

# 青海盐湖嗜盐微生物类群及 F16 菌株生长特性和抗菌、抗肿瘤活性\*

叶央芳 严小军\*\* 黄晓春 陈 焯 陈海敏 朱世华

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 宁波 315211)

**【摘要】** 从青海盐湖底泥中分离出 45 株嗜盐微生物. 其中, 丝状真菌 F16 的抗菌和抗肿瘤活性最强, 其发酵液的乙酸乙酯粗提物能抑制 4 种细菌的生长, 尤其对大肠杆菌的抑制作用最强, 具有较强的细胞毒活性, 当粗提物浓度为  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  时对肝癌细胞 BEL7402 的抑制率可达 76.91%. F16 菌株的最适生长温度为  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 培养基盐度升高, 对 F16 的抑制性增强, 当盐度超过 15% 时, F16 不生长; 在 pH 值为 5~9 范围内, F16 生长良好.

**关键词** 嗜盐微生物 抗菌 抗肿瘤 盐湖

文章编号 1001-9332(2006)10-1996-03 中图分类号 Q938 文献标识码 A

**Halophilous microbial groups in saline lake of Qinghai and the growth characteristics and anti-microbial and anti-tumor activities of F16.** YE Yangfang, YAN Xiaojun, HUANG Xiaochun, CHEN Ye, CHEN Haimin, ZHU Shihua (College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China). - Chin. J. Appl. Ecol., 2006, 17(10): 1996 ~ 1998.

A total of forty-five halophilous microorganisms were isolated from the sediment of saline lake in Qinghai Province, among which, filamentous fungus F16 showed the highest activity of anti-microorganism and anti-tumor. The ethyl acetate extract of F16 culture filtrate showed a strong cytotoxicity, and could inhibit the growth of four kinds of bacteria, especially *Escherichia coli*. When the concentration of the crude extract was  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , the inhibition rate to liver cancer cell BEL7402 reached 76.91%. The optimal temperature for F16 growth was  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ , and the increase of salt concentration in media would inhibit its growth. When the concentration of salt surpassed 15%, F16 could not survive. F16 grew well when the pH value ranged from 5 to 9.

**Key words** Halophilous microorganism, Anti-microorganism, Anti-tumor, Saline lake.

## 1 引 言

盐湖广泛分布于世界各地,是嗜盐微生物高度集中的极端环境<sup>[2]</sup>. 目前重点被研究的盐湖有美国的大盐湖、肯尼亚的死海和 Magadi 湖<sup>[6]</sup>. 我国新疆维吾尔自治区和青海省也有大量的盐湖分布. 研究表明,盐湖中微生物多样性极为丰富,存在着大量高密度的未知微生物资源<sup>[3,4,16,18]</sup>. 嗜盐菌具有稳定的嗜盐结构、功能和遗传基因,从而具有极为特殊的生理结构和代谢机制,可产生许多具有特殊性质的生物活性物质<sup>[8,10,11,14,17]</sup>. 人们研究这些微生物的最主要目的在于: 1) 寻找天然生物活性物质; 2) 使其变成合成新化合物的重要原料资源<sup>[1,7,9,12,22]</sup>. 现已发现,有上百株极端嗜盐古细菌可以产生嗜盐菌素,有些嗜盐菌能产生抗生素. 例如, *Pelagibacter variabilis* 发酵后可产生一组吩嗪类化合物 Pelagiomycins A~C, 其中 A 对宫颈癌 Hela 细胞和 BALB3T3 细胞有明显的毒性; 嗜盐菌尤其是嗜盐藻类还可以产生胡萝卜素,而胡萝卜素是强力抗氧化剂,具有抗癌、抗心血管疾病和抗白内障的功能<sup>[5]</sup>. 本文报道青海盐湖嗜盐微生物类群及 F16 菌株的生长特性和抗菌、抗肿瘤活性的初步研究.

## 2 材料与方 法

### 2.1 供试材料

土壤样品采自青海省盐湖底泥. 分离培养基(PYG)的组成成分: 蛋白胨 5.0 g, 酵母膏 1.0 g, 葡萄糖 1.0 g,  $\text{FePO}_4$

0.1 g, 海水 1 000 ml, pH 7.2~7.4. 配制固体培养基时另加入 2% 琼脂.

### 2.2 试验方法

**2.2.1 嗜盐微生物的分离及类群鉴定** 称取 5 g 底泥, 加入 45 ml 无菌海水, 振荡 30 min 后静置 10 min, 吸取 100  $\mu\text{l}$  上清液, 接种到 PYG 培养基上, 在  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  培养 3 d 后挑取单菌落, 在平板划线多次, 直至纯化. 对具有良好抗菌和抗肿瘤活性的 1 株真菌(F16)进行形态特征观察. 用光学电子显微镜直接观察菌丝特征, 用扫描电镜观察菌丝的细微结构.

**2.2.2 菌株培养液粗提物的制备** 纯化菌株活化 2 d 后, 接种于装有 300 ml PYG 液体培养基的三角瓶中, 在  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  摇床上 ( $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 培养 7 d. 培养液离心 ( $5 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 30 min, 除去菌体, 用 100 ml 乙酸乙酯提取上清液 3 次, 最后合并乙酸乙酯, 并于  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  蒸干.

**2.2.3 抗菌活性筛选** 抗菌活性筛选采用琼脂扩散法, 方法参见文献<sup>[19]</sup>. 试验指示菌为: 大肠杆菌 CMCC (B) 44102 (*Escherichia coli*), 枯草芽孢杆菌 CMCC (B) 63003 (*Bacillus subtilis*), 金黄色葡萄球菌 CMCC (B) 26001 (*Staphylococcus aureus*), 根瘤土壤杆菌 AS1. 1416 (*Agrobacterium tumefaci-*

\* 国家自然科学基金项目(20472040)、教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NECT-04-0555)、宁波大学科研基金项目(2004617)和宁波大学人才基金资助项目.

\*\* 通讯联系人. E-mail: yanxiaojun@nbu.edu.cn  
2005-09-30 收稿, 2006-07-26 接受.

ciens), 酿酒酵母 ACCC2.1882 (*Saccharomyces cerevisia*), 均购自中国科学院微生物研究所。

**2.2.4 细胞毒筛选** 细胞毒筛选采用 MTT 法, 方法参见文献<sup>[13]</sup>。本试验以人胃癌细胞 BGC-823、人子宫颈癌细胞 Hela 和人肝癌细胞 BEL7402(购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所) 作为目标细胞, 培养基为含 10% 小牛血清 (bovine calf serum, BCS) 的 1640 培养基。

**2.2.5 F16 菌株的温度、盐度和 pH 耐受试验** 温度和 pH 试验方法参见文献<sup>[13]</sup>, 试验温度分别为 4 °C、15 °C、25 °C 和 35 °C, pH 分别为 5、6、7、8、9、10、11 和 12。盐度试验方法如下: 用 NaCl 把 PDA 培养基盐度分别调节至 0、2.5%、5%、10%、15%、20%、25% 和 30%, 121 °C、高压下灭菌 20 min, 把测试菌株的菌片接种到不同盐度的 PDA 培养基平板中央, 25 °C 下培养 2 周, 测量菌落直径。每种处理重复 3 次。

### 3 结果与分析

#### 3.1 嗜盐微生物的分离及类群鉴定

从底泥样品中共筛选到 45 株菌株, 其中细菌 27 株, 真菌 16 株, 放线菌 2 株。有 18 株菌株显示了不同程度的抗菌和抗肿瘤活性。对其中 1 株活性最高的真菌 F16 进行了进一步的分析鉴定。结果发现, F16 菌株在 30 °C 的 PDA 培养基上培养 3 d 后, 菌落呈绒絮状, 气生菌丝发达, 菌落正面纤毛状白色菌丝向四周辐射状蔓延; 菌落丘状隆起, 初白色, 以后逐渐变成灰黑色, 但菌落背面呈黑色, 分泌无色水珠。在 PYG 培养基上形成的菌落质地类似于 PDA 培养基上的, 但菌落保持白色, 不变黑, 背面分泌红色色素。菌丝无色、细长 (宽 1 ~ 2 μm)、具隔膜, 分枝呈 Y 型或直角, 分枝与主干相连处略呈缢缩。菌丝顶端无隔, 分枝单生或轮生, 菌丝细胞形态多样。在电镜下可观察到该菌的有性繁殖方式, 即通过菌丝融合, 两根菌丝之间可多点融合, 同一菌丝也可与不同菌丝同时融合, 未观察到有性孢子 (图 1)。按照 Ainsworth 分类系统<sup>[21]</sup>, 将 F16 菌株归入丝孢纲, 丝孢目, 丛梗孢科。

#### 3.2 F16 菌株的抗菌活性和抗肿瘤活性

抑菌试验表明, F16 菌株能抑制除酿酒酵母之外的 4 种指示菌。F16 菌抑制大肠杆菌的能力最强, 抑菌圈直径达到 12 mm; 抑制金黄色葡萄球菌能力稍弱, 但抑菌圈直径也达到 8 ~ 10 mm; 对根瘤土壤杆菌的抑制作用最弱 (表 1)。

用改良的 MTT 法对 F16 菌株粗提物的细胞毒活性进行了检测, 结果表明其粗提物具有很强的细胞毒活性 (表 2)。F16 菌株粗提物对肝癌细胞的抑制活性最强, 3 个试验浓度都能强烈抑制细胞的生长, 而且低浓度粗提物对细胞的抑制作用并未减弱, 反而增强, 说明粗提物对 BEL7402 的毒性很大。200 μg · ml<sup>-1</sup> 的粗提物对 BGC-823 的抑制率最大, 达到 88.45%, 但随着试验浓度的减小, 粗提物对该细胞的抑制作用也减小。粗提物对 BGC-823 的抑制作用有明显的浓度差异, 所采用的 3 个试验浓度都能抑制 50% 的细胞生长。粗提物对 Hela 细胞的抑制性最弱, 仅有 100 和 200 μg · ml<sup>-1</sup> 的粗提物能抑制 50% 的细胞生长。

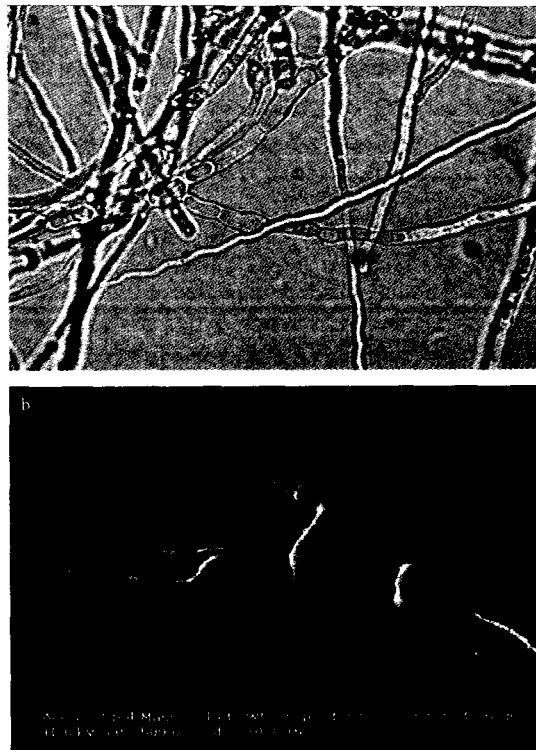


图 1 F16 菌株的菌丝体 (a, 400 x) 和菌丝融合 (b, 5 000 x)  
Fig.1 Morphology of mycelium (a, 400 x) and mycelium fission (b, 5 000 x) of strain F16.

表 1 F16 菌株乙酸乙酯粗提物与氯霉素的抑菌活性比较  
Table 1 Comparison of antibiotic activity of crude strain F16 ethyl acetate extract and chloramphenicol (mm, ±SD)

菌株 Strain	抑菌活性 Antibiotic activity	
	F16 菌株乙酸乙酯粗提物 <sup>1)</sup>	氯霉素 Chloramphenicol
大肠杆菌 <i>E. coli</i> CMCC 44102	12.31 ± 0.67	15.12 ± 1.29
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> CMCC 63003	11.72 ± 1.01	14.35 ± 1.60
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> CMCC 26001	9.26 ± 0.78	14.18 ± 0.98
根瘤土壤杆菌 <i>A. tumefaciens</i> AS1.1416	7.53 ± 0.24	13.93 ± 0.54
酿酒酵母 <i>S. cerevisia</i> ACCC2.1882	6.22 ± 0.36	0

1) Ethyl acetate extract of strain F16.

表 2 F16 菌株乙酸乙酯粗提物的抗肿瘤活性  
Table 2 Anti-tumor activity of crude ethyl acetate extract of strain F16 (±SD)

粗提物浓度 Concentration of crude extract (μg · ml <sup>-1</sup> )	抑制率 Rate of inhibition (%)		
	BEL7402	BGC-823	Hela
50	76.91 ± 0.77	63.07 ± 1.78	17.64 ± 1.38
100	73.80 ± 1.33	66.96 ± 2.13	56.16 ± 2.46
200	73.05 ± 2.15	88.45 ± 0.65	65.66 ± 0.81

#### 3.3 温度、盐度和 pH 对 F16 菌株菌丝生长的影响

试验结果表明, F16 菌株对培养温度较灵敏, 4 °C 时生长缓慢, 35 °C 时不能生长, 但在 15 °C 和 25 °C 时菌落直径差异较小, 最适宜生长温度为 15 °C 左右 (表 3)。

从盐度试验可以看出, 随着盐度的增加, F16 菌株的菌落直径随之减小。当盐度超过 15% 时, F16 菌株停止生长。

表3 不同培养温度和盐度下 F16 菌株的菌落直径  
Table 3 Colony diameter of strain F16 on plates under different incubation temperatures and salt concentrations

培养温度 Incubation temperature (°C)	菌落直径 Colony diameter (mm, ±SD)	盐度 Salt concentration (%)	菌落直径 Colony diameter (mm, ±SD)
4	17.67 ± 2.08	0	65.30 ± 0.50
15	66.67 ± 2.02	2.5	62.10 ± 2.62
25	63.33 ± 2.08	5	36.30 ± 0.30
35	0	10	17.77 ± 0.70
		15 ~ 30	0

由图2可知,在试验的pH范围内,F16菌株都能生长,但pH在5~9之间菌丝生长良好,而pH达到10以上时,菌落直径显著减小,pH为12时最小,为33.47 mm。

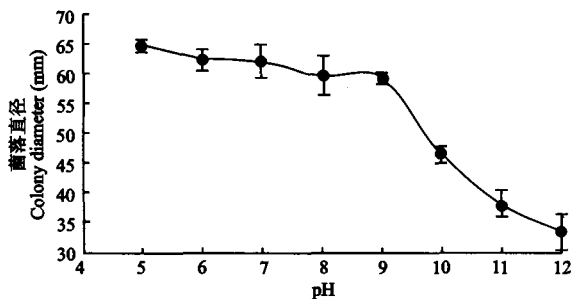


图2 培养酸碱度不同时 F16 菌株的菌落直径  
Fig. 2 Colony diameter of strain F16 on plates with different pH values.

#### 4 讨论

本试验利用传统的分离方法,从青海盐湖底泥样品中筛选到可培养微生物45株,其中细菌27株,真菌16株,放线菌2株。研究表明,可培养微生物仅占样品微生物总量的1%左右<sup>[1]</sup>。因此,盐湖底泥中应有更为丰富的微生物类群。如何研究、发掘这些未知的微生物世界,为微生物资源的开发利用提供新菌源,已是众所关注的研究热点。

极端环境中的嗜盐微生物经过长期的进化选择,菌体内已形成了稳定的能适应极端环境的特殊结构、性能和遗传基因,从而能产生出特殊活性物质<sup>[20]</sup>。本试验也证实了这一观点,从青海盐湖底泥中筛选到18个具有不同程度的抗菌和抗肿瘤活性的菌株,占总筛选到菌株的40%;在分离纯化活性物质的实验中发现,F16菌株分泌的主导物质具有比粗提物更强的生物活性。目前,从盐湖中分离筛选具有抗菌和抗肿瘤活性微生物的研究在国内外还鲜见报道,因此,从盐湖微生物中寻找天然生物活性物质是生物学家和药物学家探索的又一新途径。

#### 参考文献

- Aguilar A. 1996. Extremophile research in the European Union: From fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiol Rev*, **18**: 89 ~ 92
- Burns DG, Camakariz HM, Janssen PH, et al. 2004. Cultivation of Walsby's square haloarchaeon. *FEMS Microbiol Lett*, **238**: 469 ~ 473
- Cai L-H (柴丽红), Cui X-L (崔晓龙), Peng Q (彭谦), et al. 2004. Bacterial diversity of two salt lakes in Qinghai. *Acta Mi-*

- crobiol Sin (微生物学报), **44**(3): 271 ~ 275 (in Chinese)
- Cai L-H (柴丽红), Wang T (王涛), Cui X-L (崔晓龙), et al. 2003. A primary study of 16 strains in Keke Salt Lake by ARDRA and phylogenetic analysis. *J Yunnan Univ (Nat Sci)* (云南大学学报·自然科学版), **25**(6): 541 ~ 544 (in Chinese)
- Gu J-F (顾觉奋), Luo X-G (罗学刚). 2003. The active substances produced by extremophiles. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), **1**(4): 252 ~ 256 (in Chinese)
- Hacene H, Rafa F, Chebhouni N, et al. 2004. Biodiversity of prokaryotic microflora in El Golea Salt Lake, Algerian Sahara. *J Arid Environ*, **58**: 273 ~ 284
- Kis-Papo T, Oren A. 2000. Halocins: Are they involved in the competition between halobacteria in saltern ponds. *Extremophiles*, **4**: 35 ~ 41
- Liu A-M (刘爱民). 2002. Study advance on the halophile. *J Anhui Normal Univ (Nat Sci)* (安徽师范大学学报·自然科学版), **25**(2): 181 ~ 184 (in Chinese)
- Liu Q-Y (刘全永), Hu J-C (胡江春), Xue D-L (薛德林), et al. 2002. Bio-active substances derived from marine microorganisms. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **13**(7): 901 ~ 905 (in Chinese)
- Madem D, Ebel C, Zaccari G. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, **4**: 91 ~ 98
- Maravech M, Frolov F, Gloss LM. 2000. Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt. *Biophys Chem*, **86**: 155 ~ 164
- Margesin R, Schinner F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, **5**: 73 ~ 83
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*, **65**: 55 ~ 63
- Oren A. 2000. Biological processes in the Dead Sea are influenced by short-term and long term salinity changes. *Arch Hydrobiol Spec Issues Adv Limnol*, **55**: 531 ~ 542
- Shang H-S (商鸿生), Yang J-R (杨家荣), Zhao X-M (赵小明). 1998. A comparative study on the pathogen of *Verticillium* wilt of alfalfa and other *Verticillium* species. *Acta Pratacul Sin* (草业学报), **7**(4): 32 ~ 37 (in Chinese)
- Shentu Q-C (申屠青春), Dong S-L (董双林), Zhao W (赵文), et al. 2000. Effects of salinity and alkalinity on plankton and water chemical factors. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **11**(3): 449 ~ 454 (in Chinese)
- Tehei M, Franzetti B, Maurel MC, et al. 2002. The search for traces of life: The protective effect of salt on biological macromolecules. *Extremophiles*, **6**: 427 ~ 430
- Torres RT, Berlinck RGS, Nascimento GGF, et al. 2002. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicol*, **40**: 885 ~ 891
- Xu L-H (徐丽华), Li W-J (李文均), Cui X-L (崔晓龙), et al. 2003. Discovery of a vast amount of unknown actinomycetes from extreme environments in Xinjiang and Qinghai Provinces, China. *J Yunnan Univ (Nat Sci)* (云南大学学报·自然科学版), **25**(3): 283 ~ 292 (in Chinese)
- Zhang B-T (张波涛), Liao J-L (缪锦来), Li G-Y (李光友), et al. 2004. Research advances in the study of active substances from polar microorganism. *Mar Sci* (海洋科学), **28**(2): 58 ~ 63 (in Chinese)
- Zhang J-Z (张纪忠). 1990. *Microbial Taxonomy*. Shanghai: Fudan University Press. (in Chinese)
- Zheng L (郑立), Lin W (林伟), Yan X-J (严小军), et al. 2004. A primary study on antimicrobial and cytotoxic activity of marine bacteria. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), **15**(9): 1633 ~ 1636 (in Chinese)

作者简介 叶央芳,女,1974年生,博士,助理研究员。主要从事应用微生物方面的研究,已发表论文20篇。Tel: 0574-87600458; E-mail: yeyangfang@yahoo.com.cn

责任编辑 梁仁禄