

藻类污染生物防治新策略*

韩继刚^{1,2} 孟颂东² 叶寅² 田波^{2**}

(¹ 河北大学生命科学学院 保定 071002) (² 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

THE NEW BIOCONTROL STRATEGY OF ALGAE POLLUTION

Han Jigang^{1,2} Meng Songdong² Yie Yin² Tein Po²

(¹ College of Life Science, Hebei University, Baoding, 071002, China)

(² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

关键词: 藻类污染, 生物防治, 策略

中图分类号: Q949.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 03-0381-05

1 水体藻类污染生物防治的必要性

近些年来由于污染造成的环境恶化逐步加重, 水体藻类污染的程度也逐年加深。赤潮或水华(Red tide or Bloom)在全球范围内频繁出现是藻类污染程度加深的直接反映。我国在 1933 年到 1979 年的 46 年中仅发生过 12 次赤潮, 而 1990 年到 1994 年的 5 年中就发生了 139 次赤潮, 藻类污染灾害日趋严重。赤潮可以造成海水 pH 值升高, 粘稠度增大, 改变浮游生物的生态系统群落结构。当赤潮藻类过度密集或死亡腐解时, 又造成了海域大面积的缺氧, 甚至无氧。藻细胞代谢及腐解又会产生大量有害气体和毒素(已有许多藻类毒素引起人畜患病或致死的报道^[1-7]), 使海水变色、变臭, 破坏原有生态系统的结构与功能。藻类污染每年给全球造成几百亿美元的损失。

陆地水体中藻类污染同样严重恶化了水体环境。滇池是著名的高原淡水湖泊, 面积 300 平方公里, 平均水深 4.4 m, 湖容量 12.9 亿 m³。它是全国第六大淡水湖, 同时滇池水系是全国 13 个重点保护水系之一。近些年来, 滇池湖面面积大幅度减小, 湖盆抬高, 调蓄水量减少。1995 年排入滇池的工业废水和城市生活污水达 1.85 亿 m³, 年入湖污染物 TP102t, TN898t, COD_{Cr}41674t, 致使滇池水体严重污染和并达重富营养化程度。目前已经发生严重的蓝藻污染, 草海透明度只有 25~30 cm, 外湖只有 35~40 cm。滇池也被国家列为“九五”期间“三河、三湖”重点治理项目。

目前已知, 赤潮(水华)是由一种或几种藻类大规模的突然爆发所造成的。其形成的详细机制目前尚不是非常清楚, 但与环境恶化有着密切的联系。农田中大量化学肥料的使用, 迅速发展的水产养殖业及工业和生活污水的直接排放使江河湖泊及近海水域遭受污染。水体富营养化是发生藻类污染的直接原因。现在人类已经十分重视对环境的保护及资源的可持续开发, 以最大限度的避免环境污染以减少和防止藻类污染的发生。然而如何在藻类污染发生后及时治理、清除藻类污染是一个急需解决的问题。

目前所采用的都是非生物防治策略, 包括物理的方法和化学的方法。但对于湖泊、海洋这样大面

* 国家海洋 863(819-04-09-98)和河北省科委攻关计划资助项目

** 联系人

作者简介: 韩继刚(1970-), 男, 河北省满城县人, 河北大学生命科学学院讲师, 主要从事植物分子生物学研究。

收稿日期: 2000-04-13, 修回日期: 2001-01-16

积的水域无论是那种方法都不现实,也不可能从根本上解决藻类污染的问题。特别是由于化学药剂的非专一性,采用化学方法常常引起二次污染。对于滇池中已经发生的蓝藻污染用物理的、化学的方法进行治疗都未取得令人满意的效果进一步说明非生物的防治策略的作用是有限的。

因此探索一种高效、快速并符合可持续发展战略的治理藻类污染的新策略是非常迫切和必要的。藻类污染的生物防治是指:利用特异性的藻类病毒作为防治藻类污染发生的主要控制因子,以裂藻细菌和真菌及食藻原生动物作为辅助控制因子,在特定水体中建立控制因子—宿主的动态平衡体系,以防止藻类污染的发生或治理已发生的藻类污染的一种方法。

与非生物防治措施相比,生物防治新策略具有显著的优势:1)安全可靠,2)高效快速,3)经济性。

2 藻类污染生物防治的可行性

2.1 藻类病毒是一种高效安全的防治藻类污染发生的控制因子

2.1.1 病毒在水生生态系统中起着重要的作用:自从发现海水中存在大量的病毒后^[8-16],引起了人们很大的兴趣。随后的研究^[17-25]表明病毒是海洋中数量最多的生物个体,病毒在海水表层的典型数量为 10^{10} 个/L,为细菌的25倍。其数量随地区、深度、季节等生态环境不同而变化^[22,25]。在淡水中也发现有类似的现象^[20],但数量稍低,为 $1.2 \sim 6.1 \times 10^7$ /mL。在湖底沉积物中病毒的数量可达到 $6.5 \times 10^8 \sim 1.83 \times 10^{10}$ /mL。

水体中大量病毒的存在,表明他们不是一些惰性的颗粒而是水生生态系统中活跃的分子^[12]。越来越多的研究表明,病毒可能侵染所有的生物体并能快速增殖,从而影响生物地球化学和生态学进程^[8]。其主要作用是:(1)裂解特异性宿主(细菌和浮游植物等),成为其宿主的特异性控制性因子^[8-12,25]。一般认为病毒的裂解作用是细菌和浮游植物死亡的一个重要原因^[23],表层水中10~50%的细菌是由病毒裂解的,在富营养水体中这一比例更高。浮游植物包括原核和真核生物,都可被病毒侵染。大量的病毒(近岸水域通常为 $10^2 \sim 10^4$ /mL,有时超过 10^5 /mL)可以感染其特异的蓝藻寄主(*Synechococcus* sp.)。在海洋中,已经发现有0.8%~4.3%的细菌和蓝藻是被病毒侵染的^[11],在淡水中的情况是类似的^[22]。由于宿主中的病毒只有在裂解的最后阶段才能观察到,因此实际被感染的细菌和蓝藻可能是观察到的10倍^[8]。海洋中平均每天有20%的细菌、3%的*Synechococcus*为病毒所裂解;在淡水中这一比例更高,达到约10%~50%甚至100%^[23]。(2)控制微生物群落结构^[12](多样性调节),同时影响生物地球化学循环。

因此病毒是水体中生物群落的重要组成部分,有着重要的生态学作用^[12,17],与其宿主是一种动态的平衡关系。由于生态环境的变化,在发生藻类污染的时候,这种平衡就受到了破坏。以病毒作为生物控制因子来防治藻类污染发生就是建立或恢复这种动态平衡的过程。

2.1.2 病毒作为控制因子是安全的:病毒对其宿主的侵染具有很高的特异性。这对于以病毒作为防治藻类污染的控制因子是非常重要的,否则将会造成生态灾难。不同的藻类病毒其特异性也不完全相同,如小球藻病毒的特异性非常强,只能裂解专一株系的小球藻;而有的病毒则可感染几个株系、亚种、一个种乃至一个属。筛选特异性强的病毒,并用基因工程的手段对其宿主特异性进行改造,使其特异裂解藻类污染中的优势藻株。同时保证了其安全性。

以病毒作为防治藻类污染发生的控制因子,其对生态系统产生何种影响是非常重要的。研究发现,即使病毒只能引起一群有机体中少部分宿主的裂解,它们也能对群落中不同种或株系的比例产生很大的影响。病毒对宿主的侵染具有宿主密度依赖性和种的特异性。侵染过程就是一个随机扩散的过程。因而某个种或株系种群密度越高就越易于为病毒所侵染,而数量较少的种则受到相对保护。这正是以病毒作为防治藻类污染发生的控制因子所期望的结果。

2.1.3 病毒能迅速降低水体中特定藻类的数量:病毒有三种基本的增殖方式^[8],即:裂解性侵染、慢性侵染和溶原现象。以病毒作为防治藻类污染发生的控制因子应该筛选裂解性侵染的藻类病毒。

病毒的复制周期很短,每个宿主细胞可以释放几十到几百个子代病毒。在一定条件下,病毒的增殖

是以几何级数增加的,短时间内就可大量吸附于寄主细胞共使之裂解。K.P.Hennes 在德国 Constance 湖中的研究发现,发生水华后的水体中病毒的数量增加了 70% ~ 380%,估计每个病毒可以释放 21 ~ 121 个子代病毒。因此以病毒作为防治藻类污染的控制因子必然是高效率的,同时也是最经济的。

藻类污染与病毒有密切的关系。有很多赤潮(水华)与病毒相伴发生的报道,并且认为病毒在控制藻类污染的发生过程中起重要作用^[8,12,16,17~24]。Brussaard(1996)发现病毒或病毒样粒子在控制挪威北海由 *Emiliania huxley* 和 *Chrysochromulina* sp. 引起的赤潮上发挥关键性作用^[17]。在赤潮的衰败期,50%的 *E. huxleyi* 细胞为病毒所侵染,并在氮源紧张时引起藻细胞的裂解。1994 年,K.L.Drewes Milligan 从发生赤潮的纽约长岛分离了可以裂解导致赤潮发生的 *Aureococcus anophagefferens* 的噬菌体状病毒,并认为有控制赤潮发生的潜在应用价值。1992 年,K.Nagasaki 从发生在日本 Hiroshima Bay 中期和后期的赤潮中分离到病毒样粒子,其直径约 185 nm,对 *Heterosigma akashiwo* 具有特异性,并认为是病毒样粒子使赤潮奇迹般的快速结束。

目前已有有人工增加病毒的数量来检验病毒对浮游植物生态系统产生影响的报道。发现在实验系统中增加从自然水体中分离到的 2 ~ 200 nm 的病毒颗粒 20%,就可减少光合合成作用 50%。在不同的近海和远海水域进行的实验表明,增加病毒可以抑制细菌群落的生长量的 50%。

2.1.4 以病毒作为其宿主生物防治的控制因子已有成功先例:农作物病虫害的生物防治是生态型农业的重要环节,并被认为是安全、有效、符合生态学规律和不会带来损害的一种防治措施。已有许多应用病毒控制其特异性宿主的报道。例如杆状病毒对很大范围的昆虫害虫都有控制作用,而用作生物杀虫剂取代人工合成的化学杀虫剂;HaSNPV(*Helicoverpa armigera* virus)可能成为生物杀虫剂而特异性抑制其宿主,等等。J.Kovaliski 通过 1995 ~ 1996 的跟踪研究发现,兔出血病病毒(Rabbit Hemorrhagic Disease Virus,RHDV)可在澳大利亚南部野生欧洲兔种群中快速传播,并使兔死亡。从而认为这种病毒对野生欧洲兔是一种自然的生物控制因素。鉴于赤潮(水华)爆发时藻类的高密度以及病毒在水体介质中的快速传播,因此以病毒作为主要控制因子的藻类污染生物防治新策略具有独特的优越性。

2.2 裂藻细菌和真菌也可以作为藻类污染的生物控制因子

从不同生境(水环境、土壤和空气)中分离到大量可裂解藻类的细菌和真菌使应用细菌或真菌防治藻类污染成为可能^[18]。早在 1978 年 K.Redhead 就分离到了 70 株能裂解蓝藻的微生物,其中 62 株为真菌,分别为 *Acremonium*、*Emericellopsis*、*Verticillium* 属。所有分离物均可裂解水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*),大多数还能裂解丝状和单细胞蓝藻,但真菌的活性最高。其裂解藻类的活性与生成可扩散的胞外热稳定的头孢霉素类抗生素类物质有关^[19]。

K.R.Garza 在 1995 年分离的四株细菌, *Alteromonas* sp. A27, A28, A29, A30 可以裂解硅藻 *Skeletonema costatum* NIES-324, *Eucampia zochiacs* 和 *Thalassiosira* sp. 以及鞭毛藻 *Chattonella antiqua*。在菌株 A28、A29 中检测到了隐秘型质粒 pAS28 及 pAS29 的存在。它们在大小及限制性酶切位点方面非常相似。通过融合 *E.coli* 质粒 pCAIIC 与 pAS28,已构建了能同时转化 *E. coli* 与 A28 的穿梭质粒 pASS1。这一研究结果为建立藻类裂解菌的转化体系,(如:向这类细菌中导入几丁质酶编码基因等去壁酶基因,加速宿主藻类的裂解),提供了有益的探索。然而目前还不知道细菌与藻类相互作用的确切机制,推测是细菌分泌的胞外物质或“细胞-细胞接触机制”使藻类裂解^[18]。

除裂藻细菌和真菌外,藻类之间的拮抗作用也是很早就发现的。David L.Eng-willmot 也发现一株海洋蓝藻 *Gomposphaeria aponina* 可以成为 Florida 赤潮优势藻 *Pytychodiscus brevis* 的控制因子,并且有可能用来控制赤潮的发生。

当然,同病毒相比,以细菌、真菌和藻类作为防治藻类污染的生物因子还有很多局限性。如:特异性不强、效率不高等,而且存在着二次污染的可能。

2.3 食藻原生动物也是藻类污染的生物控制因子

Andrews 等研究发现,在水生生态系统中原生动物是捕食浮游植物的重要角色。如许多蓝藻是原生

动物的良好食物源,蓝藻的许多属可为纤毛虫类的 *Nassula*,鞭毛虫类的 *Ochromonas* 和变形虫类的 *Acanthamoeba*, *Mayorella* 和 *Nuclearia* 所捕食。因此采用食藻原生动物来减少或限制藻类污染发生时藻类群体数量的方法可能是一种高效、廉价和具有良好生态效益的生物控制措施。进一步的研究表明,以食藻原生动物作为生物控制因子,其效果与原生动物的生长和吞食率、种的特异性、藻的生长率及原生动物的被捕食率等因素有关。然而要使食藻原生动物具有实际应用价值,还有一些工作需要进一步研究,如加入水体中的原生动物对生态环境的近期和长期影响、原生动物的大规模培养技术和适当的应用方法等。

2.4 对水体藻类污染必须采取综合治理措施

藻类宿主被其特异性病毒裂解后释放出子代病毒和大量的细胞碎屑,这些营养物质如果不被清理出水体特别是表层水体,将不能从根本上消除藻类污染发生的潜在危险。寄主细胞碎屑包括可溶性的分子(单体、寡聚体和多聚体)、胶体和细胞碎片等可溶性的有机物质,除极少病毒为异养鞭毛藻类直接摄食和一些细胞碎屑继续降解外,绝大部分或全部这些物质将为或最终为细菌所利用^[11~12]。有关的静态研究模型已经建立起来。因而这些可溶性有机物质将继续保持在存在病毒侵染系统的富营养水域。但当病毒的侵染活性降低时,由于那些较大的有机体的沉降或其细胞碎屑的沉降,从而将碳和无机营养物质从营养富集区转移到深海区^[8]。另外,随着宿主裂解所释放的物质物理化学性质的不同及水体环境的不同,病毒的侵染还可能产生一些其它的生物地球化学上的影响。如:释放的多聚体将有助于海水具有某些“胶体”的性质而影响许多生物的和微观的物理化学过程,从而有助于富营养水域营养物质的聚集和沉降。但病毒的裂解作用究竟能在多大程度上凝集沉降细胞碎屑等营养物质还不知道,有待于进一步的研究。因此采取生物措施防治藻类污染发生的同时,还要重视对富营养水域进行环境的综合治理。减少三废的排放,合理开发利用资源,使富营养水域的整体环境状况得到改善,才能加快生物防治的速度并巩固生物防治的效果。

3 结论

上述研究结果使得藻类污染的生物防治成为可能。藻类污染生物防治新策略的主要内容包括:

- (1)对造成藻类污染爆发的藻类物种进行全面的调查和鉴定,对其生物学性质,包括营养、代谢和繁殖机理进行深入研究。
- (2)分离藻类病毒及病毒样粒子(VLP),建立藻类污染模式藻株及其特异病毒的感染体系,研究病毒与寄主相互作用的分子生物学机制,为应用病毒控制藻类污染进行理论方面的探索。
- (3)加强裂藻细菌、真菌的分离、鉴定及分子生物学研究,建立此类细菌、真菌常规转化方法和体系,向其中导入几丁质酶基因等去壁酶类编码基因(也可导入病毒),构建工程菌株,改进其裂藻机能,使之具有控制藻类污染的实际应用价值。
- (4)对食藻原生动物及藻类之间的拮抗作用作进一步研究,以探索其应用价值。
- (5)通过上述研究提出一套既有理论基础又有应用价值的藻类污染生物治理方案。
- (6)利用藻类病毒和裂藻细菌、真菌作为基因库,从中分离具有重要价值的调控元件及编码序列,丰富藻类基因工程研究的内容。

参 考 文 献

- [1] Carmichael W W. *J Appl Bacteriology*, 1972, 72: 445 ~ 459.
- [2] Codd G A. *Microbiological Sciences*, 1984, 1(2): 48 ~ 52.
- [3] El Saadi O E, Esterman A J, Cameron S, et al. *Med J Aust*, 1995, 162(3): 122 ~ 125.
- [4] Thebault, I, Lesne J, Boutin J P. *Med Trop(mars)*, 1995, 55(4): 375 ~ 380.
- [5] Pilotto L S, Douglas R M, Burch M D, et al. *Aust N Z J Public Health*, 1997, 21(6): 562 ~ 566.
- [6] Dawson R M. *Toxicon*, 1998, 36(7): 953 ~ 962.

- [7] Huynh-Edlerme C, Puiseux-Dao S. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1998, **192**(3):387 ~ 408.
- [8] Fuhrman J A. *Nature*, 1999, **399**:541 ~ 548.
- [9] Sieburth J M, Johnson P W, Harbraves P E. *J Phycol*, 1988, **24**:416 ~ 425.
- [10] Bergh O, Borsheim K Y, Bratbak G, et al. *Nature*, 1995, **340**:467 ~ 468.
- [11] Proctor L M, Fuhrman J A. *Nature*, 1990, **343**:60 ~ 62.
- [12] Bratbak G, Heldal M, Norland, S, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**:1400 ~ 1405.
- [13] Wommack K E, Hill R T, Martin K et al. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**:2965 ~ 2970.
- [14] John H P, Joan B R, Sunny C J et al. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**:718 ~ 724.
- [15] Shigemitsu H, Kazuki T, Isao K. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**:2731 ~ 2734.
- [16] Markus G W, Dragica F, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**:4074 ~ 4982.
- [17] Brussaard C P D. *Aquat Microb Ecol*, 1996, **19**(2):105 ~ 113.
- [18] Carza D R, Suttle C A. *Aquat Microb Ecol*, 1995, **9**(2):203 ~ 210.
- [19] Redhead K, Wright S J L. *Appl Environ Microbiol*, 1978, **35**(5):962 ~ 969.
- [20] Maranger R, Bird D F. *Microb Ecol*, 1996, **31**:141 ~ 151.
- [21] Suttle C A. *Microb Ecol*, 1994, **28**:237 ~ 243.
- [22] Mathias C B, Kirschner A K T, Velimirov B. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**:3734 ~ 3740.
- [23] Weinbauer M G, Hofle M G. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**:431 ~ 438.
- [24] Nagasaki K. *Mar Biol*, 1994, **119**(2):307 ~ 312.
- [25] Weinbauer M G, Fuks D, Puskarić S, et al. *Microb Ecol*, 1995, **30**:25 ~ 41.