

具有群体感应抑制活性的海洋细菌的筛选

丁碧婷¹ 陆叶倩¹ 董昆明¹ 王小治¹ 周晓见¹ 靳翠丽¹ 缪莉^{1,2*}

(1. 扬州大学 环境科学与工程学院 江苏 扬州 225127)

(2. 中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室 上海 201203)

摘要: 【目的】从海洋环境中筛选出能有效抑制细菌群体感应的活性菌株, 为以致病菌群体感应为靶点的新型疗法提供新的天然产物资源。【方法】以紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)为报告菌, 采用滤纸片法和双层软琼脂法相结合的筛选模型进行群体感应抑制活性菌的筛选。【结果】通过对美国圣璜岛海域海绵中分离出来的 272 株海洋细菌群体感应抑制活性的筛选, 得到了具有抑制紫色杆菌素产生的细菌 51 株, 其中 74 号菌株抑制效果最好, 具有进一步研究的价值。【结论】海洋细菌中有很多具有抑制细菌群体感应效应的菌株, 是天然群体感应抑制剂的潜在来源。

关键词: 群体感应抑制活性, 紫色杆菌, 海洋细菌

Screen for the quorum sensing inhibitory activity from marine bacterial isolates

DING Bi-Ting¹ LU Ye-Qian¹ DONG Kun-Ming¹ WANG Xiao-Zhi¹
ZHOU Xiao-Jian¹ JIN Cui-Li¹ MIAO Li^{1,2*}

(1. School of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University,
Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

(2. Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Material Medical, Chinese
Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: [Objective] Quorum sensing inhibitory activity of some marine bacterial isolates was investigated to provide potential novel origins of natural products for the promising antibacterial

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41076097, 41006097, 41106113); 新药研究国家重点实验室开放基金项目(No. SIMM1106KF-09); 江苏省高校自然科学基金项目(No. 10KJB170013, 11KJB170011)

*通讯作者: Tel: 86-514-89795882; Fax: 86-514-87978626; ✉: miaoli@yzu.edu.cn

收稿日期: 2011-07-13; 接受日期: 2011-10-17

therapeutic approaches targeting on the quorum sensing system of some pathogens. **[Methods]** In this study, we used *Chromobacterium violaceum* as the report-strain to screen for the quorum sensing inhibitory activity from some marine bacterial isolates by disc diffusion assay and double-layer soft agar assay. **[Results]** In total, 272 bacteria strains isolated from the sponge tissues collected around the San Juan Island had been tested. The results showed that 51 isolates exhibited the quorum sensing inhibitory activity. Among the active strains, bacterium No.74 had the strongest activity, which is deserved the further study on the isolation and identification of quorum sensing inhibitors. **[Conclusion]** Many marine bacterial isolates exhibit quorum sensing inhibitory, which indicated that marine bacteria are also a potential source for the natural quorum sensing inhibitors.

Keywords: Quorum sensing inhibitory activity, *Chromobacterium violaceum*, Marine bacteria

细菌感染一直威胁着人类健康, 自 19 世纪晚期德国的 Robert Koch 实验室证实了感染性疾病细菌起源学说起, 人类对抗感染性疾病的治疗才有了相对明确的目标, 以青霉素为代表的抗生菌的出现使有效治疗各种细菌感染成为可能^[1]。然而, 经过半个多世纪的迅猛发展, 越来越严重的细菌耐药性问题凸现出来, 建立新的治疗模式变得十分必要。目前认为, 最有前景的治疗措施应是清除细胞的致病能力而非损伤细胞, 以防抗性突变株的形成。研究发现, 病原菌的致病性是一种被称为群体感应(QS)的调控机制控制的, QS 通过介调致病基因表达能上调致病基因, 如介导病原菌形成较厚的生物膜, 使传统抗生素难以到达靶细胞而无法起作用, 同时也能下调致病毒性, 帮助免疫系统根除侵染病原菌^[2]。

群体感应(Quorum-sensing, QS)是由 Fuqua 等在 1994 首先提出的^[3], 是细菌根据自身细胞密度变化进行自我调节的一种群体行为^[4]。QS 系统调节细菌诸多生理功能, 如共生、竞争、发光、毒性因子的释放以及生物膜的形成等^[5]。因此, 国内外关于群体感应抑制剂(Quorum-sensing inhibitor, QSI)的研究也越来越多^[6]。目前报道的抑制剂主要是以天然信号分子(N-acyl homoserine lactones, AHL)的化学结构为模板人工合成的。Balaban 等^[7]合成了一种 RNA III 抑制肽(RIP),

通过干扰葡萄球菌 QS 体系来抑制其毒素产生; Persson 等^[8]合成了一种 AHL 类似物, 能够阻断 QS 报告菌中 LuxR 和 LasR 控制的报告基因表达。关于天然 QSI 的研究也在日趋增加, 首先被发现的具有 QS 抑制活性的天然产物是从红藻 *Delisea pulchra* 中分离到的溴化呋喃, 能够抑制 *Pseudomonas aeruginosa* 等细菌的 QS 活性, 大幅降低其生物膜对抗生素的敏感性^[9]; 大蒜提取物被证明含有至少 3 种不同的 QS 抑制剂, 其中一种已被鉴定为环状二硫化物^[10]; Nakayama 等分离到一种真菌次生代谢物 AMA, 能够抑制 *Enterococcus faecalis* 通过 QS 介调的明胶酶的产生, 但不影响其菌体生长^[11]。研究表明, 通过从微生物代谢产物中筛选天然的 QSI, 可能找到不同于 AHL 结构类似物的结构新颖的活性化合物, 从而为 QSI 的开发提供新的来源。

筛选 QSI 化合物的方法有很多种, 其中最典型的方法是用 A I 活性报告菌分析检测待筛选化合物以获得活性 QSI^[12]。紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)是一种革兰氏阴性菌, 其紫色菌素的表达受群体感应信号系统严密调控, 所以紫色杆菌可作为一种简便、直接的群体感应抑制因子筛选模型^[13]。本文以紫色杆菌为报告菌, 采用滤纸片法和双层软琼脂法相结合的筛选模型, 对 272 株分离自美国圣璜岛海域海绵

的细菌进行群体感应抑制活性的筛选, 得到具有细菌群体感应抑制活性的菌株 51 株, 其中 74 号菌株活性最高。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 实验所用的报告菌是由香港科技大学提供的紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*); 测试菌是美国圣璜岛海域海绵中分离得到的 272 株细菌。

1.1.2 培养基: (1) MB 培养基: 蛋白胨 0.5%, 酵母膏提取物 0.3%, 柠檬酸铁 0.01%, NaCl 1.945%, MgCl₂ 0.59%, MgSO₄ 0.324%, CaCl₂ 0.18%, KCl 0.055%, 琼脂 1.5%, pH 7.4–7.6。该培养基主要用于海洋细菌的培养和发酵。

(2) 软琼脂培养基: 蛋白胨 0.2%, 酵母膏提取物 0.2%, 可溶性淀粉 0.2%, NaCl 1%, 100 mL 海盐水(盐度为 3.0%–3.5%), 琼脂 0.75%, pH 7.0–7.4。主要用于双层软琼脂法筛选活性菌。

(3) 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, NaCl 0.5%, 琼脂 1.5%, pH 7.0–7.2。主要用于培养紫色杆菌。

1.2 方法

1.2.1 海洋细菌的发酵培养和提取物的制备: 将细菌从 MB 固体培养基上挑取适量接种到装有 10 mL 液体培养基的试管中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 1.5 d; 然后从试管中吸取 2 mL 菌液接种到装有 50 mL 培养基的锥形瓶中, 同样条件振荡培养 2.5 d; 再将 50 mL 菌液接种到装有 800 mL 培养基的锥形瓶中同等条件振荡培养 4 d。用 800 mL 含有 5%丙酮的乙酸乙酯进行萃取, 将上清液用旋转蒸发仪蒸馏得到粗提物, 氮吹仪下吹干后称重, 用乙酸乙酯溶成 50 g/L 溶液待用。

1.2.2 滤纸片法筛选群体感应抑制活性菌: 参照

单文荣等^[14]筛选棉花黄萎病菌抑制剂所用的方法。具体步骤如下: 制备牛肉膏蛋白胨固体培养基若干, 取 100 μL 生长良好的紫色杆菌均匀涂抹于培养基上; 吸取 10 μL 粗提物溶液滴到滤纸片上, 吹干后反扣在涂有菌液的培养基上, 将培养皿置于 30 °C 恒温培养箱中倒置培养 2 d, 每个样品做 3 组平行, 并做乙酸乙酯、青霉素、链霉素的抑制试验。如果筛选样品中含有群体感应抑制因子, 则滤纸片周围将出现不透明的白色浑浊圈, 在这个圈内紫色杆菌产生紫色素的群体感应调控机制被破坏, 色素产生被抑制, 而菌体本身生长未受影响; 若为无色透明圈, 则表示样品中含有抑制报告菌生长的活性成分, 抑制圈直径大小取决于抑制因子的强弱。培养 2 d 后观察实验结果, 测量滤纸片边缘到色素产生区域的最小半径并记录。

1.2.3 双层软琼脂法筛选群体感应抑制活性菌: 参照 Teasdale 等^[15]所用的方法适当改变后进行活性筛选。将海洋细菌从平板上接种到试管中振荡培养 1.5 d, 吸取 100 μL 菌液加入到无菌的 24 孔板中, 再加入冷却到 40 °C 的软琼脂培养基 900 μL 混匀, 空白和阴性对照均加入培养基 1 000 μL, 置于 30 °C 恒温培养箱中倒置培养 24–48 h; 取出 24 孔板, 在培养基上覆盖一层 150 μL 的软琼脂培养基, 用于避免细菌和紫色杆菌直接接触, 凝固后加入 200 μL 混有紫色杆菌的软琼脂培养基(紫色杆菌:培养基=1:9); 将 24 孔板再次放到培养箱中倒置培养 72 h, 观察结果, 记录数据。以阴性对照为参照, 若测试菌所在的孔中紫色杆菌未产生菌素, 即孔中未出现紫色, 则说明测试菌有较强的群体感应抑制活性; 若出现部分浅紫色, 说明抑制活性较弱; 若出现与阴性对照同等程度的紫色, 说明该测试菌无抑制活性。若紫色杆菌层无菌体生长, 则说明测试菌对紫色杆菌生长有抑制作用。

2 结果与分析

2.1 滤纸片法筛选结果

2.1.1 海洋细菌提取物对紫色杆菌素产生的影响: 经发酵、萃取和干燥得到粗提物 272 份, 用滤纸片法进行筛选, 结果显示(图 1), 272 株海洋细菌中有 17 株具有群体感应抑制活性, 能较好地抑制紫色杆菌素的产生, 筛出率为

6.25%。在粗提物浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{片}$ 时, 有 4 株细菌抑制半径在 2.5 mm 以上, 分别是 66、74、91 和 552 号菌株; 7 株在 1.5 mm–2.5 mm; 6 株小于 1.5 mm。当测试浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{片}$ 时, 这 17 株活性菌的抑制效果均大幅减弱, 只有 4 株菌有 1 mm 左右的抑制圈, 其中 74 号菌株抑制效果最好, 提取物浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{片}$ 时, 其抑制半径仍有 1.5 mm (图 2)。

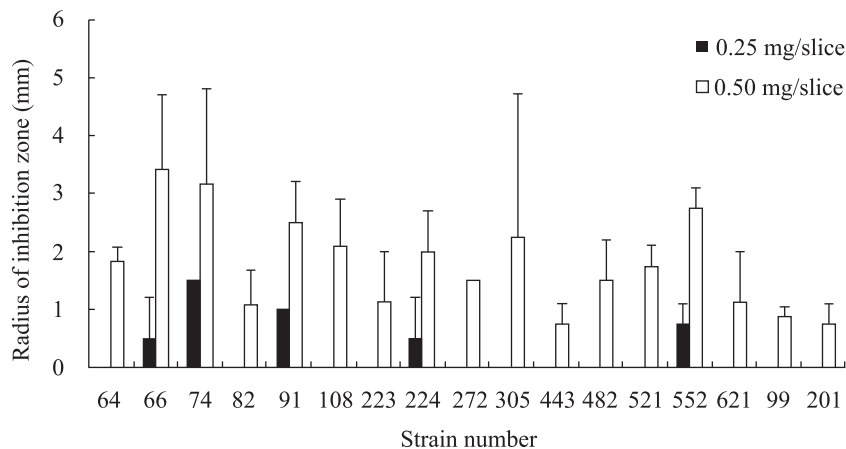


图 1 海洋细菌提取物对紫色杆菌素产生的抑制

Fig. 1 Inhibition of violacein production by extract of marine bacteria

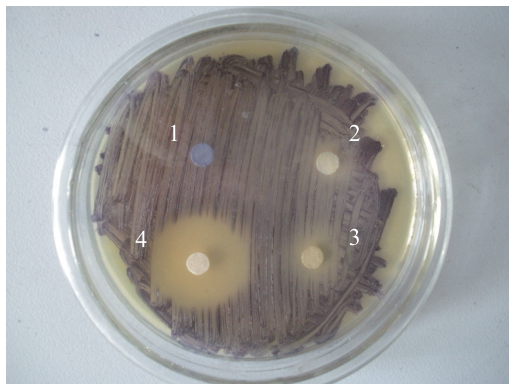


图 2 74 号海洋细菌提取物对紫色杆菌素产生的抑制

Fig. 2 Inhibition of violacein production by No. 74 extract

注: 1: 阴性对照(乙酸乙酯); 2: 0.25 mg 74 号提取物; 3: 0.50 mg 74 号提取物; 4: 200 μg 链霉素.

Note: 1: Negative control (ethyl acetate); 2: 0.25 mg No. 74 extract; 3: 0.50 mg No. 74 extract; 4: 200 μg streptomycin.

2.1.2 海洋细菌提取物对紫色杆菌生长情况的影响: 为了进一步确证 74 号菌株提取物的活性是群体感应抑制活性而不是抑菌活性, 对其进行了生长抑制实验。将隔夜培养的紫色杆菌用新鲜培养基稀释至 OD_{570} 为 0.05, 滴加到 96 孔板 3 个孔中, 分别加入 74 号菌株提取物至终浓度为 0.25 mg/L、0.5 mg/L 和终浓度为 0.1 mg/L 的链霉素, 空白对照用 DMSO 补平。30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 每隔 4 h 测试其 OD_{570} 。

结果显示(图 3), 74 号菌株提取物浓度在 0.25 mg/L 时对紫色杆菌的生长无任何影响; 0.5 mg/L 时 OD_{570} 略微下降, 降幅较小, 不影响其走势; 而链霉素对紫色杆菌生长的抑制作用十分显著, 在所测定的各个时间点其 OD_{570} 基本没有

变化。在色素产生方面,混合培养 8 h 后空白对照开始出现紫色,20 h 后提取物浓度为 0.25 mg/L 的孔中开始出现紫色,48 h 后 0.5 mg/L 的孔中也开始出现紫色。结合图 1 和图 2 的实验结果,说明 74 号海洋细菌提取物抑制紫色杆菌素的产生不是通过抑制其菌体生长来实现的。

2.2 双层软琼脂法筛选结果

运用双层软琼脂法对 272 株海洋细菌进行筛选,经过重复实验后,观察 24 孔板中紫色产生情况,发现有较好抑制紫色杆菌色素产生的细菌 40 株(表 1),筛出率为 14.71%。其中效果最好的有 18 株,占筛出菌株的 45%,效果较好的有 15 株,效果较差的有 7 株。

2.3 测试菌株的鉴定

本次实验所用的测试菌共有 272 株,采用 IST 序列分析对其中的 146 株进行了鉴定,分属 25 个菌属,数量最多的是芽孢杆菌属(*Bacillus*),共 58 株,占到总菌数的 21.32%;其次为交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*),占总菌数的

4.41%;嗜冷杆菌属(*Psychrobacter*) 3.31%,马里尼芽孢杆菌属(*Marinibacillus*) 2.94%,弧菌属(*Vibrio*) 2.21%,类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*) 2.57%,葡萄球菌属(*Staphylococcus*) 2.21%等。在筛选出的菌株中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)和交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)数量较多,其余菌属均有分布,说明紫色杆菌群体感应抑制剂在海洋细菌中分布较广,并不局限在某几个菌属中。

3 讨论与展望

细菌耐药问题是目前人类面临的重大生存危机。以细菌的群体感应系统为靶标筛得的抗菌药物,与传统的抗生素的作用机制完全不同,只抑制细菌群体感应调控的致病行为,不影响细菌的生长,因此理论上不会产生细菌耐药性^[16]。海洋生态环境独特,能产生更多新颖的微生物活性产物,海洋微生物中的 QSI 在抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗海洋污损等方面具有独特的效应。

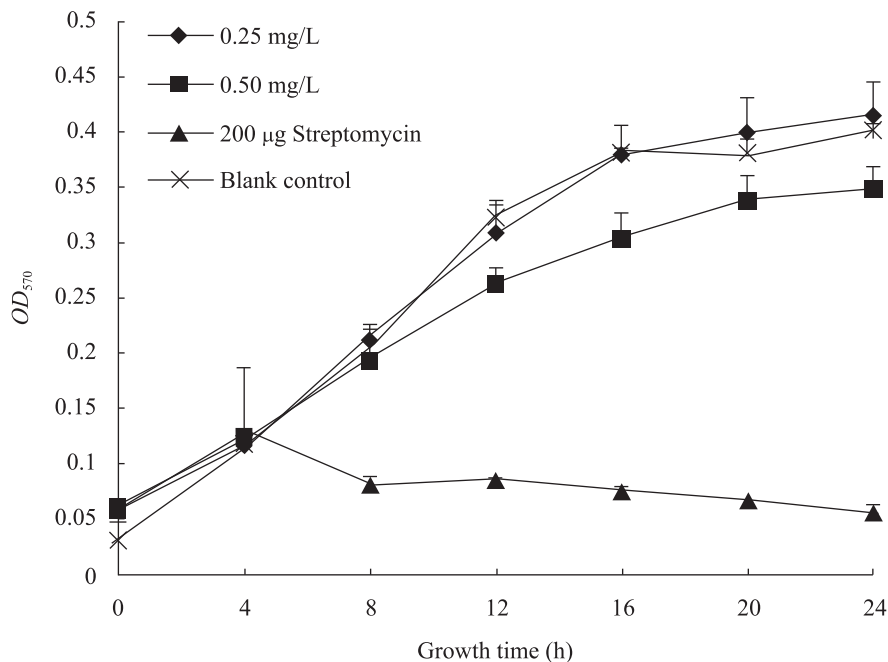


图 3 74 号海洋细菌对紫色杆菌生长情况的影响

Fig. 3 Effect of bacterium No.74 extract on the growth of *Chromobacterium violaceum*

表 1 双层软琼脂法抑制紫色杆菌素的产生

Table 1 Inhibition of violacein production by double-layer soft agar assay

菌号 Number	抑制效果 Inhibition effect	菌号 Number	抑制效果 Inhibition effect	菌号 Number	抑制效果 Inhibition effect
32	+	272	+++	552	+++
66	++	276	+++	562	+++
74	+++	292	+	590	+
108	++	301	++	597	+++
110	++	303	+	604	+
159	++	304	++	621	++
170	++	406	++	652	+++
173	+++	420	+++	655	++
176	++	446	+++	657	++
192	+	450	++	685	+++
223	+++	520	+++	686	++
259	+++	525	+++	691	+++
263	++	529	+++	742	+
743	+++				

注: +++: 抑制效果最好, 未产生紫色; ++: 部分抑制, 产生微量浅紫色; +: 产生浅紫色, 抑制效果较差。

Note: +++: The best effect of inhibition, no violacein production; ++: Partial inhibition, trace violacein production; +: Weak inhibition effect, partial violacein production.

本文所用的滤纸片法和双层软琼脂法都是筛选 QSI 的有效方法, 通过 272 株海洋菌的筛选, 初步总结出两种方法的优缺点。滤纸片法在实验过程中需对测试菌进行发酵萃取, 通过粗提物与报告菌的对峙实验来确定其 QS 活性, 是一种菌与化合物的对峙; 双层软琼脂法无需发酵萃取, 是一种菌与菌的直接对峙。就筛出率而言, 滤纸片法的筛出率为 6.25%, 低于双层软琼脂法的 14.71%; 就实验过程而言, 滤纸片法前期粗提物的制备花费时间较长, 不如双层软琼脂法简便易行; 另外, 前者是通过抑制圈半径来确定测试菌 QS 活性大小, 实验数据更为直观、准确, 而后者实验结果是通过肉眼观察的, 难免存在误差, 数据偶然性较大。因此, 我们可以看到两种方法有利有弊, 在以后的实验中可以先用双层软琼脂法进行筛选, 对于活性较好的菌株再进行滤纸片法的进一步确证, 以保证实验的严谨性。

运用紫色杆菌筛选模型对海洋细菌提取物进行群体感应抑制活性的筛选, 我们得到了 51 株能有效抑制紫色杆菌通过群体感应调控的紫色杆菌素的产生, 其中 74 号菌株的抑制效果最好, 且在一定浓度范围内不影响紫色杆菌的生长。史晓翀等^[17]运用紫色杆菌为报告菌, 使用唯一能源法和报告菌株法对青岛沿海土壤中的细菌进行群体感应抑制活性的筛选, 得到 21 株活性菌株, 其中编号为 A8 的菌株效果最好, 对其中有效成分进行分离鉴定, 发现主要化合物为环二肽 (Cyclodipeptides)。因此, 在后续实验中, 我们将对 74 号菌株进行规模化发酵, 对提取物进行分离纯化, 以得到抑制群体感应的有效化合物, 为 QSI 的进一步研究和开发提供基础。

参 考 文 献

- [1] Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant

- bacteria[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(5): 452–456.
- [2] von Bodman SB, Willey JM, Diggle SP. Cell-cell communication in bacteria: united we stand[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(13): 4377–4391.
- [3] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(2): 269–275.
- [4] Bassler BL. Cell-to-cell communication in bacteria: a chemical discourse[J]. *Harvey Lectures*, 2004, 100: 123–142.
- [5] Shiner EK, Rumbaugh KP, Williams SC. Interkingdom signaling: deciphering the language of acyl-homoserine lactones[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(5): 935–947.
- [6] Suckow G, Seitz P, Blokesch M. Quorum sensing contributes to natural transformation of *Vibrio cholerae* in a species-specific manner[J]. *The Journal of Bacteriology*, 2011, 193(18): 4914–4924.
- [7] Balaban N, Cirioni O, Giacometti A, et al. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(6): 2226–2229.
- [8] Persson T, Hansen TH, Rasmussen TB, et al. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic[J]. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2005, 3(2): 253–262.
- [9] Hentzer M, Wu H, Andersen JB, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors[J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(15): 3803–3815.
- [10] Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(5): 1799–1814.
- [11] Nakayama J, Uemura Y, Nishiguchi K, et al. Ambic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quorumones in gram-positive bacteria[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(2): 580–586.
- [12] Dong WX, Luo F, Du YG, et al. Production and properties of an inhibitor of the *Pseudomonas autoinducer* by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51(9): 783–789.
- [13] Martinelli D, Grossmann G, Séquin U, et al. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*[J]. *BMC Microbiology*, 2004, 4: 25.
- [14] 单文荣, 李俊霞, 刘花粉. 滤纸片法筛选不同活性物对棉花黄萎病菌抑制效果研究[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(19): 285–289.
- [15] Teasdale ME, Liu JY, Wallace J, et al. Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in gram-negative bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(3): 567–572.
- [16] Hentzer M, Eberl L, Nielsen J, et al. Quorum sensing: a novel target for the treatment of biofilm infections[J]. *BioDrugs*, 2003, 17(4): 241–250.
- [17] 史晓翀. 海洋微生物中细菌群体感应抑制因子的筛选与作用机制研究[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2008.