

网络优先数字出版时间:2014-11-26

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20141126.012.html>

白虎头红树林区海泥可培养细菌分离鉴定及其活性研究*

Diversity and Bioactive of Cultivated Marine Bacteria Isolated from the Sea Bed Mud at the Mangrove Zone of Baihutou

胡丽琴^{1,2}, 高程海^{1**}, 李菲^{1,2}, 杨小梅^{1,2}, 周文红², 颜栋美²

HU Li-qin^{1,2}, GAO Cheng-hai^{1**}, LI Fei^{1,2}, YANG Xiao-mei^{1,2}, ZHOU Wen-hong², YAN Dong-mei²

(1. 广西科学院 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

摘要:【目的】研究北海白虎头红树林区海泥可培养细菌多样性及其代谢产物的生物活性。【方法】采用纯培养法和分子生物学方法对样品中细菌多样性进行研究, 利用滤纸片法和卤虫致死法测试其生物活性。【结果】从海泥中分离获得相关可培养细菌 17 株, 选取 9 个代表性菌株采用 16S rRNA 基因序列的系统发育分析后发现, 其中 5 株菌属于 Firmicutes 门, 其余 4 株菌为 Proteobacteria 门。5 株细菌的代谢产物有较好的抑菌活性, 2 株菌的代谢产物对卤虫致死活性明显, 其中 1 株菌兼具两种活性。【结论】北海白虎头红树林区海泥中的细菌多样性较为丰富, 并且部分细菌具有一定的生物活性。

关键词:海洋细菌 系统发育分析 抗菌活性 卤虫致死活性

中图分类号:Q939.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2015)01-0044-05

Abstract:【Objective】To investigate the diversity and bioactive of culturable bacteria isolated from the sea bed mud at the mangrove zone of Baihutou, Beihai city. 【Methods】Cultivated marine bacteria were isolated from the sea bed mud at the mangrove zone of Baihutou by using conventional culture-dependent method, and then investigate their diversity by using phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons. Activities of the crude extract of strains were isolated and tested through filter paper method and Brine shrimp lethality. 【Results】17 bacterial strains were isolated from the sample in media(2216E, NA and ISP 2) supplement with seawater. According to morphological and biochemical characteristics, 9 strains were selected to perform a phylogenetic analysis based on their 16S rRNA gene sequences. Results showed that 9 strains isolated represented 9 species, 5 strains were the Firmicutes(55.6%) and 4 strains were the Proteobacteria (44.4%). The crude extract of 5 strains (BH-7, 9, 11, 13, 14, 15) were shown antibacterial activity, and 2 strains (BH-5, 15) showed obvious brine shrimp lethality. The BH-15 showed both activities. 【Conclusion】Cultivated

收稿日期:2014-08-10

修回日期:2014-09-09

作者简介:胡丽琴(1988-),女,硕士研究生,主要从事海洋微生物资源的保藏和应用研究。

* 国家自然科学基金项目(81260480)和广西自然科学基金项目(2011GXNSFB018035,2011GXNSFE018002,2012GXNSFAA053160,2012GXNSFEA053001)资助。

** 通讯作者:高程海(1979-),男,副研究员,主要从事海洋微生物资源的保藏和应用研究。

marine bacteria isolated from the sea bed mud at the mangrove zone of Baihutou, Beihai city, showed their potential value to the development of new drugs.

Key words: marine bacteria, phylogeny, antimicrobial activity, brine shrimp lethality

0 引言

【研究意义】海洋约占地球表面积的 71%, 独特、复杂的生态系统为海洋微生物的物种多样性提供了重要支撑。海洋微生物种类繁多, 人们迄今了解的不超过其总量的 5%, 被筛选的海洋微生物代谢产物仅约为 1%^[1]。广西北海属亚热带气候, 蕴藏着丰富的海洋微生物资源。**【前人研究进展】**廖振林等^[2]和黄大林等^[3]对广西北海红树林土壤放线菌进行纯化, 获得 10 株典型的放线菌, 多数属于链霉菌属, 其中 1 株菌具有抑菌活性。**【本研究切入点】**选取北海白虎头红树林区海泥进行可培养细菌多样性研究及其发酵产物活性的初步筛选。**【拟解决关键问题】**为广西海洋微生物资源的研究、保护和开发提供一定的理论依据和实践指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

HVE-5 高压蒸汽灭菌锅, SYD001 无菌操作台, LRH-250A 生化培养箱, HH-4 电热恒温水浴锅, ZHWY-2112C 双层恒温培养振荡器, SANYO 超低温冰箱, DHG-9140 电热恒温鼓风干燥箱, Mikro200 台式离心机, VCX-500 超声细胞破碎仪, N-1100V-W 旋转蒸发器, SHZ-CB 循环水式多用真空泵, LabCycler 温度梯度 PCR 仪, JY-SPB 水平凝胶电泳装置, GelDoc 2000 凝胶成像系统。

1.1.2 样品采集

2011 年 9 月, 海泥标本采集于广西北海白虎头红树林区, 去除表层泥样, 采样深度为 5~20 cm, 立即装入无菌袋, 然后暂存于放有冰块的保温箱内, 送回实验室后冷藏保存(-18℃)。

1.1.3 培养基及保护剂

2216E 海水培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g, 磷酸高铁 0.01 g, 琼脂 18 g, 陈海水定容至 1 L, pH 值 7.6~7.8, 121℃ 灭菌 30 min。

营养琼脂海水培养基(NA): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, 琼脂 20 g, 陈海水定容至 1 L, pH 值 7.5, 121℃ 灭菌 30 min。

ISP2 琼脂海水培养基: 蛋白胨 4 g, 酵母膏 4 g, 麦芽糖 5 g, 琼脂 20 g, 陈海水定容至 1 L, pH 值

7.2, 121℃ 灭菌 30 min。

保护剂: 20% 分析纯甘油, 121℃ 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离、纯化和保藏

在超净工作台内取约 10 g 土样, 加入到带有玻璃珠的 80 mL 无菌陈海水中, 28℃, 140 r/min 摇床 30 min, 取混合液制备 10^{-1} ~ 10^{-5} 5 个不同稀释度, 吸取 0.4 mL 不同稀释倍数的稀释液涂布于 3 种不同类型的平板培养基(2216E、NA、ISP2)上, 每个做 3 个平行, 28℃ 培养 3~5 d。肉眼观察菌落特征(形态、大小、颜色), 用双目显微镜进一步观察菌落边缘、表面状态、隆起程度, 挑取单菌落, 运用四分法重复划线纯化。纯化菌株接种在相应的液体培养基中, 28℃, 140 r/min 培养 5 d。高速离心去除培养基, 然后将菌体与保护剂混匀后分装于冻存管内, 使用分段降温法, 保存于 -80℃ 冰箱。

1.2.2 DNA 提取、扩增和系统进化树构建

菌株基因组 DNA 的提取参照周双清等^[4]的方法进行。将提取的基因组 DNA 作为模板, 用通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3' 进行 PCR 扩增。50 μL 反应体系包括 1 μL DNA 原液, 25 μL 2×Taq PCR Mastermix 溶液, 引物各 1 μL (10 μM), ddH₂O 22 μL。反应在 PCR 仪上进行, 程序为 95℃ 变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 5 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 进行 31 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增产物置于 4℃ 保存。所得产物委托广州美吉生物科技有限公司进行测序。

获得的 16S rRNA 基因序列数据, 经验证之后, 同时利用 BLAST 软件在 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库中以及 EzTaxon 服务器(<http://www.eztaxon.org/>)进行在线比对。取同源性高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象, 采用 Clustal X 软件^[5]进行多序列比对及相似性分析, 并用 NJ 法通过 MEGA 5.0 软件^[6]进行系统发育树的构建。

1.2.3 菌体粗浸膏的制备

已纯化的菌株分别接种到对应的液体培养基中进行小规模发酵。用摇床振荡培养 7 d(28℃, 140 r/min)后, 获得各个菌株发酵产物。超声波破碎菌体细胞, 加入乙酸乙酯溶液萃取发酵液。萃取液真空浓缩至少量后, 转移至安培瓶中挥发至干, 所得固

形物即为供试样品。

1.2.4 抗菌试验

采用滤纸片法^[7]测试所有供试样品对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的抑制活性。将供试指示菌制备成菌悬液,取 100 μL 滴在平板上,用涂布棒涂布均匀,制成含指示菌的平板,将灭过菌的滤纸片(6 mm)贴于含指示菌的平板上。供试样品取 5 μL 滴在滤纸片上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察抑菌圈大小判定抑菌活性。每个样品做 2 个平行。粗浸膏浓度为 10 mg/mL,空白对照为 5 μL 的 DMSO,阳性对照为 0.2 mg/mL 氯霉素。

1.2.5 生物毒活性试验

将 100 mg 卤虫虫卵加入灭菌的 400 mL 海水中,室温下由气泵缓缓充气,24 h 后去除虫卵外壳,再孵化 24 h 备用。依照 Solis^[8~10] 的改良方法,取 96 孔细胞培养板,每孔加 195 μL 含 10~15 个卤虫幼虫的孵化液,制成测试培养板。供试样品的 DMSO 溶液初浓度为 20 mg/mL,分别依次按 10 倍稀释成 3 个不同的浓度 (20 mg/mL, 2 mg/mL, 0.2 mg/mL),空白对照为 DMSO 溶液。加样体积为 5 μL ,每组试验平行做 3 次。将处理后的卤虫幼虫在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,然后在双目解剖镜下检测计数每孔卤虫死亡个体数目。计数完后每孔加入 100 μL 甲醇灭活所有卤虫,15 min 后计算每孔卤虫总数。

表 1 北海白虎头红树林区海泥可培养细菌菌落特征

Table 1 The colony characteristics of marine bacteria from mud collected at the mangrove zone of Baihutou, Beihai City

菌株号 No.	颜色 Color	形状 Shape	高度 Height	整齐度 Uniformity	表面 Surface	干湿度 Humidity	透明 Transparency
BH-1	土黄色 Earth yellow	圆形 Roundness	微凸 Dimpling	整齐 Orderliness	光滑 Smooth	偏湿 Wet	不透明 Opacity
BH-2	枯黄色 Dry yellow	无规则 Random	扁平 Flat	整齐 Orderliness	不平整 Unfairness	偏湿 Wet	不透明 Opacity
BH-3	土黄色 Earth yellow	圆形 Roundness	扁平 Flat	刺状 Thorny	平整 Level	偏中 Middle	不透明 Opacity
BH-4	黄白色 Yellowish white	圆形 Roundness	微凸 Dimpling	整齐 Orderliness	褶皱 Wrinkle	偏干 Dry	半透明 Translucent
BH-5	橙色 Orange	无规则 Random	突起 Blowup	整齐 Orderliness	不平整 Unfairness	偏干 Dry	不透明 Opacity
BH-6	枯黄色 Dry yellow	无规则 Random	微凸 Dimpling	不整齐 Irregular	平整 Level	偏湿 Wet	不透明 Opacity
BH-7	橘红色 Jacinth	椭圆形 Oval	微凸 Dimpling	不整齐 Irregular	平整 Level	偏湿 Wet	不透明 Opacity
BH-8	橘红色 Jacinth	圆形 Roundness	微凸 Dimpling	整齐 Orderliness	平整 Level	偏湿 Wet	不透明 Opacity
BH-9	牙白色 Cream white	无规则 Random	凸起 Embossment	放射状 Radial	褶皱 Wrinkle	偏中 Middle	不透明 Opacity
BH-10	牙白色 Cream white	圆形 Roundness	微凸 Dimpling	不整齐 Irregular	平整 Level	偏干 Dry	不透明 Opacity
BH-11	白色 White	无规则 Random	扁平 Flat	不整齐 Irre	平整 Level	湿润 Humid	不透明 Opacity
BH-12	橘黄色 Saffron yellow	圆形 Roundness	突起 Blowup	整齐 Orderliness	平整 Level	湿润 Humid	不透明 Opacity
BH-13	棕黑色 Brownish black	无规则 Random	微凸 Dimpling	不整齐 Irregular	不平整 Unfairness	偏中 Middle	不透明 Opacity
BH-14	黄白色 Yellowish white	圆形 Roundness	内凹 Indent	整齐 Orderliness	平整 Level	湿润 Humid	不透明 Opacity
BH-15	黄白色 Yellowish white	无规则 Random	突起 Blowup	不整齐 Irregular	不平整 Unfairness	湿润 Humid	半透明 Translucent
BH-16	橙色 Orange	圆形 Roundness	微凸 Dimpling	整齐 Orderliness	平整 Level	偏中 Middle	半透明 Translucent
BH-17	金黄色 Golden yellow	圆形 Roundness	微凸 Dimpling	整齐 Orderliness	光滑 Smooth	偏中 Middle	不透明 Opacity

卤虫生物致死活性用校正死亡率^[11]表示,按下式计算:

校正死亡率 = [(对照组存活率 - 处理组存活率) / 对照组存活率] \times 100%。

将 3 个浓度及其对应的校正死亡率输入计算机,利用 SPSS 19.0 软件^[12] 的 Probit 统计分析,得出 LD₅₀ 和 95% 置信区间。

2 结果

2.1 形态特征鉴定

对海泥样品中的可培养海洋细菌进行分离纯化,共获得 17 株海洋细菌,其形态特征见表 1。大多数菌株在对应培养基显示黄色,其次为白色,少数为黑色。菌落大多数湿润。多数菌株显示为圆形和无规则,另有少量为椭圆形。多数菌落隆起,边缘多显整齐;多数菌落不透明,极少数为半透明。

2.2 系统发育分析

通过菌落形态、细胞显微形态及 16S rRNA 基因序列测序结果去冗余,最终从 17 株菌中选取 9 个代表性菌株进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析,主要结果见图 1。这 9 个菌株分属于 2 个细菌发育类群 (Firmicutes, Proteobacteria) 的 2 个科 (Bacillaceae, Alteromonadaceae) 2 个属 (*Bacillus*, *Microbulbifer*)。其中 5 株菌属于 Firmicutes 门,占 55.6%;其余为 Proteobacteria 门,占 44.4%,主要结果见表 2。

表 2 北海白虎头红树林海泥可培养细菌的 16S rRNA 序列比对结果

Table 2 The comparison results of cultured marine bacteria from mud collected at the mangrove zone of Baihutou, Beihai City

系统发育组群/门 Phylogenetic groups/Family	菌株编号 Strain Number	最近典型菌株 Closest type strain (accession number)	相似度 Similarity(%)
Firmicutes(5)	BH-2	<i>Bacillus toyonensis</i> (AJ310100)	99.8
	BH-5	<i>Bacillus vietnamensis</i> (AB099708)	97.5
	BH-7	<i>Bacillus anthracis</i> (AB190217)	98.5
	BH-11	<i>Bacillus flexus</i> (AB021185)	99.8
	BH-9	<i>Bacillus siamensis</i> (AJVF01000043)	99.8
Proteobacteria(4)	BH-4	<i>Microbulbifer mangrovi</i> (HQ424446)	99.7
	BH-13	<i>Microbulbifer maritimus</i> (AY377986)	99.6
	BH-14	<i>Microbulbifer salipaludis</i> (AF479688)	100
	BH-15	<i>Microbulbifer yueqingensis</i> (GQ262813)	98.9

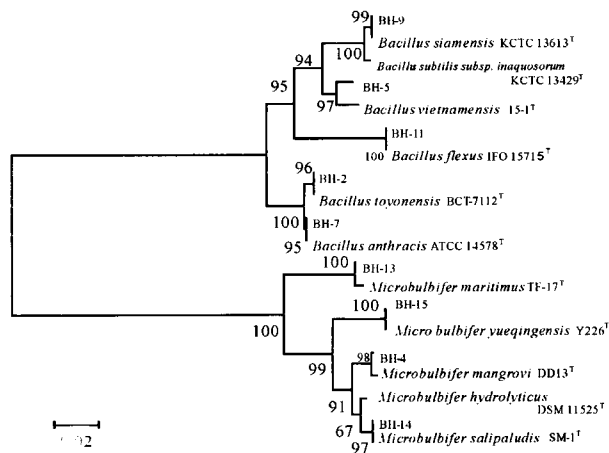


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的北海白虎头红树林区海泥可培养细菌的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequence analysis of strains isolated from mud collected at the mangrove zone of Baihutou, Beihai City

2.3 抑菌活性初步筛选

以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及蜡状芽孢杆菌为指示菌,用滤纸片法筛选 9 株上述菌株的拮抗现象。结果如表 3 所示,菌株 BH-9, BH-11, BH-13, BH-14, BH-15 对 4 个指示菌都表现出抑制作用。菌株 BH-13 对大肠杆菌的抑制作用较强(抑菌圈直径 8.5 cm)。菌株 BH-9 对金黄色葡萄球菌抑制较强(抑菌圈直径 9.0 cm)。菌株 BH-15 对枯草芽孢杆菌有较强的抑制作用(抑菌圈直径 8.3 cm)。几乎所有菌的代谢物都对蜡状芽孢杆菌有弱的抑制作用。

表 3 北海白虎头红树林区海泥细菌抑菌活性测试结果

Table 3 The antimicrobial activities of cultivated marine actinomycetes from mud collected at the mangrove zone of Baihutou, Beihai City

菌株编号 No.	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)			
	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>
BH-2	6.4	6.0	6.0	6.2
BH-4	6.0	6.0	6.0	6.0
BH-5	6.0	6.0	6.0	6.4
BH-7	6.3	6.0	6.8	6.1
BH-9	7.1	9.2	7.5	7.5
BH-11	8.0	7.5	7.0	6.8
BH-13	8.5	8.0	6.8	7.5
BH-14	8.0	6.5	7	7.3
BH-15	8.0	8.0	8.3	6.4
DMSO	6.0	6.0	6.0	6.0
氯霉素 Chloromycetin	15.3	18.2	17.9	20.7

注:滤纸片直径为 6.0 mm,抑菌圈越大表示抗菌效果越好。

Note: The diameter of filter is 6.0 mm. The greater the bacteriostatic circle, the better the antibacterial effect.

2.4 生物毒活性研究

如表 4 所示,菌株 BH-4 生物毒活性较强,LD₅₀ 为 0.700 mg/mL。BH-15 的生物毒活性次之,LD₅₀ 为 5.916 mg/mL。其他菌株的生物毒活性几乎均

大于 20 mg/mL,活性较弱或无活性。

表 4 北海白虎头红树林区海泥可培养细菌的生物毒活性测试结果

Table 4 The brine shrimp lethal activities of cultivated marine bacteria from mud collected at the mangrove zone of Baihutou, Beihai City

序列号 No.	LD ₅₀	95%置信区间 Confidence intervals of 95%	
		下限 Minimum	上限 Maximum
BH-2	>20	\	\
BH-4	>20	\	\
BH-5	0.7	0.267	1.486
BH-7	>20	\	\
BH-9	>20	\	\
BH-11	>20	\	\
BH-13	>20	\	\
BH-14	>20	\	\
BH-15	5.916	1.938	25.653

3 结论

本文对广西北海红树林区海泥可培养细菌进行分离和纯化,共得到 17 株相关菌株,选取 9 个代表性菌株进行系统发育多样性分析,发现这些菌属于 2 个细菌发育类群(Firmicutes, Proteobacteria)的 2 个科(Bacillaceae, Alteromonadaceae)、2 个属(*Bacillus*, *Microbulbifer*)。其中 5 株菌(55.6%)属于 Firmicutes 门,4 株菌(44.4%)为 Proteobacteria 门。初步探讨了这 9 株菌株的抑菌活性和生物毒活性,发现 5 株可以抑制 4 种食品常见腐败菌,其抑菌活性较好,2 株具有较强的生物毒活性,BH-15 兼具两种活性,具有开发成新型食品防腐剂 and 抗肿瘤药物的潜在价值。

参考文献:

[1] Bernan V S, Greenstein M, Maiese W M. Marine microorganisms as a source of new natural products[J]. *Advances in applied microbiology*, 1997, 43: 57-90.

[2] 黄大林,袁桂峰,徐雅娟,等.广西北海红树林土壤放线菌 BH0954 的分离和鉴定[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(18): 406-409.

Huang D L, Yuan G F, Xu Y J, et al. Isolation and identification of *Actinomycetes* sp. BH0954 from the mangrove forest soil of Guangxi Beihai [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(18): 406-409.

[3] 廖振林,刘菁,陈建宏,等.广西北海红树林土壤放线菌的分离与鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(23): 12693-12694, 12702.

Liao Z L, Liu Q, Chen J H, et al. Isolation and identification of Actinobacteria from mangrove forest in Beihai, Guangxi province [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2010, 38(23): 12693-12694, 12702.

[4] 周双清,黄小龙,黄东益,等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. *生物技术通报*, 2010(2): 123-125.

Zhou S Q, Huang X L, Huang D Y, et al. A rapid method for extracting DNA from Actinomycetes by Chelex-100 [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(2): 123-125.

[5] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.

[6] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.

[7] 方燕,潘丽霞,易湘茜,等.柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 相关可培养细菌多样性及抗污活性研究[J]. *广西科学*, 2012, 19(3): 253-256.

Fang Y, Pan L X, Yi X X, et al. Diversity and antifouling activity of culturable bacteria associated with the Beibu gulf gorgonian *Anthogorgia caerulea* [J]. *Guangxi Sciences*, 2012, 19(3): 253-256.

[8] Solis P N, Wright C W, Anderson M M, et al. A microcell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp) [J]. *Planta Medica*, 1993, 59(3): 250-252.

[9] 蒋诚,熊本强,邱细敏,等.鱼藤卤虫致死活性成分的分离和结构鉴定[J]. *中药材*, 2012, 32(5): 719-723.

Jiang C, Xiong B Q, Qiu X M, et al. Isolation and identification of *Brine shrimp* lethal activities from *derris trefoliata* [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2012, 32(5): 719-723.

[10] Meyer B N, Ferrigni N R, Putnam J E, et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents [J]. *Planta Medica*, 1982, 45(5): 31-34.

[11] 王发左.海洋真菌抗肿瘤活性次级代谢产物及其生物转化研究[D].青岛:中国海洋大学,2008.

Wang F Z. Studies on the Antitumor Constituents and Biotransformation of Secondary Metabolites Produced by Marine-derived Fungi [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.

[12] 周一平.用 SPSS 软件计算新药的 LD₅₀ [J]. *药学进展*, 2003(5): 314-316.

Zhou Y P. The calculation of LD₅₀ in new drugs with software SPSS [J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2003(5): 314-316.

(责任编辑:陆 雁)