

来自海洋的链霉菌抑菌活性与其培养条件的关系

罗文新* 陈晓佳* 黄耀坚 郑忠辉 苏文金

(厦门大学生物学系 厦门 361005)

摘要 研究培养条件对来自海洋的12株链霉菌抑菌活性的影响。结果表明,用海水(含3.5% NaCl)制备的高氏1号培养基(pH7.2)、22℃培养时,能表现抑菌活性的菌株数最多;但减少培养基的营养成分、改变氮源、NaCl浓度、pH和培养温度,部分菌株可表现新的抑菌活性,或使原有的抑菌活性有较大提高;新表现或提高的抑菌活性绝大部分都是针对革兰氏阳性菌和白色假丝酵母。本文结果提示在海洋放线菌抗生素产生菌的筛选中,应注意培养条件的选择。

关键词 海洋链霉菌, 抑菌活性, 培养基

分类号 Q93-938.1

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^[1,2]。海洋微生物是海洋生物的重要成员。近年研究表明,海洋微生物可以产生大量的有价值的生物活性物质,包括有些以前被认为是海洋动植物产生的生物活性物质现已被证实是与动植物宿主共生的微生物所产生,海洋微生物生物活性物质的研究已成为海洋药物开发的重要内容^[3-5]。本文研究培养基及其培养条件对分离自海洋的链霉菌抑菌作用的影响,为海洋放线菌中抗生素产生菌的分离筛选提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

12株海洋放线菌菌株由本实验室分离自厦门沿海潮间带海泥及动植物,按文献^[6]鉴定属于链霉菌属,菌株用高氏1号培养基保存。抑菌试验的敏感指示菌为 *Bacillus subtilis* (Bs)、*Escherichia coli* (Ec)、*B. licheniformis* (Bl)、*Staphylococcus aureus* (Sa) 和 *Candida albicans* (Ca),按常规方法保存和培养。

1.2 链霉菌培养基及其培养

以高氏1号培养基为对照培养基,以1/2高氏1号培养基、1/4高氏1号培养基、1/8高氏1号培养基(配方同高氏1号培养基,但其营

养物浓度分别相当于原配方浓度的1/2、1/4、1/8),改良高氏1号培养基(以蛋白胨代替KNO₃,其余同高氏1号培养基)和几丁质培养基^[7]为试验培养基。培养基均用陈海水(含3.5%NaCl)制备,pH为7.2。正常培养温度为22℃。可根据实验要求改变培养基的pH、NaCl浓度或培养温度。

1.3 抑菌实验

采用双层琼脂扩散法^[8],即点接链霉菌于底层培养基上,22℃培养6d后,在其上倒入一层含指示菌的培养基,倒置培养24h。分别测量抑菌圈直径(Di)和拮抗菌菌落(Dc)直径,计算比值,即Di/Dc。当Di/Dc≥2.0时即视为有抑菌作用。

2 结果

2.1 培养基对海洋链霉菌抑菌活性的影响

以对5种敏感指示菌生长抑制为指标,海水制备的常规高氏1号培养基中所测试的海洋链霉菌对5种敏感指示菌生长抑制的总菌株数最多,随后依次为改良高氏1号培养基、1/4高氏1号培养基、1/2高氏1号培养基和1/8高

国家自然科学基金资助项目(编号:39670015)

* 现工作单位:厦门大学海洋学系

1997-10-30收稿

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

氏1号培养基和几丁质培养基(表1)。然而,从抑菌活性(以 D_i / D_c 表示)看,在营养成分含量成倍减少的三种高氏1号培养基中,虽然具抗菌能力的菌株数均远少于高氏1号培养基,但 $D_i / D_c \geq 5.0$ 的菌株数占其拮抗菌总数的比例分别为:1/2高氏1号培养基(51.9%) > 1/4高氏1号培养基(34.5%) > 1/8高氏1号培

基(29.2%) > 高氏1号培养基(16.3%)(表1)。此外,虽然在几丁质培养基中表现抑菌活性的菌株不多,但其抑菌活性皆较强,88.9%的菌株的 $D_i / D_c \geq 5.0$ 。而且,与高氏1号培养基比较,部分拮抗菌菌株在试验培养基中对某些敏感指示菌的抑菌活性有很大的提高,其 D_i / D_c 至少增加了3倍,最高达7倍(表2)。

表1 不同培养基中来自海洋链霉菌的抑菌作用*

敏感菌	测试链霉菌菌株数	有抑菌活性的链霉菌菌株数											
		高氏1号		1/2高氏1号		1/4高氏1号		1/8高氏1号		改良高氏1号		几丁质培养基	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Bs	12	9	2	5	4	7	3	4	1	5	1	5	4
Ec	12	12	4	3	0	8	1	8	3	11	3	0	0
Bl	12	10	1	8	3	6	3	4	2	7	0	2	2
Sa	12	10	1	8	4	7	3	7	1	12	5	2	2
Ca	12	8	0	3	3	1	0	1	0	2	0	0	0

*: 敏感菌全名见材料和方法部分; A: 有抑菌活性菌株数; B: $D_i/D_c \geq 5.0$ 的菌株数。

表2 非正常培养条件下海洋链霉菌抑菌活性明显提高的菌株*

菌株号	培养条件	敏感菌	D_i/D_c (实验)	D_i/D_c (对照)	D_i/D_c (实验)
					D_i/D_c (对照)
F05	1/8高氏1号	Ec	10.0	3.1	3.2
N03	几丁质培养基	Bs	10.0	3.1	3.2
N03	1/2高氏1号	Ca	6.0	2.0	3
BN ₄	1/2高氏1号	Bl	8.0	2.0	4
BN ₄	几丁质培养基	Bl	14.0	2.0	7
BN ₄	1/2高氏1号	Ca	11.5	2.0	5.75
BN ₆	1/2高氏1号	Bs	12.3	2.5	4.9
BN ₆	几丁质培养基	Bs	12.0	2.5	4.8
CN ₄	1/2高氏1号	Sa	10.0	2.0	5
CN ₄	1/4高氏1号	Sa	7.5	2.0	3.75
BN ₄	pH=6	Bl	8.6	2.0	4.3
BN ₄	[NaCl]=0.05%	Bl	9.0	2.0	5
BN ₄	pH=6	Ca	10.0	2.0	5
BN ₆	pH=9	Bs	18.0	2.5	7.2
CN ₄	[NaCl]=0.05%	Sa	8.8	2.0	4.4
CN ₄	[NaCl]=0.05%	Ca	8.5	2.5	3.4
N03	[NaCl]=0.05%	Ca	7.3	2.0	3.65
F101	pH=9	Ca	8.3	2.0	4.15

*: 以海水制备的高氏1号培养基(pH7.2)、培养温度为22℃作为对照。

2.2 pH、NaCl浓度和培养温度对海洋链霉菌抑菌活性的影响

结果表明,正常条件(即海水制备的高氏1号培养基、pH7.2、培养温度22℃)下海洋链霉菌

表3 不同pH、NaCl浓度和温度条件下海洋链霉菌的抑菌活性*

敏感菌	测试放线菌菌株数	pH				NaCl浓度(%)				温度(℃)				
		6	8	9	对照	0.05	6.0	9.0	对照	10	15	25	30	对照
Bs	12	7	7	7	5	9	6	1	5	1	3	7	7	5
Ec	12	11	12	12	12	8	5	1	12	5	7	12	8	12
Bl	12	4	4	5	7	9	1	2	7	3	0	10	8	7
Sa	12	1	0	8	9	7	2	1	9	3	9	10	9	9
Ca	12	6	6	8	5	10	3	0	5	5	1	4	8	5

*: 见表2注。

对5种敏感指示菌生长抑制的总菌株数最多(表3),但改变培养基的pH或NaCl浓度可使部分菌株对革兰氏阳性菌和白色假丝酵母的抑菌活性(即 D_i / D_c)得到提高,最大可增加7.2倍(表2)。

2.3 培养基及pH、NaCl浓度和培养温度对海洋链霉菌抑菌谱的影响

通过减少培养基的营养成分或改变培养基的碳、氮源、pH、NaCl浓度和培养温度,有些在正常条件下对革兰氏阳性菌和白色假丝酵母敏感指示菌无作用的海洋放线菌表现出了新的抑菌活性,且以抑制革兰氏阳性菌为主(77%),尤其是对金黄色葡萄菌的抑制,在几丁质培养基、1/2和1/8高氏1号培养基及NaCl浓度为0.05%的高氏1号培养基中,有两株菌的 D_i / D_c 分别 ≥ 10 。

3 讨论

海洋是一个低温、高盐度、寡营养的生态环境,海洋微生物的分离和计数与培养方法及培养基的营养成分有相关性^[9]。有证据表明,海洋微生物抗生素的合成与培养基的营养程度及成分有关,如日本学者 Okami 等从浅海污泥中分离到的放线菌菌株 SS-20,只有在含有极稀营养(正常培养基稀释16倍)和加大NaCl浓度(达培养基成分的5%)的培养基或添加有 Koby Cha 的培养基中才能产生抗生素除疟霉素,在营养丰富的普通放线菌发酵培养基中则不产生^[10]。本工作根据海洋生态环境的特点,利用不同培养基或培养温度来培养海洋放线菌,结果表明虽然在用海水制备的高氏1号培养基(pH7.2)、22℃培养时各菌株生长状况良

表4 非正常培养条件下海洋链霉菌菌株新产生的抑菌活性*

菌株号	培养条件	敏感菌	D_i/D_c	菌株号	培养条件	敏感菌	D_i/D_c
F05	改良高氏1号	Sa	5.8	BN ₆	几丁质培养基	Sa	17.0
F05	1/2高氏1号	Ca	5.8	CN ₄	1/2高氏1号	Bl	6.3
F09	1/4高氏1号	Bs	2.0	CN ₄	1/4高氏1号	Bl	6.0
F101	改良高氏1号	Bl	2.4	CN ₄	1/8高氏1号	Bl	9.0
BN ₄	改良高氏1号	Sa	3.3	F05	pH=9	Sa	5.1
BN ₄	1/4高氏1号	Sa	8.3	F09	[NaCl]=0.05%	Bs	5.3
BN ₄	1/8高氏1号	Sa	4.8	F108	T=30℃	Bl	7.0
BN ₄	几丁质培养基	Sa	10.0	F108	T=30℃	Ca	5.0
BN ₆	改良高氏1号	Bs	3.0	BN ₄	[NaCl]=0.05%	Sa	12.0
BN ₆	改良高氏1号	Sa	5.6	BN ₆	pH=6	Ca	7.5
BN ₆	1/2高氏1号	Sa	13.8	BN ₆	[NaCl]=0.05%	Sa	12.0
BN ₆	1/4高氏1号	Sa	8.0	BN ₆	[NaCl]=0.05%	Ca	8.0
BN ₆	1/8高氏1号	Sa	11.0	BN ₆	T=30℃	Ca	3.3

*: 在正常条件(即海水制备的高氏1号培养基、pH7.2、培养温度22℃)不出现抑菌作用。

好,而且能表现抑菌活性的菌株数也最多(表1),但在营养成分成倍减少或改变 NaCl 浓度和 pH 的高氏 1 号培养基、改变了氮源的改良高氏 1 号培养基或几丁质培养基及 30℃ 培养时,部分在正常条件下无抑菌活性的菌株却可表现出新的抑菌活性,或使原有的抑菌活性有较大的提高,新表现或提高的抑菌活性绝大部分都是针对革兰氏阳性菌和白色假丝酵母敏感指示菌的(表 2,4)。这些结果明确地提示了海洋放线菌抑菌活性的表达和菌株的培养基及其与培养条件相关,但其机理有待研究。

本工作所得出的培养基营养成分浓度及菌种培养条件的改变均有可能获得新的拮抗菌株这一结论值得引起重视,对于海洋微生物活性物质产生菌的筛选具有重要的实践意义。

参 考 文 献

- [1] Attaway DH, Zaborsky OR. Marine biotechnology. Vol.1, Pharmaceutical and bioactive natural products. Plenum Press, 1993.
- [2] 许实波. 生物工程进展, 1996, 16(6): 25~33.
- [3] Austin B. J Appl Bacteriol, 1989, 67:461~470.
- [4] Liberra K, Liadequist U. Pharmazie, 1995, 50:583~588.
- [5] Yotsu M, Yamazaki T, Meguro Y *et al.* Toxicon, 1987, 25:225~228.
- [6] 阮继生. 放线菌分类基础. 北京: 科学出版社, 1977.
- [7] Hsu SC & Lockwood JL. Appl Microbiol, 1975, 29: 422~426.
- [8] Gauthier M J, Shewan J M, Gibson D M *et al.* J Gener Microbiol, 1975, 87(1):211~218.
- [9] Button D K, Schut F, Quang P *et al.* Appl Environ Microbiol, 1993, 59:881~891.
- [10] Okami Y, Hotta K, Yoshida M *et al.* J Antibiotics, 1979, 32:964~966.

RELATIONSHIP BETWEEN ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MARINE STREPTOMYCES SPP. AND THEIR CULTURE CONDITIONS

Luo Wenxin Chen Xiaojia Huang Yaojian Zheng Zhonghui Su Wenjin

(Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The purpose of this work was to study the effects of the culture conditions on antimicrobial activity of twelve strains of the marine *Streptomyces* spp. The results showed that the maximum numbers of the marine *Streptomyces* spp. strains having an antimicrobial activity were obtained when cultured with the starch-nitrate potassium medium (pH7.2) prepared with seawater and at 22℃. The new or increasing antimicrobial activities of the marine *Streptomyces* spp. were observed when cultured with diluted the starch-nitrate potassium medium or the medium with different nitrogen source, NaCl concentration, pH or culture temperature. The most new or increasing antimicrobial activities of the marine *Streptomyces* spp. observed were against Gram-positive bacteria and *Candida albicans* tested. The results of this work indicate that it is important to choose the culture conditions in screening the antibiotic-producers from the marine actinomycetes.

Key words Marine *Streptomyces* spp. Antimicrobial activity, Culture medium