

有毒藻产毒过程中海洋细菌的作用*

EFFECT OF MARINE BACTERIA ON HARMFUL ALGAL BLOOMS

林 伟 周名江

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

海洋微藻藻际中 (Phycosphere) 聚集着大量的细菌。由于藻菌间的相互作用及选择,可形成具有独特结构与功能的藻际细菌群落^[1]。可见,海洋微藻与细菌间所具有的密切关系,使得海洋细菌在有害藻赤潮生消及有毒藻产毒过程中发挥着重要的作用。有关工作既是赤潮科学研究中的热点,也是目前藻菌关系研究中的重点。

1 海洋细菌的自主产毒研究

据 Gallacher, S. 等 1996 年报道,最初认为赤潮藻毒素只能由微藻细胞本身产生。但是随着工作的深入,发现了一些特殊现象,如在麻痹性贝毒的研究过程中,人们发现了产毒和不产毒的塔马亚历山大藻 (*Alexandrium tamense*)。在无赤潮时,海域中贝类经检测仍有毒素的累积;除了在滤食性贝类外,麻痹性贝毒还在许多其他种动物体内被检测到;发现并确证了可自主产河豚毒素 (Tetrodotoxin, TTX) 的细菌和生活于淡水内的可产石房蛤毒素 (Saxitoxin, STX; 麻痹性贝毒中的一种) 的细菌。另外,除海洋微藻外,赤潮藻毒素还可为其他海洋生物所产生^[2]。这些现象促使人们怀疑微藻细胞是唯一产毒根源的论点,开始考虑细菌,特别是藻内共生细菌在藻毒素产生中的作用。Silva 等早在许多年前即通过电镜观察发现甲藻细胞内(甚至于核内)有细菌存在的迹象,认为这些细菌可以在藻细胞分裂时进入周围的培养基中,并经实验发现原本不产毒的无菌培养甲藻在加入来自产毒甲藻的细菌后可产毒素,因此提出甲藻内共生细菌可产麻痹性贝毒的假说。但此假说还不能令人信服,因为甲藻不产毒也可能是由于某种原因使其暂时失去产毒能力,某些细菌的刺激可使藻产毒能力得以恢复,因此与藻密切相关的自主产毒细菌的筛选获得是支持细菌为藻毒素产生根源假说的最直接的证据。Kodama 研究小组于 1987 年终于在一株高产毒的塔马亚历山大藻培养液中分离到一株可在普通营养肉汁细菌培养基中生长并产毒的细菌。但其产毒量很低。他们

1990 年认为此株细菌即为藻内共生细菌,可行好气异养,经分类鉴定为莫拉氏菌 (*Moraxella* sp.)。以后 Ogata 等在一株来自于另一海域的低毒性塔马亚历山大藻中又分离出一株可独立产毒的细菌。而采用同一技术路线在不产毒同种甲藻中未分离到产毒细菌,说明产毒细菌同有毒藻间存在某种相互关系。Doucette 等 1995 年通过采用经典细菌分类方法及应用生物化学和分子生物学技术分析鉴定上述二株产毒细菌及在其他海域中不产毒塔马亚历山大藻中分离获得的细菌,发现这些与藻密切相关的细菌,尽管来源不同,但都为同一种菌,即假单胞菌 (*Pseudo monas* sp.) 或交替单胞菌 (*Alteromonas* sp.)。在营养充分时,产毒细菌所产毒素组成相对稳定;在营养较差的培养基(如 ASW)中,其产毒能力反而提高。其产毒量既同培养基中磷含量有关,也同培养基所加唯一碳源种类有关。如在以酮戊二酸盐为唯一碳源时,磷缺乏时产毒量可提高 3 倍,而在以琥珀酸盐或苹果酸盐为唯一碳源条件下,细菌产毒量在磷充足时反而比磷缺乏时高。另外,葡萄牙的 Franca 等 1995, 1996 年也报道了他们在亚历山大藻 (*Alexandrium lusitanicum*) 和裸甲藻 (*Cyrodinium catenatum*) 中成功分离到 2 株可产麻痹性贝毒的假单胞菌 (*Pseudo monas stutzeri* 和 *P. di minuta*), 并认为此 2 株菌可存在于藻细胞内。除了假单胞菌或交替单胞菌外, Gallacher S. 甚至还发现藻培养液中的芽胞杆菌 (*Bacillus* sp.) 和气单胞菌 (*Aeromonas* sp.) 等也具有产麻痹性贝毒的能力。

实验室培养的有毒藻藻液中可以存在与藻密切

* 国家自然科学基金资助项目 39790110 号 3995001 号; 国家“九五”攻关资助项目 96-922-02-03 号; 国家“863”课题 863-819-06-05 号。

中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3879 号。 本文撰写过程中得到了李钧副研究员、于仁诚博士及王云峰博士等支持,在此表示衷心的感谢。

收稿日期:2000-03-13;修回日期:2000-06-13

相关的可独立产毒细菌,那么海洋环境中是否存在自由生存的产毒细菌呢? Kodama 研究小组 1990 年采用分级过滤方法发现在含有细菌的无藻过滤海水中存在麻痹性贝毒,但未分离出相关的产毒细菌。Galacher 等 1995 年采用小鼠成神经细胞 (Mouse Neuroblastoma, MNB) 检测法对获得的 481 株海洋细菌进行检测,发现其中 36.8% 可产生具有阻断 Na^+ 通道的活性的毒素 (Sodium Channel Blocking, SCB)。这些产毒细菌的丰度随季节变化而变化,在 6 月份时数量最多,而此时恰是麻痹性贝毒暴发期。通过高效液相色谱技术 (High Performance Liquid Chromatograph, HPLC) 对其中一株细菌所产 SCB 毒素分析,发现可能为麻痹性贝毒。美国的 Levasseur 研究小组 1996 年报道,将他们在圣劳伦斯湾海域内获得的 48 株异养细菌经 ASW 培养基(琥珀酸盐为唯一碳源)培养 3 d 后,通过 HPLC 方法分析发现其中 4 株细菌可产麻痹性贝毒。其中两株为假单胞菌和交替单胞菌,两株为不动细菌 (*Airetobacter* sp.)。他们还发生亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*, *A. ostense*) 赤潮过程中所采水样分级 (21 μm , 5 μm 和 0.22 μm 孔径滤膜) 过滤,应用 HPLC 法对各级滤膜上滞留物进行分析检测。结果发现 > 21 μm 的滤膜滞留物(含大部分藻细胞)及 5 ~ 21 μm 范围内滤膜滞留物(含有小于 21 μm 的藻细胞和碎屑)中有麻痹性贝毒存在的迹象。而在 0.22 ~ 5 μm 组分(无藻,但含有细菌)中则检测不出毒性。对此次赤潮结束后所采水样再进行分析,发现在所有过滤组分中均未检测到毒素。但是当将赤潮发生中及结束后水样分级过滤后,把所有各滤膜滞留物分别加入 ASW 细菌培养基(琥珀酸盐为唯一碳源)中培养 3 d,对培养物再进行分析,发现除赤潮发生过程中自由存在细菌(0.22 ~ 5 μm 分级组分)外,其余组分中均存在麻痹性贝毒。以上实验结果说明:海洋中存在产毒细菌,它们同赤潮藻种密切相关(可能为藻共生细菌);产毒细菌数量很小,产毒量很低,只有经选择性富集后才能发现;赤潮结束后,可能由于大量藻细胞死亡裂解,产毒细菌可自由存在于海洋中。

2 海洋细菌影响有毒藻产毒的研究

除了可独立产毒外,海洋细菌同藻细胞的相互作用也可以明显影响有毒藻的产毒能力。Tosteson 等 1989 年发现与藻 (*Ostreopsis lenticularis*) 密切相关的细菌数量与藻所产的西加鱼毒量呈正相关, Gonzalez 等 1995 年经进一步实验发现假单胞菌存在与否决定藻在生长静止期的毒性大小。Bates 等 1995 年发现,经抗生素处理得到的几株可产记忆缺失性贝毒中软骨

藻酸的无菌尖刺拟菱形藻 (*P. pungens* f. *multiseriens*), 同其自然带菌时相比,虽然藻细胞生长基本正常,但产毒能力却下降 8 ~ 10 倍。当将来自于此有毒硅藻培养液中细菌单菌株加入到该无菌藻中,藻产毒量增长了 2 ~ 95 倍,产毒量增长幅度同有毒藻本身密切相关,而所加入细菌不是决定性因素。除此之外,他们还发现,来自于无毒角毛藻 (*Chaetoceros* sp.) 培养液中的一株细菌也能增强该硅藻 (*Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriens*) 产软骨藻酸的能力,甚至可达 115 倍,这进一步说明,除了有毒藻藻际细菌外,其他来源的(无毒)细菌也能提高有毒藻产毒能力,抗生素不是使藻产毒能力下降的直接原因(但抗生素可以杀死那些可能影响藻产毒的细菌,具有间接效应)。另外, Gregory 等^[4]采用溶菌酶和十二烷基硫酸钠 (SDS) 作为除菌工具,获得无菌的甲藻 (*Alexandrium lusitanicum*), 结果发现除菌后藻产毒能力下降大约 50%; 加入产毒细菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 后产毒能力基本恢复,但前提是细菌必须同藻细胞直接接触。进一步实验发现,来自其他甲藻 (*A. tamarense*) 的产毒或不产毒的细菌不能刺激无菌藻产毒能力的恢复,表明在某种程度上存在着特异的藻菌相互作用。除具有增强作用外,细菌也可以削弱有毒藻的产毒能力。Abbot 等 1957 年发现,细菌密度的增加可导致裸甲藻 (*Gyrodinium aureolum*) 毒性的下降; Lu 等 2000 年的最新研究结果也表明:甲藻 (*A. minutum*) 的共生细菌经 HPLC 检测均无毒性,但回加经抗生素处理的藻培养液后,却对稳定期后藻细胞毒性产生消极影响,并使藻最大细胞密度下降。虽然有实验证明细菌可以影响有毒藻的产毒能力,但至今尚未发现其中有什么明显的规律。

另外,细菌在动物体内毒素的生物转化过程中也扮演着重要角色。Kotaki 等 1985 年发现来自多种海洋动植物体上的细菌可将麻痹性贝毒中膝沟藻毒素 (*Gonyautoxin*) 转化为石房蛤毒素,有的菌株甚至在厌氧状态下转化速率更高。不同贝类中的细菌对毒素利用和转化的特异性也有差异,如 Smith 等 2000 年发现分离自贻贝的细菌可将膝沟藻毒素 GTX1/4 转化为 GTX2/3,而分离自扇贝的细菌只能降解 GTX1/4,无毒素转化特性。

3 目前有关研究中存在问题的探讨

3.1 关于产毒细菌

只有在进行多种方法监测后,才能确证细菌的产毒性。Kodama 等 1988 年根据小鼠法 (MB)、薄层层析法 (TLC)、电泳法 (EP) 和 HPLC 法的共同检测结果,首

次报道发现一株可产麻痹性贝毒的细菌菌株。Ogata 等 1990 年通过小鼠成神经细胞法 (MNB) 和 HPLC 法检测后, 宣布获得第 2 株产麻痹性贝毒的细菌。该 2 株菌经其他实验室重复检测确证后, 目前已基本得到了国际上的公认。Franca S. 等 1996 年, Levasscur M. 等 1996 年已获产毒细菌的其他报道, 由于检测手段过少, 容易出现偏差 (Matsumura 于 1995 年发现, 采用 HPLC 及气相色谱-质谱等原理相近的化学分析方法均出现了在无菌的蛋白胨及酵母提取液中检测出有 TTX 存在的假阳性现象, 而同时采用 MB 等生物法检测的结果当然为阴性); 或者未经过其他实验室重复验证, 尚缺乏足够的说服力, 并且到目前为止, 只有 Gallacher 等^[3]应用质谱 (与毛细管电泳连用) 技术进行了海洋细菌产毒的定性分析检测。另外, 除麻痹性毒素外, 人们还未发现产其他藻毒素的海洋细菌。因此, 细菌产毒的论点还需要大量的实验来佐证。

据 Gallacher S. 等 1996 年报道, 对细菌是藻毒素产生根源有怀疑的另一个原因是目前所获得的产毒细菌在人工培养条件下产毒量很低, 同产毒藻所具有的高毒性不相称。因此, 要证明细菌是主要产毒者, 高产毒细菌的筛选获得具有重要意义。当然, 细菌的低产毒力也可能解释为由其他原因所造成。目前产毒细菌的培养基本上都在营养丰富的培养液中进行, 同细菌所处的自然营养环境相差很大 (与藻密切相关的细菌营养要求可能很特殊), 营养条件不适可能影响了细菌的产毒量。Doucette 等 1995 年及 Mass 等^[5]发现, 当产毒细菌处于营养较差的培养条件下其产毒能力反而有所提高。物理环境的改变也可能影响到产毒细菌的生存方式和产毒能力。Franca 等 1995 年发现, 细菌可存在于甲藻细胞壳板下并附着于藻细胞膜上。Costerton 等 1995 年认为, 附着后的细菌可以改变其表型并刺激细胞产物的生产。因此, 切断与藻细胞的密切联系改变其生态环境后, 细菌的产毒能力可能受到很大影响。应该深入研究产毒细菌的生理生态特征, 在人工培养时最大限度地模拟其自然生存时的条件。另外, Kodama 等在筛选第一株产毒细菌时, 采用了抗生素处理藻培养液 → 离心及无菌水洗 → 破碎藻细胞 → 细菌培养的方法。此后产毒细菌的筛选基本上遵循此技术路线。此方法的优点是可以排除杂菌的干扰, 迅速得到与藻密切相关的细菌。缺点是很可能将藻培养液内可能具高毒性的、对抗生素敏感的细菌杀掉, 人为造成产毒细菌多样性的下降; 而研究证明, 自然的、未经处理的藻培养液中确实存在大量的产 SCB (钠离子通道阻断剂) 毒素的细菌, 其所产毒素中某些是麻痹性贝毒^[3]。除此之外, 在有毒藻株的分离纯化

过程中以及在随后的长期人工培养条件下, 也可能会丢失一些在自然界中与藻相伴的高产毒的特殊细菌。因此产毒细菌的筛选要采用多种技术路线。

即使筛选到或培养出高产毒的细菌, 也不能就此断定细菌是藻毒素产生的唯一来源。在寻找可独立产毒细菌时, 人们发现来自不同海域的有毒或无毒甲藻 (*Alexandrium tamarense*) 培养液中都分离到同一种同藻密切相关的细菌即假单胞菌或交替单胞菌, 但这些细菌分离株有的产毒, 有的却不产毒, 并且其所产毒素在化学结构上缺乏一致性。Sako 等 1995 年研究结果也表明麻痹性毒素组成可伴随藻染色体稳定遗传, Oshima 等 1995 年发现在有毒藻中存在着可以催化毒素生物转化的酶。而早在 1985 年 Silva 等通过电镜观察发现甲藻染色体中的 DNA 纤丝与细菌表面相联系, 暗示二者间存在着遗传信息交换的可能性。因此 Shimizu Y. 1996 年猜测细菌不是毒素产生的根源, 只是由于偶然机会使之从有毒藻获得产毒能力, 即产毒能力不仅可以遗传方式垂直传递, 也可以通过某种载体, 如质粒、病毒、转座子等水平扩散 (如果此假说成立, 并且产毒细菌的种属特异性与筛选其所采用的技术路线无关, 那么假单胞菌或交替单胞菌可能更易于接受来自于有毒藻的产毒遗传物质)。另外, 无菌有毒藻仍然保持 (甚至增加) 产毒能力的报道对于细菌是产毒根源的论点也是非常不利的 (目前尚无关于除菌后有有毒藻丧失产毒能力的报道)。因此, 有毒藻的真正无菌化, 是破解藻毒素产生机制的关键所在。

3.2 关于无菌有毒藻

由于藻与细菌对抗生素敏感性有一定差异, 因而可以利用抗生素除去与藻共存的细菌。除 Gregory 研究小组外, 其他研究人员均利用抗生素做为有毒藻除菌工具 (表 1)。由于海洋中目前可培养的细菌只占其总数 (镜检) 的 1% 甚至更少, 因此对除菌后有有毒藻仅采用培养法检测细菌是否存在是不够的。从表 1 中可以看出, 大多数藻除菌后未经镜检 (甚至有的藻除菌后连细菌培养检测也未做过)。因此, 很难断定其是否确实为无菌藻。另外, 即使通过镜检未发现细菌存在迹象, 也不能肯定藻的无菌化已获成功, 特别是残存细菌过少或观测角度不合适时。Ferguson 等 2000 年的最新研究结果表明, 抗生素及其他多种化学除菌剂可能会“钝化”受处理甲藻培养液中的某些特殊细菌; 当消除除菌剂的影响后, 这类细菌会恢复生长。因此, 藻经处理后应完全排除抗生素等的影响才能进行细菌检测。而据报道目前所获得的无菌藻, 大多数是在抗生素等化学物质处理后直接进行细菌检测, 只有少数在检测前经过无菌海水漂洗。但快速水洗并不能保证

残留抗生素的排除,特别是当藻细胞内蓄积大量抗生素而排出较慢时。藻除菌后经数次传代培养后再进行细菌检测则具有明显的优点:(1)可完全排除抗生素等的影响;(2)残留细菌有充裕时间生长,使其易于被发现。另外,在除菌前,应进行藻培养液内细菌的药敏测试,否则在选择何种抗生素做为除菌工具时存在很大的盲目性(表1中所列微藻除菌前均无此项测

试)。

无菌藻的成功获得,除对于藻毒素产生机制等研究必不可少外,对于进一步筛选(杀)有害藻细菌等工作也是非常重要的。而能否成功获得真正的无菌藻,除上述需注意的方面外,还在很大程度上取决于这种藻内是否存在与藻共生的,特别是严格内共生的海洋细菌。

表1 有毒藻除菌方法的比较

藻株	药敏测试	除菌工具	培养检测	镜检检测	作者
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	未做	抗生素	未做	未做	Sakami 等 1999 年 ^[6]
<i>Alexandrium lusitanicum</i>	/	溶菌酶 + SDS	做	做	Gregory 等 1998 年 ^[4]
<i>Alexandrium tamarense</i>	未做	抗生素	做	未做	Ogata 等 1996 年
<i>Pseudonitzschia pungens f. multiseriis</i>	未做	抗生素	做	未做	Bates 等 1995 年
<i>Ostreopsis lenticularis</i>	未做	抗生素	未做	未做	Gonzalez 等 1995 年
<i>G. toxicans</i>	未做	抗生素	做	未做	Chinain 等 1995 年
<i>P. pungens f. multiseriis</i>	未做	抗生素	做	做	Douglas 等 1993 年
<i>Alexandrium catenella</i> , <i>A. tamarense</i>	未做	抗生素	做	未做	Kim 等 1993 年
<i>A. catenella</i> , <i>A. tamarense</i>	未做	抗生素	未做	未做	Baczar 1988 年

3.3 关于藻内共生细菌

是否存在有毒藻内共生的海洋细菌一直被人们所关注。Franca 等 1995,1996 年及 Mscarenhas 等 1995 年通过研究发现:特定细菌(来自于周围环境)可存在于藻细胞壳板及细胞膜之间;藻细胞胞质中也有细菌残留物存在的迹象,而在藻细胞内未找到形态结构完整的细菌。因此,他们认为,环境中的海洋细菌可通过类似“胞饮”的作用进入藻细胞内,被食物泡所俘获,由溶酶体降解,降解产物被用做甲藻细胞营养。而 Kodama 等根据经抗生素处理后培养的甲藻 *Alexandrium tamarense* 在去除藻细胞后,培养液中无细菌的现象,以及 Kodama M. 等 1996 年的蛋白质印迹实验结果,得出周围环境的细菌被藻细胞摄取后,既可以被藻降解而提供营养(藻细胞外无细菌存在时),也可以在藻细胞中生长,自然界中存在甲藻内共生细菌的结论。但这一论点难以令人信服。首先,他们所认定的内共生细菌即产毒莫拉氏菌未做过除菌所用抗生素的药敏测试,存在着这株细菌既具抗药性又可在甲藻细胞外表面粘附的可能,因此在除藻后的培养液中很难找到其踪迹。另外,即使这株莫拉氏菌人工培养时对所用抗生素敏感,也不能肯定其就是藻内共生细菌;因为在自然状态下,附着于藻细胞表面的细菌可能会具有抵抗不利因子,如抗生素等的的能力。其次,由于其所具有的粘附特性,在对甲藻细胞碎片进行蛋白质印迹分析时可以发现这株细菌存在的迹象;十二烷基硫酸

酸钠(SDS)处理可有效地促使细菌同藻细胞碎片间的分离,作者认为蛋白质印迹的再次分析表明在很大程度上存在细菌粘附于甲藻细胞外表面的可能性。除此之外,其他人也做过寻找藻内共生细菌的努力,但均未获得成功。由此可见,虽然 Silva 等早在十几年前就根据其电镜观察结果,提出甲藻存在内共生细菌的论点,但至今未有确凿有力的实验结果的支持。如果自然界确实存在严格意义上的藻内共生细菌,真正无菌有毒藻的获得将面临巨大的困难,藻毒素产生机制的研究进程也将受到很大影响。

4 有关领域研究前景

虽然藻菌关系,特别是藻菌共生关系研究是目前摸清有毒藻产毒机制的重要途径,并已取得许多阶段性成果,但同赤潮科学其他的研究领域相比,存在着许多尚未解决的问题,还有许多工作需要进一步深入进行。作者认为,应在以下几个方面加强研究:采用多种手段(特别是基于不同原理的,如生物及化学方法)同时检测产毒细菌所产毒素,提高准确性及可信度;进行根据不同原理的毒素检测方法间相关性的研究,以使今后细菌产毒的检测更加便捷、经济;采取多种技术路线,寻找高产毒细菌,特别是产麻痹性贝毒以外其他藻毒素的细菌;了解与毒素有关遗传物质在产毒生物中的分布,研究可能存在的产毒能力的水平传播机制,并研究毒素产生与细菌种属特异性的内在关

系;对获得的产毒细菌进行深入的生理生态特征的研究,通过分析优化其培养条件提高其产毒量;寻找具有高效降解藻毒素能力的海洋细菌,应用于贝类卫生生产中;应用各种(包括物理、化学)除菌及检测技术,获得真正无菌有毒藻株,建立除菌藻培养技术;以除菌前后的有毒微藻为材料,尽快了解与藻密切相关细菌同有毒藻产毒能力的相互关系;加强以有害藻为基础的细菌群落结构与功能的研究,利用菌群排它性及复原性特点,建立真正的与藻生长,特别是与藻产毒能力密切相关的细菌群落组合模式,提高产毒量,应用于毒素制备实践中。

参考文献

1 林伟等.海洋科学,1998,4:34~37

- 2 周名江等.中国海洋药物,1999,71(3):48~54
- 3 Gallacher S. *et al.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63** (1): 239~245
- 4 Gregory J. *et al.*. Reguera B. *et al.*, ed., In: Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, 1998, 406~409
- 5 Mass E. W. *et al.*. In: Reguera, B. *et al.*, ed., Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, 1998. 414~416
- 6 Sakami T. *et al.*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1999, 233:231~246

(本文编辑:张培新)