

# 放线菌 L74 溶藻物质的分离及其溶藻特性

唐水水 林炜铁\* 李敬源 蔡小龙 李会琴

(华南理工大学生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

**摘要:** 为了得到溶藻物质并进行溶藻特性的研究, 采用离心、乙醇沉淀和有机溶剂萃取的方法从发酵液中粗提得到溶藻物质, 再通过硅胶吸附柱层析和透析进行精制, 并采用试管试验法对其进行分析。研究溶藻物质的 pH 稳定性、热稳定性以及对藻类抗氧化酶系统的影响。该菌株的溶藻物质具有较大极性, 且分子量小于 3 kD; 经化学法鉴定, 基本确定为糖苷类物质、内酯类物质和萜类物质中的一种或几种的组合; 具酸碱稳定性, 但对热敏感, 随着处理温度的升高, 溶藻效果逐渐下降, 当温度超过 90 °C 处理 1 h 后, 活性几乎全部丧失; 会使藻细胞的丙二醛含量明显上升且维持在较高水平, 抗氧化酶系统中的 SOD、POD 和 CAT 在初期明显上升, 但在后期剧烈下降。  
**关键词:** 溶藻物质, 分离, 稳定性, 抗氧化酶

## Isolation and algicidal characteristics of the algicidal components from actinomycete strain L74

TANG Shui-Shui LIN Wei-Tie\* LI Jing-Yuan CAI Xiao-Long LI Hui-Qin

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

**Abstract:** To obtain the algicidal components from actinomycete strain L74, a series of techniques including centrifugation, ethanol precipitation, organic solvents extraction, silica gel adsorption chromatography, dialysis and chemical analysis were used. In addition, we studied the characteristic of stabilities of algicidal components under different pH and temperatures, and the influence of it to anti-oxidation enzyme system of *Microcystis aeruginosa*. The results suggested that the algicidal components may be or contain glycosides, lactones and triterpenes, which the molecular weights are less than 3.0 kD. In extraction experiments, petroleum ether, acetic ether and n-butanol can efficiently separate the algicidal components into water-layer. The algicidal components are stable for pH, but sensitive for temperature. After treated under 90 °C for one hour, the activity is nearly lost. When cultivated with algicidal components, the MDA contents of *Microcystis aeruginosa* increase and maintain at a high level, but the activities of SOD, POD and CAT significantly increase in the early cultivation and decline quickly in the late stage.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21076090)

\* 通讯作者: Tel: 86-20-39380601; ✉: weitie@21cn.com

收稿日期: 2010-09-16; 接受日期: 2011-01-05

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

**Keywords:** Algicidal components, Isolation, Stability, Anti-oxidation enzyme system

利用微生物法防治水华已经受到越来越多的关注, 目前有很多研究表明, 溶藻微生物能分泌溶藻物质进行溶藻<sup>[1-2]</sup>。放线菌是许多天然生物活性物质的重要来源, 同时也是一种优势微生物类群<sup>[3-4]</sup>。国内外对溶藻放线菌的研究主要集中于溶藻放线菌的分离、鉴定和溶藻现象的描述<sup>[5-7]</sup>, 而对溶藻物质的研究尚处于起步阶段。

所在课题组曾分离鉴定出一株新的溶藻放线菌<sup>[1]</sup>。为了得到较高纯度的溶藻物质, 采用离心、乙醇沉淀、有机溶剂萃取、硅胶吸附层析和透析对溶藻物质进行了分离, 并利用生化试验对其进行了研究。此外, 通过研究溶藻物质的酸碱稳定性、温度稳定性以及对藻类抗氧化酶系统的影响, 为利用放线菌溶藻物质防治水华提供了技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试藻种及菌种

**1.1.1 供试藻种:** 铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* FACHB905, 来源于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库, 25 °C 恒温、2000 lx 光照培养, 光暗比 14 h:10 h。

**1.1.2 菌种:** 为本试验室从广州大学城发生蓝藻水华的水塘周边土壤分离得到<sup>[1]</sup>, 该放线菌为弗氏链霉菌。

### 1.2 培养基<sup>[4]</sup>

**1.2.1 藻种培养基 (BG-11)(g/L):** NaNO<sub>3</sub> 1.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.04, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.075, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.036, 柠檬酸 0.006, 柠檬酸铁 0.006, EDTA·Na<sub>2</sub> 0.001, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.02, A5 液 1 mL。A5 液(g/L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86, MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.81, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.222, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.079, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.39, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.049。

**1.2.2 放线菌种子和发酵培养基(改良高氏一号, g/L):** 可溶性淀粉 20, 黄豆粉 10, NaCl 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub> 0.5, FeSO<sub>4</sub> 0.01, pH 7.2。改良高氏一号固体培养基在此基础上添加 2% 琼脂。

### 1.3 溶藻物质的制备

**1.3.1 溶藻效果的测定:** 叶绿素 a 在一切浮游藻类

里大约占有有机物干质量的 1%–2%, 是估计藻类生物量的重要指标<sup>[8]</sup>, 因此通过对比叶绿素 a 含量的变化来测定溶藻效果<sup>[9]</sup>。将溶藻物质与藻液以 1:9 的体积比混合, 培养 3 d 后, 取 5 mL 藻液, 4 000 r/min 离心 10 min 收集藻细胞。加 5 mL 95% 乙醇, 4 °C 浸泡 24 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 1 cm 比色管中测定 A<sub>665</sub>、A<sub>649</sub> 和 A<sub>750</sub>, 以 95% 乙醇作参比, 叶绿素 a 含量 Chla(mg/L)=(A<sub>665</sub>–A<sub>750</sub>)×13.7–(A<sub>649</sub>–A<sub>750</sub>)×5.76。

**1.3.2 溶藻物质粗提物的制备:** 离心获得除菌发酵液: L74 斜面菌种 28 °C 培养 3 d, 接种到三角瓶, 28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d 后, 以 10% 的接种量接种到发酵培养基, 28 °C、180 r/min 振荡培养 7 d, 收获发酵液。将发酵液经 5 000 r/min 离心 10 min, 弃去菌体收集上清液, 将上清液再经 0.22 μm 滤膜过滤 2 次, 此即除菌发酵液。

乙醇沉淀粗提取: 往除菌发酵液中缓慢加入 4 倍体积无水乙醇<sup>[10]</sup>, 常温下搅拌 30 min, 4 °C 冰箱静置 2 h, 5 000 r/min 离心 10 min, 分别收集上清液和沉淀。上清液经 40 °C 真空旋转蒸发除去乙醇并用无菌水定容至原体积, 此即乙醇浸提液。沉淀部分用无菌水重溶至原体积, 此即沉淀重溶液。以上步骤重复操作 3 次, 将乙醇浸提液及沉淀重溶液分别进行溶藻效果的测定。另取不加溶藻物质的藻液作为对照。

有机溶剂萃取: 将上述乙醇浸提液加入一倍体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇反复萃取 3 次, 每次静置 30 min, 分别收集水相与有机相<sup>[11]</sup>。将收集的水相经 40 °C 真空旋转蒸发残留有机溶剂, 用无菌水定容至原体积。将收集的有机相合并后经 40 °C 真空旋转蒸发至干后, 用无菌水定容至原体积, 分别进行溶藻效果的测定。另取不加溶藻物质的藻液作为对照。

**1.3.3 溶藻物质的精制:** 硅胶吸附柱层析: 选用 40 cm×2.6 cm 玻璃层析柱, 100–200 目硅胶, 装柱体积为 100 mL。通过反复薄层层析<sup>[12]</sup>, 确定洗脱液为氯仿: 甲醇=15:4 (V/V)。取经离心、乙醇沉淀、有机

溶剂萃取后的活性粗提物上柱进行动态吸附,用2-3倍柱体积的洗脱液进行洗脱,分管收集洗脱液。洗脱液经40℃真空减压浓缩至干,用无菌水定容至原体积,经0.22 μm滤膜过滤后,分别进行溶藻效果的测定。另取不加溶藻物质的藻液作为对照。

透析:将硅胶吸附柱层析所得到的溶藻物质装入3 kD的透析袋中,于BG-11缓冲液中,1/20 (V/V)摇床振荡透析3 h,连续3-5次,合并透析液,分别浓缩进行溶藻效果的测定。另取不加溶藻物质的藻液为对照。

**1.3.4 溶藻物质的生化试验<sup>[13]</sup>:**采用试管试验法对硅胶层析所得的溶藻物质进行定性检验。依据不同检验项目的特征显色反应和沉淀反应,结合其结果进行综合分析判断。

## 1.4 溶藻物质的溶藻特性

**1.4.1 pH对溶藻效果的影响:**将溶藻物质的pH值分别调为3.0、5.0、8.0、10.0和12.0,室温(26℃)保持2 h,然后将pH调回到自然(pH 6.7),分别取5 mL溶液加入45 mL藻液混合培养,进行溶藻效果的测定。另取不加溶藻物质的藻液为对照。

**1.4.2 温度对溶藻效果的影响:**取溶藻物质各5 mL加入到250 mL三角瓶中,分别于30℃、50℃、70℃、90℃和110℃加热处理1 h,静置至室温后,各加入45 mL铜绿微囊藻液混合培养,分别进行溶藻效果的测定。另取不加溶藻物质的藻液为对照。

**1.4.3 溶藻时间对溶藻效果的影响:**取精制的溶藻物质5 mL,加45 mL铜绿微囊藻液混合培养。另取不加溶藻物质的藻液为对照。每隔24 h取样,分别进行溶藻效果的测定。

**1.4.4 溶藻物质对铜绿微囊藻抗氧化酶系统和丙二醛含量的影响:**粗酶液的制备:取10 mL溶藻物质加于90 mL藻液中,25℃恒温、光暗比14 h:10 h、2 000 lx光照培养。另取不加溶藻物质的藻液为对照。每隔24 h取样,8 000 r/min、4℃离心10 min收集藻细胞,加适量磷酸缓冲液(pH 7.8),超声破碎5 min,12 000 r/min、4℃离心20 min,上清液定容至原体积,取上清液,-70℃保存,此即粗酶液,

采用考马斯亮蓝G250法<sup>[14]</sup>测定蛋白含量。

丙二醛MDA含量的测定采用硫代巴比妥酸法<sup>[14]</sup>,超氧化物歧化酶SOD活性的测定参考文献[15]的方法,过氧化物酶POD活性的测定参考文献[16]的方法,过氧化氢酶CAT活性的测定参考文献[17]的方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 溶藻物质的制备

**2.1.1 溶藻物质粗提物的制备:**乙醇沉淀粗提取的溶藻效果结果显示,乙醇浸提液具溶藻效果,而沉淀重溶液无溶藻效果,表明溶藻物质可以完全被乙醇提取。从图1可知,有机溶剂可以把溶藻物质有效分配至水相中,说明溶藻物质具有较大的极性。

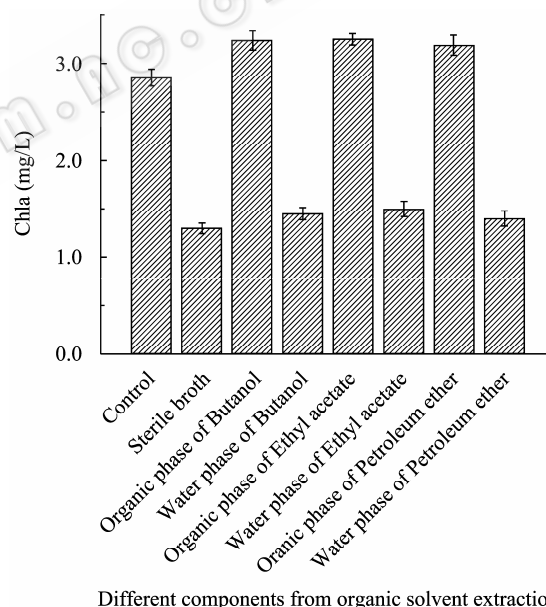


图1 有机溶剂萃取对溶藻效果的影响  
Fig. 1 The influences of organic solvent extraction on algicidal effect

**2.1.2 溶藻物质的精制:**硅胶层析液的溶藻效果显示,溶藻物质主要集中于1.5-2.0倍柱体积的洗脱液中。从图2可知,溶藻物质经透析处理后透出液具有较好的溶藻效果,说明溶藻物质为小于3 kD的小分子物质。

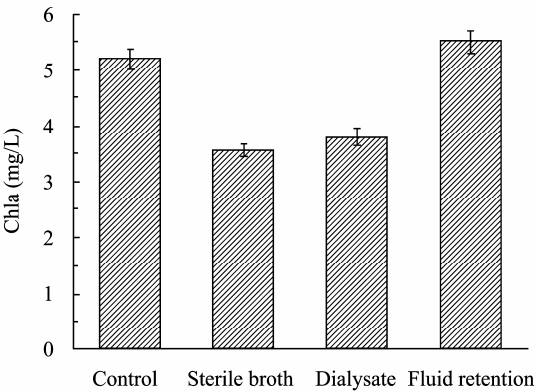


图 2 透析作用对溶藻效果的影响  
Fig. 2 The influences of dialysis on algicidal effect

**2.1.3 溶藻物质的生化试验:** 溶藻物质的生化鉴定结果如表 1 所示, 溶藻物质基本确定为糖苷类物质、三萜类物质和内酯类物质中的一种或几种的组合。游离的三萜和内酯均为低极性物质, 但有机溶剂萃取实验表明溶藻物质具有较大的极性, 这可能是由于其与糖结合, 形成相应的三萜苷及内酯苷<sup>[18-19]</sup>。

表 1 溶藻物质的生化鉴定 Table 1 Biochemical identification of algicidal components		
Test Items	Methods	Results
Alkaloids	碘化汞钾试验	-
Amino acids, peptides and proteins	茚三酮试验	-
Reducing sugars and polysaccharides	$\alpha$ -萘酚试验	+
Organic Acids	溴酚蓝试验	-
Phenols	三氯化铁试验	-
Triterpenes	冰醋酸-浓硫酸试验	+
Steroid	氯仿-浓硫酸试验	-
Cardiac glycosides	碱性苦味酸试验	-
Anthraquinone	硼酸溶液试验	-
Flavonoids	三氯化铝试验	-
Lactone	异羟肟酸铁试验	+

2.2 溶藻物质的溶藻特性

**2.2.1 pH 对溶藻效果的影响:** 从图 3 可知, 溶藻物质经不同 pH 处理 2 h 再调回自然 pH 后, 仍具溶藻效果, 说明溶藻物质具有酸碱稳定性。

**2.2.2 温度对溶藻效果的影响:** 从图 4 可知, 溶藻物质随着处理温度的升高溶藻效果下降, 当温度超过 90 °C 处理 1 h 后, 几乎无溶藻效果, 说明溶藻物质对温度敏感。

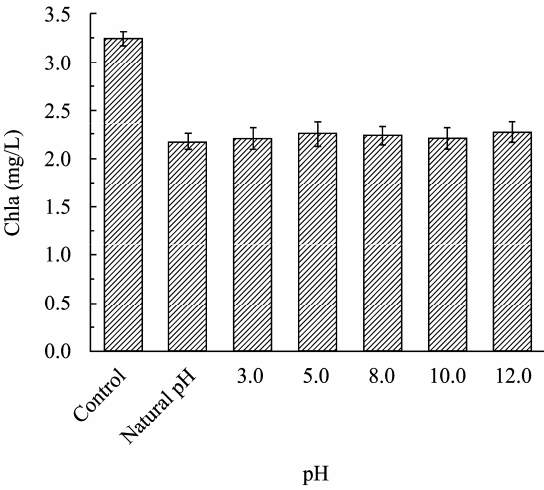


图 3 pH 对溶藻效果的影响  
Fig. 3 The influences of pH on algicidal effect

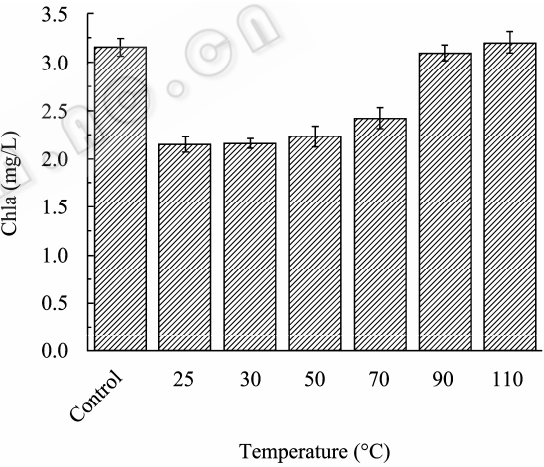


图 4 温度对溶藻效果的影响  
Fig. 4 The influences of temperature on algicidal effect

**2.2.3 溶藻时间对溶藻效果的影响:** 从图 5 可知, 随着溶藻时间的延长, 与对照组相比处理组出现溶藻现象, 前 3 天叶绿素 a 含量显著下降, 至第 7 天时其含量低于 0.5 mg/L。

**2.2.4 SOD 活性的变化:** 从图 6 可知, 对照组的 SOD 活性一直处于较低水平, 而在处理组中, 其 SOD 活性在前 4 天显著上升, 但从第 5 天起大幅度下降, 第 6 天后开始低于对照组。

**2.2.5 POD 活性的变化:** 从图 7 可知, 对照组的 POD 活性一直处于较低水平, 而在处理组中, 其

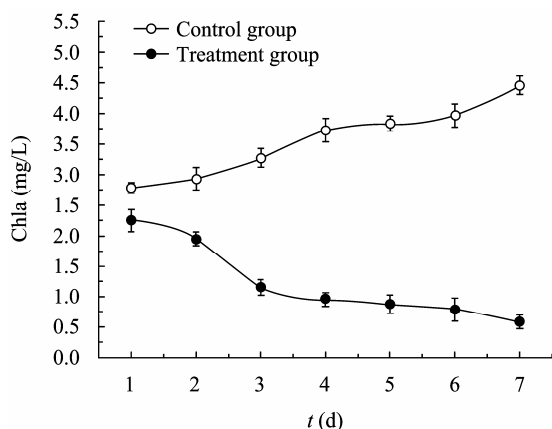


图5 溶藻时间对溶藻效果的影响

Fig. 5 The influences of algal time on algal effect

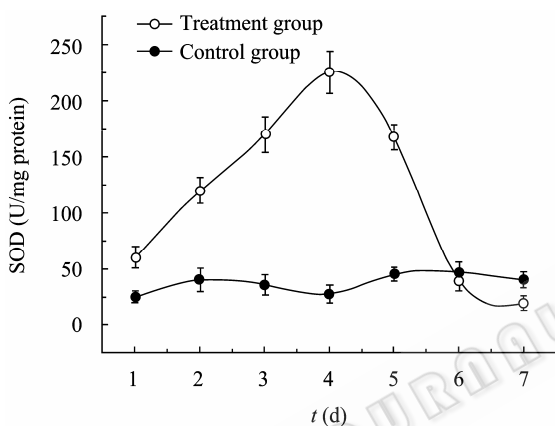


图6 溶藻物质对铜绿微囊藻 SOD 活性的影响

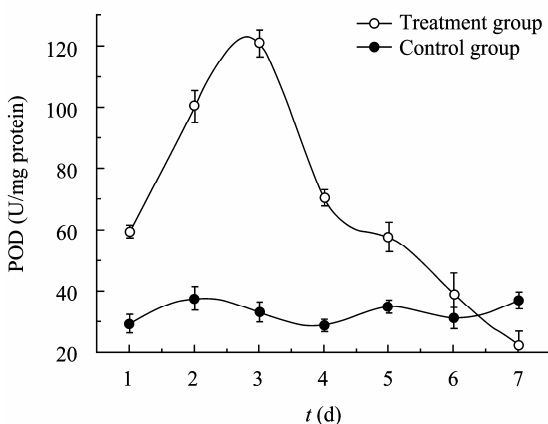
Fig. 6 Effects of algal components on SOD activity in *Microcystis aeruginosa*

图7 溶藻物质对铜绿微囊藻 POD 活性的影响

Fig. 7 Effects of algal components on POD activity in *Microcystis aeruginosa*

POD 活性在前 3 天显著上升, 第 4 天起大幅度下降, 第 7 天后其活性显著低于对照组。

**2.2.6 CAT 活性的变化:** 从图 8 可知, 对照组的 CAT 活性一直处于较低水平, 而在处理组中, 其 CAT 活性在前 4 天显著上升, 第 5 天起活性直线下降, 第 7 天后其活性明显低于对照组。

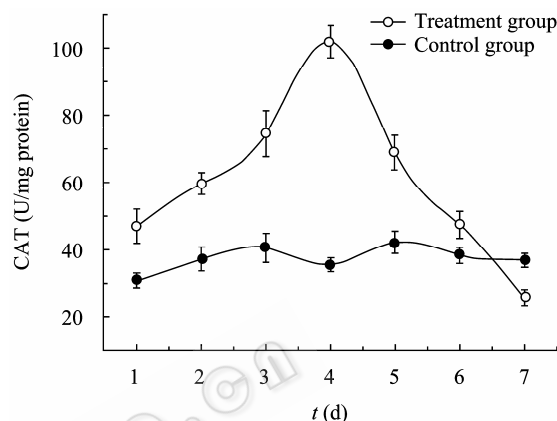


图8 溶藻物质对铜绿微囊藻 CAT 活性的影响

Fig. 8 Effects of algal components on CAT activity in *Microcystis aeruginosa*

**2.2.7 MDA 含量的变化:** MDA 通常被用来作为脂质过氧化指标, 其含量的高低反映了机体细胞受自由基攻击的程度。从图 9 可知, 对照组的 MDA 含量一直处于较低水平, 而在处理组中, 其 MDA 含量一直处于上升水平, 其后一直维持在较高水平, 这说明活性物质的加入促使藻细胞发生了膜脂过氧化。

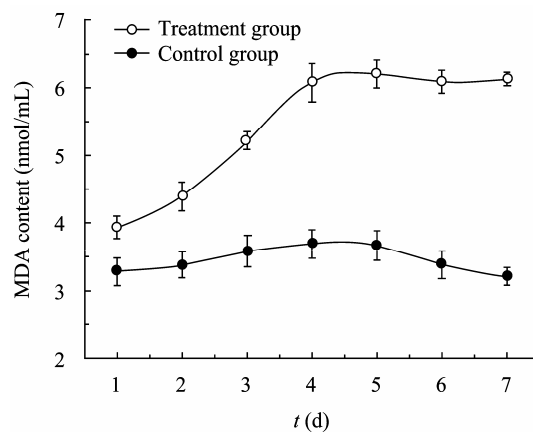


图9 溶藻物质对铜绿微囊藻 MDA 含量的影响

Fig. 9 Effects of algal components on MDA contents in *Microcystis aeruginosa*

### 3 讨论

研究表明, 机体的抗氧化防御系统作为需氧生物体内活性氧自由基清除、防止过氧化损伤的主要保护机制, 负责清除组织细胞代谢产生的活性氧自由基, 使之始终维持较低水平而不致在体内累积, 以保护生物体内功能大分子不被氧化破坏, 保持机体正常的生理功能<sup>[20]</sup>。SOD、POD 和 CAT 是机体内主要的抗氧化酶, 它们的含量和活性影响机体内的活性氧自由基水平以及脂质过氧化终末代谢产物 MDA 的含量。在本研究中, 对照组的抗氧化酶活性及 MDA 的含量一直维持在较低水平, 而在处理组中, 伴随着铜绿微囊藻的降解, SOD、POD 和 CAT 都有一个先显著上升后剧烈下降的过程, 此外, MDA 含量则明显上升且维持在较高水平。这表明, 溶藻物质的溶藻机理与破坏藻类抗氧化系统有关; SOD、POD 和 CAT 作为内源活性氧清除剂, 在溶藻初期可以清除体内产生的大量的活性氧, 维持活性氧代谢平衡, 保护膜结构, 从而在一定程度上减缓胁迫, 但是随着溶藻时间的延长, 机体产生的活性氧自由基数量超出其还原能力, 抗氧化酶活性可能因为中毒而被抑制。

### 参 考 文 献

- [1] 梁铜文, 林炜铁. 溶藻放线菌的分离鉴定及其溶藻特性[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(9): 68-72.
- [2] 张涵之, 潘伟斌, 马超. 溶藻细菌 L7 溶藻活性代谢产物的分离鉴定[J]. 中国环境科学, 2010, 30(S1): 19-23.
- [3] 姜怡, 唐蜀昆, 张玉琴, 等. 放线菌产生的生物活性物质[J]. 微生物学通报, 2007, 34(1): 188-190.
- [4] Magarvey NK, Keller JM, Bernan V, et al. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(12): 7520-7529.
- [5] 喻融, 周瑞, 刘芳遐, 等. 一种筛选溶藻放线菌的新方法[J]. 华中师范大学研究生学报, 2005, 12(4): 142-144.
- [6] 肖慈琼, 姜红, 程凯, 等. 溶藻放线菌 AN02 的筛选及其培养条件的优化[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(4): 11-14.
- [7] Yamamoto Y, Kouchiwal T, Hodokil Y, et al. Distribution and identification of actinomycetes lysing cyanobacteria in a eutrophic lake[J]. Journal of Applied Phycology, 1998, 10(4): 391-397.
- [8] 戴荣继, 佟斌, 黄春, 等. HPLC 测定饮用水中藻类叶绿素含量[J]. 北京理工大学学报, 2006, 26(1): 87-89.
- [9] Nakashima T, Miyazaki Y, Matsuyama Y, et al. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γ-proteobacterium*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 73(3): 684-690.
- [10] 郭勇. 现代生化技术[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2006: 36-101.
- [11] 蔡宝昌, 罗兴洪. 中药制剂前处理新技术与新设备[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 264-265.
- [12] 曹洪玉. 薄层层析法对药物成分的剖析[J]. 赤峰学院学报: 自然科学版, 2009, 25(12): 31-34.
- [13] 董振生, 程天印, 李丹, 等. 山莓叶化学成分分析及其生物碱的抗菌作用[J]. 畜牧兽医杂志, 2008, 27(6): 25-27, 30.
- [14] Droillard MJ, Paulin A, Massot JC. Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*)[J]. Physiologia Plantarum, 1987, 71(2): 197-202.
- [15] 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: 134-137, 195-197.
- [16] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 121-124.
- [17] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 274-277.
- [18] 张贵君. 常用中药液相与气相色谱鉴定[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 68-69.
- [19] 卢艳花. 中药有效成分提取分离技术[M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2008: 246-247.
- [20] Mathew S, Kumar KA, Anandan R, et al. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*[J]. Comp Biochem Physiol C, 2007, 145(3): 315-320.