

## 2 株球形棕囊藻溶藻细菌的分离及鉴定

晏荣军<sup>1,2</sup>, 尹平河<sup>2</sup>, 裘俊红<sup>1</sup>

(1. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 杭州 310014; 2. 暨南大学水生生物研究所, 广州 510632)

**摘要:**从珠海赤潮海水中分离出 2 株溶藻细菌 Y01 和 Y04, 对球形棕囊藻均有显著的溶藻效果. 结果表明, 溶藻细菌 Y01 和 Y04 均为革兰氏阳性菌, 对球形棕囊藻的溶解作用时间为 6 d. 借助显微镜及扫描电镜等观察 Y01 和 Y04 溶藻过程, 发现 2 株溶藻细菌的溶藻方式均为直接裂解藻细胞. 溶藻细菌 Y01 和 Y04 的 16S rDNA 系列分析表明, 溶藻细菌 Y01 和 Y04 的 PCR 扩增产物的长度分别为 1 468 bp 和 1 548 bp (登录号分别为 DQ531607 和 DQ531608). 菌株 Y01 和 Y04 与多株芽孢杆菌的 16S rDNA 核苷酸序列的同源性在 99.7% 以上, 均归属于芽孢杆菌属.

**关键词:**球形棕囊藻; 溶藻细菌; 溶藻特征; 有害赤潮; 16S rDNA; 芽孢杆菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)01-0225-06

## Isolation and Characterization of Two Marine Algicidal Bacteria Against the *Phaeocystis globosa*

YAN Rong-jun<sup>1,2</sup>, YIN Ping-he<sup>2</sup>, QIU Jun-hong<sup>1</sup>

(1. College of Chemical Engineering and Materials, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** The algae-lysis bacteria Y01 and Y04 were isolated from seawater, during a red tide survey of the Zhuhai Estuary in southern China. The algae-lysis bacteria Y01 and Y04 were Gram-positive bacteria which can remove *P. globosa* in 6 days. The lysing process was observed by microscope and SEM, both of them could directly lyse *P. globosa*. The strains were identified by the sequence analysis of 16S rDNA. The length of the two bacteria's sequences were 1 468 bp and 1 548 bp (strain Y01: DQ531607; strain Y04: DQ531608). The DNA sequence similarity searches showed that share more than 99.7% sequence homology with some strain of *Bacillus*. The algae-lysing bacteria would provide a possibility to control *P. globosa* red-tide by microbial agents.

**Key words:** *Phaeocystis globosa*; algae-lysis bacteria; algicidal characterization; harmful algal bloom; 16S rDNA; *Bacillus*

有害赤潮已经成为当今全球性的海洋灾害, 其造成的环境和经济问题日益引起重视, 寻求有效的赤潮防治途径势在必行<sup>[1,2]</sup>. 溶藻细菌 (Algae-lysis bacteria), 作为水生生态系统生物种群结构和功能的重要组成部分, 对维持藻的生物量平衡具有非常重要的作用<sup>[3,4]</sup>. 利用微生物防治藻类危害的方法逐渐得到重视, 特别是细菌对藻类生长影响的机制研究, 已逐渐被人们所关注<sup>[5-7]</sup>. 有的细菌可以释放某种物质到环境中, 非选择性地杀伤藻类细胞, 如铜绿假单胞菌能分泌吩嗪色素来杀伤藻细胞, 另有些种类的黏细菌可直接与藻细胞接触, 通过分泌溶解纤维素的酶来消化掉宿主的细胞壁, 进而使整个藻细胞溶解; 也有极少数种类的细菌可进入藻细胞内溶藻, 如一种似蛭弧菌的细菌能进入铜绿微囊藻的细胞使其溶解<sup>[8-10]</sup>. 近年来, 球形棕囊藻赤潮发生范围在不断扩大, 危害程度日益严重<sup>[11,12]</sup>, 而 Brussaard 等<sup>[13,14]</sup> 也研究了病毒对球形棕囊藻的杀灭作用. 本研究从珠海赤潮水体中分离出 2 株溶藻细菌 Y01 和 Y04, 借助显微镜及扫描电镜等分析了

Y01 和 Y04 对球形棕囊藻的溶藻效果及溶藻特性, 并通过 16S rDNA 测序分析, 探讨了细菌群落组成. 研究结果有助于人们更好地了解细菌和赤潮藻类相互作用的过程和机制, 以为赤潮的微生物防治提供可能的途径和实际指导.

### 1 材料与方法

#### 1.1 藻种

球形棕囊藻由暨南大学齐雨藻和吕颂辉教授提供. 藻培养液 f/2 培养液<sup>[15]</sup>, 温度 20℃ ± 1℃, 光照条件 12 h 光照: 12 h 黑暗.

#### 1.2 溶藻细菌的分离

用无菌移液管吸取 1 mL 新鲜的珠海赤潮海水置于 9 mL 无菌水中, 作为 10<sup>-1</sup> 稀释液, 依此类推, 制成梯度稀释液. 将已灭菌尚未凝固的 2216E 固体

收稿日期: 2010-03-15; 修订日期: 2010-04-30

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2001CB409710); 国家自然科学基金项目 (200277016)

作者简介: 晏荣军 (1976 ~), 男, 博士后, 讲师, 主要研究方向为水环境生物学, E-mail: yanrj@zjut.edu.cn

培养基(成分为:陈海水1 000 mL、琼脂粉 10 g、蛋白胨 5.0 g、酵母膏 1.0 g、磷酸高铁 0.1 g;pH = 7.6)分别倒入培养皿内,待凝固后将不同稀释度的菌悬液混匀,各吸取 0.2 mL,置于相应编号的无菌培养皿内,设置平行对照组,将接种后的平板倒置于30℃生化培养箱培养 72 h.将具有明显菌落特征的细菌从平板上挑离并进行特异性筛选,再次采取分区划线法,使菌种进一步纯化<sup>[16,17]</sup>,记录纯化后的细菌菌落特征,并进行革兰氏染色鉴定.

将分离纯化获得的细菌分别置于 150 mL 液体培养基中,180 r·min<sup>-1</sup>,30℃下培养 24 h,以无菌试管取 10 mL,分别加入到 100 mL 处于对数生长期的球形棕囊藻的培养液中,应用显微镜观察溶藻效果.

### 1.3 藻菌关系扫描电镜样品制备

取 50 mL 对照组和实验组细胞悬液,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,沉淀物用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH 7.2)清洗 2 次,每次 10 min.移入小离心管中,加 2.5% 戊二醛固定过夜.磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 30 min,离心去除上清液,加 1% 锇酸固定 1.5 h.磷酸缓冲液清洗 3 次,每次 20 min,离心后去除上清液.从低浓度到高浓度对细胞进行脱水处理,乙醇溶液浓度分别是:30%、50%、70%、80%、90%和 100%,每次脱水 5 min.再用 100% 乙醇溶液清洗 3 次,每次 20 min.细胞团用醋酸异戊酯处理 3 次,每次 30 min.以接种针挑出脱水后的细胞团,均匀涂布于预先处理好干燥的盖玻片上.将涂有细胞团的盖玻片,有细胞的一面朝上,临界点干燥除去脱水剂和少量水分.干燥后的盖玻片,用双面胶固定在铜台上,放入真空喷镀仪的真空罩内进行镀金导电处理,用电子扫描显微镜观察.

### 1.4 溶藻细菌生理生化特性、分子鉴定和系统发育分析

对有显著溶藻效果的 Y01 和 Y04 接种培养 24 h.检查纯度和浓度后,置于4℃冰箱中备用.取培养的菌液 10 μL 于无菌水中,99℃变性后离心取上清液作为模板,采用 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No. D310)进行扩增.使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (Code No. DV805A)切胶回收目的片断,取 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,以 Seq Forward、Seq Internal、Seq Reverse 为引物,对上述回收产物进行 DNA 测序.测序引物序列为:16S SeqForward: CGAGCGCAACCC TTAATCTT; Internal: CAGCAGCCGCGTAATAC; Revers: AGTTCGCCAGTTTCCAATGA,将各菌株的

16S rDNA 序列提交到 GenBank,与所测的 16S rDNA 序列经校对后,通过 Blast 程序在 GenBank 中核酸数据进行比对分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶藻细菌生长特征

分离获得 12 株细菌,分别编号为 Y01 ~ Y12.其中菌株 Y01、Y04 的培养基生长特征见表 1,可知菌株 Y01 菌落为微凸圆形菌落,而菌株 Y04 菌落为黑色金属光泽不规则.两者在颜色、光泽及形状方面差异较为明显.2 菌株在 2216E 液体培养基(成分为:陈海水1 000 mL、蛋白胨 5.0 g、酵母膏 1.0 g、磷酸高铁 0.1 g;pH = 7.6)中生长的延滞期约为 1~2 h,4 h 后进入生长对数,30 h 左右进入生长稳定期,48 h 后开始进入消亡期,培养时间超过 1 周,未发现 Y01 和 Y04 产芽孢现象.革兰氏(Gram)染色把细菌分为革兰氏阴性和阳性 2 大类,在细菌的鉴别上起着重要作用,取菌液进行革兰氏染色,并在光学显微镜下观察,结果表明 Y01 和 Y04 均为革兰氏阳性菌.

表 1 细菌菌落在固体培养基上的生长特征

Table 1 Characters of the strains on the solid medium				
编号	大小	颜色	光泽	菌落表面其他生长特征
Y01	较大	乳白	闪光	微凸、圆形,边缘整齐、不透明、规则、细密
Y04	较大	黑色	金属光泽	凸起、假根状,边缘线状分布、不透明、不规则、细密

### 2.2 溶藻细菌 Y01 和 Y04 溶藻过程观察

研究表明<sup>[18,19]</sup>,球形棕囊藻细胞计数密度与荧光吸收强度间呈线性关系.菌藻共同培养体系中细菌和藻细胞的荧光吸收值变化如图 1.整个实验过程中,未添加任何细菌的对照(control)藻细胞保持

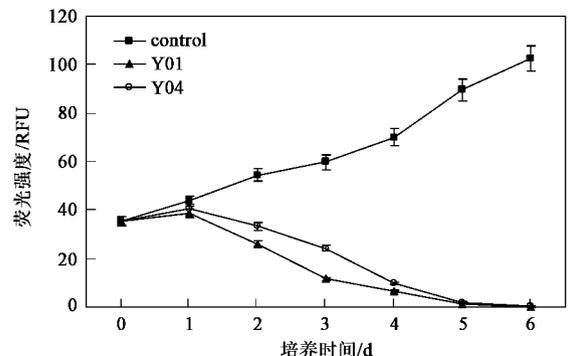


图 1 Y01 和 Y04 对球形棕囊藻生长的影响

Fig. 1 Effects of bacterial stains Y01 and Y04 to the growth of *Phaeocystis globosal*

一定的增殖速度,藻细胞密度随着培养时间延长逐渐升高. 实验组中,将溶藻细菌 Y01 和 Y04 在藻培养对数期的第 1 d 加入至藻培养液中,刚加入时,藻细胞增殖未受到明显影响,细胞密度逐渐升高,同时细菌密度也逐渐升高;但到培养第 2 d,添加细菌 Y01 和 Y04 的实验组中藻细胞开始出现死亡,肉眼可观察到大量藻细胞沉降于培养瓶底部,镜检发现藻细胞出现破裂,溶藻效应发生在培养第 2 d,此后藻细胞密度迅速下降,至培养结束,即第 6 d,实验组中已难以见到正常生存的藻细胞.

通过显微镜直接镜检藻细胞在不同取样时间的形态见图 2. 图 2(a) 是球形棕囊藻正常细胞;第 1 d 在藻培养液中添加 Y01 对球形棕囊藻生长没有明显影响,同样显微镜下观察,添加溶藻细菌 Y01 后藻细胞形态见图 2(b),没有明显变化. 第 3 d 随着细菌 Y01 加入和溶藻活性的表现,藻细胞颜色变浅,内部结构变得较正常细胞松垮,此时藻细胞已经死亡[图 2(c)]. 到培养末期,即第 6 d,培养液内多数是破裂的藻细胞碎片[图 2(d)],培养液未能见到完整藻细胞,藻培养液变成混浊沉淀.

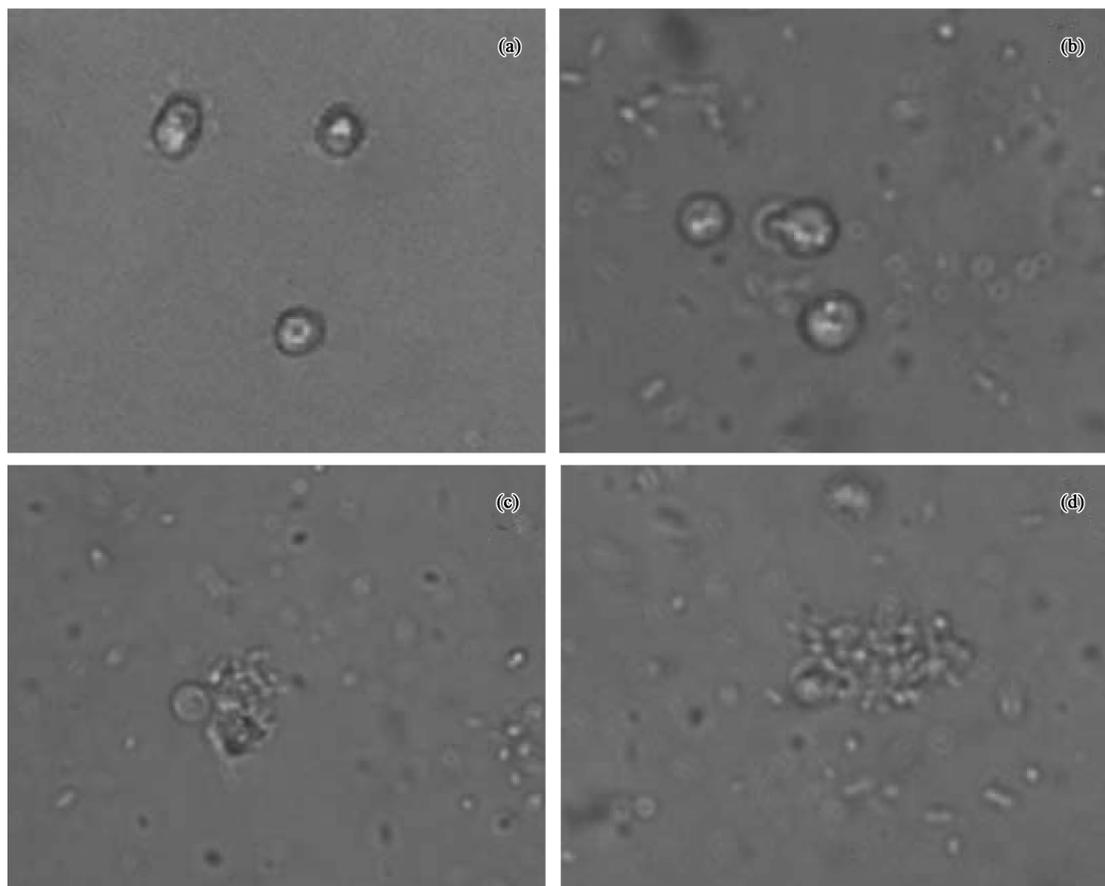


图 2 溶藻细菌 Y01 溶解球形棕囊藻细胞

Fig. 2 Algicidal bacterium Y01 infecting the *Phaeocystis globosal* cells

### 2.3 溶藻细菌 Y01 和 Y04 溶藻效果的扫描电镜观察

溶藻细菌的作用方式有直接和间接 2 种:直接溶藻,即直接进攻宿主,它需要细菌与藻细胞直接接触,甚至侵入藻细胞内;间接溶藻,即间接进攻宿主,主要包括细菌与藻竞争有限营养或细菌分泌胞外物质溶藻. 细菌对藻类的影响主要体现在,一方面细菌吸收藻类产生的有机物质,并为藻类的生长提供营养盐和必要的生长因子,从而调节藻类的生长环境,

另一方面细菌也可通过直接的或间接的作用抑制藻细胞的生长,甚至裂解藻细胞,从而表现为杀藻效应. 应用扫描电子显微镜观察藻细胞形态变化,从图 3(a) 可以看出,溶藻细菌 Y01 和 Y04 对球形棕囊藻溶解作用[(a) Y01 吸附在棕囊藻细胞表面;(b) Y01 溶解棕囊藻细胞;(c) Y04 吸附在棕囊藻细胞表面;(d) Y04 溶解棕囊藻细胞]. 溶藻细菌 Y01 和 Y04 对棕囊藻溶藻的作用过程比较相似,均为:①少数几个溶藻细菌吸附棕囊藻表面;②溶藻细菌聚集增多;③

部分棕囊藻表层破裂;④藻细胞内物质溶出,棕囊藻被溶解.因此,溶藻细菌 Y01 和 Y04 的溶藻方式应

该属于上文所述的第 2 种方式,即直接裂解棕囊藻细胞.

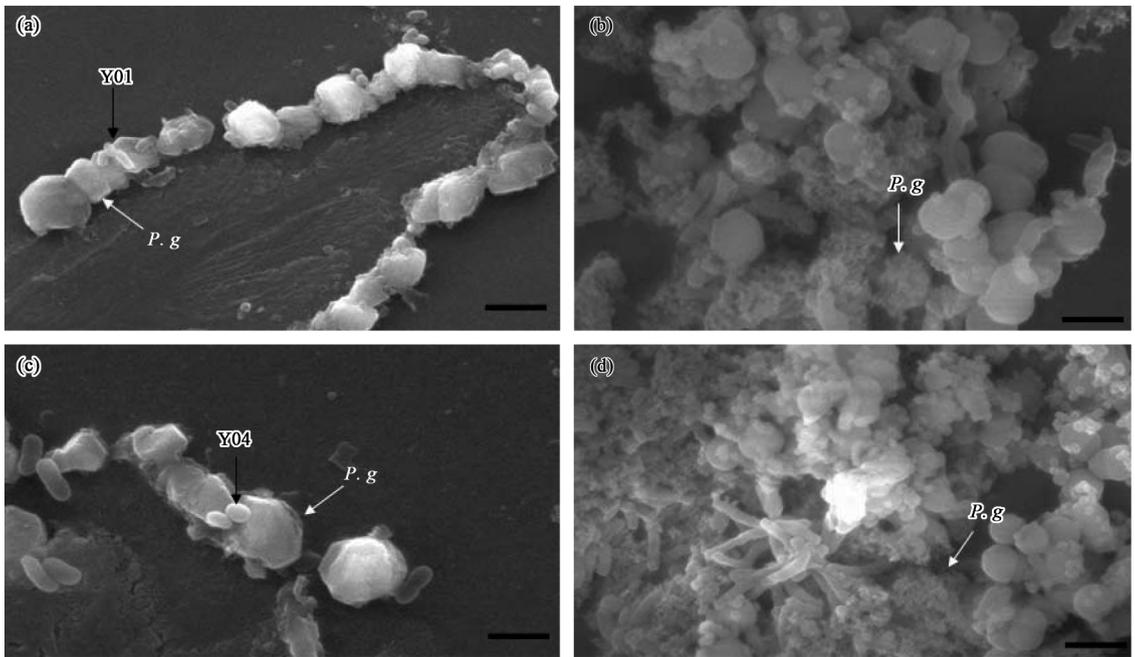


图 3 细菌 Y01 和 Y04 对球形棕囊藻溶解作用扫描电镜图(标尺为 5  $\mu\text{m}$ )

Fig. 3 SEM views of algicidal bacteria Y01 and Y04 infecting the *Phaeocystis globosa* cells(Scale bars = 5  $\mu\text{m}$ )

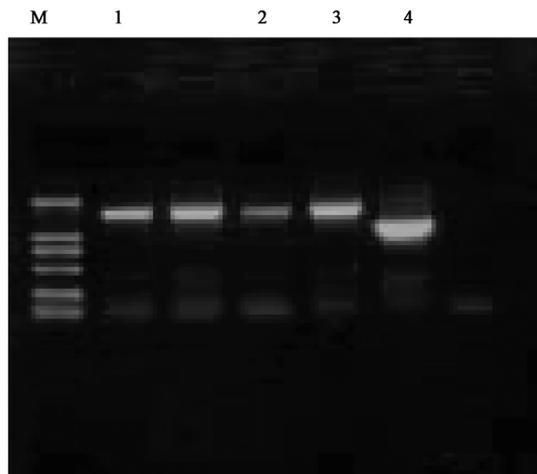
## 2.4 溶藻细菌 Y01 和 Y04 的 16S rDNA 序列分析

提高溶藻细菌的分离效率和加强溶藻细菌的分子生物学研究是溶藻细菌研究内容之一.目前 16S rDNA 序列的相似性分析是细菌定属的关键指标<sup>[20]</sup>.利用 16S rDNA 序列分析方法对溶藻细菌进行鉴定,在分子生物学水平上研究溶藻细菌,能准确地推进溶藻细菌基础研究的发展.由于细菌间的相互依赖关系和研究者缺乏对细菌特殊营养需求的了解,有些细菌是不能被分离培养的.而分离溶藻细菌的一般方法是将样品涂布平板,划线分离,获得纯培养株,然后通过溶藻实验进行筛选,这会给分离溶藻细菌带来了困难.应用 PCR 技术可以快速、灵敏,选择性地扩增微量的 DNA (或 RNA) 片段,16S rDNA 序列分析可以揭示微生物种群间的系统发育关系.本实验通过 PCR 技术直接扩增自然水体中细菌的 16S rDNA,经过序列分析,不仅能够鉴定细菌的类属及亲缘关系,而且可以直接了解自然水体中细菌多样性和时空分布状况.

溶藻细菌 Y01 和 Y04 PCR 扩增产物的长度分别为 1 468 bp 和 1 548 bp, PCR 扩增结果如图 4.使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 (Code No. DV805A) 切胶回收目的片段,取 5  $\mu\text{L}$  进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图 5.一般来说,细菌杀

藻物质的筛选是通过检测细菌培养物滤液是否具有溶藻活性的方法进行的.即首先分离细菌,然后通过溶藻实验确认细菌的培养物滤液是否具有溶藻能力.本研究对溶藻细菌 Y01 和 Y04 的 16S rDNA 进行测序,采用 BLAST 程序与 GenBank 中的已知序列进行相似性分析,并进行细菌系统发育分析.本研究中分离的溶藻细菌 Y01 和 Y04,序列在 GenBank 中的菌株编号分别为 Bankit797995, Bankit798003; 登录号分别为 DQ531607 和 DQ531608.研究表明,在海洋环境中,通过培养物获得的 16S rDNA 序列与直接从环境中获得的序列是不相同的,这与 Suzuki 等<sup>[21]</sup>的研究结果相类似.

溶藻细菌与赤潮消失有很大关系,如 Yoshikawa 等<sup>[22]</sup>从日本海域分离出的具有溶藻效应的黄杆菌属.已知的溶藻细菌主要属于  $\alpha$ -Proteobacteria、 $\beta$ -Proteobacteria 和  $\gamma$ -Proteobacteria、CFB 群或 *Alteromonas-Pseudoalteromonas* 群<sup>[23,24]</sup>,这些细菌都是革兰氏阴性细菌,偶有革兰氏阳性细菌的报道,本研究中分离的溶藻细菌 Y01 和 Y04 属于革兰氏阳性菌.图 6 序列同源性比较和系统发育表明,溶藻细菌 Y01 和 Y04 与多株芽孢杆菌的 16S rDNA 核苷酸序列的同源性均在 99.7% 以上,均归属于芽孢杆菌属.



M. DNA Marker DL2000; 1. CTA619-Y01; 2. CTA619-Y04;  
3. 正对照; 4. 负对照

图4 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig.4 PCR amplification of 16S rDNA



M. DNA Marker DL2000; 1. CTA619-Y01; 2. CTA619-Y04

图5 回收后的 16S rDNA

Fig.5 Recovered 16S rDNA

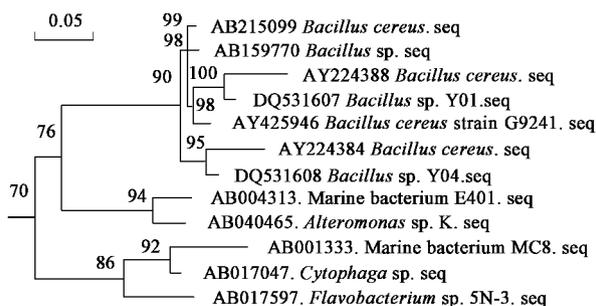


图6 溶藻细菌 Y01 和 Y04 的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of the bacteria Y01 and Y04

### 3 结论

(1)从珠海赤潮海水中分离出 2 株溶藻细菌 Y01 和 Y04,对球形棕囊藻均有显著的溶藻效果,借助显微镜及扫描电镜等研究了 Y01 和 Y04 对球形棕囊藻的溶藻效果及溶藻过程表明,2 株溶藻细菌的溶藻方式均为直接裂解藻细胞。

(2)对溶藻细菌 Y01 和 Y04 进行了 16S rDNA 测序,序列在 GenBank 中的登录号分别为 DQ531607 和 DQ531608.菌株 Y01 和 Y04 与多株芽孢杆菌的 16S rDNA 核苷酸序列的同源性在 99.7% 以上,均归属于芽孢杆菌属。

### 参考文献:

[ 1 ] 吴刚,席宁,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.

[ 2 ] 彭超,吴刚,席宇,等.3 株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻效应[J].环境科学研究,2003,16(1):37-40.

[ 3 ] Yoshinaga I, Kawai T, Takeuchi T, et al. Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay [J]. Fish Science, 1995, 61: 780-786.

[ 4 ] Yoshinaga I, Kim M C, Katanozaka N, et al. Population structure of algicidal marine bacteria targeting the red tide forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) determined by restriction fragment length polymorphism analysis of the bacterial 16S ribosomal RNA genes [J]. Marine Ecology-Progress Series, 1998, 170: 33-44.

[ 5 ] Fukami K, Yuzawa A, Nishijima T, et al. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense* [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1992, 58: 1073-1077.

[ 6 ] Imai I, Kimura S. Resistance of the fish-killing dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* against algicidal bacteria isolated from the coastal sea of Japan [J]. Harmful Algae, 2008, 7: 360-367.

[ 7 ] Imai I, Ishida Y, Sakaguchi K, et al. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan [J]. Fisheries Science, 1995, 61: 624-632.

[ 8 ] Imai I, Kim M C, Nagasaki K, et al. Relationships between dynamics of red tide-causing raphidophycean flagellates and algicidal micro-organisms in the coastal sea of Japan [J]. Phycological Research, 1998, 46: 139-146.

[ 9 ] Doucette G J. Interaction between bacteria and harmful algae: a review [J]. Natural Toxins, 1995, 3: 65-74.

[ 10 ] Doucette G J, McGovern E R, Babinchak J A, et al. Algicidal bacteria active against *Gymnodinium breve* (Dinophyceae). I. Bacterial isolation and characterization of killing activity [J]. Journal of Phycology, 1999, 35(6), 1447-1454.

[ 11 ] 王梅,尹平河,赵玲,等.二氯异氰尿酸钠和三氯异氰尿酸对棕囊藻细胞去除的研究[J].环境科学,2006,27(5):956-

- 959.
- [12] Nicolas S, Lionel D, Luis F A, *et al.* Impact of the *Phaeocystis globosa* spring bloom on the intertidal benthic compartment in the eastern English Channel: A synthesis [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, **58**: 55-63.
- [13] Brussaard C P D, Kuipers B, Veldhuis M J W, *et al.* A mesocosms study of *Phaeocystis globosa* population dynamics I. Regulatory role of viruses in bloom control [J]. *Harmful Algae*, 2005, **4**: 859-874.
- [14] Brussaard C P D, Mari X, Van Bleijswijk J D L, *et al.* A mesocosms study of *Phaeocystis globosa* population dynamics. II. Significance for the microbial community Regulatory role of viruses in bloom control [J]. *Harmful Algae*, 2005, **4**: 875-893.
- [15] Guillard R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates [A]. In: Smith W L, Chanley M H (eds.). *Culture of marine invertebrate animals* [M]. New York: Plenum Press, 1975. 29-60.
- [16] 国家技术监督局. 海洋调查规范 [M]. 北京: 中国标准出版社, 1992. 702-705.
- [17] 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. 105-106.
- [18] 裴海燕, 胡文容, 曲音波, 等. 一株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性 [J]. *环境科学学报*, 2005, **25** (6): 796-802.
- [19] 晏荣军, 尹平河. 应用 AFM 研究盐度对棕囊藻生长的影响 [J]. *海洋环境科学*, 2006, **21** (3): 60-64.
- [20] Su J Q, Yang X R, Zheng T L, *et al.* Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. *Harmful Algae*, 2007, **6**: 799-810.
- [21] Suzuki Y, Takabayashi T, Kawaguchi T, *et al.* Isolation of an allelo pathic substance from the crustose coralline algae, *Lithopllum* spp., and its effect on the brown alga, *Laminaria religiosa* Miyabe (*Phaeophyta*) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1998, **225**: 69-77.
- [22] Yoshikawa K, Adachi K, Nishijima M, *et al.*  $\beta$ -Cyanoalga-nine production by marine bacteria on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacter [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66** (2): 718-722.
- [23] Mayali X, Azam F. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms [J]. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2004, **51**: 139-144.
- [24] Roth P B, Twiner M J, Mikulski C M, *et al.* Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* [J]. *Harmful Algae*, 2008, **7**: 682-691.