

侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻生长胁迫的研究

王 琼¹, 吴 伟^{1,2*}, 季 丽¹

(1.南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘 要:为探讨侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*) SK-1 对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)生长胁迫的影响,在实验室环境下对两者共适培养基质进行了选择和优化,探究了处于不同生长期和不同初始生物量的上述两者在共基质中的数量消长规律,以及共基质体系中无机氮营养盐(NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N)的含量变化。结果显示,将取自富营养化池塘的养殖水,添加适量葡萄糖和氨氮使得 C:N:P 的近似比为 250:10:1 的培养基质作为共适培养基质。在此基质中,不同生长时期的侧孢芽孢杆菌与铜绿微囊藻共存时的生长胁迫效应不同,处于生长稳定期的菌体对生长初期的微囊藻抑制效果最好,且在一定的浓度范围内,菌体细胞密度越大,其抑藻效果越明显。研究表明,侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻生长的抑制是通过竞争营养物质与分泌胞外抑藻物质这两种方式实现的,且在藻体和菌体的不同生长阶段,这两种作用方式所占的比重不同。故在生态控藻时,须在藻类爆发生长前进行细菌种群的培育,以获得良好的生态效果。

关键词:侧孢芽孢杆菌;铜绿微囊藻;共适培养基;胁迫;无机氮

中图分类号:X131.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2014)02-0383-09 **doi:**10.11654/jaes.2014.02.025

Influence of *Bacillus laterosporus* on *Microcystis aeruginosa* Growth

WANG Qiong¹, WU Wei^{1,2*}, JI Li¹

(1.Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2.Freshwater Fisheries Research Center, Key Laboratory of Inland Fishery Eco-environment and Resource, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Interactions of algae and algae-inhibiting bacteria often control the stability of aquatic ecosystems. In this study the influence of *Bacillus laterosporus* SK-1 on the growth of *Microcystis aeruginosa* was examined under different initial biomass and at different growing periods. Concentrations of inorganic nitrogen (NO_3^- -N, NO_2^- -N, NH_4^+ -N) in the system were also monitored. A growth media with 250:10:1 of C:N:P ratio obtained by adding glucose and ammonia nitrogen to eutrophic water was used to grow *Bacillus laterosporus* and *Microcystis aeruginosa*. The bacteria had different stresses on the growth of *Microcystis aeruginosa* at different growth stages. The strain SK-1 at its stable stage had the greatest inhibitory effect on *Microcystis aeruginosa* of early growth stages. The more the initial SK-1 amount, the greater algae-inhibiting effect. The strain SK-1 inhibited the growth of *Microcystis aeruginosa* mainly through competing nutrients and secreting extracellular algae-inhibiting substances. The relative proportion of these two processes were different at different growth stages of algae and bacteria. The results suggest that bacteria should be inoculated prior to algae outbreak to best control algae ecologically.

Keywords: *Bacillus laterosporus*; *Microcystis aeruginosa*; co-substrates; stress; inorganic nitrogen

藻类和细菌作为水生生态系统中两种主要的微生物群落,在物质转化和循环过程中扮演着重要的

角色。两者之间既拮抗竞争又互惠互利的复杂关系,维护了水生生态系统的稳定。藻类是水体生态环境中的初级生产力,但因水体富营养化导致的过度生长,可危及依赖水生生态系统生存的其他生物体的正常生长,对生态平衡造成极为不利的影响。而水体中的一些微生物因具有与藻类竞争水体营养、分泌抑制藻类生长的代谢产物等特点,对维持藻类生物量的平衡

收稿日期:2013-08-19

基金项目:农业科技成果转化资金项目(2012GB23260567);现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(No.CARS-49)

作者简介:王 琼(1987—),女,硕士研究生,从事环境微生物学研究。

* 通信作者:吴 伟 E-mail:wuw@ffrc.cn; E-mail:wuwzh@263.net

起着非常重要的作用。抑藻细菌因具有生长周期短、易于规模化培养、使用方便、安全有效和环境友好性等优点,目前已成为修复富营养化水体、特别是水产养殖水体的途径之一,成为研究的热点^[1-3]。迄今为止,国内外的相关研究表明,抑藻细菌对藻类的作用方式有如下几种:一是直接作用,细菌直接与藻细胞接触,甚至侵入到藻细胞内^[4],从而抑制藻类细胞;二是间接作用^[5],即通过分泌并释放胞外物质抑制藻类生长,或者是在某种程度上影响藻类对营养物质的吸收;三是综合作用^[6],研究发现部分抑藻细菌具有两种或多种抑藻方式,即直接接触与分泌胞外物质相伴而生,或者分泌胞外物质与影响营养物质循环相结合。目前国内对抑藻细菌的研究主要集中在对抑藻细菌的分离鉴定、抑藻现象的描述以及抑藻活性物质的筛选等方面^[7-9],而对具体某种抑藻细菌对藻类生长的限制作用方式和效果了解不清,特别是对处于不同生长阶段的藻菌共存时水体中营养盐的变化和生物生长的相关性研究不明,无法真正了解抑藻细菌的抑藻机理,影响了实际应用效果。为此,作者在前期研究的基础上^[10],以分离自富营养化养殖池塘的侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*) SK-1 菌株和铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)为研究对象,研究处于不同生长期、不同初始生物量的上述两者在共基质中的数量消长规律,以及共基质体系中无机氮营养盐(NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N)的含量变化,旨在探讨侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻生长胁迫的可能方式、作用趋势及相关机制,以便为应用抑藻微生物控制养殖水体中的富营养化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验生物及培养条件

试验藻类为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*),由中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心(FACHB)提供。藻种初始活化按照 1:2 的比例接种于高温灭菌的 BG11 培养基^[11]中,置于 28 ℃、光照强度 2000~2500 lx、光暗周期比 12 h:12 h 的恒温光照培养箱中静置扩大培养,每天定时振荡 3~4 次,以防止藻细胞粘附于瓶壁上。藻细胞计数采用 0.1 mL 浮游植物计数框在 10×40 倍显微镜下进行。每次观察 100 个视野,每个样品计数 2 片,若两片计数结果个数相差 15%以上,则进行第三片计数,取其中个数相近两片的平均值作为最终数据^[12]。

试验菌株为侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*)

SK-1 菌株,由中国水产科学院淡水渔业研究中心环境保护室从养殖水体中分离、鉴定并保存。菌种培养采用液体或固体肉汤培养基,菌落计数采用稀释涂布计数法^[13]。

1.2 仪器与试剂

所用仪器:ZHJH 双面气流式无菌工作台,UV-1200 紫外-可见分光光度计,Nikon 90i 光学显微镜,PHS-3TC 数显 pH 计,YSI 溶氧仪,TOMY Autoclave SS-325 型高压灭菌器,BCD-318WS L 电冰箱,QHZ-98B 全温度光照振荡培养箱,METTLER AL204 电子分析天平,SIGMA 2-16K 低温冷冻离心机,GL-22 MS 高速冷冻离心机,XW-80A 漩涡混合仪等。

所用试剂:硝酸钠、磷酸氢二钾、亚硝酸钠、氯化铵、硫酸镁、氯化钙、柠檬酸、柠檬酸铁铵、乙二醇四乙酸、碳酸钠、硼酸、氯化锰、硫酸锌、硫酸铜、氯化钠等均为分析纯,国药集团上海试剂厂产品;牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、琼脂为北京陆桥技术有限责任公司产品。

1.3 藻菌共适培养基质的选择与优化

因适宜微囊藻生长的 BG11 培养基和适宜侧孢芽孢杆菌生长的肉汤培养基的主要营养成分差别较大,无法选择其中之一作为两种生物的共适培养基。故需选择一种适宜的使两者均能正常生长的培养基。考虑到侧孢芽孢杆菌、铜绿微囊藻生长所依赖的共同营养源是氮源,同时两者均可在养殖水质中生存,因此可通过以养殖水质为基础,优化无机氮源来实现共适培养基质的设计。共适培养基质以取自富营养化养殖池塘的养殖水(水质 COD_{Mn} 为 $17.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TN 为 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TP 为 $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4^+ -N $0.70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NO_3^- -N $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NO_2^- -N $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 7.5;以此养殖水为基础的培养液在培养藻时的 pH 值变动范围在 7.2~8.0 间,培养菌时在 7.2~7.8 间,对藻菌生长的影响无显著性差异)为基底,适当添加葡萄糖和无机氮,使培养基中 C:N:P 的近似比分别为 50:10:1、250:10:1 和 1000:10:1。通过单因素试验对培养基中的葡萄糖、不同氮源对侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻生长的影响进行探究。

1.3.1 藻菌的驯化

将在 BG11 培养基中培养至对数期的铜绿微囊藻藻液,按 30%的比例接种于添加了 50%上述合成共适培养基质的 BG11 培养基中培养至对数期。从中取出 30%的藻液,经离心后加入到合成共适培养基中培养至对数期,5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 去上清,用无菌水清洗藻体 3 次,离心后收集藻体于 4 ℃冰箱保

存待用。

将经活化的侧孢芽孢杆菌菌种,接种于100 mL 液体肉汤培养基中,于30℃、150 r·min⁻¹的振荡培养箱中培养20 h至稳定期。按1%的接种比例将菌液接入含50%合成共适培养基质的肉汤培养基中,相同条件下培养20 h,再次按1%的比例将菌液加入到合成共适培养基质中,相同条件下培养20 h,10 000 r·min⁻¹离心10 min去上清,用无菌水冲洗菌体3次,离心后收集菌体于4℃冰箱保存待用。

1.3.2 侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻在共适基质中的生长曲线

将经驯化的侧孢芽孢杆菌菌液按1%的比例接种于装有300 mL合成共适培养基质的三角瓶中,于30℃、150 r·min⁻¹的摇床中培养,每隔2 h取样一次,以高温灭菌的合成共适培养基质做空白对照,用分光光度计测定600 nm处菌体培养液的吸光值(OD₆₀₀)。以培养时间和吸光值为坐标绘制生长曲线。试验设3个平行。

将经驯化的铜绿微囊藻藻液按10%的比例接种于装有300 mL合成共适培养基质的三角瓶中,置于28℃、光照强度2000~2500 lx、光暗周期比12 h:12 h的恒温光照培养箱中静置扩大培养,每天定时振荡3~4次,每隔2 d取样一次,采用0.1 mL浮游植物计数框在10×40倍显微镜下进行藻细胞计数。以培养时间和藻细胞数量为坐标绘制生长曲线。试验设3个平行。

1.4 侧孢芽孢杆菌胁迫下铜绿微囊藻生长情况

1.4.1 共基质中初始生长的侧孢芽孢杆菌对指数生长期铜绿微囊藻的胁迫影响

收集经驯化培养并离心后的铜绿微囊藻藻体,将其添加到合成的共适培养基质中,使初始的藻细胞密度为2.8×10⁵ cells·mL⁻¹,待微囊藻生长进入指数生长期(6.0×10⁵ cells·mL⁻¹)时,分别添加不同浓度的侧孢芽孢杆菌菌体于藻类的培养液中,使培养液中初始活菌数可达10⁵或10⁶ CFU·mL⁻¹数量级。此时共适基质中的微囊藻处于指数生长期,而芽孢杆菌则处于生长初期。将活菌数为10⁵、10⁶ CFU·mL⁻¹数量级的芽孢杆菌的试验组分别标记为A-1组和A-2组。各试验处理培养10 d,每隔2 d采样一次,分别测定培养液中3种无机氮(NO₃⁻-N、NO₂⁻-N、NH₄⁺-N)的含量^[12]以及藻菌生物量。试验设3个平行,结果取其平均值。在整个试验期间,各试验处理组不再添加任何营养盐等物质。以铜绿微囊藻培养液和侧孢芽孢杆菌的纯培养液作为对照组,分别考量藻和菌的生长情况,即藻细胞计

数采用0.1 mL浮游植物计数框在10×40倍显微镜下进行^[12],菌落计数采用稀释涂布计数法^[13]。试验藻类和菌体的生长抑制率以共基质中生物的细胞数的下降率来表示,其计算公式如下:

$$R=(C_0-C_e)\times 100\%/C_0$$

其中,C₀为对照组或初始接种时的细胞密度,C_e为试验后不同时间段的细胞密度。生长情况的比较采用单因素方差分析,P<0.05为显著,P<0.01为极显著。

1.4.2 共基质中初始生长的侧孢芽孢杆菌对初始生长的铜绿微囊藻的胁迫影响

将经驯化后的铜绿微囊藻以及侧孢芽孢杆菌的纯培养液进行离心,收集菌体和藻体,同时添加至合成的共适培养基质中,此时藻体和菌体均处于生长初期(初始藻细胞密度为2.8×10⁵ cells·mL⁻¹,活菌数分别为10⁵、10⁶ CFU·mL⁻¹)。将活菌数10⁵、10⁶ CFU·mL⁻¹数量级的芽孢杆菌试验组分别标记为B-1组,B-2组。试验方法同1.4.1。

1.4.3 共基质中处于生长稳定期的侧孢芽孢杆菌对初始生长的铜绿微囊藻的胁迫影响

将驯化后的侧孢芽孢杆菌菌体按1%的比例接种到共适培养基质中,于30℃、150 r·min⁻¹的振荡培养箱中培养至稳定期(菌细胞密度10⁷ CFU·mL⁻¹),再将微囊藻藻体添加到共适培养基质中(此时藻细胞初始密度为2.8×10⁵ cells·mL⁻¹)。该试验组为C组,试验方法同1.4.1。

2 结果与分析

2.1 藻菌共适培养基质的选择和优化

将菌体按照1%的比例接种到各种不同的碳氮磷比的合成培养基质中,于30℃、150 r·min⁻¹摇床培养至稳定期。同时将藻体按10%的比例接种于同样的合成培养基质中,置于28℃、光照强度2000~2500 lx、光暗周期比12 h:12 h的恒温光照培养箱中静置扩大培养至稳定期,选择出最适培养基组分,结果见表1。

表1结果显示,在NO₃⁻-N、NO₂⁻-N和NH₄⁺-N 3种无机氮源中,侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻均能较好利用的无机氮源为氨氮,而其他两种无机氮为主要氮素时生长较慢。当培养基质中的C:N:P接近250:10:1时,即所添加的葡萄糖浓度为200 mg·L⁻¹时,侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻显示出良好的生长态势。而当葡萄糖浓度加大至800 mg·L⁻¹时,2种生物的生长与葡萄糖200 mg·L⁻¹添加量时并无显著区别。本着经济有效原则,侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻的共适培养基采

表 1 适宜侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻生长的共适培养基质的选择
Table 1 Selection of media used for both *Bacillus laterosporus* and *Microcystis aeruginosa*

试验生物	C:N:P 近似比	无机氮含量/mg·L ⁻¹			P 含量/ mg·L ⁻¹	C(葡萄糖添加)/ mg·L ⁻¹	菌生物量(OD ₆₀₀)或藻生物量/ 10 ⁵ cells·mL ⁻¹
		NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N			
侧孢芽孢杆菌	50:10:1	2.0	0.10	0.15	0.29	40	0.167
		0.7	2.0	0.15	0.29	40	0.012
		0.7	0.10	2.0	0.29	40	0.029
	250:10:1	2.0	0.10	0.15	0.29	200	0.205
		0.7	2.0	0.15	0.29	200	0.015
		0.7	0.10	2.0	0.29	200	0.030
	1000:10:1	2.0	0.10	0.15	0.29	800	0.192
		0.7	2.0	0.15	0.29	800	0.013
		0.7	0.10	2.0	0.29	800	0.035
铜绿微囊藻	50:10:1	2.0	0.10	0.15	0.29	40	8.5
		0.7	2.0	0.15	0.29	40	2.8
		0.7	0.10	2.0	0.29	40	6.5
	250:10:1	2.0	0.10	0.15	0.29	200	12.3
		0.7	2.0	0.15	0.29	200	2.9
		0.7	0.10	2.0	0.29	200	6.8
	1000:10:1	2.0	0.10	0.15	0.29	800	11.8
		0.7	2.0	0.15	0.29	800	3.0
		0.7	0.10	2.0	0.29	800	7.1

注:表中数据均以平均值计。下同。

用如下方式构建:取富营养化养殖池塘的养殖水(水质 COD_{Mn} 为 17.75 mg·L⁻¹,TN 为 1.6 mg·L⁻¹,TP 为 0.30 mg·L⁻¹、NH₄⁺-N 0.70 mg·L⁻¹,NO₃⁻-N 0.15 mg·L⁻¹,NO₂⁻-N 0.10 mg·L⁻¹,pH 值 7.5),添加葡萄糖和氨氮,使培养基质中葡萄糖和氨氮的最终浓度达 200 mg·L⁻¹ 和 2.0 mg·L⁻¹,培养基质的 C:N:P 的近似比为 250:10:1。

2.2 侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻在共适培养基质中的生长曲线

将经驯化的侧孢芽孢杆菌菌液按 1%的比例接种于装有 300 mL 的合成共适培养基质的三角瓶中,于 30 ℃、150 r·min⁻¹ 的摇床培养,每隔 2 h 取样一次,其生长情况如图 1a 所示。由图 1a 可见,侧孢芽孢杆菌在所合成的共适培养基质中生长良好,延滞期较短,在 0~2 h 内。2 h 后开始进入对数生长期,此时细菌数呈指数增加,生长至 14 h 后进入稳定期。表明共适培养基质适宜侧孢芽孢杆菌的生长。

将经驯化的铜绿微囊藻藻液按 10%的比例接种于装有 300 mL 的合成共适培养基质的三角瓶中,置于 28 ℃、光照强度 2000~2500 lx、光暗周期比 12 h:12 h 的恒温光照培养箱中静置扩大培养,每天定时振荡 3~4 次,每隔 2 d 取样一次,其生长情况如图 1b 所示。由图 1b 可见,铜绿微囊藻也能很好地适应合成的共

适培养基质,延滞期极短,接种后即快速进入指数生长期,此时藻细胞数呈指数增加,约持续 18 d 后进入稳定期。

2.3 侧孢芽孢杆菌胁迫下铜绿微囊藻生长情况

2.3.1 共基质中初始生长的侧孢芽孢杆菌对指数生长期铜绿微囊藻的胁迫影响

共基质中初始生长的侧孢芽孢杆菌对指数生长期铜绿微囊藻的胁迫影响见图 2。如图 2a 所示,不添加芽孢杆菌的对照组中,初始藻类数量为 6×10⁵ cells·mL⁻¹,随后藻细胞继续生长,至试验第 8 d 达 1.1×10⁶ cells·mL⁻¹。而添加菌液的 A-1、A-2 组,其藻类的生长显著受限。A-1 组在试验的第 2~6 d 藻细胞量较初始阶段不升反降,与初始藻类量相比下降了 9.00%~12.17%,与对照组相比下降了 29.36%~42.20%,最大下降率出现在试验后的第 2 d,至试验第 8 d 才有所增加,10 d 时数量也仅为对照组的 75.47%;而 A-2 试验组中藻类的变化趋势与 A-1 组相似,但藻类的生长受抑制程度较 A-1 组更显著。试验第 2 d 时藻细胞量为 3.8×10⁵ cells·mL⁻¹,为初始藻类量的 63.3%,下降了 36.7%,试验 6 d 时与初始相比下降了 6.3%,同样试验第 8 d 后有所增加,10 d 时数量为对照组的 72.38%。

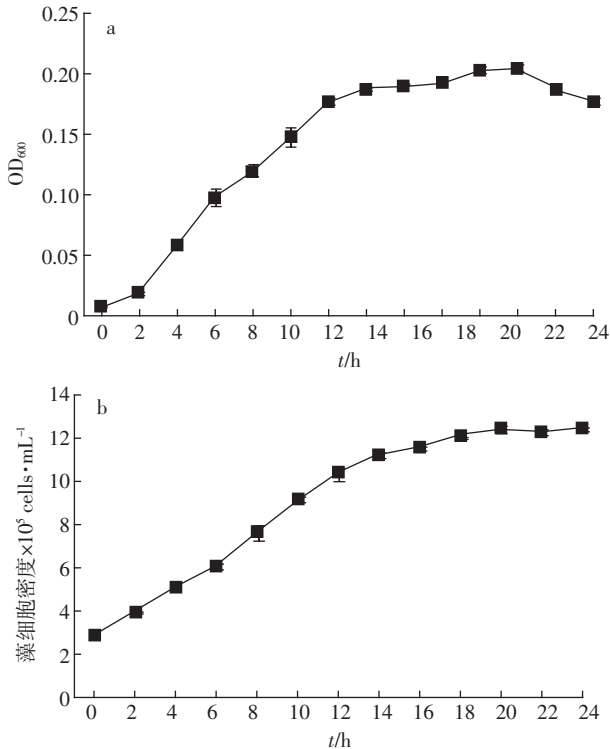


图1 侧孢芽孢杆菌 SK-1 菌株和铜绿微囊藻的生长曲线
Figure 1 Growth curves of *Bacillus laterosporus* SK-1 and *Microcystis aeruginosa*

可以这样认为,当基质中只有微囊藻且已达一定的密度时,此时所添加进去的初始芽孢杆菌菌体浓度越高,对藻细胞的抑制效果越为明显,且达到最大抑制效果的作用时间越短(A-2 处理组中的菌体是A-1 组的 10 倍)。同时,随着共培养时间的延长,藻细胞的降低率也呈现出减小的趋势。此种状态下,藻细胞数量的动态变化是:初始阶段呈现快速下降的趋势,到达最低点,随后开始慢慢反弹,但增加量显著低于纯培养的对照组($P<0.05$)。崔璐璐等^[14]在研究寡养单胞菌菌液浓度对铜绿微囊藻的抑制效果时发现,菌液浓度越高,对藻细胞的抑制效果越明显。在共培养的第 6 d 内,抑藻率达到最大,且抑藻效果随培养时间的延长先增后降。这一结果与本试验的研究结果较为相似。

图 2b 则显示出 2 个不同处理组中侧孢芽孢杆菌的动态变化。2 个处理中的芽孢杆菌呈现出相同的生长趋势,即先升后降,在共培养的第 2 d,菌体细胞量均达到顶峰。初始接种量为 4×10^5 CFU·mL⁻¹ 的芽孢杆菌 A-1 组,试验第 2 d 时为 9×10^6 CFU·mL⁻¹;初始接种量为 4×10^6 CFU·mL⁻¹ 的芽孢杆菌 A-2 组(即 A-1 组的 10 倍),试验第 2 d 时为 1.0×10^7 CFU·mL⁻¹;而初始接种量为 4×10^5 CFU·mL⁻¹ 的芽孢杆菌对照组,试验第 2 d 时细菌量达 2.25×10^7 CFU·mL⁻¹。在试验的

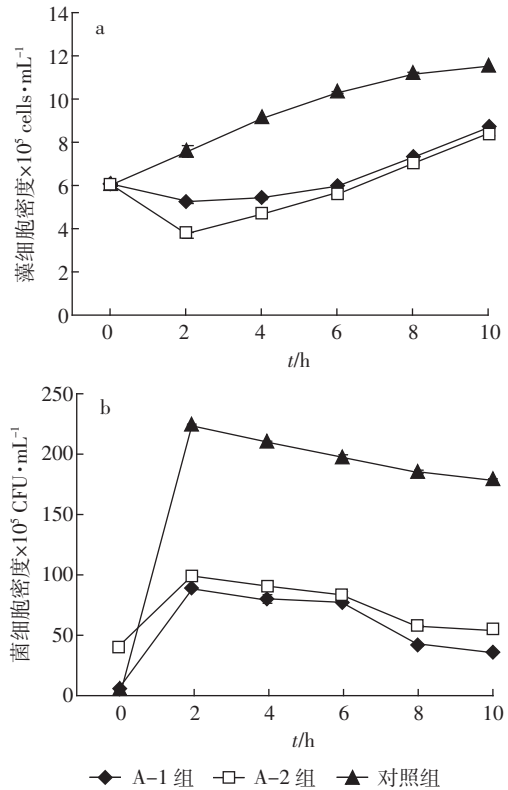


图2 共基质中初始生长的侧孢芽孢杆菌对指数生长期铜绿微囊藻的胁迫影响

Figure 2 *Microcystis aeruginosa* at exponential growth stage affected by *Bacillus laterosporus* at early growth stage

各个时间段,2 个处理组的生物量均显著($P<0.01$)低于对照组。在共培养的第 2 d,A-1 与 A-2 试验组与对照组相比,菌体生物量下降了 60.00%和 55.56%,直至第 10 d,菌体下降率已分别达到 79.44%和 68.89%。试验表明,当共适基质中藻类已生长至一定阶段后再加入菌体,藻和菌的生长均会受到抑制,相对而言菌的生长受抑制程度更大一些。

2.3.2 共基质中初始生长的侧孢芽孢杆菌对初始生长的铜绿微囊藻的胁迫影响

共基质中初始生长的侧孢芽孢杆菌对初始生长的铜绿微囊藻的胁迫影响见图 3。

由图 3a、图 3b 可以看出,B 组中不同初始浓度的芽孢杆菌对藻类生长的抑制以及细菌自身的生长趋势与 2.3.1 中 A 组的变化相一致,所不同的是 B 组藻类细胞虽然也呈先降后升的变化,但藻细胞数量始终没有高于初始数量,与对照相比,藻细胞下降率更加显著。试验第 6 d 时 B 组的藻细胞量下降至最低点,仅为初始值的 53.69%和 57.54%,下降了 46.31%和 42.46%,与对照组相比下降了 74.88%和 73.07%。而试验 10 d 时 B-1 组藻细胞为初始时的 88.0%,B-2

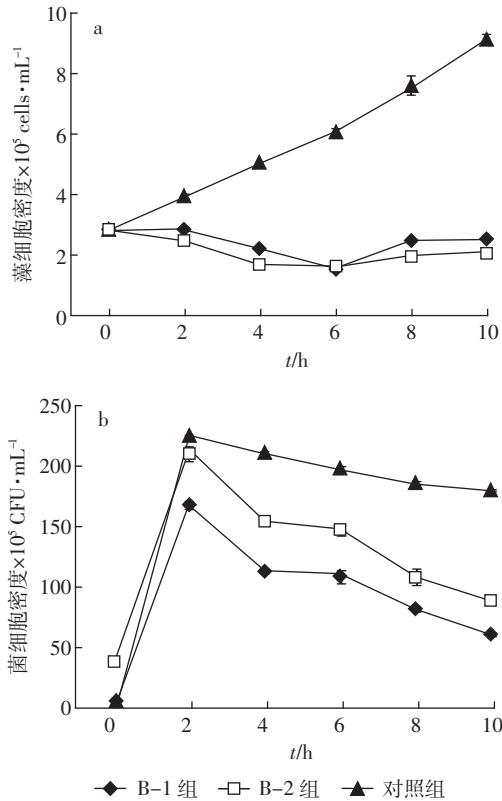


图3 共基质中初始生长的侧孢芽孢杆菌对初始生长的铜绿微囊藻的胁迫影响

Figure 3 *Microcystis aeruginosa* at early growth stage affected by *Bacillus laterosporus* at early growth stage

组为初始时的 72.63%, 与对照相比下降了 72.69% 和 77.48%。与 A 组相比, B 组的藻细胞下降率显著增高, 且最大下降率出现在试验后的第 6 d, 迟于 A 组。相比于指数生长期的微囊藻, 芽孢杆菌对生长初期的微囊藻的抑制效果更为显著 ($P < 0.01$)。同样, B 组中菌体的生长趋势与对照组保持一致, 先升后降。变化趋势同 A 组, 但试验第 2 d 时 B-2 组的菌体量接近对照组, B-1 组菌体细胞也为对照的 74.67%, 明显高于 A 组。试验 10 d 时 B-1 组和 B-2 组的菌数下降率为 66.11% 和 50.56%, 低于 A 组。说明初始生长的芽孢杆菌与初始生长的微囊藻共存时, 菌体的生长具有一定的优势。这是因为微囊藻的生长是相对较慢的, 而菌体的大量繁殖在竞争营养条件的同时, 也可能通过改变水体条件使得微囊藻形成竞争劣势。至于细菌生长过程中造成的水体条件的变化及对藻类生长的影响有待做进一步的监测和研究。

2.3.3 共基质中处于生长稳定期的侧孢芽孢杆菌对初始生长的铜绿微囊藻的胁迫影响

共基质中处于生长稳定期的侧孢芽孢杆菌对初

始生长的铜绿微囊藻的胁迫影响见图 4。

由图 4a 可见, C 组中藻类细胞的变化为先降后稳定, 始终没有高于初始数量。试验 2 d 内藻细胞量快速下降, 然后维持在相对稳定的低生物量水平, 即 $1.5 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右, 仅为初始细胞量的 52.63%。与对照组相应的时段比较, 藻细胞量的下降率为 73.49%~81.50%, 在 A、B、C 3 个不同的处理组中最高, 显然处于稳定期的芽孢杆菌菌体可更好地抑制处于生长初期的微囊藻的正常增殖。而图 4b 显示, 试验期间细菌浓度比较稳定, 维持在 $2 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上下, 与对照组的情况较一致, 各时段菌体数量与对照组相比仅下降 2.78%~10.90%。

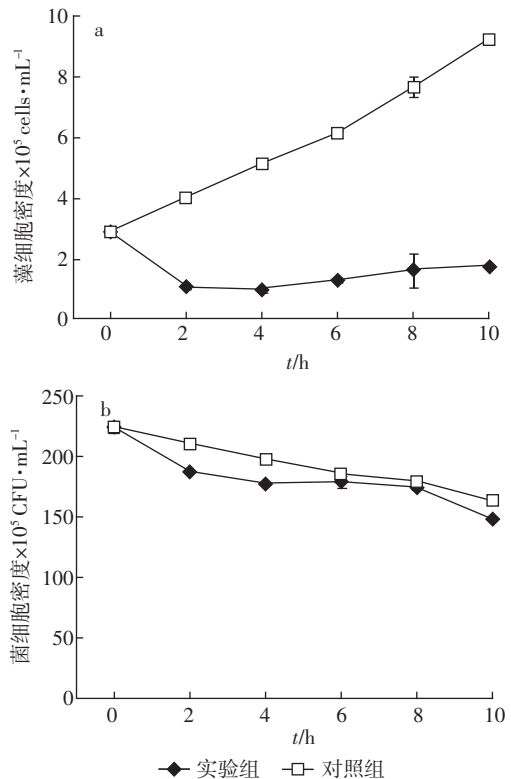


图4 共基质中生长稳定的侧孢芽孢杆菌对初始生长的铜绿微囊藻的胁迫影响

Figure 4 The stress effects of *Microcystis aeruginosa* at early growth period with *Bacillus laterosporus* at stable phase

2.3.4 侧孢芽孢杆菌与铜绿微囊藻共存时基质中无机氮的变化

在上述各试验组中菌藻生物量变化较明显的节点对培养基中无机氮含量进行分析, 了解藻菌对氮源的利用情况。由表 2 可见, 纯培养的微囊藻对培养基中的氨氮和硝态氮有较好的利用, 而对亚硝态氮利用性不好。当氨氮和硝态氮共存时, 藻类优先

表2 不同试验处理组中无机氮含量的变化
Table 2 Changes of inorganic nitrogen concentrations
in different treatments

无机氮/ 试验 mg·L ⁻¹ 时间/d		不同处理组					纯菌培养	纯藻培养
		A-1	A-2	B-1	B-2	C		
NH ₄ -N	0	2.06	2.06	2.36	2.39	2.32	2.32	2.39
	2	2.69	2.86	2.47	2.76	3.36	3.36	1.26
	6	1.31	1.47	2.24	2.40	2.90	2.90	0.74
	10	0.43	0.89	1.68	1.90	2.08	2.03	0.33
NO ₂ -N	0	0.12	0.12	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	2	0.10	0.09	0.09	0.09	0.12	0.10	0.12
	6	0.10	0.08	0.08	0.08	0.10	0.09	0.11
	10	0.09	0.06	0.08	0.07	0.09	0.06	0.11
NO ₃ -N	0	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
	2	0.13	0.13	0.15	0.15	0.14	0.13	0.14
	6	0.13	0.14	0.14	0.14	0.13	0.14	0.12
	10	0.09	0.10	0.14	0.14	0.15	0.15	0.07

利用氨氮,这主要是氨氮具有更大的最大吸收速率和更低的半饱和常数 K_s ^[15]。试验前期(0~6 d)藻类几乎只利用氨氮,只有后期氨氮基本利用完才开始消耗硝态氮。而纯培养的侧孢芽孢杆菌对氨氮、亚硝态氮有一定的利用,对硝态氮的利用性不佳。特别是试验开始后培养基质中的氨氮不降反增,这主要是与芽孢杆菌的氨化作用有关,其可将水体中的有机氮转化为氨氮。Kirchman^[16]在研究海洋异养细菌对无机盐的吸收中发现异养细菌对氨氮的吸收高于硝态氮,分别占氨氮和硝态氮被吸收总量的42%和16%。A、B处理组中的无机氮变化规律基本一致,除了亚硝态氮变化不显著外,氨氮和硝态氮的含量均高于纯藻培养组、低于纯菌培养组,表明藻菌共生时对该2种无机氮存在利用竞争。而C组的无机氮水平接近纯菌培养组,体现了C组中菌体占绝对的优势地位。菌藻共生影响了环境体系中营养盐的吸收转化效率。在藻菌共生体系中,细菌的存在使得营养物质的结构发生了改变,从而使微囊藻在氮利用能力方面发生显著变化,影响藻类种群的增殖。但关于细菌影响微囊藻对无机营养盐吸收的具体作用机理还有待进一步探究。

3 讨论

3.1 菌藻共适培养基

预试验时发现无法从BG11培养基和肉汤培养基中选择藻菌的共适培养基,因此在考虑侧孢芽孢杆菌、铜绿微囊藻生长的共适培养基时,选择从其所共

同依赖的氮源入手,在参考了污水生物处理时碳、氮、磷比^[17]的前提下,充分考虑到实际应用时的有效性和经济实用性,提出了以池塘养殖的富营养化水体为基础,适度添加葡萄糖和氨氮的组合。侧孢芽孢杆菌和微囊藻均可在池塘养殖水体中生长,养殖水体中富含糖类、氨氮等物质,且今后的实际应用也发生在养殖池塘中。选择这样的共适培养基可接近于养殖水体的生态环境条件,所进行的研究可使理论与实际充分结合。而试验表明事实也是如此,以养殖水为基础的培养液在培养藻时的pH值变动范围在7.2~8.0间,培养菌时在7.2~7.8间,对藻菌生长的影响无显著性差异。

3.2 共基质中侧孢芽孢杆菌与铜绿微囊藻的生存关系

作者在前期研究中发现,取培养至稳定期的侧孢芽孢杆菌培养液,经离心分别获得纯菌体和无菌上清液,并按不同的浓度添加到相同条件的微囊藻供试液中。培养10 d后,发现无菌上清液对微囊藻有很好的抑制效果,且这种抑制作用比经离心去除培养液成分后的纯菌体的抑制效果更为显著($P<0.01$)。在一定的浓度范围内,无菌上清液的抑藻效果与其添加量有着显著的浓度-效应关系。而纯菌体本身因在BG11培养基中的存活率较低,故抑藻效果不显著。因此可认为侧孢芽孢杆菌能在生长过程中通过分泌胞外活性物质进行抑藻(具体内容见作者的另文报导)。针对侧孢芽孢杆菌是否只能通过分泌胞外活性物质这一途径来影响铜绿微囊藻的生存这一问题,本研究设计了A~C不同的处理,以了解侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻共存时的生存关系及对水体环境中营养源的利用情况。

研究显示,在A组处理中,藻细胞处于生长旺势期,而菌则处于生长初期。两者共存后的前2 d,藻细胞不增反降,而此时菌体增长快速。结合基质中氨氮含量的变化,说明此阶段两者主要通过竞争营养物质而达到生存抑制的作用,即芽孢杆菌优先利用了培养基质中的营养物质满足了自身的生长,同时抑制了微囊藻的增殖。但因初始时微囊藻占种群优势,其必然会消耗一部分的营养资源,故使得芽孢杆菌的种群密度达不到其纯培养时的高度。在试验后期的8~10 d,因菌体数量开始下降,对资源的利用能力下降,故占种群优势的藻细胞又开始增殖。因此可以认为,初始生长的菌体可通过竞争营养抑制处于生长旺盛期的藻细胞,抑制效果主要体现在共存的初期。这种抑制作用与初始的菌体和藻体的数量比有关。A组中A-2

比 A-1 的藻细胞抑制效果好, 主要是 A-2 中芽孢杆菌的初始密度较高, 这与晋利等^[18]研究结果相一致。在其研究溶藻菌对铜绿微囊藻生长的影响时发现, 在一定的浓度范围内, 初始浓度越大, 抑藻效果越显著。

在 B 处理中, 藻和菌同时接入共适培养基质, 均处于生长初期。在藻菌共生的前 6 d, 因优先利用资源, 菌体快速增殖。菌体细胞由初始的 10^5 CFU·mL⁻¹ 数量级增加到 10^7 CFU·mL⁻¹ 数量级, 其后虽有所降低, 但依然稳定在 10^7 CFU·mL⁻¹ 数量级水平上。与此同时, 藻细胞数维持在低于初始接种量的低水平。说明芽孢杆菌因在与微囊藻的资源竞争中占优势而抑制了藻类的生长。在整个试验期, 因微囊藻的存在消耗了一部分营养物质, 使得菌体的生长并不能达到纯培养时的峰值。同时从水体氨氮的变化来看, B 组在处理期间氨氮含量介于菌和藻纯培养含量的中间, 表明菌体在增殖到稳定期后, 并非完全靠竞争营养来抑制藻类的生长, 可通过分泌胞外化感物质来抑制微囊藻的生长, 这一点在作者的前期工作中已有证明(另文报道), 且与叶姜瑜等^[19]的研究也相吻合。该研究从富营养化水体中分离得到一株具有高效溶藻效果的菌株(S7), S7 菌株通过与水华鱼腥藻(*Anabaena flosaquae*)形成竞争共栖的生态关系并通过分泌抑藻物质而抑制了水华鱼腥藻的生长。因此, 对于同处生长初期的菌藻而言, 菌体可通过竞争资源和分泌抑藻物质这 2 种方式共同作用来抑制微囊藻的生长。但与 A 组相比, 最大抑制效率出现在试验后的第 6 d, 比 A 组略晚, 这主要与生物种群密度有关。至于具体的抑制机制还有待进一步的研究。

在 C 处理中, 芽孢杆菌先成为基质中的优势生物, 然后再接入微囊藻。试验后菌体的生长相对稳定, 总菌数的变化微小, 而藻细胞数目的下降率在所有处理中为最大。结合水体资源及作者的前期工作(另文报道, 关于菌体细胞本身的抑藻作用), 表明处于稳定期的芽孢杆菌主要通过分泌并释放一些胞外物质抑制共存的藻细胞, 而两者之间因竞争营养物质而引发共存抑制的几率很小。

上述研究显示, 从共生基质中藻菌的生存情况来看, 侧孢芽孢杆菌对指数生长期的铜绿微囊藻的抑制能力逊于对生长初期藻细胞的抑制能力, 其抑藻活性与菌体的种群密度有关。一般来说, 菌体细胞密度越大, 抑藻效果越明显。其抑藻的方式是竞争共存环境中的营养物质与通过分泌胞外物质两者并存。

4 结论

(1) 取富营养化养殖池塘的养殖水, 添加葡萄糖和氨氮, 使水体中葡萄糖和氨氮的最终浓度达 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此培养基质中 C:N:P 的近似比为 250:10:1, 可作为侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻的共适培养基质。

(2) 不同生长时期的侧孢芽孢杆菌和铜绿微囊藻共存时的生长胁迫效应不同。处于生长稳定期的菌体对生长初期的微囊藻抑制效果最好。在一定的浓度范围内, 菌体细胞密度越大, 其抑藻效果越明显。

(3) 侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻生长的抑制是通过竞争共存环境中的营养物质与分泌胞外抑藻物质这两种方式实现的。在藻体和菌体的不同生长阶段, 这两种作用方式所占的比重不同。

(4) 在藻菌共栖的养殖水体中, 可利用侧孢芽孢杆菌对营养盐和生态位的竞争来控制铜绿微囊藻的过度生长, 以利于水生态系统的良性循环与动态平衡。在采用菌体进行生态控藻时, 应在藻类爆发性生长前进行细菌种群的培育, 以调控好水环境中的藻菌平衡。

参考文献:

- [1] Choi H J, Kim B H, Kim J D. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters[J]. *Biological Control*, 2005, 33:335-343.
- [2] 赵以军, 刘永定. 有害藻类及其微生物防治的基础-菌藻关系的研究动态[J]. *水生生物学报*, 1996, 20(2): 173-181.
ZHAO Yi-jun, LIU Yong-ding. Possible microbial control on the adverse impacts of algae-current information about the relationship between algae and microbes[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(2): 173-181.
- [3] Jung S W, Kim B H, Katano T, et al. *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 offers species-specific biological control of winter algal blooms caused by freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(1): 186-195.
- [4] 史顺玉. 溶藻细菌对藻类的生理生态效应及作用机理研究[D]. 北京: 中国科学院, 2006.
SHI Shun-yu. Studies on the ecophysiological effects and mechanisms of algae-lysing bacteria against the algae[D]. Beijing: The Chinese Academy of Sciences, 2006.
- [5] 马宏瑞, 章欣, 王晓蓉, 等. 芽孢杆菌 Z5 溶铜绿微囊藻特性研究[J]. *中国环境科学*, 2011, 31(5): 828-833.
MA Hong-rui, ZHANG Xin, WANG Xiao-rong, et al. Characteristics study of lysis of *Microcystis aeruginosa* by *Bacillus*. Z5[J]. *China Environmental Science*, 2011, 31(5): 828-833.
- [6] 卢兰兰, 李根保, 沈银武, 等. 溶藻细菌 DC-L5 的分离、鉴定及其溶

- 藻特性[J]. 水生生物学报, 2009, 33(5): 860–865.
- LU Lan-lan, LI Gen-bao, SHEN Yin-wu, et al. Isolation, identification and characterization of a strain of blue-green algae-lysing bacterium[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(5): 860–865.
- [7] Fu L J, An X L, Li D, et al. Isolation and alga-inhibiting characterization of *Vibrio* sp. BS02 against *Alexandrium tamarense*[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27: 2949–2956.
- [8] 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.
- Wu G, Xi Y, Zhao Y J. The latest development of research on algae-lysing bacteria[J]. *Research of Environmental Science*, 2002, 15(5): 43–46.
- [9] Kim J D, Kim B, Lee C G. Alga-lytic activity of pseudomonas fluorescens against the red tide causing marine alga *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*) [J]. *Bio Control*, 2007, 41(3): 296–303.
- [10] 王 琼, 瞿建宏, 张骞月, 等. 侧孢芽孢杆菌的抑藻效应及对养殖水体中蓝藻水华的生态防控[J]. 生态灾害科学, 2013, 36(1): 61–65.
- WANG Qiong, QU Jian-hong, ZHANG Qian-yue, et al. The algal inhibiting effect of *Brevibacillus laterosporus* and its ecological prevention and control for algae blooms in aquaculture water[J]. *Biological Disaster Science*, 2013, 36(1): 61–65.
- [11] 郑朔方, 杨苏文, 金相灿. 铜绿微囊藻生长的营养动力学[J]. 环境科学, 2005, 26(2): 152–156.
- ZHENG Shuo-fang, YANG Su-wen, JIN Xiang-can. Dynamic studies on the effect of nutrients on the growth of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Environmental Science*, 2005, 26(2): 152–156.
- [12] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 701–705.
- EPA. Methods for the monitoring and analysis of water and wastewater [M]. 4th Edition. Beijing: Chinese Environmental Science Press, 2002: 701–705.
- [13] 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, 56.
- PENG Chao, WU Gang, XI Yu, 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, 56.
- [14] 崔璐璐, 谢 冰, 彭 青, 等. 青草沙水库中一株铜绿微囊藻抑藻细菌作用研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 677–682.
- CUI Lu-lu, XIE Bing, PENG Qing, et al. Study on inhibitory effect of an anti-*Microcystis aeruginosa* bacterium strain from Qingcaosha Reservoir on *Microcystis aeruginosa* [J]. *Microbiology China*, 2012, 39(5): 677–682.
- [15] 易齐涛. 海洋菌-藻关系以及对营养盐的吸收作用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- YI Qi-tao. The study of absorption of inorganic nutrients influenced by the relationships between marine bacteria and microalgae [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006.
- [16] Kirchman D L. Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria [M]//Kirchman D L. Microbial ecology of the oceans. New York: Wiley, 2000: 261–288.
- [17] 张 著, 高大文, 袁向娟, 等. 营养物质缺乏引起的好氧颗粒污泥膨胀及其恢复[J]. 环境科学, 2012, 33(9): 3197–3201.
- ZHANG Zhu, GAO Da-wen, YUAN Xiang-juan, et al. Aerobic granular sludge bulking due to the lack of nutrient and its recovery [J]. *Environmental Science*, 2012, 33(9): 3197–3201.
- [18] 晋 利, 刘兆普, 赵耕毛, 等. 一株溶藻细菌对铜绿微囊藻生长的影响及其鉴定[J]. 中国环境科学, 2010, 30(2): 222–227.
- JIN Li, LIU Zhao-pu, ZHAO Geng-mao, et al. Effects of an algae-lysing bacterium on the growth of *Microcystis aeruginosa* and its identification [J]. *China Environmental Science*, 2010, 30(2): 222–227.
- [19] 叶姜瑜, 钟以蓉, 俞 岚, 等. 一株水华鱼腥藻溶藻菌的分离鉴定及菌藻关系初探[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(29): 18121–18124.
- YE Jiang-yu, ZHONG Yi-rong, YU Lan, et al. Identification of an algae-lysing bacterium of *Anabaena flosaquae* and primary research on their relationship [J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2011, 39(29): 18121–18124.