

研究报告

南海深海沉积物中 52 株真菌的初步分离鉴定及其代谢产物活性

曾奇^{1,2} 仲伟茂^{1,2} 向瑶^{1,2} 陈夏雨^{1,2} 田新朋¹ 张偲¹ 王发左^{1*}

(1. 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东 广州 510301)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【背景】深海环境复杂多样,蕴含着丰富的真菌资源,为深海真菌结构新颖代谢产物化学及生物活性研究提供了新契机。【目的】对南海深海环境来源真菌进行初步鉴定和代谢产物活性初步研究,旨在筛选和发现潜在的药源真菌新资源,为南海深海真菌资源的进一步开发利用奠定基础。【方法】基于内转录间隔区(ITS)序列测定对分离得到的 52 株真菌进行初步鉴定,利用纸片扩散法、Solis 改良法和 DPPH 自由基清除法对真菌粗浸膏进行了抗菌(ABA)、卤虫致死(BSL)和抗氧化活性(ABTS)筛选。【结果】52 株真菌分布在 16 个属,其中枝孢菌属(*Cladosporium*)、曲霉属(*Aspergillus*)为优势菌群,分别占菌株总数的 25.00%、23.08%; 32 株真菌发酵产物具有抑制至少 1 种指示菌的活性,其中 8 株对所有指示菌均有抑制作用; 23 株具有一定强度的卤虫致死活性,占总数的 44.23%,其中有 2 株活性较显著,IC₅₀ 值为 68.59 μg/mL 和 78.83 μg/mL; 30 株具有 DPPH 自由基清除活性,占总数的 57.69%,其中有 9 株活性较显著,EC₅₀ 值低于 100 μg/mL。

【结论】初步认知了南海部分海域深海沉积环境真菌分布和代谢产物活性特征,发现了一批潜在的活性真菌资源,为后续深海真菌代谢产物化学多样性及其功能研究提供支撑。

关键词: 深海真菌, 鉴定, 抗菌活性, 卤虫致死活性, 抗氧化活性

Isolation, identification and evaluation of 52 fungi from the deep-sea sediments of South China Sea

ZENG Qi^{1,2} ZHONG Wei-Mao^{1,2} XIANG Yao^{1,2} CHEN Xia-Yu^{1,2}

TIAN Xin-Peng¹ ZHANG Si¹ WANG Fa-Zuo^{1*}

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Background] Deep-sea environment is complex and diverse with abundant fungi that

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41476136, 41230962); Regional Demonstration Project of Marine Economic Innovation and Development of Guangdong Province (GD2012-D01-002)

*Corresponding author: Tel: 86-20-34063746; E-mail: wangfazuo@scsio.ac.cn

Received: January 30, 2018; **Accepted:** April 18, 2018; **Published online** (www.cnki.net): August 02, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(41476136, 41230962); 广东省海洋经济创新发展区域示范专项(GD2012-D01-002)

*通信作者: Tel: 86-20-34063746; E-mail: wangfazuo@scsio.ac.cn

收稿日期: 2018-01-30; 接受日期: 2018-04-18; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-08-02

provide new opportunities to study the chemical and biological activity of deep-sea fungal metabolites. **[Objective]** To isolate, identify and evaluate fungi from the South China Sea deep-sea sediment, to discover new potential drug source fungi and lay the foundation for further utilization of deep-sea fungi from the South China Sea. **[Methods]** Based on intergenic transcribed spacer sequencing, 52 fungi isolated from deep-sea sediment were identified. All fungal crude extracts were tested for antibacterial, brine shrimp lethal and antioxidative activities by using Kirby-Bauer test, Solis' method and DPPH radical scavenging method. **[Results]** These fungi could be clarified into 16 genera, in which *Cladosporium* sp. and *Aspergillus* sp. were in majority, accounting for 25.00% and 23.08%, respectively; 32 strains inhibited 1 indicative bacterium at least, 8 of which inhibited all 4 indicative bacteria; 23 strains exhibited medium brine shrimp lethality, accounting for 44.23% of all isolated strains, 2 of which exhibited obvious activities with IC_{50} of 68.59, 78.83 $\mu\text{g/mL}$; 30 strains showed DPPH radical scavenging activity, accounting for 57.69%, 9 of which with EC_{50} values lower than 100 $\mu\text{g/mL}$. **[Conclusion]** This study revealed the distribution and metabolite activities of deep-sea fungi from South China Sea and found a number of potential active fungi, and provides support for subsequent investigation on chemical diversities and biological activities of deep-sea fungi.

Keywords: Deep-sea fungus, Identification, Antibacterial activity, Brine shrimp lethality, Antioxidative activity

深海作为海洋环境中的极端区域, 约占海洋总体积的 75%, 具有低温(部分区域, 如热液口为高温)、无光、高压、厌氧、寡营养等特点, 拥有集化学物质和微生物于一体的特殊生态环境。特殊的环境决定了孕育于其中的微生物具有一些特异的遗传背景和代谢能力, 进而表现在其代谢产物化学结构的多样性、新颖性和生物活性的显著性。研究表明, 76% 的深海微生物来源天然产物拥有生物活性, 50% 以上对人类肿瘤细胞株表现出显著的细胞毒活性^[1-4]。

真菌作为深海环境中重要微生物类群之一, 因其代谢产物结构和活性多样、创新指数高、成药性强、产量大等特点, 近年来倍受研究者关注, 已成为海洋天然产物研究的焦点^[5-6]。早在 1964 年, Roth 等^[7]就从 4 450 m 深大西洋海底沉积物中分离报道了深海真菌的存在。此后, 随着深海采样和微生物分离培养技术的进步, 不同深海海域来源真菌的报道不断出现, 如南海沉积物^[8-9]、马里亚纳海沟^[10]、太平洋沉积物^[11-12]、印度中部盆地^[13-14]等。然而, 相比细菌、古菌和放线菌, 对深海来源真菌研究的报道仍然较少, 并且研究多集中在分离培养、多样性调查、功能基因鉴定和适应机制等

方面^[15], 关于活性次级代谢产物相关研究起步晚, 报道更少。2004 年, Gautschi 等^[16]首次报道了深海沉积物来源真菌 *Penicillium corylophilum* 的次级代谢产物。随后, 一系列结构新颖、具有良好生物活性的深海来源真菌次级代谢产物被逐步发现报道。据统计, 2009 年底报道的深海来源真菌的新次级代谢产物为 36 个^[17], 2017 年底也仅累积达到 240 个左右^[18-20], 深海活性真菌筛选及其次级代谢产物研究潜力巨大。

南海作为我国面积最大、最深、地貌最复杂的边缘海, 其微生物数量丰富, 是研究海洋真菌最理想区域之一^[21]。然而目前国内外对该海域真菌多样性及其特性缺乏了解, 仅有少数文献对其进行报道^[8-9, 22-23]。近年, 南海深海来源真菌次级代谢产物报道持续增加, 截至 2017 年底, 共计报道新次级代谢产物 68 个, 约占已报道深海真菌新次级代谢产物总数的 28.3%, 数量远远高于其他海域^[18-20], 并且其结构多样性丰富, 出新率高, 活性相对较好, 涉及结构类型主要包括聚酮类^[24-25]、生物碱类^[26-27]和萜类等^[28-29], 活性主要集中在抗肿瘤^[26-27]、抗菌^[28-29]、抗病毒^[25]和抗污损^[24-25]等。由此可见, 南海深海沉积物真菌是潜

在新颖活性物质的重要生产源,具有巨大的开发利用前景。

在前期工作中,我们已从南海及印度洋深海沉积物环境分离筛选到 100 多株活性真菌资源,并对其部分重要活性菌株进行了深入的代谢产物化学多样性及活性研究,从中分离报道了一系列结构新颖、生物活性显著的代谢产物^[27,30-31]。作为该工作的延续,本研究通过对南海深海沉积物环境来源真菌的初步分离鉴定及其次级代谢产物活性初步研究,调查这些菌株次级代谢和活性潜能,旨在筛选和发现潜在的药源真菌,为南海深海真菌资源的进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株、活性检测指示菌和卤虫

本研究于 2016 年 10 月,搭乘中国科学院南海海洋研究所“实验 1 号”综合科学考察船,从南海不同海域利用抓斗式采泥器采集深海沉积物样品 13 个(表 1)。从上述样品中共分离鉴定得到 52 株深海真

菌,保存于中国科学院海洋微生物研究中心。

抗菌活性指示菌株为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*),来源于中国科学院海洋微生物研究中心;卤虫卵(Brine shrimp eggs)购于天津丰年水产养殖有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

ITS 基因的 PCR 扩增采用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),由深圳华大基因科技有限公司合成;Premix Taq 酶, TaKaRa 公司;二苯代苦味肼基自由基(DPPH)、抗坏血酸(Vc)、氯霉素, Sigma 公司;无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯、丙酮等,天津市大茂化学试剂厂。摇床,苏州培美实验设备有限公司;PCR 仪, Bio-Rad 公司;离心机, Eppendorf 公司;酶标仪, TECAN 公司;超低温冷冻冰箱, 海尔有限公司;高速分散机, IKA 公司;双筒解剖镜, 奥林巴斯公司。

表 1 南海深海沉积物样品基本情况

Table 1 Basic data of deep-sea sediment samples from South China Sea

海域 Sea area	样品编号 Sample No.	经度 Longitude	纬度 Latitude	水深 Depth (m)
南海北部 Northern of South China Sea	A	115°59'54"	21°00'20"	323.0
	B	116°30'07"	20°30'15"	460.0
	C	116°42'01"	20°17'12"	596.1
	D	116°38'32"	20°26'56"	610.7
	E	116°38'02"	20°18'38"	654.5
	F	117°03'43"	20°04'38"	1 781.0
南海中南部 South Central of South China Sea	G	113°58'50"	10°17'19"	933.0
	H	117°56'02"	10°01'23"	1 102.0
	I	117°30'06"	11°38'44"	1 684.0
	J	114°38'21"	13°08'40"	3 448.0
	K	116°30'26"	17°58'47"	3 937.0
	L	118°48'01"	18°17'37"	4 000.0
	M	114°21'10"	13°30'37"	4 280.0

1.1.3 培养基

海洋真菌的分离纯化使用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和查氏培养基(CZA), 液体发酵培养使用真菌 2 号培养基, 抗菌实验使用 LB 培养基。PDA 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 马铃薯 200.0, 琼脂 15.0, 陈海水 1.0 L, pH 7.2–7.4; CZA 培养基(g/L): 蔗糖 20.0, KCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaNO_3 3.0, K_2HPO_4 1.0, 琼脂 15.0, 陈海水 1.0 L, pH 7.4–7.6; 真菌 2 号培养基(g/L): 麦芽糖 20.0, 味精 10.0, KH_2PO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, 葡萄糖 10.0, 酵母膏 3.0, 玉米粉 1.0, 甘露醇 20.0, CaCO_3 2.0, 陈海水 1.0 L, pH 值调至 6.5; LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 蒸馏水 1.0 L, pH 值调至 7.0。

1.2 方法

1.2.1 海洋真菌的分离和纯化

取 5 g 海泥, 加入到 45 mL 无菌水中, 涡旋振荡 3 min 制成悬浊液, 取 200 μL 海泥悬浊液分别均匀涂布于天然海水配制的 PDA 和 CZA 培养基中; 待培养基晾干, 放入培养箱中, 28 °C 培养 3–5 d。整个分离过程严格按照无菌操作要求完成。待培养基上长出适合大小的菌落后, 挑取单菌落转接于新的上述培养基中, 反复转接至纯培养。经过多次转接纯化后的菌株以 PDA 斜面(4 °C)、甘油管(–80 °C, 甘油浓度: 30%)两种方式保藏于中国科学院海洋微生物研究中心。

1.2.2 菌株的分子生物学鉴定

用无菌牙签挑取少量真菌菌丝体, 置 1.5 mL 离心管中, 微波法提取真菌基因组 DNA^[32]。采用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增分离菌株的 rDNA ITS 区。PCR 反应体系(25 μL): 模板 DNA 1 μL , 引物(20 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , Premix Taq 引物酶 12.5 μL , ddH₂O 补足至 25 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 50 s, 52 °C 1 min, 72 °C 50 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 产物委托深

圳华大基因科技有限公司测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 分析, 检索相似性序列, 初步确定分离菌株的种类。

1.2.3 真菌代谢产物粗浸膏的制备

将活化后的菌株接种于已灭菌、包含 100 mL 真菌 2 号培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、180 r/min 培养 7 d。取全部发酵物, 超声破碎菌体细胞, 按体积比加入 2 倍量的乙酸乙酯, 静置过夜, 超声(25 °C, 600 W, 30 min)萃取后, 25 °C、5 000 $\times g$ 离心 10 min 取上清液, 减压浓缩至干, 精确称重, 所得萃取物为供试样品。

1.2.4 抗菌实验

采用纸片扩散法^[33], 指示菌株有金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌。具体步骤为: 取供试样品 20 mg 溶解于 1 mL 甲醇溶液中, 配制成浓度为 20 mg/mL 待测样品备用。将细菌接种于已灭菌的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 24 h, 取 1 mL 菌液均匀涂布在 LB 固体培养基上, 待菌液完全渗透后, 将直径为 6 mm 的圆形无菌滤纸片均匀铺在平板上。每个纸片上加入 5 μL 待测样品, 阳性对照为氯霉素, 空白对照为甲醇溶液。将培养皿置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h, 观察抑菌圈大小来确定抑菌活性大小。滤纸片原始直径为 6 mm, 文中抑菌圈直径均为减去滤纸片之后的值。

1.2.5 卤虫致死实验

采用 Solis 的改良方法^[34–35], 利用卤虫致死活性间接来指示代谢产物的细胞毒活性。具体操作为: 取供试样品 2 mg 溶解于 1 mL 甲醇溶液中, 配成浓度为 2 mg/mL 的母液, 然后依次稀释成终浓度为 10、100、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 等一系列浓度; 称取 100 mg 虫卵加入灭菌的 400 mL 海水中, 室温下由气泵缓缓充气, 24 h 后去除虫卵外壳及未孵化的卵, 再孵化 24 h 备用。每个 96 孔细胞培养板的小孔中加入 100 μL 卤虫孵化液, 内含卤虫数量约 10–15 个, 制成测试培养板。空白对照组和每个浓度的样品组各设 3 个平行孔, 空白对照组加 100 μL

海水, 样品组加 100 μL 所需浓度的样品液。室温下培养 24 h 后用双筒解剖镜观察, 计算每孔虫体死亡数和总数, 卤虫致死活性用校正死亡率表示, 公式如下:

校正死亡率(%)=(对照组存活率-处理组存活率)/处理组存活率 $\times 100$ 。

将 3 个浓度及其对应的校正死亡率输入计算机, 用 SPSS 软件做死亡率-浓度半对数曲线, 用 3 次回归方程计算半致死浓度(IC_{50})。

1.2.6 DPPH 自由基清除实验

采用 DPPH 自由基清除能力来评价发酵产物浸膏的抗氧化活性。用无水乙醇将样品配成浓度为 2 mg/mL 的母液, 依次稀释成终浓度为 10、50、100、500 和 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的一系列溶液。样品对 DPPH 自由基清除能力根据 Yen 等^[36]方法做了一些改良后进行试验, 即: $A_c=100 \mu\text{L}$ 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液+100 μL 乙醇; $A_i=100 \mu\text{L}$ 0.2 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液+100 μL 样品溶液; $A_j=100 \mu\text{L}$ 乙醇+100 μL 样品溶液。混合均匀后室

温于暗处静置 30 min, 然后在 517 nm 处测定吸光度, 每个样品平行测试 3 次, 按下式计算自由基清除率(K):

$$\text{清除率 } K(\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100$$

式中, A_i 为实验组(样品+DPPH)的吸光值; A_j 为空白组(样品+乙醇)的吸光值; A_c 为对照组(DPPH+乙醇)的吸光值; 用 SPSS 软件做清除率-浓度半对数曲线, 用 3 次回归方程计算半清除浓度(EC_{50}), 阳性对照为抗坏血酸(Vc)。

2 结果与分析

2.1 海洋真菌的分子生物学鉴定结果

BLAST 分析 52 株深海来源真菌测序结果, 检索相似性序列, 结果表明, 52 株真菌分布在 16 个属, 其中枝孢菌属(*Cladosporium*)比例最高, 共有 13 株, 占总数的 25.00%; 其次是曲霉属(*Aspergillus*), 共 12 株, 占总数的 23.08%; 青霉属(*Penicillium*)有 6 株, 占 11.54%; 踝节菌属(*Talaromyces*) 5 株, 占 9.62%; 其他属总共 8 株, 占 15.3% (图 1)。

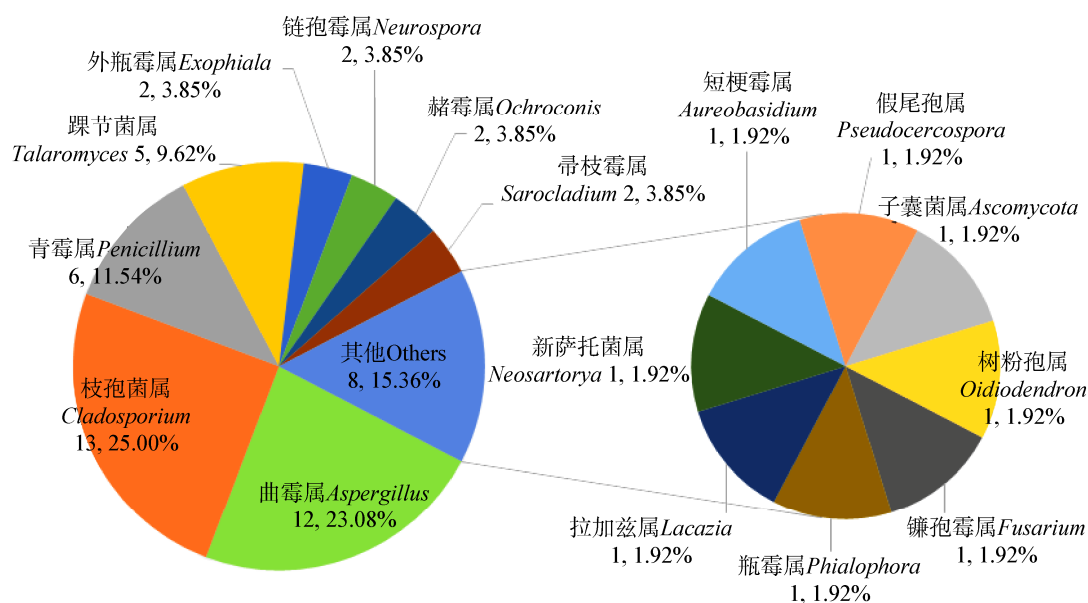


图 1 52 株真菌的分子鉴定结果

Figure 1 Molecular identification results of 52 fungal strains

注: 图 1 中数据分别表示菌株数及所占比例。

Note: The data in Figure 1 represent the number and proportion of fungal strains.

2.2 海洋真菌分布特征

从 13 个站位的 13 份沉积物样品中共分离出 52 株纯培养的真菌(图 2)，所有站位均能分离到至少 1 株真菌，其中 A-F 等 6 个样品采集自南海北部海域，从中一共分离得到 31 株深海真菌，归类于 12 个属，平均每个样品能分离到真菌 5.17 株，类属 2 个；G-M 等 7 个样品采集自南海中南部海域，从中一共分离得到 21 株深海真菌，归类为 8 个属，平均每个样品能分离到 3 株，类属 1.14 个。由此初步可见，南海北部海域可培养深海真菌多样性明显高于南海中南部海域。从垂直分布角度看，在南海北部海域，随着深度的增加(样品 A-F)，分离到的真菌数量和类群也有总体增加的趋势，其中 E 站位(654.5 m)处样品中分离到真菌属数最多，共有 6 个属，F 站位(1 781 m)处样品中分离到的真菌数量最多，合计 12 株；在南海中南部海域，菌株分布与深度之间的关系没有南海北部海域明显，除 G 站位(933 m)外，各站位

样品中分离到的菌株数量和类群基本一致，无明显差异。

2.3 抗菌活性(ABA)评价

对 4 种敏感指示菌的抑菌实验表明，32 株真菌发酵液具有抑制至少 1 种指示菌的活性，其中 8 株对所有指示菌均有抑制作用，分别是 FZQ001、FZQ014、FZQ025、FZQ028、FZQ031、FZQ032、FZQ045 和 FZQ052。阳性对照氯霉素对金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌等 4 株指示菌的抑菌圈直径分别为 10.46、7.87、11.53 和 6.44 mm (表 2)。

2.4 卤虫致死活性(BSL)评价

通过卤虫致死活性实验判断各真菌代谢产物粗提物的细胞毒活性。结果表明，23 株菌的发酵产物呈现出一定强度的卤虫致死活性($IC_{50}<500\text{ }\mu\text{g/mL}$)，占供试菌株的 44.23%，其中有 2 株活性较显著，分别为 FZQ025 和 FZQ028， IC_{50} 为 68.59 $\mu\text{g/mL}$ 和 78.83 $\mu\text{g/mL}$ (表 3)。

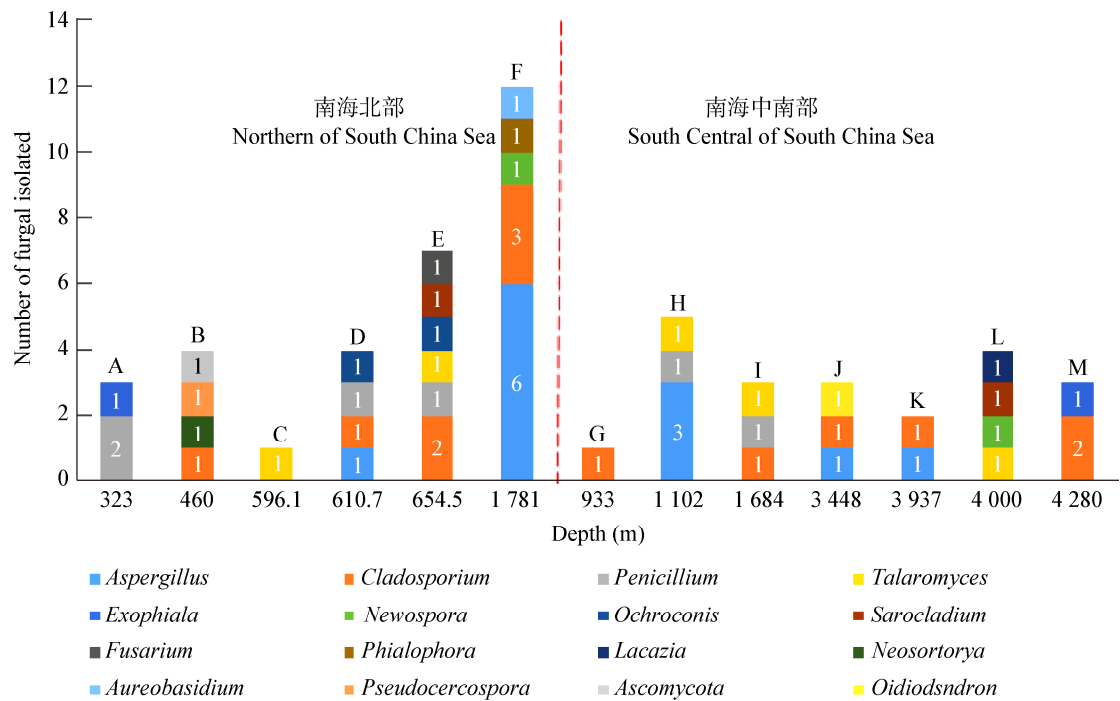


图 2 各样品中真菌的多样性和分布
Figure 2 The distribution and comparison of fungi diversity in different sample

表 2 真菌代谢产物抗菌活性实验结果

Table 2 The antibacterial activities of fungal metabolite extracts

菌株 Strains	金黄色葡萄球菌 SA	苏云金芽孢杆菌 BM	枯草芽孢杆菌 BS	大肠杆菌 EC
FZQ001	+++	+++	+	+
FZQ002	-	-	-	-
FZQ003	-	-	+	-
FZQ004	+	-	-	-
FZQ005	-	-	-	-
FZQ006	-	-	-	-
FZQ007	-	-	-	-
FZQ008	+	+	-	+
FZQ009	+	-	-	-
FZQ010	-	-	-	-
FZQ011	-	-	+	-
FZQ012	-	-	+	-
FZQ013	-	-	-	-
FZQ014	++	+++	++	+
FZQ015	-	-	-	+
FZQ016	+++	-	-	-
FZQ017	-	-	-	-
FZQ018	-	-	-	-
FZQ019	-	-	-	-
FZQ020	+	-	+	-
FZQ021	+	-	-	-
FZQ022	-	-	-	-
FZQ023	-	-	+	-
FZQ024	+	+	+	-
FZQ025	+++	+++	++	++
FZQ026	++	++	-	-
FZQ027	-	-	-	+
FZQ028	+++	+++	+++	++
FZQ029	-	-	-	+
FZQ030	-	+	-	-
FZQ031	+++	++	+	+
FZQ032	+	+	+	+
FZQ033	-	-	-	-
FZQ034	-	-	-	-
FZQ035	+	-	-	-
FZQ036	-	-	-	+
FZQ037	-	-	-	-
FZQ038	-	-	+	+
FZQ039	-	-	-	-
FZQ040	+	-	+	-
FZQ041	-	-	-	-
FZQ042	-	-	+	-
FZQ043	-	-	-	-
FZQ044	-	-	-	-
FZQ045	++	+	+	+
FZQ046	-	-	-	+
FZQ047	-	-	-	-
FZQ048	-	-	-	-
FZQ049	-	-	-	-
FZQ050	+	-	-	-
FZQ051	-	-	+	-
FZQ052	+	+	+	+
氯霉素 Chl	++++	++++	++++	++++

注：-：无抑制作用；+：抑菌圈为 1-2 mm；++：抑菌圈为 2-4 mm；+++：抑菌圈为 4-6 mm；++++：抑菌圈≥6 mm.

Note: -: No inhibition; +: Inhibition zone was 1-2 mm; ++: Inhibition zone was 2-4 mm; +++: Inhibition zone was 4-6 mm; ++++: Inhibition zone was ≥6 mm.

表 3 真菌代谢产物卤虫致死活性和 DPPH 自由基清除活性实验结果

Table 3 Brine shrimp lethality and DPPH free radical scavenging activities of fungal metabolite extracts

菌株 Strains	活性评价 Activity evaluation (μg/mL)	
	卤虫致死活性 BSL IC ₅₀	DPPH 自由基清除活性 ABTS EC ₅₀
FZQ001	262.49	15.24
FZQ002	>500.00	134.51
FZQ003	>500.00	101.27
FZQ004	>500.00	189.47
FZQ005	>500.00	195.90
FZQ006	>500.00	>500.00
FZQ007	>500.00	212.33
FZQ008	105.26	294.33
FZQ009	400.36	>500.00
FZQ010	>500.00	>500.00
FZQ011	226.86	>500.00
FZQ012	>500.00	412.32
FZQ013	479.95	>500.00
FZQ014	102.44	75.79
FZQ015	>500.00	>500.00
FZQ016	>500.00	>500.00
FZQ017	206.03	421.52
FZQ018	>500.00	202.67
FZQ019	>500.00	>500.00
FZQ020	>500.00	>500.00
FZQ021	335.72	446.13
FZQ022	159.36	310.34
FZQ023	>500.00	141.96
FZQ024	169.05	66.57
FZQ025	68.59	71.44
FZQ026	262.52	348.76
FZQ027	>500.00	>500.00
FZQ028	78.83	18.22
FZQ029	450.36	>500.00
FZQ030	238.30	476.82
FZQ031	>500.00	37.90
FZQ032	>500.00	29.85
FZQ033	>500.00	>500.00
FZQ034	>500.00	>500.00
FZQ035	117.61	410.87
FZQ036	>500.00	>500.00
FZQ037	>500.00	>500.00
FZQ038	>500.00	268.25
FZQ039	>500.00	355.99
FZQ040	>500.00	>500.00
FZQ041	>500.00	>500.00
FZQ042	>500.00	>500.00
FZQ043	160.12	323.55
FZQ044	323.83	324.71
FZQ045	207.19	50.07
FZQ046	255.15	>500.00
FZQ047	483.42	195.47
FZQ048	>500.00	341.75
FZQ049	>500.00	>500.00
FZQ050	244.54	>500.00
FZQ051	>500.00	>500.00
FZQ052	206.60	34.52

2.5 DPPH 自由基清除活性(ATBS)评价

DPPH 是一种稳定的自由基，在有机溶剂中呈紫色，可见光区最大吸收波长为 517 nm，加入抗氧化剂后，部分自由基被清除，使吸收减弱，以此来评价样品抗氧化活性强弱^[37]。实验结果表明，共有 30 株菌的发酵产物呈现出不同程度 DPPH 自由基清除活性(EC₅₀<500 μg/mL) (表 3)，占供试菌株的 57.69%；其中有 9 株活性显著，EC₅₀ 低于 100 μg/mL，分别是 FZQ001、FZQ014、FZQ024、FZQ025、FZQ028、FZQ031、FZQ032、FZQ045 和 FZQ052，占总数的 17.31%。阳性对照抗坏血酸的 EC₅₀ 为 5.77 μg/mL。

2.6 菌株分布及其代谢产物活性关系

研究初步表明，真菌代谢产物活性与其地域分布、种属呈现一定规律的联系。1 000 m 以内站位样品中分离到的真菌代谢产物活性相对较低，例如 B (460 m)、D (610.7 m)、G (933 m)等站位真菌代谢产物活性极差，多数没有或者仅表现出 1 种活性。但也并非站位越深，分离到的真菌代谢产物活性越强。有趣的是大部分活性显著的菌株均分离自中等深度的站位(1 000–2 000 m 左右)，例如 F 站位(1 781 m)样品中分离到的真菌不仅数量类型多，而且代谢产物活性丰富，12 株真菌中有 6 株具有抗菌、卤虫致死、DPPH 自由基清除 3 种活性，明显优于其他站位。*Ascomycota*、*Ochroconis*、*Pseudocercospora*、*Neosartorya* 等属真菌不仅数量少，代谢产物活性也差，前 2 者甚至在所有活性测试中均无作用；*Cladosporium*、*Aspergillus* 属数量较多，不同菌株之间代谢产物活性差异较大，既有许多具有 3 种活性的菌株，也有少部分菌株在测试中无任何活性(图 3)。

3 讨论

南海深海沉积物环境蕴含着丰富多样的真菌资源，国内外对此来源真菌相关研究报道虽逐年增多，但依然较少，限制了对南海沉积环境来源真菌资源的进一步开发利用。本研究从来源于南海不同

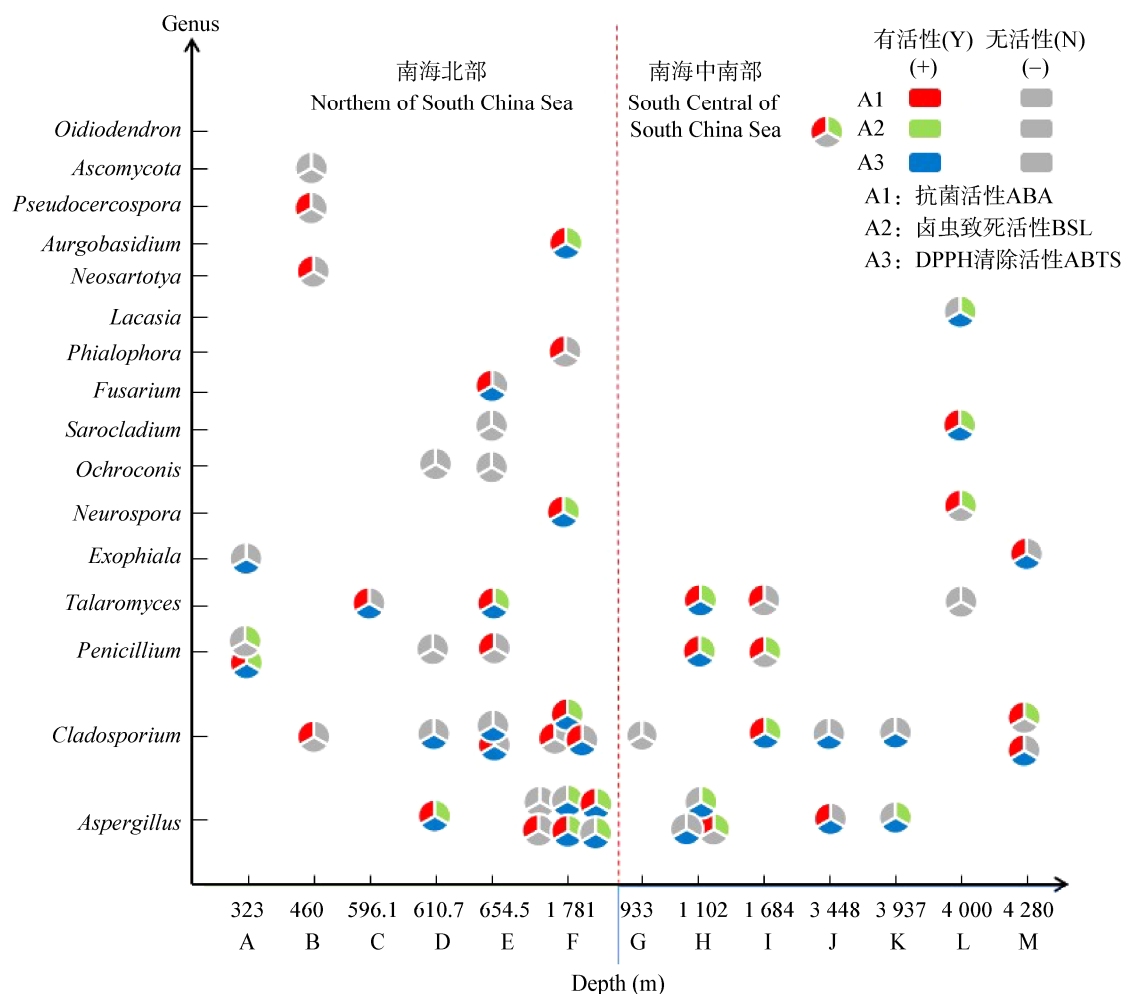


图3 各样品中真菌分布与代谢产物活性关系

Figure 3 The relationship between fungal distribution and metabolite activities in different samples

深海沉积环境的 13 份样品中分离得到的 52 株真菌,其 ITS 序列与数据库中已有真菌序列相似度均大于 97%。初步形态学鉴定和 ITS 序列分析表明,所有真菌均属于子囊菌门,未见其他门的真菌,研究结果进一步验证了当前深海真菌类群分布特征^[38]。通过传统培养方式分离得到的深海真菌中,绝大多数属于子囊菌门,少数属于担子菌门,而其他门真菌尚未成功分离,其原因可能是当前实验室内分离、培养条件尚不能充分模拟深海原位条件,例如温度、压力、黑暗等。

南海深海沉积物中的真菌物种丰富,多样性高,归类于 16 个属,其中枝孢菌属(*Cladosporium*)、

曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)为优势菌群,分别占 25.00%、23.08%和 11.54%。冯丽等^[23]利用平板涂布、低温诱导和高通量筛选等方法从南海沉积物中分离出 12 个属的真菌,其中枝孢菌属(*Cladosporium*)是最优势的属,其次是链格孢属(*Alternaria*);曲佳等^[22]利用平板涂布法从南海沉积物中分离得到的耐(嗜)盐真菌以曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)为主,分别占全部菌株的 39.0%和 12.2%,二者与本研究结果略有差异但基本一致,此差异性的出现可能与取样点深度和分离筛选方法有关。孙开明^[39]利用平板涂布法从黄海山东沿岸的沉积物中分离出的真菌以青

霉属最为广泛, 与本研究结果不同, 推测可能与海域差异性有关。除了上述三大优势菌群外, 本研究获得的其他 9 个稀有属, 如 *Talaromyces*、*Exophiala*、*Sarocladium*、*Fusarium*、*Phialophora*、*Neosartorya*、*Aureobasidium*、*Ascomycota* 和 *Oidiodendron* 等, 通过对比研究发现, 均在前人的研究中被报道过, 但也有 4 个稀有种属目前在海洋环境中未见报道, 如 *Neurospora*、*Ochroconis*、*Lacazia* 和 *Pseudocercospora* 等。综上所述, 南海深海沉积物中具有丰富新颖的海洋真菌资源, 值得进一步深入研究。

基于本研究结果, 13 个站位间的可培养真菌多样性存在较大差异, 主要表现在水平分布和垂直分布两个方面。从水平分布上来说, 南海北部海域(样品 A-F)的可培养真菌多样性明显高于南海中南部海域(样品 G-M), 这可能是因为南海北部靠近大陆, 珠江、湄公河、湄南河等三大径流常年为其输送陆源物质, 积累了大量富含营养盐的沉积物, 适于真菌的生长。从垂直分布角度看, 在南海北部海域(样品 A-F), 分离的真菌数量类群与深度之间大体成正相关趋势, 主要原因可能是站位越深, 沉降积累沉积物的时间越长, 营养物质也更加丰富。然而在南海中南部海域(样品 G-M), 菌株数量类群与深度之间无明显关系, 除 G 站位(933 m)外, 各站位样品中分离到的菌株数量类群基本一致。Zhang 等^[9]对南海 9 个站位的深海沉积物中可培养的真菌进行了比对, 同样发现各站位之间培养到的真菌多样性存在较大的差异。Rédou 等^[40]研究了海底表层以下, 跨度达千米的沉积物中可培养真菌的组成, 发现深度对真菌多样性有显著的影响。深海可培养真菌多样性和站位、深度之间的关系尚有待进一步研究。

活性评价结果表明, 本研究中分离到的真菌代谢产物表现出不同强度的抑菌、细胞毒及抗氧化活性。在分离的 52 株真菌中, 32 株真菌的发酵产物具有抑制至少 1 种指示菌的活性, 占总数的 61.53%; 23 株具有一定强度的卤虫致死活性, 占

总数的 44.23%; 30 株具有 DPPH 自由基清除活性, 占总数的 57.69%。Zhang 等^[9]从南海深海沉积物中分离得到 27 个真菌形态种, 56% 的菌株具有抗菌活性。熊枫等^[6]从西太平洋近赤道区采集到的 18 个深海沉积物样品中分离得到 83 株海洋真菌, 其中有 37 株菌株对至少 1 种指示菌有抑制作用, 有 29 株菌株对 KB 或 Raji 肿瘤细胞具有显著的抑制活性, 分别占总供测菌株的 44.6% 和 34.9%, 这与本研究结果基本吻合; 张翼等^[41]对 44 株海洋真菌(21 株来自大连潮间带植物或沉木, 23 株来自鲨鱼鳃部)的抗衰老痴呆相关活性成分进行了筛选与追踪, 发现 32 株菌的发酵产物具有 DPPH 自由基清除活性, 占总数的 72.73%, 明显高于本研究结果, 推测可能是由于深海缺氧环境导致代谢产物的差异。综合分析, 本研究发现的菌株 FZQ001、FZQ014、FZQ025、FZQ028、FZQ031、FZQ032、FZQ045 和 FZQ052 等 8 株真菌的发酵产物在 3 项活性测试方面表现优异, 可以作为潜在的目标活性菌株。其中, 菌株 FZQ025 和 FZQ028 对 4 种指示菌的抑菌圈直径均大于 4 mm, 抗菌活性显著, 卤虫致死活性 IC_{50} 为 68.59 $\mu\text{g/mL}$ 和 78.83 $\mu\text{g/mL}$, DPPH 自由基清除活性 EC_{50} 为 71.44 $\mu\text{g/mL}$ 和 18.22 $\mu\text{g/mL}$, 目前这 2 株真菌正在进行深入的次级代谢产物化学多样性及活性研究。

此外, 本文还首次初步探讨了菌株地域分布、种属与其代谢产物活性之间的关系。研究表明, 中等深度(1 000–2 000 m 左右)处站位沉积物样品中的真菌代谢产物活性最为丰富, 其次是底层深度(>3 000 m)沉积物, 表层(1 000 m 以内)沉积物中真菌代谢产物活性最差。推测其原因可能有以下几点: (1) 表层沉积物环境相对较为简单, 与中底层沉积物复杂环境相比, 缺乏特殊的条件来刺激诱导真菌产生丰富的生物活性; (2) 底层沉积物环境受某种因素的限制, 从而丧失某种特定的生物活性, 比如缺氧环境可能导致深海真菌抗氧化活性较弱。真菌种属也影响其代谢产物活性, 绝大部分稀有种属真菌代谢产物活性较差, 例如 *Ascomycota*、

Ochroconis、*Pseudocercospora*、*Neosartorya* 等。优势菌群 *Cladosporium*、*Aspergillus* 属的真菌代谢产物活性差异巨大,但大部分菌株活性均较为显著,仅有少量菌株在测试中未显示任何活性。目前,尚未见该类研究的报道。

4 结论

本文对南海深海沉积环境中分离得到的 52 株真菌进行了初步鉴定,结果表明 52 株深海真菌分布在 16 个菌属,物种多样性较高,对不同站点分离的真菌进行比较,发现南海北部海域深海真菌多样性明显高于南海中南部海域,在南海北部海域随着深度的增加,可培养深海真菌数量及种类也随之增加;通过测试其发酵产物的抗菌、卤虫致死和 DPPH 自由基清除活性,筛选出具有抑制至少 1 种指示菌活性的菌株 32 株,其中对所有 4 种指示菌株均有抑制作用的菌株 8 株;具有一定强度卤虫致死活性的菌株 23 株,其中活性尤为显著的菌株 2 株;具有不同程度 DPPH 自由基清除活性的菌株 30 株,其中活性较强的菌株 9 株;最后初步探讨了菌株地域分布、种属与其代谢产物活性之间的关系,发现真菌代谢产物活性最为丰富的区域在中等深度(1 000–2 000 m 左右)处的沉积物环境,类群主要集中在优势菌群 *Cladosporium*、*Aspergillus* 属。以上研究丰富了研究者对南海深海沉积物来源真菌多样性及其代谢产物活性的了解,为深海药源微生物发现提供资源保障,同时也为研究人员通过活性追踪方法、有目的深入开展其代谢产物化学多样性和活性研究提供指导。

REFERENCES

- [1] Saleem M, Ali MS, Hussain S, et al. Marine natural products of fungal origin[J]. *Natural Product Reports*, 2007, 24(5): 1142-1152
- [2] Raghukumar C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective[J]. *Fungal Diversity*, 2008, 31: 19-35
- [3] Skropeta D. Deep-sea natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2008, 25(6): 1131-1166
- [4] Thornburg CC, Zabriskie TM, Mcphail KL. Deep-sea hydrothermal vents: potential hot spots for natural products discovery?[J]. *Journal of Natural Products*, 2010, 73(3): 489-499
- [5] Wang XM, Li M, Luo ZH, et al. A study of marine fungi and the diversity of bioactive substances produced by them[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2007, 41(3): 69-74
- [6] Xiong F, Zheng ZH, Huang YJ, et al. Antimicrobial and antitumor activities of marine fungi isolated from sediment in deep sea[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2006, 45(3): 419-423 (in Chinese)
- 熊枫, 郑忠辉, 黄耀坚, 等. 从深海沉积物中筛选具有抗菌、抗肿瘤活性的海洋真菌[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2006, 45(3): 419-423
- [7] Roth FJ Jr, Orpurt PA, Ahearn DG. Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1964, 42(4): 375-383
- [8] Lai XT, Cao LX, Tan HM, et al. Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea[J]. *The ISME Journal*, 2007, 1(8): 756-762
- [9] Zhang XY, Zhang Y, Xu XY, et al. Diverse deep-sea fungi from the South China Sea and their antimicrobial activity[J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(5): 525-530
- [10] Takami H, Inoue A, Fuji F, et al. Microbial flora in the deepest sea mud of the Mariana Trench[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 152(2): 279-285
- [11] Xu W, Pang KL, Luo ZH. High fungal diversity and abundance recovered in the deep-sea sediments of the Pacific Ocean[J]. *Microbial Ecology*, 2014, 68(4): 688-698
- [12] Burgaud G, Le Calvez T, Arzur D, et al. Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents[J]. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(6): 1588-1600
- [13] Damare S, Raghukumar C, Raghukumar S. Fungi in deep sea sediments of the Central Indian Basin[J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2006, 53(1): 14-27
- [14] Singh P, Raghukumar C, Verma P, et al. Phylogenetic diversity of culturable fungi from the deep-sea sediments of the Central Indian Basin and their growth characteristics[J]. *Fungal Diversity*, 2010, 40(1): 89-102
- [15] Zhang Y, Xiao X. Research and development on deep sea microbiology[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24(9): 986-990 (in Chinese)
- 张宇, 肖湘. 深海微生物的研究与开发[J]. *生命科学*, 2012, 24(9): 986-990
- [16] Gautschi JT, Amagata T, Amagata A, et al. Expanding the strategies in natural product studies of marine-derived fungi: a chemical investigation of *Penicillium* obtained from deep water sediment[J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(3): 362-367
- [17] Pettit RK. Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery[J]. *Marine Biotechnology*, 2011, 13(1): 1-11
- [18] Daletos G, Ebrahim W, Ancheeva E, et al. Natural products from deep-sea-derived fungi a new source of novel bioactive compounds?[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2018, 25(2): 186-207
- [19] Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, et al. Marine natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2017, 34(3): 235-294
- [20] Wang YT, Xue YR, Liu CH. A brief review of bioactive metabolites derived from deep-sea fungi[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(8): 4594-4616

- [21] Li T, Wang P, Wang PX. A preliminary study on the diversity of bacteria in the Xisha Trough Sediment, the South China Sea[J]. *Advances in Earth Science*, 2006, 21(10): 1058-1062 (in Chinese)
李涛, 王鹏, 汪品先. 南海西沙海槽沉积物细菌多样性初步研究[J]. *地球科学进展*, 2006, 21(10): 1058-1062
- [22] Qu J, Liu KH, Ding XW, et al. Fungal diversity and enzyme activities in marine sediments in the South China Sea[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(5): 552-562 (in Chinese)
曲佳, 刘开辉, 丁小维, 等. 南海局部海洋沉积物中真菌多样性及产酶活性[J]. *微生物学报*, 2014, 54(5): 552-562
- [23] Feng L, Jiang Q, Li YX, et al. Diversity and antimicrobial activity of fungi isolated from deep-sea sediments in South China Sea[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(9): 1332-1341 (in Chinese)
冯丽, 蒋群, 李英新, 等. 中国南海部分深海沉积物真菌多样性及其抗菌活性[J]. *微生物学报*, 2017, 57(9): 1332-1341
- [24] Xu XY, Zhang XY, Nong XH, et al. Brevianamides and mycophenolic acid derivatives from the deep-sea-derived fungus *Penicillium brevicompactum* DFFSCS025[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(2): 43
- [25] Huang ZH, Nong XH, Ren Z, et al. Anti-HSV-1, antioxidant and antifouling phenolic compounds from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor* SCSIO 41502[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 27(4): 787-791
- [26] Li CS, Li XM, An CY, et al. Prenylated indole alkaloid derivatives from marine sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44[J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2014, 97(10): 1440-1444
- [27] Wang FZ, Huang Z, Shi XF, et al. Cytotoxic indole diketopiperazines from the deep sea-derived fungus *Acrostalagmus luteoalbus* SCSIO F457[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22(23): 7265-7267
- [28] Li XD, Li XM, Xu GM, et al. Antimicrobial phenolic bisabolanes and related derivatives from *Penicillium aculeatum* SD-321, a deep sea sediment-derived fungus[J]. *Journal of Natural Products*, 2015, 78(4): 844-849
- [29] Li XD, Li XM, Li X, et al. Aspewentins D-H, 20-nor-isopimarane derivatives from the deep sea sediment-derived fungus *Aspergillus wentii* SD-310[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(5): 1347-1353
- [30] Huang HB, Wang FZ, Luo MH, et al. Halogenated anthraquinones from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO F063[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(7): 1346-1352
- [31] Huang Z, Wang FZ, Tian XP, et al. Identification and activities of fungal strain 00457 isolated from the deep-sea sediment of Northern South China Sea[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012(10): 199-204 (in Chinese)
黄智, 王发左, 田新朋, 等. 一株南海北部深海沉积环境真菌 00457 的鉴定及其活性研究[J]. *生物技术通报*, 2012(10): 199-204
- [32] Pan L, Cui C, Wang B. Rapid extraction of filamentous fungal DNA for PCR amplification[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(3): 450-453 (in Chinese)
潘力, 崔翠, 王斌. 一种用于 PCR 扩增的丝状真菌 DNA 快速提取方法[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(3): 450-453
- [33] Luo ZH, Huang XL, Wang L, et al. Screening of marine bacteria with antimicrobial activity[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2002, 21(2): 181-186 (in Chinese)
骆祝华, 黄翔玲, 王琳, 等. 海洋细菌抑菌活性菌株的筛选[J]. *台湾海峡*, 2002, 21(2): 181-186
- [34] Solis PN, Wright CW, Anderson MM, et al. A Microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp)[J]. *Planta Medica*, 1993, 59(3): 250-252
- [35] Jerry LM, Gu ZM. Two simple screening methods for antitumor activity[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1997, 22(10): 617-619 (in Chinese)
杰利·L·麦克劳林, 顾哲明. 两种简易的抗肿瘤活性初筛方法[J]. *中国中药杂志*, 1997, 22(10): 617-619
- [36] Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(1): 27-32
- [37] Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, et al. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI.: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical[J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1989, 37(8): 2016-2021
- [38] Nagahama T, Takahashi E, Nagano Y, et al. Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane cold-seep sediments[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 2359-2370
- [39] Sun KM. The primary study on the diversity of marine-derived fungi associated with marine algae and sediment from the intertidal zone of Shandong, Yellow Sea[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 (in Chinese)
孙开明. 黄海山东沿岸潮间带藻生与沉积物真菌物种多样性初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2011
- [40] Rédou V, Navarri M, Meslet-Cladière L, et al. Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(10): 3571-3583
- [41] Zhang Y, Bao HY, Nie YY, et al. Screening and tracing of anti-alzheimer related bioactive constituents from marine fungi[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(11): 63-72 (in Chinese)
张翼, 鲍海燕, 聂影影, 等. 海洋真菌抗老年痴呆相关活性成分的筛选与追踪研究[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(11): 63-72