

培养基对海洋青霉菌株抗真菌活性物质的影响

杨劲松¹ 李淑彬² 钟英长²

(华南热带农业大学工学院 儋州 571737)¹

(中山大学生命科学院 广州 510275)²

摘要: 研究了培养基的配方、培养条件和培养时间对海洋青霉 M-182 菌株产生抗真菌活性物质 (M-182A) 的影响, 以期获得高效价的 M-182A。结果表明: 用海水配制经改良的高氏 1 号培养基 (高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨 + 2% 海带汁), 28℃ 培养 96 ~ 108h, M-182A 的相对效价最高。

关键词: 海洋青霉, 抗真菌作用, 相对效价, 培养基

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0019-03

EFFECTS OF MEDIUM ON ANTIFUNGI BIOACTIVE AGENTS OF MARINE *PENICILLIUM* SPP. STRAIN

YANG Jin-Song¹ LI Shu-Bin² ZHONG Ying-Chang²

(Engineering College, the South China University of Tropical Agriculture, Danzhou 571737)¹

(College of life Sciences, Zhong shan University, Guangzhou 510257)²

Abstract: The effects of components in medium culture condition and culture time on antifungi bioactive agents (M-182A) of marine *Penicillium* spp. M-182 strain were researched. We hoped that we could get high-potency of M-182A. The results showed that the highest relative potency was obtained when M-182 strain was cultured with the improved starch-nitrate potassium medium prepared with seawater. M-182 strain was cultured at 28℃ for 96 ~ 108h. The improved starch-nitrate potassium medium was starch-nitrate potassium and 0.1% peptone and 2% kelp juice.

Key words: Marine *Penicillium* spp., Antifungi function, Relative potency, Medium

近年来, 深部真菌病发病率有明显的上升趋势, 尤其是条件致病性真菌所引起的感染更为多见。这与大量使用广谱抗生素引起的菌群失调以及激素、免疫抑制剂和抗癌药物的应用导致的免疫功能低下有关。对比, 已引起医学界的极大关注, 但对真菌病的治疗, 无论浅部真菌还是深部真菌, 都缺乏毒性低疗效高的药物^[1,2]。而海洋生物可产生多种生物活性物质, 有些生物活性物质是陆地生物所没有的^[3,4]。海洋青霉 M-182 菌株的代谢产物 (M-182A) 具有广谱抗真菌作用, 有较好的应用前景。为获得更多的 M-182A, 须探索 M-182 菌株的最适生长条件, 为进一步提纯分析 M-182A 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

M-182 菌株 (青霉菌) 由本实验室从大亚湾海岸海底沉积物中分离而得。白色念珠菌为抑菌试验的敏感菌指示菌。

1.2 M-182 菌株培养基及其培养

以改良高氏 1 号培养基 (高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨) 为对照培养基。以高氏 1 号培养基, 高氏 1 号 + 2% 海带汁培养基, 高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨 + 2% 海带汁, 萨氏培养液和萨氏培养液 + 2% 海带汁为试验培养基。培养基可用自来水配制, 自然 pH。摇瓶条件: 500mL 三角瓶装量 150mL, 温度为 28℃, 摇床转速 200r/min, 培养时间约 96h。

1.3 抑菌实验

将 M-182 菌株分泌的代谢产物 M-182A 经浓缩后, 点样在涂有白色念珠菌的萨氏平板上, 于 28℃ 培养 24h, 测量抑菌圈直径, 用杯碟法原理^[5] 计算其相对效价。

2 结果

2.1 培养基对海洋青霉菌 M-182 菌株抗真菌活性的影响

以白色念珠菌生长抑制为指标, 高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨培养基中的 M-182A 为对照, 从表 1 看出 A 号培养基 (高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨 + 2% 海带汁) 产 M-182A 的相对效价最高, 其次是 E 号培养基 (萨氏 + 2% 海带汁)。

表 1 不同培养基中来自海洋青霉菌 M-182 菌株的抑菌作用

	培养基	指示菌	相对效价
A	高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨 + 2% 海带汁	白色念珠菌	3.999
B	高氏 1 号	白色念珠菌	0.6095
C	高氏 1 号 + 2% 海带汁	白色念珠菌	0.7711
D	萨氏水	白色念珠菌	0.7937
E	萨氏 + 2% 海带汁	白色念珠菌	1.641

2.2 不同海带汁浓度对 M-182 菌株产 M-182A 的影响

将干海带按重量体积比配成不同浓度的海带汁, 过滤后, 加入到高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨培养基中, 进行发酵, 其发酵产物 M-182A, 以白色念珠菌为指示菌, 作抑菌试验, 计算其相对效价。结果见表 2。

从表 2 可知, 添加约 2% 的海带汁可提高 M-182A 的抗真菌活性。

2.3 M-182 菌株在不同浓度海水培养基中的生长情况

以高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨 + 2% 海带汁为培养基, 加入不同浓度陈海水 (含 3.5% NaCl), 摇床培养约 96h, 用其 M-182A 作抑菌试验, 结果见表 3。

表 2 不同海带汁浓度对 M-182 菌株产 M-182A 的影响 *

海带汁浓度 (g/100mL)	相对效价
1	1.370
2	3.999
4	2.000
6	1.587
8	2.208
10	2.000
12	2.193

表 3 M-182 菌株在不同浓度陈海水培养基中的生长情况

海水浓度 (v/v)	生长量 (g/150mL)	pH 值	相对效价
0	0.6832	5.0	Ck (1)
20	0.6840	4.5	1.300
40	0.6860	4.5	1.340
60	0.6900	4.5	1.370
80	0.7100	4.2	1.400
100	0.9306	4.2	1.470

* 以高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨培养基所产 M-182A 为对照, 计算效价

随着海水浓度的提高, M-182 菌株的菌丝量、M-182A 的相对效价有所增加。对 M-182 菌株来说, 用海水配制培养基比用自来水配制好。

2.4 M-182 菌株在不同时间的生长及抑菌情况

以高氏 1 号 + 0.1% 蛋白胨 + 2% 海带汁, 用陈海水配制培养基, 接种量为 5%, 摇床培养。用培养到一定时间 (每隔 12h 取出样品置于冰箱, 直至培养到 168h 样品为止) 的 M-182A 作抑菌试验, 探究培养时间与 M-182 菌丝量、抗生物活性及培养液 pH 之间的关系, 其结果见图 1、图 2。

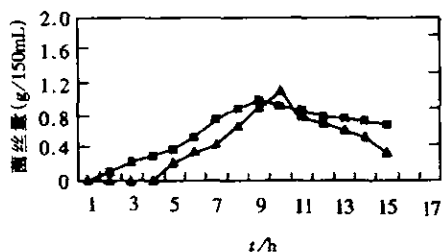


图 1 培养时间与 M-182 菌丝量 (生长曲线) 及抗生物活性 (抑菌圈直径) 之间的关系
—■— 生长量 (g/150mL), —▲— 抑菌圈直径 (mm)

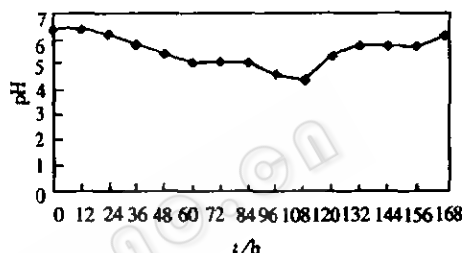


图 2 M-182 菌株培养时间与培养液 pH 之间的动态变化
—◆— pH 值

由图 1、图 2 可知, M-182 培养 108h 培养物具有较高的抗菌活性, pH 为最低 (4.4)。

3 讨论

M-182A 是 M-182 菌株的代谢产物, 具有广谱抗真菌作用 (另文报道)。我们利用改变培养基中营养成分及其含量, 筛选出适于 M-182 菌株生长发育的培养基。在这种培养基中, M-182 菌株生长良好, 抑菌力强。通过 M-182 菌株的生长曲线及抑菌圈曲线的制作, 得出最佳收菌时间为 108h 左右, 此时的 pH 值最低 (4.4)。最适培养基的筛选, 为大量产生 M-182A 和纯化 M-182A 创造了条件。有关 M-182A 中抑制真菌作用的有效成分和抑菌作用机理, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 徐积恩. 药学进展, 1991, 15 (1): 20.
- [2] 新井正. 治疗学, 1988, 20 (4): 10.
- [3] Attaway D H, Zaborsky O R. Marine biotechnology. 1: 1993.
- [4] 许实波. 生物工程进展, 1996, 16 (6): 25~33.
- [5] 钱海伦. 微生物学. 北京: 中国医药科技出版社, 1998, 356~362.