

一株溶藻菌 *Zobellella* sp. B307 对太平洋亚历山大藻的溶藻特性及作用机制研究*

马双慧¹, 白洁¹, 孙鹏飞², 王登宇¹, 相壮壮¹, 李辉^{1,3}, 晨曦^{4**}

(1. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100; 2. 自然资源部第四海洋研究所, 广西 北海 536000;
3. 中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100; 4. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 为研究溶藻菌对赤潮甲藻的作用机制, 本文从胶州湾沉积物中分离得到的一株耐盐菌株 *Zobellella* sp. B307, 并研究了该菌株对太平洋亚历山大藻 (*Alexandrium pacificum*) 的抑制效果, 从细胞结构、生理水平和分子水平探究了该菌株的抑藻途径及作用机制。结果表明, 该菌株的抑藻途径为分泌胞外活性物质的间接溶藻, 72 h 的溶藻率高达 91%。溶藻过程中藻细胞壁破损, 叶绿素 *a* 和总蛋白含量显著下降, 藻细胞的活性氧 (ROS)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性显著高于对照组, 这表明溶藻物质对藻细胞造成的强烈氧化损伤是导致其死亡的直接原因。热休克蛋白基因 (*HSP*) 表达量显著上调, 说明溶藻物质激发藻细胞产生的 ROS 在激活抗氧化系统的同时诱导产生 *HSP70*, 二者联合清除 ROS 以减缓藻细胞受应激损伤的程度; *A. pacificum* 的网格蛋白基因 (*Clathrin*) 表达量显著上调, 表示由网格蛋白介导的胞吞作用明显增强, 进而说明为减轻光合营养功能受损造成的影响, 藻细胞的异养功能增强。本研究结果有助于诠释菌藻关系, 更为探究赤潮治理的生物方法提供重要的理论支持和实践指导。

关键词: 赤潮; 亚历山大藻; 溶藻细菌; 溶藻机理; 基因表达

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2024)05-063-08

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20220180

引用格式: 马双慧, 白洁, 孙鹏飞, 等. 一株溶藻菌 *Zobellella* sp. B307 对太平洋亚历山大藻的溶藻特性及作用机制研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2024, 54(5): 63-70.

Ma Shuanghui, Bai Jie, Sun Pengfei, et al. The algicidal characteristics and mechanism of an algicidal bacterium *Zobellella* sp. B307 on *Alexandrium pacificum*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2024, 54(5): 63-70.

赤潮是指在特定的环境条件(如水体富营养化)下, 海水中某些浮游植物、原生动物或细菌爆发性增殖或高度聚集而引起水体变色的一种有害生态现象^[1], 这些赤潮生物可能有剧毒, 其大规模爆发性生长对海洋环境乃至人类生产和生活安全造成严重威胁, 学术界将这些直接造成危害的赤潮称为有害藻华(Harmful algal blooms, HABs)^[2]。近年来由于人类活动导致水体富营养化加剧, 有害藻华在全球各海域频发, 严重影响海洋生态环境, 给养殖业、旅游业造成重大损失, 同时部分藻类产生的藻毒素严重危害人体健康^[3]。目前对赤潮的治理方法可大致分为物理法、化学法和生物法^[4]; 物理法主要包括过滤、吸附和黏土絮凝沉淀等, 但往往无法根除赤潮藻; 化学法多为向水体中投加铜离子、噻唑、光催化材料和酮类衍生物等杀藻剂, 但会造成二次污染; 生物法主要为引入藻类天敌或微生物,

利用竞争关系和捕食关系来控制赤潮, 是环保且可持续的治理方法。微生物治理赤潮是近些年的热点技术, 主要使用能够抑制甚至杀死赤潮藻类的细菌或病毒, 这种方法更加切实可行, 对环境影响低, 并且有良好的发展前景^[5]。

细菌是海洋生态系统的重要组成部分, 对平衡藻类种群动态具有重要的调节作用, 菌藻关系一直是海洋生态领域的研究热点^[6]。具有溶藻功能的细菌称为溶藻菌, 其溶藻主要分为直接溶藻、间接溶藻以及直接与间接结合的溶藻方式。通过分泌胞外溶藻物质进行杀藻属于间接溶藻, 是目前发现的大多数溶藻菌的溶藻方式。迄今为止, 已有多个种属的海洋细菌被筛选并被鉴定出具有溶藻作用, 如假单胞菌属、芽孢杆菌属和不动杆菌属等^[7], 但 *Zobellella* 属的溶藻作用目前还未见报道。

* 基金项目: 自然资源部热带海洋生态系统与生物资源重点实验室开放基金课题项目(2021QN07)资助

Supported by the Fund of the Key Laboratory of Tropical Marine Ecosystem and Bioresources, Ministry of Natural Resources (2021QN07)

收稿日期: 2022-04-23; 修订日期: 2022-05-11

作者简介: 马双慧(1997—), 女, 硕士生。E-mail: midnight459@163.com

** 通信作者: 晨曦(1988—), 男, 博士, 讲师。E-mail: chenxi@ouc.edu.cn

亚历山大藻(*Alexandrium* sp.)是一类重要的赤潮甲藻,可以产生麻痹性贝类毒素(Paralytic shellfish toxins, PSTs),对海洋生物和人类造成严重危害,其在全球范围内均有分布,在中国主要分布于青岛、浙江和天津等地区海域^[8]。目前已有针对太平洋亚历山大藻赤潮治理的多项研究,但利用溶藻菌抑制太平洋亚历山大藻赤潮爆发的研究还较少。本研究以一株耐盐菌株 *Zobellella* sp. B307 为研究对象,探究该菌对太平洋亚历山大藻(*Alexandrium pacificum*)生长的影响,首次发现该菌对 *A. pacificum* 有极强的抑藻效果。本研究中还对该菌的溶藻途径及作用机制进行了分析探讨,以期为深入研究赤潮藻的控制理论及有毒赤潮的防控技术提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 藻种及菌种来源

本研究所用藻种 *A. pacificum* 由中国海洋大学浮游生物实验室提供,株号 ATHK;所用菌株由本研发团队从青岛胶州湾沉积物中分离获得^[9],经 16S rRNA 鉴定,该菌株为 *Zobellella* 属,命名为 *Zobellella* sp. B307,其基因序列在 GenBank 数据库中的登陆号为 MF407315。

1.2 溶藻实验

将培养至对数增长期的细菌发酵液离心,从而分离获得下层菌悬液和无菌的上清发酵液。分别将离心获得的下层菌悬液、无菌上清发酵液和未离心处理的含菌发酵液分别加入到三组对数期 *A. pacificum* 培养体系中继续培养,培养条件为温度 20 °C、光照 5 000 Lux、光暗比 12 h : 12 h。对照组加入等体积新配制的灭菌细菌培养基。培养期间定时取样,用于测定各项指标。

1.3 样品测定

1.3.1 叶绿素 *a* 含量测定与溶藻率计算 采用荧光分光光度法测定叶绿素 *a* 含量,根据叶绿素 *a* 含量计算溶藻率^[10]。溶藻率计算公式为:

$$\text{溶藻率} =$$

$$\frac{\text{对照组 Chl } a \text{ 含量} - \text{实验组 Chl } a \text{ 含量}}{\text{对照组 Chl } a \text{ 含量}} \times 100\%$$

1.3.2 细胞形态观察 取各组(本文 1.2 节提到的三级发酵液)培养时间为 0、6、12、24、48 和 72 h 的藻液,用 4% 的戊二醛溶液(pH=7.0)固定后,直接用于光学显微镜观察细胞形态;用于电镜观察的样品需继续离心后用 0.1 mol/L 的 PBS 冲洗,经乙醇梯度脱水和乙醇-叔丁醇(1:1)重悬后,用叔丁醇冲洗,并加叔丁醇于 4 °C 下保存,冷冻干燥后喷金,用扫描电镜(SEM)观察

藻细胞形态。

1.3.3 总蛋白测定 总蛋白浓度的测定采用了考马斯亮蓝(Bradford)法^[11],在最大吸收值(波长为 595 nm)处测定样品吸光度,计算样品中的蛋白质浓度。

1.3.4 抗氧化功能测定

(1)活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的测定是利用了 DCFH-DA 探针。在激发波长 502 nm、发射波长 530 nm 处测定吸光值^[12],根据荧光强度计算 ROS 含量。

(2)过氧化氢酶(Catalase, CAT)的测定是采用了钼酸铵法^[13]。在 405 nm 处测其吸光值,计算 CAT 活性。

(3)超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的测定是采用了黄嘌呤氧化酶法^[14]。测定其在 550 nm 处的吸光值,计算 SOD 活性。

1.3.5 基因表达差异分析

(1)藻细胞总 RNA 提取。离心收集分别加入溶藻菌及无菌发酵液后培养的 *A. pacificum*,用 Trizol 法提取藻细胞内的总 RNA。提取时,在藻细胞中放入液氮进行研磨,将研磨后的藻加入到装有预冷 Trizol 的离心管中,加入氯仿及异丙醇,生成 RNA 沉淀后,再用乙醇漂洗沉淀,沉淀物中加入适量 DEPC 水溶解,溶解后的 RNA 于 -80 °C 下保存。

(2)反转录及 PCR 扩增。采用索莱宝通用 RT-PCR 试剂盒,扩增引物序列如表 1 所示,内参基因序列来自中国海洋大学海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室^[15],基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

表 1 目的基因引物序列
Table 1 Primers of target genes

| 基因 | 引物序列(5'→3') | 扩增片段长度 |
|-----------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Gene | Primers sequence (5→3') | Length of amplified fragment/bp |
| <i>cob</i> | F: TTTTCTTCAAACCTCATTTCGG GAT | 140 |
| | R: TGGGCACAGCTTTTAACATAG CATA | |
| <i>clathrin</i> | F: GCAATGACAGGTGA CGGAG- GATTAG | 85 |
| | R: GCCTGCTGCCTTCCTTAGAT- GTG | |
| <i>HSP70</i> | F: CGGTTCCACACGTCCAAGTC AG | 110 |
| | R: GTGATGCTCTCGCCAGTGAT- GTAG | |

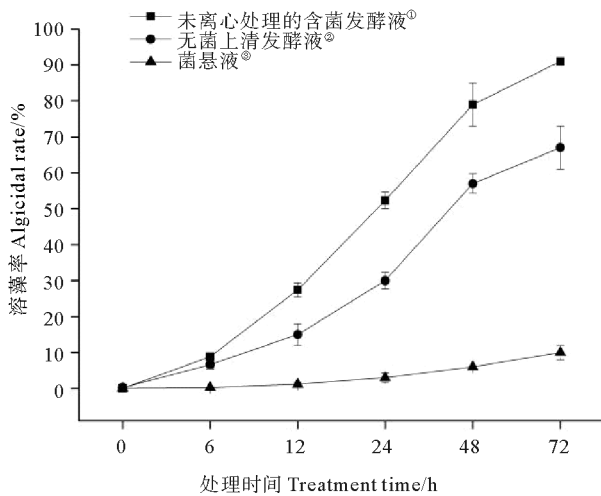
1.4 数据分析

将实验样品分为实验组和对照组, 每组 3 个平行样。数据结果以平均值±标准差来表示, 利用 SPSS 软件进行方差分析(One way ANOVA)和显著性检验, 所得结果采用 Origin 软件分析作图, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。

2 结果与分析

2.1 溶藻菌的溶藻效率与作用途径

将亚历山大藻培养体系分成三组, 并分别加入本文 1.2 节中提到的菌悬液、无菌上清发酵液和未离心处理的含菌发酵液, 各组溶藻率如图 1 所示。培养 72 h 后, 未离心处理的含菌发酵液组的溶藻率达到 91%, 说明 *Zobellella* sp. B307 是一株具有高效溶藻作用的细菌。无菌上清发酵液组的溶藻率为 67%, 二者溶藻率相差较大; 菌悬液组的溶藻率仅为 10.2%, 溶藻率远低于其他两组, 溶藻效果不显著。由此可以确定该菌株通过分泌溶藻活性物质杀藻, 溶藻方式为间接溶藻。其中, 溶藻物质能够持续保持活性, 且溶藻菌 *Zobellella* sp. B307 能够持续分泌溶藻物质。



(①The bacterial fermentation broth without centrifugation; ②Sterile supernatant of the fermentation broth; ③Bacterial suspension.)

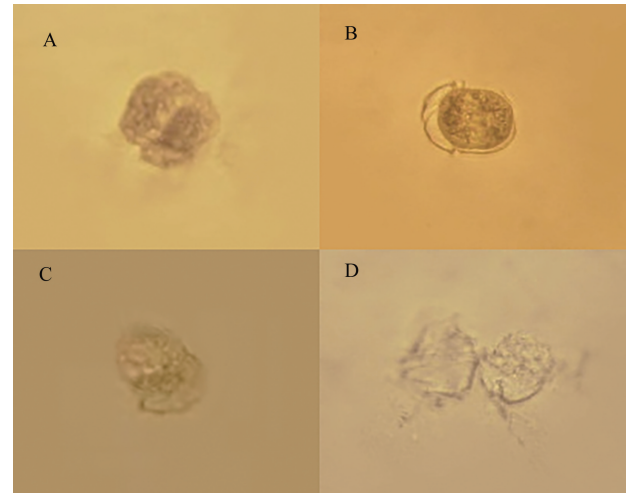
图 1 *Zobellella* sp. B307 纯菌及有菌和除菌发酵液对 *A. pacificum* 的溶藻率

Fig 1 The algicidal ratio of *Zobellella* sp. B307 on *A. pacificum*

2.2 溶藻物质对藻细胞形态结构的影响

2.2.1 光学显微镜下藻细胞形态结构的变化 细胞形态观察可以直观地显示溶藻物质对藻细胞的损伤情况。在光学显微镜下, 不同处理时间的藻细胞形态变化如图 2 所示。正常藻细胞形态近似球形, 表面结构完整, 如图 2A 所示; 当加入溶藻物质处理 6 h 后, 部分

藻细胞外壳分离, 内壁收缩, 如图 2B 所示; 12 h 后, 部分藻细胞皱缩变形, 如图 2C 所示; 处理 24 h 后部分藻细胞开始溶解死亡, 同时出现细胞碎片, 如图 2D 所示; 至 72 h 后 91% 的藻细胞溶解死亡, 培养体系内存在大量细胞碎片。



(A: 正常 Normal; B: 6 h 内壁收缩 6 h shrink; C: 12 h 皱缩变形 12 h deformation; D: 24 h 溶解性死亡 24 h cytolysis death.)

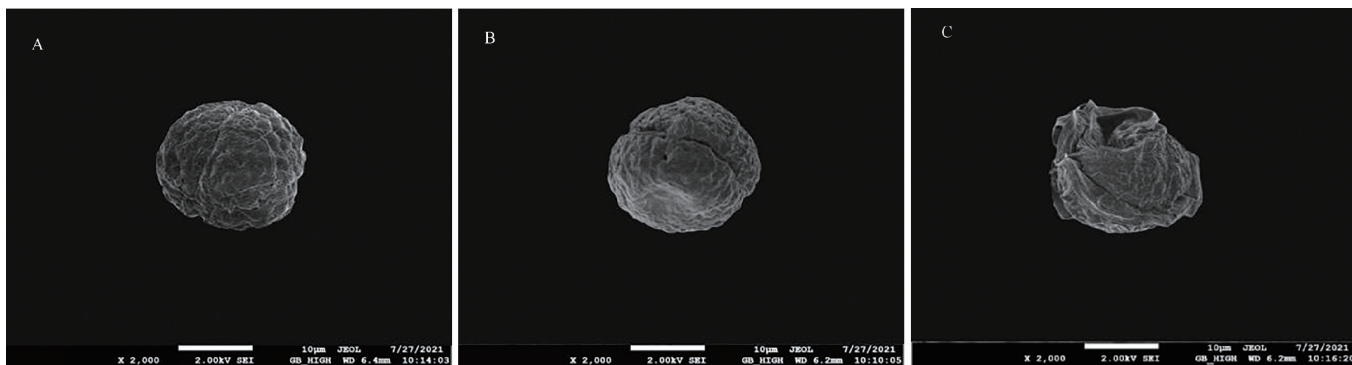
图 2 溶藻物质不同作用时间的 *A. pacificum* 形态变化(光镜)

Fig. 2 Morphological change of *A. pacificum* over time affect by algae-lysing substances (optical microscope)

2.2.2 扫描电镜下藻细胞形态结构的变化 溶藻物质对 *A. pacificum* 细胞超微结构的影响如图 3 所示。从图 3A 中可以看出, 对照组正常的藻细胞表面有突起, 近似球状, 有甲片和横沟。其中, 单个藻细胞直径约为 20 μm 。由图 3B 可见, 经溶藻物质处理 6 h 后, 部分藻细胞外壳出现局部凹陷, 表面出现孔洞; 由图 3C 可见, 处理 12 h 后, 部分藻细胞严重皱缩变形, 甚至丧失细胞结构, 与光学显微镜下的结果相符; 处理 24 h 后大部分藻细胞皱缩变形, 同时出现细胞碎片; 处理 48 和 72 h 后, 均发现藻细胞大部分破碎溶解, 难以找到完整细胞个体。由此可以看出, *Zobellella* sp. B307 的胞外分泌物对 *A. pacificum* 有极强的溶藻作用, 溶藻物质使得藻细胞外壁出现破损, 细胞质流出, 不断皱缩, 最后裂解死亡。

2.3 溶藻物质对藻细胞叶绿素 *a* 和总蛋白含量的影响

2.3.1 对藻细胞叶绿素 *a* 含量的影响 在溶藻物质作用下, *A. pacificum* 的叶绿素 *a* 含量变化如图 4A 所示。对照组和实验组的叶绿素 *a* 含量在前 6 h 内相差不大, 6 h 后实验组的叶绿素 *a* 含量开始下降, 并显著低于对照组 ($P < 0.05$), 72 h 实验组叶绿素 *a* 含量已经很低, 说明此时 90% 以上的太平洋亚历山大藻死

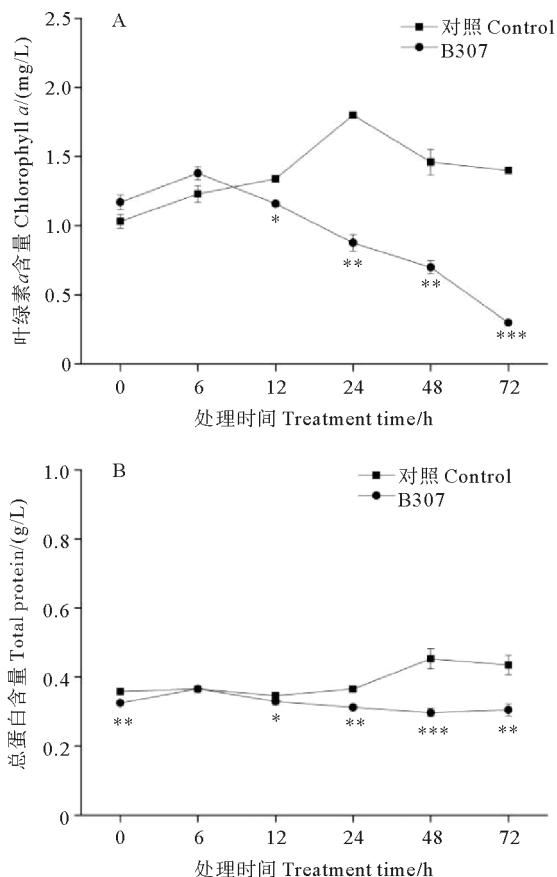


(A: 正常 Normal; B: 6 h 凹陷孔洞 6 h concave and holes; C: 12 h 皱缩变形 12 h deformation.)

图3 溶藻物质不同作用时间的 *A. pacificum* 形态变化(电镜)

Fig. 3 Morphological change of *A. pacificum* over time affect by algae-lysing substances (electron microscope)

亡并裂解,导致叶绿素分解或大量流失,最终导致藻细胞的光合作用能力受到严重影响或丧失。叶绿素 *a* 是主要的光合色素,能够反应藻细胞的完整性和生长情况。亚历山大藻中的叶绿素种类没有丝状藻等大型藻类体内的叶绿素种类多,但亚历山大藻体内的叶绿素 *a* 为自身提供了藻类自养所需要的生理基础,因此叶绿素 *a* 的含量为计算亚历山大藻初级生产力的指标^[16]。



(A: 叶绿素 *a* Chlorophyll-*a*; B: 总蛋白 Total protein; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.)

图4 溶藻物质对 *A. pacificum* 叶绿素 *a* 和总蛋白含量的影响

Fig. 4 Effects of algae-lysing substances on the chlorophyll *a* and total protein content of *A. pacificum*

2.3.2 对藻细胞总蛋白含量的影响 溶藻物质作用下藻细胞总蛋白含量的变化如图 4B 所示。在整个实验过程中,实验组和对照组藻细胞的总蛋白质含量在培养的前 24 h 差别不大,但在之后的培养时间里,对照组的蛋白质含量显著增加,而实验组的显著下降 ($P < 0.05$),说明藻细胞内蛋白质发生了变性,或者藻细胞的蛋白质合成能力受到抑制,可见溶藻活性物质对藻细胞蛋白质的抑制或破坏在其溶藻过程中发挥着一定作用。蛋白质含量的降低会影响藻细胞的相关功能,使其正常的生理活动无法进行,促进了藻细胞的裂解死亡。

2.4 溶藻物质对抗氧化系统的影响

2.4.1 对藻细胞 ROS 含量的影响 *A. pacificum*

的 ROS 含量变化如图 5A 所示。在整个实验过程中,对照组的 ROS 含量变化不大,说明正常情况下藻细胞内的 ROS 含量基本维持在一个稳定的水平。对加入溶藻活性物质的实验组进行培养,其 ROS 含量随时间推移的情况如下:在培养 6 h 时 ROS 含量开始明显上升,约为对照组的 2 倍;12 h 时 ROS 含量大幅上升并显著高于对照组 ($P < 0.05$);24 h 时 ROS 含量达峰值,约为对照组的 3 倍;24 h 后 ROS 含量开始下降,并在 72 h 时已低于对照组。

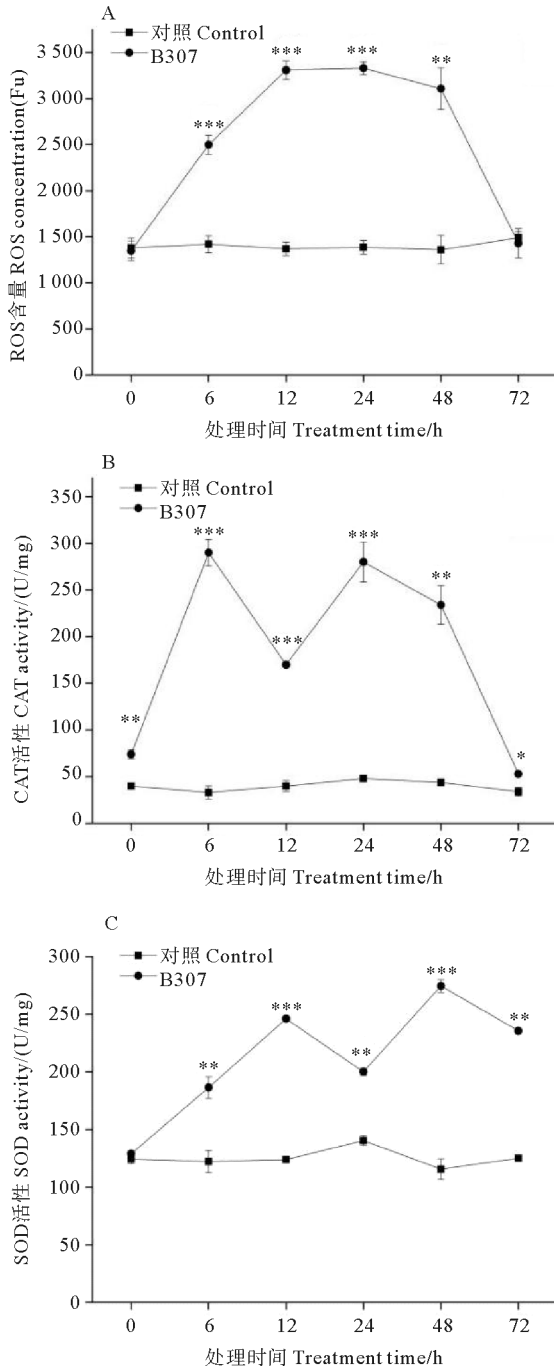
2.4.2 对藻细胞 CAT 活性的影响 *A. pacificum*

的 CAT 活性变化如图 5B 所示。对照组的 CAT 活性变化范围不大,加入溶藻物质的实验组的 CAT 在前 6 h 内迅速升高至峰值 279.14 U/mg,之后开始下降,但在 24 h 时再次升高,在 48 h 后迅速下降。观察实验组发现,CAT 活性先升高后降低,然后再次升高后再下降,这表明在溶藻物质作用的早期,藻细胞就启动了氧化应激功能,但随藻细胞自我防御机制的启动和氧爆作用^[17]的发生的交互作用,作用效果发生波动。

2.4.3 对藻细胞 SOD 活性的影响 溶藻物质作用

下,藻细胞 SOD 活性的变化如图 5C 所示。从图 5 可

以看出,对照组的 SOD 活性在整个实验周期内大致保持不变,说明在正常生理活动中,SOD 活性也是稳定的。而加入溶藻活性物质的实验组,其 SOD 活性显著高于对照组,其变化趋势与 CAT 大致相同,还与藻细胞的生理响应机制有关。



(A:ROS;B:CAT;C:SOD;*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,***: $P<0.001$ 。)

图5 溶藻物质对 *A. pacificum* 抗氧化系统的影响

Fig. 5 Effects of algae-lysing substances on the antioxidant system of *A. Pacificum*

2.5 溶藻物质作用下藻细胞相关蛋白基因表达差异

2.5.1 热休克蛋白基因表达差异 对 *A. pacificum*

的基因表达进行 qPCR 检验,溶藻活性物质作用下,藻细胞内热休克蛋白(Heatshock proteins)基因(*HSP*)表达量的变化如图 6 所示,可用于验证藻细胞受到氧化损伤的程度。从图 6 可以看出,加入溶藻活性物质 12 h 后,*HSP70* 的表达量显著高于 0 h 时 *HSP70* 的表达量($P<0.05$),说明此时 *HSP70* 基因表达上调,诱导热休克蛋白的生成,表明细胞受到外界刺激产生了应激反应。24 h 时 *HSP70* 基因表达下调,表明 HSP 合成受到了抑制。

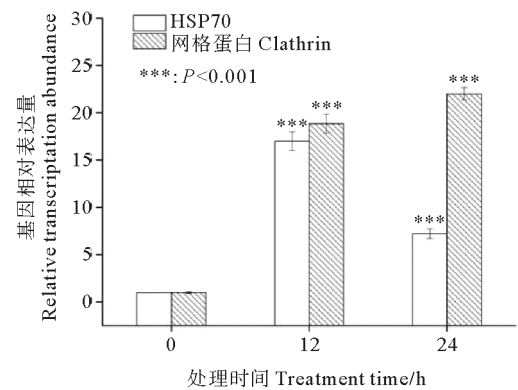


图6 溶藻菌作用下 *A. pacificum* 蛋白基因表达量变化
Fig. 6 Effect of algae-lysing substances on the related gene expression of *A. pacificum*

2.5.2 网格蛋白基因表达差异 网格蛋白基因(*Clathrin*)表达量的结果如图 6 所示,溶藻活性物质加入后,藻细胞内的 *Clathrin* 表达呈现持续上调趋势。12 h 时,该基因表达量显著高于 0 h ($P<0.05$); 24 h 时,上升趋势减缓。这表明溶藻活性物质诱导了 *A. pacificum* 网格蛋白产生,胞吞作用也会随之加强^[18]。

3 讨论

3.1 溶藻菌的溶藻方式

本研究结果表明,*Zobellella* sp. B307 的主要溶藻方式是细菌胞外活性分泌物间接溶藻,且具有很强的溶藻活性。目前已经过验证的溶藻胞外活性物质包括多肽类、灵红菌素和某些酯类^[19-21]等,有些胞外活性物质具有一定的环境稳定性,经高温、冷冻、酸碱处理后,仍具备一定的溶藻活性,能够在更复杂多变的自然环境中得以应用,同时具备后续提取加工溶藻制剂的生理基础,表明这种溶藻方式具有广泛的实用性^[22-24]。

3.2 藻细胞对溶藻物质的响应机制

被溶藻物质作用后,藻细胞结构(如细胞膜、细胞核和维持重要功能的细胞器)和生理生化水平均发生变化。细胞膜和细胞器受损导致细胞正常的生理活动无法维持,而一些酶活性、光合作用和呼吸作用等生理

过程也会受到破坏,藻细胞无法生长甚至会死亡。本研究结果表明,*Zobellella* sp. B307 的除菌上清发酵液加入 *A. pacificum* 培养液体系后,藻细胞在短时间内就迅速产生大量的 ROS,说明此时发生了氧爆作用。溶藻活性物质对藻细胞造成氧化损伤时,细胞为减轻压力而启动抗氧化系统,抗氧化酶(SOD 和 CAT)活性增强。SOD 能够将 O^{2-} 歧化为 H_2O_2 和 O_2 ,是抵御氧化压力的第一道防线^[25],CAT 能够将 H_2O_2 氧化为水和氧分子,消除 ROS 的毒性,防止细胞膜和细胞器被氧化,减轻细胞受到的伤害。在溶藻活性物质的不断刺激下,藻细胞持续产生 ROS,直到超出藻细胞的抗氧化清除能力时,藻细胞便受到不可逆损伤,导致后期 SOD 和 CAT 活性下降,藻细胞抗氧化能力下降。同时可以看出,在活性氧的刺激下,相比 SOD,CAT 的生成要早,同时 CAT 也更加脆弱,因此在后期 CAT 活性更难以维持。上述结果表明,*Zobellella* sp. B307 的溶藻活性物质会对 *A. pacificum* 造成强烈的氧化损伤,可能是导致藻细胞死亡的直接原因,此前也有研究证明氧化损伤是溶藻菌发挥溶藻作用的重要途径,王以斌等^[26]从 *Flavobacterium* sp. 的胞外活性物质中提取到有溶藻作用的灵菌红素,并通过研究表明该物质确实能升高亚历山大藻细胞内的丙二醛含量,使细胞膜通透性增加,说明藻细胞膜受损,藻体出现氧化损伤。Yu 等^[27]的研究表明,溶藻菌 LY 03 分泌出的活性物质能够使中肋骨条藻细胞受损严重,内部细胞器被破坏,抗氧化系统受到损伤,最后裂解死亡。

3.3 藻细胞 HSP70 和 Clathrin 基因表达差异

HSP 是生物体内广泛存在的一种蛋白质,当生物受到外界环境刺激(如高温、紫外线、酸、碱、氧化剂等)时,细胞会被诱导而生成 HSP,以用于抵抗恶劣外界环境的损害,从而保护生物体。氧化损伤产生的过量 ROS 可以诱导 HSP 的产生,HSP 同抗氧化酶一样,都具有清除 ROS 的功能。常见的 HSP 有 HSP60、HSP70、HSP90、sHSP(小分子热休克蛋白)^[28]等。HSP 在蛋白的合成过程中发挥着重要作用,HSP70 具有修复机制,广泛存在于生物体内,当生物受到外界环境胁迫时,HSP70 会上调,诱导合成 HSP,提高生物体对不利环境的耐受能力。Wang 等^[29]研究了多个参与抗氧化系统胁迫响应的基因后发现,*A. pacificum* 细胞的 Cu/Zn-SOD 基因和 HSP70 基因在铜离子的作用下出现显著上调,因此认为,在金属离子或其他外界因素的刺激下,这些基因对外界刺激引起的应激具有重要的保护作用。Wang 等^[30]的研究表明,细菌 *Sagittula stellata* 对海洋微拟球藻具有显著溶藻作用,使藻细胞中的 *rbcS* 基因和 *PCNA* 基因的转录受到抑制,HSP 基因表达显著上调。本研究中,HSP70 基因表

达量表现为先升高后降低,结合有关 ROS 和抗氧化酶(SOD 和 CAT)的研究结果进行判断可知,藻细胞受到溶藻活性物质刺激产生了大量 ROS,然后利用抗氧化酶去除藻细胞中的 ROS,并同时诱导藻细胞产生 HSP,因此推测 HSP 通过与抗氧化酶联合而清除 ROS。但随着活性氧持续大量的产生,超出了抗氧化系统的应对能力,最终藻细胞的应激系统受到不可逆的破坏。

网格蛋白是一类比较保守的蛋白,能够介导膜蛋白进行胞吞作用,动、植物细胞普遍存在由网格蛋白介导的胞吞作用,这一作用对生物的生长繁殖有重要的意义。网格蛋白形成的披蛋白网格小泡(Clathrin-coated vesicle)是细胞内吞的重要结构。网格蛋白不仅是介导主要胞吞作用的蛋白质,同时还影响到细胞的信号转导和代谢平衡^[30]。Meng 等^[31]的研究发现,N 和 P 能够使得微小亚历山大藻(*A. minutum*)细胞中由网格蛋白介导的胞吞作用显著上升,在长期的营养缺乏条件下,编码网格蛋白、AP-2 和 Hsc70 蛋白的 unigenes 显著上调,营养物进入 *A. minutum* 细胞主要依靠网格蛋白依赖的内吞作用,说明在营养缺乏的条件下,*A. minutum* 具有混合营养的倾向。张淑雯等^[32]已发现链状亚历山大藻(*A. catenella*)有摄食外源有机物的能力,但科学界普遍认为混合营养模式大多数发生在贫营养的情况下,亚历山大藻并不把异养作为主要能量获取的来源。Zhang 等^[33]对 *A. catenella* 进行转录组分析发现了与网格蛋白依赖性内吞作用相关的 23 种蛋白同源的 131 个 unigenes,因此判断由网格蛋白介导的胞吞作用可能在异养过程中发挥着重要作用。本研究发现,在 12 h 内,溶藻活性物质使 *A. pacificum* 细胞编码网格蛋白基因(*Clathrin*)表达量显著增加,推测溶藻物质使藻细胞的光合系统受到严重损伤时,由光合作用主导的自养过程无法正常进行,细胞为维持自身的生理活动而启动了异养功能。

4 结论

(1)溶藻菌 *Zobellella* sp. B307 对 *A. pacificum* 具有显著的溶藻作用,主要通过胞外分泌物间接溶藻。

(2)溶藻物质的作用机制:激发藻细胞产生 ROS,并激活抗氧化酶(SOD 和 CAT)清除 ROS;但由于溶藻物质的持续作用,过量的活性氧自由基导致氧化系统崩溃,最终导致藻细胞受损死亡;溶藻活性物质对藻细胞蛋白质的抑制或破坏在其溶藻过程中也发挥着间接作用。

(3)藻细胞的氧化应激诱导热休克蛋白的产生,从而联合抗氧化酶清除过量的 ROS,以减缓藻细胞受应激损伤的程度。此外,网格蛋白基因(*Clathrin*)表达量

的显著上调说明溶藻活性物质增强光合营养功能损伤诱导 *A. pacificum* 的异养功能, 以应对光合自养功能损害的影响。

参考文献:

- [1] Patel S S, Lovko V J, Lockey R F. Red tide: Overview and clinical manifestations[J]. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice, 2020, 8(4): 1219-1223.
- [2] Hofbauer W K. Toxic or otherwise harmful algae and the built environment[J]. Toxins, 2021, 13(7): 465-465.
- [3] Fleming L E, Kirkpatrick B, Backe L C, et al. Review of Florida red tide and human health effects[J]. Harmful Algae, 2010, 10(2): 224-233.
- [4] 周名江, 于仁成. 有害赤潮的形成机制、危害效应与防治对策[J]. 自然杂志, 2007(2): 72-76.
Zhou M J, Yu R C. Mechanisms and impacts of harmful algal blooms and the countermeasures[J]. Chinese Journal of Nature, 2007(2): 72-76.
- [5] Tanaka Y, Asaoka K, Takeda S. Different feeding and gustatory responses to ecdysone and 20-hydroxyecdysone by larvae of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Journal of Chemical Ecology, 1994, 20(1): 125-133.
- [6] 吴科比, 周进, 蔡中华. 藻际环境微生态结构与功能的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(5): 535-545.
Wu K B, Zhou J, Cai Z H. Review of algal phycosphere: Structure and ecological function [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2021, 33(5): 535-545.
- [7] 黄洪辉, 韩贝贝, 张书飞, 等. 海洋溶藻菌的研究进展[J]. 南方水产科学, 2019, 15(5): 126-132.
Huang H H, Han B B, Zhang S F, et al. Research progress of marine algicidal bacteria[J]. South China Fisheries Science, 2019, 15(5): 126-132.
- [8] Dai L, Yu R C, Geng H X, et al. Resting cysts of *Alexandrium catenella* and *A. pacificum* (Dinophyceae) in the Bohai and Yellow Seas, China: Abundance, distribution and implications for toxic algal blooms[J]. Harmful Algae, 2020, 93(C): 101794.
- [9] 白洁, 陈琳, 黄潇, 等. 1 株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 *Zobellella* sp. B307 的分离及脱氮特性[J]. 环境科学, 2018, 39(10): 4793-4801.
Bai J, Chen L, Huang X, et al. Isolation and nitrogen removal characteristics of salt-tolerant heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria *Zobellella* sp. B307[J]. Environmental Science, 2018, 39(10): 4793-4801.
- [10] 原雅纬. 杀藻功能菌的发掘及其对有毒亚历山大藻杀藻机制初探[D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
Yuan Y W. Study on the Discovery of Novel Algicidal Bacteria and the Mechanisms of Algicidal Bacteria Against Toxic *Alexandrium* sp. [D]. Xiamen: Xiamen University, 2017.
- [11] Yang M J, Shi D C, Wang Y G, et al. Study on Interaction of coomassie brilliant blue G-250 with bovine serum albumin by multispectroscopic[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2021(27): 1-2.
- [12] King L E, Weber R J. Development and testing of an online method to measure ambient fine particulate reactive oxygen species (ROS) based on the 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) assay [J]. Atmospheric Measurement Techniques, 2013, 6(7): 1647-1658.
- [13] Zhang X F, Mo Y H, Zhou L M, et al. Induction of hsp70, hsp90, and catalase activity in planarian *Dugesia japonica* exposed to cadmium[J]. Toxicology and Industrial Health, 2016, 32(8): 1373-1380.
- [14] Peng S X, Deng D G, He P, et al. Effects of *Microcystis aeruginosa* on the life history traits and SOD activity of *Daphnia similoides sinensis*[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2018, 25(30): 30696-30700.
- [15] 马金华. 链状亚历山大藻衰亡时期的生理与分子调控研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Ma J H. Physiological and Molecular Regulation Studies on the Decline Phase of *Alexandrium catenella*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [16] Tebbs E J, Avery S T, Chadwick M A. Satellite remote sensing reveals impacts from dam-associated hydrological changes on chlorophyll-*a* in the world's largest desert lake[J]. River Research and Applications, 2020, 36(2): 211-222.
- [17] Choudhary A, Kumar A, Kaur N. ROS and oxidative burst: Roots in plant development[J]. Plant Diversity, 2020, 42(1): 33-43.
- [18] Manuela M. Clathrin mediated endocytosis-methods and protocols [J]. European Journal of Histochemistry, 2019, 63(3): 3072.
- [19] Hui W, Lisa B, Paul R, et al. Characterisation of algicidal bacterial exometabolites against the lipid-accumulating diatom *Skeletonema* sp. [J]. Algal Research, 2016, 13: 1-6.
- [20] Feng J R, Hu Z, Wang H. Complete genome sequence of *Hahella* sp. KA22, a prodigiosin-producing algicidal bacterium[J]. Marine Genomics, 2019, 47(C): 100678.
- [21] Yin P Q, Zhang Q, Zhu J M, et al. The data of genomic and phenotypic profiles of the N-acyl homoserine lactone-producing algicidal bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* GA1 [J]. Data in Brief, 2018, 21: 966-971.
- [22] Li Y, Liu L, Xu Y, et al. Stress of algicidal substances from a bacterium *Exiguobacterium* sp. h10 on *Microcystis aeruginosa* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64(1): 57-65.
- [23] 韩光耀, 谢丽玲, 毕潇, 等. 溶藻细菌 DH-e 代谢产物对东海原甲藻的抑制作用[J]. 应用海洋学学报, 2017, 36(2): 151-157.
Han G Y, Xie L L, Bi X, et al. Inhibition effect of metabolites from algicidal bacterium DH-e on *Prorocentrum donghaiense* [J]. Journal of Applied Oceanography, 2017, 36(2): 151-157.
- [24] Li D P, Kang X, Chu L L, et al. Algicidal mechanism of *Raoultella ornithinolytica* against *Microcystis aeruginosa*: Antioxidant response, photosynthetic system damage and microcystin degradation[J]. Environmental Pollution, 2021, 287: 117644.
- [25] Huang L J, Chang X X, Wu C. Nickel induced oxidative stress and the responses of SOD isoenzymes in *Microcystis Aeruginosa* FACHB-905[J]. Advanced Materials Research, 2011(356-360): 119-126.
- [26] 王以斌, 何碧娟, 郑洲, 等. 红树林细菌 *Flavobacterium* sp. 的抑藻活性物质鉴定及其对亚历山大藻抑制作用的初步研究[J]. 中国海洋药物, 2008, 27(6): 1-4.
Wang Y B, He B J, Zheng Z, et al. Preliminary study on identifi-

- cation of algicidal active substance from mangrove bacteria *Flavobacterium* sp. and its algicidal effect on red tide algae *Alexandrium tamaranense*[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2008, 27(6): 1-4.
- [27] Yu X Q, Cai G J, Wang H, et al. Fast-growing algicidal *Streptomyces* sp. U3 and its potential in harmful algal bloom controls [J]. Journal of Hazardous Materials, 2018(341): 138-149.
- [28] Taghavizadeh Y, Amiri M S, Nourbakhsh F, et al. Bio-indicators in cadmium toxicity: Role of *HSP27* and *HSP70* [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2021, 28(21): 26359-26379.
- [29] Wang H, Kim H, Ki J S. Transcriptome survey, molecular identification, and expression analysis of stress-responsive genes in the toxic dinoflagellate *Alexandrium pacificum* under algicidal agents and metal stresses [J]. Journal of Applied Phycology, 2021, 33: 1-13.
- [30] Wang M, Yuan W Q, Chen S, et al. Algal lysis by *Sagittula stellata* for the production of intracellular valuables [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(3): 2516-2533.
- [31] Meng F Q, Song J T, Zhou J, et al. Transcriptomic profile and sexual reproduction-relevant genes of *Alexandrium minutum* in response to nutritional deficiency [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2629.
- [32] 张淑雯, 欧林坚, 吕颂辉, 等. 光照及营养盐对3种赤潮甲藻吞噬营养行为的影响 [J]. 海洋科学, 2011, 35(4): 94-99.
Zhang S F, Ou L J, Lv S H, et al. Effects of light and nutrients on the phagotrophic behaviors of three harmful dinoflagellates [J]. Marine Sciences, 2011, 35(4): 94-99.
- [33] Zhang S, Sui Z H, Chang L P, et al. Transcriptome *de novo* assembly sequencing and analysis of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* using the Illumina platform [J]. Gene, 2014, 537(2): 285-293.

The Algicidal Characteristics and Mechanism of an Algicidal Bacterium *Zobellella* sp. B307 on *Alexandrium pacificum*

Ma Shuanghui¹, Bai Jie¹, Sun Pengfei², Wang Dengyu¹, Xiang Zhuangzhuang¹, Li Hui^{1, 3}, Chen Xi⁴
(1. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. Fourth Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Beihai 536000, China; 3. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to study the algicidal mechanism of algicidal bacteria on red tide dinoflagellate, a salt-tolerant bacterium *Zobellella* sp. B307 with algicidal activity to the *Alexandrium pacificum* was isolated from the sediments of Jiaozhou Bay. To explore the algicidal mechanism of *Zobellella* sp. B307, we investigated its effect on the cellular structure, physiology and molecular mechanism of *A. pacificum*. The results showed that the inhibition mechanism of the strain was indirect lytic effects causing by extracellular active substances. And after 72 h cultivation with bacterium addition, the algicidal rate reached up to 91%, revealing its strong algicidal activity against *A. pacificum*. Meanwhile, we observed cell wall damage, chlorophyll-*a* and total protein contents decrease, and the excessive production of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). It indicated that the serious oxidative damage caused by algae-lysing substances was the direct cause of *A. pacificum* death. The expression level of heat shock protein (HSP) gene was significantly upregulated, suggesting that algae-lysing substances could induce the production of HSP, and the combined effects of highly expressed HSP and highly activated antioxidant system of *A. pacificum* could eliminate ROS and alleviate the algae cells damage caused by oxidative stress. In addition, the expression of *A. pacificum* clathrin gene was significantly upregulated, indicating algae cells could enhanced heterotrophic function to compensate the loss of photosynthesis caused by algae-lysing substances. The results of this study will contribute to explain the newly founded relationship between bacteria and algae, and explore the new biological methods of red tide control.

Key words: red tide; *Alexandrium* sp.; algicidal bacteria; algicidal mechanism; gene expression