

# 舟山群岛近海底栖真菌及其抗生活性初筛研究

王骁勇, 黄耀坚, 郑忠辉, 高亚辉, 宋思扬\*

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 对分离自舟山群岛海域海底 46 个沉积物样品中的丝状真菌进行种属鉴定, 及其代谢产物抗菌、细胞毒和乙酰胆碱酯酶抑制活性的检测. 结果显示: 舟山群岛海域海底沉积物中存在着丰富的真菌资源. 46 个沉积物样品中, 真菌含量最高可达到 2 250 CFU/g(样品). 在进行活性检测的 89 份真菌代谢产物中, 有 29.2% 的样品对一株或一株以上的指示细菌有不同程度的抑制作用; 各有 10% 左右的样品对 5 株植物致病真菌显示抑制作用, 有 49.4% 的样品对白色假丝酵母显示抑制作用, 但没有样品对黑曲霉有抑制作用; 在细胞毒实验中, 分别有 2 个、4 个和 12 个样品在浓度为 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 对 KB 细胞、Raji 细胞和 Hep G2 细胞的抑制率高于 50%; 有 55 个样品显示微弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性. 通过此次研究, 我们对舟山群岛海域的底栖真菌资源有了初步了解, 将有助于将来更全面深入的研究.

**关键词:** 海洋真菌; 抗菌活性; 细胞毒活性; 抑制乙酰胆碱酯酶

**中图分类号:** Q 939.92

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479(2006)04-0558-05

从上世纪 80 年代末期起, 海洋微生物的分离培养和代谢产物的研究成为海洋药物研究的热点. 但从现有的国内外的报道来看, 海洋微生物活性的研究主要集中在海洋细菌与放线菌上, 关于海洋真菌代谢产物的研究报道相对较少.

海洋真菌分布广泛, 在各种气候和盐浓度环境下均有出现, 能从海洋不同基质中找到, 如海洋浮木、海水浸泡的沼泽地、珊瑚、沙滩植物、红树林、海底沉积物、海洋动植物的体表和体内; 与细菌相比, 真菌代谢能力更强, 生命活动更复杂, 并且与海洋中动植物有着非常复杂的生态关系, 因而可能孕育着大量新型代谢产物. 从已分离的代谢产物成分来看, 海洋真菌产生的生物活性物质主要有萜类、肽类、生物碱、酮类和酯类化合物等, 分子较小, 结构与陆生真菌产生的化合物不同, 表现出其独特的活性, 多数具有抗细菌、抗真菌和细胞毒性. 最近有文献报道, 认为从海洋真菌分离出的次级代谢物中, 约有 70% ~ 80% 具有生物活性<sup>[1-5]</sup>. 因此, 海洋真菌很可能成为将来药物研发的一大来源, 具有很大的利用价值, 需要进行详细的研究.

现有的关于海洋真菌分离的报导多集中在共生真菌方面, 如藻类、鱼类以及红树林的共生真菌, 对海底

沉积物来源的真菌研究较少. 海底沉积物中的有机质含量高, 海洋真菌多喜欢吸附在海泥微颗粒上生长, 因此从海底沉积物中可能分离到较多真菌<sup>[5]</sup>. 舟山群岛海域是我国重要渔场, 位于长江入海口东南, 长年接受长江、钱塘江等河流注入, 同时台湾暖流和黄海沿岸流在此交汇, 渔汛期期间大量鱼类在此汇集, 使得其海底沉积物成分复杂, 有机质含量高, 适合真菌生长. 本实验对舟山群岛海域海底沉积物中的真菌资源进行了系统的调查, 包括种属鉴定和代谢产物活性检测, 认为该地区含有丰富的真菌资源, 为研究开发我国海洋微生物药用资源提供了科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 沉积物样品来源

采集自舟山群岛海域 8 个采样点(图 1), 共 46 份样品, 风干备用.

### 1.2 抗菌实验指示菌

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、白色假丝酵母 (*Candida albicans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 以及 5 株植物致病真菌玉蜀黍赤霉 (*Gibberella zeae*)、尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、刺盘孢 (*Colletotrichum lagenarium*)、大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)、寄生疫霉 (*Phytophthora parasitica* Dastur), 均为本实验室保存菌种.

### 1.3 肿瘤细胞株

收稿日期: 2005-07-07

基金项目: 国家“863”计划(2001AA620401), 国家“973”计划项目(2001CB409701), 福建省自然科学基金(C0210001)资助

作者简介: 王骁勇(1981-), 男, 硕士研究生.

\*通讯作者: sysong@jingxian.xmu.edu.cn

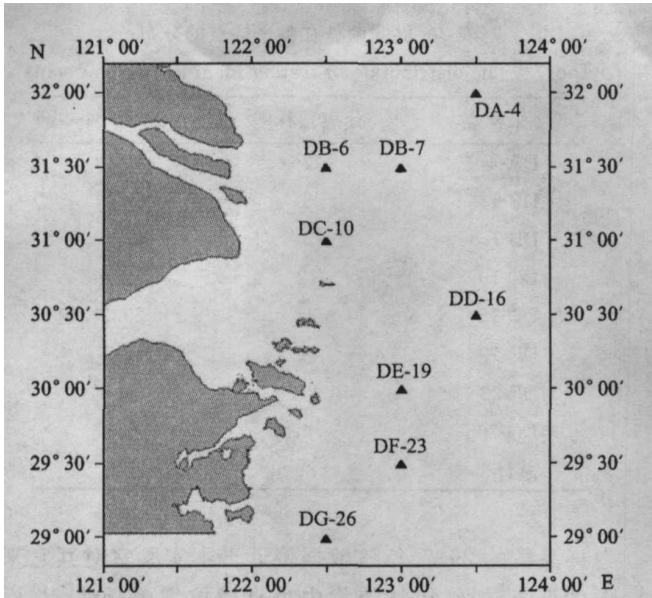


图1 舟山海域采样点

Fig. 1 The collection spots in Zhoushan Archipelago

人口腔样癌细胞 KB, 人 Burkitt's 淋巴瘤细胞 Raji, 人肝癌细胞 Hep G2, 均购于中科院上海细胞所.

#### 1.4 培养基

(1) 半海水 PD 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 淡水 500 mL, 海水 500 mL, 固体培养基加入 2% 琼脂. 121 °C 高压湿热灭菌 15 min.

(2) 牛肉膏蛋白胨培养基: 胰蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, 水 1 000 mL, pH 值 7.2~7.4. 固体培养基加入 2% 琼脂. 121 °C 高压湿热灭菌 15 min.

(3) 细胞培养基: RMPF1640 干粉 (Hyclone) 10.4 g, 溶于 1 L 双蒸水中, 加入 2 g NaHCO<sub>3</sub> 搅拌均匀, 溶解后封口, 4 °C 静置过夜, 使杂质自然沉淀, 加 10%~15% 已灭活 (56 °C 温浴 30 min) 的小牛血清 (Hyclone) 及 1% 三抗, 混匀后用 0.22 μm 孔径的无菌滤膜过滤除菌.

#### 1.5 菌株分离和代谢产物提取

用 5 mL 无菌水浸泡 0.05 g 沉积物样品, 取浸液 200 μL 涂布于半海水 PD 平板上, 放入 25 °C 培养箱培养, 菌落长出后, 挑取形态各异单菌落于 PD 斜面上, 于 25 °C 培养.

分离的菌株保存在半海水 PD 斜面上, 发酵前用相同斜面活化一次后, 接种至 200 mL 半海水 PD 液体培养基中, 于 25 °C, 120 r/min 的摇床振荡培养. 7 d 后取出, 滤去菌体, 滤液加等体积乙酸乙酯萃取, 有机相减压浓缩至干, 称量后用甲醇配成 10 mg/mL 的溶液.

#### 1.6 抗菌活性测试

用纸片法测量样品抗菌活性. 将已活化的指示细

菌制成细胞悬液, 混入 LB 培养基中 (终浓度 10<sup>6</sup> CFU/mL), 倾注法制成平板待用; 用无菌水洗涤指示真菌斜面, 得到孢子悬液, 涂布于 PD 平板待用 (终浓度为 10<sup>5</sup> CFU/mL). 用直径 5 mm 的三层滤纸片蘸取样品 (约 15 μL) 置于平板上, 以庆大霉素 (细菌) 和两性霉素 B (真菌) 标准纸片为阳性对照, 甲醇为阴性对照. 细菌生长 1 d, 真菌生长 3 d 后, 测量抑菌圈直径.

设定抑菌圈直径 8 mm 的样品为具有活性, 采用对半梯度稀释法测量最小抑菌浓度 MIC.

#### 1.7 细胞毒活性测试

采用 MTT 法<sup>[6]</sup> 检测样品的细胞毒性. 将生长状态良好的细胞用细胞培养基制成单细胞悬液, 计数后稀释成 60 个/μL, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 80 μL. 置 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 37 °C 培养 24 h 后加入经细胞培养基梯度稀释的样品 20 μL, 样品终浓度在 200~3.2 μg/mL 之间, 以顺铂为阳性对照, 继续培养 72 h 后取出, 加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μL, 37 °C 反应 3 h, 加入 100 μL 的 10% SDS-0.01 mol/L HCl, 37 °C 反应 8~12 h. 用酶标仪测量波长 590 nm 处的吸光度, 依照下式计算抑制率, 抑制率 50% 时的样品浓度值为 IC<sub>50</sub>.

抑制率 =

$$\frac{(\text{对照组 } OD \text{ 值} - \text{实验组 } OD \text{ 值})}{(\text{对照组 } OD \text{ 值} - \text{空白孔 } OD \text{ 值})} \times 100\%$$

#### 1.8 乙酰胆碱酯酶抑制活性测试

实验采用已改进的 Ellman 法<sup>[7-10]</sup> 测试样品的乙酰胆碱酯酶抑制作用. 试剂包括: (1) 缓冲液 A: 50 mmol/mL Tris-HCl, pH 8.0; (2) 缓冲液 B: 50 mmol/mL Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% 牛血清白蛋白; (3) 缓冲液 C: 50 mmol/mL Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mol/mL NaCl, 0.02 mol/mL MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; (4) 酶: V-s 型电鳗乙酰胆碱酯酶, 用缓冲液 B 配成 0.025 U/mL; (5) 标准样品: 毒扁豆碱, 用缓冲液 A 配成 1 μg/mL; (6) 底物: Acetylthiochoine iodide (ACTI), 用双蒸水配成 2.5 mmol/mL; (7) 显色剂: 5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 用缓冲液 C 配成 0.5 mmol/mL. 实验流程如下: 在酶标板上加样, 样品孔加入缓冲液 B 40 μL, 酶 20 μL, 待测样品 20 μL, 阴性对照孔加入缓冲液 B 60 μL, 酶 20 μL, 阳性对照孔加入缓冲液 B 40 μL, 酶 20 μL, 标准样品 20 μL, 空白孔加入缓冲液 B 80 μL, 37 °C 反应 15 min 后, 各孔加入底物 20 μL 和显色剂 100 μL, 立刻测 OD<sub>405</sub> ( ); 然后在 37 °C 下反应 30 min 后, 加入 50 μL 无水乙醇终止反应; 在 30 min 内测 OD<sub>405</sub> ( ). 按以下公式计算抑制率, 抑制率 50% 时的样品浓度值为 IC<sub>50</sub>.

抑制率 =

$$\left(1 - \frac{\text{样品 } OD_{405}(\quad) - \text{样品 } OD_{405}(\quad)}{\text{阴性 } OD_{405}(\quad) - \text{阴性 } OD_{405}(\quad)}\right) \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株分离和种属分布

各沉积物样品中真菌含量如表 1 所示. 在 46 个样品中, 真菌含量最高可达到 2 250 CFU/g(样品) (DG-26:0~2 cm), 但大部分样品的真菌含量在 500 CFU/g(样品) 以下. 较浅层泥样真菌含量较高, 随着深度增加, 真菌含量有缓慢下降的趋势. 比较同经度的 DG26、DB-6 和 DC-10 系列样品, 真菌含量有明显的由南向北递减的趋势, 同样的情况也出现在 DF-23、DE-19 和 DB-7 系列样品的比较中, 而 DG26 系列样品的真菌含量明显高于其他采样点同层次样品, 其原因可能与水温、水流等水文条件有关, 还需结合相关数据进行解释.

参照文献[11]以及本校微生物学教研室选编教材对所分离到的菌株进行分类, 其中, 青霉和曲霉占绝大部分, 与王书锦等<sup>[12]</sup>对辽宁近海地区海洋微生物资源的调查结果相似, 说明此类真菌在不同海域均有大量分布.

挑选来自同一采样点, 菌落形态特征不同的菌株, 进行代谢产物的活性测试. 共挑选出 89 株真菌, 其中, 青霉(*Penicillium* spp.) 61 株, 占菌株总数 68.5%; 曲霉(*Aspergillus* spp.) 18 株, 占菌株总数 20.2%; 其它菌株 10 株, 占菌株总数 11.2%. 各采样点挑选出的菌株数如表 2 所示.

### 2.2 抗菌活性测试

抗菌结果如图 2 所示. 在 89 个代谢物样品中, 有 26 个样品对一种或多种指示细菌显示出抑制活性, 占

表 2 供侧菌株在各采样点的分布

Tab. 2 The distribution of testing fungi in different spots

采样点	分离菌株数	比例/ %
DA-4	2	2.2
DB-6	5	5.6
DB-7	5	5.6
DC-10	12	13.5
DD-16	26	29.2
DE-19	12	13.5
DF-23	21	23.6
DG-26	6	6.7
总计	89	100

总样品数的 29.2%, 该数据接近于本实验室对其它来源的真菌, 如红树林植物内生真菌抗菌活性<sup>[13]</sup>, 以及王琳<sup>[14]</sup>对我国东海、黄海和太平洋西海域海洋真菌抗菌活性的研究结果. 统计 26 个样品相应菌株的种属分布, 有 75% 来自青霉, 17% 来自曲霉. 其中, 样品 PDA -1 抗菌谱较广, 对金黄色葡萄球菌的抑制作用最强, MIC 值达到 19.5 μg/mL, 对枯草芽孢杆菌的 MIC 值也达到 39.1 μg/mL, 对大肠杆菌的 MIC 值稍弱, 为 78.1 μg/mL; 样品 AA1-1 对枯草芽孢杆菌有相对较强的抑制作用, MIC 值达到 19.5 μg/mL.

样品对真菌的抗菌效果差别较大. 有 44 个样品对白色假丝酵母有抑制作用, 占总样品数 49.4%, 但抑制作用弱, MIC 值均大于 625 μg/mL; 无样品对黑曲霉有抑制作用; 各有 10% 左右的样品对 5 株植物致病真菌有抑制作用, 其中, 对玉蜀黍赤霉、刺盘孢和寄生疫霉有活性的样品较少且活性不高, 而对于尖镰孢菌和大丽轮枝菌有抗性的样品较多, 特别是对大丽轮枝菌, 有 3 个样品 (PDA -9、PDA -6、PDA -2-2) 的

表 1 各沉积物真菌数量的比较

Tab. 1 The comparison of fungi number in different sediment samples

站 位	纬度 N	经度 E	层次/ cm											
			0~2	2~4	4~6	6~8	8~10	10~20	20~30	30~40	50~60	80~90	90~100	
DA-4	32°00'	123°30'	700	325	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DB-6	31°30'	122°30'	-	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DB-7	31°30'	123°00'	300	200	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
DC-10	31°00'	122°30'	325	400	150	200	275	-	75	125	-	-	-	-
DD-16	30°30'	123°30'	750	325	350	450	400	200	-	-	-	-	-	-
DE-19	30°00'	123°00'	-	-	275	400	200	125	225	50	-	-	-	-
DF-23	29°30'	123°00'	850	400	450	125	100	150	-	-	-	-	-	-
DG-26	29°00'	122°30'	2250	1250	850	1500	750	475	-	650	300	300	550	-

说明: "-" 表示未获得该处沉积物样品.

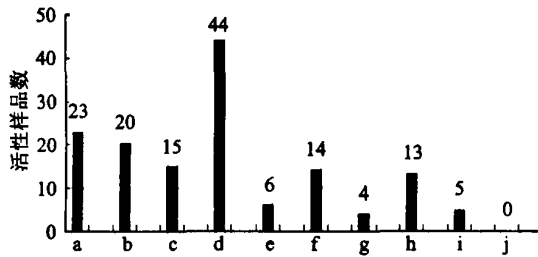


图2 抗细菌/真菌活性代谢产物数

a. 枯草芽孢杆菌; b. 大肠杆菌; c. 金黄色葡萄球菌; d. 白色假丝酵母; e. 玉蜀黍赤霉; f. 尖镰孢菌; g. 刺盘孢; h. 大丽轮枝菌; i. 寄生疫霉; j. 黑曲霉

Fig. 2 The number of antibacterial/antifungi metabolite

MIC 小于  $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 显示出相对较强的活性。

### 2.3 细胞毒测试

我们采用 MTT 法检测了样品对 KB 细胞、Raji 细胞和 Hep G2 细胞的抑制作用。结果显示, 分别有 2、4、12 个样品对 KB、Raji、Hep G2 的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 低于  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  (图 3)。其中, G26-4-1 (5) 对 3 种细胞都有较强抑制作用, 对 3 种细胞的  $IC_{50}$  分别达到 12.5、6.3、6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

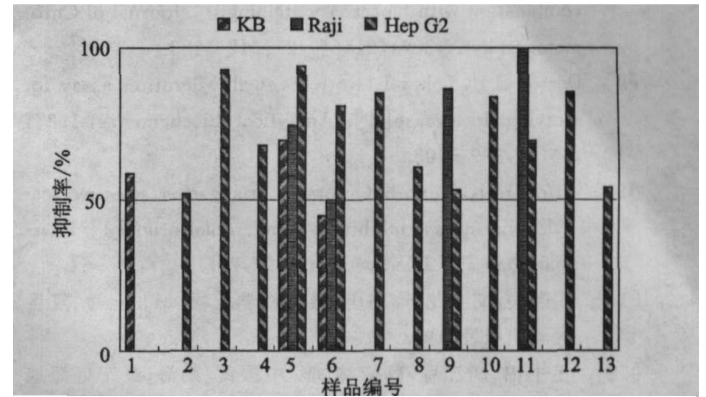
### 2.4 抑制乙酰胆碱酯酶抑制活性测试

实验测试了样品对乙酰胆碱酯酶的抑制作用。结果未发现具有强抑制作用的样品, 所有样品在稀释 100 倍 (终浓度  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 后, 均不显示抑制作用。

## 3 讨论

本实验选择舟山群岛海域海底沉积物作为研究材料, 该地区环境复杂, 营养物质来源多样, 可能有大量真菌生长。研究发现, 该地区确实含有大量真菌, 特别是南部海域, 如 DG26 系列, 其表层含菌量可达到  $2\ 250 \text{CFU}/\text{g}$  (样品)。但考虑实验室采用的分离条件和培养基选择均较为单一, 无法模拟海底特殊的生存环境以及营养组成, 将有大部分真菌无法分离得到, 因而该地区的真菌含量将远大于实验数据<sup>[15]</sup>。因此, 舟山群岛海域的真菌资源还需要更加深入的研究。

据估计, 海洋真菌至少有 1 500 种, 到 2000 年为止, 被描述过的高等海洋真菌有 444 种, 有 177 属 360 种属于子囊菌类, 51 属 74 种属于半知菌 (包括青霉和曲霉), 海洋子囊菌是海洋真菌的主体<sup>[16]</sup>。但此次分离到的菌株中, 绝大多数是青霉和曲霉, 相反种类最多的子囊菌却不多见, 这可能与分离地点的选择有关, 子囊菌通常生长在浅水中, 多见于降解的藻体和其它含纤维素的基质中<sup>[17]</sup>, 海底环境以及沉积物所含的营养成

图3 样品终浓度  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  时对肿瘤细胞的抑制率

1. AA-1; 2. AA2-2; 3. AA3-1; 4. AA3-2; 5. G26-4-1; 6. PDA -3-3; 7. PDA -3; 8. PDA -6; 9. PDA -7; 10. PDA -9; 11. PDA -1; 12. PDA -2-1; 13. PDA -2-1

Fig. 3 The inhibition rate of metabolite to KB, Raji and Hep G2 in  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 

分可能不适和子囊菌生长, 而青霉和曲霉却容易发现。

在用于活性检测的 89 份代谢产物样品中, 有 69.6% 的样品显示出各种生物活性, 显示出海洋真菌作为药用资源的巨大潜力。但这些菌株均匀分布于 8 个采样点, 无明显的地域差别。因此, 大范围采样将有助于提高活性产物的发现机率。

### 参考文献:

- [1] Wallace R W. Drugs from the sea: harvesting the results of aeon of chemical evolution [J]. Molecular Medicine Today, 1997, 3(7): 291 - 295.
- [2] Pawlik J R. Marine invertebrate chemical defenses [J]. Chemical Reviews, 1993, 93(5): 1911 - 1922.
- [3] Scheur P J. Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential [J]. Science, 1990, 248(4952): 173 - 177.
- [4] 程元荣, 郑卫. 微生物活性物质的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(10): 632 - 640.
- [5] 姜广策, 姚汝华, 林永成. 海洋半知类真菌次级代谢物研究概况 [J]. 微生物学杂志, 2001, 21(9): 41 - 44.
- [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 65(1 - 2): 55 - 63.
- [7] 张决. 海藻真菌活性菌株的初筛及 3 株海洋真菌次级代谢产物的初步研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2004.
- [8] In Kyung Rhee, Van de Meent M, Ingkaninan K, et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amarillidaceae using silica gel thin-layer chromatography in

- combination with bioactivity staining[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 915(1 - 2): 217 - 223.
- [9] Doctor B P, Toker L, Roth E, et al. Microtiter assay for acetylcholinesterase [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166(2): 399 - 403.
- [10] Otoguro K, Kuno F, Omura S. Arisugacins, selective acetylcholinesterase inhibitors of microbial origin[J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 1997, 76(1 - 3): 45 - 54.
- [11] 祖若夫, 胡宝龙, 周德庆. 微生物学教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1993.
- [12] 王书锦, 胡江春, 薛德林, 等. 中国黄、渤海、辽宁近海地区海洋微生物资源的研究[J]. *锦州师范学院学报: 自然科学版*, 2001, 22(1): 1 - 5.
- [13] 林昕, 黄耀坚, 郑忠辉, 等. 海洋木栖真菌抗菌活性的初步研究[J]. *台湾海峡*, 2004, 23(3): 308 - 313.
- [14] 王琳. 海洋活性真菌和微生物抗真菌活性的初步研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2003.
- [15] 杨道茂, 欧阳明安, 刘建福, 等. 海洋真菌的分离研究[J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2004, 26(6A): 79 - 81.
- [16] Hyde K D, Sarma V V, Jones E B G. *Marine Mycology - A Practical Approach* [M]. Hongkong: Fungal Diversity Press, 2000: 172 - 204.
- [17] 李越中, 陈琦. 海洋微生物资源多样性[J]. *生物工程进展*, 1998, 118(4): 34 - 40.

## Study on Benthic Fungi from Sediments of Zhoushan Archipelago and Antibiosis Screen

WANG Xiao-yong, HUANG Yao-jian, ZHENG Zhong-hui,  
GAO Ya-hui, SONG Si-yang\*

(School of life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract :** Fungi from 46 sediment samples of Zhoushan Archipelago were categorized, and the activity of antimicrobial, antitumor and the anti-AchE of their metabolite were tested. Results indicated: fungi resource in sediments of Zhoushan Archipelago is abundant. In 46 sediments, the highest fungi content reached to 2 250 CFU/g, and most of them were belonged to genus *Penicillium* and *Aspergillus*. According to samples they were isolated from and culture characters, 89 fungi were chosen to ferment, and their metabolites were used to antibiosis test. In these metabolites, 29.2% showed inhibition to one or more indicator bacteria strains; There are 10% samples show inhibition to each of five nosogenic fungi strains, and 49.4% to *Candida albicans*, but no one to *Aspergillus niger*; In cytotoxic test by MTT method, there are 2, 4, 12 samples inhibition rate to KB, Raji and Hep G2 respectively higher than 50% in 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . In anti-AchE test, though 55 samples show inhibition, their activities were very weak, and do not show inhibition below 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . In this study, the profile of fungi resource in the Zhoushan Archipelago was obtained, and it would be aid to further research.

**Key words :** marine fungi; antimicrobial activity; cytotoxic activity; anti-AchE activity