湛江硇洲岛全缘马尾藻共附生抗菌活性菌的筛选与多样性分析

刘颖，罗绮淇，林秀源，赖果浓，黄媛，刘焕明，徐春厚
（广东海洋大学食品科技学院，广东湛江 524088）

摘要：本文采用倾注平板法从湛江硇洲岛全缘马尾藻（*Sargassum integerrimum*）分离共附生细菌，分别以大肠埃希菌（*Escherichia coli*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）和白色念珠菌（*Candida albicans*）作为指示菌，利用牛津杯法测定抗菌活性，并对分离到的抗菌活性菌进行形态观察、生理生化试验及分子生物学水平的鉴定与多样性分析。共分离到 36 株细菌，经形态观察与生化试验去重，筛选到具有抗菌活性的细菌 11 株。经过 16S rRNA 分析发现，11 株抗菌活性细菌分属于细菌域的厚壁菌门（Firmicutes）和放线杆菌门（Actinobacteria）的 5 个科（Bacillaceae, Staphylococcaceae, Micrococcaceae, Microbacteriaceae, Dermabacteraceae）、5 个属（*Bacillus*, *Staphylococcu*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Brachybacterium*），其中 7 株菌为 Firmicutes 门，占活性菌株的 63.6 %，并成为优势类群，同时发现 4 株潜在新种（菌株 X21、X24、X31、X34）。研究表明，该岛全缘马尾藻中存在较为丰富的抗菌物质产生菌，并蕴藏着较多的微生物新类群。

关键词：马尾藻；抗菌活性；16S rRNA；多样性分析
文章篇号：1673-9078(2014)3-13-17

Screening and Diversity Analysis of Antimicrobial Activity Bacteria Associated with *Sargassum integerrimum* from Naozhou Island

LIU Ying, LUO Qi-qi, LIN Xiu-yuan, LAI Guo-nong, HUANG Yuan, LIU Huan-ming, XU Chun-hou
(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Antimicrobial activity bacteria associated with *Sargassum integerrimum* were isolated by using plate pouring method. Their antimicrobial activities were determined by Oxford cup method in which *Escherichia coli*, *Staphylococcus aurous* and *Candida albicans* were used as representative indicators for gram-negative bacteria, gram-negative bacteria and fungi, respectively. The antimicrobial activity strains were then identified according to morphological characteristics, biochemical properties and the phyogenetical analysis of 16S rRNA sequence. The diversity of antimicrobial activity isolates was also analyzed. Results indicated that 36 symbiotic bacteria were isolated, 11 of which had antimicrobial activity The subsequent analysis showed that all of the isolates belonged to five genera (*Bacillus*, *Staphylococcu*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Brachybacterium*) of five families (Bacillaceae, Staphylococcaceae, Micrococcaceae, Microbacteriaceae, Dermabacteraceae) in two phylogenetic groups (Firmicutes, Actinobacteria) and among them Firmicutes was their dominant phylum(7 strains, 63.6 %). In addition, four strains with potential new species (X24, X31, X21 and X34) were found. It is suggested that *Sargassum integerrimum* from Naozhou Island is abundant in the bacteria with antimicrobial activity and more potential new species could be collected.

Key words: *Sargassum integerrimum*; antibacterial-activity; 16S rRNA gene; diversity analysis

自然界中的生物始终与生存环境构成一个相互作用、相互影响的生态体系。海洋生物自然也和所处生存环境的特殊性与多样性相适应，并造就了种类特殊且丰富的海洋生物。据统计，海洋微生物种类达到了500~1000 万种，占海洋生命总数的 98%。海洋微生物不仅种类丰富，而且在基因组成和功能上也具有其自身的特殊性[1~2]，并产生了具有不同生物活性的化合物，如用于食品工业的各种酶、制药工业的抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗过敏等药物[3~4]。因此，从海洋环境筛选产生具有特殊性的生物活性化合物产生菌成为药物开发的研究热点。硇洲岛处于我国南海北部雷州湾，临近广东省湛江市，具有南海岛屿的典型生态特点。

收稿日期：2013-10-12
项目基金：2012 年地方高校国家级大学生创新创业训练项目（201210566017）；广东海洋大学校自然科学基金团队项目(1012017)
作者简介：刘颖（1966-），女，博士，副教授，研究方向：微生物及其代谢产物
通讯作者：徐春厚（1962-），男，教授，研究方向：微生物与免疫

2007 年至 2009 年期间，李文均研究团队先后对该岛多种生境（土壤、潮汐带沉积物、海水和部分无脊椎动物）中的微生物资源进行了调查研究，发现该岛具有较丰富的细菌多样性，并蕴藏着较多的微生物新类群[5~6]。2013 年，作者也从该岛海域生活的褐篮子鱼肠道中分离到命名为 *Paracoccus siganidrum* 的 1 株海洋细菌新种[7]。藻类是一种低等的海洋植物，作为传统食品的大型海藻—全缘马尾藻（*Sargassum integerrimum*）由于生存在特殊的环境，造就了其含有许多特殊的并具有生物活性的化合物，如多酚、硫酸多糖等抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗凝血以及增强机体免疫力等多种药理活性物质[8~10]。另一方面，具有生理活性物质的动植物体内、体表中的共附生微生物在活性物质产生方面起到什么样的作用，引物微生物学家、化学家等的关注。近年来，运用微生物学、分子生物学、化学等多种技术揭示，许多动植物中的生物活性物质的真正生产者实际上是与之共附生的微生物产生的[11~12]。由此推测，马尾藻可能存在能够产生结构新颖、作用独特的生物活性物质的共附生微生物。目前，国内外对全缘马尾藻共附生微生物，尤其是具有抗菌活性微生物多样性的研究甚少，而它恰恰是一类丰富的、特殊的微生物资源。本文通过对马尾藻共附生微生物抗菌活性菌株的分离与多样性分析的研究，为开发这一微生物资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 全缘马尾藻样品

全缘马尾藻样品，2012 年采自湛江市硇洲岛，保存于广东海洋大学食品科技学院实验室。

1.1.2 培养基

营养琼脂：蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 3.0 g、氯化钠 5.0 g、琼脂 20.0 g；YPD 琼脂培养基：马铃薯浸粉 5.0 g、葡萄糖 20.0 g、琼脂 20.0 g、氯霉素 0.1 g；改良马丁液体培养基：葡萄糖 10.0 g、蛋白胨 5.0 g、KH_2PO_4 1.0 g、$MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g、海水 1000 mL；海洋肉汤培养基：蛋白胨 5.0 g、牛肉膏 2.0 g、酵母膏 2.0 g、葡萄糖 5.0 g、海盐 20.0 g、海水 1000 mL，pH 7.5；海洋琼脂培养基：在海洋肉汤培养基中加入 2%琼脂；同化碳源培养基：$(NH_4)_2SO_4$ 0.5%、KH_2PO_4 0.1%、$MgSO_4·7H_2O$ 0.05%、酵母膏 0.02%、琼脂 2%；同化氮源培养基：KH_2PO_4 0.1%、$MgSO_4·7H_2O$ 0.05%、葡萄糖 2%、酵母膏 0.02%、琼脂 2%。

1.1.3 试剂

生化反应管，购于北京陆桥技术有限责任公司；Mghty Amp DNA Polymerase Ver.2 与 2×MightyAmp Buffer Ver.2（Mg^+浓度 4 mM，dNTP 浓度 800 μM），宝生物工程（大连）有限公司产品；16S rRNA 细菌通用引物 1492R：-GGTTACCTTGTTACGAC-，27F：-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-，上海英骏生物技术有限公司合成。

1.1.4 指示菌

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus* CMCC 26003）、大肠埃希菌（*Escherichia.coli* CMCC 44817）和白色念珠菌（*Candidia albicans* CMCC 98001），购于中国兽医药品监察所。

1.2 实验方法

1.2.1 全缘马尾藻共附生菌的分离

取新鲜全缘马尾藻 10 g，用无菌海水震摇 30 min 后 10 倍梯度稀释，取适当浓度的稀释液 0.1 mL 涂布于海洋营养琼脂平板，28 ℃培养 3 d，挑取形态不同的菌落进行纯培养。将纯化好的菌株接种于海洋营养琼脂斜面，28 ℃培养 2~3 d 后置于 4 ℃保存备用，同时接种到 20%的甘油中，-20 ℃保存，备用。

1.2.2 发酵上清液制备与抗菌活性测定

将分离培养物接种海洋肉汤培养基，28±1 ℃、140 r/min 振荡培养 3 d，将发酵液 12000 r/min 离心 10 min，取上清液用于抗菌活性测定。

采用牛津杯法[13]进行抗菌活性测定，以 2%的素琼脂为底层，当指示菌为金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌时，营养琼脂为上层培养基；当指示菌为白色念珠菌时，YPD 为上层培养基；把牛津杯置于素琼脂底层上，将适当浓度的指示菌悬液与上层培养基混合后倒入底层之上，冷却后拔出牛津杯，每孔加 200 μL 上清液，先在 4 ℃预扩散 24 h 后置于 28 ℃培养 1~2 d，观察是否有抑菌圈。

1.2.3 活性菌株的形态与生理生化鉴定

观察分离菌在海洋琼脂平板上的菌落形态特征，挑取菌落进行涂片、染色和显微镜检查，观察菌体形态特征；按照生化反应管说明书进行 MR、VP、吲哚、明胶液化、硝酸盐还原及 H_2S 产生等试验。

1.2.4 16S rRNA 序列分析及系统进化分析

挑取黄豆粒大小的待鉴定活性菌株的菌落于 500 μL 无菌双蒸水与少量海沙的 1.5 mL 离心管中，用核酸快速提取仪以 5.5 r/min 的速度震摇 30 s，加入 500 μL 氯仿反复颠倒 20 min，12000 r/min 离心 5 min，上清液即为鉴定菌株的总 DNA，细菌 PCR 扩增参照 Lu 等[14]提出的方法。将测得到的 16S rRNA 序列与

EzTaxon 中的核酸数据进行 Blast 比对，搜索得到与其同源性最高的相关序列，采用软件 Version 2.0 的 CLUSTAL-X 软件进行序列多重比对，系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算，用 MEGA 5.0 软件包采用邻接法（Neighbor-Joining method）进行聚类分析并构建细菌的 16S rRNA 基因系统发育树，重复取样 1000 次进行自展值（bootstrap value）分析以评估系统进化树的结构稳定性。

2 结果与讨论

2.1 抗菌活性菌株的分离

根据菌落形态、大小、色泽、隆起情况等特征，分离出 36 株共附生细菌。采用双层琼脂扩散法对 36 株细菌进行抗菌活性测定（见表 1），其中 1 株对大肠埃希菌有抗菌活性，14 株对金黄色葡萄球菌有抗菌活性，17 株对白色念珠菌有抗菌活性，共获得 20 株活性菌株，占分离菌株数的 55.6%。

表 1 分离菌株对不同指示菌的抗菌活性

Table 1 Antibacterial activity of bacteria for 36 strains

编号	*E.coli*	*S. aureus*	*C. albicans*	编号	*E.coli*	*S. aureus*	*C. albicans*	编号	*E.coli*	*S. aureus*	*C. albicans*
X1	-	-	-	X13	-	+	+	X25	-	-	+
X2	-	-	-	X14	-	++	+	X26	-	-	-
X3	-	-	-	X15	-	-	-	X27	-	+	+
X4	-	-	-	X16	-	-	-	X28	-	+	++
X5	-	-	-	X17	-	-	-	X29	-	-	-
X6	-	-	-	X18	-	+	++	X30	-	-	-
X7	-	-	-	X19	-	+	+	X31	-	+	+
X8	-	-	-	X20	-	++	++	X32	-	++	+
X9	-	-	-	X21	-	-	+	X33	-	+	+
X10	-	-	-	X22	-	-	+	X34	-	+	-
X11	-	-	+	X23	-	+	+	X35	-	+	-
X12	-	++	++	X24	-	-	+	X36	+	-	-

注：++：抑菌圈直径>15mm；+：抑菌圈直径<15 mm；-：无抑菌活性。

2.2 形态观察与生化试验

20 株活性菌株经显微镜观察，发现 8 株为革兰氏阴性杆状菌，6 株为革兰氏阳性杆状菌，6 株为革兰氏阴性球状菌；20 株活性菌株的 6 项的生化试验结果见表 2。由表 2 可以看出，菌株 X12 与 X25，菌株 X13 与 X14，菌株 X18 与 X20、X22、X36，菌株 X19 与 X28、X31、X32，菌株 X23 与 X33 五组分离菌生化试验结果一致，再结合形态观察结果，初步鉴定为同一种菌，每组中挑取 1 株进行 16S rRNA 序列分析。

表 2 活性菌株的生化试验

Table 2 Physio-biochemical characteristics of antibacterial activity strains

菌株编号	MR 试验	VP 试验	吲哚试验	明胶液化	硝酸盐还原	硫化氢产生
X11	-	+	-	-	+	-
X12、X25	+	-	-	+	-	-
X13、X14	+	-	-	+	-	-
X18、X20、X22、X36	+	+	-	-	+	-
X19、X28、X31、X32	+	-	-	+	-	-
X21	+	+	-	-	+	+
X23、X33	+	-	-	+	+	-
X24	+	+	-	+	+	-
X27	+	-	-	-	+	-
X34	+	-	-	+	+	-
X35	+	-	-	+	+	+

注：+：表示试验为阳性，-：表示试验为阴性。

2.3 抗菌活性菌类群的多样性

经分离菌株的菌落特征、菌体形态及部分生化试验结果分析，最终从20株有抗菌活性的菌株中挑选出11株进行基于16S rRNA基因序列的系统发育多样性分析。采用Blast 搜索软件从GenBank和EzTaxon等公共数据库进行相似性搜索，将相似性最高模式菌株与11株分离菌进行比较，结果见表3。由表3可以看出，11株分离菌属于细菌域的2 个大的系统发育类群（Firmicutes，Actinobacteria）的5个科（Bacillaceae，Staphylococcaceae，Micrococcaceae，Microbacteriaceae，Dermabacteraceae）的5个属（*Bacillus*，*Staphylococcus*，*Kocuria*，*Microbacterium*，*Brachybacterium*），其中Firmicutes门为11株活性菌的优势类群（7株），占活性菌株数的63.4%。李文均研究团队先后对该岛海域生活的海胆、海葵海洋生物中的可培养共附生细菌多样性进行了研究，也同样发现Firmicutes为分离菌株的优势类群（菌株比例分别为50.8%和40.5%）[5~6]。

表 3 抗菌活性细菌与其系统发育关系最密切的典型菌株间的系统发育关系

Table 3 Phylogenetic closest neighbors of strains with antibacterial activity as determined based on 16S rRNA gene sequence analysis

类群/科	分离株/GenBank登录号	相似性最高模式菌株/GenBank登录号	最近相似性/%
Firmicutes/Bacillaceae	X11（KF875574）	*Bacillus methylotrophicus* CBMB 205^T（EU194897）	99.9
	X14（KF875575）	*Bacillus aryabhattai* B8W22^T（EF114313）	99.6
	X18（KF875584）	*Bacillus anthracis* ATCC 14578^T（AB190217）	100.0
	X24（KF875578）	*Bacillus flexus* IFO 15715^T（AB021185）	97.6
	X25（KF875577）	*Bacillus flexus* IFO 15715^T（AB021185）	99.8
	X31（KF875580）	*Bacillus anthracis* ATCC 14578^T（AB190217）	98.4
Firmicutes/Staphylococcace	X27（KF875579）	*Staphylococcus arlettae* ATCC 43957^T（NR024664）	99.9
Actinobacteria/Micrococcaceae	X21（KF875576）	*Kocuria rhizophila* DSM 11926^T（Y16264）	98.8
	X35（KF875583）	*Kocuria assamensis* S9-65^T（HQ018931）	99.8
Actinobacteria/Microbacteriaceae	X34（KF875582）	*Microbacterium testaceum* DSM 20166^T（X77445）	98.1
Actinobacteria /Dermabacteraceae	X33（KF875581）	*Brachybacterium paraconglomeratum* LMG 19861^T（AJ415377）	99.7

2.4 物种与遗传多样性

利用Blast 搜索软件从GenBank与EzTaxon公共数据库中进行相似性搜索，下载相似性最高且有效发表的相关菌株的 16S rRNA 基因序列，采用相关软件进行序列比对、相似性计算、进化距离矩阵计算、聚类分析和系统进化树构建等系统发育分析（图 1），从图中可以看出，除了X24、X25 与*Bacillus flexus*以及X31、X18 与*Bacillus anthracis*外，其它 7 株菌分别与不同的典型菌株聚在一起，再结合表 3 细菌序列比对结果，除了菌株X18 与*Bacillus anthracis* ATCC 14578 菌株的 16S rRNA基因序列 100%相似外，其它活性菌株与其相关的已知物种的典型菌株的 16S rRNA基因序列相似性在 97.6~99.9%之间，说明大部分菌株与其系统发育关系最密切的相关菌株之间存在不同程度的遗传差异。研究发现，11 株活性菌株中有 4 株与其系统发育关系最密切的已知物种典型菌株的 16S rRNA 基因序列差异较大(表 3 和图 1 中菌号加粗的菌株)。菌株X24、X31、X21、X34 分别与*Bacillus flexus* IFO 15715^T、*Bacillus anthracis* ATCC 14578^T、*Kocuria*

rhizophila DSM 11926^T 与 *Microbacterium testaceum* DSM 20166^{T}系统发育关系最密切，并且它们之间的 16S rRNA基因序列相似性分别为 97.6%、98.4%、98.8%和 98.1%，结合形态与生理生化试验结果，推测可能分别代表 *Bacillus*、*Kocuria* 和 *Microbacterium*属中的新种。

海洋微生物是新化合物资源的巨大宝库，人们在海洋中已获得了大量的结构新颖且活性很强的生物活性物质，如抗菌、抗病毒、抗肿瘤等物质[4]。这些与海绵、海鞘、海草等海洋动植物共附生的微生物产生代谢产物的结构虽然不易确定，但往往是令人兴奋的物质[15]。本研究从湛江市硇洲岛马尾藻中共获得 11 株共附生抗菌活性菌株，并且有 4 株菌可能代表新种。李文均课题组[5~6]对湛江市硇洲岛海胆与海葵的 34 株与 42 株可培养细菌 16S rRNA 基因序列分析，发现分别有 5 株与 6 株可能为潜在新种。这些新种为获得独特的新颖化合物提供较大机率，这一点值得进一步关注与研究。

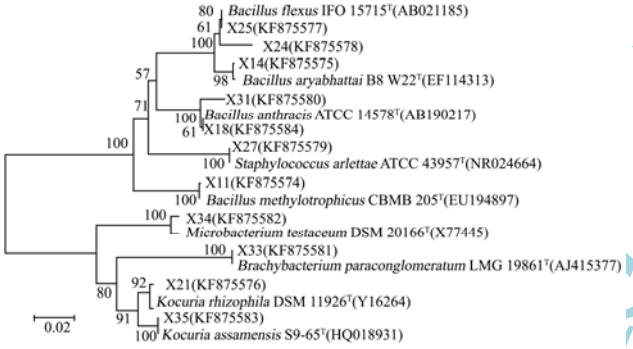


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的马尾藻相关抗菌活性细菌的系统发育树

Fig.1 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of antibacterial activity bacteria isolated from Siganus fuscescens and their closely related taxa.

Note: Numbers at branch points indicate bootstrap percentages (based on 1,000 replicates); only values >50 % are indicated. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

3 结论

用于系统发育分析的11株抗菌活性菌株归分属于2个大的系统发育类群、5个科、5个属，且大部分分离菌株与其系统发育关系最密切的已知物种典型菌株之间的基因序列存在一定的差异。另外，从抗菌活性细菌与其系统发育关系最密切的典型菌株间16S rRNA基因相似性比较以及基于16S rRNA基因序列构建的马尾藻相关抗菌活性细菌的系统发育树分析，获得4株潜在细菌新种资源，这些新种为获得独特的新颖活性化合物资源提供较大的机率。

参考文献

[1] Michelle R R, Paul R A, Alan D B, et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (6): 2541-2547

[2] Marlene H, Karen V, Javiera N, et al. Diversity of cultivable fungi associated with antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2013, DOI 10. 1007/s11274-013-1418-x

[3] Zhang C, Kim S K. Chapter 28 Application of marine microbial enzymes in the food and pharmaceutical industries [M]. Advances in Food and Nutrition Research, 2012

[4] Bhatnagar I, Kim S K. Pharmacologically prospective antibiotic agents and their sources: A marine microbial perspective [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2012, 34(3): 631-643

[5] 黄苛,张丽,刘祝祥,等.硇洲岛海胆可培养细菌的多样性[J].微生物学报,2009,49(11):1424-1429
Huang Ke, Zhang Li, Liu Zhu-xiang, et al. Diversity of culturable bacteria associated with the sea urchin hemicentrotus pulcherrimus from Naozhou Island [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(11): 1424-1429

[6] 肖怀东,陈义光,刘祝祥,等.湛江硇洲岛海葵相关可养细菌系统发育多样性[J].微生物学报,2009,49(2):246-250
Xiao Huai-dong, Chen Yi-guang, Liu Zhu-xiang, et al. Phylogenetic diversity of cultivable bacteria associated with a sea anemone from coast of the Naozhou island in Zhanjiang, China [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(2): 246-250

[7] Ying Liu, Qing-yi Xie, Kui Hong, et al. Paracoccus siganidrum sp. nov., isolated from fish gastrointestinal tract [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, 103: 1133-1139

[8] Gupta S, Abu - Ghannam N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds [J]. Trends Food Science Technology, 2011, 22: 315-326

[9] Kim S K, Himaya S W A. Medicinal effects of phlomtannins from marine brown algae [J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2011, 64: 97-109

[10] Holdt S L, Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food application and legislation [J]. Applied Phycology, 2011, 23: 543-597

[11] Radjasa O K, Vaske Y M, Navarro G, et al. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products:Their biomedical potential and possible production by microbial associants [J]. Bioorg Medicine Chemistry, 2011, 19: 6658-6674

[12] Gulder T A M, Moore B S. Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products [J]. Current Opinion in Microbiology, 2009, 12: 252-260

[13] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等.用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J].食品研究与开发,2006,27(3):110-111
Liu Dong-mei, Li Li, Yang Xiao-quan, et al. Determination of the antimicrobial activity of probiotic by oxford plate assay system [J]. Food Research and Developent, 2006, 27(3): 110-111

[14] Lu Q F, Hu H Q, Mo J J, et al. Enhanced amplification of bacterial and fungal DNA using a new type of DNA polymerase [J]. Australasian Plant Pathology, 2012, 41: 661-663

[15] Simmons T L, Coates R C, Clark B R, et al. Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages [J]. PNAS, 2008, 105(12): 4587-4594

现代食品科技