

具抗真菌活性的海洋霉菌的筛选和初步研究*

李淑彬 陆广欣 林如妹 邬进杰 蔡文德

(华南师范大学生命科学学院 广州 510631)

摘要: 从中国南海海底沉积物与海水样品中分离出 100 多株海洋霉菌; 以条件性致病真菌白色假丝酵母 (*Candida albicans*), 植物病原真菌镰刀菌 (*Fusarium* sp.) 等作为敏感测试菌株, 初筛分离到 30 多株对上述测试真菌具有明显抑制作用的海洋霉菌; 对其发酵液进行复筛, 发现其中编号分别为 B₄[#]-6、B₄[#]-3、1-B₆-6、1-B₆-10-5、1-B₆-22、C₂[#]-5、A₂-9 和 1-B₆-10 的海洋霉菌菌株其代谢产物粗提物有明显抗真菌活性; 其抗真菌谱的实验结果表明菌株 1-B₆-10-5 和 B₄[#]-3 的代谢产物还能抑制多种其他真菌的生长, 这二个菌株具有良好的开发前景。

关键词: 中国南海, 海洋霉菌, 抗真菌作用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0078-05

Screening of Marine Mold Activity and Having Antifungi Primary Research*

LI Shu-Bin LU Guang-Xin LIN Ru-Mei WU Jin-Jie CAI Weng-De

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract: More than one hundred strains of marine molds have been isolated from the sediment and the sample of seawater collected from the South China Sea. By the first screening, more than 30 strains of marine molds which can inhibit tested fungi such as *Candida albicans* and *Fusarium* sp. were obtained. The results of the second screening showed those strains designed as B₄[#]-6, B₄[#]-3, 1-B₆-6, 1-B₆-10-5, 1-B₆-22, C₂[#]-5, A₂-9 and 1-B₆-10 can produced extracellular antifungi metabolic products and the crude extract of the strains 1-B₆-10-5 and B₄[#]-3 can inhibit the growth of many other species of fungi.

Key words: The south china sea, Marine mold, Antifungi activity

近年来, 随着癌症放疗、化疗和器官移植患者人数的不断增加, 免疫抑制及艾滋病感染、空气恶化等使条件性致病真菌感染的发病率显著上升^[1], 真菌感染的机会非常高。治疗过程中不断出现严重的真菌感染^[2,3], 特别是具有抗药性的菌株的出现, 使得真菌治疗困难重重。由此在临床上急需开发出高效、低毒的广谱抗真菌药物^[4]。植物病原真菌感染也仍然是威胁农作物生长的重要因素。海洋微生物种类繁多, 是筛选新药丰富资源宝库。海洋霉菌正在成为国内外学者对海洋抗真菌药源微生物研究的新热点^[5-8]。

本研究旨对中国南海海洋霉菌抗真菌资源进行调查并分离筛选出能产生高效、广谱抗真菌代谢产物的海洋霉菌菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 海泥和海水样品: 第 1 次取样: 2002 年 1 月, 中国南海珠江口水域; 第 2 次采

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30270021)

收稿日期: 2004-07-12, 修回日期: 2004-09-02

样：2002 年 2 月，中国南海珠江口水域；第 3 次采样：2003 年 7 月，中国南海汕头南澳岛附近海域。

1.1.2 主要敏感测试菌株：白色假丝酵母 (*Candida albicans*) 购自中山大学医学院，深红酵母 (*Rhodotorula rubra*) 本实验室保存；尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 菌株 F1113、F1125、粉 F1125、粉 F1103、粉 F1122 等分别从患黄叶病的香蕉和粉蕉中分离纯化；菌株 MG3.63、3.3635、3.3642 为镰刀菌标准菌株，从中国科学院微生物研究所购得；其他植物致病真菌和霉腐真菌烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、疫霉 (*Phytophthora* sp.)、新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*)、无花果曲霉 (*A. ficuum*)、茄丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、拟茎青霉 (*Phomopsis sac*)、棉炭疽菌 (*Collettrichum gossypii*)、黑曲霉 (*A. niger*)、黄曲霉 (*A. flavus*)、桔青霉 (*Penicillium citrinum*) 等为本实验室保存。

1.1.3 主要培养基：(1) 海洋霉菌分离培养基：葡萄糖 10 g、蛋白胨 2 g、酵母浸膏 1 g、pH 6.4、琼脂 20 g，陈海水 1,000 mL， 0.70×10^5 Pa 灭菌 30 min。(2) 抗真菌活性实验用培养基和指示菌培养基：PDA 培养基。(3) 发酵培养基：同 (1) 培养基，不加琼脂。

1.2 实验方法

1.2.1 海洋霉菌的分离：按常规方法在添加链霉素和青霉素的分离培养基上涂布分离。

1.2.2 抗真菌抗生素产生菌的初筛：以白色假丝酵母、香蕉枯萎病菌尖孢镰刀菌菌株 F1113、F1125 和霉腐真菌烟曲霉等四种真菌作为敏感测试菌以琼脂挖块法^[9]初筛。

1.2.3 复筛：摇瓶培养-点滴法^[10]：挑取 1 环新制备的海洋霉菌孢子接种于 150 mL 发酵培养基中，22℃ 180 r/min 振摇 96 h，用细菌过滤器除去菌丝体，滤液经真空冷冻干燥，用 10 mL ddH₂O 溶解，得发酵产物粗提物。敏感测试菌菌悬液均匀涂布在 PDA 培养基平板上，在培养基表面轻贴 1 张无菌滤纸片 (φ 为 6 mm)，稍干后，用无菌微量移液器分别加入 20 μL 上述海洋霉菌发酵产物粗提物，28℃ 倒置培养。白色假丝酵母培养 36 h、其他培养 72 h，测量抑菌圈直径。

2 结果

2.1 海洋霉菌的分离

在分离平板上共分离得到 112 株霉菌，其中海泥样品中分离得到 94 株，海水样品中分离得到 18 株。

2.2 初筛结果

在所分离的 100 多株海洋霉菌中，有 38 株对所实验的敏感测试菌有不同程度的抑制作用。结果如表 1 所示。其中，编号为 B₄[#]-3 的抑菌活性最强，对 4 种测试菌的抑制圈的平均直径达到 31.95 mm。次之为 B₄[#]-6，其抑制圈直径为 29.05 mm。此外，编号为 1-B₆-10 的菌株对镰刀菌的抑制效果较好，但对其他两种敏感测试菌没有抑制作用。

表 1 海洋霉菌抗真菌抗生素产生菌初筛结果

海洋霉菌	测试菌株			
	F1125	F1113	烟曲霉	白色假丝酵母
A ₂ -9	+	23.3	32.5	20.7
1-B ₆ -9	20.3	23	20.8	0

续表 1

A ₂ -10	0	0	+	0
A ₂ -1	+	20.4	+	18.6
X-4	20.6	+	+	0
X-23	16.8	0	+	0
1-E ₁ -1-2	18.3	+	+	0
1-B ₇ -3	30.6	+	0	0
1-B ₆ -10	33.3	32.5	+	+
X-10	+	0	++	26.5
1-E ₁ -1-4	+	26.4	20.8	0
1-E ₅ -1-1	+	0	0	0
X-9	+	+	+	+
1-D ₁ -1-1	0	0	+	0
1-A ₂ -1	0	0	+	0
1-B ₅ -3	0	0	+	0
1-B ₃ -3	+	0	0	0
1-B ₆ -1	+	+	+	+
1-B ₆ -7	0	0	+	0
1-A ₈ -1-7	+	27.4	0	0
1-B ₇ -4	+	+	0	0
B ₄ [#] -3	35.2	26.8	35.2	30.6
B ₄ [#] -6	31.8	25.6	30.4	28.4
1-B ₇ -4	0	0	+	0
1-B ₅ -3	+	+	+	0
A ₂ -10	35.6	30.4	20.3	+
C ₁ [#] -1	+	0	+	0
C ₇ [#] -5	30.2	31.3	19.6	21.2
1-B ₆ -6	22.1	25.8	+	+
X-14	0	+	28.4	0
1-B ₆ -10-5	+	+	19.8	0
1-B ₂ -B6	0	+	+	0
X-6	23.2	28.5	+	25.8
1-B ₆ -7	0	0	+	0
1-B ₆ -6	19.4	+	+	20.6
1-E ₇ -1-5	+	0	+	0
1-B ₆ -22	20.5	+	+	22.6

注：上述数据为 3 个重复的平均值，+ 表示有一定的抑菌效果，抑菌菌圈直径小于 15 mm

2.3 复筛

对上述初筛后具有一定抑制活性的菌株进行摇瓶发酵复筛。结果如表 2。复筛结果表明，在 38 株初筛具有抗真菌活性的菌株中，有 15 株其胞外代谢产物粗提物具有明显的抗真菌活性，除 1-B6-10 对 *C. albicans* 抑制不明显外，它们对所试的测试菌其抑菌圈直径均大于 10 mm。这说明这些菌株能产生胞外抗真菌代谢产物。另 23 株虽然用琼脂挖块法初筛过程中有抑菌圈出现，但在复筛中观察不到抗菌活性。其原因可能如下：（1）所产抗生素浓度太低，在所试的浓度下观察不到抑菌现象；（2）该菌产生的抗菌物质可能存在于菌丝体内，不能释放到培养液中；（3）该菌在初筛过程中产生的抑菌现象是由于与测试菌营养竞争的结果。

表 2 海洋霉菌抗真菌抗生素产生菌复筛结果

测试菌	代谢产物粗提物用量	抑菌圈直径 (mm)	
		<i>C. albicans</i> F1113	
1-B ₆ -6	20	15.6	16.2
1-B ₆ -10	20	0	22.4
1-B ₆ -10-5	20	16.3	15.5
1-B ₆ -22	20	10.2	11.5
A ₂ -9	20	15.6	13.4
B ₄ [#] -6	20	28.8	30.2
1-B ₆ -1	20	10.5	8.3
1-B ₆ -9	20	9.6	8.7
1-B ₆ -10-3	20	15.4	15.8
1-B ₇ -3	20	10.2	11.6
A ₂ -1	20	10.7	11.6
B ₄ [#] -3	20	35.6	20.3
C ₁ [#] -1	20	10.6	12.7
C ₂ [#] -5	20	15.6	13.8
X-9	20	10.2	11.8

2.4 海洋霉菌胞外代谢产物对其他的真菌抑制作用

选取复筛过程中有明显抗真菌活性的 7 个海洋霉菌菌株 (1-B₆-6、B₄[#]-6、B₄[#]-3、1-B₆-22、1-B₆-10-5、C₂[#]-5、A₂-9) 的发酵液粗提物研究其对其他酵母菌、植物病原真菌和其它丝状真菌的抑制作用。结果如表 3 所示, 它们普遍具有比较广的抗真菌谱, 特别是编号为 1-B₆-10-5 和 B₄[#]-3 菌株胞外代谢产物对多种真菌具有较强的抑制活性, 具有进一步研究的价值和较好的开发前景。

表 3 7 株海洋霉菌代谢产物对其他真菌的抑制作用

测试菌	抑菌圈直径 (mm)						
	1-B ₆ -6	B ₄ [#] -6	B ₄ [#] -3	1-B ₆ -22	1-B ₆ -10-5	C ₂ [#] -5	A ₂ -9
3.3635	6.2	18.3	15.6	8.6	28.4	13.1	23.5
3.3642	12.3	15.6	20.8	12.4	25.2	18.7	25.8
桔青霉	0	15.4	9.3	10.7	13.5	13.2	15.7
深红酵母	15.6	11.8	18.9	9.5	10.7	12.4	9.6
黑曲霉	0	15	15	12	18	11	8
MG3.63	25	18	33	0	20	10	10
疫霉	0	10	9	10	18	0	0
粉 F1103	15	0	13	0	11	9	0
无花果霉	9	9	15	22	22	12	12
炭疽菌	0	15	10	22	22	0	24
拟茎青霉	30	30	26	0	0	0	0
叶霉	0	0	0	0	0	0	0
叶 F1102	0	0	12	0	10	0	0
叶 F1106	0	13	13	0	12	0	0
粉 F1125	8	0	15	0	12	0	13
新月弯孢霉	0	0	15	0	16	0	13
茄丝核菌	0	15	13	0	12	0	0

3 讨论

海洋环境具有与陆地环境显著不同的特征,如高压、低营养、低温、无光照以及局部高温,高盐等所谓的生命极限环境。海洋真菌适应了海洋独特的生活环境,必然造就了海洋真菌具有独特的代谢途径和遗传背景。越来越多的实验表明,海洋真菌能够产生多种多样的新颖的活性物质。C Christopherson 等从海洋中分离得到 227 株海洋真菌,其中有 27% 的海洋真菌提取物至少对一种微生物有抑制活性。

本研究从中国南海海洋珠江口岸和汕头南澳岛所采集的海底沉积物与海水样品中分离到的 112 株霉菌在初筛中有 38 株具有明显的抗真菌作用,阳性筛选率达到 30% 左右。复筛结果有 15 株的胞外发酵产物粗提物有不同程度的抑菌效果,复筛阳性率达到 10% 以上。由此看来从南海海洋采集样品分离新的抗真菌药物有着巨大的潜力。

较之细菌,真菌的生长要慢得多,真菌的鉴定特别是丝状真菌的鉴定要等繁殖器官长出后才能作出,这往往要花费较长的时间,因而具广谱抗真菌活性的药物在治疗真菌感染时具有更大的优势。现有的抗真菌药物也存在着抗菌谱窄的不足,如:灰黄霉素对酵母菌、类酵母真菌、深部丝状真菌均无效。从实验结果来看:本次实验中分离得到的菌株 B₄[#]-3, 1-B₆-10-5 抑菌作用强,抗真菌谱广,对酵母菌真类、植物病原真菌镰刀菌及其他多种丝状真菌均有抑制作用,是两株值得进一步研究与开发的具有抗真菌作用的海洋霉菌。

参 考 文 献

- [1] Rainer I, Michael S, Bettina R. *World Journal of Surgery*, 2002, **26** (3): 372 ~ 376.
- [2] Martino R, Subirà M. *Annals of Hematology*, 2002, **81** (5): 233 ~ 243.
- [3] 顾觉奋,倪孟祥,李治川. *中国新药杂志*, 2001, **10**: 328 ~ 332.
- [4] 黄文祥,王其南. *国外医药抗生素分册*, 2002, **24**: 176 ~ 182.
- [5] Liu C H, Liu J Y, Huang L L, *et al.* *Planta Med*, 2003, **69** (5): 481 ~ 483.
- [6] Byun H G, Zhang H, Mochizuki M, *et al.* *J Antibiot (Tokyo)*, 2003, **56** (2): 102 ~ 106.
- [7] 王 琳,骆祝华,黄翔玲,等. *台湾海峡*, 2002, **21** (3): 368 ~ 371.
- [8] Nagai K, Kamigiri K, Matsumoto H, *et al.* *J Antibiot (Tokyo)*, 2002, **55** (12): 36 ~ 41.
- [9] 屈 毅,杜 继. *现代医用抗生素学*. 成都:四川科学出版社,1987.
- [10] 李安生,吴绍熙. *国外医学皮肤性病学分册*, 1997, **23** (5): 265 ~ 269.