

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00321

一株海洋芽孢杆菌的鉴定及抗菌活性研究

刘小宇,许强芝,韩文菊,卢小玲,刘军华,焦炳华*

第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433

[摘要] **目的:**对一株编号为 ZJ8112 的分离自东海海域海泥样品的细菌进行鉴定和抗菌活性研究。**方法:**采用传统的分类学方法观察菌株 ZJ8112 的形态、耐盐度,结合 16S rDNA 序列分析在 GenBank 上进行比对以确立其进化地位。利用稻瘟霉菌 (*Pyricularia oryzae*) P-2b、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、白念珠菌 (*Candida albicans*) 和黄瓜黑星病菌 (*Cladosporium cucumerinum*) 作为抗菌活性指示菌,检验 ZJ8112 的抗菌活性。**结果:**枯草芽孢杆菌 ZJ8112 革兰染色阳性,芽孢中生。其最佳生长盐度为 10%,属于中等嗜盐菌。通过 16S rDNA 序列分析发现其与 *Bacillus subtilis* F121112 在进化位置上最为接近。该菌株的 16S rDNA 序列已经提交 GenBank,接受号为 EU100745。综合 ZJ8112 菌株的培养特性和形态特征,可认为 ZJ8112 是一株海洋芽孢杆菌。抗菌活性研究的结果表明其具有很强的抗稻瘟霉菌和抗大肠埃希菌活性。**结论:**ZJ8112 为中等嗜盐的海洋细菌,其最适盐度为 10%。生物学活性研究的结果表明,其发酵液具有很强的抗稻瘟霉菌活性和抗大肠埃希菌活性,具有潜在的抗生素研究的价值。

[关键词] 芽孢杆菌属;16S rDNA 序列分析;嗜盐性;抗菌活性

[中图分类号] R 282.77 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)03-0321-03

Identification and antibacterial/antifungal activity of a strain of *Bacillus* from East China Sea

LIU Xiao-yu, XU Qiang-zhi, HAN Wen-ju, LU Xiao-ling, LIU Jun-hua, JIAO Bing-hua*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To identify a strain of bacterium (numbered ZJ8112) isolated from the sediments of the East China Sea and study its antibacterial activity. **Methods:** The ZJ8112 strain was subjected to phenotypical study, salt-aggregation test and 16S rDNA sequence analysis; the sequence analysis result was searched in the GenBank to determine its characteristics. The antibacterial activity of strain ZJ8112 was tested using the following as the indicator bacteria: *Pyricularia oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and *Cladosporium cucumerinum*. **Results:** We found that the ZJ8112 was a G⁺ bacterium and had central spore. Salt-tolerant study showed that the optimum salt concentration was 10% and it belonged to moderate halophile. Analysis of the 16S rDNA gene showed high similarity (99%) to the *Bacillus subtilis* F121112. The 16S rDNA sequence of strain ZJ8112 had been submitted to GenBank (accession number: EU100745). The cultural and phenotypical characteristics demonstrated that ZJ8112 is a strain of *Bacillus*. Bioactivity study showed that ZJ8112 had potent inhibitory activity on *Escherichia coli* and *Pyricularia oryzae*. **Conclusion:** ZJ8112 is a halophytic bacterium with an optimum salt concentration of 10%. ZJ8112 can strongly inhibit the *Escherichia coli* and *Pyricularia oryzae*, showing a potential role for antibiotics development.

[KEY WORDS] *Bacillus*; 16S rDNA sequence analysis; halophilism; anti-bacterial activity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(3): 321-323]

随着细菌耐药性问题的日益严重和陆生微生物药用资源的日益匮乏,人们逐步把眼光投向了海洋。海洋微生物资源是 21 世纪新药开发的重要源泉。

本课题组近几年来几次赴东海海域采集海水、海泥样品,分离得到一批具有抗菌或抗肿瘤的活性菌株,并对一些菌株进行了代谢产物研究工作^[1-3]。本实验

[收稿日期] 2007-08-04 **[接受日期]** 2007-12-17

[基金项目] 上海市优秀学科带头人计划(05XD14023);国家“863”计划(2006AA09Z416,2007AA091501)。Supported by Shanghai Outstanding Field Leaders Program (05XD14023) and National Hi-tech R&D Program(2006AA09Z416,2007AA091501)。

[作者简介] 刘小宇,讲师。E-mail: lxy@cnb8888.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-25070303,E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

所研究的菌株 ZJ8112 是从东海海泥样品(东经 122.5°,北纬 29.4°)中分离得到的,抗菌活性筛选的结果表明其具有很强的抗稻瘟霉菌和抗大肠埃希菌活性,本文报道了它的分类鉴定及抗菌活性研究结果。

1 材料和方法

1.1 样品来源 ZJ8112 菌株分离自东海海泥样品(东经 122.5°,北纬 29.4°),菌株由本实验室保存。生物学活性指示菌株:稻瘟霉菌(*Pyricularia oryzae*)P-2b、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、白念珠菌(*Candida albicans*)和黄瓜黑星病菌(*Cladosporium cucumerinum*)均由本实验室保存。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 形态学特征 于 Zobell 2216E 培养基(人工海水配置)上 28℃ 培养 1~3 d,取菌体涂片,革兰染色后用光学显微镜观察菌体形态,改良的 Schaeffer-Fulton 染色法观察芽孢。

1.2.2 培养特征 在 Zobell 2216E 培养基上 28℃ 培养 2~3 d 后观察菌落形态。

1.2.3 不同盐度条件下菌株的生长情况 以 Zobell 2216E 培养基为基准,分别以蒸馏水、人工海水(2.5% NaCl)、以及 0.25%、2.5%、5%、7.5%、10%、12.5% NaCl 水溶液配制不同盐度的液体培养基,将 ZJ8112 接种于液体培养基 28℃ 培养 7 d,用分光光度计测定其 D_{600} 值。

1.2.4 16S rDNA 序列测定和分析 将菌株 ZJ8112 接种在无菌的平板上,28℃ 培养过夜,取单菌落悬浮于 50 μ l 无菌蒸馏水中,100℃ 水浴 5 min,离心,取上清液作为细菌 DNA 原液。采用任世英等^[4]的方法进行 PCR,正向引物 Primer A:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3',反向引物 Primer B:5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'。PCR 产物纯化后委托英骏生物技术公司进行序列测定。

1.3 抗菌活性研究 将菌株 ZJ8112 接种在 Zobell 2216E 液体培养基中 28℃,1.89 \times g 培养 7 d,发酵液离心(448 \times g,5 min),上清用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌,4℃ 冰箱保存备用。采用纸片法^[5]测活,在灭菌烘干的纸片(Φ =6 mm)上分别滴加过滤除菌的发酵液 25 μ l,以稻瘟霉菌(*Pyricularia oryzae*)P-2b、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、白念珠菌(*Candida albicans*)和黄瓜黑星病菌(*Cladosporium cucumerinum*)作为指

示菌,将滴加有发酵液的纸片分别贴在涂有指示菌的平板上,28℃ 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。以氨苄青霉素、酮康唑和氟哌酸药敏纸片(每片药敏纸片含药 5 μ g)作为阳性对照,空白培养基作为阴性对照。根据抑菌圈直径大小确定活性强度,抑菌圈直径 >15 mm 为强抑制活性,表示为“+++”;抑菌圈直径在 10~15 mm 为中等抑制活性,表示为“++”;抑菌圈直径 <10 mm 为弱抑制活性,表示为“+”;纸片周围不产生透明圈为无抑制活性,表示为“-”。

2 结果和讨论

2.1 菌株的形态特征和培养特征 光镜下可见 ZJ8112 菌体成杆状,革兰染色阳性,有芽孢,居中不膨大,属于芽孢杆菌。在固体培养基上成微黄色菌落,圆形,直径为 1~2 mm,菌落表面不光滑有皱褶,边缘整齐(图 1)。



图 1 ZJ8112 在油镜下的形态

Fig 1 Morphology of ZJ8112 strain(\times 1 000)

2.2 不同盐度条件下菌株的生长情况 在不同 NaCl 浓度下菌株 ZJ8112 的生长情况结果见图 2 所示。

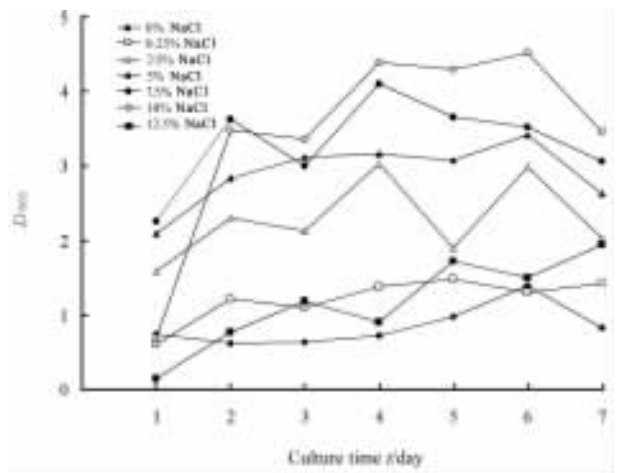


图 2 不同 NaCl 浓度对菌株 ZJ8112 生长的影响

Fig 2 Effect of NaCl concentration on the growth of strain ZJ8112

由图2可知,菌株ZJ8112在不同NaCl浓度时生长情况差异很大。在低盐度(0.25% NaCl)和蒸馏水中生长最差,在12.5%的盐度下生长情况也不佳。在2.5%~10%的盐度下,菌株生长旺盛,其中最适盐度为10%。说明该菌是一株中等嗜盐菌。

2.3 16S rDNA 序列分析 菌株ZJ8112的16S rDNA序列分析的结果表明,该菌株的16S rDNA序列全长1 515 bp,(G+C)%为55.3%。将所测定

得到的序列经校正后输入GenBank用Blast进行相似性搜索比较并绘制系统进化树(图3)。共搜索出100个相似度大于94%的结果,其中与*Bacillus subtilis* F121112(GenBank接受号:EF423589)在进化位置上最为接近。综合ZJ8112菌株的培养特性和形态特征,可认为ZJ8112是一株海洋芽孢杆菌。该菌株的16S rDNA序列已提交GenBank,接受号为EU100745。

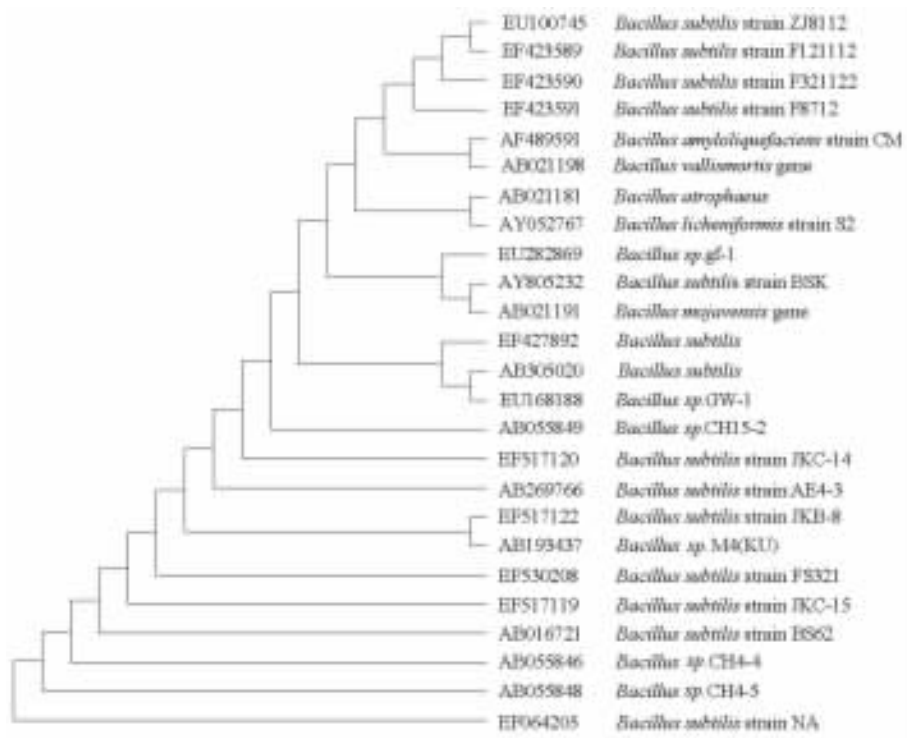


图3 菌株ZJ8112的进化树

Fig 3 The evolution tree of ZJ8112

2.4 抗菌活性研究 抗菌活性的结果表明,菌株ZJ8112对稻瘟霉菌和大肠埃希菌有很强的抑制作用,抑菌圈分别为16、17 mm;对黄瓜黑星病菌作用强度一般,抑菌圈为9 mm,对于其他试验菌无抑制作用。氨基青霉素对枯草芽孢杆菌、酮康唑对稻瘟霉、啤酒酵母、白念珠菌、黄瓜黑星病菌和氟哌酸对大肠埃希菌的抑菌圈大小分别为26、23、24、23、25和27 mm。

综上所述,ZJ8112是我们从东海海域分离得到的一株海洋细菌,其最适盐度为10%,属于中等嗜盐菌。从形态特征的观察以及16S rDNA序列测定的结果可基本判定其属于一株海洋芽孢杆菌。生物学活性研究的结果表明,其发酵液具有很强的抗稻瘟霉活性和抗大肠埃希菌活性,具有潜在的进一步应用的前景。目前正在对该菌株的发酵条件进行摸

索,以期提高单位体积的抗菌活性物质浓度便于后期代谢产物分离工作。

[参考文献]

- [1] 穆军,焦炳华,孙炳达,刘杏忠. 一株具有抗菌和细胞毒活性的海洋嗜盐菌XD20的筛选和鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 8-11.
- [2] 艾峰,许强芝,杨好,刘小宇,施晓琼,宋志刚,等. 东海微生物中6种环二肽类天然活性物质的分离和鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 22-24.
- [3] 杨好,许强芝,艾峰,刘小宇,施晓琼,焦炳华. 东海药用微生物资源的初步调查研究[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 535-537.
- [4] 任世英,王子峰,肖天, Nitsche S. 一株海洋聚磷菌YSR-3的分离与鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37: 437-443.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2001: 1340-1346.

[本文编辑] 尹茶