

# 青草沙水库中一株铜绿微囊藻抑藻细菌的作用研究

崔璐璐 谢冰\* 彭青 王文婷

(华东师范大学 环境科学系 上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室 上海 200062)

**摘要:**【目的】为了研究青草沙水库中土著微生物对藻类生长的抑制作用,从水库水体中筛选出对藻类有抑制作用的细菌并研究其对铜绿微囊藻的抑制效果。【方法】通过对水库水体中的细菌进行划线分离和筛选,挑选出一株对铜绿微囊藻生长有较好抑制作用的菌株 CL。考察其对铜绿微囊藻的抑制效果及不同培养时间和菌液浓度对抑藻效果的影响,并对菌株进行 16S rDNA 序列分析。【结果】实验菌液浓度为  $4.5 \times 10^8$  CFU/mL– $8.4 \times 10^8$  CFU/mL 时,细菌对铜绿微囊藻的抑制率可达 45.4%。抑藻效果随培养时间先增后降,在静置培养第 6 天抑藻效果达到最大。该菌经过 16S rDNA 序列分析,属于黄单胞菌科的寡养单胞菌。【结论】从青草沙水库中筛选出了对铜绿微囊藻有抑制作用的土著细菌寡养单胞菌,对青草沙水体铜绿微囊藻的控制具有一定的潜在应用价值。

**关键词:** 铜绿微囊藻, 青草沙水库, 寡养单胞菌

## Study on inhibitory effect of an anti-*Microcystis aeruginosa* bacterium strain from Qingcaosha Reservoir on *Microcystis aeruginosa*

CUI Lu-Lu XIE Bing\* PENG Qing WANG Wen-Ting

(Laboratory of Urbanization and Ecological Restoration of Shanghai, Department of Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract: [Objective]** In order to study control strategy of the *Microcystis aeruginosa* by native microorganism from Qingcaosha Reservoir water, the anti-*Microcystis aeruginosa* bacterium was isolated from Qingcaosha Reservoir water and its inhibitory effect on *Microcystis*

基金项目: 国家水专项(No. 2008ZX07421-001); 上海市建委重大科研项目(No. 建重 2008-05)

\*通讯作者: ✉: bxie@des.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2012-02-17; 接受日期: 2012-03-09

*aeruginosa* was investigated. [Methods] Based on isolating and screening the bacteria cultured from the reservoir water, a strain CL capable of inhibiting *Microcystis aeruginosa* was obtained. The inhibiting performance and influences parameters, such as culture time and concentration of bacterium on inhibitory effect were studied and 16S rDNA sequence analysis was done. [Results] Results showed that the inhibitory ratio would reach 45.4% when bacterium concentration ranged from  $4.5 \times 10^8$  CFU/mL to  $8.4 \times 10^8$  CFU/mL. Inhibitive effect first increased and then dropped with the culture time, the maximum inhibitory ratio appeared in the sixth day. 16S rDNA sequence analysis revealed that the strain CL belongs to *Stentrophomonas* genus of Xanthomonas family. [Conclusion] A native bacteria named *Stentrophomonas* capable of inhibiting *Microcystis aeruginosa* was isolated from Qingcaosha Reservoir water, which has a certain potential use in controlling *Microcystis aeruginosa* of Qingcaosha Reservoir.

**Keywords:** *Microcystis aeruginosa*, Qingcaosha Reservoir, *Stentrophomonas*

随着城市化和工农业生产的发展,大量富含氮、磷等营养物质的工业废水、生活污水流入湖泊、河流等缓流水体,使水中营养物质迅速富集,引起藻类及其他浮游生物迅速繁殖,水体溶解氧下降<sup>[1]</sup>。随着水体富营养化的加剧,藻类所引起的水污染问题已越来越引起人们的关注,淡水藻类污染已成为一个全球性的环境卫生问题<sup>[2]</sup>。由于微生物具有易于繁殖的特点,利用环境中土著微生物,特别是溶藻细菌来防治藻类危害已受到广泛关注<sup>[3-4]</sup>。探究藻菌关系和溶藻细菌对水体进行生态修复成为国内外研究的热点领域<sup>[5-6]</sup>。

有文献报道,2005年11月和2006年2月长江水中的氮磷浓度已达到水体发生富营养化的营养盐水平,并经模型预测,青草沙水库工程实施后有发生局部水体富营养化的可能<sup>[7]</sup>;而青草沙水库水源地作为上海市规划的战略水源地,对于全市水资源安全保障以及城市可持续发展具有重要作用<sup>[8-13]</sup>。因此如何防止青草沙水体藻类爆发,抑制藻类的生长,研究水体中具有抑制藻类生长的土著微生物,通过繁殖培育土著微生物来达到控藻的目的具有实际意义。

本研究通过对青草沙水库水样中的微生物进行培养并筛选分离出对铜绿微囊藻有抑制作用的土著细菌,考察其作用效果,为水库藻类土著细菌的控制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种来源

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)购自武汉水生所,采用 BG11 培养基(g/L)<sup>[14]</sup>: 硝酸钠 1.500, 七水硫酸镁 0.075, 柠檬酸铁 0.006, 碳酸钠 0.02, 磷酸氢二钾 0.04, 二水氯化钙 0.036, 柠檬酸 0.006, 乙二胺四乙酸钠 0.001, A5 溶液 1 mL, 去离子水。

A5 溶液(g/L): 硼酸 2.86, 七水硫酸锌 0.222, 钼酸钠 0.39, 四水氯化锰 1.81, 五水硫酸铜 0.079, 六水硝酸钴 0.049 4, 去离子水。采用血球计数板对铜绿微囊藻细胞浓度进行计数,并测定  $OD_{680}$ , 细胞密度  $y$  和吸光度  $x$  之间的关系式为  $y=1\ 707.4x+21.627$ ,  $R^2=0.996\ 5$ 。

### 1.2 抑藻细菌的分离

水样采自青草沙水库,采用 HQM-1 型有机玻璃采水器(2.5 L)从表层水体 0.5 m 以下取 1 L 水样装于采样瓶中,避光低温保存。单菌落的获取采用稀释法,用无菌枪头吸取 1 mL 水样于 9 mL 0.85% 的无菌 NaCl 溶液中,制成  $10^{-1}$  稀释液,以此类推分别制成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  稀释液。做平板涂布,置于 37 °C 生化培养箱中培养 24 h,将获得的单菌落分别划线 4 次以获得纯种。菌种液体培养采用 LB 培养基,在 37 °C 下 150 r/min 振荡培养 24 h,将菌种等体积接种入一定量铜绿微囊

藻液静置培养, 寻找并确认对藻类生长有抑制作用的菌株。将抑制效果最好的菌株命名为 CL 菌, 进行后续试验。

### 1.3 CL 菌液对铜绿微囊藻的抑制效果

将 10 mL CL 菌液( $OD_{600}$  为 0.42)加入到 100 mL  $OD_{680}$  为 0.367 的藻液中, 以未加菌液的藻液作为对照, 每 48 h 测吸光度, 观察菌液对藻的抑制效果并分析培养时间对抑藻效果的影响。在此基础上设定 3 个 CL 细菌浓度:  $8.4 \times 10^8$  CFU/mL、 $7.1 \times 10^8$  CFU/mL 和  $4.5 \times 10^8$  CFU/mL, 分别取 10 mL 加入到 100 mL 初始细胞密度为  $6.5 \times 10^6$  CFU/mL 的藻液中, 每 48 h 测定藻细胞密度, 以对照组的作为参照, 测定计算不同浓度菌液的抑藻率。

### 1.4 细菌的 16S rDNA 序列测定及特性

使用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCT CAG-3')和 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACG ACTT-3')扩增其 16S rDNA 片段, 并进行测序(上海生物迈浦科技有限公司)。将所测得的基因序列经 BLAST 程序与 GenBank 核酸数据库进行序列同源性比对分析。

## 2 结果

### 2.1 CL 菌液对铜绿微囊藻的抑制效果

图 1 为加入 CL 菌液对铜绿微囊藻细胞密度

的抑制效果。虽然实验组和对照组的铜绿微囊藻在实验的 2 周内均一直增长, 但处理组的藻吸光度始终低于对照组。加入 CL 菌液后, 实验观察的第 4 天已经表现出对铜绿微囊藻明显的抑制作用, 并且一直持续到实验结束的第 14 天。由此可以认为, 在藻菌共同生长过程中, CL 菌能抑制铜绿微囊藻的生长。

### 2.2 培养时间对 CL 菌抑藻效果的影响

由图 2 看出, 在静置培养过程中, 细菌抑藻率随时间变化呈现先升后降的趋势。第 4 天开始, 抑藻率明显上升, 第 6 天抑藻率达到最大, 为菌藻的最佳共培养时间。这说明, 在与藻类共同生存的环境下, CL 细菌在第 6 天发挥良好的抑藻效果。分析原因可能与铜绿微囊藻细胞生长规律有关, 铜绿微囊藻一般在第 5–8 天进入指数生长期(快速繁殖期)<sup>[15]</sup>, 随后进入稳定期和衰亡期。在进入指数生长期之前, 铜绿微囊藻生物量和生物活性都较低, 细菌在整个空间中的竞争占优势, 有利于细菌通过“藻菌互作”实现对藻类细胞生长的良好抑制效果。晋利等<sup>[16]</sup>研究发现在相同的细菌处理条件下, 细菌对处于适应期与对数期藻的抑制效果好于对处于稳定期藻的抑制效果。从 CL 细菌和藻类的共生结果来看, CL 菌对藻类不是杀灭, 而是通过营养盐和生态位的竞争来抑制藻类, 虽然相比较其他的溶藻细菌其作用时间

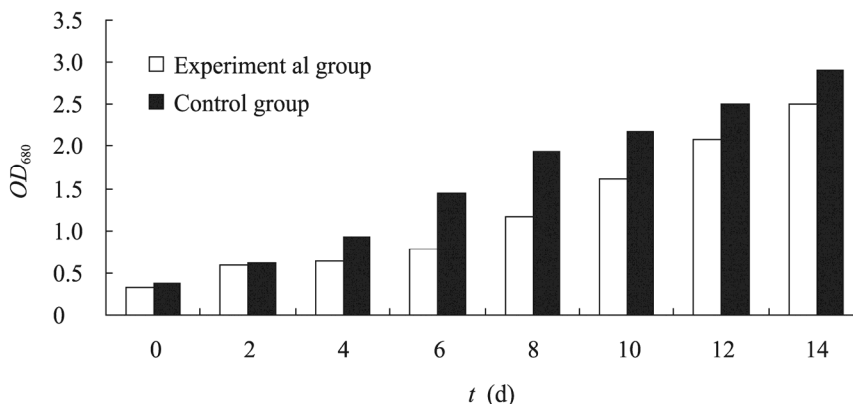


图 1 CL 菌液对铜绿微囊藻的抑制效果

Fig. 1 Inhibitory effect of CL bacterium fluid on *Microcystis aeruginosa*

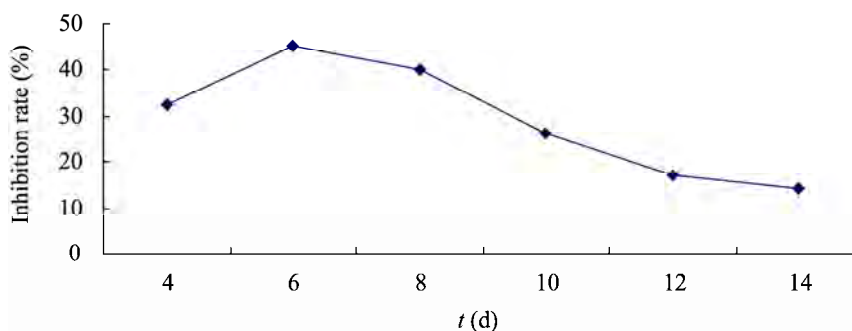


图2 抑藻率随时间变化的趋势

Fig. 2 Evolvement curve of algal inhibitory ratio versus culture time

较长,但是利用土著细菌和藻类的竞争关系达到抑制藻类的效果,对于自然生态系统的良性循环是有益的。

### 2.3 CL 菌液浓度对抑藻效果的影响

图3为选取的第6-8天的藻细胞密度的平均值,对3种不同浓度菌液下的藻细胞密度均值做比较。由图3可以看出,藻细胞生长受CL菌液

浓度的影响。实验组铜绿微囊藻细胞密度与对照组相比都有所降低,且菌液浓度越大,藻细胞密度降低得越多。由此可以初步认为,菌液浓度越大,抑藻效果越好。

图4为菌体浓度为 $8.4 \times 10^8$  CFU/mL的CL菌液与铜绿微囊藻共培养至第8天时,与对照组藻液生长情况对比,可看出左边实验组的藻液颜色

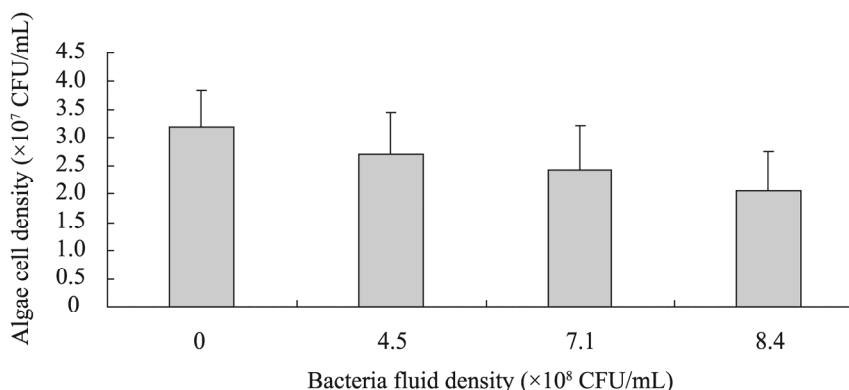


图3 CL 菌液浓度对抑藻效果的影响

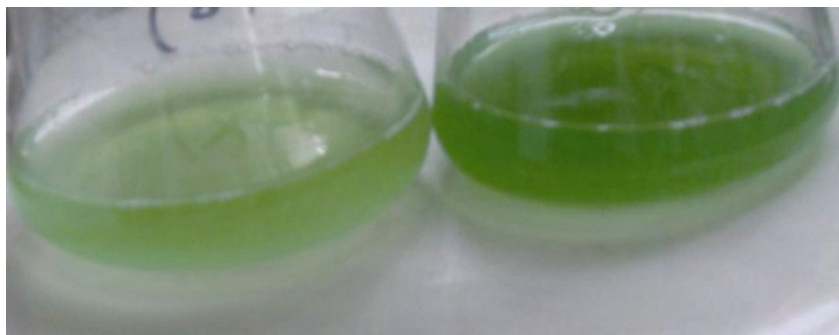
Fig. 3 Inhibitory effects on *Microcystis aeruginosa* for different bacterium concentrations

图4 实验组和对照组藻液颜色对比

Fig. 4 Color contrast of *Microcystis aeruginosa* for experiment group and control group

与对照组相比明显变浅, 铜绿微囊藻的生长受到显著抑制, 显示出较好的抑制藻类生长的效果。

## 2.4 CL 细菌的 16S rDNA 序列测定及特性

用引物 27f 和 1492r 扩增 CL 细菌的 16S rDNA 片段并测序, 通过在数据库对细菌的 16S rDNA 序列比对(登录号为 AACY020478472), 得出该菌与寡养单胞菌的相似性高达 98%。该菌的分类地位属于变形菌门, 丙型变形菌纲, 黄胞单菌目, 黄胞单菌科, 寡养单胞菌属<sup>[17]</sup>。

研究表明, 寡养单胞菌具有独特的生物化学活性、代谢特性, 在富磷培养基中培养 48 h, 菌株的除磷率大于 78%<sup>[18]</sup>。环境因素对铜绿微囊藻生长影响的研究表明, 总磷浓度的增加更易于促进铜绿微囊藻的生长<sup>[19]</sup>。而寡养单胞菌较高的除磷率特性, 可能会导致培养基中磷含量不能满足铜绿微囊藻的生长需求, 这时铜绿微囊藻就会消耗自身细胞中的磷用于生长和代谢<sup>[20]</sup>, 当细胞内磷含量降低到一定值时, 藻细胞的增长率就会降低。寡养单胞菌较高的除磷效率很可能是寡养单胞菌与藻类互作过程中对藻类产生抑制作用的内在机制。在低营养水平的水源水库中, 寡养单胞菌与铜绿微囊藻竞争营养物从而限制其生长的性能, 可为长江口水库富营养化蓝藻的治理提供一种有效的土著菌种资源。

本文初步研究报道了寡养单胞菌对铜绿微囊藻生长的抑制效果, 进一步研究将对该细菌及藻类生长、代谢的生理生化机制, 以及它们共生过程中生理生态关系, 为水体的蓝藻控制提供依据。

## 3 结论

(1) 报道了一株从青草沙水库水样中分离筛选出的抑藻菌, 该菌对铜绿微囊藻有抑制作用。菌液浓度为  $4.5 \times 10^8$ – $8.4 \times 10^8$  CFU/mL 时, 对铜绿微囊藻的抑制率可达 45.5%。在培养第 6 天可达到最大抑藻率。

(2) 该菌经 16S rDNA 鉴定, 属于黄单胞菌科的寡养单胞菌属。该菌具有良好的吸磷功能可能是细菌抑制藻类生长的内在机制。深入研究该细菌的生理生化机制以及细菌与铜绿微囊藻共生过程中的生理生态关系, 可为该菌用于长江口水库富营养化藻类的控制提供重要依据。

## 参考文献

- [1] 程丽巍, 许海, 陈铭达, 等. 水体富营养化成因及其防治措施研究进展[J]. 环境保护科学, 2007, 33(1): 18–21.
- [2] 赵以军, 刘永定. 有害藻类及其微生物防治的基础——藻菌关系的研究动态[J]. 水生生物学报, 1996, 20(2): 173–181.
- [3] 孟睿, 何连生, 席北斗, 等. 利用菌-藻体系净化水产养殖废水[J]. 环境科学研究, 2009, 22(5): 511–515.
- [4] 石苗, 邹莉, 刘新尧, 等. 水华杀藻微生物的分离与分子生物学鉴定[J]. 水生生物学报, 2005, 29(5): 587–590.
- [5] 沈琦, 唐晨, 程凯, 等. 一株溶藻细菌溶藻活性物质的性质[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(6): 1–5.
- [6] Lovejoy C, Bowman JP, Hallegraeff GM. Algicidal effects of a novel marine pseudoalteromonas isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 2806–2813.
- [7] 张宏伟, 吴健, 车越, 等. 长江口青草沙水源开发的生态环境影响[J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2009(3): 38–47.
- [8] Hall EL, Dietrich AM. A brief history of drinking water[J]. Opflow, 2000, 26(6): 8–20.
- [9] Cech TV. Principles of Water Resources: History, Development, Management, and Policy[M]. New York: John Wiley and Sons, 2003: 472.
- [10] Pires M. Watershed protection for a world city: the

- case of New York[J]. Land Use Policy, 2004, 21(1): 161-175.
- [11] Otaki Y. Water systems and urban sanitation in Tokyo and Singapore during the 19th to 20th centuries[A]//Proceedings of 6th International Summer Academy on Technology Studies[C]. Austria: Graz Technical University Press, 2004: 249-260.
- [12] 顾玉亮, 乐勤, 金迪惠. 青草沙——上海百年战略水源地[J]. 上海建设科技, 2008(1): 66-69.
- [13] 车越, 杨凯, 吴阿娜, 等. 上海城市水源战略与水源地保护: 格局、问题与展望[J]. 自然资源学报, 2005, 20(5): 651-659.
- [14] 胡小贞, 马祖友, 易文利, 等. 4种不同培养基下铜绿微囊藻和四尾栅藻生长比较[J]. 环境科学研究, 2004, 17(Suppl 1): 55-57.
- [15] 刘红涛. 铜绿微囊藻生长与环境因子的关系及其铜胁迫下的毒理学效应[D]. 上海: 华中师范大学硕士学位论文, 2003.
- [16] 晋利, 刘兆普, 赵耕毛, 等. 一株溶藻细菌对铜绿微囊藻生长的影响及其鉴定[J]. 中国环境科学, 2010, 30(2): 222-227.
- [17] Hartter DR. The use and importance of nitroaromatic chemicals in the chemical industry[A]// Rickert DE. Toxicity of Nitroaromatic Compounds[M]. Washington, DC: Hemisphere Publishing Corp, 1985: 1-14.
- [18] 王昀璐, 花日茂, 唐欣昀. 寡养单胞菌在环境保护中的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15796-15797, 15800.
- [19] 陈国永, 杨振波, 马昱, 等. 氮和磷对铜绿微囊藻细胞生长的影响[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(9): 675-679.
- [20] 高学庆, 任久长, 宗志祥, 等. 铜绿微囊藻营养动力学研究[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 1994, 3(4): 461-469.

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。