

# 一株海绵放线菌的分离鉴定及活性研究\*

张海涛 靳艳 吴佩春 张卫\*\*

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

**摘要:** 从大连潮间带繁茂膜海绵中分离到一株具有很强抑制革兰氏阳性菌活性和较强抗肿瘤活性的链霉菌。通过其形态观察, 生理生化测定和 16S rDNA 序列的测定, 初步判定属于假浅灰链霉菌 (*Streptomyces pseudogriseolus*)。并对其活性物质的生产条件进行了初步探索和优化, 确定了用天然海水配制的 TSB 培养基为最佳发酵培养基, 3 d 为最适发酵时间。

**关键词:** 繁茂膜海绵, 假浅灰链霉菌, 放线菌, 活性, 鉴定

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0060-05

## Isolation, Identification and Bioactivity Screening of *Streptomyces pseudogriseolus* Associated with Marine Sponge *Hymeniacidon perleve*

ZHANG Hai-Tao JIN Yan WU Pei-Chun ZHANG Wei\*\*

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

**Abstract:** An actinomycete B37 was isolated from an intertidal marine sponge *Hymeniacidon perleve*, which has strong activity against Gram positive bacteria and moderate activity against tumor cells. The mycelium and spore morphology, physiological properties and 16SrDNA sequence suggested that B37 is *Streptomyces pseudogriseolus*. The fermentation conditions of this strain were investigated for the biosynthesis of bioactive metabolites.

**Key words:** Marine sponge *Hymeniacidon perleve*, *Streptomyces pseudogriseolus*, Actinomycetes, Activity, Identification

海绵是海洋药物和天然产物的重要来源。2000 年的统计表明: 从海洋生物中分离得到的 6,000 多种天然产物中, 大约有 40% 源于海绵, 其活性范围涵盖了抗菌、抗炎症、抗肿瘤、抗疟疾等方面<sup>[1]</sup>。在海绵滤食的过程中, 许多微生物尤其是不能被消化的微生物得以在海绵体内保留, 这样在海绵体内和体表就富集了大量的微生物<sup>[2]</sup>。近些年, 随着研究方法的发展和研究内容的深入, 科学家从海绵中发现了越来越多的微生物, 并从某些微生物的代谢产物中发现了许多活性物质, 而其中有些活性物质过去曾被认为是海绵本身产生的。例如 Perovic 从海绵 *Halichondria panicea* 中的微生物 *Antarcticum Veiculatum* 和 *Psychroserpens burtonensis* 中分离得到了具有神经活性的化合物<sup>[3]</sup>。Debitus 从海绵 *Suberea creba* 中分离得到的假单胞菌能够产生的奎诺龙 (Quinolone) 类抗生素<sup>[4]</sup>。从海绵相关微生物入手, 从中筛选获得具有能够生产活性物质的菌株, 开辟了海绵天然产物的新来源。海绵中微生物由于其生长条件特殊, 通常难以培养, 形态多变, 不易进行鉴定, 因此应该采用传统形态生理等方法与分子生物学相结合的多相鉴定方式对其属种归属进行确定。本文在研究大连海域潮间带繁茂膜海绵过程中, 分

\* 国家“973”计划资助项目 (No.2003CB716001)

\*\* 联系人 Tel: 0411-4379069, E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

收稿日期: 2003-12-08, 修回日期: 2004-04-16

离得到了一株链霉菌 B37。对其活性和鉴定进行了探索性研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株分离

在大连地区潮间带海域采集新鲜繁茂膜海绵 (*Hymeniacidon perleve*)。其种属由中国科学院青岛海洋研究所李锦和先生鉴定。首先将海绵用无菌海水浸洗 5 遍, 以去除表面附着物及夹带的海水中微生物。然后在无菌研钵中研磨 10 min, 使之成均匀浆状, 加入两倍质量的无菌海水, 在此基础上稀释 10 倍后进行平板涂布。分离培养基采用改良 Emerson 培养基, 分离培养基中加入终浓度为 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的茶啉酸和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的重铬酸钾。

### 1.2 菌株鉴定

**1.2.1 形态观察:** 菌株的培养特征与生理生化特性采用常规微生物鉴定方法, 并参考文献及手册中所推荐的培养基<sup>[5-7]</sup>; 菌株形态观察在 Olympus BH -2 显微镜下进行, 孢子丝及孢子在 Philips XL30 扫描电镜下观察。

**1.2.2 分子鉴定:** DNA 提取参考采用细菌基因组 DNA 的小量制备方法<sup>[8]</sup>。经纯化后采用通用引物进行 16SrDNA 基因的 PCR 扩增<sup>[9]</sup>。PCR 产物测序由大连宝生物公司完成。通过互联网, 将序列提交 NCBI 数据库, 应用 Blast 程序与数据库中已有的细菌 16SrDNA 序列进行相似性比较分析。序列的比较及系统发育分析采用 Clustalx1.81 软件进行。

### 1.3 抗菌活性测定

抗菌活性测定培养基: 细菌用牛肉膏蛋白胨琼脂, 白色念珠菌为麦芽汁琼脂, 霉菌采用察氏琼脂。B37 发酵培养基为含有 2% NaCl 的 TSB 液体培养基。采用杯碟法测定发酵液抗菌活性, 每个牛津杯加入 100  $\mu\text{L}$  的发酵液上清, 细菌于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 真菌于 32 $^{\circ}\text{C}$  下培养 48 h, 检测抑菌圈直径大小。供试菌株为 *Escherichia coli* (AS 1.543), *Pseudomonas aeruginosa* (AS1.50), *Bacillus subtilis* (10002), *Staphylococcus aureus* (AS 1.879), *Candida albicans* (AS 2.2086), *Aspergillus niger* (AS 3.4463), 均购自国家菌种库和国家工业菌种库。

### 1.4 抗肿瘤细胞活性测定

Raji-人 Burkittis 淋巴瘤细胞, QGY -7701-人肝癌细胞, K562-慢性髓原白血病细胞系本实验室保存细胞。细胞培养在 RPMI1640 培养基中, 在 100% 湿度, 5%  $\text{CO}_2$  的 37 $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养。将 B37 菌株接种在含有 2% NaCl 的 TSB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$  下 230 r/min 摇床培养 5d 后, 在 5,000 r/min 下离心 10 min, 取上清用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 滤液即为待测样品, 冰箱中冻存待用。

细胞培养至 90% 铺底, 消化收集的细胞并制成单细胞悬液; 接种细胞于 96 孔板, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含  $1 \times 10^5$  个细胞的培养液; 加入 10  $\mu\text{L}$  待测样品, 阴性对照为 10  $\mu\text{L}$  的 TSB 培养基, 每个样品和对照均有 3 个平行; 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、100% 湿度的条件下培养 48 h; 取出培养板, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  以无菌生理盐水配制的 5 mg/mL 的 MTT, 37 $^{\circ}\text{C}$  下反应 4 h; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  裂解液, 充分溶解细胞 3 h; 然后用酶标仪 (BioRad, M550) 双波长比色测定各孔的吸光值, 设定测定波长 595 nm, 参考波长 655 nm<sup>[10]</sup>。

抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率} \% = \frac{\text{阴性对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{阴性对照组 OD 值}} \times 100 \%$$

## 1.5 发酵条件优化

将链霉菌 B37 在高氏一号培养基上 28℃ 培养 7 d, 接入 TSB 液体培养基内 (100 mL 培养基/500 mL 三角瓶), 28℃ 下摇床 200 r/min 培养 48 h, 然后按 10% 接种量将种子液接入不同的发酵培养基, 置于摇床 200 r/min 振荡培养, 温度为 28℃, 培养基装量为 250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基。每 24 h 取样, 并置于冰箱冻存留做实验用。以金黄色葡萄球菌为指示菌, 牛津杯法测定抗菌活性。

采用如下各种发酵培养基: (1) 蒸馏水配制的 TSB; (2) 天然海水配制的 TSB; (3) 蒸馏水配制 TSB 内含 2% NaCl; (4) 1/2 蒸馏水 + 1/2 海水配制 ISP2; (5) 天然海水配制的 ISP2; (6) 蒸馏水配制的 ISP2 内含 2% NaCl。

## 2 实验结果

### 2.1 链霉菌 B37 的鉴定

**2.1.1 形态培养特征:** 链霉菌 B37 在高氏一号培养基上生长丰茂, 气生菌丝发达, 呈深灰色。显微镜下观察, 孢子丝呈螺旋状, 4~6 圈螺旋 (见图 1)。10,000 倍电镜下观察孢子丝呈松散螺旋形, 孢子卵圆形, 大小为  $0.4 \sim 0.5 \mu\text{m} \times 0.6 \sim 0.8 \mu\text{m}$ , 表面光滑无刺 (见图 2)。链霉菌 B37 在多数实验培养基上长势良好, 但在查氏培养基和无机盐淀粉上长势较差 (见表 1)。

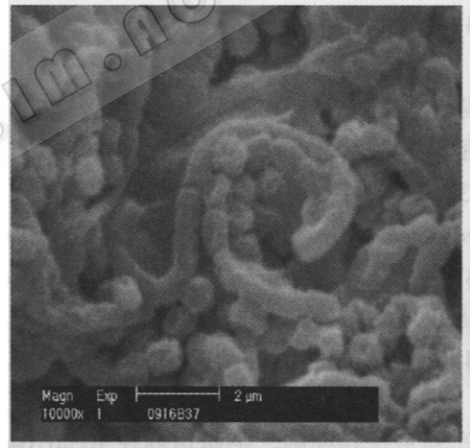
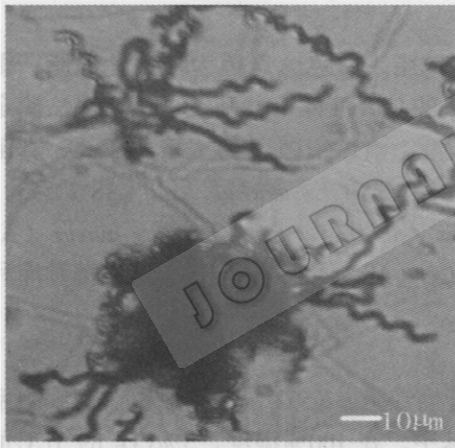


图 1 链霉菌 B37 在显微镜下照片 ( $\times 400$ )

图 2 链霉菌 B37 在电镜下照片 ( $\times 10,000$ )

表 1 链霉菌 B37 的培养特征

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素
酵母麦芽浸出 (ISP2) 培养基	浅灰白色	白色, 皱缩	无
甘油天冬素培养基	灰色	白色	无
Emerson 培养基	灰色	灰棕色	无
蔗糖硝酸盐 (查氏) 培养基	极少, 灰白	浅灰色	无
高氏一号培养基	深灰色	淡灰色	无
燕麦粉琼脂培养基	浅灰黄色	淡灰	无
淀粉无机盐 (ISP4) 培养基	极稀薄, 白色	白色	无
营养琼脂	白色	黄色, 皱缩	无

**2.1.2 生理生化鉴定结果:** 部分生理生化特征鉴定结果见表 2。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》和《放线菌的分类和鉴定》, 将实验结果同手册上不同种菌株进行比对, 并结

合 B37 在各种培养基上形态及显微镜和电镜下观察结果, 可初步判定为假浅灰链霉菌 (*Streptomyces pseudogriseolus*)。

表 2 链霉菌 B37 的生理生化特征

特征	结果	特征	结果
淀粉水解	+	L-鼠李糖	+
明胶液化	+	D-甘露醇	+
产黑色素	+	D-半乳糖	+
牛奶酪化	+	D-果糖	+
牛奶凝固	+	柳醇	+
产硫化氢	-	D-木糖	+
纤维素降解	-	L-阿拉伯糖	+
葡萄糖	+	棉子糖	-
i-肌醇	+	蔗糖	-

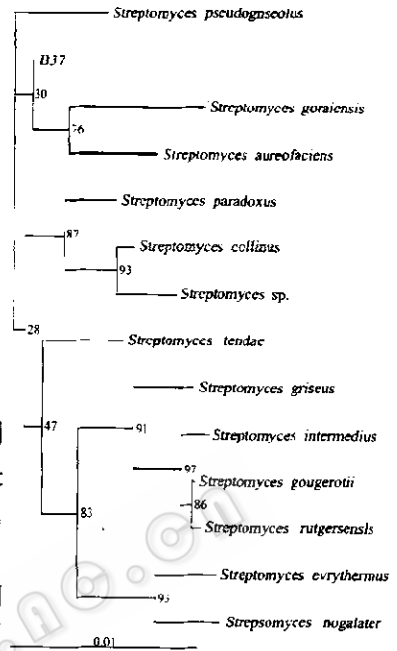


图 3 链霉菌 B37 的系统发育树

2.1.3 分子鉴定结果: 对 B37 的 16S rDNA 部分序列 (936 bp) 进行测序, 并同 GenBank 中 16SrDNA 序列进行比对, 其同假浅灰链霉菌的相似性达到 98.9%。采用 Clustalx1.81 软件, 用 N-J 法建立系统发育树, 如图 3 所示, 对其进行分析, 二者之间的进化距离相隔较近。结合对 B37 的形态观察和生理生化指标的测定, 进一步确定 B37 属于假浅灰链霉菌。

2.2 B37 的生理活性

2.2.1 B37 的抑菌活性: 采用牛津杯法测试 B37 在 TSB 培养基中发酵液的抑菌抑菌活性。活性结果见表 3, 可以看出在各种供测试菌中, B37 能专一的抑制革兰氏阳性细菌, 而对于革兰氏阴性细菌和酵母、霉菌等真菌没有抑制活性。

表 3 链霉菌 B37 发酵液对各种菌的抑制作用

测试菌	枯草芽孢杆菌	金葡球菌	大肠杆菌	绿脓杆菌	白假丝酵母	黑曲霉
抑菌直径 (cm)	2.6	4.3	-	-	-	-

2.2.2 B37 的抗肿瘤细胞活性: 以 3 种肿瘤细胞为抗肿瘤活性筛选模型, 其中 Ragi 细胞和 K562 细胞为悬浮细胞, QGY-7701 细胞为贴壁生长细胞。B37 发酵液对 3 种肿瘤细胞的生长抑制率见表 4。在显微镜下观察, 加入 B37 发酵液以后, Ragi 细胞和 K562 细胞皱缩变形, 不再圆润饱满; 而 QGY 细胞大多则悬浮在细胞培养液中, 不再贴壁。3 种细胞在视野范围内数量都明显少于阴性对照组。因此链霉菌 B37 的发酵液有较强的抑制肿瘤细胞生长的能力。

表 4 链霉菌 B37 发酵液对肿瘤细胞抑制作用

测试细胞	Ragi 细胞	K562 细胞	QGY -7701 细胞
B37 抑制率	81%	81%	78%

2.2.3 发酵条件优化: 由图 4 可以看出, 在对 B37 发酵采用各种发酵培养基效果差别不是很大。在发酵的第 3d, B37 的发酵液中的抑菌的活性物质的量最高, 此时为发酵的最佳时期, 然后就进入菌体生长滞后期, 活性物质的合成开始减少。在各种培养基中, 以 TSB 培养基和以海水配制的 TSB 培养基为最佳, 菌体在发酵时能够达到活性物

质生产的较高量。而 B37 在添加了 2% NaCl 的 ISP2 培养基中生长则需要较长的时间才能达到活性物质的生产高峰期。上述结果说明了 TSB 培养基更适合于链霉菌 B37 的生长和活性物质的生产，尤其是海水配制的 TSB 培养基。

### 3 讨论

研究黄渤海海域的繁茂膜海绵中获得了多种具有抗菌、抗肿瘤、抗 HIV 等活性的化合物<sup>[10]</sup>。然而在海绵微生物及其产生的活性物质方面的研究却尚属空白。从大连海域潮间带繁茂膜海绵中分离放线菌过程中，对海绵周围海水进行采样，但并未得到放线菌。原因可能是海水中含放线菌浓度太低，而海绵由于其滤食特性，使得体内能够富集丰富的微生物。这为我们开辟了新的微生物资源来源。并且由于海绵本身能产生许多种活性天然产物，大多数都没有确定其真正来源，其中许多已经陆续被证实是源自海绵中的相关微生物。因此从海绵中微生物入手进行活性菌株的分离和筛选是条有效的途径。

在将所测得的 16S rDNA 序列通过互联网输入 GenBank 进行 Blast 分析，序列同源性比较结果表明：B37 与假浅灰链霉菌的 16S rDNA 序列同源性达到 98.9%。与中间型链霉菌 (*Streptomyces intermedius*)，唐德链霉菌 (*Streptomyces tendae*) 的序列同源性也达到 98% 以上。但 B37 的形态特征和生理生化性能与后二者有很大的差异。目前细菌分类学家普遍认为 16S rDNA 序列同源性大于 97% 为同种成员。目前链霉菌传统的分类方法比较混乱，而 16S rDNA 的序列库有待完善。因此需要对其鉴定的各个方面进行考察，包括形态观察，生理生化测定和 16S rDNA 序列的测定。我们得到的活性菌株来源于海洋，海洋微生物的很重要特征是形态和生理性质的多变性。在综合上述鉴定方面特征的基础上，初步判定 B37 属于假浅灰链霉菌。在对该菌的活性探索方面，B37 显示了很强的专一抗菌活性，并具有较强的抑制肿瘤细胞生长的活性。

### 参 考 文 献

[1] Faulkner D J. Marine Natural Products Natural Product Reports, 2000, 17: 7 ~ 55.  
 [2] Osinga R, Armstrong E, Burgess J G B, et al. Hydrobiologia 2001, 461: 55 ~ 62.  
 [3] Perovic S, Wichels A, Schutt, C, et al. Environmental Toxicology and Pharmacology, 1998, 6: 125 ~ 133  
 [4] Debitus C, Guella G, Mancini I I, et al. J Mar Biotechnol, 1998, 6: 136 ~ 141.  
 [5] F 奥斯伯等. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 39 ~ 40.  
 [6] 阎逸初. 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社, 1992.  
 [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.  
 [8] R E 布坎南, N E 古本斯. 伯杰细菌鉴定手册 (第八版). 北京: 科学出版社, 1984.  
 [9] Webster N S, Wilson K J, Blackall L L, et al. Applied And Environmental Microbiology, 2001, 67 (1), 434 ~ 444.  
 [10] Xue S, Zhang H T, Wu P C, et al. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 298: 71 ~ 78.

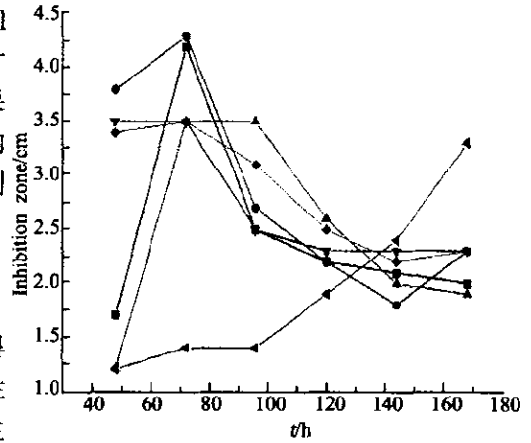


图 4 链霉菌 B37 在不同发酵培养基上发酵时间和活性关系

■ TSB, ● TSB + SW, ▲ TSB + 2% NaCl, ▼ 1/2 ISP2 + 1/2 SW, ◆ SW + ISP2, ◄ ISP2 + 2% NaCl