

抗菌和细胞毒活性海洋细菌的筛选及其次生代谢基因证据

朱 鹏¹, 郑 立², 林 晶², 邵健忠¹, 严小军^{2*}

(¹ 浙江大学生命科学院 杭州 310058) (² 宁波大学海洋生物实验室 宁波 315211)

摘 要: 从不同海域的海水、海泥和海洋生物中分离海洋细菌, 利用琼脂扩散法和 MTT 法对细菌培养液的乙酸乙酯提取物进行了抗菌和细胞毒活性筛选, 并对具有细胞毒活性的细菌菌株进行了 16S rRNA 系统发生学分析和多聚酮合酶(PKS I 型)、非核糖体肽合成酶(NRPS)的筛选。结果显示, 在分离到的 346 株海洋细菌中, 42 株细菌具有抗菌活性, 12 株具有细胞毒活性。对 12 株具有细胞毒活性的细菌菌株进行了 16S rRNA 系统发生学分析, 它们分别属于 *Agrobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Paracoccus*, *Rheinheimera*, *Aerococcus*, *Exiguobacterium* 和 *Alteromonas* 8 个属。对这 12 株具有细胞毒活性的细菌菌株进行进一步的 PKS 和 NRPS 筛选, 得到了 4 株含有 PKS I 型的 KS 结构域或 NRPS 的 A 结构域的海洋细菌, 为从聚酮和非核糖体肽等生物合成途径去深入研究其次生代谢产物提供了基因学的证据。

关键词: 海洋细菌; 抗菌; 细胞毒; 16S rRNA; 多聚酮合酶(PKS); 非核糖体肽合成酶(NRPS)

中图分类号: Q78, Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2007)02-0228-07

与陆源生物的次生代谢产物相比, 海洋生物由于生活环境复杂、门类多样化, 其天然产物具有很多新型的结构骨架和独特的化学结构, 也具有更强烈的生物活性^[1~3]。随着研究的深入, 不少学者发现相当一部分海洋动植物中的活性物质来源于附生微生物^[4~6]。由于海洋动植物中的活性物质含量低, 且生物量有限, 所以海洋微生物作为活性物质的可持续性资源正日益受到国内外研究工作者的高度重视^[7,8]。

海洋微生物次生代谢产物从生物合成途径来看, 主要是聚酮类化合物和非核糖体肽类化合物, 负责该两类化合物生物合成的酶分别属于多聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS) I 型和非核糖体肽合成酶(Non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)两个重要家族^[9~13]。PKS I 型和 NRPS 复合酶的基因主要由连续的重复基因模块(Module)构成, 每个基因模块的编码产物可催化多聚酮或多肽链的延伸和可能的修饰。PKS I 型基因簇大小从 10kb 到大于 100kb 不等, 一般包括 2~4kb 的负载模块>Loading module)线性组织的多个 4~5.5kb 的中间模块以及一个小的硫酯酶(TE)或释放域, 每个模块均含有 3~6 个功能域, 其中, 酮基合酶(Ketosynthase, KS)、酰基转移酶(Acyltransferase, AT)和酰基载体蛋白(Acylcarrier protein, ACP)是聚酮链二碳单元延伸所必需的。此外, 模块还可能含有 1~3 个修饰酮基的酶, 包括酮

基还原酶(KR)、脱水酶(DH)或烯酰基还原酶(ER)。PKS I 型基因模块的顺序和组成决定了其编码产物的结构, 而模块的数量则决定了聚酮链的长度^[14]。在 NRPS 中也有类似的模块结构, 每个模块含有腺苷酰化结构域(Adenylation, A)、缩合结构域(Condensation, C)和肽酰载体蛋白结构域(Peptidyl carrier protein, PCP)3 个必需的功能域, 这 3 种酶共同完成氨基酸单元的延伸。此外, 各模块中还可能存在差向异构化(Epimerization)、N-甲基化(N-methylation)和氧化(Oxidation)3 个修饰功能域。与 PKS I 型基因簇相似, NRPS 的模块顺序、组成和数量也分别决定着氨基酸寡肽的性质和长短^[11,15]。

本实验从山东青岛、烟台以及浙江南麂、宁波、嵊山潮间带水域分离海洋细菌, 研究它们的抗菌和细胞毒活性, 对其中一些具有活性的细菌菌株进行了 16S rRNA 序列系统发生学分析, 并运用分子生物学方法对这些细菌进行了 PKS 和 NRPS 筛选, 为进一步开展海洋微生物活性物质研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 本实验从山东青岛、烟台以及浙江南麂、嵊山、宁波的潮间带水域采集海水、海水沉积物及 11 种海洋生物采集样品(表 1)。

基金项目: 国家自然科学基金(20472040)、教育部新世纪优秀人才支持计划(NECT-04-0555)

* 通讯作者。Tel: 86-574-87600458; Fax: 86-574-87600590; E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

作者简介: 朱 鹏(1979-)男, 山西人, 博士研究生, 主要从事海洋药用微生物筛选研究。E-mail: rubyzp_nbu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-22; 接受日期: 2006-12-22; 修回日期: 2006-12-14

表 1 实验材料及其来源地

Table 1 Samples and their origins

Origin	Samples
Nanji , Zhejiang	Seawater
	Sediments
	<i>Lomentaria catenata</i>
	<i>Laurencia okamurai</i>
	<i>Ulva fasciata</i>
	<i>Hymeniacion perleve</i>
Qingdao , Shandong	<i>Euplexaura curvata</i>
	Seawater
	Sediments
	<i>Ulva pertusa</i>
	<i>Sargassum thunbergii</i>
	<i>Gymnogongrus flabelliformis</i>
Shengshan , Zhejiang	<i>Laminaria japonica</i>
	<i>Homoiodoris japonica</i>
	<i>Acanthochiton scutiger</i>
	Seawater
	Sediments
	Seawater
Ningbo , Zhejiang	Sediments

1.1.2 菌种等来源 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* , BS) CMCC (B) 63003 株、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* , SA) CMCC (B) 26001 株、大肠杆菌(*Escherichia coli* , EC) CMCC (B) 44102 株、根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* , AT) AS1.1416 株和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisia* , SC) ACCC2.1882 购于中国典型培养物保藏中心 ; *E. coli* DH5 α 购于 TaKaRa 公司 ; HeLa 细胞购于中国科学院上海典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.3 培养基 : 固体培养基(蛋白胨 0.5g , 酵母膏 0.1g , FePO₄ 0.1g , 琼脂 15g , 海水 1L , pH7.2 ~ 7.6) 液体培养基(蛋白胨 5g , 酵母膏 1g , FePO₄ 0.1g , 海水 1L , pH7.2 ~ 7.6)

1.1.4 主要试剂和仪器 : T1 Thermal Cycler(Biometra , 德国) ; Taq 聚合酶、pMD19-T Vector(TaKaRa 公司 , 日本) 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TIANGEN 公司 , 中国) ; Plasmid Miniprep Kit (Omega Bio-tek 公司)

1.2 样品处理

1.2.1 生物样品的处理 : 剪取 0.5g 样品 , 用无菌海水漂洗 3 遍 , 尽可能除去非附生细菌 , 加入 10mL 无菌海水 25℃ 研磨 , 再用无菌海水稀释为 10⁻¹、10⁻² 两个稀释度。

1.2.2 海水沉积物样品 : 称取 0.5g 样品加入 10mL 无菌海水 , 振荡摇匀后静置 , 吸取上层海水用无菌海水稀释为 10⁻¹、10⁻² 两个稀释度。

1.2.3 海水样品 : 用无菌海水稀释为 10⁻¹、10⁻² 两个稀释度。

1.3 分离细菌

细菌分离培养基采用 1/10 Zobell 2216E 固体培养基(蛋白胨 0.5g , 酵母膏 0.1g , FePO₄ 0.1g , 琼脂

15g , 海水 1L , pH7.2 ~ 7.6) 。 样品涂布后 25℃ 培养 20d , 挑取不同形态、不同颜色的单菌落转入斜面培养 , 经多次纯化后 7℃ 保存。

1.4 菌株培养液粗提取物制备

取低温保存的纯化菌株转入斜面 , 25℃ 培养 2d 后接种于装有 300mL Zobell 2216E 液体培养基(蛋白胨 5g , 酵母膏 1g , FePO₄ 0.1g , 海水 1L , pH7.2 ~ 7.6) 的三角瓶中 , 在摇床上 25℃ 震荡(120r/min) 培养 7d 。 培养液离心(5000 \times g , 30min) 除去菌体 , 上清液用乙酸乙酯(100mL \times 3) 提取 , 乙酸乙酯相 37℃ 蒸干作为活性检测的粗提取物。

1.5 抗菌活性筛选

以枯草芽孢杆菌 CMCC (B) 63003 株、金黄色葡萄球菌 CMCC (B) 26001 株、大肠杆菌 CMCC (B) 44102 株、根瘤土壤杆菌 AS1.1416 株和酿酒酵母 ACCC2.1882 株作为实验用敏感指示菌 , 用琼脂扩散法^[16]筛选抑菌活性菌株。乙酸乙酯粗提取物用甲醇溶解 , 配制成 100mg/mL 储备液 , 吸取 20 μ L 加在灭菌烘干的滤纸片(直径 = 6mm) 上 , 置于上层长有指示菌的双层营养琼脂固体平板中 , 以含甲醇的纸片作为阴性对照 , 含青霉素、氯霉素纸片(上海医药化验所产) 作为阳性对照。培养皿放于 8℃ 冰箱中过夜 , 次日于 37℃ 培养箱中培养 24h 观察结果 , 根据抑菌圈大小判别抑菌活性。

1.6 细胞毒筛选

测定细胞毒活性的 MTT 法参考 Mosmann 等报道的方法^[17]进行 , 以 HeLa 细胞作为目标细胞 , 培养基为含 10% BCS 的 RPMI1640 培养基。细胞用胰酶消化后 , 调节密度为 2 ~ 3 \times 10⁴ 个/孔 , 添加于 96 孔板中 , 每孔 195 μ L , 置于 37℃、0.5% CO₂ 培养箱中培养 24h 。 将甲醇溶解的粗提取物加入培养板中 , 使每孔样品终浓度为 200 μ g/ml , 以甲醇作为阴性对照 , 37℃、0.5% CO₂ 培养箱中培养 48h 。 取出 96 孔板 , 每孔加入 20 μ L 的 MTT(5mg/mL) , 继续培养 4h 。 弃培养液 , 每孔加入 150 μ L 的 DMSO , 37℃ 振荡 6min , 492nm 波长测定各孔的光吸收 , 抑制率(Inhibition rate) 的计算按公式 IR = (OD 阴性对照 - OD 样品) / OD 阴性对照 \times 100% 进行 , 将 IR \geq 50% 判定为具有细胞毒活性。

1.7 海洋细菌的 PKS I 型和 NRPS 筛选及其 16S rRNA 分子鉴定

1.7.1 细菌基因组 DNA 的制备 : 取培养到指数生长期细菌菌液 5mL , 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA 。

1.7.2 引物设计 : 从 GenBank 中查找已知 PKS I 型基因的保守序列 , 提交 ClustalW 软件(<http://www.bior.ox.ac.uk/clustalw/>) 对 KS 酶的基因进行序列比对

参照比对结果使用网上 CODEHOP 简并引物设计服务 结合 Primer Premier 5 生物学软件 ,设计出针对 I 型 PKS 基因保守区域 KS 片段的简并引物一套 ,预计扩增目的片段长度为 700bp 左右 ,其中正向引物针对 AMDPQR 模序 ,序列命名为 KSF(表 2) ,反向引物针对 HGTG 模序 ,序列命名为 KSR(表 2) 。对于 NPRS ,查找国外相关文献^[18] ,设计针对 NRPS 基因保守区域 A 片段的兼并引物一套 ,预计扩增目的片段长度为 1000bp 左右 ,其中正向引物针对 GAYVP 模序 ,序列命名为 NRPSK(表 2) ,反向引物针对 VKIR 模序 ,序列命名为 NRPSK(表 2) 。根据文献^[19]合成用于扩增 16S rRNA 的引物 1492R 和 27F(表 2) 。

表 2 实验中所使用的 PCR 引物

Table 2 The PCR primers used in this experiment		
Primer	Target	Sequence(5'→3')
1492R	16S rRNA	GGTTACCTTGTTACGACTT
27F	16S rRNA	AGAGTTTGATCCTGGC
KSF	KS domain	GCGATGGATCCNCAGCAGCG
KSR	KS domain	GTGCCGTGCCGTGNGYYTC
NRPSF	A domain	GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC
NRPSR	A domain	CCNCGDATYTTNACYTG

1.7.3 KS 结构域的 PCR 扩增 :50μL 扩增体系 ,反应条件为 94℃ 3min 94℃ 40s 59℃ 1min 72℃ 40s , 35 个循环 72℃ 10min。

1.7.4 A 结构域的 PCR 扩增 50 μL 扩增体系 ,反应条件为 94℃ 5min 94℃ 1min 50℃ 1min 72℃ 2min , 35 个循环 72℃ 7min。

1.7.5 16S rRNA 的 PCR 扩增 50μL 扩增体系 ,反应条件为 94℃ 5min 94℃ 1min 56℃ 1min 72℃ 1min , 35 个循环 72℃ 5min。

1.7.6 PCR 产物克隆 :PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 ,切下目的条带 ,回收 DNA ,将纯化后的 PCR 产物先与 pMD19-T Vector 连接 ,然后转化到 E. coli DH5α 感受态细胞 ,提取重组质粒。

1.7.7 DNA 序列测定和分析 :采用 BigDye terminator v3.1 和 ABI PRISM 373 自动测序仪(ABI 公司)测定克隆片段的核苷酸序列 ,测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。获得的 16S rRNA 序列提交 GenBank 用 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)与已知序列进行对比 ,用 Clustal X1.8.msw 软件进行排列 ,利用 MEGA3.1 软件绘制系统树并确定它们的系统发生学地位。

2 结果

2.1 海洋细菌活性物质的检测

根据采样海域及菌落的形态、大小、颜色等表现特征 ,从海水、海泥以及 11 种海洋生物样品中共分离到 346 株海洋细菌 ,对 5 种敏感指示菌的抑菌实

验表明 42 株细菌具有至少抑制一种指示菌的活性 (表 3) ,其中 4 株对所有指示菌都有抑制作用 ,分别是真丛柳珊瑚(*Euplexaura curvata*)中分离到的 NJ5-7-1、珍珠膜海绵(*Hymeniacidon perleve*)中分离到的 NJ6-3-1、青岛海水中分离到的 QD1-2、青岛石鳖中分离到的 QD5-2-1。产生抑菌物质的海洋细菌对于指示菌表现出不同的抑菌谱(图 1) ,在 42 株海洋细菌中 9% 对 EC 有抑制作用 ,17% 对 SC 有抑制作用 ,对 SA 有抑制作用的占 52% ,对 BS 有抑制作用的为 69% ,对 AT 有抑制作用的最多 ,占总数的 81% 。

表 3 产生抑菌物质的海洋细菌

Table 3 Marine bacteria with antimicrobial activity isolated in this experiment

Marine bacteria	Target bacteria				
	BS	SA	EC	AT	SC
NJ1-1-1	+	++	-	++	+
NJ1-4-1	-	-	-	+	-
NJ 1-8-2	+	-	-	-	-
NJ1-10 ⁻¹	-	+	-	+	-
NJ 1-14-2	+	+	-	+	-
NJ1-20-2	-	+	-	+	-
NJ2-2-1	+	-	-	+	-
NJ2-9-1	+	+	-	+	-
NJ 3-3-1	+	-	-	+	-
NJ 3-4	+	-	-	-	-
NJ 3-10	+	-	-	+	-
NJ 3-18	-	-	-	+	-
NJ 4-6-1	+	++	-	-	-
NJ 5-2-2	+	+	-	-	-
NJ 5-3-1	+	-	-	+	-
NJ 5-3-2	+	-	-	++	-
NJ 5-7-1	+++	++	+	++	++
NJ 5-16	-	-	-	+	-
NJ6-3-1	+++	++	+	++	++
NJ 6-3-2	++	++	-	+++	++
NJ 6-8-1	+	+	-	+	-
NJ 6-10 ⁻¹	-	-	-	+	-
NJ 6-14	+	-	-	+	-
NJ 6-20	-	-	-	+	-
NJ6-22	+	+	-	-	-
NJ6-25	+	+	-	-	-
NJ7-15-2	+	-	-	+	-
QD1-2	++	+++	+	++	++
QD 1-6	-	-	-	+	-
QD 2-6	+	+	-	+	-
QD 3-2	++	-	-	++	-
QD3-3-1	+	-	-	+	-
QD3-10	-	-	-	+	-
QD4-3-1	-	++	-	-	-
QD 4-7	+	+	-	++	-
QD 5-2-1	+++	+++	+	++	++
QD 5-5	+	+	-	-	-
QD5-7	-	-	-	+	-
QD 6-3-1	-	-	-	+	-
QD 7-2	+	-	-	+	-
YTBM2-1	-	+	-	+	-
YTHM-17	++	+	-	++	+

“ - ”: No inhibition ; “ + ”: Inhibition zone between 1 and 3mm ; “ ++ ”: Inhibition zone between 3 and 5mm ; “ +++ ”: Inhibition zone more than 5mm .

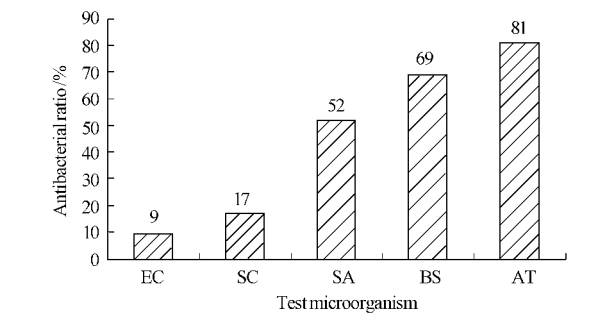


图1 海洋细菌抑菌物质的抑菌谱

Fig.1 Antimicrobial spectra of marine bacteria. “EC”: *Escherichia coli*; “SC”: *Saccharomyces cerevisia*; “SA”: *Staphylococcus aureus*; “BS”: *Bacillus subtilis*; “AT”: *Agrobacterium tumefaciens*.

在分离到的346株海洋细菌中,有12株细菌的培养液粗提取物具有细胞毒活性(图2)。其中SS6-4、NB-6、NB-52、NJ6-3-1四株海洋细菌培养液粗提取物对HeLa细胞表现出较高的抑制率,并以NJ6-3-1为最高。12株细菌的ID₅₀值范围从77.20到199.84 μg/mL(表4)。与抑制率相对应,海洋细菌NJ6-3-1的ID₅₀值(77.20 + 1.94 μg/mL)为12株细菌中最低。在分离到的12株具有细胞毒活性的细菌中6株细菌(NJ6-3-1、NJ5-1-2B、NJ1-1-1、QD1-2、QD5-2-

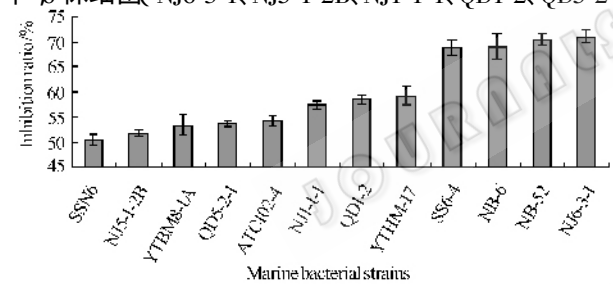


图2 海洋细菌培养液粗提取物对HeLa细胞生长抑制率

Fig.2 Inhibitory effect of the extracts from marine bacteria on HeLa cell growth.

表4 分泌细胞毒活性物质海洋细菌的来源及其ID₅₀值

Table 4 The origin of cytotoxic bacteria and the ID ₅₀ of their extracts			
Origin	Species	Bacteria	ID ₅₀ (μg/mL)
Invertebrate	<i>Euplexaura curvata</i>	NJ5-1-2B	199.84 ± 9.10
	<i>Hymeniadicon perlewe</i>	NJ6-3-1	77.20 ± 1.94
	<i>Acanthochiton scutiger</i>	QD5-2-1	175.82 ± 3.20
	<i>Homoiodoris japonica</i>	SSN-6	186.42 ± 12.60
Seaweed	<i>Lomentaria catenata</i>	NJ1-1-1	123.38 ± 3.29
	<i>Laminaria japonica</i>	YTHM8-1A	173.56 ± 7.58
		YTHM-17	127.88 ± 5.40
	<i>Alexandrium tamarense</i>	ATCI02-4	102.88 ± 1.15
Seawater	Seawater in Qingdao	QD1-2	137.50 ± 2.91
	Seawater in Shengshi	SS6-4	80.83 ± 3.47
Sediments	Sediments in Ningbo	NB-6	103.79 ± 4.46
		NB-52	99.84 ± 2.70

Each datum of the ID₅₀ represents the mean ± SD value from three independent experiments.

1、YTHM-17)还分别具有抑菌的活性(表3)。虽然分离样品采集于中国4个不同地点(表1),但从所获得的12株具有细胞毒活性的细菌的分布来看,其中来自于环境(海水和沉积物)的海洋细菌数量4株占环境细菌总数的5.19%,来自于海洋生物(无脊椎动物和海藻)的细菌数量8株占海洋生物细菌总数的10.52%,高于来自于环境样品中的百分比。

2.2 海洋细菌的PKS I型和NRPS筛选及其16S rRNA分子鉴定

对分离得到12株分泌细胞毒活性物质的细菌进行了PKS I型和NRPS的筛选(表5),其中NJ6-3-1、QD1-2、YTHM-17、NB-6共4株细菌成功的扩增出了NRPS中的A结构域,NJ6-3-1、QD1-2在成功的扩增出NRPS中的A结构域的同时,也成功的扩增出了PKS I型的KS结构域。将它们的核苷酸序列与GenBank中的已有序列进行BLAST比对,结果显示(表6),除YTHM-17的A结构域序列与细菌*Bacillus weihenstephanensis* 有较高的同源性(相似度93%)外,其它核苷酸序列与GenBank中已有序列同源性较低,其氨基酸序列BLAST比对提示为PKSI型的KS片段或NRPS的A片段,提示我们海洋细菌中的KS片段和A片段基因可能存在着丰富的多样性。

值得注意的是,对来自于QD1-2的KS结构域的氨基酸序列分析发现,其核心保守序列为VQTACSTIS,结合其上游的NDKD序列排列方式,提示该KS片段可能来源于PKS/NRPS杂和基因簇^[24]。而来自于NJ6-3-1的KS片段的氨基酸序列则不符合这个规律。由于NJ6-3-1中也成功的扩增出NRPS的A片段,提示该海洋细菌或许是分别通过两个独立的基因簇(PKS和NRPS)来合成次生代谢产物。

表5 PKS和NRPS的筛选结果

Table 5 The screening results of PKS and NRPS

Bacteria	The most related genus	PKS	NRPS
NJ1-1-1	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	-
NJ6-3-1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	+	+
NJ5-1-2B	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	-	-
QD1-2	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	+	+
QD5-2-1	<i>Paracoccus</i> sp.	-	-
YTHM8-1A	<i>Rheinheimera</i> sp.	-	-
YTHM-17	<i>Aerococcus</i> sp.	-	+
ATCI02-4	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
NB-6	<i>Bacillus</i> sp.	-	+
NB-52	<i>Exiguobacterium</i> sp.	-	-
SSN6	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	-	-
SS6-4	<i>Alteromonas</i> sp.	-	-

“ - ” no PCR product; “ + ” correct PCR product.

表 6 海洋细菌 KS 和 A 结构域序列与 GenBank 中已知序列的对比

Table 6 The sequences alignment of KS and A domains of marine bacteria isolated in this experiment with that submitted to GenBank

Marine bacteria	Domain	Size/bp (Accession number)	The most related species (Accession number)	Sequence similarity/%
NJ6-3-1	KS	686bp (DQ666948)	<i>Saccharophagus degradans</i> (ABD82980)	69
	A	1004bp (DQ666950)	<i>Mycococcus xanthus</i> (YP631805)	43
QD1-2	KS	683bp (DQ666949)	<i>Nitrosospora multiformis</i> (YP412520)	56
	A	1007bp (DQ666951)	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> (EAR30010)	75
NB-6	KS	971bp (DQ873696)	<i>Nostoc punctiforme</i> (ZP00110699)	45
	A	1028bp (DQ666952)	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (ZP01182547)	93

以细菌的 16S rRNA 通用引物对这 12 株具有细胞毒活性的海洋细菌基因组 DNA 进行扩增,测得的序列与 GenBank 中的已知序列进行比对,并利用 MEGA3.1 软件进行系统发生学分析(图 3),结果显示所检测的 12 株海洋细菌分别为属于 8 个属,它们分别是: *Agrobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Paracoccus*, *Rheinheimera*, *Aerococcus*, *Exiguobacterium*, 和 *Alteromonas*, 其中大部分细菌菌株是 *Pseudoalteromonas* (4 株)这个属。能成功扩增出 KS 结构域和 A 结构域的 4 株细菌 NJ6-3-1、QD1-2、YTHM-17、NB-6 分别属 3 个不同的属: *Pseudoalteromonas*、*Aerococcus* 和 *Bacillus*。

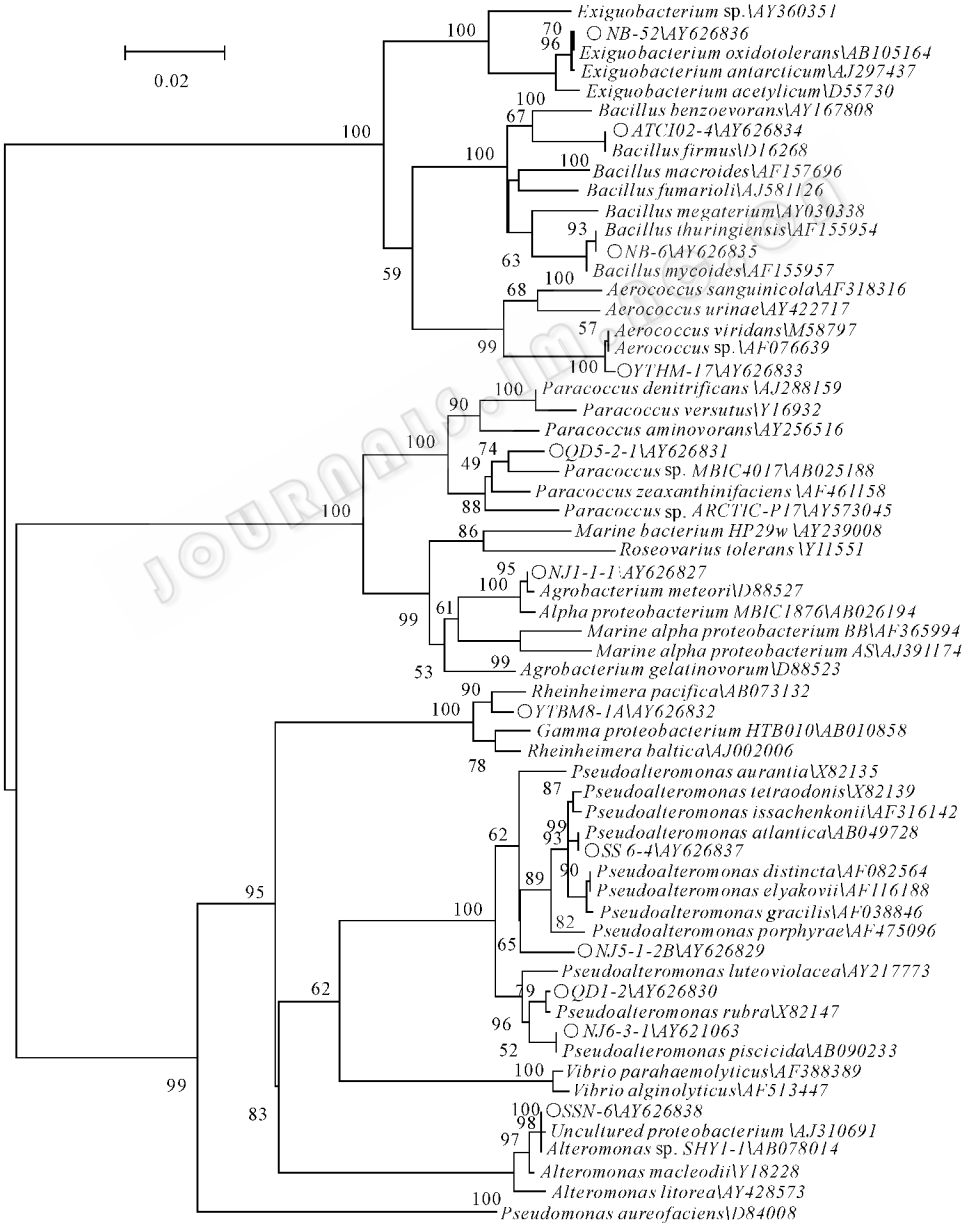


图 3 基于 16S rRNA 序列的分泌生物活性海洋细菌的系统发生学分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of marine bacteria with bioactivities based on 16S rRNA sequences. Phylogenetic trees were constructed by the Bootstrapping and Neighbor-joining rule. Numbers indicate bootstrap confidence values as the percentage of 100 bootstrap replications and less than 40% are not shown. Sequences in this experiment are preceded by open circles.

这次研究中所涉及到的核苷酸序列(16S rRNA、KS 结构域和 A 结构域)已提交 NCBI/GenBank, 并获得序列提交号, 分别为: AY621063、AY626827、AY626829 ~ AY626838、DQ666948 ~ DQ666952、DQ873696。

3 讨论

Armstrong 等^[20]认为, 海洋生物中的附生微生物与宿主之间有着紧密的联系。它们一方面可以从其动植物宿主中获得必需的各种维生素、多糖、不饱和脂肪酸等营养, 另一方面可以产生某些物质(如抗生素、毒素等)释放于水体中, 以利于宿主生长代谢或增强宿主的抵抗能力。另外, 在相关的报道中也发现某些宿主可以通过生产某种化学物质来调节其体内的附生微生物以适应其周围的环境变化^[21-22]。相反, 附生微生物也可以通过抑制宿主的细胞生长或者直接攻击宿主, 而影响或控制宿主的生长和发育^[23]。本实验中, 来源于无脊椎动物和海藻的附生微生物细菌的活性菌株的百分比高于来源于海水和沉积物。这说明了一些防御能力较差的动、植物能在海洋环境中生存, 除了自身具有的生存机制外, 其附生微生物也扮演了一定的保护性角色。

Scotti 等^[25]从 *Bacillus subtilis* 的基因组中发现了一个编码 PKS 的开放阅读框(OPF)。Chen 等^[26]也从 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 中筛选到 3 个 PKS 的相关基因簇。Michelle 等^[27]对 *Pseudoalteromonas tunicata* 进行了 PKS 的筛选, 但 PCR 结果为阴性。对于 *Aerococcus* sp. 的 PKS 和 NRPS 筛选未见相关报道。本次实验, 我们成功地从 *Pseudoalteromonas* sp. 中筛选到两株含有 PKS 的 KS 结构域和 NRPS 的 A 结构域的细菌, 从 *Bacillus* sp. 中成功筛选到含有 NRPS 中 A 结构域的细菌 NB-6, 并且首次从 *Aerococcus* sp. 中成功筛选到含有 NRPS 中 A 结构域的细菌。PKS 和 NRPS 可以合成包括抗生素、毒素在内的许多具有生物活性的天然产物。对分离到的具有抗菌、细胞毒活性的微生物进行进一步的 PKS 和 NRPS 筛选, 或许可以从分子生物学的角度来分析、阐述和推测其具有生物活性的天然产物的结构类型和合成机理。

本实验从山东青岛、烟台以及浙江南麂、宁波、嵊山潮间带水域的海水、海泥以及 11 种海洋生物中共分离到 346 株海洋细菌, 经过抗菌和细胞毒活性筛选, 结果显示其中 42 株细菌具有抗菌活性, 12 株具有细胞毒活性。对 12 株具有细胞毒活性的细菌

菌株进行 16S rRNA 系统发生学分析, 它们分别属于 *Agrobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Paracoccus*, *Rheinheimera*, *Aerococcus*, *Exiguobacterium* 和 *Alteromonas* 8 个属。对这 12 株具有细胞毒活性的细菌菌株进行进一步的 PKS I 型和 NRPS 筛选, 我们得到了 4 株含有 PKS I 型的 KS 结构域或者 NRPS 的 A 结构域的海洋细菌, 为从聚酮和非核糖体肽等生物合成途径去深入研究其次生代谢产物提供了基因学的证据。

参 考 文 献

- [1] Carte BK. Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience*, 1996, **46**: 271–286.
- [2] Rinehart KL. Antitumor compounds from tunicates. *Med Res Rev*, 2000, **20**: 1–27.
- [3] Schwartzmann G, Rocha AB, Berlinck RGS. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol*, 2001, **2**: 221–225.
- [4] Luesch H, Moore RE, Paul VJ. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplotatin 1. *J Nat Prod*, 2001, **64**: 907–910.
- [5] Schupp P, Eder C, Proksch P. Staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toaleans* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp. *J Nat Prod*, 1999, **62**: 959–962.
- [6] Unson MD, Faulkner DJ. Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia*, 1993, **49**: 349–353.
- [7] Isnansetyo A, Kamei Y. MC21 – A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30T, against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents*, 2003, **47**: 480–488.
- [8] Kelecom A. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Ann Braz Acad Sci*, 2002, **74**: 151–170.
- [9] Burgess JG, Jordan EM, Bregu M. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J Biotechnol*, 1999, **70**: 27–32.
- [10] Holmstrom C, Kjelleberg S. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, **30**: 285–293.
- [11] Moffitt MC, Neilan BA. The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. *FEMS Microbiol Letters*, 2000, **191**(2): 159–167.
- [12] 徐平, 李文均, 高慧英, 等. 聚酮类化合物生物合成途径基因阳性菌株生物多样性研究. *微生物学报*, 2005, **45**(6): 821–827.
- [13] 徐平, 李文均, 张永光, 等. 产生大环聚酮类天然产物放线菌的分子筛选研究. *中国抗生素杂志*, 2003, **28**(6): 321–325.
- [14] Katz L, McDaniel R. Novel macrolides through genetic engineering.

- [15] Cane DE , Walsh CT , Khosla C. Harnessing the biosynthetic code : combinations , permutations , and mutations. *Science* , 1998 , **282** (5386) : 63 – 68 .
- [16] Torres RT , Berlinck RG , Nascimento GG. Antibacterial activity against resistant bacterial and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from marine sponge *Arenosclera brasiliensis* . *Toxicon* , 2002 , **40** : 885 – 891 .
- [17] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* , 1983 , **65** : 55 – 63 .
- [18] Neilan BA , Dittmann E , Rouhiainen L , *et al.* Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J Bacteriol* , 1999 , **181** : 4089 – 4097 .
- [19] Valinsky L , Vedova GD , Scupham AJ , *et al.* Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. *Appl Environ Microb* , 2002 , **68** : 3243 – 3250 .
- [20] Armstrong E , Yan L , Boyd KG. The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* , 2001 , **461** (1/3) : 37 – 40 .
- [21] Trick CG , Andersen RJ , Harrison PJ. Environmental factors influencing the production of an antibacterial metabolite from a marine dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Can J Fish Aquat Sci* , 1984 , **41** : 423 – 432 .
- [22] Kawano I , Oda T , Ishimatsu A. Inhibitory effect of the iron chelator desferrioxamine (Desferal) on the generation of activated oxygen species by *Chattonella marina* . *Mar Biol* , 1996 , **126** : 765 – 771 .
- [23] Imai I , Ishida Y , Hata Y. Killing of marine phytoplankton by a bacterium *Cytophaga* sp. , isolated from the coastal Sea of Japan. *Mar Biol* , 1993 , **116** : 527 – 532 .
- [24] Michelle CM , Brett AN. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthase reflect complex pathway associations. *J Mol Evol* , 2003 , **56** : 446 – 457 .
- [25] Scotti C , Piatti M , Cuzzoni A , *et al.* A *Bacillus subtilis* large ORF coding for a polypeptide highly similar to polyketide synthases. *Gene* , 1993 , **130** (1) : 65 – 71 .
- [26] Chen XH , Vater J , Piel J , *et al.* Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloquelificans* FZB 42. *J Bacteriol* , 2006 , **188** (11) : 4024 – 4036 .
- [27] Michelle CM , Brett AN. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J Mol Evol* , 2003 , **56** : 446 – 457 .

Screening and characterization of marine bacteria with antibacterial and cytotoxic activities , and existence of PKS I and NRPS genes in bioactive strains

ZHU Peng¹ , ZHENG Li² , LI Jing² , SHAO Jian-zhong¹ , YAN Xiao-jun^{2*}

(¹ College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310058 , China)

(² Key Lab of Marine Technology , Ningbo University , Ningbo 315211 , China)

Abstract : Antibacterial and cytotoxic activities were screened for marine bacteria which have been isolated from organism , sediments and seawater in China coastal area. The results showed that 42 isolates had antimicrobial activity and 12 isolates had cytotoxicity. Molecular phylogenetic analysis of marine bacteria with cytotoxicity based on 16S rRNA sequences indicated that they were belong to the genera *Aerococcus* , *Agrobacterium* , *Alteromona* , *Bacillus* , *Exiguobacterium* , *Paracoccus* , *Pseudoalteromons* , *Rheinheimera* . Furthermore , marine bacteria with cytotoxicity were also screened for PKS I and NRPS genes which could be responsible for bioactive secondary metabolites biosynthesis , 4 strains having KS domain or A domain were obtained , which provide strong evidence that marine bioactive bacteria can produce natural products through PKS and NRPS pathways.

Keywords : marine bacteria ; antibacterial ; cytotoxicity ; 16S rRNA ; PKS ; NRPS