Supported by: Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation of Joint Guidance Project (LH2021C015); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2572020DP06); Heilongjiang Touyan Innovation Team Program (Tree Genetics and Breeding Innovation Team); Open Grant for Key Laboratory of Sustainable Forest Ecosystem Management (Northeast Forestry University), Ministry of Education (KFJJ2021YB01)

[#]These authors equally contributed to this work

***Corresponding authors:** E-mail: YUAN Xiaohan: yuanxiaohana@163.com; GU Chengbo: dilisatis@163.com

Received: 2021-10-08; **Accepted:** 2021-12-12; **Published online:** 2022-02-10

两种具有抗菌活性的次生代谢产物。【结论】首次筛选鉴定了一株木豆根际放线菌 *Streptomyces europaeiscabiei* F5, 该菌株具有广谱抑菌活性, 可代谢产生格尔德霉素和大黄素等活性物质, 具有在农业和医药领域的应用潜力, 值得进一步研究。

关键词: 木豆; 欧洲疮痂链霉菌; 抗菌活性; 次生代谢产物

Characterization and antipathogenic activity of *Streptomyces europaeiscabiei* F5 from the rhizosphere of pigeon pea

ZHENG Wenyi^{#1}, HAN Haiyan^{#1}, CUI Haichao¹, FU Yuefeng¹, LI Xinyue¹,
YUAN Xiaohan^{*2}, SONG Jinfeng³, GU Chengbo^{*1}

1 Key Laboratory of Forest Plant Ecology of Ministry of Education, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Ecological Utilization of Forestry-Based Active Substances, Engineering Research Center of Forest Bio-Preparation of Ministry of Education, College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

2 Life Science and Biotechnology Research Center, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

3 Key Laboratory of Sustainable Forest Ecosystem Management-Ministry of Education, School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] Pigeon pea (*Cajanus cajan*) is a medicinal plant with a variety of pharmacological activities. Considering the limited understanding and research on actinomycetes in the rhizosphere of pigeon pea, it is necessary to study their application and development potential. [Objective] An actinomycete strain with broad-spectrum antagonistic activity against plant pathogens and common pathogens was screened out from the rhizosphere soil of pigeon pea. The taxonomic status, metabolites and possible biosynthetic pathways were identified to provide data support for the development and application of the strain. [Methods] With 7 plant pathogenic fungi and 8 common pathogens as the indicators, plate confrontation method and filter paper diffusion method were used to screen out the actinomycete strain with broad-spectrum antagonistic activity. The selected strain was identified based on morphological characteristics and phylogenetic tree, and the secondary metabolites of the strain were detected by UPLC-Q-Exactive high-resolution mass spectrometry and UPLC-MS/MS. The polyketide synthase I (PKS-I) and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) genes of the strain were amplified by PCR to clarify the biosynthetic pathways of the antimicrobial substances. [Results] The actinomycete F5 with broad-spectrum antagonistic activity was screened out and identified as *Streptomyces europaeiscabiei*. The strain was able to produce active metabolites like geldanamycin and emodin. The genes encoding PKS-I and NRPS were presented in strain F5. [Conclusion] *Streptomyces europaeiscabiei* F5 from the rhizosphere of pigeon pea is isolated and identified for the first time. It has broad-spectrum antagonistic activity and can produce antimicrobial substances like geldanamycin and emodin, thus demonstrating great application potential in agriculture and medicine and worth of further research.

Keywords: *Cajanus cajan*; *Streptomyces europaeiscabiei*; antimicrobial activities; secondary metabolites

放线菌是一类革兰氏阳性、高 GC 含量和具有分枝状菌丝体的细菌, 广泛分布于自然界各种生态环境中。放线菌是活性天然产物的重要来源。目前在医药、兽药和农业实践中使用的天然抗生素中大约有 2/3 从放线菌中分离而来, 其中约 75% 来自链霉菌属^[1-2]。

土壤是放线菌及其活性代谢产物的一个重要来源, 目前从传统环境中获得新的放线菌资源及新的活性化合物越来越困难。科学家们逐渐把目光投向一些新的特殊环境(如海洋、盐湖、火山口、盐碱地等)。近年来药用植物根际放线菌的研究也受到越来越多的关注^[3]。由于根系可能会分泌一些特殊成分(如氨基酸、脂肪酸、有机酸、酚类、植物生长调节剂、甾醇、糖和维生素等)进入植物根际土壤, 使根际土壤成为一个特殊的微生态环境^[4]。一些药用植物根际放线菌不仅对植物病原菌具有强烈的拮抗活性^[5], 而且对常见耐药病原菌也表现出显著的抑菌活性^[6]。

木豆(*Cajanus cajan*)是一种生长在热带和亚热带的木本食用豆类。在我国主要分布在海南、云南、贵州等长江以南地区。木豆具有多种药用价值, 可治疗溃疡、痢疾、腹泻、麻疹、黄疸、肝炎、糖尿病、膀胱结石、支气管炎等疾病^[7]。目前有关木豆根际微生物的报道多为根瘤菌共生固氮方面的研究^[8-10], 对木豆根际功能放线菌的认识和研究有限, 属于尚未被大量挖掘的潜在农用与药用微生物资源。

基于此, 本研究以腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)等 7 种常见农业植物病原真菌及大肠杆菌(*Escherichia coli*)等 8 种常见病原菌为指示菌, 对前期从东北黑土分离获得的木豆根际放线菌进行抗菌活性筛选, 以期获得一株具有广谱抗

菌活性的放线菌菌株, 明确其种属分类地位, 并对该菌株的次生代谢产物进行鉴定与验证, 探讨活性菌株代谢产物可能的生物合成途径。本研究有助于探明木豆特异根际放线菌作为抗菌微生物资源的潜力, 为后期其在农业和医药领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

放线菌菌种: 供试木豆根际放线菌由本课题组前期从东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室药用植物园(哈尔滨)木豆根际土壤中分离获得并保存。

植物病原菌禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)、轮枝镰孢菌(*Fusarium verticillioides*)、腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)、水稻立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、向日葵核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、玉米大斑凸脐蠕孢菌(*Setosphaeria turcica*)、木贼镰孢菌(*Fusarium equiseti*)和常见病原菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、黏质沙雷菌(*Serratia marcescens*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)均为本实验室保藏菌株。

1.1.2 培养基

供试菌株活化和形态观察培养基: 高氏 1 号培养基的配方参考文献[11]; 拮抗放线菌活性筛选培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA); 液体发酵培养基:

酵母麦芽培养基(international streptomyces project No.2 medium, ISP2)的配方参考文献[11]。

1.1.3 主要试剂和仪器

卡那霉素标准品, 北京索莱宝科技有限公司; 分析纯乙酸乙酯, 天津市致远化学试剂有限公司; 色谱级甲醇, 北京百灵威公司; 格尔德霉素、大黄素标准品, 中国药品生物制品检定所; 细菌 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; PCR 反应试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司。恒温培养箱, 天津东联电子技术开发有限公司; PCR 仪和 UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪, ThermoFisher 公司; Agilent 1290 UPLC-6460 Triple Quad MS/MS 和 Agilent 1290-6460 三重四级杆液质联用仪, Agilent 公司。

1.2 木豆根际放线菌的活化

从 4 °C 冰箱中取出保存在斜面培养基的 3 株放线菌菌株 F5、K2 和 S9, 用接种针挑取单菌落, 接种在 GS 培养基上, 放置在 28 °C 恒温培养箱中培养, 生长 7 d 后, 划线接种在新的 GS 培养基中, 培养 7 d 即得到活化后的菌株。

1.3 木豆根际放线菌抗菌特性的筛选

采用平板对峙法测定木豆根际放线菌 F5、K2 和 S9 对 7 种常见植物病原菌的抑菌活性。将供试的 7 种病原菌接种于 PDA 培养基上, 培养一周后使用。用无菌打孔器(直径 9 mm)取生长旺盛的病原菌接种在 PDA 平板中央, 在距离病原菌 20 mm 处, 用灭菌接种棒接种待测的木豆放线菌, 以只接种病原菌的平板为对照, 每个处理 3 次重复。28 °C 恒温倒置培养 5–7 d, 观察菌落的生长情况。待对照长满平板时, 计算抑制率。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落半径} - \text{处理组菌落半径}}{\text{对照组菌落半径} - \text{菌饼半径}} \times 100\%。$$

采用滤纸片法(滤纸片直径 9 mm, 杭州双

圈滤纸有限公司)测定木豆根际放线菌 F5、K2 和 S9 的发酵产物对 8 种常见病原菌的抑制作用。将放线菌接种于 ISP2 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 摇床振荡培养 7 d 得到待测放线菌发酵液。四层纱布过滤后, 取 100 mL 滤液用等体积乙酸乙酯萃取无细胞发酵液 3 次, 然后在 35 °C 下旋蒸至干燥得粗提物, 加入 1 mL 色谱级甲醇溶解, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 保存在 4 °C 冰箱, 备用。

将 8 种常见病原菌接种在 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 摇床振荡培养 24 h, 用棉签稀释涂布在 LB 固体培养基上。在距中央 20 mm 处放上载有 20 μL 菌株粗提物的滤纸片, 以载有等体积甲醇的滤纸片为阴性对照, 以载有等体积卡那霉素溶液(20 μg/mL)的滤纸片为阳性对照, 每个处理重复 3 次。37 °C 恒温培养 24–48 h, 观察记录抑菌圈大小。

1.4 活性菌株 F5 的鉴定

1.4.1 菌落形态观察

将活性菌株 F5 接种于高氏 1 号培养基, 28 °C 培养 7–15 d, 观察记录菌株气生和基底菌丝的形态和颜色, 以及菌落在平板上的特征、孢子团的颜色和可扩散色素的颜色。

1.4.2 16S rRNA 基因序列扩增与分析

将放线菌 F5 接种于 ISP2 液体培养基中, 于 28 °C、180 r/min 摇床振荡培养 7 d, 获得放线菌 F5 培养液, 10 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 备用。

采用试剂盒提取基因组 DNA, 以 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增。上游引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'; 下游引物为 1492R: 5'-ACGGTTACCTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系(25 μL): 2×San Taq PCR Mix 12.5 μL, 27F (10 μmol/L) 2 μL, 1492R (10 μmol/L) 2 μL, DNA 模板

1 μL , ddH₂O 7.5 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 59 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 55 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 将 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对, 采用 MEGA 7.0 软件构建 F5 菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育树。

1.5 放线菌 F5 抗菌物质鉴定

1.5.1 样品溶液的制备

放线菌 F5 接种于 ISP2 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床振荡培养 7 d, 获得放线菌发酵液, 四层纱布过滤后, 等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 旋干得粗提物, 加入 1 mL 色谱级甲醇溶解, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.5.2 高分辨质谱鉴定抗菌活性成分

采用 UPLC-Q-Exactive orbitrap 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪对菌株 F5 代谢产物进行分析鉴定, 色谱条件: 色谱柱: Hypersil Gold aQ C₁₈ 柱(100 mm \times 2.1 mm \times 1.9 μm); 流速为 0.35 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 2 μL ; 流动相: A 相为 0.1%甲酸水溶液, B 相为乙腈; 洗脱条件: 0–3 min, 5% (B); 3–20 min, 5%–98% (B); 20–28 min, 98% (B); 28.0–28.1 min, 98%–5% (B); 28.1–30.0 min, 5% (B)。Q Exactive Focus 质谱条件: 扫描模式: Full Mass/ddMS², 扫描范围 (m/z): 100–1 500, 喷雾电压: 3 500/3 200 V (+/-); 蒸发温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管温度: 320 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气流速: 45 arb; 辅助气流速: 15 arb; 分辨率: 70 000; MS² 分辨率: 17 500; 碰撞能: 15、30、60。

1.5.3 UPLC-MS/MS 确证抗菌活性物质

分别称取大黄素、格尔德霉素标准品 10 mg

于 10 mL 棕色瓶中, 加甲醇超声溶解后补充甲醇至刻度线, 得 1 mg/mL 的母液。取少量母液用甲醇稀释至一系列不同浓度的标准溶液, 使用前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 收集滤液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存。

采用 Agilent 1290-6460 三重四极杆液质联用仪对粗提物和标品进行分析。色谱条件: 色谱柱: 安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱(50 mm \times 2.1 mm \times 1.8 μm); 流速为 0.4 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 2 μL ; 流动相: A 相为水, B 相为乙腈; 洗脱条件为: 0–2 min, 25% (B); 2.0–3.5 min, 25%–80% (B); 3.5–4.0 min, 80%–25% (B); 4.0–5.1 min, 25% (B)。质谱条件: 质谱系统: Aligent 1290-6460 三重四极杆液质联用仪, 扫描模式: MS²Scan, 扫描范围 (m/z): 100–1 500; 雾化气压力: 50, 温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 气体流速: 10 L/min; 毛细管电压: 3 500/3 200 V (+/-)。数据使用安捷伦 MassHunter 进行采集。

1.6 聚酮合成酶 I (PKS-I) 和非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因扩增

提取菌株 F5 的基因组 DNA 并分别对 PKS-I 和 NRPS 基因进行 PCR 扩增。PKS-I 基因采用简并引物^[12] K1F (5'-TSAAGTCSAACATCGGCAC-3')和 M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAG-3')。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。NRPS 基因采用简并引物^[13] A3F (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3')和 A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3')。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 1%琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测, 并回收 PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 木豆根际放线菌抗菌活性筛选结果

2.1.1 对植物病原菌的抗菌活性

以 7 种常见植物病原菌为供试菌, 采用平板对峙法对 3 株木豆根际放线菌 K2、F5 和 S9 的抑菌活性进行评价, 如图 1 所示, 放线菌 F5 对 7 种植物病原菌均有一定抑制效果, 其中对

腐皮镰孢菌(*F. solani*)、玉米大斑凸脐蠕孢菌(*S. turcica*)、木贼镰孢菌(*F. equiseti*)抑制效果明显, 抑制率均超过 70%; 对水稻立枯丝核菌(*R. solani*)、轮枝镰孢菌(*F. verticillioides*)、向日葵核盘菌(*S. sclerotiorum*)抑制作用较强, 抑菌率在 60%–70%之间; 对禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)抑制效果相对较弱, 抑菌率低于 50%。



图 1 木豆根际放线菌对 7 种植物病原菌的抑制效果 7 种植物病原菌的实验组和对照组: 腐皮镰孢菌(A1、A2), 玉米大斑凸脐蠕孢菌(B1、B2), 木贼镰孢菌(C1、C2), 水稻立枯丝核菌(D1、D2), 轮枝镰孢菌(E1、E2), 向日葵核盘菌(F1、F2), 禾谷镰孢菌(G1、G2)

Figure 1 Inhibitory effect of actinomycetes from *Cajanus cajan* on seven plant pathogens. Experimental group and control group of seven plant pathogens: *F. solani* (A1, A2), *S. turcica* (B1, B2), *F. equiseti* (C1, C2), *R. solani* (D1, D2), *F. verticillioides* (E1, E2), *S. sclerotiorum* (F1, F2), *F. graminearum* (G1, G2).

2.1.2 对常见病原菌的抗菌活性

以粘质沙雷菌、鲍曼不动杆菌、大肠杆菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和粪肠球菌 8 种常见病原菌为供试菌, 采用滤纸片法对 3 种木豆根际放线菌 K2、F5、S9 的抗菌活性进行研究。

如图 2 所示, 放线菌 F5 对 8 种常见病原菌有抑制作用, 其中对大肠杆菌(图 2A)和黏质沙雷菌(图 2B)抑制效果明显, 抑菌圈直径超过 20 mm; 对枯草芽孢杆菌(图 2C)、金黄色葡萄球菌(图 2D)和粪肠球菌(图 2E)抑制作用较强, 抑菌圈直径在 15–20 mm 之间; 对鲍曼不动杆菌(图 2F)和白色念珠菌(图 2G)相对较弱, 对铜绿假单胞菌(图 2H)无抑制作用。因此, 菌株 F5 对上述 8 种常见病原菌的抑制效果均优于卡那霉素。

2.2 菌株 F5 的种属鉴定结果

2.2.1 菌落形态观察

如图 3A 所示, 在高氏 1 号固体培养基上, 对抗菌活性最好的菌株 F5 进行培养, 发现菌株

生长状况良好; 菌落小且呈斑点状, 边缘不规则, 表面干燥无光泽; 有放射状菌丝产生, 其气生菌丝呈灰白色, 基内菌丝呈浅棕色, 不产生可溶性色素。

2.2.2 16S rRNA 基因序列扩增与系统进化分析

自木豆根际土中分离得到的放线菌 F5 菌株, 其 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库的比对分析结果显示, 与其相似性最高的菌株分别是 *Streptomyces stelliscabiei* CFBP4521^T (99.86%, 登录号为 NR_116532.1)、*Streptomyces scabiei* ATCC49173^T (99.86%, 登录号为 NR_116531.1) 和 *Streptomyces europaeiscabiei* CFBP 4497^T (99.79%, 登录号为 NR_116533.1), 由此确定该菌株属于链霉菌属。通过 MEGA 7.0 邻接法构建系统发育树, 如图 3B 所示。发育树结果显示, F5 与欧洲链霉菌(*Streptomyces europaeiscabiei*) 支持率为 89%, 结合该菌株的形态特征, 初步鉴定为欧洲链霉菌(GenBank 登录号为 OK448161)。

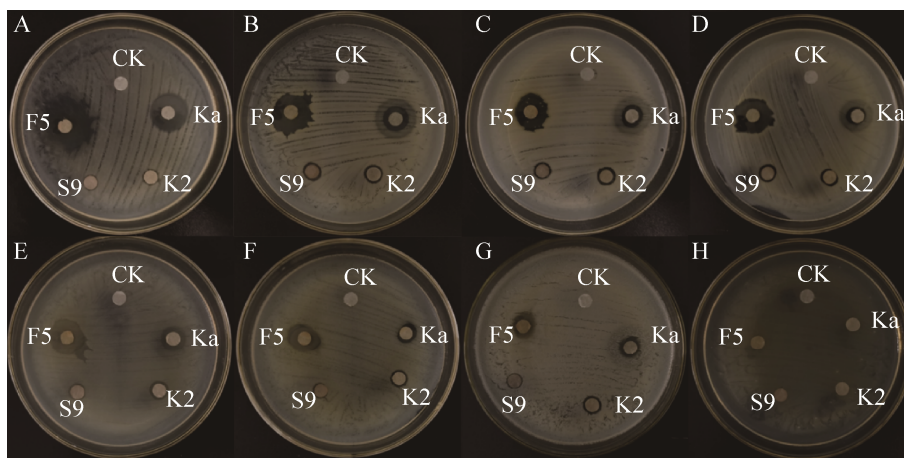


图 2 木豆根际土放线菌对 8 种常见病原菌的抑制效果 A: 大肠杆菌; B: 黏质沙雷菌; C: 枯草芽孢杆菌; D: 金黄色葡萄球菌; E: 粪肠球菌; F: 鲍曼不动杆菌; G: 白色念珠菌; H: 铜绿假单胞菌。CK: 甲醇; Ka: 卡那霉素

Figure 2 Inhibitory effect of actinomycetes from *Cajanus cajan* on eight common clinical pathogens. A: *E. coli*; B: *S. marcescens*; C: *B. subtilis*; D: *S. aureus*; E: *E. faecalis*; F: *S. aureus* G: *C. albicans*; H: *P. aeruginosa*. CK: Methanol; Ka: Kanamycin.

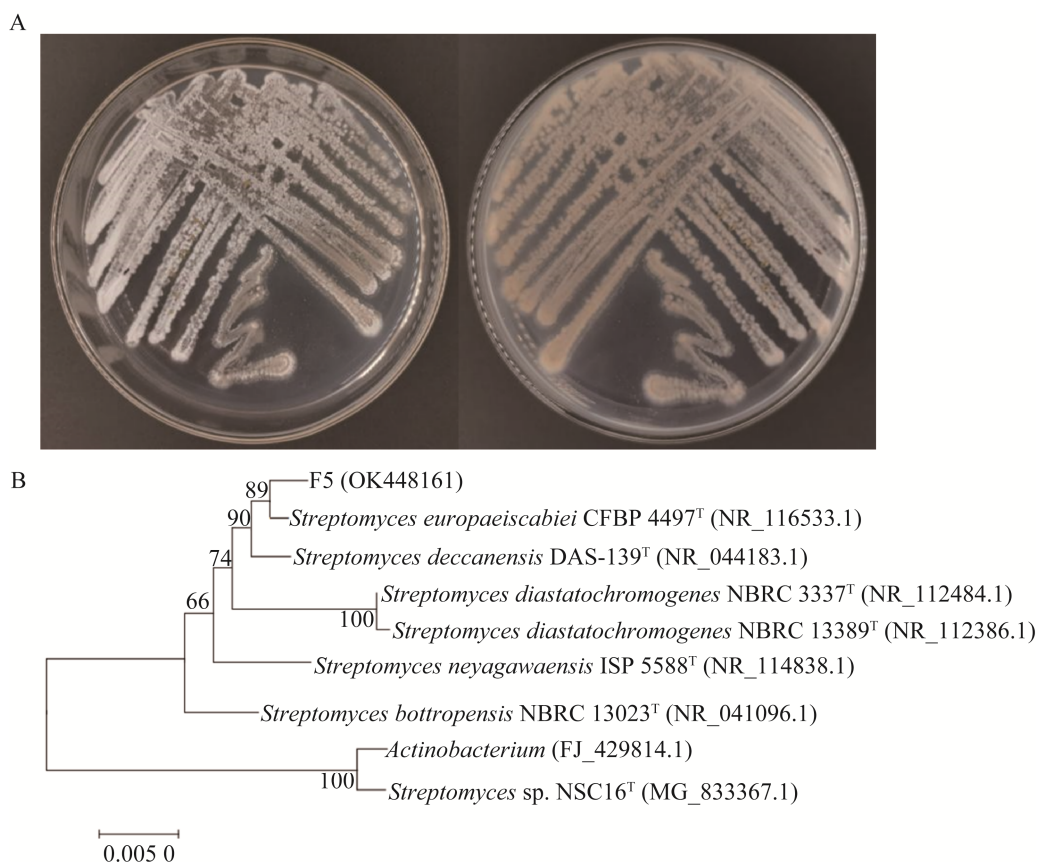


图3 菌株F5的形态与分子鉴定 A: 菌株F5在GS培养基于28 °C培养10 d的菌落形态; B: 菌株F5基于16S rRNA基因序列构建的neighbor-joining系统发育树(分支点上的数字: bootstrap支持率; 标尺刻度0.005: 序列差异的分支长度)

Figure 3 Morphological and molecular identification of strain F5. A: Colony morphology of strain F5 on GS medium after 10 days of incubation at 28 °C; B: Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain F5 (numbers in each branch points: percentages supported by bootstrap; Bar=0.005: nucleotide divergence)

2.3 放线菌F5抗菌活性物质鉴定结果

利用UPLC-Q-Exactive orbitrap四级杆—静电场轨道高分辨质谱联用仪与UPLC-MS/MS在放线菌F5发酵液中鉴定出2种与抗菌有关的化合物: 化合物1和化合物2, 如图4所示。

化合物1, 准分子离子峰 $[M+Na]^+$ 的 m/z 为583.255 49 (图4A), 推测其元素组成为 $C_{29}H_{40}N_2O_9$ 。进一步锁定一级质谱信息, 进行二级质谱扫描, 在二级质谱图中进行靶向筛选, 获得MS/MS碎片(图4B), 其 m/z 分别为

522.241 15和539.268 01。分子离子化合物可能得到 Na^+ , 产生 m/z 583.257 20 $[M+Na]^+$ 离子峰, 二级质谱中 m/z 583.257 20的离子通过麦氏重排脱去氨甲酰基连同羟基后形成的 m/z 522.241 15的 $[M+Na-HOCONH_2]^+$ 碎片离子, m/z 539.268 01碎片离子则是由 $[M+Na]^+$ 脱去氨甲酰基形成的 $[M+Na-CONH_2]^+$, 通过对整个裂解过程进行分析, 初步推测化合物1为格尔德霉素。为进一步确认, 对格尔德霉素标准品和放线菌F5发酵液提取物进行UPLC-MS/MS鉴定, 放线菌F5

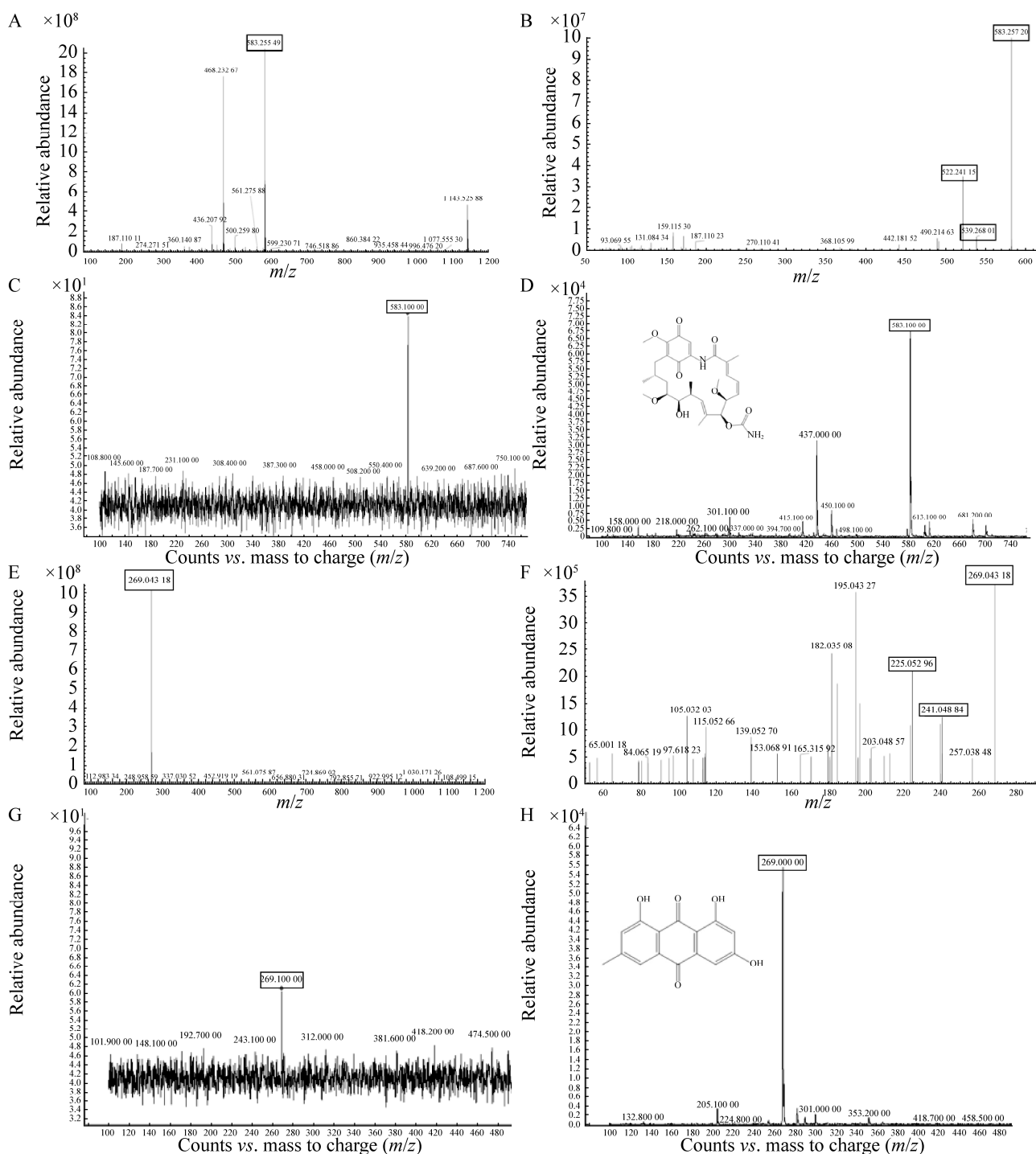


图 4 放线菌 F5 发酵产物中格尔德霉素与大黄素的鉴定 A: 化合物 1 一级质谱; B: 化合物 1 二级质谱; C: 放线菌 F5 产格尔德霉素的一级质谱图; D: 格尔德霉素标准品的一级质谱图; E: 化合物 2 一级质谱; F: 化合物 2 二级质谱; G: 放线菌 F5 产大黄素的一级质谱图; H: 大黄素标准品的一级质谱图
 Figure 4 Identification of geldanamycin and emodin in actinomycete F5 extracts. A: Primary mass spectra of compound 1; B: Secondary mass spectra of compound 1; C: Primary mass spectra of geldanamycin produced by actinomycete F5; D: Primary mass spectra of standard geldamycin; E: Primary mass spectrum of compound 2; F: Secondary mass spectra of compound 2; G: Primary mass spectra of emodin produced by actinomycete F5; H: Primary mass spectra of standard emodin

发酵液中目标化合物的碎片(图 4C)与标准品一致(图 4D), 可以确证化合物 **1** 为格尔德霉素。

化合物 **2**, 准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的 m/z 为 269.043 18 (图 4E), 推测其元素组成为 $C_{15}H_{10}O_5$ 。在二级质谱图中进行靶向筛选, 获得 MS/MS 碎片(图 4F), m/z 241.048 84, 225.052 96。推测分子离子化合物失去 H^+ 产生 m/z 269.043 18 $[M-H]^-$ 离子峰, 二级质谱中 m/z 269.043 18 丢失中性 CO 后获得 m/z 241.048 84 的 $[M-CO-H]^-$ 碎片离子, m/z 225.052 96 碎片离子则是由碎片离子 m/z 241.048 84 再失去一个氧原子所产生的 $[M-CO-O-H]^-$ 碎片离子。通过对整个裂解过程进行分析, 初步推测化合物 **2** 为大黄素。为进一步确认, 对大黄素标准品和放线菌 F5 发酵液提取物进行 UPLC-MS/MS 鉴定, 放线菌 F5 发酵液中目标化合物的碎片(图 4G)与标准品(图 4H)一致, 可以确证化合物 **2** 为大黄素。

2.4 PKS-I 和 NRPS 基因检测结果

聚酮合成酶(polyketide synthase, PKS)和非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)是调控次级代谢物聚酮类物质和非核糖体多肽合成的关键酶。这些聚酮和非核糖体多肽化合物具有抗菌、抗肿瘤等生物活性^[14-15]。利用简并引物对放线菌 F5 的 I 型聚酮合成酶(PKS-I)与非核糖体肽类(NRPS)合成酶基因进行了 PCR 扩增, 凝胶电泳检测结果如图 5 所示, 发现在 1 200–1 400 bp 与 700 bp 左右可以从该菌株中分别扩增出与预期值相近的 PKS-I 片段和 NRPS 片段。将测序后的 PKS-I 和 NRPS 基因序列在 NCBI 数据库中进行相似度比对, 结果显示其 PKS-I 基因与 *Actinoplanes* sp. ID05-A0637 (AB432241.1)相似度达 98.73%, NRPS 基因与 *Sterptomyces marinus* (AB492022.1)相似度达 98.5%。该结果表明了放线菌 F5 含有编码聚酮类、非核糖体肽类的抗生素生物合成基因, 能够产生聚酮类和非核糖体肽类抗生素, 据此初步明确了该菌株抗菌的作用机制。

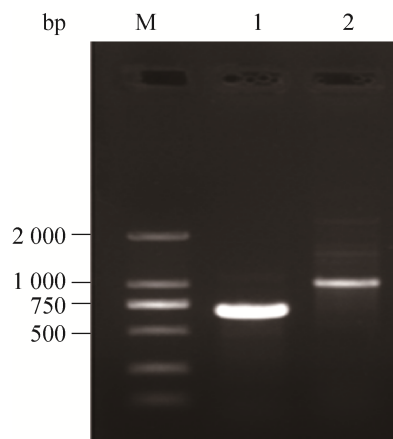


图 5 菌株 F5 基因组中 NRPS 和 PKS-I 基因扩增
M: 标准分子量标记; 1: NRPS; 2: PKS-I

Figure 5 PCR amplification of NRPS and PKS-I genes from strain F5. M: Standard molecular weight marker; 1: NRPS; 2: PKS-I.

3 讨论与结论

Hiltner 在 1904 年首次提出了根际的概念, 建议将根系表面和直接受根系影响的土壤区域称为根际^[16]。根际存在的代谢物为微生物的生长和繁殖提供了有利条件。根际是植物-土壤-微生物相互作用、物质和能量交换及信号交流的重要界面^[17]。根际微生物的数量和种类远高于根际以外的微生物^[18], 并且根际放线菌产生抗菌物质和其他生理活性物质的比例也显著高于根际周围土壤来源的放线菌^[19]。袁丽杰等从 60 种药用植物根际土壤分离出属于 17 个不同属的 900 余株根际放线菌, 显示出药用植物根际放线菌类群和数量的多样性^[20]。

本研究通过体外抗菌活性筛选获得了一株具有广谱抗菌活性的木豆根际放线菌 F5, 经形态学与分子生物学初步鉴定为欧洲疮痂链霉菌(*Streptomyces europaeiscabiei*), 该菌株对腐皮镰刀菌、玉米大斑凸脐蠕孢菌等 7 种植物病原真菌和大肠杆菌、粘质沙雷菌等 8 种常见病原菌具有广谱抗性。

通过 UPLC-Q-Exactive focus 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用仪和 UPLC-MS/MS 验证, 发现放线菌 F5 可产生格尔德霉素、大黄素 2 种活性代谢产物。放线菌次生代谢产物通常包含一系列活性组分, 本研究还通过 mzVault、mzCloud 及 ChemSpider 数据库进行比对与谱图解析, 除格尔德霉素和大黄素外还鉴定出包括 3-[(3-甲酰胺基-2-羟基苯甲酰基)氨基]-8-己基-2,6-二甲基-4,9-二氧基-1,5-二氧酮-7-基 3-甲基丁酸酯、5-{2-[(5,6-二乙基-2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基]-1-羟乙基}-2-氧代-1,2-二氢-8-喹啉基 β -D-吡喃葡萄糖醛酸、2'-脱氧-2'-[(3,5-二甲氧基苯甲酰基)氨基]-N-(1-萘甲基)腺苷等 10 余种代谢组分, 通过对鉴定组分的文献检索分析发现, 抗菌活性报道主要集中于格尔德霉素与大黄素 2 种代谢产物^[21,22], 但这 2 种活性物质具体是以单独作用或以协同作用方式发挥抗菌活性需在将来工作中进一步研究。鉴于放线菌 F5 的广谱抗菌活性, 推测格尔德霉素与大黄素将以协同作用方式发挥抗菌活性。

格尔德霉素(geldanamycin, GDM)是由吸水链霉菌产生的苯醌型安莎类抗生素, 具有抗癌、抗真菌、免疫调节、抗炎等生物活性^[21]。格尔德霉素是一种 Hsp90 抑制剂, 能与热休克蛋白 Hsp90 结合并特异性抑制该分子伴侣的功能, 使肿瘤细胞内诸多重要蛋白质迅速降解, 从而抑制肿瘤细胞的生长并引发肿瘤细胞自发凋亡^[23], 对许多革兰氏阳性菌和一些革兰氏阴性菌具有抗菌活性, 还具有抗流感病毒 H5N1 活性。研究表明格尔德霉素对念珠菌也具有体外抗真菌活性^[24]。

大黄素是一种天然蒽醌类衍生物, 广泛存在于大黄、虎杖、何首乌等中草药中^[25], 也可由各种类型的曲霉、青霉和黄丝曲霉产生^[26]。目前大黄素的合成在放线菌中尚未见报道。大

黄素对革兰氏阳性菌有抑制作用, 尤其是对芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果显著^[22], 这与本研究中表现出来的抑菌结果较为吻合。本研究中 F5 代谢产物对粪肠球菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌和大肠杆菌、粘质沙雷菌等革兰氏阴性菌的抑菌效果均较强, 但对鲍曼不动杆菌和白色念珠菌抑菌效果相对较弱。研究表明大黄素的抑菌活性与大黄素能破坏细胞壁和细胞膜的完整性有关^[27]。

近年来, 基于功能基因预测代谢产物的方法在发掘天然产物的实践中受到广泛关注^[12]。对菌株 F5 抗生素合成基因进行检测, 结果表明该放线菌基因组中存在 PKS- I 与 NRPS 基因, 提示该菌株可能通过合成聚酮类和非核糖体肽类抗生素发挥广谱的抗菌作用。放线菌抗菌基因表达的代谢产物与其培养条件密切相关, 在常规培养条件下放线菌中通常存在一些沉默基因簇, 它们只在合适的培养条件下才启动表达, 合成相应的代谢产物^[13], 除 PKS- I 与 NRPS 合成途径外, 菌株 F5 也有可能利用其他途径或抑菌机制达到抑菌效果。木豆根际放线菌 F5 菌株多样与独特的代谢特征使其具有新型抑菌剂开发的潜力, 也可作为药物先导化合物开发的候选资源。

自然界中的欧洲疮痂链霉菌(*Streptomyces europaeiscabiei*)常从马铃薯种植区感染疮痂病的马铃薯块茎上分离获得, 是马铃薯疮痂病的一种致病菌^[28-29]。目前普遍认为链霉菌的种类受生境(如土壤、海洋、火山口、植物内生放线菌、昆虫肠道等)和气候因素影响较大, 其分布存在明显的地域性^[30-31]。同一链霉菌(种属名相同)因分离环境不同, 微生物的组成、功能和代谢可能存在很大差异。本研究从健康木豆植株根际中分离出的欧洲疮痂链霉菌(*Streptomyces*

europaeiscabiei) F5 尽管与感染马铃薯疮痂病的病原菌属种名相同,但菌株分离环境不同,其生物活性和代谢产物也不尽相同。

利用放线菌的次生代谢产物制备生物制剂与医用抗生素,在农业和临床医药领域已获得广泛应用。已有欧洲疮痂链霉菌(*Streptomyces europaeiscabiei*)发酵制备生物制剂防治马铃薯晚疫病的专利报道^[32]。然而尚未发现特异产格尔德霉素和大黄素且对腐皮镰刀菌等 7 种植物病原真菌和大肠杆菌等 8 种临床病原菌具有广谱抑菌作用的活性菌株的报道。在后续研究中,可优化目标菌株的培养条件,并利用代谢工程手段对菌株活性代谢产物的调控进行深入研究,为该菌株在农业和医药领域的应用提供宝贵的菌种资源。

REFERENCES

- [1] Franco-Correa M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodríguez MX, Barea JM. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities[J]. *Applied Soil Ecology*, 2010, 45(3): 209-217
- [2] Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A. Biologically active secondary metabolites from actinomycetes[J]. *Open Life Sciences*, 2012, 7(3): 373-390
- [3] 李晓雯, 王继红, 王柯坛. 人参病原拮抗菌的筛选及抑菌活性的鉴定[J]. *东北林业大学学报*, 2019, 47(9): 91-95
Li XW, Wang JH, Wang KT. Screening and identification of an antagonistic strain against phytopathogen and its antipathogenic activity[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2019, 47(9): 91-95 (in Chinese)
- [4] 陈龙池, 廖利平, 汪思龙, 肖复明. 根系分泌物生态学[J]. *生态学杂志*, 2002, 21(6): 57-62, 28
Chen LC, Liao LP, Wang SL, Xiao FM. A review for research of root exudates ecology[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2002, 21(6): 57-62, 28 (in Chinese)
- [5] Hu JY, Li L, Peng G, Li YQ, Xu LH, Guan HL, Zhao LX, Miao CP. *Nocardia panacis* sp. nov., a novel actinomycete with antiphytopathogen activity isolated from the rhizosphere of *Panax notoginseng*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(2): 165-174
- [6] Dede A, Güven K, Şahin N. Isolation, plant growth-promoting traits, antagonistic effects on clinical and plant pathogenic organisms and identification of actinomycetes from olive rhizosphere[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 143: 104134
- [7] Pal D, Mishra P, Sachan N, Ghosh AK. Biological activities and medicinal properties of *Cajanus cajan* (L.) Mill sp.[J]. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2011, 2(4): 207-214
- [8] Dukare A, Paul S, Arambam A. Isolation and efficacy of native chitinolytic rhizobacteria for biocontrol activities against *Fusarium* wilt and plant growth promotion in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.)[J]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2020, 30: 56
- [9] Dudeja SS, Khurana AL. Interaction between pigeon-pea rhizobia and pigeon-pea cultivars during different years[J]. *Zentralblatt Für Mikrobiologie*, 1983, 138(4): 293-297
- [10] Datta C, Basu PS. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*[J]. *Microbiological Research*, 2000, 155(2): 123-127
- [11] 张月静. 7 种植物内生和根际放线菌的分离鉴定及抗菌活性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2015
Zhang YJ. Identification and antibacterial activity of the endophytic and rhizospheric actinomycetes from seven plants[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [12] Han DD, Wang LY, Luo YP. Isolation, identification, and the growth promoting effects of two antagonistic actinomycete strains from the rhizosphere of *Mikania micrantha* Kunth.[J]. *Microbiological Research*, 2018, 208: 1-11
- [13] González I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, Genilloud O. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54(3): 401-415
- [14] Miyanaga A, Kudo F, Eguchi T. Protein-protein interactions in polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase hybrid assembly lines[J]. *Natural Product Reports*, 2018, 35(11): 1185-1209
- [15] Tracanna V, De Jong A, Medema MH, Kuipers OP. Mining prokaryotes for antimicrobial compounds: from diversity to function[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(3): 417-429
- [16] Hiltner L. Über neuer erfahrungen und probleme auf

- Dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1904, 32: 1405-1417
- [17] Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(5): 634-663
- [18] Darrah PR. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach[J]. Plant and Soil, 1993, 155/156(1): 1-20
- [19] Basil AJ, Strap JL, Knotek-Smith HM, Crawford DL. Studies on the microbial populations of the rhizosphere of big sagebrush (*Artemisia tridentata*)[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2004, 31(6): 278-288
- [20] 袁丽杰, 章广玲, 张玉琴, 余利岩, 张月琴. 药用植物根际放线菌的种群多样性及生物活性初步研究[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(8): 463-466, 504
Yuan LJ, Zhang GL, Zhang YQ, Yu LY, Zhang YQ. Preliminary research about population diversity and bioactivity of rhizosphere actinomycetes from medicinal plant[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2009, 34(8): 463-466, 504 (in Chinese)
- [21] Pezzulo AA, Tudas RA, Stewart CG, Buonfiglio L, Lindsay BD, Taft PJ, Gansemer ND, Zabner J. HSP90 inhibitor geldanamycin reverts IL-13- and IL-17-induced airway goblet cell metaplasia[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2019, 129(2): 744-758
- [22] Friedman M, Xu A, Lee R, Nguyen DN, Phan TA, Hamada SM, Panchel R, Tam CC, Kim JH, Cheng LW, et al. The inhibitory activity of anthraquinones against pathogenic protozoa, bacteria, and fungi and the relationship to structure[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2020, 25(13): 3101
- [23] Li L, Wang L, You QD, Xu XL. Heat shock protein 90 inhibitors: an update on achievements, challenges, and future directions[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2020, 63(5): 1798-1822
- [24] 张晋卿, 刘伟, 谭静文, 孙毅, 万喆, 李若瑜. geldanmycin 对念珠菌的体外抗真菌活性评价[C]. 2012 年中国菌物学会学术年会会议摘要, 2012: 119-120
Zhang JQ, Liu W, Tan JW, Sun Y, Wan J, Li RY. Evaluation of the antifungal activity of geldanamycin against *Candida in vitro*[C]. Abstract of the 2012 Annual Conference of the Chinese Society of Mycology, 2012: 119-120 (in Chinese)
- [25] 张喜平. 大黄素的药理作用研究概况[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(8): 851-854
Zhang XP. General situation in pharmacological studies on emodin[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2003, 19(8): 851-854 (in Chinese)
- [26] Yang SQ, Li XM, Xu GM, Li X, An CY, Wang BG. Antibacterial anthraquinone derivatives isolated from a mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus nidulans* by ethanol stress strategy[J]. The Journal of Antibiotics, 2018, 71(9): 778-784
- [27] Dong X, Fu J, Yin XB, Cao SL, Li XC, Lin LF, Huyiligeqi, Ni J. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics[J]. Phytotherapy Research: PTR, 2016, 30(8): 1207-1218
- [28] 杨梦平, 王瑞仙, 杜魏甫, 巩晨, 于德才, 赵伟全, 宋双伟, 张红骥. 云南省马铃薯疮痂病致病链霉菌种类组成研究[J]. 植物病理学报, 2018, 48(4): 445-454
Yang MP, Wang RX, Du WF, Gong C, Yu DC, Zhao WQ, Song SW, Zhang HJ. The pathogenic *Streptomyces* species causing potato scab in Yunnan Province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2018, 48(4): 445-454 (in Chinese)
- [29] Hiltunen LH, Kelloniemi J, Valkonen JPT. First report of *Streptomyces europaeiscabiei* causing common scab on potato in Finland[J]. Plant Disease, 2014, 98(9): 1267
- [30] Gong Y, Bai JL, Yang HT, Zhang WD, Xiong YW, Ding P, Qin S. Phylogenetic diversity and investigation of plant growth-promoting traits of actinobacteria in coastal salt marsh plant rhizospheres from Jiangsu, China[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2018, 41(5): 516-527
- [31] Shi JY, Yuan XF, Lin HR, Yang YQ, Li ZY. Differences in soil properties and bacterial communities between the rhizosphere and bulk soil and among different production areas of the medicinal plant *Fritillaria thunbergii*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(6): 3770-3785
- [32] 李本金, 陈庆河, 刘裴清, 王荣波, 翁启勇. 一种防治马铃薯晚疫病的生防菌剂: CN107136122A[P]. 2017-09-08.
Li BJ, Chen QH, Liu PQ, Wang RB, Weng QY. Biocontrol inoculant for controlling potato late blight: CN107136122A[P]. 2017-09-08 (in Chinese).