

菌 - 藻相互作用下胞外酶活性变化研究*

郑天凌¹ 徐美珠¹ 俞志明² 宋秀贤²

(¹ 厦门大学生命科学院应用与环境微生物研究所 361005)

(² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 报道了在实验室培养条件下塔马亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 与几株海洋细菌之间的生态关系。实验表明, 在培养前期, 培养液中的营养成分尚足以维持藻类和细菌的生长, 细菌的加入是胞外酶活性升高的主要原因所在; 在培养的后期, 混合培养液和藻对照培养液中胞外酶活性持续升高。 *A. tamarense* 在单独培养下, 其胞外酶活性从第 12 天起才有明显的提高, 第 16 天增加较快, 达到 $0.104 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$; 至第 20 天藻体衰败时, 胞外酶活性达到最高水平, 为 $0.385 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。 *Z* 细菌单独培养时, 其胞外酶活性在单独培养的 2d 后有一个高峰值 $0.133 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 随着培养时间的延长, 其酶活性逐渐降低。细菌 *Z* 和 *Z*₀ 与 *A. tamarense* 共培养下, 两者胞外酶活性变化趋势相似。

关键词 塔马亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*), 细菌胞外酶, 菌藻关系

赤潮藻类的生长和增殖, 除了与环境中温度、光照、盐度、营养物等理化因子有密切关系外, 还与海水中的微生物有着相当复杂的生态关系^[1-3]。一方面细菌吸收藻类产生的有机物质, 并为藻类的生长提供营养盐和必要的生长因子, 从而调节藻类的生长环境; 另一方面细菌也可通过直接或间接的作用抑制藻细胞的生长, 甚至裂解藻细胞, 从而表现为杀藻效应。微生物的这种抑藻、杀藻及有效降解藻毒的作用具有种间特异性。所以, 利用微生物的种间特异性, 抑杀有害藻类而不损害其它优良浮游微藻繁殖生长, 将成为防治有害藻类的重要手段^[4,5]。

胞外酶是指那些在细胞内合成后穿过细胞质膜的酶。胞外酶水平在水体中被认为是衡量细菌和微型生物生物量的重要指标^[6]。β-葡萄糖苷酶是最为常见的一种胞外酶, 它广泛存在于海水、半咸水、海洋沉积物中, 可以水解多糖类物质中的 β-葡萄糖苷键。

塔马亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 属于涡鞭毛藻纲, 是一种可产生 PSP(神经麻痹性贝毒) 毒素的海洋甲藻。由 *A. tamarense* 产生的 PSP 毒素可以通过贝类的积累而达到使人中毒的浓度。 *A. tamarense* 赤潮不仅对人体健康造成直接危害, 而且对水产养殖业、海洋生态环境、自然景观的破坏也是相当严重。因此, 开展对 *A. tamarense* 的研究具有重要的意义。本研究目的在于探讨海洋细菌在塔马亚历山大藻赤潮生

消过程中的作用类型, 为利用微生物防治赤潮提供可靠的理论和实践基础。

1 材料

1.1 藻种来源及培养条件

1.1.1 藻种 实验用的藻种为单细胞藻类塔马亚历山大藻, 由暨南大学水生生物研究所提供。

1.1.2 培养基 藻类所用培养液选用改良的 f/2 培养液进行培养。

1.1.3 培养条件 藻类置于三角瓶中培养, 温度为 $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 光照时间 L: D=12 h: 12 h, 光照强度 3 500 lx。

* 国家 973 项目 2001CB409710 号; 国家自然科学基金项目 39790110 号和 30070157 号。

第一作者: 郑天凌, 出生于 1955 年, 博士, 教授, 博导, 在研项目主要有: 国家“九·五”重大基金项目——中国沿海典型增殖区赤潮灾害发生动力学及其防治机理研究; 国家自然科学基金项目——海洋污染环境的生物修复作用研究等。通信地址: 厦门大学生命科学院应用与环境微生物研究所, 361005, E-mail: wshwzh@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期: 2001-07-27; 修回日期: 2002-05-18

1.2 菌种的来源

1.2.1 细菌来源 从厦门西港海域 1~10 cm 深的海洋沉积物中分离。

1.2.2 细菌的分离 采样时间为 1998 年 6 月, 采样地点为厦门西港, 取表面 1~10 cm 的沉积物。在 2216 E 海洋细菌固体培养基上培养 2 d 之后, 表面长出大小形态多样的细菌菌落。此时进行细菌的分离。最初分离出 12 株菌落特征差异较大的细菌, 进行预备实验。经过预备实验筛选出 3 株形态特征和生理生化反应特性具代表性的细菌, 暂称之为 Z₁, Z₂, Z₀, 分别对这 3 种细菌进行形态学和分子生物学的鉴定。

1.3 胞外酶活性的测定

实验选用 β-葡萄糖苷酶作为测定对象。

用定量移液器移取 2 ml 水样至预先经灭菌处理的培养瓶中。每个样品包括 2 个空白组和 3 个平行组, 加样后, 立即加入 50 μl 底物 MUF-D-glucoside 工作液 (用无菌蒸馏水和甲基溶剂以 1:1 的比例溶解底物配制而成, 浓度为 10 nmol/L), 样品中底物的终浓度为 250 μmol/L, 立即在空白组中加入 50 μL HgCl₂ 溶液 (浓度为 2 mmol/L) 终止酶反应。在室温下避光培养 2~3 h, 培养结束后立即在平行组中加入 HgCl₂ 溶

液终止反应, 并迅速冷冻保存。测试前逐步解冻恢复至室温, 用 Hitachi 860 荧光分光光度计测定样品荧光强度, 激发光和发射光波长分别为 353 nm, 450 nm (其它参数为: 狭缝宽 E_x = 10 nm, E_m = 10 nm, 扫描速率为 60/s)。胞外酶活性由下式计算:

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

其中 V 为胞外酶水解底物的速率 (μg / (L · h)); F 为平行样品的荧光强度 (平均值); F₀ 为空白样品的荧光强度 (平均值); S 为单位浓度标准荧光物质的荧光强度 (μmol / L); T 为培养时间 (h); B 为 1 mol 底物中有机组分的碳含量 (本实验底物为 MUF-D-glucoside, B = 72 (g · L) / mol)。

用无菌海水配制浓度为 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.032 μmol / L 的标准荧光物 MUF 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。

在该实验中观察对照藻在实验室中自然生活状态下培养液中 β-葡萄糖苷酶水平的变化。并取培养 48 h 的海洋细菌 Z₁ 和 Z₀ 以无菌海水稀释至密度为 1 × 10² 个 / ml 的活细菌悬浊液, 在培养的第 6 天将 2.5 ml 活菌液加入 500 ml 藻细胞的培养液, 即使培养液中的细菌密度为 5 × 10⁶ 个 / ml。分别测藻细胞密度和水中 β-葡萄糖苷酶的变化。实验结果如表 1~3 所示。

表 1 *A. tamarensis* 与细菌 Z₁ 或 Z₀ 共同培养对藻细胞密度的影响

Tab.1 The effect on alga cell density when *A. tamarensis* is cultured with bacteria Z₁ or Z₀

实验组	藻细胞密度 (个 / ml)										
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	20 d
A对照	7	11	27	74	215	589	881	1 328	2 310	1 885	1 540
A + Z ₁	11	13	33	78	129	454	944	1 488	1 982	2 000	1 905
A + Z ₀	7	14	20	49	139	362	960	1 652	2 920	2 130	1 620

表 2 *A. tamarensis* 与细菌 Z₁ 或 Z₀ 共同培养对水体中 β-葡萄糖苷酶活性 (μmol / (L · h)) 的影响

Tab.2 The effect on β-GlcA (μmol / (L · h)) when *A. tamarensis* is cultured with bacteria Z₁ or Z₀

实验组	胞外酶活性 μmol / (L · h)								
	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	20 d	
A藻对照	0.021	0.037	0.037	0.056	0.082	0.104	0.287	0.385	
A + Z ₁	0.041	0.184	0.148	0.059	0.145	0.322	0.471	0.489	
Z ₁ 对照	0.011	0.133	0.133	0.060	0.058	0.053	0.050	0.048	
A + Z ₀	0.086	0.482	0.406	0.111	0.186	0.479	0.488	0.490	
Z ₀ 对照	0.050	0.062	0.066	0.050	0.057	0.064	0.032	0.035	

表 3 菌藻共同培养时 β -葡萄糖苷酶活性同二者单独培养时酶活性相加之和的比较

Tab.3 The comparison of β GlcA in cocultured system with that in controlled system

实验组	胞外酶活性比(%)							
	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	20 d
A藻对照 + Z对照	100	100	100	100	100	100	100	100
A + Z 共同培养	128	108	87.1	50.9	104	211	140	113
A藻对照 + Z ₀ 对照	100	100	100	100	100	100	100	100
A + Z ₀ 共同培养	121	487	394	105	134	285	153	117

2 结果与讨论

2.1 革兰氏染色实验和光学显微镜观察

染色与镜检结果为: Z: 革兰氏阳性, 短杆状, 长 0.7~1.0 μm , 宽 0.4~0.5 μm , 两端椭圆。Z₀: 革兰氏阳性, 杆状, 带荚膜。Z₀: 革兰氏阳性, 短杆状, 长 1.2 μm , 宽 0.5 μm , 两端椭圆, 呈胶囊状。

2.2 细菌的分子生物学鉴定

利用国际数据库中的数据, 通过序列分析和树图构建, 得到这 3 株细菌在分类学中的位置: Z 属于鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*), 但基因库中尚未发现与之相符的种, 很可能为一新种。Z 与细菌基因库中巨大芽孢杆菌 (*Bacillus negetium*) 基本一致 (仅有 2 个核苷酸差异), 是 *Bacillus negetium* 的同种不同株系; Z₀ 为芽孢杆菌的一种, 与 *Bacillus halmapalis* 的 16S rDNA 差异仅为 2%。

2.3 *A. tamarese* 藻生活过程中胞外酶的自然变化以及加入细菌对其产生的影响

实验结果如表 1~3 所示。由表 1 可以看出, 在藻类生长的指数期加入该浓度的活细菌, 对藻细胞的生长有一定的影响。在培养前期, 细菌对藻细胞生长的影响不明显; 在培养的中期, 这种影响比较明显。在培养的第 14 天, 加入细菌 Z 的培养液中藻细胞的密度为对照的 138.9%, 加入细菌 Z₀ 的培养液中藻细胞密度为对照的 124.4%; 但总体上说来, 在这一浓度下, 细菌对藻细胞密度的影响是比较微小的, 各实验组中藻细胞的密度基本上处于同等水平的。在藻细胞水平基本相同的情况下观察各实验组中胞外酶所发生的变化, 可以更直接地体现藻菌共同培养对水体中胞外酶活性的影响。

从表 2~3 可以看出, *A. tamarese* 单独培养下, 其胞外酶活性从第 12 天起才有明显的提高, 第 16 天

增加较快达到 0.104 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 至第 20 天藻体衰败时, 胞外酶活性达到最高 (0.385 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$)。这表明在培养的前期藻细胞本身所产生的胞外酶活性较低, 当藻体衰败时, 则分泌出大量的胞外酶, 这些胞外酶对藻细胞本身的裂解有重要作用。

Z 细菌单独培养时, 其胞外酶活性在单独培养的 2 d 后有一个高峰值 0.133 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 随着培养时间的延长, 其酶活性逐渐降低, 至第 14 天仅有 0.048 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。而 Z₀ 细菌胞外酶活性变化在单独培养期间不显著, 其最高峰值仅有 0.066 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 至第 14 天相应下降到 0.035 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。这说明单独的海洋细菌在海水培养液中, 分泌胞外酶的量是有限的, 并且随着培养液中可被细菌吸收的营养成分逐渐减少, 细菌的胞外酶活性随之下降。

细菌 Z 和 Z₀ 与藻 *A. tamarese* 共同培养下, 两者胞外酶活性变化趋势相似。胞外酶活性均在加入细菌的第 2 天 (即培养的第 8 天) 达到一个高峰, 但此后其活性开始下降。到了培养的第 12 天其胞外酶活性降低到一个谷点。之后 A+Z 培养液中胞外酶活性从 0.059 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 迅速增加, 到了第 20 天达到 0.489 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 的最高值; A+Z₀ 培养液中胞外酶活性从第 12 天的 0.111 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 增至第 20 天的 0.490 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。

表 3 显示的是混合培养液中胞外酶活性与对照藻细胞培养液和细菌培养液中的胞外酶活性相加之和的比较, 可以看到, 在培养前期, A+Z₀ 混合培养液中胞外酶活性明显地大于两个对照之和。在加入细菌的第 2 天, 即培养的第 8 天, 其值相当于两个对照之和的 487%, 第 10 天相当于对照的 394%。而 A+Z 混合培养液中胞外酶活性与两个对照之和相差不多。第 8 天和第 10 天的值分别为两对照之和的 108% 和 87.1%。这表明 *A. tamarese* 和 Z₀ 细菌之间有着较为深刻和密切的联系。*A. tamarese* 可以有效地促进 Z₀ 细菌胞外酶活性的增长。而 *A. tamarese* 和 Z 细菌的相互影响不明显, 它不能促进 Z 细菌的胞外酶活性增长。

研究者认为,在培养前期,培养液中的营养成分尚足以维持藻类和细菌的生长,细菌的大量加入是胞外酶升高的主要原因所在。大量的细菌从富营养化的 2216E 海洋细菌培养基上转移到 f/2 藻类海水培养基中,环境发生了较大的改变。2216E 细菌培养基中富含细菌易于吸收的小分子物质如六元糖类, f/2 海水培养基中小分子物质的含量则相对贫乏。环境的改变使细菌胞外酶的活性亦产生较大的改变。加入空白海水培养基的细菌,其胞外酶活性相应地发生一定的变化。而有藻类生长的海水中,因为藻类生命活动的影响,高聚物质的含量相对比空白海水培养基要高。因此,细菌与藻细胞共同培养时,水体中的胞外酶活性迅速升高。在培养中期,细菌胞外酶活性出现了明显的低谷。这是由于藻细胞大量繁殖,在营养竞争上处于优势地位,对外加细菌的生长起抑制作用,从而反映细菌生物量指标的胞外酶活性随之降低。

在培养的后期,混合培养液和藻对照培养液中胞外酶活性持续升高。从表 2 中可以看出,自培养的第 16 天起,藻对照的胞外酶活性即出现急剧的升高。到了第 20 天,达到 $0.385 \mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。这是由于藻细胞本身在衰老和死亡的过程中向环境中释放大量的可溶性高聚有机物。这些高聚有机物诱导了细菌中胞外酶的合成。这些酶被释放到水体中后,又可对藻细胞的进一步裂解起作用。藻类衰亡物质的分解为细菌提供了丰富的营养,从而引起细菌的大量增殖,大量的细菌合成大量的胞外酶,水体中的胞外酶即急剧上升。所以,在水环境中藻类和细菌的关系是十分微妙

的。藻类生长占优势时可抑制细菌的量,而当藻类衰败时则促进了细菌的增殖^[5,6]。

Minster 和 Chrost 1990 年在野外研究中发现,在藻类赤潮的发生阶段,水体中的胞外酶活性一般较低,而在赤潮衰败时,水体中的胞外酶活性急剧上升。本实验的结果与此符合。

分析原因,研究者认为,在藻类生长的前期即赤潮发生阶段,初级生产力高,水体中存在大量小分子的六元糖(葡萄糖、半乳糖等),抑制了 β -葡萄糖苷酶的活性及其合成。而当藻类生长后期即赤潮衰败阶段,藻类大量死亡,释放出大量可溶性高聚有机物,诱导了胞外酶的合成,从而使胞外酶的活性升高。由此可以推断,胞外酶活性的高低,是藻细胞衰老程度和藻类赤潮发展阶段的一个重要指标。

参考文献

- 1 郑天凌,薛雄志.海洋微生物在环境生态中的作用,海洋科学,1994,3:35~38
- 2 郑天凌.微型藻类在海水环境中的自净作用,环境科学学报,1990,10(2):195~200
- 3 林伟,陈翥,刘秀云.海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻生长特点比较,海洋与湖沼,2000,31(6):647~652
- 4 赵以军,刘永定.有害藻类及其微生物繁殖的基础——菌藻关系的研究动态,水生生物学报,2000,20(2):173~181
- 5 连玉武,王艳丽,郑天凌.赤潮科学中菌-藻关系研究进展,海洋科学,1999,1:35~38
- 6 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):454~461

THE VARIATION OF BACTERIAL EXTRACELLULAR ENZYMIC ACTIVITY UNDER THE INTERACTION BETWEEN BACTERIA AND ALGAE

ZHENG Tianling¹ XU Meizhu¹ YU Zhiming² SONG Xuxian²

(¹School of Life Sciences, Xiamen University, 361005)

(²Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Jul., 27, 2001

Key Words: *Alexandrium tamense*, EEA, Interaction between bacteria and algae

Abstract

This article reported the ecological relationship between *Alexandrium tamense* and several strains of marine bacteria under laboratory cultivation condition. The result showed that at the prophase of cultivation, the addition of bacteria cor-

研究报告 *REPORTS*

duced an increasing of β -glucosidase activity (β GlcA) when the nutrition in the culture medium was sufficient to maintain the growth of algae and bacteria. At the anaphase of cultivation, the β GlcA rose continually in the mixed cultivation and the control. Also the finding indicated that firstly, after 12th day in the pure culture of *A.tamarese*, the β GlcA rose obviously and increased to 0.104 mmol/(L·h) at the 16th day. Secondly, the highest level of the β GlcA (0.385 mmol/L·h) has been detected at the 20th day during the decline of algae. And finally when *Z* bacteria was cultivated separately, the β GlcA reached a peak value at 2nd day (0.133 mmol/(L·h)), then begun decreasing with the time. Moreover, the variation of β GlcA, when *Z* and *Z*₀ were cultured with algae respectively, has been investigated during this research work.

(本文编辑:刘珊珊)