

海洋细菌对赤潮藻生长及其产毒量的影响*

苏建强 郑天凌¹⁾ 俞志明[†] 宋秀贤[†]

(厦门大学生命科学院 厦门 361005)

[†](中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 采用麻痹性贝类毒素小白鼠生物测定法,研究了在可控生态条件下两株海洋细菌 S_{10} 、 P_{42} 对塔玛亚历山大藻生长及其产毒量的影响。结果表明,菌株 S_{10} 在较高浓度下对藻细胞的生长有明显的抑制作用,在较低浓度下抑藻生长作用较弱,不同浓度的菌株 S_{10} 均能有效地抑制藻细胞内麻痹性贝类毒素的产生,且在较低浓度下效果较好;菌株 P_{42} 对该藻的作用恰好与 S_{10} 相反,在较低浓度下明显抑制藻细胞的生长,不同浓度的菌株 P_{42} 也能有效地抑藻产毒,且在较高浓度下作用较明显。实验用的藻株毒力约为 $(0.95-12.14) \times 10^{-6}$ MU/cell,属于低毒藻株,该藻株在培养第 14 天达到毒性最高峰,峰值为 12.14×10^{-6} MU/cell,之后逐渐下降。讨论了海洋细菌在赤潮生物防治中的应用前景。

关键词 塔玛亚历山大藻,麻痹性贝毒,海洋细菌

中图分类号 X55

有害赤潮已经成为世界性的问题,有害赤潮产生的毒素往往经由贝类、鱼类等传递媒介造成人类中毒,其中麻痹性贝毒(paralytic shellfish poison, PSP)是分布最广、危害最严重的一类毒素。亚历山大藻是一种重要的有毒藻,与大多数麻痹性中毒事件密切相关。随着近年我国沿海经济的发展,水体污染日趋严重,亚历山大藻在近岸水体和底泥中时有出现(李瑞香等,1996;林元烧等,2002)。

水生生态系统中,微型藻类与细菌的关系越来越引起人们的重视(郑天凌等,1990,2002;Kirchner *et al*,1996;郑天凌等²⁾)。一方面,细菌可为藻类的生长提供营养盐和必要的生长因子;另一方面,细菌可抑制藻类的生长,甚至裂解藻细胞,从而表现为杀藻效应。这使人们在研究浮游植物水华和赤潮的发生、发展、衰落与消亡机理时,必然考虑微生物的重要性,其杀藻现象则为利用微生物防治赤潮提供了可能的途径。

已有的研究表明,在一些 PSP 产毒藻细胞内存在着一些菌株能产生 PSP 毒素(Kodama *et al*,1996;Levasseur *et al*,1996;Shimizu *et al*,1996;Babinchak *et al*,1998)。在菌藻共培养条件下,细菌是否对赤潮毒素的产生有促进或抑制作用,其作用机理及作用的效应如

* 国家重点基础研究发展规划(973 项目)资助,2001CB409710 号;国家自然科学基金面上项目资助,30070157,30200041 号。苏建强,男,出生于 1979 年 2 月,硕士,E-mail:ironicsjq@sina.com

1) 通讯作者,郑天凌,E-mail:wshwzh@jingxian.xmu.edu.cn

2) 郑天凌,苏建强,2002. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用研究,水生生物学报(已接受)

收稿日期:2002-07-15,收修改稿日期:2002-09-24

何,目前国内外报道几乎是空白。本文在室内培养条件下研究了两种海洋细菌与塔玛亚历山大藻共培养情况下对其生长及其藻毒力的影响,以期对我国赤潮藻的微生物防治提供帮助。

1 材料与方法

1.1 藻种来源与培养条件

实验用单细胞藻类塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*),由暨南大学水生生物研究所提供。培养液为 $f/2$ 的改良配方,培养温度为 20℃,光周期 L/D = 12h/12h。

1.2 细菌来源及菌悬液的制备

1.2.1 细菌来源 实验用两种细菌 S_{10} 、 P_{42} ,其中 S_{10} 为本实验室保存的菌种。

P_{42} 从厦门西海域海水沉积物中分离。分离方法:用无菌玻璃棒取 1g 左右沉积物,溶解于 10ml 无菌水中,打散,将此溶液加入到亚历山大藻纯培养液中培养大约 7 天;然后取此培养液 0.1ml 涂布在 2216E 培养基平板上,在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养 48h,将长出的菌落进一步分离纯化,最后接种到 2216E 培养基斜面上,在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养 48h 备用。

1.2.2 菌悬液的制备 用灭菌海水将斜面上的细菌洗出,注入加有玻璃珠的无菌三角瓶中,振荡,使菌细胞分散,用平板计数法测定起始细菌数。用无菌海水将之稀释为 3.17×10^{12} cell/ml 的活细菌悬浊液,分别简称为 $S_{10}(0)$ 和 $P_{42}(0)$,再将上述悬浊液稀释为 3.17×10^{10} 、 3.17×10^8 cells/ml 备用,分别称之为 $S_{10}(2)$ 、 $S_{10}(4)$ 、 $P_{42}(2)$ 、 $P_{42}(4)$ 。

1.3 藻菌混合培养

取处于对数生长期的藻培养液 10ml 接种于 480ml $f/2$ 培养液中;在培养时间第 0 天时分别加入 $S_{10}(0)$ 、 $S_{10}(2)$ 、 $S_{10}(4)$ 、 $P_{42}(0)$ 、 $P_{42}(2)$ 、 $P_{42}(4)$ 各 10ml;以 490ml $f/2$ 培养液接种 10ml 藻培养液作为对照。

1.4 方法

1.4.1 藻细胞密度的测定 采用鲁哥氏液固定后显微镜计数法。

1.4.2 藻毒素提取与藻毒力测定 取塔玛亚历山大藻培养液 400ml 以 2500g 离心 10min,去掉上清,加入约 3—4ml 0.1mol/L HCl 并以 1mol/L 的 NaOH 调整其 pH 为 3—4,在冰水浴中超声波破碎 5—15min 后镜检,当细胞全部破碎以后,置于沸水中水浴 5min,冷却到室温,用 1mol/L 的 HCl 和 NaOH 调整 pH = 3,以蒸馏水定容到 5ml,3500g 离心 10min,取上清液做藻毒性实验用。

依美国 AOAC (Association of Official Analytical Chemists) 推荐的方法进行藻毒性实验并计算其毒性 (Cembella *et al*, 1995)。所用动物为 20g 左右的昆明种雄性小白鼠。毒性用鼠单位/细胞 (MU/cell) 表示,1 个鼠单位 (MU) 表示使 1 只 20g 小白鼠在 15min 死亡的剂量。

2 结果与讨论

2.1 加入不同种类不同浓度海洋细菌对塔玛亚历山大藻生长的影响

从表 1 可以看出,对照组的藻细胞峰值密度是 16640 cells/ml;在加入不同浓度的 S_{10} 菌悬浊液的实验组中,藻细胞的生长都不同程度地受到抑制,其中以加入 $S_{10}(0)$ 、 $S_{10}(2)$ 的抑制效果最为明显,藻细胞的生长从一开始就受到抑制,并在整个生长周期都保持在一个

较低的密度水平,加入 $S_{10}(0)$ 、 $S_{10}(2)$ 的实验组藻细胞峰值密度分别为 3450 cells/ml、2150 cells/ml,分别相当于同期对照组藻细胞密度的 20.73% 和 12.92%;这说明较高浓度的 S_{10} 对塔玛亚历山大藻的生长具有较强的抑制作用。

表 1 加入不同浓度 S_{10} 和 P_{42} 对塔玛亚历山大藻生长(细胞密度 cells/ml)的影响

Tab. 1 The effect of different concentration of S_{10} and P_{42} on the growth of *A. tamarense*

天数(d)	0	3	6	9	12	14	16	18	20	22
$S_{10}(0)$	250	370	720	1220	1700	1650	2150	2530	2520	3450
$S_{10}(2)$	250	410	440	720	1130	1510	1330	1850	2150	1740
$S_{10}(4)$	250	550	1380	2620	7180	9360	12720	12380	14520	10960
对照	250	1240	2050	5670	8880	10040	14900	12840	16220	16640
$P_{42}(0)$	250	270	510	1630	5540	6300	10760	13370	14520	12560
$P_{42}(2)$	250	460	920	1250	2680	2800	4280	4190	4200	3420
$P_{42}(4)$	250	770	920	1130	2710	2740	3500	2870	4150	2490
对照	250	1240	2050	5670	8880	10040	14900	12840	16220	16640

从表 1 还可以看出,在加入不同浓度的 P_{42} 菌悬液的实验组中,藻细胞的生长也都受到不同程度地抑制,其中以加入 $P_{42}(2)$ 、 $P_{42}(4)$ 的抑制效果最为明显,藻细胞的生长受到抑制,并在整个生长周期都保持在一个较低的密度水平;加入 $P_{42}(2)$ 、 $P_{42}(4)$ 的实验组藻细胞峰值密度分别为 4280 cells/ml、4150 cells/ml,分别相当于同期对照组藻细胞密度的 28.72% 和 25.62%;这说明较低浓度的 P_{42} 能有效地抑制塔玛亚历山大藻的生长,这恰好同 S_{10} 的作用规律相反。

2.2 加入不同种类不同浓度的海洋细菌对塔玛亚历山大藻毒力的影响

2.2.1 塔玛亚历山大藻的产毒过程 在培养的 0—8 天,由于藻细胞密度较低,因此没有检出 PSP 毒性。而从第 9 天开始分别在各实验组和对照组检出 PSP 毒性。对照组藻细胞在培养第 14 天达到毒性最高峰,峰值为 12.14×10^{-6} MU/cell,然后下降,其他各实验组都未见此高峰(表 2)。对照组藻细胞毒素含量与培养阶段变化趋势是在对数生长中期达最高,然后逐渐下降,这与邹迎麟等(2001)的研究结果相似。

表 2 加入不同浓度 S_{10} 和 P_{42} 对塔玛亚历山大藻产毒量 ($\times 10^{-6}$ MU/cell) 的影响

Tab. 2 The effect of different concentration of S_{10} and P_{42} on the PSP production of *A. tamarense*

天数(d)	0	3	6	9	12	14	16	18	20	22
$S_{10}(0)$						1.36	5.84	4.74	3.65	3.36
$S_{10}(2)$								6.26		
$S_{10}(4)$				4.91	2.545	2.29	1.79	1.58	2.36	2.75
对照				2.55	2.48	12.14	5.82	3.60	0.952	1.20
$P_{42}(0)$					4.23	3.17	2.15	2.83	3.44	3.01
$P_{42}(2)$					4.92	7.11	4.52	3.21	4.08	3.60
$P_{42}(4)$						5.13	4.13	5.15	3.63	4.02
对照				2.55	2.48	12.14	5.82	3.60	0.95	1.20

2.2.2 海洋细菌对塔玛亚历山大藻毒力的影响 加入不同浓度的这两种海洋细菌都能不同程度地抑制塔玛亚历山大藻细胞内麻痹性贝毒的产生。从表 2 来看,加入不同浓度的 S_{10} 与藻混合培养条件下,塔玛亚历山大藻细胞毒力都明显低于对照组。其中 $S_{10}(4)$ 效果最为显著,在整个生长周期都处于一个较低的水平,而 $S_{10}(0)$ 、 $S_{10}(2)$ 的藻细胞毒力相对 $S_{10}(4)$ 要高; $S_{10}(2)$ 在整个生长周期中只有第 18 天检测出毒性,其原因是由于 $S_{10}(2)$ 对塔玛亚历山大藻生长的强烈抑制,使得培养液中藻细胞浓度偏低,进而导致所提取的毒素浓度较低,无法检出。从表 2 还可以发现,加入不同浓度的 P_{42} 能有效地抑制塔玛亚历山大藻产毒,其中 $P_{42}(0)$ 的效果最为显著,各个实验组的产毒高峰都出现在 12—14 天,并且远低于对照组。

在对数生长中后期,可以发现随着培养时间的推进,对照组藻细胞密度迅速增加,同时单细胞内所含有的毒素量迅速降低; $S_{10}(0)$ 、 $S_{10}(2)$ 、 $P_{42}(2)$ 、 $P_{42}(4)$ 这四个实验组在整个生长周期内藻细胞密度相对变化不大,并且远低于对照组,其相应的单细胞内毒素含量在中后期要高于对照组;而 $S_{10}(4)$ 、 $P_{42}(0)$ 这两个实验组对藻类生长抑制不明显,藻细胞密度也随着时间的推进而迅速增加,同时单细胞内毒素含量也较低,大约相当于对照组的水平。推测其原因,可能是由于在对照组以及抑制不明显的实验组中,藻细胞分裂速度很快,细胞内成分的合成利用了大量的氮,同时细胞体积较小,因此藻毒力较低;而在其他实验组中由于所加入海洋细菌强烈的抑制作用,藻细胞增殖变慢,细胞体积较大,培养液中基本上还处于氮过剩的状态,导致藻毒力较高。

2.2.3 不同作者对该藻毒力测定结果比较 本实验结果表明,本藻株毒力约为 $(0.95—12.14) \times 10^{-6} \text{MU/cell}$ 。郑淑贞等(1998)、江天久等(2000)分别用与本实验相同藻株测出不同毒力,分别为 $(2.23—4.11) \times 10^{-6} \text{MU/cell}$ 、 $(5.0—31) \times 10^{-6} \text{MU/cell}$,毒力相差较大,造成这种差别的主要原因是藻细胞的培养条件,培养时间、毒素提取方法及测定方法等方面的差异。

2.2.4 以菌治藻在赤潮治理中的应用前景 近年来,危害日益严重的有毒赤潮已引起了各沿海国家的关注,我国是一个海产经济大国,有害赤潮造成巨大经济损失,如贝类大量死亡,贝肉质量不能达标等,因此如何有效地防治有害赤潮已经成为各国当务之急的环保措施。目前赤潮的防治,主要是采取化学方法(俞志明等,1993)。化学方法防治虽可迅速有效地控制赤潮,但所施用的化学药剂给海洋带来了新的污染。因此,越来越多的人将目光投向了生物防治技术。利用微生物如细菌的抑藻作用,使海洋环境保持长期的可靠的生态平衡,从而达到防治赤潮的目的。以菌治藻是一种很有应用前景的赤潮治理方法。本文研究结果将对赤潮的生物防治提供一定的理论依据。

3 结论

3.1 从厦门西海域沉积物中分离出的两株海洋细菌 S_{10} 、 P_{42} ,在与塔玛亚历山大藻共培养条件下,能有效地抑制该藻的生长以及产生麻痹性贝毒。其中较高浓度的 S_{10} 和较低浓度的 P_{42} 能有效地抑制塔玛亚历山大藻的生长;而较低浓度的 S_{10} 和较高浓度的 P_{42} 抑制该藻产毒的效果较好。

3.2 实验用的塔玛亚历山大藻种毒力为 $(0.95—12.14) \times 10^{-6} \text{MU/cell}$,在对数生长中期(14d)达到产毒高峰,然后在对数生长后期逐渐下降。

参 考 文 献

- 江天久, 黄伟建, 王朝晖等, 2000. 几种环境因子对塔玛亚历山大藻(大鹏株)生长及其藻毒力影响. 应用与环境生物学报, 6(2): 151—154
- 林元烧, 曹文清, Sameer TERDAL KAR 等, 2002. 厦门西港甲藻孢囊种类和数量分布特征. 海洋与湖沼, 33(4): 407—414
- 李瑞香, 夏 滨, 1996. 胶州湾的有毒甲藻——塔玛亚历山大藻和链状亚历山大藻. 见: 朱明远, 李瑞香, 王 飞编. 中国赤潮研究. 青岛: 青岛出版社, 36—41
- 邹迎麟, 朱明远, HALL Sherwood, 2001. 两种亚历山大藻产毒过程和毒素特征研究. 黄渤海海洋, 19(3): 65—70
- 郑天凌, 1990. 微藻在海洋环境中自净的作用. 环境科学学报, 10(2): 95—100
- 郑天凌, 王 斐, 徐美珠等, 2002. 台湾海峡海域细菌产量、生物量及其在微食物环中的作用. 海洋与湖沼, 33(4): 415—423
- 郑淑贞, 林 晓, 林慧贞等, 1998. 塔玛亚历山大藻的麻痹性贝毒研究. 海洋与湖沼, 29(5): 477—480
- 俞志明, 邹景忠, 马锡年等, 1993. 治理赤潮的化学方法. 海洋与湖沼, 24(3): 314—318
- Babinchak J A, Mcgovern E R, Doucette G J, 1998. Isolation and characterization of the bacterial flora associated with PSP-related dinoflagellate species. Harmful Algae, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1998, 410—413
- Cembella A D, Milenkovic L, Doucette G *et al*, 1995. *In Vitro* Biochemical Methods and Mammalian Bioassays for Phycotoxins. Part B, Mammalian Bioassays. In: Hallegraeff GM, Anderson D M, Cembella A D ed. Manual on Harmful Marine Microalgae. Intergovernmental Oceanographic Commission Manuals and Guides No. 33 UNESCO 1995, 220—223
- Kirchner M, Sahling G, Uhling G *et al*, 1996. Does the red-tide-forming dinoflagellate *Noctiluca scintillans* feed on bacteria? Sarsia, 81: 45—46
- Kodama M, Sakamoto S, Koike K, 1996. Symbiosis of bacteria in *Alexandrium tamarense*. Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1996, 351—354
- Levasseur M, Morfort P, Doucette G J, 1996. Michaud S., Preliminary study of bacteria as PSP producers in the gulf of St. Lawrence, CANADA. Harmful and Toxic Algal Blooms, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1996, 363—366
- Shimizu Y, Gorgio C, Walker C K *et al*, 1996. Nonconformity of bacterial production of paralytic shellfish poisons: neosaxitoxin production by a bacterium strain from *Alexandrium tamarense* Ipswich strain and its significance. Harmful and Toxic Algal Blooms, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 1996, 359—362

EFFECT OF MARINE BACTERIA ON THE GROWTH AND PSP PRODUCTION OF RED-TIDE ALGAE

SU Jian-Qiang, ZHENG Tian-Ling, YU Zhi-Ming[†], SONG Xiur-Xian[†]

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

[†](Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract The effects of two strains of marine bacteria isolated from sediment of Xiamen West Sea Area on the growth and PSP production of *Alexandrium tamarense* were studied under controlled experimental conditions. The results showed that the growth of *A. tamarense* was inhibited obviously by the strain S₁₀ at high concentration, but at low concentration it has no evident effect on the growth of *A. tamarense*. The PSP (paralytic shellfish poison) production of *A. tamarense* was also inhibited by the strain S₁₀ at different concentration especially at low concentration. The function of the strain P₄₂ was contrary to the strain S₁₀, the growth of *A. tamarense* was inhibited obviously by the strain P₄₂ at low concentration and the PSP production of *A. tamarense* was inhibited by P₄₂ at different concentrations too, especially at high concentration. The toxicity of this strain of *A. tamarense* was about $(0.95 - 12.14) \times 10^{-6}$ MU/cell, a peak value $(12.14 \times 10^{-6}$ MU/cell) of toxicity appeared at 14th day, then decreased gradually.

Key words *Alexandrium tamarense*, Paralytic shellfish poison, Marine bacteria