

姜明国,甘光华,杨立芳,等. 广西红树林根际土壤放线菌的原位培养分离及其活性筛选[J]. 海洋学报,2015,37(2):55—64,doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2015.02.006  
Jiang Mingguo,Gan Guanghua,Yang Lifang,et al. *In situ* isolation of actinomycetes and screening bioactive potential from mangrove rhizosphere soils in Guangxi[J]. Haiyang Xuebao,2015,37(2):55—64,doi:10.3969/j.issn.0253-4193.2015.02.006

# 广西红树林根际土壤放线菌的原位 培养分离及其活性筛选

姜明国<sup>1,2</sup>,甘光华<sup>1,2</sup>,杨立芳<sup>3\*</sup>,李西妮<sup>2</sup>,杨桂柳<sup>2</sup>,庾利<sup>4</sup>,  
孙承航<sup>4</sup>,黄玲<sup>3</sup>,蓝金枝<sup>3</sup>

(1. 广西红树林保护与利用重点实验室,广西 北海 536000;2. 广西民族大学 广西高校微生物与植物资源利用重点实验室,广西 南宁 530008;3. 广西民族大学 化学化工学院 广西林产化学与工程重点实验室,广西 南宁 530008;4. 中国医学科学院/北京协和医学院 医药生物技术研究所,北京 100050)

**摘要:**为了发掘广西红树林根际土壤的放线菌资源,本文利用原位培养装置,埋于根际土壤中俘获放线菌,30 d 后取回实验室,采用平板涂布法对 4 个地点的原位培养样品于 15 种培养基上进行分离纯化;对分离株基于 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析;进一步进行抗菌活性和产酶活性检测。共分离得到 113 株放线菌。对其中 33 株放线菌进行测序,结果表明 20 株属于链霉菌属,11 株属于拟诺卡氏菌属,1 株属于伦兹氏菌属,1 株与拟诺卡氏菌属相似性最高为 90%,很可能属于放线菌一个新属。抗菌实验结果显示其中有 7 株、4 株、18 株、6 株、10 株、3 株实验菌株分别对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、乙型溶血性链球菌和肺炎克雷伯氏菌具有抑制作用;有 55 株、62 株、24 株、72 株的实验菌株分别具有纤维素酶活性、淀粉酶活性、胶原蛋白酶活性、酯酶活性。原位培养可以丰富对广西红树林根际土壤的认识,分离到了新种甚至可能是新属的放线菌,分离得到的部分放线菌菌株具有较高生物活性,为后续工作提供了良好的实验材料。

**关键词:**原位培养;红树林;根际土壤;放线菌;生物活性

中图分类号:Q938

文献标志码:A

文章编号:0253-4193(2015)02-0055-10

## 1 引言

分布于热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落称之为红树林,是海洋向陆地的过渡带。红树林是至今世界上少数几个物种最多多样化的生态系之一,有着不同于陆地的性质:水分高、盐分高以及氧气缺乏,其地下部分的微生物较之其他生态系统有很大的差异,

这就赋予了红树林土壤微生物产生活性物质的潜在可能性<sup>[1]</sup>。广西红树林面积占全国红树林面积的三分之一,蕴藏着巨大的海洋微生物资源。

目前,科研工作者能在实验室条件下培养出来的微生物,只占到微生物总体的 0.1%~1%,绝大部分的微生物不能通过传统的培养方法获得<sup>[2]</sup>。模拟自然环境和保持微生物间的共生关系是提高微生

收稿日期:2014-01-12;修订日期:2014-05-02。

基金项目:广西红树林保护重点实验室(GKLMC-201204);国家自然科学基金(31260004,81172963);广西自然科学基金(2012GXNSFAA053038);高等学校博士学科点专项科研基金博导类项目(201111106110032);广西民族大学重点科研项目(2012MDZD041)。

作者简介:姜明国(1973—),男,吉林省长春市人,主要从事微生物资源研究。E-mail:mzxyjiang@163.com

\*通信作者:杨立芳。E-mail:yanglf1990@163.com

物培养具备共性的关键问题,目前开发新的策略培养传统“不可培养”微生物的需求十分迫切。探索更加有效的分离方法,从海洋等极端环境中分离筛选活性菌株已成为当前微生物资源开发利用的重要研究方向<sup>[2-3]</sup>。原位培养即构建模拟微生物生存的环境系统。目前可以使用“扩散室”和“载体”两种类型的原位培养模式<sup>[4-5]</sup>。Aoi 等设计了一种中空纤维膜室培养装置,能同时用于多个简单样品的纯培养<sup>[6]</sup>。Gavriš 等采用这种扩散室装置成功的对特殊和稀有放线菌进行了培养分离<sup>[7]</sup>。Lewis 和 Nichols 等采用高通量的“扩散室”培养以前未能培养的微生物,发现的新种远远多于用传统培养皿进行培养<sup>[8-9]</sup>。可见原位培养方法在微生物的研究领域具有巨大的潜力。

目前关于红树林根际土壤放线菌的分离培养大多采用传统的分离方法,采用原位培养法进行放线菌分离培养未见报道。我们利用放线菌产生菌丝的特点制作放线菌原位俘获装置,置于不同品系的红树林根际土壤中进行共培养,旨在培养出传统分离培养方法不能分离培养的红树林根际土壤放线菌。并对所分离到的放线菌进行生物活性评价,为后续海洋放线菌次生代谢产物的研究奠定基础。

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 实验地点

广西山口红树林保护区、北海红树林育种中心、广西合浦老鼠簕红树林和东兴北仑河口红树林保护区。

表 1 广西红树林原位培养放线菌埋样地点

Tab. 1 Description of *in situ* cultivation sites

样品	站位	纬度	经度
山口	广西山口红树林保护区	21°29'52"N	109°45'39"E
育种	北海红树林育种中心	21°33'27"N	109°09'29"E
合浦	广西合浦老鼠簕红树林	21°36'44"N	109°08'59"E
东兴	东兴北仑河口红树林保护区	21°54'39"N	108°09'04"E

#### 2.1.2 培养基:

原位培养基:琼脂粉 30%,海水 1 L,自然 pH 值。

分离培养基:配制以下 15 种培养基,海水定容至 1 L,自然 pH 值用于菌株分离。

A. 酵母膏—麦芽膏培养基(YEME):酵母粉 4 g,麦芽浸出粉 10 g,葡萄糖 4 g,琼脂 18 g;

B. 改良 Emerson 培养基:葡萄糖 1 g,酵母粉 1 g,蛋白胨 4 g,氯化钠 2.5 g,琼脂 18 g;

C. 2216E 培养基:蛋白胨 5 g,酵母粉 1 g,磷酸高铁 0.1 g,琼脂 18 g;

D. M1 培养基:可溶性淀粉 10 g,酵母粉 4 g,蛋白胨 2 g,琼脂 18 g;

E. ISP2 培养基:葡萄糖 4 g,酵母粉 4 g,麦芽浸出粉 10 g,碳酸钙 2 g,琼脂 18 g;

F. 酪蛋白—酵母浸汁培养基:酪蛋白 7.5 g,酵母浸汁 10 g,七水硫酸镁 2 g,柠檬酸钠 3 g,氯化钾 2 g,氯化钠 2 g,琼脂 18 g;

G. HVG 培养基:腐植酸 1 g,磷酸氢二钠 0.5 g,七水硫酸镁 0.05 g,七水硫酸亚铁 0.01 g,碳酸钙 0.02 g,维生素 B 母液 1 ml,琼脂 18 g;

H. SC 培养基:可溶性淀粉 10 g,酪蛋白 1 g,琼脂 18 g;

I. 葡萄糖—天门冬素琼脂培养基:葡萄糖 10 g,天门冬素 0.5 g,磷酸氢二钾 0.5 g,七水硫酸镁 0.5 g,琼脂 18 g;

G. 无机盐琼脂培养基:可溶性淀粉 20 g,磷酸氢二钾 0.5 g,七水硫酸镁 0.5 g,硝酸钾 1 g,七水硫酸亚铁 0.01 g,琼脂 18 g;

K. 改良 ISP5 培养基:酵母膏 5 g,L-天门冬酰胺 1 g,甘油 10 g,磷酸氢二钾 1 g,硝酸钾 5 g,微量盐 1 mL,琼脂 18 g;

L. 甘油琼脂培养基:蛋白胨 5 g,酵母膏 3 g,甘油 20 g,琼脂 18 g;

M. GYESA 培养基:葡萄糖 10 g,酵母膏 10 g,可溶性淀粉 10 g,氯化钠 5 g,碳酸钙 3 g,琼脂 18 g;

N. 高氏一号培养基:可溶性淀粉 20 g,硝酸钾 1 g,磷酸氢二钾 0.5 g,七水硫酸镁 0.5 g,氯化钠 0.5 g,七水硫酸亚铁 0.01 g,琼脂 18 g;

O. 察氏培养基:硝酸钠 3 g,磷酸氢二钾 1 g,氯化钾 0.5 g,七水硫酸亚铁 0.01 g,七水硫酸镁 0.5 g,蔗糖 30 g,琼脂 18 g;

纯化培养基:ISP2 培养基:葡萄糖 4 g,酵母粉 4 g,麦芽浸出粉 10 g,碳酸钙 2 g,琼脂 18 g,海水加至 1 L,自然 pH 值。

以上所有培养基在冷却至 55°C 左右时加入终浓度为 100 μg/mL 的重铬酸钾作为细菌和真菌的抑制剂。

生物活性检测培养基:

(1) 淀粉水解培养基:可溶性淀粉 10 g,磷酸氢

二钾 0.3 g, 氯化钠 0.5 g, 七水硫酸镁 1 g, 硝酸钾 1 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.2~7.4。

(2) 明胶培养基: 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 20 g, 明胶 200 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

(3) 酯酶活性筛选培养基: 吐温-80 为 10 g, 硝酸铵 1 g, 氯化钙 0.1 g, 磷酸氢二钾 0.5 g, 氯化铁 0.02 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 七水硫酸镁 0.5 g, 氯化钠 1.0 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0~7.2。

(4) 纤维素酶活性筛选培养基: 微晶纤维素 8 g, 硝酸铵 1 g, 氯化钙 0.1 g, 磷酸氢二钾 0.5 g, 氯化铁 0.02 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 酵母粉 0.05 g, 七水硫酸镁 0.5 g, 氯化钠 1 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0~7.2。

### 2.1.3 指示菌株

大肠埃希氏杆菌(*E. coli* CMCC 44102)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa* CMCC 10104)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus* CMCC 26003)、普通变形杆菌(*P. vulgaris* CMCC 49027)、乙型溶血性链球菌( $\beta$ -*Streptococcus* ATCC 21059)和肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae* CMCC 46117)。以上 6 株指示菌株由本实验室保藏。

### 2.1.4 主要试剂

PGEM-T Easy Vector (Promega), 琼脂粉, 葡萄糖, 酵母粉, 麦芽浸出粉, 可溶性淀粉, 琼脂糖, 异丙醇, 乙醇, 胰蛋白胨等, 试剂均为分析纯。

### 2.1.5 仪器

LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器, HPS-250 生化培养箱, LEGEND MICR017 离心机, 格兰特 XB70 制冰机, HR-7803D 微波炉, HH-6 数显恒温水浴锅, JY-600 电泳仪, BIO-RAD 凝胶成像分析仪, BIO-RAD PCR 仪, Supra 55 Sapphire 型扫描电子显微镜等。

## 2.2 放线菌分离与纯化

### 2.2.1 原位培养装置的制作

将已灭菌的 0.22  $\mu\text{m}$  的亲水性下滤膜(购自 Millipore 中国有限公司)用 502 胶水与已灭菌的不锈钢圈贴好, 向中空内环倒入约 3 mL 原位培养基, 待培养基冷却凝固后, 将亲水性上滤膜和不锈钢圈用胶水密封(图 1)。

### 2.2.2 埋原位培养装置

将原位培养装置埋于红树林根际附近土壤中, 深度为 5~10 cm, 每个地点都埋 50 个原位培养装置。整个埋样过程及取样后处理如图 2 所示。

### 2.2.3 放线菌的分离纯化

30 d 后将原位培养装置取回清洁后, 将原位培

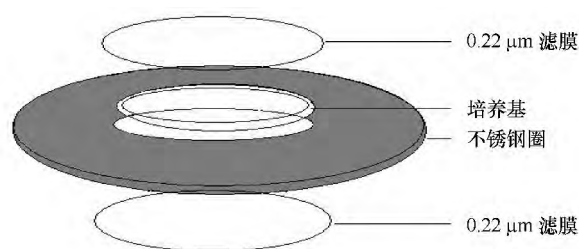


图 1 放线菌原位俘获装置

Fig. 1 Actinobacteria *in situ* cultivation trap

用 0.22  $\mu\text{m}$  的亲水性下滤膜密封不锈钢圈底部, 注入 1% 琼脂后, 用底膜同样滤膜密封

The bottom of steel washer was stuck with 0.22  $\mu\text{m}$  pore-size polycarbonate membrane, the chamber was filled with sterile 1% agar and the trap was sealed with same polycarbonate membrane



图 2 原位培养装置的使用: 埋样前(a)、取样中(b)、清理后(c)

Fig. 2 Application of the *in situ* cultivation chambers: general view of the chambers (a), the chambers in use (b), after the clean-up (c)

培养基转移到无菌 1.5 mL 的 EP 管中, 加入无菌水, 将原位培养基捣碎并充分与无菌水混匀, 吸取混悬菌液 100  $\mu\text{L}$  涂布于 15 种分离培养基上, 置 28 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 6~15 d。将形态较典型的放线菌菌落挑出, 经过 3~5 次平板划线分离纯化后转种到 ISP2 斜面培养基中保存, 编号后置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

### 2.3 放线菌 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

采用微波热震荡<sup>[10]</sup>提取放线菌基因组 DNA, 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增, 使用以下两个通用引物: 27F: 5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-AAGGAGGTGATCCAG CCGCA-3' (由上海捷瑞公司合成), PCR 扩增反应体系 (25  $\mu$ L): 引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA (50~100 ng) 1  $\mu$ L, 2 $\times$ PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, 加无菌双蒸水补至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 温育 10 min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶检测。PCR 扩增产物经电泳检测后, 进行切胶纯化, 用 T 载体置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜连接, 将菌株的 16S rRNA 转化到 *E. coli* (TOP10F'), 经氨苄筛选阳性克隆, 随机挑取阳性克隆子于 37 $^{\circ}$ C 在含有氨苄的 LB 液体培养基摇床 220 r/min, 37 $^{\circ}$ C 培养 15 h。用 T7 引物: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', SP6 引物: 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3' 进行 PCR, 电泳检测有目的条带的菌液送到生工生物工程股份有限公司进行测序。

将测序得到的基因序列运用 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行同源性分析。利用 MEGA5 软件, 采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 构建系统进化发育树。

### 2.4 菌株生物活性检测

#### 2.4.1 菌株抑菌活性检测

选用以上 6 株指示菌株进行放线菌抗菌活性试验。所有细菌指示菌株都用 ISP2 培养基培养, 采用点植法培养 7 d 后, 观察抑菌圈并测量抑菌圈的直径。

#### 2.4.2 菌株酶活检测

采用点植法培养 7 d 后, 通过 Lugol 碘液检测淀粉酶活性, 通过观察透明圈检测胶原蛋白酶和脂肪酶活性, 通过观察菌落四周澄清的晕环检测纤维素酶活性。

## 3 结果和分析

### 3.1 原位培养装置俘获放线菌的效果

取回原位培养装置后, 将原位培养基取出, 置于倒置显微镜中观察, 可以看到许多具有分枝状菌丝的菌落分散在原位培养基内。根据菌落的形态初步判断原位培养基内的菌落为放线菌。将原位培养基菌悬液涂布后, 可得到较多的放线菌菌落, 并且无细菌和真菌的出现 (图 3)。表明所采用的原位培养装置能较为单一地俘获放线菌并且效果良好。值得注意的是, 有部分原位培养装置的滤膜遭虫蚀而破损、胶水粘得不牢固导致脱落损坏或取样的时候被不小心戳破造成了一定的污染, 这是值得改进的地方。

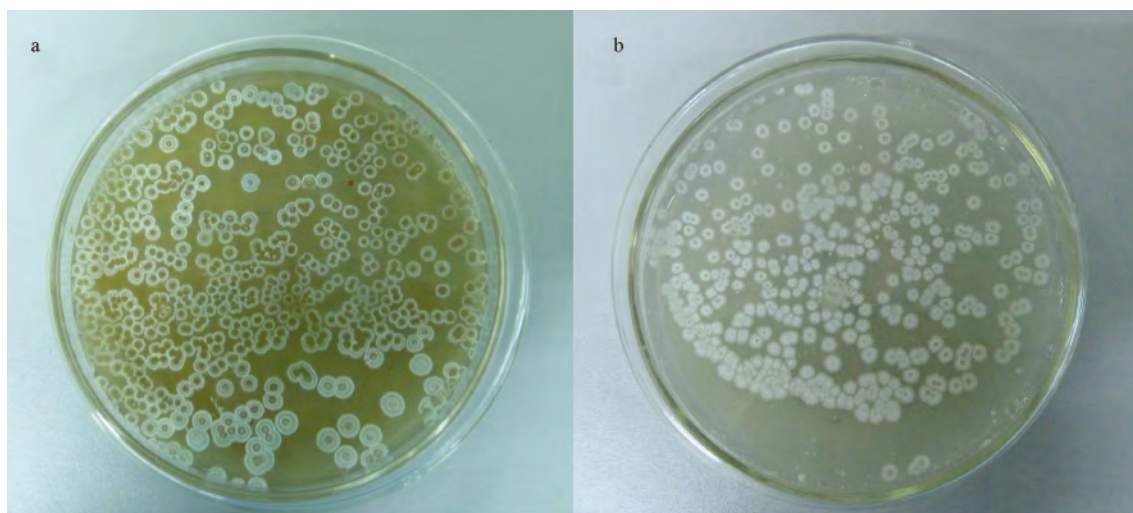


图 3 原位培养基菌悬液涂布分离放线菌的效果

Fig. 3 Isolation plates of actinomycetes, which were spread with *in situ* cultivation medium suspensions and incubated at 28 $^{\circ}$ C for 6 to 15 d

a. 高氏一号培养基; b. 无机盐琼脂培养基

a. Gauze's medium No. 1; b. Inorganic salt agar medium

### 3.2 放线菌分离结果

采用原位培养方法从广西山口红树林保护区、北海红树林育种中心、广西合浦老鼠簕红树林和东兴北仑河口红树林保护区分别得到 22 株、20 株、70 株和 1

株,总共获得 113 株放线菌。放线菌菌落大多气生菌丝发达,菌落致密干燥,菌落颜色多为白色,其次为灰色,有少数菌株菌落为红色或嫩黄色。其中分离到的放线菌 GXUN10 可能是放线菌新菌株(图 4)。

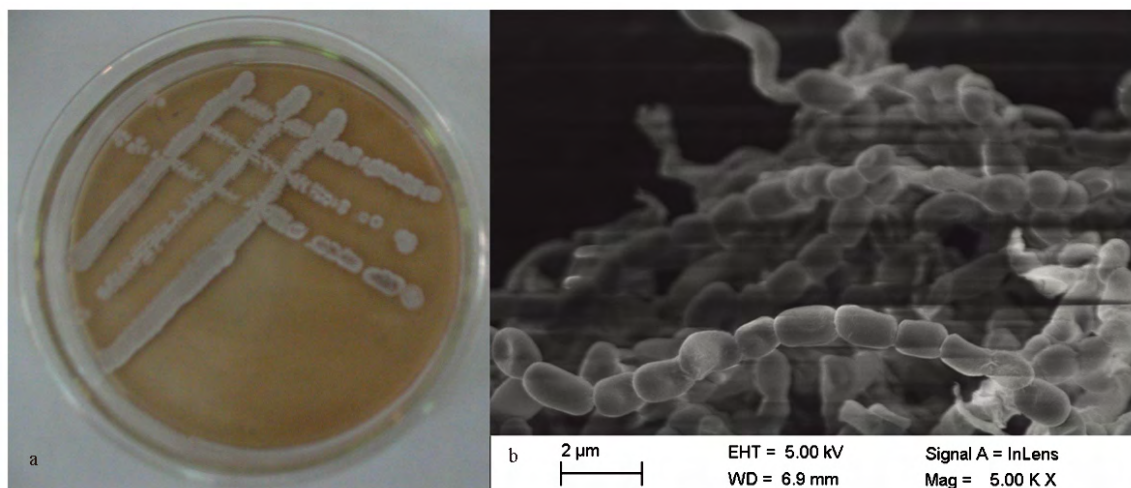


图 4 放线菌 GXUN10 的菌落形态(a)及其电镜图(b)

Fig. 4 Colony morphology (a) and electron micrograph (b) of isolate GXUN10

### 3.3 不同培养基分离放线菌的效果

图 5 是不同培养基分离的放线菌数量的比较,培养基种类标号来源于分离培养基的编号。结果表明,ISP2 培养基分离得到的红树林根际土壤放线菌菌株数量最多,其次是 M1 培养基和无机盐琼脂培养基, HVG 培养基、改良 ISP5 培养基和甘油琼脂培养基分离得到的菌株数量最少。由于不是唯一碳源培养基,所以不能确定哪种碳源对分离放线菌最有优势,但也可以看出,所选用的 15 种分离培养基中 ISP2 培养基、M1 培养基和无机盐琼脂培养基最适合用来分离红树林根际土壤放线菌。

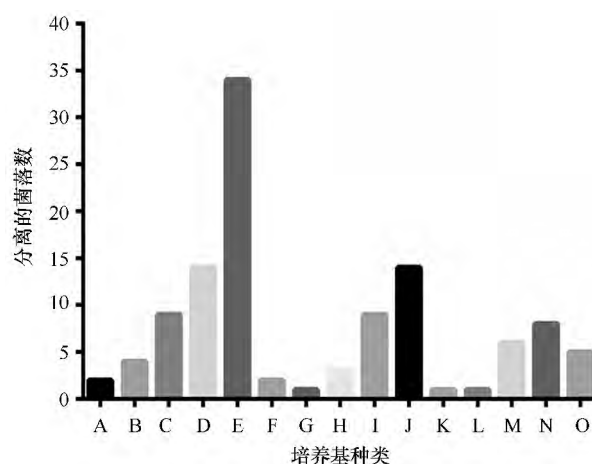


图 5 不同培养基分离到的红树林根际土壤放线菌菌落数对比

Fig. 5 Isolate numbers of marine actinobacteria on different media

### 3.4 广西红树林根际土壤放线菌的多样性

用上述 15 种分离培养基从广西 4 个地方的红树林原位培养样品中分离并保藏放线菌 113 株,测序了 33 株。测得 33 株放线菌菌株的 16S rRNA 基因序列全长接近 1 490 bp。用 BLAST 软件从 GenBank 数据库中搜索相似序列,然后采用邻接法构建放线菌与其相关菌株的系统发育树,结果(见图 6)显示,33 株放线菌分布于放线菌亚纲 3 个目 3 个科的 4 个属。链霉菌目 Streptomycineae 中的链霉菌科 Streptomycetaceae 中的链霉菌属 *Streptomyces* 20 株;链孢囊菌目 Streptosporangineae 拟诺卡氏菌科 Nocardiosaceae 中拟诺卡氏菌属 *Nocardopsis* 11 株;假诺卡氏菌目

Pseudonocardineae 中的假诺卡氏菌科 Actinosynnemataceae 中的伦兹氏菌属 *Lentzea* 1 株;另外一株编号为 GXUN10 的放线菌在基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树上独立划分为一个分支,与链孢囊菌目中 *Nocardopsis alba* PCM 2702 的序列相似性最高,但相似性仅为 90%,所以 GXUN10 很可能为链孢囊菌目 Streptosporangineae 中的新科或新属<sup>[11]</sup>。该菌的多相分类学研究工作正在进行中。

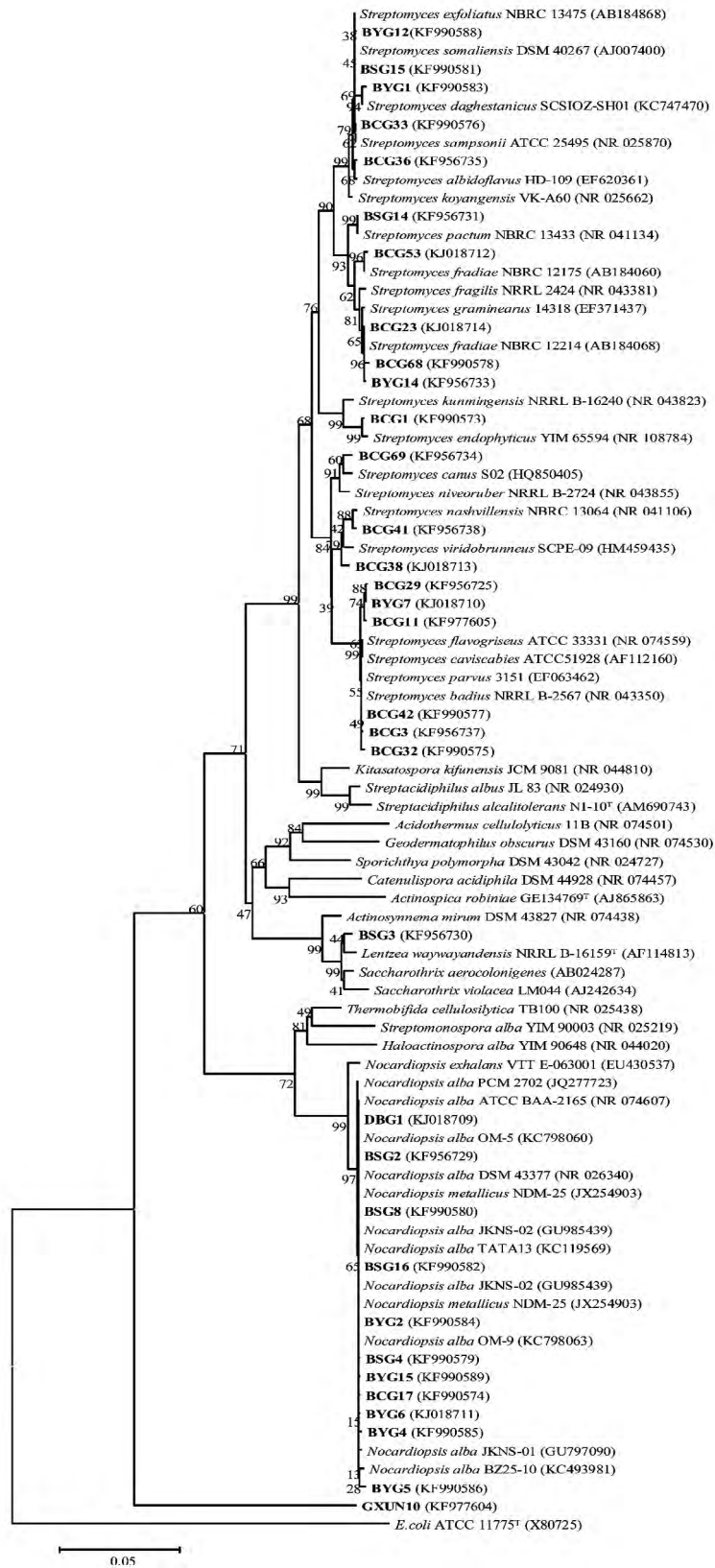


图 6 邻接法构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic neighbour-joining tree based on the 16SrRNA gene sequences of the isolated strains

### 3.5 生物活性检测结果

#### 3.5.1 菌株抑菌活性检测结果

对 113 株红树林根际土壤放线菌进行了抗菌活性的初步检测,发现 47 株放线菌样品在一种或多种指示菌筛选中显示为阳性(表 2),初筛阳性率为 41.59%。有 6.19%、3.54%、15.93%、5.31%、8.85%、2.65% 的实验菌株分别对大肠埃希氏杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、乙型溶血性链球菌和肺炎克雷伯氏菌具有抑制作用。其中,源于广西山口红树林保护区(Shankou)的 22 株菌中,初筛阳性菌株为 5 株,阳性率为 22.73%;源于北

海红树林育种中心(Yuzhong)的 20 株菌中,初筛阳性菌株为 11 株,阳性率为 55.00%;源于广西合浦老鼠簕红树林(Hepu)的 70 株菌中,初筛阳性菌株为 31 株,阳性率为 44.29%;源于东兴北仑河口红树林保护区(Dongxing)的 1 株菌中,初筛无阳性菌株。在 47 株阳性菌株中,对革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌和乙型溶血性链球菌具有抑菌作用的有 27 株,占阳性菌株的 57.45%,占总菌株的 23.89%;对所试验的 4 种革兰氏阴性细菌具有抑菌作用的有 20 株,占阳性菌株的 42.55%,占总菌株的 17.70%。

表 2 菌株的抑菌活性筛选结果

Tab. 2 Antimicrobial activity of actinomycetes form Guangxi mangrove rhizosphere

Test organism	Shankou	Yuzhong	Hepu	Dongxing
<i>E. coli</i> CMCC 44102	3/22	—	4/70	—
<i>P. aeruginosa</i> CMCC 10104	—	2/20	2/70	—
<i>S. aureus</i> CMCC 26003	2/22	4/20	11/70	—
<i>P. vulgaris</i> CMCC 49027	—	2/20	4/70	—
<i>β-streptococcus</i> ATCC 21059	—	2/20	8/70	—
<i>K. pneumoniae</i> CMCC 46117	—	1/20	2/70	—

注:表中数据为筛选阳性菌株数/该地点所有菌株总数,“—”表示无阳性菌株。

#### 3.5.2 菌株酶活检测结果

产酶实验结果表明(表 3),在所检测的 113 株红树林根际土壤放线菌,有 87 株至少具有一种酶活,其中具有纤维素酶活性、淀粉酶活性、胶原蛋白酶活性、酯酶活性菌株分别为 48.67%、54.87%、21.24%、

63.71%。另外,有 70 株具有至少 2 种以上酶活特性,占活性菌株的 80.46%,占总菌株的 61.95%;有 46 株具有 3 种以上酶活特性,占活性菌株的 52.87%,占总菌株的 40.71%;有 8 株具有 4 种酶活特性,占活性菌株的 9.20%,占总菌株的 7.08%。

表 3 菌株的产酶活性筛选结果

Tab. 3 Enzyme activity of actinomycetes form Guangxi mangrove rhizosphere

	Shankou	Yuzhong	Hepu	Dongxing
Amylase	12/22	16/20	33/70	1/1
Esterase	15/22	16/20	41/70	—
Collagenase	4/22	4/20	16/70	—
Cellulase	6/22	15/20	34/70	—

注:表中数据为筛选阳性菌株数/该地点所有菌株总数,“—”表示无阳性菌株。

## 4 讨论

国内一些研究小组对广西北部湾海域红树林共生和附生的放线菌开展过研究,如中国热带农业科学院生物技术所 Hong 等采集广西 26 份红树林样本,

分离到了 93 株放线菌<sup>[12]</sup>。同样是该研究小组 2007 年从广西的红树林区采集了 71 个样品,不进行微生物分离而直接发酵,取发酵上清液进行抗菌、抗真菌与肿瘤细胞毒活性的测定,结果显示:29.6% 的样品具有生物活性,仅次于取自海口的样品(34.1%),

在所有来自全国各地的样品中仅在广西北海古城岭的样品中检测到肿瘤细胞细胞毒活性<sup>[13]</sup>。中国医学科学院医药生物技术研究所魏玉珍等从广西山口国家红树林生态自然保护区采集 8 种真红树植物和 5 种半红树植物,采用 8 种分离培养基,分离到 118 株放线菌。对 77 株阳性菌株分类表明 44 株属于链霉菌属,25 株为小单孢属的菌株,3 株属于糖丝菌属,3 株为诺卡氏属菌株,1 株是拟诺卡氏属菌株,1 株是伦茨氏菌属的菌株<sup>[14]</sup>。广西大学梁静娟等和桂林医学院骆耐香等也对红树林放线菌开展了部分研究<sup>[15-16]</sup>。这些研究结果表明广西红树植物环境孕育了丰富多样的放线菌,但从分离方法上看,并没有全面系统地反映广西北部湾海域海洋放线菌即便是红树林共生和附生的放线菌真实面目。

传统分离培养法为了尽量杀灭细菌和真菌、使土壤放线菌孢子尽量分散,大多采用强化学试剂、强物理震荡或高温干热处理,如超声波处理法<sup>[17]</sup>、干热处理法<sup>[18]</sup>、DDC 法<sup>[19]</sup>和微波处理法<sup>[20]</sup>等,尚无采用原位培养法<sup>[21]</sup>进行放线菌分离培养的报道。传统分离培养红树林土壤放线菌的方法大多比较激烈,并且使土壤放线菌离开它们原本生活的环境,放线菌的环境生长因子、营养成分势必也随之改变,可能对部分对环境要求苛刻的放线菌造成巨大伤害,从而不能分离培养这部分放线菌。而原位培养法能尽量在不改变微生物的生长环境和条件的情况下,将原位培养装置置于红树林根际土壤中,让放线菌菌丝生长进入原位培养装置中,从而将放线菌俘获。在实验室进一步用多种不同的培养基将俘获的放线菌分离、多次纯化从

而得到纯培养的放线菌。原位培养法是在放线菌生长的大环境中与放线菌共培养,温和而不刺激,为分离新放线菌提供了可能。

本实验室设计原位培养装置是在 Lewis 等<sup>[8]</sup>的设计的基础上进行改进的,Lewis K 设计原位培养装置是为了在实验室将原位培养装置置于土壤样品表面,俘获透过下滤膜进入原位培养装置的土壤放线菌。为了隔绝空气中的菌体透过滤膜进入到原位培养装置中上滤膜选择 0.03  $\mu\text{m}$  孔径,选择孔径为 0.2  $\mu\text{m}$  的下滤膜紧贴土壤表面,土壤中的放线菌菌丝可以透过下滤膜进入到原位培养基中生长。为了俘获土壤中的放线菌,我们设计了可以在真实环境埋入泥土中俘获土壤放线菌的原位培养装置:上下滤膜都选用孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜。这样原位培养装置上面及下面的放线菌菌丝都能进入原位培养装置中,从而被俘获。本研究成功俘获分离 113 株放线菌,选取 33 株典型的放线菌提取其基因组 DNA,扩增其 16S rRNA 基因,克隆后成功测序。33 株放线菌中的 32 株隶属于 3 个不同菌属,其中链霉菌属最多,占 62.5%;拟诺卡氏菌属占 34.375%;伦茨氏菌属占 3.125%。得到一株 GXUN10 很可能隶属于放线菌一个新分类单元。这表明原位培养装置埋于红树林根际土壤放线菌原本生活的环境俘获放线菌的可行性,为国内放线菌研究者寻找新的放线菌资源提供了新的参考途径。并且我们用原位培养法所分离到的放线菌具有较好的抑菌活性和酶活性,为后续放线菌次生代谢产物的进一步研究奠定了良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] 徐丽华,李文均,刘志恒,等. 放线菌系统学[M]. 北京: 科学出版社,2007: 19.  
Xu Lihua, Li Wenjun, Liu Zhiheng, et al. Systematics of Actinobacteria[M]. Beijing: Science Press, 2007: 19.
- [2] Alain K, Querellou J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges[J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 583-594.
- [3] Ferrari B C, Binnerup S J, Gillings M. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(12): 8714-8720.
- [4] Yasumoto-Hirose M, Nishijima M, Ngirchechol M K, et al. Isolation of marine bacteria by *in situ* culture on media-supplemented polyurethane foam [J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(3): 227-237.
- [5] Bollmann A, Lewis K, Epstein S S. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(20): 6386-6390.
- [6] Aoi Y, Kinoshita T, Hata T, et al. Hollow-fiber membrane chamber as a device for *in situ* environmental cultivation[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(11): 3826-3833.
- [7] Gavriš E, Bollmann A, Epstein S, et al. A trap for *in situ* cultivation of filamentous actinobacteria[J]. J Microbiol Methods, 2008, 72(3): 257-262.
- [8] Lewis K, Epstein S, D'Onofrio A, et al. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites[J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63: 468-476.
- [9] Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg E M, et al. Use of Ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species[J]. Appl En-

- viron Microbiol, 2010, 76(8): 2445—2450.
- [10] 徐平,李文均,徐丽华,等.微波法快速提取放线菌基因组 DNA[J].微生物学通报,2003,30(4):82—84.  
Xu Ping, Li Wenjun, Xu Lihua, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes[J]. Microbiology China, 2003, 30(4): 82—84.
- [11] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(4): 846—849.
- [12] Hong K, Gao A H, Xie Q Y, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China[J]. Marine Drugs, 2009, 7(1): 24—44.
- [13] 刘颖,洪葵,庄令,等.红树林样品不经分离的微生物群落培养物生物活性研究[J].微生物学报,2007,47(1):110—114.  
Liu Ying, Hong Kui, Zhuang Ling, et al. Bioactivity survey of natural microbial consortium from mangrove[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(1): 110—114.
- [14] 魏玉珍,张玉琴,赵莉莉,等.广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J].微生物学通报,2010(6):823—828.  
Wei Yuzhen, Zhang Yuqin, Zhao Lili, et al. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from mangroves at Shankou of Guangxi province[J]. Microbiology China, 2010(6): 823—828.
- [15] 梁静娟,庞宗文,詹萍.红树林海洋细菌的分离鉴定及其活性物质初步分析[J].热带海洋学报,2006,25(6):47—51.  
Liang Jingjuan, Pang Zongwen, Zhan Ping. Isolation and identification of mangrove marine bacteria and analysis of their bioactive products[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(6): 47—51.
- [16] 骆耐香,陈森洲,袁桂峰,等.广西沿海地区红树林根系土壤中放线菌的分离与鉴定[J].基因组学与应用生物学,2010,29(2):310—313.  
Luo Naixiang, Chen Senzhou, Yuan Guifeng, et al. Isolation and identification of actinobacteria from the soil of root system of mangrove forest in Guangxi coastal area[J]. Genomics and Applied Biology, 2010, 29(2): 310—313.
- [17] 姜怡,曹艳茹,赵立兴,等.超声波处理土样分离放线菌[J].微生物学报,2010,50(8):1094—1097.  
Jiang Yi, Cao Yanru, Zhao Lixing, et al. Ultrasonic treatment of soil samples for actinomycete isolation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(8): 1094—1097.
- [18] 曹艳茹,姜怡,李有龙,等.孟加拉虎粪便放线菌的分离及其多样性[J].微生物学报,2012,52(7):816—824.  
Cao Yanru, Jiang Yi, Li Youlong, et al. Isolation methods and diversity of culturable fecal actinobacteria associated with Panthera tigris tigris in Yunnan Safari Park[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(7): 816—824.
- [19] 罗红丽,黄英,王黎明,等.西藏地区土壤放线菌种群多样性及拮抗活性研究[J].微生物学报,2005,45(5):724—727.  
Luo Hongli, Huang Ying, Wang Liming, et al. Study on population diversity and antimicrobial activity of actinomycete from acidic soil in Xizang area[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(5): 724—727.
- [20] 杨斌.放线菌分离方法的研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2008.  
Yang Bin. Study on the method of actinomycetes isolation[D]. Xianyang: North West Agriculture and Forestry University, 2008.
- [21] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein S S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296(5570): 1127—1129.

## *In situ* isolation of actinomycetes and screening bioactive potential from mangrove rhizosphere soils in Guangxi

Jiang Mingguo<sup>1,2</sup>, Gan Guanghua<sup>1,2</sup>, Yang Lifang<sup>3</sup>, Li Xini<sup>2</sup>, Yang Guiliu<sup>2</sup>, Tuo Li<sup>4</sup>,  
Sun Chenghang<sup>4</sup>, Huang Ling<sup>3</sup>, Lan Jinzhi<sup>3</sup>

(1. Guangxi Key Lab of Mangrove Conservation and Utilization, Guangxi Mangrove Research Center, Beihai 536000, China; 2. School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Utilization of Microbial and Botanical Resources, Guangxi University for Nationalities, Guangxi Nanning 530008, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University for Nationalities Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Nanning 530008, China; 4. Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Institute of Medicinal Biotechnology, Beijing 100050, China)

**Abstract:** In order to efficiently capture actinomycetes from mangrove rhizosphere soils in Guangxi, traps for particularly cultivating actinomycetes *in situ* were implanted into soil and were incubated for thirty days. A general selec-

tive isolation procedure was employed onto fifteen different media. Phylogenetic neighbour-joining tree was conducted on the 16S rRNA gene sequences of the isolates and type strains. The biological activities and enzyme production of the isolated strains were evaluated. One hundred thirty-three actinomycetes were recovered. Of the thirty-three randomly picked isolates, twenty were *Streptomyces*, eleven were *Nocardiopsis* and one was *Actinosynnema*. One isolate, GXUN10, was most closely related to *Nocardiopsis* with a low 16S rRNA gene sequence identity of 90.0%, and might represent a new genus. Seven, four, eighteen, six, ten and three isolates showed antimicrobial activities respectively to *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus bacillus vulgaris*, *Hemolytic streptococcus* and *Pneumococcus*. Fifty-five, sixty-two, twenty-two and seventy-two isolates respectively showed cellulase, amylase, collagen enzyme and esterase activities. This study provides further evidence that unusual and rare actinomycetes from mangrove rhizosphere soils in Guangxi can be recovered by *in situ* cultivation traps.

**Key words:** *in situ* cultivation; mangrove; rhizosphere soils; actinomycetes; biological activity