

研究论文

大叶藻内生放线菌的分离及抗菌活性筛选

陈 雷, 申琳溪, 马翠红, 王光玉*

(哈尔滨工业大学(威海)海洋科学与技术学院 生物工程系, 山东 威海 264209)

摘 要: 大叶藻是一种水生单子叶植物,是构成海草床的主要藻类之一。对大叶藻内生放线菌及其活性物质的研究是发现海洋微生物资源和新天然产物的有利途径。通过纯培养的方法,使用 2216E 等 7 种培养基,从山东省威海市荣成天鹅湖采集的大叶藻样品中分离出 62 株内生放线菌,并利用纸片法对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和副溶血性弧菌等 7 种指示菌进行了抗菌活性筛选,其中 RO 培养基分离出放线菌的种类和数量都较为丰富。抗菌活性筛选结果表明,48 株内生放线菌(占 77.42%)至少对 1 种指示菌表现出一定的抑制作用,36 株内生放线菌(占 58.06%)抑制 2 种及 2 种以上指示菌;并且内生放线菌对革兰氏阳性指示菌(金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌)的抗菌效果明显优于革兰氏阴性指示菌。研究结果表明,大叶藻的内生放线菌具有较好的抗菌活性,可以为海洋来源抗生素的研究提供新资源。

关键词: 抗菌活性;内生放线菌;大叶藻

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2021)01-0102-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-6647.2021.01.010

引用格式: CHEN L, SHEN L X, MA C H, et al. Isolation and antimicrobial activity screening of endophytic actinomycetes associated with *Zostera marina* [J]. Advances in Marine Science, 2021, 39(1): 102-109. 陈雷, 申琳溪, 马翠红, 等. 大叶藻内生放线菌的分离及抗菌活性筛选[J]. 海洋科学进展, 2021, 39(1): 102-109.

植物内生菌是指在植物的部分或全部生活史中,生长在植物细胞间或细胞内,且不会对植物造成直接或间接明显负面影响的一类微生物,包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌^[1]。放线菌是一类革兰氏阳性菌,相比于其他内生菌群,内生放线菌有着其独特的代谢产物,是新型生物活性化合物的重要来源^[2]。研究表明,内生菌普遍存在于各种陆生及水生植物中,而最早发现的内生放线菌是与非豆科植物共生固氮的弗兰克氏属(*Frankia*)放线菌^[3-4]。2003 年 Strobel 和 Daisy^[5]曾指出,用于分离内生菌的植物宿主要有选择性,应选择有重要植物学价值、处于不常见环境、有特殊生物学意义等的植物。目前对于植物内生放线菌的研究,以红树林、热带常绿灌木林及一些药用植物研究居多。

大叶藻(*Zostera marina*)是一种水生单子叶植物,是最常见的海草床种类之一,在太平洋和大西洋沿海均有广泛分布^[6]。我国的大叶藻主要分布于辽宁、河北和山东等沿海水域^[7]。目前对于大叶藻的研究主要集中在其生态作用和生态修复等方面。相较于其他陆生高等植物,大叶藻因生长于海中,生长代谢机制独特,其体内可能蕴藏着独特的共生微生物资源,目前有关这方面的研究报道较少。研究表明,自然环境中可在实验室条件下被分离培养的稀有放线菌较少,所用培养基和培养条件等都不同^[8-9]。本研究通过纯培养法,使用多种培养基对荣成天鹅湖湿地大叶藻的内生放线菌进行分离,以期获得较多的菌株,丰富滨海植物内生菌资源,为内生放线菌资源的利用和天然产物的开发提供研究基础。

收稿日期:2019-10-28

作者简介:陈 雷(1974—),女,副教授,博士,主要从事海洋微生物资源方面研究。E-mail: chenleihit@163.com

* 通信作者:王光玉(1972—),男,副教授,博士,主要从事海洋微生物资源方面研究。E-mail: wanggy18_2007@163.com

(王佳实 编辑)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大叶藻样品

大叶藻(*Zostera marina*)样品采自山东省威海市荣成天鹅湖湿地(122°33'E, 37°20'N)。将采集到的样品进行表面清洁后装入无菌封口袋中,并放在冷藏箱内(4℃)带回实验室用于分离试验。

1.1.2 培养基

分离培养基:采用 2216E^[10],HV^[11],SCA^[12],M2^[13],ISP2^[14],R2A^[15]和 RO 七种培养基^[16]。为抑制细菌和真菌的生长,本试验需在培养基灭菌后加入抗生素(放线菌酮的终浓度为 100 mg/mL,萘啶酸的终浓度为 20 mg/mL),用 0.22 μm 的滤膜过滤备用。

M1 固体及液体培养基^[10]用于待测菌的纯化、培养与保藏。Mueller-Hinton 肉汤(Mueller-Hinton Broth,MHB)和 Mueller-Hinton 琼脂(Mueller-Hinton Agar,MHA)均购于青岛海博生物技术有限公司,用于指示菌的培养与抗菌活性筛选。

1.1.3 指示菌

本试验采用的指示菌包括:大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*,简称 Ec)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,简称 Sa)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*,简称 Bs)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*,简称 Pa)和白假丝酵母(*Candida albicans*,简称 Ca),5 种均来自中国科学院微生物研究所的中国普通微生物菌种保藏管理中心;副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*,简称 Vp)来自广东环凯微生物科技有限公司;鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*,简称 Va)由中国科学院海洋研究所的邹玉霞副研究员提供。

1.2 试验方法

1.2.1 大叶藻内生放线菌的分离

将采集到的大叶藻样品置于超净工作台中,为避免大叶藻表面附着的微生物和其他杂质对试验的干扰,需要对采集到的大叶藻样品进行表面消毒:首先,在超净工作台中将大叶藻样品用无菌海水冲洗 3~5 次;然后,将大叶藻置于灭过菌的平皿中,用次氯酸钠溶液(有效氯 5%)浸泡 5 min,用无菌水清洗 3 次;用乙醇($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=3:1$)浸泡 3 min^[17],再用无菌水清洗 3 次,使用无菌滤纸吸干大叶藻样品表面的水分;最后,取最后一遍清洗的无菌水 100 μL 涂布于 2216E 培养基上,28℃恒温培养 14~21 d 后如果无菌落长出,表明大叶藻叶片的表面消毒较彻底^[18]。

用无菌的镊子和剪刀将样品剪成约 2 mm×2 mm 的小块,在灭过菌的研钵中研磨成匀浆用于分离试验。首先,将大叶藻匀浆置于 55℃水浴锅中加热 6 min,取 0.5 mL 匀浆加入到含有 4.5 mL 无菌海水的试管中,振荡混匀;然后,进行梯度稀释,用移液器从 1:1 000、1:10 000 和 1:100 000 的试管中分别取 100 μL 的溶液均匀涂布于 7 种固体分离培养基上,每种浓度在每种培养基上做 3 个平行;最后,放于 28℃恒温培养箱中培养 7~30 d。

用接种环挑取形态不同的菌落进行多次平板划线纯化,同时进行菌落数量和种类的记录,将纯化后的放线菌保存到 M1 固体培养基斜面上,置于 4℃冰箱保藏。同时用质量分数 15%的甘油进行菌种保藏,置于-80℃冰箱中。

1.2.2 抗菌活性筛选

采用纸片法^[19-20],通过观察待测放线菌的发酵产物粗提物对 7 种指示菌生长的抑制来筛选抗菌活性。用接种环将待测菌株接种于 50 mL M1 液体培养基中,在 150 r/min,28℃的摇床条件下培养 7~10 d。发酵结束后,在发酵液中加入等量的乙酸乙酯萃取 3 次。将有机相合并后,在旋转蒸发仪中减压蒸干,用

DMSO 溶解粗提物,配成 25 mg/mL 的溶液,置于 4 ℃ 冰箱中保存,用于抗菌活性检测。

将 7 种指示菌分别接种于 MHB 培养基中,28 ℃ 摇床中培养过夜。在直径为 6 mm 的滤纸片上滴10 μL 粗提物溶液。将适量的指示菌在二次传代培养后 24 h 内,用生理盐水配制成麦氏浊度为 0.5 的菌悬液,并将该菌悬液各 100 μL 涂布于 MHA 培养基平板上,放置 3~5 min,让表面多余的水分被琼脂吸收,然后将滤纸片放在平板上。用等量的二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)作为阴性对照;用氯霉素(30 μg)、庆大霉素(10 μg)和制霉菌素(10 μg)作为阳性对照,所有试验需重复 3 次。然后将抗菌活性测试平板放在指示菌适宜的温度下培养 1~2 d。通过测定在纸片周围产生的抑菌圈的直径来反映其抗菌活性。

2 结果与分析

2.1 大叶藻内生放线菌的分离结果

从大叶藻中共分离出内生放线菌 62 株。根据菌株在培养基上的菌落特征,比较了不同培养基的放线菌分离效果,结果见表 1。其中,RO 培养基分离出的放线菌的种类和数量最多,其次是 ISP2 培养基,M2 培养基分离出的放线菌的种类和数量都是最少的。

表 1 大叶藻内生放线菌在 7 种培养基上的分离效果

Table 1 Isolation result of endophytic actinomycetes associated with *Zostera marina* on seven kinds of media

培养基	总数/ ($\times 10^4$ cfu $\cdot$ g $^{-1}$)	种类数/种	培养基	总数/ ($\times 10^4$ cfu $\cdot$ g $^{-1}$)	种类数/种
2216E	1.13	5	SCA	1.23	6
HV	1.13	6	R2A	1.12	4
ISP2	1.34	7	RO	2.39	14
M2	1.03	4			

注:空白处无数据

2.2 抗菌活性筛选结果

本试验采用纸片法,选取了 7 株指示菌,对 62 株大叶藻内生放线菌的抗菌活性进行筛选。由图 1 可见,大叶藻内生放线菌对每种指示菌有抑制作用的菌株数。抗菌试验结果如表 2 和图 1 所示,其中有 48 株放线菌至少对 1 种指示菌有抑制作用,占待测菌株的 77.42%;有 36 株放线菌同时对 2 种及 2 种以上的指示菌有抑制作用,占待测菌株的 58.06%;有 16 株放线菌同时对 3 种及 3 种以上指示菌有抑制作用,占待测菌株的 25.80%;DYZ047 同时对 6 种指示菌有抑制作用,其中 DYZ047 对大肠埃希氏菌 *E. coli*、铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 和副溶血性弧菌 *V. parahemolyticus* 的抗菌结果如图 2 所示。结果表明,大叶藻内生放线菌对多种指示菌都显示出抗性。

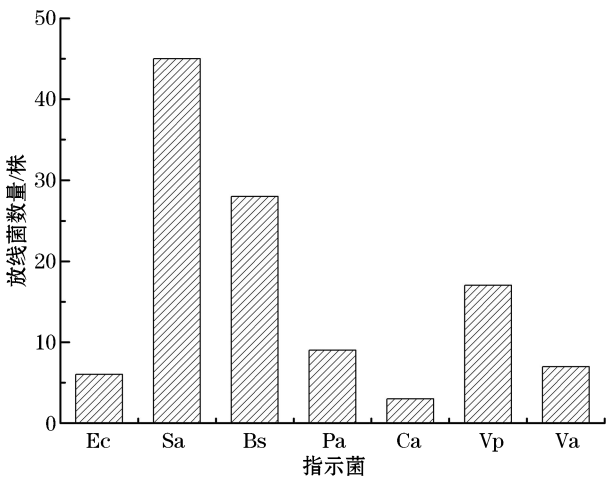


图 1 大叶藻内生放线菌抑制指示菌的菌株数

Fig.1 Number of endophytic actinomycetes inhibiting indicator strains

表 2 大叶藻内生放线菌的抗菌活性
Table 2 Antimicrobial activity of endophytic actinomycetes associated with *Zostera marina*

菌株号	Ec	Sa	Bs	Pa	Ca	Vp	Va	Ec	Sa	Bs	Pa	Ca	Vp	Va
DYZ001	-	+	-	-	-	++	-	-	+++	++	-	-	-	-
DYZ002	-	+	-	-	-	+	-	++	+++	++	+	-	-	-
DYZ004	-	+	-	-	-	+	-	++	+++	++	-	-	++	-
DYZ005	-	+	-	-	-	+	-	-	-	++	-	+++	-	-
DYZ009	-	++++	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	++	-	+
DYZ011	-	+++	-	-	-	-	-	-	+++	+	+	-	-	-
DYZ013	-	+++	+++	-	+++	+++	-	-	+++	+	+	-	-	-
DYZ015	-	+	-	-	-	-	-	++	+++	++	-	-	-	-
DYZ017	-	++	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	++
DYZ019	-	++++	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	++	++
DYZ022	-	++	-	-	-	++	-	-	++	++	+	-	++	-
DYZ023	-	-	-	-	-	+	-	-	++	++	+	-	++	++
DYZ024	-	+++	+++	-	-	++	-	+	++	-	+	-	-	-
DYZ027	-	++	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	++	-
DYZ028	-	+++	-	-	-	+	-	+	++	-	-	-	-	-
DYZ029	-	+++	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-
DYZ030	-	++	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-
DYZ031	+	++++	++	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-
DYZ032	-	+++	++	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-
DYZ033	-	++	++	-	-	++	-	+	+++	++	-	-	-	-
DYZ034	-	+++	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	++
DYZ035	-	++	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-
DYZ036	-	++	+	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-
DYZ037	-	+++	++	++	-	++	++	-	++	-	-	-	-	++

注:“-”代表没有抑制;“+”代表有抑制。抑菌圈直径用 d 表示,“+”代表 $6 < d < 8$ mm,“++”代表 $8 \leq d < 10$ mm,“+++”代表 $10 \leq d < 12$ mm,“++++”代表 $d \geq 12$ mm。表中只列出了具有抗菌活性菌株的数据

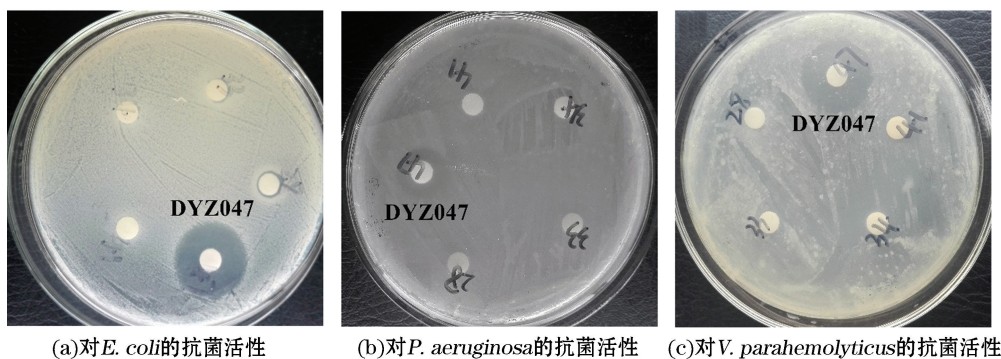


图2 菌株 DYZ047 的抗菌活性结果

Fig.2 Antimicrobial activities of the isolated strain DYZ047

大叶藻内生放线菌对革兰氏阳性指示菌的抗菌效果明显优于革兰氏阴性指示菌。对金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 有抑制作用的放线菌有 45 株,占放线菌总数的 72.58%;12 株菌的抑制作用较强,抑制圈直径在 12.0 mm 以上,其中 DYZ019 的抑菌圈直径最大达到 15.8 mm。对枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 有抑制作用的放线菌有 28 株,占放线菌总数的 45.16%;3 株菌的抑制作用很强,抑制圈直径超过 12.0 mm,其中 DYZ047 抑制作用最强,抑菌圈达到 20.7 mm。

大叶藻内生放线菌对革兰氏阴性指示菌和真菌的抗菌活性菌株相对较少。对白假丝酵母 *C. albicans* 有抑制作用的放线菌有 3 株,占放线菌总数的 4.84%。对大肠埃希氏菌 *E. coli* 有抑制作用的放线菌有 6 株,占放线菌总数的 9.68%。对铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 有抑制作用的有 9 株,占放线菌总数的 14.52%。对鳗弧菌 *V. anguillarum* 有抑制作用的放线菌有 7 株,占放线菌总数的 11.29%。其中,有 3 株菌 (DYZ013, DYZ047 和 DYZ049) 的抑制作用较强,抑制圈直径在 12.0 mm 以上, DYZ047 抑制作用最强,抑菌圈达到 20.1 mm。对副溶血性弧菌 *V. parahaemolyticus* 有抑制作用的放线菌有 17 株,占放线菌总数的 27.42%;其中,有 3 株菌 (DYZ037, DYZ046 和 DYZ047) 的抑制作用较强,抑制圈直径在 12.0 mm 以上, DYZ047 的抑菌圈直径为 18.0 mm, DYZ037 的抑菌圈最大为 18.6 mm。

3 讨 论

在纯培养法中培养基的选择对放线菌的分离结果有很大影响,放线菌适合在干燥、碱性的条件下生长^[21]。RO 培养基中微量元素丰富,有利于放线菌的生长,取得较好的分离效果。ISP2 培养基含有放线菌偏爱的糖成分(麦芽糖),分离到的大叶藻内生放线菌总数和种类数也较好。由于实验室培养放线菌时无法完全模拟自然环境,放线菌可能会迫于环境压力发生生理上的变化,处于休眠状态,称为活的非可培养状态 (Viable But Non-Culturable State, VBNC),采用常规的培养方法无法使其恢复生长活性^[22]。由于分离条件等的限制,目前得到的大叶藻中内生放线菌的种类和数量可能还远远不够,以后可以进一步通过与免培养相结合的方法研究其多样性^[23]。

本试验所选用的两株革兰氏阳性指示菌,分别为金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌。分离出的大叶藻内生放线菌对这两株革兰氏阳性指示菌的抑制作用较强。李静等^[24]对从海南东寨港真红树植物中分离到 46 株内生放线菌,使用乙酸乙酯提取发酵液进行抗菌活性筛选,结果发现 40 株菌对革兰氏阳性菌表现出较好的抑制作用。林婵春等^[25]对分离自川芎的 30 株内生放线菌进行抗菌活性筛选,对金黄色葡萄球菌表现出抑制活性的有 25 株菌,占其待测总数的 83.33%,对枯草芽孢杆菌表现出抑制活性的有 23 株,占其待测总数的 76.67%。本试验中大叶藻内生放线菌对革兰氏阴性指示菌的抑制作用较弱。这可能是由于革兰氏阴性细菌具有外膜屏障和多药外排泵,通常比革兰氏阳性细菌更耐抗生素^[26]。革兰氏阴性细菌的外膜对大的带

电分子不渗透,限制了各种抗生素类药物进入细胞内^[27]。多药外排泵是膜定位的转运蛋白,能够将多种化合物(包括药物分子)转运出细胞,从而阻止药物进入靶细胞^[28]。

4 结 语

本研究采用纯培养方法从山东省威海市的荣成天鹅湖采集的大叶藻中分离内生放线菌,并对放线菌的抗菌活性进行筛选。结果表明,从大叶藻中共分离到内生放线菌 62 株,内生放线菌资源较为丰富;对多种指示菌都表现出较好的抗性,有 48 株放线菌(占 77.42%)至少对 1 种指示菌表现出一定的抑制作用,有 36 株放线菌(占 58.06%)抑制 2 种及 2 种以上指示菌,发现了一批具有较好抗菌活性的菌株,DYZ047 同时对 6 株指示菌有抑制作用;对革兰氏阳性指示菌的抗菌效果明显优于革兰氏阴性指示菌,有 45 株放线菌(占 72.58%)对金黄色葡萄球菌有抑制作用,有 28 株放线菌(45.16%)对枯草芽孢杆菌有抑制作用。后期可以继续对抗菌活性化合物的分离,为海洋来源抗生素的研究提供新资源。

参考文献(References):

- [1] ZHANG X J, LIU R J. Broad and narrow definition of endophytes and related advances in the study[J]. Microbiology China, 2014, 41(3): 560-571. 张晓婧, 刘润进. 广义与狭义植物内生生物的定义及其研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(3): 560-571.
- [2] MATSUMOTO A, TAKAHASHI Y. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds[J]. Journal of Antibiotics, 2017, 70(5): 514-519.
- [3] HUANG X H, LI S, TAN Z J, et al. Progress of study on endophytic actinomycetes in plant[J]. Biotechnology Bulletin, 2008, 1(1): 42-46. 黄晓辉, 李珊, 谭周进, 等. 植物内生放线菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2008, 1(1): 42-46.
- [4] LI L. Isolation of endophytic actinomycetes from mangrove plants and identification of new novel species of family *Micromonosporaceae* [D]. Haikou: Hainan University, 2013. 李蕾. 红树植物内生放线菌的分离与小单孢菌科新种鉴定[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [5] STROBEL G, DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 491-502.
- [6] LI Y. Phlogenetic Relationships in Zosteraceae and population genetics of *Zostera marina* Linnaeus[D]. Qingdao: Ocean university of China, 2011. 李渊. 大叶藻科的系统发育与大叶藻居群遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [7] CHEN Z J, KONG F N. Advances in ecological research on *Zostera marina* L.[J]. Science and Technology Information, 2013, 336(16): 206-208. 陈治军, 孔凡娜. 大叶藻 (*Zostera marina* L.) 生态学研究进展[J]. 科技资讯, 2013, 336(16): 206-208.
- [8] STEWART E J. Growing unculturable bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(16): 4151-4160.
- [9] LIN L, TAN Y, CHEN F F, et al. Diversity of culturable actinomycetes in sea deposit of tiger beach at Bohai Bay, Dalian, China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 262-269. 林灵, 谭亿, 陈菲菲, 等. 大连渤海老虎滩海域沉积物可培养放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 262-269.
- [10] CUI D. Diversity of bacteria associated with ascidians from Weihai and screening of strains with bioactivities[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014. 崔迪. 威海海域海鞘来源可培养细菌多样性和活性菌株筛选[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.
- [11] WAHEEDA K, SHYAM K V. Formulation of novel surface sterilization method and culture media for the isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants and its antibacterial activity[J]. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 2017, 8(2): 1-9.
- [12] NIMNOI P, PONGSILP N, LUMYONG S. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 26(2): 193-203.
- [13] MITRA A, SANTRA S C, MUKHERJEE J. Distribution of actinomycetes, their antagonistic behaviour and the physico-chemical characteristics of the world's largest tidal mangrove forest[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2008, 80(4): 685-695.
- [14] HAMAKI T, SUZUKI M, FUDOU R, et al. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 99(5): 485-492.
- [15] CHEN L, DU S, QU W Y, et al. Biosynthetic potential of culturable bacteria associated with *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(6): 1686-1697.
- [16] SUBRAMANI R, AALBERSBERG W. Culturable rare *Actinomycetes*: diversity, isolation and marine natural product discovery[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(21): 9291-9321.

- [17] COOMBS J T, FRANCO C M M. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5603-5608.
- [18] CHEN H H, YANG Y, JIANG Y, et al. Isolation of endophytic actinomycetes[J]. *Microbiology China*, 2006(4): 185-188. 陈华红, 杨颖, 姜怡, 等. 植物内生放线菌的分离方法[J]. *微生物学通报*, 2006(4): 185-188.
- [19] ÖNER Ö, EKİZ G, HAMES E, et al. Cultivable sponge-associated actinobacteria from coastal area of eastern Mediterranean Sea[J]. *Advances in Microbiology*, 2014, 4(6): 306-316.
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement: M100-S25[S]. Pennsylvania: Wayne, 2015.
- [21] QIN S, XING K, JIANG J H, et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2011, 89(3): 457-473.
- [22] GOODFELLOW M, WILLIAMS S. Ecology of actinomycetes[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1983, 37: 189-216.
- [23] JU F, ZHANG T. 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of bacterial diversity and interactions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(10): 4119-4129.
- [24] LI J, DAI S J, TUO L, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from eumangroves collected in Dongzhaigang of Hainan Province[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(8): 1753-1765. 李静, 戴素娟, 庾利, 等. 海南东寨港真红树植物内生放线菌多样性及其抗菌活性[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(8): 1753-1765.
- [25] LIN C C, HE D M, LI J H, et al. Screening and identify of active endophytic actinomycetes in *Ligusticum chuanxiong* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(3): 76-79. 林婵春, 何冬梅, 李佳穗, 等. 川芎内生放线菌活性菌的筛选及鉴定[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(3): 76-79.
- [26] NIKAIIDO H, PAGÈS J M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(2): 340-363.
- [27] ALIBERT S, DIARRA J N, HERNANDEZ J, et al. Multidrug efflux pumps and their role in antibiotic and antiseptic resistance; a pharmacodynamic perspective[J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2016, 13(3): 301-309.
- [28] BANSAL A, MALLIK D, KAR D, et al. Identification of a multidrug efflux pump in *Mycobacterium smegmatis* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(13): 1-5.

Isolation and Antimicrobial Activity Screening of Endophytic Actinomycetes Associated With *Zostera marina*

CHEN Lei, SHEN Lin-xi, MA Cui-hong, WANG Guang-yu

(Department of Bioengineering, School of Marine Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Weihai, Weihai 264209, China)

Abstract: *Zostera marina* is a submerged monocotyledonous plant, and it is one of the main seagrasses that constitutes the seagrass bed. It's a good way to study the endophytic actinomycetes associated with *Zostera marina* for the discovery of marine microbial resource and novel bioactive natural products. Culture-dependent method was used to isolate endophytic actinomycetes associated with *Zostera marina* from the Swan Lake of Rongcheng, Weihai, Shandong Province. Seven types of media including 2216E were used for actinomycete isolation. Antimicrobial activity of the crude extracts of all isolated strains was determined using filter paper method against seven indicator bacterial strains including *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Vibrio parahaemolyticus*, etc. A total of 62 endophytic actinomycetes was isolated from *Zostera marina*, and the endophytic actinomycetes isolated on the RO medium were rich of strains and abundant. Of the 62 strains, 48 strains (77.42% of strains) showed antimicrobial activities against at least one of seven indicator strains. There were 36 strains (58.06% of strains) against two or more kinds of indicator bacteria. Isolated strains exhibited higher antimicrobial activity against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) than against Gram-negative bacteria. Our results suggest that endophytic actinomycetes associated with *Zostera marina* have good diversity and antimicrobial activity, which may be a new source for the discovery of marine antibiotics.

Key words: antimicrobial activity; endophytic actinomycetes; *Zostera marina*

Received: October 28, 2019