

# 南极抗菌活性菌株的筛选及系统发育分析

李贺<sup>1,2</sup> 林学政<sup>2\*</sup> 何培青<sup>2</sup> 刘同军<sup>1</sup>

(1. 山东轻工业学院食品与生物工程学院 山东 济南 250353)

(2. 国家海洋局第一海洋研究所 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室 山东 青岛 266061)

**摘要:** 分别以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、青枯假单胞菌、绿脓假单胞菌和苏云金芽孢杆菌为指示菌,采用琼脂扩散法对实验室保存的 580 株极地细菌进行了抗菌活性菌株的筛选与活性验证,从中筛选出 4 株对上述指示菌株具有明显抗菌效果的活性菌株,其编号分别为 97、Z11、Z18 及 Z19,并对其生长曲线、抗菌活性曲线和系统发育地位进行研究。结果表明,4 株菌均在培养 24 h 后进入指数生长期,菌株 97 在培养 48 h 后达到稳定期,而菌株 Z11、Z18 及 Z19 在培养 60 h 后达到稳定期。抗菌活性分别在培养 84、96、72 和 72 h 时达到最高。系统发育分析表明,该 4 株菌分别属于伦黑墨氏菌属(*Rheinheimera*)、嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*)。

**关键词:** 南极细菌, 抗菌活性, 系统发育分析

## Screening and phylogenetic analysis of antibacterial strains isolated from antarctic

LI He<sup>1,2</sup> LIN Xue-Zheng<sup>2\*</sup> HE Pei-Qing<sup>2</sup> LIU Tong-Jun<sup>1</sup>

(1. Food and Biological Engineering Department of Shandong Institute of Light Industry, Jinan, Shandong 250353, China)

(2. Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, SOA, First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao, Shandong 266061, China)

**Abstract:** *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis* were used as indicator strains respectively, four antibacterial strains, named as 97, Z11, Z18 and Z19 were screened from 580 strains of bacteria isolated from Antarctic by the method of agar diffusion. The growth curves, antibacterial curves and phylogenetic analysis of 4 antimicrobial strains were studied. The results showed that all of the four strains reached the log phase when they were cultured 24 h, strain 97 was in the log phase when it was cultured after 48 h, and the remaining three strains Z11, Z18 and Z19, were in the stationary when they were

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费项目(No. 01005032-2); 国家 863 计划项目(No. 2007AA091905); 基本科研业务费专项资金项目(No. 2007T11)

\* 通讯作者: Tel: 86-532-88967422; ✉ linxz@fio.org.cn

收稿日期: 2010-06-29; 接受日期: 2010-12-02

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

cultured after 60 h. They had the highest antibacterial activity when it was cultured after 84, 96, 72 and 72 h, respectively. Phylogenetic analysis indicated that these four strains belong to genera of *Rheinheimera*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* and *Psychrobacter*, respectively.

**Keywords:** Antarctic bacteria, Antibacterial activity, Phylogenetic analysis

随着抗生素的广泛使用, 微生物的抗药性逐渐增强, 新的致病菌和条件致病菌不断出现, 开发新的抗生素和寻求新的抗生素来源已成为解决这一问题的的重要途径<sup>[1]</sup>。极地具有独特的地理、环境及气候特征, 除短暂的夏季部分地区有冰雪融化外, 其余均被常年的冰雪所覆盖<sup>[2]</sup>。极地特殊的环境造就了极地微生物特殊的生物学特征及竞争优势, 栖息于极地的细菌, 为了适应恶劣的环境条件, 必须采用独特的生存策略来获得生存优势<sup>[3]</sup>, 这使其将成为研究低温生物学的良好试验材料及新型活性物质的重要的潜在来源。有关极地微生物的资源勘探与代谢活性产物研发, 已成为国际微生物学领域研究的热点之一<sup>[4-5]</sup>。国外科学家们已从南极海洋、北极鱼类肠道等各种样品中分离到了具有抗菌能力的细菌, 其中部分细菌对气单胞菌、弧菌等鱼类致病菌具有显著抑制效果<sup>[1,6]</sup>。近年来随着国内对海洋及极端环境微生物资源关注度的提高, 已陆续开展了有关极地微生物产活性化合物的筛选及研究工作, 如朱天骄等从 259 株南极微生物中筛选到具有强抗肿瘤活性的 20 株细菌<sup>[7]</sup>。

本文对分离自南极海水、海冰、海洋沉积物以及海洋动物等样品中的细菌进行了抗菌活性的筛选, 并对其中 4 株具有明显抗菌活性的菌株进行了生长曲线和抗菌曲线的测定及其系统发育分析, 以期对极地来源的新型生物活性物质的研发打下一定的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 指示菌与测试菌

指示菌分别为大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 10080), 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC 10115), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC01331), 青枯假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum* ATCC12014), 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas*

*aeruginosa* ATCC02722), 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* ATCC1603)。

测试菌来自实验室保存的极地微生物种质资源库(580 株)。

### 1.2 培养基

测试菌培养基(Zobell 2216E): 蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g, 过滤海水和自来水按 2:1 的体积比例定容至 1 000 mL,  $1 \times 10^5$  Pa 湿热灭菌 20 min。

指示菌培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, 氯化钠 10, 琼脂 15, 用蒸馏水定容至 1 L,  $1 \times 10^5$  Pa 湿热灭菌 20 min。

### 1.3 抗菌活性物质产生菌的筛选

将测试菌接种于装有 5 mL Zobell 2216E 培养基的试管(15 mm×150 mm)中, 于低温振荡培养箱中(10 °C, 150 r/min)培养 7 d, 取 1 mL 发酵液在 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 留上清测抗菌活性用。

分别以 1.1 的 6 株菌为指示菌, 用琼脂扩散法筛选抗菌活性菌株。将过夜培养的指示菌以 0.1% 的比例用无菌生理盐水进行适当的系列稀释, 然后加入到灭菌后已冷却至 45 °C 的指示菌固体培养基中, 摇匀倒入已灭好菌的平板, 每平板大约 35 mL 培养基。凝固后用直径为 9 mm 的打孔器打孔, 用琼脂培养基补孔。取上述上清液 100  $\mu$ L 加入孔内, 30 °C 培养 15 h 后观察并记录抗菌圈直径。将具有抗菌作用的菌株进一步复筛, 测定抗菌圈的直径, 每菌的抗菌圈有 3 个重复, 计算平均值, 比较抗菌效果。

### 1.4 活性菌株的生长与抗菌曲线

将筛选到的抗菌活性菌株以 1% 的比例接种于装有 30 mL Zobell 2216E 培养基的 100 mL 的三角瓶中, 于低温振荡培养箱(10 °C, 150 r/min)中培养, 每 12 h 定时取样测定其在 600 nm 下的 OD 值以确定其生长情况, 以金黄色葡萄球菌为指示菌测定其抗菌活性。

1.5 活性菌株的系统发育分析

活性菌株中的分子鉴定与系统发育分析中 DNA 模板的制备、16S rRNA 基因的 PCR 扩增与序列测定以及系统进化关系的分析均按照文献[8]进行。

2 结果

2.1 抗菌活性菌株的筛选结果

采用固体琼脂扩散法，从实验室保存的极地微生物种质资源库(580 株)中，经多次筛选、分离纯化和活性验证，筛选到了 4 株抗菌活性菌株，总抗菌活性菌株阳性率约为 0.7%。4 株活性菌株对试验指示菌均有着明显的抑制作用，其中对青枯假单胞菌的抗菌作用最为明显，而对大肠菌的抗菌作用则不如其他指示菌明显(表 1)。

表 1 活性菌株的抗菌谱(重复 3 次)				
Table 1 Antimicrobial spectrums of the screened antibiotics producing bacteria				
指示菌 Indicator microorganisms	抗菌活性菌株的抗菌圈直径 Antibacterial circle diameter of antimicrobial strains (mm)			
	Z11	Z18	97	Z19
<i>B. subtilis</i>	17.6±0.26	17.8±0.34	18.9±0.45	22.0±0.50
<i>E. coli</i>	16.0±0.34	16.6±0.41	15.9±0.26	17.0±0.41
<i>P. aeruginosa</i>	18.5±0.97	18.2±0.29	20.6±0.45	21.4±0.79
<i>S. aureus</i>	22.5±0.43	20.7±0.33	22.0±0.25	22.3±0.86
<i>B. thuringiensis</i>	16.7±0.38	17.4±0.83	19.8±0.21	21.5±0.54
<i>P. solanacearum</i>	20.5±0.78	20.3±0.74	21.7±0.60	21.9±0.33

2.2 活性菌株的生长曲线与抗菌曲线测定结果

4 株活性菌株的生长曲线和抗菌曲线分别如图 1 和图 2 所示。可以看出，在实验条件下，4 株活性菌株的大致生长情况为：0–24 h 为生长延滞期，在培养 24 h 后进入对数期，除了菌株 97 在培养 48 h 后进入生长稳定期，其他都在培养 60 h 后进入生长稳定期(图 1)。抗菌曲线表明，4 株活性菌株培养 12 h 时均没有检测到抗菌活性，培养 24 h 后抗菌性显著增强，在培养 60 h 后基本达到稳定(图 2)。相较而言，在设定的实验条件下，菌株 Z19 生长情况最好，Z11

次之，而菌株 97 生长得最慢，且达到稳定期时，生物量最低，但是其抗菌性仅次于 Z19，而 Z11 的抗菌性最差。4 株活性菌株对部分指示菌的抗菌效果如图 3 所示，可以看出，该 4 株活性菌株对指示菌均有明显的抗菌效果。

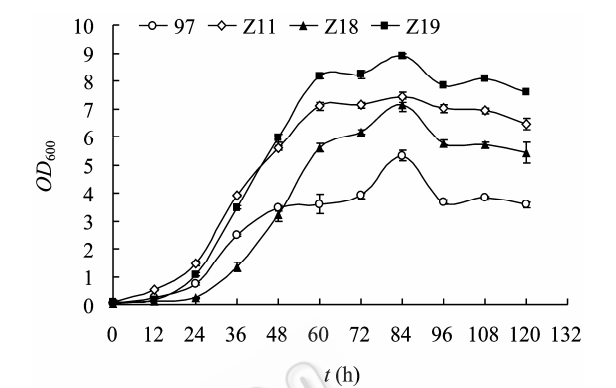


图 1 活性菌株的生长曲线  
Fig. 1 Growth curves of four antimicrobial bacteria

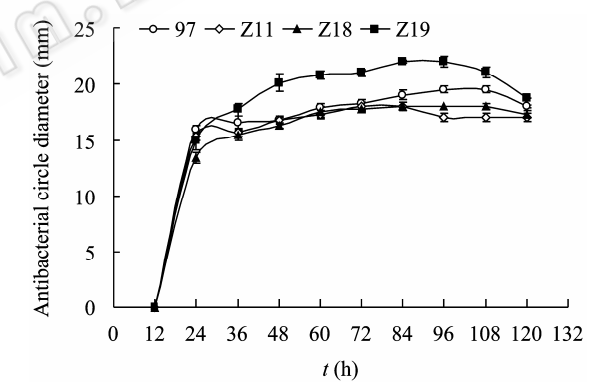


图 2 活性菌株的抗菌曲线  
Fig. 2 Antibacterial curves of four antimicrobial bacteria

2.3 活性菌株的系统发育分析结果

将筛选到的活性菌株进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增，然后将 PCR 产物进行测序，获得长度约为 1.4 kb 的 16S rRNA 基因序列。经序列比对分析后，将其提交 GenBank 数据库，获得 4 个基因序列注册号，分别为 HM059656–HM059659 (表 2)。将这些序列与 GenBank 数据库进行 BLAST 比对分析，与所筛选到的活性菌株 16S rRNA 基因序列同源性最高的菌株及其注册号如表 2 所示。

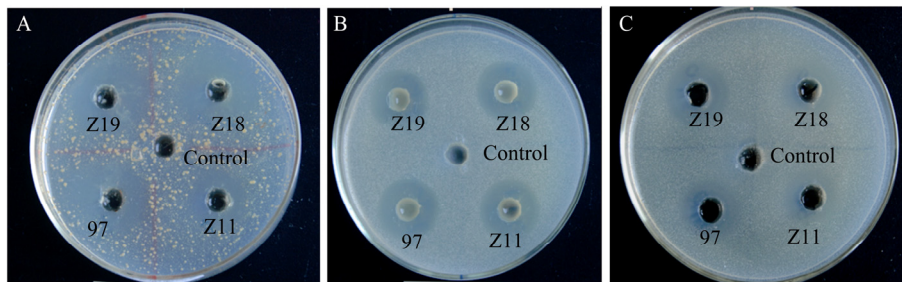


图3 4株活性菌株的抗菌效果

Fig. 3 Antibacterial effect of four antimicrobial bacteria

注: 图中指示菌分别为: A: 金黄色葡萄球菌; B: 枯草芽孢杆菌; C: 大肠杆菌。

Note: Indicator microorganisms: A: *Staphylococcus aureus*; B: *Bacillus subtilis*; C: *Escherichia coli*.

表2 抗菌活性物质产生菌株的分子鉴定

Table 2 Identification of four antimicrobial bacteria based on their partial 16S rRNA gene sequences

菌株 Strains	长度 Determined length (bp)	相似性最高菌株 Closest match similarity	相似度 Identity (%)	注册号 Accession number
97	1414	<i>Rheinheimera aquimaris</i> SW-369 <sup>T</sup> (EF076758)	100	HM059656
Z11	1420	<i>Psychrobacter nivimaris</i> 88/2-7 <sup>T</sup> (AJ313425)	99.13	HM059657
Z18	1437	<i>Pseudomonas gessardii</i> CIP-105469 <sup>T</sup> (AF74384)	99.45	HM059658
Z19	1417	<i>Psychrobacter nivimaris</i> 88/2-7 <sup>T</sup> (AJ313425)	99.29	HM059659

一般认为, 16S rRNA 基因序列同源性小于 97%, 可以认为属于不同的种, 同源性小于 93%–95%, 可以认为属于不同属<sup>[9]</sup>。从表 2 可见, 本研究中分离的活性菌株大多数与庞大的 GenBank 数据库中已有菌株的 16S rRNA 基因序列均存在着很高的相似性, 相似性均在 99% 以上, 而且菌株 97 与已注册的菌株的 16S rRNA 基因序列相似性最高可达 100%。

对活性菌株的 16S rRNA 序列采用 BioEdit 软件进行序列比对, 然后利用 MEGA 4.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ), 构建了 4 株产活性物质的菌株及其同源性较高菌株的系统发育树, 结果如图 4 所示。可以看出, 筛选到的极地活性菌均为细菌域(Bacteria)的变形杆菌门(Proteobacteria)的  $\gamma$ -变形杆菌纲( $\gamma$ -Proteobacteria), 其中 Z11 和 Z19 属于嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*), 97 属于伦黑墨氏菌属(*Rheinheimera*), Z18 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

### 3 讨论

极地细菌是极地微生物活性物质的一个重要来源, 已发现的种类包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、

交替单胞菌属(*Alteromonas*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、微球菌属(*Micrococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacterium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、着色菌属(*Chromatium*)等及许多未定菌<sup>[10]</sup>, 但能产生抗菌活性物质和酶类的以假单胞菌属为最多<sup>[11]</sup>。Kamei 等<sup>[12]</sup>从海藻中分离出一种能够抑制耐甲氧西林葡萄球菌的细菌 AMSN 就属于假单胞菌。本研究中筛选出的菌株 Z18 也属于假单胞菌属, 而菌株 Z11 和 Z19 属于嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*), 菌株 97 属于伦黑墨氏菌属(*Rheinheimera*), 这在已有的产生抗菌活性物质的南极细菌中尚未见报道。

4 株活性菌株对指示菌都具有明显的抗菌作用, 而且对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌的抗菌作用没有明显区别。本研究从 580 株保存的菌株中只筛出 4 株活性菌株, 抗菌活性菌株的阳性率不到 0.7%。Giudice 等<sup>[1]</sup>从南极海水、海冰、海洋沉积物以及海洋动物等样品分离的 580 株细菌中, 以大肠杆菌(*Escherichia coli*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)等为指示菌, 筛选出

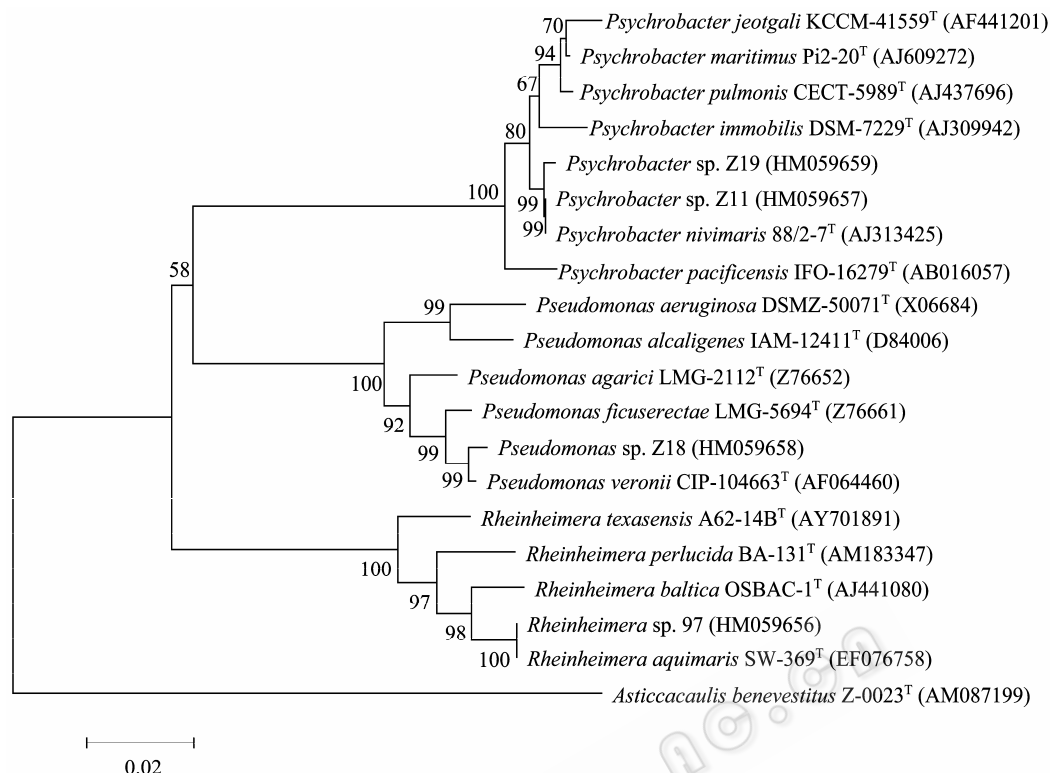


图 4 4 株抗菌活性菌株的 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of four antimicrobial bacteria based on partial 16S rRNA gene sequences

注: *Asticcacaulis benevestitus* Z-0023<sup>T</sup> (AM087199) 被用作外群, 在树节上的数字代表 1000 取样的百分比, 仅显示大于等于 50% 的情况。括号中为代表菌株的 GenBank 登录号。比例尺代表 2% 的序列差异。

Note: *Asticcacaulis benevestitus* Z-0023<sup>T</sup> (AM087199) was used as an outgroup. The numbers at the nodes indicate the percentages of occurrence in 1000 boot-strapped trees, only values that are 50% or greater are shown. The GenBank accession number (in parentheses) is indicated for each previously described strain, and four tailing strains are registered in GenBank as from HM059656 to HM059659. The scale bar represents 2% sequence difference.

22 株抗菌活性菌株, 阳性率为 3.8%; Hentschel 等<sup>[13]</sup>从 Marseille 和 Banyuls sur Mer 采集的海绵中分离出 238 株细菌, 以大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及白色念珠菌(*Candida Albicans*)等为指示菌, 筛选出 27 株抗菌活性菌株, 阳性率为 11.3%, 都明显高于本研究的活性菌株阳性率。究其原因可能为: (1) 可能受本研究所选用的指示菌的限制, 被检测的南极菌株对这些指示菌没有抑制作用。(2) 微生物代谢产物的产生受发酵条件的影响很大, 本研究中南极菌株的生长培养基为一种常用的海洋细菌培养基(1.2 中的 Zobell 2216E), 在低温振荡培养箱中(10 °C, 150 r/min)培养, 可能并不利于其抗菌活性物质的产生。(3) 南极的高压、低营养、低温极限条件导致

生存于其中的微生物的数量远远低于其他海洋环境中的数量。用于本研究的细菌主要是分离于不同深度的南极海水, 生存的环境与 Giudice 等<sup>[3]</sup>和 Hentschel 等<sup>[13]</sup>研究中的不尽相同。它们大部分时间是处于单独生存的状态而不存在和其他生物之间的激烈的生存竞争, 在这种状态下, 细菌就可能不会产生抗菌物质从而避免不必要的能量消耗<sup>[14]</sup>, 而生活于海洋表面或者寄生于其他生物上的细菌更容易产生抗菌物质<sup>[3]</sup>。

本研究中虽然只筛选到 4 株活性菌株, 但是抗菌活性显著且稳定, 因此从极地采集样品分离新的抗菌药物还是具有较大的潜力。本次实验中筛选得到的菌株 97 对指示菌抗菌作用更强一些, 抗菌谱广, 是一株值得进一步研究与开发的具有抗菌

作用的极地细菌。

## 参 考 文 献

- [1] Lo Giudice A, Brilli M, Bruni V, et al. Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea)[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2007, 60(3): 383-396.
- [2] 张波涛, 缪锦来, 李光友, 等. 极地微生物活性物质研究进展[J]. 海洋科学, 2004, 28(2): 58-63.
- [3] Lo Giudice A, Bruni V, Michaud L. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms[J]. J Basic Microbiol, 2007, 47(6): 496-505.
- [4] Marx JC, Collins T, D'Amico S, et al. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms[J]. Mar Biotechnol, 2007, 9(3): 293-304.
- [5] Vardhan Reddy PV, Pratibha MS, Shiva Nageswara Rao SN, et al. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active enzymes from culturable bacteria associated with sediment from a melt water stream of Midtre Loenbreen glacier, an Arctic glacier[J]. Res Microbiol, 2009, 160(8): 538-546.
- [6] Ringø E, Seppola M, Berg A, et al. Characterization of Carnobacterium divergens strain 6251 isolated from intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.)(J). Syst Appl Microbiol, 2002, 25(1): 120-129.
- [7] 朱天骄, 顾谦群, 朱伟明, 等. 南极微生物的分离及抗肿瘤活性筛选[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(1): 25-27.
- [8] 林学政, 陈靠山, 何培青, 等. 种植盐地碱蓬改良滨海盐渍土对土壤微生物区系的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(3): 801-807.
- [9] 王全富, 缪锦来, 李光友, 等. 南极微生物产低温蛋白酶菌株的筛选、分子鉴定及部分酶活特性[J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 437-444.
- [10] Michaud L, Di Cello F, Brilli M, et al. Biodiversity of cultivable psychrotrophic marine bacteria isolate from Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica)[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 230(1): 63-71.
- [11] Lo Giudice A, Michaud L, De Pascale D, et al. Lipolytic activity of Antarctic cold-adapted marine bacteria (Terra Nova Bay, Ross Sea)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(5): 1039-1048.
- [12] Kamei Y, Isnansetyo A. Lysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga[J]. Int J Antimicrob Ag, 2003, 21(1): 71-74.
- [13] Hentschel U, Schmid M, Wagner M, et al. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2001, 35(3): 305-312.
- [14] Gram L, Grossart HP, Schlingloff A, et al. Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(8): 4111-4116.

稿件书写规范

## 论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写  $x$ , 不用大写  $X$ , 也不用  $Mean$ 。标准差用英文小写  $s$ , 不用  $SD$ 。标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$ , 不用  $SE$ 。 $t$  检验用英文小写  $t$ 。 $F$  检验用英文大写  $F$ 。卡方检验用希文小写  $\chi^2$ 。相关系数用英文小写  $r$ 。样本数用英文小写  $n$ 。概率用英文大写  $P$ 。