

两种海洋细菌对赤潮藻的细胞生物量的影响研究*

徐金森 郑天凌** 郭清华 连玉武

(厦门大学生命科学学院 361005)

提要 在实验室培养条件下,研究了两种海洋杆菌属细菌 S_1 (*Bacillus megaterium*) 和 S_0 (*B. halmapulus*) 对赤潮藻 (*Alexandrium tatumense* (Lebour) Balech) 的细胞生物量(细胞密度及叶绿素含量)的影响。结果显示,细菌滤液对藻细胞增殖的影响与细菌浓度、细菌的种属特性以及藻细胞自身的生长阶段有关。其中,细菌浓度较高的 G_1 处理(2×10^6 个/ml)对藻细胞生物量具有明显的抑制作用,而浓度较低的 G_2 和 G_3 处理(2×10^5 , 2×10^4 个/ml)则显示了一定程度的促进作用;对于同一种赤潮藻, S_0 在抑制或促进的程度和倾向上均比 S_1 的更为明显。不管是抑制或促进作用,在藻细胞的生长前期(10 d)时比后期(18 d)的更为明显。

关键词 赤潮藻(*Alexandrium tatumense*),海洋细菌,细胞生物量,抑藻作用

赤潮是当今全球海洋的一大公害。由赤潮引起的生态环境破坏的问题日益严重,已经成为国内外生态学研究的重要内容之一^[1-13]。在水生生态系统的研究中,微型藻类与海洋细菌的相互关系越来越引起人们的重视。微型藻类是引起赤潮的主要生物,其与海洋细菌的关系主要表现在藻菌既可相互促进生长,又可相互抑制以至于杀灭对方的共生关系^[2,3,14-16]。这种复杂的生态关系因藻种及菌种的不同而异,并受到环境等因素的影响。因此,研究这种关系及其对环境的影响,对于了解水体中的营养结构及能量流动的规律,进而探讨利用细菌防治赤潮的发生的可能性等具有指导意义。

赤潮藻种塔马亚力山大藻 (*Alexandrium tatumense* (Lebour) Balech) 为涡鞭毛藻纲亚历山大藻属的有毒甲藻,是有毒赤潮的主要类群之一。在我国北至胶州湾、南至大鹏湾具有发生赤潮的历史,在厦门及邻近地区也曾报道过对虾养殖池内由其引起的赤潮^[4,5]。

为了解赤潮生物的发育与繁殖规律,开展藻-菌关系的基础研究,并探讨利用微生物防治赤潮的可能性,作者从厦门海域赤潮多发区、易发区分离而得的两种海洋细菌与赤潮藻种进行共同培养,研究了藻菌共培养环境对两者的生长的相互影响,以及水体中胞外酶 β -葡萄糖苷酶活性的影响等^[6-8]。本文报道在 *A. tatumense* 藻延滞期加入细菌滤液处理对藻的细胞密度及叶绿素含量的影响的部分结果。

1 材料与方法

1.1 藻种来源及培养条件

实验用的单细胞藻类塔马亚力山大藻由暨南大学水生生物研究所提供。藻种在进行批量培养前,选用改良的 F/2 培养液进行扩种培养。培养基组成如下:经高压灭菌的陈海水:1 000 ml, NaNO₃: 75 mg, NaH₂PO₄: 5 mg, 甘油磷酸钠: 5~30 mg, Na₂·EDTA: 436 mg, FeCl₂: 3.15 mg, CuSO₄: 0.01 mg, ZnSO₄: 0.022 mg, CoCl₂: 0.01 mg, MnCl₂: 0.18 mg, Na MoO₄: 0.006 mg, V₂O₅: 0.1 mg, Biotin: 0.1 μ g, B₁₂: 0.5 μ g。

供试验用的藻种经过了 20 代培养,在实验室条件下采用严格的人工单种培养,每次培养前均经过双重的严格灭菌(抗生素技术和离心洗涤技术)^[9],由此得到的 *A. tatumense* 藻种在电镜检查中未观察到内生菌的存在。藻种置于 500 ml 三角瓶中培养,温度为 20 ± 1 °C,光照时间为 L:D = 12h:12h。光照强度为

* 国家 973 项目 2001CB409710 号,30070157 号。

第一作者:徐金森,出生于 1953 年,博士,副教授,目前在研课题:(1)微生物在海洋污染环境中的生物修复作用;(2)我国有害赤潮生态学、海洋学及其防治机理。通讯地址:福建省厦门市,厦门大学生命科学学院 361005。

** 通讯作者。E-mail: microzh@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期:2001-07-20;修回日期:2002-05-10

3 500 lx, 培养 1 ~ 2 周。

1.2 菌种分离及其培养条件

从厦门海域海底沉积物中分离,并以 2216E 培养基(陈海水 1 000 ml,蛋白胨 5.0 g,酵母膏 1.0 g,磷酸高铁 0.1 g,琼脂 20 g, pH 7.6 ~ 7.8。)为分离培养基。经鉴定^[10]: S₁ 为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 的同种不同株系; S₀ 为芽孢杆菌属的一种 *B. halmapalis*。细菌接种于 2216 E 培养基的斜面上,置于培养箱中。温度为 25 ± 1 °C,培养 2 d。预培养的细菌 S₁ 和 S₀ 悬浊液经过常温下离心、过滤处理后,在 *A. taenense* 生长的延滞期加入 10 ml 不同浓度的细菌滤液(G: 菌空白; G₁: 2 × 10¹⁰ 个/ml, G₂: 2 × 10⁹ 个/ml, G₃: 2 × 10⁸ 个/ml)。在整个培养期间不再添加其他营养盐等物质,定时观察计算细菌滤液对藻细胞生长的影响。实验设计包含了藻空白、菌空白以及藻和菌滤液共培养的处理,所得数据均为重复实验的平均数字。

1.3 藻细胞计数与细菌计数

藻种细胞密度测定: 摇匀藻液,吸取 0.1 ml 于计数板上,滴加 1- NaI 液固定,在倒置显微镜下观察计数。

细菌计数采用 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Corp.) 染色法。苏丹黑 B 染液经过超滤等预处理。DAPI 处理的终浓度为 4 mg/L。取经充分摇匀的细菌样液调整至适宜浓度后,作负压过滤 (< 0.07 kg/cm²)、染色、制片后,在荧光显微镜 (Zeiss, 100 W HBO Mg light source, G365, FT395, LP420 filters) 下进行荧光显微计数。随机选取 10 个视野计数被染色的细菌个数,并按下式计算水样中的细菌丰度: $B = A \cdot S / (S_0 \cdot V)$ 。式中: B 为细菌丰度 (个/ml); A 为 10 视野中的细菌平均数; S 为视野面积 (mm²); S₀ 为滤膜的有效过滤面积 (mm²); V 为过滤水样体积 (ml)。

1.4 叶绿素 a (Chl-a) 含量测定

采用萃取荧光法测定。藻液经混合纤维素微孔滤膜 (0.22 μm), 浸于 DMF (N, N-二甲基甲酰胺) 原液的萃取瓶中。在黑暗条件 (冰箱中 5 °C) 下放置 0.5 h 后,取出并置暗处 0.5 h,将萃取液移至比色杯中,用日立 850 荧光分光光度计测定荧光值 (激发光 E_x = 430 nm,发射光 E_m = 670 nm) F₁。滴加 1 滴 10% HCl 于比色杯中,30 s 后测定荧光值 F₂。根据酸化前后的荧光值,按下式计算 Chl-a 的浓度: $Chl-a = FR / (R - 1) (F_2 - F_1) \times V / V_0$ 。式中: F 为换算因子 (F = 0.087 mg/L); R 为酸化因子 (R = 5); V 为萃取液体

积 (ml); V₀ 为抽滤的藻液体积 (ml); F₁, F₂ 为酸化前后的荧光值。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度的细菌滤液处理对 *A. taenense* 生长的影响

经不同浓度的细菌 S₁ 滤液处理后的 *A. taenense* 藻培养的结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出,不同浓度的细菌滤液对藻细胞密度 (D) 的影响是随着培养时间 (T) 的延长而发生变化的。在为期 18 d 的观察计数中,浓度为 G 处理 (2 × 10¹⁰ 个/ml) 的菌液对 *A. taenense* 藻细胞在生长前期 (10 d) 具有明显的抑制作用,其密度约为对照的 38%; 但在细胞生长后期 (18 d), 其抑制作用急剧减弱,其密度约为对照的 84%。经统计分析,在 G 处理和对照 G₀ 之间存在着高度相关关系,其线性回归方程为: $Y_1 = 22.430 + 0.955 x, r^2 = 0.917$ 。而较低浓度的 G₂ 和 G₃ 处理 (2 × 10⁹ 和 2 × 10⁸ 个/ml) 的菌液则对藻细胞的生长显示了一定的促进作用。在前期的第 10 天, G₂ 和 G₃ 处理的藻细胞密度分别为对照的 164% 和 154%, 而在后期的第 18 天,则分别为 110% 和 167%。G₂ 和 G₃ 处理的线性回归都呈高度相关关系。各自的回归方程

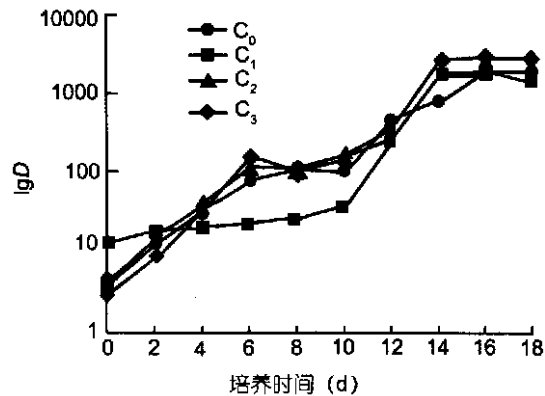


图 1 不同浓度的细菌 S₁ 滤液处理下 *A. taenense* 藻细胞密度 (D) 随培养时间 (T) 的变化

Fig.1 Variation of the cell density (D) of the alga *A. taenense* in the culture time (T) treated with different concentrations of bacterium S₁ filtrate

G₀: 对照; G₁: 细菌浓度为 2 × 10¹⁰ 个/ml 的滤液; G₂: 细菌浓度为 2 × 10⁹ 个/ml 的滤液; G₃: 浓度为 2 × 10⁸ 个/ml 的滤液(后同)
C₀: control; C₁: bacterium filtrate of 2 × 10¹⁰ cells/ml, C₂: 2 × 10⁹ cells/ml, C₃: 2 × 10⁸ cells/ml

为: $Y_2 = 57.21 + 1.086 x, \hat{r}^2 = 0.936$; 而 $Y_3 = 45.084 + 1.697 x, r^2 = 0.933$ 。

图 2 所示的是细菌 S_0 滤液处理 *A. ta nuense* 藻后对藻细胞密度的影响。该图显示,在 *A. ta nuense* 的生长前期,高浓度的 G 处理对 *A. ta nuense* 的生长表现出抑制作用。例如,在培养的第 6 天, *A. ta nuense* 细胞密度约为对照的 54%, 而 G_2 和 G_3 处理的则分别约为 233% 和 254%。这种抑制作用随着时间的延长逐渐发生了变化。到第 10 天时, G_2 、 G_3 和 G_1 处理的 *A. ta nuense* 藻细胞密度分别为对照的 64%、298% 和 232%, 而在第 18 天时, 这种比率分别为 10%、316% 和 167%。这说明在 G_3 浓度下的 S_0 细菌滤液具有相当强烈的抑藻作用, 在 G_2 和 G_1 浓度下则对藻细胞的生长具有明显的促进作用, 其中 G_2 浓度比 G_1 浓度的促进作用更为显著。统计结果表明, 在 *A. ta nuense* 生长过程中, G_2 处理和对照 G_0 之间存在着高度的相关关系, 其关系式为 $Y_{C_1} = 39.386 + 0.086 x, \hat{r}^2 = 0.901$ 。而 $Y_{C_2} = 0.156 + 3.201 x, \hat{r}^2 = 0.979$; $Y_{C_3} = 44.757 + 1.555 x, \hat{r}^2 = 0.996$ 。Reim 等 1974 年的研究发现, 杆菌 *Bacillus* 可通过释放非专一的抗生素物质以杀死藻细胞。这与本实验的结果有类似之处。

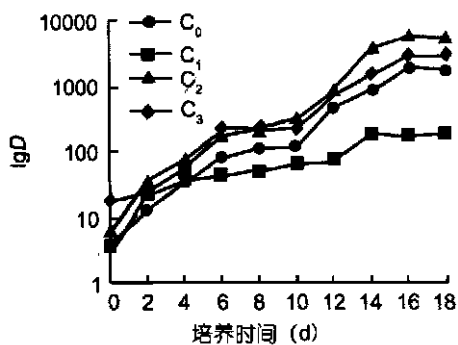


图 2 不同浓度的细菌 S_0 滤液处理下 D 随 T 的变化
Fig.2 Variation of the cell density (D) in the culture time (T) treated with different concentrations of bacterium S_0 filtrate

2.2 细菌对藻细胞叶绿素 a (Chl-a) 的影响

细菌 S_1 和 S_0 滤液对 *A. ta nuense* 藻细胞中 Chl-a 含量的影响分别总结在图 3 和图 4 中。从图 3 中可以看出, 较高浓度的细菌 S_1 滤液具有降低 *A. ta nuense*

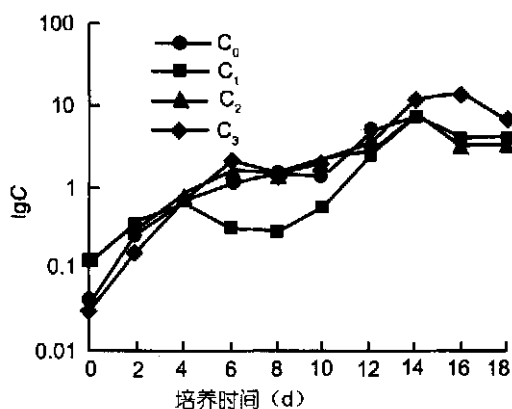


图 3 细菌 S_1 滤液处理对 *A. ta nuense* 藻细胞内叶绿素 a 含量 (C) 在 T 内的影响
Fig.3 The effect of different concentrations of bacterium S_1 filtrate on the chlorophyll a content (C) of the algae *A. ta nuense* in the culture time (T)

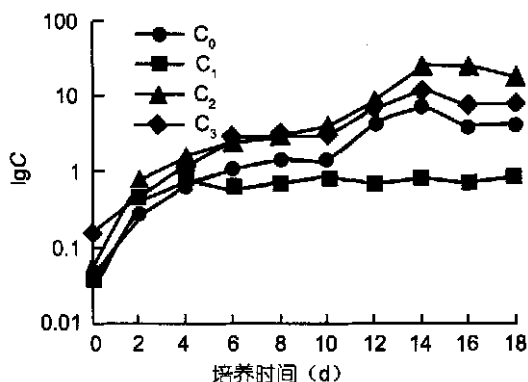


图 4 细菌 S_0 滤液处理对 *A. ta nuense* 藻细胞内叶绿素 a 含量 (C) 在 T 内的影响
Fig.4 The effect of bacterium S_0 filtrate on the chlorophyll a content (C) of the algae *A. ta nuense* in the culture time (T)

藻中的 Chl-a 含量的作用, 并且在藻生长前期的作用比后期的更为明显; G_2 处理与对照之间呈高度相关关系: $Y_{C_1} = 0.959 x - 0.381, r^2 = 0.957$ 。而尽管具有一定的波动性, 较低浓度的 G_2 和 G_3 处理却显示了一定的促进作用的倾向。两种处理也呈现出高度相关的回归关系: $Y_{C_2} = 0.189 + 0.858 x, r^2 = 0.946$; $Y_{C_3} = 0.020 + 1.682 x, r^2 = 0.823$ 。

细菌 S_0 对 *A. ta nuense* 中 Chl-a 含量的影响则更

为明显。如图 4 所示,在较高浓度的 G 处理下, S_0 具有明显地降低 *A. tamarense* 藻中的 Chl-a 含量的作用。在藻培养的第 6 天, Chl-a 含量约为对照的 55%, 在第 14 天则为 11%, 而在第 18 天则为 21%。而较低浓度的 G 和 G 处理对 Chl-a 含量则显示了促进的倾向, 并且和处理浓度有关。例如, G 浓度的促进作用就比 G 浓度的大。

由以上的实验结果可以看出, Chl-a 含量的变化趋势与 *A. tamarense* 藻细胞密度基本上是一致的, 所以 Chl-a 含量和细胞密度同样可以作为衡量藻细胞生物量的指标。因此, 有必要综合考察细菌滤液处理对 *A. tamarense* 藻的作用。

根据上述结果推断, 细菌在其生长过程中可能分泌了某些对藻类生长起调控作用的物质, 这些物质在较低浓度下可以促进藻细胞的增殖, 而在较高浓度下则起着抑制增殖的作用, 这种低浓度促进而高浓度抑制的作用类似于生长激素效应。本实验报道的仅是细菌 S_0 和 S_0 在特定浓度下对 *A. tamarense* 藻细胞生长的影响, 对于该活性成分究竟为何物, 其详细影响机理正在探讨之中。

Fukami 等 1992 年^[16]研究细菌抑制藻的作用时发现, 黄杆菌 *Flavobacterium* sp. 对裸甲藻 *Gymnodinium nagasakiense* 具有强烈的抑制和杀灭作用。Middelboe 等 1995^[14] 研究发现了铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 可产生大量的抗生素物质, 对其它细菌和藻类的生长具有抑制作用。由于藻类和细菌存在着复杂的共生关系, 因此, 在研究赤潮的发生机理时, 不能不考虑细菌作用的重要性。细菌对赤潮藻类的抑杀现象为利用微生物防治赤潮提供了可能的途径。

3 结论

根据以上实验结果, 可以得出细菌滤液处理对赤潮藻细胞生物量的影响与下列因素有关的结论: (1) 与细菌的处理浓度有关。在较高的处理浓度下均显示了对藻细胞生物量具有抑制作用, 而在较低浓度下则显示了一定程度的促进作用。(2) 与细菌的种属特异性有关。对于同一种 *A. tamarense* 藻种, 细菌 S_0 在抑制或促进的程度和倾向上均比 S_0 的更为明显。(3) 与藻细胞的生长阶段有关。不管是抑制或促进作用, 在藻细胞的生长前期时比后期的更为明显。

参考文献

- 1 齐雨藻, 钱锋。大鹏湾几种甲藻的分类学研究, 海洋与湖沼, 1994, 25(2): 206 ~ 210
- 2 李福东, 张诚, 邹景忠。细菌在浮游植物生长过程中的作用, 海洋科学, 1996, 6: 30 ~ 33
- 3 连玉武, 王艳丽, 郑天凌等。赤潮科学中藻菌关系研究的若干进展, 海洋科学, 1999, 1: 35 ~ 38
- 4 林元烧。有毒甲藻——塔马亚历山大藻在厦门地区虾塘引起赤潮, 台湾海峡, 1996, 15(1): 16 ~ 18
- 5 曾活水, 林燕顺, 姚瑞梅。厦门港赤潮调查研究论文集。北京: 海洋出版社, 1993。60 ~ 65
- 6 黄晓航。赤潮发生机理研究——海洋原甲藻的氮营养生理特征, 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 33 ~ 38
- 7 陈月琴, 屈良鹤, 曾晓梅等。南海赤潮有毒甲藻链状-塔马亚历山大藻的分子鉴定, 海洋学报, 1999, 21(3): 106 ~ 111
- 8 王斐, 郑天凌, 洪华生。海洋病毒在微生物食物环中的重要作用, 海洋科学, 1998, 6: 31 ~ 35
- 9 王素娟。藻类生物技术。上海: 上海科技出版社, 1994。20 ~ 23
- 10 郑天凌, 庄铁城, 蔡立哲等。微生物在海洋污染环境中的生物修复作用, 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(2): 524 ~ 534
- 11 Ietswaart T., Schneider P.J., Prins R.A.. Utilization of organic nitrogen sources by two phytoplankton species and a bacterial isolate in pure and mixed cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 6: 1554 ~ 1560
- 12 Mbuget J.L., Dakhama A., Lavoie M.C. et al.. Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved?, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1995, 18: 35 ~ 44
- 13 Daft M. J., Stewart W. D. P.. Ecological studies on algalytic bacteria in fresh waters, *Freshwat. Biol.*, 1975, 5: 577 ~ 596
- 14 Middelboe M., Sondergard M., Letarte Y. et al.. Attached and free-living bacteria: Production and polymer hydrolysis during a diatom bloom, *Microbial Ecol.*, 1995, 29: 231 ~ 248
- 15 Dakhama A.. Isolation and identification of anti-algal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Appl. Phycol.*, 1993, 5: 297 ~ 306
- 16 Fukami K., Nishijima T., Murata H. et al.. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* in tide and their effects on algal growth, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57(12): 2321 ~ 2326

(下转 67 页)

(上接 60 页)

INFLUENCE ON THE CELL BIOMASS OF RED TIDE ALGA *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech CULTURED WITH TWO MARINE BACTERIA

XU Jin-sen ZHENG Tian-ling GUO Qing-hua LIAN Yu-wu

(School of Life Sciences , Xianen University , 361005)

Received : Jul., 20, 2001

Key Words: *Alexandrium tamarense* , Marine bacteria , Cell biomass , Inhibition of red tide alga

Abstract

The culture of the red tide alga *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech treated with different concentrations of two marine bacteria (*S*, *Bacillus megaterium*, and *S*₀, *B. halmapulus*) filtrates, to investigate the effect of bacteria on the cell biomass (cell density and chlorophyll content) of the alga, showed that the growth and proliferation of the alga were related with the concentration, the genus speciality of the bacteria, and the growth stage of the alga itself. Treatment with greater concentration G (2×10^{10} cells/ml) of the bacterium revealed an inhibition, but an acceleration to some extent with lower concentrations of G and G₁ (2×10^9 , and 2×10^8 cells/ml, respectively), on the cell biomass of the alga. Meanwhile, bacterium *S*₀ showed a greater influence in both extent and trend of inhibition or acceleration than bacterium *S* did for the same alga *A. tamarense*. Furthermore, either inhibition or acceleration contributed much more clearly in earlier than in later stage of the proliferation of the alga *A. tamarense*.

(本文编辑:刘珊珊)