

一株自太湖微囊藻上分离到的细菌 的生长及磷代谢

刘玲莉¹ 顾宇飞¹ 罗 屿¹ 马文漪¹
周子元² 蔡后建²

(1: 南京大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 环境学院环境科学系, 南京 210093;

2: 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

提 要 磷是引起湖泊水华爆发的关键元素, 微囊藻 (*Microcystis*) 是太湖水华的主要藻种, 为了研究磷在湖泊水体低级食物链(细菌、浮游动植物等)中的代谢, 以一株自太湖微囊藻上分离的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) X 菌株为试验菌, 研究了磷形态及生长因子对其生长的影响。结果表明无机磷浓度对 X 菌生长的影响不大, 而 ATP 对 X 菌的生长有抑制作用; 在含有无机磷和有机磷的培养基中, X 菌优先利用无机磷盐, X 菌还可利用颗粒磷。X 菌需要外来生长因子, 微囊藻提取液可取代酵母膏提供其所须的生长因子。

关键词 附生菌 假单胞菌 磷代谢 磷形态 太湖

分类号 Q939.124

近年太湖的富营养化程度加剧, 每年夏秋季节均出现局部水华爆发。微囊藻 (*microcystis*) 是太湖水华的主要藻种, 微囊藻胶鞘上常伴生着细菌, 在微囊藻爆发期尤为明显^[1]。

细菌对维持藻类生物量的平衡有着非常重要的作用, 它能与藻竞争营养物质, 或有溶藻能力^[2,3]。生物治理湖泊富营养化是高经济效益低污染的有效途径之一。磷是引起湖泊富营养化的关键元素, 降低湖水的含磷量是湖泊富营养化治理的重点。要寻求有效的生物治理方法必须了解湖泊水生态系统中磷的代谢, 主要是藻和菌的磷代谢; 同时还需进一步了解菌藻之间的营养关系。自然界进入湖泊水体的磷, 部分是生物可直接利用的正磷酸盐, 其余悬浮态、溶解态磷及有机悬浮态磷是生物可潜在利用的磷^[4]。环境中磷的存在形式、含量及其转化速度对生物群落的结构和功能具有重要作用。有关磷代谢在水环境的食物链中(细菌、浮游动植物)的生物学过程研究的报道不多^[5]。作者对从太湖微囊藻上分离到的一株假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 的磷代谢进行了研究, 并初步探索了藻对菌的生长条件的影响。

1 材料和方法

1.1 试验菌

假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) X 菌株系南京大学污染控制与资源化研究国家重点实验室从太湖微囊藻分离、纯化后保存的菌种。

• 国家自然科学基金资助项目(3960025)。

收稿日期: 2000-01-14; 收到修改稿日期: 2000-03-21。刘玲莉, 女, 1977年生, 研究生。

1.2 培养基

合成培养基: 葡萄糖 $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, NH_4Cl $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 ① $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母膏 $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.3 预培养

将在 4°C 冰箱保存的斜面培养物接种 2 环于 80ml 合成培养液中, 32°C $120\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 24h, 无菌操作离心分离, 并用无菌水洗涤菌体, 重复 4 次后, 稀释至 50mL 为种菌液.

1.4 磷形态和含量对菌体生长的影响

1.4.1 无机磷源 以 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 (1:1) 为无机磷源, 培养基中磷浓度分为 0、0.02、0.20、2.00 和 $3.00\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 5 个梯度, 分装于 250mL 的三角瓶中, 每瓶 50mL, 各接种菌液 1mL, 恒温振荡培养(条件同上), 定时取样以 721 分光光度计($\lambda = 380\text{nm}$, 下同)测光密度. 以培养时间为横坐标, 光密度 OD 值为纵坐标, 绘制生长曲线.

1.4.2 有机磷源 以 ATP 为有机磷源, 磷浓度为 0、10、100、1000 和 $2500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 接种培养均同上. 定时取样测 OD 值并绘制生长曲线.

补充试验: 将培养液中的葡萄糖含量分为 $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 两个梯度, 1 号瓶中葡萄糖 $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{ATP}0\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 2 号瓶中葡萄糖 $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{ATP}500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 3 号瓶中葡萄糖 $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{ATP}500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 在相同的培养条件下(32°C $120\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 每 3h 取样, 测 OD 值.

1.5 代谢过程磷形态的测定

将 50mL 接种量为 2% 的培养液(不含颗粒磷) 32°C $120\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 24h, 取一份样离心后弃上清液, 以无菌水洗涤菌体上吸附的磷, 稀释至一定 OD 值范围. 取 10mL 菌液以钼锑分光光度法测出其含磷量, 计算了光密度为 0.01 的菌液的含磷量. 再将接种量为 2% 的培养液(含有微量外加颗粒磷)置于恒温摇床 32°C , $120\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 24h, 其间每 6h 取一次样, 测出每份样的 OD 值, 再根据各份样的光密度换算出其菌体含磷量. 最后, 以钼锑分光光度法^[6]测出各样品的各种形态的磷浓度(图 1), 其中总磷的分析值为样品直接消解测出的培养液含磷量减去样品中菌体的含磷量.

1.6 藻提取液对菌生长的影响

将从太湖中捞取的微囊藻藻泥用蒸馏水洗涤后, 称取 50g(湿重)的藻泥, 加入石英砂混匀后放入冰箱冷室内冷冻 1h, 取出用研钵研磨至一定程度后再放入冰室冷冻 1h, 如此反复冻融、研磨四次. 将经处理的藻泥用蒸馏水稀释至 150mL, $4000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 0.5h 除去较大的碎片及石英砂, 再 $14000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 0.5h 后, 微孔滤膜过滤除菌, 4°C 冰箱保存备用. 取 6 支 $1.5\times 15(\text{cm})$ 试管中分别加入酵母膏含量为 0.5、0.2、0.1、0.04、0.02、 $0.01\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养液各 5mL, 再各接种菌液 0.1mL, 三个平行, 32°C $120\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 24h, 取样测 OD 值. 然后取 4 只装有 50mL 的不含酵母膏的合成培养液的三角瓶中分别加入 2、1、0.5 和 0.1mL 无菌藻提取液, 另一三角瓶加入 50mL 含有酵母膏(0.05%)的合成培养液, 各接种菌液 1mL, 2 个平行, 32°C $120\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养, 每 3h 取样一次, 测其光密度, 共培养 24h.

① 进行有机磷试验时以三磷酸腺苷(ATP)代之.

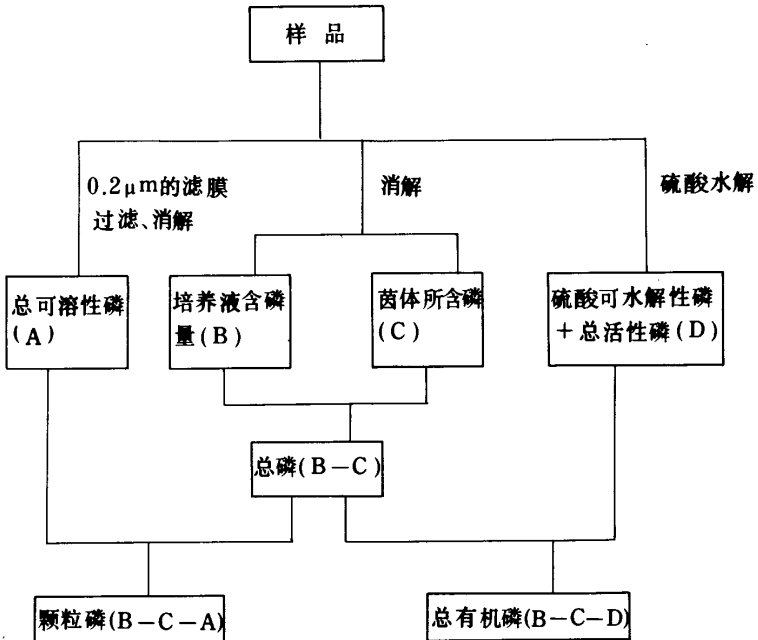


图 1 磷形态的分析步骤

Fig. 1 Procedure of test on phosphorous speciation

2 结果与讨论

2.1 磷浓度对菌体生长的影响

2.1.1 不同浓度的磷酸盐对 X 菌生长的影响 由图 2 可见, 培养液中无机磷含量对 X 菌生长无显著影响. 即使加 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 , 只含酵母膏中的微量磷(以钼锑分光光度法测出其含磷量为 $3.27mgL^{-1}$, 该菌也能维持较好的生长, 可见 X 菌对磷的需求量不大.

2.1.2 不同浓度 ATP 对 X 菌生长的影响 由图 3 可见 X 菌可利用 ATP, 但 $100\mu gL^{-1}$ ATP 对 X 菌的生长开始显示抑制作用, 高浓度时尤为明显. ATP 是一种高能磷酸化合物, 水解时释放出能量和磷酸基团. 磷含量的高低对 X 菌的生长影响不大, 也就是说在本实验中培养液所含的 ATP 水解时释放的磷酸基团并不会对 X 菌的生长代谢产生抑制作用. 培养液中随着 ATP 浓度的增加, 由于葡萄糖的存在(既是碳源, 又是能源), 会使得处于高能体系中的菌体自身的能量代谢便受到抑制, 生长速度降低, 且 ATP 浓度越高, 抑制越明显. 进一步研究发现(图 4), 相同培养条件下, 培养液中加入 $500\mu g \cdot L^{-1}$ 的 ATP 时 X 菌的迟缓期会延长, 生长速率减小. 且同浓度的 ATP 对葡萄糖浓度为 $6g \cdot L^{-1}$ 组的抑制作用较 $3g \cdot L^{-1}$ 组的大, 可见 ATP 对微生物的抑制作用可随着培养基中能源物质的含量的降低而减小.

2.2 细菌对不同形态磷的吸收和利用

总磷包括培养液中各种形态的磷, 可分为可溶性磷、颗粒磷两部分, 也可分为活性磷、酸可

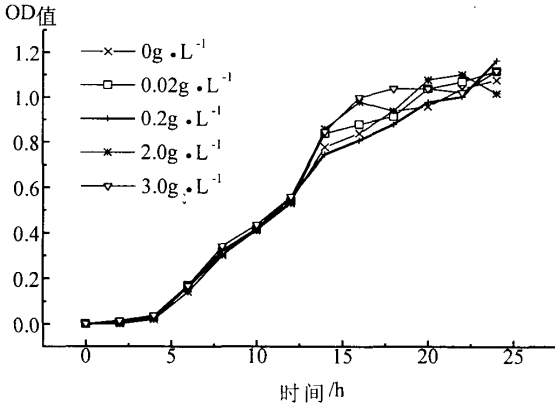


图 2 K_2HPO_4 和 $KH_2PO_4(1:1)$ 为无机磷源时 X 菌的生长曲线

Fig. 2 Effect of phosphate on the growth of X (*Pseudomonas* sp.)

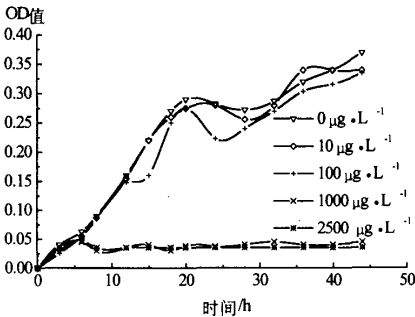


图 3 ATP 为有机磷源是 X 菌的生长曲线

Fig. 3 Effect of ATP on the growth of X (*Pseudomonas* sp.)

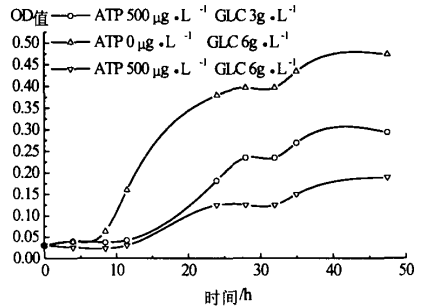


图 4 ATP 和葡萄糖以不同浓度组合时 X 菌的生长曲线

Fig. 4 Effect of ATP & glucose on the growth of X (*Pseudomonas* sp.)

水解性磷和有机磷三部分。总有机磷可用总磷减去总酸可水解性磷与活性磷之和求得，而颗粒磷由总磷减去总可溶性磷求得。

作为细胞生长所必需的元素，磷的吸收和利用对细菌的生长有重要的作用，细菌具有几种不同的代谢途径来降解不同形态的磷。总的来说细菌可利用三种不同形态的磷；无机磷酸盐、有机磷酸酯、磷酸酯。其中无机磷酸盐为通常情况下的最适磷源^[7]。由图 5 可知细菌吸收可溶性磷的量最大，利用速度也最快。在前 7h 培养期间没有消耗有机磷，可见在含有无机磷和有机磷的培养液中 X 菌优先利用无机磷。

颗粒磷与藻的生长有很好的线性相关，但颗粒磷并不能被藻直接摄取，需先转化成其他易被藻类吸收的形式^[4]。培养液中加入微量的磷酸钙，结果表明 X 菌能够利用颗粒磷(图 5)，但细菌是否对藻利用颗粒磷有协助作用尚需进一步研究。

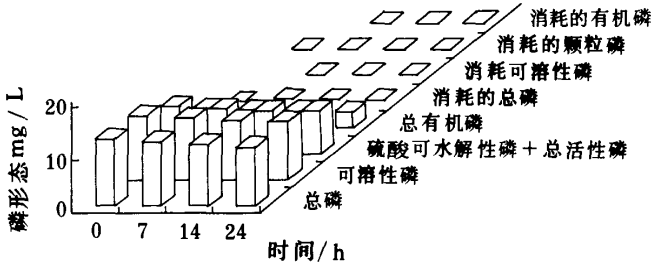


图 5 细菌对培养液中不同形态磷的吸收和利用能力

Fig.5 The Absorption of X (*Pseudomonas* sp.) on different phosphorous speciation

2.3 藻提取液对 X 菌生长的影响

在一般细菌可以生长的合成培养液中如不加入酵母膏, X 菌不能生长, 即 X 菌的生长需要外界提供生长因子。在酵母膏梯度试验中随着酵母膏浓度增加, 培养液的 OD 值也增加(图 6)。用微囊藻的提取液取代酵母膏加入培养液, 发现随着提取液量的增加, 培养液中的 OD 值也相应增加(图 7), 推测随着藻提取液的加量增加, X 菌的生物量可能还会提高, 表明微囊藻可能为附生于其胶鞘上的 X 菌提供了生长所需的生长因子(甚至其它营养物质)。

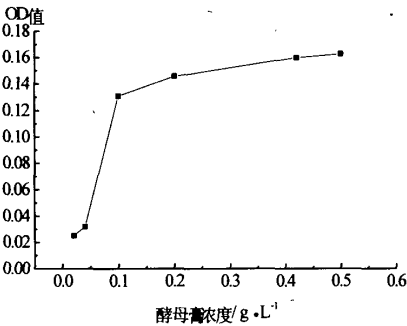


图 6 酵母膏浓度对 X 菌生长的影响

Fig.6 Effect of yeast Extract on the growth of X (*Pseudomonas* sp.)

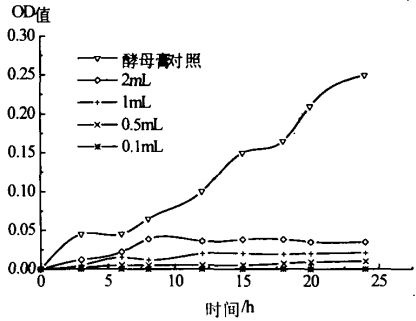


图 7 藻提取液对 X 菌生长的影响

Fig.7 Effect of algae Extract on the growth of X (*Pseudomonas* sp.)

3 结论

(1) 假单胞菌 X 菌株能利用各种形态的磷, 也能利用颗粒磷, 在无机磷、有机磷同时存在时, 优先利用无机磷。

(2) 磷酸盐含量对 X 菌生长的影响不大, 高浓度 ATP 对 X 菌株有抑制作用, 且 ATP 浓度越高抑制作用越强。

(3) 藻提取液能代替酵母膏提供 X 菌株生长所需的生长因子等营养物质。

参 考 文 献

- 1 周子元, 罗 屿等. 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
- 2 赵以军, 刘永定. 有害藻类及微生物防治的基础——菌藻关系的研究动态, 水生生物学报, 1996, 20(2): 174 - 180
- 3 Caiola M G, Pellegrini S. Lysis of *Microcystis Aeruginosa* by Bdellovibrio-like Bacteria. *J Phycol*, 1984, 20: 471 - 475
- 4 吴重华, 王晓蓉等. 羊确定月芽藻的生长与湖水中几种磷形态关系模型的建立, 环境化学, 1997, 16(4): 341 - 347
- 5 李勤生, 华 俐. 武汉东湖细菌种群结构的研究, 水生生物学报, 1989, 13(4): 340 - 347
- 6 美国公共卫生协会等编. 水和废水标准检验方法. 第 15 版. 北京: 中国建筑工业出版社, 1985
- 7 夏 琪, 姜卫红. 细菌磷代谢的分子调控. 微生物学通报, 1998, 25(5): 281 - 283

On the Growth and Phosphorous Metabolism of Bacterium Isolated from *Microcystis aeruginosu* in Taihu Lake

LIU Lingli¹ GU Yufei¹ LUO Yu¹ MA Wenyi¹
ZHOU Ziyuan² CAI Houjian²

(1: State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse,

School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China;

2: Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P. R. China)

Abstract

Phosphorous is one of the key elements that lead to eutrophication. *Pseudomonas* sp. (X strain) was isolated from *Microcystis aeruginosu* in Taihu Lake. A group of test was designed to study the growth and phosphates [$K_2HPO_4 + KH_2PO_4(1:1)$], organic phosphates (ATP), phosphorus fraction and growth factor. The results showed that the growth of X strain was not affected by inorganic phosphates and restrained by ATP. The strain preferred inorganic phosphorus to organic one when both available. X strain made use of particular phosphorus and extracted of algae that substituted for yeast extracts as growth factor.

Key Words Adhesive bacteria, *Pseudomonas* sp., phosphorus metabolism, phosphorus fraction, Taihu Lake