

· 抗感染药物专栏 ·

牛粪中链霉菌的分离鉴定及其抗菌活性*

尹逊哲¹, 郭焱², 李文杰¹, 姜爽², 于秀明³, 金宁一⁴

(1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 长春中医药大学基础医学院, 长春 130117; 3. 长春中医药大学附属医院, 长春 130021; 4. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122)

摘要 目的 分离鉴定牛粪中的链霉菌, 观察其抗菌活性。方法 采用稀释涂布法从牛粪中分离菌株, 通过固定琼脂块法以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌为指示菌筛选抗菌活性较强的菌株, 并对菌种进行生理生化鉴定及 16S rDNA 序列测定; 采用纸片扩散法测定活性菌株发酵液抗菌活性, 菌株发酵液抗菌活性物质进行水饱和正丁醇萃取, 并通过 Molish 反应、双缩脲反应及茚三酮反应进行抗菌活性物质定性鉴别。结果 从牛粪中分离出 8 株菌株, 并筛选出 1 株抗菌活性较强菌株 B5-2, 鉴定为链霉菌。活性菌株发酵液对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、费氏柠檬酸杆菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌、产气肠杆菌均具有较强抑菌作用。抑菌结果显示, 菌株 B5-2 抑菌活性物质均为水溶性物质。Molish 反应、双缩脲反应及茚三酮反应结果显示, 菌株 B5-2 的抑菌活性物质均初步鉴定为糖类和蛋白质类。结论 筛选分离的链霉菌对临床致病菌有较强的抑制作用。

关键词 链霉菌; 牛粪; 鉴定; 抗菌活性

中图分类号 R978.12; R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2018)01-0040-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2018.01.009

Isolation and Identification of *Streptomyce* from Cow Dung and Antimicrobial Activity of Its Substance

YIN Xunzhe¹, GUO Yan², LI Wenjie¹, JIANG Shuang², YU Xiuming³, JIN Ningyi⁴ (1. College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. College of Basic Medical, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Affiliated Hospital, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China; 4. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, China)

ABSTRACT Objective To isolate and identificate *Streptomyce* strain from cow dung and observe its antimicrobial activity. **Methods** Strains were isolated from cow dung by dilution coating method. Strong antibacterial strains were screened out by agar block method with fixed *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as indicative bacteria. The strains were identified based on physiological and biochemical characteristics as well as 16S rDNA gene sequence analysis. Active antibacterial fermentation broth substance was determined by disk diffusion method, and antibacterial active substance of strains fermentation broth was extracted by water-saturated *n*-butanol. Antibacterial substance of strains was identified by Molish reaction, biuret test and ninhydrin reaction. **Results** Eight strains were isolated from cow dung and one strong antibacterial strain was screened out and named B5-2, identified as *Streptomyces*. The results showed that the strain had the highly antibacterial effect on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*. The strain antibacterial active substance of fermentation broth preliminary analysis showed that strong antibacterial active substance of B5-2 was the water-soluble substance. Antibacterial substance of B5-2 was preliminarily identified as glycoside and protein by Molish reaction, biuret test and ninhydrin reaction. **Conclusion** The strain isolated have a strong inhibition effect on clinical pathogenic bacteria in clinical practice.

KEY WORDS *Streptomyces*; Cow dung; Identification; Antibacterial activity

由于抗菌药物的广泛使用, 细菌耐药问题不断增多, 耐药菌株的出现严重威胁着人类的健康, 寻找新型抗菌药物迫在眉睫^[1-4]。放线菌是一类与人类健康极为密切的微生物种群, 是产生抗菌药物最多的一类物种, 大多数分布于土壤中。近年来, 研究者们试图从反刍动物胃肠道微生物资源中分离放线菌。对药用植物内生链霉菌的研究已发现多种新的具有抗菌、抗虫活

性的物质^[5]。云南大学从西双版纳的药用植物中也分离到多种稀有放线菌^[6]。相对于植物内生放线菌的研究, 对动物肠道与粪便中共生放线菌的研究十分缺乏。牛是牛亚科牛族哺乳反刍类动物, 具有为宿主分解代谢过程中产生的有毒物质的能力^[7]。反刍动物胃肠道菌群是一些结构新颖、生物活性显著的天然活性产物的重要来源, 是分离放线菌的新颖途径, 但其

中的放线菌的作用目前还不清楚^[8]。本实验拟针对牛的粪便进行放线菌分离,筛选出具有拮抗致病菌活性的菌株,并对菌株进行鉴定,对其抗菌活性物质进行初步分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 供试样品来源于牛粪。供试细菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*),均由吉林大学第一附属医院检验科提供。供试培养基为改良高氏 1 号培养基、改良高氏 1 号液体培养基、营养琼脂、营养肉汤。其他试剂来源于国产分析纯。

1.2 放线菌分离、纯化及保存 分离培养基选择改良高氏 1 号培养基,加入抑制剂重铬酸钾 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。放线菌的分离采用平板稀释法^[9-10]。自然风干样品充分研细,称取牛粪 10 g,加入到灭菌纯化水 100 mL 中,振荡。充分静置后取牛粪悬液用无菌纯化水进行 10 倍的系列稀释,从 10^{-1} 到 10^{-2} , 10^{-3} cfu。将 3 种浓度的牛粪悬液分别加入改良高氏 1 号平板上,用无菌涂布棒在培养基表面涂匀。培养皿倒置在 28 ℃ 培养 7 d,挑选菌落形态不同的菌株在改良高氏 1 号培养基上培养,经过多次挑取单菌落纯化之后,挑取纯化后的单菌落菌株,在改良高氏 1 号试管斜面上培养 7 d 后进行编号,于 4 ℃ 冰箱保存。

1.3 活性菌株的筛选 上述分离得到的菌株在改良高氏 1 号平板上四区划线接种,倒置于 28 ℃ 培养 7 d,挑选单菌落采用琼脂块法进行抑菌活性初筛。将金黄色葡萄球菌与大肠埃希菌分别接种至营养肉汤试管中 37 ℃ 培养 15 h,采用比浊法,用无菌 0.9% 氯化钠溶液调整菌液浓度至 1.5×10^6 cfu,均匀涂布于营养琼脂平板上。将培养出的菌株单菌落取下倒置在平板上,

37 ℃ 培养 24 h。采用十字交叉法测量抑菌圈直径,筛选出抑菌活性最好的菌株进行后续实验。每个菌株设 3 个平行实验。

1.4 活性菌株鉴定

1.4.1 生理生化特征鉴定 分离纯化的活性纯菌株采用改良高氏一号培养基在不同温度及 pH 值条件下培养;经革兰染色后,通过 MOTIC 电视生物显微镜对菌株菌丝及孢子形态进行观察。

1.4.2 16S rDNA 序列测定 DNA 提取和扩增参照文献^[8]介绍的方法。16S rDNA 序列聚合酶链反应(PCR)扩增采用保守引物 1492R (5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3') 和 27F (5'-AGTTTGATCMTG-GCTCAG-3')。16S rDNA PCR 扩增,PCR 反应体系 50 μL : $10 \times \text{Ex Taq buffer}$ 5.0 μL , 2.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ dNTP Mix 4.0 μL , 10p Primer 11.0 μL , 10p Primer 2 1.0 μL , Template 2.0 μL , 5 U Ex Taq 0.5 μL , ddH₂O 36.5 μL 。PCR 扩增产物由上海美吉生物医药科技有限公司完成纯化和测序工作。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;循环体系 95 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 循环 30 次, 72 ℃ 延伸 10 min。4.0 ℃ 保存。

1.4.3 系统发育树构建 将所得序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 检索,选取同源性比较高的典型菌株的 16S rDNA 序列为参比对象,利用 DNASTar 对目标序列进行排列比对,用 MEGA 5.0 构建供试菌与参比菌之间的系统进化树^[7-8]。

1.5 活性菌株发酵液抗菌活性分析 菌株发酵培养基选择改良高氏 1 号液体培养基。采用纸片扩散法^[11-13]分析活性菌株发酵液的抗菌活性。筛选出的活性菌株挑取活化后的斜面培养基上的菌丝块接种于发酵培养基中,28 ℃, 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇瓶培养 7 d, 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min ($r=15 \text{ cm}$),取上清液过孔径 0.2 μm 过滤器保存在无菌管中,即为备用无菌发酵液。将金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、费氏柠檬酸杆菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌、产气肠杆菌 6 株供试靶标菌按上述初筛方法培养,调整浓度,均匀涂布于营养琼脂平板上。将直径 6 mm 的无菌滤纸浸于无菌发酵液中,在无菌环境中挥干后贴于含有指示菌的平板上,37 ℃ 培养 24 h,观察并记录抑菌圈大小。每组均设 3 个平行实验。

1.6 活性菌株发酵液抗菌活性物质初步分析

1.6.1 活性物质极性分析 按照“1.5”项方法制备活性菌株发酵液备用。无菌发酵液经水饱和正丁醇萃取后分为正丁醇层和水层。两相溶液经 37 ℃ 蒸发挥干后用无菌水溶解。溶解后溶液过孔径 0.22 μm 过滤器

收稿日期 2016-09-06 修回日期 2016-11-12

基金项目 * 吉林省卫生计生科研计划(2014Z099);吉林省教育厅“十二五”科学技术研究规划项目(吉教科合字[2015]第 333 号);吉林省教育厅“十三五”产业化项目(JJKH20170739KJ);吉林省科技厅自然科学基金资助项目(20160101224JC)

作者简介 尹逊哲(1991-),男,山东新泰人,硕士,从事微生物与生化药学研究。电话:0431-86171202, E-mail: yoonzhe@126.com。

通信作者 郭焱(1963-),女,吉林长春人,教授,博士生导师,主要研究方向:微生物药物。电话:0431-86171202, E-mail: ccguoyan@163.com。

保存在无菌管中。活性菌株发酵液原液、发酵液水层、发酵液正丁醇层按上述纸片扩散法进行抗菌活性测定及分析活性物质极性。

1.6.2 活性物质成分分析 通过 Molish 反应、双缩脲反应及茚三酮反应对活性菌株发酵液抗菌活性物质进行颜色鉴别。

2 结果

2.1 牛粪中菌株分离结果 从牛粪中根据菌种培养特征的不同,共分离出 8 株菌株,分别命名为 B5-1, B5-2, B5-3, B5-4, B5-5, B5-6, B5-7, B5-8。

2.2 分离菌株的生理生化特征 已分离出的 8 株菌株的最适生长温度在 25~30 ℃,最适生长 pH 值范围为 6~7。通过斜面培养基对 8 株菌株进行形态学观察,结果见表 1。

表 1 牛粪中菌株的形态特征
Tab.1 Morphological characteristics of strains from cow dung

菌落	菌落大小	分布状态	气生菌丝颜色	基内菌丝颜色
B5-1	极小	连结成片	白色	白色
B5-2	较小	点状分布	白色	棕色
B5-3	较大	点状分散	淡黄色	淡黄色
B5-4	较大	连结成片	灰色	淡紫色
B5-5	较小	连结成片	棕色	深棕色
B5-6	较大	点状分布	橘红色	粉红色
B5-7	较小	连结成片	白色	淡棕色
B5-8	较大	点状分布	白色	棕色

2.3 活性菌株筛选结果 分离出的 8 株菌株经过筛选,其中 1 株菌株对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌抑菌作用比较显著,命名为 B5-2。抑菌活性实验结果显示,菌株 B5-2 单菌落抑制金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑菌圈平均直径分别为 9.0,15.0 mm。

2.4 活性菌株发酵液抗菌活性分析结果 B5-2 菌株的发酵液对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、费氏柠檬酸杆、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌和产气肠杆菌的抑制圈直径分别为 11.5,15.5,18.0,19.0,14.0,20.0 mm,对供试菌均具有一定的抑制作用。B5-2 发酵液经萃取后各相进行抑菌实验,不同相抑菌效果不同。菌株 B5-2、发酵液经正丁醇萃取后,正丁醇层代谢物无抑菌活性,水层代谢物抑菌活性与发酵原液抑菌活性接近相同(表 2),菌株 B5-2 抑菌活性物质极性较大,与替考拉宁抑菌圈比较,抑菌效果也不尽相同(图 1)。通过 Molish 反应,B5-2 出现不同颜色程度的紫色圆环,双

缩脲反应及茚三酮反应均生成蓝紫色物质,活性物质可能是糖类或蛋白质类,需要进一步分析。

表 2 B5-2 发酵液不同极性部位对供试靶标菌的抑制活性(抑制圈直径)

Tab.2 Inhibitory activity (diameter of suppression circle) of different polarity parts of B5-2 broth on targeted bacteria

发酵液	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	费氏柠檬酸杆菌	阴沟肠杆菌	肺炎克雷白杆菌	产气肠杆菌
	mm	mm	mm	mm	mm	mm
发酵原液	11.5	15.5	18.0	19.0	14.0	20.0
正丁醇层	-	-	-	-	-	-
水层	11.5	15.5	16.0	14.0	13.0	18.0

“-”无抗菌活性
“-” no antimicrobial activity

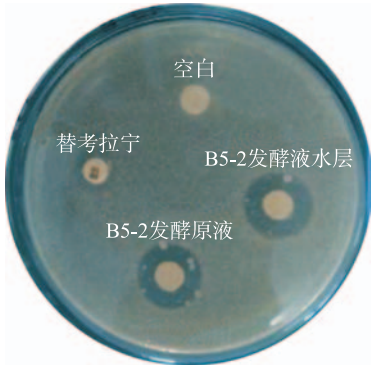


图 1 B5-2 发酵液与替考拉宁对金黄色葡萄球菌的抑制作用

Fig.1 Inhibition of B5-2 broth and teicoplanin on staphylococcus aureus

2.5 活性菌株 16S rDNA 序列测定和系统发育树构建 根据 16S rDNA 构建的系统发育树见图 2。测序结果在 NCBI 中比对,显示 B5-2 属链霉菌属;进化树分析表明 B5-2 与锈赤蜡黄链霉 (Streptomyces rubiginosohelvolus) KJ632658.1 有较高的同源性。通过菌株形态、生理生化特性及 16S rDNA 鉴定,初步认为 B5-2 属链霉菌属。

3 讨论

抗菌药物能够有效控制各类感染,降低因感染而造成的死亡,因此抗菌药物在临床治疗中的作用至关重要。“超级细菌”的出现正是由于抗菌药物的耐药引起。合理使用抗菌药物,避免耐药菌株的产生尤为重要^[13]。针对从一些特殊环境中分离放线菌的方式,哺乳动物胃肠道微生物可作为新的放线菌资源开发利用。

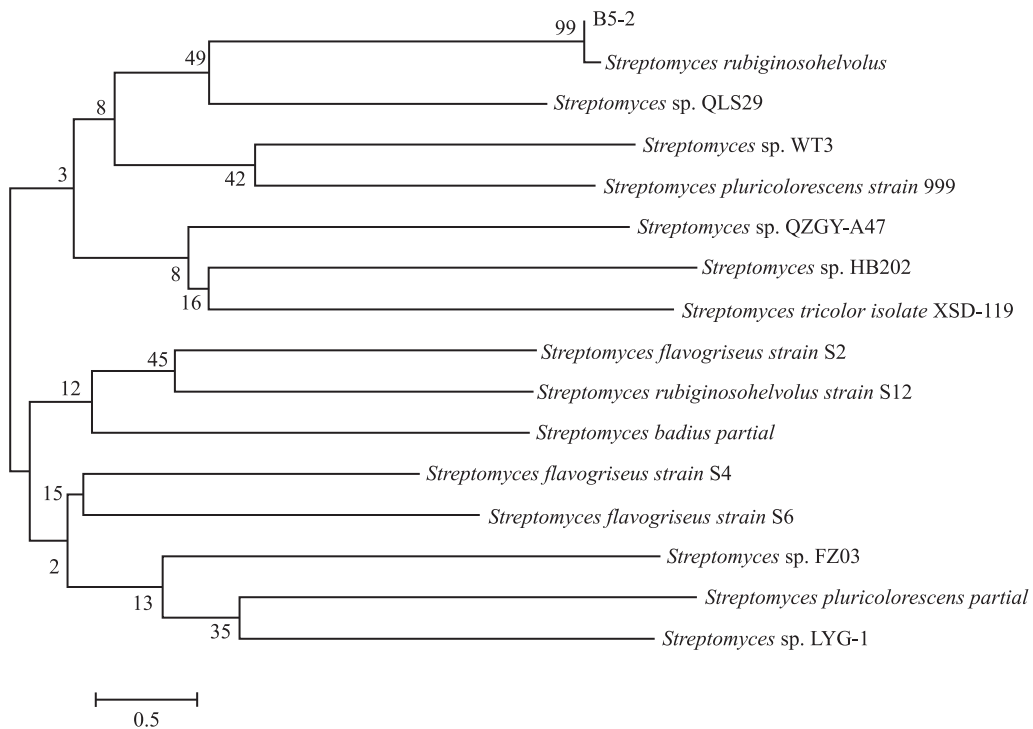


图 2 基于 16S rDNA 核苷酸序列构建的 B5-2 菌株系统发育树分析

Fig.2 B5-2 phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of 16S rDNA strain system

本实验通过对反刍类动物牛粪便中放线菌进行分离筛选鉴定,筛选出一株具有较强抑菌作用的放线菌,其对临床常见耐药菌表现出的良好抑菌效果,菌株 B5-2 对新型拮抗耐药致病菌抗菌药物的研发具有巨大的潜在研究价值。但菌株的确切分类地位及活性物质的分离提纯和结构鉴定尚待研究。下一步将对菌株 B5-2 进行大量发酵,以确定发酵液中抗菌活性物质的组分及相应的化学结构,寻找具有新型结构和高活性的天然产物,以期得到新的高抗菌活性化合物。

参考文献

- [1] 伍国梁,李林,陈豪,等.筛选鉴定一株产生抑菌活性物质的海洋放线菌[J].生物技术通讯,2013,24(4):488-492.
- [2] 奚逢源,薛长艳,郝之奎.Nocardia asteroides XI 的鉴定及抗菌活性研究[J].中国抗生素杂志,2014,39(5):394-398.
- [3] 叶胜蓝,汪江峰,黄剑.土壤放线菌 P3-2 的分类鉴定及抗菌活性研究[J].生物技术通报,2012,28(1):156-161.
- [4] 冯治翔,栗敏,刘洋,等.罗汉松及响叶杨内生放线菌的分离、活性、及多样性研究[J].中国抗生素杂志,2011,36(4):264-268.
- [5] STROBEL G,DAISY B.Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J].Microb Molec Bio

Rev;MMBR,2003,67(4):491-502.

- [6] QIN S,LI J,CHEN H,et al.Isolation,diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forest in Xishuangbanna, China[J].Appl Env Microb,2009,75(19):6176-6186.
- [7] 马晨,张和平,刘彩虹,等.牛瘤胃与肠道微生物多样性的研究进展[J].动物营养学报,2014,26(4):852-862.
- [8] EDWARDS J E,MCEWAN N R,MCKAIN N,et al.Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep[J].Microbiology,2005,151(3):707-725.
- [9] 董艳萍,郭琳,旭格拉哈布丁,等.塔克拉玛干沙漠南麓土壤放线菌资源勘探及抗菌活性初筛[J].中国抗生素杂志,2013,38(4):241-247.
- [10] BERDY J.Bioactive microbial metabolites,a personal review[J].J Antib,2005,58(1):1-26.
- [11] WU S J,FOTSO S,LI F,et al.Amorphane sesquiterpenes from a marine *Streptomyces* sp.[J]J Natu Prod,2007,70(2):304-306.
- [12] 汪学军,闫双林,闵长莉,等.蚯蚓粪中放线菌分离及其抗菌活性研究[J].中国中药杂志,2015,40(4):614-618.
- [13] 孙春莲.抗菌素合理使用与预防用药[J].中国卫生产业,2013,15(1):70-72.