聚天冬氨酸保水剂原位富集游动放线菌及其次级代谢潜力筛选

丁培治[1,2]，沈红玲[1,2]，代庆堂[1]，高　晗[1]，黄星欣[1]，万传星[1,2*]

（1. 塔里木大学 生命科学与技术学院，新疆 阿拉尔　843300；
2. 塔里木盆地生物资源保护利用省部共建国家重点实验室培育基地，新疆 阿拉尔　843300）

摘　要　塔里木河流域具有丰富的微生物资源，为了探索该区域土壤中游动放线菌属（*Actinoplans*）的物种多样性，挖掘新的游动放线菌资源，丰富塔里木河流域种质资源库，通过聚天冬氨酸（polyaspartic acid，PASP）保水剂实现游动放线菌的原位富集，采用 7 种病原菌作为靶标菌对游动放线菌的发酵粗提物进行抗菌活性筛选，结合 antiSMASH 基因簇分析并检测抗生素生物合成基因。结果表明，经 PASP 保水剂原位富集的土样中分离鉴定出 244 株菌株，分属于 3 门 5 纲 4 目 11 科 16 属 59 种，其中放线菌门（Actinomycetota）菌株 228 株，占 93%，游动放线菌属的分离率高，分离得到 103 株，21 种，占 42%。筛选出 7 株兼具抗菌活性与代谢潜力的游动放线菌菌株，说明在塔里木河沿岸含水量高的土样中存在丰富的稀有放线菌资源，PASP 原位富集方法可选择性地分离获得游动放线菌，这有利于进一步研究塔里木河流域土壤微生物中稀有放线菌的多样性，为开发利用游动放线菌资源提供参考。

关键词　聚天冬氨酸保水剂；游动放线菌；原位富集；多样性；抗菌活性

中图分类号　Q938　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1005－7021（2026）04－0042－12

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.04.004

In Situ Enrichment of *Actinoplanes* Using Polyaspartic Acid Water Retaining Agent and Screening of Its Secondary Metabolic Potential

DING Pei-zhi[1,2], SHEN Hong-ling[1,2], DAI Qing-tang[1], GAO Han[1],
HUANG Xing-xin[1], WAN Chuan-xing[1,2*]

（1. *College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Alar* 843300;
2. *State Key Laboratory Incubation Base for Conservation and Utilization of Bio-Resource in Tarim Basin, Tarim University, Alar* 843300）

Abstract　The Tarim River Basin is rich in microbial resources. To explore the species diversity of *Actinoplanes* in its soil, uncover new *Actinoplanes* resources, and enrich the germplasm resource bank of the Tarim River Basin, the in situ enrichment of *Actinoplanes* was achieved using polyaspartic acid water-retaining agent (PASP). The fermentation crude extracts of *Actinoplanes* were screened for antimicrobial activity using seven pathogenic bacteria as target strains. This was combined with antiSMASH gene cluster analysis and detection of antibiotic biosynthesis genes. The results indicate that 244 strains isolated and identified from soil samples enriched in situ with PASP belong to 3 phyla, 5 classes, 4 orders, 11 families, 16 genera, and 59 species, respectively. Among these, 228 strains belong to the phylum Actinomycetota, accounting for 93%. The genus *Actinoplanes* exhibited a high isolation rate, with 103 isolated strains and 21 species, representing 42%. Seven strains of *Actinoplanes* with both antimicrobial activity and metabolic poten-

基金项目：第三次新疆综合科学考察项目（2022xjkk0206）；塔里木大学校长基金项目（TDZKKY202201）；新疆生产建设兵团研究生科研创新项目（TDGRI202201）

作者简介：丁培治　女，博士研究生。研究方向为微生物资源挖掘与利用。E-mail：1797487953@qq.com

* 通讯作者。男，教授，博士，博士生导师。研究方向为微生物资源的农用及医用。E-mail：wanchuanxing@163.com

收稿日期：2025-12-08

tial were screened. Soil samples with high moisture content along the Tarim River harbor abundant rare actinobacterial resources. The PASP in situ enrichment method can selectively isolate *Actinoplanes*, thereby facilitating further research on the diversity of rare actinobacteria in the soil microorganisms of the Tarim River Basin and on the exploration and utilization of *Actinoplanes* resources.

Keywords polyaspartic acid ,PASP; *Actinoplanes*; enrichment culturing in situ; biodiversity; antibacterial activity

放线菌是抗生素等活性天然产物的重要来源[1],其产生的次级代谢产物约占微生物来源代谢产物的 45%[2],具有显著的生物活性特征。研究表明,这些次级代谢产物展现出广泛的药理作用,包括抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗病毒以及抗血管生成等多重功效[3]。其中,在已报道的天然抗生素中,约 70% 来源于放线菌[4],这些抗生素在临床治疗中发挥着关键作用[5]。万古霉素作为糖肽类抗生素的代表性药物,在临床应用尤其在应对多重耐药性革兰阳性菌引发的感染中具有不可替代的地位;阿奇霉素作为大环内酯类抗生素的代表,在呼吸道感染治疗中应用广泛[6]。这些放线菌来源的抗生素不仅具有显著的生物活性,还在临床实践中展现出重要的治疗价值。由于其中大部分抗生素均从链霉菌中分离获得[7],因此从链霉菌中发现新的活性物质已变得较为困难。不同类群的放线菌拥有不同的代谢途径,而游动放线菌属(*Actinoplans*)是稀有放线菌中数量较多的一类,能够产生肽类、缩肽类、多烯型大环内酯类和芳香族化合物类抗生素[8]。游动放线菌产生的多烯类抗生素辛霉素(octamycin)、糖肽类抗生素替考拉宁(teicoplanin)[9]、萘醌类抗生素绛红霉素(purpuromycin)、大环内酯类抗生素非达霉素 (Fidaxomicin)[10]和氨基糖苷类次级代谢产物阿卡波糖(Acarbose)[11]等,对多种革兰阳性耐药细菌具有抑制活性[12]。因此,游动放线菌属已成为对抗耐药病原菌的新型抗生素的重要来源。游动放线菌属于 1950 年由 Couch 建立,属于革兰阳性菌,其菌落较小,坚韧规整,直径通常为 3.5 ~ 4.0 mm。该属菌株通常缺乏气生菌丝。菌丝大多呈橙黄色,也有红、蓝、紫、绿色等不同颜色,少数种具有发育良好的气生菌丝,并能产生分生孢子[13]。游动放线菌在发育过程中,萌发的孢子首先形成基质菌丝,随后分化出具有顶端孢子囊的特殊结构,这些孢子囊在适宜的水分条件下破裂,释放出游动孢子[14],游动孢子的鞭毛结构具有运动能力和疏水表面黏附特性[15]。游动放线菌的孢囊在陆地和水体生态系统中循环发育,其基内菌丝在有机质表面生长并形成孢囊,通过风力等自然媒介广泛传播。当孢囊进入水中时,会释放出高度活动性的游动孢子[16]。这些游动孢子不仅具有运动能力,还可能受到特定化学物质的吸引,从而停留在适宜的新底物上,并在此进行繁殖[17]。聚天冬氨酸(polyaspartic acid,PASP)作为一种可生物降解的高分子保水剂,因其独特的吸水性、离子螯合性及环境友好特性,在农业和水处理领域展现出调节土壤微环境、促进植物生长的潜力[18]。研究表明,PASP 能够通过其分子链上的羧酸基团与土壤颗粒形成氢键网络,从而显著提升土壤持水能力,这种物理化学特性的改变不仅直接优化了土壤微环境,更通过水分-养分的协同调控作用重塑了微生物群落结构,特别是对水分敏感的放线菌门种群。科研人员从多种水生环境(包括淡水河流、深海沉积物以及富营养化湖泊中的腐殖质层等)中分离到多个游动放线菌新物种[19-21]。基于游动放线菌游动孢子的趋水性,可通过添加 PASP 靶向分离游动放线菌,但由于游动放线菌生长周期长,采用常规分离培养方法难以有效获取。本研究根据游动放线菌的生长特性探究其靶向分离方法,设计了特定的分离培养基并对土壤样品进行预处理,实现了游动放线菌的有效分离,提高了目标菌株的分离效率,进一步丰富了药用稀有放线菌种质资源库。在次级代谢产物研究方面,采用 antiSMASH 对菌株基因簇进行系统分析,通过识别次级代谢产物生物合成基因簇(BGCs),并结合平板抑菌活性筛选实验,运用基因簇分析与生物活性筛选相结合的策略,预测目标菌株的次级代谢潜力,以提高菌种筛选效率,旨在为后续次级代谢产物的发现与开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 采集南疆地区塔里木河河岸土(81°23′E,41°37′N)、棉田根际土(81°58′E,40°22′N)、鹰嘴豆根际土(81°69′E,40°73′N)、大豆根际土(81°67′E, 40°71′N)、苦马豆根际土(88°50′E,39°80′N)、蔬菜根际土(81°50′E,40°50′N)、柽柳林林下土(88°30′E,40°10′N)共7种土壤样品。以上7种土壤样品均采自地面以下10~20 cm表层土壤以及植物根际附着土壤。土样用自封袋保存,4 ℃冷藏备用。

1.1.2 培养基(g/L) ①1/10 ISP 2培养基:酵母浸粉0.4,麦芽提取物1,葡萄糖0.4,琼脂17;②HV培养基:腐殖酸1,KCl 1.7,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01,$CaCO_3$ 0.02,Na_2HPO_4 0.5,琼脂17;③0329培养基:可溶性淀粉10,酵母提取物2,琼脂17;④高氏一号培养基:可溶性淀粉20,KNO_3 1,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5,K_2HPO_4 0.5,NaCl 1,琼脂17;⑤1/5 TSA培养基:大豆蛋白胨1,胰蛋白胨3,NaCl 1,琼脂17。添加$K_2Cr_2O_7$溶液(70 μg/mL)、制霉菌素(100 μg/mL)、奈啶酮酸(25 μg/mL)、新生霉素(25 μg/mL)和放线菌酮(25 μg/mL)于分离培养基中,以抑制真菌和细菌及其他非目的性菌株的生长并诱导目标游动放线菌的萌发。待培养基灭菌后温度降至55 ℃时添加PASP液体保水剂。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 麦芽浸粉、蛋白胨、胰蛋白胨均购自北京奥博星生物技术公司;K_2HPO_4、KNO_3、$FeSO_4$均购自天津北辰方正试剂厂;葡萄糖(天津盛奥化学试剂有限公司);可溶性淀粉、$CaCO_3$购自国药集团化学试剂有限公司;酵母提取物(美国OXOID生物技术有限公司)。微量离心机(Centrifuge 5420,艾本德(上海)国际有限公司);PCR仪(S1000,伯乐(Bio-Rad)生命医学产品公司);电泳仪(DYCZ-26C,北京六一仪器厂);凝胶成像仪(ChemDoc XRS,伯乐(Bio-Rad)生命医学产品公司);超声波清洗机(JP-080ST,深圳市洁盟清洗设备有限公司);电子天平(GB31039,上海朴春计量仪器有限公司);恒温水浴锅(SB-1100,上海泉杰仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 土壤样品的处理 采集的土样经自然风干、均质混合后研磨过筛,按保水剂:水:土样=1:240:720(质量比)混合,分装至500 mL穿孔塑料瓶中,28 ℃恒温培养4周。取原位培养4周土样,110 ℃干热处理30 min。采用无菌生理盐水配制成10^{-1}的浑浊液,28 ℃、200 r/min恒温培养1 h,得到土壤悬浮液[22]。

1.2.2 菌株的选择性分离纯化 将土壤悬浮液5 000 r/min离心10 min,取离心得到的上清液梯度稀释至10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5},分别取150 μL涂布于1.1.2中的5种不同的分离培养基,28 ℃倒置培养7 d。挑取平板上有褶皱、橘黄色的单个菌落,采用三线法接种至ISP 2培养基,28 ℃倒置培养7~14 d,并连续划线接种直至出现清晰分离的单菌落,使用牛奶管对纯化菌株进行冷冻干燥处理,通过预冻、真空干燥等过程制备成冻干粉,并将冻干粉于4 ℃条件下长期保藏。

1.2.3 菌株的16S rRNA基因测序 采用SDS-蛋白酶法[23]提取分离纯化菌株的DNA,使用细菌通用引物27F和1492R扩增细菌16S rRNA基因序列[24],参照丁腊梅[25]分离游动放线菌的实验方法设置PCR反应体系及条件,经1%琼脂糖凝胶电泳筛选合格PCR产物,送至西安擎科生物有限公司进行双向测序,拼接后的16S rRNA序列通过EzBioCloud进行比对分析。

1.2.4 菌株系统发育树构建 为明确测序菌株的系统发育地位,基于EzBioCloud数据库筛选其近缘模式菌株的同源16S序列。通过MEGA X软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,设置1 000次自举重复检验(Bootstrap analysis)节点支持率,探究菌株间的进化关系。

1.2.5 抗菌活性实验 参照梁红丽等[24]的方法,选取革兰阳性细菌代表菌株金黄色葡萄球菌(*Staphyloccocus aureus* ATCC 25923)和革兰阴性细菌代表菌株大肠埃希菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606)、解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora* ATCC 15357)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium* ATCC 14028)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri* ATCC 12022)以及真菌代表菌株白色念珠菌(*Candida albicans* ATCC 64550)7株病原菌做

为靶标菌。将靶标菌分别接种于 100 mL 液体培养基中,28 ℃、150 r/min 培养 12 h,使菌体活化,制备成病原菌培养液。对游动放线菌进行液体发酵培养,收集发酵液并经冷冻干燥后,取干燥样品,加入 2 倍体积的甲醇进行超声辅助萃取。收集萃取液,经旋转蒸发浓缩得到粗提物浸膏。最后用甲醇溶解浸膏,配制为终浓度 100 mg/mL 的溶液用于抗菌活性检测;采用牛津杯法进行抑菌活性检测,首先将活化后的病原菌培养液与已灭菌并冷却至约 45 ℃的培养基按 1:100 充分混匀,倒入放置牛津杯的平板中,待培养基凝固后,加入 150 μL 甲醇溶解的发酵粗提物于牛津杯中,37 ℃培养 10 ~ 24 h,观察并测量抑菌圈直径。

1.2.6 NRPS 和 PKS 基因的扩增及检测 提取分离菌株的基因组 DNA。参照文献[26],采用表 1 所列非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetases,NRPS)和聚酮化合物合成酶(polyketide synthases,PKS)基因特异性引物进行 PCR 扩增,并按照其方法设置反应参数。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,检测目标条带的有无。

表 1 NRPS 与 PKS 的扩增引物

Table 1 Information of amplification primer of NRPS and PKS genes

基因	引物	引物序列(5′-3′)	目的片段长度/bp
NRPS 基因	A3F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	1 200 ~ 1 500
	A7R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS	
PKS I 基因	K1F	TSAAGTCSAACATCGGBCA	500 ~ 750
	M6R	CGCAGGTTSCSGTACCAGTA	
PKS II 基因	KSαF	TSGCSTGCTTGGAYGCSATC	700 ~ 800
	KSβR	TGGAANCCGCCGAABCCTCT	

2 结果与分析

2.1 土壤中可培养放线菌物种多样性

通过 PASP 靶向分离方法,共分离得到 103 株游动放线菌、60 株小单孢菌、37 株链霉菌和 16 株野野村菌等放线菌。在门水平上(图 1A),放线菌门(Actinomycetota)为优势菌群,占比 93%(227 株);其次为假单胞菌门(Pseudomonadota)7 株和厚壁菌门(Bacillota)10 株。基于纲水平(图 1B),放线菌纲(Actinobacteria)分离得到 227 株,占总菌株 93 %,为优势菌纲;其次为芽孢杆菌纲(Bacilli)10 株,α-变形菌纲(Alphaproteobacteria) 5 株和 γ-变形菌纲(Gammaproteobacteria) 2 株。基于目水平(图 1C),分离得到 11 个菌目,包括游动放线菌目(Actinomycetales)、小单孢菌目(Micromonosporales)、假诺卡氏菌目(Pseudonocardineae)、链孢囊菌目(Streptosporangiales)、链霉菌目(Streptomycetales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、微球菌目(Micrococcales)、生丝微菌目(Hyphomicrobiales)、棒杆菌目(Corynebacteriales)、莫拉氏菌目(Moraxellales)和假单胞菌目(Pseudomonadales),其中游动放线菌目(Actinomycetales)为优势菌目,共分离得到 103 株,占比达 42%,其次为小单孢菌目(Micromonosporales),分离得到 60 株,占比 25%。

在属水平上(图 1D),共分离出 16 个属,包括游动放线菌属(*Actinoplanes*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽孢菌属(*Bacillus*),细胞芽孢杆菌属(*Cytobacillus*)、假芽孢杆菌属(*Fictibacillus*)、考克氏俊属(*Kocuria*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、野野村菌属(*Nonomuraea*)、拟节杆菌属(*Paenarthrobacter*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、施氏假单胞菌属(*Stutzerimonas*),其中游动放线菌属为优势属,共分离出 103 株菌,占比 42%;小单孢菌属为第二优势菌属,共分离出 60 株菌,占比 25%,其他菌属的菌株分离数量较少,部分菌属仅分离出 1 株菌。

对已分离的游动放线菌使用 MEGA X 软件进行邻接法建树,结果如图 2 所示。该系统发育树用于比较不同游动放线菌与相似菌株之间的进化关系。系统发育分析表明,所有分离得到的游动放线菌均与其近缘菌株聚集于相同进化分支,属于同一物种。

2.2 添加液体 PASP 对放线菌分离效果的影响

分离鉴定结果表明,添加液体 PASP 保水剂有效促进了放线菌的分离。通过比较添加与未添加液体 PASP 培养基的分离效果发现,在 244 株分离菌株中,168 株来源于 PASP 添加组,76 株来源于对照组。对目标类群游动放线菌的分离结果显示,PASP 添加组分离游动放线菌 81 株,分离率(78.64%)显著高于对照组的 22 株(21.36%)(图 4)。本研究还发现,除游动放线菌外,小单孢菌和链霉菌等类群在 PASP 处理组

中同样保持较高丰度，说明 PASP 的添加不仅能富集游动放线菌，提高游动放线菌分离率，还能通过改变培养基微环境，对多种放线菌的培养生长起到促进作用。

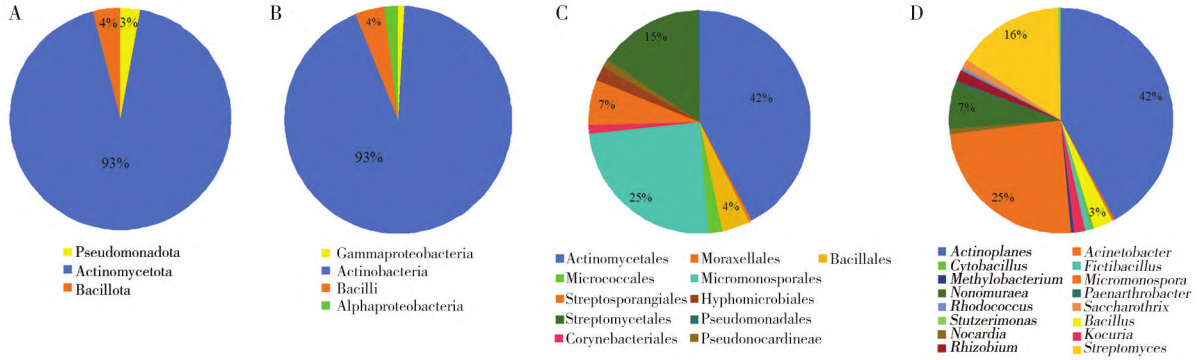


图 1　土壤中可培养细菌群落分布

Fig. 1　Distribution of culturable bacterial communities in soil

A：门水平；B：纲水平；C：目水平；D：属水平

A: Phylum level; B: Class level; C: Order level; D: Genus level

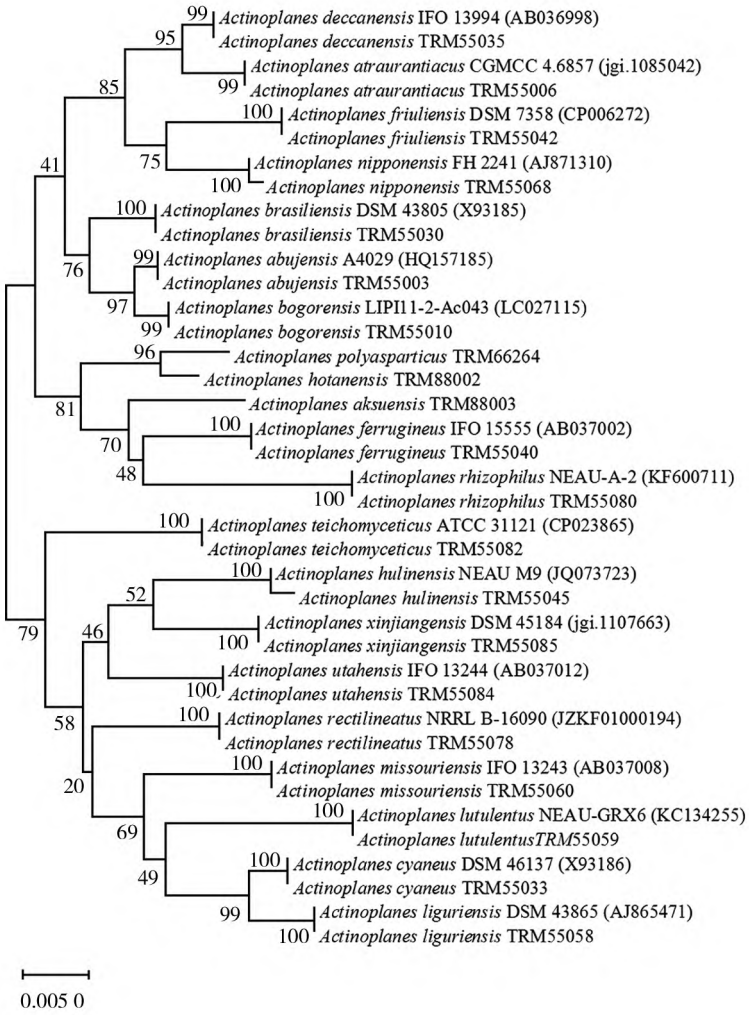


图 2　基于游动放线菌属分离株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树

Fig. 2　The phylogenetic tree of the isolated *Actinoplanes* constructed based on the 16S rRNA gene sequences

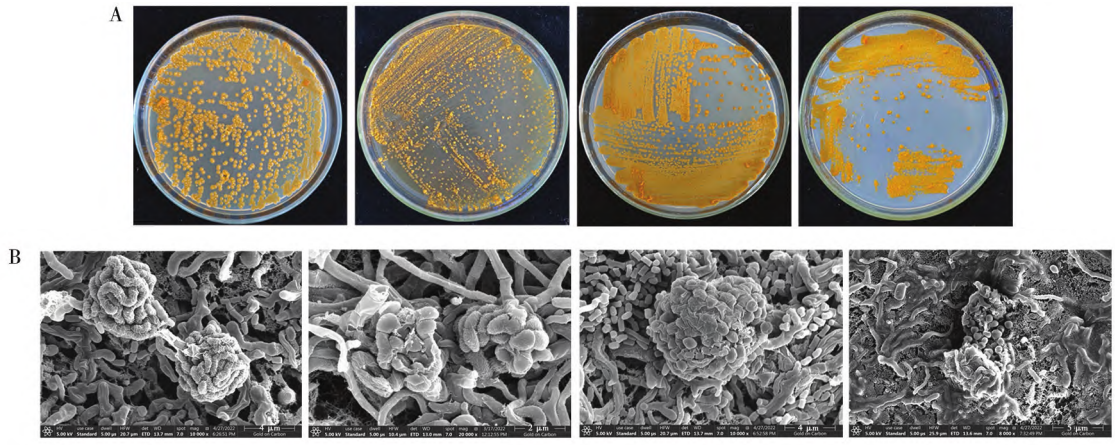


图 3　分离到的游动放线菌属菌落形态(A)及扫描电镜照片(B)

Fig. 3　The morphology of the isolated *Actinoplanes* colonies (A) and scanning electron micrograph (B)

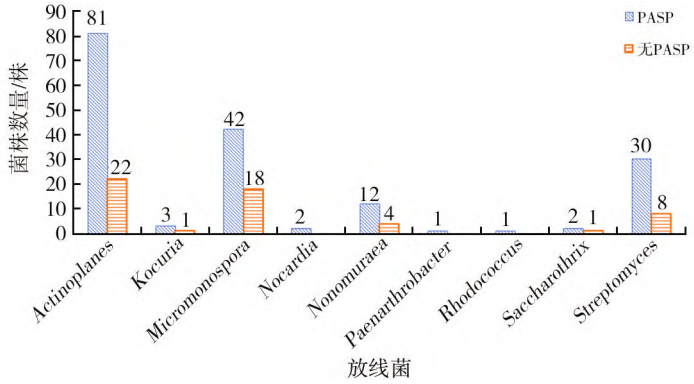


图 4　PASP 处理对放线菌物种多样性的影响

Fig. 4　The effect of PASP treatment on Actinomycetes species diversity

2.3　不同培养基分离得到放线菌多样性

除了液体保水剂的添加对放线菌的分离产生影响外,不同分离培养基所获得的菌株种类也有所不同,但是所有分离培养基均成功分离出了游动放线菌。其中,1/10 ISP 2、高氏一号、1/5 TSA 和 0329 四种培养基分离鉴定出的菌株数量较多。如图 5A 所示,1/10 ISP 2 培养基分离效果最好,共分离得到 81 株菌株,鉴定出 21 个种;高氏一号培养基次之,分离得到 68 株菌株,16 个种;1/5 TSA 培养基分离到 42 株菌株,10 个种;而 0329 培养基仅分离到 32 株菌株,8 个种。如图 5B 所示,可以比较以上四种培养基在种水平上分离鉴定游动放线菌的差异性。图 5C 显示,有 3 株游动放线菌(虎林游动放线菌(*Acinoplanes hulinensis*) TRM55045、日本游动放线菌(*Acinoplanes nipponensis*) TRM55068 和巴西游动放线菌(*Acinoplanes brasilisis*) TRM55030)在 5 种分离培养基中均被成功分离。不同分离培养基的游动放线菌分离率存在显著差异(图 5D)。其中,1/10 ISP 2 培养基的游动放线菌分离率最高,占分离得到游动放线菌菌株的 42%;高氏一号培养基占 23%,1/5 TSA 培养基占 16%,0329 培养基占 14%。结果显示,本研究选用的 1/10 ISP 两和高氏一号两种分离培养基的游动放线菌分离率最高。

2.4　游动放线菌基因组中 antiSMASH 对 NRPS 和 PKS 基因的预测

通过 antiSMASH 对分离得到的 21 种游动放线菌的生物合成基因簇进行分析,预测其次级代谢潜力。经分析可知游动放线菌基因组中大多数都具有 NRPS 和 PKS 调控基因的基因簇,基因组大小为 8.29 ~ 11.84 Mb。由图 6 可知,生物合成基因簇相对丰富的,基因组也相对较大,次级代谢潜力也越强,后续可进行次级代谢产物的分离。

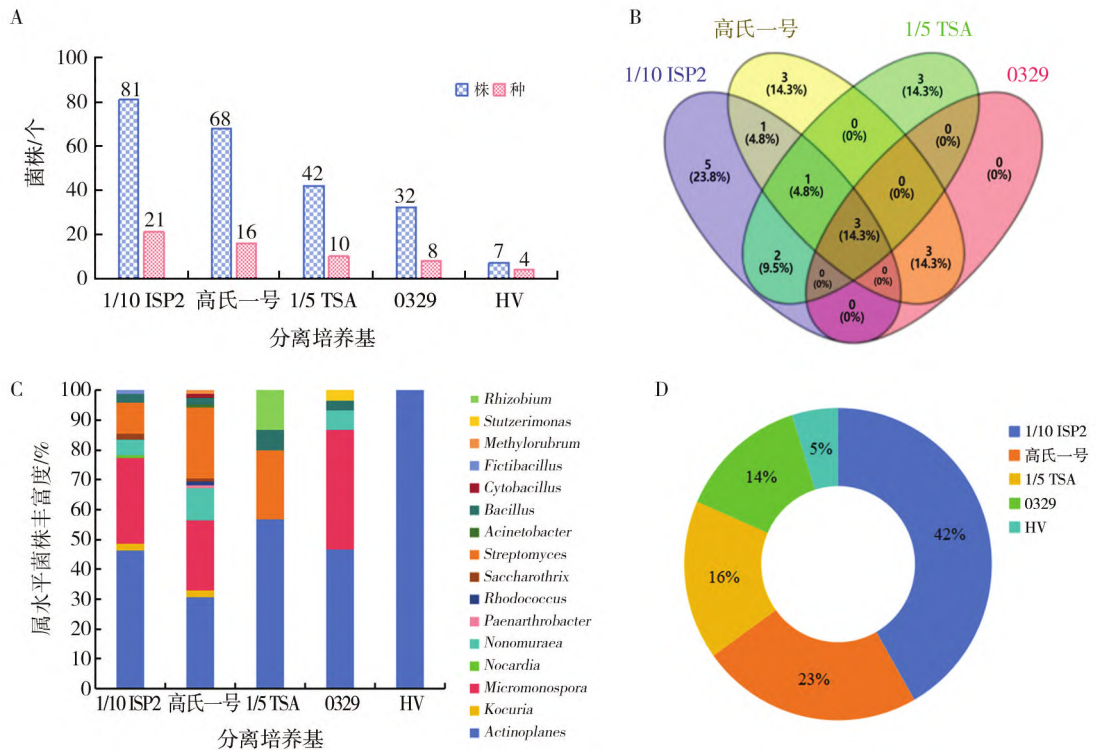


图 5　不同培养基分离可培养细菌多样性

Fig. 5　Diversity of culturable bacterial communities isolated from different culture media

A:不同培养基分离菌株的多样性;B:不同培养基种水平分离的差异;C:不同培养基属水平分离的丰富度; D:不同培养基分离游动放线菌的分离率

A: Diversity of strains isolated from different culture media; B: Differences at the species level isolated from different culture media; C: Richness at the genus level isolated from different culture media; D: Isolation rate of *Actinoplanes* from different culture media

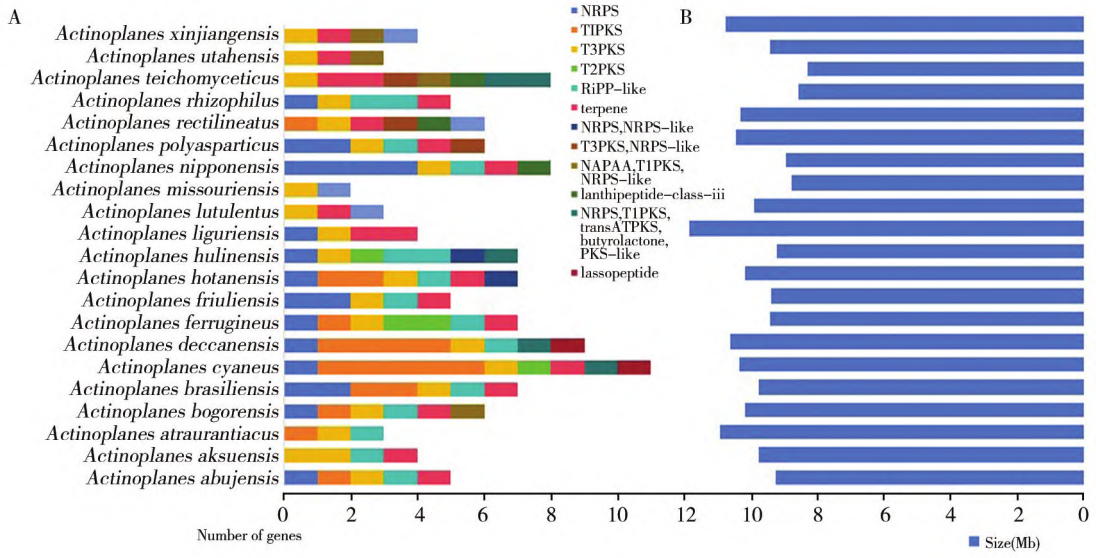


图 6　游动放线菌属次级代谢生物合成基因簇分析

Fig. 6　Analysis of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Actinoplanes*

A:基因簇的丰富度;B:基因组大小(Mb)

A: Gene cluster richness; B: Genome size (Mb)

2.5 游动放线菌的抗菌活性筛选

游动放线菌发酵粗提物采用牛津杯法检测抑菌活性，结果显示，游动放线菌 TRM66264、TRM88002、TRM88003、TRM55033、TRM55006、TRM55060、TRM55082 七株菌对 4 种及以上病原菌具有较好的抗菌活性，且对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和解淀粉欧文氏菌均具有抗菌活性。其中菌株 TRM66264、TRM55033、TRM55006、TRM55060、TRM55082 五株菌还对鼠伤寒沙门氏菌和福氏志贺氏菌具有抑菌活性；菌株 TRM66264、TRM88002、TRM88003、TRM55033 对鲍曼不动杆菌具有抑菌活性。以上菌株中仅菌株 TRM66264 对白色念珠菌具有抗菌活性，其他菌株对真菌的抗菌活性较差（表 2）。

表 2 游动放线菌抗菌活性筛选

Table 2 Antimicrobial activity screening of *Actinoplanes*

菌株	相似菌株	*Escherichia coli*	*Staphyloccocus aureus*	*Shigella flexneri*	*Salmonella typhimurium*	*Erwinia amylovora*	*Acinetobacter baumannii*	*Candida albicans*
TRM55003	*Actinoplanes abujensis*	−	+	−	−	+	+	−
TRM88003	*Actinoplanes aksuensis*	+ +	+ +	−	−	+ +	+	−
TRM55006	*Actinoplanes atraurantiacus*	+	+ +	+	+ +	+	−	−
TRM55010	*Actinoplanes bogorensis*	+	−	+	−	+	−	−
TRM55030	*Actinoplanes brasiliensis*	+ +	+	−	−	−	−	−
TRM55033	*Actinoplanes cyaneus*	+ +	+	+	+ + +	+ +	+ +	−
TRM55035	*Actinoplanes deccanensis*	−	−	+	−	+ +	−	−
TRM55040	*Actinoplanes ferrugineus*	−	−	−	−	−	−	−
TRM55042	*Actinoplanes friuliensis*	+	−	+ +	−	−	+ +	−
TRM88002	*Actinoplanes hotanensis*	+ +	+	−	−	+	+ +	−
TRM55045	*Actinoplanes hulinensis*	+	−	−	+ +	+ +	+	−
TRM55058	*Actinoplanes liguriensis*	−	−	−	−	−	−	−
TRM55059	*Actinoplanes lutulentus*	−	−	−	−	−	−	−
TRM55060	*Actinoplanes missouriensis*	+ +	+	+	+	+	−	−
TRM55068	*Actinoplanes nipponensis*	+ +	+	−	−	+	−	−
TRM66264	*Actinoplanes polyasparticus*	+ +	+ +	+	+	+	+	+ +
TRM55078	*Actinoplanes rectilineatus*	+ +	−	−	+ + +	−	−	−
TRM55080	*Actinoplanes rhizophilus*	−	−	−	−	+	+	−
TRM55082	*Actinoplanes teichomyceticus*	+	+	+	+	+ +	−	−
TRM55084	*Actinoplanes utahensis*	+	+ +	−	−	−	−	−
TRM55085	*Actinoplanes xinjiangensis*	−	−	−	−	+	−	−

注：抑菌圈直径（mm）表示抑菌活性，+：<10 mm；+ +：10 ~ 20 mm；+ + +：20 ~ 30 mm；−：无抑菌作用

2.6 NRPS 和 PKS 基因检测

NRPS 和 PKS 两类结构复杂的多功能巨型酶在合成多种活性天然产物中起着关键作用[27]。这两类酶催化合成的次级代谢产物表现出显著的抗氧化、抑制肿瘤及抗菌等生理功能特性，这类生物活性物质被广泛应用于抗感染、肿瘤治疗以及免疫调节等多种治疗用途[28]。抑菌活性实验结果表明，这些生物活性物质均对病原菌具有抑制活性。为进一步评估游动放线菌次级代谢产物的生物合成潜能，通过检测 NRPS 与 PKS 基因的存在，对分离获得的 21 株游动放线菌菌株进行了 PCR 扩增分析。结果显示，10 株游动放线菌检测出 1 条以上目的条带，其中 4 株检测到 NRPS 基因、9 株检测到 PKS Ⅰ基因、2 株检测到 PKS Ⅱ基因（表 3）。

表 3 NRPS 和 PKS 生物合成基因在 21 株细菌中的分布

Table 3 Distribution of NRPS and PKS biosynthetic genes in 21 bacterial strains

菌株	次级代谢产物合成基因			菌株	次级代谢产物合成基因		
	NRPS	PKS Ⅰ	PKS Ⅱ		NRPS	PKS Ⅰ	PKS Ⅱ
TRM55003	–	–	–	TRM55058	–	–	–
TRM88003	–	–	–	TRM55059	–	–	–
TRM55006	–	–	–	TRM55060	–	–	–
TRM55010	–	–	–	TRM55068	+	+	–
TRM55030	+	+	–	TRM66264	+	–	–
TRM55033	–	+	–	TRM55078	–	–	–
TRM55035	–	+	+	TRM55080	–	–	–
TRM55040	–	–	+	TRM55082	–	+	–
TRM55042	+	–	–	TRM55084	–	+	–
TRM88002	–	+	–	TRM55085	–	+	–
TRM55045	–	–	–				

注：+ 表示检测出目的条带；– 表示未检测出目的条带

3 讨 论

放线菌作为一类重要的微生物资源，其独特的次级代谢系统能够合成大量化学结构新颖的天然活性物质，这些化合物通常具有较高的成药性。然而，在常见的链霉菌中发现新型抗生素愈发困难，因此对稀有放线菌的研究显得尤为重要。游动放线菌作为新型抗生素的重要资源，具有极大的研究价值和开发潜力，但因其生长缓慢、不易分离且种类稀少，截至目前已知且有效发表的仅有 59 种。本研究在实验室前期研究的基础上，采用向土壤中添加 PASP，实现了游动放线菌的原位富集与靶向分离，共获得 21 种 103 株游动放线菌，其中，发现了聚天冬氨酸游动放线菌（*Actinoplanes polyasparticus*）TRM66264、和田游动放线菌（*Actinoplanes hotanensis*）TRM88002、阿克苏游动放线菌（*Actinoplanes aksuensis*）TRM88003 三个新物种，进一步丰富了游动放线菌的多样性，相关研究成果已另文发表[28]。本研究结果表明，通过调控土壤水分条件，利用 PASP 的保水特性为游动放线菌创造适宜的生长环境，有效促进了土壤中游动放线菌的富集，为后续的靶向分离提供了有利条件。该方法的成功应用不仅为游动放线菌的分离培养提供了新的技术路径，也为土壤微生物资源的开发利用提供了重要参考。

游动放线菌是稀有放线菌小单孢菌科的第二大属，其生长周期长且不易分离，需借助特殊手段才能实现分离，至今游动放线菌属的种类数目仍然较少。Shen 等[29]从大豆根中分离得到虎林游动放线菌（*Actinoplanes hulinensis*），并在溪流黏稠土壤、降雨根际土壤以及地衣等环境中都发现了游动放线菌，由于植物根际本身就有储水功能，因此把河底淤泥以及植物、作物根际土壤作为分离源大大提高了分离效率。Habib 等[30]和 Sun 等[31]通过对干旱地区的土壤样品采取水化处理，成功分离得到沙漠游动放线菌（*Actinoplanes deserti*）和新疆游动放线菌（*Actinoplanes xinjiangensis*）。这些前期研究为本研究 PASP 靶向分离方法提供了理论基础，表明游动放线菌的分离需要提供水环境以诱导孢子囊释放游动孢子。原位富集法则给微生物提供了一个适宜的原生环境，更加有利于游动放线菌的培养和分离[32]。此外，刘文龙[33]研究发现，在棉田土壤中适度施用 PASP 不仅能提高土壤的持水能力，还能从 PASP 富集的棉田土壤中分离出具有降解聚天冬氨酸功能的链霉菌。因此，本研究选用 PASP、水以及采集的土壤进行混合，以增加土壤的水分积累，从而富集游动放线菌。结合原位富集方法设计 PASP 靶向分离方法，不仅成功分离到了游动放线菌，还分离得到了其他放线菌。该方法的建立不仅能够靶向分离游动放线菌，丰富了药用微生物菌种资源，也对其他放线菌的靶向

分离提供了参考,为后续菌种资源的开发利用提供了一种有效手段。

游动放线菌作为放线菌门的重要类群,因其独特的形态特征和代谢多样性,成为发掘新型抗菌活性物质的重要资源[34]。研究表明,从德干高原游动放线菌中提取的大环内酯类化合物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)具有抑制活性[35]。此外,从 *Actinoplanes* sp. MM794L-181F6 的次生代谢产物中鉴定出一种新型噻唑基肽抗生素,命名为 Thiazoplanomicin,该物质对革兰阳性菌表现出抗菌活性[36]。产生雷帕霉素的 *Actinoplanes* sp. N902-109 则被证实具有完整的雷帕霉素生物合成基因簇[37]。游动放线菌因其丰富的次级代谢产物合成能力而备受关注,特别是其 NRPS 和 PKS 基因簇的多样性为天然产物的发现提供了重要资源[38-39]。游动放线菌基因组中通常包含多种生物合成基因簇,这些基因簇编码的复杂酶系统能够通过模块化组装线机制合成结构多样的生物活性分子,如抗生素、抗肿瘤剂和免疫调节剂等[40]。本研究通过对分离得到的游动放线菌进行基因组分析、活性筛选和生物合成基因检测,发现部分菌株具有丰富的生物合成基因簇,其中 10 株游动放线菌检测到 NRPS 型和或 PKS 型的生物合成基因,这些菌株对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、欧文氏菌和志贺氏菌均表现出抗菌活性,表明游动放线菌具有较强次级代谢潜力,然而,不同游动放线菌的基因组大小不同,部分菌株基因组中含有丰富的生物合成基因簇(如 NRPS 和 PKS),可编码合成复杂抗生素的酶系统[41]。因此,游动放线菌的次级代谢能力也存在差异,其抗菌活性主要源于其代谢过程中产生的次级代谢产物,这些产物具有抑制或杀灭其他微生物的能力,其中游动放线菌产生的聚酮类(如大环内酯)和生物碱类物质具有广谱抗菌活性。本研究采用 antiSMASH 对游动放线菌基因簇进行了系统性分析,以评估其产生次级代谢产物的潜力。通过基因组数据的挖掘和功能注释,表明所分析的游动放线菌基因组中普遍存在多种次级代谢产物合成基因簇。NRPS 和 PKS 基因簇在大多数菌株中均有分布,且其基因簇数量和种类呈现显著的多样性。基因组较大的菌株通常含有更丰富的生物合成基因簇,7 株具有拮抗活性的菌株基因组均相对较大,其中菌株 TRM66264 含有 NRPS 基因簇,表现出广谱抑菌活性,这些基因簇的广泛存在表明游动放线菌具有产生多种结构复杂、生物活性显著的次级代谢产物的遗传基础。这一发现为后续深入研究游动放线菌次级代谢产物的生物合成途径及其潜在应用价值提供了重要的理论基础。因此,后续对其次级代谢产物进行深入挖掘具有重要价值。除已知的活性天然产物外,游动放线菌中还可能存在大量编码次级代谢产物的生物合成基因簇。由于这些基因簇大多处于沉默状态,导致次级代谢产物难以预测或预测到但是无法分离且产量低[42]。因此,未来可以通过激活游动放线菌沉默基因簇的方法来提高次级代谢产物产量,从而获得更多结构新颖的天然活性产物。

本研究通过 PASP 原位富集方法,从土样中分离并鉴定了 244 株菌株,这些菌株分属于 16 个属。其中,放线菌门菌株占 228 株,游动放线菌属为优势类群。这一结果验证了 PASP 原位富集方法对游动放线菌的选择性富集效应,该方法的建立不仅实现了游动放线菌的靶向分离,突破了传统游动放线菌资源开发的瓶颈,还丰富了塔里木河流域土壤中的微生物菌种资源。此外,该方法还为其他放线菌的分离提供了参考,并为新型抗生素与农业生物制剂的开发提供了可持续的资源库。在分离的菌株中,部分菌株表现出显著的抑菌特性及次级代谢产物合成能力,这些菌株在创新性抗菌药物研发中发挥着重要作用。本研究通过筛选具有生物活性及代谢多样性的菌株,为新型抗生素的开发提供了重要的研究资源,这些具备抗菌功能和代谢潜力的微生物,在药物发现领域具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] 尚坤,阎瑾逸,高君梅,等. 放线菌来源活性天然产物发现研究进展[J]. 微生物学杂志,2023,43(4):101-108.

[2] Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, et al. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria [J]. Microbiology Research, 2014,169(4):262-278.

[3] 赵婷婷,常一民,王俊潇,等. 海洋放线菌次级代谢产物及其抗菌、抗病毒、抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国海洋药物,2018,37(4):57-72.

[4] Yan Q, Karau MJ, Raval YS, et al. *In vitro* activity of oritavancin in combination with rifampin or gentamicin against prosthetic joint infection-associated methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* biofilms[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2018,52(5):608-615.

[5] 张梦雅,张志清,李文茹,等.肺炎克雷伯氏菌对氟喹诺酮类抗生素异质性耐药研究[J].微生物学杂志, 2025,45(3):94-101.

[6] 丁衍,苏雨欣,庞启华.海洋放线菌抗肿瘤活性物质的研究进展[J].天然产物研究与开发,2020,32(2):323-333.

[7] 高瑞霞. *Actinoplanes lutulentus* 和 *Micromonospora jinlongensis* 的分类学鉴定及分离菌株活性的初步研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2019.

[8] Yushchuk O, Homoniuk V, Ostash B, et al. Genetic insights into the mechanism of teicoplanin self-resistance in *Actinoplanes teichomyceticus*[J]. The Journal of Antibiotics, 2020, 73(4):255-259.

[9] Elisa B, Pamela C, Flavia M, et al. Specificity of Induction of glycopeptide antibiotic resistance in the producing Actinomycetes[J]. Antibiotics, 2018, 7(2):36.

[10] 刘月,王娅莉,任风芝,等.非达霉素潜在有机杂质的纯化与结构鉴定[J].中国抗生素杂志, 2018,43(12):1498-1501.

[11] 张丹. 解析阿卡波糖中 C7-环醇和双脱氧糖模块的生物合成[D]. 上海:上海交通大学, 2019.

[12] Parenti F, Pagani H, Beretta G. Gardimycin, a new antibiotic from *Actinoplanes*. I. description of the producer strain and fermentation studies[J]. The Journal of antibiotics, 1976, 29(5):501-506.

[13] Cycoń M, Mrozik A, Piotrowska-Seget Z. Antibiotics in the soil environment-degradation and their impact on aicrobial activity and diversity[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10:338.

[14] Mitsuyama K, Tezuka T, Ohnishi Y, et al. Identification and characterization of a cell wall hydrolase for sporangiospore maturation in *Actinoplanes missouriensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2019,201(24):e00519-19.

[15] Kimura T, Tezuka T, Nakane D, et al. Characterization of zoospore type IV pili in *Actinoplanes missouriensis*[J]. Journal of Bacteriology, 2019,201(14):e00746-18.

[16] 李文均,张忠泽,姜成林.几种主要稀有放线菌的选择性分离[J].国外医药(抗生素分册),2002(1):18-22.

[17] Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, et al. The Prokaryotes[M]. New York: Springer, 2006:1-20.

[18] 朱梦真, 韩路, 代雅琦,等.聚天冬氨酸保水剂对胡杨光合特性的影响[J].林业资源管理,2021,19(4):149-156.

[19] Liu X, Wang M, Nie Y, et al. Isolation chip increases culturable bacterial diversity and reduces cultivation bias[J]. Current Microbiology, 2021,78(5):2025-2032.

[20] 白湜, 刘秋, 孙军德, 等. 海洋放线菌 CN5 的分离与鉴定[J]. 沈阳农业大学学报, 2013,44(2):227-230.

[21] Qu Z, Bao XD, Xie QY, et al. *Actinoplanes sediminis* sp. nov., isolated from marine sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018,68(1):71-75.

[22] 万传星,丁腊梅,刘志希,等. 一种游动放线菌靶向分离方法: 新疆维吾尔自治区, CN114525216B[P]. 2024-01-05

[23] 刘占文. 那拉提土壤拮抗放线菌鉴定及次生代谢产物初探[D]. 阿拉尔:塔里木大学, 2019.

[24] 梁红丽,沈红玲,杨秋红,等.塔里木河流域土壤小单孢菌的选择性分离及其抗菌活性筛选[J]. 塔里木大学学报, 2023, 35(1):19-30.

[25] 丁腊梅. 游动放线菌的靶向分离及其次生代谢产物挖掘[D]. 阿拉尔:塔里木大学, 2022.

[26] 王巧贞,李锋,易淑琼,等.茅尾海桐花树根际土壤来源几丁质降解菌株多样性及抗植物真菌活性的研究[J].中国抗生素杂志,2022,47(5):453-462.

[27] 邹超,孙博,宋佳,等.链霉菌聚酮类化合物和非核糖体多肽的生物合成及菌株育种研究进展[J].生物学杂志,2025,42(5):103-110.

[28] Ding LM , Ding PZ , Liu WL ,et al. Three novel *Actinoplanes* species isolated by using polyaspartic acid as a water- retaining agent for the enrichment in situ[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2023, 73(2):005705.

[29] Shen Y, Liu C, Wang X, et al. *Actinoplanes hulinensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soybean root (Glycine max (L.) Merr)[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2013,103(2):293-298.

[30] Habib N, Khan IU, Chu X, et al. *Actinoplanes deserti* sp. nov., isolated from a desert soil sample[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2018,111(12):2303-2310.

[31] Sun W, Dong G, Zhang Y, et al. *Actinoplanes sichuanensis* sp. nov. and *Actinoplanes xinjiangensis* sp. nov[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009,59(11):2763.

[32] 姜明国,甘光华,杨立芳,等.广西红树林根际土壤放线菌的原位培养分离及其活性筛选[J].海洋学报, 2015, 37(2):55-64.

[33] 刘文龙. 聚天冬氨酸保水剂对土壤微生态的影响及其降解菌的分离鉴定[D]. 阿拉尔:塔里木大学, 2021.

[34] Haktaniyan M, Bradley M. Polymers showing intrinsic antimicrobial activity[J]. Chemical Society Reviews, 2022, 51(20):8584-8611.

[35] 任会军,韩双,张灵坚,等. 德干高原游动放线菌 HS-16-20 中活性次级代谢产物的分离纯化与结构鉴定[J].中国抗生素杂志, 2016, 41(2):104-108.

[36] Takehana Y, Muramatsu H , Hatano M ,et al. Thiazoplanomi-

cin, a new thiazolyl peptide antibiotic from the leaf-litter actinomycete *Actinoplanes* sp. MM794L-181F6[J]. Journal of Antibiotics, 2025, 78(1):14-25.

[37] 黄鹤,芦现杰,胡海峰. *Actinoplanes* sp. N902-109 全基因组序列测定及分析[J]. 中国抗生素杂志,2015,40(3):171-177.

[38] Bisht N, Mayilraj S, Kumar S, et al. Identification of NRPS and type II PKS biosynthetic gene cluster (s) encoding decaplanin and kigamicin from *Amycolatopsis regifaucium* DSM 45072T[J]. Fems Microblology Letters, 2025,372:fnaf049.

[39] Akomoneh EA, Gestels Z, Abdellati S, et al. Genome mining uncovers NRPS and PKS clusters in rothia dentocariosa with inhibitory activity against *Neisseria* species[J]. Antibiotics (Basel), 2023,12(11):1592.

[40] Hou ZJ, Lai HM, Cao CY, et al. Targeted knockout and plasmid-based transfer of NRPS/PKS for improving lipopeptide iturin A synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025,302:140610.

[41] 李子强, 贾云宏, 杨殿深. 稀有放线菌产生抗菌药物的多样性[J]. 中国现代应用药学,2013,30(12):1373-1384.

[42] 贾凯丽. 里氏木霉次级代谢基因簇的删减及聚酮化合物三乙酸内酯的合成[D]. 济南:山东大学, 2023.