

污损生物膜细菌 *Pseudoalteromonas issachenkonii* YT1305-1 的鉴定及其代谢物化学成分分析

于洋^{1,4} 王建华^{1,3} 方圣涛¹ 姜作真² 周晓群² 夏传海^{1*}

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用所重点实验室 山东 烟台 264003)

(2. 烟台水产研究所 山东 烟台 264000)

(3. 中国科学院海洋研究所 海洋环境腐蚀与生物污损重点实验室 山东 青岛 266071)

(4. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【目的】对污损生物膜细菌 YT1305-1 进行菌种鉴定; 研究其作为污损生物膜优势菌之一的代谢产物。【方法】通过 16S rRNA 基因序列分析, 结合系统进化树和细菌生理生化实验对菌种进行鉴定, 通过硅胶柱层析分离方法和核磁共振检测技术分析其代谢物的化学成分。【结果】发现生物膜中存在明显的优势菌株, 假交替单胞菌属为优势菌属之一。16S rRNA 序列比对分析表明 *Pseudoalteromonas issachenkonii* 为优势菌种之一, 将目标菌种命名为 *Pseudoalteromonas issachenkonii* YT1305-1, 对其代谢物化学成分进行分析, 共得到 10 个化合物, 其中包括 5 个二酮哌嗪(DKPs)类信号分子, 环(甘氨酸-丙氨酸) (1)、环(脯氨酸-甘氨酸) (2)、环(脯氨酸-酪氨酸) (3)、环(4-羟基-脯氨酸-亮氨酸) (4)和环(4-羟基-脯氨酸-丙氨酸) (5), 以及尿嘧啶(6)、胸腺嘧啶(7)、胸腺嘧啶脱氧核苷(8)、己二酸二(2-乙基己)酯(9)和邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(10)。【结论】污损生物膜中存在明显的优势菌, 其中之一为 *P. issachenkonii* YT1305-1, 在其代谢产物中发现了疑似信号分子的物质 DKPs, 有研究表明该物质能调控生物膜的形成, 进而影响生物污损的形成, 为探究生物污损现象奠定了物质基础。

关键词: 生物污损, 生物膜, 依氏假交替单胞菌, 二酮哌嗪

基金项目: 烟台市科技发展计划项目(No. 2011063); 中国科学院海洋环境腐蚀与生物污损重点实验室开放基金项目(No. MCKF201402); 国家自然科学基金项目(No. 41206154, 21202198)

*通讯作者: ✉: chxia@yic.ac.cn

收稿日期: 2013-09-12; 接受日期: 2013-12-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

Identification of biofouling biofilms bacterium *Pseudoalteromonas issachenkonii* YT1305-1 and analysis on chemical constituents of its metabolites

YU Yang^{1,4} WANG Jian-Hua^{1,3} FANG Sheng-Tao¹ JIANG Zuo-Zhen² ZHOU Xiao-Qun²
XIA Chuan-Hai^{1*}

(1. Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resources Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China)

(2. Fishery Research Institute of Yantai, Yantai, Shandong 264000, China)

(3. Key Laboratory of Marine Environmental Corrosion and Bio-fouling, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

(4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] Bacterium YT1305-1 was isolated and identified from biofouling biofilms. As one of the dominant bacteria in biofouling biofilms, metabolites of bacterium YT1305-1 were investigated. **[Methods]** 16S rRNA gene analysis, phylogenetic tree analysis and physiological and biochemical characteristics were carried on to identify the targeted bacterium. Chemical constituents of the bacterial metabolites were purified through silica column chromatography and identified using nuclear magnetic resonance (NMR). **[Results]** There existed dominant bacterial species in biofouling biofilms. *Pseudoalteromonas* sp. was identified as one of the dominant species in biofouling bacteria. 16S rRNA analysis showed *P. issachenkonii* was one the dominant bacterium. The targeted bacterium was named *Pseudoalteromonas issachenkonii* YT1305-1 and 10 chemicals were identified from its fermentation broth, including 5 Diketopiperazines (DKPs): cyclo (Gly-Ala) (1), cyclo (Pro-Gly) (2), cyclo (Pro-Tyr) (3), cyclo (Leu-4-hydroxyl-Pro) (4), cyclo (Ala-4-hydroxyl-Pro) (5) and uracil (6), thymine (7), thymidine (8), bis (2-ethylhexyl) adipate (9), phthalate esters (2-ethyl caproic) (10). **[Conclusion]** There existed bacterial species that were obviously dominant in quantitative terms in biofouling biofilms. Bacterium YT1305-1 was purified as one of the dominant bacterium. Analysis on its metabolites identified several DKPs, which might influence the formation of biofilms and further the development of biofouling. This investigation provides material basis for biofouling studies.

Keywords: Biofouling, Biofilms, *Pseudoalteromonas issachenkonii*, Diketopiperazines

海洋生物污损(Marine biofouling)是指海洋污损生物在海洋人工设施上的附着^[1]。海洋生物污损问题是限制人们对海洋资源进行开发和合理利用的主要问题之一, 不仅能影响人工设施的正常使用, 加速金属的腐蚀, 还严重影响水产养殖业, 对海上交通、海防和沿海工业造成极大的危害和经济损失^[2]。

污损生物膜主要由各种细菌和硅藻穿插在胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)中组成, 生物膜的形成使海洋真菌、藻类孢子、污损动物幼虫等可以进行粘附并发育生长, 为大型污损生物的附着提供了立足点, 可充当藤壶、贻贝等

的营养, 从而促进污损生物的粘附, 是生物污损形成的关键环节^[3]。研究发现, 生物膜的存在对后续大型污损层的形成具有一定选择性^[4]。Sergey 等发现, 与潮间带生物膜相比, 草苔虫更倾向于附着在同一海域潮下带生物膜表面^[5]; Patel 等认为细菌生物膜中不同的菌落组成对于幼虫和孢子附着生长的影响具有很大的差异^[6]。Joint 等经实验证实, 生物膜中的细菌可以诱导浒苔游动孢子的附着, 原因在于细菌生物膜产生了类似群体感应信号分子的代谢物, 降低了孢子的游动速度, 从而增大了孢子附着生长的概率^[7]。因此, 探究生物膜中细菌的群落组成及其代谢物的化学成分, 为阐明生物污损的

形成和发展机理提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 样品来源

实验所用菌株分离自烟台海域污损生物膜样品。挂板实验地点为 37°30' N, 121°26' E。挂板日期为 11 月, 时长 5 d, 所用板材为聚氯乙烯(Poly vinyl chloride, PVC)板。

1.2 培养基和主要仪器

实验所用培养基为细菌通用营养培养基, 主要成分为(g/L): 胰蛋白胨 5, 酵母浸粉 10, NaCl 5, 培养基用海水配制, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

仪器: Bruker AVANCE III 500 型超导核磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株的鉴定: (1) 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及其序列分析: 冻存菌株活化后用 CTAB-SDS 法提取细菌总 DNA, 经 PCR 扩增、测序后进行 16S rRNA 基因序列的比对分析。PCR 引物为 16S 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 16S 1525r (5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3')^[8]。20 μ L PCR 反应体系如下: Taq DNA polymerase 0.5 U, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, dNTPs 0.5 mmol/L, 正反引物 0.5 mmol/L, 模板 DNA 1 μ L。PCR 扩增条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果经 GenBank 数据库比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)后, 采用 ClustalX 方法和 MEGA 软件进行系统进化树分析。

1.3.2 生理生化实验: 为了进一步确定分离菌株的种类, 按照细菌常用鉴定方法, 进行生理生化实验, 对细菌形态及生理生化特性进行研究, 包括革兰氏染色、淀粉水解实验、V-P 实验、甲基红实验、菌膜实验、明胶液化实验、尿素酶实验、触酶实验、硝酸盐还原实验、卵磷脂实验、糖酵解实验等。

1.3.3 细菌代谢物分析: 将菌液接入发酵培养基中, 30 °C、120 r/min 摇床培养 12 h。发酵液 4 000 r/min 离心去除菌体, 上清用乙酸乙酯和正丁醇分别萃取 4 次, 45 °C 减压浓缩, 得到粗提物。为了分离鉴定其中所含化学成分, 采用正相硅胶柱层析法将粗提物进行划段, 以二氯甲烷/甲醇不同比例混合液为洗脱剂, 按照 50:1 (600 mL)、30:1 (600 mL)、20:1 (400 mL)、10:1 (400 mL)、5:1 (400 mL) 梯度进行洗脱, 得到 8 个组分。各组分经多次硅胶柱层析进一步分离, 其中组分 A 经反复硅胶柱层析, 以石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱, 洗脱剂比例 50:1 得到化合物 **9** (122 mg)。组分 B 经反复硅胶柱层析, 以二氯甲烷/甲醇梯度洗脱, 洗脱剂比例 20:1 得到化合物 **8** (22 mg)。组分 C 经反复硅胶柱层析, 以二氯甲烷/甲醇梯度洗脱, 洗脱剂比例 10:1 分别得到化合物 **1** (17 mg)、化合物 **2** (16 mg); 剩余部分经二氯甲烷/甲醇梯度洗脱, 洗脱剂比例 8:1 得到化合物 **7** (3 mg)。组分 D 经二氯甲烷/甲醇=1:1 凝胶柱层析得到化合物 **4** (127 mg)。组分 E 经反复硅胶柱层析及反相硅胶柱层析得到化合物 **3** (98 mg); 剩余部分经二氯甲烷/甲醇=1:1 凝胶柱层析得到化合物 **6** (8 mg)。组分 F 经反复硅胶柱层析, 以二氯甲烷/甲醇梯度洗脱得到化合物 **5** (200 mg)。

1.3.4 化合物结构鉴定: 将所得化合物溶解于 0.5 mL 氘代试剂中, 进行核磁共振扫描(¹H NMR 为 500 MHz, ¹³C NMR 为 125 MHz)。记录 ¹H NMR、¹³C NMR、DEPT90、DEPT135 等谱图信息, 对谱图进行分析, 从而确定化合物的结构式和分子式。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

从生物膜混合菌中分离得到 52 株细菌, 经过 16S rRNA 基因序列比对分析, 其中 49 株为假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.), 2 株为盐单胞菌属(*Halomonas* sp.), 1 株为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。在假交替单胞菌属中, 有 16 株菌的 16S rRNA 基因序列比对结果与依氏假交替单胞菌一致性高达 98%, 取 YT1305-1 作为研究对象, 对其进行系

统进化树分析。图 1 为根据菌株 YT1305-1 的 16S rRNA 基因序列与相关假交替单胞菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树,在系统发育树中分离菌株 YT1305-1 与 *Pseudoalteromonas issachenkonii* (NR025139.1)自然聚于一支,且一致性高达 100%,表明分离菌株 YT1305-1 属于假交替单胞菌属,可以初步判断其为 *P. issachenkonii*。将该序列提交 GenBank 数据库,获得序列号为 KF709699。

2.2 目标菌株的生理生化特征

目标菌株 YT1305-1 的生理生化实验结果显示(表 1),革兰氏染色、甲基红、尿素酶、硝酸盐还原性、卵磷脂实验呈阴性,淀粉水解、V-P、菌膜、明胶液化、触酶实验呈阳性。菌株代谢葡萄糖不产酸,代谢 α -乳糖和蔗糖产酸。实验结果与文献[9]相符,结合系统进化树分析结果,可以判断该菌为 *P. issachenkonii*。

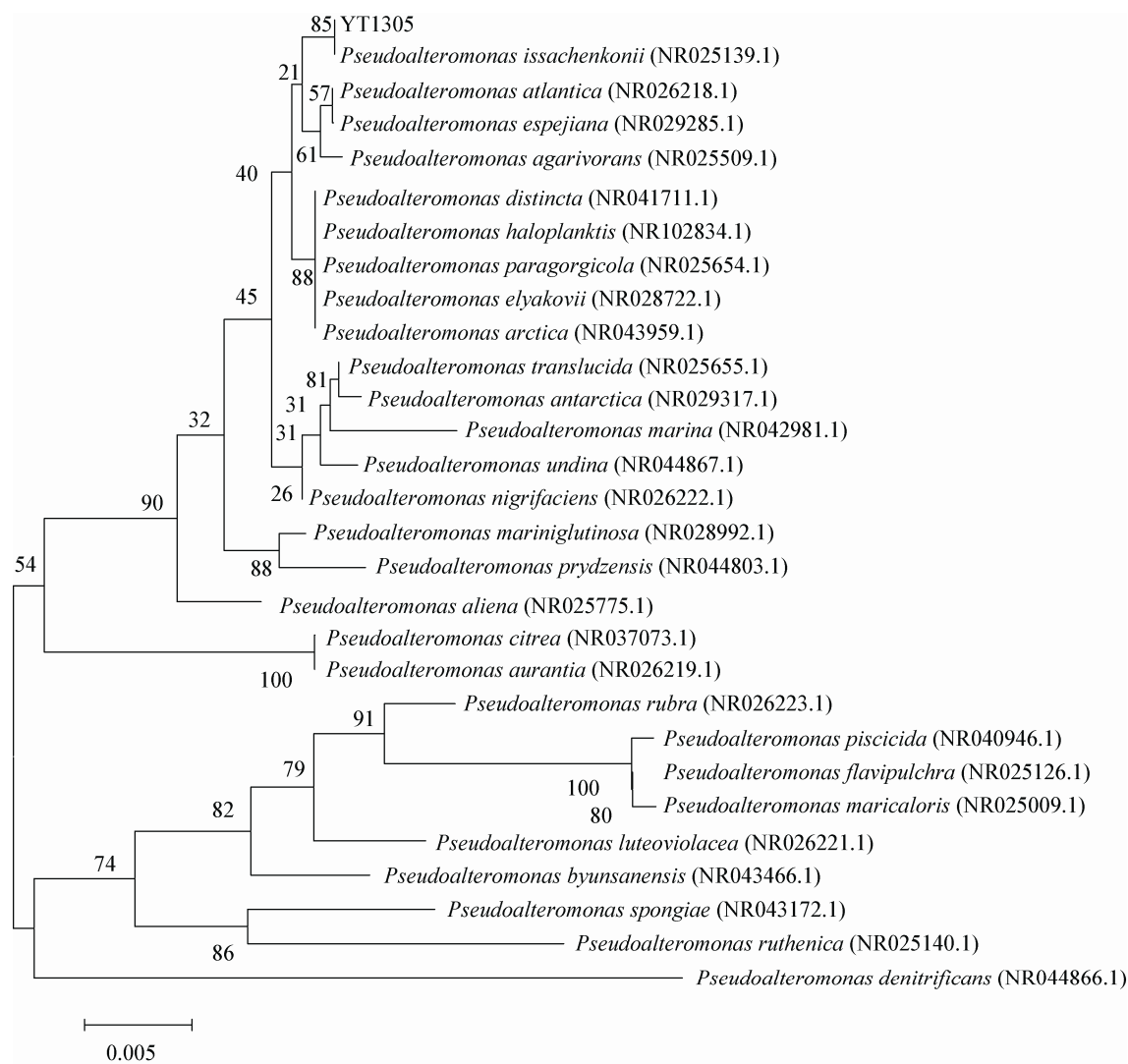


图 1 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences

注：0.005 代表 1/200 进化距离单位；分支上的数值代表为自举 1 000 次的结果；括号中序号为 GenBank 登录号。
Note: Scale bar: 0.005 nucleotide substitution per 50 nucleotides of 16S rRNA gene sequence. Nuerals on branches are the supporting percentage by 1 000 replicates. Serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers.

表1 目标菌株的生理生化特征			
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of targeted bacterium			
实验项目 Test item	结果 Results	实验项目 Test item	结果 Results
革兰氏染色 Gram staining	—	触酶实验 Catalase test	+
淀粉水解实验 Starch hydrolysis test	+	硝酸盐还原实验 Nitrate reduction test	—
V-P 实验 V-P test	+	卵磷脂实验 Lecithin test	—
甲基红实验 M.R. test	—	糖酵解实验 Glycolysis test	
菌膜实验 Pellicle test	+	葡萄糖 Glucose	—
明胶液化实验 Gelation liquefaction test	+	α -乳糖 α -Lactose	+
尿素酶实验 Urease test	—	蔗糖 Sucrose	+

注：+：阳性；—：阴性。
Note: +: Positive; —: Negative.

2.3 代谢物结构鉴定

利用核磁共振技术对所分离化合物进行结构鉴定，化合物 ¹H 谱、¹³C 谱数据如下。

化合物 **1**：淡黄色固体。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ_{H} : 8.14 (1H, s, NH-6), 7.95 (1H, s, NH-3), 4.10 (1H, m, H-2), 3.17 (2H, d, *J*=5.2 Hz, H-5), 1.25 (3H, d, *J*=6.7 Hz, H-7)。¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ_{C} : 170.8 (C-1, C=O), 167.0 (C-4, C=O), 50.1 (C-2), 44.9 (C-5), 19.1 (C-7)。化合物 **1** 核磁数据经与文献[10]对照，基本一致，被鉴定为环(甘氨酸-丙氨酸)，分子式为 C₅H₈N₂O₂。

化合物 **2**：白色固体。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_{H} : 6.59 (1H, s, NH-8), 4.09 (2H, m, H-6), 3.92 (2H, m, H-9), 3.59 (2H, m, H-3), 2.40 (2H, m, H-5), 1.94 (2H, m, H-4)。¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ_{C} : 169.7 (C-1, C=O), 163.4 (C-2, C=O), 58.5 (C-6), 46.6 (C-9), 45.3 (C-3), 28.4 (C-5), 22.4 (C-4)。化合物 **2** 核磁数据与文献[11]对照基本一致，被鉴定为环(脯氨酸-甘氨酸)，分子式为 C₇H₁₀N₂O₂。

化合物 **3**：淡黄色固体。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_{H} : 7.06 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-3', 5'), 6.63 (1H, s, NH-8), 4.12 (1H, m, H-6), 4.09 (1H, m, H-9),

3.56 (2H, m, H-3), 3.45 (2H, m, H-10), 2.35 (2H, m, H-5), 1.92 (1H, m, H-4)。¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ_{C} : 170.5 (C-1, C=O), 166.4 (C-7, C=O), 155.9 (C-4'), 130.3 (C-3', 5'), 126.8 (C-1'), 116.0 (C-2', 6'), 59.1 (C-6), 51.2 (C-9), 45.4 (C-3), 36.0 (C-10), 28.3 (C-5), 22.4 (C-4)。化合物 **3** 核磁数据与文献[12]对照基本一致，被鉴定为环(脯氨酸-酪氨酸)，分子式为 C₁₄H₁₆N₂O₃。

化合物 **4**：淡黄色油状。¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ_{H} : 6.10 (1H, s, NH-8), 4.51 (2H, m, H-6), 4.08 (1H, m, H-9), 3.71 (1H, m, H-4), 3.57 (2H, m, H-3), 2.40 (2H, m, H-5), 1.79 (2H, m, H-10), 1.52 (1H, m, H-11), 1.01–1.02 (6H, m, H-12, 13)。¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ_{C} : 170.4 (C-1, C=O), 166.2 (C-7, C=O), 68.5 (C-4), 57.4 (C-6), 54.3 (C-3), 53.4 (C-9), 38.5 (C-5), 37.4 (C-10), 24.7 (C-11), 23.2 (C-12), 21.2 (C-13)。化合物 **4** 核磁数据与文献[13]对照基本一致，被鉴定为环(4-羟基-脯氨酸-亮氨酸)，分子式为 C₁₁H₁₈N₂O₃。

化合物 **5**：白色固体。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ_{H} : 8.14 (1H, s, NH-8), 4.37 (1H, m, H-6), 4.14 (1H, m, H-9), 3.52 (1H, m, H-4), 3.24 (2H, m, H-3), 1.95 (2H, m, H-5), 1.21 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-10)。¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ_{C} :

170.8 (C-1, C=O), 167.1 (C-7, C=O), 67.5 (C-4), 57.7 (C-6), 54.2 (C-3), 50.5 (C-9), 15.7 (C-10)。核磁数据与文献[14]对照基本一致, 化合物 **5** 被鉴定为环(4-羟基-脯氨酸-丙氨酸), 分子式为 $C_{11}H_{18}N_2O_3$ 。

化合物 **6**: 白色固体。 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_H : 11.00 (1H, s, NH-1), 10.81 (1H, s, NH-3), 7.39 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-6), 5.44 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-5)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_C : 164.7 (C-14, C=O), 151.9 (C-7, C=O), 142.6 (C-5), 110.6 (C-6)。化合物 **6** 核磁数据与文献[15]对照基本一致, 被鉴定为尿嘧啶, 分子式为 $C_4H_4N_2O_2$ 。

化合物 **7**: 白色固体。 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_H : 11.00 (1H, s, NH-1), 10.58 (1H, s, NH-3), 7.24 (1H, s, H-6), 1.76 (3H, s, H-7)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_C : 165.3 (C-4, C=O), 151.9 (C-2, C=O), 138.1 (C-6), 108.1 (C-5), 12.2 (C-7)。化合物 **7** 核磁数据与文献[16]对照基本一致, 被鉴定为胸腺嘧啶, 分子式为 $C_5H_6N_2O_2$ 。

化合物 **8**: 淡黄色油状。 1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ_H : 11.27 (1H, s, NH-1), 7.69 (1H, s, H-6), 6.18 (1H, m, OH-5'), 5.24 (1H, d, $J=4.3$ Hz, OH-3'), 5.04 (1H, t, $J=5.2$ Hz, H-1'), 4.23 (1H, m, H-3), 3.75 (1H, dd, $J=3.2$ Hz, H-4'), 3.55 (2H, m, H-5'), 2.06 (2H, m, H-2'), 1.77 (3H, s, H-7)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ_C : 164.2 (C-4, C=O), 150.9 (C-2, C=O), 136.5 (C-6), 109.8 (C-5), 87.7 (C-1'), 84.2 (C-3'), 70.9 (C-4'), 61.8 (C-5'), 39.4 (C-2'), 12.7 (C-7)。化合物 **8** 核磁数据与文献[17]对照基本一致, 被鉴定为胸腺嘧啶脱氧核苷, 分子式为 $C_{10}H_{14}N_2O_5$ 。

化合物 **9**: 无色透明油状。 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H : 4.00 (4H, m, H-4, 4'), 2.35 (4H, m, H-2, 2'), 1.68 (4H, m, H-1, 1'), 1.58 (1H, m, H-6, 6'), 1.23–1.34 (12H, m, H-7, 8, 9, 7', 8', 9'), 0.91 (6H, m, H-11, 11'), 0.89 (6H, m,

H-10, 10')。 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C : 173.5 (C-3, 3', 2 x C=O), 66.8 (C-4, 4'), 38.7 (C-6, 6'), 34.0 (C-2, 2'), 30.4 (C-7, 7'), 28.9 (C-8, 8'), 24.4 (C-1, 1'), 23.7 (C-11, 11'), 22.9 (C-9, 9'), 14.0 (C-10, 10')。化合物 **9** 核磁数据与文献[18]对照基本一致, 被鉴定为己二酸二(2-乙基己)酯, 分子式为 $C_{22}H_{42}O_4$ 。

化合物 **10**: 无色透明油状。 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H : 7.72 (2H, m, H-2, 5), 7.53 (2H, m, H-3, 4), 4.24 (4H, m, H-1', 1''), 1.72 (2H, m, H-2', 2''), 1.27–1.51 (16H, m, H-3', 4', 5', 7', 3'', 4'', 5'', 7''), 0.96 (6H, d, $J=7.5$ Hz, H-6', 6''), 0.94 (6H, d, $J=7.2$ Hz, H-8', 8'')。 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C : 167.9 (2 x C=O), 132.6 (C-1, 6), 131.0 (C-3, 4), 129.0 (C-2, 5), 68.3 (C-1', 1''), 38.9 (C-2', 2''), 30.5 (C-3', 3''), 29.1 (C-4', 4''), 23.9 (C-7', 7''), 23.1 (C-5', 5''), 14.2 (C-6', 6''), 11.1 (C-8', 8'')。化合物 **10** 核磁数据经与文献[19]对照基本一致, 被鉴定为邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯, 分子式为 $C_{24}H_{38}O_4$ 。

化合物 **1–10** 结构式如图 2 所示。

3 讨论

由于海洋中低温、高压、高盐、缺氧等特殊环境特点, 使海洋微生物具有产生异于陆生生物的活性天然产物的潜力^[20]。海洋细菌在海洋环境中分布广泛, 多种海洋细菌代谢物是具有优良活性的化合物。例如, 朱伟明等从 *Bacillus cereus* 代谢产物中分离得到 2 个喹唑酮类生物碱, 均可抑制白色念珠菌的生长^[21]。Mondol 等从 *Bacillus* sp. 09ID194 的代谢物中发现 4 个脂肪酸类新化合物, 对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌均有中强度抑制活性^[22]。Yonezawa 等从一株芽孢杆菌中分离到两个新的 DKP 类化合物, 对黑曲霉菌具有抑制作用^[23]。Alim 等从 *Pseudoalteromonas phenolica* 代谢物中分离得到含有联苯结构的化合物, 发现该化合物对抵御青霉素的 *Staphylococcus aureus* 具有良好的杀菌作用^[24]。Franks 等从 *Pseudoalteromonas tunicate* 代谢物中发

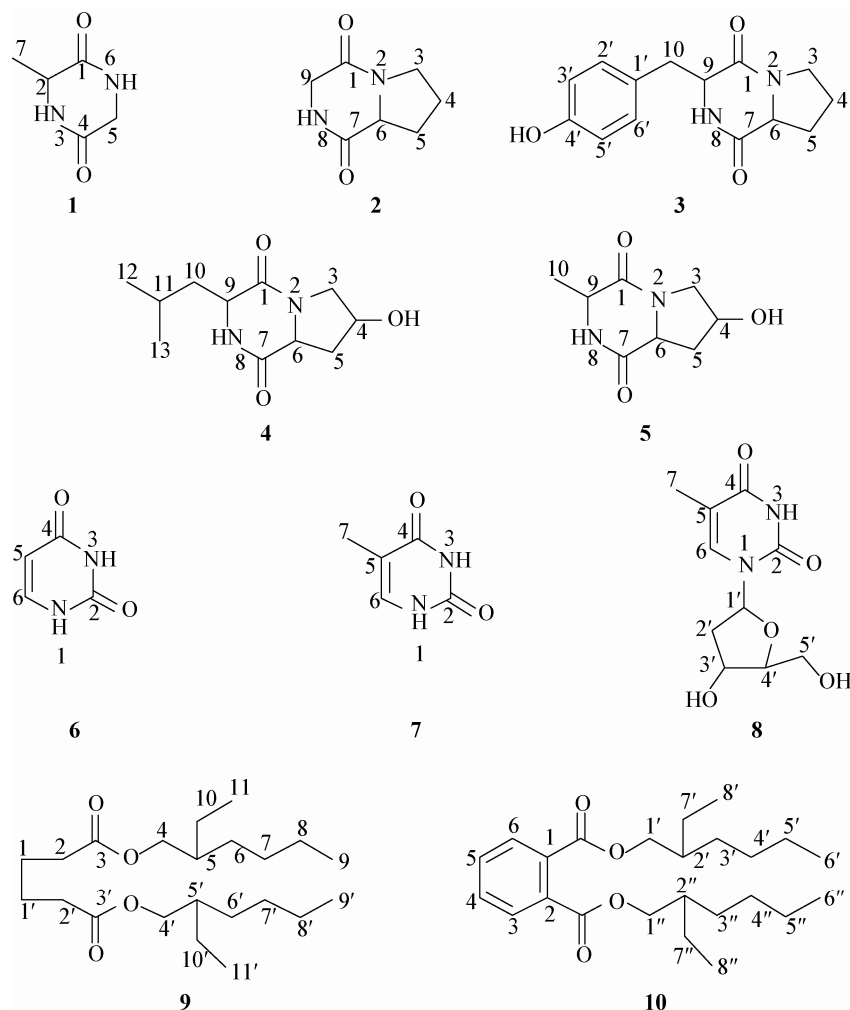


图2 化合物1-10结构式
Figure 2 Structures of compounds 1-10

现了生物碱类化合物 Tambjamines, 具有抗食素的作用, 可以抵御原生动物的捕食^[25]。由于海洋细菌代谢物种类繁多, 结构新颖, 常常具有较好的生物活性, 现已成为天然产物研究中一大热点。

生物污损是困扰人类海事活动的一大难题, 随着人们对生物污损现象认识的加深, 从生物膜入手研究污损的形成及防除成为主要研究方向之一。研究表明, 污损生物膜的群落结构组成及其代谢产物组成是影响后续污损生物附着的主要因素。Crews 等曾在生物膜海水假交替单胞菌代谢物中分离得到生物碱, 可以抑制其他微生物的生长, 对细菌自身在生物膜中的生长和繁殖具有保护作用^[26], 这

表明细菌可以利用自身的代谢物来调控生物膜的群落结构。Stanley 等利用培养条件的差异培育出群落组成不同的生物膜混合菌样品, 在后续藤壶孢子附着实验中, 上述细菌生物膜样品对纹藤壶及三角藤壶孢子的附着表现出了明显差异, 藤壶倾向于附着在某一细菌生物膜样品上, 而其他生物膜样品则表现出对藤壶孢子附着的抑制作用^[27]。Fitt 等研究了细菌发酵上清液对长牡蛎附着和变态发育行为的影响, 证明细菌产生的代谢物能够引发长牡蛎的附着, 并认为附着生物本身存在对这种化学信号物的感知和响应系统^[28]; Harder 等从生物膜细菌发酵液中萃取得到的粗提物对华美盘管虫幼虫的

附着进行诱导,证实生物膜细菌可以产生某种化学物质促进其附着生长和变态发育^[29]。因此对生物膜中细菌组成及其代谢物的研究是阐明生物污损作用机制的重要步骤。

假交替单胞菌是一个 1995 年新建立的海洋细菌属,有文献报道称,假交替单胞菌属有可能作为海洋活性代谢物的重要来源,能产生多种活性物质,如胞外酶、毒素、抗生素和胞外多糖等^[30]。

Pseudoalteromonas issachenkonii 于 2002 年被首次分离鉴定^[9],曾被作为藻类共生菌进行研究^[31],目前国内对其代谢物的研究还较少。本文首次从污损生物膜中分离得到该菌,并从其发酵液中获得了多种化合物,其中化合物 1-5 为 DKPs 类信号分子,这类化合物由于其结构的特殊性,具有多个氢键的给体与受体,已有文献报道这类化合物具有一定的抗肿瘤^[32]、抗菌^[33]、调节心率^[34]等生物活性。DKPs 类物质能与细菌群体感应系统中的受体蛋白结合,抢占 AHL 的结合位点阻断群体感应,因此这类化合物可能通过调节生物膜细菌群落的群体感应系统来影响生物污损的发生和发展^[35]。钱培元等从深海链霉菌代谢物中分离得到 DKPs 类化合物,实验证实这些化合物对纹藤壶幼虫的附着具有抑制作用,表明这类化合物在防污方面也具有较好的应用前景^[36]。本文结合 16S rRNA 和生理生化实验对污损细菌的种类进行鉴定,首次从海洋污损生物膜中将 *P. issachenkonii* 分离得到,并对目标菌株代谢物进行了分离纯化和结构鉴定,为探究生物污损的形成机制提供了物质基础,同时为寻找新型防污方法和防污剂提供了化学基础和理论依据。

参 考 文 献

- [1] 胥震, 欧阳清, 易定和. 海洋污损生物防除方法概述及发展趋势[J]. 腐蚀科学与防护技术, 2012, 24(3): 192-198.
- [2] Ma T, Fang L, Zhang GZ, et al. Effects of nutrients on biofouling formation and preponderant bacteria diversity in recirculating cooling water system[J]. China Petroleum Processing and Petrochemical Technology, 2010, 12(4): 57-62.
- [3] Yebra DM, Kiil S, Johansen KD. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings[J]. Progress in Organic Coatings, 2004, 50(2): 75-104.
- [4] Qian PY, Lau SCK, Dahms HU, et al. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture[J]. Marine Biotechnology, 2007(9): 339-410.
- [5] Sergey D, Qian PY. Facilitation and inhibition of larval attachment of the bryozoan *Bugula neritina* in association with mono-species and multi-species biofilms[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2006, 333: 263-274.
- [6] Petal P, Callow ME, Joint I, et al. Specificity in larval settlement modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(5): 338-349.
- [7] Joint I, Callow ME, Callow JA, et al. The attachment of *Enteromorpha* zoospores to a bacterial biofilm assemblage[J]. Biofouling, 2000, 16(2/4): 151-158.
- [8] Chirayu D, Rasesh YP, Tarun V, et al. Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes[J]. Research in Microbiology, 2009, 160(1): 1-9.
- [9] Elena PI, Tomoo S, Yuliya VA, et al. *Pseudoalteromonas issachenkonii* sp. nov., a bacterium that degrades the thallus of the brown alga *Fucus evanescens*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002(52): 229-234.
- [10] Li XJ, Tang HY, Duan JL, et al. Bioactive alkaloids produced by *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *Neoaurantiaca*, an endophytic bacterium from *Salvia miltiorrhiza*[J]. Natural Product Research, 2013, 27(4/5): 496-499.
- [11] Chen JH, Lan XP, Liu YH, et al. The effects of diketopiperazines from *Callyspongia* sp. on release of cytokines and chemokines in cultured J774A.1 macrophages[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(9): 3177-3180.
- [12] 崔美子, 巩婷, 朱平. 丰肉结海绵相关链霉菌 LS298 活性代谢产物研究[J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(6): 418-425.
- [13] 李德海, 顾谦群, 朱伟明, 等. 海洋放线菌 11014 中抗肿瘤活性成分的研究 I. 环二肽[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(8): 449-468.
- [14] Chen G, Zhu Y, Wang HZ, et al. The metabolites of a mangrove endophytic fungus, *Penicillium thomii*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2007, 9(2): 159-164.
- [15] 李俊, 李永爱, 许晶, 等. 中国南海网状软珊瑚分子成分研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2011, 30(3): 31-36.
- [16] 石瑛, 田黎, 王婧, 等. 海洋放线菌 *Micromonospora* sp.

- 与细菌 *Oceanospirillum* sp. 发酵液中分子成分的研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(1): 6-10.
- [17] 李文林, 毛士龙, 易杨华, 等. 丰头皮海绵分子成分研究[J]. 中国海洋药物, 2003(3): 1-4.
- [18] Tanja K, Manhai L, Eva C, et al. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor[J]. Toxicology, 2008, 246(2/3): 112-123.
- [19] Li JT, Yin BL, Liu Y, et al. Mono-aromatic constituents of *Dendrobium longicornu*[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2009, 45(2): 234-236.
- [20] 钱培元. 抗污损海洋天然产物的开发及其作用机理研究进展[J]. 生命科学, 2012, 24(9): 1026-1034.
- [21] Xu Z, Zhang Y, Fu H, et al. Antifungal quinazolinones from marine-derived *Bacillus cereus* and their preparation[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2011, 21(13): 4005-4007.
- [22] Mondol MA, Tareq FS, Kim JH, et al. Cyclic ether-containing macrolactins, antimicrobial 24-membered isomeric macrolactones from a marine *Bacillus* sp.[J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(12): 2582-2587.
- [23] Ken Y, Koji Y, Isao K. New Diketopiperazine derivatives isolated from sea urchin-derived *Bacillus* sp.[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2011, 59(1): 106-108.
- [24] Isnansetyo A, Kamei Y. MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30T, against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(2): 480-488.
- [25] Franks A, Haywood P, Holmstrom C, et al. Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*[J]. Molecules, 2005, 10(10): 1286-1291.
- [26] Franks A, Egan S, Holmstrom C, et al. Inhibition of fungal colonization by *Pseudoalteromonas tunicata* provides a competitive advantage during surface colonization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 6079-6087.
- [27] Lau SCK, Thiyagarajan V, Cheung SCK, et al. Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2005, 38: 41-51.
- [28] Fitt WK, Coon SL, Walch M, et al. Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatant[J]. Marine Biology, 1990, 106(3): 389-394.
- [29] Harder T, Lau SCK, Dahms HU, et al. Isolation of bacterial metabolites as natural inducers for larval settlement in the marine polychaete *Hydroides elegans*[J]. Journal of Chemical Ecology, 2002, 28(10): 2029-2043.
- [30] 席宇, 朱大恒, 刘红涛, 等. 假交替单胞菌及其胞外生物活性物质研究进展[J]. 微生物学通报, 2005, 32(3): 108-112.
- [31] John PB. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*[J]. Marine Drugs, 2007(5): 220-241.
- [32] 杨子娟, 向兰, 邢杰, 等. 环二肽的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(2): 73-81.
- [33] Fdhila F, Vazquez V, Sanchez JL, et al. dd-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*[J]. Journal of Natural Products, 2003, 66(10): 1299-1301.
- [34] Jamie H, Kilian G, Dyason K, et al. The effect of the isomers of cyclo-(Trp-Pro) on heart and ion-channel activity[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2002, 54(12): 1659-1665.
- [35] 郭秀春, 郑立, 周文辉, 等. 海洋微生物中二酮哌嗪类化合物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1596-1603.
- [36] Li XC, Sergey D, Xu Y, et al. Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*[J]. Biofouling, 2006, 22(3): 187-194.