

海洋放线菌 XS904 分类鉴定及其发酵液 抑菌活性的研究*

杨文鸽¹ 楼乔明² 徐大伦¹ 孙爱飞¹ 潘云娣³

(1. 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 2. 中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003; 3. 宁波出入境检验检疫局 宁波 315012)

提要 采用形态观察、培养特征、生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列分析方法, 对从宁波海域滩涂泥样中筛选到的一株放线菌 XS904 进行分类鉴定, 同时对 XS904 菌株发酵液的抑菌活性和抑菌物质的理化性质进行了研究。结果表明, XS904 菌株为链霉菌属灰浅红链霉菌(*Streptomyces griseorubens*) 的变种; 经液体培养, XS904 菌株发酵液对革兰氏阳性细菌有显著的抑菌活性, 对金黄色葡萄球菌的最小抑制浓度为 0.78%; pH 纸色谱和捷克八溶剂系统纸层析结果显示发酵液中的抑菌活性物质为一类中等极性的碱性抗生素, 易溶于三氯甲烷, 对温度较敏感, 在酸性和中性条件下稳定。

关键词 海洋放线菌, XS904, 分类鉴定, 发酵液, 抑菌活性
中图分类号 Q93

放线菌是抗生素等制药工业最重要的微生物资源之一。自 Waksman(1943)从灰色链霉菌提取出链霉素以来, 在放线菌中已发现和分离到 4000 多种抗生素, 如链霉素、土霉素、卡那霉素、井冈霉素等已广泛应用于临床治疗和农业生产。当前开发研究陆栖放线菌已相当深入, 从陆栖放线菌发现新的活性物质的几率正逐渐下降, 因此从海洋微生物资源中寻找新型微生物药物成为研究的必然趋势(Adinarayana *et al*, 2007; Janos, 2005; Maskey *et al*, 2004)。据不完全统计, 自 20 世纪 70 年代东京微生物化学研究所从海洋放线菌 *Chainia* sp. 分离到抗生素 SS-228Y 以来, 从海洋放线菌中发现结构新颖具有强生理活性的物质已达 100 多个, 其中 90% 以上产生于放线菌中的链霉菌属(林永成等, 2003)。源于链霉菌的新生理活性物质不断被发现, 新链霉菌的分离、鉴定和活性物质的筛选已成为微生物来源新药筛选工作的重要课题(Muramatsu *et al*, 2004; 徐平等, 2005)。

本实验室从宁波海域滩涂泥样中筛选到一株海洋放线菌 XS904, 经多次传代培养证实该菌株具有稳定的生理特性。本文作者在形态观察、生理生化特征

试验以及 16S rDNA 序列相似性比较的基础上对 XS904 菌株进行分类鉴定, 同时对该菌株发酵液的抑菌活性进行研究, 旨在为海洋放线菌的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 XS904 分离自宁波象山港海域滩涂海泥中。

1.1.2 供试菌 青霉(*Penicillium* sp.), 根霉(*Rhizopus* sp.), 曲霉(*Aspergillus niger*), 啤酒酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 枯草杆菌(*Bacillus subtilis*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*)。以上供试菌均由本院微生物实验室提供。

1.1.3 培养基 改良高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20g, KNO₃ 1g, NaCl 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄ 0.5g, FeSO₄ 0.01g, 琼脂 15—20g, 海水晶 30g, 蒸馏水 1000ml, pH7.2—7.4, 121 灭菌 20min。黄豆粉培养基: 可溶性淀粉 20g, 黄豆粉 15g, 葡萄糖 5g, 酵

* 浙江省自然科学基金资助项目, 402038 号。杨文鸽, 博士, 教授, E-mail: yangwenge@nbu.edu.cn

收稿日期: 2007-08-17, 收修改稿日期: 2007-10-25

母膏 2.5g, CaCO₃ 1g, 海水晶 30g, 蒸馏水 1000ml, pH 7.5—8.0, 121 灭菌 20min。

1.1.4 主要试剂和仪器 溶菌酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司, PCR 试剂盒购自大连 TAKARA 生物技术有限公司。Eiko HCP-2 临界点干燥仪(日立公司), Eiko IB-5 离子溅射仪(日立公司), Stereoscan 260 扫描电镜(日立公司), PCR 仪(美国 Eppendorf 公司)。

1.2 菌株 XS904 的初步鉴定

1.2.1 形态观察 XS904 菌株利用插片法(钱存柔等, 1999)培养 10—20d 后, 利用 Novel 光学显微镜进行形态观察; 同时取出插片, 用 2.5% 戊二醛固定 12h, 再用 1% 锇酸固定 6h, 经各级乙醇脱水, 乙酰异戊酯置换, CO₂ 临界点干燥, 喷金镀膜, 扫描电镜观察菌体形态特征。

1.2.2 培养特征与生理生化特性研究 依据《链霉菌鉴定手册》(中国科学院微生物研究所放线菌分类组, 1975)和《放线菌分类基础》(阮继生, 1977)中推荐的常用微生物鉴定方法, 观察并记录菌株的培养特征与生理生化特性。

1.3 16S rDNA PCR 扩增

1.3.1 菌体总 DNA 的提取 参照 Hopwood 等(1985)方法提取菌体总 DNA。

1.3.2 16S rDNA PCR 扩增 正向引物 PA(对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 5 端 8—27f 位核苷酸): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3; 反向引物 PB(对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 5 端 1523—1504r 位核苷酸): 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3。

PCR 扩增条件: 以热启动方式进行扩增, 94 预变性 5min; 加 *Taq* 酶后 94 变性 1min, 53 退火 1min, 72 延伸 3min, 共 30 个循环; 最后 72 延伸 5min。

1.3.3 16S rDNA PCR 扩增产物的纯化及测序 由上海英骏生物技术有限公司协助完成。

1.4 系统进化树的构建和分析

将所得到的 16S rDNA 序列用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行相似性搜索, 选取同源性较高的 16S rDNA 序列作为参比对象, 用 MEGA3.1 软件进行多序列比对, 根据 Kimura-2 参数法计算进化距离, 并采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。

1.5 XS904 菌株发酵及发酵液预处理

菌种经斜面活化后, 将孢子用无菌水洗下, 孢子悬液接种于黄豆粉培养基, 28、160r/min 摇床培养 5d; 发酵结束后, 经减压抽滤, 上清液于 -20 保存

备用。

1.6 XS904 菌株发酵液抑菌活性测定

抑菌圈直径测定: 采用滤纸片法(林鹏等, 2005), 取 6mm 无菌滤纸片, 加入 5ml 发酵液, 贴于带菌培养基上, 以黄豆粉培养基作对照, 细菌 37 培养 1d, 真菌 37 培养 2d, 十字交叉法测量抑菌圈直径。

最小抑菌浓度测定: 以原发酵液浓度为 100%, 用 3% 海水晶溶液进行倍比稀释 2、4、8、16 倍后浓度分别为 50%、25%、12.5%、6.25%, 依次类推。滤纸片法测定不同浓度发酵液的抑菌情况。

发酵液抑菌活性物质对温度和 pH 的稳定性测定(邵彦坡等, 2007): 取发酵液 30ml 分别在 30—100 水浴中放置 30min, 冰浴冷却至室温, 测定不同温度处理后发酵液的抑菌情况; 取发酵液 30ml, 用稀酸或稀碱将 pH 分别调至 3.0—10.0, 静置 24h 后, 调至原始 pH, 测定不同 pH 处理后发酵液的抑菌情况。

1.7 发酵液抑菌活性成分极性分析

用等体积的三氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯对发酵液进行萃取, 搅拌 4h 后于分液漏斗中静置过夜, 分别取水相、有机相进行抑菌活性测定。

1.8 发酵液抑菌活性成分纸层析分析

1.8.1 pH 纸层析(刘姝等, 2007) 取 9 条滤纸条(10mm × 160mm), 分别用 pH 2.2、pH 3.0—10.0 的缓冲溶液处理, 干燥后点上发酵液样品, 用水饱和的乙酸乙酯溶剂进行上行展层, 之后将滤纸条晾干进行生物显影。

1.8.2 捷克八溶剂系统纸层析(周德庆, 1980) 取 8 条滤纸条(10mm × 160mm), 点样后分别在 8 种展层溶剂中层析, 5% Na₂SO₄ 处理, 晾干后进行生物显影。捷克八溶剂系统编号如下: 1 号水饱和的正丁醇; 2 号水饱和的正丁醇, 内含 2% 对甲基苯磺酸; 3 号正丁醇: 乙酸: 水 = 2: 1: 1; 4 号水饱和的正丁醇, 内含 2% 六氢吡啶; 5 号正丁醇饱和的 0.5mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.0); 6 号正丁醇饱和的水, 内含 2% 对甲基苯磺酸; 7 号苯: 甲醇 = 4: 1, 所用滤纸先用 0.5mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.0)处理后晾干; 8 号甲醇: 水(内含 3% NaCl) = 3: 1。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态特征 在改良高氏一号培养基上, XS904 菌株生长良好, 菌落表面呈粉绒状凸起, 并带

有明显褶皱; 菌落最初为白色, 随后慢慢变成灰色或灰白色。该菌株气生菌丝发育良好, 成熟后生成孢子丝, 孢子丝直至螺旋状; 基内菌丝丰富, 多分支, 不断裂(图 1)。电镜扫描结果显示 XS904 菌株孢子链长, 分化为孢子, 孢子圆形至卵圆形, 表面有粗刺(图 2)。

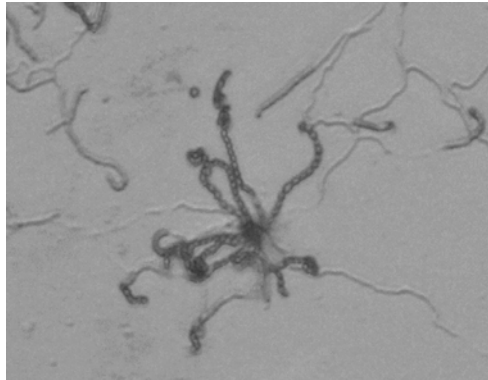


图 1 菌株 XS904 的光学显微镜照片(400×)
Fig.1 Optical micrograph (400×) of strain XS904

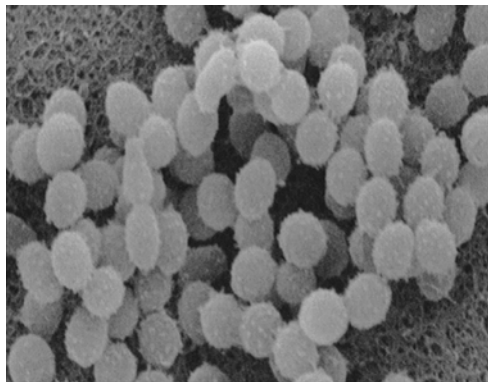


图 2 菌株 XS904 的扫描电镜图
Fig.2 Scanning electron micrograph of strain XS904

2.1.2 培养特征 利用不同的培养基培养, XS904 菌株除在酪氨酸琼脂培养基上长势一般外, 大部分合成培养基上生长良好。XS904 菌株均不产生可溶性色素, 所产的气生菌丝与基内菌丝的颜色不同, 具体结果见表 1。

2.1.3 生理生化特性 XS904 菌株能使明胶液化、淀粉水解、纤维素水解、牛奶凝固而不胨化; 不产生硫化氢、不还原硝酸盐; 可利用葡萄糖、果糖、木糖、甘露糖、肌醇、蔗糖、甘油、半乳糖作为碳源生长, 不能利用鼠李糖、棉子糖、阿拉伯糖、天冬氨酸。

2.1.4 16S rDNA 全序列的相似性比较和系统发育分析 菌株 XS904 的 16S rDNA 序列长度为 1490bp,

表 1 菌株 XS904 的培养特征

培养基	生长情况	气丝颜色	基丝颜色
葡萄糖	好	白色	黄色
酵母琼脂			
伊莫松	较好	白色	桔黄色
酪氨酸琼脂	一般	灰白色	乳白色
蔗糖蔡氏	好	橄榄绿色	淡黄色
燕麦粉琼脂	较好	微绿灰	乳白色
无机盐淀粉	较好	浅绿灰色	乳白色
营养琼脂	较好	乳白色	淡黄色

NCBI 的序列登记号为: DQ826592。将所测序列与 GenBank 数据库中的相关菌种进行比较, 构建以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树, 结果如图 3 所示。从系统进化树状图可以看出, XS904 属于链霉菌科 (Streptomycetaceae) 的链霉菌属 (*Streptomyces*)。由 16S rDNA 序列相似性分析结果看, XS904 与其最近邻的链霉菌属灰浅红链霉菌 (*Streptomyces griseorubens*) 同源率为 98.52%, 但两者在培养特征方面有一定的差异, XS904 菌株的气生菌丝以灰白、灰绿为主, 基内菌丝以乳白、淡黄为主; 而灰浅红链霉菌的气生菌丝以灰绿色为主, 基内菌丝以褐粉色为主。一般情况下, 16S rDNA 序列同源率为 98% 以上的可以认为是新菌株, 96%—97% 的可以认为是新种, 93%—95% 的可以认为是新属(任世英等, 2006), 综合形态学特征、培养特征、生理生化特征等在内的多相分类结果, 认为 XS904 菌株为链霉菌属灰浅红链霉菌的变种。

2.2 XS904 菌株发酵液抗菌谱

滤纸片法结果显示 XS904 菌株发酵液对金黄色葡萄球菌、枯草杆菌有很显著的抑制作用, 抑菌圈直径均达到 20mm 以上, 抑菌圈边缘清晰; 但对大肠杆菌、根霉、青霉、曲霉、啤酒酵母没有抑菌效果。进一步采用管碟法和抑制菌丝生长速率(刘姝等, 2007)法进行测定, 发现 XS904 发酵液对大肠杆菌和根霉等真菌仍没有明显抑菌效果。说明发酵液中活性物质主要对革兰氏阳性细菌有抑菌作用, 为一类抗革兰氏阳性菌抗生素, 因此选择金黄色葡萄球菌作为下一步实验的指示菌。

2.3 XS904 菌株发酵液最小抑菌浓度

原发酵液倍比稀释后得到一系列不同浓度的发酵液, 采用滤纸片法测定不同浓度发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌效果, 结果见表 2。

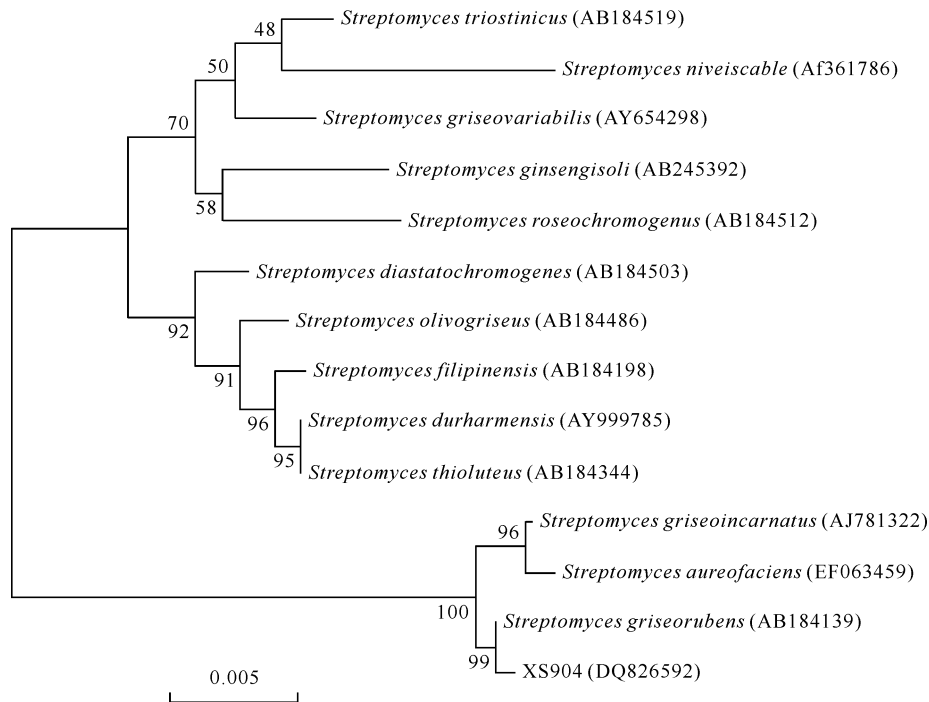


图3 依据 16S rDNA 序列同源性构建的 XS904 与相关菌株系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of XS904 and its related strains, based on 16S rDNA sequence of homology

表2 不同浓度发酵液对金黄色葡萄球菌的抑菌作用

Tab.2 The antibacterial activity of different metabolite concentrations against *Staphylococcus aureus*

发酵液浓度(%)	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39
抑菌圈直径(mm)	21.99 ± 0.50	20.00 ± 0.49	17.02 ± 0.45	14.89 ± 0.35	12.73 ± 0.44	10.95 ± 0.49	8.66 ± 0.30	7.25 ± 0.19	6.00 ± 0.00

从表 2 可知, XS904 发酵液对金黄色葡萄球菌的抑制作用随着发酵液浓度的降低而逐渐减弱; 当发酵液浓度为 0.78% 时, 对金黄色葡萄球菌仍具有抑菌效果; 但稀释至 0.39% 时, 无抑菌圈。因此发酵液对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为原发酵液浓度的 0.78%, 即对发酵液进行了 128 倍稀释。

2.4 温度和 pH 对 XS904 菌株发酵液抑菌活性的影响

由表 3 可以看出, 发酵液经不同温度(30—100)处理后, 其抑菌圈直径随处理温度上升呈现明显的下降趋势, 由 30 处理后的 22.32mm 下降到 100 处理后的 11.52mm, 说明发酵液中活性物质对温度的耐受性较弱。而经不同 pH(3.0—10.0)处理后, 其抑菌圈直径变化幅度不大, 随处理 pH 的上升略有下降, 表

明活性物质对 pH 的耐受性较强; 相比之下, 在酸性条件下处理后发酵液的抑菌圈较大, 初步认为 pH 对活性物质溶解性有影响。在酸性条件下, 活性物质以离子形式存在, 溶解性较强; 碱性条件时, 以分子形式存在, 溶解性降低, 由此推断活性物质可能是一类碱性抗生素。

2.5 XS904 菌株发酵液抑菌活性物质的极性测定

由表 4 可见, 发酵液用等体积的三氯甲烷、乙酸乙酯处理后, 抑菌活性物质主要集中在三氯甲烷有机相和乙酸乙酯水相, 说明活性物质易溶于三氯甲烷, 不易溶于乙酸乙酯; 而石油醚处理后, 其有机相无抑菌性, 说明活性物质不溶于石油醚。结果表明 XS904 发酵液中的抑菌活性物质为一类中等极性的

表3 温度和 pH 对 XS904 菌株发酵液抑菌活性的影响

Tab.3 The effect of temperature and pH on the antibacterial activity of XS904 strain metabolite

处理温度()	30	40	50	60	70	80	90	100
抑菌圈直径(mm)	22.32 ± 0.59	21.25 ± 0.46	21.00 ± 0.53	17.98 ± 0.43	15.01 ± 0.68	14.10 ± 0.36	13.87 ± 0.27	11.52 ± 0.21
处理 pH	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
抑菌圈直径(mm)	23.15 ± 0.46	23.32 ± 0.73	22.76 ± 0.54	21.68 ± 0.39	20.13 ± 0.28	20.06 ± 0.61	19.88 ± 0.52	19.45 ± 0.71

抗生素。

2.6 XS904 菌株发酵液抑菌活性物质的纸层析

XS904 菌株所产活性物质的 pH 纸层析结果见表 5。抑菌活性物质的迁移率(rate of flow, R_f)值随着 pH 的增大而上升, 最大值在碱性部分。参照经典的各类抗生素纸色谱图, 初步推定 XS904 菌株所产的活性物质为一种碱性抗生素, 这与 pH 对发酵液抑菌活性的

影响分析结果一致。

XS904 菌株所产的抑菌活性物质在捷克八溶剂系统中的纸层析结果如表 6, 活性物质在 8 种展层溶剂系统中均有较大的 R_f 值, 并且 R_f 值呈现出中间高两端略有下降的趋势。参照经典的各类抗生素纸色谱图(周德庆, 1980), 发现其与典型的六大类抗生素差别较大, 具体为何种抗生素有待于进一步研究。

表 4 有机溶剂萃取 XS904 发酵液的抑菌活性物质
Tab.4 Extraction of active substance in XS904 strain metabolite with different organic solvents

有机溶剂	氯仿		乙酸乙酯		石油醚	
	水相	有机相	水相	有机相	水相	有机相
抑菌圈直径(mm)	12.83 ± 0.42	23.45 ± 0.69	22.73 ± 0.51	12.10 ± 0.39	21.65 ± 0.48	6.00 ± 0.00

表 5 XS904 菌株发酵液抑菌活性物质的 pH 纸层析结果
Tab.5 pH paper chromatography of antibacterial substance in XS904 strain metabolite

pH	2.2	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
R_f	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.21 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.98 ± 0.02	0.97 ± 0.00	0.93 ± 0.05	0.95 ± 0.00

表 6 XS904 菌株发酵液抑菌活性物质的捷克八溶剂系统层析结果
Tab.6 Jack's Eight Solvent System chromatography of antibacterial substance in XS904 strain metabolite

溶剂号	1	2	3	4	5	6	7	8
R_f	0.70 ± 0.04	0.76 ± 0.04	0.82 ± 0.03	0.85 ± 0.03	0.81 ± 0.04	0.84 ± 0.02	0.84 ± 0.03	0.63 ± 0.03

3 结语

从天然资源中寻找活性物质代替化学农药和使用天然抗菌化合物保护作物已成为当前研究的重点。放线菌资源在天然资源中占相当大的比例, 其活性产物抗生素是微生物农药的重要来源之一。本实验室以从宁波海域滩涂泥样分离得到的链霉菌 XS904 为研究对象, 经菌种鉴定, 包括形态和培养特征、生理生化试验以及 16S rDNA 序列的同源性比较, 初步判定 XS904 为灰浅红链霉菌的变种; 其发酵液对革兰氏阳性细菌具有显著的抑制作用, 纸层析鉴定抑菌活性物质是一类中等极性的碱性抗生素, 为进一步分离提纯及结构鉴定提供了参考。

参 考 文 献

中国科学院微生物研究所放线菌分类组, 1975. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 13—15
任世英, 王子峰, 肖 天等, 2006. 一株海洋聚磷菌 YSR-3 的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 37(5): 437—443
刘 姝, 陆颖健, 陆兆新等, 2007. 海洋链霉菌 GB-2 发酵产物的抗细菌活性及性质研究. 生物工程学报, 23(6): 1077—1081
阮继生, 1977. 放线菌分类基础. 北京: 科学出版社, 36—146

邵彦坡, 方丽萍, 魏少鹏等, 2007. 海洋放线菌 B5 菌株发酵液抗菌谱及稳定性研究. 西北农业学报, 16(3): 248—251
林 鹏, 张瑜斌, 邓爱英等, 2005. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性. 海洋学报, 27(3): 133—141
林永成, 周世宁, 2003. 海洋微生物及其代谢产物. 北京: 化学工业出版社, 169—170
周德庆, 1980. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 339—345
钱存柔, 黄仪秀, 1999. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 24—25
徐 平, 李文均, 高慧英等, 2005. 聚酮类化合物生物合成途径基因阳性菌株生物多样性研究. 微生物学报, 45(6): 821—827
Adinarayana G, Venkatesan M, Saisha V *et al*, 2007. Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. Microbiological Research, 162: 322—327
Hopwood D A, Bill M J, Chater K F *et al*, 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. in preparation of chromosomal, plasmid and phage DNA, Norwich: F. Crowe & Sons Ltd, 79—80
Janos B, 2005. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot, 58(1): 1—26
Maskey R P, Helmke E, Kayser O *et al*, 2004. Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity

from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. *J Antibiot*, 57(12): 771—779
Muramatsu Y, Ohnuki T, Miyazawa I M *et al*, 2004. A-503083 A,

B, E and F, novel inhibitors of bacterial translocase I, produced by *Streptomyces* sp. SANK62799. *J Antibiot*, 57: 639—646

IDENTIFICATION OF MARINE ACTINOMYCES XS904 AND THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ITS METABOLITE

YANG Wen-Ge¹, LOU Qiao-Ming², XU Da-Lun¹, SUN Ai-Fei¹, PAN Yun-Di³

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao, 266003; 3. Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo, 315012)

Abstract In searching for natural antibiotic resources, an actinomycetes strain XS904 was discovered from marine mud flats in Ningbo, China. Based on the results of morphological, physiological-biochemical characteristics and 16S rDNA analysis, strain XS904 was identified as a variable species of *Streptomyces griseorubens*. Strain XS904 grew well on most tested media, producing abundant aerial and vegetative hyphae. However, the strain did not excrete dissoluble pigments. The spore chains of the strain XS904 were long-spiral, and the surface of spores was thorny and rugose. The vegetative hyphae had many branches without fragmentation. The metabolite of strain XS904 showed a strong inhibition against Gram-positive bacteria. The minimum inhibitory concentration of metabolite against *Staphylococcus aureus* was 0.78%. The results of Jack's eight solvent system chromatography and pH paper chromatography of the fermentation extracts from strain XS904 showed that the main active components was a type of basic antibiotic. It has medium polarity, sensitive to temperature, and stable under acid and neural conditions but easily dissolved in chloroform.

Key words Marine actinomycetes, XS904, Classification and identification, Metabolite, Antimicrobial activity