

海洋微藻培育系统抗弧菌作用机理*

林 伟 陈 驹 刘秀云

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于 1996 年 1—6 月在中国科学院海洋研究所对微藻培育系统抗弧菌作用机理进行研究。结果表明,球等鞭金藻 3011、三角褐指藻 2038、扁藻 1040 及小球藻 1061 等 4 种饵料微藻中与藻共存细菌单菌株及群落均无限制弧菌生长作用;各培养时期除菌微藻 3011 不能限制弧菌生长;除菌微藻 2038 具有微弱限制弧菌生长能力,处于生长指数后期时作用相对较强;与藻共存细菌群落回加除菌微藻 3011 及 2038,则恢复排斥弧菌能力,细菌先于弧菌加入时(如先加入 3d)排斥能力显现较快,反之则较慢。另外还发现,除菌藻 2038 代谢产物(0.65 μm 滤膜过滤获得)无限制弧菌生长能力,4 种饵料微藻(自然藻-菌混和体)代谢产物(0.2 及 0.65 μm 滤膜过滤获得)无限制弧菌生长作用。因此,微藻培育系统抗弧菌机理可归结为:以微藻为基础的微生物群落因优先占有生态空间而对弧菌菌群具有排它性。

关键词 自然及除菌微藻,与藻共存细菌,协同除菌,生态空间

中图分类号 Q938.8

海洋细菌与藻类有着密切的关系。藻细胞所分泌的有机物质可被周围细菌所摄取,其中一部分可经细菌代谢释放,为藻类生长提供营养及必需生长因子,形成一种互利关系(Halnes *et al*, 1974; Larsson *et al*, 1982; Jones, 1982; Ammerman *et al*, 1985)。除此之外,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类抗生素物质(Jones, 1982; Ohta *et al*, 1993);细菌也能抑制藻类生长,甚至可以裂解藻细胞(Jones, 1982; Imai *et al*, 1993; Yoshinaga *et al*, 1995)。另外,细菌还可以同藻类竞争其共存环境中的无机营养,如磷等(Faust *et al*, 1976)。由于藻菌间相互作用、双向选择,即可形成以藻为基础的特定的具有独特作用的与藻共存细菌群落。前期工作发现,多种饵料微藻(实为藻及与藻共存细菌混和体)对养殖动物的弧菌病原有普遍的排斥现象,呈现一定的生态防病效果(林伟等, 2000a)。但微藻及与其藻共存的细菌在抗弧菌过程中所起的作用并不清楚。本文通过研究除菌藻及未除菌藻培养液内与藻共存细菌同弧菌的相互关系,探索饵料微藻培育系统抗弧菌机理。

1 材料与方法

1.1 藻种来源及培养方法

实验用非无菌藻种于 1994 年 7 月取自本所种质库,系球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*) 3011 品系;三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*) 2038 品系;扁藻(*Platymonas*

* 农业部重点科研项目合同资助项目, 渔 95-13-96-06-06 号。林 伟,男,出生于 1963 年 12 月,副研究员, E-mail: czhang@ms. qdio. ac. cn

收稿日期: 1998-10-19, 收修改稿日期: 1999-09-16

sp.)1040 品系及小球藻(*Chlorella* sp.)1061 品系。除菌微藻藻种系除菌藻 3011 及除菌藻 2038, 来自本实验室(林伟等, 2000b)。

微藻培养液按照微藻大规模培养常用营养配方配制(林伟等, 2000a), 灭菌后备用。在藻种传代及培养过程中均严格遵循无菌操作规则。培养温度为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照度为 3000 lx, 光暗周期比为 14h:10h。

1.2 弧菌菌株来源及细菌培养基

弧菌菌株共 4 株, 其中菌株 10-1、21-1 于 1990 年分离自中国对虾(*Penaeus chinensis*)病虾肝脏, 菌株 87-1 于 1990 年分离自中国对虾病虾心脏。菌株 65# 于 1989 年分离自海湾扇贝(*Argopecten irradians*)幼体, 系扇贝幼体面盘解体致病菌。菌株 10-1 及 87-1 均为副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*), 菌株 21-1 为溶藻弧菌(*V. alginolyticus*); 菌株 65# 为鳃弧菌(*V. anguillarum*)。

细菌培养基: 2216E 液体及固体培养基。弧菌选择性硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(TCBS)培养基。

1.3 微藻培育系统内与藻共存细菌获得方法

1.3.1 与藻共存细菌单菌株获得方法 将未经抗生素处理的自然带菌微藻培养液(培养 6d)适度稀释, 吸 0.1ml 涂布 2216E 培养基平板。于 25°C 培养 7d。根据不同形态挑取单菌落于 2216E 培养基斜面培养, 4°C 保存。

1.3.2 与藻共存细菌群落获得方法 将自然带菌微藻培养液(培养 6d)100ml 经 $0.65\mu\text{m}$ 滤膜无菌过滤, 滤液再经 $0.2\mu\text{m}$ 滤膜无菌过滤。与藻共存细菌群落滞留于 $0.2\mu\text{m}$ 滤膜表面。可于无菌液体内振荡摇离滤膜。

1.4 微藻及细菌计数方法

采用血球计数器计数微藻细胞密度。采用 2216E 培养基平板涂布法计数与藻共存细菌及弧菌数量。采用 TCBS 培养基平板涂布计数弧菌数量。

1.5 除菌微藻同弧菌相互关系研究实验方法

经 2216E 液体培养基预先活化的弧菌, 适度稀释后, 分别加入 100ml 除菌微藻培养液中(即每株弧菌只加入一种除菌藻培养液内), 藻液中弧菌密度均为 3×10^3 cfu/ml 左右。光照培养 15d。定期吸取 0.1ml 培养液或经适度稀释液体在 2216E 培养基平板上涂布。 25°C 培养 2d。计数弧菌菌落数目。在实验过程中同时用高温高压灭菌海水($0.2\mu\text{m}$ 滤膜预先过滤)培养弧菌供作对照。

1.6 与藻共存细菌同弧菌相互关系研究实验方法

1.6.1 与藻共存细菌单菌株同弧菌相互关系研究实验方法 经 2216E 液体培养基预先活化的弧菌, 适度稀释, 同融化后处于 45°C 2216E 固体培养基混匀, 制备平板。将所用细菌单菌株(根据方法 1.3.1 获得)经斜面活化后点种平板表面。 4°C 过夜。 25°C 培养数天, 定期观察结果。

1.6.2 与藻共存细菌群落同弧菌相互关系研究实验方法 根据方法 1.3.2 获得与藻共存细菌群落。将附有细菌的滤膜置于与所过滤藻液同体积的 $0.2\mu\text{m}$ 滤膜过滤高温高压灭菌海水(100ml)中振荡。4 株弧菌经活化后, 适度稀释, 分别加入此海水中(使其在液体中密度为 3.0×10^3 cfu/ml 左右), 光照下培养数天。定期吸取 0.1ml 液体或经适度稀释

液体,在 TCBS 及 2216E 平板上涂布,25℃ 培养 2d。计数菌落数目。

1.7 除菌微藻回加藻相关细菌群落状态下同弧菌相互关系研究实验方法

获得微藻 3011 及 2038 培养液内细菌群落(根据方法 1.3.2),将其分别加入除菌微藻 3011 及 2038(生长指数后期)中培养 3d,经 2216E 平板涂布检测生长良好。将预先活化,适度稀释的 4 株弧菌分别加入 2 种藻中(每种藻培养液只加入 1 株弧菌),培养数天。

将 2 种微藻内细菌群落分别与处于合适密度下的 4 株弧菌一一搭配,同时加入处于生长指数后期除菌微藻 3011 及 2038 培养液中(即每种藻液中只加入 1 株弧菌及各自细菌群落),培养数天。

将 4 株弧菌预先活化,适度稀释后分别加入 2 种除菌微藻 3011 及 2038 培养液(处于生长指数后期)中(即每种藻液中只加入 1 株弧菌),培养 3d。经平板涂布检测,发现金藻 3011 中弧菌生长旺盛,三角褐指藻 2038 中,弧菌维持一定生长,此时加入与藻共存细菌,培养数天。

以上三组实验均定期检测细菌数量(见方法 1.6.2)。

2 结果与讨论

2.1 除菌微藻与弧菌相互关系

处于生长指数后期除菌藻对弧菌生长影响的实验结果如图 1 所示。当除菌藻 3011 处于生长指数后期,藻细胞密度达到高峰时(3.8×10^6 cells/ml),弧菌加入后生长非常旺盛,有时甚至超过对照实验中弧菌生长水平。表明处于此生长阶段的除菌藻 3011 不能限制弧菌生长,而处于此生长阶段的自然未除菌金藻 3011 藻强烈排斥弧菌(弧菌加入 1—2d 降至 10cfu/ml 以下)(林伟等,2000a)。处于此生长阶段的除菌藻 2038 同对照相比,有一定限制弧菌能力,但同处于生长指数后期能够严重限制弧菌生长的自然带菌藻 2038 相比(弧菌加入 24h 内均降至 10cfu/ml 以下)(林伟等,2000a),表明此时的除菌藻 2038 限制弧菌生长能力仍然很弱。

将弧菌加入培养初期除菌微藻,培养数天。结果表明:处于此生长期除菌藻 3011 不能限制弧菌生长,弧菌同与处于生长指数后期藻 3011 内生长时特点类似。此时的除菌藻 2038 同样能够微弱限制弧菌生长,但同处于培养初期未除菌藻 2038 相比(弧菌在 1—2d 内降至 10cfu/ml 以下),弧菌密度仍然较高(65# 可达到 3.09×10^5 cfu/ml)。

将弧菌加入已培养一个月的除菌微藻中培养十几天,结果表明,此时的除菌藻 3011 对弧菌生长无不利影响,弧菌生长有时甚至超过对照。与藻的其它生长阶段相比,此时弧菌密度达到高峰的速度更快。表明培养后期除菌金藻培养液更适于弧菌生长。弧菌在培养一个月后的除菌藻 2038 中生长受到微弱限制。除菌株 10-1 基本维持原数量不变外,65#、87-1、21-1 均有一定生长,呈现较高密度水平(均高于 5.0×10^5 cfu/ml)。而处于此生长阶段未除菌藻 2038 仍能强烈限制弧菌生长(弧菌加入 1—2d 降至 10cfu/ml 以下)(林伟等,2000a)。

综合以上实验结果,可以得出如下结论:除菌球等鞭金藻 3011 在其整个生长周期中,均对弧菌生长无限制作用。而除菌三角褐指藻 2038 则有微弱限制作用。其中处于生长指数后期时作用相对较强,而在培养后期作用相对较弱。培养后期限制作用相对较弱,可能同此时微藻代谢产物累积了较多的适于弧菌生长物质所致。另外,作者还发现加入弧

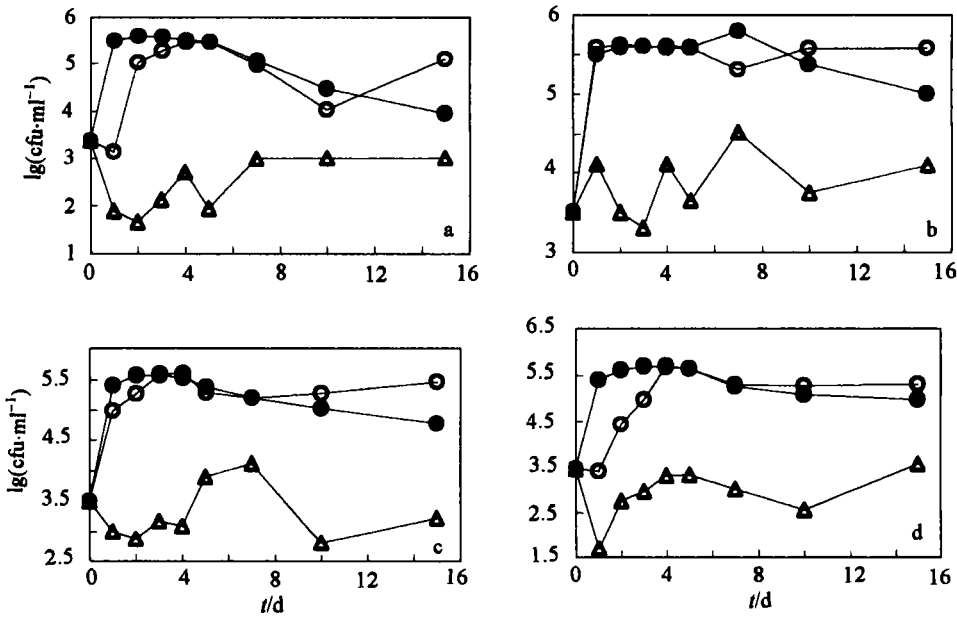


图 1 弧菌在除菌藻(生长指数后期)中的生长状况

Fig. 1 Growth conditions of the vibrios in axenic algae (late exponential phase)

a. 弧菌 10-1(vibrio 10-1); b. 弧菌 65#(vibrio 65#); c. 弧菌 87-1(vibrio 87-1); d. 弧菌 21-1(vibrio 21-1).

● 在对照中(in control); ○ 在除菌藻 3011 中(in axenic *Isochrysis galbana* 3011);

△ 在除菌藻 2038 中(in axenic *Phaeodactylum tricornutum* 2038)

菌的除菌藻 3011 有藻细胞下沉附底现象。

为了进一步研究除菌藻 2038 微弱限制弧菌生长作用机制,又设计进行如下实验:将处于生长指数后期除菌藻 2038 经 0.65μm 滤膜按无菌操作规则过滤,排除藻细胞,获得含有藻代谢产物无菌过滤液,将 4 株弧菌菌株分别加入后观察其生长情况。结果发现弧菌加入后能在更短时间内(同未过滤时相比)数量达到高峰,弧菌密度也更高(均高于 1 × 10⁶ cfu/ml),表明微藻 2038 藻细胞代谢产物不能限制弧菌生长。

2.2 与藻共存细菌同弧菌的相互关系

2.2.1 与藻共存细菌单菌株同弧菌的相互关系 根据方法 1.3.1 获得 87 株 4 种微藻中与藻共存细菌单菌株,其中金藻 3011 内 39 株,三角褐指藻 2038 内 27 株,扁藻 1040 内 17 株以及小球藻 1061 内 14 株。点种含弧菌平板并培养数天(见方法 1.6.1)。实验结果表明:与藻共存细菌及 4 株弧菌生长均良好。未发现与藻共存细菌菌落周围出现透明抑菌圈。结论:筛选得到的与藻共存细菌对弧菌生长无限制作用。

2.2.2 与藻共存细菌群落同弧菌的相互关系 将附有细菌滤膜加入无菌海水中,振荡后立即吸取 0.1ml 适度稀释液体作平板涂布。发现同自然带菌藻相比,细菌群落组成特征基本一致(通过对比观察 2216E 培养基平板),但数量略有下降(可能在过滤时丢失)。弧菌加入后培养数天。实验结果表明:与藻共存细菌及弧菌均生长良好。4 株弧菌数量均在加入后 24h 内达到很高水平(2.0 × 10⁵ cfu/ml 以上)。与藻共存细菌含量可达到 1.08 × 10⁶ cfu/ml 以上,表明与藻共存细菌群落对弧菌生长无限制作用。

2.3 除菌微藻同与藻共存细菌群落混和状态下对弧菌生长影响

未除菌饵料微藻能够限制弧菌生长。除菌微藻及其细菌群落单独存在时,均不能限制弧菌生长(除菌藻 2038 有微弱限制能力,但其代谢产物无限制作用)。为了进一步研究微藻培育系统限制弧菌生长作用机理,必须将藻及其与藻共存细菌混和,探索其同弧菌相互关系。

从图 2、图 3、图 4 中可以看出,同微藻及与藻共存细菌互相分离、单独存在时相比,二者共同存在时确实对弧菌生长产生限制作用。当与藻共存细菌首先加入,大量增多后,排斥能力最强;二者同时加入时,初期均生长良好,以后随着与藻共存细菌增多,弧菌逐渐减

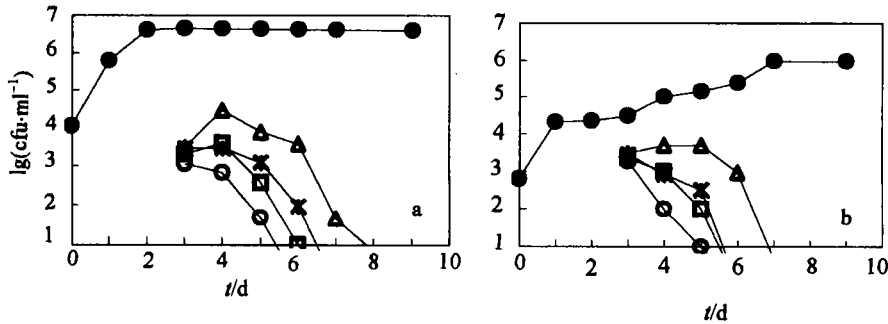


图 2 除菌藻及与藻共存细菌混和对弧菌生长影响(先加入与藻共存细菌 3d)

Fig. 2 Effects of mixtures of axenic algae and algae-concomitant bacteria on growth of the vibrios (algae-concomitant bacteria are added three days prior to the vibrios)

a. 在除菌藻 3011 中(in axenic *Isochrysis galbana* 3011);

b. 在除菌藻 2038 中(in axenic *Phaeodactylum tricornutum* 2038);

● 与藻共存细菌 (algae-concomitant bacteria); Δ 弧菌 65 # (vibrio 65 #); * 弧菌 87-1 (vibrio 87-1);

□ 弧菌 21-1 (vibrio 21-1); ○ 弧菌 10-1 (vibrio 10-1)。图 3、图 4 同

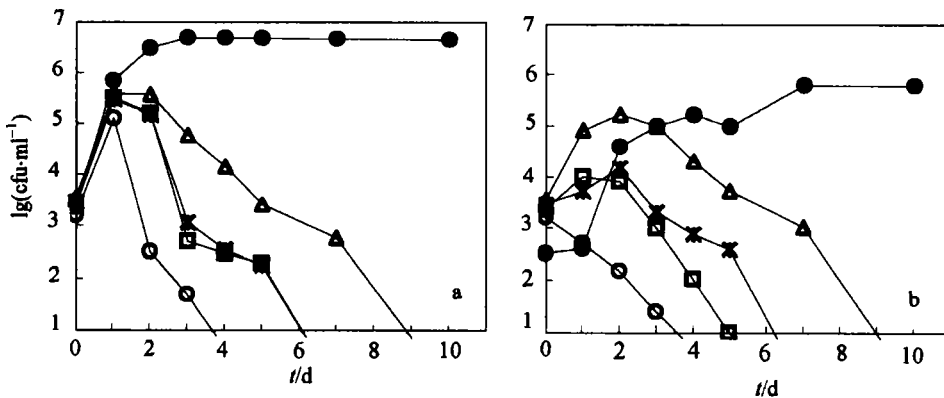


图 3 除菌藻及与藻共存细菌混和对弧菌生长影响(与藻共存细菌与弧菌同时加入)

Fig. 3 Effects of mixtures of axenic algae and algae-concomitant bacteria on growth of the vibrios (algae-concomitant bacteria and the vibrios are added simultaneously)

a. 在除菌藻 3011 中(in axenic *Isochrysis galbana* 3011);

b. 在除菌藻 2038 中(in axenic *Phaeodactylum tricornutum* 2038)

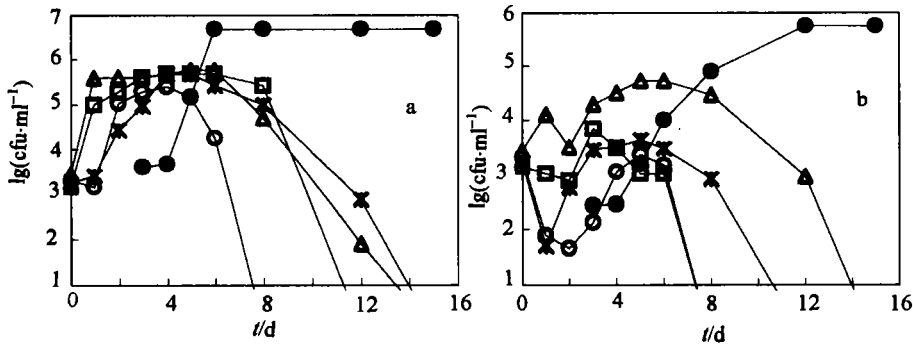


图4 除菌藻及与藻共存细菌混和对弧菌生长影响(弧菌先加入3d)

Fig. 4 Effects of mixtures of axenic algae and algae-concomitant bacteria on growth of the vibrios (the vibrios are added three days prior to algae-concomitant bacteria)

a. 在除菌藻 3011 中(in axenic *Isochrysis galbana* 3011);

b. 在除菌藻 2038 中(in axenic *Phaeodactylum tricornutum* 2038)

少。排斥弧菌能力同与藻共存细菌先加入时相比相对减弱,当弧菌首先加入,占据优势后,再加入与藻共存细菌时,对弧菌排斥能力相对来说最弱,限制弧菌生长需要更长时间,表明限制弧菌生长,不仅需要微藻及与藻共存细菌相互配合,协同作用,而且在数量上还需要达到一定水平。实验中还可以看出,藻同其与藻共存细菌比弧菌具有更强亲和力,即使初期处于劣势(图4),仍能逐渐占据优势,最终排除弧菌。

为了进一步明确微藻培育系统排斥弧菌作用机理,还设计进行微藻培育系统代谢产物同弧菌相互关系实验;将4种自然带菌微藻培养液(处于生长指数后期)经 $0.2\mu\text{m}$ 滤膜无菌过滤,排除微藻及细菌,获得含有代谢产物的无菌无藻滤液,分别加入合适密度4株弧菌(每种过滤液只加入一株弧菌),培养数天。结果显示4株弧菌在过滤液中生长良好,同无菌海水生长相仿,表明代谢产物对其生长无不利影响。考虑到 $0.2\mu\text{m}$ 滤膜可能阻挡或吸附大分子代谢产物,造成结果偏差,又采用 $0.65\mu\text{m}$ 滤膜滤除藻细胞,观察过滤液(含与藻共存细菌)对弧菌生长有无影响。结果仍然表明此过滤液不能限制弧菌生长,与藻共存细菌同弧菌均生长良好(48h内均达到生长高峰)。

微生物间或者通过对营养物质及能源的竞争而生存(条件不适宜时),或者通过空间竞争而生存(条件适宜时)(Campbell, 1983)。从本文实验结果可以看出,藻不存在时,与藻共存细菌同弧菌生长良好,与藻共存细菌对弧菌无拮抗作用;排除与藻共存细菌,弧菌也能在纯藻环境中良好生长,微藻培育系统(藻-菌混和体)代谢产物也对弧菌生长无限制,以上结果均表明不存在不利于弧菌生存的营养及能源条件。因此,弧菌在饵料微藻培育系统中生长受到排斥,是由于空间竞争失败所致。抗弧菌功能显现需藻菌共存,缺一不可。根据前期工作(林伟等, 2000a)及本文研究结果,可以认为当饵料微藻处于培养初期时,因藻与其相关细菌密度较低,占据生态空间能力有限,排斥弧菌能力较弱。处于生长指数后期后,二者的密度均达到很高水平,能最有效地占据生态空间,此时排斥能力很强。当藻处于严重老化状态时,由于藻密度下降,藻细胞活力下降,使之不能同其细菌群落有效配合,排斥弧菌能力下降,也可能由于藻的老化,引起细菌群落内细菌种类及数量的变

化,使细菌群落结构发生变化,导致排斥弧菌能力下降;或者由于藻老化后,释放更多能适于弧菌生长的代谢产物所致。在人为地将微藻及其细菌群落互相分离又重新混和的过程中,藻菌形成的稳定及平衡遭到破坏,混和后不能迅速有效地恢复,使得排斥弧菌能力也相对减弱。以后随着平衡重新建立,抗弧菌能力随之恢复并增强。总之,抗弧菌机理可以归结为:以微藻为基础的微小生物群落因优先占有生态空间而对弧菌菌群具有排他性。

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,特定的微生物群落生态系中是相对稳定的功能单位。根据以微藻为基础的微小生物群落排斥弧菌的特点及已初步探明的作用机理,可以对微藻的细菌群落进行分析,强化、优化组合,加强微藻培育系统的抗弧菌能力,更好地发展应用生态调控防病技术。本文只是对微藻培育系统抗弧菌机理进行了初步研究,深入研究还需要弄清与藻共存细菌群落结构特点,筛选同藻密切相关的与藻共存细菌,以便于进一步深入研究抗弧菌机理。

参 考 文 献

- 林 伟,陈 弼,刘秀云,2000a. 饵料微藻培育系统内海洋弧菌生长特点. 海洋与湖沼,31(4):398—403
- 林 伟,陈 弼,刘秀云,2000b. 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,31(6):647—652
- Ammerman J W, Azam F, 1985. Bacterial 5'-nucleotidase in aquatic ecosystems: a novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science*, 227: 1338—1340
- Campbell R, 1983. *Microbial Ecology*, 2nd ed. Basic Microbiology. Vol 5. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 17—18
- Faust M A, Correll D L, 1976. Comparison of bacterial and algal utilization of orphosphosphate in the estuarine environment. *Mar Biol*, 34: 151—162
- Haines K C, Guillard R R L, 1974. Growth of vitamin B₁₂-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B₁₂-producing marine bacteria. *J Phycol*, 10: 245—252
- Imai I, Ishida Y, Hata Y, 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar Biol*, 116: 527—532
- Jones A K, 1982. The Interaction of Algae and Bacteria. In: Bull A T, Slater J H ed. *Microbial Interactions and Communities*. London: Academic Press, 189—227
- Larsson U, Hagstrom A, 1982. Fractionated phytoplankton primary production, exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Mar Biol*, 67: 57—70
- Ohta S, Chang T, Ikegami N *et al*, 1993. Antibiotic substance produced by a newly isolated marine microalga, *Chlorococcum* HS 101. *Bull Environ Contem Toxicol*, 50: 171—178
- Yoshinaga I, Kawai T, Ishida Y, 1995. Lysis of *Gymnodinium nagasakiense* by Marine Bacteria. In: Lassus P, Arzul G, Erard E *et al* ed. *Harmful Marine Algal Blooms*. Paris: Technique et Documentation-Lavoisier, Intercept Ltd, 687—692

THE ANTIVIBRIO MECHANISM OF MICROALGAE CULTIVATION SYSTEM

LIN Wei, CHEN Dou, LIU Xiu-Yun

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract January to June 1996 experiments in IOCAS showed that algae-concomitant bacteria (single strains or communities) isolated from the nonaxenic algae *Isochrysis galbana* 3011, *Phaeodactylum tricornutum* 2038, *Platymonas* sp. 1040 and *Chlorella* sp. 1061 can not inhibit growth of the four vibrio strains (*Vibrio alginolyticus* one, *V. anguillarum* one and *V. parahaemolyticus* two.) Axenic algae 3011 can not restrict growth of the vibrios during its whole generation. Axenic algae 2038 has faint antivibrio function, especially in the late phase of exponential growth. Mixtures of the two axenic algae with their respective bacteria community (algae-concomitant bacteria were reintroduced into the bacteria-free microalgae) can resume antivibrio function significantly, which appears fast when axenic algae meets algae-concomitant bacteria before the vibrios (3d, for example), appears slowly if the vibrios are added in the axenic algae before the algae-concomitant bacteria. Filtrate of axenic algae 2038 lost antivibrio function. In addition filtrates of the four nonaxenic algae (algae-concomitant bacteria free or not) can not restrict growth of the four vibrio strains. Therefore, it is concluded that nonaxenic microalgae can play an antivibrio role because the algae-concomitant bacteria have priority in occupying ecological space.

Key words Nonaxenic and axenic microalgae, Algae-concomitant bacteria, Antivibrio cooperation, Ecological space