



## 专论与综述

## 海洋动物来源微生物的共培养研究进展

陈雷 申琳溪 王光玉\*

哈尔滨工业大学(威海)海洋科学与技术学院生物工程系 山东 威海 264209

**摘要:**近年来,由于一些新疾病的发生和细菌耐药性的出现,微生物来源次级代谢产物的筛选重复率越来越高,微生物一些代谢基因在现有实验室条件下无法表达,所以需要发现新的微生物资源,同时找到激活微生物代谢产物基因的方法。海洋动物体内蕴含着大量的共附生微生物资源,可以产生很多具有生物活性的化合物,是潜在的药用资源。本文综述了近年来海洋动物(海鞘、海绵、珊瑚和海葵等)来源的微生物进行共培养的研究策略,包括共培养菌株的选择、共培养条件、群体感应和信号分子对共培养菌株的影响,以及不同种类微生物间的共培养实例。共培养与单培养相比,增加了次级代谢产物的种类,提高了次级代谢产物的生物活性或产量。共培养的研究有助于发现新的海洋动物来源微生物的活性天然产物,为海洋药物的开发提供新思路。

**关键词:** 海洋动物, 微生物, 共培养, 次级代谢产物

## Co-culture of microorganisms from marine animals: a review

CHEN Lei SHEN Linxi WANG Guangyu\*

Department of Bioengineering, School of Marine Science and Technology, Harbin Institute of Technology at Weihai, Weihai, Shandong 264209, China

**Abstract:** In recent years due to some new diseases and the emergence of bacterial resistance, the higher screening repetition rate of secondary metabolites from microorganisms, some metabolic genes not expressed in the laboratory conditions, it is necessary to find new microbial strains and activate genes of microbial metabolites. Marine animals harbor rich symbiotic microbial communities, which can produce many compounds with biological activities, and are potential medicinal resources. This paper reviews the research on the co-culture of marine microorganisms associated with marine animals (ascidians, sponges, corals and sea anemones) in recent years, including the selection of co-culture strains, the conditions of co-culture, the influence of quorum sensing and signal molecules on co-culture strains, and examples of co-culture among different kinds of microorganisms. Compared with single culture, the kinds of secondary

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31300009); Natural Scientific Research Innovation Foundation in Harbin Institute of Technology (HIT.NSRIF.2014127); Discipline Construction Guide Foundation in Harbin Institute of Technology at Weihai (WH20150204); Research Innovation Foundation in Harbin Institute of Technology at Weihai (2019KYCXJJYB15)

\*Corresponding author: Tel: 86-631-5682925; E-mail: wanggy18\_2007@163.com

**Received:** 11-03-2020; **Accepted:** 24-06-2020; **Published online:** 23-09-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金(31300009); 哈尔滨工业大学科研创新基金(HIT.NSRIF.2014127); 哈尔滨工业大学威海校区学科建设引导基金(WH20150204); 哈尔滨工业大学威海校区科研创新基金(2019KYCXJJYB15)

\*通信作者: Tel: 0631-5682925; E-mail: wanggy18\_2007@163.com

收稿日期: 2020-03-11; 接受日期: 2020-06-24; 网络首发日期: 2020-09-23

metabolites or the biological activity of secondary metabolites or the productions of secondary metabolites are increased in co-culture. Co-culture is an important approach for discovering the active natural products from marine microorganisms associated with marine animals, and a new idea for the development of marine drugs.

**Keywords:** marine animal, microorganism, co-culture, secondary metabolites

海洋动物是生物活性天然产物的重要来源<sup>[1]</sup>, 如已经从海鞘(Ascidian)中分离到 1 000 多种化合物<sup>[2]</sup>。越来越多的证据表明, 从海洋动物中分离到的化合物不是海洋动物本身产生的, 而是由与其共生的微生物产生的<sup>[3]</sup>。近些年来已经对海洋动物中的微生物进行了大量的研究, 但是仍然有很多微生物无法获得纯培养。已经获得纯培养的微生物, 在基因组学研究中发现了多个次级代谢产物的合成基因, 但其在现有培养条件下不表达, 存在着沉默的生物合成途径<sup>[4-5]</sup>。由于病原菌对抗生素的耐药性不断增加, 发现新的海洋微生物、提高现有微生物产生新次级代谢产物或提高其生物活性都非常重要。为了最大程度地开发利用海洋动物来源微生物的天然资源, 通过有效的微生物共培养技术可以获得生物活性更显著、化学成分更丰富的次生代谢产物<sup>[6]</sup>。

共培养指在相同的封闭环境中培养 2 个或 2 个

以上的微生物<sup>[6]</sup>。在自然环境中种内和种间相互作用关系普遍存在。共培养是模拟微生物生长的自然环境, 在有其他微生物存在的条件下改变或增加其初级代谢产物的生成<sup>[7]</sup>。研究表明, 共培养可以增加单培养时化合物的产量, 提高化合物的活性, 更重要的是激活以前未表达的代谢物合成途径, 产生单培养时未产生的代谢产物<sup>[8]</sup>。Onaka 等将 112 株链霉菌进行共培养, *Tsukamurella pulmonis* 可以促进 36.6% (41/112 株)的链霉菌 *Streptomyces* sp.产生新的次级代谢产物, 使 54.5% (61/112 株)的链霉菌产生更多的次级代谢产物; *Rhodococcus erythropolis* 和 *Corynebacterium glutamicum* 也具有相似的效果, 分别促进 36 株和 37 株链霉菌产生新的次级代谢产物<sup>[9]</sup>。

本文综述了近年来海洋动物(海鞘、海绵、珊瑚和海葵等)来源的微生物进行共培养的研究策略(图 1), 包括共培养菌株的选择、共培养条件、群

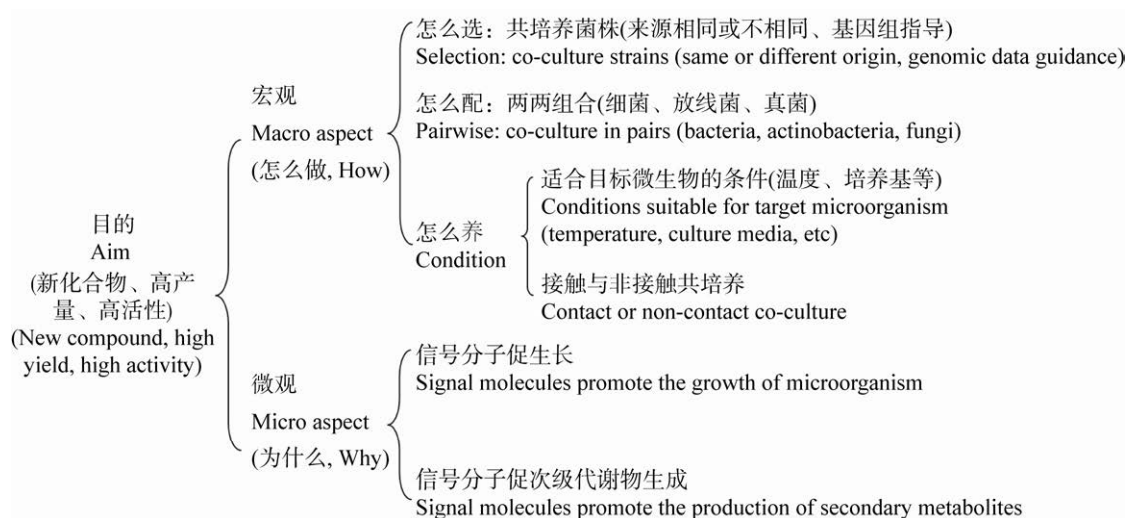


图 1 海洋动物来源微生物的共培养研究策略

Figure 1 The research on the co-culture of marine microorganisms associated with marine animals

体感应和信号分子对共培养菌株的影响,以及不同种类微生物间的共培养实例。共培养与单培养相比,增加了次级代谢产物的种类,提高了次级代谢产物的生物活性或产量。共培养的研究有助于发现新的海洋动物来源微生物的天然活性产物,为海洋药物的开发提供新思路。

## 1 共培养菌株的选择

### 1.1 相同来源微生物之间的共培养

来自同一环境的微生物往往存在协同进化作用。为了模拟海洋动物体内的微环境,往往把从同一种动物体内分离出来的微生物进行共培养,产生新的抗菌活性物质或提高抗菌活性。EI-Hawary 等将红海海域采集的海绵(*Callyspongia siphonella*)中分离出的 2 种放线菌 *Saccharomonospora* sp. UR22 和 *Dietzia* sp. UR66 进行共培养<sup>[10]</sup>。郭鹏飞等把繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perleve*)中分离出的多株链霉菌属(*Streptomyces*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*)的放线菌进行共培养<sup>[11]</sup>。黄艳琴等将分离自细薄星芒海绵(*Stelletta tenui*)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株 A72 和 A75 进行共培养<sup>[12]</sup>。董杰杰等将从南海海域的鳞海底柳珊瑚(*Melitodes squamata*)中分离出来的真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 和细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 进行共培养<sup>[13]</sup>。

### 1.2 不同来源微生物之间的共培养

不同来源的微生物共培养往往会形成竞争和拮抗作用,为了争取生存环境中的有限自然资源、竞争生存空间或维持物种间信息传递,往往会产生单独培养时不会产生的次级代谢产物,处于优势的菌株往往会产生活性次级代谢产物以抑制另一株菌的生长,而在这种条件下所产生的次级代谢产物可能具有很好的活性,如抑菌、抗肿瘤等<sup>[14]</sup>,因此,将不同来源的微生物进行共培养常作为挑选共培养菌株的筛选办法。

Sung 等将海鞘 *Styela canopus* 中分离出来的 *Streptomyces* sp. PTY087I2 和 3 种革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、甲氧西林敏感金黄

色葡萄球菌(Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA)、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)以及一种革兰氏阴性菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)进行共培养<sup>[15]</sup>。郭秀春等将繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perleve*)来源的细菌 *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-1 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)共培养<sup>[16]</sup>。Dashti 等将红海海域的海绵 *Spherospongia vagabunda* 分离出的 *Actinokineospora* sp. EG49 和地中海海域海绵 *Dysidea avara* 分离出来的 *Nocardia* sp. RV163 进行共培养<sup>[17]</sup>。

在进行海洋微生物活性筛选时常会检测抗菌活性。如果发现目标菌株对某一种或几种指示菌具有较好的抗菌活性,后期可以考虑通过共培养的方法继续探究是否有新化合物的生成。一株青霉菌属的菌株 *Penicillium* sp. ZZ380 是从野生螃蟹 *Pachygrapsus crassipes* 体内分离出来的,单独培养时分离到的多个化合物对 MRSA 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)具有较好的抗菌活性,如 Pyrrospirones C、Pyrrospirones F、Penicypyrroether A 对这 2 株指示菌的最低抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)值均在 5  $\mu\text{g/mL}$  以下;继续将菌株 ZZ380 与 MRSA 或 *E. coli* 进行共培养,通过对菌株 ZZ380 产生生存压力来刺激抗菌活性代谢产物的产生,结果表明,将菌株 ZZ380 与 2 株病原菌特别是与 MRSA 的共培养可以促进其产生具有抗菌活性的物质,包括 Pyrrospirones 类化合物<sup>[18]</sup>。

### 1.3 基因组指导下的共培养

放线菌 *Streptomyces* sp. PTY087I2 是从海鞘 *Styela canopus* 中分离出来的,对其基因组分析发现具有 37 个次级代谢产物的生物合成基因簇,包括:聚酮合酶(Polyketide Synthases, PKS)基因,非核糖体肽合成酶(Non-Ribosomal Peptidesynthetases, NRPS)基因, I、II、III 型萜类化合物,杀菌素和丁内酯等;但是将 *Streptomyces* sp. PTY087I2 进行

单培养得到的次级代谢产物都很少, 因此将 *Streptomyces* sp. 与枯草芽孢杆菌、MSSA、MRSA 和铜绿假单胞菌进行共培养, 发现 3 种抗生素 Granaticin、Granatomyacin D 和 Dihydrogranaticin B 的产量增加, 并且抗革兰氏阳性菌的活性显著增强<sup>[15]</sup>。

## 2 共培养条件

### 2.1 共培养温度

大约 90% 海洋环境的温度都在 5 °C 以下, 绝大多数海洋微生物的生长要求较低的温度, 一般温度超过 37 °C 就停止生长或死亡, 实验室培养海洋微生物多在 20–28 °C。实验室培养陆地来源的细菌多在 37 °C 培养, 放线菌和真菌多采用 28–30 °C 培养。对不同来源的菌株进行共培养时, 温度的选择主要考虑目标菌株的适宜生长温度, 同时兼顾另外一个共培养菌株的温度范围。在序列培养时可以将 2 株菌分别按照其最适培养温度培养到对数期, 然后接种, 再按照目标菌株的最适温度进行共培养。如: 将分离自繁茂膜海绵 (*H. perleve*) 的细菌 *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-1 在 25 °C 下培养至对数生长期, 把金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26001 在 37 °C 下培养 2 d 后, 将 2 株菌置于 25 °C 条件下共培养到目标菌株 NJ6-3-1 达到平台期<sup>[16]</sup>。

### 2.2 培养基选择

不同种类的培养基对微生物产生代谢产物的种类和产量都有影响, 明确共培养的目的和了解共培养菌株的代谢特点有助于找到适合的共培养培养基。蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)和粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)是从腐败的海鲈鱼中分离出来的具有群体感应现象的细菌, 与 *H. alvei* 共培养促进了 *S. marcescens* 产生信号分子酰基高丝氨酸内酯(N-Acylhomoserine Lactones, AHLs)生物被膜的产生量, 以达到保护自身的目的, 这种影响可能与菌群间群体感应现象有关<sup>[19]</sup>。这个群体感应

还受到培养基成分的影响, NaCl 质量分数为 0.5%–2.0% 时可以刺激菌株分泌 AHLs, 当质量分数大于 2.0% 时, 细菌细胞因渗透压过高而失水死亡, 菌株生长受到抑制, 进而抑制生物被膜的形成, AHLs 产量明显减少; pH 为 7.0 时产生 AHLs 的能力最强, pH 过低会导致细菌的胞外分泌物变性, pH 过高不利于菌体的聚集, 都会抑制生物被膜的形成和 AHLs 的产量下降; 共培养体系以尿素为氮源, 菌体密度较大, 但产生 AHLs 的能力较弱; 以蛋白胨和氯化铵为氮源则菌体密度较小, 但产生 AHLs 的量较多; 当共培养体系的碳源为葡萄糖、果糖、木糖或麦芽糖时, 产生 AHLs 的能力较强, 而碳源为乳糖或蔗糖时产生 AHLs 的能力较弱<sup>[19]</sup>。

### 2.3 接触和不接触培养

目前共培养大多采用接触共培养的方式, 即目标菌株和共培养菌株在同一种培养基上(或中)进行接触培养。但是由于目标菌株和共培养菌株的生长速度不同, 接触培养会使菌株之间难以达到平衡的生长状态。不接触共培养的方式, 即不同菌株生长在装有不同培养基的器皿中(往往一大一小), 然后将较小的敞口器皿置于较大的器皿中进行共培养。宋腾飞将青霉菌 ZZ380 分别与 MRSA 和大肠杆菌(*E. coli*)进行不接触共培养, 把青霉菌 *Penicillium* sp. ZZ380 接种在含有 250 mL 改良甘油精氨酸培养基的 500 mL 锥形瓶中, 将 MRSA 和大肠杆菌(*E. coli*)分别接种在装有营养肉汤培养基的开口的 20 mL 菌种瓶中, 将菌种瓶用 10–15 cm 的棉线系住, 悬挂在已接种 ZZ380 的甘油精氨酸培养基培养瓶的上部, 静置培养数天, 并以单独接种在改良甘油精氨酸培养基的 ZZ380、MRSA 和大肠杆菌(*E. coli*)作为对照组, 青霉菌 ZZ380 和 MRSA 不接触共培养组与对照组相比其代谢产物的种类和产量都有明显的提高, 共培养物的粗提物对 MRSA 和大肠杆菌(*E. coli*)的生长均有较强的抑制作用<sup>[18]</sup>。

### 3 群体感应和信号分子对共培养菌株的影响

微生物的群体感应(Quorum Sensing, QS)是指微生物在其生长过程中根据种群密度的变化来调控基因表达的一种方式<sup>[20]</sup>。当细菌密度达到一个临界阈值,它们所释放的信号分子积累到一定水平,细菌就会通过细胞之间的信息交流而引发群体感应,改变和协调它们之间的行为,共同展示出某些生理特性,包括抗生素的生物合成和生物膜的形成等<sup>[21-22]</sup>。在共培养的条件下,菌株可以产生单培养时无法产生的新的次生代谢产物,这可能是由于微生物之间的信息交流(Crosstalk)或化学防御机制获得了来自其他微生物的信号,开启了隐性生物合成基因<sup>[23]</sup>。当微生物与其他微生物相互作用时,它们会产生特定的代谢物,这些代谢物可以对其他微生物产生促进或抑制作用,成为信号分子<sup>[24]</sup>。一般来说,具有群体感应的细菌能够合成并释放一种被称为自体诱导物(Autoinducer)或信息素(Pheromone)的信号分子。不同种类细菌通讯的化学信号分子不同,大致可分为:寡肽类(Autoinducing Peptides, AIPs),以革兰氏阳性菌( $G^+$ )产生为主;酰基高丝氨酸内酯类(Acyl-Homoserine Lactones, AHLs),以革兰氏阴性菌( $G^-$ )产生为主;其他类信号分子如二酮哌嗪类(Diketopiperazines, DKPs)、假单胞菌喹诺酮信号分子(Pseudomonas Qinolone Signal, PQS)等<sup>[25]</sup>。

#### 3.1 信号分子促进生长

从湛江的牡丹珊瑚(*Pectinia paeonia*)中分离的海洋土曲霉(*Aspergillus terreus*) C23-3 其代谢产物具有一定的抗菌、抗氧化及乙酰胆碱酯酶抑制活性,并发现其可产生特征性次生代谢产物丁内酯-I<sup>[26]</sup>。丁内酯-I 是土曲霉的一种群体自感应信号分子,在菌丝生长后期具有促进孢子形成的作用<sup>[27]</sup>。将活菌或灭活菌体的枯草芽孢杆菌、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)分别以不同时间与土曲

霉 C23-3 进行共培养,发现均可产生一些丁内酯类代谢产物<sup>[6]</sup>。

#### 3.2 信号分子促进新代谢产物的生成

*Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-1 从繁茂膜海绵中分离获得,其抗菌活性同时受到种内和种间群体感应系统的调控,当 NJ6-3-1 细胞密度达到一定阈值( $OD_{630}=0.4$ )时才能产生抗菌活性物质,说明 NJ6-3-1 产生代谢物质依赖于细胞密度,即受到种内群体感应信号的调控;当模拟自然的竞争环境引入外源细菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)时,*S. aureus* 可以产生 3 种 DKPs 信号分子,而且均是单培养未产生的,其中 Cyclo-(L-Phe-L-Val)可以作为自诱导物,使 NJ6-3-1 在低细胞密度条件下就能产生抗菌活性物质,说明 NJ6-3-1 还受到种间群体感应信号的调控<sup>[16,28]</sup>。

### 4 海洋动物来源微生物的共培养

#### 4.1 放线菌和放线菌共培养

临床上使用的许多药物都是由放线菌产生的,尤其链霉菌属的放线菌是化学多样性和生物活性天然产物的重要来源。现在已经从很多海洋动物中分离到海洋放线菌<sup>[29]</sup>。

*Saccharomonospora* sp. UR22 和 *Dietzia* sp. UR66 是从红海海域海绵 *Callyspongia siphonella* 中分离出的 2 株放线菌,*Saccharomonospora* sp. UR22 的纯培养可以产生 6 种已知的化合物,而 2 种放线菌共培养可以产生 5 种与纯培养不同的化合物,一种新型的溴化氧吲哚生物碱(Saccharomonosporine A, 化合物 1)、Convolutamydine F、6-Bromo-3-Hydroxy-3-(1H-Indol-3-Yl) Indolin-2-One (化合物 3)、Nonactin 和 Vibrindole,共培养产生的化合物 1 和 3 作为潜在的 Pim-1 酶抑制剂可以抑制肿瘤细胞的生长<sup>[10]</sup>。

*Actinokineospora* sp. EG49 是从红海海域的海绵 *Spheciospongia vagabunda* 中分离出的放线菌,放线菌 EG49 可以产生 2 种新的 Angucycline 类抗生素,即 Actinosporin A 和 B,其中 Actinosporin A

对布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)表现出较好的抗性<sup>[30]</sup>。*Nocardiopsis* sp. RV163 是从地中海海域海绵 *Dysidea avara* 分离出来的放线菌, 其纯培养的代谢产物主要是信号分子二酮哌嗪类化合物; 但在 2 种放线菌的共培养中, 可以产生包括 Angucycline、Diketopiperazine 和  $\beta$ -carboline 衍生物 1–10 在内的 13 种已知化合物, 其中有 3 种化合物是纯培养中无法检测到的, 包括 N-(2-Hydroxyphenyl)-Acetamide、1,6-Dihydroxyphenazine 和 5a,6,11a,12-Tetrahydro-5a,11a-Dimethyl[1,4]Benzoxazino[3,2-b][1,4]Benzoxazine, 纯培养中无法产生的化合物 1,6-Dihydroxyphenazine 显示出对病原菌 *Bacillus* sp. P25 和布氏锥虫(*T. brucei*)的抗性, 还能抑制 *Actinokineospora* sp. EG49 的生长<sup>[17]</sup>。

从大连潮间带繁茂膜海绵 *Hymeniacidon perleve* 中分离得到 10 株放线菌, 其中, Hp-B10 属于拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*), 其余 9 个菌株都属于链霉菌属(*Streptomyces*), 对每个菌株纯培养和用 Hp-053 与其余 9 个菌株分别共培养, 然后测定对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的抗菌活性, 结果表明, 单培养时 10 个测试菌株中只有 3 个菌株(Hp-053、Hp-156 和 Hp-137)表现出抗菌活性, 而 9 个共培养体系中的 5 个显示出高于单培养的抗菌活性, 说明共培养能诱导海绵来源微生物产生不同于单培养时的代谢产物和抗菌活性物质, 但是活性物质的具体化学结构还需进一步研究<sup>[11]</sup>。

#### 4.2 细菌和细菌共培养

从我国南海三亚海域细薄星芒海绵(*Stelletta tenuis*)中分离出 104 株海洋细菌, 进行大肠杆菌(*E. coli*)等 7 种指示菌的抗菌活性筛选, 根据形态学和生化指标分析初步确认细菌 A72 和 A75 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*), A72 和 A75 菌株单独培养对荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和白假丝酵母(*Candida albicans*)均无明显的抑菌活性, 但是 A72 和 A75 组合对这 2 种指示菌的抑菌效果明显, 说明共培养产生了新的抗菌活性物质<sup>[12]</sup>。

海洋细菌 *Staphylococcus lentus* SZ2 是从印度海边的蜗牛 *Phasinella* sp. 表面分离出来的, 其可以产生一种糖脂类的表面活性剂 BS-SLSZ 2, 对卤虫(*Artemia salina*)没有毒性; 将 *S. lentus* SZ2 与水产养殖病原菌哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)共培养后, 发现 *V. harveyi* 的生长完全被抑制; 与 *S. lentus* SZ2 单培养相比, *S. lentus* SZ2 产生 BS-SLSZ 2 的含量增加, 表现出更强的抗菌活性, 明显抑制了病原菌 *V. harveyi* 和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)生物膜的形成; BS-SLSZ 2 可以有效地保护卤虫幼虫抵抗 *V. harveyi* 和 *P. aeruginosa* 的感染; 试验结果表明, BS-SLSZ 2 可以作为水产养殖中病原菌生物膜产生的抑制剂, 有效地降低了抗生素的使用<sup>[31]</sup>。

从海绵(*Pseudoceratina purpurea*)中分离出来的 4 株能够产生抗菌活性物质的细菌包括 *Bacillus licheniformis* PS2、PS79 和 *Bacillus pumilus* PS9 及 *Virgibacillus pantothenicus* PS11, 将这 4 株细菌与人病原菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)以及 3 种海洋污损细菌(FB-1、FB-5 和 FB-9)进行共培养试验, 共培养后 4 株海绵来源细菌的抗菌活性普遍增加, 其中海绵来源细菌 PS79 与海洋污损细菌 FB-9 共培养后抗菌活性增加最为明显, 抑菌圈直径由 3 mm 增加到 7 mm<sup>[32]</sup>。

#### 4.3 放线菌和真菌共培养

放线菌 *Streptomyces rochei* MB037 分离自我国南海永新岛采集的海绵 *Dysidea arenaria*, 真菌菌株 *Rhinochrysiella similis* 35 是采自我国南海鹿回头暗礁的柳珊瑚, 将两者进行共培养后获得 5 种化合物, 包括 2 个罕见的带有氰基的脂肪酸 Borrelidin J 和 K、1 个新的苯丙- $\gamma$ -吡喃酮衍生物 7-Methoxy-2,3-Dimethylchromone-4-One 和 2 个已知的十八元环大环内酯 Borrelidin 和 Borrelidin F, 其中 Borrelidin J 和 K 只在共培养中产生, 7-Methoxy-2,3-Dimethylchromone-4-One 虽然在 *S. rochei* MB037 单独培养时也有产生, 但是共培养获得的产量显

著提高;对几种化合物进行抗菌活性检测,Borrelidin J 显示出对 MRSA 很强的抑制活性, $MIC$  值为  $0.195\ \mu\text{g/mL}$ ,比环丙沙星(Ciprofloxacin)的活性还要强( $MIC$  值为  $0.313\ \mu\text{g/mL}$ )<sup>[33]</sup>。

#### 4.4 真菌和细菌共培养

海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 和海洋细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 都是从南海海域的鳞海底柳珊瑚(*Melitodes squamata*)中分离出来的,将 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 进行纯培养以及将两者共培养的结果发现,在主要次生代谢产物方面两者没有明显差异,包括抗菌物质青霉素(Penicillic Acid)、青霉素类似物、5(6)-Dihydropenicillic Acid 和 9-Chloro-8-Hydroxy-8,9-Deoxyasperlactone 以及红色素 Viopurpurin,但主要抗菌活性化合物青霉素和主要红色素 Viopurpurin 的产率比纯培养时均明显增多,这可能是真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 抵抗细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE 001 时由真菌分泌更多水解酶而得到的水解产物<sup>[13]</sup>。

真菌 *Aspergillus versicolor* 是从海绵 *Agelas oroides* 中分离出来的,将其与枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) 168 trpC2 进行共培养得到 1 个新的环五肽 Cotteslosin C、1 种新的喹啉酮生物碱 22-Epi-Aflaquinolone B、2 种新的蒽醌(Anthraquinone)和 30 个已知化合物,而这些都是在真菌单培养时未检测到的;此外,与单独培养 *A. versicolor* 相比,已知化合物 Versicolorin B、Averufin 和 Sterigmatocystin 的产量分别增加了 1.5、2.0 和 4.7 倍<sup>[34]</sup>。

真菌 *Penicillium* sp. ZZ380 是从野生螃蟹 *Pachygrapsus crassipes* 体内分离出来的,共培养菌株为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) ATCC14579,共培养后产生的 Citrin、GTRI-02、Aloesaponol III、(2S,4S)-2,4-Dimethyldecanol、Phomenin A 和 Xerucitrinic Acid A 都是 ZZ380 单独培养不能产生的化合物,其中,(2S,4S)-2,4-Dimethyldecanol 抑制人胶质瘤细胞 U87MG 和 U251 的活性最强, $IC_{50}$

值分别为  $6.17\ \mu\text{mol/L}$  和  $11.85\ \mu\text{mol/L}$ ,其还可以抑制 MASA 和大肠杆菌(*E. coli*)的生长, $MIC$  值分别为  $7.5\ \mu\text{g/mL}$  和  $5.0\ \mu\text{g/mL}$ <sup>[18]</sup>。

#### 4.5 真菌和真菌共培养

杨凯琳对 9 株海葵来源的真菌进行了共培养的研究,对作用明显的 3 组真菌进行扩大培养,从 *Pestalotiopsis* sp. TA26-33 和 *Cochliobolus* sp. TA26-46 的共培养浸膏中分离得到 3 个大环内酯类化合物,其中化合物 Paecilomycin F 在真菌 TA26-46 单独培养和共培养时产量会发生明显变化,并表现出较好的抑菌活性<sup>[14]</sup>。

青霉菌(*Penicillium citrinum*) SCSGAF 0052 和曲霉菌(*Aspergillus sclerotiorum*) SCSGAF 0053 都是从中国南海柳珊瑚(*Muricella flexuosa*)中分离得到的,共培养体系中分离出 6 个新的化合物,包括 Sclerotiorumin A-C、1-(4-Benzyl-1H-Pyrrol-3-Yl)Ethanone、Aluminiumneohydroxyaspergillin (化合物 5)和 Ferrineohydroxyaspergillin,其中,化合物 5 能够选择性地抑制淋巴瘤细胞 U937 的增殖( $IC_{50}$  为  $4.2\ \mu\text{mol/L}$ ),对鳃足虫具有较强的毒性( $LC_{50}$  为  $6.1\ \mu\text{mol/L}$ ),还能抑制 *S. aureus* 生物膜的形成<sup>[35]</sup>。

### 5 问题与展望

随着共培养技术在海洋动物来源微生物研究方面的应用,一些新的次级代谢产物被发现,或使一些代谢产物的生物活性增强,为海洋药物的开发奠定了研究基础。目前共培养技术仍存在一些问题,对于具有协同作用关系菌株的筛选和组合还是一个随机的过程,缺乏理论指导,对于共培养菌株之间作用机制的研究还不完善<sup>[36]</sup>。如何准确地寻找群体感应系统中自诱导信号和外诱导信号,多数信号分子的化学本质尚未确定<sup>[16]</sup>。这些新产生的次级代谢产物对共培养的菌株有什么影响?共培养过程的中期和后期代谢产物有什么不同?共培养后期是否会形成优势菌株?共培养菌株的投放时间对共培养结果的影响?由于大多数共培养的结果都具有偶然性<sup>[13]</sup>,缺乏可预见性

和可重复性, 因此共培养还面临着抗生素大批量生产带来的重大挑战。

对于存在的问题, 我们应加大试验研究的对象, 逐渐找到共培养菌株的最佳组合。为了获得新的次级代谢产物, 应该加大培养量, 对于有机相和水相的提取物进行充分提取, 然后通过现代分离纯化技术和结构鉴定手段确定活性物质的结构。为了避免化合物产生的偶然性, 应增加平行实验, 尝试调整共培养菌株间比例, 对比代谢产物发生的变化找到接种共培养菌株的最佳时期<sup>[15]</sup>。共培养过程中, 应了解菌株生长不同时期代谢物生成的动态变化, 菌株化学拮抗能力及 HPLC 指纹图谱变化也可揭示共培养体系中菌株之间的消长态势提供丰富的信息<sup>[29]</sup>。今后共培养研究的重点应放在作用机制的研究上<sup>[33]</sup>, 可以从代谢组学、基因组学和蛋白质组学方面展开深入的研究, 以期能够取得突破性的进展。

综上所述, 共培养是获得海洋动物共附生微生物隐蔽次级代谢途径产生的活性化合物的有效方式。共培养的研究有助于发现新的活性天然产物, 为海洋药物的开发提供新思路。

## REFERENCES

- [1] Chen L, Du S, Wang GY. Microbial origin of natural products isolated from ascidians[J]. Microbiology China, 2020, 47(1): 295-304 (in Chinese)  
陈雷, 杜爽, 王光玉. 源于微生物的海鞘天然产物[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 295-304
- [2] Steinert G, Taylor MW, Schupp PJ. Diversity of *Actinobacteria* associated with the marine ascidian *Eudistoma toaealensis*[J]. Marine Biotechnology, 2015, 17(4): 377-385
- [3] Schmidt EW, Donia MS. Life in cellulose houses: symbiotic bacterial biosynthesis of ascidian drugs and drug leads[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(6): 827-833
- [4] Woodhouse JN, Fan L, Brown MV, Thomas T, Neilan BA. Deep sequencing of non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases from the microbiomes of Australian marine sponges[J]. The ISME Journal, 2013, 7(9): 1842-1851
- [5] Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(6): 1180-1204
- [6] Liang JY, Li WQ, Yang JM, Liu YY, Nie YY, Yang WC, Zhang Y. Effects of co-culture of marine fungus *Aspergillus terreus* C23-3 and different types of marine microorganisms on secondary metabolites[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2020, 40(1): 44-54 (in Chinese)  
梁金月, 李文卿, 杨静明, 刘亚月, 聂影影, 杨文聪, 张翼. 海洋土曲霉 C23-3 与不同类型海洋微生物共培养对其次生代谢产物的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(1): 44-54
- [7] Okada BK, Seyedsayamdost MR. Antibiotic dialogues: induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(1): 19-33
- [8] Oh DC, Jensen PR, Kauffman CA, Fenical W. Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005, 13(17): 5267-5273
- [9] Onaka H, Mori Y, Igarashi Y, Furumai T. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(2): 400-406
- [10] El-Hawary SS, Sayed AM, Mohammed R, Khanfar MA, Rateb ME, Mohammed TA, Hajjar D, Hassan HM, Gulder TAM, Abdelmohsen UR. New Pim-1 kinase inhibitor from the co-culture of two sponge-associated actinomycetes[J]. Frontiers in Chemistry, 2018, 6: 538
- [11] Guo PF, Jin Y, Zhang HT, Yu XJ, Zhang W. Potential of co-culture induction in antibiotics discovery from bacteria-associated with marine sponge *Hymeniacidon perlewe*[J]. Microbiology China, 2006, 33(1): 33-37 (in Chinese)  
郭鹏飞, 靳艳, 张海涛, 虞星炬, 张卫. 共培养海绵微生物诱导抗菌活性物质的研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 33-37
- [12] Huang YQ, Li ZY, Jiang Q, Qiao Y, Li KB. Screening of sponge *Stelletta tenui* associated anti-microbial bacteria and their synergistic effects[J]. Microbiology China, 2005, 32(4): 5-10 (in Chinese)  
黄艳琴, 李志勇, 蒋群, 乔羽, 李堃宝. 细薄星芒海绵中活性菌筛选及混合菌协同效应[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 5-10
- [13] Dong JJ, Zhang XY, Bao J, Xu XY, Nong XH, Qi SH. Secondary metabolites of the co-culture of *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 and *Bacillus* sp. MNMCCE 001[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11): 1289-1295 (in Chinese)



- 董杰杰, 张晓勇, 鲍洁, 徐新亚, 农旭华, 漆淑华. 海洋真菌 *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 与细菌 *Bacillus* sp. MNMCCE001 共培养次级代谢产物[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1289-1295
- [14] Yang KL. Isolation and identification of sea anemone-derived fungi from the South China sea and the activated secondary metabolites of a fungus[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 (in Chinese)  
杨凯琳. 一种南海海葵中共附生真菌的分离鉴定和一株真菌活性次级代谢产物的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2012
- [15] Sung AA, Gromek SM, Balunas MJ. Upregulation and identification of antibiotic activity of a marine-derived *Streptomyces* sp. via co-cultures with human pathogens[J]. Marine Drugs, 2017, 15(8): 250
- [16] Guo XC, Zheng L, Cui ZS, Han P, Tian L, Wang XR. Antibacterial activity of sponge associated marine bacterium *Pseudalteromonas* sp. NJ6-3-1 regulated by quorum sensing[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(4): 545-550 (in Chinese)  
郭秀春, 郑立, 崔志松, 韩平, 田黎, 王小如. 海绵共栖细菌 NJ6-3-1 基于群体感应调控的抗菌活性[J]. 微生物学报, 2008, 48(4): 545-550
- [17] Dashti Y, Grkovic T, Abdelmohsen UR, Hentschel U, Quinn RJ. Production of induced secondary metabolites by a co-culture of sponge-associated actinomycetes, *Actinokineospora* sp. EG49 and *Nocardiopsis* sp. RV163[J]. Marine Drugs, 2014, 12(5): 3046-3059
- [18] Song TF. Study of the metabolites of marine-derived *Penicillium* sp. ZZ380 and their bioactivities[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2019 (in Chinese)  
宋腾飞. 海洋青霉菌(*Penicillium* sp. ZZ380)的代谢产物及其生物活性的研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2019
- [19] Li TT, Gao NN, Yu HF, Guo JW, Wang DF, Li JR, Huang JL. Quorum sensing signal molecule production and biofilm formation in *Serratia marcescens* when co-cultured with *Hafnia alvei*[J]. Food Science, 2019, 40(6): 128-135 (in Chinese)  
李婷婷, 高娜娜, 于海凤, 国竞文, 王当丰, 励建荣, 黄建联. 蜂房哈夫尼亚菌对粘质沙雷氏菌群体感应信号分子产生与生物被膜形成的调控[J]. 食品科学, 2019, 40(6): 128-135
- [20] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(2): 269-275
- [21] Shih PC, Huang CT. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002, 49(2): 309-314
- [22] Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms[J]. Trends in Microbiology, 2005, 13(1): 27-33
- [23] Rateb ME, Hallyburton I, Houssen WE, Bull AT, Goodfellow M, Santhanam R, Jaspars M, Ebel R. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture[J]. RSC Advances, 2013, 3(34): 14444-14450
- [24] Abrudan MI, Smakman F, Grimbergen AJ, Westhoff S, Miller EL, van Wezel GP, Rozen DE. Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(35): 11054-11059
- [25] Wang LY, Liu YS. Research progress of bacterial quorum sensing species and their signal molecules[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2015, 37(4): 318-320 (in Chinese)  
王立燕, 刘永生. 细菌群体感应种类及其信号分子的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(4): 318-320
- [26] Yang JM, Yang WC, Liu YY, Nie YY, Lei XL, Zhang Y. Influence of chemical induction on the secondary metabolites and biological activities of a marine-derived fungal strain *Aspergillus terreus* C23-3[J]. Microbiology China, 2019, 46(3): 441-452 (in Chinese)  
杨静明, 杨文聪, 刘亚月, 聂影影, 雷晓凌, 张翼. 化学诱导对一株海洋来源土曲霉 C23-3 次级代谢产物及其生物活性的影响[J]. 微生物学通报, 2019, 46(3): 441-452
- [27] Schimmel TG, Coffman AD, Parsons SJ. Effect of butyrolactone I on the producing fungus, *Aspergillus terreus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3707-3712
- [28] Guo XC, Zheng L, Zhou WH, Cui ZS, Han P, Tian L, Wang XR. A case study on chemical defense based on quorum sensing: antibacterial activity of sponge-associated bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-1 induced by quorum sensing mechanisms[J]. Annals of Microbiology, 2011, 61(2): 247-255
- [29] Li FF, Lu SS, Ji TF, He J. Advances in secondary metabolites produced by actinobacteria derived from animal-microbe mutualism and their biological activities[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2017, 52(7): 1091-1101 (in Chinese)

- 李芳芳, 陆盛胜, 吉腾飞, 何坚. 动物来源放线菌的次级代谢产物及其生物活性研究进展[J]. 药学学报, 2017, 52(7): 1091-1101
- [30] Abdelmohsen UR, Cheng C, Viegmann C, Zhang T, Grkovic T, Ahmed F, Quinn RJ, Hentschel U, Edrada-Ebel R. Dereplication strategies for targeted isolation of new antitrypanosomal actinosporins A and B from a marine sponge associated-*Actinokineospora* sp. EG49[J]. Marine Drugs, 2014, 12(3): 1220-1244
- [31] Hamza F, Kumar AR, Zinjarde S. Coculture induced improved production of biosurfactant by *Staphylococcus lentus* SZ2: role in protecting *Artemia salina* against *Vibrio harveyi*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 114: 33-39
- [32] Kanagasabhapathy M, Nagata S. Cross-species induction of antibacterial activity produced by epibiotic bacteria isolated from Indian marine sponge *Pseudoceratina purpurea*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(5): 687-691
- [33] Yu ML, Li YX, Banakar SP, Liu L, Shao CL, Li ZY, Wang CY. New metabolites from the co-culture of marine-derived actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and fungus *Rhinochrysiella similis* 35[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 915
- [34] Abdel-Wahab NM, Scharf S, Özkaya FC, Kurtán T, Mándi A, Fouad MA, Kamel MS, Müller WEG, Kalscheuer R, Lin WH, et al. Induction of secondary metabolites from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* through co-cultivation with *Bacillus subtilis*[J]. Planta Medica, 2019, 85(6): 503-512
- [35] Bao J, Wang J, Zhang XY, Nong XH, Qi SH. New furanone derivatives and alkaloids from the co-culture of marine-derived fungi *Aspergillus sclerotiorum* and *Penicillium citrinum*[J]. Chemistry & Biodiversity, 2017, 14(3): e1600327
- [36] Martínez-Buitrago PA, Ramos FA, Castellanos L. Binary co-culture selection from marine-derived microorganisms for differential production of specialized metabolites[J]. Química Nova, 2019, 42(7): 713-719

## 编辑部公告

## 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

## 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

