

具有群体感应系统微藻共栖细菌的筛选 及抑藻活性的研究*

徐鲁燕¹ 郑立¹ 韩笑天² 崔志松¹ 郭秀春³ 李馨子¹

(1. 国家海洋局第一海洋研究所生态中心 青岛 266061; 2. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071; 3. 河南大学药学院 开封 475044)

提要 以从海洋微藻中分离到的 206 株共栖细菌为材料, 采用生物传感器法筛选具有群体感应系统的细菌, 根据 16S rRNA 基因对它们进行了分子生物学鉴定和系统发育学分析。利用气相质谱联用法(GC-MS)检测群体感应信号分子酰基高丝氨酸内酯类化合物(AHLs)的种类; 采用细胞活体荧光测定方法, 研究了这类共栖细菌对微藻生长的抑制作用。结果表明, 在分离到的 206 株微藻共栖细菌中有 11 株具有群体感应系统, 它们分属于 3 类海洋细菌的系统分支: α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 和 Gram⁺细菌, 通过 GC-MS 检测确定 11 株共栖细菌都含有信号分子 C8-HSL, 部分含有 C6-HSL 和 C14-HSL, 其中 9 株细菌具有抑藻活性, 其代谢产物分别对东海原甲藻、棕囊藻、海链藻和赤潮异湾藻的生长具有不同程度的抑制作用。

关键词 微藻共栖细菌, 群体感应, 酰基高丝氨酸内酯, 抑藻活性

中图分类号 Q556.3

近年来, 赤潮已成为全球性的海洋灾害。目前治理赤潮常用的方法有物理法、化学法、生物法, 其中, 利用生物防治特别是利用微生物抑制赤潮藻类的策略具有安全、经济、高效的优点, 因此受到越来越多环境工作者的关注(郑天凌等, 2002, 2003; 王悠等, 2005)。海洋环境中的溶藻细菌(algicidal bacteria)是一类对海洋微藻生长具有抑制作用, 能裂解或直接杀死藻细胞的细菌。目前, 有学者发现赤潮发生和消亡过程中确实存在溶藻细菌, 且数量随着藻细胞的数量增加而增加, 在赤潮消亡初期达到最高峰, 并随赤潮的消亡而降低。但是在藻华初期, 虽然微藻共栖细菌的数量在逐渐增多, 却并不表现出溶藻活性; 只有当溶藻细菌达到一定数量后, 溶藻现象才会出现, 藻华随之进入消亡期(Liu *et al*, 2008)。针对溶藻细菌这种密度依赖性表达溶藻作用的现象, 本实验将群体感应机制与溶藻现象相联系, 对具有群体感应系统

微藻共栖细菌的抑藻活性进行初步研究。

群体感应(Quorum Sensing, QS)是一种当细菌数量达到一定密度时可以相互感知, 并进行基因表达, 调控产生某些生理功能的行为(Fuqua *et al*, 1994), 细菌群体感应系统通常是通过感受自身释放的自诱导信号分子(AI-1)而启动的(Schauder *et al*, 2001), 现已探明细菌主要的 AI-1 信号为酰基高丝氨酸内酯(N-acyl homoserine lactone, AHLs)类化合物, AHLs 分子都含有一个高丝氨酸内酯环, 不同的 AHLs 分子含有不同的酰化支链, 现已发现了十余种 AHLs 分子, 可通过多种方法检测。如液相质谱联用技术、气相质谱联用技术、薄层层析方法、细菌生物传感器方法。

本文以微藻共栖细菌为研究对象, 开展具群体感应系统菌株的筛选、种属鉴定研究, 同时建立有效抑藻活性检测的方法, 研究微藻共栖细菌抑藻活性与群体感应之间的关系, 以进一步加深对细菌群体

* 国家自然科学基金资助项目, 41076108 号, 41106148 号; 海洋可再生能源专项资金项目, GHME2001SW02 号; 山东省科技发展计划项目, 2011GGF01074 号。徐鲁燕, E-mail: xuluyan0720@126.com

通讯作者: 郑立, 副研究员, E-mail: zhengli@fio.org.cn

收稿日期: 2012-01-28, 收修改稿日期: 2012-03-18

感应调控功能的认识,为利用生物调控技术治理赤潮提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 样品来源及实验材料

实验所用微藻由中科院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室提供,共 61 株。微藻共栖细菌分离纯化所用培养基为海水培养基(marine both, MB),蛋白胨 5.0g,酵母粉 1.0g,磷酸高铁 0.01g,陈海水 1L, pH 7.6—7.8, 121℃, 15min 高压灭菌。

1.2 微藻处理

取生长至对数生长期的微藻 2ml, 5000r/min 离心收集藻体,用无菌海水漂洗 3 次,尽可能除去非共栖细菌(郑立等, 2006),加入 1ml 无菌海水用研磨器研磨藻体制成匀浆液备用。

1.3 微藻共栖细菌分离纯化

采用平板稀释法分离微藻共栖细菌。将微藻匀浆液用无菌海水稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三个稀释度,各取 200 μ l 涂布于含有 1/5 MB 固体培养基的平板上,每个稀释度涂布三个平板,所有样品于 25℃ 倒置培养,待长出菌落后,根据菌落形态、大小和颜色差异挑取不同的单菌落于 1/5 MB 固体培养基上划线纯化,最后转入 MB 固体试管斜面,于 4℃ 保存。

1.4 群体感应系统的检测

1.4.1 微生物传感菌检测 采用平行划线法检测 AHLs (Ravn *et al.*, 2001)。AHL 生物感应器菌株 *Agrobacterium tumefaciens* A136 (pCF218/pCF372) 在加有四环素(4.5mg/ml)和壮观霉素(10mg/ml)的 LB 培养基上过夜活化,阳性对照菌株 *A. tumefaciens* KYC6 (pCF218) 与待测菌株在普通 LB 培养基上过夜活化。在涂有 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside, 10mg/ml) 的 LB 平板上将待测菌株与生物传感菌平行划线, KYC6 与 A136 平行划线作为阳性对照, A136 与自身平行划线作为阴性对照。

1.4.2 代谢产物粗提液的制备及 GC-MS 方法检测 将具有群体感应系统的菌株接种于 300ml 的 MB 液体培养基中, 25℃ 摇瓶(150r/min)培养 7d。将培养液 8000r/min 离心 10min 除去菌体,用 125ml 乙酸乙酯萃取上清液两次,乙酸乙酯相 37℃ 蒸干后称重,溶于 1ml 乙酸乙酯中作为后续检测的粗提物备用。群体感应信号分子 AHLs 的检测采用 GC-MS(安捷伦 Agilent7980A/5975C)检测,参照郭秀春等(2010)方法。标准品的制备:分别配置 2mg/ml N-酰基高丝氨酸

内酯标准品 C6-HSL、C8-HSL、C14-HSL 甲醇母液,3 种 AHLs 母液用甲醇稀释成终浓度为 100 μ g/ml 的混合标准液用于 GC-MS 检测。气相条件:色谱柱采用 Agilent HP-5MS 石英毛细管柱(30m \times 250 μ m \times 0.25 μ m);载气为高纯氦气,流速为 1ml/min;进样口温度为 200℃;传输线温度为 280℃。升温程序为:初温为 150℃,以 25℃/min 升至 280℃,保持 3min。进样量 1 μ l,分流进样(150:1),扫描方式为选择离子检测模式(SIM)m/z143。质谱条件:电子能量为 70eV,离子源温度为 230℃,四级杆温度为 150℃。

1.5 分子生物学鉴定

对 11 株具有群体感应系统的微藻共栖细菌,通过 PCR 扩增其 16S rRNA 基因,序列经 Blast 分析,并与 GenBank 中已知细菌核苷酸序列进行比对,根据序列相似度大小来确定亲缘关系。

采用 CTAB 法对细菌基因组 DNA 进行提取(Hentschel *et al.*, 2001)。细菌 16S rRNA PCR 扩增选用通用引物 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')和 1492R(5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT-3')。PCR 反应体系(50 μ l)为:DNA 模板; 27F 10pmol; 1492R 10pmol; dNTP (2.5mmol/L) 4 μ l; 10 \times buffer (Mg²⁺) 5 μ l; Taq 酶(2mol/L) 0.5 μ l; 无菌水 37.5 μ l。PCR 扩增程序:94℃, 5min; 94℃, 45s, 56℃, 1min, 72℃, 2min, 31 个循环; 72℃, 15min。PCR 产物由北京华大基因研究中心纯化和测序。

将所获得的菌株的 16S rRNA 序列通过 Blast 与 GenBank 中已知序列进行比对。比对结果相似度达到 99% 的确定为细菌种水平,小于 99% 的确定为细菌属水平(Winson *et al.*, 1995)。比对后的序列通过 Sequin 软件提交到 GenBank,获得登陆序号。通过 Bioedit 软件和 Mega 软件对测序结果和 GenBank 数据库中比对后选取的亲缘关系较近的菌株进行序列分析,构建系统发育树,并确定它们的系统发育学地位。

1.6 抑藻实验

实验选取典型赤潮藻:锥状斯氏藻(*Scrippsiella trochoidea*)、东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)、棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)、海链藻(*Thalassiosira* sp.)、塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)、赤潮异湾藻(*Heterosigma akashiwo*),共 6 种,隶属于 4 个纲。

1.6.1 微藻细胞活体荧光强度与细胞密度相关性研究 参照郑立等(2006)方法,确定微藻荧光强度与细胞密度线性相关的密度范围。对选取的 6 株赤潮微藻进行培养,待生长至对数生长期,用无菌海水依次

将锥状斯氏藻、东海原甲藻、棕囊藻、海链藻、塔玛亚历山大藻、赤潮异湾藻稀释成 $(0.03-1) \times 10^4$ 、 $(0.06-2.8) \times 10^5$ 、 $(0.15-1.7) \times 10^6$ 、 $(0.25-10) \times 10^6$ 、 $(0.07-3.9) \times 10^4$ 、 $(0.5-7) \times 10^4$ 个/ml 的细胞悬液, 利用多功能酶标仪 (Tecan Infinite M200) 以 $EX=436\text{nm}$ / $EM=670\text{nm}$ (激发波长 Excitation Wavelength, EX ; 发射波长 Emission Wavelength, EM) 条件下测定荧光强度, 用浮游植物计数框计算微藻细胞数, 研究微藻细胞密度与荧光强度的相关性。

1.6.2 抑藻活性测定 将之前提取的细菌代谢产物用 DMSO 配置成 20mg/ml 备用。将生长到对数生长期的锥状斯氏藻、东海原甲藻、棕囊藻、海链藻、塔玛亚历山大藻、赤潮异湾藻稀释成 0.4×10^4 、 1.4×10^5 、 1.1×10^6 、 5.6×10^6 、 2.3×10^4 、 2.5×10^4 个/ml 的细胞悬液, 各取 5ml 加入试管中, 加入上述处理过的代谢产物 2.5 μl , 至终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 以 MB 培养基的萃取液加 DMSO 作为阴性对照。试管置于光照培养箱中培养[25 $^{\circ}\text{C}$, 76mmol/($\text{m}^2 \cdot \text{s}$)]。每隔 24h 取样 200 μl , 利用多功能酶标仪以 $EX=436\text{nm}$ / $EM=670\text{nm}$ 条件下测定荧光强度, 每组三个平行样。按下列公式计算生长抑制率(Inhibition Rate, IR):

$$IR = (\text{阴性对照荧光值} - \text{处理后微藻荧光值}) / \text{阴性对照荧光值} \times 100\%$$

2 实验结果

2.1 具有群体感应系统菌株的筛选

根据细菌的菌落形态、颜色、大小等特点, 共从微藻样品中筛选分离得到 206 株微藻共栖细菌。利用平行划线法进行群体感应现象的检测, 实验表明, 生物传感菌株 A136 自身平行划线时无颜色变化 (Negative control), 而阳性菌株 KYC6 能够诱导报告菌株 A136 在含有 X-gal 的平板上产生蓝色色素 (Positive control), 结果显示有 11 株微藻共栖细菌能够诱导报告菌株 A136 变色。

2.2 GC-MS 方法检测 AHLs 的种类

实验参照 Cataldi 等(2007)、郭秀春等(2010)建立的 GC-MS 检测方法, 选择 m/z 143 作为标记碎片, 采用离子扫描模式 (SIM) 对平行划线法初步检测到有群体感应现象的 11 株微藻共栖细菌的粗提液进行 AHLs 检测。以 KM-4 的色谱图为例(图 2), 通过与 AHLs 标准品的色谱图进行比对, 结果发现在 11 株菌株粗提液中都存在 C8-HSL, 其中两株细菌 D04-1 和

KM-4 中存在 C6-HSL 和 C14-HSL(表 1)。

2.3 系统发育树的构建及系统发育学分析

分子生物学鉴定结果显示(表 1), 具群体感应系统的 11 株细菌隶属于 1 科 5 个属, 分别为 Rhodobacteraceae、*Bacillus*、*Sulfitobacter*、*Marinobacter* 和 *Stenotrophomonas*。但大部分细菌都属于 Rhodobacteraceae (5 株) 和 *Sulfitobacter* (4 株)。对 11 株海洋细菌的系统发育学进行分析, 通过构建系统发育树可以发现实验菌株与已知序列细菌之间的亲缘关系(图 3), 结果表明, 它们属于 3 类海洋细菌的系统分支, 分别是 α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria 和 Gram⁺细菌。其中 7 株细菌属于 α -Proteobacteria, 包括 ST-K-5-2、PM-3、HA-1-1、PD-2、CMHK-1、L28-1 和 JN-1; 3 株细菌属于 γ -Proteobacteria: PMIK-2、KM-4、HA-1-2; 只有一株细菌 D04-1 属于 Gram⁺细菌。通过分析显示 11 株微藻共栖细菌之间有相似度很高的序列, 如 HA-1-1 和 PM-3, PD-2 和 PMHK-1, L28-1 和 JN-1, 但是这些菌株从外部形态上并不相同, 所以只确定为同种不同株的细菌。

2.4 抑藻实验

2.4.1 荧光强度与细胞密度的相关性研究 在试验所研究的微藻密度范围内, 可以发现细胞荧光强度与藻细胞密度呈显著线性相关, R^2 均在 0.99 以上, 由此可见, 微藻的生长情况可以通过藻体荧光值来表示。

2.4.2 微藻共栖细菌对赤潮藻的抑制作用 表 2 为第 3 天对赤潮藻以 $EX=436\text{nm}$ / $EM=670\text{nm}$ 条件下测定的荧光强度, 以抑制率大于 50% 确定为具有抑藻活性, 结果显示(表 2), 在 11 株具有群体感应的微藻共栖细菌中, 有 9 株具有抑藻作用 ($IR > 50\%$), 占 81%, 但不同的藻株对细菌代谢产物的耐受性各异, 其中 11 株细菌对锥状斯氏藻和塔玛亚历山大藻均无抑制作用 ($IR < 35\%$), 说明锥状斯氏藻和塔玛亚历山大藻对细菌具有较强的耐受性, 而赤潮异湾藻耐受性最差 ($IR > 85\%$)。此外, 不同细菌的抑藻谱也不相同, 根据所建立的评价体系, KM-4 和 HA-1-1 没有抑制作用, L28-1 和 PD-2 对一株赤潮藻有抑制作用, 其它 7 株细菌对至少两株赤潮藻具有抑制作用。

3 讨论

近年来, 海洋生物学家从海洋生物共栖细菌中发现了大量具有群体感应系统的细菌, 并对它们的功能进行了研究。最早的群体感应现象是在海洋费氏

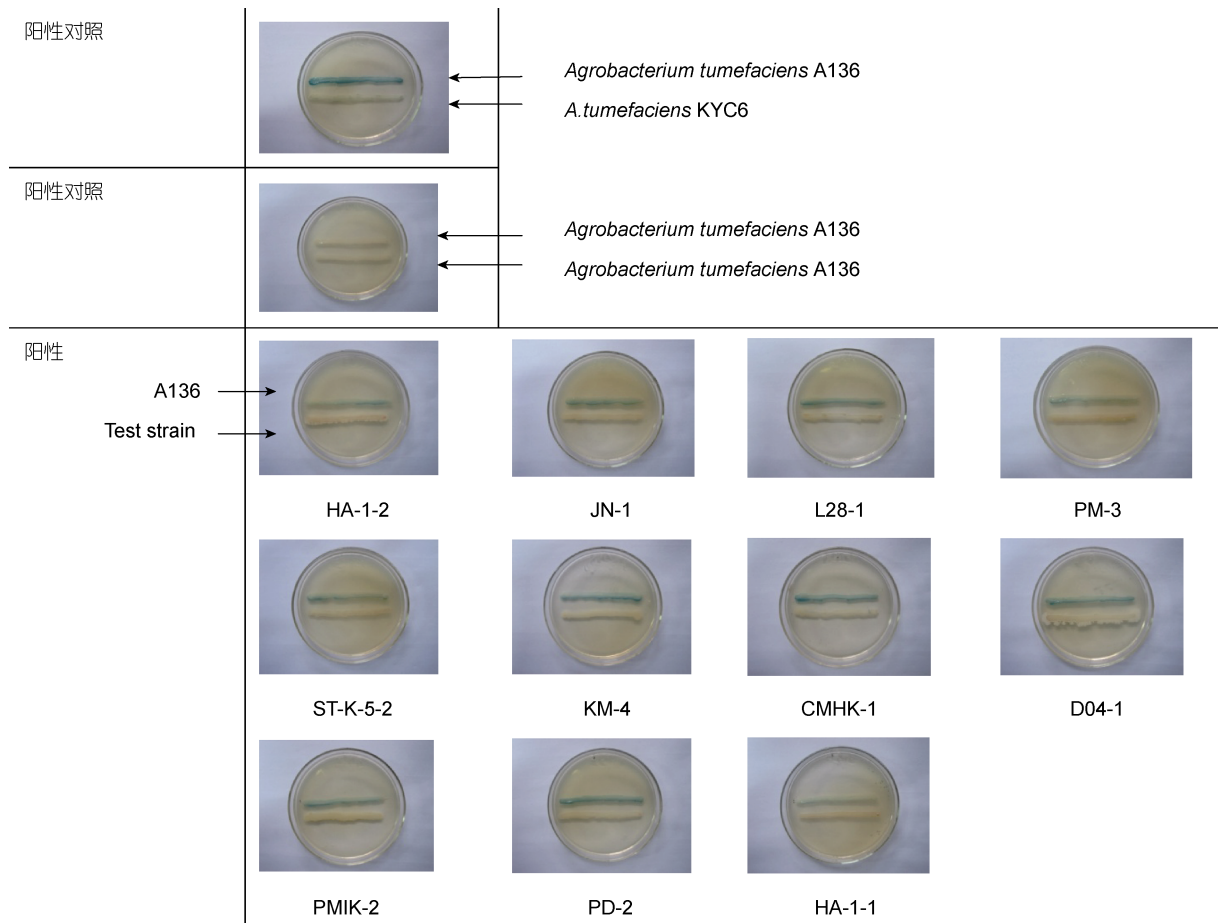


图 1 利用生物传感器法筛选具有群体感应的微藻共栖细菌

Fig.1 Marine microalgae associated bacteria with quorum sensing system screened by biosensor method

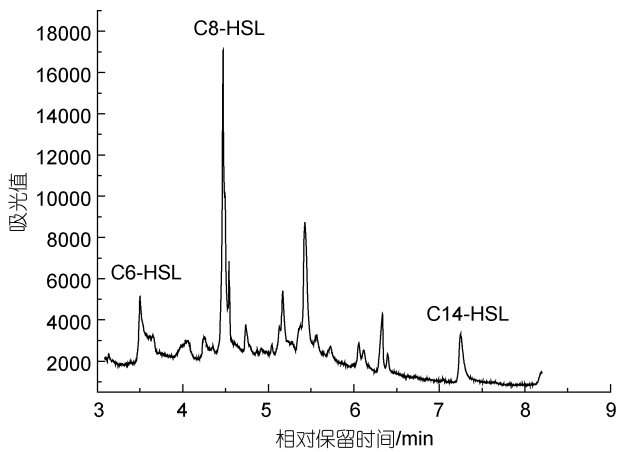


图 2 菌株 KM-4 粗提液的 SIM(m/z143)色谱图

Fig.2 SIM(m/z143) chromatogram of the extract from strain KM-4

弧菌(*Vibrio fisheri*)中发现的生物发光现象, 这类细菌以非常高的细胞密度存在于鱼类发光器官中, 宿主利用费氏弧菌发出的光捕获食物、躲避天敌(Ruby,

1996), Mitova 等(2004)在海绵共栖细菌中发现了群体感应信号分子 DKPs, 海绵和共栖细菌可以通过 DKPs 相互感应, 使细菌在海绵体表形成生物膜, 促进共栖关系的建立。郭秀春等(2008)发现海绵共栖细菌具有群体感应系统, 能调控代谢抗生素类化学防御物质。但国内外对于微藻共栖细菌群体感应现象的研究报导还很少, 特别是这类细菌的功能是否能调控其产生抑藻化合物, 并在赤潮消亡过程中扮演一定角色还不得而知。本文针对以上问题, 从海洋微藻中分离共栖细菌, 首次研究其存在的群体感应系统及抑藻作用, 以为海洋微藻共栖细菌抑藻调控机制提供新的思路。

从现有报道来看, 多种海洋细菌具有群体感应系统, Huang 等(2008)发现 *Rhodobacteraceae*、*Vibrio* 和 *Pseudoalteromonas* 是主要的产 AHLs 的菌属, Ansaldo 等(2002)、Waters 等(2005)发现 *Bacillus subtilis* 中存在群体感应系统, Gram 等(2002)分析了从岩石碎

表 1 具群体感应微藻共栖细菌的分子鉴定结果与信号分子
Tab.1 Molecular identification and signal molecules of microalgae associated bacteria with quorum sensing system

菌株编号(登录号)	对比亲缘关系最近的菌株(登录号)	比对片段长度(bp)	相似度(%)	C6-HSL	C8-HSL	C14-HSL
CMHK-1 (JQ675538)	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i> CSQ-8 (EF512131)	1345	99	-	+	-
D04-1 (JQ675539)	<i>Bacillus</i> sp. HY21 (HM579812)	1455	99	+	+	+
HA-1-1 (JQ675540)	<i>Sulfitobacter guttiformis</i> R16 (AB607871)	1367	99	-	+	-
HA-1-2 (JQ675541)	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> NBRC103161 (AB681969)	1446	99	-	+	-
KM-4 (JQ675543)	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> NBRC103161 (AB681969)	1415	99	+	+	+
L28-1 (JQ675544)	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i> CSQ-8 (EF512131)	1341	99	-	+	-
PD-2 (JQ675545)	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i> CSQ-8 (EF512131)	1345	99	-	+	-
PM-3 (JQ675546)	<i>Sulfitobacter guttiformis</i> R16 (AB607871)	1350	99	-	+	-
PMIK-2 (JQ675547)	<i>Stenotrophomonas</i> sp. FF1 (JN987861)	1436	99	-	+	-
ST-K-5-2 (JQ675548)	<i>Sulfitobacter guttiformis</i> R16 (AB607871)	1367	99	-	+	-
JN-1 (JQ713184)	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i> CSQ-8 (EF512131)	1320	99	-	+	-

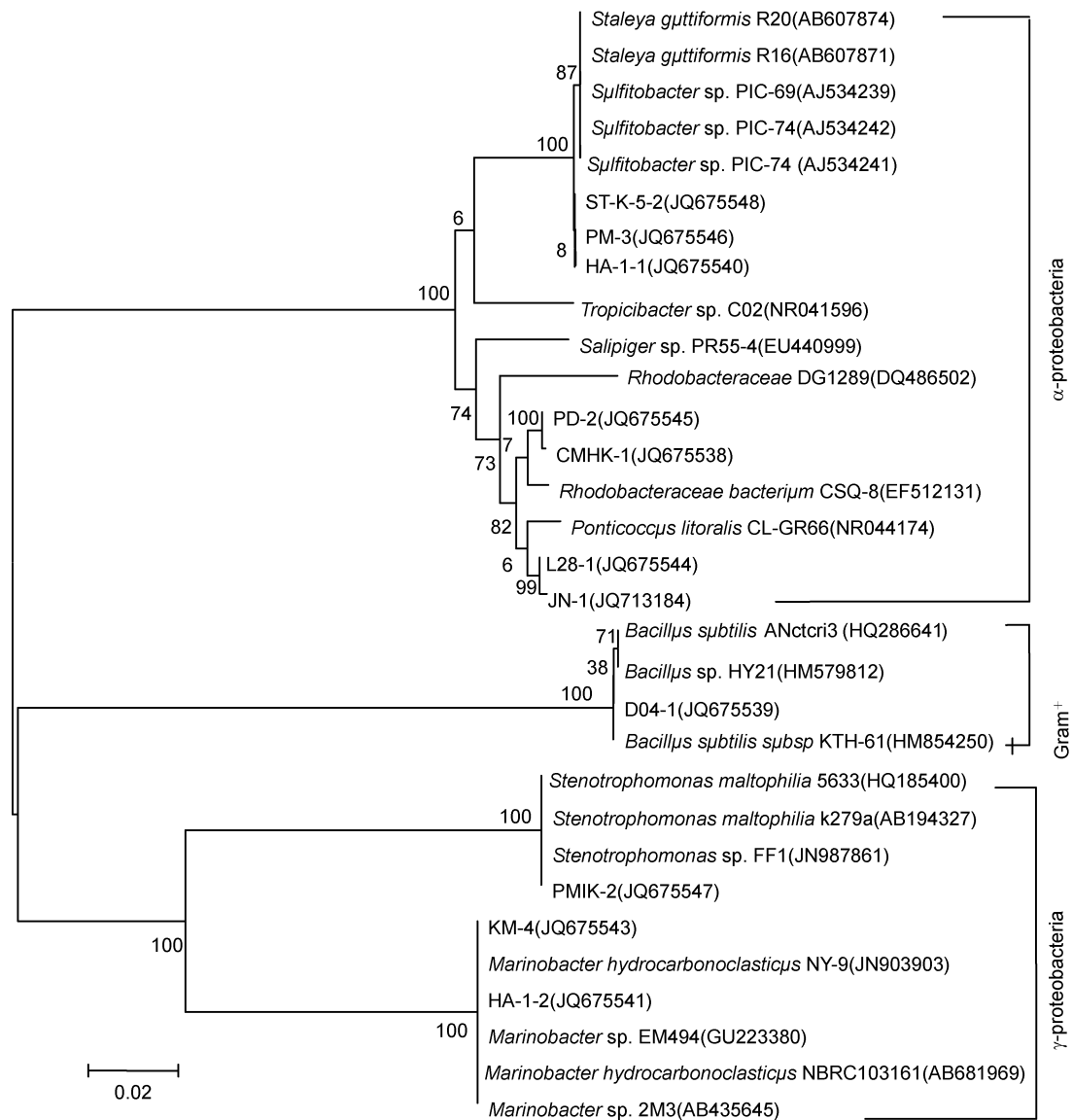


图 3 具群体感应系统的微藻共栖细菌系统发育分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of microalgae associated bacteria with quorum sensing system

表 2 微藻共栖细菌代谢产物对 6 种赤潮藻的抑藻活性(抑制率, %)

Tab.2 Algicidal activity of metabolites from microalgae associated bacteria against six red tide microalgae (IR, %)

菌株	<i>S. trochoidea</i>	<i>P. donghaiense</i>	<i>P. globosa</i>	<i>Thalassiosira</i> sp.	<i>H. akashiwo</i>	<i>A. tamarensis</i>
KM-4	12.04±3.29	11.28±2.34	10.68±0.71	12.30±1.29	9.19±0.83	32.54±9.15
PMIK-2	11.67±4.08	53.47±0.93	21.32±2.67	44.53±0.45	96.11±0.14	7.16±1.79
HA-1-1	7.04±4.72	6.89±1.97	7.97±1.13	6.27±1.17	48.75±5.15	27.14±1.29
PM-3	15.43±3.20	6.50±1.53	73.95±1.24	60.00±0.09	98.11±0.09	15.22±5.96
D04-1	6.13±4.79	61.32±4.11	70.85±0.82	8.04±0.63	96.88±0.30	10.80±5.45
HA-1-2	8.01±4.75	33.25±1.08	58.01±0.49	0.67±1.56	94.67±0.09	12.30±5.47
L28-1	11.29±3.92	14.92±3.56	3.68±0.40	45.65±1.20	98.12±0.12	8.89±2.99
ST-K-5-2	14.62±1.74	3.53±1.01	89.68±0.13	69.40±0.67	98.32±0.10	15.31±9.37
JN-1	16.40±3.98	10.11±3.77	69.23±0.42	60.16±0.27	96.48±0.48	17.75±4.26
PD-2	10.48±2.99	51.62±2.09	47.06±1.70	43.06±2.68	39.05±2.12	18.80±2.78
CMHK-1	6.61±3.57	4.18±1.70	13.56±0.46	55.11±0.79	86.64±0.85	25.79±1.14

屑和海藻中分离得到的 43 株细菌产 AHLs 的情况, 结果发现 *Marinobacter* 能产生 AHLs。Tait 等(2009)在研究石莼游动孢子附着的生物膜密度和 AHL 产生情况之间的关系时, 通过 LC-MS 的方法检测出 *Sulfitobacter* 能够产生 C4-HSL 和 C8-HSL。本实验发现海洋微藻共栖细菌中具有群体感应系统的菌株属于 1 个科 4 个属: *Rhodobacteraceae*、*Bacillus*、*Sulfitobacter*、*Marinobacter*、*Stenotrophomonas*, 大部分能产生 C8-HSL, 这也是海洋细菌普遍存在的一种 AHLs, 其中 *Stenotrophomonas* 存在群体感应系统还是首次发现。

本文对具有群体感应海洋微藻共栖细菌的抑藻活性研究发现, 细菌的抑藻作用具有明显的种属特异性, 该现象前人已有报道, 例如 Fukami 等(1992)研究发现黄杆菌 *Flavobacterium* sp. 对长崎裸甲藻 *G. nagasakiense* 具有很强的抑制作用, 而对卡盾藻 *Chattonella antiqua* 和中肋骨条藻 *Skeletonema costatum* 均无抑制作用。作者的实验表明 11 株细菌对锥状斯氏藻和塔玛亚历山大藻均无抑制作用, 而对东海原甲藻、棕囊藻、海链藻和赤潮异湾藻具有不同程度的抑制作用, 分析原因可能是因为锥状斯氏藻和塔玛亚历山大藻均属于甲藻纲(Dinophyceae), 由于甲藻纲的微藻都具有纤维素构成的较厚细胞壁, 所以对细菌代谢产物具有较强的耐受性。实验中还发现, 菌株 HA-1-2、PD-2 分别筛选自赤潮异湾藻和东海原甲藻, 并且通过抑藻活性研究, 发现两株细菌分别对赤潮异湾藻和东海原甲藻具有抑制作用, 所以这两株细菌在其宿主的生消过程中可能具有重要作

用, 后期将对这些具群体感应细菌的抑藻功能进行深入的研究, 以探明抑藻化合物及探讨其产生机制。

致谢 美国德克萨斯州立大学 Robert McLean 教授赠送生物传感器菌株, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王 悠, 俞志明, 2005. 海洋有害赤潮的生物防治对策. 植物生态学报, 29(4): 665—671
- 郑 立, 韩笑天, 严小军等, 2006. 海洋生物共栖细菌抑藻活性的初步研究. 海洋科学进展, 24(4): 511—518
- 郑天凌, 田 蕴, 苏建强等, 2002. 海洋赤潮生物与厦门海域几种细菌的生态关系研究. 生态学报, 22: 2063—2070
- 郑天凌, 苏建强, 2003. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用. 水生生物学报, 27(3): 291—295
- 郭秀春, 郑 立, 崔志松等, 2008. 海绵共栖细菌 NJ6-3-1 基于群体感应调控的抗菌活性. 微生物学报, 48(4): 545—550
- 郭秀春, 郑 立, 崔志松等, 2010. 海绵共栖细菌抗菌活性及其群体感应信号的研究. 海洋学报, 32(5): 135—143
- Ansaldi M, Marolt D, Stebe T *et al*, 2002. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. *Molecular Microbiology*, 44(6): 1561—1573
- Cataldi T R I, Bianco G, Palazzo L *et al*, 2007. Occurrence of *N*-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 361(2): 226—235
- Fukami K, Yuzawa A, Nishijima T *et al*, 1992. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(6): 1073—1077
- Fuqua W C, Winans S C, Greemberg E P, 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2):

- 269—275
- Gram L, Grossart H P, Schlingloff A *et al*, 2002. Possible Quorum Sensing in Marine Snow Bacteria: Production of Acylated Homoserine Lactones by *Roseobacter* Strains Isolated from Marine Snow. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 4111—4116
- Hentschel U, Schmid M, Wagner M *et al*, 2001. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(3): 305—312
- Huang Y L, Ki J S, Case R J *et al*, 2008. Diversity and acyl-homoserine lactone production among subtidal biofilm-forming bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 52(2): 185—193
- Liu J Q, Lewitus A J, Kempton J W *et al*, 2008. The association of algicidal bacteria and raphidophyte blooms in South Carolina brackish detention ponds, *Harmful Algae*, 7(2): 184—193
- Mitova M, Tommonaro G, Hentschel U *et al*, 2004. Exocellular cyclic dipeptides from *Ruegeria* strain associated with cell cultures of *Suberites domuncula*. *Marine Biotechnology*, 6(1): 95—103
- Pierson L S, Keppenne V D, Wood D W, 1994. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *Journal of Bacteriology*, 176(13): 3966—3974
- Ravn L, Christensen A B, Molin S *et al*, 2001. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiological Methods*, 44(3): 239—251
- Ruby E G, 1996. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fisheri-Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 50: 591—624
- Schauder S, Shokat K, Surette M G *et al*, 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, 41(2): 463—476
- Tait K, Williamson H, Atkinson S *et al*, 2009. Turnover of quorum sensing signal molecules modulates cross-kingdom signaling. *Environmental Microbiology*, 11(7): 1792—1802
- Waters C M, Bassler B L, 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 319—346
- Winson M K, Camara M, Latifi A *et al*, 1995. Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc National Acad Sci USA*, 92(20): 9427—9431

SCREENING OF MICROALGAE ASSOCIATED BACTERIA WITH QUORUM SENSING SYSTEM AND THEIR ALGICIDAL ACTIVITY

XU Lu-Yan¹, ZHENG Li¹, HAN Xiao-Tian², CUI Zhi-Song¹,
GUO Xiu-Chun³, LI Xin-Zi¹

(1. Marine Ecology Research Center, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061; 2. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 3. Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng, 475044)

Abstract Two hundred and six associated bacteria strains were isolated from marine microalgae. The bacteria with quorum sensing system were screened by biosensor method. And the identification and phylogenetic analysis of these bacteria were carried out by molecular method based on their 16S rRNA gene. Acylhomoserine lactones (AHLs), as the quorum sensing signals, were detected in the extracts of bacteria strains with quorum sensing system by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), as well as the algicidal activities were analyzed by viable cell fluorescence detection method. Results showed that 11 among the 206 strains had quorum sensing system and they belonged to three phylogenetic branches: α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria and Gram⁺ bacteria. GC-MS analysis showed that all of the 11 screened strains contained the quorum sensing signal of C8-HSL, and some of them also contained C6-HSL and C14-HSL. The algicidal activity study showed that 9 strains had inhibition effects in different degrees against four red tide microalgae including *Prorocentrum donghaiense*, *Phaeocystis globosa*, *Thalassiosira* sp. and *Heterosigma akashiwo*.

Key words Microalgae associated bacteria, Quorum Sensing, Acyl-homoserine lactone, Algicidal activity