



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115161232 A

(43) 申请公布日 2022.10.11

(21) 申请号 202210742392.3

(22) 申请日 2022.06.27

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M 2022435 2022.04.20

(71) 申请人 中国科学院南海海洋研究所

地址 511458 广东省广州市南沙区海滨路  
1119号

申请人 南方海洋科学与工程广东省实验室  
(广州)

(72) 发明人 杨清松 张文谦 董俊德 杨斌  
杨冰 凌娟 张颖 李洁 龙丽娟  
张偲

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限  
公司 44001

专利代理师 刘明星

(51) Int. Cl.

G12N 1/20 (2006.01)

G12P 7/22 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 35/741 (2015.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页  
序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

一株珊瑚来源产群体感应抑制剂的假交替  
单胞菌株SCSIO 43740及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株珊瑚来源产群体感应抑制剂的假交替单胞菌株SCSIO43740及其应用,属于微生物技术领域。本发明假交替单胞菌(Pseudoalteromonaspiscicida) SCSIO43740,保藏编号为:CCTCCNO:M2022435。该菌分离自中国海南省三亚鹿回头岸礁区的鹿角杯形珊瑚(Pocilloporadamicornis)中,其代谢产物中含有群体感应抑制剂2,4-二叔丁基苯酚(C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O),对细菌群体感应有显著的抑制效应,菌株SCSIO43740对热胁迫下鹿角杯形珊瑚的光合生理健康有一定改善作用,可应用于珊瑚人工养殖以及珊瑚礁生态修复和保护工程中。



1. 一株假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas piscicida*) SCSIO 43740, 其保藏编号为: CCTCC NO:M 2022435。
2. 一种制剂, 其特征在于, 含有权利要求1所述的假交替单胞菌SCSIO 43740和/或其代谢产物。
3. 权利要求1所述的假交替单胞菌SCSIO 43740或权利要求2所述的制剂在制备群体感应抑制剂、抑制群体感应或调理造礁石珊瑚健康状态中的应用。
4. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述的群体感应抑制剂是2,4-二叔丁基苯酚。
5. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述的调理造礁石珊瑚健康状态包括缓解珊瑚白化和/或病害防治。
6. 一种2,4-二叔丁基苯酚的制备方法, 其特征在于, 是先培养假交替单胞菌得到发酵液, 再对发酵液中的代谢产物进行分离纯化获得2,4-二叔丁基苯酚。
7. 根据权利要求6所述的制备方法, 其特征在于, 所述的培养, 是将假交替单胞菌接种于2216E液体培养基培养获得假交替单胞菌发酵液。
8. 根据权利要求6所述的制备方法, 其特征在于, 所述的分离纯化, 包括以下步骤: 向发酵液中加入乙酸乙酯, 而后进行超声波破碎和萃取; 分液保留上层有机相, 并对样品进行浓缩至干; 完全旋蒸干后, 使用甲醇溶解粗提物; 利用正相硅胶柱对样品进行初步分离, 对甲醇粗提物中加入硅胶进行拌样, 风干后填入正相硅胶柱中, 以石油醚和乙酸乙酯为流动相进行层析, 体积比为1:0、50:1、25:1、9:1、6:1、3:1、1:1、1:3, 最后使用100%甲醇进行冲洗, 目标活性产物2,4-二叔丁基苯酚在石油醚:乙酸乙酯=25:1的浓度洗脱中分离得到。
9. 根据权利要求6-8任一项所述的制备方法, 其特征在于, 所述的假交替单胞菌为假交替单胞菌SCSIO 43740, 其保藏编号为:CCTCC NO:M 2022435。
10. 2,4-二叔丁基苯酚在制备抑制群体感应制剂中的应用。

## 一株珊瑚来源产群体感应抑制剂的假交替单胞菌株SCSI0 43740及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,具体涉及一株珊瑚来源产群体感应抑制剂的假交替单胞菌株SCSI0 43740及其应用。

### 背景技术

[0002] 珊瑚礁生态系统被誉为海洋中的热带雨林,它们是地球上最具生产力和生物多样性的生态系统之一,具有重要的生态服务功能和社会经济价值(Mumby等,2008)。截至2020年,全球已发现超过2000种珊瑚。尽管如此,在国际自然保护联盟红色名录上,已有200多种珊瑚被列为濒临灭绝的物种(IUCN,2021)。工业化进程导致的温室效应和人类活动加快了珊瑚礁生态系统退化的脚步。海水升温引发的大规模的珊瑚白化是造成珊瑚礁生态系统退化的重要原因(Hoegh-Guldberg,1999)。除了珊瑚热白化外,还存在黑带病、黑斑病、白带病、白色瘟疫、白斑病、黄带病等多种疾病对珊瑚的生存造成威胁。

[0003] 珊瑚礁生态保护方式正经历快速发展阶段,从减少人为影响的被动恢复模式过渡到以人工干预的主动恢复模式。珊瑚礁主动修复模式主要包括珊瑚移植、幼虫辅助工程和微生物工程等方法。珊瑚共附生微生物具有多种益生功能,因此利用微生物工程方法进行珊瑚礁修复和保护有着巨大的潜力。群体感应(QS,quorum sensing)是某些细菌通过多种信号分子的级联控制在细菌种群水平上进行基因和行为调控的一种化学交流形式。珊瑚的某些机会致病菌可以通过群体感应机制参与影响珊瑚的疾病进程。群体感应抑制剂(QSI,quorum sensing inhibitor)是具有群体猝灭(QQ,quorum quenching)效应的化合物,群体猝灭是微生物抑制群体感应的重要机制。运用群体猝灭菌株或群体感应抑制剂对珊瑚中的机会致病菌的群体感应过程进行抑制,可能有助于珊瑚微生物病害的防治和健康调理。因此,通过分离获得产群体感应抑制剂的珊瑚共附生菌株,检测其群体感应抑制效应,并验证其对珊瑚健康的促进效应,可以为珊瑚礁生态修复和保护提供新工具。

### 发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明提供了一株假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*) SCSI043740。所述的假交替单胞菌SCSI0 43740分离自鹿角杯形珊瑚,可以用2216E液体培养基进行培养。本发明的假交替单胞菌SCSI0 43740及其产生的微生物群体感应抑制剂对模式菌紫色杆菌CV026的群体感应具有高效的抑制作用。

[0005] 本发明的第一个目的是提供一株假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas piscicida*) SCSI043740,其保藏编号为:CCTCC NO:M 2022435。

[0006] 通过在升温条件下向鹿角杯形珊瑚添加假交替单胞菌SCSI0 43740,并对其光化学效率、叶绿素a含量和虫黄藻密度等生理指标进行测定,评估菌剂对珊瑚的益生效应。结果发现在升温条件下,相比对照组,添加假交替单胞菌SCSI0 43740显著改善珊瑚光化学效率、叶绿素a含量和虫黄藻密度等光合生理指标。证实假交替单胞菌SCSI0 43740对鹿角杯

形珊瑚具有益生效应。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种微生物制剂,包含上述假交替单胞菌SCSIO 43740和/或其代谢产物。

[0008] 优选地,所述的代谢产物为2,4-二叔丁基苯酚(C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O)。

[0009] 本发明的第三个目的是提供上述的假交替单胞菌SCSIO 43740或上述微生物制剂在制备抑制剂或在调理造礁石珊瑚健康状态中的应用。

[0010] 优选地,所述的群体感应抑制剂是2,4-二叔丁基苯酚(C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O),本发明通过高效液相色谱(HPLC)和ODS反相中压色谱等方法,从假交替单胞菌SCSIO 43740发酵液中分离、纯化获得该化合物。

[0011] 优选地,所述的调理造礁石珊瑚健康状态包括缓解珊瑚白化和/或病害防治。具体地,本发明的假交替单胞菌SCSIO 43740以及微生物制剂可在珊瑚礁生态系统生态修复和保护工程中应用,特别是在珊瑚白化和病害防治中应用。

[0012] 本发明的第四个目的是提供一种2,4-二叔丁基苯酚的制备方法,是先培养假交替单胞菌得到发酵液,再对发酵液中的代谢产物进行分离纯化获得2,4-二叔丁基苯酚。

[0013] 优选地,所述的培养,是将假交替单胞菌接种于2216E液体培养基培养获得假交替单胞菌发酵液。

[0014] 优选地,所述的分离纯化,包括以下步骤:向发酵液中加入乙酸乙酯,而后进行超声波破碎和萃取;分液保留上层有机相,并对样品进行浓缩至干;完全旋蒸干后,使用甲醇溶解粗提物;利用正相硅胶柱(100~200目)对样品进行初步分离,对粗提物中加入硅胶进行拌样,风干后填入正相硅胶柱(100~200目)中,以石油醚和乙酸乙酯为流动相进行层析,体积比为1:0.50:1.25:1.9:1.6:1.3:1.1:1.3,最后使用100%甲醇进行冲洗。目标活性产物2,4-二叔丁基苯酚在流动相石油醚:乙酸乙酯=25:1的浓度洗脱中分离得到,通过薄层色谱和紫外荧光显色、碘染显色、硫酸香草醛显色、并通过核磁共振谱鉴定为单一组分,相同比移值的样品合并后使用旋转蒸发器对样品进行浓缩。

[0015] 优选地,所述的假交替单胞菌为假交替单胞菌SCSIO 43740,其保藏编号为:CCTCC NO:M 2022435。

[0016] 本发明的第四个目的是提供2,4-二叔丁基苯酚在制备抑制群体感应制剂中的应用。本发明通过圆盘扩散方法对该化合物的群体感应抑制效果进行测定,证实该化合物对添加外源信号分子(C6-HSL)的紫色杆菌CV026产生的群体感应具有抑制效果。使用超导核磁共振波谱仪进行<sup>1</sup>H-NMR和<sup>13</sup>C-NMR的测量,将群体感应抑制化合物鉴定为2,4-二叔丁基苯酚(C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O)。

[0017] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0018] (1) 本发明筛选出一株假交替单胞菌SCSIO 43740,并从其代谢产物中分离纯化出群体感应抑制剂,均对模式菌紫色杆菌CV026的群体感应具有高效的抑制作用;

[0019] (2) 本发明假交替单胞菌SCSIO 43740对热胁迫下鹿角杯形珊瑚的光合作用效率、叶绿素a含量、虫黄藻密度等光合相关生理指标有明显的改善作用,表明菌株SCSIO 43740能够应用于珊瑚人工养殖以及珊瑚礁生态修复和保护工程中;

[0020] (3) 本发明首次证实2,4-二叔丁基苯酚具有抑制群体感应作用。

[0021] 保藏说明

[0022] 本发明的*Pseudoalteromonas piscicida* SCSIO 43740,于2022年4月20日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),地址为中国.武汉.武汉大学,邮编为:430072,保藏编号为:CCTCC NO:M 2022435。

### 附图说明

[0023] 图1是假交替单胞菌SCSIO 43740的群体感应抑制效果。

[0024] 图2是假交替单胞菌SCSIO 43740的16S rDNA的系统进化发育树。

[0025] 图3是假交替单胞菌SCSIO 43740菌液甲醇粗提物的群体感应抑制效果。

[0026] 图4是假交替单胞菌SCSIO 43740菌液甲醇粗提物分离纯化得到的各组分群体感应抑制活性结果。

[0027] 图5是假交替单胞菌SCSIO 43740所产的群体感应抑制活性组分的<sup>1</sup>H-NMR超导核磁共振波谱的数据结果。

[0028] 图6是假交替单胞菌SCSIO 43740所产的群体感应抑制活性组分的<sup>13</sup>C-NMR超导核磁共振波谱的数据结果。

[0029] 图7是群体感应抑制剂的结构式。

[0030] 图8是假交替单胞菌SCSIO 43740对热胁迫下珊瑚的光化学效率的影响。

[0031] 图9是假交替单胞菌SCSIO 43740对热胁迫下珊瑚的叶绿素a含量的影响。

[0032] 图10是假交替单胞菌SCSIO 43740对热胁迫下珊瑚的虫黄藻密度的影响。

### 具体实施方式

[0033] 以下是对本发明的内容结合实施案例进行进一步的阐述,但不是对本发明的限制。

[0034] 以下实施例所述的2216E液体培养基的组成如下:5g蛋白胨,1g酵母粉,0.1g柠檬酸铁,25g氯化钠,18g琼脂,1000mL ddH<sub>2</sub>O;将上述培养基的成分混合,灭菌,即得。

[0035] 实施例1假交替单胞菌SCSIO 43740的分离、鉴定和保藏

[0036] 一、菌株的分离、纯化:

[0037] 假交替单胞菌SCSIO 43740于2019年12月,从中国海南省三亚市鹿回头岸礁的鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)生长区的珊瑚样品中用2216E液体培养基分离、纯化,获得单克隆,用50%的甘油保存于-80℃中。

[0038] 二、菌株的活性验证:使用100ml加入卡那霉素(终浓度25μg/mL)的LB液体培养基(蛋白胨:1%,酵母提取物:0.5%,氯化钠:1%;pH 7.2-7.8)培养紫色杆菌CV026,摇床温度28℃,转速180rpm,培养24h。同时,用2216E液体培养基培养筛选到的菌株SCSIO 43740,摇床温度28℃,转速180rpm,培养24h。

[0039] 采用圆盘扩散法鉴定菌株SCSIO 43740的群体感应抑制活性,步骤如下:将在LB液体培养基中培养24h的紫色杆菌CV026和0.5mM的信号分子N-己酰基-L-高丝氨酸内酯(C6-HSL)加入LB固体培养基(蛋白胨:1%,酵母提取物:0.5%,氯化钠:1%,琼脂:0.8%;pH 7.2-7.8)制成检验平板。待平板冷却凝固后,将无菌定性滤纸片放在平板上,加入在2216E培养基中培养24h的待筛选菌液10μL,滤纸间相隔大于2cm。设置实验组(假交替单胞菌SCSIO 43740菌液)和对照组(以10μL的0.1M呋喃酮的甲醇溶液作阳性对照,培养基组和甲

醇溶剂组作为阴性对照),平板在培养箱中30℃培养24h,检查滤纸片周围色素的抑制现象,判断假交替单胞菌SCSIO 43740对群体感应的抑制活性。结果如图1所示,假交替单胞菌SCSIO 43740具有抑制群体感应作用。

[0040] 其中,2216E液体培养基的组成如下:5g蛋白胨,1g酵母粉,0.1g柠檬酸铁,25g氯化钠,18g琼脂,1000mLddH<sub>2</sub>O;将上述培养基的成分混合,灭菌,即得。

[0041] 三、菌株的分子生物学鉴定:提取假交替单胞菌SCSIO 43740的基因组DNA,以通用引物27F和1492R进行扩增(Weisenburg等,1991),PCR反应扩增使用总体积50uL体系,包括25uL rTaq酶,1uL正向引物27F,1uL反向引物1492R,1uL DNA模板,22uL ddH<sub>2</sub>O。PCR反应条件为:预变性95℃5min;变性95℃30s,退火56℃30s,延伸72℃90s,循环35次;最后72℃延伸10min。运用1%琼脂糖凝胶电泳检测目的条带(1500bp左右)。选择条带清晰的PCR扩增产物至天一辉远生物科技有限公司进行测序,测到的PCR扩增产物序列如SEQ ID NO.1所示。在Ezbiocloud数据库中检索发现SCSIO 43740与该数据库中假交替单胞菌属*Pseudoalteromonas piscicida* NBRC 103038的16S rDNA序列相似度为100%。选取近似的参考序列一并构建假交替单胞菌SCSIO 43740的16S rDNA的系统进化发育树(图2)。将假交替单胞菌SCSIO 43740命名为*Pseudoalteromonas piscicida* SCSIO 43740,于2022年4月20日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),地址为中国·武汉·武汉大学,邮编为:430072,保藏编号为:CCTCC NO:M 2022435。

[0042] 实施例2假交替单胞菌SCSIO 43740代谢产物分离与抑制群体感应效果

[0043] 一、菌株代谢产物的分离、提取:使用2216E液体培养基发酵假交替单胞菌SCSIO 43740,从纯化的菌株平板中挑取单克隆接种于100mL体系中培养,摇床温度28℃,转速180rpm,培养24h。而后取10mL菌液于590mL培养基中扩大培养,在恒温振荡培养箱中以28℃,180rpm进行72h的发酵,共发酵16瓶,总体积9.6L。

[0044] 发酵完成后,向发酵液中以体积比1:1的比例加入乙酸乙酯,而后置于超声清洗仪中进行10min超声波破碎和萃取。分液保留上层有机相,并在40℃下使用旋转蒸发仪对样品进行浓缩至干。完全旋蒸干后称量粗提物重量10.0g,使用200mL甲醇溶解粗提物。

[0045] 通过圆盘扩散法验证粗提物的群体感应抑制活性,方法步骤同实施例1,设置实验组(SCSIO 43740菌液甲醇粗提物,体积:10uL)和对照组(以10uL的0.1M呋喃酮的甲醇溶液作阳性对照,甲醇溶剂组作为阴性对照)。结果如图3所示,SCSIO 43740菌液甲醇粗提物具有明显的抑制群体感应作用。

[0046] 利用高效液相色谱和正相硅胶柱分别分析和制备粗提物组分。高效液相色谱使用乙腈-水(30-100%)的梯度洗脱,对粗提物的组成和极性进行初步分析,流速2mL/min,时间60min,紫外检测器波长220nm和270nm。随后,利用正相硅胶柱(100~200目)对样品进行初步分离。向10g发酵液粗提物中加入质量比1:1的硅胶(5uM)进行拌样,40℃过夜风干,而后填入正相硅胶柱(100~200目)中,以石油醚和乙酸乙酯为流动相进行层析,体积比为1:0、50:1、25:1、9:1、6:1、3:1、1:1、1:3(依次为组分1-8),最后使用100%甲醇进行冲洗,流速50mL/min。按照时间顺序对样品进行逐管收集。

[0047] 洗脱的样品使用试管进行接取,每管10-15mL。采用薄层硅胶板对每管样品进行薄层色谱分析,根据同样品的比移值(Rf)进行区分样品。对试管中的样品在硅胶板上进行点样后,在前述洗脱的流动相比值下展开,而后使用紫外荧光显色(254nm)、碘显色、硫酸香

草醛显色,具有相同比移值(Rf)的组分进行合并。对所有分离的组分进行群体感应抑制活性筛选,确定样品中具有抑制群体感应活性的单一组分为组分3(使用流动相石油醚:乙酸乙酯=25:1的浓度洗脱分离得到的)。组分3样品进行旋蒸浓缩至干称重为0.0492g。

[0048] 二、抑制群体感应的效果测定:每一轮抑制群体感应活性物质的分离后,将过滤除菌后的样品通过圆盘扩散法验证其群体感应抑制活性,方法步骤同实施例1。所有分离的样品(组分1-6)均取10 $\mu$ L于无菌滤纸片上测试,并设置对照组(以10 $\mu$ L的0.1M呋喃酮甲醇溶液作阳性对照,甲醇溶剂组作为阴性对照)。于培养箱28 $^{\circ}$ C培养24h后观察滤纸片周围颜色变化,结果表明该菌对细菌群体感应有显著的抑制效应(图4)。

[0049] 经过反复验证的群体感应抑制剂组分3,使用旋转蒸发仪将其旋干后,使用氘代甲醇充分溶解,转移至微量核磁管内,对样品使用超导核磁共振波谱仪进行 $^1\text{H-NMR}$ (图5)和 $^{13}\text{C-NMR}$ (图6)的测量,将进一步分析其化学结构。该化合物鉴定为2,4-二叔丁基苯酚( $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$ )。使用ChemDraw 19.0对群体感应抑制剂结构绘制,其结构如图7所示。

[0050] 实施例3假交替单胞菌SCSIO 43740对鹿角杯形珊瑚的益生效应

[0051] 一、珊瑚样品准备与实验设计:于2021年11月在三亚鹿回头岸礁采集10株成体鹿角杯形珊瑚样品,平均直径约25cm。将珊瑚样品置于海南热带海洋生物实验站大棚中暂养2天进行适应后,将珊瑚处理成大小约为5cm的珊瑚断枝,共54个。采用水族胶(阿隆发, AronAlpha)将珊瑚断枝固定于圆形基座上(直径约3cm),大棚中暂养2天适应后移入室内培养体系。

[0052] 室内实验包括三组设计:1)室温控制组(29 $^{\circ}$ C);2)升温控制组(31 $^{\circ}$ C);3)升温加入群体淬灭菌株组(31 $^{\circ}$ C+SCSIO 43740)。每组处理均包含三个重复。

[0053] 将54个鹿角杯形珊瑚断枝随机分布于9个40 $\times$ 30 $\times$ 14cm养殖缸中(每缸6个),暴露于29 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C的温度下,使用12L原位海水进行培养,使用荧光灯进行从6:00到18:00的12h:12h光暗循环的照射,提供约100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的平均辐照强度。每12h进行一次换水。温度由钛金属加热棒和数字控制器共同调节(Weipro,中国)。每缸中配置有500Lh $^{-1}$ 内循环水泵对缸内海水进行搅动,以均匀缸内海水温度。每隔7d对缸内藻类进行清理。

[0054] 本实验采取阶梯升温方式。首先珊瑚断枝被维持在室内培养体系中3天,待珊瑚断枝Fv/Fm恢复至0.7左右开始进行升温。每隔两天升温1 $^{\circ}$ C。当升温两组温度升至31 $^{\circ}$ C后开始进行实验,记录为第0天。升温加入群体淬灭菌株组是在升温控制组的基础上每隔10天进行一次实验菌株SCSIO 43740的添加,待菌株生长至对数生长期进行添加,添加浓度为10 $^7$ CFU/mL,体积1mL。实验共进行两次采样,分别于第0天和第30天。每次取样从每个处理中随机选取6个断枝。

[0055] 二、生理指标测定:珊瑚共生藻中的光合作用效率的测定。在每个采样时间点,随机选取6个珊瑚断枝进行测定。对珊瑚进行暗适应30min后,使用Diving-Pam对断枝进行测试,参数设置如下:饱和脉冲强度(SI)=8,测量光密度(MI)=7,饱和脉冲宽度(SW)=0.8,光获取(G)=7和光衰减(D)=3.0天和30天分别测定一次。采用SPSS 26.0对数据进行正态性检验和方差齐性检验,进行One-way ANOVA统计分析,而后使用GraphPad prism 9.0.0进行绘图。显著性差异为P<0.05,数据表示均为平均值 $\pm$ 标准误差。实验进行到30天发现29 $^{\circ}$ C组和31 $^{\circ}$ C组之间的光合效率(Fv/Fm)存在显著性差异,这说明鹿角杯形珊瑚长期处于31 $^{\circ}$ C高温下会损害其光化学效率。29 $^{\circ}$ C环境下和31 $^{\circ}$ C加入菌株的表现相当,在整个培养期间未

表现出显著性差异(图8),表明SCSI0 43740可提高珊瑚在高温逆境下的光合效率。

[0056] 珊瑚共生体的总叶绿素a含量的测定。在每个采样时间点,每组随机选取6个珊瑚断枝进行测定。对已称量重量的珊瑚样品中加入1mL 90%丙酮,涡旋震荡混匀后,对样品进行1min的超声波破碎,每运行3s,暂停2s。在4℃黑暗环境下提取24h后,使用酶标仪测定四种波长(630nm、647nm、664nm和750nm)下的吸光值。采用SPSS 26.0对数据进行正态性检验和方差齐性检验,去除一个偏离值,进行One-way ANOVA统计分析,而后使用GraphPadprism 9.0.0进行绘图。显著性差异为 $P < 0.05$ ,数据表示均为平均值±标准误差。发现使用经验公式( $\text{Chl a} (\mu\text{g/mL}) = 11.8668 \times (A_{664\text{nm}} - A_{750\text{nm}}) - 1.7858 \times (A_{647\text{nm}} - A_{750\text{nm}})$ ),公式中 $A_x$ 是指样品对应x波长下的吸光度)对其叶绿素a进行计算后,使用珊瑚断枝的重量进行归一化(Ritchie, 2006b)。测定时间为0天和30天。发现在实验进行到第30天时,相比对照组,珊瑚断枝在29℃和31℃未加菌株组别的叶绿素a含量均显著下降,表现出统计学差异,而31℃菌株添加组别未显著下降(图9)。说明菌株SCSI0 43740能改善珊瑚热胁迫下叶绿素a的减少情况。

[0057] 珊瑚虫黄藻密度的测定。在每个采样时间点,随机选取6个已处理的珊瑚断枝进行测定。对已知重量的珊瑚样品中加入5mL过滤海水,涡旋振荡后在1000g下离心10min。虫黄藻被重悬于1mL过滤海水并混匀。取100 $\mu\text{L}$ 均匀的提取物于洗净烘干的血球计数板中,使用光学显微镜进行计数。每个样品重复计数三次。测定时间为0天和30天。采用SPSS 26.0对数据进行正态性检验和方差齐性检验,去除一个偏离值,进行One-way ANOVA统计分析,而后使用GraphPad prism 9.0.0进行绘图。显著性差异为 $P < 0.05$ ,数据表示均为平均值±标准误差。发现珊瑚断枝的虫黄藻密度在第30天的测量中31℃加入菌株SCSI0 43740的数值显著高于31℃组,且有显著性差异,说明菌株能显著改善高温胁迫下珊瑚的虫黄藻密度的下降趋势(图10)。

[0058] 综上所述,本发明的假交替单胞菌SCSI0 43740及其分离得到的活性物质对细菌群体感应有显著的抑制效应,假交替单胞菌SCSI0 43740对热胁迫下鹿角杯形珊瑚的光合作用效率、叶绿素a含量、虫黄藻密度等光合相关生理指标有一定的改善作用,具有应用于珊瑚人工养殖以及珊瑚礁生态修复和保护工程中的良好潜力。

[0059] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,上述优选实施方式不应视为对本发明的限制,本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的精神和范围内,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。



## 序列表

<110> 中国科学院南海海洋研究所

南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)

<120> 一株珊瑚来源产群体感应抑制剂的假交替单胞菌株SCSIO 43740及其应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1364

<212> DNA

<213> 假交替单胞菌 SCSIO 43740 (*Pseudoalteromonas piscicida*)

<400> 1

```

cggaactccg tggtegetgc ccctgtaac aggttggcgc acggccttcg ggtgaacca 60
actcccatgg tgtgacgggc ggtgtgtaca aggcccggga acgtattcac cgcggcatgc 120
tgttccgcga ttactagcga ttccgacttc atggggtcga gttgcagacc ccaatccgaa 180
ctgagatgcc ttttggggat taaccactg taggcacat tgtagcacgt gtgtagccca 240
accgtaagg gccatgagga cttgacgtca tccacacctt cctcccgtt atcacgggca 300
gtttccatag agtgcccagc ttgacctgct ggcaactagg gatgtgggtt gcgctcgttg 360
ccggacttaa ccgaacatct cacgacacga gctgacgaca gccatgcagc acctgtcact 420
gatccagccg aactgaagga aacgatctct cgtaaccgag atcaggatgt caagggttgg 480
taaggttctg cgcgttgctt cgaattaaac cacatgctcc accgcttgtg cgggcccccg 540
tcaattcctt tgagttttaa tcttgcgacc gtactcccca ggcggaatgc ttaatccgtt 600
aggtgtgtca ccgaacagta tactgcccga cgaactggcat tcatcgttta cgggtgtggac 660
taccagggtg tctaactctg tttgctcccc acaatttcgc acctcagcgt cagtatcgag 720
ccagtgagcc gccttcgcca ctggtgttct tccgaatate tacgaatttc acctctacac 780
tcggagttcc actcacctct ctgcaactca agactaacag ttttggaggc agttccaggg 840
ttgagccctg ggatttcacc cccaacttgc taatccgctt acgcgcgctt tacgcccagt 900
aattccgaac aacgctaacc ccctccgtat taccgcggt gctggcacgg agttagccgg 960
ggtttcttta ccaggtactg tcattatcat ccctggcgaa agagctttac gatcctaaga 1020
ccttcttcac tcacgcggca tggctagatc aggettgcgc ccattgtcta agattcccca 1080
ctgctgcctc ccgtaggagt ctgggccgtg tctcagtcce agtgtggctg atcatcctct 1140
aaaaccagct atagatcgta gacttggtag gccattacc caccaactat ctaatctaac 1200
gcgggccgat ccttcaccga taaatctttc ccccgaaggc cgtatgcggt attaccccca 1260
gtttcccagg actattccgc agtgaagggc acgttcccac gcgttactca cccgtccgcc 1320
gctaggtccg aagacctcgc tcgaactgat ggtaagctgc cgcc 1364

```



图1

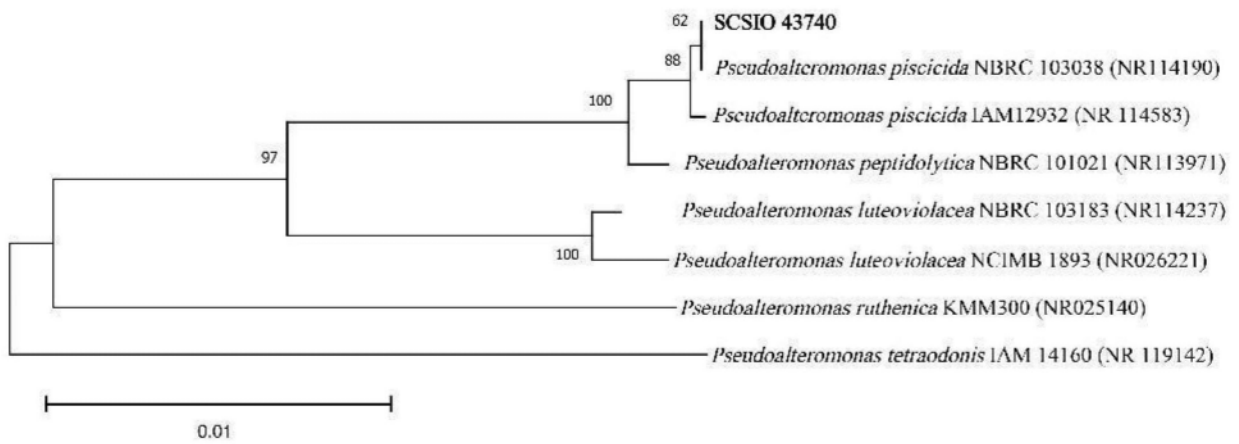


图2



图3

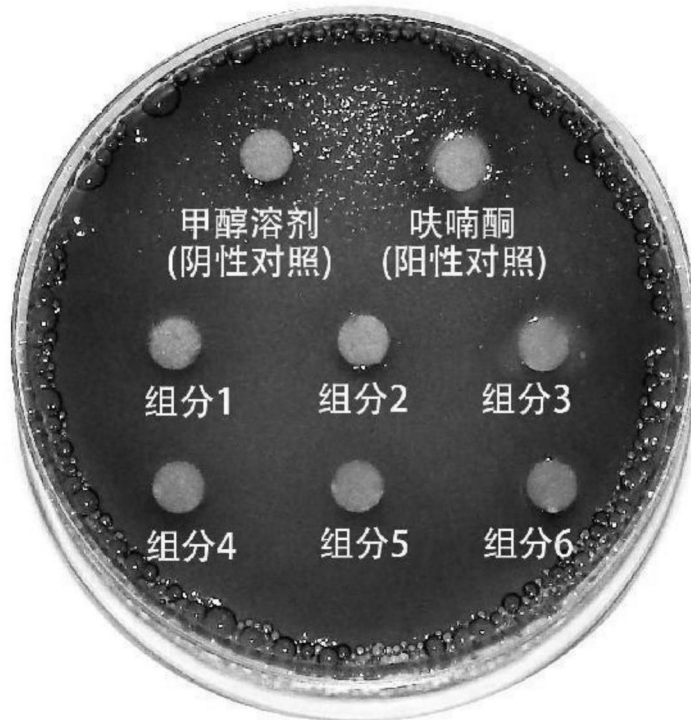


图4

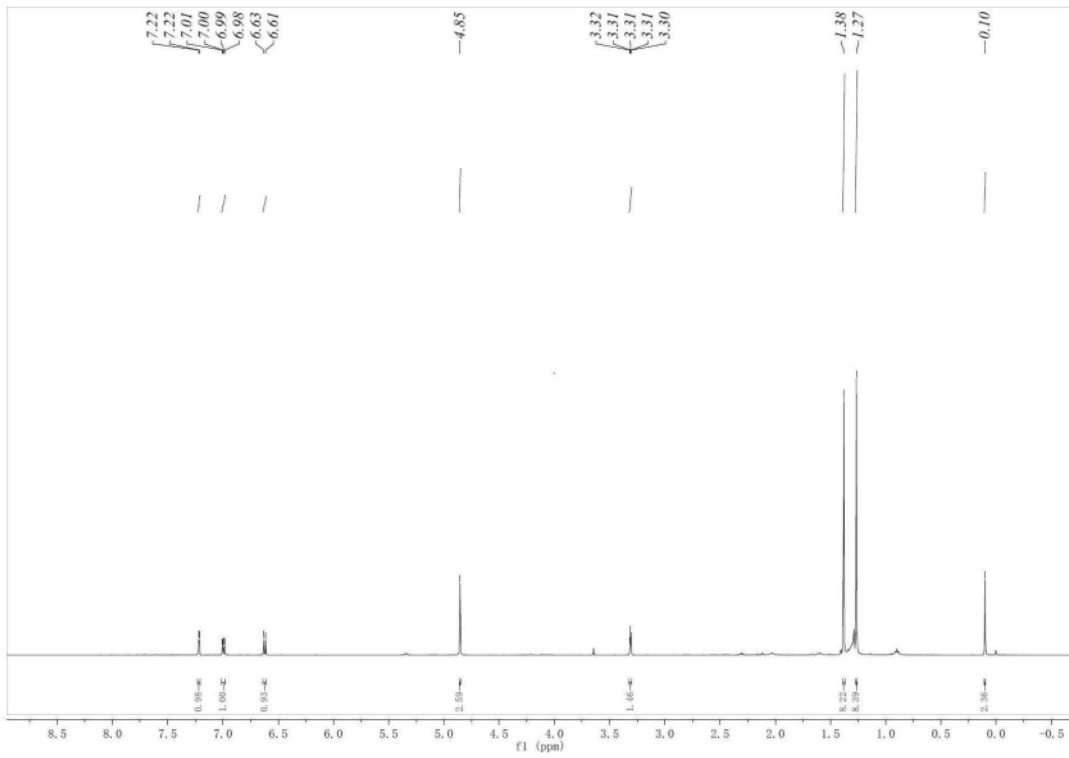


图5

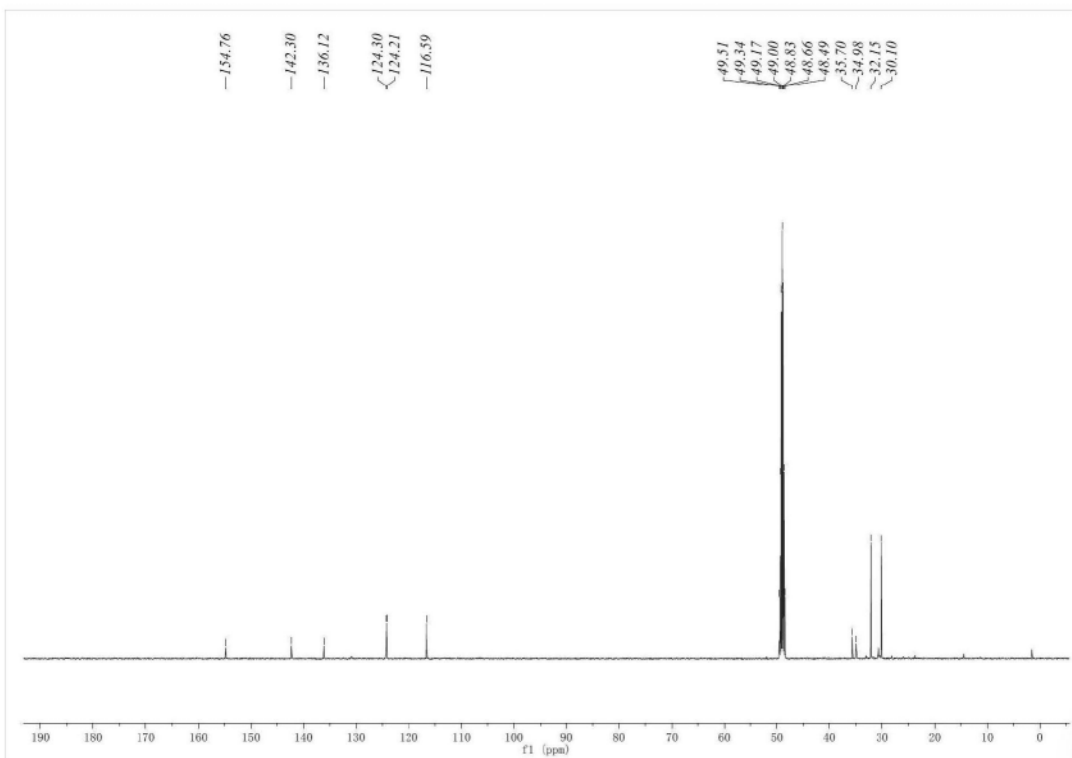


图6

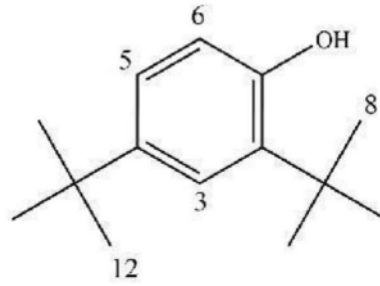


图7

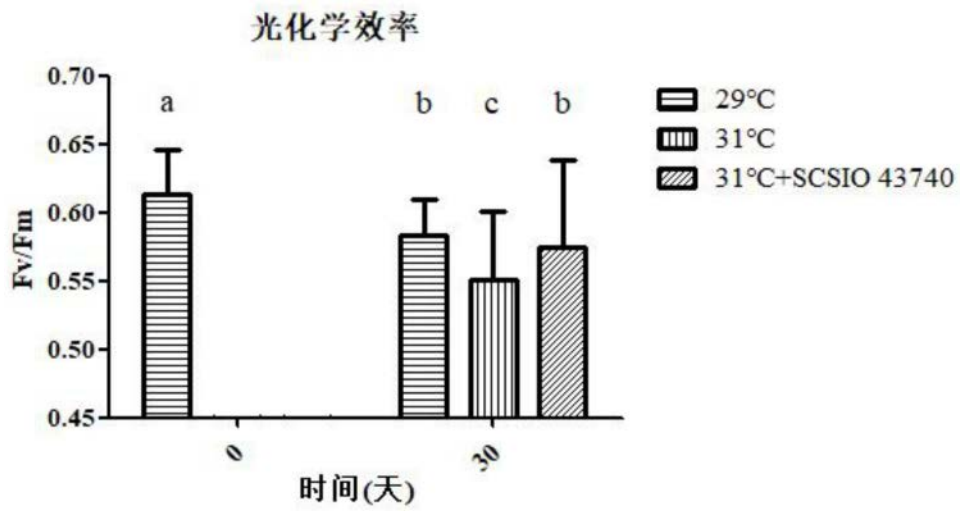


图8

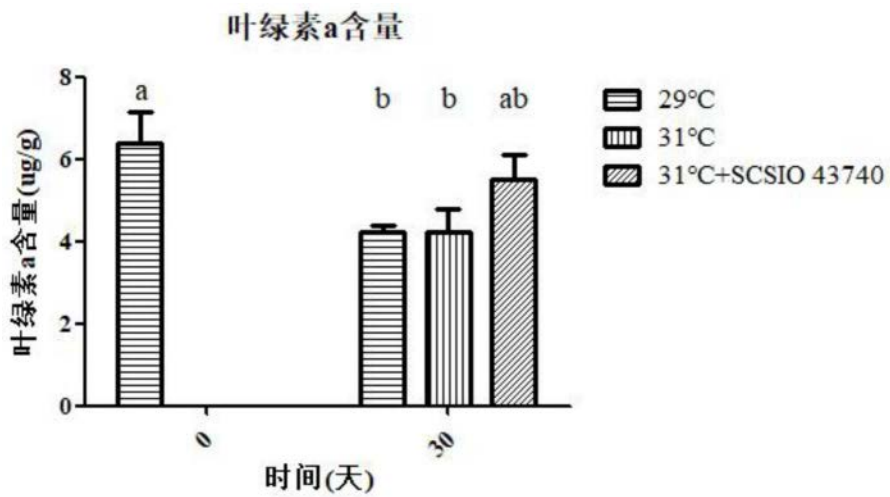


图9

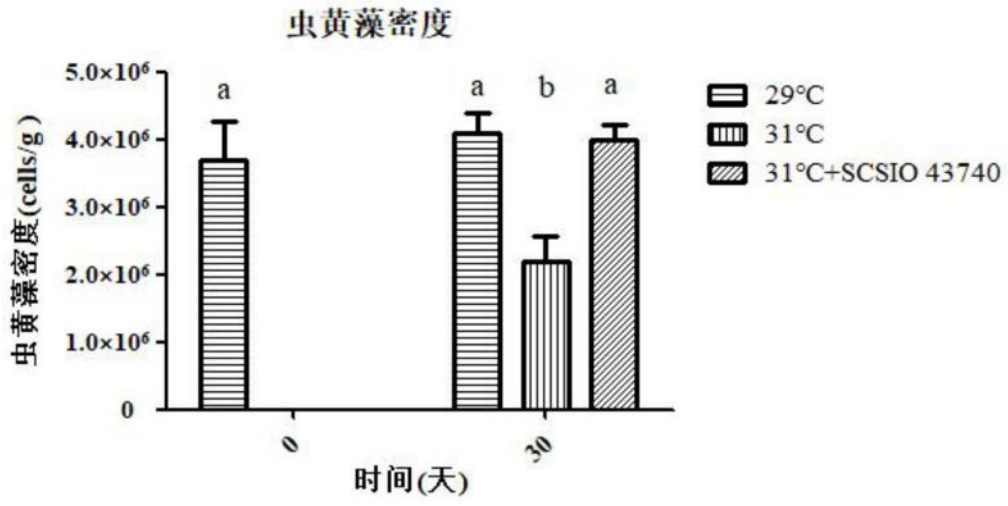


图10