

琼胶分解菌对紫菜分泌液和抽取液的生长反应及趋化性*

丁美丽

(中国科学院海洋研究所)

海洋藻类与海洋细菌(以下简称藻-菌)之间存在着复杂的关系。从研究海洋食物链和物质循环的角度来看,阐明藻-菌之间的营养关系是重要的一环。

海藻在正常生长过程中能分泌多种有机物质,如糖、氨基酸、维生素、核酸及其衍生物等等^[2,9,16,18]。这些胞外产物能刺激或支持细菌的生长^[4,8]。同样,胞外产物经细菌分解后,有些小分子的物质又能被海藻细胞吸收和再利用。

1972年, Bell 和 Mitchell^[3] 在研究海洋细菌对海藻胞外产物的趋化性和生长反应的基础上,提出了“藻际”(Phycosphere)的概念。“藻际”与陆地植物的“根际”的概念相似,指藻类细胞所排出的胞外产物向外扩展至一定距离的范围内,藻类所产生的胞外产物能刺激或抑制细菌的生长。

我们认为用“藻际”这个概念来解释藻-菌之间的营养关系颇有意义。Bell 等主要用单细胞藻进行试验,而定生海藻与海洋细菌之间的营养关系如何,迄今报道甚少^[10]。本文报道用紫菜为材料,进行琼胶分解菌对紫菜分泌液和抽取液的生长反应和趋化性的一些试验结果,期望对于深入探索定生海藻与细菌之间的营养关系能有所助益。

一、材料和方法

(一) 对细菌生长的影响

1. 材料

菌株: PA04 是从紫菜表面分离出来的分解琼胶的优势菌株,为革兰氏阴性能动杆菌,在蛋白胨牛肉膏培养基上生长快,菌落乳黄、圆而扁平、下陷,周围有透明圈。

附菌玻片: 新玻片,先在洗液里浸泡24小时后,经漂洗,煮沸和热压灭菌,然后挂在青岛汇泉湾紫菜养殖架上5天左右,让玻片靠近紫菜,使藻体周围的细菌附着在玻片上。

紫菜: 条斑紫菜 (*Porphyra Yezoensis*), 取自汇泉湾紫菜养殖架,经无菌陈海水漂洗三次,并用无菌棉花仔细轻擦藻体表面。

紫菜分泌液: 取经上述处理的紫菜10g,放入1500ml无菌陈海水中,在室温10°C左右自然光下培育一天后,取出紫菜,海水经孔径0.2 μ 的滤膜抽滤除菌,所得滤液即为紫菜

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第979号。本实验所用紫菜由中国科学院海洋研究所藻类实验生态组提供,特此致谢。

收稿日期: 1982年7月29日。

分泌液。

紫菜抽取液: 取经漂洗等处理的紫菜, 放入玻璃研钵中捣烂, 每克紫菜加入 1ml 经活性炭处理的陈海水, 然后用筛绢挤出液体, 经 12,000rpm 离心 30 分钟, 取上清液, 再经孔径 0.2μ 滤膜抽滤除菌, 即为浓度 1:1 (或 50%) 紫菜抽取液, 在 -4°C 保存备用。

琼胶: Difco 琼胶。

2. 方法

为观察紫菜对海洋细菌生长的影响, 取 1000ml 的无菌三角瓶 2 个, 分别加入无菌海水 500ml, 补充 NH_4NO_3 至浓度为 0.05%。在其中一个三角瓶中加入经处理的紫菜 0.7g, 并在每个三角瓶中加入附菌玻片 3 片 (预先测定玻片表面菌量)。将三角瓶放在日光灯下培育, 每天光照 10 小时, 光强为 5000 勒, 水温约 13°C 。两天后测定玻片表面菌数。

试验紫菜分泌液等对海洋细菌生长的影响, 取 1000ml 无菌三角瓶 4 个, 每瓶加入已知菌量的附菌玻片 3 片, 并分别加入以下物质:

- (1) 无菌陈海水 500ml + 0.5ml 陈海水;
- (2) 无菌陈海水 500ml + 紫菜抽取液 0.5ml, 使浓度为 0.05%;
- (3) 无菌陈海水 500ml + Difco 琼胶 0.5ml, 使浓度为 0.05%;
- (4) 紫菜分泌液 500ml + 0.5ml 陈海水。

上述各瓶均培育于室温 13°C 左右黑暗处, 两天后, 测定玻片表面的菌数。

为测定不同浓度紫菜抽取液对琼胶分解菌 PA04 生长的影响, 取 250ml 三角瓶 6 个, 分别加入含 0.05% NH_4NO_3 的陈海水 49ml, 及不同浓度紫菜抽取液 1ml, 使紫菜抽取液浓度分别为 1%, 0.5%, 0.1%, 0.01% 和 0.001%, 对照加入 1ml 陈海水。然后, 接入 0.1ml PA04 菌株菌悬液, 在 23°C 条件下培育两天后, 测定菌量。

细菌分析方法: 把附菌玻片放入盛有 50ml 无菌陈海水、20g 玻璃珠的 500ml 三角瓶中, 在振荡器中摇动 20 分钟。取菌悬液经适当稀释后, 在下列培养基上采用涂布平板法测定菌数。测定总异养菌菌数选用海水蛋白胨牛肉膏培养基; 测定琼胶分解菌菌数是用 0.1% 紫菜浸出液培养基 (陈海水 900ml, NH_4NO_3 2g, 1% 紫菜浸出液 100ml, 琼胶 20g, pH7.4)

(二) 细菌趋化性试验

1. 材料

菌株: 分离自紫菜藻体表面能分解琼胶的优势菌株——PA04, PA65, 和 PA71, 这些菌株均为革兰氏阴性, 运动活泼的杆菌, 经初步鉴定 PA65 和 PA71 为 *Pseudomonas*。PA65 和 PA71 培育于海水蛋白胨牛肉膏培养基; PA04 培育于 0.5% 紫菜浸出液的培养液中, 23°C 振荡培养过夜, 然后取出 1ml 移至 30ml 相同的培养液中, 振荡培养, 待达到一定菌量后取出, 将培养液 3000rpm 离心 10 分钟, 取沉淀物用经活性炭处理的陈海水洗涤两次, 再用浓度为 0.05% 吐温 80 的陈海水制成菌悬液。经镜检, 绝大多数细胞运动, 将菌液稀释至 $10^8/\text{ml}$ 。

陈海水: 陈海水 1000ml, 加入活性炭 1.5g, 振荡 60 分钟, 过滤, 再经孔径 0.2μ 滤膜抽滤除菌。

吐温 80: 用蒸馏水配成 0.5% 吐温 80 的母液, 经孔径 0.2μ 滤膜抽滤除菌后, 在 -4°C 条件下保存、备用。

毛细管: 内径 $0.2 \times 30\text{mm}$ 毛细管, 在热洗涤剂里浸泡过夜, 用热水反复冲洗, 再用蒸馏水冲洗数次后, 烤干、干热灭菌后备用。

趋化板: 用有机玻璃作材料, 按照 Palleroni 的设计加工制成^[12]。紫外线灭菌。

吸引剂: 紫菜抽取液, 制备方法如前所述; 用陈海水作为对照。

2. 方法

在每个趋化板小室里加入 0.3ml 菌悬液, 然后把吸有不同吸引剂的毛细管平放在联结小室的趋化槽里, 让毛细管的两端位于趋化板小室中央, 在 23°C 条件下培育 15 分钟。取出毛细管, 仔细擦干外壁, 再将其中的内含物移至盛有 0.05% 吐温 80 的陈海水的试管中, 冲洗毛细管内壁, 冲洗液也一并加入试管中。经稀释后, 在 0.1% 的紫菜浸出液培养基上计数。

二、结 果

1. 紫菜分泌液、抽取液和琼胶等对琼胶分解菌和异养菌生长的影响

有关紫菜、紫菜分泌液和紫菜抽取液等对玻片表面异养菌和琼胶分解菌生长的影响, 试验所得结果见表 1, 2 和图 1。

表 1 紫菜对玻片表面海洋细菌生长的影响
(细菌数/ cm^2)

细 菌	海 水	海水+紫菜
异 养 菌	5.7×10^6	9.7×10^6
琼胶分解菌	1.7×10^3	8.2×10^3

表 2 紫菜分泌液、抽取液及琼胶对玻片表面海洋细菌生长的影响
(细菌数/ cm^2)

细 菌	陈海水	紫菜分泌液	0.05% 紫菜抽取液	0.05% 琼胶
异 养 菌	1.4×10^3	3.5×10^3	5.4×10^3	9.2×10^3
琼胶分解菌	1.8×10^4	7.8×10^4	6.4×10^4	2.9×10^5

从表 1 可以清楚地看出, 紫菜对玻片表面的细菌有明显影响。经两天培育后, 在两个三角瓶中, 玻片表面附着的细菌菌数虽均有明显的增加, 但试验组(加紫菜)异养菌和琼胶分解菌菌数分别比对照组高 1.7 和 4.8 倍, 说明在培养液中加入一定量的紫菜, 有利于细菌生长和繁殖。

表 2 表明, 0.05% 紫菜抽取液、0.05% 琼胶和紫菜分泌液对异养菌和琼胶分解菌的生长都有促进作用。在上述浓度条件下, 促进异养菌生长的能力是琼胶 > 紫菜抽取液 > 紫菜分泌液。而对琼胶分解菌来说, 促进生长的能力是琼胶明显高于紫菜分泌液和紫菜抽取液。

在试验条件下, 紫菜抽取液的浓度越高, 对琼胶分解菌生长的促进作用越明显(图1)。

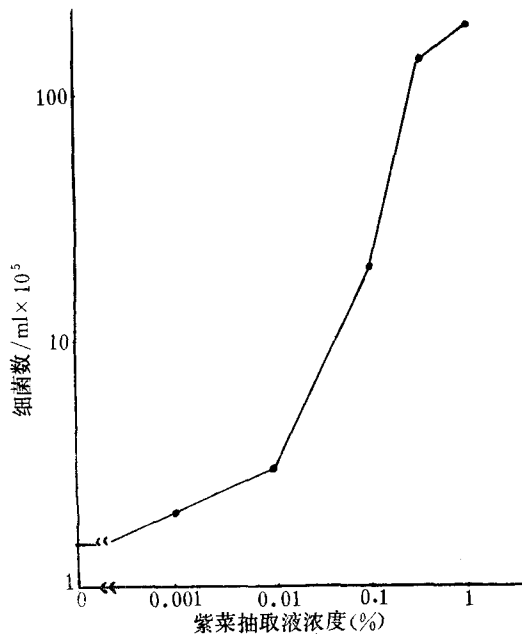


图1 不同浓度紫菜抽取液对琼胶分解菌 PA04 生长的影响

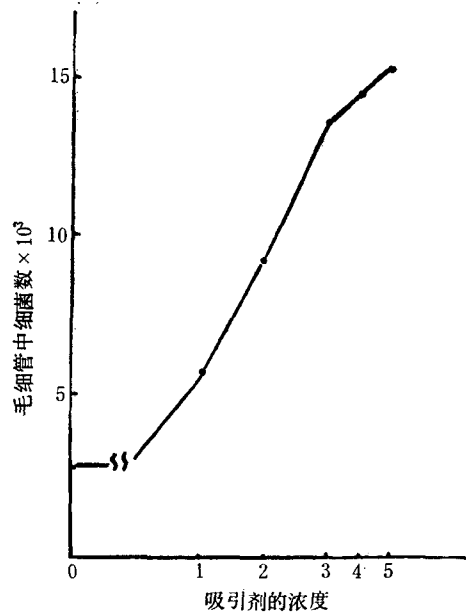


图2 琼胶分解菌 PA04 对紫菜抽取液的趋化性
吸引剂的浓度: 1. 0.1%; 2. 1%; 3. 10%;
4. 20%; 5. 50%。

图1还说明,在不同的紫菜抽取液浓度梯度范围内,琼胶分解菌菌数增加的比率是不同的。例如,当紫菜抽取液的浓度由0.1%增至0.5%时,细菌数量竟由 $3.0 \times 10^6/\text{ml}$ 增为 $1.4 \times 10^7/\text{ml}$,多达将近5倍;而抽取液浓度由0.5%增至1%,以及由0.001%增为0.01%时,则仅分别增加近0.8倍和1.6倍。

2. 琼胶分解菌对紫菜抽取液等的趋化性

琼胶分解菌对紫菜抽取液有明显的趋化性(表3)。在试验所用的三株琼胶分解菌中,以PA65的趋化能力最强,而PA04和PA71的趋化能力近似。同样,随着紫菜抽取液浓度的提高,趋入毛细管里的琼胶分解菌菌数也随之增多(图2)。在浓度为0.1%至10%的范围内,菌数呈直线增加。之后,菌量随浓度的增加而缓慢地增加。

表3 三株琼胶分解菌对紫菜抽取液的趋化性

紫菜抽取液中菌数/海水中菌数		
PA04	PA65	PA71
10.1	21	10.4

我们还进行了以下的实验,取定量菌株PA04的菌悬液接入20%紫菜抽取液中,在23°C条件下培育20分钟后测定菌量,其数量反而比培养前稍有减少。说明这些菌株在测定趋化性过程中,毛细管里菌量的显著增加,并不是由于紫菜抽取液促进细菌繁殖而引起,而是由于紫菜抽取液对琼胶分解菌吸引作用所造成的。

三、讨 论

“藻际”概念应包括三个内容：一是藻体在正常生长过程中能够排出分泌物；二是分泌物对某些细菌应当有吸引或排斥作用，或能为某些细菌所利用；三是分泌物自藻体表面向外扩展呈现出浓度梯度。已有的资料^[3,15]和我们的试验结果都能支持这一概念。

资料证明，藻类在正常生长过程中能够分泌出多种有机物质，而且这些物质大多能被细菌利用，促进其生长和繁殖^[5,6,11,13,18]。我们的试验结果也表明，紫菜在生长过程中能排出分泌物，而且分泌物明显地促进异养菌，尤其是促进琼胶分解菌的生长。不同种类的海藻所分泌的物质是有差异的，据 Kong(1979)^[10] 分析结果：产生纤维素酶的细菌，大多分离自绿藻；产生琼胶分解酶的细菌，大多分离自红藻；而产生藻朊酸酶的细菌，大多分离自褐藻。这也可从藻-菌之间的营养关系说明为什么不同藻类的藻体表面细菌区系呈现出差异^[1,7,14]。

Ukeles (1975)^[17] 指出，琼胶主要来自石花菜，但其他红藻也能分泌琼胶。0.05% 浓度的琼胶，对琼胶分解菌的生长有显著的促进作用，因为这类细菌能利用琼胶作碳源。趋化性试验结果也证明，琼胶分解菌对紫菜抽取液和琼胶有明显的趋化性，这也可能是在紫菜表面及其四周海水中琼胶分解菌数量较多的主要原因之一。

分泌物自藻体排出进入水体后，由于稀释和扩散作用，随着离藻体的距离加大，浓度递减，细菌的数量也势必急剧地减少。图 1,2 都很好地表达了这一情况。我们曾在海上进行挂玻片试验，一组玻片挂在紫菜养殖架靠近紫菜藻体处，另一组玻片挂在远离紫菜架约 15m 外的水域中，定期取回玻片，进行细菌分析。这两组玻片表面附着的琼胶分解菌的菌量相差很大，前者显著地高于后者。表明在藻体四周一定范围内的水体里——“藻际”，其微生物区系受到藻体的影响。

参 考 文 献

- [1] 陈弼、林光恒、沈世泽, 1979. 褐藻酸降解菌的研究 I. 褐藻酸降解菌与褐藻酸酶对海带藻体的作用. 海洋与湖沼 **10**(4): 329—333.
- [2] Aaronson, S., 1971. The synthesis of extracellular macromolecules and membrans by a population of the phytoflagellate *Ochromonas danica*. *Limnol. Oceanogr.* **16**(1): 1—9.
- [3] Bell, W. H. and R. Mitchell, 1972. Chemotactic and growth responses. of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol. Bull.* **143** (2): 265—277.
- [4] ———— and J. M. Lang, 1974. Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnol. Oceanogr.* **19**: 833—839.
- [5] ————, 1980. Bacterial utilization of algal extracellular products. I. The kinetic approach. *ibid.* **25**: 1007—1020.
- [6] ————, and E. Sakshaug, 1980. Bacterial utilization of algal extracellular products. 2. A kinetic study of natural population. *ibid.* **25**: 1020—1033.
- [7] Chan, E. C. S. and E. A. Mcmanus, 1969. Distribution characterization and nutrition of marine microorganisms from the algae polysiphonia lanosa and *Ascophyllum nodosum*. *Can. J. Microbiol.* **15**: 409—420.
- [8] Harrison, P. G., 1978. Growth of *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) in microcosms rich in *Zostera marina* (Anthrophyta) detritus. *J. Phycol.* **14**: 100—108.

- [9] Hobbie, J. E., O. Holm-Hansen, T. T. Packard et al, 1972. A study of the distribution and activity of microorganisms in ocean water. *Limnol. Oceanogr.* **17**: 544—555.
- [10] Kong, M. K. and K. Y. Chan, 1979. A study on the bacterial flora isolated from marine algae. *Bot. Mar.* **22**: 83—97.
- [11] Nalewajko, C., T. C. Dunstall and H. Shear, 1976. Kinetics of extracellular release in axenic algae and in mixed algal-bacterial cultures significance in estimation of total (gross) phytoplankton excretion rates. *J. Phycol.* **12**: 1—5.
- [12] Palleroni, N. T., 1976. Chamber for bacterial chemotaxis experiments. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 729—730.
- [13] Sieburth, J. M., 1969. Studies on algal substances in the sea. III. The production of extracellular organic matter by littoral marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **3**: 290—309.
- [14] ———, and J. L. Tootle, 1981. Seasonality of microbial fouling on *Ascophyllum nodosum* (L) LEJOL, *Fucus vesiculosus* L., *Polysiphonia lanosa* (L) Tandy and *Chondrus crispus* Stackh. *J. Phycol.* **17**: 57—64.
- [15] Sjoblad, R. D. and R. Mitchell, 1979. Chemotactic responses of *Vibrio oliginolyticus* to algal extracellular products. *Can. J. Microbiol.* **25**: 964—967.
- [16] Tison, D. L. and A. J. Ling, 1979. Dissolved organic matter utilization and oxygen uptake in algal-bacterial microcosms. *Can. J. Microbiol.* **25**: 1315—1320.
- [17] Ukeles, R. and J. Bishop, 1975. Enhancement of phytoplankton growth by marine bacteria. *J. Phycol.* **11**: 142—149.
- [18] Wangersky, P. J., 1978. Production of Dissolved Organic Matter. In: O. Kinne ed. «Marine Ecology». John Wiley and Sons, Vol. 4, pp. 115—220.

**CHEMOTACTIC AND GROWTH RESPONSES OF AGAR-
DEGRADING BACTERIA TO *PORPHYRA* EXTRACEL-
LULAR PRODUCTS AND EXTRACT***

Ding Meili

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao*)

ABSTRACT

Chemotactic response and growth stimulation effect of agardegrading bacteria to *Porphyra yezoensis* were studied under laboratory conditions. The sea water mixed with *Porphyra* leaflets could enhance the growth rate of agar-degrading bacteria and heterotrophic bacteria, especially that of agar-degrading bacteria. The sea water containing 0.05% agar, *Porphyra* extracellular products or 0.05% extract of *Porphyra* could stimulate the growth of agar-degrading bacteria and heterotrophic bacteria. Within the range of 0.001—1%, the higher the concentration of *Porphyra* extract, the more the number of agar-degrading bacteria. The chemotactic response of agardegrading bacteria, strain PA04, PA065, and PA71, to extract of *Porphyra* was remarkable. It has been found that the chemotactic action of strain PA04 was related to the concentration of *Porphyra* extract. The results of the experiment give good support to the term of "Phycosphere" discussed in the text.

* Contribution No. 979 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.