

## 柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 相关可培养细菌抗污活性筛选\*

### Antifouling Activity of Culturable Bacteria Associated with the Gorgonian *Anthogorgia caerulea*

方 燕<sup>1,3</sup>, 潘丽霞<sup>1</sup>, 易湘茜<sup>2</sup>, 林 琳<sup>1</sup>, 王一兵<sup>1</sup>, 高程海<sup>1\*\*</sup>

FANG Yan<sup>1,3</sup>, PAN Li-xia<sup>1</sup>, YI Xiang-xi<sup>2</sup>, LIN Lin<sup>1</sup>, WANG Yi-bing<sup>1</sup>, GAO Cheng-hai<sup>1</sup>

(1. 广西科学院, 广西南宁 530007; 2. 广西中医学院, 广西南宁 530001; 3. 广西大学, 广西南宁 530004)

(1. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530001, China; 3. Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

**摘要:**用 4 种不同培养基分离纯化柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 中的相关可培养细菌。对获得的 90 株细菌, 先用 4 株海洋污损指示菌进行活性初筛, 获得 11 株具有抑制海洋污损指示菌生长的细菌后, 再用 2 种抗海洋污损生物幼虫进行活性复筛, 复筛得到 5 株对海洋污损生物幼虫附着有抑制活性的细菌。这 5 株细菌经 16S rRNA 基因序列分析, 确定其系统发育地位为芽胞杆菌属 (*Bacillus* sp.)。

**关键词:**柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 海洋细菌 抗污损生物活性

中图分类号: Q959.134.3, Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2012)03-0253-04

**Abstract:** Based on partial morphological analysis, 90 bacterial strains were isolated from the Gorgonian *Anthogorgia caerulea* obtained from Weizhou island, Guangxi, by means of maine nutrient agar, marine agar 2216, improved LB sea agar and sea water agar. Among them, 11 bacterial strains had antifouling activities against four fouling bacteria, furthermore, 5 bacterial strains effectively inhibited larval settlement of *B. neritina* and *B. amphitrite* larvae. Five strains were selected to perform a phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences, and the results showed that these 5 isolates belong to *Bacillus* genus (*Bacillus* sp.).

**Key words:** Gorgonian, *Anthogorgia caerulea*, marine bacterial strains, antifouling

海洋微生物是海洋生物的重要成员, 据估计有 100 万至 2 亿种, 按照其类型可以分为细菌、放线菌、真菌、病毒、衣原体、支原体、噬菌体、微型藻以及微型原生动物等。柳珊瑚相关可培养细菌是指从柳珊瑚中获得的海洋细菌, 它们有抑制人体致病菌和防止病

原菌或有害海洋生物侵害柳珊瑚的功能。Gnanambal 等<sup>[1]</sup>从柳珊瑚 *Subergorgia suberosa* 和 *Junceella juncea* 中分离得到 352 株细菌, 活性测试表明其中 47 株菌株(13%)对人类 8 种致病菌和鱼类 7 种致病菌有中等或强的抑制活性。Radjasa 等<sup>[2]</sup>从柳珊瑚 *Melithaea ocracea* 中分离得到 42 株细菌, 活性测试表明其中 5 株菌株对珊瑚致病菌的生长有抑制活性。Radjasa 等<sup>[3]</sup>从柳珊瑚 *Scirpearia gracilis* 中采集到 1 株对南美白对虾致病菌 *Vibrio harveyi* 有强抑制活性的细菌 *Pseudoalteromonas luteoviolacea*。Gao 等<sup>[4]</sup>从柳珊瑚 *Junceella juncea* 中分离到 1 个新二十四环内酯 Macrolactin V, 其具有强抑制海洋污损生物指示菌活性。本研究对柳珊瑚相关可培养细菌

收稿日期: 2011-12-13

修回日期: 2012-03-16

作者简介: 方 燕(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物活性次生代谢产物研究。

\* 广西科学院基本业务经费(10YJ25HY02), 广西青年基金项目(2011GXNSFB018035), 广西科技攻关项目(桂科攻 1114011-7), 广西自然科学基金重大专项(2011GXNSFE018002)资助。

\*\* 通讯作者。

进行分离、纯化,并对获得的细菌进行小规模发酵,测试其抑制海洋污损指示菌生长和海洋污损生物幼虫附着活性,最后对活性显著的5株细菌采用16S rRNA基因序列分析其系统发育地位。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与材料采集

使用的仪器有凝胶成像系统(BIO-RAD)、PCR仪(BIO-RAD)、电泳仪(广州正一)、摇床(TQHZ-2002A)、无菌操作台(苏州亿达净化设备有限公司)、移液器(Eppendorf)、台式离心机(Mikro 200)、水浴锅(GrantSUB Aqua26)、制冰机(广州冰泉)、超低温冰箱(SANYO)、低温台式离心机(Beckman)等。

2010年8月在广西涠洲岛采用潜水方式采集柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea*,采集水深15m。柳珊瑚表面消毒后,立即装入无菌袋,然后暂存于放有冰块的保温箱内,最后送回实验室冷冻保藏(-18℃)。

### 1.2 菌株分离、纯化和保藏

柳珊瑚解冻后,先用无菌海水冲洗3次,然后用70%乙醇浸泡5min,再用无菌海水洗净残留的乙醇。用无菌刀片小心削去柳珊瑚表面,切取小块内部组织于无菌Eppendorf离心管中研磨,然后再加入1ml无菌海水,振荡混匀。以上匀浆用无菌海水依次稀释成 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 等3个浓度梯度。用无菌移液器吸取0.4ml不同稀释倍数的稀释液并转移至4种不同类型的平板培养基(NA海水培养基、MA海水培养基、改良LB海水培养基、海水琼脂培养基)上,用无菌玻璃棒将稀释液轻巧均匀地涂布在整个平板上,将各平板于28℃培养箱中培养。根据菌落特征(形态、大小、颜色)挑取单菌落,并运用四分体划线纯化,用体视显微镜观察纯化情况。获得的纯化菌株接种在斜面培养基中,于4℃暂时保藏备用。

### 1.3 抑制海洋污损指示菌活性筛选

将已经纯化的90株细菌分别接种到含有改良LB海水液体培养基和MB海水液体培养基的三角瓶(250ml)中,用摇床振荡培养7d(28℃,140r/min)后,获得各个菌株发酵产物。采用超声波破碎菌体细胞,加入1倍量(体积比)的乙酸乙酯萃取发酵液。萃取液真空浓缩至少量后,转移至安培瓶中挥发至干,所得固形物即为供试样品。

采用纸片扩散法<sup>[5]</sup>测试供试样品对4种海洋污损指示菌香港洛克氏菌(*Loktanello hongkongensis*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscida*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的抑制活性。将28℃下培养24h的4种

指示菌菌株悬浮液分别加入已经灭菌处理的改良LB海水培养基和MA海水培养基平板中。将纸片分别置于改良LB海水培养基和MA海水培养基上,紧贴培养基。供试样品用DMSO溶解成10mg/ml。将5 $\mu$ l供试样品溶液加到灭菌滤纸片( $\Phi=6$ mm),以DMSO为空白对照,以利福平(0.2mg/ml)为阳性对照,每种菌做2个平行。30℃下培养48h后观察抑菌斑的大小(直径6~10mm为弱活性,10~15mm为中等活性,15mm以上为强活性)。

### 1.4 抗海洋污损生物幼虫附着活性筛选

测试样品抗华美盘管幼虫(*Hydroides elegans*)和藤壶(*Barnacle larvae*)幼虫附着活性。华美盘管虫幼虫的培养按照Qian和Pechenik的方法<sup>[6]</sup>,幼虫需要培养5d左右以达到附着测试前的状态。藤壶幼虫的培养按照Thiyagarajan等<sup>[7]</sup>的方法,在附着测试前,处于介虫状态的藤壶幼虫在8℃黑暗环境中放置4d。将具有抑制海洋污损指示菌生长的样品用无菌海水配制成1000 $\mu$ g/ml、500 $\mu$ g/ml、250 $\mu$ g/ml、125 $\mu$ g/ml、62.5 $\mu$ g/ml等5个浓度梯度。在聚苯乙烯24孔径板的每个孔中加入1ml配制好的测试样品和20个游动的华美盘管虫幼虫或藤壶幼虫,每个样品做4个平行,加有DMSO的无菌海水作为阴性对照。将配有测试样品的24孔径板放于28℃的培养箱中放置24h后,通过显微镜观察并逐个记录已附着在板壁上的幼虫个数、没有附着在板壁上的幼虫个数以及已死亡的幼虫个数。计算已附着在板壁上的幼虫个数占实验用的幼虫总个数的百分比,通过EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM Version 1.5软件计算抑制幼虫附着 $EC_{50}$ 。

### 1.5 相关可培养细菌种属鉴定

以待测菌株总DNA作为模板,用通用引物5'-AGAGTTTGATCC/ATGGCTCAG-3'和5'-AAG-GAGGTGATCCAGCC-3'进行聚合酶链式反应(PCR),扩增待测菌株的16S rRNA基因。扩增产物经纯化后,送至上海捷瑞生物工程有限公司测序。将所测得的基因序列在GenBank核酸序列数据库中进行同源序列搜索(Nucleotide-nucleotide Blast),进行序列比对,确定活性相关可培养细菌的系统发育地位。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离纯化得到的相关可培养细菌

从柳珊瑚 *Anthogorgia caerulea* 破碎后的组织匀浆中获得90株相关可培养细菌,以MA海水培养基和改良LB海水培养基分离得到的菌落最多,其形

态也较丰富,共获得 62 株细菌,占总数的 68.88%,而从另外两种培养基中分离得到菌落数量少,而且菌落形态较单一。

## 2.2 相关可培养细菌抑制海洋污损指示菌活性

测试获得的 90 株相关可培养细菌对 4 种海洋污损指示菌的抑制活性。结果显示,共有 49 株相关可培养细菌对 1 种或者几种海洋污损指示菌有抑制作用,占总测试菌株的 54.44%,其中只在改良 LB 海水培养基显示有抑制指示菌活性的菌株有 15 株,只在 MA 海水培养基显示有抑制指示菌活性的菌株有 23 株,在两种培养基上都显示有抑菌活性有 11 株(表 1,表 2)。综合考虑共生菌株的抑制指示菌能力和广谱性,选择菌株 GX11、GX13、GX 19、GX 34、GX 39、GX 49、GX 65、GX68、GX 79、GX 88、GX 89 用作抗海洋污损生物幼虫活性试验。

表 1 采用改良 LB 海水液体培养基发酵培养的相关可培养细菌抑制指示菌能力测试结果

Table 1 Antifouling activities of the bacteria associated with Gorgonian *Anthogorgia caerulea* cultured from improved LB sea agar

菌株 Strain	抑菌斑 Bacteriostatic spot(mm)			
	Lo*	Mi	Ps	Vi
GX3		6.8		6.8
GX5		7.2		
GX9		6.4		
GX17			6.2	
GX20			6.4	
GX 21		6.8		
GX 22			6.8	
GX 24		7.4		
GX 26	6.5			
GX 28		7.2	6.4	
GX 29	6.4			
GX 30				6.5
GX 34		8.6		
GX 41				6.4
GX 42				6.6
GX 51		7.5		
GX 52		6.4		
GX 55			7.0	
GX 57		6.4		
GX 65			8.0	
GX 68			8.2	
GX 71	7.8			
GX 74	7.5			
GX 75		7.2		
GX 76		7.0		
GX 88	8.4			

\* Lo:香港洛克氏菌 *Loktanella hongkongensis*, Mi:藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*, Ps: *Pseudoalteromonas piscida*, Vi: 哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*.

表 2 采用 MA 海水液体培养基发酵培养的相关可培养细菌抑制指示菌能力测试结果

Table 2 Antifouling activities of the bacteria associated with Gorgonian *Anthogorgia caerulea* cultured from marine agar 2216

菌株 Strain	抑菌斑 Bacteriostatic spot(mm)			
	Lo*	Mi	Ps	Vi
GX 6	6.6			
GX 8	6.4			
GX 11		9.0		
GX 12		7.8		
GX 13	8.2	7.6		
GX 15		8.0		
GX 17	8.6			
GX 18			7.0	
GX 19	11.0			
GX 20				
GX 21		7.4		
GX 22		7.8		
GX 23		6.8		
GX 29	6.4			
GX 30		6.4		
GX 31		6.4	6.8	
GX 36		6.2		
GX 39	7.0			
GX 45	7.6			
GX 48	7.2			
GX 49			8.2	
GX 51		7.6		
GX 52		7.0	7.2	
GX 58	6.8			6.2
GX 62		6.4		
GX 64			7.6	
GX 68		6.4		
GX 71	6.4	6.4		
GX 75				6.6
GX 77		7.2		
GX 79	8.0			
GX 82		6.6		
GX 89	8.0	8.0	8.0	
GX 90		7.4		

\* Lo:香港洛克氏菌 *Loktanella hongkongensis*, Mi:藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*, Ps: *Pseudoalteromonas piscida*, Vi: 哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*.

## 2.3 相关可培养细菌抗海洋污损生物幼虫附着活性

共生菌株 GX11、GX 34、GX 39、GX 49、GX 79、GX 88、GX 89 发酵液的乙酸乙酯萃取物对华美盘管虫幼虫的附着表现出潜在活性,  $EC_{50}$  分别为 263.34 $\mu$ g/ml, 176.48 $\mu$ g/ml, 419.43 $\mu$ g/ml, 340.83

$\mu\text{g/ml}$ , 403.76 $\mu\text{g/ml}$ , 79.46 $\mu\text{g/ml}$ , 372.17 $\mu\text{g/ml}$ 。共生菌株 GX13、GX 19、GX 65、GX68 在实验浓度范围内,没有显示出抗华美盘管幼虫活性。共生菌株 GX11、GX13、GX 34、GX 65、GX68、GX 79、GX 88、GX 89 发酵液的乙酸乙酯萃取物对藤壶幼虫附着表现出潜在活性,  $EC_{50}$  分别为 472.47 $\mu\text{g/ml}$ , 328.39 $\mu\text{g/ml}$ , 492.64 $\mu\text{g/ml}$ , 184.59 $\mu\text{g/ml}$ , 371.47 $\mu\text{g/ml}$ , 430.69 $\mu\text{g/ml}$ , 364.64 $\mu\text{g/ml}$ , 489.23 $\mu\text{g/ml}$ 。共生菌株 GX19、GX 39、GX 49 在实验浓度范围内,没有显示出抗藤壶幼虫附着活性。

#### 2.4 相关可培养细菌的系统发育地位

进行序列比对,确定共生菌株 GX11、GX34、GX79、GX88、GX89 都属于芽胞杆菌属(*Bacillus*),其系统发育地位分别为 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. amyloliquefaciens* subsp.。

### 3 结论

采用 4 种不同培养基,对柳珊瑚中可培养共生细菌进行分离纯化,共得到 90 株相关可培养细菌。以 4 株海洋污损菌为指示菌,采用纸片扩散法对 90 株可培养共生细菌进行抑制海洋污损菌活性筛选,发现 11 株细菌有较好的抑制指示菌活性和广谱性。采用 2 种海洋污损生物幼虫对 11 株活性细菌进行活性复筛,结果表明共有 5 株共生细菌对 2 种幼虫附着有抑制活性。提取这 5 株活性菌株 16S rRNA 基因序列,通过序列比对分析确定其系统发育地位为芽胞杆菌属。

#### 参考文献:

- [1] Gnanambal K, Mary E, Chellaram C, et al. Isolation of antagonistic marine bacteria from the surface of the gorgonian corals at Tuticorin, south east coast of India[J]. Indian J Mar Sci, 2005, 34(4): 316-319.
- [2] Ocky K R, Agus S. Screening of secondary metabolite producing bacteria associated with corals using 16S rDNA-based approach[J]. J Coast Dev, 2003, 7(1): 11-19.
- [3] Ocky K R, Torben M, Hans-Peter G, et al. Antibacterial property of a coral-associated bacterium *Pseudoalteromonas Luteoviolacea* against shrimp pathogenic *Vibrio Harveyi* [J]. J Coast Dev, 2004, 7(3): 169-177.
- [4] Gao C H, Tian X P, Qi S H, et al. Antibacterial and anti-larval compounds from marine gorgonian-associated bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350T [J]. J Antibiot, 2010, 63(4): 191-193.
- [5] Acar J F. The disc susceptibility test [M]//Lorian V (ed). Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980: 24-54.
- [6] Miao L, Qian P Y. Antagonistic antimicrobial activity of marine fungi and bacteria isolated from marine biofilm and seawaters of Hong Kong [J]. Aquat Microb Ecol, 2005, 38: 231-238.
- [7] Thiyagarajan V, Harder T, Qian P Y. Relationship between the energy reserve of cyprids and metamorphosis in the barnacle *Balanus amphitrites* Darwin (Cirripedia: Thoracica) [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2002, 280: 79-93.

(责任编辑:陈小玲 邓大玉)