

· 研究报告 ·

# 南极普里兹湾海绵共附生放线菌的分离及其 次级代谢潜力评估<sup>△\*</sup>

官颖颖, 于雪, 张海雷, 张宁, 李静\*

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**目的 通过研究了解南极海域海绵共附生放线菌的多样性以及活性次级代谢产物的合成潜力。方法 采用 4 种分离培养基对南极海绵进行放线菌的分离培养, 对分离到的菌株进行抗菌及微藻克生活性的筛选, 对活性菌株的进行基于聚酮合酶、非核糖体肽合成酶和卤化酶的基因筛选。结果 共分离得到 59 株海绵共附生放线菌, 分布于 9 个属中, 以链霉菌最多。21 株具有较好的抗菌活性; 6 株菌表现出明显的赤潮微藻克生活性; 有 7 株活性菌株至少含 2 种关键的功能基因, 菌株 OAct311 和 OAct408 同时含有 4 种功能基因。结论 研究结果揭示了南极海绵共附生放线菌物蕴含丰富的放线菌资源并且有较高的合成活性次级代谢物的潜力, 具有深一步研究的价值。

**关键词:** 南极; 海绵; 共附生放线菌; 功能基因

中图分类号: R931

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2017)05-001-08

DOI: 10.13400/j.cnki.cjmd.2017.05.001

## Isolation of Antarctic sponge-associated actinobacteria and evaluation of secondary metabolites biosynthetic potential

GUAN Ying-ying, YU Xue, ZHANG Hai-lei, ZHANG Ning, LI Jing\*

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract: Objective** To analyze the diversity of actinomycetes isolated from Antarctic sponge and to evaluate secondary metabolites biosynthetic potential of these actinomycetes. **Methods** Sponge-associated actinomycetes were isolated using 4 media. 16S rDNA sequences of the representatives were amplified and sequenced to analyze phylogenetic diversity of the actinomycetes. The antagonistic activity of the sponge-associated actinomycetes was screened using modified cross-streak method. The allelopathic activity on red-tide microalgae was also tested using growth-inhibition method. A sequence-guided genetic screening strategy was used to evaluate the genetic biosynthetic potential of the active strains. **Results** 59 strains were isolated and classified into 9 genera. 21 strains were screened out with high antagonistic activity and 6 strains showed remarkable allelopathic activity. 7 strains were testified to contain at least 2 types of key biosynthetic genes while strain OAct311 and OAct408 contained all the 4 biosynthetic genes tested in this study. **Conclusion** There were abundant and diverse sponge-associated actinomycetes in Antarctic. It is one of the most important sources in searching for new bioactive compounds.

**Key words:** Antarctic; sponge; symbiosis actinomycete; biosynthetic gene

\* <sup>△</sup>基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31200009); 极地专项项目(CHINARE2016-01-05)资助

作者简介: 官颖颖(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 极地放线菌及其基因资源研究。

\* 通讯作者: 李静, 女, 副教授。E-mail: lijing313@ouc.edu.cn

收稿日期: 2017-03-01

海绵是最原始的多细胞动物,数量丰富,绝大多数存在于海洋环境中。海绵在生存竞争中,逐渐形成了一定的化学防御机制,用于防卫竞争者与天敌以及防止被微生物感染<sup>[1]</sup>。研究表明海绵的次级代谢产物对它们的化学防御机制中起到了重要的作用,这些代谢产物具有抗病毒、抗肿瘤和抗菌等生物活性,具有潜在的药用价值<sup>[2]</sup>。近年来对海绵及其活性物质的深入研究发现,其共附生微生物可能是这些结构新颖的化合物的真正来源<sup>[3]</sup>。有研究表明从海绵共附生微生物中分离得到的临床活性物质,有近 47% 来源于海绵共附生放线菌<sup>[1]</sup>,其中的 60% 来源于链霉菌<sup>[4]</sup>。海绵共附生放线菌,产生的次级代谢产物结构出新率高,有助于发现新药先导化合物。因此对海绵共附生放线菌及其次级代谢产物的研究,有利于海洋天然产物研究的发展。

国内外对海绵及其共附生微生物的研究主要集中在热带和温带海域,但最近对海绵的研究焦点已经扩大到南极寒冷水域和部分北极水域<sup>[5-6]</sup>。2004 年 Webster 等人利用 16S rDNA 文库技术和 DGGE 技术分析了 5 种南极海绵种微生物群落结构<sup>[7]</sup>,开启了针对南极海绵微生物多样性的研究。但其后的研究仍然多数聚焦于海绵可培养微生物或显微观察这两方面<sup>[8-10]</sup>。直到 2015 年,Trefault 等人首次利用高通量测序技术系统分析了 8 种南极海绵共附生微生物的多样性<sup>[11]</sup>,由于极地独特的地理及气候特征,形成酷寒、强辐射、高盐度的自然环境,赋予该区域环境中的放线菌较为独特的代谢机制,从而有可能产生新颖的次级代谢产物。因此,本研究对采集自南极普里兹湾的海绵进行共附生放线菌的分离培养,对分离菌株拮抗临床多重耐药菌活性和赤潮微藻克生活性进行筛选,并对活性菌株进行次级代谢功能基因筛选和分析,以期获得有应用潜力的药用放线菌资源,为中国极地环境放线菌资源的研究和创新药物开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

共 3 个样品,编号 P3-8-3, P5-9-7 和 Pr-1-11。样品采集于第 31 次南极科考航次普里兹湾,采集

后于 -20 °C 保藏。

#### 1.1.2 分离培养基

唯一碳源培养基<sup>[12]</sup>(分别以 1% 的葡萄糖,淀粉,海藻糖,麦芽糖,山梨醇,卡拉胶,甘油,丙酸钠作为唯一碳源,其他组分相同);棉子糖-组氨酸培养基(R-H 培养基)<sup>[13]</sup>;R2A 培养基<sup>[14]</sup>;2216E 培养基<sup>[14]</sup>;以上培养基用陈海水配置并加入制霉菌素 100 mg/L、萘啶酮酸 50 mg/L。

#### 1.1.3 主要实验仪器

光照培养箱(宁波江南仪器厂);超净工作台(Hfsafe1200, Heal Force Development Co. Ltd);电子天平(BS210S, 德国 Sartorius);电泳仪(Toy Lab Mupid-21);光学显微镜(上海光学仪器厂);V5100 可见分光光度计(上海安亭科学仪器厂);THZ-C 恒温振荡仪(江苏太仓实验设备厂);PCR 扩增仪(美国 PE 公司 Gene AMP PCR System2400);微孔滤膜(孔径 0.45、0.22 μm, 上海高桥亿箭净化器材厂);微孔滤膜抽滤器(上海高桥亿箭净化器材厂)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株的分离纯化和发酵

样品于低温解冻后,切成小块于装有无菌海水的 50 mL 烧杯中清洗 3 次,以去除海绵体表附着的微生物和其他杂质。清洗后的样品转移至研钵内研磨成浆,将海绵匀浆采用梯度稀释法涂布于上述培养基中,平板于 28 °C 倒置恒温培养约 1~4 周。挑取不同的单菌落转接在 2216E 培养基平板上进行二次纯化。纯化的菌种转接到含 20% 甘油的保种液中于 -80 °C 长期保存。斜面 28 °C 培养 24~36 h 后接种发酵培养基,装液量为 100 mL/500 mL 三角瓶。150 r/min, 28 °C 培养 7 d。发酵产物破碎,乙酸乙酯萃取。乙酸乙酯层真空浓缩至干,加甲醇配成 10 mg·mL<sup>-1</sup>,供活性筛选用。

### 1.2.2 菌株 16S rDNA 序列扩增及分析

参照 Cui<sup>[15]</sup>等人的方法提取基因组 DNA。采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3') 扩增 16S rDNA 基因。PCR 扩增条件为:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。纯化的 PCR 产物克隆到 P<sup>MD19</sup>

—T 载体并送测序。所测 16S rDNA 序列与 Genbank 数据库中已有序列比对。

### 1.2.3 菌株的拮抗多重耐药菌活性实验

抗菌活性实验采用 Cross-Streak 方法<sup>[16]</sup>,指示菌包括 4 株临床多重耐药细菌:鲍曼氏不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* 11910、甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* MR-SA、甲氧苯青霉素抗性凝固酶阴性金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* MRCNS、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和 1 株条件致病真菌白色假丝酵母菌 *Candida albicans*。平板涂布完成后置于 28 °C 培养 48~72 h 后,用坐标纸测量指示菌与放线菌拮抗区域的面积。抗菌活性值(%)=指示菌受抑制面积/指示菌涂布总面积·100%。

### 1.2.4 放线菌发酵粗提物的赤潮微藻克生活性实验

2 种赤潮微藻为赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*) 和小新月菱形藻 (*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)。将对数生长期的 2 种赤潮微藻配成 OD<sub>680</sub> 值为 0.5 的藻悬液,取 2 mL 加入 24 孔板孔中,再接入终浓度为 100 μg/mL 的发酵液粗提物,混匀后将 24 孔板置于光照培养箱中不充气培养,温度为 23 °C,光强为 60 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,亮暗比为 12h:12h。每天定时摇动 3 次,观察记录微藻生长情况。培养 5 d 后进行检测,将微孔内的藻悬液用移液枪吸打混匀测量微藻悬液在 680 nm 下的吸光值<sup>[17]</sup>。以只加入 2 μL DMSO 的赤潮微藻悬液作为空白对照。

### 1.2.5 次级代谢关键基因筛选和分析

分别用兼并引物 K1F/M6R、FW/RV、A3F/A7R<sup>[18]</sup> 和 Halo-B4-FW/Halo-B7-RV<sup>[19]</sup> 对放线菌进行 I 型聚酮合酶 (PKS-I)、II 型聚酮合酶 (PKS-II)、非核糖体肽合成酶 (NRPS) 和卤化酶的基因片段扩增,然后经过 PCR 产物的纯化、连接、转化和测序,获得基因序列。将所得序列翻译成氨基酸序列,通过 NCBI 进行 Blastx 比对和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离和多样性分析

利用上述 4 种培养基共分离得到 59 株放线菌,挑选形态不同的菌株进行 16S rDNA 全序列测序,并与 EzBioCloud 数据库已有序列进行比对(见表 1)。本实验分离得到的放线菌分布于节杆菌属 (*Arthrobacter*)、短杆菌属 (*Brevibacterium*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、束村氏属 (*Tsukamurella*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*)、*Brachybacterium*、*Nesterenkonia* 9 个属中,以链霉菌最多,共分离得到 13 个种;拟诺卡氏菌次之,共 5 个种。得到了 3 个稀有菌属,分别是束村氏属 (*Tsukamurella*)、*Brachybacterium* 和 *Nesterenkonia*,各有 1 个种。

尽管在海绵共附生微生物中放线菌所占比例较低<sup>[20]</sup>,但采用不同的培养基和预处理方式,能分离到一定量的放线菌。Imhoff 等人<sup>[21]</sup>利用 5 种选择性培养基从波罗地海域海绵 *Halichondria panicea* 中分离到 46 株海洋放线菌,链霉菌占绝大多数。张开山<sup>[22]</sup>利用平板稀释法从 20 份采集自我国海南三亚、琼海海域的海绵中分离到了大量放线菌,链霉菌属占到 71.0%。本文采用 4 种培养基从 3 个南极海绵中分离到 59 株海洋放线菌,以链霉菌属最多,共分离得到 13 个种;拟诺卡氏菌属次之,共 5 个种,这一结果,与已有的研究还是基本相符的。

### 2.2 抗菌活性评价

图 1 显示了分离自南极海绵的放线菌对 5 株临床多重耐药菌的拮抗活性。在图 1(A)和图 1(B)中可以看到,在有的指示菌生长区和放线菌生长条带之间有 1 个很明显的生长拮抗区,拮抗区域指示菌无法生长,拮抗区域越大,指示菌受到的抑制作用越强。有 21 株放线菌表现出明显的抗菌活性(见表 2),占总测试放线菌的 35.6%。

表 1 根据 16S rDNA 基因序列分析所得的放线菌代表菌株的分类从属关系  
Table 1 Phylogenetic affiliations of representative actinomycetes based on comparative analysis of 16S rDNA gene sequences

菌株编号	同源性最大的种	最大同源性/%	GenBank 收录号
OAct369	<i>Arthrobacter agilis</i> strain R-36534	99.24	KC493998
OAct200	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> strain LMG 1986	99.65	KC493995
OAct331	<i>Brevibacterium casei</i> strain Pc229	99	KC493995
OAct243	<i>Tsukamurella</i> sp. strain COL18	99	KC493977
OAct322	<i>Micrococcus luteus</i> strain CJ-G-TSA7	99	KC493984
OAct346	<i>Nesterenkonia halotolerans</i> strain YIM70084	99	KC493996
OAct349	<i>Rhodococcus fascians</i> strain LS277	99	KC493986
OAct401	<i>Nocardiopsis aegyptia</i> strain SNG49	99.45	KC493983
OAct381	<i>Nocardiopsis alba</i> strain PCM 2702	99	KC493981
OAct372	<i>Nocardiopsis ganjiahuensis</i> strain 20038	99.51	KC494000
OAct406	<i>Nocardiopsis lucentensis</i> strain DSM 44048	99	KC493980
OAct408	<i>Nocardiopsis terrae</i> strain YIM 90022	99.56	KC493982
OAct383	<i>Streptomyces albogriseolus</i> strain C60	98.75	KC494001
OAct411	<i>Streptomyces anulatus</i> strain NRRL B-2000	100	KC493992
OAct413	<i>Streptomyces bacillaris</i> strain NBRC 13487	99.93	KC493993
OAct427	<i>Streptomyces badius</i> strain NRRL B-2567	99.79	KC493991
OAct433	<i>Streptomyces bikiniensis</i> strain AM3	100	KC493971
OAct371	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i> strain KSRO2	99.75	JX290323
OAct418	<i>Streptomyces flavofuscus</i> strain CGMCC 4.1938	100	KC493972
OAct441	<i>Streptomyces marokkonensis</i> strain Ap1	98.83	KC493997
OAct449	<i>Streptomyces somaliensis</i> strain SI87	99.15	KC493975
OAct359	<i>Streptomyces triangulatus</i> strain NBRC 13799	100	KC493976
OAct434	<i>Streptomyces venezuelae</i> strain SXYM9	100	KC493973
OAct310	<i>Streptomyces violaceorectus</i> strain NBRC 13102	99.93	KC493990
OAct356	<i>Streptomyces xinghaiensis</i> strain SI87	99.93	KC493988

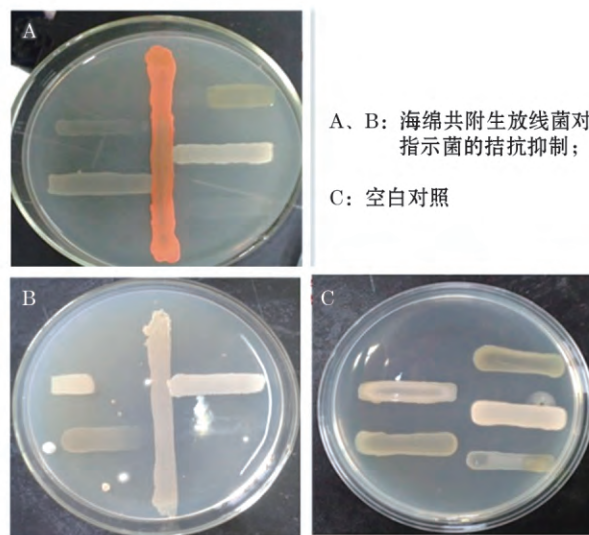


图 1 部分海绵共附生放线菌的拮抗效果图

Fig. 1 Antibiosis exhibited by sponge-associate actinobacterial strains

从表 2 可以看出,南极海绵共附生放线菌表现出了较好的抑菌活性,说明海洋放线菌产生具有生物活性次级代谢产物的潜力很大,具有很好的研究价值。有很大一部分放线菌至少对 1 种指示病原菌的抑菌率达到 100%,显示出了对该种病原微生物的强抑制作用。11 株放线菌对白色假丝

酵母有抑制,其中 5 株放线菌对白色假丝酵母抑菌率在 50%以上,最高可达到 83%,这部分放线菌有可能产生针对真菌的新的活性化合物,这对于解决白色假丝酵母近年来频发的耐药性问题提供了新的思路。

表 2 南极海绵共附生放线菌拮抗多重耐药菌活性

Table 2 Results of antibacterial activity of Antarctic actinobacteria to multiple resistant bacteria /%

菌株编号	甲氧苯青霉素		铜绿假单胞菌	鲍曼氏不动杆菌	真菌白色假丝酵母菌
	抗性金黄色葡萄球菌	抗性凝固酶阴性金黄色葡萄球菌			
OAct401	0	0	0	83	83
OAct402	100	100	0	0	0
OAct 404	100	100	100	0	0
OAct 406	7	28	0	53	53
OAct 407	7	8	0	70	70
OAct 408	0	0	0	7	7
OAct 409	0	0	0	0	0
OAct 410	0	0	0	0	0
OAct 411	0	63	0	0	0
OAct 413	100	93	0	0	0
OAct 427	0	0	0	11	11
OAct 433	90	0	0	0	0
OAct 434	100	100	0	0	0
OAct 441	0	10	0	50	50
OAct 443	0	0	0	23	23
OAct 371	23	0	0	32	32
OAct 383	20	0	0	33	33
OAct 358	40	100	50	0	0
OAct 311	0	0	0	50	50
OAct 312	6	5	0	5	5
OAct 316	0	0	53	0	0

有 4 株海绵共附生放线菌对多重耐药金黄色葡萄球菌 *S. aureus* MRSA 和 MRCNS 表现出接近 100%的拮抗活性。总体对铜绿假单胞菌的抑制率较低,总共 3 株放线菌对铜绿假单胞菌有抑制活性,其中 1 株放线菌对铜绿假单胞菌抑制率为 100%,另 2 株抑制率 50%左右。鲍曼氏不动杆菌、金黄色葡萄球菌 MRSA 和 MRCNS 等是临床上较为常见的多重耐药菌,具有较广的抗菌谱,发掘对该类致病菌有抑制作用的放线菌,对于临床医学以及抗生素药物等领域具有重大意义。在后期实验中,本文将着重对有显著抑菌制作用的菌株及其可能产生的活性次级代谢产物进行深入研究。

### 2.3 发酵粗提物的赤潮微藻克生活性

图 2 显示了海绵放线菌发酵液粗提物对 2 种赤潮微藻的抑制效果,OD<sub>680</sub> 代表加入海洋放线菌发酵液粗提物后微藻的生长情况,OD<sub>680</sub> 值越小,说明发酵液粗提物对微藻生长的抑制越明显,粗提物对赤潮微藻的克生作用越大。从图 2 可以看出,空白培养基粗提物对 2 株微藻的生长没有抑制作用,说明了活性物质并非来源于培养基成分而是菌株发酵后产生的。本文的实验结果显示南极海绵共附生放线菌的发酵粗提物对赤潮异弯藻表现出相当明显的克生作用,如菌株 OAct402、OAct406 和 OAct408 等 6 株菌对赤潮异弯藻抑制作用非常显著。有 2 株海绵放线菌 OAct311 和

OAct312 的粗提物对这 2 种微藻都有克生活性,而且效果十分明显,推测粗提物中含有较高活性

的微藻克生活性物质。



图 2 菌株粗提物对 2 种微藻的抑制效果

Fig. 2 Inhibition of microalgae by crude bioactives of the actinobacteria strains

#### 2.4 次级代谢潜力评估

将次级代谢产物合成途径中的特定基因作为筛选标记,可以在基因水平上初步评估菌株的活性物质合成潜力,从而筛选到在常规发酵条件下菌株低表达或不表达的活性物质;此外通过对基因筛选所获得的次级代谢产物合成相关基因进行生物信息学分析,还可以初步预测产物结构,在一定程度上避免化合物的重复发现。本文对 21 株有拮抗活性的南极海绵共附生放线菌的次级代谢潜力进行了评估,利用兼并引物扩增了菌株基因组 DNA 中可能含有的 PKS-I、PKS-II、NRPS 关键基因和卤化酶基因。PKS-I、PKS-II、NRPS 关键基因和卤化酶基因氨基酸序列同源性比对结果见表 3,由表可知,有 7 株活性菌株至少含 2 种功能基因,菌株 OAct311 和 408 同时含有这 4 种功能基因,结合拮抗实验和微藻克生实验结果,暗示了这 2 株菌具有产生新颖活性次级代谢产物的巨大潜力。

卤化酶是能够赋予次级代谢产物生物活性的 1 种重要后期修饰酶<sup>[19]</sup>,许多卤化物,如氯霉素(chloramphenicol)、氯四环素(chlorotetracycline)、万古霉素(vancomycin)等都是重要的抗生素。有研究报道,海洋链霉菌的卤化酶序列普遍不同于已知的卤化酶序列,由于卤化酶具有底物特异性,很可能催化合成新的卤化产物<sup>[19]</sup>。因此

本文对分离得到的南极海绵共附生放线菌也进行了卤化酶基因的筛选评估。

菌株 OAct404 卤代酶氨基酸序列与杀真菌链霉菌(*Streptomyces fungicidicus* ATCC21013)合成的卤化物——恩拉霉素(Enramycin)合成基因簇中的卤代酶高度同源,恩拉霉素是 1 种含 17 个氨基酸的脂肽类抗生素,对厌氧和需氧型的革兰氏阳性菌的作用极强,主要机理是抑制细菌细胞壁的合成。NRPS 基因筛选中也检测到 OAct404 菌株含有 NRPS 基因,由此可以推测 OAct404 可能是 1 株新的恩拉霉素产生菌,目前针对该菌株的活性筛选和化学筛选正在进行中。

菌株 OAct311 和 OAct408 的卤代酶氨基酸序列与植物内生放线菌 *Frankia* sp. Cc13 的卤代酶(YP\_481845)享有同源性。但菌株 OAct311 很可能含有 1 个新的卤代酶,它与已公开的卤代酶序列最大同源性为 60% (植物内生放线菌 *Frankia* sp. Cc13),其次,与 *Salinispora arenicola* CNS-205 的卤代酶序列同源性为 58%,与其余已知卤化物的卤代酶序列同源性均不超过 35%。盐孢菌属(*Salinispora*)是 2006 年发现的第 1 个海洋专一性的放线菌属,从其中分离到的生物碱类蛋白酶抑制剂 Salinosporamide A 是非常引人注目的卤代产物,其生物合成途径中包含着新颖的卤化酶 SalL,不同于普通的 FAD 依赖型卤化

酶,功能和结构研究揭示了 SalL 利用 S-腺苷酰-L-甲硫氨酸(SAM)作为辅因子的独特的卤化机制。

据此本文推测菌株 OAct311 极有可能产生结构新颖的卤代产物。

表 3 含功能基因菌株的信息

Table 3 Information of function gene-positive strains

/%

菌株编号	PKS-I 基因氨基酸序列 最大同源性菌株	PKS-II 基因氨基酸序列 最大同源性菌株	NRPS 基因氨基酸序列 最大同源性菌株	卤代酶基因氨基酸序列 最大同源性菌株
OAct311	<i>Streptomyces</i> sp. GBA 94-10 86	<i>Streptomyces</i> <i>misawanensis</i> 78	<i>Streptomyces</i> sp. GBA 94-10 99	<i>Frankia</i> sp. CcI3 60
OAct312	<i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0109 64		<i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0109 64	
OAct402		<i>Streptomyces</i> sp. 13 67	<i>Aquimarina</i> <i>intermedia</i> 60	
OAct408	<i>Streptomyces</i> sp. SM8 98	<i>Streptomyces</i> sp. SM8 92	<i>Saccharomonospora</i> <i>xinjiangensis</i> 87	<i>Frankia</i> sp. CcI3 99
OAct434	<i>Streptomyces auratus</i> AGR000167	<i>Streptomyces</i> sp. ID05-A0102 87		
OAct413	<i>Rhodococcus fascians</i> D188 78	<i>Nocardioopsis</i> sp. HB383 95		<i>Streptomyces</i> <i>fungicidicus</i> 76
OAct404	<i>Streptomyces</i> <i>labedae</i> 76		<i>Streptomyces</i> <i>labedae</i> 99	<i>Streptomyces</i> sp. E9(2008) 99

### 3 讨论

对于南极海绵活性物质的研究始于 20 世纪 90 年代<sup>[23-24]</sup>,但此后的研究并不是很活跃,2004 年 Ankisetty 等人报道了从南极海绵 *Dendrilla membranosa* 中发现新的二萜烯类化合物,并具有抗革兰氏阴性菌和真菌活性<sup>[25]</sup>,2016 年美国南佛罗里达大学研究人员从南极海绵 *Dendrilla membranosa* 中分离到 1 个高抗菌活性的二萜类化合物。对南极海绵共附生微生物及其活性物质的研究更少,仅在 1996 年,出现第 1 篇研究报道,从 1 株南极海绵共附生细菌 *Pseudomonas aeruginosa* 中分离到 diketopiperazine 类化合物并具有抗革兰氏阳性菌的活性<sup>[26]</sup>。针对海绵共附生微生物的相关研究基本聚焦在热带或温带海域海绵<sup>[20-21,27]</sup>,如李志勇等人采用传统分离培养手段和分子生态学技术对我国南海的多种海绵共附生微生物的多样性、群落结构和活性功能进行了研究<sup>[28-29]</sup>;此外也有大量针对海绵共附生放线菌的

次级代谢功能研究<sup>[30-31]</sup>。近年来随着人类对极端环境微生物的关注,对海绵共附生微生物的研究焦点也扩大到南极寒冷水域和部分北极水域,2004 年 Webster 等人利用 16S rDNA 文库技术和 DGGE 技术分析了 5 种南极海绵种微生物群落结构<sup>[7]</sup>。2015 年 Trefault 等人利用高通量测序技术系统分析了 8 种南极海绵共附生微生物的多样性<sup>[11]</sup>。基本上缺乏对南极海绵共附生微生物合成次级代谢活性物质及代谢潜力的系统研究。

本文的纯培养研究结果初步揭示了在南极海域海绵中同样蕴含着丰富的放线菌资源和多样性,对分离的海洋放线菌进行了抗多重耐药菌的活性筛选和次级代谢合成途径的基因筛选,得到了 21 株活性菌株,其中有 4 株海绵共附生放线菌对多重耐药金黄色葡萄球菌 *S. aureus* MRSA 和 MRCNS 表现出接近 100% 的拮抗活性,有 6 株菌对赤潮微藻表现出较高的克生活性。此外基于次级代谢合成途径关键基因的功能基因筛选也鉴定

出 7 株具有合成新颀次级代谢产物的菌株。为后续针对性地寻找卤化物提供了指导,也对分离鉴定可能具有新结构的代谢产物有很好的导向作用。本研究显示出极地海绵共附生放线菌的药用潜力,是 1 个亟待挖掘利用的海洋生物资源宝库,对于认识和利用南极生物资源具有重要的意义。

### 参考文献

- [1] Thomas T R, Kavlekar D P, LokaBharathi P A. Marine drugs from sponge-microbe association—a review[J]. Mar Drugs, 2010,8(4): 1417-1468.
- [2] Lee Y K, Lee J H, Lee K. Microbial Symbiosis in Marine Sponges[J]. J Microbiol, 2001,39(4): 254-264.
- [3] Piel J. Metabolites from symbiotic bacteria[J]. Nat Prod Rep, 2009, 26(3): 338-362.
- [4] Zhao C Y, Zhu T H, Zhu W M. New marine natural products of microbial origin from 2010 to 2013[J]. Chinese J Org Chem, 2013, 33(6):1195-1234.
- [5] Piepenburg D. Recent research on Arctic benthos: Common notions need to be revised[J]. Polar Biol, 2005,28(10): 733-755.
- [6] Samue A, Michelle K, John B, et al. Advancement into the Arctic region for bioactive sponge secondary metabolites[J]. Mar Drugs, 2011,9(11): 2423-2437.
- [7] Webster N S, Negri A P, Munro M M, et al. Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges[J]. Environ Microbiol, 2004,6(3):288-300.
- [8] Cerrano C, Calcinaì B, Cucchiari E, et al. The diversity of relationships between Antarctic sponges and diatoms: the case of *Mycale acerata* Kirkpatrick, 1907 (Porifera, Demospongiae)[J]. Polar Biol,2004,27(4): 231-237.
- [9] Mangano S, Caruso C, Michaud L, et al. Incidence of plasmid and antibiotic resistance in psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic sponges[J]. Atti Accad Pelorit Pericol Cl Sci Fis Mat Na,2011,89(1):739-745.
- [10] Henr quez M, Vergara K, Norambuena J, et al. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014,30(1): 65-76.
- [11] NicoleTrefault, Rodriguez-Marconi S, De la Iglesia R, et al. Characterization of bacterial, archaeal and eukaryote symbionts from Antarctic sponges reveals a high diversity at a three-domain level and a particular signature for this ecosystem[J]. PLoS One,2015,10(9):1-19.
- [12] 何洁,张道锋,徐盈,等. 印度洋红树林沉积物可培养海洋放线菌多样性及其活性[J]. 微生物学报,2012,52(10): 1195-1202.
- [13] 张金丽,秦玉丽,熊子君,等. 植物内生放线菌的选择性分离[J]. 微生物学通报,2013, 40(7): 1305-1313.
- [14] 蔡亚萍,苏建强,谢忠,等. 南海海域几丁质降解菌的筛选及其特性研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2008,S2: 259-263.
- [15] Cui X L, Mao P H, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae[J]. Int J Syst Evol Microbiol,2001, 51(2):357-363.
- [16] Kumar P S, Raj J P P, Duraipandian V, et al. Antibacterial activity of some actinomycetes from Tamil Nadu, India [J]. Asian Pacific J Trop Biomed,2012, 2(12):936-943.
- [17] 金秋. 大型海藻孔石莼对赤潮微藻克生作用的实验研究及其克生物质的分离与鉴定[D]. 青岛:中国海洋大学,2005.
- [18] 孙艺华,冯鹤,王超,等. 红树林放线菌多样性及其新型糖苷类化合物合成潜力的发掘[J]. 中国海洋药物,2013, 32(1):1-9.
- [19] 高鹏,郝丽君,朴玉华,等. 不同生境放线菌的卤化酶基因分析及其对卤代产物筛选的意义[J]. 微生物学报, 2009,49(10):1367-1373.
- [20] 柴光俊,李金龙,冯国芳,等. 基于元基因组的南海海绵 *Theonella swinhoei* 共生微生物次级代谢潜力研究[J]. 中国海洋药物,2016,35(6):15-23.
- [21] Imhoff S, Kerstin N, Inga K, et al. Comprehensive investigation of marine actinobacteria associated with the sponge *Halichondria panacea*[J]. Appl Environ Microb, 2010, 76(11):3702-3714.
- [22] 张开山. 海绵共附生放线菌抗肿瘤活性菌株的筛选及菌株 A01059 活性物质的研究[D]. 海口:华南热带农业大学,2007.
- [23] Perry N B, Laurent E, Marc L, et al. Alkaloids from the antarctic sponge *Kirkpatrickia variolosa*. Part 1: Variolin b, a new antitumour and antiviral compound[J]. Tetrahedron, 1994,50(13): 3987-3992.
- [24] Aimin Y, Baker B J, Julia G, et al. Discorhabdin alkaloids from the Antarctic sponge *Latrunculia apicalis*[J]. J Nat Prod,1995,58(10):1596-1599.
- [25] Ankisetty S, Amsler C D, McClintock J B, et al. Further membranoid diterpenes from the Antarctic sponge *Dendrilla membranosa*[J]. J Nat Prod,2004,67(7):1172-1174.
- [26] Jayatilake G S, Thornton M P, Leonard A C, et al. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Nat Prod,1996,59(3):293-296.
- [27] 孟庆鹏,李志勇,缪晓玲. 可培养海绵共附生微生物的 PKS 基因筛选[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 464-467.
- [28] 何丽明,李志勇,吴杰,等. 基于 PCR-DGGE 指纹的南海海绵共附生细菌优势种群的揭示与系统发育分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 487-491.
- [29] Sathiyarayanan G, Saibaba G, Kiran GS, et al. Marine sponge-associated bacteria as a potential source for polyhydroxyalkanoates[J]. Crit Rev Microbiol, 2016,8:1-19.
- [30] Ouyang Y, Wu H, Xie L, et al. A method to type the potential angucycline producers in actinomycetes isolated from marine sponges[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 99(4):807-815.