

## 不同海水浓度和培养时间对海洋真菌抗菌活性的影响

杜希萍<sup>1</sup>, 杨玖钦<sup>1</sup>, 杨秋明<sup>1</sup>, 伍菱<sup>1</sup>, 郑忠辉<sup>2</sup>, 苏文金<sup>1,2\*</sup>

(1. 集美大学生物工程学院厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021;

2. 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 福建省药物工程实验室, 福建 厦门 361005)

**摘要** 用滤纸片琼脂扩散法研究不同海水浓度和培养时间对海洋真菌抗菌活性的影响,旨在为大规模培养海洋真菌和提高获得抗菌物质的几率提供理论依据。结果显示:用不同海水浓度培养基发酵海洋真菌,在供试的10株海洋真菌中,5株海洋真菌的抗菌活性和抗菌谱有明显差异;培养时间不同,6株海洋真菌的抗菌活性差别较大。实验结果表明,不同海水浓度和培养时间对海洋真菌抗菌活性有显著影响。

**关键词** 海洋真菌;海水浓度;培养时间;抗菌活性

中图分类号 Q939 文献标识码 B 文章编号 1005-7021(2011)05-0093-04

## The Effects of Different Seawater Concentration and Culture Time on Antimicrobial Activity of Marine Fungi

DU Xi-ping<sup>1</sup>, YANG Jiu-qin<sup>1</sup>, YANG Qiu-ming<sup>1</sup>, WU Ling<sup>1</sup>, ZHENG Zhong-hui<sup>2</sup>, SU Wen-jin<sup>1,2</sup>

(1. Res Ctr. of Food Biotech., Coll. of Bioengin., Jimei Uni., Xiamen 361021;

2. Key Lab. of the Minist. of Educ. for Cell Biol. & Tumor Cell Engin., Fujian Engin. Lab. for Pharm., Schl. of Life Sci., Xiamen Uni., Xiamen 361005)

**Abstract** The effects of different seawater concentration and culture time on antimicrobial activity of marine fungi were studied using agar diffusion method with filter paper diskettes, aiming at providing theoretical foundation for culturing marine fungi on a large scale and improving the probability of antimicrobial metabolites. The results showed that the differences of antimicrobial activities and antimicrobial spectrum of five among ten tested marine fungal strains cultured in different seawater concentration media were fairly obvious; antimicrobial activities of six marine fungal strains were significantly different at the different culture time. The study indicated different seawater concentration and culture time greatly affected the antimicrobial activity of marine fungi.

**Keywords** marine fungi; seawater concentration; culture time; antimicrobial activity

海洋中蕴藏着丰富的微生物资源,其特殊复杂的海洋环境(高盐度、高压、低温、特殊光照、寡营养等)赋予海洋微生物特殊的代谢方式,代谢物化学结构具有极大的复杂性和多样性<sup>[1]</sup>。不少研究也表明,原来分离自海洋动植物的活性物质是与其共生的微生物产生的<sup>[2-5]</sup>。此外,海洋微生物具有繁殖快、易培养、代谢易于调控,菌种较易

选育等优点,可以结合现代发酵工程技术进行工业化生产,既降低海洋药物的生产成本,又无药源之忧。因此,目前国际许多大制药企业已投资海洋微生物实验室及工业化大规模培养,以优化培养条件达到高产定向培养生物活性物质的目的。海洋真菌是海洋微生物的一个重要分支,Schiehser等<sup>[6]</sup>报道了第一个从海洋真菌中分离的有抗菌

基金项目:集美大学博士启动基金(ZQ2011004);中央高校基本业务费(2010121092)资助

作者简介:杜希萍 女,讲师。现从事天然产物化学方面的研究。E-mail: xipingdu@jmu.edu.cn

\* 通讯作者。E-mail: wjsu@jmu.edu.cn

收稿日期:2011-09-08;修回日期:2011-09-20

活性的天然产物 Leptosphaerin。近年来,随着对海洋真菌研究的深入,已从中发现许多结构新颖、活性多样的化合物,包括抗肿瘤、抗病毒、抗菌化合物,细胞周期抑制剂、酶抑制剂等<sup>[7-12]</sup>。本文通过研究不同海水浓度和培养时间对海洋真菌抗菌活性的影响,旨在提高发现活性物质的几率,为大规模发酵海洋真菌提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 10 株海洋真菌(zl01a-2、ty03b-11、ty03b-8、ty03b-1、ty01a-7、zl01a-9、zl01a-11、zl03b-2、zl03b-5、zl04b-4)为厦门大学微生物药理学课题组保存菌种。

1.1.2 指示菌 金黄色葡萄球菌 CMCC26003 (*Staphylococcus aureus* CMCC26003, SA)、短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*, BP)、枯草芽胞杆菌 CMCC63501(*Bacillus subtilis* CMCC63501, BS)。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖培养基(PD/PDA):马铃薯 200 g(去皮,切成小块,加水煮沸 30 min,4~6 层纱布过滤,收集滤液),葡萄糖 20 g,用不同浓度的海水(0%、20%、50%、80%和 100%)定容至 1 000 mL;固体培养基则加 2% 琼脂,121 °C 高压灭菌 20 min;牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL, pH 7.2~7.4,121 °C 高压灭菌 20 min。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株的活化 从斜面挑取菌丝块分别接种于 50% 海水 PDA 培养基平板上,28 °C 培养 4 d。

1.2.2 菌株的固体发酵 挑取活化后菌株的菌丝块分别接种于海水浓度为 0%、20%、50%、80%、100% 的 PDA 培养基平板上,每个海水浓度发酵 100 mL,28 °C 培养 20 d。

1.2.3 菌株的液体发酵 挑取活化后菌株的菌丝块分别接种于海水浓度为 50% 的 PD 培养基中,每个菌株发酵 200 mL,180 r/min,28 °C 分别培养 7 d 和 14 d。

1.2.4 固体发酵产物的提取 将固体发酵产物切成小块,用乙酸乙酯:甲醇:乙酸(80:15:5)混合溶剂浸提 3 次,合并提取液于 45 °C 减压浓缩至干,称量后用甲醇稀释备用。

1.2.5 液体发酵产物的提取 液体发酵产物用

4 层纱布过滤,得到发酵液上清和菌体。发酵液上清用等体积乙酸乙酯萃取 2 次,合并有机相减压浓缩至干,称量后用甲醇稀释备用。

1.2.6 抗菌活性测定 用滤纸片琼脂扩散法测定发酵提取物的抗菌活性<sup>[13]</sup>。加入适量指示菌悬液于冷却至 45 °C 的牛肉膏蛋白胨培养基中,迅速摇匀(终浓度为  $10^5$  cfu/mL),倾注法制成平板待用。用微量进样器吸取含 300  $\mu$ g 发酵提取物的稀释液滴加于已灭菌的滤纸片上,待溶剂挥发干后,将含样品的滤纸片贴于琼脂平板上,37 °C 培养 24 h 后,测定抑菌圈大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 海水浓度对抗菌活性的影响

在供试的 10 株海洋真菌中,5 株海洋真菌的抗菌活性受海水浓度的影响较大。从图 1 可以看出,当海水浓度为 0%、20%、50% 和 80% 时,菌株 zl03b-5 对金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌和(或)短小芽胞杆菌表现出较强的抗菌活性;而海水浓度为 100% 时,菌株 zl03b-5 仅对金黄色葡萄球菌表现出抗菌活性,抑菌圈为 6 mm。

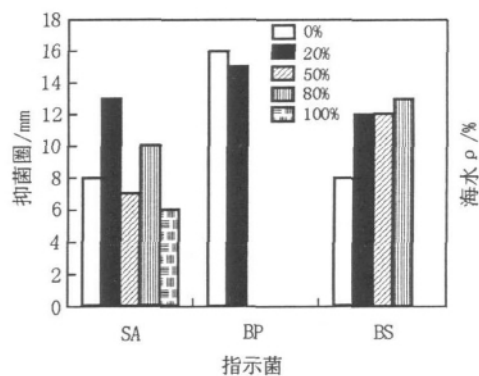


图 1 菌株 zl03b-5 的抗菌活性

Fig. 1 Antimicrobial activity of zl03b-5

当海水浓度为 0% 时,菌株 zl01a-2 表现出最强的抗菌活性,对金黄色葡萄球菌、短小芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌的抑菌圈分别为 14、8 和 17 mm;当海水浓度为 20% 和 50% 时,菌株 zl01a-2 表现出相似的抗菌活性,对短小芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌的抑菌圈均为 8 mm;而海水浓度为 80% 和 100% 时,菌株 zl01a-2 表现出最弱的抗菌活性,对短小芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌的抑菌圈均为 7

mm(表1)。

**表1 菌株 z101a-2 的抗菌活性**

Table 1 Antimicrobial activity of z101a-2

海水浓度/%	抑菌圈/mm		
	SA	BP	BS
0	14	8	17
20	0	8	8
50	0	8	8
80	0	7	7
100	0	7	7

从表2可以看出,当海水浓度为0%、20%和100%时,菌株 z104b-4 对指示菌具有抗性,而海水浓度为50%和80%时,菌株 z104b-4 对3种指示菌均没有抗性。

**表2 菌株 z104b-4 的抗菌活性**

Table 2 Antimicrobial activity of z104b-4

海水浓度/%	抑菌圈/mm		
	SA	BP	BS
0	6	0	6
20	0	7	0
50	0	0	0
80	0	0	0
100	7	6	7

菌株 ty03b-11 和 z103b-2 对短小芽胞杆菌的抗性受海水浓度的影响不大,而对金黄色葡萄球菌和枯草芽胞杆菌的抗性受海水浓度的影响较大。当海水浓度为0%时,菌株 ty03b-11 和 z103b-2 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈分别为0、14 mm;而海水浓度为80%时,其抑菌圈分别为9、17 mm;海水浓度为50%时,菌株 ty03b-11 和 z103b-2 对枯草芽胞杆菌均表现出最弱的抗性(表3和表4)。

**表3 菌株 ty03b-11 的抗菌活性**

Table 3 Antimicrobial activity of ty03b-11

海水浓度/%	抑菌圈/mm		
	SA	BP	BS
0	0	8	11
20	9	8	10
50	7	7	8
80	9	9	9
100	8	8	9

**表4 菌株 z103b-2 的抗菌活性**

Table 4 Antimicrobial activity of z103b-2

海水浓度/%	抑菌圈/mm		
	SA	BP	BS
0	14	9	12
20	15	10	13
50	14	9	11
80	17	10	13
100	16	10	14

## 2.2 培养时间对抗菌活性的影响

在供试的10株海洋真菌中,6株海洋真菌的抗菌活性受培养时间的影响显著。表5的结果表明,菌株 z103b-2、ty01a-7 和 z101a-2 培养14 d时抗菌活性较好,而菌株 z104b-4 培养14 d时对3种指示菌均没有抗性,培养7 d时能抑制枯草芽胞杆菌的生长,其抑菌圈为14 mm。菌株 ty03b-11 和 z103b-5 的抗菌活性不仅与培养时间有关,而且与指示菌种类的关系很大。培养7 d时,ty03b-11 对金黄色葡萄球菌、短小芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌的抑菌圈分别为15、8和7 mm;而培养14 d时,其抑菌圈分别为12、10和14 mm。培养7 d时,z103b-5 对金黄色葡萄球菌、短小芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌的抑菌圈分别为7、9和17 mm;而培养14 d时,其抑菌圈分别为6、9和10 mm。

**表5 培养7 d和14 d时海洋真菌的抗菌活性**

Table 5 Antimicrobial activity of marine fungi harvested at 7 days and 14 days

菌株	培养时间/d	抑菌圈/mm		
		SA	BP	BS
z103b-2	7	14	9	12
	14	15	10	13
ty01a-7	7	11	14	15
	14	13	15	16
z101a-2	7	0	0	0
	14	0	7	6
z104b-4	7	0	0	14
	14	0	0	0
ty03b-11	7	15	8	7
	14	12	10	14
z103b-5	7	7	9	17
	14	6	9	10

### 3 讨 论

不同海水浓度和培养时间对海洋真菌抗菌活性的影响国内外已有一些报道。如 Bugni 等<sup>[14]</sup>对 9 株海洋真菌进行了发酵条件的研究。发现菌株 *Penicillium brocae*( F97S76) 培养 10 d 时,人工海水比例为 20% ~ 60% 的抽提物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)表现出抗性;而人工海水比例为 80% 和 100% 的抽提物对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)表现出抗性,表明人工海水浓度变化时,代谢产物的类型也发生了变化;菌株 *Penicillium* sp. ( F97I21) 表现出人工海水浓度与抗菌活性具有极大的关系,当人工海水比例为 20% ~ 40% 时活性物质的产量较高。Masuma 等<sup>[15]</sup>研究了不同海水浓度对海洋真菌菌丝生长及抗菌活性的影响,发现 3 株海洋真菌的抗菌活性随着海水浓度的增加而增加,表明它们更适应海洋环境。郭江等<sup>[16]</sup>发现海洋真菌菌株 M-401 对藤黄八叠球菌抑菌效果最好培养时间是在 48 h,而对大肠埃希菌抑菌效果最好培养时间是在 72 h。

本文的实验结果也显示,海水浓度和培养时间对海洋真菌的抗菌活性具有显著影响。海水浓度和培养时间不同,抗菌物质的种类和产量可能有较大差别。菌株 z103b-5 和 z101a-2 在海水浓度为 0% 时具有较强的抗菌活性,而海水浓度为 100% 时的抗菌活性较弱(图 1 和表 1),表明它们可能来源于陆地或淡水,不属于专性海洋真菌,而属于兼性海洋真菌。菌株 z104b-4 在海水浓度为 0%、20% 和 100% 时具有抗菌活性,而海水浓度为 50% 和 80% 时没有抗菌活性(表 2),表明 z104b-4 可能产生抗菌活性物质用于渗透调节来适应特殊的高盐环境。菌株 z103b-2、ty01a-7 和 z101a-2 培养 14 d 时具有较强的抑菌作用,表明其抗菌活性物质可能来源于初级代谢产物;而菌株 z104b-4 培养 14 d 时没有抑菌作用,培养 7 d 时能抑制枯草芽胞杆菌的生长,表明其抗菌活性物质可能来源于次级代谢产物,抗菌活性物质的化合物类型有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 王鸿,沈丽丽,梅建凤,等. 不同培养时间海洋来源真菌 *Penicillium* spp. 701 挥发性成分分析 [J]. 中国药理学杂志, 2010,45(1): 11-13.
- [2] 焦炳华. 海洋生命活性物质和海洋药物的研究与开发 [J]. 第二军医大学学报, 2006,27(1): 5-7.
- [3] Sponga F, Cavaletti L, Lazzarini A, et al. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms [J]. J Biotechnol, 1999,70(1-3): 65-69.
- [4] 陈建国,李国明. 海洋生物抑菌物质的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2006,27(9): 820-822.
- [5] König G M, Kehraus S, Seibert S F, et al. Natural Products from Marine Organisms and Their Associated Microbes [J]. Chembiochem., 2006,7(2): 229-238.
- [6] Schiehser G A, White J D, Matsumoto G, et al. The structure of leptosphaerin [J]. Tetrahedron Lett, 1986, 27(46): 5587-5590.
- [7] You J L, Dai H Q, Chen Z H, et al. Trichoderone, a novel cytotoxic cyclopentenone and cholesta-7, 22-diene-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol, with new activities from the marine-derived fungus *Trichoderma* sp. [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2010,37(3): 245-252.
- [8] Du X P, Lu C H, Li Y Y, et al. Three New Antimicrobial Metabolites of *Phomopsis* sp. [J]. J. Antibiot., 2008,61(4): 250-253.
- [9] Bugni T S, Berman V S, Greenstein M, et al. Brocaenols A-C: Novel Polyketides from a Marine-Derived *Penicillium brocae* [J]. J. Org. Chem., 2003,68(5): 2014-2017.
- [10] Tsukamoto S, Hirota H, Imachi M, et al. Himeic acid A: a new ubiquitin-activating enzyme inhibitor isolated from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. [J]. Bioorg Med Chem Lett., 2005,15(1): 191-194.
- [11] Cui C B, Kakeya H, Okada G, et al. Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus* [J]. J. Antibiot., 1995,48(11): 1382-1384.
- [12] Rowley D C, Kelly S, Kauffman C A, et al. Halovirs A-E, New Antiviral Agents from a Marine-Derived Fungus of the Genus *Scytalidium* [J]. Bioorg Med Chem., 2003,11(19): 4263-4274.
- [13] 熊枫,郑忠辉,黄耀坚,等. 从深海沉积物中筛选具有抗菌、抗肿瘤活性的海洋真菌 [J]. 厦门大学学报, 2006,45(3): 419-423.
- [14] Bugni T S, Ireland C M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms [J]. Nat. Prod. Rep., 2004,21(1): 143-163.
- [15] Masuma R, Yamaguchi Y, Noumi M, et al. Effect of sea water concentration on hyphal growth and antimicrobial metabolite production in marine fungi [J]. Mycoscience, 2001,42(5): 455-459.
- [16] 郭江,祖国仁,孔繁东,等. 1 株海洋真菌菌株 M-401 产抑菌物质发酵条件研究 [J]. 微生物学杂志, 2007,27(1): 76-79.