

闽南-台湾浅滩上升流区拮抗菌的初步研究*

郑天凌 洪 静 郑志成 周美英

(厦门大学 361005)

提要 研究了闽南-台湾浅滩上升流区海洋拮抗菌的生态分布、种类组成及其抗菌活性。结果表明:在该海区海水中拮抗菌占总异养菌数的1.2~9.4%,沉积物中则占4.3~15.6%;拮抗菌的分布具有明显的季节变化,夏季拮抗菌的丰度大于其他季节,属的组成也较复杂多样。在所分离的拮抗菌中,有6株拮抗菌对多种试验菌株有不同程度的抑制能力,被鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、弧菌属(*Vibrio*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和无色杆菌属(*Achromobacter*)。作者讨论了海洋拮抗菌的时空分布与环境因子的关系及其在海洋环境自净中的作用,阐述了开发、利用海洋微生物资源的重要性。

关键词 上升流生态系,拮抗菌

海洋生物作为药物的来源,在抗菌、抗肿瘤、抗病毒等方面具有很大的潜力^[8,10],其中海洋微生物在抗生素的化学提取和资源开发方面更是具有得天独厚的价值。许多文献表明^[1,2,6]:海洋微生物能产生各类特殊的具有抗生作用的活性物质,是抗生素的丰富源泉。将这些产物开发成为有应用价值的医药品,是当前微生物应用研究的一个重要方向,已引起了国内外学者的普遍关注。

本文报道了对闽南-台湾浅滩上升流区海洋拮抗菌的初步研究结果;旨在了解拮抗菌在上升流海域的生态分布、种类组成等特点,为合理开发、利用海洋微生物资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 站位设立与样品采集

在闽南-台湾浅滩海区(21°20' N~24°10' N, 116°10' E~119°00' E)设立四个站位(T301,

T302, T303, T304),分别于1987年12月,1988年4,6,8,11月共5个航次按文献^[3]从不同水深(0,10,20,30,50,75,100,120,200m)采得水样100个,用大洋采泥器采得泥样20个,进行拮抗菌研究(采样时的水温、盐度见文献^[3,4])。

1.2 海洋异养菌和拮抗菌的计数

1.2.1 试验菌 大肠杆菌,金黄色葡萄球菌

1.2.2 培养基 海洋异养菌的计数采用2216E培养基,试验菌则采用胰化酪蛋白大豆琼脂培养基。

1.2.3 试验方法 细菌的计数是在琼脂平板上采用2216E培养基以涂布法进行。于20℃恒温培养4d后,用双层培养技术测定它们对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌活力。继

* 本研究为国家青年科学研究基金及国家教委基金资助课题。

收稿日期 1994年2月14日

而进行拮抗菌的计数并将其数目与样品中异养菌总数进行比较。

1.3 拮抗试验

分纯后,将6株海洋拮抗菌接种于2216E液体培养基中,28℃,180r/min摇瓶发酵5d。发酵液先用孔径为5μm的滤膜粗滤后,再经孔径为0.45μm滤膜过滤。按中华人民共和国药典(1977年版)所载钢管法测定对革兰氏阳性菌和阴性菌(绿脓杆菌、伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌、肺炎克雷伯氏菌、大肠杆菌、柠檬酸细菌、粘质沙雷氏菌、普通变形菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、粪链球菌)的拮抗作用。

1.4 海洋拮抗菌的形态观察、生理生化特征试验

将6株海洋拮抗菌依《伯杰氏细菌鉴定手册》鉴定至属。

2 结果

2.1 拮菌在不同站位、不同季节的分布

2.1.1 拮抗菌在海水中的分布(表1)

拮抗菌在该海区海水中的数量占异养菌总数的1.2~9.4%。夏季拮抗菌丰度较大,6月份各站位不同深度所含拮抗菌相对数量最大,8月份次之,4,11,12三个月拮抗菌比例较少。T301,T302,T303,T304四个站位在几个航次检出的拮抗菌比例(全年平均值)T303稍高,为7.144%;T301,T304居中,分别为6.12%和6.1%;T302较低,仅5.364%。

表1 海水中拮抗菌与总异养菌数的百分比(%)

Tab. 1 The percentage of antibiotic-producing bacteria among total heterophilic bacteria in seawater(%)

| 站位 | 1988年 | 1988年 | 1988年 | 1988年 | 1987年 | 平均 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 4月 | 6月 | 8月 | 11月 | 12月 | |
| T301 | 4.25 | 9.40 | 8.36 | 4.28 | 4.30 | 6.12 |
| T302 | 4.07 | 8.85 | 7.04 | 1.20 | 5.66 | 5.364 |
| T303 | 6.96 | 9.18 | 9.25 | 4.37 | 5.96 | 7.144 |
| T304 | 6.03 | 6.06 | 6.58 | 6.46 | 5.52 | 6.13 |
| 平均 | 5.33 | 8.37 | 7.81 | 4.08 | 5.61 | / |

2.1.2 拮抗菌在沉积物中的分布(表2)

拮抗菌在该海区沉积物中的数量占异养菌总数的比例较海水中高,为4.3~15.6%。不同

季节、不同站位拮抗菌相对数量悬殊较大,T301站在8月份数值最高(15.6%),最低值出现于2月的T301站。从总体上看,6,8月的拮抗菌相对数量较高,11,12月高,T302站的拮抗菌全年平均含量(7.32%)在四个站位中为最低。

表2 沉积物中拮抗菌与总异养菌数的百分比(%)

Tab. 2 The Percentage of antibiotic-Producing bacteria among total heterotrophic bacteria in sediments(%)

| 采集时间 (年,月) | T301 | T302 | T303 | T304 | 平均 |
|---------------|---------|------|-------|-------|-------|
| | 1987.12 | 4.30 | 7.85 | 7.33 | 8.92 |
| 1988.4 | 6.85 | / | 5.00 | 10.27 | 7.37 |
| 1988.6 | / | 6.76 | 14.86 | 8.38 | 10.00 |
| 1988.8 | 15.60 | / | 7.38 | 8.25 | 10.41 |
| 1988.11 | 6.55 | 7.34 | 8.05 | 8.18 | 7.53 |
| 平均 | 8.33 | 7.32 | 8.604 | 8.80 | / |

表3 6株海洋拮抗菌的抗菌活性(mm)

Tab. 3 Results of tests of antibiotics of 6 marine isolates (mm)

| 试验菌 | 菌株 | | | |
|-----------------------------------|-------|-------|------|------|
| | 59,36 | 12,29 | 24 | 35 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9.8 | 9.4 | 0 | 0 |
| <i>Salmonella typhi</i> | 9.9 | 9.3 | 0 | 0 |
| <i>Shigella dysenteriae</i> | 12.5 | 9.7 | 0 | 9.8 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 10.1 | 9.2 | 0 | 11.2 |
| <i>Escherichia coli</i> | 9.3 | 9.4 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter</i> | 12.2 | 0 | 0 | 9.2 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 13.1 | 9.7 | 0 | 9.8 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 9.9 | 0 | 0 | 9.3 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 10.9 | 9.8 | 9.4 | 13.2 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 14.2 | 14.5 | 10.3 | 14.7 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 9.2 | 9.3 | 0 | 14.6 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |

2.2 拮抗菌的抗菌活性(表3)

从海洋中分离的6株拮抗菌对12株试验菌有不同程度的抑制作用。59号及36号菌的培养液中所含的抗性物质的抗菌范围最广,除粪链球菌外,对其余11种试验菌均有相当明显的抑菌作用,如对金黄色葡萄球菌,抑菌圈达14.2mm。24号菌的抗菌谱较窄,仅对表皮葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有抑制作用。不同试验菌对不同拮抗菌的敏感程度各不相同,如表皮葡萄球菌是所有试验菌株中最为敏感的,对所有拮抗菌都有显著反应;粪链球菌则对所有发酵液

均无敏感性。

2.3 几株拮抗菌的初步鉴定

经鉴定,从表层海水分离的菌株 59 号和 36 号属于黄杆菌属,在海区中数量较少;分离自表层海水的菌株 12 号和 29 号属于假单胞菌属,在海区中数量较多;来自沉积物中的菌株 24 号属于弧菌属,在海区中数量也较多;菌株 35 号也由表层海水中分离到,在海区中数量很少,为无色杆菌属。

3 讨论

3.1 海洋拮抗菌的时空分布及其与环境因子的关系

3.1.1 在夏季拮抗菌的相对数量高于春、秋、冬季。上升流是海区中的一种海水涌升运动。闽南-台湾浅滩海区由于地形、海流和季风等因素的影响,上升流涌升运动更为强烈。上升流从海洋深处带来了低温、高盐、富含营养盐的深水和一些中、深层分布的生物种类,不仅改变了海区海水及沉积物的物理化学特性,也直接或间接地改变了一些生物的种群结构及数量分布。

3.1.2 T302 站位的拮抗菌相对数量(全年平均值)较 T301, T303, T304 低。可能的原因是不同季节、不同海区的上升流涌升运动不同造成的。夏季,在南澎列岛毛甲子一带形成近岸上升流,浅滩南部则全年都有上升流出现。所以在全年出现上升流的 T303, T304 站,拮抗菌相对数量(7.144%, 6.13%)高于无上升流涌升的 T307 站(5.364%)。T301 站在形成上升流的夏季中(6, 8 月)的拮抗菌的相对数量高于无上升流的 4, 11, 12 月份。

3.1.3 海洋沉积物中拮抗菌的相对含量较海水中的高。造成这一差异的可能原因有两个:其一,所研究海区主要为砂质沉积,活跃的水动力使海水中丰富的有机物颗粒难于沉积,沉积物中有机 N, P, C 相对缺乏^[5],使异养菌的生长受到限制;其二,拮抗菌产生的抗生物物质在该海区活跃的水动力作用下,被较快地稀释,因而对其周围各种微生物的拮抗作用相对较难表

现出来,而沉积物则是一个相对稳定的固相环境,拮抗菌在这一较为稳定的环境中能较为有效地抑制其它菌类的生长,从而使其自身的相对数量增大。

3.2 拮抗菌与海洋环境自净

海洋一方面在不停地接受富含微生物及各种化学物质的污水,另一方面要保持其环境的生态平衡。对海洋自净现象的观察和证实已有文献报道^[7,8,10]。如何解释这一稳定性的存在,查明生态平衡得以维持的机制,是海洋环境科学的重要课题之一。我们的研究结果表明^[11,12],海水中存在的某类活性物质是陆源微生物在环境中消失的原因之一(表 4),如将大肠菌置于不同的海水中(天然海水、过滤海水、灭菌海水和人工海水),其死亡率相差较大。在天然海水中大肠杆菌的死亡率(48h)最高,达到 90%,天然海水过滤后,水中仍有许多拮抗菌及其它水生生物释出的水溶性抗生物物质,因而在过滤海水中大肠杆菌的死亡率也较高,达到 82%;灭菌后的海水中大肠杆菌的死亡率明显下降,仅 48%,主要的原因是天然海水中产生抗菌活性物质的生物在灭菌过程中被杀死,且其所释放出来的抗性物质因热而丧失活性所致;人工海水的杀菌作用很低,其抑制机理主要为理化因子的作用,大肠杆菌在其中死亡率仅 40%。因此,笔者认为天然海水的高杀菌力是海水中理化因子和生物因子共同作用的结果,相对而言,生物因子的作用更为重要。目前,一些学者正致力于寻找这些抗菌活性物质的来源,并研究其对于由生活污水带入海洋环境的微生物,尤其是病原微生物的作用模式。此外,在对海洋重要灾害——赤潮的控制研究中,人们正试图探讨赤潮的生物防治途径。

3.3 海洋拮抗菌与抗生素开发

现代的抗生素开发及生产大多数仍是依赖于从土壤中筛选出的微生物。对其他环境中的微生物,尤其是海洋微生物,这一在抗生素的化学提取和资源开发中有着巨大潜力的生物资源,尚没有给予足够的重视。近年来,由于收集和

鉴别方面的新技术的发展,人们对海洋微生物的重要性有了一定的认识。由于海洋环境的特殊性,海洋微生物能在代谢过程中产生与陆地微生物所产生的结构不同的抗菌活性物质,这

表 4 细菌在不同海水中的死亡率比较
Tab. 4 Comparison of bacterial mortalities in different sea-water

| 实验条件 | 菌名 | 死亡率 (%) | 时间(h) | 备注 |
|------|--------------|---------|-------|-----------------------------|
| 天然海水 | 粪链球菌 (Gr. D) | 50 | 48 | 1987 年于 法国 尼斯 港 |
| 过滤海水 | 76117 | 42 | 48 | |
| 天然海水 | 大肠杆菌 | 90 | 48 | |
| 过滤海水 | | 82 | 48 | |
| 灭菌海水 | | 48 | 48 | |
| 人工海水 | | 40 | 48 | |
| 天然海水 | 金黄色葡萄球菌 | 85 | 48 | |
| 过滤海水 | | 63 | 48 | |
| 灭菌海水 | | 54 | 48 | |
| 天然海水 | 痢疾志贺氏菌 | 67 | 48 | |

些物质很可能成为抗生素的新来源。此外,海洋微生物还具有可在实验室里大量培养,它们的发酵产物所含的物质更易提纯等优点,所以从海洋微生物中寻找抗生素将是一条重要途径。相信对海洋微生物的深入探索及抗生素检出、

筛选手段的更新,从海洋微生物中可以找到更多的新抗生素和其它生物活性物质。

参考文献

[1] 梁 炜,殷丽明,1984. 抗生素 9(3):189~195.
 [2] 郑天凌等,1988. 厦门大学学报(自然科学报) 2:220~223.
 [3] 胡建宇等,1991. 闽南-台湾浅滩渔场上升流生态系研究文集. 科学技术出版社,75~84.
 [4] 吴丽云等,1991. 闽南-台湾浅滩渔场上升流生态系研究文集. 科学技术出版社,169~178.
 [5] 郭允谋等,1991. 闽南-台湾浅滩渔场上升流生态系研究文集,北京科学出版社,32~38.
 [6] B. Austin Department of Biological Sciences, 1989. *Journal of Applied Bacteriology* 67: 461~470.
 [7] Heim De Bala C. H., et al., 1952. *Bull. Acad. Natl. Med.* 136:514.
 [8] Lessard, E. J., et al., 1983. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (3):950.
 [9] Parsos, T. R., et al., 1984. *A manual of chemical and biological Methods for sea water analysis*, Oxford, Pergamon Press, England.
 [10] ZoBell, C. E., 1936. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 34 (2):113
 [11] Zheng T. L. et al., 1987. *EUR des civilisations de Nice*, P120.
 [12] Zheng T. L. et al., 1987. *These de Doctorat, U, de Nice, Uer domine Mediteraneen*, 140.

STUDIES ON THE ANTIBIOTIC-PRODUCING BACTERIA IN THE UPWELLING REGION OF THE BANK OF FUJIAN-TAIWAN FISHING GROUND

Zheng Tianling, Hong Jing, Zheng Zhicheng and Zhou Meiyong
(Xiamen University, 361005)

Received: Feb. 14, 1994

Key Words: Upwelling region, Antibiotic-producing bacteria

Abstract

Six cruises were carried out off the bank of Fujian-Taiwan Fishing Ground during the period of December 21, 1987 to November 15, 1988 in order to investigate the distribution patterns of antibiotic-producing bacteria in the upwelling region and to exploit and make use of marine microbial resource in the future. The results show that the distribution of antibiotic-producing bacteria among the heterotrophic bacteria

ranged from 1.2% to 9.4% in the water and 4.3% to 15.6% in the sediments. Six marine bacteria which synthesize antibiotics and inhibit various terrestrial bacteria in large antibacterial range and strong activity were identified. Their morphological, physiological and biochemical characters were reported and the relationship among distribution of antibiotic-producing bacteria with temporal and spatial variation, the action of upwelling and other environmental factors are discussed.