



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113186131 B

(45) 授权公告日 2023.10.27

(21) 申请号 202110481669.7

(22) 申请日 2021.04.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113186131 A

(43) 申请公布日 2021.07.30

(73) 专利权人 广州绿曦生物科技有限公司

地址 511458 广东省广州市南沙区环市大道中海达大街6号372房

(72) 发明人 徐梁 刘伟

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有

限公司 44205

专利代理师 胡辉

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/20 (2020.01)

C07D 403/14 (2006.01)

A01N 43/38 (2006.01)

A01N 43/60 (2006.01)

A01P 13/00 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103497913 A, 2014.01.08

CN 111826318 A, 2020.10.27

CN 101440355 A, 2009.05.27

CN 103012610 A, 2013.04.03

CN 103966123 A, 2014.08.06

CN 106497809 A, 2017.03.15

CN 110106116 A, 2019.08.09

US 2016251320 A1, 2016.09.01

WO 2011073874 A2, 2011.06.23

CN 106085896 A, 2016.11.09

CN 110923173 A, 2020.03.27

CN 107629976 A, 2018.01.26

CN 110724653 A, 2020.01.24

US 2014113816 A1, 2014.04.24

CN 109355238 A, 2019.02.19

刘瑞芳等. sevirin 脱蛋白.《生命科学与工程实验》.中国矿业大学出版社, 2016, 第371页.

何小维等. 纤维素概述.《功能性碳水化合物及其应用技术丛书 医药用碳水化合物》.中国轻工业出版社, 2016, 第89页.

王媛媛等. 粘着剑菌溶藻效能与溶藻过程藻胞内物质释放.《环境科学与技术》.2018, 第41卷(第07期), 第6-13页.

沈琦等. 一株溶藻细菌溶藻活性物质的性质.《环境科学与技术》.2007, (第06期), 第1-4页.

张勇等. 溶藻细菌杀藻物质的研究进展.《微生物学通报》.2004, (第01期),

刘佩蕊等. 藻华防控方法及灭活与捕获新技术研究进展.《环境科学与技术》.2021, 第44卷(第02期), 第171-185页.

宁华等. 溶藻细菌应用于生物杀藻剂的研究进展.《净水技术》.2017, 第36卷(第09期), 第27-33页.

(续)

审查员 周耕民

权利要求书1页 说明书9页 附图9页

(54) 发明名称

一种溶藻微生物菌剂及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种溶藻微生物菌剂及其应用, 其中, 所述菌剂中含有肠杆菌和/或肠杆菌提取物, 所述肠杆菌选自霍氏肠杆菌F2或阴沟肠杆菌。本发明中的微生物溶藻菌剂含有霍氏肠杆菌

F2和/或霍氏肠杆菌F2提取物, 其对水体中的铜绿微囊藻溶解效果明显, 抑藻率达到95%, 对丝状藻的抑藻率达到97%, 在实际富营养化水体中其藻细胞的去除率能够达到87.32%, 在水体富营养化治理中具有较大应用。

CN 113186131 B

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

廖春丽等.不同溶藻菌对淡水藻的溶藻效果.《贵州农业科学》.2014,第42卷(第06期),第193-195页.

牛丹丹.一株溶藻细菌对铜绿微囊藻的溶藻机制及其溶藻物质特性的研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库(工程科技I辑)》.2012,(第06期),

谭文章等.粘质沙雷氏菌中灵杆菌素合成因素探究进展.《基因组学与应用生物学》.2021,第

40卷(第04期),第1711-1718页.

Chunli Liao等.High-Cell-Density Cultivation and Algicidal Activity Assays of a Novel Algicidal Bacterium to Control Algal Bloom Caused by Water Eutrophication.《Water Air and Soil Pollution》.2014,第225卷(第11期),

思斯等.高效纤维素降解细菌的分离鉴定及酶学特性.《江苏农业科学》.2013,第41卷(第03期),第305-308页.

1. 一种溶藻菌剂,其特征在于,所述菌剂中含有肠杆菌和/或肠杆菌提取物,其中,所述肠杆菌为霍氏肠杆菌F2;所述肠杆菌提取物中含有吩嗪类物质和灵杆菌素;所述霍氏肠杆菌F2的NCBI ID为5476961,GenBank序列编号为CP047570.1;

所述肠杆菌提取物由以下方法制备得到:取霍氏肠杆菌F2菌液,8000r/min离心10min;离心后,取上清,加入有机溶液提取;其中,所述有机溶液为乙醇溶液;醇提后,脱去蛋白;其中,所述脱去蛋白采用sevag试剂蛋白脱除法,所述sevag试剂为按体积比计氯仿:正丁醇=4:1的混合溶液;脱去蛋白后,进行透析,取透析外液,即得肠杆菌提取物,所述透析的截留分子量为大于等于3.5kDa;

所述藻为铜绿微囊藻和丝状藻。

2. 根据权利要求1所述的溶藻菌剂,其特征在于,所述肠杆菌提取物中各组分的分子量小于3.5kDa。

3. 一种溶藻活性成分的制备方法,包括如下步骤:

取权利要求1中所述的霍氏肠杆菌F2菌液,8000r/min离心10min;

离心后,取上清,加入有机溶液提取;其中,所述有机溶液为乙醇溶液;

醇提后,脱去蛋白;其中,所述脱去蛋白采用sevag试剂蛋白脱除法,所述sevag试剂为按体积比计氯仿:正丁醇=4:1的混合溶液;

脱去蛋白后,进行透析,取透析外液,即得溶藻活性成分,所述溶藻活性成分包括吩嗪类物质和灵感菌素类物质;所述透析的截留分子量为大于等于3.5kDa。

4. 权利要求1或2所述的溶藻菌剂在制备水藻生长抑制剂中的应用,所述水藻为铜绿微囊藻和丝状藻。

一种溶藻微生物菌剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物领域,具体涉及一种溶藻微生物菌剂及其应用。

背景技术

[0002] 富营养化水体中水华的爆发主要是以蓝藻为主,水华鱼腥藻是引起水华蓝藻爆发的主要藻种之一,其适应性强,发生频率和危害范围仅次于微囊藻引发的有毒水华蓝藻。微囊藻中的铜绿微囊藻在生长的过程中会释放藻毒素,不仅破坏水生态系统稳定,也影响人类饮用水安全,对人类健康产生危害。

[0003] 相关技术中,控制蓝藻泛滥的技术主要有三种:物理法、化学法和生物法。物理除藻主要是利用机械除藻、气浮除藻、过滤除藻等方法进行除藻,主要是作为大面积蓝藻爆发时的紧急处理办法使用,其主要缺点在于成本高、能耗大、处理不彻底等。化学除藻主要是通过向水体中投加化学物质来达到除藻目的,除藻化学物质包括 $Al_2(SO_4)_3$ 、 $CuSO_4$ 、 $AgNO_3$ 、 $AgBiO_3$ 、 $NaBiO_3$ 、 H_2O_2 、 $KMnO_4$ 、 ClO_2 等。虽然化学除藻操作方法简单,而且除藻迅速有效,但这些除藻化学物质对环境产生的二次污染目前尚无很好的解决办法。生物法主要是通过利用生物竞争、植物相克等生物法进行抑藻。其主要是利用各生物之间对环境中营养、水分、光的竞争或者释放出化学物质使得藻类生长受到抑制。而溶藻细菌(algicidal bacteria)是通过直接(宿主或者吞噬)作用或者是间接(释放胞外物质)作用杀死藻细胞。但现有技术中的溶藻细菌种属单一,多是对于单一藻类具有抑藻能力,但大面积水华爆发往往涉及多种藻类的作用。

[0004] 因此,开发一种能够同时具有多种藻类的抑藻能力的微生物菌剂对于环境治理和生态保护具有极为重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少解决上述现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明提出一种溶藻微生物菌剂及其应用,该微生物菌剂能够有效控制蓝藻水华的生长,尤其是对于铜绿微囊藻和丝状藻的生长具有较好的抑制作用,在水体富营养化治理中具有较大的应用价值。

[0006] 本发明的第一个方面,提供一种溶藻菌剂,该菌剂中含有肠杆菌和/或肠杆菌提取物。

[0007] 根据本发明的第一个方面,在本发明的一些实施方式中,所述肠杆菌选自霍氏肠杆菌F2或阴沟肠杆菌。

[0008] 在本发明的一些优选实施方式中,所述阴沟肠杆菌包括保藏菌株GDMCG NO.60244和菌株编号SW516的阴沟肠杆菌。

[0009] 相关技术中,主要的溶藻菌株均为芽孢杆菌类,如蜡状芽孢杆菌,其对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)有很强的抑制作用,处理7天后抑藻率为90%;如海洋蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)HY339,对水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*)的生长具有较强的

抑制效果。但对于其他类别的菌株是否具有溶藻效果并未见任何公开。本发明首次发现了一些肠杆菌类,尤其是霍氏肠杆菌,具有溶藻效果,能同时抑制铜绿微囊藻和丝状藻,对藻细胞有较好的溶解作用。对铜绿微囊藻抑藻率可达到95%,对丝状藻抑藻率可达到97%,在实际富营养化水体中对各类藻细胞的去除率能够达到87.32%,具有极高的应用价值。

[0010] 在本发明的一些优选实施方式中,所述藻类包括铜绿微囊藻和丝状藻。

[0011] 当然,本领域技术人员可以根据实际使用需求,将该溶藻菌剂用于杀灭其他的水华藻类,其并不限于铜绿微囊藻和丝状藻。

[0012] 在本发明的一些优选实施方式中,所述肠杆菌提取物中各组分的分子量小于3.5kDa。

[0013] 在本发明的一些优选实施方式中,所述肠杆菌提取物中含有吩嗪类物质和灵杆菌素。

[0014] 在本发明中,发明人发现肠杆菌提取物中主要起溶藻作用的为吩嗪类物质和灵杆菌素,当然,其并不排除其他成分所共同带来的协同作用和叠加效果。

[0015] 本发明的第二个方面,提供一种溶藻活性成分的制备方法,包括如下步骤:

[0016] 取肠杆菌菌液,离心,即得溶藻活性成分。

[0017] 根据本发明的第二个方面,在本发明的一些实施方式中,所述制备方法具体为:

[0018] 将霍氏肠杆菌F2菌液在35℃、120rpm/min恒温摇床中培养48h后,离心机8000r/min离心10min,去除菌液中残留的菌丝体或其它杂质,所得上清即为溶藻活性成分。

[0019] 在本发明的一些优选实施方式中,所述制备方法还包括:离心后,取上清,加入有机溶液提取,即得溶藻活性成分。

[0020] 其中,所述有机溶液为醇溶液。

[0021] 所述醇溶液优选为乙醇溶液。

[0022] 该步骤是基于离心后得到的上清的进一步处理,通过加入95%的工业乙醇并将溶液中的醇浓度调节至80%,然后8000r/min离心10min,可以得到纯度更高的溶藻活性成分。

[0023] 在本发明的一些优选实施方式中,所述制备方法还包括:醇提后,脱去蛋白,即得溶藻活性成分。

[0024] 其中,所述脱去蛋白采用sevag试剂蛋白脱除法。

[0025] 该步骤是基于醇提后的进一步处理,加入溶液总体积的20%的sevag溶液(按体积比计,sevag溶液为氯仿:正丁醇=4:1的混合溶液),剧烈震荡10min,8000r/min离心10min,取上清。通过不断反复进行该操作去除蛋白,使溶液中的溶藻活性成分纯度更高,组分更趋向单一。

[0026] 在本发明的一些优选实施方式中,所述制备方法还包括:脱去蛋白后,进行透析,取透析外液,即得溶藻活性成分。

[0027] 其中,所述透析的截留分子量为大于等于3.5kDa。

[0028] 该步骤是基于蛋白脱除后的进一步处理,通过截留分子量为3.5kDa的透析袋透析,可以将3.5kDa以下的溶藻活性成分分离出来,从而使溶液中的溶藻活性成分纯度更高,组分更趋向单一。

[0029] 本发明的第三个方面,提供本发明第一个方面所述的溶藻菌剂在制备水藻生长抑制剂中的应用。

[0030] 本发明中的霍氏肠杆菌F2对水体中的铜绿微囊藻溶解效果明显,抑藻率达到95%,对丝状藻的抑藻率达到97%,在实际富营养化水体中其藻细胞的去除率能够达到87.32%,在水体富营养化治理中具有较大应用。

[0031] 本发明的第四个方面,提供本发明第一个方面所述的溶藻菌剂在水环境治理中的应用。

[0032] 本发明的有益效果是:

[0033] 1. 本发明中的微生物溶藻菌剂含有霍氏肠杆菌F2和/或霍氏肠杆菌F2提取物,其对水体中的铜绿微囊藻溶解效果明显,抑藻率达到95%,对丝状藻的抑藻率达到97%,在实际富营养化水体中其藻细胞的去除率能够达到87.32%,在水体富营养化治理中具有较大应用。

[0034] 2. 本发明中的霍氏肠杆菌F2提取物含有吩嗪类、灵杆菌素类物质,能够溶解藻细胞细胞壁和细胞膜,使其胞内质粒流出,藻细胞死亡,从而能有效杀灭和控制水华的泛滥,在水体富营养化治理中具有较大应用。

附图说明

[0035] 图1为本发明实施例中的霍氏肠杆菌F2的平板划线图(A)和透射电镜图(B);

[0036] 图2为本发明实施例中的计数结果霍氏肠杆菌F2的生长曲线;

[0037] 图3为本发明实施例中的霍氏肠杆菌(F2)的溶藻过程前后对比,其中,A为溶藻前的投射电镜图,B为溶藻后的投射电镜图,C为溶藻前的平板示意图,D为溶藻后的平板示意图;

[0038] 图4为本发明实施例中实验组和空白组铜绿微囊藻抑制实验对比情况,A为空白组水样实物图,B为实验组水样实物图,C为空白组藻细胞图像,D为实验组藻细胞图像;

[0039] 图5为本发明实施例中实验组和空白组丝状藻抑制实验对比情况,A为空白组水样实物图,B为实验组水样实物图,C为空白组藻细胞图像,D为实验组藻细胞图像;

[0040] 图6为本发明实施例中5株不同肠杆菌的抑藻效果对比图;

[0041] 图7为本发明实施例中实验组和空白组在富营养化水体中的抑藻效果对比图;

[0042] 图8为本发明实施例中不同处理方案的霍氏肠杆菌F2的抑藻效果对比图;

[0043] 图9为本发明实施例中霍氏肠杆菌F2菌液在提取纯化各步骤中得到的溶液的抑藻效果对比图;

[0044] 图10为本发明实施例中霍氏肠杆菌F2分泌物质的出峰情况,其中A为0.66min出峰情况,B为4.53min出峰情况;

[0045] 图11为本发明实施例中提取的灵杆菌素、吩嗪类物质对藻细胞的溶解效果对比图;

[0046] 图12为本发明实施例中灵杆菌素、吩嗪类物质对藻细胞的溶解效果示意图,其中,A为使用灵杆菌素、吩嗪类物质前,B为使用灵杆菌素、吩嗪类物质后。

具体实施方式

[0047] 为了使本发明的发明目的、技术方案及其技术效果更加清晰,以下结合具体实施方式,对本发明进行进一步详细说明。应当理解的是,本说明书中描述的具体实施方式仅仅

是为了解释本发明,并非为了限定本发明。

[0048] 所使用的实验材料和试剂,若无特别说明,均为常规可从商业途径所获得的耗材和试剂。

[0049] 溶藻菌株的分离、筛选与鉴定

[0050] (1)溶藻菌株的分离与筛选:

[0051] 取广州市某处富含藻细胞的景观水体进行LB培养基平板涂布,经过35℃恒温培养48小时后,对不同形态的微生物进行划线分离提纯。将提纯后的不同微生物分别接种到灭菌的LB液体培养基中,在120rpm、35℃的恒温摇床中培养48h形成悬菌液。取3mL悬菌液至接种有铜绿微囊藻和丝状藻的BG11培养基(藻液体积为150mL)中,在25℃、2500Lux,光暗比为16h:9h条件下培养一周,每天检测叶绿素a含量和藻细胞数量,判断待测微生物是否有抑藻效果。重复实验多次以确保结果准确性。

[0052] 其中,叶绿素a的测定采用丙酮法,当然,也可以采用其他本领域常规方法进行测定。

[0053] 叶绿素a含量的计算公式为:

叶绿素 a 含量 (μg/L)

$$[0054] \quad = \frac{(11.64 \times (D_{663} - D_{750}) - 2.16 \times (D_{645} - D_{750}) + 0.10 \times (D_{630} - D_{750})) \times V_1}{V \times \delta}$$

[0055] 其中,V为水样体积(L);

[0056] D为吸光度;

[0057] V_1 为提取液定容后体积(mL);

[0058] δ 为比色皿光程(cm)。

[0059] 藻细胞数量采用血球板计数法进行计数,当然,也可以采用其他本领域常规方法进行测定。藻细胞浓度的计算公式为:

[0060] 藻细胞浓度(个/mL) = 五格藻细胞数之和 $\times 5 \times$ 稀释倍数 $\times 10^5$ 。

[0061] (2)溶藻菌株的鉴定:

[0062] 将上述实施例中获得的具有抑藻效果的微生物培养纯化后,接种到150mL LB液体培养基中,在120rpm、35℃恒温摇床中培养48h,取培养液进行透射电镜观察和Sanger法菌种鉴定。

[0063] 结果如图1所示。

[0064] 从图1可以看出,该溶藻菌株的菌落较大,菌落表面扁平且较粗糙,菌株颜色为灰白色,湿度较低、粘稠性较高;菌体细胞为杆状、短链或者长链,长度为10~15μm,末端为方状;将分离出的纯化菌种送去基因测序公司进行菌株鉴定,该溶藻菌株被鉴定为霍氏肠杆菌F2(E nterobacter hormaechei strain F2 chromosome),该霍氏肠杆菌F2的NCBI ID为5476961,GenBank序列编号为CP047570.1,具体信息可参见https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GC_F_009905155.1/。

[0065] 霍氏肠杆菌F2的生长曲线测定

[0066] 将上述实施例得到的霍氏肠杆菌F2接种到LB培养基中,放置120rpm、35℃的恒温摇床中培养,每8h取样一次,用平板计数法进行计数。

[0067] 具体计数操作为:使用LB琼脂作为培养基,取1mL稀释后的霍氏肠杆菌F2菌液倒入

培养皿中,然后加入约20mL培养基,静置20min,再将其倒置在生化培养箱,温度设置为37℃,培养48h,结束后进行计数。

[0068] 计数结果表明(图2),霍氏肠杆菌F2的生长曲线在0~24h期间属于迟缓期,细菌在这段时间内适应新环境,并慢慢被激活。在24h~32h时,由于环境中的营养物质浓度大于细菌生长需求量,细菌大量的摄取营养物质,生长没有受到限制,此时,霍氏肠杆菌F2菌落数呈对数生长。在32h~40h时,细菌的生长速度减缓,环境内的营养物质被不断消耗导致营养物质浓度降低,细菌繁殖周期变长,并在在40h时,生物量达到最大值 4.7×10^9 CFU。在40h后,霍氏肠杆菌F2进入衰亡期,随着细菌的生长环境内的营养物质被消耗殆尽,细菌开始进入内源呼吸期,生物量开始下降,细菌自身新陈代谢释放有毒物质也会抑制其生长。

[0069] 根据该生长曲线,可以获知霍氏肠杆菌F2生长24小时后已经在对数生长期,而抑藻效果的研究将主要针对于对数生长期,即培养24h的细菌,因此,向培养7天的藻液(铜绿微囊藻)加入培养24小时的霍氏肠杆菌F2(浓度为 3.8×10^8 CFU),孵育后,可以发现原本因铜绿微囊藻生长而呈现绿色的培养基变为无色透明,经电镜观测后,证实培养皿中的铜绿微囊藻均被霍氏肠杆菌F2溶解(图3)。

[0070] 霍氏肠杆菌F2对铜绿微囊藻和丝状藻的抑制效果

[0071] (1)霍氏肠杆菌F2对铜绿微囊藻的抑制效果:

[0072] 取1000mL培养好的铜绿微囊藻,加入1mL霍氏肠杆菌F2菌液(浓度约为 2×10^9 CFU),连续观察7天。同时设立空白组,加入等量的水。

[0073] 结果如图4和表1所示。

[0074] 从图4可以看出,7天后,空白组的铜绿微囊藻藻液几乎没有变化,而加入1mL霍氏肠杆菌F2菌液的实验组的藻液变黄、变清。通过显微镜观察,空白组藻细胞呈现绿色,细胞形状完整,没有出现溶解或死亡现象,而加入1mL霍氏肠杆菌F2菌液的实验组的藻细胞呈淡黄色,细胞形状干瘪,表明藻细胞死亡,说明霍氏肠杆菌F2有效的抑制了藻细胞的生长。进一步测定空白组和实验组的藻细胞的叶绿素a含量和藻细胞数量变化,发现霍氏肠杆菌F2对铜绿微囊藻的抑藻率达到了95%。

[0075] 表1霍氏肠杆菌F2菌株加菌后叶绿素a变化情况(单位:ug/ml)

[0076]	第0天	第2天	第4天	第6天	第8天	第10天	第12天
空白组	529	556	820	1122	1643	1959	2371
加F2菌组	529	243.1	142	100.5	64	56	34

[0077] (2)霍氏肠杆菌F2对丝状藻的抑制效果:

[0078] 取1000mL培养好的丝状藻,加入1mL霍氏肠杆菌F2菌液(浓度约为 2×10^9 CFU),连续观察7天。同时设立空白组,加入等量的水。

[0079] 结果如图5所示。

[0080] 从图5可以看出,7天后,空白组的丝状藻几乎没有变化,藻丝完整均匀的分布在水中,而加入1mL霍氏肠杆菌F2菌液的实验组的藻丝聚团在一起,藻丝表层发黄,并出现藻丝腐烂的情况。通过显微镜观察,空白组藻细胞呈现绿色条状,细胞形状完整,而加入1mL霍氏肠杆菌F2菌液的实验组的藻细胞呈淡黄色团状,无完整细胞形状,表明藻细胞死亡。

[0081] 不同肠杆菌对铜绿微囊藻和丝状藻的抑制效果对比

[0082] 分别选取不同种属的肠杆菌进行检测,以判断对铜绿微囊藻和丝状藻的抑制效果

是否为肠杆菌属的共同效果。

[0083] 本实施例中使用的肠杆菌包括:大肠杆菌 (*Escherichia coli* SW102),阿氏肠杆菌 (*Enterobacter asburiae* SW324),河生肠杆菌 (*Enterobacter amnigenus* SW251),阴沟肠杆菌 (*Enterobacter acloacae* SW516)和霍式肠杆菌F2。将1000mL铜绿微囊藻分别与1mL大肠杆菌、阿氏肠杆菌、河生肠杆菌、阴沟肠杆菌和霍式肠杆菌F2菌液(浓度均为 2×10^9 CFU)混合,连续观察7天。同时设立空白组(Control check,CK),加入等量的水。每天监测各组的叶绿素a含量变化。

[0084] 结果如图6所示。

[0085] 从图6可以看出,随着培养时间的延长,空白组的铜绿微囊藻藻液叶绿素a含量呈上升趋势,说明在无干涉条件下,铜绿微囊藻仍在不断的生长繁殖。而大肠杆菌、阿氏肠杆菌、河生肠杆菌三组的叶绿素a含量变化趋势与空白组类似,说明大肠杆菌、阿氏肠杆菌、河生肠杆菌三组均无抑制水藻生长的效果。而阴沟肠杆菌组的叶绿素a含量有一定的下降趋势,说明阴沟肠杆菌也具有一定的抑制效果,但其效果的显著差异性相对较弱。霍式肠杆菌F2组中的叶绿素a含量几乎呈直线下降趋势,下降幅度大,抑藻效果最好,上述结果说明对铜绿微囊藻的抑制效果并非为肠杆菌属的共同效果,仅霍式肠杆菌F2具有良好的抑藻效果。

[0086] 将铜绿微囊藻替换为丝状藻后进行同样的实验,发现结果如铜绿微囊藻一致,大肠杆菌、阿氏肠杆菌、河生肠杆菌三组均无抑制水藻生长的效果,阴沟肠杆菌组的抑制效果极弱,仅霍式肠杆菌F2具有良好的抑藻效果。

[0087] 霍式肠杆菌F2在富营养化水体中的实际应用

[0088] 本实施例中的试验用水取自广州某富营养化河涌,用以验证霍式肠杆菌F2的实际抑藻效果,主要监测的抑藻效果评价指标为叶绿素a浓度和藻细胞数量。

[0089] (1) 试验用水制备测定:

[0090] 试验用水在实验进行前进行测定,测得叶绿素a含量为 $315.94 \mu\text{g/L}$,藻细胞浓度为 1.1×10^7 个/mL。

[0091] (2) 按照微生物投量与水的比值为0.1%~5%的比例(本实施例采用1%) 在试验用水中投入霍式肠杆菌F2,连续监测20天。同时设立空白组,加入等量的水。

[0092] 结果发现(图7),空白组叶绿素a含量和藻细胞数量在实验周期内有波动变化,但整体上并无明显的上升或者下降趋势。而投加霍氏肠杆菌F2的组在第2天时叶绿素a浓度有小幅上升,但随后开始下降,在第10~12天时下降较为明显,在第16天时水体叶绿素a含量达到最低 $24.1 \mu\text{g/L}$,随后几天,叶绿素a含量有小幅回升。藻细胞浓度显示出了同样的变化趋势。以叶绿素a含量计,霍氏肠杆菌F2对于试验用水中的藻类整体去除率为87.32%,抑藻效果明显。

[0093] 霍式肠杆菌F2抑藻机理探究

[0094] 本实施例以铜绿微囊藻为样品,探究霍式肠杆菌F2的抑藻机理。

[0095] 具体试验步骤如下:

[0096] (1) 取等量霍氏肠杆菌F2菌液,分为4组($n=3$),对四组分别进行以下处理:

[0097] ① 不做任何处理;

[0098] ② 121°C , 0.1Mpa高温灭菌30min;

[0099] ③经0.22 μ m无菌水系纤维素酯微孔滤膜过滤；

[0100] ④4 $^{\circ}$ C下10000rpm/min离心10分钟去上清液加入等体积的无菌LB培养基。

[0101] (2)将四组经过不同处理的霍氏肠杆菌F2菌液(3mL)分别移入装有147mL铜绿微囊藻液锥形瓶中,使混合液的初始叶绿素a浓度为 $1018.0 \pm 50.4 \mu\text{g/L}$,藻细胞数量为 6.6×10^7 个/mL。空白组中加入3mL LB培养基。实验组和空白组均放入温度为25 $^{\circ}$ C、光照强度为2500Lux,光暗比为16h:9h恒温培养箱中进行孵育,以叶绿素a含量和藻细胞数量作为其效果检测指标。

[0102] 结果如图8所示。

[0103] 在投加经不同处理后的霍氏肠杆菌F2菌液后(实验第2天),实验组的叶绿素a浓度低于空白组,藻细胞生长受到抑制。在实验第4天时,各组之间的叶绿素a含量指标差别较明显,其中,空白组叶绿素a含量最高,而不经任何处理的菌液组(组①)叶绿素a含量相比于其他组更低,其原因在于,因为投加了未经任何处理的菌液,菌液中的微生物并没有受到任何影响,从而可以直接起到对藻类生长的抑制作用。其他实验组中,经过不同处理后的菌液也存在一定的抑藻效果,但作用效果要低于未经任何处理的菌液。在经过10天孵育后,空白组叶绿素a含量最高,高温灭菌组(组②)和经过0.22 μ m滤膜过滤的菌液组(组③)中的叶绿素a浓度低于空白组,分别为空白组的74.05%和74.77%。而不经任何处理的菌液组中的叶绿素a含量最低,作用效果最好,叶绿素a含量为空白组的32.4%。离心组(组④)中的叶绿素a浓度几乎和空白相同。从而可以得出,霍氏肠杆菌F2经过高温灭菌和过滤均可以依然保持原来的抑藻特性,但作用效果要弱于未经任何处理的菌液,而离心之后则会失去抑藻特性。由此得出结论,霍氏肠杆菌F2抑藻的作用方式主要为释放胞外物质来实现抑藻效果,且释放的抑藻有效物质热稳定性较好,推测其为非蛋白质类物质。通过以上结论可以初步判断霍氏肠杆菌F2的抑藻作用方式主要以间接作用为主。

[0104] 基于上述推断,进一步采用提取纯化霍氏肠杆菌F2释放的胞外物质进行验证。

[0105] 具体提取步骤为:

[0106] (1)醇沉:

[0107] 将霍氏肠杆菌F2菌液在35 $^{\circ}$ C、120rpm/min恒温摇床中培养48h后,离心机8000r/min离心10min,去除菌液中残留的菌丝体或其它杂质,然后在减压旋转蒸发仪上60 $^{\circ}$ C蒸发浓缩,将离心上清液浓缩为原体积的十分之一。向浓缩后的上清液中加入95%的工业乙醇并将溶液中的醇浓度调节至80%,4 $^{\circ}$ C过夜。次日,8000r/min离心10min,取沉淀置60 $^{\circ}$ C烘箱烘干。

[0108] (2)去除蛋白:

[0109] 取步骤(1)中得到的干品,适量重溶于蒸馏水中,配制成体积比为5%的溶液。加入溶液总体积的20%的sevag溶液(按体积比计,sevag溶液为氯仿:正丁醇=4:1的混合溶液),剧烈震荡10min,8000r/min离心10min。上层溶液与下层sevag溶液之间会出现白色的陈状物(中间层,呈胶体状),取出上层溶液。重复上述操作多次,直至上层溶液与下层sevag溶液之间无陈状物,即去除了溶液中的蛋白。其中,用福林酚法对去除蛋白前后的溶液进行检测,算出蛋白质的去除率。

[0110] (3)透析除盐:

[0111] 取步骤(2)中得到的去除了蛋白的溶液,置于截留分子量为3.5kDa的透析袋中,先

用自来水透析2天,再用超纯水透析2~3天,期间每4h换水一次,用电导仪检测透析效果。若透析外液的电导值与超纯水的电导值在同一数量级,则停止透析,若否,则继续透析至透析外液的电导值与超纯水的电导值在同一数量级。透析液在8000r/min条件下离心10min,取上清液在4℃保存备用。

[0112] (4)分级醇沉:

[0113] 取步骤(3)中得到的溶液,加入95%的乙醇溶液将其醇浓度稀释至30%,4℃静置24h,10000r/min转速离心10min,得30%乙醇沉淀组分。取上清液,加入95%的乙醇溶液将其醇浓度稀释至80%,4℃静置24h,10000r/min转速离心10min,得80%乙醇沉淀组分。取上清液,加入95%的乙醇溶液将其醇浓度稀释至90%,4℃静置24h,10000r/min转速离心10min,得90%乙醇沉淀组分。其中,对比得到的30%乙醇沉淀组分、80%乙醇沉淀组分和90%乙醇沉淀组分的量,80%乙醇沉淀组分的量应最多。

[0114] 经过上述4个步骤的分离,可以得到6种溶液,包括原菌液、原菌液离心后得到的离心上清液、步骤(1)得到的浓缩醇沉液、步骤(2)得到的去蛋白质溶液、步骤(3)得到的透析液、步骤(4)得到的粗糖液(30%乙醇沉淀组分、80%乙醇沉淀组分和90%乙醇沉淀组分复溶于水)。

[0115] 根据提纯方法的选择,可以分析得到每种溶液中所含组分类别的多少,其中,原菌液中所含组分类别最多,其次是离心上清液,随后按照提纯步骤依次递减,其每组溶液中的所含组分类别大致可如表2所示。

[0116] 表2各组溶液中的所含组分类别情况

溶液	组分
原菌液	细菌、蛋白质、糖类、氨基酸、抗生素、多肽、小分子物质等
离心上清液	蛋白质、糖类、氨基酸、抗生素、多肽、小分子物质等
浓缩醇沉液	蛋白质、糖类、氨基酸、抗生素、多肽、小分子物质等
去蛋白质溶液	非游离蛋白质、糖类、氨基酸、抗生素、多肽、小分子物质等
透析液	非游离蛋白质、糖类、多肽等
粗糖液	糖类等

[0118] 取上述各组溶液作为检测样品进行抑藻效果验证,以用于识别霍氏肠杆菌F2中的抑藻活性成分。

[0119] 具体步骤为:

[0120] 按实验藻液体积的2%的量分别加入各组溶液,其中,浓缩后的溶液需换算回浓缩前体积进行投放。在温度为25℃、光照强度为2500Lux,光暗比为16h:9h恒温培养箱中进行孵育,以叶绿素a含量和藻细胞数量变化作为效果验证指标。设置空白组,加入等量的水。

[0121] 结果如图9所示。

[0122] 空白组经过7天孵育后,叶绿素a浓度为758.98μg/L、藻细胞数量为 2.24×10^7 个/mL。而去蛋白质溶液、浓缩醇沉液、离心上清液和原菌液中的叶绿素a浓度相比于空白组更低,有效去除率可达到90%左右,抑藻效果较好。透析液相比去蛋白质溶液、浓缩醇沉液、离心上清液和原菌液的抑藻效果低,有效去除率为58.1%,表明抑藻有效物质经过3.5KDa透析膜透析后部分有效物质被去除。去蛋白质溶液中藻细胞数量为 2×10^5 个/mL。在使用浓缩醇沉液时,藻细胞被絮凝在一起,溶液中游离的藻细胞数较少,可以推测浓缩醇沉液中存在

具有絮凝效果的物质。而且,实验结果还表明随着提取纯化步骤的进行,抑藻效果在不断下降,说明抑藻有效物质在不断减少,尤其是霍氏肠杆菌F2菌液在经3.5KDa透析膜透析抑藻效果显著下降,说明霍氏肠杆菌F2的抑藻有效物质的分子量可能小于3.5KDa。

[0123] 基于上述推断,可知抑藻有效物质应在透析出的溶液中存在,因此,对上述透析除盐中透析出的液体进行GC-MS、红外光谱检测,以对透析出的液体进行物质分析。

[0124] 结果如图10所示。

[0125] 结果发现,上述透析除盐中透析出的液体主要含有吩嗪类物质和灵杆菌素类物质。在对透析除盐中透析出的液体进行检测时,发现其MS出峰0.66min对应MS在144.9与157.1处有峰,与灵杆菌素标准品的145.1和157.1特征峰接近或一致,因此,可以确定透析除盐中透析出的液体中含有灵杆菌素物质。进一步对霍氏肠杆菌F2进行基因测序,发现在溶藻过程前后,均能发现存在可分泌合成灵杆菌素和吩嗪类物质的相关基因的表达。

[0126] 将吩嗪类物质和灵杆菌素类物质标准品作为样品,测试其对于藻细胞的溶解效果。

[0127] 结果如图11~12所示。

[0128] 通过电镜观察,加入吩嗪类物质和灵杆菌素类物质后,藻细胞的藻细胞壁和藻细胞膜出现溶解现象,藻细胞内质粒、细胞核、细胞质流出,藻细胞死亡。

[0129] 同时,针对上述实施例中的阴沟肠杆菌也进行同样的检测,发现其也可以合成分泌吩嗪类物质和灵杆菌素类物质。

[0130] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

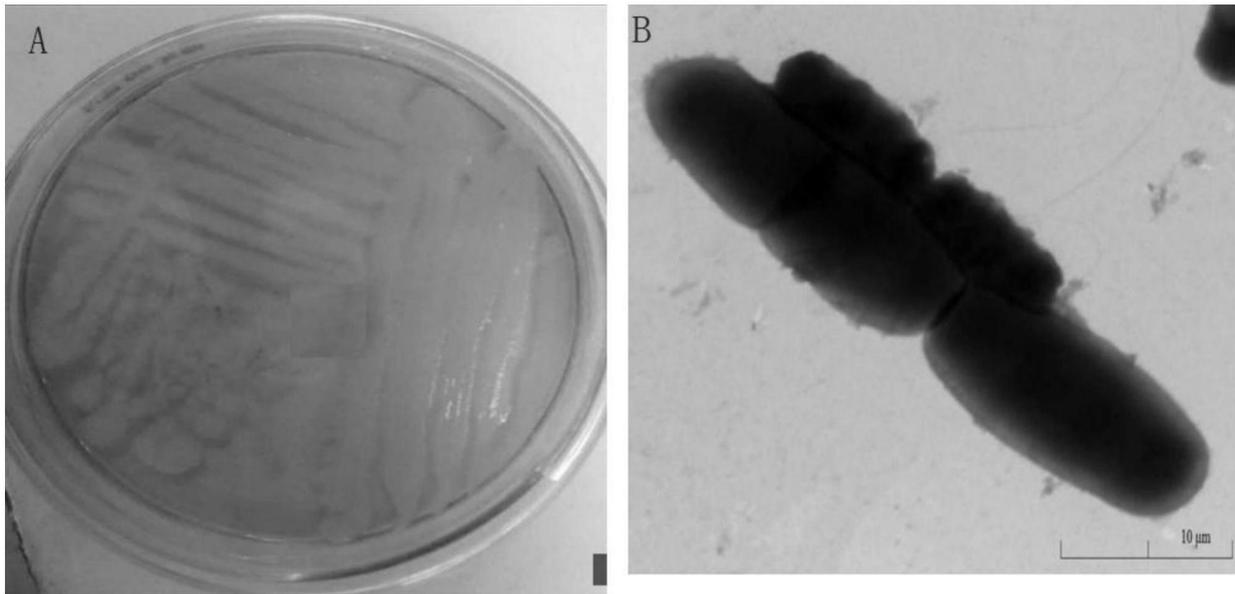


图1

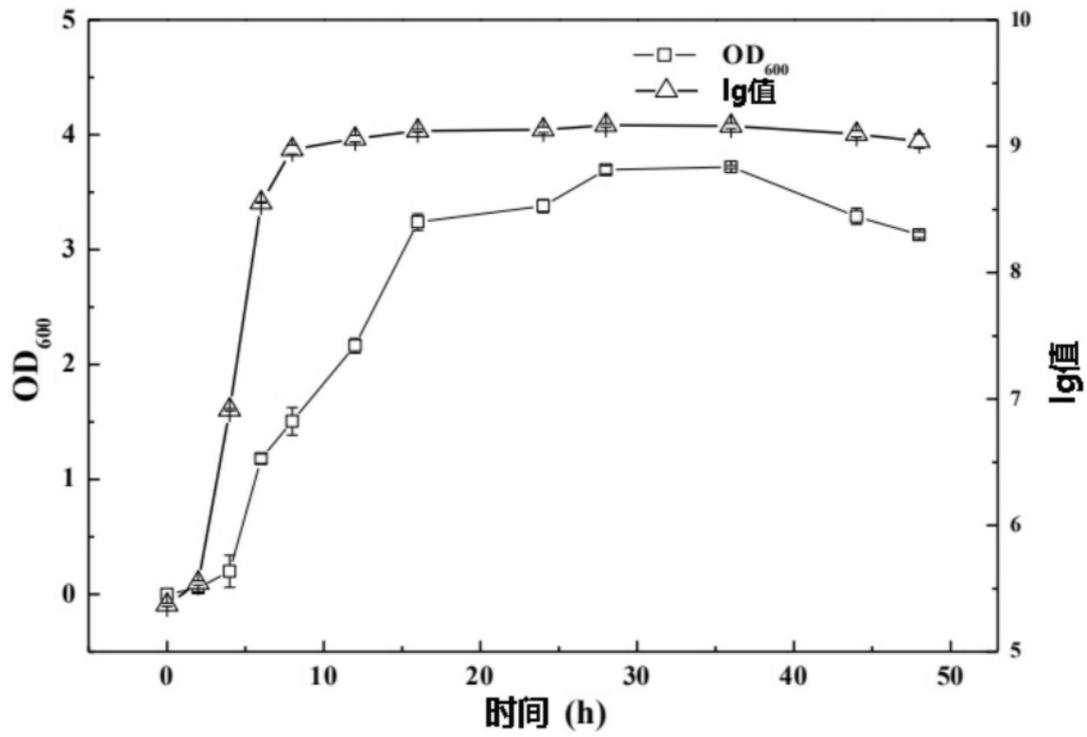


图2

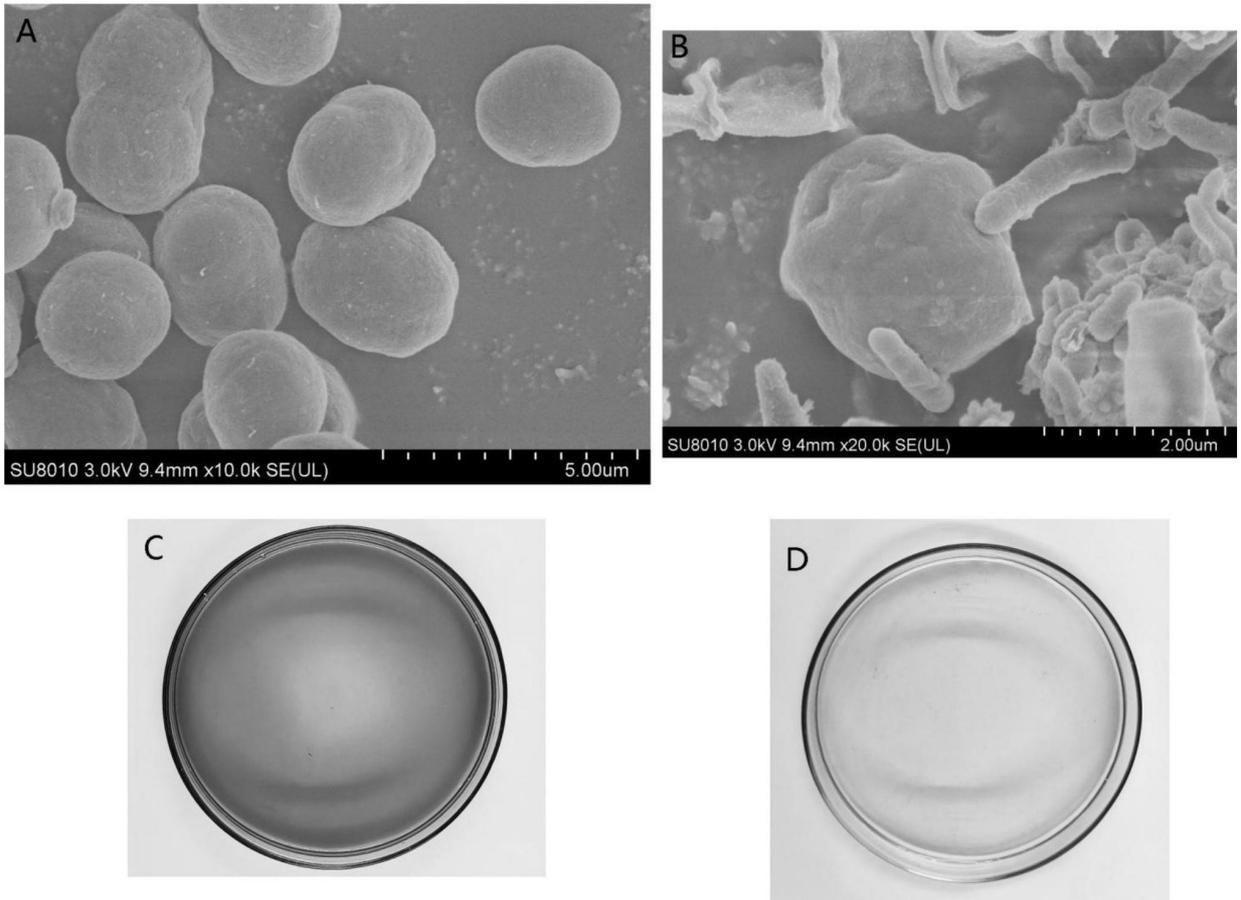


图3

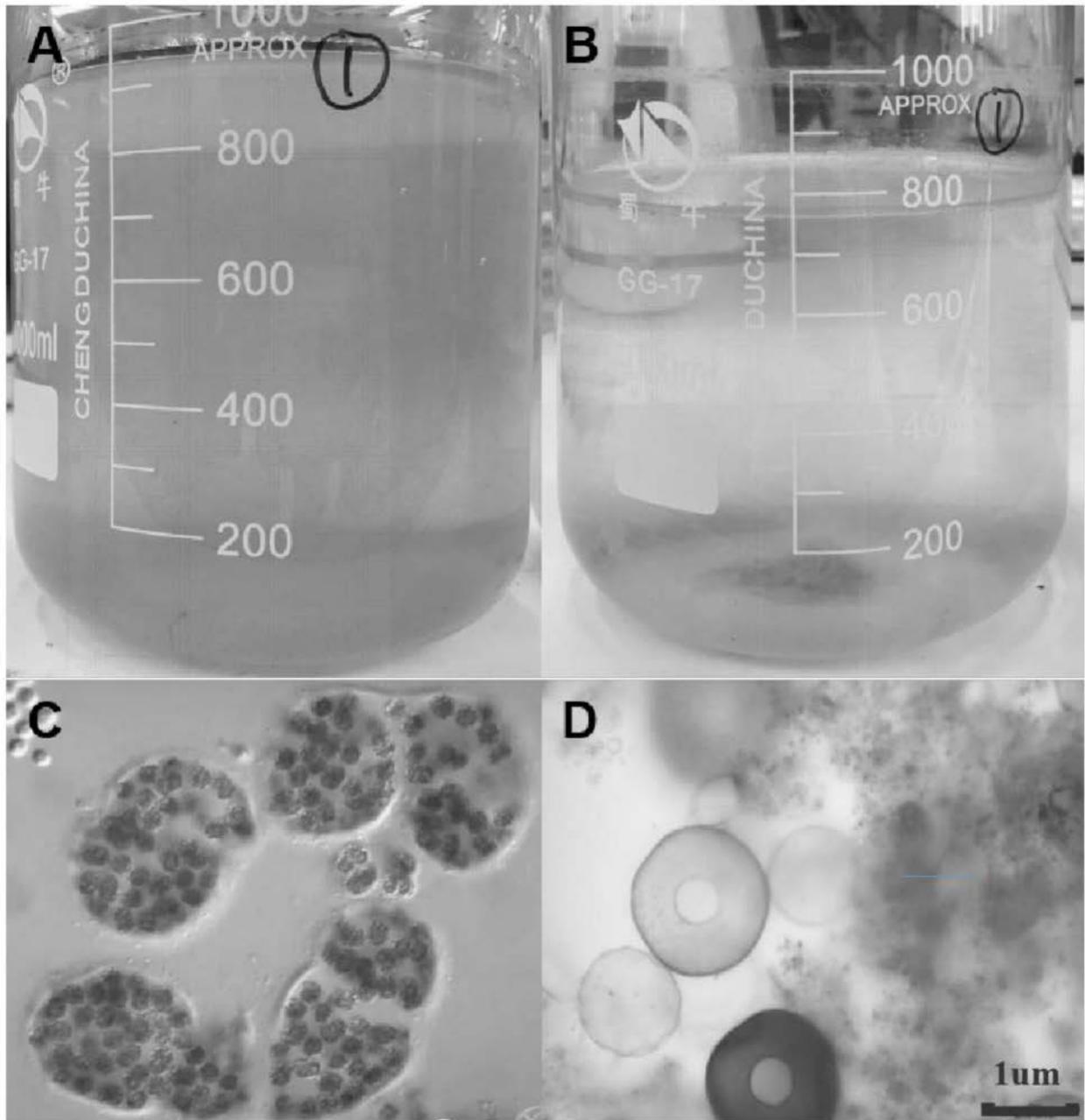


图4

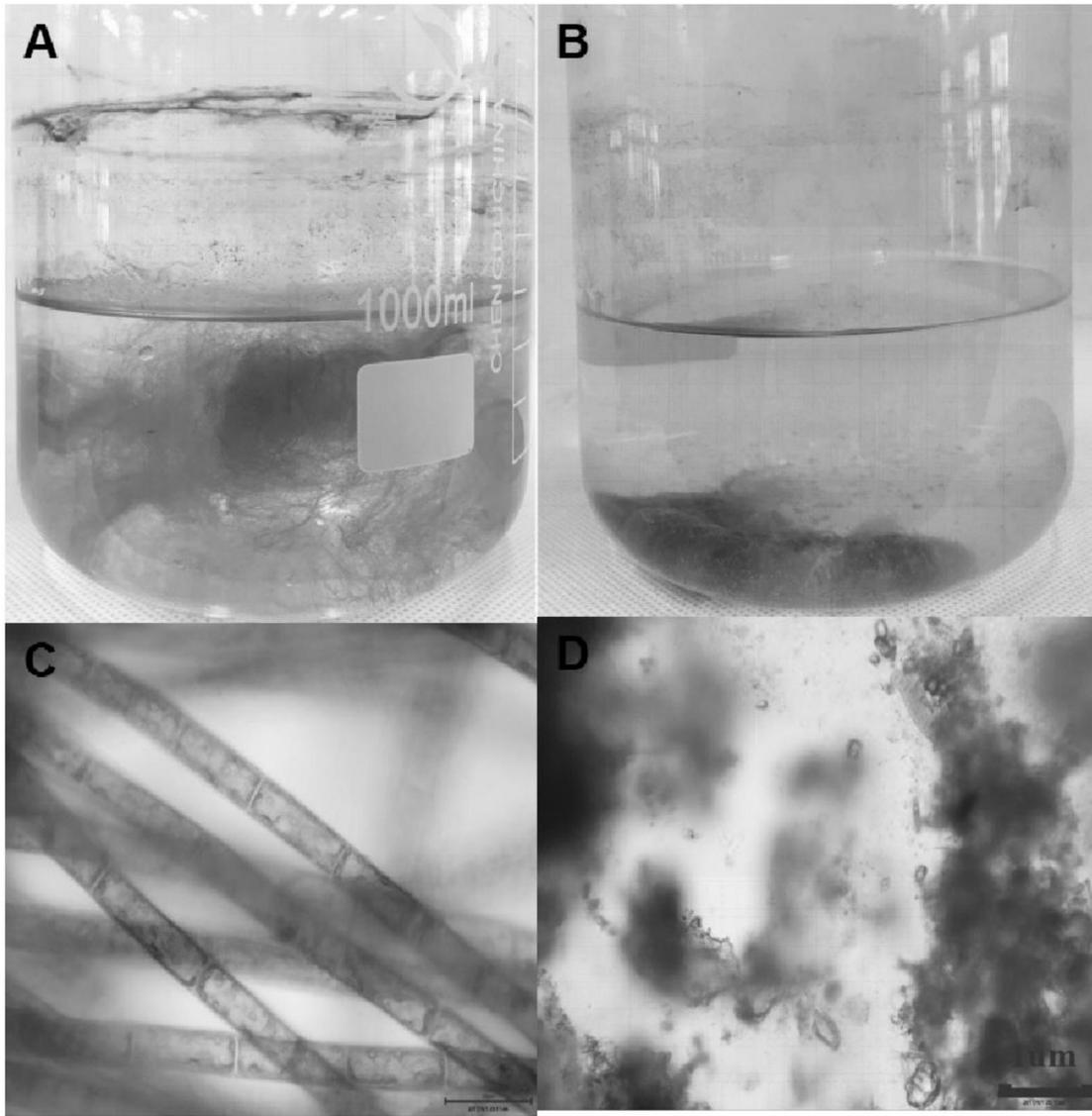


图5

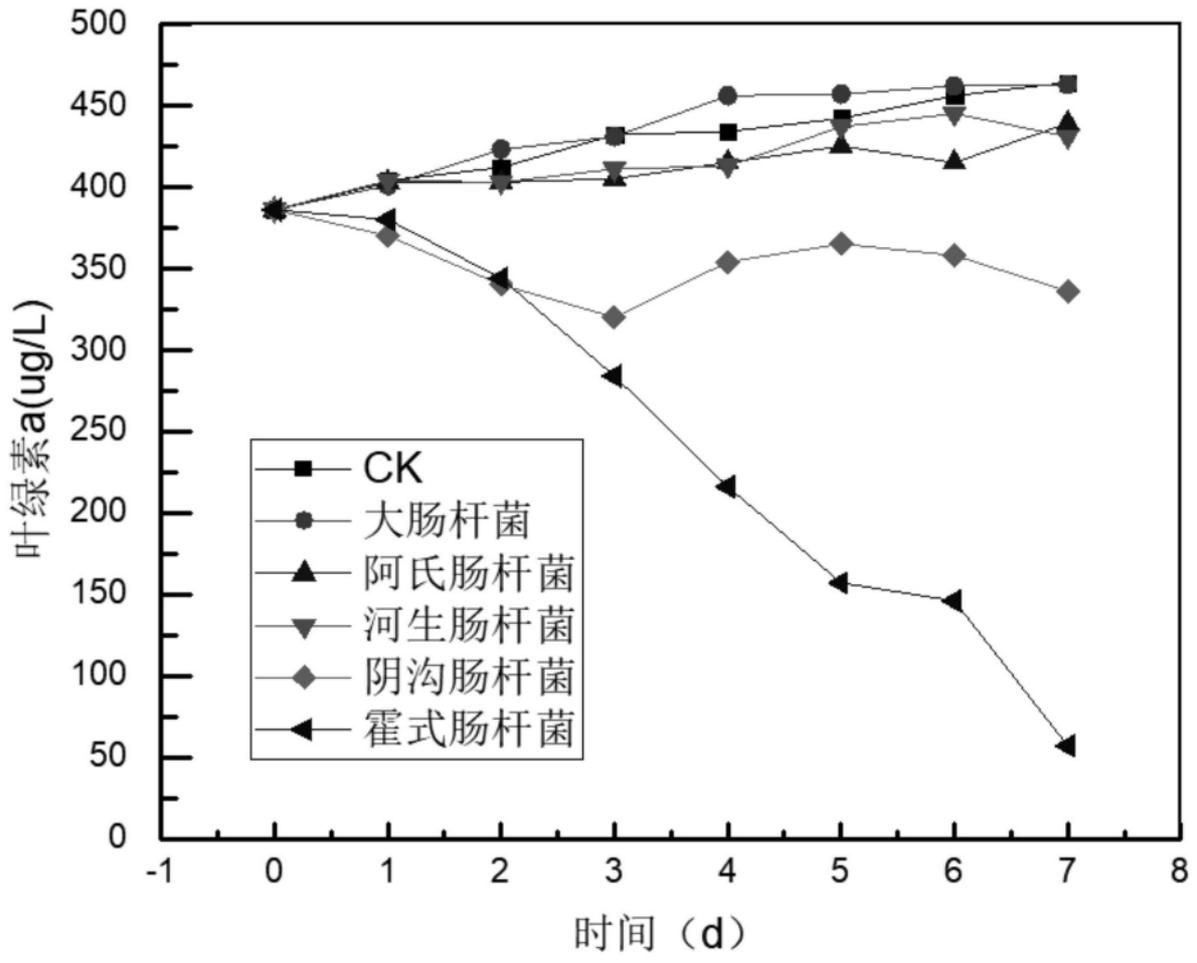


图6

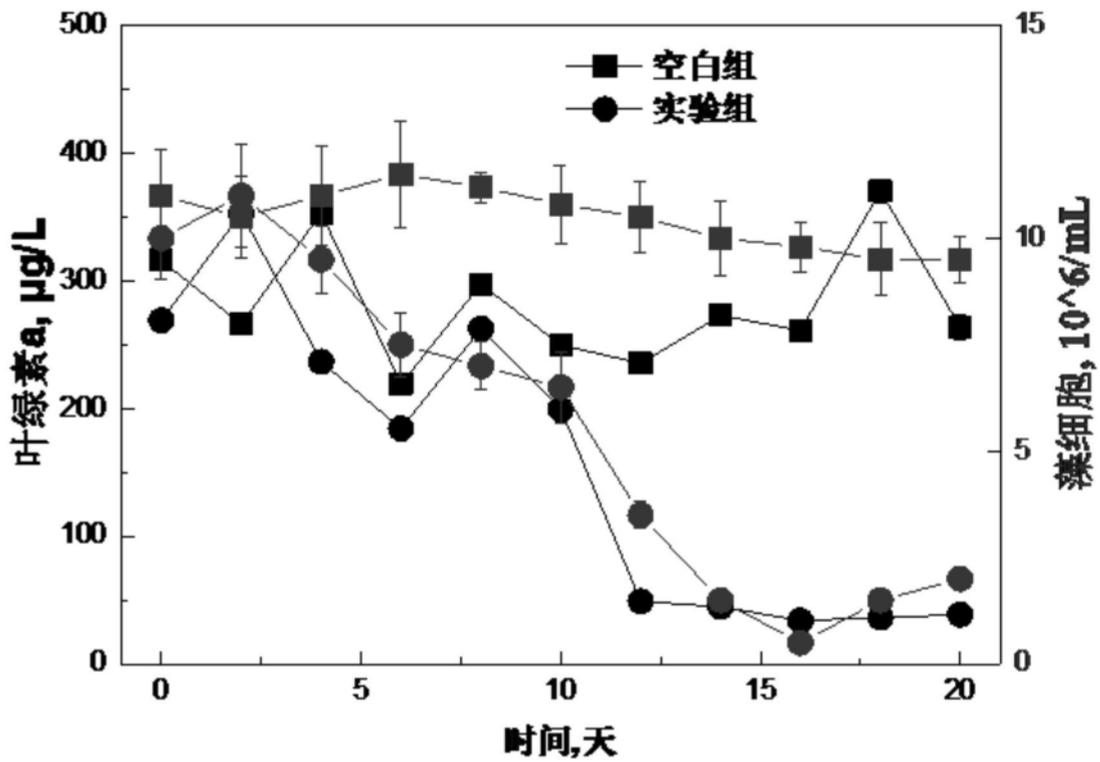


图7

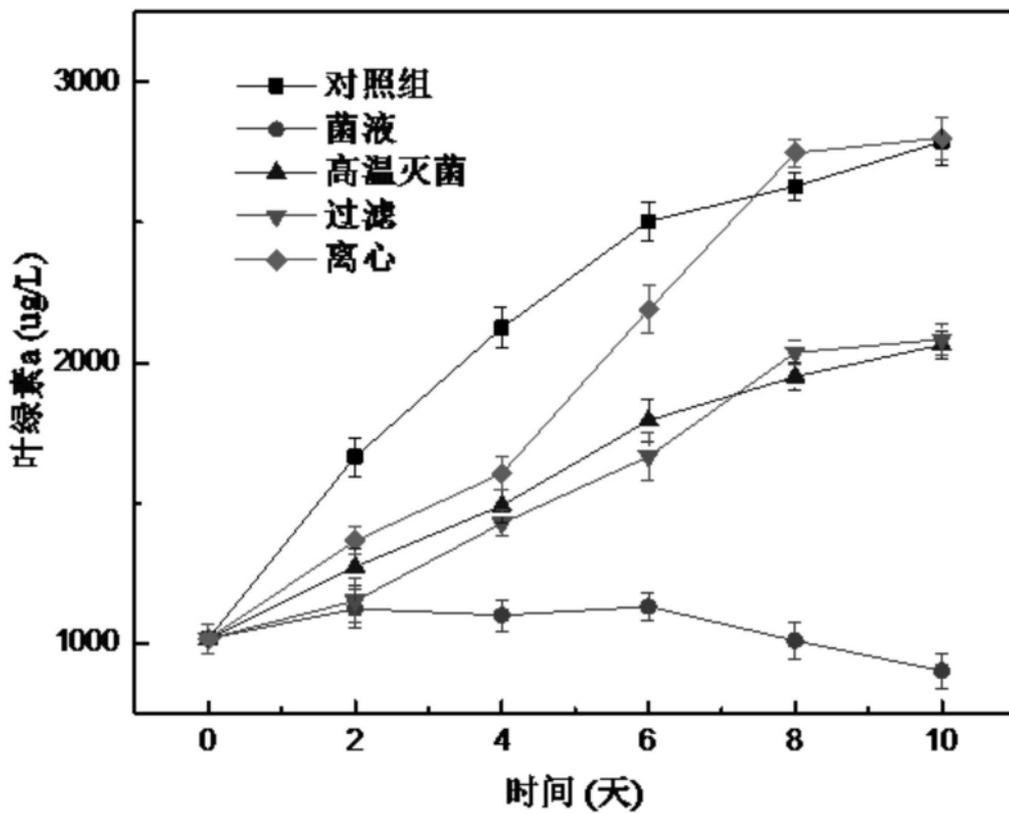


图8

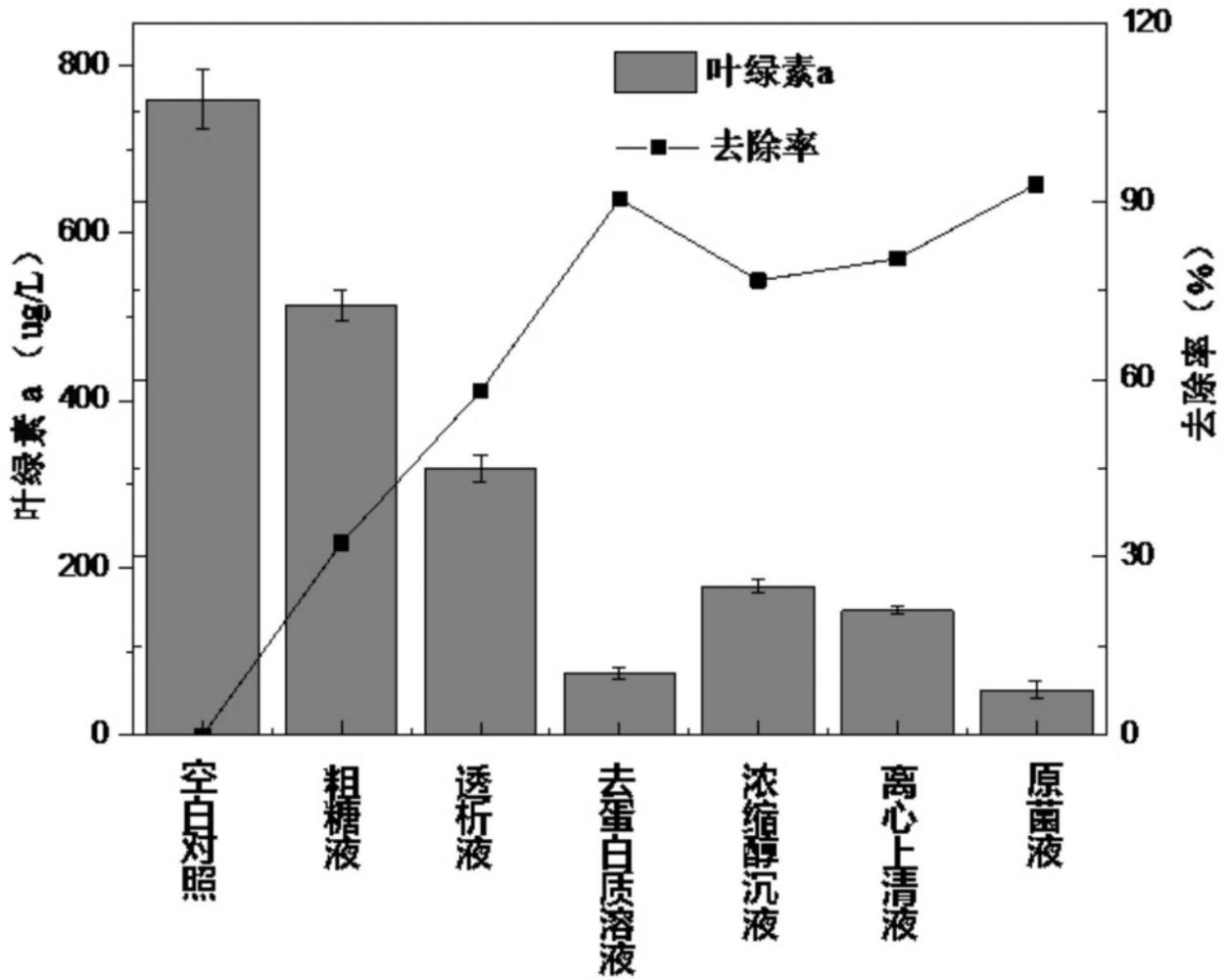


图9

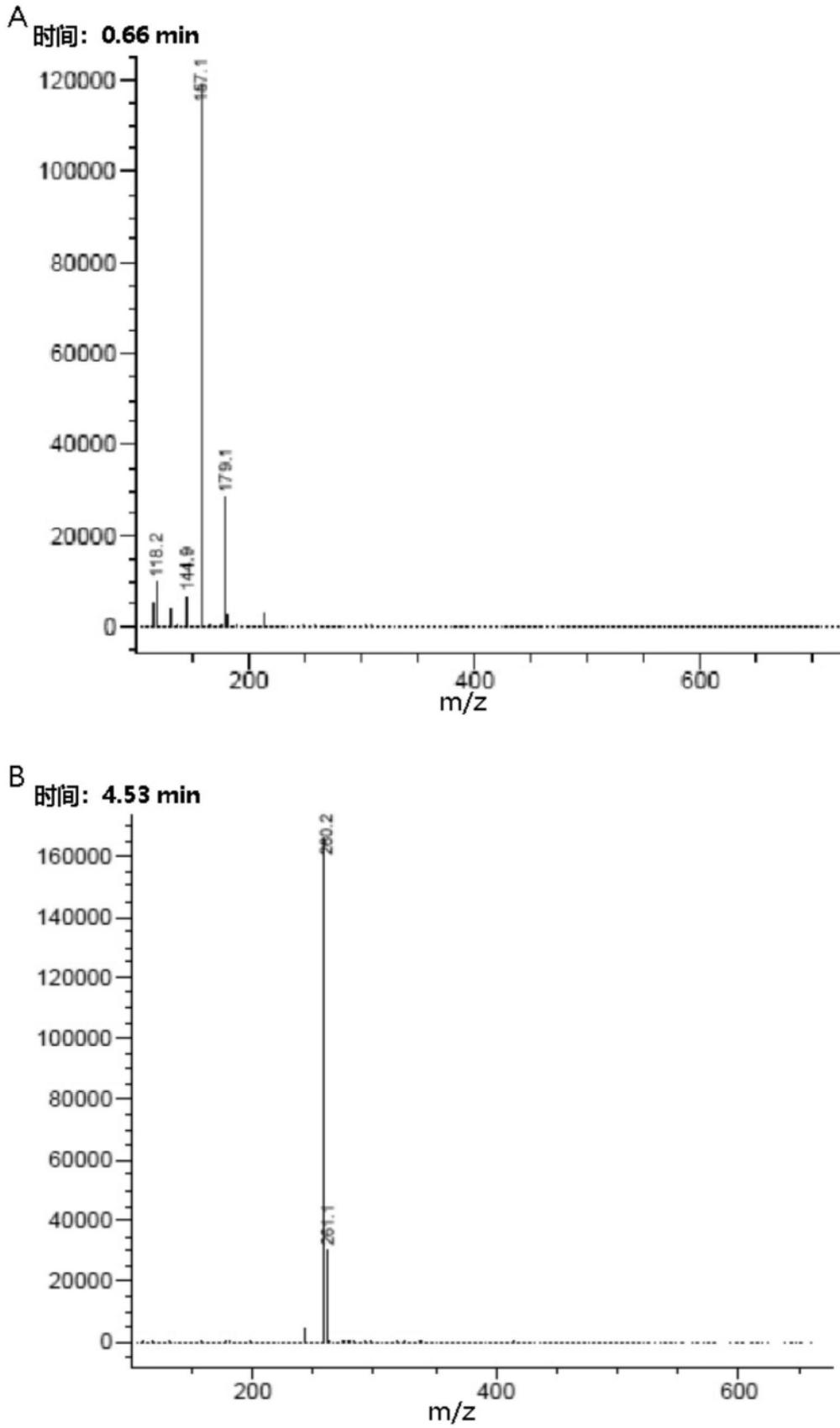


图10

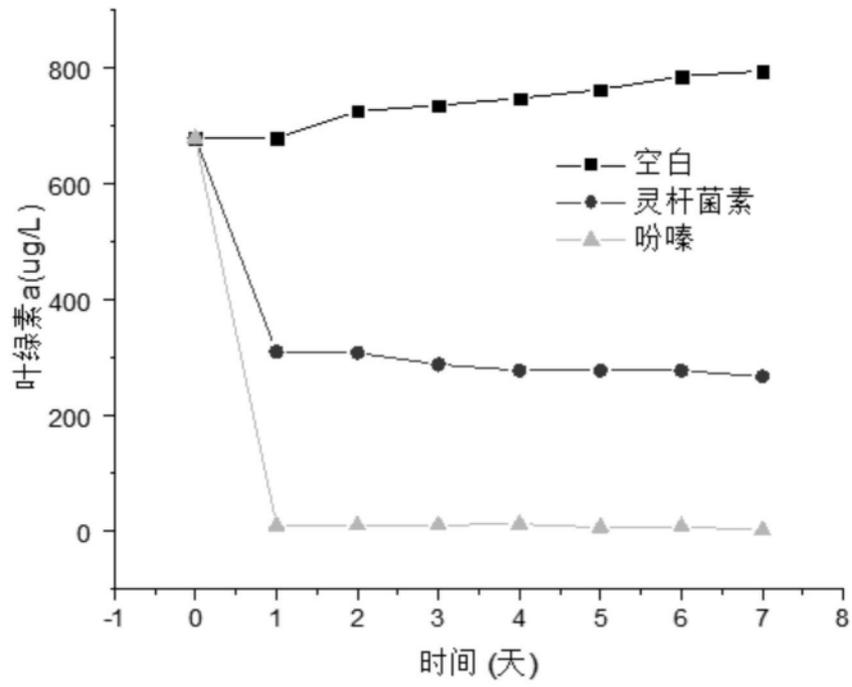


图11

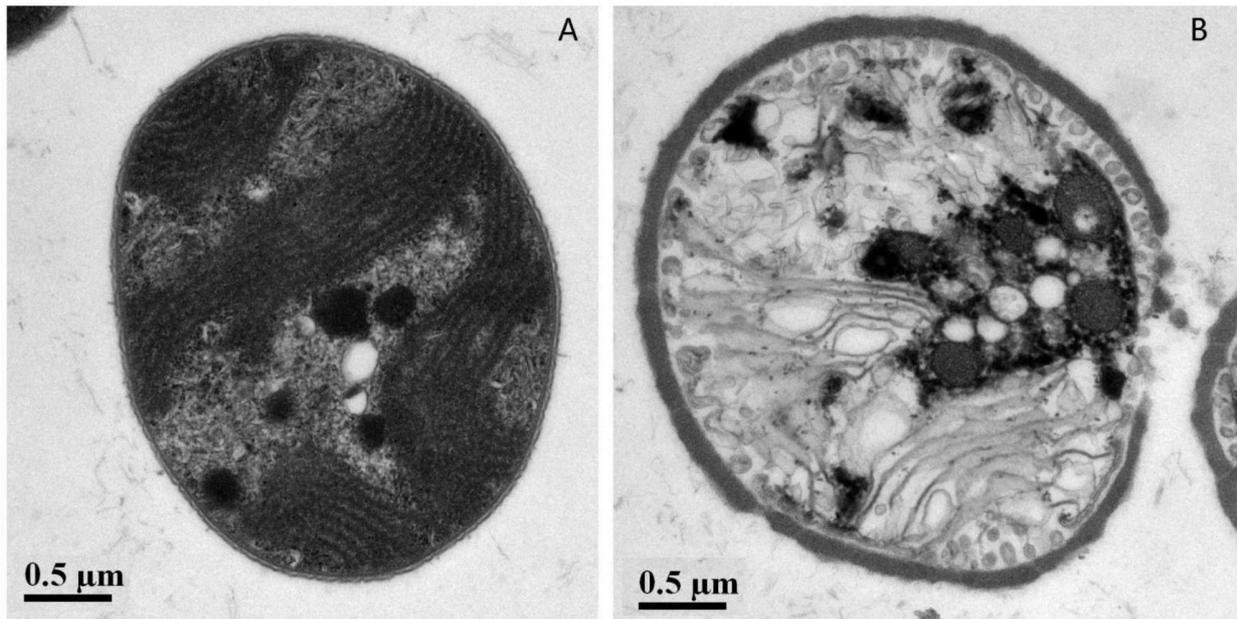


图12