

褐藻酸降解菌的研究

I. 褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用*

陈 弼 林光恒 沈世泽

(中国科学院海洋研究所)

早在1934年, Waksman 就已经从海水和海底沉积物中以及藻体上分别分离到能降解褐藻酸的细菌。在《伯吉细菌鉴定手册》中曾经把具有降解褐藻酸能力的假单胞菌组成藻酸单胞菌属 (*Alginomonas*), 其中多数种来源于海洋^[4]。后来, 由于这个属的描述特征与某些属的界限不够清楚, 在《伯吉细菌鉴定手册》第八版中又取消了这个属的名称, 并据所属种的生理生化特征分别归入有关的属^[5]。这种混乱现象说明过去对这一生理类群细菌的认识和了解是很不够的。因此, 进一步从分类、生理和生态等方面深入研究是完全必要的。近十多年来, 褐藻酸酶的研究受到国外的广泛重视^[3, 6-8]。褐藻酸酶在研究褐藻胶的化学结构以及细菌的褐藻酸代谢等方面都具有一定的重要性。在海藻遗传育种新途径的探索及海藻的生理研究等方面褐藻酸酶也是不可缺少的。

关于降解褐藻酸细菌与海带之间的相互关系国外研究很少^[1], 国内尚无研究。1961年, 安藤芳明等曾报道从腐烂的海带叶片上分离到能降解褐藻酸的细菌 *Vibrio* sp. SO-20 菌株, 认为该菌与海带藻体病害有关^[2]。我国海带养殖业中存在的某些问题, 如成体海带的烂梢、穿洞、绿烂以及烂苗、掉苗等现象, 微生物的作用也是重要的因素之一。本文着重讨论降解褐藻酸细菌的分离以及褐藻酸降解菌和褐藻酸酶对海带藻体的作用等问题。

一、材料与方 法

1. 菌株分离培养

分离培养基系采用 Waksman^[10] 或安藤芳明培养基^[2]。

为便于分离或计数海带藻体上的降解褐藻酸细菌, 在上述 Waksman 培养基中添加少量海带浸出液取代 0.5% 量的褐藻酸钠可获得更好的分离效果。

菌株分离工作可按实际需要选用稀释法或富集培养法。

稀释法 预先准备好 500 毫升三角瓶, 内装陈海水 200 毫升和小玻璃珠若干, 灭菌后待用。称取新鲜的小海带苗(约 15 厘米长) 20 克在无菌海水中轻度漂洗以除去附着于藻体上的外来污物, 然后放进上述 500 毫升三角瓶内, 摇动 15 分钟, 静置片刻, 用无菌移液管取上清液 0.1 毫升(必要时可以稀释后使用)涂布于平板上, 在 22°C 培育 7—10 天, 定期

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 493 号。
本文承曾呈奎所长提出建设性意见。照片为宋华中同志拍摄, 谨此致谢。
本刊编辑部收到稿件日期: 1978 年 8 月 8 日。

观察。当菌落周围出现透明圈时,将单菌落分别挑出,转入斜面编号,划线纯化后保存。

富集培养法 预先在三角瓶内盛 200 毫升海水及 2 克褐藻酸钠,灭菌后待用。取新鲜海带苗片若干,放入上述三角瓶内,在 22℃ 静置富集培养 7—10 天后,定期取出少量富集培养液作平板分离,并按上述方法进行单菌落分离。

尽管在褐藻酸钠平板上出现透明圈的菌落可以视为降解褐藻酸细菌的标志,但为了进一步验证其降解褐藻酸的能力,仍有必要将各菌株在 1—2% 褐藻酸钠无机液体培养基内进一步作降解能力的比较鉴定。

2. 酶的提取及其活性鉴定

将在固体斜面上活化后的褐藻酸降解菌 A-1 株接种于盛有已经灭菌的 200 毫升液体培养基的 500 毫升的三角瓶中。培养基组成成分为: 褐藻酸钠 5.0 克, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 4.0 克, NH_4NO_3 2.0 克, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.3 克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 克, 陈海水 1000 毫升; pH7.5。于 25℃ 摇床振荡培养 2 天。然后将种子培养液按 5% (V/V) 的量分别接入含有 200 毫升上述同样培养液的 500 毫升三角瓶中,摇床振荡培养 3 天。用分光光度计于 610m μ 处测定光密度以确定细菌生长情况。

收集发酵液置于 -25℃ 低温冰箱中使其迅速冻结后,取出冻结的发酵液用超声波击破。调发酵液 pH 值至 7.5; 以醋酸钙和少量硅藻土 G 进行沉淀。用细菌滤器滤除沉淀物,得滤液,加 $(NH_4)_2SO_4$ 使成 80% 饱和度,置冰箱中进行盐析。将盐析所得沉淀物进行低温旋转透析 48 小时。透析液用冷丙酮使褐藻酸酶沉淀出来。将沉淀物进行低温抽真空干燥,得褐藻酸酶粗酶制剂(即酶粉)。

褐藻酸酶活性鉴定用 Ostwald 粘度计,在 30℃ 条件下,测定褐藻酸钠在褐藻酸酶作用下不同时间粘度降低的百分率。

二、结果与讨论

1. 从养殖海带藻体上分离褐藻酸降解菌

养殖海带藻体上细菌的分布及其与海带的关系,除了安藤芳明等报道过从腐烂海带叶片上分离到降解褐藻细菌外^[2],尚未见有其他报道。根据藻类生理代谢特性,我们以 Waksman 培养基为基础,添加少量海带浸出液取代 0.5% 数量的褐藻酸钠,配制成海带浸液培养基。从养殖海区采健康的人工养殖的海带苗(约 15 厘米长),在不同培养基上作平板分离,并进行菌落计数比较。试验结果列于表 1。

表 1 在不同培养基上褐藻酸降解菌菌落计数结果

培养基	菌落总数				褐藻酸降解菌菌落数				褐藻酸降解菌占菌落总数的百分数 (%)
	皿 I	皿 II	皿 III	平均	皿 I	皿 II	皿 III	平均	
Waksman 培养基	452	342	352	382	8	7	9	8	2.1
Waksman 培养基+海带液	240	248	280	256	20	33	31	28	12.9
安藤芳明培养基	126	172	100	103	6	4	2	4	3.9

从表 1 可以看出,在有海带浸液的 Waksman 培养基上所出现的菌落总数与其他培养

基比较虽然略低,但是其降解褐藻酸的细菌菌落数反而增加了 3—7 倍。褐藻酸降解菌菌落数约占总菌落数的 12.9%, 是其他两种培养基中所出现的结果(分别为 2.1% 和 3.9%) 的 6 倍和 3 倍。这种结果经多次取样重复试验基本相似。这表明用添加有海带浸出液的 Waksman 培养基来分离和研究海带藻体上的褐藻酸降解菌具有一定的优越性。平板涂布分离结果表明它不仅较其他两种培养基出现更多的褐藻酸降解菌菌落, 而且还显示出更多样化的菌落类型。在有海带浸液培养基上所出现的菌落总数减少现象, 显然与海带藻体串的某些成分抑制作用有关, 而褐藻酸降解菌菌落数的倍数增加则是因为海带藻体的某些成分对其生长更加有利的结果。按照表 1 所示结果推算, 平均每克藻体上可以分离到 2800 个以上的褐藻酸降解菌菌落。这显然还未包括由于漂洗海带过程中所丧失的和紧密附着于藻体上未被振荡脱落的褐藻酸降解菌细胞。多次取样试验结果都表明, 在取样的每片人工养殖海带藻体上都附着相当数量的褐藻酸降解菌。这类菌在海带藻体上的优势表明, 这种菌是人工养殖海带藻体上的一种重要定居者; 其生长繁殖与海带的某些病害有着一定的关系。褐藻酸降解菌可以在人工养殖海带藻体上迅速生长繁殖, 从室内接种试验也得到验证。我们观察到: 接种于海带叶片上的褐藻酸降解菌, 可以正常生长并迅速繁殖(图版 I:2)。Sieburth 在分析藻类与微生物关系时提出了“附着植物细菌”概念^[9], 我们所观察到的褐藻酸降解菌与人工养殖海带的紧密附着关系, 把它们视为附于海带藻体上的定居者也是有根据的。

人工养殖海带上褐藻酸降解菌优势现象与养殖海区内长期大量人工养殖海带的历史可能有密切关系。我国人工养殖海带已有廿多年历史, 生产规模也相当大。养殖海区肥沃; 海带养殖季节每年长达 7—8 个月; 海底岩礁上的海带和其他褐藻等等, 对褐藻酸降解菌的生长、发展提供了良好的条件, 也为分离选择高效能的褐藻酸降解菌提供了独特的来源。

2. 褐藻酸降解菌菌株 A-1 酶活性鉴定

为了证明人工养殖海带上褐藻酸降解菌对藻体的作用是由于菌体所产生的褐藻酸酶酶解作用所致, 我们从分离得到的 72 株褐藻酸降解菌中, 依其降解褐藻酸能力的大小, 经比较鉴定选出 28 株降解褐藻酸能力较强的菌株。这些菌株都能在 2—5 天内使 2% 褐藻酸钠液体培养基上层澄清, 其中特别是 A-1 菌株(图版 I:1)。

我们选用 A-1 菌株按本文“材料与方法”中的《酶的提取及其活性鉴定》所述的步骤, 进行酶的提取, 得到了具有活性的褐藻酸酶。

酶活性鉴定中我们所用的底物为: 0.5% 褐藻酸钠 4 毫升 + 0.05M Tris-HCl 缓冲液 5 毫升, pH 8.0 和每毫升含有 1 毫克褐藻酸酶的酶液 1 毫升。在 30°C 温箱中温育作用, 于不同时间测定粘度的变化, 按 $\frac{T_a - T}{T_a - T_0} \times 100^{[2]}$ 求得粘度降低率(A%)。

测得的褐藻酸钠溶液粘度下降率如表 2 和图 1 所示。

表 2 褐藻酸钠溶液在 A-1 菌株酶液作用下不同时间粘度变化

作用时间(小时)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
粘度降低率(%)	44.8	63.2	73.6	79.7	83.8

上述活性测定结果表明我们所提取出的酶是有活性的。

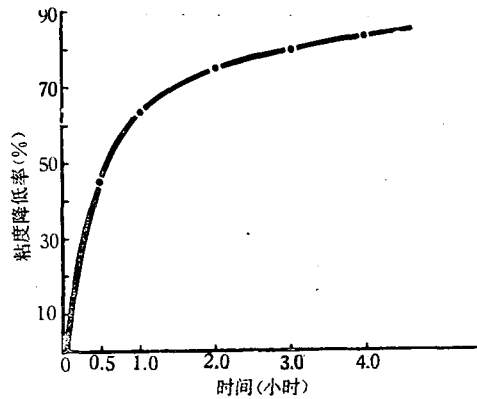


图1 褐藻酸酶的酶液作用时间与褐藻酸钠粘度降低率关系曲线

3. 褐藻酸降解菌 A-1 菌株及 A-1 菌株酶对人工养殖海带的作用

为了观察褐藻酸降解菌和褐藻酸酶对海带的作用,我们利用 A-1 菌株和由此菌株所提取出的褐藻酸酶在人工养殖海带叶片上进行接种试验和酶作用试验。将厚成期的新鲜海带叶片切下一小片,正反两面分别在紫外光灯下照射灭菌,然后将此海带片移入无菌培养皿内。在海带片中央点种 A-1 菌株培养物或 A-1 菌株酶粉,培养皿底部滴上几滴无菌海水,在 22℃ 培育,定期观察海带片的变化情况,并以另一片照射灭菌的海带作对照。试验的海带片厚度约 1.5—2.0 毫米。接种后第二天, A-1 菌株迅速在海带片上生长繁殖成菌苔,丰盛的菌苔外形明显表明被试海带片是该菌株合适的培养基。第三天海带片点种部位出现凹陷,周围组织出现半透明圈。到了第 3—5 天取出海带片检查时,点种部位组织已经软腐,用水冲洗时软腐组织随即脱落,呈现穿孔。未接种的对照组织则没有上述现象出现。

A-1 菌株酶粉对海带片的作用情况与 A-1 菌株作用的情况基本相似。

A-1 菌株对海带片的作用与 A-1 菌株提取出的褐藻酸酶对海带片作用的相似性,说明褐藻酸降解菌对海带的作用是在褐藻酸酶作用下的酶解作用过程。室内试验所观察到的这些现象与人工养殖海带过程中所出现的某些症状有颇多相似之处,这提示我们在进一步弄清人工养殖海带过程中,特别是在人工育苗系统中褐藻酸降解菌的消长规律,采取必要措施控制或防止海带某些病害的出现和蔓延是一项十分有意义的工作。当然,从褐藻酸降解菌及褐藻酸酶的应用前景来考虑,对这一类群细菌的深入研究也是很有价值的。

参 考 文 献

- [1] Andrews, J. H., 1976. The pathology of marine algae. *Biol. Rev.* 51(2): 211—253.
- [2] Ando, Y. and K. Inoue (安藤芳明, 井上胜弘), 1961. Decomposition of alginic acid by microorganisms. IV. On the Vibrio-type bacteria, newly isolated from the decaying Laminaria. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 27(4): 339—341.
- [3] ———, ———, (—————, —————), 1961. Decomposition of alginic acid by microorganisms. V. On the alginase of Vibrio sp. SO-20 strain. *ibid.* 27(4): 342—347.
- [4] Breed, R. S., Murray, E. G. D. and N. R. Smith, (Eds.) 1957. *Bergey's Manual of Deter-*

- minative Bacteriology, 7th ed. Balliere, Tindall and Cox, London. England.
- [5] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams and Wilkins Company/Baltimore. U. S. A.
- [6] Davison, I. W., Sutherland, I. W. and C. J. Lawson, 1976. Purification and properties of an alginate lyase from a marine bacterium. *Biochem. Journ.* 159(3): 703—713.
- [7] Kashiwabara, Y., Suzuki, H. and K. Nisizawa, 1969. Alginate lyase of Pseudomonads. *J. Biochem.*, 66(4): 503—512.
- [8] Preiss, J. and G. Ashwell. 1962. Alginic acid metabolisms in bacteria. I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid. *J. Biol. Chem.*, 237(2): 309—316.
- [9] Sieburth, J. McN, 1968. The influence of algal antibiosis on the marine microorganisms. In M. R. Droop (ed.), *Advances in Microbiology of the Sea*. Acad. Press. pp. 63—94.
- [10] Skerman, V. B. D. 1959. *A guide to the identification of the genera of bacteria*. Williams & Wilkins Co., Baltimore.

STUDIES ON ALGINIC ACID DECOMPOSING BACTERIA

I. ACTION OF ALGINIC ACID DECOMPOSING BACTERIA AND ALGINASE ON *LAMINARIA JAPONICA**

Chen Dou, Lin Guangheng and Shen Shize

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

ABSTRACT

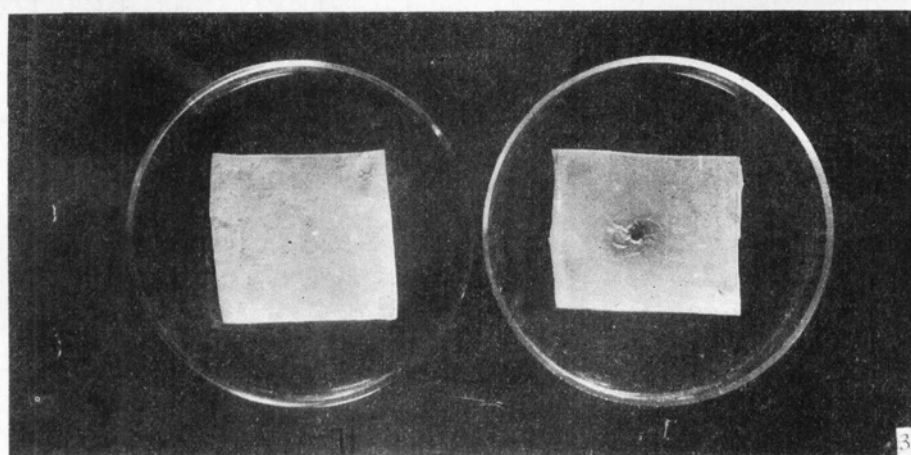
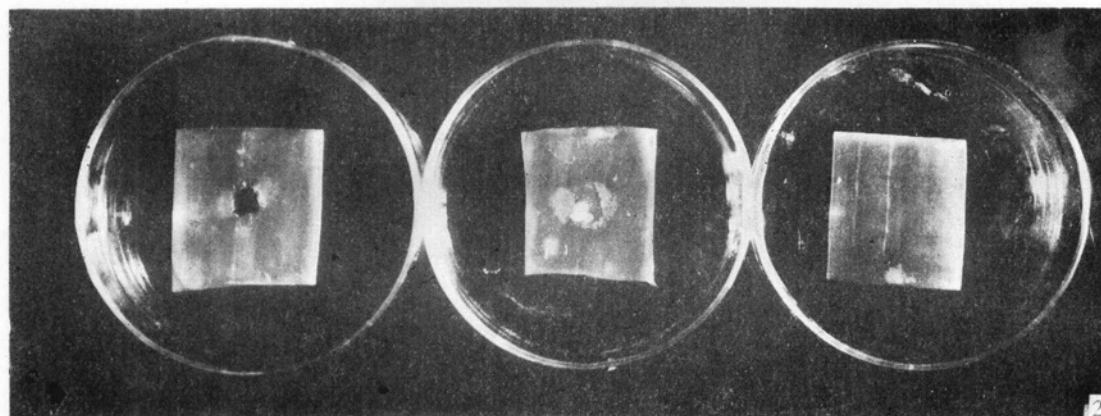
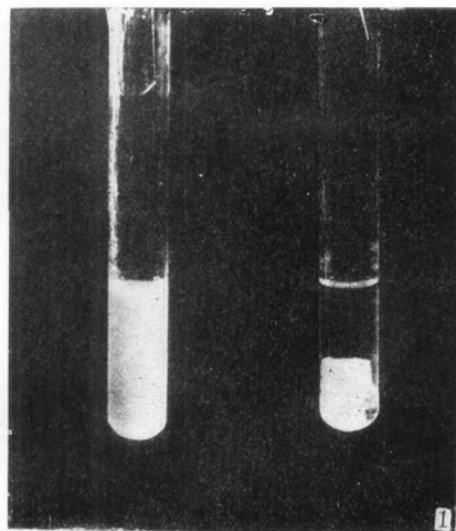
The present paper deals with the action of alginic acid decomposing bacteria and A-1 strain's alginase on haidai (*Laminaria japonica* Aresh).

1. The alginic acid decomposing bacteria were frequently isolated from cultivated haidai by using alginate agar supplemented with algae extract of *Laminaria*. Most of these isolates were able to grow and reproduce on the blades of haidai without any additional requirements. We found that these bacteria were the dominating inhabitants on the blades of cultivated Haidai.

2. The crude enzyme preparation of A-1 strain was made. The blades of haidai could be completely decomposed by the actions of A-1 strain or its crude enzyme after 3—5 days.

3. Relationship between the alginic acid decomposing bacteria and cultivated *Laminaria* was discussed.

* Contribution No. 493 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.



1. 右管：接种 A-1 菌株后液体培养基(含2%褐藻酸钠)产生澄清；
左管：未接种的液体培养基。
2. 褐藻酸降解菌 A-1 菌株在琼脂片上的生长(中)和对海带片的软腐穿孔(左)；右为对照海带片。
3. 褐藻酸降解菌 A-1 菌株的消藻酸酶对海带片的软腐穿孔作用(右)；左为对照海带片。