

广西北部湾放线菌的分离筛选及活性产物的鉴定

王聪^{1*},王坤¹,姜明国²,谭学才¹,雷福厚¹,杜方凯¹,邱子言¹,孙坤来³¹广西民族大学化学化工学院,广西林产化学与工程重点实验室,广西高校食品安全与药物分析化学重点实验室;²广西高校微生物与植物资源利用重点实验室,广西民族大学海洋与生物技术学院,南宁 530006;³浙江海洋大学食品与医药学院,浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心,舟山 316022

摘要:为从广西北部湾的泥样和植物中分离海洋放线菌,筛选具有抑菌活性的菌株,分离活性化合物。研究采用普通稀释法分离菌株,对发酵产物进行抑菌活性测试,利用活性追踪分离活性化合物,并通过波谱方法确定化合物结构。结果表明从6个海泥样品和3个植物样品中共分离73株放线菌,筛选得到具有抑香蕉枯萎病和金黄色葡萄球菌活性的菌株7株,并从其中的1株链霉菌 *Streptomyces* sp. MDCW-126 的次级代谢产物中分离鉴定了星形孢菌素。从广西北部湾分离的药用活性菌株资源具有开发和深入研究价值。

关键词:广西北部湾;放线菌;抑菌活性;星形孢菌素

中图分类号:R284.1;R931.77

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)7-1170-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.7.008

Isolation and screening of actinomycetes to produce antibiotic metabolites from Beibu Gulf nearby Guangxi

WANG Cong^{1*}, WANG Kun¹, JIANG Ming-guo², TAN Xue-cai¹, LEI Fu-hou¹, DU Fang-kai¹, QIU Zi-yan¹, SUN Kun-lai³

¹Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Key Laboratory of Guangxi Colleges and Universities for Food Safety and Pharmaceutical Analytical Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University for Nationalities;

²Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Utilization of Microbial and Botanical Resources, School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China;

³Zhejiang Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China

Abstract: To isolate marine actinomycetes from Beibu Gulf nearby Guangxi soil and plants, and to screen antibiotic actinomycete strains, and to isolate active compounds. The isolation of actinomycetes was performed by normal methods, the screening of active fermentation products was preceded by antibacterial assays, the isolation of compounds were performed by bioassay-guided method, the structure of compound was elucidated through the spectroscopic analysis. The results showed that 73 actinomycetes strains were isolated from Beibu Gulf nearby Guangxi soil and plants, 7 of which showed antimicrobial activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Staphylococcus aureus*. And staurosporin was identified from the secondary metabolites of *Streptomyces* sp. MDCW-126. Actinomycetes from Beibu Gulf nearby Guangxi are potential resources for active strains and need further study.

Key words: Beibu Gulf nearby Guangxi; actinomycetes; antimicrobial activity; staurosporin

收稿日期:2019-04-02 接受日期:2019-06-06

基金项目:广西民族大学青年基金(2018MDQN003);2018年广西高校中青年教师基础能力提升项目(2018KY0177);广西科技基地和人才专项(桂科AD18126005);广西创新驱动发展重大专项子课题(桂科AA17204087--21);广西自然科学基金联合资助培育项目(2018GXNSFAA294044)

*通信作者 Tel:86-018776156656;E-mail:wangcong@gxun.edu.cn, wangcong123206@163.com

海洋环境的特殊性造就了海洋放线菌种类及其次级代谢产物的多样性,可能产生很多具有新颖骨架结构、显著生物活性的次级代谢产物,受到研究者的广泛关注^[1,2]。在对海洋药物筛选的过程中,极有可能得到抗菌生物活性物质。北部湾(广西海域)是一个半封闭大海湾,具有丰富的海洋资

源^[3,4]。关于北部湾(广西海域)在海洋沉积物微生物活性天然产物的研究鲜有报道。因此,从海洋放线菌中寻找抑菌剂具有很大的潜力,有望成为抗菌剂药物研究的突破口。本实验用普通稀释法,从采自广西北部湾的黄槿、腐木和桐花树等3种植物样品和6个泥样中分离获得73株放线菌。对这些菌株进行发酵培养,通过TLC显色、HPLC指纹图谱分析和抗菌活性测试,筛选到一株链霉菌 *Streptomyces* sp. MDCW-126,鉴定其中一产物为星形孢菌素^[5,6],星形孢菌素是一种具有抗菌作用的吡啶咪唑类化合物^[6],经对化合物1进行了抑菌活性的测试,结果显示化合物1对香蕉枯萎病菌的MIC值为10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对金黄色葡萄球菌的MIC值为125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源

黄槿、腐木、桐花树和6个海泥样品。样品均于2017年11月采自广西北部湾。

1.1.2 分离培养基(培养基中添加的放线菌酮均为0.005%)

1.1.2.1 高氏I号培养基:可溶性淀粉2%, KNO_3 0.1%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, FeSO_4 0.001%,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.2 淀粉干酪素:干酪素0.2%,淀粉1%, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.3 葡萄糖-天冬酰胺:天冬酰胺0.05%,葡萄糖1%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.4 改良 Emorson 培养基:酵母浸粉0.1%,葡萄糖0.1%,蛋白胨0.4%, NaCl 0.4%,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.5 精氨酸甘油:精氨酸0.1%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,甘油0.75%,麦芽浸粉1%,淀粉1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,丙酸钠0.4%,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.6 M2:甘油0.75%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.1%,精氨酸0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.7 M3: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%,酪蛋白胨0.2%,天冬氨酸0.01%,丙酸钠0.4%,甘油0.5%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.8 1/10 ATCC 172:酵母浸汁0.5%,葡萄糖1%,淀粉2%, CaCO_3 1.5%,水解干酪素0.5%,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.9 酵母浸膏培养基:0.2% 酵母浸膏,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.10 牛肉浸膏培养基:0.2% 牛肉浸膏,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.11 海藻糖培养基:0.2% 海藻糖,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.2.12 蛋白胨培养基:0.2% 蛋白胨,琼脂2%,氯化钠3.3%。

1.1.3 发酵培养基

放线菌2号:可溶性淀粉2%,牛肉浸膏0.3%,蛋白胨1%,酵母浸膏1%,葡萄糖2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, CaCO_3 0.2%,氯化钠3.3%。

放线菌A₁培养基:可溶性淀粉1%,蛋白胨0.2%,酵母浸膏0.4%, KBr 0.01%, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.004%, CaCO_3 0.1%,氯化钠3.3%。

高氏I号培养基:可溶性淀粉0.2%, KNO_3 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, FeSO_4 0.001%,氯化钠3.3%。

1.1.4 实验菌株

抑菌活性实验采用2株致病菌:金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*^[3,4]。

1.1.5 试剂和仪器

HCB-1300V 洁净工作台(青岛海尔特种电器有限公司)、高压灭菌锅 YXQ-LS-75SII 型(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、生化培养箱 LRH-500A 型(广东泰宏君科学仪器股份有限公司)、Agilent 1260 HPLC(美国 Agilent 公司)、质谱仪 Mariner API-TOF 型(美国应用生物系统公司)、旋光仪 POLAX-L 型(美国 ATAGO 公司)、核磁共振仪 Agilent-DD2 500 型(Agilent 公司)。

1.2 样品预处理与菌株分离

植物样品:取植物样品1g,在75%的酒精中浸泡5min,采用无菌水冲洗后加入5mL无菌水研磨,采用无菌水逐级梯度稀释到 10^{-2} 。泥土样品:将海泥从冰箱拿出解冻,称量海泥样品1g,加入5mL无菌水逐级梯度稀释到 10^{-2} 。

采用普通稀释法对样品进行放线菌的分离,各取0.3mL均匀涂布于分离培养基的平板上,每个稀释度涂布于3个平板,置于28℃培养箱中倒置培养。对分离出的菌株进行纯化,将纯化好的菌株接入斜面培养基,存放于4℃冰箱,并保藏于含20%甘油的液体培养基中。每个样品保藏4管,冻存管标记上菌种保藏号及保藏日期,于-80℃冰箱保藏。

1.3 活性菌株的筛选

1.3.1 菌株发酵

将菌株接种于灭菌后的放线菌 2 号、放线菌 A₁ 和高氏 I 号培养基三种培养基中, 培养温度为 28 °C、转速为 180 rpm 摇床培养。

1.3.2 菌株鉴定

对具有抗菌活性的 MDCW-126 菌株进行鉴定, 菌株基因组 DNA 的提取、扩增以及测序纯化由上海生工生物工程股份有限公司完成。采用通用引物 7F(5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')、1540R(5'-AG-GAGGTGATCCAGCCGC A-3'), 按照常规方法进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。获得的 16S rDNA 序列提交 EzTaxon-e 数据库, 用软件 CMEGA 6 构建系统发育树^[4]。

1.3.3 浸膏提取

发酵液采用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 对乙

酸乙酯萃取液进行减压浓缩得到粗浸膏。

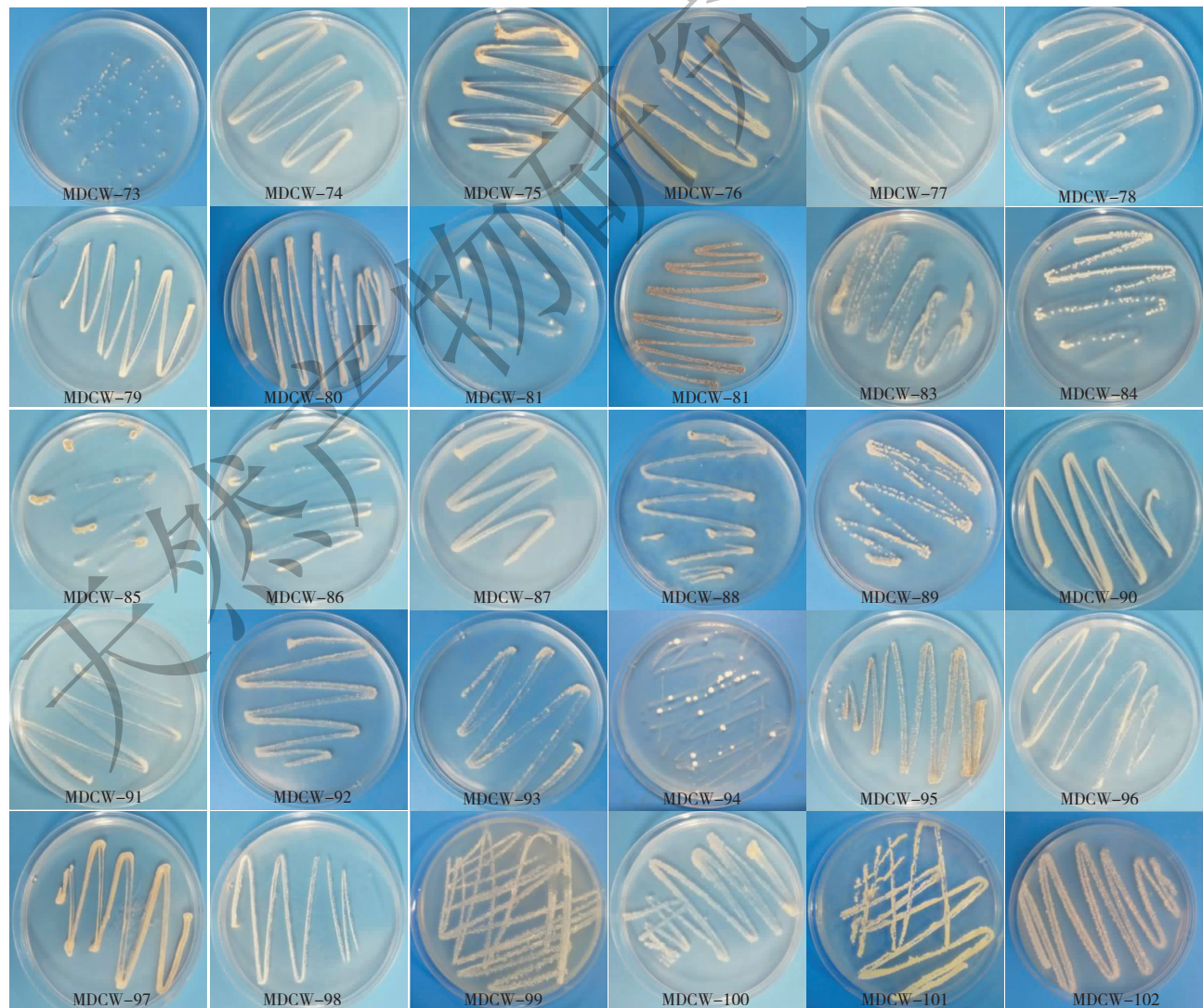
1.3.4 抑菌活性测试

抑菌活性测试采用药敏纸片法和二倍稀释法^[3,7,8]。将金黄色葡萄球菌均匀涂布到 LB 培养基(酵母浸膏 0.5%, 胰蛋白胨 1%, 氯化钠 0.5%, 琼脂 2%)上, 香蕉枯萎病菌涂布到 YPD 培养基(葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母浸膏 1%, 琼脂 2%)上。吸取 10 μL 样品加入无菌滤纸片上, 纸片干燥后贴于培养基上, 倒置于 28 °C 培养箱中, 培养时间为 12 ~ 24 h, 观察有无抑菌圈产生。致病真菌和细菌的阳性药分别是酮康唑和环丙沙星。对有分离得到的化合物采用二倍稀释法测定其最小抑制浓度(MIC)。

2 结果和讨论

2.1 菌株的分离

采用普通稀释法从黄槿、腐木、桐花树以及 6 个海泥样品中分离了 73 株放线菌, 形态见图 1。



续图 1

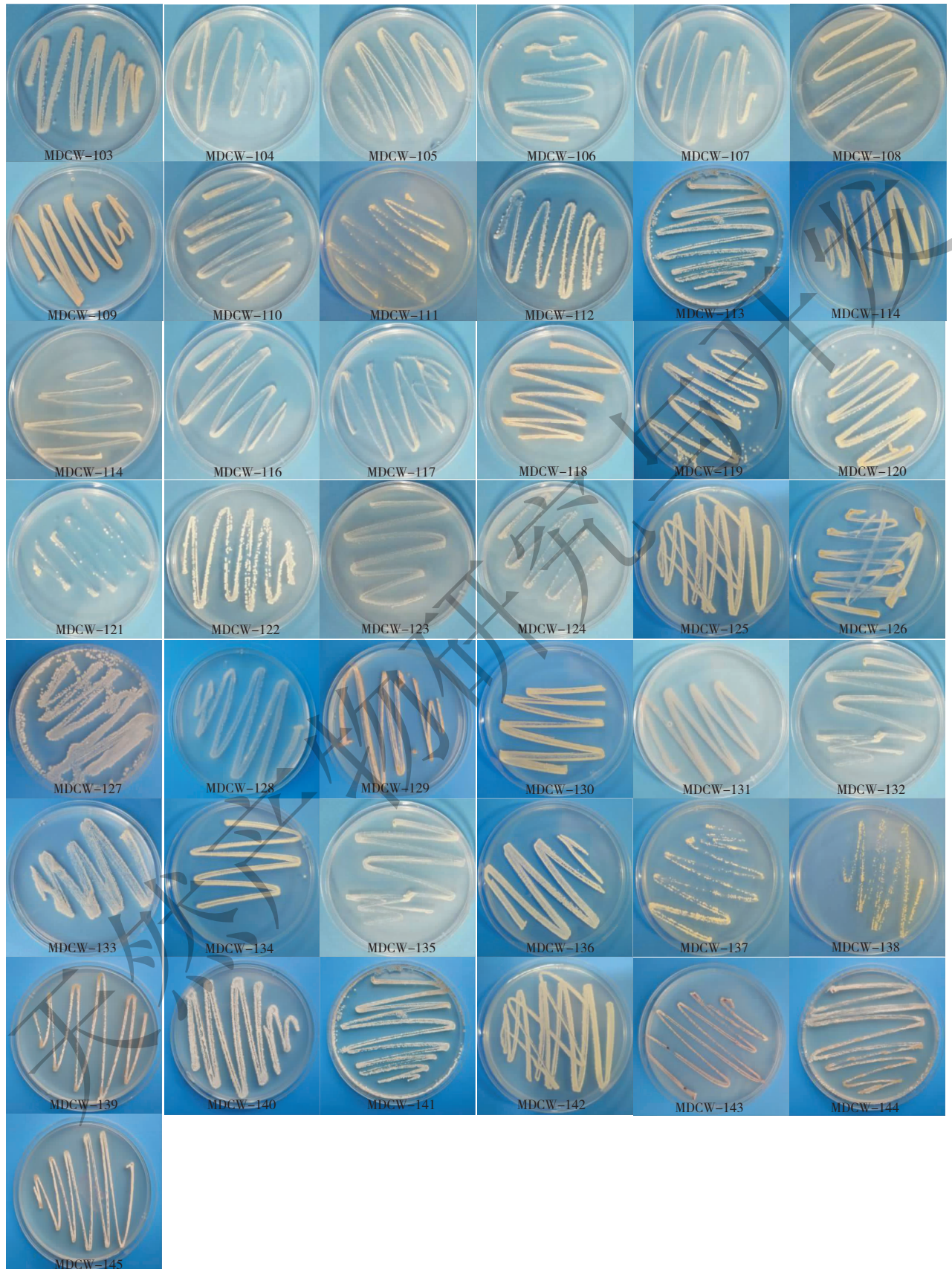


图1 分离获得的菌株菌落培养照片

Fig. 1 Photograph of colony culture of the isolated strains

2.1.1 泥样 1 (7 株): MDCW-80、MDCW-95、MDCW-101、MDCW-114、MDCW-124、MDCW-140、MDCW-143。

2.1.2 泥样 2 (2 株): MDCW-125、MDCW-142。

2.1.3 泥样 3 (4 株): MDCW-118、MDCW-139、MDCW-141、MDCW-145。

2.1.4 泥样 4 (28 株): MDCW-73 ~ 75, MDCW-77、MDCW-81、MDCW-83、MDCW-87 ~ 93, MDCW-97、MDCW-102、MDCW-104 ~ 108、MDCW-110、MDCW-115 ~ 117、MDCW-132 ~ 134、MDCW-138。

2.1.5 泥样 5 (4 株): MDCW-96、MDCW-99、MDCW-113、MDCW-135。

2.1.6 泥样 6 (1 株): MDCW-112。

2.1.7 黄槿 (3 株): MDCW-109、MDCW-129、MDCW-130。

2.1.8 腐木 9 (23 株): MDCW-76、MDCW-78 ~ 79、MDCW-82、MDCW-84 ~ 86、MDCW-94、MDCW-98、MDCW-100、MDCW-103、MDCW-111、MDCW-119 ~ 123、MDCW-126 ~ 127、MDCW-131、MDCW-136 ~ 137、MDCW-144。

2.1.9 桐花树 (1 株): MDCW-128。

结果表明:①在普通稀释法中,未稀释的样品溶液分离得到的放线菌最多(图 2);②从 M2 和 M3 培养基中分得的放线菌较多(图 3),葡萄糖-天冬酰胺和精氨酸甘油培养基没有放线菌长出;③从不同样品来看,泥样 4 和腐木分离的放线菌数量较多(图 4)。

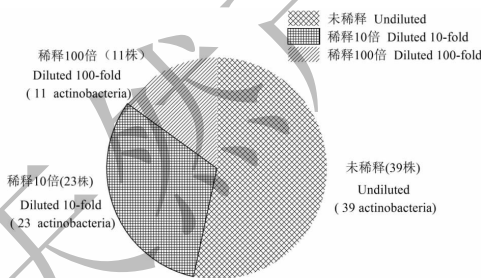


图 2 三种浓度分离的放线菌的数量

Fig. 2 Number of actinobacteria isolated by three concentrations

2.2 活性筛选

采用 3 种培养基分别对每株放线菌进行发酵培养,测定其乙酸乙酯提取物(浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的抗菌活性。活性强弱根据抑菌圈的大小来确定:如果抑菌圈的直径 $< 10 \text{ mm}$,表明有活性;抑菌圈的直

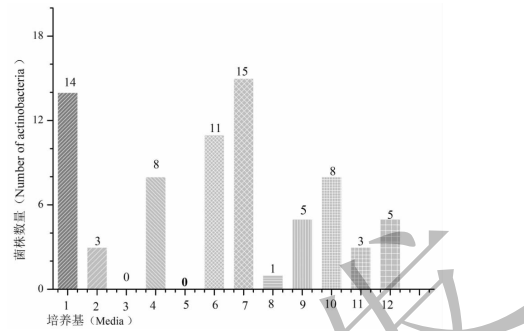


图 3 不同培养基分离放线菌的数量

Fig. 3 Number of actinobacteria isolated on the different media

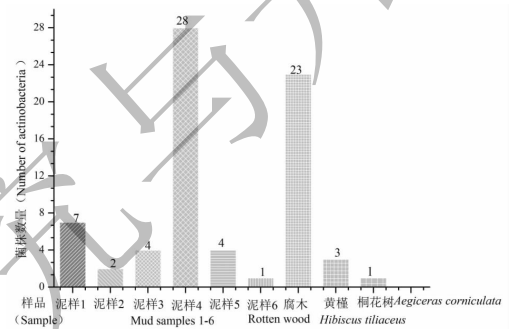


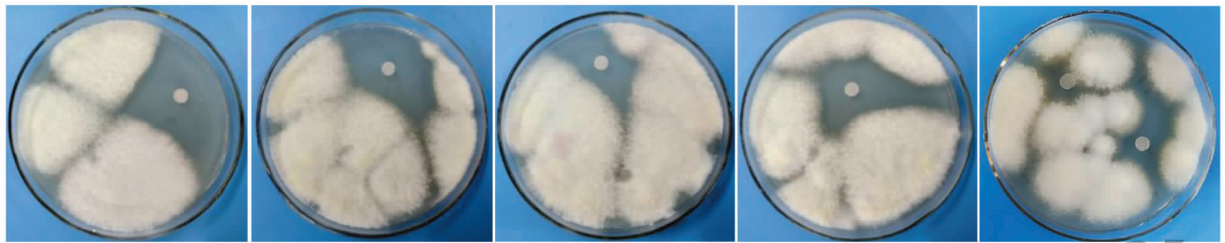
图 4 不同样品分离的放线菌的数量

Fig. 4 Number of actinobacteria isolated from different samples

径在 10 ~ 15 mm 之间,定为中等活性;抑菌圈直径 $> 15 \text{ mm}$ 表明为强活性。结果表明:菌株 MDCW-126 在 A1 培养基中的次级代谢产物具有抗金黄色葡萄球菌和香蕉枯萎病活性,菌株 MDCW-78、MDCW-96、MDCW-107 和 MDCW-125 在 A1 培养基中的次级代谢产物具有中等程度抗金香蕉枯萎病活性(图 5)。菌株 MDCW-103 在 A1 培养基中的次级代谢产物和菌株 MDCW-114 在高氏 I 培养基中的次级代谢产物具有抗金黄色葡萄球菌。对菌株 MDCW-126 进行初步研究。

2.3 菌株鉴定

菌株 MDCW-126 的 16S rDNA 基因的 PCR 扩增序列的长度为 1469 bp,与 NCBI 数据库中的菌株 *Streptomyce* sp. (*Streptomyces sanyensis* 219820) 的 16S rDNA 基因序列同源性为 96%,亲缘关系最近、在系统发育树上处于同一分支。故将菌株 MDCW-126 (GenBank 登录号 MK615749) 初步鉴定为链霉菌 *Streptomyce* sp. (图 6)^[4,9]。进一步观察其形态特征,菌落干燥,与培养基结合致密,与放线菌的链霉菌属的形态特征相一致^[7]。故鉴定菌株 MDCW-126



阳性对照 Positive control

MDCW-126

MDCW-78

MDCW-96

MDCW-107 和 125

图 5 抗香蕉枯萎病的抑菌活性图片

Fig. 5 Picture of anti-*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense activities

为链霉菌 *Streptomyce* sp.。

2.4 活性化合物的分离鉴定

对 *Streptomyces* sp. MDCW-126 的放线菌 A₁ 培

养基中的活性成分进行分离,通过凝胶柱色谱分离,分离得到一个化合物,通过 MS、NMR 和比旋光度鉴定该化合物为星形孢菌素(图 7)^[5,6]。

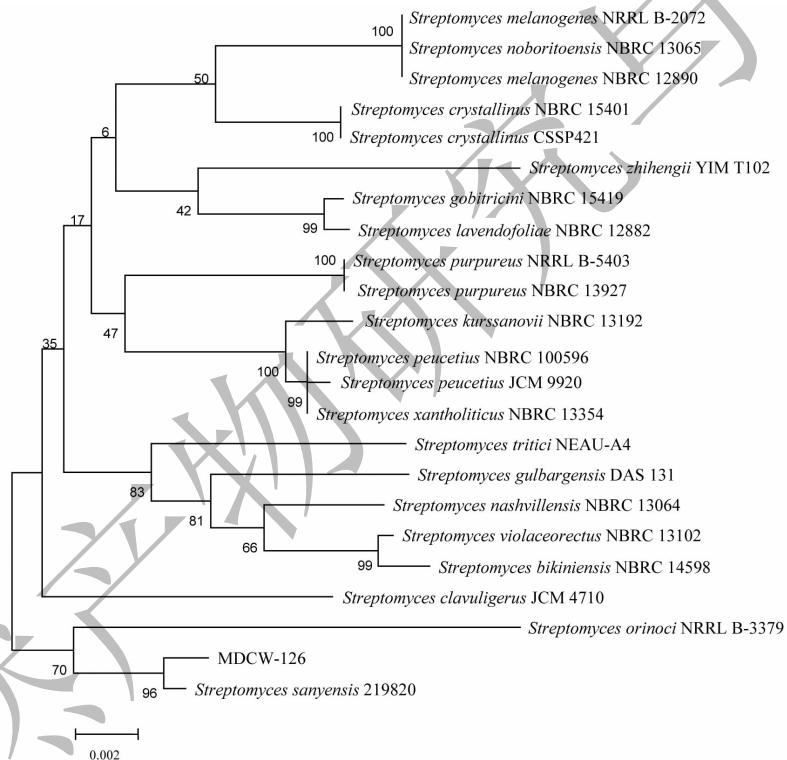


图 6 菌株 MDCW-126 鉴定

Fig. 6 Identification of strain MDCW-126

化合物 1 淡黄色固体 (MeOH), $[\alpha]_D^{25} - 30$ (c 0.2, CHCl₃); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 9.10 (1H, t, $J = 7.92$ Hz, H-4), 9.02 (1H, d, $J = 23.9$ Hz, 4'-NH), 8.42 (1H, s, 6-NH), 7.88 (2H, d, $J = 7.50$ Hz, H-8, 11), 7.35 (2H, t, $J = 7.50$ Hz, H-9, 10), 7.30 (1H, m, H-2), 7.19 (1H, t, $J = 7.45$ Hz, H-3), 6.74 (1H, dd, $J = 2.90, 9.30$ Hz, H-3), 4.79 (2H, m, H-7), 4.24 (1H, s, H-3'), 3.84 (1H, m, H-4'), 2.52 (3H, s, 4'a-CH₃), 2.29 (3H, m, 2'-

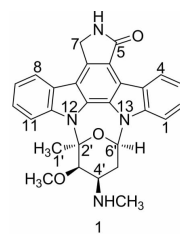


图 7 星形孢菌素的结构式

Fig. 7 The chemical structure of staurosporin

CH₃), 2.06 (3H, s, 3'-OCH₃), 1.97 (2H, m, H-5'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ: 171.9 (s, C-5), 137.8 (s, C-12a), 136.2 (s, C-13a), 132.4 (s, C-7a), 129.7 (s, C-11a), 126.1 (d, C-4), 125.8 (d, C-2), 125.5 (s, C-12b), 125.4 (d, C-9), 123.9 (s, C-7c), 122.7 (s, C-4a), 121.8 (d, C-8), 120.8 (d, C-2), 119.8 (d, C-3), 119.7 (s, C-4c), 114.9 (s, C-4b), 114.3 (s, C-7b), 112.6 (d, C-11), 109.1 (d, C-10), 93.7 (s, C-2'), 80.9 (d, 6'), 79.2 (d, C-3'), 60.0 (d, 3'-OCH₃), 53.5 (d, C-4'), 45.4 (t, C-7), 30.5 (q, 4'-a-CH₃), 27.8 (q, 2'-CH₃), 27.0 (t, C-5'); EI-MS *m/z* 467.1 [M + H]⁺。

3 结论

本研究采用普通稀释法从广西北部湾来源的海泥和植物样品中分离并获得 73 株放线菌。筛选出 5 株对香蕉枯萎病菌具有抑制作用的活性菌株、3 株对金黄色葡萄球菌具有抑制作用的活性菌株,并从其中一株放线菌 *Streptomyces* sp. MDCW-126 的次级代谢产物中分离鉴定了活性化合物——星形孢菌素。

目前,关于广西北部湾海洋来源放线菌的研究主要是菌株的分离和鉴定,并未对菌株的次生代谢产物进行研究^[10,11]。本研究从广西北部湾来源一株海洋放线菌 *Streptomyces* sp. MDW-06 中分离到 1 个新的聚酮类化合物^[4],广西北部湾蕴含着有丰富的海洋生物资源^[12],是产生新颖结构、奇特活性药物先导化合物的重要来源。因此,从广西北部湾海洋来源的放线菌中寻找新的生物活性化合物具有非常大的潜力,值得我们进行深入研究。

参考文献

- 1 Carroll AR, Copp BR, Davis RA, et al. Marine natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2019, 36:122-173.
- 2 Blunt JW, Carroll AR, Copp BR, et al. Marine natural prod-

- ucts [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34:235-294.
- 3 Wang C, Liu C, Lei F, et al. A new diterpene glycoside associated from marine-derived *Penicillium* sp. H1 [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2018, 49:5746-5750.
- 4 Wang C, Qiu Z, Lei F, et al. A new polyketide from marine-derived *Streptomyces* sp. MDW-06 [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2019, 44:413-418.
- 5 Tao L, Cong Z, Zhou S, et al. Antifungal active component of marine *Streptomyces fradiae* HNM0089 [J]. *Chin J Trop Crop* (热带作物学报), 2018, 39:753-757.
- 6 Wang M, Hao X, Li J, et al. Identification of indolocarbazoles from the marine-derived *Streptomyces* sp. IMB3-202 [J]. *Chin Med Biotechnol* (中国医药生物技术), 2018, 13:137-144.
- 7 Song X, Jiang X, Sun J, et al. Antibacterial secondary metabolites produced by mangrove-derived actinomycete *Streptomyces costaricanus* SCSIO ZS0073 [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 29:410-414.
- 8 Chen L, Zhu T, Zhu G, et al. Bioactive natural products from the marine-derived *Penicillium brevicompactum* OUCMDZ-4920 [J]. *Chin J Org Chem* (有机化学), 2017, 37:2752-2762.
- 9 Wang C, Wang L, Fan J, et al. Cytotoxic compounds from the deep-sea sediment-derived *Streptomyces malaysiensis* OUCMDZ-2167 [J]. *Chinese J Org Chem* (有机化学), 2017, 37:658-666.
- 10 Shi SB, Yang LF, Jiang MG, et al. A comparison of actinomycetes isolation medium with samples from mangrove habitats in Maowei Sea, Guangxi Beibu Gulf [J]. *Microbiol China* (微生物学通报), 2018, 45:2331-2340.
- 11 Feng L, Meng F. Screening and separation of anti-tuberculosis active substances from *Actinomycete* co-evolution with *Spongilla* [J]. *J Shandong Univ; Health Sci* (山东大学学报:医学版), 2016, 54:29-33.
- 12 Jiang L, Wu Y, Chen J, et al. Isolation and identification of the rare *Actinomyces* sp. with antimicrobial activity from mangrove soil [J]. *J Chin Antibiotics* (中国抗生素杂志), 2017, 42:311-317.