

DOI: 10.12264/JFSC2024-0335

鳙肠道菌株 BJ-1 体外调控休眠铜绿微囊藻复苏研究

邹万生¹, 莫平¹, 石彭灵¹, 王智², 罗玉双¹

1. 湖南文理学院生命与环境科学学院, 水产生物资源及环境生态湖南省工程研究中心, 湖南 常德 415000;

2. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410000

摘要: 为探究鳙(*Aristichthys nobilis*)肠道菌株 *Pseudomonas lactis* BJ-1(菌株 BJ-1)体外对休眠铜绿微囊藻(DMCs)复苏的影响及作用机理, 将 BJ-1 菌、DMCs 藻泥及池塘沉积物混匀包埋, 构建低浓度菌组(G1)、较高浓度菌组(G2)和高浓度菌组(G3), 以无菌组为对照, 在水温 25 °C、光照强度 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和光暗周期比 12 h : 12 h 条件下进行为期 21 d 的复苏试验, 并依据结果开展机理和野外验证。结果显示, 试验开始后 0~6 d 菌株 BJ-1 持续增殖, 第 6~21 d 维持稳定且 G1、G2 和 G3 菌组平均菌浓度分别为 $0.99\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $3.40\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $5.21\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 。DMCs 第 6 d 启动复苏, 相比对照组, G2 与 G3 组 DMCs 固着性胞外多糖(CPSs)含量显著下降, 光合效率与复苏率显著降低($P<0.05$), G1 组与对照组无显著差异($P>0.05$)。同时, 菌株 BJ-1 能分泌代谢产物 3-苄基哌嗪-2,5-二酮, 其浓度与 BJ-1 菌浓度呈正向线性关系($R^2=0.997$), G2 与 G3 组 3-苄基哌嗪-2,5-二酮浓度分别为 $0.95\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.41\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 此浓度下 DMCs 细胞内活性氧(ROS)水平显著提升($P<0.05$), 光合效率和复苏率显著下降($P<0.05$)。较高菌浓度(G2)下, DMCs 编码光合系统 PS II 基因(*psbD1*)、DNA 修复基因(*recA*)以及与光合作用关联的固碳功能基因(*ntcA* 和 *rbcL*)均显著下调。实验结果表明, 当菌株 BJ-1 达到较高浓度($\geq 3.40\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$)时, 可降低 DMCs 的 CPSs 含量, 同时其分泌代谢产物 3-苄基哌嗪-2,5-二酮导致 DMCs 的 ROS 水平显著提升, 共同抑制了 DMCs 的光合效率, 最终阻碍 DMCs 复苏。研究结果补充了“以鳙控藻”的理论基础, 也为池塘铜绿微囊藻水华防控提供了新思路。

关键词: 铜绿微囊藻; 代谢物; 光合效率; 胞外多糖; 复苏

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)03-0333-16

养殖池塘频繁暴发铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)水华, 严重影响池塘生态系统健康和水产生物品质^[1-2]。铜绿微囊藻受低温、暗光、外源化感物、营养盐缺乏等不利环境因子胁迫时, 因藻细胞光合系统、藻胆体或核糖体等细胞器受损而被迫休眠, 形成休眠铜绿微囊藻(dormant *Microcystis aeruginosa* cells, DMCs)^[3]。DMCs 下沉至沉积物表层躲避环境胁迫, 待条件改善后作为种源重启复苏(修复受损细胞器)进入上覆水体^[4]。较高 DMCs 复苏率可显著提升铜绿微囊藻种间竞争力, 容易种群暴发形成水华^[5], 反之则反^[6]。因此, 抑制 DMCs 复苏是防控养殖池塘铜绿微囊藻

水华暴发的有效方法。

研究表明, 低温与暗光是制约 DMCs 复苏的重要生态因子, 当池塘水温低于 7 °C^[7-8]、光照强度低于 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, DMCs 无法修复受损的光合系统和恢复光合效率, 复苏启动受阻^[9-10]。另外, 降低氮磷营养物浓度^[11], 尤其高氮磷比, 也能一定程度上抑制 DMCs 复苏^[5,12]。在水产养殖过程中常常放养一定比例鳙(*Aristichthys nobilis*)以控制铜绿微囊藻种群生物量, 然多数学者认为这种“以鳙控藻”是利用鳙的滤食特性^[13-15], 很少关注鳙是否可以通过其他途径(如抑制 DMCs 复苏)来实现控藻。2021 年 7 月底, 本团队对一正暴

收稿日期: 2024-11-04; 修订日期: 2025-12-03.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD2401604); 湖南省教育厅重点项目(24A0492); 湖南省自然科学基金(2021JJ50024).

作者简介: 邹万生(1975-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为养殖水环境调控. E-mail: zwksy@huas.edu.cn

通信作者: 邹万生, 副教授, 研究方向为养殖水环境调控. E-mail: zwksy@huas.edu.cn

发铜绿微囊藻水华的养殖池塘利用戊二醛苯扎溴铵进行消毒杀藻处理,并分隔成三个小池塘分别放养鳙、鲇(*Silurus asotus*)和青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)。8—9 月份原位调查发现,鳙池塘上覆水体中铜绿微囊藻细胞密度显著低于鲇和青鱼池塘,假单胞菌 *Pseudomonas lactis* BJ-1(简称菌株 BJ-1)在鳙池塘沉积物中为优势菌,而鲇和青鱼池塘却未检测到此菌株。调查继而发现菌株 BJ-1 也是鳙肠道优势菌株,其随排泄物排入水体后定植于沉积物表层,并在沉积物表层快速增殖(与 DMCs 同处一生境)。由此我们推测,鳙池塘中铜绿微囊藻密度低可能是 DMCs(杀藻胁迫形成的休眠体)低复苏率导致,而低复苏率可能与菌株 BJ-1 相关。为检验来源于鳙肠道的假单胞菌株 *Pseudomonas lactis* BJ-1 是否影响沉积物表层 DMCs 复苏,以及探究菌株 BJ-1 可能的作用机理,本研究设计并开展了室内外复苏试验,以期能发现水产养殖过程中鳙肠道菌与 DMCs 复苏之间的内在关系,补充丰富“以鳙控藻”的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 休眠铜绿微囊藻(DMCs) 从暴发铜绿微囊藻水华鱼塘中采集表层水样,吸取 0.1 mL 水样于半固态 BG11 培养基(中国科学院水生所提供配方)上分离、纯化铜绿微囊藻;将纯化铜绿微囊藻接种于液态 BG11 培养基中,在温度 30 °C、光照强度 25 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 条件下扩培 25 d 并转移至 1000 mL 三角瓶中,用微通风膜封口,于 4 °C 冰箱中黑暗静置 3 个月。实验前使用虹吸管($\Phi 2.0$ cm)移除三角瓶中约 700 mL 上清液,浓缩制备成 DMCs 藻泥,步骤参考 Zou 等^[16]。

1.1.2 菌液 将假单胞菌株 *Pseudomonas lactis* BJ-1 接种于琼脂培养基(0.3%牛肉膏、0.8%蛋白胨、1.5%琼脂粉、0.5%葡萄糖、0.5%氯化钠、pH 7.2),25 °C 条件下培养 24 h 进行活化。用接种针挑选 10 个菌落,接种入 200 mL 液体培养基(0.5%葡萄糖、0.1%磷酸二氢铵、0.02%七水硫酸镁、0.5%氯化钠、0.1%磷酸二氢钾),25 °C 摇瓶培养 72 h 至菌浓度 1×10^8 cfu·mL⁻¹,以此为母液继续扩培,

菌液扩培按照母液与液体培养基体积 1 : 9 进行。

1.1.3 沉积物 沉积物采样点与水体采样点一致,用柱状 KC 沉积物采样器($\Phi 16.5$ cm, KC, 丹麦)采集鱼塘表层 5 cm 沉积物,用孔径 125 μm 不锈钢筛网(NUNC, 丹麦)过滤,将预处理沉积物密封于无菌塑料袋(体积 10 L)中,冷藏运回实验室进行灭菌(121 °C, 30 min)处理。

1.1.4 培养液 试验所用培养液为经过处理的富营养化池塘养殖水体:用 5 L 水样采样器(HYDRO-BIOS, 基尔, 德国)从西洞庭湖石拱桥生态渔业合作社一鱼塘处采集水样(水面下 0.5 m),用不锈钢筛网($\Phi 10$ μm , NUNC, 丹麦)对水样过滤预处理,冷藏于聚乙烯水箱中(体积 100 L/箱)快速运回实验室进行灭菌(121 °C, 30 min)处理。

1.2 实验方法

1.2.1 复苏试验设计 将 200 mL DMCs 藻泥(材料 1.1.1)分别与 0 mL (对照组 CK)、10 mL (G1 组)、100 mL (G2 组)和 300 mL (G3 组) BJ-1 菌液(材料 1.1.2)充分浸润后,各用 10 kg 沉积物(材料 1.1.3)混匀包埋,均匀铺入长、宽和高均为 50 cm 特制立方体玻璃容器底部,用导杆沿壁向玻璃容器中缓慢加入 80 L 培养液(材料 1.1.4);CK、G1、G2 和 G3 组沉积物中 BJ-1 菌初始包埋浓度分别为 0 cfu·g⁻¹、 1×10^5 cfu·g⁻¹、 10×10^5 cfu·g⁻¹ 和 30×10^5 cfu·g⁻¹, DMCs 初始包埋浓度均为 18.00 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (DMCs 浓度以叶绿素 a 浓度表示);将玻璃容器置于温度 25 °C、光强 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、光暗周期比 12 h : 12 h 环境中进行 21 d 复苏试验。取样时间和测定指标如表 1。

为确定菌株 BJ-1 增殖过程中泌出的代谢产物种类,将浓度 1×10^8 cfu·mL⁻¹ 菌母液 1 mL 移入 500 mL 培养液中振荡培养 6 d,获得菌株发酵液并与各复苏实验组同时测定代谢产物及浓度。将检出代谢产物及浓度进行验证性复苏实验,以确定纯代谢物对 DMCs 复苏、胞外多糖 EPSs (包括 SPSs 和 CPSs)含量、活性氧(ROS)相对水平及光合效率(F_v/F_m)的影响。同时为探讨菌株 BJ-1 可能对 DMCs 复苏产生抑制效应的分子机制,在实验第 2、4 和 6 d 对各组采集 100 g 沉积物浮提出 DMCs 并存于超低温冰箱(-80 °C),实验结束后

表 1 实验中取样时间及测定指标

Tab. 1 Sampling time and measurement indicators during the experiment

测定指标 measurement indicator	材料 material	取样时间 sampling time
DMCs 光合效率(F_v/F_m)	取 20 g 沉积物浮提 DMCs	第 1–6 d
DMCs 可溶性胞外多糖(SPSs)浓度	取 40 g 沉积物浮提 DMCs	第 1 d、第 6 d
DMCs 固着性胞外多糖(CPSs)浓度	取 40 g 沉积物浮提 DMCs	第 1 d、第 6 d
超氧化物歧化酶(SOD)活性	取 30 g 沉积物浮提 DMCs	第 4 d、第 6 d
过氧化物酶(POD)活性	取 30 g 沉积物浮提 DMCs	第 4 d、第 6 d
过氧化氢酶(CAT)活性	取 30 g 沉积物浮提 DMCs	第 4 d、第 6 d
活性氧(ROS)浓度	取 40 g 沉积物浮提 DMCs	第 4 d、第 6 d
DMCs(以 Chl a 表示)	取 30 g 沉积物浮提 DMCs	第 3、6、9、12、15、18 和 21 d
菌株 BJ-1 浓度	取 10 g 沉积物	第 3、6、9、12、15、18 和 21 d
复苏铜绿微囊藻细胞密度(以 Chl a 浓度表示)	取 20 mL 上覆水	第 3、6、9、12、15、18 和 21 d
代谢产物及浓度	取 50 mL 水样/沉积物-水界面	第 6 d
DMCs 转录组测序	取 100 g 沉积物浮提 DMCs	第 2、4 和 6 d

对显著受到复苏抑制的 DMCs 提取 RNA 并送北京诺禾致源测序、构建转录文库, 并进行基因差异表达分析。

1.2.2 沉积物中 DMCs 浮提 参照 Verspagen 等^[17]方法提取沉积物中 DMCs。使用负压取样器(Φ2.5 cm, KC, 丹麦)提取沉积物, 将沉积物与适量 Percoll 硅胶悬浮液(30% Percoll 原液, 10% NaCl 溶液, 60%双蒸水, 每 1 g 沉积物 4 mL Percoll 悬浮液)充分混合, 1200×g 离心 15 min, 用醋酸纤维素膜(25 μm)滤掉上清液。将滤膜上的 DMCs 用 15 mL BG11 试剂(微囊藻培养基)或蒸馏水洗涤保存, 用于测定各项设计参数。

1.2.3 叶绿素 a、光合效率和细菌浓度测定 用叶绿素荧光仪(Photo-PAM2500, Walz, 德国)直接检测浮提 DMCs 或已复苏铜绿微囊藻叶绿素 a (chl a)浓度和光合效率(F_v/F_m), 具体操作步骤参照 Hodoki 等^[18]; 使用吖啶橙荧光法^[19]测定沉积物中 BJ-1 菌浓度。

1.2.4 胞外多糖(EPSs)检测及对 DMCs 复苏验证 取 40 g 沉积物浮提休眠铜绿微囊藻(DMCs), 用 15 mL 蒸馏水洗涤混匀, 其中 5 mL 超声波打散藻细胞团(10 kHz、10 s), 取 0.1 mL 用血细胞计数板(25×16)镜检计数。另 10 mL 离心 15 min (3000×g), 纤维素酯滤膜(0.45 μm)抽滤获上清液, 参照 Nakagawa 等^[20]测定上清液 SPSs 含量。抽滤后的 DMCs 平均分成 2 份, 一份用于复苏验证实验以

探讨 SPSs 去除(不加 BJ-1 菌)对复苏的影响, 一份用蒸馏水复溶至 10 mL, 用 1.0 mol·L⁻¹ NaOH 调节溶液 pH 至 10, 30 ℃水浴 5 h, 离心 15 min (7000×g), 纤维素酯滤膜(0.45 μm)再抽滤上清液, 参照 Nakagawa 等^[20]测定上清液 CPSs 含量。余下 DMCs 用于复苏验证实验以探讨 SPSs 和 CPSs 均去除对复苏的影响, 为满足验证实验对 DMCs 的需求, 上述过程重复 5 次。单个藻细胞 SPSs 和 CPSs 的平均含量为测定的 SPSs 和 CPSs 总含量除以藻细胞数。

1.2.5 抗氧化酶活性及 ROS 浓度的测定 取定量沉积物浮提 DMCs 并用 15 mL BG11 试剂洗涤, 离心 10 min (3000×g), 弃上清液, 用万分之一电子天平称量 DMCs 生物量。继续加入 3mL 生理盐水, 用研磨机将 DMCs 固形物匀浆 3 min^[17]后, 严格按照试剂盒说明书测定 SOD (硝基蓝四氮唑光化学还原法)、CAT (愈创木酚法)、POD (NBT 光化学还原法)活性及 ROS (荧光分光光度法)相对水平。试剂盒均购自中国江苏碧云天(Beyotime)生物技术研究院。检测得到这些生物标记物的活性或含量后, 将结果标准化为 DMCs 生物湿重(FW, fresh weight)^[17]。

1.2.6 代谢产物测定和验证 取沉积物–水界面水样 50 mL, 离心 15 min (3500×g), 用 CH₂Cl₂ 在 pH 分别为 2.0、7.0 和 11.0 条件下对上清液进行三次提取。代谢产物成分与浓度采用气相色谱–

质谱法(GCMS-QP2015, 岛津, 日本)进行测定, 色谱柱为 DB-5 石英毛细管柱。温度条件: 初始柱温 60 °C 维持 4 min, 再以 5 °C min⁻¹ 的速率升温至 300 °C, 维持该温 5 min, 进样口温度 310 °C。质谱条件: 电子源轰击能量 70 eV, 离子源温度 320 °C, 扫描间隔 0.5 s。各峰利用质谱计算机数据系统检索并比对 Nist2005 和 Wiley275 标准质谱图, 峰面积法测定各代谢产物成分相对质量分数, 确定代谢产物分子式、化学结构和浓度^[21]。纯代谢物对 DMCs 复苏验证: 依据测定的代谢产物化学结构和分子式(对应 CAS 号)采购对应化学试剂(Sigma-Aldrich 公司), 按各组测定的代谢产物浓度进行复苏验证实验, 以不添加代谢产物为对照组测量 DMCs 复苏率、 F_w/F_m 、EPSs 和 ROS 等指标。设计梯度实验以确定代谢产物最小有效浓度, 具体步骤参照 Zou 等^[16]方法进行。

1.2.7 测序与差异表达基因分析 分别使用 TRIZOL R 试剂[®](Thermo Fisher Scientific, USA)和用于 Illumina 的 NEBNext[®]Ultra[™]RNA 文库制备试剂盒(NEB, USA)提取 DMCs 的 RNA 并构建文库。所有样本均在 Illumina 测序平台(HiSeq[™] 2500)上测序, 并通过 Trinity 组装成转录序列。利用 KEGG 和 Swiss-Prot 等数据库对单基因进行功能注释。通过 RSEM 将所有处理过滤的基因(clean reads)映射到组装好的转录组参考序列上, 计算每个基因的读值, 然后采用 FPKM 算法对每个基因的读值进行归化(Normalized)处理。使用基于负二项分布的 DESeq 软件筛选差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes), 调整后的 P 值(q)(<0.05)阈值和差异倍数对数(log2)绝对值(>1)用于确定基因表达的显著差异。采用实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测相关基因表达水平。详细步骤参考 Livak 等^[22]。

1.2.8 野外试验 将正暴发铜绿微囊藻水华的鱼塘(西洞庭湖石拱桥生态渔业基地)用生石灰(CaO)抑藻处理, 4 d 后排干鱼塘水并用防水膜和固定桩将其平均分为 2 个二级塘(a、b 塘), 每个二级塘均匀分成 3 个小塘。每小塘均匀喷洒 DMCs 藻泥 5 L, 每二级塘的 3 个小塘喷洒不同体积 BJ-1 菌液(对照组 CK 不喷洒, 另 2 个小塘菌浓度分别与室

内实验 G2 和 G3 组一致, 组别为野外 FG2 和 FG3 组), 再抽取过滤后外池水填充至 1.0 m 深。测定沉积物表层 DMCs 的初始浓度和水柱中铜绿微囊藻细胞密度, 第 21 d 再次测定, 计算休眠铜绿微囊藻群体复苏率。

1.2.9 复苏率计算 复苏率计算: $R\%=(C_i-C_r)/C_i \times 100\%$, 其中 C_i 表示沉积物中 DMCs 初始包埋浓度, C_r 表示实验结束时沉积物中 DMCs 浓度^[8]。

1.2.10 数据处理 试验各组均设 3 个平行, 以平均值 $\pm$ 标准差($n=3$; $\bar{x} \pm SD$)表示每组数据, 所有数据用 Excel 2016 软件进行处理, 采用 Excel 2016 和 Powerpoint 2016 软件作图, 采用双因素方差分析(ANOVA)进行显著性差异分析($P<0.05$ 具显著性差异, $P<0.01$ 具极显著性差异)。

2 结果与分析

2.1 BJ-1 菌对 DMCs 胞外多糖(EPSs)含量、光合效率及复苏影响

试验开始后的 0~6 d, G1、G2 和 G3 沉积物中 BJ-1 菌浓度持续上升, 第 6 d 达到峰值并维持稳定, 平均浓度分别为 0.99×10^7 cfu·g⁻¹, 3.40×10^7 cfu·g⁻¹ 和 5.21×10^7 cfu·g⁻¹(图 1a)。对照组 CK(无菌组)和 G1 组 DMCs 光合效率(F_w/F_m)逐渐提升, 后恢复至正常水平, 在 0.62~0.69 之间波动, 两组间无显著性差异。G2 和 G3 组 DMCs 光合效率(分别为 0.34 和 0.26)显著低于 CK 和 G1 组($P<0.05$)(图 1b、1c), 这表明菌浓度较高时($\geq 3.40 \times 10^7$ cfu·g⁻¹)对 DMCs 光合效率具有抑制作用。第 6 d, 沉积物中 DMCs 开始复苏, 并逐渐迁移至水柱中, 沉积物中 DMCs 浓度逐渐降低(图 1d), 水柱中藻浓度逐渐增大(图 1e)。CK 与 G1 组之间复苏率无显著性差异($P>0.05$), 但均显著高于 G2 和 G3 组($P<0.05$), G2 组复苏率又显著高于 G3 组(图 1f)。实验结束后 CK、G1、G2 和 G3 组最终 DMCs 复苏率分别为 76.6%、72.3%、29.4%和 15.3%。

同时, 随着菌株 BJ-1 浓度增加, G1、G2 和 G3 组 DMCs 细胞外围 EPSs 层较 CK 组变薄, DMCs 细胞间距增大, 群体松散(图 2a~2d)。实验第 6 d, 各菌组可溶性胞外多糖(SPSs)含量均显著低于 CK 组($P<0.05$), 且菌组之间无显著差异($P>0.05$)。G1

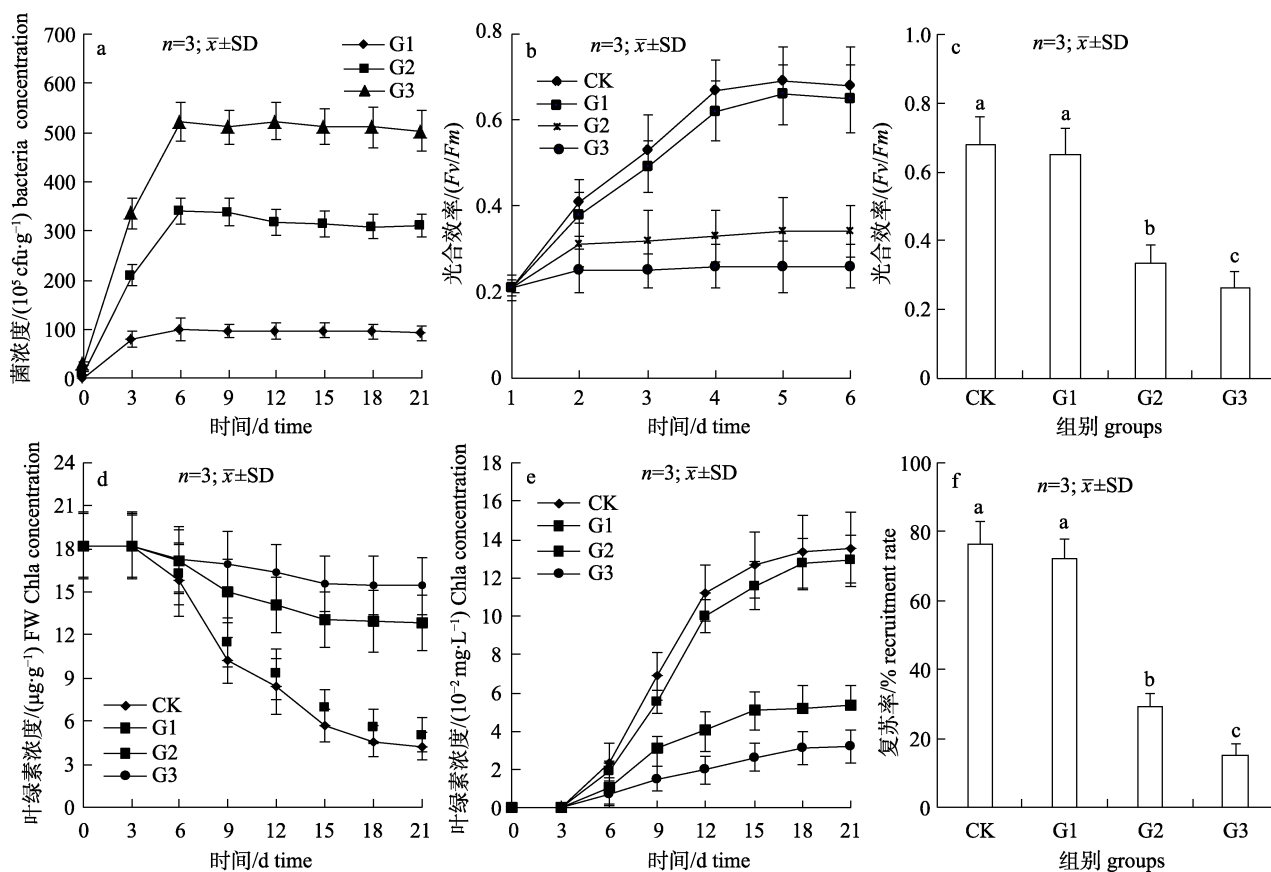


图1 菌株 BJ-1 浓度(a)、DMCs 光合效率(b-c)和复苏(d-f)动态

FW: 鲜重; CK: 对照组(不加菌); G1, G2 和 G3: 从低到高不同菌浓度组; 柱形图上方不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 1 Dynamics of strain BJ-1 concentration (a), photosynthetic efficiency (b-c) and recruitment rate of DMCs (d-f)

FW: fresh weight. CK: control group; G1, G2 and G3: groups with different bacterial concentration from low to high, respectively. Different letters above the column indicate significant difference ($P < 0.05$).

组固着性胞外多糖(CPSs)含量($1.98 \text{ pg} \cdot \text{cell}^{-1}$)与 CK 组($2.11 \text{ pg} \cdot \text{cell}^{-1}$)无显著差异,但显著高于 G2 和 G3 组(分别为 0.67 和 $0.34 \text{ pg} \cdot \text{cell}^{-1}$)(图 2e、2f)。这表明低浓度与较高浓度 BJ-1 菌均可去除 SPSs,但只有较高菌浓度能去除 CPSs。验证性复苏实验表明去除 SPSs 不影响 DMCs 光合效率和复苏率,而去除 CPSs 后 DMCs 光合效率和复苏率显著降低(图 2g、2h)。实验结果表明较高浓度 BJ-1 菌可去除 DMCs 的 CPSs、阻碍 DMCs 光合效率恢复,进而抑制 DMCs 复苏。

2.2 DMCs 细胞内活性氧水平及抗氧化酶活性

实验的第 4 d 和第 6 d, G1 组 DMCs 细胞内活性氧(ROS)水平(相对荧光水平)与 CK 组无显著性差异($P > 0.05$),均处于 $1.001 \sim 1.005$ 之间。而 G2 和 G3 组的 ROS 水平显著高于 CK 和 G1 组($P < 0.05$),同时, G3 组显著高于 G2 组($P < 0.05$)(图 3a),

这表明较低菌浓度不会对 DMCs 细胞内活性氧(ROS)水平产生影响,而较高菌浓度导致 DMCs 细胞内 ROS 水平显著升高。实验第 4 d 和第 6 d, G1 组 DMCs 抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 活性与 CK 组无显著差异($P > 0.05$),且 G1 和 CK 组第 6 d 的 SOD、POD、CAT 活性与第 4 d 相比无显著差异($P > 0.05$)。G2 和 G3 组的 SOD、POD 和 CAT 活性显著高于 G1 和 CK 组,且第 6 d 的 SOD、POD 和 CAT 活性显著高于第 4 d ($P < 0.05$)(图 3b~3d)。这些结果表明在较高浓度 BJ-1 菌条件下不仅 DMCs 细胞内活性氧(ROS)水平显著提升,其抗氧化酶 SOD、POD 和 CAT 活性也显著增强。

2.3 菌株 BJ-1 代谢产物对 DMCs 复苏的影响

从培养液、对照组(CK)、菌组(G1、G2 和 G3)及 BJ-1 发酵液中共提取到 17 种代谢物,其中 6 种代谢产物仅从菌组和发酵液中提取到,表明这

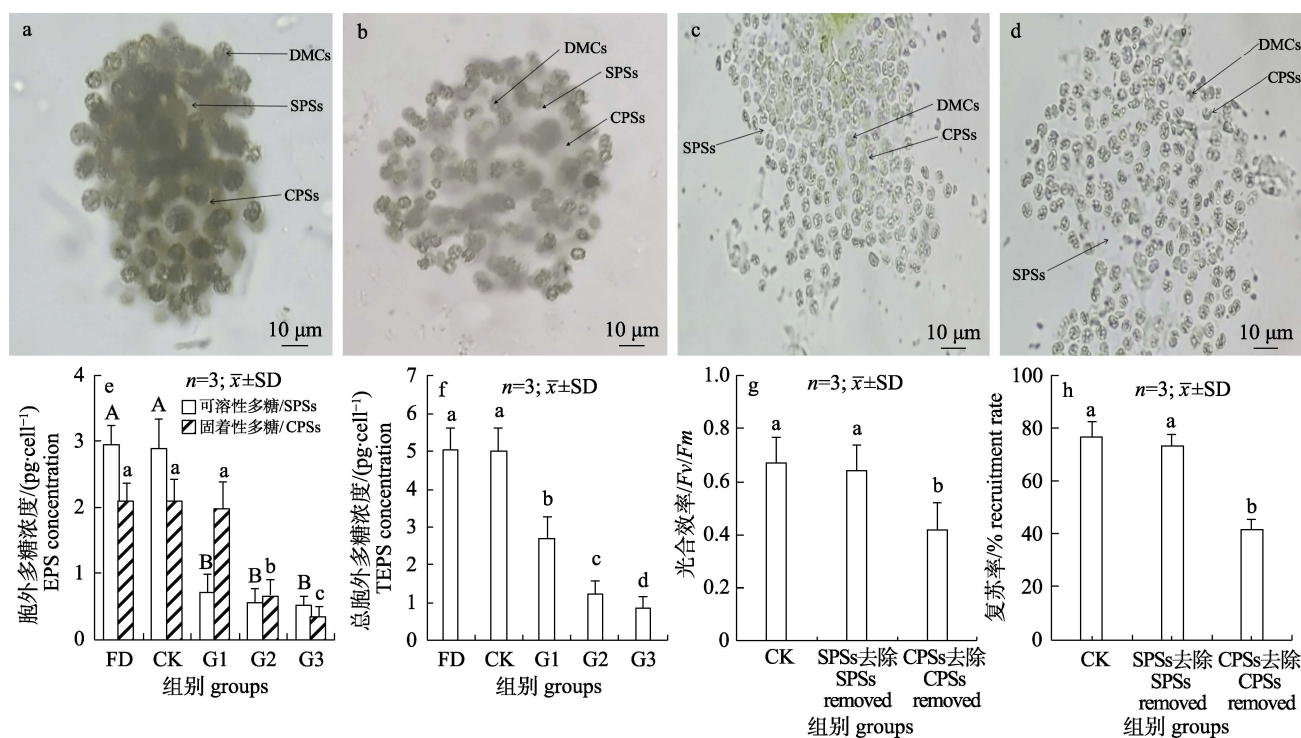


图 2 DMCs 胞外多糖形态(a-d)与含量(e-f)以及对 DMCs 光合效率(g)和复苏率(h)的影响

SPSs: 可溶性胞外多糖; CPSs: 固着性胞外多糖; FD: 第 1d. 图 2e 上方, 不同大写字母表示组间 SPSs 含量差异显著($P<0.05$), 不同小写字母表示组间 CPSs 含量差异显著($P<0.05$); 其他柱形图上方不同字母表示差异显著($P<0.05$).

Fig. 2 The morphology (a-d) and content of extracellular polysaccharides (e-f) in DMCs, and their effects on the photosynthetic efficiency (g) and recruitment rate (h) of DMCs

SPSs: soluble extracellular polysaccharides; CPSs: capsule extracellular polysaccharides; FD: first day. Different capital letters above the columns in panel e denote significant difference in SPSs content, and different lowercase letters denote significant difference in CPSs content. Different letters above the columns of other panels indicate significant difference ($P<0.05$).

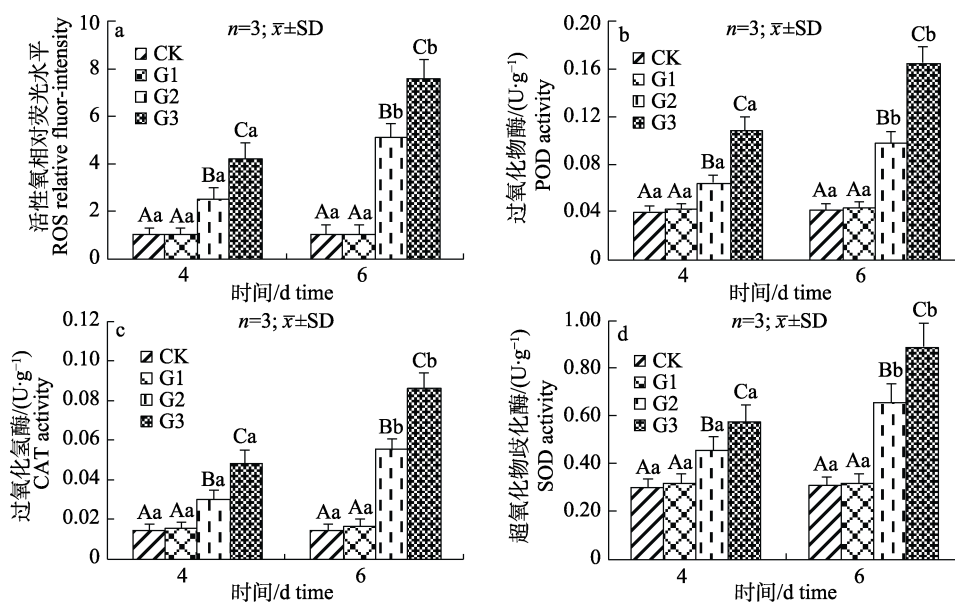


图 3 休眠铜绿微囊藻细胞内活性氧水平(a)与抗氧化酶活性(b-d)

柱形图上方不同大写字母表示同天不同组之间存在显著性差异, 不同小写字母表示同组不同天之间存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 3 Reactive oxygen species level (a) and activities of antioxidant enzyme (b-d) of DMCs among different groups

Different capital letters on the column denote significant differences among different groups on the same day.

Different lowercase letters denote significant differences among different days in the same group ($P<0.05$).

6 种代谢物均由 BJ-1 菌泌出, 分别为鼠李糖脂 A(CAS 869062-42-0)、1-氯庚烷(CAS 62016-79-9)、3,4-二氯双环[3.2.1]辛-2-烯(CAS 57615-42-6)、2-碘乙基-苯(CAS 17376-04-4)、3-苄基哌嗪-2,5-二酮(CAS 5037-75-2)和 2,4-双(1,1-二甲基乙基)-苯酚(CAS 96-76-4)。G1 组 6 种代谢物浓度分别为 0.13、0.56、0.35、0.98、0.26 和 0.56 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, G2 组为 1.47、0.51、1.12、1.16、0.95 和 1.23 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, G3 组为 1.66、0.58、1.53、1.08、1.41 和 1.37 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 2)。

验证性复苏实验(纯代谢物替代菌株 BJ-1, 验

证浓度为各组对应检出浓度)发现仅 G2 和 G3 组 3-苄基哌嗪-2,5-二酮(浓度分别 0.95 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.41 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)显著降低了 DMCs 复苏率(分别为 40.6%和 29.5%), G1 组(浓度 0.26 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)对 DMCs 复苏无显著影响(图 4a~4f), 这表明一定浓度的 3-苄基哌嗪-2,5-二酮具有抑制 DMCs 复苏的能力, 且浓度越高, 抑制效果越强。实验进一步发现 3-苄基哌嗪-2,5-二酮浓度与菌 BJ-1 浓度呈正向线性关系($R^2=0.997$)(图 4g), 抑制 DMCs 复苏的最低有效浓度为 0.80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 3), 对应的菌浓度为 $2.97\times 10^7 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 。实验按照 G2 组中检出的 6 种

表 2 各组(含培养液)代谢产物成分及浓度
Tab. 2 Composition and concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) of metabolites extracted from each group, culture solution and broth

n=3; $\bar{x}\pm SD$								
序号 item	代谢产物 metabolites (chemical compound)	分子式 formula	培养液 culture solution	CK	G1	G2	G3	BJ-1 发酵液 strain broth
1	3-苄基哌嗪-2,5-二酮 3-Benzylpiperazine-2,5-Dione	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	—	—	0.26±0.09 ^a	0.95±0.24 ^b	1.41±0.19 ^c	3.82±0.24
2	氯丙酸十八酯 3-Chloropropionic acid, Octadecyl ester	$\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{S}$	0.42±0.17	0.55±0.21	0.41±0.16	0.42±0.21	0.45±0.14	0.41±0.11
3	鼠李糖脂 A Rhamnolipid A	$\text{C}_{36}\text{H}_{64}\text{O}_{10}$	—	—	0.13±0.04 ^a	1.47±0.31 ^b	1.66±0.29 ^b	4.45±0.31
4	二甲基二甲氧基硅烷 Dimethoxydimethylsilane	$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{O}_2\text{Si}$	—	0.09±0.07	0.12±0.10	0.18±0.03	0.22±0.04	—
5	3-甲基十三烷 3-Methyl-Tridecane	$\text{C}_{14}\text{H}_{30}$	0.31±0.04	0.42±0.09	0.54±0.15	0.52±0.12	0.57±0.18	0.31±0.03
6	1-氯庚烷 1-Chloro-Heptacosane	$\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{Cl}$	—	—	0.56±0.09 ^a	0.51±0.17 ^a	0.58±0.13 ^a	2.74±0.17
7	D-柠檬烯 D-Limonene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	—	0.23±0.12	0.46±0.07	0.48±0.03	0.51±0.15	—
8	3,4-二氯双环[3.2.1]oct-2-烯 3,4-dichlorobicyclo [3.2.1]oct-2-ene	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{Cl}_2$	—	—	0.35±0.25 ^a	1.12±0.42 ^b	1.53±0.43 ^c	5.46±0.42
9	氯-2-硝基苄醇 4-chloro-2-nitrobenzyl alcohol	$\text{C}_7\text{H}_6\text{ClNO}_3$	—	0.33±0.05	0.37±0.04	0.41±0.06	0.39±0.07	—
10	十八酸 Octadecanoic acid	$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_3$	1.03±0.24	1.04±0.33	1.02±0.29	1.03±0.24	1.08±0.41	1.02±0.23
11	2-碘乙基-苯 (2-Iodoethyl)-benzene	$\text{C}_8\text{H}_9\text{I}$	—	—	0.98±0.13 ^a	1.16±0.22 ^a	1.08±0.23 ^a	4.83±0.22
12	(1-甲基十一烷基)-苯 (1-methylundecyl)-benzene	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}$	—	0.73±0.15	0.77±0.21	0.71±0.14	0.82±0.14	—
13	丁基羟基甲苯 2-Butylated hydroxytoluene	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	—	0.15±0.07	0.23±0.10	0.17±0.05	0.28±0.08	—
14	3,5-二甲氧基苯酚 3,5-dimethoxy-phenol	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$	0.24±0.08	0.45±0.07	0.32±0.04	0.46±0.11	0.48±0.07	0.25±0.05
15	2,4-二(1,1-二甲基乙基)-苯酚 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$	—	—	0.56±0.21 ^a	1.23±0.52 ^b	1.37±0.51 ^b	1.23±0.52
16	醋酸 acetic acid	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	0.31±0.15	1.14±0.32	1.40±0.27	1.35±0.19	1.31±0.15	0.18±0.05
17	2-甲基丁酸 2-Methylbutyric acid	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$	—	0.43±0.21	0.63±0.16	0.65±0.04	0.74±0.12	—

注: 同行平均值后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); “—”表示未检出。
Note: Different lowercase letters after mean values in the same row indicate significant differences ($P<0.05$); “—” indicates that the substance was not detected.

表 3 代谢产物 3-苄基哌嗪-2,5-二酮对
休眠体复苏的影响
Tab. 3 Effects of metabolites 3-Benzylpiperazine-
2,5-Dione on the recovery of DMCs

n=3; $\bar{x} \pm SD$

代谢产物 metabolites	实验浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) experiment concentration	复苏率(%) recruitment rate	P 值 P value
3-苄基哌嗪-2,5-二酮 3-Benzylpiperazine- 2,5-Dione	0.00	77.75 $\pm$ 4.86	1.000
	0.40	73.02 $\pm$ 6.45	0.367
	0.60	71.44 $\pm$ 5.28	0.198
	0.80	69.17 $\pm$ 2.35*	0.049
	1.00	38.81 $\pm$ 3.16**	<0.001
	1.20	33.76 $\pm$ 2.72**	<0.001
	1.40	30.26 $\pm$ 3.15**	<0.001

注: *表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$.
Note: * means $P<0.05$; **means $P<0.01$.

代谢产物浓度再次进行验证试验, 6 种代谢物均未对 DMCs 的 EPSs 浓度(包括 SPSs 和 CPSs)产生显著影响(图 4h), 仅 3-苄基哌嗪-2,5-二酮($0.95\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)显著提高了 DMCs 的 ROS 水平, 抑制了 DMCs 的光合效率(图 4i~4j)。这说明 BJ-1 菌通过泌出较高浓度的 3-苄基哌嗪-2,5-二酮提高 DMCs 的 ROS 水平以抑制 DMCs 的光合效率, 实现抑制 DMCs 复苏。另外, 尽管 G2 组对应的纯 3-苄基哌嗪-2,5-二酮与菌株 BJ-1 组泌出的 3-苄基哌嗪-2,5-二酮浓度均为 $0.95\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 但前者 DMCs 光合效率和复苏率显著高于后者($P<0.05$), G3 组(3-苄基哌嗪-2,5-二酮浓度 $1.41\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)类同(图 4k~4l)。这表明菌株 BJ-1 通过泌出 3-苄基哌嗪-2,5-二酮和去除 DMCs 胞外多糖共同抑制了 DMCs 光合效率和复苏。

2.4 DMCs 测序建库及基因差异表达

通过对 G2 组(复苏显著受抑组)DMCs 测序、建库分析, 共获得 5803803 个单基因, 平均长度 404 bp。功能注释结果显示基因占比较高的代谢通路 31 类(涉及基因 719314 个), 主要包括运输和分解代谢、细胞生长和死亡、信号转导、碳水化合物代谢和翻译(图 5)。比较 G2 组(处理组, TR)和 CK 组 DMCs 在复苏早期的基因表达状况, 实验第 2 d, G2 和 CK 组之间有 21 个差异表达基因(DEGs), 第 4 d, 存在 420467 个 DEGs, 与 CK 组

对比 G2 组中有 126279 个基因上调, 294188 个基因下调(图 6a, 6c), 第 6 d, G2 组 212573 个 DEGs 中的 118448 个表达显著下调(图 6b~6c)。第 4 d 与第 6 d, G2 组中 *recA*、*psbD1*、*rbcL* 和 *ntcA* 基因的相对表达水平较 CK 组显著下调, 尤其与光合作用相关基因 *rbcL* 和 *psbD1* (图 6d~6g)。这表明较高浓度 BJ-1 菌对复苏早期 DMCs 基因表达产生影响, 同时证实了 BJ-1 菌可以抑制复苏期 DMCs 的光合效率。

2.5 菌株 BJ-1 野外对 DMCs 复苏影响

在 a 塘中, FG2、FG3 组沉积物中 DMCs 复苏率分别为 39.2%和 22.7%, 显著低于对照组复苏率(68.7%), FG3 组复苏率显著低于 FG2 组($P<0.05$)。在 b 塘中, FG2、FG3 组沉积物中 DMCs 复苏率分别为 38.6%和 23.2%, 显著低于对照组复苏率(66.9%), FG3 组复苏率也显著低于 FG2 组($P<0.05$)。a 和 b 池塘各对应小塘(对照组、FG2 或 FG3)的 DMCs 复苏率没有显著差异(图 7a)。上覆水柱中已复苏铜绿微囊藻细胞密度差异与沉积物中 DMCs 复苏率差异基本一致(图 7b)。野外试验结果表明, 在池塘水体中一定浓度 BJ-1 菌可以抑制 DMCs 复苏, 且浓度越高, 抑制能力越强。

3 讨论

3.1 菌株 BJ-1 对 DMCs 复苏影响

本研究发现源自鲢肠道排泄物中的假单胞菌株 *Pseudomonas lactis* BJ-1 在较高浓度下显著抑制了 DMCs 复苏(DMCs 复苏率显著下降)。DMCs 复苏是水产养殖水域铜绿微囊藻水华暴发的关键环节, 也是铜绿微囊藻重要的生活史特征之一^[3-4], 挖掘直接或间接抑制 DMCs 复苏的水生微生物菌群, 对从前端防控铜绿微囊藻水华暴发具有重要意义。目前关于水生微生物菌群影响 DMCs 复苏的报道并不多见, 已有报道也主要集中在水生菌株促进 DMCs 复苏领域, 如 Zou 等^[16]从西洞庭冲天湖水域筛选出了 2 株能促进 DMCs 复苏的芽孢杆菌(*Bacillus*), 随后 Wang 等^[23]对 2 菌株促进 DMCs 复苏的机理进行了深入研究; 邹万生等^[24]从鲢和青鱼排泄物中分离出 3 株肠道菌(分别为假单胞菌 *Pseudomonas*、芽孢杆菌 *Bacillus* 和厚壁菌

Firmicutes), 3 菌株在较低温度下(10 和 15 °C)均具有显著提升 DMCs 光合效率并促进 DMCs 复苏

的能力。目前暂未见关于水生菌株抑制 DMCs 复苏的相关报道。

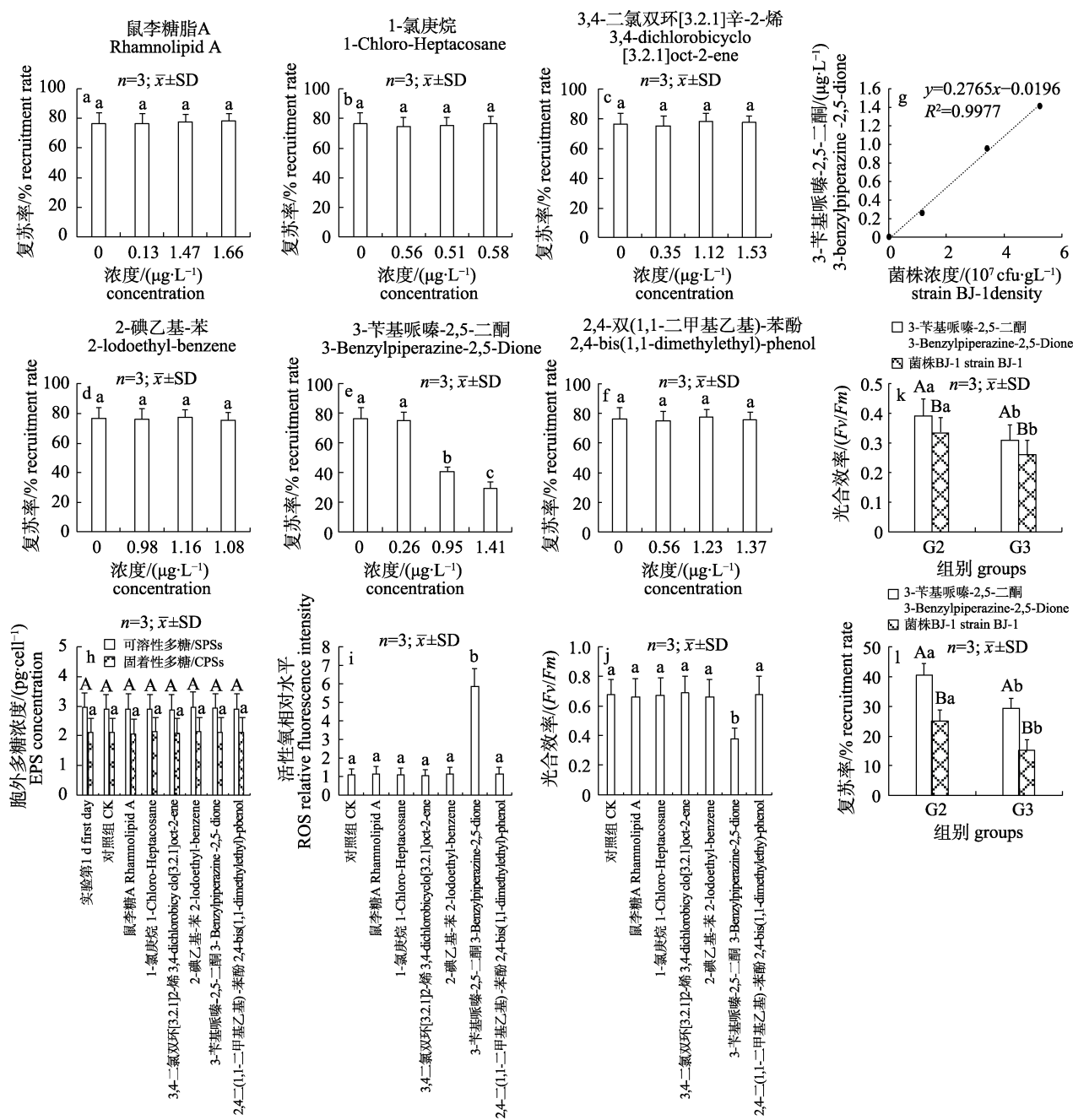


图4 纯代谢产物暴露下 DMCs 复苏率(a-f)、代谢产物与对应菌浓度(g)、胞外多糖浓度(h)、活性氧水平(i)和光合效率(j), 以及与菌株对比的光合效率和复苏率(k-l)

柱状图 h 上方不同大、小写字母分别表示组间 SPSs 和 CPSs 具显著差异; 柱状图 k 与 l 上方不同大写字母表示组内显著差异, 不同小写字母表示组间显著差异; 其他柱状图上方不同字母表示显著差异 ($P < 0.05$).

Fig. 4 Recruitment rate (a-f), corresponding bacterial concentration (g), EPSs concentration (h), ROS level (i), and photosynthetic efficiency (j) of each group under pure metabolite exposure, and which were compared with bacterial strains (k-l). Different capital and lowercase letters above the columns in panel h indicate significant differences in SPSs and CPSs among groups, respectively; Different capital letters above the columns in panels k and l indicate significant differences within groups, while different lowercase letters indicate significant differences between groups; Different letters above the columns of other panels indicate significant difference ($P < 0.05$).

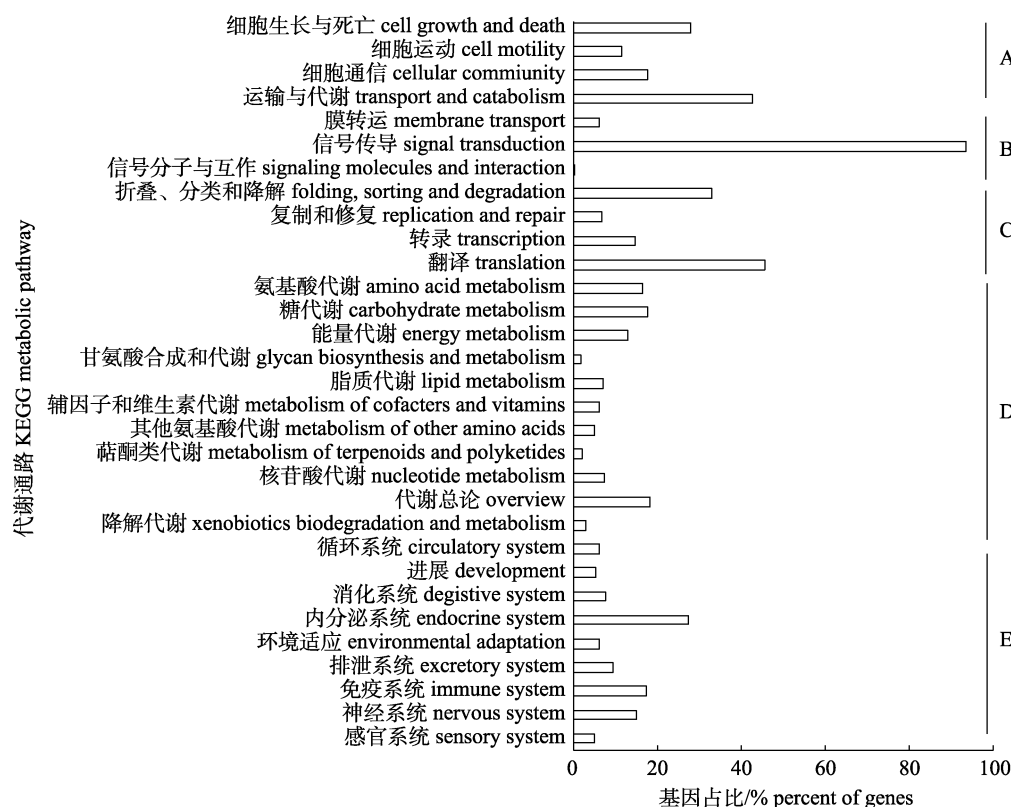


图 5 菌株 BJ-1 暴露下铜绿微囊藻休眠体注释基因富集的 KEGG 代谢途径

A-E 分别表示细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、新陈代谢和有机系统。

Fig. 5 KEGG metabolic pathways of the DMCs, which exposed strain BJ-1

A-E represent cellular processes, environmental information processing, genetic information processing, metabolism and organic systems, respectively.

菌株 BJ-1 能抑制 DMCs 复苏可能是鲢养殖池塘极少暴发水华的重要原因。有研究表明水产养殖过程中搭配放养一定数量的鲢(非经典生物操纵)可以有效防控铜绿微囊藻水华^[13,15], 然“以鲢控藻”机理目前尚不完全清晰, 有研究认为它利用了滤食性生物可以直接摄食并消化铜绿微囊藻细胞的特性^[13-14]; 而又有研究发现, 对于外围包裹着胞外多糖(EPSs)层的团体藻细胞, 鲢摄食并不会对铜绿微囊藻细胞构成完全损伤, 群体藻细胞被吞食后进入休眠状态(形成 DMCs)而不会被消化, 并最终通过肠道排泄物方式排出体外, DMCs 仍保持活性并在短期内复苏^[15]。本研究中当鲢肠道中分离的菌株 BJ-1 包埋浓度(接种)为 10×10^5 cfu·g⁻¹ 时, 6 d 后 BJ-1 菌浓度达 3.4×10^7 cfu·g⁻¹, DMCs 复苏率显著下降, 这表明菌株 BJ-1 在沉积物中具有较强的增殖能力(活性), 当增殖到一定浓度后可以显著抑制 DMCs 复苏(本实验证实了抑制

DMCs 复苏的最低有效菌浓度为 2.97×10^7 cfu·g⁻¹), 而 DMCs 低复苏率直接影响铜绿微囊藻水华的形成^[6]。同时, 本团队前期在对野外鲢养殖塘(水深 1.5 m)原位调查中发现适温条件下(25 °C)鲢肠道排泄物中菌株 BJ-1 浓度为 7.5×10^8 cfu·g⁻¹, 池塘表层沉积物中菌浓度达 3.2×10^7 cfu·g⁻¹(按照鲢放养密度 1.5 kg/m³、日排泄物量 2~3 g/kg 及本实验沉积物中菌株 BJ-1 接种浓度 10×10^5 cfu·g⁻¹ 推算, 约 9 d 后达到该浓度), 上覆水体却未检出该菌株, 且上覆水体铜绿微囊藻细胞密度显著低于鲢和青鱼池(对照组), 这表明菌株 BJ-1 随鲢肠道排泄物排入水体后定殖于表层沉积物中, 通过增殖对处于同一生境的 DMCs 产生了复苏抑制, 这也间接佐证了 DMCs 即使不被鲢肠道消化, 其复苏也将面临菌株 BJ-1 抑制。本研究中野外试验也证实菌株 BJ-1 可以在池塘生态系统中降低 DMCs 复苏率。为此, 鲢肠道假单胞菌株

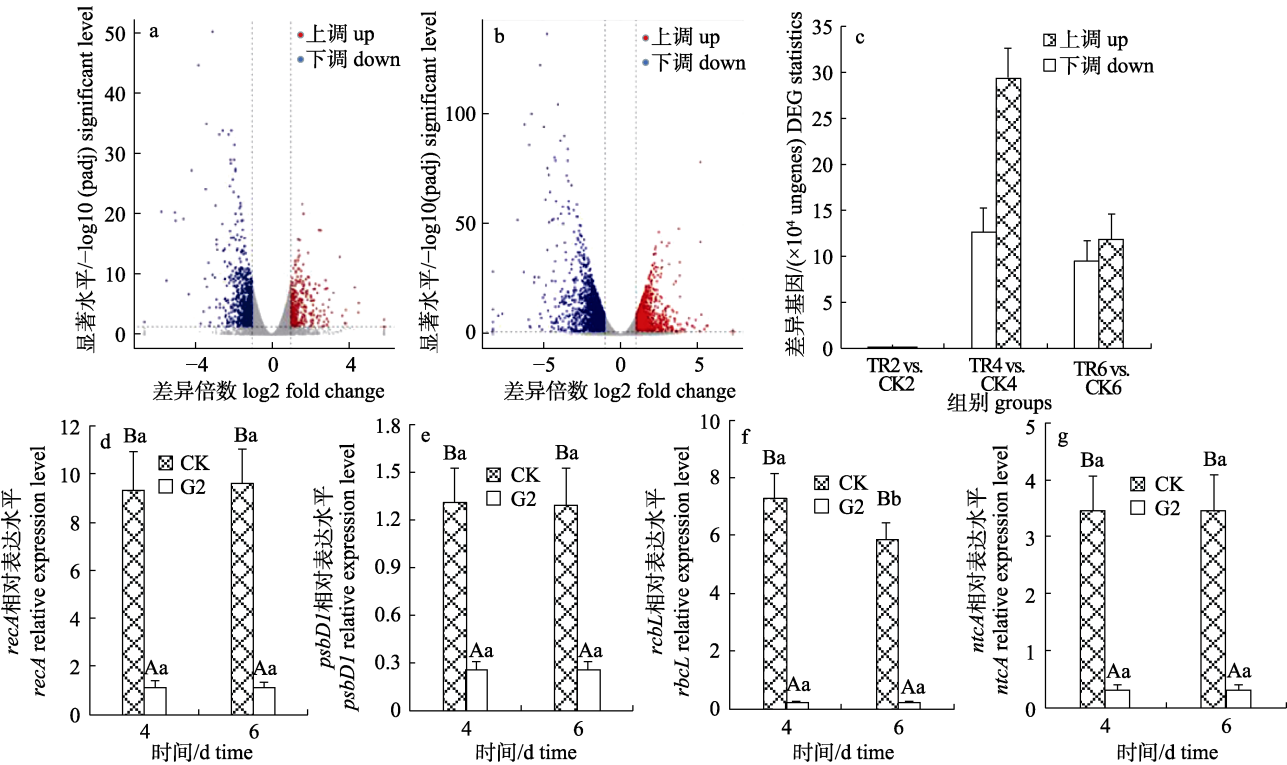


图 6 第 2, 4 和 6 d 休眠铜绿微囊藻基因表达(G2 组与 CK 组比对)

a. 实验第 4 d 的 DMCs 基因表达情况; b. 实验第 6 d 的 DMCs 基因表达情况. CK2, CK4 和 CK6: 对照组(无菌组)的第 2, 4 和 6 d; TR2, TR4 和 TR6: G2 菌组的第 2, 4 和 6 d. 柱状图上方不同大写字母表示处理组与对照组之间基因的相对表达水平差异显著, 不同小写字母表示同一基因在不同时间相对表达水平差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Gene expression of DMCs on the 2nd, 4th, and 6th days during recruitment experiment (G2 group was compared with CK group)

a. gene expression of DMCs on the 4th day of the experiment; b. gene expression of DMCs on the 6th day of the experiment. CK2, CK4, and CK6: the 2nd, 4th, and 6th day of the control group; TR2, TR4, and TR6: the 2nd, 4th, and 6th day of the bacterial group G2. Different capital letters on the panels indicated significant differences in relative expression level of the same gene between the G2 and CK group on the same day, and different lowercase letters indicated significant differences in relative expression level of the same gene at different times ($P<0.05$).

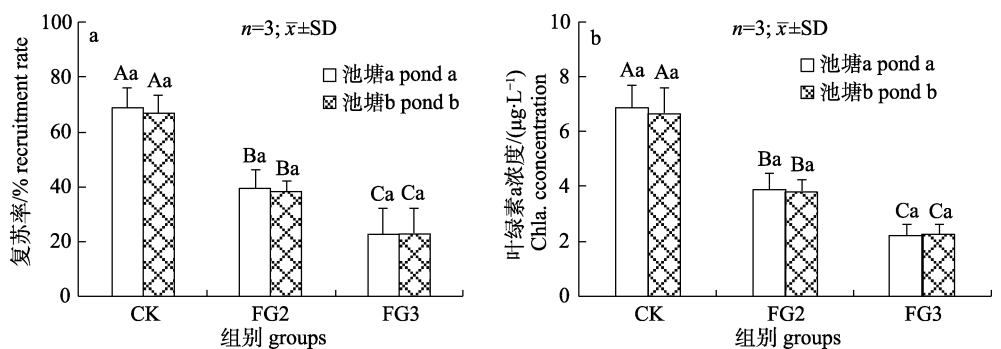


图 7 野外实验休眠铜绿微囊藻群体复苏率

CK: 对照组; FG2 和 FG3: 野外试验池塘沉积物中 BJ-1 菌浓度与室内实验组 G2 和 G3 一致的组. 不同大写字母代表同一池塘不同组之间的复苏率或叶绿素 a 浓度存在显著性差异, 不同小写字母不同池塘对应组之间的复苏率或叶绿素 a 浓度存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 7 Recruitment rate of DMCs population in field experiments

CK: control group; FG2: group with the concentration of strain BJ-1 on the sediment surface consistent with the G2 group; FG3: group with the concentration of strain BJ-1 on the sediment surface consistent with the G3 group. Different capital letters above the columns indicate significant differences in the recruitment rate of DMCs or algal density between different groups in the same pond, and different lowercase letters indicate significant differences in the same group ($P<0.05$).

Pseudomonas lactis BJ-1 可能在“以鲮控藻”过程中发挥积极作用。

3.2 胞外多糖对 DMCs 光合效率及复苏影响

本研究中菌株 BJ-1 显著降低了 DMCs 的胞外多糖(EPSs)含量,表明 BJ-1 菌株具有去除或降解 DMCs 胞外多糖的能力。尽管有研究发现铜绿微囊藻在遭遇环境胁迫时 EPSs 可以抵御或减轻浮游生物对藻细胞的伤害^[25],甚至具有一定防御溶藻细菌的能力^[26]。然更多研究表明水域生态系统中存在一些可直接接触降解铜绿微囊藻 EPSs 层菌株,可使铜绿微囊藻细胞丧失保护屏障,光合效率下降、光合作用减弱^[27-28],有些菌株还能分泌代谢产物氧化损伤 EPSs 间接影响铜绿微囊藻细胞的光合效率和活性^[29],甚至少数菌株可同时利用这两种途径诱导铜绿微囊藻细胞光合效率下降,导致藻细胞凋亡^[30]。然而,本研究发现低浓度 BJ-1 菌虽然导致了 DMCs 的可溶性胞外多糖(SPSs)含量降低(EPSs 总含量也相应降低),但没有导致 DMCs 光合效率下降,也不影响 DMCs 复苏,这表明即使 EPSs 总含量降低,但仅仅只去除或破坏了 SPSs,则对 DMCs 的光合效率和复苏率没有显著影响,DMCs 细胞仍维持正常生理活性,这似乎与上述已报道的研究结果相悖。但本研究进一步发现在较高 BJ-1 菌浓度($\geq 3.40 \times 10^7$ cfu·g⁻¹)条件下,DMCs 可溶性胞外多糖(SPSs)和固着性胞外多糖(CPSs)含量均显著降低,DMCs 光合效率和复苏率也显著下降,说明去除或破坏 CPSs 才是抑制 DMCs 光合效率和复苏率的决定性因素,本研究首次探讨了 CPSs 与 DMCs 复苏之间的内在关系。

另外,本研究中较高浓度 BJ-1 菌条件下 DMCs 一些与氧化磷酸化相关的基因显著下调。前期研究表明 DMCs 在复苏期泌出 EPSs,可以增加铜绿微囊藻细胞在水中的浮力并垂直迁移到水面,从而获得足够光能^[31-32]。然而, EPSs 的体内合成和向体表转运都需要大量的三磷酸腺苷(ATP),而 ATP 受到氧化磷酸化限制^[33]。因此,与氧化磷酸化相关基因显著下调表明 DMCs 的氧化磷酸化进程受阻,影响了 EPSs 的合成和转运,阻断 EPSs

的补偿机制,这也可能是 BJ-1 菌条件下 EPSs 含量较低的原因之一。

3.3 菌株 BJ-1 代谢产物对 DMCs 光合效率和复苏的影响

本研究中菌株 BJ-1 在较高浓度下(G2 与 G3 组)可泌出代谢产物 3-苄基哌嗪-2,5-二酮,在浓度高于 $0.80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著提高 DMCs 体内活性氧(ROS)水平,虽该代谢产物不影响 DMCs 的胞外多糖(EPSs)含量,但显著降低了 DMCs 复苏率,这表明菌株 BJ-1 不仅通过破坏 EPSs 结构,而且还通过泌出代谢产物 3-苄基哌嗪-2,5-二酮共同抑制 DMCs 复苏。目前关于菌株代谢产物抑制 DMCs 复苏的研究甚少,但类似于溶藻菌株泌出的外源代谢物用于治理各类藻类水华的报道并不鲜见^[34]。菌株 *Bacillus* sp.Lzh-5 可泌出 3-异丙基-六氢吡咯[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮代谢产物,该物质对处于细胞增殖期的铜绿微囊藻具有较强的溶解能力,菌株 *Aeromonas* sp.GLY-2107 能分泌 3-甲基吡啶使铜绿微囊藻细胞凋零失活^[35],而菌株 *Paucibacter aquatile* DH15 可分泌一种 *Paucibatin A* 的代谢产物以抑制铜绿微囊藻细胞的分裂增殖^[36]。少数研究还进一步探索代谢产物的抑藻机理,新鞘氨醇瘤菌 *Novosphingobium* sp. ERW19 通过分泌新鞘氨醇瘤素类(*novosphingonodin* I 和 II 类)化合物,诱导藻细胞内 ROS 浓度显著增加,ROS 的过度累积破坏了藻类细胞的膜系统,从而有效抑制了铜绿微囊藻的生长^[37]。代谢物 N-苄基-2-萘胺和乙酰丙酮可诱导铜绿微囊藻细胞内产生过量的 ROS,同时伴随着细胞内 SOD、POD 和 CAT 活性的显著增强^[38]。本研究中,3-苄基哌嗪-2,5-二酮对复苏期 DMCs 的作用机理与上述代谢产物具有类似性。

本研究中代谢产物 3-苄基哌嗪-2,5-二酮暴露下 DMCs 细胞内 ROS 的相对水平显著升高,光合效率显著下降。有研究表明藻类细胞的抗氧化系统虽可以清除一定浓度水平的 ROS,然过量 ROS 会干扰藻类细胞的光合系统 II (PSII)并降低其光合效率^[39]。还有研究报道菌株 *Hahella* sp. KA22 能泌出一种通过质膜转运的 Tripyrrole R 代谢物质,可导致藻类细胞 ROS 水平急剧上升,通过损

伤藻类细胞膜系统、质膜及类囊体膜,使藻细胞光合效率下降直至凋亡^[40]。这表明 3-苄基哌嗪-2,5-二酮可能通过诱导 DMCs 过量 ROS 产生而抑制 DMCs 光合效率,最终导致 DMCs 复苏率下降。然而,过量的 ROS 不仅会抑制藻细胞光合效率,还会导致细胞膜脂质体、核糖体、细胞核(DNA)和藻蛋白的氧化损伤^[41],代谢产物 3-苄基哌嗪-2,5-二酮诱导产生的 ROS 是否也通过类似途径抑制 DMCs 复苏还有待进一步研究。

另外,从 DEGs 的表达分析看,本研究中编码 DNA 修复酶基因 *recA* 基因^[42]表达的显著下调表明 DMCs 的自我修复能力显著降低, *psbD1* 基因(编码蛋白 D2)是与光合系统 II (PS II)相关的重要蛋白基因^[43],这些基因相对表达显著下调,说明 PS II 在 DMCs 中的修复被阻断,导致 DMCs 的光合效率下降。同时,与催化固定、碳化和氮代谢相关的 *ntcA* 和 *rbcL* 基因相对表达水平显著降低,而这些基因与 DMCs 光合效率及光合作用间接相关^[41]。这些结果进一步证实 BJ-1 菌株通过泌出代谢产物 3-苄基哌嗪-2,5-二酮抑制 DMCs 光合效率和复苏。

4 结论

沉积物中假单胞菌株 *Pseudomonas lactis* BJ-1 浓度较高($\geq 3.40 \times 10^7$ cfu·g⁻¹)时可显著降低 DMCs 复苏率,而其浓度较低($\leq 0.99 \times 10^7$ cfu·g⁻¹)对 DMCs 复苏率无显著影响。较高浓度 BJ-1 菌降低了 DMCs 的 EPSs (主要是 CPSs)含量,抑制了 DMCs 的光合效率和复苏。同时,菌株 BJ-1 通过分泌代谢物 3-苄基哌嗪-2,5-二酮抑制了 DMCs 光合效率(有效浓度 $0.80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),进一步阻碍 DMCs 复苏。较高浓度 BJ-1 菌处理(暴露)后,与 DMCs 光合作用相关的光合基因(*psbD1*)、DNA 修复酶基因(*recA*)和固碳基因(*ntcA* 和 *rbcL*)等显著下调。这些实验结果表明菌株 BJ-1 通过抑制 DMCs 的光合效率而阻碍了 DMCs 复苏。

参考文献:

[1] Huo D, Gan N Q, Geng R Z, et al. Cyanobacterial blooms in China: Diversity, distribution, and cyanotoxins[J]. Harmful

Algae, 2021, 109: 102106.

- [2] Su F W, Gao P C, Lai Q F, et al. Effects of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella pyrenoidosa* on water environment pH[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1380-1388. [苏发文, 高鹏程, 来琦芳, 等. 铜绿微囊藻和小球藻对水环境 pH 的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1380-1388.]
- [3] Preston T, Stewart W D P, Reynolds C S. Bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* overwinters on sediment surface[J]. Nature, 1980, 288: 365-367.
- [4] Chen Q W, Wang M, Zhang J Y, et al. Physiological effects of nitrate, ammonium, and urea on the growth and microcystins contamination of *Microcystis aeruginosa*: Implication for nitrogen mitigation[J]. Water Research, 2019, 163: 114890.
- [5] Coyne K J, Wang Y F, Johnson G. Algicidal bacteria: A review of current knowledge and applications to control harmful algal blooms[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 871177.
- [6] Ma J R, Qin B Q, Paerl H W, et al. The persistence of cyanobacterial (*Microcystis* spp.) blooms throughout winter in Lake Taihu, China[J]. Limnology and Oceanography, 2016, 61(2): 711-722.
- [7] Misson B, Latour D. Influence of light, sediment mixing, temperature and duration of the benthic life phase on the benthic recruitment of *Microcystis*[J]. Journal of Plankton Research, 2012, 34(2): 113-119.
- [8] Tang J, Song L R, Sun S S, et al. Recruitment ability of *Microcystis aeruginosa* under low light-low temperature combination[J]. Environmental Science, 2010, 31(12): 2932-2937. [汤俊, 宋立荣, 孙松松, 等. 低光低温联合作用对铜绿微囊藻复苏能力的影响[J]. 环境科学, 2010, 31(12): 2932-2937.]
- [9] Wang X Y, Zhao Y, Jiang X X, et al. The growth and physiological activity of *Microcystis aeruginosa* after flocculation using modified tannin[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 133: 180-186.
- [10] Zhang M, Shi X L, Yu Y, et al. The acclimative changes in photochemistry after colony formation of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*[J]. Journal of Phycology, 2011, 47(3): 524-532.
- [11] Yang Z, Zhang M, Shi X L, et al. Nutrient reduction magnifies the impact of extreme weather on cyanobacterial bloom formation in large shallow Lake Taihu (China)[J]. Water Research, 2016, 103: 302-310.
- [12] Duan Z P, Tan X, Parajuli K, et al. Colony formation in two *Microcystis* morphotypes: Effects of temperature and nutrient

- availability[J]. *Harmful Algae*, 2018, 72: 14-24.
- [13] Sierp M T, Qin J G, Recknagel F. Biomanipulation: A review of biological control measures in eutrophic waters and the potential for Murray cod *Maccullochella peelii peelii* to promote water quality in temperate Australia[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2009, 19(2): 143-165.
- [14] Xie P, Liu J K. Practical success of biomanipulation using filter-feeding fish to control cyanobacteria blooms: A synthesis of decades of research and application in a subtropical hypereutrophic lake[J]. *The Scientific World Journal*, 2001, 1: 337-356.
- [15] Wang S, Wang Q S, Zhang L B, et al. Large enclosures experimental study on algal control by silver carp and bighead[J]. *China Environmental Science*, 2009, 29(11): 1190-1195. [王嵩, 王启山, 张丽彬, 等. 水库大型围隔放养鲢鱼、鳙鱼控藻的研究[J]. *中国环境科学*, 2009, 29(11): 1190-1195.]
- [16] Zou W S, Wang Z, Song Q S, et al. Recruitment-promoting of dormant *Microcystis aeruginosa* by three benthic bacterial species[J]. *Harmful Algae*, 2018, 77: 18-28.
- [17] Verspagen J M H, Sneldere O F, Visser P M, et al. Recruitment of benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) to the water column: Internal buoyancy changes or resuspension[J]. *Journal of Phycology*, 2004, 40(2): 260-270.
- [18] Hodoki Y, Ohbayashi K, Kobayashi Y, et al. Temporal variation in cyanobacteria species composition and photosynthetic activity in experimentally induced blooms[J]. *Journal of Plankton Research*, 2011, 33(9): 1410-1416.
- [19] Liu C H, Sahoo S L, Tao M H. Acridine orange coated magnetic nanoparticles for nucleus labeling and DNA adsorption[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 115: 150-156.
- [20] Nakagawa M, Takamura Y, Yagi O. Isolation and characterization of the slime from a Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* K-3A[J]. *Agricultural Biological Chemistry*, 1987, 51(2): 329-337.
- [21] Pautova A K, Sobolev P D, Revelsky A I. Analysis of phenylcarboxylic acid-type microbial metabolites by microextraction by packed sorbent from blood serum followed by GC-MS detection[J]. *Clinical Mass Spectrometry*, 2019, 14: 46-53.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] Wang J, Peng Y D, Wang Z, et al. Transcriptional response of *Microcystis aeruginosa* to the recruitment promoting-benthic bacteria[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2022, 40(1): 153-162.
- [24] Zou W S, Wang Z, Song Q S, et al. Effect and track of *Mylopharyngodon piceus* and *Silurus asotus* intestinal excreta on the recruitment of dormant *Microcystis aeruginosa* in aquaculture water[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(4): 563-577. [邹万生, 王智, 宋齐生, 等. 青鱼和鲇肠道排泄物对养殖水体铜绿微囊藻休眠体复苏的影响及作用途径[J]. *水产学报*, 2021, 45(4): 563-577.]
- [25] He Y L, Ji L, Yuan Y C, et al. Recent advances in polysaccharide-dominated extracellular polymeric substances from microalgae: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025: 140572.
- [26] Wang X Y, Xie M J, Wu W, et al. Differential sensitivity of colonial and unicellular *Microcystis* strains to an algicidal bacterium *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Plankton Research*, 2013, 35(5): 1172-1176.
- [27] Park B S, Park C S, Shin Y, et al. Different algicidal modes of the two bacteria *Aeromonas bestiarum* HYD0802-MK36 and *Pseudomonas syringae* KACC10292^T against harmful cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*[J]. *Toxins*, 2022, 14(2): 128.
- [28] Zeng Y D, Wang J Y, Yang C Y, et al. A *Streptomyces globisporus* strain kills *Microcystis aeruginosa* via cell-to-cell contact[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 769: 144489.
- [29] van Le V, Kang M, Ko S R, et al. Dynamic response of bacterial communities to *Microcystis* blooms: A three-year study[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 902: 165888.
- [30] Yu Y, Zeng Y D, Li J, et al. An algicidal *Streptomyces amrissarensis* strain against *Microcystis aeruginosa* strongly inhibits microcystin synthesis simultaneously[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 34-43.
- [31] Tan X, Shu X Q, Duan Z P, et al. Two types of bound extracellular polysaccharides and their roles in shaping the size and tightness of *Microcystis* colonies[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(1): 255-262.
- [32] Liu L Z, Huang Q, Qin B Q. Characteristics and roles of *Microcystis* extracellular polymeric substances (EPS) in cyanobacterial blooms: A short review[J]. *Journal of Freshwater Ecology*, 2018, 33(1): 183-193.
- [33] Christmas N A M, Barker G, Anesio A M, et al. Genomic mechanisms for cold tolerance and production of exopolysaccharides in the Arctic cyanobacterium *Phormidesmis priestleyi* BC1401[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): Article No.533.
- [34] Li H Y, Barber M, Lu J R, et al. Microbial community

- successions and their dynamic functions during harmful cyanobacterial blooms in a freshwater lake[J]. *Water Research*, 2020, 185: 116292.
- [35] Li Z H, Geng M X, Yang H. Algicidal activity of *Bacillus* sp. Lzh-5 and its algicidal compounds against *Microcystis aeruginosa*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 981-990.
- [36] Guo X L, Liu X L, Wu L S, et al. The algicidal activity of *Aeromonas* sp. strain GLY-2107 against bloom-forming *Microcystis aeruginosa* is regulated by *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11): 3867-3883.
- [37] van Le V, Ko S R, Kang M, et al. Effective control of harmful *Microcystis* blooms by paucibactin A, a novel macrocyclic tambjamine, isolated from *Paucibacter aquatile* DH15[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 383: 135408.
- [38] Wang X M, Luo Y X, Zhang S J, et al. Acetylacetone effectively controlled the secondary metabolites of *Microcystis aeruginosa* under simulated sunlight irradiation[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2024, 135: 285-295.
- [39] Zeng Y H, Cai Z H, Cheng K, et al. Naturally occurring lasso peptides as algicidal agents against *Microcystis aeruginosa*[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 381: 135136.
- [40] Ding H, Ding J, Liu Q N, et al. Mesenchymal stem cells encapsulated in a reactive oxygen species-scavenging and O₂-generating injectable hydrogel for myocardial infarction treatment[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 433(2): 133511.
- [41] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511-515.
- [42] Qian H F, Pan X J, Chen J, et al. Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants[J]. *Ecotoxicology*, 2012, 21(3): 847-859.
- [43] de Moraes P, Stoichev T, Basto M C P, et al. Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* response to pentachlorophenol and comparison with that of the microalga *Chlorella vulgaris*[J]. *Water Research*, 2014, 52: 63-72.

***In vitro* regulation of intestinal bacteria BJ-1 from *Aristichthys nobilis* in recruitment of dormant *Microcystis aeruginosa* cells in pond ecosystem**

ZOU Wansheng¹, MO Ping¹, SHI Pengling¹, WANG Zhi², LUO Yushuang¹

1. School of life and Environmental Sciences, Hunan University of Arts and Science, Hunan Engineering Research Center for Aquatic Biological Resources and Environmental Ecology, Changde 415000, China;
2. School of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410000, China

Abstract: The recruitment of dormant *Microcystis aeruginosa* (DMCs) is an important phase in the formation of *Microcystis aeruginosa* blooms in aquaculture ponds. When subjected to external environmental stress, such as low temperature, low light, exogenous allelopathic substances, nutrient deficiency, *Microcystis aeruginosa* cells form DMCs due to damage to the photosynthetic system, phycobilisomes, ribosomes, and other organelles. These DMCs sink to the surface of the sediment to avoid environmental stress. The DMCs are used as seed sources to restart and recruit (repair damaged organelles) once conditions improve. They enter the overlying water, waiting for another outbreak of algal blooms. A higher recruitment rate of DMCs can significantly enhance the interspecific competitiveness of *Microcystis aeruginosa*, making it prone to population outbreaks and the formation of algal blooms, and vice versa. Therefore, inhibiting the recruitment of DMCs is an effective method for proactively preventing and controlling the outbreak of *Microcystis aeruginosa* blooms in aquaculture ponds. In order to investigate the effect and mechanism of *Pseudomonas lactis* BJ-1, an intestinal bacterial strain of *Aristichthys nobilis*, on the recruitment of resting DMCs in vitro, BJ-1 bacteria were mixed with DMCs and embedded into pond sediment to construct low-concentration bacterial groups (G1), higher-concentration bacterial groups (G2),

and high-concentration bacterial groups (G3). The sterile group was used as a control. The recruitment experiment was conducted for 21 days at a water temperature of 25 °C, light intensity of 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, and light-dark cycle ratio of 12 h : 12 h. Mechanism and field verification experiments were performed based on the experimental results. The experimental results showed that the strain BJ-1 continued to proliferate from the beginning of the experiment to the 6th day. After the 6th day, the bacterial concentrations of the low-concentration bacterial group G1, the higher-concentration bacterial group G2, and the high-concentration bacterial group G3 were maintained at $(0.99\pm 0.23)\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$, $(3.40\pm 0.27)\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$, and $(5.21\pm 0.39)\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. DMCs began to recruit from the 6th day, and compared with the control group, the content of capsular extracellular polysaccharides (CPSs) in DMCs in G2 and G3 groups decreased significantly, and the photosynthetic efficiency and recruitment rate of DMCs significantly decreased ($P<0.05$). In contrast, there was no significant difference between the G1 group and the control group ($P>0.05$). At the same time, the experiment found that strain BJ-1 can secrete the metabolite 3-benzylpiperazin-2,5-dione, and its concentration shows a positive linear relationship with BJ-1 bacterial concentration ($R^2=0.997$). The minimum effective concentration of metabolite 3-benzylpiperazin-2,5-dione to inhibit the recruitment of DMCs was $0.8\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The concentrations of 3-benzyl piperazine-2,5-dione in group G2 and group G3 were (0.95 ± 0.24) and $(1.41\pm 0.19)\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. At these concentrations, the intracellular reactive oxygen species (ROS) level of DMCs increased significantly ($P<0.05$), and the photosynthetic efficiency and recruitment rate of DMCs decreased significantly ($P<0.05$). An analysis of differentially expressed genes (DEGs) showed that DMCs encoding photosynthetic genes (*psbD1*), DNA repair genes (*recA*), and carbon fixation (*ntcA* and *rbcL*) functional genes were significantly down-regulated under higher bacterial concentrations (G2 group), confirming at the molecular level that bacteria BJ-1 can inhibit the photosynthetic efficiency of DMCs. Validation experiments showed that strain BJ-1 can effectively reduce the recruitment rate of DMCs in outdoor pond environments. The experimental results showed that BJ-1 bacteria in the gut of *Aristichthys nobilis* at higher concentrations ($\geq 3.40\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$) can inhibit the photosynthetic efficiency of DMCs in vitro by reducing the CPSs content of DMCs and secreting the metabolite 3-benzylpiperazin-2,5-dione, ultimately hindering the recruitment of DMCs. The experimental results provide new evidence for “controlling algae with *Aristichthys nobilis*” and also provide new ideas for preventing and controlling *Microcystis aeruginosa* blooms in aquaculture ponds.

Key words: *Microcystis aeruginosa*; metabolites; photosynthetic efficiency; extracellular polysaccharides; recruitment

Corresponding author: ZOU Wansheng. E-mail: zwsksy@huas.edu.cn