

研究简报

水华杀藻微生物的分离与分子生物学鉴定

石 苗¹ 邹 莉² 刘新尧¹ 廖永红³ 安成才¹

(1. 北京大学生命科学学院蛋白质及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871;

2. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; 3. 北京工商大学化学与环境工程学院, 北京 100037)

ISOLATION AND MOLECULAR BIOLOGICAL IDENTIFICATION OF
ALGICIDAL MICROORGANISMSSHI Miao¹, ZOU Li², LIU Xin-Yao¹, LIAO Yong-Hong³ and AN Chen-Cai¹

(1. National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871;

2. Forestry Department, North-East Forestry University, Harbin 150040; 3. College of Chemistry and Environment Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037)

关键词: 水华; 杀藻微生物; 原生动物; 溶藻菌; 噬藻体; 16S rDNA**Key words:** Water bloom; Algicidal microorganism; Protozoa; Algicidal bacteria; Cyanophage; 16S rDNA**中图分类号:** X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)05-0587-04

除藻方法一般分为工程物理方法、化学药剂法和生物方法三大类。作为庞大的富营养化湖泊的藻类控制技术, 利用工程物理方法和化学药剂法显然是行不通的, 对环境友好的生物控藻技术受到越来越多的关注, 国内外许多富营养化湖泊水华的控藻技术的研究热点转向生物控藻技术。在利用生物控藻上, 目前主要有三个方面, 一是以鱼类控制藻类的生长^[1,2]; 二是以水生高等植物控制水体富营养盐及藻类^[3]; 三是以微生物来控制藻类的生长。其中由于微生物易于繁殖的特点, 使得微生物控藻是生物控藻里最有前途的一种控藻方式。这些杀藻微生物主要包括细菌(溶藻细菌)、病毒(噬藻体)、原生动物、真菌和放线菌等五类。国内外对杀藻微生物的分离和鉴定有一些报道^[4,5], 但都不够系统和全面, 本文以本实验室的工作为基础, 较全面、系统地介绍前三类水华杀藻微生物的分离与纯化及其分子生物学鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 藻种来源及培养条件 选用柱胞藻(*Cylindrospermum* sp.)、柱胞鱼腥藻(*Anabaena cylindrica*)、窝形席藻(*Phormidium faveolarum*)、水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)、组囊藻(*Anacystis nidulans*)、小颤藻(*Oscillatoria tenuis*)、聚球藻(*Synechococcus*

7942)、水华囊丝藻(*Aphanizomenon flos-aquae*)、隐球藻(*Aphanocapsa* sp.)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)等十种藻种, 均来源于中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心。在 25℃、光照强度为 2000 lx 及持续光照条件下培养, 培养基为 BG11。所有藻种均为无菌培养。本实验水华样品采自云南昆明滇池和北京大学未名湖。

1.2 溶藻原生动物的分离 (1) 将新鲜的水华与对数期的蓝藻溶液混合培养, 富集溶藻微生物; (2) 用 10 倍稀释平板法, 将溶藻液与浓缩的蓝藻溶液混合均匀涂布在固体 BG11 培养基上, 通过镜检来观察形成的空斑中是否含有原生动物; (3) 挑取含原生动物的空斑, 用步骤(2)中的方法纯化三次; (4) 再将纯化后的空斑转移到冻融蓝藻液制成的固体培养基上, 便可获得纯培养的原生动物。(冻融蓝藻液的制备: 先将蓝藻溶液浓缩, 再用液氮反复冻融, 然后镜检, 当大部分细胞破裂后, 用离心机高速离心, 上清用 0.22μm 的滤膜过滤, 滤液保存于 -20℃ 备用。)

1.3 溶藻细菌的分离 (1) 水华与蓝藻溶液共培养, 对溶藻细菌进行富集培养; (2) 再用 10 倍稀释平板法将溶藻液涂布在肉膏蛋白胨固体培养基上分离细胞; (3) 分别挑取单菌落摇菌培养, 并取培养物做溶藻实验, 能溶藻的细菌为溶藻细

收稿日期: 2004-03-02; 修订日期: 2005-02-28

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2001AA214191); 国家科技部/云南省重大科技攻关项目(K99-05-35-01)

作者简介: 石苗(1976—), 男, 湖北孝感人; 博士生; 研究方向: 生物控藻技术

通讯作者: 安成才 E-mail: chcaian@pku.edu.cn

菌。

1.4 噬藻体的分离 (1)先离心再用 0.2 μ m 滤膜过滤新鲜水华,将滤液与蓝藻溶液共培养;(2)取溶藻液,再用 0.2 μ m 滤膜过滤,用滤液做溶藻实验,反复 3 次,均能溶藻的为噬藻体;(3)用空斑法纯化噬藻体,纯化 3 次。

1.5 溶藻微生物的分子生物学鉴定 主要是采用分子生物学技术,对溶藻微生物的保守序列进行测定,所得到的序列与 GeneBank 数据库中的核酸序列进行比对,根据序列的相似性来确定它们的分类地位^[6,7]。

原生动物的分子生物学鉴定 根据原生动物 small subunit rDNA 序列的保守性,设计引物如下:1F primer:5' AAT TAG GGT TCG ATT CCG GA 3';1R primer:5' TGT TGA GTC AAA TTA AGC CGC 3'。

基因组 DNA 的提取参照从细菌中制备基因组 DNA 的方法^[8]。以原生动物基因组 DNA 为模板,用 1F primer 和 1R primer 为引物制备 PCR 扩增反应体系(反应体系为 50 μ L,包含 100ng 的模板 DNA,1F primer 和 1R primer 各 1 μ L(引物浓度为 10pmol/ μ L),2 μ L 2.5mmol/L 的 dNTP, 5 μ L 10 $\times$ PCR buffer, 1U 的 Taq 酶,其余部分用灭菌的 milliQ 水补足至 50 μ L)。扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后开始热循环,94 $^{\circ}$ C 变性 45s,52 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,35 个循环后继续在 72 $^{\circ}$ C 保温 10min。

将 PCR 产物与 T-Vector (pGEM⁺ -T Vector, promega) 相连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,进行蓝白斑筛选,挑白斑做菌落 PCR (以 1F primer 和 1R primer 为引物),将阳性菌落送大连宝生物(大连)公司测序。

利用 NCBI 提供的在线 Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)软件,对所得到的原生动物的 small subunit rDNA 序列进行序列比对。

1.6 溶藻细菌的分子生物学鉴定 根据细菌 16S rDNA 序列的保守性,设计引物如下:2F primer 5' AGG CTT AAT ACA TGC AAG TCG AA 3';2R primer 5' CGA ACG TAC TCC CCA GGT GG3'。

参照从细菌中制备基因组 DNA 的方法^[8]。PCR 扩增体系中模板为细菌基因组 DNA,引物为 2F primer 和 2R primer,其他同原生动物的 PCR 扩增体系。扩增反应条件中将退火温度设为 61 $^{\circ}$ C,其他同原生动物的扩增条件。同原生动物 PCR 产物的克隆和序列测定。

将得到的溶藻细胞的 16S rDNA 提交到 Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch-intro.jsp>)上进行序列比对,找到跟其最相似的序列。

1.7 噬藻体的分子生物学鉴定

对于噬藻体,没有象 16S rDNA 这样的非常保守的分子标记,必须寻找别的办法。对于 Myoviridae (肌病毒科)类的噬藻体,结构蛋白基因 g20 具有非常强的保守性,可以作为进化上的分子标记,有许多成功的例子^[13-15];对于 Podoviri-

dae (短尾病毒科)类的噬藻体,基于 gene DNA pol 的较高的保守性,可以考虑作为进化上的分子标记^[16],但是引物不好设计,还没有成功的例子;对于 Siphoviridae (长尾病毒科)类的噬藻体,目前还没有很好的代表进行的分子标记。

2 结果

2.1 溶藻微生物的分离

2.1.1 原生动物的分离 空斑纯化的方法很难获得纯化的原生动物,因为杂菌的数目远多于原生动物的数量,噬藻斑中常伴随着很多杂菌。而且普通的培养基不能用来培养原生动物,给原生动物的纯化带来困难。在实验中发现,冻融处理后的藻液可作为原生动物的培养基。将 3 次纯化后的噬藻斑切下来,放到以冻融藻液为主要成分的固体培养基上培养,原生动物可在培养基上不断繁殖和向外扩散,由于原生动物个体大、运动快,扩散到最远的原生动物是纯的个体,可将培养皿直接放在倒置相差显微镜下观察,在纯种的地方做好标记,然后用牙签蘸取它们,接种到冻融藻液的液体培养基中,在适宜的培养条件下即可获得纯培养的原生动物。

采用该方法已经获得了十余种原生动物,包括核虫、纳氏虫等(石苗、邹莉、刘新尧等待发表)。其中三种原生动物的噬藻范围和噬藻效果如下(表 1)。

表 1 三种原生动物的杀藻范围和杀藻效果。“++”表示杀藻作用显著;“+”表示杀藻作用不显著;“-”表示没有杀藻作用。(W2、W3 和 2H 是分离的三种原生动物)

Tab. 1 Algicidal arranges and effects of three kinds of Protozoas. “++” shows algicidal effects are striking; “+” shows algicidal effects are not striking; “-” shows there are no algicidal effects.

	W2	W3	2H
<i>Anacystis nidulans</i>	-	-	-
<i>Anabaena cylindrical</i>	+	++	++
<i>Anabaena flosaquae</i>	++	++	++
<i>Oscillatoria tenuis</i>	-	-	+
<i>Cylindrospermum</i> sp.	+	-	-
<i>Aphanizomenon fols-aquae</i>	-	++	+
<i>Aphanocapsa</i> sp.	++	+	-
<i>Microcystis aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Synechococcus</i> 7942	-	-	-
<i>Phormidium faveolarum</i>	+	++	++

2.1.2 溶藻细菌的分离 采用这种方法分离到一种细菌 C2 其菌液的 0.22 μ m 滤液的溶藻效果最好,其次是高温灭菌后的菌液上清,再次是菌液本身的效果,菌体本身和培养 C2 的培养基对水华鱼腥藻均没有溶藻作用(图 1)。因此推断在里面起作用的是细菌的胞外分泌物,且耐高温。



图1 C2对水华鱼腥藻的溶藻效果

Fig.1 Alginate-lysing effects of strain C2 against *Anabaena flos-aquae*

2.1.3 噬藻体的分离 两株能够溶解巨型藻的噬藻体,它们基因组DNA的酶切图谱显著不同,它们均属于短尾病毒科类的噬藻体(待发表)。纯化噬藻体形成的空斑如图所示(图2)。



图2 噬藻体在巨型藻菌落上形成的空斑

Fig.2 Plaques formed by cyanophages on *Phormidium foveolatum* lawns

2.2 溶藻微生物的分子生物学鉴定

2.2.1 原生动物的分子生物学鉴定 克隆到的原生动物W2、W3和2H的small subunit rDNA的核苷酸序列已经提交到GeneBank,所测W2的small subunit rDNA的核苷酸序列为930bp(GeneBank/EMBL序列编号是AY496006),所测W3的small subunit rDNA的核苷酸序列为939bp(GeneBank/EMBL序列编号是AY496007),所测2H的small subunit rDNA的核苷酸序列为977bp(GeneBank/EMBL序列编号是AY496008)。

NCBI上的Nucleotide-nucleotide BLAST结果表明:W2属于Eukaryota; Heterolobosea; Schizopyrenida; Vahlkampfiidae; Naegleria. W3和2H都属于Eukaryota; Nucleariidae; Nuclearia.

2.2.2 溶藻细菌的分子生物学鉴定 克隆到的溶藻细菌C2的16S rDNA的核苷酸序列已经提交到GeneBank,所测核苷酸序列为795bp(GeneBank/EMBL序列编号是AY929063)。根据在Ribosomal Database Project上的序列比对结果,C2属于phylum Proteobacteria, class Alphaproteobacteria, order Rhizobiales, family Rhizobiaceae, genus Rhizobium。

2.2.3 噬藻体的分子生物学鉴定 由于分离到的两株噬藻

体都是短尾噬藻体,基因DNA pol的引物很难设计,所以暂时还无法对它们进行分子生物学鉴定。

3 讨论

冻融藻液是作者在实践中创造出来的纯化原生动物的行之有效培养基,并且这种类似的培养基(以宿主为原料)还可以用于分离一些难培养的微生物,就用这种培养基分离了一种难培养的溶藻菌。这套杀藻微生物的分离方法虽然不能够把水华中的所有杀藻微生物都分离出来(比如不能培养的溶藻菌就无法分离出来),但是这些分离出来的杀藻微生物的后续研究非常方便。除了噬藻体外,另外两种都是可以纯培养的,无论是进行分子生物学研究还是进行大规模培养都非常方便。

对于三大类不同的杀藻微生物,分别采用不同的方法来分离,使得针对性更强。对于取样来的新鲜水华,本实验室一般是同时采用这三种方法来分离,就能分离到这三类杀藻微生物了。对杀藻微生物的分子生物学鉴定使得不熟悉分类的科研人员也可以快速得到它们的分类信息,以便采取相应的研究方法。当然保守序列上的证据只是它们分类的一个有力证据,要想得到完整的分类信息,还要结合传统的形态、生理生化指标的鉴定。

面对淡水湖泊日益严重的蓝藻水华,这些分离得到的杀藻微生物可以作为控藻因子并结合环境生物工程等技术,在湖泊水华的治理中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Perrow M R, Meijer M, Dawidowicz P, et al. Biomimicry in shallow lake: state of the art [J]. *Hydrobiologia*, 1997, **342**: 343-355-365
- [2] Liu J K, Xie P. Unraveling the enigma of the disappearance of water bloom from the eastlake (lake donghu) of wuhan [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 1999, **8**(3): 312-319 [刘健康, 谢平. 揭开武汉东湖蓝藻水华消失之谜[J]. 长江流域资源与环境, 1999, **8**(3): 312-319]

- [3] Jin S D, Li Y H, Ni C H, *et al.* Uptake by *potamogeton crispus* of nitrogen and phosphorus from water and some affecting factors [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1994, **14**(2): 168—173 [金送笛, 李永函, 倪彩虹, 等. 菹草(*Potamogeton crispus*)对水体中氮磷的吸收及若干影响因素[J]. 生态学报, 1994, **14**(2): 168—173]
- [4] Liu X Y, Shi M, Liao Y H, *et al.* Protozoa capable of grazing on ganobacteria and its biological control of the algae blooming [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2005, **29**(4): 456—461 [刘新尧, 石苗, 廖永红, 等. 食藻原生动物及其在治理蓝藻水华中的应用前景. 水生生物学报, 2005, **29**(4): 456—461]
- [5] Shi S Y, Liu Y D, Shen Y W. Preliminary research on the algae lyzine Characteristics of bacterium (strain DC23) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(2): 218—221 [史顺玉, 刘永定, 沈银武. 细菌溶藻的初步研究. 水生生物学报, 2004, **28**(2): 218—221]
- [6] Edouard J, Barak R. Design and uses of *bdellovibrio* 16S rRNA-targeted oligonucleotides [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **184**: 265—271
- [7] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc, 1995
- [8] Fuller N J, Wilson W H, *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]. *App. Environ Microbiol*, 1998, **64**(6): 2051—2060