

一株溶藻菌的分离、鉴定及其溶藻物质的研究

汪 辉,刘兆普*,魏 微,赵耕毛,刘兴国 (南京农业大学海洋生物学江苏省重点实验室,江苏 南京 210095)

摘要: 从青岛市黄岛边的某富营养化池塘中分离得到 1 株具有溶藻能力的细菌,命名为 YZ.通过生理生化及 16S rRNA 序列对比分析鉴定,YZ 菌株属于无色杆菌属(*Achromobacter*).该株细菌能够有效地溶解铜绿微囊藻、小球藻和栅藻.YZ 的菌体过滤液经高温灭菌以及蛋白酶 K 处理后,能强烈抑制铜绿微囊藻的生长.而 YZ 菌体悬液对微囊藻无溶解作用,因此可推断 YZ 菌株的溶藻因子,是一种菌体胞外分泌的非蛋白类、具有热稳定性的物质.YZ 处理过的铜绿微囊藻溶液中的丙二醛含量有较大提高,说明藻发生了膜脂过氧化.

关键词: 溶藻细菌 YZ; 溶藻特性; 微囊藻; 16S rRNA

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2008)05-0461-05

Studies of separation and appraisal of an algae-lysing bacteria and its dissolved algae matter. WANG Hui, LIU Zhao-pu*, WEI Wei, ZHAO Geng-mao, LIU Xing-guo (Key Laboratory of Marine Biology of Jiangsu Province, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China). *China Environmental Science*, 2008,28(5): 461~465

Abstract: A bacterium possessing dissolved ability, which was separated from an eutrophic pond in the tide of Qingdao City was named as YZ. Through biophysics, biochemical and the analysis of its 16S rRNA sequence, the strain YZ was appraised as *Achromobacter* sp. The strain could effectively dissolve *Microcystis aeruginosa*, *Chlorella* and *Scenedesmus*. The growth of *Microcystis aeruginosa* was strongly inhibited by the strain's leaching liquid, which was treated by high temperature and protease K. However, the bacterium body of YZ had no effect on the growth of algae, indicating that the dissolved algae matter produced by this strain was of extracellular and thermo-stable. The malondialdehyde content of the tested algae significantly increased, suggesting an enhancement of the lipid peroxidation of the cellular membrane of the algae.

Key words: algae-lysing bacteria; dissolved algae character; *Microcystis aeruginosa*; 16S rRNA

由于近海水体富营养化导致藻类过量繁殖,造成水华的出现,严重影响了水域生态系统的安全以及附近居民的生活健康^[1].由于物理、化学除藻法均不能达到理想的效果,近几年利用溶藻细菌进行控藻,引起了国内外学者的广泛关注^[2-4].微囊藻是形成水华的主要藻类,因其在生长过程中分泌毒素,对动物和人体存在一定危害^[5].作者从青岛市黄岛区某富营养化池塘中筛选出 1 株溶藻细菌 YZ,研究了它对淡水铜绿微囊藻的溶藻效果及溶藻特性;并通过生理生化和 16S rDNA 测序分析,鉴定该菌为无色杆菌属.本实验对 YZ 的溶藻方式进行了探讨和研究,为进一步探讨研究溶藻菌提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种及其培养 选用蓝藻中的铜绿微

囊藻(*Microcystis aeruginosa*)FACHB469,绿藻(*Chlorophyta*)中的小球藻(*Chlorella*) NC64A、栅藻(*Scenedesmus*)FACHB416,均来源于中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心.藻种经活化后,在 25℃,光照强度为 2500lx 及光暗比为 12h : 12h 条件下培养.

1.1.2 培养基 溶藻细菌的富集培养采用牛肉膏蛋白胨培养基^[6]:牛肉膏 3g,蛋白胨 10g,NaCl5g,蒸馏水 100mL (固体培养基加入 20g 琼脂,用于溶藻细菌的分离). LB 培养基^[6]:蛋白胨 10g,酵母提取物 5g,NaCl 5g,蒸馏水 100mL.用于对分离出来的细菌进行生理生化及 16S rRNA 检测.藻类的培养采用 BG11 改良培养基^[7]: NaNO₃ 150mg, K₂HPO₄ 4mg, MgSO₄·7H₂O 7.5mg, CaCl₂·2H₂O

收稿日期: 2007-08-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30600086)

* 责任作者, 教授, sea@njau.edu.cn

3.6mg, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 5.8mg, 柠檬酸 0.6mg, 柠檬酸铁铵 0.6mg, EDTA 0.1mg, Na_2CO_3 2mg, A_5 溶液 0.1mL, 蒸馏水 99.9mL. A_5 溶液: H_3BO_3 286mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 181mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7.9mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.9mg, 蒸馏水 100mL.

1.2 方法

1.2.1 溶藻细菌的分离

从青岛黄岛边某富营养化池塘中采集水样,按 10%的比例接入预培养 14d 的铜绿微囊藻,于 25℃混合培养 7d.7d 后将黄化的藻液作为分离溶藻菌的材料,取黄化藻液按不同浓度梯度稀释,平板涂布,30℃培养 48h 后,划线分离,获得纯培养的菌株 YZ.将分离获得的菌株,进行溶藻实验以确定其溶藻效果.

1.2.2 溶藻细菌的鉴定

生理生化鉴定参照文献[8];16S rRNA 序列分析:按 Pitcher 法提取细菌的基因组总 DNA;以提取的 DNA 为模板,采用通用引物(正向 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向 1495R: 5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3')进行 16S rRNA 基因扩增.反应条件:96℃预变性 5min;95℃变性 30s;52℃退火 1min 30s;72℃延伸 1min 30s;30 个循环,延伸 10min. PCR 产物经检测纯化后,直接用 Taq DyeDeoxy Terminator cycle Sequencing Kit 测序.电泳及数据收集用 Applied Biosystems DNA Sequences (model 377)自动进行,将所测的 16S rRNA 基因序列经校对后,在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比较.

1.2.3 溶藻细菌生长曲线的测定

取 60mL LB 液体培养基于 250mL 三角瓶中,用无菌吸管吸取 2.5mL 培养 18h 的溶藻菌培养液于三角瓶中,将其置于摇床中振荡培养,培养温度 30℃,转速 150r/min.其生长曲线的测定参照文献[9].

1.2.4 溶藻试验

将 3 种受试藻分别培养至其对数生长期,再将菌株 YZ 于 30℃培养 36h 后(此时细菌数达到 10^8 个/mL),按 10%的接种量分别接种至这 3 种水华藻中,设空白对照(CK),定时观察,测定受试藻的叶绿素 a 含量;并在接种菌株 4d 后,吸取藻液在荧光显微镜下观察藻细胞破碎情况.

1.2.5 丙二醛(MDA)含量的测定

丙二醛(MDA)含量通常被用来作为植物细胞膜脂过氧化的指标.取测试样品与硫代巴比妥酸(TBA)混合,研磨并离心后再加入 TBA,混匀物在沸水中反应 30min,冷却后再离心,取上清液测定其在 450, 532,600nm 处的光吸收值,计算出 MDA 浓度^[10].

1.2.6 菌液不同处理方式对铜绿微囊藻的影响

用蛋白酶 K 处理藻液:将 2mL 藻样接种于 98mL BG11 改良培养基中,培养至对数生长期(10 瓶);其中 5 瓶作为空白对照,另外 5 瓶每瓶加入 100μL 蛋白酶 K(100mg/mL)处理;每隔 4d 测 1 次 Chl a 含量,处理前测 1 次,共测 5 次.

将不加 YZ 菌株的藻纯培养液(CK)、YZ 菌株经 0.22μm 滤膜的过滤液(I)、高温处理过滤液后再用蛋白酶 K 处理的过滤液(II)、YZ 菌株经 0.22μm 滤膜的过滤后的菌体悬液(III)各 10mL,分别加入到 100mL 铜绿微囊藻藻液中进行溶藻试验,7d 后测定 Chl a 的下降量.

1.2.7 不同滤液浓度对溶藻效果的试验

根据溶藻方式试验的结果,将不同浓度的细菌滤液分别加入到铜绿微囊藻中,使滤液浓度为 0, 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 cfu/mL,培养条件同 1.1.1,且定时测量 Chl a 的含量,以计算溶藻效果^[11-12].

2 结果与讨论

2.1 YZ 菌株的鉴定结果

2.1.1 生理鉴定

菌株 YZ 为格兰氏阴性菌,菌落呈圆形、表面光滑半透明,无芽孢,在液体 LB 培养基中呈杆状,无运动特性;厌氧,不能进行硝酸盐还原反应;能够液化明胶,但不能水解淀粉;能够利用葡萄糖,柠檬酸盐,V-P 试验呈阴性,初步确定为无色杆菌属(*Achromobacter* sp.).

2.1.2 16S rRNA 序列分析及其分子鉴定

PCR 扩增产物的长度为 1.5kb,其电泳图谱见图 8.获得的 16S rRNA 基因序列已在 GenBank 注册,获得登录号为 EF617310.用 BLAST 程序搜索发现,YZ 菌株与多株无色杆菌的 16S rRNA 基因序列的相似性均在 99.8%以上.因此结合生理生化特性,鉴定 YZ 菌株属于无色杆菌属,命名为 *Achromobacter* sp. YZ.



图1 YZ PCR 扩增产物电泳图谱
Fig.1 The amplification of YZ 16S rDNA
M 为 marker;1 为 YZ 菌株

2.2 溶藻细菌 YZ 的生长曲线

图 2 为 YZ 菌在 LB 液体培养基中的生长曲线,由图 2 可见,YZ 菌株的停滞期在 3h 左右,3h 后进入对数生长期,28h 后菌体生长进入稳定期.

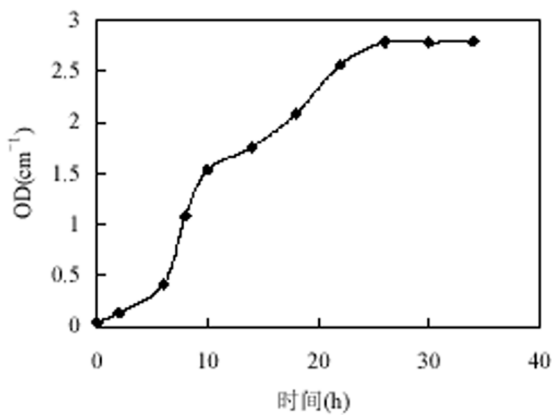


图2 YZ 菌的生长曲线
Fig.2 Growth curve of YZ

除从第 2d 才开始作用,12d 时去除率达到 64.74%.

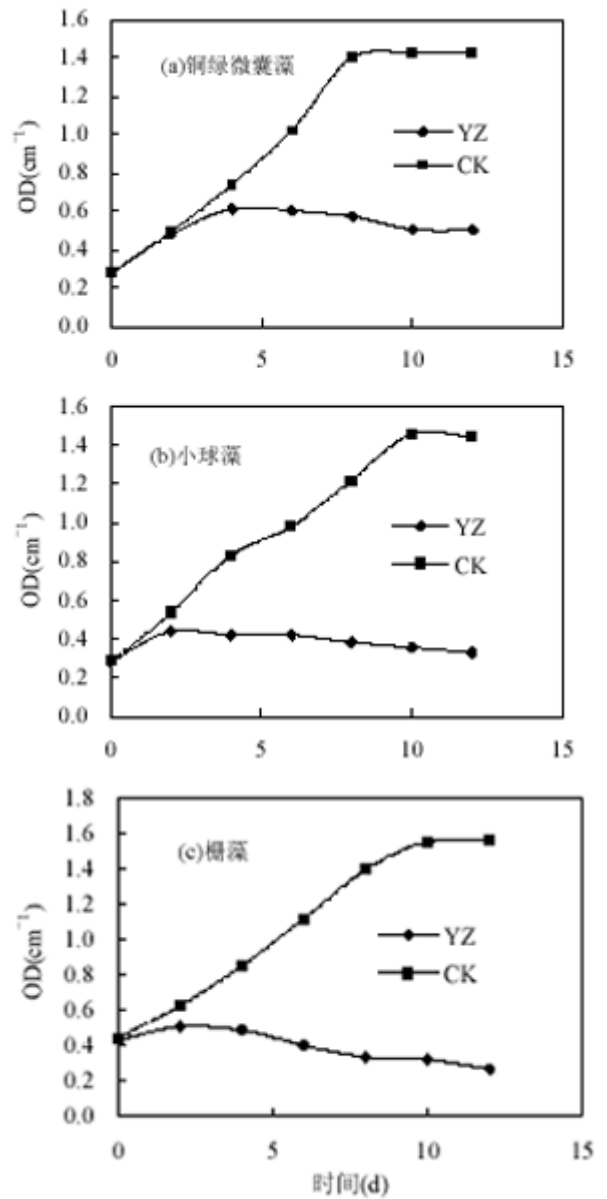


图3 YZ 菌株对 3 种藻的去除效果
Fig.3 Lytic effects of YZ on three kinds of algae
CK 为空白对照

2.3 YZ 菌株对于 3 种水华藻的液体溶解效果

YZ 菌株对 3 种水华藻的溶解效果如图 3 所示. Chl a 含量是植物生长状况的重要指标之一. 由图 3(a)可见,YZ 菌株对铜绿微囊藻的去除从一开始就产生作用,加入 YZ 菌株的铜绿微囊藻的 Chl a 含量一直呈下降趋势,通过计算,在第 12d 时,去除率达 83.19%.由图 3(b)可见,YZ 菌株对小球藻的去除也是从一开始就产生作用,接入菌株的藻液的 Chl a 含量也一直呈下降趋势,第 12d 时去除率达到 77.67%.由图 3(c)可见,YZ 菌株对栅藻的去

2.4 荧光显微镜下观察溶藻效果

图 4(a)为空白对照,图 4(b)为溶藻过程中藻类细胞的破碎图片.由图 4 可见,YZ 菌株能够使藻细胞破碎,胞内物质外流,导致藻细胞死亡.

2.5 丙二醛(MDA)含量的测定

接入 YZ 菌 7d 后,测量微囊藻中 MbA 含量变化.铜绿微囊藻藻液的 MbA 含量由 0.141 μ mol/L 上升到 0.252 μ mol/L,提高了 78.74%.MbA 含量的提高说明溶藻菌促使藻细胞发生了膜脂过氧化反应.

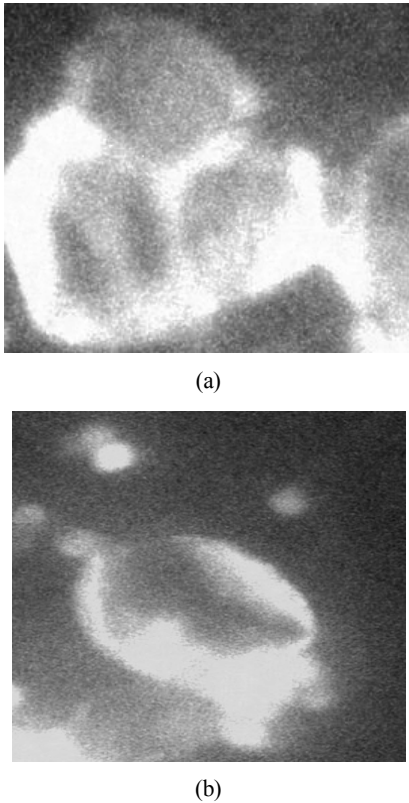


图 4 藻细胞的荧光显微镜照片(×1000)

Fig.4 Photos of algae cells under microscope(×1000)

2.6 菌液不同处理方式对铜绿微囊藻的影响

蛋白酶 K 对于微囊藻生长的影响结果(图 5)表明,加入蛋白酶 K 的 20d 内,CK 组的 Chl a 含量与蛋白酶 K 处理的藻液 Chl a 含量基本相当,说明蛋白酶 K 本身对微囊藻没有溶解作用.因此可以利用蛋白酶 K 处理细菌滤液,去除其中的蛋白质,而非采用普通的高温处理.溶藻实验中选用的蛋白酶 K 的浓度和用量,均是根据提取 DNA 与 RNA 去除蛋白质的用量计算得到^[13].

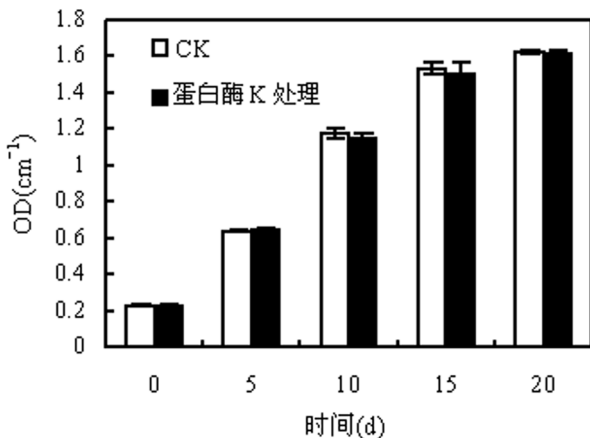


图 5 蛋白酶 K 对微囊藻的作用

Fig.5 Effects of proteinase K on *Microcystis aeruginosa*

由图 6 可见,YZ 菌株培养液经 0.22 μ m 滤膜过滤后,滤液中已不含菌体,滤液仍有溶藻作用,表明 YZ 菌释放的某种物质具有溶藻作用;滤液经蛋白酶 K 处理后对微囊藻也仍有溶解作用,证明菌体不是通过分泌蛋白质酶来溶藻的.

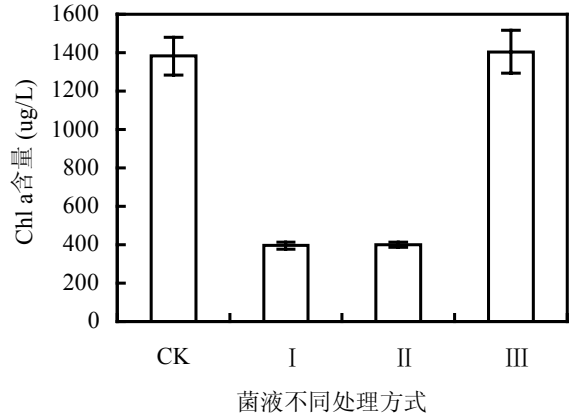


图 6 不同菌液处理方式的溶藻效果

Fig.6 Lytic effects of YZ bacteria liquids after being treated with different methods

CK 为不加 YZ 菌的藻纯培养液, I 为 YZ 菌株经 0.22 μ m 滤膜的过滤液, II 为高温处理过滤液后再用蛋白酶 K 处理的过滤液, III 为 YZ 菌株经 0.22 μ m 滤膜的过滤后的菌体悬液

2.7 YZ 不同滤液浓度对溶藻效果的影响

如图 7 所示,铜绿微囊藻的去除效果与细菌的滤液浓度有很大关系.总的趋势是溶藻菌滤液浓度越高,去除效果越好.4 种浓度处理的藻液 Chl a 的下降率分别为 61.88%、69.19%、80.91%和 85.44%.同时还发现,溶藻细菌需要一定的初始浓度,才具有溶藻效应.

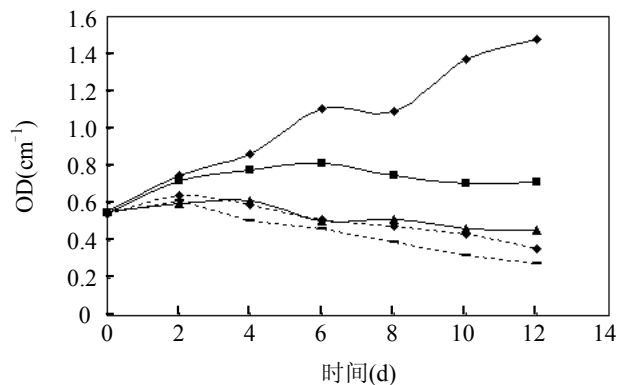


图 7 不同浓度细菌滤液对铜绿微囊藻的去除效果

Fig.7 Lytic effects of different concentration of YZ filtrate on *Microcystis aeruginosa*

◆—0 ■—10² ▲—10⁴ ●—10⁶ ×—10⁸

3 结论

3.1 细菌 YZ 经生理生化和 16S rRNA 鉴定,应为无色杆菌属.YZ 菌与铜绿微囊藻、小球藻和栅藻共培养,使得藻体的 Chl a 含量显著降低,光合效率下降,抑制 3 种藻的生长,甚至使藻死亡.

3.2 YZ 菌与铜绿微囊藻共培养,在 7d 时间内,使铜绿微囊藻 MDA 含量显著提高 78.74%.表明该菌对铜绿微囊藻细胞膜有着较强的破坏作用.

3.3 在对菌体过滤液进行高温处理之后,将适量蛋白酶 K 接入,以保证菌体过滤液中的蛋白质完全失活,从而证明了 YZ 细菌溶藻作用的因子既不是菌体本身,也不是该菌的胞外蛋白类分泌物,而是一种胞外具有很高热稳定性的非蛋白质类分泌物.

3.4 YZ 菌溶藻试验表明在一定浓度范围内,该菌溶藻效果随着共培养菌液浓度的增加而显著加强.

参考文献:

- [1] Junichi K, Junya A, Yoshinori M, et al. Development of a genetic transformation system for an alga-lysing bacterium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998,6:2061-2064.
- [2] Imai I, Sunahara T, Nishikawa T, et al. Fluctuations of the red tide flagellates *Chatonella* spp. (*Raphidophyceae*) and the algicidal bacterium *Cytophaga* sp. in the Seto Inland Sea, Japan [J]. Marine Biology, 2001,138:1043-1049.
- [3] 赵传鹏,浦跃朴,尹立红.溶藻细菌极其测定评价方法的研究进

- 展 [J]. 东南大学学报(医学版), 2005,24(3):202-206.
- [4] 彭超,吴刚,席宇,等.3 株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻效应 [J]. 环境科学研究, 2003,16(1):37-40.
- [5] Kaya K, Watanabe M W. Chemistry and toxicology of cyclic heptapeptide toxins, the microcystins, from cyanobacteria [J]. Microbiol. Cult.Coll., 1994,10:5-33.
- [6] 赵斌,何绍江.微生物学实验 [M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [7] 裴海燕,胡文容,曲音波.一株溶藻细菌的分离鉴定极其溶藻特性 [J]. 环境科学学报, 2005,25(6):796-802.
- [8] 中国科学院微生物研究所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法 [M]. 北京:科学出版社, 1978.
- [9] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验 [M]. 北京:高等教育出版社, 2002.
- [10] 李合生.植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京:高等教育出版社, 2000.
- [11] 董正臻,董振芳,丁德文.快速测定藻类生物量的方法探讨 [J]. 海洋科学, 2004,28(11):1-25.
- [12] 席宇,吴刚,张勇,等.一株淡水溶藻细菌的分离及初步研究 [J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2003,37(2):222-226.
- [13] Fuller N J, Wilson W H, Joint I R, et al. Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 g20 and its application to PCR-based detection and quantification techniques [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998,64(6):2051-2060.

致谢: 感谢中国科学院微生物研究所黄力教授对本文提出的宝贵意见.同时感谢 Utah State University, Dept. plants, soils and climate. Assistant professor Yajun Wu 对本文所做的贡献.

作者简介: 汪 辉(1985-),女,山东烟台人,南京农业大学海洋生物学省重点实验室硕士研究生,主要从事微生物和藻类的环境生物学研究工作.发表论文 1 篇.

《中国环境科学》获 2008 年度中国科协精品科技期刊工程项目资助

《中国环境科学》获得 2007 年度中国科协精品科技期刊工程项目资助后,于 2008 年继续获得该项目资助.《中国环境科学》将充分利用中国科协精品科技期刊工程项目资助经费,在广大环境保护科技人员的大力支持下,将《中国环境科学》办得更好,使《中国环境科学》在促进环境科学的学科发展,环境保护科研成果的推广和国内外学术交流中发挥更大的作用.

《中国环境科学》编辑部