

模拟生态系统中噬藻体裂解蓝藻宿主的生态学效应

廖明军, 程 凯, 赵以军*, 杜秀丽, 刘秀菊, 喻 融

(华中师范大学城市水资源分配与水环境研究中心, 武汉 430079)

摘要: 实验采用模拟生态系统, 研究了噬藻体裂解蓝藻宿主后营养物质循环变化的过程, 以及细菌和漂浮植物对这个过程的影响。结果表明噬藻体裂解宿主所释放的营养元素在细菌的作用下迅速进入新的循环并形成新的水华, 而加入浮萍则可以有效吸收水体营养, 防止新的水华发生。因此推测单纯地利用包括噬藻体在内的微生物裂解藻类的方法, 并非治理水华的有效方法, 但如果能够结合漂浮植物等其它治理手段, 则有可能同时实现水华的控制和水质的改善。

关键词: 噬藻体; 鲍氏织线藻; 浮萍; 细菌; 营养物质

文章编号: 1009-0933(2006)06-1745-05 中图分类号: Q143, Q178.1, Q938.8 文献标识码: A

Ecological effects of cyanobacteria lysis by cyanophage in cement ponds

LIAO Ming-Jun, CHENG Kai, ZHAO Yi-Jun*, DU Xi-Li, LIU Xi-Ju, YU Rong (Urban Water Resource and Environment Research Center of Huazhong Normal University). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(6): 1745~1749.

Abstract: In order to test ecological effects of Cyanobacteria lysed by Cyanophage on the nutrition cycle of fresh water, an experiment was carried out in six cement ponds with culture of the *Plectonema boryanum* IU594. Of these ponds, three were inoculated with the Cyanophage PP at 10^6 PFU $\cdot$ ml $^{-1}$ and added the duckweed. The other three ponds were inoculated with the Cyanophage PP only as control. After the treatment, the concentration of chlorophyll a, ammonia, nitrate, phosphate, total phosphorous, total nitrogen, the number of bacteria and the fresh weight of duckweed were monitored. It was found that lysis of Cyanobacteria by Cyanophage caused rapid release of the nutritional elements and brought the bacteria into a new life cycle, and led a new bloom in the control. But the duckweed could absorb the nutrition elements released from lysed cells and exhibited inhibition of the new bloom from the new life cycle in experimental group. It may be inferred that floating plants such as duckweed accompanying algal lysing microorganisms e.g. Cyanophage could eliminate the new algal bloom and improve water quality.

Key words: Cyanophage; *Plectonema boryanum*; Duckweed; Bacteria; Nutrition

近年来发现噬藻体在海洋中大量存在^[1,2], 随着感染两大海洋主要初级生产者-聚球藻(*Synechococcus*)和原绿藻(*Prochlorococcus*)的噬藻体分别被分离发现^[3], 使人们相信噬藻体在控制海洋初级生产力和物质营养循环方面起重要作用^[4]。一般认为噬藻体的裂解还可将宿主细胞内含物释放到水体中形成可被细菌等微生物利用的可溶性有机物(Dissolved Organic Material DOM)^[5]。Fuhman 认为, 在病毒裂解宿主的过程中, 至少有 99% 的宿主生物量被转化成了 DOM^[6], DOM 被细菌利用从而形成微生物食物环(microloop), 减少有机物向食物链的更高级的转化, 延长营养元素在透光层(euphotic zone)的停留时间从而延缓营养向更高级食物链的传递^[7-9], 同时其裂解作用为非宿主藻和抗性藻的生长提供了生态位^[10,11]。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470344, 30370062); 武汉市科技攻关计划资助项目(20026002097)

收稿日期: 2005-01-12; 修订日期: 2006-02-20

作者简介: 廖明军(1975~), 男, 湖北仙桃人, 博士, 主要从事环境微生物研究。E-mail: lmj1112@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhaoyj@mail.ccnu.edu.cn

Foundation item: The project was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No. 30470344 and 30370062) and Wuhan City Science and Technology Foundation (Grant No. 20026002097)

Received date: 2005-01-12; **Accepted date:** 2006-02-20

Biography: LIAO Ming-Jun, Ph.D. candidate, mainly engaged in environmental biology. E-mail: lmj1112@163.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

随着研究的进展,海洋中噬藻体所具有的重要生态功能越来越受到人们的重视。噬藻体在淡水中也有较广泛的分布^[12~14],但淡水噬藻体是否也具有同海水噬藻体类似的生态功能,有待进一步研究。

本实验采用模拟生态系统,对淡水噬藻体裂解蓝藻水华后微型生态系统中群落结构和营养物质循环发生的变化进行了初步研究,以期了解淡水噬藻体的生态功能。

1 材料和方法

1.1 材料

噬藻体 PP 是本实验室从本地分离得到^[14];鲍氏织线藻(*Plectonema boryanum* IU 594)取自中国科学院水生生物研究所,用 AA 培养基培养;浮萍(*Lemna minor*)为本实验室从野外采集,用安德鲁氏培养基培养。

1.2 实验设计与方法

1.2.1 噬藻体的浓缩 将对数生长期的鲍氏织线藻藻液 5000 ml 在 3500 r/min 下离心 10 min,浓缩定容至 500 ml,加入噬藻体感染 2d,待藻液全部变黄之后,加入 10 ml 氯仿剧烈震荡 3min,静置取上清液,再加 10% PEG8000 和 5% NaCl 低温震荡过夜,用 Heraeus 冷冻高速离心机 12000 r/min 离心 2h,将沉淀斑用无氮磷的浮萍培养液洗下,保存于 4℃下备用^[15]。

1.2.2 接种 试验在露天水泥池中进行,池子大小为 1m³。试验设 A、B 两组,每组设 3 个平行。

A 组 每池加 600L 人工湖水(KNO₃ 9.88 mg·L⁻¹、Ca(NO₃)₂·4H₂O 23.09 mg·L⁻¹、KH₂PO₄ 2.10 mg·L⁻¹,其它营养盐配方与安德鲁氏配方相同,另按 1:100 加入天然东湖湖水;称取对数期浮萍约 112.73g(鲜重),放入水池;将鲍氏织线藻用无氮磷的 AA 培养基洗涤 3 次,浓缩后,接种到上述水池,每池接种量为 400ml,接种后每池中鲍氏织线藻的生物量为干重 4.22 mg·L⁻¹;然后,向水池中加入 10ml 上述制备的噬藻体 PP 浓缩液,使噬藻体效价达到 10⁶ PFU·ml⁻¹。

B 组 不加浮萍,其他操作与 A 组完全相同。

1.2.3 观察和测定 从接种之日(标记为第 0 天)开始,在第 0、1、2、5、8、11、15、19、23、27 天时分别测定水体中细菌、氨氮、硝氮、总氮、正磷、总磷、叶绿素 a 的含量,并分别将每池浮萍用纱网捞出,沥干水分至无水滴下,然后称量其鲜重。用 Lorenzen 单色分光光度法测量水体叶绿素 a 含量^[16];用普通牛肉膏蛋白胨培养基进行细菌计数^[17],细菌培养使用德国 Heraeus CO₂ 培养箱,设置温度为 37℃,培养时间为 48h;用纳氏试剂光度法测氨氮浓度;用酚二磺酸光度法测硝酸盐氮;用过硫酸钾氧化、紫外分光光度法测总氮;用钼锑抗分光光度法测正磷和总磷^[18],分光光度计为日本岛津 2401PC 紫外分光光度计。

2 结果

2.1 浮萍生长情况

由图 1 可见,接种后,浮萍鲜重开始慢慢上升。第 2 天之后,浮萍鲜重则以较快的速度上升,进入对数生长期。到第 27 天,浮萍鲜重已达 368.9g,是起点的 3.27 倍,而且此时浮萍仍处于对数生长期。

2.2 浮游植物变化情况

以叶绿素 a 含量来反映水体浮游植物生物量的变化情况(见图 2)。A、B 两组水体起点叶绿素 a 含量基本相等,约 0.2 mg·L⁻¹,藻类都为加入的织线藻。织线藻裂解之后 A 组叶绿素 a 基本上持续接近为 0,而 B 组从织线藻裂解后即缓慢上升并在第 11 天进入对数期,到实验结束时达峰值 0.722 mg·L⁻¹,是起点的 3.61 倍。镜检 B 组水体中的浮游植物种类,以铜绿微囊藻为主,含少量小环藻,由加入的天然东湖湖水所含藻类发展而来。

2.3 细菌浓度的变化情况

细菌主要来源于浮萍、藻、培养基及池壁附生的环境细菌。如图 3 所示可以将接种后 27d 内的细菌浓度的变化分为 3 个阶段:第 1 阶段(第 0~1 天):A 和 B 组中细菌浓度都有所下降并达到接近水平,分别为 7.45 × 10⁴ CFU·ml⁻¹和 5.63 × 10⁴ CFU·ml⁻¹。第 2 阶段(第 1~第 10 天):A、B 组细菌同步形成一个生长峰,A、B 组峰值相近,分别为 2.39 和 2.16 × 10⁵ CFU·ml⁻¹。第 3 阶段(第 11~第 27 天):A、B 两组细菌形成第 2 个生长

峰, 峰值分别达 5.09×10^4 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$ 和 1.40×10^5 CFU $\cdot$ ml $^{-1}$, B 组明显高于 A 组峰值, 且第 2 生长峰均比 A、B 组的第 1 生长峰小。

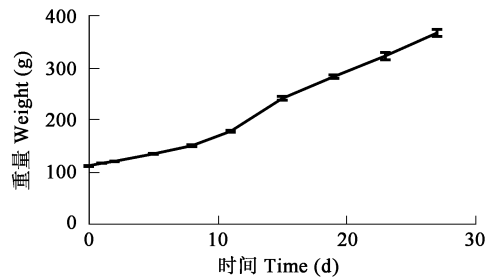


图1 浮萍鲜重变化

Fig. 1 The fresh weight of duckweed

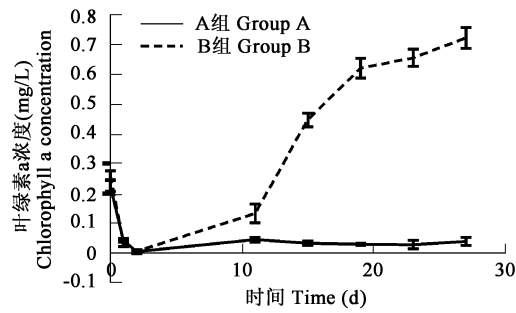


图2 叶绿素 a 含量

Fig. 2 Changes of chlorophyll a concentration

2.4 营养盐变化情况

氨氮浓度变化较为复杂, 浓度随时间变化出现 2~ 3 个峰值, 各组浓度变化的曲线相似, 峰值出现时间大致相同, 分别在第 1、8、19d 出现峰值(见图 4)。

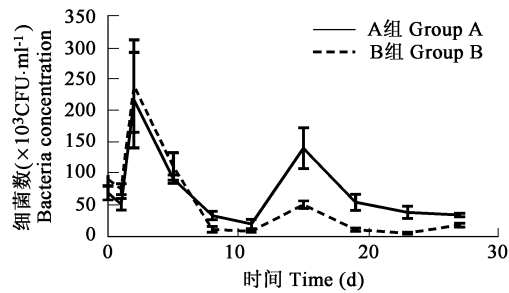


图3 细菌浓度变化曲线

Fig. 3 Changes of bacteria concentration

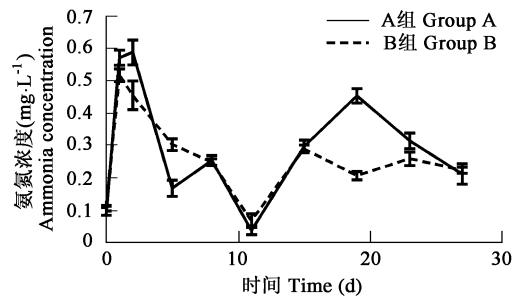


图4 氨氮浓度变化

Fig. 4 Changes of ammonia concentration

A 组起点硝氮和正磷平均浓度分别为 3.498 和 0.513 mg $\cdot$ L $^{-1}$, B 组分别为 3.476 和 0.529 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 。两组间硝氮和正磷起点浓度并无显著差异, 浓度变化曲线也十分相似, 都接近线性下降的趋势, 但 A 组下降速度显著快于 B 组: 硝氮浓度在第 5 天出现显著差异, 正磷浓度在第 8 天出现显著差异, B 组浓度均显著高于 A 组。到第 27 天实验结束 A 组硝氮和正磷平均浓度分别为 2.760 和 0.318 mg $\cdot$ L $^{-1}$, B 组分别为 2.906 和 0.402 mg $\cdot$ L $^{-1}$, 较起点都有显著的下降(见图 5, 图 6)。

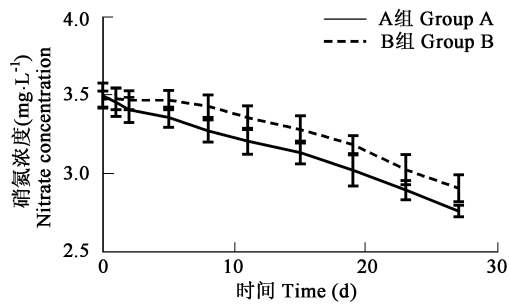


图5 硝氮浓度变化

Fig. 5 Changes of nitrate concentration

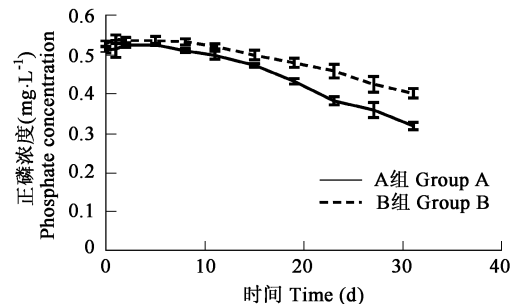


图6 正磷浓度变化

Fig. 6 Changes of phosphate concentration

总氮和总磷浓度变化曲线相似: B 组总氮和总磷浓度在起点分别为 4.08 和 0.802 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 且在实验期间基本维持不变; 而 A 组总氮和总磷浓度则持续下降。A 组起点总氮和总磷浓度分别为 4.101 和 0.796 mg $\cdot$ L $^{-1}$,

与 B 组无显著差异, 而到实验结束, 其总氮和总磷浓度分别为 3.29 和 $0.423 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 显著低于其起点和 B 组浓度(见图 7, 图 8)。

3 讨论

3.1 噬藻体裂解对系统群落结构的影响

织线藻被裂解后, 随天然湖水带入的铜绿微囊藻在 B 组池中迅速生长, 生物量迅速上升, 成为优势种。从图 2 可以看出, 铜绿微囊藻浓度远高于初始织线藻的浓度。按 Fuhman 推测, 由于病毒的裂解作用加速了微生物和 DOM 之间的物质循环, 使细胞中释放的营养物质在环境中得以富集, 并最终导致细菌和藻类生产力的提高^[7]。Lan Hewson 也认为硅藻被病毒裂解后释放的营养物质刺激了蓝藻的生长^[19]。从本实验来看, 裂解后 B 组铜绿微囊藻迅速生长, 而 A 组浮游植物叶绿素 a 持续接近为 0, 裂解产物并未引起 A 组铜绿微囊藻的大量生长, 很可能是浮萍在营养和光照上的竞争抑制了浮游植物的生长, 这还有待进一步验证。

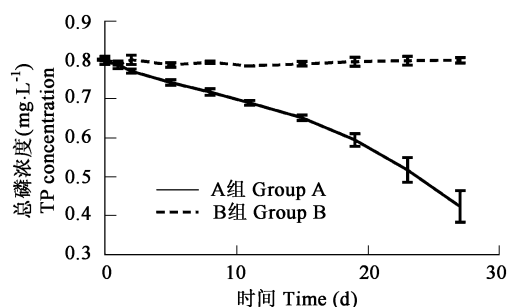


图 7 总磷浓度变化

Fig. 7 Changes of total phosphorous concentration

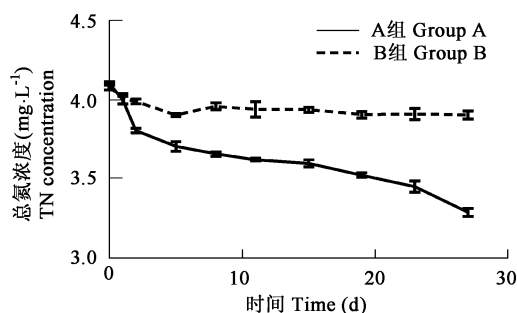


图 8 总氮浓度变化

Fig. 8 Changes of total nitrogen concentration

从细菌生长曲线来看, 细菌群落很可能发生了种群的演替, 因为细菌生长并非简单的生长曲线, 而是随时间出现几个生长峰值。这很可能是细菌群落演替的结果: 由于营养条件的不同, 在不同时期出现不同的优势种群, 这一现象与 Erik J. van Hatten 等的研究结果是吻合的^[20]。接种后的 1d 内 A、B 两组的细菌浓度都逐渐下降, 这可能是由于培养环境的变化会使一部分不适应的细菌死亡。接种 24h 后, 宿主藻被噬藻体完全裂解, 胞内大量营养物质释放到水体中并迅速被细菌利用, 形成了第 1 个生长峰。由于此时两组池中细菌种类、营养条件差异不大, 所以第 1 个生长峰没有显著的差异。第 3 阶段中 A、B 组细菌生长曲线出现明显较大的差异, B 组峰值显著高于 A 组。这可能是因为细菌经过第 1 个生长峰后, 大部分宿主藻裂解释放的营养特别是碳源已被耗尽, 无法支持细菌继续快速生长^[9, 21], PAUL KÄHLER 等的实验也证实细菌生长的限制因子是可利用的碳源^[22]。但是宿主藻的裂解释放出的物质中可能还有一类迟效的营养物质(如细胞壁等成分)^[9, 23], 这类物质被水体中的新生细菌分解利用。另外, 原来的细菌死亡后释放的营养物质, 也可被新生细菌利用^[8, 9], 从而可以维持细菌继续缓慢生长。A 组中浮萍快速生长时也会向水体分泌一些有机质, 这些有机质为新生细菌提供碳源形成 A 组第 2 次生长峰。B 组中除迟效营养物质和细菌死亡后释放的营养物质外, 快速生长的微囊藻等浮游植物也为细菌生长提供了丰富的营养, 因为微囊藻细胞外有丰富的胶被, 这是能被细菌有效利用的良好碳源。由于此阶段营养条件的明显差异, 两组池中细菌生长产生显著差异。

3.2 裂解对营养盐循环的影响

将氨氮浓度变化曲线和细菌数量变化曲线相比较可以发现, 二者峰值出现的时间是比较同步的, 这说明裂解释放的 DOM 由不同生物可利用性(bioavailability)物质组成^[13, 23], 其被细菌和藻类利用转化的过程不一样, 从而在不同阶段影响氨氮浓度的变化。

硝氮浓度一直呈下降的趋势, 这说明影响硝氮浓度的主要因素都是负相关的因素, 如浮萍和藻类吸收代谢, 也不排除硝化细菌硝化作用的可能, 而细菌代谢 DOM 产生的无机氮主要是氨氮, 对硝氮影响不大。

正磷浓度在织线藻被裂解后有一个不明显的上升过程, 然后一直下降。这说明细菌对 DOM 的代谢矿化

了部分的磷,使水体正磷浓度有所上升,但由于矿化的磷和水体背景正磷浓度相比偏低,加之浮萍和藻类对正磷的吸收,使这种上升趋势不明显。同时,A组正磷浓度下降速度显著快于B组,而且越到后期差异越大,说明A组中浮萍对正磷的吸收效果要强于B组中的铜绿微囊藻。

总氮和总磷的变化十分相似。作为一个与外界环境基本没有物质交换(至少是氮磷)的系统,水池中的总氮和总磷浓度应该是稳定的,即如B组数据所反映的情况。A组总氮和总磷浓度下降,造成这一现象的原因应该是浮萍的吸收,因为测量水体氮磷时是将浮萍排斥在外的。从A组总氮总磷下降的幅度来看,浮萍对水体氮磷的去除能力还是比较强的。

4 小结

从本实验可以看出,噬藻体能迅速裂解宿主藻,将宿主营养释放到水体引起系统群落结构和营养循环的变化。但是裂解后宿主藻的生态位很可能被新的浮游藻替代并形成更为剧烈的水华,加剧水体富营养化程度。而在裂解后加入易控制的高等水生植物,则可有效防止这种情况的发生,促进水体水质的改善。因此在试图使用病毒来治理“赤潮”和“水华”时,仅仅依靠藻类病毒和噬藻体难以彻底解决赤潮和水华问题,甚至有可能使本已十分糟糕的水质进一步恶化,而将病毒控藻用作整个生态修复系统中的一个环节才是可行的。

References:

- [1] Bergh O, Borsheim K Y, Bratbak G, *et al.* High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 1989, 340: 467~ 468.
- [2] Eric Wommack K, Rita R Colwell. Viroplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(1): 1092~ 2172.
- [3] Matthew B Sullivan, John B Waterbury, Sallie W Chisholm. Cyanophage infecting the oceanic cyanobacterium. *Prochlorococcus*, *Nature*, 2003, 424: 1047 ~ 1051.
- [4] Suttle C A, Chan A M, Cottrell M T, *et al.* Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature*, 1990, 347: 467~ 469.
- [5] Fuhrman J A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 1999, 399: 541~ 548.
- [6] Fuhrman J A. Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: the microbial food web. In: Falkowski PG, Woodhead AD eds. *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. New York: Plenum Press, 1992. 361~ 383.
- [7] Fuhrman J A, Suttle C A. Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography*, 1993, 6: 50~ 62.
- [8] Markus G. Weinbauer. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004, 28: 127~ 181.
- [9] Wilhelm S W, Suttle C A. Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience*, 1999, 49(10): 781~ 789.
- [10] Eric Wommack K, Jacques Ravel, Russell T Hill, *et al.* Hybridization analysis of Chesapeake Bay viroplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 241~ 250.
- [11] Steven M Shortl, Curtis A Suttle. Sequence analysis of marine virus communities reveals that groups of related algal viruses are widely distributed in nature. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1290~ 1295.
- [12] Suttle C A. Cyanophage and their role in the ecology of cyanobacteria. In: Whitton and Potts eds, *The Ecology of Cyanobacteria*, Boston: Kluwer Academic Publisher, 2000: 563~ 589.
- [13] Guo X, Cheng K, Zhao J, *et al.* The distribution and infectivity of cyanophage and other algae lysis factors in fresh water. *China Environmental Science*, 2003, 23(2): 167~ 170.
- [14] Zhao Y J, Cheng K, Shi Z L, *et al.* The first Cyanophage strain separation and identification in China. *Natural Science Progress*, 2002, 12(9): 923~ 927.
- [15] Han J G, Kang M, Liu P F, *et al.* Percipitation of Chlorella Virus FJ_1 by Polyethylene Glycol(PEG8000). *Acta Microbiological Sinica*, 2000, 40(5): 556~ 558.
- [16] Zhang Z S, Huang X F. *Fresh Water Plankton Research Methods*. Beijing: Science Press, 1991.
- [17] Shen P, Fan X R, Li G W. *Microbiological Experiment(The third edition)*. Beijing: Higher Education Press, 1996.
- [18] Wei F S, Qi W Q, Bi T, *et al.* *Water and Waste Water Inspection and Analysis Methods, (The fourth edition)*. Beijing: China Environmental Press, 2002.
- [19] Lan Hewson. Marine algal viruses: review of phycovirus and cyanophage biology and ecological significance. Report submitted for partial fulfillment of BT490 Botany Honours IV for the award of PGB. Sc(Hons)
- [20] Erk J van Hannen, Gabriel Zwart, Miranda P van Agterveld, *et al.* Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of Filamentous Cyanobacteria Associated with Viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999: 795~ 801.
- [21] Kähler P, Koeve W. Marine dissolved organic matter: can its C:N ratio explain carbon overconsumption? *Deep-Sea Research I*, 2001, 48: 49~ 62.
- [22] Kähler P, Bjomsen P K, Lochte K, *et al.* Dissolved organic matter and its utilization by bacteria during spring in the Southern Ocean. *Deep-sea research II*, 1997, 44(1-2): 341~ 353.
- [23] Haitzer M, Hoss S, Traunsperger W, *et al.* Effects of dissolved organic matter(DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms — a review. *Chemosphere*, 1998, 37(7): 1335~ 1362.

参考文献:

- [14] 赵以军,程凯,石正丽,等.我国首株噬藻体(蓝藻病毒)的分离和鉴定. *自然科学进展*, 2002, 12(9): 923~ 927.
- [15] 韩继刚,康明,刘平芳,等.利用聚乙二醇(PEG8000)纯化小球藻病毒FJ1. *微生物学报*, 2000, 40(5): 556~ 558.
- [16] 章宗涉,黄祥飞. *淡水浮游生物研究方法*. 北京: 科学出版社, 1991.
- [17] 沈萍,范秀容,李广武,等. *微生物学实验(第3版)*. 北京: 高等教育出版社, 1996.
- [18] 魏复盛,齐文启,毕彤,等. *水和废水监测分析方法(第4版)*. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.