

海绵 *Pseudoceratina* sp. 共栖细菌多样性及其抑制甘蔗鞭黑粉菌活性研究 *

Diversity of Sponge - Derived Bacteria Isolated from *Pseudoceratina* sp. against *Sporisorium scitamineum* in vitro

李 菲¹,黄庶识¹,王 伟²,江 蕾³,米顺利¹,余 炼^{2**}

LI Fei¹,HUANG Shushi¹,WANG Wei²,JIANG Lei³,MI Shunli¹,YU Lian²

(1. 广西科学院广西海洋天然产物与组合生物合成化学重点实验室培育基地,广西南宁 530007;2. 广西大学轻工与食品工程学院,广西南宁 530004;3. 广西民族大学海洋与生物技术学院,广西南宁 530006)

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Natural Products and Combinatorial Biosynthesis Chemistry, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 3. School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi, 530006, China)

摘要:【目的】探讨广西斜阳岛附近海域海绵共附生细菌的多样性,并筛选对甘蔗鞭黑粉菌有抑制作用的活性物质,为发现潜在的细菌新物种及开发农用生防菌肥奠定基础。【方法】采用稀释涂布法,通过6种复合营养分离培养基,从海绵 *Pseudoceratina* sp. 中分离可培养的共附生细菌。采取细菌形态学观察去除冗余,通过PCR扩增菌株的16S rRNA基因序列,并通过构建系统发育树分析物种多样性。采用牛津杯法进行抑制甘蔗鞭黑粉菌活性筛选实验。【结果】从海绵 *Pseudoceratina* sp. 中共分离到可培养细菌54株,经16S rRNA基因序列对比后,获得24株细菌,隶属于13科14属。其中,菌株BGMRC 2118与已发表有效菌株的16S rRNA基因序列的最高相似率为96.46%,可能为潜在新种。抑菌筛选实验结果显示,有8株细菌的发酵粗提物对甘蔗鞭黑粉菌具有很强的抑菌活性。【结论】广西斜阳岛附近海域中海绵共附生细菌具有较高的物种多样性,蕴藏着丰富的新物种资源,富含生物活性菌株。

关键词:海绵 共附生细菌 物种多样性 甘蔗鞭黑粉菌 抑菌活性

中图分类号:Q939.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)01-0087-07

Abstract:【Objective】The purpose of this study is to investigate the diversity of sponge-derived bacteria of *Pseudoceratina* sp. near the sea area of Xieyang Island in Guangxi and to screen for the active substances that inhibit the growth of *Sporisorium scitamineum* and lay the foundation for the discovery of potential bacterial new species and the development of agricultural biochemical fertilizer.【Methods】Using dilution coating method the sponge-derived bacteria were isolated from *Pseudoceratina* sp. through six different isolation media. The bacterial morphological observation was used to remove the redundancy. The 16S rRNA gene sequence of the strain was amplified by PCR, and the species diversity was analyzed by constructing a phylogenetic tree. The Oxford Cup method was used to the screening experiment of inhibiting the activity of *Sporisorium scitamineum*.【Results】54 strains of cultivable bacteria were isolated from *Pseudoceratina* sp., and after 16S rRNA gene

收稿日期:2017-11-27

修回日期:2018-01-03

作者简介:李 菲(1988—),女,助理研究员,主要从事海洋微生物多样性及活性研究。

* 广西科技计划项目(AD17129019),广西青年科学基金项目(2016GXNSFBA380095)和广西科技计划项目(AB16380071)资助。

** 通信作者:余 炼(1971—),女,讲师,主要从事海洋食品及微生物的分离、结构鉴定、生物活性分析及次生代谢产物等研究, E-mail:Lianyu@gxu.edu.cn.

isolated from *Pseudoceratina* sp. through six different isolation media. The bacterial morphological observation was used to remove the redundancy. The 16S rRNA gene sequence of the strain was amplified by PCR, and the species diversity was analyzed by constructing a phylogenetic tree. The Oxford Cup method was used to the screening experiment of inhibiting the activity of *Sporisorium scitamineum*.【Results】54 strains of cultivable bacteria were isolated from *Pseudoceratina* sp., and after 16S rRNA gene

sequence comparison, 24 strains of bacteria were obtained, belonging to 13 families and 14 genera. Among them, the highest similarity rate of strain BGMRC 2118 to the 16S rRNA gene sequence of the published effective strain was 96.46%, which might be a potential new species. Anti-bacterial screening experiments showed that the crude fermentation extracts of 8 strains had a strong inhibition effect against *S. scitamineum*. **【Conclusion】**The sponge-derived bacteria of *Pseudoceratina* sp. near the sea area of Xieyang Island in Guangxi had high genetic diversity, rich in new species resources and rich in bioactive strains.

Key words: *Pseudoceratina* sp., sponge-derived bacteria, genetic diversity, *Sporisorium scitamineum*, antibacterial activities

0 引言

【研究意义】海绵是一类多细胞无脊椎动物,以固着方式生活在海底。在生存竞争激烈的海底环境中,海绵缺乏有效的物理防御却能经久不衰,这一现象引起人们对海绵体内存在的极强生理活性物质的广泛关注^[1]。研究发现,海绵通过集聚或分泌多种具有抵御性或是毒害性的次级代谢产物来保护自身种群的生存,其产生的活性物质数量远超过其他海洋生物来源的活性物质,是目前发现活性物质最多的海洋生物^[2]。然而,海绵等海洋软体生物资源的过量捕捞,造成了海洋生态平衡严重破坏。越来越多的研究证实,某些来源于海绵的活性物质实际上是由其共附生微生物代谢产生的^[3-4]。因此,研究海绵共附生细菌多样性,挖掘其潜在的应用价值具有重要意义。**【前人研究进展】**目前,已从海绵共附生微生物中发现的多个结构新颖、活性显著的次级代谢产物,具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗污损、抗炎、生物毒、细胞毒和酶抑制剂等生物活性^[5-8]。如从海绵 *Xestospongia testudinaria* 共附生真菌 *Aspergillus* sp. 中分离获得 2 个新的倍半萜二聚体类化合物 disydonols A 和 C,对 HepG 2 和 Caski 癌细胞均有细胞毒活性^[9]。从叶片山海绵上分离到 2 株具有显著抑制翡翠贻贝足丝分泌和 5 株具有显著抗污损活性的菌株^[10]。**【本研究切入点】**广西斜阳岛海域地处亚热带,海底富含各式各样的海绵、珊瑚、海兔等海洋软体生物。目前,探讨该地区海绵 *Pseudoceratina* sp. 中可培养共附生细菌的分离、物种多样性及其生物活性的研究鲜见报道。**【拟解决的关键问题】**本文系统地研究广西斜阳岛海域海绵 *Pseudoceratina* sp. 的共附生细菌多样性,并展开其次级代谢产物对甘蔗鞭黑粉菌的活性筛选,旨在丰富海绵 *Pseudoceratina* sp. 共附生细菌的资源,为开发农用生防菌肥提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源

海绵 *Pseudoceratina* sp. 于 2016 年 6 月采自广

西北海市斜阳岛附近海域,水深约 10 m。样品采集后,立即装入无菌袋,并暂存于冰盒,带回实验室后于 4℃ 冷藏备用。

1.1.2 主要试剂和仪器

培养基原料、TAE 缓冲液、2×EasyTaq Super-Mix、引物(27f 和 1492r)、DNA Marker、GoldView 核酸染料等购自北京康为世纪生物科技有限公司, Chelex-100 树脂购自美国 BioRad 公司,其他有机试剂均为国产分析纯试剂。

SW-CJ-2F 型超净工作台(杭州佳滤设备有限公司), HH.B11-BS-II 型恒温培养箱(东莞市恒宇仪器有限公司), 恒温振荡器(美国 CRYSTAL), VB-55 型高压灭菌锅(德国 SYSTEC), MINIB-100 型金属浴(杭州米欧仪器有限公司), MINI-6k 型迷你离心机(常州市国旺仪器制造有限公司), Tgradient 型 PCR 扩增仪(德国 Biometra), 电泳仪(美国 BioRad), N1000 型旋转蒸发器(日本 EYELA), 凝胶成像仪(Carestream), VCX750 细胞破碎仪(美国 Sonics)。

1.1.3 供试菌的采集及保存

甘蔗黑粉菌冬孢子于 2017 年 6 月初采自广西农业科学院试验田。采集新鲜黑穗病鞭子(冬孢子)时,轻轻敲打各鞭子上的冬孢子,装于封口袋中,4℃ 冰箱保存备用。

1.1.4 培养基

(1) 固体培养基: M4、M5、M7、M9、M10、ISP4 主要成分见表 1, 此外每种培养基再添加 10.0 mL 复合盐母液(KNO₃ 1.0 g, NaCl 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NH₄NO₃ 0.1 g, FeSO₄ 0.01 g, MnCl₂ · H₂O 0.001 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0.001 g, 去离子水 10 mL), 13.0 g 琼脂和 1 000 mL 去离子水, 最后调整培养基 pH 值为 7.2~7.4。

(2) 纯化培养基^[11]: 改良的 ISP2 固体培养基, 其中麦芽提取物 2.0 g、酵母提取物 2.0 g、葡萄糖 2.0 g、琼脂 13.0 g、海水 1 000 mL。

(3) 发酵培养基: 改良的 ISP2 液体培养基。

(4) 指示菌培养基^[12]: PDA 固体培养基和 YEPS 液体培养基。

1.2 菌株的分离纯化与保藏

在超净工作台中,用灭菌手术刀切取海绵组织 1.0 g 左右,先用无菌水冲洗多次,去除海绵中的杂质,再用 75%乙醇多次喷淋海绵表面,最后用无菌水冲洗数次。将消毒好的海绵组织用研钵捣碎,研磨充分后,加入 1 mL 无菌水,即为样品原液。将原液稀释至 10^{-3} 倍、 10^{-4} 倍。吸取 200 mL 稀释样液涂布于 M4、M5、M7、M9、M10 和 ISP4 培养基上,每个样液梯度做 2 个平行板,28℃ 培养 3 周后,观察菌落的形态特征并记录详细的菌落大小、形态特征、数量等信息。将纯化好的菌株保存于 20%(V/V)甘油管中, -80℃ 保藏。

表 1 细菌分离培养基配方

Table 1 Formula of bacteria isolation media

培养基 Culture media	主要成分 Main constituent
M4	L-天门冬酰胺 L-Asparagine 1.0 g, 海藻糖 Trehalose 5.0 g, 甘油 Glycerol 10.0 mL
M5	海藻糖 Trehalose 5.0 g, 脯氨酸 Proline 1.0 g
M7	酵母粉 Yeast extract 5.0 g, L-天门冬酰胺 L-Asparagine 1.0 g, 甘油 Glycerol 10.0 mL
M9	精氨酸 Arginine 1.0 g, 甘油 Glycerol 10.0 mL
M10	葡萄糖 Glucose anhydrous 10 g, 水解酪素 Casein hydrolysate 0.5 g
ISP4	可溶性淀粉 Starch soluble 10.0 g, 甘油 Glycerol 10.0 mL, 葡萄糖 Glucose anhydrous 1.0 g

1.3 分子生物学鉴定及系统发育树分析

参照周双清等^[13]的方法提取少量细菌的 DNA。细菌 16S rRNA 基因序列扩增反应条件和反应程序均参照李菲等^[14]的方法进行。扩增产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测是否合格。潜在新种 BGMRC 2118 的 PCR 扩增产物条带进行切胶回收,连接 pEASY-T1 克隆载体后,导入 Top10 感受态细胞中,挑选多个转化后的菌落,用 PCR 法验证克隆的片段大小,扩增样品均委托上海美吉生物医药技术有限公司广州分公司测序。测序结果经 DNASTar 软件整理,利用 EzTaxon 服务器 (<http://www.eztaxon.org/>)^[15] 进行在线比对;选取同源性最高菌株的序列作为参比对象,运用 MEGA5.0 软件,采用 Neighbor-Joining 法构建系统树,Bootstrap1000 次检测各分支的置信值,并对各菌株的系统发育地位进行分析^[16]。

1.4 抑菌活性筛选

1.4.1 细菌粗提物的制备

配制 180 mL 发酵培养液置于 500 mL 锥形瓶中,将处于生长对数期的 24 株细菌分别接种至发酵液中,每株菌接种 3 瓶,置于 180 r/min 恒温振荡器,28℃ 培养 7 d。发酵液离心分离菌体和发酵液,菌体

加入少量去离子水,再用细胞破碎仪处理 20 min。处理后的发酵液和菌体用 1:1(V/V)乙酸乙酯进行萃取 3 次,萃取间隔 20 min。浓缩干燥粗提物,置于干燥器中室温保存。

1.4.2 抑制甘蔗鞭黑粉菌担孢子及菌丝生长活性鉴定

(1)待试菌板的制备。参照李菲等^[12]的方法,确定甘蔗鞭黑粉菌的冬孢子萌发后单倍体担孢子的配型(+,-)。分别挑取 2 种异型(+,-)担孢子接种于 50 mL YEPS 液体培养基中,置于 28℃、180 r/min 摇床中培育 36 h,即为异型(+,-)担孢子菌悬液,记为 A 菌液和 B 菌液;取 2 种异型担孢子悬浮液等体积混合,制成复合型的初始菌悬液,记为 C 菌液。待灭菌后的 PDA 固体培养基冷却至 55℃ 左右,按 10%(V/V)的菌液量将 A、B 和 C 菌液分别加入 3 瓶 PDA 固体培养基中,充分摇匀,倒入平板后待其凝固,备用。

(2)抑菌活性测定。采用牛津杯法^[17]检测 24 株细菌抑制甘蔗鞭黑粉菌活性的情况。用 3.0 mL DMSO 溶解细菌粗提物,用一次性灭菌过滤器对 24 个样品进行过滤处理。以 DMSO 为空白对照,5 μg/mL 吡啶菌胺溶液为阳性对照。每个牛津杯加入初始样液 100 μL,置于 28℃ 培养 7 d 后,用垂直交叉法测量各抑菌圈的直径。

2 结果与分析

2.1 细菌的多样性分析

根据不同菌落的形态,如颜色、光泽、形状、边缘、状态和气丝等初步鉴定,从海绵 *Pseudoceratina* sp. 中共分离到 54 株菌,详情见表 2。经 16S rRNA 基因测序比对后,获得 24 株细菌,其中变形菌门占 45.83%(11 株),厚壁菌门占 37.50%(9 株),放线菌门占 16.67%(4 株);优势菌属为 *Bacillus* sp.。

2.2 细菌的系统发育树分析

经 16S rRNA 基因测序及比对结果分析,共获得细菌 24 株,隶属于 13 科 14 属。选择与其同源性最高的细菌序列构建 Neighbor-Joining 系统发育树(图 1)。其中,细菌 BGMRC 2118(全长 1 544 bp)与 *Bacillaceae* 科中有效发表菌株 *Bacillus abyssalis* SC-SIO-15042^T、*Bacillus horikoshii* DSM 8719^T 和 *Bacillus soli* NBRC 102451^T 系统发育最密切,相似率分别为 96.46%、96.40%和 96.26%。菌株 BGMRC 2118 与芽孢杆菌科中邻近的有效发表菌株构建 Neighbor-Joining 系统发育树(图 2)分析,菌株 BGMRC 2118 与 *Bacillus abyssalis* SC-SIO-15042^T 能稳

定地聚成一簇。采用的 Maximum-Likelihood 和 Maximum-Parsimony 法构建的系统发育树也获得相同结果。因此,菌株 BGMRC 2118 为 Bacillaceae 科中的一个潜在新分类单元。

表 2 海绵 *Pseudoceratina* sp. 共栖细菌列表

Table 2 List of sponge-derived bacteria isolated from *Pseudoceratina* sp.

目 Order	科 Family	属 Genus	菌株数量 No. of strains	目 Order	科 Family	属 Genus	菌株数量 No. of strains
柄杆菌目 Caulobacterales	柄杆菌科 Caulobacteraceae	短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i>	1	鞘脂单胞菌目 Sphingomonadales	鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae	鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	1
肠杆菌目 Enterobacteriales	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	沙雷氏菌属 <i>Serratia</i>	13	微单孢菌亚目 Micromonosporineae	微单孢菌科 Micromonosporaceae	微单孢菌属 <i>Micromonospora</i>	1
		肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	5	微球菌亚目 Micrococccineae	Microbacteriaceae	Agrococcus	1
放线菌目 Actinomycetales	诺卡氏菌科 Nocardiaceae	戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	1		短杆菌科 Brevibacteriaceae	短杆菌属 <i>Brevibacterium</i>	1
红杆菌目 Rhodobacterales	红杆菌科 Rhodobacteraceae	副球菌属 <i>Paracoccus</i>	3	芽孢杆菌目 Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus</i>	1
假单胞菌目 Pseudomonadales	假单胞菌科 Pseudomonadaceae	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	8		葡萄球菌科 Staphylococcaceae	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	2
	莫拉菌科 Moraxellaceae	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	6		芽孢杆菌科 Bacillaceae	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	10

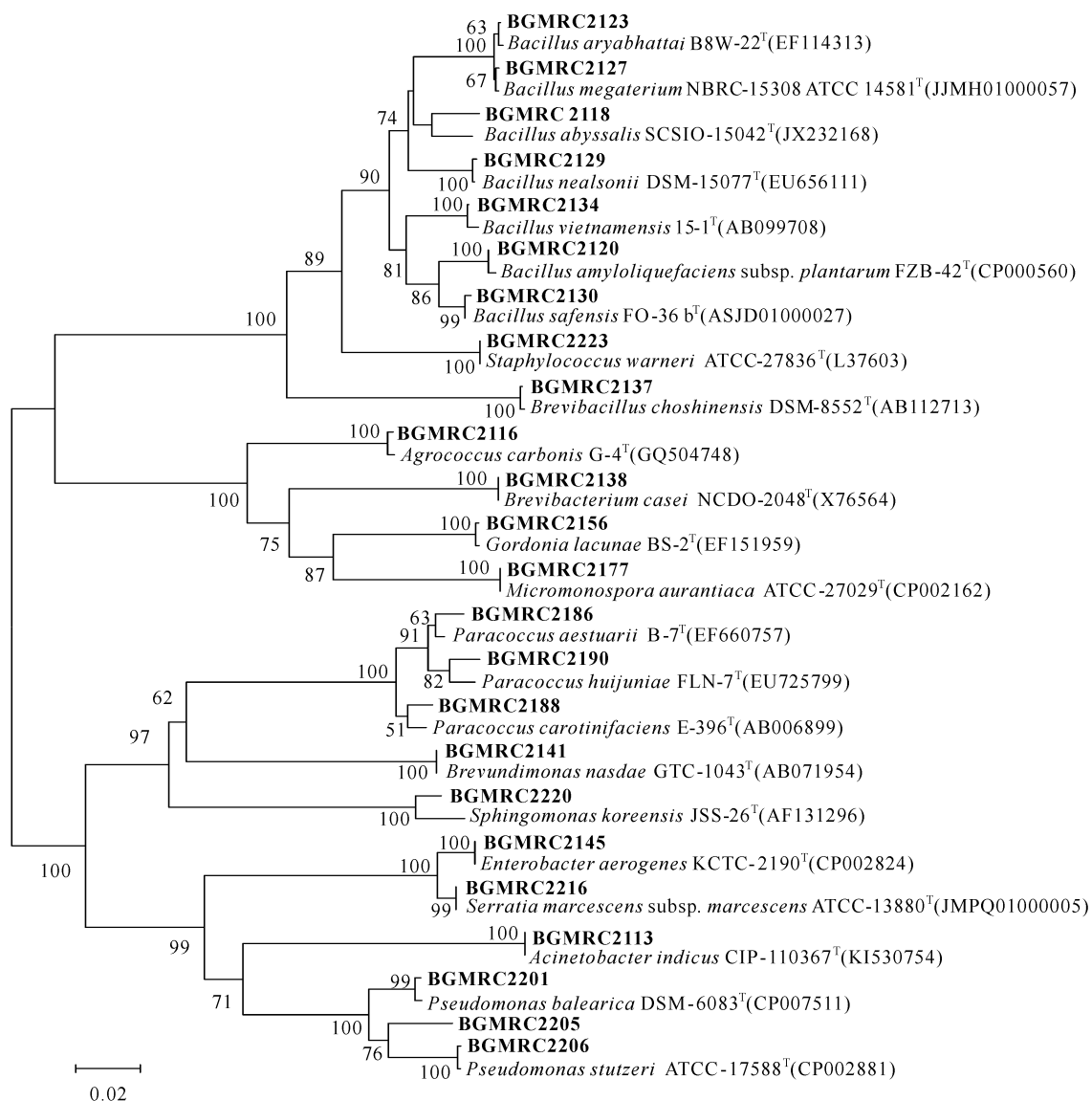


图 1 海绵 *Pseudoceratina* sp. 共栖细菌的 16S rRNA 基因序列 N-J 系统发育树

Fig. 1 The neighbour-joining phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequence of sponge-derived bacteria isolated from *Pseudoceratina* sp.

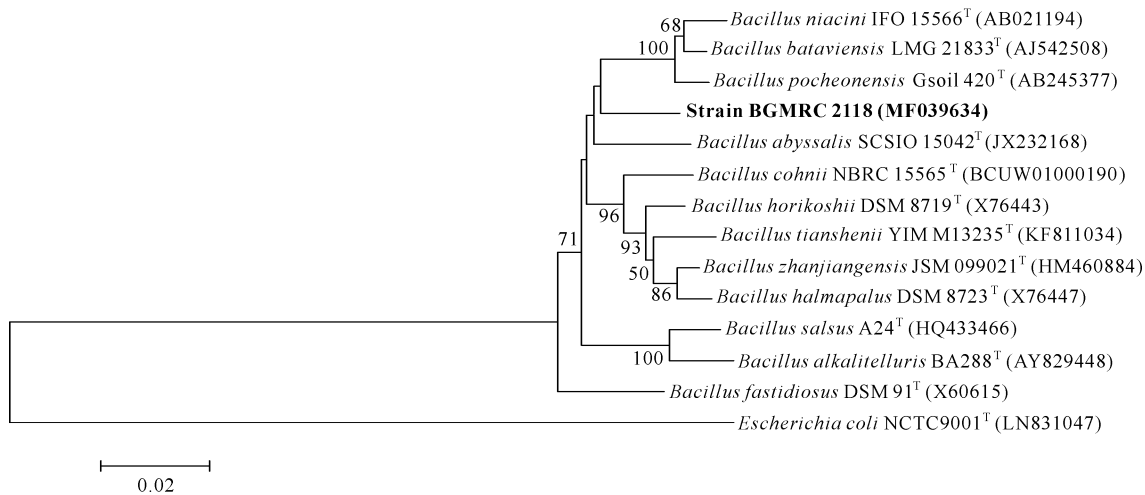


图2 BGMRC 2118 与芽孢杆菌科中邻近有效菌株的 N-J 系统发育树

Fig. 2 The neighbour-joining phylogenetic tree of strain BGMRC 2118 and the adjacent effective strains in the family Bacillaceae

2.3 不同培养基的细菌分离效果

采用 6 种分离培养基,从海绵 *Pseudoceratina* sp. 中共分离出细菌 54 株,经 16S rRNA 基因测序比对后,获得 24 株细菌,各培养基的分离效果见图 3。由图 3 可见,M9(含有少量精氨酸)上分离到的细菌种类最多,包含 8 个菌属;ISP4(含可溶性淀粉)分离到的细菌种类最少,包含 4 个菌属。由菌落数统计结果可知,M4、M5、M7、M9、M10 和 ISP4 培养基上菌

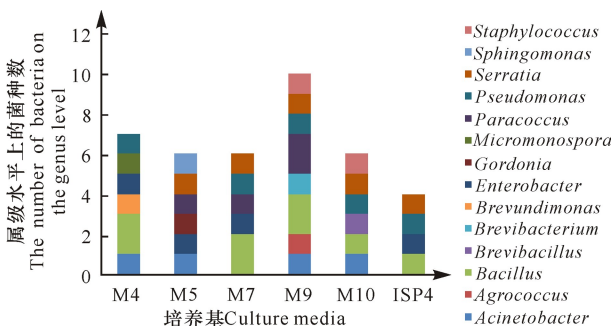


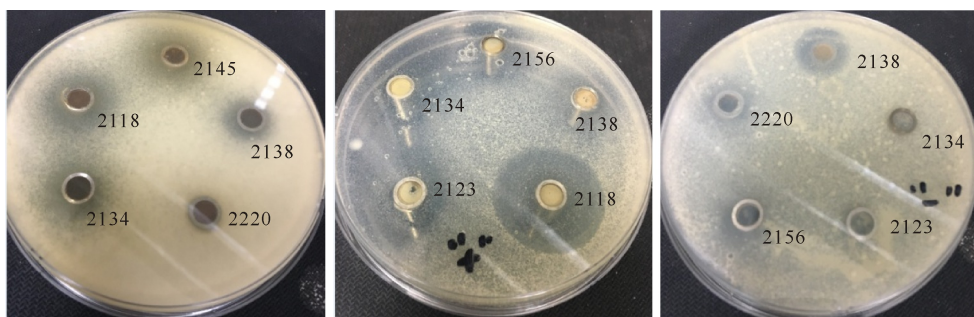
图3 6种培养基的分离效果

Fig. 3 Separation effect of 6 kinds of culture media

落数分别为 1.3×10^5 cfu/mL、 3.5×10^4 cfu/mL、 2.2×10^4 cfu/mL、 5.4×10^4 cfu/mL、 1.6×10^5 cfu/mL 和 3.8×10^4 cfu/mL。M9 培养基获得 10 株细菌,隶属于 8 属,其获得的菌株数和多样性均较高;而 ISP4 培养基获得 4 株细菌,其多样性和细菌数均较少。就新颖性而言,潜在新菌 BGMRC 2118 是从 M7 培养基上分离获得的。

2.4 抑菌活性的初步筛选

选用 24 株细菌进行抑制甘蔗鞭黑粉菌的活性筛选,结果显示(图 4):6 株细菌具有抑制菌丝生长活性,总阳性率为 25.0%,抑菌圈直径 6.5~19.0 mm;5 株细菌抑制“+”型担孢子(培养 7 d 后呈花朵状记为“+”型担孢子),总阳性率为 20.8%,抑菌圈直径为 11.0~24.0 mm;3 株细菌抑制“-”型担孢子(培养 7 d 后呈光滑圆形记为“-”型担孢子),总阳性率为 12.5%,抑菌圈直径为 10.5~15.5 mm。其中,有 5 株同时具有抑制 2 种或 3 种甘蔗鞭黑粉菌形态的活性(表 3)。阳性对照组(5 μ g/mL 啶酰菌胺溶液 100 μ L)出现明显抑菌圈,抑菌圈直径为(23.0 \pm 2.0) mm,阴性对照组未出现抑菌圈。



从左到右依次为细菌粗提物对甘蔗鞭黑粉菌菌丝、“+”型担孢子、“-”型担孢子的抑制作用

From left to right; Inhibitor effect of bacteria crude extract against *Sporisorium scitamineum* mycelium, plus type sporidia, minus type sporidia

图4 抑菌活性筛选

Fig. 4 Antibacterial activity screening

表 3 抑菌活性菌株的筛选结果

Table 3 Screening results of antibacterial activities

菌种编号 Bacterial number	相似菌株 Closest relative (Accession No.)	抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)		
		甘蔗鞭黑粉菌菌丝 <i>Sporisorium scitamineum</i> mycelium activity	“+”型担孢子 Plus type sporidia activity	“-”型担孢子 Minus type sporidia activity
BGMRC 2177	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 ^T	12.27±0.28	27.25±1.77	—
BGMRC 2118	<i>Bacillus abyssalis</i> SCSIO 15042 ^T	18.30±0.28	30.25±0.28	13.25±0.99
BGMRC 2134	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 ^T	16.15±0.49	19.36±1.13	—
BGMRC 2123	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W-22 ^T	12.19±0.14	15.97±0.14	—
BGMRC 2156	<i>Gordonia lacunae</i> BS-2 ^T	—	17.44±0.85	—
BGMRC 2138	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO-2048 ^T	13.07±0.71	—	14.85±0.49
BGMRC 2220	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB-42 ^T	—	—	11.45±0.78
BGMRC 2145	<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC-2190 ^T	16.51±0.92	—	—

注：“—”表示无抑菌活性

Note: “—” indicates no antibacterial activity

3 讨论

海绵作为一种滤食性动物,具有独特的内腔、管道和多孔结构,有利于摄取海水中的有机颗粒、微生物、藻类或原生动物等,使其成为海洋微生物的良好生长繁殖场所。大量的微生物附着在海绵表面、体内的细胞间、细胞内部及细胞的细胞核,可占到海绵鲜质量的50%~60%^[18-19]。为了丰富广西斜阳岛海域海绵中共附生细菌的多样性和生物活性等信息,采用6种分离培养基,对海绵 *Pseudoceratina* sp. 中可培养的共附生细菌进行定量分析,获得可培养细菌54株,隶属于13科14属24种。其中,32株 γ -变形菌(占59.26%)、14株厚壁菌(占25.92%)、5株 α -变形菌(占9.26%)及3株放线菌(占5.56%)。可见,海绵 *Pseudoceratina* sp. 中占统治地位的是 γ -变形菌,这与“ γ -变形菌是海绵共生体的主要组成部分”的研究结论^[20-21]相符合。

就新颖性而言,在广西斜阳岛海域海绵共附生细菌研究中,发现1株芽孢杆菌属的新种 *Bacillus* sp. BGMRC 2118,值得对其进行新物种的多相分类鉴定研究。有研究指出,芽孢杆菌属的菌种可通过竞争营养空间、产生脂肽类抗生素、诱导植物系统抗性等作用,使其具有抗菌、抗肿瘤及抗炎症等广泛的生物活性^[22]。鉴于新物种发现新型高效化合物的潜力相对较大^[23],本文对 BGMRC 2118 开展抑菌活性研究,发现其具有对甘蔗鞭黑粉菌有抑制作用的活性物质。

采用牛津杯法对24株细菌进行抑制甘蔗鞭黑粉菌活性筛选,结果表明,8株细菌表现出显著的抑菌活性,总阳性率为33.33%。其中,4株为 *Bacillus* 属,1株为 *Micromonospora* 属,1株为 *Gordonia* 属,1株为 *Brevibacterium* 属,1株为 *Enterobacter* 属。

然而,从海绵 *Pseudoceratina* sp. 中分离到7株 *Bacillus* 属,其抑菌活性不尽相同,BGMRC 2118 对甘蔗鞭黑粉菌的菌丝形态、“+”型担孢子和“-”型担孢子均有显著活性,BGMRC 2134 和 BGMRC 2123 均对菌丝形态和“+”型担孢子有明显活性,BGMRC 2220 对“-”型担孢子有明显活性,芽孢杆菌属的其他菌株对甘蔗鞭黑粉菌均未表现出明显抑菌活性。可见,虽然活性菌株与非活性菌株隶属相同门级,相同科级,甚至是相同属级,但其抑菌效果不尽相同。这种差异在一定程度上说明生存环境是自然选择的一个动力,尽管生存环境相同,但菌株也会因结构和功能不同,而产生代谢的差异。

4 结论

从海绵 *Pseudoceratina* sp. 中共分离到可培养细菌54株,经16S rRNA 基因序列对比后,获得24株细菌。其中,菌株 BGMRC 2118 与已发表有效菌株的16S rRNA 基因序列的最高相似率为96.46%,可能为潜在新种。24株细菌中,有8株细菌的发酵粗提物对甘蔗鞭黑粉菌具有很强的抑菌活性。可见,广西斜阳岛海域的海绵存在着丰富的共附生细菌资源,具有广谱的抑菌活性,这对今后研究和开发新型生防菌肥具有积极的影响与借鉴。

参考文献:

- [1] 李志勇,何丽明,蒋群. 海绵共附生细菌种群组成的PCR-DGGE 基因指纹分析[J]. 生物技术通报,2006(1): 61-64.
LI Z Y, HE L M, JIANG Q. Study on the Sponge-associated bacterial community based on PCR-DGGE fingerprinting[J]. Biotechnology Bulletin, 2006(1): 61-64.
- [2] 张艳凤,许勇,陈雷,等. 海绵内/共生稀有放线菌 *Derm-acoccus* sp. X4 次级代谢产物分离纯化及结构解析[J].

- 生物工程学报,2016,32(5):599-609.
- ZHANG Y F, XU Y, CHEN L, et al. Isolation, identification and structural characterization of secondary metabolites from amarine sponge-derived rare actinobacterium *Dermaococcus* sp. X4 [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(5): 599-609.
- [3] WANG G Y. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2006, 33(7): 545-551.
- [4] 王宏梅, 赵心清. 可培养海洋放线菌生物多样性的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 996-1000.
- WANG H M, ZHAO X Q. Progress in the Bio-diversity studies of culturable marine actinobacteria [J]. Microbiology China, 2007, 34(5): 996-1000.
- [5] 宋恺, 胡洁, 林文翰, 等. 海绵共附生真菌多样性及其次级代谢产物的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2014(4): 36-42.
- SONG K, HU J, LIN W H, et al. Studies on diversity of sponges-associated fungi and their secondary metabolites [J]. Biotechnology Bulletin, 2014(4): 36-42.
- [6] 刘睿, 方玉春, 段琳, 等. 海绵共附生放线菌 *Saccharopolyspora* sp. nov 中抗肿瘤活性成分的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(11): 646-649.
- LIU R, FANG Y C, DUAN L, et al. Antitumor active components of *Saccharopolyspora* sp. nov derived from *Mycale plumose* sponge [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(11): 646-649.
- [7] 彭杰, 吴晓鹏, 张开山, 等. 海绵共附生放线菌 *Streptomyces* sp. A01059 抗稻瘟病活性物质的分离研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(9): 51-54.
- PENG J, WU X P, ZHANG K S, et al. Separation of active compounds against *Pyricularia oryzae* from sponge-associated actinobacteria *Streptomyces* sp. A01059 [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(9): 51-54.
- [8] WRINGHT A E, MCCARTHY P J, SCHULTE G K. Sulfircin: A new sesterterpene sulfate from a deep-water sponge of the genus *Ircinia* [J]. Journal of Organic Chemistry, 1989, 54(14): 3472-3474.
- [9] SUN L L, SHAO C L, CHEN J F, et al. New bisabolane sesquiterpenoids from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. isolated from the sponge *Xestospongia testudinaria* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(3): 1326-1329.
- [10] 陈志颖, 王祥, 苏培, 等. 叶片山海绵共附生细菌的防污活性研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2015, 54(3): 340-346.
- CHEN Z Y, WANG X, SU P, et al. Study on antifouling activity of bacteria associated with marine sponge *mycale phyllophila* [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2015, 54(3): 340-346.
- [11] 李小群, 李菲, 李家怡, 等. 海芒果可培养细菌的分离鉴定及其抑制海洋鱼类致病菌活性研究 [J]. 广西科学院学报, 2017(2): 108-113.
- LI X Q, LI F, LI J Y, et al. Identification and inhibition activity inhibit fish pathogens of cultivated bacteria isolated from cerbera manghas [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2017(2): 108-113.
- [12] 李菲, 高程海, 余炼, 等. 秋茄内生细菌多样性及抑制甘蔗黑穗霉菌活性研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2017(4): 318-327.
- LI F, GAO C H, YU L, et al. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Kandelia candel* against *Ustilago scitaminea* Sydow in vitro [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2017(4): 318-327.
- [13] 周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板 [J]. 生物技术通报, 2010(2): 123-125.
- ZHOU S Q, HUANG X L, HUANG D Y, et al. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100 [J]. Biotechnology Bulletin, 2010(2): 123-125.
- [14] 李菲, 高程海, 竺利波, 等. 茅尾海无瓣海桑内生细菌多样性及其细胞毒活性 [J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 689-697.
- LI F, GAO C H, ZHU L B, et al. Diversity and cytotoxic activity of endophytic bacteria isolated from *Sonneratia apetala* of Maowei Sea [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(4): 689-697.
- [15] KIM K H, ROH S W, CHANG H W, et al. *Nocardia basaltis* sp. nov., isolated from black beach sand [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59: 42-47.
- [16] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [17] 宫小明, 马荣桢, 孙军, 等. 黄曲霉毒素生物防控菌的筛选及鉴定 [J]. 微生物学杂志, 2015(2): 103-108.
- GONG X M, MA R H, SUN J, et al. Screening and identification of aflatoxin bio-controlling bacterial strain [J]. Journal of Microbiology, 2015(2): 103-108.
- [18] 方玉春, 李凌绪, 朱天骄, 等. 海绵微生物的分离培养及一种活性代谢产物的初步研究 [J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(4): 742-744.
- FANG Y C, LI L Z, ZHU T J, et al. Isolation, cultivation of a sponge-derived fungus and studies on its bioactive metabolites [J]. Periodical of Ocean University of China, 2009, 39(4): 742-744.
- [19] 张文龙, 陈名洪, 方东升, 等. 福建海绵放线菌多样性及其次级代谢产物合成能力 [J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(6): 407-413.
- ZHANG W L, CHEN M H, FANG D S, et al. Diversity and secondary metabolite biosynthetic potential of actinomycetes associated with a marine sponge in Fujian [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40(6): 407-413.
- [20] HENTSCHEL U, FIESELER L, WEHRL M, et al. Microbial diversity of marine sponges [J]. Progress in Molecular & Subcellular Biology, 2003, 37: 59-88.

(下转第 99 页 Continue on page 99)

4 结论

本研究结果表明,按照以下工艺、配方制作的鳕鱼皮胶原蛋白肽即食凝胶产品品质最佳:将鳕鱼皮胶原蛋白肽粉溶于其 20 倍质量 50℃ 的蒸馏水中,完全溶解为鳕鱼皮胶原蛋白肽溶液,按 12 mg/100 g 溶液的比例向其中加入乳酸菌 YF-L922 冻干粉 37℃ 保温脱腥 1.0 h,然后分别加入溶液质量分数为 9% 的果冻粉、3% 的木糖醇粉、0.3% 的环糊精混合均匀加热到 100℃ 使其完全溶解,真空包装后,在 (85±1)℃ 热水烫煮 20 min 灭菌,冷却。检验结果表明,产品开封后具有本身应有的色泽、香味,无异味,无腐败,无肉眼可见的其他外来异物,产品整体口感适宜;且其微生物指标均符合食品安全国家标准《果冻》(GB 19299—2015)的微生物限量要求。

参考文献:

[1] 刘淇,李慧,赵玲,等. 鳕鱼皮胶原蛋白肽的功能特性及抗氧化活性[J]. 食品工业科技,2012(1):135-137,140.
LIU Q, LI H, ZHAO L, et al. Study on functional properties and antioxidation activity of collagen polypeptide from codfish skin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012(1):135-137,140.

[2] 贾冬英,王文贤,姚开,等. 胶原蛋白多肽功能特性的研究[J]. 食品科学,2001,22(6):21-24.
JIA D Y, WANG W X, YAO K, et al. Study on functional properties of collagen peptides [J]. Food Science, 2001,22(6):21-24.

[3] 曹荣安,李浩,李良玉,等. 胶原蛋白的生理功能特性及其应用[J]. 肉类工业,2010(1):7-9.
CAO R A, LI H, LI L Y, et al. Physiological function property and applications of collagen protein[J]. Meat Industry, 2010(1):7-9.

[4] 张志胜,齐文聪,韩晴,等. 鳕鱼皮胶原蛋白的提取与应用[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(8):3228-3233.
ZHANG Z S, QI W C, HAN Q, et al. Extraction and application of cod skin collagen[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016,7(8):3228-3233.

[5] 顾斌洲,王加斌,滕芳芳,等. 鳕鱼皮制备胶原蛋白肽的工艺优化[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2015,34(5):452-456.
GU B Z, WANG J B, TENG F F, et al. Process for pre-

paring cod skin collagen peptide optimization[J]. Journal of Zhejiang Ocean University: Natural Science, 2015, 34(5):452-456.

[6] 杨婷婷,胡建恩,杨帆,等. 水产胶原蛋白及其生物活性肽的研究和应用[J]. 精细与专用化学品,2011,19(5):5-10.
YANG T T, HU J E, YANG F, et al. Review on the research and application of aquatic collagen and bioactive peptides[J]. Fine and Specialty Chemicals, 2011,19(5):5-10.

[7] 淑英,敖冉,宋佳,等. 响应面法优化鳕鱼皮酸溶性胶原蛋白的提取工艺[J]. 食品工业科技,2015,36(24):269-272,377.
SHU Y, AO R, SONG J, et al. Optimization of extraction condition of acid-soluble collagen from cod skin by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015,36(24):269-272,377.

[8] 刘春娥,刘峰,刘苏瑶,等. 鳕鱼皮胶原活性多肽的制备研究[J]. 食品研究与开发,2012,33(12):161-163.
LIU C E, LIU F, LIU S Y, et al. Study on preparation of active collagen peptides from cod skin [J]. Food Research and Development, 2012,33(12):161-163.

[9] 郭玉华,李钰金,吴新颖,等. 鳕鱼皮胶原蛋白肽酶解液脱色脱腥工艺的研究[J]. 中国食品添加剂,2010(4).
GUO Y H, LI Y J, WU X Y, et al. Study on decolorizing and deodorization of cod skin enzymolysis collagen peptide liquid[J]. China Food Additives, 2010(4).

[10] 曾少葵,杨萍,邓楚津,等. 罗非鱼皮明胶的脱腥方法及理化性质[J]. 水产学报,2010,34(3):349-356.
ZENG S K, YANG P, DENG C J, et al. Study on the removal fishy odour and physicochemical properties of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin [J]. Journal of Fisheries of China, 2010,34(3):349-356.

[11] 李斌,李长江,杜志欣,等. 罗非鱼皮制胶原蛋白脱腥技术的比较研究[J]. 淡水渔业,2013,43(6):82-85.
LI B, LI C J, DU Z X, et al. Comparison on the techniques of deodorization of tilapia skin collagen [J]. Freshwater Fisheries, 2013,43(6):82-85.

[12] 王浩田,马俪珍,付翠萍. 鲶鱼肉的脱腥工艺研究[J]. 安徽农业科学,2011(10):6063-6066.
WANG H T, MA L Z, FU C P. Research on deodorization technology for catfish meat [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011(10):6063-6066.

(责任编辑:陆雁)

(上接第 93 页 Continue from page 93)

[21] TAYLOR M W, SCHUPP P J, DAHLLÖF I, et al. Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity [J]. Environmental Microbiology, 2004,6(2):121-130.

[22] 唐金山,高昊,戴毅,等. 环脂肽类成分研究进展[J]. 药学学报,2008,43(9):873-883.
TANG J S, GAO H, DAI Y, et al. Progress on the studies of cyclic lipopeptides [J]. Acta Pharmaceutica Sini-

ca, 2008,43(9):873-883.

[23] TAKAHASHI Y, OMURA S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2003,49(3):141-154.

(责任编辑:米慧芝)