

# 两株溶藻细菌对棕囊藻溶藻作用的原子力显微镜研究

杨晓新, 尹平河

(暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

【摘要】 细菌在赤潮生消过程中起着重要的作用. 课题组从珠海赤潮发生海域采集的11株细菌中分离、筛选出2株具有显著溶藻效果的细菌. 用原子力显微镜研究结果表明, 2株细菌均属杆菌, 形态明显不同, 均可作用于球形棕囊藻, 导致藻细胞破裂和胞内物质溶出而死亡, 达到治理棕囊藻赤潮的目的.

【关键词】 溶藻细菌; 溶藻作用; 棕囊藻; 原子力显微镜

【中图分类号】 Q949.2; X55 【文献标识码】 A 【文章编号】 1000-9965(2008)01-0090-05

## Study on the two of algae-lysing bacteria which control red-tide of *Phaeocystis globosa* by AFM

YANG Xiao-xin, YIN Ping-he

(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

【Abstract】 Algae-lysing bacteria is a kind of sea bacteria accompanied with red tide, which can inhibit or kill algae cell. Eleven bacteria were separated from red tide zone in Pearl Sea, from which 2 with remarkable algae-lysing effect were isolated. Their characters and inhibition on growth of *Phaeocystis globosa* were studied by AFM. The results showed that both of them were bacillus but with different configuration. Both could inhibit *P. globosa* by breaking algae cell surface layer and making the inclusion of algae cell released until *P. globosa* was lysed and died finally, which provided both theory and practice method for controlling the red tide of *P. globosa*.

【Key words】 algae-bacteria; algae-lysing; *Phaeocystis globosa*; AFM

目前,有害赤潮已经成为全球性的海洋灾害. 仅1997-2006的10年时间,中国海域发生的赤潮面积累计已达95 000平方公里,直接经济损失近50多亿元. 鉴于赤潮在各方面造成的严重影响,研究赤潮防治方法、制定有关防治对策已经成为许多国家和地区的当务之急. 赤潮治理方法主要有物理方法、化学方法和生物方法. 溶藻细菌是赤潮发生时伴随的一种海洋细菌,能够通过直接或间接方式抑

制藻类生长,杀死藻细胞,从而消灭有害赤潮. 溶藻细菌作为赤潮防治的新方法和可能微生物,开始引起广泛关注.

藻类与细菌有着密切的关系. 近几年文献报道了一些溶藻的细菌菌株<sup>[1-2]</sup>. 探究藻菌关系和溶藻细菌对水体进行生态修复是利用微生物方法治理有害藻类的热点<sup>[3-4]</sup>,溶藻细菌能够调节水生生态系统中的初级生产力,是影响自然界中藻类种群动力

【收稿日期】 2007-09-25

【基金项目】 广东省自然科学基金重点项目(04105835);广东省教育厅学科建设重点项目

【作者简介】 杨晓新(1973-),女,博士研究生,研究方向:环境生态学. 通讯作者:尹平河 tyinph@jnu.edu.cn

学的一个重要因素,对藻类的生长和毒性起着潜在的调控作用<sup>[5]</sup>.关于溶藻细菌目前国内多为一些综述性文献<sup>[6-8]</sup>,鲜见研究报道.开展对溶藻细菌作用方式的研究有助于了解溶藻细菌的作用机制,分离和研制高效的细菌除藻剂.课题组从珠海赤潮发生海域中采集了11株细菌,从中分离、筛选出2株具有显著溶藻效果的细菌H、B,利用原子力显微镜进一步研究了其对棕囊藻的溶藻作用,试图了解海水环境中的藻菌关系和溶藻细菌杀灭赤潮生物的机理,为赤潮的微生物防治提供科学依据.

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

球形棕囊藻汕头株由暨南大学齐雨藻和吕颂辉教授提供.藻类培养选用F/2改良配方,培养温度 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,光照强度为4 000 lx,光暗比为12 h:12 h.

海洋溶藻细菌H、B是课题组在2004年1月26日从珠海香洲码头海水水样中分离、筛选所得.

### 1.2 实验方法

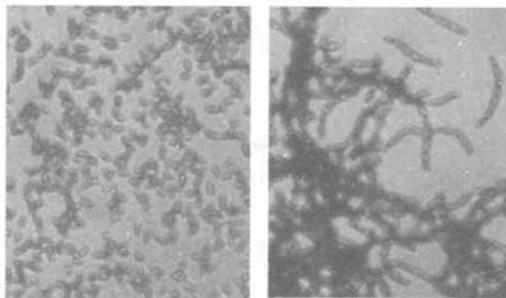
(1)溶藻细菌的初步鉴定:溶藻细菌的初步鉴定我们采用革兰氏染色鉴定法,并记录下细菌当时的革兰氏染色及形态特征.

(2)细菌溶藻的原子力显微镜研究:将无菌蒸馏水滴在干净的盖玻片上,用接种环移取新鲜的细菌到盖玻片上,并匀化,制成细菌悬浊液,加入质量分数2.5%戊二醛固定,自然风干.然后用蒸馏水洗去上面的盐,以消除NaCl结晶体的影响.待其干燥后,用原子力显微镜观察细菌的形态.再用接种环分别将海洋溶藻细菌H、B接种到2216E液体培养基,在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下,180 r/min振荡培养24 h,获得活细菌悬浊液.分别移取10 mL上述H、B细菌培养液加入到180 mL F/2培养液中,再加入10 mL对数期的藻液进行溶藻实验.空白对照组中未加入活细菌悬浊液.待培养48 h,取样进行溶藻的原子力显微镜观察.原子力显微镜观察采用100  $\mu\text{m}$ 扫描器,UL20B硅探针,悬臂针尖曲率半径10 nm,力常数为2.8 N/m,Ultraleve rB探针.图像数据采集为轻敲模式,扫描速率0.25~1 Hz.用样品监视光镜定位所要扫描的样品区域,空气中成像(室温).用仪器自配的IP2.1软件进行图像数据的采集和处理.所有图像只进行平滑处理,以消除慢扫描方向上的低频噪音.

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶藻细菌的初步鉴定

用革兰氏染色对H、B进行初步鉴定,结果如图1所示.由图1(a)可以看出,溶藻细菌H为杆菌,呈革兰氏阳性.细菌两端椭圆,菌落为黄色,光滑,边缘完整.图1(b)是溶藻细菌B的显微照片,B为杆菌,也呈革兰氏阳性.B细菌菌体首尾相连,常表现为2个以上连在一起.菌落为乳白色,圆形,湿润,凸透镜状,边缘完整.



(a) H细菌

(b) B细菌

图1 H、B细菌的革兰氏染色照片

### 2.2 溶藻细菌的形态特征观察

原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)可以在气相或液相的自然状态下对样品进行检测、成像,使样品更接近生理状态,既可观察生物样品局部解剖特征,还可以检测生物样品的分子间相互作用力,成像可达到纳米分辨率.

利用原子力显微镜可以更清楚看出H细菌为杆菌,大小为 $0.8 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ ,属于中型杆菌,细菌的长轴向距离(a)为2  $\mu\text{m}$ ,短轴向距离(b)为0.8  $\mu\text{m}$ ,如图2所示.

图3是细菌B株的原子力显微镜照片.从图3可以看出,B细菌也为杆菌,单个菌体大小为 $2.4 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ ,属于中型杆菌.图4是细菌B的更细微的群体照片.从图4可以看出,B细菌常常以多种方式相互连结,形成多联体.图4(a)、(b)、(c)分别为B细菌的三联体、四联体和六联体.

图1(b)和图4对比可见,B细菌菌体革兰氏染色图片与原子力显微镜的观察结果略有区别.两者都反应出菌体喜欢形成多细胞聚集集体,细菌个数不确定.原子力显微镜能更清晰地表征B细菌连接方

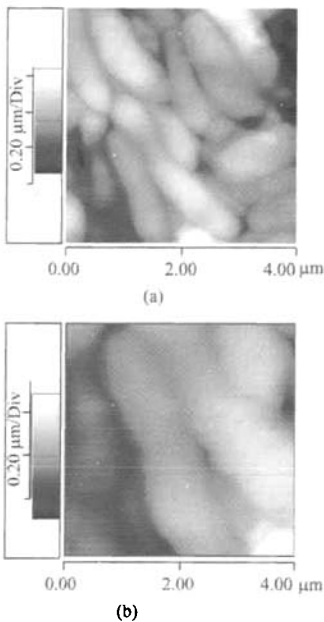


图 2 H 细菌的原子力显微镜观察

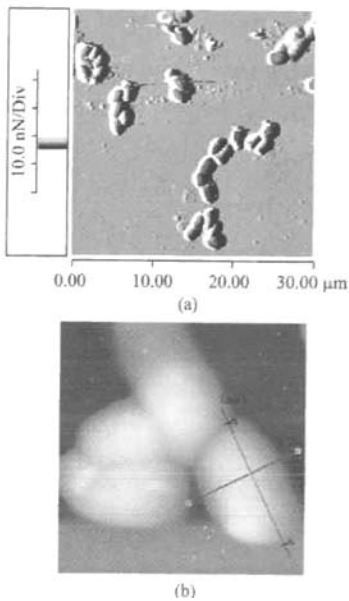


图 3 B 细菌的原子力显微镜观察

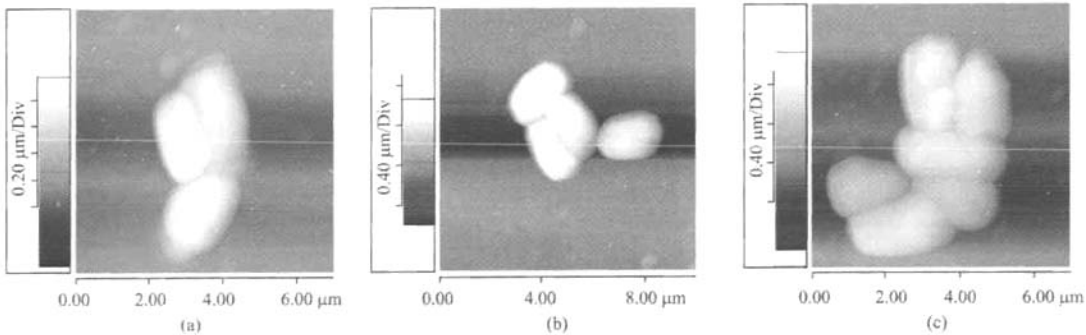


图 4 细菌 B 的三联体、四联体及六联体

式的多样化. 此外,用原子力显微镜对细菌 B 株进行观察的时候发现,其细胞较软,容易挤压在一起而变形,且其细胞壁比较薄,极易被探针刮破.

2.3 溶藻细菌对藻细胞作用

将空白对照组样品进行原子力显微镜观察,结果如图 5、图 6. 图 5 表明在未加入溶藻细菌的对照组藻样中,很容易找到呈球形的完整藻细胞. 藻细胞大小为  $2.6\text{ }\mu\text{m}\times 3.5\text{ }\mu\text{m}$ ,细胞边缘光滑完整,但表面存在明显的塌陷,产生塌陷的原因是在对藻细胞进行洗盐预处理的时候藻细胞脱水所致. 图 6 是图 5 中的藻细胞边缘局部放大的观察结果. 从图 6 中可以清晰看到,放大后其边缘呈连续光滑分布,藻

细胞并没有破裂.

在藻液中加入溶藻细菌,共同培养 48 h 后,用原子力显微镜观察样品中藻细胞的变化情况,结果见图 7、图 8、图 9. 从图 7 可以看出,藻细胞不完整,已经成为不规则的细胞碎片,表明有溶藻现象发生. 对比溶藻细菌作用前后的藻细胞边缘局部放大图 6 和图 8,可以看到溶藻细菌作用后,藻细胞边缘破碎非常严重. 说明细菌对藻细胞产生了影响,并使其破裂,从而杀灭或抑制藻细胞生长. 从图 9 还可以看到藻细胞破裂后,在碎片旁边有一些均匀的颗粒状物质,这些颗粒物很规则的聚集在一起,有可能是藻细胞的胞内溶出物.

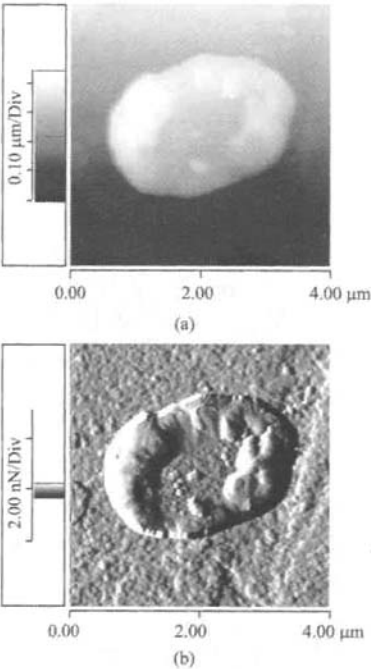


图 5 完整的藻细胞形态

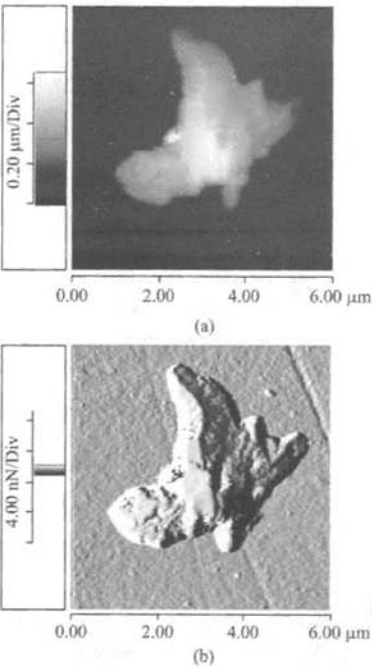


图 7 细菌作用后破碎藻细胞形态

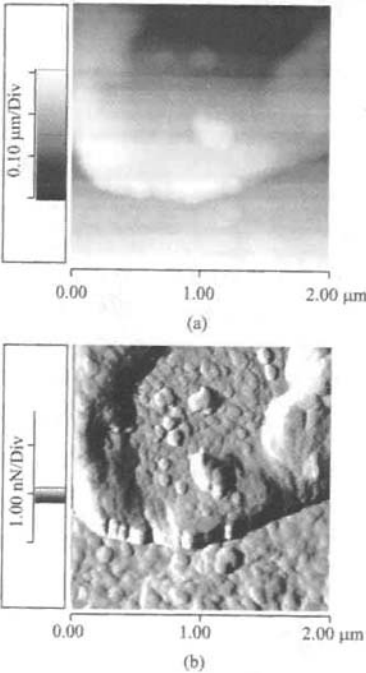


图 6 藻细胞局部边缘放大形态图

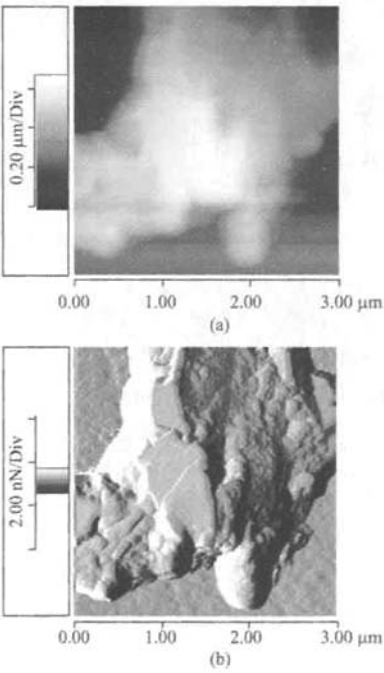


图 8 细菌作用后破碎藻细胞形态局部放大图

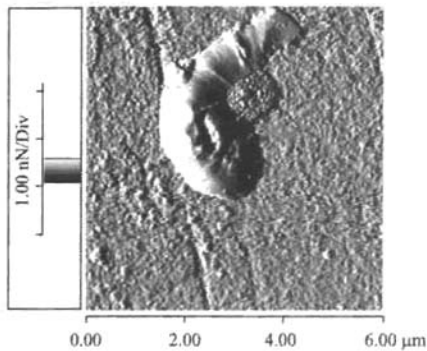


图 9 细菌作用下破碎藻细胞溶出物

从上述实验结果初步可以看出,溶藻细菌对藻细胞产生了破坏作用,导致细胞破裂和胞内物质溶出,从而有效地杀灭或抑制藻类的生长,这一研究结果与文献报道<sup>[6]</sup>的蛭弧菌和某些黏细菌直接接触溶解藻细胞的结论一致。

实验也发现,藻液中加入细菌 H 或细菌 B 后,光学显微镜下观察到一些藻细胞外观完整,但细胞壁变薄、变透明,细胞不会游动,这可能是溶藻细菌分泌的化学物质对藻细胞产生溶蚀和化学杀灭,导致藻细胞失去活性。这些化学物质可能是胞外蛋白质、水解酶、多糖及一些有机化合物<sup>[7]</sup>。

### 3 结论

从珠海赤潮发生海水中分离出溶藻细菌 H 和溶藻细菌 B,经革兰氏染色初步鉴定和原子力显微镜进一步确认,2 株细菌均为杆菌,两者均呈革兰氏阳性,形态明显不同。

用原子力显微镜研究发现,溶藻细菌对球形棕囊藻细胞有破坏和杀灭作用,可导致藻细胞破裂和胞内物质溶出而死亡。溶藻细菌也会分泌的一些

化学物质对藻细胞产生溶蚀和化学作用,杀灭和控制赤潮生物生长,达到治理赤潮的目的。

### 〔参考文献〕

- [1] LEE S O, KATO J, TAKIGUCHI N, et al. Involvement of an extra cellular protease in algicidal activity of the marine bacteria *Pseudoalteromonas* sp. StainA28 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(10): 4334 - 4339.
- [2] YOSHIKAWA K, ADACHI K, NISHIJIMA M, et al.  $\beta$ -Cyanoalanine production by marine bacteria on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(2): 718 - 722.
- [3] KIM M C, YOSHINAGA I, IMAI I, et al. A close relationship between algae-lysis bacteria and termination of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) blooms in Hiroshima Bay [J]. *Japan Mar Ecol Prog Ser*, 1998, 170(1): 25 - 32.
- [4] LOVEJOY C, BOWMAN J P. Algae-lysis effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class proteobacteria gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the Genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(8): 2806 - 2813.
- [5] 郑天凌, 苏建强. 海洋微生物在赤潮生消中作用 [J]. *水生生物学报*, 2003, 27(3): 291 - 295.
- [6] 吴刚, 席宁, 赵以军. 溶藻细菌研究的最新进展 [J]. *环境科学研究*, 2002, 15(5): 43 - 46.
- [7] 张勇, 席宇, 吴刚. 溶藻细菌杀藻物质的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2004, 31(1): 127 - 131.
- [8] 赵以军, 刘永定. 有害藻类及其微生物防治的基础——藻菌关系的研究动态 [J]. *水生生物学报*, 1996, 20(2): 173 - 181.

〔责任编辑:黄建军〕