

产吡啉杆菌对棕鞭藻絮凝收获的影响机制

张波^{1,2}, 文然², 孙文昕², 苏琰儒¹, 任琴¹

(1. 集宁师范学院 生命科学与技术学院, 内蒙古 乌兰察布 012000; 2. 陕西科技大学 环境科学与工程学院, 西安 710021)

摘要:生物絮凝法收获微藻细胞具有毒性小、成本低、效率高等优点。为揭示产吡啉杆菌(*Porphyrobacter*)对棕鞭藻絮凝收获的影响机制,比较在BG11培养基、含5 g/L葡萄糖的BG11(glu + BG11)培养基中纯藻体系以及其与*Porphyrobacter*共培养体系中的棕鞭藻絮凝效率,并对不同体系中的胞外有机物(AOM)产量与组成及藻际细菌群落结构进行分析。结果表明:在BG11、glu + BG11纯藻培养体系中微藻絮凝效率分别为62.40%和19.02%,而当棕鞭藻与*Porphyrobacter*在glu + BG11体系中共培养时絮凝效率则高达93.42%,且此时AOM产量及AOM中多糖产量显著降低;对于glu + BG11体系,AOM中的阿拉伯糖、鼠李糖产量均在藻菌共培养时较高,且AOM所含的单糖种类与BG11体系相同;*Porphyrobacter*可使AOM中的蛋白质酰胺基团发生峰偏移,引起色氨酸、酪氨酸等蛋白质类物质的改变;相比纯藻培养体系,*Porphyrobacter*能适应棕鞭藻glu + BG11培养体系并成为优势菌属,同时存在芽孢杆菌属(*Bacillus*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)等细菌。产吡啉杆菌可显著降低棕鞭藻AOM产量并影响其组成,促进棕鞭藻絮凝。

关键词:产吡啉杆菌;棕鞭藻;AOM;絮凝

中图分类号:Q939.97;X172 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)01-0146-07

Influence mechanism of *Porphyrobacter* on flocculation harvest of *Ochromonas* sp.

ZHANG Bo^{1,2}, WEN Ran², SUN Wenxin², SU Yanru¹, REN Qin¹

(1. School of Life Science and Technology, Jining Normal University, Ulanqab 012000, Inner Mongolia, China;

2. School of Environmental Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract: Harvesting microalgae cells by bioflocculation has the advantages of low toxicity, low cost and high efficiency. In order to reveal the influence mechanism of *Porphyrobacter* on the flocculation harvest of *Ochromonas* sp., the flocculation efficiency of *Ochromonas* sp. in BG11 medium, BG11 medium containing 5 g/L glucose (glu + BG11) pure algal system and coculture system with *Porphyrobacter* were compared, and the algal organic matter (AOM) yield and composition and the community structure of bacteria in the phycosphere in different systems were analyzed. The results showed that the flocculation efficiency of microalgae in BG11 and glu + BG11 pure algal culture systems were 62.40% and 19.02% respectively. The flocculation efficiency in the coculture system of *Ochromonas* sp. and *Porphyrobacter* in glu + BG11 reached 93.42%, and the AOM yield and polysaccharide yield in AOM decreased significantly. For coculture system in glu + BG11, the yield of arabinose and rhamnose in AOM increased significantly, and the type of monosaccharide in AOM was the same as BG11 system. *Porphyrobacter* shifted the peak of protein amide group in AOM and caused the changes of protein substances such as tryptophan and tyrosine. Compared with the pure algal culture system, *Porphyrobacter* could adapt to the culture system of *Ochromonas* sp. as the dominant bacteria, while species of

Bacillus, *Flavobacterium* and *Brevundimonas* appeared. *Porphyrobacter* can promote the flocculation of *Ochromonas* sp. through reducing the AOM yield of *Ochromonas* sp. and affecting its composition.

Key words: *Porphyrobacter*; *Ochromonas* sp.; AOM; flocculation

收稿日期:2021-12-16;修回日期:2022-09-24

基金项目:陕西省科技厅自然科学基金基础研究计划项目(2020JQ-714)

作者简介:张波(1986),男,副教授,博士,研究方向为微藻生物技术(E-mail)zb546170683@163.com。

微藻因富含油脂、光合效率高、生长速度快、不占用耕地等优点,具有很高的利用价值,作为一种可再生、环境友好的新型能源来源越来越受到人们的关注。目前,利用微藻细胞制备生物柴油的技术已较为成熟,但细胞收获成本过高(占总成本的20%~30%),这是制约微藻产业化生产的瓶颈问题。因此,有必要寻找一种低成本、高效的微藻细胞收获方法。现阶段应用于微藻收获的方法主要有离心、过滤法、气浮法、沉降法和絮凝法^[1]。离心法采收效率高、易于操作,但是能耗大、运行成本高。过滤法是常用的固液分离法,可用于采收个体较大的微藻(如空星藻、螺旋藻),但对于个体较小的微藻(如小球藻、微拟球藻)采收效果并不理想,另外定期更换滤膜也会增加采收成本。气浮法仅适用于采收部分单细胞藻类,不能普遍用于各类微藻培养体系。沉降法则存在效率低、耗时长等问题。絮凝法具有较高的经济性和采收效率,并能显著降低能耗,被认为是实现大规模微藻收获的最佳方法。

絮凝法是通过电中和、架桥或网捕作用实现水中粗分散胶体物质的分离。影响微藻絮凝的因素主要包括微藻细胞属性、pH、营养环境等^[2]。微藻在生长代谢过程中会分泌胞外有机物(Algal Organic Matter, AOM), AOM的成分主要为多糖和蛋白质,它们会与微藻细胞竞争有限的絮凝剂,从而对絮凝效果产生影响。AOM的产量与组分因藻种而异,并受培养条件的影响。例如,与真核微藻相比,蓝藻倾向于产生蛋白质相对含量较高的AOM,并且多糖的羧基数目与位置也不同。常见的絮凝法包括物理絮凝、化学絮凝、生物絮凝^[3]。生物絮凝因具有毒性小、成本低、效率高等优点,近年来在生物燃料研究领域得到了广泛关注。

生物絮凝包括微藻细胞自絮凝和微生物絮凝两种方式^[4]。微藻细胞自絮凝是指在培养过程中由于微藻自身合成的糖苷或多糖等絮凝活性物质分泌到细胞表面,与周围藻细胞相互作用,进而引发细胞自絮凝现象。微生物絮凝是利用细菌、真菌及放线菌本身或其代谢产生的黏性物质,通过网捕或架桥作用使藻细胞相互聚集的过程^[5]。其中,利用细菌絮凝微藻具有可降解、成本低、效率高等优点,近年来成为研究热点。有研究指出:柠檬酸杆菌代谢产物中存在的氨基、羧基等活性基团,在小球藻絮凝过程中发挥重要作用;放射性根瘤菌的胞外聚合物能够形成网状纤维结构将藻细胞连接;短波单胞菌属、芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属能够分泌色氨酸、鼠李

糖等絮凝性物质,对微藻絮凝起着积极作用^[6];黄杆菌可以将AOM中的大分子物质降解为较小的聚合物从而诱导絮凝。微藻培养体系中的内源性细菌种类繁多、功能丰富,且与微藻容易形成良好的共生关系,因此利用细菌等微生物进行微藻的絮凝收获,尤其是开发利用微藻培养体系中的大量内源性细菌资源具有良好的应用前景。

目前,对于藻际环境中微藻共栖细菌对藻细胞絮凝效率影响的研究较为缺乏。因此,本文以前期研究中筛选的一株棕鞭藻共栖细菌——产吡啉杆菌(*Porphyrobacter*)为研究对象,通过对棕鞭藻的絮凝效果、AOM产量与组分、藻际细菌群落结构的分析,对两种典型生长模式(自养、混养)下的微藻絮凝差异进行比较,从而阐明微藻共栖细菌*Porphyrobacter*对微藻细胞聚集的影响机制,以期为在不同营养环境下建立高效微藻采收体系提供重要指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

所用藻株分离自陕西科技大学人工湖,经16S rDNA序列分析比对,鉴定其为棕鞭藻属*Ochromonas* sp. (Genbank查找号MN028256)。所用菌株为前期研究中在棕鞭藻培养体系中筛选出的一株共栖细菌,经16S rDNA序列鉴定为产吡啉杆菌(*Porphyrobacter*)^[7]。

硝酸、氢氧化钠,分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;葡萄糖(glu)、氯化铝,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

QGZ-500A智能光照培养箱,杭州琦胜科技有限公司;OPTIMA XPN-10型低温超速离心机,美国贝克曼库尔特公司;Cary 5000型紫外可见分光光度计,美国安捷伦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌和微藻的培养

细菌培养:在固体LB培养基平板中挑取单菌落,接种到液体LB培养基中,在28℃下以150 r/min振荡培养24 h(OD₆₀₀约为1.0)。

微藻培养:利用BG11培养基^[8]和glu+BG11培养基(BG11培养基中添加5 g/L葡萄糖)培养棕鞭藻。取10 mL培养至对数生长期的棕鞭藻培养液于灭菌的离心管中,以5 000 r/min离心10 min后弃上清,加入少量无菌水于离心管中即得到微藻悬液。取培养基150 mL置于250 mL三角瓶中,接种微藻

悬液即纯藻培养体系,接种后的微藻培养液 OD_{540} 为 0.2;向纯藻培养体系中接种 1 mL 的细菌培养液 (OD_{600} 约为 1.0) 则为藻菌共培养体系。光照培养箱内振荡培养 7 d,光照强度 3 000 lx,温度 28 °C,光周期(L:D)为 14 h:10 h,摇床转速 150 r/min。

1.2.2 微藻絮凝效率测定

吸取 10 mL 培养至稳定期的藻液置于 20 mL 试管中,并测定其在 540 nm 处的吸光度(D_0),加入 300 μ L 的 $AlCl_3$ 溶液(1 g/L)使得 Al^{3+} 终质量浓度为 30 mg/L,并充分振荡试管。微藻样品沉降 10 min 后,于液面以下 2 cm 处取样,使用分光光度计测定 540 nm 处的吸光度(D),并按照公式(1)计算絮凝效率(Y)^[9]。

$$Y = (1 - D/D_0) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 微藻 AOM 产量与组分分析

取 40 mL 藻液置于 50 mL 离心管中,以 5 000 g 离心 5 min 后弃上清,使用 25 mL 质量浓度 0.85 g/100 mL 的生理盐水冲洗,再以 5 000 g 离心 5 min,重复 3 次。再加入 25 mL 质量浓度 0.85 g/100 mL 的生理盐水溶液,于 50 °C 下加热 3 h 后以 11 000 g 离心 15 min,将上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤,即得到 AOM 溶液^[10]。

将 AOM 溶液置于 50 mL 离心管后用 Whatman No. 1 滤膜进行过滤,将滤液于 10 000 r/min 离心 10 min。取上清液,加入等体积的丙酮,在 4 °C 条件下保存 48 h 后于 10 000 r/min 离心 10 min,取沉淀冷冻 24 h,所得粉末即为 AOM^[11]。AOM 产量为每升藻液中 AOM 粉末质量。

AOM 中蛋白质产量测定采用考马斯亮蓝法^[12],多糖产量测定采用苯酚-硫酸法^[13],单糖测定采用离子色谱分析法^[14],荧光物质测定采用三维荧光光谱分析法^[15],官能团测定采用傅里叶红外光谱法^[16]。

1.2.4 群落结构分析

使用基因组 DNA 提取试剂盒(Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒)对样品 DNA 进行提取。以已提取的基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物 338 F(5' - ACTCTACGGGAG GCAGCAG - 3') 与 806 R(5' - GGACTACHVGGGTW TCT - AAT - 3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L)为 Taq PCR Master Mix 12.5 μ L,10 μ mol/L 的正反向引物各 1 μ L,DNA 模板 1 μ L,加纯水补充至 25 μ L。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 3 min,61 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,29 个循环;循环结束后 72 °C 延伸 5 min;12 °C 保存。PCR 扩增产物经 1.5 g/100 mL 琼脂糖凝胶电泳,经核酸染料染色后用凝胶成像系统进行验证,使用胶回收试剂盒对混合后

的 PCR 产物进行切胶纯化,将纯化产物进行细菌宏基因组 16S rDNA 测序,测序区间为 V3 ~ V4 可变区,测序平台为 Illumina MiseqTM。

使用 QIIME(Version 1.8.0) 软件中的 UCLUST 对 Tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类,获得分类操作单元(Operational Taxonomic Units, OTU)。细菌分别基于 Silva 和 UNITE 参考数据库进行比对,得到每个 OTU 对应的物种分类信息。使用 Mothur(Version 1.30) 软件对样品 Alpha 多样性指数进行评估。利用 QIIME 软件生成不同分类水平上的物种丰度表,再利用 R 语言工具绘制成样品各分类学水平下的群落结构图。

2 结果与讨论

2.1 *Porphyrobacter* 对棕鞭藻絮凝效率和 AOM 产量的影响(见图 1)

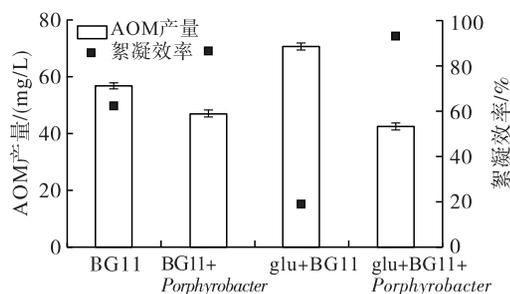


图 1 *Porphyrobacter* 对棕鞭藻絮凝效率和 AOM 产量的影响

由图 1 可知,棕鞭藻在 BG11、glu + BG11 培养基中纯藻培养时絮凝效率分别为 62.40%、19.02%,对应的 AOM 产量分别为 57.074、71.089 mg/L,葡萄糖的添加使得 AOM 产量增多、藻细胞絮凝受到强烈抑制。Zhang 等^[17] 研究表明,微藻在混养模式下生长时会分泌大量对絮凝有一定抑制作用的有机物,从而对微藻絮凝产生影响。相较于纯藻培养体系,不同环境下 *Porphyrobacter* 与棕鞭藻共培养体系中的藻细胞絮凝效率均显著提高,尤其是在 glu + BG11 培养基中,微藻絮凝效率高达 93.42%,约为纯藻培养的 5 倍,藻细胞絮凝受到葡萄糖抑制的现象被解除,并且此时 AOM 产量最低,为 42.506 mg/L。刘珂轶^[7] 指出,棕鞭藻和 *Porphyrobacter* 共培养时可以形成互利共生的种间关系,棕鞭藻培养液能够促进 *Porphyrobacter* 分泌更多的吲哚-3-乙酸(IAA)以促进棕鞭藻的生长。已有研究表明,细菌对微藻絮凝的影响机制各不相同,但主要是通过细菌自身分泌某些具有絮凝活性的物质或细菌表面的带电官能团通过电中和作用促使藻细胞聚集。例如:Oh 等^[18] 指出,类芽孢杆菌 AM49 在与小球藻共培养生长过程中会产生具有絮凝活性的高分子分泌物荚膜

或黏液层,其主要成分为多糖、蛋白质、脂类及其复合物,从而影响小球藻的絮凝效率;Wang等^[19]以30:1的菌藻比将假单胞菌投加到微拟球藻中,共培养3 d后藻细胞收获率达90%,细菌表面的带电官能团通过电中和作用促进微藻絮凝。本研究发现,*Porphyrobacter*与棕鞭藻共培养过程使得AOM产量发生改变,从而影响藻细胞絮凝。

AOM的成分包括蛋白质、多糖、氨基酸、酵素、脂肪等物质,其中多糖与蛋白质为主要成分。*Porphyrobacter*对AOM中多糖与蛋白质产量的影响如图2所示。

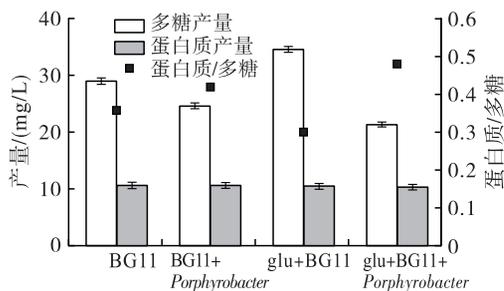


图2 *Porphyrobacter*对AOM中多糖与蛋白质产量的影响

表1 不同培养体系中棕鞭藻所产AOM的各类单糖产量与占比

单糖	BG11		BG11 + <i>Porphyrobacter</i>		glu + BG11		glu + BG11 + <i>Porphyrobacter</i>	
	产量/(mg/L)	占比/%	产量/(mg/L)	占比/%	产量/(mg/L)	占比/%	产量/(mg/L)	占比/%
甘露糖	1.949	11.29	2.852	17.05	2.765	11.89	1.012	6.42
核糖	1.852	10.73	1.774	10.61	2.987	12.84	1.843	11.70
鼠李糖	1.470	8.52	1.380	8.25	1.322	5.68	2.306	14.64
葡萄糖醛酸	2.707	15.68	1.608	9.61	5.146	22.12	1.055	6.70
葡萄糖	4.282	24.81	4.775	28.55	6.159	26.48	4.977	31.60
半乳糖	1.782	10.32	1.935	11.57	1.413	6.07	1.136	7.21
阿拉伯糖	1.170	6.78	1.223	7.31	1.264	5.43	2.775	17.62
岩藻糖	2.050	11.88	1.180	7.05	2.205	9.48	0.647	4.11

由表1可知,BG11培养基中进行纯藻培养与藻菌共培养时单糖产量分别为17.262、16.727 mg/L,glu + BG11培养基中进行纯藻培养与藻菌共培养时单糖产量分别为23.261、15.751 mg/L。不同体系中棕鞭藻所产AOM均含有甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、岩藻糖。藻菌共培养时,BG11培养基中AOM的单糖以葡萄糖、甘露糖、半乳糖为主,占单糖总量的比例分别为28.55%、17.05%、11.57%;glu + BG11培养基中AOM的单糖以葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖为主,占单糖总量的比例分别为31.60%、17.62%、14.64%。葡萄糖作为不同体系中最主要的单糖,是各类微藻AOM的重要组成部分,为藻细胞的生长代谢提供能量。Guo等^[22]研究指出,斜生栅藻所产AOM的单糖包括葡萄糖、甘露糖、半乳糖、鼠李糖和果糖,物质的量比为8:5:3:2:1。Mishra等^[23]指出,半乳糖、葡萄糖、木糖和果糖作为单糖组成存在于盐藻中。

由图2可知,不同体系下AOM中多糖产量差异明显,多糖产量的显著差异是AOM产量不同的主要原因。相较于藻菌共培养体系,不同环境下纯藻培养时多糖的产量更高,尤其是在glu + BG11体系的AOM中,多糖产量高达34.554 mg/L,为共培养时的1.64倍。Li等^[20]研究表明,微藻AOM产量与培养基成分、培养条件有关,AOM中的多糖包含带负电荷的基团,能够与溶液中带有正电荷的离子产生电中和作用,从而对微藻的絮凝产生抑制作用。AOM中的蛋白质产量在不同体系中较为接近,不同体系中蛋白质/多糖的比例依次为0.357、0.418、0.297、0.481(见图2)。AOM中蛋白质是疏水官能团的重要来源,对微藻细胞的桥接具有一定作用,蛋白质/多糖越高,微藻细胞之间连接就越紧密,从而促进了絮凝^[21]。

2.2 *Porphyrobacter*对棕鞭藻AOM组分的影响

2.2.1 不同培养体系中棕鞭藻AOM的单糖组成

表1为不同培养体系中棕鞭藻所产AOM的各类单糖产量与占比。

由此说明,微藻AOM中单糖组成及产量的差异与藻种、营养环境有关,多糖的功能活性与其单糖组成具有直接的联系。在glu + BG11培养基中,纯藻培养与藻菌共培养时葡萄糖醛酸产量占单糖总量的比例分别为22.12%和6.70%,与此同时,岩藻糖的占比在藻菌共培养体系中也显著下降。Vandamme等^[24]研究发现,斜生栅藻自絮凝过程受到抑制是因为溶液中的多糖与磷酸盐竞争从而干扰 $Ca_3(PO_4)_2$ 晶体的形成,且多糖成分中主要是葡萄糖醛酸发挥抑制絮凝作用。这与2.1中glu + BG11培养基中纯藻培养时絮凝效率最低,藻菌共培养时絮凝效率最高的结果相一致。在不同环境中,藻菌共培养时的阿拉伯糖产量均高于纯藻培养,并且阿拉伯糖在glu + BG11培养基中藻菌共培养时产量最高,而此时对应的藻细胞絮凝效率高达93.42%,因而推测阿拉伯糖产量的增高与藻细胞聚集性增强有着密切的联系。

2.2.2 不同培养体系中棕鞭藻 AOM 的红外和三维荧光光谱分析

在 glu + BG11 培养基中进行纯藻培养与藻菌共培养时棕鞭藻所产 AOM 的红外光谱如图 3 所示。

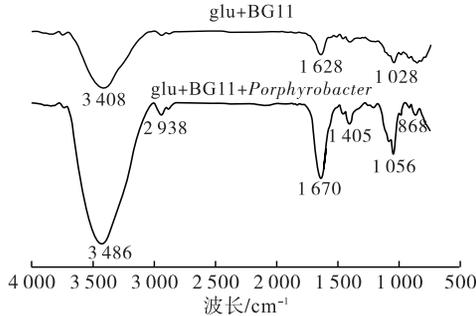


图 3 不同培养体系中棕鞭藻 AOM 的红外光谱

由图 3 可知,500 ~ 1 000 cm^{-1} 之间为脂肪胺的 $=\text{C}-\text{H}$ 、 $-\text{N}-\text{H}$ 吸收峰,该区域谱带多而弱。1 030 cm^{-1} 附近的吸收峰为多糖的 $\text{C}-\text{O}$ 、 $\text{C}-\text{C}$ 伸缩振动,1 400 cm^{-1} 附近的吸收峰为蛋白质的对称弯曲振动与 $-\text{CH}_3$ 的剪式振动,1 630 cm^{-1} 附近的吸收峰是蛋白质酰胺基团 ($-\text{NHC}=\text{O}-$) 中的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动,2 940 cm^{-1} 附近的吸收峰为 $\text{C}-\text{H}$ 不对

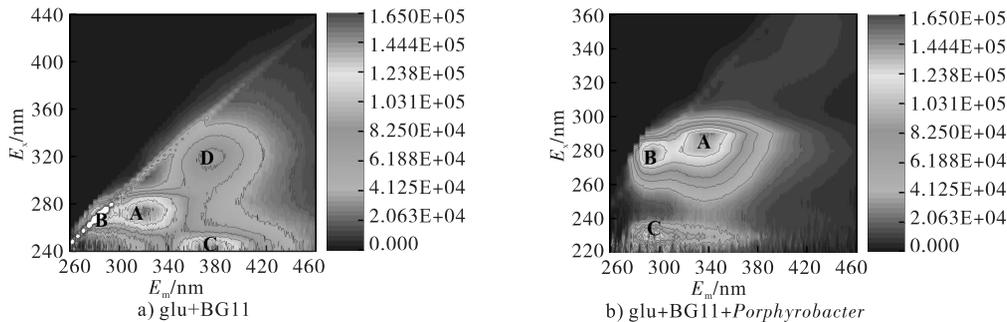


图 4 不同培养体系中棕鞭藻三维荧光光谱

由图 4 可知,藻菌共培养体系中的荧光峰种类少于纯藻培养体系。峰 A ($E_x/E_m = 250 \sim 310 \text{ nm}/290 \sim 350 \text{ nm}$) 为芳香族蛋白氨基酸如色氨酸及其类似物,相较于纯藻培养体系,藻菌共培养时峰 A 的荧光强度更强,色氨酸荧光峰与 AOM 中的芳环氨基酸结构有关,主要来源于多肽、氨基酸、蛋白质等物质, *Porphyrobacter* 会促使微藻在生长代谢过程中分泌这些物质从而强化藻细胞聚集过程。峰 B ($E_x/E_m = 250 \sim 295 \text{ nm}/270 \sim 302 \text{ nm}$) 为可溶性微生物副产物,其是微生物在进行内源呼吸或者应对环境压力的过程中产生的溶解性有机物,能够在不破坏菌体细胞的情况下与微生物相分离。峰 C ($E_x/E_m = 200 \sim 250 \text{ nm}/270 \sim 380 \text{ nm}$) 为蛋白类物质,峰 D ($E_x/E_m = 300 \sim 330 \text{ nm}/360 \sim 390 \text{ nm}$) 为多糖。相比于藻菌共培养体系,峰 D 仅存在于纯藻培养体系中,这可能与葡萄糖的添加有关,葡萄糖作为有机碳源能够提高微藻的生长代谢速度,并促使微藻分泌大量的胞外

称伸缩振动,3 400 cm^{-1} 附近的吸收峰是蛋白质的 $\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动与多糖 $\text{O}-\text{H}$ 伸缩振动。两种体系中均存在 1 030、1 630、3 400 cm^{-1} 附近的吸收峰,而 850、1 400、2 940 cm^{-1} 附近的吸收峰仅存在于藻菌共培养体系中,纯藻培养体系所含的吸收峰种类(3 种)少于藻菌共培养体系(6 种)。与纯藻培养体系相比,藻菌共培养体系中 1 628、3 408 cm^{-1} 处的吸收峰均出现偏移,这是因为 *Porphyrobacter* 的添加使得棕鞭藻 AOM 中的蛋白质酰胺基团发生变化而引起色氨酸、酪氨酸等蛋白质类物质的改变,微藻絮凝效率也因此受到影响。何嘉雯^[25] 利用柠檬酸杆菌收获小球藻时,细菌分泌的絮凝活性物质中存在氨基、羧基等活性基团,在絮凝过程中发挥了重要作用。同时,2 940 cm^{-1} 附近存在的糖类特征峰 $\text{C}-\text{H}$ 不对称伸缩振动仅存在于藻菌共培养体系中(见图 3),该峰主要来自各种膜及细胞壁的成分^[26],这与藻菌共培养体系中 AOM 产量、组分发生变化密不可分。

棕鞭藻所产 AOM 的三维荧光光谱如图 4 所示。

多糖以抑制藻细胞聚集,而 *Porphyrobacter* 与棕鞭藻的共培养过程则显著降低了微藻多糖类物质的分泌。但也有研究发现,小球藻培养基中存在的大量胞外多糖可以通过与 Ca^{2+} 的螯合作用有效促进藻细胞聚集,小球藻的回收率可达 91%^[27]。因此,AOM 中多糖对于微藻絮凝的影响与藻种、营养环境等因素有着密切关系。

2.3 *Porphyrobacter* 对棕鞭藻培养体系中菌群结构的影响

在 glu + BG11 培养基中进行纯藻培养与藻菌共培养,根据各样本的 OTU 注释结果和 OTU 丰度表,对丰度最高的 17 个物种属水平进行分析,结果见图 5。

由图 5 可知:在 glu + BG11 培养基中,短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、噬冷菌属 (*Algoriphagus*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、微小杆菌属 (*Exigubacterium*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 仅存在于藻菌共培养体系中;而产吡啶杆菌属 (*Porphyrobacter*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、玫瑰球菌属 (*Roseococcus*)、*Fluviicola*、囊胚单胞菌属

(*Blastomonas*)、宝石单胞菌属(*Gemmatimonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、巨大芽殖杆菌属(*Gemmobacter*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*) 在纯藻培养与藻菌共培养体系中均存在。不同体系的细菌群落结构在属水平上存在较大差异,纯藻培养与藻菌共培养体系的香农指数分别为1.487 4、1.694 0,藻菌共培养体系的生物多样性更高,优势菌属包括产吡啉杆菌属(*Porphyrobacter*)、微小杆菌属(*Exigubacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*),菌群相对丰度分别为40.72%、14.12%、11.75%、9.42%、9.28%。其中,产吡啉杆菌属(*Porphyrobacter*)相对丰度最高、优势最为明显,说明*Porphyrobacter*能够作为优势菌种与棕鞭藻在混养模式下共生。

本研究中玫瑰球菌属(*Roseococcus*)在不同培养体系中的相对丰度较为接近,分别为1.7%、1.6%。张波等^[28]在对比不同营养环境下棕鞭藻共栖细菌群落结构的研究中发现,玫瑰球菌属(*Roseococcus*)作为棕鞭藻良好的共生菌在含糖营养环境中的相对丰度会显著下降。本研究中根瘤菌属(*Rhizobium*)在纯藻体系中相对丰度较高,它能够促进植物的生长,提高棕鞭藻的生物量。短波单胞菌属(*Brevundimonas*)只存在于藻菌共培养体系中,相对丰度为9.28%。黄杆菌属(*Flavobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、噬冷菌属(*Algoriphagus*) 在藻菌共培养体系中的相对丰度均高于纯藻体系。有研究证明短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)能够分泌色氨酸、鼠李糖等物质,这些分泌物对微藻絮凝产生重要的影响^[29],与2.2和2.1中glu+BG11培养基中藻菌共培养体系AOM中鼠李糖的产量(2.306 mg/L)最高,微藻亦具有最高的絮凝效率(93.42%)一致。Vu等^[30]指出,黄杆菌属(*Flavobacterium*)可以分解体系中的有机物进而对藻细胞絮凝具有诱导作用。芽孢杆菌属(*Bacillus*)可刺激小球藻分泌更多的色氨酸,同时显著提高微藻絮凝效率^[31]。

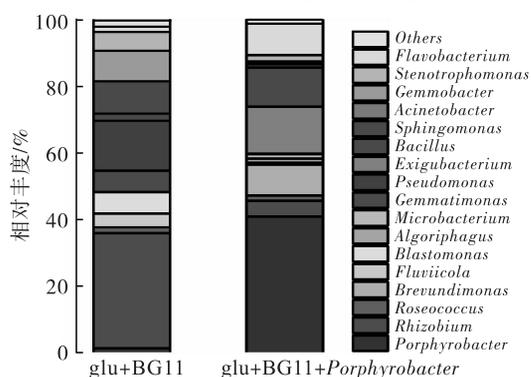


图5 *Porphyrobacter*对棕鞭藻培养体系中菌群结构的影响

3 结论

(1)相较于微藻的自养生长环境,在含葡萄糖的营养环境中*Porphyrobacter*对棕鞭藻具有更为强烈的絮凝促进效果,同时解除葡萄糖对微藻的絮凝抑制作用,利用*Porphyrobacter*构建微藻促絮凝体系具有良好的应用前景。

(2)*Porphyrobacter*与棕鞭藻共培养过程中可显著降低AOM产量并使得其中单糖组成发生明显变化,如葡萄糖醛酸、岩藻糖的占比均低于纯藻培养体系,阿拉伯糖的占比则显著提升;同时会引起AOM中色氨酸、酪氨酸等蛋白质类物质的改变,进而使得微藻絮凝效率大幅提升。

(3)*Porphyrobacter*易成为棕鞭藻共栖环境中的优势菌属,同时体系中会形成以微小杆菌属(*Exigubacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)为代表的微生态环境。

参考文献:

- [1] ZHAO F Y, XIAO J M, DING W, et al. An effective method for harvesting of microalga: coculture - induced self - flocculation [J]. J Taiwan Inst Chem Eng, 2019, 100: 117 - 126.
- [2] 郭锁莲, 赵心清, 白凤武. 微藻采收方法的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 721 - 728.
- [3] 胡沅胜, 刘斌, 郝晓地, 等. 微藻处理污水中的絮凝分离/采收研究现状与展望 [J]. 环境科学学报, 2015, 35(1): 12 - 29.
- [4] ALAM M A, VANDAMME D, CHUN W, et al. Bioflocculation as an innovative harvesting strategy for microalgae [J]. Rev Environ Sci Biol, 2016, 15(4): 573 - 583.
- [5] LEI X Q, ZHENG W, DING H Y, et al. Effective harvesting of the marine microalga *Thalassiosira pseudonana* by *Marinobacter* sp. FL06 [J]. Bioresour Technol, 2018, 269: 127 - 133.
- [6] LEE J, CHO D H, RAMANAN R, et al. Microalgae - associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris* [J]. Bioresour Technol, 2013, 131: 195 - 201.
- [7] 刘珂轶. 棕鞭藻共栖细菌对藻细胞生长代谢的影响机制 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2021.
- [8] RIPPKA R, DERUELLES J, WATERBURY J, et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of *Cyanobacteria* [J]. J Gen Microbiol, 1979, 111(1): 1 - 61.
- [9] 施华升, 沈仁豪, 胡振, 等. 外源活性污泥胞外聚合物对小球藻聚集行为的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(3): 570 - 577.
- [10] 赵艳, 汪成, 王超霞, 等. 一株新型自絮凝凯式拟小球藻的两步培养产油技术 [J]. 水生生物学报, 2019, 43(1): 196 - 204.
- [11] HENDERSON R K, BAKER A, PARSONS S A, et al. Characterisation of algalenic organic matter extracted from

- cyanobacteria, green algae and diatoms[J]. *Water Res*, 2008, 42(13): 3435–3445.
- [12] 李娟,张耀庭,曾伟,等.应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J]. *中国生物制品学杂志*, 2000(2): 118–120.
- [13] 杨勇杰,姜瑞芝,陈英红,等.苯酚硫酸法测定杂多糖含量的研究[J]. *中成药*, 2005(6): 706–708.
- [14] 牟世芬,朱岩,刘克纳.离子色谱方法及应用[J]. 3版.北京:化学工业出版社,2018.
- [15] 吕桂才.溶解有机物三维荧光光谱结合多变量分析在赤潮藻识别中的应用[D].山东 青岛:中国海洋大学,2010.
- [16] 李崇华,马贵党,尹斌,等.莱茵衣藻胞外聚合物的提取和红外光谱表征[J]. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(1): 176–183.
- [17] ZHANG B, CHEN S F. Effect of different organic matters on flocculation of *Chlorella sorokiniana* and optimization of flocculation conditions in swine manure wastewater[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 192: 774–780.
- [18] OH H M, LEE S J, PARK M H, et al. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49[J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(15): 1229–1234.
- [19] WANG H, LAUGHINGHOUSE H D, ANDERSON M A, et al. Novel bacterial isolate from Permian groundwater, capable of aggregating potential biofuel – producing microalga *Nannochloropsis oceanica* IMET1 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(5): 1445–1453.
- [20] LI Y G, XU L, HUANG Y M, et al. Microalgal biodiesel in China: opportunities and challenges[J]. *Appl Energ*, 2010, 88(10): 3432–3437.
- [21] HUANG Z S, WANG Y F, JIANG L, et al. Mechanism and performance of a self – flocculating marine bacterium in saline wastewater treatment [J]. *Chem Eng J*, 2018, 334: 732–740.
- [22] GUO S L, ZHAO X Q, WAN C, et al. Characterization of flocculating agent from the self – flocculating microalga *Scenedesmus obliquus* AS – 6 – 1 for efficient biomass harvest[J]. *Bioresour Technol*, 2013, 145: 285–289.
- [23] MISHRA A, JHA B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro – algae *Dunaliella salina* under salt stress [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(13): 3382–3386.
- [24] VANDAMME D, FOUBERT I, FRAEYE I, et al. Influence of organic matter generated by *Chlorella vulgaris* on five different modes of flocculation[J]. *Bioresour Technol*, 2012, 124: 508–511.
- [25] 何嘉雯.柠檬酸杆菌 W4 收获小球藻工艺及作用机制研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2019.
- [26] 孙素琴,梁曦云,杨显荣.六色灵芝的 FTIR 快速无损鉴别[J]. *光谱学与光谱分析*, 2002(2): 226–228.
- [27] RASHID N, NAYAK M, LEE B, et al. Efficient microalgae harvesting mediated by polysaccharides interaction with residual calcium and phosphate in the growth medium[J]. *J Clean Prod*, 2019, 234: 150–156.
- [28] 张波,刘珂轶,张安龙,等.不同营养环境下棕鞭藻共栖细菌的群落结构比较[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(8): 2812–2818.
- [29] ZHAO R R, CHEN G W, LIU L, et al. Bacterial foraging facilitates aggregation of *Chlamydomonas microspira* in an organic carbon source – limited aquatic environment[J/OL]. *Environ Pollut*, 2020, 259: 113924 [2021–12–16]. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113924>.
- [30] VU C H T, CHUN S J, SEO S H, et al. Bacterial community enhances flocculation efficiency of *Ettlia* sp. by altering extracellular polymeric substances profile [J]. *Bioresour Technol*, 2019, 281: 56–65.
- [31] LIU Y P, CHEN L, ZHANG N, et al. Plant – microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root – associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 [J]. *Mol Plant Microb Interact*, 2016, 29(4): 324–330.

(上接第 136 页)

4 运行情况

经过半年的正常生产,近红外光谱仪采集窗口表面没有黏附膨化大豆粉,透光度仍然很好,说明配备的吹扫装置可以有效去除黏附在采集窗口上的膨化大豆粉,避免了对检测结果造成影响。实践表明,近红外光谱仪可以应用于膨化大豆粉中水分、粗蛋白质、粗脂肪含量的在线检测。

5 结语

在线近红外光谱仪配合全自动镜头吹扫系统在膨化大豆粉加工行业具有可推广性,对膨化大豆粉水分、粗蛋白质和粗脂肪含量的测定具有可靠性和准确性,可以实时反映生产线产品指标的变化,为生产参

数的调整及时提供信息。另外,还可以继续开发在线近红外光谱仪测定膨化大豆粉灰分、尿素酶活性等其他质量指标定标曲线,以满足快速检测需求。

参考文献:

- [1] 饲料中水分的测定:GB/T 6435—2014 [S].北京:中国标准出版社,2014.
- [2] 饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法:GB/T 6432—2018 [S].北京:中国标准出版社,2018.
- [3] 饲料中粗脂肪的测定:GB/T 6433—2006 [S].北京:中国标准出版社,2006.
- [4] 饲料中水分、粗蛋白质、粗纤维、粗脂肪、赖氨酸、蛋氨酸快速测定 近红外光谱法:GB/T 18868—2002 [S].北京:中国标准出版社,2002.