

一株抑制浒苔生长海洋细菌的分离与鉴定

汪靖超¹, 辛宜轩²

(1. 青岛大学 生物系, 山东 青岛 266071; 2. 青岛第二中学, 山东 青岛 266061)

摘要: 从青岛近海海泥中分离了 57 株细菌, 通过毒性实验, 得到了一株对浒苔具有较强毒性的细菌 EP23。对该菌株进行了菌落、菌体形态学观察、生理生化特征分析及 16S rDNA 序列分析, 鉴定该菌为弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)。该菌培养液高速离心的上清液对浒苔具有较强毒性, 表明弯曲芽孢杆菌 EP23 是通过分泌胞外物质的间接方式进行的。

关键词: 溶藻细菌; 浒苔(*Enteromorpha prolifera* (Müller) J. Ag.); 鉴定; 弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)
中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2011)11-0001-03

浒苔(*Enteromorpha prolifera* (Müller) J. Ag.)是一种大型经济海藻, 属绿藻门、石莼目、石莼科、浒苔属, 广泛分布于河口、近海滩涂, 自然繁殖能力和环境适应能力特别强。适度的浒苔生长会消耗水体中的营养盐和浮游生物, 在一定程度上能降低赤潮的发生几率, 但浒苔等绿藻的瞬间大量爆发则会形成绿潮。绿潮现在已成为全世界范围的富营养化难题, 法国 Brittany 海区绿藻大规模爆发, 每年打捞的绿藻可达 85 000 m³, 日本从 20 世纪 70 年代起每年均有绿潮爆发, 横滨市每年花费在打捞绿藻上的费用可达 4 000 万日元^[1-3]。2007 年 7 月和 2008 年 6 月, 青岛近海海域发生了大规模浒苔漂浮现象, 政府和民间动员大量人力物力, 两年分别打捞出 7 000 多吨和 100 多万吨浒苔^[4-5]。

溶藻细菌(Algae-lysing bacterium)能够通过直接或间接方式, 抑制藻类生长或杀死藻类, 从而溶解藻细胞。在利用物理、化学以及其他方法治理水华都不太理想的情况下, 溶藻细菌的使用已经引起越来越多学者的关注^[6-7]。作者从青岛海域的海泥中分离纯化了一株可抑制浒苔生长的海洋细菌 EP23, 并对该菌株进行了鉴定, 以期对浒苔的生物防治研究提供理论根据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

浒苔采自青岛第一海水浴场, 海泥取自青岛大麦岛, 实验用海水取自青岛奥帆赛场。16S rDNA 引物合成、DNA 序列分析由上海生工生物工程有限公司完成, 克隆所需工具酶购自大连宝生物工程有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 培养基

实验用牛肉膏蛋白胨培养基、LB 培养基均用陈海水配制。

1.3 实验方法

1.3.1 浒苔培养

接种浒苔于无菌海水中, 光照培养箱中培养。培养温度为 20℃, 光照强度为 60 μmol/(m²·s), 光: 暗为 12 h:12 h, 每天摇动培养瓶 3 次。

1.3.2 溶藻细菌的分离

称取 10 g 海泥, 放入盛有 90 mL 无菌海水并带有玻璃珠的三角烧瓶中, 振荡 30 min。悬液稀释后涂布牛肉膏蛋白胨培养基, 28℃培养 48 h, 对培养出的众多细菌再划线分离纯化, 获得单个菌落。

1.3.3 溶藻细菌对浒苔抑制活性的测定

分别挑取分离的各菌落于 2 mL LB 培养液中, 28℃振荡培养 24 h, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 按照 1 : 100 的比例(V/V)加入浒苔培养液中, 混匀, 20℃继续培养 3 d, 观察浒苔变化。

1.3.4 菌种鉴定

1.3.4.1 菌体形态学观察

牛肉膏蛋白胨平板划线培养待鉴定菌株, 28℃恒温培养 1~3 d, 进行形态学、革兰氏染色、鞭毛染色和芽孢染色观察, 具体方法参照文献^[8]进行。

1.3.4.2 生理生化特征的测定

参照文献^[8]介绍的方法进行。

收稿日期: 2010-12-15; 修回日期: 2011-03-22

作者简介: 汪靖超(1973-), 男, 山东泰安人, 讲师, 硕士, 主要从事微生物学方向研究, E-mail: wangjingchao@yahoo.com

1.3.4.3 基因组 DNA 的提取和 16S rDNA 的扩增

参照文献[9-10]的方法进行 DNA 的提取、引物设计及 PCR 扩增。

1.3.4.4 克隆载体的构建、测序及分子生物学鉴定

回收 PCR 产物, 连接到 pMD-18T Simple 载体, 转化 *E. coli* DH5 α , 碱法提取质粒, 酶切后进行电泳分析并测序。将测序结果用 NCBI 的 Blast 程序进行序列同源性比对。

2 结果

2.1 细菌的分离

从实验海泥中分离得到了特征明显的 57 株细菌, 测定各菌株对浒苔的毒性, 有 8 株菌株对浒苔有抑制作用, 其中毒性最强的为第 23 号菌株, 该菌株编号为 EP23。

表 1 EP23 菌株的生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of strain EP23

生理生化特征	结果	生理生化特征	结果
接触酶	+	酪氨酸水解	-
酪素水解	+	苯丙氨酸脱氨酶	-
明胶水解	+	柠檬酸钠盐	+
淀粉水解	+	卵磷脂酶	-

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。

综合该菌株的菌落形态、个体特征及其生理生化反应特性, 参照文献[11-12], 将 EP23 菌株初步鉴定为弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)。

2.4 16S rDNA 序列分析

由 PCR 扩增产物电泳图(图 1)可见, 扩增得到目的片段长约 1.5 kb 左右, 与 16S rRNA 序列长度一致。将扩增的 16S rDNA 序列克隆后测序得到 1451 bp 长度的序列, 该序列在 GenBank 中的登录号为 GQ279347。将该序列与 GeneBank 库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行 BLAST 比较后, 发现该菌株与弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus* strain KSC_SF9c) 16S rDNA 同源性高达 99.7%, 结合细菌的常规鉴定结果, 将该菌株鉴定为枯草芽孢杆菌。

2.5 EP23 对浒苔的毒性

EP23 菌株经过液体培养后, 经过高速离心去除绝大部分菌体, 上清液按体积 1 : 100 的比例, 加入浒苔的培养液, 3 d 后藻体开始变黄, 5 d 后浒苔全部死亡, 叶绿素分解, 说明 EP23 的胞外产物对浒苔具有明显的毒性。

2.2 菌株 EP23 的形态特征

EP23 菌株在牛肉膏蛋白胨培养基上 28℃培养 24 h 后, 形成的菌落圆形、扁平、灰白色、不透明、黏稠、大小中等、表面不光滑、边缘不规则。草酸铵结晶紫常规染色, 光镜下观察该菌为杆状, 单生、双生或多个细胞连接成链状, 菌体大小为 0.7~0.8 μm × 2.5~3.5 μm 。悬滴法观察 EP23 菌株具有很强的运动性, 硝酸银鞭毛染色观察到细胞有周生鞭毛; Schaeffer-Fulton 氏染色法观察到大量菌体内有芽孢, 未见伴孢晶体, 芽孢中生, 椭圆形, 芽孢囊不膨大; 革兰氏染色阳性。

2.3 生理生化特征

EP23 菌株的生理生化特征见表 1。

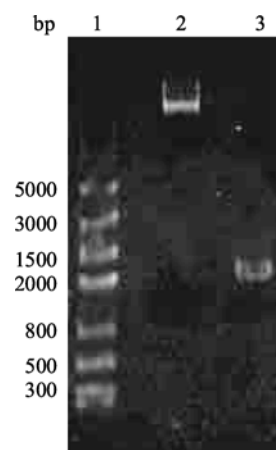


图 1 EP23 菌株基因组 DNA 的提取与 16S rDNA 的扩增

Fig. 1 Genomic DNA and 16S rDNA of strain EP23

1. DNA marker; 2. 基因组 DNA; 3. PCR 产物

1. DNA marker; 2. Genomic DNA; 3. 16S rDNA by PCR amplification

3 讨论

目前对于浒苔的爆发, 除了动用人力打捞之外, 缺少有效的控制方法。雷清新等^[13]研究了铜离子对缘管浒苔(*E. linza*)的毒性, 结果显示 0.5 mg/L 的 Cu²⁺可使缘管浒苔迅速死亡。孙修涛等^[14]研究了盐度、温度、

黑暗、酸度等 4 个理化环境因子以及生石灰、硫酸铜、含氯消毒剂、7 种除草剂对浒苔生长的影响, 结果显示浒苔是一种具有极强抗逆能力的海洋植物, 各种试验用药物均需要较高的浓度才会对浒苔有毒性, 而药物的大量使用又会对海洋环境造成新的污染。

利用溶藻细菌控制水华的研究在国外已有数十年历史, 近年来, 不少国外研究者认为: 水华和赤潮的突然消亡可能与溶藻细菌的感染有关^[7]。国内外陆续报道了多种具有溶藻活性的细菌, Reim^[15]曾报道了一株杆菌属细菌对蓝藻有溶藻活性, 该细菌通过分泌胞外物质杀死蓝藻细胞。细菌的溶藻方式一般有两种: 一是直接溶藻, 也就是直接进攻藻细胞, 它需要菌体与藻细胞直接接触, 甚至侵入藻细胞内部; 二是间接溶藻, 主要包括细菌同藻类争夺营养或细菌分泌胞外物质溶藻^[6]。本文分离到的弯曲芽孢杆菌 EP23, 其培养液高速离心后, 上清液对浒苔具有明显毒性, 表明弯曲芽孢杆菌 EP23 是通过分泌胞外物质的间接方式进行溶藻的, 作者也将对该菌分泌的毒素性质及其抑制浒苔生长的机理作深入的研究。

弯曲芽孢杆菌 EP23 的实际应用, 还有几个问题需要加以解决, 首先, 虽然该菌本身就是从海泥中分离而来, 也未见弯曲芽孢杆菌是鱼、虾、贝等海洋生物致病菌的报道, 但该菌对于广大海洋生物是否存在毒性, 施用后能否造成二次污染, 还需要进行广泛深入的研究; 同时, 浒苔大爆发根本原因是水体的富营养化, 而细菌溶藻后水体中大量的氮、磷并未被去除, 富营养化问题仍然存在, 利用细菌进行溶藻, 虽然可在表面上消除浒苔爆发形成的绿潮, 并不能从根本上解决水华问题, 彻底解决浒苔大爆发的问题还应该以预防为主, 减少对海水的污染,

控制海水的富营养化。

参考文献:

- [1] 应成琦, 张婷, 李信书, 等. 我国近海浒苔漂浮种类 ITS 与 18S rDNA 序列相似性分析[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 215-219.
- [2] Hiraoka M, Ohno M, Kawaguchi S, et al. Crossing test among floating *Ulva thalli* forming 'green tide' in Japan[J]. Hydrobiologia, 2004, 512(1): 239-245.
- [3] Merceron M, Antoine V, Auby I, et al. In situ growth potential of the subtidal part of green tide forming *Ulva* spp. Stocks[J]. The Science of the Total Environment, 2007, 384: 293-305.
- [4] 张晓雯, 毛玉泽, 庄志猛, 等. 黄海绿潮浒苔的形态学观察及分子鉴定[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 822-829.
- [5] 丁兰平, 梁日孝. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)的分类鉴定、生境习性及分布[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 68-71.
- [6] 卢兰兰, 李根保, 沈银武, 等. 溶藻细菌 DC-L14 的分离、鉴定与溶藻特性[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(1): 106-109.
- [7] 吴刚, 席宇, 赵以军. 溶藻细菌研究的最新进展[J]. 环境科学研究, 2002, 15(5): 43-46.
- [8] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [9] 刘进元. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2002.
- [10] 闫志勇, 王斌, 苏维奇, 等. 多重半套式 PCR 检测细菌 16S rRNA 基因方法的建立[J]. 青岛大学医学院学报, 2001, 37(1): 22-24.
- [11] R E 布坎南, N E 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] 雷清新, 于志刚, 张经, 等. 铜对缘管浒苔生理状态的影响[J]. 海洋环境科学, 1998, 17(1): 11-14.
- [14] 孙修涛, 王翔宇, 汪文俊, 等. 绿潮中浒苔的抗逆能力和药物灭杀效果初探[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 130-136.
- [15] Reim R L, Shane M S, Cannon R E. The characterization of a *Bacillus* capable of blue-green bactericidal activity[J]. Can J Microbiol, 1974, 20(7): 981-986.

Isolation and identification of a bacterial strain that inhabits the growth of *Enteromorpha prolifera*

WANG Jing-chao¹, XIN Yi-xuan²

(1. Biology Department, Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. Qingdao No.2 Middle School, Qingdao 266061, China)

Received: Dec., 15, 2010

Key words: algae-lysing bacterium; *Enteromorpha prolifera*; identification; *Bacillus flexus*

Abstract: Fifty-seven bacteria strains were isolated from sea mud at Qingdao. Strain EP23 was found to have algae-lytic activity toward *Enteromorpha prolifera*. Strain EP23 was identified as *Bacillus flexus* by morphological characters, physiological characteristics, and 16S rDNA sequence analysis. After ultracentrifugation, the bacterial culture supernatant displayed algae-lytic activity toward *Enteromorpha prolifera*, indicating that certain extracellular substances produced by the strain are responsible for the algae-lytic ability.

(本文编辑: 梁德海)