



## 黄海日照海域部分可培养细菌的分离、初步鉴定及产琼胶酶细菌的筛选

刘昂<sup>\*</sup>, 王爽, 杜峰, 薛庆节, 李秀真

济宁医学院基础医学院, 山东 济宁 272067

**摘要:** 海洋细菌在海洋的物质与能量循环中起着非常重要的作用。为了适应复杂多变的海洋环境, 海洋细菌在物种和基因方面表现出极高的丰富度。【目的】对中国黄海日照海域部分可培养细菌进行分离、初步鉴定, 同时筛选产琼胶酶菌株。【方法】对从日照海域河流入海口和潮间带沙样和海水中分离到的 73 株细菌进行了 16S rRNA 基因序列测定, 并进行序列同源性分析。同时检测了这些菌株对琼脂的降解能力。【结果】结果显示, 分离到的 73 株细菌属于 4 个门、13 个科、34 个属。18 株细菌可能是新分类单元, 其中 16 株为潜在新种, 2 株为可能的新属。73 株细菌中, 5 株菌具有降解琼脂的能力, 最高的琼胶酶活可达到  $2.17 \pm 0.04$  U/mL, 其中 4 株嗜琼胶属的细菌降解琼脂糖的产物均为新琼四糖。【结论】本研究丰富了人们对黄海海域可培养细菌多样性的理解, 为新物种和新酶的研究提供了基础, 并为琼胶酶的提取提供了高产菌株。

**关键词:** 可培养细菌, 多样性, 潜在新种, 琼胶酶活性

海洋细菌是海洋生物的重要组成部分, 在海洋的物质能量循环<sup>[1]</sup>和生态平衡维持<sup>[2]</sup>等方面发挥了重要的作用。海洋细菌大多属于变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、绿弯菌门和蓝细菌门, 其中变形菌门比例最高<sup>[3]</sup>。为了适应复杂多变的海洋环境, 例如高压、高盐、低温、低氧等, 海洋细菌表现出丰富的物种多样性、遗传多样性与代谢产物多样性。据报道, 在原核微生物标准命名列

表网(List of prokaryotic names with standing in nomenclature, LPSN, <http://www.bacterio.net/number.html>)所收录的 36 个门中, 有 34 个在海洋环境中有所分布, 这充分体现了海洋细菌物种多样性。除此之外, 广袤的海洋中蕴藏着大量未鉴定的细菌新种与酶资源。仅 2019 年 1–3 月, 在微生物学分类权威杂志 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 上发表的

基金项目: 济宁医学院教师科研扶持基金(JYFC2018KJ069)

\*通信作者。E-mail: liuang08@163.com

收稿日期: 2019-04-08; 修回日期: 2019-06-24; 网络出版日期: 2019-08-15

海洋新种就有 30 种。而海洋中的酶资源不仅为基础科学研究提供了材料,在医药、环保、工业、农业等领域也展现出良好的应用前景,例如琼脂降解酶资源。

琼脂降解酶,又称琼胶酶,可以将琼脂分解为琼胶寡糖。天然琼胶主要存在于某些海藻的细胞壁中。为了应对海水中寡营养的环境,部分海洋微生物可以利用海藻中的琼胶作为唯一碳源。第一株琼脂降解细菌就是分离自挪威海岸的海水中<sup>[4]</sup>。嗜琼胶属的细菌均分离自海洋<sup>[5]</sup>。可见,海洋细菌是分离纯化琼胶酶的良好来源。到目前为止,琼胶酶的应用已经涵盖了医疗、食品、化妆品、养殖以及科研中<sup>[6]</sup>。例如,琼胶酶可降解红藻细胞壁中的琼胶,用于制备红藻原生质体。琼胶酶可用于从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段<sup>[7]</sup>。近年来,琼胶酶降解琼脂的产物——新琼寡糖(NAOs)的应用,引起了科学家极高度的重视。研究表明,NAOs 具有抑制革兰氏阴性菌引起的小鼠的脓毒症<sup>[8]</sup>、降低小鼠的胆固醇<sup>[9]</sup>、抑制 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的炎症反应<sup>[10]</sup>等作用,具有广阔的应用前景。因此,对琼胶酶的研究与高产菌株的筛选成为至关重要的课题。

由于海洋细菌多数目前尚无法培养,因此目前研究细菌多样性多采用分子生物学手段,其中高通量测序能够获得某一海域大多数微生物物种信息,是目前研究物种多样性最常用的方法。但是若要获得可培养的、应用潜力较大的纯种细菌,纯培养的方法仍是目前最为常用的手段,也是进一步研究细菌生理特性和生态功能的基础。本研究对采自日照海域潮间带和入海口的样品做了分离培养,并选取了 73 株细菌进行基于 16S rRNA 基因序列的物种鉴定。由于部分细菌在琼脂平板上培养时形成了明显的凹陷,本研究对此类细菌

进行了分离培养与酶活测定。研究成果为更好地认识海洋细菌多样性提供了数据支持,也为琼胶酶的分离纯化提供了较为高产的菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

73 株菌分别分离自中国日照黄海入海口(35°13' N 119°22' E)和潮间带(35°28' N 119°36'E)的沙样与海水中。沙样与海水均利用 50 mL 无菌离心管采集,采用低温冷藏的方式运输并保存在 4 °C。

### 1.2 培养基

**1.2.1 TYS 固体培养基:** 0.5%胰蛋白胨(Oxoid), 0.1% 酵母浸出物(Oxoid), 1.5%琼脂(Biosharp), 人工海水, pH 7.5。

**1.2.2 琼胶酶发酵培养基:** 0.6% 胰蛋白胨(Oxoid), 0.1%酵母浸出物(Oxoid), 0.002% FeCl<sub>3</sub>, 0.15%琼脂(Biosharp), 人工海水。

### 1.3 菌株的分离纯化及初步鉴定

**1.3.1 细菌分离培养:** 用无菌人工海水悬浮沙样,加入 10 颗直径 1 mm 的玻璃珠, 15 °C、200 r/min 振荡 1 h, 静止取上清液梯度稀释并涂布 TYS 平板。海水样品直接稀释并涂布平板。TYS 平板在 20 °C 培养 1 个月,并选取不同时间段的单菌落继续分离纯化。分离纯化得到的菌种保存在-80 °C 甘油管(20%甘油)中。

**1.3.2 系统发育分析:** 利用基因组提取试剂盒(北京百泰克,中国)提取菌株的基因组 DNA。利用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATC TTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTT GTTACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因片段,并于北京擎科新业生物技术有限公司完成测序。测序

得到的序列在 EzBioCloud ([www.ezbiocloud.net/](http://www.ezbiocloud.net/)) 和 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对得到最相近菌株与相似度。采用 MEGA X 软件进行多序列比对分析与进化树创建。进化树采用 maximum-likelihood<sup>[11]</sup>法创建, 并利用 MEGA X 计算最佳算法模型。

## 1.4 琼胶酶活性测定与酶解产物分析

**1.4.1 产琼胶酶菌株的筛选与培养:** 在 TYS 固体平板上, 选择能凹陷琼脂的菌株, 进一步纯化并接种到 TYS 液体培养基中, 在 25 °C 培养 24 h, 然后以 3% 接种量接种至琼胶酶发酵培养基中, 25 °C 培养 48 h 测定酶活性。

**1.4.2 粗酶液中琼胶酶活性测定:** 琼胶酶活性测定是采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS)测定还原糖增加量。菌液发酵 48 h 后, 取 1 mL 发酵液 13000 r/min 离心 3 min 所得上清即为粗酶液, 取 100 μL 粗酶液, 加入 100 μL 1% 的琼脂糖溶液, 45 °C 孵育 15 min, 加入 100 μL DNS 溶液并煮沸 5 min 终止反应, 测定 520 nm 的吸光值。对照组使用 100 μL 煮沸 2 min 的粗酶液代替。标准曲线是用 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg/mL 的 D-半乳糖制作的。同时测定发酵液 48 h 后 600 nm 的吸光值。各实验重复 3 次, 结果以平均值±标准差表示, 并通过 T 检验分析每两组数据之间差异的显著性。

酶活力单位定义为: 1 min 催化底物产生 1 μmol 还原糖所需的酶量作为一个酶活力单位(U), 并根据公式(1)运算。

$$\text{琼胶酶活性} = \frac{(\Delta A - b) \times 1000 \times (n \div 180)}{a \times V \times t} \quad \text{公式(1)}$$

其中,  $\Delta A$  为实验组与对照组  $OD_{520}$  的差值,  $b$  为标准曲线截距,  $n$  代表酶液的稀释倍数,  $a$  为标准曲线的斜率,  $V$  代表反应体积,  $t$  代表反应时间。

**1.4.3 酶解产物分析:** 发酵液培养 48 h 后, 取 1 mL 培养物 13000 r/min 离心 3 min, 取 100 μL 粗酶液, 加入 100 μL 1% 的琼脂糖溶液, 45 °C 孵育 24 h, 煮沸 5 min 终止反应。取 5 μL 以薄层色谱 (thin-layer chromatography, TLC) 方法对寡糖成分进行分析。TLC 展开组分体积比为正丁醇: 冰乙酸: 水=2: 1: 1, 显色剂为含 10% 硫酸的乙醇。

## 2 结果和讨论

### 2.1 培养的细菌多样性分析

基于 16S rRNA 基因序列构建的 Maximum-likelihood 进化树分析表明, 73 株细菌属于 34 个不同的属(图 1), 比例较高的有弧菌属(*Vibrio*, 15 株)、*Lentibacter* (5 株)、*Ruegeria* (4 株)、*Loktanella* (4 株)、嗜琼胶属(*Agarivorans*, 4 株)和假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*, 4 株)。34 个属分别属于 5 个不同的纲:  $\gamma$ -变形菌纲(7 个科, 35 株菌),  $\alpha$ -变形菌纲(2 个科, 24 株菌), 黄杆菌纲(1 个科, 10 株菌), 芽孢杆菌纲(2 个科, 3 株菌)和放线菌纲(1 个科, 1 株菌)。结果表明, 本研究从潮间带和入海口筛选到的大部分细菌属于变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门以及放线菌门, 其中变形菌门比例最高(80.8%)。早期卢婧雯等对东海和南海表层海水中可培养细菌多样性分析中, 优势菌群也是变形菌门, 所占比例分别为 90.5% 和 77.4%, 与本研究结果类似<sup>[12]</sup>。同样是对海洋环境样品的分析, 陈柔雯<sup>[13]</sup>和刘玉娟等<sup>[14]</sup>对南海深海沉积物中可培养细菌多样性分析中, 优势类群为厚壁菌门。变形菌门均为革兰氏阴性菌, 而厚壁菌门均为革兰氏阳性菌。研究结果差异较大。分析其原因, 除了培养基的选择差异, 潮间带与表层海水可能以变形菌门为优势种群, 而深海沉积物可培养优势

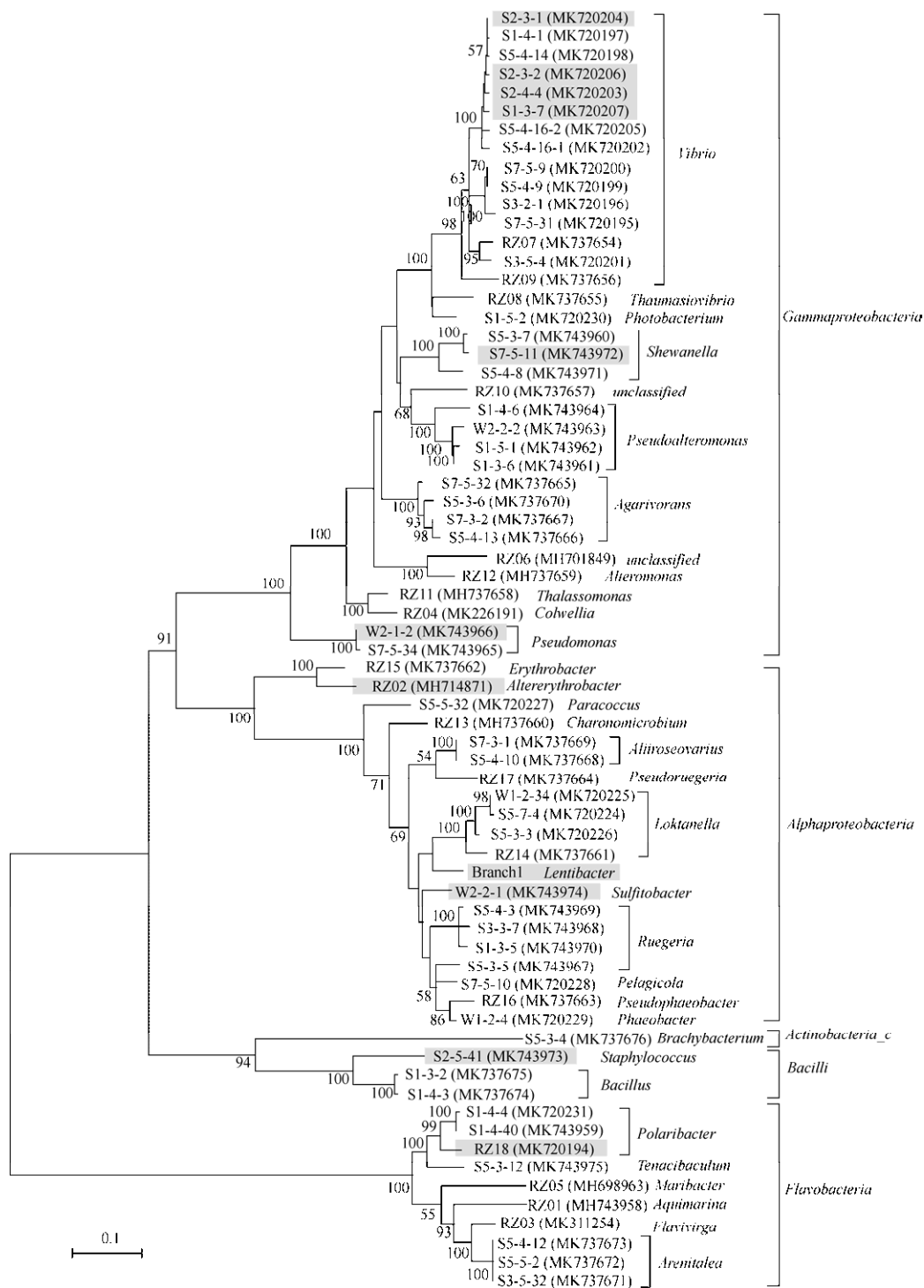


图 1. 基于 16S rRNA 基因序列构建的黄海日照海域 73 株菌最大似然法系统进化树

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of the 73 isolates from the Yellow Sea. The tree was constructed using the maximum likelihood method and bootstrap values (>50%) based on 1000 replicates are indicated at nodes. Bar 0.1 substitutions per nucleotide position. Branch 1 represents 5 strains closely related to *lentibacter algarum* with GenBank accession numbers from MK720219 to MK720223. The strains with shading marks were isolated from estuary area and the other strains were isolated from intertidal area.

种群为厚壁菌门。目前对黄海日照海域可培养细菌多样性的研究尚未报道过。

对潮间带 61 株和入海口 12 株细菌的分析显示, 虽然入海口处分离的菌株量较少, 但同样包含  $\gamma$ -变形菌纲(6 株菌)、 $\alpha$ -变形菌纲(4 株菌)、黄杆菌纲(1 株菌)和芽孢杆菌纲(1 株菌)(图 1)。其中葡萄球菌属(S2-5-41)和亚硫酸盐杆菌属(W2-2-1)菌株仅在入海口处样品中分离到。葡萄球菌属菌株 S2-5-41 的最相似模式菌株 *Staphylococcus warneri* ATCC 27836<sup>T</sup> (16S rRNA 基因序列相似度 99.52%) 是 1975 年首次在皮肤上分离到的, 结合日照入海

口处临近村庄, 考虑可能是因为人类活动带入的。而亚硫酸盐杆菌属的菌株 *Sulfitobacter* sp. M44 曾被报道, 其次级代谢产物可以抑制肿瘤细胞的生长<sup>[15]</sup>, 该菌株与我们筛选到的 W2-2-1 在 NCBI BLAST 比对的 16S rRNA 基因序列相似性为 99.13%, 因此 W2-2-1 也具有很高的研究价值, 值得进一步研究。

## 2.2 潜在细菌新种或新属的统计与分析

16S rRNA 基因序列相似度小于 98.65%, 可以认定为可能的新种或新属<sup>[16]</sup>。统计结果表明, 有 18 株菌可能是新种或新属(表 1), 新种属的比

表 1. 与最相近模式菌株的 16S rRNA 基因相似度小于 98.65% 的分离菌株

Table 1. Isolates that share less than 98.65% 16S rRNA gene sequence similarity with the closest type strain

Genus	Isolate	Closest type strain and the isolation source <sup>a</sup>	16S rRNA gene sequence similarity/%
<i>Gammaproteobacteria</i>			
<i>Vibrio</i>	RZ09	<i>Vibrio marisflavi</i> WH134 <sup>T</sup> (sea water at a depth of 10 m)	96.28
<i>Vibrio</i>	RZ07	<i>Vibrio sagamiensis</i> LC2-047 <sup>T</sup> (sea water)	97.77
<i>Colwellia</i>	RZ04	<i>Colwellia asteriadis</i> KMD002 <sup>T</sup> (an Amur starfish collected at a depth of 10 m)	96.79
<i>Enterovibrio</i>	RZ08	<i>Thaumasiovibrio subtropicus</i> C4V358 <sup>T</sup> (coral reef sea water at a depth of 6 m)	95.83
<i>Glaciecola</i>	RZ06	<i>Glaciecola nitratireducens</i> FR1064 <sup>T</sup> (coastal surface sea water)	94.16
<i>Neiella</i>	RZ10	<i>Neiella marina</i> J221 <sup>T</sup> (intestine of a sea cucumber)	92.71
<i>Thalassomonas</i>	RZ11	<i>Thalassomonas atypical</i> RZG4-3-1 <sup>T</sup> (sea water at a depth of 58 m)	97.06
<i>Alteromonas</i>	RZ12	<i>Alteromonas marina</i> SW-47 <sup>T</sup> (seawater)	98.41
<i>Alphaproteobacteria</i>			
<i>Altererythrobacter</i>	RZ02	<i>Altererythrobacter luteolus</i> SW109 <sup>T</sup> (sea water of a tidal flat)	97.30
<i>Charonomicrobium</i>	RZ13	<i>Charonomicrobium ambiphotosyntheticum</i> EG17 <sup>T</sup> (saline effluent stream)	97.48
<i>Loktanella</i>	RZ14	<i>Loktanella agnita</i> R10SW5 <sup>T</sup> (sea water at a depth of 9-13 m)	97.74
<i>Erythrobacter</i>	RZ15	<i>Erythrobacter citreus</i> RZ35F-1 <sup>T</sup> (sea water at a depth of 35 m)	98.58
<i>Pseudophaeobacter</i>	RZ16	<i>Pseudophaeobacter arcticus</i> DSM23566 <sup>T</sup> (sea ice)	98.63
<i>Pseudoruegeria</i>	RZ17	<i>Pseudoruegeria haliotis</i> WM67 <sup>T</sup> (the gut of an abalone collected from coastal area)	98.2
<i>Flavobacteria</i>			
<i>Aquimarina</i>	RZ01	<i>Aquimarina versatilis</i> CBA3207 <sup>T</sup> (seashore sand)	96.22
<i>Flavivirga</i>	RZ03	<i>Flavivirga amylovorans</i> JC2681 <sup>T</sup> (sea water)	97.84
<i>Maribacter</i>	RZ05	<i>Maribacter polysiphoniae</i> DSM23514 <sup>T</sup> (a red alga collected from Sea of Japan)	97.66
<i>Polaribacter</i>	RZ18	<i>Polaribacter reichenbachii</i> KCTC23969 <sup>T</sup> (a green alga collected from Sea of Japan)	98.54

<sup>a</sup>The isolation source of the corresponding type strain is shown in parenthesis.

例高达 25%。其中两株菌 RZ06、RZ10 与最相似模式菌株的相似度均小于 95%，可能代表潜在的新属<sup>[17]</sup>，其他 16 株菌为潜在的新种。Maximum-likelihood 进化树分析显示，虽然 RZ06 与菌株 *Agaribacter marinus* 8-8<sup>T</sup> 聚簇(图 2-A)，但 bootstrap 值只有 24%，说明 RZ06 有可能是新属。RZ10 并不与任何一株已命名的菌株聚簇(图 2-C)，支持其新属的可能性。这两株菌可作进一步分类鉴定。RZ08 与其最相似模式菌株 *Thaumasiovibrio subtropicus* C4V358<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因序列相似度也较低(95.83%)，进化树分析表明 RZ08 并不是新的分支，且 Bootstrap 值为 96%，因此应为潜在的新种而不是潜在新属(图 2-B)。本研究所分离到的 16 株潜在的新种分布在  $\gamma$ -变形菌纲(6 株菌)、 $\alpha$ -变形菌纲(6 株菌)和黄杆菌纲(4 株菌)中，本研究所分离到的 2 株潜在的新属菌株均分布在  $\gamma$ -变形菌纲中(图 1)。进一步分析表明，除了菌株 RZ13 之外，与本研究所分离到的其他潜在新种或新属菌株 16S rRNA 基因序列相似度最高的模式菌株均分离自海洋生境，例如表层海水、潮间带沉积物、海藻或者海洋动物体内(表 1)。与菌株 RZ13 的 16S rRNA 基因序列相似度最高的模式菌株分离自盐水中(表 1)。这些菌株的筛选为后期利用多相分类学方法鉴定新物种提供了基础。

### 2.3 琼胶酶活性测定与酶解产物分析

在 25 °C 条件下培养 2 d 后，有 5 株菌在琼脂平板表面形成了明显的凹陷，编号分别为 S7-5-32、S5-4-13、S7-3-2、S5-3-6 和 S5-4-8。除 S5-4-8 属于希瓦氏属以外，其他菌株均属于嗜琼胶属，16S rRNA 基因序列相似度最高的分类单元分别为 *Agarivorans litoreus* (S7-5-32)、*Agarivorans aestuarii* (S5-4-13, S7-3-2)、*Agarivorans albus* (S5-3-6)。为

了筛选琼胶酶高产菌株以备研究使用，本研究测定了这些菌株粗酶液的酶活。结果表明嗜琼胶属的 4 株菌的粗酶液表现出明显的琼胶酶活性(表 2)，而希瓦氏属菌株 S5-4-8 的粗酶液检测不到琼胶酶活性(数据未展示)。实验结果还显示 4 株嗜琼胶属的菌株中，S5-3-6 发酵 48 h 后的粗酶液的琼胶酶活性(2.17±0.04 U/mL)高于其他 3 株细菌，且统计学分析表明差异具有统计学意义( $P$  值均小于 0.05)。由于每株细菌的生长速率不一样，经过同等培养时间相同条件培养后，培养液的细菌数量不一样。为了更好地比较 4 株嗜琼胶属菌株酶活性高低，本研究进一步通过换算比较了不同菌株菌液  $OD_{600}$  均为 1.00 条件下酶活性高低(表 2)，结果表明当菌液  $OD_{600}$  换算为 1.00 时，菌株 S5-3-6 酶活性(0.87±0.01 U/mL)仍高于其他 3 株细菌，且统计学分析表明差异具有统计学意义( $P$  值均小于 0.05)。谢喜珍等研究的琼胶酶高产菌株(弧菌属细菌)的粗酶液酶活最高为 2.15 U/mL<sup>[18]</sup>，并可以通过加入金属离子、优化发酵条件来提升酶活。可见 S5-3-6 也属于琼胶酶高产菌株。其最相似分类单元 *Agarivorans albus* 种内的菌株也经常用来研究  $\beta$ -琼胶酶的酶学性质。例如付晓婷等<sup>[19]</sup>利用大肠杆菌表达了来自菌株 *Agarivorans albus* YKW-34 (与菌株 S5-3-6 的 16S rRNA 基因序列相似度为 96.65%)的重组  $\beta$ -琼胶酶 rAgaB34 基因，结果显示含重组 rAgaB34 的大肠杆菌发酵液的最高酶活性为 1.67 U/mL，而从大肠杆菌发酵液纯化后的重组酶 rAgaB34，其降解琼脂糖的比活力达到 242.18 U/mg；且研究结果表明 rAgaB34 降解琼脂糖的终产物主要为新琼四糖。刘婷威等<sup>[20]</sup>研究了菌株 *Agarivorans albus* RZW1-1(该菌株 16S rRNA 基因序列未公布)产琼胶酶的发酵条件优化，优化后的粗酶液酶活性为 23.02 U/mL。但是

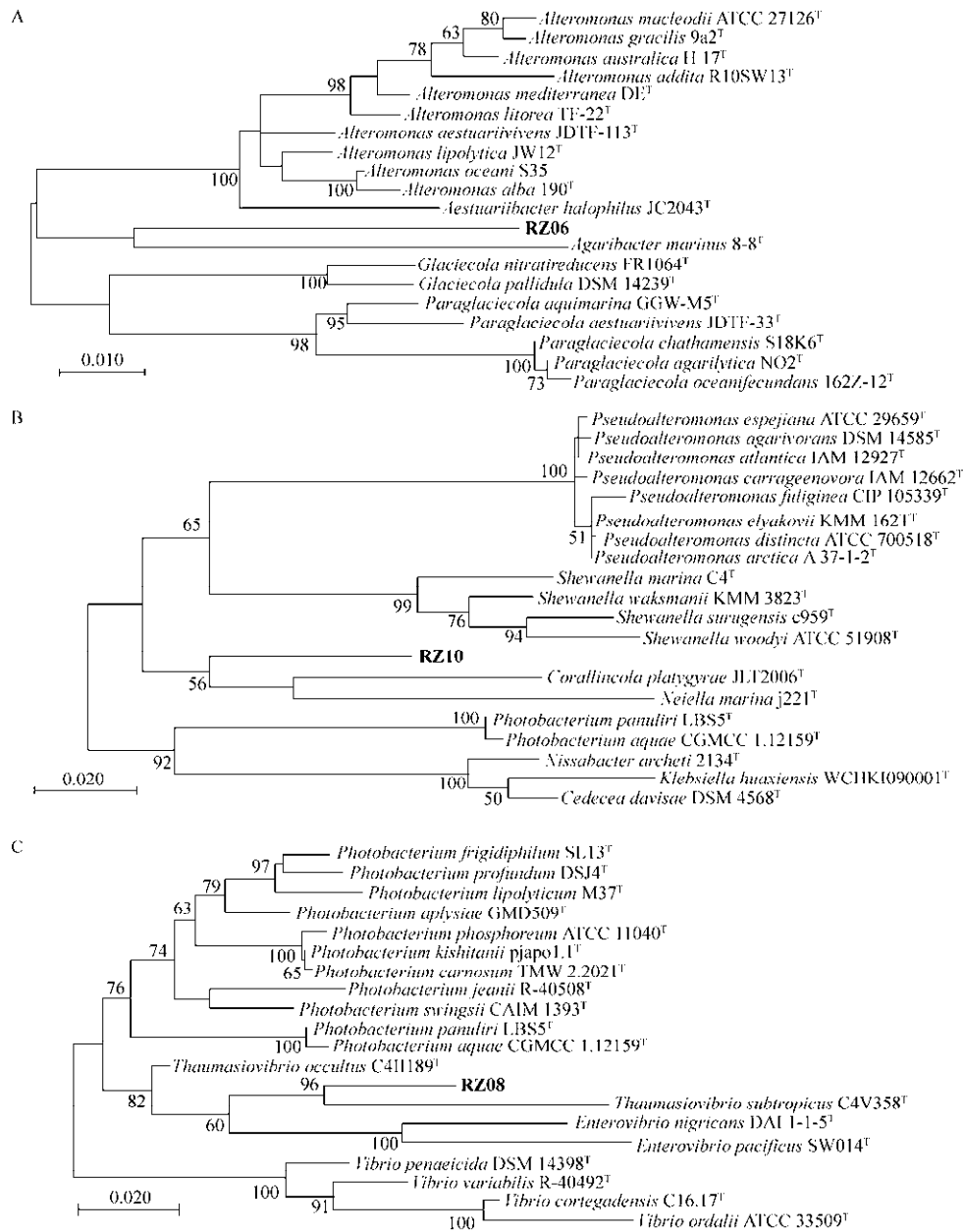


图 2. 基于 16S rRNA 基因序列构建的潜在新属菌株 RZ06、RZ10、RZ08 及其近缘的模式菌株的最大似然法进化树

Figure 2. Phylogenetic trees based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic positions of strains RZ06, RZ10 and RZ08 and related representatives of some other genera. The trees were constructed using the maximum likelihood method and bootstrap values (>50%) based on 1000 replicates were indicated at nodes. A: Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic positions of strain RZ06 (in bold) and related representatives of some other genera. Bar 0.01 substitutions per nucleotide position. B: Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic positions of strain RZ10 (in bold) and related representatives of some other genera. Bar 0.02 substitutions per nucleotide position. C: Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic positions of strain RZ08 (in bold) and related representatives of some other genera. Bar 0.02 substitutions per nucleotide position.

表 2. 四株产琼胶酶菌株发酵 48 h 后的琼胶酶活性

Table 2. Agarase activity of the 4 strains after a 48-hour-cultivation

Strain number	Agarase activity/ (U/mL)	$OD_{600}$	Agarase activity/ $OD_{600}$ (U/mL)
S7-5-32	1.79±0.15	2.33±0.04	0.77±0.05
S5-4-13	1.96±0.14	2.90±0.05	0.67±0.04
S7-3-2	1.81±0.07	2.63±0.12	0.69±0.01
S5-3-6	2.17±0.04	2.45±0.04	0.87±0.01

刘婷威等研究中琼胶酶活力单位的定义为 1 min 内催化底物产生 1  $\mu$ g 还原糖所需的酶量作为一个酶活力单位(U), 而本研究琼胶酶活力单位的定义采用更为通用的标准, 即 1 min 内催化底物产生 1  $\mu$ mol 还原糖所需的酶量作为一个酶活力单位(U)。将刘婷威等研究结果按照本研究酶活定义换算后, 其优化后的粗酶液活性为 0.13 U/mL, 仅为菌株 S5-3-6 粗酶液活性的 1/17。

菌株 S5-4-8 与其他 4 株菌不同, 在其生长平板表面能够看到明显的凹陷, 而且在发酵培养基中培养 16 h 后, 发酵培养基中的琼脂小块完全溶解, 但用 DNS 法测酶活时, 结果却为阴性。为此我们查阅了相关文献, 与其 16S rRNA 基因序列相似度最高的模式菌株 *Shewanella japonica* KMM 3299<sup>T</sup> (99.52%)<sup>[21]</sup>, 可以在琼脂平板上形成凹陷, 作者据此认为该菌株可以降解琼脂; 但另一篇文章报道, 与 *Shewanella japonica* KMM 3299<sup>T</sup> 16S rRNA 基因序列相似度为 98.3% 的一株细菌, 其发酵液琼胶酶活性检测结果为阴性<sup>[22]</sup>。这些报道与本研究结果相吻合, 即 S5-4-8 可在琼脂平板上形成凹陷, 但其发酵液中检测不到琼胶酶活性。据此我们推测, 可能是 S5-4-8 降解的不是琼脂糖, 而是琼脂的另一种成分琼脂果胶(也称琼胶酯)。由于缺少商品化的琼胶酯, 这一推论尚需我们进一

步研究验证。

根据断裂键位置的不同, 可将琼胶酶分为  $\alpha$ -琼胶酶和  $\beta$ -琼胶酶, 目前分离到的绝大多数琼胶酶为  $\beta$ -琼胶酶。据已发表的文献报道, 嗜琼胶属的细菌产生的琼胶酶都是  $\beta$ -琼胶酶<sup>[23-24]</sup>, 降解琼胶的产物为新琼寡糖, 因此我们以新琼二糖(neoagarobiose, NA2)、新琼四糖(neoagarotetraose, NA4)和新琼六糖(neoagarohexaose, NA6)为标准品检测了酶解产物。薄层色谱结果表明, 嗜琼胶属 4 株细菌粗酶液降解琼脂糖 24 h 后的主要产物是新琼四糖(图 3)。林伯坤等<sup>[25]</sup>的研究表明, 嗜琼胶属的一株细菌 *Agarivorans* sp. HZ105 的降解酶系有 4 种琼胶酶 HZ1、HZ2、HZ3、HZ4, 降解琼脂糖的最终产物为新琼二糖和新琼四糖。这些结果表明嗜琼胶属细菌的琼胶酶降解产物相似, 多为低聚合度的新琼寡糖(新琼四糖和新琼二糖)。

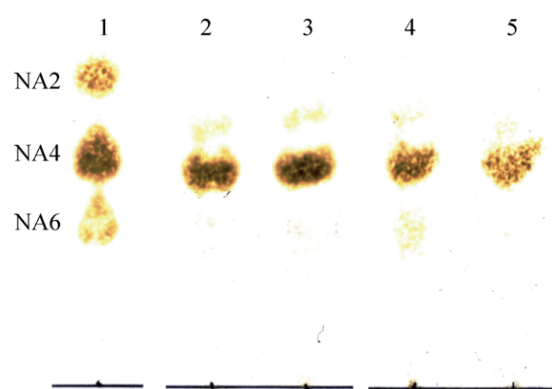


图 3. 嗜琼胶属 4 株细菌发酵液降解琼脂糖产物薄层色谱

Figure 3. TLC analysis of the hydrolysis reaction products of the four agar-degrading isolates. Reactions were performed at 45 °C for 24 h. Lane 1: standards of NA2, NA4 and NA6; lane 2: products of strain S5-4-13; lane 3: products of strain S5-3-6; lane 4: products of strain S7-5-32; lane 5: products of strain S7-3-2.



### 3 结论

本研究对采自黄海日照入海口和潮间带的样品进行了分离培养, 获得 73 株细菌并测定了其 16S rRNA 基因序列。系统发育分析结果显示所培养菌株多属于  $\gamma$ -变形菌纲(35 株菌)和  $\alpha$ -变形菌纲(24 株菌), 其次为黄杆菌纲(10 株菌), 还有少量菌株属于芽孢杆菌纲(3 株菌)和放线菌纲(1 株菌), 具有丰富的细菌物种多样性。此外, 本研究分离到的菌株中有 18 株为潜在细菌新种或新属, 表明该区域有丰富的细菌新物种资源可供开发。本研究所分离到的潜在新种或新属资源为后续的细菌新物种的多相分类鉴定提供了基础。

海洋中蕴藏的不仅有新菌种资源, 还有多种应用前景广阔的胞外酶。当前, 新琼寡糖良好的医疗应用前景促使我们去筛选琼胶酶高产菌株。本研究分离了 5 株能够降解琼脂的细菌, 并从其中 4 株嗜琼胶属菌株的发酵液中检测到了明显的琼胶酶活性, 其中菌株 S5-3-6 表现出最高的酶活 ( $2.17 \pm 0.04$  U/mL)。此外, 进一步的分析表明该 4 株菌降解琼脂糖的主要产物均为新琼四糖。S5-4-8 表现出了特殊的性质, 即能在琼脂平板上形成凹陷而发酵液中却检测不到琼胶酶活性, 其原因尚需进一步研究。本研究筛选到的琼胶酶降解菌株为进一步研究开发海洋来源琼胶酶资源奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Azam F, Malfatti F. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(10): 782–791.
- [2] Zheng TL, Xue XZ, Li FD. The role of marine microorganisms in the ecological environment. *Marine Sciences*, 1994, (3): 35–38. (in Chinese)
- [3] 郑天凌, 薛雄志, 李福东. 海洋微生物在生态环境中的作用. *海洋科学*, 1994, (3): 35–38.
- [4] Wilms R, Köpke B, Sass H, Chang TS, Cypionka H, Engelen B. Deep biosphere-related bacteria within the subsurface of tidal flat sediments. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(4): 709–719.
- [5] Morrice LM, McLean MW, Williamson FB, Long WF.  $\beta$ -agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Purifications and some properties. *European Journal of Biochemistry*, 1983, 135(3): 553–558.
- [6] Kim SG, Pheng S, Lee YJ, Eom MK, Shin DH. *Agarivorans aestuarii* sp. nov., an agar-degrading bacterium isolated from a tidal flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(8): 3119–3124.
- [7] Jahromi ST, Barzkar N. Future direction in marine bacterial agarases for industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(16): 6847–6863.
- [8] Zhang WW, Sun L. Cloning, characterization, and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(9): 2825–2831.
- [9] Kang DR, Yoon GY, Cho J, Lee SJ, Park HJ, Kang TH, Han HD, Park WS, Yoon YK, Park YM, Jung ID. Neoagarooligosaccharides prevent septic shock by modulating A20-and cyclooxygenase-2-mediated interleukin-10 secretion in a septic-shock mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 486(4): 998–1004.
- [10] Yang JH, Cho SS, Kim KM, Kim JY, Kim EJ, Park EY, Lee JH, Ki SH. Neoagarooligosaccharides enhance the level and efficiency of LDL receptor and improve cholesterol homeostasis. *Journal of Functional Foods*, 2017, 38: 529–539.
- [11] Wang W, Liu P, Hao C, Wu LJ, Wan WJ, Mao XZ. Neoagar-oligosaccharide monomers inhibit inflammation in LPS-stimulated macrophages through suppression of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44252.
- [12] Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, 17(6): 368–376.
- [13] Lu JW, Zhang XQ, Du LL, Yang ZJ, Wu M, Lu LD. Bacterial isolation and diversity analysis of four seawater sampling sites of the East China Sea and the South China Sea. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2012, 39(4): 443–449. (in Chinese)

- 卢婧雯, 张心齐, 杜丽丽, 杨志坚, 吴敏, 卢龙斗. 中国东海及南海近海 4 采样点海水可培养细菌的多样性研究. 浙江大学学报(理学版), 2012, 39(4): 443–449.
- [13] Chen RW, Wang KX, He YQ, Tian XP, Long LJ. Diversity of cultured bacteria isolated from a deep sea sediment in South China Sea. *Biotic Resources*, 2018, 40(4): 321–333. (in Chinese)  
陈柔雯, 王可欣, 何媛秋, 田新朋, 龙丽娟. 一份南海深海沉积物样品中可培养细菌的多样性. 生物资源, 2018, 40(4): 321–333.
- [14] Liu YJ, Tian XP, Huang XF, Long LJ, Zhang S. Diversity of cultivable bacteria isolated from marine sediment environments in South China Sea. *Microbiology China*, 2014, 41(4): 661–673. (in Chinese)  
刘玉娟, 田新朋, 黄小芳, 龙丽娟, 张德. 中国南海沉积环境可培养细菌多样性研究. 微生物学通报, 2014, 41(4): 661–673.
- [15] Long C, Liu XY, Lu XL, Jiao BH. Studies on the secondary metabolites of a marine *Sulfitobacter* sp. (M44). *Chinese Journal of Antibiotics*, 2012, 37(4): 254–257. (in Chinese)  
龙聪, 刘小宇, 卢小玲, 焦炳华. 海洋亚硫酸杆菌 M44 的代谢产物研究. 中国抗生素杂志, 2012, 37(4): 254–257.
- [16] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2): 346–351.
- [17] Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 249–266.
- [18] Xie XZ, Lin J, Xie Y, Ye XY. Separation and purification of agarase and study on its properties. *China Biotechnology*, 2017, 37(1): 46–52. (in Chinese)  
谢喜珍, 林娟, 谢勇, 叶秀云. 海洋来源琼胶酶的分离纯化及酶学性质研究. 中国生物工程杂志, 2017, 37(1): 46–52.
- [19] Fu XT, Pan CH, Lin H, Kim SM. Gene cloning, expression, and characterization of a  $\beta$ -Agarase, AgaB34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(3): 257–264.
- [20] Liu TW, Zhu XS, Chen MQ, Zhang P, Guo S, Sun PY, Wang Y. Optimization of the agarase-producing fermentation conditions in strain *Agarivorans albus* RZW1-1. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(10): 4372–4379. (in Chinese)  
刘婷威, 朱新术, 陈梦仟, 张鹏, 郭帅, 孙朋洋, 王燕. *Agarivorans albus* RZW1-1 产琼胶酶的发酵条件优化. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(10): 4372–4379.
- [21] Ivanova EP, Sawabe T, Gorshkova NM, Svetashev VI, Mikhailov VV, Nicolau DV, Christen R. *Shewanella japonica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(3): 1027–1033.
- [22] Martin M, Barbeyron T, Martin R, Portetelle D, Michel G, Vandenberg M. The cultivable surface microbiota of the brown alga *Ascophyllum nodosum* is enriched in macroalgal-polysaccharide-degrading bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1487.
- [23] Yoon SY, Lee HM, Kong JN, Kong KH. Secretory expression and enzymatic characterization of recombinant *Agarivorans albus*  $\beta$ -agarase in *Escherichia coli*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 47(10): 1037–1042.
- [24] Zhang PJ, Zhang JR, Zhang LJ, Sun JN, Li Y, Wu L, Zhou JH, Xue CH, Mao XZ. Structure-based design of agarase AgWH50C from *Agarivorans gilvus* WH0801 to enhance thermostability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(3): 1289–1298.
- [25] Lin BK, Lu GY, Song Y, Xie RQ, Chen HL, Hu Z. The agar-degrading enzymatic system of marine bacterium *Agarivorans* sp. HZ105. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(1): 160–166. (in Chinese)  
林伯坤, 陆国永, 宋燕, 谢锐权, 陈鸿霖, 胡忠. 海洋细菌 *Agarivorans* sp. HZ105 的琼胶降解酶系. 生物技术通报, 2015, 31(1): 160–166.

## Isolation and identification of some cultivated bacteria from the sea area of Rizhao for screening of agarase-producing bacteria

Ang Liu<sup>\*</sup>, Shuang Wang, Feng Du, Qingjie Xue, Xiuzhen Li

College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, Shandong Province, China

**Abstract:** Marine bacteria are the major members of marine life. Compared with those living on the land, marine bacteria exhibit high diversity in species, genes and ecological functions, valuable for both fundamental studies and biotechnological applications. **[Objective]** Isolation and identification of some culturable bacteria from the sea area of Rizhao for screening of agarase producing strains. **[Methods]** A total of 73 strains were isolated and their 16S rRNA genes were sequenced. Agarsae activity of agar-digesting strains was determined. **[Results]** These isolates belong to 34 genera, 13 family and 4 phyla, showing rich species diversity. Furthermore, 16S rRNA gene sequence analysis also showed that among these 73 strains, 18 strains potentially represented novel species. Our results also showed that 5 strains were positive for agarase activity and the highest agarase activity of these strains was determined to be  $2.17\pm 0.04$  U/mL. **[Conclusion]** This study widens our understanding for the diversity of marine bacteria in species and agarase activity.

**Keywords:** culturable bacteria, bacterial diversity, novel species, agarase activity

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the Supporting Fund for Teachers' Research of Jining Medical University (JYFC2018KJ069)

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: liuang08@163.com

Received: 8 April 2019; Revised: 24 June 2019; Published online: 15 August 2019