

研究综述 REVIEWS

maximum growth of grass shrimp, *Penaeus monodon*, with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg, *Aquaculture*, 1998, **163**(15):201~211

辅助参考文献

王安利、母学全、凌利英。中国对虾配合饲料中Vc添加量的研究,海洋与湖沼,1996,27(4):368~371

徐世昌、刘铁斌等。中国对虾维生素营养的研究,中国对虾Vc营养,青岛海洋大学学报,1994,24(3):364~371

王道尊、冷向军。异育银鲫对Vc需求量的研究,上海水产大学学报,1996,5(4):240~245

韩阿寿、梁亚全、高淳仁。斑节对虾对磷酸酯化维生素C的需求量的研究,水产学报,1996,20(1):88~91

宋进美。不同剂型Vc对罗非鱼生长的影响,水利渔业,1996,6(5):36~38

Dabrowski K, Giereszko A. Ascorbic acid protects against male infertility in a teleost fish, *Aquaculture, Abstract*, 1997, **14**(1):52

Giereszko A. Sperm quality and ascorbic concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin, *Aquac. Abst.*, 1997, **12**(4):2290

L. J. Hardie *et al.*. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 1991, **95**(6):201~214

Guary M., Kanazawa A., Tanaka N. Requirement for ascorbic acid Nutritional requirements of prawn *Mam*, *Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, 1976, **25**:53~57

Kean J. C., Castell J. D., J. rider D. J. Juvenile lobster (*Homarus americanus*) do not require dietary ascorbic acid, *Aquact. Euro*, 1985, **3**(8):368~370

Shiau S. Y. *et al.*. Vitamin C requirement of grass shrimp, *Penaeus monodon*, as determined with L-ascorbyl-2-monophosphate, *Aquaculture*, 1997, **122**(4):347~357

Eya J. C. "Brokerskull disease" in African catfish *Clarias gariepinus* is related to a dietary deficiency of ascorbic acid, *J. World Aquac. Soc.*, 1996, **27**(4):493~498

Blom J. H., Dabrowski K. Ascorbic acid metabolism in fish: is there a maternal effect on the progeny?, *Aquaculture*, 1996, **147**(3/4):215~224

Akand A. M., Sato M. Effect of graded levels of dietary ascorbic acid on mobilization of calcium and phosphorus in rainbow trout, (*Salmo gairdnerii*), *Nutr. Abst. Rev.*, 1997, **64**(1):214

Catacutan M. R., Latavilla-Htogo C. R. L-Ascorbyl-2-phosphate-Mg as a source of vitamin C for juvenile *Penaeus monodon*, *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 1997, **46**(1):40~47

(本文编辑:刘珊珊)

海洋微藻胞外产物研究进展*

ADVANCES IN STUDIES ON THE EXTRACELLULAR PRODUCTS OF MARINE MICROALGAE

高亚辉 荆红梅 黄德强 杨心宁

(厦门大学生命科学院 361005)

海洋微藻是海洋生态系统中的最主要初级生产者,具有种类多、数量大、繁殖快等特点,在海洋生态系统的物质循环和能量流动中起着极其重要的作用。Fogg 1966年和 Hellebust 1974年研究发现,海洋微藻在生长过程中会不断向周围环境中释放多种代谢产物,如碳水化合物、氨基酸、酶、脂类、维生素、有机磷酸、毒素、挥发性物质以及抑制和促进因子等。这些产物统称为胞外产物(Extracellular products,

* 厦门大学国家教育部海洋生态环境开放研究实验室(MEE)开放基金(MEE9903)、教育部留学回国人员科研启动基金(教外司留[1999]363号资助项目)。

第一作者:高亚辉,出生于1963年,教授(博士),主要从事微藻分类生态和生理生化研究。Email: gaoyh@jingxi-an.xmu.edu.cn

收稿日期:2001-06-25;修回日期:2001-12-10

ECP)。胞外多聚物 (Extracellular polymeric substance, EPS) 是胞外产物的一大类别。ECP(或 EPS) 是海水中化学物质的一个重要来源,它们在海洋生态系统碳循环、微食物环、藻-菌(藻、其他生物)的相互作用中起着重要作用。海洋微藻 ECP 研究与海洋生产力、物质循环、能量流动、赤潮、水产养殖等方面研究密切相关。因而,海洋微藻 ECP 的研究引起了海洋学家的高度重视,成为目前海洋科学研究的热点之一。关于海洋 ECP 的研究国内外已有不少报道,但研究对象多为细菌(尤其是蓝细菌)、大型藻类、无脊椎动物等。我国海洋微藻 ECP 的研究工作与国外相比,开始较晚,水平较低,相关报道较少。本文简要综述了海洋微藻 ECP 几个方面的研究进展,并展望了 ECP 在抗菌方面的作用。

1 胞外溶解有机碳

海洋中的有机碳是全球最大的储碳库之一,其有机碳主要以颗粒有机碳 (Particle organic carbon, POC) 和溶解有机碳 (Dissolved organic carbon, DOC) 的形式存在。海洋环境中 POC 是生态系统中物质循环和能量流动研究的主要内容,也是评价海区初级生产力水平的一个重要参数。POC 在水体中的含量变化与微藻的初级生产力、POC 的垂直通量等因素有关。海水中的 DOC,即溶解有机物质,可在 1 000 ~ 10 000 年时间尺度影响大气 CO₂ 的含量,认识其变化过程对研究全球碳循环十分重要。近年来,由于大气中 CO₂ 浓度增加和温室效应引起的气候变化引起了科学家对碳循环的重视。

海洋微藻通过光合作用合成有机碳是海洋中 DOC 的重要来源之一。Carslo 1998 年通过示踪实验发现,由微藻固定的碳至少有 5% ~ 10% 以 DOC 形式释放到水体中,有的藻类释放 DOC 高达 10% ~ 25%^[2]。其中有些不稳定的 DOC,很快被细菌分解而参与再循环。藻类在何种生长情况下释放的有机碳最多,不同研究者有不同的看法。有人认为有机碳的释放是健康细胞的行为,也有人认为细胞在营养盐限制和衰老时高速释放 DOC。Willams 等 1990 年指出,生长状况良好的、处于指数期的硅藻也只释放光合作用所合成碳量的 10% 以下;而在水华后期藻细胞大量死亡时,释放有机碳量达到 17% ~ 38%。

¹⁴C 标记是研究碳吸收和释放的常用技术。在 130 lx 光强下,可检测到 *Synura petersenii* 对 ¹⁴C 的吸收; 1 000 lx 和 2 000 lx 光强下,(DOC) - ¹⁴C 释放均较少;

基本分析表明释放的高分子量部分是胞外杂多糖^[3]。聚球藻 (*Synechococcus bacillaris*)、棕囊藻 (*Phaeocystis* sp.) 等有毒藻类在生长过程中,DOC 的产生速率约为 5 ~ 13 μmol/d,构成了总有机碳 (TOC) 的大部分 (约为 10% ~ 32%); 在人工培养基中培养 14 d 后,其 DOC 的释放与总有机碳 (TOC) 的产生之间有一个近似的摩尔平衡,DOC 与 POC 随着细胞周期增多,分别构成了 TOC 的 18% ~ 45% 和 26% ~ 80%^[4]。自然水体中 POC 与 DOC 的释放平衡最终影响食物网的结构,尤其是藻类与异养细菌之间的相互作用以及生物汇集碳的速率和机制。

2 胞外氮

水中溶解有机氮 (DON) 是水体微生物的重要氮源,主要是由微藻释放的^[5]。硅藻从外界吸收的硝酸盐约有 1% 以 DON 的形式分泌到外界,释放速率约为 10.4 ~ 13.3 nmol/h。DON 的释放可能是通过膜被动运输的。较小微藻比较大微藻的 DON 释放效率更高。胞外 N 的释放百分比接近或少于 C 的胞外释放百分比。水体中胞外溶解 DNA (dDNA) 可能是浮游微生物最主要的 N、P 营养的潜在来源,藻类是 dDNA 的最重要来源,而细菌则是它主要的分解者。黄群藻 (*Synura* sp.) 的胞外溶解有机物经分光光度计检测,得到大量蛋白质。该藻同时产生具有对铜高度亲和、对铅中度亲和特性的一个主要配体。水网藻 (*Hydrodictyon reticulatum*) 在暗中吸收硝酸盐的速率为白光下的 1/5,在缺少碳源时,吸收、还原的氮主要以铵的形式释放,从而导致胞外进一步碱化。N 营养限制条件下的 *Dunaliella tertiolecta* 在光照时向外界分泌大量氨基酸 (约 100 nmol/10⁶ 个细胞),而在黑暗条件下消失^[6]。Reisser 等 1993 年有报道在一富养湖泊中,藻类细胞被病毒溶解而急剧减少后,水体中 dDNA 的量增多,主要是分子量低于 500 bp 的 DNA。该系统可用于分析水体中藻类与病毒之间的动态相互关系。

迄今,对于海洋微藻胞外溶解有机碳尤其是胞外多糖的报道较多,主要包括多糖的合成分泌机制、结构、种类等;而胞外溶解有机氮的分泌机制、主要化合物种类还未有系统、详细的报道。

3 胞外酶

目前关于胞外酶的研究主要集中在细菌、真菌方面,藻类胞外酶研究较晚,相关报道不多。近期已陆续发现有关微藻胞外酶的报道,如胞外碳酸酐酶、胞

外氨基酸氧化酶等。

碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase) 是一含 Zn 的金属酶,可催化 HCO_3^- 与 CO_2 的相互转化。迄今,已在很多微藻中发现胞外 CA 酶。该酶主要使藻细胞利用水体中 HCO_3^- 进行光合作用, HCO_3^- 在靠近藻细胞表面处脱水成 CO_2 ,再经扩散或主动运输至细胞内。胞外 CA 酶缺乏时,微藻细胞直接利用 CO_2 。因而,胞外酶是 HCO_3^- 和 CO_2 在光合作用中得到有效利用的重要调节因子。胞外 CA 酶是一诱导酶。三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) 在生长早期已有胞外碳酸酐酶,而直至静止期,部分总溶解无机碳消耗后,自由 CO_2 浓度 $< 5 \mu\text{mol/L}$, HCO_3^- 浓度 $< 1 \text{mmol/L}$ 时,胞外 CA 才能检测到。当碳营养充足细胞转入低碳环境中,几分钟内便可检测到 CA 酶。此过程需光,且能被 3,3',4'-dichlorophenyl-1,1-dimethylurea (DCMU) 阻抑。另外再加入 DIC(溶解无机碳),则 CA 活性又减弱。CA 酶的阻抑子为膜不透性的 Dextranbound sulphanamide (DBS),通过影响 CA 酶活性而影响光合速率。在 DIC 最低浓度 $< 0.1 \mu\text{mol/L}$ 时,细胞具有最大的胞外 CA 活性,DBS 丧失了 38% 的抑制光合速率特性。表明 CA 酶在碳源有限环境下,保持高速光合作用的关键作用。目前推测:调节胞外 CA 活性的关键因子为流入细胞的总无机碳量,它同时也决定着流入叶绿体的总无机碳量。当总碳源不足以支持光合作用时,则胞外 CA 酶被激活,以调节 CO_2 与 HCO_3^- 之间的相互作用^[7]。

Quarmby 1994 年证实在水中 NH_4^+ 处于检测的极限、硅藻生物量水平已显示水华时,其胞外氨基酸氧化酶出现最高活性,而在水华期间无活性。该酶活性出现表明硅藻在寡营养水中吸收了较多的 NH_4^+ 。

硅藻胞外 -N-乙酰葡糖胺酶具有水解作用。其总酶活性 (TEA) 范围为 $0.2 \sim 19.1 \text{nmol/h}$,低亲和力酶活性 (LEA) 约为 TEA 的 60%。LEA 与硅藻生物量随着时间延长而呈现显著相关 $r(s) = 0.578$ 。该酶活性可能部分起源于附着在硅藻细胞上的分解甲壳质细菌的胞外酶,或来自于硅藻的其他胞外酶,使之能从周围水体氨基糖中吸收 -N-乙酰葡糖胺,而不用自身合成^[8]。

4 胞外产物与细菌的关系

Bell 等 1972 年指出,藻类细胞生长过程中不断向周围释放许多代谢产物,使藻细胞周围形成了一种独特的可称为藻际 (Phycosphere) 的微环境,在这种营养丰富的环境中聚集着大量细菌。微藻的天然胞外产

物包括:碳水化合物、脂类、肽、挥发性物质、有机磷酸、维生素、毒素、抗生素等。藻际中细菌与藻细胞间具有复杂的相互关系。藻细胞在新陈代谢过程中产生并分泌于水体的有机物质,被周围细菌摄取后,一部分经细菌代谢后以矿物或其他形式释放回海洋中,又为藻类生长提供营养及必需的生长因子。此外,Ohta 1993 年指出,藻菌间还普遍存在拮抗作用,如藻类能产生抑制细菌生长的抗生长类物质,细菌也能抑制藻类生长甚至裂解藻细胞。因而藻际关系研究对于探索生态系统内物质循环和能量流动、赤潮发生机制及防治途径均有重要意义^[1]。

微藻与细菌之间的相互作用在时间和空间上有很大变化。一般情况下,混合培养时,细菌的氨肽酶和 -葡糖酐酶活性在 70 h 后强烈升高;而纯培养时,直至 50 ~ 70 h 后其活性稍升高,但随后急剧下降。有藻类和颗粒多聚物存在时,细菌的高速生长和胞外水解酶活性的增加,导致细菌对有机营养的高度矿化,增加了藻类生长。而某些情况下,细菌与藻类竞争营养而抑制藻类生长。因而水体中污染物可改变细菌与微藻之间的相互作用,从而影响微环境及全球环境中营养物质和碳的流量和循环。

在藻类生物膜上生长的细菌可能是以藻类分泌物作为能源,并以无机营养成分进行生长。近期常采用 ^{14}C 来研究藻类光合作用产生的溶解有机碳 (DOC) 的分子大小、生化组成及被异养细菌利用的情况。Sudh 1992 年用加 $\text{HCO}_3^- - ^{14}\text{C}$ 的培养液培养一昼夜后,用选择性过滤法除去藻类(滤液中含有细菌),在黑暗中培养,则异养培养之间与之后收集样品的量及组分差异即为细菌利用结果。在异养培养最初阶段收集的 $\text{DOC} - ^{14}\text{C}$ 常含有高分子量和低分子量的组分(有时含中等分子量成分)。在有污染的湖泊中,中等分子量组分占净 $\text{DOC} - ^{14}\text{C}$ 的绝大部分,被细菌利用最快,该部分可能全部由分子量约为 6 000 D 的多糖组成。氨基酸、多肽、其他有机酸、碳水化合物是被异养细菌利用的较重要的低分子量 $\text{DOC} - ^{14}\text{C}$ 组分,但每种的利用率相差较大。通常细菌利用低分子量组分相对较快而高分子量组分较弱或无利用。可能 DOC 的低分子量组分较高分子量组分对细菌更为重要。藻类释放的 DOC 并不包括任何情况下可作为细菌底物的物质,其中的高分子量成分可能有助于构成海洋环境中高分子量溶解有机碳。

硅藻分泌物主要为低分子量化合物 ($< 1 \text{kD}$),而蓝藻释放的主要为高分子量化合物 ($> 100 \text{kD}$)。低分

子量化合物和多糖是胞外有机碳 (EOC) 的主要成分。当水体中硅藻为优势种时,细菌吸收 EOC 的速度较蓝藻占优势时更快;在蓝藻水华时,细菌吸收低分子量化合物 (< 1 kD) 较其他成分更快。表明:细菌随 EOC 组分变化而快速反应,吸收率随藻类中优势种不同而不同^[9]。

水体中的细菌活动是由几个生物因子尤其是微藻所控制的。集胞藻 (*Synechocystis* sp.) 的胞外产物能减少大肠杆菌和沙门氏菌的生长,促进霍乱弧菌的生长^[1]。无论在无菌还是混合(有菌)培养条件下,藻类均活跃分泌 DOC(溶解有机碳),但其浓度会有所变化。藻类抗菌活性的变化是与藻类生长阶段相关的。有些藻类的最大抗菌活性出现在对数期,而有的出现在静止期。以 N、P 作为藻类营养限制因子时,细菌能影响藻类存活率,其影响程度主要依赖于藻类生长的营养限制类型及培养条件^[10]。

在过去的几十年中,微藻作为抗菌和药用活性物质日益受到重视。已分离和鉴定了大量新颖结构的抗菌化合物。微藻作为不能经化学合成的生物活性分子的自然来源尤其受到重视。藻类产生的这些化合物早已在药剂学中作为有效的外用抗菌、抗感染物质。然而,用于其他治疗目的,如在以小鼠为处理对象的实验中无活性或相反地对测试动物有极强的毒性,与我们的期望相悖。且同一藻种在生长的不同阶段分泌的物质不同,其抗菌活性也有变化。同时,关于这些胞外化合物的抗生性究竟是专一的,还是广谱的;其在环境中所能达到的最高浓度;对某一菌种产生抗性的特定浓度还不甚了解;对于藻类潜在病原体的抗性效应仍需进一步证实。

5 结语

目前,国内外关于海洋微藻胞外产物方面的研究以胞外碳,尤其是胞外多糖为最多,主要围绕多糖的形态结构和分泌机制、胞外溶解有机碳的分泌及其生态作用等问题进行,有关胞外酶、其他胞外产物的组成、产生的内外环境条件、对水体溶解有机物的贡献和细菌的再利用等研究相对较薄弱。加强该方面的研究将进一步揭示微藻胞外产物在海洋生产力、海洋生物地球化学循环、微型食物网中的作用及在药物和保

健品开发利用方面潜在的应用前景。

主要参考文献

- 1 林伟、陈弱。微藻与细菌相互关系研究在海水养殖中的重要意义,海洋科学,1998,22(4):34~37
- 2 Carsol C. A. et al. . Organic carbon partitioning during phytoplankton spring blooms in the Ross Sea polynya and the Sargasso Sea, *Limnology and Oceanography*, 1998, 43(3): 375~386
- 3 Vieira A. A. H. et al. . Release of dissolved organic matter in a tropical strain of *Synura peterseii* (Chrysophyceae) grown under high irradiances, *Phycologia*, 1998, 37(5): 357~362
- 4 Biddanda B. et al. . Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton, *Limnology and Oceanography*, 1997, 42(3): 506~518
- 5 Cho. J. C. . Response of bacterial communities to changes in composition of extracellular organic Carbon from phytoplankton in Daechung Reservoir (Korea), *Archiv. Fur. Hydrobiologie*, 1997, 138(4): 559~576
- 6 Lebourlangier C. et al. . Photorespiration in continuous culture of *Dunaliella tenuiolecta* (Chlorophyta): Relationships between serine, glycine, and extracellular glyoxalate, *Journal of Phycology*, 1998, 34(4): 651~654
- 7 Iglesiasrodriguez M. D. et al. . Bicarbonate utilization by marine phytoplankton species, *New Phytologist.*, 1997, 135(1): 163~168
- 8 Vrba J. et al. . Extracellular lowaffinity beta-Nacetylglucosaminidases linker to the dynamics of diatoms and crustaceans in freshwater systems of different trophic degree, *International Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 1997, 82(2): 277~286
- 9 Oufdou K. et al. . Experimental study of the effect of *Synechocystis* sp. (Picrocyanobacteria) on the behaviour of some bacteria of sanitary interest, *Annales de Limnologie International Journal of Limnology*, 1998, 34(3): 259~268
- 10 Brussaard C. P. D. et al. . Influence of bacteria on phytoplankton cell mortality with Phosphorus or Nitrogen as the algal-growthlimiting nutrient, *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, 14(3): 271~280

(本文编辑:张培新)