

· 专题报道 ·

一株具有抗菌和细胞毒活性的海洋嗜盐菌 XD20 的筛选和鉴定

穆 军¹, 焦炳华^{1*}, 孙炳达², 刘杏忠²

(1. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 2. 中国科学院微生物研究所真菌地衣系统学国家重点实验室, 北京 100080)

[摘要] **目的:**从中国东海分离筛选活性海洋微生物, 进而确定所获取的活性菌株的分类地位。 **方法:**乘坐专业考察船只在中国东海海域进行系统采样, 采用抗菌模型和细胞毒模型进行活性筛选。对获取的活性菌株进行形态特征研究、盐需求测试、核糖体 rDNA ITS 区序列分析, 并将所测得序列在 NCBI 数据库中进行相似性搜索, 选取其中相似性较高的序列以邻接法构建系统进化树, 将该菌株分类鉴定到种。 **结果:**从我国东海海域 C01 站位(122°26'30", 30°43'48")30 m 水深处分离获得一活性菌株 XD20, 是一嗜盐菌株, 能耐受高达 10.0% 的盐浓度, 合适的生长盐浓度范围为 2.5%~7.5%; 它对白念珠菌具有抑菌活性, 对 SMMC 7721 细胞株和 HeLa 细胞株具有细胞毒活性。以菌丝断裂方式产生节孢子, 孢子大小及形态与 *Wallemia sebi* 相符; rDNA ITS 区测序发现, 该菌株序列与 *Wallemia sebi* 的多条序列相似程度较高, 且差异均在 ITS1 和 ITS2 区, 属于可变区。 **结论:**活性菌株 XD20 首次从海洋中分离获得, 为一嗜盐海洋菌株, 鉴定为 *Wallemia sebi* (Fr.) Arx。

[关键词] 海洋嗜盐菌; 抗菌菌活性; 细胞毒活性**[中图分类号]** R 282.77 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0008-04

Screening and identification of an anti-bacterial and cytotoxic marine halophilic strain XD20

MU Jun¹, JIAO Bing-hua^{1*}, SUN Bing-da², LIU Xing-zhong² (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Key Laboratory of Systematic Mycology and Lichenology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

[ABSTRACT] **Objective:** To isolate and screen the active marine microorganisms from East China Sea and to identify the phenotypes of the isolated active strains. **Methods:** The samples were widely collected from East China Sea and the active strains were screened out through an anti-bacterial model and a cytotoxic model. The isolated strains were subjected to phenotypical study, salt-aggregation test and rDNA ITS sequencing. Neighbor-joining phylogenetic trees were drawn by comparing the results of rDNA ITS sequencing with sequences of described species in the BLAST server of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). One of the strains, subsequently named XD20, was identified to species level. **Results:** XD20, a halophilic strain with a highest tolerable salt concentration of 10.0% and suitable concentration range of 2.5% to 7.5%, was collected and isolated on the site of C01 (122°26'30", 30°43'48") 30 meters under water. XD20 showed an inhibitory effect on the growth of *Candida albicans* and a cytotoxic activity toward SMMC7721 and HeLa cells. XD20 produced arthroconidia by mycelium break and the arthroconidia had similar size and morphology to those of *Wallemia sebi*. rDNA ITS sequencing showed that the sequence of XD20 had a higher similarity to those of *Wallemia sebi* and the differences were located in ITS1 and ITS2 areas, both belong to variable region. **Conclusion:** XD20, an active halophilic strain fungus, has been obtained from the sea for the first time, and has been identified to be *Wallemia sebi* (Fr.) Arx.

[KEY WORDS] marine halophilic fungi; anti-fungus activity; cytotoxic activity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1): 8-11]

近年来,随着陆生微生物药用资源的日益淘尽和获新率严重下降,世界各国研究人员相继将目光投向了浩瀚的海洋^[1~3]。在一次对我国东海海域进行的大规模样品采集和活性菌株筛选研究中,作者获得了一株具有抗真菌活性的海洋菌株 XD20, 它所产生的 3 个活性化合物的相对分子质量分别为 411、413 和 429, 前两者结构已被鉴定为 C₂₈H₄₅NO 和 C₂₈H₄₇NO 的甾体生物碱^[4]。本文报道对该菌株的分离筛选过程和分类鉴定结果。

1 材料和方法

1.1 菌株 XD20 的采集及分离纯化

1.1.1 样品采集 本次采样作业中乘坐排水量为

[基金项目] 国家高技术研究发展计划/863 计划(2001AA215441); 上海市优秀学科带头人计划(D5XD1423). Supported by National High-tech R&D Program/863 Program(2001AA215441) and Shanghai Outstanding Field Leaders Program(D5XD1423).

[作者简介] 穆 军, 博士, 现为大连交通大学环境科学与工程学院教授。

* Corresponding author. E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

500 吨的专业船只,北起上海崇明岛东部海域,绕行上海市、杭州湾,经台州、温州进入福建海域,沿途均离开海岸线 20~30 海里(1 海里=1 852 m),在该航线上连续布点采集表层、中层水样以及海底底泥,并使用拖网捕获海洋动物而后分离动物附生样品。

1.1.2 菌株 XD20 的分离纯化 分离培养基配方:牛肉膏 4.0 g,酵母膏 1.0 g,蛋白胨 4.0 g,葡萄糖 1.0 g,1%链霉素 5 ml,琼脂 20 g,人工海水 1 000 ml,调节 pH 值为 6.5。人工海水配方:NaCl 25.0 g,Na₂SO₄ 4.0 g,KCl 0.7 g,NaHCO₃ 0.20 g,KBr 0.10 g,H₃BO₃ 0.03 g,NaF 0.003 g,1.0 mol/L MgCl₂ 溶液 53 ml,1.0 mol/L CaCl₂ 溶液 10 ml,0.1 mol/L SrO₂ 溶液 0.90 ml,加蒸馏水至 1 000 ml,pH 值调为 6.5。

取无菌采集来的海水样品 1 ml,加入灭过菌的 9 ml 人工海水中,振荡混匀,制成 10⁻¹ 稀释液,进一步稀释为 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 浓度梯度液,各取 0.1 ml,分别涂布于不同的分离培养基琼脂平板上,25℃ 恒温培养。14 d 内挑取菌落。以平板划线法进行多次的划线分离,直接显微镜镜检分纯为止。

1.2 菌株 XD20 的活性筛选

1.2.1 指示菌株及细胞株 测试海洋菌株的抗菌活性和细胞毒活性。使用的指示菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白念珠菌(*Candida albicans*)和大豆疫霉根腐病菌(*Phytophthora sojae*)。指示菌细菌培养基为营养肉汤培养基和营养琼脂培养基,真菌培养基配方为葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 ml,自然 pH。细胞毒性测定用的肿瘤细胞株为 SMMC7721 细胞株和 HeLa 细胞株,均由第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室保存。

1.2.2 活性测试方法 (1)使用琼脂块法进行抗菌活性初筛。从经分离培养的每一菌落挑取少量菌苔,重新接种到营养琼脂平板上培养,5~10 d 后将长好的菌落用打孔器打出 1 cm 直径的菌块;指示菌液体培养 24 h,用棉签蘸取少量菌液均匀涂布在适于指示菌生长的营养琼脂平板上;将菌块放置到涂过指示菌的平板上,放入恒温箱培养。测试抗真菌活性时,培养温度 28℃;测试抗细菌活性时,培养温度 30℃,12~24 h 内观察抑菌圈的出现。根据抑菌圈判断被测菌株抗菌活性的有无及大小。(2)初筛有活性后,用纸片法进行复筛。活性菌株采用液体发酵方式进行摇瓶培养,培养液体积 30~50 ml,1 周左右发酵结束。将发酵液减压蒸干,依次用少量乙酸乙酯、正丁醇、甲醇抽提,得乙酸乙酯相、正丁醇相、甲醇相,每相取 50 μl 加到纸片上,晾干,逐片移

入涂有指示菌的琼脂平板上,恒温培养。(3)细胞毒活性测定:将纸片法测定抗菌活性时使用的有机溶剂抽提相取一定量加入 96 孔板,洁净工作台中晾干,采用 MTT 法测定细胞毒活性。

1.3 菌株 XD20 的分类鉴定

1.3.1 菌株 XD20 的盐需求测试 在分离培养基中补加 NaCl,最终配制成 0.2%、2.5%、5.5%、7.5%和 10.0% NaCl 浓度的系列营养盐培养基,灭菌后倒入培养皿中制成固体平板,划线接种 XD20 菌株,25℃ 恒温培养。在 2~14 d 内观察菌株在不同盐浓度上的生长情况。

1.3.2 纯培养观察菌落形态及产孢情况 菌株接种到含 2.5% NaCl 的 PDA 平板上,黑暗培养 10 d 后测量菌落直径。从 PDA 平板上切下 5 mm 的方形带菌培养基块,置于灭菌载玻片上,加盖玻片,在 50 ml 离心管或培养皿中培养 1 周,取下盖玻片制玻片,观察孢子形状并测量孢子和菌丝直径大小。

1.3.3 核糖体 rDNA ITS 区序列分析 真菌总 DNA 提取步骤:平板培养 10 d 菌落用解剖刀刮取菌丝,置 1.5 ml 离心管中,加 200 μl CTAB 提取缓冲液、少量石英砂,用玻棒研磨,然后再加入 400 μl CTAB,65℃ 水浴 1 h,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,饱和酚和氯仿异戊醇分别抽提,最后无水乙醇沉淀,12 000 r/min 离心,倒出乙醇溶液,晾干。最后,复溶于 50 μl 纯水备用。

PCR 扩增引物^[5]为 ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' 和 ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。扩增体系(50 μl 体系)为:纯水 30 μl;Buffer 5 μl;Mg²⁺ 3 μl;dNTP 2 μl;引物各 2 μl;DNA 聚合酶 4 μl (4 U);模板 2 μl。扩增程序:95℃、3 min;94℃、1 min;54℃、40 s;72℃、1 min;30 个循环后 72℃ 维持 10 min。使用的 PCR 仪为 050-801T Gradient 96 型,扩增产物的纯化使用申能博彩生物科技有限公司 3S PCR 扩增产物纯化试剂盒。测序引物为 ITS1,由申能博彩生物科技有限公司提供。

1.3.4 系统进化树构建 将所测得序列在 NCBI 数据库中用 Megablast 进行相似性搜索,选取其中相似性较高的序列以邻接法(neighbor-joining,NJ)构建系统进化树,外群选择属于 *Wallemia muriae* 的两条序列(AY302534、AY328918)和属于 *Wallemia ichthyophaga* 的两条序列(AY302523、AY302522)。所用程序为 MEGA3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004),碱基替代模型为 Nucleotide: Kimura 2-parameter。Bootstrap 分析进行 1 000 次重复。

2 结 果

2.1 样品采集及菌种分离纯化结果 菌株 XD20 的采样点为 C01 站位,通过 GPS 定位其经度为 122°26′30″,纬度为 30°43′48″。该菌株存在于通过使用 GO-FLOW 型水样采集器采集的中层水样中,水深约 30 m。通过连续 2 次平皿划线分离,经光学显微镜镜检获得了纯菌株。该菌株在培养平板上的菌落生长情况如图 1 所示。

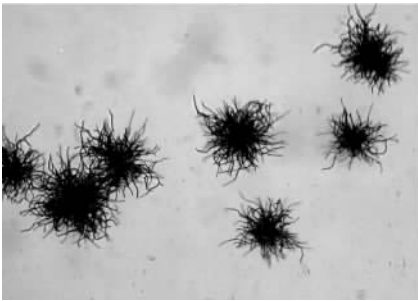


图 1 菌株 XD20 的菌落生长情况
Fig 1 Morphology of marine strain XD20(×150)

采用压滴法观察 XD20 活菌株的基内菌丝和气生菌丝,显示其形成横隔膜;测得菌丝直径为 3.5~4.5 μm,孢子直径为 2.0~3.0 μm。依据形成横隔

膜特征和菌丝直径范围,将其归属为真菌。

2.2 菌株 XD20 的活性筛选结果 表 1 显示菌株 XD20 对白念珠菌有抑菌活性,对枯草杆菌和大豆根腐病菌无作用。同时,菌株 XD20 具有针对 SMMC7721 细胞株和 HeLa 细胞株的细胞毒活性。而且抗菌和细胞毒活性组分主要集中在乙酸乙酯抽提物中

2.3 菌株 XD20 的分类鉴定结果

2.3.1 菌株 XD20 的盐需求测试 XD20 菌株在 0.2% 的盐度下生长极其微弱,而在 2.5% 海水盐度下生长旺盛,表明该菌株是一嗜盐菌株。XD20 菌株能在 5.5% 和 7.5% 的盐度下旺盛生长,在 10.0% 的高盐度下也能微弱生长,表明该菌株能耐受高达 10.0% 的盐浓度,但合适的生长盐浓度范围为 2.5%~7.5%。

2.3.2 纯培养菌落形态及产孢观察 菌落生长极缓慢,25℃ 下 10 d 直径仅 0.3~0.5 cm;初期褐色,随培养时间延长颜色加深到深褐色,背面深褐色到黑色。菌丝浅褐色,菌丝 0.4~0.8 μm 宽。分生孢子梗特化不明显,或菌丝直接断裂成为节孢子,菌丝(分生孢子梗)在与节孢子连接处稍变宽。节孢子圆柱状或球状,圆柱状孢子 0.9~1.3 × 1.7~2.2 μm,球形孢子直径 0.7~0.9 μm,孢子表面有细纹或光滑(图 2)。

表 1 菌株 XD20 的活性筛选结果
Tab 1 Activity screening of strain XD20

Sample	Tested bacterial strains and cell lines					
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Phytophthora sojae</i>	SMMC7721	HeLa
XD20 strain	—	—	—	—	—	—
Ethyl acetate extract	—	—	+	—	+	+
Butanol extract	—	—	—	—	—	—
Methanol extract	—	—	—	—	—	—

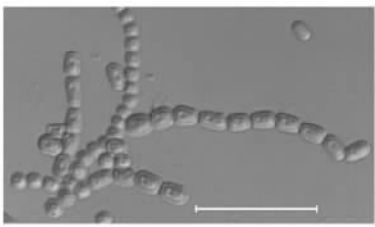


图 2 菌株 XD20 的孢子形态
Fig 2 Morphology of spores of marine strain XD20
bar=10 μm

2.3.3 核糖体 rDNA ITS 区序列分析结果 rDNA ITS 的 megablast 分析结果表明,XD20 与 *Wallemia sebi* 属中的各菌株具有极高的同源性

(84.01%~99.17%),而与 *Wallemia muriae* 和 *Wallemia ichthyophaga* 的同源性较低(<30%)。据此,可确定 XD20 为 *Wallemia sebi* 菌属。XD20 的 rDNA ITS 序列已递交 GenBank 登录。

从基于 rDNA-ITS 部分序列重建的系统进化树可以看出,同属 *Wallemia sebi* 的 rDNA-ITS 序列被聚在一个分支中,虽被分成两个组,但分支内 Bootstrap 支持率仅为 53%,说明这些序列间有较高的相似性,XD20 菌株序列也被聚类在这个分支内。菌株 XD20 以菌丝断裂方式产生节孢子,孢子大小及形态与 Domsch 等^[6]报道的基于 rDNA-ITS 部分序列重建的 NJ 树(示合意树拓扑结构,图 3)*Wallemia sebi*

相符;该菌株在高盐基质上生长,与报道的 *Wallemia sebi* 的耐高渗透生长特性相符;此外,通过核糖体 rDNA ITS 区测序发现,该菌株序列与属于

Wallemia sebi 的多条序列相似程度较高,且差异均在 ITS1 和 ITS2 区,属于可变区。据此我们鉴定该菌株属于 *Wallemia sebi* (Fr.) Arx。

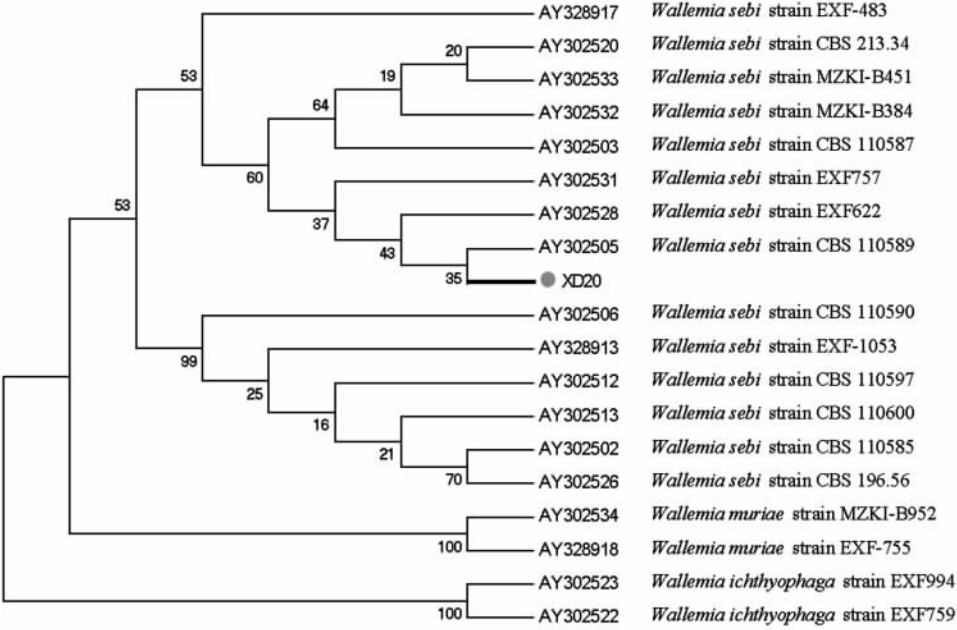


图 3 *Wallemia sebi* (Fr.) Arx 的分类地位
Fig 3 Position of *Wallemia sebi* (Fr.) Arx in phenotypic tree

3 讨 论

对于海洋药物发现来说,最希望分离得到真正的海洋土著微生物,这样获得有别于陆生来源已知抗生素的机率才会较大。判断海洋微生物的一个重要指标即是对海水盐度的耐(嗜)性。菌株 XD20 从我国东海海域 30 m 水深处获得,是一嗜盐菌株,能耐受高达 10.0% 的盐浓度,合适的生长盐浓度范围为 2.5%~7.5%;对白念珠菌有抑菌活性,而对枯草杆菌和大豆根腐病菌无作用;对 SMMC7721 细胞株和 HeLa 细胞株具有细胞毒活性。按照一般的海洋微生物天然药物研究观点,该活性菌株应是一海洋微生物菌株。然而通过形态特征和系统进化树构建分析后表明,该菌株与 Domsch 等^[6]报道的耐高渗透真菌 *Wallemia sebi* 相符,并鉴定为 *Wallemia sebi* (Fr.) Arx。 *Wallemia sebi* 通常见于岩盐、盐腌制品、纺织品以及水果上,但在海洋中尚未见有报道。因此菌株 XD20 的起源成为了一个令人感兴趣并尚待进一步阐明的问题。菌株 XD20 产生 3 个活性化合物,其中 2 个化合物国外已见报道^[7],相对分子质量分别为 411、413,海洋生态条件对活性化合物的产生类型和产生量的影响也将在随后的研究中加以探讨。

[参 考 文 献]

[1] Imamura N, Nishijima M, Takadera T, et al. New anticancer antibiotics pelagomicins produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis*[J]. J Antibiot (Tokyo), 1997,50:8-12.
[2] Shiozawa H, Kagasaki T, Torikata N, et al. Thiomarinols B and C, new antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium[J]. J Antibiot (Tokyo), 1995, 48:907-909.
[3] Amagata T, Minoura K, Numata A. Gymnasterone & novel cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a sponge [J]. Tetrahedron Lett, 1998,39:3773-3774.
[4] 穆 军. 中国东海药源海洋微生物筛选与新抗生素研究[D]. 上海:第二军医大学, 2003.
[5] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press Inc., 1990. 315-322.
[6] Domsch KH, Gams W, Anderson TH. Compendium of soil fungi [M]. London: Academic Press, 1980. 133-138.
[7] Takahashi L, Maruta R, Ando K, et al. UCA1064-B, a new antitumor antibiotic isolated from *Wallemia sebi*: production, isolation and structural determination[J]. J Antibiot (Tokyo), 1993,46:1312-1314.

[收稿日期] 2005-12-10 [修回日期] 2005-12-23
[本文编辑] 邓晓群