

一株具有抗稻瘟霉活性的海洋细菌 32-11-2-2 的筛选和分离鉴定

杨 好, 许强芝, 艾 峰, 刘小宇, 施晓琼, 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:**从中国东海微生物样品中分离筛选活性细菌菌株,并对活性菌株 32-11-2-2 进行鉴定。**方法:**采用无限稀释和平板划线法分离微生物样品,利用稻瘟霉模型进行活性筛选;并对其中的活性菌株 32-11-2-2 的形态、培养特征以及生理生化特征进行研究,使用 16S rDNA 序列分析的方法对菌株 32-11-2-2 进行了分类鉴定。**结果:**分离得到 421 株细菌,包括活性菌株 54 株,其中活性菌株 32-11-2-2 是一株弱嗜盐菌,具有陆地芽孢杆菌的形态特点,能产生胞外淀粉酶、过氧化氢酶,液化明胶、石蕊牛奶反应阳性,16S rDNA 序列分析该菌株与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)同源性达到 98% 以上。**结论:**活性菌株 32-11-2-2 是一株适应了海洋环境的枯草芽孢杆菌。

[关键词] 海洋生物学;芽孢杆菌,枯草;活性筛选;鉴定**[中图分类号]** R 282.77**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0718-04

Screening, identification and classification of an antimetastasis marine bacterium from Eastern China Sea

YANG Yu, XU Qiang-zhi, AI Feng, LIU Xiao-yu, SHI Xiao-qiong, JIAO Bing-hua* (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To screen, identify and classify an antimetastasis marine bacterium strain 32-11-2-2 of Eastern China Sea. **Methods:** The marine bacteria were isolated with the infinite dilution and plate streak technique and screened for antimetastatic active strains by *Pyricularia Oryzae* model. The active strain 32-11-2-2 was subjected to morphological, physiological and biochemical study, and was classified by the analysis of the 16S rDNA sequence. **Results:** A total of 421 strains of marine bacteria were isolated from marine water and sediment samples; 54 of them had antimetastatic activity. The study of morphological, physiological and biochemical characteristics showed that the strain 32-11-2-2 was a slight halophilic strain; it had the morphological characteristics of a continent *Bacillus* and could produce amylase, fluidify glutin; and it also showed a positive reaction in the litmus milk test. The 16S rDNA analysis showed the strain 32-11-2-2 had a 98% homology with *Bacillus subtilis*. **Conclusion:** The strain 32-11-2-2 has been identified to be a *Bacillus subtilis* adapted to the oceanic environment.

[KEY WORDS] marine biology; *Bacillus subtilis*; bio-screen; identification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(7): 718-721]

在过去的 70 多年中,人们从陆地微生物资源中寻找新药已取得巨大的成就,但是随着陆地微生物资源的枯竭和临床上耐药情况的日趋严重,寻找活性物质的新源泉成为当务之急。

由于海洋环境的特殊性,海洋微生物具有独特的代谢方式,其代谢物化学结构也具有极大的复杂性和多样性。海洋微生物作为一个巨大的尚待开发的资源越来越受到关注。在从中国东海海域多个站点采集各种微生物样品分离筛选过程中,我们得到的一株具有抗稻瘟霉活性的菌株 32-11-2-2,结合菌株的培养和生理生化特性,应用 16S rDNA 作为分子指标对该菌进行了分子分类鉴定,并对所得数据进行分析 and 讨论。

1 材料和方法

1.1 样品采集 2004 年 5 月在东海离岸 30 海里

以远海域不同站点采集的微生物样品 39 份,其中包括海洋底泥样品 28 份,水样 11 份。采样范围北起上海崇明岛,南至福建的南麂列岛,跨越纬度 27°15'~31°34'。样品采集后 4℃ 低温保存。

1.2 菌株分离^[1] 将无菌采集的海水 1 ml 加入已灭菌的人工海水 9 ml 振荡混匀,制成 10⁻¹ 稀释液,进一步按 1:10 比例逐级稀释成 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释液,取各梯度稀释液 0.1 ml 涂布到分离培

[基金项目] 上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养基金(05XD14023), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA09Z416, 2006AA09Z425). Supported by Fund for "One Hundred Leading Scientists for 21st Century" of Health Department of Shanghai Municipal Government(05XD14023) and National High-tech R&D Program (863 Program)(2006AA09Z416, 2006AA09Z425).

[作者简介] 杨 好, 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: jiaobh@mail.uninet.com.cn

培养基平板上,25℃恒温培养7~14 d,根据样品不同以及菌株形态的差异挑取单菌落,以平板划线进行多次划线分离,显微镜镜检分纯为止,4℃保存在相应的斜面培养基上。

分离培养基(ZoBell 2216E 培养基):蛋白胨0.5%,酵母膏0.1%,磷酸亚铁0.01%,琼脂1.5%,人工海水100 ml,pH 6.0~6.5,115℃高压灭菌30 min。

1.3 发酵液制备 菌株接种于5 ml 相应的液体培养基中(将相应配方中的琼脂成分除去)25℃,130 r/min 摇床培养2 d,活化菌株,在无菌条件下取100 μ l 菌液转移入新鲜的液体培养基20 ml 中继续摇床培养7 d,取5 ml 菌液离心(4℃,2 000 r/min,5 min)去除菌体,上清用0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌,4℃保存备用。

1.4 活性筛选实验 根据 Kobayashi 等^[2]的稻瘟霉筛选方法和检测指标,对纯化的菌株进行活性筛选,用稻瘟霉模型筛选出来的活性菌株,再参照文献^[3]利用传统纸片法以黄瓜黑星病菌为指示菌复筛。

稻瘟霉(*Pyricularia oryzae*)P-2b,复旦大学医学院提供;黄瓜黑星病菌(*Cladosporium cucumerinum*)由本实验室保存;指示菌培养基均采用改良PDA培养基。

1.5 菌株鉴定

1.5.1 形态特征 于ZoBell 2216E培养基(人工海水配置)上28℃培养2 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和Fulton染色观察芽孢。

1.5.2 培养特征 在ZoBell 2216E培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、LB培养基上28℃培养2~3 d后观察菌落形态及颜色。

1.5.3 生理生化特征 对菌株32-11-2-2进行了淀粉水解试验、油脂水解试验、明胶水解试验、石蕊牛奶试验、v-p反应以及耐盐实验^[4]。

1.5.4 16S rDNA 序列测定和分析 参考邹玉霞等^[5]的方法将菌株32-11-2-2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,于100℃水浴5 min,离心(2 000 r/min,5 min),取上清作为细菌DNA原液。采用通用引物进行16S rDNA基因的PCR扩增,正向引物Primer A(对应于*E. coli*的16S rDNA5'端8~27f位置);5'-

AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';反向引物Primer B(对应于*E. coli*的16S rDNA5'端1 492~1 510r位置);5'-TTA AGG ATG GTG ATG CCG CA-3'。在50 μ l PCR反应体系中含有1 \times PCR缓冲液,1.5 mmol/L MgCl₂,dNTP混合物各200 μ mol/L,引物各0.5 μ mol/L,*Taq* DNA聚合酶2.5 U,1 μ l 细菌DNA原液。PCR扩增条件为96℃预变性6 min,然后94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸3 min共30个循环,再72℃后温育6 min。PCR产物纯化后委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。对测定得到的16S rDNA序列利用相关生物软件BLAST和Clustal W1.8进行分析。

2 结果和讨论

2.1 活性菌株的筛选 从海水、海洋底泥样品中分离得到421株细菌,有54株表现出程度不一的抗稻瘟霉活性,其中来自浙江附近海域的海水样品(编号zj0304)的菌株32-11-2-2,表现出很强的抗稻瘟霉活性,使稻瘟霉菌丝末端发生明显的膨大变形(图1A),在稀释10³倍以上仍能使稻瘟霉菌丝生长异常。利用纸片法以黄瓜黑星病菌作为指示菌复筛,抑菌圈直径为25 mm。

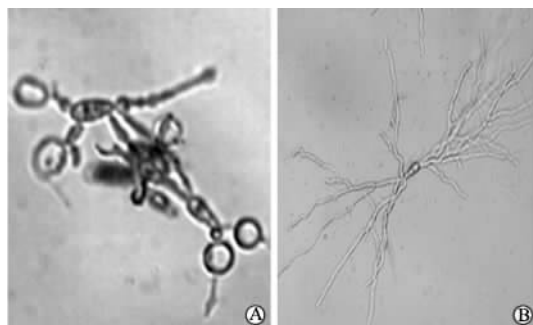


图1 稻瘟霉菌丝末端膨大变形(A)及正常生长(B,×400)

Fig 1 Swollen conidia of *Pyricularia Oryzae* (A) and normal conidia of *Pyricularia Oryzae* (B,×400)

2.2 菌株的形态特征和培养特征 菌体短杆状,大小约为(0.3~0.5) μ m \times (0.6~0.8) μ m,革兰染色阳性,芽孢卵圆,位置居中,不膨大。在ZoBell2216E固体培养基上单菌落呈圆形,直径1~2 mm,表面光滑,稍隆起,颜色微黄不透明,边缘整齐,在ZoBell 2216E液体培养基中生长有絮状沉淀生成。扫描电镜图见图2。

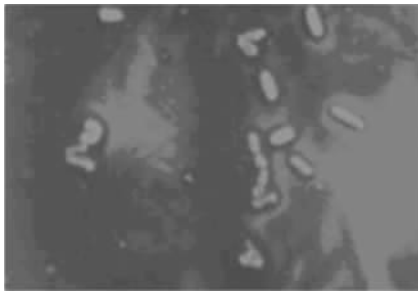


图2 菌株32-11-2-2的扫描电镜图

Fig 2 Morphology of strain 32-11-2-2

(*Bacillus sp.*) under electron microscope($\times 5\ 000$)

2.3 生理生化特征 结果显示菌株32-11-2-2具有过氧化氢酶活性,能产生胞外淀粉酶,液化明胶,分解牛奶中的酪蛋白产碱,耐盐试验表明该菌株在10%浓度以下的NaCl中都能生长,2.5%NaCl浓度下生长最好,为最适生长盐度。

2.4 16S rDNA 序列分析 菌株32-11-2-2的16S rDNA序列有1 457 bp,3个反应通测,具体核苷酸序列如下:CCT ATA ATG CAA GTC GAG CGG AAG ATG GGA GCT TGC TCC CTG ATG TTA GCG GCG GAC GGG TGA GTA ACA CGT GGG TAA CCT GCC TGT AAG ACT GGG ATA ACT CCG GGA AAC CGG GGC TAA TAC CGG ATG GTT GTT TGA ACC GCA TGG TTC AGA CAT AAA AGG TGG CTT CGG CTA CCA CTT ACA GAT GGA CCC GCG GCG CAT TAG CTA GTT GGT GAG GTA ACG GCT CAC CAA GGC GAC GAT GCG TAG CCG ACC TGA GAG GGT GAT CGG CCA CAC TGG GAC TGA GAC ACG GCC CAG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT AGG GAA TCT TCC GCA ATG GAC GAA AGT CTG ACG GAG CAA CGC CGC GTG AGT GAT GAA GGT TTT CGG ATC GTA AAG CTC TGT TGT TAG GGA AGA ACA AGT GCC GTT CAA ATA GGG CGG CAC CTT GAC GGT ACC TAA CCA GAA AGC CAC GGC TAA CTA CGT GCC AGC AGC CGC GGT AAT ACG TAG GTG GCA AGC GTT GTC CGG AAT TAT TGG GCG TAA AGG GCT CGC AGG CGG TTT CTT AAG TCT GAT GTG AAA GCC CCC GGC TCA ACC GGG GAG GGT CAT TGG AAA CTG GGG AAC TTG AGT GCA GAA GAG GAG AGT GGA ATT CCA CGT GTA GCG GTG AAA TGC GTA GAG ATG TGG AGG AAC ACC AGT GGC GAA GGC GAC TCT CTG GTC TGT AAC TGA CGC TGA GGA GCG

AAA GCG TGG GGA GCG AAC AGG ATT AGA TAC CCT GGT AGT CCA CGC CGT AAA CGA TGA GTG CTA AGT GTT AGG GGG TTT CCG CCC CTT AGT GCT GCA GCT AAC GCA TTA AGC ACT CCG CCT GGG GAG TAC GGT CGC AAG ACT GAA ACT CAA AGG AAT TGA CGG GGG CCC GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG GTT TAA TTC GAA GCA ACG CGA AGA ACC TTA CCA GGT CTT GAC ATC CTC TGA CAA TCC TAG AGA TAG GAC GTC CCC TTC GGG GGC AGA GTG ACA GGT GGT GCA TGG TTG TCG TCA GCT CGT GTC GTG AGA TGT TGG GTT AAG TCC CGC AAC GAG CGC AAC CCT TGA TCT TAG TTG CCA GCA TTC AGT TGG GCA CTC TAA GGT GAC TGC CGG TGA CAA ACC GGA GGA AGG TGG GGA TGA CGT CAA ATC ATC ATG CCC CTT ATG ACC TGG GCT ACA CAC GTG CTA CAA TGG ACA GAA CAA AGG GCA GCG AAA CCG CGA GGT TAA GCC AAT CCC ACA AAT CTG TTC TCA GTT CGG ATC GCA GTC TGC AAC TCG ACT GCG TGA AGC TGG AAT CGC TAG TAA TCG CGG ATC AGC ATG CCG CGG TGA ATA CGT TCC CGG GCC TTG TAC ACA CCG CCC GTC ACA CCA CGA GAG TTT GTA ACA CCC GAA GTC GGT GAG GTA ACC TTT TAG GAG CCA GCC GCC GAA GGT GGG ACA GAT GAT TGG GGG AAG TCG AA。所测定得到的16S rDNA序列结果校正后输入GenBank、EMBL、DDBJ等数据库用BLAST软件进行相似性搜索比较,Clustal W1.8软件进行多序列比对,菌株32-11-2-2与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中的各菌株具有极高的同源性(98%以上),推定为枯草芽孢杆菌。从比对得到的高度同源序列中随机选取部分序列构建了系统进化树,显示菌株32-11-2-2与同源菌株的亲缘关系(图3)。

菌株32-11-2-2是从中国东海浙江沿岸海域海水样品中分离获得的,其发酵液能使稻瘟霉分生孢子和菌丝生长受抑并发生明显变形,对菌株进行16S rDNA序列分析,并结合菌株的形态、培养特征和生理生化反应等多项分类特征综合分析后将菌株32-11-2-2归属于为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),耐盐实验表明该菌株在接近海水盐度的2.5%NaCl浓度下生长最好,推测可能是早前被从陆地冲刷到海洋中,并已经适应了海洋高盐的环境。有关

该菌株发酵液的活性物质的分离纯化和结构分析工作正在进行当中。

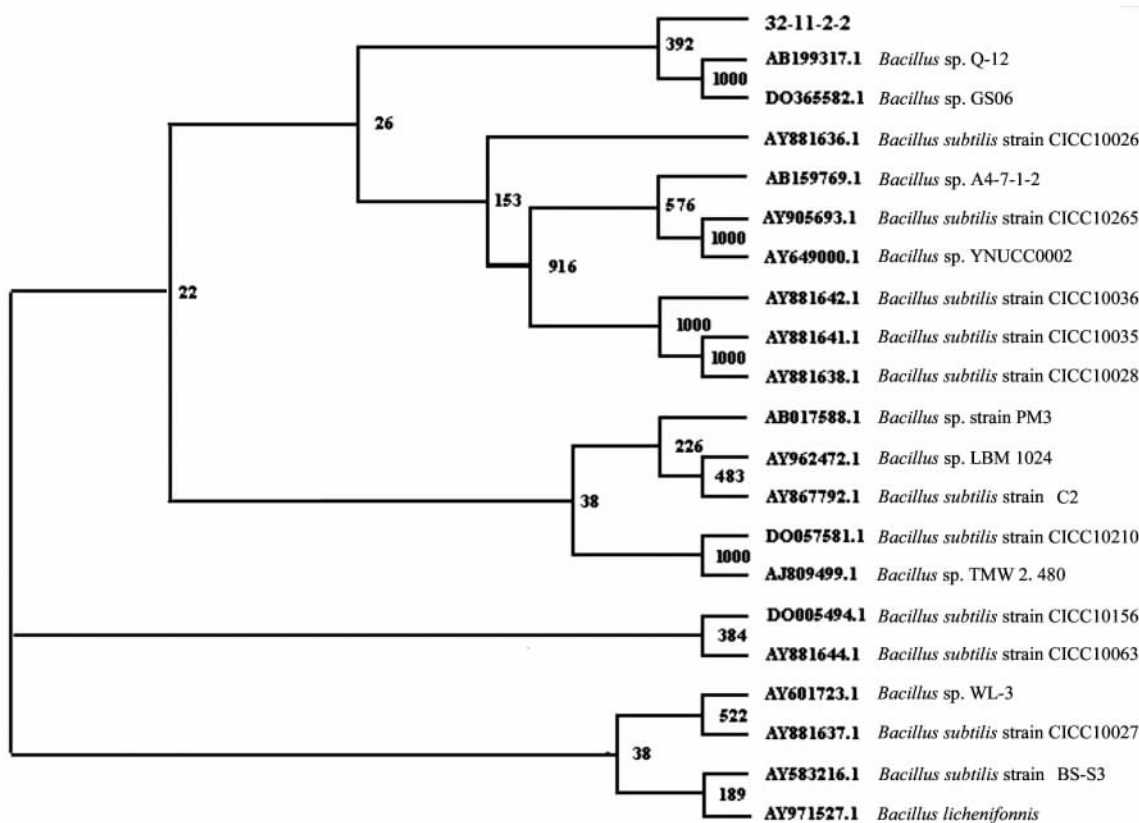


图 3 根据 16S rDNA 序列进行菌株 32-11-2-2 的系统发生学分析

Fig 3 Phylogenetic analysis of strain 32-11-2-2 based on 16S rDNA sequence

Phylogenetic tree showing the relationship of strain 32-11-2-2 with the known strains selected from GenBank, DDBJ, EMBL

[参考文献]

[1] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 65-70.
 [2] 宋志刚, 许强芝, 鲁心安, 等. 利用真菌分生孢子筛选抗真菌活性的海洋微生物[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 1300-1301
 [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生

出版社, 1982: 1063-1097.
 [4] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 146-147.
 [5] 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. 高技术通讯, 2004, 14: 89-93.
 [收稿日期] 2006-12-15 [修回日期] 2007-04-26
 [本文编辑] 尹 荼

《医道求真——〈黄帝内经〉学术体系研究》已出版

《医道求真——〈黄帝内经〉学术体系研究》已由人民军医出版社于 2006 年 12 月出版, 大 32 开, 平装。

《医道求真——〈黄帝内经〉学术体系研究》ISBN: 978-7-5091-0668-6, 定价: 28.00 元。该书是一部研究《内经》的中医学术理论性专著。编者烟建华从医 40 余年, 不懈求索医道真谛, 站在大文化、大科学、大医学高度审视中医学, 对《内经》学术体系的结构、内涵、形成、发展与研究成果的应用、《内经》五脏概念、神概念、睡眠理论、生命的四时法则以及用统计学方法研究中医藏象理论、《内经》理论的临床应用等方面作了精辟的分析和论述。该书结合现代医学思维模式、理论、研究方法, 将《内经》中一些基本概念和抽象理论作了客观地、科学地阐述, 对推动中医理论研究和全面认识中医具有重要的和积极的作用。本书适合于广大中医师、中医及中西医结合研究工作者学习参考。

本书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址: 北京市 100036 信箱 188 分箱, 邮编: 100036

电话: 010-51927252; 010-51927300-8168 E-mail: wanglan@pmmp.com.cn