

不同形态磷源对铜绿微囊藻与附生假单胞菌磷代谢的影响

邹迪, 肖琳*, 杨柳燕, 万玉秋

(南京大学环境学院 污染控制与资源化国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 实验研究磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)、甘油磷酸钠 ($\text{Na}\beta\text{-glycerophosphat}$, Na Gly)、磷酸钙和卵磷脂 (lecithin, LEC) 4 种不同形态的磷源对铜绿微囊藻的生长代谢及其与附生假单胞菌磷代谢关系的影响。测定了微囊藻的生长、水中磷浓度的变化、碱性磷酸酶活性 (alkaline phosphatase activity, APA) 和微囊藻中总磷含量的变化。结果表明, 附生假单胞菌的存在能促进铜绿微囊藻的生长, 并可以将微囊藻不易直接吸收的磷形态转化为磷酸盐等物质供微囊藻利用。碱性磷酸酶在微囊藻和 X 菌利用大分子有机磷的过程中起重要作用。

关键词: 铜绿微囊藻; 假单胞菌; 磷形态; 碱性磷酸酶

中图分类号: X524 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)03-0118-04

Effects of Phosphorus Sources of Different Forms on Phosphorus Metabolism of *Microcystis aeruginosa* and Adhesive *Pseudomonas* sp.

ZOU Di, XIAO Lin*, YANG Li-yan, WAN Yu-qiu

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: The effects of different forms of phosphorus sources on the phosphorus metabolism of *Microcystis aeruginosa* and attached *Pseudomonas* sp. were investigated after four substance of different phosphorus forms: NaH_2PO_4 , Natrium- β -glycerophosphat (Na Gly), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and lecithin were added in the non-phosphorus MA culture. The growth of *Microcystis aeruginosa*, total phosphorus, alkaline phosphatase activity in water and total phosphorus in *Microcystis aeruginosa* were measured every day or every two days. Results show that attached *Pseudomonas* sp. could accelerate the growth of *Microcystis aeruginosa*, and transform some phosphorus forms which could not be assimilated very easily by *Microcystis aeruginosa* to some forms as phosphate to utilize for *Microcystis aeruginosa*. Alkaline phosphatase plays an important role in the utilization of large molecular organic phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and attached *Pseudomonas* sp.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; *Pseudomonas* sp.; phosphorus forms; alkaline phosphatase

太湖、滇池和巢湖等湖泊的水体富营养化问题已经对人们的生存环境质量构成了潜在的威胁。我国湖泊发生水华时的优势种群主要是铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)^[1], 在微囊藻生长过程中, 其胶鞘上附生着细菌, 细菌对藻的生长和形态都有较大的影响^[2-4]。本实验室对微囊藻上附生细菌的磷代谢以及游离附生细菌对铜绿微囊藻中磷释放和磷迁移的影响进行了初步研究^[2,5-7], 但细菌和微囊藻相互作用的研究不多见。磷是藻类生长的主要限制因子之一, 但即使水体中溶解性磷浓度很低, 微囊藻也能够利用内源性磷大量生长, 最终造成水华暴发。不同形态磷源的生物可利用度不同, 对藻和菌生长代谢的影响可能也不同。因此, 研究磷形态对微囊藻与附生菌磷代谢的影响有助于揭示蓝藻水华暴发的机理, 为其控制提供理论依据, 具有非常重要的现实意义。本试验在培养液中分别添加磷酸二氢钠、 β -甘油磷酸钠 (Na Gly)、磷酸钙和卵磷脂 (LEC), 研究了这 4 种不同形态的磷源对铜绿微囊藻的生长代

谢及其与附生假单胞菌磷代谢关系的影响。

1 材料和方法

1.1 试验藻种和菌种

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 由中科院武汉水生生物研究所提供, 用改良的 MA 培养基培养^[6], pH 8.6, 培养在 25℃ 光照培养箱中, 光暗比为 12:12。试验开始前将处于对数生长期的微囊藻转移到无磷 MA 培养基中培养 3d, 使藻细胞处于磷饥饿状态。附生细菌为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) X 菌株, 系南京大学环境微生物室从太湖微囊藻上分离得到。

1.2 试验方法

收稿日期: 2004-08-11; 修订日期: 2004-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40371102); 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2002CB412307)

作者简介: 邹迪 (1980~), 女, 天津人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学研究。

* 通讯联系人

(1) 试验设置 由于附生假单胞菌粘着在微囊藻的胶鞘上,要分开测定比较困难,所以先将附生假单胞菌从微囊藻中分离出来,再用透析袋将铜绿微囊藻和假单胞菌隔开,只让磷酸盐等小分子代谢产物通过.本实验所购买的卵磷脂(国产)分子量约为 1 000 左右,透析袋(GREENBIRD MD-25)的截留分子量为 3500,所以卵磷脂也能通过透析袋.

试验分组:在无磷 MA 培养基中分别添加 4 种磷源,共设 5 个磷源组. A: NaH_2PO_4 , B: NaGly , C: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (加在透析袋内), D: LEC, E: LEC (加在透析袋内). 对 A、B、D 3 组,每组又分别设藻+菌试验组和仅有微囊藻的对照组,以及仅有附生菌的对照组.对 C、E 2 组,每组分别设藻+菌试验组和仅有附生菌的对照组.各形态磷源换算成有效磷浓度均为 0.3 mg/L 左右.每日或隔日取样,仅有微囊藻的对照组和藻+菌的试验组测定藻细胞密度,水中磷浓度和碱性磷酸酶活性,藻中总磷含量,仅有附生菌的对照组只测定水中碱性磷酸酶活性.试验开始和结束时测定附生菌中的总磷含量.

(2) 接种 将磷饥饿状态的铜绿微囊藻以 $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,用无菌水洗涤 2 次,然后接入已灭菌的试验培养液中,初始藻密度约为 $4\times 10^6/\text{mL}$ 左右.附生菌 X 菌用 LB 液体培养基预培养 2 d.各取菌液 4 mL ,以 $10\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,用无菌水洗涤 2 次,然后用少量无磷 MA 培养液将菌体转入透析袋中,将透析袋置于已灭菌的试验培养液中,菌体细胞密度约为 $1.0\times 10^7/\text{mL}$ 左右(接近水华暴发时附生菌的密度).所有试验组及对照组都在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 光照培养箱中培养,光暗比为 12:12.

(3) 铜绿微囊藻的生长曲线 用 Nikon102 型显微镜和血球计数板计数藻细胞数目,再换算出培养液中的藻细胞密度.

(4) 水中磷浓度和藻中总磷含量的测定 取 4 mL 藻液, $7\ 000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,取出上清液,保留.将沉淀物和上清液分别加入 $1\text{ mL } 50\text{ g/L}$ 的过硫酸钾, $121\text{ }^\circ\text{C}$ 消化 30 min .用以抗坏血酸为还原剂的磷钼蓝比色法测定.

(5) 水中碱性磷酸酶活性(APA) 的测定^[8] 取 4 mL 样品, $7\ 000\text{ r/min}$ 离心 15 min ,取 2 mL 上清液加入已灭菌的试管中,随后加入 1 mL Tris-HCl 缓冲溶液($\text{pH}=8.4$),摇匀后加入 2 mL 反应底物对硝基苯磷酸二钠(*p*-Nitrophenyl phosphate, PNP-P, AMRESCO 产品).将试管放入 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 的生化培养箱中,反应 6 h ,用 120 g/L NaOH 溶液来终止反应.用

752 紫外光栅分光光度计在 410 nm 测定反应产物对硝基苯酚(*p*-Nitrophenol, PNP) 的产生量,计算 APA.

2 结果与讨论

2.1 铜绿微囊藻的生长曲线

由图 1 和图 2 可以看出,这 4 种不同形态的磷源都能够被铜绿微囊藻吸收利用.其中,无机磷(NaH_2PO_4) 和小分子有机磷(NaGly) 是以往研究中最常用的 2 种磷形态^[9],很容易被微囊藻吸收利用.从图中看出,以这 2 种物质作为磷源时藻的生长情况更好一些.仅以颗粒磷 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 作为微囊藻磷源的研究报道很少,而 X 菌能利用颗粒磷^[5],所以可以初步推测,颗粒磷先被 X 菌吸收利用,然后以可溶性磷酸盐的形式释放出来,提供给铜绿微囊藻, X 菌起到了缓释磷源的作用.另外,以往研究表明,铜绿微囊藻纯培养条件下,培养液的 pH 会因光合作用而升高,而当附生细菌存在时,细菌的呼吸代谢可以缓解 pH 的升高,这样也相对有利于磷酸钙的溶解和利用.对每一种形态的磷源来说,含附生菌的藻能比无菌的藻得到更高的最大生长量,说明附生菌的存在能促进微囊藻的生长.这是由于菌的生长处于动态平衡,不断有细胞在衰亡,所以也不断会有菌的细胞构成物如核酸、磷脂等大分子分解,由此所产生的磷酸盐被传输到细胞外,释放到水体中,供微囊藻生长利用.本试验中, X 菌的生长需要有机碳特别是小分子有机碳(如葡萄糖、乙酸盐等)作为碳源,还需要生长因子的存在,而这些在原始的 MA 培养基中都不具备,必须由微囊藻的代谢产物来提供^[10-12],因此附生假单胞菌与微囊藻的代谢紧密联系在一起.

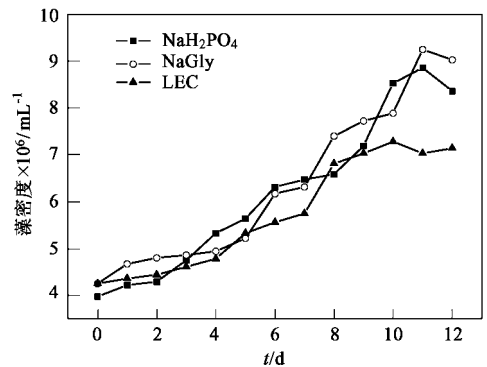


图 1 无菌对照藻的生长曲线

Fig.1 The growth curves of *Microcystis aeruginosa* without attached *Pseudomonas* sp.

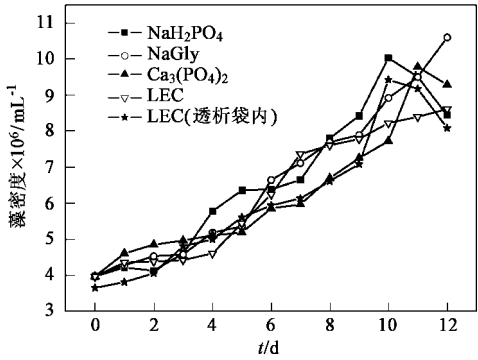


图 2 含附生菌的藻的生长曲线

Fig.2 The growth curves of *Microcystis aeruginosa* in presence of attached *Pseudomonas* sp.

2.2 水中总磷浓度和铜绿微囊藻中总磷含量变化过程

由图 3 可以看出,本试验所添加的外源性磷含量较低,在 3 d 后水中的总磷含量就降低到检测限以下.卵磷脂中的磷可能由于极难氧化,所以测得的磷浓度值与实际添加量不符,但仍然能被藻类吸收利用.对无机磷和小分子有机磷来说,含附生菌的培养液中磷浓度降低更快,这是由于在培养初期, X 菌正处于生长旺盛的阶段,也会吸收水中的磷.

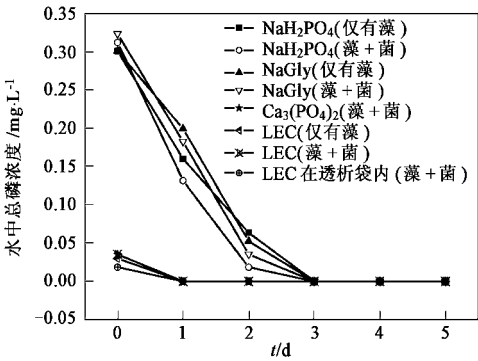


图 3 水中总磷浓度变化

Fig.3 Variation of total phosphorus in water

大分子有机磷(LEC)也能被微囊藻和 X 菌吸收利用,由图 4 ~ 图 6 可以看出,在无机磷和小分子有机磷化合物被利用时,APA 值无显著变化.而当大分子有机磷被利用时,APA 值显著升高,而且当微生物与卵磷脂之间被透析袋隔开时,水中的 APA 值增加更快.由此推测,微囊藻和 X 菌可直接吸收利用小分子有机磷,亦可通过碱性磷酸酶的水解作用来利用大分子有机磷.这与黄世玉等对海洋藻类吸收利用有机磷化合物的研究结果相似,藻类利用有机磷有 2 条途径,即对于小分子有机磷,藻类为直接吸收,对较大分子的有机磷,则经碱性磷酸酶水解

后再吸收利用^[13-15].另外,在图 5 中,颗粒磷 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 也能诱导 APA 活性增加,说明颗粒磷被微囊藻和 X 菌利用也是通过碱性磷酸酶的作用.

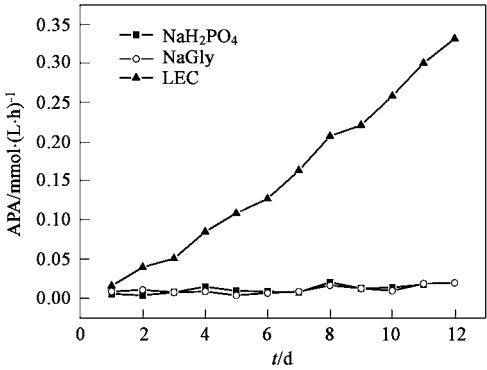


图 4 水中碱性磷酸酶活性变化(无菌对照藻)

Fig.4 Variation of APA in water (*Microcystis aeruginosa* without attached *Pseudomonas* sp.)

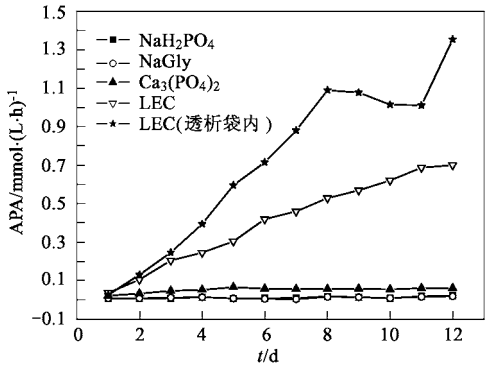


图 5 水中碱性磷酸酶活性变化(藻 + 菌)

Fig.5 Variation of APA in water (*Microcystis aeruginosa* in presence of attached *Pseudomonas* sp.)

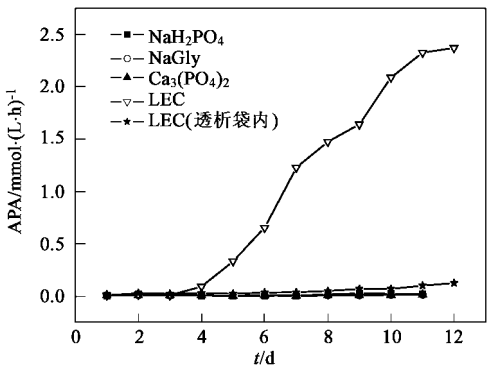


图 6 水中碱性磷酸酶活性变化(仅有菌)

Fig.6 Variation of APA in water(attached *Pseudomonas* sp. without *Microcystis aeruginosa*)

由图 7 ~ 图 8 可以看出,各试验组和对照组在培养过程中,微囊藻体内的磷含量都呈现出先增高后降低的趋势.由于试验开始时微囊藻处于磷饥饿

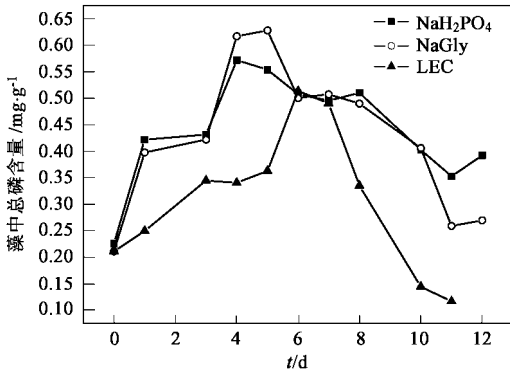


图 7 无菌对照藻中的总磷含量变化

Fig.7 Variation of total phosphorus in *Microcystis aeruginosa* without attached *Pseudomonas* sp.

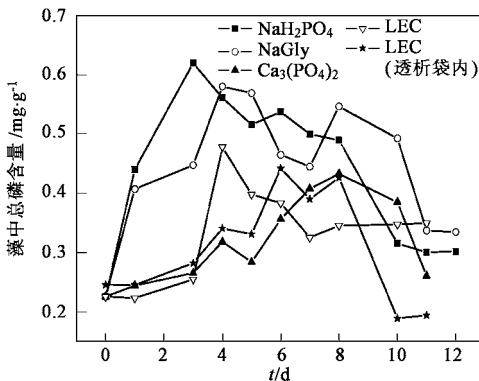


图 8 含附生菌的藻中的总磷含量变化

Fig.8 Variation of total phosphorus in *Microcystis aeruginosa* in presence of attached *Pseudomonas* sp.

状态,所以在培养初期会快速吸收水中的磷,而此时藻的生物量增加不多,所以体内磷含量明显上升.随着藻的不断生长繁殖,所需要的磷不断增多,但外源性磷逐渐不能完全满足其生长需要,所以微囊藻就会消耗其自身细胞中的磷用于生长代谢,藻体内的磷含量有所下降.从图中可以看出,不论是否含有附生菌,在无机磷(NaH_2PO_4)和小分子有机磷(NaGly)培养的微囊藻体内的磷含量都高于颗粒磷($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)和大分子有机磷(LEC)培养的微囊藻,这说明无机磷和小分子有机磷的生物可利用性高于颗粒磷和大分子有机磷.在有附生菌存在的情况下,试验开始时,将菌体内的磷换算成整个系统中的磷浓度约为 0.78 mg/L ,试验结束时,以无机磷、小分子有机磷、颗粒磷、卵磷脂、卵磷脂(透析袋内)为磷源的试验组中,透析袋内的总磷含量换算成系统磷浓度分别为 0.18 、 0.11 、 0.78 、 0.27 、 0.65 mg/L ,说明在试验过程中,每种磷形态培养液中的 X 菌都向外释放了一部分磷,供微囊藻生长.从图 4~6 可以

看出,在以卵磷脂作为磷源时, X 菌产生的 APA 值高于微囊藻产生的 APA 值,即 X 菌利用卵磷脂的能力比微囊藻强,所以 X 菌的存在能帮助微囊藻将更多的卵磷脂水解为容易利用的磷形态,供微囊藻生长.同时,随着微囊藻和附生菌分别进入不同的生长阶段,它们的代谢也会发生变化, X 菌对它所释放的磷也可能存在再吸收的过程,所以对每一种磷形态来说,含附生菌的藻与无菌对照藻的磷含量相比,有时高有时低.

3 结论

附生假单胞菌的存在能促进铜绿微囊藻的生长,并可以将微囊藻不易直接吸收的磷形态转化为磷酸盐供微囊藻利用.碱性磷酸酶在微囊藻和 X 菌利用大分子有机磷的过程中起重要作用.

参考文献:

- [1] 蔡启明.太湖环境生态研究[M].北京:气象出版社,1998.
- [2] 周子元,罗屿,马文漪,等.太湖中 4 种细菌的分离、鉴定及生长曲线的测定[J].湖泊科学,1998,10(4):59~62.
- [3] Ashen J B, Goff L J. Molecular and Ecological evidence for species specific and coevolution in a group of marine algal-bacterial symbioses [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7):3024~3030.
- [4] Brunger A K. Contribution of bacteria in the mucilage of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) to benthic and pelagic bacterial production in a hypereutrophic lake [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 29(1):13~22.
- [5] 刘玲莉,顾宇飞,罗屿,等.一株自太湖微囊藻上分离到的细菌的生长及磷代谢[J].湖泊科学,2000,12(4):373~378.
- [6] 顾宇飞,罗屿,马文漪,等.温度、碳、氮、磷对一株芽孢杆菌生长的影响[J].应用与环境生物学报,2000,6(1):86~89.
- [7] 蒋丽娟,史小丽,杨柳燕,等.游离附生假单胞菌对铜绿微囊藻细菌中 ^{32}P 释放的影响[J].环境科学学报,2003,23(4):521~524.
- [8] 高光,高锡芸,秦伯强,等.太湖水体中碱性磷酸酶的作用阈值[J].湖泊科学,2000,12(4):353~358.
- [9] 张民,史小丽,蒋丽娟,等.两种外源性磷及振荡对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)生长的影响[J].应用与环境生物学报,2002,8(5):507~510.
- [10] Worm J, Søndergaard M. Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) [J]. Aquatic microbial ecology, 1998, 14(1):19~28.
- [11] Brunberg A. Contribution of bacteria in the mucilage of *Microcystis* spp. To benthic and pelagic bacterial production in a hypereutrophic lake [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 29(1):13~22.
- [12] Sommaruga R, Roberts R D. The significance of autotrophic and heterotrophic picoplankton in hypertrophic ecosystems [J]. FEMS microbiology ecology, 1997, 24(3):187~200.
- [13] 黄世玉,黄邦钦.不同磷源对藻类生长和生化组成的影响[J].台湾海峡,1997,12(4):458~464.
- [14] 王海黎,洪华生,黄邦钦.海洋环境中溶解有机磷的生物活性初探[J].厦门大学学报(自然科学版),1995,34(3):416~420.
- [15] 黄邦钦,王海黎,洪华生,等.厦门海域浮游植物和细菌对溶解有机磷的利用[J].厦门大学学报(自然科学版),1996,35(4):625~630.