

藻际可培养细菌对雨生红球藻生长和虾青素积累的影响*

李芸¹, 刘发龙¹, 王巧晗^{1,2**}, 刘岩^{1,2}, 李景玉^{1,2}, 官庆礼^{1,2}

(1.海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学), 山东 青岛 266003; 2.中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 为探究雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)藻际可培养细菌多样性及可培养细菌对雨生红球藻生长和虾青素积累的影响,本实验采用培养分离法,在乙酸钠兼养条件下,共分离到8株雨生红球藻藻际细菌,通过16S rDNA测序鉴定,并在NCBI网站比较序列发现,编号为DBQ、HS、BTH、DBB、XBL、HB、FH、JH的菌株分别与*Pseudomonas* sp.、*Methylobacterium* sp.、*Chryseobacterium* sp.、*Bacillus* sp.、*Paracoccus* sp.、*Planctopirus hydrillae*、*Rhodobacter vinaykumarii*、*Brevundimonas vesicularis*的16S rDNA序列具有最高的相似性。分别将8株细菌与通过抗生素处理获得的纯种雨生红球藻共培养,测定了8株藻际细菌对雨生红球藻细胞密度、藻液pH、叶绿素及虾青素含量的影响。实验发现,HS处理组在绿色阶段培养第9天获得最高细胞密度,为 3.65×10^6 cells/mL,且显著高于对照组;DBB处理组虽然能够促进藻细胞密度增加,但与对照组并无显著差异;DBQ处理组藻细胞密度显著低于对照组及其他处理组。第1~7天,藻液叶绿素浓度的变化与藻细胞密度变化趋势有一定相似性,绿色阶段后期,叶绿素浓度呈现下降趋势,也说明藻细胞内部叶绿素向其他色素转变,同时标志着绿色阶段的结束。绿色阶段培养过程中,藻液pH变化幅度较大,由初始值7.0左右上升到9.30左右,但是培养后期处理组与对照组藻液pH并无显著差异。在测定藻液虾青素含量时,仅HS处理组虾青素含量略高于对照组,但并无显著差异;通过计算单个藻细胞虾青素含量发现DBQ处理组单个藻细胞虾青素含量显著高于对照组。

关键词: 混合营养培养;雨生红球藻;藻际细菌;生长;虾青素

中图法分类号: Q93-3; S917

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2020)07-044-12

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20190124

引用格式: 李芸, 刘发龙, 王巧晗, 等. 藻际可培养细菌对雨生红球藻生长和虾青素积累的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(7): 44-55.

LI Yun, LIU Fa-Long, WANG Qiao-Han, et al. Effects of cultivable phycosphere bacteria on growth of *Haematococcus pluvialis* and its astaxanthin accumulation[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(7): 44-55.

自然环境中,微藻与细菌之间的相互作用非常复杂。以微藻为研究对象的正面作用中,藻际某些细菌可以通过提供营养^[1]、维生素^[2]、植物激素^[3]、螯合剂^[4]、或挥发性有机化合物^[5],创造有利的生长环境^[6]等方式来促进微藻生长;反面作用:细菌通过与微藻竞争营养物质^[6],产生毒素^[7],产生抑制微藻生长的物质^[8]等方式抑制藻体生长。此外,一些细菌虽然在培养前期可以促进微藻生长,但到培养后期最终会通过多种方式杀死它们的微藻宿主^[9-11]。因此,细菌群落对提升或降低微藻的生产力有潜在作用。所以确定哪些细菌具有正面或负面影响,以及其在藻际细菌群落中是否占据优势地位是非常重要的。假设可以将培养体系中细菌对微藻生长的积极影响扩大,消除细菌对微藻的消极影响,并且结合物理化学方法优化微藻生物

量生产,可能会大大提高微藻生产力,具有较强的经济意义。

目前已有研究显示巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)可以促进小球藻(*Chlorella vulgaris*)的生长^[12];根瘤菌属(*Rhizobium* sp.)能促进莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、小球藻和布氏藻(*Brucella braunii*)的生长^[13]等。目前关于雨生红球藻藻际细菌的研究甚少,藻际细菌的研究大多集中在大型藻类(比如海带及紫菜)、赤潮藻类^[14-18],以及一小部分饵料微藻^[19-20],所以关于雨生红球藻藻际细菌多样性及菌群结构可查阅的文献及研究进展也非常有限;另外,混合营养条件下的研究更是少之又少。其中张怀瑾^[21]从自养培养的雨生红球藻藻际分离得到一株橘红色的戈登氏菌株(*Gordoniaterrae*),研究发现该菌株能够合

* 基金项目:青岛海洋经济发展示范城市项目资助

Supported by Qingdao Ocean Economic Development Demonstration City Project

收稿日期:2019-04-03; 修订日期:2019-05-30

作者简介:李芸(1993),女,硕士生。E-mail:1736149321@qq.com

** 通讯作者:E-mail:wangqiaohan@ouc.edu.cn

成胡萝卜素,其提取物也有较强的抗氧化性,且耐高温,推测其可能参与雨生红球藻的虾青素合成途径,具有巨大的研究价值。探究雨生红球藻藻际细菌多样性,获得对雨生红球藻生长的有益微生物,并且利用有益微生物来促进雨生红球藻绿色阶段细胞数量的增加或者提高雨生红球藻红色阶段的虾青素积累量,对雨生红球藻养殖具有巨大的应用前景和经济意义。本实验采用培养分离法,利用细菌 LB 培养基分离了乙酸钠兼养条件下雨生红球藻藻际细菌,探究了雨生红球藻藻际可培养细菌的多样性,并利用 16S rDNA 测序方法对分离细菌鉴定;将筛选到的细菌液体培养,分别将细菌菌液按照一定的浓度与处于活跃期的藻种共培养,确定单一细菌对雨生红球藻生长及虾青素积累的影响。试图利用藻际细菌来提高雨生红球藻生物量生产或提高虾青素含量。

1 实验材料

1.1 藻种及培养条件

本实验所使用的藻种为雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*),为中国海洋大学藻类学与藻类养殖研究实验室保存藻种。其长期在本实验室光照培养箱中于锥形瓶培养;培养条件如下:

①绿色阶段:培养温度:23℃;光照强度:60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;光暗周期:14 h : 10 h;光源:日光灯。

②红色阶段:培养温度:26℃;光照强度:120 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;光暗周期:24 h : 0 h;光源:日光灯。实验所用雨生红球藻培养基为 MCM 培养基^[22];pH 调节为 6.99~7.03。

1.2 细菌培养基及培养条件

分离纯化雨生红球藻藻际细菌使用淡水 LB 培养基培养^[23];固、液态培养基分置于 28℃ 恒温培养箱,28℃、180 r/min 摇床培养条件下培养。

1.3 试剂药品

抗生素类:氯霉素、庆大霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、链霉素均购于北京索莱宝科技有限公司;有机溶剂及培养基药品:甲醇、乙酸、二甲基亚砷、氢氧化钠以及配制 MCM 培养液所需的试剂均购于国药集团化学试剂有限公司;配制细菌通用培养基的试剂均购于 Sigma-Aldrich 公司。

2 实验方法

2.1 雨生红球藻藻际细菌的分离纯化

将长期在乙酸钠混合营养条件下培养且处于对数生长期的藻种,按照 1 : 10 的比例接种于含有 270 mL 灭菌 MCM 培养液的 500 mL 锥形瓶中,设置 3 个重复。根据藻液实际浓度稀释一定的倍数,分别吸取 100 μL 均

匀涂布在提前倒好的无菌 LB 固体培养基上,置于 28℃ 的恒温培养箱,待长出菌落,及时挑取单菌落于新的 LB 固态培养基上,多次纯化直至分离到纯种菌落,且达到鉴定质量。

2.2 细菌鉴定

2.2.1 试剂盒法提取细菌 DNA 将纯化好的菌株接种于 LB 液体培养基,28℃,180 r/min 恒温摇床培养 24 h,8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。采用 Bacterial DNA Kit 试剂盒法提取各细菌 DNA。

2.2.2 PCR 扩增 以提取的细菌 DNA 为模板,采用细菌 16SrDNA 序列通用引物 27F (5' AGAGTTGATCCTGGCTCAG3) 和 1492R (5' TACGGTTACCTTGTTACGACTT3') 进行 PCR 扩增。

2.2.3 琼脂糖凝胶电泳及菌株测序 PCR 扩增结束后,利用琼脂糖凝胶电泳,来检测扩增结果。成功扩增的 PCR 产物随后交由北京华大基因有限公司进行测序。将公司测序返回的 16S rDNA 序列在 NCBI 上进行 BLAST 搜索。将鉴定出的细菌序列上传至 NCBI 网站,并获得登陆号。

2.3 纯种雨生红球藻的获得

本实验中我们利用各抗菌谱抗生素联合处理雨生红球藻藻液,结合固态培养基纯化获得纯种雨生红球藻。通过查找常用抗生素抗菌谱,选择的抗生素种类为:链霉素、卡那霉素、庆大霉素、氨苄青霉素。用超纯水配制好 10 g/L 的抗生素母液,并采用抽滤方式除菌。4 种抗生素同时分别添加 (100~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 每 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为一个梯度) 处理雨生红球藻藻液 (共 10 个处理组,每个浓度设置 3 个重复)。将扩种的纯种雨生红球藻培养数代以消除抗生素影响后,以培养 6 d、状态较好的雨生红球藻为藻种,收集离心并用灭菌培养液洗涤 3 次,重新悬浮在培养液中作为藻菌共培养的藻种。

2.4 细菌保种

接种纯化好的单一菌株菌落,于装有灭菌 LB 液体培养液的 250 mL 锥形瓶中,摇床培养 24 h 后 (T:28℃; 转速:180 r/min); 采用甘油与细菌菌液 1 : 1 的比例保种于 1.5 mL 保种管中,并置于 -80℃ 保存。

2.5 藻菌共培养菌种处理

分别取 100 μL 保种的菌液于装有灭菌的 LB 液体培养液的 250 mL 锥形瓶中摇床培养 24 h,用灭菌的 50 mL 离心管收集菌液并离心,去掉滤液,并用灭菌 MCM 培养液洗涤 3 次,重新用新鲜 MCM 培养液悬浮备用。

2.6 藻菌共培养

于含 265 mL 灭菌培养液的 500 mL 锥形瓶中,分别加入 30 mL 重新悬浮的藻种,然后分别加入 5 mL 重新

悬浮 OD₆₀₀ 值为 0.50 左右(接种浓度为 10⁴ cfu/mL)的菌液。对照组不加悬浮菌液以 5 mL 灭菌 MCM 培养液代替,各处理均设置 3 个重复。接种完成后,同时置于绿色阶段培养条件下培养。将培养至第 10 天的雨生红球藻转移至红色阶段条件下培养,每天取样在光学显微镜下观察藻细胞变红情况。每天定点摇瓶 3 次,随机交换锥形瓶位置,以避免藻细胞贴壁、沉降以及由于光照不均造成的误差。

2.6.1 藻细胞密度的测定 在接种后第 1 天,每天取 4 mL 藻液于 5 mL 离心管中(取样前要充分摇匀藻液,以免取样不均所造成的误差),用灭菌的 MCM 培养液将藻液稀释合适的倍数,取 100 μ L 稀释后的藻液于 0.1 mL 的浮游植物计数框中,在放大 $\times 100$ 倍的光学显微镜下对藻细胞计数,每个样品计数 3 次,以减少计数过程中出现的误差。

2.6.2 藻液 pH 测定 在接种后第 1 天,每天取 4 mL 藻液于 5 mL 离心管中(取样前要充分摇匀藻液,以免取样不均所造成的误差)。利用 Accumet. Fisher Scientific pH 计测定藻液 pH 值。

2.6.3 叶绿素含量测定 每隔一天分别取 4 mL 藻液于 10 mL 离心管中离心,去除上清液。采用甲醇比色法测定^[24]藻液叶绿素含量变化。

2.6.4 虾青素含量测定 待镜检雨生红球藻细胞完全变红后,分别取 4.5 mL 藻液于 10 mL 离心管中离心去上清液,绿色阶段培养结束后,每天取样显微镜下观察藻细胞变红情况。待对照组藻细胞完全变红后,采用分光光度法测定藻液虾青素含量^[24]。

2.7 统计分析

所有数据表示为每个处理 37 个重复测量的代表性数值。通过计算标准偏差来检查结果的可靠性。使用软件 IBM SPSS Statistics 22 单因素方差分析。通过方差分析(ANOVA)方法评估平均值的差异,确定数据是否符合方差齐性以及正态分布,结果差异显著性进行 Duncan 检验,使用 excel 软件作图。

3 结果

3.1 藻际细菌的分离与鉴定

在乙酸钠兼养雨生红球藻藻际中共分离到 8 株细菌,分别编号为 DBQ、HS、BTH、DBB、XBL、HB、FH、JH。分离到的细菌表观特征如表 1 所示,照片如图 1 所示。根据北京华大基因公司的测序结果,分别将 8 株细菌 16S rDNA 序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对,编号为 DBQ、HS、BTH、DBB、XBL、HB、FH、JH 的菌株分别于 *Pseudomonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Paracoccus* sp., *Planctopirus hydrillae*, *Rhodobacter vinaykumarii*, *Brevundimonas vesicularis* 的 16S rDNA 序列具有最高的相似性。将 8 株细菌 16S rDNA 序列与其相近的细菌的 16S rDNA 序列构建的系统发育树如图 2 所示。将 8 株细菌 16S rDNA 的序列上传至 NCBI 网站,获得登陆号分别为 MK675106、MK675107、MK675109、MK675110、MK675111、MK660006、MK660007、MK660008。

表 1 藻际细菌表观特征

Table 1 The apparent characteristics of bacteria in the phycosphere

编号 Number	菌落大小 Colony size	颜色 Color	形状 Shape	边缘 Edge	透明度 Transparency	粘稠度 Viscosity
BTH	小	橘黄色	圆形	整齐,较干燥	不透明	不粘稠,易挑起
XBL	较小	乳白色	圆形	整齐,较湿润	半透明	较粘稠,易挑起
DBQ	大	白色	圆形	整齐,湿润	不透明	较粘稠,易挑起
FH	较大	粉红色	圆形	整齐,不湿润	不透明	较粘稠,易挑起
HS	较小	红色	圆形	整齐,较干燥	不透明	较粘稠,易挑起
DBB	很大	白色	不规则	不整齐,干燥	不透明	不粘稠,不易挑起
JH	较大	金黄色	圆形	整齐,湿润	不透明	较粘稠,易挑起
HB	较大	白色	放射状	不整齐,干燥	不透明	不粘稠,不易挑起

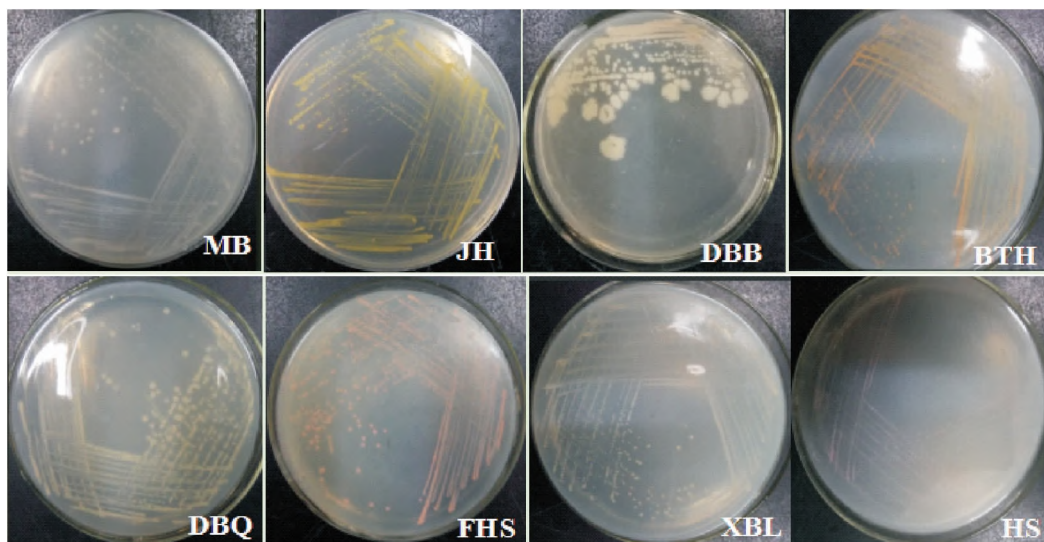


图 1 藻际细菌照片

Fig.1 The picture of the bacterial in the phycosphere

3.2 抗生素处理雨生红球藻

将不同浓度梯度的 4 种抗生素组合溶液与处于对数期兼养培养的雨生红球藻一同接种于灭菌 MCM 培养液中处理培养 3~5 d。每天摇瓶多次,以使抗生素与藻细胞充分接触。处理结束,将用抗生素处理过的藻液接种于无菌的 MCM 培养液中培养 5~7 d,并利用添加乙酸钠的 MCM 固态培养基来检测除菌效果。最终在链霉素、卡那霉素、庆大霉素、氨苄青霉素分别为 600 $\mu\text{g/mL}$ 的联合抗生素组合处理条件下,获得纯种雨生红球藻藻落。并将纯种藻种逐级扩种培养。

3.3 单一细菌的添加对雨生红球藻细胞密度的影响

如图 3 所示。接种当天即第 0 天的细胞密度不予测定,以避免藻细胞减少产生的不利影响。因 XBL 实验组在培养过程中很早就出现细胞沉降,而且藻细胞聚集在一起被细菌菌膜包裹,计数时存在太大误差,因此只统计了剩余 7 个处理组以及对照组的细胞密度变化情况。

由图可以看出在绿色阶段培养过程中,尽管藻细胞计数存在波动,但随培养时间延长而不断上升。第 1~5 d,藻细胞密度增加幅度较大;培养后期增长较为缓慢;第 9 天大部分实验组的藻细胞密度达到最大,第 10 天有稍微下降的趋势,原因可能是随着培养时间的增加,藻细胞贴壁的现象严重以及藻细胞出现沉降,导致细胞计数时存在误差。细胞密度由最初接种密度约为 $2.50 \times 10^4 \text{ cells/mL}$,在 HS 处理组的第 9 天获得最高细胞密度,为 $3.65 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 。培养第 1~7 天,除 DBQ、HB 及 FHS 处理组外,其他各处理组均对藻细胞密度的增加表现出促进作用;但在培养结束时仅有 HS、DBB 2 个处理组中的藻细胞密度大于对照组(C),且仅有 HS 处理组第 9 天细胞密度显著高于对照组,其他处

理组促进效果并不显著。DBQ 处理组在 10 d 的培养过程中,密度显著低于对照组以及其他处理组;其他处理组中藻细胞密度低于对照组,但与对照组差异并不显著。在细胞计数时观察到,处理组中藻细胞比较容易聚集在一起,不同于对照组大部分藻细胞都分散存在,也是处理组在计数时存在较大误差的原因。

3.4 单一细菌对雨生红球藻藻液 pH 的影响

图 4 是各实验组在培养过程中藻液 pH 变化情况。实验开始时,培养体系 pH 为 6.97~7.03。经过 10 d 的培养,对照组 pH 最高达到 9.36 左右,其他处理组也都达到 9.00 左右的高 pH。培养前期 pH 上升幅度较大,该时间段也对应了藻细胞生长的对数期,所以通过 pH 的变化情况也可以从侧面反映雨生红球藻的生长分裂能力。第 7~10 天, pH 变化幅度较小,甚至有下降的趋势,其也对应了实验组中细胞密度增加缓慢的现象,说明雨生红球藻已进入稳定生长期。而且各实验组的 pH 除在第 3~5 天有显著差异外,其余时间 pH 差异不显著,特别是在培养结束时。因总培养体积有限所导致的取样体积有限是导致 pH 测定过程中误差较大的原因,另外实验操作中也存在一定误差。

3.5 单一细菌对雨生红球藻叶绿素含量的影响

图 5 是各实验组在培养过程中藻液叶绿素含量变化情况。因培养初期藻细胞密度较低,所以从接种后的第 3 天开始每隔 1 d 取样测定,到培养后期每天取样测定叶绿素含量。由图可以看出在培养期间的藻液叶绿素含量变化与藻细胞密度有一定的相似性。第 3 天,各实验组的叶绿素含量无显著差异。第 6~8 天,除 HB、DBQ、XBL 处理组外其余各处理组中的叶绿素含量均大于对照组,但与对照组并无显著差异。第 3~8 天,各实验组叶绿素含量都呈现逐渐上升的趋势,在

这段时期,细胞密度增加是导致叶绿素含量上升的主要因素;第8~10天,除对照组、DBQ处理组外,其他实验组都呈现不变及下降的趋势。另外,第9~10天,添加菌液的处理组叶绿素含量降低幅度普遍高于对照组。在藻

液叶绿素测定过程中,因培养总体积不大,导致每天进行叶绿素测定时取样体积较小,及添加菌液的处理组在培养中后期藻细胞聚集在一起,导致取样不均匀都是导致藻液叶绿素含量测定时出现较大误差的原因。

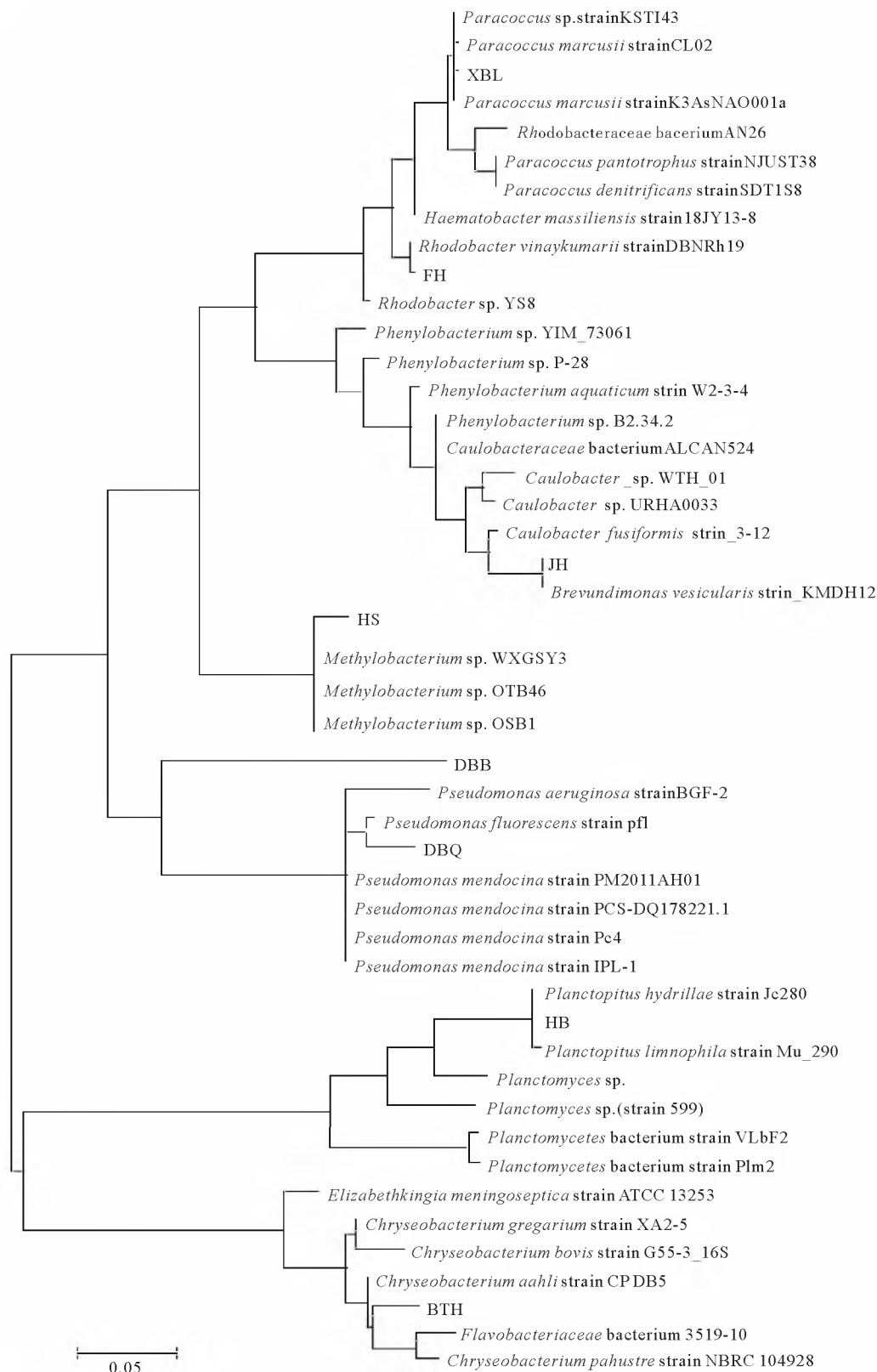
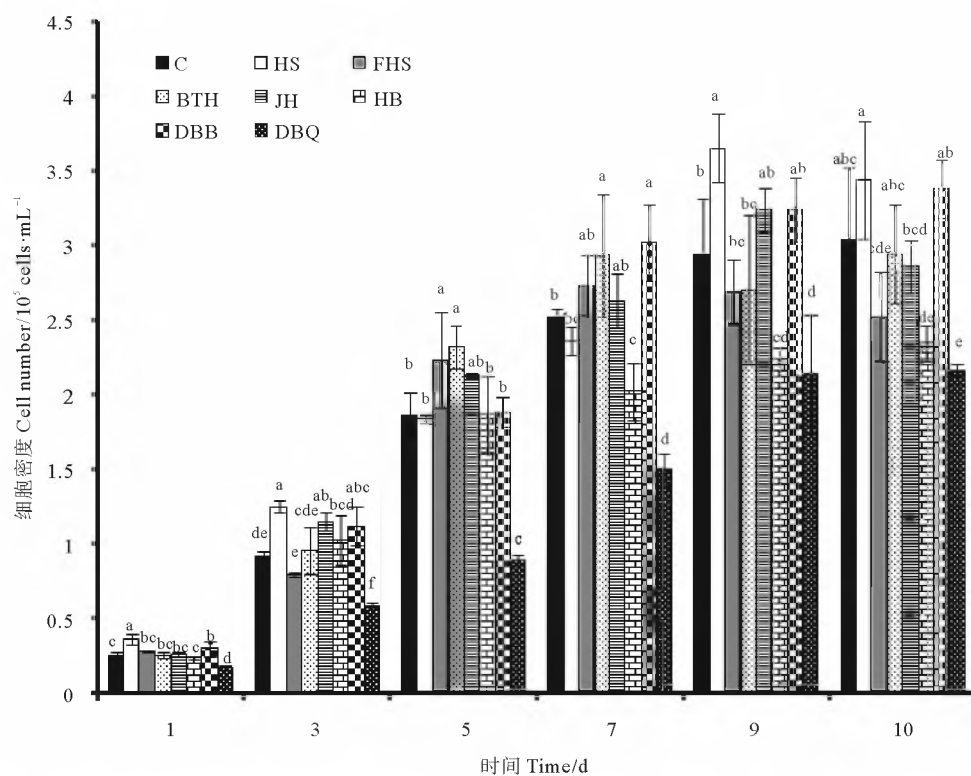


图2 8株藻际细菌系统发育树

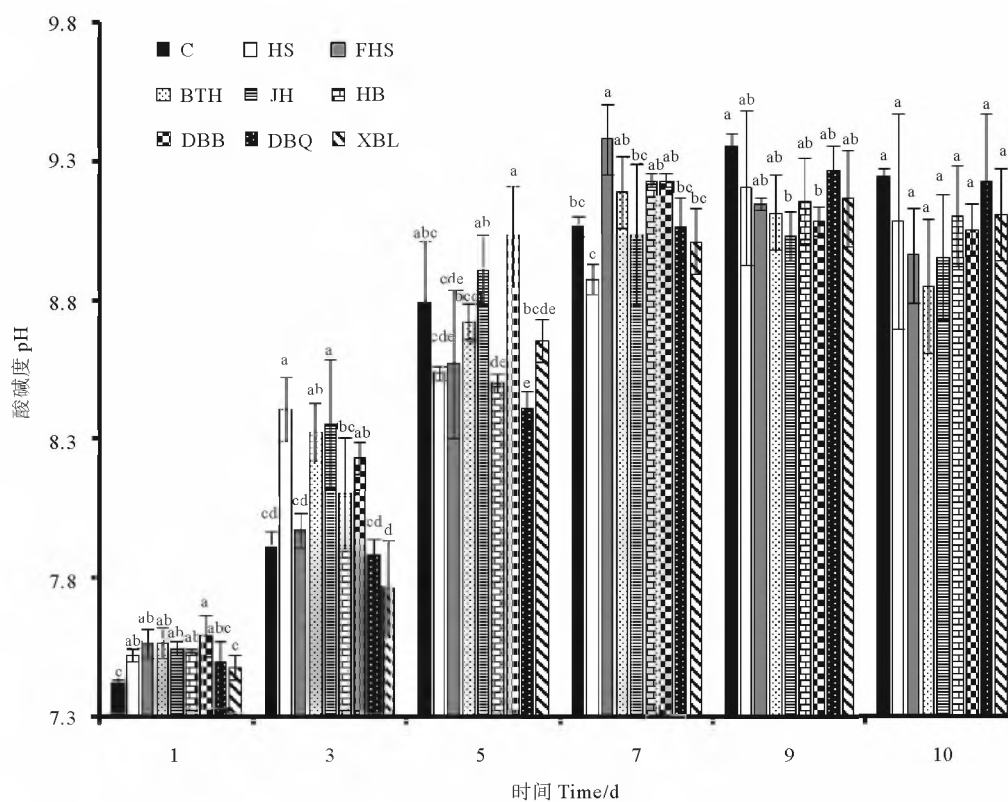
Fig.2 The phylogenetic tree of 8 strains of bacteria in the phycosphere



(图中不同字母间表示差异显著 ($P < 0.05$)。Data with different letters at the same column mean significant difference between each other ($P < 0.05$).)

图 3 藻菌共培养雨生红球藻细胞密度

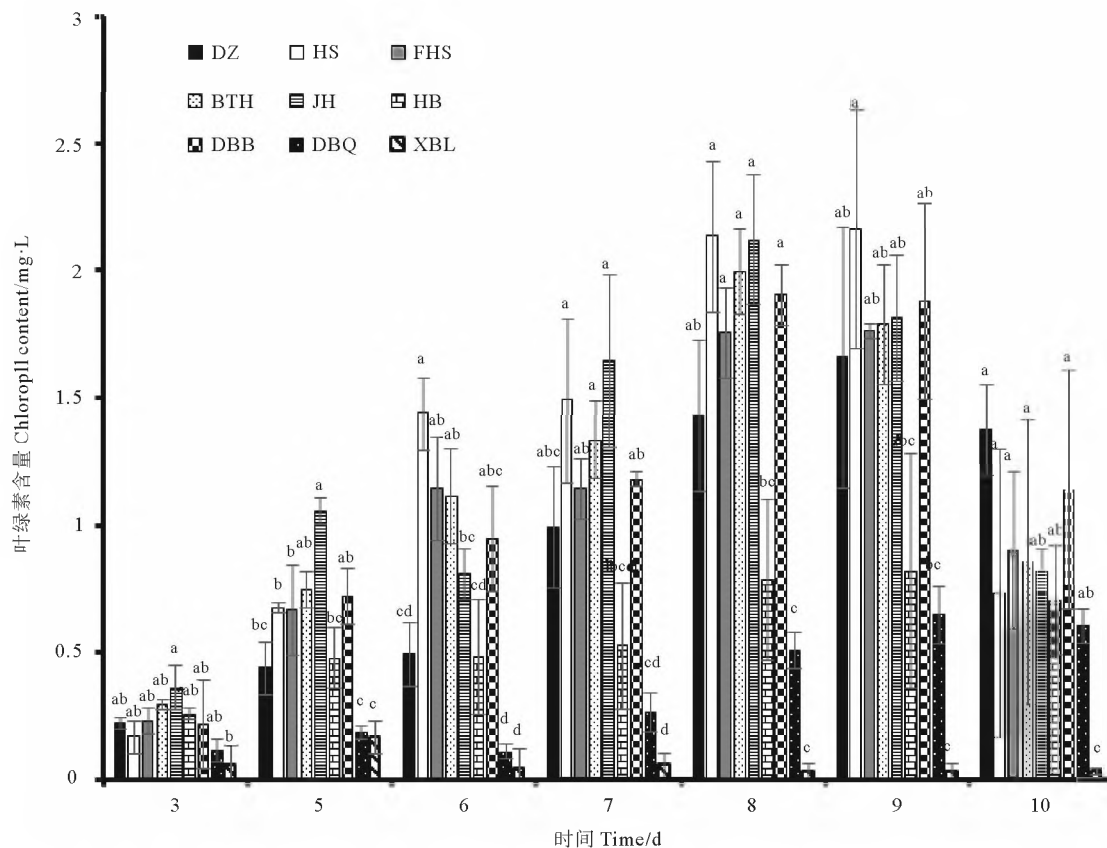
Fig.3 The cell density of *Haematococcus pluvialis* in co-culture of algae and bacteria



(图中不同字母间表示差异显著 ($P < 0.05$)。Data with different letters at the same column mean significant difference between each other ($P < 0.05$).)

图 4 藻菌共培养雨生红球藻藻液 pH

Fig.4 The pH value of *Haematococcus pluvialis* in co-culture of algae and bacteria



(图中不同字母间表示差异显著 ($P < 0.05$)。Data with different letters at the same column mean significant difference between each other ($P < 0.05$)).

图5 藻菌共培养雨生红球藻藻液叶绿素含量

Fig.5 The chlorophyll content of *Haematococcus pluvialis* in co-culture of algae and bacteria

3.6 单一细菌对雨生红球藻虾青素积累的影响

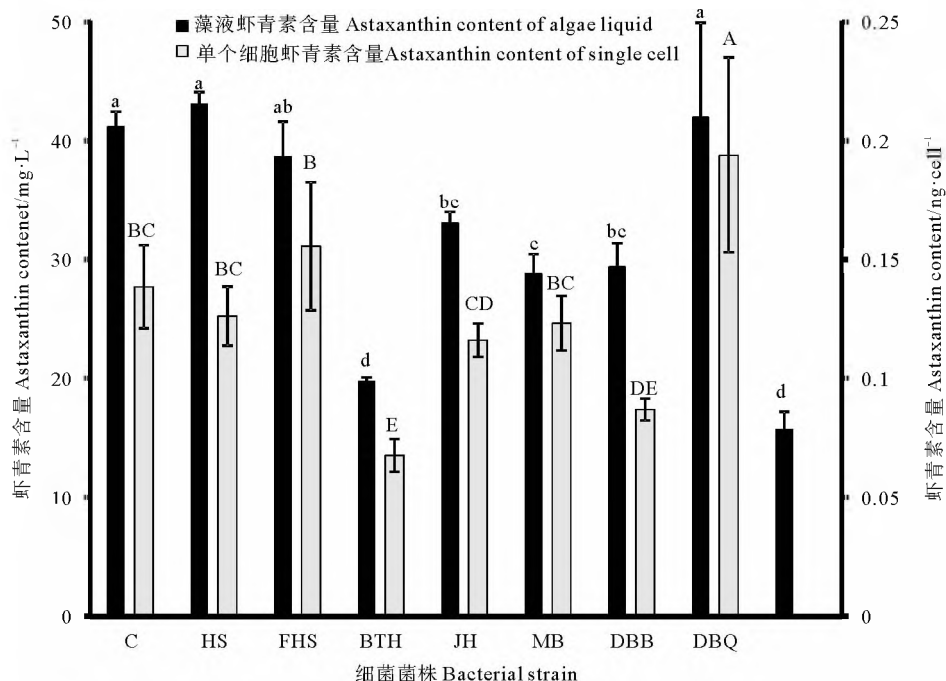
图6是单一细菌对雨生红球藻藻液及单个藻细胞虾青素含量的影响。雨生红球藻经过绿色阶段的培养,藻细胞增加到一定数目,通过改变培养条件,以加快藻细胞中虾青素的积累速率。实验发现,对藻细胞密度增加有一定促进作用的处理组中,仅有HS处理组略高于对照组,但差异并不显著,虾青素含量分别为44.35和43.84 mg/L。其他处理组藻液虾青素含量或显著低于对照组或与对照组无显著差异。DBQ处理组虽细胞密度显著低于对照组,但该处理组藻液虾青素含量与对照组并无显著差异。通过计算单个藻细胞虾青素含量,发现DBQ处理组单个藻细胞虾青素含量显著高于对照组及其他处理组,因此DBQ菌液的添加的虽然不会促进藻细胞密度的增加,但是对于单个藻细胞虾青素积累来说有一定的优势。其他处理组单个细胞虾青素含量显著低于对照组或与对照组无显著差异。

4 讨论

现阶段由于培养条件的限制,大多数异养细菌不能人为培养。有研究表明,我们仅能培养自然环境中

占比不到1%的微生物^[25-26]。但在本实验中利用传统培养方法获得了8株藻际细菌,不仅探究了乙酸钠兼养下雨生红球藻藻际可培养细菌的多样性,也为探究其对雨生红球藻生长和虾青素积累的影响提供了物质基础。从藻际细菌种类来看,乙酸钠兼养条件下的藻际可培养细菌种类丰富,相比张怀瑾在自养培养的雨生红球藻藻际分离到1株藻际细菌的结果^[21],本实验中乙酸钠的添加是分离到藻际细菌种类较多的最大原因。乙酸钠的添加不仅为藻细胞提供了异养营养的碳源,同时也为藻际细菌的生长繁殖提供了营养。分离到的藻际细菌以变形菌门(Proteobacteria)为主,该菌门也在很多海洋微藻藻际被分离到^[17, 27-29],虽然雨生红球藻为淡水微藻,其与海水细菌种类同源性还是较大的。另外,分离过程中拟杆菌门(Bacteroidetes)的*Chryseobacterium* sp. 是优势菌株,该菌株也是在自然环境中分离比较频繁的细菌种类^[30-31]。另外,有许多研究表明*Paracoccus* sp.、*Pseudomonas* sp. 中的某些菌株具有降解有机污染物的能力^[32-34]。

目前来说,获得纯种微藻的方法有很多。利用单一的除菌方法往往效果不佳,局限性较大,导致纯化效率不高。本实验中我们结合韩吉昌等^[35]提供的无菌微



(图中不同字母间表示差异显著($P < 0.05$)。Data with different letters at the same column mean significant difference between each other ($P < 0.05$.)

图6 藻菌共培养雨生红球藻藻液及单个细胞年虾青素含量

Fig.6 The astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* liquid and single cell in co-culture of algae and bacteria

藻获得方法,采用应用广泛的抗生素处理法结合平板划线法来获得纯种藻株。在藻菌共培养实验中,发现有2株菌株(DBB、HS)对藻细胞密度增加有促进作用,其分别属于厚壁菌门(Bacteroidetes)、变形菌门。对于有些细菌在培养前期促进藻细胞密度增加,而在培养后期抑制藻细胞生长的现象,很可能是因为在培养前期各营养元素较为充足,并且异养细菌与藻细胞的营养方式有一定的互补作用,因此会加快藻细胞密度增加;而到培养中后期,由于各营养元素消耗殆尽,细菌很可能会与藻细胞争夺微量元素或者其他物质,因此会出现抑制作用;另一方面,因为分离的细菌菌株大部分会积累色素,随着体系中细菌密度的增加,很可能对藻细胞产生遮光作用,会影响藻细胞对光能的利用效率;最后体系中细菌的大量繁殖,会产生菌膜,对藻细胞的自由运动以及分裂产生阻碍作用,会加速藻细胞老化。另外,培养后期较高的pH值也许是限制雨生红球藻细胞密度增加的另一个因素。

绿色阶段10天培养过程中pH上升幅度较大,一方面说明雨生红球藻对培养体系中pH的缓冲作用较差,同时说明藻细胞对碱性培养环境的耐受度较高。王璇等人的研究中发现培养过程中藻液pH的变化与营养盐浓度的变化存在一定的相关性^[36],另外在该研究在绿色阶段第7天后,pH的升高放缓的现象^[36]与本研究结果较为相似。各实验组pH在接种后1~5 d显著增加,这可以通过硝酸盐代谢来解释^[37]:雨生红球

藻细胞的不断生长繁殖使得MCM培养液中的硝酸盐被转移到雨生红球藻细胞中,其中硝酸盐通过硝酸还原酶和亚硝酸还原酶催化的两个还原反应被还原成铵;同时,在这些还原反应中会产生 OH^- 和 H_2O ,由硝酸盐转化为铵产生的 OH^- 将释放到培养基中,是导致pH升高的重要原因。也有研究显示外源碳酸钠的添加也是导致藻液pH较高的原因,但Pang等^[38]的实验中,添加1.33 g/L乙酸钠培养的雨生红球藻藻液在培养结束后稳定在8.50左右,远远低于本实验结束时9.30的pH。猜测,藻株及其他培养条件存在差异是出现巨大差异的原因。绿色阶段后期藻液中 CO_2 溶解度增加是藻液pH有下降趋势的原因,因培养后期,藻液中营养元素已经消耗殆尽,藻细胞光合作用强度下降,导致藻液中 CO_2 浓度升高,其次菌液的添加使得处理组细菌可能会大量繁殖,也会产生一部分 CO_2 使得藻液 CO_2 溶解度增加。

处于绿色阶段的雨生红球藻细胞中主要色素组成为叶绿素、 β -胡萝卜素、叶黄素;红色阶段雨生红球藻细胞中虾青素含量会大幅度上升,还会出现角黄素以及海胆酮等次生胡萝卜素^[39-42]。藻液叶绿素含量的变化趋势大体符合细胞密度变化趋势,说明藻液叶绿素浓度在一定程度上可以反映藻细胞密度及细胞活力。本实验中培养第8天后,各实验组中叶绿素浓度的停滞及下降预示着藻细胞生长受到胁迫,比如培养体系中pH过高、营养元素消耗殆尽等,使得藻细胞内的叶绿

素向其他色素转变,虾青素开始积累。对于有些处理组中叶绿素含量降低幅度高于对照组的现象,一定程度上说明藻际细菌的添加会加快藻细胞由绿色阶段向红色阶段的转变速率,即藻际细菌的添加可能会抑制藻细胞的活力。如林伟等^[43]发现,除菌后的球等鞭金藻及小球藻不易老化,更容易保持悬浮状态;回加细菌于除菌藻,藻细胞容易下沉附底。

大量研究显示雨生红球藻在胁迫条件下,例如高温、高光照、营养盐缺乏等条件,细胞内会大量积累虾青素^[44]。对藻细胞密度增加有一定促进作用的 HS、DBB 处理组,并不能显著提高藻液虾青素含量。对藻细胞密度增加有显著抑制作用的 DBQ 处理组反而能显著提高单个藻细胞虾青素含量,DBQ 处理组中单位藻细胞虾青素含量较高的原因是复杂的,尤其细菌的存在会使得培养液的组分及其物质循环变得更加复杂^[45]。本实验中 DBQ 处理组显著抑制雨生红球藻生长所造成的胁迫环境对藻细胞虾青素积累是有利的,推测原因可能是 DBQ 的添加促进了藻细胞内的虾青素合成途径^[46],比如 DBQ 有可能会产生合成虾青素的前体物质^[46],或者促进化学反应中酶活性加快虾青素积累^[48],导致单位细胞内虾青素含量较高。本实验结果也充分说明想要提高雨生红球藻虾青素产量,绿色阶段生物量的积累和红色阶段单位藻细胞的虾青素积累效率都是必要的。因此可以考虑在雨生红球藻绿色阶段结束后,添加 DBQ 菌株的菌液,以达到促进单个藻细胞中虾青素积累的效果。

5 结语

本实验在乙酸钠混合营养条件下,分离了 8 株雨生红球藻藻际细菌。经过 16S rDNA 鉴定发现其分别属于 *Pseudomonas* sp.、*Methylobacterium* sp.、*Chryseobacterium* sp.、*Bacillus* sp.、*Paracoccus* sp.、*Planctopirus hydrillae*、*Rhodobacter vinaykumarii*、*Brevundimonas vesicularis*。在单一细菌与雨生红球藻共培养实验在,发现 *Methylobacterium* sp.、*Bacillus* sp.能够促进绿色阶段雨生红球藻藻细胞密度的增加,*Pseudomonas* sp.对于增加单位细胞虾青素含量具有一定优势。

参考文献:

- [1] 熊玉琴,杨锐,杨华田,等.藻际芽孢杆菌对坛紫菜生理的影响[J].生物学杂志,2018,35(1):37-41.
Xiong Y Q, Yang R, Yang H T, et al. Effects of phycosphere *Bacillus* sp. WPy SW2 on physiology of *Pyropia haitanensis* [J]. Journal of Biology, 2018, 35(1): 37-41.
- [2] Croft M T, Lawrence A D, Raux-Deery E, et al. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria[J]. Na-

ture (London), 2005, 438(7064): 90-93.

- [3] Amin S A, Hmelo L R, Van Tol H M, et al. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria[J]. Nature, 2015, 522(7554): 98-101.
- [4] Amin S A, Green D H, Hart M C, et al. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(40): 17071-17076.
- [5] Amavizca E, Bashan Y, Ryu C M, et al. Enhanced performance of the microalga *Chlorella sorokiniana* remotely induced by the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Bacillus pumilus*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41310.
- [6] Mouget J L, Dakhama A, Lavoie M C, et al. Algal growth enhancement by bacteria: Is consumption of photosynthetic oxygen involved? [J]. Fems Microbiology Ecology, 2010, 18(1): 3-5.
- [7] Paul C, Pohnert G. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: Regulated protease excretion for specific algal lysis[J]. PLOS ONE, 2011, 6(6): 21032.
- [8] Scott P, Kenneth F. Growth inhibition of *Nannochloropsis* species by *Bacillus pumilus*[J]. Algal Research, 2016, 20: 70-76.
- [9] Seyedsayamdost M R, Case R J, Kolter R, et al. The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis* [J]. Nature Chemistry, 2011, 3(4): 331-335.
- [10] Hui W, Tomasch Jürgen, Victoria M, et al. Identification of genetic modules mediating the jekyll and hyde interaction of dinoroseobacter shibae with the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1262.
- [11] Wang H, Tomasch J, Jarek M, et al. A dual-species co-cultivation system to study the interactions between Roseobacters and Dinoflagellates[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 311.
- [12] Tanabe, Yuuhiko Okazaki, Yusuke Yoshida, et al. A novel alphaproteobacterial ectosymbiont promotes the growth of the hydrocarbon-rich green alga *Botryococcus brauni* [J]. Scientific Reports, 2015, 5(10): 10467.
- [13] Rivas M O, Riquelme V C E. Interactions of *Botryococcus braunii* cultures with bacterial biofilms[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(3): 628-635.
- [14] 褚椒江,朱鹏,严小军.海带藻际微生物抗菌活性及其多样性的初步研究[J].水生生物学报,2011,35(6):972-979.
Chu J J, Zhu P, Yan X J. Antimicrobial activity and diversity of marine bacteria in phycosphere of *Laminaria japonica* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(6): 972-979.
- [15] 方文雅.紫菜与藻际微生物互作研究平台的初步研究[D].宁波:宁波大学,2010.
Fang W Y. Preliminary Study of the Platform to Study the Interaction of *Porphyra* spp. and Their Phycospheres [D]. Ningbo: Ningbo University, 2010.
- [16] 沈梅丽,杨锐,骆其君,等.坛紫菜养殖周期中的藻际微生物多样性[J].微生物学报,2013,53(10):1087-1102.
Shen M L, Yang R, Luo Q J, et al. Microbial diversity of *Pyropia haitanensis* phycosphere during cultivation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(10): 1087-1102.
- [17] 王剑.典型赤潮藻类可培养藻际细菌的分子鉴定与藻菌关系研究[D].广州:暨南大学,2014.
Wang J. Studies on the Relationships Between Microalgae and

- Phycosphere Bacterial and Molecular Identification of Culturable Bacterial Isolated from Typical Red Tid Microalgae[D]. Guangzhou: Jinan University, 2014.
- [18] 连玉武, 王艳丽, 郑天凌, 等. 赤潮科学中藻菌关系研究的若干进展[J]. 海洋科学, 1999(1): 35-38.
- Lian Y W, Wang Y L, Zheng T L, et al. Advance in the research in interaction between red tid algae and bacterial[J]. Marine Sciences, 1999(1): 35-38.
- [19] 王晴晴, 高金伟, 时晓婷, 等. 海洋饵料微藻与共生细菌相互关系研究进展[J]. 农业与技术, 2016, 36(7): 11-12.
- Wang Q Q, Gao J W, Shi X T, et al. Advances in research on the relationship between marine bait-microalgae and commensal bacteria[J]. Agriculture and Technology, 2016, 36(7): 11-12.
- [20] 黄振华, 陈星星, 柯爱英, 等. 2 种海洋饵料微藻藻际环境的细菌多样性研究[J]. 水生态学杂志, 2018, 39(1): 44-49.
- Huang Zh H, Chen X X, Ke A Y, et al. Bacterial diversity in the phycosphere of two marine bait-microalgae[J]. Journal of Hydroecology, 2018, 39(1): 44-49.
- [21] 张怀瑾. 雨生红球藻培养优化及藻际微生物的研究[D]. 北京: 清华大学, 2016.
- Zhang H J. Optimization of *Haematococcus pluvialis* Cultivation and the Bacteria in Its Phycosphere Environment[D]. Beijing: Tsinghua University, 2016.
- [22] 张睿钦, 管斌, 孔青, 等. 雨生红球藻异养转化产虾青素的条件研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(6): 624-630.
- Zhang R Q, Guan B, Kong Q, et al. Study on astaxanthin accumulation by heterotrophic transformation in *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Zhejiang University(Agric&Life Sci), 2011, 37(6): 624-630.
- [23] 孙慧洁, 黄惠琴, 朱军, 等. 2 株海绵细菌的分离与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2010, 30(3): 1-4.
- Sun H J, Huang H Q, Zhu J, et al. Isolation and identification of two sponge bacteria from marine sponge[J]. Journal of Microbiology, 2010, 30(3): 1-4.
- [24] 崔丹丹, 杨柳, 孙雪, 等. 玉米素和水杨酸对雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*) 生长及虾青素积累的影响[J]. 海洋与湖沼, 2018, 49(3): 682-691.
- Cui D D, Yang L, Sun X, et al. Effects of zeatin and salicylic acid on growth and astaxanthin accumulation *Haematococcus pluvialis* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2018, 49(3): 682-691.
- [25] 李富超, 周婕, 秦松. 元基因组用于未培养微生物的研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(5): 79-82, 88.
- Li F Ch, Zhou J, Qing S. Metagenomics research on uncultured microorganisms[J]. Marine Sciences, 2010, 34(5): 79-82, 88.
- [26] 范念斯, 齐嵘, 杨敏. 未培养微生物的培养方法进展[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(3): 524-530.
- Fan N S, Qi R, Yang M. Current technical progresses in the cultivation for uncultured microorganism[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2016, 22(3): 524-530.
- [27] 黄振华, 陈星星, 柯爱英, 等. 2 种海洋饵料微藻藻际环境的细菌多样性研究[J]. 水生态学杂志, 2018, 39(1): 44-49.
- Huang Zh H, Cheng X X, Ke A Y, et al. Bacterial diversity in the phycosphere of two marine bait-microalgae[J]. Journal of Hydroecology, 2018, 39(1): 44-49.
- [28] 苗祯, 杜宗军, 李会荣, 等. 5 株北极微藻藻际环境的细菌多样性[J]. 生态学报, 2015, 35(5): 1587-1600.
- Miao Zh, Du Z J, Li H R, et al. Analysis of bacterial diversity in the phycosphere of five arctic microalgae[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5): 1587-1600.
- [29] 杨小茹, 苏建强, 郑小伟, 等. 基于分子技术的 1 株产毒藻藻际细菌多样性分析[J]. 环境科学, 2009, 30(1): 271-279.
- Yang X R, Su J Q, Zheng X Q, et al. 16S rDNA clone library analysis of microbial diversity associated with the PSP-producing dinoflagellate alexandrium tamarense[J]. Environmental Science, 2009, 30(1): 271-279.
- [30] 郑艳, 姚婷. PCR-DGGE 分析甘薯酸浆自然发酵过程中细菌多样性[J]. 食品科学, 2016, 37(7): 99-103.
- Zheng Y, Yao T. Analysis of bacterial diversity during natural fermentation of sweet potato sour liquid by PCR-DGGE[J]. Food Science, 2016, 37(7): 99-103.
- [31] 白玉. 天山冻土微生物的系统多样性分析及生长特性的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- Yu B. Systematic Diversity Analysis and Growth Characteristics of Microbes in the Frozen Soil of Tianshan Mountains [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007.
- [32] 司文攻, 吕志刚, 许超. 耐受高浓度氨氮异养硝化菌的筛选及其脱氮条件优化[J]. 环境科学, 2011, 32(11): 3448-3454.
- Si W G, Lv Zh G, Xu Ch. Isolation of heterotrophic nitrifiers which can tolerate high concentration of ammonia-nitrogen and the optimization of their nitrogen removal efficiency in wastewater [J]. Environmental Science, 2011, 32(11): 3448-3454.
- [33] 毛健, 骆永明, 滕应, 等. 一株高分子量多环芳烃降解菌的筛选、鉴定及降解特性研究[J]. 微生物学通报, 2008(7): 1011-1015.
- Mao J, Luo Y M, Teng Y, et al. Isolation and characterization of a high-molecular-weight (HMW) PAHs degrading bacterial strain [J]. Microbiology China, 2008(7): 1011-1015.
- [34] 季金殿. 羽毛角蛋白质降解菌的分离、鉴定与角蛋白酶基因的克隆、表达[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- Ji J D. Isolation, Identification of Feather Keratin Degrading Bacteria and Cloning, Expression of Keratinase Gene [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2009.
- [35] 韩吉昌, 王松, 张琳, 等. 一种利用高浓度联合抗生素批量纯化微藻的方法[J]. 中国海洋湖沼学报, 2016, 34(1): 79-85.
- Han J Ch, Wang S, Zhang L, et al. A method of batch-purifying microalgae with multiple antibiotics at extremely high concentrations[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2016, 34(1): 79-85.
- [36] 王旒, 管斌, 孔青, 等. 利用控 pH 流加培养法提高雨生红球藻的生物量及虾青素产量[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(2): 120-124.
- Wang N, Guan B, Kun Q, et al. Enhancing biomass of *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production by pH-controlled fed-batch culture[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(2): 120-124.
- [37] Cheirsilp B, Torpee S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition; Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation[J]. Biore-source Technology, 2012, 110: 510-516.
- [38] Pang N, Chen S. Effects of C5 organic carbon and light on growth

- and cell activity of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions[J]. *Algal Research*, 2017, 21: 227-235.
- [39] 孟春晓, 高政权, 王依涛, 等. 影响雨生红球藻中虾青素积累条件的研究进展[J]. *水产科学*, 2011, 30(2): 118-121.
- Meng X Ch, Gao Zh Q, Wang Y T, et al. Progress of factors affecting accumulation of astaxanthin in green alga *Haematococcus pluvialis*[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(2): 118-121.
- [40] 王群, 桑敏, 李爱芬, 等. 雨生红球藻培养过程中色素动态变化与光合生理特性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22(5): 850-854.
- Wang Q, Sang M, Li A F, et al. The dynamic change of pigments and photosynthetic physiological characteristics of *Haematococcus pluvialis* cultures [J]. *Natural Product Research and Development*, 2010, 22(5): 850-854.
- [41] 廖兴辉, 王明兹, 李小妹, 等. 高产虾青素的雨生红球藻胁迫条件和中试研究[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(6): 29-34.
- Liao X H, Wang M i, Li X M, et al. Research on the stress induced conditions and pilot test of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2015, 41(6): 29-34.
- [42] Wan M, Zhang J, Hou D, et al. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light-dark cyclic cultivation[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 167(3): 276-283.
- [43] 林伟, 陈騊, 刘秀云. 海洋微藻除菌及除菌与自然带菌微藻生长特点比较[J]. *海洋与湖沼*, 2000(6): 647-652.
- Lin W, Chen D, Liu X Y. Marine microalgal axenation and comparison of growth characteristics between natural and axenic marine microalgae[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000(6): 647-652.
- [44] 王群, 桑敏, 李爱芬, 等. 雨生红球藻培养过程中色素动态变化与光合生理特性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22(5): 850-854.
- Wang Q, Sang M, Li A F, et al. The dynamic change of pigments and photosynthetic physiological characteristics of *Haematococcus pluvialis* cultures [J]. *Natural Product Research and Development*, 2010, 22(5): 850-854.
- [45] 周进, 林光辉, 蔡中华. 微生物在藻际环境中的物质循环作用[J]. *应用生态学报*, 2016, 27(8): 2708-2716.
- Zhou J, Lin G H, Cai Zh H. Roles of microbes in matter cycles in phycosphere niche[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(8): 2708-2716.
- [46] 巩风英. 雨生红球藻中虾青素合成及几何异构体的分析研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2017.
- Gong F Y. A Study on the Synthesis of Astaxanthin and the Analysis of Its Geometric Isomers in *Haematococcus pluvialis* [D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2017.
- [47] 应巧兰, 叶勇. 影响雨生红球藻 797 株生长和虾青素积累的某些因素[J]. *应用与环境生物学报*, 2002, 8(1): 56-60.
- Ying Q L, Ye Y. Some factors affecting growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus Pluvialis* strain 797[J]. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 2002, 8(1): 56-60.
- [48] 孟春晓. 雨生红球藻中虾青素合成关键酶基因的顺式作用元件研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2005.
- Meng X Ch. Characterization of *Cis*-acting Elements of Genes Encoding Two Key Enzymes in Astaxanthin Biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* [D]. Qingdao: Graduate School of the Chinese Academy of Sciences (Ocean Institute), 2005.

Effects of Cultivable Phycosphere Bacteria on Growth of *Haematococcus pluvialis* and Its Astaxanthin Accumulation

LI Yun¹, LIU Fa-Long¹, WANG Qiao-Han^{1,2}, LIU Yan^{1,2}, LI Jing-Yu^{1,2}, GONG Qing-Li^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China;

2. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to explore the diversity of cultivable bacteria in *Haematococcus pluvialis* phycosphere and their effects on the growth of *H. pluvialis* and its astaxanthin accumulation, we used the traditional culture separation method to isolate 8 bacterial strains in the mixotrophic culture of *H. pluvialis*. Based on 16S rRNA gene sequences, strains (DBQ, HS, BTH, DBB, XBL, HB, FH and JH) were found to be highly similar with *Pseudomonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Paracoccus* sp., *Planctopirus hydrillae*, *Rhodobacter vinaykumarii* and *Brevundimonas vesicularis*, respectively. We used 8 strains as the additives, and studied their effects on cell density, algal pH, and chlorophyll and astaxanthin contents of *H. pluvialis* purified ahead with antibiotics. We found that the HS obtained the highest cell density on the 9th day, which was 3.65×10^5 cells/mL, significantly higher than that of control. DBB increased the cell density; however no significant difference was found from that of control. From day 1 to day 7, the change in chlorophyll concentration was the same as that in algal cell density. At the end of green phase, the concentration of chlorophyll showed a decreasing trend, indicating that the chlorophyll in algal cells changed to other pigments and marked the end of green phase. At the green stage, the pH of algal liquid changed greatly, from the initial of 7.0 to about 9.30. However, there was no significant difference from that of control at the end of culture. The astaxanthin content of HS was slightly higher than that of control; however, no significant difference from that of control. It was also found that the content of astaxanthin in single algal cells of DBQ was significantly higher than that of control.

Key words: mixotrophic culture; *Haematococcus pluvialis*; phycosphere bacteria; growth; astaxanthin

责任编辑 朱宝象