

两株海洋微生物抗肿瘤代谢产物的 筛选及其菌种鉴定*

衣 尧^{1,2} 郑兰红¹ 陈世建¹ 盛 军¹ 孙 谧^{1①}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要 对 5 株海洋微生物进行发酵培养, 发酵液离心后, 收集上清液, 采用饱和正丁醇萃取制备海洋微生物的代谢产物, 采用 MTT 活性跟踪法, 以 BEL-7402、RKO、A549、U251 和 MCF-7 等细胞系为模型, 对代谢产物进行抗肿瘤活性的筛选。结果显示, 菌株 S-1 和 N16 代谢产物的活性组分具有较好的抗肿瘤活性: 菌株 S-1 对 MCF-7、U251 和 BEL-7402 三种肿瘤细胞的 IC_{50} 值分别为 44、102 和 82 $\mu\text{g/ml}$; 菌株 N16 对 MCF-7 和 BEL-7402 两种肿瘤细胞的 IC_{50} 值分别为 84、133 $\mu\text{g/ml}$ 。对菌株 S-1 和 N16 进行了 16S rRNA 序列分析、生理生化特征鉴定, 结果显示, 菌株 S-1 为短芽孢杆菌属(*Brevibacillus* sp.), N16 为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。通过显微镜观察了菌株 *Brevibacillus* sp. S-1 和 *Bacillus* sp. N16 代谢产物的活性组分对 BEL-7402 细胞形态的影响, 表明两株菌的活性组分可以改变肝癌细胞 BEL-7402 的细胞形态, 抑制细胞增殖。该研究为新型抗肿瘤先导化合物的发现提供了新的海洋微生物种质资源。

关键词 海洋微生物; 菌种鉴定; 代谢产物; 抗肿瘤活性

中图分类号 Q93 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2014)06-0114-06

海洋环境有着特殊的生态条件, 比如高盐、低温、无光等, 形成了海洋微生物基因组成和代谢产物的多样性(张恩等, 2010; 任虹等, 2010; 薛宝贵等, 2012; 王英姿等, 2013; Tan *et al*, 2012)。因此, 海洋微生物成为寻找具有生物活性的天然产物的重要资源。近 20 年来, 从海洋无脊椎动物短头海兔中分离出一种抗肿瘤五肽尾海兔素 10 (Luesch *et al*, 2001), 从海洋海鞘中分离出抗肿瘤环肽 Vitilevuamide (Cruz-Monserrate *et al*, 2003), 从海绵(*Phakellia costata*)中分离出抗肿瘤环七肽 Phakellistatins (Pettit *et al*, 1993), 这些具有抗肿瘤活性的天然产物是医学界开发新型抗肿瘤药物的重要基础。目前, 已经从多种海洋微生物的代谢产物中分离出具有开发价值的抗肿瘤化合物(Lebar *et al*, 2007; Petit *et al*, 2013; Schwartsmann *et al*, 2003)。尽管

如此, 海洋抗肿瘤药物的数量仍然无法与陆生来源的抗肿瘤药物相比。因此, 新的抗肿瘤药物的研发仍然需要寻找更多海洋微生物活性物质。本研究采用 MTT 活性跟踪法从 5 株海洋细菌中筛选出两株具有较好活性的菌株, 并测定了其代谢产物粗提物对多种肿瘤细胞株的 IC_{50} 值, 这两株菌株的代谢产物对多种肿瘤细胞均有较好的抗肿瘤活性, 具有良好的研究价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 中国水产科学院黄海水产研究所海洋产物资源与酶工程实验室菌种库保藏菌株 S-1、N16、SW2、SS10、B12-2, 均由采集自不同区域的

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014B01YQ01)、山东省科技发展计划项目(2014GSF121016)和中央级公益性科研院所基本业务费专项资金项目(206030220130017; 20603022012013)共同资助。衣 尧, E-mail: yiyao-@163.com

① 通讯作者: 孙 谧, 研究员, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-04-07, 收修改稿日期: 2014-07-18

海水和海泥样品中分离。

1.1.2 细胞株 人肝癌细胞 BEL-7402、结肠腺癌细胞 RKO、非小细胞肺癌细胞 A549、胶质瘤细胞 U251、乳腺癌细胞 MCF-7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 恒温培养箱(Thermorma 311, 美国 Thermo), 酶标仪(Infinite M200 PRO, 瑞士 TECAN), 离心机(CF 15Rii, 日本 Hitachi), 96 孔梯度 PCR 仪(Robocycler, 美国 Stratagene), 核酸电泳仪(DY-A 型, 北京六一)。

1.1.4 主要试剂 PCR 扩增相关试剂和核酸 Marker, 宝生物工程公司; DMSO、胰蛋白酶, Solarbio 公司; RPMI1640、特级胎牛血清, Hyclone 公司; DMEM、F-12K 培养基, 吉诺公司; MTT, Sigma 公司; 微孔滤膜, 美国 Pall 公司; 其他常规试剂为国产优质纯试剂; 实验用水为超纯水和蒸馏水。

1.1.5 培养基 种子培养基: 10 g/L 蛋白胨, 3 g/L 牛肉膏, 5 g/L NaCl, pH=7.0, 121℃ 灭菌 30 min。

发酵培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH=7.0, 121℃ 灭菌 30 min。

1.1.6 16S rRNA 引物(刘志恒, 2002) 采用 16S rRNA 通用引物, 正向引物 27F(5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCA-3'), 反向引物 1492R(5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3'), 由上海生工生物工程有公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菌株的发酵培养 用接种环从各菌株保存的斜面上挑取一环菌落接种于 3 ml 种子培养基中, 于 30℃、200 r/min 的摇床中恒温培养 24 h, 即为种子培养液; 按照 4% 的接种量将活化后的种子培养液接种于 300 ml 的发酵培养液中, 相同条件下继续培养 36 h。

1.2.2 菌株的发酵活性组分的制备(项斌等, 2010) 将各菌株发酵液在 10000 g 的条件下离心 15 min 后取上清液, 加入等体积的水饱和正丁醇萃取发酵液, 每次萃取 4 h, 收集上层有机相, 之后利用旋转蒸发仪将萃取液在 80℃ 减压蒸干。减压蒸干的样品经重溶、离心、冻干后, 得到具有抗肿瘤活性的发酵活性组分。

1.2.3 细胞培养和抗肿瘤测定 BEL-7402 细胞、RKO 细胞和 MCF-7 细胞采用 RPMI1640 培养基, U251 细胞采用 DMEM 高糖培养基, A549 细胞采用 F-12K 培养基。将各肿瘤细胞接种于含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 RPMI1640、DMEM 或 F-12K 培养液中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养

箱内培养, 取对数生长期细胞用于实验。

MTT 抗肿瘤活性分析方法(He *et al*, 2005): 取对数生长期的细胞, 胰酶消化后调整细胞悬液密度为 4×10^4 个/孔, 接种于 96 孔板中, 每孔 180 μ l, 在 37℃ 条件下培养 24 h。然后将样品溶解在磷酸盐缓冲液中, 先经过微孔滤膜过滤除菌, 用合适的培养液将样品稀释成 5 个浓度梯度, 每孔加入 20 μ l, 4 个平行孔, 置于细胞培养箱中继续培养 48 h。然后, 加入 MTT(5 mg/ml) 20 μ l, 置 CO₂ 培养箱 37℃ 培养 4 h。弃除孔中培养液, 然后每孔加入 DMSO 150 μ l, 37℃ 恒温振荡 30 min。酶标仪检测各孔在 570 nm 的吸光值, 实验重复 3 次。细胞抑制率 = $[(A_{\text{对照}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{对照}}] \times 100\%$ 。采用 Excel 分析软件计算半数抑制浓度 IC₅₀。

1.2.4 菌种鉴定 菌株基因组 DNA 的提取采用 Invitrogen Genomic DNA mini Kit。

16S rRNA 序列的 PCR 扩增体系: 以菌株提取的基因组 DNA 为模板, 加入 2 μ l 引物(见 1.1.6); 0.25 μ l Taq DNA 聚合酶(5 U/ml); 5 μ l 10 \times PCR 反应缓冲液; 4 μ l dNTP MasterMix; ddH₂O 补足至 50 μ l。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 4 min; 30 个循环(94℃ 30 s, 55℃ 40 s, 72℃ 90 s); 72℃ 延伸 10 min。经 1.5% 的琼脂糖电泳检测观察后, 若发现在 Marker 1.5 kb 左右有一条单带, 证明 16S rRNA 序列成功扩增, PCR 产物送北京华大基因测序。

将所测定菌株的 16S rRNA 序列进行双向拼接后, 在 NCBI 网站上通过 BLAST 检索已有序列进行相似性比较分析, 下载与实验菌株亲缘关系较近的序列, 用 BioEdit 软件进行多序列比对, 采用 Mega 4.1 软件的邻接法(Neighbor-joining Method)绘制系统发育树。

依据《伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)》(Bergey *et al*, 1994), 实验按照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠等, 2001)及《微生物学实验》(沈萍等, 1999)进行。

1.2.5 倒置显微镜观察活性组分对细胞形态的影响(Wang *et al*, 2012) 取对数生长期的细胞, 将细胞制成浓度为 4×10^4 个/ml 的细胞悬液, 均匀铺在 96 孔培养板中, 每孔加入 180 μ l, 置于 CO₂ 恒温培养箱中 37℃ 培养 24 h。参考 MTT 实验结果加样, 4 个平行孔, 每孔加入 20 μ l 样品, 继续在 37℃ 恒温培养箱中培养 48 h。取出平板后在倒置显微镜下对细胞形态进行观察, 并拍照记录。

1.2.6 数据统计与分析 实验数据以 3 次试验结果的平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 统计学处理用 *t* 检验进行统计显著性分析, 以 $P < 0.05$ 作为不同处理之间显著差异的标志。

2 结果

2.1 MTT 法检测活性组分的抗肿瘤活性

将 5 种制备好的代谢产物分别稀释成浓度为 200、100、50、25 $\mu\text{g/ml}$ 的样品, 作用于肿瘤细胞系 (BEL-7402、RKO、U251、A549、MCF-7) 48 h, 并通过 MTT 法检测细胞活性。结果发现有两种菌株(S-1 和 N16)的代谢产物对肿瘤细胞系的增殖有抑制作用, 其他 3 种菌株的代谢产物对肿瘤细胞系几乎无抑制作用。如表 1 结果显示, 菌株 S-1 对 MCF-7、U251 和 BEL-7402 三种肿瘤细胞的 IC_{50} 值分别为 44、82、102 $\mu\text{g/ml}$; 而菌株 N16 对 MCF-7 和 BEL-7402 两种肿瘤细胞的抑制率最高, 分别为 84、133 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 1 海洋菌株代谢产物对几种肿瘤细胞的 IC_{50} 值 ($\mu\text{g/ml}$)的测定($n=3, \chi=S$)

Tab.1 The IC_{50} of fermented products from the marine strains on several cancer cells

菌株 Strain	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)				
	BEL-7402	RKO	U251	A549	MCF-7
S-1	102 ^c	147 ^d	82 ^b	108 ^e	44 ^a
N16	133 ^b	160 ^d	165 ^d	146 ^e	84 ^a

注: 同一行数值右上角标有不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)

Note: Data within the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

2.2 菌种鉴定结果

2.2.1 16S rRNA 序列分析 菌株 S-1 和 N16 的 16S rRNA 序列 PCR 产物经电泳检测为大小约 1.5 kb 的单带(图 1)。

分别对它们的 PCR 产物测序, 测得 S-1 和 N16 的 16S rRNA 的序列长度分别为 1466 bp 和 1541 bp。

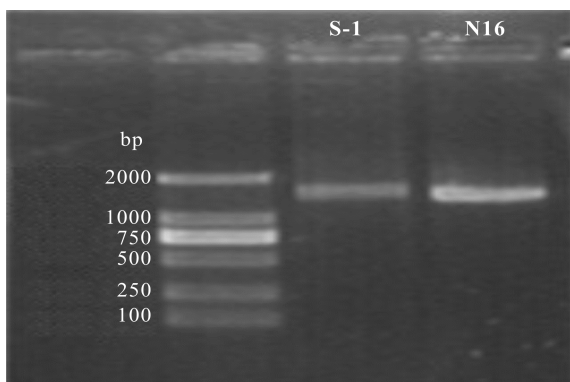


图 1 菌株 S-1 和 N16 的 16S rRNA PCR 扩增结果

Fig.1 The 16S rRNA PCR result of strains S-1 and N16

将它们的序列在 NCBI 的 16S rRNA 核酸数据库中通过 Blast 进行分析, 下载与实验菌株亲缘关系最近的序列, 通过 Mega 4.1 软件 Neighbor-joining 选项绘制发育树(图 2): Bootstrap 重复 1000 次, 模型选择核酸 p-distance。

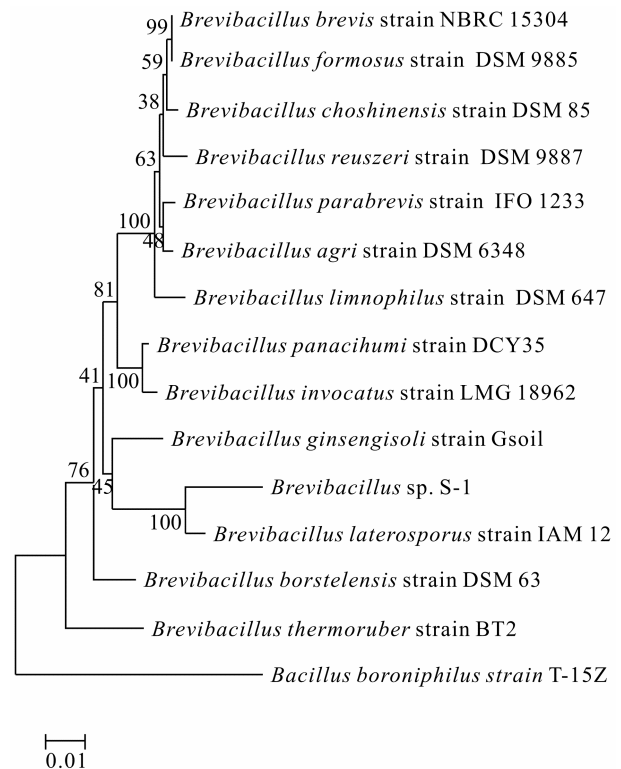


图 2 菌株 S-1 的系统发育树

Fig.2 The phylogenetic tree of strain *Brevibacillus* sp. S-1

由图 2 和图 3 可知, 菌种 S-1 和 N16 分别与 *Brevibacillus laterosporus* IAM 12 和 *Bacillus cereus* ATCC 14579 strain ATCC 1 在同一分支上, 在进化位置上最为接近。

2.2.2 生理生化特征 菌株 S-1 有较好的耐盐性, 在 7% NaCl(w/v)培养液中生长良好。生长 pH 范围为 5.0–9.0。生长温度范围较宽, 在 15–37°C 环境下也可良好生长。菌株 N16 为好氧菌, 在 pH 为 7.0–7.5、培养温度为 15–30°C、6% NaCl (w/v)的培养基中生长良好。其他生理生化鉴定结果见表 2。

参考《伯杰细菌鉴定手册(第九版)》, 分析菌株的生理生化特征指标; 结合 16S rRNA 序列分析结果, 初步确定菌株 S-1 为短芽孢杆菌属(*Brevibacillus* sp.), N16 为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.), 分别命名为 *Brevibacillus* sp. S-1 和 *Bacillus* sp. N16。

2.3 倒置显微镜观察活性组分对细胞形态的影响

通过 MTT 法, 发现海洋菌株 *Brevibacillus* sp. S-1

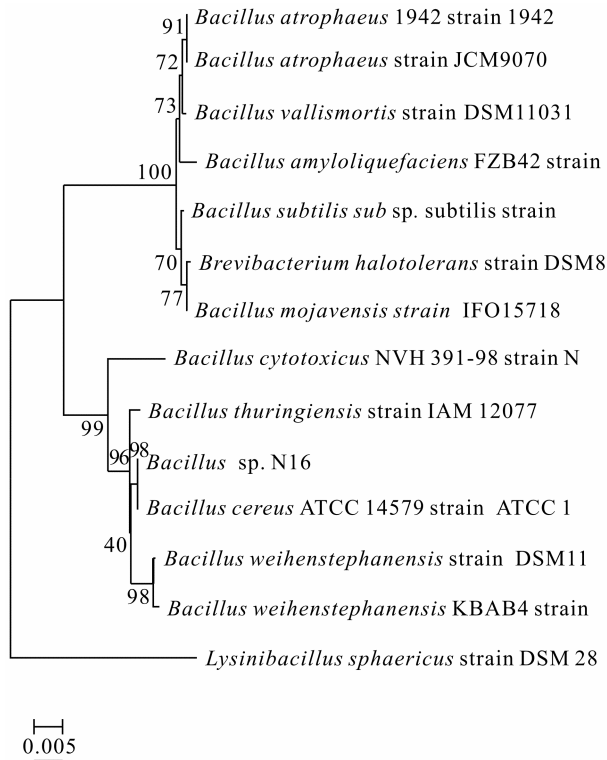


图 3 菌株 N16 的系统发育树

Fig.3 The phylogenetic tree of strain *Bacillus* sp. N16

和 *Bacillus* sp. N16 的活性组分具有体外抑制人肝癌细胞 BEL-7402 的活性。因此, 通过倒置显微镜观察了活性组分对肿瘤细胞的作用过程。结果表明, 对照组(图 4、图 5-a)的 BEL-7402 细胞具有人肝癌细胞的形态特点: 细胞贴壁生长, 细胞之间排列紧密, 并呈马赛克状连成一片; 而经过 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的活性组分处理后(图 4、图 5-b), 细胞外形发生变化, 细胞体积变小, 细胞间连接变少, 间隙明显; 当组分浓度达到 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时(图 4、图 5-c), 细胞轮廓也越来越粗糙, 细胞最终变圆并解体。这些说明两株海洋菌株的抗肿瘤活性组分在体外可以改变 BEL-7402 细胞的细胞形态, 并能有效抑制 BEL-7402 细胞的增殖。

表 2 菌株 S-1 和 N16 的生理生化特征

Tab.2 The physiological and biochemical properties of strain S-1 and N16

特征 Characteristics	S-1	N16
革兰氏染色 Staining	+	+
菌株形状 Cell shape	杆状 Rods	杆状 Rods
是否产芽孢	是 Yes	是 Yes
Spore production		
孢子主要位置	中生	中生
Spore main position	Middle position	Middle position
孢子形状	椭圆 Oval	椭圆 Oval
Spore shape		
鞭毛 Flagella	周生 Peritrichous	周生 Peritrichous
运动性 Moveability	+	+
厌氧生长	-	-
Anaerobic growth		
氧化酶 Oxidase	+	-
V-P 试验	-	+
Voges-Proskauer test		
硝酸盐还原	+	+
Nitrate reduction		
柠檬酸盐利用	-	+
Citrate utilization		
硫化氢产生	-	+
H ₂ S production		
吲哚实验 Indole test	-	-
水解明胶	+	-
Hydrolyzed gelatin		
葡萄糖产酸	+	+
Glucose producing acid		
阿拉伯糖产酸	-	+
Arab sugar producing acid		
甘露醇产酸	+	-
Mannitol producing acid		
葡萄糖产气 Glucose gas	-	+
7% NaCl	+	+

注: “+”为反应阳性, “-”为反应阴性

Note: +. Positive; -. Negative

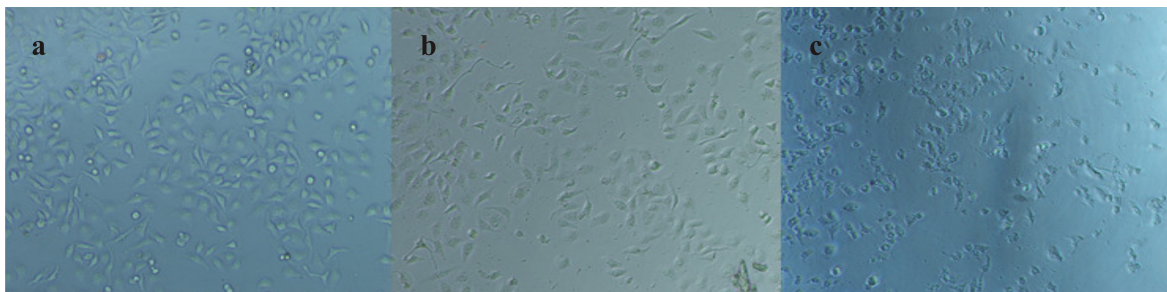


图 4 菌株 S-1 代谢产物对 BEL-7402 的形态影响

Fig.4 The morphological change of BEL-7402 cells induced by fermented product from *Brevibacillus* sp. S-1

a. 阴性对照; b. 浓度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; c. 浓度 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

a. Negative control; b. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fermented product; c. 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fermented product

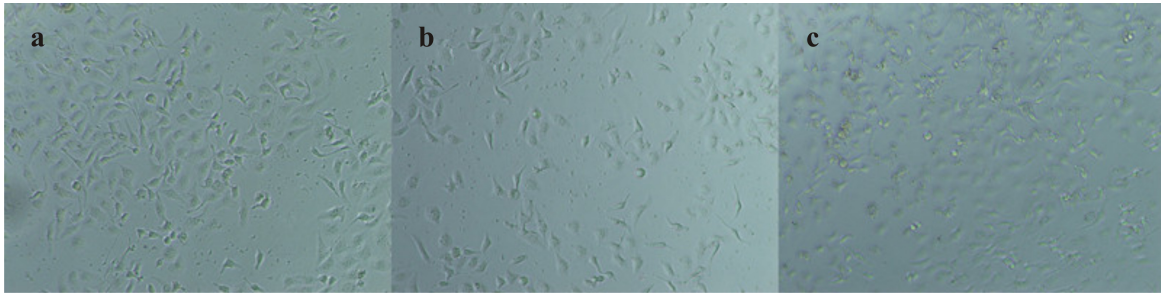


图 5 菌株 N16 代谢产物对 BEL-7402 的形态影响

Fig.5 The morphological change of BEL-7402 cells induced by fermented product from *Bacillus* sp. N16

a. 阴性对照; b. 浓度 100 µg/ml; c. 浓度 200 µg/ml
a. Negative control; b. 100 µg/ml fermented product; c. 200 µg/ml fermented product

3 讨论

本研究从实验室保藏的 5 株海洋微生物中通过 MTT 活性跟踪法筛选出两株产抗肿瘤活性物质的菌株 S-1 和 N16。它们的代谢产物对多种肿瘤细胞株 (BEL-7402、RKO、U251、A549、MCF-7) 都具有良好的抗肿瘤活性, 有进一步研究的价值。通过 16S rRNA 的序列分析和生化特征试验, 初步确定 S-1 为短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus* sp.), N16 为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。两种海洋菌株的发酵液通过正丁醇萃取制备的活性组分, 通过 MTT 和形态学观察法初步确定有抑制肝癌细胞 BEL-7402 增殖并引起细胞形态改变的生物活性。

本研究以筛选小分子化合物为目的, 采用有机溶剂萃取的方法 (Acharya *et al*, 2012; Benariba *et al*, 2012; Jain *et al*, 2012; Wen *et al*, 2012), 从 5 株供试菌中筛选出两株产抗肿瘤活性物质的菌株。后期试验可对有较好抗肿瘤活性的组分通过多种方式进一步纯化, 包括超滤、离子交换层析、分子筛层析和高效液相色谱等。其他暂无生物活性的菌株可以通过不同极性或非特异性的试剂或不同的肿瘤细胞模型重新筛选, 以期待有新的抗肿瘤活性物质的发现。

海洋微生物是自然资源最大的宝库, 蕴含着巨大潜力。近年来, 从海洋细菌、海洋真菌和海洋放线菌中筛选出越来越多新颖抗肿瘤化合物, 其中有很多已经进入临床阶段 (田树红等, 2007)。尽管如此, 现在仍只有极少数海洋微生物来源的抗肿瘤药物在市场上应用。因此, 一方面要加快和完善先导化合物的筛选和纯化工艺; 另一方面要尽量避免相同菌株的筛选和相同化合物的纯化等基础工作 (田树红等, 2007)。海洋中有抗肿瘤活性的微生物多以放线菌和真菌为主, 从芽孢杆菌属的海洋细菌代谢产物中筛选出抗肿瘤活性物质的报道并不多见。因此, 本研究丰富了抗

肿瘤海洋微生物种质资源, 有望为结构新颖的抗肿瘤先导化合物的发现奠定基础。

参 考 文 献

- 王英姿, 姬泓巍, 李兆新, 等. 磺胺邻二甲氧嘧啶在牙鲆体内的代谢动力学. 渔业科学进展, 2013, 34(6): 94-99
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 43-65
- 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版). 北京: 高等教育出版社. 1999, 15-123
- 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002, 62-67
- 田树红, 黄惠琴, 鲍时翔, 等. 海洋微生物抗肿瘤天然产物研究进展. 微生物学通报, 2007, 34(4): 799-803
- 任虹, 崔承彬. 海洋微生物抗肿瘤活性产物研究进展. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(5): 57-63
- 项斌, 杜国华, 王煦辰, 等. 快速分离与鉴定天山堇菜中的天然环肽. 药学报, 2010, 45(11): 1402-1409
- 张德, 张长生, 田新朋, 等. 中国海洋微生物多样性研究. 生物多样性保护, 2010, 25(6): 651-658
- 薛宝贵, 楼宝, 徐冬冬, 等. 密度胁迫对黄姑鱼幼鱼生长、代谢及非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 45-51
- Acharya SR, Acharya NS, Bhangale JO, *et al*. Antioxidant and hepatoprotective action of *Asparagus racemosus* Willd. root extracts. Indian J Exp Biol, 2012, 50(11): 795-801
- Benariba N, Djaziri R, Hupkens E, *et al*. Insulinotropic action of *Citrullus colocynthis* seed extracts in rat pancreatic islets. Mol Med Rep, 2012, 7(1): 233-236
- Cruz-Monserrate Z, Vervoort HC, Bai R, *et al*. Diazonamide A and a synthetic structural analog: disruptive effects on mitosis and cellular microtubules and analysis of their interactions with tubulin. Mol Pharmacol, 2003, 63(6): 1273-1280
- He QJ, Yang B, Lou YJ, *et al*. Contragestazol (DL111-IT) inhibits proliferation of human androgen-independent prostate cancer cell line PC3 *in vitro* and *in vivo*. Asian J Androl, 2005, 7(4): 389-393
- Jain NK, Singhai AK. Protective role of *Beta vulgaris* L. leaves extract and fractions on ethanol-mediated hepatic toxicity.

- Acta Pol Pharm, 2012, 69(5): 945–950
- Lebar MD, Heimbegner JL, Baker BJ. Cold-water marine natural products. Chem Inform, 2007, 38(45): 774–797
- Luesch H, Moore RE, Paul VJ, *et al.* Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. J Nat Prod, 2001, 64(7): 907–910
- Petit K, Biard JF. Marine natural products and related compounds as anticancer agents: an overview of their clinical status. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13(4): 603–631
- Pettit GR, Cichacz Z, Barkoczy J, *et al.* Isolation and structure of the marine sponge cell growth inhibitory cyclic peptide phakellistatin 1. J Nat Prod, 1993, 56(2): 260–267
- Schwartzmann G, Da Rocha AB, Mattei J, *et al.* Marine-derived anticancer agents in clinical trials. Expert Opin Investig Drugs, 2003, 12(8): 1367–1383
- Tan QW, Ouyang MA, Shen S, *et al.* Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Neosartorya* fisheries. Nat Prod Res, 2012, 26(15): 1402–1407
- Wang C, Liu M, Cheng LY, *et al.* A novel polypeptide from *Meretrix meretrix* Linnaeus inhibits the growth of human lung adenocarcinoma. Exp Biol Med (Maywood), 2012, 237(4): 442–450
- Wen Q, Lin X, Liu Y, *et al.* Phenolic and lignan glycosides from the butanol extract of *Averrhoa carambola* L. Root. Molecules, 2012, 17(10): 12330–12340

(编辑 冯小花)

Screening of Antitumor Metabolites From Two Marine Microorganisms and Their Strain Identification

YI Yao^{1,2}, ZHENG Lanhong¹, CHEN Shijian¹, SHENG Jun¹, SUN Mi^{1①}

(1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;
2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Marine microorganisms are the important resources in the natural products with biological activity. Finding antitumor drugs and compounds from germplasm resources has become a hot topic. The current study investigated the biological role of the fermented products of marine bacteria isolated from marine strains in several cancer cell lines. Five marine strains were fermented, and the supernatant was collected after centrifugation as total products that were fractionated with n-butyl alcohol. The pooled organic layer was evaporated using a rotary evaporator under reduced pressure, and the peptide pellet was dissolved in phosphate buffer for further usages. Antitumor metabolites of five marine microorganisms were screened by MTT method in several cancer cell lines. The result showed that the fermented products of strain S-1 and N16 inhibited cancer cell proliferation. Specifically, fermented product from strain S-1 attenuated MCF-7, U251 and BEL-7402 cell proliferation and the IC_{50} were 44 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 82 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 102 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Moreover, fermented product from strain N16 inhibited MCF-7 and BEL-7402 cell proliferation and their IC_{50} was 84 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 133 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. The fermented products of S-1 and N16 induced the morphological change of the BEL-7402 cells. According to their 16S rRNA sequences and physiological biochemical properties, strains S-1 and N16 were identified as *Brevibacillus* sp. and *Bacillus* sp., respectively. The further research is to find new antitumor compounds from the fermented products of marine bacteria *Brevibacillus* sp. S-1 and *Bacillus* sp. N16. This study supports that the germplasm resources of marine microorganisms may be a novel resource for the discovery of novel anti-tumor compounds.

Key words Marine microorganism; Strain identification; Fermented product; Antitumor activity

① Corresponding author: SUN Mi, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn