

文章编号: 1674-7054(2020)02-0156-07

海绵共附生放线菌的分离鉴定与抑菌活性分析

肖珂^{1,2}, 周双清³, 许云¹, 吴文婧¹, 夏薇²,
张荣萍², 黄东益², 黄小龙¹

(1. 热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228; 2. 海南大学热带作物学院, 海口 570228;
3. 海南大学园艺学院, 海口 570228)

摘要: 为了探究海南海绵共附生放线菌资源的多样性及潜在的药用价值, 采用 4 种分离培养基分离海南文昌海域海绵的共附生放线菌, 利用 16S rRNA 序列分析对分离的放线菌进行鉴定, 采用滤纸片扩散法对分离放线菌的发酵产物进行抗菌活性分析。结果表明, 从 4 种海绵中共获得 50 株放线菌, 所分离菌株归属于 5 个亚目、6 个科和 7 个属, 包括链霉菌属、小单孢菌属、红球菌属、糖多孢菌、栖白蚁菌属、分枝杆菌属和 *Krasilnikoviella* 属, 其中 *Krasilnikoviella* 为首次从海绵中分离得到, 4 株海洋放线菌为潜在的新物种。抗菌活性测试显示 48% 的分离菌株呈现抗细菌活性, 24% 的分离菌株呈现抗植物丝状病原真菌活性。本研究结果初步揭示了海南文昌海域海绵共附生放线菌的可培养物种多样性及其发酵产物的抑菌活性。

关键词: 海绵; 放线菌; 分离; 抑菌活性

中图分类号: Q 93-331; Q 993.13² **文献标志码:** A **DOI:** 10.15886/j.cnki.rdxwb.2020.02.005

海洋放线菌是海洋微生物的重要组成部分, 也是海洋微生物新天然产物挖掘的重要资源之一^[1]。海洋放线菌产生多种新天然产物, 结构类型包括聚酮类、生物碱类、脂肪酸类、肽类、萜烯类等, 并具有多种生物活性, 包括抗菌、抗寄生虫、抗疟、抗炎、抗氧化、抗肿瘤以及免疫调节剂等^[2]。因此, 海洋放线菌一直受到国内外海洋天然产物研究者的青睐。海洋放线菌广泛栖息于各种海洋生态环境, 包括海水、海底沉积物、海洋动物(如海绵、珊瑚)、海洋植物(如海藻、海草)表面及内部组织等。其中, 海绵是海洋放线菌的良好宿主, 海洋放线菌与海绵形成了附生、共生或者内生的相互关系^[3]。有研究表明, 海绵共附生放线菌不仅种类丰富多样, 而且产生结构新颖的次级代谢产物^[1]。这些次级代谢产物在海绵的化学防御中起到了重要的作用, 同时还具有抗菌、抗肿瘤和抗寄生虫等生物活性, 具有潜在的药用开发价值^[4]。因此, 近年来海绵共附生放线菌已成为海洋微生物天然产物研究的热点。海南岛地处热带, 四面环海, 海绵种类繁多, 为研究海绵共附生放线菌提供了丰富的材料。鲍时翔等^[5-6]从三亚和琼海海域采集的海绵中分别分离到具抗肿瘤活性和抗流感病毒活性的共附生链霉菌。HUANG Y 等^[7]从南海采集的海绵样品中分离到多个种属的共附生放线菌, 27.5% 的菌株具有抗菌活性, 91% 的菌株含有聚酮类或非核糖体肽合成酶基因。本实验室从三亚海域采集的海绵中分离到放线菌新种 *Streptomyces spongiicola* HNM0071, 并从中发现了抗肿瘤先导化合物十字孢碱和棘霉素^[4,8]。研究显示海南的海绵共附生放线菌资源具有种类丰富新颖、药用价值高的特点, 值得广泛深入的研究。基于此, 笔者从海南文昌海域采集多种海绵作为样品, 分离其共附生放线菌、并分析其菌株多样性和抗菌活性, 旨在为此类海洋共附生放线菌资源的前期开发提供资源和科学依据。

收稿日期: 2020-02-02

修回日期: 2020-02-20

基金项目: 2019 年海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC069; 2019RC133)

第一作者: 肖珂(1996-), 女, 海南大学热带作物学院 2017 级硕士研究生. E-mail: 1434128521@qq.com

通信作者: 黄小龙(1977-), 男, 副教授. 研究方向: 海洋微生物资源与应用. E-mail: hx12012@163.com

1 材料与方 法

1.1 实验材料 海绵样品: 采集于海南文昌东郊椰林海 域, 样品采集后, 4 h 内带回实验室 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用, 共 4 种海绵样品(编号: WC-33, WC-4, WC-20, WC-24)。病原细菌: 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*); 病原真菌: 薯蓣炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*Cg9)、芒果炭疽病菌(*Colletotrichum asianum*T0408)、橡胶炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*RC178)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*f. sp. *cubense*race 4)、木薯采后根腐病菌(*Lasiodiplodia theobromae*)和水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*); 以上病原细菌均来自本实验室保存菌株。

1.2 培养基 (1)分离培养基 I: 可溶性淀粉 20 g, KNO_3 1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 陈海水 500 mL, 自来水 500 mL, 琼脂 20 g, pH 7.4 ~ 7.6。(2)分离培养基 II: 甘油 6 mL, 精氨酸 1.0 g, 磷酸氢二钾 1.0 g, 硫酸镁 0.5 g, 琼脂 20 g, 陈海水 500 mL, 自来水 500 mL, pH 自然。(3)分离培养基 III: 葡萄糖 1 g, 蛋白胨 0.5 g, 胰胨 0.3 g, NaCl 0.5 g, 复合维生素 3.75 mg(维生素 B1, 核黄素, 烟酸, 维生素 B6, 泛酸钙, 肌醇, p-氨基苯甲酸各 0.5 mg, 生物素 0.25 mg), 陈海水 500 mL, 自来水 500 mL, 琼脂 20g, pH 7.2。(4)分离培养基 IV: 酵母浸粉 4 g, 麦芽浸粉 10 g, 葡萄糖 4 g, 琼脂 20 g, 陈海水 500 mL, 自来水 500 mL, pH 7.0。以上 4 种分离培养基的选用基于不同的碳氮源组合和不同的 pH 值, 以适应不同海洋放线菌的生长需求。

抑制剂: 放线菌酮 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和重铬酸钾 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (加入所有分离培养基中); ISP2 培养基: 酵母浸粉 4 g, 麦芽浸粉 10 g, 葡萄糖 4 g, 陈海水 500 mL, 自来水 500 mL, 琼脂 20 g, pH 7.0; 发酵培养基: 酵母浸粉 4 g, 麦芽浸粉 10 g, 葡萄糖 4 g, 陈海水 500 mL, 自来水 500 mL, pH 7.0。

1.3 海洋放线菌菌株分离 将采集的海绵样品用无菌海水清洗 3 次, 除去表面附着物及其他杂质; 称取海绵样品各 1 g, 剪碎, 置于无菌研钵中; 加入 10 mL 无菌水研磨成匀浆, 旋涡振荡 1 min, 静置 30 s, 吸取上清液按体积比为(1 : 10), (1 : 100), (1 : 1 000)的比例稀释; 取稀释 $100\text{ }\mu\text{L}$ 分别涂布于 4 种分离培养基, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 培养 7 ~ 28 d; 菌落长出后, 挑取单菌落到 ISP2 培养基上, 反复纯化。纯化后的菌株分别保存于 ISP2 斜面 and $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的无菌甘油(20%)。

1.4 海洋放线菌菌株鉴定 从分离的菌株中选取形态特征差异较大的菌株进行 16S rRNA 序列分析, 放线菌 DNA 的提取参照周双清等^[9]的方法, 即挑取绿豆大小的放线菌单菌落于无菌的 1.5 mL Eppendorf 管中备用; 在装有菌体的 Eppendorf 管中加入 0.5 mL 10%(w/v) 的无菌 Chelex-100 溶液, 在旋涡混合器上振荡 5 s, 沸水浴 10 min, 冷却至室温后 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取上清作为 PCR 的模板进行 16S rRNA 基因扩增, PCR 引物序列: 27F(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG), 1492R(GGTTACCTTGTTACGACTT), 扩增产物送往上海生物工程有限公司进行测序。根据待测菌株的 16S rRNA 基因测定序列的结果, 将获得的序列登录 EzTaxon 数据库(<https://www.ezbiocloud.net/>)中做同源序列比对搜索, 以确定菌株的种属。

1.5 海洋放线菌抑菌活性分析 用无菌竹签挑取绿豆大小菌块接种发酵培养基, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养 7 ~ 10 d, 三倍体积的乙酸乙酯萃取发酵培养液 3 次, 萃取液合并后经减压旋蒸浓缩得粗提物, 将粗提物溶解于 4 mL 甲醇, 得到菌株发酵提取物。(1)抗细菌活性评价: 取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的上清液加在直径为 6 mm 的滤纸片上, 待滤纸片风干后, 贴在已分别接种了 4 种病原细菌的琼脂营养培养基表面(细菌浓度 $1\times 10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$), $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 1 d, 采用十字交叉法测定抑菌圈直径, 重复 3 次。(2)抗真菌活性评价: 用无菌竹签挑取病原真菌菌块置于 PDA 平板中心, 在距离 PDA 平板中心 2 cm 处贴滴加有发酵提取物的滤纸片, 左右各 1 片, 3 点成线, 均匀排列, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 5 ~ 7 d, 观察并计算抑制率, 重复 3 次。

抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/ 对照菌落直径。

2 结果与分析

2.1 海绵共附生放线菌的分离及鉴定 笔者采用 4 种分离培养基,对采集于海南文昌海域的 4 种海绵的共附生放线菌进行分离纯化,共获得 50 株纯化的放线菌。为确定分离菌株的分类地位,依据菌株菌落形态差异将分离菌株初步分组,挑选出各组中的代表性特征菌株进行下一步分析,共选择 22 株菌株,并扩增其 16S rRNA 序列测序分析。结果(图 1)表明,这 50 株菌株隶属于 6 个科(*Streptomyces*、*Micromonosporineae*、*Pseudonocardia*、*Nocardia*、*Corynebacterineae* 和 *Promicro*、*monosporaceae*), 7 个属(链霉菌属 *Streptomyces*、小单孢菌属 *Micromonospora*、栖白蚁菌属 *Isoptericola*、*Krasilnikoviella* 属、分枝杆菌属 *Mycobacterium*、红球菌属 *Rhodococcus*、糖多孢菌属 *Saccharopolyspora*)。其中链霉菌属 *Streptomyces* 为优势属,共分离得到 19 株菌,约占 38.00%;其次为小单孢菌属 *Micromonospora*,共分离得到 18 株菌,约占 36.00%;*Krasilnikoviella* 属分离得到 7 株菌,约占 14.00%;红球菌属 *Rhodococcus* 和栖白蚁菌属 *Isoptericola* 都分别分离得到了 2 株菌,约占总数的 8.00%;分枝杆菌属 *Mycobacterium* 和糖多孢菌属 *Saccharopolyspora* 各分离到了 1 株菌,约占总数的 4.00%。此外,红球菌属菌株 HNM0569、链霉菌属菌株 HNM0574、小单孢菌属菌株 HNM0616 以及分枝杆菌属菌株 HNM0591 与亲缘关系最近的有效发表种的 16S rRNA 基因序列的相似性都 \leq 98.7%(表 1)。根据使用基因组数据进行原核生物分类的最低标准^[10],这 4 个菌株可能是潜在的新物种。

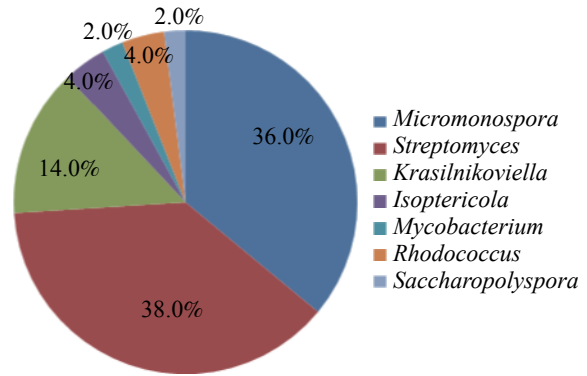


图 1 海绵共附生放线菌的多样性

Fig. 1 Diversity of sponge symbiotic actinomycetes

此外,红球菌属菌株 HNM0569、链霉菌属菌株 HNM0574、小单孢菌属菌株 HNM0616 以及分枝杆菌属菌株 HNM0591 与亲缘关系最近的有效发表种的 16S rRNA 基因序列的相似性都 \leq 98.7%(表 1)。根据使用基因组数据进行原核生物分类的最低标准^[10],这 4 个菌株可能是潜在的新物种。

表 1 代表性菌株 16S rRNA 基因序列分析

Tab. 1 16S rRNA gene sequence analysis of representative strains

编号 Numbering	GeneBank ID	样品来源 Sample source	最相似典型菌株(登录号) The most similar typical strain (login number)	相似度/% Similarity
HNM0594	MN446727	WC-4	<i>Isoptericolacucumis</i> AP-38 T(KU201961)	99.14
HNM0579	MN446724	WC-20	<i>Isoptericolananjingensis</i> H17 T(HQ222356)	99.93
HNM0562	MN446736	WC-33	<i>Krasilnikoviellaflava</i> DSM 21481 T(jgi.1053042)	99.79
HNM0577	MN446737	WC-33	<i>Krasilnikoviellamuralis</i> T6220-5-2bT(LC148843)	99.58
HNM0617	MN446738	WC-33	<i>Micromonosporaaurantiaca</i> ATCC 27029T(CP002162)	99.58
HNM0608	MN446730	WC-20	<i>Micromonosporachalcea</i> DSM 43026 T(X92594)	99.06
HNM0616	MN446734	WC-33	<i>Micromonosporaechinofusca</i> DSM 43913 T(LT607733)	98.70
HNM0609	MN446731	WC-4	<i>Micromonosporasedimnicola</i> DSM 45794T(FLRH01000004)	99.85
HNM0615	MN446733	WC-33	<i>Micromonosporasediminis</i> CH3-3 T(AB889541)	99.78
HNM0619	MN446735	WC-33	<i>Micromonosporaterminaliae</i> TMS7 T(KX394339)	99.28
HNM0581	MN446725	WC-20	<i>Micromonosporatrujilloniae</i> 234402 ^T (HQ123435)	99.03
HNM0611	MN446732	WC-33	<i>Micromonosporatulbaghia</i> DSM 45142 T(jgi.1058868)	99.13
HNM0591	MN446726	WC-4	<i>Mycobacterium fragae</i> DSM 45731T(LQOW01000023)	92.67
HNM0569	MN446720	WC-33	<i>Rhodococcusgannanensis</i> M1T(KX887333)	98.05
HNM0563	MN446717	WC-33	<i>Rhodococcusphenolicus</i> DSM 44812 T(LRRH01000094)	98.89
HNM0595	MN446728	WC-4	<i>Saccharopolysporaindica</i> VRC122 T(JX411621)	99.28
HNM0578	MN446723	WC-33	<i>Streptomyces araujoniae</i> ASBV-1T (EU792889)	99.50

续表 1 Tab. 1 continued

编号 Numbering	GeneBank ID	样品来源 Sample source	最相似典型菌株(登录号) The most similar typical strain (login number)	相似度/% Similarity
HNM0565	MN446718	WC-33	<i>Streptomyces diastaticus</i> NRRL B-1773 T(DQ026631)	99.28
HNM0575	MN446722	WC-33	<i>Streptomyces nanshensis</i> SCSIO 01066T(EU589334)	98.78
HNM0596	MN446729	WC-24	<i>Streptomyces plicatus</i> NBRC 13071 T(AB184291)	99.64
HNM0568	MN446719	WC-33	<i>Streptomyces sedi</i> YIM 65188 T(EU925562)	99.30
HNM0574	MN446721	WC-33	<i>Streptomyces xishensis</i> YIM M 10378 T(HQ585118)	97.44

2.2 海绵中共附生放线菌的组成与分布 各海绵样品中共附生放线菌分离结果(表 2)表明, 样品 WC-33 分离得到的菌株数量为 26 株, 占分离种属的 52%, 其次为样品 WC-4, 共分离得到 16 株菌, 样品 WC-20 上分离得到 5 株菌, 样品 WC-24 上分离得到的菌株最少, 只有 3 株。各种样品上分离的菌株不仅数量上有差别, 种类上也存在一定的差异。其中, 样品 WC-33 多样性最丰富, 共分离得到 7 种不同属的放线菌。样品菌株 WC-4 虽然分离到了 16 株菌, 但是其多样性不太丰富, 仅为 2 个属, 而样品 WC-20 和样品 WC-24 不仅得到的菌株数量少, 而且种类也不丰富。另外, 表 2 结果表明, 不同海绵样品上放线菌种类的分布具有较大的差异, 其中小单孢属 *Micromonospora* 在 4 种不同的海绵样品上均有分布, 链霉菌属 *Streptomyces* 在

3 种不同的海绵样品上均有分布, 而其他种属放线菌只在样品 WC-33 中分离得到, 如栖白蚁菌属 *Isoptericola*、*Krasilnikoviella* 属、分枝杆菌属 *Mycobacterium*、红球菌属 *Rhodococcus*、糖多孢菌属 *Saccharopolyspora* 等均来源于 WC-33 号样品。

2.3 海绵共附生放线菌抑菌活性分析 对 50 株海洋放线菌的发酵提取物进行抑菌活性分析, 结果(表 3)表明, 24 株海洋放线菌的发酵产物对 4 种指示细菌显示出不同程度的抑菌作用, 占总菌数的 48%。其中 16 株海洋放线菌显示出抗无乳链球菌活性, 14 株海洋放线菌显示出抗金黄色葡萄球菌活性, 11 株海洋放线菌显示出抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性, 仅有 2 株海洋放线菌显示出抗大肠杆菌活性。此外, 各海洋放线菌种属之间抗细菌活性比例呈现明显差异。除了 *Mycobacterium* 和 *Rhodococcus* 属海洋放线菌未发现抗细菌的菌株之外, 其他 5 个属的海洋放线菌均含有抗细菌活性菌株, 其中链霉菌属海洋放线菌的抗细菌活性比例为 52.63%, *Micromonospora* 属为 33.33%, 其他 3 个属(*Isoptericola*、*Krasilnikoviella*、*Saccharopolyspora*)的分离菌株数尽管较少, 但活性菌株比例却相当高。

12 株海洋放线菌的发酵产物对 6 种指示丝状病原真菌显示出不同程度的抑菌作用, 占总菌数的 24%(表 3)。其中 20% 的海洋放线菌对薯蓣炭疽病菌显示抑菌活性, 14% 的海洋放线菌对橡胶炭疽病菌显示抑菌活性, 12% 的海洋放线菌对香蕉枯萎病菌显示抑菌活性, 10% 的海洋放线菌对水稻稻瘟病菌和木薯根腐病菌显示抑菌活性, 仅 6% 的海洋放线菌对芒果炭疽病菌显示抑菌活性。此外, 各海洋放线菌种属之间抗真菌活性比例也呈现明显差异, 其中 *Mycobacterium*、*Krasilnikoviella* 和 *Rhodococcus* 属海洋放线菌未发现抗真菌活性的菌株, 而 *Isoptericola* 属海洋放线菌抗真菌活性比例最高, 活性比例为 50%, 链霉菌属海洋放线菌的抗真菌活性比例次之, 活性比例为 47.37%; *Micromonospora* 属海洋放线菌最少, 活性比例仅为 5.56%。

表 2 4 种海绵样品上的共附生放线菌分布

Tab. 2 Distribution of symbiotic actinomycetes on 4 sponge samples

放线菌种属 Species of actinomycetes	放线菌数量/株 Number of actinomycetes			
	海绵 WC-20	海绵 WC-24	海绵 WC-33	海绵 WC-4
	<i>Isoptericola</i> sp	-	-	2
<i>Krasilnikoviella</i> sp	-	-	7	-
<i>Micromonospora</i> sp	5	1	1	11
<i>Mycobacterium</i> sp	-	-	1	-
<i>Rhodococcus</i> sp	-	-	2	-
<i>Saccharopolyspora</i> sp	-	-	1	-
<i>Streptomyces</i> sp	-	2	12	5
分离菌株数(种类) Strains (species)	5(1)	3(2)	26(7)	16(2)

表3 海洋放线菌抗细菌和抗真菌活性分布

Tab. 3 Distribution of antibacterial activity of marine actinomycetes

分类 Classification	总菌数/株 Total bacterial count	抗细菌菌数/株 Antibacterial strains				抗真菌菌数/株 Antifungal strains						活性菌数(比例)/株 Active strain	
		C1	C2	C3	C4	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	细菌	真菌
<i>Isoptericola</i>	2	1	1	1	-	0	0	0	0	1	0	2(100%)	1(50%)
<i>Krasilnikoviella</i>	7	0	2	3	4	0	0	0	0	0	0	5(71.43%)	0
<i>Micromonospora</i>	18	0	3	3	5	1	0	0	0	1	1	6(33.33%)	1(5.56%)
<i>Mycobacterium</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodococcus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharopolyspora</i>	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1(100%)	1(100%)
<i>Streptomyces</i>	19	1	8	4	6	4	3	4	4	8	6	10(52.63%)	9(47.37%)
总计(比例)	50	2(4%)	14(28%)	11(22%)	16(32%)	6(12%)	3(6%)	5(10%)	5(10%)	10(20%)	7(14%)	24(48%)	12(24%)

注: C1: 大肠杆菌, C2: 金黄色葡萄球菌, C3: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌, C4: 无乳链球菌。Z1. 香蕉枯萎病菌; Z2. 芒果炭疽病菌; Z3. 水稻稻瘟病菌; Z4. 木薯根腐病菌; Z5. 薯蓣炭疽病菌; Z6. 橡胶炭疽病菌。

Note: C1: *Escherichia coli*; C2: *Staphylococcus aureus*; C3: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; C4: *Streptococcus agalactiae*. Z1. *Fusarium oxysporum*; Z2. *Colletotrichum asianum*; Z3. *Magnaporthe grisea*; Z4. *Lasioidiplodia theobromae*; Z5. *Colletotrichum gloeosporioides*; Z6. *Colletotrichum gloeosporioides*.

3 讨论

海绵既是海洋天然产物的重要来源之一,也是海洋放线菌共附生的良好宿主。近10年来,海绵共附生放线菌资源一直是国内外研究的热点^[11-16]。迄今共有63个属的放线菌在海绵中被发现,其中不少为新鉴定的放线菌新种^[17-24]。这些新颖的海洋放线菌已成为海洋新天然产物研究的重要资源。例如, PIMENTEL-ELARDO等^[21]从海绵共附生放线菌新种 *Saccharopolysporacebuensis* 中分离到2个新颖的大环内酰胺化合物 Cebulactams A1 和 A2; YAN等^[15]利用基因组挖掘技术从海绵共附生新种 *Micromonosporayangpuensis* 中分离到1个新颖的葱醌烯二炔类化合物 yangpunicin A, TAWFIKE等^[23]添加N-乙酰氨基葡萄糖激活了海绵共附生放线菌新种 *Actinokineosporasphaciospongiae* 的沉默基因簇,获得了2个新的 Fridamycins 化合物。本研究采用纯培养的方式,从海南文昌东郊椰林海域采集的4种海绵中分离获得了50株海绵共附生放线菌,基于16S rRNA基因序列分析,分离菌株归属为6个科7个属的放线菌。其中常见的链霉菌属 *Streptomyces* 和小单孢菌属 *Micromonospora* 分离株数最多,不常见的糖多孢菌属 *Saccharopolyspora*、红球菌属 *Rhodococcus* 和分枝杆菌属 *Mycobacterium*、*Isoptericola* 等放线菌属分离得菌株较少,这与前人的报道一致^[10]。而 *Krasilnikoviella* 属的放线菌为首次从海绵中分离得到。此外,16S rRNA基因序列相似性比对发现,链霉菌 HNM0574、红球菌 HNM0569、小单孢菌 HNM0616 以及分枝杆菌 HNM0591 具有较低的相似性($\leq 98.7\%$),说明这些菌株是一类新颖的海绵共附生放线菌,值得进一步通过多相分类确定其种水平的分类地位。海绵共附生放线菌资源通常具有丰富的生物活性,包括抗菌、抗肿瘤以及抗寄生虫等,而抗菌活性表现尤为突出^[24]。中国海洋大学朱伟明课题组对近40年来的海洋链霉菌天然产物进行了综述分析,在已报道的547个海洋链霉菌新天然产物中,海绵共附生链霉菌来源的新天然产物占了64个,其中1/5的化合物表现出抗菌活性^[24]。本研究抗菌活性评价结果显示48%的分离菌株能产生抗细菌活性代谢产物,24%的分离菌株能产生抗植物丝状病原真菌活性代谢产物,预示这些海绵共附生放线菌菌株在医用和农用抗菌天然产物的挖掘上具有潜在的利用价值。

4 结论

本研究从海南文昌东郊椰林海域采集的4种海绵中分离到50株海洋放线菌,结合形态和16S

rRNA 基因序列分析, 归属为 5 个亚目 6 个科 7 个属 (*Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora*, *Isoptericola*, *Krasilnikovella*, *Mycobacterium*), 其中部分菌株如 HNM0574, HNM0569, HNM0616 以及 HNM0591 显示为潜在的新种。在抗菌活性评价中, 48% 的分离菌株呈现抗细菌活性, 24% 的分离菌株呈现抗植物丝状病原真菌活性, 其中 *Streptomyces*、*Isoptericola* 和 *icromonospora* 属海洋放线菌的抑菌活性较强; *Streptomyces* 属海洋放线菌的抗细菌活性比例最高, 而 *Isoptericola* 属海洋放线菌抗真菌活性比例最高。 *Mycobacterium* 和 *Rhodococcus* 属海洋放线菌没有显示出抑菌活性。这些活性菌株可作为后续海洋放线菌抗菌活性天然产物挖掘的重要菌源。

参考文献:

- [1] YANG C, QIAN R, XU Y, et al. Marine actinomycetes-derived natural products [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2019(19): 1 – 51.
- [2] ABDELMOHSEN U R, BAYER K, HENTSCHEL U. Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes [J]. *Nat Prod Rep*, 2014(31): 381 – 399.
- [3] SELVIN J, NINAWA A, S EGHAL KIRAN G, et al. Sponge-microbial interactions: Ecological implications and bioprospecting avenues [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2010, 36(1): 82 – 90.
- [4] ZHOU S, XIAO K, HUANG D, et al. Complete genome sequence of *Streptomyces spongiicola* HNM0071T, a marine sponge-associated actinomycete producing staurosporine and echinomycin [J]. *Marine Genomics*, 2019(43): 61 – 64.
- [5] 鲍时翔, 吴春燕, 贺乐, 等. 抗流感病毒 H1N1 海绵放线菌的筛选及菌株 HA10201 的鉴定 [J]. *中国海洋药物*, 2012(1): 10 – 13.
- [6] SÁNCHEZ C, MÉNDEZ C, SALAS J A. Indolocarbazole natural products: Occurrence, biosynthesis, and biological Activity [J]. *Natural Product Reports*, 2007, 23(6): 1007 – 1045.
- [7] HUANG Y, XI L, RUAN J. Diversity and biosynthetic potential of culturable actinomycetes associated with marine sponges in the China Seas [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(12): 5917 – 5932.
- [8] HUANG X, ZHOU S, HUANG D, et al. *Streptomyces spongiicola* sp. nov. an actinomycete derived from marine sponge [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(2): 738 – 743.
- [9] 周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板 [J]. *生物技术通报*, 2010(2): 123 – 125.
- [10] CHENG C, OTHMAN E M, REIMER A, et al. Ageloline, a new antioxidant and antichlamydial quinolone from the marine sponge-derived bacterium *Streptomyces* sp SBT345 [J]. *Tetrahedron Lett*, 2016(57): 2786 – 2789.
- [11] JOSEPH F J R S, INIYAN A M, VINCENT S G P. HR-LC-MS based analysis of two antibacterial metabolites from a marine sponge symbiont *Streptomyces pharmamarensis* ICN40 [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017(111): 450 – 457.
- [12] KITANI S, UEGUCHI T, IGARASHI Y, et al. RakicidinF, a new antibacterial cyclic depsipeptide from a marine sponge-derived *Streptomyces* sp [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2018, 71(1): 139.
- [13] ZHANG H, ZHENG W, HUANG J, et al. *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp.nov., an actinomycete isolated from the marine sponge *Hymeniacidon perleve* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006(56): 2309 – 2312.
- [14] PIMENTEL-ELARDO S M, TIRO L P, GROZDANOV L, et al. *Saccharopolysporacebuensis* sp.nov., a novel actinomycete isolated from a Philippine sponge (Porifera) [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(3): 628 – 632.
- [15] ZHANG L, XI L, RUAN J, et al. *Micromonospora yangpuensis* sp.nov., isolated from a sponge [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012(62): 272 – 27.
- [16] SUPONG K, SURIYACHADKUN C, SUWANBORIRUX K, et al. *Verrucosipora andamanensis* sp.nov., isolated from a marine sponge [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(11): 3970 – 3974.
- [17] HUANG X L, ZHOU S Q, HUANG D Y, et al. *Streptomyces spongiicola* sp.nov., an actinomycete derived from marine sponge [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(2): 738 – 743.
- [18] SOUZA D T, DA SILVA F S P, DA SILVA L J, et al. *Saccharopolyspora spongiae* sp.nov., a novel actinomycete isolated from the marine sponge *Scopalinaruetzleri* (Wiedenmayer, 1977) [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(6): 2019 – 2025.
- [19] LI L, WANG J, ZHOU Y, et al. *Streptomyces reniochalina* sp.nov. and *Streptomyces diacarni* sp.nov., from marine sponges [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018(69): 99 – 104.

- [20] HUANG X L, KONG F D, ZHOU S Q, et al. *Streptomyces tirandamycinicus* sp.nov., a novel marine sponge-derived actinobacterium with potential against *Streptococcus agalactiae* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 482.
- [21] PIMENTEL-ELARDO S M, GULDER T A, HENTSCHEL U, et al. Cebulactams A1 and A2, new macrolactams isolated from *Saccharopolyspora cebuensis*, the first obligate marine strain of the genus *Saccharopolyspora* [J]. *Tetrahedron Letters*, 2008, 49(48): 6889 – 6892.
- [22] YAN X, CHEN J J, ADHIKARI A, et al. Genome mining of *Micromonospora yangpuensis* DSM 45577 as a producer of an anthraquinone-fused enediyne [J]. *Organic Letters*, 2017, 19(22): 6192 – 6195.
- [23] TAWFIKE A, ATTIA E Z, DESOUKEY S Y, et al. New bioactive metabolites from the elicited marine sponge-derived bacterium *Actinokineospora spheciospongiae* sp.nov [J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 1 – 9.
- [24] 王聪, 梅显贵, 朱伟明. 海洋链霉菌来源的天然产物[J]. 海洋科学集刊, 2016, 51: 86 – 124.

Isolation, Identification and Antibacterial Activity of Actinomycetes Associated with Marine Sponge

XIAO Ke^{1,2}, ZHOU Shuangqing³, XU Yun¹, WU Wenqiang¹, XIA Wei²,
ZAHNG Rongping², HUANG Dongyi², HUANG Xiaolong¹

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources of the Ministry of Education of China, Hainan University, Haikou, Hainan 570228;

2. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 3. Institute of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: To investigate microbial diversity and potential pharmaceutical value of actinomycetes associated with marine sponges from Hainan actinomycetes associated with marine sponges from Wenchang sea area in Hainan were collected, isolated and identified, and their anti-microbial activities were analyzed. Four media were used to isolate and purify the actinomycetes from the marine sponges, and the isolates were identified according to their 16S rRNA sequences. the antibacterial activities of their fermented products were tested using standard disk diffusion. Results showed that a total of 50 strains of actinomycetes were isolated from 4 types marine sponges. The isolates belonged to 7 genera within 6 families, 5 suborders of *Actinobacteria*, and contained *Streptomyces*, *micromonospora*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora*, *Isoptericola*, *Mycobacterium* and *Krasilnikoviella*, among which *Krasilnikoviella* was first recorded isolated from marine sponges. Four isolates were potential novel species. The antimicrobial test showed that 48% of the total isolates displayed antibacterial activity while 24% inhibited plant filamentous pathogenic fungi. The diversity and antimicrobial activity of the fermented products of the actinomycetes associated with marine sponges collected from Wenchang sea area in Hainan were preliminarily revealed.

Keywords: marine sponge; isolation; actinomycetes; antibacterial activity

(责任编辑: 钟云芳)