

研究报告

絮凝菌株 *Shinella* sp. xn-1 对铜绿微囊藻的絮凝效果许艳婷¹ 李祎^{1,2*} 赵国威¹ 王海磊¹ 郑天凌²

(1. 河南师范大学生命科学学院 河南 新乡 453007)

(2. 厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361102)

摘要: 【目的】研究絮凝功能细菌 xn-1 对有害水华藻——铜绿微囊藻的絮凝效果, 以期为有害水华的治理提供新的选择。【方法】采用涂布划线法从藻际分离纯化絮凝功能微生物; 基于 16S rRNA 基因序列确定进化地位; 通过不同金属离子确定絮凝机制; 梯度醇沉法获得絮凝物质; 以酶标仪测定絮凝效率。【结果】菌株 xn-1 确定属于申氏杆菌属(*Shinella*), 且命名为 *Shinella* sp. xn-1。在添加 Ca^{2+} 作为促凝剂的条件下对铜绿微囊藻表现出高效的絮凝效果, 其絮凝效果主要来源于胞外上清, 而表现出高效的絮凝效果所需要的胞外上清添加量为 3.0%。从胞外上清中获得的絮凝物质以 0.5 g/L 的添加量作用于藻细胞后表现出高效的絮凝效果, 且随着处理时间增加, 絮凝团的体积增大。【结论】*Shinella* sp. xn-1 通过分泌胞外絮凝物质对铜绿微囊藻表现出高效的絮凝效果, 在絮凝作用下藻细胞聚集在一起形成大体积的絮凝团, 该研究有利于治理有害水华。

关键词: 铜绿微囊藻, 申氏杆菌属, 絮凝物质, 絮凝效果

Flocculation effect of *Shinella* sp. xn-1 on *Microcystis aeruginosa*XU Yan-Ting¹ LI Yi^{1,2*} ZHAO Guo-Wei¹ WANG Hai-Lei¹ ZHENG Tian-Ling²

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

(2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China)

Abstract: [Objective] To study the flocculation effect of bacterial strain xn-1 on water bloom causing species-*Microcystis aeruginosa*, to control water bloom. [Methods] Flocculation bacterium was isolated from phycosphere based on plate spread and streak technique; 16S rRNA gene was applied to determine the evolutionary status. Flocculation mechanism was confirmed by addition of different metal ions as coagulants. Bioflocculant was obtained by gradient alcohol precipitation. Microplate reader was used to study flocculation activity. [Results] Strain xn-1 was determined as a species of the genus *Shinella*, designated as *Shinella* sp. xn-1. Strain xn-1 exhibited high flocculation activity on *M. aeruginosa* with adding Ca^{2+} as coagulants, and the flocculation activity was originated from extracellular supernatant, showing high flocculation efficiency with the concentration of 3.0%.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 51008119, 41576109); Doctoral Scientific Research Start-up Foundation of Henan Normal University (No. 5101049170160)

*Corresponding author: Tel: 86-373-3326559; E-mail: liyi@htu.edu.cn

Received: December 01, 2016; Accepted: February 13, 2017; Published online (www.cnki.net): February 28, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51008119, 41576109); 河南师范大学博士科研启动基金项目(No. 5101049170160)

*通讯作者: Tel: 86-373-3326559; E-mail: liyi@htu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-01; 接受日期: 2017-02-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-28

Biofloculant isolated from extracellular supernatant could exhibit high flocculation effect with the addition of 0.5 g/L, and the algal flocs became huger with the increase of processing time.

[Conclusion] *Shinella* sp. xn-1 shows high flocculation activity on *M. aeruginosa* through secreting extracellular biofloculant, and the flocs with large volume are formed under the flocculation effect. This study is a useful option to control water blooms in the future.

Keywords: *Microcystis aeruginosa*, *Shinella*, Biofloculant, Flocculation effect

随着工业化步伐的大力推进, 包含大量氮、磷物质的工业及生活废物被排放入水体后, 造成水体中营养过剩, 引起藻类及其他浮游生物迅速繁殖, 即“水体富营养化”^[1]。在水体富营养化出现后, 蓝藻由于其自身繁殖迅速和竞争性强, 往往可以抑制其他藻类的生长而成为水体富营养化的优势种, 从而形成“水华”^[2]。蓝藻形成水华后会引引起水质恶化, 造成其他水生生物的死亡^[3]。特别是某些蓝藻如铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)会散发刺鼻的气味, 还会产生微囊藻毒素(Microcystins), 对人体健康造成严重的影响^[4]。如何有效缓解及治理蓝藻水华成为淡水环境研究的热点和焦点。

目前国内外对水华的治理方法主要包括物理、化学、生物等方法^[5]。有研究者采用投加化学试剂来达到絮凝藻的效果, 但是这些化学药品会对水体环境造成二次伤害, 不具有生态安全性。超声絮凝和电絮凝等物理方法成本较高、不易操作, 并不能很好地应用于水华的治理^[6]。近年来, 不少研究者发现微生物可以与蓝藻进行相互作用, 或者可以分泌絮凝物质, 从而有效缓解蓝藻水华的危害^[7], 并且微生物具有生态安全性, 也是我们主要的研究方向。

本论文主要研究菌株 *Shinella* sp. xn-1 对铜绿微囊藻的絮凝作用, 以蓝藻水华藻——铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* 7820)为研究目标, 从蓝藻藻际环境中筛选到一株有明显絮凝功能的菌株 xn-1, 对其进行了形态鉴定和进化地位确定, 并对其絮凝作用来源、絮凝物质添加量及不同 pH 和不同金属离子对其絮凝效果的影响等进行初步探究, 以期应用絮凝微生物治理蓝藻水华奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌种、藻种及其培养

絮凝菌株 xn-1 分离于铜绿微囊藻 7820 藻际, 采用 LB 培养基(胰蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, 氯化钠 30.0 g, pH 7.2, 1.0 L 蒸馏水), 于 28 °C、150 r/min 振荡培养。供试藻种为铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* 7820)购于中国科学院野生生物种质库, 采用 BG11 培养基, 于光强 50 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 温度 25 ± 1 °C, 昼夜比 L:D=12 h:12 h 的条件下培养。BG11 培养基(g/L): NaNO_3 1.500, K_2HPO_4 0.040, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075, $\text{CaCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.036, Na_2CO_3 0.020, 柠檬酸 0.006, 柠檬酸铁 0.006, 微量元素溶液 A5 1.0 mL, EDTA 0.001, 蒸馏水 1.0 L, 用于铜绿微囊藻的培养。微量元素混合溶液 A5 (g/L): H_3BO_3 2.860, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.810, ZnSO_4 0.222, Na_2MoO_4 0.390, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.079, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.490。絮凝培养基(g/L): NaCl 24.0, NH_4Cl 1.0, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 6.5, KH_2PO_4 2.0, 葡萄糖 10.0, 酵母粉 0.6, pH 调至 7.0, 用于菌的培养。

1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, TaKaRa 公司。超净工作台, 苏州智净净化设备有限公司; 酶标仪, 郑州金友宁仪器有限公司; 光照培养箱, 宁波莱福科技有限公司; 离心机, 美国贝克曼库尔特公司; 光学显微镜 BX63, 日本奥林巴斯有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 絮凝菌株 xn-1 的分离: 取铜绿微囊藻 7820 的藻液 20 mL, 通过 0.2 μm 的聚碳酸膜过滤, 获得游离和粘附的细菌样品^[8]。采取逐级稀释法将样品分别涂布在 LB 固体培养基表面, 置于 28 °C 培养 2–3 d。挑取不同类型单菌落划线于 LB 固体平板,

置于 28 °C 温度下培养 2–3 d, 重复该步骤直到得到纯培养。分别将 0.5 mL 不同纯培养的发酵产物接种于 10 mL 铜绿微囊藻培养液中, 于室温 120 r/min、振摇 5 min 后, 再在 25±1 °C、昼夜比 L:D=12 h:12 h 的条件下培养 7 d, 0.5 mL 灭菌的 BG11 培养基加入藻液作为对照组, 处理组和对照组分别设置 3 个平行; 观察处理组中对 7820 藻有絮凝作用的菌株, 从而筛选出絮凝菌株。用 20% 甘油将其保存在 -80 °C, 待用。

1.3.2 菌株 xn-1 的菌落形态观察及简单染色: 将菌株 xn-1 接种到 LB 固体平板上, 于 28 °C 恒温培养 24–48 h, 观察细菌菌落形态, 并通过简单染色后, 在油镜下观察细菌细胞形态。

1.3.3 菌株 xn-1 的 16S rRNA 基因序列测定: 菌株 xn-1 的基因组 DNA 是用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取, 以提取的基因组 DNA 为模板, 用 16S rRNA 基因扩增的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3') 进行 PCR。PCR 反应体系: 27F (10 μmol/L) 1 μL, 1492R (10 μmol/L) 1 μL, DNA (50 ng/μL) 10 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 10×Buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL, 加 ddH₂O 补足至 50 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环 30 次; 72 °C 8 min。PCR 扩增后发现目的条带, 送公司测序。将测序结果与 NCBI 的 GenBank 数据库以及 EzTaxon 数据库^[9] 进行比对, 选取与所测序列相似性较高的种或属。应用 ClustalX 和 MEGA 4.0 生物软件^[10], 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.3.4 菌株 xn-1 对藻细胞的絮凝效果: 将培养至对数期的菌株 xn-1 的发酵液均按照 5.0% (体积比) 的添加量加入到铜绿微囊藻的培养液中作为实验组, 添加同样体积无菌的絮凝培养基的藻液作为对照组。实验分成两组进行: (1) 实验组和对照组均不加氯化钙; (2) 实验组和对照组均加终浓度为 5 mmol/L 的氯化钙。以上处理组与对照组分别设置 3 个平行, 将其同时置于 25±1 °C, 12 h 光照, 12 h 黑暗, 50 μE/(m²·s) 光照强度条件下培养, 6 h 后取

藻培养液表层(从上至下藻液的 1/3 高度)样品, 然后用酶标仪测定处理组与对照组藻细胞在 OD₆₈₀ 条件下的吸光度值, 并按照公式(1)计算絮凝率。

$$\text{絮凝率}(\%) = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \quad (1)$$

其中, *A* 为对照组中藻细胞在 OD₆₈₀ 条件下的吸光度值, *B* 为处理组中藻细胞在 OD₆₈₀ 条件下的吸光度值。

1.3.5 絮凝培养基的 pH 对菌株 xn-1 絮凝效果的影响以及絮凝效果来源的探究: 将菌株 xn-1 接种于 pH 分别为 6.0、7.0、8.0 的絮凝培养基中进行培养, 将培养至对数期的菌株 xn-1 的发酵液均按照 5.0% (体积比) 的添加量加入到铜绿微囊藻的藻液中作为处理组, 添加同样体积的无菌絮凝培养基的铜绿微囊藻藻液为对照组。处理组与对照组均加终浓度为 5 mmol/L 的 CaCl₂ 溶液, 放摇床于室温摇匀后 (120 r/min, 5 min), 放入光照培养箱, 6 h 后用移液器分别吸取表层藻液, 用酶标仪测定吸光度值 (OD₆₈₀) 并按照公式(1)计算絮凝效率, 以上处理组与对照组分别设置 3 个平行。

菌株 xn-1 培养 48 h 后分别进行处理得到 3 种样品: (1) 细菌发酵液, 即直接收集对数期菌株的发酵液; (2) 无菌上清, 即将菌株 xn-1 的发酵液 10 000×g 离心 15 min 后, 收集上清经过 0.22 μm 滤膜过滤, 得到无菌上清; (3) 细菌菌体, 即将菌株 xn-1 的发酵液按照上述条件离心后, 去除上清后得到菌体, 将菌体用无菌 BG11 培养基重悬洗涤 2–3 次后, 重悬于等体积 BG11 中, 得到细菌菌体。将上述得到的细菌发酵液、无菌上清和细菌菌体分别按照体积比 5.0% 的添加量加入到铜绿微囊藻 7820 藻液中, 同时以添加相同体积的无菌絮凝培养基作为对照组, 处理组与对照组均设置 3 个平行, 并连续测定藻细胞在 OD₆₈₀ 条件下的吸光度值。

1.3.6 菌株 xn-1 不同添加量的上清及处理时间对絮凝效果的影响: 将菌株 xn-1 的无菌上清按照 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0% 和 5.0% 的添加量分别加入到铜绿微囊藻 7820 藻液中作为处理组, 同时以添加相同体积的无菌絮凝培养基作为对照组, 处理组与对照组均加终浓度为 5 mmol/L 的

CaCl₂ 溶液, 放摇床于室温摇匀后(120 r/min, 5 min), 放入光照培养箱。分别放置 20、40、60、80、100、120、360 min 后, 从光照培养箱中轻轻拿出处理组和对照组, 用移液器分别吸取表层藻液, 用酶标仪测定吸光度值(OD_{680})并按照公式(1)计算絮凝效率, 以上处理组与对照组分别设置 3 个平行。

1.3.7 不同金属离子对菌株 xn-1 絮凝效果的影响: 配制 NaCl、KCl、MgCl₂、CuCl₂、FeCl₃ 终浓度为 500 mmol/L 的母液, 1×10^5 Pa 灭菌待用; 处理组为 5.0% 的菌株 xn-1 无菌上清分别添加终浓度为 5 mmol/L 的 NaCl、KCl、MgCl₂、CuCl₂ 和 FeCl₃ 溶液, 相同体积无菌絮凝培养基藻液分别添加不同金属离子作为对照组, 放摇床于室温摇匀后(120 r/min, 5 min), 放入光照培养箱。30 min 后用移液器分别吸取表层藻液, 用酶标仪测定吸光度值(OD_{680})并按照公式(1)计算絮凝效率, 以上处理组与对照组分别设置 3 个平行。

1.3.8 絮凝物质的提取及其对铜绿微囊藻的絮凝效果: 絮凝物质提取方法^[11]: 取菌株 xn-1 培养 48 h 后的发酵液, 6 000×g 离心 20 min 后收集上清; 加入二倍体积预冷的无水乙醇, 4 °C 放置 24 h 后在 6 000×g 离心 30 min 收集沉淀; 用预冷的丙酮洗 2 次沉淀, 每次均 6 000×g 离心 10 min; 然后冷冻干燥后称重。将以上得到的絮凝物质, 按照 0.05、0.15、0.30、0.50、1.00 g/L 的添加量将絮凝物质加入到铜绿微囊藻 7820 藻液中作为处理组, 正常生长的铜绿微囊藻 7820 藻液作为对照组。处理组与对照组均加终浓度为 5 mmol/L 的 CaCl₂ 溶液, 放摇床摇匀后(120 r/min, 5 min), 放入光照培养箱, 2 h 后用移液器分别吸取表层藻液, 用酶标仪测定吸光度值(OD_{680})并按照公式(1)计算絮凝效率, 以上处理组与对照组分别设置 3 个平行。

1.3.9 光学显微镜下观察絮凝过程: 将絮凝物质按照 0.5 g/L 的添加量添加到铜绿微囊藻 7820 藻液中, 同时添加终浓度为 5 mmol/L 的 CaCl₂, 放摇床摇匀后(120 r/min, 5 min), 放入光照培养箱, 分别在 5、10、20 min 不同的絮凝时间取样, 并在光学显微镜下观察絮凝过程。

1.3.10 数据分析: 显著性分析采用 Origin 8.5 进行分析, 其中“*”代表 $P < 0.05$, “**”代表 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株 xn-1 的形态特征

菌株 xn-1 在盐度为 3.0% 的 LB 固体培养基上生长 48 h 后, 可以观察到菌株 xn-1 菌落为白色, 呈圆形, 边缘不齐整, 菌落湿润, 不透明(图 1A)。将细菌细胞进行简单染色后在光学显微镜下观察到细菌细胞呈短小杆状, 细胞长约 2 μ m, 直径约为 0.4 μ m–0.6 μ m (图 1B)。

2.2 菌株 xn-1 的 16S rRNA 基因序列及系统进化树分析

测序后获得 1 485 bp 的几乎完整的 16S rRNA 基因序列, 将该序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库以及 EzTaxon 数据库进行比对, 结果表明菌株 xn-1 与申氏杆菌属 *Shinella yambaruensis* MS4^T 最高相似性为 99.79%。通过 ClustalX 和 MEGA 4.0 生物软件, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 2), 在进化树中与 *Shinella yambaruensis* MS4^T 在同一分支。因此, 确定该菌株应该为申氏杆菌属的一株细菌, 命名为 *Shinella* sp. xn-1。

2.3 菌株 xn-1 对藻细胞的絮凝效果

将菌株 xn-1 的发酵产物按照体积比 5.0% 的添加量加入到铜绿微囊藻 7820 藻培养液中进行絮凝实验。菌株 xn-1 的发酵液对铜绿微囊藻细胞有絮凝效果, 但是在不添加氯化钙作为促凝剂的第一处理组的絮凝效率较低, 仅为 20.67%; 而添加了氯化钙的处理组对藻细胞的絮凝率显著高于($P < 0.01$)未加氯化钙的处理组, 达到 79.30% (图 3)。

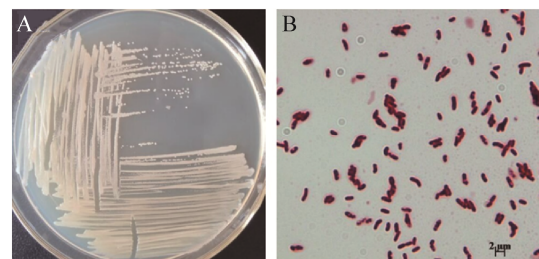


图 1 菌株 xn-1 的菌落形态(A)及细胞形态(B)
Figure 1 Colony morphology (A) and cell morphology (B) of strain xn-1

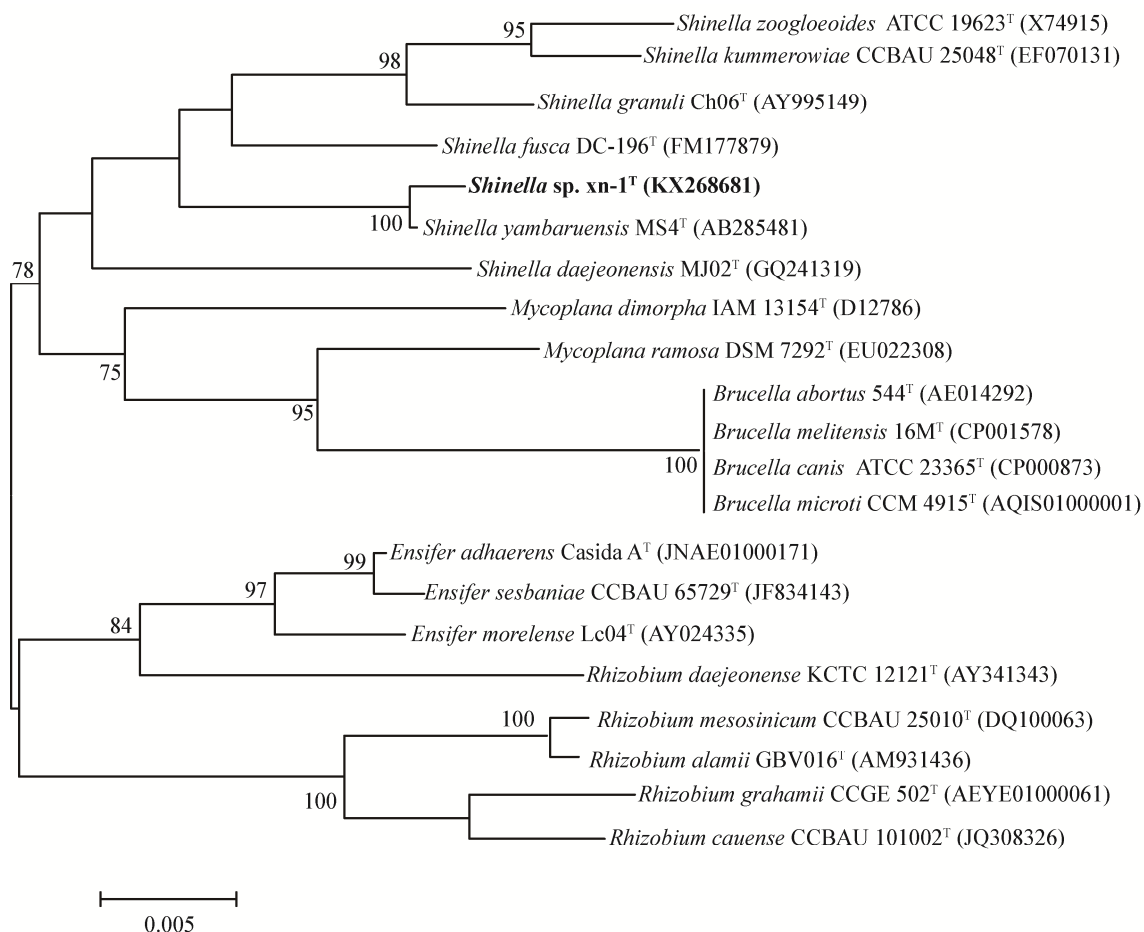


图2 菌株 xn-1 的 16S rRNA 基因序列的系统进化树

Figure 2 Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic positions of strain xn-1 based on 16S rRNA gene sequences

注：步长值通过 1 000 次重复运算在各分支点显示出来；只保留步长值大于 70%；标尺=0.005 K_{nuc} 。

Note: Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch points; Only bootstrap values > 70% are showed; Bar, 0.005 nucleotide substitution rate (K_{nuc}) units.

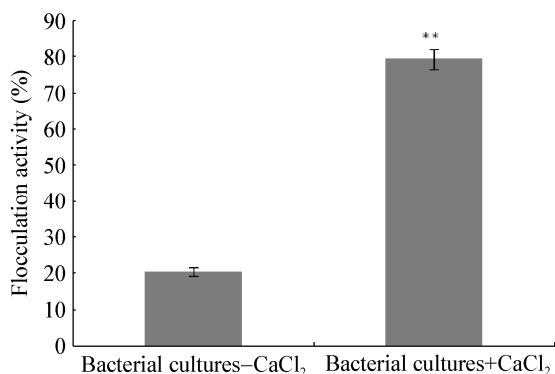


图3 菌株 xn-1 有无加氯化钙的絮凝效果

Figure 3 Flocculation activity of strain xn-1 with or without adding $CaCl_2$

Note: ** were presented as means \pm standard error of the mean and were evaluated using one-way analysis of variance followed by the least significant difference test with $P < 0.01$. The same below.

2.4 絮凝培养基的 pH 对菌株 xn-1 絮凝效果的影响以及絮凝作用来源

由图 4 结果可知, pH 值为 6.0 时, 絮凝效率偏低, 为 65.14%; 而在絮凝培养基的 pH 值为 7.0 或 8.0 时, 絮凝效率均达到较高水平且差别不大, 分别为 84.17%、83.86% (图 4)。该结果表明, 絮凝培养基在中性偏弱碱性条件下菌株 xn-1 的絮凝率显著高于 ($P < 0.01$) 其在酸性条件下, 即培养基的 pH 在中性偏碱性时絮凝率较高, 絮凝效果好。

由图 5 结果可知, 添加了无菌上清的处理组较添加了相同体积无菌絮凝培养基的对照组表现出明显的絮凝效果, 且絮凝率较添加了发酵产物和细菌细胞的处理组最高, 达 86.66%; 添加了发酵产物

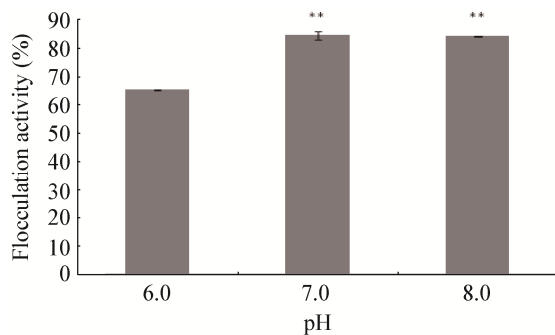


图4 培养基不同 pH 对菌株 xn-1 絮凝效果的影响
Figure 4 Effect of different pH on flocculation activity of strain xn-1

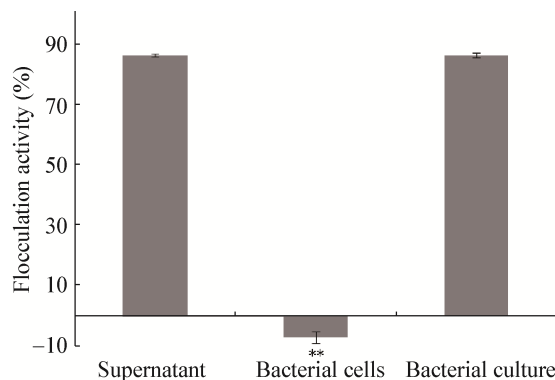


图5 菌株 xn-1 的絮凝效果来源
Figure 5 The flocculation source of strain xn-1

的处理组也表现出了明显的絮凝效果,虽然没有添加无菌上清处理组的絮凝率高,但与其差别不大,为 86.58%;而添加了细菌细胞的处理组,不但没有表现出明显的絮凝效果,且絮凝率显著低于($P<0.01$)添加了无菌上清和发酵产物的处理组。

2.5 菌株 xn-1 不同添加量的上清及处理时间对絮凝效果的影响

由图 6 结果可知,在整个处理过程中,添加量为 0.5%和 1.0%的处理组的絮凝效果与对照组相比,几乎无明显的区别,其絮凝率在各测定阶段均保持较低水平;2.0%处理组的絮凝率明显高于 0.5%和 1.0%处理组,其絮凝率逐渐升高后趋于稳定,整个处理过程中最高絮凝率为 59.96%,絮凝效果较明显;而 3.0%处理组的絮凝率明显高于 2.0%处理组,仅在 20 min 的处理时间内就可达到 75.98%,并且

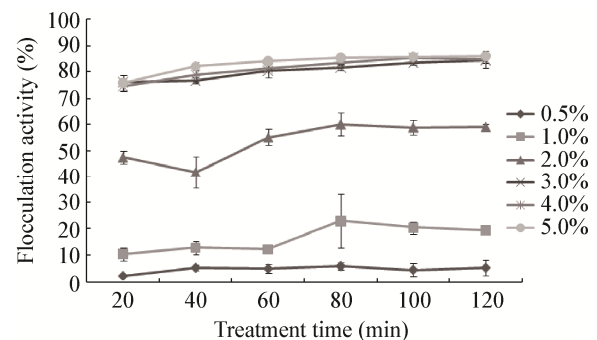


图6 菌株 xn-1 不同添加量的上清及处理时间的絮凝效果
Figure 6 Effects of different dosages of supernatant and treatment times on flocculation activity of strain xn-1

随着处理时间的延长,絮凝率逐渐增大为 84.29%,絮凝效果明显;4.0%和 5.0%处理组的絮凝率明显高于 0.5%、1.0%和 2.0%处理组,但与 3.0%处理组差别不大,絮凝率均能在 20 min 内达到较高水平,絮凝效果明显。该结果表明,菌株 xn-1 无菌上清添加量为 3.0%以上的处理组中絮凝效果明显。

2.6 不同金属离子对菌株 xn-1 絮凝效果的影响

由图 7 结果可知,添加 $MgCl_2$ 、 $NaCl$ 、 KCl 溶液的处理组中有絮凝效果,但效果不明显,絮凝率分别为 16.75%、31.97%、36.89%,均在较低水平;而添加 $FeCl_3$ 和 $CuCl_2$ 溶液的处理组中,絮凝率分别达到 80.79%和 83.22%,絮凝效果比较明显。该结果表明 Na^+ 、 K^+ 等一价金属离子虽然对微藻絮凝有促进效果,但没有 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 等二价或者三价金属离子对微藻絮凝的促进效果显著。

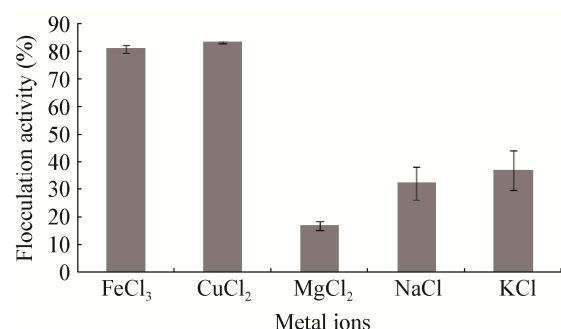


图7 不同金属离子对菌株 xn-1 絮凝效果的影响
Figure 7 Effects of different metal ions on the flocculation activity of strain xn-1

2.7 絮凝物质不同添加量对铜绿微囊藻 7820 絮凝效果的影响

絮凝物质不同添加量对铜绿微囊藻 7820 絮凝效果影响的结果如图 8 所示。絮凝物质添加量为 0.5 g/L 和 1.0 g/L 时,絮凝率均达到较高水平且相差不大,分别为 74.81%和 77.58%;而絮凝物质添加量为 0.05 g/L 和 0.15 g/L 时,絮凝率明显低于絮凝物质添加量为 0.5 g/L 和 1.0 g/L 时的絮凝率,分别为 11.05%和 36.36%。该结果表明,絮凝物质添加量为 0.5 g/L 时,絮凝效果明显。

2.8 光学显微镜下的絮凝过程

将絮凝物质添加量为 0.5 g/L 时的处理组在不同时间进行取样,在显微镜下更直观地观察菌株 xn-1 絮凝铜绿微囊藻 7820 的整个絮凝过程,结果如图 9 所示。图 9A 为没有加絮凝物质的对照组铜绿微囊藻 7820 的藻细胞;图 9B、C、D 分别为添加絮凝物质后在 5、10、20 min 观察到的藻细胞絮凝结果。在处理 5 min 时絮凝处理组与对照组相比有少量藻细胞聚集,形成较小絮凝团;而处理 10 min 时可以看到大量藻细胞聚集成团,处理 20 min 时看到更明显的大片絮凝团形成。该结果表明,随着絮凝时间的延长,絮凝团逐渐增大,进而絮凝沉降,絮凝物质可以被用来进行藻细胞的收集。

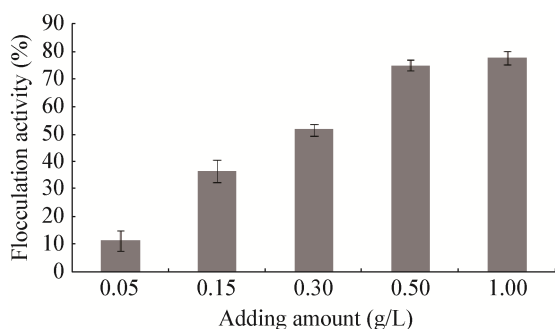


图 8 絮凝物质不同添加量对絮凝效果的影响

Figure 8 Effects of different dosages of bioflocculant on flocculation efficiency

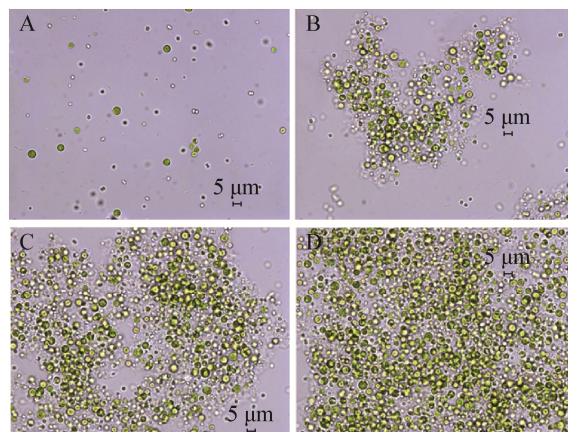


图 9 菌株 xn-1 所分泌胞外絮凝物质对铜绿微囊藻细胞的絮凝过程

Figure 9 High flocculation activity of *Shinnella* sp. xn-1 on *M. aeruginosa* through secreting extracellular bioflocculant

注: A: 对照组藻细胞; B: 处理时间 5 min 的絮凝团; C: 处理时间 10 min 形成的絮凝团; D: 处理时间 20 min 的絮凝团; 标尺=5 μm.

Note: A: Algal cells in control; B: The formed flocs after 5 min treatment time; C: The formed flocs after 10 min treatment time; D: The formed flocs after 20 min treatment time; Bar=5 μm.

3 讨论

铜绿微囊藻是一种蓝藻,常在淡水水体引发水华,由于该藻可以产生微囊藻毒素,对淡水水资源、水生生物生存及人类健康造成严重威胁^[12]。如何安全、高效地控制淡水水华是目前淡水资源研究的热点问题。环境中的微生物能够与藻细胞通过复杂的相互作用杀死、抑制或者絮凝藻细胞^[13]。因此,目前有报道已开展用微生物来治理有害藻华,但是相关研究主要集中在利用微生物治理海洋藻类所引发的赤潮中,而细菌与淡水藻类之间相互作用的研究并不多,特别是利用絮凝细菌通过絮凝蓝藻细胞从而治理蓝藻水华的关注很少。

本研究从蓝藻藻际中筛选到一株有高效絮凝功能的菌株 xn-1,首先对该菌株进行了形态特征观察和分子鉴定,最终确定菌株 xn-1 为申氏杆菌(*Shinnella*)属,与菌株 *Shinnella yambaruensis* MS4^T 有最高相似性为 99.79%。菌株 xn-1 在进化树中与 *Shinnella yambaruensis* MS4^T 在同一分支。因此,确

定该菌株应该为申氏杆菌属的一株细菌, 命名为 *Shinella* sp. xn-1。申氏杆菌属最早是由 An 等提出^[14]。申氏杆菌属的细菌主要是从污泥、土壤、堆肥中分离得到, 广泛参与硝酸盐还原等^[15], 但是很少有关于 *Shinella* 属菌株和藻类相互关系的报道。我们前期研究发现 *Shinella* sp. xn-1 对能源微藻——小球藻的生物质有高效的絮凝作用, 可以用于能源微藻生物质的获取^[16], 但菌株 xn-1 对于水华藻——铜绿微囊藻的絮凝作用还不清楚。因此, 我们着重开展了该部分的研究。

将菌株 xn-1 的发酵液添加入铜绿微囊藻培养液中进行絮凝实验, 发现添加氯化钙处理组的絮凝效果比较明显, 且明显好于不添加氯化钙的处理组, 该结果表明絮凝过程需要 Ca^{2+} 协助^[17]。絮凝微生物对微藻的絮凝作用往往需要有金属离子参与, 金属离子可以作为促凝剂促进微生物对微藻的絮凝。有报道称, 微藻的絮凝机制一般包括电荷中和理论和离子桥联理论, 其中电荷中和理论认为藻细胞表面的负电荷被带正电荷的颗粒中和, 从而消除了电荷斥力而沉降下来; 而离子桥联理论则证实微藻絮凝过程需要有金属离子参与, 金属离子可以同时结合在藻细胞和微生物细胞表面, 并在不同颗粒间架桥, 从而将微藻细胞沉降^[18]。在本研究中, 菌株 xn-1 的絮凝作用需要钙离子参与, 没有添加钙离子的处理组其絮凝率显著低于钙离子添加组。因此, 钙离子桥联可能是菌株 xn-1 絮凝铜绿微囊藻的主要机理。

细菌与微藻之间的絮凝关系最早是由 Rodolfi 等在培养微拟球藻的时候发现的^[19-20]。细菌对藻细胞絮凝的作用方式主要有两种: 一种是带阳离子的絮凝菌与带阴离子的藻细胞接触通过电荷中和进行直接絮凝^[21]; 另一种是通过絮凝菌分泌一些絮凝物质, 通过絮凝物质与藻细胞进行间接絮凝^[7]。本实验中菌株 xn-1 的发酵产物和无菌上清均有较高的絮凝能力, 且无菌上清絮凝率最高为 86.66%; 而细菌菌体无絮凝效果。实验结果证明菌株 xn-1 通过分泌一些絮凝物质对铜绿微囊藻 7820 进行间接絮凝, 该

絮凝物质的活性成分为非蛋白和多糖及含三键和累积双键的小分子物质, 其作用机制为电荷中和^[16,22]。

从金属离子絮凝效果的实验结果可以看出, 添加 FeCl_3 和 CuCl_2 溶液的处理组较添加 MgCl_2 、 NaCl 、 KCl 溶液的处理组有明显的絮凝效果。有报道称, 二价或者三价金属离子对微藻絮凝的促进效果显著高于一价金属离子, 如 Lei 等研究 MBF-L03 絮凝小球藻时发现 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 和 Fe^{3+} 有明显的絮凝效果, 而 K^+ 、 Na^+ 无明显絮凝效果^[23]。但是也有研究发现有的微生物絮凝微藻的过程中并不需要添加金属离子作用促凝剂^[24]。在本研究中 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 与菌株 xn-1 一同加入藻液中都显著提高了菌株 xn-1 对藻细胞的絮凝能力, 因此菌株 xn-1 需要添加金属离子作用促凝剂。然而, 由于 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 对环境有一定的危害性, 所以一般通过添加 Ca^{2+} 作为促凝剂来进行絮凝实验^[25]。

菌株 xn-1 的絮凝物质产量明显高于之前报道过的絮凝物质的产量^[21,26]。当絮凝物质添加量为 0.05 和 0.15 g/L 时的处理组中絮凝效果不明显, 但当絮凝物质添加量为 0.5 g/L 时絮凝效果明显, 絮凝率为 74.81%。但是絮凝物质的絮凝效率没有 FLC-xn-1 絮凝小球藻的絮凝率高, 在 FLC-xn-1 添加量为 30 mg/L 时, 对小球藻的絮凝率可以达到 82.8%, 这可能跟藻的种类有关^[16]。为了直观地看到这一絮凝现象, 将絮凝物质添加量为 0.5 g/L 的处理组在不同时间进行显微镜观察, 可以看到藻细胞由少变多进行聚集进而絮凝的整个过程。藻细胞随着处理时间的增加, 逐渐聚集在一起, 形成较大体积的絮凝团, 而絮凝团使得藻细胞沉降下来, 从而达到絮凝藻细胞的目的。在菌株 xn-1 的絮凝作用下, 藻细胞被聚集在一起, 但不会破坏藻细胞而释放藻毒素, 有利于环境的保护, 从而达到安全、高效地治理水华。

4 结论

菌株 xn-1 对水华藻——铜绿微囊藻 7820 有高效的絮凝效果, 通过形态学观察和分子鉴定, 确定菌株 xn-1 属于申氏杆菌属(*Shinella*), 并命名为

Shinella sp. xn-1。菌株 xn-1 通过分泌胞外絮凝物质从而表现出絮凝能力,在添加终浓度为 5 mmol/L 氯化钙的条件下,添加为 3.0%以上的无菌上清对藻细胞有很高的絮凝率。菌株 xn-1 的絮凝物质产量较高,并在絮凝物质添加量为 0.5 g/L 时有较高的絮凝率,在显微镜下观察到在絮凝物质作用下铜绿微囊藻 7820 逐渐被絮凝在一起,随着处理时间增加形成越来越大的絮凝团。我们的研究对于有害水华藻的治理有一定的帮助,微生物絮凝水华藻是一种安全、高效的生物防治方法,为水华治理提供了新思路和新选择。

参 考 文 献

- [1] Schindler DW, Hecky RE, Findlay DL, et al. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(32): 11254-11258
- [2] Li Y, Liu L, Xu YT, et al. Stress of algicidal substances from a bacterium *Exiguobacterium* sp. h10 on *Microcystis aeruginosa*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2016, 64(1): 57-65
- [3] Reynolds CS. Cyanobacterial water-blooms[J]. Advances in Botanical Research, 1987, 13: 67-143
- [4] Li D, Li Y, Zheng TL. Advance in the research of marine algicidal functional bacteria and their algicidal mechanism[J]. Advances in Earth Science, 2013, 28(2): 243-252 (in Chinese)
李东, 李祎, 郑天凌. 海洋溶藻功能菌作用机理研究的若干进展[J]. 地球科学进展, 2013, 28(2): 243-252
- [5] Makower AK, Schuurmans JM, Groth DT, et al. Transcriptomics-aided dissection of the intracellular and extracellular roles of microcystin in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(2): 544-554
- [6] Wan C, Zhang XY, Zhao XQ, et al. Harvesting microalgae via flocculation: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(2): 161-171 (in Chinese)
万春, 张晓月, 赵心清, 等. 利用絮凝进行微藻采收的研究进展[J]. 生物工程学报, 2015, 31(2): 161-171
- [7] Sun PF, Cai H, Bai NL, et al. Revealing the characteristics of a novel bioflocculant and its flocculation performance in *Microcystis aeruginosa* removal[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 17465
- [8] Miao Z, Du ZJ, Li HR, et al. Analysis of bacterial diversity in the phycosphere of five Arctic microalgae[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(5): 1587-1600
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
- [9] Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(10): 2259-2261
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599
- [11] Wan C, Zhao XQ, Guo SL, et al. Bioflocculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanic* by flocculation[J]. Bioresource Technology, 2013, 135: 207-212
- [12] Yuan YT, Zhang HG, Pan G. Flocculation of cyanobacterial cells using coal fly ash modified chitosan[J]. Water Research, 2015, 97: 11-18
- [13] Wang XX, Jiang CC, Zhu J, et al. Research on the application of microbial techniques to algae removal[J]. Industrial Water Treatment, 2011, 31(2): 1-4 (in Chinese)
汪小雄, 姜成春, 朱佳, 等. 微生物在除藻方面的应用研究[J]. 工业水处理, 2011, 31(2): 1-4
- [14] An DS, Im WT, Yang HC, et al. *Shinella granuli* gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(2): 443-448
- [15] Lee M, Woo SG, Ten LN. *Shinella daejeonensis* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from sludge of a leachate treatment plant[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(9): 2123-2128
- [16] Li Y, Xu YT, Liu L, et al. First evidence of bioflocculant from *Shinella albus* with flocculation activity on harvesting of *Chlorella vulgaris* biomass[J]. Bioresource Technology, 2016, 218: 807-815
- [17] Powell RJ, Hill RT. Rapid aggregation of biofuel-producing algae by the bacterium *Bacillus* sp. strain RP1137[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 6093-6101
- [18] Qin PY, Zhang T, Chen CX. Flocculating mechanism of microbial flocculant MBFTRJ21[J]. Environmental Science, 2004, 25(3): 69-72 (in Chinese)
秦培勇, 张通, 陈翠仙. 微生物絮凝剂 MBFTRJ21 的絮凝机理[J]. 环境科学, 2004, 25(3): 69-72
- [19] Amin SA, Parker MS, Armbrust EV. Interactions between diatoms and bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2012, 76(3): 667-684
- [20] Rodolfi L, Zittelli GC, Barsanti L, et al. Growth medium recycling in *Nannochloropsis*, sp. mass cultivation[J]. Biomolecular Engineering, 2003, 20(4/6): 243-248
- [21] Vandamme D, Foubert I, Muylaert K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production[J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(4): 233-239
- [22] Li Y, Zhu H, Lei XQ, et al. The first evidence of deinoxanthin from *Deinococcus* sp. Y35 with strong algicidal effect on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 290: 87-95
- [23] Lei XQ, Chen Y, Shao ZZ, et al. Effective harvesting of the microalgae *Chlorella vulgaris* via flocculation-flotation with bioflocculant[J]. Bioresource Technology, 2015, 198: 922-925
- [24] Kim DG, La HJ, Ahn CY, et al. Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3163-3168
- [25] Pu SY, Qin LL, Che JP, et al. Preparation and application of a novel bioflocculant by two strains of *Rhizopus* sp. using potato starch wastewater as nutrilitate[J]. Bioresource Technology, 2014, 162: 184-191
- [26] Deng SB, Gang Y, Ting YP. Production of a bioflocculant by *Aspergillus parasiticus* and its application in dye removal[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 44(4): 179-186