

李菲, 李喆, 胡文进, 等. 广西茅尾海红树林土壤放线菌多样性及功能酶活性研究[J]. 海洋学报, 2021, 43(2): 88–97, doi:10.12284/hyxb2021010
Li Fei, Li Zhe, Hu Wenjin, et al. Biodiversity and functional enzymes of actinomycetes isolated from mangrove soil in the Maowei Sea, Guangxi[J]. Haiyang Xuebao, 2021, 43(2): 88–97, doi:10.12284/hyxb2021010

广西茅尾海红树林土壤放线菌多样性 及功能酶活性研究

李菲¹, 李喆², 胡文进³, 黄庶识², 刘泾泾⁴, 黄媛林², 王巧贞², 潘信利^{2*}

(1. 广西科学院 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西科学院 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室, 广西南宁 530007; 3. 广西科学院 国家非粮生物质能源工程技术研究中心/非粮生物质酶解国家重点实验室/广西生物炼制重点实验室/广西生物质工程技术研究中心, 广西南宁 530007; 4. 北京理工大学 材料学院, 北京 100081)

摘要: 研究广西茅尾海红树林自然保护区内红树林土壤中可培养放线菌的多样性, 挖掘具有高产多种功能酶活性的放线菌类群。应用可培养技术和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析研究红树林土壤中可培养放线菌的多样性; 并以 10 种酶活底物为指示物, 结合点植法和透明圈法对可培养的放线菌进行功能酶活性筛选。结果显示, 从红树林土壤中共分离到 444 株放线菌, 隶属于 6 目 13 科 24 属 63 种, 其中 3 株放线菌为潜在新种。从 63 株不同种的放线菌中筛选出 56 株放线菌在至少 1 种功能酶活性检测中显示阳性, 总阳性率为 88.89%; 其中具有 2 种以上功能酶活性的放线菌 31 株, 链霉菌属、微杆菌属和短小杆菌属的产酶菌株最为丰富。综上所述, 广西茅尾海红树林自然保护区内红树林土壤中可培养放线菌的种类丰富多样, 潜藏着放线菌新资源, 且功能酶活性显著, 具有较大的挖掘潜力。

关键词: 广西; 茅尾海红树林; 土壤; 放线菌; 功能酶

中图分类号: Q939.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2021)02-0088-10

1 引言

工业生物催化是以酶应用为核心, 其具有位点和立体专一性的优势, 通过基因克隆、突变和杂交等手段, 用易错 PCR 方法构建突变库, 结合高通量筛选策略来提高酶的活性、稳定性、立体选择性和非水反应性能^[1]。鉴于生物催化的显著优势, 广大学者和研发人员对各种生物功能酶展开深入研究。如黑曲霉 *Aspergillus niger* 963 的植酸酶基因, 重组至毕赤酵母中表达, 其植酸降解产量较原黑曲霉提高 3 000 倍以上^[2];

诺卡氏菌 *Nocardia* sp. YS-2002 发酵腈水合酶活力最高达 6 000 国际单位, 并在大肠杆菌和毕赤酵母中获得表达^[3]。深海热液口嗜热厌氧古细菌热球菌属 *Thermococcus* sp. HJ21 产胞外耐热酸性 α -淀粉酶, 最适温度高达 95℃^[4]; 肇东市日成酶制剂公司黑曲霉酸性 β -甘露聚糖酶, 其酶活力可达 20 000 U/mL, 高于目前生产菌株的 25 倍, 在真菌基因工程菌中处于领先地位^[5]。然而, 随着功能酶制品行业的迅速发展, 进而显露出不少弊端, 主要体现在以下 3 个方面^[1]: (1) 酶的种类单一, 由多种原酶组成的多功能复合酶制剂发

收稿日期: 2020-04-23; 修订日期: 2020-08-10。

基金项目: 国家自然科学基金(31560017); 广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室运行补助项目(20-065-63); 广西科技计划科技基地和人才专项(桂科 AD17129019); 广西科技计划重点研发项目(桂科 AB16380071); 广西科学院基本科研业务费资助项目(2018YBJ303, 2019YBJ101); 广西青年科学基金项目(2018GXNSFBA050021)。

作者简介: 李菲(1988—), 女, 广西省南宁市人, 主要从事海洋微生物资源开发与利用研究。E-mail: finylee@yeah.net

* 通信作者: 潘信利。E-mail: pxl@gxas.cn

展滞后,难以满足市场的需要;(2)酶活力低,产品的提取工艺和设备水平相对落后,导致一些产品的性价比低,缺乏市场竞争力;(3)酶制剂生产过程中产生的“三废”会造成环境污染问题。因此,寻找高产多种功能酶的菌种资源成为解决这一瓶颈的重要方法,并能有效地推动我国酶制剂工业持续健康发展。

红树林作为独特的潮间带生态系统,对保护热带和亚热带的海岸线至关重要^[6]。红树林系统常年受到海水周期性浸淹、波浪、强风、强流、径流、沉积物、污水及废水等因素的影响,形成了复杂的组成成分,加快了能量和物质循环速度,增强了生产力和有机质的降解活性。然而,微生物作为红树林生态系统中种类丰富、数量庞大的组成部分,在碳固定、碳分解、氮固定和硫代谢等物质和能量循环过程中起着关键作用^[7]。此外,红树林微生物长期生活在高温、高盐、强风、缺氧和强紫外线等劣势环境中,其遗传物质随之不断适应和进化^[8],代谢出结构新颖、种类丰富、活性多样的化合物^[9]。研究发现,红树林微生物的代谢产物具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗血栓、抗氧化、细胞毒和杀虫等生物活性^[10-12],且富含淀粉酶、纤维素酶、葡聚糖酶、几丁质酶和蛋白酶等多种功能酶及抗生素类化合物^[13-16]。广西茅尾海红树林自然保护区内为热带过渡海洋性季风气候,海陆交会使物质积累丰富,蕴育着庞大的生物类群。针对这一特殊生境,本研究选取该保护区内的土壤作为研究对象,通过8种分离培养基、分子鉴定和系统发育分析,获得红树林土壤中可培养放线菌的多样性信息。采用点植法和透明圈法,以期获得具有高产多种功能酶活性的菌

株,为从海洋环境中寻找新的微生物资源提供理论依据和实践指导。

2 材料和方法

2.1 实验材料

2.1.1 红树林土壤样本

2018年8月从广西茅尾海红树林自然保护区(21°44'53''N, 108°36'14''E)中采集了3处土壤样本(每处相距5 m,由近岸红树林往外采集)。样品装于密封袋,4℃低温保藏备用。

2.1.2 培养基

1)分离培养基

AGG、M7、P7、M10、M4、M5、M9和P3(表1)。

2)纯化培养基

改良ISP2固体培养基^[17]。

3)酶活筛选培养基

脲酶筛选培养基:尿素 20.0 g,胰蛋白胨 1.0 g,葡萄糖 1.0 g, NaCl 5.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g, 酚红 0.012 g, 琼脂 15.0 g, 去离子水 1 000 mL。酯酶筛选培养基:吐温 20 或吐温 80 10 mL, 胰蛋白胨 1.0 g, 琼脂 15.0 g, 去离子水 1 000 mL。过氧化氢酶和氧化酶活性筛选培养基以改良 ISP2 固体培养基为载体。纤维素酶^[18]、蛋白酶、淀粉酶^[19]、几丁质酶^[20]和褐藻胶裂解酶^[21]筛选培养基参考了对应文献配制。

2.2 实验方法

2.2.1 菌株的分离纯化

将土壤平铺于无菌平皿中,经 65℃ 热风干燥 30 min。称取 2.0 g 样品装于 20 mL 无菌水中摇匀;制成 10⁻² 和 10⁻³ 稀释度的样液,取 200 μL 梯度稀释的样液接种

表 1 分离培养基配方

Table 1 Recipe of media for actinomycetes isolation

培养基	主要成分	其他成分
AGG	可溶性淀粉10.0 g, 葡萄糖1.0 g, 甘油10 mL	复合盐母液10 mL, 琼脂14.0 g, 去离子水1 000 mL, pH7.2~7.4
M7	酵母提取粉5.0 g, L-天门冬酰胺1.0 g, 甘油10 mL	复合盐母液10 mL, 琼脂14.0 g, 去离子水1 000 mL, pH7.2~7.4
P7	L-酪氨酸0.5 g, L-天门冬酰胺1.0 g, 甘油10 mL	复合盐母液10 mL, 琼脂14.0 g, 去离子水1 000 mL, pH7.2~7.4
M10	可溶性淀粉1.0 g, 水解酪素0.5 g	复合盐母液10 mL, 琼脂14.0 g, 去离子水1 000 mL, pH7.2~7.4
M4	L-天门冬酰胺1.0 g, 海藻糖5.0 g, 甘油6 mL	复合盐母液10 mL, 琼脂14.0 g, 去离子水1 000 mL, pH7.2~7.4
M5	海藻糖5.0 g, 脯氨酸1.0 g, 土壤浸出液20 mL	复合盐母液10 mL, 琼脂14.0 g, 去离子水1 000 mL, pH7.2~7.4
M9	精氨酸1.0 g, 甘油6 mL	复合盐母液10 mL, 琼脂14.0 g, 去离子水1 000 mL, pH7.2~7.4
P3	燕麦粉20.0 g	复合盐母液10 mL, 琼脂14.0 g, 去离子水1 000 mL, pH7.2~7.4

注:复合盐母液按如下成分比例配制:KNO₃ 1.0 g, NaCl 2.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NH₄NO₃ 0.1 g, FeSO₄ 0.01 g, MnCl₂·H₂O 0.001 g, ZnSO₄·7H₂O 0.001 g, 去离子水10 mL。

于 8 种复合营养培养基中, 28℃ 培养数天, 及时观察菌株的生长情况, 挑取肉眼可见菌落进行纯化培养, 记录其形态特征和菌落数, 以 30%(V/V) 甘油-ISP2 混合液作为保护剂, 将纯化好的菌株制成冻存管于 -70℃ 条件下以保藏。

2.2.2 16S rRNA 系统发育分析

采用 chelex-100 树脂^[22] 快速提取细菌的 DNA 作为 PCR 模板, 并根据 Walsh 等^[23] 的方法对其进行 PCR 扩增。扩增和测序引物选用 27F 和 1522R, 参照李菲等^[24] 的方法设定 PCR 反应条件。其中, 潜在新菌株的 PCR 扩增产物条带用试剂盒进行切胶回收, 将纯化好的 DNA 连接到 pEASY-T1 克隆载体上, 转化至 Trans-T1 感受态细胞中, 涂布于含氨苄西林的 LB 固体培养基 (蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 14.0 g, 去离子水 1 L), 培养 18~24 h, 观察菌落情况, 挑取阳性克隆子, 用 PCR 法验证克隆的片段大小。扩增产物经 1% 琼脂糖-TAE 凝胶电泳检测合格后, 委托北京擎科新业生物技术有限公司进行测序分析。序列经 BioEdit Sequence Alignment Editor 软件整理后, 利用 EzBioCloud 数据库 (<https://www.ezbiocloud.net/>) 进行在线比对^[25]; 以同源性最高菌株的有效序列作为参比对象, 构建 Neighbor-Joining 系统发育树, 各分支置信值设为 Bootstrap 1 000 次, 对各菌株的系统发育地位进行分析^[26]。

2.2.3 放线菌的酶活性检测

运用点植法将待测放线菌接种于酶活筛选培养基上, 28℃ 恒温培养 1~7 d。用透明圈法初步测定酯酶、蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、几丁质酶和褐藻胶裂解酶活性, 观察培养基上菌苔产生透明圈的情况; 脲酶活性筛选则是观察培养基变色情况, 培养基变桃红色则为阳性, 反之则不变色。过氧化氢酶活性筛选是将 5% 的过氧化氢溶液滴加至每个菌苔, 观察菌苔产气泡的情况, 若产气泡, 则判定菌株具有过氧化氢酶活性。氧化酶活性筛选是将 2% N, N-二甲基对苯二胺二盐酸盐溶液滴加至每个菌苔, 观察菌苔变色情况, 若菌苔在 30 s 内变成紫红色则判定菌株含有氧化酶活性, 反之则无。

3 结果与分析

3.1 红树林土壤放线菌的多样性

广西茅尾海红树林保护区内红树林土壤中共分离到 444 株放线菌, 通过形态、大小和颜色等形态学特征去除部分冗余菌株, 得到 97 株放线菌进一步开展 16S rRNA 基因测序分析, 结果获得 63 种放线菌,

隶属于 6 目 13 科 24 属 (图 1, 表 2)。链霉菌属为优势类群, 即菌种数为 14, 占所获菌种数的 22.22%; 其他均属于稀有放线菌, 共 49 种, 占所获菌种数的 77.78%, 其中微杆菌属有 8 种, 占 12.70%。

根据放线菌 16S rRNA 基因序列相似性小于 98.65% 的菌株属于不同物种的归类原则^[27], 对红树林土壤中分离到的放线菌进行新颖性分析, 3 株放线菌的 16S rRNA 基因序列 (约 1 500 bp) 与其最近缘的典型菌株序列相似性均低于 98.5%。其中, 菌株 Y1190 与微杆菌科的有效发表种 *Agromyces italicus* DSM 16 388^T (AT XF01000012), B2965 和 Y1290 分别与诺卡氏菌科的有效发表种 *Gordonia oryzae* RS15-1S^T (RKMH01000030) 和 *Gordonia sediminis* AMA 120^T (MH013353) 相似性最高, 其相似率分别为 97.42%、98.02% 和 98.35%。基于 16S rRNA 基因序列, 3 株潜在新种与其所在菌科中邻近菌株构建的 Neighbor-Joining、Maximum-Likelihood 和 Maximum-Parsimony 系统进化树, 均能与其相似菌株在进化树上聚为一簇。由此推测, 菌株 Y1190、B2965 和 Y1290 可能分别为微杆菌科和诺卡氏菌科中的潜在新分类单元。需要进一步展开多相分类学鉴定工作, 以确定菌株 Y1190、B2965 和 Y1290 的分类地位。

3.2 不同分离培养基的种属分析

采用 8 种分离培养基, 从红树林土壤中共分离到 63 种放线菌, 分离效果见图 2 和表 3。结果显示, 以菌属数为主, 培养基的分离效果从优到次排序为 P3、P7=M10、M4、M5=M7、AGG、M9; 以菌种数为主, 排序为 P3、M10、P7、M4、M5、M7、AGG=M9; 以菌株数为主, 排序为 M5、M10、P3、M4=P7、AGG、M7、M9。综合 3 个数值分析, P3、M10 和 P7 培养基的分离效果显著, 分离到的放线菌种类和数量均较为丰富; 其中, 短杆菌属、纤维微菌属、假节杆菌属和四折叠球菌属类群仅在 P3 培养基中获得。结合多样性指数分析 (表 3), P3 培养基分离的放线菌多样性最好, 其次是 P7、M10、M4 和 M7 培养基, M5、M9 和 AGG 培养基的分离效果较差。P3 培养基主要以粗燕麦作为能源物质, 富含各种维生素、微量元素和纤维等物质, 但水溶性较差, 属于寡营养培养基。此外, 本研究发现燕麦、甘油和海藻糖可作为分离红树林生境的理想碳源; 脯氨酸、天门冬氨酸和水解酪素为理想氮源。

3.3 放线菌的酶活性筛选结果

以尿素、吐温 20、吐温 80、羧甲基纤维素钠、胶体几丁质、可溶性淀粉和脱脂奶粉等原料作为筛选底物, 对 63 株不同种的放线菌进行功能酶活性筛选

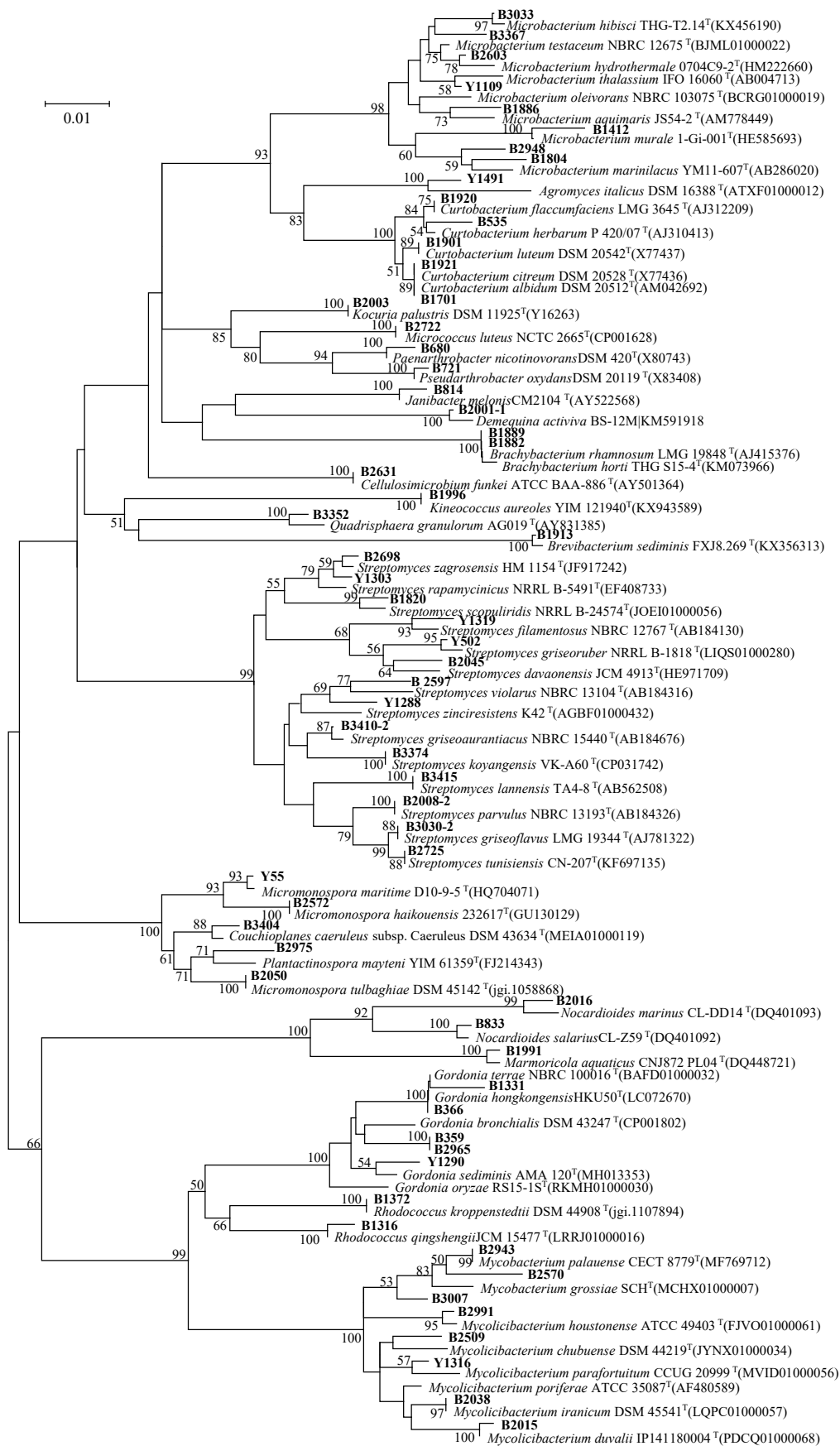


图1 红树林土壤放线菌的16S rRNA基因序列 Neighbor-Joining 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of actinomycetes from mangrove soil based on 16S rRNA sequences

表 2 红树林土壤放线菌的分布

Table 2 Distribution of actinomycetes from mangrove soil

目	科	属	株数	种数	
动孢菌目	动孢菌科	动球菌属 <i>Kineococcus</i>	7	1	
		四折叠球菌属 <i>Quadrisphaera</i>	1	1	
微球菌目	间孢囊菌科	两面神菌属 <i>Janibacter</i>	2	1	
		皮杆菌科	短状杆菌属 <i>Brachybacterium</i>	19	2
	短杆菌科	短杆菌属 <i>Brevibacterium</i>	3	1	
	原小单孢菌科	纤维微菌属 <i>Cellulosimicrobium</i>	5	1	
	纤维单孢菌科	去甲基醮菌属 <i>Demequina</i>	14	1	
	微杆菌科	短小杆菌属 <i>Curtobacterium</i>	167	5	
		壤霉菌属 <i>Agromyces</i>	20	1	
		微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	37	8	
		微球菌科	考克氏菌属 <i>Kocuria</i>	1	1
			微球菌属 <i>Micrococcus</i>	18	1
			节杆菌属 <i>Paenarthrobacter</i>	1	1
假节杆菌属 <i>Pseudarthrobacter</i>			4	1	
小单孢菌目	小单孢菌科	科氏游动菌属 <i>Couchioplanes</i>	1	1	
		小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>	9	3	
		植物产孢放线菌属 <i>Plantactinospora</i>	1	1	
分枝杆菌目	诺卡氏菌科	戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	25	5	
		红球菌属 <i>Rhodococcus</i>	21	2	
	分枝杆菌科	分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	6	2	
		<i>Mycolicibacterium</i>	24	6	
丙酸杆菌目	类诺卡氏菌科	大理石雕菌属 <i>Marmoricola</i>	4	1	
		类诺卡氏菌属 <i>Nocardioides</i>	36	2	
链霉菌目	链霉菌科	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	18	14	

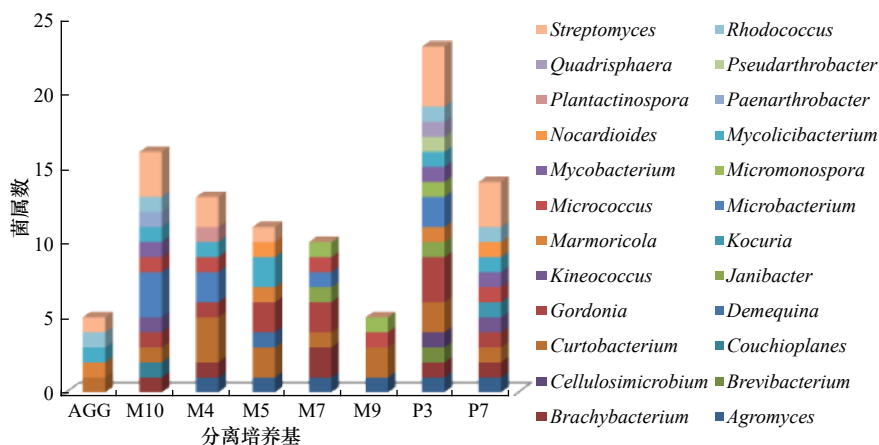


图 2 不同培养基分离到放线菌的种类数量

Fig. 2 Quantities of species isolated from different media

表 3 不同培养基分离到的细菌多样性

Table 3 Bacterial diversity isolated from different media

细菌多样性	培养基							
	AGG	M10	M4	M5	M7	M9	P3	P7
菌株数	34	73	53	108	27	24	72	53
菌种数	5	16	13	11	10	5	24	14
菌属数	5	12	9	8	8	4	16	12
Shannon-Wiener指数	1.213	2.202	2.068	1.693	2.262	1.457	2.776	2.107
Simpon指数	0.647	0.849	0.817	0.769	0.832	0.733	0.910	0.804
Pielou指数	0.344	0.513	0.521	0.362	0.686	0.459	0.649	0.531

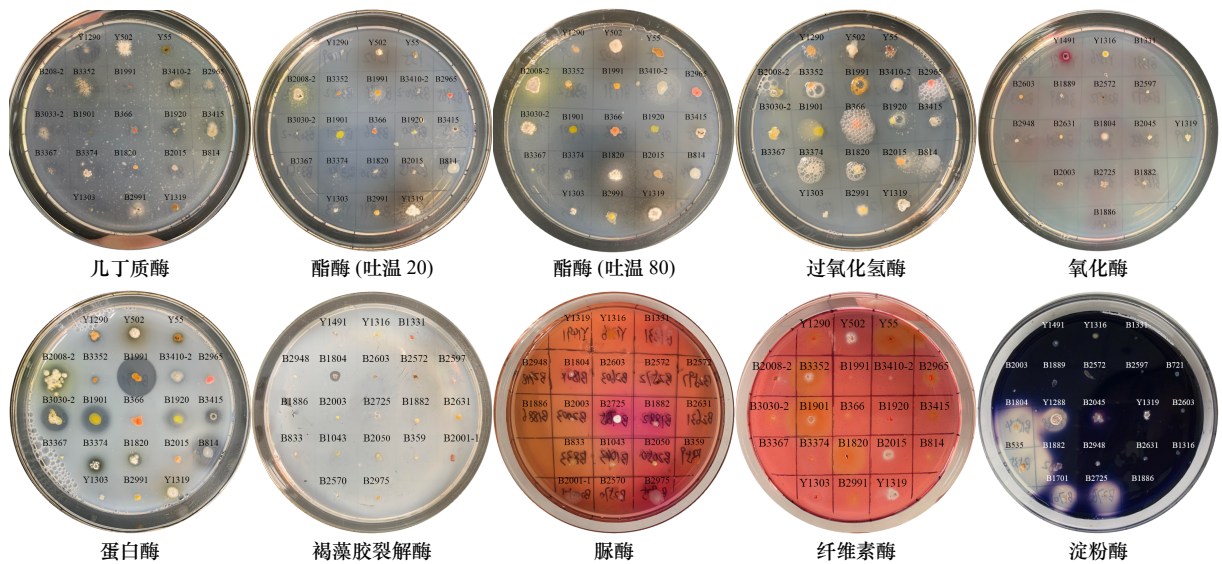


图 3 部分放线菌的酶活检测效果图

Fig. 3 Renderings of enzyme activity in some actinomycete

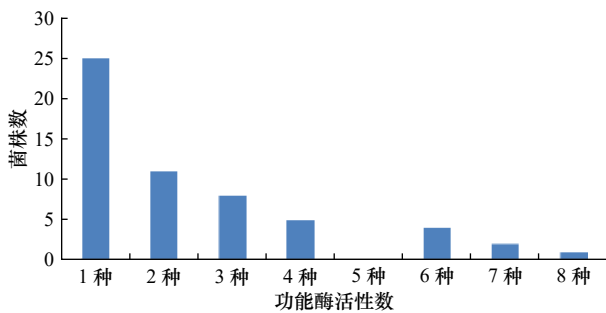


图 4 56 株放线菌的酶活筛选结果

Fig. 4 Enzyme-producing activities of 56 actinomycetes

(图 3, 图 4)。结果表明, 从所测菌株中筛选到 56 株放线菌在至少 1 种功能酶活性检测中显示阳性, 总阳性率为 88.89%; 筛选到具有 2 种以上酶活性的放线菌为 31 株, 总阳性率为 49.21%。表 4 所示, 产脲酶、酯酶、过氧化氢酶、纤维素酶、蛋白酶、氧化酶、淀粉

酶、几丁质酶和褐藻胶裂解酶活性的放线菌数分别为 12 株、25 株、36 株、17 株、24 株、2 株、4 株、5 株和 5 株, 阳性率分别为 19.05%、39.68%、41.27%、26.98%、38.10%、3.17%、6.35%、7.94% 和 7.94%。

4 结论与讨论

放线菌是一种最具经济价值和生物技术价值的原核生物, 是产生抗生素、酶及其抑制剂等功能活性物质的主要来源。据报道, 截至 2002 年, 已知的微生物活性次生代谢产物超过 22 000 种, 其中 70% 来自放线菌, 20% 来自真菌, 7% 由芽孢杆菌产生, 1%~2% 来源于其他细菌^[28]。其中, 放线菌因其丰富的生物化学多样性、可大规模培养及易于遗传操作等优点, 日益成为生产生物活性化合物和工业酶的重要资源^[28]。据报道, 来源于海洋的放线菌含有丰富的功能

表 4 56 株放线菌的功能酶活性

Table 4 Enzyme-producing activities of 56 actinomycetes

放线菌类群	产酶菌数												酶活菌株数
	脲酶	酯酶			过氧化氢酶	纤维素酶	蛋白酶	氧化酶	淀粉酶	几丁质酶	褐藻胶裂解酶		
		吐温20	吐温80	2种酯酶									
<i>Agromyces</i>	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Brachybacterium</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Brevibacterium</i>	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Cellulosimicrobium</i>	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Couchioplanes</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Curtobacterium</i>	1	4	1	4	4	3	5	-	2	1	1	1	5
<i>Demequina</i>	-	1	1	1	1	-	1	1	-	-	1	-	1
<i>Gordonia</i>	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Janibacter</i>	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	1	-	1
<i>Kineococcus</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Kocuria</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Marmoricola</i>	-	1	-	1	1	-	1	-	-	1	-	-	1
<i>Microbacterium</i>	-	3	2	3	4	2	2	1	1	-	1	-	5
<i>Micrococcus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Micromonospora</i>	-	-	-	-	2	2	1	-	-	-	-	-	3
<i>Mycobacterium</i>	-	1	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Mycolicibacterium</i>	-	-	1	1	4	1	-	-	-	-	-	-	6
<i>Nocardioides</i>	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>Paenarthrobacter</i>	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Plantactinospora</i>	1	1	1	1	1	1	-	-	-	1	-	-	1
<i>Pseudarthrobacter</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Quadrisphaera</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Rhodococcus</i>	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Streptomyces</i>	3	5	6	9	6	5	10	-	1	2	1	-	13

注: -表示无功能酶活性。

酶,红树林作为海洋特殊的生态系统,其放线菌在功能酶上的研究却寥寥无几^[18,29-31]。本研究选取广西茅尾海红树林自然保护区内的红树林土壤作为研究对象,开展可培养放线菌多样性分析,从中分离到可培养放线菌 444 株,隶属于 6 目 13 科 24 属 63 种,分离到放线菌的优势菌群为链霉菌属(22.22%)和微杆菌属(12.70%),与各地红树林土壤中放线菌优势菌群的报道不尽相同,如马来西亚热带红树林土壤中的链霉菌属占 59.80%^[32];印度洋红树林土壤中的链霉菌属和

杜拉菌属分别占 32.37% 和 15.11%^[31];九龙江口红树林放线菌中的小单胞菌属和链霉菌属分别占 81.38% 和 13.20%^[33];巴西红树林土壤中放线菌以微杆菌属为主^[34];海南海口北港岛红树林土壤放线菌主要以脱醌菌属和微球菌属为主^[35];海南三亚红树林底泥中放线菌以小单胞菌属为主^[36]。此外,本研究发现,红树林土壤中存在动球菌属、四折叠球菌属、短状杆菌属、假节杆菌属、科氏游动菌属和 *Mycolicibacterium* sp. 等放线菌类群,该部分放线菌仅在盐湖、高盐咸水滩和

盐场等高盐环境中被发现^[37-38]。可见,红树林生境中富含耐盐的放线菌类群。

酶活检测结果显示,这一批红树林土壤放线菌中具有丰富的酶活特性且部分菌株的酶活特性显著。研究发现,红树林土壤中酶活代谢活力最强的类群为链霉菌属,其次是微杆菌属和短小杆菌属,这与大部分的研究报道结果相似^[19,34,39]。其中,产酯酶、过氧化氢酶和蛋白酶的放线菌数较高,这可能与红树林土壤富含动植物残体所提供的脂素和蛋白类等营养物质有关。此外,红树林生境中有机质较非红树林区域的丰富^[40],致使其生境放线菌具有多种功能酶活性,但本文研究结果显示,具有2种以上酶活功能的放线菌

有31株,仅占50%左右,且3种以上酶活功能的菌株数更少了。究其原因可能是:(1)人工配置培养基的底物具有一定筛选作用;(2)红树林土壤受到海水周期性浸淹,海水中动植物残体及红树植物代谢产生丰富有机质,放线菌通过分解这些有机质来生存;(3)红树林放线菌的生境特殊,其需具备多种功能酶特性,以便利用复杂多变的生境中微量的有机质进行生存。后续将用活性追踪对这56株放线菌的功能酶进行分离、检验和分析,进一步确定其具体的作用机制。综上所述,广西茅尾海红树林保护区的放线菌资源丰富,在酶制剂应用方面具有较强的开发潜力,为后续筛选农业应用微生物提供了依据。

参考文献:

- [1] 黎高翔. 中国酶工程的兴旺与崛起[J]. 生物工程学报, 2015, 31(6): 805-819.
Li Gaoxiang. The rise of enzyme engineering in China[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(6): 805-819.
- [2] 殷亮, 杨文竹, 王新宇, 等. 黑曲霉 *Aspergillus niger* 963植酸酶基因phyA2 N-糖基化突变体的构建与表达分析[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(6): 54-59.
Yin Liang, Yang Wenzhu, Wang Xinyu, et al. Construction and expression analyse of N-linked glycosylation site mutants of phyA2 gene from *Aspergillus niger* 963[J]. China Biotechnology, 2010, 30(6): 54-59.
- [3] 史悦, 于慧敏, 罗晖, 等. 诺卡氏菌腈水合酶突变基因在重组大肠杆菌中的高活性表达[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2007, 47(12): 2176-2179.
Shi Yue, Yu Huimin, Luo Hui, et al. High level expression of a mutated nitrile hydratase gene of *Nocardia* sp. in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Journal of Tsinghua University (Science and Technology)*, 2007, 47(12): 2176-2179.
- [4] 王淑军, 陆兆新, 吕明生, 等. 一株深海热液口嗜嗜嗜古菌的分类鉴定及高温酶活性研究[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 130-136.
Wang Shujun, Lu Zhaoxin, Lü Mingsheng, et al. Identification and hyperthermophilic enzyme activities of a hyperthermophilic archaeon isolated from deep-sea hydrothermal vent[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2009, 32(2): 130-136.
- [5] 何勇, 王艳. 一种酸性 β -甘露聚糖酶作用特性的分析研究[J]. 饲料工业, 2010, 31(8): 16-18.
He Yong, Wang Yan. Research on the functional characteristics of acidic β -mannanase[J]. *Feed Industry*, 2010, 31(8): 16-18.
- [6] Duke N C. Mangrove floristics and biogeography revisited: further deductions from biodiversity hot spots, ancestral discontinuities, and common evolutionary processes[M]//Rivera-Monroy V, Lee S, Kristensen E, et al. *Mangrove Ecosystems: A Global Biogeographic Perspective: Structure, Function and Services*. Cham: Springer, 2017: 17-53.
- [7] Sangkanu S, Rukachaisirikul V, Suriyachadkun C, et al. Evaluation of antibacterial potential of mangrove sediment-derived actinomycetes[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 112: 303-312.
- [8] 胡亚强. 红树林区困水虱肠道微生物多样性及可培养微生物抑菌活性研究[D]. 海口: 海南大学, 2016.
Hu Yaqiang. Analysis of intestinal microbial diversity *Sphaeroma* and bacteriostatic activity of culturable microorganism[D]. Haikou: Hainan University, 2016.
- [9] Ek-Ramos M J, Gomez-Flores R, Orozco-Flores A A, et al. Bioactive products from plant-endophytic gram-positive bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10(2): 463.
- [10] Zhao Huaxian, Yan Bing, Mo Xueyan, et al. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in the subtropical mangrove wetland ecosystem of South China Sea[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 87(1): 1-14.
- [11] 李菲, 高程海, 竺利波, 等. 茅尾海无瓣海桑内生细菌多样性及其细胞毒活性[J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 689-697.
Li Fei, Gao Chenghai, Zhu Libo, et al. Diversity and cytotoxic activity of endophytic bacteria isolated from *Sonneratia apetala* of Mao-wei Sea[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(4): 689-697.
- [12] 李蜜, 侯师师, 银江林, 等. 北部湾徐闻海域红树内生细菌物种多样性及其杀线虫活性研究[J]. 广西植物, 2020, 40(3): 301-310.
Li Mi, Hou Shishi, Yin Jianglin, et al. Diversity and nematocidal activity of endophytic bacteria from mangrove plants collected from Beibu Gulf coast at Xuwen[J]. *Guihaia*, 2020, 40(3): 301-310.
- [13] Bhatnagar D, Imelda J, Paulraj R. Amylase and acid protease production by solid state fermentation using *Aspergillus niger* from mangrove swamp[J]. *Indian Journal of Fisheries*, 2010, 57(1): 45-51.
- [14] Chen W C, Tseng W N, Hsieh J L, et al. Biodegradation and microbial community changes upon shrimp shell wastes amended in mangrove river sediment[J]. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*,

- 2010, 45(5): 473–477.
- [15] Gao Zhaoming, Ruan Lingwei, Chen Xiulan, et al. A novel salt-tolerant endo- β -1,4-glucanase Cel5A in *Vibrio* sp. G21 isolated from mangrove soil[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1373–1382.
- [16] Kafilzadeh F, Dehdari F. Amylase activity of aquatic actinomycetes isolated from the sediments of mangrove forests in south of Iran[J]. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 2015, 41(2): 197–201.
- [17] 李菲, 高程海, 余炼, 等. 秋茄内生细菌多样性及抑制甘蔗黑穗霉菌活性研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(4): 318–327.
Li Fei, Gao Chenghai, Yu Lian, et al. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Kandelia candel* and its *in-vitro* activity against *Ustilago scitaminea* Sydow[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2017, 42(4): 318–327.
- [18] 宋朝霞, 范玲, 李鹏, 等. 一株纤维素酶高产细菌的筛选及鉴定[J]. *河南工程学院学报(自然科学版)*, 2018, 30(4): 76–81.
Song Zhaoxia, Fan Ling, Li Peng, et al. Screening and identification of a cellulase-producing strain[J]. *Journal of Henan University of Engineering (Natural Science Edition)*, 2018, 30(4): 76–81.
- [19] 赵雅慧, 张舒琳, 吴家法, 等. 山口红树林根际土壤可培养细菌多样性及其活性筛选[J]. *海洋学报*, 2018, 40(8): 138–151.
Zhao Yahui, Zhang Shulin, Wu Jiafa, et al. Screening the diversity and activity of culturable bacteria isolated from mangrove rhizosphere soil at Shankou[J]. *Haiyang Xuebao*, 2018, 40(8): 138–151.
- [20] Roberts W K, Selitrennikoff C P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity[J]. *Journal of General Microbiology*, 1988, 134(1): 169–176.
- [21] 李恒, 朱思婷, 刘旭梅, 等. 褐藻胶裂解酶产生菌的分离鉴定及产酶发酵优化[J]. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(9): 94–101.
Li Heng, Zhu Siting, Liu Xumei, et al. Identification of an alginate lyase producing strain *Halomonas* sp. WF6 and fermentation optimization[J]. *China Biotechnology*, 2014, 34(9): 94–101.
- [22] 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, 26(2): 123–125.
Zhou Shuangqing, Huang Xiaolong, Huang Dongyi, et al. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010, 26(2): 123–125.
- [23] Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. *Biotechniques*, 1991, 10(4): 506–513.
- [24] 李菲, 高程海, 余炼, 等. 川蔓藻内生及根际细菌多样性与抑菌活性研究[J]. *广西植物*, 2018, 38(7): 924–933.
Li Fei, Gao Chenghai, Yu Lian, et al. Diversity and antifungal activity of endophytic and rhizospheric bacteria isolated from *Ruppia maritima*[J]. *Guihaia*, 2018, 38(7): 924–933.
- [25] Kim K H, Roh S W, Chang H W, et al. *Nocardioides basaltis* sp. nov., isolated from black beach sand[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 42–47.
- [26] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [27] Kim M, Oh H S, Park S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64: 346–351.
- [28] Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites[J]. *Microbiological Research*, 2012, 167(10): 571–580.
- [29] Kulkarni C P, Maurya C B. Characterization of the cellulase enzyme produced by actinomycetes isolated from the mangrove Coastal areas[J]. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 2017, 14(2): 685–690.
- [30] Kiranmayi M U, Poda S, Vijayalakshmi M. Production and optimization of L-asparaginase by an actinobacterium isolated from Nizampatnam mangrove ecosystem[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2014, 35(5): 799–805.
- [31] 何洁, 张道锋, 徐盈, 等. 印度洋红树林沉积物可培养海洋放线菌多样性及其活性[J]. *微生物学报*, 2012, 52(10): 1195–1202.
He Jie, Zhang Daofeng, Xu Ying, et al. Diversity and bioactivities of culturable marine actinobacteria isolated from mangrove sediment in Indian Ocean[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1195–1202.
- [32] Lee L H, Zaina N, Azman A S, et al. Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia[J]. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 698178.
- [33] 林鹏, 张瑜斌, 邓爱英, 等. 九龙江口红树林土壤微生物的类群及抗菌活性[J]. *海洋学报*, 2005, 27(3): 133–141.
Lin Peng, Zhang Yubin, Deng Aiyong, et al. Microflora and antimicrobial activities of soil microorganisms in mangrove forests in the Jilong Estuary, China[J]. *Haiyang Xuebao*, 2005, 27(3): 133–141.
- [34] Dias A C F, Dini Andreote F, Dini-Andreote F, et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(7): 1305–1311.
- [35] 孙静, 王素英, 张德超, 等. 海南红树林根系土壤中可培养细菌的多样性分析[J]. *海洋科学*, 2014, 38(7): 27–33.
Sun Jing, Wang Suying, Zhang Dechao. Diversity of culturable bacteria from the soil of root system of mangrove forest of Beigang island in Hainan Province[J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(7): 27–33.
- [36] 冯玲玲, 杨芹, 张露, 等. 海南三亚红树林放线菌多样性及抗菌活性[J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(11): 1355–1363.
Feng Lingling, Yang Qin, Zhang Lu, et al. Diversity and anti-microbial activity of actinobacteria isolated from mangrove in Sanya of Hainan Province[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2018, 43(11): 1355–1363.

- [37] 张瑶, 夏占峰, 曹鑫波, 等. 阿克苏高盐咸水滩放线菌分离新策略及系统发育多样性[J]. 微生物学报, 2013, 53(8): 798–808.
Zhang Yao, Xia Zhanfeng, Cao Xinbo, et al. New isolation methods and phylogenetic diversity of Actinobacteria from hypersaline beach in Aksu[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(8): 798–808.
- [38] 关统伟, 向慧平, 冯栩, 等. 硝尔库勒湖可培养放线菌多样性及其功能酶和抗细菌活性[J]. 微生物学报, 2018, 58(10): 1864–1874.
Guan Tongwei, Xiang Huiping, Feng Xu, et al. Diversity and antibacterial activity of culturable actinobacteria from Xiaoerkule Lake[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(10): 1864–1874.
- [39] Niladevi K N, Prema P. Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes[J]. Actinomycetologica, 2005, 19(2): 40–47.
- [40] 孟昊, 薛智权, 唐杰, 等. 深圳福田红树林土壤可培养微生物和土壤酶活性研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(1): 53–56.
Meng Hao, Xue Zhiquan, Tang Jie, et al. Soil culturable microorganisms and the activity of enzymes in mangrove sediment from Futian, Shenzhen[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(1): 53–56.

Biodiversity and functional enzymes of actinomycetes isolated from mangrove soil in the Maowei Sea, Guangxi

Li Fei¹, Li Zhe², Hu Wenjin³, Huang Shushi², Liu Jingjing⁴, Huang Yuanlin², Wang Qiaozhen², Pan Xinli²

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China; 3. National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery/State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology/Guangxi Key Laboratory of Bio-refinery/Guangxi Biomass Engineering Technology Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China; 4. School of Materials Science and Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the diversity of actinomycetes collected from the Maowei Sea Natural Reserve of Mangrove in Guangxi, and screen the functional enzymes activities from these actinomycetes. Actinobacterial diversity of Mangrove soil was studied by culturable method and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. Ten enzyme active substrates were selected as indicator reaction. Activity for functional enzymes was tested by inoculating single colony method. Total of 444 strains of culturable actinomycetes were obtained from mangrove soil environment, they were classified into 63 species, 24 genera, 13 families and 6 orders by 16S rRNA gene sequence analysis. The three strains of them was potential new species. *Streptomyces* sp. was the dominant genus. Among them, 56 strains were screened with at least one or more enzymes activity. The total positive rate was 88.89%. And two enzymes activity at least could be screened from the 31 strains. And the dominant strains capable of enzyme-producing were of *Streptomyces* sp., *Microbacterium* sp. and *Curtobacterium* sp. Our results showed that in the Maowei Sea Natural Reserve of Mangrove soil, there existed a higher diversity of culturable actinomycetes, and there are large numbers of unknown actionobacterial groups here. These actinomycetes have the abilities to produce excellent functional enzymes.

Key words: Guangxi; mangrove in the Maowei Sea; soil; actinomycetes; functional enzymes