

海洋细菌素的研究进展

Research and prospect of bacteriocins from marine bacteria

王树杉, 于敏, 张晓华

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q93.335

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)01-0125-07

在自然环境中,有些微生物通过抑制或杀死另一种微生物的拮抗作用来获得竞争优势。有的细菌产生细菌素,可杀死与其亲缘关系相近种。细菌素通常是指由细菌分泌的、对同种或其他亲缘关系很近的细菌有抑制作用的一种蛋白类抑菌物质。细菌素的蛋白质性质以及多种明显区别于抗生素的优点,使其具有广阔的应用空间。据报道,海洋细菌中的多个属种都具有抑制其他海洋细菌或各种动植物病原菌生长的活性。海洋细菌作为发现细菌素的潜在重要来源,受到了越来越多的关注,各国研究者已经成功地从海洋细菌中分离得到细菌素及类细菌素。本文将对具有抑菌活性的海洋细菌研究概况,海洋细菌产生的细菌素的研究进展,以及其应用前景加以论述。

1 具有抑菌作用的海洋细菌

1.1 海洋细菌抑菌活性研究概况

早在1927年,德国科学家Kofinek^[1]就发现海水可以抑制大多数非海洋细菌的生长。20世纪30年代,Zobell^[2]、Carpenter等^[3]、Beard和Meyers^[4]也相继报道了海水对于多种革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌的抑制作用。科学家们推测,海水的这种抑菌特性主要是来自于海洋微生物产生的抑菌物质。此后,越来越多的具有抑菌活性的海洋细菌被分离出来。近年来国内外的研究表明,来源于不同海域、海洋动植物体表或体内以及海洋沉积物的海洋细菌,多个属种都具有抑菌活性,占有相当比例。日本近年来对海洋微生物进行了广泛研究,发现约有27%的海洋微生物具有抑菌活性^[5]。在苏格兰沿岸海水中的海藻及无脊椎动物样品中分离到400株生物体表附着细菌,其中

35%的菌株有拮抗活性^[6]。Anand等^[7]于2006年从印度洋东南海区海绵中分离出75株海洋细菌,其中21%的菌株有抑菌活性,可以抑制多种细菌或真菌性病原菌。在南极海域采集到的580株海洋细菌中,22株对大肠杆菌等陆生菌具有抑菌作用,其中同一属种海洋细菌的表型和抑菌作用方式也不同,具有很强的个体差异^[8]。2008年,Wiese等^[9]对从波罗地海褐藻*Laminaria saccharina*中分离出的具有抑菌活性的细菌多样性进行了研究,在采集到的210株海洋细菌中有103株有抑菌活性,分属于变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)的21个属。

1.2 近年来发现的有抑菌活性的海洋细菌种类

目前已报道,海洋细菌中多个属种都具有抑菌活性,主要有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、海洋单胞菌属(*Marinomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)、肉杆菌属(*Carnobacterium*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)等。

1.2.1 假单胞菌属

假单胞菌是专性需氧的革兰氏染色阴性无芽胞

收稿日期: 2011-01-09; 修回日期: 2011-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(40876067); 国家863计划项目(2007AA09Z434)

作者简介: 王树杉(1984-),女,硕士,研究方向: 海洋微生物学, E-mail: shanshan840309@yahoo.com; 张晓华,通信作者,女,博士,教授,从事海洋微生物学研究,电话: 0532-82032767, Email: xhzhang@ouc.edu.cn

杆菌,具端生鞭毛,能运动。有些菌株产生荧光色素或(和)红、蓝、黄、绿等水溶性色素,不发酵糖类。据报道,荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) F19/13 能通过竞争培养基中的游离铁离子,竞争排斥杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*),减少养殖鲑鱼病害发生的机率^[10]。将荧光假单胞菌应用到虹鳟鱼养殖中,对虹鳟鱼的病原菌——鳗弧菌产生较强的抑菌作用,可以有效降低虹鳟鱼的死亡率^[11]。

1.2.2 气单胞菌属

气单胞菌属于弧菌科,是常见的腐物寄生菌,广泛分布于土壤、海水、动物肠道中。从中国大连海域海泥样品中分离得到一株具有很强抑菌活性的海洋细菌,可以抑制大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、普通变形菌(*Proteus vulgaris*)和哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的生长,经鉴定属于气单胞菌属^[12]。嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)是这一属的代表种,Patrizia 等^[13]发现分离自水体的嗜水气单胞菌能够产生类细菌素的抑菌物质,拮抗葡萄球菌(*Staphylococcus*)、李斯特菌(*Listeria*)等革兰氏阳性菌。

1.2.3 交替单胞菌属

交替单胞菌为革兰氏阴性菌,曲杆状,具单侧极生鞭毛,通常分布于海洋或者沿岸地区。扇贝性腺中分离到的河豚毒素交替单胞菌(*Alteromonas haloplanktis*),能够产生胞外抑菌物质,被成功用于扇贝幼体养殖中,可拮抗养殖水体中的病原弧菌,保障扇贝幼体的正常生长^[14]。

1.2.4 假交替单胞菌属

假交替单胞菌属是 Gauthier 等^[15]于 1995 年报道的新属,属变形菌门, γ -变形菌纲,交替单胞菌目,假交替单胞菌科,革兰氏染色阴性。目前该属有 30 余种细菌,全部来自于海洋。该属细菌的代谢类型众多,种间形态和生理生化特征差异较大,有些种类可产生色素,有些种类则可以分泌抗细菌、抗真菌、杀藻类、溶琼脂、细胞毒和抗病毒等生物活性物质。Kjelleberg 实验室^[16-18]近十几年来,对被囊假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas tunicata*)和石莼假交替单胞菌(*P. ulvae*)的抑菌活性及抑菌物质的性质、结构、作用方式、产生条件等各方面进行了深入研究。

1.2.5 海洋单胞菌属

海洋单胞菌属最早是在 1983 年由 Van Landschoot 和 DeLey 为了给两株特别的交替单胞菌属的

菌种归类提出的^[19]。目前已报道该属的地中海海洋单胞菌(*Marinomonas mediterranea*)可以分泌产生一种广谱抑菌蛋白 Marinocine,对多株革兰氏阳性及阴性菌株均有抑菌作用^[20]。

1.2.6 弧菌属

弧菌属为革兰氏阴性菌,属兼性厌氧菌,多生活于水中。弧菌属中的许多种类都属于养殖动物病原菌,例如鳗弧菌(*V. anguillarum*)、哈维氏弧菌、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)及牙鲆肠弧菌(*V. ichthyenteri*)等。但同时,弧菌属的某些种类也可以其分泌的抑菌活性物质来拮抗其他病原菌的生长。Sugita 等^[21]从日本海域的鱼肠道中分离出一株弧菌 NM10,该弧菌对于鱼类病原菌巴斯德氏菌(*Pasteurella*)具有较强的抑制作用。从中国海南周边海域分离筛选出的一株具有抑菌活性的海洋细菌 B2817,经鉴定属于弧菌属的一个新种^[22]。

1.2.7 芽孢杆菌属

芽孢杆菌属为革兰氏阳性菌,已报道的该属细菌中有多种属于海洋细菌。田黎等^[23]从东海大陆架、渤海、珠江口、黄岛等地采集菌株,筛选出若干株具有抑菌活性的芽孢杆菌,其抑菌谱广,性状稳定。还有报道海泥中也分离出了有抑菌效果的芽孢杆菌,该菌的代谢产物对多种细菌有抑菌作用^[24]。

1.2.8 发光杆菌属

属于革兰氏阴性菌,具极生鞭毛,分离自海洋环境和海生动物的消化道中。从健康养殖南美白对虾肠道内分离出的发光杆菌对哈维氏弧菌、费氏弧菌(*V. fischeri*)、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和荧光假单胞菌都有拮抗作用^[25]。

1.2.9 玫瑰杆菌属

玫瑰杆菌属于革兰氏阴性菌。Planas 等^[26]发现一株玫瑰杆菌属细菌对鳗弧菌具有良好的抑制作用,将其应用到注射鳗弧菌的大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼中,发现该菌能较强地抑制鳗弧菌的生长,保护幼鱼。

1.2.10 肉杆菌属

肉杆菌属为革兰氏阳性菌,出现于肉产品和鱼中。从新鲜鱼样品中或者冷冻鱼肉中分离得到的栖鱼肉杆菌(*Carnobacterium piscicola*)具有抑菌作用,能够抑制冷藏熏三文鱼肉中的单核球增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*)的生长^[27]。

1.2.11 欧文氏菌属

欧文氏菌常寄生于植物并引起腐败病,是酷似

大肠杆菌的一种细菌。属名是为了尊重美国植物病理学家 Erwin F. Smith 而得名,但不少学者认为应纳入大肠杆菌类,属于杆菌属。据报道,分离自海洋环境的欧文氏菌(*Erwinia* sp.)对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)具有强抑制作用^[28]。

2 海洋细菌素的研究进展

2.1 细菌素的概述

细菌素是一类由核糖体合成的、在细菌对数生长期产生并分泌到细胞外的具有蛋白质特性、对其他细菌(尤其是亲缘关系较近的细菌)有拮抗作用的杀菌物质^[29-30]。最早由 Gratia^[31]于 1946 年对大肠杆菌的研究中提出,后来发现很多细菌都可以产生类似物质, Jacob^[32]于 1953 年将这类物质称为细菌素。细菌素既有结构简单的低分子质量的蛋白质或阳离子多肽,又有高分子质量的具有复杂结构的蛋白质。

2.1.1 细菌素的分类

由革兰氏阳性菌乳酸菌分泌的细菌素可分为 3 型^[33-34],其中 型细菌素,又称羊毛硫抗生素(Lantibiotics),其分子质量<5 kDa,显著特点是翻译后经过修饰,分子活性部位含有大量的稀有氨基酸,如羊毛硫氨酸(Lanthionine)、-甲基羊毛硫氨酸(-methyllanthionine)等。这类多肽还可以分成两小类:一类结构柔软,带正电和疏水基团,可在靶细胞膜上形成通道而起作用;另一类是球状多肽,不带电或带负电荷。型细菌素为小分子的热稳定肽(SHSP),分子质量<10 kDa,翻译后不被修饰(二硫键除外),属阳离子多肽,分为三个亚类: N-末端氨基酸序列为: Tyr-Gly-Asn-Gly-Val 并由两个半胱氨酸所构成的 S-S 桥,具有抗李斯特菌活性;孔道复合物由两个具不同氨基酸序列的肽类寡聚体形成;能被硫醇激活、活性基团有还原性半胱氨酸残基。型细菌素为大分子热不稳定肽(LHLP),分子质量>10 kDa,具热不稳定性。

由革兰氏阴性细菌分泌的细菌素可分为大肠杆菌素(colicin)和小菌素(microcin)^[33-34]。大肠杆菌素的分子质量为 25~28 kDa。小菌素通常是由细菌细胞分泌产生的,分子质量<10 kDa,热稳定性好,对链霉蛋白酶和枯草溶菌素有抗性;所有的小菌素都需特定的细胞表面受体才能进入细胞,其中小菌素又可进一步分成两种类型,一类为分子质量<5 kDa,翻

译后被修饰,且作用位点在细菌胞内;另一类小菌素的分子质量为 7~10kDa,翻译后不被修饰,属阴离子多肽,作用位点在细菌膜上。

目前,国内外对细菌素的研究较深入,已经发现了几十种细菌素,被鉴定的细菌素有 Nisin、Laetacin、Laeloein、Helvetiein、Fermentiein、Sakeein、Laetiein、Plantaein、Subtiein 等,其中已被广泛应用的是 Nisin,也称尼生素。

2.1.2 细菌素的作用机制

细菌素的抑菌谱往往比真核生物产生的抗菌肽(antimicrobial peptides)的抑菌谱窄,但其作用浓度却比真核生物分泌的抗菌肽要低很多,这可能与靶细胞上有细菌素的特异性受体有关^[34]。

细菌素的作用机制主要是通过吸附于敏感细菌,与其细胞膜上的特异性细胞膜外蛋白受体结合,借助于两条不同的途径进入细胞内来达到杀死该菌细胞的目的:(1)形成孔道,结合在作用细菌的细胞膜上,与细胞膜上特异受体结合,形成 1 个孔道,改变细胞膜内外离子浓度,从而导致作用细胞的死亡。(2)核酸内切酶作用,通过降解细胞内的染色体,抑制细胞内蛋白质的合成以杀死细菌。(3)其他作用方式,例如大肠杆菌素 M 可以抑制细胞壁脂多糖 O-抗原生物合成;在羊毛硫细菌素中,一些细菌素通过与细胞壁上一些蛋白的结合而阻止细胞壁的形成进行杀菌。

2.1.3 细菌素与抗生素的区别

细菌素与抗生素都能较强烈地抑制甚至杀死其他微生物,具有一定的抑菌谱。因为细菌素具有与抗生素相似的一些性质和作用,因此细菌素最初甚至被认为就是抗生素。但细菌素和抗生素是不同的,抗生素是某些微生物通过酶促反应将初级代谢物转变为结构性的次级代谢物,不存在结构基因。而细菌素一般是通过核糖体直接合成的蛋白质类物质。编码细菌素的结构基因、涉及细菌素运输及发挥作用的蛋白质编码基因,以及赋予宿主对该细菌素具有“免疫力”的相关产物的基因一般都位于质粒或转座子上。因此,细菌素可以杀死同种但不携带该质粒的菌株。

与抗生素相比,细菌素具有很多的优点:大部分细菌素只对近缘关系的细菌有损害作用,且无毒、无副作用、无残留、无抗药性,同时也不污染环境。

2.2 海洋细菌素的研究进展

2.2.1 海洋细菌素的研究概况

由于海洋具有高压、高盐、低营养、低温、无

光照以及局部高温等独特的环境,造就了海洋细菌种类的特异性及代谢途径的多样性,可产生与陆地细菌不同的生物活性物质。

关于海洋细菌分泌抑菌物质的研究报道已有很长一段时间^[35-36],但早期报道的多为分离自海洋微生物的低分子质量抑菌物质。细菌素的研究多集中于乳酸杆菌、大肠杆菌、芽孢杆菌等来自于陆生生物或陆地环境的菌种,关于海洋细菌产生细菌素的研究报道较少。最近十几年,随着研究的深入,海洋细菌作为发现抑菌肽和抑菌蛋白的潜在重要来源,受到了越来越多的关注,各国研究者成功地从多种海洋细菌中分离得到细菌素或类细菌素,并应用分子生物学、生物化学等手段,进一步加深对海洋细菌抑菌蛋白类物质的研究与应用。

国外对于海洋细菌产生细菌素的研究开展较早。早在1989年,Barja等^[35]就从分离自西班牙东北海岸海水样品的一株交替单胞菌株P-31中分离纯化得到一种抑菌蛋白。随后,Austin等^[36]也从海水以及鱼、蟹、贝类等海水养殖生物体内分离到一株动性球菌属(*Planococcus*)的菌株,能够产生细菌素抑制鱼类病原菌。1997年,Sugita等^[21]在鱼体肠道筛选出抑制巴斯德菌的弧菌NM10,分离得到小于5kD的类细菌素。Kjelleberg实验室最近十几年关于被囊假交替单胞菌生物活性的研究证实,被囊假交替单胞菌能够分泌一种大小约190kDa的专性抑制细菌的大分子蛋白质(命名为AlpP)^[16],属于一种新型的细菌素。

国内关于海洋细菌分泌产生细菌素的研究起步较晚。2001年,莫照兰等^[37]发现气味黄杆菌(*Flavobacterium odoratum*) QJ2对对虾病原菌哈维氏弧菌有良好的抑制作用。经生理生化测定,确定该抑菌产物为具有蛋白质性质的细菌素。李会荣等^[38]也于2001年从健康的斑节对虾幼体及其养殖环境中分离的213株菌中,筛选出5株对养殖鱼虾主要病原菌有明显抑菌效果的细菌,其中一株鉴定为橙色假交替单胞菌(*P. aurantia*),该菌能产生一种蛋白质性质的抑菌物质,但其分子质量大小尚不清楚。

2.2.2 目前主要研究的海洋细菌素及其性质

Carnocin UI49是由栖鱼肉杆菌产生的细菌素。栖鱼肉杆菌最初分离自新鲜的鱼样品中。该细菌素分泌于细菌的指数生长期,可以抑制多种近缘细菌的生长,且具有裂解感觉细胞的特殊抑菌作用模式。随后,Yamazaki等^[39]又从另一株栖鱼肉杆菌CS256

中纯化出细菌素Piscicocin CS256。Piscicocin属于IIa型细菌素,大小为4430Da,可以抑制肠球菌(*Enterococcus* sp.)、李斯特菌、小球菌(*Pediococcus* sp.)的生长。Piscicocin CS256作用的pH范围较广,对热稳定,N端序列为YGNGL。

养殖动物病原菌——创伤弧菌同样也可以产生抑制亲缘关系较近的其他病原弧菌的细菌素。Shehane等^[40]从采集自美国沿海水样中的具有抑菌活性的创伤弧菌中纯化出两种细菌素BC1和BC2。其中BC1能够抑制创伤弧菌本身、霍乱弧菌(*V. cholerae*)和副溶血弧菌。BC2具有较广的抑菌谱,可以抑制所有被测弧菌,以及类志贺毗邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)和大肠杆菌。BC2性质十分稳定,经冷冻、高温高压处理或者是强酸碱处理后仍具有活性。细菌素BC2的广谱抑菌性以及稳定性为杀死鱼类病原弧菌提供了新的药物来源。

同样是很多鱼类致病菌的哈维氏弧菌VIB571,也会产生类细菌素^[41]。该类细菌素可以抑制其他4株弧菌,但VIB571自身却没有受到抑制影响。它的活性会受到脂酶、蛋白酶K、胃蛋白酶、胰岛素、链霉蛋白酶E、SDS的抑制;60℃下处理10min后活性丧失;而pH2-11范围内该类细菌素活性至少可维持5h。为了研究编码该类细菌素基因所处的位置,使用了半致死剂量的DNA破坏剂,观察菌体类细菌素产物的应急变化情况。与多数细菌在DNA被破坏时分泌细菌素增多不同,VIB571分泌的类细菌素并没有出现应急性的增高。VIB571也没有被提取出任何质粒,这表明该类细菌素很可能是由染色体编码,而不是多数细菌素的质粒编码。

来自于海藻表面的地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)产生一种分子质量为30.7kDa的新型细菌素^[42]。抑制甲氧苯青霉素耐受性金黄色葡萄球菌、耐万古霉素的肠球菌和李斯特菌。该细菌素与已经报道的另一株芽孢杆菌的抑菌蛋白YbdN有很高的相似性。由于抗生素的广泛使用,越来越多的人类和动物的致病菌产生了耐药性,因此,寻找对耐药性病原菌有抑制作用的细菌素物质非常必要。对于该海洋地衣芽孢杆菌产生的新型细菌素的性质和结构研究,为将来实验室制出,甚至是大型生产对抗耐药性致病菌的药物,奠定了基础。

Marinocin是分离自地中海海洋单胞菌的一种大分子广谱抑菌蛋白^[20]。由Lucas-Elio等分离纯化了Marinocin,并且用简并引物克隆了编码该细菌

素的基因 *lodA*。该细菌素具有相对热稳定性,对许多水解酶(如糖苷酶、脂肪酶、蛋白酶)有抵抗力,分子质量在 140~170kDa 范围。其抑菌谱很广,可以抑制包括一些 G^+ 和 G^- 细菌、医院分离的临床致病菌株以及对传统抗生素高度耐药的葡萄球菌和假单胞菌,但对检测的真核生物无任何作用。细菌素 Marinocine 只有在含有 L-赖氨酸的培养基并且是在好氧条件下才具有抑菌效应。最近,Marinocine 被证实是一种新的赖氨酸氧化酶^[43],能催化 L-赖氨酸的氧化脱氢反应,形成 6-半醛-2-氨基己二酸、氨气和过氧化氢。正是因为 Marinocine 可以催化赖氨酸产生过氧化氢这一区别于其他赖氨酸酶的特性,才使得其具有特殊的抑菌活性。关于 Marinocine 抑菌作用机理的研究为其他海洋细菌素的发现和应用提供了非常好的资料。

2.3 海洋细菌素的应用前景

细菌素本身具有许多优良性质:具有较好的选择性杀菌效果;不会在动物体内蓄积而引起不良反应,无副作用、无残留、无抗药性,易被人体消化道中的一些蛋白酶(如胰蛋白酶)所降解;具有热稳定性,并耐酸、耐低温贮藏;同时也不会造成环境污染。为了检验细菌素的安全性和有效性,Bhunja 等^[44]用细菌素 pediocin AcH 对小鼠和兔子分别进行皮下注射、静脉注射和腹腔注射进行免疫研究时发现,pediocin AcH 没有致死作用,也没有导致实验对象产生任何不良反应。目前细菌素已广泛应用于食品工业、饲料、医疗、生物防治等领域。其中以食品工业的应用最为广泛,乳酸菌的细菌素产物 Nisin 在乳制品、肉制品、罐头制品中的使用已有很长一段时间。

与陆生菌细菌素的广泛应用相比,处于研究起步阶段的海洋细菌素的安全性及有效性还没有得到检验,应用范围也没有确定。但越来越多的学者将目光放在了水产养殖中应用海洋细菌素来防治水产动物病害的发生。当前,水产养殖过程中抗生素的滥用已导致了养殖水体的污染,并且使许多致病菌产生了耐药性,对于新型抑菌活性物质的需求越来越迫切。海洋细菌分泌的细菌素由于其安全性和有针对性的抑菌效果,受到了越来越多的关注。Longeon 等^[45]使用分泌抑菌蛋白的抑菌交替单胞菌 X153 对双壳类幼体进行毒性测试,结果显示,经一段时间的培养,该菌株对双壳类幼体没有明显的毒性作用,

并且能够有效降低其死亡率,这为防治水产养殖病害的发生提供新的思路。由于海洋细菌素具有较广的抑菌谱,除了可以应用于水产养殖动物病原菌的防治之外,还可以向治疗人类的疾病(例如皮肤病)的领域拓展。

此外,海洋细菌素还可以作为防止生物污损(biofouling)的一项重要手段。海洋微生物在物体表面的不良沉积会导致污损现象的发生,这严重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。海洋细菌素可以有效抑制污损微生物的生长,从而达到防止生物污损的目的。

3 结语与展望

综上所述,海洋细菌抑菌活性的研究已经日趋成熟,可开发利用的菌株也不断增加。但是仍有许多方面的研究做的不够深入,仍没有足够的证据充分证明可以成功应用海洋细菌来抑制水产养殖动物病原菌的理论。一些研究成果认为通常体外试验结果在养殖动物体内也是有效的,但实际上仍然需要考虑到细菌之间的竞争作用。许多拮抗菌的试验结果,仅局限于单一菌株使用。然而,如果多种细菌制成的混合制剂可以适应不同条件的需求,那么多种细菌协调作用的效果很可能比单一细菌的效果更明显。

海洋细菌分泌的细菌素对于水产养殖动物的多种致病菌有良好的抑制作用,国内外越来越多的学者开始关注这一领域并取得了一定的研究成果。然而,目前对于海洋细菌素的研究多集中于对其的分离纯化、生物学性质的研究,以及分子质量和 N 端氨基酸序列的测定。对于后续的研究,还存在一定的难题有待解决。许多细菌素的作用机理尚不明确,需要通过拮抗菌与病原菌的混合培养,对病原菌细胞形态变化情况的观察加以研究;由于细菌素的不稳定性以及获得足够抑菌效果浓度的困难性,很多情况下无法直接进行细菌素对水产养殖动物的毒性测试;另外,细菌素的大量获得要借助基因工程手段,可以根据其氨基酸序列同源性,设计出适合的 PCR 引物,扩增编码细菌素的基因片段,再将此编码基因克隆至大肠杆菌的表达载体,表达并纯化得到大量重组的细菌素,用于进一步的研究与应用。

参考文献:

[1] Kořinek J. Einbeitrag zur mikrobiologie des meeres[J].

- Zentr Bakt Parasitenk, 1927, 2(71): 73-79.
- [2] Zobell C E. Bactericidal action of sea water[J]. Proc Soc Exptl Biol Med, 1936, 34: 113-116.
- [3] Carpenter L V, Settr L R, Weinberg M. Chloramine treatment of sea water[J]. Pub Health, 1938, 28: 929-934.
- [4] Beard P J, Meadowcroft N F. Survival and rate of death of intestinal bacteria in sea water[J]. Pub Health, 1935, 25: 1023-1026.
- [5] 刘雪莉, 钱伯初. 日本海洋天然活性物质研究简况[J]. 中国海洋药物, 1997, 16(1): 45-49.
- [6] Burgess J G, Jordan E M, Bregu M. Microbial antagonism: A neglected avenue of natural products research[J]. Biotechnol, 1999, 70 (1-3): 27-32.
- [7] Anand T P, Bhat A W, Shouche Y S, et al. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India[J]. Microbiol Res, 2006, 161: 252-262.
- [8] Lo Giudice A, Bruni V, Michaud L. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms[J]. Basic Microbiol, 2007, 47: 496-505.
- [9] Wiese J, Thiel V, Nagel K, et al. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea[J]. Mar Biotechnol, 2008, 11: 287-300.
- [10] Smith P, Davey S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent *Pseudomonas*[J]. Fish Dis, 1993, 16:521-524.
- [11] Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, et al. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 969-973.
- [12] Riquelme C, Hayashida G, Araya R, et al. Isolation of a native bacterial strain the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios[J]. Shellfish Research, 1996, 15(2): 369-374.
- [13] Patrizia M, Elisa G, Moreno B. Bacteriocin-like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 220: 121-125.
- [14] Gauthier G, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen.nov., and proposal of twelve new species combinations[J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45: 755-761.
- [15] Gauthier M J, Flatau G N. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds[J]. Can J Microbiol, 1976, 22: 1612-1619.
- [16] James S G, Holmström C, Kjelleberg S. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 2783-2788.
- [17] Egan S, Holmström C, Kjelleberg S. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 1499-1504.
- [18] Franks A, Haywood P, Holmström C, et al. Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunnicata*[J]. Molecules, 2005, 10: 1286-1291.
- [19] Macian M C, Arahal D R, Garay E, et al. *Marinomonas aquamarina* sp. nov., isolated from oysters and seawater[J]. Syst Appl Microbiol, 2005, 28(2):145-150.
- [20] Lucas-Elio P, Hernandez P, Sanchez-Amat, et al. Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1721: 193-203.
- [21] Sugita H, Matsuo N, Hirose Y, et al. *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 4986-4989.
- [22] 吕家森, 黄惠琴, 丛明, 等. 一株海洋细菌的鉴定及其活性物质的初步研究[J]. 海洋学报, 2006, 28(5): 173-177.
- [23] 田黎, 李光友. 海洋芽孢杆菌的培养条件及产生的胞外抗菌蛋白[J]. 海洋学报, 2004, 23(4): 95-100.
- [24] 任召珍, 郑媛, 孙谧, 等. 海洋侧孢短芽孢杆菌 Lh-1 抗菌活性物质的分离及特性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(6): 997-100.
- [25] 宛立, 王吉桥, 杨世勇, 等. 健康养殖南美白对虾肠

- 道细菌的抗菌活性[J]. 水产科学, 2006, 25(2): 61-64.
- [26] Planas M, Pérez-Lorenzo M, Hjelm M. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae[J]. Aquaculture, 2006, 255: 323-333.
- [27] Yamazaki K, Suzuki M, Kawai Y, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen Surimi[J]. Food Protection, 2003, 66: 1420-1425.
- [28] 孙昌魁, 刘清海, 马桂荣. 几株产活性物质的海洋细菌的分离与初步鉴定[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(1): 5-8.
- [29] Tagg J R, Dajani A S, Wannamaker L W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria[J]. Bacteriol Rev, 1976, 40: 722-756.
- [30] Heng N C K, Tagg J R. What's in a name? Class distinction for bacteriocins[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4: 2.
- [31] Gratia A. Surun remarquable exmpled'antagonisme entre deux Souches de Colibaeille[J]. CR Soc Biol, 1925, 93: 1040-1041.
- [32] Jacob F, Wollmane S. Biosynthesis of a colicin and its mode of action[J]. Ann Inst Pasteur(Paris), 1952, 83(3): 295-315.
- [33] Dirix G, Monsieurs P, Dombrecht B, et al. Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters[J]. Peptides, 2004, 25: 1425-1440.
- [34] Gordon D M, Oliver E, Littlefield-Wyer J. Bacteriocins: ecology and evolution[M]. Berlin: Springer, 2006.
- [35] Barja J L, Lemos M L, Toranzo A. Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 33: 1674-1679.
- [36] Austin B, Billaud A C. Inhibition of the fish pathogen, *Serratia liquefaciens*, by an antibiotic-producing isolate of *Planococcus* recovered from sea water[J]. Fish Dis, 1990, 13: 553-556.
- [37] 莫照兰, 俞勇, 王祥红, 等. 细菌 QJ2 对对虾病原性哈维氏弧菌的拮抗作用[J]. 水产学报, 2001, 25(5): 432-437.
- [38] 李会荣, 俞勇, 李筠, 等. 海洋有益菌的筛选与鉴定[J]. 高技术通讯, 2001, 11(9): 18-22.
- [39] Yamazaki K, Suzuki M, Kawai Y, et al. Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, Pisciocin CS526, from Surimi-Associated *Carnobacterium piscicola* CS526[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(1): 554-557.
- [40] Shehane S D, Sizemore R K. Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus*[J]. Appl Microbiol, 2002, 92: 322-328.
- [41] Prasad S, Morris P C, Hansen R, et al. A novel bacteriocin-like substance (BLIS) from a pathogenic strain of *Vibrio harveyi*[J]. Microbiology, 2005, 151: 3051-3058.
- [42] Amal M T, Morris P C, Hansen R, et al. Recovery and characterization of a 30.7-kDa protein from *Bacillus licheniformis* associated with inhibitory activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococci*, and *Listeria monocytogenes*[J]. Mar Biotechnol, 2006, 8: 587-592.
- [43] Lucas-Ello P, Gómez D, Solano F, et al. The antimicrobial activity of Marinocine, synthesized by *Marinomonas mediterranea*, is due to hydrogen peroxide generated by its lysine oxidase activity[J]. J Bacteriol, 2006, 188(7): 2493-2501.
- [44] Bhunia A K, Johnson M C, Ray B, et al. Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici*[J]. Appl Bacteriol, 1990, 69(2): 211-225.
- [45] Longeon A, Peduzzi J, Barthelemy M, et al. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153[J]. Mar Biotechnol, 2004, 6: 633-641.

(本文编辑: 张培新)