

研究简报

细菌溶藻的初步研究

史顺玉 刘永定 沈银武

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

PRELIMINARY RESEARCH ON THE ALGAE LYING CHARACTERISTICS OF BACTERIUM(STRAIN DC23)

SHI Shun Yu, LIU Yong Ding and SHEN Yir Wu

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 溶藻菌; 溶解; 微囊藻

Key words: Algae Lysing bacterium; Lysis; Microcystis

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)02-0219-03

滇池是我国西南地区的大型浅水湖泊, 近十几年来, 滇池蓝藻水华发生的频率和数量均明显增加。其中微囊藻(*Microcystis* spp.)水华是危害最严重的一类, 由于这类水华发生普遍, 持续时间长, 而且多数产毒, 危害性很大, 因而倍受人们的关注^[1]。人们不断致力于微囊藻水华的消除、其毒素的降解、危害防治等方面的研究, 期望减少以至消除微囊藻对生态系统和人类健康的影响。对于控制水体中有毒藻类及其负面影响乃至最终消除, 人们采取了多种措施, 总的说来为两种基本途径: 一是控制它们在水体中的生长繁殖而保持其较低的生物量, 二是采用各种办法来杀死它们。通过微生物的方法来控制有害藻类是人们探索的途径之一^[2]。其中溶藻细菌对水华的控制、维持藻的生物量平衡有非常重要的作用^[3]。本实验主要从细菌与水华藻类的关系角度来展开研究, 首先从滇池中分离出80多个菌株, 分析其各自与微囊藻种群增长之间促、控、抑或共存的关系; 然后选择对微囊藻有较大影响的细菌, 进行抑藻、溶藻或裂藻的试验观察。实验结果表明, 滇池中存在着一些对微囊藻生长有显著影响的细菌, 其中细菌DC23的溶藻能力十分强, 接种3d内能够将浓绿的培养液变成乳白色, 经扩大培养, 在10L水平的试验具有同样效果。该菌株的分离发现为进一步从细胞分子水平上探究藻-菌关系, 探索溶藻细菌可能的控藻技术提供了前提条件。

1 材料和方法

1.1 藻种来源 选用的 *M. aeruginosa* , *M. wesenbergii* , *M. viridis* 取自本所藻种保藏中心(FACHB)。 *Scenedesmus* 和 *Aphanizomenon* 自云南滇池分离。在23—25℃, 光照强度为2000lx, 及光暗周期16h: 8h的条件下培养。培养基为BG11。

1.2 细菌的分离及培养 2002年10月—12月以及2003年8月—9月, 从云南滇池中采水样进行溶藻细菌的分离, 纯化并编号, 然后将分离的菌株接入藻液中, 设有空白对照。试验发现细菌DC23对藻的生长有明显抑制作用。

1.3 DC23生长曲线的测定 在TSB培养基(胰酶大豆肉汤)中接入细菌, 接种量为10% (10⁸个/mL), 30℃振荡培养(100r/min), 定时取样, 并测其在420nm下的OD值。

1.4 溶藻试验 (a) 液体溶藻按照每30mL藻液加3mL菌液的方式进行, 设空白对照。定时在显微镜下观察, 并隔天测量其叶绿素含量。菌液选择不同的浓度梯度(10³—10¹⁰个/mL)进行试验。(b) 固体溶藻取浓缩过的藻液2mL用固体培养基(BG11+1%琼脂)培养, 置于光照培养箱内培养4d, 再按不同浓度接入细菌DC23, 观察其溶藻现象。(c) 水槽溶藻取一组6个相同规格(30×30×70cm³)的玻璃水槽, 置于室外。从滇池基地集藻区取水样加入玻璃水槽中(每格水槽的水样均为36L), 按不同浓度接入细菌DC23, 并定时搅动水样。试验过程

收稿日期: 2003-11-17; 修订日期: 2004-12-10

基金项目: 国家973项目(2002CB412300); 863项目(2002AA601021); 中国科学院重大项目(KZCX-F-SW-12); 国家重大环境课题(K99053501); 中国科学院方向性创新课题(200316)资助

作者简介: 史顺玉(1978—), 女, 贵州遵义人; 硕士; 主要从事藻类生理生态方面的研究

通讯作者: 刘永定, liuyd@hbw.ac.cn

中不定期地观察、拍摄试验现象, 显微镜下观察藻细胞的形态特征变化; 定期测定水体的叶绿素含量。

1.5 叶绿素荧光效率分析 用便携式植物效率分析仪 (PEA, Hansatech^R, U. K.) 测定叶绿素荧光。激发光强为最大光强的 50% ($1500\mu\text{E}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$), 暗适应时间不少于 15min, 记录时间 5s, 测定均在室温下进行。用可变荧光 (F_v) 与最大荧光 (F_m) 的比值 F_v/F_m 表示光合效能活性的大小。

1.6 丙二醛含量测定 取 0.5g 鲜藻样品, 加 5% TCA (三氯乙酸) 5mL, 研磨后所得匀浆在 3000r/min 下离心 10min; 取上清液 2mL, 加 0.67% TBA (硫代巴比妥酸) 2mL, 混合后在 100℃ 水浴上煮沸 30 min, 冷却后再离心一次; 分别测定上清液在 450nm、532nm、600nm 处的吸光度值, 并按公式: $C/\mu\text{mol/L} = 6.45(A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$ 算出 MDA 浓度。

1.7 探讨溶藻方式 对溶藻液用 0.2μm 的滤膜过滤 2 次, 取滤液, 并测试其有无活菌生长。确定该滤液无菌后, 重复液体溶藻试验。

2 结果与分析

2.1 细菌 DC23 生长曲线的测定

如图 1 所示, 细菌 DC23 的迟缓期很短, 小于 0.5h, 约 10h 左右就进入稳定期。

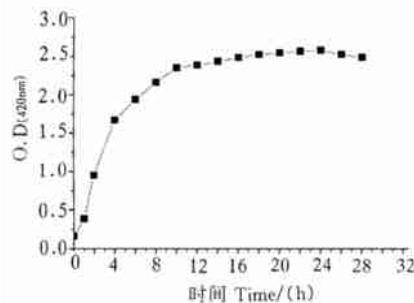


图 1 细菌 DC23 的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of bacterium DC23

2.2 溶藻试验

在液体溶藻试验中, DC23 对 *M. aeruginosa*, *M. wessenbergii*, *M. viridis*, *Scenedesmus* 和 *Ap hanizomenon* 均有很强的溶解作用, 尤其是对 *M. wessenbergii*, 12h 即可见溶藻效果, 2d 后测叶绿素含量, 下降 70% 左右。选用该细菌的不同浓度梯度 (10^3 — 10^{10} 个/mL) 做溶藻试验, 当 DC23 在 10^3 — 10^5 个/mL 时, 溶藻现象不明显; 当 DC23 在 10^5 — 10^{10} 个/mL 时, 溶藻现象明显, 且初始浓度越大, 溶藻效果越显著, 溶藻时间越短。显微镜下可观察到藻细胞凝聚或藻细胞碎片成团存在的地方, 聚集较多的溶藻菌 DC23。该菌导致藻细胞凝聚之后, 继续保持溶解藻细胞的特性, 凝聚的细胞会进一步溶解、破碎。

固体溶藻试验的效果不明显, DC23 对 *M. aeruginosa* 和 *Scenedesmus* 基本上无溶解现象, 但 *M. wessenbergii* 在一周后有变黄的现象。

水槽溶藻试验: 从滇池集藻区取水样倒入玻璃水槽中, 藻液叶绿素的初始浓度为 0.6668μg/mL 左右。试验现象见图 2。从左至右, 玻璃水槽的标号为 1—6 号, 其中 1、3、5 号为加菌液的水槽, 2、4、6 号为未加菌液的水槽; 1、2 号接通气泵, 3—6 号不接通气泵, 但定时搅动水体; 3 号接入的细菌接种量为 3% 左右 (10^8 个/mL), 5 号接入的细菌接种量为 6% 左右 (10^8 个/mL)。第 2d 可见溶藻效果, 第 4d 浓绿的藻液或变为乳白色(不通气), 或变为浅土黄色(通气)。图 2(a) 为投加菌液后第 4d 拍摄的照片(1—6 号), 可明显看到滇池水华消失的现象。图 2(b) 为 5 号和 6 号的近照。

2.3 叶绿素荧光效率分析

2d 后 *M. wessenbergii* 已经测不出其光合效能, 而 *M. viridis* 的光合效能下降 91%。

2.4 加菌前后藻种丙二醛含量的变化

接入溶藻菌 4d 后, 测量其丙二醛含量。*M. wessenbergii* 的丙二醛含量由 $0.0353\mu\text{mol/g}$ 上升为 $0.07\mu\text{mol/g}$, 增高了 98.3%; *M. aeruginosa* 的丙二醛含量由 $0.2685\mu\text{mol/g}$ 上升为 $0.4104\mu\text{mol/g}$, 增高了 52.8%; *M. viridis* 的丙二醛含量由 $0.4467\mu\text{mol/g}$ 上升为 $0.6482\mu\text{mol/g}$, 增高了 45%。



图 2 溶藻试验

Fig. 2 The algae lysing experiment

2.5 探讨溶藻方式

显微镜下观察,发现藻细胞的凝聚现象,藻细胞凝聚处发现细菌菌体附在藻细胞上,而该藻细胞周围已出现若干细胞碎片,推测可能是由于细菌直接侵入藻细胞,导致藻细胞发生破碎。该菌菌体大于 $0.2\mu\text{m}$,用 $0.2\mu\text{m}$ 的针头过滤器过滤后,在平板上测试无活菌生长,用滤液重复溶藻试验,没有发现溶藻现象,进一步支持了该细菌是通过与宿主直接接触的方式来完成溶藻的推断。

3 讨论

溶藻菌对藻细胞的溶解和对藻生长的抑制,有四种情况:直接接触溶藻;释放有毒物质;非选择性地杀伤藻细胞;藻同细菌竞争有限的营养物质失败^[1]。从滇池分离的溶藻菌DC23是属于直接接触溶藻的类型,它的纯培养液对藻有很强的溶解作用,而过滤液则不起溶解效果。细菌DC23的溶藻方式与Mitsutani^[4], Imai I^[7]分别报道噬胞菌(*Cytophaga* sp. A5Y和J18/M01)一致,这两种细菌的培养物对硅藻有强烈的溶解作用,但过滤液不起任何作用。Yoko Yamamoto和Kenji Suzuki^[5]从土壤中分离一株柱状的G⁻细菌MY-1,亦通过直接接触溶藻的方式溶解藻细胞,但它们只对固体培养的蓝藻具有很强的溶解作用,而在液体培养基中很难生长,不能达到溶藻的效果。细菌DC23与之相反,对于液体培养的蓝藻有很强的溶解作用,但对于固体培养下的藻很少或没有溶解现象。推测可能由于DC23在液体中细菌能够快速运动,容易扩散,故能够较快地溶解藻细胞,而在固体中运动比较困难,不易扩散,影响了溶藻菌入侵藻细胞的能力和速度的缘故。该菌在液体培养基中具有很强的溶藻能力,它能导致藻种叶绿素含量的下降,光合效能的急剧降低,以及丙二醛含量的大幅度增高。细菌对藻的溶解作用与其初始浓度及生长速度有一定关系。彭超等^[6]报道的M6、M8和M1溶藻的浓度下限分别为: 10^5 个/mL、 10^6 个/mL、 10^5 个/mL,且当溶藻菌的初始浓度越大,溶藻效果越突出,而低于溶藻下限时,溶藻现象延迟或不明显。笔者所采用的溶藻菌DC23,当其初始浓度在 10^3 — 10^5 个/mL时,溶藻现象不明显,但当其

初始浓度在 10^5 — 10^{10} 个/mL时,溶藻现象明显,12h内即可见溶藻效果。

利用细菌等微生物来控制水华具有很好的研究前景,近年来已经有不少人意识到它的重要性和意义。从云南滇池分离出的溶藻菌DC23对微囊藻等蓝藻有很强的溶解作用,可望今后应用于滇池及其他污染湖泊的防治中,相关的试验如大规模的池塘试验、生态安全性研究、生理试验等正在进行中;该菌的分离为将来从分子水平研究细菌溶藻机制提供了条件。

参考文献:

- [1] LI X Y, Song L R, Liu Y D. The production, Detection and toxicology of microcysts[J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 1999, 23(5): 517—522. [李效宇, 宋立荣, 刘永定. 微囊藻毒素的产生、检测和毒理学研究. 水生生物学报, 1999, 23(5): 517—522]
- [2] Zhao Y J, Liu Y D. Possible microbial control on the adverse impacts of algae: Current information about the relationship between algae and microbes[J]. *Acta Hydrobiol. Sin.*, 1996, 20(2): 173—181. [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. 水生生物学报, 1996, 20(2): 173—181]
- [3] Caiola M G, Pellegrini S. Lysis of *Microcystis aeruginosa* by Bdellovibrio like bacteria[J]. *J Phycol*, 1984, 20(1): 471—475
- [4] Mitsutani A, Takesue K, M., et al. Lysis of *Skedtonema costatum* by *Cytophaga* sp., isolated from the coastal water of the Ariake sea [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58(2): 2158—2167
- [5] Yamamoto Y, Suzuki K D. Ultrastructural studies on lysis of blue green algae by a bacterium[J]. *J. Gen Appl Microbiol*, 1977, 23(3): 285—295
- [6] Peng C, Wu G, Xi Y, et al. Isolation and identification of three Algae Lysing bacteria and their lytic Effects on blue green algae (Cyanobacteria) [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2003, 16(1): 37—40. [彭超, 吴刚, 席宇等. 3株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻效应. 环境科学研究, 2003, 16(1): 37—40]
- [7] Imai I, Ishida Y, Hata Y. Kill of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp., isolated from the coastal sea of Japan[J]. *Mar Biol.* 1993, 116(2): 527—532