

南极乔治王岛陆地土壤和潮间带放线菌 多样性及其抑菌活性研究^{△*}

严立恩, 陈志荣, 王晶晶, 官颖颖, 李静*

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:目的 系统研究南极乔治王岛陆地土壤和潮间带中放线菌的多样性, 并对分离菌株拮抗临床多重耐药菌活性进行筛选。方法 利用放线菌门特异引物扩增 16S rDNA 序列, 构建放线菌 16S rDNA 基因克隆文库, 对文库进行多样性指数分析和系统发育分析。采用琼脂块扩散法以 3 株临床多重耐药菌为指示菌, 筛选具有高抑菌活性的潜在药用放线菌。结果 土壤放线菌文库和潮间带放线菌文库的覆盖率分别为 54.55% 和 87.2%, 陆地土壤中放线菌群落以放线菌纲为优势菌, 潮间带样品中酸微菌纲占据明显优势。陆地土壤中的放线菌分布于 10 个目 16 个科中, 潮间带底泥中放线菌则分布于 7 个目 13 个科中。纯培养得到 141 株放线菌, 其中从陆地样品中分离得到 93 株菌, 分布于放线菌纲的 7 个属 17 个种中, 从潮间带样品中分离得到 41 株菌, 分布于 5 个属 10 个种中。有 17 株具有显著抑菌效果的菌株, 其中 4 株菌抑菌活性最强, 可强烈抑制 3 株多重耐药菌。结论 南极乔治王岛陆地土壤和潮间带底泥环境中蕴涵着丰富且多样的放线菌资源, 陆地土壤中放线菌的多样性要高于潮间带底泥中放线菌的多样性。南极链霉菌和诺卡氏菌具有较强的拮抗多重耐药菌的活性, 具有进一步研究的价值。

关键词: 南极乔治王岛; 放线菌; 多样性; 多重耐药菌

中图分类号: R931

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2016)01-019-10

Phylogenetic diversity analysis and antimicrobial activity of the terrestrial and intertidal zone of the King George Island at the Western Antarctic

YAN Li-en, CHEN Zhi-rong, WANG Jing-jing, GUAN Ying-ying, LI Jing*

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

Abstract: Objective To analyze the actinobacterial diversity of the soil and intertidal zone sediment of the King George Island and to access the antimicrobial activities of the Antarctic actinomycetes against multiple resistant bacteria. **Methods** Actinobacteria-specific 16S rDNA gene clone library was constructed. Representative clones were sequenced and placed into operational taxonomic unit (OTU) groups according to the 16S rDNA sequence similarity. Diversity statistics was analyzed using SPADE analysis software. 8 selective media were used to isolate actinomycetes strain. Agar diffusion method was used to evaluate the antimicrobial activities of the strains obtained. **Results** The values of coverage of 16S rDNA gene clone libraries of soil and intertidal sediments were 54.55% and 87.2%, respectively. The dominant actinobacteria in soil and the intertidal sediments were Class Actinobacteria and Class Acidimicrobia, respectively. 93 strains were isolated from soil and classified into 7 genera while 41 strains from

* **△基金项目:** 国家自然科学基金青年项目(31200009); 极地专项项目(CHINARE2015-01-06-06; CHINARE2014-02-01)资助

作者简介: 严立恩(1988-), 女, 硕士研究生, 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: 2015-04-23

intertidal zone sediment belonging to 5 genera. 17 strains exhibited antimicrobial activity while 4 stains showed strong activity against 3 multiple resistant bacteria. **Conclusion** There were abundant and diverse actinobacteria in terrestrial and intertidal zone of the King George Island at the Western Antarctic. Antarctic Streptomyces and Nocardia strains could be important resources for new antimicrobial metabolites.

Key words: the King George Island; antarctic; diversity; multiple resistant bacteria

由于极地独特的地理及气候特征,形成了 1 个干燥、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;此外,也会产生物种的新颖性和多样性,蕴涵着不可估量的应用潜力。近年来,随着中国对两极的重视、科考等硬件设施的完善,不少研究人员开始将眼光投向了南北极放线菌这一领域。南极乔治王岛是南设得兰群岛中最大的岛屿,位于南极洲的低纬地区,具有南极洲海洋性气候特点。因处在南极半岛与南美大陆间的多气旋地带,生物环境特征复杂而且多变,生物区系相对比较复杂,生态环境和生物群落对区域性或全球性气候环境变化具有敏感性,是研究南极陆地和近岸海域生态系统的理想场所。16S rDNA 基因文库技术在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性,目前广泛应用于放线菌群落遗传多样性和动态分析中^[1-2]。因此,本研究利用 16S rDNA 基因文库技术和纯培养技术对南极乔治王岛区域的土壤和潮间带中的放线菌物种多样性和系统发育多样性进行分析,并对分离菌株拮抗临床多重耐药菌活性进行筛选,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 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品

样品采集于南极乔治王岛专项科考航次,样品采集后于 -20°C 保藏。

1.1.2 培养基

菌株分离培养基:改良淀粉酪素、高氏一号、改良高氏一号、甘油-精氨酸、丙酸钠、腐殖酸-复合维生素、淀粉-酪素和 M1 共 8 种选择性培养基,培养基中添加终浓度为 20 g/mL 的茶啶酮酸、

25 g/mL 的制霉菌素和 50 g/mL 的重铬酸钾。发酵培养基:葡萄糖 2%、 K_2HPO_4 0.05%、 MgSO_4 0.05%、NaCl 0.05%、牛肉膏 0.3%、玉米浸粉 0.3%、酵母浸膏 1%、可溶性淀粉 1%、 CaCO_3 0.2%,pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 样品总 DNA 的提取

采用 SDS-CTAB-溶菌酶法^[3-4]提取总 DNA。

1.2.2 16S rDNA 克隆文库的构建

采用放线菌门特异性引物对土壤总 DNA 进行 PCR 扩增,引物名称为 S-C-Act-235-a-S-20 和 S-C-Act-878-a-A-19,PCR 反应条件参照 Stach^[5]方法进行。将目的条带纯化回收后通过 T4 连接酶与载体 pMD19-T 载体连接,并转化 E. coli DH5 α 感受态细胞。将转化产物涂布在含有氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上,随机挑取白色克隆子,用 M13 载体引物进行阳性验证,并构建克隆文库。PCR 扩增出插入的放线菌 16S rDNA 基因片段后用 Hha I 和 Hae III 双酶切 3 h,选取酶切带型不同的重组子送到上海博尚生物有限公司进行测序。

1.2.3 16S rDNA 克隆文库多样性指数及系统发育分析

文库多样性指数分析:定义克隆子同序列相似性小于 99% 的归为不同的分类单元,克隆序列的相似性大于 99% 的归类为同一个 OTU 为标准^[5],使用 Mothur^[6]软件划分所构建的克隆文库的 OTUs。然后根据划分的 OTUs 利用软件 EstimateS 752 构建稀有度曲线,用 Rarefaction Curve 分析 16S rDNA 克隆文库,获得文库的覆盖率 Coverage C 值;使用 SPADE (<http://Hchao.stat.nthu.edu.tw>) 分析软件对文库多样性指数进行分析。

系统发育分析:根据测序结果,用 BLAST 搜索程序从 GenBank 等公共数据库中调出相似性较

高的相关菌株的 16S rDNA 基因序列,用 Clustal X^[7]进行多序列比对,系统进化矩阵根据 Kimura 模型估算,用 MEGA5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件^[8]采用邻接法(Neighbor-Joining)聚类分析,并构建出系统进化树。

1.2.4 菌株分离、纯化和保藏

取 10 g 土壤样品于无菌生理盐水,潮间带样品于无菌陈海水中,剧烈振荡至混合均匀,然后置于 56 °C 水浴 6 min,上清液逐级稀释后涂布固体分离培养基平板上,25 °C 恒温培养 2~3 周,挑取不同的单菌落转接在相同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。

1.2.5 菌株基因组 DNA 提取、16S rDNA 序列扩增及分析

放线菌基因组 DNA 提取参照 Cui 等人^[9]的方法,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 扩增产物克隆到 pMD19-T 载体 (TaKaRa), 送上海博尚生物工程公司测序。所测 16S rDNA 序列与 Genbank 数据库中已有序列比对。

1.2.6 抗临床多重耐药菌活性实验

指示菌株为鲍曼氏不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* 11910、甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球

菌 *Staphylococcus aureus* MRSA 和甲氧苯青霉素抗性凝固酶阴性金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* MRCNS。将分离得到的代表菌株自斜面分别接种于发酵培养基上,28 °C 恒温培养 7~9 d 后用无菌刀片切取边长约 6 mm 的琼脂小块,用无菌镊子正向放置于涂布有供试菌株菌液的培养基上。28 °C 恒温培养约 24 h,观察并记录是否存在抑菌圈及抑菌圈直径。阳性对照:吸取 10 μL 浓度为 1 mg/mL 的环丙沙星滴到无菌滤纸片(直径 6 mm)上,待吸收完全,贴在涂布有供试菌株菌液的培养基上。

2 结果

2.1 克隆文库的构建和检验

部分样品总 DNA 的电泳结果如图 1A 所示,目的片段的大小约为 10Kb;应用放线菌特异性引物扩增可获得约 640 bp 的目的条带(见图 1B)。纯化 DNA 产物通过 T4 连接酶与载体 pMD19-T 载体连接,并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。应用 M13 引物对克隆子进行菌落 PCR 验证,排除假阳性克隆,土壤和潮间带底泥样品分别得到 121 和 161 个阳性克隆。通过比较 Hha I 和 Hae III 双酶切图谱(见图 2),根据酶切带型挑选代表克隆子进行测序。测序得到的序列用 Mothur 软件分别划分 OTU。土壤样品构建的文库 T5 得到 78 个 OTUs,;潮间带底泥构建的文库 CH4 得到 44 个 OTUs。各序列的 Genbnk 收录号: KJ849344-KJ849616。

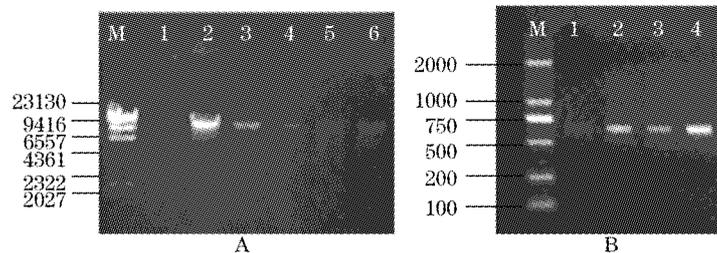


图 1 提取的总 DNA 及放线菌门特异引物扩增产物

Fig. 1 Total DNA and Actinobacterial-specific 16S rDNA gene PCR

注: A: 提取的样品总 DNA; B: 放线菌门特异引物 PCR 扩增产物; 1-6: 部分样品;
M(A): λ DNA/HindIII 单切 DNA 分子量标准; M(B): DL2000 DNA 分子量标准;
Note: A: Total DNA; B: Actinobacterial-specific PCR product; 1-6: samples;
M(A): λ DNA/HindIII DNA marker; M(B): DL2000 DNA marker.

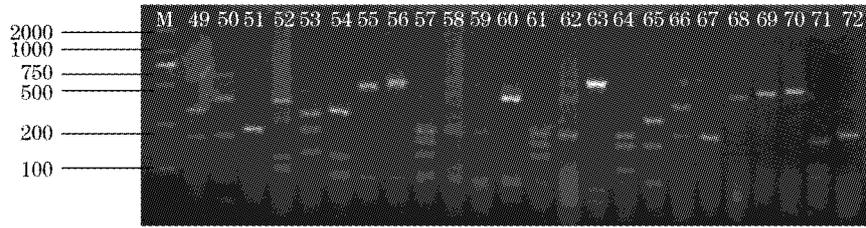


图 2 部分克隆子酶切后电泳检测图

Fig. 2 Agrose electrophoresis of enzyme digestion after amplification

M: D2000 Marker; 49-72: 克隆子编号

Note: M: DNA marker DL2000; 152~175: Number of clones.

2.2 16S rDNA 基因文库多样性指数分析

利用 Estimate S 752 软件构建各文库的稀有度曲线,如图 3 所示。Kemp^[10]的研究结果表明,随着库容(Library size)的增大,OTUs 的数目总是在增加,几乎没有哪一个文库能够穷尽样品中微生物的多样性。因此,用 Rarefaction Curve 分析 16S rDNA 克隆文库, Coverage C 不可能达到 100%,当 Rarefaction Curve 趋于平缓或者趋于平台期时也就可以认为库容已经足够。从图 3 中可以看出,潮间带文库 CH4 的稀有度曲线有明显的平缓趋势,基本处于平台期,说明这个文库的库容足够,涵盖了它们所在区域的绝大多数放线菌类群;而土壤文库 T5 的稀有度曲线还处于增长期,显示还需挑取更多的克隆子进行分析才可能更好地获得土壤放线菌多样性数据。

使用 SPADE (<http://Hchao.stat.nthu.edu.tw>) 分析软件对文库多样性指数进行分析。结果如表 1,在可信区间为 95%的情况下,文库

T5 和 CH4 的覆盖率分别为 54.55% 和 87.2%。香农指数表示个体间分配的均匀性,数值越大表示个体分配的越均匀,文库 T5 和 CH4 分别为 4.164 和 3.034,辛普森指数分别为 0.980 和 0.919。综合 2 个文库的覆盖率及其多样性指数可以看出,南极乔治王岛陆地放线菌的物种多样性要明显高于潮间带中放线菌的多样性。

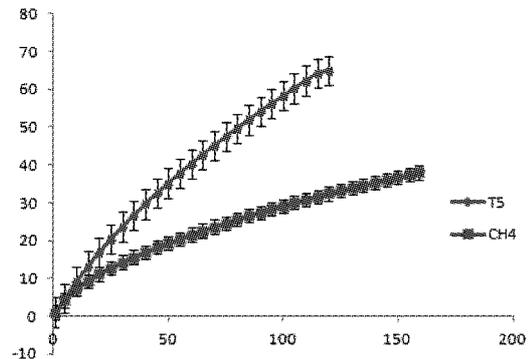


图 3 16S rDNA 克隆文库的稀有度曲线

Fig. 3 Rarefaction curve of clone libraries

表 1 土壤和潮间带放线菌克隆文库的多样性指数

Table 1 Diversity indexes of the actinobacterial clone libraries

文库	OTUs	克隆子数	覆盖率 C	香农指数 (H)	最大多样性指数 (Hmax)	均匀性指数 (J)	辛普森指数 (SI)
T5	78	121	54.55%	4.164	6.285	0.663	0.980
CH4	39	161	87.2%	3.034	5.459	0.556	0.919

2.3 16S rDNA 基因序列分析

将土壤和潮间带底泥文库的克隆序列进行同源比对分析,对对比结果进行统计(见表 2)。结果表明,2 个 16S rDNA 文库的克隆序列全都分布在放线菌纲(Actinobacteria)和酸微菌纲(Acidimicrobiia)中,土壤文库 T5 中,放线菌纲有 52 个

OTUs 和 76 个克隆序列,占该 T5 文库 OTUs 总数的 66.7%,克隆子总数的 62.8%,这 76 个克隆序列分布于棒杆菌目(Corynebacteriales)、链孢囊菌目(Streptosporangiales)、链霉菌目(Streptomycetales)、微球菌目(Micrococcales)、丙酸杆菌目(Propionibacteriales)、弗兰克氏菌目(Frankia-

les)、动孢囊菌目(Kineosporiales)、假诺卡氏菌目(Pseudonocardiales)、小单孢菌目(Micromonosporales)和酸微菌目(Acidimicrobiales)等 10 个目,涵盖了分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)、链孢囊菌科(Streptosporangiaceae)、拟诺卡氏菌科(Nocardiopsaceae)、链霉菌科(Streptomycetaceae)、微球菌科(Micrococcaceae)、间孢囊菌科(Intrasporangiaceae)、类诺卡氏菌科(Nocardiodaceae)、地嗜皮菌科(Geodermatophilaceae)、中村氏菌科(Nakamurellaceae)、弗兰克氏菌科(Frankiaceae)、

动孢囊菌科(Kineosporiaceae)、假诺卡氏菌科(Pseudonocardiaceae)、小单孢菌科(Micromonosporaceae)、Iamiaceae、Ilumatobacter 和酸微菌科(Acidimicrobiaceae)等 16 个科。酸微菌纲中的 45 个克隆子全都分布于酸微菌目中的酸微菌科、Iamiaceae 和 Ilumatobacter 3 个科中,其中酸微菌科在该区域分布广泛,它的克隆子数和 OTUs 都是最多的,分别占克隆子总数和 OTUs 的 21.5% 和 17.9%。

表 2 土壤和潮间带样品放线菌 16S rDNA 文库分析

Table 2 Analysis of actinomycetes 16 S rDNA clone libraries of soil and intertidal samples

纲	目	科	OTUs 土壤 (潮间带)	克隆子数土壤 (潮间带)	
放线菌纲 Actinobacteria * 76 (26)	棒杆菌目 Corynebacteriales	分枝杆菌科 Mycobacteriaceae	1 (0)	1 (0)	
		假诺卡氏菌科 Pseudonocardiaceae	4 (0)	5 (0)	
	小单孢菌目 Micromonosporales	小单孢菌科 Micromonosporaceae	5 (0)	7 (0)	
		链孢囊菌科 Streptosporangiaceae	1 (0)	1 (0)	
	2 * 链孢囊菌目 2 * Streptosporangiales	拟诺卡氏菌科 Nocardiopsaceae	1 (0)	1 (0)	
		高温双孢菌科 Thermobispora	0 (1)	0 (1)	
		链霉菌科 Streptomycetaceae	6 (2)	6 (2)	
		微球菌科 Micrococcaceae	7 (3)	16 (4)	
		间孢囊菌科 Intrasporangiaceae	4 (1)	8 (3)	
	丙酸杆菌目 Propionibacteriales	纤维素单胞菌科 Cellulomonadaceae	0 (1)	0 (1)	
		类诺卡氏菌科 Nocardiodaceae	8 (6)	15 (11)	
		丙酸杆菌科 Propionibacteriales	0 (1)	0 (1)	
		弗兰克氏菌目 Frankiales	地嗜皮菌科 Geodermatophilaceae	5 (1)	7 (1)
	动孢囊菌目 Kineosporiales	中村氏菌科 Nakamurellaceae	3 (0)	3 (0)	
		弗兰克氏菌科 Frankiaceae	5 (0)	5 (0)	
		动孢囊菌科 Kineosporiaceae	2 (2)	2 (2)	
		酸微菌纲 Acidimicrobia * 45 (135)	东大分子与细胞所菌科 Iamiaceae	3 (4)	7 (8)
			Ilumatobacter	9 (12)	12 (78)
	酸微菌科 Acidimicrobiaceae		14 (3)	26 (17)	
	Microthrix		0 (3)	(0)32	

潮间带底泥文库 CH4 共 161 个克隆子, 分布于链孢囊菌目 (Streptosporangiales)、链霉菌目 (Streptomycetales)、微球菌目 (Micrococcales)、丙酸杆菌目 (Propionibacteriales)、弗兰克氏菌目 (Frankiales)、动孢囊菌目 (Kineosporiales) 和酸微菌目 (Acidimicrobiales) 7 个目, 涵盖了高温双孢菌科 (Thermobispora)、链霉菌科 (Streptomycetaceae)、微球菌科 (Micrococcaceae)、纤维素单胞菌科 (Cellulomonadaceae)、间孢囊菌科 (Intrasporangiaceae)、类诺卡氏菌科 (Nocardioideae)、丙酸杆菌科 (Propionibacteriales)、地嗜皮菌科 (Geodermatophilaceae)、动孢囊菌科 (Kineosporiaceae)、Iamiaceae、Ilumatobacter、Microthrix 和酸微菌科 (Acidimicrobiaceae) 13 个科。从表 2 中可以看出, 酸微菌纲的克隆子数和 OTUs 数最多, 各为 135 个和 22 个, 分别占该文库中克隆子总数和 OTUs 总数的 83.9% 和 56.4%, 是潮间带底泥中的巨大优势菌群, 这些克隆子分布于酸微菌目的 Ilumatobacter、Iamiaceae、Microthrix 和酸微菌科 4 个科中, 其中 Ilumatobacter 有 12 个 OTUs, 78 个克隆子, 占 OTUs 总数的 30.8%, 克隆子总数的 48.4%; 其次是 Microthrix 的克隆子数最多, 为 32 个, 占克隆子总数的 19.9%、但其 OTUs 仅为 3 个, 说明该地区中 Microthrix 的数量较多但多样性较低。放线菌纲中的 26 个克隆子分布于棒杆菌目、链霉菌目、微球菌目、丙酸杆菌目、弗兰克氏菌目和动孢囊菌目 6 个目中, 其中类诺卡氏菌科的 OTUs 和克隆子数最多, 分别为 6 个和 11 个, 说明类诺卡氏菌科是该地区放线菌纲中的优势菌群; 微球菌科的 4 个克隆子被划分为 3 个 OTUs; 间孢囊菌科的 3 个克隆子被划分到 1 个 OUT 中; 链霉菌科和动孢囊菌科的 OTUs 和克隆子数均为 2 个; 高温单胞菌科、纤维素单胞菌科、丙酸杆菌科

和地嗜皮菌科的 OTUs 和克隆子数均为 1 个, 说明这些类群在该地区中虽然都有分布但数量和多样性都较低。

2.4 纯培养菌株的多样性分析

利用 8 种培养基从南极乔治王岛陆地土壤和潮间带的 11 个样品中分离纯化得到 134 株放线菌, 菌株经过表观形态排重后挑选代表菌株提取 DNA、连接、转化送测序, 并将测序结果与 EzBio-Cloud 数据库 (<http://www.ezbiocloud.net/>) 中的序列进行比对, 比对结果如表 3 所示。菌株分布于链霉菌属 (*Streptomyces*)、冢村氏菌属 (*Tsukamurella*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardopsis*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、斯捷连科氏菌属 (*Nesterenkonia*)、库克菌属 (*Kocuria*) 和微球菌属 (*Micrococcus*) 9 个属的 25 个种中, 其中含有 7 个稀有菌属; 链霉菌的种类最多, 共有 13 个种; 其次是节杆菌属和拟诺卡氏菌属, 均为 3 个种。其中从陆地样品中分离得到 93 株菌, 分布于链霉菌属、拟诺卡氏菌属、节杆菌属、假诺卡氏菌属、冢村氏菌属、微球菌属和微杆菌属 7 个属的 17 个种中; 从潮间带样品中分离得到 41 株菌, 分布于链霉菌属、节杆菌属、涅斯捷连科氏菌属、微球菌属和库克菌属 5 个属的 10 个种中, 其中 *Micrococcus yunnanensis* YIM 65004^T 和 *Arthrobacter agilis* DSM 20550^T 在陆地和潮间带样品中均有分离到。拟诺卡氏菌属以及稀有放线菌属中的假诺卡氏菌属和冢村氏菌属没有从潮间带样品中分离到。以上结果均表明南极乔治王岛陆地样品中放线菌的多样性要高于潮间带样品中放线菌的多样性。这可能是由于潮间带特殊的环境^[11] (辐射强、盐度高) 限制了微生物的生存, 而且潮间带样品均为砂砾影响了分菌效果。

表 3 基于 16S rDNA 序列分析所得的放线菌菌属代表菌株的分类从属关系

Table 3 Phylogenetic affiliations of representative actinomycetes based on comparative analysis of 16S rDNA gene sequences

菌株编号	16S rDNA 序列同源性最大种	最大同源性/%	收录号	分离样品
OAct607	<i>Tsukamurella pulmonis</i> DSM 44142 ^T	99.72	KP235204	陆地
OAct679	<i>Nesterenkonia halotolerans</i> YIM 70084 ^T	99.65	KP235230	潮间带
OAct656	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM 8609 ^T	99.93	KP235231	陆地
OAct658	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T	99.71	KP235225	陆地
OAct663	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 ^T	99.83	KP235232	潮间带
OAct687	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447 ^T	99.31	KP235227	潮间带
OAct661	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i> Y8 ^T	100.00	KP235228	陆地
OAct603	<i>Arthrobacter agilis</i> DSM 20550 ^T	99.66	KP235205	陆地
OAct611	<i>Arthrobacter agilis</i> DSM 20550 ^T	99.24	KP235226	潮间带
OAct653	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 ^T	99.17	KP235208	陆地
OAct626	<i>Arthrobacter oryzae</i> KV-651 ^T	99.93	KP235210	潮间带
OAct643	<i>Nocardioopsis lucentensis</i> DSM 44048 ^T	99.93	KP235222	陆地
OAct666	<i>Nocardioopsis aegyptia</i> DSM 44442 ^T	99.38	KP235224	陆地
OAct622	<i>Nocardioopsis abla</i> DSM 43377 ^T	99.93	KP235207	陆地
OAct677	<i>Streptomyces griseorubens</i> NRBC 12780 ^T	99.86	KP235229	陆地
OAct612	<i>Streptomyces celluloflavus</i> NBRC 13780 ^T	100.00	KP235209	陆地
OAct617	<i>Streptomyces albogriseolus</i> NRRL B-1305 ^T	99.53	KP235211	陆地
OAct659	<i>Streptomyces bacillaris</i> NBRC 13487 ^T	99.93	KP235212	陆地
OAct621	<i>Streptomyces harbinensis</i> NEAU-Da3 ^T	99.13	KP235213	陆地
OAct639	<i>Streptomyces anulatus</i> NRRL B-2000 ^T	99.93	KP235214	陆地
OAct625	<i>Streptomyces albidoflavus</i> DSM 40445 ^T	99.65	KP235215	陆地
OAct672	<i>Streptomyces finlayi</i> NRRL B-12114 ^T	99.59	KP235216	陆地
OAct601	<i>Streptomyces cirratus</i> NRRL B-3250 ^T	99.52	KP235217	潮间带
OAct619	<i>Streptomyces globisporus</i> NBRC 12867 ^T	99.72	KP235218	潮间带
OAct632	<i>Streptomyces youssoufiensis</i> X4 ^T	99.45	KP235219	潮间带
OAct647	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> LMG 19316 ^T	99.93	KP235220	潮间带
OAct680	<i>Streptomyces xiamenensis</i> MCCC 1A01550 ^T	99.13	KP235221	潮间带

2.5 抗临床多重耐药菌活性评价

采用琼脂块扩散法,以目前临床上的 3 株多重耐药菌鲍曼氏不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* 11910、甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* MRSA 和甲氧苯青霉素抗性凝固酶阴性金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*

MRCNS 为指示菌,对分离得到的南极放线菌抑菌活性检测(见图 4)。根据测试菌株抑菌圈直径与阳性对照(环丙沙星)抑菌圈直径的比值 R 判断测试菌株抑菌活性的大小,共得到 17 株能够具有显著抑菌效果的菌株,包括 9 株链霉菌、6 株拟诺卡氏菌以及节杆菌和假诺卡氏菌各 1 株(见表 4)。

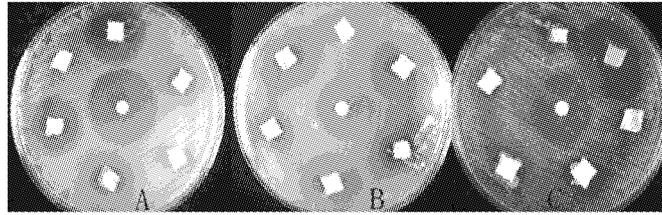


图4 部分南极放线菌的抑菌效果图

Fig. 4 Antibacterial activity results of Antarctic actinomycetes

A: 鲍曼氏不动杆菌 11910; B: 甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌;

C: 甲氧苯青霉素抗性凝固酶阴性金黄色葡萄球菌

A: *Acinetobacter baumannii* 11910; B: *Staphylococcus aureus* MRSA; C: *Staphylococcus aureus* MRCNS

表4 南极放线菌拮抗多重耐药菌实验结果

Table 4 Results of antibacterial activity of Antarctic actinobacteria to multiple resistant bacteria

菌株编号	菌属	<i>A. baumannii</i> 11910	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>S. aureus</i> MRCNS
OAct622	<i>Nocardiopsis</i> sp.	—	+	+
OAct640	<i>Nocardiopsis</i> sp.	++	+	+
OAct644	<i>Nocardiopsis</i> sp.	—	—	+
OAct649	<i>Nocardiopsis</i> sp.	—	+	—
OAct650	<i>Nocardiopsis</i> sp.	++	+	—
OAct666	<i>Nocardiopsis</i> sp.	—	+	+
OAct612	<i>Streptomyces</i> sp.	+	—	—
OAct618	<i>Streptomyces</i> sp.	++	+	w
OAct628	<i>Streptomyces</i> sp.	+	+	+
OAct639	<i>Streptomyces</i> sp.	+	—	—
OAct648	<i>Streptomyces</i> sp.	—	+	+
OAct659	<i>Streptomyces</i> sp.	—	++	+
OAct671	<i>Streptomyces</i> sp.	+	+	+
OAct674	<i>Streptomyces</i> sp.	—	+	++
OAct677	<i>Streptomyces</i> sp.	++	+	+
OAct626	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	w
OAct661	<i>Pseudonocardia</i> sp.	—	+	+

注:R,测试菌株抑菌圈直径与阳性对照(环丙沙星)抑菌圈直径的比值。

R<0.3,阴性-;0.5>R>0.3,微弱 w;1.2>R>0.5,阳性+;R>1.2,强阳性++

从表4可以看出,有2株拟诺卡氏菌、6株链霉菌和1株节杆菌可以抑制鲍曼氏不动杆菌,1株节杆菌。4株拟诺卡氏菌可抑制 *S. aureus* MRSA 和 *S. aureus* MRCNS; 链霉菌也对金黄色葡萄球菌表现出较好的抑菌活性,分别有7株、6株链霉菌可以抑制 *S. aureus* MRSA 和 *S. aureus* MRCNS。假诺卡氏菌 OAct661 对 *S. aureus*

MRSA 和 *S. aureus* MRCNS 也有较好的抑菌活性。在这17株具有显著抑菌效果的菌株中, OAct640 (*Nocardiopsis* sp.), OAct628、OAct671 和 OAct677 (*Streptomyces* sp.) 等4株菌的抑菌活性最强,对鲍曼氏不动杆菌 *A. baumannii* 11910、*S. aureus* MRSA 和 *S. aureus* MRCNS 均有抑制作用。

3 讨论

近年来,针对极地放线菌的研究相关报道逐渐增多,余勇等分析了北冰洋 Chukchi 海盆表层沉积物中的可培养放线菌多样性及其生物活性^[12],张改云等对北冰洋海洋沉积物中放线菌群落及多样性进行了分析^[13]。尽管目前已在南极地区土壤^[14-17]、菌垫^[18]、冰碛^[19]和海洋沉积物^[20]等不同生境中发现了 2 个新属、近 15 个放线菌新种,但与其他环境放线菌研究相比,研究的深度和广度还有较大差距,研究手段多基于纯培养技术^[21-22],缺少针对放线菌这一特殊类群的系统研究,迄今为止仅 Cowen 等人^[23]报道利用 16S rDNA 基因文库技术对南极 McMurdo 干谷土壤放线菌多样性进行了分析。本文利用 16S rDNA 基因文库和纯培养技术相结合的方法对南极乔治王岛陆地土壤和潮间带底泥的放线菌多样性开展深入系统的分析和评估。本研究组的研究结果表明南极乔治王岛陆地土壤和潮间带底泥环境中蕴涵着丰富且多样的放线菌资源,而且陆地土壤中放线菌的多样性要高于潮间带底泥中放线菌的多样性,陆地土壤中的放线菌分布于 10 个目 16 个科中,潮间带底泥中放线菌则分布于 7 个目 13 个科中。在陆地土壤样品和潮间带样品所含的放线菌群落在高级分类地位上也有明显差异,陆地土壤样品中的放线菌群落以放线菌纲为优势菌,潮间带样品中则是酸微菌纲占据明显优势。利用纯培养的方法从 17 个陆地土壤样品中得到的 141 株放线菌分布于棒杆菌目、链孢囊菌目、链霉菌目、微球菌目和假诺卡氏菌目 5 个目中,其中从陆地样品中分离得到 93 株菌,分布于放线菌纲的 7 个属 17 个种中,从潮间带样品中分离得到 41 株菌,分布于 5 个属 10 个种中,以上结果均表明南极乔治王岛陆地样品中放线菌的多样性要高于潮间带样品中放线菌的多样性。与陆地环境不同,南极地区的潮间带由于冰雪、冬季冰鞘的季节性冲刷,强 UV 辐射、高盐度和温度变化的影响,成为受干扰最强的环境^[11],由此推测这可能导致了这 2 个区域放线菌种类及多样性的差别,后续可进一步结合环境因子,采用高通量测序的方法深入评估南极乔治王岛土壤和潮间带中放线菌群落结构的差异以及地理分布特征,加强对南极特殊环境中放线菌的认知。

鲍曼氏不动杆菌和金黄色葡萄球菌等是临床上较为常见的多重耐药菌,具有较广的抗菌谱^[24-25],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。本文对分离菌株的抑菌活性结果显示,分离自南极的诺卡氏菌和链霉菌表现出良好的生物活性,17 株具有显著抑菌活性的菌株中绝大多数为诺卡氏菌和链霉菌,3 株链霉菌和 1 株诺卡氏菌的抑菌活性最强,对鲍曼氏不动杆菌 *A. baumannii* 11910、*S. aureus* MRSA 和 *S. aureus* MRCNS 均有较强的抑制作用。链霉菌一直被认为是产生各种抗生素的主要来源,已知微生物来源的生物活性物质中,放线菌来源的生物活性物质约占 70%,其中以链霉菌属 (*Streptomyces* sp.) 为主,约占 50%,其次是诺卡氏菌属^[26]。近年来,由于病原微生物耐药性的日益增强和新型感染性疾病的不断涌现,寻求和开发新的微生物资源,对新型抗生素的发现和耐药性感染性疾病的治疗具有重大的现实意义^[27]。的研究结果表明,南极陆地土壤蕴含了丰富的放线菌物种资源,也是新药开发和天然活性产物的重要来源,后期本研究组将对这些南极放线菌菌株的代谢产物进行分离纯化,并进行其结构的鉴定和进一步的活性测试,评估其是否具有可观的研究前景和药用潜力,以期新型药物的开发提供研究基础。

参考文献

- [1] 夏占峰,关统伟,阮继生,等. 艾丁湖沉积物放线菌多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(8):1023-1031.
- [2] Song Z Q, Zhi X Y, Li W J, et al. Actinobacterial diversity in hot springs in Tengchong (China), Kamchatka (Russia), and Nevada (USA) [J]. Geomicrobiol J, 2009, 26(4): 256-263.
- [3] Zhou J Z, Mary B, James T. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Appl Environ Microb, 1996, 62(2): 316-322.
- [4] Colin J, Jenneifer H, Dache W, et al. A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples [J]. Appl Environ Microb, 1997, 63(12):4993-4995.
- [5] Stach E, Maldonado A, Ward C, et al. New primers for the class Actinobacteria; application to marine and terrestrial environments [J]. Environ Microbiol, 2003, 5(10): 828-841.
- [6] Patrick S, Sarah W, Thomas R, et al. Introducing mothur:

- Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75 (23): 7537-7541.
- [7] Thompson D, Gibson 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(24): 4876-4882.
- [8] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28 (10): 2731-2379.
- [9] Cui X L, Mao P H, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardio-psaceae [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51(2): 357-363.
- [10] Kemp F, Aller Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rRNA libraries can tell us [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 47(2): 161-177.
- [11] Yu Y, Li H R, Zeng Y X, et al. Phylogenetic diversity of culturable bacteria from Antarctic sandy intertidal sediments [J]. *Polar Biol*, 2010, 33(6): 869-875.
- [12] Meng Y, Yu Y, Li H R, et al. Phylogenetic Diversity and Biological Activity of Actinobacteria Isolated from the Chukchi Shelf Marine Sediments in the Arctic Ocean [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(3): 1281-1297.
- [13] Zhang G Y, Cao T F, Ying J X, et al. Diversity and novelty of actinobacteria in Arctic marine Sediments [J]. *Anton van Leeuw*, 2014, 105(4): 743-754.
- [14] Mevs U, Stackebrandt E, Schumann P, et al. *Modestobacter multiseptatus* gen. nov., sp. nov., a budding actinomycete from soils of the Asgard Range (Transantarctic Mountains) [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(1): 337-346.
- [15] Gupta, P, Reddy, G S, Delille, D, et al. *Arthrobacter gangotriensis* sp. nov. and *Arthrobacter kerguelensis* sp. nov. from Antarctica [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(6): 2375-2378.
- [16] Lars G, Felizitas B, Kai M, et al. *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011, 61(4): 979-984.
- [17] Li J, Tian X P, Zhu T J, et al. *Streptomyces fildesensis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from Antarctic soil [J]. *Anton Van Leeuw*, 2011, 100(4): 531-543.
- [18] Reddy G S N, Prakash, J S S, Prabahaar V, et al. *Kocuria polaris* sp. nov., an orange-pigmented psychrophilic bacterium isolated from an Antarctic cyanobacterial mat sample [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(1): 183-187.
- [19] Prabahaar V, Dube S, Reddy G S, et al. *Pseudonocardia antarctica* sp. nov. an actinomycetes from McMurdo Dry Valleys, Antarctica [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2004, 27 (1): 66-71.
- [20] Li H R, Yu Y, Luo W, et al. *Marisediminicola antarctica* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from the Antarctic [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 60(11): 2535-2539.
- [21] Cameron R, Morelli A, Johnson M. Bacterial species in soil and air of the antarctic continent [J]. *Antarct JUS*, 1972, 7: 187-189.
- [22] Penka M, Sava T, Nadezhda D, et al. Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica [J]. *J Cult Collect*, 2000, 3: 3-14.
- [23] Babalola O, Kirby M, Le Roes-Hill M, et al. Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils [J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11(3): 566-576.
- [24] Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, et al. Multi resistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2010, 23(4): 332-339.
- [25] 周燕飞, 邓敏. 连续 3 年临床分离鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性 [J]. *中国感染控制杂志*, 2015, 14(1): 42-44.
- [26] 林永成, 周世宁. 海洋微生物及其代谢产物 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [27] 焦炳华, 穆军, 许强芝, 等. 海洋微生物来源新抗生菌的研究 [J]. *抗感染药学*, 2004, 1(1): 1-9.