

文章编号: 1000-0615(2018)07-1009-10

DOI: 10.11964/jfc.20170810933

## 高温下芽孢杆菌对坛紫菜生长及生理的影响

杨华田, 熊玉琴, 杨锐\*

(宁波大学海洋学院, 浙江省海洋生物重点实验室, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 坛紫菜是我国东海区栽培的重要经济海藻, 其生长适温为20℃, 极限高温为29℃。高温和病原菌均会导致坛紫菜生长受抑、藻体病烂。为研究高温下藻际微生物对坛紫菜生长的影响, 本文以坛紫菜叶状体和藻际芽孢杆菌(实验证明该菌株在20℃下为紫菜的益生菌)为材料, 检测了在28℃下藻际芽孢杆菌对坛紫菜相对生长率(RGR), 抗氧化酶(SOD、POD)活性, 可溶性蛋白、游离脯氨酸(Pro)、丙二醛(MDA)和藻胆蛋白含量等生理指标的影响。结果显示, 28℃下, 在实验初始阶段, 菌藻共培养组坛紫菜比纯培养对照组有较高的RGR, 但随着培养时间的延长, 两组的RGR无显著性差异; 4d后两组坛紫菜均出现腐烂, 菌藻共培养组的藻体腐烂程度更为剧烈; 培养24h后, 菌藻共培养组的SOD、POD活性和MDA水平均显著高于对照组, 而渗透调节物质可溶性蛋白和Pro显著低于对照组; 共培养组中, 坛紫菜的藻胆蛋白含量均显著高于对照组。该研究表明, 28℃下, 虽然在短期内藻际芽孢杆菌会促进坛紫菜的生长, 但随着培养时间的延长反而不利于坛紫菜的生长, 且加剧活性氧和渗透压胁迫, 表明该菌的生态功能因环境变化而发生了改变。

**关键词:** 坛紫菜; 芽孢杆菌; 藻际; 功能

**中图分类号:** S 968.4

**文献标志码:** A

紫菜(*Pyropia*)属于红藻门(Rhodophyta)、原红藻纲(Protofloridae)、红毛菜科(Bangiaceae), 是重要的经济海藻<sup>[1]</sup>。我国长江以北地区以条斑紫菜(*P. yezoensis*), 浙闽地区以坛紫菜(*P. haitanensis*)为主要栽培品种。近年来, 由于温室效应、海洋酸化等全球气候变化以及不合理管养和过渡密植等人为因素, 造成紫菜病害频发, 经济损失严重。

目前已报道的引发紫菜病害的原因主要包括两方面, 一方面是由病原菌侵染等生物因素引发的紫菜病害, 如海科贝特菌(*Cobetia marina*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、紫菜腐霉菌(*Pythium porphyrae*)和拟油壶菌属(*Olpidiopsis*)等可引发紫菜叶状体细菌性红烂病、绿斑病、黄斑病等病害<sup>[2]</sup>; 另一方面, 高温、低盐、低pH、台风及阴

雨天气等非生物理化因子也是引发紫菜病烂的重要因素, 其中, 高温是近年来紫菜病烂高发的主要原因。高温等理化胁迫会造成紫菜内膜系统损伤, 导致膜透性改变, 藻体代谢失衡; 另外, 胁迫导致藻体活性氧爆发, 加剧各种损伤。藻类可以通过上调丙二醛(MDA)与游离氨基酸(Pro)等渗透调节物质的含量以及氧化酶系统的活性进行机体修复<sup>[3-5]</sup>, 但如果胁迫条件过于激烈或时间过长, 藻体自我修复能力有限, 则会迅速腐烂, 造成生产的巨大损失。

关于藻际微生物的相关研究为我们全面理解紫菜病害提供了新的视角。藻际微生物种类多样且功能复杂, 一部分藻际微生物可以通过分泌与藻类生长相关的物质如维生素、生长素类似物等促进藻类生长<sup>[6-8]</sup>; 而另有一部分微生物

收稿日期: 2017-08-21 修回日期: 2018-01-09

资助项目: 国家自然科学基金(31772871); 浙江省重大科技专项(2016C02055-6B); 现代农业产业技术体系专项(CARS-50); “水产”浙江省重中之重学科开放基金(xkzsc1509)

通信作者: 杨锐, E-mail: yangrui@nbu.edu.cn

则会破坏藻类的正常结构和功能,对藻体生长产生负面影响,如假交替单胞菌(*Pseudalteromonas* sp. NPyS3)抑制颗石藻(*Pleurochrysis carterae*)的生长及钙化,腐霉菌引起紫菜叶状体赤腐病,茎点菌(*Phoma porphyrae*)引起条斑紫菜白斑病等<sup>[9-11]</sup>。而紫菜实际栽培环境中的微生物种类复杂且多样,其中并非单一致病菌或者有益菌。据沈梅丽等<sup>[12]</sup>报道,病原菌可能广泛存在于藻际,但并未致病,这提示环境与藻类发病与否关系密切。植物病害三角理论认为环境可能是病害发生的主导因素,环境可以通过影响微生物进一步影响植物,从而引发植物病害<sup>[12-13]</sup>,这说明生物体共附生细菌的功能可能会随着环境变化而改变。

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)在自然界分布广泛,是常见的海洋微生物,也是一类公认的水产养殖益生菌<sup>[10, 14]</sup>。方文雅等<sup>[15]</sup>从温州紫菜养殖区的海水中分离的特征性优势菌即为芽孢杆菌,具有较强的抑菌活性,推测可能在藻际微环境的细菌群落中起重要调节作用。Xiong等<sup>[16-17]</sup>发现藻际细菌*Bacillus* sp. WPySW2在20℃可促进坛紫菜生长和糖类物质的累积、提高蛋白含量、显著上调或下调藻体氨基酸代谢和三羧酸循环等相关代谢物,但不会引起紫菜抗氧化酶(SOD, POD)和Pro含量的升高,无胁迫作用,是一株益生菌。而我们另外的实验数据显示,在28℃下与*Bacillus* sp. WPySW2共培养的坛紫菜叶片腐烂加剧。探明高温条件下藻际微生物功能改变的原因及其可能对藻体产生的效应,将为我们判断逆境中藻类是否面临来自理化环境和藻际微生物的双重胁迫,解释紫菜高温病害机制提供新的论据。

本研究关注28℃(紫菜栽培的高温胁迫条件下藻际*Bacillus* sp. WPySW2对坛紫菜生长以及各项生理指标的影响,以期了解高温下以*Bacillus* sp. WPySW2为代表的藻际微生物的功能及其可能的生理作用,更全面地评价其生态功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及预处理

坛紫菜叶状体及其培养条件 实验用“浙东1号”坛紫菜叶状体于2016年11月10日采集于宁波象山,洗净阴干后,-20℃密封保存。实验前

取出样品,于灭菌海水中复苏24 h,挑选形状一致的健康叶片,裁剪成约1 cm<sup>2</sup>的小段,于灭菌海水中洗刷3次,将坛紫菜叶状体置于0.7% KI溶液中浸泡10 min后用灭菌海水清洗3次后备用。紫菜培养基:宁波大学Ⅲ号营养母液(100 g/L KNO<sub>3</sub>、10 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.5 g/L FeSO<sub>4</sub>、0.25 g/L MnSO<sub>4</sub>和20 g/L EDTA-Na<sub>2</sub>,用0.22 μm微孔滤膜过滤除菌),使用时与灭菌海水以1:1 000体积比配制成营养海水。在温度20℃,光强50~70 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光周期12 L:12 D,充气条件下进行培养。

坛紫菜叶状体的无菌处理 处理方法参考已有文献<sup>[18]</sup>。随后置于0.1%(W/V)的氨苄青霉素溶液中浸泡10 min,再于组合抗生素氨苄青霉素(终浓度为300 μg/mL)、卡那霉素(终浓度为100 μg/mL)庆大霉素(终浓度为100 μg/mL)中处理10 h。用灭菌海水漂洗3次,将坛紫菜叶片置于新鲜培养液12 h以上。随后更换培养液2次,每次间隔12~24 h,以彻底去除残留抗生素。常规培养2 d备用。

芽孢杆菌及培养条件 *Bacillus* sp. WPySW2分离自紫菜藻际,-80℃保存于浙江省海洋生物工程重点实验室。保藏菌种接种于100 mL 2216E液体培养基(酵母粉1 g,蛋白胨5 g,柠檬酸铁0.1 g,海水定容至1 000 mL,pH 8.0~8.3),37℃条件下转速为140 r/min摇床中活化。扩大培养条件与活化条件一致,培养过夜后,离心去除培养液。沉淀清洗离心后,用坛紫菜培养液调整细胞浓度约1×10<sup>8</sup>个/mL备用。

### 1.2 实验方法

芽孢杆菌与坛紫菜叶状体共培养 500 mL的充气培养瓶中加入300 mL紫菜培养基,接种0.2 g无菌处理过的坛紫菜叶状体与约3×10<sup>8</sup> cells/mL *Bacillus* sp. WPySW2,设置3个平行。坛紫菜叶状体与*Bacillus* sp. WPySW2共培养条件:温度28℃,光强50~70 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光周期12 L:12 D,充气培养。因28℃下藻体培养4 d即出现腐烂,因此,分别于0、6、12、24、48和72 h取样,测定可溶性蛋白(soluble protein)、藻红蛋白(R-phycoerythrin, RPE)、藻蓝蛋白(R-phyocyan, RPE)、别藻蓝蛋白(allo-phyocyan, APC)、Pro和MDA的含量,以及超氧化物歧化酶活性(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)的活性。以经抗生素处理的坛紫菜叶状体为对照,培养条件与共培养组相同。

相对生长率的测定 实验期间, 分别于第1、2、3天测量坛紫菜叶片鲜重变化, 按照以下公式计算相对生长率(RGR)<sup>[19]</sup>:  $RGR (\%/d) = (\ln M_t - \ln M_0) / t \times 100$ 。

式中,  $M_0$ 为藻体的初始质量(g),  $M_t$ 为培养至第 $t$ 天藻体的鲜重(g), 称量前用吸水纸将藻体表面培养液吸干。

可溶性蛋白含量测定 可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝G250法<sup>[20]</sup>, 以牛血清白蛋白为标准样测定。精确称0.1 g鲜藻, 加入1 mL PBS缓冲溶液, 冰上研磨后4 000 r/min离心10 min (4 °C), 上清液即为待测蛋白溶液。

公式: 样品蛋白质质量分数 $[\mu\text{g/g} (FW)] = (C \times V)$

公式: 样品蛋白质质量分数 $[\mu\text{g/g} (FW)] = (C \times V) / W$

式中 $C$ 为查标准曲线所得样品测定管中蛋白质的浓度( $\mu\text{g/mL}$ );  $V$ 为样品提取液的总体积;  $W$ 为样品鲜重。

酶活测定 酶液制备: 取0.3 g新鲜藻体, 加入0.1 mol/L pH=7.4 PBS缓冲溶液, 冰上研磨后制备成10%匀浆液, 然后在4 °C下4 000 r/min离心10 min, 取上清液用于酶活力测定。采用南京建成生物科技公司的T-SOD试剂盒(A001-1, 羟胺法), POD测定试剂盒(A084-3, 比色法)测定抗氧化酶活性。

藻胆蛋白的测定 藻胆蛋白含量测定参考高洪峰<sup>[21]</sup>的方法。精确称取0.02 g藻体3份, 液氮研磨, 加入2 mL PBS缓冲溶液, 放入冰箱冷冻(-20 °C), 室温解后离心(12 000 r/min, 4 °C) 20 min, 上清液即为藻胆蛋白粗提液, 分别测定 $A_{565}$ 、 $A_{615}$ 和 $A_{650}$ 值。计算公式:

$$C_{RPE} = 0.123A_{565} - 0.068A_{615} + 0.015A_{650} \quad (1)$$

$$C_{RPC} = 0.162A_{615} - 0.001A_{565} - 0.098A_{650} \quad (2)$$

$$C_{APC} = 0.171A_{650} - 0.006A_{565} - 0.004A_{615} \quad (3)$$

式中,  $C_{RPE}$ 、 $C_{RPC}$ 、 $C_{APC}$ 分别为R-藻红蛋白、R-藻蓝蛋白和别藻蓝蛋白的含量。

Pro含量测定 采用茚三酮方法测定Pro含量, 参考文献<sup>[3]</sup>并略有改动。新鲜藻体吸干表面水分, 取0.1 g, 液氮研磨, 加入3%磺基水杨酸溶液5 mL, 沸水浴10 min, 3 000 r/min, 离心10 min, 取上清液用于Pro测定。

MDA含量的测定 采用硫代巴比妥酸

(thiobarbituric acid, TBA)比色法参照<sup>[22]</sup>, 取0.1 g鲜藻, 加入5 mL PBS缓冲溶液磨成匀浆液, 转移至10 mL试管中, 加入5 mL含有0.5%TBA的10%三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA), 混合液在沸水中加热10 min, 冷却后10 000 r/min, 20 °C, 离心10 min, 收集上清液, 分别测定450、532和600 nm吸光值, 按照以下公式计算MDA含量:

$$\text{MDA} [\mu\text{mol/g} (FW)] = [6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}] \times V_t / (1\ 000 \times FW)$$

式中,  $V_t$ 为上清液体积(mL);  $FW$ 为样品鲜重(g)。

统计分析 各实验设3个平行4次重复, 数据采用Excel 2007和SPSS 13.0统计软件进行数据处理及统计分析, 用双因素方差分析(Two-Way ANOVA)和 $t$ -test以 $P < 0.05$ 为显著水平进行统计分析。

## 2 结果

本实验中28 °C, 72 h内坛紫菜的生物量依然在增多, 菌藻共培养组相对生长率RGR呈下降趋势, 对照组的RGR则呈上升趋势(图1)。在0-48 h, 芽孢杆菌会促进坛紫菜叶状体的生长, 共培养组坛紫菜叶片的RGR显著高于对照( $P < 0.05$ ), 然

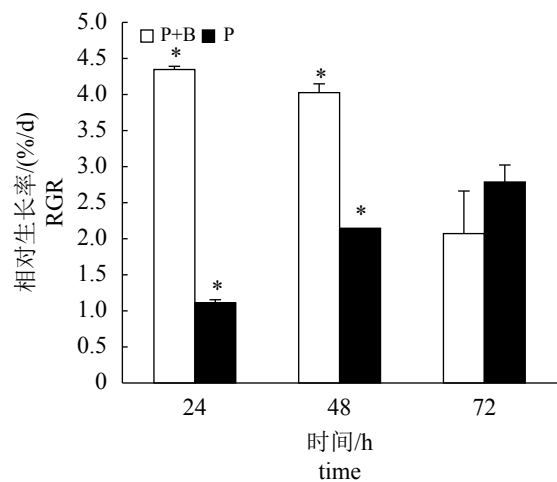


图1 28 °C下WPySW2对坛紫菜相对生长率的影响 “\*”表示同一时间点不同处理之间差异显著( $P < 0.05$ ); “P+B”表示菌藻共培养组, “P”表示对照组; 下同

Fig. 1 Effects of WPySW2 on relative growth rate (RGR) of *P. haitanensis* at 28 °C

“\*” means the difference between different treatments is significant ( $P < 0.05$ ); “P+B” represents the co-culture group, “P” represents the control group; the same below



而,这种促进作用在72 h后则不再明显( $P>0.05$ )。二因素方差分析结果显示,培养时间和藻际微生物的加入都会对坛紫菜的RGR产生显著影响,由藻际微生物和培养时间引起的差变分别为7.79和2.47,可见藻际微生物对于RGR的影响要大于时间产生的影响。4 d之后,不论对照组还是菌藻共培养组,藻体都出现腐烂现象,培养体系变浑浊,菌藻共培养组腐烂程度较对照组严重。

SOD和POD是植物体内的活性氧清除酶系,该酶系统的动态变化反映了植物机体的抗性机理<sup>[23]</sup>。28 °C下,菌藻共培养组SOD酶活性(图2-a)在24 h时显著升高( $P<0.05$ ),并显著大于对照组( $P<0.05$ )。菌藻共培养组样品的POD酶活性

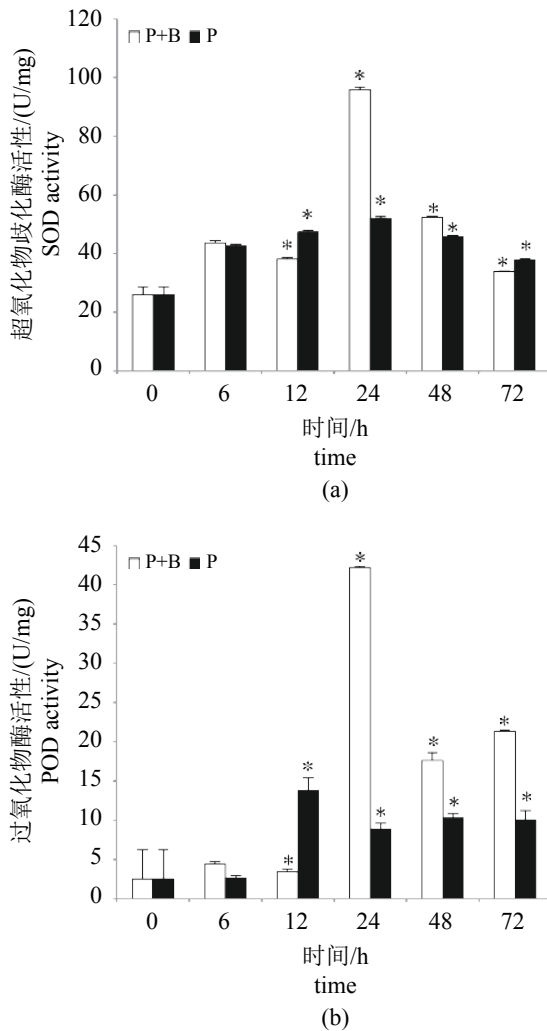


图2 28 °C下WPySW2对坛紫菜抗氧化酶(a-SOD, b-POD)活性的影响

Fig. 2 Effect of WPySW2 on SOD and POD activity of *P. haitanensis* at 28 °C

整体呈先上升后下降的趋势(图2-b), 24 h POD酶活显著上升( $P<0.05$ )达到最高, 48 h虽显著下降( $P<0.05$ ), 但下降后的酶活依旧高于对照组, 至72 h虽有小幅升高但不显著。对照组12 h的酶活显著上升( $P<0.05$ ), 高于共培养组, 但24 h后POD和SOD酶活都显著低于共培养组( $P<0.05$ )。数据提示菌藻共培养组坛紫菜的抗氧化酶表现出更高的活性以应对更大的活性氧胁迫。

MDA由膜脂过氧化产生, 其含量是衡量植物细胞膜损伤程度的重要指标<sup>[23]</sup>。菌藻共培养组和对照组的MDA含量都在6 h时显著上升( $P<0.05$ )并达到最高, 说明高温条件下两组坛紫菜都受到了一定程度的氧化胁迫。整体上除了48 h, 其余时间点菌藻共培养组的MDA含量都高于对照组, 尤其在72 h时, 菌藻共培养组的MDA含量显著高于对照组(图3), 表明菌藻共培养组的坛紫菜膜脂过氧化程度较高。

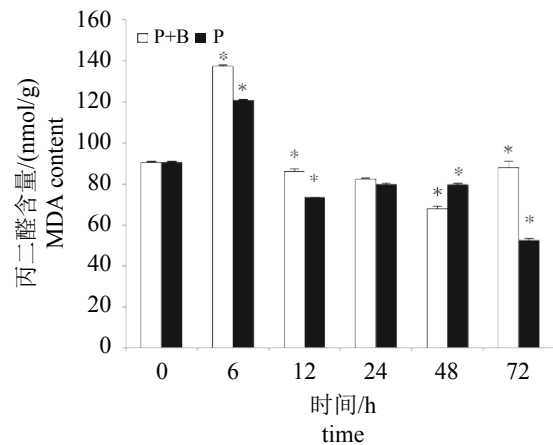


图3 28 °C下WPySW2对坛紫菜丙二醛含量的影响

Fig. 3 Effect of WPySW2 on the content of MDA of *P. haitanensis* at 28 °C

可溶性蛋白是一种重要的渗透调节物质和营养物质, 它的增加和积累可以提高细胞的保水能力, 对细胞的生命物质以及生物膜起到保护作用<sup>[24]</sup>。28 °C下共培养组可溶性蛋白的含量波动较大, 对照组的数据总体上则比较稳定。菌藻共培养组在12 h时可溶性蛋白含量达到最高并显著高于对照组( $P<0.05$ ), 24 h时该数值下降, 显著低于对照组( $P<0.05$ )。其后共培养组可溶性蛋白含量虽有上升但也一直低于对照组(图4)。

Pro是植物体内重要的渗透调节物质, 它在植物体内的积累与植物所受环境胁迫呈正相关<sup>[25]</sup>。实验前6 h, 菌藻共培养组坛紫菜中的Pro含量略

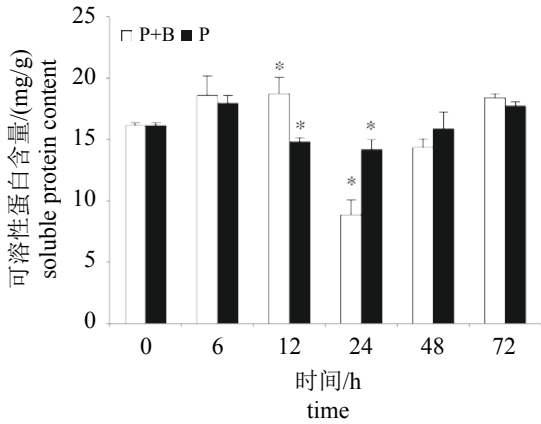


图4 28 °C下WPySW2对坛紫菜可溶性蛋白含量的影响

Fig. 4 Effect of WPySW2 on soluble protein content in *P. haitanensis* at 28 °C

高于对照组, 12 h后有所下降, 于24 h达到最低, 并显著低于对照组( $P < 0.05$ ); 随后, 共培养组的Pro含量急剧上升, 于72 h后显著高于纯培养组( $P < 0.05$ )。而对照组的相应数据呈现先上升后下降的趋势, 在12 h达到峰值后逐渐降低, 至72 h时显著低于共培养组(图5)。两组的Pro含量在24 h左右达到极大差值, 与可溶性蛋白含量的变化规律相似。Pro和可溶性蛋白都是渗透调节物质, 二者的变化规律提示, 在24 h之后, 菌藻共培养组的坛紫菜较对照组面临更大的渗透压胁迫。

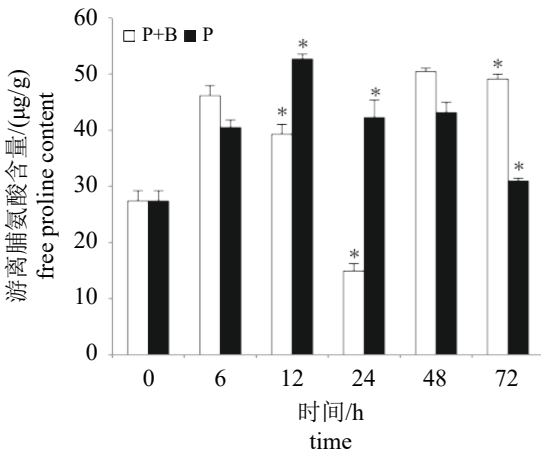


图5 28 °C下WPySW2对坛紫菜游离脯氨酸含量的影响

Fig. 5 Effect of WPySW2 on the content of free proline of *P. haitanensis* at 28 °C

藻胆蛋白是红藻、蓝藻和部分甲藻特有的光合色素, 是鉴定紫菜的品质好坏的重要指标<sup>[26]</sup>。

本研究中, 芽孢杆菌对坛紫菜的藻胆蛋白合成有一定促进作用(图6)。坛紫菜中3种色素蛋白

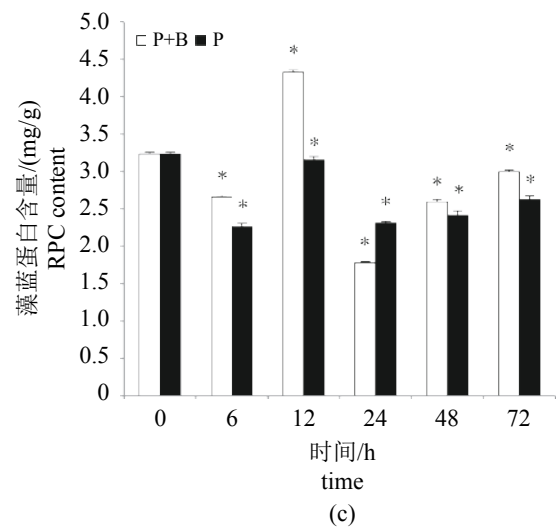
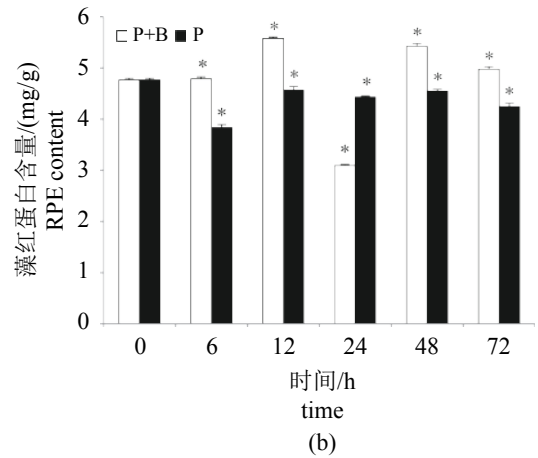
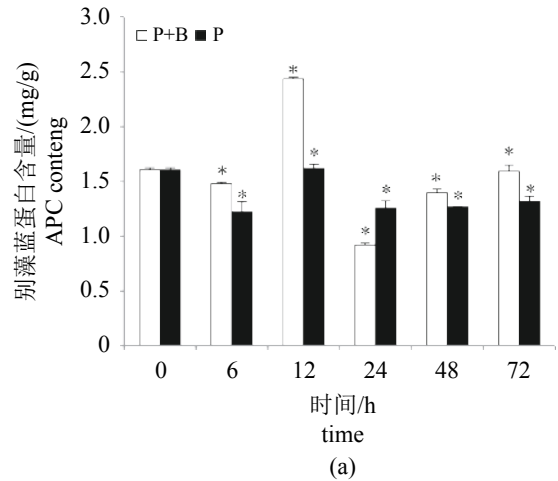


图6 28 °C下WPySW2对坛紫菜藻胆蛋白含量(a-APC, b-RPE, c-RPC)的影响

Fig. 6 Effect of WPySW2 on the content of APC, RPE and RPC in *P. haitanensis* at 28 °C

(APC、RPC、RPE)含量整体变化趋势一致,并在12 h达到最高值。菌藻共培养组的3种藻胆蛋白含量在6、12、48和72 h时均显著高于对照组( $P<0.05$ )。在12 h时对照组和菌藻共培养组的藻胆蛋白含量最高,菌藻共培养组的藻胆蛋白含量分别为RPE 5.58 mg/g, RPC 4.33 mg/g, APC 2.44 mg/g;对照组的含量分别为RPE 4.57 mg/g, RPC 3.15 mg/g, APC 1.62 mg/g。24 h时菌藻共培养组坛紫菜的藻胆蛋白含量显著低于对照组( $P<0.05$ )。

综上,28 °C高温下,与对照组相比,菌藻共培养组的坛紫菜在培养前期(0~12 h左右)所受活性氧和渗透压胁迫并不明显;但是,随着培养时间的延长,坛紫菜所受活性氧及渗透压胁迫的程度加剧。菌藻共养的坛紫菜中藻胆蛋白含量始终高于对照组。

### 3 讨论

Xiong等<sup>[16]</sup>曾报道在20 °C条件下菌株WPySW2对坛紫菜的生长有一定的促进作用。然而,本研究表明,28 °C条件下WPySW2对坛紫菜的生长造成了一定程度的胁迫。这提示在高温下WPySW2对于坛紫菜的功能发生了转变。

高温胁迫会诱导藻体内活性氧升高,高浓度活性氧促使膜脂中的不饱和脂肪酸过氧化为MDA,进而破坏膜结构的完整性<sup>[27-29]</sup>。细胞在感受到过量的活性氧信号之后会启动抗氧化系统提高体内抗氧化酶活性以减轻伤害<sup>[4]</sup>。同时,高温促进植物体的淀粉与蛋白质水解,引起体内可溶性糖与游离氨基酸,特别是脯氨酸含量的增加,藻体会调动渗透压调节系统,积累脯氨酸等渗透调节物,力图改善细胞渗透调节能力以应对热胁迫减轻细胞损伤<sup>[30-31]</sup>。将本研究数据与熊玉琴等<sup>[16-17]</sup>在20 °C条件下培养坛紫菜的数据比较发现,28 °C高温对坛紫菜的生长和抗氧化系统、渗透调节系统都产生了一定抑制,主要表现为坛紫菜RGR降低、藻体内的活性氧积累导致活性氧清除系统的SOD和POD酶活升高、膜脂氧化物MDA含量升高、可溶性蛋白含量下降。这与陈伟洲等<sup>[32]</sup>、Yang等<sup>[4]</sup>关于热胁迫下紫菜的生理变化规律一致。Pro含量与张元等<sup>[33]</sup>测得的30 °C条件下的野生型坛紫菜的数据相近,并且显著高于其在21 °C条件下的含量。另外,本

研究结果显示,高温对坛紫菜合成藻胆蛋白有一定促进作用,这支持了史修周等<sup>[26]</sup>坛紫藻内的藻胆蛋白含量随温度升高而增加的研究结果。藻胆蛋白是重要的捕光色素和保护色素,具有清除体内自由基的功能,因此,在藻体受胁迫时,增加体内藻胆蛋白的含量会有助于藻类提高抗逆性<sup>[34]</sup>。综上,28 °C高温对于坛紫菜而言是一个较大的胁迫,藻体各项机能都有所下降。

温度是影响海水微生物群落组成和功能的主要环境因素<sup>[35]</sup>。高温不但影响藻类的生长,同时也会极大地改变细菌的生长和代谢。温度变化能够影响微生物群落的形态结构,如Townsend等<sup>[36]</sup>研究表明,细菌生物膜的形成受温度调节。Kamjunke<sup>[37]</sup>发现低温下在菌藻共培养体系中,细菌与藻类生物量均会增加,但高温会使细菌生物量增加而藻类生物量减少,推测可能原因为温度升高导致微生物与藻类竞争水中有机质的营养。另外,海洋微生物的代谢也会受环境温度影响,微生物感知环境信号后启动自身某些机制从而改变代谢。如海洋细菌在高温环境下呼吸作用增强<sup>[38]</sup>,放线菌在不同培养温度下的代谢产物抑菌性迥异<sup>[39-40]</sup>。藻际细菌的群落结构和代谢变化亦会对菌藻关系产生显著影响<sup>[41]</sup>。Wohlers-Zöllner等<sup>[42]</sup>报道温度变化会改变藻际微生物的群落组成以及微生物与藻体之间细胞结合毒素的数量与质量,导致“菌藻互作”的方式发生改变<sup>[43]</sup>。本研究中,在28 °C下培养初期(0~12 h),芽孢杆菌的加入会提高坛紫菜的RGR,随着培养时间的延长,菌株的益生作用发生了改变。本实验室对该菌株进行的生物膜研究表明,24 h恰好是WPySW2大量繁殖并形成稳定生物膜的平台期。是否因为28 °C促进芽孢杆菌的快速增殖加剧了细菌与紫菜的营养竞争,或是因为高温促进细菌在藻体表面形成稳定的生物膜而增加了藻体与环境物质交换的难度,有待进一步验证。本研究结果提示,在高温天气下应对紫菜养殖环境的藻际微生物进行实时监控,以及时发现环境中的生物胁迫隐患,全面合理地预防藻类病害。

### 参考文献:

- [1] Sutherland J E, Lindstrom S C, Nelson W A, *et al.* A new look at an ancient order: generic revision of the

- Bangiales (Rhodophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2011, 47(5): 1131-1151.
- [ 2 ] 沈梅丽, 杨锐, 骆其君, 等. 坛紫菜养殖周期中的藻际微生物多样性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(10): 1087-1102.
- Shen M L, Yang R, Luo Q J, *et al.* Microbial diversity of *Pyropia haitanensis* phycosphere during cultivation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(10): 1087-1102(in Chinese).
- [ 3 ] 张元. 坛紫菜对高温胁迫应答机制的初步研究[D]. 厦门: 集美大学, 2011.
- Zhang Y. Preliminary research on response mechanism of *Porphyra haitanensis* under high-temperature stress[D]. Xiamen: Jimei University, 2011 (in Chinese).
- [ 4 ] Yang R, Liu W, Zhang X L, *et al.* Sequences of *Mn-sod* gene from *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) and its expression under heat shock[J]. *Botanica Marina*, 2013, 56(3): 249-259.
- [ 5 ] Luo Q J, Zhu Z J, Yang R, *et al.* Characterization of a respiratory burst oxidase homologue from *Pyropia haitanensis* with unique molecular phylogeny and rapid stress response[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, 27(2): 945-955.
- [ 6 ] 吴小凯, 朱竹君, 杨锐, 等. 紫菜共附生真菌次生代谢产物对坛紫菜生长的影响[J]. *海洋学研究*, 2011, 29(2): 89-99.
- Wu X K, Zhu Z J, Yang R, *et al.* Effect of the secondary metabolites of a fungus strain isolated from *Porphyra* on the growth of *Porphyra haitanensis*[J]. *Journal of Marine Sciences*, 2011, 29(2): 89-99(in Chinese).
- [ 7 ] Miller T R, Hnilicka K, Dziedzic A, *et al.* Chemotaxis of *Silicibacter* sp. strain TM1040 toward dinoflagellate products[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4692-4701.
- [ 8 ] 宋悦, 崔晓山, 陈娟娟, 等. 不同高温胁迫条件下的坛紫菜中植物激素分析[J]. *水产学报*, 2017, 41(10): 1578-1587.
- Song Y, Cui X S, Chen J J, *et al.* The profiling of eleven phytohormones in *Pyropia haitanensis* under different high-temperature environments[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(10): 1578-1587(in Chinese).
- [ 9 ] 宋丹丹, 杨锐, 任继锐, 等. 环境pH值和假交替单胞菌对颗石藻的影响[J]. *生物学杂志*, 2014, 31(5): 50-54.
- Song D D, Yang R, Ren J R, *et al.* Effects of environmental pH and *Psuedoalteromonas* sp. NPyS3 on the *Pleurochrysis carterae*[J]. *Journal of Biology*, 2014, 31(5): 50-54(in Chinese).
- [10] Andrews J H. The pathology of marine algae[J]. *Biological Reviews*, 2010, 51(2): 211-252.
- [11] Guan X Y, Li J B, Zhang Z, *et al.* Characterizing the microbial culprit of white spot disease of the conchocelis stage of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 25(5): 1341-1348.
- [12] Scholthof K B. The disease triangle: pathogens, the environment and society[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(2): 152-156.
- [13] Augspurger C K. Seedling survival of tropical tree species: interactions of dispersal distance, light-gaps, and pathogens[J]. *Ecology*, 1984, 65(6): 1705-1712.
- [14] Reim R L, Shane M S, Cannon R E. The characterization of a *Bacillus* capable of blue-green bactericidal activity[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1974, 20(7): 981-986.
- [15] 方文雅, 杨锐, 朱鹏, 等. 紫菜外生细菌抑菌活性及其多聚酮合酶(PKS I)基因筛选[J]. *微生物学报*, 2009, 49(2): 153-160.
- Fang W Y, Yang R, Zhu P, *et al.* Antibacterial activity of *Porphyra* spp. epiphytic bacteria and polyketide synthase I gene screening[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(2): 153-160(in Chinese).
- [16] Xiong Y Q, Yang R, Sun X X, *et al.* Effect of the epiphytic bacterium *Bacillus* sp. WPySW2 on the metabolism of *Pyropia haitanensis*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(2): 1225-1237.
- [17] 熊玉琴, 杨锐, 杨华田, 等. 藻际芽孢杆菌对坛紫菜生理的影响[J]. *生物学杂志*, 2018, 35(1): 37-41.
- Xiong Y Q, Yang R, Yang H T, *et al.* Effects of phycosphere *Bacillus* sp. WPySW2 on physiology of *Pyropia haitanensis*[J]. *Journal of Biology*, 2018, 35(1): 37-41(in Chinese).
- [18] 周金梅, 杨锐, 方文雅, 等. 坛紫菜叶状体的无菌化培养及其应用[J]. *生物学杂志*, 2012, 29(3): 83-87.
- Zhou J M, Yang R, Fang W Y, *et al.* Study on the axenic culture and application of *Porphyra haitanensis* thallus[J]. *Journal of Biology*, 2012, 29(3): 83-87(in Chinese).
- [19] Zou D H, Gao K S. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Gigartinales, Rhodo-



- phyta) grown at different irradiance levels[J]. *Phycologia*, 2009, 48(6): 510-517.
- [20] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [21] 高洪峰. 不同生长期坛紫菜中藻胆蛋白的含量变化[J]. *海洋与湖沼*, 1993, 24(6): 645-648.
- Gao H F. The variation in the contents of phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* collected in different growing stages[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1993, 24(6): 645-648(in Chinese).
- [22] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 210-211.
- Gao J F. Experimental guidance for plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 210-211 (in Chinese).
- [23] Liu W, Wang M, Yan Z, *et al.* Effect of cold hardening on SOD, POD activities and on contents of MDA in different ploidy watermelon seedling[J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2004, 24(4): 578-582.
- [24] 何云, 李贤伟, 李西, 等. 2种野生岩生植物叶片可溶性蛋白含量对低温胁迫的响应[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(18): 7552-7553.
- He Y, Li X W, Li X, *et al.* Response of two kinds of wild rock plant leaf soluble protein content to low temperature stress[J]. *Journal of Anhui Agri. Sci*, 2008, 36(18): 7552-7553(in Chinese).
- [25] Ashraf M, Foolad M R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 59(2): 206-216.
- [26] 史修周, 徐燕, 梁艳, 等. 坛紫菜藻胆蛋白及叶绿素a的测定与分析[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2008, 13(3): 221-226.
- Shi X Z, Xu Y, Liang Y, *et al.* Measurement and analysis of the contents of phycobiliprotein and chlorophyll a in *Porphyra haitanensis*[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2008, 13(3): 221-226(in Chinese).
- [27] Savicka M, Škute N. Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Ekologija*, 2010, 56(1-2): 26-33.
- [28] Turóczy Z, Kis P, Török K, *et al.* Overproduction of a rice aldo-keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 75(4-5): 399-412.
- [29] 杨锐, 张晓龙, 徐丽宁, 等. 坛紫菜耐高温胁迫机理之初步研究[C]//中国海洋湖沼学会藻类学分会第七届会员大会暨第十四次学术讨论会论文摘要集. 呼和浩特: 中国海洋湖沼学会, 2007.
- Yang R, Zhang X L, Xu L N, *et al.* A preliminary study on the mechanism of high temperature stress resistance of *Porphyra haitanensis*[C]//A summary of the seventh session of the algal Symposium chapter of the Chinese society for oceanology and limnology and the paper of the fourteenth Symposium. Huhehaote: Chinese society for oceanology and limnology, 2007.
- [30] 屠小菊, 汪启明, 饶力群. 高温胁迫对植物生理生化的影响[J]. *湖南农业科学*, 2013(13): 28-30.
- Tu X J, Wang Q M, Rao L Q. Effects of high temperature stress on physiology and biochemistry of plant[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2013(13): 28-30(in Chinese).
- [31] Szabados L, Savouré A. Proline: A multifunctional amino acid[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(2): 89-97.
- [32] 陈伟洲, 吴文婷, 许俊宾, 等. 不同生态因子对皱紫菜生长及生理组分的影响[J]. *南方水产科学*, 2013, 9(2): 14-19.
- Chen W Z, Wu W T, Xu J B, *et al.* Effects of different ecological factors on growth and physical components of *Porphyra crispata*[J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(2): 14-19(in Chinese).
- [33] 张元, 谢潮添, 陈昌生, 等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应[J]. *水产学报*, 2011, 35(3): 379-386.
- Zhang Y, Xie C T, Chen C S, *et al.* Physiological responses of gametophytic blades of *Porphyra haitanensis* to rising temperature stresses[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(3): 379-386(in Chinese).
- [34] Piñero Estrada J E, Bermejo Bescós P, Del Fresno A M V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract[J]. *Il Farmaco*, 2001, 56(5-7): 497-500.
- [35] Sunagawa S, Coelho L P, Chaffron S, *et al.* Structure and function of the global ocean microbiome[J]. *Science*, 2015, 348(6237): 1261359.
- [36] Townsley L, Yildiz F H. Temperature affects c-di-GMP



- signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(11): 4290-4305.
- [37] Kamjunke N. Temperature affects the response of heterotrophic bacteria and mixotrophic algae to enhanced concentrations of soil extract[J]. *Hydrobiologia*, 2010, 649(1): 379-383.
- [38] Kritzberg E S, Duarte C M, Wassmann P. Changes in Arctic marine bacterial carbon metabolism in response to increasing temperature[J]. *Polar Biology*, 2010, 33(12): 1673-1682.
- [39] 王新, 周艳艳, 郑天凌. 海洋细菌生态学的若干前沿课题及其研究新进展[J]. *微生物学报*, 2010, 50(3): 291-297.
- Wang X, Zhou Y Y, Zheng T L. Recent advances in marine bacterial ecology-A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(3): 291-297(in Chinese).
- [40] Maskey R P, Li F C, Qin S, *et al.* Chandrananimycins A-C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions[J]. *Journal of Antibiotics*, 2003, 56(7): 622-629.
- [41] 王剑, 王朝晖, 熊毅俊. 不同时期条纹环沟藻可培养藻际细菌研究[J]. *中国环境科学*, 2014, 34(6): 1540-1547.
- Wang J, Wang Z H, Xiong Y J. Culturable phycosphere bacteria from different growth stages of *Gyrodinium striatum*[J]. *China Environmental Science*, 2014, 34(6): 1540-1547(in Chinese).
- [42] Wohlers-Zöllner J, Breithaupt P, Walther K, *et al.* Temperature and nutrient stoichiometry interactively modulate organic matter cycling in a pelagic algal-bacterial community[J]. *Limnology and Oceanography*, 2011, 56(2): 599-610.
- [43] Dziallas C, Grossart H P. Microbial interactions with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their dependence on temperature[J]. *Marine Biology*, 2012, 159(11): 2389-2398.

## Effects of *Bacillus* sp. on *Pyropia haitanensis* at high temperature

YANG Huatian, XIONG Yuqin, YANG Rui\*

(School of Marine Sciences, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province,  
Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** *Pyropia haitanensis* is an important economic seaweed cultivated in the East China Sea. Its optimum growth temperature is about 20 °C, and the extremely high temperature is about 29 °C. *P. haitanensis* is vulnerable to disease due to high temperature or hostile epiphytic bacterial flora in the phycosphere. In this study, the thalli of *P. haitanensis* were co-cultured with *Bacillus* sp. WPySW2 which was proved to be probiotic to *Pyropia* at 20 °C. However, the experiment was conducted at 28 °C, an extremely high temperature to *Pyropia* species. The physiological indexes such as relative growth rate (RGR), activities of antioxidant enzymes (SOD and POD), contents of soluble proteins, free proline (Pro), malondialdehyde (MDA), and phycobiliproteins (phycorythrin, phycocyanin, and allophycocyanin) were detected. The results showed that: at 28 °C, the RGR of co-cultured *P. haitanensis* was higher than the control at the beginning, while the difference became less significant when the co-culture process continued. Both the control and co-cultured samples rotted 4 days later, and the conditions of co-culture groups were worse. After co-culturing for 24 h, the activities of SOD and POD, and the content of MDA in co-culture samples were higher than the control. The contents of soluble proteins and free Pro were much lower than those in the control. The contents of phycobiliproteins in co-cultured groups were higher than the control. It revealed that at the high temperature such as 28 °C, *Bacillus* sp. WPySW2 could promote the growth of *P. haitanensis* at the beginning of co-culture, however, when the co-culture process continued, the bacteria inhibited the growth and the physiological conditions of the algae. The results indicated the phycospheric bacteria could change the ecological functions when the environment changed.

**Key words:** *Pyropia haitanensis*; *Bacillus*; phycosphere; function

**Corresponding author:** YANG Rui. E-mail: yangrui@nbu.edu.cn

**Funding projects:** National Nature Science Foundation of China (31772871); Major Scientific and Technological Project of Zhejiang Province (2016C02055-6B); China Agriculture Research System (CARS-50); Open Fund of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Aquaculture in Ningbo University (xkzsc1509)