

细薄星芒海绵中活性菌筛选及混合菌协同效应*

黄艳琴 李志勇** 蒋 群 乔 雨 李堃宝

(上海交通大学生命科学技术学院海洋生物技术实验室 上海 200240)

摘要: 通过平板涂布法从我国南海三亚海域细薄星芒海绵中筛选出 104 株海洋细菌, 采用琼脂扩散法、纸片法和细胞浓度记数法进行抗菌活性筛选, 发现 23 株对于大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉、白假丝酵母、宛氏拟青霉具有稳定的抗菌活性, 占总细菌的 22.2%; 根据形态学与生化指标分析初步确认其中 4 株抗菌活性显著的 A05、A08、A72、A75 为芽孢杆菌。研究发现, 海绵细菌在抗菌活性方面具有正向和负向的协同效应, 其中 A72-75 组合对于白假丝酵母和荧光假单胞菌具有显著的正向协同效应。

关键词: 细薄星芒海绵, 海洋细菌, 抑菌活性, 协同效应

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0005-06

Screening of Sponge *Stelletta tenuis* Associated Anti-microbial Bacteria and Their Synergistic Effects*

HUANG Yan-Qin LI Zhi-Yong** JIANG Qun QIAO Yu LI Kun-Bao

(Marine Biotechnology Laboratory, School of Life Science and Biotechnology,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract: A total of 104 marine bacterial strains were isolated from *Stelletta tenuis* around Sanya area of South China Sea by dilution-plate method and were screened for anti-microbial activity on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Penicillium variotii* by agar diffusion, paper disc diffusion assay and cell concentration counts methods. It was found that 23 strains, which are 22.2% of the total isolated strains, have anti-microbial activities. Among the 23 strains, A05, A08, A72 and A75 were morphologically, physiologically and biochemically characterized and identified to be the genus *Bacillus*. At the same time, it was proved that there are positive and negative synergistic effects between or among active strains, e. g., as for A72-75 combination, an obvious enhanced anti-microbial activities on inhibiting *Candida albicans* and *Pseudomonas fluorescens* growth was observed than A72 or A75.

Key words: *Stelletta tenuis*, Marine bacteria, Anti-microbial activity, Synergistic effects

自 20 世纪 50 年代以来, 人们从海绵中发现了许多生物活性物质。1995 年后从海绵中发现的活性物质数量几乎与从其它所有海洋生物中发现的活性物质总量相当, 因此海绵已经成为开发海洋活性物质尤其海洋药物的重要资源。海绵的腔状多孔的结构特点与过滤海水获取营养的方式使其成为海洋微生物良好的宿主。由于目前对于海绵体内的微生物与海绵的关系还不明确, 一般笼统地将这些微生物称为海绵共附生微生物。

* 国家高技术研究发展计划项目 (“863” 项目) (No. 2004AA628060)

上海市科学技术委员会青年科技启明星计划资助 (No. 04QMX1411)

上海市高校优秀青年教师后备人选计划资助

** 通讯作者 Tel: 021-54743351, E-mail: zyli@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2004-08-16, 修回日期: 2004-09-02

物。已有证据表明一些化合物是由这些共附生微生物合成的^[1]。这就给了我们一个提示, 通过从海绵中分离共附生微生物, 筛选获得活性菌株, 就可以通过发酵工程手段大量获取某种活性物质, 为解决海绵活性物质大量制备的瓶颈问题找到一条途径。

虽然国外已开始从海绵中分离筛选微生物的研究^[2], 但对于细薄星芒海绵共附生微生物的研究以及混合菌培养尤其是活性菌间的协同效应还没有相关报道。在我国, 海绵相关微生物的研究才刚刚开始^[3]。本文目的在于从中国南海细薄星芒海绵 (*Stelletta tenuis*) 中筛选具有抗菌活性的海洋细菌, 并尝试进行混合菌协同效应的研究, 这对于我们从海绵分离具有活性物质产生能力的菌株、了解海绵的化学防御及活性物质产生机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 海绵

细薄星芒海绵 (*Stelletta tenuis*) 采自我国南海三亚周遍海域, 由中国科学院海洋研究所李锦和研究员鉴定。

1.2 活性菌的分离、纯化

将细薄星芒海绵 (*Stelletta tenuis*) 无菌条件下切成 1mm³ 的细块浸泡于无菌人工海水中, 取浸出液梯度稀释后涂布于人工海水配置的牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 挑取单菌落, 反复划线得到纯培养的菌株。

1.3 抗菌活性菌的筛选

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、白假丝酵母 (*Candida albicans*)、宛氏拟青霉 (*Penicillium variotii*) 7 种菌为指标菌 (购于中国科学院微生物研究所)。单菌初筛采用琼脂扩散法^[4], 混合菌活性筛选采用纸片法。第 7 天观察记录抑菌圈外径, 每个结果重复 9 次。

1.4 基于传统分类方法的活性菌初步鉴定

按照文献 [5, 6] 进行形态观察、革兰氏染色、运动性试验、过氧化氢酶试验、唯一碳源试验、淀粉水解等试验。根据文献 [7, 8] 初步确定活性菌的分类地位。

1.5 混合菌协同效应研究

1.5.1 混合菌不同组合的抗菌活性: 取 28℃ 培养 48h 的单菌菌液 10μL, 进行不同单菌的组合, 以 1% 的接种量接种于人工海水配置的牛肉膏蛋白胨培养基 (总体积为 1mL) 中发酵培养。将稀释 100 倍后的菌液用于抑菌试验 (纸片法), 记录第 7d 抑菌圈外径 (纸片直径为 5mm), 通过对比单菌的活性衡量混合菌活性的改变。

1.5.2 活性菌胞外提取物的抑菌活性: 将发酵培养 72h 的单菌和混合菌 8, 500r/min 离心 20min 得上清, 0.22μm 膜过滤除菌, 乙酸乙酯萃取 3 次, 合并后真空浓缩得到胞外提取物, 用 5mL 人工海水牛肉膏蛋白胨培养基溶解。将指标菌 28℃ 活化 24h, 以 1/5 (V/V) 的比例向 100mL 指标菌中加入胞外提取物, 28℃、150r/min 摇床培养, 以没有添加胞外提取物的指标菌做空白对照, 每隔 12h 取样 3mL, 用血细胞计数板计数每毫升培养液的细胞总数。按照以下公式计算胞外提取物对指标菌的抑制率: $\eta = (M - N) / M \times 100\%$, 式中: η 为抑制生长率, M 为每毫升空白对照指标菌培养液的细胞总数, N 为每毫升添加胞外提取物的指标菌培养液的细胞总数。

2 结果与讨论

2.1 活性菌分离与抗菌活性筛选

分离得到 104 株细菌, 其中 23 株有抑菌活性, 占 22.2%, 结果如表 1。海绵是最为原始的多细胞动物, 通过产生毒素和其它化合物来抗微生物感染、阻止掠食者、或与其它固着生物竞争生存空间。抗菌活性物质可能就是海绵化学防御机制的基础。

表 1 细薄星芒海绵中 23 种细菌的抑菌结果

菌株 编号	指 标 菌						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus nigers</i>	<i>Pacecilomyces variotii</i>
A05	++	-	-	-	+++	-	++
A06	-	-	+	-	-	-	++
A08	-	-	+++	-	+	-	++
A09	-	-	++	-	++	-	-
A11	-	-	++	-	+	+	+
A12	-	-	+	-	++	+	-
A17	-	-	++	-	-	-	++
A18	-	-	++	-	-	+	++
A20	-	-	++	-	-	-	-
A32	-	-	-	-	-	++	-
A39	-	-	-	-	-	++	-
A40	-	-	-	-	++	++	++
A45	-	-	-	-	-	-	++
A46	++	-	-	-	-	-	++
A57	-	-	-	-	+	++	-
A63	-	-	-	-	-	++	+
A64	++	-	-	-	++	-	++
A69	++	++	-	-	-	-	+
A70	-	++	-	-	-	-	++
A71	-	-	-	-	++	++	++
A72	-	-	+++	-	+	++	++
A75	-	+++	+++	+	+	++	+++
A77	-	-	-	-	++	-	-

注: - 表示没有抑菌斑和抑菌圈, + 表示有抑菌斑, ++ 表示抑菌斑向周围生长, +++ 表示有明显的抑菌圈, 结果为 9 次重复的结果

由表 1 可以看出: 3 种革兰氏阳性菌 *Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis* 和 *Pseudomonas fluorescens* 有 12 种拮抗菌, 占活性菌 60.9% (14/23); 真菌 *Aspergillus nigers*、*Candida albicans*、*Pacecilomyces variotii* 的拮抗菌占活性菌的 95.7% (22/23); 对 *Escherichia coli* 没有出现明显抑菌圈的拮抗菌, 只有 3 株出现抑菌斑。A05 对 *Candida albicans*、A08 和 A72 对 *Bacillus subtilis*、A75 对 *Staphylococcus aureus* 及 *Bacillus subtilis* 都有明显的抑菌效果, 其中 A75 抑制的 4 种指标菌中, 两个为革兰氏阳性细菌, 另外两个为霉菌, 很具有代表性。A05、A08、A72、A75 这 4 株活性菌的抑菌谱各异, 不过也有

相同之处,就是 A08、A72、A75 都对 *Bacillus subtilis* 有拮抗作用;约 90% 的天然抗生素对于革兰氏阴性菌如大肠杆菌无抑制效果^[10-13],对 *Escherichia coli*,我们所研究的细菌也没检测到明显的抑菌圈。基于以上结果,我们选择 A05、A08、A72、A75 这 4 个菌株进行形态学与生理生化分析,同时进行不同组合的混合发酵培养,以期找到活性协同增强的组合。

2.2 活性菌的形态特征与生理生化特性分析

海洋细菌的最适盐度一般在 2% ~4%^[14],实验证明 A05、A08、A72、A75 这 4 个菌株在 2% ~4% 的盐度范围内生长良好,符合海洋细菌的生长特性。

A05、A08、A72、A75 这 4 个菌株的形态特征及生理特性测定结果见表 2。这 4 株菌的过氧化氢酶反应呈阳性,为好氧或兼性厌氧菌;有鞭毛,具有运动性;有芽孢,A05 和 A75 芽孢短杆状,中生或近端生。A08 芽孢椭圆,侧生。A72 芽孢中生或近端生,芽孢短杆状,甲基红反应阴性,都不能水解淀粉,硝酸盐还原反应 A72、A75, A05 为阳性, A75 为阴性;均可以利用柠檬酸盐;A05、A72 能液化明胶。A72、A75 可以还原硝态氮。发酵葡萄糖产酸不产气;皆耐盐;石蕊牛奶反应均产酸,凝固,不冻化。

表 2 活性菌株的主要形态特征以及生理特性

试验项目	活性菌编号			
	A05	A08	A72	A75
革兰氏染色	G ⁻	G ⁺	G ⁻	G ⁺
个体大小	3 ~ 4 μm	2 ~ 3 μm	4 ~ 5 μm	3 ~ 3.5 μm
个体形态	杆状	杆状	杆状	杆状
菌落颜色	浅棕色	米色	白色	浅黄色
菌落大小	1.0mm	0.5mm	0.7mm	0.5mm
色素产生	棕色	无	无	黄绿色
芽孢有无	短杆状	椭圆	短杆状	短杆状
运动性	+	+	+	+
过氧化氢酶测	+	+	+	+
定明胶液化	-	+	-	-
硫化氢产生	-	-	-	-
石蕊牛奶实验	+	+	+	+
耐盐试验	+	+	+	+
发酵葡萄糖产酸	+	+	+	+
发酵葡萄糖产气	-	-	-	-
乳糖的利用	+	+	+	-
麦芽糖的利用	-	+	-	-
淀粉水解试验	-	-	-	-
甲基红试验	-	-	-	-
柠檬酸盐实验	+	+	+	+
硝酸盐还原试验	-	+	+	-

注: + 表示阳性反应, - 表示阴性反应,均为 3 次重复实验的结果

通过细菌形态观察和生理生化试验,根据文献 [7] 和 [8],可以初步确认这 4 株活性菌属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。A08 和 A75 和短小芽孢杆菌类似,但 A08 和 A75

石蕊牛奶产酸, A08 还能还原硝酸盐。A05、A72 和短芽孢杆菌相似, 但 A05 和 A72 都能在 7% 的 NaCl 中生长。这些差异可能是由于海洋及海绵独特的环境所致。

2.3 活性菌组合的协同效应

海绵体中微生物可以达到体积的 40% 以上^[15]。我们推测共同存在于同一海绵中的不同微生物可能在海绵活性物质产生-积累-转移过程中存在一定的协同关系。下面我们对 A05、A08、A72、A75 单菌及其不同组合的混合菌的抗菌活性进行对比分析, 结果见表 3。从表 3 可以看出: 就单菌而言, 用纸片法检测得到 A05、A08、A72 的抑菌结果和表 1 一致, 这进一步证实了抗菌活性的稳定性。

表 3 表明 A05、A08、A72、A75 这 4 株活性菌之间出现了协同增强效应: A72、A75 单菌对 *Pseudomomas fluorescens*、*Candida albicans* 均无明显的抑菌活性, 可是 A72-75 组合对这两个指标菌抑菌效果明显。同时我们也发现活性菌之间也存在着负向协同效应, 例如: A75 单菌对 *Aspergillus nigers* 有拮抗作用, 但是含有 A75 的组合则没有出现明显的抑菌圈; A05-72-75、A05-08-72-75 组合的活性会比 A72-75 和 A08-72-75 组合减弱甚至消失等。这里发现的活性菌之间的正向和负向协同效应对于我们了解和揭示海绵活性物质的产生及化学防御机制具有重要意义。

表 3 A05、A08、A72、A75 及其组合菌的抑菌谱 (抑菌圈外径 mm)

菌株 编号	指 标 菌						
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomomas fluorescens</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus nigers</i>	<i>Paceciliomyces variotii</i>
A05	/	/	/	/	7	/	/
A08	/	/	16	/	/	/	/
A72	/	/	20	/	/	/	/
A75	/	13	15	/	/	9	16
A05-08	/	/	/	/	/	/	/
A05-72	/	/	/	/	/	/	/
A05-75	/	/	/	/	/	/	9
A08-72	/	/	/	/	/	/	/
A08-75	/	6	18	/	/	/	6
A72-75	/	/	/	9	13	/	/
A05-08-72	/	/	6	/	/	/	/
A05-08-75	/	/	/	/	/	/	16
A05-72-75	/	/	/	/	/	/	16
A08-72-75	/	/	/	/	/	/	15
A05-08-72-75	/	/	/	/	/	/	/

注: “/” 表示没有明显抑菌圈, 数字表示抑菌圈外径大小, 所有结果均为 9 次重复实验的平均值

针对具有活性协同增强的 A72-75 组合进行了进一步研究, 结果见图 1 与图 2。图 1 和图 2 显示 A72-75 胞外提取产物的抑菌效果明显好于 A72 和 A75 单菌。对于指标菌 *Candida albicans*, 添加胞外提取物可以明显延缓其进入平台期的时间, 而对于最大细胞浓度没有显著影响; 胞外提取物 36h 时的抑制率为 19.2%。对于指标菌 *Pseudomomas fluorescens*, 添加 A72-75 胞外提取物可以显著降低其指数生长期的生长速度和最大细胞浓度, 48h 时的抑制率高达 71.36%。可见, A72-75 组合具有远比单菌强得多的抑制 *Candida al-*

bicans、*Pseudomonas fluorescens* 指标菌生长的活性, 并表现出不同的抑制效果。

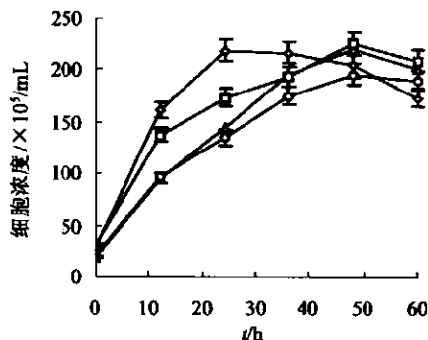


图1 添加胞外提取物抑制 *C. albicans* 的生长曲线

—○— *C. albicans*, —△— A72 + *C. albicans*,
—□— A75 + *C. albicans*, —◇— A72-75 + *C. albicans*

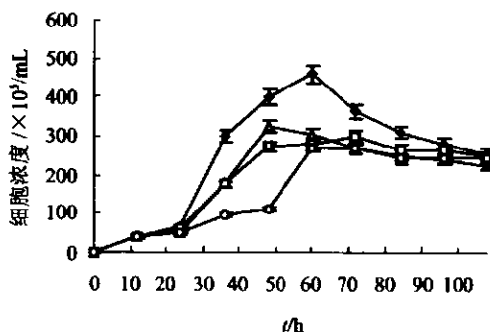


图2 添加胞外提取物抑制 *P. fluorescens* 的生长曲线

—◇— *P. fluorescens*, —△— A72 + *P. fluorescens*,
—□— A75 + *P. fluorescens*, —○— A72-75 + *P. fluorescens*

3 结论

本研究可以初步得到以下结论: (1) 从细薄星芒海绵筛选出 104 株海洋细菌, 其中 23 株具有抗菌活性, 占总的得到的细菌的 22.2%。(2) 筛选得到了 4 株抗菌活性显著的 A05、A08、A72、A75 细菌, 基于传统的形态学观察与生理生化分析初步确认 A08 和 A75 为革兰氏阳性的短小芽孢杆菌, A05 与 A72 为革兰氏阴性的短芽孢杆菌, 4 者均具有耐盐性, 在 2% ~ 4% 盐度范围生长良好。(3) 研究发现分离自细薄星芒海绵筛选的细菌在抗菌活性方面具有正向和负向的协同效应, 其中 A72-75 组合对于白假丝酵母和荧光假单胞菌具有显著的正向协同效应, 抑菌效果显著增强。

参考文献

- [1] Kobayashi J, Ishibashi M. Chem Rev, 1993, 93: 1753 ~ 1769.
- [2] Kefalas E, Castritsi-Catharios J, Miliou H. Ecological Indicators, 2003, 2: 339 ~ 343.
- [3] 何丽明, 李志勇, 蒋群, 等. 微生物学通报, 32 (3): 51 ~ 56.
- [4] 李会英. 高科技通讯, 2001, 9: 19.
- [5] 沈萍, 范秀容, 李光斌. 微生物学实验 (第三版). 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [6] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册 (第八版). 北京: 科学出版社, 1984.
- [8] 张纪忠, 黄静娟, 盛宗斗, 等. 微生物分类学 (第一版). 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [9] Pawlik J R, McFall G, Zea S. Chem Ecol, 2002, 28: 1103 ~ 1115.
- [10] Vaara M. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37: 2255 ~ 2260.
- [11] Demain A L. Appl Microbial Biotechnol, 1999, 52: 455 ~ 463.
- [12] Nikaido H. J Bacteriol, 1996, 178: 5853 ~ 5819.
- [13] Lewis K. Trends Biochem Sci, 1994, 19: 119 ~ 123.
- [14] 方金瑞, 黄维真. 中国海洋药物, 1995, 14 (4): 21 ~ 25.
- [15] Unson M D, Holland N D, Faulkner D J. Mar Biol, 1994, 119: 1 ~ 11.