

文章编号:1673-1689(2010)01-0094-04

红树林放线菌的筛选与抗真菌和抗肿瘤活性的测定

李蓉^{1,2}, 张京良¹, 江晓路^{*1}, 管华诗²

(1. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国海洋大学 医药学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 通过从深圳福田红树林根际于不同季节采集的 3 份土样和 2 份水样中分离得到 95 株放线菌, 94% 的放线菌为链霉菌属。测定 95 株放线菌发酵液对 9 种病原真菌的抗菌活性, 其中 31.6% 的放线菌发酵液有不同程度的抗病原真菌作用。同时采用 MTT 法测定了它们对肺癌细胞 A549、白血病细胞株 K562 两种肿瘤细胞的细胞毒活性, 其中 21% 放线菌发酵液具有细胞毒活性。s33、s62、s65 和 s68 这个 4 株放线菌发酵液具有抑制 5 种以上真菌的作用, 并且对两种肿瘤细胞株均有作用。

关键词: 红树林; 放线菌; 抗真菌活性; 抗肿瘤活性

中图分类号: R 979.1

文献标识码: A

The Antifungal and Antitumor Activities of the Isolated Mangrove Forest Actinomycetes

LI Rong^{1,2}, ZHANG Jing-liang¹, JIANG Xiao-lu^{*1}, GUAN Hua-shi²

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. School of Medicine and Pharmaceutics, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The objective of this study is to isolate mangrove forest derived actinomycetes strains for obtaining the bioactive metabolite producing strains to investigate antifungal and anti-tumor active metabolites. For this, actinomycetes strains were isolated by single colony isolation technique. The antifungal activity was assayed by paper method. The anti-tumor activity was assayed by MTT method. Ninety-five strains of actinomycetes were isolated from 3 soil samples and 2 water samples collected from a mangrove forest in Futian, south of Shenzhen, China, of which 94% were streptomycetaceae. Nine pathogens were used to test the antifungal activity of the ninety-five strains, among of them 31.6% of the fermentation broth showed the antifungal activity. Two tumor cell lines (A549 and K562) were used to test the antitumor activity with the MTT method. The result indicated that 21% of the fermentation broth presented the antitumor activity. Furthermore, the fermentation broth of the s33, s62, s65 and s68 showed antifungal activity toward more than five pathogens and antitumor activity on the two cell lines.

Key words: mangrove forest, actinomycetes, antifungal activity, antitumor activity

收稿日期: 2008-07-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771646)。

作者简介: 李蓉(1981-), 女, 湖北荆州人, 药物化学专业博士研究生。

*通讯作者: 江晓路(1958-), 山东青岛人, 理学博士, 教授, 主要从事应用微生物学方面的研究。

Email: jiangxl@ouc.edu.cn

红树林是分布于热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落。该地带的土壤由于处于咸淡水交汇的特殊环境,兼具海洋与陆地的性质,同时又不断接受红树林植物的供养、庇护,蕴藏着极为丰富独特的微生物资源^[1-2]。微生物是红树林生态系统的重要组成部分和最主要的分解者,推动着生态系统的物质循环与能量流动^[3]。放线菌是原核生物中高 G+C 含量的革兰氏阳性细菌类群,在自然界中分布很广,不仅在自然界物质能量循环中扮演重要的角色,更能够产生种类繁多的生物活性物质,是一类具有广泛实际用途和巨大经济价值的微生物资源。据统计,放线菌源的抗生素占有所有抗生素的 67% (主要是链霉菌 52% 和稀有放线菌 15%)^[4]。世界各地的科学工作者相继从海洋微生物的放线菌中分离获得具有抗细菌、真菌和抗肿瘤的活性产物和临床药物,并已证明这些活性具有相关性^[5-6]。生存于红树林根际的放线菌,由于红树林生态系统的特殊多样性,因而具有复杂独特的代谢途径,其次级代谢产物在结构类型以及生物活性方面都呈现出与陆生放线菌不同的特点和多样性^[7]。因此,从不同的生态环境乃至极端环境筛选新的放线菌菌株是微生物药物研究的热点。

作者从深圳福田红树林根际和水环境中分离放线菌,并研究其抗真菌和抗肿瘤细胞活性。福田红树林保护区位于深圳湾的东北部,属亚热带海洋性季风气候,年平均相对湿度高达 79%^[8]。林内各种植物生长茂盛,物质积累丰富,微生物组成复杂而丰富,具有很高的研究价值。

1 材料与方法

1.1 样品

分别于不同季节分离自深圳福田红树林采集的土样和水样。土样采集自 5 cm 深的根际泥,水样采集于土壤空隙水。

1.2 供试菌株和肿瘤细胞株

供试菌株为白色假丝酵母 (*Candida albicans*), 黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 圆弧青霉 (*Penicillium cyclopium*), 黑根霉 (*Rhizopus nigricans*), 辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*), 黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*), 小麦赤霉病菌 (*Gibberella sanbinetti*), 黄瓜霜霉病菌 (*Pseudoperonospora cubensis*), 谷子白发病菌 (*Sclerospora graminicola*), 以上菌种均由中国海洋大学食品与工程学院微生物实验室提供。肺癌细胞 A549、白血病细胞株 K562 由中国海洋大学医

药学院药理实验室提供。

1.3 培养基

1) 放线菌培养基:改良 Gause 1 号培养基 (NaCl 质量浓度为 1 g/dL);

2) 放线菌发酵培养基 (组分 g/dL):豆粉 1.2, 玉米粉 1.2, 淀粉 0.6, K_2HPO_4 0.2, NaCl 0.5, pH 7.2~7.4, 121 灭菌 20 min。

3) 霉菌和酵母菌培养基:PDA 培养基 (马铃薯 200 g 削皮切丝煮沸 20 min, 取浸汁, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 自然, 115 灭菌 30 min)。

1.4 放线菌分离、初步鉴定与发酵

1.4.1 分离 采用稀释分离法进行分离,分离于加有 0.01% 重铬酸钾的 Gause 1 号培养基平板 (重铬酸钾溶液在 Gause 1 号培养基融化冷却后至 50 左右时加入)。置 28 培养 5 d 后挑取单菌落分离纯化。将纯化的单菌落接到 Gause 1 号斜面上培养后,编号置于 4 保存。

1.4.2 初步鉴定 将放线菌用插片法接种在 Gause 1 号培养基上,28 培养 7~8 d 后,取出插片,用光学显微镜进行菌体形态观察^[9]。

1.4.3 发酵 活化放线菌至 Gause 1 号斜面培养,28 培养 5 d 后接种到发酵培养基摇瓶发酵。100 mL 三角瓶中装 30 mL 发酵培养基,摇床转速 180 r/min,28 发酵 5 d。

1.5 抗肿瘤细胞毒活性的样品准备

发酵液中加入体积比 2 倍量的丙酮,超声破碎菌体,离心取上清液,减压浓缩至不含丙酮,冷冻干燥,得各菌株的发酵提取样品。精密称量适量样品,用 80% 的甲醇配成 1 g/L 的样品溶液,供测试抗肿瘤活性。

1.6 抗菌和抗肿瘤活性测定方法

1.6.1 抗菌活性的测定 在培养皿中分别移入菌浓度为 10⁹ cfu/mL 的供试菌悬液 0.1 mL,移液管取已融化冷却至 45 的 PDA 培养基 12 mL/平皿,立即混匀。待凝固后,在直径为 6 mm 的圆形无菌双层滤纸片上注入放线菌发酵上清液 20 μ L,放在平板上于 28 培养 24~48 h 后测定抑菌圈直径^[9]。

1.6.2 抗肿瘤细胞毒活性的测定 肿瘤细胞在 37、体积分数 5% CO₂ 下培养于含有 10% 胎牛血清的培养液中,约 2 d 传代一次。在 96 孔平底培养板中每孔加入 1 \times 10⁵ 个处于对数生长期的肿瘤细胞。每孔 200 μ L,37 培养 1 h 后,每孔加样品液 2 μ L,继续于 37 培养 24 h^[10]。培养结束后在光

学显微镜下观察细胞形态变化,判断有无细胞凋亡或细胞坏死的形态特征,必要时拍照。每孔加预冷的5 g/L的MTT溶液(用PBS溶液配制)各20 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育4 h,4 000 r/min离心10 min,吸去上清液,每孔各加150 μ L DMSO,置酶标仪上充分振荡,使MTT紫色产物完全溶解,测量每孔570 nm处的OD值。实验中全部测试样品均设3个孔,取OD平均值,按下式计算抑制率(IR):

$$IR = (OD_{\text{空白}} - OD_{\text{样品}}) / OD_{\text{空白}} \times 100\%$$

2 实验结果

2.1 放线菌的分离与初步鉴定

将不同季节采集到的5份样品进行微生物分离,共分离到形态特征各有差异的放线菌95株,夏季采集样品中分离的放线菌较冬季样品多9%。通过初步鉴定发现,其中89株放线菌为链霉菌属,小单孢菌属5株,诺卡氏菌属1株。

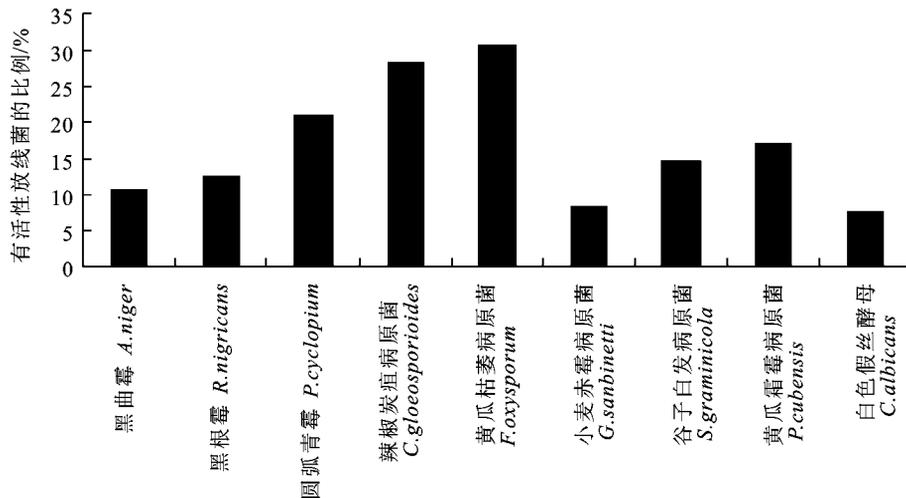


图1 对9种供试真菌菌株有抑菌活性的95株放线菌比例

Fig.1 Ratio of antifungal activity strains in 95 actinomycetes

2.3 放线菌发酵液细胞毒活性

以肺癌细胞A549、白血病细胞K562为供试肿瘤细胞测定菌株发酵液的细胞毒活性。抑制率大于50%则确定作为具有细胞毒活性。结果显示,21%的放线菌的发酵液有抗肿瘤细胞毒活性。同时具有抑制两种肿瘤细胞株活性的放线菌有6株,分别为s10、s33、s47、s62、s65和s68,结果见表1,2。

3 结 语

深圳福田红树林内植物生长茂盛,根部发达,代谢活动旺盛,能释放较多的糖、氨基酸、维生素及

2.2 放线菌发酵液的抗菌活性

对95株放线菌进行摇瓶发酵,测发酵上清液的抗菌活性。作者选取不同类型的致病性真菌,包括植物致病菌黑曲霉、黑根霉、圆弧青霉、辣椒炭疽病菌、黄瓜枯萎病菌、小麦赤霉病菌、黄瓜霜霉病菌、谷子白发病菌以及致病性真菌白假丝酵母作为代表性供试菌株进行测定。抑菌圈的直径大于10 mm则确定为具有抑菌活性。结果表明,31.6%的放线菌的发酵液显示出单一或多种抗菌活性。由图1可见,对辣椒炭疽病原菌和黄瓜枯萎病原菌有较好的抑制活性的放线菌的发酵液分别有28.4%和30.5%。同时具有抑制两种供试菌活性的有20株,同时具有抑制3种供试菌活性的有14株,同时具有抑制4种供试菌活性的有9株,具有抑制5种以上供试菌的活性的放线菌菌株有4株,分别为s33、s62、s65和s68。

其他可作为微生物营养的物质,从而促进根际微生物的生长繁殖;微生物的代谢活动及其代谢产物又可增加红树植物的养分或促进其对养分的吸收和利用,从而有利于植物的生长^[11]。所以红树林内微生物组成复杂,其中包括大量的放线菌对红树林根际生态起到调节作用。

红树林根际放线菌在种类和数量上都远远比菜园、湖畔、海泥等地所含放线菌丰富和众多^[12]。作者从福田红树林分离得到了95株放线菌,包括89株链霉菌、5株小单孢菌和1株诺卡氏菌,其中31.6%的放线菌发酵液具有抗病原真菌作用,21%放线菌发酵液具有细胞毒活性。在供测试的9种病

表 1 放线菌发酵液对肿瘤细胞株 A549 的作用

Tab. 1 Antitumor activity toward cell line A549 of fermentation broth of actinomycetes

菌编号	吸光值 \pm 标准偏差		抑制率/ %
	空白	样品	
s10	1.268 \pm 0.119	0.593 \pm 0.098	53.2
s33	1.268 \pm 0.119	0.554 \pm 0.115	56.3
s47	1.268 \pm 0.119	0.498 \pm 0.079	60.7
s62	1.268 \pm 0.119	0.484 \pm 0.142	61.8
s65	1.268 \pm 0.119	0.478 \pm 0.092	62.3
s68	1.268 \pm 0.119	0.467 \pm 0.126	63.2

表 2 放线菌发酵液对肿瘤细胞株 K562 的作用

Tab. 2 Antitumor activity toward cell line k562 of fermentation broth of actinomycetes

菌编号	吸光值 \pm 标准偏差		抑制率/ %
	空白	样品	
s10	1.412 \pm 0.134	0.702 \pm 0.112	50.3
s33	1.412 \pm 0.134	0.682 \pm 0.107	51.7
s47	1.412 \pm 0.134	0.704 \pm 0.124	50.1
s62	1.412 \pm 0.134	0.685 \pm 0.108	51.5
s65	1.412 \pm 0.134	0.699 \pm 0.099	50.5
s68	1.412 \pm 0.134	0.691 \pm 0.135	51.1

原真菌中,对植物致病菌辣椒炭疽病原菌和黄瓜枯萎病原菌抑制率相对较高。s33、s62、s65 和 s68 这 4 株放线菌的发酵液具有抑制 5 种以上病原真菌的活性。s10、s33、s47、s62、s65 和 s68 这 6 株放线菌的发酵液同时对 2 种肿瘤细胞株均有作用。由结

果可知,s33、s62、s65 和 s68 这 4 株放线菌的发酵液中的次生代谢产物具有较好的应用前景,具有较高的研究价值。有关这 4 株放线菌的发酵液的分纯化以及这 4 株菌的生理生化特征正在进行中。

参考文献(References):

- [1] LIN P, ZHANG YB, DENG A Y, et al. Microflora and antimicrobial activities of soil microorganisms in mangrove forests in the Jiulong Estuary[J]. *China Acta Oceanol Sin*, 2005, 27(3): 133 - 141.
- [2] 林鹏. 中国红树林生态系[M]. 北京:科学出版社, 1997:1 - 67.
- [3] Hashim A A S, Essam H G, Kareema M S. Bacterial community and some physicochemical characteristics in a subtropical mangrove environment in Bahrain [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50(2): 147 - 155.
- [4] 刘志恒. 放线菌——微生物药物的重要资源[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(6): 143 - 145.
LIU Zhi-heng. Actinomycetes—important resource of microbiology medicine[J]. *Microbiology*, 2005, 32(6): 143 - 145. (in Chinese)
- [5] Sponga F, Cavaletti L, Lazzarini A, et al. Biodiversity and potentials of marine derived microorganisms [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70: 65 - 69.
- [6] Erba E, Bergamaschi D, Ronzoni S, et al. Mode of action of thiocoraline, a natural marine compound with antitumour activity[J]. *British Journal of Cancer*, 1999, 80: 971 - 980.
- [7] 郑志成, 周美英, 姚炳新. 红树林根际放线菌的组成及生物活性[J]. *厦门大学学报:自然科学版*, 1989, 28(3): 306 - 310.
ZHENG Zhi-cheng, ZHOU Mei-ying, YAO Bing-xin. The composition and activity of actinomycetes in the root of mangrove[J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 1989, 28(3): 306 - 310. (in Chinese)
- [8] 林益明, 向平, 林鹏. 深圳福田几种红树植物繁殖体与不同发育阶段叶片热值研究[J]. *海洋科学*, 2004, 28(2): 43 - 48.
LIN Yi-ming, XIANG Ping, LIN Peng. Caloric values of propagules and leaves at the different development stages of mangrove species at Futian, Shenzhen[J]. *Ocean Science*, 2004, 28(2): 43 - 48. (in Chinese)
- [9] 周德庆. 微生物学实验手册(第一版)[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1986.
- [10] 韩晓, 崔承彬, 韩小贤. 海洋来源微生物的分离培养与抗肿瘤活性筛选[J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35(4): 241 - 246.
HAN Xiao, CUI Cheng-bin, HAN Xiao-xian. Isolation of marine-derived microorganisms and screening for their anti-tumor activity [J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2008, 35(4): 241 - 246. (in Chinese)
- [11] 曹启民, 郑康振, 陈耿, 等. 红树林生态系统微生物学研究进展[J]. *生态环境*, 2008, 17(2): 893 - 845.
CAO Qi-min, ZHENG Kang-zhen, CHEN Geng, et al. A review of studies on microbiology of mangrove ecosystems[J]. *Ecosystem*, 2008, 17(2): 893 - 845. (in Chinese)
- [12] 蒋云霞, 郑天凌, 田蕴. 红树林土壤微生物的研究:过去、现在、未来[J]. *微生物学报*, 2006, 46(5): 848 - 851.
JIANG Yun-xia, ZHENG Tian-ling, TIAN Yun. Research on mangrove soil microorganisms: past, present and future [J]. *Acta Microbiological Sinica*, 2006, 46(5): 848 - 851. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)