

网络出版时间:2019-04-01 15:19 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.10.008
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190401.1518.016.html

秦岭丹江流域黏细菌的分离及其代谢产物研究

王 军^{1,2},李宏铎³,张 琨^{1,2},高 磊^{1,2},万 一^{1,2}

(1 陕西省微生物研究所 分子生物学研究中心,陕西 西安 710043;

2 陕西省科学院 秦岭天然产物工程中心,陕西 西安 710043;3 西安市食品药品检验所微生物室,陕西 西安 710056)

【摘 要】【目的】分离陕西秦岭丹江流域土壤中的黏细菌,收集其代谢产物,对代谢产物成分和活性进行分析。【方法】采用大肠杆菌诱导法和滤纸片诱导法分离从丹江流域采集的 18 份土壤样品中的黏细菌,用摇瓶发酵得到其代谢产物,采用枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌和大肠杆菌作为指示菌对代谢产物进行平板抑菌试验;对 4 种指示菌抑制活性明显菌株的代谢产物成分进行 HPLC 和薄层色谱(TLC)分析,采用细胞凋亡法测试了代谢产物组分对 HepG2 肝癌细胞的毒性。【结果】共分离纯化出 23 株黏细菌,包括黏球菌属(*Myxococcus*)15 株,珊瑚球菌属(*Corallococcus*)3 株,孢囊杆菌属(*Cystobacter*)1 株,原囊菌属(*Archangium*)3 株,软骨霉状菌属(*Chondromyces*)1 株。抑菌试验表明 15 号菌株的 2 号代谢产物对 4 种指示菌均有不同程度的抑制作用。对 HPLC 得到的 15 号菌株 2 号代谢产物的 5 号组分进行研究,结果表明,其能明显增加 HepG2 细胞凋亡。【结论】秦岭丹江流域土样中的黏细菌具有一定的多样性,得到 1 株活性菌株,其代谢产物具有抑菌活性和抗肿瘤细胞活性。

【关键词】黏细菌;代谢产物;生物活性;丹江流域

【中图分类号】Q939.93

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2019)10-0063-08

Isolation and metabolites of myxobacteria from the Danjiang River in Qinling Mountains

WANG Jun^{1,2}, LI Hongduo³, ZHANG Kun^{1,2}, GAO Lei^{1,2}, WAN Yi^{1,2}

(1 Molecular Biology Research Center, Shaanxi Institute of Microbiology, Xi'an, Shaanxi 710043, China;

2 Engineering Center of Qinling Mountains Natural Products, Shaanxi Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710043, China;

3 Xi'an Institute for Food and Drug Control, Department of Microbiology, Xi'an, Shaanxi 710056, China)

Abstract:【Objective】Myxobacteria were isolated from soils of the Danjiang River in Qinling Mountains, Shaanxi, and their metabolites were collected to analyze the composition and activities. 【Method】Myxobacteria were isolated from 18 soil samples collected from Danjiang River by the living *Escherichia coli* and filter paper methods. The metabolites were obtained by fermentation. Biological activity experiments were carried out by the test bacteria of *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus* and *E. coli*. The strains with inhibitory activities against 4 indicator bacteria were analyzed and their metabolites were separated by HPLC and thin layer chromatography (TLC). The toxicity effect of metabolites to HepG2 on human hepatocellular carcinoma cells line was tested by apoptosis assay *in vitro*. 【Result】A total of 23 strains were isolated including *Myxococcus* (15 strains), *Corallococcus* (3 strains), *Cystobacter* (1 strains), *Archangium* (3 strains) and *Chondromyces* (1 strains). Antibacterial experiments showed that metabolite No 2 of strain 15 had inhibition against 4 tested indicator bacteria. Component No 5 of metabolite No 2 of strain 15 ob-

【收稿日期】2018-09-28

【基金项目】陕西省科技厅重点研发计划项目(2017NY-116, 2017NY-139);陕西省科学院应用基础研究专项(2015K-12)

【作者简介】王 军(1982—),男,陕西西安人,助理研究员,硕士,主要从事微生物分离及代谢产物研究。

E-mail: wangjun198272@163.com

【通信作者】万 一(1975—),男,河北昌黎人,研究员,博士,主要从事分子生物学及微生物学研究。E-mail: wanyi6565@sina.com

tained by HPLC was further studied,and it can significantly induce apoptosis of HepG2 cells.【Conclusion】The diversity of myxobacteria from soil samples of Danjiang River was rich,and the metabolites of an obtained strain had antibacterial and antitumor activities.

Key words: myxobacteria;metabolites;biological activities;Danjiang River

黏细菌(myxobacteria)是一类能够在平板培养基上滑动的革兰氏阴性杆菌,在系统进化上属于 δ 变形菌纲(Deltaproteobacteria)的黏球菌目(Myxococcales)。目前黏球菌目分为 3 个亚目,23 个属,约 60 个种^[1-2]。黏细菌具有复杂的多细胞群体行为,能够形成形态各异、由多细胞聚集的子实体结构,且可以在细胞间传导信号,因而被认为是“社会性的细菌”^[3]。由于其特殊的生活史,黏细菌能够产生丰富多样的次级代谢产物,目前从黏细菌代谢产物中发现的活性物质约有 600 种,数量上仅次于放线菌和芽孢杆菌,是一个重要的药源微生物类群^[4],因其代谢产物普遍具有新颖的结构和良好的活性,故吸引着越来越多研究者的关注^[5]。

秦岭作为长江、黄河两大水系的分水岭和我国暖温带与北亚热带的过渡地带,其生物多样性富集,遗传资源丰富,是世界上具有典型地域特征的生物种质库,有“天然基因宝库”之称^[6]。秦岭地质与气候的多样性营造出了丰富的土壤类型,这些多样化的土壤对于研究者从中寻找新颖的黏细菌菌株,继而获得具有良好生物活性的次级代谢产物具有很好

的利用价值^[7]。目前有关秦岭地区黏细菌资源的开发和利用的相关报道仍然较少,因此有必要从该地区丰富多样的土壤资源中寻找黏细菌资源并考察其多样性。丹江发源于陕西省商洛市西北部的秦岭南麓,干流全长 390 km,为汉江最长的支流。丹江流域作为南水北调中线工程的水源,具有良好的水质,流域内地质构造复杂,土壤类型多样^[8],而该地区尚未有相关黏细菌研究的报道。本研究以丹江流域典型河滩地等土壤样品为对象,对秦岭特殊土壤环境中的黏细菌资源进行分离和筛选,同时对其代谢产物进行了研究,丰富了秦巴山区微生物菌种资源,旨在为综合开发利用秦巴山区的黏细菌资源及其活性代谢产物提供理论和物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样采集 18 份土壤样品采集自陕西省商洛地区丹江流域(表 1)。土样采自土壤表层 2~10 cm 处,每个地点取 3 个样,混匀。土样采集后,立即自然风干,放入 4℃冰箱保存,以防止霉菌污染。

表 1 18 份土样的采集信息
Table 1 Characters of 18 soil samples

地点 Location	经纬度 Latitude and longitude	海拔/m Altitude	气温/℃ Temperature	相对湿度/% Relative humidity	土样编号 No.	土样类型 Soil type
黑龙口镇 Heilongkouzhen	N33°59′,E109°46′	844	20.2	44.7	1	油菜田 Brassica campestris
					2	松树根部 Root of pine tree
					3	杂草地 Grassland
二龙山水库 Erlongshan Reservoir	N33°55′,E109°53′	764	25.6	38.0	4	砂石土 Sand and gravel soil
					5	麦田 Wheat field
					6	污泥 Sludge
商洛市郊区 Shangluo City	N33°50′,E109°59′	673	31.5	17.8	7	河滩地 Beach land
					8	核桃树根部 Walnut tree roots
					9	沿河泥土 Soil along the river
中村镇 Zhongcunzhen	N33°26′,E110°11′	770	21.4	21.4	10	草地土 Grassland soil
					11	田地黏土 Soil clay
					12	月季花根部 Rose root
竹林关 Zhulinguan	N33°27′,E110°23′	450	26.8	27.5	13	麦田 Wheat field soil
					14	河岸砂地 Riverbank sand
					15	河岸污泥 Riverbank sludge
湘河大桥 Xianghedaqiao	N33°18′,E109°54′	287	25.2	41.0	16	桥下积土 Soil under bridge
					17	杂草根部 Root of weeds
					18	煤土 Coal soil

1.1.2 培养基 (1)WCX 培养基。氯化钙 1 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 L,pH 7.2。

(2)VY/2 培养基。面包酵母 5 g,氯化钙 1 g,维生素 B₁₂ 0.5 mg,琼脂 15 g,蒸馏水 1 L,pH 7.2。

(3)ST21CX Agar 培养基。A 溶液:磷酸氢二钾 1 g,酵母提取液 20 mg,琼脂 15 g,蒸馏水 600 mL,pH 7.2。B 溶液:硝酸钾 1 g,硫酸镁 1 g,氯化钙 1 g,氯化铁 200 mg,硫酸锰 100 mg,蒸馏水 400 mL,pH 7.2。痕量元素:MnCl₂·4H₂O 100 mg,CoCl₂ 20 mg,CuSO₄ 10 mg,Na₂MoO₄·2H₂O 10 mg,ZnCl₂ 20 mg,LiCl 5 mg,SnCl₂·2H₂O 5 mg,H₃BO₃ 10 mg,KBr 20 mg,KI 20 mg,EDTA,Na-Fe³⁺盐 8 g,蒸馏水 1 L。先将 A 溶液和 B 溶液分别灭菌后混合,再过滤添加 1 mL 痕量元素溶液获得 ST21CX Agar 培养基。

(4)CAS 液体培养基。酪朊 1%,七水合硫酸镁 0.1%,甘油 10%,pH 6.8。

(5)M26 培养基。马铃薯淀粉 0.8%,大豆蛋白胨 0.2%,葡萄糖 0.2%,酵母浸出汁 0.2%,七水合硫酸镁 0.1%,氯化钙 0.1%,灭菌后加入过滤除菌的痕量元素 0.1%。

(6)HT 培养基。可溶性淀粉 3.0%,磷酸氢二钾 0.1%,氯化钙 0.01%,七水合硫酸镁 0.015%,氯化亚铁 0.001%,硝酸钠 0.25%,pH 7.2。

(7)V-Y 培养基。活性干酵母 1.0%,维生素 B₁₂ 0.5 mg/L,氯化钙 0.1%,七水合硫酸镁 0.05%,pH 7.2。

(8)MX04 培养基。土豆淀粉 1.0%,葡萄糖 0.2%,酵母粉 0.2%,脱脂奶粉 0.4%,氯化钙 0.1%,七水合硫酸镁 0.1%,EDTA 钠铁盐 0.08%,甘油 0.5%,SP207 树脂 0.02 g/mL。

(9)LB 培养基。蛋白胨 1.5 g,酵母粉 0.75 g,氯化钠 1.5 g,蒸馏水 150 mL,pH 7.2。

(10)MEM 基础培养基和 DMEM 完全培养基。购自 Hyclone,分别用于细胞的清洗和培养。

以上培养基中各组分百分含量均为质量分数。

1.1.3 仪器与试剂 隔水式培养箱 GH4500,天津泰斯特仪器有限公司;宽视场体视显微镜 PXS,上海光学仪器五厂;全温摇瓶柜 HYG-A,常州市国旺仪器制造有限公司;细胞培养箱 Thermo Scientific 8000,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;倒置拍照显微镜 Leica DMI3000B,德国徕卡;荧光显微镜 Olympus IX71,日本奥林巴斯;旋转蒸发仪 RE-52,上海亚荣生化仪器厂;安捷伦 1260 高效液相色谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司。甲醇、乙腈均为色谱级,天津科密欧化学试剂有限公司。

1.1.4 菌种与细胞 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) ATCC 6633、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC

6538P、藤黄微球菌(*M. luteus*) NICPBP 28001、大肠杆菌(*E. coli*) CMCC 44102,均由陕西省微生物研究所菌种资源中心提供。HepG2 细胞系,由陕西省人民医院提供。

1.2 黏细菌的分离、纯化及分类

1.2.1 土样的预处理 取冰箱保存的土样 10 g,研细并过孔径为 0.15 mm 的筛网,然后加入 5% 纳他霉素溶液 20 mL 以抑制真菌生长,浸泡 24 h 后离心取下层沉淀。

1.2.2 土样中黏细菌的诱导 根据不同黏细菌的食性,采用大肠杆菌诱导法和滤纸片诱导法从土样中分离黏细菌。具体方法如下:①噬细菌性黏细菌。收集生长至对数期的大肠杆菌,离心后用适量无菌水混匀,在 WCX 培养基平板上涂成圆斑,在圆斑中央放置处理后的土样。②噬纤维素黏细菌。将高压灭菌后的滤纸片平铺在 ST21CX Agar 培养基平板上,在滤纸片中央放置土样。上述平皿均放置于 30℃ 隔水式培养箱中,每日在解剖镜下检查营养细胞的移动和子实体的形成^[9-10]。

1.2.3 黏细菌的纯化 当平板上土壤周围有黏细菌子实体形成时,挑取并转移至 VY/2 培养基平板中,30℃ 培养,反复转接直至纯净无杂菌。将在平板上生长的单一黏细菌挑入 CAS 液体培养基中,-80℃ 保存^[11]。

1.2.4 黏细菌的分类 依据文献[2]的标准,用宽视场体视显微镜对分离的黏细菌菌落形态、细胞颜色和子实体形态进行观察,根据显微特征对其分类。

1.3 黏细菌代谢产物的抑菌活性及鉴定

1.3.1 代谢产物的获得 从平板上挑取培养好的菌体分别至 M26、HT、V-Y、MX04 培养基中,培养基体积为 50 mL/瓶,30℃、180 r/min 发酵 10 d。每个发酵产物添加 5 g 的 HP20 大孔吸附树脂吸附,然后过滤树脂,再用 50 mL 甲醇洗脱树脂,挥干甲醇,得到黏细菌代谢产物^[12-13]。

1.3.2 代谢产物的活性测试 以枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄微球菌和大肠杆菌为指示菌^[14],测定 23 个菌株的 92 个代谢产物的抑菌活性。将上述指示菌在 LB 培养基中培养过夜,吸取 1 mL 加入已冷却至约 50℃ 左右的 LB 平板培养基中,倒平板,用打孔器在培养基上打孔,加入待测样品,以生理盐水作为空白对照,37℃ 培养,观察代谢产物的抑菌效果^[15-16]。

1.3.3 黏细菌的鉴定 对 1.3.2 节获得的对 4 种指示菌均有抑制活性的菌株,进行分子生物学鉴

定^[17],具体方法为:采用 CTAB 法提取黏细菌总 DNA,用细菌通用引物 27F 和 1492R 对黏细菌菌株总 DNA 进行 16S rRNA 扩增,对 PCR 产物进行测序,将所得序列结果在 NCBI 进行比对,与已登录的黏细菌构建系统发育树,确定其归属^[18-19]。

1.4 黏细菌代谢产物的 HPLC 和薄层色谱(TLC)分析

将 1.3.2 节对上述 4 种指示菌均具有抑菌活性菌株的代谢产物用甲醇溶解,利用 HPLC 进行分离,以乙腈-体积分数 0.1%三氟乙酸作为流动相进行梯度洗脱,对各洗脱峰分别取样,再用 TLC 对洗脱峰样品进行分析。

1.5 黏细菌代谢产物的细胞毒性检测

(1)取冻存的 HepG2 细胞系,37℃快速解冻后,1 000 r/min 离心 5 min,用 MEM 基础培养基清洗 2 次(因为在冷冻的过程中加入了对细胞繁殖生长有害的物质),用 MEM 基础培养基重悬后再离心^[20]。

(2)加入 DMEM 完全培养基进行培养,每天换 1 次培养基。

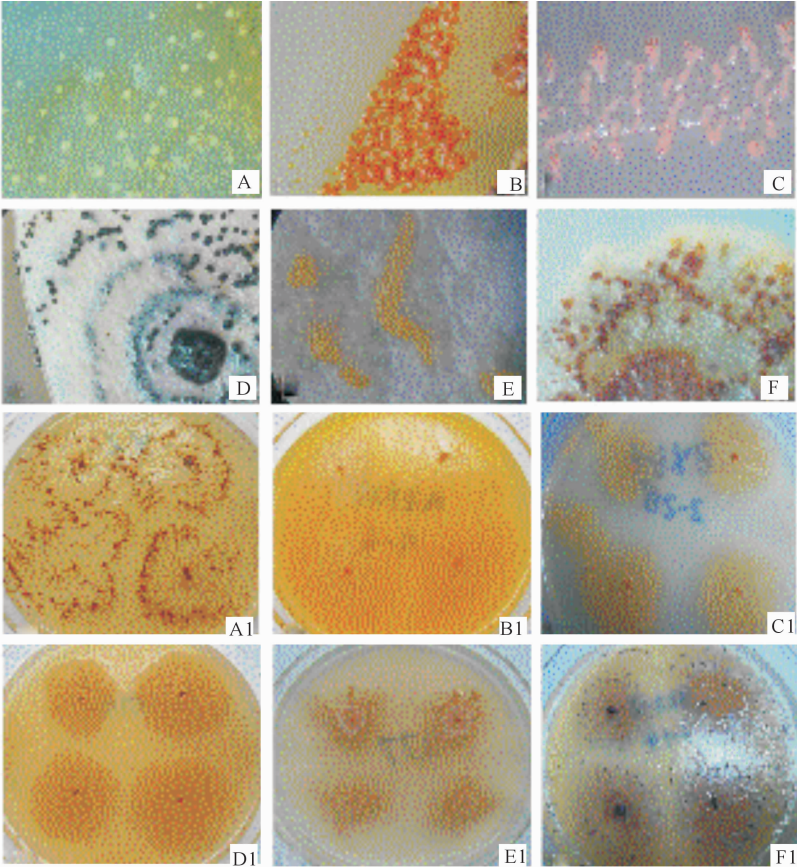
(3)观察 HepG2 细胞生长状况,待 HepG2 细胞处于对数生长期时,调整细胞浓度为 5×10^4 CFU/mL,将细胞分盘铺于 24 孔板,于 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h。

(4)向 HepG2 细胞中分别加入无菌水(空白对照)和黏细菌代谢产物。然后在 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h,吸掉上清液,用 PBS 清洗 2 次,用体积分数 4%多聚甲醛室温固定 30 min,每孔加入 500 μL 的 Hoechst33258 染液,室温避光孵育 30 min^[21],之后将其在荧光显微镜下进行观察。

2 结果与分析

2.1 黏细菌的分离与纯化

从 18 个土样中共诱导出 35 株黏细菌,经过反复纯化,得到 23 株黏细菌,部分菌株见图 1。



A~C. 大肠杆菌诱导法分离的黏细菌:A. 黏球菌;B. 珊瑚球菌;C. 原囊菌;D~F. 滤纸片诱导法分离的黏细菌:D. 珊瑚球菌;E. 黏球菌;F. 孢囊杆菌;A1~F1. 纯化的黏细菌:A1. 软骨霉状菌;B1. 黏球菌;C1. 黏球菌 a;D1. 珊瑚球菌 b;E1. 原囊菌;F1. 孢囊杆菌
A—C. Myxobacteria isolated by induction of *E. coli*;A. *Myxococcus*;B. *Corallococcus*;C. *Archangium*;D—F. Myxobacteria isolated by induction of filter paper;D. *Corallococcus*;E. *Myxococcus*;F. *Cystobacter*;A1—F1. Purified myxobacteria;
A1. *Chondromyces*;B1. *Myxococcus*;C1. *Myxococcus* a;D1. *Corallococcus* b;E1. *Archangium*;F1. *Cystobacter*

图 1 分离获得的部分黏细菌菌株
Fig. 1 Isolated myxobacteria strains

2.2 黏细菌的分类

对获得的 23 株黏细菌,依据黏细菌分类标准,经鉴定认为,从丹江流域不同生境土样中分离纯化得到的黏细菌包括黏球菌属(*Myxococcus*)15 株,珊瑚球菌属(*Corallococcus*)3 株,孢囊杆菌属(*Cystobacter*)1 株,原囊菌属(*Archangium*)3 株,软骨霉状菌属(*Chondromyces*)1 株。说明秦岭丹江流域土壤中黏细菌资源较为丰富,具有一定多样性,但也有其自身的特点。一是黏细菌类型比较集中,主要以黏球菌属为主,这也与该属黏细菌均为嗜细菌类型,较

适于采用大肠杆菌诱导法和滤纸片诱导法进行分离;二是砂石类土样诱导得到的黏细菌较少,大多数菌株由植物根部以及含腐殖质较多的土样中分离得到,这可能是因为有些种属不易形成子实体,从而导致菌株丢失,影响了多样性的分析结果。

2.3 黏细菌代谢产物的抑菌活性

用 4 种培养基对分离得到的 23 株黏细菌进行发酵,共得到 92 个代谢产物,采用抑菌圈法测定这些代谢产物对 4 种指示菌的抗菌活性,结果见表 2 和图 2。

表 2 92 个黏细菌代谢产物抑菌试验结果

Table 2 Antibacterial test results of 92 metabolites of myxobacteria									
代谢产物 Metabolites	枯草芽 孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色 葡萄球菌 <i>S. aureu</i>	藤黄 微球菌 <i>M. luteus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	代谢产物 Metabolites	枯草芽 孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色 葡萄球菌 <i>S. aureu</i>	藤黄 微球菌 <i>M. luteus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
1-1	—	—	—	—	12-3	+	—	—	—
1-2	—	—	—	+	12-4	—	—	—	—
1-3	—	—	—	—	13-1	—	—	—	—
1-4	—	+	—	—	13-2	+	+	—	—
2-1	—	—	—	—	13-3	—	—	—	—
2-2	—	+	—	+	13-4	—	—	—	—
2-3	—	—	—	—	14-1	—	—	—	+
2-4	+	—	—	—	14-2	+	+	—	—
3-1	—	—	—	—	14-3	—	—	—	—
3-2	—	—	—	—	14-4	—	—	—	—
3-3	—	—	—	—	15-1	—	+	—	—
3-4	—	—	—	—	15-2	+	+	+	+
4-1	—	—	—	—	15-3	—	—	+	—
4-2	—	+	—	—	15-4	—	+	—	—
4-3	—	—	—	—	16-1	—	—	—	—
4-4	—	—	+	—	16-2	+	—	—	+
5-1	—	—	—	—	16-3	—	—	—	—
5-2	—	+	—	+	16-4	—	—	—	—
5-3	—	—	—	—	17-1	—	—	—	—
5-4	—	+	—	—	17-2	—	+	—	—
6-1	—	—	—	—	17-3	—	—	+	—
6-2	+	—	+	—	17-4	—	—	—	—
6-3	—	—	—	—	18-1	—	—	—	—
6-4	+	—	—	—	18-2	+	—	—	+
7-1	—	—	—	—	18-3	—	—	—	—
7-2	—	—	—	—	18-4	—	—	—	—
7-3	—	+	—	—	19-1	+	—	—	—
7-4	—	—	—	—	19-2	—	—	—	—
8-1	+	—	—	+	19-3	—	+	+	—
8-2	+	—	+	—	19-4	—	—	—	—
8-3	—	—	—	—	20-1	—	—	—	—
8-4	—	—	—	—	20-2	+	—	—	—
9-1	—	—	—	—	20-3	—	—	—	—
9-2	—	—	—	—	20-4	—	—	—	—
9-3	—	—	—	—	21-1	—	—	—	—
9-4	—	—	—	—	21-2	—	+	—	+
10-1	—	+	—	—	21-3	—	—	—	—
10-2	—	—	—	—	21-4	—	—	—	—
10-3	—	—	—	—	22-1	—	+	—	—
10-4	—	—	—	—	22-2	—	—	—	—

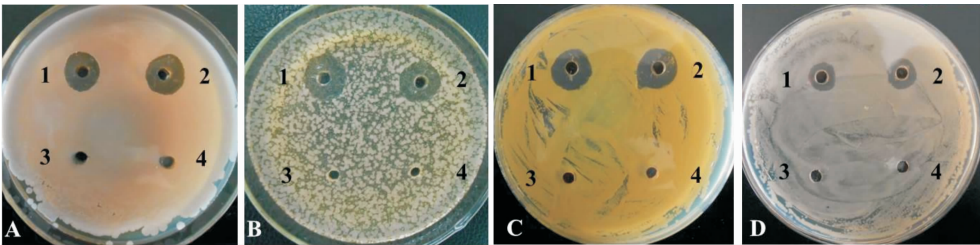
表 2(续) Continued table 2

代谢产物 Metabolites	枯草芽 孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色 葡萄球菌 <i>S. aureu</i>	藤黄 微球菌 <i>M. luteus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	代谢产物 Metabolites	枯草芽 孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色 葡萄球菌 <i>S. aureu</i>	藤黄 微球菌 <i>M. luteus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>
11-1	—	+	—	—	22-3	—	—	—	—
11-2	—	+	+	—	22-4	—	—	—	—
11-3	—	—	—	—	23-1	—	—	—	—
11-4	+	—	—	—	23-2	+	—	—	+
12-1	—	—	—	—	23-3	—	—	—	—
12-2	—	—	—	+	23-4	—	+	—	—

注：“-”前的 1~23 为菌株编号，“-”后的 1~4 为代谢产物编号。“+”表示有抑菌作用，“-”表示没有抑菌作用。
Note: 1—23 before “-” mean strain No. , 1—4 after “-” mean metabolites No. . “+” represents antibacterial activity, “-” represents no anti-tibacterial activity.

表 2 和图 2 显示,15 号菌株的 2 号代谢产物(15-2)对 4 种指示菌的抑菌圈明显,均有不同程度的抑制作用。

对黏细菌 15 号菌株进行鉴定,表明其与 *Myxococcus fulvus* 最为接近(图 3)。已将其序列提交至 GenBank,序列号为 MK045846。



1, 2. 代谢产物;3, 4. 空白对照;A. 枯草芽孢杆菌;
B. 金黄色葡萄球菌;C. 藤黄微球菌;D. 大肠杆菌
1 and 2. Metabolites; 3 and 4. Blank controls; A. *B. subtilis*; B. *S. aureu*; C. *M. luteus*; D. *E. coli*

图 2 黏细菌 15 号菌株代谢产物的抑菌活性观察

Fig. 2 Antibacterial activities of metabolites by strain 15 of myxobacteria

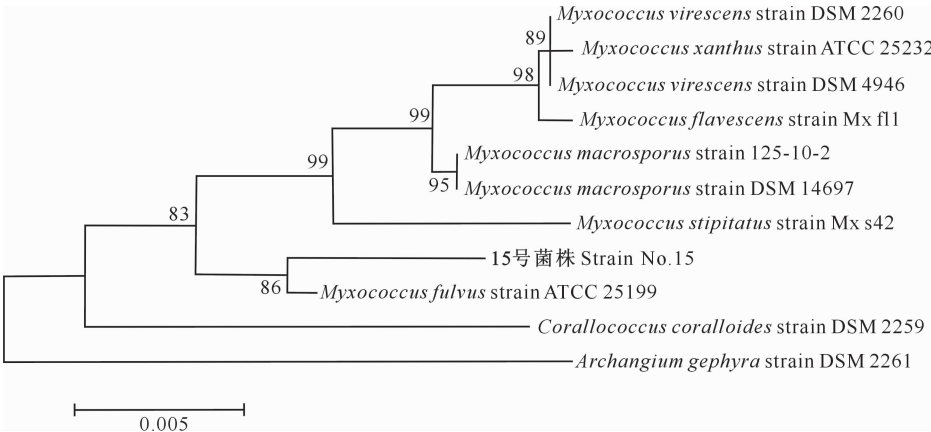


图 3 黏细菌 15 号菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain No 15 of myxobacteria

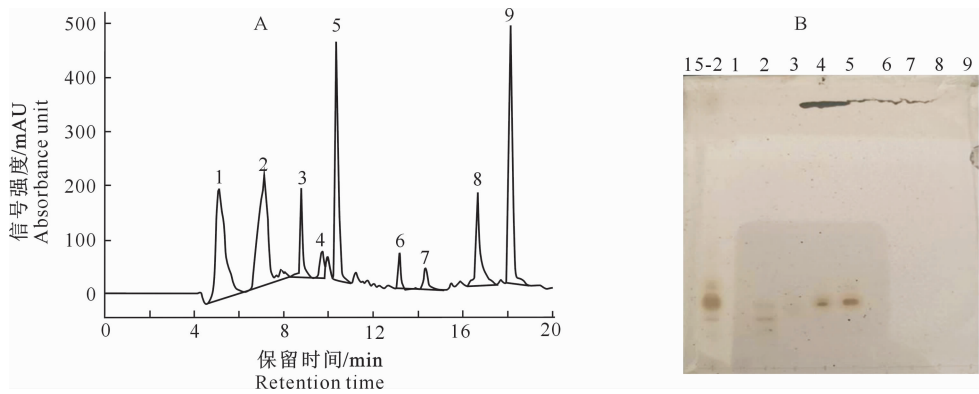
2. 4 黏细菌活性代谢产物的 HPLC 和 TLC 分析

通过 HPLC 图谱可知,15-2 代谢产物约有 9 个明显的洗脱峰,之后对这 9 个组分进行 TLC 分析,结果见图 4。从图 4 可以看出,5 号洗脱峰在 HPLC 图谱中的信号较强,且在薄层板上呈现较为明显单一的斑点。

2. 5 黏细菌代谢产物对 HepG2 的细胞毒性试验结果

对 15-2 号代谢产物 5 号组分进行 HepG2 细胞毒性试验,结果见图 5。由图 5 可知,空白对照组的细胞核基本无凋亡,细胞饱满,生长良好;而 15-2 代谢产物处理组细胞核有明显凋亡,细胞变得肿胀、拉

长,从而使细胞凋亡。



1~9 分别表示不同保留时间的洗脱峰

1-9 denote outflow peaks at different retention times, respectively

图 4 丹江流域黏细菌活性代谢产物 15-2 的 HPLC(A) 和 TLC(B)检测结果

Fig. 4 Separation of active metabolite 15-2 of myxobacteria from Danjiang River by HPLC (A) and TLC (B)

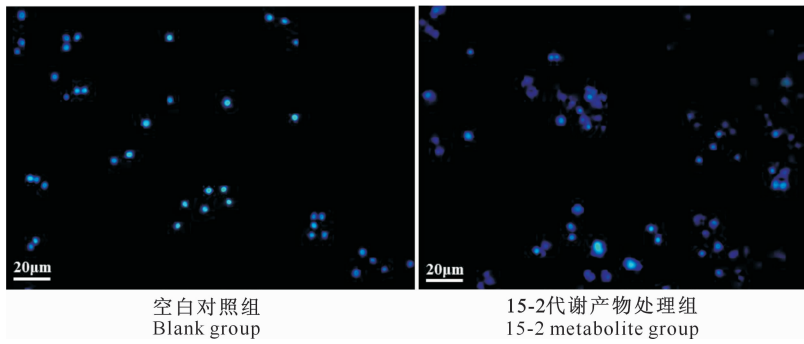


图 5 丹江流域黏细菌活性代谢产物 15-2 对 HepG2 细胞的毒性

Fig. 5 Toxicity of myxobacterial metabolite 15-2 of myxobacteria from Danjiang River to HepG2 cells

3 讨 论

秦岭作为我国南北气候分界线,其独特的地理位置和复杂的生物环境孕育着丰富的生物资源。据调查,秦岭地区主要土壤包括山地石渣土、黄土、褐土、棕壤、潮土、水稻土、淤土、山地草甸土等,土壤类型丰富多样^[22]。在秦岭特定的生态环境中,动物、植物、微生物构成了相互依赖的生存关系,其特殊的环境因素决定了微生物的多样性。作为我国的代表性山区,其黏细菌相关研究目前仍然较少,因此对秦岭地区特定土样进行黏细菌的分离、多样性分析和代谢产物的活性研究,以便更加深入地了解该地区微生物资源的分布情况^[23]。

本研究从丹江流域不同生境土样中分离纯化得到 23 株黏细菌,包括黏球菌属(*Myxococcus*) 15 株,珊瑚球菌属(*Corallococcus*) 3 株,孢囊杆菌属(*Cystobacter*) 1 株,原囊菌属(*Archangium*) 3 株,软骨霉

状菌属(*Chondromyces*) 1 株^[24]。由于本次采集的沿河土样类型比较接近,以及现有黏细菌分离方法具有的特殊性,使分离得到的黏细菌菌株以黏球菌属为主,这与该属黏细菌生长快、易于挑取和纯化、杂菌污染较少有关^[25]。

本研究结果表明,普通的菌株分离手段能获得大量的微生物群体,但难以分离获得新颖的微生物资源,从而使得现阶段土壤中不可培养的黏细菌资源未得到有效的认识和利用。传统的黏细菌分离方法主要以诱导分离为主,具有分离时间长、容易染杂菌、纯化较困难等缺点。因此,改进黏细菌分离方法,利用多种手段进行难培养黏细菌的分离,尤其是关于噬纤维素类群黏细菌纯化方法的优化是目前亟待解决的问题。此外,土样采集的丰富程度也决定着分离菌株类型的多样性^[26],本试验在后续研究中应在收集丰富多样的土样的基础上改进黏细菌的分离方法,设法得到更多难培养的黏细菌菌株,为研究秦

巴山区黏细菌资源提供依据。

4 结 论

秦岭丹江流域土壤中蕴含着较为丰富的黏细菌资源,能够以较少的土壤样本分离得到较多类型的黏细菌类型,其中黏细菌 15 号菌株的 2 号代谢产物具有较好的抑菌活性,其 5 号组分具有较好抑制 HepG2 肝癌细胞活性,但由于发酵得到的代谢产物产量较少,其结构尚未得到解析,仍需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(4): 403-427.
- [2] Reichenbach H. The Myxococcales [M]// Garrity G M, Bergey's manual of systematic bacteriology; part 3. the alpha-, beta-, delta-, and epsilon-proteobacteria. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2005: 1059-1143.
- [3] Harvey C W, Du H, Xu Z, et al. Interconnected cavernous structure of bacterial fruiting bodies [J]. PLoS Computational Biology, 2012, 8(12): e1002850.
- [4] Wenzel S C, Muller R. Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating examples of curious biochemistry [J]. Natural Product Reports, 2007, 24(6): 1211-1224.
- [5] Wiebke L, Corinna W, Joachim W. Actinobacteria and myxobacteria: two of the most important bacterial resources for novel antibiotics [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2016(398): 273-302.
- [6] 曹永昌, 谭向平, 和文祥, 等. 秦岭地区不同林分土壤微生物群落代谢特征 [J]. 生态学报, 2016, 36(10): 2978-2986.
Cao Y C, Tan X P, He W X, et al. The metabolism characteristics of microbial community in different forest soil in Qinling Mountains area [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(10): 2978-2986.
- [7] 房志, 徐卫华, 张晶晶, 等. 基于生物多样性与生态系统服务功能的秦岭山系自然保护体系 [J]. 生态学报, 2017, 37(16): 5334-5341.
Fang Z, Xu W H, Zhang J J, et al. Designing protected area systems in the Qinling Mountains based on biodiversity and ecosystem service evaluation [J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(16): 5334-5341.
- [8] 聂凤莲. 浅谈商洛市丹江流域综合治理面临的问题及对策 [J]. 甘肃科技纵横, 2014, 43(4): 28-29.
Nie F L. Problems and countermeasures of comprehensive management of Danjiang River Basin in Shangluo [J]. Gansu Science and Technology, 2014, 43(4): 28-29.
- [9] Li Y Z, Hu W, Zhang Y Q, et al. A simple method to isolate salt tolerant myxobacteria from marine sample [J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 50(2): 205-209.
- [10] Zhang L P, Wang H Y, Fang X M, et al. Improved methods of

isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains [J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 54(1): 21-27.

- [11] Wioletta W D, Anna J B, Hanna D, et al. Current trends in myxobacteria research [J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(1): 17-33.
- [12] Zhang L, Yan K, Zhang Y, et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(11): 4606-4611.
- [13] Mulwa L S, Stadler M. Antiviral compounds from myxobacteria [J]. Microorganisms, 2018, 6(3): 73-87.
- [14] 肖蓉, 文也, 唐少军, 等. 土壤样品中粘细菌的分离鉴定及其生物活性检测 [J]. 微生物学报, 2014, 54(12): 1429-1437.
Xiao R, Wen Y, Tang S J, et al. Isolation, identification and biological activity of myxobacteria from soils [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(12): 1429-1437.
- [15] Zarai Z, Kadri A, Ben Chobba I, et al. The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia [J]. Lipids in Health and Disease, 2011(10): 161.
- [16] Lasse van G, Dieter M, Nidja R, et al. Some current concepts in antibacterial drug discovery [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(2): 2949-2963.
- [17] Miyashita M, Sakane T, Suzuki K, et al. 16S rRNA gene and 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences analysis of the genus *Myxococcus* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 282(2): 241-245.
- [18] Li B Y, Yao Q, Zhu H H. Approach to analyze the diversity of myxobacteria in soil by semi-nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) based on taxon-specific gene [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e108877.
- [19] Lee C, An D, Lee H, et al. Correlation between sorangium cellulose subgroups and their potential for secondary metabolite production [J]. Journal of Microbiol Biotechnol, 2013, 23(3): 297-303.
- [20] Gingras M C, Roussel E, Bruner J M, et al. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and analogous normal brain tissue [J]. Journal of Neuroimmunology, 1995, 57(1/2): 143-153.
- [21] Zhao Y S, Bachelier R, Treilleux I, et al. Tumor alphavbeta 3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases [J]. Cancer Research, 2007, 67(12): 5821-5830.
- [22] Mohr K I, Stechling M, Wink J, et al. Comparison of myxobacterial diversity and evaluation of isolation success in two niches: Kiritimati Island and German compost [J]. Microbiology Open, 2016, 5(2): 268-278.
- [23] Kathrin I M, Tanja Z, Joachim W, et al. Myxobacteria in high moor and fen: an astonishing diversity in a neglected extreme habitat [J]. Microbiology Open, 2017, 6(4): e464.

(下转第 79 页)

Lett,1997,410(2):195-200.

[16] Najami N,Janda T,Barriah W,et al. Ascorbate peroxidase gene family in tomato:its identification and characterization [J]. Mol Genet Genomics,2008,279(2):171-182.

[17] Jiang J,Su M,Wang L,et al. Exogenous hydrogen peroxide reversibly inhibits root gravitropism and induces horizontal curvature of primary root during grass pea germination [J]. Plant Physiol Biochem,2012,4(53):84-93.

[18] Abdelkrim S,Jebara S H,Jebara M. Antioxidant systems responses and the compatible solutes as contributing factors to lead accumulation and tolerance in *Lathyrus sativus* inoculated by plant growth promoting rhizobacteria [J]. Ecotoxicol Environ Saf,2018,166:427-436.

[19] 蒋景龙,李 丽,曹小勇,等. 山黧豆抗逆性研究进展 [J]. 西北植物学报,2013,33(10):2141-2146.

Jiang J L,Li L,Cao X Y,et al. Advancement in research on stress resistance of grass pea [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2013,33(10):2141-2146.

[20] Miller G,Suzuki N,Ciftci-Yilmaz S,et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses [J]. Plant,Cell and Environment,2010,33(4):453-467.

[21] Diaz-Vivancos P,Faize L,Nicolas E,et al. Transformation of plum plants with a cytosolic ascorbate peroxidase transgene leads to enhanced water stress tolerance [J]. Ann Bot,2016,117(7):1121-1131.

[22] Wang X,Cai J,Jiang D,et al. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase [J]. Journal of Plant Physiology,2005,162(4):465-472.

[23] Kim M D,Kim Y H,Kwon S Y,et al. Enhanced tolerance to methyl viologen-induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants over expressing the *Cu/ZnSOD*,*APX* and *NDPK2* genes [J]. Physiol Plant,2010,140(2):153-162.

[24] Li Z,Zhang J,Li J,et al. The functional and regulatory mechanisms of the *thellungiella salsuginea* ascorbate peroxidase 6 (*TsAPX6*) in response to salinity and water deficit stresses [J]. PLoS ONE,2016,11(4):e0154042.

[25] Slade D,Radman M. Oxidative stress resistance in *deinococcus radiodurans* [J]. Microbiol Mol Biol Rev,2011,75(1):133-191.

(上接第 70 页)

[24] Kathrin I M. Diversity of myxobacteria-we only see the tip of the iceberg [J]. Microorganisms,2018,6(3):84-106.

[25] Nan B,Zusman D R. Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria [J]. Annual Review of Genetics,2011,45:21-39.

[26] Herrmann J,Abou Fayad A,Mülle R. Natural products from myxobacteria;novel metabolites and bioactivities [J]. Natural Product Reports,2017,34(2):135-160.