

滇池中芽孢杆菌的 ARDRA 分类及溶藻特性*

宁 华¹, 张荣先², 陈 浩³, 杨志荣¹, 孙 群^{1**}

(1: 四川大学生命科学学院, 成都 610064)

(2: 铜仁职业技术学院, 铜仁 554300)

(3: 四川省原子能应用研究院, 成都 610066)

摘 要: 针对从滇池中分离到的 28 株芽孢杆菌, 用扩增 rDNA 限制性酶切片分析法(ARDRA)进行了初步分类, 共获得 5 个操作分类单元(OUT), 其中 OTU5 为主要类型, 包括 14 株细菌菌株。同时, 以铜绿微囊藻和水华鱼腥藻为裂解对象, 对该 28 株菌株的溶藻能力进行了测定, 发现 OTU5 中有 6 株芽孢杆菌具有较好的溶藻能力, 其培养液上清液具有强烈的溶藻作用, 能在 pH7、25℃ 的条件下抑制受试藻类的生长, 可见, 该 6 株芽孢杆菌应是通过分泌胞外物质而起溶藻作用的。

关键词: 芽孢杆菌; ARDRA; 溶藻细菌; 溶藻作用; 滇池

ARDRA analysis of *Bacillus* spp. isolated from Lake Dianchi and their algae-lytic effect

NING Hua¹, ZHANG Rongxian², CHEN Hao³, YANG Zhirong¹ & SUN Qun¹

(1: College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, P.R.China)

(2: Tongren Polytechnic, Tongren 554300, P.R.China)

(3: Sichuan Institute of Atomic Energy, Chengdu 610066, P.R.China)

Abstract: A total of 28 *Bacillus* strains isolated from Lake Dianchi were classified by amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) on their 16SrDNA through restriction digestion by *AluI*. Our data showed that all strains isolated could be classified into 5 Operational Taxonomic Units (OUT), and OTU5 was the dominant one, including 14 species. The lytic effects of all strains on *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* were studied, and 6 strains in OTU5 showed much stronger activity than others. The supernatant of 4 strains in OTU5 exhibited lytic function at almost the same strong level as their corresponding whole broth, which indicated that extracellular lytic substance produced by *Bacillus* cells could have lytic effects on algae.

Keywords: *Bacillus*; ARDRA; algae-lytic bacteria; algae-lytic function; Lake Dianchi

滇池是云南的重要高原淡水湖泊, 由于近几十年人类活动的影响, 滇池受到了严重的污染, 水体富营养化程度不断加深, 导致水华和赤潮的连年发生。目前, 滇池的藻类治理问题已经成为一大环境难题, 急需有效控制藻类的方法。

利用拮抗微生物来治理湖泊富营养化一直受到关注, 已有研究尝试利用微生物来降低湖水中氨氮及总磷污染^[1], 以及利用微生物对藻类的拮抗作用来降低藻类生物量^[2]。溶藻细菌(algicidal bacteria)是一类以直接或间接方式抑制藻类生长, 或杀死藻类、溶解藻细胞的细菌的统称^[3], 对水华的控制、维持藻类生物量平衡有非常重要的作用^[2]。假单胞菌属、粘细菌属、黄杆菌属、噬胞菌属, 纤维弧菌属等细菌都被报道具有溶解藻细胞、降解藻毒素的作用^[2,4]。芽孢杆菌是主要的具有溶藻功能的细菌, 我国的裴海燕^[5]、彭超^[6]等都分离到具有溶藻作用的芽孢杆菌, 郭吉等^[4]也从太湖分离到对铜绿微囊藻有溶藻作用的芽孢

* 四川省科技攻关计划高效生物杀藻剂的研究与应用项目(05NG002-006)资助。2007-11-28 收稿; 2008-03-27 收修改稿。

宁华, 女, 1983 年生, 硕士研究生; E-mail: feinia325@sina.com.

** 通讯作者; E-mail: qunsun2002@scu.edu.cn.

杆菌, 刘晶等也分离到具有溶藻功能的蜡状芽孢杆菌和短小芽孢杆菌^[7]. 同时芽孢杆菌也被报道过具有分解碳系、氮系、硫系污染物、分解淤泥、絮凝等作用^[8], 因此芽孢杆菌对于水生生态系统的生物修复有很重要的意义. 对于富营养湖泊的有效治理方式是在外源污染得到控制的前提下, 通过在湖内重建良性的生态结构和优化管理, 提高污染自净能力, 抑制蓝藻水华^[9-10]. 因此对从滇池水体中分离到的土著芽孢杆菌进行研究, 能为建立防止藻类污染发生的湖泊动态平衡体系提供研究依据. 同时对引起水华的主要藻类有抑制和溶解作用的细菌作为生物抑制藻剂开发的材料, 将能为有针对性和特异地治理滇池水华奠定基础.

扩增 rDNA 限制性酶切片段分析法(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA)在 1992 年由 Vaneechoutte 等建立, 是一种快速、简便、有效的分子水平上的分类方法, 目前被广泛地应用于新物种的发现、微生物分类及鉴定、共生菌、病原菌的微生物遗传多样性的检测等. ARDRA 方法是基于 rRNA 的保守性和特异性, 利用 PCR 技术选择性扩增 rDNA 片段(如 16SrDNA、23SrDNA、16-23SrDNA)并对其酶切分析, 在这一序列上的差异导致特异性限制性片段长度多态性谱带, 从而分析及揭示微生物的多样性和系统发育差异^[11-12].

本研究以从滇池中分离到的 28 株芽孢杆菌菌株为对象, 采用 ARDRA 方法进行分类, 同时对其溶藻效果与溶藻特性进行研究.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 藻种及菌种 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* 905)、水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*), 均来源于中国科学院水生生物研究所淡水藻种库. 藻种经活化后, 在 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 光照强度为 3000lx, 光暗周期比 12h:12h 条件下培养.

滇池芽孢杆菌菌株为本实验室从滇池泥样和水样中分离得到的 28 株菌株, 分别来自滇池的海埂公园、观音山河段、八宝山河段、入水口、出水口等地点. 这些菌株经镜检为含芽孢的革兰氏阳性好氧菌株, 均属于芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)^[13].

1.1.2 培养基 (1)蓝藻培养基BG-11^[14]; (2)细菌用培养基肉膏蛋白胨培养基; (3)促芽孢淡薄培养基: 酵母膏 0.7g、蛋白胨 1g、葡萄糖 1g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2g、 MgSO_4 0.2g、 K_2HPO_4 1g、琼脂20g、水1000ml.

1.1.3 PCR 所用材料 PCR 扩增试剂及内切酶购自成都博瑞克公司; 引物 16SrDNA F 和 16SrDNA R 由 Invitrogen 公司合成.

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取及 16SrDNA 扩增 对于细菌菌株, 采用 SDS-CTAB 的方法提取细菌总 DNA^[15]. 以细菌总 DNA 为模板, 采用一对 16SrDNA 的通用引物进行 PCR 扩增, 正向引物 16SrDNA F 5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 16SrDNA R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'^[12]. PCR 反应体系 25 μl 包括 Buffer 2.5 μl , Taq 酶 0.5 μl , dNTP 2 μl , 引物各 1 μl , ddH₂O 补足. 反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 4min, 30 个循环(94 $^\circ\text{C}$ 变性 1min, 56 $^\circ\text{C}$ 退火 1min, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2min), 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 20min. 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物.

1.2.2 ARDRA 扩增出的 PCR 产物被限制性内切酶 *Alu* I 酶切, 酶切体系为 20 μl 由 8 μl PCR 产物, 2 μl Buffer, 0.5 μl 酶(5 个 U), 9.5 μl ddH₂O 组成. 酶切反应在 37 $^\circ\text{C}$ 下进行 2h 后加入 2 μl 的 loading buffer 终止反应, 然后用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测酶切条带.

1.2.3 筛选具有溶藻功能的芽孢杆菌 将 28 株芽孢杆菌接入牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 37 $^\circ\text{C}$ 摇床培养 1d. 取扩大培养 1 周的水华鱼腥藻和铜绿微囊藻悬浊液 5ml 移入灭菌试管中, 再接入 0.5ml 芽孢杆菌菌液, 混合均匀, 同时设置未加菌液的藻类为空白对照. 置光照培养箱培养 8-12d(培养条件同 1.1.1)^[7]后观察处理液是否变黄, 根据颜色变化筛选出具有溶藻能力的芽孢杆菌.

1.2.4 细菌的生理生化鉴定 对具有溶藻能力的细菌进行鉴定. 采用美国 Biolog 公司生产的 Biolog 鉴定仪. 在 Biolog 96 孔平板上, 除对照孔不含碳源外, 每孔都含有四氮唑紫(tetrazolium violet) 缓冲的营养培养基和不同碳源. 选择革兰氏阳性杆菌的测试板, 将待测菌株悬液调节到适当浓度, 用加样器将菌悬液

加入到微孔板中, 在 35℃ 有氧环境中培养 24h 后, 用 Biolog 菌种鉴定仪检测显色反应, 用 MicroLog4 菌种鉴定软件进行数据分析。

1.2.5 部分芽孢杆菌溶藻方式的测定 将受试菌株接入牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 37℃ 摇床(200r/min)培养 96h 后, 取部分发酵液离心(5000r/min)15min 后取上清液。在 10ml 水华鱼腥藻和铜绿微囊藻中分别加入 1ml OD₆₈₀ 约为 0.5 的上清液^[7], 对照组则加入 1ml 牛肉膏蛋白胨液体培养基, 每隔 12h 用分光光度计在 680nm 下检测其吸光值。每组设 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 ARDRA 分析结果

对 28 株芽孢杆菌菌株提出的总 DNA 分别扩增其 16SrDNA, 产生大约 1500bp 的扩增片段(图 1a)。用限制性内切酶 *Alu* I 对 PCR 产物进行 ARDRA 多态性分析, 结果得到 5 种酶切条带, 每 1 个 16S rDNA 限制片段长度多态性类型代表了一个操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU), 即得到了 5 种 OTU(图 1b)。其中 OTU5 为最主要的一个类型, 有 14 株细菌菌株属于这个类型, 为优势 ARDRA 型。OTU3 与 OTU4 分别有 5 株和 7 株菌株; OTU1 与 OTU2 分别有 1 株菌株。

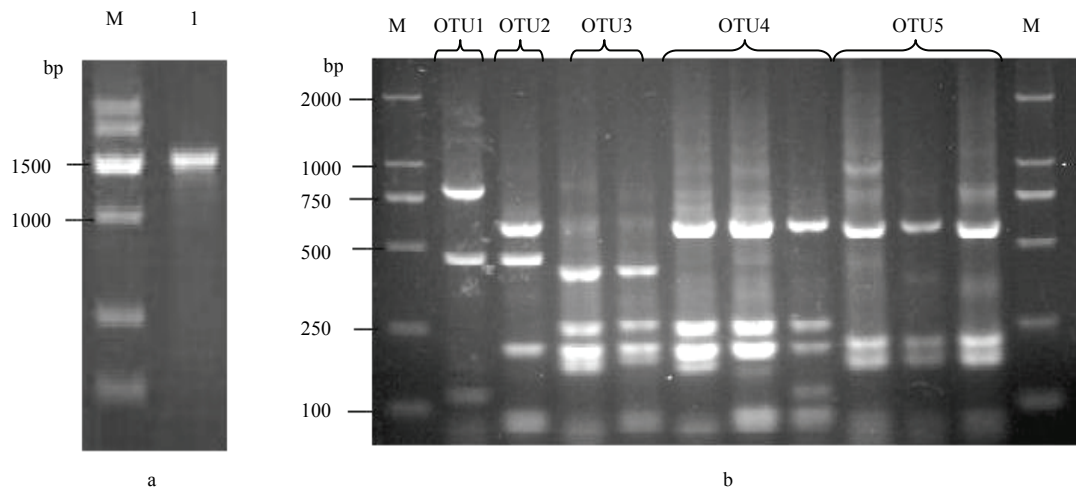


图 1 ARDRA 琼脂糖凝胶电泳图谱

a: 扩增出的 16SrDNA 片段 (M: Marker VII, Lane 1: 16SrDNA 产物) b: 28 株细菌的 16S rDNA PCR 产物经 *Alu* I 酶切后产生的 ARDRA 类型(M: DL2000, Lane OTU1-OTU5: 5 种不同的 ARDRA 型)

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of ARDRA

a: PCR product of 16S rDNA (M: Marker VII; Lane1: PCR Product of 16SrDNA) b: ARDRA patterns of PCR-amplified 16S rDNA digested with endonuclease *Alu* I of the 28 strains(M: DL2000; Lane OTU1-OTU5: ARDRA patterns of strains)

2.2 筛选具有溶藻功能的芽孢杆菌

将 28 株芽孢杆菌菌株分别接入藻中培养 8-12d 后, 观察到 OTU4 与 OTU5 中部分芽孢杆菌菌株对一种或两种藻类有一定的生长抑制的作用。其中属于 OTU5 的部分菌株对藻类有明显的黄化作用(图 2), 藻细胞经 OTU5 的细菌作用后出现停止增殖、溶解、细胞凝聚等现象。

2.3 OTU5 中细菌生理生化鉴定

OTU5 中的菌株在固体肉汤培养基上的菌落部分有差别, 但在显微镜下的个体形态上无明显的差别, 都为革兰氏阳性呈链杆菌, 芽孢中生, 呈柱状, 一般不膨大。

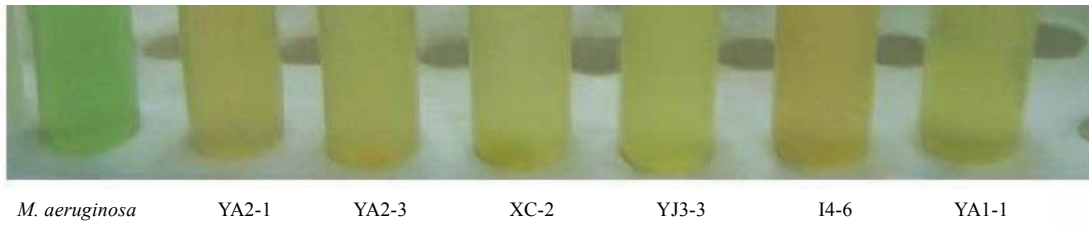


图2 OTU5 中的 6 株菌对微囊藻的溶藻效果
Fig.2 Lysis of *Microcystis* by 6 strains from OTU5

将 OTU5 的菌株细胞接种到 GP96 微孔板上, 培养 24h 后测定菌株的“代谢指数”, 根据菌株对腺苷、肌苷、糊精、胸苷、糖元、尿苷等 95 种碳源的利用能力进行鉴定. 根据生理生化鉴定结果, OTU5 中溶藻效果较好的菌株大多为蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌等遗传关系相近的菌株. 溶藻效果最好的 YA1-1 菌株与 Biolog 数据库中的蜡样/苏云金芽孢杆菌 A 型(*Bacillus cereus/thuringiensis* A)有 98%的相似性, YA2-3 菌株与数据库中的蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycoides*)有 99%的相似性, XC-2 菌株与数据库中的蜡样/苏云金芽孢杆菌 C 型(*Bacillus cereus/thuringiensis* C)有 99%的相似性.

2.4 OTU5 中菌株的溶藻方式

选择 OTU5 中的 YA2-1、YA2-3、I4-6、YA1-1 这 4 株菌株进行溶藻方式的研究. 将 4 株菌株发酵液的上清液分别加入到铜绿微囊藻和水华鱼腥藻中混合培养, 测定其溶藻能力.

溶藻细菌的作用方式一般分为两种: 一是直接溶藻, 即直接进攻宿主, 它需要细菌与溶藻细胞直接接触, 甚至侵入藻细胞内; 二是间接溶藻, 即间接进攻宿主, 主要包括细菌同藻竞争有限营养或细菌分泌胞外物质溶藻^[16]. 实验结果显示, 4 株菌株发酵液的上清液都有强烈的溶藻作用, 可见 OTU5 中的芽孢杆菌均通过向细胞外分泌具有溶藻能力的活性物质的方式对藻类进行间接溶藻.

由图 3 可见, 上清液对于铜绿微囊藻的溶藻作用明显好于水华鱼腥藻. 对于铜绿微囊藻(图 3a), 对照组中的藻类一直保持良好的生长状态, 2d 后 OD 值达到了 1 以上; 而在各处理组中, 藻类生长在细菌培养液上清液作用下被明显抑制了, 在 24h 时对照与处理组已有明显差异($P < 0.05$). I4-6 和 YA1-1 两种细菌培养液上清液的作用最强烈, 微囊藻在 72h 内几乎一直没有生长.

对于水华鱼腥藻, 细菌上清液对它的生长起到了一定的抑制作用, 但在上清液作用下的藻类仍有一定程度的生长(图 3b). 与图 3a 比较, 上清液对于水华鱼腥藻的抑制作用不如铜绿微囊藻强烈.

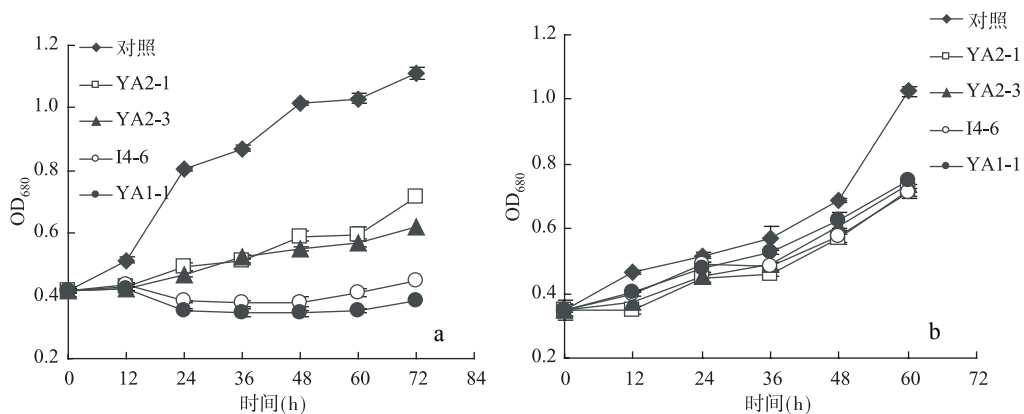


图 3 OTU5 中 4 种菌株发酵上清液的溶藻效果 (a: 铜绿微囊藻; b: 水华鱼腥藻)

Fig.3 The lytic effect of broth supernatant effect of 4 strains in OTU5

3 讨论

在该研究中对于芽孢杆菌的分类采用了 ARDRA 技术, 该技术是新发展起来的一项现代分子生物学技术^[11], 相比于普通的生理生化方法常出现的表型表达不稳定、敏感性不高、测试项目多、费时费力等问题, ARDRA 具有快速、简便、可靠的优点. 一些分子标记技术也被用于菌株的分类, 如 RFLP、RAPD、AFLP、ERIC-PCR 等方法^[15,17]. 这些技术都各有优缺点, RFLP 方法具有可靠性, 但费时、费力、周期长; RAPD 方法具有方便性, 但受条件影响大; AFLP 有上述两者的优点, 但所需费用昂贵、技术要求高. 上述的分子标记技术能在种间、种内水平对菌株进行区分, 而就本研究的目的而言, 需要对菌株在种属水平上进行初步分类, ARDRA 方法能在一定程度上反映出核糖体 DNA 的遗传多样性, 所提供的遗传信息对初步分析菌株的遗传差异具有帮助.

在筛选具有溶藻能力的芽孢杆菌实验中, 发现具有较好溶藻能力的细菌菌株大多集中在 OTU5 中, 且菌株发酵液的上清液对藻类有抑制作用, 因此 OTU5 中遗传关系相近的菌株分泌产生了能抑制藻类生长的活性物质. 在之前关于芽孢杆菌溶藻研究的报道中, 裴海燕等^[5]、彭超等^[6]、刘晶等^[7]、Nobuyuki 等^[18]都通过实验证明所分离得到的具有溶藻能力的芽孢杆菌是通过释放胞外物质进行溶藻的. 但也有报道蜡样芽孢杆菌对于水华束丝藻通过直接接触的方式溶藻^[19]. 可见同一种芽孢杆菌对于不同的水华藻类有不同的溶藻方式, 但就目前的资料来看芽孢杆菌对于微囊藻属的藻类主要还是通过间接溶藻的方式溶藻. OTU5 型的菌株不仅是滇池中最大的一类芽孢杆菌菌株也是最具有溶藻功效的一类芽孢杆菌菌株. 经过生理鉴定 OTU5 中的菌株大多为蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌等遗传关系相近的菌株, 鉴定的结果也与菌株的 ARDRA 类型吻合^[20]. 由此可见滇池中存在大量这类对于铜绿微囊藻有抑制作用的芽孢杆菌, 这对于利用滇池的土著细菌重建湖泊良性的生态结构有很重要的意义.

据多年研究资料, 滇池形成水华的种类主要有蓝藻门的微囊藻属, 其次为束丝藻属和鱼腥藻属, 其中以铜绿微囊藻占绝对优势^[21]. 铜绿微囊藻是滇池规模最大、发生时间最长的水华, 更为严重的是铜绿微囊藻水华属有毒水华, 所含毒素是一种肝毒素, 能使受试动物肝脏充血肿大, 甚至死亡, 对水生生态环境和人类健康存在潜在危害^[22], 因此, 铜绿微囊藻也是对滇池环境危害最大的一类藻类. 在本研究中筛选到了多株对铜绿微囊藻有更强溶藻效果的 OTU5 芽孢杆菌菌株, 这将对研究抑制铜绿微囊藻生长的细菌及其分泌的活性物质、开发针对滇池的特异性生物抑制藻剂具有重要的实际应用价值.

4 参考文献

- [1] 李佐荣. 微生物在湖泊营养化中的应用. 安徽农学通报, 2007, **13**(9): 63-194.
- [2] 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] 赵传鹏, 浦跃朴, 尹立红. 溶藻细菌及其测定评价方法的研究进展. 东南大学学报(医学版), 2005, **45**(3): 203-206.
- [4] 郭 吉, 浦跃朴, 尹立红等. 太湖溶藻细菌的分离及评价. 东南大学学报(自然科学版), 2006, **36**(2): 293-297.
- [5] 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. 环境科学学报, 2005, **25**(6): 796-802.
- [6] 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): 37-56.
- [7] 刘 晶, 潘伟斌, 秦玉洁等. 两株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性. 环境科学与技术, 2007, **30**(2): 17-22.
- [8] 顾宗濂. 中国富营养化湖泊的生物修复. 农村生态环境, 2002, **18**(1): 42-45.
- [9] 韩继刚, 孟颂东, 叶 寅等. 藻类污染生物防治新策略. 微生物学报, 2001, **41**(3): 381-385.
- [10] 李明传. 水环境生态修复国内外研究进展. 中国水利, 2007: 25-27.
- [11] Vanechoutte M, Rossau Rudi, VOS de P *et al.* Rapid identification of bacteria of the *comamonadaceae* with amplified ribosomal DNA restriction analysis(ARDRA). *FEMS Microbiol Lett*, 1992, **93**: 227-234.
- [12] 陈晓蕾, 张忠泽. 微生物的 ARDRA 检测. 微生物学杂志, 1999, **19**(4): 40-43.
- [13] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 62-72.
- [14] 陈宇炜, 高锡云, 陈伟民等. 太湖微囊藻的生长特征及其分离纯培养的初步研究. 湖泊科学, 1999, **11**(4): 351-356.
- [15] Rosa G L, Carolis ED, Sali M *et al.* Genetic diversity of bacterial strains isolated from soils, contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, by 16S rRNA gene sequencing and amplified. fragment length polymorphism fingerprinting.

- Microbiological Research*, 2006, **161**: 150-157.
- [16] 张勇, 席宇, 吴刚. 溶藻细菌杀藻物质的研究进展. 微生物学通报, 2004, **31**(1): 127-131.
- [17] 陈敏, 方序. 工业废水中降酚菌的分离及 ARDRA 多态性分析. 微生物学通报, 2005, **32**(6): 12-15.
- [18] Nobuyuki Nakamura, Kazunori Nakano, Norio Sugiura *et al.* A novel Cyanobacteriolytic Bacterium, *Bacillus cereus*, Isolated from a Eutrophic Lake. *Bioscience and Bioengineering*, 2003, **95**(2): 179-184.
- [19] Shi Shunyu, Liu Yongding, Shen Yinwu *et al.* Lysis of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacterium) by a bacterium *Bacillus cereus*. *Biological Control*, 2006, **39**: 345-351.
- [20] XiYang Wu, Mark JW, Michael Hornitzky *et al.* Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, **64**: 107-119.
- [21] 刘丽萍, 张秀敏, 赵祥华. 滇池水华综合控制对策探讨. 上海环境科学, 2002, **21**(12): 745-755.
- [22] 刘丽萍. 滇池水华特征及成因分析. 环境科学研究, 1999, **12**(5): 36-37.