

共培养海绵微生物诱导抗菌活性物质的研究^{*}

郭鹏飞^{1,2} 靳艳¹ 张海涛¹ 虞星炬¹ 张卫^{1,*}

(中国科学院大连化学物理研究所 海洋生物产品工程组 大连 116023)¹

(中国科学院研究生院 北京 100039)²

摘要: 从大连潮间带繁茂膜海绵中分离得到 10 株放线菌, 对各菌进行抗枯草芽孢杆菌活性检测。结果显示: 当各菌单独培养时, 10 株菌中有 3 株菌显示抗菌活性; 当菌 Hp-053 与其余 9 株菌分别共培养时, 9 个共培养体系中 5 个显示出高于单培养的抗菌活性。进一步对部分共培养发酵液乙酸乙酯提取物进行薄层层析显色分析、生物自显影分析, 证明共培养能诱导海绵相关微生物产生不同于单培养的代谢产物和抗菌活性物质。共培养可能是一条重新开发利用一些由于无活性或低活性而被忽视的海洋微生物菌种的新途径。

关键词: 繁茂膜海绵, 海绵相关微生物, 共培养, 诱导, 抗菌活性

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0033-05

Potential of Co-culture Induction in Antibiotics Discovery from Bacteria-associated with Marine Sponge *Hymeniacidon perleve*^{*}

GUO Peng-Fei^{1,2} JIN Yan¹ ZHANG Hai-Tao¹ YU Xing-Ju¹ ZHANG Wei^{1,*}

(*Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023*)¹

(*Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039*)²

Abstract: Ten actinomycetes strains from inter-tidal marine sponge *Hymeniacidon perleve* of China Yellow Sea were isolated and bio-assayed for antibiotic activities. 3 of the 10 strains displayed antimicrobial activity when in monoculture. While strain Hp-053 was co-cultured with each of the other 9 strains, 5 of the 9 co-cultures exhibited enhancing antimicrobial activity. TLC results and bio-autography of extracted samples indicated that chemical compounds and antimicrobial compounds produced by co-cultures of sponge associated actinomycetes were different from those by monoculture. Co-culture induction may be a valuable novel tool for the exploitation of sponge associated microorganism.

Key words: *Hymeniacidon perleve*, Sponge-associated microorganism, Co-culture, Induction, Antimicrobial activity

海绵是海洋药物和天然产物的重要来源, 至今已经从海绵中分离得到大量的抗菌、抗肿瘤、抗病毒等天然活性物质, 是目前最大的海洋天然产物来源^[1]。海绵属于底栖过滤捕食动物, 其独特的摄食、滤食系统使其体内体表富集了大量的微生物。据统计, 海绵体内的微生物群落约占海绵干重的 40% 左右, 比周围海水中微生物含量的高出 2 个数量级^[2]。在一些分离自海绵的微生物发酵产物中发现了原以为是海绵产生的活性物质, 如原认为产自于海绵 *Dysidea herbacea* 的多溴化联苯醚抗生素被证明实际来源于此海绵的内生菌 *Oscillatoria spongeliae*^[3]。说明海绵相关微生物参与这些天然产物的合成或者是它们的真正来源^[4], 因此海绵相关微生物的研究已经逐渐成为海绵天然产物

^{*} 国家“973”计划资助项目 (No. 2003CB716001)

^{**} 通讯作者 Tel: 0411-84379069, E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

收稿日期: 2005-03-24, 修回日期: 2005-04-18

研究的重要部分。

通过方法的改进已从海绵中分离到越来越多的微生物,但是由于环境的改变大部分海绵相关微生物在纯培养的条件下并不表现出活性,因此海绵相关微生物天然产物的研究仍处于初级阶段^[5],目前迫切需要采用一些新的筛选方法来发现更多结构新颖的天然产物。共培养是在陆生微生物中已有很多研究基础的方法,通过微生物之间互惠共生或竞争等相互作用^[6],微生物共培养可以影响代谢产品的生产。但在海洋微生物的开发中这是一个被忽视的方法^[7],特别对于海绵这一复杂的微生态体系,微生物间的关系也非常复杂,海绵中分离到的相关微生物可能更易于在共培养条件下相互影响并产生一些生物活性物质。

繁茂膜海绵产于我国黄海潮间带,其粗提液表现出较强的抗菌活性,本实验室也已从中提取到许多有活性的化合物,同时也从该海绵分离得到一些放线菌^[8]。本文以10株繁茂膜海绵的放线菌为研究对象,通过抗菌实验、薄层层析显色和生物自显影等方法,比较单培养和共培养对菌株代谢产物和活性的影响,研究共培养对海绵相关微生物活性物质的诱导作用。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株分自大连地区潮间带海域的繁茂膜海绵 (*Hymeniacidon perleve*),并在本实验室中纯化后冷冻保存。

1.2 菌株初步鉴定

1.2.1 培养特征:通过对各菌在高氏固体培养基上的生长状况(快慢)、气生菌丝、基内菌丝和可溶性色素的观察,考察菌的培养特征。

1.2.2 分子鉴定:DNA提取参考细菌基因组DNA的小量制备方法^[9]。经纯化后采用通用引物进行16S rDNA基因的PCR扩增^[10]。PCR产物测序后,序列提交NCBI数据库,应用Blast程序与数据库中已有的细菌16S rDNA序列进行相似性比较分析,在属一级水平上确定菌株的归属。

1.3 共培养和单培养

以菌Hp-053为目标菌,其余9种菌分别为共生菌进行共培养实验。首先将各菌在TSB液体培养基中,30℃200r/min摇床培养48h制备各菌种子液;然后以3种接种顺序进行共培养:(a)5mL Hp-053种子液与5mL共生菌种子液混合接种于大豆淀粉液体发酵培养基(100mL/500mL flask)中,30℃200r/min摇床共培养108h;(b)5mL共生菌种子液先接种于发酵培养基中,摇床单培养24h后,接入5mL Hp-053种子液,再摇床共培养84h;(c)5mL Hp-053种子液先接种于发酵培养基中,摇床单培养24h后,接入5mL共生菌种子液,再摇床共培养84h。

单培养为将各菌单独接5mL种子液于发酵培养基中,摇床单培养108h。

1.4 抗菌活性测定

供试菌株:*Bacillus subtilis* (10002),购自国家菌种库。

抗菌活性测定培养基:牛肉膏蛋白胨琼脂。

采用杯碟法测定发酵液抗菌活性,每个牛津杯加入200 μ L发酵液上清,于32℃培养24h,检测抑菌环半径大小。

1.5 薄层层析显色

样品为发酵上清液调至pH为6.8后的乙酸乙酯抽提浓缩液(2mL);样品(上样

量为15 μ L, 展开剂为: 氯仿/甲醇 = 9: 1) 在薄层层析板上展开, 待层析板上溶剂挥发后, 用茴香醛-硫酸显色剂喷板, 然后在90 $^{\circ}$ C ~ 125 $^{\circ}$ C下加热3 ~ 5min显色。

1.6 生物自显影

将100 μ L枯草芽孢杆菌悬液(浓度为6.0 \times 10⁶ CFU/mL)均匀涂布于牛肉膏蛋白胨琼脂平板上, 然后在涂菌平板上贴上溶剂已经挥发的薄层层析板(样品已展开), 32 $^{\circ}$ C培养24 h, 观察记录抑菌圈。

2 实验结果

2.1 菌株初步鉴定结果

将分离自繁茂膜海绵的10株放线菌在高氏培养基中进行培养特征考察, 结果见表1。从表1可以看出各菌在高氏培养基上的培养特征之间没有重复, 属于不同的菌种。进一步的分子鉴定: 对各菌16S rDNA部分序列(约500 bp)进行测序, 并同GenBank中的16S rDNA序列进行比对和相似性分析, 初步确定Hp-B10属于*Nocardiopsis*属, 其余9株菌都属于*Streptomyces*属。

表1 菌株培养特征

菌株编号	生长状态	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素	菌属
Hp-053	优	灰褐色	灰色	无	<i>Streptomyces</i>
Hp-111	差	灰色	灰色	无	<i>Streptomyces</i>
Hp-156	优	灰色	浅灰色	无	<i>Streptomyces</i>
Hp-150	优	灰黄色	灰棕色	无	<i>Streptomyces</i>
Hp-B10	良	灰色	深红色	深红色	<i>Nocardiopsis</i>
Hp-137	优	浅灰黄色	灰棕色	无	<i>Streptomyces</i>
Hp-144	优	灰色	浅灰白色	无	<i>Streptomyces</i>
Hp-B19	优	黑色	黑色	无	<i>Streptomyces</i>
Hp-B40	良	灰色	黄色	无	<i>Streptomyces</i>
Hp-131	良	浅灰色	浅黄色	黄色	<i>Streptomyces</i>

2.2 测试菌株在单培养和共培养模式下的抗菌活性

采用牛津杯法测单培养和共培养发酵液抑制枯草芽孢杆菌的活性, 结果见表2。单培养时10个测试菌株中只有3个表现出活性: Hp-053, Hp-156和Hp-137, 抑菌环半径分别为3.5mm, 5.0mm, 2.0mm。以Hp-053为目标菌株, Hp-156, Hp-137分别与其共培养时, 抑菌活性均比单培养时有所增强, 抑菌环半径分别为6.5mm和6.0mm。当Hp-053与单培养不显示活性的Hp-111, Hp-150, Hp-B10这3株菌分别共培养时, 共培养的抑菌活性均有明显提高, 抑菌环半径分别为8.5mm, 6.0mm和5.5mm, 都远高于Hp-053单培养时的活性, 说明共培养诱导能明显促进海绵相关微生物活性代谢物质的产生。

表2 测试菌株在单培养和共培养模式下的抗菌活性

菌株编号	共培养 ²		单培养
	抑菌环半径 (mm) ¹		抑菌环半径 (mm)
Hp-053			3.5 \pm 0.5
Hp-111	8.5 ¹	(c) ³ \pm 0.8	0
Hp-156	6.5	(c) \pm 0.5	5.0 \pm 0.5
Hp-150	6.0	(c) \pm 0.5	0
Hp-B10	5.5	(a) \pm 0.5	0

续表2

Hp-137	6.0	(c) ±0.5	2.0 ±0.5
Hp-144	0		0
Hp-B19	0		0
Hp-B40	0		0
Hp-131	0		0

¹抑菌环的半径：即抑菌圈的半径和牛津杯的半径差，²共培养表示 Hp-053 与其余 9 种菌分别进行共培养实验，³括号内的字母表示共培养的接种顺序（详见 1.3 共培养和单培养）

2.3 代谢产物谱

通过薄层层析谱分析微生物代谢产物，考察单培养、共培养对代谢产物的影响。采用薄层茴香醛-硫酸显色对发酵液抽提物的薄层层析结果进行分析，结果如图 1 所示，当 Hp-111 与 Hp-053 分别单培养时，其提取物没有类似颜色的条带出现，而当这两株菌共培养时其提取物显示深蓝色条带，与单培养时的结果完全不同。同样 Hp-B10 与 Hp-053 共培养，在 $R_f \approx 0.2$ （图中画圈处）出现了一条蓝色的条带，而在单培养时两个菌种都没有该带，经多次实验证明并不是浓度等其他原因引起，而是确实出现了新的条带。Hp-156 与 Hp-053 共培养，所有的条带颜色与单培养相比明显加深。以上实验均经过多次重复，而且上样浓度均保持相同，说明产生以上差别是代谢产物本身引起的，而并非操作误差引起的。

2.4 活性成分的确定

为了进一步确定共培养后活性组分的变化，采用生物自显影对发酵液抽提物进行分析，结果如图 2 所示。Hp-111, Hp-053 单培养时其提取物在薄层层析的物质中不显示活性，而 Hp-111 与 Hp-053 共培养提取物有明显的抑菌圈，这证明这两菌的共培养产生了不同于单培养的活性物质。Hp-156 单培养提取物有一个较小的抑菌圈，而 Hp-

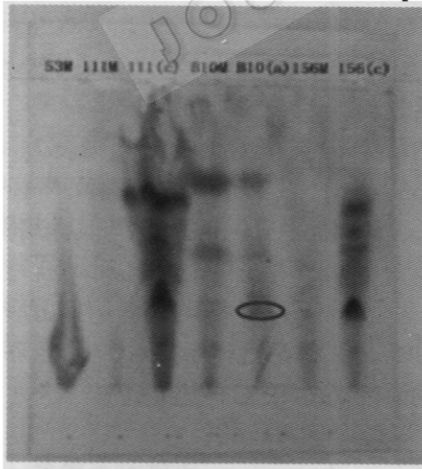


图1 薄层显色

展开剂：氯仿/甲醇=9:1 v/v，显色剂：茴香醛-硫酸，样品从左到右依次为：53M—Hp-053 单培养，111M—Hp-111 单培养，111(c)—Hp-111 和 Hp-053 共培养，B10M—Hp-B10 单培养，B10(a)—Hp-B10 和 Hp-053 共培养，156M—Hp-156 单培养，156(c)—Hp-156 和 Hp-053 共培养

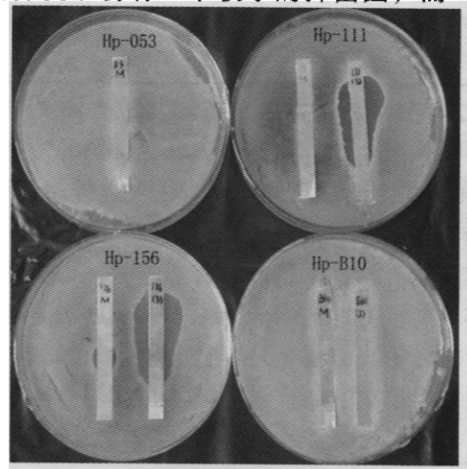


图2 生物自显影

薄层展开条件和样品均与薄层显色相同，供试菌株为枯草芽孢杆菌，样品依次为：Hp-053 Hp-053 单培养，Hp-111（左：Hp-111 单培养，右：Hp-111 和 Hp-053 共培养），Hp-156（左：Hp-156 单培养，右：Hp-156 和 Hp-053 共培养），Hp-B10（左：Hp-B10 单培养，右：Hp-B10 和 Hp-053 共培养）

156 与 Hp-053 共培养提取物在相同的位置有较大的抑菌圈, 并且在不同的位置也有抑菌圈, 这说明共培养不仅可能增强原抗生素的产量而且产生新的活性物质。需要说明的是, Hp-053, Hp-B10 及 Hp-B10 和 Hp-053 共培养在活性检测中有活性而在生物自显影中没有活性, 可能的原因: 可能其活性物质是水溶性物质, 不能被有机溶剂抽提, 或者是因为生物自显影所用的样品量非常少, 采用牛津杯法所需的样品量非常大, 所以牛津杯法中显示的活性在生物自显影中可能就不显示。

3 讨论

通过抗菌活性, 薄层显色及生物自显影对分离自繁茂膜海绵的 10 株放线菌在单培养和共培养两种不同培养模式下, 对代谢产物的活性及分布进行研究, 结果表明, 多数海绵相关菌 (5/9) 在与 Hp-053 共培养时都能相互作用、提高活性; 说明海绵相关微生物共培养时不仅可以增强海绵相关微生物的活性, 而且可以相互诱导产生新的不同于单培养的活性代谢产物。由于这 10 株菌都来自于繁茂膜海绵, 因此同时也验证了文献中的结论: 来自于同一环境的微生物比不同环境的微生物更容易相互作用^[6]。

虽然实验室的条件可能与自然环境有差异, 但是从海绵相关微生物之间较强的相互作用, 可以推测: 在海绵体内, 这些海绵相关微生物之间可能更多的通过相互作用或与宿主海绵的相互作用来完成一些重要的代谢功能。共培养诱导是一条重新开发利用一些由于无活性或低活性而被忽视的菌种的新途径, 是一种有效的利用海绵相关微生物的方法。

参考文献

- [1] Blunt J W, Brent R C, Munro M H G, *et al.* *Natural Products Reports*, 2004, **21**: 1 ~ 49.
- [2] Osinga R, Armstrong E, Burgess J G B, *et al.* *Hydrobiologia*, 2001, **461**: 55 ~ 62.
- [3] Osinga R, Tramper J, Wijffels R H. *Trends in Biotechnology*, 1998, **16**: 130 ~ 134.
- [4] Proksch P, Edrada R A, Ebel R. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, **59**: 125 ~ 134.
- [5] Trischman J A, Oeffner R E, de Luna M G, *et al.* *Marine Biotechnology*, 2004, **6**: 215 ~ 220.
- [6] 李春笋, 郭顺星. *微生物学通报*, 2004, **31** (3): 156 ~ 161.
- [7] Burgess J G, Jordan E M, Bregu M, *et al.* *Journal of Biotechnology*, 1999, **70**: 27 ~ 32.
- [8] 张海涛, 靳艳, 吴佩春, 等. *微生物学通报*, 2004, **31** (5): 60 ~ 64.
- [9] RE 布坎南, E 吉本斯. *伯杰细菌鉴定手册 (第八版)*. 北京: 科学出版社, 1984.
- [10] Webster N S, Wilson K J, Blackall L L, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67** (1): 434 ~ 444.