

溶藻菌 H6 对铜绿微囊藻的溶藻特性研究^{*}

邓信爽¹ 代群威^{1,2#} 胡 鸿¹ 陈春坛¹ 利 勇¹ 赵玉连³

(1.西南科技大学环境与资源学院,四川 绵阳 621010;

2.西南科技大学核废物与环境安全国防重点学科实验室,四川 绵阳 621010;

3.西南科技大学生命科学与工程学院,四川 绵阳 621010)

摘要 全球水华现象日益严重,微生物控藻由于具有成本低、高效、环境友好等优点被广泛关注。以筛自河道的一株溶藻菌 H6 为对象,开展其对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的溶藻特性研究。实验结果表明,H6 最佳投加量(体积分数)为 5%,最佳投加时机为蓝藻水华暴发初期(680 nm 波长处的光密度(OD_{680})为 0.3),pH 控制在 5~11,7 d 溶藻率超过 70%。H6 以间接溶藻为主,直接溶藻为辅,通过分泌耐高温的溶藻物质进行除藻且溶藻产物为腐殖酸类物质。H6 属于肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*),在宽 pH 范围内有较好溶藻效果,丰富了水体蓝藻水华治理方面的菌种资源;分泌的溶藻物质的耐高温特性为后续菌粉制备及生产应用提供了便利。

关键词 蓝藻水华 溶藻菌 铜绿微囊藻 肠杆菌属 溶藻方式

DOI:10.15985/j.cnki.1001-3865.2023.03.004

Study on the algicidal characteristics of *Microcystis aeruginosa* by algicidal bacterium H6 DENG Xinshuang¹, DAI Qunwei^{1,2}, HU Hong¹, CHEN Chuntan¹, LI Yong¹, ZHAO Yulian³. (1. School of Environment and Resources, Southwest University of Science and Technology, Mianyang Sichuan 621010; 2. Fundamental Science on Nuclear Wastes and Environmental Safety Laboratory, Southwest University of Science and Technology, Mianyang Sichuan 621010; 3. College of Life Sciences and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang Sichuan 621010)

Abstract: The global water bloom phenomenon become more and more serious. Microbial algae control is widely concerned because of its low cost, high efficiency and environmental friendliness. In this study, the algicidal bacterium H6 sieved from the river was used to carry out the study of its algicidal characteristics on *Microcystis aeruginosa*. The experimental results showed that the best dosage (volume fraction) of this strain was 5%, the best dosage time was at the beginning of cyanobacterial bloom when the $OD_{680}=0.3$, and the 7 d algicidal efficiency could exceed 70% after treatment in the pH range of 5-11. H6 was mainly indirect algicidal, supplemented by direct algicidal, and it removed algae by secreting algicidal substances that were resistant to high temperature with humic acid substances as the algicidal products. H6 was a strain of *Enterobacteriaceae* with good algicidal effect in a wide pH range, which enriched the strain resources for cyanobacterial bloom treatment in water bodies; its secreted algicidal substances were high temperature resistant, which provided convenience for subsequent powder preparation and production application.

Keywords: cyanobacterial blooms; algicidal bacteria; *Microcystis aeruginosa*; *Enterobacteriaceae*; algicidal method

近年来,随着科技的进步,我国工农业发展进程加快,大量氮磷元素经雨水冲刷或人工排放进入到自然水体,导致江河、湖库富营养化,有毒蓝藻繁殖,从而形成“水华”现象^[1-2]。

蓝藻水华是世界范围的环境问题之一^[3]。铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)作为引起蓝藻水华的主要藻种之一,其产生的微囊藻毒素和蓝藻毒

素将威胁水生态系统的生物多样性^[4]、人类健康^[5]、饮用水安全和社会经济^[6-7]。目前,治理蓝藻水华的方法主要为物理法、化学法和生物法^[8]。微生物控藻由于效果显著、投资成本低及环境友好等优点,引起众多学者关注^[9-10]。国内外学者分别从蓝藻水华暴发的湖泊、河道水体或底泥、土壤、生物体内分离纯化得到控藻微生物^[11-14]。这些微生物去除铜绿微

第一作者:邓信爽,女,1999年生,硕士研究生,研究方向为环境污染调控与生态修复。[#]通讯作者。

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No.4187288);区域创新发展联合基金重点项目(No.U21A2016)。

囊藻的机理主要为直接溶藻和间接溶藻,而目前所报道的微生物控制铜绿微囊藻实验,其溶藻机理多为微生物分泌胞外物进行间接溶藻^[15-16];且溶藻菌分泌物积累到一定浓度,才能有效去除藻细胞^[17]。因此,为达到化合物的有效浓度,大多研究者将菌液投加量设定在 10%(体积分数,下同)左右^[18-19],这在实际工程中可能会对水体造成外源污染。

本研究以铜绿微囊藻作为受试藻种,从河道水体中分离出一株溶藻菌 H6,在较低投加量下探讨其溶藻条件和溶藻机理,以期为陆地蓝藻水华治理提供优势菌种资源与技术储备。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

铜绿微囊藻购自中国科学院水生生物研究所,编号为 FACHB-434,参照文献[20],选用 BG-11 培养基,在(25±1)℃、光照强度 1 000~2 000 lx,光暗比 12 h:12 h 条件下进行活化与扩培。

1.2 实验方法

1.2.1 溶藻菌分离鉴定及生长曲线测定

采集四川某河道上覆水,经牛肉膏蛋白胨培养基富集培养后进行涂布、划线,分离纯化菌株。经过初筛与复筛后,选择溶藻效率高的菌株作为后续实验菌株。

分离纯化的菌株采用 Bioscreen C 全自动生长仪测定其在 600 nm 处的光密度(OD_{600}),绘制生长曲线。纯化菌株交由某生物信息科技有限公司进行 16S rDNA 序列测定,将所得基因序列与 NCBI-BLAST 数据库进行同源性比较,确定溶藻菌株种属,并构建系统发育树。

1.2.2 溶藻菌的溶藻特性研究

(1) 不同菌株投加量对溶藻活性的影响

将溶藻菌培养至对数生长期($OD_{600}=0.4$, pH=8.4),按照投加量 1%、5%、10%加入生长期藻液(680 nm 处的光密度(OD_{680})=0.6)中,空白组按体积分数 10%添加牛肉膏蛋白胨培养基,测定第 1、3、5、7 天叶绿素 a 含量,计算溶藻率。

(2) 不同 pH 对溶藻活性的影响

将铜绿微囊藻培养至对数生长期($OD_{680}=0.6$),调整生长期菌液($OD_{600}=0.4$)pH 分别为 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0,处理 3 h 后调节回菌液原 pH (pH=8.4),按照投加量 5%加入生长期菌液,空白组以等量牛肉膏蛋白胨培养基补充,测定第 1、3、5、7 天叶绿素 a 含量,计算溶藻率。

(3) 不同初始藻密度对溶藻活性的影响

将铜绿微囊藻培养至对数生长期,调整藻液 OD_{680} 分别为 0.3、0.5、0.7,再按照投加量 5%加入对数生长期菌液($OD_{600}=0.4$, pH=8.5),空白组以等量牛肉膏蛋白胨培养基补充,测定第 1、3、5、7 天叶绿素 a 含量,计算溶藻率。

(4) 溶藻方式的确定

取 5 mL 对数生长期菌液($OD_{600}=0.4$, pH=8.6),经 4℃、6 000 r/min 处理 10 min 后的上清液再通过 0.22 μ m 滤膜两次,过滤除菌,制备为上清液。收集离心沉淀,用新鲜无菌水清洗 3 遍,最后等体积重悬制备为菌悬液。取 5 mL 对数生长期菌液上清液经高温高压(121℃、 1.0×10^5 Pa)灭活处理 20 min,制备为高温灭菌液。将相同体积菌液、上清液、菌悬液、高温灭菌液按照投加量 5%加入对数生长期藻液($OD_{680}=0.6$)中,测定第 1、3、5、7 天叶绿素 a 含量,计算溶藻率。

1.2.3 分析测定方法

叶绿素 a 采用乙醇法^[21]进行测定,藻细胞形态表征按照文献[22]观察,胞外有机物(EOM)按照文献[23]测定,按照式(1)计算溶藻率(η ,%)。

$$\eta = (c_0 - c_1) / c_1 \times 100\% \quad (1)$$

式中: c_0 和 c_1 为分别为空白组和处理组叶绿素 a 质量浓度,mg/L。

2 结果与分析

2.1 溶藻菌分离鉴定及生长曲线

经过初筛与复筛,有 10 株菌株对铜绿微囊藻有明显的溶藻效果,其中一株菌株溶藻效果稳定,命名为 H6,供后续实验使用。经革兰氏染色,菌株染色结果为阴性,菌体呈杆状,单个细胞宽 0.7~0.9 μ m,长 2~5 μ m,H6 的 16S rDNA 序列与路氏肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*) VITPSR-027 相似。结合菌株形态特征与 16S rDNA 序列分析,将 H6 鉴定为肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)。H6 在培养 3 h 后进入对数生长期,22 h 后达到稳定期, OD_{600} 最高达到 0.72(见图 1)。

2.2 溶藻菌的溶藻特性

不同 H6 投加量下的溶藻效果见图 2。当初始叶绿素 a 为 0.6 mg/L 时,随着时间的延长,1%投加量实验组溶藻率呈现负增长趋势;而 5%和 10%投加量实验组溶藻率均呈现正增长趋势。这说明在低投加量下,铜绿微囊藻仍能继续存活;而在较高投加量下,H6 显示出良好的溶藻活性,且当投加量从

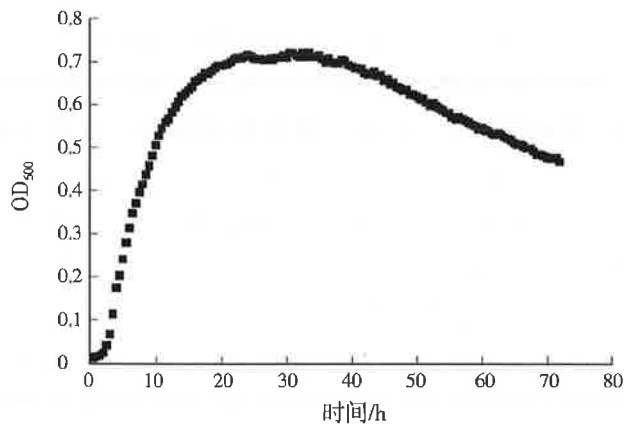


图 1 H6 生长曲线

Fig.1 Growth curve of H6

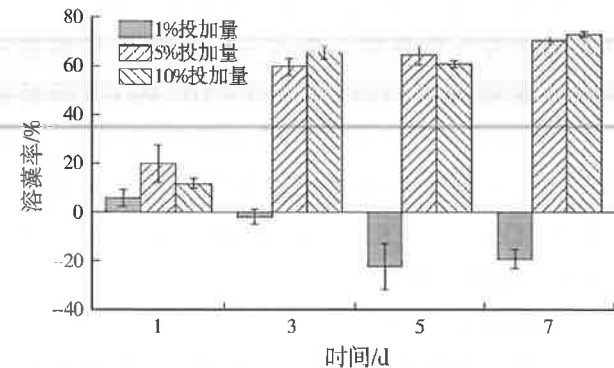


图 2 不同 H6 投加量下的溶藻效果

Fig.2 Algicidal effect at different H6 dosage

5%上升至 10%时,溶藻率无显著变化,即在 5%投加量下就能达到较好的溶藻效果,与 KONG 等^[24]的研究结果相似。结合上述分析,选择溶藻菌投加量为 5%进行后续实验。

对不同初始 pH 下的溶藻菌的溶藻效果进行分析,结果见图 3。菌液在 pH 为 3.0 的条件下处理后,溶藻率较低,而在 pH 为 5~11 条件下,溶藻率较高。H6 的 7 d 溶藻率由低到高分别为:pH=3.0、pH=7.0、pH=9.0、pH=5.0、pH=11.0。当 pH=11.0 时,H6 对铜绿微囊藻的 7 d 溶藻率为 80%左右,说明 H6 能够适应碱性环境。铜绿微囊藻引起的蓝藻水华通常发生在低浓度 CO₂ 与高 pH 的水体环境中^[25],因此,肠杆菌属溶藻菌 H6 能够较好适应铜绿微囊藻水华环境。

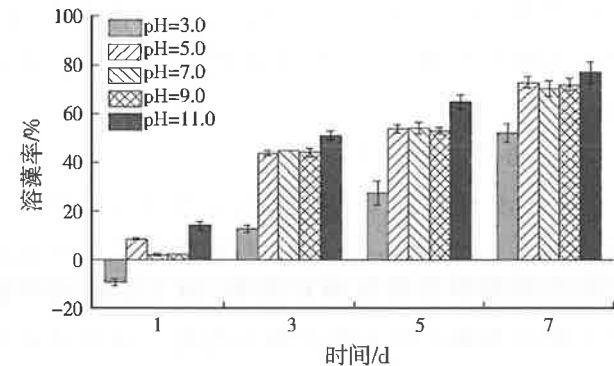


图 3 不同初始 pH 下的溶藻效果

Fig.3 Algicidal effect at different initial pH

天然水体中,水华暴发期叶绿素 a 通常为 0.04~0.39 mg/L^[26-27],但当水华严重时,叶绿素 a 可接近 2.0 mg/L^[28]。因此,为探索溶藻菌最佳投加时期,需在不同初始藻密度下进行实验,结果见图 4。初始 OD₆₈₀=0.3 时,1 d 溶藻率为 36.6%,7 d 溶藻率达 83.1%,且溶藻菌溶藻率在 1~3 d 增长较快;初始 OD₆₈₀=0.5 时,1 d 溶藻率为 33.9%,而 7 d 溶藻率达 61.2%;初始 OD₆₈₀=0.7 时,1 d 溶藻率为 15.2%,7 d 溶藻率仅为 38.6%。初始藻密度越低,叶绿素浓度也越低,H6 对铜绿微囊藻的抑制效果越好。这说明在实际蓝藻水华治理时投放 H6 的最佳时机为水华暴发初期,与 YAN 等^[29]的结论一致。

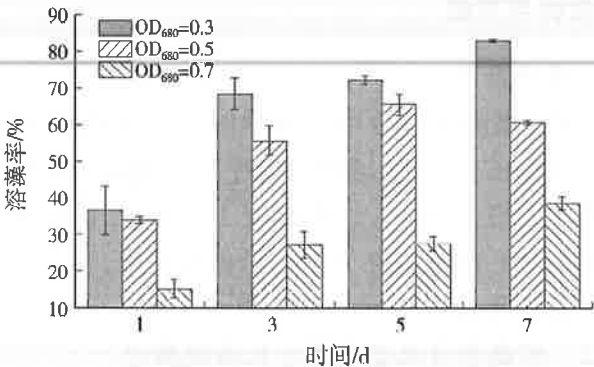


图 4 不同初始藻密度下的溶藻效果

Fig.4 Algicidal effect at different initial algae concentration

2.3 溶藻菌的溶藻方式

溶藻菌溶藻方式一般分为两种,直接溶藻和间接溶藻。直接溶藻,是溶藻菌直接进攻藻细胞,使藻细胞发生破裂死亡;间接溶藻,是溶藻菌通过分泌溶藻物质,干预其正常代谢,从而阻止藻细胞的生长繁殖^[30]。

H6 培养 7 d,菌液、上清液、菌悬液、高温灭菌液处理组溶藻率见图 5。菌悬液处理组的 7 d 溶藻率为 11.0%;而菌液、上清液及高温灭菌液处理组的 7 d 溶藻率分别达到 81.8%、75.7%及 74.2%。以上结果表明,H6 的上清液及菌悬液均有一定的溶藻效果,但上清液的溶藻率远高于菌悬液,因此H6溶藻

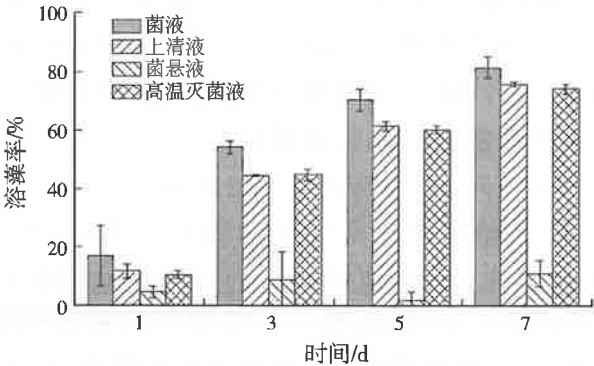


图 5 不同处理的溶藻效果对比

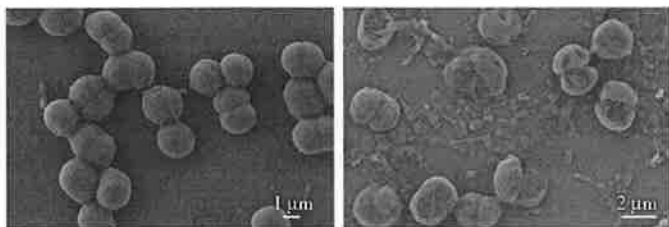
Fig.5 Algicidal effect comparison among different treatments

方式主要为间接溶藻。

溶藻菌间接溶藻中分泌的物质包括氨基酸氧化酶、蛋白酶等蛋白质类物质或对温度敏感的三萜皂苷^[31]。上清液经 121 ℃ 灭菌 20 min 后依旧具备较好的溶藻效果,即 H6 分泌的溶藻物质具有耐高温特性,这种高效的溶藻物质不是蛋白质类物质及三萜皂苷。

2.4 溶藻菌作用下的藻细胞形态变化

通过对比 H6 作用下的铜绿微囊藻细胞形态(见图 6),发现未经 H6 处理的藻细胞表面光滑,呈球状,直径约为 3 μm ,细胞结构完整。经过 H6 处理后的藻细胞表面出现明显的褶皱、内陷且大量的藻细胞破裂。结果说明,H6 分泌的物质能够对藻细胞形态形成破坏效果,从而致其死亡,与陈旭清等^[32]描述的蓝藻腐烂过程相似。



(a) 未经H6处理 (b) 经过H6处理

图 6 铜绿微囊藻细胞形态变化

Fig.6 Morphological changes of *Microcystis aeruginosa* cells

从电镜图片中还可以看出,加入 H6 的实验组中,藻细胞周围聚集着大量的细菌,该现象与 HENRICHSEN 等^[33]提出的溶藻菌会通过“奴隶机制”分泌营养物质促使藻细胞靠近的理论一致。在野外环境中,微囊藻会产生胞外多糖形成胶被,促使单细胞形成群体^[34];胶被不仅作为保护屏障抵御外界胁迫,还参与蓝藻营养物质的传递、吸收和储存^[35]。因此,溶藻菌的“奴隶机制”在野外情况下可以大量吸引被胶被包裹的铜绿微囊藻靠近,并通过与胶被接触,使溶藻菌分泌物与藻细胞壁某个位点接触,建立溶藻菌与藻细胞群体之间的联系,从而达到溶藻效果^[36]。

2.5 EOM 变化

藻类通过光合作用形成的藻类有机物包括 EOM 和胞内有机物(IOM),EOM 是藻细胞正常生长繁殖过程中由代谢作用释放到水环境的有机物;IOM 存在于藻细胞内,由于细胞自身分解作用而形成,当藻细胞衰亡破裂时,IOM 会由细胞内释放至水体中^[37]。不同投加量下藻液 EOM 变化见图 7。空白组中存在一个较强的荧光峰 T1,出峰位置为激发波长(E_x)/发射波长(E_m)=270~280 nm/320~

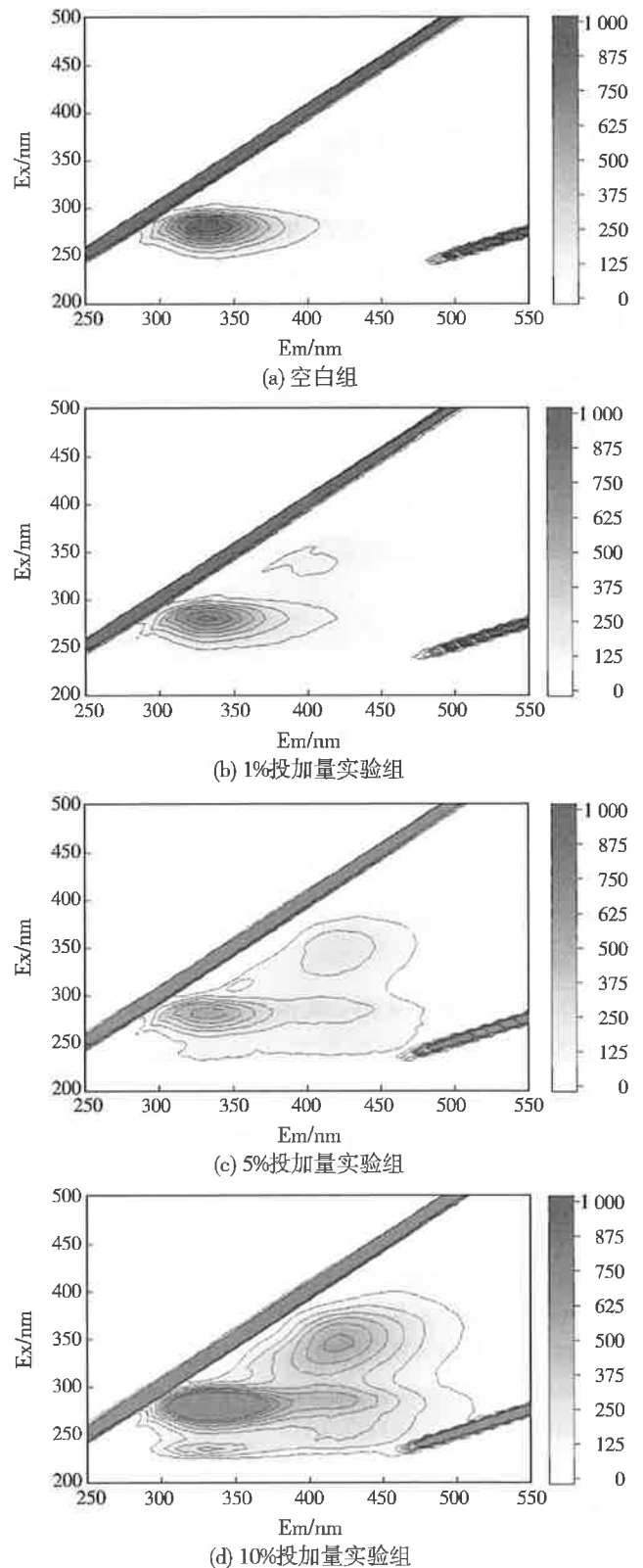


图 7 不同投加量下藻液 EOM 变化

Fig.7 Changes of EOM in algal solution at different dosage

330 nm,以类色氨酸物质为主,代表可溶性微生物代谢产物。1%投加量实验组中除荧光峰 T1 外出现了新的荧光峰 A,出峰位置为 $E_x/E_m=325\sim370$ nm/400~450 nm,以腐殖酸类物质为主,代表藻类的分泌物以及藻细胞死亡后被微生物分解的物质,其强度反映了藻类活性高低^[38]。5%、10%投加量实验组中除荧光峰 T1、A 外新增一个荧光峰 T2

(10%投加量实验组尤为明显), T2 出峰位置为 $E_x/E_m=225\text{ nm}/325\text{ nm}$, 以类酪氨酸与类色氨酸物质为主, 主要存在于藻细胞内, 当藻细胞衰亡破裂时, 会由细胞内释放至水体中^[39]。随着投加量的增加, 荧光峰 A 强度增强, 说明藻细胞活性随着投加量增加而降低, 藻细胞死亡并被分解为腐殖酸类物质, 该物质不能再被微生物利用; 而荧光峰 T2 出现并进一步增强, 说明藻细胞发生了破裂, 藻细胞 IOM 流出。

3 结 论

(1) 从四川某河道上覆水中分离出一株对铜绿微囊藻具有较好溶藻效果的溶藻菌 H6, 细菌形态观察及 16S rDNA 序列分析表明 H6 属于肠杆菌属。

(2) 实验室条件下, H6 对铜绿微囊藻的最佳控制条件为: 投加量 5%, 在蓝藻水华暴发初期 ($OD_{680}=0.3$) 投加, pH 处于 5~11, 7 d 溶藻率超过 70%。

(3) H6 溶藻方式以间接溶藻为主, 其分泌的物质通过促使藻细胞发生褶皱、内陷及破裂从而导致藻细胞死亡, 且分泌的溶藻物质经高温后仍具备较强的溶藻活性。

(4) H6 作用 7 d 后, 藻液中的 EOM 出现了腐殖酸类和类酪氨酸、类色氨酸类物质, 表明 H6 在促使藻细胞死亡的过程中有 IOM 流出, 并且藻细胞死亡后被分解, 其产物为腐殖酸类物质。

参考文献:

- [1] 段扬, 吴文俊, 蒋洪强, 等. 长江经济带农田氮素平衡特征与污染风险评估分析[J]. 生态环境学报, 2020, 29(7): 1344-1351.
- [2] MORGANE L M, CHANTAL G O, ALAIN M, et al. Eutrophication: a new wine in an old bottle? [J]. Science of the Total Environment, 2019, 651(1): 1-11.
- [3] LIU J, YANG C, CHI Y, et al. Algicidal characterization and mechanism of *Bacillus licheniformis* Sp34 against *Microcystis aeruginosa* in Dianchi Lake[J]. Journal of Basic Microbiology, 2019, 59(11): 1112-1124.
- [4] 吕萍, 李慧莉, 徐勇, 等. 营养物质对铜绿微囊藻生长和藻际细菌的影响[J]. 环境科学, 2022, 43(10): 4205-4210.
- [5] KHAIRY H, EL SHEEKH M. Toxicological studies on microcystin produced by *Microcystis aeruginosa*: assessment and management[J]. Egyptian Journal of Botany, 2019, 59(3): 551-566.
- [6] PIVOKONSKY M, SAFARIKOVA J, BARESOVA M, et al. A comparison of the character of algal extracellular versus cellular organic matter produced by cyanobacterium, diatom and green alga[J]. Water Research, 2014, 51: 37-46.

- [7] MOHAMED Z A, HASHEM M, ALAMRI S A. Growth inhibition of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and degradation of its microcystin toxins by the fungus *Trichoderma citrinoviride*[J]. Toxicon, 2014, 86: 51-58.
- [8] 史小丽, 杨瑾晟, 陈开宁, 等. 湖泊蓝藻水华防控方法综述[J]. 湖泊科学, 2022, 34(2): 349-375.
- [9] CHEN M, DING S, XIANG C, et al. Mechanisms driving phosphorus release during algal blooms based on hourly changes in iron and phosphorus concentrations in sediments[J]. Water Research, 2018, 133: 153-164.
- [10] JEF H, CODD G A, PAERL H W, et al. Cyanobacterial blooms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(8): 471-483.
- [11] 陈莉婷, 左俊, 宋立荣, 等. 溶藻细菌筛选及溶藻活性物质对铜绿微囊藻生理活性的影响[J]. 水生生物学报, 2020, 44(3): 638-646.
- [12] 刘锦钰. 溶藻菌 *Bacillus licheniformis* Sp34 及其溶藻物质的溶藻特性与机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [13] 张嗣萍. 一株广谱性溶藻细菌的筛选鉴定、溶藻特性及溶藻机理的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [14] 张槿. 白腐菌 *Schizophyllum commune* 除藻及降解藻毒素-LR 效果研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2012.
- [15] 许明宸, 张文艺, 毛林强. 太湖土著田螺消化道中溶藻菌 XMC 溶藻进程与叶绿素 a 降解动力学研究[J]. 环境化学, 2021, 40(6): 1855-1861.
- [16] 马少雄. 溶藻菌 WJ6 对蓝、绿藻引起水体富营养化的去除研究[D]. 合肥: 安徽建筑大学, 2021.
- [17] LIU Q A, FENG X A, SHENG Z B, et al. Enhanced wastewater treatment performance by understanding the interaction between algae and bacteria based on quorum sensing [J]. Bioresource Technology, 2022, 354: 1-12.
- [18] 卢露, 马金玲, 牛晓君, 等. 铜绿微囊藻溶藻菌 EA-1 的分离鉴定及溶藻特性[J]. 中国环境科学, 2021, 41(11): 5372-5381.
- [19] 洪桂云, 马少雄, 王佳, 等. 高效铜绿微囊藻溶藻菌 WJ6 的分离鉴定及溶藻特性[J]. 中国环境科学, 2018, 38(11): 4269-4275.
- [20] 王波, 张光明, 马伯志, 等. 微囊藻毒素在超声场中的降解研究[J]. 环境科学, 2005, 26(6): 103-106.
- [21] 武艳, 苗春光. 改性蛭石去除水体中蓝藻效果的研究[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(21): 127-129.
- [22] 曾予映. 直接溶藻链霉菌 *Streptomyces* sp. G9 的溶藻特性与作用机制的探索[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [23] ZHANG X, YIN G, ZHAO N, et al. Chromophoric dissolved organic matter influence correction of algal concentration measurements using three-dimensional fluorescence spectra [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 210: 405-411.
- [24] KONG Y, WANG Q, CHEN Y J, et al. Anticyanobacterial process and action mechanism of *Streptomyces* sp. HJC-D1 on *Microcystis aeruginosa* [J]. Environmental Progress & Sustainable Energy, 2020, 39(4): e13392.
- [25] LEMOS R V, TSUJIMURA S, LEDEZMA P, et al. Extracellular electron transfer by *Microcystis aeruginosa* is solely driven by high pH[J]. Bioelectrochemistry, 2021, 137: 107637.

(下转第 309 页)