

不同生境具抑菌作用的海洋真菌筛选

周松林^{1,2}, 林映莹¹, 赵唤阁¹, 黄用豪¹

(1. 海南医学院热带病重点实验室, 海南海口 571199; 2. 南京师范大学生命科学院, 江苏南京 210046)

摘要 [目的] 为了测定海口沿海海域不同生境的海洋真菌抑菌状况。[方法] 从海口西海岸沿线、南渡江入海口以及演丰红树林 3 个生境分离到 162 株海洋真菌, 通过药敏纸片法测定海洋真菌代谢产物对 4 株病原细菌的抑菌活性。[结果] 82.72% 的海洋真菌具有不同程度的抑菌作用, 其中分离自红树林生境的海洋具有抑菌作用的程度最高, 西海岸生境分离的真菌次之, 入海口生境分离的海洋真菌具有抑菌作用的概率相对最低。[结论] 从不同生境分离到的海洋真菌, 其抑菌效果也不一样。因此, 当需要筛选某种活性的海洋真菌时, 可到具有较易筛选出该活性的生境中筛选。

关键词 海口; 海洋真菌; 生境; 抑菌活性; 药敏纸片

中图分类号 S931.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)05-004-03

Screening of Marine Fungi in Different Habitats with the Antibacterial Activity

ZHOU Song-lin^{1,2}, LIN Ying-ying¹, ZHAO Huan-ge¹ et al (1. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Medicine, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571199; 2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210046)

Abstract [Objective] To determine the inhibitory condition of marine fungi coastal waters of Haikou in different habitats. [Method] 162 strains of marine fungi were isolated from three different habitats along the west coast of Haikou, Nan Dujiang mouth out, and Yan Feng mangrove, and the antibacterial effects of marine metabolites on the 4 strains of pathogenic bacteria were measured by K-B assay. [Result] The present study showed that 82.72% of total marine fungi have different degree bacteriostasis, which isolated from the mangrove habitat fungi have highest antibacterial activity, and second was isolated from habitat at the west coast of Haikou, and lowest antibacterial activity were isolated estuary habitat marine fungi. [Conclusion] So the metabolism products of isolated from difenent habitats fungi have difenent degree antibacterial activity, and we can conclude that screening target strains should from the purpose of habitat.

Key words Haikou; Marine fungi; Habitats; Antibacterial activity; Drug sensitive slips

海洋环境具有高压、高盐、低温、低光照、寡营养、低溶氧等特点。为了适应这样的生存环境, 海洋生物在新陈代谢、生存繁殖方式和适应方式等方面产生了与陆地生物有所不同的代谢系统以及机体防御系统^[1]。但是, 由于地球的海陆分布不均, 海洋生态环境实际上也是由许多不同的生境组成的, 因此在不同生境下蕴育着不同的微生物种群^[2]。自从 1945 年意大利人 Brotzu^[3-4] 在撒袍丁岛城市排污口附近的海水发现一株产头孢菌素 C 的头孢霉 (*Cephalosporium acremonium*), 对海洋真菌的研究脚步就一刻也没有停止过。特别是近 10 年以来, 每年都从海洋真菌中发现的大量结构新奇、具有抑菌、抗肿瘤、抗病毒的新的代谢产物为新药研发提供了大量的先导化合物^[5-7]。以海口沿海海域 3 个不同的海洋生境 (即西海岸沿线的海滩、港口码头, 南渡江入海口区域和演丰镇红树林) 为采集目的地, 笔者分离其海洋真菌, 并检测其发酵产物的抑菌活性。

1 材料与方法

1.1 抑菌所用指示菌株 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 均为实验室保存菌种。

1.2 培养基 真菌培养基为通用液体 (固体) 培养基, 组成为: 葡萄糖 10 g、蛋白胨 2 g、酵母膏 1 g、琼脂 20 g、陈海水 600 ml, 蒸馏水定容至 1 L, 自然 pH, 121 °C 高压灭菌 20 min。细菌培养基为 Luria-Bertani (LB) 液体 (固体) 培养基, 组

为: 蛋白胨 10 g、酵母膏 5 g、NaCl 10 g, 蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min。

1.3 海洋真菌的分离

1.3.1 样品采集。 在 2011 年 9 月~2012 年 10 月从海南省海口市西海岸浅海域的 3 处不同海洋生境 (西海岸沿线、南渡江入海口、演丰红树林) 采集海洋漂浮腐枝枯叶和泥沙样品。样品采集后, 用冷藏箱低温保藏, 带回实验室再进行菌株分离。

1.3.2 样品真菌的分离。

1.3.2.1 腐枝枯叶的处理。 将采集回来的样品先用无菌水清洗数次后用剪刀剪成边长为 0.5 cm 的正方形小片, 然后分别用浓度 1% 的生汞浸泡 30 s, 浓度 75% 的酒精浸泡 45 s, 最后用无菌水清洗 3 次, 用无菌镊子将小片均匀地分布到培养皿上, 在平均每个培养皿上放置 6~7 个样品。将培养皿放置在 25 °C 恒温生化培养箱中培养 2~5 d, 直至长出菌落。

1.3.2.2 海水、泥沙的处理。 泥沙、海水直接用无菌生理盐水按 1:10 的比例稀释制成悬液便可, 稀释液涂布在平板上, 至培养箱中培养 2~5 d, 直至长出菌落。

1.4 海洋真菌的发酵产物抑菌作用的筛选

1.4.1 海洋真菌的发酵培养和提取物的制备。 从平板培养基中接种适量真菌到装有 40 ml 液体培养基的锥形瓶 (150 ml) 中, 于 25 °C、120 r/min 振荡培养 15 d。发酵液经冻融、研磨成匀浆后, 加入等体积的乙酸乙酯进行振荡萃取 3 次, 合并上层萃取液。萃取液用旋转蒸发仪在 40 °C 下减压浓缩后, 至真空旋转干燥仪上干燥后称量。根据质量的不同, 用适量的丙酮溶解后得到 10 mg/ml 样品待测物, 测试其活性。

1.4.2 海洋真菌提取物抑菌活性的测定。 海洋真菌抑菌活性的采用药敏纸片法^[8]。每张纸片加入 5 μl 的 10 mg/ml 代测药

作者简介 周松林 (1979-), 男, 湖南邵阳人, 博士研究生, 研究方向: 微生物学。

收稿日期 2014-12-24

品,对纸片加入 5 μ l 丙酮。试验结果重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 海洋真菌的分离 从海口沿海 3 个不同的生境中共分离得到 162 株海洋真菌。不同样品及生境分离得到的真菌数量见表 1。

表 1 海口沿海海洋真菌分离的分布情况

生境	泥沙、海水	腐枝枯叶	总计
海口西海岸沿海	24	82	106
南渡江出海口	6	16	22
演丰红树林	13	21	34

2.2 海洋真菌发酵产物的抑菌活性 162 株海洋真菌发酵粗提取物对 4 株病原细菌的抑制结果见表 2。在分离的所有海洋真菌中,只有 28 株海洋真菌代谢产物粗提取物对 4 种指示病原细菌均无抑制作用,占总数量的 17.28%,但有 42 株真菌的代谢产物对 4 种病原细菌均有一定的抑制作用,占其总菌株的 25.93%。其中,对金黄葡萄球菌物无明显抑制效果的为 51 例,有非常强的抑制效果的有 8 例(抑菌圈 ≥ 15 cm);对肺炎克雷氏伯菌无明显抑制效果的为 76 例,有非常强的抑制效果的有 9 例;对铜绿假单胞菌无明显抑制效果的为 73 例,有非常强的抑制效果的有 5 例;对大肠杆菌无明显

表 2 海洋真菌对 4 株病原细菌的抑制作用

序号	S.	K.	P.	E.	序号	S.	K.	P.	E.	序号	S.	K.	P.	E.
ZJ1	+	++	+	+	G22	+	+	+	-	M54	++	+	-	+
ZJ2	++	+	++	++	M1	+	-	+	+	M55	-	+	-	+
ZJ3	+	+	++	+	M2	++	++	-	++	M56	+	-	+	-
ZJ4	+	+	-	-	M3	++	-	++	++	M57	-	+	-	-
ZJ5	+++	-	-	+	M4	+	-	++	+	M58	++	+	+	+
ZJ6	++	+	++	+++	M5	+	+	+	+	M59	-	-	-	-
ZJ7	++	-	+	+	M6	+	-	+	++	M60	++	-	+	-
ZJ8	++	+++	-	-	M7	+	-	+	-	M61	++	++	-	++
ZJ9	+	-	+	++	M8	++	-	+	++	M62	-	-	-	-
ZJ10	++	-	+	+	M9	+	-	+	-	M63	++	++	+	+
ZJ11	+	-	-	+	M10	+	+	+	-	M64	+	++	++	+
ZJ12	+	-	-	-	M11	+	+	+	-	M65	++	+	+	-
ZJ13	++	++	++	+	M12	+	++	+	++	M66	++	+	+	-
ZJ14	+	++	+	-	M13	++	+++	-	++	M67	-	-	-	-
ZJ15	+++	++	-	++	M14	-	++	-	++	M68	++	+	+	+
ZJ16	++	++	-	-	M15	-	-	+	+	M69	-	-	-	-
ZJ17	+	+	++	-	M16	-	-	+	+	M70	-	-	-	-
ZJ18	+	+	+	+	M17	++	-	+	+	M71	-	-	-	+
ZJ19	+++	-	-	++	M18	-	++	+	+	M72	-	-	-	+
ZJ20	-	+++	++	-	M19	++	++	+	-	M73	-	-	-	-
ZJ21	++	-	-	+	M20	++	++	-	++	M74	++	+	+	+
ZJ22	++	++	-	++	M21	+	+	+	+	M75	+	++	+	++
ZJ23	++	++	+	++	M22	+++	++	+	++	M76	-	-	-	+
ZJ24	-	+	-	-	M23	-	+	+	+	M77	+++	++	+	+
ZJ25	-	++	-	-	M24	+	-	-	++	M78	+	++	++	+
ZJ26	+	-	++	+	M25	+++	++	+	+	M79	+	+	+	+
ZJ27	++	+	++	++	M26	+++	+++	-	++	M80	-	-	-	-
ZJ28	+	++	+++	++	M27	++	+	-	+	M81	-	-	-	-
ZJ29	++	+	++	-	M28	+	++	+	+	M82	-	-	-	-
ZJ30	+	+++	-	+	M29	+	-	+	++	M83	++	+	++	-
ZJ31	++	+++	+++	-	M30	+	+	+	+	M84	-	-	++	+
ZJ32	+	++	++	++	M31	+	+	+	+	M85	++	-	-	-
ZJ33	+	++	+++	+++	M32	-	-	-	-	M86	-	+	-	+
ZJ34	++	+	++	+	M33	+	+	-	-	M87	++	-	-	+
G1	+	-	+	-	M34	++	++	+	++	M88	+	-	-	+
G2	-	-	-	-	M35	+	++	+	-	M89	++	+	+	+
G3	-	-	-	-	M36	++	++	+	+	M90	-	-	-	-
G4	-	-	-	-	M37	+	++	++	++	M91	-	-	-	-
G5	++	+	-	+	M38	+	++	+	-	M92	-	-	-	-
G6	-	-	++	+	M39	+	++	+	+	M93	-	-	+	+
G7	+	-	+	-	M40	++	+++	++	+++	M94	-	-	-	-
G8	-	-	-	-	M41	-	-	-	-	M95	-	-	+++	-
G9	+	+	+	-	M42	-	-	-	-	M96	++	+	+	+++
G10	+	-	+	+	M43	-	-	-	-	M97	+	-	+	++
G11	+	-	-	-	M44	-	-	-	-	M98	+	-	-	+
G12	-	-	-	-	M45	-	-	-	-	M99	+	-	-	++
G13	+	-	-	+	M46	++	++	++	++	M100	++	++	++	++
G14	-	-	-	-	M47	-	+++	++	+++	M101	-	-	-	-
G15	++	+	+	-	M48	-	-	-	-	M102	-	-	-	-
G16	+++	+	+	+	M49	-	+	+	++	M103	+	+	-	+
G17	++	+	-	+++	M50	+	-	-	+	M104	-	-	-	-
G18	+	-	++	+	M51	+	+	-	+	M105	+	+	+++	+++
G19	++	-	+	+	M52	-	-	-	+	M106	-	++	++	+
G20	+	+	+	+	M53	++	-	-	+	空白	-	-	-	-
G21	+	+++	+	+++										

注:“-”:抑菌圈直径 < 6 cm;“+”:6 cm \leq 抑菌圈直径 < 10 cm;“++”:10 cm \leq 抑菌圈直径 < 15 mm;“+++”:抑菌圈 ≥ 15 cm。

抑制效果的为62例,有非常强的抑制效果的有6例。

3 讨论

从海口沿海3个不同生境中分离得到162株海洋真菌,其中海口西海岸沿线路径最长,包括沙滩、滩涂、海港,也是人口活动最多的地方,采集集的样品最多,分离的菌株也最多;南渡江是海南省最大的淡水河流,有不少文献报道淡水河进入大海的区域微生物数量和种类非常丰富^[1-3];演丰红树林在海口沿海线的东方,对于红树林来说,其真菌种类丰富,并且常常有新颖的活性化合物的报道^[6-7]。但是,研究中分离的海洋真菌数量并没有想象中的多,其原因部分是由于在同一样品相同(似)的菌株只分离1株;另外,分离的通用培养基可能对红树林和河流入海口的真菌分离效果不佳;三是采集的样品量太少等。

在分离的162株海洋真菌中,有28株海洋真菌代谢产物粗提取物对4种指示病原细菌均无抑制作用,占总数量的17.28%,其中沿海岸生境的有23株,入海口生境的占5株,分别占其总分离菌株数的21.70%、22.72%,而红树林分离到的34株真菌均至少对某一病原细菌有一定的抑制作用;在42株对4种病原细菌均有一定抑制作用的真菌中,红树林生境的有12株,西海岸生境的有27株,入海处生境的只有3株,分别占其分离总数的35.29%、25.47%和13.64%;在23株至少对1种病原菌有强烈抑制作用的(抑菌圈直径 ≥ 15 cm)海洋真菌中,红树林生境的为10株,西海岸沿线生境的为10株,如海口生境的为3株。这些表明从红树林分

离的真菌更多的具有抑菌作用,其次是分离来自西海岸沿线生境的真菌,入海口生境再次之。

从抑菌效果来看,有4株海洋真菌对4种病原菌都较强抑制效果(抑菌圈 ≥ 10 cm)。它们分别为M-22、M-40、M-46、M-100,其中菌株M-22发酵液对金色葡萄球菌有很强的抑制作用(抑菌圈 ≥ 15 cm),而菌株M-40对克雷氏肺炎菌和大肠杆菌的也有很强的抑制作用。有7株对至少2种指示病原菌有很强的抑制效果(抑菌圈 ≥ 15 cm)。它们分别为ZJ-31、ZJ-33、G-21、M-26、M-40、M-47、M-105。因此,这10株海洋真菌可以作为种子菌株,作为开发新的抗生素备选目标的可能,但其代谢产物需要进一步研究。

参考文献

- [1] KARL D M, LETELIER R. Marine Habitats, In: Moselio Schaechter, eds. Encyclopedia of microbiology, Third Edition [M]. Oxford, UK: Academic Press, 2009: 258-277.
- [2] 张晓华. 海洋微生物学[M]. 青岛: 海洋大学出版社, 2009: 1-15.
- [3] FLYNN E H. Cephalosporins and Penicillins [M]. NY: Academic Press, 1972: 972.
- [4] 郑维发. 真菌代谢产物的药物发现——资源、问题和策略[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 151-157.
- [5] BLUNT JW, COPP BR, KETZERS RA, et al. Marine natural products [J]. Nat Prod Rep, 2014, 31: 160-258.
- [6] BLUNT JW, COPP BR, KEYZERS RA, et al. Marine natural products [J]. Nat Prod Rep, 2012, 29: 144-222.
- [7] 赵成英, 朱统汉, 朱伟明. 2010-2013之海洋微生物新天然产物[J]. 有机化学, 2013, 33(6): 1195-1234.
- [8] NIU Y, NAN Y, YUAN L, et al. Study on antibacterial effect of medlar and hawthorn compound extract *in vitro* [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(3): 567-573.
- [9] reversion to fertility [J]. Genetics, 1993, 135: 869-879.
- [29] CHASE C D. Expression of CMS-unique and flanking mitochondrial DNA sequences in *Phaseolus vulgaris* L [J]. Curr Genet, 1994, 25: 245-251.
- [30] 杨光圣, 傅廷栋, 马朝芝, 等. 油菜波里马细胞质雄性不育恢复基因的筛选与遗传[J]. 中国农业科学, 1996(29): 17-22.
- [31] KOMORI T, OHTA S, MURAI N, et al. Map-based cloning of a fertility restorer gene, Rf-1, in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant J, 2004, 37: 315-325.
- [32] BROWN G G, FORMANOVA N, JIN H, et al. The radish Rfo restorer gene of *Ogura cytoplasmic* male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats [J]. Plant J, 2003, 35: 262-272.
- [33] DESLOIRE S, GHERBI H, LALOUI W, et al. Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide repeat protein family [J]. EMBO Rep, 2003, 4: 588-594.
- [34] KLEIN R R, KLEIN P E, MULLETT J E, et al. Fertility restorer locus Rf1 of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the collinear region of rice chromosome 12 [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111: 994-1012.
- [35] ZHANG J F, TURLEY R B, STEWART J M. Comparative analysis of gene expression between CMS-D8 restored plants and normal non-restoring fertile plants in cotton by differential display [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 553-561.
- [36] SMALL I D, PEETERS N. The PPR motif—a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins [J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25: 46-47.
- [37] AUBOURG S, BOUDET N, KREIS M, et al. In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants [J]. Plant Mol Biol, 2000, 42: 603-613.
- [38] LURIN C, ANDRÉS C, AUBOURG S, et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis pentatricopeptide* repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis [J]. Plant Cell, 16: 2089-2103.

(上接第3页)

- [17] 裴文锋. 哈克尼西棉细胞质雄性不育系和保持系花发育不同时期 microRNA 研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [18] WANG F, STEWART J M, ZHANG J. Molecular markers linked to the Rf2 fertility restorer gene in cotton [J]. Genome, 2007, 50(9): 818-824.
- [19] HE S, YU Z H, VALLEJOS C E, et al. Pollen fertility restoration by nuclear gene Fr in CMS common bean: an Fr linkage map and the mode of Fraction [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 1056-1062.
- [20] ZHUANG J Y, FAN Y Y, WU J L, et al. Localization of the restorer genes for WA-CMS in rice [J]. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(2): 129-134.
- [21] LI X Q, JEAN M, LANDRY B S, et al. Restorer genes for different forms of brassica cytoplasmic male sterility map to a single nuclear locus that modifies transcripts of several mitochondrial genes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(17): 10032-10037.
- [22] 马勇. 哈克尼西棉细胞质雄性不育系、保持系及恢复系花粉发育差异基因表达分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [23] 崔明晖. 棉花细胞质雄性不育相关基因分离及标记转化[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [24] 徐明良, 杨金水. 玉米T型胞质感病性及雄性不育的分子基础[J]. 遗传, 1995, 17(S1): 24-29.
- [25] CUI X Q, WISE R P, SCHNABLE P S. The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize [J]. Science, 1996, 272: 1334-1336.
- [26] KOIZUKA N, IMAI R, FUJIMOTO H, et al. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, orf687 that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosen radish [J]. Plant J, 2003, 34: 407-415.
- [27] ZABALETA E, MOURAS A, HERNOULD M, et al. Transgenic male-sterile plant induced by an unedited atp9 gene is restored to fertility by inhibiting its expression with antisense RNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 11259-11263.
- [28] JANSKA H, MACKENZIE S. Unusual mitochondrial genome organization in cytoplasmic male sterile common bean and the nature of cytoplasmic