

海洋贝类附生细菌区系分析及弧菌拮抗菌的筛选

张 柯, 丁翠玲, 张 栋

(山东大学 威海分校 海洋学院, 山东 威海 264209)

摘要: 对中国威海近海海域的紫贻贝、牡蛎、花蛤、毛蛤、扇贝、海兔等 6 种海洋贝类的附生细菌进行了分离培养, 筛选得到 100 株细菌。从中选出 45 株有代表性的菌株, 克隆其 16S rDNA 序列, 进行分子鉴定。结果表明, 这些细菌分布在 *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bizionia*, *Brevundimonas*, *Cellulophaga*, *Cobetia*, *Gelidibacter*, *Kocuria*, *Krokinobacter*, *Lacinutrix*, *Marinobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Planomicrobium*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Salinibacterium*, *Shewanella*, *Tenacibaculum* 和 *Vibrio* 共 21 个属中。利用平板点种法对这 100 株菌株进行了抗菌活性筛选, 结果显示有 2 株细菌具有明显的抗菌活性。

关键词: 细菌多样性; 海洋贝类; 16S rDNA; 区系分析; 拮抗

中图分类号: Q958.8; Q933 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2011)07-0026-04

贝类属于软体动物门, 全世界贝类现存 1.1 万种左右, 其中 80% 生活于海洋中, 它是自然界生物中仅次于昆虫类的第二大族类。贝类中绝大多数种类均可食用, 很多贝类的肉质肥嫩, 鲜美可口, 营养丰富。海洋贝类已发展为海水养殖的重要对象, 产量也极为可观。不少贝类是不可缺少的优良中药材, 如珍珠和珍珠层粉、鲍的贝壳石决明、宝贝的贝壳海巴、乌贼的内壳海螵蛸、海兔的卵群等。与陆生生物的次生代谢产物相比, 海洋生物由于生活环境复杂门类多样化, 其天然产物具有很多新型的结构骨架和独特的化学结构, 也具有更强烈的生物活性。随着研究的逐步深入, 不少学者发现相当一部分海洋动植物中的活性物质来源于其附生微生物。由于海洋微生物具有可产生种类多样、结构新颖的活性物质及易于大规模工业生产的特点, 所以海洋微生物作为活性物质的可持续性资源正日益受到国内外学者的重视^[1-2]。

我国是世界贝类养殖大国, 形成规模养殖的经济贝类有近 20 种, 贝类养殖已经成为威海市海水养殖业的支柱之一。但是随着我国沿海城市工业的迅速发展, 向海洋排放的废弃物日益增多, 部分水域已受到不同程度的污染。贝类的生长位置比较稳定, 一旦遇到水质污染, 较易受到污染。再者双壳贝类属于滤食性生物, 在滤食饵料生物的同时, 也将水中的有害物质吸入体内。食用不洁贝类极易引发疾病, 从而局部暴发食品中毒事件。我国政府近年来对食品安全十分重视, 并积极采取多种措施, 加强对贝类

的卫生管理, 确保贝类的食用安全。为了解海洋贝类产品的卫生状况以及消费者食用贝类产品受微生物污染的危害程度, 作者就威海近海主要海洋贝类进行附生微生物区系分析, 对其食用安全性做出正确的评价, 不仅可以为有效保证贝类食用安全提供理论依据, 还可增强贝类贸易市场竞争力, 对完善和提高我国贝类安全管理水平, 保证国民身体健康和在国际贸易中维护自身利益均有重大意义^[3-4]。

本实验从山东威海近海海域多处地点采集 6 种具有代表性海洋贝类, 对其附生细菌进行多样性分析, 以实验室保藏鳃弧菌 W1 为指示菌筛选出其中具有较强抗菌活性的菌株, 为进一步开展海洋微生物抗菌活性物质的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集

实验所需样品贝类均于 2010 年 4~6 月采自山东威海近海海域、小石岛养殖场和不同的贝类人工养殖场等多个不同地点。采集时用塑料袋装取适量海水运输以保持其鲜活。在采样 2 h 内将样品处理^[5]。

1.2 培养基

2216E 培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g, 柠檬酸

收稿日期: 2010-10-12; 修回日期: 2011-03-11

基金项目: 山东大学威海分校科研立项资助项目(A10021)

作者简介: 张柯(1990-), 男, 山东济南人, 本科生, 主要从事海洋细菌筛选及其抗菌活性研究, E-mail: adxyz1990@163.com

铁 0.1 g, 陈海水 1 000 mL, pH 7.6。

TCBS 培养基: TCBS 合成培养基加水溶解^[6]。

1.3 附生细菌的分离

首先用无菌海水反复冲洗样品, 用镊子无菌操作取出贝肉, 用无菌海水反复冲洗。称取 3~5g 样品放入研磨器内, 加 3 mL 无菌海水充分研磨。将研磨液用无菌海水稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 五个浓度。用涂布棒均匀涂布于 2216E 培养基, 28℃ 培养 96 h。挑取不同菌落于 2216E 平板上划线分离, 以获得纯培养。将分离的不同菌株接种于 TCBS 培养基上, 观察菌株是否能够生长及其菌落形态。利用 -80℃ 冰箱保藏菌种^[7]。

1.4 抗菌活性筛选

以实验室保藏菌种 W1 为实验用敏感指示菌, 用平板点种法筛选具有抑菌活性菌株。以 DH5 α 作为阴性对照, 以实验室保藏 A18 为阳性对照。培养皿置于 28℃ 培养 48 h。根据抑菌圈大小判断抑菌活性。

1.5 16S rDNA 序列测定和分析

1.5.1 PRC 模板 DNA 的制备

将细菌接种于 2216E 平板上, 28℃ 培养过夜。取单一菌落悬浮于 20 μ L 无菌蒸馏水中。于 100℃ 水浴加热 10 min, 立即放入冰水混合物中。

1.5.2 16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增与测序

扩增 16S rDNA 的正向引物为 27F: 5'-AGAGT-TTGATC(C/A)TGGCTCAG-3', 反向引物 1492R: 5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3' 在 50 μ L 的 PCR 反应体系中含有: 1 \times PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 4 \times dNTP 混合物各 200 μ mol/L, 引物各 0.5 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 0.8 μ L(5U/ μ L), 1 μ LDNA 原液。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 6min; 接 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72℃ 温育 8 min, 4℃ 保存^[7]。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 直接交由北京三博远志生物有限责任公司进行序列测定。

1.5.3 序列分析及数据处理

将测定的基因序列输入 GenBank, 获得收录号。并运用 Blast 程序与数据库中已存在的细菌 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。利用 MEGA4.0 软件绘制系统发育树, 确定其系统发生学地位。

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

根据菌落在 2216E 培养基及 TCBS 培养基上的形态、大小、颜色等表观特征, 选取不同类型的有代表性的菌落, 从采集自威海近海的 6 种代表性贝类中共分离得到 100 株海洋细菌。挑取这些海洋细菌, 平板划线纯化至单菌落。利用 -80℃ 冰箱保藏菌种。

2.2 16S rDNA 序列测定

从分离到的 100 株细菌中选出 43 株有代表性的纯培养细菌进行 16S rDNA 扩增和测序, 将测得的序列提交到 GenBank, 获得收录号 (HQ443218、HQ538732-HQ538773), 利用 Blaster 进行相似性比较^[8]。利用 MEGA4.0 软件进行系统发生学分析, 结果见图 1。

结果显示, 测序的 45 株细菌分别属于 21 个属, *Psychrobacter* 属分布最多有 7 株, 5 株分布在 *Pseudoalteromonas* 属, *Arthrobacter*, *Vibrio* 两个属分别有 4 株。其中 ZH18 与 *Micrococcus luteus* 具有最高同源性, 但两者有明显的区别, 可能为潜在的新种。杜宗军等^[9]从海葵中分离到的 56 株细菌分属于 *Pseudoalteromonas*, *Colwellia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Endozoicomonas*, *Roseovarius*, *Paracoccus*, *Loktanella*, *Leisingera*, *Sulfitobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Plantibacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Joostella*, *Psychroserpens*, *Cellulophaga*, *Krokinobacter*, *Polaribacter* 和 *Psychrobacter* 共 22 个属。分布于 *Pseudoalteromonas* 属的菌株最多, 达到了 16 株, 4 株属于 *Vibrio* 属, 有 7 株与已发现细菌的最高相似度在 97% 以下, 可以认为是潜在的新种。在分离到的 56 株细菌中 17 株可产蛋白酶, 20 株产脂肪酶, NQ8 对指示菌具有很强的拮抗作用。通过两个实验的结果对比可分析出, 海洋动物附生细菌多分布在 *Pseudoalteromonas* 属, *Vibrio* 属也有较多分布, 其中一些菌株对弧菌属有较强拮抗作用。目前, 可根据海洋动物体内弧菌属细菌的分布情况对其食用安全性做出正确的评价。一些病原性弧菌常可在扇贝的育苗期大量繁殖, 引起贝类幼苗的疾病, 短时间内可使贝苗大量下沉、死亡, 造成极大的经济损失。通过本次的实验结果可以分析出, 自然海域及人工养殖场的海洋贝类附生细菌中不同程度的都存在对人类健康产生威胁的致病菌, 人们在食用海洋贝类时, 应充分加工杀灭其中的病原性微生物以保证食用的

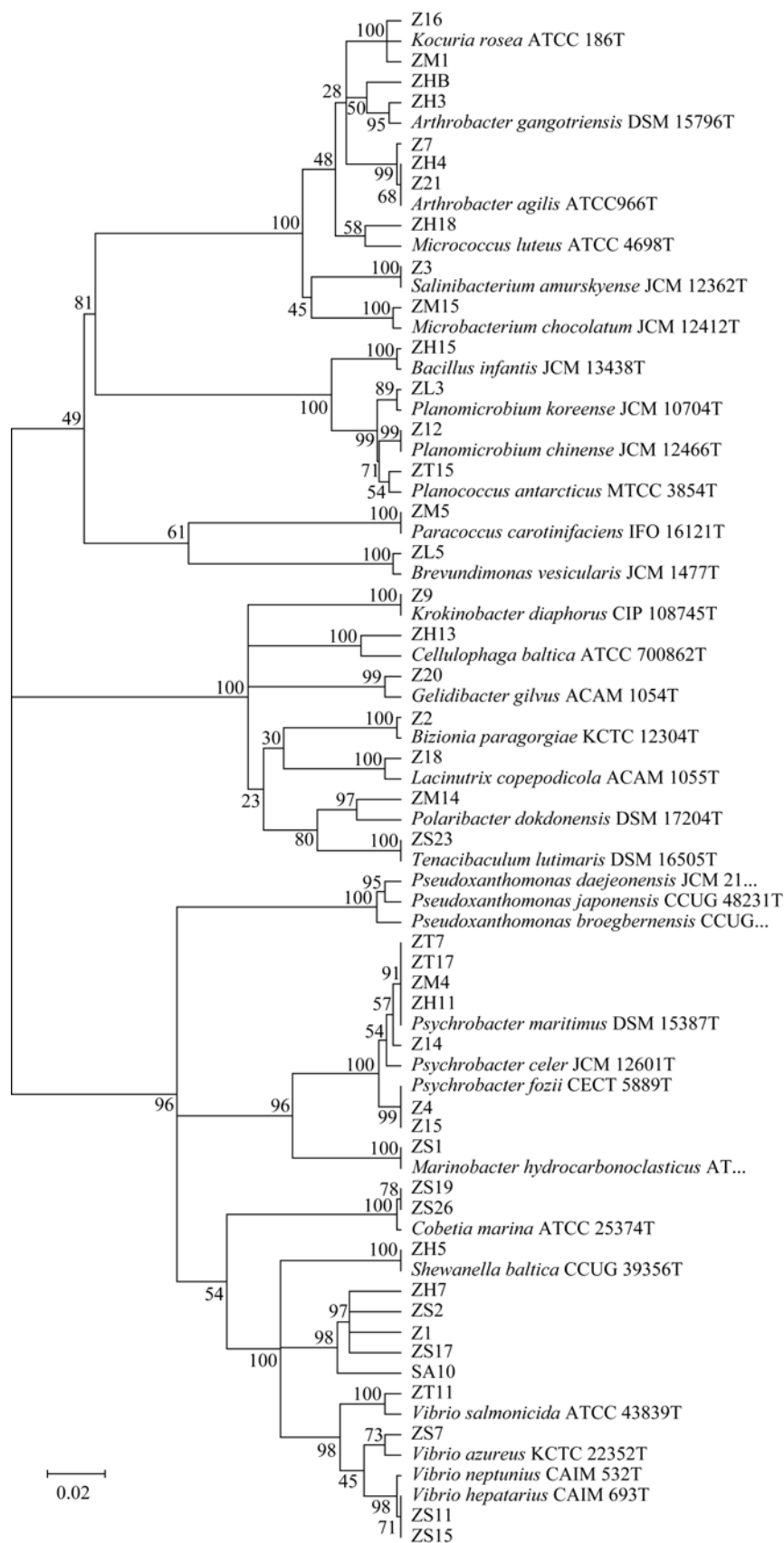


图 1 威海近海海洋贝类附生细菌及其他相关细菌的系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining tree of bacteria attached on the marine shellfish isolated from Weihai coast and some related strains

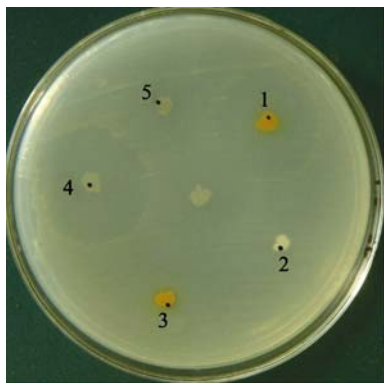


图2 SA10对 *Vibrio gallicus* V8产生的抑菌圈(图中4所示)

Fig. 2 Inhibition zones produced by SA10 (marked as 4) to *Vibrio gallicus* V8

安全性。

2.3 弧菌拮抗菌的筛选

采用平板点种法,以实验室保藏弧菌 W1 (*Vibrio anguillarum*)、V8(*Vibrio gallicus*)为实验指示菌,对从海洋贝类中分离到的 100 株细菌进行抗菌活性筛选。抑菌实验筛选出 2 株具有较高抗菌活性菌株 SA10 及 ZH18。两株具高抗菌活性的菌株分别属于 *Pseudoalteromonas* 和 *Micrococcus* 两个属。

3 讨论

从威海近海 6 种海洋贝类中筛选分离出 100 株附生细菌,根据菌株的颜色、表面状态、边缘形状、是否透明等表观特征从中选出 43 株进行了 16S rDNA 序列测定和分析。其中 36 株细菌可鉴定到种^[7]。这 43 株细菌分布在 21 个属中,其中有 7 株分布在 *Psychrobacter* 属,5 株分布在 *Pseudoalteromonas* 属, *Arthrobacter*, *Vibrio* 两个属分别有 4 株。

从以上结果可以看出,威海近海贝类附生细菌具有较大的多样性。各份样品中均检出了一定数量的致病菌,随着在食物链中的传递与积累,必将由此引起人类的健康问题,这提醒我们要高度重视海洋贝类的食用安全。我们应对养殖环境的卫生安全引起足够重视,在食用海洋贝类时应充分加热以达到食用安全,海洋贝类的食品安全问题是一个需要我们长期关注的重要课题。

贝类因其栖息环境、摄食方式等限制,成为微生物的良好宿主。海洋贝类中的附生微生物与宿主之间有着紧密的联系。某些附生微生物可以产生抗生

素以利于一些防御能力较差的宿主在复杂的海洋环境中生存。其中有很多结构新颖的活性物质是潜在的新药来源。

我国海域面积广阔,海洋贝类更是分布广泛、种类繁多。海洋贝类体内多样的微生物是开发海洋贝类活性物质及海洋药物潜在的宝贵资源。海洋贝类附生细菌多样性分析是对其开发利用的基础,但其中大多数还处于非培养状态,相信随着现代微生物技术的迅猛发展,可培养的细菌种类会越来越多,新类别细菌的发现有利于人们对于海洋微生物的开发工作,相关的进一步研究有待更多学者的不断研究。

致谢:本研究承蒙我的指导老师杜宗军副教授及苗婷婷女士指导完成,感谢他们的热心指导和大力帮助,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] 朱鹏,郑丽. 抗菌和细胞毒活性海洋细菌的筛选及其次生代谢基因证据[J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 228-234.
- [2] 张戌升,李志勇. 基于皱皮海绵宏基因组的 PKS 基因筛选的研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(3): 526-528.
- [3] 王彩理,滕瑜,秦小明,等. 山东主要经济贝类资源及现状[J]. 专论与综述, 2010, 1: 3-4
- [4] 黄备,唐静亮,胡颢琰. 舟山市海洋贝类生物体内的细菌学研究[J]. 中国环境监测, 2010, 26(1): 31-33.
- [5] 杜宗军,王祥红,李海峰,等. 一株海洋发光细菌的分离鉴定及其发光条件的初步研究[J]. 海洋湖沼通报, 2003, 2(6): 58-63.
- [6] 王祥红,杜宗军,陈刚,等. 有益细菌 A18 在海湾扇贝(*Argopecten irradians*)育苗中的应[J]. 高技术通讯, 2002, 08: 84-88.
- [7] 杜宗军,赵苑,李美菊,等. 青岛近海琼胶降解细菌的筛选和多样性分析[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 32(2): 277-282.
- [8] 杜宗军,王鹏,李筠,等. 两株琼胶酶高产细菌的筛选和鉴定[J]. 海洋科学, 2002, 26(3): 1-4.
- [9] DU Zong-jun, ZHANG Wan-yi, XIA Hong-jie. Isolation and diversity analysis of heterotrophic bacteria associated with sea anemones[J]. Acta Oceanol Sin, 2010, 29(2): 62-69.
- [10] 陈吉祥,刘斌,池政豪,等. 环境因子对鳗弧菌生长和胞外蛋白酶表达的影响[J]. 海洋科学, 2009, 33(1): 54-57.

(下转第 36 页)

Isolation and biodiversity analysis of bacteria attached on the marine shellfish and selection of vibrios-antagonism bacteria

ZHANG Ke, DING Cui-ling, ZHANG Dong

(College of Marine ,Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China)

Received: Oct., 12, 2010

Key words: bacterial diversity; marine shellfish; 16S rDNA; flora analysis; antagonistic

Abstract: A preliminary screening of bacteria attached on the marine shellfish from six marine shellfishes(*Mytilus edulis*, *Concha ostreae*, *Ruditapes variegata*, *Anadara uropygimelana*, *Placopecta magellanicus*, and *Ovula ovum*) in the coastal waters of Weihai yielded 100 isolates, among which 45 strains were selected for further analysis. To investigate the phylogenetic position of these strains, the 16S rDNA sequences were cloned, sequenced, and compared with those of related strains and a molecular phylogenetic dendrogram was constructed based on genetic distance analysis . The strains were classified as members of genera *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bizionia*, *Brevundimonas*, *Cellulophaga*, *Cobetia*, *Gelidibacter*, *Kocuria Krokinobacter*, *Lacinutrix*, *Marinobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Planomicrobium*, *Pseudoalteromonas* , *Psychrobacter*, *Salinibacterium*, *Shewanella*, *Tenacibaculum*, and *Vibrio*. The antimicrobial activity of the 100 strains were screened by the agar flat seeding method. The experiment results showed that 2 strains had obvious antimicrobial activity.

(本文编辑: 梁德海)