

基于细菌/真菌相互作用的红树林内生真菌活性菌株筛选*

张柳红, 李嫣然, 李云龙, 宁嘉盈, 周耀航, 熊智瑶,
李佳欣, 王玉如, 黄志坚, 刘岚
(中山大学海洋科学学院, 广东 广州 510006)

摘要: 为筛选出具有抑菌活性且次级代谢产物丰富的红树林内生真菌, 以水产养殖中分离得到的2株病原细菌(*Vibrio parahaemolyticus* B1和*Acinetobacter johnsonii* B2)对2014年从珠海淇澳-担杆岛省级自然保护区采集得到的616株红树林内生真菌进行代谢产物抗菌活性和丰富度筛选。利用共培养技术, 寻找在共培养后菌落形态特征出现明显变化或形成抑菌圈的内生真菌。通过对纯培养和共培养真菌的粗提物进行抑菌活性检测和HPLC指纹图谱分析, 筛选出在共培养条件下可诱导产生新代谢产物且抑菌效果显著提高的菌株, 为发现抗菌化合物提供新来源。

关键词: 红树林内生真菌; 抑菌活性; HPLC指纹图谱; 次级代谢产物

中图分类号: Q93-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2017)02-0093-09

Screening of antibacterial strains from mangrove endophytic fungi based on bacterial/fungal interactions

ZHANG Liuhong, LI Yanran, LI Yunlong, NING Jiaying, ZHOU Yaohang, XIONG Zhiyao,
LI Jiaxin, WANG Yuru, HUANG Zhijian, LIU Lan

(School of Marine Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to screen out mangrove endophytic fungal strains with antibacterial activity and abundant secondary metabolites, two strains of aquatic pathogenic bacteria named as *Vibrio parahaemolyticus* B1 and *Acinetobacter johnsonii* B2 were co-cultured with 616 strains of mangrove endophytic fungi, which were collected from Guangdong Zhuohai Qiao-Dangan island nature reserve in 2014, respectively. And then some of the endophytic fungi with obvious changes in the morphology of the colonies or produce inhibition zones after co-culture were investigated. The crude extracts of pure cultures and co-cultures were analyzed by HPLC fingerprints to find out some fungal strains that could induce new secondary metabolites and increase antibacterial effect in co-culture conditions. In addition, their antibacterial activity against *V. parahaemolyticus* B1 and *A. johnsonii* B2 were evaluated. It is a new strategy for these strains to produce novel antibacterial compounds.

Key words: mangrove endophytic fungi; antibacterial activity; HPLC fingerprint; secondary metabolites

* 收稿日期: 2016-11-18

基金项目: 国家自然科学基金(21272286); 海洋公益性行业科研专项经费(201305017); 海洋生物天然产物化合物库基金(GD2012-D02-001); 中山大学2015年大学生创新训练和创业训练计划项目(教务[2015]105号)

作者简介: 张柳红(1991年生), 女; 研究方向: 天然产物化学; E-mail: zhanglhn@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 黄志坚(1970年生), 男; 研究方向: 海洋微生物; E-mail: lsshzhj@mail.sysu.edu.cn;

刘岚(1971年生), 女; 研究方向: 天然产物化学; E-mail: cesllan@mail.sysu.edu.cn

红树林是生长于热带、亚热带海岸和河口潮间带的木本植物群落,是四大海洋高生产力生态系统之一,也是陆地到海洋过渡型生态系统。由于边缘效应,红树林生态环境具有强还原性、强酸性、高含盐量和营养丰富等特点^[1],为一大群适应了高盐度和定期潮汐冲刷等生存环境的微生物提供了必要的栖息之地,红树林内生真菌就是红树林微生物资源中的主要类群。红树林丰富的微生物环境,使微生物间存在激烈的生存竞争,促使微生物产生丰富的次级代谢产物,为寻找新抗菌活性物质提供了源泉^[2]。本课题组已从红树林内生真菌分离得到许多结构新颖或活性良好的次级代谢产物^[3-4]。在过去的红树林内生真菌次级代谢产物研究中,大部分是采用纯培养的方式大规模发酵真菌,进而分离其次级代谢产物,但在纯培养条件下,有些真菌的基因处于沉默的状态,产生次级代谢产物的途径不表达或者表达被抑制^[5],这就减少了发现活性天然产物的机会。共培养基于微生物间的相互作用,可激活沉默的生源合成基因簇^[6],是产生新活性代谢产物的重要途径^[7-9]。

耐药细菌性疾病是水产养殖中最为常见而且危害最大的一类疾病,由于抗生素的过量使用,使水产病原菌的种类和数量显著增加,养殖生物耐药病原菌病害的发生也越来越频繁,微生物病害防治的难度越来越大^[10]。近年来全国范围内水产养殖毁灭性病害的频繁发生表明,当病害发生时,施虐的病原微生物很可能已具有了抗药性^[11],抗生素药物疗法已不再有效。为寻求新型抗生素,需要探索新的抗菌机制或寻找新的抗菌活性物质。本研究旨在通过真菌与水产致病菌共培养,抑菌活性检测和 HPLC 指纹图谱分析等手段,筛选出在与水产致病菌共培养时能够被诱导产生新的活性物质且抑菌效果较纯培养时显著提高的红树林内生真菌,作为进一步次级代谢产物研究的目标菌株,寻找真菌由于与水产致病菌的生存竞争而产生针对水产致病菌作用的特殊代谢产物,为发现新型抗菌活性物质打下基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:SW-CJ-1FD 型超净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);YXQ-LS-100SII 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);RE-2010 型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司);Multiskan[®] GO 全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公司);Waters 高校液相

色谱仪(沃特世科技(上海)有限公司)。

试剂:甲醇、乙酸乙酯、二氯甲烷(AR,天津市富宇精细化工有限公司);DMSO(CP,广州化学试剂厂);实验所用水均为蒸馏水;PDA 培养基(马铃薯浸出粉 300 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L,广东环凯微生物科技有限公司);LB 肉汤培养基(胰蛋白胨 10 g/L、酵母膏粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L、pH 为 6.9~7.1,青岛高科园海博生物技术有限公司)。

1.2 实验材料

实验用真菌为本课题组 2014 年分离自中国珠海淇澳红树林保护区的红树植物,种属未鉴定。实验用的 2 株病原细菌为 2014 年分离自广东冠利海洋生物有限责任公司茂名试验站养殖海水,经分子生物学鉴定为 *Vibrio parahaemolyticus* B1(以下简称: B1) 和 *Acinetobacter johnsonii* B2(以下简称: B2), GenBank 登录号分别为 KY077678 和 KY077679。所有菌种均保存在广州中山大学海洋科学学院海洋生物天然产物研究所。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株活化 细菌活化:在超净工作台内,按为 1:10 比例将细菌原液接种于 LB 肉汤培养基中,并于 37 °C 恒温摇床震荡培养(150 r/min) 18~24 h。

真菌活化:在超净工作台内,用接种针或接种环从冻存管中挑取真菌菌丝,按照三点转接法接种于 PDA 平板培养基中,并于 28 °C 静置培养 3~5 d,拍照记录菌株的生长形态。

1.3.2 真菌和细菌纯培养、共培养 真菌纯培养:在超净工作台内,用接种针挑取活化后的真菌菌落外缘菌丝于 PDA 平板培养基上,28 °C 静置培养 3~5 d,观察并拍照记录菌落形态。

细菌纯培养:在超净工作台内,用移液枪取 100 μL 活化后的细菌液于 PDA 平板培养基,用涂布棒涂布均匀,37 °C 静置培养 3~5 d,观察并拍照记录菌落形态。

真菌/细菌共培养:在超净工作台内,用移液器取 100 μL 活化后的细菌液于 PDA 平板培养基,并用涂布棒均匀涂布到平板的各个角落,然后用接种针挑取活化后的真菌菌落外缘菌丝按照三点转接法接种于上述涂布有细菌液的 PDA 平板中,28 °C 静置培养 3~5 d,观察并拍照记录纯培养和共培养的真菌菌落形态有无改变,有无抑菌圈或色素产生,寻找相互作用强烈,形态变化明显的菌株。

1.3.3 次级代谢产物提取 对筛选出的菌株,其

纯培养和共培养完成后，将整个含菌培养基放入茶袋中，用甲醇/乙酸乙酯/二氯甲烷（体积比为 3:2:1）浸泡 2~3 d（浸泡没过茶袋），超声萃取菌株的代谢产物并收集浸泡液，将浸泡液用旋转蒸发仪旋干后，用乙酸乙酯萃取 2~3 次。取上层乙酸乙酯有机相，并用旋蒸仪浓缩蒸干，甲醇复溶后转移至青霉素瓶中，放置于通风橱内挥干得到粗提物，待 HPLC 指纹图谱分析及抗菌活性检测。

1.3.4 HPLC 指纹图谱分析 将粗提物用甲醇溶解并用微孔滤膜（0.22 μm）过滤，配制成 3 mg/mL 的样品，利用 Waters 1525-2998 HPLC 进行指纹图谱分析。流动相采用乙腈/水体系（A：15% 乙腈 + 85% 水；B：15% 水 + 85% 乙腈）；梯度洗脱（0~22 min, 100% A - 100% B；22~27 min, 100% B；27~35 min, 100% B - 100% A）；流速 1 mL/min；柱温 30 °C；进样量 30 μL；检测波长范围为 190~700 nm；色谱柱规格为 Zorbax SB-C18（9.4 mm × 250 mm, 5 μm）。

1.3.5 抗菌活性检测 采用 96 孔板法^[12] 检测纯培养和共培养粗提物分别对 B1 和 B2 的抑菌活性。活化 B1 和 B2 后，按 1:10 比例接种于 LB 肉汤培养基中，37 °C 恒温摇床震荡培养（150 r/min）12 h，再将菌种悬浮液以 1:100 比例接种至 LB 肉汤培养基，37 °C 恒温摇床震荡培养（150 r/min）3 h，在 600 nm 波长下读取吸光值 A，调整 A 值至 0.5，再用新鲜 LB 肉汤培养基以 1:100 比例稀释，此时菌液浓度约为 5×10^5 CFU/mL，适用于药敏实验。将粗提物样品用体积比为 1:4 的 DMSO 水溶液配制成 1 mg/mL 的母液，分别取 50 μL 母液转移至 96 孔板中，再加入 150 μL 上述细菌悬浮液，37 °C 恒温摇床震荡培养（150 r/min）18 h 后在 600 nm 波长下读取 A 值。50 μL 体积比为 1:4 的 DMSO 水溶液加上 150 μL 细菌悬浮液的体系作为阴性对照。每个样品设两个平行，A 值取平均值。根据公式计算抑菌率：

$$\text{抑菌率} = \frac{A_{\text{阴性对照值}} - A_{\text{实测值}}}{A_{\text{阴性对照值}}} \times 100\%$$

2 结果分析与讨论

2.1 共培养对真菌菌落形态的影响

为了寻找对水产病原菌有强烈作用的菌株，本研究选取 616 株红树林内生真菌分别进行纯培养及与水产病原菌 B1 和 B2 共培养，根据纯培养和共培养的菌落形态变化和抑菌圈有无及大小等的观察结果，筛选出 162 株（占总体菌株数量的 26.3%）

共培养时有显著相互作用的内生真菌作为后续研究的候选菌株。以 QA-740 为例观察真菌共培养前后的菌落形态差异，从图 1 可知，QA-740 在纯培养时产青绿色孢子，孢子分布较均匀，菌落颜色呈咖啡色；在与 B1 共培养时，生长较缓慢，菌落直径较小，产淡黄色孢子，菌落颜色呈砖红色；在与 B2 共培养时，产暗绿色和白色孢子，且菌落边缘被白色孢子包围，菌落颜色呈砖红色，说明真菌/细菌共培养会影响 QA-740 的生长状态，使其产生不同颜色的孢子，导致菌落颜色和形态发生变化。以 QA-741 为例观察真菌共培养前后抑菌圈的有无及大小，图 2 显示，QA-741 纯培养时菌落内部凸起，产暗绿色和白色孢子，菌落边缘规则且被白色孢子包围；在与 B1 共培养时菌落内部凸起且产白色孢子，而菌落边缘产砖红色孢子，无白色孢子包围；在与 B2 共培养时菌落内部凸起且产白色孢子，菌落边缘产砖红色孢子且被白色孢子包围，并形成直径为 17~24 mm 的抑菌圈，说明 QA-741 对 B2 具有抑制作用。

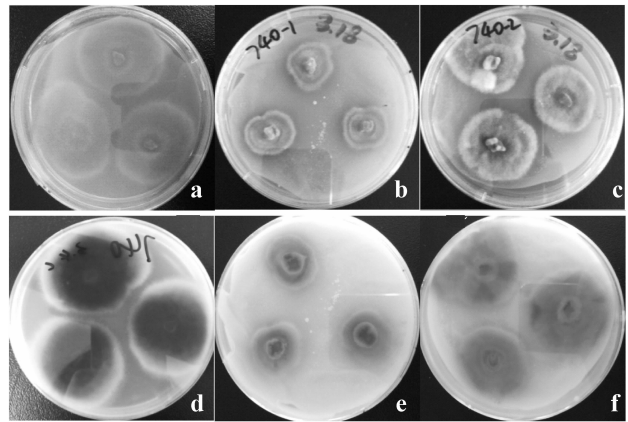


图 1 QA-740 纯培养和共培养的菌落变化图

Fig. 1 Colony change maps of QA-740 after pure culture and co-culture

a/d: QA-740 纯培养正/背面观；b/e: QA-740 与 B1 共培养正/背面观；c/f: QA-740 与 B2 共培养正/背面观

2.2 抑菌活性筛选结果与分析

对 162 株内生真菌的纯培养和共培养进行次级代谢产物的提取，共获得 486 份粗提物（每株真菌 3 份粗提物，即纯培养，与 B1 共培养，与 B2 共培养各一份）。对上述粗提物样品进行抑菌活性检测，以抑菌率 $\geq 70\%$ 为有抑菌活性，结果见表 1。由表 1 可知，对 B1 有抑制作用的粗提物样品有 75 份，对 B2 有抑菌活性的粗提物样品有 130 份，

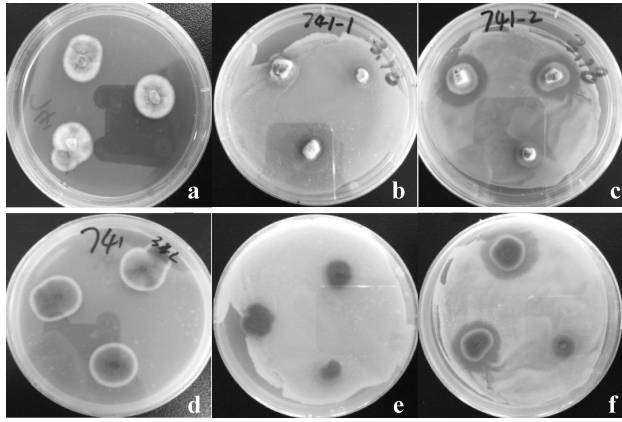


图 2 QA-741 纯培养和共培养的菌落抑菌圈变化图
Fig. 2 Changes of bacterial inhibition zone of QA-741 after pure culture and co-culture

a/d: QA-741 纯培养正/背面观; b/e: QA-741 与 B1 共培养正/背面观; c/f: QA-741 与 B2 共培养正/背面观

其中, 有 54 份粗提物样品同时对 B1 和 B2 有抑制活性, 因此, 共有 151 份粗提物样品有抑菌活性。此外, 根据表 1, 在对 B1 有抑制作用的 75 份粗提物样品中, 纯培养样品有 40 份 (占 53.3%), 与 B1 共培养样品有 14 份 (占 18.7%), 与 B2 共培养样品有 21 份 (占 28.0%); 在对 B2 有抑制作用的 130 份粗提物样品中, 纯培养样品有 67 份 (占 51.5%), 与 B1 共培养样品有 27 份 (占 20.8%), 与 B2 共培养样品有 36 份 (占 27.7%)。因此, 从样品所占比例上看, 纯培养样品所占比例较大, 且共培养的粗提物样品对 B1 和 B2 的抑制作用具有随机性, 不存在特异性。

通过对 B1 有抑菌活性的粗提物样品的分析, 共筛选出 19 株候选菌株, 这些真菌为纯培养、与 B1 共培养和与 B2 共培养 3 份粗提物样品同时有抑菌作用, 或者纯培养样品无抑菌活性但共培养样品显示出抑菌活性。候选真菌的编号和对应的培养条件见表 2。同样地, 对 B2 有抑制作用的粗提物样品进行统计分析, 挑选出 27 株候选内生真菌, 其编号及培养条件见表 2。在上述对 B2 有抑制作用的 27 株候选内生真菌中, 有 8 株在对 B1 有抑制作用的 19 株候选菌株中, 因此共筛选出 38 株候选菌株。由表 2 可知, 在这 38 株候选菌株中, 有 23 株内生真菌在纯培养时无抑菌活性, 共培养后显示出对 B1 或 B2 的抑菌活性, 表明抑菌活性物质为在共培养条件下胁迫产生的, 是本研究的重点研究对象, 将结合 HPLC 指纹图谱分析结果进一步筛选。

2.3 HPLC 指纹图谱筛选结果与分析

根据抑菌活性检测结果, 筛选出纯培养粗提物

无抑菌效果但共培养粗提物表现出抑菌活性的内生真菌共 23 株, 编号分别为: QA-49、QA-108、QA-115、QA-123、QA-137、QA-153、QA-591、QA-592、QA-597、QA-598、QA-616、QA-623、QA-653、QA-654、QA-696、QA-768、QA-2006、QA-2575、QA-2579、QA-2583、QA-2608、QA-2614 和 QA-2655。上述内生真菌的粗提物经 HPLC 分析, 得到其指纹图谱, 观察比较上述样品在检测波长为 254 nm 时的 HPLC 色谱图, 发现有 4 株内生真菌的次级代谢产物较为丰富 (图 3), 这些菌株的编号分别为 QA-124、QA-598、QA-623 和 QA-712。

其中, QA-124 (图 3a) 纯培养和共培养样品对 B1 和 B2 均有抑制作用, 其色谱峰出峰位置基本相同, 但共培养样品在 11.5 min 的色谱峰强度比纯培养样品的高。同样地, QA-712 (图 3b)

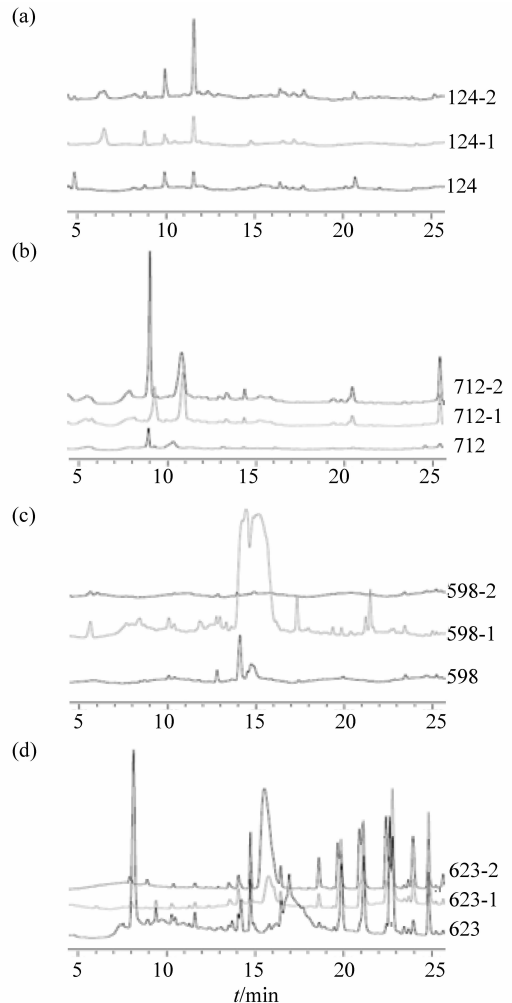


图 3 粗提物样品 (3 mg/mL) 在检测波长为 254 nm 时的 HPLC 指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint chromatograms of the crude extracts (3 mg/mL) under the wavelength of 254 nm

表 1 粗提物样品的抑菌活性¹⁾

Table 1 Antibacterial activity of the extracts

%

菌株编号	对 B1 的抑制率			对 B2 的抑制率		
	纯培养	与 B1 共培养	与 B2 共培养	纯培养	与 B1 共培养	与 B2 共培养
QA-15	80.4	- *	-	92.5	-	-
QA-16	79.1	-	-	92.4	76.5	84.3
QA-17	75.0	-	-	-	-	-
QA-19	74.8	79.4	-	89.8	-	-
QA-23	76.0	-	-	87.6	-	-
QA-28	-	-	-	93.6	-	-
QA-32	-	-	-	93.7	84.5	-
QA-33	-	-	-	93.3	-	-
QA-39	-	-	-	79.8	-	-
QA-44	-	-	-	-	-	-
QA-46	-	-	-	87.6	-	-
QA-48	-	-	-	-	-	-
QA-49	-	-	-	-	-	-
QA-51	-	-	-	-	-	-
QA-52	-	-	-	-	-	-
QA-57	-	-	-	73.1	-	-
QA-59	-	-	-	85.3	-	90.2
QA-65	73.1	83.7	-	78.4	-	79.0
QA-73	-	-	-	-	-	-
QA-74	-	-	-	-	-	-
QA-77	-	-	-	76.3	89.9	-
QA-79	-	-	-	-	-	-
QA-80	-	-	-	-	-	-
QA-82	-	-	-	-	-	-
QA-86	-	-	-	90.4	-	-
QA-92	-	-	-	92.9	71.2	-
QA-95	-	-	-	-	-	-
QA-101	70.2	-	-	92.3	-	81.5
QA-103	-	-	-	90.3	-	-
QA-105	-	-	-	89.8	-	93.1
QA-108	-	-	-	-	82.9	86.5
QA-109	-	-	-	83.1	-	-
QA-110	-	-	-	-	-	-
QA-115	-	-	-	-	84.3	83.9
QA-123	-	-	-	-	-	92.3
QA-124	82.6	92.2	92.8	91.1	83.2	91.5
QA-128	-	-	-	-	-	-
QA-131	-	-	-	-	-	-
QA-137	-	-	-	-	-	81.1
QA-139	-	-	-	90.7	-	-
QA-141	-	-	-	93.7	93.9	94.1
QA-142	-	-	-	88.4	88.3	-
QA-143	-	-	-	-	-	-
QA-146	-	-	-	-	-	-
QA-152	-	-	-	91.7	88.8	87.4
QA-153	-	-	-	-	88.9	-
QA-591	-	-	90.9	-	-	81.7

续表 1

%

菌株编号	对 B1 的抑制率			对 B2 的抑制率		
	纯培养	与 B1 共培养	与 B2 共培养	纯培养	与 B1 共培养	与 B2 共培养
QA - 592	-	-	79.8	-	-	-
QA - 595	89.7	-	-	-	-	-
QA - 597	-	-	83.3	-	-	-
QA - 598	-	88.4	-	-	-	-
QA - 602	-	-	-	90.5	-	-
QA - 604	85.7	-	-	-	-	-
QA - 609	-	-	-	-	-	-
QA - 612	-	-	-	82.5	-	-
QA - 613	-	-	-	91.0	-	-
QA - 614	86.1	-	-	-	-	73.9
QA - 616	-	-	82.4	85.7	-	-
QA - 617	-	-	-	-	-	-
QA - 623	-	-	73.8	87.8	-	-
QA - 624	77.5	-	-	-	-	-
QA - 626	-	-	-	-	-	-
QA - 628	-	-	-	-	-	-
QA - 632	83.2	-	82.7	74.2	72.6	78.1
QA - 637	91.5	89.2	-	-	-	-
QA - 645	-	-	-	84.8	-	-
QA - 647	-	-	-	91.8	90.9	-
QA - 650	90.6	88.4	-	70.3	-	76.5
QA - 652	87.5	-	93.1	-	-	70.7
QA - 653	-	-	-	90.9	-	86.5
QA - 654	-	-	85.6	-	-	-
QA - 664	85.4	-	-	-	-	-
QA - 666	-	-	-	85.0	-	-
QA - 675	-	-	-	75.2	-	-
QA - 677	-	-	-	-	-	-
QA - 679	-	-	-	92.1	92.8	92.6
QA - 693	-	-	-	87.3	87.0	-
QA - 696	-	91.0	-	87.1	-	-
QA - 706	-	-	-	88.6	88.1	84.7
QA - 712	90.4	-	88.5	91.8	89.2	-
QA - 714	91.3	87.2	86.6	88.7	88.7	-
QA - 716	-	-	-	88.4	-	-
QA - 720	77.7	-	-	89.6	-	85.3
QA - 724	86.8	-	88.2	-	-	-
QA - 726	84.6	90.5	88.1	-	-	-
QA - 730	-	-	-	-	-	-
QA - 739	-	-	-	89.2	-	87.1
QA - 740	89.2	80.1	87.8	86.0	86.4	86.3
QA - 741	86.7	82.2	87.2	-	-	-
QA - 745	-	-	-	-	-	-
QA - 748	-	-	-	-	-	-
QA - 753	-	-	-	-	-	-
QA - 755	-	-	-	-	-	-
QA - 764	-	-	-	86.4	-	80.9
QA - 767	-	-	-	-	-	78.6

续表 1

%

菌株编号	对 B1 的抑制率			对 B2 的抑制率		
	纯培养	与 B1 共培养	与 B2 共培养	纯培养	与 B1 共培养	与 B2 共培养
QA - 768	-	-	-	-	-	-
QA - 774	-	-	-	-	-	-
QA - 775	-	-	-	-	-	-
QA - 780	-	-	-	-	-	-
QA - 782	-	-	-	-	-	-
QA - 793	-	-	-	-	-	-
QA - 803	-	-	-	-	-	-
QA - 814	-	-	-	-	-	-
QA - 821	-	-	-	-	-	-
QA - 832	-	-	-	-	-	-
QA - 846	-	-	-	-	-	-
QA - 1984	90.1	-	-	-	-	-
QA - 1988	-	-	-	-	-	-
QA - 1996	-	-	-	-	-	-
QA - 2001	-	-	-	-	-	-
QA - 2006	-	-	78.2	-	-	-
QA - 2018	-	-	-	95.8	92.1	89.3
QA - 2035	76.1	-	-	90.5	-	-
QA - 2039	89.4	-	-	94.0	-	-
QA - 2041	88.5	-	-	88.4	-	-
QA - 2043	85.8	-	-	-	-	-
QA - 2045	-	-	-	91.0	92.6	91.9
QA - 2555	-	77.9	-	-	-	-
QA - 2558	-	-	-	88.7	-	89.9
QA - 2563	74.3	-	71.0	92.3	-	94.0
QA - 2571	75.5	-	89.0	80.9	-	-
QA - 2574	-	-	-	-	73.2	89.9
QA - 2575	-	-	-	-	-	-
QA - 2576	-	-	-	79.1	-	87.5
QA - 2577	-	-	-	94.1	90.4	89.5
QA - 2578	-	-	-	-	87.2	94.5
QA - 2579	-	-	85.1	95.0	93.1	-
QA - 2581	71.5	-	-	-	-	91.1
QA - 2583	-	-	-	-	-	-
QA - 2585	-	-	-	-	-	-
QA - 2586	-	-	-	85.3	-	-
QA - 2587	82.2	-	-	-	-	-
QA - 2589	-	-	-	-	-	-
QA - 2593	-	-	-	-	-	-
QA - 2595	-	-	-	-	-	-
QA - 2598	-	-	-	-	-	-
QA - 2606	87.9	-	-	-	-	-
QA - 2608	-	80.6	-	-	-	-
QA - 2610	-	-	-	80.8	-	-
QA - 2613	-	-	-	-	-	85.7
QA - 2614	-	-	80.0	-	-	-
QA - 2617	-	-	-	-	-	-
QA - 2621	-	-	-	70.2	-	-

续表 1

%

菌株编号	对 B1 的抑制率			对 B2 的抑制率		
	纯培养	与 B1 共培养	与 B2 共培养	纯培养	与 B1 共培养	与 B2 共培养
QA - 2625	72.3	-	-	77.0	90.0	89.5
QA - 2630	80.3	87.3	81.8	92.4	-	-
QA - 2631	90.3	-	-	71.2	-	-
QA - 2632	79.0	-	-	77.7	-	-
QA - 2633	83.8	-	-	74.6	-	-
QA - 2635	84.7	-	-	-	-	-
QA - 2643	-	-	-	-	-	-
QA - 2645	-	-	-	-	-	-
QA - 2648	-	-	-	-	-	-
QA - 2651	-	-	-	-	-	-
QA - 2653	-	-	-	-	79.0	-
QA - 2655	-	-	-	-	-	-
QA - 2657	-	-	-	-	-	-
QA - 2661	-	-	-	-	-	-
QA - 2673	-	-	-	-	-	-
QA - 2677	-	-	-	-	-	-
QA - 2685	-	-	-	84.0	-	-
QA - 2688	-	-	-	-	-	-
QA - 2716	-	-	-	-	-	-

1) “-”表示抑菌率 < 70%

表 2 候选菌株的编号及培养条件¹⁾

Table 2 Numbers and culture conditions of the candidate fungi

菌株编号	anti - 1 培养条件	anti - 2 培养条件	菌株编号	anti - 1 培养条件	anti - 2 培养条件
QA - 16		pure&co - 1&co - 2	QA - 693		pure&co - 1&co - 2
QA - 49		co - 1	QA - 696	co - 1	
QA - 108		co - 1&co - 2	QA - 712		pure&co - 1&co - 2
QA - 115		co - 1&co - 2	QA - 714	pure&co - 1&co - 2	
QA - 123		co - 2	QA - 726	pure&co - 1&co - 2	
QA - 124	pure&co - 1&co - 2		QA - 740	pure&co - 1&co - 2	
QA - 137		co - 2	QA - 741	pure&co - 1&co - 2	pure&co - 1&co - 2
QA - 141		pure&co - 1&co - 2	QA - 768		co - 2
QA - 152		pure&co - 1&co - 2	QA - 2006	co - 2	
QA - 153		co - 1	QA - 2035		pure&co - 1&co - 2
QA - 591	co - 2	co - 2	QA - 2555	co - 1	pure&co - 1&co - 2
QA - 592	co - 2		QA - 2575		co - 1&co - 2
QA - 597	co - 2		QA - 2578		pure&co - 1&co - 2
QA - 598	co - 1		QA - 2579	co - 2	co - 1&co - 2
QA - 616	co - 2	co - 2	QA - 2583		co - 2
QA - 623	co - 2		QA - 2608	co - 1	
QA - 637		pure&co - 1&co - 2	QA - 2614	co - 2	co - 2
QA - 653		co - 2	QA - 2630	pure&co - 1&co - 2	pure&co - 1&co - 2
QA - 654	co - 2		QA - 2655		co - 1

1) pure: 内生真菌纯培养样品; co - 1: 内生真菌与 B1 共培养样品; co - 2: 内生真菌与 B2 共培养样品; pure&co - 1: 内生真菌纯培养和与 B1 共培养样品; pure&co - 2: 内生真菌纯培养和与 B2 共培养样品; co - 1&co - 2: 内生真菌与 B1 或 B2 共培养样品; pure&co - 1&co - 2: 内生真菌纯培养和与 B1 或 B2 共培养样品

纯培养和共培养样品对 B2 均有抑制活性, 其色谱峰出峰位置也基本相同, 但共培养样品在 9, 11, 21 和 26 min 的色谱峰强度均明显高于纯培养样品, 说明真菌/细菌共培养会改变一些真菌次级代谢产物的产量。QA-598 (图 3c) 与 B1 共培养的样品对 B1 有抑制活性, 其纯培养和与 B2 共培养的样品均无抑制作用, 而从这些样品的 HPLC 指纹图谱中可看出, 598-1 的色谱峰数目明显大于纯培养和 598-2 的样品, 说明 598-1 的化合物丰富度较高, 其粗提物样品检测到的抗菌活性可能来源于 QA-598 与 B1 共培养后刺激产生的化合物, 表明真菌/细菌共培养可激活某些沉默基因, 进而促进真菌产生类型多样的次级代谢产物。QA-623 (图 3d) 纯培养和共培养样品的色谱峰均很丰富, 且出峰位置基本一致, 但 623-2 在 15.8 min 的峰强度明显高于纯培养和 623-1 样品, 结合活性检测结果中只有 623-2 样品对 B1 有抑制作用, 说明次级代谢产物的浓度会影响抑菌活性的结果, 具体情况有待进一步的考究和验证。

3 结 论

目前真菌代谢产物的研究通常采用纯培养的模式, 而自然界的真菌和细菌是共同存在的, 为争夺生存空间, 互相之间通过化学物质进行斗争, 相互间的作用有可能诱导各类活性化合物的产生。本研究的实验结果表明, 真菌/细菌共培养可以改变真菌的菌落形态、颜色等特征, 可以促进或者抑制真菌的生长, 进而提高或者降低真菌次级代谢产物的多样性, 也可以提高或者降低真菌次级代谢产物的产量, 进而影响其抑菌活性。此外, 从比例上看, 真菌/细菌共培养前后样品对细菌 B1 和 B2 的抑制作用不具有特异性, 即有些与 B1 共培养的粗提物样品对 B2 有抑制活性, 而与 B2 共培养的粗提物样品可能对 B1 有抑制作用。因此, 真菌/细菌共培养技术在真菌次级代谢产物的相关研究领域有很大的应用前景, 在后续工作中有待深入研究。

根据共培养前后真菌菌落形态变化的观察结果, 从 616 株红树林内生真菌中筛选出 162 株内生菌株, 再根据抑菌活性检测结果从中筛选出 38 株候选菌株, 并通过对目标菌株的 HPLC 指纹图谱的分析筛选出 4 株次级代谢产物较丰富的目标真菌, 编号分别为: QA-124、QA-598、QA-623 和 QA-712, 其中 QA-623 的 HPLC 色谱图出峰数目较多, 说明其次级代谢产物较为丰富, 拟对其进行大规模培养并进一步分离其次级代谢产物, 从中寻找针对水产病原菌的新型抑菌活性化合物。

参考文献:

- [1] 高剑, 李赤, 王燕, 等. 红树林内生真菌多样性及其应用潜能 [J]. 菌物研究, 2013, 11(3): 212-216.
GAO J, LI C, WANG Y, et al. Diversity and application potential of endophytic fungi associated with mangroves [J]. Journal of Fungal Research, 2013, 11(3): 212-216.
- [2] ONN M, LIM P, AAZANI M, et al. Initial screening of mangrove endophytic fungi for antimicrobial compounds and heavy metal biosorption potential [J]. Sains Malaysiana, 2016, 45(7): 1063-1071.
- [3] 宋双, 薛艳钰, 陆勇军, 等. 南海红树林内生真菌 *Fusarium solani* 387# 次级代谢产物研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2015, 54(5): 67-71.
SONG S, XUE Y Y, LU Y J, et al. The secondary metabolites of the mangrove endophytic fungus *Fusarium solani* 387# [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2015, 54(5): 67-71.
- [4] MA Y H, LI J, HUANG M X, et al. Six new polyketide decalin compounds from mangrove endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* 328# [J]. Marine Drugs, 2015, 13(10): 6306-6318.
- [5] PETTIT R K. Mixed fermentation for natural product drug discovery [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83: 19-25.
- [6] RUTLEDGE P J, CHALIS G L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters [J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(8): 509-523.
- [7] PATHAK R, KUMAR R, GAUTAM H K. Cross-species induction and enhancement of antimicrobial properties in response to gamma irradiation in *Exiguobacterium* sp. HKG 126 [J]. Indian Journal of Microbiology, 2013, 53(2): 130-136.
- [8] ADNANI N, VAZQUEZ-RIVERA E, ADIBHATLA S N, et al. Investigation of interspecies interactions within marine micromonosporaceae using an improved co-culture approach [J]. Marine Drugs, 2015, 13: 6082-6098.
- [9] DUSANE D H, MATKAR P, VENUGOPALAN V P, et al. Cross-species induction of antimicrobial compounds, biosurfactants and quorum-sensing inhibitors in tropical marine epibiotic bacteria by pathogens and biofouling microorganisms [J]. Current Microbiology, 2011, 62(3): 974-980.
- [10] 黄志坚, 陈勇贵, 翁少萍, 等. 多种细菌与凡纳滨对虾肝胰腺坏死症 (HPNS) 爆发有关 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2016, 55(1): 1-11.
HUANG Z J, CHEN Y G, WENG S P, et al. Multiple bacteria species were involved in hepatopancreas necrosis syndrome (HPNS) of *Litopenaeus vannamei* [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2016, 55(1): 1-11.
- [11] FLEGEL T W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 110(2): 166-173.
- [12] SELIN C, STIETZ M S, BLANCHARD J E, et al. A pipeline for screening small molecules with growth inhibitory activity against *Burkholderia cenocepacia* [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128587.