

南麂岛海域沉积物中海洋放线菌的分离研究

王海雁, 刘 健, 赵淑江

(温州医学院 环境与公共卫生学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 采用稀释涂板法研究了南麂岛海域沉积物中海洋放线菌的分离技术, 分析了真空干燥处理、热处理、海水浓度、培养基种类等因素对分离效果的影响; 首次将羧甲基纤维素钠(CMC)溶液应用于海洋沉积物样品的预处理, 探讨了不同浓度的CMC对海洋沉积物样品中放线菌分离结果的影响。结果表明: 海洋沉积物经干燥处理、50℃热处理20 min均能有效地减少细菌数量, 利于海洋沉积物中放线菌的分离; 60%的海水配制的培养基对海洋放线菌的分离效果优于纯海水所配培养基, 并且培养基中添加海泥浸出液能有效地增加海洋放线菌的出菌率; 以质量浓度为2 g/L的CMC为分散剂时, 不仅能良好地分散沉积物样品中的放线菌孢子, 而且能明显地增加海洋放线菌的检出量及稀有放线菌的数量。

关键词: 南麂岛; 海洋沉积物; 海洋放线菌; 分离方法; 羧甲基纤维素钠(CMC)

中图分类号: P736.2; Q939.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-3096(2010)01-0048-04

海洋放线菌由于其代谢活性产物结构新颖、功能独特, 从而受到了广泛关注, 成为海洋新药开发中重要的微生物资源^[1-4]。而海洋放线菌的分离是海洋放线菌资源开发的关键一步, 虽然有较多关于陆地放线菌分离方法的报道, 但由于陆地与海洋间的环境条件不同可能造成在分离两种生境下生存的放线菌时分离方法上会存在较大的差异。实验证明, 样品的预处理方法对样品中放线菌的分离效果能产生重要影响^[5-8]。中国海域广阔, 但对海洋放线菌资源的研究和开发却非常有限。近几年, 虽然有关不同海域海洋放线菌多样性的研究报道日益增多^[9-10], 但对南麂岛海域海洋放线菌资源的研究鲜有报道。

南麂岛地处亚热带, 坐落于浙江平阳县鳌江口外30海里的东海海面, 位于27°27' N, 121°05' E, 因其复杂的海洋气候环境和丰富的海洋生物资源而闻名。海域底质以粉砂质粘土为主。因其远离大陆, 受人类活动及污染程度较小, 优越的海洋自然环境条件, 使其具有丰富的海洋生物多样性, 被誉为“贝藻王国”。1998年12月成为中国目前唯一纳入联合国教科文组织世界生物圈保护区网络的海洋类型自然保护区。本实验针对南麂岛独特的海洋环境, 选择南麂岛海域的沉积物样品为实验对象, 研究了几种不同的沉积物样品预处理方法对该海域中海洋放线菌分离效果的影响, 并首次探讨了羧甲基纤维素钠(CMC)溶液在沉积物样品预处理中对海洋放线菌孢子的分散效果, 旨在为该海域的海洋放线菌分离培养建立有效的分离方法, 为进一步开发该海域的海洋放线菌资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 海泥的采集

选择含腐殖质丰富的南麂岛养殖区附近海域为海泥采集区, 水深约15 m。随机采集12份海洋沉积物样品, 用无菌三角烧瓶盛放, 放于冰盒保存, 次日送回实验室进行处理。并经初步实验研究后, 以含海洋放线菌最丰富的12号样品为供试沉积物样品。

1.2 培养基及相关试剂的制备

高氏一号培养基(GAU), HV培养基, 几丁质培养基(CM), 甘油精氨酸培养基(GAR), 淀粉酪蛋白培养基(SC), 培养基均用来源于样品采集区的陈海水配制而成。抑制剂是终质量浓度为 0.5×10^{-6} 的重铬酸钾^[11]。

几丁质的制备: 取海虾透明壳质部分, 去除肉屑后, 加洗衣粉煮0.5 h, 水洗烘干后, 每10 g虾皮用20 mL丙酮浸润, 再用20 mL浓盐酸浸泡成稠糊状。

海泥溶出液: 称取与样品采集于同一地点的沉积物1 000 g, 加入海水1 000 mL, 煮沸60 min, 暗处放置2 d后过滤, 用海水定容置1 000 mL备用。

CMC溶液: 将CMC用无菌海水配置成5个稀释度的溶液备用。

收稿日期: 2008-07-19; 修回日期: 2009-03-28

基金项目: 温州市科技计划资助项目(Y20080092)

作者简介: 王海雁(1982), 女, 山东菏泽人, 硕士, 主要研究方向海洋渔业致病菌防治, E-mail: wan gyan-190707@163.com; 赵淑江, 通信作者, 电话: 0577-86699553, E-mail: zsj62@163.com

1.3 放线菌菌株分离

采用稀释涂板法^[12]。均称取沉积物样品 1 g, 加入装有玻璃珠的 10 mL 无菌海水中激烈震荡 20 min 后, 静置 30 min, 取上清液, 逐级稀释至 10^{-3} , 各取 0.15 mL 分别涂平板, 每处理各设 3 个重复, 28℃ 培养 7 d。以 10^{-2} 稀释度计数。

1.4 数据的处理

实验数据均采用 DPS 13.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 干燥处理对放线菌分离效果的影响

取两份沉积物样品, 一份无菌保存于 4℃ 冰箱中, 一份平铺于无菌培养皿, 经 24 h 真空干燥, 然后研磨成粉做稀释处理。用高氏一号进行放线菌的分离。如表 1 所示, 真空干燥处理后, 细菌的数量急剧减少, 而放线菌减少量较小。

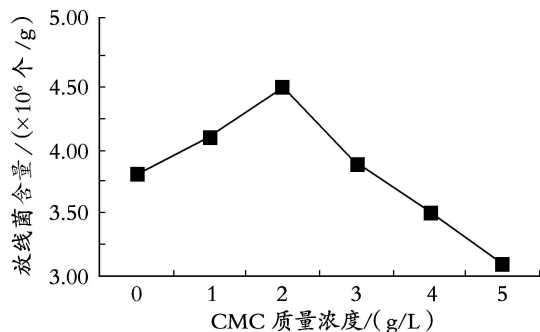


图 1 不同质量浓度的 CMC 对放线菌分离效果的影响

Fig. 1 The influence of different CMC concentrations on the isolation effect of marine actinomycetes strains

2.3 热处理对放线菌分离效果的影响

将风干后的样品经质量浓度为 2 g/L 的 CMC 震荡处理 30 min, 使样品充分分散后, 放于不同水浴中处理相应的时间。用高氏一号进行放线菌的分离。分离结果如表 2 所示, 随着温度的升高, 放线菌的数量呈现先增后减得趋势, 而细菌数量逐渐减少。并且同一温度下经过不同时间的处理后, 放线菌分离结果也将产生影响。结果表明 50℃ 处理 20 min 所获得的放线菌数量最多, 细菌数量也不会影响到放线菌的挑选。

表 2 热处理对放线菌分离效果的影响

Tab. 2 The influence of thermal treatment on the isolation effect of marine actinomycetes strains

温度(℃)	时间(min)	含量(10^6 个/g)	
		放线菌	细菌
未加热	0	4.3	26.5

表 1 干燥处理对放线菌分离效果的影响

Tab. 1 The influence of vacuum drying on the isolation effect of marine actinomycetes strains

处理方式	含量(10^6 个/g)	
	放线菌	细菌
新鲜沉积物	4.1	65.3
干燥沉积物	3.9	27.6

2.2 不同质量浓度的 CMC 对放线菌分离效果的影响

样品经真空干燥处理后, 再经不同浓度 CMC 处理, 用高氏一号培养基进行放线菌分离。分离结果如图 1。随着 CMC 质量浓度的增加, 放线菌总数呈先增后减的趋势, 而细菌无明显变化。2 g/L 的 CMC 处理样品后, 分离得到数量较多海洋放线菌。

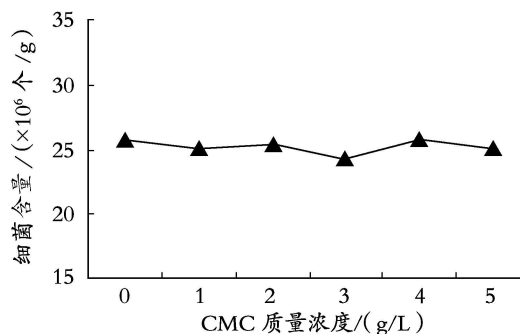


表 2 续

温度(℃)	时间(min)	含量(10^6 个/g)	
		放线菌	细菌
30	10	5.2	25.8
	20	5.6	25.3
	30	5.8	24.1
40	10	6.1	21.6
	20	7.1	20.5
	30	7.6	19.7
50	10	8	16.3
	20	8.3	15.1
	30	7.5	14.6
60	10	6.8	13.6
	20	6.2	12.1
	30	5.9	9.7

2.4 海水浓度对放线菌分离效果的影响

将样品先后经质量浓度为 2 g/L 的 CMC 震荡分散处理、50℃ 加热 20 min 后,涂布于不同浓度海水配置的高氏一号培养基上。培养结果显示,60% 的陈海水配置的培养基上,放线菌分离的数量明显高于纯海水配置的培养基(图 2)。

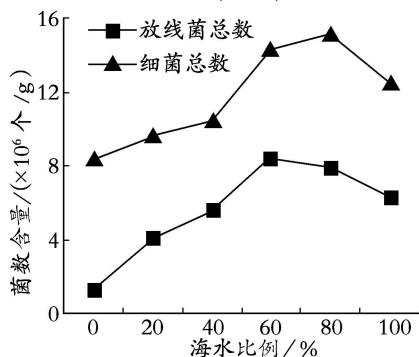


图 2 海水浓度对放线菌分离效果的影响

Fig. 2 The influence of seawater concentration on the isolation effect of marine actinomycetes strains

2.5 培养基种类对放线菌分离计数结果的影响

将样品先后经质量浓度为 2 g/L 的 CMC 震荡分散处理、50℃ 加热 20 min 后,将样品梯度稀释涂布于 60% 陈海水配置的不同培养基。结果显示,GAU、HAV 两种培养基分得的放线菌数目明显多于其他培养基,而添加沉积物浸出液的培养基分离到得菌落数明显多于未添加者(表 3)。

表 3 不同培养基对放线菌的分离效果

Tab. 3 The influence of thermal treatment on the isolation effect of marine actinomycetes strains

培养基	含量(×10 ⁶ 个/g)			
	放线菌		细菌	
	a	b	a	b
GAU	8.5	9.1	14.3	14.6
HV	7.3	7.6	9.6	10.3
CM	6.1	6.5	10.1	10.5
SC	4.7	5.1	12.4	12.6
GAR	5.4	5.8	15.1	15.7

注: a 为未添加沉积物浸出液; b 为添加 100 mL 沉积物浸出液

3 讨论

将沉积物样品经真空干燥处理后,对放线菌的出菌率影响不大,但细菌的数量明显减少。原因是细菌对干燥环境比较敏感,水分的散失导致细菌丧失活力,而大部分放线菌的孢子能够耐受干燥。

CMC 因具有悬浮等作用,一定质量浓度的

CMC 溶液能够较好的分散和悬浮海泥样品中的放线菌孢子,保证了样品悬液的均一性。试验中作者发现,如果 CMC 的质量浓度过小则对孢子起不到悬浮及分散的作用,因为有些孢子可能吸附于底泥颗粒上而沉降。而 CMC 质量浓度过大黏度增强,会使部分孢子粘附于吸管壁造成误差。CMC 与以往报道的 0.05% 十二烷基磺酸钠(SDS)等分散剂对沉积物样品的分散效果是否存在差异有待于进一步地进行对比试验^[13],为沉积物样品的预处理选择一种良好分散剂提供一定的参考。

放线菌的孢子具有耐热、耐干燥的性质。适度的热处理不仅能够减少细菌的数量而且能诱发某些放线菌孢子的萌发,增加放线菌的出菌率。实验发现海洋底泥样品的热处理温度不宜过高,高于 60℃ 后将降低放线菌的出菌率,建议对海洋沉积物热处理温度为 40~60℃。

采用 60% 的海水配置高氏一号培养基能增加分离到的海洋放线菌数量和种类。而培养基中添加沉积物浸出液对海洋放线菌的分离效果更佳,分析可能沉积物浸出液能提供其原有生活环境中的某些微量元素,从而增加了放线菌的出菌率。海水的浓度能够影响海洋放线菌生长环境的渗透压,本试验发现 60% 的海水配置的培养基最有利于放线菌的分离,海水质量浓度过高造成环境渗透压过大从而破坏菌体的细胞膜,使菌体死亡,所以配置海洋放线菌培养基时应该考虑所用陈海水的质量浓度。

样品采集于离南麂岛鱼类养殖区 2 海里处,实验结果表明从该区采集的样品中能分离到较多数量的放线菌,说明养殖区附近海域可能是海洋放线菌相对密集的地方。原因可能是养殖区投放的饵料残留、生物体所产代谢废物形成了该区丰富的腐殖质,并随潮汐扩散到养殖区周围,为海洋放线菌的生存和繁殖提供了充足的营养。吴少杰等在对胶州湾海洋放线菌分布的研究中也曾发现江河入海口等含有腐殖质丰富的水域沉积物中含有丰富的海洋放线菌资源^[14]。因此,为了更好地开发南麂岛海域的放线菌资源,今后可以有针对性地选择腐殖质相对丰富的海域进行样品采集。

参考文献:

- [1] Kelecom A. Secondary metabolites from marine microorganisms [J]. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2002, 74(1): 151-170.
- [2] Bull A T, Stach J E, Ward A C, et al. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2005, 87: 65-79.

- [3] Dobretsov S, Dahms H U, Qian P Y, *et al.* Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites [J]. *Biofouling*, 2006, **22**(1): 43-54.
- [4] Fenical W, Jensen P R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria [J]. *Nature Chemical Biology*, 2006, **2**: 666-673.
- [5] 段淑蓉. 几种利用预处理分离稀有放线菌的方法 [J]. *安徽农学通报*, 2007, **13**(23): 32-33.
- [6] Macnaughton S J, O'donnell A G. Tuberculostearic acid as a means of estimating the recovery using the dispersion and differential centrifugation of actinomycetes from soil [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1994, **20**: 69-70.
- [7] Li Y V, Terekhova L P. Isolation of actinomycetes from soil using extremely high-frequency radiation [J]. *Mikrobiologiya*, 2002, **71**: 119-122.
- [8] Li Y V, Terekhova L P, Alferova I V, *et al.* The application of succession analysis in combination with EHF irradiation to the selective isolation of actinomycetes from soil [J]. *Mikrobiologiya*, 2003, **72**: 114-117.
- [9] 王书锦, 胡江春, 薛德林, 等. 中国黄海、渤海、辽宁近海地区海洋微生物资源的研究 [J]. *锦州师范学院学报(自然科学版)*, 2001, **22**(1): 1-4.
- [10] 王宏梅, 赵心清. 可培养海洋放线菌生物多样性的研究进展 [J]. *微生物学学报*, 2007, **34**(5): 996-1 000.
- [11] 司美茹, 薛泉宏, 来航线. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究 [J]. *微生物学通报*, 2004, **31**(2): 61-65.
- [12] 周德庆. *微生物学实验教程* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [13] Hayakawa M, Nonomura H. A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil [J]. *Actinomycetol*, 1989, **3**(2): 95-104.
- [14] 吴少杰, 王淑军, 等. 胶州湾海洋放线菌的分布及其抗微生物活性 [J]. *中国海洋药物杂志*, 2006, **25**(5): 10-13.

Isolation of marine actinomycetes strains from sediments in Nanji Island offshore

WANG Hai-yan, LIU Jian, ZHAO Shu-jiang

(School of Environmental Science and Public Health, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Received: Jul. , 19, 2008

Key words: Nanji Island; marine sediment; marine actinomycete; isolation method; sodium carboxymethyl cellulose (CMC)

Abstract: The isolation technologies of marine actinomycetes from the sediments in Nanji Island offshore were studied by using the gradient dilution and plate paint isolation methods. The influences of Vacuum drying, thermal treatment of the marine sediment samples, seawater concentration and medium variety on the isolation effect of marine actinomycetes strains were tested. And sodium carboxymethyl cellulose (CMC) was applied to the pretreatment of marine sediments for the first time. The results showed that bacteria decreased obviously in the samples by Vacuum drying and 50℃ thermal treatment for 20 minutes. The culture mediums made of 60% seawater were superior to those made of pure seawater. And adding mud leachate into the mediums could increase the strains of actinomycetes significantly. CMC of 2 g/L could disperse the spores of actinomycetes effectively, and increase the species of actinomycetes and their strains significantly.

(本文编辑: 梁德海)