



主持人: 郭志强

# 南海冷泉区深海沉积物来源放线菌的 分离培养及其抑菌活性

陈以秋<sup>1,2</sup>, 韩梅桂<sup>2</sup>, 韩 壮<sup>2</sup>, 唐 敏<sup>1</sup>

(1. 海南大学 生态与环境学院, 海口 570228; 2. 中国科学院 深海科学与工程研究所, 三亚 572000)

**摘要:** 为挖掘南海冷泉区可培养放线菌资源及其潜在的生物活性, 采用稀释涂布法分离培养了来源于南海冷泉区深海沉积物中的放线菌, 利用 16S rRNA 基因测序鉴定菌株, 构建系统发育树, 并分析了放线菌的多样性; 通过 K-B 法药敏试验对放线菌发酵粗提物进行抑菌活性测试。结果显示: 分离获得的 50 株放线菌隶属于 5 个科, 7 个属, 其中 5 株放线菌被初步判定为潜在新种。7 株放线菌的发酵粗提物对副溶血性弧菌、甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌和甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌呈现不同程度的抑菌活性, 其中活性最好的为小单孢菌属 (*Micromonospora*) 的 2 株菌, *Micromonospora* sp. LDBS3988 抑菌活性最强, *Micromonospora* sp. LDBS3949 抑菌活性较为广谱。

**关键词:** 深海沉积物; 放线菌; 抑菌活性; 冷泉

中图分类号: Q93-331

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2023)05-0545-07

陈以秋, 韩梅桂, 韩壮, 等. 南海冷泉区深海沉积物来源放线菌的分离培养及其抑菌活性 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(5): 545-551. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230022

放线菌具有重要的生态学意义, 也是很多生物活性物质的来源之一<sup>[1]</sup>。放线菌种类繁多, 在陆地和水域生态系统中都有广泛分布。国内外的研究者在陆源放线菌及其活性物质方面已开展了较充分的研究, 从相关菌株中也发现了许多结构新颖的活性化合物。目前对海洋环境中放线菌的研究还需进一步加强, 特别是对深海区域放线菌的探索 and 开发尚处于起步阶段。地球表面约 71% 的面积是海洋, 其中 95% 的海域深度超过 1000 m<sup>[2]</sup>, 深海环境具有高压、低温、黑暗、寡营养等特征, 生活在其中的生物也具备相应独特的适应能力, 这些适应能力通常伴随着对基因、初级及次级代谢途径的调控<sup>[3]</sup>。研究发现在长期的进化过程中, 深海放线菌等生物体内常产生有独特结构的次生代谢物, 且具有一定的生物活性<sup>[4-5]</sup>, 而且这些活性物质具有是陆源微生物中未被发现过的新颖化

合物结构<sup>[6]</sup>, 具有重要的研究价值。可见, 广阔而独特的深海环境是研究和开发放线菌资源的良好场所。

南海是西太平洋最大的边缘海域, 海域面积达 350 万 km<sup>2</sup>, 平均深度为 1350 m, 最深深度超过 5.5 km<sup>[7-8]</sup>。冷泉是一种特殊的海底环境, 在冷泉深部富含硫化氢、甲烷等碳氢化合物的流体会向海底表面渗漏或喷发, 因此冷泉环境中含有大量的甲烷<sup>[9]</sup>, 因此冷泉环境中的微生物群落优势种属多为硫酸盐还原菌、好氧甲烷菌、氧甲烷菌、硫氧化菌等<sup>[10]</sup>, 该类群的冷泉微生物丰富度高于热液和普通海底沉积物<sup>[11]</sup>。不同冷泉的微生物群落存在差异<sup>[12]</sup>。南海冷泉区微生物资源多样性丰富<sup>[13]</sup>, 从南海冷泉区丰富的微生物资源中寻找新型次级代谢产物有利于加强对海马冷泉未知生物资源的开发与利用。已有许多新型活性物质来源于南海冷

收稿日期: 2022-11-30

修回日期: 2022-11-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32160270, 31660128); 海南省重大科技计划项目 (ZDKJ2019011)

第一作者: 陈以秋 (1995-), 女, 海南大学生态与环境学院 2020 级硕士研究生. E-mail: 13759015920@163.com

通信作者: 唐敏 (1972-), 女, 教授. 研究方向: 水生生态, 生态毒理. E-mail: 1251054716@qq.com

泉微生物<sup>[14-19]</sup>,对微生物资源的利用推动了深海微生物资源的应用潜力评价。

海马冷泉位于南海西北陆坡,是南海2个活跃的冷泉之一<sup>[10]</sup>,目前对海马冷泉微生物群落研究较少<sup>[20-23]</sup>。本研究主要在南海海马冷泉区,对沉积物中的放线菌进行分离纯化、培养鉴定、多样性分析及次级代谢产物抗菌活性的研究,旨在挖掘海马冷泉区可培养的放线菌资源,及其潜在的生物活性价值,为后续研究和开发冷泉放线菌资源提供参考资料。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 沉积物样品由中国科学院深海科学与工程研究所“探索一号”科考船搭载的“深海勇士”号载人潜水器于2021年2月采集于南海海马冷泉区。样品采集后,放置4℃冰箱冷藏。巡航结束后,所有样品放在冰上运送到实验室,放置4℃保存备用。样品分为3组HM2、HM3、HM6(表1)。

抗菌活性检测采用7种供试菌,即H119(粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*)、H57(甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、G280(甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*, MSSA)、H442(亚胺培南敏感鲍曼不动杆菌

表1 深海沉积物样品信息表

样品	潜次	深度/m	坐标(经度E,纬度N)
HM2-1a	SY336	1365.0	110°28'20.67", 16°43'44.75"
HM2-1c	SY336	1365.0	110°28'20.67", 16°43'44.75"
HM3-1a	SY337	1383.0	110°27'31.32", 16°43'52.21"
HM3-1b	SY337	1383.0	110°27'31.32", 16°43'52.21"
HM3-1c	SY337	1383.0	110°27'31.32", 16°43'52.21"
HM3-1d	SY337	1383.0	110°27'31.32", 16°43'52.21"
HM3-1f	SY337	1383.0	110°27'31.32", 16°43'52.21"
HM6-1a	SY340	1368.2	110°42'29.19", 16°25'40.40"
HM6-1b	SY340	1368.2	110°42'29.19", 16°25'40.40"
HM6-1c	SY340	1368.2	110°42'29.19", 16°25'40.40"
HM6-1d	SY340	1368.2	110°42'29.19", 16°25'40.40"
HM6-1e	SY340	1368.2	110°42'29.19", 16°25'40.40"
HM6-1f	SY340	1368.2	110°42'29.19", 16°25'40.40"

注:样品名称最后的字母表示海水-沉积界面以下沉积物深度,a:0~4cm;b:4~8cm;c:8~12cm;d:12~16cm;e:16~20cm;f:20~24cm。

imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*)、E292(亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌 imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*)、G1(高地芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis*)、F1(副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*)。菌株分离、发酵、抑菌活性测试使用相应的培养基(表2)。

表2 深海沉积物放线菌分离、发酵、活性测试所用培养基配方

用途	培养基名称	培养基组分
分离培养	ISP3琼脂培养基	燕麦 20 g, 琼脂 18 g, 七水合硫酸亚铁 0.001 g, 四水合氯化亚锰 0.001 g, 七水合硫酸锌 0.001 g, 海水 1 L, pH=7.3
	R2A琼脂培养基	R2A 18.1 g, 海水 1 L, pH=7.0
分离/发酵培养	2216E培养基	Difco marine broth 2216E 37.4 g, 琼脂 20 g, 海水 1 L, pH=7.4
活性测试	LB培养基	胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, ddH <sub>2</sub> O 1 L, 琼脂 20 g, ddH <sub>2</sub> O 1 L, pH=7.4

**1.2 深海放线菌菌株分离与保存** 在无菌条件下,称取0.1g深海沉积物样品,加入1mL无菌海水,振荡10min,随后将沉积物悬浊液梯度稀释 $10^{-1}$ 到 $10^{-6}$ ,稀释倍数为 $10^{-6}$ 悬浊液100μL于培养基中涂布,28℃倒置培养,每隔24h观察菌落生长状况,待形成菌落后,挑取部分菌,采用三区划线法接种到分离培养基,重复纯化培养多次直至得到单一纯化菌株。随后用含25%甘油液体培

养基冻存(-80℃)保种。

**1.3 深海放线菌菌株鉴定** 利用试剂盒提取DNA(TIANamp Bacteria DNA Kit),以16S rDNA序列通用引物27F/1492R<sup>[24]</sup>、Taq酶体系对其进行PCR扩增。对PCR产物验证通过后测序(擎科生物公司)。测序结果拼接完成后,上传EZbio-cloud在线数据库(<https://www.ezbiocloud.net>)进行对比分析,获得菌株的分类信息。以近缘菌株的

16S rRNA 基因序列作为参比对象, 采用 MEGA 软件 neighbor-joining 构建系统发育树。

1.4 放线菌的发酵培养及次级代谢产物的提取 在 2216E 琼脂培养基上采用平板划线法培养菌株形成菌落, 挑取单菌落, 接种至 5 mL 发酵培养基中培养(28 °C, 180 r·min<sup>-1</sup>)3 d, 获得种子菌液。随后, 按照发酵培养基: 种子液(v : v)= 100 : 5 的比例进行发酵培养(28 °C, 180 r·min<sup>-1</sup>)7 d, 发酵液总体积为 105 mL。发酵完成后, 取乙酸乙酯与发酵液等体积充分混合, 萃取 3 次, 有机相合并后经旋转蒸发仪浓缩获得粗提物, -20 °C 保存备用。

1.5 深海放线菌的抑菌活性分析 采用 K-B 纸片扩散法药敏试验<sup>[25]</sup> 检测放线菌发酵粗提物对 7 种供试菌的抑菌活性。用甲醇(分析纯)配制待测粗提物溶液(10 g·L<sup>-1</sup>), 分 2 次滴加到灭菌滤纸片(直径 6 mm)上, 每次滴加 5 μL, 将风干的滤纸片贴在涂布了供试菌的固体培养基上(供试菌稀释至 10<sup>-3</sup> 涂布), 采用万古霉素以及氯霉素(1 g·L<sup>-1</sup>)为阳性对照, 甲醇溶液为空白对照, 37 °C 培养 24 h。通过与阳性对照的抑菌圈直径对比, 判断粗提物的抑菌活性。

## 2 结果与分析

2.1 深海沉积物中放线菌的菌种分离鉴定及其多样性分析 实验从 HM2、HM3、HM6 三组沉积样中分离出 50 株放线菌, 从 HM3 样品组中分离的放线菌最多, 共 26 株, 其次是 HM6 样品组, 19 株, HM2 样品组的最少, 只有 5 株(图 1)。这 50 株放线菌都属稀有类型, 形态类似于细菌, 无气生菌丝, 隶属于 7 个属(图 2), 其中类诺卡式菌属(*Nocardioides*)22 株、迪茨氏菌属(*Dietzia*)13 株、乔治菌属(*Georgenia*)6 株、考克氏菌属(*Kocuria*)

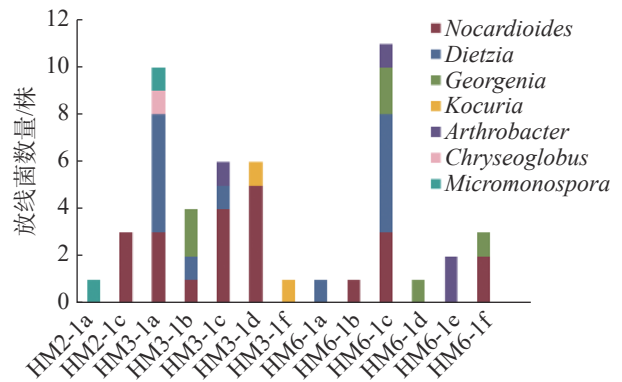


图 1 从各沉积样品中分离到的放线菌种类

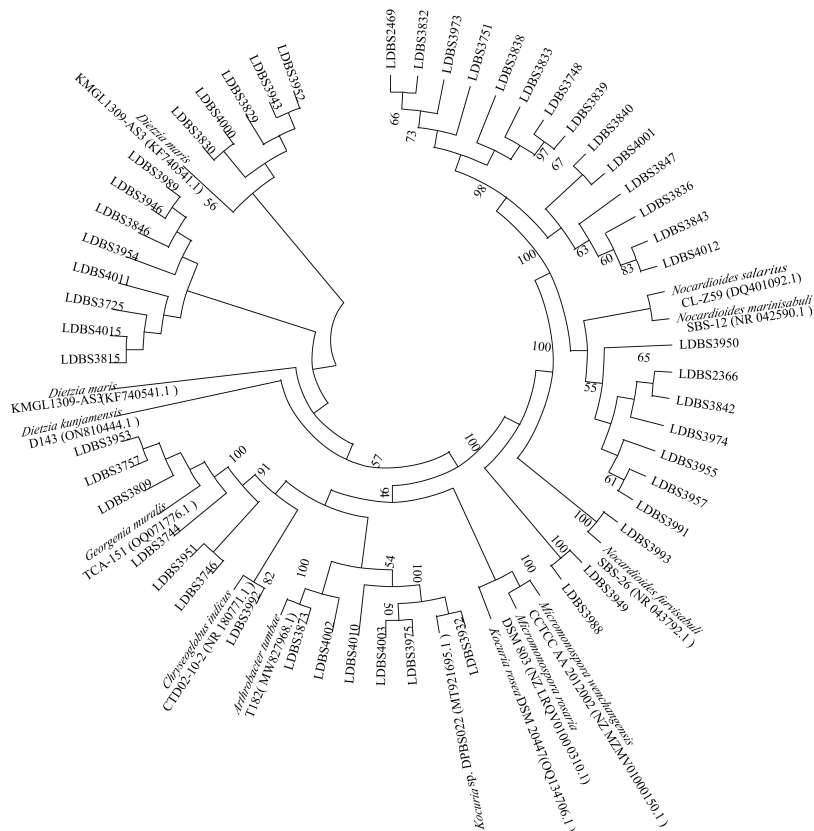


图 2 分离出的 50 株放线菌与近缘菌株的系统发育树

系统发育树为 1000 次 Bootstrap 分析所得结果; 图中的数值是 Bootstrap 大于 50% 的结果, 进化距离为 0.005。

4 株、节杆菌属 (*Arthrobacter*) 2 株、小单孢菌属 (*Micromonospora*) 2 株、印度洋金色丸菌属 (*Chryseoglobus*) 1 株。各放线菌属间的相对丰富度呈现一定差异, 其中类诺卡氏菌属在 3 组样品中属于优势菌。采用 2216E 培养基、R2A 琼脂培养基和

ISP3 琼脂培养基分别筛选到 18、29 和 3 株放线菌, R2A 培养基更适合用于筛选深海放线菌。基于对潜在新菌种的界定<sup>[26-28]</sup>, 在这 50 株放线菌中, 有 6 株与近缘菌株 16S rRNA 基因的相似度低于 98.7%, 初步判断为潜在新种(表 3)。

表 3 50 株放线菌中潜在的新菌株

菌株编号	近缘菌株	相似度/%	样品来源
LDBS3725	<i>Dietzia maris</i> DSM 43 672	98.66	HM3-1a
LDBS3838	<i>Nocardioides marinisabuli</i> SBS-12	98.65	HM3-1c
LDBS3839	<i>Nocardioides marinisabuli</i> SBS-12	98.58	HM3-1c
LDBS3840	<i>Nocardioides salarii</i> CL-Z59	98.66	HM3-1c
LDBS3974	<i>Nocardioides salaries</i> CL-Z59	98.52	HM3-1a
LDBS3988	<i>Micromonospora rosaria</i> DSM 803	98.52	HM3-1a

2.2 放线菌的抑菌活性分析 通过对 50 株放线菌的发酵液粗提物进行抑菌活性分析, 发现 7 株放线菌的粗提物对 3 种供试菌显示出不同程度的抑菌作用, 抑制活性比例为 14%。其中, 5 株菌对 F1 有抑菌活性, 4 株对 G280 有活性, 2 株对 H57 有活性。编号为 LDBS2366 和 LDBS2469 的菌株粗提物仅对 G280 有抑菌活性。LDBS3832、LDBS3950 和 LDBS3974 对 F1 有轻微抑菌活性,

此外 LDBS3974 对 H57 也有轻微抑菌活性。LDBS3949 的菌株粗提物对 H57、G280、F1 均有抑菌活性。LDBS3988 的菌株粗提物对 G280 和 F1 有抑菌活性。50 株放线菌粗提物对 H119、H422、E292、G1 均没有活性。小单孢菌属的抑菌活性及抑菌范围都优于类诺卡氏菌属(表 4)。其中, 小单孢菌属的菌株 LDBS3949 和 LDBS3988 呈现出良好的抑菌效果。

表 4 放线菌代表性菌株的抗菌活性

菌株编号及阳性对照	菌株名称	抑菌圈直径/mm						
		H119	H57	G280	H422	E292	G1	F1
LDBS2366	<i>Nocardioides</i> sp.	-	-	10	-	-	-	-
LDBS2469	<i>Nocardioides</i> sp.	-	-	12	-	-	-	-
LDBS3832	<i>Nocardioides</i> sp.	-	-	-	-	-	-	7
LDBS3949	<i>Micromonospora</i> sp.	-	15	12	-	-	-	22
LDBS3950	<i>Nocardioides</i> sp.	-	-	-	-	-	-	10
LDBS3974	<i>Nocardioides</i> sp.	-	7	-	-	-	-	7
LDBS3988	<i>Micromonospora</i> sp.	-	-	30	-	-	-	20
万古霉素		19	20	20	-	-	18	20
氯霉素		-	-	-	20	20	-	-

注: H119: 粪肠球菌, H57: 甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌, G280: 甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌, H442: 亚胺培南敏感鲍曼不动杆菌, E292: 亚胺培南耐药鲍曼不动杆菌, G1: 高地芽孢杆菌, F1: 副溶血性弧菌; -: 无活性, 除 H422 和 E292 以氯霉素为阳性对照, 其余病原菌以万古霉素为阳性对照。

### 3 讨论

从南海海马冷泉区的三组沉积物样品中分离

到 50 株放线菌, 属于 5 个科, 7 个属, 其中类诺卡氏菌属、迪茨氏菌属是优势菌, 后者为海洋特有。这与从南大西洋深海沉积物分离出的 36 株放线

菌不同,属于 6 个科,8 个属,其中微球菌属、迪茨氏菌属和微杆菌属是优势菌<sup>[29]</sup>,也有实验分离出 132 株放线菌,属于 13 个科,19 个属,其中考克氏菌属、短杆菌属和链霉菌属是优势菌<sup>[30]</sup>。在这些沉积样品中,共有种属的放线菌有迪茨氏菌属、考克氏菌属、微球菌属、微杆菌属。不同沉积样品的放线菌种属存在着差异,这可能一方面是源自地域环境差异,另一方面是因不同的培养条件和分离方法造成的。基于对潜在新种的界定,本研究分离的放线菌中有 6 株的相似性低于 98.7% 初步认为是潜在新种,它们属于迪茨氏菌属、类诺卡式菌属、小单孢菌属。有研究发现 *Nocardioides* sp. strain CF18 利用单加氧酶(pBMO)在丁烷上生长,而 pBMO 与甲烷氧化细菌的甲烷单加氧酶(pMMO)基因序列相似<sup>[31]</sup>,推测这些酶助力于类诺卡式菌属菌株在含大量甲烷环境的冷泉中能生存并成为优势属。

本研究中发现诺卡式菌属和小单孢菌属的发酵液粗提物都呈现出较好的抗菌活性,其中,小单孢菌属的 LDBS3988 和 LDBS3949 菌株对 G<sup>+</sup> 菌 MRSA、MSSA,以及 G<sup>-</sup> 菌 *V. parahaemolyticus* 都表现出抑制作用。Zhang 等<sup>[32]</sup> 曾从南海沉积物来源的小单孢菌属的次级代谢产物中分离到 3 个新化合物 fluostatins I-K,小单孢菌属的次级代谢产物对金黄色葡萄球菌具有较好的抑制作用。除了能产多种化合物的小单孢菌属外,本研究分离到的类诺卡式菌属对 MRSA、MSSA、*V. parahaemolyticus* 也呈现出一定的抗菌活性,这是首次报道深海来源类诺卡式菌属有抑菌活性。尤其是小单孢菌属的 2 株菌 LDBS3988 和 LDBS3949 的发酵粗提物呈现较强的抑菌活性,具有较好的深入研究价值。

目前对南海冷泉沉积样品中硫化细菌的研究较多<sup>[33]</sup>,但对放线菌的研究还较少。本研究揭示了冷泉区丰富的放线菌资源,这些具有活性的菌株可作为挖掘深海放线菌抗菌天然产物的重要资源。后期研究将通过优化培养条件、发酵条件、激活沉默次级代谢合成途径等手段进一步挖掘新颖活性化合物,为从深海极端环境中寻找新型抗生素提供参考资料。

## 参考文献:

- [1] SUBRAMANI R, AALBERSBERG W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites [J]. *Microbiological Research*, 2012, 167(10): 571 – 580.
- [2] KAMJAM M, SIVALINGAM P, DENG Z, et al. Deep Sea actinomycetes and their secondary metabolites [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 760.
- [3] SKROPETA D, WEI L. Recent advances in deep-sea natural products [J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(8): 999 – 1025.
- [4] WRIGHT P C, WESTACOTT R E, BURJA A M. Piezo-tolerance as a metabolic engineering tool for the biosynthesis of natural products [J]. *Biomolecular Engineering*, 2003, 20(4/5/6): 325 – 331.
- [5] MA L, BARTHOLOME A, TONG M H, et al. Identification of a fluorometabolite from *Streptomyces* sp. MA37: (2R3S4S)-5-fluoro-2, 3, 4-trihydroxypentanoic acid [J]. *Chemical Science*, 2015, 6(2): 1414 – 1419.
- [6] RAMALINGAM V, RAJARAM R. Antioxidant activity of 1-hydroxy-1-norresistomycin derived from *Streptomyces variabilis* KP149559 and evaluation of its toxicity against zebra fish *Danio rerio* [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(20): 16615 – 16623.
- [7] SU J. Overview of the South China Sea circulation and its influence on the coastal physical oceanography outside the Pearl River Estuary [J]. *Continental Shelf Research*, 2004, 24(16): 1745 – 1760.
- [8] 蔡观强, 彭学超, 张玉兰. 南海沉积物物质来源研究的意义及其进展[J]. *海洋科学进展*, 2011, 29(1): 113 – 121.
- [9] BOETIUS A, WENZHÖFER F. Seafloor oxygen consumption fuelled by methane from cold seeps [J]. *Nature Geoscience*, 2013, 6(9): 725 – 734.
- [10] FENG D, QIU J W, HU Y, et al. Cold seep systems in the South China Sea: an overview [J]. *Journal of Asian Earth Sciences*, 2018, 168: 3 – 16.
- [11] KNITTEL K, BOETIUS A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 311 – 334.
- [12] VIGNERON A, CRUAUD P, PIGNET P, et al. Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California) [J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(8): 1595 – 1608.
- [13] 孙瑜, 牛明杨, 刘俏, 等. 南海 Formosa 冷泉区沉积物微生物多样性与分布规律研究 [J]. *微生物学报*, 2022, 62(6): 2001 – 2020.
- [14] HU X Y, LI X M, YANG S Q, et al. New cytochalasin derivatives from deep-sea cold seep-derived endozoic fungus *Curvularia verruculosa* CS-129 [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2022, 19(8): e202200550.

- [15] HU X Y, WANG C Y, LI X M, et al. Cytochalasin derivatives from the endozoic *Curvularia verruculosa* CS-129, a fungus isolated from the deep-sea squat lobster *Shinkaia crosnieri* living in the cold seep environment [J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(12): 3122 – 3130.
- [16] SONG Q, YANG S Q, LI X M, et al. Aromatic polyketides from the deep-sea cold-seep mussel associated endozoic fungus *Talaromyces minioluteus* CS-138 [J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(8): 529.
- [17] HU X, LI X, YANG S, et al. Vercytochalasins A and B: Two unprecedented biosynthetically related cytochalasins from the deep-sea-sourced endozoic fungus *Curvularia verruculosa* [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2023, 34(2): 107516.
- [18] YAN L H, LI P H, LI X M, et al. Chevalinulins A and B, proangiogenic alkaloids with a spiro[bicyclo[2.2.2]octane-diketopiperazine]skeleton from deep-sea cold-seep-derived fungus *Aspergillus chevalieri* CS-122 [J]. *Organic Letters*, 2022, 24(14): 2684 – 2688.
- [19] JIN E, LI H, LIU Z, et al. Antibiotic dixiamycins from a cold-seep-derived *Streptomyces olivaceus* [J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(9): 2606 – 2611.
- [20] NIU M, FAN X, ZHUANG G, et al. Methane-metabolizing microbial communities in sediments of the Haima cold seep area, northwest slope of the South China Sea [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(9): fix101.
- [21] ZHUANG G C, XU L, LIANG Q, et al. Biogeochemistry, microbial activity, and diversity in surface and subsurface deep-sea sediments of South China Sea [J]. *Limnology and Oceanography*, 2019, 64(5): 2252 – 2270.
- [22] JING H, WANG R, JIANG Q, et al. Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification is an important potential methane sink in deep-sea cold seeps [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 748: 142459.
- [23] LING J, GUAN H, LIU L, et al. The diversity, composition, and putative functions of gill-associated bacteria of bathymodiolin mussel and vesicomyid clam from Haima cold seep, South China Sea [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1699.
- [24] WEISBURG W G, BARNES S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697 – 703.
- [25] FOR THE BSAC WORKING PARTY ON SUSCEPTIBILITY TESTING, ANDREWS J M. BSAC standardized disc susceptibility testing method [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, 48(suppl\_1): 43 – 57.
- [26] 肖珂, 周双清, 许云, 等. 海绵共附生放线菌的分离鉴定与抑菌活性分析 [J]. *热带生物学报*, 2020, 11(2): 156 – 162.
- [27] 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 Letters*, 2016, 57(25): 2786 – 2789.
- [28] KIM M, OH H S, PARK S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346–351. doi: 10.1099/ijs.0.059774-0
- [29] 贾文文. 南大西洋深海放线菌的分离与多样性分析 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
- [30] 张玉便, 张改云. 南大西洋深海沉积物中可培养放线菌的多样性 [J]. *应用海洋学学报*, 2014, 33(4): 508 – 515.
- [31] SAYAVEDRA-SOTO L A, HAMAMURA N, LIU C W, et al. The membrane-associated monooxygenase in the butane-oxidizing Gram-positive bacterium *Nocardioides* sp. strain CF<sub>8</sub> is a novel member of the AMO/PMO family [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(3): 390 – 396.
- [32] ZHANG W, LIU Z, LI S, et al. Fluostatins i–k from the South China Sea-derived *Micromonospora rosaria* scsio N<sub>160</sub> [J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(11): 1937 – 1943.
- [33] RUFF S E, BIDDLE J F, TESKE A P, et al. Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(13): 4015 – 4020.

## Isolation, cultivation and antibacterial activity of actinomycetes from the sediments in the deep-sea cold seeps of South China Sea

CHEN Yiqiu<sup>1,2</sup>, HAN Meigui<sup>2</sup>, HAN Zhuang<sup>2</sup>, TANG Min<sup>1</sup>

(1. School of Ecological and Environmental Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Sanya Institute of Deep-sea Science and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Sanya, Hainan 572000, China)

**Abstract:** In order to explore the resources and potential bioactivity value of actinomycetes, actinomycetes were isolated from the deep-sea sediments in the cold seeps of South China Sea by serial dilution and spread plate technique and cultured. The strains of isolated actinomycetes were identified by using 16S rRNA gene sequencing, based on which a phylogenetic tree was constructed, and the diversity of actinomycetes were analyzed. The antibacterial activities of the crude extracts of the isolated actinomycetes were tested by using the K-B test for antibiotic susceptibility. The results showed that 50 isolated actinomycetes belonged to 5 families and 7 genera, and that 5 strains of actinomycetes were preliminarily identified as potential new species. And the crude extracts of 7 strains showed different antibacterial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Among the 7 strains, two strains of *Micromonospora* displayed the highest antibacterial activity. *Micromonospora* sp.LDBS3988 has the highest antibacterial activity, and *Micromonospora* sp.LDBS3949 has a broad-spectrum antibacterial activity.

**Keywords:** deep-sea sediment; actinomycetes; antibacterial activity; cold seep

(责任编辑:叶 静)