



研究报告

一株中肋骨条藻特异溶藻菌的分离鉴定及溶藻特性

石新国^{1,2} 李悦¹ 郑文煌¹ 肖宇淳¹ 刘乐冕^{1,2} 陈剑锋^{*1,2}

1 福州大学生物科学与工程学院 福建 福州 350108

2 福州大学福建海产品废弃物综合利用工程技术研究中心 福建 福州 350108

摘要:【背景】赤潮频发引起严重的海洋生态学问题,不仅直接影响到海洋生态系统稳定、海洋生物资源可持续利用和水产养殖业等海洋产业的健康发展,而且对人类健康也构成了严重威胁。高效的溶藻细菌是生物法防控赤潮的有效工具之一。【目的】分离得到对中肋骨条藻具有高效溶藻效果的溶藻细菌,并对其分子鉴定,研究该菌株的溶藻机理以及溶藻菌所分泌溶藻物质的特性。【方法】采用 2216E 平板稀释涂布法分离纯化细菌,测定 16S rRNA 基因序列以鉴定细菌种类,利用显微镜计数溶藻菌处理后的目标藻种计算溶藻率,通过扫描电镜观察溶藻菌对中肋骨条藻的溶藻过程,利用常规生理生化方法研究溶藻菌溶藻物质的特征,并通过透析袋截留法研究溶藻物质分子量大小。【结果】分离得到一株中肋骨条藻高效溶藻菌 FDHY-CJ,该菌株属于交替单胞菌属 (*Alteromonas* sp. FDHY-CJ)。该菌株 72 h 处理赤潮藻结果显示,对中肋骨条藻溶藻率为 95.45%,对于其他常见赤潮藻溶藻率低于 40%。溶藻菌 FDHY-CJ 通过胞外分泌物溶藻;溶藻物质的溶藻特性不受反复冻融的影响,但对酸碱性及温度较为敏感;扫描电镜观察结果显示该溶藻菌的溶藻物质直接溶解中肋骨条藻的细胞壁,致使硅质壳打开、内容物流出,达到溶藻的效果;溶藻活性物质具有被乙醇和乙酸乙酯沉淀的特性。【结论】溶藻菌 FDHY-CJ 对中肋骨条藻具有特异溶藻作用,对其他常见赤潮溶藻效果不明显;该细菌溶藻方式为通过分泌物间接溶藻,溶藻物质属于蛋白类,大小在 3.5–10.0 kD 之间。

关键词: 赤潮藻, 中肋骨条藻, 特异溶藻菌, 溶藻特性

Isolation and algicidal characteristics of a specific algicidal bacterium on *Skeletonema costatum*

SHI Xin-Guo^{1,2} LI Yue¹ ZHENG Wen-Huang¹ XIAO Yu-Chun¹ LIU Le-Mian^{1,2}
CHEN Jian-Feng^{*1,2}

1 College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China

2 Fujian Engineering Research Center for Comprehensive Utilization of Marine Products Waste, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China

Abstract: [Background] The frequent occurrence of harmful algae blooms causes serious marine

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41976130, 41606121)

***Corresponding author:** E-mail: jfchen@fzu.edu.cn

Received: 27-11-2019; **Accepted:** 07-05-2020; **Published online:** 17-07-2020

基金项目: 国家自然科学基金(41976130, 41606121)

*通信作者: E-mail: jfchen@fzu.edu.cn

收稿日期: 2019-11-27; 接受日期: 2020-05-07; 网络首发日期: 2020-07-17

ecological problems, which not only directly affects the stability of marine ecosystems, the sustainable use of marine biological resources, and the healthy development of marine aquaculture, but also lead to a serious threat to human health and even life. Efficient algae-lysing bacteria are one of the effective tools to control harmful algae blooms by biological methods. **[Objective]** Isolation and molecular identification of algae-lysing bacteria with high algicidal effect on *Skeletonema costatum*, and studying the algae-lysing mechanism of this strain and the characteristics of algae-lysing substances secreted by algae-lysing bacteria. **[Methods]** The 2216E plate dilution method was used to isolate and purify bacteria. The 16S rRNA gene sequence was determined to identify the bacterial species. The cell concentration was monitored using microscope for both control and treatment to calculate algicidal rate. The algicidal progress of challenged *S. costatum* was observed by scanning electron microscope. The algae-dissolving process of *S. costatum* was studied by using conventional physiological and biochemical methods to study the characteristics of algae-lysing substances. The molecular weight of algae-lysing substances was detected by dialysis bag retention method. **[Results]** A high-efficiency alginolytic bacterium FDHY-CJ for *S. costatum* was isolated, which belonged to the genus *Alteromonas* (*Alteromonas* sp. FDHY-CJ). The 72-hour treatment of red tide algae by this strain showed that the algae lysis rate was 95.45% against *S. costatum* and less than 40% for other common red tide algae. Algae-lysing FDHY-CJ lyses algae through extracellular secretions. The algae-lysing properties of algae-lysing substances are not affected by repeated freezing and thawing, but are sensitive to acidity, alkalinity and temperature. Scanning electron microscopy observations showed that the algae-lysing bacteria's algae the substance directly dissolves the cell wall of *S. costatum*, causing the siliceous shell to open and the contents to flow out, then the algae was lysed. The algae-lysing active substance has the characteristics of being precipitated by ethanol and ethyl acetate. **[Conclusion]** The algae-lysing bacteria FDHY-CJ has specific algae-lysing effect on *S. costatum*. The bacterial algae-lysing was indirect algae-dissolving through secretion, and the molecular weight of this compound was between 3.5 kD and 10.0 kD.

Keywords: Harmful algae, *Skeletonema costatum*, Specific algicidal bacterium, Algicidal characteristics

近几十年来,我国近海由于富营养化而引起的赤潮发生频率和规模呈现明显增加的趋势,目前赤潮已成为一个全球性的科学和环境问题,不仅直接影响到海洋生态系统稳定、海洋生物资源可持续利用和水产养殖业等海洋产业的健康发展,对人类健康也构成严重威胁,引起了各国政府及科学界的高度重视^[1-3]。中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)是一种广温、低盐的近岸性硅藻,广泛分布在我国沿海海域^[4],是我国影响最大的硅藻赤潮物种。

近年的研究结果显示,海洋水体中的一些异养细菌和有害藻华的暴发及消亡有着密切的关系^[5-6],有些细菌在有害藻华的突然消亡过程中起到重要的作用^[7-8]。因此,研究人员在溶藻菌的分离及溶藻特性方面做了较多的探索,并获得

一些较为高效的溶藻细菌菌株^[9]。目前已报道较为有效的溶藻菌多为广谱型溶藻细菌,对于环境中的多种赤潮藻类都有杀灭作用^[10-11],而对于专门溶解中肋骨条藻的菌株报道较少。溶藻菌 *Kordia algicida* 对于硅藻具有特异的溶藻效果,然而除了对中肋骨条藻的溶藻率较高以外,对于威氏海链藻和三角褐指藻也有一定的溶藻效果^[12]。

本研究从福建长乐海域筛选出一株对中肋骨条藻有高效特异溶藻活性的细菌,并对该细菌进行了鉴定。本研究还进一步探讨了该溶藻菌对中肋骨条藻的溶藻机理以及溶藻菌所分泌溶藻物质的特性,这些结果对于深入研究有害藻华过程中的菌藻关系以及开发高效的溶藻菌剂提供了良好的材料和研究基础。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂和仪器及培养基

基因组提取试剂盒, 上海捷瑞生物工程公司。离心机, 上海安亭科学仪器厂; PCR 仪、电泳仪, Bio-Rad 公司; 摇床, 上海世平实验设备有限公司; 恒温培养箱, 常州国华电器有限公司; 超净工作台, 上海跃进医疗器械有限公司; 光照培养箱, 宁波海曙赛福实验仪器厂; 场发射扫描电镜, FEI 公司; 显微镜, 尼康有限公司。

F/2 培养基采用 Guillard 等的配制方法^[13]。

2216E 培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母提取物 1.0, 磷酸高铁 0.1, 海盐 30.0, 琼脂粉(固体培养基) 15.0。

1.2 藻种来源与培养方法

中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)购自上海光语生物科技有限公司, 米氏凯伦藻(*Karenia mikimotoi*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)、强壮前沟藻(*Amphidinium carterae*)、伊姆裸甲藻(*Gymnodinium impudicum*)、亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)由厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室提供。中肋骨条藻与三角褐指藻这两种硅藻采用 F/2 培养基^[13]; 东海原甲藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、强壮前沟藻、亚历山大藻和伊姆裸甲藻采用 F/2-Si (不加硅)培养基^[13]。藻种均培养于 20 °C 光照培养箱中, 光照强度 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光暗周期 14 h:10 h (光:暗)。使用 Lin 等的方法^[14]对藻液进行预处理, 用抗生素混合物处理藻液, 其中含有氨苄青霉素(200 mg/L)、卡那霉素(100 mg/L)和链霉素(100 mg/L), 以在溶藻实验之前去除藻细胞生长环境中的细菌, 将生长状态处于指数期的培养藻液用于杀藻实验。

1.3 溶藻细菌的分离与鉴定

在福建省长乐海域采取不同区域的表层海水水样, 通过梯度稀释涂布的方式接种到 2216E 固体培养基上, 28 °C 培养 48 h。将长出的各个单菌落

接种在 1 mL 的 2216E 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 24 h, 取 0.5 mL 菌液接种到 10 mL 处于经过抗生素处理的对数生长期中肋骨条藻藻液中^[14], 48 h 后使藻液呈现白化、镜检藻细胞多数破裂的菌株认为是溶藻菌。选取其中溶藻效果较好的一株细菌进行进一步研究, 并将该株细菌编号为 FDHY-CJ。溶藻效率计算方法: 溶藻效率(%)=(1-实验组藻细胞浓度/对照组藻细胞浓度) \times 100。其中中肋骨条藻的藻细胞浓度用血球计数板通过显微镜计数。

溶藻细菌的形态学及生理生化特性鉴定按照《常见细菌系统鉴定手册》^[15]和《一般细菌常用鉴定方法》^[16]进行鉴定。使用细菌基因组提取试剂盒提取溶藻细菌的总基因组 DNA 作为模板, 使用引物 16S-27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 16S-1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')^[17]对溶藻细菌的 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增^[17], 对扩增子进行纯化、克隆和测序。

1.4 溶藻细菌对不同赤潮藻的溶藻效果

将溶藻细菌 FDHY-CJ 于 28 °C、200 r/min 培养至指数后期(OD_{600} 为 2.5, 1.9×10^9 CFU/mL, 下同), 菌液以 2% 的浓度接种于抗生素处理后的对数生长期伊姆裸甲藻、亚历山大藻、强壮前沟藻、赤潮异弯藻、米氏凯伦藻、中肋骨条藻和三角褐指藻藻液中^[14], 每个藻种的处理设置 3 个重复, 分别在 0、6、24、48、72 h 取样, 每次取 2 mL 培养液进行藻细胞浓度计数。设置空白对照, 对照组为加入等体积无菌 2216E 培养基的同时期藻液。计算藻细胞浓度和溶藻率。

为了研究不同浓度下 FDHY-CJ 对中肋骨条藻的溶藻活性, 在菌液与藻液体积比为 0.5%、1.0%、2.0% 情况下进行共培养。设置空白对照, 对照组为加入 0.5%、1.0%、2.0% 体积无菌 2216E 培养基的同时期藻液, 计算藻细胞浓度和溶藻率。

1.5 溶藻细菌的溶藻特性

为了确定溶藻细菌 FDHY-CJ 的溶藻方式,将对数期的中肋骨条藻分为 4 组,每组 3 个平行,每个平行样为 50 mL 藻液。第 1 组加入 1 mL (2% 体积) 溶藻细菌菌液;第 2 组加入 1 mL (2% 体积) 溶藻细菌的胞外产物,即溶藻细菌的培养液经 8 000 r/min 离心 8 min 后用 0.22 μm 微滤膜过滤的上清;第 3 组加入 1 mL (2% 体积) 溶藻细菌的菌细胞悬液,即溶藻细菌的培养液经 8 000 r/min 离心 8 min 后去上清,用等体积无菌海水重悬清洗一次,再次离心去上清,加入等体积无菌海水重悬菌体备用;第 4 组加入 1 mL (2% 体积) 无菌细菌培养基作为对照组。计算滤液和细菌细胞处理的培养物的藻细胞浓度和溶藻率。

1.6 扫描电子显微镜观察 FDHY-CJ 的溶藻过程

将菌株 FDHY-CJ 培养后的上清液以 2% 的比例添加到中肋骨条藻对数期培养物中,于不同时间点取样,用 2.5% 戊二醛固定。通过 3.5 kD 的透析袋脱盐和脱有机物质,之后将样品上样于单晶硅片上,干燥后喷金,用场发射扫描电镜观察溶藻过程。

1.7 溶藻细菌 FDHY-CJ 代谢物的特性

1.7.1 理化性质

将溶藻细菌的无菌滤液分别进行 α -萘酚试验 (Molish)、碘试验;同时用不同浓度 (0.1%、0.5%、1.0%) 醋酸铅处理菌液后按 2.0% 的体积比接入藻液中,24 h 后取样,验证溶藻活性。实验做 3 个重复。

1.7.2 热稳定性

将制备的无菌滤液在 -80、20、40、80 和 120 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 2 h,然后在室温下解冻或冷却。将处理滤液以 2% 的比例接种到藻类培养物中,设置 3 个平行样。24 h 后取样检验溶藻活性。

1.7.3 酸碱稳定性

将溶藻细菌的无菌滤液 pH 值调节至 3.0、7.0、9.0 和 11.0,保持 2 h,然后调回初始 pH 值。

将处理滤液以 2% 的比例接种到指数生长期的中肋骨条藻中,设置 3 个平行样。24 h 后取样检验溶藻活性。

1.7.4 反复冻融

将溶藻细菌的无菌滤液加入 5 mL 无菌离心管中,放置于液氮,5 min 后取出放于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴融化,反复此冻融步骤 3 次。然后等其冷却至室温后,将处理滤液以 2% 的比例接种到指数生长期的中肋骨条藻中,设置 3 个平行样。24 h 后取样检验溶藻活性。

1.7.5 紫外线处理

将溶藻细菌的无菌滤液放置于紫外灯下 (40 W) 20 cm 处,分别照射 30、90、150 和 210 min,照射后将处理滤液以 2% 的比例接种到指数生长期的中肋骨条藻中,设置 3 个平行样。24 h 后取样检验溶藻活性。

1.7.6 有机溶剂萃取

将溶藻细菌的无菌滤液与等体积的正己烷混合。剧烈振荡 1 h 后,将混合物转移到分液漏斗中静置 0.5 h 以收集有机相。重复操作 3 次,以尽可能提取活性化合物。然后将有机相的各部分合并,蒸发至干,将所得提取物定义为正己烷萃取物。根据上述方法制备各种提取物,包括正丁醇、二氯甲烷和乙酸乙酯等其他有机溶剂。将所有蒸发至干的生物有机溶剂萃取物溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中。接着接种到藻类培养物中以确定杀藻活性。加入等体积浓度的 DMSO 作为溶剂对照,设置 3 个平行样。24 h 后取样检验溶藻活性。

1.7.7 溶藻物质分子量大小

用不同分子量大小的透析袋 (3.5、10.0 和 14.0 kD) 对溶藻细菌的无菌滤液进行透析,在透析后,将透析袋内截留产物以 2% 的体积比接种到指数生长期的中肋骨条藻中,24 h 后取样,检验溶藻活性。加入未处理的无细胞滤液作为阳性对照,每个处理设置 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 溶藻细菌的分离与鉴定

从福建省长乐海域表层海水的水样中共分离纯化得到 35 株溶藻细菌, 与藻共培养后复筛出一株对中肋骨条藻具有专一溶藻活性的海洋细菌, 将其命名为 FDHY-CJ。中肋骨条藻对照组呈现黄色浑浊液, 实验组颜色变白并且有絮凝现象, 经显微镜观察藻细胞已被溶藻细菌破坏, 进而证明菌株 FDHY-CJ 具有溶藻的能力, 该菌株对中肋骨条藻处理后的溶藻率达 95.45%。

将菌株 FDHY-CJ 划线接种于 2216E 固体培养基上, 培养 2 d 后进行形态观察及生理生态研究; 菌株 FDHY-CJ 呈杆状, 单个, 革兰氏染色呈阴性, 菌落形态为圆形, 不透明, 菌落呈乳白色, 表面光滑湿润, 挑起为粘稠状, 芽孢染色、甲基红(MR)、V-P 测定、脲酶、柠檬酸盐、苯丙氨酸脱氨酶反应为阴性, 接触酶、淀粉水解、葡萄糖、果糖、木糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、甘露醇反应为阳性(表 1)。

表 1 溶藻细菌 FDHY-CJ 生理生化特性
Table 1 Physiological and biochemical characteristic of algicidal bacterium FDHY-CJ

Items	Results	Items	Results
Gram reaction	-	Phenylalanine deaminase	-
Spore staining	-	Catalase test	+
Methyl red	-	Starch hydrolysis	+
Voges-Proskauer	-	Assimilation of:	
Sporty	-	Glucose	+
Urease activity	-	Fructose	+
Citrate assimilation	-	Xylose	+
Saline:		Sucrose	+
5%	+	Lactose	+
10%	+	Galactose	+
15%	+	Mannitol	+
20%	-		

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

扩增 FDHY-CJ 菌株的 16S rRNA 基因, 对基因序列进行克隆和序列分析, 结果显示 FDHY-CJ 与 *Alteromonas* sp. strain E522-9 相似性为 99%, 因此初步鉴定溶藻细菌 FDHY-CJ 属于交替单胞菌 (*Alteromonas* sp.), 将其命名为 *Alteromonas* sp. FDHY-CJ, 16S rRNA 基因在 GenBank 的登录号为 MN463606。

将 FDHY-CJ 的 16S rRNA 基因与 GenBank 上几株常见的溶藻菌种属的序列采用邻接法 (neighbor-joining method) 构建的系统发育树, 如图 1 所示。系统发育分析的结果表明 15 株 γ -变形菌 (*Gammaproteobacteria*) 以 100% 的支持率聚为一支, 其中 FDHY-CJ 以 100% 的支持率位于 γ -变形菌的同一亚群 *Alteromonas* 属中, 与目前所报道的常见假单胞菌属同属 γ -变形菌, 其扫描电镜图片如图 2 所示。

2.2 溶藻细菌对不同赤潮藻的溶藻效果

将亚历山大藻、伊姆裸甲藻、强壮前沟藻、米氏凯伦藻、赤潮异弯藻、三角褐指藻和中肋骨条藻常见的赤潮藻进行接种培养, 于相应的对数生长期分别加入 2% 的 FDHY-CJ 菌液, 记录藻丰度数量变化情况, 并与对照组作出对比, 计算出不同溶藻菌对不同赤潮藻的溶藻率。

实验结果如图 3 所示, 菌株 FDHY-CJ 表现出对中肋骨条藻的溶藻特异性, 48 h 溶藻率达 95.37%; 而对于其他赤潮藻类的溶藻率低于 40%, 其中包括同属于硅藻的三角褐指藻, 72 h 溶藻率仅为 18.11%。

2.3 溶藻细菌的溶藻特性

对溶藻细菌 FDHY-CJ 的溶藻方式进行了研究, 结果如图 4 所示。从图 4 中的数据可以看出, FDHY-CJ 的溶藻方式是以间接溶藻为主, 溶藻细菌 FDHY-CJ 菌液的溶藻率最高达 96.0%, 上清液的溶藻率为 84.0%, 菌细胞略有一些溶藻效果, 溶藻率为 26.0%。

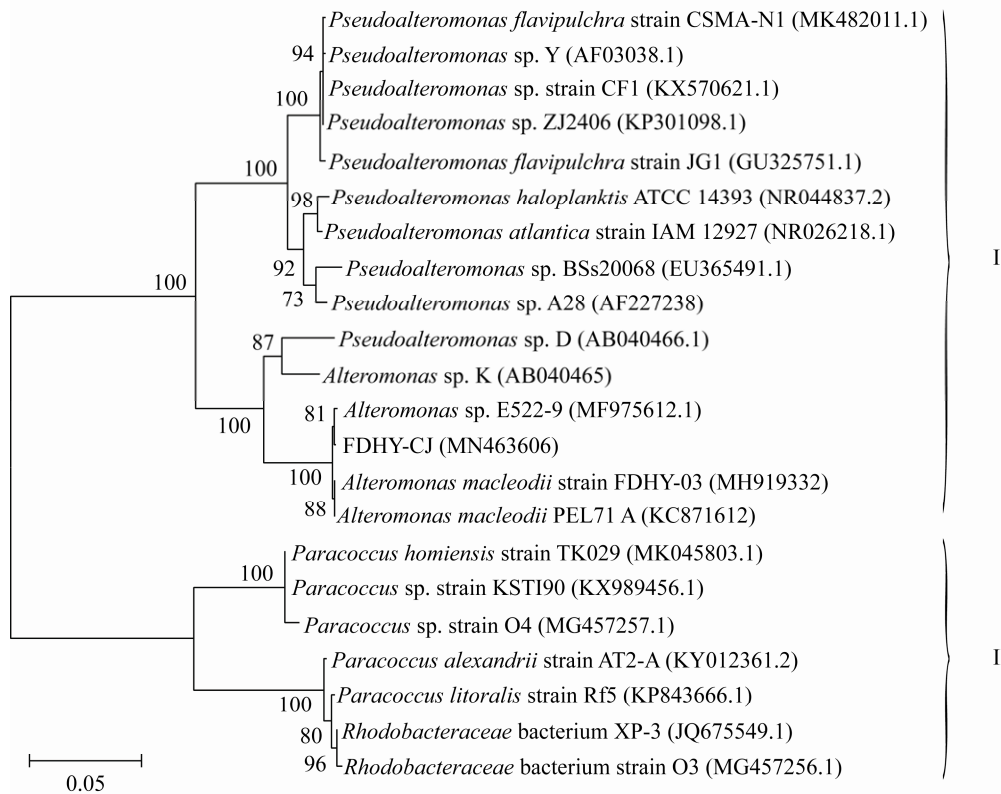


图1 溶藻菌株 *Alteromonas* sp. FDHY-CJ 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of algicidal bacteria strain FDHY-CJ based on 16S rRNA gene sequence

注: 对节点值大于 50% 的数值进行了标记, 其中, I 为 γ -变形菌; II 为噬纤维菌黄杆菌-拟杆菌群。分支处标注有自展值, 标尺所示长度为 0.05 核苷酸置换率。

Note: Support of nodes >50% are shown. I: *Gammaproteobacteria*; II: *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes*. The bootstrap values are shown at the node; Bar 0.05 means the nucleotide substitution rate of 0.05.

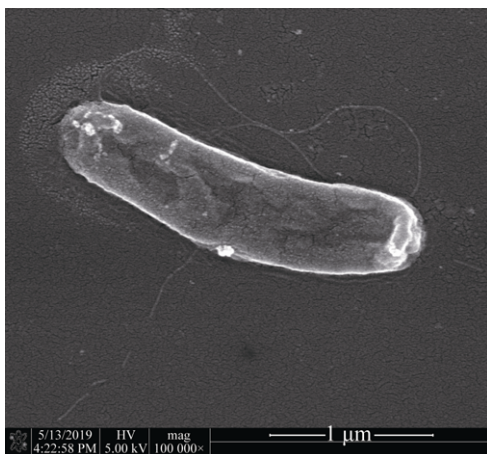


图2 溶藻细菌 FDHY-CJ 扫描电镜图片

Figure 2 Scanning electron microscopy image of algicidal bacterium FDHY-CJ

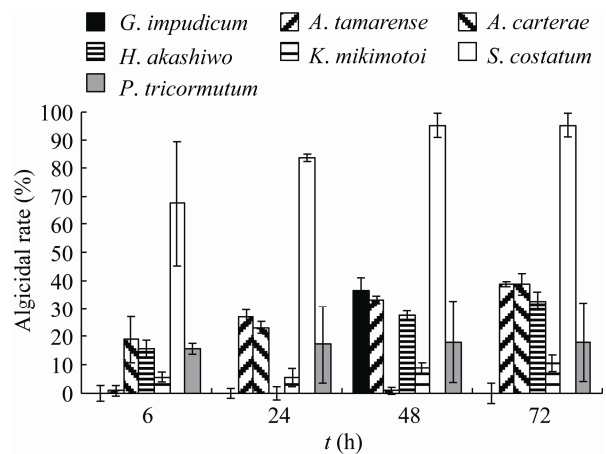


图3 溶藻细菌 FDHY-CJ 对不同赤潮藻的溶藻效果

Figure 3 The algal-lytic activity of FDHY-CJ against several harmful-algal-bloom forming species

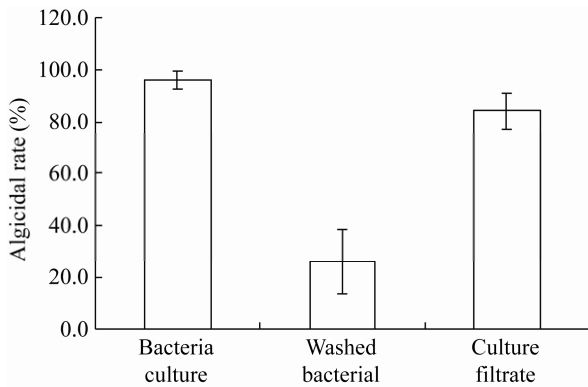


图4 溶藻细菌对中肋骨条藻不同溶藻方式的溶藻效果
Figure 4 The attack manner of strain FDHY-CJ on *S. costatum*

将溶藻细菌以不同初始浓度加入到对数期的中肋骨条藻藻液中, 如图5所示, 以0.5%初始菌浓度将菌株FDHY-CJ发酵培养液加入对数期生长期的中肋骨条藻中, 72 h溶藻率为57.89%; 以1%初始菌浓度添加时, 24 h溶藻效果为57.58%, 48 h为63.64%, 之后溶藻率变化不大; 以2%浓度添加时, 24 h溶藻活性可达83.76%, 48 h可达95.37%, 到72 h溶藻率可达95.45%。可见交替单胞菌FDHY-CJ对中肋骨条藻具有较高的溶藻效率。

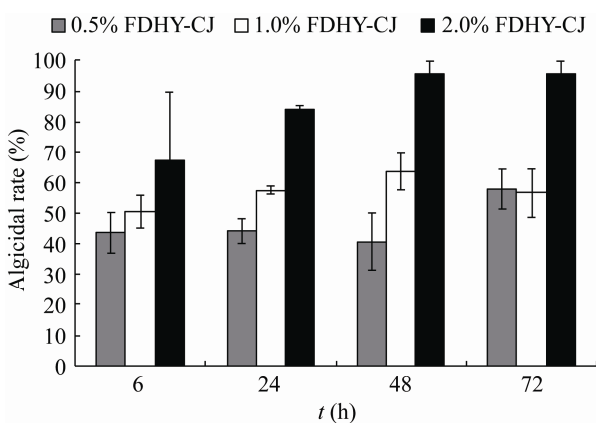


图5 不同初始浓度的FDHY-CJ溶藻细菌对中肋骨条藻的溶藻效果

Figure 5 Algicidal rate of *S. costatum* with different volume of FDHY-CJ culture added

2.4 扫描电子显微镜观察FDHY-CJ的溶藻现象

为了观察FDHY-CJ的超微结构以及该溶藻菌对中肋骨条藻的溶藻过程, 用场发射扫描电镜对溶藻细菌在不同处理时间点的溶藻情况进行观察, 如图6所示, 可见FDHY-CJ菌体为杆状, 长约2.0 μm , 宽约0.8 μm , 具有明显的交替单胞菌形态特征。该溶藻菌处理中肋骨条藻6 h后, 藻细胞的细胞壁开始破裂, 硅质壳打开, 内容物流出, 之后破裂处不断扩大, 表明藻细胞壁是FDHY-CJ溶藻代谢物主要的攻击对象, 对于藻细胞之间的连接刺则没有破坏作用。

2.5 溶藻细菌FDHY-CJ代谢物性质

在不同温度处理条件下, FDHY-CJ溶藻代谢物对中肋骨条藻的溶藻率结果如图7A所示, 菌株FDHY-CJ代谢物的溶藻活性对温度比较敏感, 当其代谢物经120 $^{\circ}\text{C}$ 处理后, 溶藻物质基本失去活性, 溶藻率仅13.36%, 因此菌株FDHY-CJ的溶藻活性对热稳定性较低。将菌株FDHY-CJ的代谢产物经不同pH处理后, 其代谢物对中肋骨条藻的溶藻率结果如图7B所示, 菌株FDHY-CJ代谢物对酸碱较敏感, 在酸或碱性条件下溶藻活性均显著降低。

对FDHY-CJ进行 α -萘酚、碘实验, 可以看出经萘酚反应两液分界处并未出现紫红色环状, 碘试验也并未出现蓝色, 说明菌株FDHY-CJ产生的溶藻活性物质为非多糖类化合物。进行醋酸铅处理后溶藻效果如图8A所示, FDHY-CJ代谢物的溶藻活性明显受醋酸铅影响, 当醋酸铅浓度升高时溶藻活性物质的溶藻效果明显下降。反复冻融对FDHY-CJ溶藻物质的影响如图8B所示, 冻融后的杀藻效果和对照相比变化不大。溶藻物质可以被有机溶剂提取, 其中提取效率最高的有机溶剂为乙酸乙酯(图8C), 溶藻物质经紫外线处理后溶藻效果有所下降(图8D), 说明该溶藻物质为蛋白类物质。

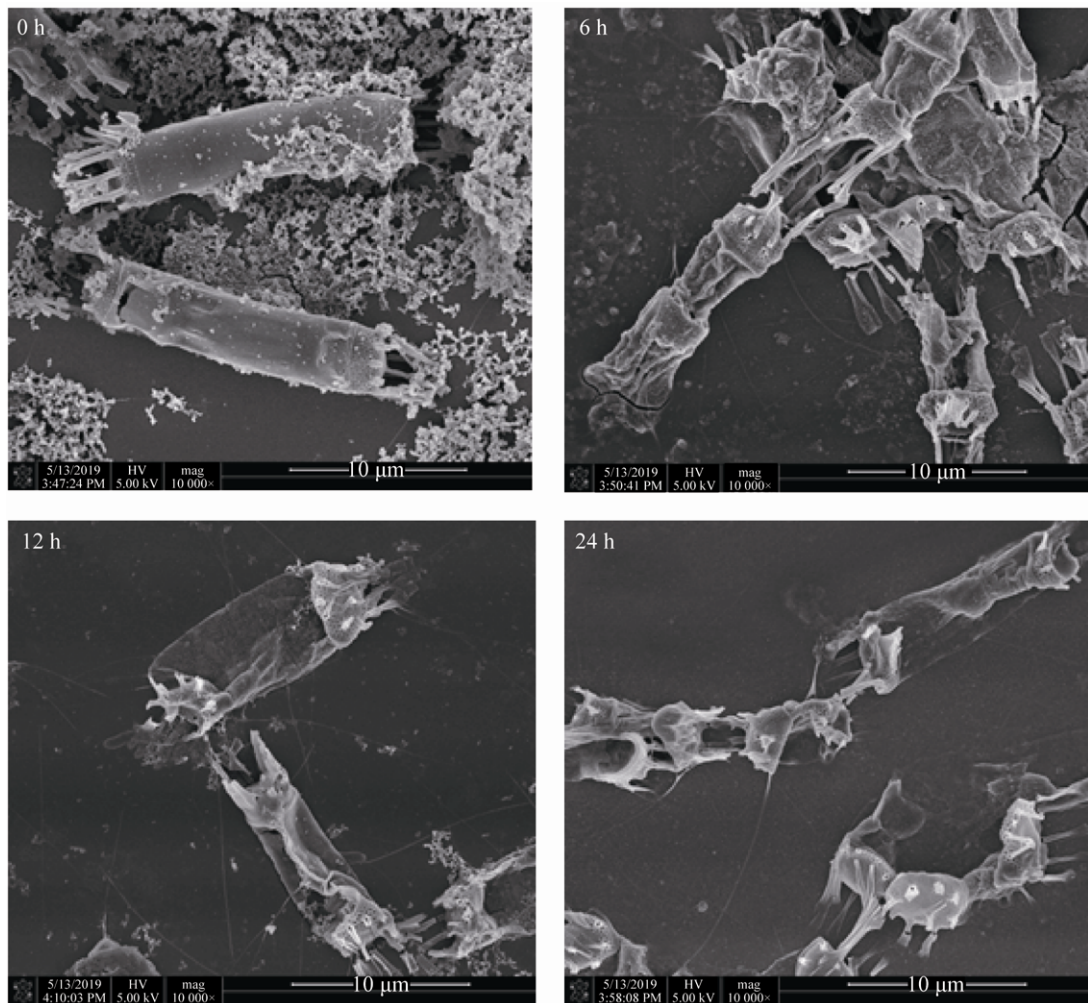


图 6 扫描电镜下溶藻细菌 FDHY-CJ 对中肋骨条藻的溶藻过程

Figure 6 Scanning electron microscopic observations of *S. costatum* attacked by FDHY-CJ

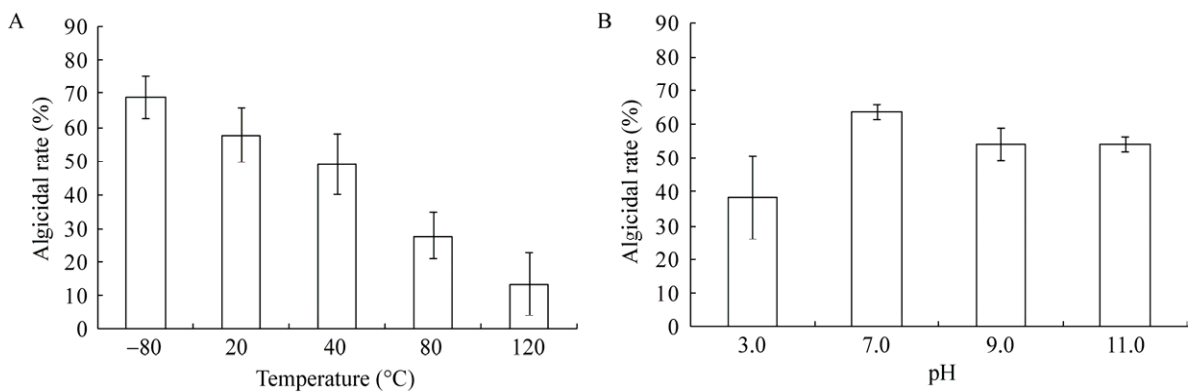


图 7 不同温度(A)和酸碱(B)条件处理后的菌株 FDHY-CJ 代谢物对中肋骨条藻的溶藻效果

Figure 7 Algicidal efficiency of FDHY-CJ metabolites treated with different temperature (A) and pH (B) conditions on *S. costatum*

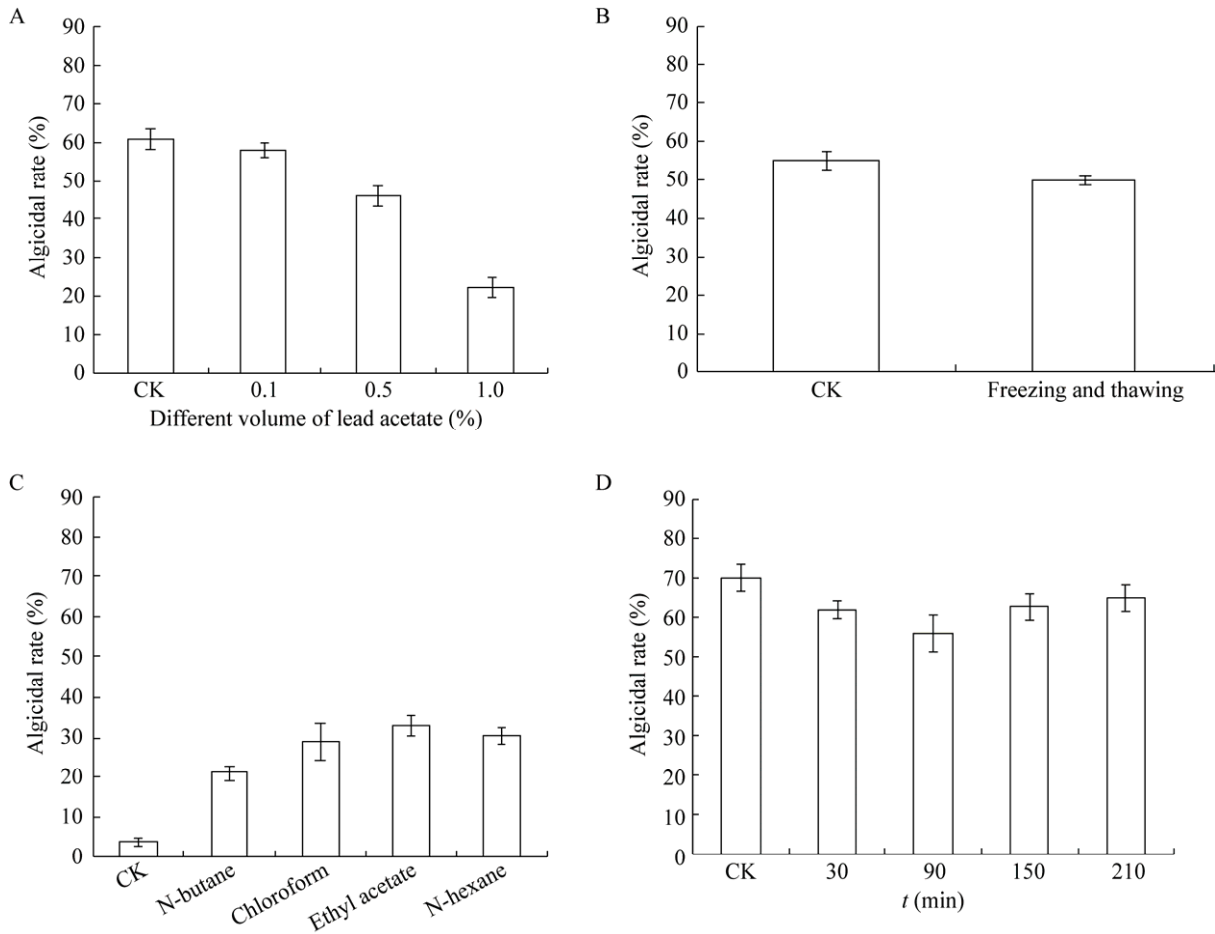


图 8 经不同处理后的菌株 FDHY-CJ 代谢物对中肋骨条藻的溶藻效果

Figure 8 Algicidal efficiency of FDHY-CJ metabolites treated with different treatments

注: A: 醋酸铅处理; B: 反复冻融; C: 有机溶剂萃取; D: 紫外线处理.

Note: A: Treated by lead acetate; B: Freezing and thawing; C: Extracted by organic solvents; D: Treated by UV.

溶藻代谢物透析前后对中肋骨条藻的溶藻效率如图 9 所示, 使用不同分子量的透析袋对 FDHY-CJ 无菌滤液进行透析, 先使用了 MWCO 为 3.5 kD 的透析袋, 可看出在透析前后的溶藻效率无明显差异, 说明透析前后代谢物中的有效溶藻分子没有流失, 得出有效溶藻分子量 > 3.5 kD; 接着使用了 MWCO 为 10.0 kD 的透析袋, 透析后溶藻效果明显低于透析前, 说明 FDHY-CJ 的有效溶藻物质已基本流失, 分子量 < 10.0 kD。综上所述, 该溶藻物质可能是水解酶类, 分子量主要在

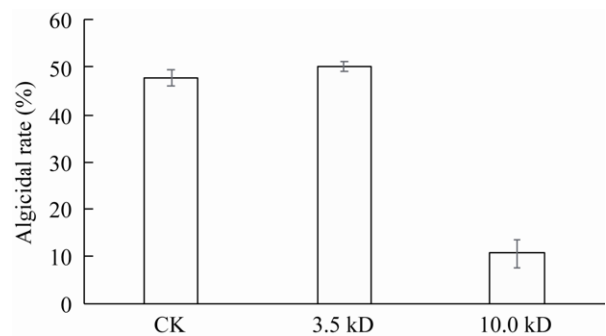


图 9 菌株 FDHY-CJ 溶藻活性组分的分子量范围

Figure 9 Molecular weight of algicidal compounds of bacterium FDHY-CJ

3.5–10.0 kD 之间。该溶藻物质较为准确的分子量还需要用其他方法(如 SDS-PAGE 等)进行测定。

3 讨论

长期的调查研究结果显示,在赤潮暴发过程中海洋微生物群落表现出由 α 变形菌向 γ 变形菌演替的趋势^[7,18],期间 γ 变形菌降解藻细胞,最终会使赤潮终止^[19-20],这可为开展生物法进行赤潮的防治提供丰富的生物资源^[21-22]。目前已经有一些报道从赤潮发生的海域分离出溶藻细菌^[6,10,23-24],以期用于开发防治赤潮的生物制剂^[25]。本研究分离得到一株对中肋骨条藻具有特异溶藻效果的溶藻菌,属于 γ 变形菌纲中的交替单胞菌属,并对其溶藻特性、溶藻过程以及溶藻物质的分离进行了研究,以期揭示溶藻菌对目标藻种的溶藻分子机制提供参考。

目前所报道的溶藻菌对于其目标藻种的溶藻作用一般都具有特异性,有些菌株溶藻的范围比较广泛,能够溶解多种门类的藻种,如 Zhang 等分离的一株溶藻菌 Y42 对多种甲藻和硅藻均具有一定的溶藻活性^[11]; Paul 等在溶藻菌 *Kordia algicida* 中分离得到一种水解酶类物质对 3 种硅藻都具有一定的溶藻活性,对中肋骨条藻的溶藻作用尤为明显^[12]。然而有些菌株溶藻的范围比较窄,仅能够溶解特异的类群甚至特异的藻种。管成伟^[26]用菌株 LP-10 对 25 种藻种进行了溶藻试验,发现菌株仅对其中球形棕囊藻等 6 种藻有溶藻效果,对其余 20 种藻几乎没有溶藻效果。Kim 等^[19]发现溶藻细菌的溶藻效应也表现出一定的选择性, Pokrzywinski 等^[27]分离得到的菌株 IRI-160 仅对裸甲藻类藻种具有较高的溶藻活性。这种特性使菌株对于有害藻的控制具有选择针对性^[19,27]。溶藻菌具有广谱型或者特异型溶藻效果和溶藻菌的类型及其分泌的溶藻物质有关^[21]。在海洋系统中,颗粒态存在的细菌多具有广谱溶藻效果,而游离态存在的细菌多具有特异性溶藻效果^[28]。本研究分离得到的溶藻菌 FDHY-CJ 仅对中肋骨条藻具有较高的溶藻活

性,对于其他常见赤潮藻,包括亚历山大藻、赤潮异弯藻、强壮前沟藻等溶藻活性较低,对于同属于硅藻的三角褐指藻溶藻率也仅为 18.11%。因此溶藻菌 FDHY-CJ 可作为开发特异防控中肋骨条藻赤潮的优良材料。

本研究所分离得到的溶藻菌 FDHY-CJ 属于交替单胞菌属(*Alteromonas*),该属的细菌是海洋系统中报道最多的溶藻菌类群之一,也是海洋中丰度最高的菌群之一^[29]。该类群的细菌通常和海洋浮游植物密切相关并且常表现为具有溶藻活性^[30],还有报道显示该类细菌也具有溶解其他细菌^[31]或者抑制其他细菌生长的作用^[32]。目前已发现该属的细菌能够溶解的藻类包括骨条藻^[33]、多环旋沟藻^[34]、亚历山大藻以及赤潮异弯藻^[30]等。该属溶藻菌的溶藻方式多为分泌胞外活性物质以降解目标藻种的表面大分子和细胞壁^[10,35]。本研究的结果显示 FDHY-CJ 的溶藻作用是通过间接溶藻方式,即通过产生水解酶类进行溶藻,分子量在 3.5–10.0 kD 之间,这为进一步研究该溶藻菌和中肋骨条藻的互作奠定了良好的研究基础。

4 结论

(1) 分离得到的菌株 FDHY-CJ 属于交替单胞菌属(*Alteromonas*),按照体积比 2% 的比例接种中肋骨条藻后,48 h 溶藻率达 95.37%,为目前报道的赤潮藻高效溶藻菌之一。

(2) 溶藻菌 FDHY-CJ 溶藻范围较窄,对中肋骨条藻具有专一的溶藻效果,对研究中提到的其他藻类溶藻效果不明显。

(3) 溶藻菌 FDHY-CJ 通过胞外分泌物间接溶藻,首先溶解藻细胞壁。溶藻物质鉴定为蛋白类物质,可能是水解酶类,分子量在 3.5–10.0 kD 之间。

REFERENCES

- [1] van Dolah FM. Diversity of marine and freshwater algal toxins[A]//Botana L. Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection[M]. New York: CRC Press, 2000: 173-186
- [2] Landsberg JH. The effects of harmful algal blooms on

- aquatic organisms[J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2002, 10(2): 113-390
- [3] Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM. *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*[M]. Berlin: Springer, 1998: 662
- [4] Huang XQ, Jiang XS, Wang GL, et al. Principal environmental factors during red tide outbreak of *Skeletonema costatum* in Yangtse estuary III: water temperature, salinity, DO and pH[J]. *Marine Science Bulletin*, 1994, 13(4): 35-40 (in Chinese)
黄秀清, 蒋晓山, 王桂兰, 等. 长江口中肋骨条藻赤潮发生过程环境要素分析: 水温、盐度、DO 和 pH 特征[J]. *海洋通报*, 1994, 13(4): 35-40
- [5] Buchan A, LeClerc GR, Gulvik CA, et al. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(10): 686-698
- [6] Pokrzywinski KL, Tilney CL, Modla S, et al. Effects of the bacterial algicide IRI-160AA on cellular morphology of harmful dinoflagellates[J]. *Harmful Algae*, 2017, 62: 127-135
- [7] Li DX, Zhang H, Chen XH, et al. Metaproteomics reveals major microbial players and their metabolic activities during the blooming period of a marine dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense*[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(2): 632-644
- [8] Wichels A, Hummert C, Elbrächter M, et al. Erratum to bacterial diversity in toxic *Alexandrium tamarense* blooms off the Orkney isles and the firth of forth[J]. *Helgoland Marine Research*, 2004, 58(2): 93-103
- [9] Tilney CL, Pokrzywinski KL, Coyne KJ, et al. Effects of a bacterial algicide, IRI-160AA, on dinoflagellates and the microbial community in microcosm experiments[J]. *Harmful Algae*, 2014, 39: 210-222
- [10] Shi XG, Liu LM, Li Y, et al. Isolation of an algicidal bacterium and its effects against the harmful-algal-bloom dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* (*Dinophyceae*)[J]. *Harmful Algae*, 2018, 80: 72-79
- [11] Zhang FX, Ye Q, Chen QL, et al. Algicidal activity of novel marine bacterium *Paracoccus* sp. strain Y42 against a harmful algal-bloom-causing dinoflagellate, *Prorocentrum donghaiense*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(19): e01015-18
- [12] Paul C, Pohnert G. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21032
- [13] Guillard RRL, Ryther JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) gran[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, 8(2): 229-239
- [14] Lin SJ, Cheng SF, Song B, et al. The *Symbiodinium kawagutii* genome illuminates dinoflagellate gene expression and coral symbiosis[J]. *Science*, 2015, 350(6261): 691-694
- [15] Dong XZ, Cai MY. *Manual of Bacterial Culture Identification*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 353-390 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-390
- [16] Bacterial Taxonomy Group, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. *Common Identification Methods for Common Bacteria*[M]. Beijing: Science Press, 1978: 1-50 (in Chinese)
中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 1-50
- [17] DeLong EF. Archaea in coastal marine environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(12): 5685-5689
- [18] Teeling H, Fuchs BM, Becher D, et al. Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom[J]. *Science*, 2012, 336(6081): 608-611
- [19] Kim JD, Kim JY, Park JK, et al. Selective control of the *Prorocentrum minimum* harmful algal blooms by a novel algal-lytic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* AFMB-008041[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(4): 463-472
- [20] Ruff SE, Probandt D, Zinkann AC, et al. Indications for algae-degrading benthic microbial communities in deep-sea sediments along the Antarctic Polar Front[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2014, 108: 6-16
- [21] Meyer N, Bigalke A, Kaulfuß A, et al. Strategies and ecological roles of algicidal bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(6): 880-899
- [22] Anderson CR, Berdalet E, Kudela RM, et al. Scaling up from regional case studies to a global harmful algal bloom observing system[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 250
- [23] Yang XR, Li XY, Zhou YY, et al. Novel insights into the algicidal bacterium DH77-1 killing the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 482-483: 116-124
- [24] Kristyanto S, Kim J. Isolation of marine algicidal bacteria from surface seawater and sediment samples associated with harmful algal blooms in Korea[J]. *Korean Journal of Microbiology*, 2016, 52(1): 40-48
- [25] Su JQ, Yang XR, Zheng TL, et al. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. *Harmful Algae*, 2007, 6(6): 799-810
- [26] Guan CW. Study on algicidal characteristics and mechanism

of a novel algicidal bacterium *Bacillus* sp. LP-10 isolated from East China Sea[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2014 (in Chinese)

管成伟. 来源于中国东海的溶藻细菌 *Bacillus* sp. LP-10 的溶藻特性及溶藻机制研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2014

- [27] Pokrzywinski KL, Place AR, Warner ME, et al. Investigation of the algicidal exudate produced by *Shewanella* sp. IRI-160 and its effect on dinoflagellates[J]. Harmful Algae, 2012, 19: 23-29
- [28] Park JH, Yoshinaga I, Nishikawa T, et al. Algicidal bacteria in particle-associated form and in free-living form during a diatom bloom in the Seto Inland Sea, Japan[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2010, 60(2): 151-161
- [29] Mayali X, Azam F. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2004, 51(2): 139-144
- [30] Cho JY. Algicidal activity of marine *Alteromonas* sp. KNS-16 and isolation of active compounds[J]. Bioscience,

Biotechnology, and Biochemistry, 2012, 76(8): 1452-1458

- [31] Takamoto S, Yamada K, Ezura Y. Production of bacteriolytic enzymes during the growth of a marine bacterium *Alteromonas* sp. No. 8-R[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 1994, 40(6): 499-508
- [32] Long RA, Qureshi A, Faulkner DJ, et al. 2-n-pentyl-4-quinolinol produced by a marine *Alteromonas* sp. and its potential ecological and biogeochemical roles[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 568-576
- [33] Wang H, Butt L, Rooks P, et al. Characterisation of algicidal bacterial exometabolites against the lipid-accumulating diatom *Skeletonema* sp.[J]. Algal Research, 2016, 13: 1-6
- [34] Imai I, Kimura S. Resistance of the fish-killing dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* against algicidal bacteria isolated from the coastal sea of Japan[J]. Harmful Algae, 2008, 7(3): 360-367
- [35] Imai I, Ishida Y, Sakaguchi K, et al. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan[J]. Fisheries Science, 1995, 61(4): 628-636

(上接 p.3514)

征稿简则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 10 人时全部列出, 多于 10 人时列出前 10 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model[J]. Cell, 1999, 96(1): 47-56
- [2] Cheng XY, Liu WW, Xu Y, Zhou NY. Screening and characterization of culturable hydrocarbon-degrading strains from the South and East China Seas[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 975-985 (in Chinese)
- [3] 程晓宇, 刘伟伟, 许楹, 周宁一. 中国东海和南海海域可培养烃类降解细菌的筛选及功能[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 975-985
- [4] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
- [5] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [6] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
- [7] 刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

(下转 p.3867)