

# 塔玛亚历山大藻藻际细菌溶藻过程

王 新<sup>1,2,3</sup>, 周立红<sup>1</sup>, 郑天凌<sup>1,2,3,\*</sup>, 宁修仁<sup>2</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005; 2. 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室, 杭州 310012

3. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005)

**摘要:** 海洋微藻在生长过程中向周围环境分泌多种胞外产物, 形成细菌自由生长的藻际环境, 藻际细菌对微藻的生长有一定的调控作用。在指数生长期的塔玛亚历山大藻培养液中加入 1% 的 2216E 培养基, 在加入 2216E 后 16h 内藻细胞全部裂解。用数码显微镜记录了藻细胞形态变化, 分别用 DAP 法和荧光模拟底物法测定了细菌数量、胞外酶活性变化, 结果表明: 在溶藻过程中细菌数量、胞外酶活性在第 6 小时到第 10 小时增加了 50~100 倍。塔玛亚历山大藻藻际细菌主要分布在藻细胞表面, 其群落结构改变和数量剧增是溶藻的主要原因, 细菌分泌的  $\alpha$ -D-葡萄糖苷酶和几丁质酶可能在溶藻过程中起重要作用。

**关键词:** 塔玛亚历山大藻; 藻际环境; 胞外酶活性; 藻菌关系; 赤潮防治

文章编号: 1000-0933 (2007) 07-2864-08 中图分类号: Q143 文献标识码: A

## Lysis of *Alexandrium tamarense* mediated by bacteria in its phycosphere

WANG Xin<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Li-Hong<sup>1</sup>, ZHENG Tian-Ling<sup>1,2,3,\*</sup>, NING Xiu-Ren<sup>2</sup>

1 School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2 Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, SOA, Second Institute of Oceanography, SOA, Hangzhou 310012, China

Acta Ecologica Sinica, 2007, 27 (7): 2864 ~ 2871

**Abstract:** Bacteria can freely grow in the phycosphere of marine algae which produce extracellular substances to their surrounding environment. These bacteria could regulate the growth of algae. One percent (v/v) of 2216E medium was mixed into *Alexandrium tamarense* culture system. These results show that algal cells were all lysed within 16 hours. After adding 2216E medium, both the abundance and the extracellular enzyme activity of bacteria increased by 50—100 times from the 6<sup>th</sup> hour to the 10<sup>th</sup> hour in lysis of algae. These experiments suggest that bacteria in the phycosphere could mainly attach to the surface of *Alexandrium tamarense*. Changes in the population of this community might cause the lysis in algae. The  $\alpha$ -D-glucosidase and chitinase produced by bacteria could play a major role in lysis of algae.

**Key Words:** *Alexandrium tamarense*; phycosphere; Extracellular Enzyme Activity (EEA); interaction between bacteria and algae; control of red-tide

海洋微藻是海洋环境中物质和能量的启动泵, 是海洋生态系统中最为重要的初级生产者, 在生长过程中

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370276); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20050384002); 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室开放基金资助项目 (LMEB200601)

收稿日期: 2006-08-14; 修订日期: 2007-03-05

作者简介: 王新 (1979-), 男, 河南南阳人, 博士生, 主要从事海洋微生物生态研究. E-mail: wxxm@163.com

\*通讯作者 Corresponding author E-mail: Wshwzh@xmu.edu.cn

**Foundation item:** The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30370276), The Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20050384002), Open Fund of Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry (No. LMEB200601)

**Received date:** 2006-08-14; **Accepted date:** 2007-03-05

**Biography:** WANG Xin, Ph. D. candidate, mainly engaged in marine microbial ecology. E-mail: wxxm@163.com

<http://www.ecologica.cn>

不断向周围环境释放碳水化合物、氨基酸、酶、肽类、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多种代谢产物,这些产物统称为胞外产物(Extracellular products, ECP),构成海水中化学物质的重要来源<sup>[1-3]</sup>。微藻分泌的这些有机物质使得微藻的周围聚集了以细菌为主的大量微生物,形成和微藻有着相互作用的、具有独特结构和功能的藻际微生物群落。1972年, Bell<sup>[4]</sup>认为,微藻胞外产物对细菌食物链有着很重要的作用,形成了自微藻细胞向外到一定距离的对细菌生长有刺激作用的区域,类似于陆上的根际环境。他把这个区域命名为“藻际环境”(Phycosphere)。细菌可以自由生长在藻际环境<sup>[5]</sup>,或依附在藻细胞表面<sup>[6,7]</sup>,或在藻细胞内成为藻的内共生菌<sup>[8]</sup>。藻际环境中生存的细菌和微藻有着独特的生态关系,微藻在新陈代谢过程中产生并分泌于胞外的有机物质,被周围细菌摄取利用,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,藻菌之间的相互作用在微食物环中物质生物地球化学循环过程中起着关键性的作用<sup>[9]</sup>。细菌对微藻分泌物的趋化性<sup>[4,5,10,11]</sup>表明微藻对藻际细菌群落结构的形成有着可能是决定性的作用,一些研究也表明藻际细菌和海洋中的自由细菌在系统发育上有着明显的区别<sup>[12,13]</sup>。Jasti等<sup>[14]</sup>对塔玛亚历山大藻藻际细菌的系统发育多样性的分析中发现,不同区域来源的塔玛亚历山大藻藻际细菌组成大多是相同的,群落结构比较稳定,一些产毒的藻株还有着紧密联系的特殊种属的细菌。藻际细菌对微藻的生长、繁殖、孢囊形成、死亡都具有重要作用<sup>[15-17]</sup>,调控着微藻的生长过程,而一些特殊种属的藻际细菌可能在其中起主要作用。细菌抑(杀)藻作用的研究已有较多相关成果,而天然藻际细菌群落与微藻相互作用关系因其复杂性尚少有报道。作者在研究中发现赤潮藻塔玛亚历山大藻单种培养体系中有稳定的细菌群落结构,细菌群落结构的变化极大的影响塔玛亚历山大藻的生长,甚至在短时间内溶藻。作为一个相对简单的体系,可以作为微藻-藻际细菌相互作用研究的实验模型。本文通过加入少量 2216E到塔玛亚历山大藻培养液中改变其中细菌的生长,对因此产生的溶藻过程做初步研究,探讨藻际细菌和微藻的相互作用关系,为藻菌关系和赤潮防治的研究增添新的内容。

## 1 材料与方 法

### 1.1 藻种来源及培养条件

实验用的藻种为塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*),由暨南大学水生生物研究所提供。藻种置于三角瓶中用改良的 f/2培养液进行培养,温度为 20℃,光照周期为 12(L):12(D),光照强度为 3500lx,培养两周后处于指数生长期,藻密度约为 4680cell/ml。

### 1.2 2216E液体培养基及加入量

2216E液体培养基成份为:陈海水 1000ml 蛋白胨 5.0g 酵母膏 1.0g 磷酸高铁 0.1g; pH = 7.6; 高压灭菌后备用。在指数生长期的塔玛亚历山大藻培养液内加入 2216E 为 1%。

### 1.3 药品和试剂

DAP 购自 SIGMA 公司,工作液浓度为 5μg/ml。荧光模拟底物 MUF- $\beta$ -D-glucopyranoside、L-Leucine-MCA、MFU-N-acetyl-glucosaminide、MUF- $\beta$ -D-galactopyranoside 以及 MUF 和 MCA 标准品均购自 SIGMA 公司。MUF- $\beta$ -D-glucopyranoside 和 L-Leucine-MCA 用甲基溶纤剂和灭菌海水以 1:1 的比例分别配制成 8mmolL<sup>-1</sup> 和 4mmolL<sup>-1</sup> 的工作液, MFU-N-acetyl-glucosaminide、MUF- $\beta$ -D-galactopyranoside 用甲基溶纤剂分别配制成终浓度 4mmolL<sup>-1</sup> 和 3mmolL<sup>-1</sup> 的母液, MUF 和 MCA 标准品用甲基溶纤剂配制成 10mmolL<sup>-1</sup> 的母液,避光冷藏待用。HgCl<sub>2</sub> 购自华美生物工程有限公司,工作液浓度为 2mmolL<sup>-1</sup>。

### 1.4 藻细胞形态变化的观察

自塔玛亚历山大藻培养液中加入 2216E 开始,每 2h 取样 1 次,在数码荧光显微镜(OLYMPUS BX41, 数码摄像头: DP50)下观察细胞的形态结构变化并拍照,放大倍数为 10×100。

### 1.5 细菌计数

细菌计数采用 DAPI 染色法<sup>[17,18]</sup>。自塔玛亚历山大藻培养液中加入 2216E 开始,每 2h 取样 1 次,经 DAPI 染色后,用数码荧光显微镜(OLYMPUS BX41)进行观察,以同期生长的未加 2216E 的塔玛亚历山大藻培

养液为对照同时进行计数。计数时,随机选取 10个视野计数被染色的细菌个体按下式计算水样中的细菌丰度:

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

式中,  $A$  为 10个视野中细菌平均数,  $S_2$  为视野面积,  $S_1$  为滤膜有效过滤面积,  $V$  为用于计数的藻培养液样品的体积。

## 1.6 细菌胞外酶活性的测定

**1.6.1 胞外酶活性的测定**采用荧光模拟底物法 (Fluorogenic Model Substrates, FMS)<sup>[19~21]</sup>,以胞外酶水解底物的速率来表示胞外酶活性。自塔玛亚历山大藻培养液中加入 2216E开始,每 2h取样一次,样品均分为两份,其中 1份经孔径 5 $\mu\text{m}$ 的滤膜(上海半岛公司产品)过滤,未加 2216E的对照只取 1份且不过滤。各种酶活性测定中反应体系均为 1ml,在 20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光进行,荧光值的测定使用 SPECTRA MAX M<sub>2</sub>型多功能酶标仪。

葡萄糖苷酶和氨肽酶活性的测定采用加入过量荧光模拟底物法,设 3个平行和 2个空白。待测样品中加入 25 $\mu\text{l}$ 的工作液,使得 MUF- $\beta$ -D-glucoopyranoside 和 L-Leucine-MCA 的终浓度分别为 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,反应约 10min后在空白样品中加入 25 $\mu\text{l}$ 的  $\text{HgCl}_2$ 工作液终止反应并开始计时,在氨肽酶反应 1h、葡萄糖苷酶反应 2h后加入 25 $\mu\text{l}$ 的  $\text{HgCl}_2$ 工作液终止反应。测定荧光值时激发波长和发射波长 葡萄糖苷酶为 360nm、450nm,氨肽酶为 380nm、450nm,狭缝宽均为 10nm。胞外酶活性由下式计算:

$$V = (F - F_0) / (T \times S)$$

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),  $F_0$  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 ( $\mu\text{mol}$ )标准荧光物质的荧光强度。

几丁质酶和 半乳糖苷酶活性的测定采用加入系列浓度底物法,反应体系同样为 1ml, MUF-N-acetylglucosaminide母液用无菌海水稀释成 4、2、1、0.5 $\text{mmol L}^{-1}$ ,加入待测样品后终浓度分别为 100、50、20、10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; MUF- $\beta$ -D-galactopyranoside母液用无菌海水稀释成 3、2、1、0.5 $\text{mmol L}^{-1}$ 加入待测样品后终浓度分别为 75、50、25、10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 。每个浓度设两个平行和两个空白对照,空白样品在加入底物后立即加入 25 $\mu\text{l}$ 的  $\text{HgCl}_2$ 工作液终止反应,平行样品在反应 2h后加入 25 $\mu\text{l}$ 的  $\text{HgCl}_2$ 工作液终止反应,在激发波长 360nm、发射波长 450nm,狭缝宽均为 10nm的条件下测定荧光值。胞外酶对底物的水解反应遵循 Michaelis & Mentden 动力学反应方程,胞外酶活性由经米氏方程推导出的线性方程作图计算:

$$t/f = (K_m + S_n) / V_{\text{max}} + A / V_{\text{max}}$$

式中,  $f$  为外加底物被水解的比例,  $t$  为水样的培养时间(h),  $K_m$  为米氏常数,  $S_n$  为天然底物的浓度 ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $A$  外加荧光底物浓度 ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )。所得线性图的斜率的倒数即为胞外酶水解底物的速率。

## 1.6.2 MUF和 MCA 标准工作曲线

MUF和 MCA 母液用灭菌的  $f/2$ 培养液配制成浓度为 1、0.5、0.25、0.125、0.063、0.032 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液,与样品同期测定荧光强度作标准工作曲线,斜率即为  $S_0$ 。

## 2 结果

### 2.1 溶藻过程中藻细胞形态的变化

塔玛亚历山大藻培养液中加入 2216E液体培养基后 4h,藻细胞形态保持正常状态,细胞结构完整(图 1),在低倍镜视野中约半数藻细胞仍可缓慢运动。从第 4小时开始,藻细胞的形态开始发生明显可见的变化,细胞轮廓仍完整,但细胞周围出现絮状物(图 1,图 2-1),可能是藻细胞壁上某些附属物脱落或者细胞壁外层结构发生变化所致,一些壳片破碎并开始脱落(图 1,图 2-2),而藻细胞也失去运动能力。在培养过程中也发现藻细胞从第 4小时以后开始下沉到三角瓶底部,鞭毛受其他因素作用失去其功能是藻细胞下沉的一个重要原因。在第 8小时观察的样品中发现,多数藻细胞出现细胞内物质溢出胞外的现象(图 1,图 3-1),也有一些藻细胞原生质收缩,在细胞壁和原生质之间出现明显可见的空隙(图 1,图 3-2)。图 1中 4-1到 4-6显示了第 10小时样品中的一个藻细胞在约 2.5h内的变化过程。开始在藻细胞的一端出现胞内物质溢出的现象(图 1,

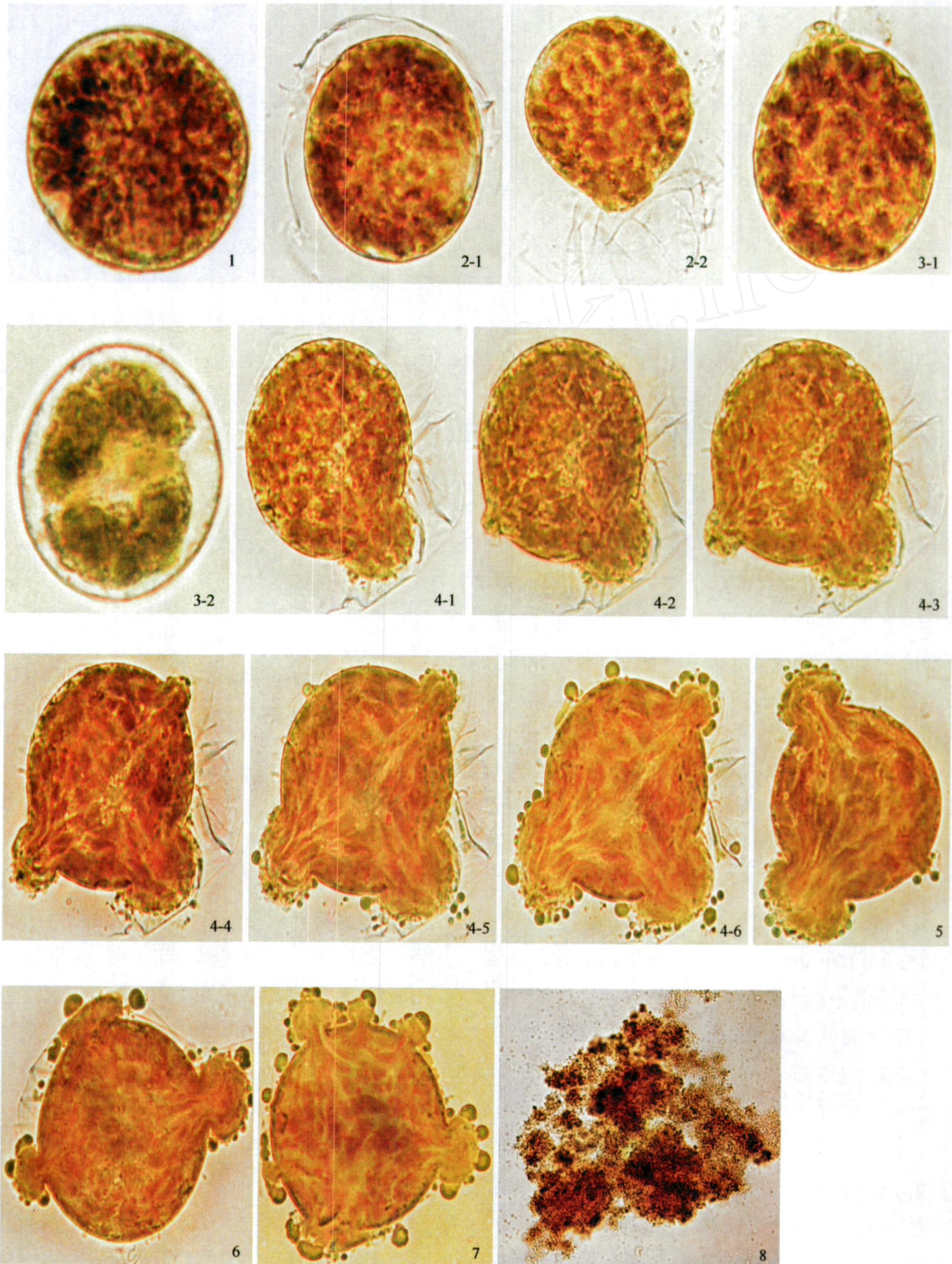


图1 塔玛亚历山大藻培养液中加入 2216E 后藻细胞形态变化

Fig. 1 Variation of algae cell structure after the 2216E medium was added to *A. tamarensis* culture

<http://www.ecologica.cn>

图 4-1),接着在近 90 角的地方出现胞内物质外溢的突起并不断增大,随后在这个突起的对称面胞内物质也开始外溢(图 1,4-4)并不断扩大,在细胞上的其他地方也开始有胞内物质溢出,最后藻细胞结构基本瓦解,破碎的藻细胞周围出现膜泡(图 1,4-6)。图 1 中 5、6、7 显示了第 12 小时观察到的其它处于破碎状态的藻细胞,从细胞结构上看,胞内物质溢出的位置大多呈某种对称,应该是位于藻细胞壁各甲片之间的横沟或纵沟处,这时的藻培养液在下层呈混浊状,上层近于澄清。在 14h 以后视野中基本看不到具有细胞轮廓的藻细胞,多为藻细胞完全裂解后形成的团絮状物质(图 1,8),藻培养液基本澄清,在三角瓶底部残留一些絮状物。

### 2.2 溶藻过程中细菌丰度的变化

用于培养塔玛亚历山大藻的 *f/2* 培养液是经过灭菌处理的,在培养过程中培养液内的细菌丰度逐渐增加,指数生长期达到  $8.59 \times 10^5 \text{ cell/ml}$ 。加入 2216E 培养基后,培养液内细菌总量逐渐增加,从第 2 小时到第 6 小时分别为  $1.79 \times 10^6$ 、 $2.56 \times 10^6$ 、 $3.55 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ 。从第 6 小时开始培养液中的细菌数量快速增加,其中第 8 小时到第 10 小时之间增加最为迅速,由  $8.12 \times 10^6 \text{ cell/ml}$  增加到  $3.50 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ 。随后 2h 内细菌丰度变化不大,但第 12 小时到第 14 小时出现第二次剧增,由  $3.58 \times 10^7 \text{ cell/ml}$  增加到  $5.09 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ ,然后保持稳定,未加入 2216E 的对照样品中的细菌数量变化不大。

### 2.3 溶藻过程中胞外酶活性的变化

胞外酶的活性反映了藻培养液中细菌的活性,在加入 2216E 之后的藻培养液中 葡萄糖苷酶、氨肽酶、几丁质酶和 半乳糖苷酶的活性整体上呈增加的趋势,未加 2216E 的对照中各种胞外酶活性基本保持恒定。从胞外酶的粒径特性来看,在第 10 小时以前,胞外酶的活性主要集中在  $5\mu$  以上的颗粒中,用  $5\mu$  滤膜过滤后的藻培养液中胞外酶的活性占总胞外酶活性的 1%~20%,从第 10 小时开始过滤后藻培养液中的胞外酶活性显著增加(见下图)。葡萄糖苷酶在加入 2216E 后 2h 即开始明显增加,由  $0.0170\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$  增至  $0.1180\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,第 6 小时到第 10 小时培养液中的 葡萄糖苷酶活性由  $0.3850\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$  剧增至  $1.6973\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,而后保持稳定,在 14h 后开始下降。过滤后的藻培养液中的 葡萄糖苷酶活性从第 10 小时开始由  $0.1256\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$  不断增加至第 16 小时的  $1.3481\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,接近藻培养液中的 葡萄糖苷酶活性。藻培养液中的氨肽酶活性保持在较高的水平,未加入 2216E 前即保持在  $1.365\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,之后缓慢增加至第 10 小时的  $3.8109\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$  并开始下降。过滤后藻培养液中的亮氨酸氨肽酶活性同样从第 10 小时开始逐渐增加至第 16 小时的  $2.3501\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,基本同 葡萄糖苷酶活性的变化趋势。几丁质酶和 半乳糖苷酶的活性相对较低,几丁质酶活性从第 6 小时开始剧增,由  $0.0042\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$  到第 10 小时的  $0.0170\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,随后开始降低,过滤后藻培养液中的几丁质酶同样由第 10 小时开始,由  $0.0024\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$  到第 16 小时的  $0.0050\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 。半乳糖苷酶的活性变化和前述 3 种胞外酶活性变化相比在时间上比较滞后,从第 8 小时的  $0.0019\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$  开始增加,第 14 小时达到最高的  $0.1682\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 。过滤后的藻培养液中胞外酶的活性从第 12 小时才开始明显增加,由  $0.0145\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$  到第 16 小时的  $0.1542\mu\text{mol}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 。

## 3 讨论

### 3.1 细菌在藻培养液中的分布和生长特性

实验所用的塔玛亚历山大藻是用无菌的改良 *f/2* 培养液经多次传代的,然而在其生长过程中培养体系中的细菌却逐渐增加至接近自然环境中的细菌丰度。微藻单克隆大多是通过微吸管从环境中获取单个藻细胞后经培养形成的,没有经过无菌处理微藻的藻际细菌便同微藻一起经传代培养,逐渐形成一个紧密联系的藻-

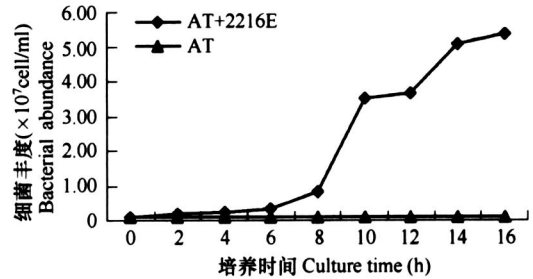


图 2 溶藻过程中细菌丰度变化

Fig 2 Variation of bacteria abundance in the process of algae-lysing

菌培养体系<sup>[14]</sup>。对于塔玛亚历山大藻藻际细菌来说, *f/2*培养液缺乏其生长所需碳源,其分布和生长必然决定性的受到塔玛亚历山大藻的影响,形成具有稳定群落结构特征的藻际细菌群落, Jasti等<sup>[14]</sup>人的研究也证实了这一点。在藻培养体系中加入 2216E后细菌数量逐渐增加,从第 6小时开始的急剧增加和藻细胞从相同时间开始的细胞结构的变化相对应,而在本实验室经抗生素除菌后获得的无菌塔玛亚历山大藻培养液中加入同样剂量的 2216E对藻生长没有影响,充分表明细菌在溶藻过程中起重要作用。藻细胞溶藻过程显示最先破裂的地方多位于藻细胞壁上的横沟或纵沟,这里很可能就是藻际细菌大量聚集的地方。细菌的数量在加入 2216E后第 12~14小时出现第 2次剧增,很可能是因为藻际细菌与藻细胞紧密相连,在培养体系中的分布不均匀,在藻细胞裂解之后,大量细菌分散到藻培养液中,使得荧光显微镜单个视野中细菌数量增加,从而造成细菌数量第 2次剧增的假相。细菌胞外酶活性的粒级特性也表明塔玛亚历山大藻藻际细菌主要依附在藻细胞表面。

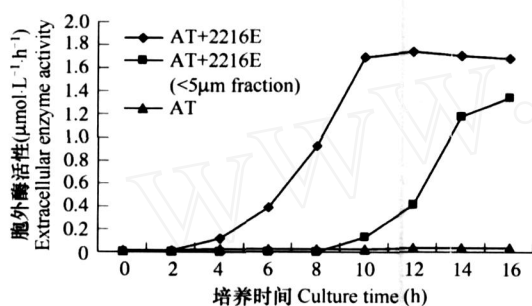


图3 溶藻过程中β-葡萄糖苷酶活性变化

Fig. 3 The β-glucosidase activity in the process of algae-lysing

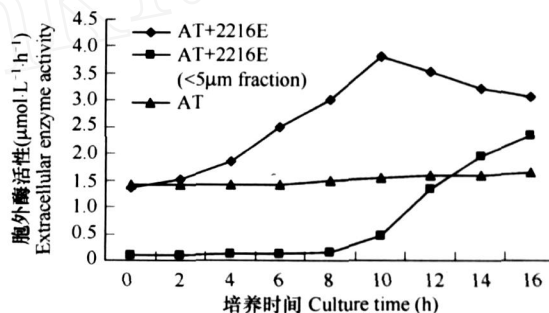


图4 溶藻过程中氨基酶活性变化

Fig. 4 The aminopeptidase activity in the process of algae-lysing

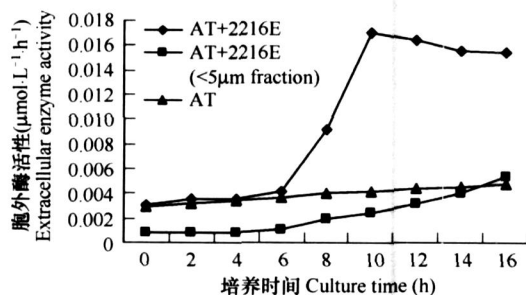


图5 溶藻过程中几丁质酶活性变化

Fig. 5 The chitinase activity in the process of algae-lysing

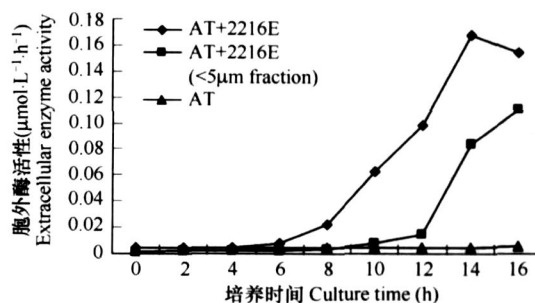


图6 溶藻过程中半乳糖苷酶活性变化

Fig. 6 The β-galactosidase activity in the process of algae-lysing

### 3.2 溶藻过程中细菌的活性和作用

塔玛亚历山大藻藻际细菌群落是在长期的传代过程中形成的,其活性直接受塔玛亚历山大藻胞外产物的调控。在经灭菌处理的 *f/2*培养液中,其氮源的获得主要是通过分解微藻分泌的肽类胞外产物,因此在指数生长期的藻培养液中的氨基酶活性维持在较高的水平,达  $1.365\mu\text{mol L}^{-1}\text{h}^{-1}$ 。加入 2216E后氨基酶活性持续增加,到藻细胞开始破裂的第 10h后开始下降,此时破裂的藻细胞提供了部分可利用的氮源物质。葡萄糖苷酶是藻际细菌分泌的主要胞外酶,在培养过程中维持在一定的水平,但仅是氨基酶活性的 1%左右,说明塔玛亚历山大藻在生长过程中向胞外分泌了大量的可直接利用的有机碳。在加入 2216E后葡萄糖苷酶活性的变化和细菌丰度的变化趋势基本一致,在溶藻的过程中比正常状态下突增了近 100倍,其活性达到  $1.6973\mu\text{mol L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,而塔玛亚历山大藻细胞壁主要由多糖类物质组成,很可能葡萄糖苷酶在藻细胞裂解过程中起主要作用,一些研究也表明细菌溶藻主要是通过分泌酶类胞外物质的作用<sup>[22-24]</sup>。几丁质酶活性虽然较低,在正常状态下几乎可以忽略,但其在溶藻过程中和葡萄糖苷酶活性类似的变化趋势暗示在藻际细菌

中存在的少量利用几丁质的细菌在溶藻过程中起着一定的作用。细菌胞外酶是诱导酶,一般认为细菌优先利用葡萄糖,在溶藻过程中 半乳糖苷酶的活性变化相对滞后,可见藻际细菌中存在以半乳糖为主要碳源的种类。实验中测定的几种胞外酶在过滤后的藻培养液中活性较低,说明依附在藻细胞表面的藻际细菌分泌的胞外酶和菌体联系较紧密,这也使得藻际细菌对底物有着较高的转化率和利用率,因而可以保证在较短的时间内细菌生物量的大量增加。

### 3.3 藻际细菌调控微藻生长作用和机制初探

塔玛亚历山大藻培养液中加入 为 1%的 2216E之后藻际细菌的生长发生变化,细菌生物量急剧增加,最终产生溶藻的效应。显然,加入的 2216E并不能满足数量呈百倍增长的藻际细菌生长的需要,其作用应该是一定程度上刺激一种或者几种藻际细菌的生长,改变藻际细菌的群落结构。在长期的传代过程中,塔玛亚历山大藻和已形成的具有特定结构和功能的藻际细菌群落之间存在着相互作用的某种形式的动态平衡状态,藻际细菌群落结构的改变必然对塔玛亚历山大藻的生长产生影响。在正常的培养状态下,塔玛亚历山大藻最终同样是衰亡、沉底、裂解,类似于 2216E加入之后溶藻的最终状态。加入 2216E后藻际细菌的群落结构的改变促使细菌生物量的剧增,塔玛亚历山大藻的裂解则是满足藻际细菌剧烈变化营养需求的必然结果。郑天凌等<sup>[25]</sup>在外加细菌共培养过程中发现细菌的胞外酶活性在塔玛亚历山大藻生长的不同阶段依营养状态而变化,在培养后期,大量的藻类胞外物质促进了细菌的生长和胞外酶活性的增高,结果导致塔玛亚历山大藻的加速衰亡。从实验结果来看,溶藻的过程和藻际细菌分泌的 葡萄糖苷酶和几丁质酶活性密切相关,它们在溶藻过程中的作用和机制有待进一步的研究。而藻际细菌群落结构在外因作用下发生改变,细菌数量急剧增加的原因也是了解藻际细菌溶藻机制需进一步研究的关键问题。

### 3.4 藻际细菌在藻菌关系研究和赤潮防治中的意义

塔玛亚历山大藻是我国沿海多发的一种重要有毒赤潮藻,运用微生物对赤潮进行生物防治因具有诸多优势而成为人们关心的热点问题。目前对藻菌关系研究的目的是在了解藻菌相互作用关系的基础上找到一条调控赤潮藻生长的途径,进而运用到赤潮的生物防治中<sup>[26,27]</sup>。然而在实践中获得高效、稳定的抑(杀)藻细菌和纯种培养的赤潮藻等基础性的重要工作遇到了诸多的困难。塔玛亚历山大藻在长期传代的过程中形成的不受其它生物因素影响的藻-藻际细菌生态系统,是实验生态条件下藻-藻际细菌关系研究的一个良好模型。将它们形成的一个小型的生态结构作为一个整体来研究,不但可以避开获得无菌微藻的困境,在实践中也更有意义。这有可能成为藻菌关系研究的一个新思路 and 新的突破点。

在自然环境中,由于藻际微环境的存在,微藻和其已形成的具有特定结构和功能的藻际微生物群落之间存在着某种形式的平衡状态,当这种平衡被打破之后,或有利于微藻的增长,或使其衰亡,在赤潮发生的海域,赤潮藻-藻际细菌的相互作用将更为明显。在一些被认为病毒起重要作用的赤潮突然消亡的事件中<sup>[28,29]</sup>,有学者认为具溶藻作用的细菌也可能起重要作用<sup>[24,30]</sup>。从本实验观察到的结果来看,藻际细菌也是一个不容忽视的方面。相关研究的深入,必将为从群体生态角度进行赤潮生物防治增添新的依据。

### References:

- [1] Alexander M. *Microbial Ecology*. New York: Wiley, 1971. 509.
- [2] Fogg G E. The extracellular products of algae. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 4, 1966, 195—212.
- [3] Hellebust J A. Extraction of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 1965, 10: 192—206.
- [4] Bell W, Mitchell R. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biological Bulletin*, 1972, 143, (2): 265—277.
- [5] Blackburn N T, Fenchel J. Mitchell. Microscale nutrient patches in planktonic habitats shown by chemotactic bacteria. *Science*, 1998, 282: 2254—2256.
- [6] Kogure K, Simidu U, Taga N. Bacterial attachment to phytoplankton in seawater. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1982, 56: 197—204.
- [7] Vaque D, Duarte C M, Marrase C. Influence of algal population dynamics on phytoplankton colonization by bacteria: evidence from two diatom species. *Marine Ecology Progress Series*, 1990, 65: 201—203.

- [ 8 ] Lewis J, Kennaway G, France S, *et al* Bacterium-dinoflagellate interactions: investigative microscopy of *Alexandrium* spp. (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia*, 2001, 40: 280—285.
- [ 9 ] Azam F. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*, 1998, 280: 694—696.
- [ 10 ] Casamatta D A, Wickstrom C E. Sensitivity of two disjunct bacterioplankton communities to exudates from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* kutzing. *Microbial Ecology*, 2000, 41: 64—73.
- [ 11 ] Gonzalez J M, Sino R, Massana R, *et al* Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing north atlantic algal bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 60 (10): 4237—4246.
- [ 12 ] Crump B C, Ambrust E V, Baross J A. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacteria communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 3192—3204.
- [ 13 ] Rooney-Vargz J N, Giewat M W, Savin M C, *et al* Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microbial Ecology*, 2005, 49: 163—175.
- [ 14 ] Jasti S, Sieracki M E, Poulton N J, *et al* Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium* spp. and other phytoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (7): 3483—3494.
- [ 15 ] Doucette G J, Kodama M, Franca S, *et al* Bacterial interactions with harmful algal bloom species: bloom ecology, toxigenesis and cytology. In: Anderson D. M., Cembella A. D., Hallegraeff G M. eds, *Physiological ecology of harmful algal blooms*, Berlin: Springer-Verlag, 1998. 619—647.
- [ 16 ] Adachi M, Kanno T, Okamoto R, *et al* Population structure of *Alexandrium* (Dinophyceae) cyst formation-promoting bacteria in Hiroshima Bay, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (11): 6560—6568.
- [ 17 ] Zheng T L, Tian Y, Su J Q, *et al* Study on the Ecological Relationship Between a Red-tide Causative Alga and Three Strains of Bacteria Isolated from Xiamen Harbor. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22 (12): 2063—2070.
- [ 18 ] Barry Sherr, Evelyn Sherr, Paul del Giorgio. Enumeration of total and highly active bacteria. In: John H. Paul ed *Methods In microbiology, Marine Microbiology*. San Diego: Academic Press, 2001. 30: 129—159.
- [ 19 ] Hoppe H G. Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. In: Kempetal eds *Hand book of methods in aquatic microbial ecology*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 423—43.
- [ 20 ] Hoppe H G. Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. In: Chrost, R. J., ed *Microbial Enzymes in Aquatic Environments*. New York: Springer-Verlag, 1991. 60.
- [ 21 ] Zheng T L, Xu M Z, Zhang Y, *et al* EEA—A new, key parameters of marine ecology and its application. *Journal of Oceanography In Taiwan Strait*, 2001, 20 (4): 453—461.
- [ 22 ] Baker K H, Herson D S. Interactions between the diatom *Thalassiosira Pseudonanna* [sic] and an associated *Pseudomonad* in mariculture system. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 35: 791—796.
- [ 23 ] Fukami K, Yuzawa A, Nishijima T, *et al* Isolating and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58: 1037—1077.
- [ 24 ] Sun-og Lee, Junichi Katō, Noboru Takiguchi, *et al* Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoaeromonas* sp. Strain A28. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (10): 4334—4339.
- [ 25 ] Zheng T L, Xu M Z, Yu Z M, *et al* The variation of bacterial external Extracellular Enzymatic Activity under the interaction between bacteria and algae. *Marine Sciences*, 2002, 26 (12): 41—45.
- [ 26 ] Zheng T L, Su J Q. The role of marine microorganisms in the occurrence and decline of red-tide. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27 (3): 291—295.
- [ 27 ] Zhao Y J and Liu Y D. Possible microbial control on the adverse impacts of algae-current information about the relationship between algae and microbes. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20 (2): 173—181.
- [ 28 ] Sieburth J M, *et al* Ultrastructure and ecology of *Aueococcus anophagefferes* Gen. et sp. nov. (Chrysophyceae): the dominant picoplankton during a bloom in Narragansett Bay, Rhode Island, Summer, 1985. *Journal of Phycology*, 1988, 24: 416—425.
- [ 29 ] Bratbak G, Egge K, Heldal M. Viral mortality of the marine alga *Emiliania Huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Marine Ecology Progress Series*, 1993, (83): 273—280.
- [ 30 ] Dakhama A, de la No e J, Lavoie M C. Isolation and identification of anti-algal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, 1993, 5 (9): 297—306.

#### 参考文献:

- [ 17 ] 郑天凌, 田蕴, 苏建强, 等. 海洋赤潮生物与厦门海域几种细菌的生态关系研究. *生态学报*, 2002, 22 (12): 2063 ~ 2070.
- [ 21 ] 郑天凌, 徐美珠, 张瑶, 等. EEA——一种新的、重要的海洋生态学参数及其应用. *台湾海峡*, 2001, 20 (4): 453 ~ 461.
- [ 25 ] 郑天凌, 徐美珠, 俞志明, 等. 菌藻相互作用下胞外酶活性变化研究. *海洋科学*, 2002, 26 (12): 41 ~ 45.
- [ 26 ] 郑天凌, 苏建强. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用. *水生生物学报*, 2003, 27 (3): 291 ~ 295.
- [ 27 ] 赵以军, 刘永定. 有害藻类及其微生物防治的基础——藻菌关系的研究动态. *水生生物学报*, 1996, 20 (2): 173 ~ 181.