

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (12) :1429 – 1437; 4 December 2014
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.12.005

土壤样品中粘细菌的分离鉴定及其生物活性检测

肖蓉¹, 文也¹, 唐少军¹, 赵新民², 丁学知¹, 胡胜标¹, 夏立秋¹, 孙运军^{1*}

¹湖南师范大学生命科学学院, 微生物分子生物学国家重点实验室培育基地, 湖南 长沙 410081

²湖南城市学院化学与环境工程系, 湖南 益阳 413000

摘要: 【目的】从土壤样品中分离粘细菌, 对其进行纯化、归类与鉴定, 以丰富粘细菌菌种资源; 对纯化得到的粘细菌进行抑菌、杀虫及抗肿瘤生物活性的分析, 为粘细菌次级代谢产物的开发奠定基础。【方法】采用灭活大肠杆菌和滤纸片诱导子实体法从土样中分离粘细菌, 结合形态观察、生理生化特征和 16S rDNA 基因序列同源性分析, 对分离到的各菌株进行鉴定并归类。通过平板扩散法、昆虫口服毒性测试、肿瘤细胞毒性实验等方法, 检测粘细菌代谢产物生物活性。【结果】共分离得到 35 株粘细菌, 初步分类为: 粘球菌属 (*Myxococcus*) 9 株; 珊瑚球菌属 (*Corallocooccus*) 9 株; 侏囊菌属 (*Nannocystis*) 11 株; 堆囊菌属 (*Sorangium*) 6 株。从其中纯化得到 8 株粘细菌, 对其进行了鉴定并命名。发现了具有高效且广谱的肿瘤细胞毒性效应菌株 S22, S51 和 S55 也具同样的细胞毒性; 另外, 还发现具有肿瘤细胞毒性的菌株 S20 和 S22 对枯草芽胞杆菌和白色念珠菌也具有较好的抑菌活性。【结论】土壤中存在丰富的粘细菌资源, 发现了具有肿瘤细胞毒性的弱小珊瑚球菌与具有抑菌和强抗肿瘤活性的大孢珊瑚球菌, 粘细菌是活性天然产物与新药开发的重要资源。**关键词:** 粘细菌, 分离鉴定, 生物活性

中图分类号: Q939 文章编号: 0001-6209(2014)12-1429-09

粘细菌是 δ 变形菌纲下的一类单细胞革兰阴性细菌, 广泛分布于富含腐殖质的土壤表层、腐败的树木枯枝落叶、食草类动物的粪便等环境中^[1]。此外, 海洋、盐碱地等含氧量低、渗透压高的特殊环境中也发现了粘细菌的存在^[2-5]。在营养贫瘠的条件下, 粘细菌能形成肉眼可见、颜色鲜艳、形态各异的子实体。粘细菌子实体含有大量休眠状态的粘孢子, 对紫外线、干旱、高温等环境具有极强抗性, 当条件适宜时, 可萌发成营养细胞^[6]。

粘细菌是继放线菌、芽孢杆菌之后的第三大类次级代谢产物产生菌^[5,7]。目前, 已经从粘细菌中发现了 100 多种次级代谢产物的基本结构单元与 600 种结构衍生物^[8]。关于粘细菌的分离与活性物质的研究, 国内外已有大量的报道, 但由于粘细菌活性产物结构各异、种类多样、活性高效, 对该菌种资源的挖掘和利用越来越受到重视^[9-20]。最近, 德国 Rolf Müller 等从粘细菌新属 *Aetherobacter* 中发现了新物质 atheramides, 此为一类聚酮类环肽化合物,

基金项目: 国家“973 项目”(2011CB111680); 国家“863 计划”(2011AA10A203); 湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心项目(20134486)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-731-88872298; E-mail: sunyj@hunnu.edu.cn

作者简介: 肖蓉(1988-), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事粘细菌菌种资源开发及粘细菌抗肿瘤方面的研究。E-mail: xiaorongamian@sina.com

收稿日期: 2014-08-13; 修回日期: 2014-09-18

对人类结肠癌细胞 HCT-416 的 IC_{50} 为 $0.11 \mu\text{mol/L}$ [20]。国内不少学者从多个地区也分离获得了具有抗肿瘤与抑制细菌活性的粘细菌,如徐晓坤等从土壤中分离得到了兼具有抑制多种细菌、真菌与多种肿瘤细胞的褐色粘球菌 *M. fulvus* X21 [21];陶龙鑫等从内蒙古贺兰山土壤中获得一株对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、马铃薯晚疫病菌和核盘菌有抑制作用的黄色粘球菌 *M. xanthus* H-1 [22]。

粘细菌是一类重要的资源微生物,但我国对粘细菌的研究起步较晚,粘细菌菌种资源缺乏,加快我国粘细菌菌种资源的开发及其次级代谢产物的研究具有重要意义。本研究采用灭活大肠杆菌和滤纸片诱导子实体的方法 [6],从广东、山东、及江西、湖南、湖北、山西等省份采集了 32 份土样,从中分离粘细菌并鉴定归类。对形态特征不同的 8 株粘细菌分离株,进行了抑菌、抗肿瘤及杀虫生物活性的研究,发现具肿瘤细胞毒性的弱小珊瑚球菌与具抑菌和强抗肿瘤活性的大孢珊瑚球菌,这对丰富粘细菌菌种资源的同时,也为粘细菌次级代谢产物的研究和开发奠定了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样:通过多点取样法,从广东、山东、江西、湖南、湖北和山西 6 省份采集土样,供分离粘细菌。所采土样为农田土、菜地土和公路旁绿化带表层土壤。

1.1.2 供试菌株:大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*),均由本实验室保藏。

1.1.3 供试细胞株:小鼠黑色素瘤细胞 B16 (murine melanoma B16 cells)、小鼠乳腺癌细胞 4T1 (murine breast cancer cells)、人宫颈癌细胞 HeLa (human cervical carcinoma cells)、人类结肠癌细胞 HCT-416 (human colon cancer cells)、人脐静脉上皮细胞 HUVEC (human umbilical vein epithelial cells) 均由本实验室保藏。

1.1.4 供试昆虫:棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 幼

龄期幼虫与甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼龄期幼虫,均由本实验室饲养孵化。

1.1.5 培养基:WAX 固体培养基, CNST 固体培养基, MD1 液体培养基, LB 液体培养基 [23]。

1.2 粘细菌的分离

粘细菌的分离采用子实体诱导方法。

1.2.1 土样的预处理:称量研钵磨细的 3.5 g 土样,加入 2 mL 已配制好并过滤除菌的抗生素混合液, 55°C 水浴 10 min 后,放置 6 h,在分离前再 55°C 水浴 10 min [23]。

1.2.2 灭活大肠杆菌诱导法:将高温灭菌的大肠杆菌液滴加在含放线菌酮 (终浓度为 $25 \mu\text{g/mL}$) 的 WAX 平板上,将处理后的土样滴加在灭活大肠杆菌旁,在 30°C 恒温培养至第 3-5 天后,开始进行持续观察。

1.2.3 滤纸片诱导法:将处理后的土样滴加在 CNST 平板上的灭菌滤纸旁, 30°C 恒温培养,一周后持续观察子实体的形成情况。

1.2.4 粘细菌的纯化:在体视显微镜下,用无菌注射器针头挑取粘细菌子实体头部转接于新鲜 WAX 平板,待长出透明菌膜时,挑取透明菌膜外缘转至新鲜 WAX 平板上, 30°C 培养。

1.2.5 粘细菌的纯培养检验及菌种保藏:挑取子实体接入 MD1 液体培养基,摇瓶 30°C 培养 3 天后,观察菌株生长状态。培养基液体不浑浊,摇瓶中菌呈有团块状、囊片状或紧贴摇瓶壁生长,则该菌株已纯化。制备 25% 的甘油,将纯化好的菌液转入 25% 甘油,放置 -80°C 保藏。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态观察:将各分离菌株分别接种到 WAX 和 CNST 平板上,用体视镜观察子实体形态。将各菌株接种到 MD1 液体培养基中, 30°C 培养 5 天,取菌体进行革兰染色,并观察细胞形态。

1.3.2 生理生化特征观察:参照文献 [1] 方法进行。

1.3.3 16S rDNA 基因扩增、测序与系统发育树的构建:参照文献 [24] 方法。

1.4 生物活性测定

1.4.1 抑菌谱:采用琼脂平板扩散法,取 $10 \mu\text{L}$ 培养 7 天的粘细菌发酵上清液,进行抑菌实验。

1.4.2 体外抗肿瘤细胞活性:实验组加入 $10 \mu\text{L}$ 培养 7 天的粘细菌发酵上清液,对照组加入等量无菌 MD1 液体培养基,作用 24 h 后,观察肿瘤细胞的形

态变化。用北京索莱宝科技有限公司 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测肿瘤细胞的增殖抑制率。

1.4.3 杀虫活性: 采用口服毒性试验检测粘细菌发酵上清液对棉铃虫幼虫与甜菜夜蛾幼虫的毒性作用。在 24 孔板内加入饲料 (每 10 mL 饲料加入 1 mL 分离菌株发酵上清液), 每孔饲喂一条幼虫, 分别在 24、48、72 h 后计量幼虫死亡率。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离纯化与鉴定

利用子实体诱导法筛选得到粘细菌, 通过挑取子实体和菌膜进行纯化, 根据形态观察结果进行初步分类: 粘球菌属 (*Myxococcus*) 9 株; 珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 9 株; 侏囊菌属 (*Nannocystis*) 11 株; 堆囊菌属 (*Sorangium*) 6 株。从山东省 3 份土样中分离得到粘细菌 8 株, 珊瑚球菌属 5 株, 粘球菌属 3 株; 从广东省 2 份土样中得到粘细菌 7 株, 珊瑚球菌属 2 株, 粘球菌属 3 株, 侏囊菌属 1 株, 堆囊菌属 1 株; 从湖南省 23 份土样中获得 15 株, 其中珊瑚球菌属 1 株, 珊瑚球菌属 2 株, 侏囊菌属 7 株, 堆囊菌属 5 株; 从湖北省 2 份土样中得到 1 株珊瑚球菌和 1 株粘球菌; 从山西省 1 份土样中得到 2 株侏囊菌; 从江

西省 1 份土样中得到 1 株侏囊菌。其中, 从山东省分离的珊瑚球菌属菌株占珊瑚球菌属总分离株数的 55.56%。经不断纯化, 得到 S8、S20、S22、S34、S47、S51、S55、S68 共 8 株形态特征不同的粘细菌, 对这 8 株粘细菌进行了后续的形态观察、生理生化特征检测与 16S rDNA 分子鉴定。

2.1.1 粘细菌的形态特征: 8 株粘细菌革兰染色均为阴性, 营养细胞杆状, 在平板上具有特征性的波纹、涟漪、脊状运动, 菌落扩展, 在加有灭活大肠杆菌的 WAX 板上都能形成肉眼可见的子实体。在液体 MD1 培养基中培养, 呈团块、囊块、颗粒状、薄膜或贴壁生长, 培养液呈鲜艳亮丽的黄、粉红、大红等颜色。S8 营养细胞短粗杆状, 末端钝圆, 可逐步变粒状或类球形, 在加有灭活大肠杆菌的 WAX 板上子实体橙红色, 能蚀刻琼脂, 还可侵噬活菌 (图 1-A), 液体 MD1 培养为红色, 呈球形颗粒状。S20 营养细胞细长杆状, 末端尖, 在 WAX 板上形成扩展粘稠的脊状菌落, 子实体肉粉色 (图 1-B); 液体 MD1 培养为灰白色, 呈白色团块或薄片状。S22 营养细胞长杆状, 末端锥形, 子实体球形或椭球形, 粉红色 (图 1-C); 液体 MD1 培养亮粉红色, 囊块或薄膜贴壁生长。S34 营养细胞杆状, 末端圆, 子实体球形或椭球形, 褐红色 (图 1-D); 液体 MD1 培养淡黄色, 球形囊块。S47 营养细胞杆状, 末端平, 菌落涟漪状 (图 1-

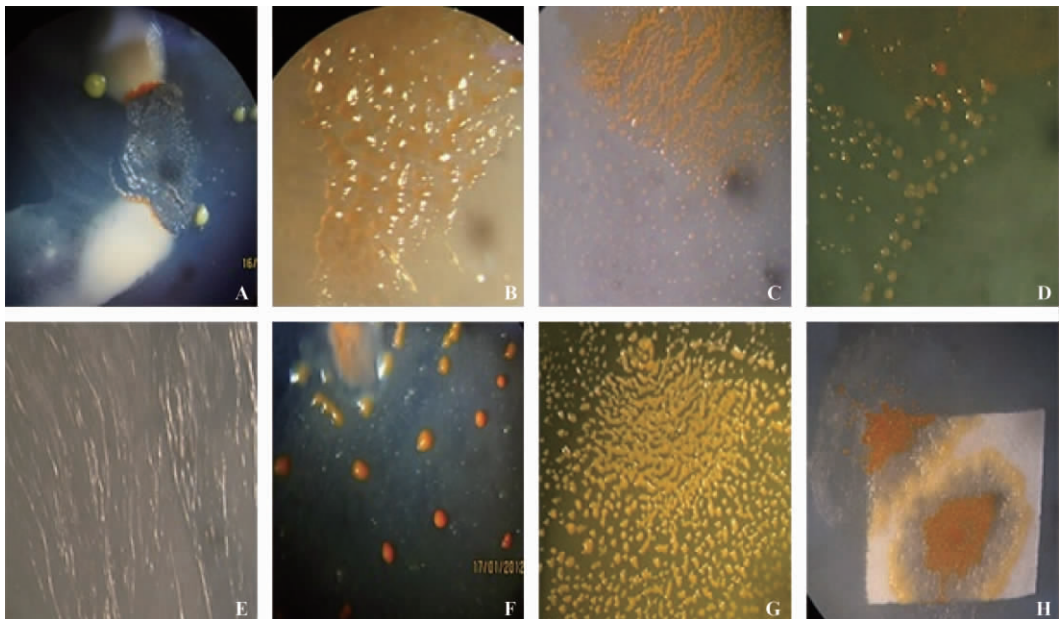


图 1. 粘细菌子实体及菌落在 WAX 平板和 CNST 平板上的形态图

Figure 1. The morphology of different myxobacteria strains on the WAX plate or CNST plate. A: S8, B: S20, C: S22, D: S34, E: S47, F: S51, G: S55, H: S68.

E); 液体 MD1 培养白色, 较大球团状。S51 营养细胞长杆状, 末端钝圆, 菌落辐射分布, 子实体球形橙黄色 (图 1-F); 液体 MD1 培养橙黄色, 囊块状。S55 营养细胞长细杆状, 末端尖, 菌落粘稠辐射状, 子实体亮黄色球形或椭圆形 (图 1-G); 液体 MD1 培养亮黄色, 贴瓶壁或底生长, 囊片或椭圆形。S68 营养细胞粗杆状, 末端平, 菌落辐射状, 子实体鲜艳橙黄色, 球形或椭球形, 可糊化并降解滤纸, 也可侵噬大肠杆菌 (图 1-H); 液体 MD1 培养鲜亮橙黄色囊片状、球形或椭圆形团块状。

表 1. 粘细菌的生理生化特征

Table 1. The biophysiological and biochemical characteristic of the myxobacteria strains

characteristics	S8	S20	S22	S34	S47	S51	S55	S68
nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+
methyl red test	+	+	+	+	+	+	+	+
urase test	+	+	+	+	+	+	+	+
growth on tween 80	-	+	+	+	-	+	+	+
hydrolysis of starch	-	+	+	+	+	+	+	+
hydrolysis of sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+
hydrolysis of casein	+	+	+	+	+	+	+	-
hydrolysis of gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+
hydrolysis of cellulose	-	-	-	-	-	-	-	+
catalase activity	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : positive reaction; - : negative reaction.

2.1.3 系统发育树的构建: 分离菌株 S8、S20、S22、S34、S47、S51、S55、S68 的 16S rDNA 序列在 GenBank 中经 BLAST 分析, 分别与 *N. pusilla* strain Na p29、*C. exiguus* strain Cc e167、*C. macrospores* STXZ 54、*M. sp.* SDU-118、*Phaselicystis flava* strain SBKo001、*M. fulvus* strain NBRC100070、*M. xanthus* DK 1622、*S. cellulosum* strain KYC3080 具最高相似性, 相似性分别为 99%、99%、100%、99%、92%、99%、99%、99%。根据这些数据, 利用 MEGA4.1 的 Kimura-2-Parameter 模型, 运用邻接法 (NJ) 构建系统发育树如图 2 所示。根据以上比对结果, 结合构建的系统进化树 (图 2), 将这 8 株菌分别鉴定并命名为 S8 (*Nannocystis pusilla* S8), S20 (*Corallocooccus exiguus* S20), S22 (*Corallocooccus macrosporus* S22), S34 (*Myxococcus sp.* S34), S47 (*Phaselicystis flava* S47), S51 (*Myxococcus fulvus* S51), S55 (*Myxococcus xanthus* S55), S68 (*Sorangium cellulosum* S68)。

2.2 生物活性检测

2.2.1 抑制细菌生长活性: 结果显示, 菌株 S22 (*C.*

2.1.2 粘细菌生理生化特征: 依照文献 [1] 进行实验, 这 8 株粘细菌均可利用无机硝酸盐, 吸附刚果红, 具脂酶、过氧化氢酶活性, 能水解明胶。粘球菌属和小囊菌属都不能降解纤维素, 但粘球菌属能水解淀粉, 利用蔗糖, 降解吐温 - 80; 侵蚀小囊菌不水解淀粉和纤维素, 不能降解吐温 - 80。堆囊菌属能降解纤维素, 水解淀粉, 利用蔗糖, 降解吐温 - 80, 但不具脂酶活性 (表 1), 生理生化特征与文献 [1] 中各属粘细菌的特征相符。

macrosporus) 具有抑制枯草芽胞杆菌和白色念珠菌生长的作用, 第 4 天的发酵液上清出现微弱的抑菌圈; 发酵培养 8 天时, 出现了较大抑菌圈, 环半径分别为 2.3 mm 和 2.0 mm; 继续培养到第 10 天和第 12 天, 抑菌效果减弱 (图 3)。

2.2.2 体外抗肿瘤细胞活性: 在肿瘤细胞培养液中加入各菌株不同时期的发酵培养液上清, 作用 24 h 后, 观察肿瘤细胞形态变化。经发酵上清液作用后, 与对照相比, 实验组肿瘤细胞增殖受到了抑制, 细胞数目减少, 大部分细胞皱缩变成球形, 但没有发生裂解, 如 S22、S51 和 S55 作用的 B16 细胞形态 (图 4-D, G, H) 及 S22、S34、S51、S55 作用的 HeLa 细胞形态 (图 4-M, N, P, Q)。S22 发酵液上清作用这两种肿瘤细胞 6 h 后, 细胞就开始变成球形, 结团死亡。MTT 实验数据显示, S22 和 S55 对 4 种肿瘤细胞和正常细胞的抑制率均可高达 85% - 93%, S51 的抑制率也可达 70% 以上, S34 与 S20 分别可达 60% 和 40%, 而相比 S8、S47、S63 这 3 株菌的肿瘤细胞毒性较微弱, 抑制率在 10% - 30% 之间 (图 5)。

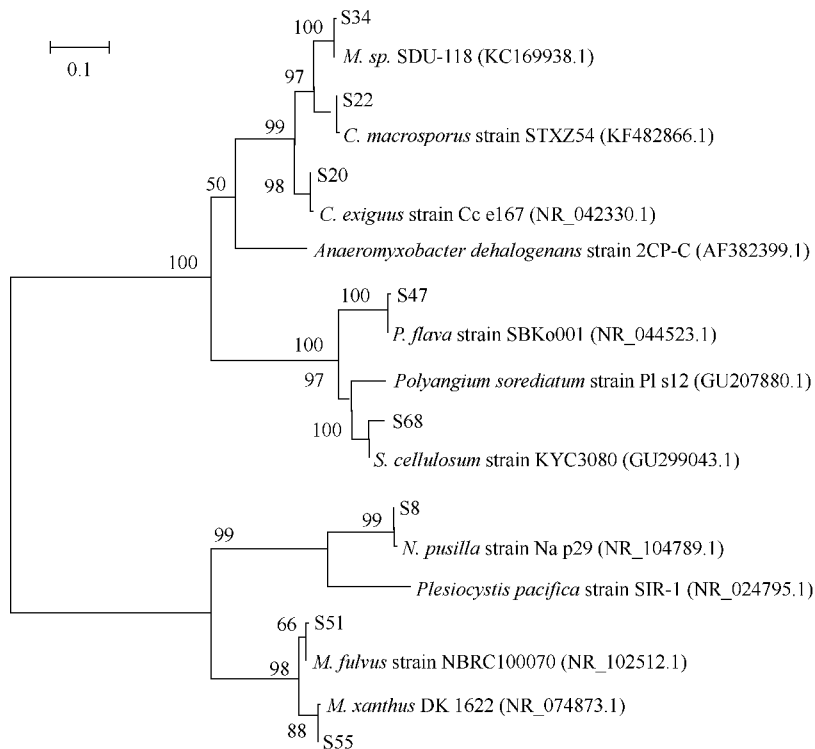


图 2. 根据 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2. The phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method.

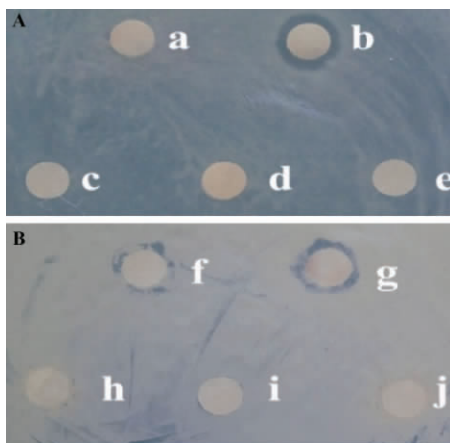


图 3. 不同时期粘细菌 S22 发酵上清对枯草芽孢杆菌 (A) 和白色念珠菌 (B) 的生长抑制效果

Figure 3. The inhibition effects of culture supernatant from strain S22 at different times to *B. subtilis* (A) and *C. albicans* (B). a, f: 4d; b, g: 8d; c, h: 10d; d, i: 12d; e, j: MD1 culture medium.

2.2.3 杀虫活性: 各菌株发酵上清液对棉铃虫幼虫和甜菜夜蛾幼虫的口服毒性较弱, 菌株 S51 对甜菜夜蛾幼虫的杀虫活性达 32.5%, 而其他菌株发酵上清液对棉铃虫幼虫和甜菜夜蛾幼虫的毒力较低 (图 6)。

3 讨论

从 6 省的采集土样中均分离获得了粘细菌, 这说明粘细菌的生态分布具有广泛多样性。分离菌株的结果显示, 珊瑚球菌属与粘球菌属菌株更多地分布于有机质含量高的山东土样和广东土样中。本工作中采自山东省和广东省的土样均为菜园土黑土, 该类型土一般有机质含量较高。而湖南省采集的土样大多为黄土, 有机质含量相对较低, 粘细菌出菌率低, 表明粘细菌种类的分布与土样中有机质含量有较大关系, 这与李曙光等报道的粘细菌在富含有机质的黑土或农田土土壤样品中数量较多, 而在黄土或沙土中的数目较少^[24] 结论相似。此外, 粘细菌的种类分布也可能与采集土样时不同省份的气候气温有关。本工作采集土样的时间为冬末春初, 此时湖南气温在零摄氏度左右, 气候干冷, 因而分离到较多的耐寒侏囊菌和堆囊菌; 而广东气温仍维持在十几摄氏度, 气候温和, 分离得到了更多种类的粘细菌, 4 个属的菌株在广东省均分离得到了, 这与 Dawid 报道的粘细菌更倾向于分布在低纬度, 温度稍高, 气候

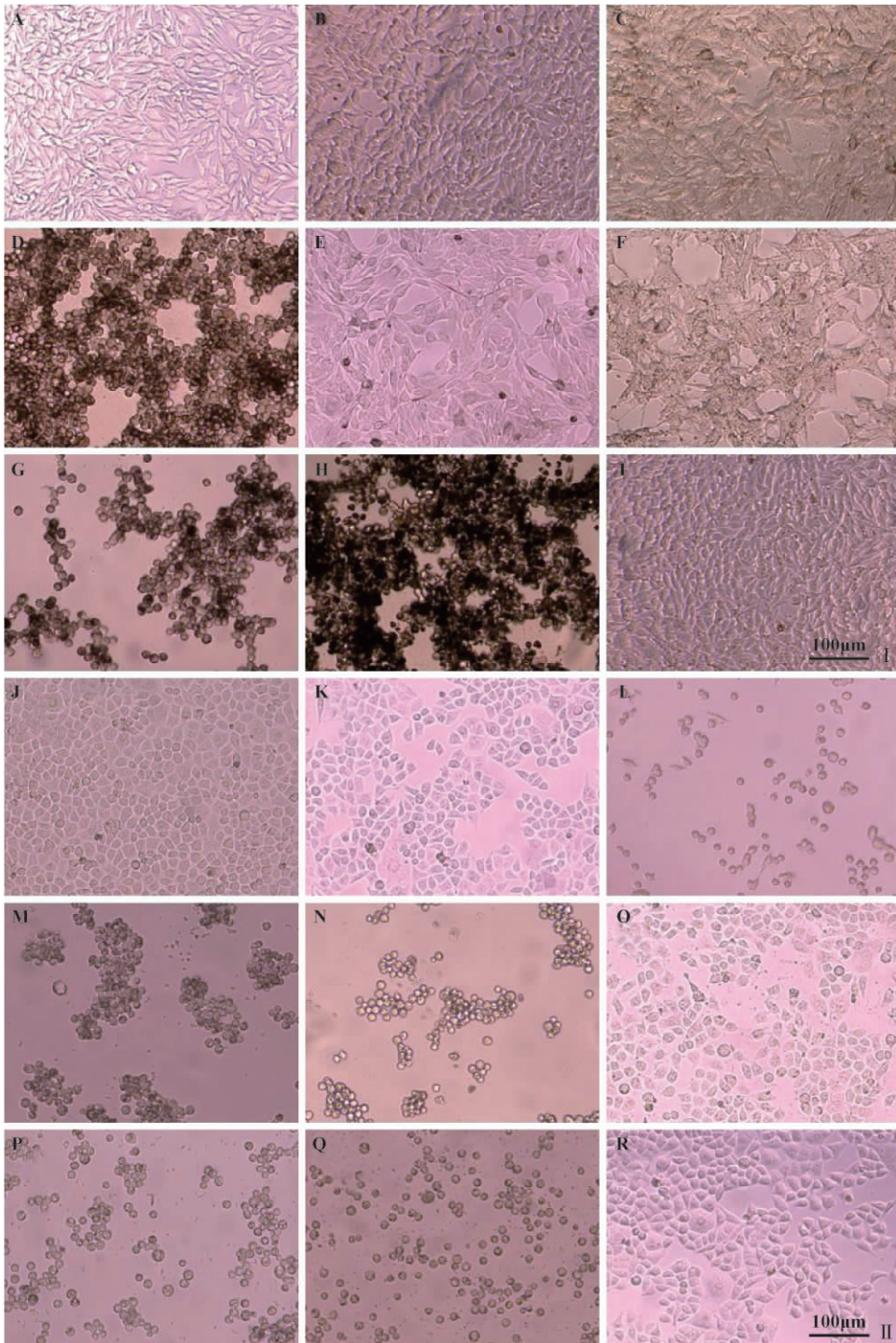


图 4. 粘细菌发酵上清液对小鼠黑色素瘤细胞 B16 (I) 和人宫颈癌细胞 HeLa (II) 的毒性效应

Figure 4. The cytotoxicity ration of culture supernatant from different strains toward cancer cells B16 and HeLa. A, J: MD1 culture medium; B, K: S8; C, L: S20; D, M: S22; E, N: S34; F, O: S47; G, P: S51; H, Q: S55; I, R: S68. The scale bar, 100 µm.

温和的地区^[5]相符。

粘细菌生物活性检测试验结果表明,粘细菌是活性天然产物与新药开发的重要资源。抑菌实验显

示,菌株 S22 (*C. macrosporus*) 对枯草芽胞杆菌和白色念珠菌的生长有较好的抑制作用,表明其发酵培养 8 天时可以产生具有抑制这 2 种菌生长的活性代

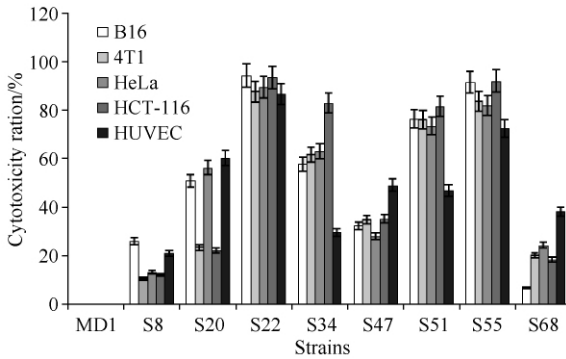


图 5. 各分离菌株发酵上清液对不同肿瘤细胞的抑制率

Figure 5. The cytotoxicity ration of culture supernatant from different strains toward selected tumor cells. Strains: S8, S20, S22, S34, S47, S51, S55, S68. Tumor cells: B16, 4T1, HeLa, HCT-116. All kinds of cells were cultivated in the 96 well plates without (control) or with samples.

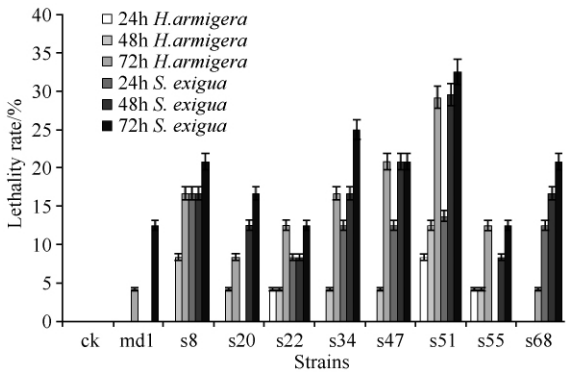


图 6. 各粘细菌发酵上清液对棉铃虫幼虫和甜菜夜蛾幼虫的 24h、48 h、72h 致死率

Figure 6. The lethality rate of culture supernatant of myxobacteria to the larvae of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* at different times (24, 48, 72h).

谢产物, 具有抑菌抗生素开发的潜能。本工作发现弱小珊瑚球菌 *C. exiguus* S20 次级代谢产物具较强肿瘤细胞毒性, 大孢珊瑚球菌 *C. macrosporus* S22 的次级代谢产物兼有抑菌与强抗肿瘤活性。近年来从粘细菌中分离得到越来越多的抗肿瘤活性物质, 徐晓坤等从 *M. fulvus* X21 中提取的甲醇粗提物对 K562 肿瘤细胞具有高毒力, IC_{50} 为 $11 \mu\text{g} / \text{mL}$, 对 HeLa 细胞系的 IC_{50} 为 $52 \mu\text{g} / \text{mL}$ ^[21]; 从 *M. xanthus* 中发现的大环类化合物 3-O-methyl-myxochelin A 具强烈抑制 26-L5 鼠移植性结肠癌细胞活性^[25]。体外肿瘤细胞毒性实验结果显示, 本工作得到的粘球菌属 *M. fulvus* S51 和 *M. xanthus* S55 对各种肿瘤细胞的抑制率均分别达 80%、85% 以上, 提示这两株菌的活性产物具有开发为广谱抗肿瘤药物的潜在可能

性。杀虫生测实验结果显示, 菌株 S51 在生物防治方面具潜在的研究和应用价值, 这突破了粘细菌次级代谢产物新的研究方向。

粘细菌 S22 菌株发酵上清液的抑菌活性随发酵时间的延长而发生变化, 发现抑菌活性物质在第 4 天或之前已经开始产生, 到第 8 天时产量积累达最多, 再继续培养时抑菌活性降低, 认为到发酵后期该活性产物可能被菌体本身的相关酶所降解, 这种现象暂无相关文献报道, 有待进一步研究。Ramar Perumal Samy 等报道从百花牛角瓜 (*Calotropis procera*) 根皮中分离的蛋白 CP-P 通过抑制核因子 κB (NF- κB) 途径诱导乳腺癌细胞凋亡时, 乳腺癌细胞发生了细胞皱缩、核质固缩等形态变化^[26]。本工作中 S22 和 S55 发酵上清液作用后肿瘤细胞与该报道中描述的形态变化类似, 表明 S22 和 S55 次级代谢产物也可能是通过 NF- κB 途径来抑制肿瘤细胞的增殖, 导致肿瘤细胞凋亡。而本研究中大部分粘细菌活性物质在杀伤肿瘤细胞的同时, 也显示了对正常细胞有毒力影响, 这一问题目前已经成为大多高活性粘细菌天然产物开发为抗癌药物的一个障碍, 如干扰细胞骨架合成的化合物 Disorazol^[27], 需要在抗肿瘤药物开发过程中运用基因工程手段或化学合成修饰方法进行相应改造, 降低抑制正常细胞增殖的毒副作用。本实验中纯化出的一部分粘细菌不具有杀虫活性, 这可能与其生活环境及生活习性相关, 粘细菌主要是以枯枝、落叶、腐木、动物粪便等腐生质以及土壤中的细菌为营养来源, 暂时未发现与昆虫有生物链或共生的相关性。

参考文献

- [1] Brenner D, Krieg N, Staley J. The proteobacteria (Part C): the alpha-, beta-, delta-, and epsilon proteobacteria. Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2005: 1059-1144.
- [2] Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Hiraiishi A, Ahn JW, Yamanaka S. *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the pacific coasts of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53:189-195.
- [3] Zhang YQ, Li YZ, Wang B, Wu ZH, Zhang CY, Gong X, Qiu ZJ, Zhang Y. Characteristics and living patterns of marine myxobacterial isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 6(71): 3331-3336.

- [4] Thomas SH, Elizabeth PC, Phillip MJ, Sanford RA, Frank EL. Diversity and distribution of *Anaeromyxobacter* strains in a uranium-contaminated subsurface environment with a nonuniform groundwater flow. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (11) :3679-3687.
- [5] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 2000, 24 (4) : 403-427.
- [6] Shimkets LJ, Reichenbach H, Dworkin M. The myxobacteria. *The Prokaryotes*, 2006, 7: 31-115.
- [7] Herrmann J, Elnakady Ya, Wiedmann Rm, Ullrich A, Rohde M, Kazmaier U, Vollmar Am, Müller R. Pretubulysin: from hypothetical biosynthetic intermediate to potential lead in tumor therapy. *PLoS One*, 2012, 7 (5) : e37416.
- [8] Chai Y, Pistorius D, Ullrich A, Weissman KJ, Kazmaier U, Müller R. Discovery of 23 natural tubulysins from *Angiococcus disciformis* An d48 and *Cystobacter* SBCb004. *Chemistry & Biology*, 2010, 17: 296-309.
- [9] Horstmann N, Essig S, Bockelmann S, Wieczorek H, Huss M, Sasse F, Menche D. Archazolid A-15-O- β -D-glucopyranoside and iso-archazolid B: potent V-ATPase inhibitory polyketides from the myxobacteria *Cystobacter violaceus* and *Archangium gephyra*. *Journal of Natural Products*, 2011, 74, 1100-1105.
- [10] Garcia R, Krug D, Müller R. Discovering natural products from myxobacteria with emphasis on rare producer strains in combination with improved analytical methods. *Methods in Enzymology*, 2009, 458:59-91.
- [11] Gerth K, Bedorf N, Höfle G, Irschik H, Reichenbach H. Epothilons A and B : antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria) production, physico-chemical and biological properties. *The Journal of Antibiotics*, 1996, 49 (6) : 49-53.
- [12] Cortina NS, Krug D, Plaza A, Revemann O, Müller R. Myxoprincomide: a natural product from *Myxococcus xanthus* discovered by comprehensive analysis of the secondary metabolome. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51, 811-816.
- [13] Schiefer A, Schmitz A, Schäberle TF, Ppecht S, Lämmer C, Johnston K, Vassilyev DG, König GM, Hoerauf A, Pfarr K. Corallopyronin A specifically targets and depletes essential obligate *wolbachia* endobacteria from filarial nematodes *in vivo*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2012, 206:249-257.
- [14] Irschik H, Jansen R, Höfle G, Gerth K, Reichenbach H. The corallopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from myxobacteria. *The Journal of Antibiotics*, 1985, 38 (2) :145-152.
- [15] Ohlendorf B, Leyers S, Krick A, Kehraus S, Wiese M, König GM. Phenylannolones A-C: biosynthesis of new secondary metabolites from the myxobacterium *Nannocystis exedens*. *ChemBioChem*, 2008, 9, 2997-3003.
- [16] Kunze B, Trowitzsch-Kienast W, Höfle G, Reichenbach H. Nannochelins A, B and C, new iron-chelating compounds from *Nannocystis exedens* (myxobacteria) production, isolation, physico-chemical and biological properties. *The Journal of Antibiotics*, 1992, 45 (2) : 147-150.
- [17] Reichenbach H. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2001, 27 (3) : 149-156.
- [18] Hammer S, Sommer A, Fichtner I, Becker M, Rolff J, Merk J, Klar U, Hoffmann J. Comparative profiling of the novel epothilone, sagopilone, in xenografts derived from primary non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16 (5) : 1452-1465.
- [19] Whitehead RP, McCoy S, Rivkin SE, Gross HM, Conrad ME, Doolittle GC, Wolff RA, Goodwin JW, Dakhil SR, Abbruzzese J. A phase II trial of epothilone B analogue BMS-247550 (NSC # 710428) ixabepilone, in patients with advanced pancreas cancer: a southwest oncology group study. *Investigational New Drugs*, 2006, 24 (6) : 515-520.
- [20] Plaza A, Garcia R, Bifulco G, Martinez JP, Hüttel S, Sasse F, Meyerhans A, Stadler M, Müller R. Aetheramides A and B, potent HIV-inhibitory depsipeptides from a myxobacterium of the new genus 'Aetherobacter'. *Organic Letters*, 2012, 14 (11) :2854-2857.
- [21] Xu XK, Zhao L, Shao MQ, Liu L. Isolation, identification and product activity research of myxobacterial X21. *Journal of Shandong Polytechnic University*, 2012, 26 (3) : 23-26. (in chinese)
许晓坤, 赵林, 邵明倩, 刘新利. 粘细菌 X21 的分离鉴定及产物活性研究. 山东轻工业学院学报, 2012, 26 (3) : 23-26.
- [22] Tao LX, Liu PS, Feng FF, Liu HR. Isolation and identification of a myxobacterium strain H-1 and its antibiotic activity analysis, *Journal of Mongolia Agricultural University*, 2012, 33 (3) : 130-135. (in chinese)
陶龙鑫, 刘沛生, 冯福应, 刘惠荣. 一株粘细菌 H-1 的分离鉴定及抗菌活性分析. 内蒙古农业大学学报, 2012, 33 (3) : 130-135.

- [23] Tang SJ, Xiao R, Wen Y, Liu W, Ding XZ, Xia LQ. Isolation and identification of *Myxobacteria* strain STXZ54 with antitumor activities. *Acta Microbiologia Sinica*, 2014, 54 (5) : 62-72. (in Chinese)
唐少军, 肖蓉, 文也, 秦浩, 刘慰, 丁学知, 夏立秋. 粘细菌 STXZ54 的分离鉴定及其抗肿瘤活性. 微生物学报, 2014, 54 (5) : 62-72.
- [24] Li SG, Zhou XW, Wu ZH, Li YZ. Population ecology and survival strategy of myxobacteria. *Microbiology China*, 2013, 40 (1) : 172-179. (in Chinese)
李曙光, 周秀文, 吴志红, 李越中. 粘细菌的种群生态及其生存策略. 微生物学通报, 2013, 40 (1) : 172 - 179.
- [25] Meiser P. *Myxococcus xanthus*-a myxobacterial model strain as multiproducer of secondary metabolites. Saarland University Doctor Academic Dissertation. 2008.
- [26] Samy RP, Rajendran P, Li F. Identification of a novel *Calotropis procera* protein that can suppress tumor growth in breast cancer through the suppression of NF- κ B pathway. *PLoS One*, 2012, 7 (12) : e48514.
- [27] Irschik H, Jansen R, Gerth K, Höfle G, Reichenbach H. Disorazol A, an efficient inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria. *The Journal of Antibiotics*, 1994, 1 (48) : 31-35.

Isolation, identification and biological activity of myxobacteria from soils

Rong Xiao¹, Ye Wen¹, Shaojun Tang¹, Xinmin Zhao², Xuezhi Ding¹, Shengbiao Hu¹, Liqiu Xia¹, Yunjun Sun^{1*}

¹State Key Laboratory Breeding Base of Microbial Molecular Biology, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan Province, China

²Department of Chemistry and Environmental Engineering, Hunan City University, Yiyang 413000, Hunan Province, China

Abstract: [Objective] Purpose of this work was to screen myxobacteria from soils and study their biological activities towards pathogenic bacteria, tumor cells and insects. [Methods] Through inactivated *E. coli* and filter paper inducing methods, we isolated and purified myxobacteria from soil samples. Then we identified these purified strains based on morphological observation, physiological and biochemical characteristics, and the 16S rDNA sequences homologous analysis. By plate diffusion experiments, oral toxicity tests and tetrazolium assays, we investigated the biological activities of the myxobacterial culturesupernatant. [Results] We isolated 35 myxobacterial strains and classified them as 4 genera: *Myxococcus* (9), *Corallococcus* (9), *Nannocystis* (11) and *Sorangium* (6). Eight purified myxobacteria were identified and named. Cytotoxicity tests show that strain *C. macrospores* S22 had potent and broad-spectrum cytotoxic effect on tumor cell lines including B16, 4T1, HeLa and HCT-116, so did the strains *M. fulvus* S51, *C. exiguus* S22 and *M. Xanthus* S55. Additionally, *C. macrospores* S22 also shows inhibitory activity to pathogenic bacteria *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. [Conclusion] Myxobacteria are widely distributed in natural soils. *C. macrosporus* has potent toxicity against cancer cells and pathogenic bacteria; and *C. exiguus* with antitumor activity. The myxobacterial strains are promising resources for discovery and development of new active natural products and drugs.

Keywords: myxobacteria, isolation and identification, biological activity assays

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB227300), by the National High Technology Research and Development Program of China (2011AA10A203) and by the Cooperative Innovation Center of Engineering and New Products for Developmental Biology of Hunan Province (20134486)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-88872298; E-mail: sunyj@hunnu.edu.cn

Received : 13 August 2014 / Revised : 18 September 2014