

## 一株产碱性磷酸酶附生菌对微囊藻生长的影响\*

赵 婕<sup>1</sup>, 李建宏<sup>1\*\*</sup>, 管章玲<sup>1</sup>, 许 玲<sup>1</sup>, 潘 澄<sup>1</sup>, 李朋富<sup>2</sup>

(1: 南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物技术与生物多样性重点实验室, 南京 210046)

(2: 南京大学生命科学院, 南京 210093)

**摘 要:** 为研究产碱性磷酸酶( ALP) 细菌对微囊藻(*Microcystis aeruginosa*) 从有机磷中获得磷营养的影响, 从微囊藻群体中分离获得一株产 ALP 附生菌 Y6, 通过 ITS 分子鉴定该菌属赤杆菌属(*Erythrobacter*)。探讨该菌在有机磷条件下对微囊藻生长及生理代谢的影响, 结果表明: (1) 细菌发酵液中 ALP 活性与 Y6 菌的浓度呈正相关, 在培养初期的延滞期即开始产生 ALP; (2) 在有机磷源条件下 Y6 的加入对微囊藻生长有促进作用; (3) 有机磷源条件下, Y6 有助于维持群体微囊藻的上浮率和较大群体, Y6 的加入也有维持藻细胞叶绿素荧光强度的作用。本研究的结果表明, 产 ALP 附生菌有助于微囊藻利用水体中有机磷, 有利于水华形成。

**关键词:** 微囊藻; 藻上附生菌; 碱性磷酸酶; Chl. a 荧光强度; 水华

## Effect of an attached bacterium of alkaline phosphatase producing on the growth of *Microcystis aeruginosa*

ZHAO Jie<sup>1</sup>, LI Jianhong<sup>1</sup>, GUAN Zhangling<sup>1</sup>, XU Ling<sup>1</sup>, PAN Cheng<sup>1</sup> & LI Pengfu<sup>2</sup>

(1: College of Life Sciences, Jiangsu Key Laboratory for Biotechnology and Biodiversity, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, P. R. China)

(2: School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China)

**Abstract:** To study the effect of alkaline phosphatase( ALP) bacteria on *Microcystis aeruginosa* obtaining phosphorus from organic phosphorus compounds, an attached bacterium strain Y6 which produced ALP was isolated from *M. aeruginosa* colonies. It was identified as a strain of *Erythrobacter* by its ITS molecular characteristic. The effects of the bacterium on the growth and physiology of *M. aeruginosa* in the organic phosphorus condition investigated in this paper. The results show that: (1) ALP activity in the culture broth was positively related Y6 concentration, initial lag phase of incubation began to produce ALP; (2) Under the condition of organic phosphorus, Y6 could promote the growth of *M. aeruginosa*; (3) Y6 could maintain floating rate and bigger colonies of colonial *M. aeruginosa*, and hold chlorophyll fluorescence of algal cells in the organic phosphorus medium. This research suggested that ALP producing attached bacteria could help *M. aeruginosa* using organic phosphorus and forming blooms.

**Keywords:** *Microcystis aeruginosa*; attached bacteria; alkaline phosphatase; Chl. a fluorescence intensity; water bloom

磷是许多湖泊水体的主要限制性营养元素<sup>[1]</sup>, 对浮游藻类的生长起决定作用。水体中磷存在的主要形式是溶解性有机磷(DOP)和悬浮态颗粒磷(Sestonic P), 其中生物可直接利用的溶解性反应磷仅占5% - 8%<sup>[2]</sup>。浮游生物通过产生碱性磷酸酶(ALP)催化有机磷分解补充磷营养<sup>[3]</sup>。许多研究表明水体中碱性磷酸酶与磷营养水平之间呈明显的负相关<sup>[4-5]</sup>。

微囊藻群体胶鞘多糖中常伴生着许多微生物, 附生菌与藻类的生长密切相关, 在微囊藻暴发期尤为明显<sup>[6-8]</sup>。与浮游藻类相比附生菌的生长几乎不受磷浓度的限制<sup>[9]</sup>, 微囊藻胶鞘上的附生菌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<sup>[10-11]</sup>。但目前对微囊藻附生的产 ALP 细菌尚未见详细

\* 江苏省科技厅社会发展项目(BS200765)和国家重点基础研究发展计划“973”项目(2008CB418004)联合资助。  
2010-04-15 收稿; 2010-06-01 收修改稿。赵婕, 女, 1986年生, 硕士; E-mail: zhaojie-xj@163.com.

\*\* 通讯作者; E-mail: lijianhong@nju.edu.cn.

的研究报道. 本研究从自然水华的微囊藻群体中分离筛选出一株产 ALP 细菌, 并以一株群体微囊藻和一株单细胞微囊藻为材料, 研究了该菌在有机磷存在下对微囊藻生长及生理代谢的影响, 探讨了附生菌与微囊藻生长之间的关系.

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种及培养

群体形态的微囊藻 *Microcystis aeruginosa* XW01 (以下简称 XW01), 由本实验室分离保存; 单细胞形态的微囊藻 *M. aeruginosa* PCC7806 (以下简称 PCC7806), 由法国 LCB-CNRS 张承才教授惠赠. BG-11 培养基<sup>[12]</sup> 28℃ 培养, 光照强度为 60 μmol/(m<sup>2</sup> · s), 培养期间间隙振荡.

将藻种 6000r/min 离心 10min, 弃上清, 用灭菌无磷 BG-11 培养基重复冲洗藻体 3 次, 接入无磷 BG-11 培养 20d 作为磷饥饿藻种. 群体藻种用筛绢过滤出藻体, 洗涤后接种.

### 1.2 产碱性磷酸酶附生菌的分离和培养

在南京师范大学仙林校区月亮湾水华暴发时, 用 200 目筛绢过滤采集微囊藻群体. 取少量藻泥用无菌 BG-11 培养液反复悬浮过滤洗涤, 去除游离细菌. 使用无菌石英砂将群体微囊藻用涡旋振荡器振荡破碎, 滤纸滤去藻体, 附生菌含于滤液中. 用合成培养基<sup>[9]</sup> 培养附生菌, 待培养平板上长出明显菌落后, 逐一测定各菌落产碱性磷酸酶 (ALP) 活力<sup>[13]</sup>.

1ml 菌种接种于 20ml LB 培养液中, 30℃, 150r/min 摇床培养 24h, 离心分离, 并用无菌无磷 BG-11 培养液洗涤菌体, 重复 4 次后, 用液体 BG-11 稀释至 50ml 的种菌液, 菌浓度约为 3.0 × 10<sup>6</sup> cells/ml, 用于接种到微囊藻中.

### 1.3 不同有机磷条件下产 ALP 菌对微囊藻生长的影响

以有机磷酸苯二钠 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P) 代替 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 比较 2 种磷浓度条件下产 ALP 菌对两株微囊藻生长的影响. 一是高磷浓度, 即参照 BG-11, 设置磷浓度为 5.4mg/L; 二是低磷浓度, 参照太湖水域平均磷水平<sup>[14]</sup>, 设置磷浓度为 0.1mg/L. 培养藻分装于 100ml 的三角瓶中, 每瓶 30ml, 各接种菌液 1ml, 每个样品设定 3 个平行. 实验周期较长的实验按同样比例将培养体积扩大至 60ml (250ml 三角瓶). 定时取样, 藻浓度用岛津 UV2401 紫外分光光度计测定 650nm OD, 测定前先经涡旋振荡处理 3min, 尽量使群体分散.

### 1.4 各生理指标及理化因子的测定

Chl. a 采用丙酮法测定<sup>[15]</sup>; 叶绿素荧光采用流式细胞仪测定<sup>[16-17]</sup>; ALP 活性采用磷酸苯二钠比色法测定<sup>[18]</sup>.

藻的群体大小用显微镜观察 20 个随机视野, 显微镜微尺测定群体大小, 由于在盖玻片和载玻片之间, 微囊藻群体基本呈同等厚度的薄饼状, 故可以近似面积估算群体体积大小. 计数 200 个藻群体以上; 藻液置于 25 ml 量筒中, 静置 2h, 用吸管小心吸取上层 5ml 藻液, 上浮率以上层藻液中叶绿素占总培养藻叶绿素的比率计算.

$$B = \frac{C_1 V_1}{C_1 V_1 + C_2 V_2} \times 100$$

式中, 相对浮力 (B) 表示藻细胞在藻液上层所占的比例. C<sub>1</sub> 是上层藻细胞的 Chl. a 浓度; V<sub>1</sub> 是上层藻细胞的体积. C<sub>2</sub> 和 V<sub>2</sub> 分别为剩余部分的藻细胞 Chl. a 浓度及体积.

### 1.5 菌种的分子鉴定

提取基因组 DNA, PCR 扩增 16S rRNA - 23S rRNA ITS 序列<sup>[19-20]</sup>. PCR 产物经过测序 (上海英骏生物公司), 获得的序列通过 NCBI 网站上 Blast 比对, 从 GenBank 选取同源性高 ITS 序列, ClustalX (Version 1.83) 软件进行比对分析. MEGA3.1 软件包中的 Kimura 2-Parameter Distance 模型计算进化距离, Neighbor-Joining 法构建系统发生树, 1000 次随机取样, 计算 bootstrap 值以评估系统发生树的置信度.

### 1.6 数据统计分析

数据采用 Excel 分析, 显著性差异采用 SPSS 分析方法, P < 0.05 认为有显著性.

## 2 结果与讨论

### 2.1 附生菌 Y6 的产 ALP 活性

通过筛选,我们得到一株产碱性磷酸酶较强的附生菌 Y6. 发酵液中 ALP 活性与菌的浓度呈正相关,即使在生长初期 6h 的迟滞期内,培养液中的 ALP 活性也迅速增加(图 1),说明 ALP 的合成与菌的生长周期无关.

### 2.2 产酶菌株分子鉴定

用 Y6 附生菌基因组 DNA 作模板进行 PCR 扩增,获得了 ITS 基因,经测序获得了其碱基序列(登录号: HM099637). 通过 Blast 比对(www.ncbi.nlm.nih.gov)分析, Y6 菌与赤杆菌属的 *Erythrobacter litoralis* 最相似. 因此,判断该菌为赤杆菌属的一种. Y6 与近似菌株的遗传树见图 2.

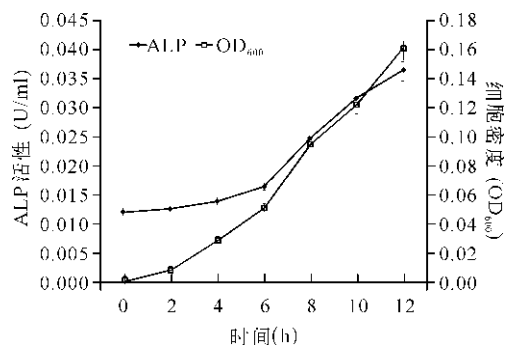


图 1 不同培养时间下 Y6 菌的浓度及 ALP 活性变化

Fig. 1 Y6 bacteria concentrations and ALP activities in culture medium at different culture times

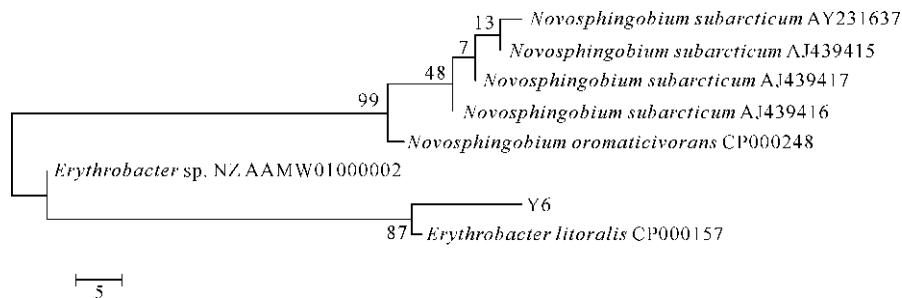


图 2 基于 16S rRNA - 23S rRNA ITS 的系统发育树

Fig. 2 16S rRNA - 23S rRNA ITS based phylogenetic tree

### 2.3 有机磷源条件下 Y6 菌对微囊藻生长的影响

用有机磷取代无机磷的条件下群体微囊藻 XW01 和单细胞微囊 PCC7806 的生长速度都显著降低(图 3). 但在 Y6 菌的作用下,微囊藻的生长得到显著地恢复,说明 Y6 菌有助于微囊藻获得生长所需的磷营养. 两种状态的微囊藻中,对 PCC7806 作用效果更显著.

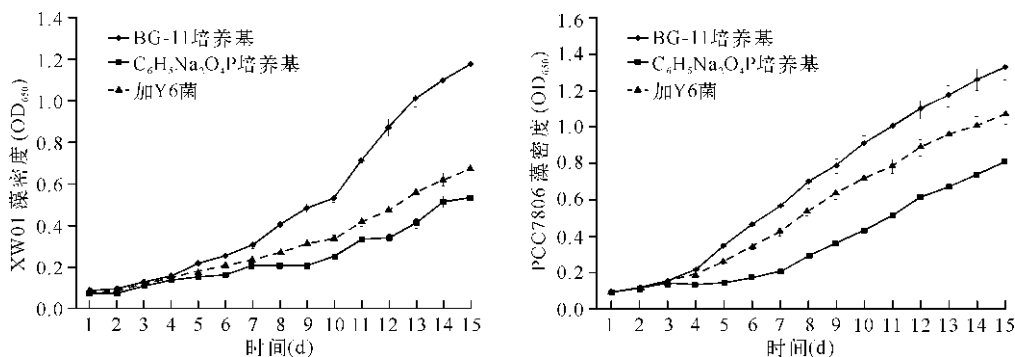


图 3 有机磷条件下 Y6 菌对微囊藻生长的影响

Fig. 3 Effect of Y6 bacteria on the growth of *M. aeruginosa* in the organic phosphorus medium

在近似太湖平均磷浓度的有机磷条件下(低浓度磷), Y6 菌对微囊藻的生长显示出类似的促进作用(图 4).

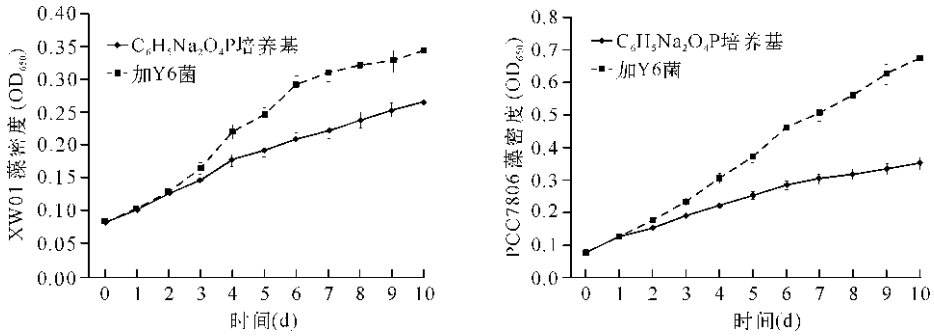


图4 低有机磷条件下 Y6 菌对微囊藻的生长影响

Fig. 4 Effect of Y6 bacteria on the growth of *M. aeruginosa* in the low organic phosphorus medium

2.4 有机磷条件下 Y6 菌对微囊藻胞外 ALP 活性的影响

Y6 菌对微囊藻培养物中 ALP 活性的影响可以看出,在有 BG-11 足够无机磷供给的条件下(图 5),藻类胞外培养液中的 ALP 很低,特别是 PCC7806 的胞外 ALP 几乎为 0;在有机磷诱导下,微囊藻能产胞外 ALP, XW01 和 PCC7806 分别在培养的第 6d 和第 3d 出现 ALP 高峰,随后逐渐降低(图 5). ALP 的升高反映了环境中可用磷的状况. 当 Y6 菌存在时,两株藻的胞外 ALP 显著降低,峰值时分别降低 43% 和 39%,表明 Y6 菌对磷供给的促进.

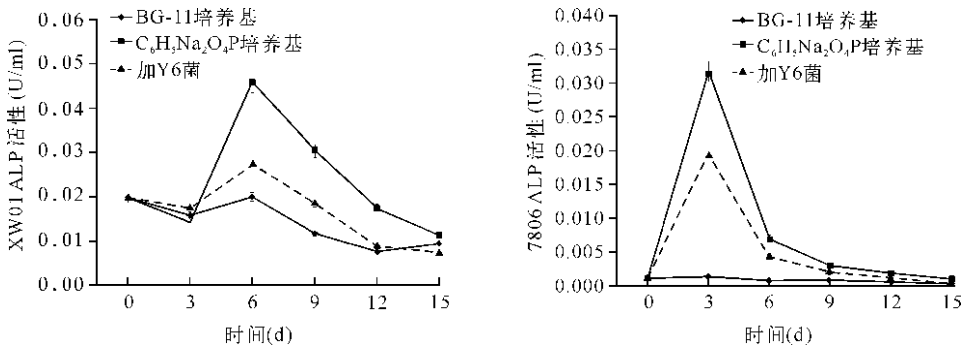


图5 Y6 菌对微囊藻培养液中 ALP 活性的影响

Fig. 5 Effect of strain Y6 on the ALP activity of *M. aeruginosa* cultural media

2.5 群体微囊藻群体上浮率与群体大小

对于群体微囊藻 XW01, Y6 菌对其群体上浮率以及群体大小均产生影响;在 BG-11 有足够无机磷供给的条件下, XW01 的上浮率高达 90%;在无机磷缺乏条件下,上浮率降为 38%;Y6 菌的作用使上浮率提高到 68%, Y6 的促上浮率作用显著 ( $P = 0.011$ ) (图 6a).

与充足无机磷相比磷缺乏导致群体大小的减小,最大群体分布由  $0.1 \times 10^3 - 0.5 \times 10^3 \text{ mm}^2$  减小到  $0.01 \times 10^3 - 0.05 \times 10^3 \text{ mm}^2$ , 附生菌 Y6 的存在,有助于大群体状态的维持,最大群体分布在  $0.05 \times 10^3 - 0.1 \times 10^3 \text{ mm}^2$ , 大于  $0.1 \times 10^3 - 0.5 \times 10^3 \text{ mm}^2$  的大群体的比例高于 50%,显著高于无 Y6 菌的状态 ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_4\text{P}$  培养基,图 6b).

2.6 Y6 菌对微囊藻细胞荧光强度的影响

用 FCM 技术,可以对培养液中的每个藻细胞的生理状态进行逐个检测与分析. 本实验的检测值为 2 万个细胞的平均值,每秒的细胞流量在  $10^3$  个左右,因而 FCM 的检测结果具有大样本的统计学意义.

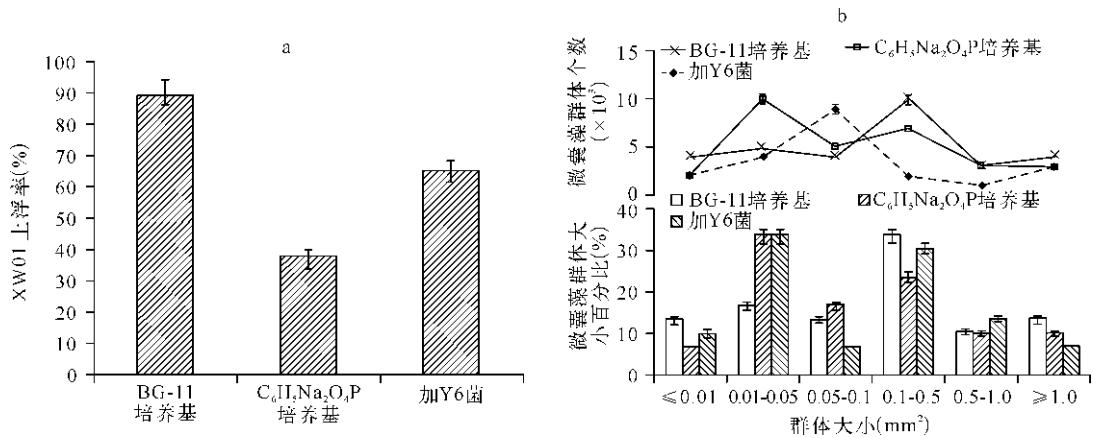


图 6 Y6 菌对微囊藻 XW01 上浮率(a)与群体大小(b)的影响

Fig. 6 Effect of Y6 on floating rate (a) and colonial size (b) of *M. aeruginosa* XW01

FCM 测得 PCC7806 的细胞密度二维坐标定量图 (图 7) 横坐标表示 Chl. a 荧光强度, 纵坐标 SSC-H 与细胞内精细结构和颗粒性质有关, 图中圈出的区域显示为荧光强度较高的正常藻细胞群体, BG-11 充足可用磷条件下大多数藻细胞 Chl. a 荧光强度集中于 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> 之间的较高区域; 有机磷源条件下的藻细胞 Chl. a 荧光强度下降到 10<sup>3</sup>, 说明有效磷供应不足使藻细胞内部结构受到破坏. Y6 菌的加入使得藻细胞 Chl. a 荧光强度有所提高, 高荧光区域内藻细胞数量增加, 且更为集中.

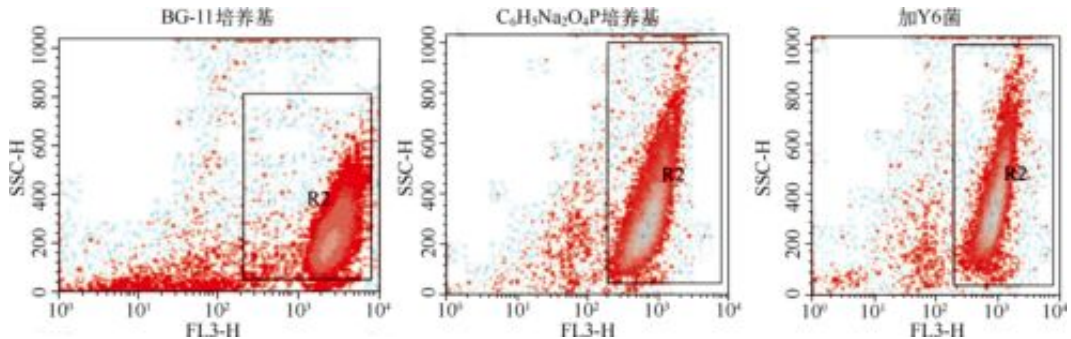


图 7 Y6 菌对微囊藻 PCC7806 影响的荧光二维分布图

Fig. 7 Effects of Y6 bacteria on the two dimensional distribution of the fluorescence of *M. aeruginosa* PCC7806

图 8 中横坐标 FL3-H 表示 Chl. a 荧光强度, 纵坐标表示某一荧光强度藻细胞出现的频率. BG-11 条件下藻细胞 Chl. a 荧光强度的峰值在 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> 之间, 磷源缺乏的条件下藻细胞 Chl. a 荧光强度峰值降至 10<sup>3</sup> 附近,

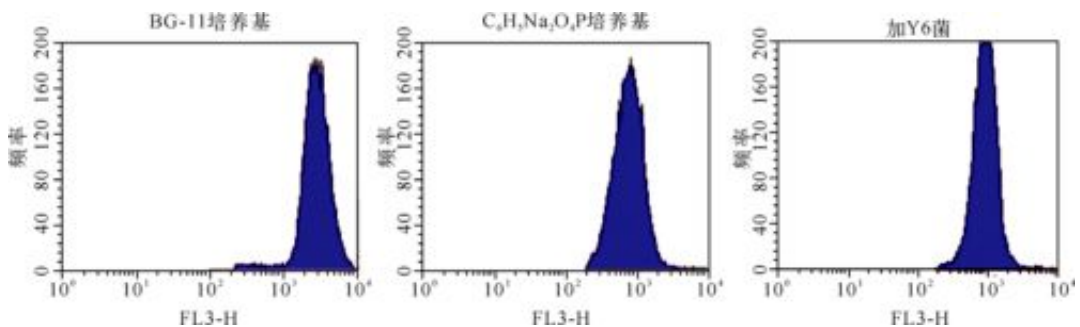


图 8 Y6 菌对微囊藻 PCC7806 的叶绿素荧光强度的影响

Fig. 8 The Chl. a fluorescence intensity of *M. aeruginosa* PCC7806 after Y6 bacteria inhibited

而加入 Y6 菌培养后在相同荧光强度区域, PCC7806 荧光强度出现频率的峰值要明显高于未加入 Y6 菌的加磷培养的藻. 结果显示 Y6 菌有助于藻获得磷.

### 3 讨论

水体中磷营养水平与浮游藻类的增殖以及水华的形成密切相关, 浮游藻类能直接利用的磷形态是无机态的正磷酸盐<sup>[21]</sup>, 一般情况下水体中生物可直接利用的溶解性反应磷仅占 5% - 8% , 往往难以满足浮游植物快速生长的需要. 然而有研究表明, 尽管湖泊水体中生物可直接利用的溶解性反应磷相对含量很低, 但仍能暴发水华<sup>[2]</sup>. 在缺磷胁迫下, 藻体内通常具有一套应急的磷供应体系以适应环境变化<sup>[22]</sup>, 蓝藻除了可直接分解藻体内的存储磷来满足生长的需要外, 同时也通过产生胞外 ALP 来分解环境中的有机磷, 以获得磷营养<sup>[23]</sup>. 磷酸酶是调节营养循环的一个重要生物化学参数, 是生物获得可利用性磷的重要途径<sup>[24]</sup>. 磷酸酶的合成、分泌与稳定性可反映水体磷营养的水平<sup>[25]</sup>. 在缺磷胁迫条件下, 除了藻类可产生 ALP 外, 其生长环境中产 ALP 的微生物同样能够水解磷酸酯以替代磷源, 补偿所缺乏的磷<sup>[26-27]</sup>, 微生物解磷作用, 对藻类获得磷的补充起着重要影响. 本研究的结果显示, 产 ALP 附生菌的加入促进了有机磷分解, 为藻类生长提供无机磷源.

在仅有有机磷供给的条件下, 微囊藻可被诱导产生大量的 ALP(图 5), 但加入 Y6 菌后, 培养物中 ALP 水平大大降低. 其结果可能是由于 Y6 菌降解有机磷, 为微囊藻提供生物可用的磷, 抑制了其 ALP 的产生; 另一方面, 加入 Y6 菌后, 培养液中总体 ALP 水平下降到较低水平, 其原因可能是由于附生菌 Y6 还具有其他分解有机磷的途径.

有机磷源条件下群体微囊藻 XW01 和单细胞微囊 PCC7806 的生长均受到磷供给限制的抑制; 在产 ALP 菌 Y6 的作用下, 微囊藻的生长得到显著地恢复. 在有机磷的条件下 Y6 菌对维持群体微囊藻的群体大小和细胞上浮率都起到了一定的作用. 群体状态和良好的上浮能力是微囊藻获得生态优势的关键, Y6 菌有助于微囊藻大群体状态的形成, 为水华的形成提供条件; 同时, 对单细胞藻的叶绿素荧光强度等多个生理指标及理化因子的研究也表明, Y6 菌对微囊藻的生长有一定的促进作用.

### 4 参考文献

- [ 1 ] Hecky RE, Kilham P. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments : A review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnol Oceanogr*, 1988, **33**(4, part 2) :796-822.
- [ 2 ] Halemejkó GZ, Chróst RJ. The role of phosphatases in phosphorus mineralization during decomposition of lake phytoplankton blooms. *Arch Hydrobiol*, 1984, **101**:489-502.
- [ 3 ] Jochem FJ. Probing the physiological state of phytoplankton at the single-cell level. *Scientia Marina*, 2000, **64**(2) :183-195.
- [ 4 ] 高 光, 高锡芸, 秦伯强等. 太湖水体中碱性磷酸酶的作用阈值. *湖泊科学*, 2000, **12**(4) :353-358.
- [ 5 ] 王 艳, 唐海溶. 不同形态的磷源对球形棕囊藻生长及碱性磷酸酶的影响. *生态科学*, 2006, **25**(1) :38-40.
- [ 6 ] 杨柳燕, 蒋丽娟, 秦伯强等. 铜绿微囊藻与附生假单胞菌静态吸磷的比较. *中国环境科学*, 2004, **24**(5) :572-575.
- [ 7 ] 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. *湖泊科学*, 1998, **10**(4) :59-62.
- [ 8 ] 朱丽萍, 高 光, 汤祥明等. 微囊藻水华期间水体及藻体上细菌的动态. *湖泊科学*, 2009, **21**(3) :395-400.
- [ 9 ] 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. *湖泊科学*, 2000, **12**(4) :373-378.
- [ 10 ] 代瑞华, 刘会娟, 曲久辉等. 氮磷限制对铜绿微囊藻生长和产毒的影响. *环境科学学报*, 2008, **28**(9) :1739-1744.
- [ 11 ] 邹 迪, 肖 琳, 杨柳燕等. 不同形态磷源对微囊藻与附生假单胞菌磷代谢的影响. *环境科学*, 2005, **26**(3) :119-121.
- [ 12 ] Allen MM. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J Phycol*, 1968, **4**:1-4.
- [ 13 ] 庄百川. 一株产碱性磷酸酶菌株的分离、鉴定及发酵条件研究[学位论文]. 浙江: 浙江大学, 2006.
- [ 14 ] 黄文钰, 高 光, 舒金华等. 含磷洗衣粉对太湖藻类生长繁殖的影响. *湖泊科学*, 2003, **15**(4) :326-330.
- [ 15 ] 邹 琦. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [ 16 ] 于 洋, 孔繁翔, 钱蕾蕾. 流式细胞术在铜对藻类生态毒理研究中的应用. *环境化学*, 2004, **23**(5) :525-528.
- [ 17 ] 谭 啸. 利用流式细胞仪研究温度对两种藻竞争的影响. *湖泊科学*, 2006, **18**(4) :419-424.

- [18] 钱士匀. 临床生物化学和生物化学检验实验指导书. 北京:人民卫生出版社,2004.
- [19] 刘海燕,宦海琳,汪育文等. 微囊藻毒素降解菌 S3 的分子鉴定及其降解毒素的研究. 环境科学学报,2007,27(7):1145-1150.
- [20] 张桂山,贾小明,马晓航等. 一株多菌灵降解细菌的分离、鉴定及系统发育分析. 微生物学报,2004,44(4):417-421.
- [21] 曹秀云. 浮游植物胞外磷酸酶在富营养化湖泊磷循环过程中的作用[学位论文]. 武汉:中国科学院水生生物研究所,2005.
- [22] Chae-Hong L, Ozkanca R, Flint KE. The effects of osmotic stress on survival and alkaline phosphatase activity of *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol Let*, 1996, 137(1):19-24.
- [23] Dyhrman S. Ectoenzymes in *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae*, 2005, 4(3):619-627.
- [24] Hernandez I, Perez-Pastor A, Llorens LP. Ecological significance of phosphomonoesters and phosphomonoesterase activity in a small Mediterranean river and its estuary. *Aqua Ecol*,2000, 34(2):107-117.
- [25] Li H, Veldhuis JW, Post AF. Alkaline phosphatase activities among planktonic communities in the northern Red Sea. *Marine Ecol Prog Series*, 1998, 173:107-115.
- [26] Chróst RJ. Environments control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In:Chróst RJ ed. *Microbial enzymes in aquatic environments*. New York :Springer-Verlag, 1991:29-59.
- [27] 谭 香,沈 宏,宋立荣. 三种水华蓝藻对不同磷浓度生理响应的比较研究. 水生生物学报,2007, 31(5):693-699.