

蓝细菌螺旋拟柱孢藻的抑菌活性研究

聂利华, 张宇超, 钟富胜, 肖璐, 郑雅琼 (揭阳职业技术学院生物工程系, 广东揭阳 522000)

摘要 [目的]探讨螺旋拟柱孢藻藻株是否具有潜在的抑菌活性。[方法]从汕头澄海人工对虾养殖池分离纯化藻株, 通气扩大培养, 离心收集、冷冻干燥后, 采用乙醇提取并用柱层析分离, 先后得到藻体的乙醇提取物和叶绿素提取物。以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为受试菌种, 采用圆形纸片法进行抑菌活性研究。[结果]藻体乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有抑菌作用, 其抑菌直径分别为 11.8、10.3 mm; 藻叶绿素粗提物仅对金黄色葡萄球菌有抑菌作用, 抑菌直径为 24.2 mm。[结论]螺旋拟柱孢藻乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有中等强度的抑菌活性, 而藻体叶绿素提取物仅对金黄色葡萄球菌抑菌, 但呈高灵敏抑菌效应, 该藻株有望成为生物抑菌来源物质的新型材料而得到进一步开发利用。

关键词 蓝细菌; 螺旋拟柱孢藻; 乙醇提取物; 叶绿素提取物; 抑菌活性

中图分类号 R915 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)08-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.08.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Antibacterial Activity of Cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* helix to Bacteria

NIE Li-hua, ZHANG Yu-chao, ZHONG Fu-sheng et al (Department of Bioengineering, Jieyang Polytechnic, Jieyang, Guangdong 522000)

Abstract [Objective] To explore the potential antibacterial activity of Cyanobacteria *C. raciborskii* helix. [Method] After isolation and purification of the algae from the artificial shrimp culture pond in Chenghai, Shantou, aeration expansion culture, centrifugal collection, freeze-drying, ethanol extraction and column chromatography separation were used to obtain the ethanol extract and chlorophyll pigment extract of the algae. The antibacterial activity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was studied by circular disk method. [Result] The ethanol extract of the algal body had bacteriostatic effect on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and its bacteriostatic diameter was 11.8 mm and 10.3 mm respectively; The crude extract of algal chlorophyll only had bacteriostatic effect on *Staphylococcus aureus*, and the bacteriostatic diameter was 24.2 mm. [Conclusion] The ethanol extract of *C. raciborskii* had moderate antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*, while chlorophyll extract only inhibited *S. aureus* with strong activity. It was expected to be a new source material of biological antibacterial and be further developed and utilized.

Key words Cyanobacteria; *Cylindrospermopsis raciborskii* helix; Ethanol extract; Chlorophyll extract; Antibacterial activity

寻找能够抗植物病原体、水生动物病原体、人类病原体的有效化合物一直是科学家们研究的热点之一, 特别是近年来随着抗生素类药物的滥用、环境污染的加剧, 人类免疫力逐渐下降造成新的致病菌、条件致病菌及超级耐药菌日益增多等全世界面临的严峻的社会问题^[1], 寻求安全有效的抗菌来源物质显得尤为迫切, 天然中草药植物及微生物资源在抗菌活性物质的来源方面承担着重要的角色^[2-3]。拟柱孢藻是一种具有原核微生物特性与植物双重特性的水生蓝细菌藻类物质, 属于蓝藻纲念珠藻目念珠藻科拟柱孢藻属, 以拉氏拟柱孢藻 (*Cylindrospermopsis raciborskii*) 为模式种^[4], 其生存适应力高、入侵性强, 是近年来呈全球性扩张分布的一种新型淡水蓝藻, 它首次入侵某一水体几年后就能形成强烈占优势的水华藻^[5]。

查广才等^[6-7]在凡纳滨对虾健康养殖与虾池环境微生物生态研究中, 发现一株在虾池中呈优势生长且其生长与水体致病性弧菌及其他藻类等水生生物数量呈负相关的拟柱孢藻, 后经形态与基因鉴定等方面证实, 此藻为一株少见的呈螺旋形不产毒的拟柱孢藻, 暂命名为螺旋拟柱孢藻 (*Cylin-*

drospermopsis raciborskii helix)^[8]。为探究此藻株潜在的抑菌性能, 该试验在前期采样、分离、鉴定的基础上, 扩大培养并收集、采用乙醇提取获得醇提物, 另外用柱层析分离藻体的叶绿素粗提物, 以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作为供试细菌, 用圆形纸片法进行抑菌试验, 为天然抑菌活性物质来源提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验蓝细菌藻株采于汕头澄海人工凡纳滨对虾养殖池, 所用菌种金黄色葡萄球菌和大肠杆菌来自揭阳职业技术学院微生物实验室。受试细菌选用营养琼脂培养基(购自广东凯微生物科技有限公司)进行培养。试验蓝细菌藻株的基础培养基采用该实验室前期摸索出来的改良 BG11 培养基进行^[8], 其含量配方如下: NaNO₃ 0.38 g/L、Mg·SO₄·7H₂O 75 mg/L、Na₂CO₃ 20 mg/L、CaCl₂·2H₂O 36 mg/L、Na₂EDTA 1 mg/L、Citric acid 6 mg/L、K₂HPO₄ 40 mg/L、Ferric ammonium citrate 6 mg/L、Trace metal mix A5 1 mL/L (A5 的成分主要有 ZnSO₄·7H₂O 0.22 g/L、MnCl₂·4H₂O 1.86 g/L、H₃BO₃ 2.86 g/L、Na₂MoO₄·2H₂O 0.36 mg/L、CuSO₄·5H₂O 0.08 g/L、Co(NO₃)₂·6H₂O 0.05 g/L), 双纯水定容至 1 L, 用 0.1 mol/L 的氢氧化钠与 0.1 mol/L 的盐酸调 pH 为 8.2。

1.2 试验仪器 ML32 明美拍照显微镜(明美科技有限公司); SCIENTZ-650E 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); TDL-8M 台式冷冻离心机(上海户湘仪离心机仪器有限公司); LGJ-18 真空冷冻干燥机(北京松源华兴

基金项目 揭阳职业技术学院创新强校工程(2016—2020)立项项目(JYPSHFV_B1701); 揭阳市科技计划项目(2019ny011); 揭阳职业技术学院校级大学生创新创业训练项目(JYCXLJH1902); 广东省科技创新战略专项资金(pdjh2022b1078)。

作者简介 聂利华(1977—), 女, 湖北仙桃人, 讲师, 硕士, 从事水生微生物生理与药理活性研究。

收稿日期 2022-05-13

科技发展有限公司);ISO9001 霉菌培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司);PGX-250B 智能光照培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);BXM-30R 立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 藻株培养与离心收集。在前期摸索出最佳培养基的基础上,进行无菌通气扩大培养^[9],通气速率为 1.5 L/min,培养条件为温度(28±1)℃、光照 4 000 lx、光暗周期 12 h/12 h。每天观察生长及藻色变化,并定期检查通气装置,待其对数生长期时进行离心收集(4 000 r/min, 10 min, 4℃),之后进行冷冻干燥获得藻体。

1.3.2 藻乙醇提取物的制备。称取 1 g 干藻,加入 95%乙醇 9 mL,采用研磨、浸渍、超声波(25℃、功率 120 W、超声 6~8 min、静置 5~6 h)提取,完成置于 15 mL 离心管中后拧紧离心管盖子,常温放置 24 h,离心、取上清液即可得到藻类乙醇提取液。

1.3.3 藻体叶绿素的提取与分离。称取 1 g 干藻,加入 90%乙醇 9 mL,采用研磨、浸渍、超声波(25℃、功率 120 W、超声 6~8 min、静置 5~6 h)提取多次,合并滤液,并用旋转蒸发仪蒸发得到浸膏,加入少量 95%乙醇溶解,得到浓的粗产品,之

后采用氧化铝柱层析分离纯化,湿法装柱、上样、用 95%乙醇进行洗脱,收集流出液,即得到纯化的色素^[10]。

1.3.4 菌悬液的制备。采取涂布和划线的方法将金黄色葡萄球菌与大肠杆菌进行纯化培养,之后挑选单菌落接种于装有 100 mL 营养肉汤培养基的 150 mL 锥形瓶中,置于霉菌培养箱中,37℃培养 18 h。采用 0.5 麦氏比浊法,用无菌生理盐水将菌培养液配制成 1.5×10⁸ CFU/mL,稀释至 10⁶后,即制成试验所用的菌悬液,4℃保存备用^[11]。

1.3.5 抑菌活性测定。采用圆形纸片法^[12]进行抑菌试验设计,除提取物试验组外,试验设置对照组有无菌蒸馏水空白对照、1 mg/mL 氨苄青霉素钠阳性对照、细菌纯菌培养对照和溶剂阴性对照,其中各提取物试验组、氨苄青霉素钠阳性对照和溶剂阴性对照制作相应的药敏纸片。试验时,加 100 μL 菌悬液于平板上,均匀涂布,摆放在直径为 5 mm 已制作好的药敏纸片上,在 37℃培养 18~24 h 后观察结果,测量抑菌圈。每个样品设 3 个平行,结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 分离藻株生长情况 分离纯化的藻体镜下观察呈卷曲、螺旋的丝状,末端尖细,宽度 2.0~3.5 μm,长度可至 60 μm、多数 20~50 μm(图 1),偶见异形胞,顶生。

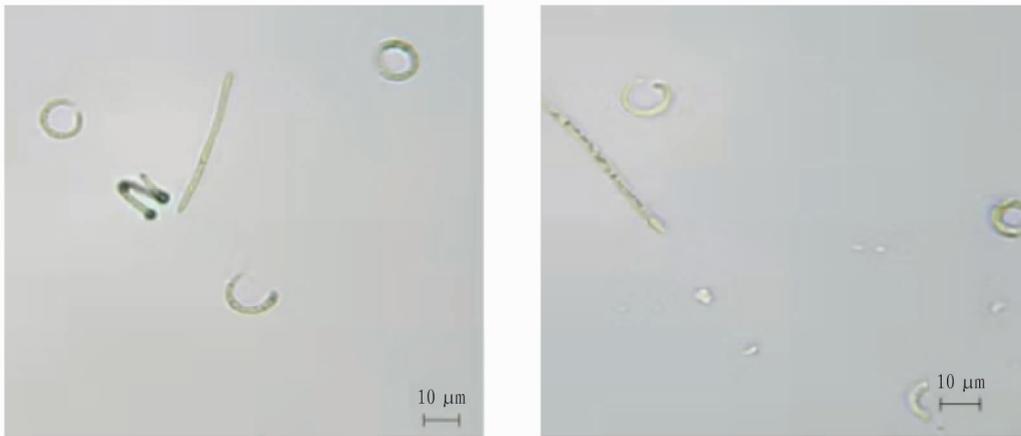


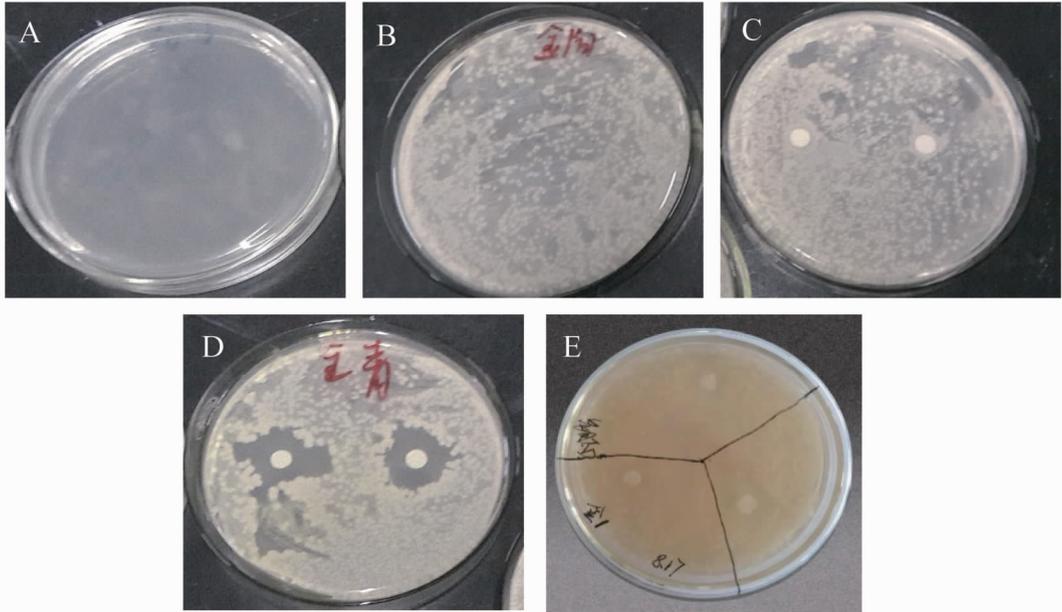
图 1 分离藻株的镜下观察(10×40)

Fig.1 Microscopic observation of isolated algae (10×40)

2.2 抑菌活性 图 2~3 和表 1 是螺旋拟柱孢藻乙醇提取物采用圆形纸片法对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌结果。图 2~3 的 A 是无菌蒸馏水空白对照,表明操作无污染;B 是金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的单纯菌接种,说明这 2 种细菌在营养琼脂培养基生长良好,并且培养和操作过程中没有被污染;C 是溶剂挥发至干的药敏纸片(乙醇的挥发干片)对 2 种受试菌的抑菌情况,测量结果表明,2 种受试菌的抑菌圈直径均为 6.0 mm;D 是氨苄青霉素钠药物对 2 种细菌的阳性对照,测量结果表明,阳性对照的抑菌圈直径均为 17.0 mm;E 是藻类乙醇提取物对 2 种细菌的抑菌试验组,其中对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 11.8 mm,对大肠杆菌的抑菌圈直径为 10.3 mm。以上测量数据显示,藻类乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径均大于 10.0 mm,说明藻类乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有较强的

抗菌活性,且呈现中度敏感。

图 4~5 和表 2 是螺旋拟柱孢藻叶绿素提取物采用圆形纸片法对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌结果。图 4~5 的 A~C 与藻体的乙醇提取物一样,分别为无菌蒸馏水空白对照、纯菌培养对照与溶剂阴性对照;D 是氨苄青霉素钠药物对 2 种细菌的阳性对照,抑菌圈直径分别为 41.0 mm(金黄色葡萄球菌)、21.6 mm(大肠杆菌);E 是螺旋拟柱孢藻叶绿素提取物对 2 种细菌的抑菌试验组,抑菌圈直径分别为 24.2 mm(金黄色葡萄球菌)、6.0 mm(大肠杆菌)。以上测量数据显示,藻类叶绿素提取物对金黄色葡萄球菌抑菌圈直径>15.0 mm,抗菌活性强,呈现高度敏感;而藻类叶绿素提取物对大肠杆菌抑菌圈直径<7.0 mm,说明藻类叶绿素提取物对大肠杆菌并无抗菌活性。

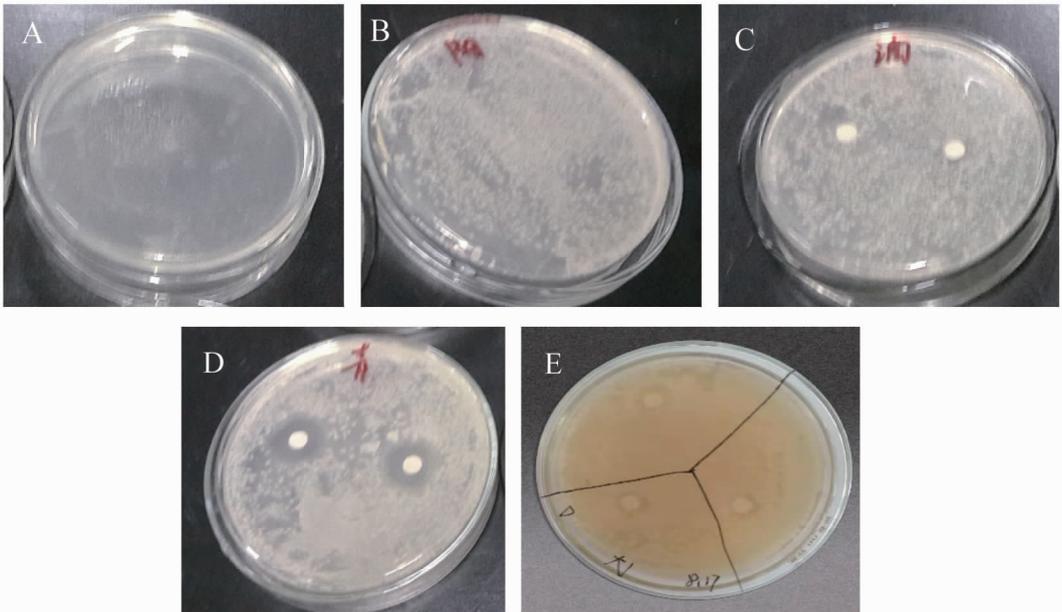


注: A. 无菌蒸馏水空白对照; B. 金黄色葡萄球菌纯菌培养对照; C. 溶剂阴性对照; D. 氨苄青霉素钠阳性对照; E. 藻类乙醇提取物试验组。

Note: A. Sterile distilled water blank control; B. Control of pure culture of *S. aureus*; C. Solvent negative control; D. Positive control of ampicillin sodium; E. Test group of ethanol extracts from *C. raciborskii*.

图 2 螺旋拟柱孢藻乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌结果

Fig.2 Bacteriostatic results of the ethanol extract of *C. raciborskii* against *Staphylococcus aureus*



注: A. 无菌蒸馏水空白对照; B. 大肠杆菌纯菌培养对照; C. 溶剂阴性对照; D. 氨苄青霉素钠阳性对照; E. 藻类乙醇提取物试验组。

Note: A. Sterile distilled water blank control; B. Control of pure culture of *E. coli*; C. Solvent negative control; D. Positive control of of ampicillin sodium; E. Test group of ethanol extracts from *C. raciborskii*.

图 3 螺旋拟柱孢藻乙醇提取物对大肠杆菌的抑菌结果

Fig.3 Bacteriostatic results of the ethanol extract of *C. raciborskii* against *E. coli*

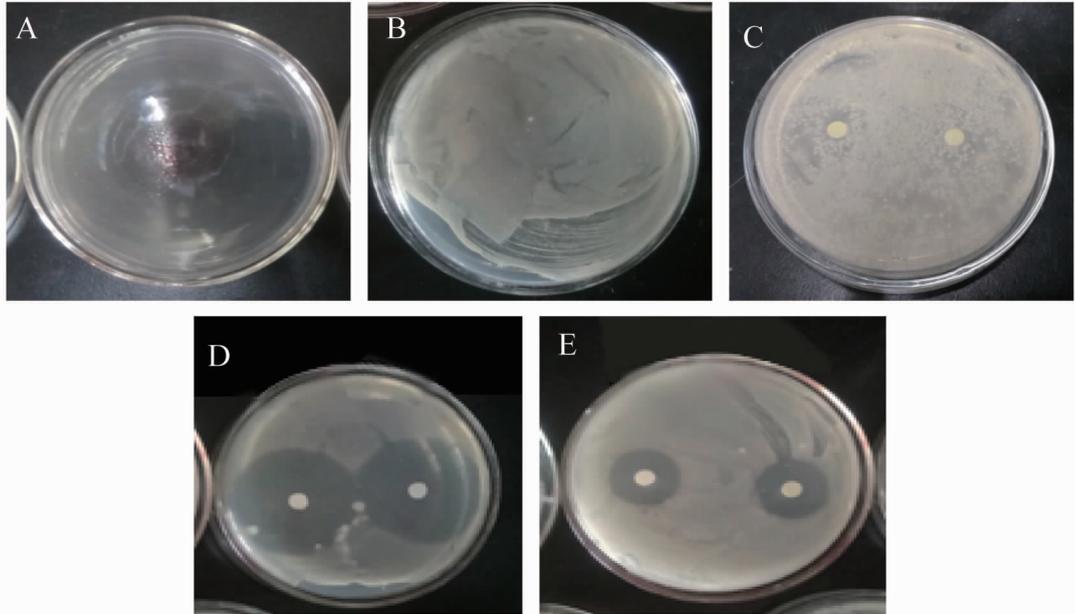
从螺旋拟柱孢藻提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌数据的横向比较(图 6)可以看出,抑菌活性最强的是藻体叶绿素提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌,其次是藻体乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抑菌,这 3 种情况的抑菌圈直径均大于 10.0 mm,属于中度及高度敏感的范围。

从受试菌来看,该藻的 2 种提取物均对金黄色葡萄球菌有抑菌活性且呈中度、高度敏感,而对大肠杆菌来讲,只有乙醇提取物呈中度敏感。另外从提取物的种类来看,该蓝细菌的叶绿素提取物对金黄色葡萄球菌选择性高,而乙醇提取物的抑菌范围广。

表1 螺旋拟柱孢藻乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌结果

Table 1 Antibacterial activity against *S.aureus* and *E.coli* of ethanol extracts from *C.raciborskii*

药物 Drug	抑菌物质 Antibacterial substance	金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>		大肠杆菌 <i>E.coli</i>	
		抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic ring//mm	敏感度 Sensitivity	抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic ring//mm	敏感度 Sensitivity
阳性对照 Positive control	氨苄青霉素钠	17.0	高度敏感	17.0	高度敏感
溶剂对照 Solvent control	乙醇挥发干片	6.0	不敏感	6.0	不敏感
螺旋拟柱孢藻 <i>C.raciborskii</i>	藻乙醇提取物	11.8	中度敏感	10.3	中度敏感



注:A.无菌蒸馏水空白对照;B.金黄色葡萄球菌纯菌培养对照;C.溶剂阴性对照;D.氨苄青霉素钠阳性对照;E.藻类叶绿素提取物试验组。

Note:A.Sterile distilled water blank control; B.Control of pure culture of *S.aureus*;C.Solvent negative control;D.Positive control of ampicillin sodium;E. Test group of chlorophyll extracts from *C.raciborskii*.

图4 螺旋拟柱孢藻叶绿素提取物对金黄色葡萄球菌的抑菌结果

Fig.4 Bacteriostatic results of the chlorophyll extracts of *C.raciborskii* against *S.aureus*

表2 螺旋拟柱孢藻叶绿素提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌结果

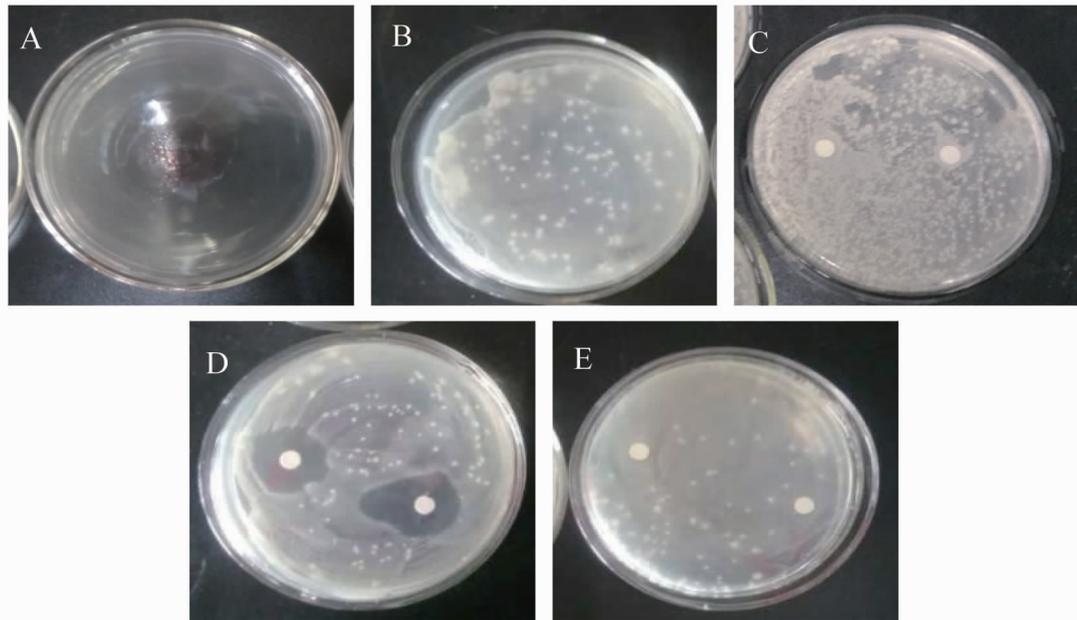
Table 2 Antibacterial activity against *S.aureus* and *E.coli* of chlorophyll extracts from *C.raciborskii*

药物 Drug	抑菌物质 Antibacterial substance	金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>		大肠杆菌 <i>E.coli</i>	
		抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic ring//mm	敏感度 Sensitivity	抑菌圈直径 Diameter of bacteriostatic ring//mm	敏感度 Sensitivity
阳性对照 Positive control	氨苄青霉素钠	41.0	高度敏感	21.6	高度敏感
溶剂对照 Solvent control	乙醇挥发干片	6.0	不敏感	6.0	不敏感
螺旋拟柱孢藻 <i>C.raciborskii</i>	藻色素提取物	24.2	高度敏感	6.0	不敏感

3 讨论与结论

我国医药市场上广泛使用的抑菌剂很大一部分是化学合成,毒副作用大,且很多细菌也极易对抑菌药产生耐药性,导致目前超级细菌流行,因此从天然生物材料中研发更高效、更安全的抑菌剂尤为迫切,而新型淡水来源的蓝细菌拟柱孢藻具有这种潜质。近年来的研究表明,拟柱孢藻不仅在我国水体广泛分布,甚至在一些大型水库、湖泊中已成为优势种并产生水华^[13],此藻生物入侵能力很强,其一旦在某一水体生长后能明显抑制水中其他藻类以及细菌的生长。该

研究以潮汕地区汕头澄海人工养殖虾池中获得的螺旋拟柱孢藻(*C.raciborskii helix*)为研究材料,该藻株是截至目前首次在国内发现能够生长在淡水虾池中,并且可以促进虾池水质健康,提高对虾产量。有研究表明该藻分泌物可能对虾育苗池中细菌和其他藻类有抑制作用^[6-7]。但国内外研究人员对拟柱孢藻抑菌活性的研究鲜见报道。故该研究以螺旋拟柱孢藻为材料,尝试藻体多种成分的提取,以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为受试菌,进行抑菌活性的检测,以期探讨螺旋拟柱孢藻是否可作为天然的生物抑菌剂,减少目前化学合



注: A. 无菌蒸馏水空白对照; B. 大肠杆菌纯菌培养对照; C. 溶剂阴性对照; D. 氨苄青霉素钠阳性对照; E. 藻类叶绿素提取物试验组。

Note: A. Sterile distilled water blank control; B. Control of pure culture of *E. coli*; C. Solvent negative control; D. Positive control of ampicillin sodium; E. Test group of chlorophyll extracts from *C. raciborskii*.

图 5 螺旋拟柱孢藻叶绿素提取物对大肠杆菌的抑菌结果

Fig.5 Bacteriostatic results of the chlorophyll extracts of *C. raciborskii* against *E. coli*

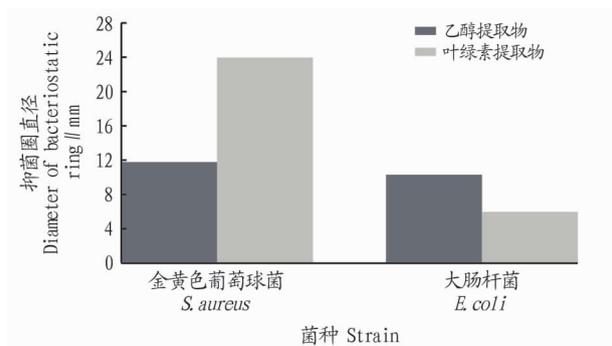


图 6 螺旋拟柱孢藻提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌作用

Fig.6 Antibacterial effects on *S. aureus* and *E. coli* of extracts from *C. raciborskii* helix

成的抑菌剂给环境带来的威胁。

目前关于藻类生物有效活性成分的提取方法主要有溶剂浸提、回流提取、索氏提取、蒸馏萃取、超临界 CO_2 萃取、超声波辅助萃取、微波萃取等^[14]。结合实验室条件及前期摸索,该试验采用以乙醇为溶剂进行浸提,为消除溶剂的影响,提取中需尽量使乙醇挥发完且需同时设立溶剂对照组同步处理。抑菌结果表明,藻类的乙醇提取物对 2 种受试菌均有不同程度的抑菌作用,因抑菌圈直径均大于 10.0 mm,表现为中等强度的抑菌性能,而藻体叶绿素提取物仅对金黄色葡萄球菌有效,但呈现高度敏感的抑菌效应,表明藻体乙醇提取物可产生较广范围的抑菌效应,叶绿素提取物抑菌范围小但抑菌性能高。

参考文献

- [1] 周越,杨瑶瑶,张翕,等.基于中国背景的细菌耐药所致健康和经济负担的系统评价[J].中国药房,2021,32(20):2543-2550.
- [2] 金黎明,金鑫浩,侯熙彦,等.具有抗菌活性的海洋真菌天然产物研究进展[J].中国海洋药物,2017,36(4):66-74.
- [3] 褚福鑫,白志强,朱红惠.微生物中抗耐药菌活性天然产物的研究进展[J].天然产物研究与开发,2015,27(8):1466-1482.
- [4] SEENAYYA G, SUBBA-RAJU N. On the ecology and systematic position of the alga known as *Anabaenopsis raciborskii* (Wolosz.) Elenk. and a critical evaluation of the forms described under the genus *Anabaenopsis* [M]// DESIKACHARY T V. Taxonomy and biology of blue-green algae. Madras, India: University of Madras Press, 1972.
- [5] KOVÁCS A W, PRÉSING M, VÖRÖS L. Thermal-dependent growth characteristics for *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanoprokaryota) at different light availabilities: Methodological considerations [J]. Aquatic ecology, 2016, 50(4): 623-638.
- [6] 查广才,周昌清,麦雄伟.凡纳滨对虾低盐度高产虾池环境微生物生态研究[J].生态科学,2006,25(3):231-235.
- [7] 查广才,周昌清,黄建荣,等.凡纳对虾淡化养殖健康虾池水体生态研究[J].中山大学学报(自然科学版),2005,44(1):78-81,85.
- [8] 聂利华,杨东娟,刘亚群,等.一株虾池来源的螺旋拟柱孢藻藻株的分离鉴定及重金属离子 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对其生长的影响[J].微生物学报,2019,59(7):1307-1317.
- [9] 聂利华,李训仕,林壮森,等.拟柱孢藻对水体重金属的生物富集作用研究[J].水生态学杂志,2017,38(1):41-45.
- [10] 李胜生,董元华,刘云,等.微囊藻中叶绿素 a 提取方法的优化[J].环境监测管理与技术,2008,20(4):43-45.
- [11] 符家珠,杨宝,刁晓平,等.海南沿海羊栖菜和海带不同提取物的抑菌活性[J].广东畜牧兽医科技,2013,38(1):34-37.
- [12] 张卓然,黄敏.医学微生物学实验学[M].3版.北京:科学出版社,2008:28-29.
- [13] 刘蕾,雷腊梅,肖利娟,等.一座南亚热带小型水库水体营养状态与浮游植物的季节变化[J].生态科学,2008,27(2):71-76.
- [14] 李勇.浙江沿海典型大型藻类资源活性物质利用研究[D].上海:上海海洋大学,2018.