

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.10.009

1 株抑制铜绿微囊藻生长的放线菌的分离鉴定^①

徐耀波^{1,3}, 谢洁¹, 潘国庆¹, 周泽扬^{1,2}

1. 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716;

2. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047; 3. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715

摘要:近年来,有害藻类在天然水体中暴发,引起严重的水华现象,是造成环境污染的重要原因.微生物除藻因具有较高的除藻效力且对环境友好,已成为防治蓝藻水华的新研究方向.从西南大学校园内富营养化景观池塘岸边的土壤中分离得到了 1 株放线菌 F913,该菌株的发酵液能够明显抑制引起水华现象的有害蓝藻——铜绿微囊藻 FACHB-905 菌株的生长.根据 F913 菌株在鉴别培养基上的培养特征、菌体形态特征、生理生化特性以及 16S rDNA 序列分析结果,将 F913 菌株鉴定为马来西亚链霉菌(*Streptomyces malaysiensis*).该研究结果为进一步利用该菌株开展有害蓝藻的生物防治奠定了前期基础.

关键词:铜绿微囊藻;抑制;放线菌;分离;鉴定

中图分类号: Q939.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)10-0057-05

有害藻类在天然水体中的暴发日益严重,已经成为全球瞩目的环境灾害.我国太湖、滇池等兼具自然与人文特色的水体环境也深受有害藻类的严重影响.过量繁殖的水华藻类严重恶化水质,影响水体的生态、渔业、景观,甚至威胁到饮用水的安全^[1].目前尚无有害藻类防控的有效方法,因而研究和开发安全、高效、廉价的水华控制技术是我国乃至世界急需解决的重大环境问题.

微生物除藻主要是研究利用细菌、放线菌、真菌对藻类的生长竞争和代谢产物的抑制作用,以及蛭弧菌和噬藻体对藻类的寄生作用达到微生物控制藻类过度生长的目的,这些微生物被统称为溶藻微生物^[2].微生物除藻具有较高的除藻效力且对环境友好,有关溶藻微生物的研究已成为防治蓝藻水华的一个新方向.

为获得可用于藻类生物防治的微生物,本研究从西南大学校园内富营养化景观池塘岸边土壤中分离微生物,以有害蓝藻——铜绿微囊藻为靶标,筛选溶藻微生物,获得 1 株对铜绿微囊藻生长具有显著抑制作用的放线菌,编号为 F913,并进一步对 F913 菌株进行了分类鉴定和溶藻效率的检测.论文研究结果为深入研究该菌株溶藻机理及利用该菌株进行有害蓝藻的生物防治奠定了坚实的前期研究基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品

土壤样品采集自西南大学校园内富营养化景观池塘岸边.

① 收稿日期: 2015-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270091);西南大学基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2014C156);家蚕基因组生物学国家重点实验室开放课题(SKLSGB2013025);西南大学基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2014C155).

作者简介: 徐耀波(1977-),男,湖北襄阳人,博士研究生,讲师,主要从事应用微生物的研究.

1.1.2 供试菌株

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* FACHB-905), 购自中国科学院淡水藻种库。

1.1.3 培养基

放线菌分离、纯化培养采用高氏 1 号固体培养基^[3], 放线菌的发酵采用高氏 1 号液体培养基, 铜绿微囊藻培养采用 BG11 液体培养基^[4], 放线菌培养特征及形态特征鉴别培养基采用国际链霉菌计划(ISP)指定的 7 种培养基^[5]: 酵母膏麦芽糖汁琼脂培养基(ISP-2), 燕麦粉琼脂培养基(ISP-3), 无机盐淀粉琼脂培养基(ISP-4), 甘油天冬素琼脂培养基(ISP-5), 高氏 1 号培养基, Czapck 培养基和马铃薯浸汁培养基. 放线菌生理生化特征所用培养基^[6-7]为: 明胶液化培养基, 牛奶凝固与胨化培养基, 淀粉水解琼脂培养基, 纤维素水解培养基, H₂S 产生培养基, 碳源利用的基础培养基(选用的碳源分别有 L-阿拉伯糖, D-木糖, D-葡萄糖, D-果糖, L-鼠李糖, 蔗糖, 棉子糖, D-甘露醇以及 L-肌醇)。

1.2 方法

1.2.1 放线菌的分离纯化

放线菌的分离使用高氏 1 号培养基, 采用梯度稀释涂平板法^[3], 纯化采用划线分离法^[3]。

1.2.2 铜绿微囊藻的培养

铜绿微囊藻培养条件为 25 °C, 光照强度 2 000 lx, 光暗比为 14 : 10, 采用 BG11 液体培养基, 培养至对数生长期时, 用新鲜 BG11 培养基稀释, 采用血球计数板计数^[3], 调节藻细胞浓度至 10⁶ 个/mL 备用。

1.2.3 抑制蓝藻生长效果的检验

将纯化后的分离株接种于装有 50 mL 高氏 1 号液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C, 180 r/min, 摇瓶培养 7 d 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL 接种于装有 24 mL 指数生长期的铜绿微囊藻培养液的试管中, 对照组加入经 121 °C 灭菌处理后的发酵液, 空白对照组加入 BG11 培养基, 光照培养 7 d 后观察藻细胞的生长情况, 采用血球计数板计数藻细胞浓度, 然后计算溶藻率。

$$\text{溶藻率} = (C_C - C_T) / C_C \times 100\%$$

C_C 表示对照组藻细胞浓度, C_T 表示处理组藻细胞浓度。

1.2.4 溶藻微生物的分类鉴定

1.2.4.1 形态及生理生化鉴定

将纯化后的分离株接种于国际链霉菌计划(ISP)指定的 7 种培养基上, 28 °C 培养, 在第 3 d, 7 d, 30 d 观察记录菌株的培养特征^[5]; 菌体形态观察采用埋片法^[7]培养 7 d, 用 0.1% 美蓝染色, 油镜观察; 生理生化鉴定方法参考文献^[6-7]。

1.2.4.2 放线菌 DNA 提取, 16S rDNA 序列 PCR 扩增及系统发育树的构建

采用北京庄盟国际生物基因科技有限公司的细菌基因组 DNA 小量提取试剂盒提取放线菌 DNA, 采用细菌 16S rDNA 基因扩增通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-GGTTACCT-TGTTACGACTT-3') 扩增. PCR 采用北京庄盟生物基因科技有限公司生产的 2×TaqPCR MasterMix(含染料)型号为 Catalog# ZT201, 采用 50 μL 体系, 包括 25 μL 2×MasterMix, 2.0 μL 模板 DNA, 1.0 μL 27F 引物(10 μmol/L), 1.0 μL 1492R 引物(10 μmol/L), 然后补充 dd H₂O 至 50 μL. 扩增条件: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min. PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送华大基因生物技术有限公司进行测序, 根据测序结果在 NCBI 网站上进行序列比对, 采用 Clustal W 1.81 软件进行多序列比对, 并通过 MEGA4.1 软件构建系统进化树^[7-8]。

2 结果与分析

2.1 放线菌的分离筛选与溶藻效果检验

从土壤样品中共分离获得 26 株放线菌, 抑菌检测结果表明, 编号为 F913 的菌株发酵上清液对铜绿微囊藻的生长具有很强的抑制作用如图 1, 加入发酵液 7 d 后, 溶藻率可达 98.3%, 并且溶藻效果可持续 30 d 以上.

2.2 菌株 F913 的分类鉴定

2.2.1 形态特征

菌株 F913 在高氏 1 号培养基上, 菌落初期为白色, 随着孢子的形成, 菌落逐渐转变为灰白色, 菌落最终颜色为灰色, 不产生水溶性色素. 菌株 F913 的气生菌丝较发达, 孢子丝呈螺旋形, 如图 2 所示. 菌株 F913 在多种鉴别培养基上均生长良好, 菌落初期均为白色, 随着孢子的形成, 菌落逐渐转变为灰白色, 菌落最终颜色为灰色, 在所试培养基上均不产生水溶性色素, 其培养特征如表 1 所示.

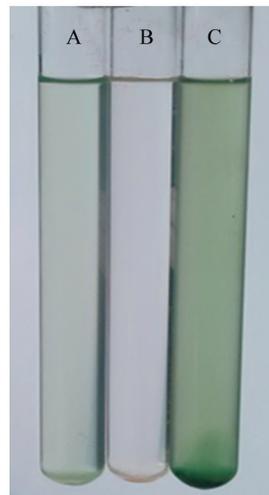


图 1 菌株 F913 发酵液的溶藻效果
A: 加入 1 mL BG11 培养基的空白对照, B: 加入 1 mL F913 发酵液, C: 加入 1 mL 经 121 °C 灭菌处理的 F913 发酵液.

图 1 菌株 F913 发酵液的溶藻效果

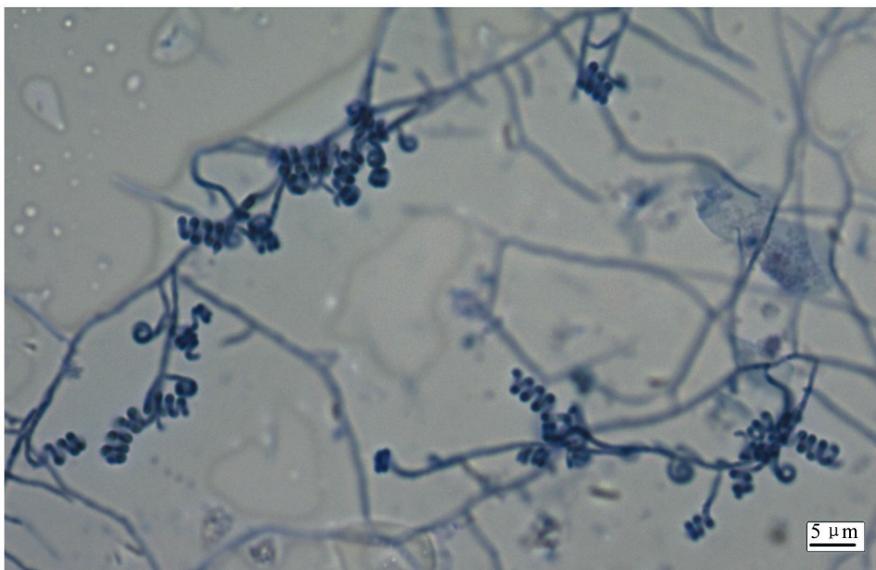


图 2 菌株 F913 孢子丝形态

表 1 菌株 F913 的培养特征

培养基	生长状况	气生菌丝	基内菌丝	水溶性色素
ISP-2	+++	白色、灰色	黄色	无
ISP-3	++	白色、灰色	白色	无
ISP-4	++	白色、灰色	黄色	无
ISP-5	+	白色、灰色	白色	无
高氏 1 号	+++	白色、灰色	黄色	无
Czapek	++	白色、灰色	白色	无
马铃薯浸汁	+++	白色、灰色	浅黄色	无

2.2.2 生理生化特征

在所试的 9 种碳源培养基中的碳源菌株 F913 均可利用, 它还能分泌淀粉酶水解淀粉, 能分泌纤维素酶水解纤维素, 能够使牛奶凝固, 但不能使明胶液化, 菌株 F913 各种酶的活性及对碳源的利用情况如表 2 所示.

表 2 放线菌 F913 菌株的生理生化特征

生化试验	结果	生化试验	结果
L-阿拉伯糖	+	蔗糖	+
D-木糖	+	棉子糖	+
D-葡萄糖	+	明胶液化	-
D-果糖	+	牛奶凝固与胨化	+
L-鼠李糖	+	淀粉水解	+
D-甘露醇	+	纤维素水解	+
L-肌醇	+	H ₂ S 产生	-

2.2.3 16S rDNA 序列分析结果

通过对菌株 F913 的 16S rDNA 序列的扩增、测序, 获得该基因 1391bp 的序列, 提交该序列至 GenBank 数据库, 其登录号为 KP338102. 将该序列与 GenBank 中的序列进行在线比对, 结果表明其与多株 *Streptomyces malaysiensis* 的 16S rDNA 基因序列同源性高达 100%, 基于 16S rDNA 的系统发育结果表明 F913 菌株与登录号为 NR041410 的 *Streptomyces malaysiensis* NBRC 16446 菌株在系统发育树中处于同一最小分支, 如图 3 所示.

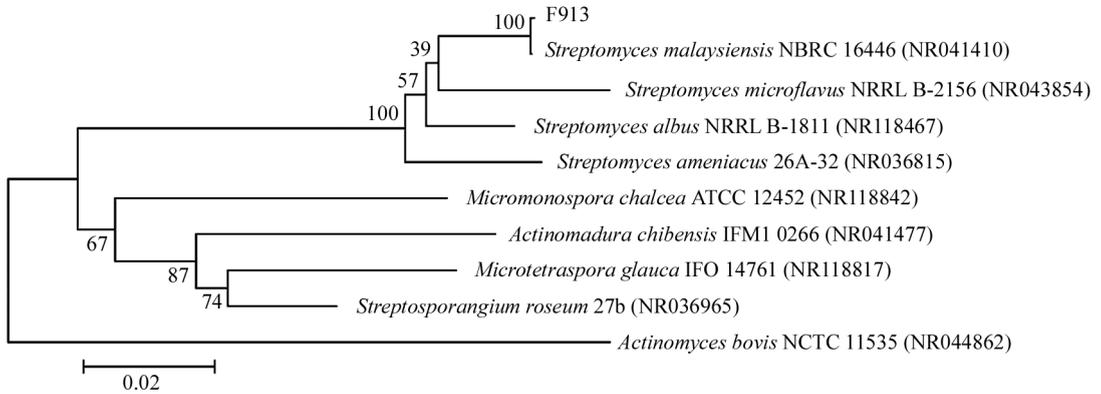


图 3 F913 菌株基于 16S rDNA 的系统发育树

结合菌株 F913 的形态特征、培养特征、生理生化反应特征, 以及基于 16S rDNA 序列的系统发育分析结果, 将菌株 F913 鉴定为马来西亚链霉菌(*Streptomyces malaysiensis*).

3 讨论

马来西亚链霉菌是 Amira 1999 年从来自马来西亚的土壤中分离并确立的放线菌新种^[9], 目前对该菌株的抑菌活性研究还不多. 据报道, 仅从该菌株代谢物中分离出了一种新化合物 Malayamycin, 该化合物能够明显抑制颖枯壳针孢(*Stagonosporanodorum*)的生长, 可用于防治小麦颖枯病^[10]. Cheng 等^[11]2010 年报道首次从 1 株马来西亚链霉菌发酵液中分离出了阿扎霉素复合物, 具有抑制多种植物病原真菌生长的作用. 管章玲等^[12]发现马来西亚链霉菌对小麦赤霉病病原菌禾谷镰刀菌具有明显的抑制作用. 杨佩文等^[13]从 1 株拮抗植物病原真菌的马来西亚链霉菌的发酵液中分离出了阿扎霉素 F3, F4 和尼菲霉素. 刘为营等^[14]发现 1 株编号为 1161 的马来西亚链霉菌对多种革兰氏阳性细菌具有抑菌活性, 并从该菌株的发酵液中分离出了阿扎霉素 F4 和 F5. Zheng 等^[15]从海边红树林土壤中分离出了 1 株马来西亚链霉菌, 发现该菌株的发酵液能够高效专一地杀灭有害赤潮藻-球形棕囊藻, 可用于治理赤潮, 他们于 2011 年申请了 1 项以马来西亚链霉菌的发酵液制备强效抑藻活性化合物——尼日利亚菌素的专利, 专利号为: 201110067581. 但是目前, 尚未有人报道马来西亚链霉菌具有抑制水华蓝藻——铜绿微囊藻生长的作用, 本研究为研究利用马来西亚链霉菌治理蓝藻水华奠定了基础.

参考文献:

- [1] JENNIFER D H, JANA A, KAREL A C. Are Interactive Effects of Harmful Algal Blooms and Copper Pollution a Concern for Water Quality Management [J]. Water Research, 2014, 60(9): 41-53.

- [2] 倪兆林, 申元英. 溶藻微生物净化富营养化水体的作用 [J]. 微生物学通报, 2014, 41(1): 156—160.
- [3] 周德庆. 微生物学实验教程 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [4] ROSMARIE R, JOSETTE D, JOHN B W, et al. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria [J]. Journal of General Microbiology 1979, 111(3): 1—61.
- [5] SHIRLING EB, GOTTLIEB D. Methods for Characterization of *Streptomyces species* [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313—340.
- [6] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1975.
- [7] 阮继生, 黄 英. 放线菌快速鉴定与系统分类 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [8] 徐丽华, 李文均, 刘志恒. 放线菌系统学——原理、方法及实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [9] AMIRA AT, BONGCHEOL K, SEUNG B K, et al. *Streptomyces malaysiensis* sp. nov., a New Streptomyces Species with Rugose, Ornamented Spores [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(4): 1395—1402.
- [10] LI W F, MICHAEL C, ANDREW C, et al. Malayamycin, a New Streptomyces Antifungal Compound, Specifically Inhibits Sporulation of *Stagonosporanodorum* (Berk) Castell and Germano, the Cause of Wheat Glume Blotch Disease [J]. Pest Management Science, 2008, 64(12): 1294—1302.
- [11] CHENG J H, YANG S H, SASIKUMAR A P, et al. Azalomycin F Complex is an Antifungal Substance Produced by *Streptomyces malaysiensis* MJM1968 Isolated from Agricultural Soil [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010, 53(5): 545—552.
- [12] 管章玲, 辛海峰, 李建宏, 等. 小麦赤霉病拮抗菌的筛选及应用 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28(2): 309—313.
- [13] 杨佩文, 赵江源, 李铭刚, 等. 马来西亚链霉菌 ECO 00002 产生的阿扎霉素 F3、阿扎霉素 F4 和尼菲霉素: 分离纯化、结构解析及其抗植物病原真菌活性 [C]. 杭州: 第八届全国新农药创制学术交流会议论文集, 2009: 352—362.
- [14] 刘为营, 殷 瑜, 钱秀萍, 等. 放线菌 1161 代谢产物分离纯化及其菌种鉴定 [J]. 药物生物技术, 2011, 18(4): 322—327.
- [15] ZHENG X W, ZHANG B Z, ZHANG J L, et al. A Marine Algicidal actinomycete and Its Active Substance Against the Harmful Algal Bloom Species *Phaeocystis globosa* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(20): 9207—9215.

Isolation and Identification of an Actinomycete Strain with Algicidal Activity Against *Microcystis aeruginosa*

XU Yao-bo^{1,3}, XIE Jie¹, PAN Guo-qing¹, ZHOU Ze-yang^{1,2}

1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. College of Bioscience, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China;

3. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In recent years, harmful algae outbreaks have often occurred in natural water bodies, causing serious water blooms, which is an important cause of environmental pollution. Algicidal microbes can remove algae with high effectiveness and are friendly to the environment. Therefore, it has become a new research direction to control cyanobacteria blooms with algicidal microbes. In a study reported herein, an Actinomycete strain, F913, was isolated from the shoreside soil of the eutrophic pond in Southwest University, which showed high algicidal activity against *Microcystis aeruginosa* FACHB-905, the harmful alga causing algal blooms. Based on the its cultural characteristics and the results of physio-chemical tests and 16S rDNA sequence analysis, strain F913 was identified as *Streptomyces malaysiensis*. Furthermore, the obtained results in this article may be potentially useful for bio-control harmful algal blooms through this strain.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; inhibition; actinomycetes; isolation; identification

