

研究报告

滇池中溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻效应

王琪 Paulina Simon 刘锦钰 迟玉新 代先祝 杜红霞 张晓辉

五十岚泰夫 杨彩云* 罗锋*

(西南大学资源环境学院 重庆 400715)

摘要:【背景】藻类水华或赤潮在世界范围内频发,带来各种危害,亟需找到有效途径控制水华或赤潮。溶藻细菌具有杀死藻类控制藻类生物量的能力,可以作为防治水华和赤潮的有效工具。【目的】分离并鉴定滇池中的铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)及其溶藻细菌,对溶藻菌作用于铜绿微囊藻的溶藻效应进行研究,初步了解其溶藻特性与溶藻机制。【方法】采用 LB 平板稀释涂布,再经多次划线分离纯化细菌,测定 16S rRNA 基因序列以鉴定细菌种类;采用毛细管分离的方法分离铜绿微囊藻,并测定其 *cpcBA* 基因序列以鉴定蓝藻种类;采用热乙醇法提取叶绿素 a,从而计算溶藻效率;基于过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)探究藻细胞在溶藻菌处理下的抗氧化系统响应。【结果】共分离获得 11 株微囊藻和 17 株针对铜绿微囊藻的高效溶藻菌。选取其中一株生长速度最快的铜绿微囊藻 DCM4 和一株溶藻效果最好的溶藻菌 Sp37 (*Bacillus siamensis*)进行后续研究。Sp37 对 DCM4 的 4 d 溶藻率达到 92.4%±1.5%,且对微囊藻属的水华微囊藻(*M. flos-aquae*)和惠氏微囊藻(*M. wesenbergii*)均有溶藻效果,而对绿藻没有溶藻效果。Sp37 的原菌液和无菌滤液对 DCM4 的 4 d 溶藻率分别为 86.8%±4.3%和 81.1%±2.2%,两者没有显著差异($P>0.05$)。Sp37 菌体对 DCM4 的溶藻率为 25.4%±7.3%。Sp37 无菌滤液经不同温度和 pH 处理之后的溶藻率与未经处理的无菌滤液的溶藻率无明显差异。Sp37 无菌滤液处理藻细胞会使藻细胞的 CAT、GSH 和 MDA 含量发生变化。【结论】菌株 Sp37 对铜绿微囊藻 DCM4 具有高效的溶藻作用,而且对微囊藻属具有一定的溶藻特异性。Sp37 是通过分泌胞外物质间接溶藻,且溶藻物质具有热稳定性和酸碱稳定性。Sp37 无菌滤液处理藻细胞会触发藻细胞抗氧化系统,并且会损伤藻细胞膜。Sp37 无菌滤液很可能是通过对藻细胞造成氧化胁迫,最终导致藻细胞死亡的。

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31600095, 41301263); Chongqing Postdoctoral Science Foundation (Xm2016082); Chongqing Research Program of Advanced Technology and Application Foundation (cstc2016jcyjA0525); Chongqing Research Funds of Scientific Platform and Base Construction (cstc2014pt-sy0017); Chongqing Research Program of Social Undertaking and Livelihood Security (cstc2016shmszx1176)

*Corresponding authors: Tel: 86-23-68250097

E-mail: YANG Cai-Yun: yangcyice@163.com; LUO Feng: van77@swu.edu.cn

Received: January 10, 2018; **Accepted:** March 27, 2018; **Published online** (www.cnki.net): April 12, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31600095, 41301263); 重庆市博士后科学基金(Xm2016082); 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2016jcyjA0525); 重庆市科技平台与基地建设(重点实验室)项目(cstc2014pt-sy0017); 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2016shmszx1176)

*通信作者: Tel: 86-23-68250097

E-mail: 杨彩云: yangcyice@163.com; 罗锋: van77@swu.edu.cn

收稿日期: 2018-01-10; **接受日期:** 2018-03-27; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-04-12

关键词: 溶藻菌, 铜绿微囊藻, 叶绿素 a, 杀藻物质, 抗氧化系统

Identification of algicidal bacterium Sp37

WANG Qi PAULINA Simon LIU Jin-Yu CHI Yu-Xin DAI Xian-Zhu DU Hong-Xia
ZHANG Xiao-Hui YASUO Igarashi YANG Cai-Yun* LUO Feng*

(College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: [Background] Phytoplankton blooms are a worldwide problem that brings a serious threat to environment and human health. It is urgent to control bloom through effective methods. Algicidal bacteria have been considered as an effective strategy to control bloom because they can kill algae. **[Objective]** To isolate and identify *Microcystis aeruginosa* and its algicidal bacteria from Dianchi Lake, and further analyze the algicidal effect and inhibition mechanism of algicidal bacteria against *M. aeruginosa*. **[Methods]** Bacteria were isolated by dilution separation method and identified based on 16S rRNA genes. Algae were isolated by dilution separation and capillary separation methods, and identified based on *cpcBA* and 18S rRNA genes. Algicidal efficiency was calculated based on the chlorophyll-a concentration of algal culture, which was measured with heat-ethanol extraction method. Determination of CAT (catalase), GSH (glutathione) and MDA (malondialdehyde) were used to investigate the algal response of antioxidant system to the algicidal bacteria. **[Results]** In total 11 *Microcystis* and 17 algicidal bacteria strains were isolated, *M. aeruginosa* DCM4 and *Bacillus siamensis* Sp37 were selected for the further research. Sp37 showed a strong algicidal activity against *M. aeruginosa* DCM4 ($A_e=92.4\%\pm1.5\%$, $t=4$ d), and it also can kill *M. flos-aquae* and *M. wesenbergii* of Cyanophyta, but not *Monoraphidium* and *Scenedesmus* of Chlorophyta; there is no significant difference of algicidal ratio ($P>0.05$) between the culture and cell-free filtrate of Sp37 ($86.8\%\pm4.3\%$ and $81.1\%\pm2.2\%$ ($t=4$ d), respectively), while that of washed cells were much lower ($25.4\%\pm7.3\%$); Sp37 cell-free filtrates that treated at different temperature and pH conditions displayed no obvious difference of algicidal effects; Cell-free filtrate of Sp37 caused great changes of CAT, GSH and MDA content of DCM4. **[Conclusion]** Sp37 had strong algicidal effect on *M. aeruginosa* DCM4, and it is likely can kill *Microcystis* selectively. Sp37 kills *M. aeruginosa* DCM4 by releasing algicidal substance(s) which has (have) good thermal and acid-base stability. Cell-free filtrate of Sp37 can activate antioxidant systems and destroy cell membrane of DCM4, and ultimately cause algal cell death.

Keywords: Algicidal bacteria, *Microcystis aeruginosa*, Chlorophyll-a, Algicidal substance, Antioxidant system

在海洋、湖泊和河流等水体中,藻类快速生长并聚集可引起赤潮与水华的发生。近年来,伴随着水体富营养化和气候变暖等环境问题的突出,水华与赤潮在世界范围内频发^[1]。水华和赤潮可带来多种危害:藻类大量繁殖会堵塞管道,影响用水系统,降低水中溶解氧,影响水体中鱼类等生存;一些藻类还会产生藻毒素(如微囊藻毒素),严重危害人类及周边其他生物的健康^[2]。因此水华和赤潮问题亟待有效解决。藻类的控制和治理主要有物理法、化学法和生物法,在目前利用物理、化学等方法治理

水华效果不理想或者容易产生二次污染的情况下,环境友好型的生物法为治理藻类提供了一条新的途径。目前,利用溶藻细菌进行水华和赤潮的治理成为国内外研究的热点^[3-5]。

滇池是我国西南地区第一大淡水湖,有“高原明珠”之称。近些年来,滇池的富营养化程度加重,以铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)为优势种的蓝藻水华的暴发越来越频繁,造成每年4-11月均为水华发生期^[6],其中7-9月是水华发生的高峰期^[7]。目前对滇池中蓝藻水华溶藻菌的研究仅限

于溶藻方式、溶藻范围等。例如,从滇池分离并鉴定的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) DC-L5^[8]、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*) DC-L14^[9]、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*) YA1-1、蕈状芽孢杆菌(*B. mycoides*) YA2-3^[10]等溶藻菌,发现是通过分泌胞外物质间接溶藻;史顺玉分离获得了对6株蓝藻及2株绿藻均有溶藻作用的溶藻菌假单胞菌(*Pseudomona* sp.) DC10^[11],这些研究对相关溶藻菌的溶藻机理均未作出阐释。本研究从滇池分离得到多株细菌,基于一株前期从滇池中分离获得的铜绿微囊藻进行溶藻菌的筛选,对其溶藻能力和方式作出阐释,并初步分析其溶藻特性和溶藻机理,以期为实现以溶藻菌控制滇池蓝藻水华提供优质的控藻菌资源与理论指导。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

NaCl、酵母提取物、胰蛋白胨,北京索莱宝科技有限公司;FastDNA Spin Kit, MP biomedical 公司;DNA 通用纯化试剂盒,厦门鹭隆生物科技有限公司;PCR 反应体系中所用试剂和酶, TaKaRa 公司;引物,重庆擎科兴业生物技术有限公司。

人工气候培养箱,宁波东南仪器有限公司;天平、pH 计,赛多利斯科学仪器有限公司;立式高速冷冻离心机, Tomy 公司;台式高速冷冻离心机, Beckman 公司;PCR 仪, 郎基科学仪器有限公司;紫外可见分光光度计, 岛津公司;多功能酶标仪, Bio-Tek 公司。

1.2 溶藻菌的分离鉴定与培养

细菌的分离:将采集的滇池水体梯度稀释后,涂布于 LB 固体平板培养基(LB 固体培养基(g/L): NaCl 10.0, 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 琼脂糖 1.5, pH 调整为 7.0–7.2), 30 °C 避光培养 2–3 d。待菌落长出后,选取形态特征不同的单菌落,进行多次划线,最终获得纯菌。共获得 120 株细菌,将菌株用甘油冻存法保存于–80 °C。

细菌的鉴定:通过 16S rRNA 基因测序鉴定。PCR 引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA

G-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT T-3')。PCR 反应体系(25 μ L): 2.5 μ L 10 \times PCR buffer (Mg²⁺ free), 2.5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 0.5 μ L dDTP, 上、下游引物 10 μ mol/L 各 0.5 μ L, 0.25 μ L Taq 酶(5 U/ μ L), 2 μ L DNA 模板,补足水至 25 μ L。PCR 反应条件:94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环;72 °C 5 min。取 2 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,然后用凝胶成像仪检测电泳条带。PCR 产物送北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。

细菌的培养:溶藻相关的研究中,细菌培养于 1/6 LB 液体培养基中,30 °C、180 r/min 培养。LB 全营养培养基会对蓝藻的生长产生影响,LB 稀释实验结果显示,1/6 LB 对蓝藻的生长基本无影响,因此本研究中用于溶藻实验的细菌均培养于 1/6 LB 中。

细菌生长曲线的测定:取 200 μ L 菌悬液接种于 20 mL 1/6 LB 培养基中,30 °C、180 r/min 培养,设 3 组平行;每隔 2 h 取样测定其在 600 nm 处吸光度(OD_{600});以 OD_{600} 表征其生长情况,便于后续实验取样。

1.3 蓝藻的分离与培养

1.3.1 蓝藻的分离

所用蓝藻培养基为 BG11 培养基^[12]。滇池水体偏碱性,pH 在 8.8–8.9 左右,因此将所用由滇池分离的藻种的培养基 pH 调至 8.8。采用镜检和毛细管分离的方法分离蓝藻:将水样和无菌水分别滴于载玻片上,在显微镜下观察,选择目标藻团,使用毛细管挑取水样中的藻团,放入一滴无菌水中,再从放入藻团的水滴中挑取目标藻团,以此类推直至挑取单个藻细胞或单个藻团为止。将最后获取的藻细胞接入备有 BG11 培养基的试管中培养。培养一个月后镜检如只有单一种类,则视为单藻分离成功,并富集培养为后续鉴定做准备。分离过程中所有器皿都经灭菌处理。

1.3.2 蓝藻的鉴定

藻类初步鉴定主要参考《浙江省主要常见淡水藻类图集(饮用水水源)》^[13],根据显微形态将滇池

水样中微囊藻分离出, 后续通过 *cpcBA* 基因进行微囊藻种类鉴定^[14-15]。DNA 提取采用改良 CTAB 法进行^[16]; PCR 引物 PC β F (5'-GGCTGCTTGTTCACGCGACA-3')和 PC α R (5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3')^[14]。PCR 反应体系(25 μ L): 2.5 μ L 10 \times PCR buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 0.5 μ L dDTP, 上、下游引物 10 μ mol/L 各 0.5 μ L, 0.25 μ L *Taq* 酶 5 U/ μ L, 2 μ L DNA 模板, 补足水至 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min; 取 3 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 然后用凝胶成像仪检测电泳条带。PCR 产物送由北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。

1.3.3 蓝藻的培养

采用 BG11 培养基在 28 $^{\circ}$ C、光照 3 000 lx、光暗比 14:10 条件下培养。

1.3.4 蓝藻生长曲线的测定

将 5 mL 藻液接种于 100 mL BG11 液体培养基中, 设 3 组平行; 每隔 3 d 取样测定其叶绿素 a 含量和在 680 nm 处的吸光度(OD_{680}); 以 OD_{680} 表征其大致生长情况和叶绿素 a 含量, 便于后续实验取样。

1.4 溶藻菌的筛选

溶藻菌的筛选采用藻菌共培养的方法。将各菌株在上述培养条件下的菌悬液, 取 1 mL 菌液以体积比 5% (体积比)等量加入 20 mL 藻液中, 并以加入 1/6 LB 的藻液为对照, 能使藻液黄化的菌株则为溶藻菌。选取其中溶藻作用快、溶藻效率高的菌株作为候选实验菌株。

1.5 细菌对藻细胞的溶藻试验

1.5.1 细菌对藻细胞的溶解作用

将细菌液体培养至稳定期, 取 1 mL OD_{600} 约为 0.67 时(*Sp37* 接种于 1/6 LB 中生长至稳定期的 OD 值)的菌液按照 5% (体积比)添加到 20 mL 对数生长期的初始叶绿素 a 浓度约为 3.6 mg/L 的藻液(如无特别说明, 后续实验中所用菌液均为 OD_{600} 约为 0.67 的菌液, 藻液均为叶绿素 a 浓度约为 3.6 mg/L 的藻液)中, 并向相同藻液中加入等量 1/6 LB 作为

对照, 各设 3 组平行; 每隔 12 h 取样, 用于测定叶绿素 a 浓度。叶绿素 a 测定方法采用热乙醇法^[17-18]。溶藻率计算方法为: $A_e=(C_0-C_t)/C_0\times 100\%$ 。其中, A_e 是作用于蓝藻的溶藻率; C_0 和 C_t 分别代表对照组和处理组的叶绿素 a 含量。

1.5.2 细菌的溶藻方式及溶藻物质的特性

溶藻方式: 取稳定期的原菌液、无菌水洗涤 3 次并以 1/6 LB 重悬的菌体、用 0.22 μ m 滤膜过滤的无菌滤液各 1 mL 分别按照 5% (体积比)添加进 20 mL 藻液中共培养, 向相同藻液中加入等量 1/6 LB 作为对照, 各设 3 组平行; 于第 4 天取样进行叶绿素 a 的测定。

溶藻物质稳定性: 将培养至稳定期的菌悬液过滤得到的无菌滤液的 pH 用 1 mol/L HCl 溶液和 1 mol/L NaOH 溶液分别调成 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0, 在室温下处理 3 h 后调回原 pH, 取 1 mL 无菌滤液以 5% (体积比)分别添加 20 mL 藻液进行共培养; 将无菌滤液置于 -20、40、60、80、100 $^{\circ}$ C 等温度下处理 3 h 后恢复至室温, 取 1 mL 无菌滤液以 5% (体积比)分别添加进 20 mL 藻液进行共培养; 加入未经任何处理的无菌滤液作为对照, 每组设 3 个平行。共培养 4 d 后取样测定各组体系的叶绿素 a 浓度。

1.6 藻细胞经无菌滤液处理后的生理生化响应

将细菌培养至稳定期, 取其无菌滤液 1 mL 与 20 mL 藻液进行共培养, 设置 3 个平行样品, 分别在 3、12 和 18 h 取样, 取样之后去上清, 用无菌水洗涤 3 次, 将藻细胞保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。根据试剂盒操作说明测定藻细胞过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)以及丙二醛(MDA)的含量。各生理生化指标均利用南京建成试剂盒进行测定。

2 结果与分析

2.1 微藻与溶藻细菌的分离鉴定

经鉴定一共获得 11 株微囊藻和 3 株绿藻, 选取其中的铜绿微囊藻 DCM4、水华微囊藻 DCM1、惠氏微囊藻 DCM11、单针藻(*Monoraphidium* sp.)

DCA4、栅藻(*Scenedesmus* sp.) DCA5 以及从日本购买的铜绿微囊藻 NIES-843 作为实验藻株。

从滇池水体分离出 17 株具有高效溶藻能力的细菌。本文选取其中一株作用速度快、溶藻效率高的菌株 Sp37。将 Sp37 的 16S rRNA 基因序列与 EzBioCloud 网站中已登录的 16S rRNA 基因序列进行核苷酸序列同源性比较,结果发现,Sp37 与多株芽孢杆菌(*Bacillus*)的相似性达 99% 以上,其中与一株 *Bacillus siamensis* 的相似性最高,达 99.93%。据此将 Sp37 归于 *Bacillus siamensis*。Sp37 菌株的系统发育树见图 1。

2.2 菌株 Sp37 的生长曲线

将 Sp37 接种在液体 1/6 LB 中培养,每隔 2 h 取样,测定其 600 nm 处吸光度(OD_{600}),绘制生长曲线如图 2 所示。从图 2 中可以看出,Sp37 迟缓期在 0–6 h,对数生长期在 6–14 h,14 h 后进入稳定期。后续选取细菌浓度较高的稳定期进行溶藻相关试验。

2.3 菌株 Sp37 对铜绿微囊藻 DCM4 的溶藻效果

Sp37 对 DCM4 有明显溶藻作用(图 3):在初始叶绿素 a 浓度约为 3.6 mg/L 的藻液中加入 Sp37,共培养 12 h 之后 DCM4 的生长就受到抑制,叶绿素 a 含量不再增加,共培养 1 d 后,溶藻率达到 $42.7\% \pm 3.6\%$,说明菌株对铜绿微囊藻 DCM4 的溶藻效果非常好;共培养 4 d 后,铜绿微囊藻 DCM4

的去除率达到 $92.4\% \pm 1.5\%$ (图 3),说明菌株 Sp37 对 DCM4 的溶藻效果很好。目前已有芽孢杆菌溶解藻的报道,包括芽孢杆菌能选择性杀死铜绿微囊藻^[19-20],短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)对多种微囊藻有溶藻效果^[8]。而本研究分离的溶藻菌 *Bacillus siamensis* Sp37 目前尚未有杀藻功能的相关报道。另外,目前所报道的关于溶藻菌研究中目标藻的初始叶绿素 a 含量都较低(0.5–1.0 mg/L)^[20-21],且溶藻所需要时间都较长(达到 80% 的溶藻率,所需时间 > 7 d)^[5,12]。本实验采用的供试藻叶绿素 a 的含量(3.6 mg/L)远高于自然水华的叶绿素 a 含量(0.04–0.39 mg/L)^[22-23],而菌株 Sp37 能够在短时间内杀死该浓度的藻,这对以后 Sp37 的实际应用提供了更大的可能性。

2.4 菌株 Sp37 的宿主范围

为了确定 Sp37 的溶藻对象是否有一定的种类特异性,本研究选择了能引起水华的 3 株蓝藻及 2 株绿藻进行 Sp37 的溶藻实验,主要包括水华微囊藻 DCM1、惠氏微囊藻 DCM11、铜绿微囊藻 NIES843、单针藻 DCA4、栅藻 DCA5。从表 1 中可以看出,菌株 Sp37 对微囊藻 DCM1、DCM11 和 NIES843 都有溶藻效果,其中对铜绿微囊藻 NIES843 的溶藻效果最好,在共培养 8 d 时溶藻效率为 $99.8\% \pm 0.0\%$;对水华微囊藻 DCM1 和惠氏微囊藻 DCM11 也具有较好溶藻效果,在共培养第 8 天时溶藻率分别为

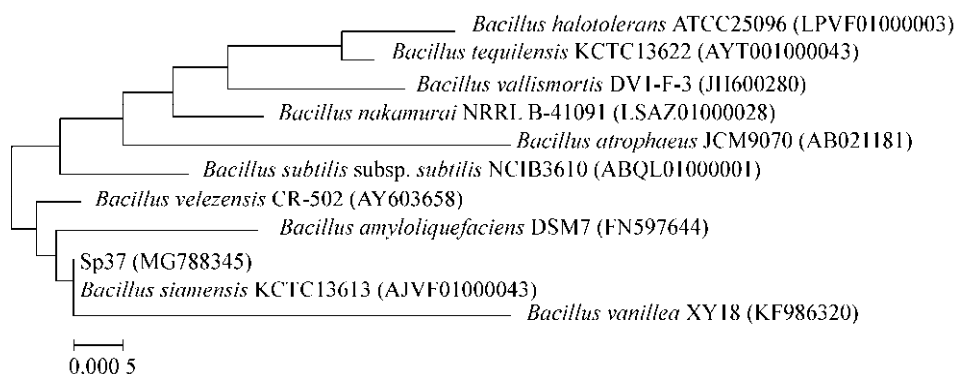


图 1 基于菌株 *Bacillus siamensis* Sp37 的 16S rRNA 基因序列同源性构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence homolog of *Bacillus siamensis* Sp37

注:括号中的数字为 GenBank 登录号;标尺长度代表进化距离。

Note: Numbers in parenthesis represented GenBank accession number; The scale bar represents the evolutionary distance.

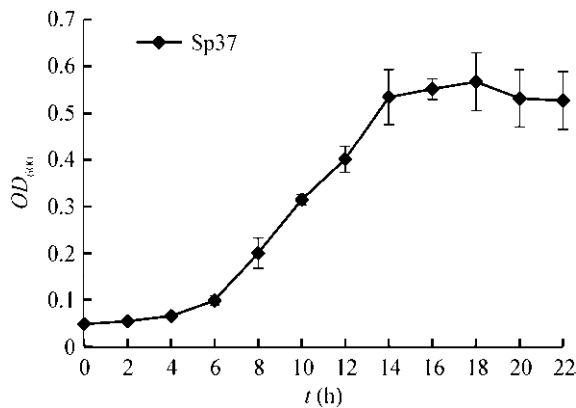


图2 细菌 *Bacillus siamensis* Sp37 的生长曲线
Figure 2 The growth curve of *Bacillus siamensis* Sp37

79.4%±2.5% 和 69.8%±1.8%；对绿藻中的单针藻 DCA4 和栅藻 DCA5 则没有溶藻效果。由此说明，菌株 Sp37 可能对微囊藻有选择性的溶藻作用，而不对其他藻产生危害。微囊藻是我国最常见的淡水水华蓝藻，也常产生微囊藻毒素^[2,24]，微囊藻毒素是一种肝毒素，长期饮用含有微囊藻毒素的水源可能会引发肝癌。因此筛选出能够高效且迅速地溶解微囊藻的菌株，具有实际应用意义^[25]。

2.5 菌株 Sp37 溶解铜绿微囊藻 DCM4 的作用方式以及溶藻物质的特性

溶藻细菌主要有直接溶藻和间接溶藻两种方式。为了研究菌株 Sp37 对铜绿微囊藻 DCM4 的作用方式，将 Sp37 的原菌液、洗涤后的菌体和无菌过滤液分别接入藻液进行共培养。共培养 4 d 后，各组都对 DCM4 有一定杀藻效果(图 4)。其中 Sp37 原菌液和无菌滤液的溶藻效果较好，4 d 后的溶藻率分别为 86.8%±4.3%和 81.1%±2.2%，两者没有显著差异(t -test, $P>0.05$)；经无菌水洗涤过的菌体对 DCM4 的溶藻效果较差，溶藻率为 25.4%±7.3%。上述结果表明菌株 Sp37 的溶藻方式是间接溶藻，即通过释放某些溶藻活性物质杀死铜绿微囊藻 DCM4。经无菌水洗涤过后的菌体对 DCM4 也有一定的溶藻效果，可能是由于细菌在藻液中生长仍然能够分泌溶藻物质。目前已报道的溶藻菌主要都是通过分泌抑制藻类生长或者溶解藻细胞的胞外物质来间接攻击藻类，例如，

Su 等分离到一株对甲藻有溶藻作用的交替假单胞菌，也是通过分泌活性物质溶藻^[26]；Skerratt 等分离到多株对甲藻有间接溶藻作用的细菌^[3]；Yang 等分离了一株对铜绿微囊藻有较好的溶藻效果的地杆菌属溶藻菌^[5]。

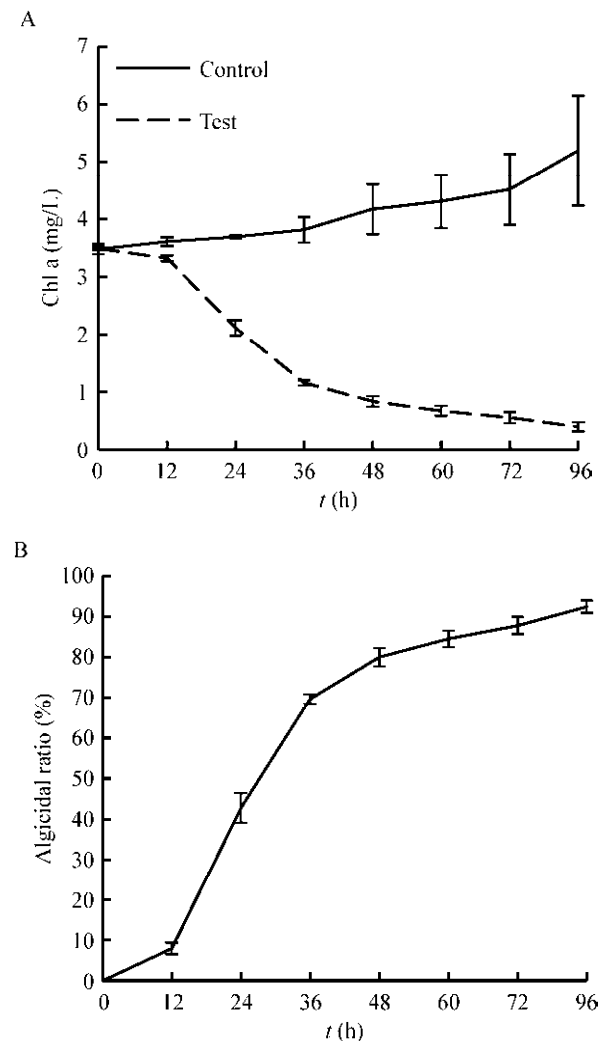


图3 菌株 Sp37 对铜绿微囊藻 DCM4 作用下的叶绿素 a 含量变化(A)及溶藻效率(B)

Figure 3 Content of Chlorophyll-a (A) and algicidal effect (B) of Sp37 on *M. aeruginosa* DCM4

注：图中 Test 指加入培养 Sp37 到稳定期的菌悬液与藻液共培养，Control 指加入 1/6 LB 与藻液共培养。

Note: Test is indicated that the culture of Sp37 was inoculated in *M. aeruginosa* DCM4 and co-cultivated; Control is indicated that the 1/6 LB was inoculated in *M. aeruginosa* DCM4 and co-cultivated.

表 1 菌株 Sp37 对其他微囊藻和真核绿藻的溶藻效果比较

Table 1 The algicidal activities of Sp37 against the tested *Microcystis* and eukaryotic algae

Phylum	Algae strain	Algicidal ratio ($t=8$ d, %)
Cyanobacteria	DCM1 (<i>Microcystis flos-aquae</i>)	79.4 \pm 2.5
Cyanobacteria	DCM11 (<i>Microcystis wesenbergii</i>)	69.8 \pm 1.8
Cyanobacteria	NIES843 (<i>Microcystis aeruginosa</i>)	99.8 \pm 0.0
Chlorophyta	DCA4 (<i>Monoraphidium</i> sp.)	—
Chlorophyta	DCA5 (<i>Scenedesmus</i>)	—

注：—：没有溶藻现象。

Note: —: No algicidal effect.

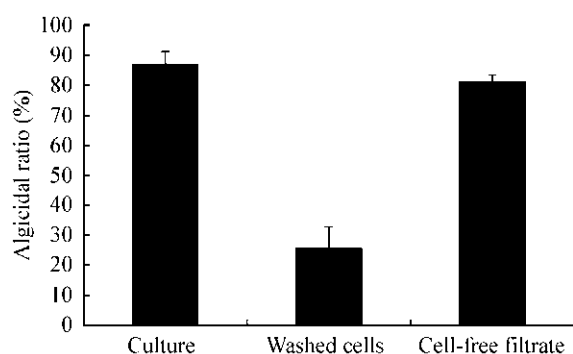


图 4 细菌 Sp37 菌液不同组分对铜绿微囊藻 DCM4 的溶藻率

Figure 4 The algicidal effect of different culture ingredients of Sp37 on *M. aeruginosa* DCM4

由上述结果可知，菌株 Sp37 不是通过细胞直接接触藻细胞攻击 DCM4，而是通过分泌溶藻物质杀死 DCM4。为了初步了解该溶藻物质的特性，对 Sp37 无菌滤液做了不同处理后再与 DCM4 进行共培养。图 5 结果显示，无菌滤液经不同 pH (3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0) 和温度 (-20、40、60、80、100 °C) 处理之后的溶藻效率与未经任何处理的无菌滤液的溶藻效率没有显著差异 ($P>0.05$)，说明 Sp37 分泌的胞外溶藻物质的活性在酸碱、冷冻和高温处理后并没有发生明显变化。由上述结果可知菌株 Sp37 分泌的溶藻物质具有酸碱稳定性和冷热稳定性，说明应该不是蛋白质或者多肽类物质。

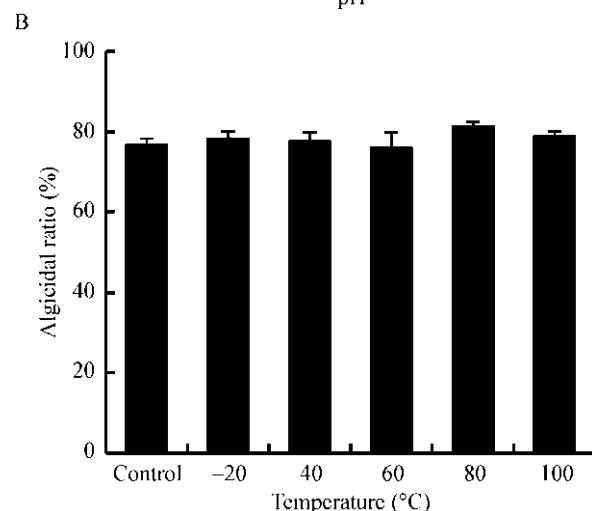
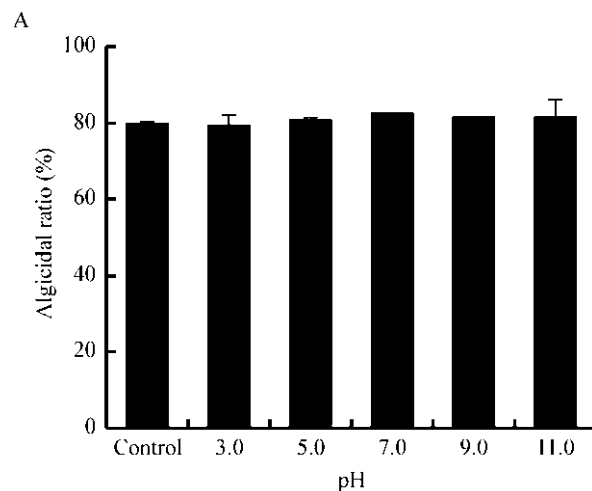


图 5 Sp37 无菌滤液经不同处理后对 DCM4 的溶藻效率
Figure 5 Algicidal effect of cell-free filtrate of Sp37 treated at different acidity-alkalinity (A) and temperature (B) on DCM4

注：A：无菌滤液经不同 pH 处理后的溶藻效率，B：无菌滤液经不同温度处理后的溶藻效率。

Note: A: The algicidal efficiency of cell-free filtrate treated at different pH; B: The algicidal efficiency of cell-free filtrate treated at different temperature.

2.6 在溶藻作用下藻细胞的生理生化响应

2.6.1 在溶藻作用下藻细胞的抗氧化系统响应

藻类在正常情况和各种环境胁迫下都能产生活性氧自由基，但在正常情况下细胞内活性氧的产生和清除处于一种动态平衡的状态。当藻细胞遭受外界环境胁迫时可能会引起活性氧的增加，从而启动活性氧清除机制，并引起氧化损伤。抗氧化系统包括酶抗氧化系统和非酶抗氧化系统。

为了研究藻细胞内酶抗氧化系统对溶藻作用的响应,选取藻细胞内过氧化氢酶(CAT)含量进行测定。CAT 是抗氧化系统中最重要的酶之一,能够促进分解细胞代谢产生的对机体有害的 H_2O_2 ,防止 H_2O_2 在体内积累对细胞造成损害。结果如图 6A 所示,DCM4 藻细胞 CAT 的含量随着 Sp37 无菌滤液处理时间的增加而上升。在处理 18 h 时,处理组藻细胞内的 CAT 含量相对于对照组显著升高($P<0.05$)。上述结果表明,随着 SP37 无菌滤液处理时间的延长,触发了藻细胞的防御机制,使得藻细胞的 CAT 含量上升以抵御伤害。傅丽君等在研究溶藻菌对塔玛亚历山大藻时也发现,溶藻菌的上清液处理藻细胞前期使得 CAT 有一定增长趋势^[27]。

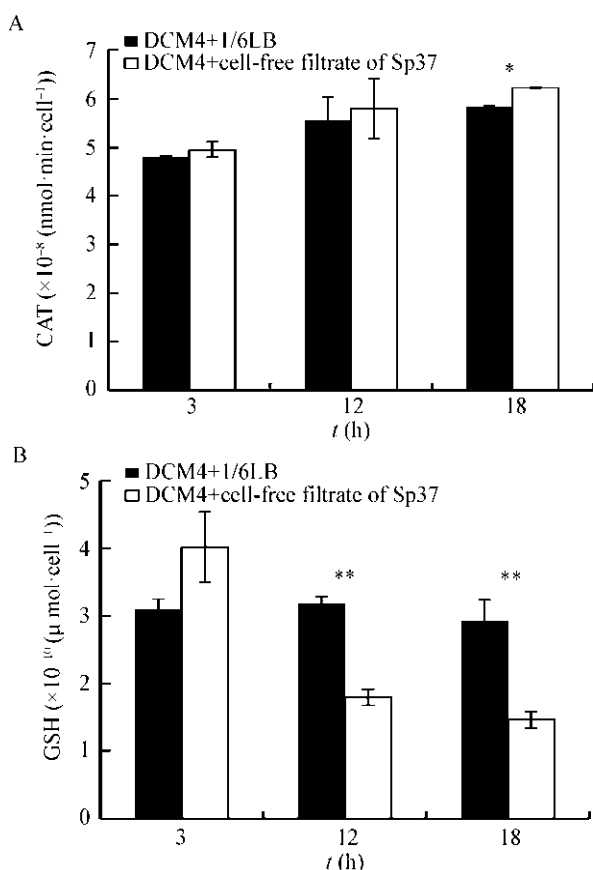


图 6 Sp37 无菌滤液对 DCM4 藻细胞 CAT (A)和 GSH (B)含量的影响

Figure 6 Influence of Sp37 cell-free filtrate on the CAT (A) and GSH (B) of DCM4

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

在非酶抗氧化系统中,还原型谷胱甘肽(GSH)也可以清除 ROS。GSH 中含有巯基,巯基在自身氧化时清除 ROS。在处理 3 h 时处理组的 GSH 含量高于空白组,然而从 12 h 开始,处理组的 GSH 含量开始下降;在处理 12 h 和 18 h 时,处理组的 GSH 含量显著低于空白组($P<0.01$) (图 6B)。GSH 含量在经 Sp37 无菌滤液处理前期升高而后期降低,可能是因为 GSH 在清除 ROS 的同时,自身转换成了氧化型谷胱甘肽(GSSG),导致 GSH 含量降低。在 Tan 等的研究中,溶藻菌对球形棕囊藻的溶藻作用中,GSH 的含量也是呈现出先上升再下降的趋势^[28]。

以上结果表明,Sp37 产生的溶藻物质诱导了 DCM4 酶抗氧化系统和非酶抗氧化系统的响应,以减缓活性氧造成的氧化压力。

2.6.2 溶藻作用对藻细胞膜完整性的影响

为了探究 Sp37 的无菌滤液是否对藻细胞完整性造成损伤,测定了细胞膜的脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量,以了解溶藻过程对细胞膜完整性的影响。在处理 3 h 和 12 h 时,处理组和对照组没有明显的变化;但是处理 18 h 之后,处理组的 MDA 含量显著高于对照组($P<0.01$) (图 7),表明在溶藻物质的作用下藻细胞膜发生较强的脂质过氧化反应。MDA 的升高可能是因为 Sp37 无

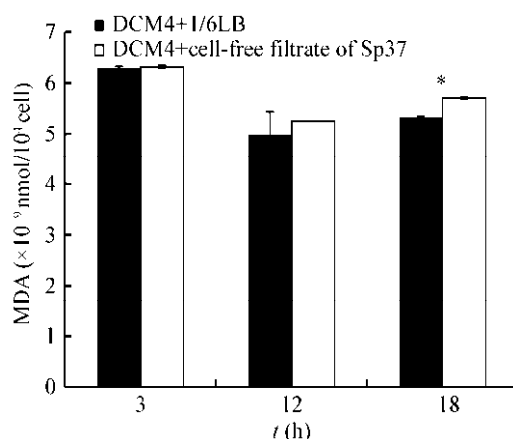


图 7 Sp37 无菌滤液对 DCM4 藻细胞 MDA 含量的影响

Figure 7 Influence of Sp37 cell-free filtrate on the MDA of DCM4

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

菌滤液对藻细胞造成胁迫,藻细胞产生大量 ROS,虽然藻细胞启动了抗氧化机制,酶抗氧化和非酶抗氧化物质都显著上升,但是最终也未能完全清除 ROS,最终造成藻细胞膜的氧化损伤。黄昌妙等^[29]发现水华鱼腥藻在多株溶藻菌活性代谢产物的胁迫下,MDA 浓度急剧上升,藻细胞膜脂质过氧化程度加剧,膜系统和功能受损。史顺玉的研究结果也表明,加入溶藻细菌之后藻细胞的 MDA 含量明显提高^[30]。

3 讨论与结论

本研究从滇池水华区分离出溶藻菌 Sp37,经 16S rRNA 基因鉴定为 *Bacillus siamensis*。该菌对铜绿微囊藻、水华微囊藻、惠氏微囊藻都有较强的溶藻能力,对高浓度的铜绿微囊藻 DCM4 有高效杀灭作用;菌株 Sp37 是通过分泌一种或多种具有酸碱稳定性和冷热稳定性的非蛋白类物质实现对 DCM4 的间接溶藻。总的来说,Sp37 分泌的溶藻物质对远高于水华叶绿素 a 浓度的水华藻铜绿微囊藻有强烈的杀灭效果,且性质稳定易于保存,在今后的水华防治中有极大的应用前景。

一般认为,溶藻菌分泌杀藻活性物质是作用于藻的生理过程^[31]而影响藻的生长。在本研究中 Sp37 无菌滤液处理 DCM4 的过程中,藻细胞中与酶抗氧化机制相关的 CAT 含量和非酶抗氧化机制中的 GSH 含量都发生了显著变化。可知 Sp37 无菌滤液对藻细胞产生了氧化胁迫,使得 DCM4 抗氧化系统被激发来减缓氧化胁迫对藻细胞造成的损害。但 18 h 处理组藻细胞 MDA 含量的上升,表明细胞膜脂质过氧化的发生,说明藻细胞的抗氧化机制最终未能阻止 Sp37 无菌滤液对藻细胞造成严重的氧化胁迫。本研究通过藻细胞在溶藻菌作用下生理生化的响应来初步推断,溶藻菌 Sp37 无菌滤液对藻细胞产生氧化胁迫,造成藻细胞损伤,最终导致藻细胞死亡。另外,对 Sp37 无菌滤液的具体溶藻机制、分泌的溶藻活性物质的确认及其生物安全性还有待于进一步研究。本研究获得的高效铜绿微囊藻杀藻菌,为淡水水体(尤其是滇池)中蓝藻

水华的微生物治理提供了优质的控藻菌资源;对其杀藻特性的进一步解析,为杀藻菌在水华治理的实际应用提供了重要的理论指导。

REFERENCES

- [1] O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, et al. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change[J]. *Harmful Algae*, 2012, 14: 313-334
- [2] Oh HM, Lee SJ, Jang MH, et al. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2000, 66(1): 176-179
- [3] Skerratt JH, Bowman JP, Hallegraeff G, et al. Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary[J]. *Marine Ecology Progress*, 2002, 244: 1-15
- [4] Niu DD, Zheng QS, Liu ZP, et al. Algicidal effect of an algae-lysing bacterium YZ on *Microcystis aeruginosa*[J]. *China Environmental Science*, 2011, 31(2): 321-326 (in Chinese)
牛丹丹, 郑青松, 刘兆普, 等. 溶藻细菌 YZ 对铜绿微囊藻的溶藻特性研究[J]. *中国环境科学*, 2011, 31(2): 321-326
- [5] Yang L, Maeda H, Yoshikawa T, et al. Algicidal effect of bacterial isolates of *Pedobacter* sp. against cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*[J]. *Water Science and Engineering*, 2012, 5(4): 375-382
- [6] Liu LP. Characteristics of blue algal bloom in Dianchi Lake and analysis on its cause[J]. *Research of Environmental Sciences*, 1999, 12(5): 36-37 (in Chinese)
刘丽萍. 滇池水华特征及成因分析[J]. *环境科学研究*, 1999, 12(5): 36-37
- [7] Lu WK, Yu LX, Ou XK, et al. Relationship between occurrence frequency of cyanobacteria bloom and meteorological factors in Lake Dianchi[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2017, 29(3): 534-545 (in Chinese)
鲁韦坤, 余凌翔, 欧晓昆, 等. 滇池蓝藻水华发生频率与气象因子的关系[J]. *湖泊科学*, 2017, 29(3): 534-545
- [8] Lu LL, Li GB, Shen YW, et al. Isolation, identification and characterization of a strain of blue-green algae-lysing bacterium from Lake Dianchi[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(5): 860-865 (in Chinese)
卢兰兰, 李根保, 沈银武, 等. 溶藻细菌 DC-L5 的分离、鉴定及其溶藻特性[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(5): 860-865
- [9] Lu LL, Li GB, Shen YW, et al. Isolation, identification and characterization of blue-green algae-lysing strain DC-L14 from Lake Dianchi, China[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2009, 15(1): 106-109 (in Chinese)
卢兰兰, 李根保, 沈银武, 等. 溶藻细菌 DC-L14 的分离、鉴定与溶藻特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(1): 106-109
- [10] Ning H, Zhang RX, Chen H, et al. ARDRA analysis of *Bacillus* spp. isolated from Lake Dianchi and their algae-lytic effect[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2008, 20(5): 675-680 (in Chinese)
宁华, 张荣先, 陈浩, 等. 滇池中芽孢杆菌的 ARDRA 分类及溶藻特性[J]. *湖泊科学*, 2008, 20(5): 675-680
- [11] Shi SY. Studies on the ecophysiological effects and mechanisms

- of algae-lysing bacteria against the algae[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2006 (in Chinese)
- 史顺玉. 溶藻细菌对藻类的生理生态效应及作用机理研究[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所博士学位论文, 2006
- [12] Pei HY, Hu WR, Qu YB, et al. Algae-lytic character and its identification of one algae-lysing bacterium[J]. China Environmental Science, 2005, 25(3): 283-287 (in Chinese)
- 裴海燕, 胡文容, 曲音波, 等. 一株溶藻细菌的溶藻特性及其鉴定[J]. 中国环境科学, 2005, 25(3): 283-287
- [13] Chen Q. Most Common Freshwater Algal Images of Zhejiang Province: Drinking Water Sources[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2010 (in Chinese)
- 陈茜. 浙江省主要常见淡水藻类图集: 饮用水水源[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010
- [14] Li XQ, Yang F, Yin LH, et al. Separation, identification and toxigenicity of algae in bloom of Meiliang Bay of Lake Taihu[J]. Journal of Southeast University (Natural Science Edition), 2010, 40(6): 1332-1336 (in Chinese)
- 李小琴, 杨飞, 尹立红, 等. 太湖水华藻的分离、鉴定和产毒特性[J]. 东南大学学报: 自然科学版, 2010, 40(6): 1332-1336
- [15] Bozarth CS, Schwartz AD, Shepardson JW, et al. Population turnover in a *Microcystis* bloom results in predominantly nontoxic variants late in the season[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(15): 5207-5213
- [16] Li JL, Wang S, Yu J, et al. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2013, 48(1): 72-78 (in Chinese)
- 李金璐, 王硕, 于婧, 等. 一种改良的植物 DNA 提取方法[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72-78
- [17] Chen YW, Chen KN, Hu YH. Discussion on possible error for phytoplankton chlorophyll-a concentration analysis using hot-ethanol extraction method[J]. Journal of Lake Sciences, 2006, 18(5): 550-552 (in Chinese)
- 陈宇伟, 陈开宁, 胡耀辉. 浮游植物叶绿素 a 测定的“热乙醇法”及其测定误差的探讨[J]. 湖泊科学, 2006, 18(5): 550-552
- [18] Winternans JF, De Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1965, 109(2): 448-453
- [19] Guan YH, Ma J, Lei GY, et al. Isolation, identification and algicidal characteristics of an algicidal bacterium[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 28(7): 1288-1293 (in Chinese)
- 关英红, 马军, 雷国元, 等. 一株溶藻菌株的分离鉴定及溶藻特性[J]. 环境科学学报, 2008, 28(7): 1288-1293
- [20] Xuan HL, Dai XZ, Li J, et al. A *Bacillus* sp. strain with antagonistic activity against *Fusarium graminearum* kills *Microcystis aeruginosa* selectively[J]. Science of the Total Environment, 2017, 583: 214-221
- [21] Li Y, Liu L, Xu Y, et al. Stress of algicidal substances from a bacterium *Exiguobacterium* sp. h10 on *Microcystis aeruginosa*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64(1): 57-65
- [22] Wang L, Cai QH, Zhang M, et al. Spatiotemporal dynamics and related affecting factors of summer algal blooms in Xiangxi Bay of Three Gorges Reservoir[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(8): 1940-1946 (in Chinese)
- 王岚, 蔡庆华, 张敏, 等. 三峡水库香溪河库湾夏季藻类水华的时空动态及其影响因素[J]. 应用生态学报, 2009, 20(8): 1940-1946
- [23] Zhu LP, Gao G, Tang XM, et al. Variation of bacteria in water and attached on *Microcystis* colonies and their activity during the algal blooms[J]. Journal of Lake Sciences, 2009, 21(3): 395-400 (in Chinese)
- 朱丽萍, 高光, 汤祥明, 等. 微囊藻水华期间水体及藻体上细菌的动态[J]. 湖泊科学, 2009, 21(3): 395-400
- [24] Orr PT, Jones GJ. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures[J]. Limnology & Oceanography, 1998, 43(7): 1604-1614
- [25] Xi Y, Wu G, Zhang Y, et al. The isolation and preliminary study on an algae-lysing bacterium in freshwater[J]. Journal of Central China Normal University (Natural Sciences), 2003, 37(2): 222-226 (in Chinese)
- 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
- [26] Su JQ, Yang XR, Zheng TL, et al. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Harmful Algae, 2007, 6(6): 799-810
- [27] Fu LJ, Li D, Wu CJ, et al. Effects of algicidal bacterium BS03 (*Microbulbifer* sp.) on the growth and antioxidant systems of *Alexandrium tamarense*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(6): 784-790 (in Chinese)
- 傅丽君, 李东, 吴承集, 等. 溶藻细菌 BS03(*Microbulbifer* sp.) 对塔玛亚历山大藻生长及抗氧化系统的影响[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 784-790
- [28] Tan S, Hu XL, Yin PZ, et al. Photosynthetic inhibition and oxidative stress to the toxic *Phaeocystis globosa* caused by a diketopiperazine isolated from products of algicidal bacterium metabolism[J]. Journal of Microbiology, 2016, 54(5): 364-375
- [29] Huang CM, Pan WB, Li Y, et al. Effect of three algicidal bacterial strains on antioxidase activities of *Anabaena Flos-aquae*[J]. Environmental Science and Technology, 2009, 22(6): 10-13 (in Chinese)
- 黄昌妙, 潘伟斌, 李燕, 等. 三株溶藻菌对水华鱼腥藻抗氧化酶活性的影响[J]. 环境科技, 2009, 22(6): 10-13
- [30] Shi SY, Shen YW, Li DH, et al. Isolation, identification and algae-lytic characteristic of a bacterium *Staphylococcus* sp.[J]. China Environmental Science, 2006, 26(5): 587-590 (in Chinese)
- 史顺玉, 沈银武, 李敦海, 等. 溶藻细菌 DC21 的分离、鉴定及其溶藻特性[J]. 中国环境科学, 2006, 26(5): 587-590
- [31] Lu HS, Liu WJ, Zhang Y, et al. Identification of algicidal bacterium R1 and its influence on the metabolism of *scenedesmus* in a co-culture[J]. Microbiology China, 2016, 43(3): 495-503 (in Chinese)
- 陆洪省, 刘文君, 张瑶, 等. 溶藻菌 R1 的分离鉴定以及对栅藻共代谢的影响[J]. 微生物学通报, 2016, 43(3): 495-503