

学校编码: 10384
学 号: 21720081152538

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

台湾海峡专性海洋放线菌筛选、鉴定和次级 代谢产物研究

Isolation, Identification and Secondary Metabolites

Investigations of the Obligate Marine Actinomycetes from
Taiwan Strait

刘节喜

指导教师姓名: 郑忠辉教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2011年05月

论文答辩日期: 2011年06月

学位授予日期: 2011年06月

答辩委员会主席: 黄耀坚教授

评 阅 人:

2011年06月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
1. 专性海洋放线菌及其海洋放线菌新种属生物多样性研究.....	1
1.1 专性海洋放线菌生物多样性.....	2
1.2 海洋放线菌新种属生物多样性.....	4
2 专性海洋放线菌生物活性物质研究.....	6
2.1 海洋专性放线菌—— <i>Salinispora</i> 属生物活性物质研究.....	6
2.2 <i>Marinispora</i> 属菌株次级代谢产物研究.....	16
2.3 其他专性海洋放线菌次级代谢产物研究.....	20
3 本课题的研究目的、意义及内容.....	22
材料与方法.....	23
1 材料.....	23
1.1 土样来源.....	23
1.2 常用培养基.....	23
1.3 常用测活性指示菌和细胞株.....	26
1.4 海洋稀有放线菌选择性分离用抗生素及抑菌剂.....	27
1.5 常用试剂及配制.....	27
1.6 主要试剂及常用耗材.....	29
1.7 主要仪器.....	29
2 方法.....	31
2.1 技术路线.....	31
2.2 海洋稀有放线菌的分离.....	31
2.3 菌株的纯化及保种.....	32
2.4 专性海洋放线菌筛选.....	34
2.5 海洋放线菌 16S rDNA 序列分析.....	36
2.6 海洋放线菌固体液体发酵及粗提物的制备.....	38

2.7 生物活性测定	39
2.8 天然产物的分离纯化	41
2.9 化合物的结构鉴定	43
结果与分析	44
1 海洋放线菌的分离及海水依赖性的测定	44
1.1 海洋放线菌的分离	44
1.2 海洋放线菌海水依赖性测定	45
2 生物活性菌株的筛选	46
2.1 抗菌活性初筛	46
2.2 抗菌活性复筛	50
2.3 体外抗肿瘤活性测定	51
3 菌株初步分类鉴定	53
3.1 活性菌株的 16S rDNA 序列分析	53
3.2 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析	54
4 专性海洋放线菌的复筛	56
4.1 菌株的分子鉴定	56
4.2 专性海洋放线菌(<i>Salinispora</i>)形态观察	57
4.3 不同盐浓度对四株专性海洋放线菌生长及抗菌和抗肿瘤活性的影响 ..	58
5 两株专性海洋放线菌 (<i>Salinispora</i> 属) 次级代谢产物研究	61
5.1 菌株 46 次级代谢产物研究	61
5.2 菌株 196 次级代谢产物研究	79
讨论与结论	90
讨论	90
1.1 台湾海峡沉积物中稀有放线菌多样性及生物活性	90
1.2 菌株 46 次级代谢产物的分离鉴定	91
1.3 菌株 196 次级代谢产物的分离鉴定	93
结论与展望	94
参 考 文 献	97
附 录	103

附录 1 液体小量发酵抗菌活性结果（豆饼粉培养基）	103
附录 2 液体小量发酵抗菌活性结果（M1 培养基）	105
附录 3 活性菌株的 16Sr DNA 比对结果和 GenBank 登录号	108
致 谢	111

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

ABSTRACT in Chinese	I
ABSTRACT in English	III
Introduction	1
1 The diversity investigations of the obligate marine actinomycete and other new genus	2
1.1 The diversity of the obligate marine actinomycete.....	4
1.2 The diversity of the new genus marine actinomycete.....	4
2 The investigation of bioactive compound from the obligate marine actinomycete	6
2.1 The investigation of bioactive compound from <i>Salinispora</i> strains	6
2.2 The investigation of bioactive compound from <i>Marinispora</i> strains	16
2.3 The investigation of second metabolites from other marine actinomycetes..	20
3 Purpose、 contents and significane of this thesis	22
Materials and Methods	23
1 Materials	23
1.1 Marine sediment samples.....	23
1.2 Medium	23
1.3 The indicator bacteria and tumor cell line	26
1.4 Antibiotics and antibacterial agents	27
1.5 Reagents and preparation	27
1.6 Main reagents and disposable materials	29
1.7 Main instruments	29
2 Methods	31
2.1 Technology rout	31
2.2 Isolation of marine actinomycete.....	31
2.3 Purification and preservation of marine actinmycete	32
2.4 Rescreening of the obligate marine actinomycetes.....	34
2.5 Phylogenetic analysis of marine actinomycete	36
2.6 Fermentation and preparation of crude extract about marine actinomycetes	38

2.7 Antibiotic activity.....	39
2.8 Isolation of secondary metabolites.....	41
2.9 Identification of compounds	43
Results and Analysis	44
1 Isolation of marine actinomycetes and seawater-dependent Assay	44
1.1 Isolation of marine actinomycetes	44
1.2 Marine actinomycetes grow on seawater-dependent Assay.....	45
2 Screening of bioactivities strains	46
2.1 Preliminary Antimicrobe Assay	46
2.2 Rescreening Antimicrobe Assay	50
2.3 The cytotoxicity activities Assay	51
3 Preliminary identification of marine actinomycete	53
3.1 16S rDNA sequences analysis about the bioactivities strains.....	53
3.2 Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences	54
4 Rescreening of the obligate marine actinomycetes	56
4.1 16S rDNA sequences analysis about the obligate marine actinomycetes.....	56
4.2 Morphology of the obligate marine actinomycete	57
4.3 Effects of different salinity on Salinispora strains growth and bioactivity....	58
5 Secondary metabolite investigations of two Salinispora strains.....	61
5.1 Secondary metabolite study of strain 46.....	61
5.2 Secondary metabolite study of strain 196.....	79
Discussion and Conclusion	90
1 Discussion.....	90
1.1 The diversity and bioactivity of novel actinomycetes from Taiwan Strait ...	90
1.2 Identification of compounds from strain 46.....	91
1.3 Identification of compounds from strain 196.....	93
2 Conclusion	94
References.....	97
Appendix	103
Appendix 1 The antibacterial results of extract from soybean medium	103
Appendix 2 The antibacterial results of extract from M1 medium.....	105
Appendix 3 The Blast results and GenBank accession number	108
Acknowledgements.....	111

摘要

天然产物是药物的重要来源。海洋具有高压、低温、高盐度等极端环境，生活在其中的海洋放线菌已发展出独特的代谢方式，这不仅确保其在极端环境中生存，也提供了产生新颖次级代谢产物的潜力。现已从专性海洋放线菌中分到了很多结构新颖、生物活性广泛的新化合物，为新药物的发现提供了宝贵的先导化合物资源。

本论文从采集自台湾海峡的海洋沉积物中分离、筛选专性海洋放线菌以及具有生物活性的海洋放线菌，并对专性海洋放线菌的次级代谢产物进行初步研究，旨在发掘海洋放线菌资源及先导药物，为创制新型微生物药物奠定基础。

采用选择性分离方法，从9份海洋沉积物中分离到243株海洋放线菌，其中小单孢菌样215株，占88.5%。对450株海洋放线菌进行海水依赖性测定，考察盐分对海洋放线菌的生长及活性的影响，发现菌株23、46、174、196、S02和X08等6株菌为严格海水依赖性菌株；采用琼脂块法，对这些菌株的抗菌活性进行初筛，结果显示，79.9%的菌株对一种或多种指示菌有抑制作用。

根据初筛结果，进一步对100株菌株进行两种不同液体培养基发酵，并对发酵液粗提物的抗菌、抗肿瘤活性进行测定，结果表明，对8种指示菌中的一种或者多种具有抗菌活性的菌株占90%，对HeLa和/或HepG2细胞有显著抑制作用的菌株占36%。

根据抗菌、抗肿瘤活性测定结果，挑选74株菌进行16S rDNA序列分析，发现这些菌株分布于*Micromonospora*、*Verrucosisspora*、*Solwaraspora*、*Salinispora*和*Streptomyces*等5个属中，其中小单孢菌属（*Micromonospora*）的菌株数量最多，占供测菌株59%，专性海洋放线菌有6株，都归属于*Salinispora*。

考察不同盐梯度对4株专性海洋放线菌生长状况及生物活性影响，发现4株菌在含100%海盐浓度及天然海水的培养基上均长势最好，生物活性测定结果显示，海盐浓度对供测菌株的抗菌、抗肿瘤活性也具有显著的影响。

选取两株专性海洋放线菌46和196菌株进行次级代谢产物研究，从菌株46发酵产物中分离纯化并鉴定了4个化合物，其中3个为已知化合物（**ljx-3**、**ljx-6**和

ljx-9), 1个新化合物 (**ljx-11**)。从菌株196的发酵产物中分离鉴定了4个化合物, 其中有3个是新化合物 (**ljx-14**、**ljx-15**和**ljx-27**), 1个为已知化合物 (**ljx-36**)。

化合物生物活性测定结果表明, 化合物**ljx-3**、**ljx-6**、**ljx-14**、**ljx-15**、**ljx-36** 在浓度为20 μg /片时对金黄色葡萄球菌均具有较强的活性, 其中**ljx-15**在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对HeLa和HepG2抑制率分别为47.2%和31.4%。

研究表明, 台湾海峡沉积物中药用放线菌资源丰富, 尤其是蕴藏于其中的专性海洋放线菌具有较强的抗菌、抗肿瘤活性, 并能产生一些结构新颖的次级代谢产物, 是研究开发微生物药物的重要资源。

关键词: 专性海洋放线菌; 抗菌活性; 抗肿瘤活性; 次级代谢产物

ABSTRACT

The nature products were the important source of the medicine. As marine environmental with high-pressure、low temperature、high salinity, marine actinomycetes have developed unique metabolic way, it is not only ensure its survival in extreme environments, but also provides the potential to produce novel antibiotics. From the secondary metabolites of the obligate marine actinomycetes (such as *Salinispora*), a lot of compounds with new structures and great bioactive diversities have been found. So the study of obligate marine actinomycetes is the effective method for the development of medicine finding.

In this thesis, sediment samples from different sities of Taiwan Strait were used for selective isolation of obligate marine actinomycetes and active marine actinomycetes. With the preliminary investigations of secondary metabolites, we are intended to search for novel structure and bioactive compounds.

243 marine actinomycete strains were separated from 9 sediment samples using selective isolation methods and different pretreatments. Among which, 215(81.5%) were *Micromonospora*-lik strains. 450 strains were screened for growth with seawater-dependent assay. It was studied that the salinity effect of strain growth and bioactivity. Six strains of all tested grew equally well on medium prepared with M1/SW but not detectable growth on M1/DI water. It was proved that they displayed an obligate requirement of seawater for growth. Fermentations from cultured strains grew on the M1 media were tested using agar block methods to preliminary screen their antimicroble activity, 79.9% of total strains had shown the inhibition at laest one kind of indicator bacterium.

According to the results of the preliminary antimicrobial, Extracts from 100 strains were cultured on two media (M1 and soybean medium). Most of them showed activity against at least one kind of indicator bacterium, which was accounting for 90%. MTT method was used to detect the cytotoxicity activities of 100 marine actinomycetes. Results showed that, when at 50 $\mu\text{g/mL}$, 36 strains inhibited the growth either HeLa or HepG2, while 22 inhibited the growth of HeLa, 29 strains inhibited the growth of HepG2.

Phylogenetic analyses of the nearly complete 16S rDNA sequences of 74 strains indicate that they form a coherent clade within five genus, such as *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Solwaraspora*, *Salinispora* and *Streptomyces*. Among which, the number of *Micromonospora* strains was the largest, accounting for 59% of measured strains. Six of them were attribution to *Salinispora* genus.

The assay about the salinity effects on four obligate marine actinomycetes growth and bioactivities. Four strains did grow best on M1 medium with 100% Instant Ocean and nature seawater. The bioactivities results showed that salt concentration has a significant impact on the measured strains for antibacterial and anti-tumor activity.

In the studies of the secondary metabolites from two *Salinispora* strains 46 and 196. From strain 46 fermentation products, four compounds (**ljx-3**, **ljx-6**, **ljx-9**, **ljx-11**) including one new compound (**ljx-11**) were isolated. From strain 196 fermentation products, four compounds (**ljx-14**, **ljx-15**, **ljx-27**, **ljx-36**) including three new compounds (**ljx-14**, **ljx-15**, **ljx-27**) were isolated. In the tests of antimicrobial activities, several compounds showed strong activities, such as: **ljx-3**, **ljx-6**, **ljx-15**, **ljx-36**. Among them compound **ljx-15** showed moderate cytotoxicity activity. The inhibition against HeLa and HepG2 were 47.1% and 31.4% separately when at 10 $\mu\text{g/mL}$.

Our study indicated that medicinal-actinomycetes from Taiwan Strait sediment are tremendous, the obligate marine actinomycetes have significant antimicrobial and cytotoxicity activities. So they have the potential to yield novel structure, which made them the crucial source in the study of natural products.

Key words: Marine actinomycetes; seawater-dependent strains; antibiotic and cytotoxicity activities; Secondary metabolites

前言

1 专性海洋放线菌及其海洋放线菌新种属生物多样性研究

放线菌是一类数量大, 种类多, 具有分枝状菌丝体的高(G+C) mol%的革兰氏阳性细菌。许多放线菌的次级代谢产物具有医药和植物保护方面的用途, 已广泛用作抗细菌、抗真菌和抗肿瘤药物。现已发现的数万种微生物来源的生物活性物质中, 约有70%是由放线菌合成的^[1]。包括抗菌抗肿瘤物质^[2]、免疫抑制剂^[3, 4]及各种酶类^[4]。目前分离得到的绝大多数放线菌都来源于土壤, 陆生放线菌产生的抗生素占天然来源抗生素的三分之二以上。然而, 随着病原微生物对抗生素抗性的日益增加, 肿瘤发病率逐渐提高, 寻找具有新型作用机制的抗生素已迫在眉睫。近20年来, 从陆生放线菌中分离得到的先导化合物的数量锐减, 于是人们把目光投向了更为广阔的生境——海洋^[5]。海洋占地球面积的70%, 海洋微生物无论从数量还是多样性方面来说都是巨大的。

海洋放线菌的生活环境十分特殊, 如: 高盐度、高压、低营养、低温及与不同生物之间的关系等^[6]。在这些所谓生命的极限环境中, 海洋放线菌已形成独特的代谢方式, 这不仅确保其在极端环境中生存, 也提供了产生新颖抗生素的潜力。因此海洋环境将成为放线菌开发的重要新来源。

虽然人们普遍认为海洋放线菌是陆地土壤中放线菌休眠孢子流入海洋里再生的结果^[7], 但越来越多研究表明海洋环境中确实存在着专性海洋放线菌 (obligate marine actinomycetes) 或海洋固有的放线菌 (Indigenous marine actinomycetes)。1984年 Helmke 等人首次从海洋沉积物土样中分离得到一株专性海洋放线菌, 并鉴定为新种 *Rhodococcus marinonascens*^[8]。此后, 随着不断深入的研究, 越来越多的专性海洋放线菌被发掘。目前已发现的专性海洋放线菌包括 *Salinispora*, *Marinospora* 属及 *Salinibacterium*, *Aeromicrobium*, *Williamsia*, *Demequina*, *Verrucosispora*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* 等属中的一些种。此外, 利用 16S rDNA 序列分析, 还发现深海沉积物存在的放线菌分类单元大于 1300 个, 并且大部分都是前所未有的新种甚至新属^[9]。

1.1 专性海洋放线菌生物多样性

1991 年 Jensen 等人从海洋沉积物中分离到一类依赖海水生长的海洋放线菌 MAR1^[10]，随后利用分子生物学技术进行分析发现与陆地放线菌有明显的区别，直到 2002 年对其 16S rDNA 序列分析表明它们是小单孢菌科的一个新属^[11]，将 MAR1 群菌株定为盐生孢菌属 (*Salinispora*)，这是第一个被发现的专性海洋放线菌属。该属广泛存在于热带、亚热带的海洋沉积物中，此外在海洋动植物体内也有发现，如 2005 年 Tae 等从采自大堡礁的一株海绵 *Pseudoceratina clavata* 中也分到了这个属的菌株^[12]。现已分离得到 *Salinispora* 属菌株有 2500 多株，该属目前已经确定了三个种分别为 *Salinispora tropica*、*Salinispora arenicola*^[13]和 *Salinispora pacifica*^[14]。

Salinispora 属菌株的发现，证实了海洋环境中存在海洋特有的放线菌种群。为专性海洋放线菌的研究提供了充足的证据。2005 年 Paul 等人又从加利福尼亚海 56 m 深的海洋沉积物中筛选分离得到 MAR2，基于 16S rDNA 序列发育系统分析 (图 1) 是链霉菌科的一个新属^[15]，命名为 *Marinispota* 属，是继 *Salinispora* 属之后又一专性海洋放线菌。虽然对 *Marinispota* 属菌株没有进行种的分类，但从图 1 可以看出 *Marinispota* 属在系统发育树上处于三个不同分支上，表明该属至少存在三个种。目前已从不同的采集地点的海泥样品中分离得到了 20 株本属菌株，表明 *Marinispota* 属在海洋环境中也是广泛存在的。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库