

海洋酵母菌研究简况

陈椒芬 刘秀云

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

海洋酵母菌作为一类海洋微生物正在受到人们的关注。我们从 1976 年起开始进行了海洋酵母菌的生态调查和应用研究。本文拟简述海洋酵母菌的分离培养、生态、生理特性及其应用。读者如需进一步了解, 可参阅有关综述^[1-3]。

海洋酵母菌的分离培养

海水中酵母菌细胞密度很低, 用平板稀释法分离很难奏效, 一般常用超滤膜浓集, 方法是先用无菌采水瓶从特定站位采集水样, 将一定量海水(近岸海水 100—200 毫升, 远洋 500—1000 毫升)立即通过硝化纤维素滤膜(孔径 0.2—0.6 微米)浓集酵母菌, 然后取下滤膜紧贴于营养琼脂平板上置保温箱培养。

从海泥中分离酵母菌, 如为近岸浅滩海泥, 可用灭菌匙挖取海泥, 如在较深处, 则需用采泥器取样, 然后取约 1 立方厘米海泥在小体积的灭菌海水中, 加玻璃珠振摇或用振荡器制成悬浮液, 待粗颗粒泥沙下沉后, 取 1 毫升悬液于培养皿中, 再倒入融化并冷至 45℃ 的营养琼脂制成平板进行分离, 亦可用超滤膜法分离。

分离海藻体上附着的酵母菌, 可称取 5 克鲜藻放入 100 毫升无菌海水中, 加玻璃珠振荡 10 分钟后静置, 取上清液用超滤膜法分离。

从海栖动物体表分离酵母菌, 如是大动物, 可取其一小片在营养琼脂表面划线, 如是小动物, 常把整个个体直接划线, 或将样品放入液体培养基内培养几天后进行分离。海鸟及其它动物内脏内含物中的酵母菌, 可将内含物用无菌海水适当稀释后作平板分离。

所用分离培养基基本上与常规的相似。van

Uden 等^[4]认为用含 2% 葡萄糖、1% 蛋白胨、0.5% 酵母膏、pH 4.5 的过滤海水培养基是分离海洋酵母最实用的培养基; Sieburth 等^[5]则试验确定了一种用于分离的“C 培养基”, 其中含胰蛋白酶, 并且是用 Baldeston 人工海水配制的。

用平板法计数菌落和直接计数所得结果相差颇大, 沿岸海水样品甚至可相差一百倍。造成这种差异的因素很多, 如有些酵母细胞集中吸附在颗粒物上, 有些细胞丧失了繁殖能力等。但是也不能排除有部分酵母菌不能在至今所用的分离培养基上生长的可能性。企图用一种培养基分离所有酵母菌的愿望是不现实的, 但探讨分离培养基配方, 仍应是研究海洋酵母菌的重要内容。

有效控制细菌和霉菌, 是决定分离酵母菌成败的关键。一般用酸性培养基来抑制细菌生长, 由于酵母菌比细菌耐酸。但海洋酵母菌生在碱性的海洋环境中, 可能有部分酵母菌对酸敏感。我们在分离沿海岸海藻体上的酵母菌时, 用每升含青霉素 G 钾盐 400—600 毫克的培养基, 效果很好。抑制霉菌的生长, 需用抑霉剂丙酸钠或联(二)苯^[6]。Hoppe^[3]主张将培养温度降低到 20℃ 以下, 这样可使霉菌繁殖减缓而不影响酵母菌生长。

为了在白色滤膜上更清楚地鉴别酵母菌落, Scshadri 等^[7]建议在 pH 7 的“C 培养基”中加显色剂 2、3、5 三苯基四唑氯化物(TTC)。酵母菌可使其还原而菌落变成红色。有人用黑色滤膜来衬托白色酵母菌落, 也可达到相同效果。

分布在不同地区的酵母菌对温度的要求不同。河口区的多数酵母菌最适生长温度为

37℃以上;一般海洋酵母菌的最适生长温度在30℃以下;远洋中的则在12—15℃。通常分离平板置20℃培养5—7天可见到菌落,在12—14℃则需9天;10℃需7—14天。如将培养温度降到5℃,培养时间虽然较长,但可以较少遗漏中低温酵母菌。

海洋酵母菌的生态分布

从各种海洋基物中分离的绝大多数酵母菌的形态特征和生化特性与已知陆地上的酵母菌相似。因此,可以认为多数海洋中的酵母菌是陆地上酵母菌适应了海洋环境生存下来的种类,仅少数是真正的海洋酵母菌(见表1)。此外,新近从海洋中分离并建立了新属的酵母菌有 *Steriomatomyces* (从印度洋分离), *Sympodiomyces* (从南极海水中分离)、*Rhodospiridium* 和 *Leucosporidium* 等。不过这些属的分布范围都很狭窄。

海洋中大量存在的酵母菌是假丝酵母属 (*Candida*)、隐球酵母属 (*Cryptococcus*)、德巴利酵母属 (*Debaryomyces*)、红酵母属 (*Rhodotorula*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*)、酵母属 (*Saccharomyces*) 和丝孢酵母属 (*Trichosporon*) 等。其中汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*)、白球拟酵母 (*Torulopsis candida*)、浅白隐球酵母 (*Cryptococcus albidus*)、多形假丝酵母 (*Candida polymorpha*)、红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 和牧草红酵母 (*R. graminis*) 等是所有大洋和水团都能找到的所谓“无处不在”的种类。

沿岸酵母菌种类较繁杂,有来自陆地、河口和海洋的种类;在远洋,种类就单纯多了,除汉逊德巴利酵母外,大量存在的是无孢子酵母属。

海洋酵母菌分布极广,几乎所有海洋基物上都有酵母菌。酵母菌的密度有从近岸到远洋递减的趋势。各大洋中酵母菌的数量测定结果见表2。沿岸海区是藻类繁殖地,酵母菌分布均匀,外洋则明显地呈现微带性和不平衡性。如

表1 真正的海洋酵母菌^[1]

迪丹斯丝孢酵母 (<i>Trichosporon diddensii</i>)
皮状丝孢酵母皮尼变种 (<i>Tr. cutaneum</i> var. <i>peneaus</i>)
洛德丝孢酵母 (<i>Tr. lodderi</i>)
河口酿酒酵母 (<i>Saccharomyces estuarii</i>)
佐贝尔梅奇酵母 (<i>Metschnikowia zobellii</i>)
克里斯梅奇酵母 (<i>M. krissii</i>)
黑马朗球拟酵母 (<i>Torulopsis haemulonii</i>)
海生假丝酵母 (<i>Candida marina</i>)
托里斯球拟酵母 (<i>Torulopsis torresii</i>)
海生球拟酵母 (<i>T. marina</i>)
蛛形梅奇酵母 (<i>Metschnikowia artemias</i>)
楔形拿逊酵母 (<i>Nadsoniomyces sphenoides</i>)

北太平洋海域,从表层到深度为750米以内区域,检出率很高,到深度1千米以上就急剧减少^[9]。这主要由于温度、压力、有机物浓度和氧浓度的影响。不过,即使在溶解氧浓度极低的硫化氢带也还有生芽的酵母细胞存在^[10]。

表2 各大洋中的酵母菌数量

海区	站位	样品数	阳性样品百分率	酵母菌数量(个/升)		文献
				最低-最高	平均	
印度洋	16	179	65	1—153	36	(11)
	22	393	15	1—3	1	(2)
印度洋-太平洋	30	344	37		14	(2)
	18	368	32	1—23	3	(2)
太平洋	20	417	31	1—145	4	(2)
	22	455	18	?—20	2	(2)
	7	130	22	1—4	1	(2)
大西洋		36	47	0.2—12		(12)
黑海	21	174	48	5—150	<10	(13)
北海	12	54	99	<10—>3000		(14)

大洋中酵母菌数量虽然较少,但局部水团中其密度可以很高。如1964年夏天在(Heligoland)西部出现双鞭毛藻(*Nactiluca*)“水花”,随着藻体的衰败和死亡,酵母菌细胞数急剧增高,可达3000个/升^[14]。另外,在两条海流的混合带上,酵母菌的密度也较高^[10,15]。这可能是由于混合带上有机物比较丰富,海流的运动又使营养得到有效的利用的缘故。

海洋酵母菌的生理特性

一、对氯化钠的需求和耐盐性

海洋酵母菌耐盐能力很强,如汉逊德巴利酵母能耐浓度高达22%(重量/体积)的氯化钠。但浓度过高时,酵母菌的生长延迟期及增代时间延长。深红酵母在8.1%氯化钠溶液中延迟期为28.5小时,在16%氯化钠溶液中则为68小时;浅白隐球酵母在氯化钠浓度为0—4%时,增代时间为3小时,在8%时为7小时,而在21%时则需21小时^[20]。Shinano^[2]指出,在低浓度氯化钠溶液中,陆地和海洋中的酵母菌增殖速度无差别,但当浓度高至9%时,陆地酵母菌的增殖速度就受到阻碍。Uden^[21]检查了100株海洋酵母菌的耐盐能力,仅有3株在含3.5%氯化钠的培养基中不能生长。由此可见,海洋酵母菌对氯化钠的要求不如海洋细菌那么突出,即使耐盐能力比陆地酵母菌高,二者也没有本质上的差别。

二、最适生长温度

多数海洋酵母菌的最适生长温度是24℃左右,最高至30℃,大部分能在5℃时生长;河口区的酵母菌,最适生长温度为37℃左右,不能在5℃下生长。Hoppe^[3]在经过滤灭菌的海水中培养胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*),发现在4℃时,增代时间长,存活率高,培育80小时仍存活80%;20℃时,增代时间短,存活率低。而且4℃时的细胞密度比20℃时高18倍。用显微镜观察,处于适温范围以外的细胞结构逐渐破裂,而有色素的红酵母,高温会使它的色素减退。

由于海洋中90%的水体温度在5℃以下,因此低温酵母占比例很高。Bruce等^[22]检查358株海洋酵母,低温种类有92株。这些菌株的最适生长温度在10—15℃之间。从南极冰雪中分离的一种白冬孢酵母;*Leucosporidium antarcticum*最适温度是17℃,从南极海水中分离的一种圆酵母为12—15℃;*T. austromarina*

海底沉积物中也有酵母栖居。九州沿岸的泥沙中,酵母细胞数在2000个/克,在富含有机物的泥中,其数量还要多得多^[14]。据 Fell^[17]检查,底土中的酵母菌主要是近平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)、弯假丝酵母(*C. curvate*)、汉逊德巴利酵母、浅白隐球酵母(*Cryptococcus albidus*)和深红酵母(*Rhodotorula rubra*)等。

酵母菌是异养微生物,因此它的生存和其它生物关系密切。从腐烂海藻及浮游植物体上可分离到大量酵母菌。如从南加利福尼亚海滩的腐烂藻类中分离的佐贝尔梅奇酵母,每克样品中有520—39,200个细胞。生活的海藻也是海洋酵母良好的栖居场所。如罗德岛洲(Rhode Island)附近的9种海藻上都有大量酵母菌。用电子显微镜直接观察藻体表面,可见到酵母菌丝,带芽的细胞和芽痕等。有的海藻可分泌某种抗生物物质抑制酵母生长,如褐藻分泌的一种多酚类物质,在滤膜上和酵母菌接触后即抑制其生长。附着在藻体上的酵母菌是直接利用有机物,还是间接利用细菌分解的简单有机物,尚未有足够证据阐明。Suchiro^[18]在盛有浮游植物的瓶中加入四环素和柠檬酸抑制细菌繁殖,使浮游植物在室温下自然腐烂,7天后酵母菌就大量繁殖起来。这证明,在没有细菌参与分解的情况下,酵母菌也能降解和同化腐烂植物的大部分有机物。海藻体内丰富的多糖被一层坚实的蛋白质鞘包埋。在海洋酵母中,分解 β -D(1,3)葡聚糖的昆布糖酶活性极低^[19]。海洋酵母菌所利用的有机物,可能是沿岸海藻干露后重新被淹时释放的光合作用产物,这部分物质最多可达排出产物总量的30%。

海洋酵母菌和海洋动物的关系密切。酵母菌从海水中获得有机物,又被浮游动物捕食,海洋动物又是某些酵母菌的居留场所和传播者。如汉逊德巴利酵母常寄居于鱼体皮肤的粘液里,太平洋某些鱼类肠道储藏大量的佐贝尔梅奇酵母,随鱼类迴游而传布。不过一般来说,鱼类和无脊椎动物体内酵母菌较少,有些动物,如海胆和海绵等,还含有抑制酵母菌生长的物质。

为 18—21℃, 这些都被认为是严格的低温酵母。

三、耐压性

海洋酵母菌有一定的耐压能力。Kriss^[10] 从黑海 1000—1500 米深的厌氧层中分离到酵母菌, 他指出海洋酵母具有反硝化的能力, 能将硝酸盐还原成亚硝酸盐。因此, 当水中缺氧时, 能利用硝酸盐等化合态的氧。

四、营养要求

外洋海水的有机碳浓度很低, 仅 200—5000 微克/升, 显然, 营养贫乏是限制酵母菌数量的主要因素。不过, 海洋酵母菌能同化多种糖醇类, 而且多数能利用碳氢化合物, 并具有乳化和降解原油的能力。另外, 多数酵母菌进行氧化代谢, 能从少量碳源获得高效能量, 这些又是海洋酵母菌广泛分布的有利因素。

对 B 族维生素的需要, 也是海洋酵母的特性之一。Roth^[21] 检测了 410 株海洋酵母菌, 发现多数需要一种以上的维生素, 尤其是生物素和硫胺素。海洋中维生素的含量仅 10^{-12} 克分子, 因此只有那些不绝对需要维生素的种类, 如红酵母和牧草红酵母 (*Rhodotorula graminis*) 能广泛分布。

海洋酵母菌的应用

海洋酵母菌含丰富的蛋白质。近年来, 用它作为轮虫、丰年虫和鱼虾幼苗的饵料, 以及稚鲷的人工合成饵料, 效果都很好。1977—1978 年, 我们用一种红酵母的活菌体饲喂刺参幼虫, 18 天稚参的成活率为 5.7%, 达到当前生产指标。因此, 开发海洋酵母菌作饵料, 将大大促进水产养殖事业的发展。

鉴于多数海洋酵母菌具有同化多种烃类化合物的能力, Kato^[24] 从深度为 1120 米的海底土中分离了一株假丝酵母, 能同化 10—20 个碳的正烷烃, 28℃ 时, 在含 7.6% (重量/体积) 底物的培养基内, 3 天可产生 40 克/升菌体。因

此, 从海洋酵母菌中筛选石油酵母, 是一条重要途径。

海洋酵母菌产生的特异生理活性物质, 已受到人们注意。Shinano^[25] 报道, 65 株海洋酵母菌中, 有 32 株在培养基中沉淀碳酸钙。Siepmann 等观察到, 类球形德巴利酵母 (*Debaryomyces subglobosus*) 可大量分泌核黄素, 这种酵母菌多从鱼的内脏分离。Vacelet 证明, 海洋酵母菌是近岸海水中合成维生素的生物。Dennis 指出, 丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 和茁芽丝孢酵母 (*T. pullulans*) 有溶解植物细胞壁中纤维素的活性, 而且丝孢酵母, 瘦弱隐球酵母 (*Cryptococcus macerans*) 和白假丝酵母 (*Candida albicans*) 可分解果胶质。丝孢酵母常可在浮游植物和腐烂的海藻中分离到。Morris 发现, 有一部分海洋酵母菌分解脂肪的能力很强, 这些菌株可从腌鲑鱼体内分离。可以期望, 从应用微生物角度探索优良菌株, 海洋酵母菌是有潜力的对象。

海洋微生物学是一门正在发展的学科。由于海洋区域广阔, 目前的调查研究工作仍是零星和局部的, 关于海洋微生物的生态、生理特性的资料更为稀少。为了揭示海洋酵母菌和其它微生物与动植物的复杂关系, 还要做很多工作。除了在方法上需要创新外, 还应与其它学科结合起来进行综合研究。只有深入掌握了海洋微生物的生态和生理特性, 海洋微生物的应用途径才可能逐渐开阔起来。

参 考 文 献

- [1] van Uden, N. and J. W. Fell: Marine Yeasts, *Advances in Microbiology of the Sea* (eds. by Droop, M. R. and E. J. F. Wood), vol. 1, Academic Press, London, 1968, pp. 167—201.
- [2] Fell, J. W.: Yeasts in Oceanic Regions, *Recent Advances in Aquatic Mycology* (ed. by Gareth Jones, E. B.), Elek Science, London, 1976, pp. 93—124.
- [3] Hoppe, H. G.: Yeasts, *Marine Ecology* (ed. by Kinne, O.), vol. 3, John Wiley and Sons, London, New York, 1976, pp. 347—356.
- [4] van Uden, N. and R. Casteo-Branco: *Limnol. Oceanogr.*, 8: 323—329, 1963.
- [5] Sieburth, J. M. and K. Jensen: *Appl. Micro-*

- biol., 15: 830—838, 1967.
- [6] Hertz, M. R. and M. Levias: *Fd. Res.*, 7: 430—441, 1942.
- [7] Seshadri, R. and J. V. Sieburth: *Appl. Microbiol.*, 22: 507—512, 1971.
- [8] van Uden, N. and C. E. Zobell: *Antonie van Leeuwenhoek*, 28: 175—283, 1962.
- [9] Shinano, H.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 28: 1113—1122, 1962.
- [10] Kriss, A. E.: *Marine Microbiology*, 孙国王、李世珍译:《海洋微生物学》, 科学出版社, 北京, 1964.
- [11] Fell, J. W.: *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.*, 17: 454—470, 1967.
- [12] Capriotti, A.: *Arch. Microbiol.*, 42: 407—414, 1962.
- [13] Meyers, S. P. et al.: *Bull. Mar. Sci.*, 17: 576—596, 1967.
- [14] Meyers, S. P. et al.: *Mar. Biol.*, 1: 118—123, 1967.
- [15] Fell, J. W. and van Uden, N.: Yeast in Marine Environments, *Symposium on Marine Microbiology* (ed. by Oppenheimer, C. H.), Thomas Springfield, 1963, pp. 329—340.
- [16] Suehiro, S.: *Sci. Bull. Fac. Agric. Hyushul Univ.*, 20: 223—227, 1963.
- [17] Fell, J. W. et al.: *Limnol. Oceanog.*, 5: 366, 1960.
- [18] Suehiro, S.: *J. Fac. Agric. Hyushu. Univ.*, 13: 227—235, 1964.
- [19] Chesters, C. G. C. and A. T. Bull: *Biochem. J.*, 86: 28—31, 1963.
- [20] Norkrans, B.: *Arch. Microbiol.*, 54: 374—392, 1966.
- [21] van Uden, N.: Occurrence and Origin of Yeasts in Estuaries, *Estuaries* (ed. by Lauff, G. H.), AAAS Wash. Publ., 83: 306—310.
- [22] Bruce, J. and E. O. Morris: *Antonie van Leeuwenhoek*, 39: 331, 1973.
- [23] Roth, F. J. Jr. et al.: *Limnol. Oceanogr.*, 7: 178—185, 1962.
- [24] Kato, N. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 35: 1469—1476, 1971.
- [25] Shinano, H.: *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 39: 91—96, 1973.
- [26] Morris, E. O.: *J. Appl. Bacteriol.*, 38: 211—224, 1975.