

海洋链霉菌 GB-2 发酵产物的抗细菌活性及性质研究 Antibacterial Activity and Property of the Fermentation Product of Marine *Streptomyces* sp. GB-2

刘 姝¹, 陆颖健², 陆兆新^{1*}, 吕凤霞¹, 别小妹¹, 房耀维¹, 丁重阳¹

LIU Shu¹, LU Ying-Jian², LU Zhao-Xin^{1*}, LÜ Feng-Xia¹, BIE Xiao-Mei¹, FANG Yao-Wei¹ and DING Zhong-Yang¹

1 南京农业大学食品科技学院, 南京 210095

2 南京工业大学理学院, 南京 210009

1 College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 College of Sciences, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

摘 要 从连云港海域潮间带采集的样品中筛选得到一株产高活性抗细菌物质的链霉菌 GB-2。该菌的发酵产物对蜡样芽孢杆菌 AS1.1846、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 及 6 株耐药性金黄色葡萄球菌等 11 株革兰氏阳性菌、大肠杆菌 AS1.487、荧光假单胞菌 AS1.1802 等 4 株革兰氏阴性菌有显著拮抗作用。纸层析对抗细菌物质分析结果表明, 菌株 GB-2 所产抗细菌物质是中性的水溶性物质, 其产生与海水的存在有显著相关性。发酵液稳定性研究表明, 该物质在 121℃、pH1 和 pH12 条件下抑菌活性均不变, 紫外线照射也不影响其抑菌活性。显示菌株 GB-2 产物在生防、食品及医药方面潜在的应用价值。

关键词 海洋链霉菌 GB-2, 发酵产物, 抗细菌活性, 稳定性

中图分类号 Q939.13 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)06-1077-05

Abstract Marine *Streptomyces* GB-2, isolated from marine samples collected in the intertidal zone of Lianyungang, was found to produce antibacterial substance which exhibited significant inhibitory effects on 11 Gram-positive bacteria and 4 Gram-negative bacteria. The antibacterial substance was proved to be neutral and water-soluble according to paper chromatogram analysis, and its production was significantly associated with artificial seawater. The stability analysis of the fermentation broth of *Streptomyces* GB-2 showed that it was very stable at pH1 and pH12 under 121°C and changed very little under ultraviolet treatment. The substance produced by strain GB-2 exhibited potential use in the areas of bio-control, food and medical application.

Key words marine *Streptomyces* sp. GB-2, the fermentation product, antibacterial activity, stability

海洋生物资源是一个正在开发的重要资源^[1,2]。海洋环境独特,可产生完全不同的新颖生物活性物质,因此海洋环境中多样的微生物资源为新活性物质的开发提供了可能。目前的天然抗生素大约有三分之二是来自放线菌^[3],且近年来不断有新的海洋

放线菌菌种及其产生新的抗生素的报道^[4,5],特别是新的平板霉素的发现更加促进了对放线菌的研究^[6]。从海洋放线菌中寻找新型抗菌活性物质成为目前研究的热点^[7,8]。本研究室从连云港连岛海域采集的样品中分离得到一株对多种细菌均具有较强

Received: March 19, 2007; Accepted: April 26, 2007.

This work was supported by a grant from the Open Project of the Key Marine Biotechnology Laboratory of Jiangsu Province of China(No.2006HS011).

* Corresponding author. Tel : + 86-25-84395572 ; E-mail : fmb@njau.edu.cn

江苏省海洋生物技术重点实验室开放课题基金项目(2006HS011)资助 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

抗菌活性的链霉菌 GB-2 (另文发表), 本文对其发酵产物的抗细菌活性及性质进行了探索性研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

链霉菌 GB-2 系从连云港海域潮间带所采的土样中分离得到, 供试指示菌见表 2 和表 3。

1.2 培养基

固体培养基: 链霉菌 GB-2 采用高氏合成一号固体培养基, 细菌采用营养琼脂培养基, 以上培养基的配制参照文献 [9]。液体培养基: 链霉菌 GB-2 采用黄豆粉发酵培养基^[10]。链霉菌 GB-2 所用培养基均为人工海水配制, 所有培养基均为 121℃ 灭菌 20min。

1.3 水对发酵液抗细菌活性的影响

链霉菌 GB-2 培养斜面, 用 50mL 无菌水洗下孢子, 180r/min 振荡 20min, 制成孢子悬液。将孢子悬液按 10%(V/V) 的接种量接种于分别用自来水、蒸馏水、人工海水、陈海水配制的黄豆粉发酵培养基中 28℃, 180r/min 培养 7d。发酵液在 4℃ 下 10000g 离心 15min, 上清液经 0.45μm 滤膜后, 采用管碟法^[11]测定抑菌活性。所有试验设 4 个重复。

1.4 抗细菌活性试验

按 1.3 方法, 将 GB-2 用人工海水配制培养基进行发酵, 取上清液测定对不同细菌的抗菌活性。所有试验设 3 个重复。

1.5 抗耐药性金黄色葡萄球菌 (DRSA) 试验

按照文献 [12] 中圆纸片扩散试验方法测定发酵上清液对 6 株 DRSA 的抑菌效果, 37℃ 培养 24h, 测量抑菌圈直径并记录结果。所有试验设 3 个重复。

1.6 发酵液抗细菌活性的稳定性研究

1.6.1 热及酸碱处理: 取 3mL (原始 pH 7.0) GB-2 发酵上清液 9 份, 分别进行 9 种处理。I: 121℃, 0.5h; II: 121℃, 1h; III: pH1, 20h; IV: pH12, 20h; V: pH1, 20h 再 121℃, 0.5h; VI: pH1, 20h 再 121℃, 1h; VII: pH12, 20h 再 121℃, 0.5h; VIII: pH12, 20h 再 121℃, 1h; IX: 未处理的对照。处理完成后 pH 调回至 7.0, 采用管碟法^[11]以蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌为代表菌株检测抑菌活性, 观察并测量抑菌圈的大小。所有处理中的 pH 调节均采用 3 mol/L HCl 和 3mol/L NaOH; 121℃ 处理在高压灭菌锅中进行。所有试验均设 3 个重复。

1.6.2 紫外线处理: 取 5mL GB-2 的发酵上清液 5 份, 加入无菌平皿中, 铺成约 5mm 薄层, 无菌条件下用 40W 紫外灯分别照射 1h、6h、12h、24h, 再采用管

碟法^[11]以蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌为代表菌株测抑菌活性, 以未照射过的上清液为对照, 观察并测量抑菌圈的大小。所有试验均设 3 个重复。

1.7 发酵产物性质的测定

1.7.1 Doskochilova 溶剂系统纸层析: 取经真空冷冻浓缩 3 倍的发酵上清液参照文献 [11] 采用 8 种溶剂系统进行纸层析, 采用生物显迹法将层析纸条贴于含菌平板上, 观察结果并测量 Rf 值。所有试验均设 3 个重复。

1.7.2 pH 纸层析: 取 3 倍浓缩的发酵上清液参照文献 [11] 进行 pH 纸层析, 采用生物显迹法将层析纸条贴于含菌平板上, 观察结果并测量 Rf 值。所有试验均设 3 个重复。

1.8 数据分析

所有试验结果以平均值报告, 方差分析采用 SPSS12.0 软件。

2 结果与分析

2.1 水对发酵液抗细菌活性的影响

将菌株 GB-2 用不同水配制的培养液发酵, 取发酵上清液采用管碟法以蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌为指示菌测抑菌活性。发酵液色泽和抑菌活性结果见表 1。

表 1 GB-2 菌株不同处理组的发酵液色泽和抑菌圈直径

Table 1 The color of the fermentation broth and the diameter of zone of inhibition

Water	Color of fermentation broth	Diameter of zone of inhibition/mm	
		<i>Bacillus cereus</i> ASI.1846	<i>Escherichia coli</i> ASI.487
Distilled water	Deep brown	30.90 ± 0.79 ^c	26.43 ± 0.43 ^b
Tap water	Deep brown	32.16 ± 0.26 ^b	26.78 ± 0.60 ^b
Aged seawater	Light brown	32.72 ± 0.91 ^{ab}	27.07 ± 0.49 ^b
Artificial seawater	Light brown	33.53 ± 0.31 ^a	27.92 ± 0.50 ^a

a, b, c: the different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

由表 1 可知用自来水和蒸馏水配制的培养基发酵后, 其发酵液呈深褐色, 而用人工海水和陈海水配制培养基发酵的发酵液呈浅褐色, 这可能与海水盐度高、所含矿物质丰富有关, 盐度低的状况可能更有利于菌株 GB-2 在生长过程中产生色素。

以不同水配制的发酵培养液对菌株 GB-2 进行发酵, 其发酵液对蜡样芽孢杆菌和大肠杆菌的抑菌圈直径结果经方差分析, 差异达到显著水平。用人工海水配制培养基比用其它水配制可显著提高菌株的抑菌活性, 陈海水仅次之, 表明菌株 GB-2 产抗菌物质需要较高的无机盐离子的存在, 体现了菌株

GB-2 的海洋性特征,这与 Pathirana 等的报道类似^[13-15]。此外,人工海水在提高菌株 GB-2 的抗菌活性上比陈海水更好,这可能是由于天然陈海水有某种抑制成分^[16]。鉴于这一结果,在后续研究中采用了人工海水配制发酵培养基。

2.2 抗菌活性试验结果

采用管碟法测定菌株 GB-2 发酵液对 9 株不同细菌的抗菌活性,包括蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌等 5 种革兰氏阳性菌,大肠杆菌、荧光假单胞菌、普通变形杆菌、苍白杆菌等 4 种革兰氏阴性菌。由抑菌圈结果(见表 2)可知,发酵上清液对 5 种革兰氏阳性菌的抑菌圈直径均超过了 20mm,而对 4 种革兰氏阴性菌的抑菌效果,除苍白杆菌的抑菌圈略小于 20mm 外其余的抑菌圈也均超过 20mm。表明链霉菌 GB-2 产生的抗菌物质对 9 株供试菌株具有明显的抑制作用。

表 2 菌株 GB-2 产物的抗菌谱测定结果
Table 2 The antibacterial spectrum of substance produced by strain GB-2

Bacteria	Test strains	Diameter of zone of inhibition/mm
Gram-positive bacteria	<i>Micrococcus luteus</i> CMCC28001 ^a	45.75 ± 1.28
	<i>Bacillus cereus</i> ASI.1846 ^b	31.24 ± 0.29
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ^c	32.77 ± 0.21
	<i>Bacillus subtilis</i> ^c	29.00 ± 0.41
	<i>Staphylococcus aureus</i> ASI.2465 ^b	22.50 ± 0.29
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> ASI.487 ^b	29.56 ± 0.35
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ASI.1802 ^b	30.57 ± 0.20
	<i>Proteus vulgaris</i> ^c	33.48 ± 0.36
	<i>Ochrobactrum intermedium</i> DN2 ^c	17.97 ± 0.29

a: from Center for Medical Culture Collector(CMCC); b: from China General Microbiology Culture Collection Center(CGMCC); c: stored in our lab.

2.3 抗 DRSA 活性试验结果

采用圆纸片扩散试验方法测定发酵上清液对 6 株 DRSA 的抑菌活性,所有耐药株均能被抑制,且抑菌圈直径均超过了 20 mm,可见链霉菌 GB-2 产生的抗菌物质对所供试 DRSA 具有明显的抑制作用(见表 3)。

2.4 发酵液抗菌活性的稳定性研究

2.4.1 对热和酸碱的稳定性:由表 4 可以看出,链霉菌 GB-2 的发酵液经高温及酸碱处理后,抑菌能力没有显著改变。从抑菌圈直径大小可以看出,发酵液经过不同处理后,除处理组 VII 和 VIII 略有下降,没有明显的差异。结果表明链霉菌 GB-2 发酵液的抗菌活性对酸碱热有较好的稳定性。

表 3 菌株 GB-2 产物对耐药性金黄色葡萄球菌的抑菌效果

Table 3 Antibacterial activity of substance produced by strain GB-2 on drug-resistant *Staphylococcus aureus*

Test strains	Diameter of zone of inhibition/mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 ^a	26.53 ± 0.59
DRSA187(StrR,ChlR,SulR,GenR) ^b	23.63 ± 1.06
DRSA 563(SulR) ^b	34.62 ± 2.41
DRSA 9933(StrR,SulR,GenR,EryR) ^b	24.79 ± 1.66
DRSA 00019(PenR,SulR) ^b	24.47 ± 0.97
DRSA 98063(SulR) ^b	24.50 ± 0.55
DRSA 98064(StrR,SulR,GenR) ^b	31.36 ± 2.47

a: stored in the lab of College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University. StrR: streptomycin-resistant, ChlR: chloramphenicol-resistant, SulR: sulfamethoxazole-resistant, GenR: gentamicin-resistant, EryR: erythromycin-resistant, PenR: penicillin-resistant.

表 4 酸、碱、热对菌株 GB-2 发酵液抗菌活性的影响

Table 4 Effect of different temperature and pH on stability of the antibacterial activity of the fermentation broth of strain GB-2

Group	Diameter of zone of inhibition/mm		
	pH	Temperature	
I	pH7	121°C 0.5h	<i>Bacillus cereus</i> ASI.1846: 29.60 ± 0.61 ^c <i>Escherichia coli</i> ASI.487: 27.45 ± 0.44 ^c
II	pH7	121°C 1h	29.78 ± 0.20 ^c / 27.33 ± 0.49 ^c
III	pH1	20h 28°C	30.27 ± 0.54 ^c / 28.22 ± 0.53 ^c
IV	pH12	20h 28°C	30.17 ± 0.48 ^c / 28.13 ± 0.27 ^c
V	pH1	20h 121°C 0.5h	29.47 ± 0.57 ^c / 27.98 ± 0.56 ^c
VI	pH1	20h 121°C 1h	29.36 ± 0.45 ^c / 27.62 ± 0.40 ^c
VII	pH12	20h 121°C 0.5h	26.40 ± 0.35 ^b / 26.25 ± 0.43 ^b
VIII	pH12	20h 121°C 1h	25.35 ± 0.50 ^a / 25.02 ± 0.20 ^a
IX	Control		29.97 ± 0.26 ^c / 28.02 ± 0.57 ^c

a, b, c: the different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

2.4.2 对紫外线的稳定性:表 5 表明,发酵液经不同时间紫外线照射后,抑菌能力没有发生明显的变化。抑菌圈直径大小显示发酵液在紫外线照射 0h、1h、6h、12h 和 24h 后,抗菌效果与对照没有明显的差异。可见,链霉菌 GB-2 发酵液的抗菌活性对紫外线照射的稳定性较好。

表 5 紫外线对菌株 GB-2 发酵液抗菌活性的影响

Table 5 Effect of ultraviolet on the antibacterial activity of the fermentation broth of strain GB-2

Group	Diameter of zone of inhibition/mm	
	<i>Bacillus cereus</i> ASI.1846	<i>Escherichia coli</i> ASI.487
0h	31.16 ± 0.39 ^a	27.58 ± 0.60 ^a
1h	31.14 ± 0.20 ^a	27.20 ± 0.38 ^a
6h	31.11 ± 0.40 ^a	27.23 ± 0.34 ^a
12h	31.23 ± 0.36 ^a	27.14 ± 0.43 ^a
24h	31.14 ± 0.41 ^a	27.25 ± 0.47 ^a

a, b: the different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

2.5 发酵产物性质的测定

2.5.1 Daskochilova 溶剂系统纸层析:链霉菌 GB-2 所产抗菌产物在 8 种溶剂系统中展层后经生物显迹 根据 Rf 值绘制图 1。

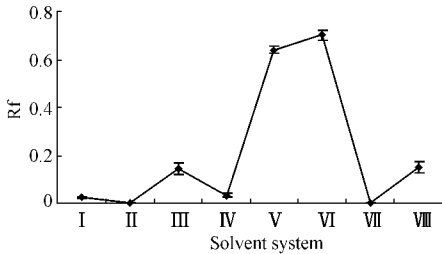


图 1 抗菌产物在 Daskochilova 8 溶剂系统中的层析结果

Fig. 1 The paper chromatography result of antibacterial product in Daskochilova system

I : water-saturated butanol ; II : water-saturated butanol containing 2% p-toluene sulfonic acid ; III : butanol: acetic acid: water (2 : 1 : 1) ; IV : water-saturated butanol containing 2% hexahydropyridine ; V : butanol-saturated 0.5mol/L PBS (pH7) ; VI : butanol-saturated water containing 2% p-toluene sulfonic acid ; VII : benzene: methanol (4 : 1) ; VIII : methanol : water (3 : 1) .

由图 1 可看出 GB-2 所产抗菌产物在水饱和的正丁醇、含 2% 对甲苯磺酸的水饱和的正丁醇、含 2% 六氢吡啶的水饱和的正丁醇、苯: 甲醇 (4 : 1) 溶剂中几乎未动, 在正丁醇: 乙酸: 水 (2 : 1 : 1) 甲醇: 水 (3 : 1) 溶剂中移动较小, 而在正丁醇饱和的 0.5mol/L pH7 的磷酸缓冲液和含 2% 对甲苯磺酸的正丁醇饱和的水溶剂中移动较大, 折线图呈近船帆型, 参照各类抗生素纸层析图谱^[11], 可知 GB-2 所产抗菌产物属于水溶性抗生素。

2.5.2 pH 纸层析:链霉菌 GB-2 所产抗菌产物在用不同 pH 值缓冲液处理过的滤纸上进行展层后经生物显迹 结果见图 2。由图 2 可知不同 pH 下抗菌产物在溶剂中移动距离相近, 说明 GB-2 所产抗菌产物可能为一中性抗生素。

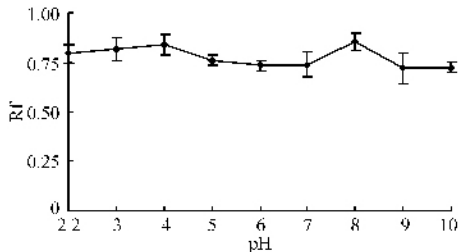


图 2 不同 pH 值下抗菌产物的层析结果

Fig. 2 The paper chromatography result of the antibacterial product under different pH conditions

3 结论

微生物耐药性的日益增强给生防和医药行业造

成了巨大的挑战, 从环境中筛选新的抗生素仍是解决微生物耐药性的一个有效方法^[17]。本研究室自连云港海域采集的海泥样品中分离得到一株链霉菌 GB-2, 其发酵产物具有较强抗菌活性, 通过对其发酵的研究发现该菌色素的产生与水分盐度密切相关, 且用人工海水配制培养基可显著提高菌株 GB-2 发酵液的抗菌活性, 充分体现了该菌株的海洋性特性。

链霉菌 GB-2 发酵液抗菌活性测定及稳定性研究表明其发酵产物不仅能抑制大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及其耐药菌株等致病菌, 而且具有良好的酸、碱、热及对紫外线的稳定性, 预示了其在生防农药、食品防腐剂及医药等方面的潜在应用价值。通过纸层析分析初步确定菌株 GB-2 的抗菌产物为中性的水溶性抗生素, 为进一步分离提纯及结构鉴定提供了参考。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Zou YI(邹艳丽), Sun M(孙谧), Wang Y(王跃军). Purification and characterization of a lysozyme from a marine microorganism. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, **21**(3): 420 - 424.
- [2] Zhang XY(张晓英), Zhao QY(赵权宇), Xue S(薛松), et al. Bioactive compounds from marine sponges and cell culture of marine sponges. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**(1): 10 - 15.
- [3] Bull AT. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu Rev Microbiol*, 1992, **46**: 219 - 252.
- [4] Cho WK, Lee HS, Rho JR, et al. New lactone-containing metabolites from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *J Nat Prod*, 2001, **64**(5): 664 - 667.
- [5] Venugopal JM, Michael S, Hartmut L, et al. New butenolides from two marine *Streptomyces*. *J Nat Prod*, 2000, **63**(11): 1570 - 1572.
- [6] Wang J, Soisson SM, Young K, et al. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*, 2006, **441**: 358 - 361.
- [7] Kin SL. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol*, 2006, **9**: 245 - 251.
- [8] Bradley SM, John AK, Xiang LK. Exploiting marine actinomycete biosynthetic pathways for drug discovery. *Anto Van Leeuwen*, 2005, **87**: 49 - 57.
- [9] Shen F(沈萍), Fan XR(范秀容), Li GW(李广武). *Microbiology Experiment*, 3rd ed. Beijing: Higher Education Press(高等教育出版社), 1999.
- [10] Zheng ZH, Zeng W, Huang YJ, et al. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **188**: 87 - 91.
- [11] Zhou DQ(周德庆). *Handbook of Microbiology Experiment*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers(上海科学技术出版社), 1980.

- [12] Yao HC(姚火春). Veterinary Microbiology Experiment Manual. 2nd ed. Beijing : China Agricultural Press(中国农业出版社), 2002.
- [13] Pathirana C , Tapiolas DM , Jensen PR , *et al.* Structure determination of maduralide : a new 24-membered ring macrolide glycoside produced by a marine bacterium(*Actinomycet ales*). *Tetrahedron Lett* , 1991 , **32** : 2323 – 2326.
- [14] Umezawa H , Okami Y , Kurasawa S , *et al.* Marinactan , antitumor polysaccharide produced by marine bacteria. *J Antibiot* , 1983 , **36** (4) : 471 – 477.
- [15] Trischman JA , Tapiolas DM , Jensen PR , *et al.* Salinamides A and B : anti-inflammatory depsipeptides from a marine *Streptomyces* . *J Am Chem Soc* , 1994 , **116** : 757 – 758.
- [16] Zeng W(曾伟). Screening of marine actinomycetes with antitumor activity and isolation and identification of the cytotoxic compounds produced by strain N350. Xiamen : Xiamen University , 2001 , pp. 34.
- [17] Lotfi M , Raoudha BA , Samiha S , *et al.* Isolation , purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res Microbiol* , 2003 , **154** : 345 – 352.