

红树林样品不经分离的微生物群体培养物生物活性研究

刘颖^{1,2} 洪葵^{*} 庄令¹ 林海鹏¹

(¹ 中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所 热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

(² 广东海洋大学食品科技学院 湛江 524025)

摘 要: 从海南、广西与广东三省的红树林区采集了 181 个样品, 不进行微生物分离而直接作发酵剂接种到发酵培养基进行发酵, 取发酵上清液进行抗细菌、抗真菌与肿瘤细胞毒活性的测定。同时对样品进行可培养微生物的分离与生物活性测定。结果显示: 不同样品类型的生物活性差异较大。在 15 个具有强抗活性的样品中, 有 5 个样品分离到的单株菌均无任何生物活性, 说明这 5 个样品的生物活性可能是由微生物的群体作用产生的, 也可能是某种没有培养出的微生物产生的。初步表明了探索微生物混合培养获得生物活性代谢产物的可能性。

关键词: 红树林; 微生物群体培养物; 生物活性

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0110-05

近年来, 不断地从海洋微生物中发现了具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等药理活性物质, 使其成为药物开发利用研究的热点^[1-3]。红树林是热带、亚热带陆海交汇的海湾河口地区潮间带特有的生态系统, 且生存在咸淡水交迭的特殊环境, 并规律性地受到海水浸泡和露空, 其特殊的生态环境造就了丰富而特有的微生物资源^[4], 并产生许多化学结构独特的代谢产物^[5-7]。然而人们在寻找微生物天然产物时, 主要是通过分离培养技术获得某一菌株, 再通过纯种发酵来获得目的产物。但天然状态下的微生物的生命活动不是单一的, 而是群体化的, 当我们将微生物群体看作是一个多细胞个体时, 不同微生物的功能就类似多细胞生物的不同组织和器官, 配合完成一个生命过程, 不断进化以适应各种自然环境^[8,9]。如 Cueto 等^[10]发现一株海洋真菌只有在发酵过程加入细菌, 才会刺激产生抗生素。YU 等^[11]以红树林沉淀物富集的细菌群体进行多环芳烃化合物的降解, 4 周后芴与菲有 100% 的降解, 目前很难找到具有这种降解效果的单株菌, 又如我国的传统发酵产品中使用酒曲、酱曲作为发酵剂也是通过微生物群体发酵获得产品。这些启发人们在利用微生物资源时, 不一定要通过纯培养, 而可以直接应用微生物的群体作用。

本研究以红树林土壤、海洋动物及红树植物的不同部位作为样品, 不经微生物分离培养而直接利用自然环境富集的微生物群体进行发酵, 并进行抗

菌和细胞毒活性检测, 与从具有强抗性样品中分离的可培养微生物活性检测的结果相比较, 观察活性是由微生物群体作用的, 还是由单菌作用引起的, 从而了解微生物是否可以通过群体作用产生生物活性物质, 探索利用微生物群体作用获得生物活性物质的可能性。

1 材料和方法

1.1 样品

1.1.1 采集时间与地点: 从 2003 年至 2005 期间, 分别在海南、广东与广西三省采集共 181 个样品, 样品类型包括土壤、红树林底栖动物、红树植物的不同组织等。土壤样品是以每个红树品种的土壤为一个样品, 不同地点的相同红树品种仍为不同的样品, 每种动物为一个样品, 红树植物样品中湛江的植物部分以每种树采到的不同部位按等比例混合后作为一个样品, 其它地点的样品是以每种树的不同部位分别作为一个样品(表 1)。

1.1.2 样品处理: 土壤: 称取 5g 样品, 在无菌操作下加入到盛有 45mL 无菌 50% 陈海水的三角瓶中, 充分震荡均匀后, 于 28℃, 200r/min 摇床振荡 0.5h, 备用。根、果、叶等植物部分: 分别称取 5g, 用自来水冲洗干净, 然后用 75% 酒精浸泡 1~2min, 再用无菌水冲洗后, 在无菌操作下剪碎, 研磨, 分别加入到 45mL 无菌 50% 陈海水中, 充分震荡均匀后, 于 28℃, 200r/min 摇床振荡 0.5h, 备用。海洋动物: 对动物样

基金项目: 863 海洋生物技术主题(2004AA628040) 科技部社会公益项目(2004DIB3J072)

* 通讯作者。Tel 86-898-66984969, Fax 86-898-66890978, E-mail k1022@163.net

作者简介: 刘颖(1966-), 女, 山东人, 博士研究生, 研究方向为应用微生物。E-mail liuyingxk@sina.com

收稿日期: 2006-03-29, 接受日期: 2006-04-11, 修回日期: 2006-06-20

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

表1 样品采集记录

Table 1 Record of sample collection

Date	Sample locations	Sample types	Number of samples
July 2003	Wenchang Touyuan mangrove of Hainan province in China	soil, root, fruit, leaf	44
May 2004	Guchengling mangrove of Guangxi province in China	sea squirt, echinus etc marine animals	71
August 2004	Wenchang Qinglang Harbor mangrove of Hainan province in China	soil, root, fruit, leaf	41
September 2004	Haikou Dongzai Harbor mangrove of Hainan province in China	soil	11
May 2005	Zhanjiang mangrove of Guangdong province in China	the mixed sample of root, fruit and leaf	14

品进行解剖,其消化道或皮剪碎,加入到45mL无菌50%陈海水中,充分震荡均匀后,于28℃,200r/min摇床振荡0.5h备用。

1.1.3 培养基 M1培养基^[12]、马丁培养基^[12]、高氏一号培养基^[12]分别用于细菌、真菌与放线菌的分离,黄豆粉培养基(SLM)^[13]用于液体发酵。

1.2 微生物的分离与发酵

分别以1.2的分离培养基,采用稀释涂布的方法对所收集的样品进行细菌、真菌、放线菌的分离。对分离到的单株菌株再经SLM发酵,28℃ 200r/min,细菌发酵3d,真菌与放线菌发酵7d。将发酵液于4℃ 10,000r/min离心15min,上清液再用0.22μm细菌过滤器处理,无细胞滤液用于抗菌和抗肿瘤活性测定。另将不经分离的土壤与根、果、叶等植物部分和海洋动物的备用液分别按10%的接种量接入SLM中,28℃ 200r/min摇床培养7d。同前方法获得无细胞滤液用于抗菌和抗肿瘤活性测定。

1.3 生物活性测定

对无细胞滤液进行生物活性测定,抗菌活性采用改进的美蓝-酶标仪法^[14],指示菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),由海南省农垦医院提供。

抗真菌活性测定采用美蓝-酶标仪法^[14],指示菌为白色念珠菌(*Candida albicans*),由海南省农垦医院提供。抗肿瘤活性测定采用四唑盐(MTT)法^[13]靶细胞株为B16和Hela子宫颈癌细胞。活性评价标准:抑制金黄色葡萄球的效果相当于氟康唑4μg/mL以上的,计为有抗菌活性。抑制白色念珠菌的效果相当于硫酸卡那霉素4μg/mL以上的,计为有抗真菌活性。抗肿瘤活性的效果相当于丝裂霉素C 5μg/mL以上的,计为有抗肿瘤活性。

2 结果

2.1 不同采样地点样品的活性检测

对海南省、广西与广东省不同区域的红树林区采集的181个样品发酵,并对发酵上清液进行活性检测,结果见表2。具有抗菌和肿瘤细胞毒活性的样品数为47个。所有地点都不同程度检测到有抗菌和抗真菌活性的样品,但肿瘤细胞毒活性的样品只从广西北海古城岭的样品中检测到,这个地区的样品主要是红树林底栖动物。

表2 不同采样地点样品的生物活性检测结果

Table 2 Results of bioactivities assay for samples collected from different location

Sample location	Number of samples	Number of anti-bacteria samples	Number of anti-fungi samples	Number of anti-cancer cell samples	Number of bioactive samples	Percentage of bioactive samples
WenchangTouyuan mangrove of Hainan province in China	44	9	6	0	15	34.1
Guchengling mangrove of Guangxi province in China	71	3	11	8	21	29.6
Wenchang Qinglang Harbor mangrove of Hainan province in China	41	5	1	0	6	14.6
Haikou Dongzai Harbor mangrove of Hainan province in China	11	1	1	0	2	18.2
Zhanjiang mangrove of Guangdong province in China	14	2	1	0	3	21.4
Add up	181	20	20	8	47	26.0

When bioactive strains were counted, strain having over two bioactivities was counted one.

2.2 不同样品类型的活性检测

对海南文昌头苑、海南文昌清澜港、海南文昌东寨港采集的不同红树的根、叶、花、果等样品,湛江同

一地点同种红树的各部位等比例混合的样品,每种红树的土壤样品,广西北海古城岭采集的海鞘、文蛤等各种海洋动物样品,进行活性比较。结果表明(表

3) 不同样品类型活性差异较大,果、叶样品的活性百分率较低,土壤、植物各部位的混合样品与海鞘、文蛤等海洋生物样品的活性百分率较高,其中土壤

样品的活性百分率最高,而海洋动物样品的抗肿瘤活性是比较突出的。

表3 不同样品类型的活性

Table 3 Anti-bacteria, anti-fungi and anti-cancer activities for different types of samples

Sample types	Number of Samples	Number of anti-bacteria samples	Number of anti-fungi samples	Number of anti-cancer cell samples	Number of bioactivity samples	Percentage of bioactive samples
fruit	4	0	0	0	0	0
leaf	24	1	0	0	1	4.2
root	16	1	2	0	3	18.8
skin	10	1	1	0	2	20
flower	5	1	0	0	1	20
soil	42	11	4	1	16	38.1
mixed sample of root, leaf, etc	9	2	1	0	3	33.3
Marine animals	71	3	11	8	21	29.6
Add up	181	19	18	9	47	26.0

When bioactive strains were counted, strain having over two bioactivities was counted one.

2.3 强活性样品中可培养微生物的分离与活性检测

从181个样品中筛选得到47个具有生物活性的样品,其中15个具有强活性(强活性是指抑制金黄色葡萄球的效果相当于氟康唑 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上的,抑制白色念珠菌的效果相当于硫酸卡那霉素 $8\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上的,抗肿瘤活性指标以丝裂霉素C $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上),比较从中分离的可培养微生物的活性。结果显示(表4),15个强活性样品中,8个为动物样品,4个土壤样品,其他根、叶、皮的样品各1个。抗金黄色葡萄球菌活性样品10个,抗白色念珠菌活性样品3

个,B16细胞毒活性的活性样品2个。从表4看出,有5个样品(1106、1122、1116、1214、1305)本身具有强活性,但分离到的单株菌均无任何抗菌活性;另一个样品1146只分离到1株虽与1146本身有同样类型的抗性,但其活性减弱的细菌。有3个样品(1161、1123、1111)分离到的抗性菌株改变了抗性类型,说明微生物失去群体的共同作用时,抗性类型发生了变化。而其余样品分离到的活性菌株除了有的具有样品原有类型的抗性外,还兼有其它抗性类型的菌株。总之微生物群体作用的抗性与其分离到的菌株抗性存在一定的差异。

表4 强活性样品中可培养微生物的种类与活性

Table 4 Bioactivity of isolated microorganisms from high bioactive samples

Sample No.	Sample types	Bioactivity	Number of isolated			Number of Bioactive strains		
			bacteria	fungi	Actinomycetes	anti-bacteria	anti-fungi	anti-Cancer cell
1106	Marine animal	anti-cancer	8	0	0	0	0	0
1161	Marine animal	anti-cancer	1	3	0	1	0	0
1146	Marine animal	anti-fungi	4	0	0	0	1	0
1122	Marine animal	anti-fungi	4	0	0	0	0	0
1123	Marine animal	anti-fungi	3	3	1	1	0	0
0951	soil	anti-bacteria	9	7	0	1	4	1
0953	soil	anti-bacteria	11	3	0	3	1	3
0955	soil	anti-bacteria	16	5	8	7	5	9
1111	Marine animal	anti-bacteria	2	0	0	0	0	1
1113	Marine animal	anti-bacteria	4	1	0	1	1	0
1116	Marine animal	anti-bacteria	3	0	0	0	0	0
1214	root	anti-bacteria	9	9	0	0	0	0
1217	leaf	anti-bacteria	8	5	2	1	1	2
1218	skin	anti-bacteria	1	8	0	1	2	1
1305	soil	anti-bacteria	6	4	0	0	0	0
合计			89	48	11	16	15	17

When bioactive strains were counted, strain having over two bioactivities was counted one.

3 讨论

海洋药物是当今新药开发的热点,而海洋微生物药物由于其可再生性,对环境没有影响以及一些海洋天然产物被发现是共附生的微生物合成而成为热中之重。本课题组前期工作已广泛收集热带亚热带海域尤其是红树林环境的样品,进行微生物分离及生物活性检测,获得了大量有活性的菌株^[13,15,16],并分离鉴定了活性化合物^[17,18]。

通过不经分离的海洋环境样品发酵后的生物活性与其分离到的可培养微生物发酵产物活性比较,我们发现一些不经分离的样品发酵后表现出有生物活性,而从这些样品中分离出的单株菌无任何生物活性。产生这一现象的原因有以下几种可能:①样品发酵后的生物活性是由样品中的不同微生物共同作用的结果;②某些产生活性物质的微生物没有被分离到;③样品本身的一些化学物质与微生物的相互作用产生的。

微生物在天然状态下,是一个和谐的群体,它们能有效地利用环境资源并适应生境,集体防御不良的因素^[8],这些过程是单株微生物不能完成的,必须依靠两种或两种以上的微生物共同作用。而许多传统的微生物工业就是混合发酵如酒曲的制作、某些葡萄酒、白酒的酿造、湿法冶金^[19]、污水处理^[20]等都是微生物群体作用的应用。已有利于两种以上微生物群体作用合成活性代谢产物的报道^[10,11]。

由于培养条件、培养基组成等与某些可以产生活性物质的菌株要求不符的原因,可能导致使产生具有生物活性的单株菌不能分离到。

样品中的活性与样品本身携带的化学物质也会有关系。本研究发现的不经分离有活性而分离的微生物无活性的样品中,3个是动物样品,1个是红树植物根样品,1个是土壤样品,这些海洋动物和植物根本身携带的一些化学物质可能本身具有活性或通过与微生物合作产生生物活性。

本研究发现的现象初步表明了生物活性代谢产物可能由微生物混合培养获得,我们将进一步确认这种群体作用并解释其作用的机制。

致谢 本研究结果是在对大量样品处理的结果上选出的,在采样、发酵、可培养微生物的分离与活性检测中,阎冰、陈华、王岳坤、许云、朱九滨、张鹏、杨健、刘丽华、庄露、刘峰、张志华、雷湘兰、孙倩、谢新强、李健娜、朱义明、刘思等同学分别参与了不同阶段的

工作,在此表示感谢!

参 考 文 献

- [1] Wagner-Dobler I, Beil W, Lang S, et al. Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. *Advances In Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 2002, **74**: 207 - 238.
- [2] Kelecom A. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2002, **74**: 151 - 170.
- [3] Proksch P, Edrada RA, Ebel R, Drugs from the seas-current status and microbiological implications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**(2-3): 125 - 134.
- [4] 林 鹏. 中国红树林生态系. 北京: 科学出版社, 1997, 23 - 30.
- [5] Lin Y, Wu X, Deng Z, et al. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No. 2606 from a salt lake in the Bahamas. *Phytochemistry*, 2002, **59**: 469 - 471.
- [6] Lin Y, Wu X, Feng S, et al. Five Unique Compounds: Xyloketal from Mangrove Fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea Coast. *J Org Chem*, 2001, **66**: 6252 - 6256.
- [7] Isaka M, Suyamsestakorn C, Tanticharoen M, et al. Aigialomycins A-E, new Resreptic macrolides from the marine mangrove fungus *aigialus parvus*. *J Org Chem*, 2002, **67**: 1561 - 1567.
- [8] Shapiro JA. Thinking about bacterial population as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol*, 1998, **52**: 81 - 104.
- [9] Rainey P. Bacterial populations adapt genetically, by natural selection even in the lab! *Microbiology Today*, 2004, **31**: 160 - 161.
- [10] Cueto M, Jensen PR, Kauffman C. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *J Nat Prod*, 2001, **64**: 1444 - 1446.
- [11] Yu SH, Ke L, Wong YS, et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, 2005, **31**: 149 - 154.
- [12] 王岳坤, 洪 葵. 红树林因子对土壤微生物数量的影响, 热带作物学报, 2005, **26**(3): 109 - 114.
- [13] 闫莉萍, 洪 葵, 胡申才, 等. 海南近海 30 株抗 B16 细胞活性放线菌的 16S rDNA 多样性分析. 微生物学报, 2005, **45**(2): 185 - 190.
- [14] 洪 葵, 肖 春. 一种抗酵母类真菌抗生素的快速检测方法, ZL03128096.
- [15] 陈 华, 洪 葵, 庄 令, 等. 海南清澜港红树林微生物的分离及细胞毒活性评价. 热带作物学报, 2006, **27**(1): 59 - 63.
- [16] 朱九滨, 洪 葵, 庄 令, 等. 红树林细胞毒活性放线菌的筛选及其所产活性物质的初步研究. 华南热带农业大学学报, 2005, **11**(3): 5 - 8.
- [17] Hu S, Tan R, Hong K, et al. Methyl indole-3-carboxylate. *Acta Cryst*, 2005, **E61**: 1654 - 1656.
- [18] 高 昊, 张 雪, 王乃利, 等. 具有细胞毒活性的红树林真菌泡盛酒曲霉中的甾类成分. 中草药, 2006, **37**(增刊): 193 - 196.
- [19] 姜成林, 徐丽华. 微生物资源. 北京: 科学出版社, 1997, 163

[20] Md Zahangir Alam, A Fakhrul-Razi, Abul H Molla. Biosolids accumulation and biodegradation of domestic wastewater treatment

plant sludge by developed liquid state bioconversion process using a batch fermented. *Water Research*, 2003, 37: 3569 – 3578.

Bioactivity survey of natural microbial consortium from mangrove

LIU Ying^{1,2}, HONG Kui^{1*}, ZHUANG Ling¹, LIN Hai-peng¹

(¹ Institute of Tropical Biological Sciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China)

(² College of Food Science, Guang dong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Microbial natural products have been mainly acquired by pure culture. While in nature, different microorganisms in one habitat may work together as a whole to produce special secondary metabolites to adapt to their environments. “Quorum-sensing” is a way that they would use. A microbial consortium is like a multi-cellular individual that different microorganisms interact with each other to fulfill a special function. A marine fungus only produce antibiotics when a bacterium co-cultured (Cueto et al, 2001); and some traditional Chinese fermentation food are produced by mixed culture. These inspired us that directly using natural microbial consortium instead of isolate the individual microorganism may be a worth to risk in search for bioactive products. In this research, One hundred and eighty one samples were collected from three mangrove areas of Hainan, Guangxi and Guangdong, in China, which were fermented directly and evaluated for their anti-bacteria, anti-fungi and anti-cancer cell activities. Fifteen samples with high activities were further studied. Microorganisms were isolated from these 15 high bioactive samples and re-detected for their bioactivity, among which, microorganisms isolated from 5 samples that numbered 1106, 1122, 1116, 1214 and 1305 didn't show any activity although the un-isolated samples themselves showed high bioactivity. Four strains were isolated from one sample of number 1146. Among these strains, one strain showed the same bioactivity targets as the sample itself, but lower activity of anti-fungi than the sample itself. The other three strains didn't show any bioactivity. Microorganisms isolated from three samples that numbered 1161, 1123 and 1111, changed their initial bioactivity targets. These results suggested that natural microbial consortium culture have the potential to produce bioactive metabolites. It is supposed that some uncultured microorganisms or the community action may be the reason for their activity. This is an initial step on using microbial consortium to produce bioactive metabolites.

Keywords: Mangrove; Microbial consortium culture; Bioactivity

Foundation item: Chinese programs for High Technology Research and Development (2002AA 628140); China Science and Technology Ministry, Program for Social Profit (2004DIB3J072)

* Corresponding author. Tel 86-898-66984969 Fax 86-898-66890978 E-mail k1022@163.net

Received 29 March 2006/Accepted 11 April 2006/Revised 20 June 2006