

刺参体内外微生物组成及其生理特性的研究*

孙 奕 陈 弼

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 从刺参 *Stichopus japonicus* 前后消化管、体腔液和表皮上所分离到的 359 株细菌分别属于弧菌属、假单胞菌属、奈瑟氏球菌属、不动杆菌属、柄杆菌属、黄杆菌属、节杆菌属、微球菌属、黄单胞菌属、棒杆菌属、产碱菌属这十一个主要菌属; 57 株酵母菌分别属于球拟酵母属、红酵母属、隐球酵母属和德巴利氏酵母属四个属。刺参样品分别于 1986 年 10 月至 1988 年 5 月采自灵山岛、威海和青岛。

研究表明, 刺参肠道微生物的特异性主要体现在后肠, 并在其中分离到罕见的 *Caulobacter* 属菌株。肠道微生物的组成和生理生化特性, 反映出刺参选择性摄取藻类营养的特点。刺参栖居地泥中常见的芽孢杆菌在肠道内很少发现; 前肠数量较高的弧菌和假单胞菌在后肠大为消弱。刺参体液对某些细菌有抑制作用, 对体内微生物组成与数量有一定调节控制作用。

海参是生长于海底礁岩和细砂上的一种棘皮动物。作为一支古老的生物类群, 它经过亿万年来生存竞争而繁衍至今, 其生活习性的独特是令人费解的。它不断吞食周围环境中的泥土和动植物碎屑, 这些物质如何被海参利用并转化成自身的高蛋白、高营养成分呢? 海参的消化管较短, 与许多海洋生物相比都为简单, 那么它又是如何完成繁重的消化吸收功能的呢? 我们知道, 动植物碎屑以及沉积物所含有的微生物从事着大量的转化和分解工作^[1], 它们在海参体内又是如何的呢? 本文从刺参 *Stichopus japonicus* 微生物的组成与功能研究入手作初步探讨。

关于消化道中微生物的群落, 已在海洋生物中有一些报道, 但尚未见到海参消化管中微生物组成研究的报告。本文对刺参微生物区系的结构和功能的研究, 为进一步探索刺参的代谢作用、营养机制以及对于刺参的人工养殖、病害和防治等提供一定的基础资料。

一、材料与方 法

1. 样品来源与处理

海参 *Stichopus japonicus* 样品分别于 1986 年 10 月至 1988 年 5 月采自灵山岛、威海以及青岛沿岸。

(1) 刺参前肠与后肠样品的制备 以无菌解剖法从活海参内取出肠道。以无菌海

* 中国科学院海洋研究所调查报告第 1579 号。

本文系国家自然科学基金资助项目。

廖玉麟研究员对本文提出宝贵意见, 谨志谢意。

收稿日期: 1988 年 11 月 7 日。

水冲洗外肠壁,断开前、后肠并挤掉其内部的泥砂;分别在低温下研磨,与定量的无菌海水充分混匀,制成样品稀释液。

(2) 刺参体腔液样品的制备 在刺参腹部开一口,迅速用无菌注射器吸取体腔内的水。由于海参能够自动堵住伤口,故取样宜快。

(3) 刺参体表样品的制备 将从海底取回的新鲜刺参以无菌海水冲洗后于 -50°C 低温下速冻数分钟,取一定面积的表皮进行研磨,然后稀释并分离微生物。

(4) 栖居地泥样的制备 采集刺参生长地周围的细泥,以无菌海水稀释,同时加无菌玻璃珠摇动,以使粘附在泥砂、碎屑颗粒上的微生物悬浮到液体海水中,沉淀 15 分钟后取用上层清液。

(5) 刺参肠道泥样的制备 断开活海参前后肠道,分别取挤出的泥砂。处理方法同上。

2. 菌株的分离与鉴定

(1) 细菌 样品充分混匀,经过沉淀后取上清液,再按 10 倍稀释。取适宜的稀释液 0.1ml 作平板涂布。

计数分离异养细菌采用牛肉汁营养培养基,计数弧菌采用 TCBS 培养基。培养物于 25°C 培养 3~5 天后观察结果,选取密度适宜的平板逐一挑取菌落,经过划线纯化之后,进行鉴定。细菌按 Bergey 手册^[4]进行。

在进行生理实验时,采用了褐藻酸钠降解培养基、琼脂降解培养基、几丁质降解培养基、海水酪素琼脂培养基以及淀粉培养基^[2,5]。

(2) 酵母菌 采用超滤膜培养法,于无菌条件下真空抽滤适量样品,使样品中酵母菌集中在孔径为 $0.2\mu\text{m}$ 的滤膜上。将滤膜贴于 pH 4.5~5.0 的酵母分离培养基的表面,于 25°C 下培养 4~5 天。从滤膜上挑取酵母菌落,经纯化后,按娄德手册进行鉴定^[1,6]。

3. 刺参体腔液活性干粉的制备

收集刺参体腔液并经过 48h 低温透析,在 Labconco 真空冷冻干燥器中真空冷冻干燥,制成干粉。粉剂经紫外线照射灭菌,供生物测试之用。

二、结果与讨论

1. 刺参肠道细菌组成特征

对新鲜刺参以及人工条件下饥饿培养的刺参的消化管、体腔液和体表皮分别进行平板计数、菌株分离和鉴定。359 株细菌分离株经过鉴定分别为 *Vibrio* (弧菌属)、*Pseudomonas* (假单胞菌属)、*Arthrobacter* (节杆菌属)、*Corynebacterium* (棒杆菌属)、*Acinetobacter* (不动杆菌属)、*Micrococcus* (微球菌属)、*Neisseria* (奈瑟氏球菌属)、*Flavobacterium* (黄杆菌属)、*Xanthomonas* (黄单胞菌属)、*Caulobacter* (柄杆菌属)和 *Alcaligenes* (产碱菌属);刺参栖居地泥砂作为对照,除上述菌群外,还有 *Bacillus* (芽孢杆菌属)和 *Achromobacter* (无色杆菌属)。表 1 列出了这些细菌在不同来源的样品中分布的情况。

对细菌的分离结果进行分析,发现刺参肠道微生物组成特点是: 肠道中的优势菌群主要为弧菌和假单胞菌两属。分别对前、后肠肠壁上的细菌研究结果(表 2)表明,无论是

表 1 刺参及泥样中细菌属的分布

Tab. 1 Distribution of bacterial genera in *S. japonicus* and its habitat mud

细 菌 属	饥饿刺参肠道和腔液		新鲜刺参肠道和腔液		表 皮		栖居地泥	
	No.	P(%)	No.	P(%)	No.	P(%)	No.	P(%)
<i>Vibrio</i>	47	27.8	69	83.1	35	30.2	—	—
<i>Pseudomonas</i>	66	39.1	8	9.6	14	12.1	3	7.3
<i>Arthrobacter</i>	7	4.1	—	—	6	5.2	—	—
<i>Corynebacterium</i>	1	0.6	—	—	1	0.8	1	2.4
<i>Acinetobacter</i>	10	5.9	—	—	10	8.6	1	2.4
<i>Micrococcus</i>	4	2.4	—	—	8	6.9	—	—
<i>Neisseria</i>	2	1.2	—	—	26	22.4	1	2.4
<i>Flavobacterium</i>	7	4.0	3	3.6	3	2.6	1	2.4
<i>Xanthomonas</i>	4	2.4	—	—	1	0.8	1	2.4
<i>Caulobacter</i>	15	8.9	—	—	—	—	—	—
<i>Alcaligenes</i>	—	—	—	—	1	0.8	1	2.4
<i>Achromobacter</i>	—	—	—	—	—	—	12	29.3
<i>Bacillus</i>	—	—	1	1.2	10	8.6	20	48.8
uncertain(未定)	7	3.6	2	2.4	1	0.8	—	—
合计	170	100	83	100	116	100	41	100

表 2 前、后肠优势细菌属的分布(%)

Tab. 2 Distribution of dominant bacterial genera in foreguts and hindguts of *S. japonicus*

细菌属	饥饿刺参		新鲜刺参	
	前肠	后肠	前肠	后肠
弧菌属	50	15.2	92	75
假单胞菌属	38	34.8	8	9.4
细菌属的数目	5	9	2	4

饥饿还是新鲜的刺参,弧菌的比例总是前肠高于后肠(见图 1),而且两个优势菌群之和也是前肠高于后肠。

进一步分析发现,后肠的菌群种类繁多,组成广泛,而前肠却相对单一(表 2)。尤其是饥饿刺参中这种现象更为显著。一些在海泥中极为少见的细菌类群,如柄杆菌属在饥饿刺参的后肠中以较高的比例(22.7%)分离得到。该菌在后肠的定居富集,说明后肠的微生物组成具有较高的特异性,其在刺参营养吸收、排斥其它菌群的繁殖等方面可能是有作用的。

刺参肠道中微生物来源于吞食的泥中。对栖居地海泥以及前、后肠泥中异养细菌计数结果(见表 3)表明,前肠泥中的细菌数量高出其它两者的 30 倍,也就是说,前肠选择性摄入的大量细菌在后肠消失了。与此相反,柄杆菌属的细菌能在后肠富集定居,这反映了

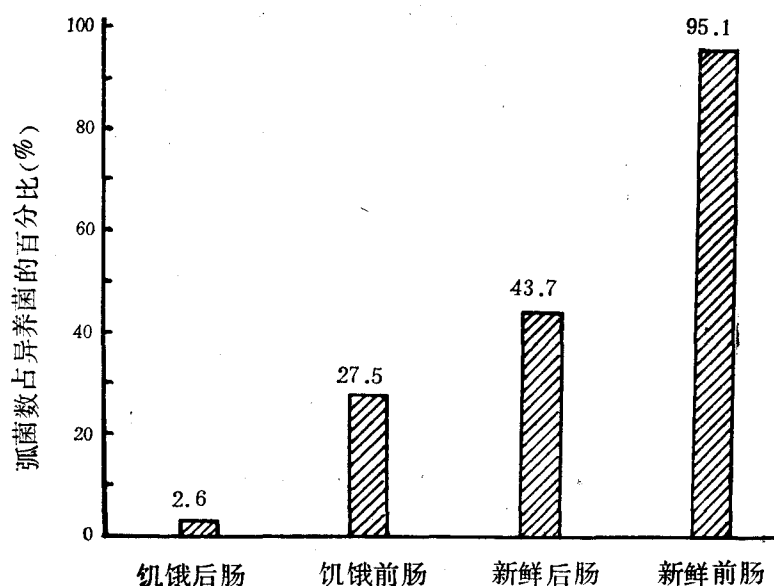


图 1 肠道中弧菌数与异养菌总数的比值

Fig. 1 Ratio of *Vibrio* to the total heterotrophic bacteria in the gut of *S. japonicus*

表 3 几种泥样中的芽孢杆菌比例①

Tab. 3 Percentages of *Bacillus* in mud samples

样品来源	泥中异养菌总数		芽孢杆菌的比例(%)
	细菌数/g湿泥	比 值	
栖居地泥	4.3×10^5	1	13.5
前肠泥	1.3×10^7	30	0
后肠泥	4.2×10^5	~1	0
前肠组织	/		0
后肠组织	/		1.2

① 样品于 1988 年 5 月取自青岛沿岸。

机体对微生物具有调节控制作用。

异养细菌的组成表明,栖居地泥与刺参肠道中的细菌类群有较大差异。特别是底泥中芽孢杆菌属的细菌在肠道中绝少发现(表 3)。刺参选择性摄取藻类可能导致芽孢杆菌减少,因为藻类表面极少有这一类群的细菌。另外,芽孢杆菌是底泥中代谢分解活力旺盛的菌群,对蛋白质的分解较为明显,所以高蛋白含量的海参对芽孢杆菌的抑制作用也是一个潜在的原因。

2. 刺参体内外细菌的生理生化特点及其功能

对上述分离的细菌进行了分解褐藻酸钠、几丁质、琼脂、淀粉以及明胶、酪蛋白的定性测定,结果见表 4。由表中可知,褐藻酸钠降解菌群以及几丁质降解菌群在刺参消化管和体表的比率都明显高于栖居地泥(图 2、图 3)。这一现象也可以从各属细菌分离株的生理生化特性上得到印证和解释。例如,芽孢杆菌属和无色细菌属的大多数分离株都不能降

表 4 不同生理类群细菌在刺参体内以及栖居地泥中的分布(%)

Tab. 4 Distribution of different physiological group of bacteria in *S. japonicus* and the habitat mud

样品名称 生理菌群	饥饿刺参		新鲜刺参		栖居地泥
	肠 道	腔 液	肠 道	腔 液	
降解褐藻酸钠	62.6	34.8	91.0	93.3	7.5
分解几丁质	62.8	40.9	95.6	93.3	12.8
分解琼脂	27.0	4.3	0	0	2.5
降解淀粉	65.3	56.7	83.7	86.7	70.7
降解明胶	69.7	65.2	97.2	100	86.8
分解酪蛋白	38.8	69.6	92.5	100	69.2

表 5 刺参及泥样中细菌分离株的生化降解特性①

Tab. 5 Degrading characteristics of bacterial isolates from *S. japonicus* and habitat mud

属 名	菌株来源	褐藻酸钠	几丁质	琼 脂	淀 粉	明 胶	酪蛋白
弧菌属	饥饿刺参肠道和腔液	+++	+++	+	+++	+++	++
	新鲜刺参肠道和腔液	+++	+++	—	+++	+++	+++
	表皮	+++	+++	—	+++	+++	+++
假单胞菌属	饥饿刺参肠道和腔液	++	++	+	++	+	+
	新鲜刺参肠道和腔液	++	++	—	+	++	++
	表皮	+	+	—	+	+++	++
	栖居地海泥	+	+	—	+++	+++	++
节杆菌属	(见表 1)	—	++	—	+	++	+
不动杆菌属	(见表 1)	—	+	—	—	+	+
微球菌属	(见表 1)	—	+	—	+	++	++
奈瑟氏球菌属	表皮、饥饿刺参肠道	—	✓	—	—	—	✓
黄杆菌属	(见表 1)	+	++	+	+	+	+
黄单胞菌属	饥饿刺参肠道和腔液	++	++	++	+++	+++	+
柄杆菌属	饥饿刺参后肠	+	+	—	+	+	+
无色杆菌属	栖居地泥	—	+	—	+++	+++	++
芽孢杆菌属	栖居地泥	✓	+	✓	++	++	++
	表皮	—	+	—	++	++	+

① +++ 示 85% 以上的菌株能够降解; ++ 示 50~85% 的菌株能够降解; + 示 5~50% 的菌株能够降解; ✓ 示有个别降解(<5%); — 示不降解。

解褐藻酸钠和几丁质(见表 5), 而这两属细菌在泥样中所占比例却很大。与此成为鲜明对照的是, 刺参体内常见的弧菌和假单胞菌则对两种多糖均有很高的降解比例。

从海藻中分离的细菌具有较高的褐藻酸钠降解活性。刺参肠道细菌的生理生化特性与海藻表面的细菌极为相似, 在前肠中见到的大量弧菌和假单胞菌也是海藻和海泥中常见的类群。这一现象至少说明, 刺参前肠大量的微生物来源于食物中的藻类碎屑。肠道中的褐藻酸钠降解菌群比栖居地泥高出 10 倍左右(图 2), 进一步说明刺参能够选择性地摄取藻类碎屑以及其中的微生物。

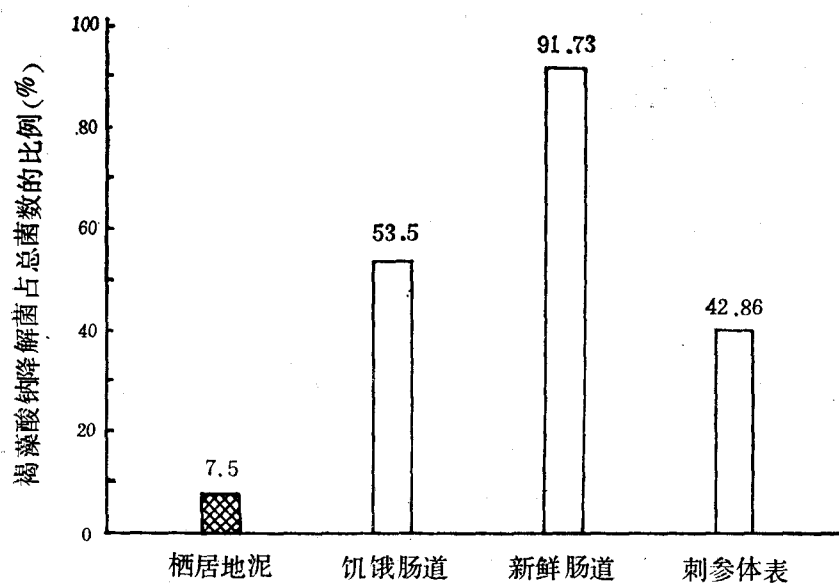


图 2 褐藻酸钠降解菌在不同来源样品中的比高

Fig. 2 Comparison of alginic acid decomposing bacteria from different source

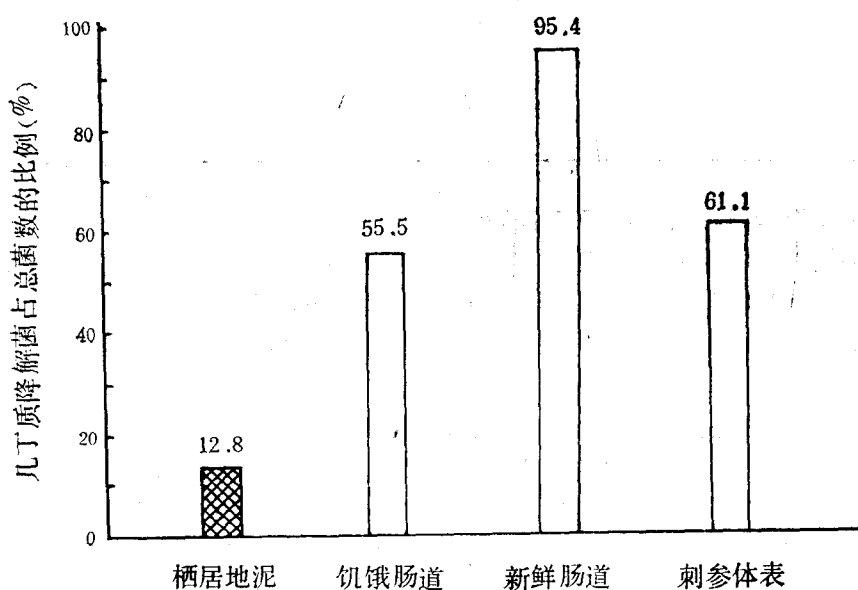


图 3 几丁质降解菌在不同来源样品中的比高

Fig. 3 Comparison of chitin degrading bacteria from different source

表 4 的结果还显示出,饥饿刺参消化管中褐藻酸钠、几丁质、淀粉、明胶和酪蛋白的降解能力普遍下降,而琼脂降解能力则有所提高。根据表 5 列出的部分细菌分离株的生化降解特性,从饥饿刺参体内分离的细菌,如不动杆菌属、微球菌属、柄杆菌属,其生理生化活性较弱;从体表上分离得到较多的奈瑟氏球菌,也是一类生理活性较弱的菌群。相反,

从新鲜刺参肠道中分离得到的优势菌以及海泥中常见的优势菌则多是代谢力旺盛的细菌类群。这与饥饿状态下营养物减少是一致的,反映了刺参体内外细菌的生理特点。

3. 刺参体内外酵母菌组成特征及其功能

以滤膜法从刺参的消化管和表皮上分离得到酵母菌 57 株,均为球状和椭圆状的细胞,无假菌丝。根据娄德手册分类鉴定,分别为 *Torulopsis* (球拟酵母属)、*Rhodotorula* (红酵母属)、*Cryptococcus* (隐球酵母属)以及 *Debaryomyces* (德巴利氏酵母属)四属(表 6)。长期饥饿的刺参用此法分离不到酵母菌,但在扫描电镜下能够看到肠内酵母菌的存在。

对栖居地泥及刺参肠内酵母菌的分离,发现肠内的酵母菌具有比较集中和单一的趋势。海藻中常见的假丝酵母属 (*Candida*)^[7] 在刺参肠道中未分离到。这一现象在以酵母菌为饵料进行刺参人工养殖时是值得注意的。

表 6 在不同样品中的酵母菌数目

Tab. 6 Numbers of yeasts isolated from different kinds of samples

酵 母 菌 属	新 鲜 刺 参			短期饥饿 17 天的刺参		合 计
	前 肠	后 肠	表 皮	后 肠	表 皮	
<i>Torulopsis</i>	3	30	13	1		47
<i>Rhodotorula</i>	4			2	1	7
<i>Cryptococcus</i>	2					2
<i>Debaryomyces</i>		1				1
总 数	9	31	13	3	1	57

4. 海参体腔液对微生物的调节与控制

在刺参体腔液中分离到少量的细菌,其组成与后肠组织比较一致。在饥饿和新鲜两种状态下,肠道细菌密度差异不大,但在饥饿和新鲜刺参的体腔液中,细菌密度分别为 95 个/ml 和 3.3×10^2 个/ml。饥饿时体腔液细菌密度明显下降,这意味着细菌数量在体腔中受到抑制。

收集刺参体腔液进行低温真空冷冻干燥,浓缩成粉状,其中的各种生物物质保持活性。用这种干粉对刺参中分离到的细菌进行测试,发现它有抑菌效应,在一些细菌生长的平皿上产生弱抑菌圈。由于抑菌物质在琼脂中扩散较慢,抑菌现象须在低温长时间扩散之后才能在常温培养下看到。活性干粉对分离到的弧菌、芽孢杆菌以及其它菌属的某些菌群有不同程度的抑制作用。

很早人们就已经发现海参体内含有毒性物质,其中的活性成分由 Chanley 等人 (1955) 命名为 Holothurin。它在低浓度下对许多类型的生物体有毒性,但到目前为止,这种毒性物质对微生物的抑制作用尚未见有报道。本实验发现,毒性物质对刺参体内外分离的大量常见细菌有抑制活性,可以设想,这对生活在微生物大量繁殖的环境中并且自身含有高营养成分的海参来说,不失为一种有效的防御措施。这种毒性物质的存在,可以调节海参体内微生物的数量,并为海参直接消化利用微生物提供了一种可能的解释。Ca-

irns^[3]在研究 Holothurin 的抗癌作用时,发现其粗提液比纯制品的作用更大,而纯品的抗癌能力却丧失或大为降低。这说明有效成分是多种的。Treft (1958) 还发现海参肠道中的变形细胞能吞噬枯草芽孢杆菌,并认为这是海参消化细菌的一种机制。所以,海参中抑菌物质的成分和作用不是单一的。究竟何种物质对细菌产生抑制作用,待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组,1973。常见与常用真菌。科学出版社,1~120 页。
- [2] 中国科学院微生物研究所细菌分类组,1978。一般细菌常用鉴定方法。科学出版社,1~179 页。
- [3] Cairns, S. D., 1973. Effect of Holothurin on Sarcoma 180 and β -16 Melanoma Tumors in Mice. *Gulf Res. Rep.* 4(2): 205—213.
- [4] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th ed.). The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1268pp.
- [5] Furniss, A. L., et al., 1978. The *Vibrio*. In: Public Health Laboratory Service Monograph Series 11. Maidstone Public Health Laboratory, London, 1—57.
- [6] Lodder, J., 1971. The Yeasts—A Taxonomic Study. North-Holland/American Elsevier, 1385 pp.
- [7] Patel, K. S., 1975. The Relationship Between Yeasts and Marine Algae. *Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B* 82: 25—28.
- [8] Sieburth, J. McN., 1979. Sea Microbes. Oxford University Press, New York, 39—69.

THE MICROBIAL COMPOSITION OF *STICHOPUS JAPONICUS* AND ITS PHYSIOLOGICAL PROPERTY*

Sun Yi Chen Dou

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

Three hundred and fifty-nine strains of bacterium and fifty-seven strains of yeast isolated from foregut, hindgut, coelomic liquid and body surface of *Stichopus japonicus* were studied for biochemical activities. Bacteria mainly belong to eleven genera: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Caulobacter* and *Alcaligenes*. Yeasts are attributed to *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, and *Debaryomyces*.

Bacterial isolates from hindgut of hungry *S. japonicus* are characterized by abundance in members of *Caulobacter* which are rarely isolated from marine sedimentary environment. The studies on microbial composition and physiological property show that the debris of algae could be selectively taken in by *S. japonicus*. *Bacillus* strains are the common members in the habitat sedimentary mud, but few of them could be found from *S. japonicus*. *Vibrio* and *Pseudomonas* are depressed in the hindgut though they are dominant in foregut. The concentrate of coelomic liquid from living *S. japonicus* was prepared by lyophilization and showed certain inhibitory action for some bacteria. This kind of inhibitory substance may play a special role for regulating and controlling the microbial community of *S. japonicus*.

* Contribution No. 1579 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.