

东海药用微生物资源的初步调查研究

杨 好,许强芝,艾 峰,刘小宇,施晓琼,焦炳华*

(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)

[摘要] **目的:**对中国东海药用微生物资源进行初步调查研究。**方法:**从中国东海采集海水和底泥样品,选用不同的分离培养基,采用无限稀释及平板划线的方法分离出单菌落,利用纸片法和稻瘟霉模型对菌株发酵液进行活性筛选。**结果:**从样品中分离得到 1 041 株单菌落,包括 506 株放线菌,421 株细菌和 114 株真菌,其中具有抗菌活性菌株 303 株,活性菌株分离率为 29.1%。抗稻瘟霉分生孢子活性菌株 219 株,活性菌株分离率为 21.0%。**结论:**分离得到的抗菌活性菌株,抗稻瘟霉分生孢子活性菌株的比例均达到 20.0% 以上,说明东海具有丰富的药用微生物资源。

[关键词] 海洋药;东海;活性筛选

[中图分类号] R 282.77 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0535-03

Medicinal microorganisms of the East China Sea: a preliminary study

YANG Yu, XU Qiang-zhi, AI Feng, LIU Xiao-yu, SHI Xiao-qiong, JIAO Bing-hua* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the resources of medicinal microorganisms of the East China Sea. **Methods:** The sea water and sediment samples were collected from the East China Sea. Different culture media were used to isolate the microorganism strains by infinite dilution and streak plate procedure. Then the isolated strains were screened for antimicrobial active strains using paper disc diffusion model and for antimitosis active strains using *Pyricularia Oryzae* model. **Results:** A total of 1 041 strains of marine microorganisms were isolated from marine water and sediment samples, including 506 actinomycetes, 114 fungi and 421 bacteria. It was found that 303(29.1%) strains of marine microorganisms had antimicrobial activity and 219 (21.0%) strains had antimitotic activity. **Conclusion:** The proportions of strains with antimicrobial activities and antimitotic activities are both above 20%, suggesting that the East China Sea has rich resources of medicinal microorganisms.

[KEY WORDS] marine drugs; the East China Sea; bio-screen

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 535-537]

自从 1929 年弗莱明从真菌中发现青霉素以来,微生物活性代谢产物已成为药物的丰富资源。在过去的 70 多年,人们从陆地微生物资源中寻找新药已取得巨大的成就,但是随着陆地微生物资源的枯竭和临床上耐药情况的日趋严重,寻找活性物质的新源泉成为当务之急,海洋微生物作为一个巨大的尚待开发的资源越来越受到关注。

利用海洋微生物资源,首先要对海洋微生物资源进行调查研究,鉴于目前对东海药用微生物资源缺乏较为系统的研究,我们在东海大范围采样,收集和保存了一批海洋微生物菌株,并对其体外发酵产物活性进行了初步的研究,大致分析了海洋微生物的体外发酵产物的拮抗活性与微生物种类及样品来源之间的关系,以期海洋药源微生物的后继开发提供参考。

1 材料和方法

1.1 样品采集 2004 年 5 月在东海 30 海里(1 海里=1.852 公里)以远海域不同站点采集微生物样

品 39 份,采样范围包括了上海、浙江、福建沿海海域,北起上海崇明岛南至福建的南麂列岛(纬度 27°15'~31°34')。其中包括海洋底泥样品 28 份,海水样品 11 份,样品采集后 4℃ 低温保存。我们实验室对其中 4 份泥样,4 份水样进行了菌株分离。

1.2 菌株分离^[1] 泥样:称取样品中心部位海泥 5 g,加入 45 ml 已灭菌的人工海水中,充分振荡混匀成混悬液,静沉。无菌采集的海水(水样)及静沉后泥样(取上清)均用灭菌人工海水逐级稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释液,取各梯度稀释液 0.2 ml 分别涂布到 5 种不同的分离培养基平板上,25℃ 恒温培养 7~14 d,根据样品不同以及菌株形态的差异挑取单菌落。

在分离过程中反复进行平板划线并结合显微镜

[基金项目] 上海市优秀学科带头人计划(05XD1423)。Supported by Shanghai Outstanding Leading Scientist Plan(05XD1423)。

[作者简介] 杨 好,硕士生。

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

检进行纯化,4℃保存在相应的斜面培养基上。放线菌培养基(%) : 1号:葡萄糖 1.0,酵母膏 1.0,牛肉膏 0.04,蛋白胨 0.40,琼脂 1.50;2号:葡萄糖 0.50,酵母膏 0.50,牛肉膏 0.40,蛋白胨 0.40,琼脂 2.0。细菌培养基(%) : 3号:蛋白胨 0.50,酵母膏 0.10,FeSO₄ 0.001,琼脂 1.50;4号:葡萄糖 0.60,蛋白胨 0.50,酵母膏 0.10,琼脂 2.0。真菌培养基:市售孟加拉红培养基,添加氯霉素 0.1 g/L。

以上培养基均用人工海水配制,pH 6.0~6.5,8 MPa,高压灭菌 30 min。

1.3 发酵液制备 菌株接种于 5 ml 相应的液体培养基中(将相应配方中的琼脂成分除去)25℃ 130 r/min 摇床培养 2 d,活化菌株,在无菌条件下取 100 μl 菌液转移入新鲜的液体培养基 20 ml 中继续摇床培养 7 d,取 5 ml 菌液离心(2 000 r/min,4℃,5 min)去除菌体,上清用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌,4℃保存备用。

1.4 活性筛选

1.4.1 抑菌实验 参照文献^[2],采用圆形纸片法筛选活性菌株。

抑菌实验用指示菌:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),白色念珠菌(*Candida albicans*),以上菌株为本实验室保存。

以 3 种氨基青霉素、酮康唑、氟哌酸药敏纸片作为阳性对照,无菌生理盐水作为阴性对照。

在平板上加入 0.1 ml 的指示菌悬液,用玻棒涂布均匀,细菌指示菌用营养琼脂平板,真菌指示菌用 PDA 平板。将待测发酵液 50 μl 滴加在预先灭菌的圆形滤纸片上(直径 6 mm),自然晾干,然后将纸片贴在平板上,37℃ 恒温培养 1~2 d,观察结果并测量抑菌圈的大小。

1.4.2 抗稻瘟霉分生孢子活性筛选 稻瘟霉模型是以稻瘟霉的分生孢子及菌丝形态异常或生长抑制为活性指标的生物活性检测模型,可以用来筛选具有抗有丝分裂的次生代谢物,具有经济、快速、简便、平行性好等优点,是一种比较理想的初筛模型,利用该模型已经成功获得抗肿瘤药物 rhizoxin。具体操作参照文献^[3]的方法进行,根据文献^[4]的指标判断活性。

2 结果

按照采样点的不同以及菌落形态、大小、颜色等特点,利用 5 种不同的分离培养基分离得到 1 041 株纯培养物,包括 506 株放线菌,114 株真菌以及

421 株细菌,从海泥样品中分离得到菌株数目明显多出海水样品,尤其是真菌。

2.1 海洋微生物抗菌活性菌株的筛选 利用 3 株指示菌进行抑菌实验筛选出具有抗菌活性菌株 303 株,总活性率为 29.1%,其中包括放线菌 191 株、细菌 78 株、真菌 34 株,分别占活性菌株总数的 37.7%、18.5%、29.8%。3 种不同类型海洋微生物中活性菌的分离率表现为放线菌>真菌>细菌。

2.1.1 海洋放线菌的抗菌活性 从放线菌中分离得到的抑菌活性菌株比例最高,为 37.7%。活性菌株的抑菌活性以抗枯草杆菌为主,占活性菌株总数的 82.5%,抗大肠杆菌的活性菌株有 16 株,占 8.3%,抗真菌的活性菌株有 42 株,比例为 22%,其中有 6 株同时具有抗枯草杆菌和大肠杆菌活性,有 4 株菌可以同时抑制大肠杆菌、枯草杆菌和真菌。

2.1.2 海洋细菌的抗菌活性 海洋细菌在三者当中活性菌株所占的比例最低,为 18.5%,抑菌活性也主要表现在抗枯草杆菌方面,占活性菌株总数的 78.2%(61 株),抗真菌的活性菌株比例为 21.8%(17 株),没有发现对大肠杆菌有活性的菌株,也没有同时对两种或三种受试菌都有活性的菌株。

2.1.3 海洋真菌的抗菌活性 真菌的抗菌活性菌株比例介于放线菌和细菌之间,为 29.8%,同样是以抗枯草杆菌为主,占活性菌株总数的 73.5%(25 株),抗大肠杆菌的活性菌株比例为 11.8%(4 株),抗真菌的比例为 14.7%(5 株),其中有 5 株对枯草杆菌和大肠杆菌都有活性,有 3 株菌对三种受试菌都表现出活性。

2.2 海洋微生物抗稻瘟霉分生孢子活性菌株的筛选 利用稻瘟霉活性筛选出具有活性的菌株 219 株,总活性率 21.0%,其中包括 126 株放线菌,54 株细菌,29 株真菌,分别占活性菌株的 57.5%、25.0%、13.2%。

3 讨论

1966 年, Burkholder 从海洋含溴假单胞菌(*Pseudomonas bromotilis*)中分离得到抗生素硝吡咯菌素 Pyrrolnitrin,开启了海洋微生物活性的探索研究,20 世纪 90 年代以来对于海洋微生物的研究越来越受重视,发现了许多在化学上和生物学上有意义的次级代谢产物,例如日本 Tokyo 小组从海洋放线菌中分离得到的含硼化合物 aplasmonhodie^[5],能抑制革兰阳性菌等,而且在体内具有抗疟活性,美国加利福尼亚大学海洋研究所从加州海岸分离得到的一株深海菌,从中获得了一系列新的细

胞毒和抗病毒的大环内酯,具有极强的抗菌活性和抗黑色素瘤活性,随着研究的深入还发现许多原来分离自海洋大型生物的活性成分其真正的来源是其共附生的微生物^[6],这一些都说明海洋微生物是药物研究与开发的新的资源。

我们实验室的工作也说明了这一点,我们利用传统的抗菌模型和稻瘟霉模型对分离自东海的三大类共1 041株海洋微生物进行筛选,得到抗菌活性菌株303株,具有抗稻瘟霉分生孢子活性的菌株219株,比例均达到20%以上,说明东海的药用微生物资源丰富。

从海泥样品分离到的微生物数量明显比海水样品多,尤其是海洋真菌的数量,而且活性菌株一半以上来自海洋底泥,可能与底泥中营养物质相对比较丰富有关。不同种类的海洋微生物活性菌株分离率有一定的差别,在抗菌活性方面,海洋放线菌分离率最高,真菌次之,海洋细菌最低,这与文献^[7]的报道是一致的,在抗稻瘟霉分生孢子活性菌株筛选中,放线菌分离率仍然最高,不同的是海洋细菌活性菌株分离率比真菌高,与陆地微生物不同,这些提示我们可能在海洋环境中细菌比真菌更倾向于产生具有抗有丝分裂的次级代谢产物,而且细菌比放线菌、真菌更易于培养发酵,这些可以为今后的研究方向及侧重点的选择提供一定参考。

另外据报道,陆地微生物的抗菌活性大部分是针对革兰阳性菌的,而以大肠杆菌为代表的革兰阴性菌由于细胞膜组成、胞内药物排出泵等机制,对将近90%的天然抗生素都有耐药性^[8,9],筛选抗革兰

阴性菌活性的菌株对于新的抗生素开发有重大意义。在筛选过程中,我们发现海洋微生物的抗菌活性绝大部分也是针对枯草杆菌这类革兰阳性菌的,但是其中有20株是有抗大肠杆菌活性的,对其进行深入地研究,可能从中可以发现一些新的抗菌物质。

[参考文献]

- [1] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1986:65-70.
 - [2] 徐叔云,卞如濂,陈 修. 药理实验方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2001:1340-1346.
 - [3] Kobayashi H, Namikoshi M, Yoshimoto T, et al. A screening method for antimicrobial and antifungal substances using conidia of *Pyricularia oryzae*: modification and application to tropical marine fungi[J]. J Antibiotics, 1996, 49: 873-878.
 - [4] 张 伟,王 涛,裴月湖,等. 利用生物模型-稻瘟霉筛选活性菌株[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19: 448-450.
 - [5] 方金瑞,黄维真. 海洋生物产生的溴代吡咯类抗菌物质[J]. 中国海洋药物, 1991, 10: 21-22.
 - [6] Proksch P, Edrada RA, Ebel R. Drugs from the sea-current status and microbiological implication [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(2-3): 125-134.
 - [7] 刘雪莉,钱伯初. 日本海洋天然活性物质研究简况[J]. 中国海洋药物, 1997, 16: 45-46.
 - [8] Zgurskaya HI, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes[J]. Molecul Microbiol, 2000, 37: 219-225.
 - [9] Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria[J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10: 12-26.
- [收稿日期] 2005-11-02 [修回日期] 2006-03-21
[本文编辑] 尹 茶

Increased expression of Toll-like receptor 4 on peripheral-blood mononuclear cells in patients with coronary arteriosclerosis disease

Geng HL, Lu HQ, Zhang LZ, Zhang H, Zhou L, Wang H, Zhong RQ (Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] The family of Toll-like receptors (TLRs) initiates innate immune responses, and Toll-like receptor 4 (TLR4) was considered to be an important player in the initiation and progression of atherosclerotic disease. The aim of the study was to investigate the expression of TLR4 on peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with coronary arteriosclerosis disease (CAD). We have examined the expression of TLR4 protein and mRNA by flow cytometry (FCM) and real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In addition, the levels of plasma lipids were determined by automatic biochemistry analyzer. The results showed that the positive rates and the mean mRNA copy number of TLR4 in CAD group were significantly higher than that in controls. But no significant difference was found in the positive rate and the mean mRNA copy number of TLR4 between CAD group with normal level of plasma lipids and the CAD group with abnormal level of plasma lipids. We suggest that expression level of TLR4 on peripheral-blood mononuclear cells is increased in atherosclerotic, but the differential expression of TLR4 has no correlation with the level of plasma lipids.

[Clin Exp Immunol, 2006, 143: 269-273]