

1 株裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.) 的分离鉴定*

周茂洪 周 林 赵肖为** 余林静 林 娜

(温州大学应用技术学院 温州 325035)

摘要: 采用松树花粉诱集法从乐清湾红树林分离到一株纯培养物, 其特点为: 营养菌体为椭圆球形, 单核; 营养菌体的细胞壁由许多紧压在一起的致密鳞片层构成, 在细胞壁不连续处可分辨鳞片; 营养菌体形成外质网, 它产生于外质网形成体; 营养菌体以产生游动孢子行无性繁殖, 游动孢子为双鞭毛; 无性繁殖过程中形成四分体结构。据此鉴定为裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.)。

关键词: 裂殖壶菌, 破囊壶菌, 红树林, 乐清湾

中图分类号: Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0048-04

Separation and Identification of *Schizochytrium* sp. *

ZHOU Mao-Hong ZHOU Lin ZHAO Xiao-Wei** YU Lin-Jing LIN Na

(School of Applied Technologies, Wenzhou University, Wenzhou 325035)

Abstract: A strain was separated from the Yueqing bay using pine pollen baiting. The vegetative thallus of the separated strain is oval and uninucleate. It possesses a cell wall composed of many compact layers of closely pressed scales, which can be resolved where the cell wall is disrupted. The radiating branched extensions of the thallus, the ectoplasmic net, emerges from the sagenogenetosome. Asexual reproduction is by conversion of the vegetative thallus to many biflagellate zoospores, during which tetrads of cells are formed. It was identified with *Schizochytrium* sp. based on the features mentioned above.

Key words: *Schizochytrium*, *Thraustochytriaceae*, Mangrove, Yueqing bay

破囊壶菌是嗜腐败微生物, 占腐烂的褐藻上微生物总数的 30%。它广泛地存在于有机溶解物多和盐度高的环境中, 海水中含量达 $2.5 \times 10^3 \sim 4.5 \times 10^4$ 个/L^[1], 而在富于有机溶解物的红树林中, 其生物量更大。破囊壶菌的分离一般采用壶菌标准分离技术 (松树花粉或其它花粉诱饵海水样本)^[2], 在花粉上粘附生长的破囊壶菌比正常情况大许多^[3]。

破囊壶菌于 1936 年首次被发现, 当时分离到的为 *Thraustochytrium proliferum*, 被归类为卵菌纲 (Oomycetes)、水霉目 (Saprolegniales)^[4]。但是, 破囊壶菌缺乏卵菌典型的鞭毛过渡区和细胞壁组成, 超微结构接近于网粘菌, 而且, 分子生物学的研究结果认为它更应该属于原生动物^[4], 现被列在管毛生物界 (Stramenopila)、不等毛门 (Heterokonta)、网粘菌纲 (Labyrinthulomycetes)、破囊壶菌目 (Thraustochytriales)、破囊壶菌科 (Thraustochytriaceae)^[6]。

破囊壶菌 (*Thraustochytrids*) 是一类类似于微藻但缺乏叶绿体故而不行光合作用的专性海生真核微生物, 共分 7 属: *Althornia*、*Aplanochytrium*、*Japonochytrium*、*Laby-*

* 温州市科技发展规划项目 (No. S2004B017)

** 通讯作者 Tel: 0577-86689291, E-mail: sherwood@wzu.edu.cn

收稿日期: 2005-10-17, 修回日期: 2005-12-15

rinthuloides、*Schizochytrium*、*Thraustochytrium* 和 *Ulkenia*^[7]。近年来,破囊壶菌备受关注,因为其廿二碳六烯酸(DHA)含量非常高,某些菌株达到脂肪酸含量的50%,结构类似的脂肪酸含量低,容易分离纯化,而且没有鱼腥味^[8,9]。长期以来,DHA的来源是鱼油和微藻。鱼油的产量和DHA含量都不稳定,提取物夹杂鱼腥味;微藻培养需要光照和CO₂,生产工艺繁杂,成本高。目前认为极具潜力实现工业化生产DHA的微生物是破囊壶菌^[10],尤其是*Thraustochytrium*和*Schizochytrium*^[11]。

研究DHA生产所采用的*Thraustochytrium*和*Schizochytrium*基本上分离自红树林^[8,9,11,12]。红树林是生长在热带、亚热带海岸及河口潮间带泥地的常绿灌木或乔木的总称,其蕴涵的微生物区系组成比较特殊,是资源微生物的重要来源之一。浙江省温州市乐清湾北部的西门岛南岙山北边(北纬28°20',东经121°16')生长着一片上个世纪50年代引种成功的红树林,距福建省中部以南的红树林自然分布区400多公里,是太平洋西岸分布最北的红树林。

破囊壶菌的形态、繁殖方式、生态、分离培养方法等与真菌非常相似,广泛存在于海洋,但是,采用海生真菌分离平板,对自然环境中的底物进行直接的显微镜观察,难以发现其踪迹^[1]。国内未见关于其分离和电镜鉴定的研究报道。作者从该红树林的腐败落叶上分离并鉴定得到1株裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.),有关内容报道如下。

1 材料与方法

1.1 培养基^[7]

葡萄糖1g,明胶水解物1g,酵母提取物0.1g,蛋白胨0.1g,琼脂18g,陈海水定容至1L,pH7.5。另加链霉素和青霉素各250mg/L和GeO₂3mg/L。陈海水:将海水于暗处放数周,待其杂质沉淀后过滤而得。

1.2 实验方法

1.2.1 采样:在乐清湾西门岛南岙山红树林中选择10个采样点,每个采样点各采集5份红树林腐败落叶,共采集样品3次,时间分别为2004年3月、4月和5月。

1.2.2 分离^[13]:取红树林腐败落叶,剪成直径约为1.5cm的小圆片,用含有链霉素和青霉素各1g/L的无菌海水洗净,接种于固体平板上,每皿3片,加约5mL无菌海水和少量无菌松树花粉于平板上,在25℃下培养4~5d,挑取松树花粉,观察在松树花粉上粘附生长的培养物,将粘附培养物的松树花粉再转接到新的平板上进行培养,直到得到纯培养物为止。

1.2.3 菌株鉴定:在扫描和透射电镜下观察纯培养物的外部形态和超微结构,根据文献[1,7,14,15]进行鉴定。

2 结果与讨论

从乐清湾红树林的腐败落叶上分离到的纯培养物粘附在松树花粉上生长(图1),营养菌体为椭圆球形(图2),单核(图3)。营养细胞剖面(图4)。具有外质网(图5),外质网产生于外质网形成体(sagenogenetosome、sagenogen或bothrosome,图6)。营养菌体以产生游动孢子行无性繁殖,游动孢子为不等长的双鞭毛(图7)。营养菌体的细胞壁

由许多紧压在一起的致密鳞片层构成,在细胞壁不连续处可分辨鳞片(图8)。

由鳞片构成的细胞壁、外质网和外质网形成体等3个特征是现行的破囊壶菌鉴定标准。根据以上的扫描和透视电镜的观察结果,我们鉴定分离得到的纯培养物为破囊壶菌(*Thraustochytriaceae*)。

破囊壶菌各属的分类主要依据其孢子囊形态和孢子释放机制。在游动孢子生成过程中形成四分体结构是裂殖壶菌(*Schizochytrium*)的特征。根据图9,我们鉴定该纯培养物为裂殖壶菌(*Schizochytrium* sp.)。

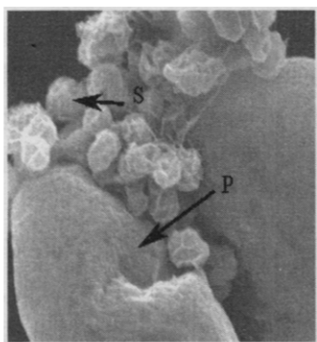


图1 花粉(P)与裂殖壶菌(S)($\times 1.8K$)

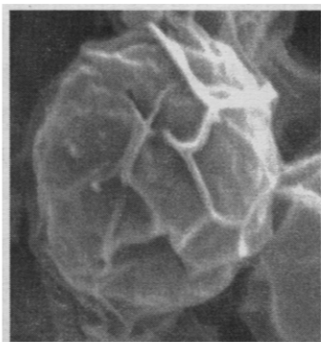


图2 营养细胞扫描图($\times 10K$)



图3 营养细胞细胞核(N)($\times 20K$)

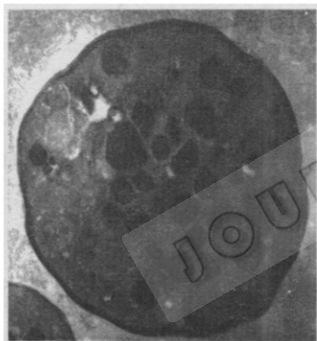


图4 营养细胞剖面图($\times 12K$)

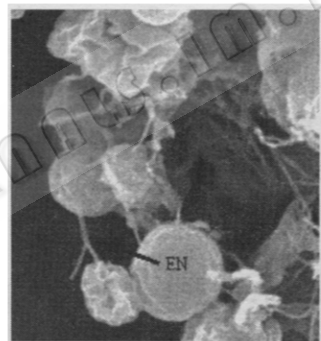


图5 营养细胞外质网(EN)($\times 2.5K$)

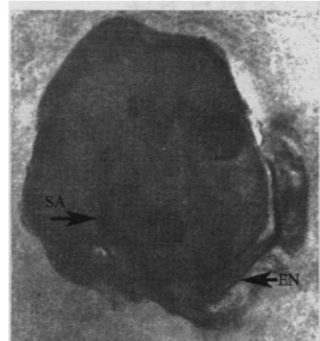


图6 营养细胞外质网(EN)和外质网形成体(SA)($\times 12K$)

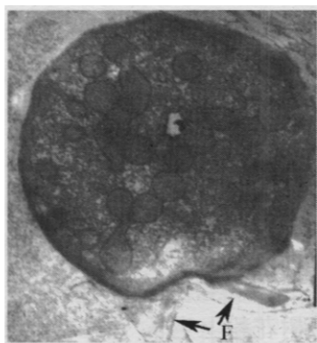


图7 游动孢子(F:鞭毛)($\times 12K$)



图8 细胞壁(W)和鳞片(S)($\times 50K$)

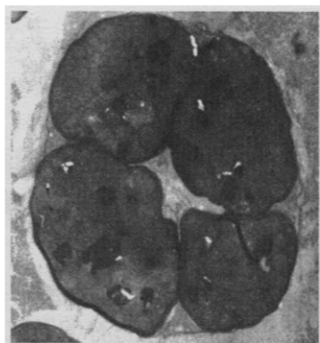


图9 四分体($\times 5K$)

通常, 从低温水域 (包括其它低温环境) 中分离得到的微生物含有更多量的多不饱和脂肪酸^[16]。乐清湾是太平洋西岸红树林分布的最北端, 其纬度高于文献报道的、研究 DHA 生产所采用的破囊壶菌的分离地^[8,9,11,12]。我们可以期望分离得到的裂殖壶菌含有较高的 DHA, 有关该菌的生理特征、多不饱和脂肪酸含量和组成等, 以及与文献报道的其它破囊壶菌的比较, 将另文发表。

参 考 文 献

- [1] Moss S T. Biology and phylogeny of the Labyrinthulales and Thraustochytriales. In: Moss S T. The biology of marine fungi. Cambridge: Cambridge Univ Press, 1986. 105 ~ 115.
- [2] 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002. 263 ~ 264.
- [3] Raghukumar S, Anil A C, Khandeparker L, *et al.* Mar Biology, 2000, 136: 603 ~ 609.
- [4] Sparrow F K. The present status of Classification of Biflagellate fungi. In: Gareth E B. Recent advances in aquatic mycology. New York: John Wiley & Sons, 1976. 213 ~ 222.
- [5] Cavalier-Smith T, Allsopp M T F P, Chao E E. Philos Trans R Soc London B Biol Sci, 1994, 346: 387 ~ 397.
- [6] Dick M W. Straminipilous fungi: Systematics of the peronosporomycetes, including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids, and similar organisms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 269 ~ 287.
- [7] Porter D. Phylum Labyrinthulomycota. In: Margulis L, *et al.* Handbook of protocista the structure, cultivation, habitats and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants and fungi. Boston: Johns and Barlett Publishers, 1990. 388 ~ 396.
- [8] Yokochi T, Honda D, Higashihara T, *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 49: 72 ~ 76.
- [9] Bowles R D, Hunt A E, Bremer G B, *et al.* J Biotechnol, 1999, 70: 193 ~ 202.
- [10] Lewis T E, Nichols P D, McMeekin T A. Mar Biotechnol, 1999, 1: 580 ~ 587.
- [11] Fan K W, Chen F, Jones E B G, *et al.* J Ind Microbiol Biotechnol, 2001, 27: 199 ~ 202.
- [12] Kamlangdee N, Fan K W. Songklanakarin J Sci Technol, 2003, 25 (5): 643 ~ 650.
- [13] Bremer G B. Hydrobiologia, 1995, 295: 89 ~ 96.
- [14] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 2 ~ 20.
- [15] Alexopoulos C J, Mims C W, Blackwell M. Introductory mycology (4th ed.). New York: John Wiley and Sons, 1996. 743 ~ 750.
- [16] Erwin J. Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms. In: Erwin J. Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms. New York: Academic Press, 1973. 41 ~ 143.