

有效微生物群(EM)中抑藻酵母及其活性物质特性

叶秋雯, 王志平, 于晓娟, 丁丛, 蔡伟民*

上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240

摘要: 采用选择性培养基从有效微生物群(EM)中富集出酵母菌, 通过向对数增长期的混合藻液中加入酵母菌、葡萄糖、酵母菌+葡萄糖、经酵母菌发酵除菌后的葡萄糖溶液分别考察了其对水华藻的抑制效应。结果表明, 混合酵母菌自身对于水华藻没有抑制作用, 单独添加葡萄糖的水华藻甚至出现快速增殖; 而在添加葡萄糖+酵母菌或酵母菌发酵液的实验中水华藻近似被完全抑制, 最大抑制率达 97%。据此可知, 抑制水华藻增殖的并非酵母菌自身, 而是具有高热稳定性的胞外分泌物。HPLC-SEC 与三维荧光光谱分析表明, 酵母菌发酵液中含有明显的芳环类羧酸及蛋白质物质, 但由于其在高温灭菌后仍有良好的抑藻活性, 因而进一步确定其抑藻活性物质为含苯环的有机酸。此外, 依据对实验中水华藻细胞形态的显微镜观察, 该酸性胞外物可能是通过破坏藻细胞的叶绿体结构来达到抑藻效果的。

关键词: 有效微生物群(EM); 酵母菌; 胞外分泌物; 水华藻; 抑制

中图分类号: Q143

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2009) 06-2033-06

富营养化水体发生的水华污染直接导致水体的浊度上升、可见度下降而影响自然景观; 同时, 藻类自身代谢容易消耗大量的溶解氧而使水体缺氧、水生生物窒息死亡, 而死亡生物的厌氧分解又会产生恶臭污染; 且部分水华藻类产生的藻毒素会沿食物链传递而威胁人类的健康, 因此, 如何有效控制水华污染一直是人们关注的热点^[1-2]。

20 世纪 60 年代, 研究人员通过对水华消亡过程的观察, 发现在水华藻类上附生有多种微生物, 并能有效分解藻类, 据此推断这些微生物与水华消失有很大关系, 并展开了有关病毒、真菌以及细菌溶藻的研究^[3]。随着研究的深入, 研究人员逐渐认识到, 溶藻细菌主要是通过释放胞外活性物质来杀灭藻类, 具体包括蛋白质类^[4-5]、氨基类^[6]及抗生素类^[7]有机化合物。国内外已报道有数十种溶藻细菌, 有些甚至已申报了相关专利^[8]。然而, 由于这些微生物胞外物质存在提取分离困难及生物安全性等问题, 迄今尚未在实际工程中得以大规模应用^[9]。

目前应用于富营养化水体水华污染控制比较典型的微生物区系是日本琉球大学比嘉照夫开发的有效微生物群(Effective Micro-Organisms, 简称 EM 菌)^[10-12], 其对水体透明度、叶绿素 a 质量浓度的改善有明显的效果, 在一定程度上可有效抑制藻类的生长, 防止水华的发生。该混合微生物菌群是以光合细菌、放线菌、酵母菌和乳酸菌为主^[13], 用特定的方法混合培养所形成的微生物复合体系, 但仍存在土著微生物竞争的局限性。若能确定其中抑

制藻类增殖的主要微生物种类, 则可大大加速其扩培进程, 增强其对土著微生物的竞争优势, 从而更有针对性的抑制水华藻的过度增殖。为此, 本项研究拟采用选择性培养基富集出酵母菌, 探讨其对水华藻的抑制效率及其抑制活性表达, 以期探索新型生物抑藻技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

藻种及其培养: 取自上海交通大学闵行校区思源湖, 使用 BG-11 培养基置于智能人工气候箱 (RXZ2300B 型) 中培养。BG-11 培养液配制方法见文献^[14]。培养条件: 温度(26±1) °C, 光暗比 14 : 10, 光照 40 μmol·m⁻²·s⁻¹ (约为 3 000 lx), 采用 JD23 型数字式照度计测定。

EM 菌: 购自上海泓宝绿色水产科技发展有限公司。

培养基: 酵母菌富集分离培养采用 YPD 培养基^[15]: 20 g 葡萄糖, 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母浸膏, 1 000 mL 水。酵母菌扩培时采用 10 g·L⁻¹ 葡萄糖溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 酵母菌富集分离

取已灭菌的 YPD 液体培养基, 按 10% 的体积比例接入 EM 菌, 置于恒温振荡培养箱中, 在(30±1) °C、120 r·min⁻¹ 的条件下培养 48 h。再按 10% 的体积比例转接菌液至 YPD 培养基进行第二、三次富集, 每次培养 48 h, 得到混合酵母菌液。

1.2.2 酵母菌及其胞外物对水华藻的影响

基金项目: 上海市科委 (052312057)

作者简介: 叶秋雯(1984 年生), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为富营养化污染控制。E-mail: yeqiuwen@sjtu.edu.cn

*通讯作者, 蔡伟民, E-mail: wmcai@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-16

将受试水华藻培养至对数生长期,取 1.2.1 培养得到的混合酵母菌液离心(4000 r·min⁻¹, 20 min),取下层酵母菌悬浊液。用蒸馏水清洗(即进行混匀——离心操作)2次后接种到处于对数增长期的水华藻中,初始酵母菌细胞密度约为 5×10⁶·mL⁻¹。其中一组不添加任何基质,另一组加入葡萄糖至 4 g·L⁻¹以促进酵母菌增殖,分别编号为实验组 I、II。实验对照组为 BG-11 培养基,实验组及对照组初始水华藻细胞密度均约为 5×10⁶·mL⁻¹。

另取受试水华藻培养至对数增长期,一组加入葡萄糖至 4 g·L⁻¹,另一组按比例加入酵母菌培养液使其初始糖质量浓度为 4 g·L⁻¹。(酵母菌培养液为上述离心清洗的酵母菌于 10 g·L⁻¹的葡萄糖溶液内培养 72 h,而后经 12000 r·min⁻¹ 高速离心分离得上清液 121 °C 灭菌后制得,按酵母培养液/水华藻液=2/3 接入),分别编号为实验组 III、IV。实验对照组为 BG-11 培养基,实验组及对照组初始水华藻细胞密度均约为 5×10⁶·mL⁻¹。

1.2.3 叶绿素质量浓度的测定

采用乙醇提取-分光光度法测定叶绿素的质量浓度。取培养藻液 5 mL,离心(4000 r·min⁻¹, 20 min)后去上清液收集藻细胞于匀浆器中,加入少量(<10 mL) 95% (体积分数,下同)乙醇,匀浆至藻细胞破碎后转移至 10 mL 具塞离心管中,用 95%乙醇定容至 10 mL,于 4 °C 黑暗下提取 24 h,离心后取上层提取液,以 95%乙醇为空白,分别在 750、665、649、470 nm 波长下测定吸光度。按文献[16]计算各培养藻液的叶绿素质量浓度。

1.2.4 藻细胞形态观察

采用荧光相差显微镜(NikonE400, Japan)跟踪实验过程中藻细胞形态的变化情况。

1.2.5 酵母菌胞外活性物质分析

HPLC-SEC 分析: HPLC-SEC 分析时以装配

TSK-GEL G3000SW_{XL} 排阻色谱柱的岛津 Class 10AVP 液相色谱(Shimazu, Japan)进行胞外活性物质检测,流动相为 0.1 M 氯化钠+0.025 M 磷酸氢钠+0.025 M 磷酸氢二钠,设置检测波长 254 nm,柱温 30 °C,流量为 1.0 mL·min⁻¹。

荧光光谱分析:采用 Hitach F7000 荧光光谱仪进行,以 240 nm·min⁻¹的扫描速率按激发光与发射光步进 5 nm 的方式扫描,扫描范围设置为激发光 220~400 nm,发射光 300~550 nm。

1.3 数据处理方法

酵母菌及其胞外物对藻类的抑制率(Inhibition Ratio, IR)公式为^[17]:

$$IR(\%) = (1 - \rho/\rho_0) \times 100 \quad (1)$$

式中: IR——抑制率(%); ρ ——实验组叶绿素质量浓度(mg·L⁻¹); ρ_0 ——对照组叶绿素质量浓度(mg·L⁻¹)。

2 实验结果与讨论

2.1 叶绿素质量浓度的变化趋势

向处于对数增长期的水华藻液中分别接种酵母菌、酵母菌+葡萄糖、葡萄糖及酵母菌发酵液后,定期取混合液测定其所含叶绿素,以此评估各组分对藻类的抑制效果(图 1)。由对照组叶绿素质量浓度变化趋势曲线可见,藻类在无抑制条件下,其生长基本符合 Logistic 模型,曲线为 S 型,在培养 500 h 左右时溶液中叶绿素质量浓度达到最高。在单独添加酵母菌的实验组 I 中,由于所投加酵母菌缺少相应的生长基质,其对于水华藻的增殖近似没有影响,甚至于在接种后的前两天促进了藻类的增殖。在经历 500 h 的培养后,水华藻数量仅略低于对照组。而在接种酵母菌并添加葡萄糖液的实验组 II 中,获得生长基质的酵母菌表现出了良好的抑藻活性,其叶绿素质量浓度在为期 500 h 的实验中仅在接种初期有所增加,后期甚至低于接种时的质量浓度,表明酵母菌生长对于水华藻有良好的抑制作用。

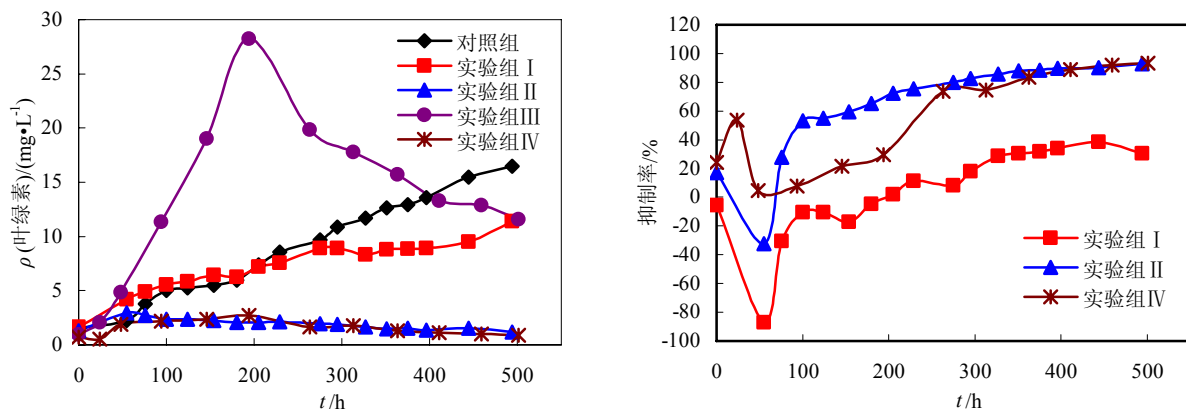


图1 水华藻增长曲线及抑制率

Fig.1 Curves of algae incubated with different inhibitors

相比较而言,在单独接种葡萄糖的实验组III中,藻液所含的叶绿素浓度在接种后急剧上升,在第9天时达到最大值(约 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),此后逐步降低,表明葡萄糖能大幅促进水华藻的增殖,并随着培养液中葡萄糖的消耗而逐步恢复到与实验组I相近的浓度。在实验组II中,叶绿素浓度在起始阶段同样出现了小幅的增加,而在接种经灭菌处理酵母菌发酵液的实验组IV中,叶绿素浓度始终低于对照组,在初始阶段小幅增殖后溶液中叶绿素质量浓度随时间逐步减少,最终抑制率达到93%以上,藻类几乎无法生长。这表明经灭菌处理的酵母菌发酵液同样具有良好的抑制作用,实验组II中酵母菌对水华藻的抑制作用很可能是由酵母菌代谢葡萄糖所产生的胞外物质所触发的。

2.2 藻细胞形态变化

针对各实验组中叶绿素浓度的变化,实验中采用相差显微镜观察了不同阶段水华藻的细胞形态(图2)。相比于对照实验组,添加酵母菌及葡萄糖的实验组II中藻细胞出现了明显的质壁分离情况,叶绿素消减严重,导致水华藻的颜色趋淡乃至近似

透明,而部分藻细胞体积有所增大但细胞外部轮廓清晰,结构完整,未观察到有藻体破损的细胞。表明在酵母菌生长代谢抑制水华藻增殖的过程中,其对于水华藻的抑制并不是通过溶解藻细胞而达成的,更可能是通过破坏藻细胞的叶绿素进行的。在单独接种葡萄糖的实验组III中,藻细胞颜色基本不变,藻体饱满且体积有所增大,这与叶绿素测定的结果相一致,表明单纯的投加葡萄糖反而会促进水华藻的过度增殖。在接种经灭菌处理的酵母菌发酵液实验组IV中,同样观察到了一定的质壁分离现象,叶绿素消减严重导致水华藻的颜色趋淡,但与实验组II中受抑制藻细胞略有不同的是,本组中受抑制藻细胞的细胞器明显较多,细胞结构充实,表明其抑制作用与实验组II中的基本一致。

2.3 抑藻活性物质的 HPLC 分析

通过对比分析上述不同实验组的实验结果,初步断定酵母菌对水华藻的抑制作用是通过其代谢过程产生的胞外活性物质起作用的。为此,研究中采用 HPLC-SEC 对比分析了各实验组水华藻液中溶解性有机物分子量的分布特性(图3)。如图3所

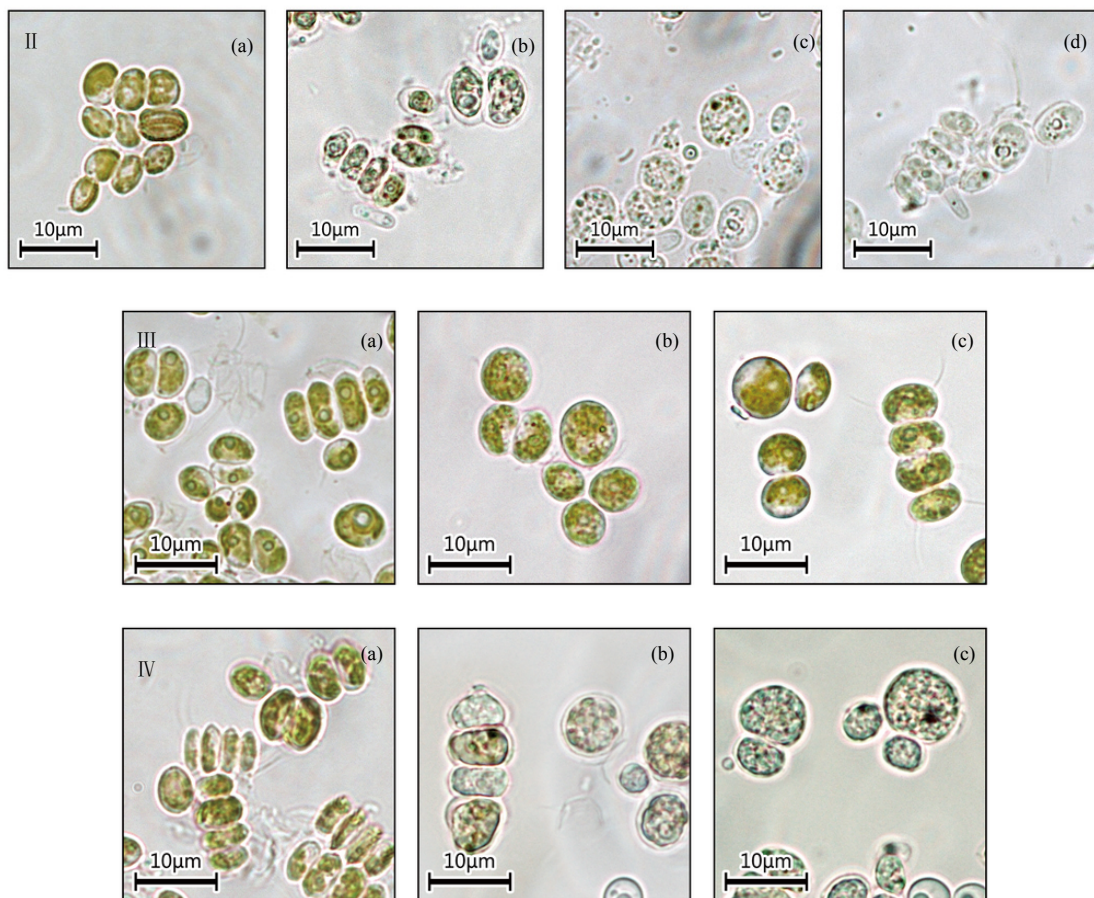


图2 藻细胞形态的变化情况

Fig.2 Changes of algal cells

II: (a)对照组; (b)120 h; (c)240 h; (d)360 h. III: (a)对照组; (b)200 h; (c)400 h. IV: (a)对照组; (b)200 h; (c)400 h

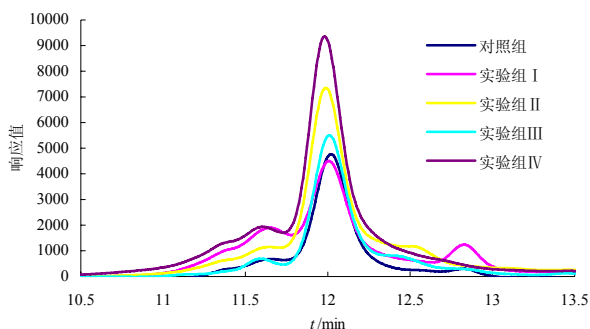


图3 抑藻液中溶解性胞外物质的HPLC-SEC图谱

Fig.3 HPLC-SEC Atlas of soluble extracellular material in algae solution

示,各实验组藻液中的主要溶解性有机物分子量基本一致,约为200 Da,表明具有抑藻活性的有机物

并不是蛋白质类的(这一点与经灭菌的实验组IV仍有良好的抑藻活性相一致)。同时,在抑制作用较强的实验组II和IV中,其紫外吸收强度明显大于抑制作用较弱的实验组I与III,表明起抑藻作用的胞外物质可能是有较强紫外吸收作用的具有芳环或共轭结构的有机物。

2.4 抑藻活性物质的荧光光谱特性

荧光激发-发射光谱被广泛应用于水体中溶解性有机污染物的检测与表征,通过三维荧光光谱图中荧光峰位置的识别,可近似确定相应的有机物种类^[18]。本项实验中,通过对比各实验组水样的三维荧光光谱可以看出(图4),所有实验水样均含有蛋白质荧光峰(Ex/Em=260~280 nm/310~350 nm),这

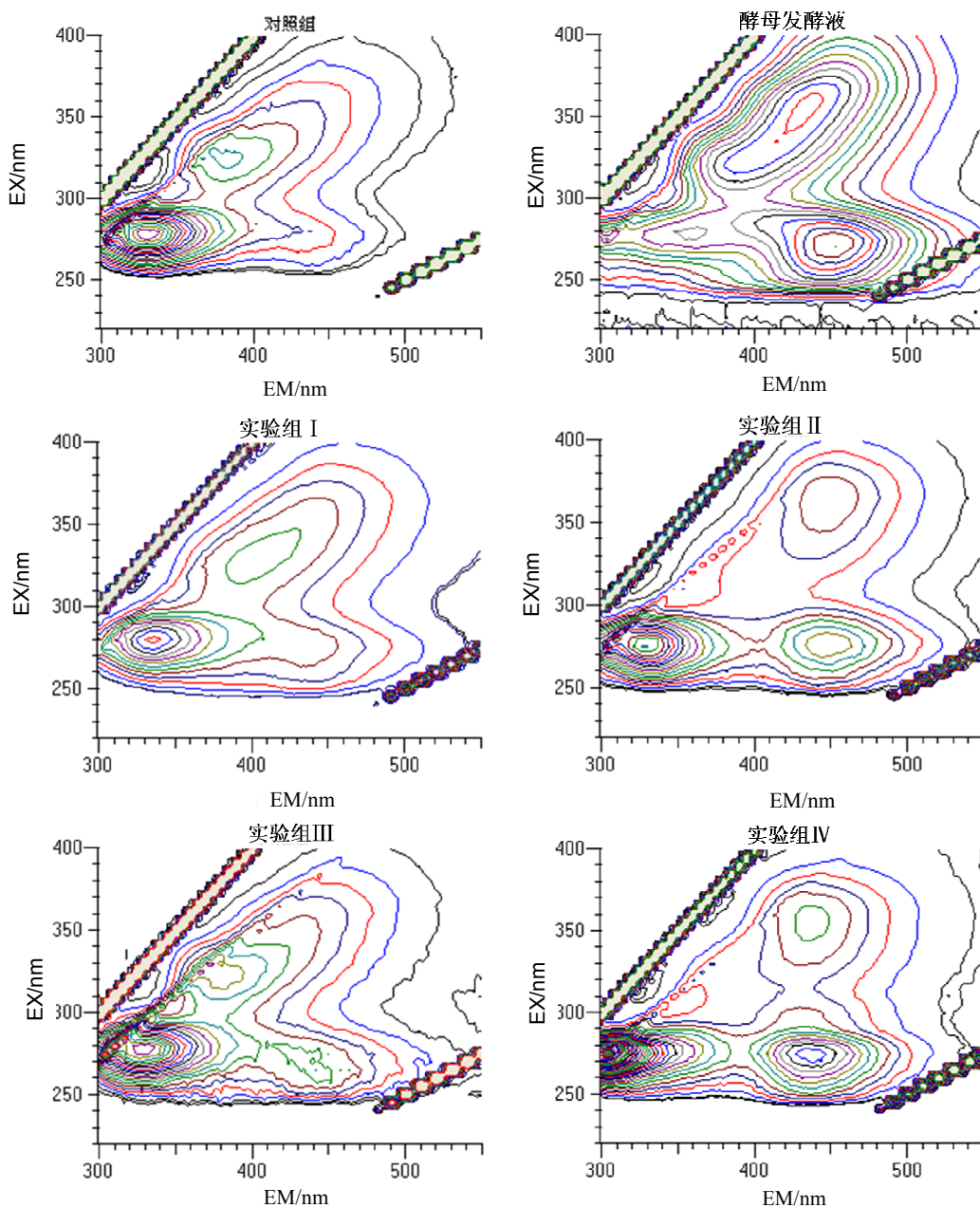


图4 实验水样中胞外物的三维荧光等高线

Fig.4 Three-dimensional fluorescence contour map of soluble extracellular material in water samples

主要是实验中藻细胞代谢所产生的蛋白质类物质形成的;在表现出抑藻活性的实验组 II 和 IV 中,有明显的腐殖酸荧光峰($E_x/E_m=260\sim 280\text{ nm}/420\sim 450\text{ nm}$, $340\sim 360\text{ nm}/420\sim 450\text{ nm}$),而在未表现出抑藻活性的实验组 I 与 III 中,荧光峰主要出现在多糖峰位置($E_x/E_m=310\sim 340\text{ nm}/380\sim 410\text{ nm}$)。由此可以看出,酵母菌发酵液中具有抑藻活性的胞外物质应该是含有芳香环的酸性物质,其具体组成及分子结构尚有待于进一步的研究。

3 结论

(1) 经过 YPD 培养基富集分离的 EM 菌在营养物存在条件下表现出了良好的抑藻活性,在接种混合酵母菌并添加葡萄糖的混合藻液中,水华藻的叶绿素质量浓度显著降低并持续维持在较低水平,按叶绿素浓度计在 20 天的实验期内抑制率达 90% 以上。

(2) 在没有碳源存在的条件下,混合酵母菌液并未对水华藻产生抑制作用;而在水华藻中投加经过高温灭菌的酵母菌胞外物时却表现出了良好的抑藻活性,表明混合酵母菌的抑藻活性是由具有高热稳定性的胞外分泌物产生的。

(3) 通过对受抑制营养藻细胞的显微镜观察发现,受抑制藻细胞的外部轮廓清晰,结构完整,而颜色减淡,叶绿素质量浓度显著降低,推测该混合酵母的抑藻活性物主要是通过破坏叶绿素而达到抑藻作用的。

(4) 通过对受试水样的 HPLC-SEC 与三维荧光光谱分析,初步确定该抑藻活性物质是含有芳香环的酸性物质。

参考文献:

- [1] 李锋民, 胡洪营. 生物化感作用在水处理中的应用[J]. 中国给水排水, 2003, 19(7): 38-40.
LI Minfeng, HU Hongying. Applications of bio-allelopathy in water treatment[J]. China Water & Wastewater, 2003, 19(7): 38-40.
- [2] 宋关玲. 生物修复技术在水体富营养化治理中的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 27(35): 8597 - 8598.
SONG Guanling. Applications of bio-remediation technology in eutrophic waterbody treatment[J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2007, 27(35): 8597-8598.
- [3] 李小彩, 裴海燕, 胡文容. 溶藻细菌及溶藻物质研究进展[J]. 工业水处理, 2007, 27(6): 10-13.
LI Xiaocai, PEI Haiyan, HU Wenrong. Development of the research on algicidal bacteria and its algicidal substances[J]. Industrial Water Treatment, 2007, 27(6): 10-13.
- [4] LEE S O, KATO J, TAKIGUCHI N, et al. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp strain A28[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4334-4339.
- [5] TAKENAKA S, WATANABE M F. Microcystin L R degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease[J]. Chemosphere, 1997, 34(4): 749-757.
- [6] KODANI S, IMOTO A, MITSUTANI A, et al. Isolation and identification of the anti-algal compound, harmaline (1-methyl-beta-carboline), produced by the algicidal bacterium, *Pseudomonas* sp K44-1[J]. Journal of Applied Phycology, 2002, 14(2): 109-114.
- [7] KAWANO Y, NAGAWA Y, NAKANISHI H, et al. Production of thiotropocin by a marine bacterium, *Caulobacter* sp. and its antimicrobial activities[J]. Journal of Marine Biotechnology, 1997, 5(4): 225-229.
- [8] KATO J. Novel peptide having algicidal activity with respect to red tide algae, derived from *Pseudoalteromonas* species, useful for inhibiting algicidal activity. Japan, P2006296318-A[P]. 2006.
- [9] 王飞, 李燕. 溶藻细菌胞外溶藻活性物质分离的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17): 7071-7073.
WANG Fei, LI Yan. Development progress of the separation of extracellular algae-lysing components from algae-lysing bacteria[J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2008, 36(17): 7071-7073.
- [10] 李雪梅, 杨中艺, 简曙光, 等. 有效微生物群控制富营养化湖泊蓝藻的效应[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2000, 39(1): 81-85.
LI Xuemei, YANG Zhongyi, JIAN Shuguang, et al. Control of algae bloom in eutrophic water by Effective Micro-organisms[J]. Acta Scientiarum: Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2000, 39(1): 81-85.
- [11] 王平, 吴晓芙, 李科林, 等. 有效微生物群(EM)抑藻效应研究[J]. 环境科学研究, 2004, 17(3): 34-38, 59.
WANG Ping, WU Xiaofu, LI Kelin, et al. Study of algae inhibiting effect of Effective Micro-organisms (EM)[J]. Research of Environmental Sciences, 2004, 17(3): 34-38, 59.
- [12] 王平, 吴晓芙, 李科林, 等. 应用有效微生物群(EM)处理富营养化源水试验研究[J]. 环境科学研究, 2004, 17(3): 39-43.
WANG Ping, WU Xiaofu, LI Kelin, et al. Study of preliminary test with utilization of Effective Micro-organisms (EM) in Algae-Type Eutrophical Water Treatment[J]. Research of Environmental Sciences, 2004, 17(3): 39-43.
- [13] 比嘉照夫. 人·くらし·生命が変わる, EM 环境革命[M]. 东京: 综合ユニコム株式会社, 1994: 299-348.
- [14] 金相灿, 屠清英. 湖泊富营养化调查规范[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 345-349.
JIN Xiangcan, TU Qingying. Lake Eutrophication Survey Specifications[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1990: 345-349.
- [15] 郑少奎, 杨敏, 杨清香. 自然选育酵母菌对不同废水处理及资源化研究[J]. 上海环境科学, 2001, 20(11): 525-530.
ZHENG Shaokui, YANG Min, YANG Qingxiang. Study on treatment of different wastewater by natural screen yeasts and resources reuse[J]. Shanghai Environmental Sciences, 2001, 20(11): 525-530.
- [16] 章宗涉, 黄祥飞. 淡水浮游生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 345-348.
ZHANG Zongshe, HUANG Xiangfei. Freshwater Plankton Research Methods[M]. Beijing: Science Press, 1991: 345-348.
- [17] 李锋民, 胡洪营. 大型水生植物浸出液对藻类的化感抑制作用[J]. 中国给水排水, 2004, 20(11): 18-21.
LI Minfeng, HU Hongying. Allelopathy and inhibitory effect of extracts from macrophytes on algae growth[J]. China Water & Wastewater, 2004, 20(11): 18-21.
- [18] CHEN W, WESTERHOFF P, LEENHEER J A, et al. Fluorescence excitation-Emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(24): 5701-5710.

Inhibition of algae with yeast in effective micro-organisms (EM) and their active extracellular matters

YE Qiuwen, WANG Zhiping, YU Xiaojuan, DING Cong, CAI Weimin

School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: In this study, yeasts in Effective Micro-organisms (EM) as well as their extracellular matters were used to inhibit the growth of algae. According to the results of inhibition experiment with yeasts, glucose, yeast + glucose, as well as the zymolytic glucose solution, extracellular organic matters were determined as the active fractions in the inhibition of bloom-algae, which maintained the chlorophyll concentration below the initial concentration during the 20 days experiment. With the help of high press liquid chromatography-size exclusion chromatography (HPLC-SEC) and Excitation-Emission Fluorescence (EEM), the active fractions were further determined as carboxylic acid containing with aromatic unit. Moreover, observation of algal cell with microscope revealed that structures of inhibited algal cells were still intact, but the chlorophylls in cells were decreased greatly. Therefore, algae might be inhibited by the damage of chlorophyll with the aromatic carboxylic acid.

Key words: EM; yeast; extracellular organic matters; algae; inhibition