

两株琼胶酶高产细菌的筛选和鉴定*

杜宗军¹ 王 鹏¹ 李 筠¹ P. A. W. Robertson²
B. Austin²

(¹ 青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

(² Department of Biological Sciences, Heriot Watt University, Edinburgh, Scotland, U. K.)

提要 从海洋环境中筛选得到两株琼胶酶的高产菌株,通过形态观察和生理生化反应,确定它们属于弧菌属。通过 BIOLOG 细菌鉴定系统鉴定,并同弧菌属标准菌株分析比较,确定这两株菌都是塔式弧菌(*Vibrio tubiashii*),这两株菌在碳源利用方面存在差别。

关键词 琼胶酶,筛选,鉴定,海洋细菌

琼胶(琼脂)由琼脂糖和琼脂酯组成,琼脂糖是由(1→3)-O-β-D-半乳糖和(1→4)-O-3,6-内醚-α-L-半乳糖交替组成的线形链状分子;琼脂酯由复杂的长短不一的半乳糖残基的多糖链组成,其中包含有多种取代基如硫酸基、甲基等,对于其结构具体细节还不是很清楚。天然琼胶主要存在于某些海藻的细胞壁中,琼胶酶在这些海藻的单细胞分离、酶解破壁制备原生质体等过程中具有重要的使用价值,是一种海藻遗传工程的工具酶^[2];同时,琼胶酶在分子生物学方面也多有应用。因此,琼胶酶的研究具有重要的理论意义和应用价值。根据琼胶酶降解琼脂糖的作用方式不同,而把它们分为两类:α-琼胶酶(EC3.2.1.-),作用于琼脂糖的α(1→3)糖苷键,产物为琼胶寡糖,以3,6-内醚-α-L-半乳糖作为还原性末端;β-琼胶酶(EC3.2.1.81)水解D-半乳糖残基和3,6-内醚-α-L-半乳糖残基之间的β(1→4)糖苷键,产生的琼胶寡糖以D-半乳糖残基作为还原性末端。微生物来源的琼胶酶主要来自于细菌,一部分细菌是从河流、土壤和污水中分离得到的,但能够产生琼胶酶的微生物主要来自海洋细菌。由于琼胶被降解,这些细菌的菌落周围会出现凹陷或液化。作者从青岛近海筛选出两株可以高效产生琼胶酶的海洋细菌,并对其进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 培养基

1.1.1 2216 E 海洋细菌培养基 蛋白胨 5 g,酵母膏 1 g,磷酸铁 0.1 g,琼脂 15 g,陈海水 1 000 ml

121 ℃,20 min 灭菌后倒平板。

1.1.2 海藻培养基 新鲜海藻 125 g,剪碎,加入陈海水 500 ml,氯化钙 0.7 g,匀浆,4 ℃曝气过夜,纱布过滤,补足海水至 500 ml,加入琼脂 5 g,121 ℃,20 min 灭菌后倒平板。

1.1.3 细菌斜面 采用 2216 E 培养基。

1.2 取样及处理方法

1.2.1 取样地点 青岛市黄岛区薛家岛附近海域。

1.2.2 取样 分别用无菌离心管取海水、底泥和海藻。

1.2.3 样品处理 海水直接稀释涂布平板,底泥和海藻加入到装有无菌水的试管中,充分振荡,洗涤表面,然后系列稀释,选取合适浓度涂布平板。28 ℃恒温培养 48 h。

1.3 筛选和复筛^[4]

平板培养 48 h 后,取出观察,具有产生琼胶酶能力的菌株,菌落周围会出现明显的凹陷。选取凹陷明显的菌株,2216 E 海洋琼脂平板划线分离纯化。初筛分离纯化得到的菌株,分别接种斜面和平板培养。平板培养 72 h 后用卢戈氏碘液染色观察,琼胶平板可

* 达尔文计划资助项目 1628065 号。

第一作者:杜宗军,出生于 1974 年,硕士,讲师,从事海洋微生物学研究。E-mail:duzongjun@yahoo.com

收稿日期:2001-12-07;修回日期:2002-01-21

以被染色,能够产生琼胶酶的细菌,由于菌落周围琼胶被降解,降解后的琼胶不能着色,因此其菌落周围会产生水解圈(透明圈),选取透明圈大的菌株。斜面培养1周,轻微振荡,选取能够液化琼胶斜面的菌株。

1.4 菌落形态观察

复筛得到的菌株,平板划线28℃培养48h,观察菌落形态。

1.5 基本性质测定^[1,3]

革兰氏染色、运动性观察、氧化发酵试验、氧化酶试验、发光实验、葡萄糖产气、鞭毛观察、接触酶试验、O129敏感性试验以及需盐性实验按文献方法进行。

1.6 利用 BIOLOG 细菌鉴定系统进行鉴定

1.6.1 BIOLOG 用细菌稀释液蒸馏水500ml,加入0.01% Phytigel,加热至沸腾,然后加入1.5% NaCl,搅拌,使充分溶解,加入0.03% Pluronic F68,搅拌溶解,20ml每管分装,121℃,20min灭菌备用。

1.6.2 实验方法 菌株活化培养,然后采用平板密集划线的方法培养24h,用接种环取菌到稀释液中,比色,使稀释液达到合适浓度(透过率52%)。然后接种菌液150μl到96孔板,平板型号为GN2,培养24h,观察结果。

1.6.3 结果的计算机分析 将观察到的结果输入到计算机,利用Biolog Microlog 1 4.01 B软件程序分析。将所得菌种对碳源利用情况输入菌种数据库,利用SMUPGMA分析软件,同弧菌属标准菌株比较,对其相似性进行分析,确定菌种名称和分类地位。

2 实验结果与分析

2.1 菌种筛选和复筛

结果见图1。通过筛选和复筛,得到两株琼胶酶高产细菌 QM4 和 QM6,进行进一步研究。

2.2 菌落形态观察

QM4 和 QM6 在平板上都能够生长形成规则的圆形菌落,表面光滑,边缘整齐,湿润,不透明,恒温培养48h菌落直径约为6mm。

2.3 菌株基本形态和生理生化反应

结果见表1。通过菌株的生理生化特征可以看出,这两株菌符合弧菌属的特征,特别是符合弧菌属的几个关键特征,因此鉴定它们属于弧菌属。这两株细菌在不添加NaCl的淡水平板上均不生长,表明它们都是海洋细菌。

2.4 利用 BIOLOG 细菌鉴定系统对两株细菌的鉴定情况

实验结果显示,这两株细菌对于 BIOLOG GN 平板上95种碳源可以利用的较少, QM4 和 QM6 都可以利用糊精、糖元、吐温40、吐温80、N-乙酰-D-葡萄糖胺、纤维二糖、D-果糖、D-半乳糖、α-D-葡萄糖

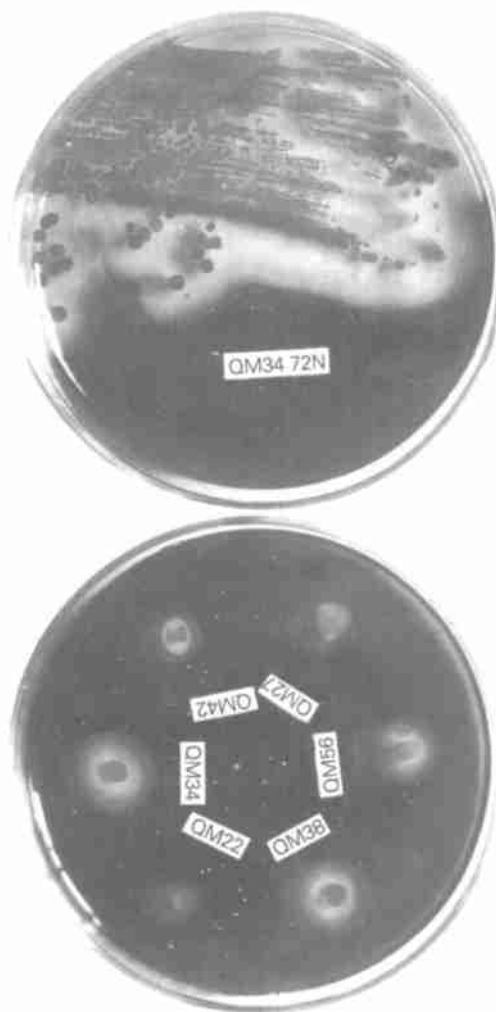


图1 利用卢戈氏碘液对产酶菌株进行筛选

Fig.1 Screening for agarolytic bacteria by flooding the plate with Lugol iodide solution

糖、麦芽糖、D-甘露糖醇作为碳源,另外 QM6 可以利用肌苷而 QM4 不能,其余碳源两株细菌都不能利用。通过计算机对实验数据进行分析,这两株细菌都和塔式弧菌 (*Vibrio tubiashii*) 最为接近, QM4 的可能

表 1 QM34 和 QM56 形态特征及生理生化反应

Tab.1 Morphological, physiological and biochemical characteristics of QM34 and QM56

菌株	形状	革兰氏染色	运动	氧化发酵	氧化酶	过氧化氢酶	发光	鞭毛	O/129(150 μg)
Q M34	杆状	G ⁻	+	发酵	+	+	-	极生单	敏感
Q M56	杆状	G ⁻	+	发酵	+	+	-	极生单	敏感
菌株	0 % NaCl 生长	1 % NaCl 生长	6 % NaCl 生长	8 % NaCl 生长	Arg 脱羧	Lys 脱羧	Orn 脱羧	葡萄糖 产气	
Q M34	-	++	+	-	-	-	-	-	
Q M56	-	++	+	-	-	-	-	-	

注: + :阳性; ++ :强阳性; - :阴性

表 2 进行 BIOLOG 分析所用标准菌株

Tab.2 The type strains used in the analysis by BIOLOG

菌株	中文名称	拉丁文
V284	解藻朊酸弧菌	<i>V. alginolyticus</i>
V285	坎氏弧菌	<i>V. campbellii</i>
V286	鲨鱼弧菌	<i>V. carchariae</i>
V291	费氏弧菌	<i>V. fischeri</i>
V292	河流弧菌	<i>V. fluvialis</i>
V294	产气弧菌	<i>V. gazogenes</i>
V295	哈氏弧菌	<i>V. harveyi</i>
V297	梅氏弧菌	<i>V. metschnikovii</i>
V298	最小弧菌	<i>V. minicus</i>
V300	纳瓦拉弧菌	<i>V. navarrensis</i>
V303	东方弧菌	<i>V. orientalis</i>
V304	副溶血弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>
V305	海利斯顿氏弧菌	<i>Listonella pelagia</i>
V306	解蛋白弧菌	<i>V. proteolyticus</i>
V307	病海鱼弧菌	<i>V. ordalii</i>
V308	灿烂弧菌	<i>V. splendidus</i>
V314	霍氏弧菌	<i>V. hollisae</i>

性是 99 %,相似度为 0.775, QM56 的可能性为 100 %,相似度为 0.814, 据此判断这两株菌都是塔式弧菌 (*Vibrio tubiashii*)。

将这两株菌的碳源利用情况输入计算机,并同标准菌株比较。可以看出 QM34 和 QM56 的相似性程度超过 95 %,可以肯定是一个种。同其他弧菌标准菌株相比,坎氏弧菌 (*V. campbellii*) 同这两株菌的相似性在 90 %左右,其余菌株则相差较远。所用标准菌株见表 2。

3 讨论

琼胶酶是一种海藻工具酶,其琼胶水解产物琼胶寡糖具有多种生理活性,在医药上具有重要的应用

潜力;同时,琼胶酶在海水养殖和现代分子生物学研究中也有重要的应用价值。国外对于琼胶酶的研究近几十年来多有报道,分离出一些琼胶酶高产菌株,其中弧菌属的海洋细菌较多。1990 年, Taoki 等分离出 1 株可高效产生琼胶酶的弧菌 (*Vibrio* sp. AP2); 1993 年 Yasushi sugano 等选育出弧菌 (*Vibrio* sp. JT0107) 并提纯了其胞外琼胶酶。本研究从海洋环境中筛选具有高效产生琼胶酶能力的细菌,通过形态特征及生理生化反应,并利用 BIOLOG 细菌鉴定系统将这两株细菌鉴定为塔式弧菌 (*Vibrio tubiashii*)。产生琼胶酶的塔式弧菌目前尚未见到报道。

参考文献

- 1 沈萍,范秀容,李广武主编.微生物学实验.北京:高等教育出版社,1999. 26~46
- 2 Araki T., Lu Z., Morishita T. . Optimization of parameters for isolation of protoplasts from *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta), *Journal of marine biotechnology*, 1998, 6(3):193~197
- 3 Colwell R. R. . *Vibrio in the Environment*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1984. 285~363
- 4 Hans G. Schlegel. *General Microbiology* (Seven Edition), Cambridge, Cambridge University Press, 1992. 459~460

辅助参考文献

- T. Aoki, T. Araki, M. Kitamikado. Purification and characterization of a novel β -Agarase from *Vibrio* sp. AP2 *Eur. J. Biochem.*, 1990, 187: 461~465
- Y. Sugano, I. Terada, M. Arita *et al.* . Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium *Vibrio* sp. Strain JT0107, *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(5): 1549~1554



ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TWO BACTERIA PRODUCING AGARASE

DU Zongjun¹ WANG Peng¹ LI Jun¹ P. A. W. Robertson² B. Austin²

(¹ College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao 266003)

(² Department of Biological Sciences, Heriot Watt University, Edinburgh., Scotland, U.K.)

Received: Dec. 7, 2001

Key Words: Agarase, Isolation, Identification, Marine bacteria

Abstract

Two marine bacteria, QMB4 and QMB6, were isolated from the sea water near Qingdao. They can produce extracellular agarase. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the two isolates have been tested. The results showed that both of the two strains were *Vibrio* sp. Further analysis were carried out with BIOLOG. The two isolates were identified as *Vibrio tubiashii*. There are still some differences in the capacity of using carbonaceous between the two strains.

(本文编辑:刘珊珊)