

文章编号: 1000-5862(2020)01-0076-06

铜绿微囊藻附生细菌多样性及其溶磷活性研究

过七根,熊粟粟,肖瑶,徐常龙,张炳火*

(九江学院药学与生命科学学院,江西九江 332000)

摘要: 为了解铜绿微囊藻附生细菌的多样性及其溶磷活性,采用平板稀释涂布法分离细菌,并利用16S rRNA基因序列分析确定其分类学地位,用钼锑抗比色法检测其溶磷活性,用苯磷酸二钠法检测其磷酸酶活性。结果表明:分离的细菌分属于4个门,即放线菌门、变形菌门、拟杆菌门和异常球菌-栖热菌门;其中83%以上的细菌至少对卵磷脂、植酸钙和磷酸钙中的1种具有溶磷活性,94%以上的细菌表现出1~3种磷酸酶活性,且导致磷培养基的pH值下降。铜绿微囊藻附生细菌中存在丰富的溶磷微生物,这些微生物对藻类获取足够的可溶性磷元素可能具有重要的意义。

关键词: 铜绿微囊藻; 附生细菌; 溶磷活性; 磷酸酶

中图分类号: S 154.2; X 172 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2020.01.13

0 引言

蓝藻水华的常见种属主要有微囊藻(*Microcystis*)、鱼腥藻(*Anabaena*)、束丝藻(*Aphanizomenon*)、浮丝藻(*Planktothrix*)等,其中尤以微囊藻水华最为常见,最具危害性^[1]。铜绿微囊藻是引起水华的最常见微囊藻^[2]。本课题组从前期铜绿微囊藻 FACHB-905 培养液中分离出鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)、土壤球菌(*Agrococcus*)、贫营养杆菌(*Modestobacter*)和 *Pseudomonas* 等属的细菌,和这些细菌共培养时,铜绿微囊藻生长速率明显高于纯培养,且其中部分细菌对溶藻放线菌 *Streptomyces eurocidicus* JXJ 0089 有抑制作用^[3]。

本文研究与这株铜绿微囊藻关系密切的可培养细菌,以及它们溶解不溶性磷的能力和磷酸酶活性,为深入理解藻-菌关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

藻种: 铜绿微囊藻 FACHB-905,购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库。用 HGZ 培养基培

养,培养条件为 25℃、30~50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光暗比为 12:12^[4]。

细菌分离培养基: 葡萄糖 4 g,酵母膏粉 4 g,麦芽膏粉 5 g,琼脂 20 g, H₂O 800 mL,密度约为 5×10^7 CFU $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的藻液 200 mL, pH 值为 7.4, 121℃ 灭菌 30 min。

解磷培养基: 采用文献[5]的配方。

磷酸酶活性检测培养基: 葡萄糖 4 g,酵母膏粉 4 g,麦芽膏粉 5 g, H₂O 1 000 mL, pH 值为 7.4, 121℃ 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离纯化 采用无菌水对藻液进行梯度稀释,取适当梯度稀释液 0.2 mL 涂布于分离培养基平板上,于 28℃ 培养箱中培养 1~10 d,及时将长出的单菌落挑出,并在新鲜平板上划线分离,确认为纯培养后接种斜面培养基培养并保藏。

1.2.2 细菌 16S rRNA 基因系统发育分析 参照文献[6]进行细菌总 DNA 提取及 16S rRNA 扩增,扩增产物送检测序,测序结果与数据库 EzBioCloud database 的 16S rRNA 基因序列比较,利用软件 CLUSTAL_X1.83 将与研究菌株相似性高的菌株序列进行多重比对,利用 MEGA5 软件构建 16S rRNA 基因序列系统进化树。

收稿日期: 2018-12-16

基金项目: 国家自然科学基金(31060010),江西省科技厅课题(20111BBG70012-4),江西省环保厅科技课题(JXH-BKJ2013-14),江西省教育厅科技课题(GJJ151080)和九江学院重点课题(201511)资助项目。

作者简介: 过七根(1978-),男,江西抚州人,副教授,主要从事微生物学相关研究。E-mail: 936452840@qq.com

通信作者: 张炳火(1968-),男,江西九江人,教授,博士,主要从事蓝藻水华防治研究。E-mail: binghuozh@126.com

1.2.3 细菌解磷作用及磷酸酶活性 (i) 解磷作用. 采用点接法,将纯培养细菌接入解磷培养基平板上,培养 3~7 d 后,根据平板上溶磷圈有无和大小,判断细菌是否有解磷活性及活性强弱. 有些微生物解磷活性在固体平板上和液体培养时表现不一致^[7],因此,同时对分离的细菌进行液体解磷活性研究,将细菌悬液接入液体解磷培养基中(对照组接入等体积的无菌水),在 28 ℃、160 r·min⁻¹条件下摇床培养 5 d 后,采用钼锑抗比色法^[5]测培养液中可溶性磷含量,并用 pH 计检测培养液的 pH 值. (ii) 磷酸酶活性. 将菌株接种于磷酸酶活性检测培养基中,在 28 ℃、160 r·min⁻¹条件下摇床培养 3 d 后,采用苯磷酸二钠法^[8]检测培养液的酸性、中性和碱性磷酸酶活性. 以 1 mL 培养液 12 h 催化苯磷酸二钠产生 0.1 mg 苯酚为 1 个磷酸酶活性单位^[9]. 同时检测试验可溶性磷含量高的培养液的磷酸酶活性.

2 结果与分析

2.1 细菌分离纯化

从藻液中分离纯化到 47 株可培养细菌,其中绝大多数能够产生黄色或红色色素,少数为乳白色或半透明,多数细菌能够在不加藻液的细菌培养基中正常生长,但少数菌株必须在加有藻液的细菌培养基中才能够生长,且长势较差,如菌株 JXJ CY10.

2.2 16S rRNA 基因序列分析

经 16Sr RNA 基因序列分析,结合细菌菌落特征,将 47 株菌合并为 35 株细菌(见表 1),包括放线菌门(Actinobacteria) 16 株,分属于 6 个科 7 个属;变形菌门(Proteobacteria) 12 株,其中 α -变形菌(*Alpha-proteobacteria*) 10 株,分属于 5 个科 6 个属, γ -变形菌(*Gammaproteobacteria*) 2 株,分属于 2 个科 2 个属;拟杆菌门 5 株,分属于 3 个科 3 个属;异常球菌-栖热菌门 2 株,分属于 1 科 1 属.

表 1 分离自铜绿微囊藻 FACHB-905 培养液的 35 株细菌分类学地位

菌株编号	所属门	所属科	相似性最高的有效发表种	相似性/%
JXJCY01	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium marinilacus</i>	98.84
JXJCY06	Actinobacteria	Nocardioidaceae	<i>Nocardioides aromaticivorans</i>	98.58
JXJCY07	Actinobacteria	Intrasporangiaceae	<i>Janibacter limosus</i>	98.90
JXJCY08	Actinobacteria	Intrasporangiaceae	<i>Janibacter melonis</i>	99.38
JXJCY14	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	97.71
JXJCY15	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium saccharophilum</i>	98.78
JXJCY16	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Agrococcus terreus</i>	99.66
JXJCY19	Actinobacteria	Geodermatophilaceae	<i>Modestobacter marinus</i>	99.12
JXJCY21	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Citricoccus zhacaiensis</i>	97.84
JXJCY25	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium foliorum</i>	99.38
JXJCY29	Actinobacteria	Micrococcaceae	<i>Micrococcus flavus</i>	98.86
JXJCY33	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium pumilum</i>	97.93
JXJCY35	Actinobacteria	Nocardioidaceae	<i>Nocardioides furvisabuli</i>	99.28
JXJCY38	Actinobacteria	Nocardioidaceae	<i>Nocardioides alpinus</i>	99.12
JXJCY44	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium testaceum</i>	99.04
JXJCY46	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium testaceum</i>	99.25
JXJCY03	Alphaproteobacteria	Phyllobacteriaceae	<i>Nitrateductor indicus</i>	97.23
JXJCY09	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas melonis</i>	99.93
JXJCY10	Alphaproteobacteria	Unclassified	<i>Phreatobacter oligotrophus</i>	97.50
JXJCY11	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas hankookensis</i>	98.95
JXJCY26	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus marcusii</i>	99.93
JXJCY27	Alphaproteobacteria	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium goesingense</i>	99.51
JXJCY32	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas humi</i>	99.08
JXJCY37	Alphaproteobacteria	Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia submarina</i>	99.18
JXJCY41	Alphaproteobacteria	Hyphomicrobiaceae	<i>Devosia yakushimensis</i>	98.26
JXJCY42	Alphaproteobacteria	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas abaci</i>	99.57
JXJCY02	Gammaproteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Raoultella planticola</i>	99.93
JXJCY12	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	99.53
JXJCY04	Bacteroidetes	Cytophagaceae	<i>Spirosoma spitsbergense</i>	93.04

表 1(续)

菌株编号	所属门	所属科	相似性最高的有效发表种	相似性/%
JXJCY13	Bacteroidetes	Sphingobacteriaceae	<i>Mucilaginibacter daejeonensis</i>	96.31
JXJCY20	Bacteroidetes	Cytophagaceae	<i>Spirosoma spitsbergense</i>	93.31
JXJCY28	Bacteroidetes	Hymenobacteraceae	<i>Hymenobacter luteus</i>	99.25
JXJCY39	Bacteroidetes	Sphingobacteriaceae	<i>Mucilaginibacter polytrichastri</i>	96.15
JXJCY05	Deinococcus-Thermus	Deinococcaceae	<i>Deinococcus murrayi</i>	95.46
JXJCY43	Deinococcus-Thermus	Deinococcaceae	<i>Deinococcus wulumuqiensis</i>	99.65

2.3 细菌解磷作用

试验结果表明,在固体平板上形成溶磷圈的菌株较少,其中在植酸钙固体平板上只有菌株 JXJCY01 和 JXJCY12,在磷酸钙平板上有菌株 JXJCY01、JXJCY12、JXJCY13、JXJCY44、JXJCY46 和 JXJCY47.在液体纯培养条件下,许多菌株表现出解磷活性,但不同菌株的解磷能力差异较大,同一菌株对卵磷脂、植酸钙和磷酸钙的解磷活性也表现出较大差异(见表 2).

pH 值检测结果(见表 2)表明:卵磷脂灭菌后

pH 值由起始值 7.00 下降到 6.20 左右,即使不接菌的卵磷脂培养基 pH 值也会随培养时间的延长而下降,5 d 后下降到 4.10 左右,而植酸钙和磷酸钙培养基灭菌后 pH 值未出现明显变化,均为 7.00 左右,无菌条件下在摇床上振荡培养 5 d 后,pH 值基本维持不变.与对照组相比,接菌培养 5 d 后,28.6% 的菌株导致卵磷脂培养基 pH 值显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),所有菌株均导致植酸钙培养基 pH 值显著降低($P < 0.01$),71.4% 的菌株导致磷酸钙培养基 pH 值显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$).

表 2 35 株细菌培养液可溶性磷含量及 pH 值

菌号	可溶性磷含量/(mg · mL ⁻¹)			培养液 pH 值		
	卵磷脂	植酸钙	磷酸钙	卵磷脂	植酸钙	磷酸钙
放线菌						
JXJCY01	0.12 ± 0.47	1.98 ± 0.26	0.30 ± 0.11	4.09 ± 0.14	6.15 ± 0.05**	6.70 ± 0.08**
JXJCY06	—	—	—	4.07 ± 0.20	5.51 ± 0.11**	7.00 ± 0.05
JXJCY07	—	2.73 ± 0.32	0.52 ± 0.14	4.18 ± 0.17	5.95 ± 0.08**	6.11 ± 0.06**
JXJCY08	—	41.92 ± 0.53	0.16 ± 0.10	4.00 ± 0.15	5.57 ± 0.06**	6.19 ± 0.08**
JXJCY14	—	—	1.17 ± 0.15	4.05 ± 0.11	6.45 ± 0.06**	7.02 ± 0.03
JXJCY15	—	—	0.84 ± 0.14	3.91 ± 0.09*	6.33 ± 0.08**	6.91 ± 0.02**
JXJCY16	—	3.85 ± 0.35	—	4.15 ± 0.19	6.05 ± 0.07**	6.76 ± 0.05**
JXJCY19	0.72 ± 0.09	3.14 ± 1.27	0.27 ± 0.04	4.13 ± 0.14	6.23 ± 0.08**	6.77 ± 0.06**
JXJCY21	0.47 ± 0.17	1.09 ± 0.16	25.88 ± 1.38	4.09 ± 0.12	6.36 ± 0.12**	5.80 ± 0.04**
JXJCY25	42.78 ± 3.28	58.19 ± 1.79	181.62 ± 12.55	3.08 ± 0.12**	3.03 ± 0.07**	4.74 ± 0.06**
JXJCY29	0.51 ± 0.09	4.39 ± 0.14	51.21 ± 2.42	4.03 ± 0.14	6.02 ± 0.07**	5.32 ± 0.11**
JXJCY33	0.38 ± 0.08	0.25 ± 0.09	—	4.02 ± 0.17	6.30 ± 0.06**	6.87 ± 0.06*
JXJCY35	—	2.54 ± 0.08	—	3.83 ± 0.12*	5.35 ± 0.11**	6.83 ± 0.08*
JXJCY38	0.63 ± 0.08	34.48 ± 2.70	1.24 ± 0.21	4.00 ± 0.14	5.45 ± 0.11**	5.60 ± 0.06**
JXJCY44	0.89 ± 0.16	54.55 ± 4.12	0.40 ± 0.08	3.86 ± 0.13*	5.38 ± 0.06**	6.50 ± 0.06**
JXJCY46	1.99 ± 0.13	15.08 ± 0.57	0.14 ± 0.08	3.99 ± 0.12	5.63 ± 0.08**	6.70 ± 0.09**
变形菌门 α-变形菌						
JXJCY03	—	—	—	4.07 ± 0.12	6.71 ± 0.02**	7.01 ± 0.02
JXJCY09	—	—	—	4.18 ± 0.16	5.76 ± 0.08**	6.59 ± 0.06**
JXJCY10	—	—	—	4.12 ± 0.06	6.98 ± 0.13**	7.00 ± 0.09
JXJCY11	2.20 ± 0.18	57.05 ± 1.68	5.09 ± 0.38	3.83 ± 0.08**	5.06 ± 0.06**	5.15 ± 0.09**
JXJCY26	—	8.71 ± 0.41	14.66 ± 0.35	4.06 ± 0.11	5.37 ± 0.14**	4.90 ± 0.06**
JXJCY27	—	—	—	4.07 ± 0.10	6.04 ± 0.05**	6.51 ± 0.08**
JXJCY32	2.06 ± 0.11	70.14 ± 2.87	2.29 ± 0.24	3.97 ± 0.09	5.29 ± 0.05**	5.60 ± 0.11**
JXJCY37	—	7.89 ± 0.21	—	3.88 ± 0.10*	5.42 ± 0.06**	6.13 ± 0.10**
JXJCY41	—	—	—	4.08 ± 0.13	6.46 ± 0.06**	6.96 ± 0.04
JXJCY42	—	28.82 ± 1.25	0.31 ± 0.09	3.92 ± 0.11*	5.22 ± 0.04**	5.85 ± 0.07**

表 2(续)

菌号	可溶性磷含量/(mg · mL ⁻¹)			培养液 pH 值		
	卵磷脂	植酸钙	磷酸钙	卵磷脂	植酸钙	磷酸钙
变形菌门 γ -变形菌						
JXJCY02	0.54 ± 0.03	2.06 ± 0.05	—	4.01 ± 0.06	6.11 ± 0.16 ^{**}	6.86 ± 0.08 [*]
JXJCY12	1.64 ± 0.24	18.88 ± 1.73	14.89 ± 1.58	3.72 ± 0.10 ^{**}	5.48 ± 0.05 ^{**}	5.60 ± 0.12 ^{**}
拟杆菌门						
JXJCY04	0.86 ± 0.08	3.27 ± 0.31	—	4.17 ± 0.14	5.62 ± 0.10 ^{**}	6.97 ± 0.03
JXJCY13	3.95 ± 0.36	31.79 ± 2.89	0.52 ± 0.19	3.99 ± 0.12	4.85 ± 0.06 ^{**}	7.01 ± 0.02
JXJCY20	1.73 ± 0.08	119.48 ± 3.07	0.51 ± 0.11	4.04 ± 0.16	4.96 ± 0.07 ^{**}	6.99 ± 0.03
JXJCY28	2.19 ± 0.10	3.38 ± 0.31	2.52 ± 0.28	3.97 ± 0.05 [*]	6.22 ± 0.08 ^{**}	6.99 ± 0.04
JXJCY39	4.95 ± 0.32	4.13 ± 0.37	—	4.02 ± 0.08	5.67 ± 0.06 ^{**}	6.99 ± 0.03
异常球菌-栖热菌门						
JXJCY05	1.40 ± 0.14	0.80 ± 0.08	10.67 ± 0.74	3.97 ± 0.11	6.00 ± 0.06 ^{**}	6.37 ± 0.08 ^{**}
JXJCY43	—	6.25 ± 0.26	0.93 ± 0.17	3.94 ± 0.07 [*]	5.83 ± 0.07 ^{**}	6.83 ± 0.10 [*]

注: — 表示未检测到可溶性磷; * 和 ** 分别表示试验组与对照组在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上差异显著。

2.4 磷酸酶活性

在中性、酸性和碱性条件下,放线菌培养液 3 种磷酸酶活性检出率高达 81.25%,但缺乏高活性菌株,酶活均未超过 7.00 U · mL⁻¹(见表 3);变形菌 3 种磷酸酶活性检出率相对较低,只有 38.90%,但 JXJCY42 在碱性条件下,酶活达到(37.54 ± 2.46) U · mL⁻¹;拟杆菌门 3 种磷酸酶活性检出率为 73.30%,高活性菌株较多,在酸性条件下,JXJCY13、JXJCY28 和 JXJCY39 酶活分别为 27.90 ± 2.22、39.51 ± 1.92 和(41.71 ± 2.45) U · mL⁻¹.检测结果还显示,表 2 中可溶性磷含量较高的培养液的磷酸酶活性并不高,酶活均未超过 2.00 U · mL⁻¹.

表 3 35 株细菌培养液的磷酸酶活性 U · mL⁻¹

菌号	酸性磷酸酶	中性磷酸酶	碱性磷酸酶
放线菌			
JXJCY01	0.94 ± 0.20	1.78 ± 0.29	0.35 ± 0.12
JXJCY06	—	6.58 ± 0.49	1.16 ± 0.28
JXJCY07	0.19 ± 0.08	1.05 ± 0.20	—
JXJCY08	0.38 ± 0.00	6.21 ± 0.057	0.21 ± 0.05
JXJCY14	0.11 ± 0.05	0.30 ± 0.05	0.29 ± 0.06
JXJCY15	0.16 ± 0.12	2.69 ± 0.34	—
JXJCY16	0.03 ± 0.00	—	0.17 ± 0.06
JXJCY19	0.42 ± 0.03	0.67 ± 0.02	—
JXJCY21	0.13 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.22 ± 0.07
JXJCY25	—	4.60 ± 0.68	—
JXJCY29	0.97 ± 0.09	0.13 ± 0.05	0.06 ± 0.02
JXJCY33	0.67 ± 0.14	5.35 ± 0.47	0.15 ± 0.04
JXJCY35	4.27 ± 0.44	0.89 ± 0.23	2.92 ± 0.36
JXJCY38	0.75 ± 0.05	3.98 ± 0.32	0.39 ± 0.04
JXJCY44	—	0.24 ± 0.05	—
JXJCY46	0.24 ± 0.05	3.17 ± 0.33	1.02 ± 0.12

表 3(续)

U · mL⁻¹

菌号	酸性磷酸酶	中性磷酸酶	碱性磷酸酶
变形菌门 α -变形菌			
JXJCY03	—	—	—
JXJCY09	0.16 ± 0.05	—	—
JXJCY10	—	—	—
JXJCY11	6.50 ± 1.01	—	—
JXJCY26	—	1.88 ± 0.56	—
JXJCY27	—	1.42 ± 0.25	—
JXJCY32	1.02 ± 0.09	—	—
JXJCY37	1.26 ± 0.20	0.35 ± 0.00	0.90 ± 0.10
JXJCY41	—	0.83 ± 0.20	—
JXJCY42	0.48 ± 0.05	—	37.54 ± 2.46
变形菌门 γ -变形菌			
JXJCY02	1.02 ± 0.07	0.98 ± 0.10	—
JXJCY12	—	—	6.44 ± 0.91
拟杆菌门			
JXJCY04	1.10 ± 0.17	0.62 ± 0.09	—
JXJCY13	27.90 ± 2.22	8.04 ± 0.41	3.74 ± 0.42
JXJCY20	—	0.99 ± 0.26	—
JXJCY28	39.51 ± 1.92	1.83 ± 0.20	—
JXJCY39	41.71 ± 2.45	7.66 ± 0.72	2.21 ± 0.40
异常球菌-栖热菌门			
JXJCY05	0.67 ± 0.05	2.82 ± 0.35	—
JXJCY43	0.54 ± 0.08	—	—

注: — 表示未检测到磷酸酶活性。

3 讨论

3.1 铜绿微囊藻附生细菌的多样性

本文通过稀释涂布分离,并对获得的纯培养物 16S rRNA 基因序列分析,发现铜绿微囊藻 FACHB-905 培养液中除了 *Proteobacteria*、*Bacteroidetes* 和 *Ac-*

tinobacteria 3 类微生物外^[10], 还有未见报道的异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*) 的异常球菌属(*Deinococcus*); 虽然在分离物中 *Proteobacteria* 占 34.3%, 但其中却未发现 β -*Proteobacteria*. 本试验中这 2 类分离物共 21 株, 占分离物的 60.0%, 特别是 *Actinobacteria* 占分离物的 45.7%. 然而, 当和这些分离物共培养时, 微囊藻生长速率往往增加^[11], 这说明这些放线菌与铜绿微囊藻关系极为密切, 但它们是游离细菌还是附生细菌尚需要进一步研究. 鞘脂单胞菌目(*Sphingomonadales*) 在微囊藻水华中似乎不可或缺, 而其中的鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*) 更是微囊藻的重要附生细菌^[10]. 本试验从该藻液中分离出 4 株属于鞘氨醇单胞菌属的不同菌株, 占所分离的 α -*Proteobacteria* 的 40.0%, 这进一步说明了鞘脂单胞菌目的细菌是微囊藻的重要附生细菌.

3.2 解磷活性及解磷机制

许多微囊藻附生细菌具有解磷能力, 使不溶性磷变为可溶性磷^[12-13], 其中就有放线菌^[14]. 本试验发现, 在 *Proteobacteria* 中虽然有许多解磷菌株, 但其比例却低于放线菌和拟杆菌, 这说明放线菌和拟杆菌对微囊藻获取足够的磷, 可能具有重要意义, 因此, 它们对水华发生、发展和暴发的作用不容忽视.

微生物解磷机制多样. 分泌有机酸, 使不溶性磷变为可溶性磷, 是微生物解磷的重要机制之一^[15-16]. 根据 pH 值检测结果(见表 2), 本试验分离到的所有菌株均能导致 1~3 种不溶性磷培养基的 pH 值显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 特别是植酸钙培养基($P < 0.01$), 可溶性磷含量与 pH 值下降有一定相关性, 但并不成线性关系, 这与张英等^[17] 的研究结果类似. 以上结果说明, 分泌有机酸是它们的解磷机制之一, 但它们分泌何种有机酸尚有待进一步研究.

磷酸酶是水解磷酸酯的酶, 能够将底物分子上的磷酸基团除去, 生成磷酸根离子. 在生长过程中向胞外分泌磷酸酶, 是部分细菌的解磷机制之一. 根据实验结果(见表 3), 放线菌培养液磷酸酶活性检出率最高, *Proteobacteria* 特别是 α -*Proteobacteria* 培养液磷酸酶活性检出率最低, 这似乎部分解释了能够降解 3 种不溶性磷的 α -*Proteobacteria* 最小比例原因. 然而, 实验也发现, 在含麦芽浸膏粉和酵母浸膏粉的培养基中, 磷酸酶活性高的菌株对 3 种解磷培养基中的难溶性磷源的降解效率并不高, 甚至很低,

这说明这些磷酸酶的活性或其含量可能受麦芽浸膏粉和酵母浸膏粉中的物质影响, 在自然情况下也可能受藻细胞分泌物的影响; 同时, 表 2 中可溶性磷含量高的磷培养基的培养液, 其磷酸酶活性却均未超过 $2.00 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 这说明除了分泌有机酸和磷酸酶来降解不溶性磷外, 这些细菌可能还具有其它解磷机制, 这有待进一步研究.

4 参考文献

- [1] 赵洋, 叶兴林, 杨琴, 等. 2-(4-氯苯基)-4-(4-甲氧基苯基) 唑啉抑制微囊藻生长的研究及应用前景探究 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2014, 38(3): 314-317.
- [2] Gumbo J R, Cloete T E, Van Zyl G J, et al. The viability assessment of *Microcystis aeruginosa* cells after co-culturing with *Bacillus mycoides* B16 using flowcytometry [J]. Physics and Chemistry of the Earth, 2014, 72/73/74/75: 24-33.
- [3] 李汉全, 张炳火, 杨建远, 等. *Streptomyces eurocidicus* JXJ 0089 对铜绿微囊藻的抑制 [J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1037-1044.
- [4] Zhang Binghuo, Chen Wei, Li Haiquan, et al. An antialgal compound produced by *Streptomyces jiujiangensis* JXJ 0074T [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(18): 7673-7683.
- [5] 中华人民共和国农业部种植业管理司. NY/T 1847—2010. 微生物肥料生产菌株质量评价通用技术要求 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [6] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学: 原理、方法及实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [7] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170(1): 265-270.
- [8] 赵兰坡, 姜岩. 土壤磷酸酶活性测定方法的探讨 [J]. 土壤通报, 1986, 3: 138-141.
- [9] 陈丹阳, 李汉全, 张炳火, 等. 2 株解磷细菌的解磷活性及作用机制研究 [J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(3): 410-418.
- [10] Shi Limei, Cai Yuanfeng, Yang Hualin, et al. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with *Microcystis aeruginosa* and other cyanobacteria [J]. Journal of Environmental Science, 2009, 21(11): 1581-1590.
- [11] 李汉全, 张炳火, 杨建远, 等. *Streptomyces eurocidicus* JXJ 0089 对铜绿微囊藻的抑制 [J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1037-1044.
- [12] 邹迪, 肖琳, 杨柳燕, 等. 不同形态磷源对铜绿微囊藻与

- 附生假单胞菌磷代谢的影响 [J]. 环境科学, 2005, 26 (3): 118-121.
- [13] 赵婕, 李建宏, 管章玲, 等. 1 株产碱性磷酸酶附生菌对微囊藻生长的影响 [J]. 湖泊科学, 2011, 23 (1): 49-55.
- [14] Zhao Guiying, Du Jingjing, Yong Jia, et al. The importance of bacteria in promoting algal growth in eutrophic lakes with limited available phosphorus [J]. Ecological Engineering, 2012, 42 (9): 107-111.
- [15] Chen Yepi, Pekha P D, Arun A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities [J]. Applied Soil Ecology, 2006, 34 (1): 33-41.
- [16] Hameeda B, Reddy Y H, Rupela O P, et al. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna [J]. Current Microbiology, 2006, 53 (4): 298-302.
- [17] 张英, 芦光新, 谢永丽, 等. 溶磷菌分泌有机酸与溶磷能力相关性研究 [J]. 草地学报, 2015, 23 (5): 1033-1038.

The Diversity and Phosphate Solubilization Activity of *Microcystis aeruginosa*-Associated Bacteria

GUO Qigen, XIONG Suli, XIAO Yao, XU Changlong, ZHANG Binghuo*

(College of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang Jiangxi 332000, China)

Abstract: In order to understand the diversity and phosphate solubilization activity of *Microcystis aeruginosa*-associated bacteria, dilution plating procedure is used to isolate the bacteria, and the 16S rRNA gene sequences are used to determine the taxonomic status of the bacteria, the molybdenum antimony resistance colorimetric and disodium phenyl phosphate methods are used to analyze solubilizing-phosphate activities and phosphatase activities of the bacteria, respectively. The results show that the isolates belong to four phylums, i. e. Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes and Deinococcus-Thermus, respectively. And more than 83% of these bacteria exhibit solubilizing-phosphate activities at least on one of the three phosphorus sources such as lecithin, phytin and tricalcium phosphate, and more than 94% of these bacteria exhibit 1 ~ 3 kinds of phosphatases, and result in decline of the pH value of phosphorus media. There are abundant solubilizing-phosphate bacteria in the *Microcystis aeruginosa*-associated bacteria, and these microorganisms probably play an important role for the algae to obtain enough soluble phosphorus.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; associated bacteria; phosphate solubilization activity; phosphatase

(责任编辑: 刘显亮)