



研究报告

青岛近海沉积物生物被膜中密度感应及密度感应淬灭细菌多样性

田晓荣¹ 于敏^{1,2} 李蓓¹ 杜瑞¹ 张静静¹ 张晓华^{*1,2}

1 中国海洋大学海洋生命学院 山东 青岛 266003

2 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 山东 青岛 266237

摘要:【背景】细菌密度感应(Quorum sensing, QS)是指细菌利用分泌的信号分子进行相互交流的现象,而密度感应淬灭(Quorum quenching, QQ)是指通过干扰信号分子的产生、释放、积累或应答从而抑制密度感应通路。【目的】探究青岛近海沉积物生物被膜中密度感应和密度感应淬灭细菌的多样性。【方法】采用海水培养基 2216E 从青岛近海沉积物生物被膜中分离获取可培养细菌,采用平板交互划线和高通量筛选的方法分别筛选具有密度感应和密度感应淬灭的菌株。【结果】共分离获得 83 株共 54 种具有密度感应和密度感应淬灭的细菌,分属于四大细菌门类:变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和放线菌门。其中,38 株(45.8%)可以产生酰基高丝氨酸内酯(Acyl-homoserine lactone, AHL)类信号分子,它们分属于变形菌门(37 株, 15 种)和拟杆菌门(1 株, 1 种),优势属为弧菌属和鲁杰氏菌属;能够降解 AHL 类信号分子的有 57 株(68.7%),在变形菌门(41 株, 23 种)、拟杆菌门(14 株, 10 种)、厚壁菌门(5 株, 5 种)以及放线菌门(1 株, 1 种)中均有分布。【结论】在青岛近海沉积物生物被膜可培养细菌中,具有密度感应和密度感应淬灭现象的菌株具有很高的丰度和多样性,为后续生态学意义的研究与海洋微生物的开发提供了参考。

关键词: 表层沉积物, 生物被膜, 密度感应, 密度感应淬灭

Diversity of quorum sensing and quorum quenching bacteria in sediment biofilm of Qingdao offshore

TIAN Xiao-Rong¹ YU Min^{1,2} LI Bei¹ DU Rui¹ ZHANG Jing-Jing¹
ZHANG Xiao-Hua^{*1,2}

1 College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China

2 Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, Shandong 266237, China

Abstract: [Background] Quorum sensing refers to the phenomenon that bacteria use secreted signal molecules to communicate with each other, while quorum quenching refers to inhibiting the quorum sensing pathway by interfering with the production, release, accumulation or response of signal molecules.

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFA0601303); National Natural Science Foundation of China (41476112)

***Corresponding author:** Tel: 86-532-82032767; E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

Received: 14-07-2018; **Accepted:** 11-10-2018; **Published online:** 14-12-2018

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFA0601303); 国家自然科学基金(41476112)

***通信作者:** Tel: 0532-82032767; E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018-07-14; **接受日期:** 2018-10-11; **网络首发日期:** 2018-12-14

[Objective] To explore the diversity of quorum sensing and quorum quenching bacteria in sediment biofilm of Qingdao offshore. **[Methods]** Culturable bacteria were isolated from the sediment biofilm of Qingdao offshore by marine agar 2216E. The bacteria with quorum sensing and quorum quenching activities were screened by plate interaction and high-throughput screening methods. **[Results]** A total of 83 bacterial strains and 54 bacterial species were isolated, belonging to the four major phyla of bacteria: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*. Among them, 38 strains (45.8%) produced acyl-homoserine lactones signal molecules (AHLs), belonging to *Proteobacteria* (37 strains, 15 species) and *Bacteroidetes* (1 strain, 1 species). The dominant bacteria belong to the genera *Vibrio* and *Ruegeria*. 57 strains (68.7%) can degrade AHLs, including *Proteobacteria* (41 strains, 23 species), *Bacteroidetes* (14 strains, 10 species), *Firmicutes* (5 strains, 5 species) and *Actinobacteria* (1 strain, 1 species), which showed high abundance and diversity. **[Conclusion]** The results of this study indicate that among the bacterial isolates from sediments biofilm in Qingdao offshore, quorum sensing and quorum quenching bacteria showed a high abundance and diversity. It laid a foundation for further research and development.

Keywords: Surface sediment, Biofilm, Quorum sensing, Quorum quenching

密度感应(Quorum sensing, QS)是广泛存在于细菌中的一种交流方式^[1], 细菌在生长过程中能够不断产生一些化学信号分子并分泌到周围环境中, 通过感应这些化学信号分子的浓度, 细菌可以监测菌群的数量, 调控某些相关基因的表达^[2]。在众多的 QS 系统中, 酰基高丝氨酸内酯(Acyl-homoserine lactone, AHL)类的 QS 调控机理是目前研究最为透彻的。典型的 AHL 类信号分子由一个高丝氨酸内酯环和酰基侧链组成^[3]。近年来, 随着环境中 QS 信号分子的发现, 密度感应现象已经开始从单个细菌延伸到了复杂多变的生态环境中。在海洋环境中, QS 信号分子最容易存在于细菌密度很高的微生境中, 例如动物的发光器官、微生物席、生物被膜以及颗粒有机碳(Particulate organic carbon, POC)等^[4]。目前从海雪^[5-6]、海绵^[7]、刺细胞动物^[8]以及海洋潮汐生物被膜^[9]等环境中都成功分离得到了具有 AHL 合成能力的菌株。

密度感应淬灭(Quorum quenching, QQ)是指通过干扰信号分子的产生、释放、积累或应答, 从而达到阻抑密度感应通路的作用。QQ 现象的检测与 QS 正好相反, 通过检测 AHL 类信号分子浓度的降低来检测是否具有 QQ 现象。相比 QS, 目前对海洋环境中 QQ 的作用还未开展广泛的研究。一些研究也表明 QQ 现象在海洋环境中是非常丰富的, 例如 Hmelo 等^[4]发现 AHL 信号分子在天然海水中降解的速度比

人工海水快很多, 其原因主要在于 QQ 的作用。

QS 和 QQ 现象与细菌生物被膜关系非常密切。尽管近年来在海洋环境中 QS 和 QQ 现象相继被发现, 然而对于海洋环境中天然生物被膜的 QS 和 QQ 现象却鲜有报道。我们对海洋沉积物表层生物被膜这个微生物密集热点区域的 QS 和 QQ 现象更是知之甚少。在海洋环境中浮游植物碎屑、浮游动物尸体残骸以及海雪等有机质通过沉降为沉积物表层输送了大量的有机质^[10-11]。在这个特殊的区域, 微生物群落系统具有非常高的密度和多样性, 并且与海水的物质交换尤为密切^[11]。探究该区域 QS 和 QQ 菌株的多样性可为了解 QS 现象在海洋环境中的生态学意义提供参考意见。

本研究中, 我们以青岛近海表层沉积物生物被膜为研究对象, 利用海水琼脂培养基 2216E 从生物被膜中分离获得可培养细菌, 采用平板交互划线法和高通量 QQ 菌株筛选法分别筛选具有 AHL 类信号分子合成和降解能力的菌株, 并利用细菌 16S rRNA 基因构建系统发育树, 从而揭示该生境中 QS 和 QQ 细菌的多样性和丰度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

EDTA 和抗生素购自上海索莱宝生物科技有限公司; X-Gal 购自上海源叶生物科技有限公司;

C12-HSL 和 C6-HSL 购自 Sigma 公司; 16S rRNA 基因扩增引物由铂尚生物技术有限公司合成; PBS 缓冲液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, NaH_2PO_4 0.3 g, NaCl 8.5 g, ddH_2O 定容至 1 L, 用 NaOH 调 pH 至 7.2–7.4, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 4 °C 保存。PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

1.1.2 培养基

LB 培养基的配制参照文献[12]; 海水营养培养基 2216E 参照《海洋微生物学》(第 2 版)^[13]配制; AT 培养基的配制参照文献[12]; 抗生素的终浓度为壮观霉素 50 mg/L、四环素 4.5 mg/L。

1.1.3 菌株和培养条件

从青岛近海沉积物表层生物被膜所分离到的所有菌株, 均采用海水营养培养基 2216E 进行培养和分离纯化; 用于高通量筛选具有 AHL 类信号分子降解能力的菌株采用 AT 培养基培养筛选。

报告菌株 *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218/pCF372)^[14–15]可检测酰基侧链长度为 C4–C14 的 AHL 信号分子, 其常规培养条件为 LB 培养基(壮观霉素: 50 mg/L; 四环素: 4.5 mg/L), 28 °C。该菌由美国德克萨斯州立大学 Robert J. C. McLean 教授惠赠, 其工作原理为外源质粒 pCF218 过量表达 AHL 受体蛋白 TraR, AHL-TraR 复合体与质粒 pCF372 的启动子结合, 诱导质粒下游 *lacZ* 基因过量表达 β -半乳糖苷酶。因此, A136 可通过检测 β -半乳糖苷酶的活性, 指示其他菌株合成分泌 AHLs 的能力。

1.2 样品采集

2017 年 7 月中旬在青岛近海海滩(120°33'E, 36°07'N), 选取未被人为破坏的潮间带泥质沉积物, 用高温灭菌棉签蘸取沉积物表层天然生物被膜(图 1), 立即带回实验室用无菌生理盐水冲洗下棉签上的样品, 将得到的细菌悬液按照 10^0 – 10^5 倍稀释涂布在 2216E 平板上, 28 °C 培养箱中培养 2 d。

1.3 细菌的分离纯化

选取菌落数目合适的 2216E 平板, 采取三区划线的方式进行细菌的分离纯化, 28 °C 培养。连续



图 1 青岛近海栈桥泥质表层沉积物生物被膜

Figure 1 Biofilm of surface sediment in Qingdao offshore

纯化 3 次, 当菌落形态单一时, 挑取单克隆在斜面上进行划线培养, 待菌落长出后, 使用含有 15% 甘油的生理盐水重悬后保存于 -80 °C 超低温冰箱中。

1.4 DNA 的提取和 16S rRNA 基因鉴定

采用煮沸法^[16]提取细菌基因组 DNA。采用标准的 PCR^[17]方法, 使用通用引物 B8F (5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3')和 B1510R (5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3')^[18]对细菌的 16S rRNA 基因进行扩增。将扩增成功的 16S rRNA 基因用限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Hae* III 进行双酶切, 选取酶切图谱不同的 PCR 产物送至青岛华大基因有限公司测序, 将测序结果提交至微生物标准数据库 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)^[19]以及 NCBI 中进行 BLAST 同源性序列比对, 以 16S rRNA 基因序列相似性 $\geq 98.65\%$ 作为同种菌株的划分标准确定细菌的分类地位^[20]。

1.5 具有密度感应(QS)活性菌株的筛选

以根癌农杆菌 A136 (pCF218/pCF372)菌株为报告菌, 采用平板交互划线法^[21]检测待测菌株是否具有 AHL 类信号分子的合成能力, 如图 2A 所示。

将活化好的待测菌与 A136 在固体培养基上画线共培养, 二者呈 T 字形, 相近但不接触。在 28 °C 培养 24 h, 随后覆盖一层含终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ X-Gal 的水琼脂(10 g 琼脂, 1 L 蒸馏水), 室温静置

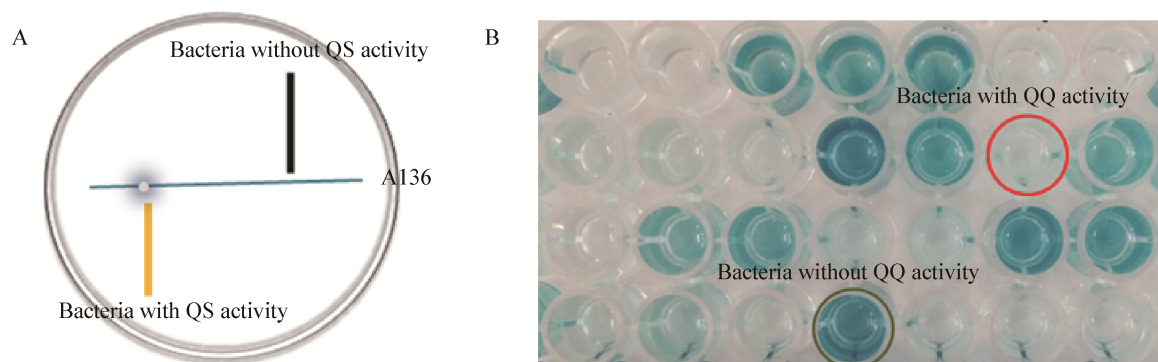


图 2 QS (A)和 QQ (B)活性菌株的筛选方法

Figure 2 The screening methods of bacteria with QS (A) and QQ (B) activities

12 h。阳性细菌所产生的 AHL 类信号分子可以通过琼脂扩散被 AHL 报告菌 A136 所感应,通过观察两菌交互点附近 A136 的颜色变化推知 AHL 类信号分子的存在。报告菌显蓝色即为 AHL 合成阳性。阳性对照菌为已知具有 AHL 合成能力的哈维氏弧菌 BB120^[22]。

1.6 具有密度感应淬灭(QQ)活性菌株的筛选

采用 Tang 等^[12]建立的密度感应淬灭细菌高通量筛选方法进行 QQ 活性菌株的筛选。如图 2B 所示,培养基为 AT 培养基,温度为 28 °C。

将分离得到的 83 株待测菌株接种于海水 2216E 液体培养基中,28 °C、170 r/min 培养 24 h。178 μL 菌液与 2 μL C12-HSL 或 C6-HSL (1 mmol/L)、20 μL PIPES (1 mol/L, pH 6.7)混匀,28 °C 孵育 24 h 后 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,取无菌上清 10 μL,加入到含有 190 μL AT-A136 检测液的 96 孔板中充分混匀。在 28 °C 显色 24 h 后用酶标仪检测 492 nm 和 630 nm 的吸光度,按照公式计算 β-半乳糖苷酶活性。其中阳性对照菌为具有较强 AHL 降解能力的菌株 Th120^[13],阴性对照为 PBS 缓冲液。

$$\text{标准化的 } \beta\text{-半乳糖苷酶活性} = \frac{0.653 \times OD_{492} - OD_{630}}{0.267 \times OD_{630} - OD_{492}}$$

1.7 构建系统发育树

分别将所有具有 AHL 类信号分子降解能力和合成能力的菌株与其近缘菌株的 16S rRNA 基因序列利用软件 MEGA 7.0 以邻接法(Neighbor-Joining)

构建系统发育进化树,1 000 次自展(Bootstrap)来评估进化树的准确性。

2 结果与分析

2.1 细菌分离及菌种鉴定

从青岛近海沉积物表层生物被膜中共分离得到 83 株 54 种可培养细菌,结果如图 3 所示。这些细菌可以分为 4 个门类,包括变形菌门(63 株,36 种),拟杆菌门(14 株,10 种),厚壁菌门(5 株,5 种),放线菌门(1 株,1 种)。63 株变形菌门细菌主要分属于 γ-变形菌纲(29 株,21 种)和 α-变形菌纲(34 株,15 种)。29 株 γ-变形菌纲的细菌包括弧菌目(12 株,7 种);假单胞菌目(8 株,7 种);交替单胞菌目(8 株,7 种)。34 株 α-变形菌纲细菌全部属于红杆菌目。14 株拟杆菌门细菌分属于黄杆菌纲和鞘脂杆菌纲,黄杆菌纲细菌共 13 株,分属于 7 个种;鞘脂杆菌纲 1 株,该菌具有较强的纤维素降解能力。厚壁菌门的 5 株细菌都属于芽孢杆菌。值得一提的是,弧菌属和鲁杰氏菌属细菌数量最多,分别有 12 株和 29 株。此外共分离获得 2 株潜在细菌新种,菌株 TXR405 的 16S rRNA 基因序列与最相似菌株 *Seonamhaeicola algicola* 的相似性为 97.1%;TXR437 的 16S rRNA 基因序列与最相似菌株 *Maribacter polysiphoniae* 的相似性为 95.8%。它们是否为细菌新种,仍需进一步生理生化实验进行分类鉴定。

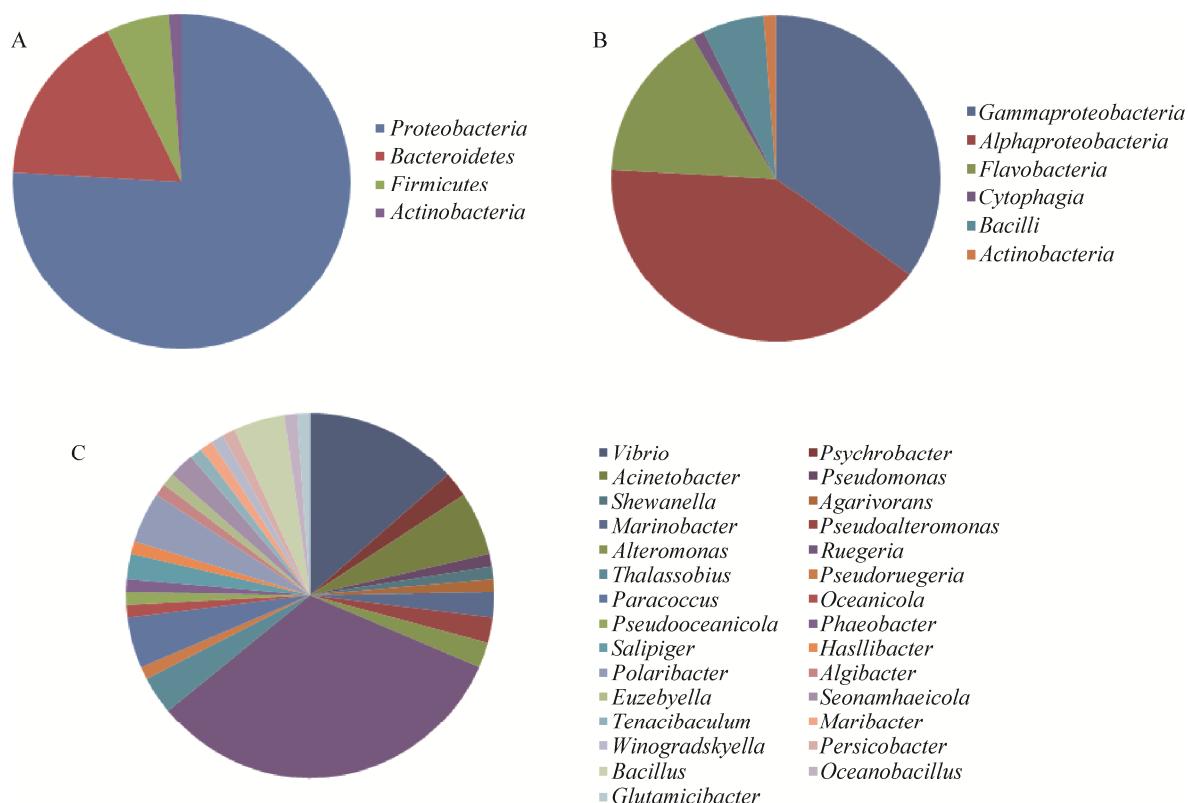


图3 表层沉积物生物被膜细菌在门(A)、纲(B)、属(C)水平上的微生物群落组成

Figure 3 Microbial community composition of surface sediment biofilm at phylum (A), class (B) and genus (C) level

2.2 具有密度感应(QS)活性菌株的筛选结果

利用 AHL 报告菌 A136 采用平板交互划线法对具有 AHL 合成能力的细菌进行筛选, 得到具有 AHL 类信号分子合成能力的菌株 38 株, 占有菌株的 45.8%。从门/纲的水平分析, 它们主要分属于 α -变形菌纲和 γ -变形菌纲, 只有一株 TXR5161 属于拟杆菌门的黄杆菌纲。从属水平来看, 它们分别属于弧菌属、鲁杰氏菌属、嗜琼胶菌属、不动杆菌属、浮球菌属、海洋生菌属以及 *Thalassobius*、*Haslibacter* 和 *Winogradskyella*, 并且以弧菌属和鲁杰氏菌属的细菌居多, 分别有 9 株和 19 株。其中嗜琼胶菌属、*Haslibacter*、*Winogradskyella* 菌株的 AHL 信号分子合成能力为首次发现。选取本研究筛选到的所有能够合成 AHL 类信号分子的菌株与参考菌株利用软件 MEGA 7.0 构建系统发育进化树, 如图 4 所示。

2.3 具有密度感应淬灭(QQ)活性菌株的筛选结果

根据 Tang 等^[12]建立的高通量筛选 QQ 细菌的方法及公式计算 β -半乳糖苷酶活性。与阴性对照比较, β -半乳糖苷酶活性降低即为具有 AHL 降解能力的菌株。本研究以两种不同长度酰基侧链的信号分子为底物(C6-HSL, C12-HSL), 发现在所筛选菌株中, 能够降解长链信号分子(C12-HSL)并使 β -半乳糖苷酶活性降低程度达到 40% 及以上的菌株有 57 株, 占有菌株的 68.7%。它们在变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门以及放线菌门中均有分布。同时具有降解短链(C6-HSL)和长链信号分子(C12-HSL)能力的细菌有 5 株, 它们是 *Alteromonas* TXR425, 鲁杰氏菌属 TXR442 和 TXR503, 黄杆菌属 TXR5231, 以及 *Maribacter* 的 TXR437, 并且 TXR437 为一株潜在海洋新菌。既能合成 AHLs 又能降解 AHLs 的菌

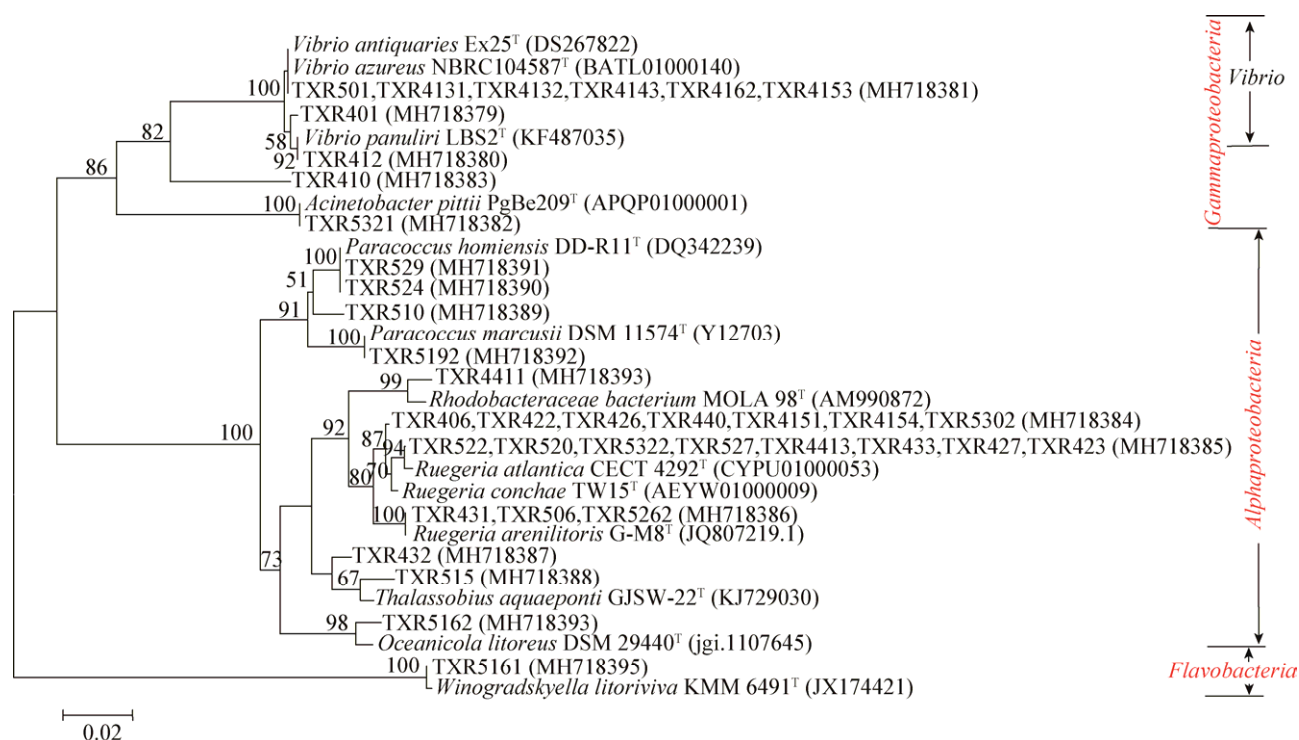


图4 具有QS活性的菌株与参考菌株的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of bacteria with QS activity and their reference taxa

注: 括号中的序号表示菌株的 GenBank 登录号; 标尺: 核苷酸的替代率为 0.02; 各分支点显示的数字代表通过 1 000 次重复运算得到的置信值。

Note: The serial number in brackets denotes the GenBank accession number of the strain; Scale bar: The nucleotide substitution rate was 0.02; Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch points.

株有 24 株, 它们主要分布在变形菌门中, 分属于鲁杰氏菌属、浮球菌属、弧菌属、不动杆菌属以及拟杆菌门中的 *Winogradskyella*。此外, 发现 *Glutamicibacter* 和微球菌科的菌株具有 AHL 类信号分子的降解能力。选取本研究中筛选到的所有具有 AHL 降解能力的菌株与参考菌株, 利用软件 MEGA 7.0 构建系统发育进化树, 如图 5 所示。

3 讨论与结论

本研究共从青岛近海表层沉积物生物被膜中分离到 83 株海洋细菌, 主要分为 4 个门类: 变形菌门、黄杆菌门、厚壁菌门和放线菌门, 而且大部分为典型的海洋细菌, 这一点符合海洋环境中细菌多样性的分布特征^[5,7]。变形菌门细菌(63 株)占据绝对优势, 比例高达 75.9%, 分属于 γ -变形菌纲(29 株)和 α -变形菌纲(34 株)。在 γ -变形菌纲细菌中, 弧菌

属占有很高的比例, 共有 12 株。在 α -变形菌纲细菌中, 鲁杰氏菌占据绝对优势, 共有 20 株。该结果与香港渔场潮汐生物膜中分离菌株的结果相似^[9], 证明了弧菌和鲁杰氏菌属细菌为该环境中的优势菌属。丰度仅次于变形菌门的是拟杆菌门细菌, 它们大部分属于黄杆菌科, 其中有一株属于鞘脂杆菌纲, 在分离过程中发现其具有极强的纤维素降解能力。除了这些优势种属, 我们还分离得到了一些厚壁菌门和放线菌门细菌以及 2 株潜在新菌。海洋天然生物被膜细菌的分离纯化结果展示了一种高度多样且非常有特点的微型生态系统。

海洋天然生物被膜内如此高的细菌多样性, 为筛选具有 AHL 合成及降解能力的细菌提供了很好的材料。通过使用 A136 平板交互划线的方法, 我们共筛选到 38 株具有 AHL 类信号分子合成能力的菌株, 占有所有菌株的 45.8%, 这个比例比前人的研



图 5 具有 QQ 活性的菌株与参考菌株的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of bacteria with QQ activity and their reference taxa

注: ●表示既具有 QQ 活性, 又能够合成 AHL 类信号分子的菌株; 括号中的序号表示菌株的 GenBank 登录号; 标尺: 核苷酸的替代率为 0.05; 各分枝点显示出来的数字代表通过 1 000 次重复运算得到的置信值。

Note: AHLs were identified from the isolates marked by ●; The number in brackets denotes the GenBank accession number of the strain; Scale bar: The nucleotide substitution rate was 0.05; Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch points.

究结果^[5-9]更高,究其原因,我们认为沉积物表层生物被膜这个特殊的生境中较高的微生物丰度和多样性使得细菌之间的相互交流更为密切, QS 在该环境中发挥的作用更大。该 38 株菌主要分布在两个门:变形菌门(37 株)和拟杆菌门(1 株)。其中 γ -变形菌纲 11 株, 5 种; α -变形菌纲 26 株, 10 种。变形菌门的嗜琼胶菌属和 *Haslibacter* 的 AHL 类信号分子合成能力为首次报道。在 γ -变形菌纲中占很高比例的弧菌属(9 株)以及 α -变形菌纲中的鲁杰氏菌属(19 株)也组成了 QS 菌株的主要来源, 这两个属的菌株在 QS 菌株中所占的比例高达 74%。这两个属的细菌,也是目前在海洋环境中报道较多的 AHL 类信号分子产生菌^[23]。变形菌门细菌是 QS 信号分子的主要来源^[24], 弧菌是研究最早的 QS 信号分子产生菌。而鲁杰氏菌属于 MRC 细菌(*Marine Roseobacter clade*)的类群,是近年在 QS 和 QQ 领域研究较多的细菌^[25]。截至目前,已报道的拟杆菌门 QS 菌株非常少。本文报道了一株拟杆菌门中 *Winogradskyella* TXR5161 的 AHL 类信号分子合成能力。实验室培养条件下 QS 与生物被膜关系的研究非常多,而在这种天然生物被膜环境中 QS 的作用机制尚不明确^[26]。有研究表明, QS 是微生物表面定殖的重要调节机制,还可以参与调节生物被膜中微生物的相互作用^[27]。在环境中很多重要的机制都与 QS 有关,例如氨氧化、硝化氧化、反硝化、硫氧化作用等^[28-31]。目前有报道称超过 80%的 MRC 细菌都拥有 QS 调节系统^[32-33],并且有研究者猜测被海水淹没的表层沉积物可能会作为一种有机营养物质来源,从而吸引 MRC 细菌并支持其生长到产生 QS 的阶段^[34],这也解释了为何本研究中从表层沉积物生物被膜中分离到的 MRC 细菌——鲁杰氏菌如此之多。在天然生物被膜中, QS 菌株占比很高,远远超过了海水、海雪、海绵等地,暗示了细菌可能利用 QS 作为一种生存竞争武器,使自己在如此高密度的环境中占据一定的优势。

通过高通量筛选方法对具有 AHL 降解能力菌株的筛选结果来看, QQ 在天然生物被膜中所占比

例非常高。此前 Saurav 等^[35-36]从红海和地中海地区收集的海绵提取物进行了细菌分离及 QQ 活性菌株的筛选,结果显示 20%的菌株表现出了 QQ 活性。在大堡礁的一项研究表明,在 284 个海洋生物的提取物中,有 23%的菌株表现出降解 QS 信号分子的能力。Romero 等^[37]曾从 166 株海洋微生物中分离得到 24 株具有短链 AHL 降解能力的细菌。而在本研究中,我们发现具有长链 AHL 信号分子降解能力的菌株更为普遍,其中 β 半乳糖苷酶活性降低程度达到 40% 及以上的有 57 株,占有菌株的 68.7%;具有短链信号分子 C6-HSL 降解能力的菌株有 5 株。这个结果与 Muras 等^[38]对海水中 604 株自由生活细菌的筛选结果类似。Huang 等^[9]通过对生物被膜形成过程中信号分子的检测,发现在成熟生物被膜中,以长链信号分子居多。此外也有研究表明,短链 AHL 信号分子的内酯环更容易被具有较高 pH 的海水打开。因此推断,在生物被膜中具有降解长链 AHL 信号分子菌株的大量存在,与被膜中长链信号分子的积累有很大的关系,细菌为了在生物被膜的群体中维持自身的生存,抵抗优势种群如弧菌、鲁杰氏菌的 QS 武器,不得不进化出降解信号分子的机制。另外生物被膜等高密度环境下信号分子的积累很有可能使得 AHL 成为细菌的一种碳源^[39-40]。此外,从分离结果来看,有 18 株鲁杰氏菌分别属于 *Ruegeria atlantica*、*Ruegeria conchae* 和 *Ruegeria arenilitoris*, 它们非常特殊,不仅在所分离到的可培养细菌中占据了较高的比例,而且同时具有合成和降解 AHL 类信号分子的能力,该属细菌在海洋环境中提供的生态意义,以及是否可以进一步开发利用有待进一步研究。

从海洋沉积物表层生物被膜分离得到的 QS 与 QQ 活性菌株具有较高的丰度和多样性,丰富了除海雪、海绵、刺细胞动物、POC 等微生物密集区的密度感应现象研究,为密度感应现象在海洋环境中的生态学意义提供了一些基础数据。本研究分离得到的优势属——弧菌属和鲁杰氏菌属的生态学意义也有待进一步研究。此外, QS 与细菌毒力因子之

间的关系研究已经十分明确,通过 QQ 干扰 QS 系统,能够在不杀死细菌的情况下特异性阻断致病细菌毒力基因的表达,从而有效控制病原菌致病性,为新型抗生素的开发提供了新的思路。从本研究在青岛近岸沉积物表层生物被膜分离得到的高丰度的 QQ 活性菌株有待作为新的海洋药物进行开发利用。

REFERENCES

- [1] Neelson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance[J]. Microbiological Reviews, 1979, 43(4): 496-518
- [2] Winzer K, Williams P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2001, 291(2): 131-143
- [3] Ng WL, Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network architectures[J]. Annual Review of Genetics, 2009, 43: 197-222
- [4] Hmelo L, van Mooy BAS. Kinetic constraints on acylated homoserine lactone-based quorum sensing in marine environments[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2009, 54(2): 127-133
- [5] Gram L, Grossart HP, Schlingloff A, et al. Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 4111-4116
- [6] Jatt AN, Tang K, Liu JW, et al. Quorum sensing in marine snow and its possible influence on production of extracellular hydrolytic enzymes in marine snow bacterium *Pantoea ananatis* B9[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2015, 91(2): 1-13
- [7] Mohamed NM, Cicirelli EM, Kan JJ, et al. Diversity and quorum-sensing signal production of *Proteobacteria* associated with marine sponges[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(1): 75-86
- [8] Ransome E, Munn CB, Halliday N, et al. Diverse profiles of *N*-acyl-homoserine lactone molecules found in cnidarians[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 87(2): 315-329
- [9] Huang YL, Ki JS, Case RJ, et al. Diversity and acyl-homoserine lactone production among subtidal biofilm-forming bacteria[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2008, 52(2): 185-193
- [10] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(2): 95-108
- [11] Dang HY, Lovell CR. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(2): 467-475
- [12] Tang KH, Su Y, Brackman G, et al. MomL, a novel marine-derived *N*-acyl homoserine lactonase from *Muricauda olearia*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(2): 774-782
- [13] Zhang XH. Marine Microbiology[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2016: 368-369 (in Chinese)
- [14] McLean RJ, Whiteley M, Stickler DJ, et al. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 154(2): 259-263
- [15] Zhu J, Beaber JW, Moré MI, et al. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(20): 5398-5405
- [16] Margassery LM, Kennedy J, O'Gara F, et al. Diversity and antibacterial activity of bacteria isolated from the coastal marine sponges *Amphilectus fucorum* and *Eurypon major*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(1): 2-8
- [17] Romero M, Martin-Cuadrado AB, Roca-Rivada A, et al. Quorum quenching in cultivable bacteria from dense marine coastal microbial communities[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 75(2): 205-217
- [18] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703
- [19] Kim OS, Cho YJ, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62: 716-721
- [20] Kim M, Oh HS, Park SC, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(2): 346-351
- [21] Chu WH, Vatter DA, Maitin V, et al. Bioassays of quorum sensing compounds using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum*[A]/Rumbaugh KP. Quorum Sensing[M]. New York: Humana Press, 2011, 692: 3-19
- [22] Mok KC, Wingreen NS, Bassler BL. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression[J]. EMBO Journal, 2003, 22(4): 870-881
- [23] Milton DL. Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2006, 296(2/3): 61-71
- [24] Boyer M, Wisniewski-Dyé F. Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(1): 1-19
- [25] Zan JD, Liu Y, Fuqua C, et al. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in the *Roseobacter* clade[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(1): 654-669
- [26] Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms[J]. Trends in Microbiology, 2005, 13(1): 27-33
- [27] Shrout JD, Nerenberg R. Monitoring bacterial twitter: does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms?[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(4): 1995-2005
- [28] González JE, Marketon MM. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 574-592
- [29] Toyofuku M, Nomura N, Kuno E, et al. Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas*

- aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(24): 7947-7956
- [30] De Clippeleir H, Defoirdt T, Vanhaecke L, et al. Long-chain acylhomoserine lactones increase the anoxic ammonium oxidation rate in an OLAND biofilm[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(4): 1511-1519
- [31] Mellbye BL, Bottomley PJ, Sayavedra-Soto LA. Nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* produces *N*-acyl-homoserine lactone autoinducers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(17): 5917-5926
- [32] Slightom RN, Buchan A. Surface colonization by marine Roseobacters: integrating genotype and phenotype[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6027-6037
- [33] Wagner-Döbler I, Biebl H. Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage[J]. Annual Review of Microbiology, 2005, 60: 255-280
- [34] Buchan A, Mitchell A, Cude WN, et al. Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing in members of the marine bacterial *Roseobacter* clade: complex cell-to-cell communication controls multiple physiologies[A]//de Bruijn FJ. Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria, I&II[M]. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2016: 225-233
- [35] Saurav K, Costantino V, Venturi V, et al. Quorum sensing inhibitors from the sea discovered using bacterial *N*-acyl-homoserine lactone-based biosensors[J]. Marine Drugs, 2017, 15(3): 53
- [36] Chen CL, Maki JS, Rittschof D, et al. Early marine bacterial biofilm on a copper-based antifouling paint[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 83: 71-76
- [37] Romero M, Martin-Cuadrado A, Otero A. Determination of whether quorum quenching is a common activity in marine bacteria by analysis of cultivable bacteria and metagenomic sequences[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(17): 6345-6348
- [38] Muras A, López-Pérez M, Mayer C, et al. High prevalence of quorum-sensing and quorum-quenching activity among cultivable bacteria and metagenomic sequences in the Mediterranean sea[J]. Genes (Basel), 2018, 9(2): 100
- [39] Torres M, Rubio-Portillo E, Antón J, et al. Selection of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and of its potential for biocontrol in aquaculture[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 646
- [40] Torres M, Romero M, Prado S, et al. *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve larval cultures[J]. Microbiological Research, 2013, 168(9): 547-554

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊,中国科技核心期刊,CSCD核心期刊,曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计,本刊2012年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2019年每册定价80元,全年960元,我们免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413