



蒋诗林, 叶宇歆, 沈娟, 朱家勇, 金小宝. 美洲大蠊肠道内生放线菌抗金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性分析 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (2): 453–461.

美洲大蠊肠道内生放线菌抗金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性分析

蒋诗林, 叶宇歆, 沈娟, 朱家勇, 金小宝*

(广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广东省生物活性药物研究重点实验室, 广州 510006)

摘要: 昆虫肠道共生放线菌作为一种特境放线菌, 因与土壤中的放线菌生存环境的不同, 研究其种类和抗菌活性具有重要意义。将金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 这两种致病菌作为指示细菌, 对分离自美洲大蠊 *Periplaneta americana* 肠道的 159 株内生放线菌使用牛津杯法实验, 分别对其进行体外抑菌活性筛选, 随后利用 16S rRNA PCR、BLAST 同源性和构建系统发育树相结合的方法对菌株进行分子生物学鉴定, 对关键酶基因非核糖体多肽合成酶 (Nonribosomal peptide synthetase, NRPS) 基因、多聚酮合酶 (Polyketone synthase, PKS) 基因和卤化酶基因 FADH2 进行初步筛选。结果表明 49 株放线菌能够不同程度的抑制金黄色葡萄球菌和 MRSA, 有 11 株放线菌对两种致病菌均具有不同程度的抑制作用。49 株放线菌中链霉菌属有 36 株 (73.47%), 属于优势菌属; 其余的 13 株放线菌分别属于戈登氏菌属、微杆菌属、短状杆菌属、分枝杆菌属、无色杆菌属和小单孢菌属。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 11 株放线菌中有 6 株放线菌均检测到关键酶基因 *PKS I*、*NRPS* 和卤化酶基因 *FADH2*。本研究表明美洲大蠊肠道中含有具有抗菌活性的放线菌资源。

关键词: 美洲大蠊; 放线菌; 抗金黄色葡萄球菌; 抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 分类鉴定

中图分类号: Q965; Q969.9; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 02-453-09

Anti-*Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity analysis of actinomycetes from the guts of *Periplaneta americana*

JIANG Shi-Lin, YE Yu-Xin, SHEN Juan, ZHU Jia-Yong, JIN Xiao-Bao* (College of Life Science and Biopharmaceutical, Guangdong Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: As a special actinomycete, intestinal symbiotic actinomycetes are different from the actinomycetes in the soil. Therefore, it is of great significance to study their types and antibacterial activities. Anti-*Staphylococcus aureus* and MRSA activities of 159 actinomycetes strains of *Periplaneta americana* were screened using the Oxford cup and confrontation co-culture method in vitro while using 2 species of human pathogenic bacteria of *S. aureus* and MRSA as the research object. Molecular biological identification of strains was carried out by 16S rRNA PCR, Blast homology comparison and phylogenetic tree construction. The result showed 49 endophytic actinomycetes had different degrees of anti-*Staphylococcus aureus* and MRSA activity, and 11 strains had antagonistic effects on both bacteria. Among

基金项目: 广东省公益研究与能力建设项目 (2017A020211008); 广东省普通高校基础研究与应用基础项目 (2018KZDXM041)

作者简介: 蒋诗林, 硕士, 主要研究方向为生物活性物质, E-mail: 983517954@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 金小宝, 男, 博士, 教授, 主要研究方向为放线菌药用资源, E-mail: jinxf2001@163.com

收稿日期 Received: 2020-06-11; **接受日期** Accepted: 2020-07-28

the 49 strains of *Actinomycetes*, 36 strains (73.47%) belong to the genus *Streptomyces*, which belongs to the dominant genus; the other 13 strains were *Gordon's*, *Microbacteria*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Achromobacter* and *Micromono-spora*. The results of agarose gel electrophoresis showed that the key enzyme genes *PKS I*, *NRPS* and *FADH2*-dependent halogenase were all detected in the 6 strains. This study showed that there were rich actinomycetes with antibacterial activity on the guts of *P. americana*.

Key words: *Periplaneta americana*; *Actinomycetes*; anti-*Staphylococcus aureus*; anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; identification

金黄色葡萄球菌危害着人们的生命健康, 是一种常见人体致病菌, 可导致心内膜炎、皮肤以及软组织感染等诸多疾病。由于抗生素的滥用引起耐药菌的出现 (毕振飞等, 2015), 其中就包含有对甲氧西林产生耐药的金黄色葡萄球菌, 在临床上的检出率较高, 其引起的严重感染, 是临床治疗的难点之一 (刘晓瑜等, 2015), 这两种病原菌引起的疾病是人们急需解决的健康问题。

美洲大蠊是自然环境中的一种古老的昆虫, 是传统的昆虫类中药材 (高洁等, 2018), 其长期生存在遍布病原微生物的垃圾堆和污水池等恶劣环境中, 有很强的生存和抗疾病能力 (徐毅, 2015; Adenusi *et al.*, 2018), 文献报道其肠道内生活着大量的共生微生物 (陈后亮等, 2015), 其抗病能力可能与肠道内的共生菌群相关联。放线菌广泛存在于自然界中, 有研究表明其能产生多种抗菌次级代谢产物, 以往的研究往往针对土壤环境中的放线菌, 分离得到新型化合物的几率逐年降低 (胡松英等, 2011), 因此寻找新的特境放线菌资源更具有研究价值。本课题组已从美洲大蠊肠道分离得到 159 株内生放线菌 (方霞等, 2016), 本文将金黄色葡萄球菌和 MRSA 等两种人体常见致病菌作为指示菌, 利用琼脂扩散法检测这 159 株肠道内生放线菌是否具有体外抗菌活性, 随后用分子生物学方法对目标放线菌进行分类鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 放线菌库和指示病原菌

本研究 159 株放线菌从美洲大蠊肠道分离得到 (方霞等, 2016), 置于 -80°C 存于无菌甘油密闭保存。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC25923) 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, ATCC25213)

采购自广东省微生物研究所。

1.1.2 培养基

菌株采用高氏合成 I 号培养基 (广东环凯微生物科技有限公司) 进行划线分离, 分离培养基中加入了 $65\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的重铬酸钾防止其他细菌的干扰; 将菌株接种到高氏合成 I 号培养基进行纯化, 并将纯化过的放线菌置于高氏合成 I 号培养基上保存; 种子培养基: 酵母提取物 2 g, 胰蛋白胨 12 g, 葡萄糖 10 g, 无菌水 1 000 mL, pH 7.2 ~ 7.4; 采用链霉菌培养基 2 号 (ISP-2) 用于发酵培养, ISP-2: 葡萄糖 4 g, 麦芽提取物 10 g, 酵母提取物 4 g, 无菌水 1 000 mL, pH 7.2 ~ 7.4; LB 液体培养基: 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 无菌水 1 000 mL; LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入 20 g 的琼脂。

1.1.3 主要实验试剂及仪器

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程技术有限公司); Taq PCR Master mix、DNA Marker (日本 TaKaRa 公司)。台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); GelDoc 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 电泳仪 (北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 美洲大蠊肠道 159 株内生放线菌的抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性的测定

用接种环将 159 株放线菌在高氏一号平板上划线, 将平板培养 7 d, 依次挑取各单菌落, 将菌落接种到 100 mL 的种子培养基中, 置于 28°C 恒温摇床中, 以 180 r/min 摇瓶培养 2 d, 然后将菌株的种子液以 5% 的接种量转接到 ISP-2 中, 发酵培养条件为 180 r/min、 28°C 摇瓶发酵 7 d, 待菌株发酵完成, 将菌株发酵液以 4 000 r/min 离心 30 min, 弃菌丝体, 收集发酵液上清液用于后期实验 (陈雨晴等, 2014)。运用琼脂扩散法中的牛津杯法 (余之蕴等, 2016) 测定各菌株发酵液抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性: 将金黄色葡萄球菌和 MRSA

分别接种于 100 mL LB 液体培养基中, 置于 37℃ 恒温摇床中, 以 180 r/min 振荡培养 6~8 h, 各取 150 μ L 菌液加入 100 mL LB 培养基, 混合均匀后倒板。将培养基置于室温中冷却, 随后将牛津杯平稳地放置在平板上, 各牛津杯孔中依次添加 200 μ L 收集来的各菌株的发酵液上清液, 吸取等体积的液体空白培养基作为阴性对照, 分别以 50 μ L 64 μ g/mL 的氨苄青霉素钠和 50 μ L 256 μ g/mL 的盐酸万古霉素作为阳性对照。将平板置于 37℃ 培养箱中过夜培养, 观察是否出现抑菌圈 (梁大敏等, 2019), 并用直尺测量抑菌圈的直径。

1.2.2 细菌 16S rRNA 系统发育树分析

选择具有抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性的放线菌, 依次提取各放线菌的基因组 DNA, 用通用保守引物 27f 和 1492r 对目标菌株的 16S rRNA 基因扩增, 通用引物 (Passari *et al.*, 2015) (27f 为 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492r 为 TACGGC TACCTTGTACGA CTT) 由上海英潍捷基公司设计完成。50 μ L PCR 扩增反应体系: Taq PCR Master mix 25 μ L, 上游、下游引物各 2.5 μ L, 模板 DNA 2.0 μ L, 高压灭菌 ddH₂O 18 μ L, 同时设立空白对照组 (模板 DNA 用无菌 ddH₂O 代替), 上述过程均确保在无菌环境下操作。PCR 扩增反应条件: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 57℃ 70 s, 72℃ 30 s, 反应 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 将扩增产物放置 4℃ 保存。将 PCR 扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 委托上海生物工程有限公司进行扩增产物的基因测序。

1.2.3 菌株 16S rRNA 系统发育树分析以及 BLAST 同源性比对

将测序所得序列输入 NCBI 的 GenBank 数据库中, 将各菌株序列进行 BLAST 同源性对比, 获得同源性较高的菌株, 随后选用 MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) 软件中的 Neighbor Joining 进行系统发育树分析 (Scholz, 2016), 自展检验 (bootstrap) 重复抽样 1 000 次, 以评估系统进化树的拓扑结构稳定性, 发育树各节点数值代表自展的重复比例。

1.2.4 菌株抗生素合成关键酶基因和卤化酶基因的鉴定

参考 Izumikawa 等 (Izumikawa *et al.*, 2003; Hornung *et al.*, 2007; 王海强等, 2017) 的方法, 在 GenBank 数据库中检索 Helogebase、非核糖体多

肽合成酶和多聚酮合酶的相关氨基酸序列, 利用 Clustal W 软件对其进行对比后, 使用软件 Primer 5.0 设计引物, 随后用 DNAMAN 软件对引物进行功能评估, 获得 2 个关键次级代谢生物合成基因 NRPS (A3F: GCSTACSYSATSTACACSTCSGG; A7R: SASGTCVCCSGTSCGGTAS)、PKS I (K1F: TSAA GTCSAACATCGGBCA; M6R: CGCAGGTTSCSGTACCAGTA) 和卤化酶基因 FADH2 (Halo-B4-FW: TTCCCSCGSTACCASATCGGSGAG; Halo-B4-RV: GSGGATSWMCCAGWACCAS CC) 的 PCR 扩增引物序列。根据 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书方法, 依次提取各放线菌的基因组 DNA, 并分别对 2 个关键合成酶基因和卤化酶基因 FADH2 进行 PCR 扩增, 将 PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行分析。

2 结果与分析

2.1 对金黄色葡萄球菌和 MRSA 有拮抗作用的放线菌的筛选结果

159 株放线菌中有 49 株放线菌能够抑制金黄色葡萄球菌和 MRSA 的活性, 49 株放线菌中链霉菌属有 36 株, 占 73.47%, 为优势菌属; 其余 13 株放线菌隶属于 6 个菌属, 分别为戈登氏菌属、微杆菌属、短状杆菌、分枝杆菌、无色杆菌属和小单孢菌属。其中, 能够抑制金黄色葡萄球菌生长的内生放线菌有 44 株, 能够抑制 MRSA 生长的为 16 株。有 11 株内生放线菌对两种细菌均有拮抗作用, 分别是 WA4-31、WA12-1-1、WA5-4-31、WA22-1-2、WA2-34、WA22-2-1、WA23-2-1、WA12-1-21、WA12-1-25、WA20-4-6、WA23-1-4, 测量 11 株放线菌的抑菌圈直径, 对金黄色葡萄球菌和 MRSA 抑制作用最强的分别为 WA12-1-1 (15.63 $\pm$ 0.57 mm) 和 WA22-1-2 (15.23 $\pm$ 0.21 mm), 实验结果见图 1、图 2、表 1 和表 2。

2.2 11 株放线菌的系统发育树构建、BLAST 同源性对比和分子生物学鉴定

将对金黄色葡萄球菌和 MRSA 具有抑制作用的菌株 16S rRNA 基因序列输入 NCBI 的 GenBank 数据库中, 运用 BLAST 程序进行同源性对比, 11 株菌分别属于戈登氏菌属、微杆菌属、无色杆菌属和链霉菌属。选取亲缘性最高的菌株序列, 利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。结果见图 3, 进一步验证 WA4-31 为戈登氏菌, WA12-

1-21、

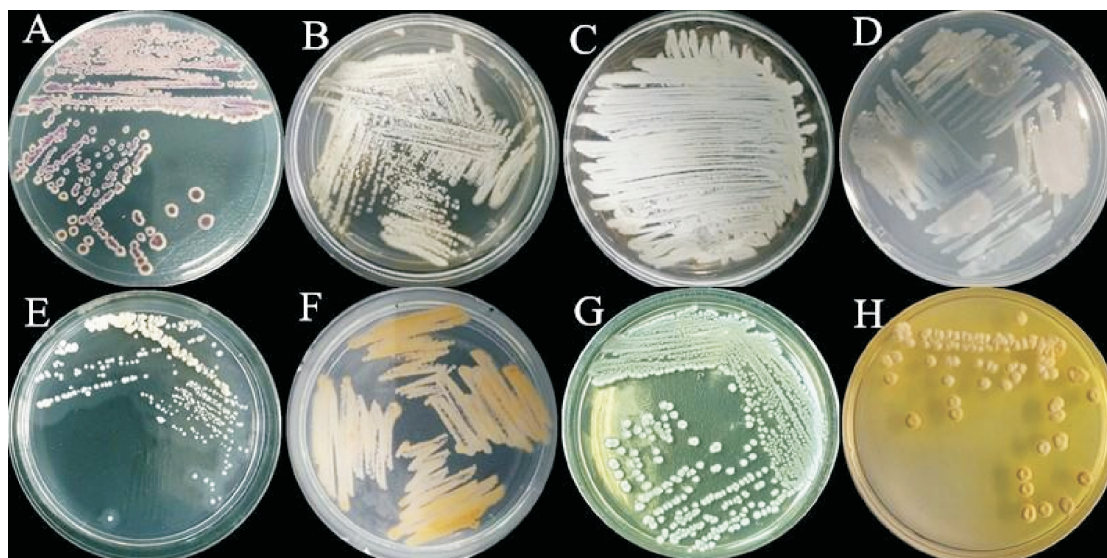


图1 美洲大蠊部分肠道内生放线菌在高氏 I 号培养基上的形态学观察

Fig. 1 Morphological observation of some endophytic actinomycetes of *Periplaneta americana* on Gaoshi I Medium

注: A ~ H 分别为菌株 WA23-2-1、WA22-1-2、WA12-1-21、WA2-7、WA22-2-1、WA5-2-37、WA5-4-31、WA5-1-29。Note: A ~ H were strains WA23-2-1、WA22-1-2、WA12-1-21、WA2-7、WA22-2-1、WA5-2-37、WA5-4-31、WA5-1-29.

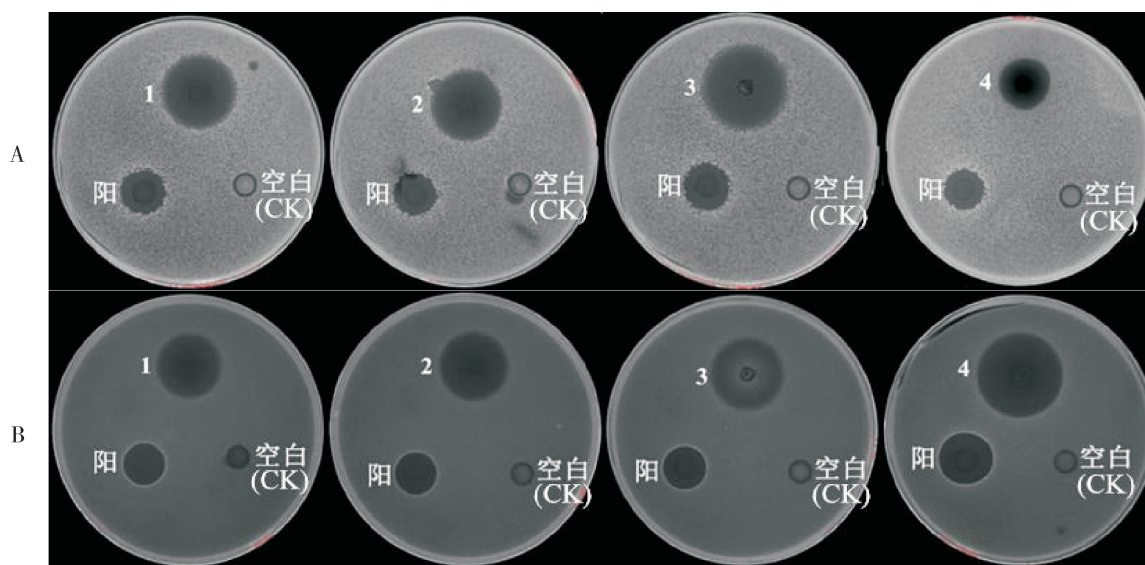


图2 美洲大蠊部分肠道内生放线菌体外抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性筛选实验结果

Fig. 2 Screening results of *in vitro* anti-*Staphylococcus aureus* and MRSA activity of some endophytic actinomycetes from the guts of *Periplaneta americana*

注: A, 1~4 分别为 5-2-24、22-1-2、5-2-37、23-2-1 发酵液上清液对金黄色葡萄球菌的作用结果,空白为空白对照(等量液体空白发酵液),阳为阳性对照(50 μ L 64 μ g/mL 的氨苄青霉素钠);B, 1~4 分别为 5-4-31、5-1-7、10-1-6、5-2-40 发酵液上清液对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的作用结果,空白为空白对照(等量液体空白发酵液),阳为阳性对照(50 μ L 256 μ g/mL 的盐酸万古霉素)。Note: A, 1~4 were the effects of 5-2-24, 22-1-2, 5-2-37, 23-2-1 fermentation broth supernatant on *S. aureus*, blank is blank Control (equal liquid blank fermentation broth), positive as positive control (50 μ L of 64 μ g/mL ampicillin sodium); B, 1~4 were the effects of 5-4-31, 5-1-7, 10-1-6, 5-2-40 fermentation broth supernatant on Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), blank is blank Control (equal liquid blank fermentation broth), positive as positive control (50 μ L of 256 μ g/mL vancomycin hydrochloride).

表 1 具有抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性的 49 株美洲大蠊肠道内生放线菌的抗菌情况

Table 1 Distribution of 49 strains of endophytic actinomycetes from the Guts of *Periplaneta americana* with anti-*Staphylococcus aureus* and MRSA activity

菌属 Genus	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
链霉菌属 (株) <i>Streptomyces</i> (strain)	32	12
戈登氏菌属 (株) <i>Gordon's</i> (strain)	2	1
微杆菌属 (株) <i>Microbacteria</i> (strain)	4	2
短状杆菌属 (株) <i>Brevibacterium</i> (strain)	—	1
分枝杆菌属 (株) <i>Mycobacterium</i> (strain)	1	—
无色杆菌属 (株) <i>Achromobacter</i> (strain)	3	—
小单孢菌属 (株) <i>Micromonospora</i> (strain)	2	—
合计 (株) Total (strain)	44	16

注 “—” 表示无抑菌活性。Note “—” indicates that it has no antibacterial activity.

表 2 11 株具有抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性放线菌的抑菌圈结果

Table 2 Results of bacteriostatic circle of 11 strains of actinomycetes with anti-*Staphylococcus aureus* and MRSA activity

菌株编号 Strain number	金黄色葡萄球菌 (mm) <i>Staphylococcus aureus</i>	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (mm) Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
WA2-34	12.27 ± 0.25	13.43 ± 1.02
WA4-31	9.33 ± 0.61	7.77 ± 0.82
WA5-4-31	13.77 ± 0.25	12.40 ± 0.36
WA12-1-1	15.63 ± 0.57	14.33 ± 0.15
WA12-1-21	13.20 ± 0.20	11.50 ± 0.50
WA12-1-25	7.40 ± 0.53	6.90 ± 0.85
WA20-4-6	12.63 ± 0.32	10.70 ± 0.26
WA22-1-2	13.30 ± 0.26	15.23 ± 0.21
WA22-2-1	11.90 ± 1.01	8.47 ± 0.42
WA23-2-1	10.53 ± 0.50	14.37 ± 0.32
WA23-1-4	8.33 ± 0.47	9.33 ± 1.70

WA12-1-25 为微杆菌，WA5-4-31 为无色杆菌，WA22-1-2、WA2-34、WA22-2-1、WA20-4-6、WA12-1-1、WA23-1-4、WA23-2-1 为链霉菌，且分别与土壤中的戈登氏菌属、微杆菌属、无色杆菌属和链霉菌属亲缘关系较近。

2.3 11 株放线菌部分抗生素合成关键酶基因的筛选结果

琼脂糖凝胶电泳结果显示 (表 3)，有 9 株放

线菌检测到卤化酶基因 FADH2 (约 700 bp)，有 7 株放线菌检测到两种关键酶基因 NRPS (约 900 bp) 和 PKS I (约 750 bp) 中的一种或两种。另外 WA2-34、WA12-1-1、WA12-1-21、WA20-4-6、WA22-1-2、WA22-2-1 均检测到两种关键酶基因和卤化酶基因 FADH2。

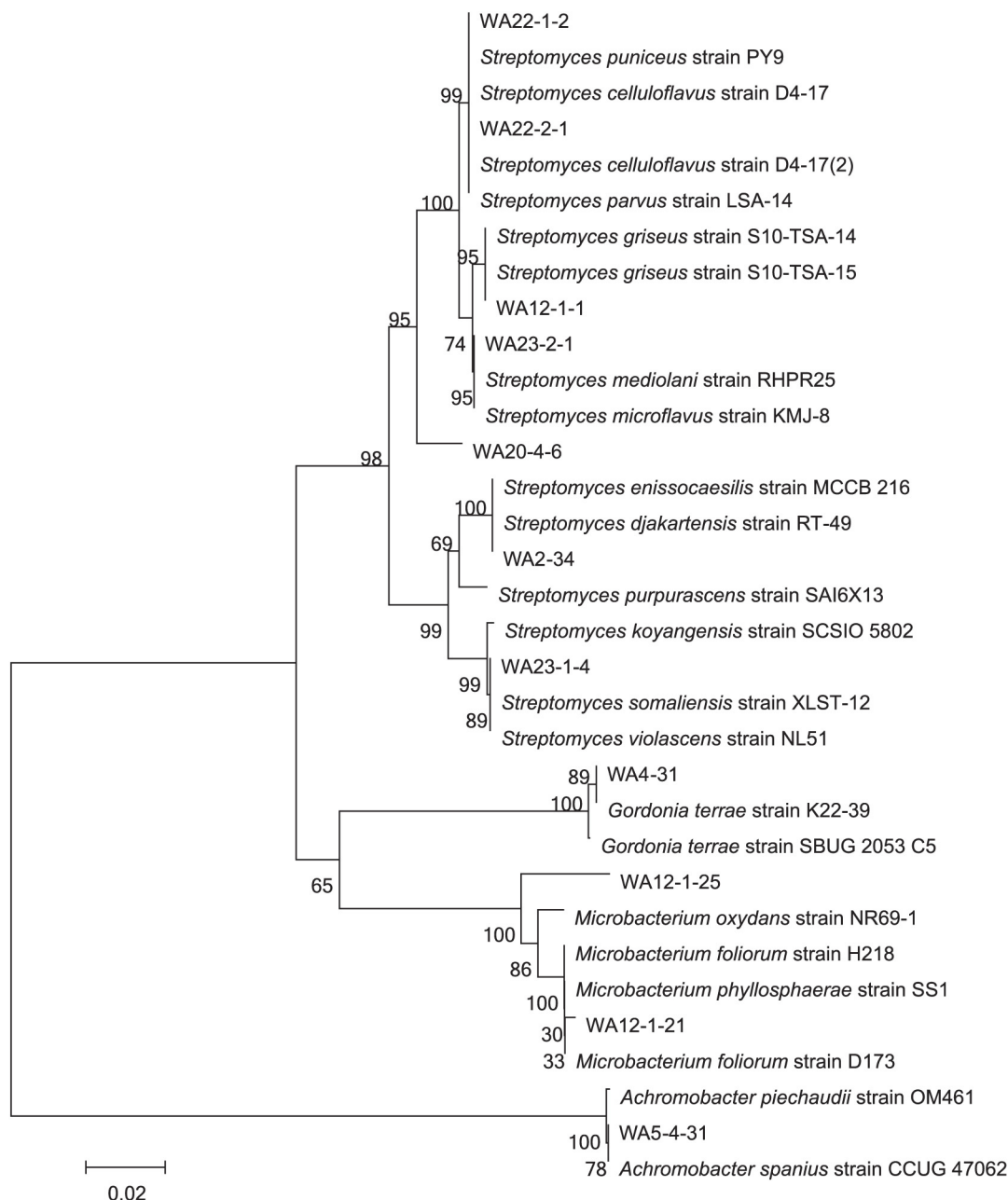


图3 抑制两种细菌生长的11株内生放线菌的16S rRNA基因序列系统发育树

Fig. 3 16S rRNA gene sequence phylogenetic tree analysis of the 11 strains of Actinomycetes with anti-*Staphylococcus aureus* and MRSA activity

3 结论与讨论

金黄色葡萄球菌可造成普遍的临床感染，它是感染性心内膜炎和菌血症以及骨关节，皮肤和软组织等相关感染的主要病因（Tong *et al.*, 2015）。由于临床上抗生素使用的不合理性，导致细菌的耐药性问题愈发紧迫（赵艳坤等，2018）。MRSA引起的健康问题愈发严重，与越来越多的感

染相关，影响了全球人类的健康，且通常具有多重耐药。在临床实践中，MRSA构成了主要威胁，显著增加了感染发病率，死亡率和整体医疗费用（Bassetti *et al.*, 2019; Emeka-Nwabunnia *et al.*, 2019），因此迫切需要开发新型广谱抗生素来对抗频繁出现的多重耐药病原体（Sengupta *et al.*, 2015）。昆虫与微生物之间的共生相互作用是自然界中广泛存在的，微生物共生体能够产生具有抗菌活性的物质，为宿主提供化学防御，用以抵抗

表 3 11 株具有抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性菌株部分抗生素合成关键酶基因的筛选结果

Table 3 Screening results of some key genes for antibiotic synthesis of 11 strains with anti-*Staphylococcus aureus* and MRSA activity

菌株编号 Strain number	FADH2-依赖性卤化酶 FADH2-dependent halogenase	非核糖体多肽合成酶 Nonribosomal peptide synthetase	I 型聚酮合酶 Polyketone synthase I
WA2-34	+	+	+
WA4-31	+	+	-
WA5-4-31	-	-	-
WA12-1-1	+	+	+
WA12-1-21	+	+	+
WA12-1-25	+	-	+
WA20-4-6	+	+	+
WA22-1-2	+	+	+
WA22-2-1	+	+	+
WA23-2-1	-	-	-
WA23-1-4	-	-	-

病原体 (Aileen *et al.* , 2016; Arango *et al.* , 2016) 。美洲大蠊是已知的最古老的有翅昆虫之一，具有很强的适应各种复杂环境的能力 (Zhang *et al.* , 2016) ，由于其生长环境的特殊性，其肠道内共生菌可能产生抗菌活性物质帮助其增强对有害病原菌的抵抗力。

在生物活性物质的天然生产者中，放线菌是药物应用中新的抗生素的主要来源 (Jakubiec-Krzesniak *et al.* , 2018) ，尤其是放线菌中的链霉菌属，提供了在现在临床中使用的 60% 以上的抗生素 (Esnault *et al.* , 2017) 。本研究前期从美洲大蠊肠道分离获得 159 株内生放线菌，本研究在此基础上对上述菌株的抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性进行了分析，结果显示 30. 82% (49 株) 的内生放线菌对金黄色葡萄球菌和 MRSA 表现出不同程度的抑制作用，这 49 株放线菌包含有链霉菌属、戈登氏菌属、微杆菌属、短状杆菌属、分枝杆菌属、无色杆菌属和小单孢菌属，其中 WA4-31、WA22-1-2、WA2-34、WA22-2-1、WA23-2-1、WA12-1-21、WA5-4-31、WA12-1-25、WA20-4-6、WA12-1-1、WA23-1-4 等 11 株美洲大蠊肠道共生放线菌对两种细菌均有抗菌活性。推测这些放线菌中有可能产生具有抗金黄色葡萄球菌和 MRSA

活性的新的天然产物，尤其是对两株病菌均具有抗性的放线菌。许多具有重要药用研究价值的微生物次级代谢产物的合成往往需要通过非核糖体多肽合成酶和聚酮合酶共同参与形成结构模块，随后通过 FADH2-依赖性卤化酶催化，从而形成具有抑菌活性的代谢产物 (Neumann *et al.* , 2008; 薛永常等, 2014; 滕安然等, 2019) 。具有多种抗菌活性的放线菌具有很高的研究价值，值得优先研究，因此，本实验对 11 株放线菌的关键酶基因 PKS I、NRPS 和 FADH2-依赖性卤化酶基因进行筛选，发现 WA2-34、WA12-1-1、WA12-1-21、WA20-4-6、WA22-1-2、WA22-2-1 均检测到两种关键酶基因和卤化酶基因 FADH2，说明这 6 株放线菌有分泌聚酮类和非核糖体肽类化合物的潜力。现在已知的抗生素大部分产自链霉菌，但随着研究的深入，从链霉菌中分出新型抗生素的几率越来越少 (袁丽杰等, 2012) 。戈登氏菌属、微杆菌属、短状杆菌属、分枝杆菌属、无色杆菌属和小单孢菌属是放线菌中的稀有菌属，针对这类菌群的抗菌活性的研究较少。例如有关戈登氏菌属的研究多与其生物降解能力相关 (Liu N *et al.* , 2020) ，鲜有研究其发酵产物的抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 的作用，而且这 4 株稀有放线菌中的

WA5-4-31 和 WA12-1-25 对 MRSA 和金黄色葡萄球菌均有较强的抗菌活性。因此研究 11 株放线菌中的稀有菌属, 有可能分出具有抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性的新颖的化合物。下一步实验拟重点对这 11 株放线菌中的 4 株稀有菌属进行研究, 运用硅胶柱层析、半制备高效液相、核磁共振、质谱等现代波谱技术对这些放线菌的次级代谢产物进行分析研究, 以期获得具有良好的抗金黄色葡萄球菌和 MRSA 活性的新天然产物。

本研究在对 159 株美洲大蠊肠道内生放线菌的研究中发现 30.82% 放线菌的次级代谢产物对金黄色葡萄球菌和 MRSA 可产生不同程度的拮抗作用, 其中有 22.45% (11 株) 放线菌对 2 种指示病原菌均有不同程度的抑制作用, 且 11 株放线菌中有 4 株放线菌为稀有菌属, 揭示了美洲大蠊肠道内生放线菌具有产生活性次级代谢产物的潜力。

参考文献 (References)

- Adenusi AA, Akinyemi MI, Akinsanya D. Domiciliary Cockroaches as carriers of human intestinal parasites in Lagos Metropolis, Southwest Nigeria: Implications for public health [J]. *Journal of Arthropod-borne Diseases*, 2018, 12 (2): 141–151.
- Aileen, Berasategui, Shantanu, *et al.* Potential applications of insect symbionts in biotechnology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100 (4): 1567–1577.
- Arango RA, Carlson CM, Currie CR, *et al.* Antimicrobial activity of actinobacteria isolated from the guts of subterranean termites [J]. *Environmental Entomology*, 2016, 45 (6): 1415–1423.
- Bassetti M, Russo A, Carnelutti A, *et al.* Emerging drugs for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2019, 24 (3): 191–204.
- Bi ZF, Song MZ, Mao CQ, *et al.* Antimicrobial effects and mechanisms of natural plant antimicrobial solution against *Staphylococcus aureus* [J]. *Journal of Biology*, 2015, 32 (6): 50–54. 卮振飞, 宋明珠, 郭灿泉, 等. 天然植物抗菌液对金黄色葡萄球菌的抑菌作用及机理 [J]. *生物学杂志*, 2015, 32 (6): 50–54.
- Chen YQ, Huang HQ, Liu M, *et al.* Isolation and identification of an *Actinomycetes* strain against *Rootknot nematode* from mangrove soil [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 10: 174–178. 陈雨晴, 黄惠琴, 刘敏, 等. 1 株具有抗根结线虫活性的红树林土壤放线菌的分离与鉴定 [J]. *生物技术通报*, 2014, 10: 174–178.
- Chen QL, Tang DX, Long FX. Research progress of tujia medicine Cockroach [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2015, 26 (7): 1719–1721. 陈启亮, 唐东昕, 龙奎奎. 土家药蜚蠊的研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26 (7): 1719–1721.
- Emeka-Nwabunnia I, Ejigeme K, Oguoma O I. Antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from children under the age of five years in Anambra State [J]. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 2019, 36 (1): 213–221.
- Esnault C, Dulermo T, Smirnov A, *et al.* Strong antibiotic production is correlated with highly active oxidative metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145 [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 200–209.
- Fang X, Shen J, Jin XB, *et al.* Isolation and identification of endophytic *Actinomycetes* from medical insects (*Periplaneta americana*) [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2016, 11 (6): 550–553. 方霞, 沈娟, 金小宝, 等. 药用昆虫美洲大蠊内生放线菌的分离和鉴定 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11 (6): 550–553.
- Gao J, Shen YM, Yue BS. Research progress in pharmacological action and clinical efficacy of *Periplaneta americana* [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2018, 34 (4): 203–208. 高洁, 沈咏梅, 岳碧松. 美洲大蠊药理作用及其临床疗效的研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34 (4): 203–208.
- Hu SY, Zhang YL, Huang JC, *et al.* Screening of antifungal symbiotic *Actinomycete* from *Termite* and initial identification of strain BY02 [J]. *Journal of Microbiology*, 2011, 31 (3): 17–20. 胡松英, 张应焰, 黄娟翠, 等. 白蚁共生放线菌的抗菌活性筛选及菌株 BY02 的初步鉴定 [J]. *微生物学杂志*, 2011, 31 (3): 17–20.
- Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski, *et al.* A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources [J]. *Chembiochem*, 2007, 8 (7): 757–766.
- Izumikawa M, Murata M, Tachibana K, *et al.* Cloning of modular type I polyketide synthase genes from salinomycin producing strain of *Streptomyces albus* [J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, 11 (16): 3401–3405.
- Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisch-Mateusiak A, Guspil A, *et al.* Secondary metabolites of *Actinomycetes* and their antibacterial, antifungal and antiviral properties [J]. *Pol. J. Microbiol*, 2018, 67: 259–272.
- Liang DM, Tian P, Liu T, *et al.* Screening and potential evaluation of secondary metabolic of anti-MRSA *actinomycetes* from soil [J]. *China Brewing*, 2019, 38 (7): 131–135. 梁大敏, 田鹏, 刘铁, 等. 土壤来源抗 MRSA 放线菌的筛选及次级代谢潜力评估 [J]. *中国酿造*, 2019, 38 (7): 131–135.
- Liu N, Shi YE, Li J, *et al.* Isolation and characterization of a new highly effective 17 β -estradiol-degrading *Gordonia* sp. strain R9 [J]. *3 Biotech*, 2020, 10 (4): 1–10.
- Neumann CS, Fujimori DG, Walsh CT, *et al.* Halogenation strategies in natural product biosynthesis [J]. *Chemistry & Biology*, 2008, 15 (2): 99–109.
- Passari AK, Mishra VK, Saikia R, *et al.* Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic *Actinomycetes* associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 273.
- Scholz CFP, Kilian M. The natural history of cutaneous

- propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66 (11): 4422–4432.
- Sengupta S, Pramanik A, Ghosh A, et al. Antimicrobial activities of *Actinomycetes* isolated from unexplored regions of sundarbans mangrove ecosystem [J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15 (1): 170.
- She ZY, Huang BY, Liu HQ, et al. Antibacterial activity of foods additives against five strains of probiotics by oxford plate assay system [J]. *The Food Industry*, 2016, 37 (1): 171–174. [徐之蕴, 黄宝莹, 刘海卿, 等. 牛津杯法测定食品添加剂对五种益生菌的抑菌活力 [J]. *食品工业*, 2016, 37 (1): 171–174]
- Liu XY, Ma YC. Screening and identification of antagonistic endophytes against drug-resistant bacteria from medicinal plants [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31 (3): 154–160. [刘晓瑜, 马玉超. 抗耐药细菌药用植物内生菌的筛选与鉴定 [J]. *生物技术通报*, 2015, 31 (3): 154–160]
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10): 2731–2739.
- Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28 (3): 603–661.
- Teng AR, Li L, Su HM. The research progress in NRPS and PKS hybrid metabolites [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology*, 2019, 26 (5): 455–460. [滕安然, 李力, 苏红梅. 聚酮酶和非核糖体多肽合成酶杂合体研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2019, 26 (5): 455–460]
- Wang HQ, An XX, Hou SF, et al. Biosynthetic potential of 39 strains of endophytic *Actinomycetes* [J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2017, 37 (3): 254–261. [王海强, 安向向, 侯淑芬, 等. 39 株内生放线菌次级代谢产物的合成潜能 [J]. *河北大学学报 (自然科学版)*, 2017, 37 (3): 254–261]
- Xu Y. Research progress on *Cockroaches* as carriers of pathogens [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2015, 22 (5): 636–639. [徐毅. 蜚蠊病原体携带研究进展 [J]. *实用预防医学*, 2015, 22 (5): 636–639]
- Xue YC, Cai HM, Li G. Cloning of a halogenase gene from marine *Streptomyces* sp. B-17 and its bioinformatics analysis [J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 34 (2): 12–16. [薛永常, 蔡宏明, 李根. 海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. B-17 卤化酶基因的克隆及生物信息学分析 [J]. *微生物学杂志*, 2014, 34 (2): 12–16]
- Yuan LJ, Liu AH, Zhang YQ, et al. Screening and identification of a rare *Actinomycetes* exhibiting IMPDH inhibitive activity [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012, 12: 150–155. [袁丽杰, 刘爱华, 张玉琴, 等. 一株具有 IMPDH 抑制活性的稀有放线菌的筛选和鉴定 [J]. *生物技术通报*, 2012, 12: 150–155]
- Zhang J, Zhang Y, Li J, et al. Midgut transcriptome of the *Cockroach periplaneta americana* and its microbiota: Digestion, detoxification and oxidative stress response [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11 (5): e0155254.
- Zhao YK, Liu HM, Wang S, et al. Research progress on drug resistance of *Staphylococcus aureus* in Bovine mastitis [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34 (10): 18–25. [赵艳坤, 刘慧敏, 王帅, 等. 奶牛乳房炎源金黄色葡萄球菌耐药性研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2018, 34 (10): 18–25]