

# 柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 相关可培养共生放线菌多样性及其生物毒活性研究 \*

## Diversity and Biototoxicity of Culturable Actinomycetes Associated with the Gorgonian *Anthogorgia caerulea*

杨小梅<sup>1,2</sup>, 李 菲<sup>1,2</sup>, 胡丽琴<sup>1,2</sup>, 周文红<sup>2</sup>, 覃 媚<sup>1,2</sup>, 高程海<sup>1\* \* \*</sup>

YANG Xiao-mei<sup>1,2</sup>, LI Fei<sup>1,2</sup>, HU Li-qin<sup>1,2</sup>, ZHOU Wen-hong<sup>2</sup>, QIN Mei<sup>1,2</sup>, GAO Cheng-hai<sup>1</sup>

(1. 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530001)

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

**摘要:**【目的】研究斜阳岛附近海域柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 可培养共生放线菌多样性及其发酵液代谢产物的生物毒活性。【方法】采用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对从广西斜阳岛附近海域采集的柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 可培养共生放线菌多样性进行研究, 利用卤虫致死法测试其生物毒活性。【结果】从柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 中分离获得相关可培养放线菌 23 株, 采用 16S rRNA 基因序列的系统发育分析后发现, 这些菌株属于 2 个亚纲 9 个科 9 个属 23 种。绝大部分菌株都具有一定的生物毒活性, 其中 10 株菌株有较强生物毒活性, 1 株有显著毒活性。【结论】广西斜阳岛附近海域柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 中存在较为丰富的放线菌多样性, 部分菌株具有较强的生物毒活性。

**关键词:** 海洋放线菌 柳珊瑚 系统发育分析 生物毒活性

**中图分类号:** Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2014)04-0248-05

**Abstract:**【Objective】To investigate the diversity and biototoxicity of culturable actinomycetes isolated from Gorgonian *Anthogorgia caerulea* collected at the Xieyang island.【Methods】Cultivated marine bacteria were isolated from Gorgonian *Anthogorgia caerulea* collected at the Xieyang island by using conventional culture-dependent method, and then investigate their diversity by using phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons. Activities of the crude extract of strains isolated were tested through brine shrimp lethality.【Results】We isolated 23 bacterial strains from the sample in media (2216E, NA and ISP2) supplement with seawater. On the basis of morphological and biochemical characteristics, we

selected 23 strains to perform a phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. The results showed that there were 2 subclass, 9 family, 9 genus and 23 species. Activity results showed that the crude extract of 10 strains showed obvious brine shrimp lethality.【Conclusion】Gorgonian *Anthogorgia caerulea* collected at the Xieyang island showed high diversity of actinomycetes, and some of them showed obvi-

收稿日期: 2014-08-10

修回日期: 2014-09-09

作者简介: 杨小梅(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物资源的保藏和应用研究。

\* 国家自然科学基金项目(81260480), 广西科技攻关项目(桂科合: 14123001-7)和广西自然科学基金项目(2012GXNSFAA053160)资助。

\*\* 通讯作者: 高程海(1979-), 男, 副研究员, 主要从事海洋微生物资源和应用研究。

ous biotoxicity against brine shrimp.

**Key words:** marine-derived actinomycetes, Gorgonian, phylogenetic analysis, bioactivity

**【研究意义】**海洋微生物主要是指生活在海水、海底沉积物(海泥)及与海洋动植物共附生的微生物总称。独特的生长环境(高盐、低温、无光照或弱光照)给予了海洋微生物不同于陆地微生物的代谢途径和遗传方式<sup>[1]</sup>。**【前人研究进展】**方燕等<sup>[2]</sup>对采集于广西涠洲岛附近海域的柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 相关可培养细菌进行分离纯化,获得 90 株细菌,发现有 49 株细菌对至少 1 种海洋污损指示菌有抑制活性,6 株菌株的发酵液对两种幼虫附着有抑制活性。滕宪存等<sup>[3]</sup>从采自广西涠洲岛的花刺柳珊瑚(*Echinogorgia flora*)中筛选获得了 1 株具有细胞毒活性的青霉菌。**【本研究切入点】**目前为止,未见对广西斜阳岛柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 中共生放线菌资源的调查研究。**【拟解决关键问题】**对广西斜阳岛柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 可培养放线菌多样性进行研究,并对其发酵液的生物毒活性进行初步筛选,为广西柳珊瑚共生放线菌的研究、保护和利用提供一定的理论依据和实践指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 仪器和试剂

HVE-5 型高压蒸汽灭菌锅,SYD001 型无菌操作台,LRH-250A 型生化培养箱,HH-4 型电热恒温水浴锅,ZHWY-2112C 型双层恒温培养振荡器,SANYO 型超低温冰箱,DHG-9140 型电热恒温鼓风干燥箱,Mikro200 型台式离心机,VCX-500 型超声细胞破碎仪,N-1100V-W 型旋转蒸发器,SHZ-CB 型循环水式多用真空泵,LabCycler 型温度梯度 PCR 仪,JY-SPB 型水平凝胶电泳装置,GelDoc 2000 型凝胶成像系统,SMZ800 型多功能体视显微镜。

TE 缓冲液(pH=8.0);Premix Taq、PCR 反应试剂、16S rRNA 扩增用 PCR 引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')均购自南宁科迪生物科技有限公司。DNA Marker、Goldview II 型核酸染料购自上海生物工程公司。

#### 1.1.2 样品采集

2010 年 9 月在广西北海斜阳岛周边海域采集柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea*,样品采集后立即装

入无菌袋中,暂存于放有冰块的保温箱内,送回实验室冷冻保藏(-18℃)。

### 1.2 菌株分离、纯化和保藏

在超净工作台内取珊瑚样品约 10g,先用无菌的冷却研钵碾磨后,加入到装有 80mL 无菌陈海水的 250mL 锥形瓶中,置于 28℃,140rpm 摇床震荡 48h,取混合液制备  $10^{-1} \sim 10^{-5}$  5 个不同稀释度的稀释液,吸取 0.5mL 各个稀释倍数的稀释液涂布于 3 种不同类型的平板培养基(2216E,高氏 1 号,ISP2)上,每个做 3 个平行,28℃下培养 3~5d。肉眼初步观察平板上的菌落特征,再用显微镜进一步观察后确定分离对象,挑取其单菌落,运用四分法重复划线分离纯化。纯化好的菌株经标记后接种在相应的液体培养基中,28℃,140rpm 培养 5d。培养液经高速离心去除培养基,再将菌体与保护剂甘油混匀后分装于冻存管内,使用分段降温法保存于-80℃冰箱。

### 1.3 DNA 提取、扩增和系统进化树构建

菌株 DNA 的提取参照周双清等<sup>[4]</sup>的方法。取一定量的单菌落装入含有 100 $\mu$ L chelax 的 PCR 管中,混匀后离心取上清液作为 DNA 模板。反应体系:1 $\mu$ L DNA 模板,25 $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR Mastermix 溶液,引物 27F、1492R 各 1 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 22 $\mu$ L。取 50 $\mu$ L 反应体系于 PCR 管进行 PCR 扩增,扩增程序为 95℃变性 5min,94℃变性 1min,55℃复性 5min,72℃延伸 1.5min,进行 31 个循环,72℃延伸 10min。取 2.5 $\mu$ L PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶电泳(100V,30min)测试纯度。PCR 产物委托广州美吉生物科技有限公司测序,结果利用 BLAST 软件获取其 16S rRNA 基因序列并在 EzTaxon 服务器(<http://www.eztaxon.org/>)进行在线比对。取同源性、相似度最高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象,采用 Clustal X<sup>[5]</sup>软件进行多序列比对及相似性分析,确定菌株种属关系。

### 1.4 生物毒活性试验

#### 1.4.1 菌体粗浸膏的制备

将已鉴定的 23 株放线菌接种到含有 ISP2 海水液体培养基的 250mL 三角瓶中,置 28℃,140r/min 摇床培养 7d。发酵液经超声波破碎菌体细胞后加入等量的乙酸乙酯萃取 3 次。萃取液旋蒸浓缩至少量后,用干净的吸管转移至西林瓶中,待挥发干燥后

所得固形物即为供试样品。

#### 1.4.2 生物毒活性试验

取卤虫卵 100mg 置于 500mL 烧杯中,加入人工海水 400mL,用一小充气泵缓缓充气,室温孵化 24h,除去卵壳及未孵化的卵,卤虫幼虫继续培养 24h,备用。

依照 Solis<sup>[6~8]</sup>的改良法,取 96 孔细胞培养板,每孔加 175 $\mu$ L 无菌海水,20 $\mu$ L 含 10~15 个卤虫幼虫的虫孵化液和 5 $\mu$ L 样品溶液,制成测试培养板。空白对照组和每个浓度的样品组各设 3 个平行孔,空白对照组加 100 $\mu$ L 人工海水,样品组加 100 $\mu$ L 所需浓度的样品液。每个测试样品设置 20mg/mL, 2mg/mL, 0.2mg/mL 3 个终浓度。室温培养 24h 后,在双目解剖镜下检测计数海虾死亡个体数目。

海虾生物致死活性用校正死亡率<sup>[9]</sup>表示,按下列公式计算:

表 1 斜阳岛柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 可培养放线菌菌落特征

Table 1 The colony characteristics of marine actinomycetes from Gorgonian *Anthogorgia caerulea* collected at Xieyang island

菌株号 No.	颜色 Color	形状 Shape	高度 Height	整齐度 Uniformity	表面 Surface	干湿度 humidity	透明 Transparency
101	灰白色	圆形	扁平	不整齐	不平整	偏干	不透明
103	黄色	圆形	微凸	整齐	平整	偏中	不透明
104	黄色	圆形	扁平	刺状	平整	偏中	不透明
105	橘红色	圆形	微凸	整齐	平整	偏湿	不透明
106	橘红色	圆形	微凸	整齐	平整	偏湿	不透明
107	橘红色	圆形	突起	整齐	平整	偏中	不透明
108	乳白色	不规则	微凸	不整齐	平整	偏湿	不透明
109	红色	圆形	突起	整齐	平整	偏湿	不透明
110	淡红色	圆	微凸	整齐	平整	偏中	不透明
111	黄色	圆形	微凸	整齐	平整	偏中	不透明
117	乳白色	圆形	内凹	放射状	平整	偏干	不透明
118	暗红色	圆形	扁平	整齐	平整	偏干	不透明
119	橘红色	圆形	微凸	整齐	平整	偏湿	不透明
121	嫩黄色	圆形	微凸	放射状	褶皱	偏中	不透明
123	白色	圆形	扁平	整齐	褶皱	偏干	半透明
124	白色	圆形	微凸	整齐	平整	干	不透明
125	灰色	圆形	微凸	不整齐	褶皱	干	不透明
126	橙色	圆形	微凸	整齐	平整	干	半透明
127	淡红色	圆形	突起	整齐	平整	偏干	不透明
128	红色	圆形	突起	整齐	平整	中	不透明
129	粉红色	圆形	扁平	整齐	平整	中	不透明
130	红色	圆形	突起	整齐	平整	偏湿	不透明
131	玫红色	圆形	突起	整齐	平整	中	不透明

校正死亡率 = (对照组存活率 - 处理组存活率) / 对照组存活率  $\times$  100%。

将 3 个浓度及其对应的校正死亡率输入计算机,利用 SPSS 19.0 软件<sup>[10]</sup>的 Probit 统计分析,得出 LD<sub>50</sub>和 95%置信区间。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株形态特征

根据菌株的不同菌落形态,如颜色(黄色、红色、白色等)、形状(圆形、椭圆、不规则等)、高度(扁平、微凸、内凹)、边缘(光滑、褶皱)、表面(光滑、粗糙等)、干湿度(偏干、偏湿、中等)和透明(透明、不透明)等初步鉴定,从斜阳岛柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 样品中共分离得到 23 株放线菌,其形态特征见表 1。

### 2.2 菌株的分析鉴定与系统发育分析

经菌落形态特征及 16S rRNA 基因序列测序结果比对, 结果如表 2、图 1 所示, 获得的 23 个菌株分属于 2 个亚纲(放线菌亚纲, 酸微菌亚纲)的 9 个科 9 个属。其中放线菌亚纲 19 株, 占 82.6%, 其余为酸微菌亚纲, 占 17.4%, 23 株放线菌中链霉菌属 (*Streptomyces* sp.) 有 3 株, 微球菌属 (*Micrococcus* sp.) 2 株, 嗜皮菌属 (*Modestobacter* sp.) 3 株, 节杆菌属 (*Kocuria* sp.) 3 株, 红球菌属 (*Rhodococcus* sp.) 2 株, 迪茨氏菌属 (*Dietzia* sp.) 2 株, 丙酸杆菌属 (*Pseudonocardia* sp.) 4 株, 小单孢子菌属 (*Micromonospora* sp.) 2 株, 戈登氏菌属 (*Gordonia* sp.) 1 株, 诺卡氏菌属 (*Nocardioopsis*) 1 株。

### 2.3 生物毒活性研究

由表 3 可知, 绝大部分菌株都具有一定的生物毒活性, 而有 11 株菌株有较强活性 ( $LD_{50} < 1.0 \text{mg/mL}$ ), 其中菌株 101 (*Streptomyces malachitospinus* -

*nus*) 生物毒活性最强, 为  $0.021 \text{mg/mL}$ 。

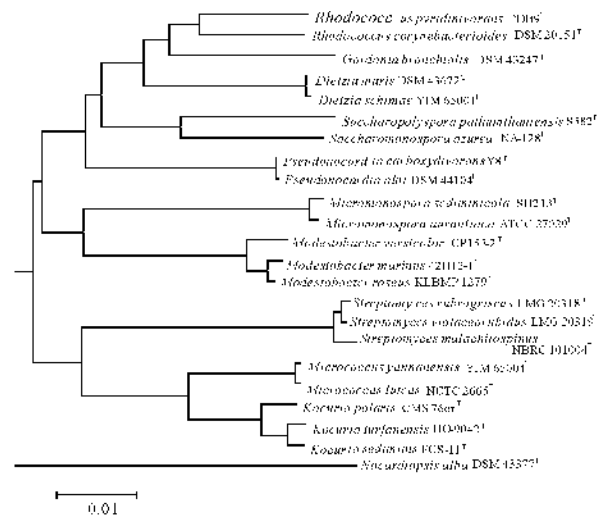


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的斜阳岛柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 可培养放线菌系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence analysis of strains isolated from Gorgonian *Anthogorgia caerulea* collected at Xieyang island.

表 2 斜阳岛柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 可培养放线菌的 16S rRNA 序列比对结果

Table 2 The comparison results of cultured marine actinomycetes from Gorgonian *Anthogorgia caerulea* collected at Xieyang island

系统发育组群/门 Phylogenetic groups/Family	菌株编号 Strain Number	最近典型菌株 Closest type strain (accession number)	相似度 Similarity(%)
Firmicutes (5)	101	<i>Streptomyces malachitospinus</i> NBRC 101004	99.87
	103	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004	99.87
	104	<i>Modestobacter versicolor</i> CP153-2	99.47
	105	<i>Kocuria polaris</i> CMS 76or	99.87
	106	<i>Kocuria turfandensis</i> HO-9042	99.60
	107	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> PDB9	99.60
	108	<i>Modestobacter marinus</i> 42H12-1	99.60
	109	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672	99.60
	110	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i> Y8	100.00
	111	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665	99.87
	117	<i>Nocardioopsis alba</i> DSM 43377	99.06
	118	<i>Micromonospora sediminicola</i> SH2-13	100.00
	119	<i>Kocuria sediminis</i> FCS-11	99.20
	121	<i>Saccharopolyspora pathumthaniensis</i> S582	99.73
	123	<i>Saccharomonospora azurea</i> NA-128	100.00
	124	<i>Streptomyces rubrogriseus</i> LMG 20318	99.60
	125	<i>Streptomyces violaceorubidus</i> LMG 20319	99.60
	126	<i>Modestobacter roseus</i> KLBMP 1279	98.53
	127	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104	99.87
	128	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> DSM 20151	99.73
	129	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029	100.00
	130	<i>Dietzia schimae</i> YIM 65001	99.20
	131	<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247	98.66

表3 斜阳岛柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 共生放线菌的生物毒活性测试结果

Table 3 The brine shrimp lethal activities of cultivated marine actinomycetes from Gorgonian *Anthogorgia caerulea* collected at Xieyang island

序列号 No.	死亡个数 Fatality number (mg/mL)			LD <sub>50</sub>	95%置信区间 Confidence intervals of 95%	
	20	2	0.2		下限 Minimum	上限 Maximum
101	33	24	16	0.021	0.000	0.263
103	26	21	14	0.534	0.068	1.516
104	33	21	12	0.811	0.011	3.722
105	35	26	17	0.111	0.000	0.506
106	21	16	12	2.180	0.082	10.702
107	31	22	12	0.777	0.244	1.767
108	7	10	9	>20	\	\
109	35	21	14	0.226	0.039	0.540
110	20	12	9	13.460	2.420	1.766
111	24	19	11	1.849	0.425	7.542
117	29	16	10	0.796	0.136	2.352
118	23	16	10	3.414	0.604	52.916
119	30	17	12	1.045	0.271	2.721
121	18	15	9	11.675	2.092	2.705
123	9	8	9	>20	\	\
124	34	22	14	0.561	0.190	1.167
125	36	27	13	0.207	0.044	0.460
126	19	14	11	8.656	1.497	6.347
127	22	18	15	0.799	0.000	9.800
128	21	17	10	3.229	0.374	16.287
129	24	14	12	1.387	0.392	4.293
130	34	22	14	0.409	0.134	0.831
131	28	19	11	1.373	0.478	3.358

注:各样品浓度的卤虫死亡个数为3个平行的加合。

Note: Fatality numbers of the brine shrimp obtained from three parallel repetition

### 3 结论

随着陆地资源的挖掘殆尽,占地球表面积 71% 的海洋以其与陆地环境迥异的独特生理环境、复杂的物种关系走进大家研究的视野。目前海洋放线菌的研究逐步成熟,已经分离出若干具有生物活性的菌株,其代谢产物不乏具有抗肿瘤、抗真菌、抗细菌、抗疟、杀虫及免疫调节等功能。本文初步对广西北海斜阳岛柳珊瑚可培养放线菌进行了分离和纯化,共得到 23 株放线菌,经过分析,这 23 株放线菌分属于 2 个亚纲 9 个属。初步探讨 23 株放线菌发酵产物的生物毒活性,发现有 11 株具有较强的生物毒活性,其中 1 株生物毒活性显著。

#### 参考文献:

[1] 王亚楠. 中国南海柳珊瑚共附生微生物多样性与抗菌作用研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2012.  
Wang Y N. Diversity and Antibacterial Activity of

Symbiotic Microbial from the Gorgonian in South Chinese Sea [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.

- [2] 方燕,潘丽霞,易湘茜,等. 柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 相关可培养细菌多样性及抗污活性研究[J]. 广西科学,2012,19(3):1-5.  
Fang Y, Pan L X, Yi X X, et al. Diversity and antifouling activity of culturable bacteria associated with the Beibu gulf gorgonian *Anthogorgia caerulea* [J]. Guangxi Sciences, 2012, 19(3): 1-5.
- [3] 滕宪存,庄以彬,王义,等. 花刺柳珊瑚共生真菌 *Penicillium* sp. gxwz406 的次生代谢产物研究[J]. 中国海洋药物杂志,2008,29(4):3-5.  
Teng X C, Zhuang Y B, Wang Y, et al. The secondary metabolites study in symbiotic fungi *Penicillium* sp. gxwz406 of *Thorns gorgonians* [J]. The Chinese Journal of Marine Drugs, 2008, 29(4): 3-5.
- [4] 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.  
Zhou S Q, Huang X L, Huang D Y, et al. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100 [J]. Biotechnology Bulletin, 2010(2): 123-125.
- [5] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [6] Solis P N, Wright C W, Anderson M M, et al. A microcell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp) [J]. Planta Medica, 1993, 59(3): 250-252.
- [7] 蒋诚,熊本强,邱细敏,等. 鱼藤卤虫致死活性成分的分 离和结构鉴定[J]. 中药材,2012,32(5):719-723.  
Jiang C, Xiong B Q, Qiu X M, et al. Isolation and identification of *Brine shrimp* lethal activities from *Derris trefoliata* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2012, 32(5): 719-723.
- [8] Meyer B N, Ferrigni N R, Putnam J E, et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents [J]. Planta Medica, 1982, 45(5): 31-34.
- [9] 王发左. 海洋真菌抗肿瘤活性次级代谢产物及其生物转化研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2008.  
Wang F Z. Studies on the Antitumor Constituents and Biotransformation of Secondary Metabolites Produced by Marine-derived Fungi [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [10] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD<sub>50</sub> [J]. 药学进展, 2003(5): 314-316.  
Zhou Y P. The calculation of LD<sub>50</sub> in new drugs with software SPSS [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2003(5): 314-316.

(责任编辑:陆雁)