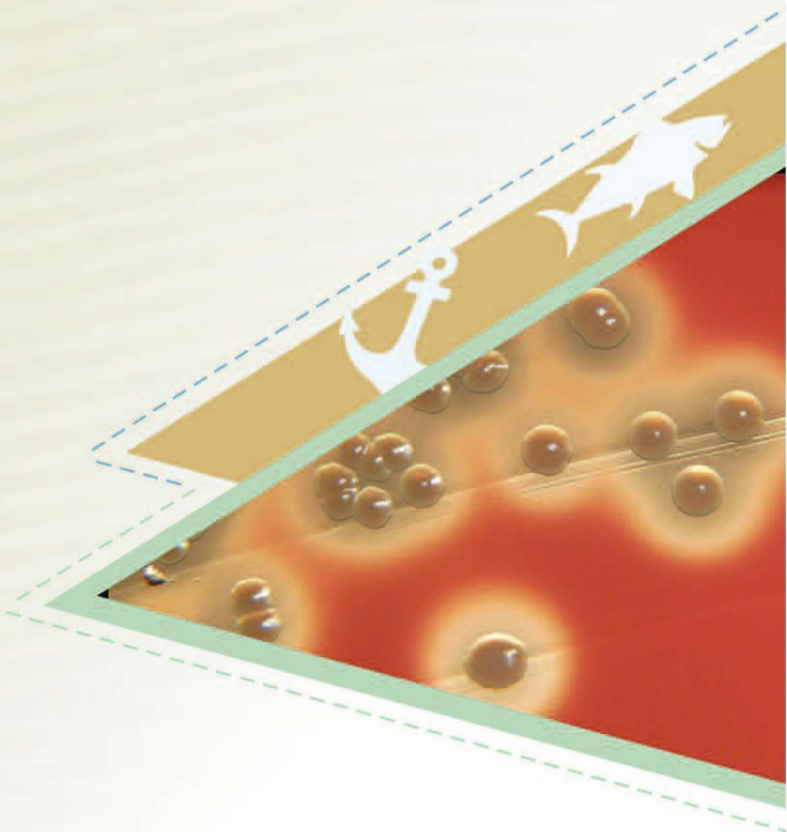
 海洋资源开发技术专业教材

海洋微生物工程

Marine Microbial Engineering

牟海津 主编



中国海洋大学出版社
CHINA OCEAN UNIVERSITY PRESS

中国海洋大学教材建设基金资助

海洋微生物工程

主 编:牟海津(中国海洋大学)

副主编:孔 青(中国海洋大学)

张晓华(中国海洋大学)

编 者:马悦欣(大连海洋大学)

王静雪(中国海洋大学)

王晓雪(中国科学院南海海洋研究所)

冯 娟(中国水产科学研究院南海水产研究所)

刘占英(内蒙古工业大学)

李秋芬(中国水产科学研究院黄海水产研究所)

严 群(江南大学)

张 锐(厦门大学)

林学政(国家海洋局第一海洋研究所)

中国海洋大学出版社

· 青 岛 ·

图书在版编目(CIP)数据

海洋微生物工程 / 牟海津主编. — 青岛: 中国海洋大学出版社, 2016. 7

ISBN 978-7-5670-1112-0

I. ①海… II. ①牟… III. ①海洋微生物 IV. ①Q939

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 060226 号

出版发行	中国海洋大学出版社	
社 址	青岛市香港东路 23 号	邮政编码 266071
出版人	杨立敏	
网 址	http://www.ouc-press.com	
订购电话	0532-82032573 (传真)	
责任编辑	董 超	电 话 0532-85902342
电子信箱	465407097@qq.com	
印 制	蓬莱利华印刷有限公司	
版 次	2016 年 7 月第 1 版	
印 次	2016 年 7 月第 1 次印刷	
成品尺寸	185 mm 3 260 mm	
印 张	16.5	
字 数	360 千	
印 数	1 ~ 1500 册	
定 价	39.00 元	

海洋资源开发技术专业教材编写指导委员会

- 主任 薛长湖(中国海洋大学)
- 副主任 徐 敏(南京师范大学)
王永学(大连理工大学)
章超桦(广东海洋大学)
- 委员 (按姓氏笔画排序)
- 杨家新(南京师范大学)
李八方(中国海洋大学)
李来好(中国水产科学研究院南海水产研究所)
李和生(宁波大学)
汪东风(中国海洋大学)
汪秋宽(大连海洋大学)
陈舜胜(上海海洋大学)
林 洪(中国海洋大学)
周德庆(中国水产科学研究院黄海水产研究所)
夏文水(江南大学)
曹敏杰(集美大学)
梁振林(山东大学威海校区)
- 秘书长 汪东风(中国海洋大学)

前 言

PREFACE

本书通过对海洋微生物的特性、类群及资源分布等基础知识的介绍,以及海洋微生物开发利用技术、海洋微生物酶及天然产物工程、深海与极地微生物工程、海洋微生物与食品工程、地球工程、海洋生态修复工程、能源工程等应用型和工程化内容的阐述,使读者能够系统地学习海洋微生物工程这一新兴领域的基础知识、现代技术、工程范畴及发展趋势。

本书是应“海洋资源开发技术”、“海洋生物技术”等新兴海洋类专业的设立,从发现与利用海洋微生物资源角度出发,为推动海洋微生物资源工程化应用而编撰的,适合高年级本科生及研究生相关课程的教材。本书涉及较多前沿性的科学知识,甚至有些内容尚属目前正在探索与揭示的科学领域,需要读者从前瞻性、探索性的视角来加以甄别和取舍。同时,本书更希望为海洋微生物学领域的科学研究人员提供参考,从而帮助科研人员更有效地利用可持续发展的海洋微生物资源,研制具有我国自主知识产权的海洋微生物高值化的生物产品;强化我国海洋微生物产业发展中“中试研究”这一薄弱环节,打造覆盖海洋微生物产品“发现—中试—产业化”整个过程的完整研发链;形成海洋微生物产品、生产菌种和工艺,直至海洋微生物工程产业具有良好发展态势。

因为海洋微生物工程领域发展快,分支学科多,所以有些内容可能没有涉及,加之笔者水平所限,书中难免存有不足之处,希望读者能提出宝贵意见,以便再版时加以修改。

目 录

CONTENTS



绪 论	1
第一章 海洋微生物资源概述	7
第一节 海洋微生物的基本特征	8
第二节 海洋细菌	21
第三节 海洋古菌	31
第四节 海洋真核微生物	36
第五节 海洋病毒	39
第二章 海洋微生物研究方法与工程技术	48
第一节 海洋微生物的分离和培养技术	48
第二节 海洋微生物的检测和鉴定技术	55
第三节 海洋微生物天然产物筛选技术	63
第四节 海洋微生物发酵工程技术	68
第三章 海洋微生物天然产物工程	77
第一节 海洋微生物胞外多糖	77
第二节 海洋生物毒素	81
第三节 不饱和脂肪酸	88
第四节 其他海洋微生物天然产物	95
第四章 海洋微生物酶工程	105
第一节 蛋白酶	105
第二节 脂肪酶	111
第三节 多糖降解酶	113
第四节 溶菌酶	127

第五节 海洋噬菌体聚糖酶·····	129
第五章 海洋微生物与生物制药工程 ·····	134
第一节 概 述·····	134
第二节 海洋细菌与生物制药工程·····	136
第三节 海洋放线菌与生物制药工程·····	139
第四节 海洋真菌与生物制药工程·····	144
第六章 海洋微生物与食品工程 ·····	150
第一节 海洋食品原料中的微生物危害·····	150
第二节 传统海洋发酵食品·····	160
第三节 海洋食品原料的高值化生物转化工程技术·····	166
第四节 海洋微生物在食品安全控制中的应用·····	174
第七章 深海与极地微生物工程 ·····	184
第一节 深海与极地微生物多样性与适应性机制·····	184
第二节 深海与极地微生物生物活性物质·····	189
第三节 深海与极地微生物研究与开发技术·····	194
第八章 微生物与海洋生态修复工程 ·····	198
第一节 陆源污染及其生物修复·····	201
第二节 海水养殖水域污染及其生物修复·····	209
第三节 海洋石油污染及其生物修复·····	215
第四节 赤潮的发生与微生物控制·····	220
第五节 海洋环境监测中的微生物技术·····	222
第九章 海洋微生物与地球工程 ·····	225
第一节 微生物在海洋地球化学循环中的作用·····	225
第二节 微生物对海洋环境变化的响应·····	230
第三节 海洋地球工程中的微生物调控技术·····	232
第十章 海洋微生物与能源工程 ·····	235
第一节 微生物对海洋成油成气的影响·····	235
第二节 生物柴油·····	239
第三节 燃料乙醇·····	243
第四节 其他类能源·····	245
参考文献 ·····	252

绪 论*

海洋占地球表面积的 71%，达 $3.6 \times 10^8 \text{ km}^2$ ，是微生物资源研究与开发的巨大宝库。据统计，海洋微生物(marine microorganism)有 1 000 万~2 亿种，在正常海水中的数量一般少于 10^6 cells/mL 。海洋生态环境复杂，高盐度、高压、低温及特殊的光照特征可能使海洋微生物形成了不同于陆地微生物的生理结构和代谢方式。海洋微生物不仅在物质循环、能量流动、生态平衡及环境净化等方面担负着重要的角色，而且是海洋药物、保健品和生物材料的重要来源。海洋微生物作为获得新型化合物的重要来源，正日益为国内外海洋研究工作者所重视。在这一背景下，以开发利用海洋微生物资源为主要目的的海洋微生物工程学科就应运而生了。

一、海洋微生物工程的研究内容

目前还没有确切的关于海洋微生物工程的定义，而对于海洋微生物的定义，世界海洋微生物学家之间也有过争议。有的学者强调源生地，认为只有那些源生于海洋中的“土著”类群才是海洋微生物；更多的学者则坚持，只要能够适应海洋环境并能在其中持续存活、繁殖的微生物都应认为是海洋微生物，尽管据推测海洋中的许多微生物是由陆地环境经河水、污水、雨水或尘埃等途径而来的，但特殊的海洋环境赋予海洋微生物以新的活性，使海洋微生物形成了不同于陆地微生物的生理结构和代谢方式。目前较为公认的海洋微生物定义为：来自(或分离自)海洋环境，其正常生长需要海水，并可在寡营养、低温条件(也包括在海洋中高压、高温、高盐等极端环境)下长期存活并能持续繁殖子代的微生物。而陆生的一些耐盐菌或广盐的种类，在淡水和海水中均可生长，则称之为兼性海洋微生物。

“分离”和“培养”是两个不同的概念，基于 16S rDNA 序列分析的结果显示，海洋中的绝大多数微生物都未获得纯培养。现在普遍认为，海洋环境中的微生物能在实验室条件下培养出来的还不到 1%，因此传统的微生物分离培养方法培养出的微生物远远无法体现出海洋中存在的微生物多样性及其所代表的真实类群。

海洋微生物工程是以开发和利用海洋微生物资源为目的的，采用现代生物工程技术，

* 本章由牟海津编写。

通过海洋微生物的代谢和生理活动,实现海洋微生物及其代谢产物在活性天然产物开发、食品工程、新能源开发、生态修复等众多领域的应用。海洋微生物工程是微生物工程在海洋领域的延伸,其实质是将海洋微生物与基因工程、细胞工程、蛋白质工程、固相化菌、固相化酶等现代生物工程技术相结合,以工程化开发和应用为导向的海洋微生物学分支学科。

二、人类发现和利用海洋微生物的历史

相比陆地微生物的研究,海洋微生物的研究历史要短得多。1838年 Ehrenberg 第一次分离并描述了一种海洋细菌,即折叠螺旋体(*Spirochaeta plicatilis*);1864年 Monzonneuvo 等从海藻中首先发现了海洋真菌;Cohn 于 1865 年分离并报道了奇异贝氏硫菌(*Beggiatoa mirabilis*);1875年, Pflügere 确认海鱼体内有发光细菌;Warming 于 1876 年报道了紫硫螺菌(*Thiospirillum violaceum*)、罗氏硫螺菌(*Thiospirillum rosenbergii*)及杆状无色硫杆菌(*Achromatium mulleri*)等 3 种海洋细菌。随后, Certes、Fischer、Russell、Issatchenko、Butkevich、Kusnetzow、Rubentschik、克里斯等人都对海洋微生物学的发展做出了不可磨灭的贡献。1884年 Certes 在 Talisman 探险活动中,从海水样品中发现了 96 个好氧细菌。Fischer 最先提出外海中存在有“土著”海洋微生物,并于 1894 年通过改良的营养琼脂培养技术研究了海洋细菌的分布与种群,推断海洋细菌在海洋有机物循环过程中担负着重要的角色。Russell 于 1892~1936 年间发表 4 篇论文,论述伍兹霍尔附近大西洋海区的细菌区系、海洋发光等问题。苏联学者 Issatchenko(1914)在他的著作《北冰洋细菌的研究》中,最先阐述了海洋细菌存在的重要性,奠定了微生物在世界大洋的水团内物质循环过程中的作用基础。这些学者的贡献主要在于用传统的、初步的方法确认海洋微生物的存在和作用,并开启了海洋微生物学的研究方向,使之逐步孕育成一个独立的分支学科的雏形。

20 世纪 20 年代末、30 年代初开始了应用及定量水生细菌学研究,海洋微生物学研究进入到创建和发展时期,其代表人物就是国际著名海洋微生物学家 Zobell(佐贝尔)。佐贝尔博士(1904—1988)被国际海洋学界誉为现代海洋微生物学之父,他是海洋微生物学的先锋科学家之一和奠基人,在海洋微生物的采样、培养、特征和分布规律等方面建立了系统的研究方法和研究理论。他于 1941 年发明的 J-Z 海水采样瓶,至今仍是最经济、简便的海洋细菌水样采集装置;他发明的 Zobell 2216 系列培养基一直在海洋微生物的分离与培养中为后人所使用;所撰写的专著《海洋微生物学》(1946)被世界各国奉为经典。佐贝尔在海洋物质循环、海洋微生物研究技术、海洋病原微生物、海洋微生物应用及海洋生态学等领域均取得了重要的研究成果。由于其学识、成就和对学科发展的划时代贡献,他被公认为是该领域的杰出老人“Grand old man”。其主要成就有以下几个方面:

1. 明确了专性海洋微生物的土著性

佐贝尔当初创建现代海洋微生物学时需冲破许多陈规陋俗。首先人们普遍怀疑海洋微生物不是土著的,而是陆源污染来的。1933 年,佐贝尔与同事的一篇文章“Are there specific marine bacteria?”有力地证明了海洋微生物的“土著性”。他们发现淡水或非海洋的细菌在海水培养基上生长少,而海洋来源的细菌要多得多。他的人工海水培养基满足了 70%~75%的海洋种之需,再加 10%的真正海水进去,将使 80%~85%的海洋种生长。

在此期间,他和他的同事发明并运用了一系列海上采样装置和培养基,如 J-Z 海水采样瓶和 Zobell 2216 系列培养基。

2. 提出了海洋微生物的附着机制

通过对浸水表面(船身)生物沾污及附生(periphytic)细菌的研究,佐贝尔发现,微生物首先在物体表面形成细菌膜,其后大生物以各种方法和营养需要而吸附上去,污损生物如藤壶等甲壳动物、贻贝等软体动物、海鞘等被囊动物及其他附着生物和定居生物及相关植物相继附着。这一机制为海洋防污损材料、油漆工业的发展提供了理论根据。

3. 证明了天然海水的杀菌性

1936 年佐贝尔提出了海水对非海洋细菌,特别是革兰氏阳性菌具有很强的杀灭作用。此后, Carpenter 等人(1938)也证明天然海水能够在半小时内杀灭来自于污水中 80% 的微生物。

4. 揭示了海洋环境微生物学的现象

佐贝尔探讨了海洋微生物是如何在生理功能上适应海洋低温、高渗、高压等环境因素等问题;创造了适于海洋环境硝化细菌的研究方法,发现了硝化作用的一部分是由光化学激活的,它们与氮循环相关。研究了海水中细菌的垂直分布现象,初步发现阳光的杀菌作用以及静水压、溶解氧、浮游生物和季节变化现象,由此将研究扩展至海洋沉积物,创立并发展了海洋的地微生物学(Geomicrobiology),所涉及内容有沉积物细菌的种群、数量、分布、活动范围、影响因子等。

5. 发展了应用和基础海洋微生物学

佐贝尔还关注海洋水产的微生物病原机制研究,不仅找到了水产动物病原菌,而且使基础海洋微生物学得到了发展。1934 年发现了新种微生物——鱼皮无色杆菌即鱼鳞假单胞菌。在直至 1944 年的 10 年中,他们一共发现了 60 个海洋新种。他鉴定的物种(包括以后鉴定的)迄今仍大多为国际命名委员会所认可。佐贝尔对海洋微生物学从应用和基础两方面产生了浓厚的兴趣,并一直贯彻于其整个生涯。此外佐贝尔对海水中细菌的有机质氧化速率、好气细菌的培养要求和培养技术、采样方法、大洋中肠系细菌的生存问题、海洋空气中的微生物、石油及烃的降解以及几丁质降解等课题也有广泛的研究。

6. 开创了海洋微生物天然产物的研究

由于技术条件和研究水平的限制,当时人们对海洋微生物的认识还很粗浅。在 1939 年出版的《伯杰氏鉴定细菌学手册》(*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*)第五版中,记载有 1 335 种细菌,其中只有 86 种是从海洋中分离出来的,而对海洋酵母和霉菌了解得更少。1947 年, Rosenfeld 和 Zobell 发表了海洋微生物产生抗生素的论文 *Antibiotic production by marine microorganisms*,发现所试验的 7 株海洋细菌对非海洋来源细菌或人类病原菌有明显抑制或杀灭作用,推动了海洋微生物活性物质研究历程的发展。

进入 20 世纪 60 年代以后,国际上开展了大量有关海洋微生物分布、生理特征、分离培养、发酵技术及其代谢产物的研究。海洋微生物中天然活性产物研究最成功的例子是头孢霉素,它是由顶头孢霉菌产生,顶头孢霉菌最早是 1945 年从意大利撒丁岛分离的。头孢霉素已开发到第四代,达 30 多个品种,广泛应用于临床。而从海洋假单胞菌中发现抗癌活

性化合物硝吡咯菌素后,又兴起了从海洋微生物中寻找抗癌药物的热潮。近年来,海洋微生物资源的利用与开发已受到许多国家和科学界的关注,国际上许多大的制药企业纷纷建立了海洋微生物实验室,从事新的抗感染、抗肿瘤、免疫抑制剂等药物的研究与开发。

我国海洋微生物学起始于 20 世纪 50 年代末。中国海洋大学(原山东海洋学院)薛廷耀教授等 1958 年对胶州湾口细菌数量波动进行研究,由此拉开了我国海洋微生物生态调查的序幕;薛教授同时专注于海洋小球菌、发光菌和硫杆菌的研究,从海水中分离到小球菌,其生理生化特征和生物学分类进行研究;从海泥中分离培养硫杆菌,以期用作细菌肥料在强碱土改良中发挥作用;相关著作(译著)包括《海洋细菌学》、《元素的环境化学》、《水产细菌学》等。陈世阳等于 1961 年开展了海洋自生固氮菌的研究。同时期的重要代表人物还有中国科学院海洋研究所的孙国玉、丁美丽、陈弼等。1964 年由孙国玉、李世珍编译了苏联学者 A. E. 克里斯结合自己的调查研究工作写成的专著《海洋微生物学(深海)》,为深海微生物学的研究提供了宝贵的资料。徐怀恕教授提出的海洋病原菌的“非可培养状态”理论,在国际上引起了很大轰动。

三、海洋微生物工程的研究现状与发展趋势

20 世纪 90 年代以后,海洋微生物学研究逐步进入到工程化研究时期。研究人员从海洋微生物中发现了大量具有特殊生理活性的天然化合物,如抗生素、生物毒素、酶抑制剂、酶、多糖、氨基酸、不饱和脂肪酸、维生素、色素以及具有抗病毒、抗肿瘤活性的物质等,对其工程化研究和应用的工作也如火如荼地展开了。

现已发现,众多的海洋微生物可产生抗生素,其中包括链霉菌属(*Streptomyces*)、别单胞菌属(*Alteromonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、着色菌属(*Chromatium*)、钦氏菌属(*Chainia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等菌及许多未定菌,产生的抗生素包括吡咯类、酯类、糖苷、醌类、缩肽类、萜类和生物碱类等,有些结构类型从未在陆生菌中见过。日本发现约 27% 种属的海洋微生物具有抗菌活性。有人发现,海洋微生物中 14.1% 的细菌、44.0% 的放线菌、11.5% 的真菌都具有不同程度的拮抗性。海洋动植物体内也含有多种以共生或互生方式生活的微生物。苏联学者发现,20%~50% 的海鞘、海参体内的微生物可产生具有细胞毒性和杀菌活性的化合物。有人估计,海绵中的共生微生物约占海绵体积的 40%,可从中获取多种生物活性物质。例如, Kobayashi M. 等从海绵体内分离出一株弧菌,能够产生一种新型的吡啶三聚体抗生素 trisindoline;分离自海绵 *Stylotello agminata* 的水溶性六环二胍抗生素 palauamine,对链球菌、杆菌的作用明显。Ayer 等从贻贝组织匀浆液中分离到木霉属真菌,能产生有抗菌活性的多肽类物质 peptaibols。

海洋微生物产生的抗病毒、抗肿瘤物质也得到了广泛深入的研究。Custafson 等从海洋细菌中分离出一种大环内酯类化合物 madolactin,具有抗菌、抗病毒及抗癌作用。日本从海藻上分离到一株湿润黄杆菌(*Flavobacterium uliginosum*),能产生对小鼠肉瘤 180 有明显抑制作用的胞外多糖 marinactam(MACT),其作用机制主要是激活巨噬细胞。分离自日本 3 000 多米深海底底泥的 *Alteromonas haloplanktis* 在含有沙丁鱼和鱿鱼粉的

海水培养基中产生活性物质——一种离子载体类产物 bisucaberin, 该产物在很小剂量 (10 mg/mL) 的情况下, 与巨噬细胞、纤维肉瘤 1023 等肿瘤细胞一起培养时, 溶瘤细胞作用明显。另外, 海绵中存在有复杂的微生物群落, 海绵中的抗癌物质是由海绵中共生或共栖的细菌所产生的, 已报道从这些细菌中可以分离出抗白血病、鼻咽癌的活性成分; 从海鱼胃内容物、海葵体内等也分离出能够产生抗肿瘤成分的链霉菌。

除分离出药物先导化合物以外, 海洋微生物还是开发新型酶制剂、生物材料等的重要来源。研究工作者已经从海洋微生物中发现了几丁质酶、褐藻胶裂合酶、琼胶酶、卡拉胶酶等海洋多糖降解酶, 以及低温蛋白酶、脂肪酶、溶菌酶等。海洋生态环境差异很大, 有高温的深海热液喷口, 有低温的南北两极, 此外海底还有一些高酸碱的区域, 加之深海的静压, 使这些极端环境微生物能够产生出不同于陆地微生物的特有酶类。

随着海洋资源得到逐渐深入的开发和利用, 许多海洋毒素得到分离和纯化。由于海洋毒素毒性较大, 真正应用到临床医药上的尚不多, 但实验证明, 海洋毒素具有广阔的应用前景和开发价值。过去人们从海绵、海藻、海洋动物体内提取的毒素, 已发现有相当一部分的真正来源是海洋微生物, 如河鲀毒素、海葵毒素、石房蛤毒素、辛骏河毒素等。

此外, 利用海洋微生物处理海洋环境污染也取得了很大的进展, 特别是在海洋石油污染的生物修复方面, 国外在 20 世纪 40 年代就开展了细菌降解油污的研究, 我国这方面的研究始于 20 世纪 70 年代末期。研究表明, 在海洋中存在着大量能够降解石油的微生物, 它们的种类组成和土壤、淡水中降解石油微生物有很大不同。已报道能够降解海洋石油污染物的微生物有 200 多种, 分属于 70 个属, 其中细菌有 40 个属。能够降解石油烃的细菌有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、弧菌属 (*Vibrio*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、气单胞菌属 (*Aeromonas*)、无色杆菌属 (*Achromobacter*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 等。能够降解石油烃的酵母菌有假丝酵母属 (*Candida*)、红酵母属 (*Rhodotorula*)、毕赤酵母属 (*Pichia*) 等。海洋中能够降解石油烃的霉菌数量要少于细菌和酵母菌, 主要有青霉属 (*Penicillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、镰孢霉属 (*Fusarium*) 等。20 世纪 80 年代末美国在 Exxon Vadez 油轮石油泄漏的生物修复项目中, 短时间内清除了污染, 治理了环境, 是生物修复成功应用的开端, 同时也开创了生物修复在治理海洋污染物中的应用。

自 20 世纪 70 年代以来, 人们将目光进一步投向广阔大洋的深水和海底及沉积物或岩石中、下层的地壳圈, 并成为海洋生命科学和环境科学的焦点之一。一系列成果的取得使人们认识到海底广阔领域——由表层沉积物几米到表面下 800 m 的沉积物中均有生物存在。对这一范围的探索及对一些迹象的推断, 使人们大胆地提出了海底深部生物圈 (Subseafloor deep biosphere, 缩写为 SFDB) 这一概念, 并使该生物圈年龄可上溯到 1 500 万年前。SFDB 是深海微生物学研究的主要内容和领域之一。它的重中之重是由深海(洋)地学和深海(洋)微生物学等生物学科相交叉而形成的边缘科学, 即深海(洋)地微生物学 (deep sea geomicrobiology)。迄今相关研究及其前景吸引并推动多学科科学家的热烈参与。

海洋微生物作为一种重要的生物资源,在研究与开发生物活性物质和海洋药物方面具有明显的优势:① 来源于海洋的微生物具有特异的遗传和代谢特性,容易产生新的活性物质;② 来源于陆地的海洋微生物经过长期的环境适应过程,其生理和代谢特征也发生了明显的变化,因而能够产生陆地微生物所不能产生的新型活性物质;③ 海洋微生物往往与海洋动植物存在共生或共栖关系,为提高宿主在海洋环境中的适应性和生存力,常常产生抑制宿主竞争对手的次生物质,这类微生物产生抗生素的能力远远高于非附生海洋微生物和陆地微生物;④ 与海洋动植物相比,海洋微生物具有生长周期短、代谢易于控制、菌种易于选育及可通过大规模发酵实现工业化生产的优势;⑤ 海洋微生物的开发不至于导致海洋生态环境失衡,更具有自然资源的可持续利用性。

虽然海洋微生物学的研究历史较短,而以海洋微生物天然产物开发为主体的海洋生物工程的研究仍处于起步阶段,但是近年来已经成为世界各国开发的热点,有关海洋微生物及其代谢产物在活性天然产物利用、食品工程、新能源开发、生态修复等领域的研究报道层出不穷,展现出巨大的发展潜力。海洋微生物资源非常丰富,但是国内外在海洋生物工程领域的总体研究水平尚存在不足,相信随着细胞工程、发酵工程、基因工程、分离工程等技术的发展应用,海洋生物工程领域的研究一定会取得迅猛发展,为蓝色经济建设产生强劲的助推力。



第一章

海洋微生物资源概述*

海洋微生物资源丰富,在正常海水中的密度一般少于 10^6 cells/mL。在 1 L 海水里会有超过 2 万种海洋微生物,也就是说,在大海里游泳时,如果不小心咽下了一口海水,那么就等于咽下了 1 000 种细菌。这些微生物绝大多数为海水中的正常菌群成员,在海水、海洋动植物体表、体内广泛存在。据有关调查,海洋动植物体表共生或附生的微生物数量为,细菌: $1.0 \times 10^5 \sim 2.1 \times 10^5$ CFU/g (CFU: 菌落形成单位 colony forming units),放线菌: $7.7 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^4$ CFU/g,真菌: $5.4 \times 10^4 \sim 3.1 \times 10^5$ CFU/g。而在对中国对虾暴发性流行病的调查过程中,检测到对虾甲壳表面的异养菌数量为 $2.3 \times 10^3 \sim 9.3 \times 10^5$ CFU/cm²,血淋巴中为 $1.0 \times (10^2 \sim 10^3)$ CFU/mL,肠道中为 $9.3 \times 10^6 \sim 7.3 \times 10^9$ CFU/g,肝胰腺中为 $4.3 \times 10^3 \sim 9.9 \times 10^3$ CFU/g。

海洋细菌中的革兰氏阴性菌数量超过 90%,其中弧菌属 (*Vibrio*) 占海洋细菌总数的 18.2%~70.6%,其特征为革兰氏染色阴性,端生单根鞭毛,扫描电镜观察菌体只有一个弯曲(图 1-1),呈弧状或逗点状,一般长 $0.8 \sim 3 \mu\text{m}$ 、宽 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$;在弧菌鉴别性培养基——TCBS 培养基表面生长,并形成黄色或绿色的菌落(图 1-2)。海洋微生物中有些为条件病原菌,在正常海洋环境中大量存在,在海洋动物机体体质下降、环境条件恶化或该种微生物大量繁殖等情况下,有可能引起海洋动物发病。

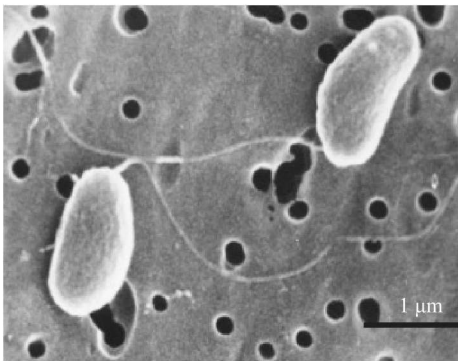


图 1-1 弧菌细胞的扫描电镜照片

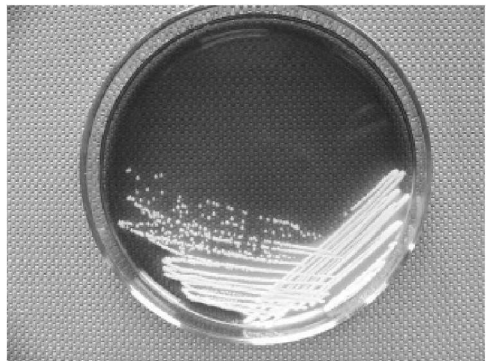


图 1-2 弧菌在 TCBS 平板上的菌落特征

* 本章由牟海津、张晓华编写。

第一节 海洋微生物的基本特征

与陆地环境相比,海洋环境复杂多样,以高盐、高压、低温和寡营养为主要特征。海洋平均深度为 4 km,最深处达 11 km,是全球水循环的最终贮存所。海水生境的垂直分布,显著影响海洋生物的种类和数量。海水有充足光线射入的区域称为透光带,水温较高;其下为无光带,一般 25 m 以下就不会有光线透入。在远洋区,水深 0~200 m 为表面海洋带;水深大于 200 m 至不超过 6 000 m 为深海区,黑暗而寒冷;水深大于 6 000 m 则为超深渊海区,寒冷且压力大。海水温度从海洋表面至水深 50 m 范围内下降迅速,水深大于 50 m 通常低于 10 ℃。氧气浓度从表面往下逐渐降低,约在 1 000 m 处最低,在 1 000~4 000 m 范围内又逐渐升高。

处于海洋环境中的微生物为了生存,必须从自身的生理结构、代谢方式及生活行为等方面发生适应性的改变。因此,从海洋环境中筛选得到的微生物,通常具备不同于陆地微生物的特殊生理活性,并可能产生某种特殊的代谢产物。

一、海洋微生物的生理特征

1. 嗜盐性

嗜盐性是海洋微生物最普遍的特点。真正的海洋微生物的生长必需在海水中,海水中富含多种无机盐类和微量元素。除了钠为海洋微生物生长与代谢所必需之外,钾、镁、钙、磷、硫及其他微量元素也是某些海洋微生物生长所必需的。典型海洋微生物生长最适的盐度为 20~40,并且在缺乏氯化钠时不生长。嗜盐微生物可在盐度为 40 以上的环境中生长,而极端嗜盐菌(extreme halophiles)可在盐度为 150~300 的范围中生长。极端嗜盐菌主要分布在古菌中的几个属,能够在盐田、海底盐池等地方生长,而真细菌中极端嗜盐菌只有红色盐杆菌(*Salinibacter ruber*)等少数细菌。

在高渗环境中,海洋微生物需要通过合适的机制保持一定的细胞液浓度,从而避免水分的丢失。一种常见的方式是在细胞内积累糖、醇类或氨基酸等极易溶于水的物质,如海洋蓝细菌能够合成 α -葡萄糖基甘油(α -glucosylglycerol),海洋革兰氏阴性细菌能够合成甘氨酸甜菜碱(glycine betaine)或谷氨酸盐(glutamate),海洋革兰氏阳性细菌能积累脯氨酸。此外,极端嗜盐古菌可以通过一种主动机制,将胞外的 K^+ 泵到胞内,直到胞内的 K^+ 浓度与胞外 Na^+ 达到平衡。极端嗜盐菌的酶和结构蛋白中还含有大量的酸性氨基酸,保护其构象不受高盐浓度的影响。

2. 嗜压性

海洋中每下降 10 m 就会增加 1 个大气压,75% 以上面积的海洋深度超过 1 000 m,深海微生物必须承受十分强大的静水压。从深海中分离培养出来的细菌和古菌能够耐受高压,在 1~400 个大气压的范围中生长。一些深海微生物只有在压力超过 400 个大气压时才生长良好,这些微生物称为专性或极端嗜压菌(obligate or extreme barophiles, or piezophiles)。利用特殊技术,如将样品采集到有压力的容器中培养,可以使更多的专性嗜压菌被培养出来。基因组学研究表明,大多数的极端嗜压微生物和普通的耐压菌或压力敏感菌(barosensitive)的亲缘关系较近,但同时也存在一些独特的分类群。在海底热液喷口

附近,还生存有一些专性嗜压的化能自养古菌。

高压通常会使得微生物的生长速率和代谢活性降低。高压降低了酶与底物的结合,所以耐压菌在进行压力培养时的代谢速率相对较低。嗜压菌的蛋白质中脯氨酸和甘氨酸的比例下降,弹性较小,不易受压力的影响。高静水压下生长的微生物含有较高浓度的渗透活性物质,可以保护蛋白质在高压下不受水合作用的影响。

3. 嗜冷性

大约 90% 的海洋环境温度在 5 °C 以下,在深海和两极的海水温度一般为 -1 °C ~ 4 °C。大部分的海洋微生物不适于在 30 °C 以上的环境中生长,通常最适宜的生长温度为 18 °C ~ 28 °C,在 0 °C ~ 4 °C 生长缓慢。嗜冷(psychrophilic)微生物是指最高生长温度为 20 °C 左右,最适生长温度低于 15 °C,最低生长温度为 0 °C 以下的微生物。耐冷(psychrotolerant)微生物是指最高生长温度高于 20 °C,最适温度高于 15 °C,在 0 °C ~ 5 °C 可生长繁殖的微生物。这两类微生物的生态分布和适应低温的分子机制存在一定差异。在丰富底物存在条件下,嗜冷菌在 0 °C 的生长要超过耐冷菌。嗜冷菌只能在较窄的温度范围内生长,而耐冷菌则能在较宽的温度范围内生长。嗜冷菌主要分布于极地、深海或高纬度的海域中。

嗜冷菌中的蛋白质含有较多的 α -螺旋和较少的 β -折叠。在蛋白质的活性区域存在特殊的氨基酸,使底物更容易进入活性区域。嗜冷菌产生的嗜冷酶在工业上有很好的应用前景。*Colwellia psychroerythrea* 是第一个被全基因组测序的嗜冷菌。此外,嗜冷菌的细胞膜构造具有适应低温的特点,其细胞膜中普遍发现有多聚不饱和脂肪酸类(PUFAs),使得细胞膜在低温条件下能够维持流动性,有利于低温条件下营养物质的吸收。

4. 低营养性

海水中营养物质比较稀薄,营养物质含量成为决定海水中微生物分布最重要的影响因素。河口湾、港口附近的海水、养殖水体微生物种类及数量较多,例如,海洋细菌数量在河口湾区域约 10^5 cells/mL,养殖水体中 $10^5 \sim 10^6$ cells/mL(到发病季节 6~8 月份可超过 10^7 cells/mL),而在远洋海水中仅为 $10 \sim 250$ cells/mL。部分海洋细菌要求在营养贫乏的培养基上生长。在一般营养较丰富的培养基上,有的细菌于第一次形成菌落后即迅速死亡,有的则根本不能形成菌落。这类海洋细菌在形成菌落过程中因其自身代谢产物积聚过甚而中毒致死。这种现象说明常规的平板法并不是一种最理想的分离海洋微生物的方法。

5. 趋避性

许多海洋细菌和古菌都有一条或多条鞭毛,可以游动。鞭毛的数量和位置可作为菌种分类的重要指标。海洋细菌中,在细胞的一端附着一条单鞭毛(极生鞭毛),或以周生鞭毛(peritrichous flagella)形式遍布在细胞的表面。细菌鞭毛的直径约 20 nm,由许多单一的鞭毛蛋白(flagellin)亚基组成。目前对古菌鞭毛的合成和结构所知甚少,其基本结构类似于细菌鞭毛,但古菌鞭毛由多种蛋白质亚基构成,并且更为纤细(13 nm)。细菌鞭毛具有刚韧性,可以像螺旋桨一样运动,如海洋弧菌的鞭毛可以每秒旋转 1 700 转。极生鞭毛对于细胞游离状态时的运动非常有效,而侧生鞭毛可以使细胞在黏性环境中易于运动。海洋细菌的鞭毛还在细菌定植和生物膜形成过程中发挥重要作用。

在中性环境中,细菌会以一种完全随机的方式运动,沿着一条直线游动,在一个“翻滚(tumble)”后,又沿着另一个直线方向前进。但是,如果环境中存在诱导剂(attractant)或趋避剂(repellent),改变运动方向的频率就会发生变化,随机运动(random walk)就有了偏向性。沿着诱导剂的浓度梯度,细胞翻滚的频率降低,朝向诱导剂来源的方向直线运动的时间增长,这即是正趋化性(positive chemotaxis)。细菌通过细胞表面一系列的化学感应器(chemoreceptors)感觉外界化合物浓度的细微变化,并以一套信号传递系统向鞭毛的“翻滚发生器(tumble generator)”传递信号,这一复杂过程涉及大量的功能蛋白质和酶类。

向光运动,即趋光性(phototaxis),在海洋光合细菌中很常见,它们能够探测不同波长可见光的强度,并向着更高光强的区域游动。一种嗜盐古菌,盐沼杆菌(*Halobacterium salinarum*)具有视紫红质,是一种光线感应器。此外,其他的趋向性运动包括趋氧性(aerotaxis)、趋磁性(magnetotaxis)等。某些种类海洋细菌中具有一种内含体(inclusion body),即磁小体(magnetosomes),可使细胞向着磁场的方向运动(图 1-3)。

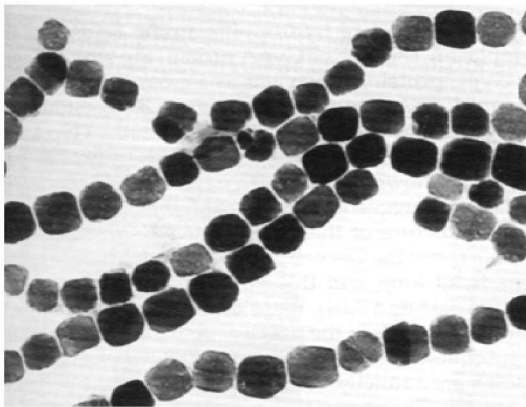


图 1-3 *Aquaspirillum magnetotacticum* 细胞内以 Fe_3O_4 为主要成分的磁小体

6. 附着生长与密度感应系统

海水中的营养物质虽然稀薄,但海洋环境中各种固体表面或不同性质的界面上吸附积聚着较丰富的营养物。海洋细菌附着在海洋中生物和非生物固体的表面,形成细菌生物被膜(bacterial biofilm, BBF),并为其他生物的附着创造条件,从而形成特定的附着生物区系。某些专门附着于海洋植物体表而生长的细菌称为植物附生细菌。由此看来,海洋细菌的生存状态主要有两种:游离状态和附着于固体表面的生物被膜状态,生物被膜状态的细菌比游离状态的具有更强的抗逆性。

细菌生物被膜,是指细菌吸附于固体表面后,分泌大量的以胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)为主的胞外基质,细菌相互粘连并将自身菌落聚集包裹其中形成的膜状物。生物被膜中存在多种生物大分子,如蛋白质、多糖、DNA、RNA、肽聚糖、脂和磷脂等物质。研究表明,海洋环境中大多数细菌细胞外都包围有胞外多糖,对海洋细菌的生长和生理功能的正常发挥起到重要的作用。胞外多糖可以通过影响细菌细胞周围海洋环境的方式,帮助细菌忍受海洋中的极端温度、为细胞提供屏障保护、帮助细菌细胞对基质表面的吸附、缓冲 pH 以及海水盐浓度的变化、促进细胞间的生化作用、吸附可溶性有机