

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201812007

田守征, 黄之锴, 赵玉瑛, 等. 剑叶龙血树内生放线菌活性菌株的筛选和鉴定 [J]. 广西植物, 2020, 40(5): 727-734.  
TIAN SZ, HUANG ZP, ZHAO YY, et al. Bioactivity and identification of endophytic actinomycetes from *Dracaena cochinchinensis* [J].  
*Guihaia*, 2020, 40(5): 727-734.

## 剑叶龙血树内生放线菌活性菌株的筛选和鉴定

田守征<sup>1</sup>, 黄之锴<sup>2</sup>, 赵玉瑛<sup>2</sup>, 赵庆<sup>2</sup>, 张晓梅<sup>1\*</sup>

(1. 云南中医药大学 基础医学院, 昆明 650500; 2. 云南中医药大学 中药学院, 昆明 650500)

**摘要:** 为筛选具有抗菌抗肿瘤活性的药用植物内生菌资源, 该文对 300 余株分离自中国云南西双版纳及越南地区剑叶龙血树的内生放线菌采用琼脂块扩散法进行抗病原细菌活性筛选、平板对峙法进行抗真菌活性筛选、SRB 法测定菌株的细胞毒活性及 PCR 扩增方法筛选非核糖体肽合成酶 NRPS 基因及聚酮合酶 PKS-I、PKS-II 基因; 对得到的优势菌株经 8 种培养基进行发酵, 采用 10 种病原细菌、3 种病原真菌及 2 种人肿瘤细胞株测试其发酵粗提物的抗菌及抗肿瘤活性以确定最佳发酵培养基; 用 16S rRNA 基因测序方法初步鉴定 5 株优势菌株的分类地位。结果表明: 初筛得到 5 株抗菌活性、体外细胞毒活性及 NRPS、PKS 相关基因表达阳性的菌株 S01-S05, 其中 4 株 (S01-S04) 属于链霉菌属、1 株 (S05) 属于类诺卡氏菌属; 菌株经不同培养基发酵后产物的抗菌和抗肿瘤活性不同, 其中 *Streptomyces* sp. S04 在 7 种培养基中的发酵提取物对 8 种测试病原菌均有较强抑制作用, 且该菌株用 Medium C 的发酵提取物对人肝癌 Hep G2 细胞株抑制率达到 100%, 为剑叶龙血树内生菌活性成分挖掘及新型抗菌药物筛选奠定了基础。

**关键词:** 剑叶龙血树, 内生放线菌, 抗菌活性, 抗肿瘤活性, 16S rRNA 基因分析

中图分类号: Q939 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)05-0727-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Bioactivity and identification of endophytic actinomycetes from *Dracaena cochinchinensis*

TIAN Shouzheng<sup>1</sup>, HUANG Zhipu<sup>2</sup>, ZHAO Yuying<sup>2</sup>,  
ZHAO Qing<sup>2</sup>, ZHANG Xiaomei<sup>1\*</sup>

(1. College of Basic Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

收稿日期: 2019-02-13

基金项目: 国家自然科学基金(21662048, 31600018); 云南省科学技术厅-云南中医学院应用基础研究联合专项项目 [2017FF116(-002)]; 广东省热带亚热带植物资源重点实验室开放课题(PlantKF10) [Supported by the National Natural Science Foundation of China(21662048, 31600018); Yunnan Province of Science and Technology Department and Yunnan University of Traditional Chinese Medicine Applied Basic Research Joint Program [2017FF116(-002)]; Guangdong Key Laboratory of Tropical and Subtropical Plant Resources Open Program (PlantKF10)]。

作者简介: 田守征(1988-), 男, 河南睢县人, 硕士, 实验师, 研究方向为药用植物内生菌分离及活性代谢产物发掘, (E-mail) Tianshzh\_0101@126.com。

\*通信作者: 张晓梅, 博士, 副教授, 研究方向为药用植物内生菌活性代谢产物发掘, (E-mail) meimeizhang.net@163.com。

**Abstract:** In order to screen endophytic bacteria resources with antitumor activities from medicinal plant, 300 endophytic actinomycetes isolated from *Dracaena cochinchinensis* collected from Xishuangbanna, China and Vietnam were studied. SRB method was used to detect the activity of antitumor cells, agar diffusion and plate confrontation methods were used to test antimicrobial activities, Polymerase Chain Reaction was used to detect NRPS, PKS-I and PKS-II genes, and the taxonomic studies of the five selected active strains were performed using 16S rRNA gene analysis. Eight media were designed to cultivate five selected active strains and the antimicrobial activities of their fermented extraction were detected by oxford-cup test against ten pathogenic bacteria and three pathogenic fungi, the antitumor activities were measured by MTT assay in two tumor cell lines. As a result, four of the five active strains were classified as *Streptomyces* spp. and the remaining one as *Nocardioides* sp. Different media resulted in different activities, most media of strain S04 showed strong activities against eight pathogens and the inhibition rate of the fermentation product of S04 in Medium C on Hep G2 cell line was up to 100%, which could be a novel resource for the mining of bioactive compounds for further studies.

**Key words:** *Dracaena cochinchinensis*, endophytic actinomycetes, antimicrobial activities, antitumor activities, 16S rRNA gene analysis

微生物来源的天然产物在人和动植物疾病中发挥着重要作用,广泛用作抗细菌、抗真菌和抗肿瘤的临床药物,在医药行业和农业方面做出了重要贡献(Katz & Baltz, 2016)。已发现 3 万多种微生物来源的代谢产物中,约有 30% 由放线菌所产生,60% 由真菌产生,10% 由粘细菌产生(Bérdy, 2012; Subramani & Aalbersberg, 2012)。据保守估计,迄今为止从微生物中发现的次生代谢产物数量仅占其基因组所编码总数的 20%~30% (Ikeda et al., 2003),且自然界中至少 90% 以上的微生物资源未被人们认识。现在普遍认为,新生境可能蕴藏新物种,新物种可能拥有新基因,新的基因资源可能决定了代谢机制的多样性和新颖性,从而能极大程度地避免化合物重复发现的问题(Tiwari & Gupta, 2012)。近年来的统计发现,从特殊生境微生物中分离到新的活性物质的概率远高于普通土壤微生物,它们极有可能成为发现新活性先导化合物及新药的重要来源(Bull et al., 2005)。因此,人们把研究目光转向栖息于特殊生境的微生物,如海洋、动植物内生环境、高温热泉、盐湖、洞穴等各种极端环境(Zhang et al., 2013; 张道锋, 2013; 张晓梅, 2014)。

植物内生菌(endophytes)是指那些生活史的部分或全部阶段生活于健康植物组织内部的真菌或细菌,宿主植物不表现出病症,可通过组织学方

法或从严格表面消毒的植物组织中分离或从植物组织内直接扩增出微生物 DNA 的方法来证明其内生(朱文勇, 2013)。内生菌是一类非常重要的微生物资源,它们具有独特的分化和发育过程,使其能够适应植物内部这个特殊的环境,同时它们还能够编码产生多种生物活性物质,被广泛应用于医药、工业、农业、食品以及环保等领域。内生菌和高等植物经长时间的协同进化,为适应宿主体内微环境,允许自身与宿主植物之间进行基因信息的交流转移,使得自身发生遗传变化,使某些内生菌产生抗生素、植物生长激素等生物活性物质,尤其是一些内生菌还获得了产生和宿主植物相同或相似化合物的能力,提示我们从植物内生菌尤其药用植物内生菌中挖掘具有宿主植物相似活性代谢产物的潜力极大。世界范围内对内生菌研究的关注始于 1993 年,Stierle 从短叶紫杉的内生真菌中发现紫杉醇(Stierle et al., 1993),此后喜树碱、鬼臼毒素和长春新碱等抗癌明星药也陆续从其原产植物的内生真菌中发现(Amna, 2006)。内生放线菌次生代谢产物的研究较内生真菌少,典型代表是云南美登木内生放线菌 *Streptomyces* spp.,从中分离得到一系列萜霉素类(naphthomycin K)、巴佛洛霉素类、Ⅲ型聚酮类、大环内酯等类型的新化合物(Lu & Shen, 2007; Li et al., 2008; Yang et al., 2012),大部分具有抗菌或抗肿瘤细胞等活

性。目前已得到的具有多种生物活性的聚酮类化合物和非核糖体多肽类化合物大多由放线菌产生 (Panchanathan et al., 2013)。此外植物内生菌具有产生与宿主同样或不同的活性次级代谢产物的能力,对于新药产生途径以及药用植物的保护都具有重要意义。

剑叶龙血树 (*Dracaena cochinchinensis*) 广泛分布于我国(云南、海南、广西)及其他东南亚国家,被列入我国国家重点保护野生药材物种名录,属国家 II 级保护植物,《中国植物红皮书—稀有濒危植物(第一册)》(1992 年)将其收录为渐危种。龙血树树脂药用,可提取中医传统外伤科用药“龙血竭”,在治疗心血管病、抗炎、抗肿瘤、治疗子宫内膜异位症及止血活血等方面具有较好的疗效。然而,剑叶龙血树生长缓慢,血竭产量低,收获血竭会严重破坏百年生长的植物。本文将研究剑叶龙血树内生放线菌的抗菌和抗肿瘤生物活性,筛选并鉴定活性显著的菌株,并对其发酵条件进行考察,为下一步从中发掘新型抗菌抗肿瘤活性成分奠定基础,并对濒危名贵野生药材剑叶龙血树的保护有一定意义。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌种

1.1.1 内生放线菌 以中国云南西双版纳及越南地区剑叶龙血树植物组织中分离得到的 300 余株内生放线菌为材料,由云南大学云南省微生物研究所提供。

1.1.2 病原指示菌 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC6633)、白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus* 1029)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* ATCC25922)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PA01)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* X 8956)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis* ATCC29212)、曼胞不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii* ATCC19606)、克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumonia* ATCC13883)、白色念珠菌 (*Candida albicans* SC 5314)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、炭黑曲霉菌 (*Aspergillus carbonarius*)、

赭曲霉菌 (*Aspergillus westerdijkiae*),以上菌株均为课题组前期保存。

### 1.2 肿瘤细胞株

人乳腺癌肿瘤细胞株 MCF-7 及人肝癌肿瘤细胞株 Hep G2 购买自美国模式培养物保藏中心 (ATCC, Boulevard, Manassas, VA 20110 USA)。

### 1.3 培养基

1.3.1 病原细菌培养基 LB: tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, agar 15 g, ddH<sub>2</sub>O 1L, pH 7.2~7.6。

1.3.2 病原真菌培养基 沙保氏培养基: glucose 40 g, peptone 10 g, agar 15 g, ddH<sub>2</sub>O 1L, pH 6.0。PDA: potato 200 g (煮沸 20 min 后过滤,取汁弃渣), glucose 20 g, agar 15 g, ddH<sub>2</sub>O 1 L, pH 6.0~7.0。

1.3.3 放线菌活化增殖培养基 YMG: yeast extract 4 g, glucose 4 g, malt extract 10 g, agar 15 g, ddH<sub>2</sub>O 1L, pH 7.2~7.6。

1.3.4 发酵培养基 Medium A: mannitol 20 g, peptone 20 g; Medium B: oat 20 g, trace salt 1 mL; Medium C: potato 200 g (煮沸 20 min 后过滤,取汁弃渣), glucose 10 g; Medium D: yeast extract 4 g, glucose 4 g, malt extract 10 g; Medium E: peptone 2 g, beef extract 3 g, yeast extract 3 g, glycerol 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g, NaCl 1 g; Medium F: soluble starch 10 g, glucose 2 g, yeast extract 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, NaCl 1 g, trace salt 1 mL; Medium G: soluble starch 2 g, glucose 20 g, yeast extract 2 g, peptone 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, NaCl 4 g; Medium H: soluble starch 20 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g。以上培养基均为 1 L, pH7.2~7.6, agar 15 g。

1.3.5 肿瘤细胞培养基 DMEM 培养基。

### 1.4 主要试剂和仪器

蒸馏水,无水乙醇、甲醇、冰乙酸、乙酸乙酯、丙酮等均为分析纯。N-1000 旋转蒸发器 (EYELA, 日本), TH1-300 恒温培养摇床 (上海一

恒科技有限公司),BSA124S 分析天平(德国赛多利斯集团),SW-CJ-2FD 洁净工作台(中国苏州安泰 AIRTECH 公司),ES-315 高压蒸汽灭菌锅(TOMY, 日本),DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),LRH-250 生化培养箱(上海一恒科技有限公司),SK5200H 超声仪(上海科导)。

## 1.5 方法

**1.5.1 内生菌优势菌株的筛选** 放线菌在 YMG 培养基上培养 4 d,用含菌的琼脂块扩散法进行放线菌抗病原细菌活性筛选;用平板对峙法进行抗真菌活性筛选;用 SRB 法测定菌株的细胞毒性。分别用 A3F/A7R(700~800 bp)、K1F/M6R(1 200~1 400 bp)、KsaF/KSaR(613 bp)引物进行 PCR 筛选非核糖体肽合成酶 NRPS 基因及聚酮合酶 PKS-I、PKS-II 基因(Qin et al.,2009)。

**1.5.2 优势菌株的分类分析** 对筛选出的阳性菌株进行基因组提取,利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 PA:5'-CAG AGT TTG ATC CTG GCT-3',PB:5'-AGG AGG TGA TCC AGC CGC A-3'进行 PCR 扩增。扩增条件:94 ℃预变性 5 min;30 个循环(94 ℃变性 1 min,56 ℃退火 1 min),72 ℃延伸 3 min;72 ℃总延伸 6 min。得到的 PCR 产物经 0.8%琼脂糖胶回收后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,得到的序列经 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>)中的 EzTaxon 在线比对服务进行相关标准菌株的相似性搜索,确定菌株的分类学地位,并调出相关放线菌的 16S rRNA 基因序列,随后用 Clustal X 进行序列比对,最终用 MEGA 6 软件 Neighbour-Joining 法构建系统发育树。

**1.5.3 优势菌株产活性代谢产物发酵培养基的优化**

**1.5.3.1 菌株发酵及提取** 内生放线菌接种于 YMG 培养基平板上,28 ℃恒温培养箱倒置培养 3~4 d 做为菌种,挑取适量菌丝分别接于 A-H 培养基(25 mL·plate<sup>-1</sup>),每株菌每种培养基发酵 100 mL,于 28 ℃恒温培养箱倒置培养,14 d 后将琼脂切块于三角烧瓶中,用乙酸乙酯:甲醇:冰乙酸(80:15:5)浸泡过夜提取三遍,把琼脂过滤后在旋转蒸发仪上减压浓缩回收溶剂,用有机溶剂将粗提物转至样品瓶,等溶剂完全挥发后,称

重计算产量,样品备用。

**1.5.3.2 生物活性检测** 病原指示菌分别接种至液体 LB 培养基,白色念珠菌于 28 ℃,其余病原细菌于 37 ℃,220 r·min<sup>-1</sup>震荡培养 18 h。用 LB 液体培养基分别对各指示菌菌液进行梯度稀释,稀释至浓度为 1×10<sup>6</sup>~1×10<sup>7</sup>个·mL<sup>-1</sup>。

采用牛津杯法测定各菌株不同发酵粗提物的体外抗菌活性,指示菌用涂布法或混菌法准备。每个粗提物用 4 mL 丙酮溶解,分别取 50 μL 进行活性测定,取 50 μL LB 培养基做阴性对照,取 50 μL 丙酮做空白对照,取等体积抗生素溶液做阳性对照(病原细菌以 5 μg 利福霉素为阳性对照;白色念珠菌用 20 μg 氟康唑为阳性对照)。白色念珠菌于 28 ℃培养,其余病原细菌于 37 ℃培养,24 h 后用游标卡尺测量抑菌圈的直径大小。

采用 MTT 法对部分发酵产物进行抗肿瘤活性测试。粗筛浓度为 20 μg·mL<sup>-1</sup>,加样 72 h 后观察肿瘤细胞生长状况。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌优势菌株的筛选

对 300 余株分离自剑叶龙血树的内生放线菌进行抗病原细菌、抗病原真菌活性、抗肿瘤细胞活性以及 PKS-I、PKS-II 和 NRPS 基因的研究,拟筛选出兼具多种抗菌活性和肿瘤细胞毒活性,并具有产聚酮类化合物和非核糖体多肽类化合物潜力的菌株。筛选结果表明,五株内生放线菌 S01-S05 整体结果较好,对初筛的 6 种以上病原细菌表现出显著抑菌活性,菌株 S02 和 S04 对 8 种病原细菌的抑制作用较好,抑菌圈直径最高达 38 mm。5 株菌对产毒真菌和肿瘤细胞株的活性以及次级代谢相关基因簇筛选的结果如表 1 所示,S01、S02 和 S05 同时对三株产毒真菌均有抗菌活性;S01 和 S02 中 PKS-I、PKS-II 和 NRPS 三种基因均为阳性;S02 发酵液粗提物对 Hep G2 和 MCF-7 细胞株有显著抑制活性,IC<sub>50</sub>值分别为 10 和 3 μg·mL<sup>-1</sup>。

### 2.2 优势菌株 16S rDNA 序列扩增及系统发育学分析

对初筛出的 5 株优势菌株提取基因组后进行 16S rRNA 基因测序,将所得序列在数据库中进行

表 1 5 株菌的抗真菌抗肿瘤活性及 3 种次级代谢产物表达关键酶基因簇检测

Table 1 Antifungal activities, PKS-I, PKS-II, NRPS genes presentation and cytotoxicities of the five selected actinomycetes

菌株编号 Strain code	抗真菌活性 Antifungal activities			生物合成基因 Biosynthetic gene			细胞毒活性 Cytotoxicity (IC <sub>50</sub> , μg · mL <sup>-1</sup> )	
	A	B	C	PKS-I	PKS-II	NRPS	Hep G2	MCF-7
S01	+	+	+	+	+	+	56	120
S02	+	+	+	+	+	+	10	3
S03	-	-	-	+	+	-	688	870
S04	+	-	+	+	+	-	1 721	695
S05	+	+	+	-	+	-	691	623

注: A. 禾谷镰刀菌; B. 赭曲霉菌; C. 炭黑曲霉菌; +. 有活性; -. 无活性。

Note: A. *Fusarium graminearum*; B. *Aspergillus westerdijkiae*; C. *Aspergillus carbonarius*; +. Positive activity; -. Negative activity.

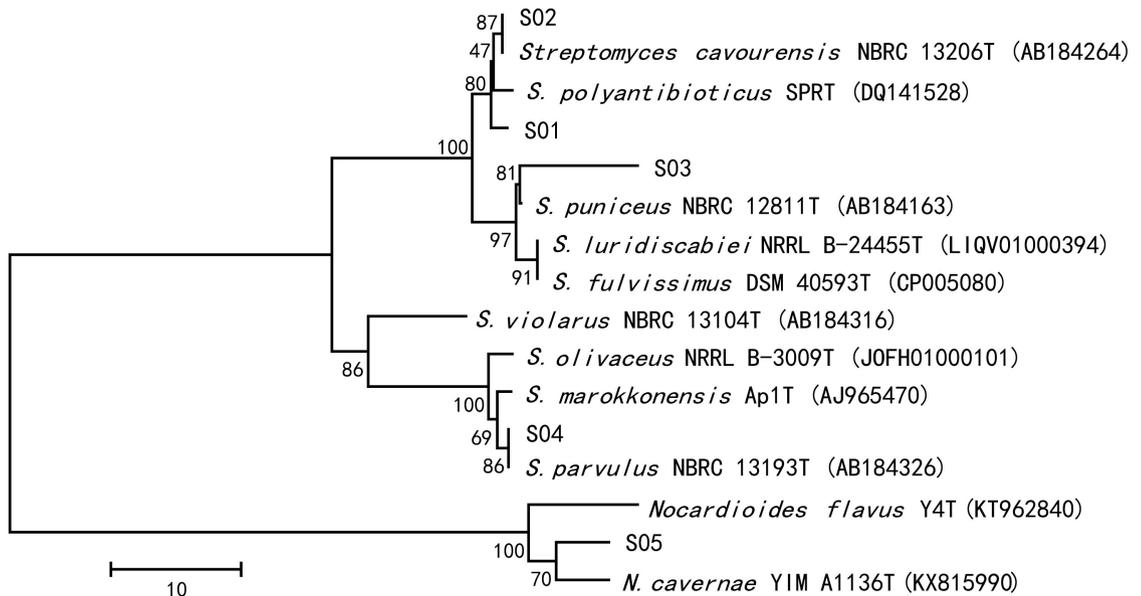


图 1 5 株优势菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing relationship of the five selected endophytic actinomycetes

同源性搜索,结果表明,菌株 S01 与 *Streptomyces cavourensis* (AB184264) 的序列相似性最高,为 99.7%; 菌株 S02 与 *Streptomyces cavourensis* (AB184264) 的序列相似性最高,为 100.0%; 菌株 S03 与 *Streptomyces puniceus* (AB184163) 的序列相似性最高,为 98.66%; 菌株 S04 与 *Streptomyces parvulus* (AB184326) 的序列相似性最高,为 100.0%; 菌株 S05 与 *Nocardioidea cavernae* (KX815990) 的

序列相似性最高,为 98.26%。构建系统发育树后,5 株菌分别与其比对相似性最高的菌株位于同一系统发育分枝上(图 1)。综合同源性比对结果及系统发育分析,并结合各自培养特征,菌株 S01、S01、S03 和 S04 为链霉菌,菌株 S05 为类诺卡氏菌。

### 2.3 优势菌株发酵培养基筛选

不同发酵条件对菌株次级代谢产物有显著影

表 2 剑叶龙血树内生放线菌不同培养基的发酵产量

Table 2 Yields of extract produced by the endophytic actinomycetes from *Dracaena cochinchinensis* in different fermented media

菌株编号 Strain code	不同培养基发酵产量 Yields in different fermented media (mg · 100 mL <sup>-1</sup> )							
	A	B	C	D	E	F	G	H
S01	81.10	74.00	45.90	37.50	34.30	43.60	79.30	20.30
S02	50.30	73.00	55.00	53.40	48.30	42.10	109.70	22.50
S03	60.50	98.20	105.00	43.70	20.90	26.70	27.50	12.60
S04	30.30	52.60	55.70	20.80	21.50	10.70	32.90	12.50
S05	30.00	74.60	47.80	39.50	17.20	36.70	21.60	11.70

响,设计 8 种培养基对筛出的 5 株阳性菌株分别进行小量发酵,结合菌株长势,发酵提取物产量及抗菌活性综合确定菌株高产活性代谢产物的发酵培养基。不同培养基发酵粗提物产量如表 2 所示,综合来看,8 种培养基中 C 培养基的产量和长势相对于其他培养基较好,菌株在 A 和 H 培养基上生长状况较差;且菌株在不同培养基产色素不同,预示不同培养基产生不同代谢产物。

5 株剑叶龙血树内生放线菌不同培养基发酵产物抑菌活性筛选结果见表 3。5 株内生菌的发酵提取物对 8 种或以上测试菌有不同程度的抑菌活性,菌株 S4 抑菌活性较强,S02 和 S03 次之,S01 和 S05 活性较弱;其中所有菌株的各种发酵提取物对鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* X 8956) 均无抑制作用,对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PA01) 仅有菌株 S04 的 C 培养基发酵产物表现出活性,抑菌圈直径为 12.06 mm,故以上两株病原菌的情况未在表中列出。从表中可以看出,大多数菌株的 B、C、D、E、F、G 6 种培养基发酵提取物抑菌活性较 A 和 H 两种培养基发酵提取物强。

对菌株不同培养基发酵提取物进行体外细胞毒活性测试结果表明,S04C (为菌株 S04 在 Medium C 中的粗提物的简写,下同) 对人肝癌 Hep G2 细胞株具有较强的抑制作用,抑制率达到 100%;S01C 和 S02C 具有中等强度的抑制作用,抑制率为 60%,其余发酵产物表现出微弱或无抑制作用。

以上结果表明,5 种优势菌株在 C 培养基中的长势、发酵粗提物产量及活性相对于其他培养基较好,可作为下一步对目标菌株活性成分挖掘的目标发酵培养基。

### 3 讨论

从剑叶龙血树内生放线菌菌种库的 300 余株内生菌中筛选出 5 株兼具抗多种病原菌和细胞毒活性且 NRPS、PKS 基因簇阳性的菌株,并以 10 株临床常见的致病菌:白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、鲍曼不动杆菌、克雷伯氏菌、粪肠球菌、白色念珠菌、鼠伤寒沙门氏菌和铜绿假单胞菌以及人乳腺癌肿瘤细胞株、人肝癌细胞株为靶标,对这 5 株菌高产活性成分的发酵培养基进行优化,确定其最佳培养基,为下一步从目标菌株中挖掘活性成分奠定了基础。

药用植物内生放线菌是新天然产物及活性物质发掘的重要源泉,本研究筛选出的 5 株优势菌经分类鉴定为 2 个属的 4 个种,其中 S01-S04 为链霉菌属,链霉菌是放线菌中资源最多,产生抗生素种类最多的一个属,部分目标菌株来源于其他环境的同种菌株已有产生活性成分的报道 (Su et al., 2013; Prakasham et al., 2014; Pan et al., 2015; Aehtesham et al., 2018), 可见筛选出的活性内生链霉菌具有产生多种活性成分潜力,但本研究的目标菌株来源于传统药用植物剑叶龙血树内生,这个特殊的新环境能否产生有别于其他环境菌株

表 3 剑叶龙血树内生放线菌发酵提取物对病原菌的抑菌活性

Table 3 Antimicrobial activities of endophytic actinomycetes from *Dracaena cochinchinensis* in different fermented media

菌株编号 Strain code	培养基 Medium	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)							
		a	b	c	d	e	f	g	h
S01	A	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	8.01	9.28	-	-	8.84	-	9.82	30.74
	C	12.13	13.27	10.95	-	10.27	10.84	11.14	25.40
	D	14.57	10.53	10.03	-	8.76	8.36	8.88	20.34
	E	10.29	10.37	11.34	-	8.42	-	11.58	13.63
	F	11.34	10.51	-	-	11.85	11.02	12.66	28.20
	G	13.68	13.89	-	12.89	12.64	10.68	12.52	13.68
	H	-	8.26	8.79	-	-	-	9.27	12.36
S02	A	10.80	-	11.62	-	-	-	-	9.90
	B	20.98	20.69	21.60	13.21	17.82	17.42	18.89	22.11
	C	20.12	21.98	21.35	13.06	17.98	17.72	18.64	19.65
	D	17.73	10.90	14.73	-	13.93	11.65	12.05	17.54
	E	10.43	-	-	-	-	9.76	-	-
	F	15.90	16.54	13.75	-	-	13.95	12.15	30.61
	G	17.38	15.26	19.42	13.87	12.03	14.07	15.48	25.40
	H	9.49	-	-	-	8.34	-	8.46	13.73
S03	A	8.13	-	-	-	-	-	-	-
	B	16.35	16.69	15.36	18.46	18.35	18.33	16.54	13.56
	C	17.89	18.11	15.81	18.68	17.11	16.35	15.33	13.07
	D	16.30	15.92	15.52	15.32	15.98	13.30	14.78	14.92
	E	14.40	16.17	16.61	15.89	16.83	15.77	22.50	14.14
	F	13.74	15.79	14.47	10.12	14.05	15.48	16.14	9.67
	G	15.47	13.81	14.34	15.64	14.01	14.15	15.48	-
	H	8.37	-	-	-	-	-	1.00	-
S04	A	11.46	15.50	12.34	12.30	10.26	-	13.99	-
	B	25.70	28.21	27.64	23.50	23.40	20.02	23.51	-
	C	25.83	28.08	25.94	23.86	22.98	20.87	23.65	-
	D	23.96	25.07	25.10	23.20	22.43	19.17	21.38	-
	E	19.02	21.12	22.37	21.07	18.91	18.93	19.48	-
	F	22.40	23.29	23.38	21.34	20.25	20.81	21.08	-
	G	28.34	28.35	25.47	23.95	22.62	25.00	32.61	-
	H	20.16	23.93	21.12	23.62	17.13	18.42	17.49	-
S05	A	15.05	15.60	15.50	13.54	13.31	17.04	12.04	-
	B	12.53	10.71	13.33	-	11.32	-	8.55	12.27
	C	16.56	11.76	15.03	13.38	11.71	14.23	13.97	13.58
	D	12.63	10.94	11.66	-	-	10.04	8.86	16.01
	E	11.80	11.86	10.05	-	8.13	9.52	8.66	16.90
	F	10.81	11.85	10.88	-	9.63	8.60	9.07	21.92
	G	10.31	17.98	-	10.50	9.25	9.12	12.65	17.07
	H	10.60	11.03	-	-	-	-	-	14.91

注: 病原指示菌 a-h 依次为白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、鲍曼不动杆菌、克雷伯氏菌、粪肠球菌、白色念珠菌。“-”表示抑菌圈直径为 0。

Note: a-h are *Staphylococcus albus* 1029, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Candida albicans* SC5314, respectively. “-” means the diameter of the bacteriostatic circle is 0.

的活性成分还有待于进一步研究;从本研究的结果来看,S01 和 S02 两株菌鉴定为同一个种,但它们在抗菌抗肿瘤活性以及不同培养基的生长情况差异显著,提示我们这两个同种不同个体的菌株可能含有不一样的活性成分,许多研究也有类似的报道。基于此,有望从中挖掘结构或活性新颖的天然产物。此外,菌株 S05 属于稀有放线菌类诺卡氏菌属,与其相似性最高的菌株 *Nocardioides cavernae* YIM A1136 为 Han et al. (2017)报道的新物种,尚无次生代谢活性成分相关研究,可将其列为优先研究的对象。

剑叶龙血树内生放线菌具有较好的抑菌和抗肿瘤活性,发酵条件明确,菌株易培养且菌种稳定,开发利用前景广阔,部分菌株活性代谢产物的挖掘工作正在积极进行中。

## 参考文献:

AEHTESHAM H, MUZAFAR AR, QAZI PH, et al., 2018. *Streptomyces puniceus* strain AS13, Production, characterization and evaluation of bioactive metabolites: A new face of dinactin as an antitumor antibiotic [J]. *Microbiol Res*, 207: 196–202.

AMNA T, PURI SC, VERMA V, et al., 2006. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anti-cancer alkaloid camptothecin [J]. *Can J Microbiol*, 52 (3): 189–196.

BERDY J, 2012. Thoughts and facts antibiotics; Where we are now and where we are heading [J]. *J Antibiot*, 65: 385–395.

BULL AT, STACH JE, WARD AC, et al., 2005. Marine actinobacteria: Perspectives, challenges, future directions [J]. *Anton Leeuwenhoek J Microbiol*, 87 (1): 65–79.

HAN MX, FANG BZ, LI WJ, et al., 2017. *Nocardioides cavernae* sp. nov., an actinobacterium isolated from a karst cave [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67(3): 633–639.

IKEDA H, ISHIKAWA J, HANAMOTO A, et al., 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* [J]. *Nat biotechnol*, 21(5): 526–531.

KATZ L, BALTZ RH, 2016. Natural product discovery: Past, present, and future [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 43(2–3): 155–176.

LI J, LU CH, SHEN YM, et al., 2008. Novel polyketides isolated from *Streptomyces* sp. [J]. *Helv Chim Acta*, 91: 741–745.

LU C, SHEN Y, 2007. A novel ansamycin, naphthomycin K

from *Streptomyces* sp. [J]. *J Antibiot*, 60(10): 649–53.

PAN HQ, YU SY, WANG SJ, et al., 2015. Identification and characterization of the antifungal substances of a novel *Streptomyces cavourensis* NA4 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 25(3): 353–357.

PANCHANATHAN M, JAYACHANDRAN M, KANNAN S, et al., 2013. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives [J]. *Microbiol Res*, 168 (6): 311–332.

PRAKASHAM RS, SUDHEER KB, JAMAL A, et al., 2014. Production of polypeptide antibiotic from *Streptomyces parvulus* and its antibacterial activity [J]. *Braz J Microbiol*, 45(1): 303–312.

QIN S, LI J, LI WJ, et al., 2009. Solation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China [J]. *Appl Environ Microbiol*, 75 (19): 6176–6186.

STIERLE A, STROBEL GA, STIERLE D, 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 260: 214–216.

SUBRAMANI R, ALBERSBERG W, 2012. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites [J]. *Microbiol Res*, 167 (10): 571–580.

SU SS, TIAN L, PER YH, et al., 2013. Two new compounds from the metabolites of a marine-derived actinomycete *Streptomyces cavourensis* YY01-17 [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 15(3): 265–269.

TIWARI K, GUPTA RK, 2012. Rare actinomycetes: A potential storehouse for novel antibiotics [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 32(2): 108–132.

YANG YH, FU XL, LI LQ, et al., 2012. Naphthomycins LN, ansamycin antibiotics from *Streptomyces* sp. CS [J]. *J Nat Prod*, 75: 1409–1413.

ZHANG XM, ZANG DF, LI WJ, et al., 2013. *Marininema halotolerans* sp. nov., a novel thermoactinomycete isolated from a sediment sample, and emended description of the genus *Marininema* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63(12): 4562–4567.

ZHANG DF, 2013. Diversity of culturable bacteria and activities of amylase and cellulase in sedimentary environment of Northern South China Sea [D]. Kunming: Yunnan University. [张道锋, 2013. 南海北部沉积环境可培养细菌多样性及其产淀粉酶和纤维素酶活性研究 [D]. 昆明: 云南大学.]

ZHANG XM, 2014. Study on secondary metabolites of five rare marine actinomycetes [D]. Kunming: Yunnan University. [张晓梅, 2014. 五株海洋稀有放线菌次级代谢产物研究 [D]. 昆明: 云南大学.]

ZHU WY, 2013. Study on secondary metabolites of three endophytic bacteria [D]. Kunming: Yunnan University. [朱文勇, 2013. 三株内生菌次生代谢产物研究 [D]. 昆明: 云南大学.]