

doi:10.11835/j.issn.1000-582X.2013.09.022

溶藻细菌 S7 胞外溶藻活性物质的分离鉴定

王金霞¹, 罗固源², 叶姜瑜², 许晓毅², 刘 静²

(1. 重庆工程职业技术学院 矿业与环境工程学院, 重庆 400037;

2. 重庆大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室 重庆 400045)

摘 要: 为了对菌株 S7 胞外溶藻活性物质进行分离鉴定, 首先对溶藻细菌 S7 所分泌的溶藻活性物质进行分离和纯化, 进而采用紫外光谱、红外光谱、荧光光谱和质谱对该活性物质进行了初步鉴定。结果表明, 甲醇洗脱组分的溶藻效果最强, 紫外光谱扫描结果显示溶藻细菌 S7 溶藻活性物质可能含有 3~5 个共轭的不饱和键; 红外光谱扫描结果显示活性组分中可能含有羟基、饱和烃基和芳香醚; 三维荧光光谱扫描结果显示溶藻活性物质有两个较强的荧光峰 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, 峰值分别出现在 264/436 nm 和 378/369 nm 处; 质谱分析结果显示活性组分中含有 6 种物质, 它们的分子量分别为 163.1、246.3、274.3、318.3、404.5 和 475.4。

关键词: 溶藻细菌; 铜绿微囊藻; 溶藻活性物质; 纯化; 鉴定

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 1000-582X(2013)09-141-05

Purification and characterization of the extracellular algae-lysing components from an algae-lysing bacteria

WANG Jinxia¹, LUO Guyuan², YE Jiangyu², XU Xiaoyi², LIU Jing²

(1. Institute of Mining and Environmental Engineering, Chongqing Vocational Institute of Engineering, Chongqing 400037, China; 2. Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

Abstract: Purification, characterization and initial identification of extracellular algae-lysing constituents of fermentation products of the algicidal bacteria S7 are carried out by ultraviolet spectrum, infrared spectrum, fluorescence spectra and mass spectrum, and the results show that the eluates of methanol have the best algicidal effects. These active algicidal substances made of conjugation unsaturated bonds, hydroxyl, saturated alkyl and aromatic ethers. In the three-dimensional fluorescence spectroscopy, two strong fluorescence peaks appear at 264/436 nm and 378/369 nm respectively. Mass spectrum indicates that the active substances consist of six monomers, and their molecular weights are 163.1, 246.3, 274.3, 318.3, 404.5 and 475.4, respectively.

Key words: algicidal bacteria; microcystic aeruginosa; extracellular algae-lysing constituents; purification; characterization

收稿日期: 2013-04-13

基金项目: 科技部国际合作项目(2007DFA90660); 重庆市重大科技攻关项目(CSTC2006AA7003)

作者简介: 王金霞(1980-), 女, 重庆大学博士, 主要从事环境卫生与安全理论与技术的研究, (E-mail) wangjinxia1980@126.com。

近年来,有害藻类水华爆发已经成为世界性的难题,有害藻类的大量繁殖对饮用水源、养殖业、旅游业以及人类健康造成极大的影响^[1-2]。溶藻细菌的应用作为一种生物控制手段,在控制水华爆发方面显示出了极大的潜力^[3]。国外学者对溶藻细菌和溶藻物质的研究较早,Roth^[4]分离出多株溶藻细菌,其中,25株为变形菌属(γ -proteobacteria),8株是噬纤维菌-屈挠杆菌-拟杆菌(Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides,CFB),还发现了一株球菌、一株杆菌和一株动性杆菌。Su^[5]发现塔玛亚历山大藻(*A. tamarense*)能被假交替单胞菌 SP48 分泌的溶藻物质杀死。Kim^[6]研究结果也表明假交替单胞菌 AFMB-08041 通过间接方式溶藻,其溶藻物质为 β -葡萄糖苷酶。Ren^[7]通过研究表明铜绿假单胞菌 R219 的乙酸乙酯萃取液与无菌滤液均具有较强的杀藻作用。Chena^[8]分离到一株棕黄色菌株可以合成一种氨基酸氧化酶,能催化产生过氧化氢杀死藻细胞。Sakata^[9]发现一株假单胞菌,能够分泌 2,3-吡啶酮杀死硅藻。常见的溶藻细菌有粘细菌、弧菌、黄杆菌、假单胞菌、葡萄球菌、假交替单胞菌等。目前已经报道了氨基酸、多肽、蛋白质、抗生素、生物碱、色素、含氮化合物及其他溶藻活性物质。国内文献大多是对溶藻细菌的分离、鉴定和溶藻特性的描述,多数溶藻细菌的溶藻物质还未被纯化与鉴定,这极大的限制了溶藻物质的进一步开发和利用^[10]。本课题组从三峡库区支流彭溪河中分离出一株具有较强溶藻效果的细菌,编号为 S7,研究发现该细菌通过分泌胞外溶藻物质的方式进行间接溶藻^[11]。本研究对溶藻细菌 S7 所分泌的溶藻物质进行分离纯化后,通过紫外光谱、红外光谱、荧光光谱和质谱等分析方法对该细菌胞外溶藻活性物质进行了研究,以期为实现最终利用溶藻物质制备高效、绿色的杀藻物质,解决有害藻水华问题提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验仪器

SHZ-DA 型循环水真空泵、RE 旋转蒸发器、SPX 智能型生化培养箱、85-2 数显恒温磁力搅拌器、HPX-9272MBE 数显不锈钢电热培养箱、QYC200 恒温摇床、UVMINI-1240 紫外可见分光光度计、721 型可见分光光度计、Agilent Technologies 6410 Triple Qusd LC/MS、EQUINOX55 型傅立叶变换红外光谱仪、日立 F-7000 荧光分光光度计。

1.2 供试藻种

选用的藻种为来自中国科学院水生生物研究所

藻种保藏中心铜绿微囊藻(*Microcystic aeruginosa* 905)。采用 BG11 培养液进行培养,培养条件为如下,光照强度:2000~2500 lux,培养温度:25 $^{\circ}$ C,光暗周期比:14 h:10 h。

1.3 无菌滤液制备

细菌培养采用牛肉膏蛋白胨液体培养基,在 1 500 rpm、30 $^{\circ}$ C 的恒温摇床中培养,24 h 后取菌液 1 000 mL,以 5 000 rpm 离心 15 min,留下菌体,加入 1 000 mL 灭菌蒸馏水,继续培养,48 h 后再经 10 000 rpm 离心 15 min 得上清液备用。

1.4 溶藻物质粗提物制备

取 500 mL 细菌上清液用旋转蒸发仪在 65 $^{\circ}$ C 下浓缩至 50 mL,首先用分子量为 8~14 kDa 的透析袋透析 24 h,将袋外的透析液用旋转蒸发仪在 65 $^{\circ}$ C 下浓缩至 50 mL,其次将上述浓缩液继续用环己烷等体积萃取 3 次,收集水相用旋转蒸发仪在 65 $^{\circ}$ C 下蒸发掉残留的环己烷,用蒸馏水定容至 50 mL,最后用无水乙醇进行沉淀,每次加入 3 倍体积的无水乙醇,收集上清液,共重复 3 次,用 65 $^{\circ}$ C 旋转蒸发仪浓缩至干,用甲醇溶解残渣并定容至 50 mL,得到溶藻物质的粗提物。

1.5 溶藻物质粗提物纯化

溶藻物质纯化采用硅胶柱层析,氯仿/甲醇(V/V)比例为:9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,4:6,3:7,2:8,1:9 和纯甲醇进行梯度洗脱,流速:20 滴/min,每 100 mL 为一个洗脱组分,将各洗脱组分用旋转蒸发仪,在 65 $^{\circ}$ C 下蒸干后,残渣加入蒸馏水溶解并定容至 50 mL;将各组分的定容液分别加入相同质量浓度的藻液,通过测定铜绿微囊藻叶绿素 a(Chla)的质量浓度变化来检测各组分的溶藻能力,测定方法采用丙酮提取分光光度法^[12]。

1.6 溶藻物质的鉴定

1) 紫外光谱扫描。采用 200~900 nm 的紫外-可见分光光度计,对活性组分进行扫描并分析。

2) 红外光谱扫描。对活性组分采用液膜法进行红外光谱仪扫描并进行定性分析。

3) 荧光光谱法扫描。采用日立 F-7000 荧光分光光度计对活性组分进行的荧光属性进行分析。

4) 利用液-质谱联用仪对活性组分的分子量进行分析。

2 结果与讨论

2.1 溶藻活性物质的纯化

图 1 为各洗脱组分对铜绿微囊藻溶藻效果的比较,叶绿素 a 浓度越低,说明溶藻效果越强,通过分

析表明,当氯仿/甲醇的体积比大于 5:5 时,洗脱组分未表现出明显的溶藻效果,体积比小于 4:6 时表现出不同的溶藻效果,且洗脱溶剂极性越强溶藻效果也增强,其中甲醇洗脱组分对叶绿素 a 的去除率为 50% 以上,该洗脱组分的溶藻效果最强。

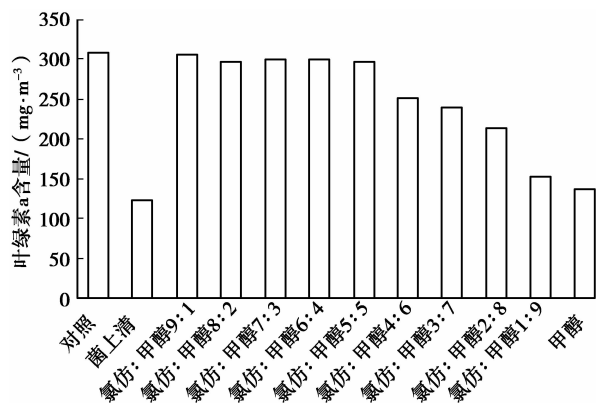


图1 氯仿-甲醇梯度洗脱后各组分对铜绿微囊藻的溶藻效果

2.2 紫外光谱分析

图2为甲醇洗脱组分的紫外可见光谱扫描结果,该洗脱组分的最大吸收峰在 330 nm 处,表明该组分中的溶藻物质可能含有 3~5 个共轭单位。

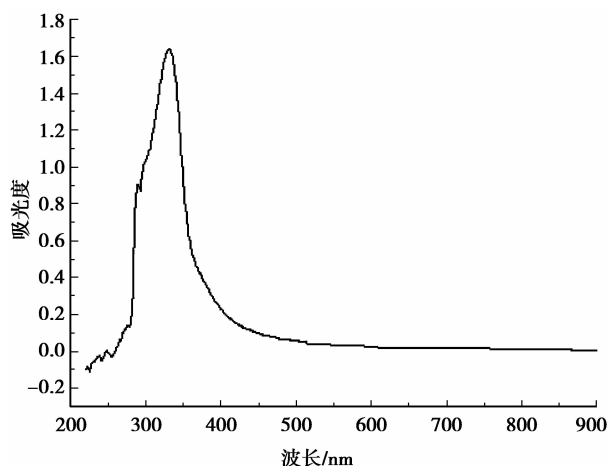


图2 甲醇洗脱组分的紫外光谱图

2.3 红外光谱分析

图3为甲醇洗脱组分红外光谱扫描结果,在 $3\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 O-H 自由羟基的伸缩振动, $3\ 500\sim 3\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 之间宽的吸收峰为分子间 O-H 的伸缩振动,表明该组分中溶藻物质有羟基存在; $3\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 以下约 $3\ 000\sim 2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 之间是饱和的 C-H 伸缩振动区,表明取代基对它们影响很小,因此 $2\ 910\sim 2\ 980\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的频率吸收为饱

和烃的 C-H 伸缩,说明该组分中的溶藻物质有饱和和羟基存在;还有两个 C-O 伸缩振动吸收则表明溶藻物质还有芳香醚存在,这两个吸收峰是 $1\ 260\ \text{cm}^{-1}$ 处的 Ar-O 伸缩和 $1\ 070\ \text{cm}^{-1}$ 处的 R-O 伸缩。

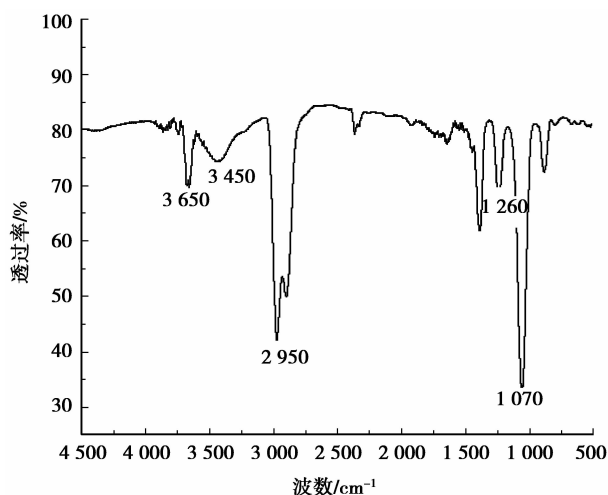
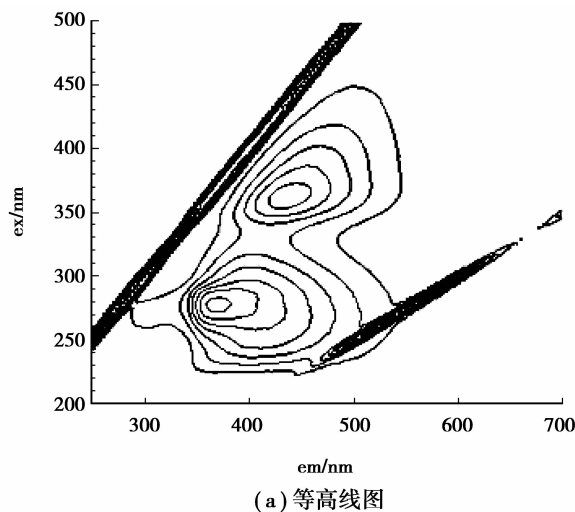


图3 甲醇洗脱组分红外光谱图

2.4 荧光光谱分析

图4为甲醇洗脱组分荧光光谱图,(a)是等高线图,(b)是三维荧光光谱图,荧光图中横坐标为发射波长(λ_{em}),纵坐标为激发波长(λ_{ex})。但有两类散射效应在三维荧光光谱中出现的位置相对固定但不影响实验分析,一条为水的拉曼散射区,在荧光图左上方,另一条是水的二级 Rayleigh 散射区,在荧光图右下方^[13]。通过分析可知甲醇洗脱组分中的溶藻物质具有荧光属性,光谱图出现 378/369 nm 和 264/436 nm 两个较强的荧光峰,且后者峰荧光强度大于前者。



(a) 等高线图

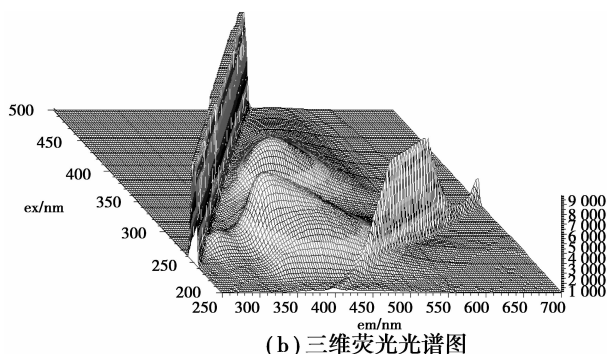


图 4 甲醇洗脱组分荧光光谱图

2.5 质谱分析

表 1 为溶藻活性物质的质谱分析结果,结果表明在甲醇洗脱组分中分析出 6 种物质,分子量分别为 163.1、246.3、274.3、318.3、404.5 与 475.4。

表 1 质谱分析结果

物质分子量	质谱峰号	质荷比	峰丰度	相对峰丰度
163.1	1	135.1	32 419	9.2
163.1	2	163.1	353 202	100
163.1	3	164.1	34 021	9.6
246.3	1	246.3	244 182	100
246.3	2	247.3	38 776	15.9
274.3	1	274.3	413 281	100
274.3	2	275.4	70 443	17.0
318.3	1	230.3	66 520	17.9
318.3	2	318.3	371 606	100
318.3	3	319.3	75 637	20.6
404.5	1	251.3	13 014	30.2
404.5	2	369.2	9 967	23.2
404.5	3	376.9	9 831	22.8
404.5	4	405.4	43 050	100
404.5	5	415.3	15 159	35.2
404.5	6	469.6	10 444	24.3
404.5	7	610.4	14 483	33.6
404.5	8	690.7	18 164	42.2
404.5	9	719.2	10 214	23.7
404.5	10	809.5	15 792	36.7
475.4	1	102.2	17 982	8.2
475.4	2	453.5	217 877	100
475.4	3	454.4	62 323	28.6
475.4	4	455.5	11 361	5.2
475.4	5	475.5	77 000	35.3
475.4	6	476.4	23 754	10.9

3 讨论

细菌分泌的溶藻活性物质种类多样,且性质不

同,目前尚无一种通用的分离和纯化方法,导致大多数的溶藻物质没有被纯化和鉴定。目前多采用紫外光谱、红外光谱、质谱、核磁共振波谱等多种物理化学分析技术,对溶藻物质进行研究和表征。本研究依次通过透析、有机溶剂萃取、醇沉和硅胶柱层析的方法对细菌溶藻活性物质进行分离纯化,然后经过紫外光谱、红外光谱、荧光光谱和质谱等分析技术对溶藻物质的特性进行了研究。细菌溶藻物质的最大紫外吸收峰在 220、273、279 nm 处均有报道,本研究结果显示最大紫外吸收峰为 330 nm。红外光谱扫描结果显示甲醛洗脱组分中的溶藻物质可能含有饱和烃基、羟基和芳香醚。研究发现芳香类物质具有 $\pi^* - \pi$ 共轭双键,有很强的荧光反应,可以采用三维荧光光谱技术对含有芳香类物质的样品进行检测分析^[13]。在对有机物的物理化学特性进行定性和定量描述时,多种荧光光谱技术被广泛用,例如同步荧光光谱、荧光激发光谱、荧光发射光谱和三维荧光光谱等。为了进一步了解溶藻物质的化学行为和特性,有必要对溶藻物质荧光特性进行研究。研究结果表明该菌溶藻物质具有很强的荧光属性。说明溶藻物质具有平面性好的特点,很可能含有大的共轭体系和刚性结构,即有 n 电子或 π 电子的结构,与紫外光谱结果含有芳香醚和红外光谱结果含有 3~5 个共轭单位相一致。近年来,关于溶藻细菌溶藻物质分子量的研究也有较多报道。Nobuyuki^[14]发现蜡状芽孢杆菌能够产生非蛋白质类物质可以溶解铜绿微囊藻,通过透析的方法得到其分子量小于 2 kDa 的判断。Kim^[15]发现一株溶藻细菌,命名为 AFK-13,其溶藻物质为分子量在 50~100 kDa 之间的蛋白质类物质,能够溶解水华鱼腥藻。Lee^[16]分离出一株假交替芽孢杆菌,能够分泌分子量为 50 kD 的丝蛋白酶。对硅藻有溶藻效果。国内学者史顺玉^[17]分别用 5、10、30 kDa 的超滤管超滤进行实验研究,结果发现细菌 DC10 溶藻物质的分子量在大于 30 kDa,细菌 DC21 溶藻物质的分子量小于 5 kDa,细菌 DC-P 溶藻物质的分子量主要在 10~30 kDa 之间。李燕^[10]通过透析实验对 3 株溶藻细菌的分子量进行研究,发现细菌 L8 和 L18 分泌的溶藻物质分子量在 3.5~7 kDa 之间,L7 的溶藻物质分子量在 3.5 kDa 以内。而本研究表明细菌 S7 分泌的溶藻物质的分子量在 0.2~0.5 kDa 之间,可能是一种新的溶藻活性物质。

4 结论

1) 紫外光谱扫描结果表明:细菌 S7 分泌的活性

溶藻物质可能含有 3~5 个共轭单位。

2) 红外光谱扫描分析结果表明:细菌 S7 分泌的溶藻活性物质可能含有羟基、饱和烃基和芳香醚。

3) 荧光光谱扫描结果表明,细菌 S7 分泌的溶藻活性物质具有荧光属性,光谱图出现 378/369 nm 和 264/436 nm 两个较强的荧光峰,且后者峰荧光强度大于前者。

4) 质谱法检测出活性组分中含有分子量为 163.1、246.3、274.3、318.3、404.5 和 475.4 的 6 种物质。

参考文献:

- [1] Qin B, Zhu G, Gao G, et al. A drinking water crisis in Lake Taihu, China: Linkage to climatic variability and lake management[J]. *Environ Manage*, 2010, 45(1): 105-112.
- [2] Paerl H W, Huisman J. Blooms like it hot [J]. *Science*, 2008, 320(5872): 57-58.
- [3] Kim M J, Jeong S Y, Lee S J. Isolation, identification, and algicidal activity of marine bacteria against *Cochlodinium polykrikoides* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(6): 1069-1078.
- [4] Roth P B, Twiner M J, Mikulski C M, et al. Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* [J]. *Harmful Algae*, 2008, 7(5): 682-691.
- [5] Su J Q, Yang X R, Zheng T L, et al. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. *Harmful Algae*, 2007, 6(6), 799-810.
- [6] Kim J D, Kim J Y, Park J K, et al. Selective control of the proroentrum minimum harmful algal blooms by a novel algal-lytic bacterium *pseudoalteromonas haloplanktis* AFMB-008041[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(4): 463-472.
- [7] Ren H, Zhang P, Liu C, et al. The potential use of bacterium strain R219 for controlling of the bloom-forming cyanobacteria in freshwater lake [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(3): 465-472.
- [8] Chena W M, Sheub F S, Sheub S Y. Novell-amino acid oxidase with algicidal activity against toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* synthesized by a bacterium *Aquimarina* sp [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2011, 49(4): 372-379.
- [9] Sakata T, Yoshikawa T, Nishitarumizu S. Algicidal activity and identification of an algicidal substance produced by marine *Pseudomonas* sp. C55a-2 [J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(3): 397-402.
- [10] 李燕, 潘伟斌, 杨丽丽. 三株溶藻细菌胞外溶藻活性物质若干分离特性的研究 [J]. *微生物学通报*, 2008, 35(2): 171-177.
- LI Yan, PAN Weibin, YANG Lili. Research on separation characteristics of the extracellular algae-lysing components from three algae-lysing bacteria [J]. *Microbiology*, 2008, 35(2): 171-177.
- [11] 罗固源, 刘静, 王金霞, 等. 一株溶藻细菌对铜绿微囊藻的溶藻机理初探 [J]. *生态环境学报*, 2010, 19(11): 647-2651.
- LUO Guyuan, LIU Jing, WANG Jinxia, et al. Primary research on algicidal mechanism of an algae-lysing bacterium to *microcystis aeruginosa* [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(11): 2647-2651.
- [12] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 670-672.
- [13] 金丹, 张玉钧, 李国刚, 等. 菲的三维荧光光谱特性研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(5): 1319-1322.
- JIN Dan, ZHANG Yujun, LI Guogang, et al. Study on three-dimensional fluorescence spectra of phenanthrene [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2009, 29 (5): 1319-1322.
- [14] Nobuyuki N, Kazunori N. A novel cyanobacteriolytic bacterium, bacillus isolated from a eutrophic lake cereus [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(2): 179-184.
- [15] Kim J D, Kim B, Lee C G. Alga-lytic activity of *pseudomonas fluorescens* against the red tide causing marine alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) [J]. *Bio Control*, 2007, 41(3): 296-303.
- [16] Lee S, Kato J, Takiguchi N, et al. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine Bacterium *Pseudoalt eromonas* sp Strain A28 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4334-4339.
- [17] 史顺玉. 溶藻细菌对藻类的生理生态效应及作用机理研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006.

(编辑 郑洁)