

专论与综述

假交替单胞菌及其胞外生物活性物质研究进展*

席 宇¹ 朱大恒^{1**} 刘红涛² 韩绍印¹(郑州大学生物工程系 郑州 450052)¹ (郑州大学细胞生物学研究室 郑州 450052)²

摘要: 假交替单胞菌是新建立的一个海洋细菌属, 它独特的生物学特性引起了越来越多研究者的关注。简介了假交替单胞菌的分类地位、生态分布等特点, 重点阐述了假交替单胞菌生物活性物质的种类及其生物活性, 最后对假交替单胞菌的应用前景进行了展望。

关键词: 假交替单胞菌, 生物活性物质, 应用前景

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0108-05

Advances on *Pseudoalteromonas* Species and Their Extracellular Bioactive Compounds*

XI Yu¹ ZHU Da-Heng^{1**} LIU Hong-Tao² HAN Shao-Yin¹(Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)¹(Laboratory for Cell Biology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)²

Abstract: The newly established genus *Pseudoalteromonas* has attracted significant interest of more and more researchers by their unique biological characteristics. In this review, the classification and ecological distribution of *Pseudoalteromonas* were briefly discussed, then special emphasis placed on the extracellular bioactive agents and their bioactivity of *Pseudoalteromonas*. Some ideas for further studies on *Pseudoalteromonas* were also proposed.

Key words: *Pseudoalteromonas*, Bioactive compounds, Application future

微生物在海洋中的分布非常广泛, 它们具有不同于其它微生物的生活环境和代谢途径, 能够产生许多结构新颖、作用特殊的活性物质。目前, 海洋微生物作为生物活性物质的新来源日益为国内外研究者所重视。假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas*) 是一新建立的海洋细菌属, 能够产生多种活性物质, 表现出多种生物活性。国外对该属细菌的研究较多, 分离出了多株假交替单胞菌^[1-7]。国内对假交替单胞菌研究较少^[8], 对其活性物质研究尚属空白。鉴于此, 作者在参考国内外最新研究进展的基础上综述了假交替单胞菌胞外活性物质的种类, 生物活性及其应用前景。

1 假交替单胞菌研究概况

1.1 假交替单胞菌分类地位 从海洋中分离的运动型革兰氏阴性异养细菌根据其发酵碳水化合物能力的不同可分为两个亚群, 其中发酵类群为假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 非发酵类群最初命名为交替单胞菌属 (*Alteromonas*)。1995 年 Gauthier 等在 16S rRNA

* 肿瘤与生物工程资助项目 (No. 教重办 2002-2 号)

** 通讯作者 Tel: 0371-7783235, E-mail: phdxy@sohu.com

收稿日期: 2004-07-14 修回日期: 2004-09-10

序列的基础上经系统发育学比较指出交替单胞菌属的细菌实际上应包括两个属：一个属仍命名为交替单胞菌属，另一个新属命名为假交替单胞菌属^[9]。假交替单胞菌作为一个新的海洋细菌属，引起了广大科研人员的关注。

1.2 假交替单胞菌生态分布特点 假交替单胞菌仅分布于海洋环境中，目前在世界范围海洋中，包括南极洲严寒海洋生境中分离到多株假交替单胞菌，已经鉴定到种的有 *P. tunicata*、*P. agarolyticus* 和 *P. bacteriolytica* 等 20 多种。多数假交替单胞菌可以分泌色素，能够生存于贫营养的海洋环境中，在多数情况下它们附生于海鞘、甲壳动物、珊瑚、无脊椎动物幼虫、藻类和海绵等高等真核生物的表面。Torben^[10] 等采用实时定量 PCR 技术 (Real-Time Quantitative PCR, RTQ-PCR) 检测了海洋样品中假交替单胞菌的分布与丰度，结果表明假交替单胞菌在海洋环境中是广泛分布的。众多研究表明假交替单胞菌的适应机制和存活策略具有多样性和有效性，这保证它们能够广泛的生存于海洋环境中。

2 假交替单胞菌胞外生物活性物质

假交替单胞菌能分泌多种胞外活性物质，包括胞外酶、胞外毒素，抗生素和胞外多糖等，这些物质表现出抗菌、溶菌、杀藻、分解半乳糖、降解纤维素和果胶以及软化琼胶等多种生物活性，有助于假交替单胞菌获取营养和竞争生存空间等，具有重要的生态学作用。

2.1 胞外酶 假交替单胞菌能够产生多种胞外酶，主要有琼脂酶、 β -半乳糖苷酶， α -淀粉酶和果胶裂解酶等。Vera 等从南太平洋近岸分离到一株革兰氏阴性细菌，经鉴定为 *P. antarctica* N-1。它产生的胞外琼脂酶被提纯 125 倍，达到电泳纯，酶活收率为 44%，此酶是 β -琼脂酶，分子量为 33kD，最适 pH 为 7.0，在 30℃ 以下酶活性保持稳定，在不高于 0.5 mol/L 的 Na^+ 存在的条件下，不会影响其活性。该酶能够水解琼脂的 β -1, 4 糖苷键，生成新琼脂四糖 (neoagarotetraose) 和新琼脂己糖 (neoagarohexaose) 作为主要的产物^[1]。能够降解琼脂的假交替单胞菌很多，主要包括 *P. agarolyticus*，*P. carrageenovorax*，*P. atlantica* 和 *P. citrea* 等。

Hoyoux 等从 *P. haloplanktis* TAE79 中分离出嗜冷 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)；Fernandes 等从南极洲海水中分离到一株嗜冷假交替单胞菌能够分泌 β -半乳糖苷酶，最适温度 26℃，并且制备为固定化酶时，水解乳糖能力与游离态的酶相同^[2]。Maria 等报道 3 株嗜冷 *P. haloplanktis* TAB23 附生于不同的宿主时，能够以两种不同代谢途径分泌 α -淀粉酶^[3]。Truong 等研究表明嗜冷 *P. haloplanktis* ANT/505 培养物上清液能够以 3 种不同的方式裂解果胶，经纯化和检测，首次从嗜冷海洋细菌中分离获得 2 种果胶裂解酶 (pectate lyase)，并且成功克隆了编码这 2 种酶的基因，为进一步的研究打下了基础^[4]。上述几种假交替单胞菌产生的胞外酶为低温酶，有些假交替单胞菌也能够产生耐热酶，Cristina 等分离筛选一株 *Pseudoalteromonas* sp. CP76 在对数晚期分泌一种金属蛋白酶 CP1，该蛋白酶的最适温度和最适 pH 值分别为 55℃ 和 8.5，当反应基质中的盐浓度为 7.5% 时，该酶活性最强^[5]。

此外，许多假交替单胞菌产生的一些胞外酶具有强烈的溶菌和杀藻活性，Lee 用亚硝基胍处理具有溶藻效应的假交替单胞菌 A28 时获得 2 株缺失溶藻能力的假交替单胞菌 NH1 和 NH2，通过对蛋白酶检测发现：NH1、NH2 的蛋白酶活性比 A28 低 15%。对 A28 培养物的上清液分离纯化，获得均一的蛋白酶，分子量为 50kD，N 端氨基酸序列

为 Ala-Thr-Pro-Asn-Asp-Pro, 最适 pH 值和温度分别为 8.8 和 30℃。DFP、抗蛋白酶、胰凝乳蛋白酶抑制剂、亮抑酶肽强烈抑制其活性; EDTA, EGTA 等不抑制其活性。纸片法检测, 该蛋白酶具有强烈的溶藻活性。这表明假交替单胞菌 A28 是通过产生一种丝氨酸蛋白酶而溶藻的^[6]。

2.2 毒素 一些假交替单胞菌能够产生胞外毒素。*P. tetratodonis* 能够产生神经毒素 (neurotoxin) 和河豚毒素 (tetratodotoxin), 这些毒素能够引起河豚科鱼类中毒; *P. piscicida* 释放一些毒素能够引起某些鱼类的死亡; *P. tunicata* 产生的一些毒素能够抑制无脊椎动物幼虫和藻类孢子的进一步萌发; *P. atlantica* 能够导致蟹类 (*Cancer pagurus*) 快速死亡, 主要毒力因子为脂多糖, 或者是脂多糖与其它的热稳定毒力因子共同起作用^[8]。*P. denitrificans* 在密度培养的条件下能够分泌一些自体毒素, 杀死自身细胞从而抑制自身的进一步生长。假交替单胞菌分泌的有毒化合物具有多重作用, 与其它没有毒性的胞外物质相比, 它们能够更严格调节假交替单胞菌的微生物环境, 在海洋生态环境中具有重要的意义^[11]。

2.3 抗生素 许多假交替单胞菌表现出广谱的抗菌效应, 这些细菌主要包括 *P. aurantia*、*P. rubra* 和 *P. luteoviolacea* 等, 它们能够分泌高分子量的抗生素类物质。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 是引起全球性医院内感染的重要致病菌之一, 目前医院正面临着 MRSA 的感染日益严重和多重耐药的挑战。Isnansetyo 等分离的一株 *P. phenolica* sp. Nov O-BC30T 能够产生一类含酚的抗生素 MC21-A, 强烈的抑制 MRSA 和肠球菌 (*Enterococcus*) 的生长, 但对链球菌 (*Streptococcus*) 生长的影响不明显。在浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, MC21-A 对人类正常纤维源细胞 (human normal fibroblast), 鼠噬铬细胞瘤 (rat pheochromocytoma) 和 Vero 细胞没有细胞毒效应, 因此 MC21-A 可以作为开发新型高效抗生素的一个重要的活性物质来源^[12,13]。不同的假交替单胞菌表现的抗菌活性有所不同, 它们可以产生不同的抗生素类物质。这可能是由于细菌最初选择不同的宿主或生活环境, 随进化分别产生不同的抗生素类物质的缘故。

2.4 胞外多糖 一些假交替单胞菌能够分泌胞外多糖 (exopolysaccharides, EPS), EPS 可以增加产生菌及某些其它海洋生物在特定环境中的存活机会。一株假交替单胞菌 S9 无论是在液体还是固体培养状态下稳定期都能够产生 EPS, 促进产生菌定居在无脊椎动物幼虫的表面。对 S9 分泌 EPS 在产生菌附着于宿主过程中的作用进行详细研究, 结果表明在营养贫乏条件下, 无论是游离的细菌, 还是附着于宿主和无机颗粒表面的细菌, EPS 的分泌量都增加, EPS 在细胞表面分泌量的增加进一步增强了产生菌与宿主的附着。EPS 还可以增强营养物质的摄取和减少一些物质通过细胞的扩散, 因此 EPS 的分泌可以帮助假交替单胞菌 S9 逃离贫营养的生境^[11]。Corsaro 等报道 *P. haloplanktis* TAC125 能够分泌 EPS, 并且不同的培养温度对 EPS 的成分也有影响^[14]。此外, 某些假交替单胞菌分泌的 EPS 中含有抗菌成分, 能够控制一些病原菌的附着作用, 从而有利于宿主和生活在 EPS 产生菌附近生物的存活; EPS 还具有保护屏障的作用, 阻止抗生素和原生动物的作用。因此很可能 EPS 的上述特性为产生菌提供了一种有效的存活策略。

3 假交替单胞菌研究展望

不同的假交替单胞菌能够分泌多种不同的生物活性物质, 表现出多种生物活性。

目前国外对假交替单胞菌生物活性物质进行大量研究,已取得一定的成果。结果表明这些活性物质在防治有害藻类水华、生物防污、工业生产和开发抗菌和抗肿瘤海洋药物等方面展示了诱人的应用前景。假交替单胞菌无论在基础理论研究领域还是在应用研究方面都已经引起了研究者的高度重视。

3.1 基础理论研究领域研究前景 假交替单胞菌通常附着于真核生物上,与其真核宿主共生一起,这种共生关系有助于我们研究微生物与宿主之间相互关系的重要机制。假交替单胞菌能够产生多种不同的胞外活性物质,表明它们的代谢途径具有多样性,有助于研究微生物的代谢作用及其调控机制,在微生物代谢组学研究领域具有重要的意义。假交替单胞菌在海洋环境中的广泛分布,表明它们的适应机制和存活策略具有多样性和有效性,研究其适应机制和存活策略有助于我们深刻的了解海洋微生物生态系统的多样性。而且一些极端条件下假交替单胞菌生存机理的研究对微生物菌种选育、改良和培养工艺等的创新同样具有重要理论价值。

3.2 应用研究领域应用前景 (1) 有害藻类水华的防治:富营养化已成为当今世界水体普遍存在的环境问题,有害藻类水华(harmful algae blooms)的爆发则是水体富营养化引起的生物污染现象。随着全球水体富营养化的加剧,有害藻类水华爆发日趋频繁,其造成的环境和经济问题日益引起人们的重视,因此对藻类特别是对有害藻类的控制受到国内外有关专家的重视。目前主要利用物理和化学方法防治水华,效果其不理想。许多假交替单胞菌能够分泌胞外酶,强烈地抑制藻类孢子萌发,或溶解藻类细胞,作为有害藻类水华生物防治的可能生物,假交替单胞菌具有潜在的应用前景^[6]。

(2) 生物防污:生物污损(biofouling)是有害海洋微型或大型生物在物体表面的一种不良沉积。污损现象的发生严重地影响着船舶的性能和寿命,使船舶航速降低、灵活性减弱、燃料的消耗增加、壳体的腐蚀加速等。海洋污损生物主要为多种菌类和藻类。假交替单胞菌能够分泌多种胞外活性物质,抑制多种细菌和藻类生长。通过对假交替单胞菌生物活性物质的研究,可以为开发高效、无毒的生物防污剂提供新的思路和技术支持^[15]。

(3) 工业生产:假交替单胞菌能够产生多种低温酶。低温纤维素酶可用于纺织、纸浆、造纸工业; α -淀粉酶可用于生产面包、纺织品、酿造及清洁剂; β -牛乳糖酶去除牛奶中的乳糖^[3];蛋白酶用于清洁剂和肉类嫩化等。总之假交替单胞菌产生的诸多低温酶能在较低的环境条件下加速生物降解的过程,可用于食品、纺织、造纸、环保、医药、饲料等领域,为这些领域的工业生产带来了更多的生机。而且通过研究低温酶发酵与制备工艺,克隆基因并在适宜的宿主系统中进行高效表达,可以为工业生产提供新酶品种。

4 结束语

综上所述,假交替单胞菌具有产生多种多样新颖生物活性物质和酶的巨大潜力,特别是这些生物活性物质能通过发酵胞外生产,与现代微生物发酵技术相结合,极容易实现工业化的生产。假交替单胞菌的研究前景无疑是很广阔的。中国作为一个拥有18,000 km 海岸线的世界海洋大国之一,海洋资源丰富,具备开发和利用假交替单胞菌这一微生物资源的基础条件和优势,研究和开发假交替单胞菌及其生物活性物质具有重要的现实意义。因此,假交替单胞菌及其胞外活性物质的研究必定是未来一段时期内成果倍出的一个研究领域。

参 考 文 献

- [1] Vera J, Alvarez R, Murano E, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1998, **64** (11): 4378 ~ 4383.
- [2] Fernandes S, Geueke B, Delgado O, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 2002, **58**: 313 ~ 321.
- [3] Tutino M L, Parrilli E, Giaquinto L, *et al.* Journal of Bacteriology, 2002, 5814 ~ 5817.
- [4] Truong LV, Tuyen H, Helmke E, *et al.* Extremophiles, 2001, **5**: 35 ~ 44.
- [5] Cristina S P, Mellado E, Bertoldo C, *et al.* Extremophiles, 2003, **7**: 2212 ~ 28.
- [6] Lee S, Kato J, Takiguchi N, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, **66** (1): 4334 ~ 4339.
- [7] Carolina C R, Rowley A F. Appl Environ Microbiol, 2004, **70** (2): 729 ~ 735.
- [8] 曾润颖, 赵 晶. 微生物学通报, 2002, **29** (6): 12 ~ 16.
- [9] Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Int J Syst Bacteriol, 1995, **45**: 755 ~ 761.
- [10] Torben L, Skovhus N B, Holmström R C. Appl Environ Microbiol, 2004, **70** (4): 2373 ~ 2382.
- [11] Carola H, Staffan K. FEMS Microbiology Ecology, 1999, **30**: 285 ~ 293.
- [12] Isnansetyo A, Kamei Y. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, **53** (2): 583 ~ 588.
- [13] Isnansetyo A, Kamei Y. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, **47** (2): 480 ~ 488.
- [14] Corsaro M M, Lanzetta R, Parrilli E, *et al.* Journal of Bacteriology, 2004, **186** (1): 29 ~ 34.
- [15] Holmstrom C, Egan S, Franks A, *et al.* FEMS Microbiology Ecology, 2002, **41**: 47 ~ 58.