

塔马亚历山大藻与细菌的共培养及其微生态效应^{*}

徐金森 郑天凌^{**} 陈霞 连玉武

(厦门大学生命科学院 厦门 361005)

摘要 为研究赤潮藻类与海洋细菌的微生态关系,在实验室模拟条件下将塔马亚历山大藻(*Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech)与海底沉积物中分离的两种细菌(*Bacillus megaterium*, S₇; *B. halmapulus*, S₁₀)共同培养,并探讨了藻菌共培养对*A. tamarense*生长以及对水体中胞外酶 β -葡萄糖苷酶活性(β -GlcA)的影响。实验结果表明,在培养的第2周内,与细菌S₇或S₁₀共培养的*A. tamarense*细胞数分别比CK增加约12%和24%,而在第3周内则各增加23%和5%左右。另外,分别与*A. tamarense*共培养的细菌S₇或S₁₀的 β -GlcA变化趋势相似,呈马鞍型曲线。在*A. tamarense*生长的后期, β -GlcA随着藻细胞的裂解程度的增加而迅速提高。图3 参25

关键词 赤潮;塔马亚历山大藻;细菌;胞外酶

CLC Q949.240.8

CO-CULTURE OF RED TIDE ALGAE *ALEXANDRIUM TAMARENSE* (LEBOUR) BALECH WITH BACTERIA AND ITS MICRO-ECOLOGICAL EFFECTS^{*}

XU Jinsen, ZHENG Tianling^{**}, CHEN Xia & LIAN Yuwu

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract One of red tide algae, *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, was co-cultured with two species of bacteria, *Bacillus megaterium* (S₇) and *B. halmapulus* (S₁₀) isolated from Xiamen western sea, to investigate the micro-ecological relationship between the red tidal algae and sea bacteria. The results showed that the cell number of the alga *A. tamarense* increased by about 12% and 24% in the second week, and 23% and 5% in the third week compared with the control. Moreover, there was a roughly similar variation trend of the activity of extra-cellular enzyme and β -glucosidase in the growth media of bacteria S₇ or S₁₀ co-cultured with the alga. The β -glucosidase activity rapidly increased at the later stage of algal growth accompanying the increase of the decay of algal cells. Tab 3, Ref 25

Keywords red tide; *Alexandrium tamarense*; bacteria; extra-cellular enzyme

CLC Q949.240.8

赤潮是在一定的环境条件下,海水中某些浮游植物、原生动动物或细菌在短时间内突发性增殖或高度聚集引起海水变色的一种生态异常现象,是当今全球海洋的一大公害。微型藻类是引起赤潮最主要的种类,而海洋细菌与之有着密不可分的联系。有关藻菌关系的研究近年来已经引起了国内外研究者的关注^[1-3]。

塔马亚历山大藻[*Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech]属于涡鞭毛藻纲,是一种可产生神经麻

痹性贝毒毒素的海洋甲藻,有着较高的赤潮发生频率。在我国北至胶州湾、南至大鹏湾均有发现,也具有发生赤潮的历史。继齐雨藻等(1994)在大鹏湾发现该藻之后^[6],林元烧(1996)也报道了厦门及邻近地区对虾养殖池由塔马亚历山大藻引发的赤潮^[7]。

为了解赤潮生物的生理特点与繁殖规律,提高对赤潮发生机理和爆发规律的认识,寻找利用微生物防治赤潮的可能途径,作者对赤潮藻类*A. tamarense*与分离自厦门海域的两种细菌进行共同培养,并对藻菌共培养对*A. tamarense*生长以及水体中的胞外酶 β -葡萄糖苷酶活性(β -GlcA)的影响进行了研究。

收稿日期:2001-08-13 接受日期:2001-09-28

*国家自然科学基金资助项目(九五重大基金项目:39790110,面上基金项目:30070157) Supported by the National Natural Science Foundation of China

**通讯作者 Corresponding author

1 材料与方法

1.1 试验材料

藻种: 实验用的单细胞藻类塔马亚历山大藻 (*A. tamarensis* (Lebour) Balech) 由暨南大学水生生物研究所提供. 藻种在进行批量培养前, 选用改良的 F/2 培养液进行扩大培养^[8]. 供试验用的藻种经过了 20 代培养, 在实验室条件下采用严格灭菌的人工单种培养. 由此得到的 *A. tamarensis* 藻种在电镜检查中未观察到内生菌的存在. 藻种置于三角瓶中培养, 温度为 $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 光照周期为 12(L) 3(D). 光照强度为 3 500 lx, 培养 1~2 wk. 取指数生长期的藻种接种进行有关实验.

菌种: 从厦门海域海底沉积物中分离, 并经 2216E 培养基(陈海水 1 000 mL; 蛋白胨 5.0 g; 酵母膏 1.0 g; 磷酸高铁 0.1 g; 琼脂 20 g. pH 7.6~7.8) 分离纯化而来. 经鉴定^[9], S_7 为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 同种不同株系; S_{10} 为芽孢杆菌属的一种 *B. halmopalus*. 细菌接种于试管的 2216E 培养基的斜面上, 置于培养箱中培养. 温度为 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 培养 2 d.

底物: 标准荧光物质 MUF- β -*d*-glucoside (Sigma Co.) 工作液, 无菌蒸馏水和甲基溶纤剂以 1:3 的比例溶解底物配制而成, 浓度为 10 mmol L^{-1} , 避光冷藏, 待用.

1.2 测定方法

实验设置 5 种待测样品, 分别为 *A. tamarensis* 空白, S_7 、 S_{10} 的细菌空白以及 *A. tamarensis* 分别与 S_7 、 S_{10} 细菌共同培养的试验组合. 每种待测样品均设置 5 个重复, 并取其算术平均值为测定值. 实验用的海水经高压灭菌 ($121 ^\circ\text{C}$, 30 min) 冷却后, 分装、定量至 300 mL. 其中 3 种植入预培养的藻种后, 置于与扩大培养相同的光温条件下培养. 待藻种在该条件下进入指数生长期时将 S_7 、 S_{10} 细菌分别接入其中的 2 种待测样品中, 另一种作为藻空白. 同时在海水中分别接入 S_7 、 S_{10} 细菌作为菌空白. 将 5 种样品都置于扩大培养基相同的光温条件下培养. 每隔 1 d 从各待测样品中吸取藻种进行细胞计数, 并测定胞外酶活性.

藻细胞密度测定: 摇匀藻液, 吸取 0.1 mL 于计数板上, 滴加 I-NaI 液固定, 在倒置显微镜下观察计数. 计数时经与 CK 组校正, 剔除了死细胞的空壳板等的影响.

胞外酶 β -葡萄糖苷酶 (β -GlcA) 活性的测定^[10]: 分别移取 2 mL 水样至预先经灭菌处理的培养瓶中, 立即加入 50 μL 底物 MUF- β -*d*-glucoside 工作液, 使得样品中底物的终浓度为 $250 \mu\text{mol L}^{-1}$, 然后立即在空白样品中加入 50 μL HgCl_2 溶液, 终止酶反应, 在室温条件下避光培养 2~3 h, 培养结束后在平行组中加入 HgCl_2 终止反应,

并迅速冷冻保存. 测试前逐步解冻恢复至室温, 用 HI-TACHI 860 型荧光分光光度计测定荧光强度. 激发光和发射光波长分别为 353 nm, 450 nm. (其他参数为: 狭缝宽 $E_x=10 \text{ nm}$, $E_m=10 \text{ nm}$, 扫描速度 60 s^{-1}). β -GlcA 由下式计算而得:

$$V = (F - F_b) \times B / T \times S$$

式中: V 为胞外酶水解底物的速率 ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$); F 为平行样品的荧光强度(平均值); F_b 为空白样品的荧光强度(平均值); T 为培养时间(h); S^* 为单位浓度 (μmol) 标准荧光物质的荧光强度; B 为 1 mol 底物中有机组分的碳含量(本实验底物为 $B=72 \mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$).

* 用无菌海水配制浓度为 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.032 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的标准荧光物质 MUF- β -*d*-glucoside 溶液, 与样品同期测定荧光强度作标准工作曲线, 斜率即为 S .

2 结果与讨论

2.1 共培养对 *A. tamarensis* 细胞生长与形态的影响

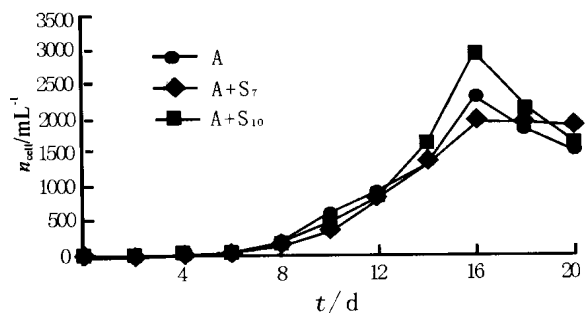


图 1 在细菌 S_7 和 S_{10} 共培养下 *A. tamarensis* 的生长曲线

Fig 1 The growth of algae *A. tamarensis* co-cultured with bacteria S_7 and S_{10}

如图 1 所示, 在本实验条件下, 细菌在培养前期对藻细胞数的影响并不明显; 而后期则逐渐明显表现出对藻细胞生长的影响. 例如, 在培养的 d14, 与细菌 S_7 或 S_{10} 共同培养的藻细胞数分别比 CK 的增加约 12% 和 24%, 其细胞数分别在 d16~18 达到各自的最大值, 而至 d20, 则其增值各为 23% 和 5% 左右. 以共培养处理 A+S₇ 和 A+S₁₀ 对单独培养的藻细胞数做统计分析, 得到了高度相关的线性回归方程. 其中, $y_{(A+S_7)} = 1.018x - 0.933$, $r^{**} = 0.98$, 而 $y_{(A+S_{10})} = 1.217x - 83.537$, $r^{**} = 0.99$, 表明在共培养条件下细菌对 *A. tamarensis* 藻细胞的生长具有明显的影响.

此外, *A. tamarensis* 体呈单细胞形态, 长略大于宽, 其细胞大小为 $l 16 \sim 31 \mu\text{m}$, $b 13 \sim 30 \mu\text{m}$. 在培养前 8 天, 发现有 2 个或 4 个细胞相连成链(多数为 2 个). 培养

14 d后, 则仅见单细胞, 且藻细胞游动变为缓慢, 并发现有藻细胞消亡后遗留的空壳板. 藻细胞有趋光性, 培养14 d后, 藻液出现浑浊, 且藻细胞多沉淀于三角瓶底. 尼贝肯曾报道过, 甲藻的个体一般较小, 好单个生活, 很少形成链状^[11]. 本试验中观察到的 *A. tamarense* 藻体成链细胞的现象与该报道有所不同, 并且也得到广东大鹏湾水域和台湾南部养蟹池中获得的材料的佐证^[6, 12~13], 说明 *A. tamarense* 成链现象还是较为普遍的.

2.2 藻菌共培养对水体中 β -GlcA 的影响

近年来, 国内外学者研究发现, 在赤潮发生的初始阶段, 水体中的胞外酶合成受抑制, 而在赤潮的衰落阶段, 胞外酶大量合成, 这些酶在藻细胞的裂解中可能有着重要的作用^[3~4, 14~15]. 例如已有报道称, 在富营养化的湖水发生水华的发展过程中, 水体中细菌的细胞分泌物的量增加一倍以上, 而细菌胞外酶的活性也有显著的增强. 假单胞菌、杆菌、蛭弧菌、黄杆菌等可分泌有毒物质并释放于水环境中, 抑制某些藻类如甲藻和硅藻等的生长^[4~5]. 细菌胞外酶的催化作用对物质转化起着重要的作用. 胞外酶通过水解作用使高聚物裂解, 逐步变为可直接被吸收利用的小分子物质. 其中, β -GlcA 是最为常见的一种胞外酶, 广泛存在于各种水体中. 因此, 胞外酶活性被认为是阐明有机物和异养微生物类群相互关系的一个重要工具^[16~18].

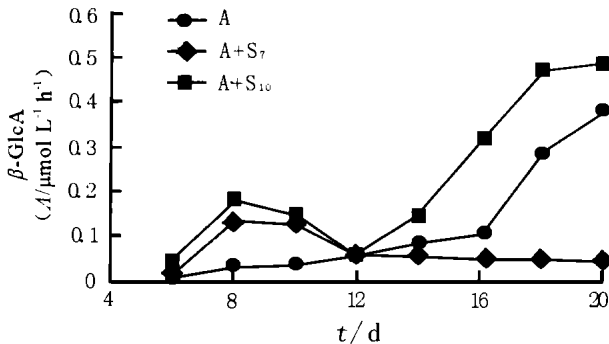


图2 细菌 S_7 和 *A. tamarense* 共培养对水体中 β -GlcA 活性 (Δ) 的影响

Fig 2 The β -GlcA activity (Δ) in water with the co-cultured bacteria S_7 and alga *A. tamarense*

图2显示的是细菌 S_7 和 *A. tamarense* 共培养时对水体中的 β -GlcA 活性影响的情形. 从图中可以看出, S_7 细菌单独培养的 d8, 其水体中的 β -GlcA 有一峰值 (0.133 ± 0.003) $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. 随着培养时间的延长而逐渐降低, 至 d20 仅为 (0.048 ± 0.011) $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. 共培养处理 A+S₇ 在水体中的 β -GlcA 活性水平明显高于 A 和 S_7 单独培养的, 整体上呈一马鞍型曲线. 以共培养处理

A+S₇ 的 β -GlcA 活性水平对对照 A 的作线性回归处理, 得到方程 $y_{(A+S_7)} = 0.083 + 1.186x$, 两者的相关系数为 $r^{**} = 0.92$. 细菌 S_{10} 在单独培养期间的 β -GlcA 大体保持在 $0.03 \sim 0.07 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ 范围内 (见图3). 另外, *A. tamarense* 在单独培养下, 其水体中的 β -GlcA 从 d12 起逐渐提高, d16 起增加较快, 达到 (0.104 ± 0.02) $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. 而至 d20 藻体衰败时, β -GlcA 达到最高 (0.385 ± 0.023) $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. 这也许可以说明, 在培养前期, 可被细菌吸收的营养较多时细菌的 β -GlcA 较低, 而在藻体处于衰败时, 在藻体分泌大量不被细菌吸收的有机物的诱导下致使 β -GlcA 提高.

细菌 S_{10} 与 *A. tamarense* 共培养下的 β -GlcA 变化趋势与处理 A+S₇ 的相似, 先后出现两个峰值, 形成马鞍型的变化曲线. 处理 A+S₁₀ 的 β -GlcA 在共培养 d8 时达到第一个高峰 [(0.482 ± 0.005) $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$]. 到了 d12 时则明显降低 [(0.111 ± 0.01) $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$]. 但到了 d20 则增至 (0.49 ± 0.013) $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. 值得注意的是, 虽然处理 A+S₁₀ 显示了与处理 A+S₇ 同样的增加趋势, 但经数理统计分析表明, A+S₁₀ 和 A 之间没有存在高度的线性回归关系.

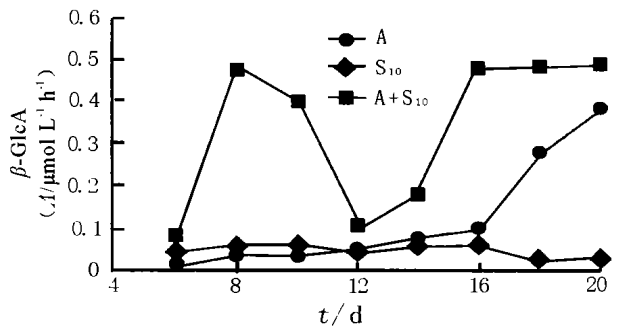


图3 细菌 S_{10} 与 *A. tamarense* 共培养对水体中的 β -GlcA 活性 (Δ) 的影响

Fig 3 The β -GlcA activity (Δ) in water with the co-cultured bacteria S_{10} and alga *A. tamarense*

关于细菌与藻类的关系, 一般认为主要体现在: 细菌在赤潮形成过程中提供营养盐, 在赤潮发生后后期分解有机物, 并且它们同赤潮藻类还可能共生、竞争、拮抗等错综复杂的关系. 从处理 A+S₇ 在培养前期出现的 β -GlcA 值大致等于细菌 β -GlcA 与藻空白 β -GlcA 之和的现象来看, *A. tamarense* 藻细胞似乎没有促进 S_7 细菌胞外酶活性增大; 但在处理 A+S₁₀ 的前期, 其 β -GlcA 值大于细菌空白 β -GlcA 与藻空白 β -GlcA 之和, 说明 *A. tamarense* 藻细胞可能促进了 S_{10} 细菌胞外酶活性的提高. 这种现象据认为与细菌本身的特性及藻菌间营养竞争有关^[4~5, 17, 19]. 有研究认为, 藻细胞在生长时会分泌细菌生长所需要的物质, 而细菌在利用藻细胞外分泌物的

同时,相应地产生了CO₂、无机营养、以及生长因子等,从而改善了藻细胞的微环境,促进了藻细胞的生长^[1, 3~4, 20~22].在培养试验的中期,A + S₇和A + S₁₀试验组合的β-GlcA均明显降低.由此可以推测,在该期间内由于藻细胞的大量繁殖,该藻在营养竞争上处于优势地位,对细菌生长起着抑制作用,从而使细菌胞外酶活性降低.

根据Chrost(1991)等的研究,菌藻共培养中胞外酶的合成受“抑制—诱导”机制所调控,当水体中可被细菌直接利用的溶解有机物足够时,相关胞外酶合成被抑制,而当其下降到临界水平时,胞外酶抑制作用得以解除,在水体中大分子有机物的诱导下,细菌大量合成相关胞外酶,有效降解大分子有机物,释放可被细菌直接吸收的有机物,以维持细菌的营养需要^[23~25].从本次实验中看,在培养后期,藻菌共培养以及藻空白的胞外酶活性逐渐增加,这是由于逐渐经成熟、衰老以至裂解的藻细胞分泌的高聚有机物无法被细菌直接利用,相关胞外酶在这样的环境下被诱导而大量合成,胞外酶的酶活性随着藻细胞的裂解程度的增加而迅速增高.

References

- Ietswaart T, Schneider PJ, Piins RA. Utilization of organic nitrogen sources by two phytoplankton species and a bacterial isolate in pure and mixed cultures. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **6**: 1554 ~ 1560
- Ogata T. Toxic marine phytoplankton. Edna Graneli ed. NY: Elsevier, 1990. 311 ~ 315
- Daft MJ, Stewart WDP. Ecological studies on algal-lysing bacteria in fresh waters. *Freshwat Biol*, 1975, **5**: 577 ~ 596
- Middelboe M, Sondergard M, Letarte Y. Attached and free-living bacteria: production and polymer hydrolysis during a diatom bloom. *Microbial Ecol*, 1995, **29**: 231 ~ 248
- Dakhama A. Isolation and identification of anti-algal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Phycol*, 1993, **5**: 297 ~ 306
- Qi YZ(齐雨藻), Qian F(钱锋). Taxonomical studies on red tide causative dinoflagellates in Dapeng Bay, South China Sea. *Oceanol Limnol Sin*(海洋与湖沼), 1994, **25**(2): 206 ~ 210
- Lin YS(林元烧). Red tide caused by a marine toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamarensis* (Lebour) Balech, in shrimp ponds in Xiamen. *J Oceanogr Taiwan Strait*(台湾海峡), 1996, **15**(1): 16 ~ 18
- 程兆第, 高亚辉, 刘师城. 福建沿岸微型硅藻. 北京: 海洋出版社, 1993.
- Zheng TL(郑天凌), Zhuang TC(庄铁城), Cai LZ(蔡立哲), Tian Y(田蕴), Guo CL(郭楚玲), Xu MZ(徐美珠), Li SJ(李少菁). The role of microbes in bioremediation of marine polluted environment. *J Xiamen Univ (Nat Sci)* [厦门大学学报(自然科学版)]. 2001, **40**(2): 524 ~ 534

- Hoppe HG. Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. In: Kemp ed. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewos Publishers 1993
- 尼贝肯 JW 著; 林光恒, 李和平等译. 海洋生物学—生态学探讨. 北京: 海洋出版社, 1991. 31 ~ 32
- Chen YQ(陈月琴), Qu LH(屈良鹤), Zeng LL(曾隄梅), Qi YZ(齐雨藻), Zheng L(郑磊). Molecular identification of red tide toxic *Alexandrium tamarensis*—*Alexandrium catenella* from the South China Sea. *Acta Oceanol Sin*(海洋学报), 1999, **21**(3): 106 ~ 111
- Reim RL. The characterization of a *Bacillus* capable of blue-green bactericidal activity. *Can J Microbiol*, 1974, **20**: 981 ~ 986
- Fukami K, Nishijima T, Murata H. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, **57**(912): 2321 ~ 2326
- Shilo M. Lysis of blue-green algae by myxobacter. *Bacteriol*, 1970, **140**: 453 ~ 461
- Li FD(李福东), Zhang C(张诚), Zou JZ(邹景忠). Role of bacteria in the growth process of phytoplankton. *Marine Sci*(海洋科学), 1996, **20**(6): 30 ~ 33
- Lian YW(连玉武), Wang YL(王艳丽), Zheng TL(郑天凌), Hong HS(洪华生). Advance in the research on interaction between red tide algae and bacteria. *Marine Sci*(海洋科学), 1999, **23**(1): 35 ~ 38
- Wang F(王斐), Zheng TL(郑天凌), Hong HS(洪华生). Biological function of bacterial extracellular enzyme. *Marine Sci*(海洋科学), 1999, **23**(3): 31 ~ 35
- Zheng TL(郑天凌), Wang F(王斐), Xu MZ(徐美珠), Tian Y(田蕴), Su JQ(苏建强), Hong HS(洪华生). β-glucosidase activity in the Taiwan Strait. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 2001, **7**(2): 175 ~ 182
- Dakhama A. Stimulatory and inhibitory effects of pseudomonas on the growth of algae. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci*, 1989, **1714**: 46 ~ 51
- Zheng TL(郑天凌). The role of marine microbes in ecological environment. *Marine Sci*(海洋科学), 1994, **18**(3): 35 ~ 38
- Lin W(林伟), Zhou MJ(周名江). Effect of marine bacteria on harmful algal blooms. *Marine Sci*(海洋科学), 2001, **25**(3): 34 ~ 38
- Munster U, Chrost RJ. *Aquat Microb Ecol*. New York: Springer-Verlag 1990
- Balech E. Proc Int Conf. 3rd. New York: Elsevier, 1985. 33 ~ 39
- Jiang TJ(江天久), Huang WJ(黄伟建), Wang ZH(王朝辉), Luo YM(骆育敏), Yin YW(尹伊伟), Qi S(杞桑). Effects of water temperature, salinity and pH on growth and toxicity of *Alexandrium tamarensis* (Lebour) Balech (Dapeng Strain). *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 2000, **6**(2): 151 ~ 154