

# 溶藻细菌胞外活性物质对蛋白核小球藻的 毒性效应

张纯敏 潘伟斌\* 陈岩贲

(华南理工大学 广东 广州 510006)

**摘要:** 为了探索分离到的溶藻细菌L7胞外活性物质对蛋白核小球藻的毒性效应和致毒机理, 采用不同质量浓度的L7胞外活性物质冻干粉(L7-LPEAC)处理蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*), 测定藻细胞的光合作用效率(EPR)以及蛋白质、叶绿素a和丙二醛(MDA)的含量。L7-LPEAC溶液浓度较低(0.80 g/L和 1.25 g/L)时促进蛋白核小球藻的生长, 其 96 h、120 h的EC<sub>50</sub>分别为 5.75 g/L 和 2.55 g/L。当 L7-LPEAC 溶液浓度 $\geq 2.00$  g/L 时, 叶绿素 a 和蛋白质含量变化同步呈现先增加后减少的趋势; 处理 72 h 后, L7-LPEAC 溶液浓度分别为 2.00 g/L, 3.13 g/L, 4.90 g/L 的浓度组中, 藻细胞 MDA 含量与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ), 浓度组 7.67 g/L 和 12.00 g/L 则与对照组差异极显著( $P < 0.01$ ); 处理 120 h 后, 各浓度组藻细胞叶绿素 a 含量的相对抑制率均大于 60%。使用 L7-LPEAC 修复富营养化水体时, 选择适当的投加浓度, 既能杀灭引起水体富营养化的目标藻类, 又能避免对其他藻类产生抑制作用, 可以较好地维持水生生态系统的平衡。

**关键词:** 蛋白核小球藻, 毒理, 溶藻细菌, 溶藻活性物质

## The Toxic Effects of the Extracellular Active Components from One Algae-lysing Bacteria on *Chlorella Pyrenoidosa*

ZHANG Chun-Min PAN Wei-Bin\* CHEN Yan-Zhi

(College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

**Abstract:** Toxic effects of L7 lyophilized powder of extracellular active components (L7-LPEAC), extracted from the Algae-lysing bacteria L7, on *Chlorella pyrenoidosa* were studied according to the changes of effective photosynthesis rate (EPR), the protein content, the chlorophyll a content and the MDA content of algae. The results showed that the growth of alga was promoted at low concentrations of L7-LPEAC (0.80 g/L, 1.25 g/L). The 96 h-EC<sub>50</sub> and 120 h-EC<sub>50</sub> upon *Chlorella pyrenoidosa* are 5.75 g/L and 2.55 g/L, respectively. The chlorophyll a content increased firstly and then decreased at high concentrations of L7-LPEAC ( $\geq 2$  g/L), so did the protein content. Compared with the control group, there is a significant statistics difference ( $P < 0.05$ ) in the treatment groups (2.00 g/L, 3.13 g/L, 4.90 g/L), while extreme significant statistics difference ( $P < 0.01$ ) in the other treatment groups (7.67 g/L, 12.00 g/L) after 72 h. The inhibition rates of chlorophyll a content of *Chlorella pyrenoidosa* in all treatment groups reached over 60% after 120 h. For the

remediation of eutrophic nature water body, it can not only kill the algae which caused the water eutrophication, but also maintain the balance of the aquatic ecosystem well by adding some proper concentrations of L7-LPEAC.

**Keywords:** *Chlorella pyrenoidosa*, Toxicology, Algae-lysing bacteria, Extracellular algae-lysing components

利用溶藻细菌防治水华和赤潮, 作为富营养化水体藻类生物防治的可能途径之一, 已经受到广泛关注。多项研究表明, 许多溶藻细菌能分泌胞外活性物质, 对宿主藻类的生长起抑制作用<sup>[1]</sup>。因此, 分离筛选环保、高效、专一的溶藻活性代谢产物, 最终开发安全、高效的生物杀藻剂已经日渐成为治理藻类水华和赤潮问题的思路之一。近年来, 国内外相关人员和机构对溶藻细菌的溶藻机理以及溶藻活性物质的分离、提纯和鉴定进行了较为深入的基础性研究。然而, 在“以菌治藻”的工程实施之前还有大量的研究工作要开展, 例如进行溶藻细菌及其胞外活性物质的毒理效应分析、安全性评价和在天然水体中的适应性研究等<sup>[2-5]</sup>。

藻类对水生生态系统的平衡和稳定起着至关重要的作用, 藻类测试是水生态毒理学中不可或缺的方法之一。蛋白核小球藻作为藻类测试的典型藻种, 具有对毒物敏感、繁殖快、易于培养等特点<sup>[6,7]</sup>。作者研究了不同质量浓度溶藻细菌L7胞外活性物质冻干粉(L7 lyophilized powder of extracellular active components, 以下简称L7-LPEAC)对蛋白核小球藻生长等方面的影响, 探讨溶藻细菌L7胞外活性物质对蛋白核小球藻的毒性和致毒机理, 为实际应用前的生态风险评估提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试藻种:** 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*), 来源于中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心。

**1.1.2 溶藻细菌:** 本课题组从广州城区某富营养化池塘筛选获得, 编号为L7, 属蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 菌株PCR扩增产物的长度为154 bp, 在GenBank的登录号是DQ459876(Strain L7)。菌种以牛肉膏蛋白胨斜面培养基于4°C冷藏保存<sup>[5]</sup>。前期研究表明, 该溶藻细菌分泌的胞外活性物质对可能引起水华的铜绿微囊藻和水华鱼腥藻有较好的溶藻效果

[3,4]。

### 1.2 方法

**1.2.1 藻种培养:** 将蛋白核小球藻藻种接种到 SE 培养基中, 温度(24 ± 1)°C, 光强 2 500 Lx~3 000 Lx, 光暗比为 12 h 12 h, 静置培养, 每天定时摇动 5 次, 每次 10 min。每隔 96 h 移种 1 次, 重复 3 次以上, 使同一培养基中蛋白核小球藻的生长阶段趋同。镜检细胞正常后进行实验。

表 1 SE 培养基  
Table 1 SE Medium

NaNO <sub>3</sub>	0.25 g	Soil extract	40 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.075 g	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.005 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075 g	Fe-EDTA	1 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025 g	A5 solution *	1 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.175 g	Distilled water	958 mL
NaCl	0.025 g		

Note: \*: Composition of the A5 solution (Add to 100 mL of distilled water): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 286 mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 181 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 7.9 mg.

**1.2.2 L7 胞外活性物质冻干粉(L7-LPEAC)的制备:** 经过接种、振荡培养、离心、抽滤等步骤得到L7 无菌滤液, 用平板计数法计数, 该菌液中溶藻细菌个数为 2.23×10<sup>7</sup> CFU/mL。依据文献提供的方法制备无菌浓缩液<sup>[8]</sup>, 再用冷冻干燥机将无菌浓缩液制成 L7-LPEAC。

**1.2.3 实验设置:** 根据预备实验的结果开展正式实验。正式实验分 2 次进行: 1) 将 L7-LPEAC 溶于 SE 培养液, 设置 7 个等对数间距的浓度梯度(0.80 g/L, 1.25 g/L, 2.00 g/L, 3.13 g/L, 4.90 g/L, 7.67 g/L, 12.00 g/L)。以上 7 个浓度组和 1 个对照组分别处理等体积的蛋白核小球藻藻液(250 mL L7-LPEAC 溶液混合 250 mL 藻液), 每隔 24 h 测定各混合液中藻细胞叶绿素a含量。初始混合液中藻种平均密度约为 4.0×10<sup>5</sup> /L。2) 用 1) 中浓度 ≥ 2.00 g/L 的 5 个浓度组处理蛋白核小球藻细胞, 初始条件和处理方法同 1), 每隔 24 h 测定各混合液的EPR值以及蛋白质、MDA

含量。

**1.2.4 光合作用效率(EPR)测定:** 每组混合液各取 10 mL, 3000 r/min, 离心 5 min, 弃清液, 暗适应 15 min~30 min, 然后装入石英比色杯进行测量。测量使用叶绿素荧光仪(PAM2100), 温度保持 20°C, 样品用光化灯照 3 min, 使光合作用稳定, 再给出短暂的饱和光脉冲, 引起尖锐的荧光峰, EPR即为饱和峰高与最大荧光峰高的比值<sup>[8]</sup>。以各浓度组L7-LPEAC溶液质量浓度的对数为横坐标, EPR抑制率为纵坐标, 参照文献[9-12]方法, 求出 96 h、120 h半数效应浓度值 EC<sub>50</sub>。

**1.2.5 叶绿素a含量测定:** 采用乙醇萃取分光光度法<sup>[8]</sup>。

**1.2.6 蛋白质含量测定:** 每组混合液各取 25 mL, 4000 r/min, 离心 20 min, 弃清液, 加入 3 mL 0.05 mol/L、pH 值为 7.8 的磷酸缓冲液。然后用超声波细胞破碎仪破碎 3 min, 定容至 5 mL, 离心, 上清液即粗酶液<sup>[13]</sup>。采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

**1.2.7 MDA含量测定:** 取上述粗酶液, 使用硫代巴比妥酸(TBA)法测定MDA含量<sup>[14]</sup>。

### 1.3 试验数据的统计与分析

共设 7 个浓度组和 1 个对照组, 每组设置 3 个平行。所得数据采用  $(\bar{x} \pm s)$  表达, 用 SPSS 12.0 软件进行方差分析和 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 L7-LPEAC 对蛋白核小球藻光合作用效率(EPR)的影响

用L7-LPEAC处理蛋白核小球藻 96 h和 120 h后, 各浓度组和对照组藻细胞的光合作用效率(EPR)及其抑制率分别如表 2、表 3 所示。在同一时刻, 随着 L7-LPEAC 溶液浓度的升高, 藻细胞 EPR 值逐渐下降, EPR 抑制率逐渐上升, 剂量-效应关系明显。L7-LPEAC 对蛋白核小球藻 96 h 和 120 h 的 EC<sub>50</sub> 值分别为 5.75 g/L 和 2.55 g/L。

### 2.2 L7-LPEAC 对蛋白核小球藻叶绿素 a 含量的影响

用L7-LPEAC处理蛋白核小球藻 120 h后, 各浓度组藻细胞叶绿素 a 含量相比对照组的抑制率如图 1 所示。L7-LPEAC 溶液浓度为 0.80 g/L 和 1.25 g/L 的两组其相对抑制率均为负值, 藻液颜色浓绿,

表 2 处理 96 h 蛋白核小球藻光合作用效率(EPR)抑制率

Table 2 Inhibition of the effective photosynthesis rate (EPR) of *Chlorella pyrenoidosa* after 96 h incubation

质量浓度 Concentration (g/L)	光合作用效率 EPR <sup>*</sup>	EPR 抑制率 Inhibition of EPR <sup>*</sup> (%)	<i>n</i>
0.00	0.243 ± 0.004 (1.65%)	0.00 ± 0.00	3
2.00	0.206 ± 0.011 (5.20%)	15.35 ± 4.53 (29.52%)	3
3.13	0.183 ± 0.005 (2.47%)	24.83 ± 1.55 (6.26%)	3
4.90	0.151 ± 0.004 (2.68%)	37.99 ± 1.59 (4.18%)	3
7.67	0.066 ± 0.003 (4.65%)	72.98 ± 1.02 (1.39%)	3
12.00	0.024 ± 0.006 (23.27%)	90.24 ± 2.43 (2.39%)	3

Note: <sup>\*</sup>:  $\bar{x} \pm s$  (CV%) of a typical experiment.

表 3 处理 120 h 蛋白核小球藻光合作用效率(EPR)抑制率

Table 3 Inhibition of the effective photosynthesis rate (EPR) of *Chlorella pyrenoidosa* after 120 h incubation

质量浓度 Concentration (g/L)	光合作用效率 EPR <sup>*</sup>	EPR 抑制率 Inhibition of EPR <sup>*</sup> (%)	<i>n</i>
0.00	0.256 ± 0.007 (2.66%)	0.00 ± 0.00	3
2.00	0.192 ± 0.006 (2.96%)	24.89 ± 4.16 (16.73%)	3
3.13	0.079 ± 0.003 (3.85%)	69.04 ± 1.15 (1.67%)	3
4.90	0.027 ± 0.005 (16.91%)	89.61 ± 1.57 (1.76%)	3
7.67	0.000	100.00 ± 0.00	3
12.00	0.000	100.00 ± 0.00	3

Note: <sup>\*</sup>:  $\bar{x} \pm s$  (CV%) of a typical experiment.

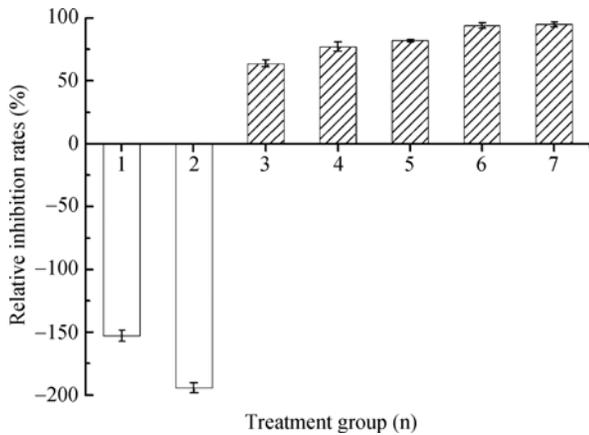


图1 蛋白核小球藻叶绿素 a 处理 120 h 的相对抑制率  
**Fig. 1 The relative inhibition rates of the chlorophyll a content of *Chlorella pyrenoidosa* after 120 h incubation**  
 Note: 1: 0.80 g/L; 2: 1.25 g/L; 3: 2.00 g/L; 4: 3.13 g/L; 5: 4.90 g/L; 6: 7.67 g/L; 7: 12.00 g/L.

L7-LPEAC 对藻细胞生长起促进作用; L7-LPEAC 溶液浓度  $\geq 2.00$  g/L 的 5 个浓度组, 观察其藻液颜色均变黄或白化, 叶绿素 a 相对抑制率均在 60% 以上, 12.00 g/L 浓度组相对抑制率达 94.93%。

对于 L7-LPEAC 溶液浓度  $\geq 2.00$  g/L 的 5 个浓度组, 叶绿素 a 含量呈现先上升后下降的变化趋势。在 48 h, 各浓度组叶绿素 a 含量都高于对照组, 且与对照组相比呈现极显著差异 ( $n=3, P<0.01$ )。此时, 除 L7-LPEAC 溶液浓度 2.00 g/L 浓度组外, 其余各组达到最大值, 且呈现较好的剂量-效应关系。72 h 时 3.13 g/L、4.90 g/L、7.67 g/L 和 12.00 g/L 4 个浓度组叶绿素 a 含量下降显著, 与各自 48 h 叶绿素 a 含量相比差异极显著 ( $n=3, P<0.01$ )。

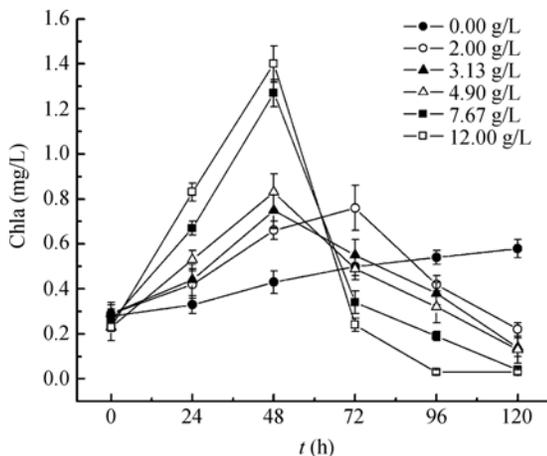


图2 L7-LPEAC 对蛋白核小球藻叶绿素 a 含量的影响  
**Fig. 2 Effects of L7-LPEAC on the chlorophyll a content of *Chlorella pyrenoidosa***

### 2.3 L7-LPEAC 对蛋白核小球藻蛋白质含量的影响

离心收集经 L7-LPEAC 处理的藻细胞, 测定藻体中蛋白质的含量, 结果见图 3。处理后藻细胞蛋白质含量整体呈现先增加后减少的趋势。48 h 时各浓度组藻细胞蛋白质含量达到最高值, 随后逐渐下降。

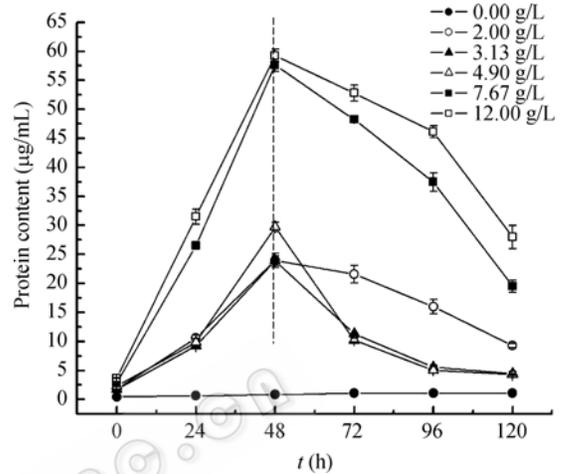


图3 L7-LPEAC 对蛋白核小球藻蛋白质含量的影响  
**Fig. 3 Effects of L7-LPEAC on the protein content of *Chlorella pyrenoidosa***

### 2.4 L7-LPEAC 对蛋白核小球藻 MDA 含量的影响

L7-LPEAC 处理 72 h, 各浓度组中藻细胞 MDA 含量如图 4 所示。在 2.00 g/L、3.13 g/L 和 4.90 g/L 浓度组 MDA 含量均高于对照组, 与对照组相比差异显著 ( $n=3, P<0.05$ )。7.67 g/L 和 12.00 g/L 浓度组

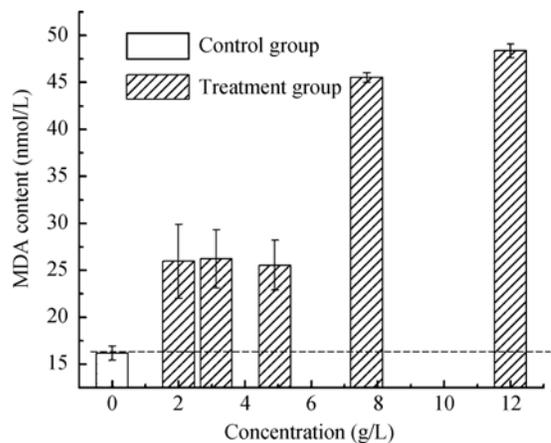


图4 处理 72 h 蛋白核小球藻 MDA 含量  
**Fig. 4 The MDA content of *Chlorella pyrenoidosa* after 72 h incubation**

中 MDA 含量远高于对照组, 与对照组相比差异极显著( $n=3, P<0.01$ )。

### 3 讨论

光合作用是生物界所有物质代谢和能量代谢的基础。在光合作用的原初反应, 吸收光能传递、转换为电能的过程中, 有一部分光能损耗是以较长的荧光方式释放的。自然条件下的叶绿素荧光和光合作用有着十分密切的关系<sup>[15]</sup>。在 96 h 和 120 h, 各受测浓度组体现出较好的剂量-效应关系: 混合液中 L7-LPEAC 质量浓度越高, EPR 值越小。由此说明, 在 L7-LPEAC 胁迫下, 藻细胞参与光合作用的电子受体减少, 从而减少了荧光峰基线以上的水平, 造成饱和脉冲光减少, 指示光合作用能力减弱, 初级生产力降低。

L7-LPEAC 溶液浓度  $\leq 1.25$  g/L 时促进蛋白核小球藻的生长, 其对蛋白核小球藻 96 h、120 h 的  $EC_{50}$  值分别为 5.75 g/L 和 2.55 g/L。何鉴尧等利用 L7 无菌滤液研究表明, L7 不只是单纯地杀灭富营养化水体中的所有藻类或某些特定藻类, 而是能较好地调节藻类群落结构, 使其朝着较为稳定的方向发展。因此在使用 L7-LPEAC 修复富营养化水体时, 应选择适当的投加浓度, 不仅可以杀灭引起水体富营养化的目标藻类, 而且能避免对其他藻类产生抑制作用, 可以较好地维持水生生态系统的平衡。

结合图 2 和图 3 可见, 蛋白质含量和叶绿素 a 含量的变化趋势基本相同。分析认为亦可能是由于藻细胞叶绿体遭受破坏以后, 其光合作用受阻, 加速了藻细胞蛋白质的损伤; 而藻细胞蛋白质作为叶绿体的有机成分, 又反过来影响叶绿体功能的正常发挥。

各浓度组蛋白质含量在处理 48 h 到达极大值后开始急剧减少, 表明藻细胞的生长对 L7-LPEAC 表现出短暂的“兴奋效应”<sup>[13,14]</sup>后受到抑制, 造成蛋白质损伤。直至处理 120 h, 各浓度组蛋白质含量均较少, 但仍高于对照组蛋白质含量。随着处理时间的增加, 各浓度组蛋白质含量可能会持续减少以至低于对照组蛋白质含量。

处理藻细胞 72 h, 随 L7-LPEAC 溶液浓度增加, 藻细胞脂质过氧化产物 MDA 含量增加, 与对照组相比差异显著( $n=3, P<0.05$ )或极显著( $n=3, P<0.01$ )。藻细胞生物膜脂化水平升高可能导致膜的选择通透性升高, 可能因为 L7-LPEAC 浓度过高引起膜系统脂质过氧化而破坏了细胞和叶绿体等细胞器膜结构。

### 4 结论

1) L7-LPEAC 溶液浓度  $\leq 1.25$  g/L 时, 促进蛋白核小球藻的生长, 其 96 h 和 120 h 的  $EC_{50}$  值分别为 5.75 g/L 和 2.55 g/L。

2) 使用 L7-LPEAC 修复富营养化水体时, 选择适当的投加浓度, 既能杀灭引起水体富营养化的目标藻类, 又能避免对其他藻类产生抑制作用。

### 参考文献

- [1] 郭吉. 太湖溶藻芽孢杆菌的溶藻作用及机制研究. 东南大学硕士学位论文, 2007.
- [2] 吕伟英, 赵以军, 周瑞, 等. 一种快速检测分离溶藻细菌方法的初探. 微生物学通报, 2007, 34(1): 119-122.
- [3] 刘晶, 潘伟斌, 秦玉洁, 等. 两株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性. 环境科学与技术, 2007, 30(2): 17-22.
- [4] 林敏, 潘伟斌, 张太平, 等. 三株溶藻细菌溶藻活性代谢产物的初步研究. 生态环境, 2007, 16(2): 358-362.
- [5] Rui-min MU, Zheng-qiu FAN, Hai-yan PEI, et al. Isolation and algae-lysing characteristics of the algicidal bacterium B5. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(11): 1336-1340.
- [6] Xia-li YUE, Xiao-qing YU, Yong-hong LIU, et al. Effect of bensulfuron-methyl on growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(3): 316-321.
- [7] Torres MA, Barros MP, Campos SC, et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(1): 1-15.
- [8] 李燕, 潘伟斌, 杨丽丽. 三株溶藻细菌胞外溶藻活性物质若干分离特性的研究. 微生物学通报, 2008, 35(2): 171-177.
- [9] Schafer H, Hettler H, Fritsche U, et al. Biotests using unicellular algae and ciliates for predicting long-term effects of toxicants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1994, 27(1): 64-81.
- [10] OECD. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 201: Alga Growth Inhibition Test. 1984.
- [11] OECD. Draft Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, 2004, 39B: pp.1-23.
- [12] 朱小山, 朱琳, 田胜艳, 等. 三种碳纳米材料对水生生物的毒性效应. 中国环境科学, 2008, 28(3): 269-273.
- [13] 聂湘平, 鹿金雁, 李潇, 等. 蛋白核小球藻对叔丁基对羟基茴香醚的毒性响应. 暨南大学学报(自然科学版), 2007, 28(5): 513-517.
- [14] 石瑛, 杜青平, 谢树莲. 1,4-二氯苯对蛋白核小球藻的毒性效应. 环境科学研究, 2007, 20(3): 133-136.
- [15] 梁英, 冯力霞, 尹翠玲, 等. 叶绿素荧光技术在微藻环境胁迫研究中的应用现状及前景. 海洋科学, 2007, 31(1): 71-75.