

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01106

中国东海亚硫酸杆菌属微生物的鉴定及生物学活性分析

龙 聪, 卢小玲, 刘军华, 高 云, 焦炳华*, 刘小宇*

第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**对44株中国东海来源的亚硫酸杆菌进行16S rDNA的序列测定和生物学活性的初步分析。**方法:**用PCR方法对细菌的16S rDNA序列进行扩增,并在GenBank上进行相似性搜索。将全部亚硫酸杆菌的16S rDNA序列运用Clustal X1.8软件进行多序列比对并用MEGA4.1绘制进化树。利用稻瘟霉菌(*Pyricularia oryzae*) P-2b、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*)作为指示菌检测菌株发酵液的抗菌活性。以HL-60、HepG2细胞作为细胞毒活性指示细胞株检测菌株发酵液的细胞毒活性。采用ABTS和DPPH抗氧化模型检测菌株发酵液的自由基清除能力。**结果:**经与GenBank数据库比对,44株菌均与亚硫酸杆菌属有很高的相似性(97%~100%)。所有菌株发酵液对指示菌未显示出抗菌活性。菌株发酵液有不同程度的细胞毒活性和清除自由基的能力。19株菌的发酵液对HepG2细胞有抑制作用,抑制率为6.8%~42.8%,18株菌的发酵液对HL-60细胞有抑制活性,抑制率为6.9%~43.6%。12株菌的发酵液对ABTS自由基清除能力,清除率为4.49%~23.08%,8株菌发酵液对DPPH自由基有清除能力,清除率为1.23%~30.76%。**结论:**44株中国东海来源的亚硫酸杆菌表现出显著的细胞毒活性及抗氧化活性,具有潜在的药用价值。

[关键词] 亚硫酸杆菌;鉴定;细胞毒性;自由基清除

[中图分类号] R 931.77 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)10-1106-04

Identification and biological activity screening of *Sulfitobacter* sp. from East China Sea

LONG Cong, LU Xiao-ling, LIU Jun-hua, GAO Yun, JIAO Bing-hua*, LIU Xiao-yu*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To determine the 16S rDNA sequences of 44 strains of *Sulfitobacter* sp. obtained from the East China Sea and to study their biological activities. **Methods:** PCR was used to amplify the 16S rDNA sequences of the 44 strains, and the obtained sequences were subjected to GenBank similarity search. The multiple sequence alignment of the 44 strains was done by Clustal X1.8 and MEGA4.1. The antibacterial activities of *Sulfitobacter* sp. fermentation broths were tested using the following indicator bacteria; *Pyricularia oryzae*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. The cytotoxic activities of the fermentation broths were tested using HL-60 and HepG2 as the indicator cells. ABTS and DPPH antioxidant models were applied to test the free radical scavenging efficacy of the fermentation broth. **Results:** Analysis of the 16S rDNA genes of the 44 strains showed high similarity (97%-100%) to *Sulfitobacter* sp.. No fermentation broths of the 44 strains showed evident antibacterial activities, and they showed different degrees of cytotoxic activities and free radical scavenging capacities. Nineteen strains inhibited the growth of HepG2 cells, with the inhibition rate ranging 6.8%-42.8%; 18 strains inhibited the growth of HL-60 cells, with the inhibition rate ranging 6.9%-43.6%; 12 strains showed ABTS radical scavenging capacity, with the elimination rate ranging 4.49%-23.08%; and 8 strains showed DPPH radical scavenging capacity, with the elimination rate ranging 1.23%-30.76%. **Conclusion:** The 44 *Sulfitobacter* sp. strains possess evident cytotoxic activities and free radical scavenging capacities, making them potential for medicinal application and laying a foundation for further development of these bacteria.

[KEY WORDS] *Sulfitobacter* sp.; identification; cytotoxicity; free radical elimination

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(10):1106-1109]

[收稿日期] 2009-07-20 **[接受日期]** 2009-09-02

[基金项目] 国家高技术研究发展计划("863"计划, 2006AA09Z416, 2006AA09Z425, 2007AA091501). Supported by National High-tech R&D Program("863" Program, 2006AA09Z416, 2006AA09Z425, 2007AA091501).

[作者简介] 龙 聪, 硕士生. E-mail: long79919@sina.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 021-81870965, E-mail: jiaobh@live.cn; Tel: 021-81870970-8004, E-mail: liuxiaoyu8888@msn.com

海洋是一个极其复杂的生态系统,特殊的海洋生态环境赋予了海洋微生物独特的新陈代谢机制。海洋微生物作为新的生命活性物质产生的源泉吸引了越来越多国内外学者的关注,成为研究的热点^[1]。海洋分子生物学、基因序列测定、生物信息学的巨大发展极大地促进了海洋微生物天然产物的研究与开发。其中,海洋细菌的天然产物是新药开发的重要资源。许多细菌的次生代谢产物具有细胞毒活性,这为新的抗肿瘤药物的开发奠定了基础^[2]。亚硫酸杆菌属(*Sulfitobacter* sp.)由 Sorokin 1995 年首次从黑海中发现,因其能氧化亚硫酸盐以提供代谢能量而得名。近年来,亚硫酸杆菌属的细菌陆续在很多海域被发现并报道^[3-6],但缺乏亚硫酸杆菌发酵产物生物学活性方面的研究。

本课题组以寻找新型药用先导化合物为目的,在对东海微生物进行大规模的活性筛选过程中,发现了多株具有不同生物学活性的亚硫酸杆菌。本研究对这些亚硫酸杆菌进行 16S rDNA 序列测定,并对其抗菌、抗氧化及细胞毒活性进行分析,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 44 株菌株均分离自中国东海海域(东经 120.9°~122.8°,北纬 27.5°~30.9°)海水样品,现保存于本教研室菌种库。

1.2 菌株 16S rDNA 序列测定 采用菌落 PCR 方法进行菌株的 16S rDNA 序列测定。具体步骤如下:菌株于 Zobell 2216E 培养基(蛋白胨 5 g,酵母膏 1 g,磷酸铁 0.1 g,人工海水 1 L,pH 7.2~7.6)上 28℃ 培养 2~3 d,进行平板划线 3 次,挑取单菌落,于 100 μl 灭菌水中变性(99℃,10 min)后离心取上清作为模板,采用 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Code No. D310)进行 PCR 扩增目的片段。反应体系和反应条件按照说明书确定。取 5 μl 进行 1% 琼脂糖电泳,紫外灯下切下与标记物对应约为 1.5 kb 的目标条带,使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (Code No. DV805A)切胶回收目的片段送宝生物工程(大连)有限公司进行 DNA 测序。测序结果在 GenBank 上进行比对,Clustal X1.8 软件进行多序列比较,并用 MEGA4.1 绘制进化树。

1.3 活性筛选

1.3.1 发酵液制备 菌株接种于 5 ml 2216E 培养液中 28℃ 150 转/min 摇床培养 1 d,活化菌株,在无氧条件下将菌液转移入新鲜的培养液 50 ml 中继续

摇床培养 1 d,再将菌液转移入新鲜的培养液 500 ml 中,摇床培养 7 d,将发酵液离心(1 800×g,4℃,5 min)去除菌体,取 5 ml 上清用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,留存滤液进行抗菌活性及细胞毒活性分析。其余上清液用乙酸乙酯等量萃取 3 次,浓缩萃取液至干备用。

1.3.2 抗菌活性筛选 采用纸片法^[7],在灭菌烘干的纸片(Φ=6 mm)上分别滴加过滤除菌的发酵液 25 μl,以稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)P-2b、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*)作为指示菌,将滴加有发酵液的纸片分别贴在涂有指示菌的平板上,28℃ 培养 16~18 h 后测量抑菌圈直径。以氨苄青霉素、酮康唑和氟哌酸药敏纸片(每片药敏纸片含药 5 μg)作为阳性对照,空白培养液作为阴性对照。根据抑菌圈直径大小确定活性强度:>15 mm 为强抑制活性,表示为“+++”;10~15 mm 为中等抑制活性,表示为“++”;<10 mm 为弱抑制活性,表示为“+”;纸片周围不产生透明圈为无抑制活性,表示为“-”。

1.3.3 细胞毒活性筛选 细胞毒活性指示细胞株:人肝癌细胞 HepG2 和人急性淋巴细胞性白血病细胞 HL-60,均保存于本实验室。RPMI 1640 培养液(另加 10 mmol/L HEPES,2.0 mg/ml NaHCO₃,100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素和 10% 新生小牛血清),于 CO₂ 孵箱中 37℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养。贴壁细胞用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化传代。采用 MTT 法^[8]测定发酵液的细胞毒活性。将处于对数生长期的细胞制成单个细胞悬液,调整细胞密度为 0.8×10⁵个/ml,接种于 96 孔培养板,每孔接种 180 μl,转板 6 h 后加 20 μl 待测发酵液,培养 48 h 后加入 10 μl 5 mg/ml 的 MTT 溶液,继续培养 4 h,终止培养。仔细吸去上清,悬浮细胞先离心再吸去上清。每孔加入 150 μl DMSO,轻轻振荡,1 h 后用酶标仪测定光密度 D₅₇₀ 值,以放线菌素 D 为阳性对照,空白的细菌培养液为阴性对照,细胞培养液为空白调零组,根据测定的光密度值计算样品的抑制率:发酵液的抑制率(%)=(D_{空白}-D_{样品})/D_{空白}×100%。

1.3.4 抗氧化活性筛选 二苯代苦味酰基自由基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)是一种很稳定的自由基,最大吸收波长为 517 nm。当有自由基清除剂存在时其颜色减退程度与清除剂的清除能力及数量呈定量关系^[9]。2,2'-联氮-双(3-乙基苯噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)经活性氧化后生成稳定的蓝绿色阳离子自由基 ABTS⁺·,最大吸收波长为

734 nm。当有自由基清除剂存在时,该物质会与 ABTS⁺· 发生反应而使反应体系褪色,其颜色的减退程度与清除剂的清除能力及数量呈定量关系^[10]。

DPPH 自由基清除实验:将 DPPH 用乙醇配制成浓度为 6×10⁻⁵ mol/L 的溶液,0~4℃ 避光放置 8 h。菌株发酵液提取物用甲醇配制成 1 mg/ml 的溶液。取菌株发酵液 0.3 ml,与 0.5 ml DPPH 溶液混合,避光静置 20 min,测定 517 nm 处的光密度值 D_i。以槲皮素为阳性对照,甲醇为空白对照。计算菌株发酵液对自由基的清除率。菌株发酵液对自由基的清除率(%)=(D₀-D_i)/D₀×100%。其中,D₀为空白溶液的光密度值,D_i为发酵液提取物与 DPPH 反应后的光密度值。

ABTS 自由基清除实验:将 ABTS 配制成 0.25 mol/L 的水溶液,取 5 ml 加入 88 μl 的 2 mmol/L 的过硫酸钾,以 25 倍体积的乙醇进行稀释,稀释后避光保存 13 h。取菌株发酵液 0.1 ml 与 0.9 ml 的 ABTS 溶液混合,避光静置 20 min,测定 734 nm 处的光密度值 D_i。以槲皮素为阳性对照,甲醇为空白对照。计算菌株发酵液对自由基的清除率。菌株发酵液对自由基的清除率(%)=(D₀-D_i)/D₀×100%。其中 D₀为空白溶液的光密度值;D_i为发酵液提取物与 ABTS 反应后的光密度值。

1.4 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 16S rDNA 序列分析 将 44 株菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 上已知菌株数据比对后发现,全部 44 个序列均与 *Sulfitobacter* sp. 具有很高的相似性,相似度 97%~100%。将这 44 株菌与 5 株亚硫酸杆菌标准菌株进行多序列比对(Clustal X1.8),再运用 MEGA4.1 (Beta)绘制进化树,如图 1 所示。其中 DQ683726、DQ097527、Y17387、AY180102、AY180103 分别为标准菌株 *Sulfitobacter marinus* strain SW-265^T、*Sulfitobacter litoralis* strain Iso 3^T、*Sulfitobacter mediterraneus*、*Sulfitobacter dubius* strain KMM 3554^T、*Sulfitobacter delicatus* strain KMM 3584^T 的 GenBank 接收号。

2.2 抗菌活性筛选结果 结果表明,44 株测试菌均未能表现出明显的抗菌活性。

2.3 细胞毒活性筛选结果 44 株测试菌发酵液对于 HepG2 细胞和 HL-60 细胞表现出不同程度的抑制活性。19 株菌发酵液对 HepG2 细胞有抑制作用,抑制率 6.8%~42.8%,标准差 1.1%~4.1%(图 2A),18 株菌发酵液表现出对 HL-60 细胞的抑制活

性,抑制率 6.9%~43.6%,标准差 1.1%~3.9%(图 2B)。其中部分菌株发酵液对测试的 2 种肿瘤细胞株均有中等或较强的抑制活性,如 M66、M44、M33 等。但有些菌株表现出一定的特异性,如 M6 发酵液对 HepG2 细胞有较强的抑制作用(抑制率为 32%),而对 HL-60 细胞则没有抑制活性;反之,A16 菌株发酵液对 HL-60 细胞的抑制率达 23.9%,而对 HepG2 细胞则完全没有抑制活性。

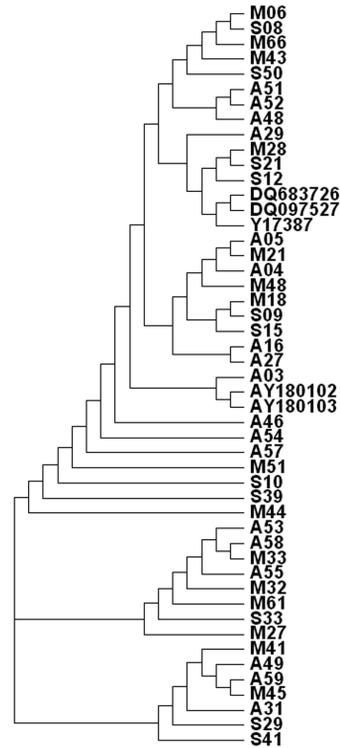


图 1 49 株亚硫酸杆菌的多序列比对结果

Fig 1 Multiple sequence alignment of 49 *Sulfitobacter* strains

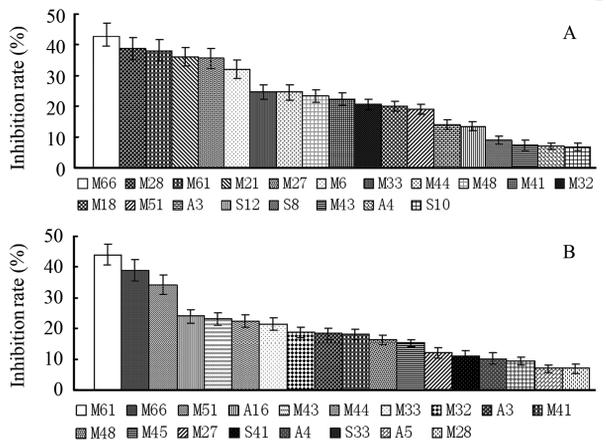


图 2 菌株发酵液对 HepG2(A)、HL-60 细胞(B)生长的抑制作用

Fig 2 Inhibition of HepG2(A) and HL-60(B) cell growth by fermentation broth of bacteria

n=5, $\bar{x} \pm s$

2.4 抗氧化活性筛选结果 44 株测试菌的发酵液对于 ABTS 和 DPPH 表现出不同程度的清除活性。12 株菌发酵液对 ABTS 自由基有清除活性,清除率 4.49%~23.08%,标准差 1.1%~2.8%(图 3A),8 株菌发酵液表现出对 DPPH 自由基的清除活性,清除率 1.23%~30.76%,标准差 0.7%~3.0%(图 3B)。其中 A31、M6 菌株的发酵液对 ABTS 和 DPPH 自由基均有中等清除活性。但有些菌株表现出一定的特异性,如:M51 发酵液对 DPPH 清除作用较强(清除率为 30.76%),而对 ABTS 清除作用较弱(清除率为 7.87%)。同样,M48、M28、A03 等发酵液对 ABTS 清除作用较强,而对 DPPH 清除作用较弱。另外 A51、M41、M66 发酵液对 ABTS 自由基有较强的清除活性而对 DPPH 完全没有作用。

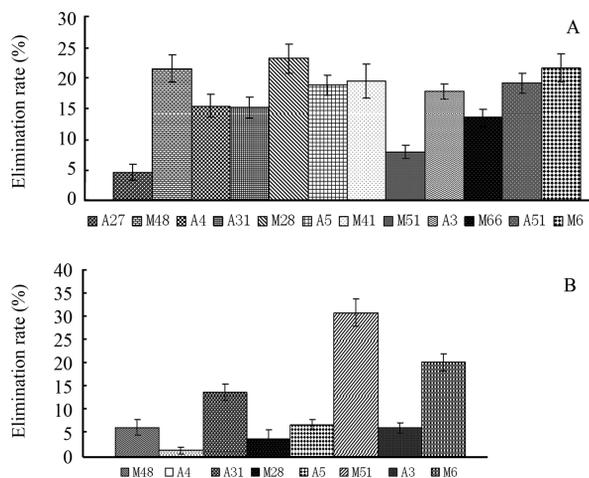


图 3 菌株发酵液对 ABTS(A)、DPPH(B) 自由基的清除作用

Fig 3 ABTS(A) and DPPH(B) radical scavenging capacity of fermentation broth of bacteria

$n=5, \bar{x} \pm s$

3 讨论

亚硫酸杆菌属细菌可能在维持海洋生态环境稳定中发挥较重要的作用。Ivanova 等^[4]认为亚硫酸杆菌可能参与海洋的硫循环;Brakstad 等^[11]指出亚硫酸杆菌属的细菌与海洋原油的生物降解密切相关;Vásquez 等^[12]在中毒的甲藻中发现亚硫酸杆菌参与了封闭毒素钠道的产生。但目前仍缺乏有关亚硫酸杆菌次生代谢产物的相关研究。

本研究的多序列比对结果表明,49 株菌显示了不同的进化发生位置,可大致分为 5 个大集合。但是,从进化树上看,5 种标准菌株的进化位置均出现于进化树的上半部,44 株菌中有相当大的一部分(约

30 株菌)与标准菌株的进化位置并不是十分接近,提示该属细菌可能还有许多未确定的种,有待进一步深入研究。

生物学活性研究表明,菌株虽然没有表现出抗菌活性,但部分菌株有中等或较强的细胞毒活性和自由基清除活性。研究结果为进一步研究亚硫酸杆菌次生代谢产物奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Blunt J W, Copp B R, Hu W P, Munro M H, Northcote P T, Prinsep M R. Marine natural products[J]. Nat Prod Rep, 2008, 25:35-94.
- [2] Gulder T A, Moore B S. Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products[J]. Curr Opin Microbiol, 2009, 12: 252-260.
- [3] Pukall R, Buntfuss D, Frühling A, Rohde M, Kroppenstedt R M, Burghardt J, et al. *Sulfitobacter mediterraneus* sp. nov., a new sulfite-oxidizing member of the α -Proteobacteria[J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49:513-519.
- [4] Ivanova E P, Gorshkova N M, Sawabe T, Zhukova N V, Hayashi K, Kurilenko V V, et al. *Sulfitobacter delicatus* sp. nov. and *Sulfitobacter dubius* sp. nov., respectively from a starfish (*Stellaster equestris*) and sea grass (*Zostera marina*) [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54:475-480.
- [5] Park J R, Bae J W, Nam Y D, Chang H W, Kwon H Y, Quan Z X, et al. *Sulfitobacter litoralis* sp. nov., a marine bacterium isolated from the East Sea, Korea [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57:692-695.
- [6] Yoon J H, Kang S J, Oh T K. *Sulfitobacter marinus* sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57:302-305.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:1651-1653.
- [8] Wang F Z, Fang Y C, Zhu T J, Zhang M, Lin A Q, Gu Q Q, et al. Seven new prenylated indole diketopiperazine alkaloids from holothurian derived fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. Tetrahedron, 2008, 64:7986-7991.
- [9] Milardović S, Iveković D, Grabarić B S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical [J]. Bioelectrochemistry, 2006, 68:175-180.
- [10] Meot-Duros L, Le Floch G, Magné C. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116:258-262.
- [11] Brakstad O G, Lødeng A G. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea [J]. Microbiol Ecol, 2005, 49:94-103.
- [12] Vásquez M, Grüttner C, Möeller B, Moore E R. Limited selection of sodium channel blocking toxin-producing bacteria from paralytic shellfish toxin-contaminated mussels (*Aulacomya ater*) [J]. Res Microbiol, 2002, 153:333-338.