

# 龙须菜体表附生细菌的几种分离方法比较\*

徐永健 乐观宗 张友平

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

**摘要:** 采用超声波粉碎法、涡旋振荡法、超声波清洗法、研磨匀浆法等4种不同的方法处理龙须菜,分离其体表的附生细菌,并对分离细菌的数量、种类、形态结构、细胞壁特性等进行了观察和分析。通过对不同方法和相同方法的不同处理所得结果比较显示,超声波清洗法和研磨匀浆法对分离细菌的数量和种类效果都较差;超声波粉碎法和涡旋振荡法效果较好,尤以超声波粉碎法的30W30s处理效果最好,该方法分离到本项目4个方法13个处理获得的16个菌株中的12个菌株,龙须菜的细菌数 $1.75 \times 10^6$  cells/g。

**关键词:** 海藻, 龙须菜, 附生细菌, 分离方法

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0123-04

## Comparison with Several Methods to Isolate Epiphytic Bacteria from *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta)\*

XU Yong-Jian LE Guan-Zong ZHANG You-Ping

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211)

**Abstract:** We used 4 methods, such as ultrasonic crush (UC), ultrasonic rinse (UR), whirl surge (WS) and rubbing (RU), to isolate epiphytic bacteria from red alga *Gracilaria lemaneiformis*. Then, we counted bacteria numbers, detected bacterial species, observed bacterial configuration and characteristic of cell wall. Compared with these methods and with different treatments in one method, the results were drawn: the UR and RU were inferior in all methods to isolate bacterial numbers and species, the UC and WS were better, especially, the treatment 30W 30s of UC was the best in experiment, which isolated 12 of 16 bacterial species, and got  $1.75 \times 10^6$  cells per gram wet weight *G. lemaneiformis*.

**Key words:** Seaweed, *Gracilaria lemaneiformis*, Epiphytic bacteria, Isolation method

藻类在生长过程中向环境释放大量的有机物质,使藻细胞周围形成一个独特的微环境,称为藻际微环境(Phycosphere)。在藻际微环境中,生活着大量的细菌,这些细菌具有独特的结构与功能,同藻细胞之间构成复杂的关系。如对藻体的附着和变态产生影响<sup>[1]</sup>,调控藻体分泌的物质<sup>[2]</sup>;已发现的许多海洋活性物质是由海藻附生菌产生的,如抗生素、酶、色素等<sup>[3,4]</sup>,藻际微环境中的微生物是一个潜在丰富的资源库<sup>[5]</sup>。

尽管已分离和鉴定了许多藻类的附生菌,揭示了两者之间一定的关系。但对藻际细菌的很多生态学意义仍然还没有研究清楚,在大多数情况下甚至连起作用菌株都没有分离到<sup>[6]</sup>。要研究这些附生细

菌的相关性质和作用以及细菌与海藻之间的复杂关系,首先要找到一种能够有效的从海藻表面分离附生微生物的方法。目前国内关于藻类表面附生细菌的分离方法的报道还很少,在实验中涉及到附生微生物分离的仪器和方法也不尽一致。本实验采用4种不同的仪器,设置了系列分离方法对龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)体表附生细菌进行了分离和鉴定,试图寻找出一种有效的分离方法,为以后类似研究提供一些参考和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

实验用龙须菜(*G. lemaneiformis*)采自宁波象

\*宁波市博士基金项目(No. 2005A610025)

宁波市科技项目(No. 2004610028)

宁波市自然科学基金项目(No. 2006A610087)

通讯作者 Tel: 86-574-87600374, E-mail: xuyongjian@nbu.edu.cn

收稿日期: 2006-03-10, 修回日期: 2006-05-10

山港内的养殖筏架,带回实验室后,冲洗干净,去除杂藻,暂养在室用100L塑料大桶中,暂养条件为:60W荧光灯作光源,光周期12L:12D,添加营养盐20 $\mu$ mol(N)/L、2 $\mu$ mol(P)/L,每天早晚搅拌2次。

实验中,用于分离微生物的培养基为Zobell 2216E海水培养基。

实验采用的主要分离仪器有:超声波粉碎机JY96-II型(宁波科生仪器厂),旋涡振荡仪QL-861(江苏海门市麒麟医用仪器厂),超声波清洗CQ25-12D(宁波新艺生物科技股份有限公司),石英砂和匀浆研钵。

## 1.2 分离方法

取暂养龙须菜约0.2g,用灭菌纱布吸干藻体表面水分,电子天平准确定量,记录各处理的藻体重量。把海藻分别放入到已经灭菌的装有10 mL海水的大试管中,用棉塞塞紧,整个过程无菌操作。然后再进行下一步的处理。各处理设2个重复,各处理的鲜藻量及编号见表1。

表1 不同处理的龙须菜用量及技术指标

分离方法	各处理技术指标	龙须菜质量(g)
超声波 粉碎法	S1 (30W 30s)	0.2117 $\pm$ 0.0024
	S2 (30W 1.5min)	0.2037 $\pm$ 0.0018
	S3 (30W 3min)	0.2125 $\pm$ 0.0031
	S4 (50W 30s)	0.2090 $\pm$ 0.0014
	S5 (50W 1.5min)	0.2034 $\pm$ 0.0027
	S6 (50W 3min)	0.2018 $\pm$ 0.0011
研磨法	Y (匀浆)	0.1942 $\pm$ 0.0017
	W1 (3min)	0.2026 $\pm$ 0.0029
旋涡振荡法	W2 (6min)	0.2078 $\pm$ 0.0019
	W3 (10min)	0.2043 $\pm$ 0.0012
	C1 (3min)	0.2037 $\pm$ 0.0025
超声波 清洗法	C2 (6min)	0.2103 $\pm$ 0.0035
	C3 (10min)	0.2082 $\pm$ 0.0022

**1.2.1 超声波粉碎法:**设6个组别,第1组:把超声波粉碎机的探头插入到装有龙须菜的大试管底部附近,开动仪器,功率30W,作用时间30s,处理液为S1;第2组:与第1组功率相同,时间增加到1.5min,处理液为S2;第3组:功率30W,时间3min,处理液为S3;第4组:处理方法同第1组,功率设为50W,作用时间为30s,处理液为S4;第5组:与第4组同,时间1.5min,处理液为S5;第6组:与第4、5组同,时间3min,处理液为S6。

**1.2.2 旋涡振荡法:**设3个组别,第1组:手持大试管,使其在旋涡振荡仪上振荡,试管的角度与旋涡振荡仪成90度,作用时间为3min,处理液为W1;第2组:方法与上述相同,处理时间6min,处理液为W2;第3组:处理时间10min,处理液为W3。

**1.2.3 超声波清洗法:**也设3个组别,第1组:把大试管放入到超声波清洗仪处理液面以下,作用时间3min,处理液为C1;第2组:方法同前,作用时间6min,处理液为C2;第3组:处理时间10min,处理液为C3。

**1.2.4 研磨匀浆法:**在研钵中加入适量的石英沙,4℃环境下加入10mL生理盐水充分研磨,静置,处理液为Y。

## 1.3 菌株分离、纯化和观察

对以上各处理的处理液,用灭菌移液枪吸取上清液100 $\mu$ L,分别注入到盛有900 $\mu$ L无菌海水的离心管中,吹吸多次,使充分混匀,制成 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 稀释度的菌悬液,用灭菌移液枪吸取100 $\mu$ L菌悬液在平板上均匀涂布,放入恒温培养箱28℃培养;分别于36h、48h、72h进行菌落计数,根据下述公式进行换算得每g鲜重海藻所得的细菌密度(BN, cells/g):

$$BN = V \cdot [10 \times 10^{-1} \text{cfu} + 100 \times 10^{-2} \text{cfu}] / (6 \times W)$$

其中:BN为单位海藻重量所分离的菌落数(cells/g),V为处理液的体积(mL), $10^{-1}$ cfu、 $10^{-2}$ cfu分别为 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 稀释梯度平板上36h、48h、72h3次计数最多一次的菌落个数,W为龙须菜鲜重(g)。

及时挑取形态不同的菌落,进行纯化培养,直到没有新的菌落长出,该过程约持续1周。对于纯化培养的细菌,对其菌落进行形状、大小、颜色、革兰氏染色观察和描述。

## 1.4 数据分析

用SPSS统计软件进行方差分析及多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 各处理分离的菌落数量比较

各处理所分离的菌落数量见图1。从图中可以看出:Y组即匀浆处理所得的菌落数最少,平均仅为 $1.96 \times 10^2$  cells/g龙须菜;超声波清洗仪的C组,以C2处理6min的作用时间为最佳,低于和

高于此处理时间所得的结果都不好；相似的涡旋振荡仪的 W 组也是如此，作用时间 6 min 以上效果才比较好，经比较分析 6 min 和 10 min 处理所得的结果差异不显著 ( $P>0.05$ )；使用超声波粉碎仪的 S 组，图中显示，不管其作用功率为 30W 或 50W，所分离到的菌落数都随着作用时间的延长而减少，其中低功率处理要好于高功率处理，分离到最多菌落数的处理是 S1，为  $1.75 \times 10^6$  cells/g，也是在所有 13 种处理中所得菌落数最多的。

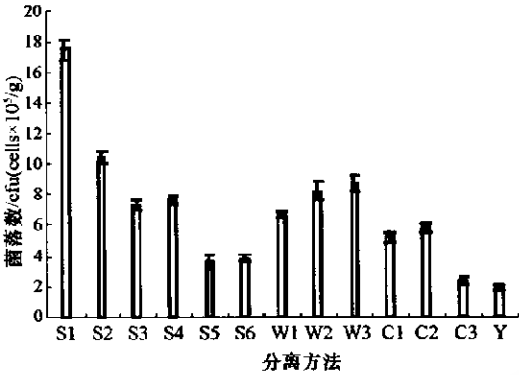


图 1 不同处理所得菌落数量比较

2.2 各处理分离菌株数量比较

根据各纯化平板上菌株的菌落形状特征（见表 2），各处理所分离到的菌株种类数量，如表 3。其中用超声波粉碎法，处理龙须菜所获得的菌落种类数量相对要比其他几种方法所得的种类数要多些，尤以 S1 处理（30W30s）效果最好，初步分离到 12 株附生细菌；涡旋振荡法也获得了较多的菌落种类，且随着处理时间的延长，获得的菌落数也在增多，但本试验中 6 min 处理和 10 min 处理尽管在所得菌落种类数量上有一些差异，不过两处理间在所得的单位藻体细菌细胞密度上没有显著的差异 ( $P>0.05$ )；采用超声波清洗法进行海藻附生菌的处理，以 6 min 处理所得的效果最好，得到的菌落种类数量也最多；通过对海藻匀浆化处理仅获得 7 株附生菌的菌落特征。在获得的所有 16 株菌落中，以 I、II、IV、VI、VII、XI 这 6 个菌株出现的机率较高，尤其是菌株 I 在每一个处理中都能分离到，而 III、V、IX、X、XII、XV、XVI 这 7 个菌株出现的机率较低。

表 2 16 株细菌的菌落特征

菌株	菌落形状	菌落大小	色泽	隆起	边缘	G <sup>+</sup> /G <sup>-</sup>
I	圆形	中	内部透明，外部有白色环	平	光滑	G <sup>-</sup>
II	圆形	中	中心淡黄色	平	光滑	G <sup>-</sup>
III	圆形	小	深黄色	平	光滑	G <sup>-</sup>
IV	圆形	中	乳白色→透明→乳白色	平	光滑	G <sup>-</sup>
V	圆形	小	黄色	平	光滑	G <sup>-</sup>
VI	圆形	细小	淡黄色	平	光滑	G <sup>+</sup>
VII	圆形	小	乳白色	凸面	光滑	G <sup>-</sup>
VIII	圆形	中	中心黄色，边缘淡黄色	平	光滑	G <sup>-</sup>
IX	不规则	中	中心乳白，边缘透明	低凸	较粗糙	G <sup>-</sup>
X	圆形	小	粉红色	平	光滑	G <sup>-</sup>
XI	圆形	小	白色	低凸	光滑	G <sup>-</sup>
XII	圆形	中	黄色	平	光滑	G <sup>-</sup>
XIII	圆形	大	透明	平	粗糙	G <sup>-</sup>
XIV	圆形	中	中心浅棕色，边缘乳白	凸面	较粗糙	G <sup>+</sup>
XV	圆形	大	深黄色	平	光滑	G <sup>-</sup>
XVI	圆形	中	乳白色	低凸	粗糙	G <sup>-</sup>

表 3 不同分离方法所得到的菌株种类

处理	株数	菌落种类															
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
S1	12	+	+	+	+	+	+		+			+		+	+	+	+
S2	9	+	+	+	+		+		+			+			+		+

续表3

S3	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S4	6	+	+	+		+					+	+
S5	9	+	+	+	+	+	+	+		+	+	
S6	7	+	+	+	+	+				+	+	
W1	5	+		+		+	+			+		
W2	7	+	+	+		+	+	+		+		
W3	8	+	+	+		+		+		+	+	+
C1	5	+		+		+	+			+		
C2	8	+	+	+		+	+	+		+	+	
C3	6	+	+	+		+	+			+		
Y	7	+	+	+	+	+	+			+		

### 3 结论与讨论

本次实验采用的不同方法从龙须菜藻体表面分离到的菌株数为5~12株不等,总共获得了16株细菌。徐泳等<sup>[7]</sup>采用研磨匀浆法在海带表面分到11株附生菌,马悦新等<sup>[8,9]</sup>采用10 min 涡旋振荡法从绿藻、红藻、褐藻体表分离到6~13株不等的附生菌,这与本试验所得结果相似。这些资料没有对藻体表面的附生细菌数量进行定量分析,而获得的附生细菌群落结构的差异,可能与不同海藻表层细胞结构不同有关,还有可能是与采用的处理方法不同有关,如本试验中同一方法的不同处理间所得的结果也不一样,因此,为了更好地进行菌藻间的研究和数据的横向比较,非常有必要在处理技术和方法等方面进行进一步地探讨。

本实验采用了4种不同的方法分离龙须菜附生菌群落,从所得的单位藻体附生菌的数量上来看,超声波清洗法和匀浆法相对较差,这可能与超声波清洗仪的工作原理有关,其主要用于物体表面的清洗,而我们把海藻放到玻璃管中再放入仪器,这样的作用效果不佳;匀浆法效果最差,可能是研磨破坏了细菌的细胞结构造成了不可培养,导致得到的细菌数量和种类较少。涡旋振荡法的效果较好,且随着处理时间的延长,所得的细菌密度有所增加,但6 min 以上处理,增加不多;超声波粉碎法的效果最好,但不是作用时间越长越好,在相同功率下,分离效果30s>1.5 min>3min,而低功率作用效果要好于高功率,超声波处理时间过长,会对细菌产生很大的破坏<sup>[10]</sup>,

超声波粉碎仪有粉碎细胞及分离物体表面附着物的作用,功率太高和作用时间太长可能是把分离下来的细菌都粉碎了,因此,本试验中时间短(30s)能量低(30W)处理效果最好。

从分离的附生菌的菌株数量来看,超声波粉碎法分离到的菌落最多,并且得到了其它分离方法没有分离下来的菌落,尤其是能分离到出现机率较低的菌株,这应与该方法超声波直接作用于藻体表面有关,这样可分离出藻体表面深层附生的细菌种类。

### 参考文献

- [1] 张朝霞,柯才焱,冯丹青,等. 海洋学报, 2005, 27 (5): 96~102.
- [2] 蒋丽娟,史小丽,杨柳燕,等. 环境科学学报, 2003, 23 (4): 521~524.
- [3] Jensen P R, Fenical W. Annu Rev Microbiol, 1994, 48: 559~571.
- [4] 缪辉南,戴建凉. 生物工程进展, 1995, 15 (1): 8~13.
- [5] Burgess J G, Jordan E M, Bregu M, et al. J Biotech, 1999, 70: 27~32.
- [6] Fisher M M, Wilcox L W, Graham L E. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (11): 4384~4389.
- [7] 徐泳,秦松,庞国兴,等. 高技术通讯, 2004, 2: 81~86.
- [8] 马悦欣,王岩,刘璐,等. 大连水产学院学报, 2003, 18 (4): 252~257.
- [9] 马悦欣,孙田,王海燕,等. 大连水产学院学报, 2004, 19 (1): 6~9.
- [10] 陈荣凤,薛广波,顾春英. 上海预防医学杂志, 1999, 11 (11): 491~495.