

文章编号 1000-5013(2006)03-0307-03

海洋真菌 *Aspergillus* sp. MF134 的抗菌特性

陈碧娥 张思梨

(华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

摘要 采用固体发酵和液体摇瓶震荡培养两种培养方法获得丝状真菌 *Aspergillus* sp. MF134 培养物,并从中提取活性物质.应用纸片扩散法和比浊法测定提取物的抑菌作用,探讨 MF134 菌的抗菌活性及影响因素.实验结果表明,该菌固体培养物的提取物对枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)和白色假丝酵母(*Candida albicans*)有明显的抑制作用.其抗菌活性产物主要在孢子形成时产生的,而且与海水的存在有关,海水培养物所产生的抗菌活性高于淡水培养物.

关键词 海洋真菌, 抗菌活性, 海洋曲霉, 代谢产物

中图分类号 Q 178.53; Q 949.325; Q 949.331

文献标识码 A

近期的研究表明,海洋真菌是新的、具有生物活性的天然产物的重要来源.据估计,海洋真菌至少有 1 500 种^[1],但只有一部分种属被描述过,主要是丝状子囊菌(*Filamentous ascomycetes*)和半知菌类(*Fungi imperfecti*),其中以青霉菌和曲霉菌居多.曲霉菌广泛地分布在陆地和水生的环境中.海洋中的浮木、海水,以及珊瑚、海绵、海藻、贝类、海鱼等海洋的动植物均有曲霉存在.目前在海洋曲霉菌中已发现了许多重要的代谢产物,如新的神经营养聚合物^[2]、酶^[3]、酶的抑制剂^[4],以及抗肿瘤和抗菌的活性物质^[5]等.已有报道的内容主要涉及分离菌的分布及代谢产物的结构.实际上,海洋真菌具有不同的生长特性并影响其活性物质的产生,这是值得关注的问题.本文报道从福建湄洲湾海域的水样中分离的曲霉 MF134 菌的生长特性及抑菌作用,探讨与抗菌活性相关的因素.

1 材料与方法

1.1 菌种

Aspergillus sp. MF134(简称 MF134),取自福建湄洲湾海域的水样经分离而得.根据显微镜下观察到的形态特征,鉴定为曲霉菌.

1.2 培养基及培养方法

1.2.1 斜面培养基 斜面培养基为海水 PDA 培养基.斜面培养 25℃,5~6 d.本实验所用海水均为天然海水,取自福建惠安海域.海水经过滤后,测定其含盐量,并用未经加工的粗海盐将其质量分数调为 3.5%,避光保存.

1.2.2 液体摇瓶培养基 20 g 葡萄糖,1 g 蛋白胨,1 g KH_2PO_4 ,1 L 海水,pH 值自然.摇瓶培养为 500 mL,三角瓶装量 150 mL,温度 25℃,转速 150 r·min⁻¹,培养时间 5~6 d.

1.2.3 固体培养基 700 g 麸皮,200 g 米糠,100 g 大麦芽粉,1 L 海水,pH 值自然.培养方法:500 mL 三角瓶装 60 g 固体培养基,将斜面孢子用无菌水洗下,制成孢子悬浮液.接种量为每瓶接 2 mL 菌液(含菌数每毫升约为 10⁸ 个),25℃ 恒温静置 7 d.

1.3 分析测定方法

1.3.1 生物量的测定 培养液过滤后,将所得菌体用蒸馏水洗涤 2~3 次,真空抽滤去除水分,置 55

收稿日期 2006-01-18

作者简介 陈碧娥(1946-),女,教授,主要从事应用微生物的研究. E-mail:jfzhang@hqu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(20272015)

~ 65 真空干燥箱烘干至恒重.

1.3.2 抗菌活性的测定 (1) 产物的提取. 液体培养所得的干菌体或固体培养物用甲醇浸泡 7 d 后, 蒸馏得提取物. 液体培养所得的滤液用 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{氯仿}) : V(\text{甲醇}) = 3 : 2 : 1$ 的溶液萃取后, 蒸馏得提取物. (2) 抗菌作用的测定. (a) 纸片扩散^[6]法. 纸片 $\varnothing 6 \text{ mm}$, 以 *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* 作为指示菌, 在指示菌适宜的温度下培养 24 h, 观察是否有抑菌圈出现. (b) 比浊法^[7]. 比较添加提取物与对照物(未添加提取物)的指示菌的浊度(OD_{620}), 具抗性的样品能抑制被测菌超过对照菌的 80 %.

2 结果与讨论

2.1 MF134 菌的形态特征及生长特性

在 PDA 培养基上, 25 培养 5 d, MF134 的菌落大小 \varnothing 为 6 ~ 8 mm, 菌丝为白色, 孢子蓝绿色. MF134 菌在温度 20 ~ 30 下生长良好, 海水盐的质量分数在 3.5 % ~ 10.0 % 内均可生长, 最适生长盐的质量分数为 5.0 %. 液体摇瓶静置培养在液面形成菌膜, 而震荡培养形成菌丝球, 菌丝球的大小与碳源有关. 以葡萄糖为碳源, 菌丝球大小 \varnothing 约为 5 mm. 液体摇瓶培养在海水及淡水均能生长, 并形成孢子, 但生长及代谢过程不同. 图 1 为 MF134 在海水及淡水培养基摇瓶震荡培养的生长曲线. 从图 1 可看出, 在海水培养基 MF134 菌停滞期较短, 进入对数生长期后, 72 h 即可达到最高的生物量(M), 而在淡水培养基, 停滞期较长, 96 h 才达到最高的生物量, 且生物量低于前者.

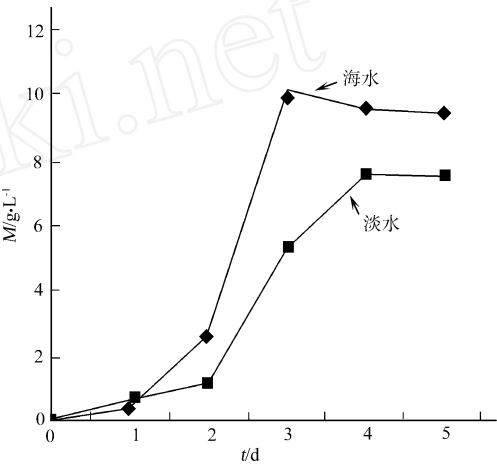


图 1 MF134 菌在海水及淡水的生长曲线

2.2 不同生长条件对抑菌作用的影响

分别用海水和淡水配制麸皮固体培养基, 在同样的接种量及培养条件下, 培养 7 d. 培养物的提取物用丙酮及无菌水溶解后, 用纸片扩散法测定 MF134 菌的抗菌特性. 提取物的水溶液对指示菌无抑菌作用. 提取物的丙酮溶液的抑菌作用, 如表 1, 图 2 所示. 从表 1

表 1 海水与淡水固体培养物的抑菌作用比较

指示菌	抑菌圈 \varnothing mm	
	海水培养物	淡水培养物
<i>B. subtilis</i>	16 ~ 17	8 ~ 9
<i>S. aureus</i>	-	-
<i>E. coli</i>	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-

可以看出, MF134 菌的海水固体培养物对革兰氏阳性菌 *B. subtilis* 的抑菌作用, 明显比淡水中的固体培养物强, 海水中的微量元素及其他成分不仅影响了海洋真菌的生长, 也影响其抗菌活性.

2.3 抗菌活性产物的产生与细胞分化的相关性

MF134 菌液体摇瓶震荡培养的干菌体提取物及培养液的萃取物, 分别用纸片扩散法测定它们对 4 种指示菌的抑菌作用, 结果均呈阴性反应. 比较液体培养物与固体培养物的差异, 固体培养基的组分较复杂, 可能含有某种诱导成分, 而且固体培养物兼有胞内和胞外的产物. 但更明显的一个区别是, 在液体培养基中, MF134 菌主要以菌丝球的状态存在, 仅有少量孢子形成; 而在麸皮固体培养基, MF134 菌的菌丝几乎完全分化为孢子, 其培养物主要是孢子, 代谢产物的产生与细胞的分化具有相关性. MF134 菌的具抗菌活性的代谢产物, 主要在孢子形成时产生而不是在营养菌丝阶段产生.

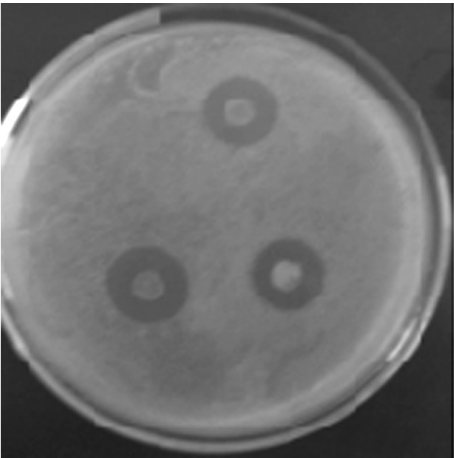


图 2 MF134 菌的海水培养物对 *B. subtilis* 的抑制作用

2.4 测定方法对抑菌作用实验结果的影响

采用比浊法测定 MF134 菌麸皮固体培养物提取物的抑菌作用. 由于枯草杆菌在液体培养基的表面呈膜状生长,不适合用比浊法测定,因此只以 *S. aureus*, *E. coli* 和 *C. albicans* 为指示菌. 测定结果,该提取物对 *S. aureus* 及 *E. coli* 无抑菌作用,而对 *C. albicans* 有明显的抑制作用. 纸片扩散法是测定抑菌作用的常用方法,但其灵敏度较低,因此未能测出对 *C. albicans* 的抑菌作用. 海洋微生物具有代谢产物多样,但含量低的特点,为筛选具抗菌活性的菌株,须采用多种测定方法相结合的策略. OD₆₂₀ 法操作简便,具有较高的灵敏度,但只能以在液体培养基能呈浊状生长的微生物为指示菌.

3 结束语

海洋真菌 MF134 既能在海水,也能在淡水生长、繁殖,形成无性孢子,但它更适合海水的生长环境. 在海水的环境,不仅有较高的生物量,而且具有较强的抗菌活性. 在适当的培养条件下, MF134 菌所产生的具有生物活性的物质,对革兰氏阳性细菌和真菌有明显的抑制作用. 根据生态学的观点,抗生素的生物合成是海洋真菌与其他微生物进行生存斗争所用的化学防护手段. 微生物通常会改变其形态来应答环境的改变,因此不难理解抗菌活性物质的产生与细胞的分化有关. 与陆地真菌相比,人类对海洋真菌的认识较晚,对于抗菌物质产生的诱导机制及影响因素仍然知之甚少. 研究海洋真菌的代谢产物,不仅有利于新药的开发,也有助于了解和认识真菌.

参 考 文 献

- 1 林永成,周世宁. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京:化学工业出版社,2003. 224~225
- 2 Tsukamoto S, Miura S, Yamashita Y, et al. Aspermytin A: A new neurotrophic polyketide isolated from a marine-derived fungus of genus *Aspergillus*[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter, 2004, (14): 417~420
- 3 Frolova G M, Sil'cheko A S, Pivkin M V, et al. Amylases of the fungus *Aspergillus flavipes* associated with *Fucus evanescens*[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2002, 38(2): 134~138
- 4 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]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letter, 2005, (15): 191~194
- 5 Afiyatullo S S, Kalinovskii A I, Pivkin M V, et al. Fumitremorgins from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2004, 40(6): 615~617
- 6 马绪荣,苏德模. 药品微生物检验手册[M]. 北京:科学出版社,2001. 215
- 7 Sponga F, Cavaletti L, Lazzarini A, et al. Biodiversity and potentials of marine-derived micro-organisms[J]. Journal of Biotechnology, 1999, (70): 65~69

Antimicrobial Characteristics of Marine Fungi

Aspergillus sp. MF134

Chen Bi e Zhang Sili

(College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, 362021, Quanzhou, China)

Abstract Strain *Aspergillus sp.* MF134 was a facultative marine fungi isolated from a brine sample from Meizhou bay. In order to search the antimicrobial characteristics of strain MF134 and the factors affected it, two different methods, solid fermentation and liquid shake culture, were used. The cultures were extracted by organic solvents, and its antibiotic activity was assayed by paper diffusing method and turbidimetry. The result showed that the extracts of solid fermentation cultures had obvious inhibiting action on both *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. The antibiotic substances were produced while spores formed and the antibiotic activity was influenced by the existence of brine. The extracts of brine cultures had a higher antibiotic activity than that of flash water cultures. Choosing a suitable method for measuring antibiotic action was essential to know the characteristics of marine fungi.

Key words marine fungi, antibiotic activity, marine aspergillus, metabolite