

海洋真菌 ZJ27 次级代谢产物的抑菌活性的研究

肖碧红¹, 陈彬², 雷晓凌¹, 余志刚², 李学恭¹, 徐佳¹

(1. 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524025; 2. 中山大学 化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 对从南海海藻内生真菌 ZJ27 次级代谢产物中分离得到的 5 种化合物进行抑菌活性的研究, 采用 96 孔板法测定化合物对蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、白色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、金黄色葡萄球菌等 6 种细菌的抑制活性, 并用生长速率法测定化合物对黑曲霉、尖孢镰刀菌、立枯丝核菌和白色念珠菌等 4 种真菌的抑制活性。化合物对上述 6 种细菌均有不同的抑制作用, 其中化合物 1 对枯草芽孢杆菌、白色葡萄球菌和藤黄八叠球菌有很好的抑制作用, MIC 值分别为 0.1、0.2、0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 。化合物 1 和 2 对黑曲霉、尖孢镰刀菌、立枯丝核菌和白色念珠菌也有很好的抑制作用, 化合物 1 对这 4 种真菌的 IC_{50} 分别为 15.06、3.09、3.68、8.19 $\mu\text{mol/mL}$, 化合物 2 相应的 IC_{50} 为 22.28、21.32、8.18、21.75 $\mu\text{mol/mL}$ 。化合物 1 和 2 作为天然抗菌物质, 具有广谱抑菌效果, 具有较高的应用潜力和综合开发前景。

关键词: 海洋真菌; 次级代谢产物; 抑菌活性

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)03-0095-05

海洋微生物已被证明是丰富的活性代谢产物的新源泉。海洋真菌作为海洋微生物一大类群, 近年来引起了人们的广泛关注。从海洋真菌的代谢产物中不仅得到许多结构新颖的化合物, 而且发现了不少化合物具有良好的药理活性。海洋活性物质抑菌性的研究, 从 20 世纪 40 年代就拉开了序幕, 到八九十年代, 随着海洋生物技术的发展, 人们从海洋细菌、放线菌和真菌等微生物中获取的抑菌活性物质日益增多^[1]。

真菌 ZJ27 分离自广东湛江南海沿海海藻, 鉴定为青霉属, 对 ZJ27 进行扩大培养, 通过多种色谱技术结合分离纯化其代谢产物, 得到 5 个化合物, 其结构如图 1 所示^[2]。本研究报道 5 种化合物对 6 种细菌, 以及化合物 1 和 2 对 4 种真菌的抑菌活性。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和仪器

供试菌种: 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*)、藤黄八叠球菌(*Sarcina luteus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和白色念珠菌(*Candida albicans*), 购于广东微生物研究所, 现保存在中山大学化学与化学工程学院广东省生物功能分子重点实验室。

主要仪器: 上海博迅生化培养箱(SPX-250B-Z 型)、雷勃 Labsystems 酶标仪(MK3)、苏净集团超净工作台(SW-CJ-2FD)。

溶剂: 二甲基亚砜(DMSO; 广东光华化工厂, 分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 抑制细菌活性的测定

样品溶液的制备: 根据化合物分子量的大小, 称取适量的样品, 用 DMSO 溶解配置 20 $\mu\text{mol/mL}$ 的样品溶液 1 mL。

收稿日期: 2011-07-25; 修回日期: 2011-09-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(20972197), 广东省自然科学基金项目(9151027501000055), 广东省科技计划项目(2010B030600004), 广东海洋大学基金项目(E09095)

作者简介: 肖碧红(1986-), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋活性物质, 电话: 18977098914, E-mail: xiaobihong@126.com; 雷晓凌, 通信作者, 教授, 电话: 0759-2362247, E-mail: leixl-19@126.com

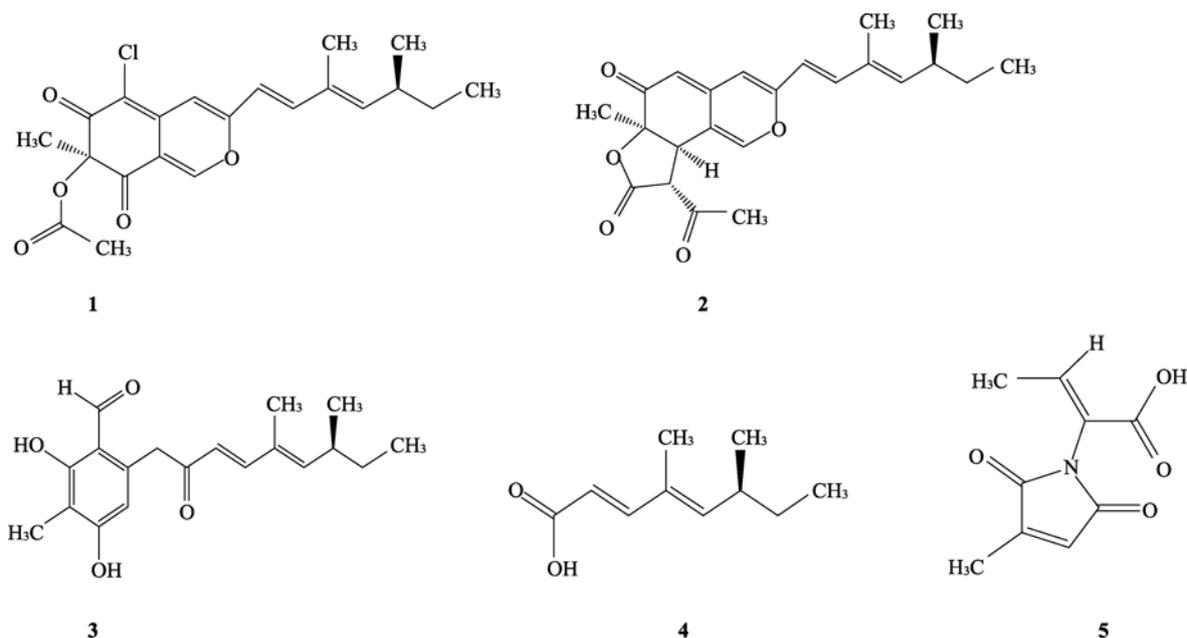


图 1 化合物 1~5 的结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1~5

菌悬液的制备：以蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、白色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、金黄色葡萄球菌为细菌抑菌实验供试菌，供试菌在营养琼脂斜面培养基上传代培养一次后，将其接种至 LB 液态培养基中 37℃ 培养 12~18 h，再用 LB 液态培养基将细菌菌种稀释至细菌数目为 10⁶ CFU/mL。

抑菌活性的筛选用 96 孔板法^[3-4]，将 96 孔板留出第一列作对照，分别做空白对照 2 孔，阳性对照 3 孔和阴性对照 3 孔。空白对照孔加入 200 μL LB 液态培养基；阴性对照孔加入 198 μL 细菌菌悬液，2 μL DMSO；阳性对照孔加入 198 μL 细菌菌悬液，2 μL 盐酸环丙沙星(DMSO 配置)；其余样品实验孔各加入 198 μL 细菌菌悬液，2 μL 样品溶液。每个样品设三个平行孔。震荡混合均匀后 37℃ 静止培养 20 h，用酶标仪测定其在 630 nm 处的吸光度。用下式求抑菌率：

$$\text{抑菌率}(\%) = (1 - \text{样品的吸光度平均值} / \text{阴性对照}) \times 100$$

最小抑菌浓度(MIC)实验采用 96 孔板法^[4-5]。用二倍稀释法，使最终样品浓度为 0.2、0.1、0.05、0.025、0.012 5、0.006 2、0.003 1、0.001 6 μmol/mL。操作如抑菌活性的筛选实验。

1.2.2 抑制真菌活性的测定

样品溶液的制备：根据化合物分子质量的大小，称取适量的样品，用少量 DMSO 完全溶解，加水使

样品浓度为 20 μmol/mL，DMSO 浓度 5%；并用 5% 的 DMSO 的水溶液依次稀释为 10、5、2.5、1.25 μmol/mL；各浓度样品溶液配置 6 mL。

供试菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)上传代培养一次后备用。

采用菌丝生长速率法测定抑菌活性^[6-7]。将配好的样品与 PDA 培养基按 1:9 的比例混合均匀，倒入 5cm 的培养皿，冷却备用。以 5% 的 DMSO 溶液与 PDA 培养基按 1:9 的比例混合均匀制备的平板作为空白对照。然后用打孔器把培养 4 d 的真菌打成直径 5 mm 菌饼分别放入平板中央，菌丝面朝下，每皿 1 块，每个样品设三组平行。供试菌株置于 28℃ 恒温培养，待对照组菌丝即将长满整个培养皿时，采用十字交叉法测量菌落直径，用下式求出抑菌率：

$$\text{抑菌率}(\%) = [(\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}) - (\text{处理菌落直径} - \text{菌饼直径}) / (\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径})] \times 100$$

测定化合物在 20 μmol/mL 的浓度下对 4 种真菌的抑菌活性。

数据处理及半抑制浓度(IC₅₀)的计算方法^[7]：在 20、10、5、2.5、1.25 μmol/mL 浓度下测定对 4 种真菌的抑菌活性，将抑制百分率换算成抑制几率值，以试验中设定的浓度对数为横坐标，抑制几率值为纵坐标，作回归直线，求出毒力回归方程式和真菌

菌丝生长的半抑制浓度(IC₅₀)。

2 结果与分析

2.1 抑制细菌结果

2.1.1 化合物对细菌抑制作用的初筛

在 96 孔板法试验中, 2 μL 样品溶液加入 198 μL 细菌菌悬液中, 样品浓度稀释 100 倍, 终浓度为 0.2 μmol/mL。抑菌结果如表 1。

筛选结果表明: 样品浓度为 0.2 μmol/mL 时, 化合物 1 对 6 种细菌均有抑制作用, 其中对枯草芽孢杆菌、白色葡萄球菌、藤黄八叠球菌几乎有完全的抑制作用; 化合物 2 对枯草芽孢杆菌有中等强度的抑制作用, 对蜡状芽孢杆菌有较弱的抑制作用; 化合物 4 和 5 对金黄色葡萄球菌有较弱的抑制作用。

2.1.2 化合物对细菌的最小抑菌浓度的测定

选取化合物 1 有完全抑制作用的 3 种细菌做最小抑菌浓度测定。结果显示: 化合物 1 对枯草芽孢杆

菌、白色葡萄球菌和藤黄八叠球菌有很好的抑制作用, MIC 值分别为 0.1、0.2、0.2 μmol/mL。

2.2 抑制真菌结果

2.2.1 化合物对真菌抑制作用的初筛

从表 2 可以看出, 样品浓度为 20 μmol/mL 时, 化合物 1 和 2 对这 4 种真菌都显示了很好的抑制活性, 尤其是化合物 1, 对这 4 种真菌的抑制率都超过了 50%, 对立枯丝核菌和尖孢镰刀菌的抑制率高达 91.67%和 78.95%, 对黑曲霉及白色念珠菌的活性也分别为 66.22%、63.64%。化合物 2 对立枯丝核菌的抑制率也超了 50%, 为 63.89%。

2.2.2 化合物对真菌的半抑制浓度(IC₅₀)测定

测定这 2 种化合物不同浓度时对这 4 种菌的抑制效果, 求 IC₅₀ 值, 结果见表 3。化合物 1 和 2 对黑曲霉、尖孢镰刀菌、立枯丝核菌和白色念珠菌都有较好抑菌作用, 尤其是化合物 1, 对这 4 种菌的 IC₅₀

表 1 化合物(浓度为 0.2 μmol/mL)对细菌的抑制率(%)

Tab. 1 The inhibitory rates of compounds on bacteria(concentration, 0.2 μmol/mL)

供试菌种	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4	化合物 5
蜡状芽孢杆菌	12.24 ± 0.22	36.61 ± 0.89	-	-	-
枯草芽孢杆菌	99.33 ± 1.15	69.13 ± 2.76	-	-	-
金黄色葡萄球菌	32.29 ± 2.37	-	-	37.50 ± 3.19	31.25 ± 2.44
白色葡萄球菌	99.40 ± 0.53	-	-	-	-
藤黄八叠球菌	98.93 ± 0.83	-	-	-	-
大肠杆菌	49.88 ± 5.42	-	-	-	-

注: “-”表示没有抑制作用

表 2 化合物(浓度为 20 μmol/mL)对真菌的抑制率(%)

Tab. 2 The inhibitory rates of compounds on fungi(concentration, 20μmol/mL)

样品	黑曲霉	尖孢镰刀菌	立枯丝核菌	白色念珠菌
化合物 1	66.22 ± 4.23	78.95 ± 5.79	91.67 ± 4.28	63.64 ± 5.42
化合物 2	33.03 ± 2.56	47.37 ± 1.92	63.89 ± 3.22	45.54 ± 2.17

表 3 化合物对真菌的半抑制浓度(IC₅₀)

Tab. 3 IC₅₀ values of compounds on fungi

供试病原菌	样品	独立回归方程	相关系数	IC ₅₀ (μmol/mL)
黑曲霉	化合物 1	y=1.908 6+2.632 4x	0.975 8	15.06
	化合物 2	y=2.271 9+2.023 8x	0.907 6	22.28
尖孢镰刀菌	化合物 1	y=4.402 6+1.233 3x	0.940 8	3.09
	化合物 2	y=4.395 4+0.454 9x	0.950 3	21.32
立枯丝核菌	化合物 1	y=4.013 8+1.735 3x	0.974 3	3.68
	化合物 2	y=4.3180 4+0.755 5x	0.978 9	8.18
白色念珠菌	化合物 1	y=4.004 7+1.094 6x	0.974 9	8.19
	化合物 2	y=3.650 0+1.009 4x	0.987 8	21.75

分别为 15.06、3.09、3.68 及 8.19 $\mu\text{mol/mL}$ ，均小于化合物 2 相应的 IC_{50} 。化合物 1 和 2 对立枯丝核菌的抑制作用都较好，对黑曲霉的抑制作用相对较弱。化合物 1 和 2 对供试真菌抑制作用存在明显的浓度效应，即随化合物浓度的降低，抑制作用也逐渐减弱，化合物 1 的趋势更加明显。

3 结论与讨论

近年来，伴随着抗生素的滥用，微生物耐药性形成的速度远快于人类发现新抗生素的速度。来自极端环境的海洋微生物及其代谢产物的抑菌性研究明显增多，海洋真菌代谢产物对藤黄八叠球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌、黑曲霉及白色念珠菌等微生物都有不同程度的抑制作用^[8-11]。本研究中海洋真菌 ZJ27 的次级代谢产物中的 5 种化合物对细菌和真菌都有一定的抑菌效果，尤其是化合物 1 和 2 对细菌和真菌的抑制效果都比较明显，具有广谱抗菌性。化合物的抑菌机理与应用有待继续研究与开发。

本论文真菌供试菌中尖孢镰刀菌、立枯丝核菌是分布广泛的植物病原菌，可导致香蕉、棉花及禾草等许多农作物病害的发生^[12-14]。传统化学农药的使用，对环境与健康造成了极大的危害，从天然资源中寻找活性物质代替化学农药，使用天然抑菌化合物保护作物已成为当前研究的重点之一。本研究中海洋天然产物化合物 1 和 2 对这 2 种真菌的抑制取得了良好的效果，这表明利用海洋真菌代谢产物控制植物病原菌有一定的潜力，这方面的深入研究可望为植物病害的有效控制开辟一条新的途径。

参考文献:

- [1] 崔海信, 魏刚, 陶黎明. 海洋微生物源杀菌化合物的研究进展[J]. 浙江化工, 2009, 40(10): 10-13.
- [2] 肖碧红, 余志刚, 雷晓凌. 南海沿海海藻内生真菌 ZJ27 次级代谢产物研究[J]. 中药材 2011, 5: 46-48.
- [3] Esther M F L, Mateus C, Monteiro D C, et al. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian Cerrado Isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2007, 38: 785-789.
- [4] Zgodaj J R, Porter J R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi[J]. Pharmaceutical Biology, 2001, 39: 221-225.
- [5] Christopher G P, Priya U, Amanda R T, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing [J]. Nature Protocols, 2008, 3: 1494-1500.
- [6] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 北京: 世界图书出版公司, 2000: 108.
- [7] 华南农学院. 植物化学保护[M]. 广州: 农学出版社, 1983: 411-432.
- [8] 郭江, 祖国仁. 一株海洋真菌菌株 M2401 产抑菌物质发酵条件研究[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(1): 77-79.
- [9] 邵长伦, 胡谷平, 杨瑞云, 等. 南海红树林内生真菌 B77 次级代谢产物研究[J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2008, 47(1): 56-58.
- [10] Silva E D, Geiermann A S, Mitova M I, et al. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived penicillium species[J]. J Nat Prod, 2009, 72: 477-479.
- [11] Trisuwana K, Rukachaisirikul V. Pyrone derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18[J]. Phytochemistry, 2009, 70: 554-555.
- [12] 石仁才, 商鸿生, 张敬泽. 中国中部 5 省(市)草坪禾草立枯丝核菌的菌丝融合群研究[J]. 植物病理学报, 2008, 2: 147-152.
- [13] 玉山江·买买提, 郭庆元, 迪娜热·甫拉提. 新疆南疆棉花立枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)菌丝融合群及其营养体亲和群研究[J]. 新疆农业大学学报, 2007, 3: 10-13.
- [14] 何欣, 黄启为, 杨兴明, 等. 香蕉枯萎病致病菌筛选及致病菌浓度对香蕉枯萎病的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(18): 3809-3816.

Antibacterial activity of secondary metabolites of marine fungi ZJ27

XIAO Bi-hong¹, CHEN Bin², LEI Xiao-ling¹, SHE Zhi-gang², LI Xue-gong¹, XU Jia¹

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Received: Jul.,25,2011

Key words: marine fungi; secondary metabolites; antibacterial activity

Abstract: The antibacterial activities of five compounds isolated from secondary metabolites of seaweed endophytic fungi ZJ27 were studied in *Bacillus cereu*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus albus*, *Sarcina luteus*, and *Staphylococcus aureus* and the antifungal activities were tested in *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Candida albicans* by the growth rate method. Different compounds had different antibacterial activities in the six bacteria. Compound 1 showed remarkable inhibition of *B. subtilis*, *S. albus* and *S. luteus* with an MIC of 0.1, 0.2, and 0.2 $\mu\text{mol/mL}$, respectively. Compounds 1 and 2 had notable inhibition of *A. niger*, *F. oxysporum*, *R. solani* and *C. albicans*, with the IC_{50} values of compound 1 being 5.06, 3.09, 3.68, and 8.19 $\mu\text{mol/mL}$ and those of compound 2 were 22.28, 21.32, 8.18, and 21.75 $\mu\text{mol/mL}$. As natural antibacterial substances, Compounds 1 and 2 have a great range of potential utilities and a prospect of development and are worth further study.

(本文编辑: 梁德海)