

Conde-Martínez *et al.* *BMC Microbiology* (2017) 17:230  
DOI 10.1186/s12866-017-1136-x

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Use of a mixed culture strategy to isolate halophilic bacteria with antibacterial and cytotoxic activity from the Manaure solar saltern in Colombia



Natalia Conde-Martínez, Alejandro Acosta-González, Luis E. Díaz and Edison Tello\* 

汇报人: 宜冰芳 汇报日期: 2019.12.29

IF:5.84

# 目录

01

Introduction

03

Results and  
discussion

02

Materials and  
methods

04

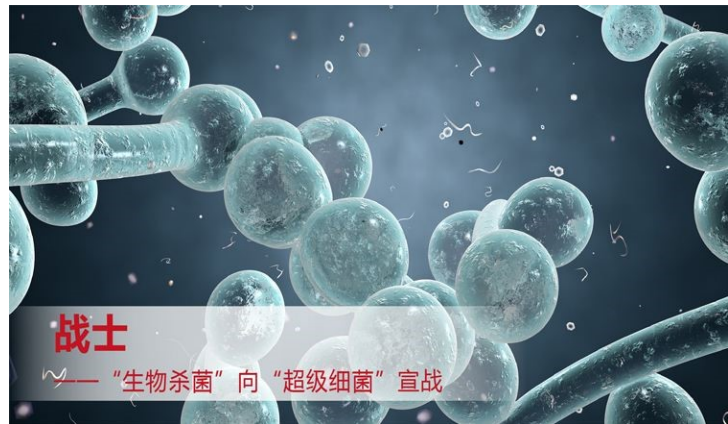
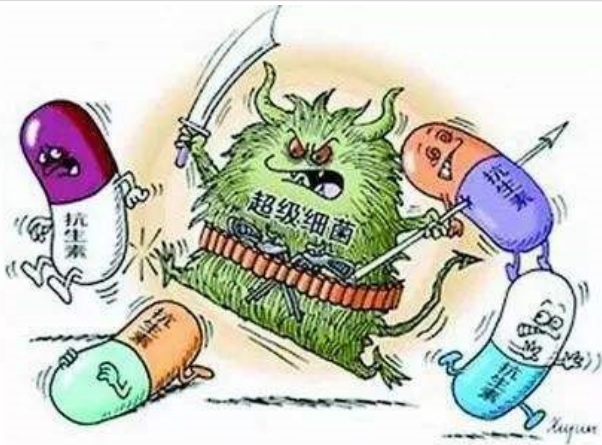
Conclusion



**Part 01**  
**Introduction**



# Introduction



耐药性细菌是一个日益严重的全球健康问题。

在海洋这类高盐度的特殊生境下，大多数关于生物活性物质的研究都集中在抗癌药物上，“超级细菌”的增加促使探索具有抗菌活性物质的研究范围扩大。

# Introduction



海洋一直是生物活性代谢产物开发的重要来源；晒盐场正在成为具有生物活性的代谢物的重要来源。

晒盐场是一种多池系统，其中海水被泵送通过相连的晒盐池，通过日照蒸发，盐度逐渐增加，最终盐度能够达到海水的十倍。这一特殊生境已被用于研究微生物多样性。

# Introduction



传统上，筛选具有抗菌活性的微生物需要进行单个菌株的分离，是一个非常耗时的过程。相比之下，以混合培养方式筛选具有潜在生物活性的微生物，可以处理和测试更多的样品，并且可以评估更多的培养条件。



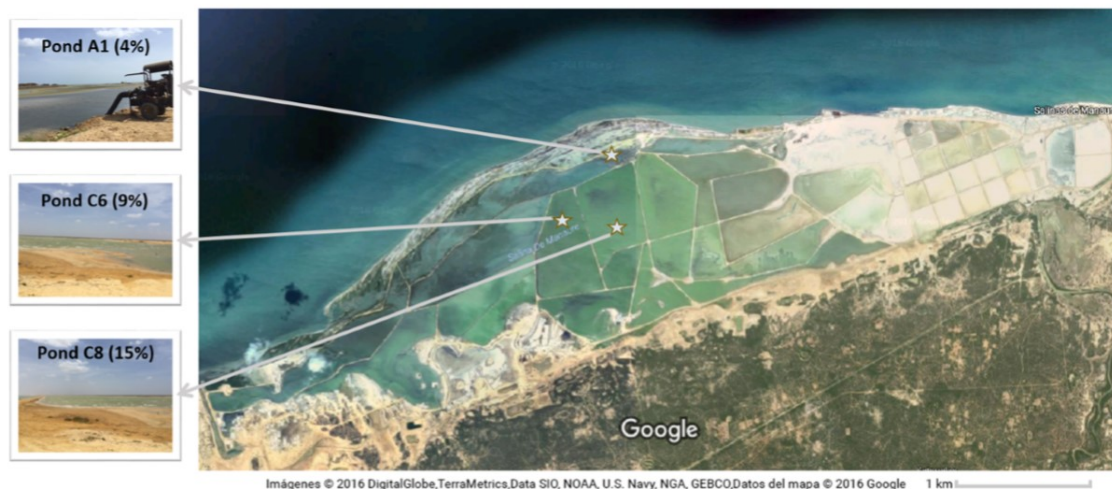
通过混合培养方法对盐水和沉积物样品鉴定产生生物活性物质的细菌，确认它们的生物活性。



**Part 02**  
**Materials and methods**



# Materials and methods



**Fig. 1** Solar saltern ponds located in the Big Group Salinas Manaure, La Guajira, Colombia (北纬11°46'32.0" N, 东经72°27'27.4" W)

晒盐池： 盐水(B)和沉积物(S)样品

晒盐池： 盐度 (4%, 9%和15%)

pH ( 7.5-7.8 )

温度 ( 28-31°C )



# Materials and methods

**Table 1** Media selected for the growth of halophilic bacteria and archaea

Medium	Observations
M1 Halophile Agar I	Halophilic Bacteria
M2 DSMZ 372	<i>Halobacterium</i> spp.
M3 <i>Salinibacter ruber</i>	Extreme halophilic Bacteria
M4 <i>Salinibacter ruber</i>	Extreme halophilic Bacteria
M5 MCAT	Extreme halophilic Archaea
M6 Halophilic Actinobacteria	<i>Nocardiopsis</i> sp
M7 DSMZ 1018	<i>Haloferax</i> spp.

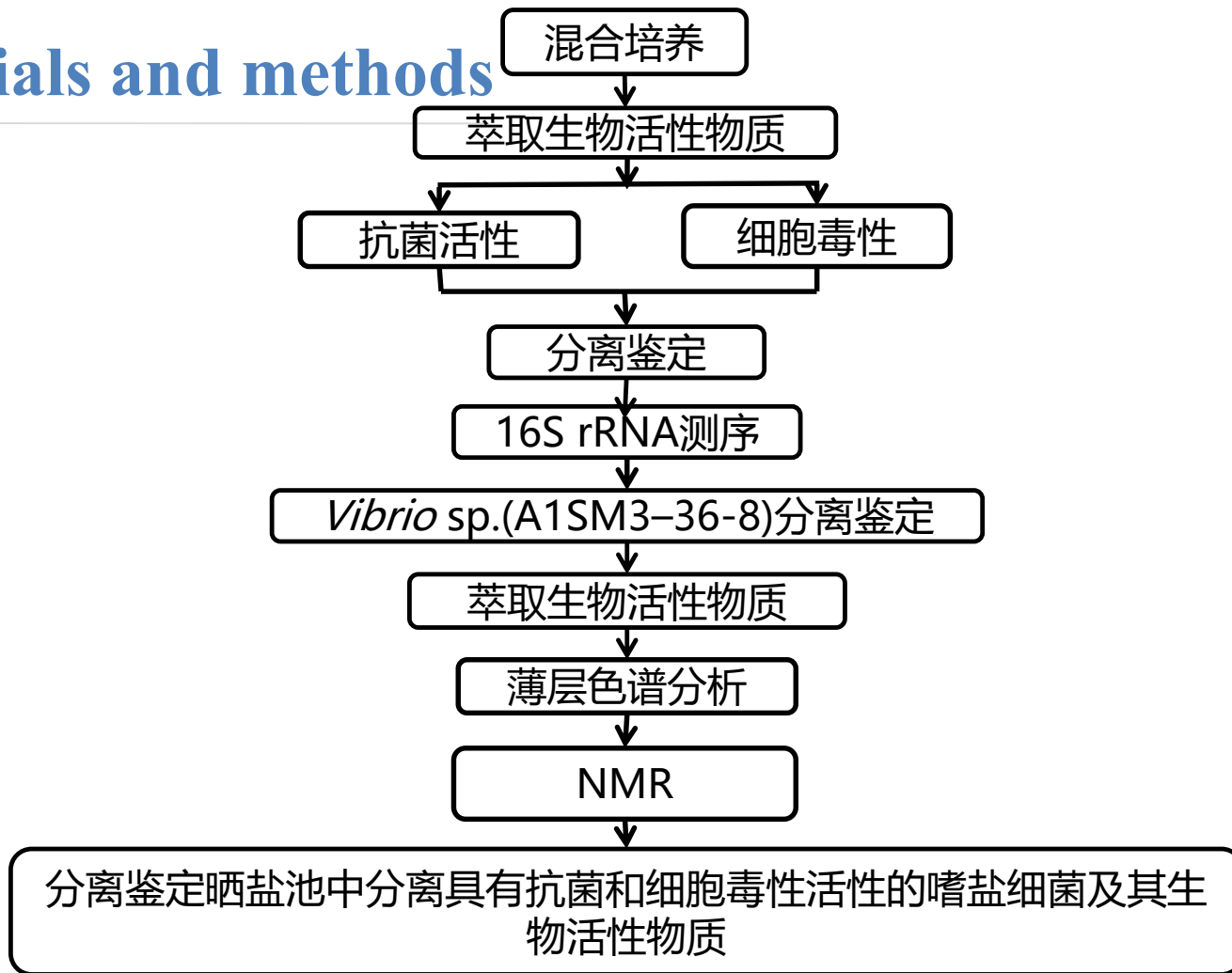
将盐水样品 (4%, 9%或15%[w/v])

涂布接种于7种不同的NaCl培养基中。

向沉积物样品 (4%, 9%或15%[w/v])

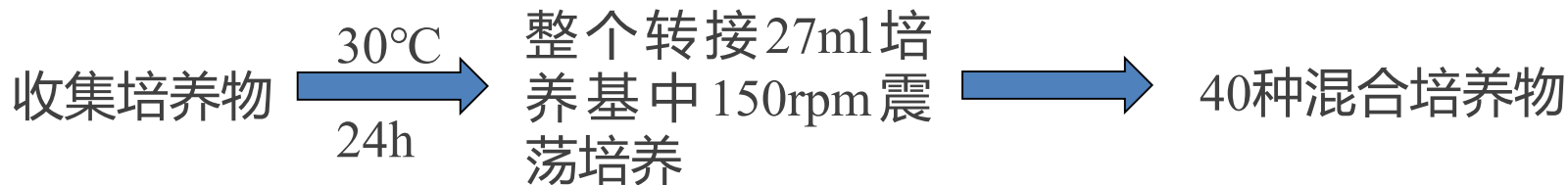
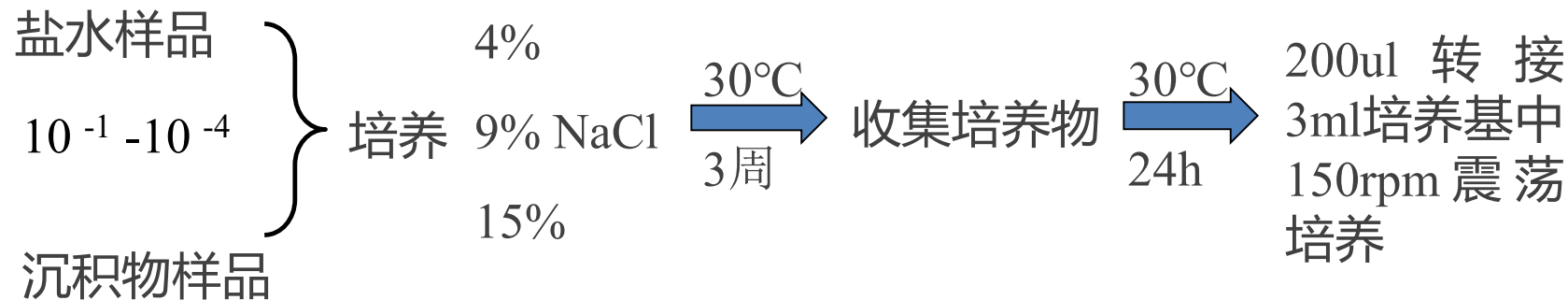
加入5mL水(0.5%盐度)混匀离心。将上清液接种于与盐水样品的相同培养基上。

# Materials and methods



# Materials and methods

## 混合培养



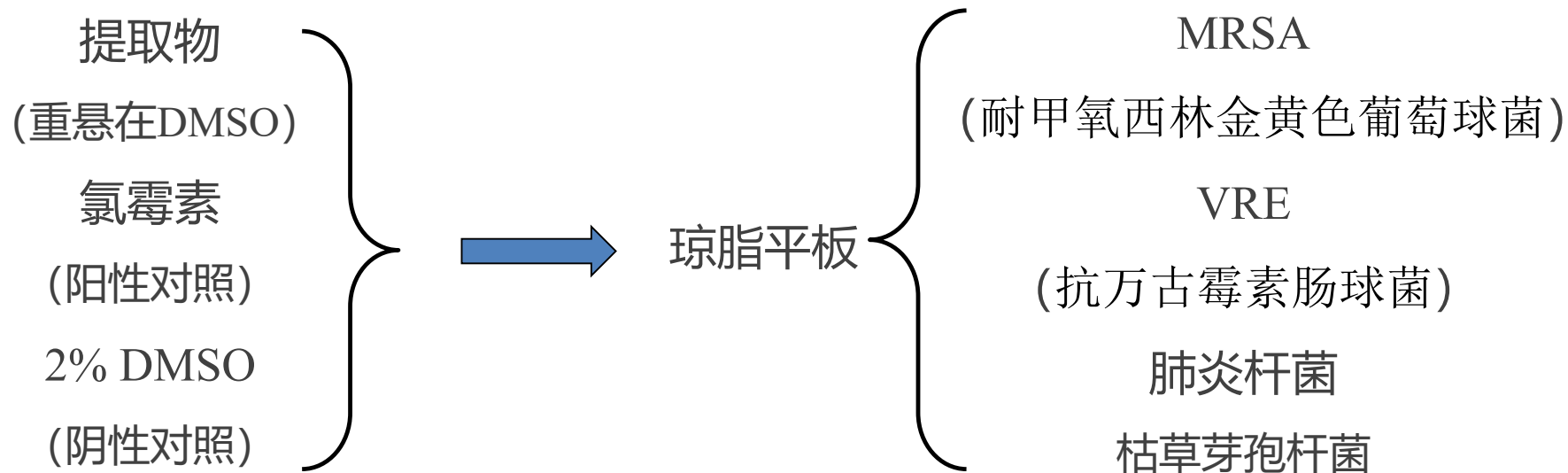
# Materials and methods

## 粗提物的提取

混合培养物 → 乙酸乙酯  
萃取两次 → 旋转蒸发去除有机部分

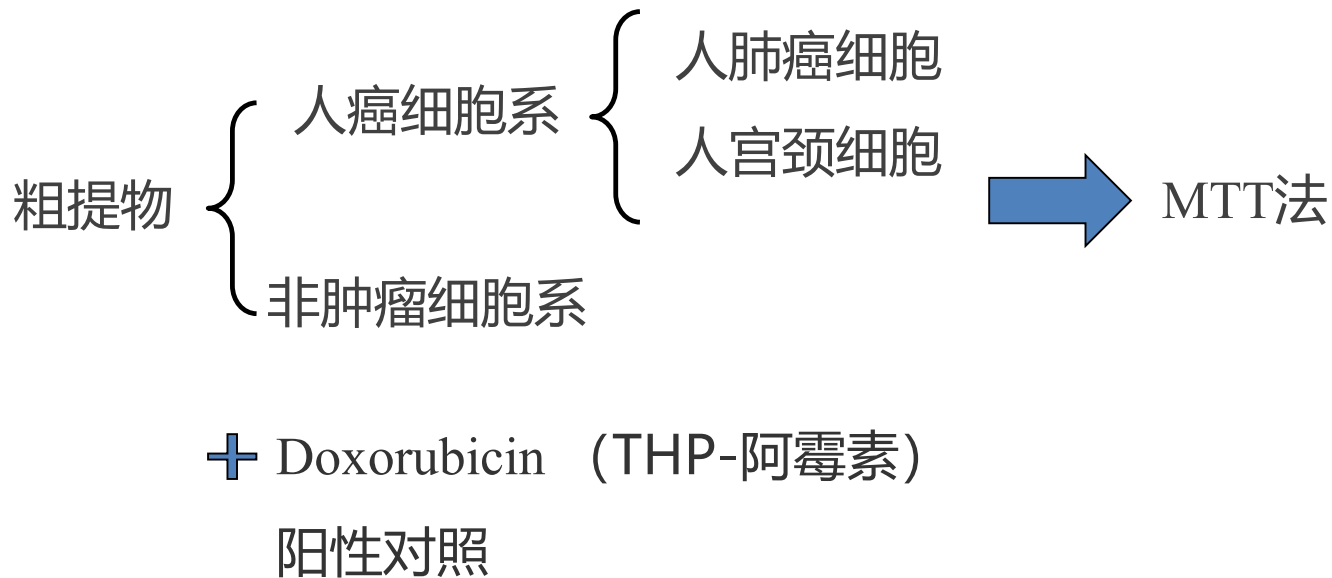
# Materials and methods

## 抗菌活性 琼脂平板法



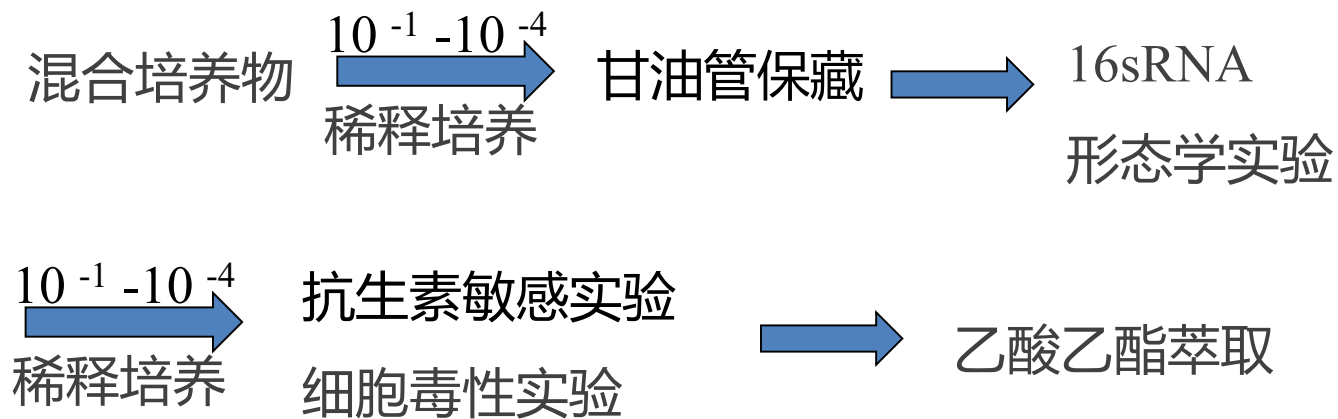
# Materials and methods

## 细胞毒性



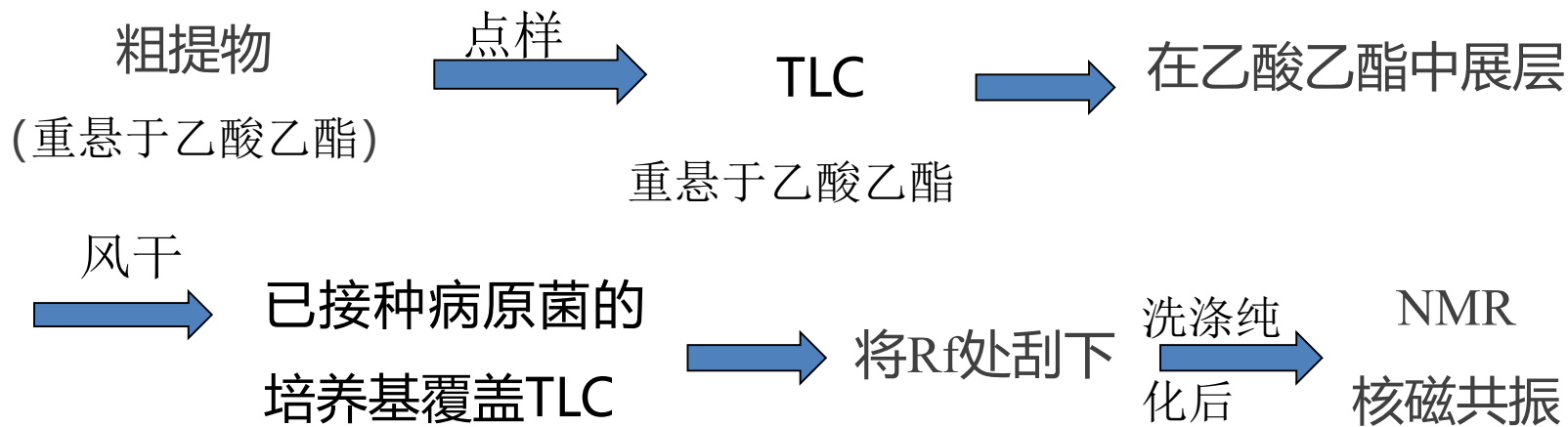
# Materials and methods

## 混合培养物中细菌的富集、分离和鉴定



# Materials and methods

## 弧菌属A1SM3-36-8的生物活性提取物的薄层色谱分析





# Materials and methods

---

## NMR

核磁共振波谱法(Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, 简称 NMR)

核磁共振波谱运用于半固体及微量样品的研究, 可以提供分子中化学官能团的数目和种类信息, 适合于液体、固体。



**Part 03**  
**Results and discussion**



**Table 2** Antibacterial and cytotoxic activities of the extracts obtained from the 40 mixed cultures against the indicated multidrug resistant pathogens and human cancer cell lines

Extract	Antibacterial Activity				Cytotoxic Activity <sup>a</sup> (IC <sub>50</sub> µg/mL)		
	<i>B. subtilis</i>	MRSA	VRE	<i>K. pneumoniae</i>	A549	SiHa	L929
A1BM2-1	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1SM2-2	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6BM2-3	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6SM2-4	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8BM2-5	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8SM2-6	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1BM4-7	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1SM4-8	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6BM4-9	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6SM4-10	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8BM4-11	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8SM4-12	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1BM7-13	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1SM7-14	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6BM7-15	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6SM7-16	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8BM7-17	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8SM7-18	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1BM5-19	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1SM5-20	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8BM5-21	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8SM5-22	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1BM6-23	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1SM6-24	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6BM6-25	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6SM6-26	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8BM6-27	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8SM6-28	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1SM1-29	+	+	-	-	> 100	> 100	> 100
A1BM1-30	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6SM1-31	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6BM1-32	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8SM1-33	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8BM1-34	-	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1BM3-35	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
A1SM3-36	+	+	-	-	44.90 ± 3.77	> 100	> 100
C6BM3-37	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C6SM3-38	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8BM3-39	+	-	-	-	> 100	> 100	> 100
C8SM3-40	-	-	-	-	64.60 ± 4.91	> 100	> 100

<sup>a</sup>> 100: IC<sub>50</sub> value over 100 µg/mL are considered not cytotoxic [59]

## 抗菌活性测定的结果:

40种提取物中有24种对抗枯草芽孢杆菌具有抗菌活性;

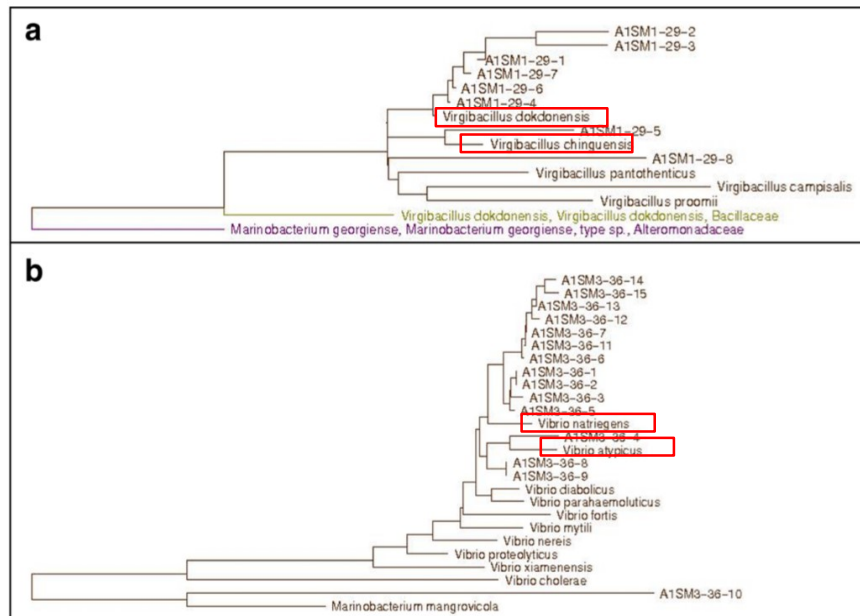
提取物 A1SM1-29 和 A1SM3-36 对MRSA具有抗菌活性;

## 细胞毒性试验的结果:

提取物C8SM3-40, A1SM3-36均显示出对人肺癌细胞系 (A549) 的抑制活性;

40种提取物均未显示出对非肿瘤细胞系成纤维细胞L929的任何毒性 (IC<sub>50</sub> > 100µg/ mL) 。

# Results and discussion



**Fig. 2** Phylogenetic tree reconstruction based on 16S rRNA genes of the bacterial isolates and their closest relatives. **a** A1SM1-29 isolate and its closest relatives. **b** A1SM3-36 isolate and its closest relatives

基于16S rRNA基因的细菌分离株及其亲缘关系的系统发育树重建。  
a. A1SM1-29分离物及其亲缘。 b. A1SM3-36分离株及其亲缘。

# Results and discussion

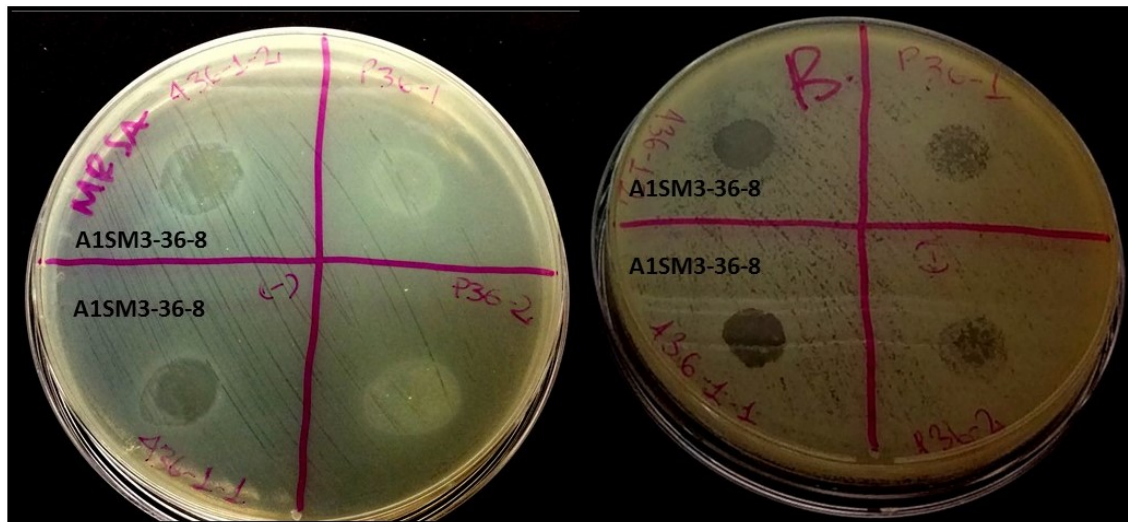
**Table 3** Antibiotic susceptibility profile of the *Vibrio* sp.

A1SM3–36-8 isolate

Antibiotic	Susceptibility <sup>a</sup>	Inhibition zone (mm)
Vancomycin	R	–
Amoxicillin	R	–
Penicillin G	R	–
Chloramphenicol	S	28
Erythromycin	I	16
Ampicillin	R	–
Tetracycline	I	19
Clindamycin	R	–
Cefoxitin	I	18
Nalidixic acid	I	20
Rifampicin	S	23

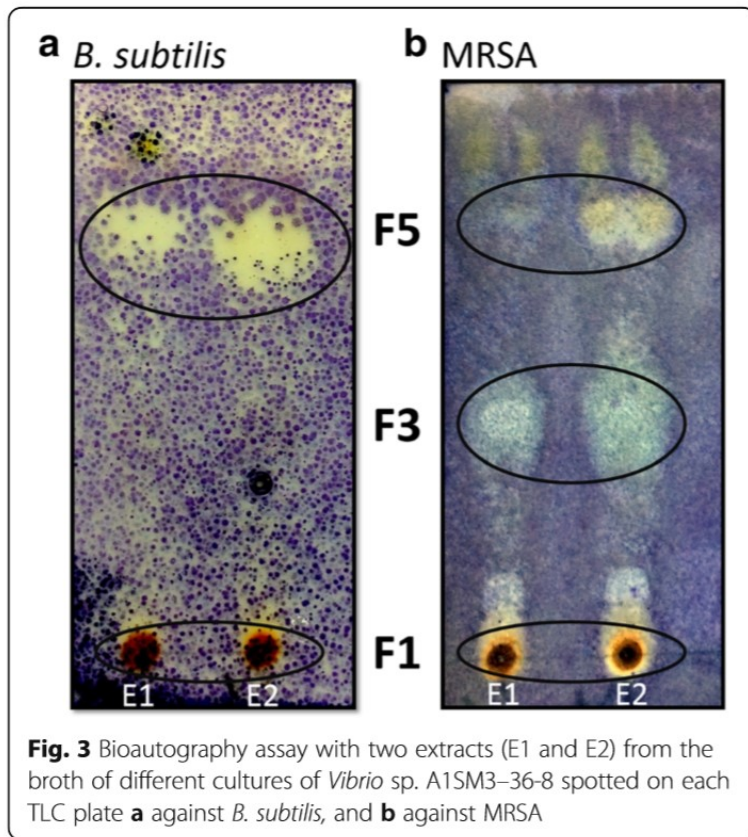
对该分离株的抗生素敏感性进行了评估

# Results and discussion



A1SM3-36-8提取物对于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和枯草杆菌的抑菌活性。

# Results and discussion



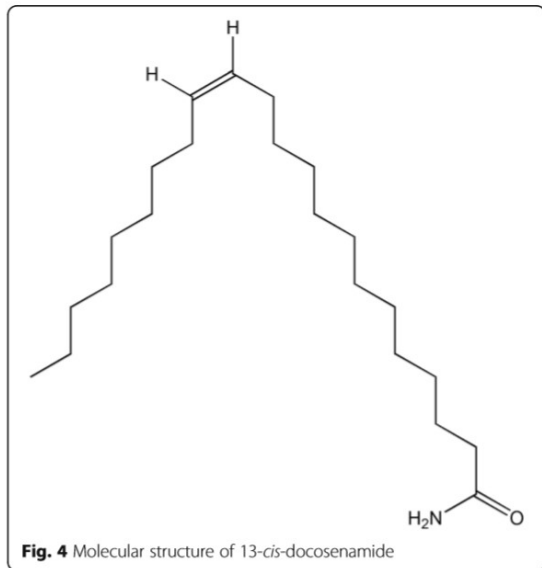
从 *Vibrio* sp. A1SM3-36-8  
的生物活性组分:

~~Rf 0.1 (F1, 2.4 mg)~~

Rf 0.4 (F3, 6.3 mg)

~~Rf 0.9 (F5, 3.0 mg)~~

# Results and discussion



通过NMR分析：F3为13-*cis*-docosenamide



## Results and discussion

使用混合培养物并随后分离的策略导致了一种指导性分离方法的发展，该方法可用于鉴定产生抗菌和细胞毒性代谢产物的细菌。

从混合培养物A1SM1-29中分离得到的分离株均未显示生物活性，因此有待进一步研究以确定生物活性代谢物的产生是否受该混合培养物菌株之间的相互作用所调节或分离产生变化的影响。

由于提取率低，无法表征显示出抗菌活性的另外两个部分。Rf 0.1 (F1, 2.4 mg)，Rf 0.9 (F5, 3.0 mg)。

13-*cis*-docosenamide在他其研究中表现出了更高的抑制活性，因为在本研究中，评估的是粗提取物而不是纯化合物的细胞毒性。



**Part 04**  
**Conclusion**



## Conclusion

---

本研究，通过生物学测定法检测初始混合培养物中的生物活性分子，进行生物活性分离株的筛选，分离得到可产生具有抗菌活性弧菌属A1SM3-36-8。结果表明，使用混合培养的方法是鉴定具有药理学应用的微生物培养物的有效替代方法。

此外，鉴定了F3生物活性级分中的主要化合物 13-*cis*-docosenamide（13-顺式-二十二酰胺），这可能是A1SM3-36提取物对MRSA的抗菌活性的化合物。

敬请各位老师批评指正！

