

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00024

两株产生大环内酯 Macrolactin S 的海洋细菌的筛选及鉴定

韩文菊, 卢小玲, 许强芝, 刘小宇, 杨 桥, 王国飞, 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:**从中国东海分离筛选抗菌活性微生物, 确定活性菌株的分类地位。**方法:**随机挑选 30 株本室保存的分离自中国东海的细菌, 利用抗大肠杆菌模型进行活性筛选。对活性菌株进行形态特征、生化特征、盐需求测试及 16S rDNA 序列分析, 并将所测得的序列在 NCBI 数据库进行相似性搜索, 选取其中具有代表性的序列以邻接法构建系统进化树, 将菌株鉴定到属。**结果:**筛选出活性菌株 F81612 和 F201721, 它们的最适生长盐浓度分别为 10% 和 7.5%, 菌株形态特征、生化性质与 *Bacillus sp.* 相符, 菌株 F81612 和 F201721 的 16S rDNA 序列分别与 *Bacillus subtilis* 和 *Bacillus amyloliquefaciens* 相似程度最大。**结论:**利用抗大肠杆菌模型筛选到两株产大环内酯 Macrolactin S 的细菌, 均为中等嗜盐的海洋 *Bacillus sp.*。

[关键词] Macrolactin S; 芽孢杆菌; 鉴定; 16S rDNA

[中图分类号] R 931.77 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0024-04

Screening and identification of two Macrolactin S-producing bacteria from the sea

HAN Wen-ju, LU Xiao-ling, XU Qiang-zhi, LIU Xiao-yu, YANG Qiao, WANG Guo-fei, JIAO Bing-hua*

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

[ABSTRACT] **Objective:** To isolate and screen active marine microorganisms from the East China Sea and to identify the phenotypes of the isolated strains. **Methods:** Thirty strains of bacteria isolated from the East China Sea were selected randomly, and the active strains were screened out by the anti-*Escherichia coli* model. The active strains were subjected to physiological and biochemical characteristics, salt-aggregation test, and 16S rDNA sequence analysis. Neighbor-joining trees were constructed by comparing the results of 16S rDNA sequences with sequences described in the BLAST server of the National Center for Biotechnology Information (NCBI); the strains were subsequently identified to genus level. **Results:** Strains F81612 and F201721 were screened out with the optimum salinities of 10% and 7.5%, respectively. Their morphology and biochemical characteristics were similar to those of *Bacillus sp.*. 16S rDNA sequence analysis showed that sequences of F81612 had a higher similarity to those of *Bacillus subtilis*; F201721 was similar to *Bacillus amyloliquefaciens*. **Conclusion:** Two Macrolactin S-producing strains have been screened out by the anti-*Escherichia coli* model, and they are identified as moderate halophilic *Bacillus sp.*

[KEY WORDS] Macrolactin S; *Bacillus sp.*; identification; 16S rDNA

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(1):24-27]

海洋是一个极其复杂的生态系统, 而且海洋环境特殊, 其中的生物在这样特殊的环境下生存产生一些新结构新活性化合物的几率也较陆地生物大^[1]。面对日益严峻的病原菌耐药情况, 陆地微生物资源几乎开发殆尽, 本实验室以寻找新型药用先导化合物为目的, 对东海微生物进行了多次采集、分离纯化及活性筛选工作, 其中利用抗大肠杆菌模型筛选到了活性菌株 F81612 和 F201721, 前期对两菌

株的代谢产物进行分离, 均得到了一种新的大环内酯 Macrolactin S, 它对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌表现出很强的抑制活性^[2]。本研究报告了两个菌株的筛选和分类鉴定结果。

1 材料和方法

1.1 菌株来源及培养基 30 个菌株是由本实验室从中国东海不同站点采集的海泥样品中分离得到并

[收稿日期] 2008-06-17 **[接受日期]** 2008-09-18

[基金项目] 国家高科技研究发展(“863”)计划(2006AA09Z416, 2006AA09Z425). Supported by National High Technology R&D Program (2006AA09Z416, 2006AA09Z425).

[作者简介] 韩文菊, 硕士生. E-mail: byxhan@tom.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81870303, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

保存的。培养基:葡萄糖 10 g,酵母提取粉 10 g,蛋白胨 4 g,牛肉膏 0.4 g,人工海水 1 000 ml,pH 6.0。指示菌大肠杆菌由本实验室保存,培养基为牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,蒸馏水 1 000 ml,pH 7.0~7.2。

1.2 主要试剂和仪器 *Taq* DNA 聚合酶,dNTP,PCR Buffer ($\times 10$),Loading Buffer ($\times 5$),DNA Marker,EB(TaKaRa 公司);通用引物^[3]正向:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3',反向:5'-TTA AGG ATG GTG ATG CCG CA-3'(上海生物工程公司合成);吸附柱式琼脂糖凝胶回收试剂盒(博大泰克生物技术有限公司);CE2021 2000 系列 PCR 仪(Stratagene 公司);PAC 3000 电泳仪(Bio-Rad 公司);凝胶成像系统(天能公司);Himac CR21 高速低温离心机(Hitachi 公司);722s 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.3 活性菌株的筛选 30 个菌株以 28℃、130 次/min、40%装液量震荡培养 4 d,8 000 r/min ($r=10$ cm)离心,0.45 μm 的微孔滤膜过滤除菌,制备发酵液,保存于 4℃待用。取 5 μl 处理后的发酵液加到直径 5 mm 的滤纸片上,再把纸片贴于涂有大肠杆菌菌液的平板上,16~18 h 后观测有无抑菌圈及抑菌圈大小^[4]。

1.4 活性菌株的分类鉴定

1.4.1 菌株形态观察及生化鉴定 参考文献^[5]进行。

1.4.2 菌株盐需求测试 参考文献^[5]进行。

1.4.3 细菌总 DNA 的提取 参考 Knut 等^[6]的方法将细菌划线接种在培养基平板上,28℃培养过夜,挑取单菌落悬浮于 50 μl 无菌蒸馏水中,于 100℃水浴 5 min,12 000 r/min($r=4$ cm)离心 10 min,上清即为细菌总 DNA 模板。

1.4.4 16S 基因的 PCR 扩增及序列分析 25 μl 反应体系:1 μl 模板,引物各 0.5 μl ,2 μl dNTP,2.5 μl Buffer($10\times$),0.25 μl *Taq* 酶,18.25 μl ddH₂O。94℃预变性 5 min;(94℃,1 min;58℃,1 min;72℃,1 min)30 个循环;72℃延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收。委托上海英骏生物技术有限公司测序。测定的 16S rDNA 序列递交 GenBank,获得序列号,并用 Blast 程序进行序列同源性分析,选取具有代表性的序列以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。所用软件程序为 Cluster X 1.83 和 Mega 4.0。

2 结果

2.1 活性菌株筛选结果 如图 1 所示,4 号菌株(F201721)和 10 号菌株(F81612)对大肠杆菌表现出很强的抑制活性,抑菌圈直径均为 3 mm。

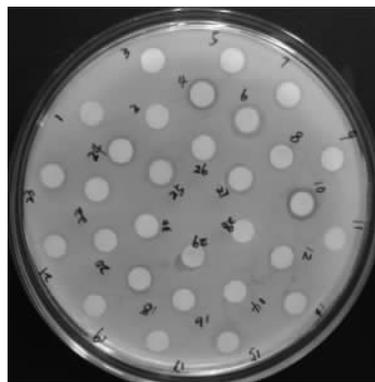


图 1 筛选具有抗大肠杆菌活性的菌株

Fig 1 Screening of active strains against *Escherichia coli*

2.2 细菌的分类鉴定结果

2.2.1 菌株生长情况及菌体形态特征 F81612 菌落在培养基平板上呈圆形,边缘不整齐,单菌落直径 1~2 mm,表面不光滑微隆起,颜色灰白;F201721 在培养基平板上呈圆形,边缘整齐,单菌落直径 2~3 mm,表面光滑,颜色灰白;在液体培养基中生长均有菌膜产生;两者镜检革兰染色阳性,菌体长杆状(图 2),芽孢染色有短杆状芽孢,位置居中且不膨大。

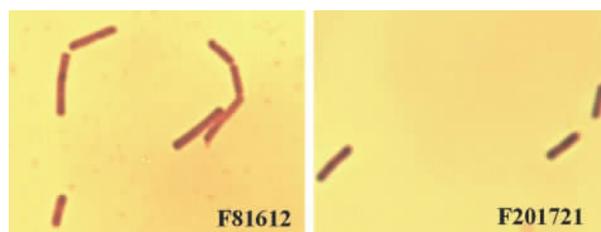


图 2 菌株革兰染色

Fig 2 Gram staining of two strains

Original magnification: $\times 1\ 000$

2.2.2 生化特征 两种菌株的糖利用情况及部分生化反应结果见表 1。

2.2.3 盐需求测试 菌株 F81612 和 F201721 在不同 NaCl 浓度下的生长情况如图 3、图 4 所示。菌株 F81612 的最适生长盐度为 10%,F201721 的最适生长盐度为 7.5%,均为中等耐盐菌^[7]。

2.2.4 16S rDNA 序列分析 菌株 F81612 测得的 16S rDNA 序列有效长度为 1 515 bp(GenBank 序列

号 EU136046), F201721 测得的 16S rDNA 序列有效长度为 1 663 bp(GenBank 序列号 EF217872), 输入 NCBI 用 Blast 软件进行相似性搜索比较, 与相关的序列构建系统进化树见图 5, F81612 与 *Bacillus*

subtilis 位于同一分支中, F201721 与 *Bacillus amyloliquefaciens* 位于同一分支中, 同源性都在 99% 以上, 归属于芽孢杆菌属, 但要鉴定到种还需要与模式种进行 DNA-DNA 同源性杂交方能确定。

表 1 糖利用情况及生化反应

Tab 1 Utilization of saccharine and biochemical reaction

Reaction	F81612	F201721	Reaction	F81612	F201721
Glucose	+	+	Catalase	+	+
Lactose	-	+	OF-test	F	F
Maltose	-	-	Starch hydrolysis	+	+
Mannose	-	+	Malolate	+	+
Sucrose	+	+	Citrate	-	-
Arabinose	-	-	Phenylalanine	-	-
Xylose	-	-	Phosphate glucose peptone water(VP)	+	+
Galactose	-	-	Arginine dihydrolase	+	+
Sorbose	-	-	Nitrate reduction	+	+
Maltotriose	-	-	Violet milk	Base	Base
Fructose	+	+	Gelatin liquefaction	+	+
Mannitol	-	+	Hydrogen sulfide	-	-

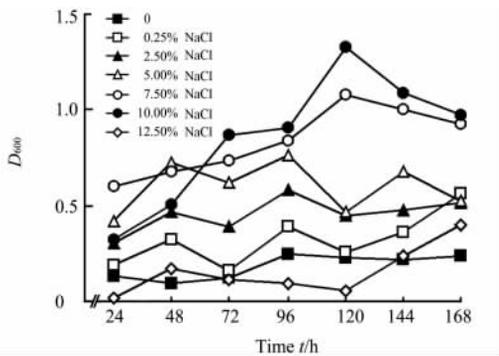


图 3 不同 NaCl 浓度下菌株 F81612 的生长情况
Fig 3 Growth of F81612 at different concentrations of NaCl

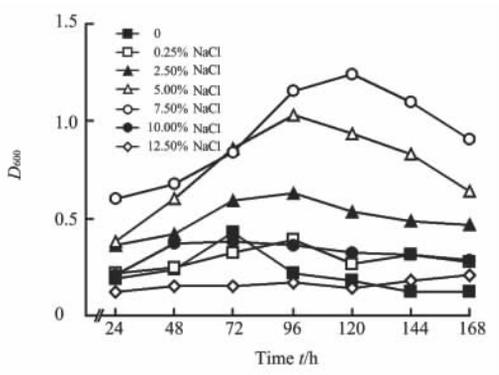


图 4 不同 NaCl 浓度下菌株 F201721 的生长情况
Fig 4 Growth of F201721 at different concentrations of NaCl

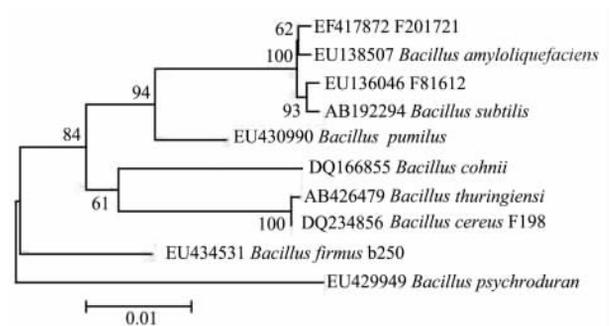


图 5 菌株 F81612、F201721 与相关细菌的进化关系
Fig 5 Phenotypic tree of strains F81612, F201721 and related bacteria

3 讨论

面对日益严重的抗生素耐药情况, 人们都在寻找新的活性化合物, 在陆地微生物资源几乎开发殆尽之时, 天然产物研究者对海洋微生物的次级代谢产物进行了大量的研究。我们也通过大肠杆菌模型对东海微生物进行了筛选, 得到了活性菌株 F81612 和 F201721, 两个菌株都产生了一种新的大环内酯 Macrolactin S, 该化合物表现出了很强的抗菌活性, 具有很大的开发价值, 所以对菌株进行分类鉴定并确定其海洋来源是很有必要的, 通过形态观察和系统进化树的构建分析, 两个菌株都归属于芽孢杆菌, 它们的最适生长盐度分别为 10% 和 7.5%, 应该是

海洋来源的菌株。Macrolactins 家族的多数成员都分离自芽孢杆菌^[8-10], 我们的这部分工作也进一步证实了芽孢杆菌是 Macrolactins 家族的主要产生菌, 为深入探讨这一类大环内酯的生物合成机制奠定了一定的基础。

[参考文献]

- [1] Elisabetta C, Martina M, Anna M, Roberto P, Giovanna R. Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia fici formis* (Porifera, Demospongiae) [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2004, 309: 21-33.
- [2] Lu X L, Xu Q Z, Shen Y H, Liu X Y, Jiao B H, Zhang W D, et al. Macrolactin S, a novel macrolactin antibiotic from marine *Bacillus sp.* [J]. Nat Prod Res, 2008, 22: 342-347.
- [3] Barlaan E A, Sugimori M, Furukawa S, Takeuchi K. Electronic microarray analysis of 16S rDNA amplicons for bacterial detection [J]. J Biotechnol, 2005, 115: 11-21.
- [4] González L, Sandoval H, Sacristán N, Castro J M, Fresno J M, Tornadizo M E. Identification of lactic acid bacteria isolated from *Genestoso cheese* throughout ripening and study of their antimicrobial activity [J]. Food Control, 2007, 18: 716-722.
- [5] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 38-158.
- [6] Knut R, Gro H K, Ragnhild H, Jan T R. Rapid identification and classification of bacteria by 16S rDNA restriction fragment melting curve analyses (RFMCA) [J]. Food Microbiol, 2007, 24: 474-481.
- [7] 王振雄, 徐 毅, 周培瑾. 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究 [J]. 微生物学报, 2000, 40: 115-120.
- [8] Yoo J S, Zheng C J, Lee S, Kwak J H, Kim W G. Macrolactin N, a new peptide deformylase inhibitor produced by *Bacillus subtilis* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16: 4889-4892.
- [9] Jaruchoktaweetchai C, Suwanborirux K, Tanasupawatt S, Kittakoop P, Menasveta P. New macrolactins from a marine *Bacillus sp.* Sc026 [J]. J Nat Prod, 2000, 63: 984-986.
- [10] Romero-Tabarez M, Jansen R, Sylla M, Lünsdorf H, Häussler S, Santosa D A, et al. 7-O-Malonyl Macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50: 1701-1709.

[本文编辑] 孙 岩

· 消 息 ·

我校研究生课题获上海市第九届教育科学研究优秀成果一等奖

上海市教育科研工作会暨上海市第九届教育科学研究获奖成果颁奖大会于 2008 年 12 月 17 日顺利召开。由我校长征医院牵头、全校合作共同承担并历经多年完成的“国家教育科学‘十五’规划课题”《临床医学专业学位研究生质量评价体系的研究》获上海市第九届教育科学研究优秀成果一等奖(教育改革实验)。

该课题自 2001 年始, 2005 年申报批准为国家教育科学“十五”规划课题。课题组由我校长征医院牵头, 负责人为内科教研室副主任朱樑教授。课题研究前后经历了 8 年时间, 校研究生院, 校计算机教研室、校心理学教研室, 长海医院, 以及复旦大学, 中国科技大学, 上海教育考试院, 美国哥伦比亚大学、德克萨斯大学等单位的近百名学者参与了研究。

该课题在原有的临床医学专业研究生培养考核的基础上, 按照国务院学位委员会对临床医学专业研究生的要求并适应医学模式转变和医学教育国际化新形势的需要, 结合我国实际情况, 针对临床医学 11 个二级学科及所属三级学科的 7 个年级的博士研究生、硕士研究生和七年制学员培养的各个环节, 运用系统科学的可靠性理论, 通过组合式考试(考核)方法, 将由众多临床医学专家研究确定并优化组合的评价指标采用可靠度最高的并-串联混合组合结构建立了质量考核评价系统, 同时对此系统中归属于同一能力的各项指标进行重新组合形成了质量分析评价体系, 组成多维度综合评价模型。

应用教育测量理论对该体系进行科学的评价, 不断优化、完善临床医学专业学位研究生质量考核评价体系, 在国内外还未见相关报道。应用本模型对研究生的培养质量进行全面的考核评价并作多种能力的多维度分析, 针对临床医学专业学位研究生培养的各个环节提出反馈意见, 可使培养质量达到更高的水平。同时, 课题也对建立高素质考核专家队伍进行了理论与实践的探讨。该课题成果对教学评价工作者及教育测量理论研究者有一定的借鉴和参考价值。