

56-61

武汉东湖几丁质分解菌生态研究

李勤生 许建华

Q949.32

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

提要 对武汉东湖水柱和沉积物中几丁质分解菌的种类组成、数量分布及动态的研究结果表明:几丁质分解菌中,放线菌居于优势,在水柱中约为总数的50—72.3%,在沉积物中约为63—88.5%。经鉴定的102株放线菌中,链霉菌属(*Streptomyces*)占总数的70.6%,链孢囊菌属(*Streptosporangium*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、小多孢菌属(*Micropolyspora*)分别为8.8%、9.8%和10.8%。细菌中主要是芽孢杆菌属(*Bacillus*),占鉴定菌株数的42%,其次为沙雷氏菌属(*Serratia*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、微球菌属(*Micrococcus*)和短杆菌属(*Brevibacterium*)的一些菌株。在数量分布上,沉积物中高于水柱2—3个数量级;东湖I站高于II站。随着季节更迭,水温上升,其数量亦有相应变化。对菌株分解几丁质的能力和其它生物活性作了比较,并就所得结果进行了讨论。

关键词 几丁质分解菌, 细菌, 放线菌, 水微生物生态

几丁质是自然界中非常丰富的多醣类物质。据粗略估算,水生态圈中,每年产生的几丁质约 10^{11} t^[1];在世界范围内,除真菌、原生动物、线虫和昆虫等来源的几丁质外,仅来自甲壳纲动物的产量即高达 150×10^3 t^[2]。几丁质如此大量累积,已成为社会关注的潜在环境问题。几丁质由 β -1,4-N-乙酰葡萄糖胺(NAG)的多聚物组成。除无机强酸外,在大多数有机溶剂中均不溶解。在天然环境中,将几丁质转化为NAG主要依赖于微生物的作用^[2,3]。因此,研究几丁质转化的生物学过程,包括几丁质分解菌的种类组成、数量分布及动态、分解活力和机理,对认识水生态系统中微生物群落结构和功能,开发利用生物资源、保护水环境都是有意义的。为此,我们选择武汉东湖这一具有代表性的浅水富营养化湖泊作了一些研究,结果报道于后。

一、材料与方法

(一)采样点的选择

东湖I站为沿岸带,II站为湖泊开阔区。1991年3、4、5月中旬在I、II站采集水样和沉积物样各一次;4月下旬、5月上旬在东湖I站先后补充采样两次。

(二)几丁质分解菌的培养、计数和纯化

1. 几丁质培养基的制备:参照《细菌属的鉴定指导》^[4]。

本文于1991年11月5日收到,1991年12月31日改回。

2. 取适当稀释后的水样和沉积物样 1.0mL, 加入适量几丁质琼脂混合倾注平板(直径 9.0cm)。30℃培养一周后, 对其中具有几丁质分解透明圈的菌落计数。

3. 挑取分解几丁质的单个菌落, 在几丁质琼脂平板上划线分离纯化, 进一步确认其分解能力。纯化后转种几丁质琼脂斜面保存备用。

(三) 菌株生物学特性检测及分类鉴定

1. 几丁质分解能力的强弱以菌落和分解透明圈直径之比值(CZ/CS)作为比较的标准^[2]。

2. 纤维素分解、淀粉水解、牛奶凝固和胨化、硝酸盐还原活力等检测方法参照《一般细菌常用鉴定方法》^[5]。

3. 抗菌活性检测: 采用点种法。以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和大肠杆菌(*E. coli*)分别作为革兰氏阳性和阴性细菌代表株。菌种分别由华中农业大学和中国科学院微生物研究所提供。

4. 菌株的分类鉴定: 参照文献^[6,7,8]。

二、结果与讨论

(一) 东湖几丁质分解菌的数量动态和分布

几丁质分解菌数量无论在水柱和沉积物中东湖 I 站均较 II 站为高; I、II 两站沉积物中几丁质分解菌数量高于水柱 2—3 个数量级(表 1)。

表 1 东湖 I、II 站几丁质分解菌动态和分布(1991 年 3—5 月)

Tab. 1 Dynamics and distribution of chitin-decomposing microorganisms in Donghu Lake (March-May, 1991)

| 样品 | | 水柱(CFU/mL) | | | | | | 沉积物(CFU · 10 ⁴ /mL) | | | | | |
|----|----|------------|----|-----|----|----|----|--------------------------------|-----|-------|-----|-----|-----|
| | | I | | | II | | | I | | | II | | |
| 月 | 日 | T* | B* | A* | T | B | A | T | B | A | T | B | A |
| 3 | 15 | 17 | 8 | 9 | 12 | 6 | 6 | 5.6 | 2.1 | 3.6 | 4.1 | 1.4 | 2.7 |
| 4 | 19 | 108 | 51 | 57 | 81 | 34 | 47 | 15.7 | 5.3 | 11.4 | 8.8 | 3.0 | 5.8 |
| 4 | 29 | 142 | 59 | 83 | | | | 21.4 | 6.9 | 14.5 | | | |
| 5 | 8 | 157 | 52 | 105 | | | | 58.0 | 12 | 46.0 | | | |
| 5 | 15 | 183 | 51 | 132 | | | | 181.0 | 26 | 155.0 | | | |

* T—NJ 质分解菌总数 A—分解几丁质放线菌数 B—NJ 质分解细菌数 CFU—菌落数

分析其原因可能与几丁质绝大部分以沉积物形式存在有关。东湖 I 站受周围环境影响较大, 污染比较严重, 采样期间水体透明度约 70cm 左右; II 站处于湖泊开阔区, 水质较 I 站好, 透明度约 100cm 左右, 其中几丁质分解菌数量亦较低。这与两站异养细菌数量的分布也呈一致的趋势^①。

① 李勤生, 武汉东湖异养细菌生态研究, 1992。

调查期间,随着季节的更替和水温上升,几丁质分解菌的数量增长显著。3—4月,东湖水温由9℃上升至15℃,其数量表现为较平缓的增加;4—5月水温上升至22—25℃,其数量大幅度上升。沉积物中几丁质分解菌数量大量增长的原因,除了其基数较高外,也可能与水温升高及沉积物中具有充分的营养条件有关。

(二)东湖几丁质分解菌的种类组成

研究结果表明东湖中几丁质分解菌主要包括放线菌和细菌两大类群。在多数情况下,放线菌数量超过细菌,在沉积物中更为显著(图1)。众所周知,土壤是放线菌的主要栖息场所,沉积物中有机物质丰富,较之湖水更接近于陆地生境,从而导致湖内几丁质分解菌呈现上述组成和分布特点。随着时间变化,分解几丁质放线菌出现大幅度增长(表1),在水柱和沉积物中所占比例上升,而细菌在此期间增长幅度较小,所占比例相对下降。

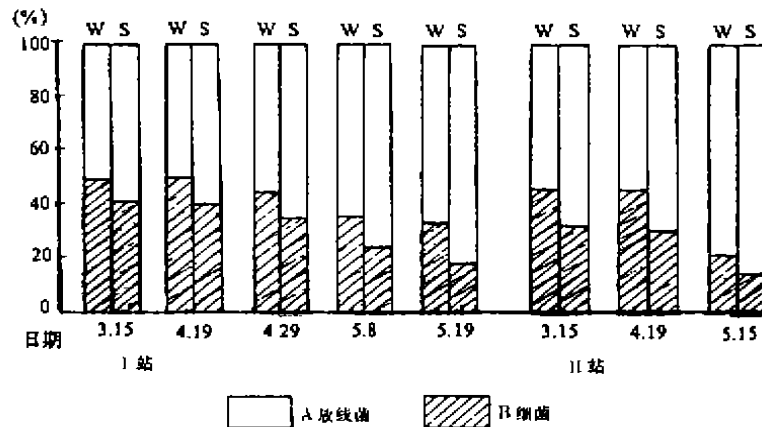


图1 东湖 I、II 站几丁质分解菌种类组成示意图

Fig. 1 The specific composition of chitin-decomposing microorganisms in Donghu Lake Station I and II

图中: W 为水柱, S 为沉积物。

值得注意的是东湖 I 站和 II 站的水柱和沉积物中几丁质分解菌的数量虽均有变化,但两站分解几丁质的细菌和放线菌的比例却是相似的。这一现象似乎表明在几丁质分解过程中,这两大类群微生物间有着一定的相互关系,其普遍性和规律性有待进一步研究阐明。

对东湖中几丁质分解菌分类鉴定结果发现,分解几丁质的 102 株放线菌中主要包括链霉菌属 (*Streptomyces*)、链孢囊菌属 (*Streptosporangium*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*) 和小多孢菌属 (*Micropolyspora*) 中的一些菌株,其中以链霉菌属居于优势,占放线菌株总数的 70.6% (表 2)。分解几丁质的细菌株中以芽孢菌属 (*Bacillus*) 的成员居多,为检测菌株数的 36%;其次是沙雷氏菌属 (*Serratia*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*) 等分别为 20% 左右,此外还有短杆菌属 (*Brevibacterium*), 以及分类位置待定的菌株 (表 3)。

此外,从 3 月 15 日样品中,分解几丁质的放线菌中仅检出链霉菌属与链孢囊菌属; 4 月 19 日样品中,种类组成较为多样,共有四属。细菌中亦有类似现象。可见,几丁质分解菌的多样性随着时间的变化亦有相应的改变 (表 2, 3)。

表 2 分解几丁质放线菌的种类组成

Tab. 2 Specific composition of chitin-decomposing actinomycetes in Donghu Lake (March-May, 1991)

| 采 样 日 期 | 菌株总数 菌株数 | 链霉菌属 | | 链孢囊菌属 | | 小单孢菌属 | | 小多孢菌属 | |
|------------|-------------|------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | | 菌株数 | (%) | 菌株数 | (%) | 菌株数 | (%) | 菌株数 | (%) |
| 3月15日 | 49 | 41 | 83.7 | 8 | 16.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4月19日 | 53 | 31 | 59.6 | 1 | 1.9 | 10 | 19.2 | 11 | 21.2 |
| 合 计 | 102 | 72 | 70.6 | 9 | 8.8 | 10 | 9.8 | 11 | 10.8 |

表 3 分解几丁质细菌的种类组成

Tab. 3 Specific composition of chitin-decomposing bacteria in Donghu Lake (March-May, 1991)

| 采样日期 | 菌株总数 | 芽孢杆菌属 | 沙雷氏菌属 | 微球菌属 | 气单胞菌属 | 短杆菌属 | 未定菌株 |
|--------|------|-------|-------|------|-------|------|------|
| 3月15日 | 18 | 5 | 3 | 4 | 5 | 0 | 1 |
| 4月19日 | 37 | 15 | 7 | 7 | 6 | 1 | 1 |
| 合 计 | 55 | 20 | 10 | 11 | 11 | 1 | 2 |
| 百分比(%) | 100 | 36 | 18 | 20 | 20 | 2 | 4 |

(三) 菌株分解几丁质能力及其它活力的比较

检测结果发现放线菌分解几丁质的能力普遍较强。受检的 102 株放线菌中 50% 以上菌株的分解透明圈与菌落直径(CZ/CS)的比值大于 2.0。链孢囊菌属与小多孢菌属中, 70% 以上菌株的 CZ/CS 值超过 2.0。细菌分解几丁质的能力一般较弱, 其中沙雷氏菌属和芽孢杆菌属的菌株较其它类群分解能力为强(表 4)。这一结果对筛选分解几丁质的应用菌株是有参考价值的。

表 4 菌株分解几丁质能力的比较

Tab. 4 A comparison of activity for decomposing chitin microorganisms

| CZ/CS* | 链霉菌属 | 链孢囊菌属 | 小单孢菌属 | 小多孢菌属 | 细菌 | 合 计 | |
|--------|------|-------|-------|-------|------|-----|------|
| | | | | | | 菌株数 | % |
| <0.5 | 7 | 1 | 1 | 3 | 20 | 32 | 20 |
| >0.5-1 | 17 | 0 | 0 | 0 | 23 | 40 | 25 |
| >1-2 | 13 | 1 | 3 | 0 | 10 | 27 | 17.2 |
| >2-3 | 24 | 3 | 6 | 6 | 2 | 41 | 26 |
| >3 | 11 | 4 | 0 | 2 | 0 | 17 | 10.8 |
| 合计 | 72 | 9 | 10 | 11 | 55 | 157 | |
| % | 45.9 | 5.7 | 6.4 | 7.0 | 35.0 | 100 | 100 |

* 几丁质分解透明圈与菌落直径之比值。

此外, 102 株放线菌对革兰氏阳性和阴性细菌的拮抗作用检测结果发现, 其中 51.9% 的菌株抑制革兰氏阳性细菌; 18.6% 抑制革兰氏阴性细菌。许多菌株还兼有分解纤维素、水解淀粉、还原硝酸盐及凝固和胨化牛奶的能力(表 5)。

表 5 分解几丁质放线菌的生物学活性

Tab. 5 The biological activities of the chitin-decomposing actinomycetes

| 菌 株 数 (+) | 拮抗作用 | | 分解纤维素 | 水解淀粉 | 硝酸盐还原 | 牛奶胨化和凝固 |
|-------------|----------------|----------------|-------|------|-------|---------|
| | G ⁺ | G ⁻ | | | | |
| 链霉菌属 | 35 | 15 | 59 | 55 | 54 | 67 |
| 链孢囊菌属 | 2 | 0 | 9 | 9 | 7 | 9 |
| 小单孢菌属 | 7 | 1 | 8 | 0 | 6 | 8 |
| 小多孢菌属 | 9 | 3 | 9 | 1 | 9 | 6 |
| 合 计 | 53 | 19 | 85 | 65 | 76 | 90 |
| (+)菌株百分比(%) | 51.9 | 18.6 | 83.3 | 63.7 | 74.5 | 88.2 |

由以上研究结果可见这类微生物不仅具有较强的分解几丁质的能力,特别是放线菌更为突出,而且兼有分解纤维素、水解淀粉、还原硝酸盐、胨化或凝固牛奶的能力,表明它们对湖泊内多种酶类和蛋白质等物质均有降解作用,它们是水生态系统中C、N、O、H等循环过程中不可忽视的重要微生物类群。此外,几丁质是某些水生动物的重要组分,真菌胞壁亦含有几丁质,许多分解几丁质的放线菌还能抑制革兰氏阳性或阴性细菌,这类微生物对水生态系统中生物群落的结构和功能,无疑会产生相当大的多方面的影响。

基于几丁质分解菌的一些特性,显示着它们在工、农业和医药方面的广阔应用前景^[1,9,10]。已有关于利用粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens* QM 1466)转化甲壳类废弃物生产单细胞蛋白的报道^[2],还有筛选强力几丁质分解菌使之将氨基糖转化成乙醇的研究^[10]。据悉,日本每年加工处理甲壳素用于工业方面已超过 10^3 Mg。此外,还有可能在医药和杀虫剂方面提供新的产品。

参 考 文 献

- [1] Riccardo Muzzarelli, Charles Jeuniaux & Graham W. Gooday (eds), Chitin in Nature and Technology. Plenum press New York and London, 1985.
- [2] Cody, R. M., Davis, N. D., Lin, J. & Shaw, D., Screening microorganisms for chitin hydrolysis and production of ethanol from amino sugars. *Biomass*, 1990, 21: 285—295.
- [3] Campbell, L. L., & Williams, O. B., A study of chitin-decomposing microorganisms of marine origin. *J. Gen. Microbiol.*, 1951, 5, 894—905.
- [4] V. B. D. 斯克尔曼(蔡妙英等译), 细菌鉴定的鉴定指导。北京, 科学出版社, 1978。
- [5] 中国科学院微生物研究所细菌分类组, 一般细菌常用鉴定方法。北京, 科学出版社, 1978。
- [6] 阮维生, 放线菌分类基础。北京, 科学出版社, 1977。
- [7] 阮维生、刘志恒、梁丽儒、杨法成编著。放线菌研究及应用。北京, 科学出版社, 1990。
- [8] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed. 1984.
- [9] Mauch, F., Hadwiger, L. A. & Boller, T., Antifungal hydrolysis in pea tissue. *Plant Physiol.*, 1988, 87(2): 325—333.
- [10] Pellejeier, A. & Sygusch, J., Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* Pl. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56(4): 844—848.

STUDY ON ECOLOGY OF CHITIN-DECOMPOSING MICROORGANISMS IN DONGHU LAKE (IN WUHAN, CHINA)

Li Qinsheng Xu Jianhua

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072)

Chitin is the second most abundant polysaccharide in nature. It has been estimated that 10^{11} tons of chitin are produced annually in the aquatic biosphere in such forms as the exoskeletons of crustaceans, mollusca, coelenterates, in protozoa and in the cell walls of fungi and algae. Therefore the decomposition of chitin is an important component in the recycling of carbon and nitrogen in aquatic ecosystems. In the nature, conversion of chitin to β -1,4 N-acetylglucosamine (NAG) depends on microorganisms.

In the present work, the dynamics and distribution of population, the species composition and the decomposing activity of chitin-decomposing microorganism in Donghu Lake (a eutrophic shallow lake in Wuhan, China) were studied.

1. Dynamics and distribution:

During March-May, 1991, the numbers of chitin-decomposing microorganisms are higher in the Station I than in the Station II, and much higher in the sediment than in the water column (about 10^2 - 10^3). As the temperature increased from 9°C to 25°C, the chitin-decomposing microorganisms increased with a higher ratio of actinomycetes. (Tab. 1, Fig. 1).

2. Species composition

Actinomycetes and bacteria are included in chitin-decomposing microorganisms. In 155 identified strains of microorganisms there are *Streptomyces* (72 strains), *Streptosporangium* (9 strains), *Micromonospora* (10 strains), *Micropolyspora* (11 strains), *Bacillus* (20 strains), (*Serratia* (10 strains), *Micrococcus* (11 strains), *Aeromonas* (11 strains), *Brevibacterium* (1 strain) and 2 strains unidentified. The *Streptomyces* and *Bacillus* are the dominant groups (45.9% and 12.7% respectively).

3. Comparison of decomposing activity of strains:

According to the value of decomposing clear zone to colony size, the results are shown in Table 2. Worth mentioning is that there are about 55% strains which belong to actinomycetes with higher decomposing activity for chitin, the CZ/CS value over 2.

Key words Chitin-decomposing microorganisms, bacteria, actinomycetes, aquatic microbio-ecology