

文章编号: 1000-5013(2008)04-0567-04

# 一株(海洋)头孢菌的培养条件及抑菌活性实验

蔡婀娜, 黄惠莉

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 对福建崇武海域的生物共生及附生微生物进行筛选分离, 得到一株具有一定抗菌活性的海洋真菌 S9. 通过对海洋真菌 S9 的生理特性测定和发酵培养, 研究该海洋真菌的生长周期及各种参数之间的关系. 正交实验表明, 海洋真菌 S9 的最佳发酵方案: 蔗糖  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 蛋白胨  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值为 6.5, 发酵时间为 10 d. 抑菌性能检测表明, 发酵液对白色念珠菌有一定的抑制作用.

**关键词:** 海洋真菌; 抑菌活性; 分离纯化; 发酵培养; 生理生化特性

**中图分类号:** Q 93.3

**文献标识码:** A

在过去的半个多世纪里, 陆地动物、植物和微生物是新抗生素的主要来源. 随着对陆地生物研究的不断深入, 从陆地生物中发现新的抗生素的机会将大大减小, 所以科学家们将开发新的抗生素来源放在尚未完全开发的海洋生物上, 特别是海洋微生物上. 海洋微生物不仅种类繁多, 而且生存环境独特, 导致生物代谢过程各不相同. 海洋中的天然产物与陆地上的天然产物具有很大差异, 其中有大量结构独特的化合物, 是巨大的潜在药物资源, 具有广阔的开发应用前景. 近几年来, 从海洋中寻找微生物新种和具有特殊功能的生理活性物质, 已成为国内外的研究热点<sup>[1-6]</sup>. 本文采用分离纯化技术获得一株具有一定抑菌活性的海洋真菌, 并对该菌株的抑菌性能进行初步鉴定. 通过对该菌的一些基本特性、培养条件进行初步研究, 以期获得具有较高抗菌活性的物质.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌种 福建泉州崇武海滩的海泥、贝壳、海螺及其附着物中分离得到的海洋真菌. 供试菌为大肠杆菌、金黄葡萄球菌、白色念珠菌.

1.1.2 培养基的制备 (1) 马丁培养基: 10 g 葡萄糖, 5 g 蛋白胨, 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15~20 g 琼脂, pH 值自然, 1 L 海水, 121 灭菌 30 min. (2) 查氏培养基: 2 g  $\text{NaNO}_3$ , 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g  $\text{KCl}$ , 0.5 g  $\text{MgSO}_4$ , 0.01 g  $\text{FeSO}_4$ , 30 g 蔗糖, 1 L 海水, pH 值自然, 121 灭菌 20 min. (3) 种子培养基: 40 g 可溶性淀粉, 5 g 葡萄糖, 3 g 蛋白胨, 1 L 海水. (4) 发酵培养基: 200 g 马铃薯, 3 g 蛋白胨, 1 g 酵母粉, 5 g 葡萄糖, 1 L 海水.

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选 采用平板分离法进行初筛和复筛, 得到相对比较纯的菌落.

1.2.2 抑菌实验 取离心后的发酵液 10 mL, 加入已配制好的查氏培养基 90 mL, 倒平板. 待凝固后, 将大肠杆菌、金黄葡萄球菌和白色念珠菌分别稀释为  $10^{-5}$  和  $10^{-6}$ , 接入平板, 放置在 25, 37 培养箱中分别培养 48 h, 观察其抑菌情况.

1.2.3 参数测定 菌体干质量的测定采用恒重法. 蛋白质质量浓度的测定采用考马斯亮兰法<sup>[7]</sup>. 葡萄糖质量浓度的测定采用<sup>[8]</sup> DNS(3,5-二硝基水杨酸) 试剂法.

收稿日期: 2008-01-28

作者简介: 蔡婀娜(1962-), 女, 实验师, 主要从事生化分离技术的研究. E-mail: ana@hqu.edu.cn.

基金项目: 泉州市科技计划项目(2007N03)

2 结果与讨论

2.1 海洋真菌的生理生化特性

2.1.1 形态观察 采用稀释方法,按不同稀释度分别涂布于平板培养基上培养.经过初筛复筛后,得到 27 种不同形态的菌种,再经过多次菌落挑选与分离纯化,得到 3 种较纯菌落,保存于冰箱.其中,菌株 S9 开始呈白色,成熟后菌落外观呈圆形状,中心部分呈黄绿色,边缘整齐,气生菌丝发达,中心部分突起.通过形态观察和比对,可以清晰地看到菌丝和孢子,初步确定其为半知菌纲,丛梗孢目,丛梗孢科,头孢霉属的产黄头孢菌(*Cephalosporinm chrysogenum*).在显微镜下观察形态,如图 1 所示.

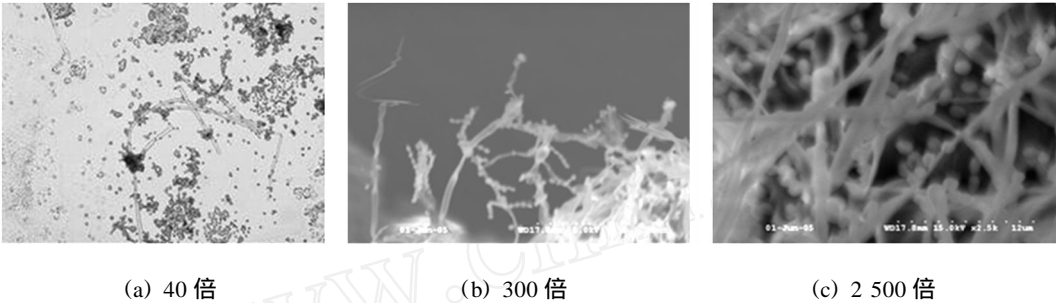


图 1 海洋真菌 S9 的显微镜形态  
Fig. 1 The microscope image of marine fungal S9

2.1.2 生理生化特性 对海洋真菌 S9 进行生理生化特性测试,实验结果如表 1 所示.从表 1 可知,海洋真菌 S9 能利用葡萄糖、果糖和乳糖进行发酵,在分解葡萄糖的过程中产生大量酸性物质,使培养基 pH 值下降至 4.5 以下,甲基红指示剂变红.该海洋真菌没有产生淀粉酶的能力,在强碱环境下没有被空气中的氧氧化为二乙酰(二乙酰与蛋白胨中的胍基生成红色化合物).它不能产生明胶酶(类蛋白水解酶),不能将明胶先水解为多肽,再进一步水解为氨基酸,未失去凝胶性质而液化.该海洋真菌没有产生尿素水解酶,不能将培养基中的尿素水解产生碱性物质(碳酸铵),不能分解培养基中的含硫氨基酸或含硫化合物而产生硫化氢气体.

2.2 发酵过程的影响因素

在不同发酵时间内,对海洋真菌 S9 进行发酵培养,分别测定发酵液的蛋白质质量浓度、葡萄糖质量浓度、pH 值、细胞干质量浓度,以及代谢物抑菌性能对发酵过程的影响,如图 2 所示.

(1) pH 值.从图 2(a)中可看出,pH 值的变化在第 2 天有 1 个最低点出现,然后呈持续增长趋势,发酵过程为产碱过程.

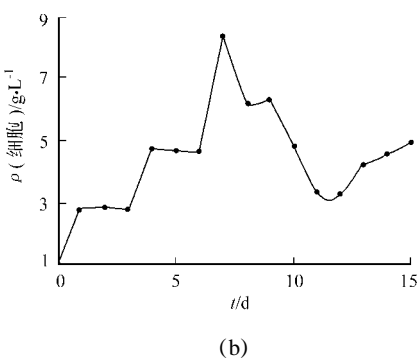
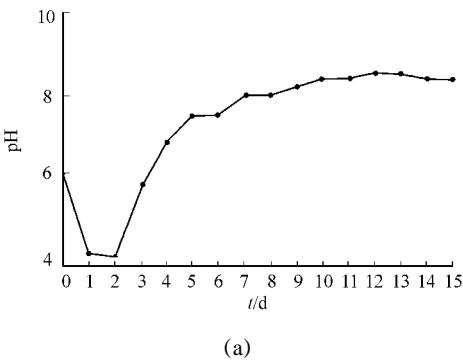
(2) 细胞干质量浓度.从图 2(b)中可看出,细胞干质量浓度的最高峰出现在第 7 d 左右,然后开始下降.这表明在菌体生长达到最高峰后进入平衡期,持续几天的稳定期生长后进入衰退期,细胞干质量浓度下降.

表 1 海洋真菌 S9 生理生化特性

Tab. 1 The physiology and biochemistry characteristic of marine fungal S9

测试项目		结果
糖酵解试验 (有气泡产生)	葡萄糖	+
	果糖	+
	乳糖	+
淀粉水解试验		-
乙酰甲酯甲醇试验		-
甲基红试验		+
明胶液化试验		-
尿素酶试验		-
硫化氢试验		-
三糖铁琼脂试验		-

注: + 表示阳性, - 表示阴性



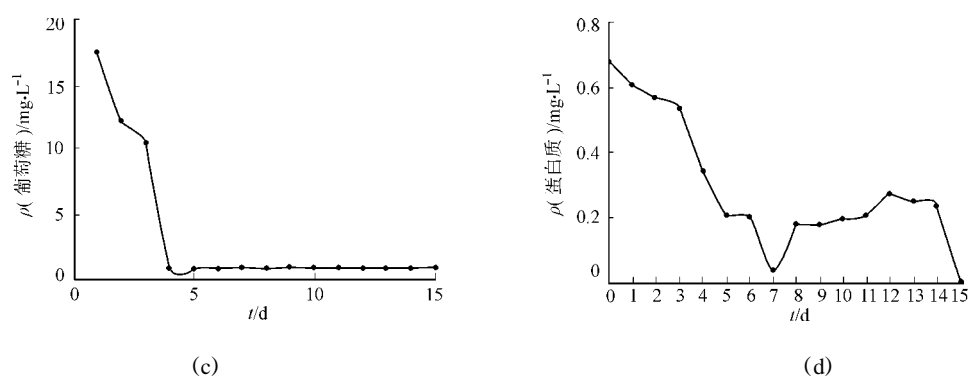


图 2 海洋真菌 S9 发酵过程中参数变化

Fig. 2 The parameter change in fermentation process of marine fungal S9

(3) 葡萄糖的质量浓度. 从图 2(c) 中可看出, 在海洋真菌的发酵过程中, 该菌种在前 4 d 大量繁殖, 已经把葡萄糖耗尽, 而且发酵过程并不产糖, 代谢物中也不含有单糖成分.

(4) 蛋白质的质量浓度. 从图 2(d) 中可看出, 随着真菌细胞生长, 发酵液蛋白质质量浓度逐渐降低, 最低点出现在第 7 d 的时候. 此时海洋真菌细胞开始大量繁殖, 营养耗尽. 从第 8 d 开始蛋白质的质量浓度有所增加, 初步认为海洋真菌的次生代谢物为蛋白质类物质.

2.3 正交试验

表 2 为正交实验因素水平表. 表 2 中, A 为碳源(质量浓度为  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), B 为氮源(蛋白胨,  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), C 为 pH 值, D 为时间(d), 培养条件为  $25^\circ\text{C}$ , 往复摇床转速为  $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ . 以发酵液中蛋白质含量( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )作为参考指标, 正交实验结果如表 3 所示.

表 2  $L_9(3^4)$  因素水平表

Tab. 2 The table of  $L_9(3^4)$

factor and level				
水平	A	B	pH	t/d
1	葡萄糖	1.25	5.0	8
2	乳糖	1.50	6.5	10
3	蔗糖	1.75	8.0	12

从表 3 可以看出, D 的  $R$  值最大, 说明时间对蛋白质的产生影响最大. 因此, 最适宜的实验条件: 蔗糖质量浓度为  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 蛋白胨质量浓度为  $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 值为 6.5, 发酵时间为 10 d. 在此条件下, 更有利于海洋真菌次生代谢物的产生.

表 3 正交实验结果

Tab. 3 The result of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	(蛋白质)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	pH	(葡萄糖)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	1	1	1	1	0.18	7.98	0.98
2	1	2	2	2	0.23	8.32	0.98
3	1	3	3	3	0.17	8.73	1.49
4	2	1	2	3	0.18	8.45	1.65
5	2	2	3	1	0.21	8.07	4.83
6	2	3	1	2	0.24	8.28	1.22
7	3	1	3	2	0.23	8.26	0.93
8	3	2	1	3	0.22	8.54	1.24
9	3	3	2	1	0.22	8.22	0.93
$K_1$	0.58	0.59	0.63	0.60			
$K_2$	0.63	0.66	0.63	0.70			
$K_3$	0.67	0.62	0.61	0.57			
$R$	0.03	0.03	0.01	0.04			

2.4 次生代谢产物的抑菌性能

(1) 以大肠杆菌、金黄葡萄球菌为供试菌, 观测其抑菌实验结果, 发现真菌次生代谢产物对大肠杆菌、金黄葡萄球菌没有产生抑菌性能. (2) 以白色念珠菌为供试菌, 取离心后的发酵液 10 mL, 加入已配制好的查氏培养基 90 mL, 倒平板. 待凝固后以  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  稀释度接种白色念珠菌, 放置在  $25^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$  培养箱中培养 48 h 后观察到其有抑菌作用, 如图 3 所示. 由图 3 可见, 在添加发酵液的平板上, 菌落数比未添加发酵液的平板上的菌落数少许多. 说明发酵液对白色念珠菌有一定的抑制作用, 该株海洋真菌可

(a) 空白的  $10^{-5}$  菌落数(b) 添加发酵液的  $10^{-5}$  菌落数(c) 添加发酵液的  $10^{-6}$  菌落数

图 3 次生代谢产物的抑菌性能

Fig. 3 The antagonistic capability of fungal secondary metabolites

以产生抑制真菌的活性物质.

### 3 结束语

从海洋生物中分离纯化得到一株海洋真菌 S9,通过生理特性测定及抑菌性能研究表明,在一定条件下具有抑制白色念珠菌的作用. 其次生代谢物的分析鉴定有待于进一步的研究.

#### 参考文献:

- [1] 郝树站,王素英. 海洋微生物生物活性物质的研究进展[J]. 生命科学研究, 2005, 7(1): 68-70.
- [2] 肖建球. 海洋微生物代谢物抗肿瘤活性的研究进展[J]. 中医药导报, 2005, 11(7): 95-96.
- [3] 梁剑光,王晓飞,陈义勇,等. 海洋真菌及其活性代谢产物研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(4): 1-3.
- [4] 廖文斌,鲍时翔. 红树林放线菌产抗菌活性物质的分离纯化研究[J]. 药物生物技术, 2004, 11(6): 376-380.
- [5] CHANDRALATA R, SESHAGIRI R, SHEELU G, et al. Buried in time: Culturable fungi in a deep-sea sediment core from the Chagos Trench, Indian Ocean[J]. Oceanographic Research Papers, 2004, 51(11): 1759-1768.
- [6] 陈碧娥,张思梨. 海洋真菌 *Aspergillus sp.* MF134 的抗菌特性[J]. 华侨大学学报:自然科学版, 2006, 27(3): 307-309.
- [7] 江南,吴开力,黄强. 一种简便的考马斯亮蓝 G250 蛋白质染色方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 560-561.
- [8] 李华,刘开启,王革. 利用还原糖法测定木霉菌产几丁质酶特性[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2003, 16(1): 19-22.

## The Studies on Cultural Condition and Antagonistic Activity of a Marine Fungus

CAI E-na, HUANG Hui-li

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

**Abstract:** The symbiotic microorganisms fungus S9 was isolated using different cultural medium from marine organisms in Chongwu Sea. Its physiological characters and relation between fermentation conditions and growth period were studied. The experimental results show the optimum condition for the fermentation of the obtained marine fungal: concentration of sucrose is  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , concentration of peptone is  $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH = 6.5, fermentation time is 10 d. Fungal secondary metabolites have antagonistic activity on fungal growth.

**Keywords:** marine fungus; antagonistic activity; separate and purification; fermentation conditions; physiology characteristic

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 陈国华)