

贵州黔南喀斯特洞穴放线菌抗菌活性筛选及差异研究*

牛雪可^{1,2**}, 兰永哲^{1,2}, 李文均³, 曹煜⁴, 黄劲², 廖万清⁵, 康颖倩^{1,2***}

(1. 贵州医科大学 基础医学院 微生物学教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 贵州省微生物与人类健康关系研究人才基地暨贵州省普通高校病原生物学特色重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 中山大学 生命科学学院, 广东 广州 510275; 4. 贵州医科大学附院 皮肤科, 贵州 贵阳 550004; 5. 第二军医大学上海长征医院 真菌学研究所, 上海 200003)

[摘要] 目的: 探索贵州黔南荔波喀斯特地区洞穴放线菌资源, 筛选具有抗菌活性的放线菌菌株。方法: 采集贵州荔波茂兰喀斯特森林无名洞穴内土壤样品, 采用纯培养的方法分离菌株, 并扩增其 16S rRNA 基因、筛选其中放线菌; 使用 3 种培养基发酵, 管碟法对放线菌进行抗菌活性检测。结果: 共分离出 35 株放线菌, 分属于 3 个目、5 科、9 个属、22 个种, 红球菌属为优势菌属 (45.7%); 42.8% 的菌株对至少一种测试菌具有抗菌活性; 使用 AM3 及 ISP5 培养基获得具有抗性发酵液的比例均占 53.3%, RA 培养基只有 33.3% 的发酵液具有抗性。结论: 贵州黔南喀斯特无名洞穴内存在丰富的具备潜在抗菌活性的放线菌资源, 不同的发酵培养条件影响放线菌抗菌活性。

[关键词] 喀斯特; 放线菌; 抗菌活性; 培养条件; 筛选; 贵州

[中图分类号] R379.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)05-0519-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.05.005

Isolation and Identification of Actinomycetes with Antibacterial Activity from Karst Caves in Southern Guizhou

NIU Xueke^{1,2}, LAN Yongzhe^{1,2}, LI Wenjun³, CAO Yu⁴, HUANG Jing², LIAO Wanqing⁵, KANG Yingqian^{1,2}

(1. Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Guizhou Talent Base Program of Guizhou Provincial Government, Key Laboratory of Medical Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China; 4. Department of Dermatology and Venereal Disease, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 5. Institute of Medical Mycology, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] Objective: To explore local actinobacteria resources, and screen actinobacteria strains with antibacterial activity in Southern Guizhou China. **Methods:** Soil samples from unknown caves in Maolan forest were collected and isolated by pure culture. The 16S rRNA gene was amplified and the actinomycetes were screened. Five kinds of culture media were used for fermentation, and the antimicrobial activity of three clinical pathogens was detected by cylinder plate method. **Results:** A total of 35 actinomycetes from Karst caves were isolated, belonging to 3 orders, 5 families, 9 genera and 22 species. The antimicrobial activity of these actinomycetes were tested against pathogenic bacteria. The result suggested that 42.8% of these strains showed antimicrobial activity against at least one tested bacterium. The media used for the growth played a crucial role in the antimicrobial activity. The rate of the antimicrobial activity was highest in AM3 and ISP5 (55.3%) followed by R2A (33.3%).

* [基金项目] 贵州省科技厅优秀青年科技人才培养计划项目 [黔科合(2017)5639]; 贵州省卫计委医疗卫生援黔专家团廖万清院士工作室项目 [gzwj2016-1-050]; 贵阳市科技局项目 [筑科合同(2017)5-19]; 贵州省科技厅科技支撑计划项目 [黔科合支撑(2019)2873]

** 贵州医科大学 2016 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: kangyingqian@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2019-05-28 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190528.0227.005.html>

Conclusion: There are abundant actinobacteria with antimicrobial activity in Karst caves. Fermentation media have influence on the antimicrobial activity.

[Key words] Karst; actinomycetes; antimicrobial activity; culture conditions; screen; Guizhou

在深海热液口发现的、以化能无机营养生物为基础的生态系统已颠覆了所有生命都依赖于光的理论^[1],喀斯特洞穴作为极端环境中一种特殊的生态系统,具有黑暗、对流交换缓慢、营养物质匮乏等特点,洞穴环境虽特殊但仍有大量生理功能特殊和耐受适应的生物存在,且多样性丰富^[2]。由于地理条件的限制,大多数洞穴未被探测或极难进入,因此受到外界环境干扰少,能够较好的保持其原始性,洞穴内常生存着一些能够耐受极端环境的微生物,且微生物还处于较为原始的抗药性阶段,可以在其中寻找天然的抗菌药物。目前贵州省喀斯特地区放线菌研究主要集中在土壤放线菌生物多样性^[3-5]、喀斯特环境与微生物的相互作用方面,对天然喀斯特洞穴内放线菌生物多样性及抗菌活性研究有限,而位于贵州荔波县的茂兰国家级喀斯特森林自然保护区,是我国中亚热带喀斯特地貌上原生性森林植被保存较完好的一块宝地,本实验从茂兰喀斯特天然洞穴中采集样本,对原生态微生物进行纯培养,选择真菌、细菌、放线菌中 5 种致病菌进行放线菌的抗菌活性研究,为贵州省放线菌的分类及资源开发提供研究资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品 2018 年 8~9 月于贵州省荔波市茂兰喀斯特森林无名洞穴内采集,置于无菌纸袋中,运回实验室 4℃ 保存。

1.1.2 培养基 发酵培养基 1 (AM3): 可溶性淀粉 10 g, 大豆粉 10 g, 甘油 10 g, 蛋白胨 15 g, CaCO₃ 2 g。发酵培养基 2 (RA): 可溶性淀粉 20 g, 葡萄糖 10 g, 麦芽提取物 10 g, 麦芽糖 10 g, 玉米粉 5 g, 微量元素 100 U/L, CaCO₃ 2 g。发酵培养基 3 (ISP5): 葡萄糖 10 g, 酵母提取物 4 g, 麦芽提取物 10 g。纯化培养基 (TSA): 大豆蛋白胨 5 g, 胰蛋白胨 15 g, NaCl 15 g, 琼脂 15 g。

1.1.3 测试病原微生物 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) ATCC25922、白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC10231、新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) H99、土地戈登氏菌 (*Gordonia terrae*) IFM 161, 大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌为贵州医科大学微生物学教研室保存菌株,其余均获赠于日本千叶大学真菌研究所。

1.1.4 主要试剂 TIANGEN® 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Genstar® PCR MIX、国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 放线菌分离 将土壤样本风干研磨后,使用无菌水制成 10⁻² 土壤悬液,取 200 μL 涂布于分离平板上,28℃ 培养 7 d,观察生长菌落的形态特征,挑取单菌落接种于 TSA 板进行纯化,28℃ 培养 4~5 d,直至获得单一纯菌。

1.2.2 基因组 DNA 提取及 16S rRNA 扩增 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒制备 DNA 模板,采用 16S rRNA 通用引物^[6] 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 1492r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 进行 PCR 扩增,反应体系及条件参照文献^[7]。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后送英淮捷基(上海)贸易有限公司进行序列测定。

1.2.3 16S rRNA 基因比对 将获得的序列在 CLUSTAL_X program 进行比对后^[8],与现有的纯培养序列在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 及 EzTaxon-e 工具进行比对^[9]。

1.2.4 抗菌活性实验 将筛选出的放线菌每株接种于 AM3、RA、ISP5 三种不同的培养基中,置于 28℃ 摇床中发酵 1 周,10 000 r/min 离心取上清,过 0.22 μm 滤膜,获得发酵液。将病原菌活化后,制成菌悬液 (0.5 麦氏),均匀涂布于无菌 PDA/TAS 平板上,使用管碟法^[10],于 37℃ 正置培养 24~48 h。十字交叉法记录抑菌圈直径。

2 结果

2.1 分离到的放线菌

从茂兰喀斯特洞穴样品中共分到 35 株放线菌,归属于放线菌门下 3 个目 5 个科 9 个属 22 个种,其中优势菌属为 *Rhodococcus* 属 (45.7%), *Arthrobacter* 属 (17.1%)。见表 1。

表 1 贵州荔波茂兰喀斯特森林无名洞穴放线菌分离结果

Tab. 1 Actinomycetes isolation result in Kast caves

目 (order)	科 (Family)	属 (Genus)	所占比例 (%)	
<i>Corynebacteriales</i> (棒杆菌目)	<i>Nocardiaceae</i> (诺卡氏菌科)	<i>Rhodococcus</i> (红球菌属)	45.70	
<i>Micrococcales</i> (微球菌目)	<i>Micrococcaceae</i> (微球菌科)	<i>Paenarthrobacter</i> (巴氏杆菌属)	8.57	
		<i>Arthrobacter</i> (节杆菌属)	17.10	
		<i>Paeniglutamicibacter</i> (儿茶酸杆菌属)	5.71	
		<i>Microbacterium</i> (微杆菌属)	5.71	
		<i>Pseudarthrobacter</i> (假节杆菌属)	2.86	
		<i>Promicromonosporaceae</i> (原小单孢菌科)	<i>Cellulosimicrobium</i> (纤维单胞菌属)	2.86
		<i>Sanguibacteraceae</i> (血杆菌科)	<i>Oerskovia</i> (厄氏菌属)	2.86
<i>Streptomycineae</i> (链霉菌目)	<i>Streptomycetaceae</i> (链霉菌科)	<i>Streptomyces</i> (链霉菌属)	8.57	

2.2 抗菌活性

35 株放线菌中 15 株对至少一种病原菌具有抑制作用, 占比 42.8%, 其中编号为 K1028、K1006、K2049 的菌株对白念珠菌有抑制作用, 尤其 K1028 菌株抑制作用最强, 属于微杆菌属; 9 株放线菌对新生隐球菌有抑制作用, 其中 K4211-2 (巴氏杆

菌)、K4213 (厄氏菌属)、K4239-2 (链霉菌属) 表现出了极强的抑制作用; K4239-2 (链霉菌属) 及 K3102 (链霉菌属)、K4212-3 (红球菌属) 对戈登氏菌具有抑制作用; K3218-1、K417 对金黄色葡萄球菌具有抑制作用, K4213、K417、K3219、K2010 对大肠埃希菌具有抑制作用。见表 2。

表 2 分离放线菌对 5 种病原菌抗菌活性

Tab. 2 Antibacteria activity of actinomycetes

菌株编号	发酵培养基	<i>Cryptococcus neformans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Gordonia terrae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
K4211-2	1	-	-	-	-	-
	2	++	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
K4218-1	1	++	-	-	+++	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
K4213	1	+++	-	-	-	+++
	2	-	-	-	-	-
	3	++	-	-	-	-
K4212-2	1	+	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
K4212-3	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
K4239-2	1	-	-	++	-	-
	2	+++	-	+++	-	-
	3	++	-	-	-	-
K1028	1	-	-	-	-	-
	2	-	+++	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
K1006	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	++	-	-	-

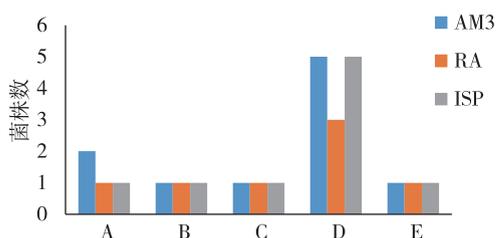
续表

菌株编号	发酵培养基	<i>Cryptococcus neformans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Gordonia terrae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
K441	1	+	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	++	-	-	-	-
K2049	1	-	++	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
K2031	1	+++	-	-	-	-
	2	+++	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
K3102	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	++	-	-
K417	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+++	+++
	3	-	-	-	-	-
K3219	1	-	-	-	-	+++
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
K2010	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	+++

注:+++表示抑菌圈直径>25 mm,++表示抑菌圈直径 15 mm~25 mm,+为抑菌圈直径<15 mm,-表示无抑菌圈

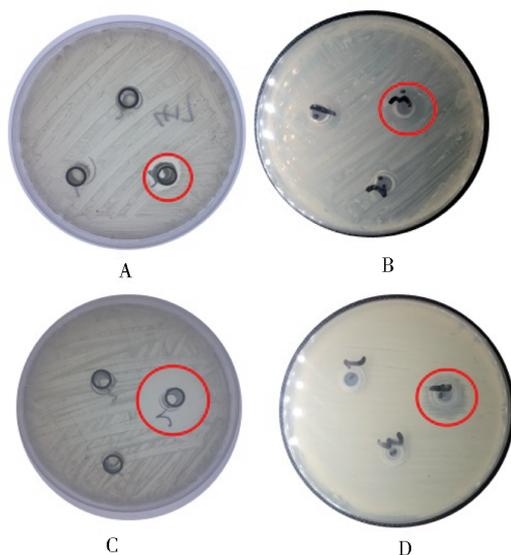
2.3 不同培养基获得抗菌活性的差异

在抗菌活性试验中,同一菌株使用不同的培养基发酵,其代谢产物对同一病原菌的抗菌活性差异显著。15 株活性菌株中,在 AM3 培养基中具有抗菌活性的菌株有 8 株,占 53.3%,ISP5 培养基有抗菌活性菌株数量与 AM3 相同,RA 培养基有抗菌活性菌株数量为 5 株,占比 33.3%。见图 1、图 2。



注:A为*E. coli*,B为*S. aureus*,C为*G. terrae*,
D为*C. neformans*,E为*C. albicans*

图 1 放线菌在不同培养基发酵条件下的抑菌谱
Fig. 1 Antimicrobial spectrum of actinomycetes under different fermentation conditions



注:A为K1032菌株3号发酵液对*Gordonia terrae*的抑制作用,B为K441菌株3号发酵液对*Cryptococcus neformans*的抑制作用,C为K1028菌株2号发酵液对*Candida albicans*的抑制作用,D为K2049菌株1号发酵液对*Candida albicans*的抑制作用

图 2 部分菌株在不同发酵培养条件下的抑菌情况
Fig. 2 Difference antimicrobial activity under different culture condition

3 讨论

本研究首次对贵州茂兰喀斯特森林内的洞穴进行了放线菌类群的分离鉴定及抗菌活性筛选研究,选择使用了3种不同的发酵培养基(RA、ISP5、AM3)对放线菌产生抗菌活性差异的影响因素进行了比较和探讨。共分离获得35株可培养放线菌,其中棒杆菌目和微球菌目所占比例各半,优势菌属为红球菌属(45.7%)、其次为节杆菌属(17.1%),另有少量的链霉菌属,而湖北、云南、河南等地洞穴放线菌优势菌属为链霉菌属^[11-13],表明微生物群落多样性存在地域性差异。在分离到的放线菌中42.8%的菌株表现出了抗菌活性,尤其是对病原真菌有较强的抑制作用。抗真菌抗生素的发展一直较抗细菌抗生素缓慢^[14]。近年来,随着HIV感染的蔓延、免疫抑制剂的广泛使用、免疫功能低下患者的增加、人口的老齡化、器官移植等医疗技术的发展以及留置医疗器械的广泛使用等,导致侵袭性真菌感染的发病率及耐药率逐渐升高^[15-16]。侵袭性真菌感染不仅能造成皮肤、黏膜的浅表感染,还能造成免疫功能低下患者致命的系统感染。有学者从肺癌、艾滋病、慢性粒细胞白血病等样本中分离出大量念珠菌^[17-18],成为医院感染排名第四位的病原菌^[19],也是导致血液、肿瘤和ICU病房患者最主要的死亡原因之一,致死率达到40%~60%^[20]。白念珠菌感染的日益流行及其较高的致死率一直都是人们关注的。本研究发现了多株对念珠菌及隐球菌具有抑制作用的活性菌株,研究结果有助于天然、高效、广谱、抗真菌抗生素的开发,具有巨大的利用价值。

本次研究使用的3种发酵培养基,碳氮源的成分的差异影响了放线菌抗菌活性。碳源和氮源是影响微生物代谢的重要因素,从AM3及ISP5培养基发酵产物中获得具有抗性菌株的比例高于RA培养基。考虑单因素影响,促进放线菌抗菌活性物质产生的最佳碳源为玉米粉其次为可溶性淀粉及葡萄糖,最佳氮源为蛋白胨其次为黄豆粉酵母粉^[21-24]。本次洞穴中分离到的放线菌在使用葡萄糖作为碳源或麦芽提取物作为氮源的培养基发酵时,产生具有抗菌活性的物质量少或无抗菌活性的物质产生,一方面提示麦芽提取物并非理想的洞穴放线菌活性物质产生的营养因子,另一方面说明淀粉作为碳源有利于发酵液中活性物质的产生和代谢^[25],培养基的碳氮源差异最终导致分离到的放

线菌的代谢谱变化,使抑菌活性更强或失去了抑菌活性。因此在进行洞穴放线菌活性筛选时,可以选择黄豆粉、酵母粉等复合氮源,其中不仅含糖,氮素和灰分,还含有促进放线菌生成及孢子萌发的生长因素,可以促进新的天然活性产物的发现^[26]。

综上所述,本研究对黔南喀斯特洞穴极端环境的放线菌资源进行了初步调查,分离得到了具有潜在开发利用价值的放线菌资源,对当地放线菌微生物资源的开发和保护有重要的意义。

4 参考文献

- [1] JANNASCH H W. Review lecture: The chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents[J]. Proceedings of the Royal Society of London, 1985, 225(225):277-297.
- [2] LUO W, WANG S, LIU X. Research progresses and prospect of chimney effect about carbon cycle in the karst cave system[J]. Advances in Earth Science, 2014, 29(12):1333-1340.
- [3] 金方,刘涛华,牟丽丽,等. 贵州地区土壤中需氧放线菌的分离鉴定[J]. 贵州农业科学, 2015(3):114-117.
- [4] 刘倩瑛. 喀斯特地区微生物生态系统及其与气候因子之间的关系——以湖北清江和尚洞为例[D]. 武汉: 中国地质大学, 2010.
- [5] 左俊辉,罗群,郭喜梅. 中国地貌三大阶梯对喀斯特发育的若干影响——以中国西南岩溶区为例[J]. 科技信息, 2012(18):210-211.
- [6] LANE, D J. 16S/23S rRNA sequencing [M]. New York: John Wiley and Sons Inc, 1991, 115-175.
- [7] MENG Y C, LIU H C, YANG L L, et al. Microbacterium sorbitolivorans sp. nov. a novel member of Microbacteriaceae isolated from fermenting bed in pigpen[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(12):5556.
- [8] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25:4876-4882.
- [9] YOON S H, HA S M, KWON S, et al. Introducing EzBio-Cloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67:1613-1617.
- [10] 李青,刘华梅,陈振民,等. 管碟法测定苏云金杆菌上清液中增效物质含量的研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(3):73-74.
- [11] 戴素娟,李静,刘少伟,等. 河南神仙洞放线菌资源勘探及抗菌活性筛选[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(9):1112-1115.
- [12] 程娟. 云南喀斯特洞穴可培养放线菌多样性及其酶活筛选研究[D]. 昆明: 云南大学, 2014.

(下转第535页)