

研究报告

抑藻菌株 *Bacillus* sp. hsn03 分离鉴定及其对铜绿微囊藻的抑制效果与特征

许艳婷¹ 宋瑞雪¹ 田聪琦¹ 李祎^{1,2*}

(1. 河南师范大学生命科学学院 河南 新乡 453007)

(2. 厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361102)

摘要:【背景】蓝藻常形成水华,严重破坏水生环境及威胁水生生物。微生物能够专一性地抑制蓝藻的生长,从而可以被用于蓝藻水华的控制。【目的】分离筛选一株对有害水华藻——铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 7806 有高效抑藻能力的菌株,对其进行生理生化 and 分子鉴定,并研究其抑藻效果与特征。【方法】通过 API 试剂条确定其生理生化特征,对细菌的 16S rRNA 基因进行测序并构建系统进化树,通过探究细菌菌体、上清、发酵液的抑藻效果确定该菌的抑藻方式,通过测定不同温度、pH、蛋白酶 K、有机溶剂萃取和透析条件下的抑藻效果及傅里叶红外光谱来确定胞外抑藻物质的性质。【结果】菌株 hsn03 与芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.) 的 *Bacillus sonorensis* NBRC101234 有最高相似性,达 99.59%;通过分泌胞外抑藻物质对铜绿微囊藻生长表现出抑制效果,且最佳抑藻添加量为 7.0% (体积比);胞外抑藻物质为一类分子量大于 500 Da 且小于 1 kD,耐高温,耐酸碱,含有叁键和累积双键,非蛋白、多糖类的小分子物质。【结论】抑藻菌株的挖掘与鉴定对于丰富有害藻华藻的抑藻菌质资源有非常大的促进作用,通过对抑藻方式、效果和特征的研究为进一步将抑藻菌应用于铜绿微囊藻的治理奠定基础。

关键词: 铜绿微囊藻, 芽孢杆菌属, 抑藻活性物质, 抑藻效果与特征

Isolation and identification of *Bacillus* sp. hsn03 with algicidal activity on *Microcystis aeruginosa*

XU Yan-Ting¹ SONG Rui-Xue¹ TIAN Cong-Qi¹ LI Yi^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

(2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China)

Abstract: [Background] Cyanobacteria often form water bloom, seriously damage the aquatic environment and threaten aquatic organisms. Microbes can specifically inhibit the growth of cyanobacteria, and be used to control cyanobacteria bloom. [Objective] To isolate and screen

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (51008119, 41576109); National Research Project Training Fund of Henan Normal University (5101049170805)

*Corresponding author: Tel: 86-373-3326559; E-mail: liyi@htu.edu.cn

Received: January 13, 2018; Accepted: February 06, 2018; Published online (www.cnki.net): March 20, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(51008119, 41576109); 河南师范大学国家级科研项目培育基金(5101049170805)

*通信作者: Tel: 86-373-3326559; E-mail: liyi@htu.edu.cn

收稿日期: 2018-01-13; 接受日期: 2018-02-06; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-03-20

bacterial strains with high algicidal ability against harmful algal bloom causing species——*Microcystis aeruginosa* 7806, as well as the identification of the physiological, biochemical and molecular characteristics, meanwhile, algicidal mode and activity of the bacterium. **[Methods]** The physiology and biochemistry characteristics of strain hsn03 were studied by the API test kit. The 16S rRNA gene was sequenced and the phylogenetic tree was constructed. The algicidal activity was investigated by determination of the algicidal effect of bacterial cells, supernatant and bacterial culture on *Microcystis aeruginosa* 7806. The characteristics of algicidal substance were determined by measuring the algicidal activity of algicidal substance treated by different temperature, pH, protease K, organic solvent extraction, dialysis, as well as FTIR spectroscopy. **[Results]** Strain hsn03 possessed the highest similarity (99.59%) with the *Bacillus sonorensis* NBRC101234. Strain hsn03 showed high algicidal activity on *M. aeruginosa* through secreting extracellular algicidal substances, and the optimum addition amount of bacterial supernatant was 7.0% (V/V). The characteristics of algicidal substance was high thermal stability, pH stability and low molecular weight (500–1 000 Da), which was proved to be not protein and polysaccharide, and algicidal active compound was confirmed to contain triple bond and cumulated double bonds. **[Conclusion]** The excavation and identification of algicidal bacteria play an important role in enriching the resource of algicidal bacteria to control harmful algal bloom. By studying algicidal methods, effects and characteristics, we will lay the foundation for further application of algicidal bacteria to control *Microcystis aeruginosa*.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*, *Bacillus* sp. hsn03, Algicidal substances, Algicidal activity and characteristics

我国可利用的淡水资源有限,特别是随着生活垃圾的随意丢弃和含有大量氮、磷元素工业废水的肆意排放,严重污染了现有的淡水湖泊资源^[1-3]。由于氮、磷等元素的大量增加导致藻类等水生生物快速繁殖,从而使淡水水体呈现蓝绿色的现象就是水华,是水体富营养化的一种特征^[4]。蓝藻形成水华的频率非常高,形成水华后会引引起水质恶化,不仅会造成水生生物的死亡,还会威胁人体健康^[5-6]。因此,有效治理蓝藻水华是治理淡水水源污染的当务之急。

目前国内外对水华的治理方法有很多^[6]。有研究者通过在水体中投加特殊品种鱼类,让鱼类捕食蓝藻用于蓝藻的清除,虽然有一定作用,但鱼类的摄食和排泄会加速磷的活化,反而促进了藻类的生长^[7]。还有研究者采用物理方法如超声波法或直接过滤除藻,但此法对水体中藻浓度有较大要求且成本高^[8]。而化学方法一般通过投加高锰酸钾、硫酸铜等化学试剂来达到杀藻的效果,然而此法必然容易导致水中金属盐浓度上升,再

次对水体环境造成伤害。生物方法则是利用微生物与蓝藻进行竞争性生长,或者通过微生物分泌的胞外物质来缓解蓝藻水华的危害,又因微生物分布广、种类多、效率高、具有专一性和生态安全性^[9]。因此,生物方法是当前最为安全有效的除藻方法。

本文以铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* 7806)为研究目标,从养猪场养殖废水中筛选一株具有明显抑藻效果的细菌菌株 hsn03,对其进行了进化地位确定、形态鉴定和生理生化鉴定,并对抑藻方式、胞外抑藻物质性质及所含官能团进行初步探究,为进一步将抑藻菌应用于铜绿微囊藻的治理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

胰化蛋白胨、氯化钠、酵母粉、柠檬酸、柠檬酸铁、NaNO₃、K₂HPO₄、MgSO₄·7H₂O、CaCl₂·7H₂O、Na₂CO₃ 均为国产分析纯;细菌基因组 DNA 提取试剂盒, TaKaRa 公司。光照培养箱,

宁波莱福科技有限公司；超净工作台，苏州净化设备有限公司；恒温振荡培养箱，上海龙跃仪器设备有限公司；高速冷冻离心机，贝克曼公司；PCR 仪，上海伯乐生命医学产品有限公司；光学显微镜，尼康公司；傅里叶红外光谱仪，Bruker 公司。

1.2 供试菌种、藻种及其培养

菌株 hsn03 分离于养猪场新鲜养殖废水中，采用 LB 培养基(g/L:胰化蛋白胨 10.0，氯化钠 10.0，酵母粉 5.0，pH 7.2)于 37 °C、150 r/min 振荡培养。供试藻种为铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* 7806)，购于中国科学院野生生物种质库，采用 BG11 培养基于光照强度 50 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ，温度 25 \pm 1 °C，昼夜比 L:D=12 h:12 h 的条件下培养。BG11 培养基 (g/L) : NaNO_3 1.500 , K_2HPO_4 0.040 , $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075 , $\text{CaCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.036 , Na_2CO_3 0.020 , 柠檬酸 0.006 , 柠檬酸铁 0.006 , 微量元素溶液 A5 1.0 mL , EDTA 0.001 , 蒸馏水 1 000 mL , 用于铜绿微囊藻的培养。微量元素混合溶液 A5 (g/L) : H_3BO_4 2.860 , $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.810 , ZnSO_4 0.222 , Na_2MoO_4 0.390 , $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.079 , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.490。

1.3 实验方法

1.3.1 杀藻菌株 hsn03 的分离

取养猪场新鲜养殖废水 20 mL，通过用玻璃珠将废水混合均匀，获得细菌样品。采取梯度稀释法将样品分别涂布在 LB 固体培养基表面，置于 37 °C 培养 2–3 d。挑取不同形态单菌落划线于 LB 固体平板，置于 37 °C 培养 2–3 d，重复该步骤直至得到纯培养。分别将 0.5 mL 不同纯培养的发酵产物接种于 OD_{680} 为 0.22 的 10 mL 铜绿微囊藻培养液中，于 120 r/min 振荡 5 min 后，再在 25 \pm 1 °C，昼夜比 L:D=12 h:12 h，光照强度 50 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下培养 7 d，0.5 mL 灭菌的 BG11 培养基加入藻液中作为对照组，处理组和对照组分别设置 3 个平行；观察处理组中对 7806 藻有抑藻作用的菌株，

从而筛选出抑藻菌株。

1.3.2 菌株 hsn03 的菌落形态观察及简单染色

将菌株 hsn03 接种到 LB 固体平板上，于 37 °C 恒温培养 24–48 h，观察细菌菌落形态。并通过简单染色后，在油镜下观察细菌细胞形态。

1.3.3 菌株 hsn03 的生理生化鉴定

参照 Analytic Products INC (API)方法及其他生理生化鉴定，对菌株 hsn03 进行 20 E 和 20 NE 等生理生化指标测定；产色素实验为取一滴 20% 的 KOH 溶液滴在载玻片上，挑取适量菌体于液滴中，若液滴变为红色、粉色或褐色，则证明是阳性，可以产生色素；抑藻细菌降解淀粉、尿素能力实验为将淀粉、尿素以 1% 的添加量加入到 LB 固体培养基中，将菌株接种到该固体培养基上，在 37 °C 条件下培养 2–3 d，若菌落周围有透明圈形成则表明该菌株具有降解该化合物的能力，否则没有降解该化合物的能力；接触酶实验为将双氧水按 1:1 稀释，在干净培养皿盖中滴加稀释后的双氧水，然后用无菌枪头从待测菌的新鲜平板上稍刮一点涂布在双氧水滴上，若立刻剧烈产生气泡，则该菌为接触酶阳性；若只有微弱气泡产生，则该菌为接触酶弱；若不产生气泡，则该菌为接触酶阴性。

1.3.4 菌株 hsn03 的 16S rRNA 基因测定

以菌株 hsn03 的基因组 DNA 为模板，用 16S rRNA 基因扩增的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3')进行 PCR。PCR 反应体系为：27F 和 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL ，DNA (50 ng/ μL) 10 μL ，*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.5 μL ，10 \times Buffer 5 μL ，dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL ，加 ddH₂O 补足至 50 μL 。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 8 min。PCR 扩增后的目的条带送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果与 NCBI 的 GenBank 数据库以及 EzTaxon 数据

库^[10]进行比对, 选取与所测序列相似性较高的种或属。应用 ClustalX 和 MEGA 4 生物软件^[11], 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.3.5 菌株 hsn03 的抑藻效果实验

将培养至对数期的菌株 hsn03 的发酵液(OD_{600} 为 0.80)按照 5.0% (体积比)的添加量加入到铜绿微囊藻培养液中, 添加同样体积的无菌 LB 液体培养基的藻液为对照组, 以上处理组与对照组分别设置 3 个平行, 将处理组和对照组同时置于 25 ± 1 °C, 12 h 光照, 12 h 黑暗, 光照强度 $50 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 条件下培养, 每天连续取样用酶标仪测定处理组与对照组藻细胞在 OD_{680} 条件下的吸光度值, 并按照公式计算抑藻率。

$$\text{抑藻率}(\%) = (A - B) / A \times 100$$

其中, A 为对照组中藻细胞在 OD_{680} 条件下的吸光度值, B 为处理组中藻细胞在 OD_{680} 条件下的吸光度值。

1.3.6 菌株 hsn03 的抑藻方式

将培养至对数期(OD_{600} 为 0.80)的菌株 hsn03 进行以下处理: (1) 细菌发酵液, 未经任何处理的发酵液; (2) 无菌上清, 即将菌株 hsn03 的发酵液经 8 000 r/min 离心 5 min 除去菌体后收集上清; (3) 细菌菌体, 即将菌株 hsn03 的发酵液按照上述条件离心后, 除去上清得到的菌体。将细菌发酵液、无菌上清和细菌菌体分别按照 5.0% (体积比)的添加量加入铜绿微囊藻培养液中, 同时以添加相同体积的无菌 LB 液体培养基的藻液为对照组, 处理组与对照组均设置 3 个平行, 测定藻细胞在 OD_{680} 条件下的初始吸光度值之后, 每隔 24 h 测一次, 连续测定 7 d。

1.3.7 不同添加量的菌株 hsn03 的上清对藻细胞的抑制效果

将菌株 hsn03 的上清液分别按照 1%、3%、5%、7%、9% 的添加量加入到铜绿微囊藻 7806 培养液中, 并分别添加不同体积的灭菌 LB 培养基于藻液中作为对照组(不同体积 LB 培养基对藻细胞生长无影响), 每组实验均设置 3 个重复, 均置于

25 °C, 光照强度为 $50 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照培养箱中培养, 测定藻细胞在 OD_{680} 条件下的初始吸光度值之后, 每隔 24 h 测一次, 连续测定 7 d。

1.3.8 抑藻物质性质的探究

(1) 热稳定性。取菌株 hsn03 的无菌上清于 5 个离心管中, 分别在 40、60、80、99 °C 水浴处理 2 h, 以及 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌处理 20 min, 冷却至室温后将各处理组上清液按 7.0% 的终浓度加入藻液中进行抑藻活性检测。以加入等量灭菌 LB 液体培养基为对照组和未处理上清为阳性对照组, 每组实验均设置 3 个重复, 置于 25 °C, 光照强度为 $50 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照培养箱中培养, 测定藻细胞初始 OD_{680} 值, 之后每隔 24 h 测一次, 连续测定 7 d。

(2) 酸碱稳定性。取菌株 hsn03 上清液, 用 1 mol/L 的 NaOH 和 5 mol/L 的 HCl 溶液分别调节 pH 至 3.0、5.0、9.0、11.0, 室温处理 2 h 后, 再回调至初始 pH, 以未处理的无菌上清液作为阳性对照, 各处理组的上清液以 7% 的终浓度添加到藻液中进行抑藻活性检测, 以加入等量灭菌 LB 液体培养基的藻液为对照组, 每组实验均设置 3 个重复, 置于 25 °C, 光照强度为 $50 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照培养箱中培养, 测定藻细胞初始 OD_{680} 值, 之后每隔 24 h 测一次, 连续测定 7 d。

(3) 蛋白酶 K 处理。取菌株 hsn03 的上清液, 加入蛋白酶 K 使浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并于 55 °C 的水浴锅中处理 2 h, 将处理后的上清液按终浓度为 7% 的添加量加入到藻液中, 以加入等量灭菌 LB 液体培养基的藻液为对照组和加入等量未处理上清的藻液为阳性对照组, 每组实验均设置 3 个重复, 置于 25 °C, 光照强度为 $50 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照培养箱中培养, 测定藻细胞初始 OD_{680} 值, 之后每隔 24 h 测一次, 连续测定 7 d。

(4) 有机溶剂萃取。取菌株 hsn03 的上清液, 分别用不同极性的有机溶剂(二氯甲烷、三氯甲烷、正丁醇、甲苯)按有机溶剂与上清液 5:1 (体积比)的比例萃取抑藻物质; 取萃取 1 h 后的有机相用

旋转蒸发仪蒸干,用少量二甲亚砜(DMSO)溶解后加入到藻液中做抑藻实验。以加入等量灭菌DMSO的藻液为对照组和加入等量未处理上清的藻液为阳性对照组,每组实验均设置3个重复。

1.3.9 抑藻物质透析处理及成分分析

取菌株 hsn03 的上清液分别于透析袋[MWCO (Molecular weight cut off)=100 Da、MWCO=500 Da 和 MWCO=1 kD]中,置于无菌蒸馏水中透析 48 h (隔 24 h 换新鲜的无菌蒸馏水),取透析后的上清按终浓度 7%的添加量分别加入到藻液中,以加入等量灭菌 LB 液体培养基的藻液为对照组和加入等量未处理上清的藻液为阳性对照组,每组实验均设置 3 个重复。为了进一步确定该抑藻物质的组成成分,将透析后有抑藻能力和无抑藻能力的处理组的化学基团用傅里叶红外(FITR)光谱仪在波数频率为 400–4 000 cm^{-1} 范围内测定,并对傅里叶红外光谱图做出分析。

1.3.10 数据分析

显著性分析采用 Origin 8.5 进行分析,其中“*”代表 $P<0.05$,“**”代表 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株 hsn03 的形态特征及生理生化鉴定

菌株 hsn03 在 LB 固体培养基上生长 24 h 后,可以观察到菌株 hsn03 菌落为浅黄色,呈圆形,边

缘不齐整,表面有褶皱,不透明,如图 1A 所示;将细菌细胞进行简单染色后,在光学显微镜下可观察到细菌细胞呈短杆状,椭圆形,该细菌细胞长约 2 μm ,宽约 0.5 μm (图 1B 中箭头指出),且视野中可见大量芽孢。对菌株 hsn03 进行生理生化实验,结果如表 1 所示。将菌株 hsn03 菌体涂于滴有 20% KOH 的载玻片上,液滴的颜色并未变为红色、粉色或褐色,说明其不能产色素。涂于滴有稀释的双氧水的平皿里,产生大量的气泡,说明该菌接触酶阳性。将菌株 hsn03 接种于添加尿素、淀粉的 LB 固体平板上,经过培养,菌落周围并未出现透明圈,说明该菌没有降解淀粉、尿素的能力。

2.2 菌株 hsn03 的 16S rRNA 基因及系统进化树分析

将测序后的 16S rRNA 基因序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库以及 EzTaxon 数据库进行比对,结果表明该菌株与芽孢杆菌属(*Bacillus*)的菌株 *Bacillus sonorensis* NBRC101234 (AYTN01000016) 有最高相似性,为 99.59%。通过 ClustalX 和 MEGA 4 生物软件,采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,从图 2 可以看出,该菌株与 *Bacillus sonorensis* NBRC101234 (AYTN01000016) 在同一分支中。结合菌株形态特征及生理生化指标和系统进化树分析,确定该菌株为芽孢杆菌属的一株细菌,且命名为 *Bacillus* sp. hsn03 (MF925340)。

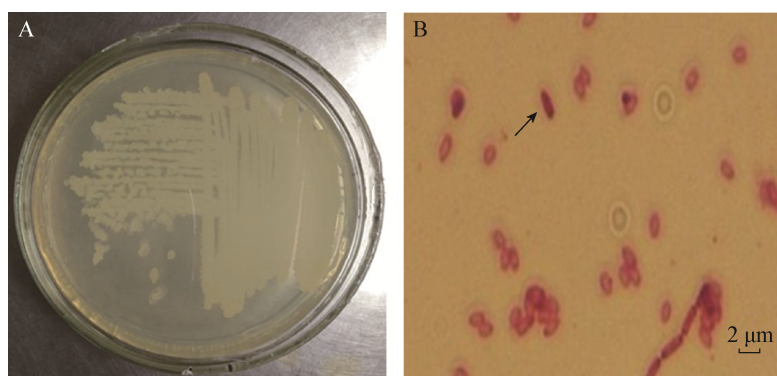


图 1 菌株 hsn03 的菌落形态(A)及细胞形态(B)

Figure 1 Colony morphology (A) and cell morphology (B) of strain hsn03

表 1 菌株 hsn03 的生理生化特性

Table 1 The physiology and biochemistry characteristics of strain hsn03

表型检测	结果	表型检测	结果
Phenotypic tests	Results	Phenotypic tests	Results
Reduction of nitrate to nitrite	+	β-galactosidase	+
Denitrification	—	Lysine decarboxylase	—
Indole production	—	Ornithine decarboxylase	—
D-glucose fermentation	+	CITrate utilization	+
Arginine dihydrolase	+	H ₂ S production	—
UREase	—	UREase	—
Aesculin hydrolysis	+	Tryptophane deaminase	—
Gelatin hydrolysis	+	INDole production	—
D-glucose	+	Acetoin production	+
L-arabinose	+	GELatinase	+
D-mannose	+	Glucose	+
D-mannitol	+	Mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+	Inositol	+
D-maltose	+	Sorbitol	w
Potassium gluconate	+	Rhamnose	w
Capric acid	—	Saccharose	+
Adipic acid	—	Melibiose	—
Malic acid	+	Amygdalin	+
Trisodium citrate	+	Arabinose	+
Phenylacetic acid	—		

Note: +: Positive; w: Weakly positive; —: Negative.

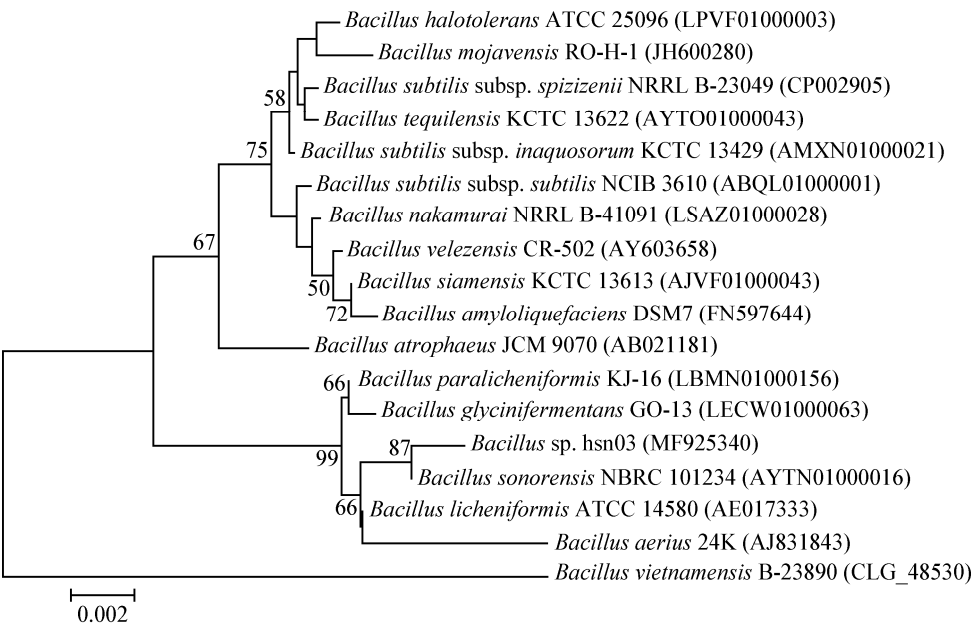


图 2 菌株 hsn03 的 16S rRNA 基因的系统进化树

Figure 2 Neighbor-Joining tree showing the phylogenetic positions of strain hsn03 based on 16S rRNA gene sequences

2.3 菌株 hsn03 的抑藻方式及发酵液不同添加量的抑藻效果

为了确定菌株 hsn03 的抑藻方式, 分别将菌株 hsn03 的发酵液($OD_{600}=0.80$)、无菌上清及细菌细胞按照终浓度 5.0% (体积比) 的添加量加入藻液中进行抑藻实验。如图 3A 所示, 添加了无菌 LB 培养基的对照组的藻细胞, 其 OD_{680} 值逐渐增大, 在第 7 天时达到 1.05。添加了细菌细胞处理组的藻细胞, 其 OD_{680} 值也在逐渐增大, 在第 7 天 OD_{680} 值达到 1.00, 与对照组几乎相同, 该值的大小与藻细胞的数量成正比, 说明藻细胞生长旺盛, 表明该菌体几乎无抑藻效果。而添加了无菌上清与发酵液的藻液, 与对照组相比, 藻细胞的 OD_{680} 值在处理过程中前 3 天处于较低的稳定水平, OD_{680} 值均维持在 0.21, 第 3 天到第 5 天呈现出略微上升的趋势, 第 5 天时 OD_{680} 值分别维持在 0.35 和 0.30, 第 7 天分别为 0.30 和 0.25, 这表明无菌上清与发酵液均能明显抑制藻细胞的生长。

由图 3B 可知, 在分别添加了 1%、3%、5%、7% 和 9% 无菌上清的处理组中藻细胞呈现出不同的生长状态。在整个处理过程中, 1% 处理组藻细胞的抑藻率一直维持在较低水平, 且为负值, 该结果表明 1% 的添加量无抑藻效果。3% 和 5% 处理组随着处理时间的延长, 其抑藻率虽有些波动, 但整体呈上升趋势, 抑藻率较低, 在第 7 天时分别为

15% 和 30%。7% 和 9% 处理组在第 2 天之后均对藻细胞的生长表现出明显的抑制效果, 抑藻率的增长程度大且稳定, 而当添加量为 7% 和 9% 时, 其抑藻率在第 7 天均达到较高水平, 而 9% 的添加量并没有比 7% 表现出更高的抑藻效果。因此, 结果表明无菌上清的添加量为 7% 左右时, 抑藻效果最好。

2.4 抑藻物质性质

由图 4A 可知, 菌株 hsn03 的胞外抑藻物质在不同温度处理后的抑藻效果仍维持比较稳定的水平。各处理温度作用下的胞外抑藻物质与未经任何处理的阳性对照组相比仍具有较高的抑藻活性, 在 121 °C 条件下处理后仍有较好的抑藻效果, 结果表明温度对该物质几乎没有影响, 抑藻物质具有热稳定性。

由图 4B 可知, 在 pH 为 3.0、5.0、9.0、11.0 时, 胞外抑藻物质的活性与阳性对照组相比没有明显差别。表明菌株 hsn03 胞外抑藻物质的活性不受酸碱的影响, 具有酸碱稳定性。

由图 4C 可知, 菌株 hsn03 的胞外抑藻物质经蛋白酶 K 处理后的抑藻效果与阳性对照组几乎没有差别, 表明该抑藻物质不是蛋白类物质。

由图 4D 可知, 经过二氯甲烷、氯仿、正丁醇萃取后的胞外抑藻物质的抑藻率显著低于阳性对照组($P<0.01$), 而经甲苯萃取后的胞外抑藻物质的

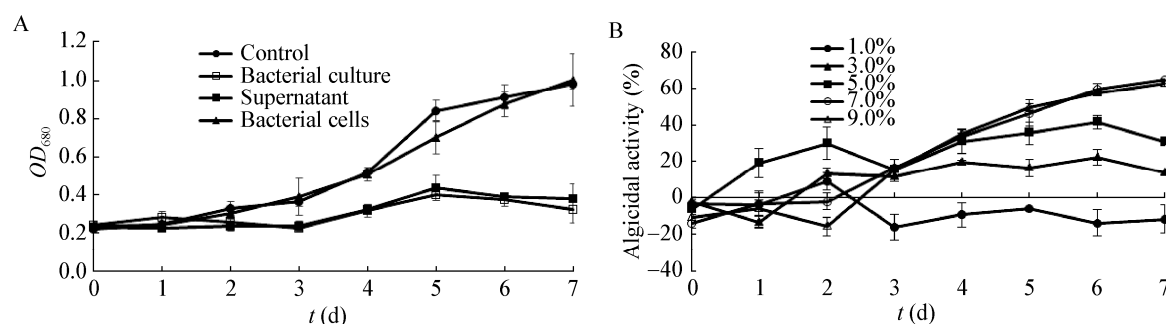


图 3 菌株 hsn03 的抑藻效果来源(A)和不同添加量的发酵液及处理时间的抑藻效果(B)

Figure 3 The algicidal source of strain 03 (A) and effects of different dosages of bacterial culture and treatment times on algicidal activity of strain hsn03 (B)

注: 所有的误差棒代表 3 个生物学重复的标准差。

Note: All error bars indicate the SE of the three biological replicates.

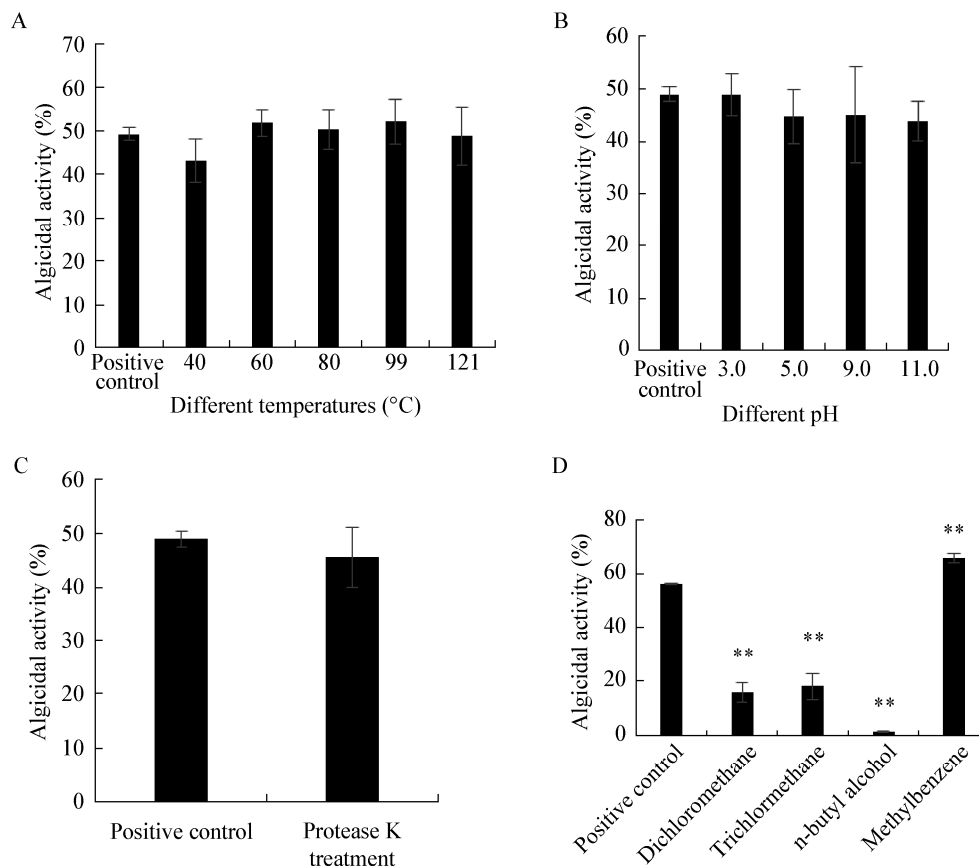


图4 菌株 hsn03 的上清经不同温度(A)、pH (B)、蛋白酶 K (C)和有机溶剂萃取(D)处理后的抑藻效果

Figure 4 Effect of different temperature (A), pH (B), protease K (C), organic solvent extraction (D) on the algicidal activity of the supernatant

注: 所有的误差棒代表3个生物学重复的标准差. **代表与阳性对照相比在统计学上的显著差异 $P < 0.01$.

Note: All error bars indicate the SE of the three biological replicates. ** represents a statistically significant difference of $P < 0.01$ when compared to the positive control.

抑藻率显著高于阳性对照组($P < 0.01$), 说明二氯甲烷、氯仿和正丁醇不能从抑藻物质中萃取出有效成分, 而甲苯能从抑藻物质中萃取出有效成分。该抑藻物质的极性小于甲苯。

2.5 抑藻物质透析处理及成分分析

为了确定抑藻物质的分子量范围, 进行了透析实验(图 5A)。结果表明, 在截留分子量为 500 Da 和 100 Da 的透析袋透析处理后的抑藻物质对铜绿微囊藻 7806 表现出明显的抑藻效果, 显著高于截留分子量为 1 kD 的透析袋透析后的处理组($P < 0.01$)。该结果表明透析处理后, 该抑藻物质可以通过 1 kD 透析袋, 不能通过 500 Da 透析袋, 分

子量大于 500 Da 且小于 1 kD。

为了进一步确定该抑藻物质中化学基团成分, 将透析后有抑藻能力(500 Da)和无抑藻能力(1 kD)的物质做傅里叶红外光谱分析, 结果如图 5B 所示。发现无抑藻效果的傅里叶红外光谱图与有抑藻效果的傅里叶红外光谱图相比, 在 $1\,650\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,092\text{ cm}^{-1}$ 处代表蛋白质和所有糖衍生物的吸收峰仍然存在, 但在 $2\,128\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰消失了, 这表明抑藻物质可能和 $2\,128\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰有关, $2\,128\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰代表叁键和累积双键伸缩振动区域。因此可以得出结论, 该抑藻活性物质应包含叁键和累积双键。

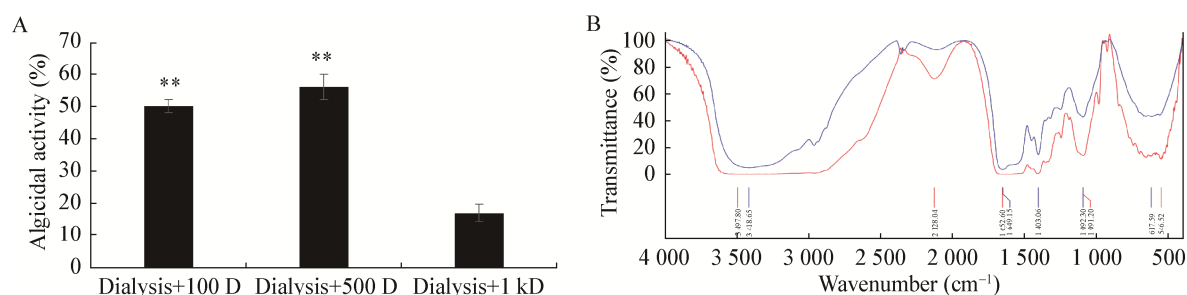


图5 菌株 hsn03 的上清经透析处理后的抑藻效果(A)及抑藻物质透析后的官能团图谱(B)

Figure 5 Effect of different dialysis treatment (A) on the algicidal activity of the supernatant and the functional groups of algicidal substance after dialysis were analyzed using FTIR spectroscopy (B)

注: 波长检测范围在 400–4 000 cm⁻¹.

Note: The spectra at 400–4 000 cm⁻¹ are reproduced.

3 讨论

目前水体富营养化和藻类污染问题愈发严重, 其中铜绿微囊藻就是最常见的水华蓝藻之一。由于该藻可以产生微囊藻毒素, 不仅破坏水生生态系统的平衡还威胁人类健康, 因此对铜绿微囊藻引起的淡水水华问题已引起人们的广泛关注^[12-13]。由于细菌等微生物具有经济、环境友好等特点, 且与藻类有着复杂紧密的联系, 所以利用细菌杀/抑藻来治理水华, 已成为新的研究方向^[14]。

本研究从养殖废水中筛选到一株对铜绿微囊藻 7806 具有抑制效果的菌株 hsn03, 为了更好地开展抑藻研究, 我们首先对该菌株进行了形态特征观察、生理生化特征研究和分子鉴定, 通过一系列研究最终确定菌株 hsn03 属于芽孢杆菌(*Bacillus sonorensis*)属, 与 *Bacillus sonorensis* NBRC101234 (AYTN01000016)有最高相似性, 为 99.59%, 将菌株 hsn03 命名为 *Bacillus* sp. hsn03 (MF925340)。芽孢杆菌属具有生长快、易运输和分布广泛等优点, 在生物防治领域、水质净化和促进饲料中营养素降解等方面有着广泛的应用^[15]。而芽孢杆菌属在杀藻领域也有报道, Guan 等从东海表层海水样品中分离出芽孢杆菌属的 *Bacillus* strain LP-10, 表明 *Bacillus* strain LP-10 可能是一个潜在控制有害藻华的生物剂, 对赤潮藻——球形棕囊藻有杀藻

效果^[16]。

在所分离筛选的控藻细菌中溶藻菌报道的较多^[17-18], 而抑藻菌相对较少。抑藻菌一般适用于抑制浓度较低的藻细胞生长, 尤其适合在赤潮或水华发生初期使用, 通过抑制藻细胞生长以达到控制藻类生物量, 阻止藻类大量增殖的效果。而溶/杀藻菌则通常适用于浓度较高的藻液, 一般通过分泌抑/杀藻物质从而有效地裂解藻细胞, 以缓解赤潮或水华暴发的危害^[19]。微生物对藻细胞的抑制方式主要有两种, 一种是微生物与藻细胞直接接触表现出抑藻效果, 为直接抑藻; 另一种是微生物分泌胞外抑藻物质来表现出抑藻效果, 为间接抑藻^[20]。为了确定菌株 hsn03 的抑藻方式, 将该菌株的发酵产物、无菌上清和细菌菌体进行抑藻实验, 结果表明菌株的发酵产物和无菌上清均有较高的抑藻效果, 而细菌菌体无抑藻效果。这就表明菌株 hsn03 中起抑藻效果的抑藻物质是细菌分泌的胞外物质, 属于间接抑藻。这与已报道的芽孢杆菌 B1 能分泌一种细胞外物质作用于球形棕囊藻的抑藻方式相似^[21]。将不同添加量的菌株 hsn03 的无菌上清作用于藻细胞, 发现随着添加量的增加, 抑藻效果越明显, 说明抑藻效果具有浓度依赖性。这与已报道的微生物通过间接作用所表现出的抑藻或者杀藻能力存在浓度依赖性的研究结果相似^[22]。

为了确定该抑藻物质的性质, 将无菌上清分别在不同温度、pH、蛋白酶 K 等条件下处理, 结果表明处理后的无菌上清均仍具有良好的抑藻效果, 说明该抑藻物质具有较高的热稳定性、酸碱稳定性且非蛋白类物质。而无菌上清在经过不同极性大小的有机溶剂萃取后, 发现只有经过甲苯萃取后的无菌上清有抑藻效果, 这就表明该抑藻物质可萃取到甲苯中, 极性小于甲苯。将胞外物质在截留分子量为 1 kD 的透析袋透析后, 透析袋内的物质没有抑藻能力, 而在截留分子量为 500 Da 和 100 Da 的透析袋透析后, 透析袋内的物质有抑藻能力, 这说明抑藻物质的分子量大于 500 Da 且小于 1 kD。为了进一步确定该抑藻物质的组成成分, 将通过 500 Da 和 1 kD 透析袋透析后的傅里叶红外光谱图对比, 发现无抑藻效果的傅里叶红外光谱图中在波数为 $2\,128\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰消失了, 这表明抑藻物质可能和 $2\,128\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰有关, 波数在 $2\,128\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰代表叁键和累积双键^[23]。细菌的次级代谢产物类型非常多, 具有抑藻能力的胞外物质有很多种, 如蛋白质、脂肪酸、多糖、色素等^[24-25]。有报道细菌的胞外抑藻物质为小分子物质, 如 Guan 等^[16]发现芽孢杆菌可以分泌一种耐高温的小分子物质对球形棕囊藻的生长有明显的抑制效果; 但本研究中菌株 hsn03 所分泌的胞外抑藻物质与已报道的并不相同, 该胞外物质分子量在 500 Da 和 1 kD 之间, 耐高温, 耐酸碱, 因此可以推测, 该胞外抑藻物质不是蛋白质、多糖等大分子物质, 有可能是一种新型的含有叁键和累积双键的小分子抑藻活性物质。该抑藻物质的发现及其性质的研究为蓝藻水华治理提供了更多的理论基础, 若能广泛应用, 将对环境的治理起到巨大的作用。

4 结论

本研究通过对一株高效抑藻菌株 hsn03 进行形态学观察、生理生化特征检测和分子鉴定, 确定该菌株 hsn03 属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.), 与

芽孢杆菌属菌株 *Bacillus sonorensis* NBRC 101234 的 16S rRNA 基因的最高相似性为 99.59%。菌株 hsn03 通过分泌胞外抑藻物质从而对铜绿微囊藻(*M. aeruginosa* 7806)表现出抑藻效果, 并且当添加量为 7.0% 时, 该抑藻效果最为明显。通过对胞外抑藻物质的性质探究, 确定该抑藻物质是一种耐高温、耐酸碱、分子量在 500 Da 和 1 kD 之间含有叁键和累积双键的非蛋白、非多糖的小分子物质。

REFERENCES

- [1] Sheng H, Liu H, Wang CY, et al. Analysis of cyanobacteria bloom in the Waihai part of Dianchi Lake, China[J]. Ecological Informatics, 2012, 10: 37-48
- [2] Zhu X, Zhu JH, Hu MM. General thinking on the management of blue algae outbreak in the Taihu lake, the Chaohu lake and the Dianchi lake[J]. Meteorological and Environmental Research, 2015, 6(1): 48-54, 58
- [3] Kong FX, Ma RH, Gao JF, et al. The theory and practice of prevention, forecast and warning on cyanobacteria bloom in Lake Taihu[J]. Journal of Lake Sciences, 2009, 21(3): 314-328 (in Chinese)
孔繁翔, 马荣华, 高俊峰, 等. 太湖蓝藻水华的预防、预测和预警的理论与实践[J]. 湖泊科学, 2009, 21(3): 314-328
- [4] Schindler DW, Hecky RE, Findlay DL, et al. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(32): 11254-11258
- [5] Reynolds CS. Cyanobacterial water-blooms[J]. Advances in Botanical Research, 1987, 13: 67-143
- [6] Makower AK, Schuurmans JM, Groth D, et al. Transcriptomics-aided dissection of the intracellular and extracellular roles of microcystin in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(2): 544-554
- [7] Lu KH, Yan WJ, Su SA. Environmental and ecological engineering on control and remediation of eutrophicated waterbodies: by using ameliorated alum plasma and fishes to control blue-green blooms of qiaodun reservoir[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2002, 22(6): 732-737 (in Chinese)
陆开宏, 晏维金, 苏尚安. 富营养化水体治理与修复的环境生态工程——利用明矾浆和鱼类控制桥墩水库蓝藻水华[J]. 环境科学学报, 2002, 22(6): 732-737
- [8] Li JP, Long H, Song C, et al. Study on the removal of algae from lake water and its attendant water quality changes using ultrasound[J]. Desalination and Water Treatment, 2014, 52(25/27): 4762-4771
- [9] Sun PF, Cai H, Bai NL, et al. Revealing the characteristics of a novel bioflocculant and its flocculation performance in

- Microcystis aeruginosa* removal[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17465
- [10] Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(10): 2259-2261
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599
- [12] Yu CC, Wu C, Zheng WW, et al. Pollutions by algae and microcystins in surface water in Shenqiu County in Huaihe River basin[J]. Journal of Environment and Health, 2013, 30(11): 967-971 (in Chinese)
虞聪聪, 伍晨, 郑唯韡, 等. 淮河流域沈丘县地表水藻类及其毒素污染状况研究[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(11): 967-971
- [13] Hettiarachchi IU, Sethunga S, Manage PM. Contamination status of algae toxins microcystins in some selected water bodies in sri lanka[A]//Proceedings of International Forestry and Environment Symposium[C]. Sri Lanka: University of Sri Jayewardenepura, 2014
- [14] Fu LJ, An XL, Li D, et al. Isolation and alga-inhibiting characterization of *Vibrio* sp. BS02 against *Alexandrium tamarense*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(12): 2949-2956
- [15] Cheng X, Li KT, Huang L. Research on growth characteristics and algicidal effects of *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(7): 120-125 (in Chinese)
程新, 李昆太, 黄林. 一株枯草芽孢杆菌的生长特性及抑藻效果研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(7): 120-125
- [16] Guan CW, Guo XY, Cai GJ, et al. Novel algicidal evidence of a bacterium *Bacillus* sp. LP-10 killing *Phaeocystis globosa*, a harmful algal bloom causing species[J]. Biological Control, 2014, 76: 79-86
- [17] Shi SY, Liu YD, Shen YW, et al. Lysis of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacterium) by a bacterium *Bacillus cereus*[J]. Biological Control, 2006, 39(3): 345-351
- [18] Li Y, Zhu H, Zhang HJ, et al. Toxicity of algicidal extracts from *Mangrovimonas yunxiaonensis* strain LY01 on a HAB causing *Alexandrium tamarense*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 278: 372-381
- [19] Li Y, Zhu H, Lei XQ, et al. The death mechanism of the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarense* induced by algicidal bacterium *Deinococcus* sp. Y35[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 992
- [20] Li D, An XL, Fu LJ, et al. Isolation, identification and characterization of algicidal bacterium BS03 against *Alexandrium tamarense*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(1): 44-52 (in Chinese)
李东, 安新丽, 傅丽君, 等. 溶藻细菌 BS03 分离、鉴定及其对塔玛亚历山大藻生长的影响[J]. 环境科学学报, 2013, 33(1): 44-52
- [21] Li Q, Zhao L, Yin PH. Characteristics study of extracellular active substance of *Bacillus* sp. B1 on *Phaeocystis globosa*[J]. Environmental Science, 2012, 33(3): 838-843 (in Chinese)
李蕾, 赵玲, 尹平河. 芽孢杆菌 B1 胞外活性物质对球形棕囊藻的溶藻特性研究[J]. 环境科学, 2012, 33(3): 838-843
- [22] Li Y, Zhu H, Guan CW, et al. Towards molecular, physiological, and biochemical understanding of photosynthetic inhibition and oxidative stress in the toxic *Alexandrium tamarense* induced by a marine bacterium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(10): 4637-4652
- [23] Zeng GM, Wang P, Wang Y. Algicidal efficiency and mechanism of *Phanerochaete chrysosporium* against harmful algal bloom species[J]. Algal Research, 2015, 12: 182-190
- [24] Li Y, Zhu H, Lei XQ, et al. The first evidence of deinoxanthin from *Deinococcus* sp. Y35 with strong algicidal effect on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 290: 87-95
- [25] An XL, Zhang BZ, Zhang HJ, et al. Discovery of an algicidal compound from *Brevibacterium* sp. BS01 and its effect on a harmful algal bloom-causing species, *Alexandrium tamarense*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1235