

DOI: 10.3969/j.issn.2095-3704.2013.01.014

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

王琼¹, 瞿建宏², 张骞月¹, 吴伟^{1,2*}

(1. 南京农业大学 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: 以一株侧孢芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) 为试验菌株, 研究其对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 的抑制效应, 并将其应用于水产养殖富营养化水体中, 进行蓝藻水华的生态控制。结果表明, 侧孢芽孢杆菌可以抑制铜绿微囊藻的生长, 使其叶绿素 a 的含量显著下降, 从而抑制了其光合作用的活性, 达到限制铜绿微囊藻细胞增殖的目的。这种抑制作用与侧孢芽孢杆菌的细菌含量成正比, 初始接种的菌体浓度越高, 抑制作用越强, 且这种限制作用在菌藻接触后的 8~10 d 较为显著。将活菌数 $\geq 10^8$ 个/mL 的侧孢芽孢杆菌按 0.50、1.00 mg/L 的用量加入淡水池塘养殖的富营养水体, 在 60 d 内不仅可使养殖水体中的 TN、TP 和高锰酸盐指数有所下降, 同时还可显著抑制藻类的数量, 增加藻类的种类, 提高养殖水体中藻类的 Shannon-Weaver 多样性指数, 较好地调节藻类群落结构。研究显示, 侧孢芽孢杆菌因具有较强的抑藻能力, 在生物修复养殖富营养化水体的水生生态系统方面有着良好的应用前景。

关键词: 侧孢芽孢杆菌; 铜绿微囊藻; 抑制; 养殖水体; 水华

中图分类号: X52 文献标志码: A 文章编号: 2095-3704 (2013) 01-0061-05

The Algal Inhibiting Effect of *Brevibacillus laterosporus* and Its Ecological Prevention and Control for Algae Blooms in Aquaculture Water

WANG Qiong¹, QU Jian-hong², ZHANG Qian-yue¹, WU Wei^{1,2*}

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

Abstract: Choosing *Brevibacillus laterosporus* to research the algal inhibiting effect for *Microcystis aeruginosa*, and applied it to the eutrophic water for algae blooms ecological control. The result showed that *Brevibacillus laterosporus* could control the growth of *Microcystis aeruginosa* which made the content of chlorophyll a dropping significantly and so as to restrain their photosynthetic activity, and it also limited the cell proliferation of *Microcystis aeruginosa*. The inhibiting effect was proportional to the content of *Brevibacillus laterosporus* which indicated that concentration was higher, the stronger inhibition especially after 8~10 days the algae contacting with bacteria. Adding the viable count with greater than or equal to 10^8 CFU/mL to the eutrophic water according to 0.50, 1.00 mg/L, which not only can make the total nitrogen, total phosphorus and Permanganate index down in 60 days, but also can significantly inhibit the number of algae, increasing the types

收稿日期: 2013-01-17

基金项目: 农业科技成果转化资金项目(2012GB23260567)和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, 女, 硕士生, 主要从事渔业生态环境保护研究; 通讯作者: 吴伟, 研究员, 主要从事污染生态学及环境生物学的研究, E-mail: wuw@ffrc.cn。

of algae, improve the algae Shannon-Weaver diversity index in aquaculture water, and control better for algae community structure. This study showed that *Brevibacillus laterosporus* had strong algal inhibiting ability and a good application prospect in aquatic ecological system for bioremediation of eutrophic water.

Key words: *Brevibacillus laterosporus*; *Microcystis aeruginosa*; inhibition; aquaculture water; algae blooms

随着水体富营养化的加剧,有害藻类水华的暴发日趋频繁。研究表明^[1],我国目前66%以上的湖泊、水库处于富营养化的水平,其中重富营养和超富营养占22%,使得富营养化成为我国目前与今后相当长一段时期内的重大水环境问题。近年来,太湖、滇池、巢湖等富营养化湖泊相继出现大面积的蓝藻水华暴发,以产毒的微囊藻水华最为常见,造成严重的环境污染、健康危害和经济损失。而对于养殖水体而言,适度的富营养是维持水体生产力,保证养殖生物健康生长的基础。但如果暴发蓝藻水华,使得藻类大量堆积、死亡及分解,可导致水质的恶化,危害养殖生物。因此探求有效的藻类水华防治途径势在必行。

富营养化水体水生生态系统的生态修复可以从控制藻类繁殖和调整藻类群落结构方面着手,使整个水生生态系统趋于平衡并向良好的方向发展。国外相关研究表明,水华的迅速消退可能与水体中某些具有抑藻作用的细菌感染有关^[2-4],抑藻细菌的抑藻作用已引起广泛的关注^[5-7]。抑藻细菌在水生生态系统中能将微型藻类种群密度调节到一个适当的程度,对维持藻类生物量的平衡具有非常重要的作用^[8]。然而,抑藻细菌对养殖水生生态系统中藻类群落结构的影响研究尚未见报道。为此,本试验以实验室分离所得的一株侧孢芽孢杆菌为试验菌株,研究了其对蓝藻水华的主要种类—铜绿微囊藻的抑制效应,并将其投入富营养化的水产养殖水体,研究其对水质营养盐水平和水体藻类群落结构的影响,探讨利用其修复富营养化养殖水体生态环境的前景。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用侧孢芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*)由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心环境保护研究室分离鉴定提供;试验用铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*, FACHB 905),由中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心提供。

1.2 仪器与试剂

蛋白胨,牛肉膏,北京陆桥技术有限责任公司产品;氯化钠,硝酸钠,磷酸氢二钾,硫酸镁,氯化钙,柠檬酸,柠檬酸铁铵,EDTA,碳酸钠,硼酸,氯化锰,硫酸锌,硫酸铜,钼酸钠,硝酸钴,N-(1-萘基)-乙二胺盐酸盐,氨基磺酸,钼酸铵,氯化亚锡等均为分析纯,国药集团上海试剂厂产品。

所用仪器有 SIGMA 2-16K 低温冷冻离心机, GL-22 MS 高速冷冻离心机, ZHJH-1214 双面气流式无菌工作台, TOMY Autoclave SS-325 型全自动高压灭菌器, SANYO MIR-153 型高低温恒温培养箱, QHZ-98B 全温度光照震荡培养箱, ZHWY 200B 恒温振荡摇床, METTLER AL204 电子分析天平, UV-1200 紫外-可见分光光度计, Nikon 90i 光学显微镜, BUCHI K370 自动定氮仪, PHS-3TC 数显 pH 计, YSI 溶氧仪, XW-80A 漩涡混合器等。

1.3 侧孢芽孢杆菌的抑藻效应

1.3.1 侧孢芽孢杆菌菌液和铜绿微囊藻藻液的制备

从试管斜面上取侧孢芽孢杆菌菌苔一环,接种到 150 mL 灭菌的液体肉汤培养基中,于 30 °C、120 r/min 摇床上培养 24 h 备用(活菌数约为 2×10^8 CFU/mL)。液体肉汤培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 5 g/L, NaCl 5 g/L,调 pH7.0~7.2, 121 °C 灭菌 20 min。铜绿微囊藻接种入装有 200 mL 灭菌 BG11 培养基^[6]的 500 mL 三角瓶中,于 28 °C、2 500 lx 光照及光暗比为 12 h:12 h 的条件下培养 4 d,取对数生长期的藻液备用(藻细胞约为 2×10^6 cell/mL)

1.3.2 侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻生长的抑制效应

分别取 5、10、20 mL 侧孢芽孢杆菌菌液经 10 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,将沉淀用 5 mL 灭菌的肉汤培养基重新悬浮后加入到 45 mL 铜绿微囊藻藻液中,于 28 °C、2 500 lx 光照及光暗比为 12 h:12 h 的条件下培养。试验设空白对照组和培养基对照组各 1 个。空白对照组为 45 mL 铜绿微囊藻藻液加 5 mL 灭菌的 BG11 培养基,培养基对照组为 45 mL 铜绿微囊藻藻液加 5 mL 灭菌的肉汤培养基。每组设 3 个平行,每隔 48 h 分别测定铜绿微囊藻藻液的

叶绿素含量。

叶绿素 a 的测定采用丙酮法^[9],藻的去除率 R 定义为: $R=(C_0-C_e)/C_0$, 式中: C_0 为空白对照组铜绿微囊藻叶绿素 a 的含量, $\mu\text{g/L}$; C_e 为处理样铜绿微囊藻叶绿素 a 的含量, $\mu\text{g/L}$ 。

1.4 侧孢芽孢杆菌对养殖水体中蓝藻水华的生态防控

试验于 2012 年 7 月—9 月在江苏无锡的某鱼类养殖场的养殖池塘内进行,共 5 个池塘。每个养殖池的面积为 $13\,340\text{ m}^2$,水深为 1.5 m,水温 $29.2\sim 32.1\text{ }^\circ\text{C}$ 。设对照池 1 个,试验池 2 个。对照组中不加侧孢芽孢杆菌菌液,而 2 个试验组中菌液(活菌量 $\geq 10^8$ 个/mL)用量分别为 0.50 mg/L , 1.0 mg/L (经毒性试验,侧孢芽孢杆菌在 $10\,000\text{ mg/L}$ 以下对养殖生物无毒性,对养殖生态具有安全性),每个试验组做 2 个平行。每 10 d 使用 1 次侧孢芽孢杆菌菌液,分别在试验开始、试验后 30 d 和 60 d 时取样测定 TN、TP、高锰酸盐指数和叶绿素 a 的浓度和藻类的组成与数量^[10],以了解侧孢芽孢杆菌对养殖水体中蓝藻

水华的控制。采用 Shannon-Weaver 多样性指数分析藻类群落结构的变化。Shannon-Weaver 多样性指数表达式为:

$$H = \sum_{i=1}^S (n_i/N) \log_2(n_i/N) \quad (1)$$

(1)式中: H 为 Shannon-Weaver 多样性指数; N 为藻类总个体数或细胞数,单位:个; n_i 为第 i 种藻类的个体数或细胞数,单位:个; S 为总的藻类种数,单位:个。试验共进行 60 d,期间不换水,并且 5 个塘中鱼类养殖密度和管理水平均严格一致。试验结果使用 SPSS 软件进行差异显著性分析, $P<0.05$ 表明差异显著, $P<0.01$ 表明差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 侧孢芽孢杆菌的抑藻效应

不同添加量的侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻的抑制效应详见表 1。

表 1 侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻的抑制效应

试验分组	不同时间铜绿微囊藻的叶绿素含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$					
	0 d	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d
空白对照组	2 120	2 350	2 600	3 000	2 960	2 800
培养基对照	2 120	2 380	2 720	3 020	2 880	2 720
5 mL 试验组	2 120	2 330	2 100*	1 875**	1 480**	1 020**
10 mL 试验组	2 120	2 300	1 897*	1 576**	1 236**	858**
20 mL 试验组	2 120	2 200	1 648**	1 246**	968**	636**

注:表中数据均以平均值表示,*表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$ 。

由表 1 可知,在试验的 10 d 时间内,空白对照组的铜绿微囊藻在前 6 d 呈生长态势,其叶绿素含量由初始的 $2\,120\text{ }\mu\text{g/L}$ 增加至 $3\,000\text{ }\mu\text{g/L}$,从 8 d 后开始下降,10 d 时为 $2\,800\text{ }\mu\text{g/L}$ 。添加肉汤培养基的对照组在试验前 6 d 的生长稍快于空白对照组,8 d 后的下降率也比空白对照组略高,但均无显著性差异,表明肉汤培养基在 10 d 的试验时间内对铜绿微囊藻无影响。而添加了 5、10、20 mL 侧孢芽孢杆菌菌液(即藻液中含菌数为 $1\times 10^9/\text{CFU}$ 、 $2\times 10^9/\text{CFU}$ 和 $4\times 10^9/\text{CFU}$)的试验组中,试验前 2 d 铜绿微囊藻有一定的增长,其中 5 mL 和 10 mL 试验组与空白对照组相接近,20 mL 试验组要略低于空白对照组,但无显著性差异。3 个浓度试验组在试验 2 d 后叶绿素

含量开始下降,至试验第 10 d 时,5 mL 侧孢芽孢杆菌试验组的铜绿微囊藻叶绿素较初始时下降了 51.89%,而 10、20 mL 试验组则下降了 59.53% 和 70.00%,表明在一定条件下,侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻具有明显的抑制作用。侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻的抑制具有显著的浓度-效应关系,即菌液添加量越多抑制效果越明显。这是因为随着添加量的增大,藻液中芽孢杆菌的活菌数或菌体代谢产物增加,抑藻能力就会增大。

据报导^[8],抑藻细菌的作用方式一般分为两种:一是直接抑藻,即直接进攻宿主,它需要细菌与藻细胞直接接触,甚至侵入藻细胞内;二是间接抑藻,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抑藻^[11-12]。从本研究可以看出，侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻的叶绿素a含量有显著影响，而叶绿素是藻细胞中光能的吸收和传递者，其含量的降低会使光合作用受到影响，表明光合系统极有可能是侧孢芽孢杆菌对铜绿微囊藻的抑制位点之一。因此，藻类的光合系统是很敏感的生态位点，极易受到抑藻细菌的攻击。至于这种影响是细

菌本身还是其分泌产物所导致，则需作进一步的研究和探讨。

2.2 侧孢芽孢杆菌对养殖水体中蓝藻水华生态防控

为了更好地了解侧孢芽孢杆菌对水产养殖水体中蓝藻水华的控制能力，于2012年夏天在蓝藻暴发性生长阶段，在淡水养殖池塘中进行了长达60 d的生态防控试验，试验结果见表2。

表2 侧孢芽孢杆菌对淡水养殖池塘水体生态环境的控制

侧孢芽孢杆菌的用量/(mg·L ⁻¹)	试验时间/d	水体中的质量浓度/(mg·L ⁻¹)				藻类情况	
		DO	TN	TP	高锰酸盐指数	种类/种	生物量/(10 ⁵ ·L ⁻¹)
0	0	6.95	1.082	0.080	5.75	26	128
	30	5.50	0.098	0.029	5.05	24	382
	60	4.90	0.307	0.025	6.25	21	1536
0.50	0	7.02	1.106	0.078	5.68	26	132
	30	6.45	0.746	0.033	4.14	24	207
	60	5.70	0.288	0.031	5.52	23	1045
1.00	0	7.00	1.137	0.085	5.72	26	125
	30	6.85	0.086	0.047	3.88	28	186
	60	6.02	0.256	0.042	4.85	28	658

由表2可知，在试验的60 d时间内，对照组藻类的种类由26种减少为21种，蓝藻中的铜绿微囊藻成为优势种，藻类数量由128×10⁵ cell/L增加至1536×10⁵ cell/L，增加了1100%，水体出现蓝藻水华。而使用了0.50~1.00 mg/L侧孢芽孢杆菌的试验组，其藻类数量仅增加了691.6%和426.4%，显著低于对照组(P<0.01)。水体的富营养化程度明显改善，浮游植物的生物多样性有所增加，藻类种类数为23种和28种，高于对照组。同时，这种改善的效果也可从水质指标上反映出来。试验过程中，DO水平维持在4.90~7.02 mg/L，属中等水平，对照组和2个试验组随着试验时间的延长有下降的趋势，试验后期试验组较对照组高，存在显著性差异(P<0.05)。DO的变化说明，虽然对照组藻类数量增加很快，光合作用能力增强，但随着藻类的老化和呼吸作用的增加，水体中的DO反而有所降低，体现出水体衰老的态势。TN在试验过程中呈下降趋势，试验组的下降率要高于对照组。虽然试验组的藻类受侧孢芽孢杆菌的抑制有所下降，其利用氮的能力有所减弱，但由于菌体本身在代谢中需要消耗氮源，因此试验组TN的下降仍高于对照组。而TP

则不同，因试验组限制了水体水华的发展，故藻类对磷的利用下降，因此与对照组相比，试验组TP的含量较对照组略高。在高锰酸盐这一指标上，对照组因大量繁殖的藻类的衰亡，后期水体的高锰酸盐指数有所上升，上升幅度为8.70%，反之，试验组有2.82%~15.21%的下降。因此，无论从养殖水体的水质指标还是浮游植物的种类和数量上均可以看出。侧孢芽孢杆菌对养殖富营养水体中的水华具有一定的控制作用。

为了更好地了解侧孢芽孢杆菌对水体中浮游植物群落结构的影响，通过对水体中藻类的Shannon-Weaver多样性指数的计算来反映。

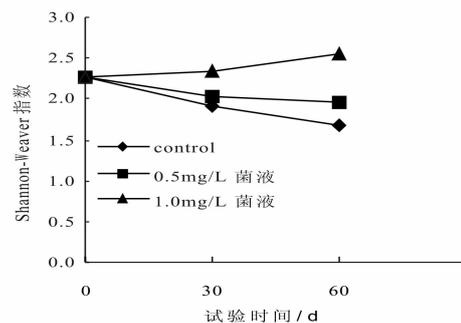


图1 养殖水体中藻类的Shannon-Weaver系数的变化

由图1可知,对照组在试验的60 d内水体中藻类的Shannon-Weaver指数由2.26降为1.68,而添加了侧孢芽孢杆菌的试验组,其水体中藻类的Shannon-Weaver指数在试验末期为1.96和2.54,明显高于对照组,表明试验组的藻类生物多样性高于对照组,群落结构较为复杂,稳定性较好。藻类是水生生态系统最主要的初级生产者,是食物链的起点,在维持整个生态系统平衡方面起着至关重要的作用,而藻类生物多样性的直接反映水体生态系统的稳定性和水质状况^[13]。在没有进行生物防控时,优势种铜绿微囊藻的快速增殖在很大程度上改变了水体藻类的群落结构,群落结构变得较为单一,稳定性变差;采用侧孢芽孢杆菌控制水华藻类后,水体藻类群落结构变得较为复杂,稳定性较好,水质维持在较好的水平,其中1.00 mg/L侧孢芽孢杆菌试验组的效果较明显。研究表明,抑藻细菌对水体藻类群落结构的影响起着主要的作用,而抑藻细菌本身作为水生生态系统中生物种群结构和功能的重要组成部分,能较好地调节藻类群落结构,在生物修复养殖富营养化水体的水生生态系统方面有着很好的应用前景。

3 结 论

(1) 侧孢芽孢杆菌可以抑制铜绿微囊藻的生长,使其叶绿素 a 的含量显著下降,从而抑制其光合作用的活性,达到限制铜绿微囊藻细胞增殖目的。这种抑制作用与侧孢芽孢杆菌的细菌含量成正比,初始接种的菌体浓度越高,抑制作用越强。一般这种限制作用在菌藻接触后的 8~10 d 较为显著。

(2) 将活菌数 $\geq 10^8$ 个/mL的侧孢芽孢杆菌按 0.50、1.00 mg/L的用量加入淡水池塘养殖的富营养水体,在60 d 内不仅可使养殖水体中的TN、TP和高锰酸盐指数有所下降,同时还可显著抑制藻类的数量,增加藻类的种类,提高养殖水体中藻类的Shannon-Weaver多样性指数,较好地调节藻类群落结构,在生物修复养殖富营养化水体的水生生态系统方面有着很好的应用前景。

参考文献:

[1] 黄漪平. 太湖水环境及其污染控制[M]. 北京: 科学出版

社, 2001: 23-25.

- [2] Lee S, Kato J, Takiguchi N, et al. Involvement of an extracellular protease in Algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28[J]. Applied Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 4334-4339.
- [3] Doucette G J, Kodama M, France S, et al. Bacterial interactions with harmful algal bloom species: Bloom ecology, toxigenesis and cytology[J]. NATO ASI Series, Series G Ecological Sciences, 1998, 41: 619-647.
- [4] Christopher G P, Tom L D. Infection, growth and community-level consequences of a diatom pathogen in a sonoran desert stream[J]. Journal of Phycology, 1993, 29(4): 442-452.
- [5] Ana M A, Maria S F, Sandra R O, et al. Identification and characterization of potentially algalytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2005, 52(3): 191-200.
- [6] 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[J]. 环境科学学报, 2005, 25(6): 796-802.
- [7] 史顺玉, 沈银武, 李敦海, 等. 溶藻细菌DC21的分离、鉴定及其溶藻特性[J]. 中国环境科学, 2006, 26(5): 587-590.
- [8] 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[J]. 水生生物学报, 1996, 20(2): 173-181.
- [9] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 134-136.
- [10] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版, 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 230-290.
- [11] Jeong S Y, Ishida K, Ito Y, et al. Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*[J]. Tetrahedron Letters, 2003, 44(43): 8005-8007.
- [12] 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[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(2): 17-22.
- [13] 孙军, 刘东艳. 多样性指数在海洋浮游植物研究中的应用[J]. 海洋学报, 2004, 26(1): 62-75.