

# 海洋细菌抗肿瘤活性菌株的筛选与鉴定

王雪玲<sup>1</sup>, 缪莉<sup>1, 2\*</sup>, 董昆明<sup>1</sup>, 周晓见<sup>1</sup>, 靳翠丽<sup>1</sup>, 钱晓晴<sup>1</sup>, 马君千<sup>1</sup>

(1. 扬州大学 环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127;

2. 中国科学院 上海药物研究所 新药研究国家重点实验室, 上海 201203)

**摘要:** 采用 MTT 法对分离自美国圣璜岛海域的 251 株海洋细菌进行抗肿瘤活性的筛选, 以期从海洋环境中筛选出具有抗肿瘤活性的菌株, 为新型抗肿瘤药物开发提供新的天然产物资源。结果表明: 54 株海洋菌有较好的抗肿瘤活性, 在测试浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 对 HeLa 细胞的抑制率均大于 50%, 占总测试菌株的 21.5%, 其中有 7 株菌株对 HeLa 细胞的抑制率在 85% 以上。在所有活性菌株中, 菌株 No. 657 的活性最强, 其液体发酵及固体发酵的提取物, 对 HeLa 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为  $36.53, 3.19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 经菌株形态的观察和 16S rDNA 序列分析鉴定, 该菌株为变形斑沙雷氏菌 *Serratia proteamaculans*。这表明, 海洋微生物是抗肿瘤活性物质的重要来源, 菌株 No. 657 是一株很好的抗肿瘤活性菌, 其固体发酵更适宜其活性代谢产物的产生。

**关键词:** 海洋细菌; 抗肿瘤活性; MTT 法; 抑制率

中图分类号: Q 939.1

文献标志码: A

文章编号: 1671-4652(2012)02-0018-05

## The screening and identification of marine bacteria with antitumor activity

WANG Xue-ling<sup>1</sup>, MIAO Li<sup>1, 2</sup>, DONG Kun-ming<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-jian<sup>1</sup>,  
JIN Cui-li<sup>1</sup>, QIAN Xiao-qing<sup>1</sup>, MA Jun-qian<sup>1</sup>

(1. Coll of Environ Sci and Engin, Yangzhou Univ, Yangzhou 225127, China;

2. Nat Key Lab of Drug Res, Shanghai Inst of Materia Med, Chinese Acad of Sci, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT:** The antitumor activity of some marine bacterial isolates was investigated to provide potential active strains as well as novel active compounds for the antitumor drug development. In this study, by using MTT assay, we screened for the antitumor activity from some marine bacterial strains which were isolated from San Juan Island. The results showed that, among 251 tested bacterial isolates, 54 isolates (about 21.5%) showed better antitumor activity. Their inhibition rates against HeLa cell at the concentration of  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  were higher than 50%. And 7 of them showed stronger antitumor activity with the inhibitory rate higher than 85%. Among all the active strains, bacterium No. 657 showed the most remarkable antitumor activities. The antitumor activities ( $\text{IC}_{50}$ ) of its metabolites extracted from liquid fermentation and solid-state fermentation were  $36.53$  and  $3.19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. This strains was identified as *Serratia proteamaculans*, according to its morphological observation and 16S rDNA sequence analysis. Our results indicated that marine microorganisms are an important source of antitumor substances. Isolate No. 657 might be a good antitumor active strain and the solid-state fermentation should be better for its active metabolites production.

**KEY WORDS:** marine bacteria; antitumor activities; MTT assay; the inhibition rate

癌症是威胁人类健康的主要疾病之一, 根据世界卫生组织预计, 到 2030 年每年将有超过 11 万人死于癌症, 抗肿瘤药物的研究已成为研究的热点。

海洋覆盖了地球表面的 72%, 且由于海洋生物栖息地的多样性, 造成海洋生物在物种、基因组和生态功能上的多样性<sup>[1-2]</sup>。据调查, 海洋环境潜在的新物种超过 6 000 种<sup>[3]</sup>。因此, 海洋成为开发生物活性物质的重要来源。近 20 年来, 已从海绵、海鞘、海兔、海藻、珊瑚等海洋生物中分离获得大量具有抗

收稿日期: 2012-02-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41076097, 41006097, 41106113); 新药研究国家重点实验室开放基金项目(SIMM1106KF-09)

作者简介: 王雪玲(1986—), 女, 山东莘县人, 扬州大学硕士研究生, 主要从事海洋微生物抗肿瘤研究。

\* 联系作者, E-mail: miaoli@yzu.edu.cn

肿瘤活性的化合物<sup>[4-7]</sup>,这些化合物是开发抗肿瘤新药物的重要来源,如由海绵中抗肿瘤物质合成了药物 eribulin mesylate<sup>[8]</sup>,由海鞘中活性物质得到了抗肿瘤药物 trabectedin<sup>[9]</sup>。越来越多的试验证明来自海洋动植物的活性物质的真正生物源是海洋微生物。目前,该方面研究主要集中在海洋细菌、真菌、放线菌抗肿瘤化合物的研究上,已经分离出许多具有开发价值的抗肿瘤化合物<sup>[10-15]</sup>。尽管如此,海洋来源的抗肿瘤药物在药物市场上的比重仍远远低于陆地来源,因此,开发新的抗肿瘤药物仍然需要寻找更多、抗肿瘤性更强的海洋微生物活性物质。本研究采用 MTT 法测定了海洋菌粗提物对 HeLa 肿瘤细胞株的细胞毒活性,从 251 株海洋细菌中筛选出多株具有较好抗肿瘤活性的菌株,其中一株海洋细菌具有很强的抗肿瘤活性,具有很好的研究价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

1) 供试菌株:本研究测试所用菌株为海绵共附生细菌,由香港科技大学海洋海岸实验室提供,分离自美国圣璜岛海域,其海绵样品采集及菌株分离方法见文献<sup>[16]</sup>。

2) 培养基:细菌种子培养基及液体发酵培养基,蛋白胨 5.0 g,酵母膏 3.0 g,柠檬酸铁 0.1 g,NaCl 19.45 g,MgCl<sub>2</sub> 5.9 g,MgSO<sub>4</sub> 3.24 g,CaCl<sub>2</sub> 1.8 g,KCl 0.55 g,加蒸馏水 1 L,调节 pH 至 7.4~7.6;细菌固体发酵培养基,配方同上,每 1 L 培养基添加 12.0 g 琼脂;细胞培养基,RPMI (Roswell Park Memorial Institute)1640 完全培养基,加 10% 灭活小牛血清及 1% 二抗(青霉素、链霉素),混匀后用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌。

3) 肿瘤细胞株:人宫颈癌 HeLa 细胞购自上海复祥生物科技有限公司。

### 1.2 试验方法

1) 菌株发酵及粗提物的获取:用接种环从 4 °C 冰箱保存的平板上挑取海洋菌单菌落,接种到装有约 8 mL 无菌培养基的试管中,放置在 30 °C、130 r·min<sup>-1</sup> 的恒温摇床上培养 36 h,即获得海洋菌种子液,按 5% 接种量接种到装有 400 mL 无菌培养基的 1 L 三角瓶中,继续培养 3.5 d。添加与发酵液等体积的萃取溶剂(95% 乙酸乙酯+5% 丙酮)萃取发酵液,收集上层有机相,浓缩至干,称重,用 DMSO 溶解配制成 20 μg·mL<sup>-1</sup>,备用。

2) 抗肿瘤活性的筛选:采用 MTT 法<sup>[17]</sup>对菌株粗提物的抗肿瘤活性进行测定。培养 HeLa 细胞至约 90% 铺满,用 0.25% 胰酶消化液消化收集细胞,吹打制成单细胞悬液,血球计数板计数,按约 5 000 个·mL<sup>-1</sup> 接种于 96 孔板中,每孔 80 μL,然后置于 CO<sub>2</sub> 培养箱,37 °C、CO<sub>2</sub> 浓度 50 mL·L<sup>-1</sup> 下培养 24 h,海洋菌粗提物用 RPMI 1640 完全培养基稀释,每孔 20 μL,并设置 3 个复孔,以氟尿嘧啶注射液(5-Fu)为阳性对照(作用浓度 10 μg·mL<sup>-1</sup>),设置空白对照和阴性对照,继续培养 72 h 后取出,每孔加入 5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 MTT 20 μL,37 °C、CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h,吸出孔内液体,每孔加入 100 μL DMSO,放置培养箱内 15 min,取出用酶标仪测 570 nm 处的 D 值,依照下式计算抑制率:抑制率=(阴性对照组 D 值-试验组 D 值)/(阴性对照组 D 值-空白对照组 D 值)×100%。

用 SPSS17.0 软件将抑制率数据和细菌粗提物处理浓度进行 logistic 曲线拟合并进行 probit 转化,计算 IC<sub>50</sub>。

3) 固体发酵:取培养 36 h 的海洋菌种子液,用接种环蘸取种子液在海洋菌固体平板上划线,25 °C 恒温培养 4 d,收集菌体,用 CHCl<sub>3</sub>+CH<sub>3</sub>OH (体积比为 1:1) 萃取,离心取上层液,浓缩,称重并配制成 20 μg·mL<sup>-1</sup> 以备用。

4) 活性菌株的鉴定:① 菌株的形态观察。取 25 °C 恒温培养 2 d 的海洋菌固体平板,观察菌落形态,形态特征参照文献<sup>[18]</sup>。同时进行扫描电镜观察,电镜样品制备方法参见文献<sup>[19]</sup>。② 16S rDNA 分析。细菌总 DNA 的提取,按照上海生工生物工程公司 SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取;以细菌的总 DNA 为模板,采用细菌 16S rDNA 的通用引物 7f (5'-CA-GAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 1540r (1522) (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 PCR 扩增,

PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 35 s, 55 °C 35 s, 72 °C 90 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 8 min; 16S rDNA 序列的测定由上海生工生物工程公司完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 MTT 法活性初筛

采用 MTT 法对 251 株海洋菌进行活性初筛, 测定其在浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时对 HeLa 细胞的细胞毒活性。由表 1 可知, 有 54 株海洋菌具有抗肿瘤活性(对 HeLa 细胞的抑制率  $\geq 50\%$ ), 占总测试菌株的 21.5%, 其中有 7 株海洋菌具有较强的抗肿瘤活性(对 HeLa 细胞的抑制率  $\geq 85\%$ ), 其编号分别为 No. 45、No. 71、No. 147、No. 390、No. 447、No. 566、No. 657、No. 657 的活性最强, 抑制率达到 95.8%。

### 2.2 活性复筛

为了进一步验证活性菌株的抗肿瘤活性, 设计活性复筛试验, 将活性初筛中具有较好抗肿瘤活性的菌株按同等发酵条件进行重复发酵, 获得菌株粗提物, 并用 MTT 法测定其在浓度为 100、50、25、12.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时对 HeLa 细胞的抑制率, 并得出各菌株的  $\text{IC}_{50}$ 。由表 2 可知, 在粗提物浓度为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 7 株

海洋菌的抗肿瘤活性较强, 与初筛结果一致, 且在较低测试浓度时也表现出一定的抗肿瘤活性; 各菌株对 HeLa 细胞的  $\text{IC}_{50}$  均低于  $65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 其中, No. 657 的  $\text{IC}_{50}$  达到  $36.53 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 因此选取 No. 657 作为后续活性化合物的分离等工作的研究对象。

表 1 抗肿瘤活性菌株对 HeLa 细胞的细胞毒活性  
Tab. 1 The cytotoxic activity of the bacterial strains against HeLa cells

编号	抑制率/%	编号	抑制率/%	编号	抑制率/%
33	71.7±2.1	329	54.0±0.5	566	89.9±0.6
45	86.2±3.6	343	73.4±5.5	593	56.5±0.5
50	59.2±0.6	350	61.0±1.2	597	55.2±2.2
55	58.3±1.2	368	55.8±0.8	604	54.3±5.5
59	59.2±0.5	388	64.6±0.2	606	52.5±0.6
64	66.6±0.1	390	91.1±0.9	608	51.3±2.2
65	67.3±0.8	392	59.8±2.3	621	58.0±3.5
71	85.8±1.8	421	50.7±1.4	646	56.0±2.3
83	50.9±1.1	430	51.6±1.8	648	58.6±0.4
86	77.3±0.6	446	59.2±1.5	651	56.8±0.8
93	53.2±0.3	447	86.2±2.8	656	75.4±3.4
98	65.3±2.1	451	53.4±0.4	657	95.8±3.1
104	78.7±1.8	461	54.2±0.8	659	59.8±1.2
106	72.1±0.5	462	50.7±1.4	661	51.9±0.4
147	92.9±3.5	465	59.8±5.7	680	60.4±0.8
160	55.5±2.4	482	51.9±3.3	681	51.9±1.4
279	53.6±1.6	486	55.5±6.3	682	66.2±5.1
305	57.2±0.7	554	52.1±0.6	683	69.9±1.3

表 2 7 株海洋菌的抗肿瘤梯度活性及对 HeLa 细胞的  $\text{IC}_{50}$

Tab. 2 The Gradient activity of 7 marine bacteria and their  $\text{IC}_{50}$  on HeLa cells

编号	抑制率/%				$\text{IC}_{50}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
	$100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
45	85.1±5.0	31.4±2.5	0.2±0.1	0.0±0.0	63.18
71	87.8±2.0	46.8±4.2	13.6±0.3	0.1±0.0	51.22
147	90.8±3.2	26.5±1.5	5.6±0.3	0.0±0.1	60.41
390	92.1±2.3	45.6±3.3	11.5±0.2	0.1±0.1	50.59
447	84.2±5.5	26.5±1.2	14.4±0.4	0.0±0.0	61.06
566	86.5±1.5	50.8±2.4	6.8±0.3	0.0±0.1	52.52
657	94.2±3.2	62.5±0.8	25.6±1.0	13.4±0.2	36.53

### 2.3 No. 657 固体发酵与液体发酵产物抗肿瘤活性的比较

本研究发现菌株 No. 657 液体发酵对环境条件的依赖性较强, 为了获得稳定、高产、高效的抗肿瘤活性物质, 设计固体发酵试验, 并与液体发酵抗肿瘤活性进行比较, 分别测定 2 种方法获得的粗提物在浓度为 160、80、40、20、10、5、2.5、1.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时对 HeLa 细胞的抑制率, 计算其  $\text{IC}_{50}$ 。结果显示, 就粗提物的产量而言, 每 100 mL 培养基液体发酵获得粗提物约 7 mg, 而固体发酵约 18 mg, 产量明显高于液体发酵; 就抗肿瘤活性(图 1)而言, 在较高浓度时, 两者均表现出较好的抗肿瘤活性, 在  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度时, 液体发酵粗提物(LE)活性显著降低(抑制率小于 20%), 而固体发酵粗提物(SE)活性仍较高(抑制率大于 80%), SE 在浓度为  $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时仍有一定的抗肿瘤活性(抑制率大于

20%, 而 LE 在浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时已极低(抑制率接近于 0); 软件分析得 SE 的  $\text{IC}_{50}$  为  $3.19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 比 LE 的活性提高了 10 倍。表明 No. 657 固体发酵方法明显优于液体发酵方法, 因此 No. 657 可采用固体发酵进一步研究。

#### 2.4 菌株 No. 657 形态观察

菌株 No. 657 在固体培养基上生长状况良好,  $25^\circ\text{C}$  培养 48 h 即可形成明显菌落, 菌落形态如图 2(a) 所示。菌落呈规则圆形, 边缘整齐, 不透明, 表面较湿润, 产生紫红色色素。No. 657 的细微结构即场发射扫描电子显微镜照片见图 2(b), 在扫描电镜下观察呈短小棒状, 直径约  $0.4 \sim 0.6 \mu\text{m}$ , 长约  $1.5 \sim 2.2 \mu\text{m}$ , 外观饱满, 表面光滑

#### 2.5 菌株 No. 657 16S rDNA 序列分析结果

菌株 No. 657 测得的 16S rDNA 序列有效长度为 1 403 bp, 将 No. 657 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中已发表的 16S rDNA 序列进行同源性比较, 选取 6 株与 No. 657 亲缘关系较近的菌株, 构建系统发育树(图 3)。由图 3 可见, No. 657 与 *Serratia proteamaculans* 568 聚于同一分支中, 相似性为 99.15%, 因此鉴定该菌株为变形斑沙雷氏菌 *Serratia proteamaculans*。

### 3 讨论

在目前天然产物的研究中, 大多采用液体发酵的方法来获取微生物的提取物, 这种方法具有易于控制、易于实现规模培养等优点。但是, 这种方法也存在着诸多不足之处, 比如发酵条件影响较大、物质提取分离等操作能耗较大等, 尤其是对于一些在液体发酵中生长不稳定的菌株, 往往造成活性产物不能产生或含量极低, 不利于后续的研究。而本研究通过测定菌株 No. 657 液体发酵和固体发酵粗提取物对 HeLa 细胞的细胞毒活性显示, 固体发酵粗提取物在产量及抗肿瘤活性上均优于液体发酵方法。因此, 从海洋中筛选活性菌株时, 可以采用固体发酵和液体发酵相结合的方法获取粗提取物, 两者择其优作为后续研究的方法。

国内外关于海绵活性物质的研究较早, 目前已经从海绵中分离到许多结构新颖的活性产物<sup>[20-21]</sup>。越来越多的研究表明从海绵中分离得到的许多活性物质是由其共附生的微生物所产生的, 例如从石海绵 *Theonella swinhoei* 体内分离到 2 种活性物质, 一种是 swinholide A, 具有细胞毒活性, 是由细菌产生的, 另一种是抗真菌环肽 theopalauamide, 是由丝状细菌 *Entotheonella palauensis* 产生的<sup>[22]</sup>; 与海绵 *Dysidea* sp. 共生的 *Vibri* sp, 它可以产生具有细胞毒活性和抗菌活性的 4-溴-2-苯基甲醚<sup>[23]</sup>; 马成新等<sup>[24]</sup>从分离自海绵 *Hymeniacidon perleve* 的细菌中获得一种抗生活性物质, 对植物和人类的致病真菌葡萄孢菌、稻瘟霉、镰刀菌、紫青霉、白念珠菌均有很好的拮抗作用。从海绵中获得活性物质在原料来源

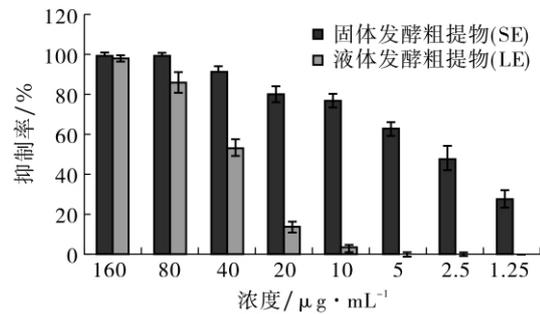


图 1 No. 657 固体发酵与液体发酵抗肿瘤活性的比较  
Fig. 1 Comparison of antitumor activities between liquid fermentation and solid-state fermentation of No. 657

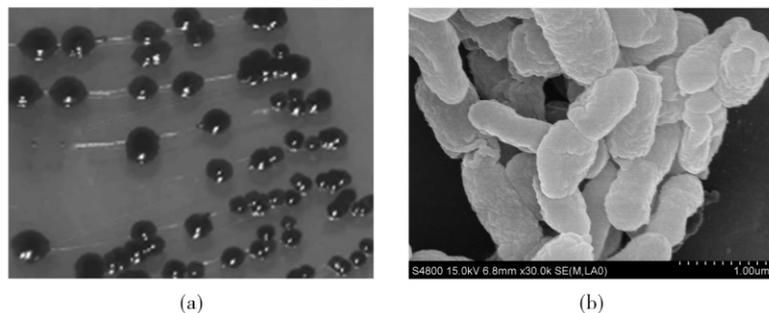


图 2 No. 657 的菌落形态(a)及场发射扫描电子显微镜(b)照片  
Fig. 2 The colony morphology (a) and field emission scanning electron microscope (b) photograph of strain No. 657



图 3 菌株 No. 657 系统发育树  
Fig. 3 The phylogenetic tree of strain No. 657

上存在着巨大的限制,而从微生物中获得活性物质可以通过微生物发酵来实现,更易于应用于生产,具有很好的应用前景。本研究通过 MTT 法对 251 株海绵共附生细菌进行抗肿瘤活性筛选,得到一株高活性菌株 No. 657, 鉴定为变形斑沙雷氏菌 *Serratia proteamaculans*, 其固体发酵粗提物对 HeLa 细胞的  $IC_{50}$  值为  $3.19 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 显示出极强的抗肿瘤活性。有关该菌株抗肿瘤物质的分离、纯化及结构鉴定等工作尚有待深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 齐相薇, 张湘宁, 黄培春. 抗肿瘤海洋生物活性物质的研究进展 [J]. 海南医学, 2012, 23(2): 118-121.
- [2] 姜 健, 杨宝灵, 鲁红凯, 等. 海洋微生物生物活性物质的研究 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2004(S2): 91-95.
- [3] Schumacher M, Kelkel M, Dicato M, et al. A survey of marine natural compounds and their derivatives with anti-cancer activity reported in 2010 [J]. *Molecules*, 2011, 16(7): 5629-5646.
- [4] Hickford S J H, Blunt J W, Munro M H G. Antitumour polyether macrolides: four new halichondrins from the New Zealand deep-water marine sponge *Lissodendoryx* sp [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2009, 17(6): 2199-2203.
- [5] Aoki S, Cao L, Matsui K, et al. Kendarimide A, a novel peptide reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells, from a marine sponge of *Haliclona* sp [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(33): 7053-7059.
- [6] Rodriguez A, Martinez N. Marine antitumor agents: 14-deoxycrassin and pseudoplexaurol, new cembranoid diterpenes from the caribbean gorgonian *Pseudoplexaura porosa* [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1993, 49(2): 179-181.
- [7] Hassan H M, Khanfar M A, Elnagar A Y, et al. Pachycladins A-E, prostate cancer invasion and migration inhibitory eunicellin-based diterpenoids from the red sea soft coral *Cladiella pachyclados* [J]. *Journal of Natural Products*, 2010, 73(5): 848-853.
- [8] Gradishar W J. The place for eribulin in the treatment of metastatic breast cancer [J]. *Current Oncology Reports*, 2011, 13(1): 1-6.
- [9] D'Incalci M, Galmarini C M. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2010, 9(8): 2157-2163.
- [10] Medina R A, Goegeer D E, Hills P, et al. Coibamide A, a potent antiproliferative cyclic depsipeptide from the Panamanian marine cyanobacterium *Leptolyngbya* sp [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(20): 6324-6325.
- [11] Tripathi A, Puddick J, Prinsep M R, et al. Hantupeptins B and C, cytotoxic cyclodepsipeptides from the marine cyanobacterium *Lynghya majuscula* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(2/3): 307-311.
- [12] Kasetrathat C, Ngamrojanavanich N, Wiyakrutta S, et al. Cytotoxic and antiplasmodial substances from marine-derived fungi, *Nodulisporium* sp. and CRI247-01 [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(14): 2621-2626.
- [13] Wang F, Fang Y, Zhang M, et al. Six new ergosterols from the marine-derived fungus *Rhizopus* sp. [J]. *Steroids*, 2008, 73(1): 19-26.
- [14] Park C, Shin H J, Kim G Y, et al. Induction of apoptosis by streptochlorin isolated from *Streptomyces* sp. in human leukemic U937 cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22(6): 1573-1581.
- [15] Sato S, Iwata F, Mukai T, et al. Indoxamycins A-F, cytotoxic tricyclic polypropionates from a marine-derived actinomycete [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2009, 74(15): 5502-5509.
- [16] Lee O O, Wong Y H, Qian P Y. Inter- and intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from San Juan Island, Washington [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3513-3521.
- [17] 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.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-355.
- [19] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法 [J]. *电子显微学报*, 2005, 24(4): 440.
- [20] Hassan W, Edrada R A, Ebel R, et al. New imidazole alkaloids from the Indonesian sponge *Leucetta chagosensis* [J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(5): 817-822.
- [21] Charan R D, Mckee T C, Boyd M R. Cytotoxic alkaloids from the marine sponge *Thorectandra* sp. [J]. *Natural Product Research*, 2004, 18(3): 225-229.
- [22] Bewley C, Holland N, Faulkner D. Two classes of metabolites from the onella swinhoei are localized in distinct populations of bacterial symbionts [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1996, 52(7): 716-722.
- [23] Elyakov G, Kuznetsova T, Mikhailov V, et al. Brominated diphenyl ethers from a marine bacterium associated with the sponge *Dysidea* sp. [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1991, 47(6): 632-633.
- [24] 马成新, 李 枫, 胡江春, 等. 海绵细菌 B25W 的鉴定及其活性物质的初步研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2004, 29(10): 626-628.

(责任编辑 王子斌)