

贪婪偈海绵中抗菌活性细菌的筛选及初步鉴定*

沈颖 李志勇** 蒋群 黄艳琴 何丽明

(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: 采用平板涂布法从我国南海三亚周边海域贪婪偈海绵 (*Dysidea avara*) 中分离海绵共附生细菌, 采用金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白假丝酵母、宛氏拟青霉、黑曲霉 7 种指标菌进行抑菌试验筛选抗菌活性菌, 同时对于得到的活性菌进行生理生化鉴定。共分离获得 149 个细菌菌株, 发现 20 株具有抑制真菌和革兰氏阳性细菌的活性, 占细菌总数的 13.4%。经过细菌形态观察和生理生化试验, 发现此 20 株活性菌属于革兰氏阳性芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。

关键词: 贪婪偈海绵, 细菌, 抗菌活性, 分类学

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0015-05

Isolation and Screening for Anti-microbial Bacteria from Sponge *Dysidea avara**

SHEN Ying LI Zhi-Yong** JIANG Qun HUANG Yan-Qin HE Li-Ming

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

Abstract: Sponge *Dysidea avara*-associated bacteria were isolated by dilution-plate method and the bacterial anti-microbial activities were screened for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Penicillium variotii* by agar diffusion method. At the same time, morphology observations, biochemical and physiological identification of active strains were made. In this paper, 149 strains were isolated from sponge *Dysidea avara*. 20 strains, which amount to 13.4% of the total isolated strains, were found to have anti-microbial activity against fungi and gram-positive bacteria and were identified to be the genus *Bacillus* sp.

Key words: *Dysidea avara*, Bacteria, Anti-microbial activity, Taxonomy

海洋因其独特的环境条件而使海洋生物成为具有药用价值的新化合物的来源。相对于其他海洋生物, 海绵中发现的生物活性物质非常丰富^[1]。早在上世纪 80 年代, 就在地中海水域采集的贪婪偈海绵 (*Dysidea avara*) 中分离出 avarol 和 avarone 两种具有多种生物活性的物质^[2~6]。由于海绵捕捞或人工养殖困难、活性物质含量极微、海绵体结构复杂等原因, 很难大量获得海绵相关物质, 因此海绵活性物质来源限制已经成为海绵药物研究与开发的瓶颈。

越来越多的研究表明, 一些原本认为是海绵产生的活性物质其实是由其共附生微生物产生的^[7,8]。由于目前对于海绵体内的微生物与海绵的关系还不明确, 一般将这些

* 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: 021-27974893, E-mail: zyli@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2004-09-06, 修回日期: 2004-10-09

微生物皆称为海绵共附生微生物。从海绵共附生微生物的分离与活性筛选入手, 寻找可能由这些微生物合成的活性代谢产物, 最终实现活性菌发酵培养是解决海绵活性物质大规模制备的一条最为切实可行的途径。

本文采用传统的微生物技术对我国南海三亚周边海域的贫婪偃海绵体内的细菌进行分离培养并进行抗菌活性筛选, 对于得到的活性菌进行形态学与生理生化分析, 目的在于得到相关活性菌, 建立种子资源库, 为进一步开发利用海绵共附生微生物资源奠定基础。对于南海贫婪偃海绵活性菌的研究还没有研究报道, 因此具有比较重要的研究价值。

1 材料与方法

1.1 海绵

贫婪偃海绵 (*Dysidea avara* (Schmidt)) 采自我国南海三亚周边海域, 由中国科学院海洋研究所李锦和研究员鉴定。

1.2 细菌分离

从海绵浸泡液及海绵碎块平板培养物中分离。使用的分离培养基为人工海水配制的营养肉汤培养基。培养条件为 28℃。人工海水配方如下: NaCl 26.518 g, MgCl₂ 2.447 g, MgSO₄ 3.305 g, CaCl₂ 1.141 g, KCl 0.725 g, NaHCO₃ 0.202 g, NaBr 0.083 g, 蒸馏水定容至 1,000 mL。

1.3 抗菌活性筛选

7 种指示菌株为: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) AS 1.2465、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) AS 1.3373、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) AS 1.55、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) AS 1.3343、白假丝酵母 (*Candida albicans*) AS 2.2086、宛氏拟青霉 (*Paeccilomyces variotii*) AS 3.776、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) AS 3.5487, 均购自中国科学院微生物研究所的中国普通微生物保藏中心。

使用琼脂扩散法对分离到的待测菌进行抑菌活性测定。根据琼脂扩散法测得的抑菌圈直径大小, 确定细菌对 7 种指标菌的抗菌谱。

1.4 抗菌活性菌株的形态学与生理生化分析

主要参照文献 [9~12] 进行。根据菌种鉴定所必须的指标和将来对发酵条件研究的需要, 选择进行了 12 项生理生化指标试验。

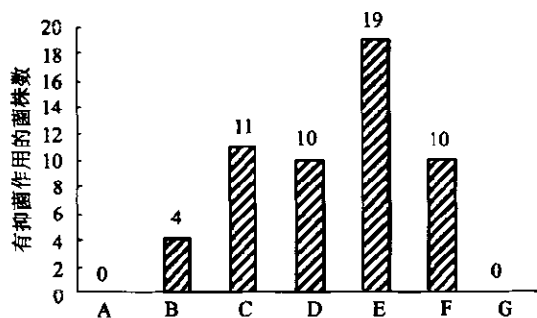


图 1 20 个活性菌株对 7 种指标菌株抗菌谱
A *E. coli*, B *B. subtilis*, C *P. fluorescens*, D *S. aureus*,
E *P. variotii*, F *A. niger*, G *C. albicans*

2 结果与讨论

2.1 细菌分离与活性筛选

从贫婪偃海绵的浸出液及海绵块共分离到 149 株细菌, 按照 C01-C149 进行编号。从中筛选具有抗菌活性的细菌 20 株, 抑菌结果见表 1, 占总数 149 株的 13.4%。

根据表 1 的结果得到图 1 所示的海绵细菌抗菌谱, 可见这 20 株细菌的抗性主要针对真菌中的宛氏拟青霉 (19 株, 12.8%)、黑曲霉 (10 株, 6.7%), 细菌中的枯草芽孢杆菌 (4 株, 2.7%)、

金黄色葡萄球菌 (10 株, 6.7%) 和荧光假单胞菌 (11 株, 7.4%)。没有发现对革兰氏阴性菌大肠杆菌的拮抗菌株, 也没有发现对白假丝酵母存在明显抑菌活性的拮抗菌。

表 1 20 株细菌的抑菌结果

编号	指示菌株						
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. variotii</i>
C51	-	-	-	-	-	++	+
C52	-	-	-	-	-	+++	+
C54	-	-	-	-	-	++	+
C59	-	-	-	-	-	++	+
C76	-	-	-	-	-	++	+
C77	-	-	-	-	-	++	+
C88	-	-	-	-	-	++	+
C89	-	-	-	-	-	++	+
C93	-	-	+	+++	-	+++	-
C96	-	-	-	-	-	++	+
C111	-	-	+	+++	-	-	+
C114	-	-	+	+	-	-	++
C117	-	-	+	+	-	-	+
C118	-	+	+	+++	-	-	+
C123	-	+	+	+++	-	-	+
C126	-	+	+	+++	-	-	+
C127	-	++	+	++	-	-	+
C128	-	-	+	+	-	-	+
C129	-	-	+	+	-	-	+
C130	-	-	-	++	-	-	+

注: + 表示抑菌圈直径 $d < 2\text{ mm}$, ++ 表示 $2\text{ mm} < d < 4\text{ mm}$, +++ 表示 $d > 4\text{ mm}$

图 2 是对于海绵浸泡液和碎块两种来源的细菌的抗菌谱比较。可见, 两种途径获得的细菌的抗菌活性具有差异性, 这提示我们这两种途径获得的细菌可能以不同的方式存在于海绵中。而采用相同途径分离筛选到的活性菌所具有的抑菌谱和形态具有相似性, 有可能是因为这些菌株在相同环境下生存, 是相同的环境因素对微生物长期选择的结果。

2.2 形态学与生理生化分析

显微镜观察可以发现 20 株活性菌形态皆为大小不一的杆状菌。经革兰氏染色发现, 所有菌株皆为革兰氏阳性菌。经过芽孢染色, 发现 20 个菌株都产生各种形态不一的芽孢。

从生理生化反应结果来看, 20 株菌皆为化能异养型细菌, 好氧或兼性厌养; 对碳源氮源的利用能力不一。此 20 种菌株有很强的酶活

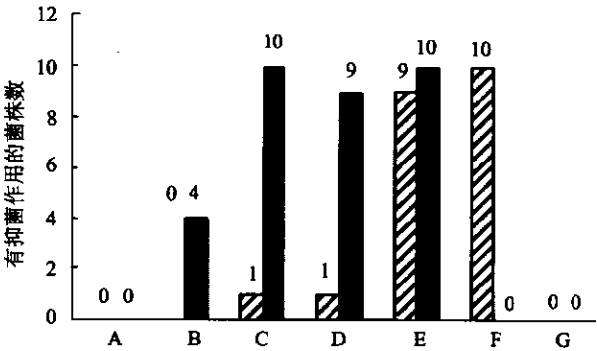


图 2 两种分离途径抑菌谱的对比
斜线柱状体为浸泡液中分离的细菌, 黑色柱图为海绵碎块平板培养物中分离的细菌
A *E. coli*, B *B. subtilis*, C *P. fluorescens*, D *S. aureus*,
E *P. variotii*, F *A. niger*, G *C. albicans*

性：除了 C77 与 C93 不能水解淀粉之外，其余的菌株皆能产生淀粉酶；所有菌株都具有蛋白酶活性。耐盐性试验的结果表明，此 20 种活性菌皆可以耐高盐，可说明此 20 株细菌皆为海洋细菌。根据其形态观察和生理生化试验结果，根据文献[9]，基本可以确定 20 株菌株皆属于革兰氏阳性菌的芽孢杆菌属的菌株。

根据初步的形态学与生理生化分析，再结合抑菌试验的抗菌谱，可以初步将这 20 个菌株分成 9 个类别。C51、C52、C54、C59、C76、C88、C96 等 7 株为一类，取 C51 为代表；C114、C128 为一类，取 C114 为代表；C117、C129 为一类，取 C117 为代表；C118、123、126、127 为一类，取 C123 为代表。C77、C89、C93、C111、C130 各为一类，这 9 种代表性菌株的革兰氏染色结果见图 3，生理生化试验结果见表 2。

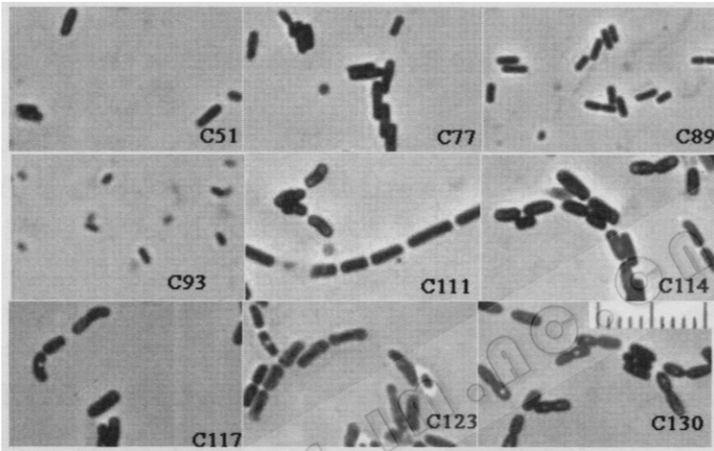


图 3 活性菌革兰氏染色与形态观察

标尺为每小格 1 μ m

表 2 9 种活性菌的生理生化试验结果

菌株 编号	生理生化指标														
	1	2			3			5	6	7	8	9	10	11	12
		A	B	C	D	E	F								
C51	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	还原, 脲化, 凝块少
C77	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	酸凝固, 脲化
C89	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	还原, 脲化, 凝块少
C93	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	还原
C111	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	酸凝固, 脲化
C114	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	酸凝固, 脲化
C117	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	酸凝固, 脲化
C123	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	凝乳, 脲化
C130	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	凝乳, 脲化

注 1: 1 过氧化氢酶试验, 2 唯一碳源试验, A 为葡萄糖, B 为麦芽糖, C 为乳糖, D 为甘露醇, 3 唯一氮源试验 (无机氮), E 为硫酸铵, F 为硝酸钾, 4 葡萄糖发酵, 5 甲基红 M.R. 试验, 6 柠檬酸盐利用试验, 7 淀粉水解试验, 8 硝酸盐还原试验, 9 明胶液化试验, 10 酪素水解试验, 11 耐盐试验, + 代表在 2%、4%、6% 盐度下都生长, 12 石蕊牛奶反应记录结果为随时间变化观察到的现象

注 2: 所有试验中如无特别注明, + 代表试验结果阳性, - 代表结果阴性

海洋环境中大部分细菌为革兰氏阴性菌。而本文分离到的海绵活性菌皆为革兰氏

阳性的芽孢杆菌属细菌。在一些其他种属的海绵中也确有发现各种具有抑菌活性的芽孢杆菌属的细菌的存在^[13]。这不排除是海绵选择性吸收和积聚海水中相应微生物的结果,或者是海绵体内微生物的特异性所致。大量的具有抗菌活性的芽孢杆菌属细菌高比例存在贪婪促海绵中也有可能是由于其产生的芽孢使其更容易在海绵体内存活。还有一个原因可能来自于本实验的分离方法。

本文仅涉及活性菌的初步鉴定与分类,只能确定到属。对于这些菌株进一步的鉴定以及其在系统分类上的位置将在以后的研究中结合 16S rDNA 同源性分析等方法确定。关于活性菌株发酵产生代谢物的研究也将是我们今后的一个重要研究内容。

参 考 文 献

- [1] Zhang W, Zhang X, Cao X, *et al.* J Biotechnol, 2003, **100**: 161 ~ 168.
- [2] Müller W E, Dogovic N, Zahn R K, *et al.* Basic Appl Histochem, 1985, **29** (4): 321 ~ 330.
- [3] Cariello L, Zanetti L, Cuomo V, *et al.* Comp Biochem Physiol B, 1982, **71** (2): 281 ~ 283.
- [4] Sarin P S, Sun D, Thornton A, *et al.* J Nat Cancer Inst, 1987, **78**: 663 ~ 666.
- [5] Ferrandiz M L, Sanz M J, Bustos G, *et al.* Eur J Pharmacol, 1994, **253** (1 ~ 2): 75 ~ 82.
- [6] De Rosa S, De Caro S, Iodice C, *et al.* J Biotechnol, 2003, **100** (2): 119 ~ 125.
- [7] Bewley C A, Holland N D, Faulkner D J. Experientia, 1996, **52**, 716 ~ 722.
- [8] Kobayashi J, Ishibashi. Chem Rev, 1993, **93**: 1753 ~ 1769.
- [9] 布坎南 R E, 吉本斯 N E 编. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版). 北京: 科学出版社, 1984. 729 ~ 731.
- [10] 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.
- [11] 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. 116 ~ 123.
- [12] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002. 141 ~ 159.
- [13] Ivanova E P, Nicolau D V, Yumoto N, *et al.* Mar Bio, 1998, **130**: 545 ~ 551.