

溶藻细菌杀藻物质的研究进展*

张勇 席宇 吴刚**

(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)

摘要: 溶藻细菌作为防治有害藻类水华的一种可能微生物, 已引起了众多科研人员的关注。大多数溶藻细菌分泌的生物活性杀藻物质对宿主藻类具有强烈的杀灭作用。首先讨论了细菌活性杀藻物质的生态作用, 重点阐述了目前已经报道的细菌杀藻物质的种类及其提取和分离方法, 最后对细菌杀藻物质的进一步研究提出几点看法。

关键词: 溶藻细菌, 有害藻类水华, 杀藻物质

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0127-05

ADVANCES ON ALGICIDAL SUBSTANCES PRODUCED BY ALGICIDAL BACTERIA

ZHANG Yong XI Yu WU Gang

(College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079)

Abstract: In recent years, more and more researchers have realized the possibility that algicidal bacteria could be a useful tool in reducing the impact of harmful algae blooms. In this review, the ecological roles of algicidal substances was briefly discussed, then special emphasis placed on the categories and extract methods of algicidal substances which have been reported. Some ideas for the further studies on algicidal substances were also proposed.

Keywords: Algicidal bacteria, Harmful algal bloom, Algicidal substances

随着全球水体富营养化的加剧, 有害藻类水华的爆发日趋频繁, 其造成的环境和经济问题日益引起人们的重视。用铜制剂、除草剂等化学杀藻剂可以直接杀死藻类, 但这些化学物质的专一性差, 而且容易富集在食物链中造成二次污染。溶藻细菌 (algicidal bacteria), 作为水生生态系统生物种群结构和功能的重要组成部分, 对维持藻类生物量平衡具有非常重要的作用^[1]。近年来, 不少国外研究者认为: 水华的突然消亡可能与溶藻细菌的感染有关^[2,3]。溶藻细菌作为水华防治的可能微生物, 已引起越来越多的关注。多数溶藻细菌能够分泌细胞外物质, 对宿主藻类起抑制或杀灭作用, 因此通过溶藻细菌筛选高效、专一, 能够生物降解的杀藻物质已经成为开发杀藻剂的一个新思路^[4]。目前国内对溶藻细菌的研究处于起步阶段, 而对于细菌杀藻物质的研究尚属空白。鉴于此, 作者根据国内外的最新研究成果, 对水生生态系统中细菌杀藻物质的作用、种类和研究方法作一概述, 并展望了溶藻细菌杀藻物质研究和应用前景。

1 细菌杀藻物质的作用方式

溶藻细菌是指能够通过直接或间接方式抑制藻类生长, 或杀死藻细胞, 从而导致

* 留学回国人员科研启动基金资助项目 (No. 教外司 [2000] 367 号)

武汉市科技攻关计划 (No. 20026002097)

** 联系人 E-mail: wugang1962@163.net

收稿日期: 2003-06-25, 修回日期: 2003-09-25

藻细胞溶解的细菌。近年来,越来越多的研究人员认识到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学的一个重要因素,对有害藻类水华的迅速消退起了重要的作用。溶藻细菌的作用方式一般分为两种:一是直接溶藻,即直接进攻宿主(direct attack),它需要细菌与藻细胞直接接触,甚至侵入藻细胞内;二是间接溶藻,即间接进攻宿主(indirect attack),主要包括细菌同藻竞争有限营养或细菌分泌胞外物质溶藻^[2]。其中分泌胞外物质溶藻文献报道较多,是溶藻细菌的主要作用方式。研究溶藻细菌的作用方式不仅可以了解溶藻细菌的作用机制,而且可以指导我们尝试分离和研制高效的杀藻剂。

2 细菌杀藻物质的种类

细菌可以通过释放特异性或非特异性的胞外物质,如蛋白质、多肽、氨基酸、抗生素和羟胺等杀死藻细胞。这类细菌常见的有弧菌、假单胞菌、黄杆菌、交替单胞菌、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)等。目前报道的细菌杀藻物质主要有以下几类。

2.1 蛋白质 Lee分离的一株海洋细菌假交替单胞菌 A28 (*Pseudoalteromonas* sp. A28)能杀死骨条藻(*Skeletonema costatum* NIES-324)。纸片法检测(paper disk assay)表明:A28培养液上清具有强烈的杀藻活性。将A28的上清液用10,000Mw的滤膜超滤所获得的浓缩上清液显示出杀藻活性,这表明A28能产生细胞外大分子物质杀藻。100℃加热15 min或68℃加热1h,A28的上清液会失去杀藻活性,检测表明浓缩的上清液有蛋白酶和DNase活性。采用诱变剂N-甲基-N'-亚硝基胍(NTG)诱变后选育出两株无杀藻活性的A28的突变株NH1和NH2。NH1和NH2的上清液中的蛋白水解酶活性要比A28低15%。应用离子交换层析后通过制备凝胶电泳来纯化A28的蛋白水解酶,纯化的蛋白水解酶具有强烈的杀藻活性。该蛋白水解酶为单体蛋白,分子量约为50kD,N末端的氨基酸序列经测定为Ala-Thr-Pro-Asn-Asp-Pro。用succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide作为底物进行实验,结果表明该蛋白酶的最适pH和最适温度分别为8.8和30℃。其活性能被苯甲基磺酰氟(PMSF,一种Ser抑制剂)、二异丙基氟磷酸(DFP)、抗蛋白酶、胰凝乳蛋白酶抑制剂和亮抑酶肽强烈抑制。而EDTA、EGTA、邻二氮杂菲、四乙烯五胺,对它则没有明显抑制作用。这些结果表明A28能产生一种胞外丝氨酸蛋白酶杀藻^[2]。

Mitsutani报道一株海洋细菌假交替单胞菌A25 (*Pseudoalteromonas* sp. Strain A25)以浓度 10^4 cells/mL接种到骨条藻 *Skeletonema costatum* NIES-324培养物中后,2d内能溶解全部藻细胞。通过双向电泳对A25及其无溶藻活性的突变株A25W1的细胞蛋白进行分析,结果表明:在A25的稳定期,有大量的蛋白质产生,但这些蛋白质在其晚对数期检测不到,而且在突变株A25W1的稳定期和晚对数期均检测不到。无细胞提取物中也能检测到溶藻活性,但只能来自A25的稳定期细胞。这表明假交替单胞菌A25的稳定期所产生的一些蛋白质能够杀死骨条藻^[5]。

2.2 多肽 Imamura从Biwa湖采集的含微囊藻的水样中分离一株细菌,通过16S rDNA序列分析及分类研究,将其归类于鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.),该菌株能够分泌一种对微囊藻有强烈杀灭活性的五肽 argimicin A,分子式为 $C_{32}H_{62}N_{12}O_8$ 。它在12 ng/mL和100 ng/mL时分别对绿色微囊藻(*Microcystis viridis* NIES-102)和铜绿微囊藻(*M. aeruginosa* NIES-298)有着很强的杀藻活力。但对大肠杆菌(*Escherichia coli* IAM12119)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis* IFO3027)、小球藻(*Chlorella vulgaris* IAMC-27)无效果。虽然

它是一种多肽, 易被水生细菌降解, 但是它对直接从环境中分离的含有细菌的蓝藻仍有很强的杀藻效果^[4]。Yamamoto 报道一种海洋放线菌释放的 L-赖氨酸, 最低质量浓度为 5000 ng/mL 时才能抑制微囊藻的生长^[6]。因此 Argimicin A 是一种高效的、选择性的杀藻物质, 有望应用于有害藻类水华的实际防治中。

Banin 报道一株珊瑚褪色弧菌 (*Vibrio shiloi*) 能合成并分泌一种胞外多肽, 称之为毒素 P, 该毒素能够抑制与珊瑚共生的虫黄藻的光合作用, 导致虫黄藻死亡, 从而引起珊瑚褪色。纯化的毒素 P 为含有 12 个残基的多肽: PYPVYAPPPVVP, 分子量为 1295.54D, 通过化学方法可以合成毒素 P。当有 12.5 mmol/L 的 NH_4Cl 存在时, 纯天然或合成的毒素 P (浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$) 能在 5 min 内使虫黄藻的光合量子产量 (photosynthetic quantum yield) 减少 64%, 且抑制程度与毒素 P 的浓度成正比。当虫黄藻培养液中有 NH_4Cl 和毒素 P 时, 培养液的 pH 从 7.8 迅速下降到 7.2, 这表明毒素 P 能够促进 NH_3 转入细胞内。而 NH_3 进入细胞内能破坏 pH 梯度并阻断光合作用, 从而导致光合量子产量的下降^[7]。毒素 P 的这种作用模式有助于解释珊瑚褪色的机制。

2.3 氨基酸 Yoshikawa 从日本西南的一些岛 (Yap, Palau, Okinawa) 采集水样分离细菌, 进而筛选具有抗蓝藻活性的细菌。在供试的 2594 株分离细菌中, 有 37 株能产生抗颤藻 (*Oscillatoria amphibia* NIES-361) 的物质。其中的一株 C-979, 经鉴定为 *Vibrio* sp., 将其培养在 2.4 L 的海洋肉汤 2216 培养基中, 用来鉴定该菌产生的生物活性物质。通过仪器分析以及应用高级 Marfey 法, 确定了这种被纯化的强亲水性化合物为 β -氰基-L-丙氨酸 (L-CNAla)。这是首次报道细菌在没有供应氰离子的培养基中产生了 β -氰基-L-丙氨酸。该化合物不抑制细菌、酵母菌和真核微藻的生长, 但发现一些蓝藻对 0.4-25 $\mu\text{g/mL}$ 的该化合物敏感。用薄层层析法检测了 37 种能产生抗蓝藻物质的分离细菌在海洋肉汤中是否产生 β -氰基-L-丙氨酸, 结果表明其中的 36 株细菌的培养物中含有 β -氰基-L-丙氨酸, 这表明海洋细菌的 β -氰基-L-丙氨酸产物是广泛分布的^[8], 该化合物可能是影响海洋藻类种群动力学的一个重要因素。

2.4 抗生素 Dakhama 发现一株铜绿假单胞菌能释放低分子量, 热抗性物质, 对供试的绿藻和蓝藻的生长有强烈的抑制作用。这种杀藻物质对不同的酶都具有抗性, 在避光条件下, 于 4℃ 的琼脂中保存 3 个月后仍有活性。铜绿假单胞菌可产生一系列抗生素物质, 例如不同的吩嗪色素, PYO (脓) 化合物, 糖脂类等。经检测表明铜绿假单胞菌通过释放琼脂扩散性吩嗪色素对宿主藻类的生长起抑制作用。绿脓素和一种未鉴定的浅蓝色素对宿主藻类的生长没有效果, 而 1-羟基吩嗪和氧绿菌素却有强烈的抗藻活性^[3]。

2.5 含氮化合物 Paul 的研究发现分离的一株活性硝化细菌—节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) 能抑制小球藻 (*Chlorella vulgaris*)。该菌是通过氧化铵或其它还原性的氮化合物时释放的羟胺起作用。将该菌在平板上培养时, 可积累 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 N-羟胺。小球藻对低于 0.24 $\mu\text{g/mL}$ 的 N-羟胺敏感。作者还检测到 10 $\mu\text{g/mL}$ 的脲对小球藻也有抑制效果^[9]。

2.6 其它细菌杀藻物质 随着藻类学、水生生态系统和环境科学研究的进展, 溶藻细菌的杀藻物质被不断报道。Lovejoy 通过细菌的培养物滤液实验发现一株假交替单胞菌分泌细胞外物质溶藻^[10]。Baker 发现某种假单胞菌 T827/2B 分泌一种高分子量的热不稳定的化合物, 能够杀死硅藻 (*Thalassiosira pseudonana*)^[11]。Shinsaku 证明了施氏假单胞菌释放一些高活性的杀藻物质, 能够选择性地杀死绿胞藻类的 *Chattonella antiqua*, 最低

的致死浓度为 0.5%, 但与之共同培养的黄尾鱼却不受任何影响^[12]。Hayashida 分离的菌株 EHK-1 能产生一种扩散性溶藻物质来杀死 *Heterocapsa circularisquama*^[13]。Ishio 报道弧菌 (*Vibrio alginifestus*) 能产生甲藻抑制剂 DGI (dinoflagellated growth inhibitor) 杀死 *Chattonella antiqua*^[1]。这些细菌杀藻物质大都未被鉴定, 溶藻机制仍不十分清楚。

3 细菌杀藻物质的提取和筛选方法

一般来说, 细菌杀藻物质的筛选是通过检测细菌培养物滤液是否具有溶藻活性的方法进行的。即首先分离细菌, 然后通过溶藻试验确认细菌的培养物滤液是否具有溶藻能力, 如果滤液具有溶藻能力, 表明细菌能够通过分泌物质的方式溶藻, 然后采取各种生物和化学方法来纯化和鉴定细菌的杀藻物质, 但这种方法效率较低。比如 Yoshikawa 直接用甲醇来提取所有分离细菌的培养物, 低温干燥后与藻共培养来检测这些细菌的分泌物是否具有杀藻效果, 从供试的 2594 株分离细菌中仅发现 37 种能产生抗颤藻 (*Oscillatoria amphibia* NIES-361) 的物质。从杀藻活性最高的菌株 C-979 中纯化和鉴定出杀藻物质为 β -氨基-L-丙氨酸^[8]。这实际上是一种直接的随机筛选细菌杀藻物质的方法, 实验周期长, 劳动量大。

Imamura 为了提高筛选抗微囊藻化合物的效率, 采用了一种两步筛选法。首先通过液体共培养实验分离筛选溶藻细菌, 然后用无水乙醇提取溶藻细菌的培养物, 室温干燥后与微囊藻共培养, 从中筛选分泌杀微囊藻物质的菌株, 最后从这些菌株中分离和鉴定杀藻物质^[4]。这种方法大大提高了筛选细菌杀藻物质的效率。

由于细菌杀藻物质的种类很多, 且特性各不相同, 所以细菌杀藻物质的纯化和鉴定难度较大, 目前尚无一种合适的通用的方法。因此许多细菌的杀藻物质尚未被纯化和鉴定, 限制了对其溶藻机制的进一步研究。需要人们掌握一定的物质纯化和鉴定的方法, 并积极利用一些创新的技术和手段。

4 细菌杀藻物质研究的展望

细菌的杀藻物质作为开发新型生物杀藻剂的一种新思路, 具有重要的理论意义和潜在的应用价值。提取、纯化和鉴定高效的宿主特异性细菌杀藻物质已经提到了议事日程。提高溶藻细菌的分离效率和加强溶藻细菌的分子生物学研究将是未来一段时期内溶藻细菌杀藻物质研究的热点。

利用溶藻细菌提取和纯化杀藻物质已经成为一种高效的方法。提高溶藻细菌的分离效率, 就能提高细菌杀藻物质的提取和纯化效率。Imamura 等对分离溶藻细菌的水样来源及其溶藻方式进行了比较, 结果表明水华期间水样是分离高效溶藻细菌的最好来源, 从水华期间分离的溶藻细菌中能够筛选出高效率的杀蓝藻化合物^[4]。在水生生态系统中, 采用常规的培养方法许多细菌是不可培养的^[14], PCR 技术可以快速、灵敏, 选择性的扩增微量的 DNA (或 RNA) 片段, 16S rDNA 序列分析可以揭示微生物种群间的系统发育关系。通过 PCR 技术直接扩增自然水体中细菌的 16S rDNA 序列, 直接分析细菌的类属及亲缘关系, 然后根据分析结果选择合适的培养基和方法进行分离培养, 则能够克服部分细菌不易培养这一弊端, 有利于我们分离更多的溶藻细菌, 提高细菌杀藻物质的提取和纯化效率。

目前在分子水平上对细菌杀藻物质的作用机制研究甚少。Kato 从分离的溶藻细菌

交替单胞菌 A28 中检测到了隐蔽型的质粒——pAS28。通过融合 pAS28 和大肠杆菌载体 pCRIIc 构建了能同时转化大肠杆菌和 A28 的一种穿梭质粒 (命名为 pASS1), 能以 $10^6/\mu\text{gDNA}$ 的转化率转化 A28。这一研究结果为开展溶藻细菌的分子生物学研究提供了有益的探索^[15]。因此, 加强对分泌杀藻物质的细菌的分子生物学研究, 克隆编码杀藻物质基因, 阐明杀藻的分子机制。并在此基础上, 通过基因工程操作, 导入藻类去壁酶基因或其它细菌的杀藻物质基因, 构建高效的工程菌株, 应用于有害藻类水华的生物防治中。

在细菌的杀藻物质应用于防治有害藻类水华之前, 首先必须了解该杀藻物质是否具有特异性, 是否对其它微藻、原生动物、鱼类及有益生物产生毒害, 因此必须考虑细菌杀藻物质的生物安全性问题; 其次, 水华终止后, 细菌杀藻物质在水体和沉积物中的归趋问题, 也是我们值得考虑的问题之一。总之, 溶藻细菌的杀藻物质为有害藻类水华的生物防治提供了新的手段。我们可以利用细菌分泌的杀藻物质作为天然杀藻剂。同时, 深入了解细菌杀藻物质的化学结构和性质将进一步合成新的、高效专一的, 能生物降解的杀藻剂提供理论依据。

致谢 感谢中国科学院武汉病毒研究所陈士云博士审校此文。

参考文献

- [1] 赵以军, 刘永定. 水生生物学报, 1996, 20 (2): 173 ~ 181.
- [2] Lee S O, Kato J, Takiguchi N, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (10): 4334 ~ 4339.
- [3] Dakham A, Noue J D, Lavoie M C. J Appl Phycol, 1993, 5 (9): 297 ~ 306.
- [4] Imamura N, Motoike I, Shimada N, *et al.* J Antibiotics, 2001, 54 (7): 582 ~ 587.
- [5] Mitsutani A, Yamasaki I, Kitaguchi H, *et al.* Phycologia, 2001, 40 (3): 286 ~ 291.
- [6] Yamamoto Y, Kouchiwa T, Hodoki Y, *et al.* J App Phycol, 1998, 10 (2): 391 ~ 397.
- [7] Banin E, Khare S K, Naider F, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2001, 67 (4): 1536 ~ 1541.
- [8] Yoshikawa K, Adachi K, Nishijima M, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (2): 718 ~ 722.
- [9] Paul S B, Jinnque R, Haim B G. Water Research, 1979, 13 (1): 267 ~ 273.
- [10] Lovejoy C, Bowman J P, Hallegraeff G M. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (8): 2806 ~ 2813.
- [11] Baker K H, Herson D S. Appl Environ Microbiol, 1978, 35 (6): 791 ~ 796.
- [12] Mitsutani A, Yamasaki I, Kitaguchi H, *et al.* Phycologia, 2001, 40 (3): 275 ~ 279.
- [13] Hayashida S, Tanaka S, Teramoto Y, *et al.* Agric Biol Chem, 1991, 55 (3): 787 ~ 790.
- [14] Ward D M, Weller R, Bateson M M. Nature, 1990, 345 (6270): 63 ~ 65.
- [15] Kato J, Amie J, Murata Y, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (6): 2061 ~ 2064.

关于测序类论文的投稿说明

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请作者先通过计算机网络进入国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库接受号 (Accession No.) 后再投稿, 谢谢!

《微生物学通报》编辑部