

一株抗硅藻附着的海绵附生菌的 鉴定及发酵条件优化

刘书宇¹, 俞思羽¹, 夏翊腾¹, 靳翠丽^{1,2}, 张立奎^{1,2}, 周晓见^{1,2}

(1. 扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127; 2. 扬州大学海洋科学与技术研究所, 江苏 扬州 225127)

摘要:为了从海绵共附生微生物中寻找天然高效抗污损活性物质, 本文针对前期研究获取的4株具有显著抗硅藻附着的活性菌株进行活性验证和比较, 选出其中最优菌株进行菌种鉴定及发酵条件优化. 比较了活性菌株对小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)、咖啡双眉藻(*Amphora coffeaeformis*)、碎片菱形藻(*Nitzschia frustulum*)附着的抑制活性, 确定菌株UST050418-715为最优菌株; 通过16S rDNA的测序分析, 结合平板的菌落形态和扫描电镜下菌体特征, 鉴定活性菌株UST050418-715为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*). 为优化该菌株的培养条件, 选择了酵母粉、蛋白胨、NaCl、pH值进行四因素三水平的正交实验, 对菌株培养条件进行优化. 发现选择的4个因素对应的菌株发酵产物对硅藻附着的抑制活性大小不同, 影响显著性顺序是酵母粉>蛋白胨>NaCl>pH值, 综合菌株发酵产物活性、粗提物产量和菌株生长情况进行分析, 确定菌株UST050418-715基于海洋2216E培养基的最佳发酵条件为: 蛋白胨含量7.5 g/dm³, 酵母粉含量3 g/dm³, NaCl含量10.45 g/dm³, pH值9.5.

关键词:海洋生物学; 海绵共附生微生物; 抗硅藻附着; 菌株鉴定; 发酵条件优化; 正交试验

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2016. 04. 006

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972(2016)04-0499-08

海洋设施表面上, 海洋生物大量聚集、生长和繁殖, 这种现象一般称为海洋生物污损^[1]. 形成海洋污损生物群落有很多, 硅藻和细菌在初期会附着, 而一些无脊椎和脊椎动物和大型的藻类等在后期的也会附着在海洋设施表面上. 海洋生物污损已经在全球范围内成为军事、工程和水产养殖等方面的技术难题^[2]. 有报道称, 因为海洋生物污损全球每年造成经济损失近200亿美元^[3]. 目前, 已经应用的抗污损的方法中涂料防污技术因涂料中有毒防污剂的可控性释放, 工艺简单、技术成熟、经济有效而广泛应用^[4]. 曾经三丁基锡(Tributyltin, TBT)也是应用最广泛的有毒防污剂, 但在环境中不易降解, 且会通过食物链在生物体内富集, 严重破坏海洋生态安全^[5]. 2001年, 国际海事组织开始禁止含TBT涂料的使用. TBT替代品主要有Irgarol 1051、Diuron、Sea-

Nine 211等有机物和铜、锌等. 但它们对环境产生的影响同样不可忽视, 目前很多国家已经限制了Irgarol 1051和Diuron的使用^[6-7]. 因此, 人们的目光越来越转向无毒高效、环境友好型的防污活性化合物^[8]. 近年来, 使用活性天然产物作为防污涂料的添加剂, 成为开发无毒高效环保防污添加剂的研究热点.

生活在海洋中的动植物, 如珊瑚、海绵等, 通过在体内产生或者向环境释放一些具有特殊生物活性的次级代谢产物, 通过麻醉、排斥和防粘附等作用防御其他生物附着在其体表生长, 使其表面具有防污损的能力^[9-12]. 这些防御化学物质是天然防污添加剂候选品, 具有经济、高效、稳定、环境友好、易生物降解等优良特性^[13]. 其中, 存在于海绵等多孔型生物体内的共附生微生物已经达到很高的密度, 能

收稿日期: 2015-10-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(41306131, 41106113, 41271521); 教育部科学技术研究重点项目资助项目(211065); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2012267, BK20130440); 江苏省教育厅高校自然科学基金资助项目(13KJB180029, 11KJB170011)

作者简介:刘书宇(1991~), 女, 硕士研究生; E-mail: 15252573989@163.com

通讯作者:周晓见, 男, 博士, 教授; E-mail: zhouxiaojian@yzu.edu.cn

接近或超过 1×10^6 个/ cm^3 ^[14-15]. 如今,有研究表明以前人们通过分离海绵中的物质所得到的许多化合物,其真正的生产者不是海绵自身,而是共附生海绵体内的微生物^[16-17]. 海绵共附生微生物的特殊生存环境和种群多样性,造就了其在化合物结构和多样性方面与陆地微生物有显著的不同,所以成为目前天然产物领域中研究新热点^[18-21]. 迄今为止从海洋微生物中已分离出 20 多个抗污损活性天然产物,有脂肪酸类、异丁烯内酯类、环二肽类、二羟基苯酸以及大环内酯类等^[22]. 如 Mary 等(1993)分离了多株 *Vibrio* 属的抗藤壶幼虫附着的活性细菌^[23]. Carola 等(2002)发现 *Pseudoalteromonas* 属中许多能产生抗污损化合物,其中最显著的是 *P. tunicate*, *P. citrea* 和 *P. rubra* 3 种^[24]. Kon-ya 等(1994)从海绵 *Halichondria okadai* 中分离出细菌 *Alteromonas* sp., 能有效抑制纹藤壶附着^[25].

在生物污损过程的初期阶段,主要是硅藻和细菌附着在海洋新表面. 其中硅藻有很快的附着速度,能在光能所能到达的海水中迅速繁殖;在附着之后会分泌胞外多聚物,不仅加固自身的附着,还帮助小颗粒的有机物或生物附着,从而便于后续的大型污损生物最终在该新表面形成复杂和巨大的群落^[26]. 因此,一旦成功抑制硅藻附着,不仅生物膜的形成会得到防止,巨大密集的污损生物群落的形成也会得到推迟或者阻止.

本研究根据前期工作已经筛选出有抗硅藻附着活性的海绵附生细菌,从中选取具有显著抗硅藻附着活性的 4 株菌株进行活性验证和比较,选出其中活性高又稳定的菌株,对其进行鉴定和发酵条件优化.

1 材料与方法

1.1 细菌及测试硅藻

4 株菌株 UST050418-315、UST050418-694、UST050418-708 和 UST050418-715 来源于香港科技大学海岸海洋实验室的海绵附生微生物库(Coastal Marine Laboratory of the Hong Kong University of Science and Technology, CML of HKUST). 以上菌株经本实验室初筛具有抗硅藻活性^[27-28].

测试硅藻有 3 种:小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*),由中国海洋大学水产学院提供;碎片菱形藻(*Nitzschia frustulum*)和咖啡双眉藻(*Amphora coffeaeformis*)均由 CML of HKUST 提供.

细菌基础培养基:5.0 g/ dm^3 蛋白胨,1.0 g/ dm^3 酵母膏,0.1 g/ dm^3 柠檬酸铁,19.45 g/ dm^3 NaCl, 5.9 g/ dm^3 MgCl_2 , 3.24 g/ dm^3 MgSO_4 , 1.8 g/ dm^3

CaCl_2 , 0.55 g/ dm^3 KCl, pH 值为 7.4 ~ 7.6, 琼脂 15 ~ 20 g/ dm^3 . 硅藻培养液采用 f/2 配方^[29].

1.2 细菌培养及粗提物的提取

将保存于 -80°C 超低温冰箱中的菌株常温解冻后,接入装有培养基试管中, 25°C 下 130 r/min 恒温振荡培养 48 h 后进行平板划线. 挑取单菌落重复活化培养 3 次后接种比例 5% (体积分数) 进行液体培养基逐级放大. 在 28°C 下 130 r/min 恒温振荡培养 3.5 d 后,在菌液中加入等体积的乙酸乙酯(含 5% 丙酮)进行振荡萃取分离,收集上层有机相,一共萃取 3 次. 合并有机相,在 37°C 下用旋转蒸发仪进行减压浓缩,用冷冻离心浓缩仪冻干,称重^[30].

1.3 抗硅藻附着活性验证和比较

按照俞思羽等(2015)方法进行实验^[31]. 将粗提物溶解于二甲基亚砜(DMSO)中配制成 60 mg/ cm^3 母液. 取 50 cm^3 处于对数增长期的硅藻培养液并混匀,在 4 000 r/min 的转速下离心 10 min 后将上清液倒出,再加入同等体积的人工海水再混匀、离心,再用同样的方法重复混匀、并且离心 2 次. 将粗提物母液用人工海水稀释至 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 后取 0.5 cm^3 加入 24 孔板测试孔中,并加入 0.5 cm^3 调整密度后的硅藻($1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 个/ cm^3),使得粗提物的测试浓度为 100 ppm,平行 3 组. 以 DMSO 代替母液作为空白对照. 24 孔板经 25°C 光照培养 24 h 后,晃动洗去未附着或附着不牢的硅藻,弃去培养液. 注入 1 cm^3 人工海水,重复洗涤 3 次. 洗涤完成后,放入显微镜下观察孔底附着的藻细胞个数. 抑制率按以下公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{实验组附着藻细胞数}}{\text{对照组附着藻细胞数}}) \times 100$$

1.4 活性菌株鉴定方法

1.4.1 形态学特征 将菌株 UST050418-715 平板在 25°C 下恒温培养 2 d,并观察菌落的形态.

1.4.2 扫描电镜分析 按照谢家仪等(2005)^[32]的方法进行菌株的扫描电镜分析. 具体步骤如下:取已经培养 36 h 的菌液,于 4 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,重复洗涤 3 次. 加入 2.5% 戊二醛在 4°C 冰箱中静置 2 h 对菌株进行前固定,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清;再用 1% OsO_4 对菌株进行后固定,用 0.1 mol/ dm^3 PBS 清洗 3 ~ 4 次(每次 15 min),离心,弃上清,超纯水洗涤 3 次. 依次用 50%、70%、80%、90% 乙醇脱水各 1 次,再用 100% 乙醇脱水 2 次(每次 30 min). 然后用 1:1 的乙酸戊酯:乙醇、纯戊酯依次置换 30 min. 在 CO_2 临界点进行干燥,粘样后进行离子溅射金,再利用扫描电镜进行观察.

1.4.3 16S rDNA 测序分析 按照 Moreno 等 (2002)^[33]的方法对活性菌株 UST050418-715 进行 16S rDNA 测序分析. 使用的引物为: 7f (5'-CA-GAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 1540r (5'-AGGAGGT-GATCCAGCCGCA-3').

1.5 活性菌株发酵条件优化

根据前期研究结果筛选出的 4 个重要因素 (pH 值、蛋白胨、酵母粉、NaCl), 设置 4 个因素 × 3 个水平 × 3 重复的正交试验, 具体试验设置见表 1^[28].

表 1 菌株培养条件正交试验 $L_9(3^4)$ 设置
Tab.1 Orthogonal test design[$L_9(3^4)$] for the strain culture conditions

水平	因素			
	A:蛋白胨含量/g · dm ⁻³	B:酵母粉含量/g · dm ⁻³	C:NaCl 含量/g · dm ⁻³	D:pH 值
1	2.5	1.5	10.45	5.5
2	5.0	3.0	19.45	7.5
3	7.5	4.5	28.45	9.5

2 结果与分析

2.1 菌株的活性验证

通过实验室前期筛选工作, 已经得到若干有抗硅藻活性的菌株^[27-28]. 本实验选取其中编号为

UST050418-315、UST050418-694、UST050418-708 和 UST050418-715 的 4 株菌株, 进行进一步的活性验证和比较, 以确定抗硅藻附着活性最优菌株, 实验结果见表 2.

表 2 菌株粗提物的抗硅藻附着活性
Tab.2 Anti-settlement activities against diatoms by strains' crude extracts

菌株	抑制率/%			平均抑制率/%
	<i>Nitzschia closterium</i>	<i>Amphora coffeaeformis</i>	<i>Nitzschia frustulum</i>	
UST050418-315	84.5	90.2	99.2	91.30 ± 7.41
UST050418-694	86.8	91.3	99.2	92.40 ± 6.28
UST050418-708	91.7	88.2	99.2	93.00 ± 5.62
UST050418-715	90.9	90.4	95.1	92.10 ± 2.58

如表 2 所示, 菌株 UST050418-715 对 3 种硅藻的附着现象均有较强的抑制作用, 其抑制率均 ≥ 90.0%, 平均抑制率达 92.1%; 菌株 UST050418-708 对 3 种藻的平均抑制率最高, 但是对咖啡双眉藻 (*Amphora coffeaeformis*) 的抑制率小于 90.0%. 后续实验发现, 从 UST050418-715 菌株中提取的粗提物活性较其它 2 种菌株要明显, 且在随培养时间延长活性降低速度变慢. 所以, 本研究选择菌株 UST050418-715 作为进一步的研究对象.

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态学观察 培养结果显示, 经改良的 2216E 固体培养基适宜菌株 UST050418-715 生长, 28℃ 下培养 48 h 即可形成比较明显的菌落, 其中单菌落颜色呈乳白色且不透明, 形状为近圆形, 边缘整齐, 菌落表面光滑湿润(图 1).

对菌株 UST050418-715 进行场发射扫描电子显微镜 (FE-SEM) 观察, 结果如图 2 所示. 从场电镜照



图 1 菌株 UST050418-715 的平板照片
Fig.1 Strain colonies photograph of UST050418-715 on culture dish

片可以看出, 菌株 UST050418-715 的细胞呈条形短

杆状,圆末端,长为 0.9 ~ 1.0 μm,宽为 0.3 ~ 0.4 μm,长宽比约为 3:1. 菌体分布密集,纵横交错,排

列没有规律.

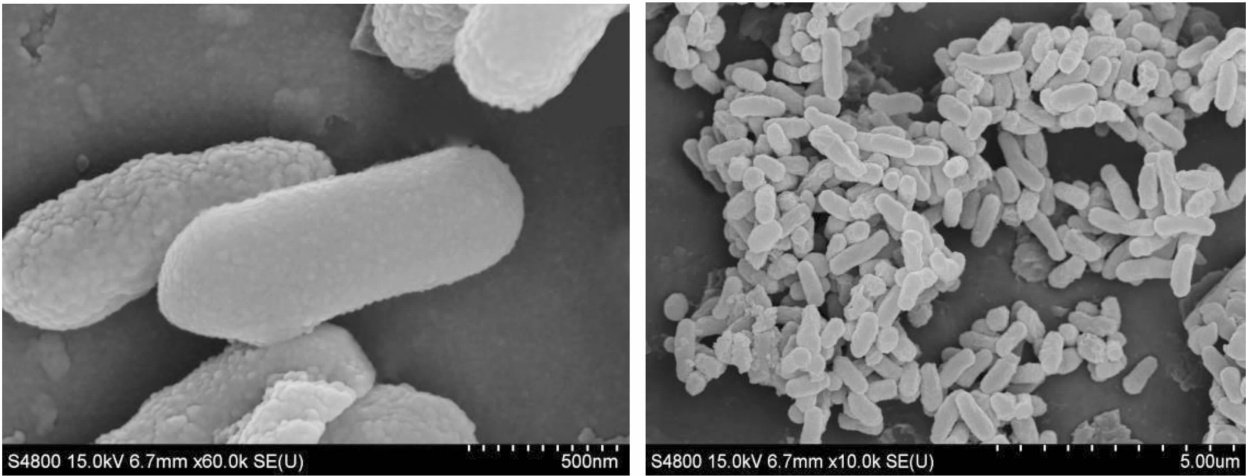


图2 菌 UST050418-715 的场发射扫描电子显微镜照片
Fig. 2 Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM) photograph of strain UST050418-715

2.2.2 16S rDNA 序列测定 16S rDNA 基因序列经分析,得到的有效长度为 1 472 bp. 将该 16S rDNA 序列放入 GenBank 中进行同源性检索,选取了 11 株

与菌株 UST050418-715 亲缘关系最接近的菌株,采用 Blast 软件进行同源性比较,用 MEGA5.0 软件构建系统发育树(图 3).

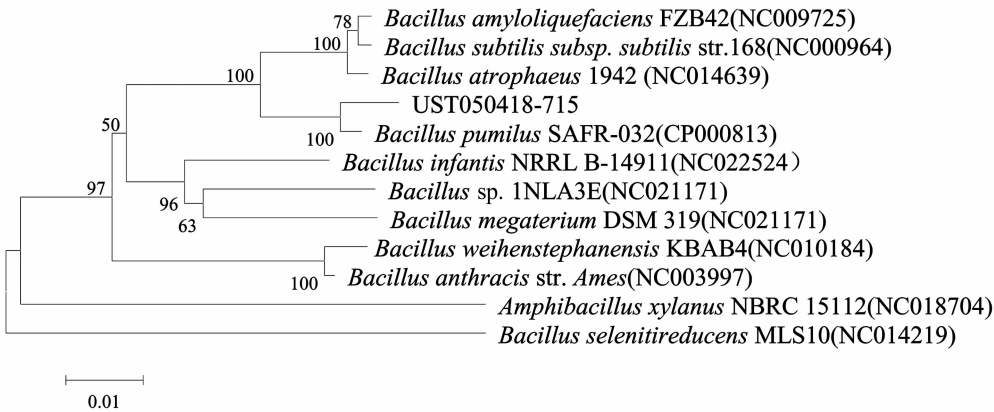


图3 菌株 UST050418-715 基于 16S rDNA 基因序列构建的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences for strain UST050418-715

从系统发育树可看出,菌株 UST050418-715 和短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* SAFR-032 同源性达 99% 以上(图中显示为 100%),再结合其形态特征和菌落生长特征,鉴定 UST050418-715 为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)的一个菌株.

2.3 活性菌株培养条件优化

根据文章前面活性验证结果,将以抗小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*) 附着活性为目标,以 2216E 培养基为基础,对前期研究筛选的 4 个重要因素(pH 值、蛋白胨、酵母粉、NaCl^[28])进行 4 因素 3 水平 3 重复试验.

实验结果如表 3 所示,在设置的 9 组培养条件下,菌株 UST050418-715 均表现出了一定的抗附着活性,但是各组活性有一定的差异. 分别计算蛋白胨含量、酵母粉含量、NaCl 含量和 pH 值这 4 个因素的水平总值(*K* 值),水平均值(*k* 值)和极差(*R*),然后进行比较. 从极差 *R* 值分析,所选取的 4 个因素对菌株 UST050418-715 粗提物活性的影响的强弱顺序为:酵母粉(B) > 蛋白胨(A) > NaCl(C) > pH 值(D).

方差分析结果见表 4. 4 个因素对实验结果均有显著影响,应为影响抑制活性的主要因子,说明根据前期研究所确定的因素选择正确.

表 3 菌株培养基成分优化正交试验结果 $L_9(3^4)$

Tab. 3 Result of orthogonal test $L_9(3^4)$ on the culture medium optimization

项目	蛋白胨含量 /g · dm ⁻³	酵母粉含量 /g · dm ⁻³	NaCl 含量 /g · dm ⁻³	pH 值	抑制活性 /%			T_i
	A	B	C	D	1	2	3	
1	A ₁ (2.5)	B ₁ (1.5)	C ₁ (10.45)	D ₁ (5.5)	74.82	67.83	76.92	219.57
2	A ₁ (2.5)	B ₂ (3.0)	C ₂ (19.45)	D ₂ (7.5)	75.87	70.28	70.97	217.12
3	A ₁ (2.5)	B ₃ (4.5)	C ₃ (28.45)	D ₃ (9.5)	76.22	72.48	65.60	214.30
4	A ₂ (5.0)	B ₁ (1.5)	C ₂ (19.45)	D ₃ (9.5)	64.68	67.43	65.60	197.71
5	A ₂ (5.0)	B ₂ (3.0)	C ₃ (28.45)	D ₁ (5.5)	66.51	75.69	83.74	225.94
6	A ₂ (5.0)	B ₃ (4.5)	C ₁ (10.45)	D ₂ (7.5)	70.55	70.08	74.85	215.48
7	A ₃ (7.5)	B ₁ (1.5)	C ₃ (28.45)	D ₂ (7.5)	77.61	63.80	67.18	208.59
8	A ₃ (7.5)	B ₂ (3.0)	C ₁ (10.45)	D ₃ (9.5)	80.96	87.87	91.96	260.79
9	A ₃ (7.5)	B ₃ (4.5)	C ₂ (19.45)	D ₁ (5.5)	70.24	82.84	73.19	226.27
K_1	650.99	625.87	695.84	671.78	$T = 1\ 985.77$			
K_2	639.13	703.85	641.10	641.19				
K_3	695.65	656.05	648.83	672.80				
k_1	217.00	208.62	231.95	223.93				
k_2	213.04	234.62	213.70	213.73				
k_3	231.88	218.68	216.28	224.27				
R	18.84	26.00	18.25	10.54				

注: K_1 、 K_2 和 K_3 表示水平总值, k_1 、 k_2 和 k_3 表示水平均值, R 为极差, T_i 表示实验组抑制活性之和, T 表示抑制活性总和

表 4 菌株 UST050418-715 正交试验方差分析

Tab. 4 Variance analysis for orthogonal test $L_9(3^4)$ of strain UST050418-715

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
因素 A(蛋白胨)	197.40	2	98.70	23.556	* *
因素 B(酵母粉)	343.58	2	171.79	41.000	* *
因素 C(NaCl)	195.04	2	97.52	23.274	* *
因素 D(pH 值)	71.70	2	35.85	8.556	* *
误差	75.42	18	4.19		
总合	883.14	26			

注: “* *”代表 4 个因素对实验结果的影响是极显著的

对各组合抗硅藻附着活性平均值进行 Duncan 法多重比较 ($p = 0.1$), 结果见表 5。从表中可以看出, 组合 8 的活性最高; 其次是组合 9、5; 组合 1、6、2、3、7 的活性没有显著性差异; 组合 4 活性则相对最差。

分析各组合发酵条件下的粗提物产量, 对各组合粗提物产量用 Duncan 法进行多重比较 ($p = 0.05$), 结果见图 4。从图中可以看出, 组合 9 的产量最高; 其次是组合 7、8; 组合 2、3、4、5、6 的产量没有显著性差异; 组合 1 的产量相对最低。

表 5 正交试验中的抗硅藻附着活性 Duncan 法多重比较

Tab.5 Multiple comparison analysis of orthogonal test $L_9(3^4)$

组合编号	<i>Nitzschia closterium</i> 抑制率/%		
	1	2	3
8	86.90		
9		75.40	
5		75.30	
1		73.17	73.17
6		72.50	72.50
2		72.40	72.40
3		71.47	71.47
7		69.53	69.53
4			65.90

注:Duncan 法多重比较表格中 1、2、3 列表示数据从大到小排列,不同列数据差异显著,同列数据之间差异不显著($p=0.1$)

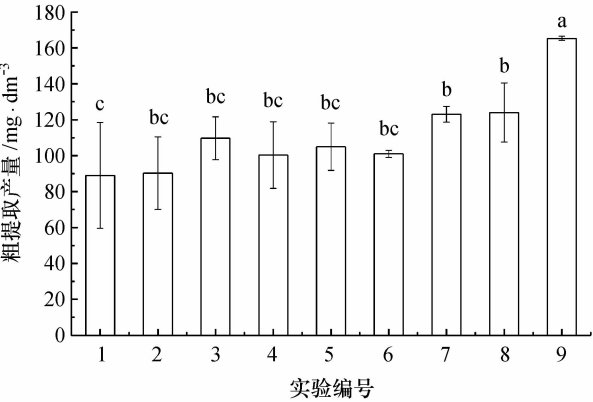


图 4 不同培养条件下的粗提物产量
Fig.4 Production of crude extract in different culture conditions

柱上相同字母表示其经 Duncan 法多重比较,两组数据差异不显著;反之则表示差异显著($p=0.05$)

各组合下菌株 UST050418-715 的生长情况如图 5 所示,通过测得发酵完后菌液在 630 nm 下的吸光度值,来反应菌株细胞的生长情况.可以看出组合 9 的菌株生长情况最好,其次是组合 8,组合 5、6、7 没有显著性差异,组合 1 的生长情况相对最差.

寻找最佳发酵条件,是为了得到活性最好的细菌粗提物,也是为了得到最高的粗提物产量,当 3 个指标结果不同时,应优先考虑活性高的组合.根据以上分析结果,组合 8 下的菌株 UST050418-715 活性最好,其次是组合 9、5;组合 9 的产量最高,其次是组合 7、8;组合 9 的菌株生长情况最好,其次是组合 8.因此,选取活性最好且产量和生长情况较好的组合 8,即 $A_3B_2C_1D_3$ 为最佳发酵条件:蛋白胨含量为

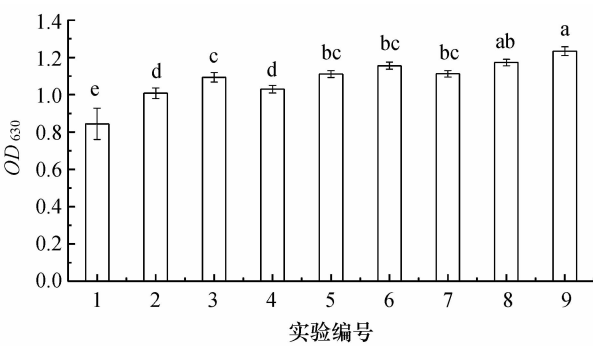


图 5 不同实验组合下菌液的吸光度值
Fig.5 Absorbance of bacterial suspension in different test battery

柱上相同字母表示其经 Duncan 法多重比较,两组数据差异不明显;反之则表示差异显著($p=0.05$)

7.5 g/dm³, 酵母粉含量为 3 g/dm³, NaCl 含量为 10.45 g/dm³, pH 值为 9.5.

3 讨论

海洋微生物所生存的特殊环境造成了其物种、基因组成和生态功能等多方面的多样性.这种海洋环境因为具有高压、低营养、低温(特别是深海)、无光照或光照强度低、以及局部高温等特点,而使海洋微生物产生结构独特、生物活性多样性的代谢产物,这些化合物是很良好的天然抗污损物质,具有极为重要的理论意义和实践价值^[34].

通过实验前期筛选工作,已经从海绵共附生生物中获得了多株抗硅藻附着的活性菌株^[27-28].本文从中选取 4 株具有显著抗硅藻附着的活性菌株进行活性验证.结果显示,这 4 株测试细菌均对 3 种硅藻(小新月菱形藻、咖啡双眉藻、碎片菱形藻)具有明显的抑制作用(平均抑制率 >90.0%).说明海绵共附生微生物是抑制附着硅藻作用的天然产物的良好来源.这 4 种菌株中,UST050418-715 对 3 种硅藻的附着现象均有较强的抑制作用,其抑制率均 ≥ 90.0%,平均抑制率达 92.1%.后续实验也发现该菌株中提取的粗提物活性较为明显,且随培养时间延长活性较为稳定.因此,本文选择 UST050418-715 菌株进行菌种的鉴定及发酵条件优化的工作.稳定的来源和产量是许多动物来源和植物来源的新型抗污损化合物投入实际应用、满足市场需求的一个难以跨越的限制.而微生物则可以在较短的时间内通过规模发酵,保证充足的活性物质来源,并便于利用现有的发酵工程技术和分离手段实现工业化生产^[35].因此,具有抗污损活性的微生物种质资源变得越来越重要,它们的发现将是抗污损技术行业重

要的争夺点。

而在发酵工程中,培养环境条件的变化导致微生物代谢产物差异显著;具体的影响因素很多,包括培养条件、培养方式和培养基成分等多个方面。确定最优的培养模式,是微生物发酵获得大量高活性的目标化合物的重要前提。根据前期研究结果筛选出的4个因素(pH值、蛋白胨、酵母粉、NaCl)进行发酵条件优化,这四种因素对发酵结果影响从大到小

的顺序依次:酵母粉>蛋白胨>NaCl>pH值。由此可知,氮源对该菌的发酵效果影响较大,也对后续的化合物分离过程具有一定的指导意义。

另外,在确定最佳培养条件时,不应仅局限于发酵产物活性,而且应结合粗提物产量和菌株自身增殖生长情况进行综合分析,才能为目标化合物的获取提供稳定的保障,为规模化发酵及后续活性物质分离纯化提供有力的支撑。

参考文献:

- [1] Huang Z G. Marine fouling and its prevention[M]. 2. Beijing: Ocean Press, 2008: 219-240.
- [2] Brantley S E, Molinski T F, Preston C M, et al. Brominated acetylenic fatty acids from *Xestospongia* sp., a marine sponge-bacteria association[J]. Tetrachedron, 1995, 51: 7 667-7 672.
- [3] Xu Y, He H, Schulz S, et al. Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 1 331-1 336.
- [4] 黄运涛, 彭乔. 海洋生物污损的防治方法及研究进展[J]. 全面腐蚀控制, 2004, 18(1): 3-5.
- [5] 陈美玲, 丁凡, 高宏, 等. 环境友好型海洋船舶防污涂料的研究进展[J]. 材料保护, 2010(7): 47-49.
- [6] Anita G J B, Sascha B S, Willem H P. Impact of the antifouling agent Irgarol 1051 on marine phytoplankton species [J]. Journal of Sea Research, 2009, 61: 133-139.
- [7] Chambers L D, Stokes K R, Walsh F C. Modern approaches to marine antifouling coatings[J]. Surface and Coatings Technology, 2006, 201: 3 642-3 652.
- [8] 张洪荣, 原培胜. 船舶防污技术[J]. 船舶科学技术, 2006, 28(1): 10-14.
- [9] Newman D J, Cragg G M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years[J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(3): 461-477.
- [10] 王长云, 耿美玉, 管华诗. 海洋药物研究进展与发展趋势[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(3): 278-282.
- [11] Proksch P, Edrafa R A, Ebel R. Drug from the sea-current status and microbiological implications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(2/3): 125-134.
- [12] 黄奕, 李志勇. 海绵及其共附生微生物的活性物质与化学防御[J]. 生物技术通报, 2006(1): 13-17.
- [13] Denys R, Steinberg P D, Willemsen P, et al. Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays[J]. Biofouling, 1995, 8: 259-271.
- [14] 查鑫垚, 靳翠丽, 陈毓迢, 等. 海绵附生微生物中具有 α 葡萄糖苷酶抑制活性菌株的筛选[J]. 台湾海峡, 2012, 31(3): 380-386.
- [15] 查鑫垚. 具有 α 葡萄糖苷酶抑制活性的海绵共附生微生物及其活性产物研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [16] Fabbri D, Adamiano A, Falini G, et al. Analytical pyrolysis of dipeptides containing proline and amino acids with polar side chains. Novel 2,5-diketopiperazine markers in the pyrolysates of proteins[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2012, 95: 145-155.
- [17] Luis S M, Ballesteros J, Gutierrez M. Antibacterial constituents from the octocoral-associated bacterium *Pseudoalteromonas* sp. [J]. Revista Latinoamericana de Quimica, 2011, 39(1/2): 75-83.
- [18] Dash S, Jin C L, Lee O O, et al. Antibacterial and antilarval-settlement potential and metabolite profiles of novel sponge-associated marine bacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36: 1 047-1 056.
- [19] Lee O O, Lau S C K, Tsoi M M Y, et al. *Gillisia myxillae* sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from the marine sponge *Myxilla incrustans*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 56: 1 759-1 799.
- [20] Lee O O, Tsoi M M Y, Li X C, et al. *Thalassococcus halodurans* gen. nov., sp. nov., a novel halotolerant member of the *Roseobacter* clade isolated from the marine sponge *Halichondria panicea* at Friday Harbor, USA[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57: 1 919-1 924.
- [21] Qian P Y, Xu Y, Fusetani N. Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives[J]. Biofouling, 2010, 26(2): 223-234.

- [22] 钱培元. 抗污损海洋天然产物的开发及其作用机理研究进展[J]. 生命科学, 2012, 24(9): 1 026-1 034.
- [23] Mary A S R, Mary V S R, Rettschof D, et al. Bacterial-barnacle interaction: potential using juncellins and antibiotics to alter structure of bacterial communities[J]. Journal of Chemical Ecology, 1993, 19: 2 155-2 164.
- [24] Carola H, Suhelen E, Ashley F, et al. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 41(1): 47-58.
- [25] Kon-ya K, Shimidzu N, Miki W, et al. Indole derivatives as potent inhibitors of larval settlement by the barnacle, *Balanus amphitrite*[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1994, 58(12): 2 178-2 181.
- [26] Leflaive J, Ten-Hage L. Effects of 2E, 4E-Decadienal on motility and aggregation of diatoms and on biofilm formation[J]. Microbiology Ecology, 2011, 61: 363-373.
- [27] 忻夏莹, 靳翠丽, 周晓见. 抗硅藻附着活性细菌的筛选、鉴定与发酵条件优化[J]. 海洋科学, 2013, 37(10): 90-96.
- [28] 靳翠丽. 海绵附着微生物对底栖硅藻附着性能的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [29] 田治立, 王长海, 于贞, 等. 纤细角毛硅藻培养条件优化[J]. 海洋科学, 2005, 29(2): 5-7.
- [30] Yang L H. Antifouling compounds from the marine sponge *Acanthella cavernosa* and its associated microbes[D]. Hong Kong: Hong Kong University of Science and Technology, 2006.
- [31] 俞思羽. 一株海绵共生芽孢杆菌的抗硅藻附着活性物质的分离与鉴定[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [32] 谢家仪, 董光军, 刘振英. 扫描电镜的微生物样品制备方法[J]. 电子显微学报, 2005, 24(4): 440.
- [33] Moreno C, Romero J, Espejo R T. Polymorphism in repeated 16S rDNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*[J]. Microbiology, 2002, 148(4): 1 233-1 239.
- [34] 忻夏莹. 抗硅藻附着活性细菌的筛选、鉴定与发酵条件优化[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [35] Lau S C K, Thiagarajan V, Qian P Y. The bioactivity of bacterial isolates in Hong Kong waters for the inhibition of barnacle (*Balanus amphitrite* Darwin) settlement[J]. Experimental Marine Biology Ecology, 2003, 282(1/2): 43-60.

Identification and culture conditions optimization for an active sponge-associated bacterium against diatom attachment

LIU Shu-yu¹, YU Si-yu², XIA Yi-teng¹, JIN Cui-li^{1,2}, ZHANG Li-kui^{1,2}, ZHOU Xiao-jian^{1,2}

(1. College of Environmental Science & Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;

2. Marine Science & Technology Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: To search for natural and efficient anti-fouling active substances, 4 sponge-associated microorganisms, which were preliminarily found with strong activities of restraining diatom attachment, were selected to verify and compare their activities. The most active bacterial strain of UST050418-715 was selected based on the activities against the settlement of 3 tested diatoms, including *Nitzschia closterium*, *Amphora coffeaeformis*, and *Nitzschia frustulum*. And the strain UST050418-715 was identified as *Bacillus pumilus* based on the 16S rDNA sequence analysis, cell morphology and colony characteristics. To optimize the cultivation conditions of strain UST050418-715, orthogonal tests were carried out with 4 factors (yeast extract concentration, peptone concentration, NaCl concentration and pH) and 3 levels. The 4 factors all affected the anti-settlement activities of fermentation products, and interferential efficiencies of which are yeast concentration > peptone concentration > NaCl concentration > pH. Combined the results of orthogonal tests with crude exact yields and growth of the strain, the optimum culture conditions of UST050418-715 were concluded as marine 2216E medium containing 7.5 g/dm³ peptone, 3 g/dm³ yeast extract, 10.45 g/dm³ NaCl, and pH 9.5.

Key words: marine biology; sponge-associated microbes; restraining diatom settlement; strain identification; optimization of culture conditions; orthogonal test

DOI:10.3969/J. ISSN.2095-4972.2016.04.006