



地中海弧菌 117-T6 的溶藻活性

史含梦^{1,2}, 洪帆^{1,2}, 戴应芬^{1,2}, 徐梦雅^{1,2}, 杨锐^{1*}

(1. 宁波大学, 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波, 315211;

2. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波, 315211)

摘要: 为验证地中海弧菌 117-T6(*Vm* 117-T6)是否具有广谱溶藻性, 本实验观察了其对于赤潮异湾藻、颗石藻、叉鞭金藻和东海原甲藻的溶藻作用, 并对其溶藻物质的特性进行了分析。结果表明, 紫菜黄斑病致病菌 *Vm* 117-T6 对赤潮异湾藻、颗石藻、叉鞭金藻和东海原甲藻等微藻具有较强溶藻活性, 可使藻类叶绿素含量显著降低, 是一株广谱性溶藻细菌。*Vm* 117-T6 能在 40 min 内使赤潮异湾藻的活动能力下降, 光合作用受抑, 感染 120 min 即可导致藻体裂解并产生白色絮状沉淀。该菌株能降解卡拉胶, 不能降解果胶、纤维素和几丁质。*Vm* 117-T6 菌体、胞内及胞外提取物均具有较强的溶藻活性, 其胞外溶藻物质易溶于水、不溶于石油醚和乙酸乙酯, 具较强极性; 耐高温、不易被活性炭吸附、乙醇处理会降低溶藻活性。*Vm* 117-T6 在常规与易感条件下的关键差异蛋白包括大量的 ABC 转运蛋白、外膜蛋白、鞭毛蛋白及少量毒素。上述结果提示, *Vm* 117-T6 毒力效应物中含有极性的内毒素物质, 且与毒力因子转运、分泌以及细胞黏附相关的蛋白可能在其毒力作用中发挥重要作用。本实验为解析该菌株溶藻机制提供了证据, 为该菌的防治及应用提供了参考。

关键词: 地中海弧菌 117-T6; 溶藻细菌; 溶藻; 赤潮异湾藻

中图分类号: S 946

文献标志码: A

溶藻细菌 (algae-lysing bacteria) 是可以通过直接或间接方式抑制藻类生长或杀死藻类、溶解藻细胞的细菌的统称^[1]。1942 年有研究发现, 寄生多囊粘菌 (*Polyangium parasiticum*) 能杀死刚毛藻 (*Cladophora* spp.), 首次报道了细菌溶藻现象^[2]。随后关于细菌溶藻的报道陆续增多。现已报道的溶藻细菌有黏细菌属 (*Myxobacter*)、噬纤维菌属 (*Cytophaga*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Phingomonas*)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)、弧菌属 (*Vibrio*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等^[3-4]。

许多海洋致病菌都具有溶藻特性。李杰等^[5]

在绿斑病紫菜的藻体中发现海洋假交替单胞菌 (*P. marina*) 具有较强的胞外酶活性, 可杀死藻细胞。黄林彬等^[6]发现科贝特氏菌属 (*Cobetia*) 可侵入坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 藻细胞并释放内毒素而杀死紫菜细胞, 引起红烂病^[7]。Wang 等^[8]发现海洋弧菌 DHQ25 可分泌胞外蛋白来抑制和杀死赤潮藻。Jeong 等^[9]研究发现, 海洋芽孢杆菌 SY-1 菌株分泌的多肽类物质 (bacillamide) 对多环旋沟藻有特异性的杀灭作用。Guo 等^[10]证实了气单胞菌菌株 GLY-2107 可通过分泌热稳定性的胞外化合物来杀死铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)。Li 等^[11]报道从患病的海带藻体上分离出的假交替单

收稿日期: 2021-10-16 修回日期: 2021-12-15

资助项目: 浙江省自然科学基金 (LY22C190002); 国家自然科学基金 (32273155); 宁波市科技创新重大专项 (2021Z004, 2021Z104); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-50)

第一作者: 史含梦 (照片), 从事藻类生物技术方面研究, E-mail: shihanmengshou@foxmail.com

通信作者: 杨锐, 从事藻类生物技术与健康栽培方面研究, E-mail: yangrui@nbu.edu.cn



胞杆菌 SM0524 可分泌藻酸盐裂解酶, 使海带腐烂。可见, 溶藻细菌的作用方式多样, 且机制复杂。

紫菜丝状体黄斑病是紫菜贝壳丝状体育苗期间高发的严重疾病, 能够导致贝壳出现黄斑, 最后白化, 造成育苗失败^[12]。地中海弧菌 (*V. mediterranei*) 117-T6 (*Vm* 117-T6) 被证实是该病的一种致病菌, 可以破坏紫菜丝状体细胞的内膜系统, 导致细胞空胞化^[13]。我们发现, *Vm* 117-T6 同样也能感染紫菜叶状体以及赤潮异弯藻等其他藻类, 造成细胞解体, 是一株广谱性的溶藻细菌。本实验拟观察 *Vm* 117-T6 对赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*)、颗石藻 (*Pleurochrysis carterae*)、叉鞭金藻 (*Dirateria inornata*) 和东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 的溶藻作用, 探究其溶藻物质的特性, 为解析菌株的溶藻机制提供证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料培养

实验所用赤潮异弯藻 (NMBJah045)、颗石藻、叉鞭金藻和东海原甲藻均由浙江省海洋生物工程重点实验室藻种库提供。

将经 0.22 μm 孔径滤膜过滤后的海水, 每 1 L 中添加 1 mL 宁大 3 号母液^[12] 作为培养基。将藻种按 1.0×10^3 CFU/mL 的密度按照 1:5 (体积比) 的比例, 接种至培养液中, 于培养箱中培养 3~4 d, 每日摇瓶 2 次。于 20 $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 36 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 光暗周期 12 L:12 D 条件下将微藻培养至指数生长期。调整藻液浓度至 1.0×10^6 CFU/mL, 备用。

1.2 *Vm* 117-T6 的培养

紫菜丝状体黄斑病病原菌 *Vm* 117-T6 保存于浙江省海洋生物工程重点实验室。保藏菌株室温解冻后接种至 NaCl 浓度为 1% 的胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB, 青岛海博生物技术有限公司) 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$, 110 r/min, 活化培养 12 h。菌株扩增与培养条件相同。

1.3 *Vm* 117-T6 感染实验

取活化的 *Vm* 117-T6, 2 775 $\times$ g 离心 5 min, 去除培养基后, 在灭菌的富 N/P 的营养海水 (0.0008% $\text{P-H}_2\text{PO}_4$, 0.002% N-NO_3) 中重新悬浮。调整菌体密度约 1.0×10^7 CFU/mL。

将菌体按 1:10 (体积比) 接种于指数生长中期的赤潮异弯藻、颗石藻、叉鞭金藻和东海原甲藻等藻液中, 每组设置 3 个平行。感染 72 h 后测定藻体中叶绿素 a 含量, 并计算其溶藻率。取适量藻液, 7 104 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清液, 加入等体积 95% 乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h, 7 104 $\times$ g 离心 5 min, 取上清液于 649 nm 和 665 nm 下测定其 OD 值。 $C_a = 13.95 \times \text{OD}_{665} - 6.88 \times \text{OD}_{649}$ 。式中, C_a 为叶绿素 a 的质量浓度。

溶藻率的测定: $I(\%) = (1 - C_t/C_0) \times 100\%$ 。式中, I 为溶藻效率; C_t 和 C_0 分别为感染时间为 t 时和 0 时对照的叶绿素 a 浓度。

1.4 *Vm* 117-T6 对不同碳源的降解作用

分别以果胶、卡拉胶、纤维素和几丁质作为唯一碳源制备选择培养基。将浸有 *Vm* 117-T6 的滤纸片贴附在特定的选择培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。培养基用碘液染色 5 min 后, 无菌水清洗染液, 测量菌落周围透明圈的大小, 以判断 *Vm* 117-T6 降解不同碳源的能力。

1.5 *Vm* 117-T6 胞内物、胞外物和菌体的溶藻效果

胞内物制备 参照已有文献^[14], 以 1:100 (体积比) 的比例将 *Vm* 117-T6 接种于 NaCl 浓度为 1% 的 TSB 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$, 110 r/min 培养 48 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$, 11 180 $\times$ g 离心 30 min, 收集菌体, 加入灭菌的富 N/P 营养海水 (0.0 008% $\text{P-H}_2\text{PO}_4$, 0.002% N-NO_3) 重悬浮。低温下, 超声细胞粉碎机破碎 20 min, 将破碎液 11 180 $\times$ g 离心 5 min, 取上清液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

胞外物制备 参照已有研究^[9], 将 200 μL *Vm* 117-T6 涂布于铺有无菌玻璃纸, NaCl 浓度为 1% 的大豆酪蛋白琼脂培养基 (TSA, 青岛海博生物技术有限公司) 上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。随后, 加入 2 mL 富含 N、P 的无菌营养海水 (0.0 008% $\text{P-H}_2\text{PO}_4$, 0.002% N-NO_3), 清洗菌苔。4 $^{\circ}\text{C}$, 11 180 $\times$ g 离心 30 min。上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

菌体制备 以 1:100 (体积比) 的比例将 *Vm* 117-T6 接种至 NaCl 浓度为 1% 的 TSB 培养基中, 110 r/min, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 备用。

***Vm* 117-T6 胞外物、胞内物、菌体溶藻效果测定** 将上述处理所得溶藻物质以 1:10 (体

积比)的比例接入 100 mL 指数生长中期的赤潮异弯藻藻液中, 24 h 后测定其叶绿素 a 含量并计算其溶藻率。叶绿素 a 含量及其溶藻率的计算方法同“*Vm* 117-T6 感染实验”。

1.6 感染赤潮异弯藻显微观察

将制备好的 *Vm* 117-T6 的胞外物与菌体按照 1:10(体积比)的比例接入 100 mL 指数生长中期的赤潮异弯藻藻液中, 感染条件为 20 °C, 光照强度 36 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 光周期为 12 L:12 D, 培养 40、80 和 120 min 时取藻细胞于光学显微镜下观察。

1.7 不同处理下 *Vm* 117-T6 胞外提取物对溶藻率的影响

***Vm* 117-T6 胞外物乙醇处理** 取 *Vm* 117-T6 胞外物溶藻组分 100 mL, 加入 3 倍体积无水乙醇, 常温下静置 10 min, 1 776 $\times$ g 离心 20 min, 分别收集上清液和沉淀。上清液于 65 °C 真空旋蒸浓缩至 100 mL, 重复 3 次。用少量蒸馏水溶解残留固体, 得到溶解相。将收集的沉淀用蒸馏水溶解后合并, 去除残留乙醇, 得到沉淀相。无菌水定容至 100 mL。

***Vm* 117-T6 胞外物有机溶剂萃取** 取 *Vm* 117-T6 胞外物溶藻组分 100 mL, 用 2 倍体积石油醚或乙酸乙酯静置萃取 24 h, 分别收集水相和有机相。水相经 65 °C 真空蒸发掉残留有机溶剂。有机相于 65 °C 真空蒸发干燥, 用少量蒸馏水溶解残留固体。无菌水定容至 100 mL。

***Vm* 117-T6 胞外物活性炭吸附** 取 *Vm* 117-T6 胞外物溶藻组分 100 mL, 加入适量活性炭粉后, 经过 1 776 $\times$ g 离心, 过滤, 将处理后的组分用无菌水定容至 100 mL。

***Vm* 117-T6 胞外物高温处理** 取“*Vm* 117-T6 胞内物、胞外物和菌体的溶藻效果”中胞外物溶藻组分 100 mL, 100 °C 水浴 20 min, 冷却至室温, 0.22 μm 的滤膜过滤, 无菌水定容至 100 mL。

***Vm* 117-T6 胞外物不同组分溶藻率的测定**

将上述处理所得溶藻物质以 1:10(体积比)的比例接入 100 mL 指数生长中期的赤潮异弯藻藻液中, 24 h 后测定其叶绿素 a 含量并计算其溶藻率。叶绿素 a 含量及其溶藻率的计算方法同“*Vm* 117-T6 感染实验”。

1.8 *Vm* 117-T6 不同条件下差异蛋白的分离与分析

对常规条件、最佳生长条件与易感条件下菌株的差异蛋白进行分析。将 *Vm* 117-T6 于 3 种条件培: A(易感条件下)为 30 °C、pH 6.0、盐度 20; B(常规条件)为 26 °C、pH 6.0、盐度 20; C(最佳生长条件^[12])为 30 °C、pH 7.0、盐度 20。培养条件同“*Vm* 117-T6 的培养”。参照“*Vm* 117-T6 胞内物、胞外物和菌体的溶藻效果”的方法制备不同生长条件下菌体的胞外物与胞内物。

利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离菌株蛋白质, 切割目的片段经胰蛋白酶消化后进行液相色谱质谱联用仪(Liquid Chromatograph Mass Spectromete, LC-MS)分析^[15], 蛋白鉴定工作由上海鹿明生物科技有限公司协作完成。制备 C₁₈ 膜填充柱; 将挥发干的多肽样品重新溶解于 Nano-HPLC Buffer A 中; 对多肽样品进行活化、平衡、固肽、脱盐, 后更换新的 EP 管, 用 40 μL Nano-HPLC Buffer B 洗脱多肽样品, 并将脱盐后的多肽样品挥干。

将多肽样品重新溶解于 Nano-HPLC Buffer A 中。采用 Nano-HPLC 液相系统(EASY-nLC1200, Thermo Inc., 美国), 色谱柱使用 Trap column(RP-C18, 100 $\mu\text{m}\times$ 20 mm, Thermo Inc., 美国)和 Analysis column(RP-C18, 75 $\mu\text{m}\times$ 150 mm, Thermo Inc., 美国)进行分离。酶解产物经毛细管高效液相色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪(Thermo Scientific, 美国)进行全扫描(full scan)分析。

结果按照如下所示参数进行搜库分析, Software: ProteomeDiscover 2.4; Database: 地中海弧菌 -uniprot-*Vibrio*+organism_mediterranei.fasta; MS1 tolerance: 10 ppm; MS2 tolerance: 0.02 Da; Missed cleavage: 2; Static modification: Carbamidomethyl (C); Dynamic modification: Acetyl (Protein N-term)、Deamidated (NQ)、Oxidation (M)。

1.9 统计方法

实验数据采用 Excel 2020 和 Origin 2020 软件进行作图分析, 并采用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)或双因素方差分析(Two-Way ANOVA), 使用 Tukey 多重比较检验来确定各处理间的差异显著性。数据以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, $P<0.05$ 表示显著差异, $P<0.01$

表示差异极显著。

2 结果

2.1 *Vm* 117-T6 对不同微藻的溶藻作用

Vm 117-T6 感染 72 h 后溶藻率显示, 该菌株具有广谱且较强的溶藻活性, 对东海原甲藻的溶藻率高达 93.5%、对赤潮异弯藻、颗石藻和叉边金藻的溶藻率分别达到了 88.5%、62.3% 和 73% (图 1)。

2.2 *Vm* 117-T6 对不同微藻叶绿素含量的影响

Vm 117-T6 感染 72 h 后, 不同微藻的叶绿素 a 的含量始终显著低于对照组 ($P < 0.05$, 图 2)。不同藻类对 *Vm* 117-T6 的敏感程度也有所差异。处理 72 h 后, 赤潮异弯藻和东海原甲藻的叶绿素 a 含量较对照组分别下降 7.71 和 14.34 倍; 而颗石藻与叉鞭金藻的叶绿素 a 含量较对照组分别下降 1.65 和 2.67 倍。

本研究所用微藻均为从东海赤潮中分离获得的形成赤潮水华的种类。鉴于上述实验结果, 考虑到赤潮异弯藻无细胞壁, 便于更好地观察细胞变化, 因此, 后续实验选取赤潮异弯藻为对象, 用于评估 *Vm* 117-T6 的溶藻特性。

2.3 *Vm* 117-T6 对不同碳源的降解能力

果胶、卡拉胶、纤维素和几丁质均为藻类细

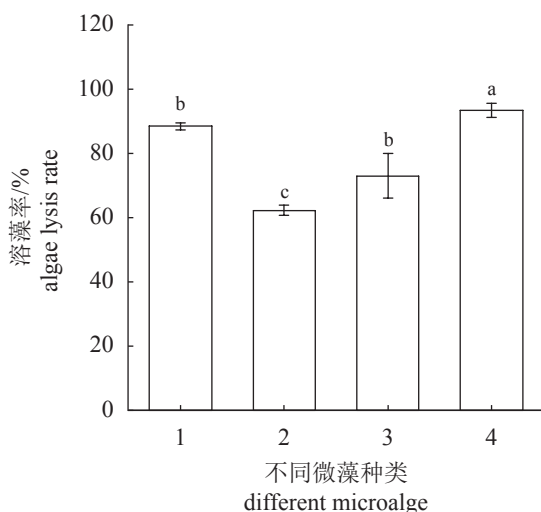


图 1 *Vm* 117-T6 感染不同微藻 72 h 的溶藻率

1. 赤潮异弯藻, 2. 颗石藻, 3. 叉鞭金藻, 4. 东海原甲藻

Fig. 1 Algae-lysis rate of *Vm* 117-T6 infection on different microalgae for 72 h

1. *H. akashiwo*, 2. *P. carterae*, 3. *D. inornata*, 4. *P. donghaiense*

胞壁的重要组分, 以其作为唯一碳源来培养 *Vm* 117-T6, 发现菌株仅在卡拉胶固体培养基上形成明显的透明水解圈 (图 3), 而对其他几种物质无显著效果。这说明 *Vm* 117-T6 具有特异性降解卡拉胶的能力, 不能分解果胶、纤维素和几丁质。

2.4 *Vm* 117-T6 胞外物、胞内物和菌体的溶藻效果

对 *Vm* 117-T6 的胞内物、胞外物及菌体进行溶藻效果比较。处理 24 h 后, 胞内物、胞外物与菌体的溶藻率分别为 $38.23\% \pm 3.76\%$ 、 $41.84\% \pm 2.05\%$ 和 $37.89\% \pm 3.63\%$ (图 4-a), 三者之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。添加 *Vm* 117-T6 胞外物的赤潮异弯藻的叶绿素 a 含量从 (52.64 ± 0.98) mg/L 降低至 (26.14 ± 0.94) mg/L (图 4-b), 差异极显著 ($P < 0.01$), 而胞内物和菌体亦显著降低了赤潮异弯藻的叶绿素 a 的含量 ($P < 0.05$)。结果显示, *Vm* 117-T6 及其胞内物与胞外物均对赤潮异弯藻有显著抑制作用。

2.5 *Vm* 117-T6 胞外物及菌体对赤潮异弯藻细胞形态的影响

Vm 117-T6 胞外物对赤潮异弯藻细胞形态的影响结果显示, 感染 0 min 的赤潮异弯藻细胞呈圆形, 细胞结构完整、紧密, 游动迅速 (图版-1,5)。胞外物感染 40 min 后, 藻细胞的泳动能力减弱、细胞逐渐膨胀变圆、细胞质中开始出现空腔 (图版-2)。此时, 藻细胞边缘完整; 胞外物感染 80 min, 藻细胞内空腔不断增大, 内含物的颜色逐渐变淡 (图版-3)。胞外物感染 120 min, 藻细胞破裂, 细胞质组分呈颗粒状分散在培养液中 (图版-4)。

Vm 117-T6 菌体对赤潮异弯藻细胞形态的影响结果显示。整体而言, 菌体感染导致藻体活性降低更为严重, 在感染 40 和 80 min, 藻细胞的结构较胞外物感染组更为松散, 感染 120 min 时, 赤潮异弯藻的细胞内容物分散成不规则的透明颗粒, 其中嵌有细菌菌体 (图版-5-8), 表明菌体感染会对赤潮异弯藻造成更严重的损伤。

2.6 *Vm* 117-T6 胞外物不同处理对赤潮异弯藻的溶藻效果

对 *Vm* 117-T6 胞外物进行不同处理, 并检测其产物的溶藻活性。结果显示, 作用 24 h 后, 与未经处理的胞外物溶藻率 ($41.84\% \pm 2.05\%$) 相比, 石油醚水相、碳吸附和高温处理样本的都检测到

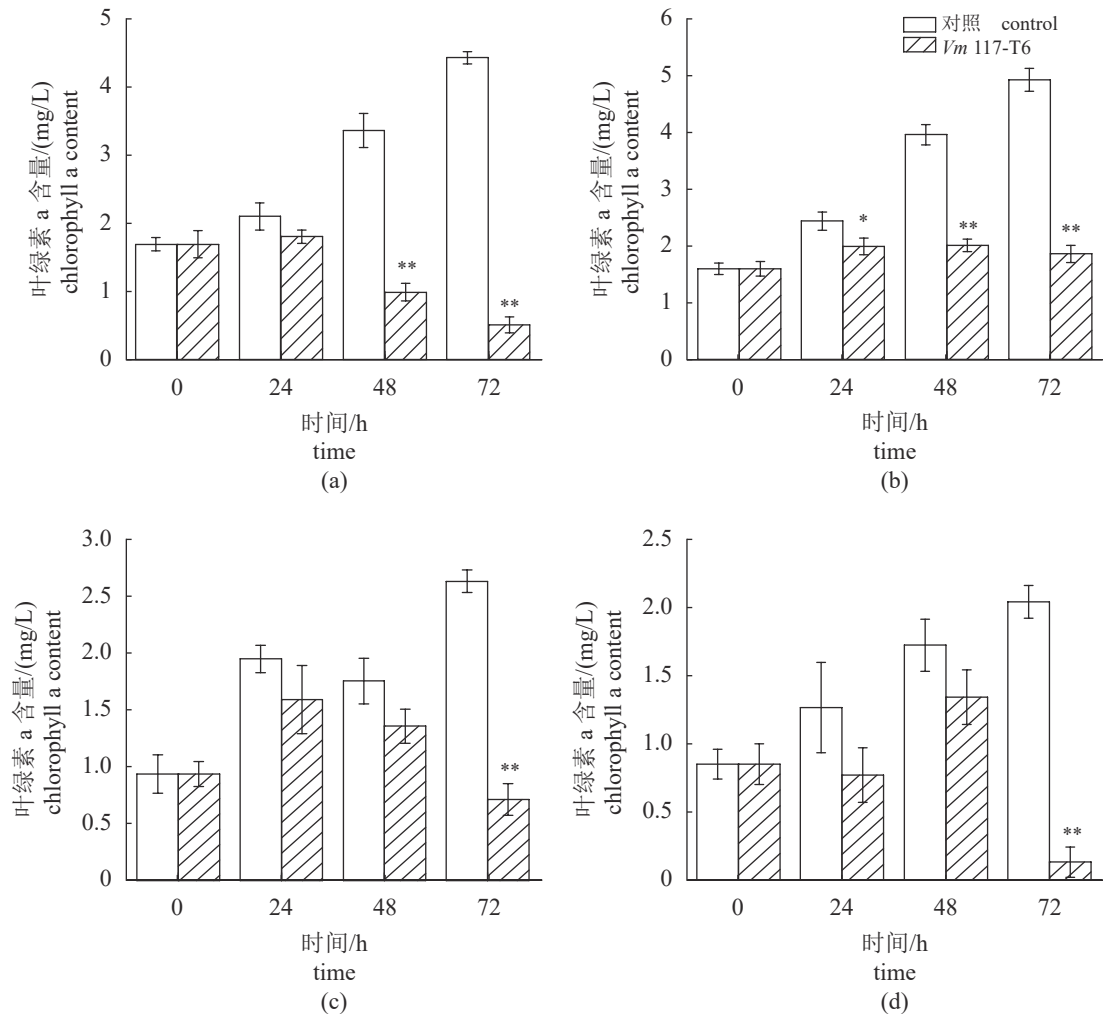


图2 *Vm 117-T6* 感染 72 h 对不同微藻叶绿素 a 含量的影响

(a) 赤潮异弯藻, (b) 颗石藻, (c) 叉鞭金藻, (d) 东海原甲藻; 对照. 未经感染的微藻, *Vm 117-T6*. 感染 *Vm 117-T6* 的微藻; “*”表示同一时间点不同处理之间差异显著 ($P<0.05$), “**”表示同一时间点不同处理之间差异极显著 ($P<0.01$).

Fig. 2 Effect of 72 h *Vm 117-T6* infection on the chlorophyll a content of different microalgae

(a) *H. akashiwo*, (b) *P. carterae*, (c) *D. inornata*, (d) *P. donghaiense*; control. uninfected microalgae, *Vm 117-T6*. uninfected microalgae; “*” means the difference between different treatments is significant ($P<0.05$), “**” means the difference between different treatments is extremely significant ($P<0.01$).

较高溶藻率, 分别为 $44.77\% \pm 2.39\%$ 、 $41.83\% \pm 1.91\%$ 和 $41.90\% \pm 1.79\%$, 四者之间无显著性差异 ($P>0.05$) (图 5)。乙酸乙酯水相、乙醇溶解相与沉淀相的溶藻率分别为 $32.64\% \pm 1.56\%$ 、 $22.77\% \pm 2.56\%$ 、 $35.67\% \pm 2.79\%$, 显著低于未处理的胞外物溶藻活性 ($P<0.05$), 但此三者之间差异不显著 ($P>0.05$)。胞外物的石油醚相或者乙酸乙酯相的溶藻率均为负值, 与正常培养的藻类无显著性差异 ($P>0.05$), 表示此二者不具溶藻活性。由此可知, *Vm 117-T6* 胞外溶藻物的特性: 易溶于水, 不溶于石油醚和乙酸乙酯, 具较强极性; 耐高温, 不易被活性炭吸附, 乙醇处理会降低溶藻活性。

2.7 *Vm 117-T6* 不同条件下差异蛋白的分析

分析易感条件与常规条件下 *Vm 117-T6* 胞内物和胞外物的蛋白差异, 结果发现分子量为 37 和 40 ku 的蛋白质条带变化最显著 (图 6)。这些蛋白条带均注释到地中海弧菌 OX, 而且其中含有较多分泌蛋白结合蛋白 (表 1), 如 ABC 转运蛋白的结合蛋白, 外膜蛋白 TolC、OmpA, II 型及 VI 型分泌系统的结合蛋白。除 RTX toxin 蛋白外, 胞外蛋白中未发现与已知溶藻物质相关的蛋白质和肽段。

综上, 我们推测 *Vm 117-T6* 的溶藻毒力因子中应含有极性内毒素类物质, 此外, 与毒性因子

转运、分泌以及细胞黏附相关的转运蛋白等蛋白质在其毒力作用中也发挥了重要功能。这说明多种溶藻机制参与了 *Vm* 117-T6 的溶藻过程。

3 讨论

细菌可以通过直接溶藻、间接溶藻、或是通过营养竞争的方式使藻细胞死亡^[16]。直接溶藻, 即细菌直接接触藻体进行攻击, 甚至侵入藻细胞内部, 杀死藻细胞^[17]。Li 等^[18]从福建厦门水域分离得到了一株几丁质单胞菌属细菌 (*Chitinimonas prasine* LY03), 其可通过鞭毛黏附在假微型海链

藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 的藻细胞上, 产生几丁质酶降解藻细胞壁, 最终导致藻细胞死亡。果胶、卡拉胶、纤维素和几丁质是藻类细胞壁的重要成分。部分溶藻细菌的溶藻活性与果胶酶^[19]、 β -葡萄糖苷酶、几丁质酶^[20]、纤维素酶^[21]等有关。在本研究中, *Vm* 117-T6 可降解卡拉胶, 但不能降解果胶、纤维素和几丁质等物质。由于卡拉胶并非本研究的几种微藻细胞壁的主要成分^[22], 因此, 推测 *Vm* 117-T6 对本研究中几种微藻的溶解作用并非作用于这些藻类的细胞壁。

间接溶藻作用是近年来文献报道最多的细菌溶藻方式。细菌通过分泌胞外溶藻化合物来攻击藻类细胞^[16]。本研究中 *Vm* 117-T6 的胞外溶藻化合物表现出较强的水溶性、耐高温、不易被活性炭吸附且被乙醇部分沉淀的特性。这表明 *Vm* 117-T6 的胞外溶藻物质中可能含有极性内毒素类物质。目前已报道的溶藻细菌可能分泌灵菌红素、鼠李糖脂、生物表面活性物质和抗生素等来抑制藻细胞生长或者杀死藻细胞^[9,18,23]。Wang 等^[24]发现鼠李糖脂可降低藻细胞活性, 改变藻体形状, 长时间处理会导致藻类产生白色絮状沉淀^[25]。这与本研究中 *Vm* 117-T6 对赤潮异弯藻的作用相似。*Vm* 117-T6 的胞外溶藻物质具体为何, 仍需进一步查证。

藻体形态显示, 菌体感染会比胞外物感染造成藻细胞更大的损伤, 因此, 菌株的毒力除了胞外物质还应该包括其他毒力因子的参与。本研究

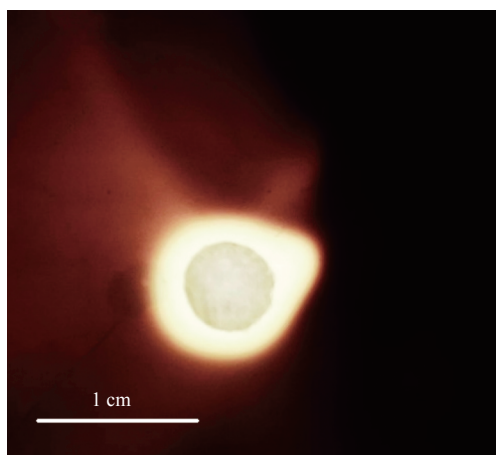


图3 *Vm* 117-T6 在卡拉胶固体培养基上的水解圈

Fig. 3 Hydrolysis zone of *Vm* 117-T6 on carrageenan solid medium

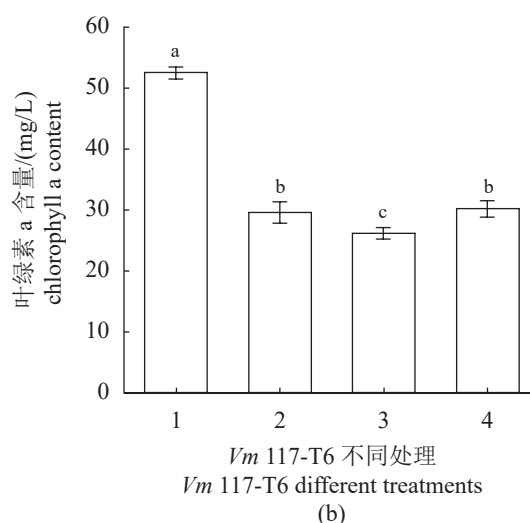
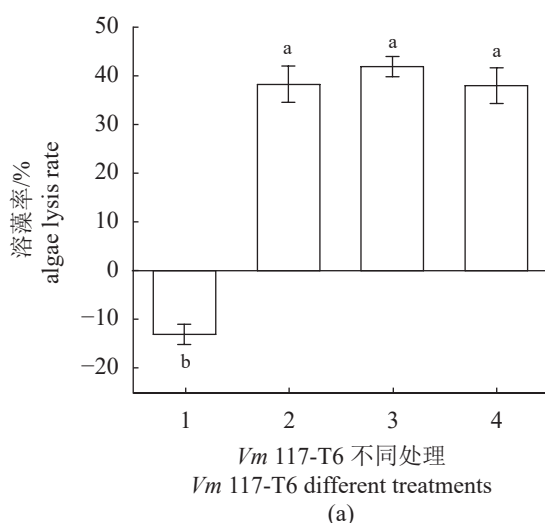
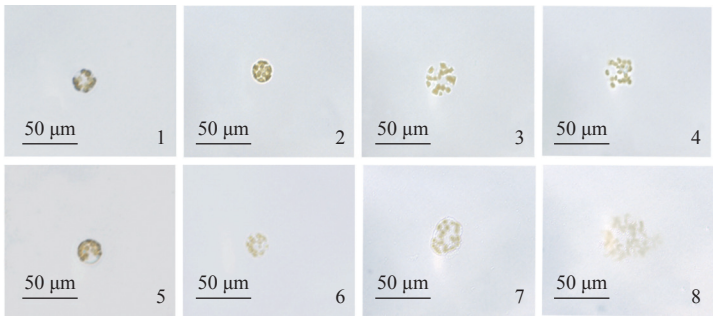


图4 *Vm* 117-T6 胞内物、胞外物及菌体作用 24 h 对赤潮异弯藻的溶藻率的影响

1. Ck, 2. 胞内物, 3. 胞外物, 4. 菌体。

Fig. 4 Alginolytic effect of different microalgae-lysing components of *Vm* 117-T6 on *H. akashiwo* for 24 h

1. Ck, 2. intracellular enzyme (IS), 3. extracellular substance (ES), 4. bacteria (BAT).



图版 Vm 117-T6 胞外物和菌体感染对赤潮异湾藻细胞形态的影响

1. 胞外物感染 0 min, 2. 胞外物感染 40 min, 3. 胞外物感染 80 min, 4. 胞外物感染 120 min, 5. 菌体感染 0 min, 6. 菌体感染 40 min, 7. 菌体感染 80 min, 8. 菌体感染 120 min。

Plate Vm 117-T6 extracellular and bacterial infection of *H. akashiwo*

1. extracellular substance infection for 0 min, 2. extracellular substance infection for 40 min, 3. extracellular substance infection for 80 min, 4. extracellular substance infection for 120 min, 5. bacterial infection for 0 min, 6. bacterial infection for 40 min, 7. bacterial infection for 80 min, 8. bacterial infection 120 min.

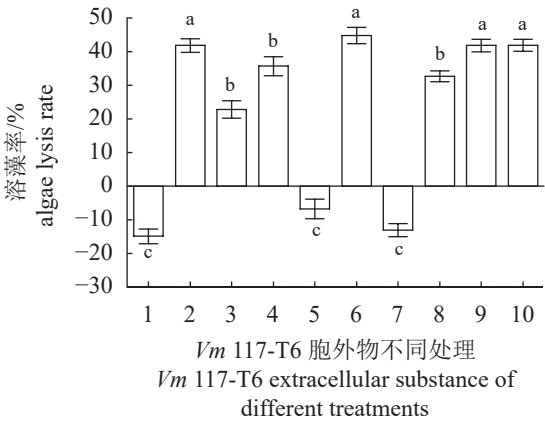


图 5 Vm 117-T6 胞外物不同处理产物作用 24 h 对赤潮异湾藻溶藻率的影响

1. Ck, 2. 胞外物, 3. 乙醇溶解相, 4. 乙醇沉淀相, 5. 石油醚相, 6. 石油醚水相, 7. 乙酸乙酯相, 8. 乙酸乙酯水相, 9. 碳吸附, 10. 高温。

Fig. 5 Effects of different treatment products of Vm 117-T6 extracellular substance on the algae lysis rate of *H. akashiwo* in 24 h

1. Ck, 2. extracellular substance, 3. ethanol dissolution phase, 4. ethanol precipitation phase, 5. upper layer of petroleum ether, 6. lower layer of petroleum ether, 7. upper layer of ethyl acetate, 8. lower layer of ethyl acetate, 9. carbon adsorption, 10. high temperature.

中, *Vm* 117-T6 在易感条件下差异最大的蛋白质主要为 ABC 转运蛋白、外膜蛋白以及少量 RTX toxin。这些蛋白或多肽是许多致病菌的毒力因子, 也是很多细菌溶藻的重要手段。目前已报道的溶藻蛋白一般为分子量约为 10 ku 的小分子分泌蛋白^[26-28]。Banin 等^[28]发现一种使珊瑚褪色的施罗氏弧菌 (*V. shilonii*), 能分泌多肽降低共生虫黄藻细

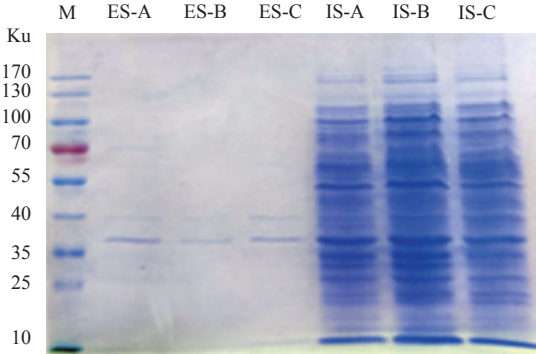


图 6 Vm 117-T6 胞内物和胞外物蛋白电泳图谱

M. 蛋白质分子量标准; ES (extracellular substance) 为 *Vm* 117-T6 胞外物, IS (intracellular substance) 为 *Vm* 117-T6 胞内物; ES-A 和 IS-A 的培养条件为 30 °C、pH 6.0、盐度 20, ES-B 和 IS-B 的培养条件为 26 °C、pH 6.0、盐度 20, ES-C 和 IS-C 的培养条件为 30 °C、pH 7.0、盐度 20。

Fig. 6 Vm 117-T6 intracellular and extracellular protein electrophoresis pattern

M. marker 170; ES (extracellular substance), *Vm* 117-T6 extracellular substance, IS (intracellular substance), *Vm* 117-T6 intracellular substance; culture conditions of ES-A and IS-A are 30 °C, pH 6.0, salinity 20, culture conditions of ES-B and IS-B are 26 °C, pH 6.0, salinity 20, culture conditions of ES-C and IS-C are 30 °C, pH 7.0, salinity 20.

胞内的 pH, 从而阻碍藻细胞的光合作用。该细菌后被证实为地中海弧菌的同物异名^[29]。郑宁宁^[26]于丛毛单胞科 (Comamondaceae) 细菌 WR11 溶藻过程中发现, 其外膜蛋白、ABC 转运蛋白、II 型分泌系统蛋白表达显著高于突变株 M20。海洋杀藻细菌 (*Hahella* sp. KA22) 分泌的灵菌红素可诱导活性氧 (ROS) 产生, 通过特定的 ABC 转运蛋白刺激藻细胞, 使其光合系统紊乱, 达到杀死藻细胞

表 1 *Vm* 117-T6 溶藻蛋白鉴定结果分析

Tab. 1 Identification and protein annotation of lysing proteins in pathogenic <i>Vm</i> 117-T6		
主蛋白的识别号 the identification no. of the main protein	蛋白简称 protein abbreviation	蛋白质注释信息 protein annotation information
A0A2C9PCN7	A0A2C9PCN7_9VIBR	iron ABC transporter substrate-binding protein OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=BSZ05_08760 PE=4 SV=1
A0A2C9P9F4	A0A2C9P9F4_9VIBR	amino acid ABC transporter substrate-binding protein OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=BSZ05_06335 PE=4 SV=1
A0A2S9ZMV2	A0A2S9ZMV2_9VIBR	outer membrane channel protein TolC OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=tolC PE=4 SV=1
A0A3G4VIQ9	A0A3G4VIQ9_9VIBR	RTX toxin OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=ECB94_25995 PE=4 SV=1
A0A3G4VE07	A0A3G4VE07_9VIBR	OmpA family protein OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=ECB94_13480 PE=4 SV=1
A0A3G4VCD8	A0A3G4VCD8_9VIBR	Tol-Pal system protein TolB OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=tolB PE=3 SV=1
A0A2C9PE11	A0A2C9PE11_9VIBR	OmpA-like domain-containing protein OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=BSZ05_15070 PE=4 SV=1
A0A3G4VH42	A0A3G4VH42_9VIBR	iron transporter OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=ECB94_20595 PE=4 SV=1
A0A2C9PE96	A0A2C9PE96_9VIBR	type VI secretion system-associated lipoprotein OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=BSZ05_15755 PE=4 SV=1
A0A2S9ZN80	A0A2S9ZN80_9VIBR	outer membrane protein assembly factor BamD OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=bamD PE=3 SV=1
A0A2S9ZKJ4	A0A2S9ZKJ4_9VIBR	toxin-antitoxin system YwqK family antitoxin OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=COR51_18005 PE=4 SV=1
A0A3G4VJP7	A0A3G4VJP7_9VIBR	amino acid ABC transporter substrate-binding protein OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=ECB94_23425 PE=4 SV=1
A0A2S9ZI35	A0A2S9ZI35_9VIBR	flagellin OS= <i>Vibrio mediterranei</i> OX=689 GN=COR51_22580 PE=3 SV=1

的目的^[30]。ABC 转运蛋白作为重要的跨膜转运蛋白，以主动转运和单向转运的方式实现多种分子的跨膜运输^[31]。

TolC 蛋白在很多革兰氏阴性菌中参与了毒力因子的分泌^[32]，通过调节病原菌的环境刺激耐受能力，增强其定殖活性，从而对病原菌进行致病力调控^[33]。RTX toxin 是一种重要的毒力因子，在众多致病革兰氏阴性菌的细胞活性中起重要作用^[34]。吴寒华等^[35]在新型海杆菌 (*Marinobacter*) 菌株 YWL01 的基因组中不仅检测到 LuxR 同系物、RTX 毒素同系物，同时也检测到了编码外膜蛋白 TolC 的基因。在 *Vm* 117-T6 的胞外蛋白中也检测到外膜蛋白 TolC 和 RTX toxin 等序列。同时，在 *Vm* 117-T6 胞外物的蛋白组分中存在革兰氏阴性菌中介导细菌杀伤作用的 VI 型分泌系统^[36]的结合蛋白以及参与细菌定殖宿主的过程，与细菌运动性、黏附性、以及毒力相关的外膜蛋白 OmpA^[37]和鞭毛蛋白 Flagellin OS。

综上，*Vm* 117-T6 是一株广谱的活性较强的溶藻细菌，其毒力作用物中含有水溶性强且热稳定的内毒素类物质，且转运蛋白、外膜蛋白以及与细菌定植相关的蛋白可能也在其毒力中发挥重要作用。推测多种溶藻机制参与该菌株的溶藻过程。该菌株的胞外分泌物中含有极性性强且热稳

定的溶藻物质，可能是其感染性强^[12-13]、传播速度快的重要原因。

自 2000 年以来，我国近海大规模赤潮不断出现，并呈现出多样化、小型化和有害化的演变趋势，对沿海地区社会经济发展和生态系统健康构成严重威胁^[38]。有研究发现，在赤潮生消的过程中，细菌、病毒等海洋微生物的丰度会发生较大变化，从侧面验证了赤潮的消亡很大程度上与细菌有着密切的关系^[2,39]。溶藻细菌作为水生生态系统中种群结构和功能的重要组分，对维持藻的生物量平衡具有非常重要的作用^[16,40]。本研究中，*Vm* 117-T6 对赤潮异弯藻、东海原甲藻、叉边金藻和颗石藻等微藻均具有溶藻活性，也从另一个方面显示该菌株生态功能的多样性。是否能够将该菌株开发成抑制赤潮的安全性功能菌株值得进一步探究。

（作者声明本文无实际或潜在的利益冲突）

参考文献 (References):

[1] 邓建明, 陶勇, 李大平, 等. 溶藻细菌及其分子生物学研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(6): 895-900.
Deng J M, Tao Y, Li D P, et al. Advances in research of algicidal bacteria[J]. Chinese Journal of Applied and
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Environmental Biology, 2009, 15(6): 895-900 (in Chinese).
- [2] 李东, 李伟, 郑天凌. 海洋溶藻功能菌作用机理研究的若干进展[J]. 地球科学进展, 2013, 28(2): 243-252.
- Li D, Li Y, Zheng T L. Advance in the research of marine algicidal functional bacteria and their algicidal mechanism[J]. Advances in Earth Science, 2013, 28(2): 243-252 (in Chinese).
- [3] 吴刚, 席宇, 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.
- Wu G, Xi Y, Zhao Y J. The latest development of research on algae-lysing bacteria[J]. Research of Environmental Sciences, 2002, 15(5): 43-46 (in Chinese).
- [4] Yang J, Qiao K, Lv J P, et al. Isolation and identification of two algae-lysing bacteria against *Microcystis aeruginosa*[J]. Water, 2020, 12(9): 2485.
- [5] 李杰, 牟宗娟, 杨慧超, 等. 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)绿斑病病原菌的分离鉴定[J]. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 140-146.
- Li J, Mou Z J, Yang H C, et al. Isolation and identification the pathogen of *Pyropia yezoensis* green spot disease[J]. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(4): 140-146 (in Chinese).
- [6] 黄林彬, 严兴洪. 紫菜叶状体的红烂病研究[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(2): 226-231.
- Huang L B, Yan X H. Study on the red-rotting disease of *Porphyra blades*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(2): 226-231 (in Chinese).
- [7] 严兴洪, 黄林彬, 周晓, 等. 坛紫菜叶状体的细菌性红烂病研究[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 313-322.
- Yan X H, Huang L B, Zhou X, et al. Study on a bacterial red-rotting disease of *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 313-322 (in Chinese).
- [8] Wang B X, Zhou Y Y, Bai S J, et al. A novel marine bacterium algicidal to the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(5): 552-557.
- [9] Jeong S Y, Ishida K, Ito Y, et al. Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*[J]. Tetrahedron Letters, 2003, 44(43): 8005-8007.
- [10] Guo X L, Liu X L, Wu L S, et al. The algicidal activity of *Aeromonas* sp. strain GLY-2107 against bloom-forming *Microcystis aeruginosa* is regulated by *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(11): 3867-3883.
- [11] Li J W, Dong S, Song J, et al. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524[J]. Marine Drugs, 2011, 9(1): 109-123.
- [12] 徐梦雅, 杨锐, 刘棋琴, 等. *Vibrio mediterranei* 117-T6 引发的坛紫菜黄斑病的初步研究[J]. 水产学报, 2020, 44(4): 661-671.
- Xu M Y, Yang R, Liu Q Q, et al. Yellow spot disease in *Pyropia* species infected by *Vibrio mediterranei* 117-T6[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(4): 661-671 (in Chinese).
- [13] Yang R, Liu Q Q, He Y Y, et al. Isolation and identification of *Vibrio mediterranei* 117-T6 as a pathogen associated with yellow spot disease of *Pyropia* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. Aquaculture, 2020, 526: 735372.
- [14] 史广宇, 尹华, 叶锦韶, 等. 铜绿假单胞菌胞内酶粗提液对十溴联苯醚的降解[J]. 环境科学, 2013, 34(4): 1517-1523.
- Shi G Y, Yin H, Ye J S, et al. Biodegradation of decabromodiphenyl ether by intracellular enzyme obtained from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Environmental Science, 2013, 34(4): 1517-1523 (in Chinese).
- [15] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 359-362.
- [16] 焦彦凯, 严小军, 李小兵. 溶藻细菌及溶藻化合物研究进展[J]. 工业微生物, 2018, 48(4): 56-62.
- Jiao Y K, Yan X J, Li X B. Advances in research of algicidal bacteria and algae-lysing compounds[J]. Industrial Microbiology, 2018, 48(4): 56-62 (in Chinese).
- [17] 汪辉. 溶藻细菌对水华与赤潮微藻的抑制效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- Wang H. Inhibiting effects of algae-lysing bacteria on water bloom and red tide alga[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [18] Li Y, Zhu H, Lai Q L, et al. *Chitinimonas prasina* sp. nov., isolated from lake water[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt_9): 3005-3009.
- [19] Kumazawa N H, Fukuma N, Komoda Y. Attachment of *Vibrio parahaemolyticus* strains to estuarine algae[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 1991, 53(2): 201-5.

- [20] 王新, 周立红, 郑天凌, 等. 塔玛亚历山大藻藻际细菌溶藻过程[J]. *生态学报*, 2007, 27(7): 2864-2871.
Wang X, Zhou L H, Zheng T L, *et al.* Lysis of *Alexandrium tamarense* mediated by bacteria in its phycosphere[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(7): 2864-2871 (in Chinese).
- [21] 江晓. 糙刺 (*Stichopus horrens*) 参肠道溶藻细菌的研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2014.
Jiang X. A study on algicidal bacteria isolated from the intestine of *Stichopus horrens*[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2014 (in Chinese).
- [22] 胡亚芹, 竺美. 卡拉胶及其结构研究进展[J]. *海洋湖泊通报*, 2005, 27(1): 94-102.
Hu Y Q, Zhu M. Study progress of carrageenans and their structure[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2005, 27(1): 94-102 (in Chinese).
- [23] Kawano Y, Nagawa Y, Nakanishi H, *et al.* Production of thiotropocin by a marine bacterium, *Caulobacter* sp. and its antimicrobial activities[J]. *Journal of Marine Biotechnology*, 1997, 5(4): 225-229.
- [24] Wang X L, Gong L Y, Liang S K, *et al.* Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Harmful Algae*, 2005, 4(2): 433-443.
- [25] 陈延君, 王红旗, 王然, 等. 鼠李糖脂对微生物降解正十六烷以及细胞表面性质的影响[J]. *环境科学*, 2007, 28(9): 2117-2122.
Chen Y J, Wang H Q, Wang R, *et al.* Effects of rhamnolipid on the biodegradation of n-hexadecane by microorganism and the cell surface hydrophobicity[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(9): 2117-2122 (in Chinese).
- [26] 郑宁宁. 一株丛毛单胞菌科细菌对铜绿微囊藻抑制作用的研究 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2019.
Zheng N N. A study of the inhibition of *Microcystis aeruginosa* by a comamonadaceae bacteria[D]. Wuhan: Central China Normal University, 2019 (in Chinese).
- [27] 石新国, 李悦, 肖宇淳, 等. 中肋骨条藻高效溶藻菌 FDHY-C3 的分离鉴定及溶藻作用研究[J]. *海洋环境科学*, 2021, 40(1): 114-121.
Shi X G, Li Y, Xiao Y C, *et al.* Isolation and identification of a high efficiency algicidal bacterium FDHY-C3 and algicidal characteristics on *Skeletonema costatum*[J]. *Marine Environmental Science*, 2021, 40(1): 114-121 (in Chinese).
- [28] Banin E, Khare S K, Naider F, *et al.* Proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of *Zooxanthellae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1536-1541.
- [29] Thompson F L, Hoste B, Thompson C C, *et al.* The coral bleaching *Vibrio shiloi* Kushmaro *et al.* 2001 is a later synonym of *Vibrio mediterranei* pujalte and garay 1986[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(4): 516-519.
- [30] Yang K, Chen Q L, Zhang D Y, *et al.* The algicidal mechanism of prodigiosin from *Hahella* sp. KA22 against *Microcystis aeruginosa*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 7750.
- [31] 刘艳青, 赵永芳. ABC转运蛋白结构与转运机制的研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(3): 223-229.
Liu Y Q, Zhao Y F. Structure and mechanism of ABC transporter[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2017, 29(3): 223-229 (in Chinese).
- [32] Weng Y, Fields E G, Bina T F, *et al.* *Vibrio cholerae* TolC is required for expression of the ToxR regulon[J]. *Infection and Immunity*, 2021, 89(10).
- [33] 李英. 胸膜肺炎放线杆菌 TolC 同源蛋白的功能鉴定及其毒力机制研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2017.
Li Y, The mechanisms of TolC homologs involved in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [34] Lally E T, Hill R B, Kieba I R, *et al.* The interaction between RTX toxins and target cells[J]. *Trends in Microbiology*, 1999, 7(9): 356-361.
- [35] 吴寒华, 李登峰, 严小军, 等. 一株海杆菌的溶藻活性及基于基因组的溶藻机理分析[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2017, 30(1): 23-28.
Wu H H, Li D F, Yan X J, *et al.* Algicidal activity of *Marinobacter* sp. YWL01 and algicidal mechanism analysis based on its genome sequence[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2017, 30(1): 23-28 (in Chinese).
- [36] 杨震. 溶藻弧菌中VI型分泌系统对细菌的毒力调控机制 [D]. 上海: 华东理工大学, 2018.
Yang Z. Virulence regulation mechanism of type VI secretion systems in *Vibrio alginolyticus*[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2018 (in Chinese).
- [37] 白雪瑞, 王权, 陈永军, 等. 副溶血弧菌 *ompA* 基因缺失株的生物学特性及致病性分析[J]. *南京农业大学学报*, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 2018, 41(5): 902-910.
- Bai X R, Wang Q, Chen Y J, *et al.* Biological characteristics and pathogenicity of an *ompA* mutant of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(5): 902-910 (in Chinese).
- [38] 于仁成, 吕颂辉, 齐雨藻, 等. 中国近海有害藻华研究现状与展望[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(4): 768-788.
- Yu R C, Lv S H, Qi Y Z, *et al.* Progress and perspectives of harmful algal bloom studies in China[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(4): 768-788 (in Chinese).
- [39] Imai I, Kim M C, Nagasaki K, *et al.* Relationships between dynamics of red tide-causing raphidophycean flagellates and algicidal micro-organisms in the Coastal Sea of Japan[J]. *Phycological Research*, 1998, 46(2): 139-146.
- [40] 郑宁宁, 孙丽, 丁宁, 等. 有害微藻抑藻细菌多样性及抑藻机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1204-1219.
- Zheng N N, Sun L, Ding N, *et al.* Diversity of algicidal bacteria associated with harmful microalgae and the algicidal mechanisms[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1204-1219 (in Chinese).

Algae-lysing activity of *Vibrio mediterranei* 117-T6

SHI Hanmeng^{1,2}, HONG Fan^{1,2}, DAI Yingfen^{1,2}, XU Mengya^{1,2}, YANG Rui^{1*}

(1. Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Many algal pathogens have a broad spectrum of algae-lysing activity. In order to verify whether *Vibrio mediterranei* 117-T6 (*Vm* 117-T6) has broad-spectrum algicide properties, this paper observed its algal lysis on *Heterosigma akashiwo*, *Pleurochrysis carterae*, *Dirateria inornata* and *Prorocentrum donghaiense*, and the characteristics of the algae-lysing substances were analyzed. In this study, *Vm* 117-T6, a pathogenic bacterium for the yellow spot disease of *Pyropia*, showed a broad-spectrum algae-lysing activity. It exhibited strong algae-lysing activity to *H. akashiwo*, *P. carterae*, *D. inornata* and *P. donghaiense*, which significantly reduces the chlorophyll content of these microalgae. *Vm* 117-T6 can also reduce the motility of *H. akashiwo* within 40 min, inhibit photosynthesis, cause algal lysis and produce white flocculent precipitates after infection over the 120 min. *Vm* 117-T6 can degrade carrageenan, but cannot degrade pectin, cellulose and chitin. The live bacterium, its intracellular and extracellular extracts showed strong microalgae-lysing activity. The extracellular algae-lysing compounds were easily soluble in water, insoluble in petroleum ether and ethyl acetate, which indicated strong polarity. It was resistant to high temperature, and was not easily adsorbed by activated carbon. Ethanol treatment reduced the lysing-algae activity. There were a large amount of ABC transporter, outer membrane protein, flagellin and a small amount of toxin in the key differential proteins under conventional and susceptible conditions. The results indicate that *Vm* 117-T6 does not dissolve algae through cell wall degradation, and the virulence effectors of *Vm* 117-T6 contain endotoxins, and the proteins related to the transport, secretion and cell adhesion may play an important role in the virulence of *Vm* 117-T6. This paper provides evidence for the analysis of the algae-lysing mechanism of this strain, and also lays a foundation for the prevention and control of this strain.

Key words: *Vibrio mediterranei* 117-T6; algae-lysing bacteria; algae lysis; *Heterosigma akashiwo*

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

Funding projects: Nature Science Foundation of Zhejiang Province (LY22C190002); National Natural Science Foundation of China (32273155); Ningbo Science and Technology Innovation Major Special Project (2021Z004, 2021Z014); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-50)