微藻与细菌相互关系研究在海水养殖中的重要意义*

SIGNIFICANCE OF STUDY ON MICROALGAE-BACTERIAL RELATIONSHIP IN MARICULTURE

林 伟 陈 驹

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

* Jones, A. K. (1982) 指出海洋中藻菌间有着密切的关系。Fogg, G. E. (1966), Hellebust, J. A. (1974) 指出, 藻细胞在生长过程中不断地向周围释放许多代谢产物, 如脂、肽、碳水化合物、维生素和毒素, 以及生长抑制和促进因子等。Bell, W. 等(1972)指出, 由于藻向环境释放了大量的有机物质, 使藻细胞周围形成了一种独特的可称之为藻际(Phycosphere)的微环境; Caldwell, D. E. 等(1978)指出, 在这种环境中聚集着大量的细菌, 形成了具有独特结构与功能的藻际细菌群落(如在藻际细菌群落中人们很难找到革兰氏阳性细菌)。藻际中细菌同藻细胞间具有复杂的相互关系。如藻细胞在新陈代谢中产生的有机物质, 被周围细菌摄取后, 一部分经细菌代谢后又以矿物或其他形式释放回海洋中, 因此同时又为藻类生长提供营养及必需的生长因子。除此之外, Ohta, S. 等(1993)指出, 藻菌间还普遍存在着拮抗关系。如藻类能够产生抑制细菌生长的抗生素类物质, 而 Ishio, S. 等(1987), Fraleigh, P. C. 等(1988), Imai, I. 等(1993)指出, 细

菌也能抑制藻类甚至可以裂解藻细胞^[6]。Faust, M. A. 等(1976)指出, 细菌还可以同藻类竞争环境中的无机营养(如磷等)。因此藻菌关系研究对于探索生态系统内物质循环及能量流动, 对于摸清赤潮发生机制及演替过程进而寻找防治途径都具有重要的意义^[1]。顺便说一句, 藻菌关系, 特别是藻菌共生关系的研究也是目前日趋受到重视的藻毒素的产生机制研究的重点之一^[5]。

海洋微藻、细菌及其代谢产物资源的研究早已受到人们的普遍重视, 但是关于海洋微藻与细菌间, 特别是饵料微藻与藻际细菌相互关系的研究在海水养殖业中的应用报道甚少。而藻菌相互关系的深入研究, 既可以把饵料资源开发推向更深层次的领域, 又可以为生态调控防病技术在海水养殖中的应用寻找

* 农业部重点科研项目, 编号渔 95-13-96-06-06;
中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3396 号。
收稿日期: 1998-04-01

新途径。

1 藻菌关系研究对于海水养殖中饵料微藻资源开发利用的意义

一种适宜做为饵料的微藻获得需要经过分离及纯化等过程。在此过程中,源自采集地的藻细胞周围细菌在微藻分离、纯化过程中一直存在,同藻相伴,并且在以后的藻种传代过程中,不可避免地又会因污染而引入一些细菌。因此在人工培养条件下(如加有充足营养盐的培养液,合适的光照及温度,以及高密度的微藻细胞等)逐渐形成了适应新环境的细菌群落,而这种细菌群落中很可能有不利于藻细胞生长的细菌。作者近期研究也证实了这一点。如微藻经抗生素处理并多次传代消除残留抗生素影响后,经细菌培养及荧光镜证实无菌后,获得的无菌藻(如球等鞭金藻 *Isochrysis galbana*)同未经抗生素处理的同株自然带菌微藻相比,具有更长的生长稳定期(或静止期),因此当经过长时期培养(如 30 d),自然带菌微藻由于老化,大部分藻细胞下沉,而在无菌藻培养液中仍有大量的悬浮细胞。并且在转入新鲜培养液后,无菌藻具有更短的延迟期,生长启动更快。表明微藻藻际细菌群落中存在促使藻细胞老化的细菌。进一步研究表明,通过将分离纯化后的藻际细菌单菌株加入到无菌藻培养液中培养,发现确实存在着抑制藻细胞生长的细菌。另外,作者在球等鞭金藻及三角褐指藻藻际细菌菌群中还发现了促进藻细胞生长的细菌菌株。因此,饵料微藻培育系统内的细菌类群的特点可直接制约微藻生产的质量和成数。

海洋微藻是大多数海水养殖动物(如虾、贝等)不可缺少的植物性饵料,同时也是多种仔鱼的动物性饵料(如轮虫等)的天然饵料,因此持续提供优质饵料微藻是发展海水养殖业的重要保证。由于目前海水养殖中所使用的饵料微藻藻种并不十分理想,经常在培养过程中出现失败的情况。微藻活饵供应中断是育苗失败的重要原因之一。因此当前生产上急需新型优质的理想饵料微藻。如前面所述,饵料微藻实际上是微藻与特定细菌的混和体,饵料微藻培育系统中所伴随的细菌类群特点可直接制约微藻生产的质量和成数。因此饵料微藻资源不仅仅是微藻细胞本身,还应该包括伴随藻细胞的,以前被人们所忽视的特定的相关细菌。作者认为饵料微藻资源开发除了经分离纯化而获得新型藻种等传统方法及通过遗传变异获得新种外,还应该包括利用生物控制技术,对现有的饵料微藻同

相关细菌进行优化组合,从而获得新型、优质的饵料。即可以通过应用各种物理或化学的除菌技术,获得无菌藻种;另一方面通过研究,排除培育系统内不利于藻细胞生长的细菌,筛选获得各种有益菌株(包括来自于非培育系统);根据藻-菌间亲和性及利用菌群结构复原性和排他性等特点,以无菌微藻为主体,建立具有稳定结构与功能的藻-菌优化组合模式及其培养技术,获得新型、优质饵料。因此通过藻-菌关系的深入研究,可以把饵料微藻资源的研究推向更深层次的领域。有关这方面的研究工作目前正在进行中。

2 藻菌关系研究对于海水养殖中生态调控应用的意义

在我国海水养殖业发展过程中,因疾病流行致使生产遭受损失的情况经常发生,其中以养虾业受到的挫折尤为突出。虽然对虾病的病原诊断、检测,以及防病技术等进行了大量研究,获得了很多成果,在生产实践也解决了一些问题,但随着养殖业的发展,病原种类日趋增多,病情发展越来越快,发病区域迅速扩大。特别是自 1993 年以来,更连续几年暴发了大规模虾病,造成了巨大的经济损失。防病工作陷于被动局面,生产面临危机。生产者力图摆脱困境,使生产恢复到原来的规模和水平,但至今未见成效。

实际上,一切事物的发展规律都有其自身的因果关系。任何病原的发生和疾病的传播流行都是有条件的。可以认为目前养殖业——特别是养虾业因疾病流行而造成衰退是长期推行某种不合理养殖模式的结果。生态系必须具备合理的结构,以其为基础,才能进行良性的物质循环和能量流动。但是如果减少生态系中的生物种群,简化生态系结构,则会人为地切断物质循环路线,使物质循环受阻不畅,容易出现有机污染,进而恶化生态环境,刺激致病微生物大量繁殖,从而导致疾病流行。关于目前我国养虾业所推行的养殖模式的特点和缺陷已经有人做过很好的研究^[2,3]。在虾池人工生态系中的生物结构中,部分因子(主要是养殖对象)被人为强化,而在调节生态平衡中起重要作用的因子被削弱或排除,改变了其固有的生物结构。为了解决对虾对能量的需求与虾池有限生产力(如活体饵料)的矛盾,必须引入该生态系之外的人工饵料。其结果是过剩的人工饵料及大量的对虾排泄物有机质部分或者溶解、悬浮于水体中,或者沉积于池底,使得微生物不能及时将这些物质正常地氧化分解为各类营养盐,引起有机质腐败,经厌氧微生物(如硫

酸盐还原菌等)代谢产生大量有毒化合物,毒害虾体,并因水质和底质败坏而诱发病菌(如弧菌)大量繁殖,导致疾病发生。海水养殖动物等育苗过程中,由于饵料微藻在培育过程中因经常失败而使供应中断,使得养殖人员不得不求助于代用饵料。如在对虾蚤状期利用卵黄,在轮虫培养过程中利用酵母、鱼油等代替植物性饵料微藻。为了提高强化饵料营养价值或以补充为目的,适度投喂一些辅助性动物性饵料(如卵黄、鱼油等)是可以的,但却不能本末倒置,以动物性饵料为主体或完全替代植物性饵料。因为在养殖生态系中特定的微生物群落具有结构的稳定性和功能的特异性,以微藻为基础的微生物群落显然不同于以动物为基础的微生物群落。CHEN-Du(1989)经研究发现弧菌是大多数海水养殖动物体内外常见的微生物区系成员,但有研究报道在微藻培育系统中则几乎找不到弧菌^[7]。作者(1989)通过调查研究发现许多动物性饵料中存在着大量的弧菌(一般大于 10^4 个/ml或g),当投喂动物性饵料或来源于动物等的植物替代性饵料后,水体中弧菌量会迅速上升。Colwell, R. R.等(1984)指出,鳃弧菌是鱼类弧菌病的重要致病菌。当投喂金藻强化轮虫营养价值时,轮虫培养液内几乎检测不到鳃弧菌,而采用鱼油或小球藻加酵母强化时,培养液内则有大量的鳃弧菌出现^[8]。由于残饵的腐败,加剧了水质及底质恶化,使得异养细菌特别是弧菌数量又攀新高。以上例子说明由于养殖模式自身的缺陷,破坏了养殖生态系中微生物多样性,致使病菌异常增殖,这种条件对疾病流行始终是一个潜在的危险。为了控制病害的发生,不得不使用大量抗生素等药物,造成污染加剧,产生了新的弊病。如大量抗生素直接或经食物链累积于养殖动物体内,对食用者形成潜在危害,使得我国多种养殖动物出口欧洲市场受挫。

众所周知,病害是目前限制海水养殖业发展的关键因子。由于药物防治效果逐年下降,不良后果日趋明显,促使人们逐渐意识到生态调控在海水养殖中的重要性,开始建立以控制、预防病害为主的合理、高效、系统的健康养殖技术及生态学防病技术^[2,3]。

强调生态调控防病技术的研究是在总结我国养殖动物(特别是对虾)防病工作的经验与教训的基础上提出来的。在养殖水域内生物多样性和生物间相互作用关系是生态平衡的基础^[2,3]。在发展某种养殖动物的初期阶段,一般很少发生疾病就是得益于这种自然生态环境,在这种环境中微生物多样性制约着病原的发展。但超越极限的养殖活动可破坏生态系中生物间相互依存、相互制约的内在联系。因此随着养殖时

间的延续和生产规模的扩大,更由于前面所提到的养殖模式及技术自身的缺陷,使生态环境遭到破坏,因而诱发某些病原菌的异常增殖,破坏了生物多样性结构,从而导致疾病流行。为了防止在养殖过程中日益增多的疾病出现,人们不得不加大药物的用量及延长使用时间。局部环节短时间使用药物是可行的,也是必要的,但是决不能将药物引入整个养殖系统内。在养殖环境中滥用药物的主要弊病是良莠不分,许多有益的微生物也被消灭干净。生物间竞争与互助都是维持生态平衡不可少的手段,缺一不可,否则会导致生态平衡失调^[2]。因此,大量用药后水域中可出现暂时的“生物空白”现象,水域生产力下降,竞争消失,生态平衡遭到破坏,使环境呈不稳定的危险状态。据Sofia Gil-Turnes, M.等(1989)报道,生活在虾卵表面的一种细菌 *A. lteromonas sp.* 所产生的 2, 3-**indoline-dione (isatin)** 能抑制病原真菌,而在无这种细菌的环境中卵容易受到真菌的侵袭。作者在最近也进行了有关的实验:完全消毒的虾卵只有在完全消毒的海水中才能孵化;而完全消毒虾卵在自然海水以及未消毒虾卵在完全消毒的海水中均不能孵化,观察发现这两种情形下虾卵表面都存在大量微生物。作者还调查发现1994年寿光第二养虾场采用消毒海水孵化虾苗,其结果是由卵带来的多种病原恶性发展,致使孵化工作完全失败。其次隐存分布于养殖动物体内外某些病原,往往是药物洗劫后的幸存者,在消毒后的环境里它们将优先得到发展。朱校斌等(1991)指出,如长期使用广谱抗生素后,敏感细菌受到抑制,而不敏感的细菌则乘机在体内大量繁殖,形成新的二次感染。另外,滥用药物还会损害养殖动物正常生长以及产生抗药性菌系等。如滥用抗生素可以影响对虾外壳的发育,损伤内脏器官,使对虾生长变慢,此外因受药物刺激而进一步诱发产生抗药性病原菌系,也使药物失去作用。还有前面所讲的累积于养殖动物体内的抗生素对食用者也能形成潜在的危险。另外,林光恒(1991)指出,某些病变为非菌类引起的纯生理性疾病,如白黑斑病等,药物防治根本无效^[4]。由于海水养殖环境的特殊性,养殖动物体内难以达到有效的药物浓度,而大量使用势必会造成对养殖水域内外生态环境的破坏。因此,提倡发展生态调控防病技术以取代单纯依赖药物防治技术,其目的就是要保证养殖业的发展建立在可持续发展的基础上,而养殖业可持续发展战略的关键问题是要使养殖水域变成具有防病功能的生态体系。

在养殖生态系中,微小生物群落具有结构的稳定

性和功能的特异性。以藻类为基础的微生物群落和以动物为基础的微生物群落在养殖生态系中的消长规律随着环境中生物类群和理化条件的变化而异,特定的微生物群落在生态系中是相对稳定的功能单位。因此有可能应用生态调控技术强化某些微生物群落结构以达到防病的效果。前面讲过弧菌是绝大多数海水养殖动物体内外常见的微生物菌群,而在微藻培养系统中则几乎分离不到弧菌。作者早期研究发现,在不使用药物的情况下,对虾育苗全过程中弧菌在养殖水体中密度可出现两个高峰。在育苗初期的第1次弧菌数量高峰是产卵病虾带来的。但在对虾蚤状期使用饵料微藻后,弧菌数量开始下跌。在糠虾期出现的弧菌数量第2次高峰,是在使用卤虫幼虫或其他动物性饵料取代微藻后重新发展起来的。两次高峰之间的弧菌数量低谷,显然与使用饵料微藻有直接联系,表明饵料微藻具有简单的生态调控作用。把不同病原弧菌菌株分别接种到4种生产中常用饵料微藻(金藻、扁藻、小球藻及三角褐指藻)培养液中,经培养发现4种微藻普遍具有排斥弧菌的功能,在生长对数后期至稳定期抑制弧菌生长的能力最强。为了探讨藻-菌间相互作用关系及其对弧菌的排斥作用机理,作者又利用抗生素处理获得除菌的微藻藻株及筛选获得藻际细菌的纯培养菌株。试验结果表明,除菌微藻对弧菌的生长几乎没有排斥或限制作用,来自微藻培育系统的细菌对弧菌生长也没有抑制作用,未经抗生素处理的自然带菌微藻培养液中代谢产物也不能抑制弧菌生长,而在除菌微藻及其藻际细菌的协同作用下所表现出来排斥弧菌的效果非常明显,因此抗弧菌机理很可能是由于以微藻为基础的微生物群落优先占据有效空间,以其特有的排他性功能,限制外来弧菌的生存与发展。有关藻-菌相互作用机理的深入研究目前正在进行中。

在特定的生态系中,固有的生物结构对外来影响因素具有明显的排他性和复原性特点,因此它具有结构上的稳定性和功能上的特异性。如果把养殖水域视为养殖生态系,那么它也应该具有合理的生物组成和优化的环境功能。由于养殖模式自身的缺陷,仅靠药物不能从根本上解决问题(特别是自身污染问题),并且滥用药物还容易形成恶性循环。因此,以保护生态环境和保持生态环境平衡为目标,创造最大的经济效益和生态效益,将养殖业建立在可持续发展的基础上,则必须建立生态养殖模式。因而需要调整目前养殖生态系结构,增加生物种群,使生态系内生物具有

合理组成,增强生物结构的稳定性,促进物质循环和能量流动。应强调浮游植物在海水养殖生态调控中的重要性。除了在养殖过程特定阶段作为必要饵料外,浮游植物还应在养殖全过程中做为补充饵料。如在对虾养成期促使浮游植物良性繁殖,可以因光合作用而直接增加水中溶解氧。作为补充饵料可以为对虾提供一定能量,减少了人工饵料投喂量,减轻了水质污染。同时浮游植物生长繁殖消耗水中由残饵及对虾排泄物分解(经微生物作用)产生的各类营养物质(如氮、磷等),促使物质循环加快,有利于能量流动和转化以及生态平衡稳定。另外,由于以藻类为基础的微生物群落具有结构和功能上的特异性,因此强调重视浮游植物在海水养殖中的作用,还可以实现生态调控防病的目的。而要保持植物性饵料的充足供应,发挥浮游植物在海洋养殖环境中生态调控中的重要作用,必须对藻菌相互关系及相互作用机理进行深入的研究。另外,为了在养殖生态系(特别是虾池)中保持正常的浮游植物种群组成,防止赤潮发生,也要进行深入的藻菌相互关系研究。

因此,通过研究弄清饵料微藻及其相关细菌菌群组成和功能的特异性,藻-菌相互依存条件及饵料微藻排斥弧菌的机理等方面问题,完全有可能应用人工控制技术,改进优化藻-菌组合,强化饵料微藻的抗弧菌功能及其他有益性能,为持续提供新型、优质饵料微藻提供理论依据,并为生态调控防病技术在海水养殖中的应用寻找新途径。

参考文献

- 1 赵以军等.水生生物学报,1996,20(2):173~182
- 2 林光恒.中国海洋科学研究及开发.青岛:青岛出版社,1993.331~335
- 3 李庆彪等.海洋学报,1995,17(5):135~139
- 4 蔡生力等.海洋水产研究,1997,18(1):28~32
- 5 Doucette, G. J. Harmful Marine Algal Blooms. In: P. Lassus, et al., eds., Technique et Documentation-Lavoisier, Intercept Ltd., 1995, 385~394
- 6 Yoshinaga, L., et al. Harmful Marine Algal Blooms. In: P. Lassus, et al., eds., Technique et Documentation-Lavoisier, Intercept Ltd., 1995. 687~692
- 7 Verdonck, L., et al. J. World Aquacult. Soc., 1994, 25:55~59
- 8 Verdonck, L., et al. Aquaculture, 1997, 149:203~214