

海洋赤潮生物与厦门海域几种细菌的生态关系研究

郑天凌^{1,2}, 田蕴¹, 苏建强¹, 王艳丽¹, 连玉武¹, 洪华生^{2,3}

(1. 厦门大学生命科学学院; 2. 海洋环境科学教育部重点实验室; 3. 厦门大学环科中心, 厦门 361005)

摘要: 选择我国沿海易发有毒赤潮藻——塔马亚历山大藻 [*Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, 1985] 和从厦门海域筛选的海洋细菌作为实验材料, 研究在实验生态条件下 *A. tamarense* 的生理生态特征, 及其与 3 株从厦门海域筛选的海洋细菌 S₅, S₇, S₁₀ 与 *A. tamarense* 共同培养表现的生态关系的差异性。结果表明: 在实验室条件下, *A. tamarense* 可以较好地生长并保持自然状态下的若干特性, 其生长曲线与微生物的生长曲线相似; 分别在藻细胞生长的延滞期和指数期加入细菌过滤液, 发现 3 种海洋细菌的过滤液对 *A. tamarense* 生长有不同的抑制作用效果。三者的抑藻能力大小依次为 S₁₀ > S₅ > S₇。本文对海洋细菌抑藻作用机理、赤潮的生物防治可能性进行了讨论。

关键词: 塔马亚历山大藻; 海洋细菌; 生态关系

Study on the Ecological Relationship Between a Red-tide Causative Alga and Three Strains of Bacteria Isolated from Xiamen Harbor

ZHENG Tian-Ling^{1,2}, TIAN Yun¹, SU Jian-Qiang¹, LIAN Yu-Wu¹, WANG Yan-Li¹, HONG Hua-Sheng^{2,3}

(1. School of Life Sciences, Xiamen University; 2. Key Lab for Marine Environmental Science of Ministry of Education; 3. Environmental Science Research Centre, Xiamen University, Xiamen 361005, China). Acta Ecologica Sinica, 2002, 22(12): 2063-2070

Abstract The physiological and ecological properties of *Alexandrium tamarense*, a kind of red-tide causative alga, and the ecological relationship between this alga and three strains of marine bacteria isolated from Xiamen western sea area were examined in the controlled ecological conditions. *A. tamarense* can grow well and keep some of its peculiarity when cultured under the laboratory conditions. Its growth curve is as same as that of the general microorganism. Bacteria are not found in the purely cultured *A. tamarense* cell. Three strains of Bacteria are isolated from the sediments of Xiamen Harbor. After the morphological examination and the molecule-biological study, it can be identified that S₅ probably is a new specie of *Sphingomonas*, S₇ is *Bacillus megaterium* and S₁₀ is *Bacillus halmapalus*. The relationship between three strains of bacteria S₅, S₇, S₁₀ and the alga *A. tamarense* is studied by adding the bacteria's filtrate into the alga culture separately in the lag phase and exponential phase of the alga growth. The three strains show different ecological effect. The filtrate of bacteria S₅ and S₁₀ can also markedly inhibit the alga's growth and multiplication at the concentration of 2×10^{10} cells/ml. S₁₀ has the stronger inhibiting ability than that of S₅. While middle concentration (2×10^9 cells/ml) filtrate of S₅ and S₁₀ can markedly improve the growth and multiplication of the alga. S₁₀ has the stronger promotion than that of S₅ to the alga's growth. The inhibition and promotion are both more remarkable in the alga's lag phase than exponential phase. The filtrate of S₅ and S₁₀ has no evident effect on the alga's growth at the concentration of 2×10^8

基金项目: 国家自然科学基金重大基金资助项目 (39790110); 福建省自然科学基金重点资助项目 (D0020001)

收稿日期: 2001-03-26; **修订日期:** 2001-11-20

作者简介: 郑天凌 (1955~), 男, 福建人, 博士, 教授。主要从事海洋环境微生物研究。E-mail: wshwzh@jingxian.xmu.edu.cn

cells/ml Bacterium S7 has no clear inhibition or promotion to the alga. The mechanisms of bacterial inhibition and the possibility of red-tide control by biological methods were discussed.

Key words: *Alexandrium tamarense*; marine bacteria; ecological relationship

文章编号: 1000-0933(2002)12-2063-08 中图分类号: Q143 文献标识码: A

近年来,随着人口的持续增长和经济的高速发展,排入海洋的有机氮、磷等污染物大大增加,造成某些水体交换条件不良的海湾富营养化,赤潮的发生有逐年增加的趋势。

海洋微型藻类是引起赤潮最主要的种类。一般情况下,微型浮游藻类的增殖对水产养殖和渔业捕捞是有益的。但是,有时这种增殖却产生负面效应。海水中浮游藻类超常的大量增殖常常引起赤潮,使水产养殖、捕捞业和旅游业蒙受巨大的经济损失,并对环境和人体健康产生严重的危害。在已知的5000多种海洋浮游藻类中,能够增殖到使海水表层变色(即所谓“赤潮”)程度的大约有300种,而能够产生对动物和人类有害的毒性物质的有40种左右。

赤潮藻类的生长和增殖,除了与环境温度、光照、盐度、营养物等理化因子有密切关系外,还与海洋细菌有密不可分的联系。一方面细菌吸收藻类产生的有机物质,并为藻类的生长提供营养盐和必要的生长因子,从而调节藻类的生长环境;另一方面细菌也可通过直接的或间接的作用抑制藻细胞的生长,甚至裂解藻细胞,从而表现为杀藻效应。而藻类对细菌也有相似的两方面作用^[1]。

A. tamarense 属于涡鞭毛藻纲,是一种可产生PSP(神经麻痹性贝毒)毒素的海洋甲藻,在美国、欧洲、南美、菲律宾、香港等地区有着较高的赤潮发生频率。其适应能力强,生存范围广,在我国北至胶州湾、南至大鹏湾都有发现,具有发生赤潮的历史。由*A. tamarense*产生的PSP毒素可以通过贝类的积累而达到使人中毒的浓度。1986年,台湾就曾经发生过因食用含*A. tamarense*的蛤而中毒的事件^[2]。齐雨藻等在大鹏湾水域发现了这一种类^[3];林元烧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^[4]。

基于该赤潮藻对海洋生态环境破坏的严重性、对海水养殖业和人类健康危害的加剧,作者选择其为实验藻种,研究该藻在实验生态条件下的生长、增殖和衰亡规律及其与几株海洋细菌的相互关系,以探讨微生物防治赤潮的可能途径。

1 材料和方法

1.1 藻种来源及培养条件

藻种 实验用的藻种为单细胞藻类塔马亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*),由暨南大学水生生物研究所提供。

培养基 藻类所用培养液选用改良的f/2培养液进行培养。

培养条件 藻类置于三角瓶中培养,温度为 22 ± 1 ,光照时间12L/12D,光照强度3500lx。

1.2 细菌的来源

从赤潮多发区厦门西海域1~10cm深的海水及沉积物中分离海洋细菌3株(S₅、S₇、S₁₀)。

1.3 藻细胞计数

摇匀三角瓶中的藻液,用吸管从中吸取藻的培养液0.1ml滴在专用的藻细胞计数板(购自武汉水生所)的计数槽内,滴加1%NaI溶液固定。静置1min后置于倒置显微镜下观察计数。

1.4 细菌计数

细菌计数采用DAPI染色法。用荧光显微镜(Zeiss Microscope, 100W HBO mercury light source; G365, FT395, LP420)进行荧光显微计数。计数时,随机选取10个视野计数被染色的细菌个体(每个视野以15~30个细菌为宜)按下式计算水样中的细菌丰度:

$$\text{细菌丰度}(\text{cell/ml}) = A \times S_1 / (S_2 \times V)$$

式中,A为10个视野中细菌平均数,S₁为视野面积,S₂为滤膜有效过滤面积,V为过滤水样体积。

1.5 叶绿素含量的测定

采用萃取荧光法。将藻液滤于混合纤维素酯微孔滤膜上(0.22μm),然后将滤膜浸入盛有6m DMF(N,

N-二甲基甲酰胺)原液(AR 级)的萃取瓶中。在黑暗条件(冰箱中 5 左右)放置 0.5h 后, 萃取液即可移至比色杯中, 用日立 850 荧光分光光度计测定(激发光 $E_x = 430\text{nm}$, 发射光 $E_m = 670\text{nm}$) 荧光测定步骤如下:

(a) 取出样品放于室温, 黑暗处约 0.5h, 使样品温度与室温一致。

(b) 测定样品荧光值 F_{a0} 。

(c) 滴加 1 滴 10% 盐酸于比色杯中, 30s 后测定荧光值 F_b 。根据酸化前后的荧光值, 按以下公式计算 Chl-a 的浓度:

$$\text{Chl-a} = \text{FDR} / (R \times 1) (F_b \times F_a) \times V_1 / V_2$$

式中, FD 为换算因子, $FD = 0.087 (\mu\text{g} / \text{m l})$;

R 为酸化因子, $R = 5$; V_1 为萃取液体积 (m l); V_2 为抽滤的藻液体积 (m l); F_a, F_b 为酸化前后的荧光值。

1.6 细菌的分子鉴定

1.6.1 总 DNA 的制备及 16S rDNA 的 PCR 扩

增 取适量菌种, 加入提取缓冲液 (10mmol/L TrisHCl, 10mmol/L NaCl), 加热振荡混匀, 取 1 μ l 稀释成为 500 μ l, 其余在 20 保存。取菌种稀释液 2.5 μ l 为模板, 进行 16S rDNA 基因 PCR 扩增, 扩增引物为: 16S+ 5' A GACTTTGA TCCTGGCTCA G3', 1486R 5' CGGCTACCTTGTTACGACTTC3', 分别对应于 16S rDNA 5' 末端和 3' 末端的一段保守序列。PCR 反应程序为 94 下 2 min, 然后再 94 下 1 min, 55 下 1 min, 72 下 2 min, 30 个循环, 扩增完成后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查, 其余保存于 20 。

1.6.2 16S rDNA 序列测定与分析 PCR 产物经 Qia Quick PCR Purification Kit 纯化后, 使用 377 型自动 DNA 测序仪 (ABI PRISM) 进行序列测定, 测序引物为 16S+, 1486R。以计算机分析软件 BLAST, Pc-gene6.0 进行序列的比较排列, 序列间引入适当的空格, 以达到最大的同源性, 序列间核苷酸的差异值以 Phylip3.5 的 DNA dist 进行比较, 以 Neighbor 程序进行树图构建。

2 结果

2.1 细菌的分离、培养及鉴定

三株海洋细菌来自厦门西港海域的沉积物。采样时间为 1998 年 6 月, 采样地点为厦门西港, 取表面 1 ~ 10cm 的沉积物。

在 2216E 海洋细菌固体培养基上培养 2d 之后, 获得一批大小形态多样的细菌菌落。经反复分纯、筛选, 选留了 14 株菌落特征差异较大的细菌, 进行藻菌关系的实验研究。经过预备实验筛选出 3 株有明显抑制藻作用的 S_5, S_7, S_{10} 菌株, 分别对这三株细菌进行形态学和分子生物学的鉴定。 S_5 属于鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*), 但基因库中尚未发现与之相符的种, 很可能为一新种。 S_7 与细菌基因库中巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 基本一致 (仅有 2 个核苷酸差异), 是 *Bacillus megaterium* 的同种不同株系; S_{10} 为芽孢杆菌的一种, 与 *Bacillus hamapalus* 的 16S rDNA 差异仅为 2%。

2.2 A. tanarense 在实验室培养条件下的生长周期及生长特征

实验中发现 20 下, 当藻细胞接种浓度在 100 cell/ml 时, 开始的几天培养液为澄清液。随着细胞的增殖, 培养液的浑浊度逐渐增加。在培养前 8d 中, 光镜下可看到有 2 个或 4 个相连成链的细胞。培养 10d 以后, 仅见到单个细胞, 且藻细胞游动由迅速变为缓慢, 并发现有藻细胞消亡后遗留的空壳板。观察藻细胞培养液, 发现该藻具有明显的趋光性。10d 以后培养液明显开始浑浊, 这时藻细胞的数量呈指数增长, 溶液逐渐变成浅赭红色, 恰似海面上赤潮暴发时的状况。在此之后衰老的藻细胞逐渐开始沉淀于三角瓶底部。

该藻在实验室培养中的细胞密度变化曲线符合典型的微生物的生长规律, 即有明显的延滞期、指数期、稳定期、衰亡期。说明 *A. tanarense* 为一种微型藻类, 其生长特征和大多数微生物存在着共性。

2.3 细菌对 A. tanarense 生长和增殖的影响

表 1 改良 f/2 培养液的组成

Table 1 The ingredients of improved f/2 culture medium for algae

成分 Compounds	数量 Amount	成分	数量
陈海水 (高压灭菌)	1000ml	(微量元素)	
Store seawater			
1. 主要营养盐 Major nutrient			
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022mg		
NaNO ₃	75mg	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01mg
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5mg	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.18mg
		NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.006mg
2. 微量元素 Trace element		3. 维生素 Vitamin	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	4.36mg	B ₁	0.1mg
FeCl ₂ · 6H ₂ O	3.15mg	B ₁₂	0.5 μ g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01mg	Biotin	0.1 μ g

2.3.1 延滞期加入细菌滤液对 *A. tamarense* 生长和增殖的影响 在 *A. tamarense* 生长的延滞期,即最初接种时加入细菌滤液,观察其对藻细胞生长繁殖以及叶绿素含量的影响。结果如图 1~ 6 所示。

其中细菌滤液的浓度的计算:最高浓度即“原液”是细菌密度为 1×10^{12} cell/ml 的细菌悬浊液在常温下经过离心并抽滤得到的上清液, 10^{-1} 为此上清液用无菌海水稀释 10 倍, 10^{-2} 为此上清液用无菌海水稀释 100 倍。加入比例为每 500ml 藻细胞培养液加入 10ml 细菌滤液。换算下来,即 $S_{原液}$ 为密度为 2×10^{10} cell/ml 的细菌悬浊液的滤液, $S_5 \times 10^{-1}$ 为密度为 2×10^9 cell/ml 的细菌悬浊液的滤液。

从图 1 可以看出,加入高浓度 S_5 细菌滤液的实验组中,藻细胞的密度的增长从一开始即受到明显的抑制,其增长十分缓慢,随着培养时间的延长,其抑制作用更为显著。当该细菌滤液稀释到 10^{-1} 和 10^{-2} 浓度时,则对 *A. tamarense* 的生长有一定促进作用。以 $S_5 \times 10^{-1}$ 对藻细胞的促进作用较为显著。稀释浓度为 10^{-2} 的细菌滤液对藻细胞也有一定的促进作用,但比较之下,其效果不如 $S_5 \times 10^{-1}$ 显著。

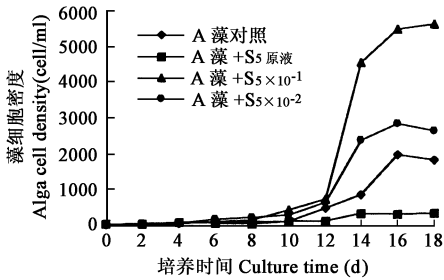


图 1 延滞期加入细菌 S_5 滤液对藻细胞密度的影响
Fig. 1 The effect on alga cell density (cell/ml) when the filtrate of bacteria S_5 is added to *A. tamarense* culture during the lag phase

1. *Temarense* control; 2. *Temarense*+ S_5 ; 3. *Temarense*+ $S_5 \times 10^{-1}$; 4. *Temarense*+ $S_5 \times 10^{-2}$

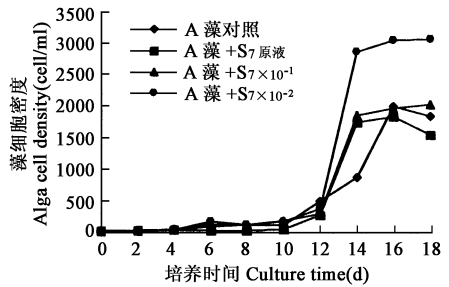


图 2 延滞期加入细菌 S_7 滤液对藻细胞密度的影响
Fig. 2 The effect on alga cell density (cell/ml) when the filtrate of bacteria S_7 is added to *A. tamarense* culture during the lag phase

1. *Temarense* control; 2. *Temarense*+ S_7 ; 3. *Temarense*+ $S_7 \times 10^{-1}$; 4. *Temarense*+ $S_7 \times 10^{-2}$

从图 2 可知,不同浓度 S_7 细菌滤液对藻细胞的作用与 S_5 滤液的作用具有相似的趋势,但有一定的波动。 S_7 原液浓度对 *A. tamarense* 藻细胞在生长初期有一定的抑制作用,但在细胞生长的后期这种抑制作用不明显。 $S_7 \times 10^{-1}$ 和 $S_7 \times 10^{-2}$ 对藻细胞生长有所促进,但促进并不十分显著。 S_7 与 *A. tamarense* 的这种关系是比较微妙和复杂的。

从图 3 可见,加入 S_{10} 细菌滤液的实验组情况与 S_5 基本一致。高浓度 S_{10} 滤液对藻细胞生长的抑制比 S_5

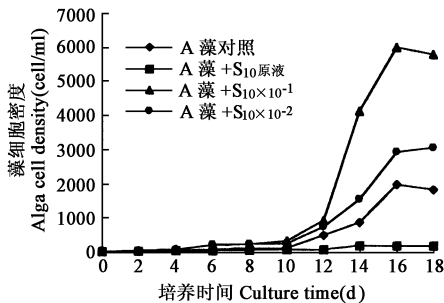


图 3 延滞期加入细菌 S_{10} 滤液对藻细胞密度的影响
Fig. 3 The effect on alga cell density (cell/ml) when the filtrate of bacteria S_{10} is added to *A. tamarense* culture during the lag phase

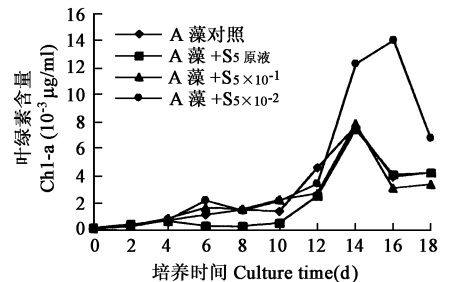


图 4 延滞期加入细菌 S_5 滤液对藻细胞叶绿素的影响
Fig. 4 The effect on alga chlorophyll content ($10^{-3} \mu\text{g/ml}$) when the filtrate of bacteria S_5 is added to *A. tamarense* culture during the lag phase

更为明显。这表明此浓度下的 S_{10} 细菌滤液具有相当强烈的抑藻作用。但是, 较低浓度的细菌滤液, 如加入 $S_{10} \times 10^{-1}$ 和 $S_{10} \times 10^{-2}$ 两组的藻细胞生长则受到明显的促进, 其中 $S_{10} \times 10^{-1}$ 对藻细胞的促进最为显著。与 S_5 相比, 高浓度的 S_{10} 菌液对 *A. tamarense* 有更强的抑制作用, 而低浓度菌液对 *A. tamarense* 的生长具有更明显的促进作用。

在此实验期间藻细胞叶绿素 Chl-a 的变化情况如图 4~ 图 6 可以看到, 高浓度的 $A + S_5$ 原液和 $A + S_{10}$ 原液对藻细胞 Chl-a 含量均有显著抑制作用, 其中 S_{10} 原液的抑制作用更为强烈。由以上结果可以看出, 叶绿素的变化趋势同藻细胞密度基本上是一致的, 因为叶绿素和细胞密度同样是衡量藻细胞生物量多少的指标。两者都证明了高浓度的 S_5 和 S_{10} 细菌滤液对藻细胞的生长确实有抑制作用, 而较低浓度的细菌 S_5 和 S_{10} 滤液, 如 $S_5 \times 10^{-1}$ 和 $S_{10} \times 10^{-1}$ 对藻细胞的 Chl-a 值有显著的促进作用。更低浓度的细菌滤液如 $S_5 \times 10^{-2}$ 和 $S_{10} \times 10^{-2}$ 对藻细胞 Chl-a 值也有促进, 但促进程度较低。细菌 S_{10} 也有类似的作用。

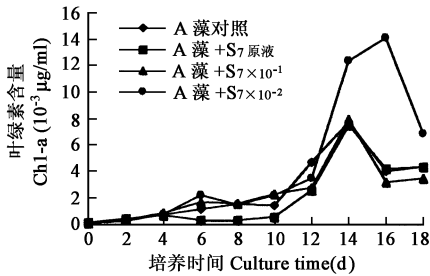


图 5 延滞期加入细菌 S_7 滤液对藻细胞叶绿素的影响
Fig 5 The effect on alga chlorophyll content ($10^{-3} \mu\text{g/ml}$) when the filtrate of bacteria S_7 is added to *A. tamarense* culture during the lag phase

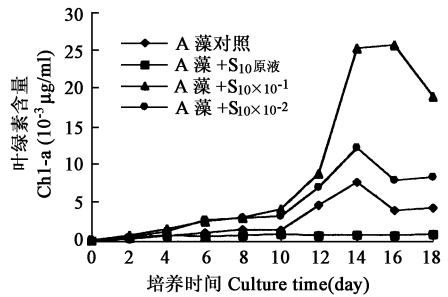


图 6 延滞期加入细菌 S_{10} 滤液对藻细胞叶绿素的影响
Fig 6 The effect on alga chlorophyll content ($10^{-3} \mu\text{g/ml}$) when the filtrate of bacteria S_{10} is added to *A. tamarense* culture during the lag phase

从图 5 可知, 细菌 S_7 的滤液加入藻细胞培养液时, 较高浓度的细菌滤液即 S_7 原液对藻细胞 Chl-a 含量也有一定的抑制作用, 低浓度对藻细胞 Chl-a 含量也有一定的促进作用, 但规律性不明显, 与它对藻细胞密度的作用同样, 具有相当的波动性。

2.3.2 指数期加入细菌滤液对藻细胞生长和增殖的影响 在 *A. tamarense* 生长的指数期, 即接种之后的第 8 天, 加入细菌滤液, 观察其对藻细胞生长和繁殖的影响。结果如图 7~ 图 9 所示。

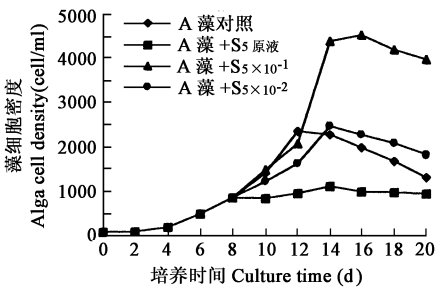


图 7 指数期加入细菌 S_5 滤液对藻细胞密度的影响
Fig 7 The effect on alga cell density (cell/ml) when the filtrate of bacteria S_5 is added to *A. tamarense* culture during the exponential phase

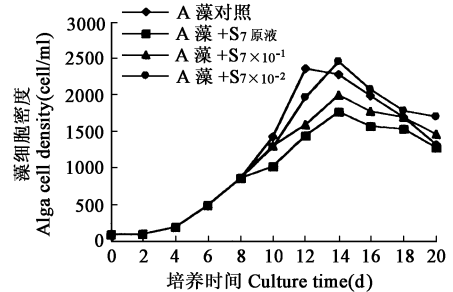


图 8 指数期加入细菌 S_7 滤液对藻细胞密度的影响
Fig 8 The effect on alga cell density (cell/ml) when the filtrate of bacteria S_7 is added to *A. tamarense* culture during the exponential phase

指数期加入细菌 S_7 的滤液, 对藻细胞的生长的影响不甚明显。从图 8 可以看到, 加入高浓度的 S_7 后,

藻细胞的密度有所降低,但幅度不大。在细菌滤液加入的最初,对藻细胞的生长是有一定的抑制作用的。但随着时间的延长,藻细胞逐渐克服了这种抑制,从而密度逐渐增加到接近正常的水平。浓度较低的两组细菌滤液对藻细胞的作用也不明显。联系到延滞期加入 S_7 出现测量值的波动,可以推断在这几种浓度下,细菌 S_7 分泌的物质对 *A. tamarense* 的作用十分有限。

细菌 S_{10} 的情况同 S_5 较为相象。从图 9 可以看出,加入高浓度 S_{10} 滤液的培养液中,藻细胞的密度受到较为明显的抑制。比起延滞期加入同样浓度的 S_{10} 对藻细胞的抑制作用来,其作用程度大大减弱了。这说明在延滞期加入细菌 S_{10} 滤液可以较为有效地控制藻细胞的增殖,而在指数期加入同样浓度的细菌 S_{10} 滤液,其效果不如延滞期显著。

细菌滤液对 *A. tamarense* 藻细胞叶绿素含量的影响见图 10~ 图 12 所示。可以看到,细菌滤液对叶绿素的影响趋势基本上与其对细胞密度的影响相同。比起延滞期加入细菌滤液来,指数期加入高浓度细菌滤液对藻细胞叶绿素含量的抑制幅度大大减小。

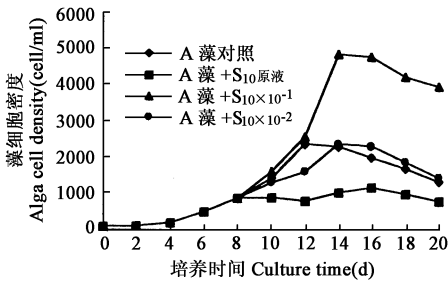


图 9 指数期加入细菌 S_{10} 滤液对藻细胞密度的影响

Fig. 9 The effect on alga cell density (cell/ml) when the filtrate of bacteria S_{10} is added to *A. tamarense* culture during the exponential phase

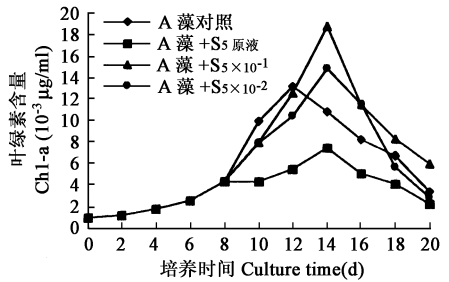


图 10 指数期加入细菌 S_5 滤液对藻细胞叶绿素的影响

Fig. 10 The effect on alga chlorophyll content ($10^{-3} \mu\text{g/ml}$) when the filtrate of bacteria S_5 is added to *A. tamarense* culture during the lag phase

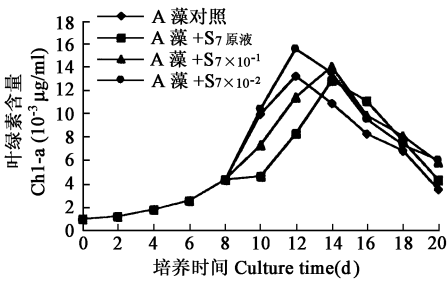


图 11 指数期加入细菌 S_7 滤液对藻细胞叶绿素的影响

Fig. 11 The effect on alga chlorophyll content ($10^{-3} \mu\text{g/ml}$) when the filtrate of bacteria S_7 is added to *A. tamarense* culture during the lag phase

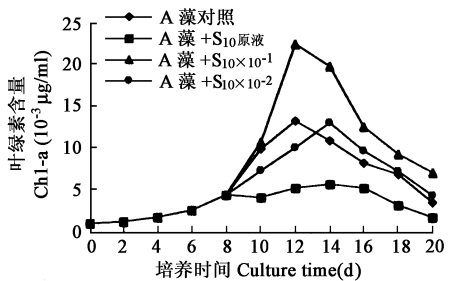


图 12 指数期加入细菌 S_{10} 滤液对藻细胞叶绿素的影响

Fig. 12 The effect on alga chlorophyll content ($10^{-3} \mu\text{g/ml}$) when the filtrate of bacteria S_{10} is added to *A. tamarense* culture during the lag phase

3 讨论

3.1 细菌抑藻作用机理的探讨

3.1.1 细菌的抑藻作用具有明显的种属特异性 Fukami K 等研究细菌的抑藻作用时发现,黄杆菌 *Flavobacterium* sp. 对裸甲藻 *G. mikimotoi* 具有强烈的抑制和杀灭作用,而对 *Chattonella*, *Heterosigma akashiwo* 和骨条藻 *Skeletonema costatum* 均无效。这表明该细菌对 *Gymnodinium nagasakiense* 的杀灭作用是专一的^[5]。本实验中比较 3 株细菌的滤液对 *A. tamarense* 作用的区别,可以发现, S_5 和 S_{10} 对 *A. tamarense* 的作用是比较显著和有规律性的。其中 S_{10} 对藻细胞的抑制和促进都最明显。而细菌 S_7 和 *A. tamarense* 的

关系没有明显的规律并具有相当的波动性。这说明对于同一种藻类, 细菌的作用具有明显的种属特异性。

3.1.2 细菌释放有毒物质到环境中, 非特异性地杀伤藻类 假单胞菌 *Pseudomonas*^[6], 杆菌 *Bacillus*^[7], 弧菌 *Vibrio*, 黄杆菌 *Flavobacterium* sp. 和 *Saprospirira* sp.^[5] 可分泌有毒物质释放于水环境中, 抑制某些藻类如甲藻和硅藻等的生长。本实验中获得的细菌 *S10* 经鉴定为 *Bacillus halimiflavus*。已知铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 可产生大量的抗生素类物质如扩散性吩嗪色素物质, 这些物质对其它细菌和藻类的生长都有抑制作用^[8]。最近有人从这种细菌中提取了几种特异性杀藻的抗生素物质, 其中有些物质如 1-羟基吩嗪和氧氟菌素强烈抑制蓝藻和绿藻的生长。而 *Pseudomonas stutzeri* 可分泌高活性的抑藻物质^[9]。这些物质是已知的对藻类杀伤力最强的细菌产物, 它可杀死顽固的赤潮藻类 *Chattonella antiqua*。Imai 等在日本 Hiroshima 海湾发现 4 株 *Aeromonas* 属的细菌也可以杀死 *C. antiqua*^[10]。Ishio 等在 1993 年从海洋污水中分离出了一种弧菌 *Vibrio alginifestus*, 它可分泌一种“甲藻生长抑制剂 (DGI)”, 可杀死 *C. antiqua*, 不过其毒性不够稳定。而从 *P. stutzeri* 中提取出的 DGI 不仅活性较前者高, 且毒性较稳定 (4 时 3 个月保持不变), 并且对鱼类无害, 所以看来这是比较理想的杀藻物质^[11]。关于杀藻机理, 一般认为它通过作用于生理过程如阻断呼吸链, 抑制细胞壁合成, 抑制孢子的形成等方面, 以达到抑制藻细胞生长或杀灭藻细胞的结果。细菌对藻类的这些抑制作用使人们开始考虑细菌防治赤潮的可能途径^[12, 13]。

本实验也说明, 在细菌滤液中确实存在某种或多种物质可以对 *A. tamarense* 的生长起作用。进一步可以推断, 细菌在其生长的过程中分泌了某些对藻类生长起调控作用的物质。这种物质在较低的浓度下可以促进藻细胞的快速增殖, 而在较高浓度下对藻细胞的增殖起抑制作用。这种物质的作用类似于生长激素, 即高浓度表现为抑制作用, 低浓度则为促进作用。

此外, 细菌也可进入藻细胞内而溶藻^[14]。这是极其少见的事件。与细菌寄生在藻细胞的情况不同, 这种侵入引起了宿主细胞的自溶。

由于藻类和细菌之间存在的这些错综复杂的关系, 使人们在研究浮游植物水华和赤潮的发生、发展、衰落与消亡的机理之时, 不能不考虑细菌的重要性。尤其是细菌对赤潮藻类的杀灭作用, 近年来越来越引起世界赤潮研究领域的重视。细菌杀藻现象为利用微生物防治赤潮提供了可能的途径。此外, 细菌同藻类之间的共生现象是全面研究赤潮机理和赤潮防治对策必须考虑的重要问题。

3.2 防治赤潮, 应该从延滞期着手

从实验中发现, 只要环境适宜, *A. tamarense* 藻即使在实验室条件下进行培养是很容易生长的。可以想象它在天然海水环境中的生长会更加旺盛。该藻在我国和全球广泛分布, 并多次引起海洋和人工养殖虾池的赤潮, 正是因为它有很强的适应性。

比较延滞期和指数期加入细菌滤液对藻细胞的密度和叶绿素影响情况, 在延滞期细菌滤液的抑藻作用要大大高于指数期。因而, 作者认为: 防治赤潮, 应该从延滞期着手, 力图把赤潮藻类的增殖控制在延滞期, 不可使之进入指数期。因为一旦进入指数期, 其增殖的势头则难以遏制。

虽然 *A. tamarense* 在实验室中很容易生长, 但是合适的培养条件还是很重要的。尤其是温度, 它起着决定性的作用。观察到, *A. tamarense* 可以忍受偏低的温度, 但很难在较高温度下生存。在多次的培养实践中, 发现如培养温度高于 28℃, *A. tamarense* 极易在 1~2d 内死亡。

3.3 细菌防治有害赤潮可能途径的探讨

3.3.1 使用经典手段和分子生物学手段研究赤潮期间细菌的时间和空间分布特点, 从而描述细菌与这些藻类在生态系统和功能上的关系。 定期检测海洋菌群的多样性的变化, 以期确定预报赤潮发生的生物指标以及投放多种抑藻菌的准确时间, 以维护海洋环境的平衡关系, 防患于未然。

3.3.2 分离出对赤潮藻类有特殊抑制效果的菌株。 这些菌株可能存在于海底沉积物、海洋污水、或赤潮发生时的海水中。在实验室检测其抑藻效果, 测量其最低抑藻浓度等有关指标, 建立档案以备使用。

3.3.3 分离并鉴定细菌与藻类的生物活性代谢物, 分别研究它们对细菌和藻类生长的效应或毒性, 阐明它们在自然界合成的方式和作用机制。

3.3.4 抑藻细菌或细菌抑藻因子的大量生产。 可采用发酵罐大量繁殖抑藻细菌; 也可采用基因工程手段,

将细菌中产生抑藻因子的基因引入工程菌如大肠杆菌进行大规模生产。大量生产的细菌或抑藻物质制成水剂或片剂,随时可根据需要投放于海水中。

参考文献

- [1] Zheng T L (郑天凌), Zhong T C (庄铁城), Cai L Z (蔡立哲). The role of microbes in bioremediation of marine polluted environment *Journal of Xiamen University* (in Chinese) (厦门大学学报), 2001, **40**(2): 524~ 534
- [2] Su H M. A toxic dinoflagellate first recorded in Taiwan. Proc 1st Int. Symp. on Red Tides, N Y/Elsevire, 1989. 85~ 88
- [3] Qi Y Z (齐雨藻), Qian F (钱锋). Study on the taxonomy of several species of dinoflagellate in Daya Bay. *Oceanologia ET Limnologia Sinica* (in Chinese) (海洋与湖沼), 1994, **25**(2): 206~ 210
- [4] Lin Y S (林元烧). Toxic dinoflagellate—*Alexandrium tamarense* a causative red-tide algae in shrimps pond in Xiamen area *Journal of Oceanography in Taiwan Strait* (in Chinese) 台湾海峡, 1996, **15**(1): 16~ 18
- [5] Fukami K. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, **58**(6): 1073~ 1077.
- [6] Dakham A. Isolation and identification of anti-algal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Phycol.*, 1993, (5): 297~ 306
- [7] Reim R L. The characterization of a *Bacillus* capable of blue-green bactericidal activity. *Can. J. Microbiol.*, 1974, **20**: 981~ 986
- [8] Middelboe M, Sondergaard M, Letarte Y, et al. Attached and free-living bacteria: Production and polymer hydrolysis during a diatom bloom. *Microbial Ecology*, 1995, **29**: 231~ 248
- [9] Dakham A. Stimulatory and inhibitory effects of *Pseudomonas* on the growth of algae. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1989, **1714**: 46~ 51.
- [10] Mai I, Ishia Y, Sakaguchi K, et al. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay. *Japan. Fisheries Science*, 1995, **61**(4): 628~ 636
- [11] Shinsaku Hayashida, et al. Isolation of anti-algal *Pseudomonas stutzeri* strains and their lethal activity for *Charitonella antiqua*. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **55**(3): 787~ 790
- [12] Lin F D (李福东), Zhang C (张诚), Zou J Z (邹景忠). Role of bacteria in the growth process of phytoplankton (细菌在浮游植物生长过程中的作用). *Marine Science* (in Chinese) (海洋科学), 1996, (6): 30~ 33
- [13] Lian Y W (连玉武), Wang Y L (王艳丽), Zheng T L (郑天凌). Advance in the research on interaction between red tide algae and bacteria (赤潮科学中藻菌关系研究的若干进展). *Marine Science* (in Chinese) (海洋科学), 1999, (1): 30~ 35.
- [14] Caola M G & Peilegrini S. Lysis of *Microcystis aeruginosa* by *Bdellovibrio*-like bacteria. *J. Phycol.*, 1984, (20): 471~ 475