

具抑菌活性海洋微生物的筛选

林 敏 宁喜斌

(上海水产大学食品学院, 上海市 200090)

摘 要 从采集于上海郊区海域的海水和海泥样品中分离出 193 株海洋细菌, 从中筛选抑菌活性菌株。分别利用琼脂块法和管碟法对分离出的菌株进行初筛和复筛, 结果显示, 有 29 株海洋细菌具有抑菌活性, 占总分离菌株的 15%, 其中抑菌能力较强的 G4, 抑菌谱较广, 能同时抑制革兰氏阳性和阴性指示菌。

关键词 海洋细菌 抑菌活性 筛选

Selection of Marine Bacteria with Antimicrobial Activity

LIN Min NING Xi-bin

(Food College of Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract A total of 193 strains of marine bacteria were isolated from seawater and marine sediments collected from different areas of Shanghai suburbs. These strains were screened for antimicrobial active strains. They were measured by agar block and cyclinder-plate methods. The result shows that there were 29 marine bacteria with antimicrobial activity which accounted for 15% of the total isolates. Strain G4 appears the strongest activity against positive and negative indicator bacteria among the strains.

Key words Marine bacteria Antimicrobial activity Screening

众所周知, 半个世纪以来陆生微生物的发酵产物一直是制药工业的重要资源之一, 由于该领域研究历史久远, 研究方法落后和筛选模型陈旧, 要寻找新的微生物种属或筛选出新的活性代谢产物, 难度越来越大, 由此造成新药开发面临挑战^[1]。全球 80% 以上的物种蕴藏于海洋中, 由于海洋生物独特的生存环境(如高压、高渗、高温、低温等复杂多变的生态环境)及海洋生物物种间的生态作用远比陆生生物物种的复杂和广泛, 其作用多通过物种间化学作用物质信息素、种间激素、拒食剂等来实现, 因此, 海洋生物的活性远比陆生生物强。尤其重要的是有些海洋生物的活性物质在结构上与陆生生物的化合物不同, 表现出独特的活性^[2]。海洋微生物的资源广阔, 据估计, 业已进行过研究和鉴别的海洋微生物不到整个海洋微生物的 5%。尚有如此巨大的海洋资源未得到研究和开发利用, 因此, 从海洋微生物的次级代谢产物中寻找并开发有别于陆栖微生物的生理活性物质, 成为当前微生物学研究的一个重要方向。早在 1947 年 Rosenfeld 等对 58 株海洋细菌进行了试验研究, 发现其中 7 株对一般非海洋型细菌有强大

6 孟凡伦, 马桂荣, 孔 健. 乳链球菌 SB900 肽聚糖对中国对虾免疫功能的影响. 山东大学学报(自然科学版), 1999, 34(1): 89.

7 魏 静, 陆承平, 黄 捷等. 克氏原螯虾的血淋巴细胞原代培养. 畜牧与兽医, 1999, 31(5): 11~12.

8 张镜如主编. 生理学(第四版). 71~73. 北京: 人民卫生出版社, 1997.

的抗菌作用,并指出这7株多属球菌及芽孢杆菌^[3]。1958年 Grein 等又对来自近岸的166株海洋放线菌进行了试验,发现有70株对各种革兰氏阳性及阴性菌均有抗菌活性,1966年 Bamm 等从341株海洋细菌中筛选出60株具有抗菌活性,其中58株对沙门氏菌有较强的抗菌活性^[4]。1966年 Burkholder 等分离到一种名叫食溴假单胞杆菌的微生物,它能产生一种多溴化合物($C_{10}H_4NOBr_5$),对革兰氏阳性菌有强大抑制作用^[5]。

就新药的开发而言,从海洋微生物中筛选抑菌活性菌株是一项重要的前期工作。我国位于太平洋西岸,是一个海洋大国,拥有渤海、黄海、东海、南海四大海域,地理条件差异大,温度相差悬殊,海洋微生物资源极其丰富。对于黄、渤、南海海域的微生物资源利用已经进行过相关研究^[6],但关于东海海域微生物资源的情况报道较少,本文就上海临近东海海域分离出的海洋微生物进行抑菌筛选,为寻找新的抗菌活性物质提供参考。

1 材料和方法

1.1 仪器

恒温摇瓶床、微型离心机、恒温培养箱、净化台、手提式消毒锅等。

1.2 样品采集

于2004年7月至12月分别从上海奉贤、芦潮港、南汇等地的海域浅滩采集海泥和海水样品。采样瓶需事先灭菌,并用冰袋控制其温度,于2h内赶回实验室进行处理。

1.3 菌株分离

称取海泥1g,加入无菌人工海水10mL,剧烈振荡制成均匀的混悬液,逐级稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} …… 10^{-7} ,各取0.1mL,分别涂布于不同的分离培养基上^[7]。对海水样品直接稀释,采用平板涂布法进行分离。平板涂布后,于28℃下培养1~2天,然后根据样品的不同以及菌落形态的差异来分离代表性菌株。经数次纯化后,于4℃下保藏于2216E^[8]斜面。

1.4 抑菌实验

1.4.1 指示菌 大肠杆菌(*Escherichia coli* 1.543),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* 1.72),志贺氏菌(*Shigella* 51387),沙门氏菌(*Salmonella* 50041)等购自中科院微生物研究所。

1.4.2 实验方法

指示菌菌悬液的配制:用3~5mL无菌生理盐水洗下指示菌菌苔,倒入含玻璃珠的三角瓶中充分打散,制成一定质量分数的菌悬液,使含菌数为1000万cfu/mL。

用琼脂块法^[9]对所分离到的菌株进行抗菌活性的初筛。具体方法如下:将测试菌株制备成菌悬液,稀释至适当的质量分数后涂布于2216E平板,在28℃下培养1~2天,用打孔器将各小单菌落取下并移至湿室中培养成熟,然后再移至含指示菌的营养琼脂平板上,然后于37℃下培养18~24h,观察并用游标卡尺测定抑菌圈直径。

将初筛菌株接入发酵培养基,28℃摇床培养48h,用管碟法^[10]复筛。将发酵液离心10000r,10min后得到上清液。于含指示菌的平板中放入无菌牛津杯,滴入一定量的离心发酵液,以不接菌的发酵液作对照。37℃下培养18~24h,同样用游标卡尺测定抑菌圈直径。

2 结果和分析

2.1 海洋细菌的分离

按照采样海域以及菌落形态、大小、色泽等的不同,从各种培养基中分离出193株海洋微生物。其中从海水样中分离出106株,海泥样中分离出87株。

2.2 拮抗菌株的筛选

2.2.1 初筛

用琼脂块法初筛,从分离到的 193 株海洋细菌中筛选出 29 株拮抗菌株,占总分离菌株数的 15%。其中从海泥中筛选出 17 株具有抑菌活性的菌株,占分离菌株总数的19.5%;海水中的拮抗菌株数为 12 株,占分离菌株总数的11.3% (见图 1)。由此可以看出,从海泥中分离出拮抗菌株的概率大于海水样。

指示菌中以金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌作为抗革兰氏

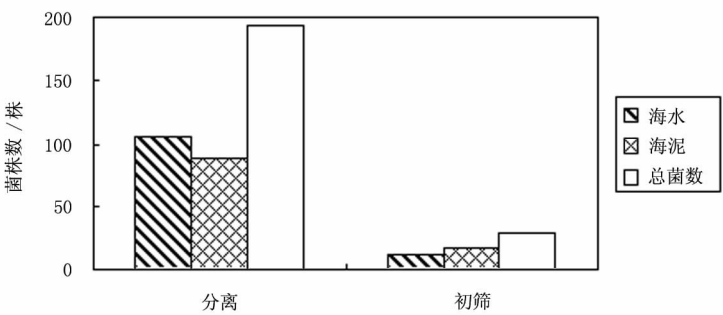


图 1 海水、海泥样品分离和筛选对比

Fig.1 The comparison of the strains isolated and screened from seawater and sediment

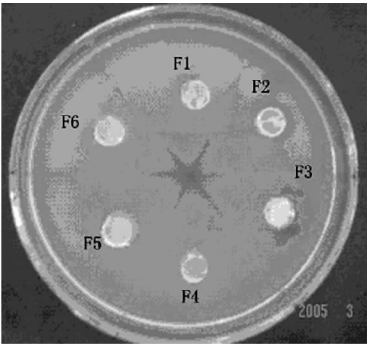


图 2 菌株 F1、F2、F3、F4、F5、F6 对大肠杆菌的抑制结果
Fig.2 The inhibition of strains F1、F2、F3、F4、F5、F6 to *Escherichia coli* 1.543

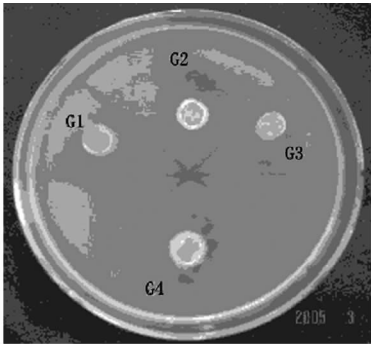


图 3 菌株 G1、G2、G3、G4 对大肠杆菌的抑制结果
Fig.3 The inhibition of strains G1、G2、G3、G4 to *Escherichia coli* 1.543

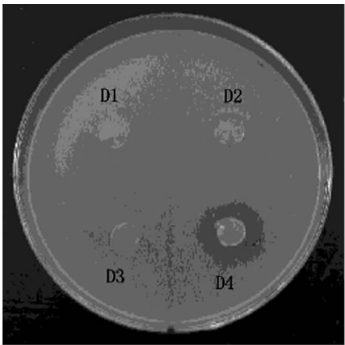


图 4 菌株 D1、D2、D3、D4 对志贺氏菌的抑制结果
Fig.4 The inhibition of strains D1、D2、D3、D4 to *Shigella* 51387

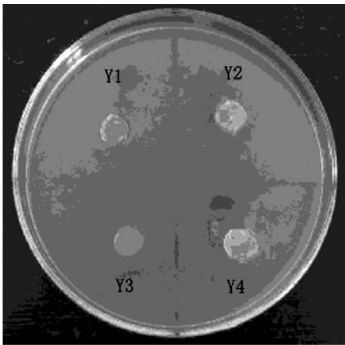


图 5 菌株 Y1、Y2、Y3、Y4 对沙门氏菌的抑制结果
Fig.5 The inhibition of strains Y1、Y2、Y3、Y4 to *Salmonella* 50041

阳性菌的代表,以大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌作为抗革兰氏阴性菌的代表。在 29 株菌中,抗革兰氏阳性菌的拮抗菌株有 21 株,占拮抗菌总数的72.4%;而抗革兰氏阴性菌的菌株有 9 株,占拮抗菌总数的 31%。其中有 1 株菌株能同时抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。几株拮抗菌株对不同指示菌的抑制效果见图 2 ~ 图 5。

由图 2 可明显看出, F2、F3 对大肠杆菌有抑制作用,但 F2 的抑制能力比 F3 更强;图 3 中, G2、G4 对金黄色葡萄球菌都有很强的抗菌效果,其他菌株则无透明圈出现。同理,从图 4 和图 5 中可以看出, D4、Y2 分别对志贺氏菌、沙门氏菌具有显著的抑菌作用。将这些有抑制作用的菌株记录、保存下来以

进行复筛。

2.2.2 复筛

采用液体发酵法对初筛后得到的 29 株有抑菌活性的菌株进行复筛,得到 3 株抑菌能力较强、抑菌谱较广的菌株,编号分别为 F3、D4、G4。其抑菌能力的比较见表 1。对这 3 株拮抗菌的抑菌稳定性还将

表 1 3 株海洋拮抗菌的抗菌活性

Tab. 1 Inhibitory activities of 3 marine isolates						单位:mm
	<i>Escherichia coli</i> 1. 543	<i>Salmonella</i> 50041	<i>Shigella</i> 51387	<i>Staphylococcus aureus</i> 1. 72	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
F3	19. 24	—	19. 28	20. 18	15. 40	—
D4	—	15. 00	20. 26	19. 12	16. 42	18. 54
G4	21. 00	17. 60	25. 50	25. 84	17. 70	19. 36

进行进一步研究。

由表 1 可以看出,G4 这株菌株是抑菌谱相对最广的,它同时可以抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。D4 对革兰氏阳性菌的抑制效果比对革兰氏阴性菌的好。而 F3 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抑制效果都并不是很好。

3 结果和讨论

上述研究结果表明,海洋细菌中存在着丰富的抗菌资源。用琼脂块法进行抑菌菌株的筛选较简便,不受设备限制。对于大量地分离海洋菌株而言,琼脂块法适合初筛,易看出筛选结果。而采用液体发酵法则可以进行更多的实验。在对海洋微生物进行活性筛选时,这两种方法均属可行且效果较好的。当然,在筛选抗菌活性菌株时,还可根据抗菌谱的要求,特异性地筛选一定类型的海洋细菌,能提高活性菌株的比率。

本试验筛选出一株广谱抑菌海洋细菌 G4,有关菌株 G4 的鉴定及其抗生物质理化特性、结构等的研究正在进行中。

参考文献

- 1 李越中,陈 琦. 海洋微生物资源及其产生生物活性代谢产物的研究[J]. 生物工程进展,2000,20(5):28~31.
- 2 Carte B. K. . Biomedical potential of marine natural products[J]. Bioscience, 1996, 46 (4): 271~286.
- 3 Demain A. L. . Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999(52):455~463.
- 4 Kala R. R. . Microbial production of antibiotics from mangrove ecosystem[M]. Cochín: CMFRI Special Publication, 1995(61):117~122.
- 5 骆祝华,黄翔玲,王 琳等. 海洋细菌抑菌活性菌株的筛选[J]. 台湾海峡,2002,21(2):181~185.
- 6 王书锦,胡江春,薛德林等. 中国黄、渤海、辽宁近海地区海洋微生物资源的研究[J]. 锦州师范学院学报(自然科学版),2001,22(1):1~5.
- 7 林丽玉,高霞灵,吴萍茹等. 海洋药物资源的微生物分离技术[J]. 中国海洋药物,1999,71(3):15~18.
- 8 国家海洋局. 海洋生态环境监测技术规程[S],2002 年 4 月.
- 9 祖若夫,胡宝龙,周德庆编. 微生物实验教程[M]. 上海:复旦大学出版社,1993.
- 10 马绪荣,苏德模编. 药品微生物学检验手册[M]. 北京:科学出版社,2000.

收稿日期:2005-06-29; 修回日期:2005-09-03

作者简介:林 敏(1980-),女,上海水产大学在读研究生,研究方向:食品生物技术。

发稿编辑 汤惠明