

李东,安新丽,傅丽君等. 2013. 溶藻细菌 BS03 分离、鉴定及其对塔玛亚历山大藻生长的影响[J]. 环境科学学报, 33(1): 44-52

Li D, An X L, Fu L J, et al. 2013. Isolation, identification and characterization of algicidal bacterium BS03 against *Alexandrium tamarense* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 33(1): 44-52

溶藻细菌 BS03 分离、鉴定及其对塔玛亚历山大藻生长的影响

李东^{1,2}, 安新丽², 傅丽君^{2,3}, 林毅¹, 郑天凌^{2,*}

1. 华侨大学化工学院, 厦门 361021

2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室及滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门大学生命科学院, 厦门 361005

3. 莆田学院环境与生命科学系, 莆田 351100

收稿日期: 2012-02-27

修回日期: 2012-03-28

录用日期: 2012-04-06

摘要: 从福建漳江口红树林区筛选出一株对产贝毒赤潮原因藻——塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamatense*) 具有强溶藻能力的细菌, 命名为 BS03, 通过生理生化及 16S rDNA 序列分析对该菌株进行鉴定, 并探讨了菌株 BS03 对塔玛亚历山大藻的溶藻特性和溶藻代谢产物的初步性质。结果发现, 菌株 BS03 属于微泡菌属 (*Microbulbifer* sp.) 相似性达 99%; 对塔玛亚历山大藻的杀藻效果具有一定浓度效应, 在一定浓度范围内处理浓度越高, 溶藻效果越好; 菌株 BS03 对处于不同生长时期的塔玛亚历山大藻都表现出较好的杀藻效果, 其中对处于延滞期的塔玛亚历山大藻表现出最佳的杀藻效果, 处理 96 h 后, 抑藻率达 98.17%; 不同生长期菌株对塔玛亚历山大藻溶藻作用无明显差异; 菌株 BS03 通过间接作用方式溶藻, 所分泌的胞外活性物质的分子量小于 1 kDa, 耐酸碱、具热稳定性, 推测为非蛋白质、非核酸和非多糖类物质。

关键词: 溶藻细菌; 溶藻活性物质; 赤潮; 塔玛亚历山大藻

文章编号: 0253-2468(2013)01-44-09

中图分类号: X172

文献标识码: A

Isolation, identification and characterization of algicidal bacterium BS03 against *Alexandrium tamarense*

LI Dong^{1,2}, AN Xinli², FU Lijun^{2,3}, LIN Yi¹, ZHENG Tianling^{2,*}

1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021

2. State Key Lab of Marine Environmental Science and Key Laboratory of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005

3. Department of Environment and Life Science, Putian University, Putian 351100

Received 27 February 2012;

received in revised form 28 March 2012;

accepted 6 April 2012

Abstract: A bacterial strain, BS03, exhibiting strongest activity against the toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamatense*, was isolated from the Zhangjiang Estuary Mangrove National Natural Reserve, China. Based on 16S rRNA gene sequences and biochemical and morphological characteristics, the strain BS03 was determined to be *Microbulbifer* sp. on the basis of 99.0% similarity with reference strain sequences from the NCBI. The growth of *A. tamatense* was strongly suppressed by BS03 in all growth phases. With the strongest algicidal activity noted against harmful algae in the lag stage, the removal rate of *A. tamatense* reached 98.17% after 96 h. In addition, the initial concentration of the bacterial culture strongly affected the algicidal ability. The higher concentration of the bacterial culture was, the stronger algicidal activity to the *A. tamatense*. Furthermore, BS03 indirectly attacked *A. tamatense* by algicidal substances. The molecular weight of algicidal compounds were less than 1 kDa, and heat tolerant and stable in acidic and alkaline conditions. According to our results, we speculated the algicidal compounds could not be proteinaceous, nucleate and polysaccharide. These findings indicated that strain BS03 could be a potential bio-agent for future use in controlling harmful algal blooms.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目、面上项目 (No. 40930847, 31070442); 福建省自然科学基金 (No. 2010J01150); 海洋公益性行业科研专项经费资助 (No. 201305016, 201305041, 201305022)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40930847, 31070442), the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2012J01150) and the Public Science and Technology Research Funds Projects of Ocean (No. 201305016, 201305041, 201305022)

作者简介: 李东 (1986—), 男, E-mail: lidongbox2006@163.com; * 通讯作者 (责任作者) E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn

Biography: LI Dong (1986—), male, E-mail: lidongbox2006@163.com; * **Corresponding author** E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn

Keywords: algicidal bacterium; algicidal substances; harmful algal blooms; *Alexandrium tamarense*

1 引言(Introduction)

塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)是一种能产生麻痹性贝毒素(PSP)的海洋甲藻(洪专等, 2006),是当前有害赤潮主要原因藻种之一,其所产生的PSP毒素不仅对生态环境产生不利的影响同时也对人类的健康及海洋经济的发展造成了巨大的威胁。鉴于塔玛亚历山大藻的各种危害,对其的防治显得越来越重要。当前藻类控制技术可归结为:物理方法、化学方法及生物防治,其中溶藻微生物防治技术因具有成本低、安全性好的潜能,引起了越来越多研究人员的关注(Chen *et al.* 2012; Paul *et al.* 2011; 王新等, 2010)。溶藻细菌(Algicidal bacteria)是一类以直接或间接方式抑制藻类生长,或杀死藻类、溶解藻细胞的细菌的统称,具有较好的生态安全性,尤其适合在赤潮发生初期使用,在短期内即可达到控制藻类生物量,阻止藻类大量增殖的效果,势必成为赤潮生物防治的一个重要手段(Shi *et al.* 2006)。目前,国内外已有不少对溶藻细菌的报道,主要有:黄杆菌属(*Flavobacterium*) (Yoshikawa *et al.* 2000)、噬纤维菌属(*Cytophaga*) (Imai *et al.* 1993; Mitsutani *et al.* 1992)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*) (Su *et al.* 2011)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*) (彭超等, 2003)、黏细菌属(*Myxobacter*) (Shilo, 1970)、芽孢杆菌属(*Bacillus*) (Kim *et al.* 2009)等。但对于溶藻菌的研究多局限于菌株分离、鉴定、溶藻现象的描述,且研究的菌株大多是针对原核藻类,针对真核藻类的菌株已见报道的较少(Choi *et al.* 2005; Gumbo *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011)。课题组从红树林沉积物中分离得一株高效去除塔玛亚历山大藻的溶藻菌BS03,利用16S rDNA序列分析方法对其进行鉴定,并对菌株溶藻及胞外活性物质性质进行初步探讨,以期为进一步寻找及开发有价值的溶藻微生物提供参考。

2 材料与方法(Materials and methods)

2.1 供试菌株、藻种及其培养

①供试菌株BS03分离自福建漳江口红树林区沉积物,采用2216E培养基(Wang *et al.* 2010),于 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 28℃摇床振荡培养。②供试藻种为产麻痹性贝毒的塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense* ATGD98-006),由暨南大学水生生态研究

所提供。采用f/2培养基(Su *et al.* 2011),于光强 $50\text{ }\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、温度 $(20\pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$ 、昼夜比L:D=12 h:12 h的条件下培养。③实验中所涉及的处理终浓度均以菌株BS03处理液添加到藻液的体积比计算。

2.2 实验方法

2.2.1 溶藻细菌的分离 从漳江口红树林区称取沉积物样品,按质量比1:50的比例加入到已灭菌的f/2培养液里,外加无菌的细玻璃珠,漩涡振荡至泥样均匀分散并使其静置15 min后,吸取5 mL上清液移到装有50 mL处于生长对数期的塔玛亚历山大藻培养液中,并以加入等体积无菌液体2216E培养基为空白对照。每隔6 h于光学显微镜下观察塔玛亚历山大藻的生长状况,挑选出现大量藻细胞死亡的培养液作为筛选溶藻菌的材料。将挑选的藻培养液用无菌海水梯度稀释并吸取100 μL 溶液涂布至2216E平板培养基上,在28℃条件下培养2~7 d,用接种环挑选出菌落特征差异大的细菌进行平板划线法纯化菌种。纯化的细菌在2216E液体培养基中培养24 h后,用20%甘油将其保存在-70℃冰箱中。

2.2.2 菌株BS03的电镜观察 将菌株BS03接种到2216E固体平板上,于28℃恒温培养24~36 h;滴1滴2%PTA(磷钨酸)于载玻片上,接种环挑取少许菌体于液滴内;将铜网放置液滴内,染色2 min,取出铜网,烘干,即可置电镜下观察。

2.2.3 菌株BS03生长曲线测定 将保存在固体培养基上的菌株BS03接种到装有5 mL灭菌的2216E液体培养基的试管中,经过12 h培养活化后,用无菌移液枪按1.0%的接种量接种到装有100 mL 2216E培养基的三角瓶中,于28℃, $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 进行培养,每隔4 h取样,在分光光度计上测 OD_{600} 值。

2.2.4 菌株BS03生理生化、分子鉴定和系统发育

1) 菌株BS03特性的鉴定

参照API方法及其他生理生化鉴定(东秀珠等 2001),对菌株BS03进行20E和ZYM等生理生化指标测定。

2) 菌株BS03分子生物学鉴定

用厦门鹭隆生物公司DNA通用纯化试剂盒提取细菌DNA,以所取DNA为模板,用27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R: 5'-

GGTTACCTTGTTACGACTT-3'通用引物进行 PCR. PCR 反应体系如下: 27F 1 μL , 1492R 1 μL , DNA10 μL , TaqDNA 聚合酶 0.5 μL , 10 \times Buffer 5 μL , dNTPs 1 μL , 加 ddH₂O 补足至 50 μL . 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 循环数 30, 在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下充分延伸 8 min. 取 2 μL PCR 反应产物用浓度为 1.0% 的琼脂糖凝胶, 于 120 V 电压下电泳, 电泳完毕将凝胶置于紫外灯下进行观察. 回收 PCR 产物并同 pMD18-T 载体相连, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆子, 验证有正确插入的片段, 送出测序. 将所获得有效序列在 NCBI 上进行比对, 选取与所测序列相似性较高的种或属 (Jurkevitch, 2000), 应用 clustalx 和 MEGA4 生物软件, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树.

2.2.5 菌株 BS03 溶藻方式的探讨 将培养至对数生长期的 BS03 菌液, 分别取 50 mL 设置以下 5 种处理: A 为菌培养液, 即菌株发酵后所得, 未经任何处理; B 为无菌上清液, 即 A 经 1.0×10^4 g 离心 10 min, 取上清经 0.22 μm 滤膜过滤后所得; C 为菌悬液, 即 A 经 1.0×10^4 g 离心 10 min, 弃上清, 菌体沉淀经无菌 f/2 洗涤 3 次, 重悬于 50 mL 无菌 f/2 培养基中所得; D 为菌培养液 + 2216E, 即 A 补加 10% 终浓度的无菌 2216E 液体培养基所得; E 为菌悬液 + 2216E, 即 C 补加 10% 终浓度无菌 2216E 液体培养基所得. 将上述 A、B、C、D、E 5 种不同的处理液进行溶藻效果验证, 每种处理液分别按终浓度 0.5%、1.5%、2.0% 3 个水平添加到 250 mL 装有 100 mL 对数生长期的塔玛亚历山大藻培养液的三角瓶中进行培养, 同时设 2 个对照: control 1 为藻培养液添加 1.5% 2216E 液体培养基; control 2 为添加 1.5% 无菌 f/2; 各组试验和对照均设定 3 组重复, 培养取样后藻液用鲁戈氏碘液固定染色, 在光学显微镜下用血球计数板计数, 每隔 12 h 计算抑藻率, 测定溶藻效果.

塔玛亚历山大藻抑藻率 (Inhibition Rate, IR) 定义为:

$$IR = (N_c - N_i) / N_c \times 100\% \quad (1)$$

式中, N_c 为 control 2 对照组塔玛亚历山大藻浓度 (个 $\cdot\text{mL}^{-1}$); N_i 为处理组塔玛亚历山大藻浓度 (个 $\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.2.6 塔玛亚历山大藻与菌株 BS03 所处生长期对溶藻效果的影响

1) 菌株 BS03 对不同生长期的塔玛亚历山大藻溶藻效果的影响

取对数期的菌株 BS03 上清液, 按 1.5% 的终浓度, 分别加入到 100 mL 延滞期 (10^3 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$)、对数期 (4×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$)、稳定期 (10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$) 藻液中; 以相同条件下添加等体积 2216E 培养基作为对照. 所有试验均设置 3 组重复.

2) 不同生长期的菌株 BS03 对塔玛亚历山大藻溶藻效果的影响

分别取延滞期、对数期和稳定期的菌株 BS03 上清液, 按 1.5% 的终浓度, 加入 100 mL 对数期的藻液中; 在相同条件下以添加等体积的 2216E 培养基作为对照, 所有试验均设置 3 组重复.

2.2.7 菌株 BS03 溶藻物质性质初探

1) 透析

取无菌上清液 5 mL 于透析袋 (MWCO = 1 kDa) 内, 室温下无菌海水透析 24 h 后, 转入新鲜无菌海水中继续透析 24 h; 将透析袋内透析液吸出, 透析袋外透析液浓缩, 均用蒸馏水稀释到原体积, 分别按 1.5% 的终浓度接入藻液中, 进行溶藻活性检测.

2) 乙醇沉淀

取 50 mL 无菌上清液加入 3 倍体积无水乙醇, 常温下静置 10 min, 以 5.0×10^3 g 离心 10 min, 收集上清液和沉淀. 将收集的上清液经 45 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至 50 mL 后, 再次加入 3 倍体积的无水乙醇, 重复上述步骤两次. 将收集的上清液经 45 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转至干后, 用无菌 2216E 溶解残留固体并定容至 50 mL, 将 3 次收集的沉淀用少量无菌 2216E 溶解合并后定容至 50 mL, 另取未处理过的无菌上清液 50 mL 为 control. 将溶解相、沉淀相、原上清液分别按 1.5% 的终浓度接入藻液中进行溶藻活性检测.

3) 热稳定性

取无菌上清液 20 mL 分别在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 、100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min, 以及 120 $^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min, 以 25 $^{\circ}\text{C}$ 处理为 control, 将各处理液按 1.5% 的终浓度接入藻液中进行溶藻活性检测.

4) 酸碱稳定性

取无菌上清液 20 mL 2 份, 用 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 和 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 溶液分别调 pH 至 11 和 3, 室温放置 2 h, 再回调至原始 pH, 以原上清液作为对照, 各处理液按 1.5% 的终浓度接入藻液中进行溶藻活性检测, 以上所有实验设 3 组重复.

3 结果与讨论(Results and discussion)

3.1 菌株 BS03 生长特征

菌株 BS03 在 2216E 固体培养基上于 28 °C 培养 2~3 d 后,可以观察到菌株 BS03 菌落为乳白色,呈椭圆形,有的连成链状,边缘圆整,稍有隆起,菌体表面湿润光泽,不透明. 菌株 BS03 的电镜照片如图 1 所示. 细胞形状为杆状,大小为(0.5~1.0) μm \times (2.0~6.0) μm ,有鞭毛. 菌株在 0~4h 处于生

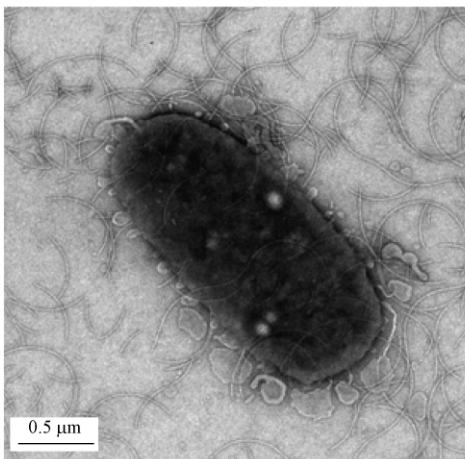


图 1 菌株 BS03 的电镜照片

Fig. 1 Transmission electron microscopy of strain BS03

长延滞期; 4~36 h 处于生长对数期,此时细菌生长旺盛,代谢活力最强,菌体急剧扩增,新物质的合成速度最快,对不良环境的抵抗力强; 36~40 h 处于生长稳定期,时间较短; 40 h 后进入生长衰亡期,菌体数量不断下降. 菌株 BS03 的生理生化试验测定结果表明,BS03 为革兰氏阴性菌,可水解淀粉,但不能使牛奶凝固,能使明胶液化,并能较好地利用纤维素.

3.2 菌株 BS03 系统发育分析及 16S rDNA 鉴定

菌株 BS03 16S rDNA 基因 PCR 扩增后,得长度约 1.5 kb 的片段,产物单一,产量较大. 测序后获得全长为 1456 bp 的 16S rDNA 序列,提交至 GenBank 数据库后,用 Blast 比对分析,发现该菌株与微泡菌属(*Microbulbifer* sp. [DQ993341]) 的序列相似性为 99%. 结合菌株形态、菌落特征及生理生化指标,确定该菌株为微泡菌属(*Microbulbifer* sp.). 构建系统发育树,结果如图 2 所示. 由图可知该属的其它种之间仍存在较大差异,如与 *Microbulbifer okinawensis*、*Microbulbifer donghaiensis* 和 *Microbulbifer epialgicus* 等. 当前已知的溶藻细菌主要属于 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria、CFB 群或 *Alteromonas*-*Pseudoalteromonas* 群 (Mayali *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2008), 这些细菌都是革兰氏阴性细菌,偶有革兰氏阳性细菌的报道.

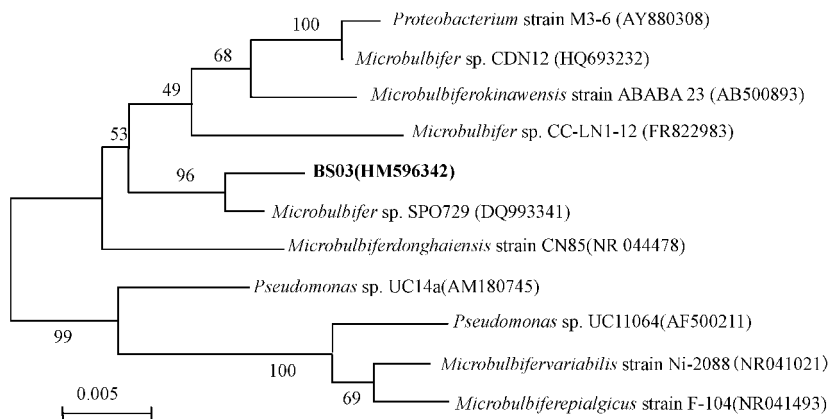


图 2 菌株 BS03 系统进化树图

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Microbulbifer* sp. BS03. Phylogenetic neighbour-joining tree of strain BS03 and relevant strains constructed from complete sequences of 16S rDNA. Numbers in bracket represent the sequences accession number in Gene Bank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar 0.005 sequence divergence

3.3 菌株 BS03 溶藻方式的探讨

由图 3 试验结果可知,高浓度(1.5%、2.0%)的 BS03 菌培养液、无菌上清液及菌培养液 + 2216E

处理组都表现出强溶藻活性,处理 48 h 后抑藻率就分别达到了 46.43% 和 53.57%、50.06% 和 52.39%、53.64% 和 59.10%,且随着处理时间的延

长 抑藻率也随之增大,培养 96 h 后抑藻率均达到 86.0% 以上(图 3a、b、d);而 0.5% 浓度的 BS03 菌培养液、无菌上清液处理组的溶藻活性则较弱,培养 96 h 后抑藻率仅为 35.23% 和 23.08% (图 3a、b)。菌培养液 + 2216E 的 0.5% 处理组相比菌培养液的 0.5% 处理组也表现出了较强的溶藻活性(图 3d) 培养 96 h 后抑藻率达 64.0%。BS03 菌悬液不同浓度处理后的藻液无明显的溶藻效果,培养 96 h 后最高抑藻率仅为 9.53% (图 3c);BS03 菌悬液 + 2216E 处理组相比菌悬液处理组也表现出了明显的

溶藻作用(图 3e),培养 96 h 后 2.0% 浓度处理组的抑藻率达 59.18%。0.5% 浓度处理组抑藻率也达到 27.37%。比较菌悬液处理组和菌悬液 + 2216E 处理组的实验结果,表明该菌株的溶藻作用主要是其所分泌的胞外溶藻物质所致,而不是菌体本身。BS03 菌悬液和对照组(控制 抑藻率为 5.0% 左右)的抑藻率数据表明菌株 BS03 的菌悬液及培养基 2216E 培养基对塔玛亚利山大藻也有一定的抑制作用,但这种抑制作用相对于菌株所分泌物质的抑藻作用是很微弱的。

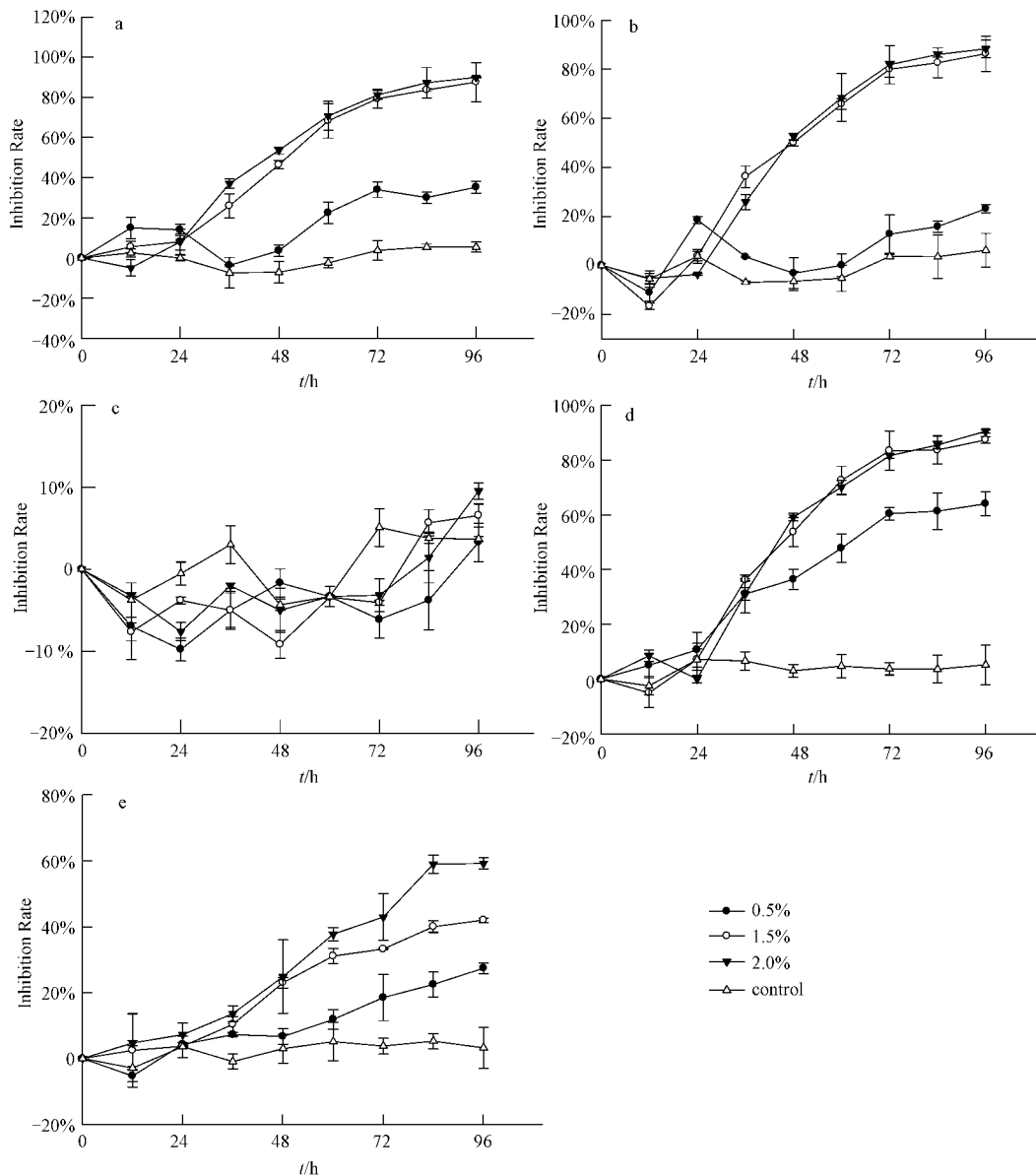


图 3 菌株 BS03 对塔玛亚历山大藻的影响(a. 菌培养液; b. 无菌上清液; c. 菌悬液; d. 菌培养液 + 2216E; e. 菌悬液 + 2216E; control. + 2216E)

Fig. 3 Impact of bacterial strain BS03 on *Alexandrium tamarense* cultures: (a) bacterial culture added; (b) culture filtrate added; (c) washed bacterial cells added; (d) bacterial culture plus additional 2216E broth added; and (e) washed bacterial cells plus additional 2216E broth added; Control 1 = algal cultures with 2216E broth added

溶藻微生物的作用方式主要有直接溶藻和间接溶藻两种 (Bai *et al.*, 2011) . 前者是溶藻微生物直接与藻细胞接触或侵入细胞内, 在藻类大量繁殖的同时, 溶藻微生物也突发地大量增殖, 导致藻细胞裂解死亡 (Shi *et al.*, 2006b; Shilo, 1970) ; 后者是溶藻微生物通过释放胞外活性物质作用于藻细胞, 导致藻细胞死亡 (Wang *et al.*, 2010b; 吕静琳等, 2011) . 研究发现 1.5% 和 2.0% 浓度的 BS03 菌培养液和无菌上清液表现出强的杀藻能力, 不同浓度的菌悬液均未表现杀藻能力, 而菌悬液补加 2216E 后却表现出一定的杀藻能力, 这些结果表明 BS03 是通过释放胞外活性物质进行溶藻, 菌体本身不具有溶藻活性. 有报道表明, 溶藻作用与溶藻细菌的浓度有关, 不同的溶藻细菌有不同的下限浓度要求, 只有达到或超过这个浓度时才有明显的溶藻效果 (彭超等 2003) . 当 BS03 菌浓度低于 0.5% 时, 其所产的胞外活性物质对塔玛亚历山大藻的溶解作用就不显著, 反而促进了藻类的生长. 随着 BS03 菌浓度的增加, 溶藻效果愈明显, 这些表明只有当溶藻活性物质的浓度达到一定的阈值才表现出溶藻活性. 因此提高溶藻菌初始浓度, 增加胞外活性代谢物的分泌, 能缩短溶藻时间, 增强溶藻效果. 菌株 BS03 无菌上清液 1.5% 和 2.0% 浓度处理组, 杀藻效果差异不大, 表明对于定量藻液, 溶藻活性物质有一定的作用饱和浓度.

3.4 菌株 BS03 溶藻效果的观察

结果如图 4 所示, 其中图 4a 为正常藻细胞, 结构完整, 细胞壁棱角轮廓清晰可见; 当溶藻菌 BS03 作用藻细胞后, 藻细胞的游动性减慢, 甚至停止, 藻细胞的形态也开始发生变化: 出现质壁分离, 细胞质收缩, 细胞壁和细胞质之间出现间隙 (图 4b) ; 长时间处理后藻细胞被裂解, 细胞内物质大量被分解释放 (图 4c) ; 溶解末期显微镜下基本找不到具有细胞轮廓的细胞, 多为细胞裂解后形成的碎片 (图 4d) .

3.5 塔玛亚历山大藻与菌株 BS03 所处生长期对溶藻效果的影响

由图 5a 可知, 1.5% 终浓度的 BS03 上清液处理延滞期和对数期塔玛亚历山大藻后, 二者的抑藻率分别达到 98.17%、83.72%, 表现出强的杀藻作用; 而 1.5% 的 BS03 上清液作用于稳定期塔玛亚历山大藻后, 抑藻率只为 66.28%. 因此, 选择在塔玛

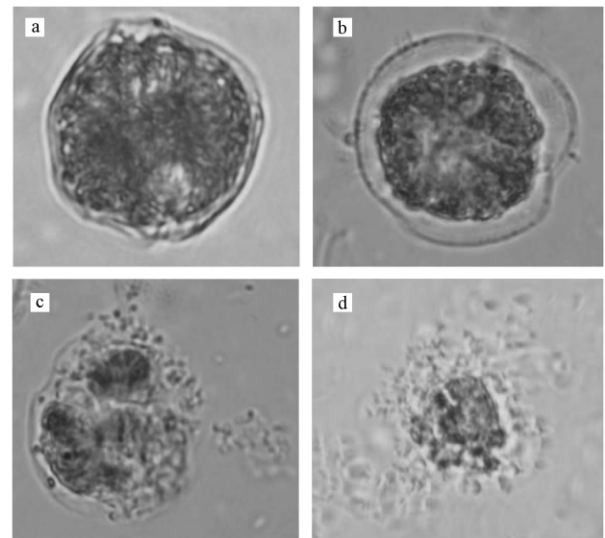


图 4 菌株 BS03 对塔玛亚历山大藻的溶藻作用 (a. 正常藻细胞; b. 细胞壁开始分离; c. 胞内物质溶解释放; d. 细胞碎片)

Fig. 4 Cytolytic effects of strain BS03 on *A. tamarense* (a. normal cell; b. cell walls becoming detached; c. release of cellular contents; d. broken thecae)

亚历山大藻的延滞期加入 BS03 可获得最佳的杀藻效果. 处于对数期和稳定期的 BS03 上清液对塔玛亚历山大藻的溶藻作用没有明显的影响, 而处于延滞期的 BS03 上清液却对塔玛亚历山大藻具有一定的促进作用 (结果见图 5b) . 在赤潮爆发的过程中, 选择合适的时期添加杀藻剂尤为重要, 塔玛亚历山大藻在稳定期时藻细胞的数量和产毒量达到顶峰, 此时加入杀藻剂即使杀死赤潮藻, 但其产生的胞外有毒物质也会对环境产生有害的影响. 因此, 应选择塔玛亚历山大藻生长相对脆弱的延滞期投入杀藻剂进行杀藻, 方能有效控制赤潮的发生与危害. 有报道称 (Costerton *et al.*, 1987) , 微生物所分泌的胞外物能够起到抵抗抗生素、原生动物捕食等保护屏障作用, 菌株 BS03 对生长对数期、稳定期的塔玛亚历山大藻的溶藻效果较差, 原因可能为相对于延滞期而言, 处于对数期和稳定期藻细胞营养物质减少、胞外分泌物增加, 对藻起到一定的保护作用, 以致藻的去除率下降. 菌株 BS03 对藻细胞的溶解效果不受菌株所处的生长期影响, 原因可能为该溶藻活性物质分泌于菌株 BS03 生长初期, 在菌株生长过程中, 不能被作为营养源优先利用或再利用 (关英红等 2008) .

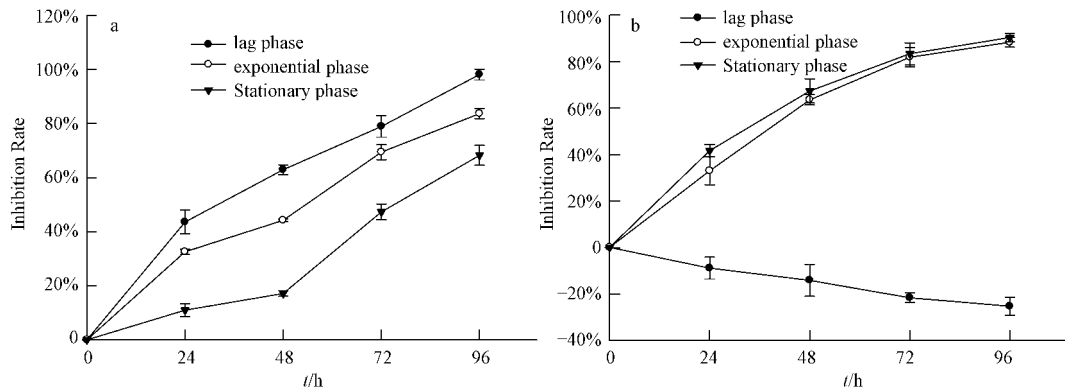


图5 塔玛亚历山大藻和 BS03 菌株所处生长期对溶藻效果的影响 (a. 塔玛亚历山大藻生长期; b. 菌株 BS03 生长期)

Fig. 5 The influences of *Alexandrium tamarense* and strain BS03 growth phase on algicidal effect (a. algal growth phase; b. strain BS03 growth phase)

3.6 菌株 BS03 溶藻活性物质性质的研究

由图 6a 知,菌株 BS03 发酵液经截留分子量为 1 kDa 的透析袋透析后,各组分的抑藻率出现明显的差别,菌株原上清液的抑藻率为 90.01%,袋外透析液的抑藻率为 84.93%,而袋内透析样的抑藻效率仅为 15.65%。袋内透析样相对于对照几乎无溶藻效果,而袋外透析液仍具有很强的溶藻效果。据此可判断菌株 BS03 的胞外溶藻活性物质的分子量小于 1 kDa。乙醇沉淀后各实验组分中(图 6b),原

上清液的抑藻率为 78.34%,乙醇溶解相的抑藻率为 69.57%,而沉淀相的抑藻率仅为 8.51%。因乙醇在水溶液中,可使许多蛋白质、核酸、多糖等物质沉淀,菌株 BS03 发酵液经乙醇沉淀后,析出大量的白色和褐色沉淀。此沉淀在无菌 2216E 溶液溶解后却丧失了大部分的溶藻活性,而溶解相和原上清液则仍显示较强的溶藻活性。由此说明菌株 BS03 的溶藻活性物质可能不是蛋白质、核酸、多糖等物质。

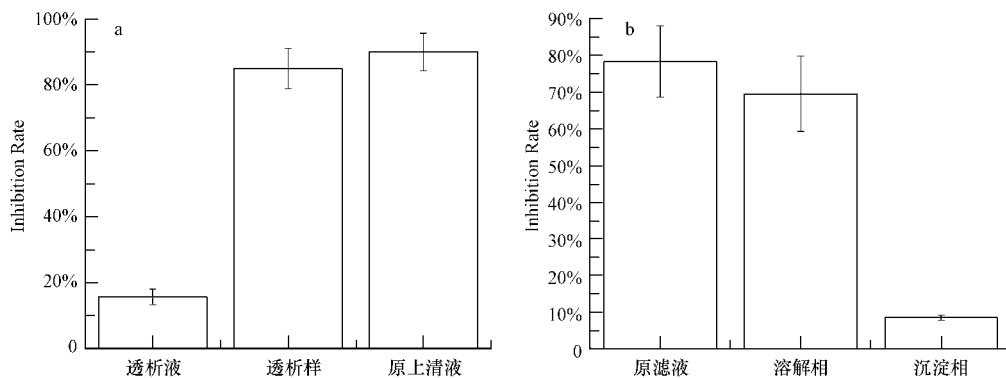


图6 菌株 BS03 上清液透析、乙醇沉淀后各组分对塔玛亚历山大藻溶藻效果影响

Fig. 6 The influences of strain BS03 different dialysis fractions and soluble solids, sedimentation on algicidal effect

由图 7a 可知,经不同温度(40 °C、60 °C、80 °C、100 °C、120 °C)处理的菌株 BS03 上清液相比于对照组(25 °C)抑藻率相差不大,均在 85.0% 左右,其中 120 °C 处理组抑藻率(73.53%)略有下降,但总体来说抑藻率受温度影响较小。由此说明菌株所分泌的溶藻物质具有很好的热稳定性。

由图 7b 可见,经强酸、强碱处理后,BS03 无菌滤液对塔玛亚历山大藻的溶藻活性未受影响,仍表现出较强的溶藻效果,抑藻率仍达 86.53%、

83.65%,由此说明 BS03 溶藻活性物质具有较好的酸碱稳定性。

溶藻菌所分泌的溶藻活性物质的种类繁多,性质不一,当前已报道的溶藻活性物质主要有生物碱、蛋白质、多肽、氨基酸、抗生素等。如 Yoshikawa 等从细菌(*Vibrio* sp.) C979 中分离的强亲水性化合物 β -氨基-L-丙氨酸(Yoshikawa *et al.* 2000); Lee 等从海洋溶藻菌 *Pseudoalteromonas* sp. A28 发现的分子量为 50 kDa 对骨条藻(*Skeletonema costatum* NIES-

324) 具有较强溶藻效果的丝氨酸蛋白酶 (Lee *et al.* 2000). 虽然较多的溶藻活性物质已经被分离和鉴定出来了, 但仍有许多溶藻活物质的性质和种类依然不清楚: Baker 等在 1978 就发现了假单胞菌可分泌一种高分子量的热稳定的化合物能够杀死硅藻 (Baker *et al.*, 1978); Nakamura 等发现株蜡状芽孢杆菌 N-14 可分泌, 具亲水性、热稳定性, 分子量小于 2 kDa 的胞外物质, 且在碱性条件下可以更

高效的溶解铜绿微囊藻 (Nakamura *et al.* 2003); Su 等在研究海洋溶藻菌 sp48 时发现, 菌株胞外活性物质具有一定的热稳定性, 但不具有耐酸性 (Su *et al.* 2007). 与他们的研究不同, 菌株 BS03 的溶藻活性物质分子量小于 1 kDa, 具有一定的热稳定性和耐酸碱性, 且该活性物质在乙醇溶液中不能沉淀即该物质可能不属于蛋白、核酸、多糖类物质, 由此推断其可能为一种新型活性物质.

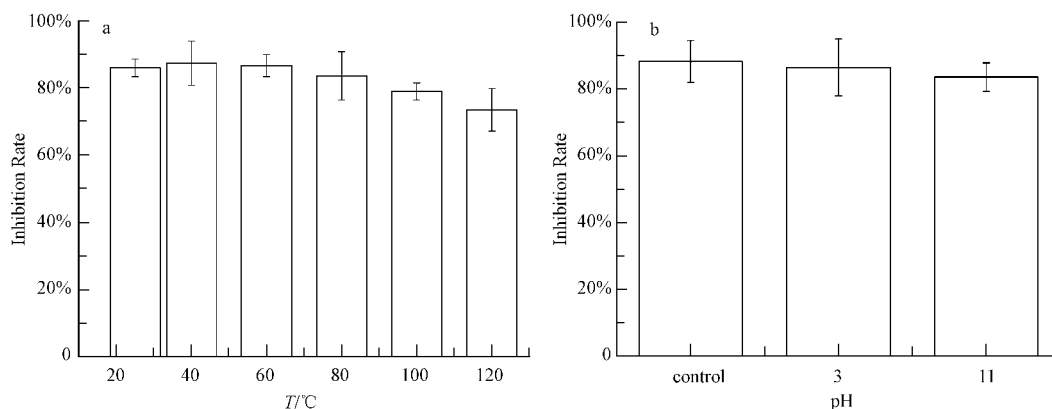


图 7 不同温度、pH 处理对塔玛亚历山大藻溶藻效果的影响

Fig. 7 The influences of different temperature and pH treats on algicidal effect

4 结论 (Conclusions)

1) 分类学研究表明, 菌株 BS03 与微泡菌属的 16S rDNA 序列同源性达 99%, 归属于微泡菌属 (*Microbulbifer* sp.).

2) 菌株 BS03 对处于不同生长时期的塔玛亚历山大藻均具有较好的溶藻效果, 其中对延滞期的塔玛亚历山大藻溶藻效果最佳; 不同生长时期的菌株对塔玛亚历山大藻溶藻作用无明显差异.

3) 菌株 BS03 对塔玛亚历山大藻的溶藻效果具有一定的浓度效应, 溶解作用方式为间接溶藻, 菌株所分泌的胞外溶藻物质为一类分子量小于 1 kDa 耐酸碱、具热稳定性的非蛋白、核酸、多糖类物质.

责任作者简介: 郑天凌 (1955—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事应用与环境微生物学, 水产微生物学, 资源微生物学, 生态环境保护和污染环境治理等方面的研究, E-mail: wshwzh@xmu.edu.cn.

参考文献 (References):

Bai S J, Huang L P, Su J Q, *et al.* 2011. Algicidal effects of a novel marine actinomycete on the toxic dinoflagellate *Alexandrium*

tamarense [J]. *Curr Microbiol* 62(6): 1774-1781

Baker K H, Herson D S. 1978. Interactions between the diatom *Thalassiosira Pseudonana* and an associated *Pseudomonad* in a mariculture system [J]. *Appl Environ Microbiol* 35(4): 791-796

Chen W M, Sheu F S, Sheu S Y. 2012. *Aquimarina salinaria* sp. nov., a novel algicidal bacterium isolated from a saltpan [J]. *Arch Microbiol*, 194(2): 103-112

Choi H J, Kim B H, Kim J D *et al.* 2005. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters [J]. *Biological Control*, 33(3): 335-343

Costerton J W, Cheng K J, Geesey G G *et al.* 1987. Bacterial biofilms in nature and disease [J]. *Annu Rev Microbiol* 41: 435-464

东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社. 353-370

关英红, 马军, 雷国元, 等. 2008. 一株溶藻菌株的分离鉴定及溶藻特性 [J]. *环境科学学报* 28(7): 1288-1293

Gumbo J R, Cloete T E. 2011. The mechanism of *Microcystis aeruginosa* death upon exposure to *Bacillus mycoides* [J]. *Phys Chem Earth*, 36(14): 881-886

Imai I, Ishida Y, Hata Y. 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan [J]. *Marine Biology*, 116(4): 527-532

Jurkevitch E, Ramati B. 2000. Design and uses of *Bdellovibrio* 16S rRNA-targeted oligonucleotides [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 184(2): 265-271

Kim Y S, Lee D S, Jeong S Y *et al.* 2009. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the harmful raphidophyceae

- Chattonella marina* [J]. *J Microbiol* 47(1):9-18
- Lee S O ,Kato J ,Takiguchi N *et al.* 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp strain A28 [J]. *Appl Environ Microb* 66(10):4334-4339
- 吕静琳,王宾香,郑天凌. 2011. 海洋细菌活性蛋白 活性肽研究的若干新进展[J]. *微生物学报* 50(9):1121-1128
- Mayali X ,Azam F. 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms [J]. *J Eukaryot Microbiol* ,51(2):139-144
- Mitsutani A ,Takesue K ,Kirita M ,*et al.* 1992. Lysis of *Skeletonema costatum* by *Cytophaga* sp. Isolated from the coastal water of the Ariake sea [J]. *Nippon Suisan Gakk* 58(11):2159-2169
- Nakamura N , Nakano K , Sugiura N , *et al.* 2003. A novel cyanobacteriolytic bacterium , *Bacillus cereus* , isolated from a Eutrophic Lake [J]. *J Biosci Bioeng* 95(2):179-184
- Paul C ,Pohnert G. 2011. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: Regulated protease excretion for specific algal lysis [J]. *Plos One* 6(6):e21032
- 彭超,吴刚,席宇,等. 2003. 3 株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻效应 [J]. *环境科学研究* ,16(1):37-40
- Roth P B ,Twiner M J ,Mikulski C M *et al.* 2008. Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* [J]. *Harmful Algae* 7(5):682-691
- Shi M ,Zou L ,Liu X *et al.* 2006. A novel bacterium *Saprospira* sp. strain PdY3 forms bundles and lyses *cyanobacteria* [J]. *Front Biosci* ,11:1916-1923
- Shi S Y ,Liu Y D ,Shen Y W ,*et al.* 2006. Lysis of *Aphanizomenon flos-aquae* (*Cyanobacterium*) by a bacterium *Bacillus cereus* [J]. *Biological Control* 39(3):345-351
- Shilo M. 1970. Lysis of blue-green algae by myxobacter [J]. *Journal of Bacteriology* ,104(1):453-461
- Su J Q ,Yang X R ,Zhou Y Y *et al.* 2011. Marine bacteria antagonistic to the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* (*Dinophyceae*) [J]. *Biological Control* 56(2):132-138
- Su R Q ,Yang X R ,Zheng T L *et al.* 2007. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. *Harmful Algae* 6(6):799-810
- Wang B X ,Zhou Y Y ,Bai S J ,*et al.* 2010. A novel marine bacterium algicidal to the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. *Lett Appl Microbiol* 51(5):552-557
- Wang X ,Li Z J ,Su J Q ,*et al.* 2010. Lysis of a red-tide causing alga , *Alexandrium tamarense* caused by bacteria from its phycosphere [J]. *Biological Control* 52(2):123-130
- 王新,周艳艳,郑天凌. 2010. 海洋细菌生态学的若干前沿课题及其研究新进展 [J]. *微生物学报* 50(3):291-297
- Yoshikawa K ,Adachi K ,Nishijima M ,*et al.* 2000. Beta-cyanoalanine production by marine bacteria on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward *cyanobacteria* [J]. *Appl Environ Microb* 66(2):718-722
- Zhang H ,Yu Z L ,Huang Q. 2011. Isolation , identification and characterization of phytoplankton-lytic bacterium CH-22 against *Microcystis aeruginosa* [J]. *Limnologica* 41(2):70-77