

海洋动植物共附生微生物的分离和抗菌活性研究*

姜健** 范圣第 杨宝灵 邵阳 元起

(大连民族学院生物工程系 大连 116600)

摘要: 从海参、海胆、海葵、海兔、石莼、羊栖菜、裙带菜分离得到 125 种共附生海洋微生物, 以 6 种敏感菌为指示菌, 从中获得具有抑菌活性的细菌 21 株, 放线菌 8 株, 真菌 2 株。21 株抑菌海洋细菌中芽孢杆菌属为 7 株, 占 33.3%, 弧菌属为 11 种, 占 52.2%, 其余 3 株为假单胞杆菌属, 占 14.5%。8 株抑菌海洋放线菌中链霉菌属为 5 株, 占 62.5%, 小单孢菌属为 3 株, 占 36.5%。2 株抑菌海洋真菌均为青霉菌。

关键词: 海洋, 共附生微生物, 抗菌活性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0065-04

Isolation and Identification of Antimicrobial Activity of Symbiotic and Epiphyte Microorganisms on Marine Organisms*

JIANG Jian** FAN Sheng-Di YANG Bao-Ling TAI Yang YUAN Qi

(Bioengineering Department, Dalian Nationalities University, Dalian 116600)

Abstract: The 125 strains of the symbiotic and epiphyte microorganisms were isolated from marine organisms (Sea cucumber, Sea urchin, Sea anemone, Sea actinia, Ulva, Sargassum, Undaria). Among them, 21 strains of bacteria, 8 strains of actinomycetes and 2 strains of fungi have shown to have antagonistic activity on bacterial or fungal growth. In the 21 strains of bacteria, 7 strains belong to *Bacillus* sp., 11 strains belong to *Vibrio* sp., and 3 strains belong to *Pseudomonas* sp.. In the 8 strains of actinomycetes, 5 strains belong to *Streptomyces* sp., 3 strains belong to *Micromonospora* sp.. 2 strains of fungi belong to *Penicillium* sp..

Key words: Marine, Symbiotic and epiphyte microorganisms, Antimicrobial activity

海洋微生物具有产生生物活性物质的巨大潜力, 目前发现的许多海洋生物活性物质都分离自海洋微生物, 并且发现以前有些被认为是海洋动植物产生的生物活性物质实际上是由与动植物宿主共生的微生物所产生^[1-3]。与海洋动植物共生存的微生物提高了宿主在海洋中的环境适应性和生存能力, 可产生抑制宿主竞争对手的次生物质。因此, 人们对海洋微生物开发新的特效药寄予极大的希望。目前, 已知的大多数生物活性化合物的产生是菌株特异的, 而不是分类学上种属特异的, 故可直接培养分离到的菌株以取得新生理活性化合物^[4,5]。本研究对大连海域一些动物植物的共附生微生物进行培养和分离, 并进行抗菌性实验, 以期获得具有抗菌活性的海洋微生物。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于 2003 年 3~6 月在大连海域采集海参、海胆、海葵、海兔、石莼、羊栖菜和裙带

*大连民族学院博士科研启动基金项目 (No. 20036217)

大连民族学院“太阳岛”科研立项课题 (No. 030513)

** 通讯作者 Tel: 0411-87656219, E-mail: jjx@dlnu.edu.cn

收稿日期: 2004-05-21, 修回日期: 2004-07-30

菜。采集样品均存放在无菌瓶中，实验过程均为无菌操作。

1.2 微生物分离

用无菌海水洗去表面附着沙粒等杂质，分别称重、匀浆，取上清液分离。细菌分离培养基为佐贝尔培养基 (Zobell's agar)；放线菌采用高氏 I 号培养基 (Gause I agar)；真菌培养基 (GYT)：葡萄糖 10 g，酵母膏 1 g，蛋白胨 2 g，25% 人工海水定容至 1 L。

1.3 抗菌实验

采用琼脂平板划线法初筛，后用双层琼脂扩散法验证^[6]。

抑菌实验用敏感指示菌：金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, BS)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*, EC)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*, PF)、白假丝酵母 (*Candida albicans*, CA)、宛氏拟青霉 (*Paeecilomyces variotii*, PV)。

拮抗菌的鉴定按常规细菌学和真菌学鉴定方法鉴定到属^[7]。

2 结果与分析

2.1 海洋动植物共附生微生物中的拮抗菌

按照菌落形态、大小、色泽和生长速度等特点，从各种分离培养基分离获得 125 株纯培养物，分别用 6 株敏感菌为指示菌进行抑菌试验，共获 31 株拮抗菌，其中 21 株细菌、8 株放线菌和 2 株真菌，总抗菌率 24.8%。拮抗菌的分离率表现为放线菌 > 细菌 > 真菌 (表 1)。

表 1 海洋动植物共附生拮抗微生物的分离率

微生物种类	分离菌数	拮抗菌数	分离率 (%)
细菌	83	21	25.3
放线菌	29	8	27.6
真菌	13	2	16.4
合计	12	31	24.8

2.2 拮抗细菌的鉴定和抗菌活性

21 株拮抗细菌分属 3 个已知属 (表 2)。主要为假单胞菌属 (3 株)、弧菌属 (11 株) 和芽胞杆菌属 (7 株)。其中，从海参上分离出 6 株拮抗细菌，占总拮抗细菌的 28.6%，从石莼中分离出 4 株拮抗细菌，占总拮抗细菌的 19.0%，从海胆中分离出 3 株拮抗细菌，占总拮抗细菌的 14.3%，从海兔中分离出 3 株拮抗细菌，占总拮抗细菌的 14.3%，从羊栖菜中分离出 2 株拮抗细菌，占总拮抗细菌的 9.5%，从裙带菜中分离出 2 株拮抗细菌，占总拮抗细菌的 9.5%，从海葵中分离出 1 株拮抗细菌，占总拮抗细菌的 4.8%。拮抗细菌的抑菌活性以抗革兰氏阳性菌为主，有 15 株，占拮抗细菌总数的 71%；抗革兰氏阴性菌有 5 株，占拮抗细菌总数的 23.8%，抗丝状真菌的拮抗菌株 3 株，占拮抗细菌总数的 14.3%，抗酵母菌的拮抗菌株 1 株，占拮抗细菌总数的 5%，既抗革兰氏阳性菌又抗革兰氏阴性菌有 5 株，占拮抗细菌总数的 23.8%，表明海洋动植物共附生拮抗细菌以抗革兰氏阳性菌为主。

表 2 拮抗细菌的鉴定及其抑菌谱

宿主	菌株号	菌种属别	敏感指示菌					
			SA	BS	EC	PF	CA	PV
海参	X28	<i>Vibrio</i> sp.	++		+			
海参	X65	<i>Vibrio</i> sp.		+				++
海参	X71	<i>Bacillus</i> sp.	+		++			
海参	X96	<i>Pseudomonas</i> sp.				+		
海参	X115	<i>Vibrio</i> sp.		+				
海参	X121	<i>Bacillus</i> sp.	+					
石莼	X12	<i>Vibrio</i> sp.		++				
石莼	X82	<i>Pseudomonas</i> sp.			+			
石莼	X91	<i>Vibrio</i> sp.				++		
石莼	X105	<i>Bacillus</i> sp.	+++		+			
海胆	X38	<i>Pseudomonas</i> sp.		+				+
海胆	X47	<i>Vibrio</i> sp.	+		++			
海胆	X117	<i>Bacillus</i> sp.	+			+		
海兔	X4	<i>Vibrio</i> sp.				++		
海兔	X98	<i>Bacillus</i> sp.	+			+		
海兔	X120	<i>Vibrio</i> sp.	+					
羊栖菜	X9	<i>Vibrio</i> sp.		++				
羊栖菜	X30	<i>Bacillus</i> sp.						++
裙带菜	X59	<i>Vibrio</i> sp.	+		+			
裙带菜	X83	<i>Bacillus</i> sp.					++	
海葵	X58	<i>Vibrio</i> sp.	+					

+ 表示抑菌圈直径 < 1.0 cm, ++ 表示 1.0 cm ≤ 抑菌圈直径 < 2.0 cm, +++ 表示抑菌圈直径 ≥ 2.0 cm

2.3 拮抗放线菌的鉴定和抗菌活性

8 株拮抗放线菌分属于 2 个已知属 (表 3), 为链霉菌属 (5 株) 和小单孢菌属 (3 株), 其中从海葵分离出 3 株, 占总分离放线菌的 37.5%, 从海参分离出 2 株, 占总分离放线菌的 25%, 从石莼、海胆、海兔中各分离出 1 株, 分别占 12.5%。拮抗放线菌中抗革兰氏阳性菌有 4 株, 占拮抗放线菌总数的 50%, 抗革兰氏阴性菌有 1 株, 占拮抗放线菌总数的 12.5%, 抗丝状真菌有 3 株, 占拮抗放线菌总数的 37.5%, 抗酵母菌的放线菌没有, 表明海洋动植物共附生拮抗放线菌以抗革兰氏阳性菌和真菌为主。在链霉菌属的分离菌株中, 共有 4 个类群: 黄色类群、白孢类群、粉红孢类群和吸水类群, 其中黄色类群是最主要的拮抗菌。

表 3 拮抗放线菌的鉴定及其抑菌谱

宿主	菌株号	菌种属别	敏感指示菌					
			SA	BS	EC	PF	CA	PV
海葵	F36	<i>Streptomyces</i> sp.		++				
海葵	F103	<i>Micromonospora</i> sp.						+
海葵	F110	<i>Streptomyces</i> sp.		+				
海参	F14	<i>Micromonospora</i> sp.	+					
海参	F70	<i>Streptomyces</i> sp.						+
石莼	F103	<i>Streptomyces</i> sp.			++			
海胆	F69	<i>Micromonospora</i> sp.						+++
海兔	F100	<i>Streptomyces</i> sp.		+				

+ 表示抑菌圈直径 < 1.0 cm, ++ 表示 1.0 cm ≤ 抑菌圈直径 < 2.0 cm, +++ 表示抑菌圈直径 ≥ 2.0 cm

2.4 拮抗真菌的鉴定和抗菌活性

2株抑菌海洋真菌均为青霉属(表4),从石莼和海兔上各分离出1株。其中Z77为抗细菌菌株,对革兰氏阳性菌有抗性,Z53对酵母菌具有抗性。未发现有抗革兰氏阳性菌和真菌的菌株。

表4 拮抗真菌的鉴定及其抑菌谱

宿主	菌株号	菌种属别	敏感指示菌					
			SA	BS	EC	PF	CA	PV
石莼	Z77	<i>Penicillium</i> sp.	+	+	+			
海兔	Z53	<i>Penicillium</i> sp.						+

+ 表示抑菌圈直径 < 1.0 cm, ++ 表示 1.0 cm ≤ 抑菌圈直径 < 2.0 cm, +++ 表示抑菌圈直径 ≥ 2.0 cm

3 讨论

早在1966年,Burkholder从海洋含溴假单胞菌分离到抗生素硝吡咯菌素(Pyrolnitrin)^[8],海洋微生物活性物质探索研究从此开始,随后不断有新的拮抗海洋微生物被发现。如Burgess等发现能够产生抗生素的海洋光合细菌-*Chromatium purpurdum*^[9],郑忠辉从厦门海区潮间带石莼、浒苔、江篱、海兔、海葵及鲨鱼肠道分离得289株共附生微生物^[10],从中获得有拮抗活性的细菌28株、放线菌17株、真菌8株。上述结果表明,海洋动植物共附生微生物中存在着丰富的抗菌资源,本研究工作支持了这一结论,从海参、海胆、海葵、海兔、石莼、羊栖菜、裙带菜分离得到125种共附生微生物,以6种敏感菌为指示菌,从中获得具有抑菌活性的细菌21株,放线菌8株,真菌2株。

本工作还表明,不同动植物分布的拮抗微生物的比例差别很大。以细菌为例,海参拮抗菌的分离菌株最多,为6株,其次为石莼,为4株,而海葵中则只发现1株拮抗菌的存在,而在拮抗放线菌分离中,海葵的分离菌株最多,其次为海参。按照动物与植物进行拮抗微生物总量的对比,会发现动物共附生微生物数量要远远多于植物,这实际上反映了海洋微生物的多样性和不同的海洋动植物个体的特异性,说明海洋动植物共附生拮抗微生物的存在与数量取决于其宿主的微生境条件。所以,在研究海洋动植物共附生拮抗微生物、寻找海洋微生物生物活性物质时,海洋动植物宿主选择是提高筛选效率的重要前提。

参考文献

- [1] Carte B K. *Bioscience*, 1996, 46 (4): 271 ~ 286.
- [2] 刘全水, 胡江春, 薛德林, 等. *应用生态学报*, 2002, 13 (7): 901 ~ 905.
- [3] 李越中, 陈琦. *生物工程进展*, 2000, 20 (5): 28 ~ 31.
- [4] 刘铁汉, 周培瑾. *微生物学通报*, 1999, 26 (3): 232.
- [5] 王意敏, 刘志恒. *微生物学通报*, 1999, 26 (2): 137 ~ 140.
- [6] 周德庆. *微生物学实验手册*. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 65 ~ 67.
- [7] 陈绍铭, 郑福寿. *水生微生物实验法*. 北京: 海洋出版社, 1985. 225 ~ 226.
- [8] Burkholder P R, Pfister R M, Leitz F P. *Appl Microbiol*, 1966, 14: 649 ~ 653.
- [9] Burgess J G, Miyashita H, Sudo H. *J Mar Biotechol*, 1993, 1 (2): 101 ~ 104.
- [10] 郑忠辉, 陈连兴, 黄耀坚, 等. *台湾海峡*, 1998, 17 (4): 439 ~ 444.