

海绵共栖细菌 NJ6-3-1 基于群体感应调控的抗菌活性

郭秀春^{1,2}, 郑立^{*}, 崔志松¹, 韩平², 田黎^{1,2}, 王小如¹

(¹ 国家海洋局第一海洋研究所, 青岛市现代分析技术及中药标准化重点实验室, 青岛 266061)

(² 青岛科技大学, 化工学院生物系, 青岛 266042)

摘要:【目的】选择一株海绵共栖细菌 *Pseudoalteromonas sp.* NJ6-3-1, 研究其抗菌物质的代谢是否受到群体感应的调控。【方法】我们研究了在不同生长条件细菌 NJ6-3-1 代谢物的抗菌活性与细胞密度的关系; 通过模拟自然的竞争环境, 研究了低密度条件下的细菌 NJ6-3-1 与外源细菌 *Staphylococcus aureus* 共培养时的抗菌活性情况。【结果】实验发现细菌 NJ6-3-1 代谢抗菌物质的行为与细胞密度密切相关, 只有当细胞密度达到一定的阈值 $OD_{630}=0.4$ 时, NJ6-3-1 才能代谢抗菌物质; 同时发现外源病原菌 *S. aureus* 代谢产物中存在某种信号分子, 能诱导 NJ6-3-1 在不产生抗菌物质的生长条件下代谢抗菌物质。【结论】以上结果初步说明 NJ6-3-1 的抗菌活性受到种内和种间群体感应系统的调控。

关键词: 群体感应; 海洋细菌; 自体诱导物; 抗菌活性

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0545-06

“群体感应”是细菌生长到一定密度(quorum)时相互感应(sensing), 并进行基因表达, 调控产生独特的、多样的群体行为的现象^[1]。具有群体感应的细菌在生长过程中, 能够合成并释放一种被称为自体诱导物(autoinducer, AI)或信息素(pheromones)的信号分子, 且信号分子的浓度随着细菌密度的增加而增加, 当细菌密度达到一个临界阈值, 它们所释放的信号分子积累到一定水平时, 细菌就会通过细胞之间的信息交流而引发群体感应, 改变和协调它们之间的行为, 共同展示出某些生理特性, 包括生物发光、抗生素的生物合成、毒性基因的表达、质粒的转移、色素的产生及生物膜的形成等等^[2-6]。细菌具有群体感应现象的基本条件是, 细菌的某些特性依赖于细胞密度, 即在低密度情况下, 某些特性不表达, 只有达到某一密度阈值时才表达。

至今, 人们已经在微生物中发现了种内(intraspecies)和种间(interspecies)两种群体感应系统。

种内群体感应是微生物感受自身种群释放的自体诱导信号分子(AI-1)从而表现出相应的生理现象^[7], 目前已经确认了三类 AI-1, 包括革兰氏阴性细菌释放的酰基高丝氨酸内酯(AHL)类化合物, 革兰氏阳性细菌释放的寡肽类化合物(AIP)^[8], 以及真菌释放的芳香醇类化合物^[9,10]; 种间群体感应则是在竞争环境下, 感受外源微生物释放的种间信号分子(AI-2)而表现出一定的生理现象^[7], 种间群体感应信号(AI-2)是 Bassler 等近年发现的一类信号分子, 确定为呋喃硼酸二酯(Furanosyl borate diester)分子, 许多革兰氏阴性和阳性细菌都可以产生这种信号分子, 并能被不同种类的微生物感应^[11,12]。

目前, 已经发现许多海洋细菌具有群体感应系统, 如生物发光, 生物膜的形成等都是某些海洋细菌受群体感应的调控所表现出来的现象。种间信号分子 AI-2 就是在具有群体感应体系的海洋细菌—哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 中发现并确定的^[13,14], 研究发现, 该菌的

基金项目: 国家自然科学基金(20602009, 40776098); 国家“863”项目(2007AA09Z435); 山东省 2006 年度博士后科研项目(200602012); 国家海洋局青年基金(2006105)

*通讯作者。Tel: +86-532-88961802; Fax: +86-532-88963253; Email: zhengli@fio.org.cn

作者简介: 郭秀春(1982-), 女, 山东人, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物及天然产物研究。Email: guoxiuchun1982@163.com

收稿日期: 2007-08-31; 修回日期: 2007-12-15

生物发光现象受到 luxS 系统的调控^[15]。Mitova 等在海绵共栖细菌中发现了一系列二肽类化合物(diketopiperazines, DKPs), 他认为海绵细胞和共栖细菌可以利用这种信号分子进行相互感应, 使得细菌在海绵体表形成生物膜, 促进共栖关系的建立^[16]。我们在前期工作中发现一株海绵共栖细菌 NJ6-3-1 具有很好的抗菌和细胞毒活性, 同时发现了该细菌可能存在群体感应系统的实验现象, 如在细菌 NJ6-3-1 的代谢产物中发现了 3 个 DKPs 化合物^[17], 在细菌 NJ6-3-1 培养过程中通过添加外源细菌的培养液, 可使其代谢产物的抗菌和细胞毒活性增强等, 因此我们提出了海洋细菌 NJ6-3-1 抗菌活性产物的代谢过程可能受到群体感应调控的假设。

为了进一步证实我们的假设, 本实验通过改变生长因子(营养寡富和温度高低), 控制细菌细胞密度, 研究细菌 NJ6-3-1 的抗菌活性与细胞密度的关系, 同时利用微生物共培养技术验证细菌 NJ6-3-1 代谢抗菌物质是否受到种间群体感应的调控。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 实验所用菌株 NJ6-3-1 分离于海绵 *Hymeniacidon perleve*, 经 16S rRNA 序列分析鉴定为 *Pseudoalteromonas* sp.(AY621063)。其次级代谢产物

具有显著的抗菌及细胞毒活性。外源诱导实验所用的共培养细菌为金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* CMCC(B)26001。

1.1.2 培养基: 菌株 NJ6-3-1 的基础培养基为添加适量葡萄糖的 Zobell 2216E(marine broth, MB)培养基, 成分为蛋白胨 5g, 酵母粉 1g, 葡萄糖 1g, 磷酸铁 0.1g, 海水 1L, pH7.2~7.6; *S. aureus* 的培养基为 32 号营养培养基, 其成分为蛋白胨 5g, 酵母粉 5g, 牛肉膏 5g, 氯化钠 5g, 葡萄糖 5g, 水 1L, pH7.0。

1.1.3 主要试剂: 蛋白胨和牛肉膏(杭州微生物试剂厂), 酵母粉(北京双旋微生物培养基制品厂), 葡萄糖和乙酸乙酯(天津市广成化学试剂有限公司), 磷酸铁(中国医药上海化学试剂公司), MTT (methylthiazolotetrazolium)(sigma 公司), TLC 硅胶板(TLC aluminium sheets, 20 cm×20 cm, silica Gel 60F254, Merck, USA), 以上试剂均为分析纯。

1.2 抗菌活性的密度依赖实验

实验通过调节温度的高低和培养基营养的寡富, 共设置九种不同的培养条件(表 1)来控制细胞密度, 将 5mL 细菌悬液($OD_{630}=0.6$)接种于含有 300mL 液体培养基的 500mL 三角瓶中, 按表 1 中所述的条件培养, 定期取样, 用酶标仪(Microplate Reader RT-2100C)在 630 nm 处测定吸光度, 以此表示细菌的生长情况, 培养进入衰亡期结束测定抗菌活性。

表 1 实验设置的九种不同培养条件

Table 1 Nine different kinds of culture conditions in experiment

Experimental groups	1	2	3	4	5	6	7	8	9
T/	20	20	20	25	25	25	30	30	30
Medium	MB	1/2MB	1/5MB	MB	1/2MB	1/5MB	MB	1/2MB	1/5MB

1.3 外源细菌诱导 NJ6-3-1 产生抗菌活性

采用 1.2 实验结果中低于产生抗菌活性的细胞密度阈值的培养条件, 添加外源菌与细菌 NJ6-3-1 共培养, 研究细菌 NJ6-3-1 的抗菌活性。

1.3.1 不同外源诱导物的获得: *S. aureus*(SA)在 37 含 50mL 32 号营养培养基的 100mL 三角瓶中培养 2d 后, 离心除去上清液, 菌体中加入 50mL 的 1/5MB 培养基得到 50mL 的 SA 活菌悬液; 50mL 的 SA 活菌悬液通过高压灭菌即获得 50mL 的 SA 死菌悬液; 上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤后准确移取 50mL, 即得 50mL 的 SA 无菌滤液。

1.3.2 外源诱导物质的添加: NJ6-3-1 在 25 的 300mL 1/5MB 培养基中培养至对数生长期时, 分别向培养基中

加入以上外源诱导物质: (1) 50mL SA 死菌悬液; (2) 50mL SA 活菌悬液; (3) 50mL SA 无菌滤液。继续于 25 下培养, 直至 NJ6-3-1 进入平台期, 研究其抗菌活性。

1.4 海洋细菌代谢产物的提取

收集细菌 NJ6-3-1 培养液于 5000r/min 离心 10min 除去菌体, 上清液用乙酸乙酯萃取(100mL × 3), 乙酸乙酯相于 37 旋转蒸干, 作为粗提取物备用。

1.5 代谢产物抗菌活性的检测

(1) 参照 Mearns-Spragg A^[18]的纸碟法判断抑菌活性大小, 以病原菌金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 作为抗菌活性的指示菌。(2) 参照 Gibbons 和 Gray^[19] TLC 生物自显影方法, 并加以改进, 以 *S. aureus* 为抗菌活

性的指示菌,跟踪检测是否具有相同的抑菌成分。具体方法如下:用 1mL 乙酸乙酯和甲醇(1:1)的混合溶液溶解粗样品,点载 2 μ L 样品于 3.5cm \times 5cm TLC 硅胶板上,以二氯甲烷:甲醇(10:1, V/V)作为展开剂展层,硅胶板于紫外灯下照射 20min 后,放在营养琼脂培养基表面,其上均匀铺盖一层含有指示菌的熔融营养琼脂培养基(45 $^{\circ}$ C),冰箱中放置过夜,次日于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24h。用 5mg/mL MTT 染色,继续培养 1h,判断抑菌圈情况。

2 结果

2.1 不同培养条件下细菌 NJ6-3-1 的抗菌活性与细胞密度的关系

在细菌 NJ6-3-1 培养至平台期时测定代谢产物的抗菌活性,结果如表 2 所示,不同培养条件下,细菌 NJ6-3-1 的抗菌活性是不同的。抗菌活性以 MB 和 1/2MB 为培养基,25 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 下生长时为最高;而在 1/5MB 中培养的细菌,在 3 种不同温度下培养其代谢产物均无抗菌活性。

表 2 不同培养条件下 NJ6-3-1 代谢产物的抗菌活性及其细胞密度

Table 2 The antibacterial activity of metabolites and cell density of NJ6-3-1 in the different culture conditions

Number	Culture condition (medium, temperature)	Cell density in stationary phase/ OD_{630}	Antibacterial activity (inhibition zone)
1	MB, 20	0.452	++
2	1/2 MB, 20	0.442	++
3	1/5 MB, 20	0.354	-
4	MB, 25	0.479	+++
5	1/2 MB, 25	0.540	+++
6	1/5 MB, 25	0.345	-
7	MB, 30	0.507	+++
8	1/2 MB, 30	0.498	+++
9	1/5 MB, 30	0.395	-

“-”: No inhibition; “+”: Inhibition zone between 1 and 3 mm; “++”: Inhibition zone between 3 and 5 mm; “+++”: Inhibition zone \geq 5 mm

细菌 NJ6-3-1 的抗菌活性与其细胞密度的相关性如图 1 所示,在 20 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 的 1/5 MB 培养基条件下培养的细菌,到达平台期时的细胞密度分别为 OD_{630} =0.354, 0.345 和 0.395, 均小于 0.4, 此时其代谢产物均无抗菌活性;而在其它几种条件下培养的细菌,到达平台期时的细胞密度均大于 0.4 且其代谢产物都有抗菌活性,并且细菌代谢产物的抗菌活性随着细胞密度的升高而增大。这说明细菌 NJ6-3-1 抗菌活性物质的代谢是依赖于细胞密度的,且细菌表现出抗菌活性所需达到的细胞密度的阈值为 OD_{630} =0.4, 由此也可以确定低密度培养条件(即细菌的细胞密度低于阈值而不表现抗菌活性的培养条件)为 1/5 MB 培养基。

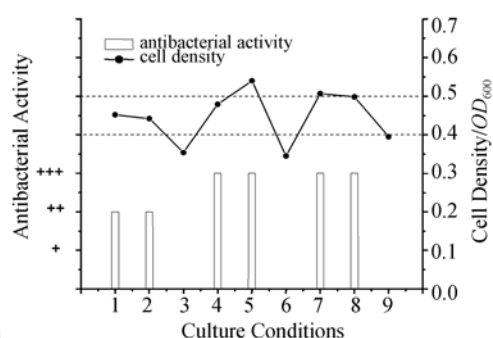


图 1 不同培养条件下细菌 NJ6-3-1 代谢产物的抗菌活性与其细胞密度的关系图

Fig. 1 The relationship figure between the antibacterial activity of metabolites and cell density of bacterium NJ6-3-1 in different culture conditions. 1-9 was the different conditions according to table.2. “-”: Inhibition zone between 1 and 3 mm; “++”: Inhibition zone between 3 and 5 mm; “+++”: Inhibition zone \geq 5 mm

2.2 不同培养条件下细菌抗菌活性物质的代谢情况

通过二氯甲烷:甲醇=10:1 展层, TLC 生物自显影(图 2), 我们可以看到在 9 种不同培养条件下, 细菌 NJ6-3-1 代谢产物的抗菌主成分有多种物质, 在 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C 下细菌代谢产物的抑菌圈数量明显少于在 30 $^{\circ}$ C 条件下细菌代谢产物的抑菌圈数量, 从抑菌圈的位置来

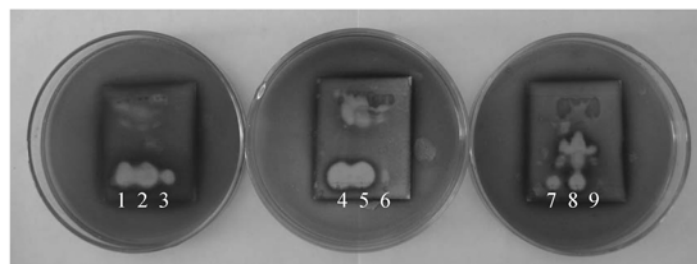


图 2 不同生长条件下 NJ6-3-1 抗菌代谢产物 TLC 生物自显影

Fig. 2 TLC bioautography assay of antibacterial metabolites of NJ6-3-1 in the different culture conditions 1-9 was the different conditions according to table.2, and the test microorganism is *S. aureus*.

看,不同培养条件下获得的代谢产物在 R_f 值为 0.10 处均有一个抑菌圈。20 下,3 种培养基产生的主要抑菌物质均为 R_f 值为 0.10 的物质,且从抑菌斑大小可以看出,1/5 MB 培养基下产生的抑菌物质含量很小;25 下,MB、1/2 MB 培养基下产生的抑菌物质基本相同,除了 R_f 为 0.10 的抑菌物质外,在 R_f 为 0.80 和 0.93 处还有两个抑菌物质,而 1/5 MB 培养基下没有产生这两个抑菌物质;30 下,是 NJ6-3-1 产生抗菌物质最多的培养条件,MB 培养基下产生了 4 个抑菌圈, R_f 值分别为 0.1、0.3、0.5、0.7,1/2 MB 培养基下产生 3 个抑菌物质, R_f 值分别为 0.1、0.3、0.5,1/5 MB 培养基下产生两个抑菌物质, R_f 分别为 0.3、0.5。从这个结果,我们初步判断在低密度条件下产生的不同于高密度条件下的抗菌成分,即 $R_f=0.1$ 处的物质可能是群体感应诱导的抗菌物质。并且我们可以确定低密度培养条件应选择温度为 25 。

生物自显影技术考察的是抑菌圈在 TLC 板上的位置,其大小与点样量及指示菌琼脂层的厚度都有关系,所以不能以大小来比较不同平板中样品抗菌活性的大小,只能根据抑菌斑出现的位置判断其数量和性质。然而从同一平板的测定结果,我们仍能看出细菌在 1/5MB 的培养基中产生的抗菌物质的抑菌圈都是最小的,这一结果与纸碟法测定结果是一致的。

2.3 加入不同外源诱导物质后细菌 NJ6-3-1 抗菌活性产物的代谢情况

在外源诱导实验中,细菌 NJ6-3-1 于低密度培养条件(即 1/5 MB, 25)下培养,在未进入对数生长期前向培养液中添加 3 种外源物质,继续培养至平台期后获得代谢产物的粗提取物,经 TLC 生物自显影检测发现,细菌 NJ6-3-1 在加入 3 种不同物质后其代谢产物的抑菌活性不同(图 3)。

SA 死菌作为外源诱导物质,相对于 SA 活菌和 SA 无菌滤液是对照,因其不引入任何其他代谢物质,所以添加 SA 死菌的 NJ6-3-1 在低密度培养条件下仍保持低细胞密度。而添加 SA 活菌和 SA 无菌滤液也未加入促进细菌 NJ6-3-1 生长的富营养物质,通过 OD_{630} 检测,3 种情况下细菌密度均低于 0.4,因此可认为于低密度培养条件下培养的 NJ6-3-1 在加入 3 种不同物质后仍保持低密度生长。生物自显影结果(图 3)显示,细菌 NJ6-3-1 在添加 SA 死菌悬液后仍不表现抗菌活性;而添加 SA 活菌和 SA 无菌滤液后却表现出抗菌活性,主要产生了 R_f 为 0.1 的抗菌物质。这表明 SA 的代谢产物中存在某种信号分子,能诱导 NJ6-3-1 在不产生抗菌物质的生长条件下代谢抗菌物

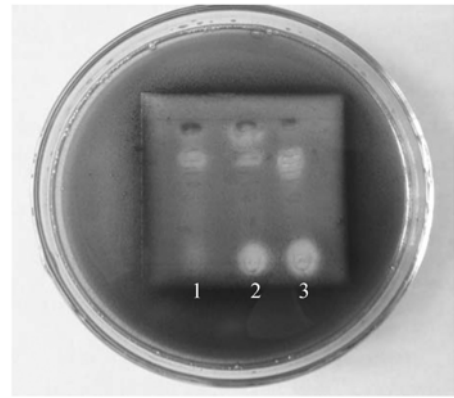


图 3 加入不同外源物质后 NJ6-3-1 抗菌代谢产物 TLC 生物自显影

Fig. 3 TLC bioautography assay of antibacterial metabolites of NJ6-3-1 after adding different substance of SA. 1-3 indicated the antibacterial activity of metabolites of NJ6-3-1 after adding 50mL of SA living suspension, 50mL of SA mortuary suspension and 50mL of SA sterile filtrate respectively.

质,这也证实 NJ6-3-1 抗菌活性产物的代谢受到种间群体感应的调控。

3 讨论

本实验初步验证了海绵共栖细菌 NJ6-3-1 抗菌代谢物的产生依赖于细胞密度即受种内群体感应的调控,并且确定了群体感应的细胞密度阈值 $OD_{630}=0.4$,通过抗菌活性的测定,确定了低密度培养条件:以 1/5 MB 为培养基,25 下培养。通过 TLC 生物自显影实验,确定了细菌 NJ6-3-1 受群体感应调节的抗菌物质为 $R_f=0.1$ 的物质。实验模拟自然竞争胁迫环境,将低密度生长条件下的细菌 NJ6-3-1 与外源细菌 *S. aureus* 混合培养,结果发现外源细菌 *S. aureus* 的代谢物中存在某种信号分子,可以诱导低密度 NJ6-3-1 产生抗菌物质,由此我们认为海洋细菌 NJ6-3-1 同时存在种间群体感应系统调控抗菌物质的代谢。

近年来已有不少学者研究发现有许多细菌种属都能产生杀死或抑制其他致病微生物的化学物质,因而可以被用作“生物调控”^[20~22],而这种“生物调控”仅仅在这些细菌群体的大小达到一个临界阈值密度时才会发生,被归为受群体感应机制控制的细胞密度依赖性基因表达^[23]。已有证据显示种内群体感应的一些微生物产生抗菌次级代谢产物时起着关键作用,包括 *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 代谢产生抗菌物质 Polyketide^[24],乳酸菌产生细菌素^[25],以及植物软腐病的条件致病菌 *Erwinia carotovora* 通过 AHLs 信号控制抗生素 β -lactam carbapenems 的生物

合成^[26]等。此外, Kievit 和 Byer 等也研究发现致黄假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens*), 胡萝卜欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)中抗生素的产生都受到种内群体感应的调控^[21,22, 27-29]。本实验也发现海洋细菌 NJ6-3-1 在代谢抗菌物质时依赖于细胞密度, 初步证实了该菌具有群体感应调控系统。

目前关于细菌代谢受种间群体感应调控的报道较少, Triscehman 等^[33]及英国的 Burgess 研究组^[34]发现将海洋细菌与病原菌混合培养可以促进海洋细菌产生抗生素, 他们认为可能是外源微生物产生的某种信号分子诱导了目标微生物的次级代谢, 但具体的作用机制还不明确。我们通过外源诱导实验也发现外源细菌 *S. aureus* 可释放某些信号分子诱导细菌 NJ6-3-1 在低密度条件下产生抗菌代谢产物, 这说明细菌 NJ6-3-1 也可能同时存在种间群体感应系统调控其抗菌物质的代谢。同时具有种间和种内群体感应系统的细菌已有报道, Bassler^[30-32]等就发现海洋细菌 *Vibrio harveyi* 拥有两个群体感应系统, 其中 AHL 调控种内群体感应系统, AI-2 调控种间群体感应系统。

本研究尚处于群体感应机制调控海洋细菌代谢抗菌物质的初步研究阶段, 还需进一步确定经诱导所产生的抗菌物质, 对抗菌物质进行分离纯化和结构表征, 寻找自诱导信号及外源诱导信号, 这些工作将在后续研究过程中进行报道。

致谢 本文得到中科院海洋所海洋生态与环境重点实验室开放课题、崂山区共建生物医药研发测试中心(LS-05-KJZX-76)项目的资助。

参 考 文 献

- [1] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, 176: 269-275.
- [2] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 165-199.
- [3] Winzer K, Williams P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol*, 2001, 291: 131-143.
- [4] Shih PC, Huang CT. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49: 309-314.
- [5] DeLisa MP, Bentley WE. Bacterial autoinduction: looking outside the cell for new metabolic engineering targets. *Microbial Cell Factories*, 2002, 1(1): 5-9.
- [6] Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 2005, 13: 27-33.
- [7] Williams P. Quorum sensing. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, 296: 57-59.
- [8] Voloshin SA, Kaprelyants AS. Cell-cell interactions in bacterial populations. *Biochemistry*, 2004, 69: 1268-1275.
- [9] Nickerson KW, Atkin AL, Hornby JM, et al. Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 3805-3813.
- [10] Chen H, Fink GR. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev*, 2006, 20: 1150-1161.
- [11] Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest*, 2003, 112: 1291-1299.
- [12] March JC, Bentley WE. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15: 495-502.
- [13] Surette MG, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 1639-1644.
- [14] Bassler BL. How bacteria talk to each other regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2: 582-587.
- [15] Stephen TM, Karina BX, Shawn RC, et al. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Molecular Cell*, 2004, 5: 677-687.
- [16] Mitova M, Tommonaro G, Hentschel U, et al. Exocellular cyclic dipeptides from a ruegeria strain associated with cell cultures of *Suberites domuncula*. *Mar Biotechnol*, 2004, 6: 95-103.
- [17] Zheng L, Yan XJ, Xu JL, et al. *Hymeniacidon perleve* Associated bioactive bacterium *Pseudoalteromonas sp.* NJ6-3-1. *Appl Biochem Microbiol.*, 2005, 41: 29-33.
- [18] Mearns-Spragg A, Bregu M, Boyd KG, et al. Cross-species induction and enhancement of antimicrobial activity produced by epibiotic bacteria from marine algae and invertebrates, after exposure to terrestrial bacteria. *Lett Appl Microbiol*, 1998, 27: 142-146.
- [19] Gibbons S, Gray AI. Isolation by planar chromatography. In: Cannell RJP, Eds. *Natural Products Isolation*. 1998, 209-245.
- [20] Pierson LS, Kepenne VD, Wood DW. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J bacterial*, 1994, 176: 3966-3974.
- [21] Bainton NJ, Stead P, Chhabra SR, et al. N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *J Biochem*, 1992, 288(3): 997-1004.
- [22] Schnider-Keel U, Seematter A, Maurhofer M, et al. Autoinduc-

- tion of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites Salicylate and pyoluteorin. *J Bacteriol*, 2000, 182: 1215–1225.
- [23] 吴红, 宋志军, Niels Hoiby. 细菌与细菌之间的信息交流-革兰氏阴性细菌的 Quorum-Sensing 系统. *自然科学进展(Progress in Natural Science)*, 2003, 13(7): 679–687.
- [24] El-Sayed AK, Hothersall J, Thomas CM. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiology*, 2001, 147: 2127–2139.
- [25] Quadri LE. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 82: 133–145.
- [26] Whitehead NA, Byers JT, Commander P, *et al.* The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, 81: 223–231.
- [27] de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infect Immun*, 2000, 68(9): 4839–4849.
- [28] Byer JT, Lucas C, Salmond GPC, *et al.* Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J Bacteriol*, 2002, 184(4): 1163–1171.
- [29] Pirhonen M, Flego D, Heikinheimo R, *et al.* A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J*, 1993, 12(6): 2467–2476.
- [30] Bassler BL. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, 2002, 109: 421–424.
- [31] Bassler BL, Wright M, Silverman MR. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol*, 1994, 13: 273–286.
- [32] Diane McDougald, Sujatha Srinivasan, Scott A. Rice, *et al.* Signal-mediated cross-talk regulates stress adaptation in *Vibrio* species. *Microbiology*, 2003, 149: 1923–1933.
- [33] Trischman JA, Oeffner RE, Luna MG, *et al.* Competitive induction and enhancement of indole and a diketopiperazine in marine bacteria. *Mar. Biotechnol*, 2004, 6(3): 215–220.
- [34] Yan LM, Boyd KG, Adams DR, *et al.* Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in Bacilli. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(7): 3719–3727.

Antibacterial Activity of Sponge Associated Marine Bacterium *Pseudalteromonas sp.* NJ6-3-1 Regulated by Quorum Sensing

Xiuchun Guo^{1,2}, Li Zheng^{1*}, Zhisong Cui¹, Ping Han¹, Li Tian^{1,2}, Xiaoru Wang¹

¹ Qingdao Key Lab of Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061)

² College of Chemistry and Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042)

Abstract: [Objective] We chose a sponge-associated marine-bacterium *Pseudoalteromonas piscicida* NJ6-3-1 to study whether its antibacterial activity were regulated by quorum sensing. [Methods] We studied the relationship between the antibacterial activity and bacterial density under various growth conditions. To simulate the natural competitive environment, we monitored the antibacterial activity at low cell density when the species were co-cultured with *Staphylococcus aureus*. [Results] Antibacterial activity correlated closely with cell density. Marine bacterium NJ6-3-1 started producing antibacterial compounds when cell density reached the threshold value of $OD_{630}=0.4$. Some signal molecules existing in the metabolites of *S. aureus* could induce the production of antibacterial substance by marine-bacteria NJ6-3-1 even cell density below the required threshold. [Conclusion] The results provide preliminary evidence to support the hypothesis that the antibacterial activity of NJ6-3-1 was regulated by the quorum sensing system of intraspecies and interspecies.

Keywords: quorum sensing; marine bacterium; autoinducer; antibacterial activity

Supported by the National Natural Science Foundation of China(20602009、40776098) and the National High Technology Research and Development Program of China (2007AA09Z435)

*Corresponding author. Tel: +86-532-88961802; Fax: +86-532-88963253; E-mail: zhengli@fio.org.cn

Received: 31 August 2007/ Revised: 15 December 2008