

技术与方法

一种快速检测分离溶藻细菌方法的初探*

吕伟英¹ 赵以军¹ 周瑞¹ 吴广涛² 胡蝶¹ 吴刚^{1**}(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)¹ (华中农业大学生命科学技术学院 武汉 430070)²

摘要: 传统的细菌培养基对铜绿微囊藻具有毒性作用, 会大大影响溶藻细菌的筛选效率和准确性。通过基本培养基各成分对铜绿微囊藻 DS 的作用研究发现, 培养基中的葡萄糖成分对藻有抑制作用, 并且这种抑制作用与培养基中的葡萄糖浓度密切相关, 当培养基中葡萄糖的浓度在 0.1~0.4g/L 时, 藻细胞生长受到抑制, 当用柠檬酸三钠取代葡萄糖后, 铜绿微囊藻在改良后的培养基中生长正常, 与对照组相比无显著性差异 ($P < 0.05$)。用改良的培养基富集水样中的溶藻微生物, 并用此培养液直接感染宿主藻, 一周内即可初步快速检测是否含有溶藻细菌。此种方法既排除了培养基的干扰因素, 又迅速增加了溶藻细菌的生物量, 并可大量收集细菌分泌的胞外物质, 为溶藻细菌尤其以分泌物溶藻的细菌的初步筛选提供了一条快捷、有效的途径。

关键词: 溶藻细菌, 微囊藻, 葡萄糖, 快速检测

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0119-04

A Methodological Study on Rapid Identification and Isolation of Algicidal Bacteria*

LV Wei-Ying¹ ZHAO Yi-Jun¹ ZHOU Rui¹ WU Guang-Tao² HU Die¹ WU Gang^{1**}(College of Life science, Huazhong Normal University, Wuhan 430079)¹(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)²

Abstract: In order to increase the efficiency of algicidal bacteria isolation, The components of minimal medium for isolation of algicidal bacteria were tested for the effect on growth of *Microcystis aeruginosa* DS and a modified minimal medium was established. The results indicated that glucose at the concentration of 0.1~0.4g/L in minimal medium inhibited the growth of *Microcystis aeruginosa* DS, and a modified minimal medium was developed using sodium citrate instead of glucose as carbon source. On modified medium algicidal bacteria could be successfully isolated directly from field sample in 1 week. *Microcystis aeruginosa* DS could grow well on modified medium and the algicidal materials were secreted into medium by bacteria and the growth medium could be directly used for algicidal test.

Key words: Algicidal bacteria, *Microcystis*, Glucose, Rapid identification

由水体富营养化导致大规模蓝藻水华的爆发, 不仅降低了水资源利用效能, 造成严重的生态破坏及巨大的经济损失, 而且产生的蓝藻毒素给人类的健康带来极大的隐患。寻找有效的治理蓝藻水华的方法已迫在眉睫。微生物方法控制有害藻类以其安全、环保、有效, 已备受人们的广泛关注^[1]。如何快速检测并分离到高效的溶藻细菌是微生物方法控制有害藻类的前期关键。溶藻细菌

分布于自然水体中, 对水华的控制、维持藻的生物量平衡有非常重要的作用^[2]。然而, 由于在自然水体中溶藻细菌的比率较低^[3,4], 采用传统方法分离比较困难, 国内外对溶藻细菌的分离仍需要不断探索新方法^[5]。

目前对溶藻细菌的分离培养传统上采用牛肉膏蛋白胨培养基, 然而在溶藻细菌分离及溶藻试验中需反复洗涤溶藻细菌, 以排除培养基的干扰,

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30370062)

武汉市重点科技攻关项目 (No. 20026002097)

** 通讯作者 E-mail: microbcnu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-03-08, 修回日期: 2006-04-22

这一过程往往使细菌分泌的胞外物质丢失, 不仅导致以分泌物质溶藻的溶藻细菌漏筛, 而且使得溶藻作用耗时长, 效率低。如何排除细菌培养基对藻生长的影响是我们工作的重点所在。基于牛肉膏蛋白胨培养基为天然培养基, 其有效成分不确定, 本实验以细菌的基本培养基为研究对象, 考察培养基成分对藻生长的影响, 找到影响因素, 并对培养基成分改良, 以期找到一种既对藻生长没有影响又能使细菌在其中生长的培养基, 这样, 既可排除培养基的干扰, 又可大量收集细菌分泌的胞外物质, 提高溶藻菌的分离效率及溶藻效果, 为溶藻细菌的筛选分离提供新的途径。

微囊藻水华是蓝藻水华中危害最大的一类, 因此分离到溶解微囊藻水华的溶藻细菌, 更具有实际的应用意义。现以实验室培养的铜绿微囊藻为宿主藻种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 藻种及培养: 铜绿微囊藻 DS、铜绿微囊藻 7820、铜绿微囊藻 7806, 均由中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心提供; 在 $23^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 2000 lx , 及光暗周期 $16\text{h} : 8\text{h}$ 的条件下培养。

1.1.2 水样采集: 选取武汉市 3 个富营养化池塘: 解放公园池塘, 狂欢岛鱼塘, 关桥养殖所水池。

1.1.3 培养基: 基本培养基: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 葡萄糖 5g, NaCl 5g, k_2HPO_4 1g, H_2O 定容至 1,000 mL; 改良培养基: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 柠檬酸三钠 0.5g, k_2HPO_4 1g, H_2O 定容至 1,000 mL; 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 3g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, H_2O 定容至 1,000 mL (固体培养基加入 20 g 琼脂); 藻培养基: BG11^[7]。

1.2 方法

1.2.1 基础培养基成分对藻的作用: 分两组实验进行: 第一组实验是在基础培养基试验的基础上, 分别每次减少基础培养基的一种成分, 进行溶藻实验比较; 第二组实验是把基础培养基中各成分按培养基中的量配成溶液, 各组分别进行溶藻实验比较。溶藻实验中选择对数生长期的微囊藻 DS, 培养基与藻接入比例为 1: 10, 每天定时取样, 测藻叶绿素 a 含量。

1.2.2 不同量的葡萄糖对藻的作用: 配制 5g/L 的葡萄糖溶液, 分别取 1 mL、2 mL、4 mL、6 mL、8 mL、10 mL 的葡萄糖溶液加入到 90 mL 藻液, 加入量不足 10 mL 的用 BG11 补足。实验方法同上。

1.2.3 基础培养基与改良培养基的比较: 分别取 10 mL 基础培养基与改良培养基, 加入到 90 mL 藻液中, 每组 3 个平行, 比较两种培养基对藻生长的影响。

1.2.4 溶藻细菌的检测及筛选的常规方法^[6]: 采集水样预处理: 采集的水样首先经 $0.8\mu\text{m}$ 的纤维滤膜过滤, 滤液再经 $0.22\mu\text{m}$ 的纤维滤膜过滤, 收集 $0.22\mu\text{m}$ 的纤维滤膜, 待用。

溶藻细菌的检测: 把收集的 $0.22\mu\text{m}$ 的纤维滤膜剪成小份, 分别投入到供试藻种中, 对照组投入未经使用的 $0.22\mu\text{m}$ 的纤维滤膜, 按 1.1.1 的方法培养一至两周, 将对照组生长正常, 实验组黄化的藻液再转接入新鲜的供试藻种中, 仍有黄化现象的藻液作为分离溶藻细菌的材料。

溶藻细菌的分离: 取黄化藻液适度稀释, 固体牛肉膏蛋白胨培养基倒平板分离纯化细菌, 保存纯培养菌株。纯化菌株接种于液体牛肉膏蛋白胨培养基培养至对数期, 收集细菌细胞并用生理盐水洗涤 3 次, 用 BG11 培养基制备菌悬液, 菌悬液按 1: 10 比例接入供试藻中, 有黄化现象的即为目的菌。

1.2.5 改良培养基检测及筛选溶藻细菌: 把采集的水样经 $0.22\mu\text{m}$ 的纤维滤膜过滤浓缩后, 把滤膜直接加入到改良的培养基, 12h 后把培养好的菌液按 1: 10 的比例直接加入供试藻中, 对照组加入等量的改良的培养基, 培养观察。有黄化现象的藻液中即可能有溶藻细菌存在。

取黄化藻液适度稀释, 通过固体牛肉膏蛋白胨培养基倒平板分离纯化黄化藻液中的细菌, 得到单菌落, 用改良的培养基分别培养纯化的菌株, 分别与藻共培养, 进行溶藻试验, 有溶藻作用的即为溶藻细菌。

1.2.6 5 株溶藻细菌在改良培养基中的生长情况比较: 观察在改良培养基中新分离到的两株溶藻细菌及本实验室保藏的 3 株溶藻细菌在改良培养基中的生长情况。

1.2.7 藻生物量的测定: 以叶绿素 a 含量表示。测定方法参考文献[7]。

2 结果

2.1 基础培养基中不同成分对藻的作用

改变基础培养基成分, 比较这几组基础培养基对藻生长的影响。基础培养基 1: 缺少 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 成分; 基础培养基 2: 缺少葡萄糖成分; 基础培养基 3: 缺少 NaCl 成分; 基础培养基 4: 缺少 K_2HPO_4 成分; 对照: 没有加基础培养基。

由图 1 可以看出藻起始叶绿素 a 浓度为 0.2548 mg/L, 3d 后对照组叶绿素 a 浓度为 0.8155 mg/L, 基础培养基、基础培养基 1、基础培养基 3、基础培养基 4 中叶绿素 a 浓度分别为 0.2548 mg/L, 0.2548 mg/L, 0.227 mg/L, 0.2085 mg/L, 基础培养基 2 中叶绿素 a 浓度为 0.5187

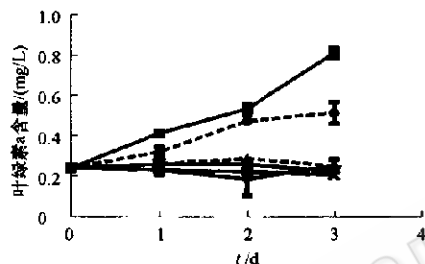


图 1 基础培养基对 DS 作用

—■— 对照, —▲— 基本培养基, —◆— 基本培养基 1,
—●— 基本培养基 2, —▼— 基本培养基 3, —×— 基本培养基 4

2.2 不同量的葡萄糖对藻的作用

由图 3 可见, 对照组起始藻叶绿素 a 含量为 0.2548 mg/L, 当加入葡萄糖溶液 1 mL 时, 即培养体系中葡萄糖的浓度达到 0.05 g/L 时, 3d 后藻叶绿素 a 含量为 0.7691 mg/L, 与对照组藻叶绿素含量 0.8154 mg/L 经统计学分析无显著性差异 ($P < 0.01$), 故此浓度的葡萄糖, 对藻生长基本没有影响; 当加入葡萄糖溶液 2 mL 时, 培养体系中葡萄糖的浓度达到 0.1 g/L 时, 3d 后藻叶绿素 a 含量为 0.4227 mg/L, 与对照相比, 藻细胞生长受到一定抑制, 藻生长速率小于对照组中藻细胞生长速率; 当加入葡萄糖溶液的量为 4 mL 时, 3d 后藻叶绿素 a 含量为 0.3373 mg/L, 可见藻细胞生长受到的抑制作用随葡萄糖浓度的增加而增强, 但有一极限, 即当培养体系中葡萄糖的浓度增加到某一量时, 可出现最大抑制作用, 如继续增加葡萄糖溶液的

mg/L。由此可见, 基础培养基、基础培养基 1、基础培养基 3、基础培养基 4 均对藻生长产生明显的抑制作用, 藻在基础培养基 2 生长受到一定的抑制但抑制作用不强, 藻细胞生长速率小于对照组中藻细胞生长速率。比较这几种培养基成分, 基础培养基、基础培养基 1、基础培养基 3、基础培养基 4 均含有葡萄糖成分。

把基础培养基各成分分别加入到藻中, 由图 2 可见, 3d 后含有葡萄糖的组分中藻叶绿素 a 浓度为 0.2049 mg/L, 只有含有葡萄糖的组分对藻生长产生抑制, 藻在其他组分中可正常生长。由统计分析可知, 所有含葡萄糖的组分与对照组间存在显著性差异 ($P > 0.05$)。由此推测, 基础培养基的抑藻作用可能主要来自葡萄糖的影响。

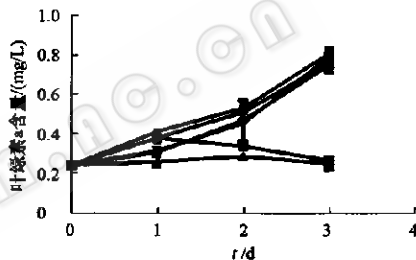


图 2 培养基各成分对藻作用

—■— 对照, —▲— 基本培养基, —▼— 磷酸二氢铵,
—●— 葡萄糖, —◆— 氯化钠, —×— 磷酸氢二钾

量时, 3d 后藻叶绿素 a 含量均在 0.3 mg/L 左右。

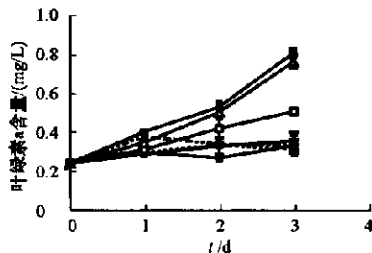


图 3 不同量的葡萄糖对藻的影响

—■— 对照, —△— 1mL, —◇— 2mL, —●— 4mL
—◆— 6mL, —▲— 8mL, —▼— 10mL

2.3 基础培养基中柠檬酸三钠取代葡萄糖和氯化钠的比较实验

由图 4 可见, 3d 后藻在改良后的培养基中叶绿素浓度为 0.7901 mg/L, 对照组藻叶绿素含量为 0.8154 mg/L, 由统计分析, 改良培养基与对照组

之间不存在显著性差异 ($P < 0.01$)。可见改良后的培养基对藻生长没有抑制作用,藻在改良培养基中可以正常生长。

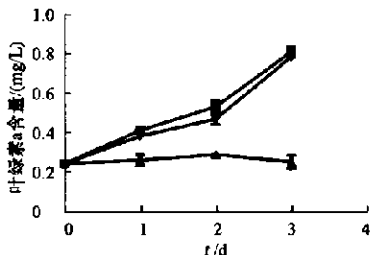


图4 不同培养基对藻作用

■—对照, ▲—基础培养基, ▼—改良基础培养基

2.4 溶藻细菌筛选方法的比较

用常规的方法处理3个水池的水样,两周后均没有观察到微囊藻藻液黄化的现象;改用改良的培养基处理解放公园、关桥水样,两天就观察到微囊藻藻液黄化,从黄化藻液中分离纯化细菌,两周内筛选到两株溶藻细菌,其中1株为高效,以分泌物溶解微囊藻的溶藻菌,但处理狂欢岛水池的水样,没有观察到微囊藻藻液黄化,推测其原因,有可能是所取水样中不存在溶解微囊藻的溶藻菌。总体比较两种筛选方法,常规的方法更易于造成菌的漏筛,改良培养基筛选周期短,效率高。

2.5 5株溶藻细菌在改良培养基中的生长情况比较

新分离的两株溶藻细菌在改良培养基中生长良好,12h左右进入稳定生长期;实验室保藏的3株溶藻细菌中有两株在改良培养基中生长不良,12h基本没有生长,一株生长良好。由此,改良培养基虽能在一定程度上提高筛选效率,但由于只能满足某些细菌的生长,仍存在不足,还需要进一步探讨。

3 讨论

铜绿微囊藻是我国淡水中最常见的水华藻类,提高溶解铜绿微囊藻菌株的分离更具科学意义和实际意义。溶藻细菌传统的分离方法操作繁琐,效率低,排除培养基的干扰是提高溶藻细菌分离效率的关键之一。

实验结果表明,细菌基本培养基中的葡萄糖

成分是造成其杀藻的真正原因。当少量外源葡萄糖存在时,藻类可利用葡萄糖进行混合性营养,基本不影响其生长;而当大量外源葡萄糖存在时,葡萄糖浓度过高,可能改变藻细胞的渗透压,使得藻细胞的生长速率降低,甚至受到抑制作用^[8]。李师翁曾报道不同浓度的葡萄糖能不同程度影响小球藻的生长^[9]。藻种不同对葡萄糖的耐受性也不同^[8,10]。实验证明了铜绿微囊藻细胞对葡萄糖的耐受性很低,0.1g/L的葡萄糖即可对其产生毒害作用。

通过对细菌基本培养基进行改良,得到了一种改良的细菌培养基,该培养基对铜绿微囊藻生长基本没有影响。用此改良培养基分离溶解铜绿微囊藻细胞的溶藻菌,不仅排除了培养基对铜绿微囊藻的干扰,而且不影响细菌的胞外分泌物,为溶藻细菌尤其以分泌溶藻物质的细菌的初步筛选提供了一条快捷、有效的途径。

在此改良培养基中有些溶藻细菌生长不良,究其原因可能是由于此培养基对某些细菌来说属于一种寡营养成分的培养基,不能满足其生长,因此仍存在不足,但此筛选方案为溶藻细菌尤其为溶水华微囊藻细胞的溶藻菌提供了一条探索思路。沿着这一途径思考,继续摸索培养基的改良,将最终为溶藻细菌的筛选提供更为行之有效的方法。

参考文献

- [1] 赵以军,刘永定. 水生生物学报, 1996, 20 (2): 173~181.
- [2] Caiola M G, Pellegrini S. J Phycol, 1984, 20 (1): 471~475.
- [3] Imamura N, Motoike I, Shimada N, et al. Antibiotics, 2001, 54 (6): 582~587.
- [4] Lovejoy C, Bowman J P, Hallegneff G M. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (8): 2806~2813.
- [5] 吴刚,席宇,赵以军. 环境科学研究, 2002, 15 (5): 43~46.
- [6] Lesee P, Alexander N. Methods in Enzymology, 1988, 167: 322~333.
- [7] Imamura N, Motoike I, Shimada N, et al. J Antibiotics, 2001, 54 (6): 582~587.
- [8] 周秋香,张得强,孙汉文. 河北大学学报, 2001, 21 (1): 68~71.
- [9] 李师翁,王毅民. 微生物学通报, 1998, 25 (2): 91~92.
- [10] 王明兹,庄惠如,陈必链. 微生物学通报, 2001, 28 (1): 31~35.