

深海沉积物中龙须菜降解菌群的筛选与鉴定及多样性分析

丁志新¹, 陈兴麟², 周治东³, 金敏², 曾润颖^{2,4}

(1. 浙江理工大学, 浙江 杭州 310018; 2. 国家海洋局第三海洋研究所、海洋生物遗传资源省部

共建国家重点实验室培育基地, 福建 厦门 361005; 3. 福建海洋研究所, 福建 厦门 361005;

4. 南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东 广州 510300)

摘要:以龙须菜为唯一的营养源对深海沉积物进行富集和筛选, 获得一个可降解龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*)、紫菜 (*Porphyra umbilicalis*) 和海带 (*Laminaria japonica*) 产生还原性寡糖的菌群. 通过 16S rRNA 序列及 16S rRNA-RFLP 分析对该菌群中的细菌多样性进行了研究. 结果表明, 降解菌群中的细菌组成主要为弧菌属 (*Vibrio*, 8 株)、火色杆菌属 (*Flammeovirga*, 7 株) 和希瓦氏菌属 (*Shewanella*, 5 株), 其中希瓦氏菌属和火色杆菌属的细菌在菌群中的丰度较高. 采用龙须菜为唯一营养源的筛选培养基对菌群中的细菌进行分离, 获得 4 株具有琼胶酶活力的细菌, 包括 2 株火色杆菌属和 2 株希瓦氏菌属细菌. 培养和未培养的结果均表明火色杆菌和希瓦氏菌这 2 个属为所研究的深海沉积物主要的龙须菜降解菌. 对原始降解菌群和所分离的关键菌株进行了龙须菜酶解产糖能力的比较, 结果发现菌群中的弧菌属菌株虽然自身没有酶解龙须菜的能力, 但可能可以协助关键菌株, 提高菌群对龙须菜的降解效率. 因此本研究中所获得的菌群和菌株有望在琼胶寡糖的绿色生产中得到广泛应用.

关键词:海洋生物学; 深海; 龙须菜; 降解; 菌群; 多样性; 火色杆菌; 希瓦氏菌

DOI: 10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2016. 02. 001

中图分类号: P735

文献标识码: A

文章编号: 2095-4972 (2016)02-0151-06

龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 又名江蓠、鹿角菜、凤菜等, 是红藻门江蓠属 (*Gracilaria*) 海藻的典型代表, 是产琼胶的优良种, 亦用作鲍鱼饵料或者加工成海洋蔬菜等, 它富含多糖, 含量可达到其干重的 30% 左右. 目前龙须菜主要用于生产琼脂, 而近年来利用海藻多糖水解酶酶解海藻琼脂产生的琼脂寡糖分子量更小, 应用更广泛, 经济价值更高, 引起了人们研究的兴趣^[1-3]. 海藻寡糖的抗肿瘤、抗病毒、增强免疫等药理作用^[4] 和抑菌^[5]、清除羟基自由基^[6] 的生物活性正在被用于医药食品农业等诸多领域, 发展前景巨大. 有研究表明, 琼胶低聚糖的生理活性功能与其还原端结构密切相关^[7].

虽然琼胶寡糖在食品工业、医药工业、日用化

工、生物工程等许多方面有广阔应用前景, 但琼胶寡糖至今还没有进行产业化的生产, 其中一个重要的原因就是未能找到大规模有效降解琼脂的途径, 因此分离出更多的高产琼胶酶的菌株用于工业生产, 大力开发琼胶寡糖的活性功能, 成为今后海藻深加工及琼脂工业重点努力的方向^[8-10].

本研究通过对西太平洋深海沉积物泥样中的微生物进行富集筛选, 寻找高效降解龙须菜多糖 (或降解酶高产) 的菌群和菌株, 为龙须菜多糖的高值化利用和寡糖应用的产业化发展奠定基础.

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

于 2007 年 7 月搭载大洋 1 号 DY-115-19 航次

收稿日期: 2015-05-07

基金项目: 海洋公益性行业科研专项资助项目 (201505026); 厦门南方海洋中心资助项目 (13GZP003NF09); 福建省科技计划重点资助项目 (2012Y0071)

作者简介: 丁志新 (1984 ~), 硕士研究生; E-mail: 154389918 @ qq. com

通讯作者: 曾润颖 (1972 ~), 男, 研究员; E-mail: zeng@tio. org. cn

第五、六航段,采集位于西太平洋“暖池”区(具体经纬度为 $21^{\circ}53'08''\text{N}$, $160^{\circ}41'24''\text{E}$; $19^{\circ}30'30''\text{N}$, $157^{\circ}24'31''\text{E}$)的深海沉积物泥样. 采用多管采样器采集 10 g 泥样,并接入 30 cm^3 富集培养基中进行 50 d 的富集培养.

1.2 培养基

本研究中采用的培养基配方如下:

富集培养基:1.0% 龙须菜粉末(质量占比,下同),原位海水, 121°C 高温高压灭菌.

酶解培养基:酵母膏 0.2%, 另外根据实验需要添加 1.0% 的酶解底物,包括龙须菜、紫菜、海带、麒麟菜,用陈海水配制, pH 值 7.0, 121°C 高温高压灭菌.

筛选培养基:龙须菜 1.0%, 酵母膏 0.2%, 琼脂 1.5%, 陈海水, pH 值 7.0, 121°C 高温高压灭菌.

1.3 16S rRNA 扩增和 RFLP 分析

取 500 mm^3 富集后的深海沉积物样品均匀涂布于筛选培养基平板上, 20°C 下培养 3 ~ 5 d, 挑取在培养基上产生明显凹陷圈的原始降解菌群, 悬浮于无菌水中, 并用细菌基因组提取试剂盒提取该菌群的总 DNA. 然后以获得的菌群总 DNA 为模板进行 16S rRNA 基因的扩增, 扩增所用引物为 27F: $5'-\text{AGAGTTTGATCCTGGCTCAG}-3'$ 和 1492R: $5'-\text{GGT-TACCTTGTACGACTT}-3'$ [11-12].

1.4 关键菌株的分离与鉴定

将富集筛选得到的原始降解菌群重悬于无菌海水中, 并按不同稀释梯度均匀涂布于筛选培养基平板上, 于 20°C 中培养, 待菌落长出后, 挑取在培养基上产生明显凹陷圈的单菌落进行保种和 16S rRNA 序列分析.

1.5 海藻降解试验

将原始降解菌群或分离的关键菌株分别接入用不同海藻[龙须菜、紫菜(*Porphyra umbilicalis*)、海带(*Laminaria japonica*)或麒麟菜(*Eucheuma serra*)]配制的酶解培养基中, 25°C 、200 r/min 条件下震荡培养, 测定不同时间段还原糖的产生量, 检验菌群或菌株对海藻的降解能力. 还原性寡糖含量采用 DNS 法 [13] 来测定.

1.6 薄层色谱分析

将龙须菜降解上清和琼胶寡糖标准品分别点样于薄层层析硅胶板上, 将硅胶板放入层析缸中进行展层, 展层剂为正丁醇: 冰乙酸: 水 = 1 : 2 : 1 (V : V : V), 待展层结束后将硅胶板置于通风厨中干燥, 而后用硫酸-乙醇(1:9, V : V) 均匀喷洒于硅胶板上, 并放入 90°C 烘箱中进行显色.

2 结果和讨论

2.1 龙须菜降解菌群富集筛选和降解效果分析

从西太平洋深海沉积物中采集泥样样品, 并以龙须菜为唯一的营养源对该样品进行富集. 富集后的深海沉积物样品经梯度稀释后, 均匀涂布于筛选培养基平板上进行培养和筛选. 结果显示其中一个菌群能够液化并降解琼脂, 在培养基上形成明显的凹陷圈. 挑取该菌群分别接入用不同海藻(龙须菜、紫菜、海带和麒麟菜)配制的酶解培养基中进行海藻降解效果分析. 如图 1 所示, 该菌群能够降解龙须菜、紫菜和海带产生还原性寡糖, 但无法降解麒麟菜. 由于龙须菜和紫菜属于红藻, 降解后产物为琼胶; 海带属于褐藻, 降解后产物为褐藻酸, 因此推测该菌群所产生的主要降解酶为琼胶酶和褐藻酸酶.

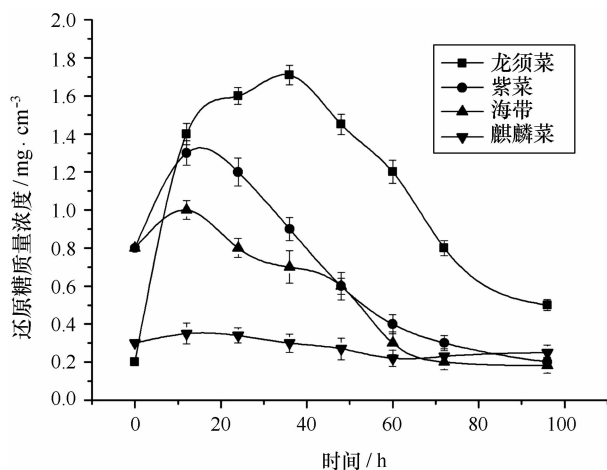


图 1 深海沉积物富集菌群降解海藻的效果分析

Fig. 1 Degradation of alga by enriched bacterial flora from deep-sea sediments

2.2 降解菌群的多样性分析

通过提取降解菌群总 DNA 作为模板扩增 16S rRNA, 并通过 RFLP 和 16S rRNA 序列分析来研究该菌群的细菌多样性. 根据 RFLP 和 16S rRNA 序列分析结果, 我们一共获得 21 种 16S rRNA 基因型, 将获得的基因型序列提交 NCBI 数据库比对, 整理与它们同源性较高的细菌 16S rRNA 序列进行遗传距离计算, 并根据遗传距离计算结果绘制系统发育树(图 2).

结果表明, 降解菌群中的细菌组成主要为弧菌属(*Vibrio*, 8 株)、火色杆菌属(*Flammeovirga*, 7 株)和希瓦氏菌属(*Shewanella*, 5 株), 其中希瓦氏菌属和火色杆菌属的细菌在菌群中的丰度较高. 降解菌群中丰度最高的 2 株细菌为 H11 菌株和 H1 菌株, 它们占菌群总丰度 75% 左右, 其中 H11 菌株与

Flammeovirga yaeyamensis 同源性最高,达 97.73%,命名为 *Flammeovirga* sp. wpaga001,菌株 H1 与 *Shewanella pacifica* KMM3597 同源性最高,达 99.73%,命名为 *Shewanella* sp. wpaga003. 此外,由于 H7 菌株

的 16S rRNA 序列与数据库已知菌株的 16S rRNA 同源性均较低而未得到有效鉴定,其与弧菌属的细菌同源性最高(95%),但在系统发育树上却处在独立的分支,可能具有不同的进化地位.

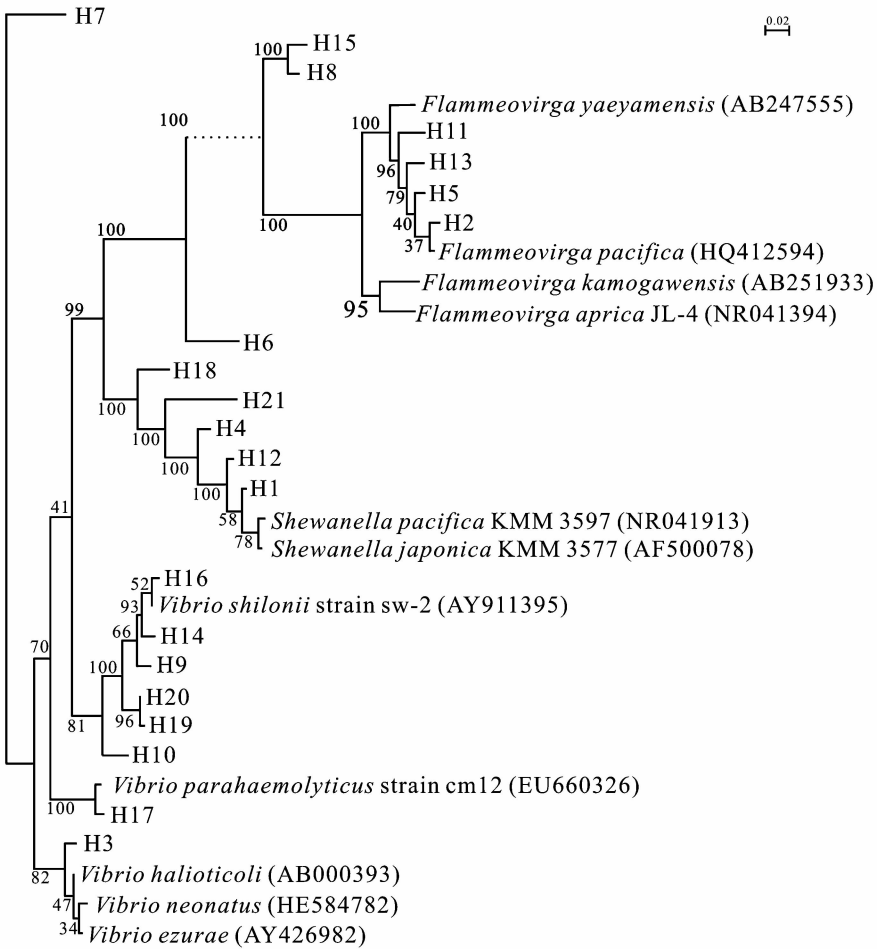


图2 深海沉积物降解菌群基于 16S rRNA 序列的系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of enriched bacterial flora from deep-sea sediments based on 16S rRNA sequences
发育树采用邻接法构建,虚线代表遗传距离为 0.2

2.3 龙须菜降解菌群中关键菌株筛选与降解活力分析

为了筛选菌群中起主要降解作用的菌株,我们在筛选培养基上将菌群进行进一步的稀释涂布和划线纯化,获得 4 个在筛选培养基平板上产生凹陷圈的单一菌落,经 16S rRNA 序列鉴定,其中 2 株为火色杆菌属细菌(*Flammeovirga* sp. wpaga001 及 *Flammeovirga* sp. wpaga002),另 2 株为希瓦氏菌属细菌(*Shewanella* sp. wpaga003 及 *Shewanella* sp. wpaga004).

薄层色谱分析结果表明筛选到的 4 株菌株都具有降解龙须菜产生寡糖的能力. 它们的水解产物主要为新琼二糖、四糖、六糖和八糖,而作为对照的大肠杆菌 *E. coli*. 则无降解龙须菜的能力(图 3).

为了比较关键菌株与原始降解菌群的龙须菜降解活力,培养 *Flammeovirga* sp. wpaga001、*Shewanella* sp. wpaga003 和原始的降解菌群至相同的细菌生长期和细菌浓度,并按 10% 的接种量分别接入含龙须菜的酶解培养基中. 如图 4 所示, *Flammeovirga* sp. wpaga001、*Shewanella* sp. wpaga003 单独或者混合培养,其降解龙须菜的活性都显著低于原始菌群,说明原始菌群中的其他菌株如弧菌属可能能够协助关键菌株,提高对龙须菜的降解效率.

2.4 讨论

深海环境中的微生物资源十分丰富,且由于其环境条件的特殊性,我们可以从深海中分离得到具有多种活性的特殊微生物^[14-16]. 本研究从西太平洋深海沉积物中筛选得到一个海藻降解菌群,该菌群

参考文献:

- [1] 刘思俭. 我国江蓠的种类和人工栽培[J]. 湛江海洋大学学报, 2001, 21(3): 71-79.
- [2] 刘朝阳, 孙晓庆. 龙须菜的生物学作用及应用前景[J]. 养殖与饲料, 2007(5): 55-58.
- [3] 薛志欣, 杨桂明, 王广策. 龙须菜琼胶多糖的提取、纯化与性能表征[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 174-177.
- [4] 褚燕, 于文功, 韩峰. 琼胶酶高产海洋假单胞菌 CY24 的筛选及培养条件优化[J]. 中国海洋药物, 2003 (5): 1-4.
- [5] 张红艳, 林凯, 阎春娇. 国外天然防腐剂的研究进展[J]. 粮食加工, 2004(3): 57-60.
- [6] 陈海敏, 严小军, 郑立, 等. 琼胶的降解及其产物的分析[J]. 郑州工程学院学报, 2004, 24(3): 41-44.
- [7] 唐传核, 彭志英. 功能性食品基料低聚糖及膳食纤维类开发现状[J]. 粮食与油脂, 2000(8): 33-35.
- [8] 赵雪, 薛长湖, 徐强, 等. 琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 280-282.
- [9] 缪伏荣, 李忠荣. 琼胶的降解及其产物的开发应用[J]. 海洋科学, 2002, 26(3): 1-4.
- [10] 杨华. 采用超声波技术提取台湾种龙须菜多糖的工艺研究[J]. 食品科技, 2008(9): 158-161.
- [11] 北京大学生物教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1992: 4.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 87-96.
- [13] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [14] Hou Y, Chen X, Chan Z, et al. Expression and characterization of a thermostable and pH-stable β -agarase encoded by a new gene from *Flammeovirga pacifica* WPAGA1[J]. Process Biochemistry, 2015, 50: 1 068-1 075.
- [15] Hazen T C, Dubinsky E A, DeSantis T Z, et al. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria[J]. Science, 2010, 330(6 001): 204-208.
- [16] DeLong E F, Yayanos A A. Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea procaryotes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 51(4): 730-737.
- [17] Takahashi M, Suzuki K, Nakagawa Y. Emendation of the genus *Flammeovirga* and *Flammeovirga aprica* with the proposal of *Flammeovirga arenaria* nom. rev, comb. nov. and *Flammeovirga yaeyamensis* sp. nov[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, (56): 2 095-2 100.
- [18] Ivanova E P, Sawabe T, Gorshkova N M, et al. *Shewanella japonica* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51: 1 027-1 033.
- [19] Nakagawa Y, Hamana K, Sakane, et al. Reclassification of *Cytophaga aprica* in *Flammeovirga* gen. nov. as *Flammeovirga aprica* comb. nov. and of *Cytophaga diffluens* in *Persicobacter* gen. nov. as *Persicobacter diffluens* comb. nov. [J]. International Journal of Systematic Bacteriol, 1997, 47: 220-223.
- [20] Xu H, Fu Y, Yang N, et al. *Flammeovirga pacifica* sp. nov., isolated from deep-sea sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(4): 937-941.

Screening, identification and diversity analysis of *Gracilaria lemaneiformis*-degrading flora from deep-sea sediments

DING Zhi-xin¹, CHEN Xing-lin², ZHOU Zhi-dong³, JIN Min², ZENG Run-ying^{2,4}

(1. Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. State Key Laboratory Breeding Base of Marine Genetic Resources, Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China; 3. Fujian Institute of Oceanography, Xiamen 361005, China; 4. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510300, China)

Abstract: A bacteria flora that could directly degrade several algal including *Gracilaria lemaneiformis*, laver and kelp was isolated from deep-sea sediments of the west Pacific Ocean using *Gracilaria lemaneiformis* as solo nutrition for enrichment. 16S rRNA sequencing and 16S rRNA-RFLP analysis were carried out to investigate the bacterial diversity of *Gracilaria lemaneiformis*-degrading flora. The results showed that flora was mainly comprised of *Vibrio* (8 strains), *Flammeovirga* (7 strains) and *Shewanella* (5 strains). After the separation of original flora, 4 strains including 2 *Flammeovirga* and 2 *Shewanella* strains were found to possess the ability of *Gracilaria lemaneiformis* degradation. Thus, both uncultured and cultured analysis performed in our study suggested that *Flammeovirga* and *Shewanella* were the key strains responsible for algal degradation. Furthermore, comparison of *Gracilaria lemaneiformis*

mis-degrading activity between original flora and isolated key strains showed that the *Vibrio* may help to improve the activity of flora despite of the lack of alga-degrading ability. Therefore, the present novel *Gracilaria lemaneiformis*-degrading flora and strains may be widely applied in production of oligosaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* in the future.

Key words: marine biology; deep-sea; *Gracilaria lemaneiformis*; degradation; flora; diversity; *Flammeovirga*; *Shewanella*

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2016. 02. 001

(责任编辑:杜俊民)