

海洋放线菌 YH91 分类鉴定及其抑菌活性的研究

王 皓^{1,2}, 刘 秋², 孙建龙^{1,2}, 闫建芳², 赵柏霞^{1,2}, 刘志恒¹

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 从海洋沉积物中分离到一株放线菌 YH91, 该菌株对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、以及镰刀菌具有较强的抑制作用。对其进行包括形态特征、培养特征、生理生化特性、细胞壁化学成分以及 16S rDNA 序列的研究分析结果表明, 该放线菌是链霉菌属淀粉酶链霉菌(*Streptomyces diastaticus*)的一株亚种。

关键词: 海洋放线菌; YH91; 分类鉴定; 抑菌活性

中图分类号: Q93-331 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)06-0039-05

很多放线菌能够产生具有广谱杀菌效果的次生代谢产物。据不完全统计, 放线菌产生的活性次生代谢产物约占目前已发现微生物活性次生代谢产物的 50%^[1]。海洋微生物具有不同于陆地微生物的代谢途径, 可产生完全不同于陆地微生物的新颖生物活性物质^[2], 因此海洋放线菌在新型抗生素以及生物农药的开发等方面具有巨大潜力。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)是导致食品污染和人类感染的主要细菌, 而它们又分别是 G⁺和 G⁻的代表菌。镰刀菌属真菌(*Fusarium moniliforme*)是植物产后病害的重要病原菌之一, 危害水稻、小麦、玉米等作物, 造成严重减产, 其中一些菌种也可引起人类疾病, 且有致癌作用^[3]。选用上述 3 种菌为供试菌株, 通过对海洋沉积物中分离得到的海洋放线菌抑菌活性测定, 筛选到一株海洋放线菌 YH91, 其发酵液能够抑制所选供试病原菌, 并且抑菌活性稳定。通过对该菌株的鉴定及其抑菌活性的研究, 为下一步代谢产物的研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

采集辽宁省大连市龙王塘西口距离海岸 300 m 的海洋沉积物, 从中分离得到海洋放线菌 YH91, 于 -80 °C 冰箱中冻干保存。

1.1.2 培养基

菌种鉴定培养基: 高氏一号培养基、蔗糖硝酸盐

琼脂培养基、燕麦粉琼脂培养基、无机盐淀粉琼脂培养基、甘油天冬素琼脂培养基、马铃薯块培养基、营养琼脂培养基、淀粉琼脂培养基; 发酵培养基: 高氏一号液体培养基; 抗菌活性测定培养基: PDA 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基。以上培养基的配方参照文献[4-5]。

1.2 方法

1.2.1 形态特征以及培养特征研究

用高氏一号培养基划线埋片, 于 28 °C 下培养 5 d 后, 用光学显微镜和电子显微镜观察菌株 YH91 形态特征。于 7 种菌种鉴定培养基分别划线, 在 28 °C 下培养 7 d, 进行培养特征观察。

1.2.2 生理生化特性

参照文献[6-8]进行生理生化特性鉴定。

1.2.3 细胞壁化学组分分析

全细胞壁氨基酸和全细胞水解产物糖组份分析采用 Stanek 等^[9]和王平^[10]的快速薄板层析法(TLC)进行。

1.2.4 16S rDNA 的扩增及其同源性比较

用微波法^[11]进行放线菌总 DNA 的提取。以培养至对数期的新鲜菌丝体基因组 DNA 为模板, 采用原核生物通用引物 F27 及 R1492(由上海生工公司合成)

收稿日期: 2011-12-15; 修回日期: 2012-03-16

基金项目: 国家自然科学基金(31070005); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(DC10030102, DC10030106)

作者简介: 王皓(1987-), 男, 黑龙江大庆人, 硕士研究生, 主要从事应用微生物学研究, 电话: 0411-87532757, E-mail: 87115wh@163.com; 刘秋, 通信作者, 电话: 0411-87656045, E-mail: liuqiu@dlnu.edu.cn; 刘志恒, 通信作者, 电话: 024-82139726, E-mail: lzhh1954@163.com

进行 16S rDNA 序列扩增，引物序列为 F27:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; R1492:5'-TACCTTGTACGACTT-3', PCR 反应体系和反应条件见参考文献[12], 用 1%琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物检测。采用 DNA 纯化试剂盒(宝生物(大连)工程技术有限公司)进行 PCR 扩增产物的回收 pMD19-T 克隆试剂盒(宝生物(大连)工程技术有限公司)进行 PCR 扩增产物的连接以及连接产物的转化, 由北京三博远志生物公司进行 16S rDNA 序列分析。将所测得的 YH91 的 16S rDNA 序列同 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 中已有序列进行比对分析, 利用 MEGA5.0 软件构建 N-J (Neighbor-joining)系统进化树, 确定菌株的分类地位。

1.2.5 抑菌物质活性测定

用接种针取 YH91 孢子接种于装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 28 150 r/min 培养 7 d 制备菌株 YH91 发酵液, 发酵液在 8 000 r/min 条件下离心 5 min。上清液过 0.45 μm 滤膜, 采用管碟法^[13]测定上清液对 3 种指示菌的抑菌活性。

1.2.6 抑菌物质稳定性研究

取 5 mL(原始 PH 7)YH91 发酵上清液 9 份, 进行 9 种处理, I: 未处理作为对照; II: 100℃, 0.5 h; III: pH 2, 24h; IV: pH 12, 24 h; V: pH 2, 24 h, 再 100℃, 0.5 h; VI: pH 12, 24 h, 再 100℃, 0.5 h; VII: 紫外照射 0.5 h; VIII: 紫外照射 1 h; IX: 紫外照射 3 h。检测上清液的抑菌活性, 以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌以及镰刀菌属作为指示菌, 细菌于 37℃培养 24 h, 真菌于 28℃培养 60 h, 记录抑菌结果并进行显著性检验。热

处理部分在恒温水浴锅中进行, pH 调节采用 3 mol/L HCL 和 3 mol/L NaOH; 所有试验设 3 个重复。

2 结果

2.1 形态特征

取 YH91 玻片在光学显微镜下观察,其基内菌丝细长多分支, 色泽浅而透明, 相互交织成网状。电子显微镜观察孢子丝呈不规则分枝状, 孢子卵圆或圆形, 孢子之间无缢缩, 大小为 (0.8~1.1)μm×(1.1~1.4)μm, 孢子表面有纹饰(图 1)。

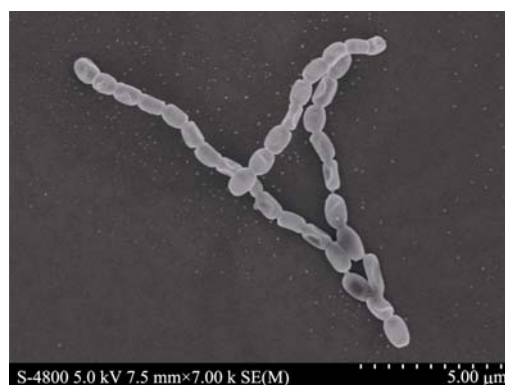


图 1 菌株 YH91 的扫描电镜图(×7 000)

Fig. 1 Scanning electron micrograph of strain YH91(×7 000)

2.2 培养特征

利用不同培养基培养, YH91 产生的气生菌丝与基内菌丝的颜色各不相同, 均不产生可溶性色素, 除在马铃薯块培养基上长势一般外, 在其余培养基长势良好。具体结果见表 1。

表 1 菌株 YH91 的培养特征

Tab. 1 Cultural characteristics of strain YH91

培养基	生长情况	气生菌 (丝颜色)	基内菌丝 (颜色)	培养基	生长情况	气生菌丝 (颜色)	基内菌 (丝颜色)
高氏一号	+++	白色	淡紫色	营养琼脂	+++	粉红色	粉色
蔗糖硝酸盐	++	灰色	灰白色	无机盐淀粉	+++	乳白色	浅黄色
燕麦粉琼脂	+++	浅粉色	粉色	淀粉琼脂	+++	灰白色	浅黄色
马铃薯块培养基	+	灰色	暗黄	甘油天冬素	++	灰白色	浅粉色

注: “+++”: 生长良好; “++”: 生长一般; “+”: 生长差

2.3 生理生化特性

YH91 菌株能液化明胶、还原硝酸盐、不胨化牛奶、不水解淀粉、不水解纤维素、不产生黑色素, 不产硫化氢。能利用葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖、甘露醇, 不利用果糖、蔗糖、木糖、棉子糖、肌

醇。YH91 与淀粉酶链霉菌(*S. diastaticus*)具体形态特征及生理生化特征的比较见表 2。

2.4 细胞壁化学类型

经 TLC 全细胞水解液分析发现, 菌株 YH91 细

胞壁组成中含 L,L-DAP; 有葡萄糖,无阿拉伯糖、甘露糖、木糖和马杜拉糖等特征性糖。其细胞壁氨基

酸型为 I 型, 糖型为 C 型。符合链霉菌属(*Streptomyces*) 的化学分类特性。

表 2 菌株 YH91 形态特征及生理生化特征

Tab. 2 Morphological characteristics and physiological and biochemical properties of strain YH91

实验项目	YH91	淀粉酶链霉菌	实验项目	YH91	淀粉酶链霉菌
孢子表面形态	褶皱	光滑	葡萄糖	+	+
孢子丝形态	螺旋	链状	阿拉伯糖	+	+
淀粉水解	-	+	果糖	+	-
明胶液化	-	-	鼠李糖	+	-
牛奶凝固	+	+	蔗糖	-	+
牛奶胨化	-	+	果糖	-	+
硝酸盐还原	+	-	棉籽糖	-	-
纤维素水解	-	+	肌醇	-	-

注: “+”: 反应为阳性或能利用该糖; “-”: 反应为阴性或不能利用该糖

2.5 16S rDNA 的扩增及序列分析

菌株 YH91 的 16S rDNA 序列长度为 1 450 bp, NCBI 的序列登记号为: JN205799. 将所测序列与 GenBank 数据库中的相关菌种进行比较, 其与 *Streptomyces diastaticus subsp. ardesiacus* 的序列相似

性为 99.4%。构建以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树, 结果如图 2 所示。

2.6 抑菌物质活性分析

由图 3 可见, YH91 的发酵液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌以及镰刀菌都具有明显的抑制作用, 抑菌

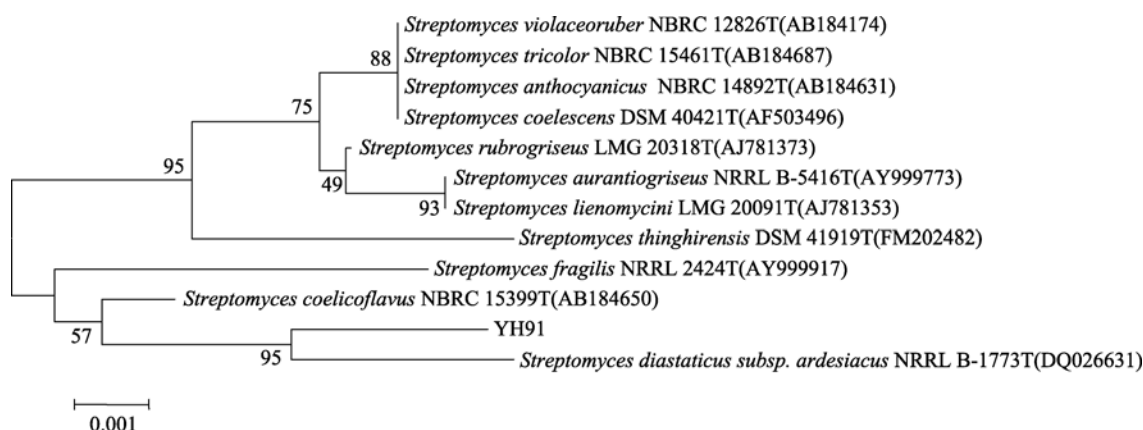


图 2 菌株 YH91 系统进化发育树

Fig. 2 Rooted phylogenetic tree of strain YH91

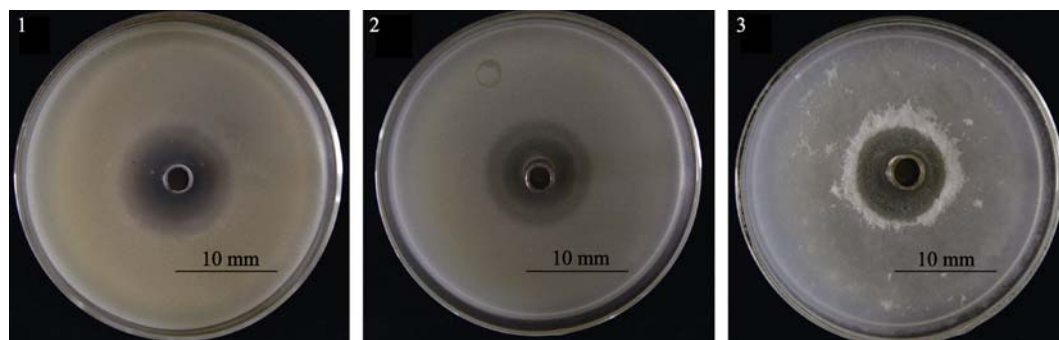


图 3 YH91 对不同病原菌的抑制结果

Fig. 3 Bacteriostatic activities of strain YH91 to different bacteria

1. 金黄色葡萄球菌; 2. 大肠杆菌; 3. 尖孢镰刀菌

1. *S. aureus*; 2. *E. coli*; 3. *F. moniliforme*

圈直径分别达到 32、34 和 29 mm, 说明该活性物质为一类广谱抗生素。

2.7 抑菌物质稳定性分析

由表 3 可见, 发酵液在经过酸、碱、高温及紫外照射处理后, 抑菌圈直径大小没有明显改变。在 0.05

水平进行显著性检验, 结果显示其对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑制作用经碱处理后略有下降, 对镰刀菌的抑制作用经酸处理后略有下降, 其余各组与未经处理的上清液无显著差异。说明链霉菌 YH91 所产生的活性物质对酸、碱、热以及紫外照射的稳定性较好。

表 3 YH91 抗菌活性物质稳定性试验结果

Tab. 3 The stabilities of the antimicrobial substances produced by strain YH91

组别	抑菌圈直径 (mm)			组别	抑菌圈直径 (mm)		
	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	镰刀菌		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	镰刀菌
I	31.78 ± 0.49 ^a	34.07 ± 0.38 ^a	29.33 ± 0.61 ^a	VI	30.37 ± 0.53 ^c	32.16 ± 0.37 ^b	29.26 ± 0.55 ^a
II	31.31 ± 0.24 ^{ab}	33.64 ± 0.49 ^a	29.56 ± 0.70 ^a	VII	31.85 ± 0.31 ^a	33.86 ± 0.57 ^a	28.77 ± 0.28 ^a
III	32.03 ± 0.58 ^a	33.79 ± 0.64 ^a	27.04 ± 0.39 ^b	VIII	31.62 ± 0.45 ^a	33.91 ± 0.46 ^a	28.72 ± 0.34 ^a
IV	30.69 ± 0.37 ^{bc}	32.43 ± 0.51 ^b	29.11 ± 0.22 ^a	IX	31.77 ± 0.40 ^a	33.69 ± 0.25 ^a	28.86 ± 0.48 ^a
V	31.88 ± 0.66 ^a	33.96 ± 0.20 ^a	27.30 ± 0.57 ^b				

注: 同列比较的不同字母表示在 0.05 水平差异显著

3 讨论

据 Pridham 等^[14]的报道, *S. diastaticus subsp. ardesiacus* 的孢子丝螺旋形, 孢子表面光滑, 气生菌丝为石板灰色, 基丝无色, 能水解淀粉, 能使牛奶凝固并胨化, 不能液化明胶; 而菌株 YH91 的孢子丝为不规则分枝, 孢子表面有纹饰, 气生菌丝为浅粉色、乳白色或灰白色, 基内菌丝为淡紫色或粉色, 不能水解淀粉, 能凝固牛奶但不能使牛奶胨化, 能液化明胶。综上所述, 菌株 YH91 与 *S. diastaticus subsp. ardesiacus* 的形态特征、培养特征及生理生化特性存在较大的差异。因而认为菌株 YH91 为 *S. diastaticus subsp. ardesiacus* 的一株亚种。

目前, 从天然资源中寻找活性物质代替化学农药以及开发天然抗菌化合物已成为研究的重点^[15]。海洋放线菌 YH91 的发酵液能够有效抑制金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)以及镰刀菌(*F. moniliforme*)的生长, 经酸、碱、热及紫外线的处理之后, 抑菌物质的活性受到的影响较小, 表现出良好的稳定性, 在生物防治以及医药研究等方面的研究具有潜在价值, 其活性物质的分离、纯化和结构解析等研究正在进行中。

参考文献:

[1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. The Journal of antibiotics(Tokyo), 2005, 58: 1-26.
 [2] Carté B K. Biomedical potential of marine natural

products[J]. Bioscience, 1996, 46(4): 271-286 .
 [3] 杨青, 朱建国. 镰刀菌和镰刀菌感染[J]. 浙江检验医学, 2010, 8(2): 16-18 .
 [4] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 214-215.
 [5] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1966, 16: 313-340.
 [6] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975.
 [7] 闫逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
 [8] 徐立华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
 [9] Staneck J L, Roberts G D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography[J]. Appl Microbiol, 1974, 28: 226-231.
 [10] 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[J]. 微生物学通报, 1986, 8(5): 228-230.
 [11] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.
 [12] 姜淑梅. 一种简单有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法生物技术, 2007, 17(1): 39-41.

- [13] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 339.
- [14] 闫逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 473.
- [15] Lam K S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9: 245-251.

Identification of a marine actinomyce YH91 and its antimicrobial activity

WANG Hao^{1,2}, LIU Qiu², SUN Jian-long^{1,2}, YAN Jian-fang², ZHAO Bai-xia^{1,2}, LIU Zhi-heng¹

(1. Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Received: Dec.,15,2011

Key words: marine actinomycete; YH91; identification; antimicrobial activity

Abstract: An actinomycete strain YH91, isolated from marine sediment collected in Liaoning Province, north-east China, was determined by the polyphasic taxonomy method. The strain showed strong antagonism against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Fusarium* sp. According to its morphological and cultural characteristics, the physiological and biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis, the strain was a new subspecies of *Streptomyces diastaticus*.

(本文编辑: 康亦兼)