

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.12.008

活性污泥对微藻聚集影响及细菌群落响应研究

丁雨龙, 陈国炜, 施华升, 吴雪菲, 苏馈足, 刘丽

(合肥工业大学土木与水利工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要:针对微藻收集问题,文章以小球衣藻(*Chlamydomonas microspiraera*)为研究对象,探究活性污泥细菌对微藻聚集的影响和微藻聚集对污泥细菌群落结构的影响,揭示菌藻聚集体形成机制。结果表明:污泥细菌的出现能显著促进小球衣藻的聚集,其聚集率随着污泥细菌数量的增加而上升,混合培养时小球衣藻聚集率比纯培养时(聚集率为12.94%)有较大提升,在藻菌细胞数量比为1:10时,聚集率可达62.92%;菌藻体系中菌藻聚集体的胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)分泌量比纯培养微藻上升约163.38 mg/L。对污泥细菌种群变化的分析显示,假单胞菌属 *Pseudomonas* 和根瘤菌属 *Rhizobium* 在促进小球衣藻聚集方面发挥着重要的作用。

关键词:小球衣藻;活性污泥;微藻聚集

中图分类号:X172

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2025)12-1629-09

Effect of activated sludge on microalgae aggregation and bacterial community response

DING Yulong, CHEN Guowei, SHI Huasheng, WU Xuefei, SU Kuizu, LIU Li

(School of Civil and Hydraulic Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: To address the issue of microalgae harvesting, this study took *Chlamydomonas microspiraera* as the research subject to investigate the effect of activated sludge on microalgae aggregation and the impact of microalgae aggregation on the bacterial community structure of the sludge, thereby revealing the mechanisms underlying the formation of bacterial-algal aggregates. The results showed that the presence of sludge bacteria significantly promoted the aggregation of *Chlamydomonas microspiraera* and its aggregation rate increased with the increase of the number of sludge bacteria. The aggregation rate of *Chlamydomonas microspiraera* in mixed culture was higher than that in pure culture (12.94%), and the aggregation rate could reach 62.92% at the ratio of algae to bacteria of 1:10. At the same time, the extracellular polymeric substances (EPS) secretion of the bacterial-algal aggregates increased about 163.38 mg/L compared to the pure culture of microalgae. Analysis of the population change of sludge bacteria showed that *Pseudomonas* and *Rhizobium* played an important role in promoting the aggregation of *Chlamydomonas microspiraera*.

Key words: *Chlamydomonas microspiraera*; activated sludge; microalgae aggregation

单细胞微藻类具有较高的光合效率、较快的生长速度和较高的生产率等优势,正逐渐成为生产新一代生物质燃料的原材料。微藻在生物质燃料里被认为是最有前途的能源之一^[1],然而,微藻

的收集问题一直是藻类制生物质燃料应用的瓶颈。细菌群落在天然水生系统中的微藻聚集中发挥重要作用。文献[2]研究表明,类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)对小球藻表现出较高的絮凝

收稿日期:2023-09-07;修回日期:2025-06-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(42277298)

作者简介:丁雨龙(2000—),男,安徽合肥人,合肥工业大学硕士生;

陈国炜(1976—),女,安徽无为,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:gwchen@hfut.edu.cn;

苏馈足(1977—),女,河北衡水人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师;

刘丽(1972—),女,安徽寿县人,博士,合肥工业大学教授,硕士生导师。

活性,但是需要添加化学絮凝剂(CaCl_2)才能达到最佳絮凝性能。森林土源芽孢杆菌(*Solibacillus silvestris*)生产的生物絮凝剂在没有其他化学凝结剂的情况下可有效地絮凝自由悬浮的海洋微藻(*Nannochloropsis* sp.)。藻类-细菌絮凝与其他传统的收集絮凝方法相比具有明显的优势,比如:微藻细胞不受损伤,并且可以保持聚集体完整性;在广阔的范围内可以重复使用介质,从而减少营养物质的成本和用水需求^[3]。

在生物聚集过程中,微藻和细菌聚集会产生大量絮状物并通过重力沉降下来,过程不使用任何金属和化学絮凝剂^[4],其机理分析近年来成为研究热点。生物絮凝涉及由分泌的生物聚合物引起的微藻絮凝,尤其是胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)^[5]。细菌与微藻共生时通过随机相遇、趋化性、垂直传送等方式接近微藻,通过物理的手段增加了藻际的尺寸,促进藻类的聚集^[6]。微藻和细菌达到了互利共生,如藻类提供给细菌多糖等有机物,而细菌提供给藻类维生素等物质^[7]。

污泥细菌作为天然的自絮凝体具有良好的聚集能力。近年来国内外相关研究较多关注细菌聚集,如生物膜、好氧颗粒污泥形成和调控方面,但是污泥细菌对微藻的聚集作用及其机理的相关研究很少。本文通过将污泥细菌与藻类共培养来探究细菌与微藻细胞的相互作用,通过分析菌藻 EPS 分泌量、藻菌环境中的细菌多样性特征和微生物群落结构,探究污泥细菌对微藻自聚集的影响。

1 实验材料与方法

1.1 实验藻种

实验藻种为小球衣藻(*Chlamydomonas microspira*),编号为 FACHB-52,购自中国科学院野生生物种质库淡水藻种库(中国武汉),在 BDP-250 人工气候培养箱(上海百典仪器设备有限公司)中培养,设置温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度为 2 000 lx,光暗比为 12 h/12 h,接种后瓶口用已灭好菌的透气膜进行封口处理。微藻培养时每天定时摇动 2~3 次,培养基采用 SE 液体培养基,生长周期大约 20 d,培养第 7 天后进入对数生长期。

1.2 污泥细菌

实验污泥取自合肥工业大学市政工程系序批式活性污泥法反应器(sequencing batch reactor activated sludge process, SBR)中正在曝气阶段

的活性污泥,以气单胞菌属 *Aeromonas*、邻单胞菌属 *Plesiomonas*、克雷白氏杆菌属 *Klebsiella* 为主。用 100 mL 烧杯取 30 mL 污泥,加入 0.2% 焦磷酸钠作为解絮剂^[8],在 4°C 下采用 KQ5200DE 超声波振荡器(昆山舒美超声仪器有限公司)以 90% 功率振荡 10 min,然后移至 50 mL 规格的离心管内,将离心管放入 QL-861 旋涡振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)中振荡 10 min,使污泥细菌从污泥中分离出来,再将离心管静置 30 min 后取上清液,采用吖啶橙染色法^[9]进行计数,确定污泥细菌的数量。

1.3 实验设置

在超净台中取 30 mL 处于对数生长期的无菌藻液(1.3×10^6 CFU/mL)放入 50 mL 离心管中,将其离心(2 000 r/min, 10 min)并重新悬浮至 25 mL,然后分别放入 7 个 50 mL 规格的灭菌透明螺口瓶中。藻类和细菌都需要养分和生存空间,藻菌细胞数量比(下文简称“藻菌比”)过高会引起藻类之间的过度竞争和生态失衡,从而导致系统不稳定,难以控制和操作^[10],本文通过设定合适的藻菌比来构建菌藻体系。准备 5 份不同体积的污泥菌液(4.4×10^7 CFU/mL),使其满足藻菌比为 1:0.1、1:1、1:2、1:5、1:10,将其离心(8 000 r/min, 10 min)后舍去上清液,重新悬浮至 5 mL,分别加入 5 个藻液瓶中,确保实验在相同的体积下进行。另外准备 1 组无菌藻液和菌液作为对照。将实验装置放入光照培养箱中培养 6 d,光照培养箱条件与微藻培养条件一致。分别在培养 0、1、2、4、6 d(0 d 表示体系处于初始状态)测定藻类聚集率。实验重复 2 次,每次 3 组平行实验。

1.4 分析方法

1.4.1 微藻聚集率

从藻液瓶中下部取 50 μL 于载玻片上,置于 BA410 生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)下观察拍摄,采用 Motic Images Plus 2.0 软件对微藻图像进行采集拍摄,并随机摄取 15 个视野进行图像分析^[11]。

1.4.2 EPS 的提取和分析

采用改进的 EPS 提取方法^[12]分析菌藻 EPS 成分。首先分别在 0、2、4、6 d 时用灭菌枪头取不同比例的菌藻混合液 2 mL,并加入 1 mL 的 NaOH (1 mol/L),置于 80°C 水浴环境下,以 150 r/min 振荡 40 min^[13];然后加入 1 mL HCl(1 mol/L)中和多余的羟基,在 4°C 、8 000 r/min 下离心 15 min;离

心后取上清液通过 0.45 μm 滤膜过滤,备测提取液蛋白质和多糖。

1) 多糖测定。取 1 mL 合理稀释的滤后样品放入试管中,并加入 3 mL 0.2% 蒽酮硫酸溶液,将试管置于冷水中冷却,充分振荡并立即放入沸水浴中,15 min 后取出,冷水浴 5 min。以超纯水空白样作参比,在 620 nm 波长下使用 UV-2600 紫外分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司)测定其吸光度。多糖的测定采用硫酸-蒽酮法,以葡萄糖为标准物质绘制标准曲线,并计算其质量浓度。每组样品测量重复 2 次,以减小实验误差。

2) 蛋白质测定。采用 Lowry 法,以牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)溶液做标准蛋白绘制标准曲线(全程避光),在 750 nm 波长下测定其吸光度,并根据标准曲线计算蛋白质的质量浓度。每组样品测量重复 2 次,以减小实验误差。

1.4.3 SEM 观察

采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope,SEM)观察微藻聚集体表面和内部结构。吸取适量微藻聚集体置于 5 mm \times 5 mm 硅片(苏州工业园区艾思科技有限公司)上,放入冰箱在 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 4 h,然后放入 BT2KXL 真空冷冻干燥机(美国 VirTis 公司)冷干 8 h。冷干结束进行样品预处理,具体步骤^[14]如下。

1) 固定。将冷干好的微藻聚集体放入 2.50% 戊二醛溶液(pH=6.8)并淹没样品,然后置于冰箱中在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下固定 4 h。

2) 冲洗。固定好的微藻聚集体用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲(phosphate buffer saline,PBS)溶液(pH=6.8)冲洗 3 次,每次 5 min。

3) 脱水。采用梯度乙醇脱水,将冲洗好的样品依次置于体积分数为 30%、50%、70%、80%、90%、100%的乙醇中进行脱水,每次 10~15 min。

4) 置换。用乙醇与乙酸异戊酯体积比为 1:1 的溶液、纯乙酸异戊酯溶液各置换 1 次,每次 30 min。

5) 干燥。将置换后的样品小心取出,放入滤纸叠成的小盒中,置于干燥器内干燥 8 h。

6) 固定和喷金。用镊子小心取出干燥微藻聚集体样品,用导电胶将样品黏附在铝制托盘上,用 IB-5 Giko 型离子溅射镀膜仪在样品表面镀上一层 100 nm 厚度的金属膜。

将处理好的待测样品置于 SUPRA 40 场发射扫描电子显微分析仪(德国 Zeiss 公司)下观察分析。

1.4.4 激光共聚焦显微镜观察

1) 藻的固定。将盖玻片用 0.1 mol/L 盐酸溶液灭菌 30 min,然后依次用无菌水、乙醇水冲洗,表面用氮气干燥,并用 0.1 mg/L 聚-L-赖氨酸溴盐溶液包被 3 h;完成上述程序后,使微藻在其上附着 24 h,然后用 PBS 溶液清洗培养皿盖玻片以除去未黏附细胞^[15]。

2) 染液处理。对 EPS 进行多重荧光染色,以观察微藻-细菌 EPS 的分布情况。

染色完成的样品使用 LSM710 激光共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope,CLSM)(德国 Carl Zeiss 公司)观察。显微镜拍摄的图像使用 ZEN 2012 共聚焦软件处理^[16]。

1.4.5 种群分析方法

本文 DNA 分析采用上海生工生物高通量宏基因组微生物测序方法,具体分析过程如下。

1) 细菌取样。实验取 3 个样品,分别为对照组细菌样品(S1)、接种前污泥细菌样品(S2)、接种后污泥细菌样品(S3)。S1、S2 均为液体样品,直接取样放入 5 mL 离心管中保存;S3 取样是在实验结束后,取藻菌比 1:10 藻菌液里的菌藻混合物 5 mL 用滤纸过滤,然后将附带有菌藻混合物的滤膜放入 5 mL 离心管中。

2) 样品 DNA 预处理。对于液体样品 S1、S2,混匀原始菌液,待样品足够时,取 4 mL 液体样品,分多次加入灭菌的 2 mL 离心管中,以 10 000 r/min 在室温下离心 5 min,弃置上层液体,倒置离心管于吸水纸上 1 min,直至没有液体流出。对于 S3 样品,需剪碎膜样品,使细菌能更多地接触裂解液,破碎细胞壁。注意操作过程中使用的剪刀和镊子先在酒精灯下高温灭菌,适当冷却后再用。

3) 样品 DNA 提取。具体提取步骤参照 OMEGA 试剂盒 E. Z. N. ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 的试剂盒使用说明书。

4) DNA 完整性检测。使用琼脂糖凝胶检测 DNA 完整性。

5) 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增。需要进行 2 轮扩增。在第 1 轮扩增中,利用 Qubit3.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 精确定量,以确定 PCR 需要加入的 DNA 量。PCR 所用的引物为 341F 和 805R,已经融合了 MiSeq 测序平台的 V3~V4 通用引物。341F 引物序列为 CCCTACACGACGCTCTTCGATCTGb(arcode) CCTACGGGNGGCWGC

AG,805R 引物序列为 GACTGGAGTTCCTTG GCACCCGAGAATTCCAGACTACHVGGGTA TCTAATCC。

PCR 体系配制顺序如下: $2 \times$ Taq master Mix $15 \mu\text{L}$, Bar-PCR primer F ($10 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{L}$, Primer R ($10 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{L}$, Genomic DNA $10 \sim 20 \text{ ng}$, 最后加水至 $30 \mu\text{L}$ 。

配制好 PCR 体系后进行 PCR 扩增, 反应程序为: 在 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 运行 3 min , 然后以 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 、 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s 、 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 的顺序进行 5 个循环, 再以 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s 、 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s 、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 的顺序进行 20 个循环, 最后以 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 运行 5 min , 并以 $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 结束。

在第 2 轮扩增中, 引入 Illumina 桥式 PCR 兼容引物, 体系配制步骤为: $2 \times$ Taq master Mix $15 \mu\text{L}$, Primer F ($10 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{L}$, Primer R ($10 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{L}$, PCR products (第 1 轮) 20 ng , 最后加水至 $30 \mu\text{L}$ 。

配制好 PCR 体系后进行 PCR 扩增, 反应程序为: 在 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 运行 3 min , 然后以 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s 、 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s 、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 的顺序进行 5 个循环, 再以 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 运行 5 min , 并以 $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 结束。

待 PCR 扩增结束后, 对产物进行琼脂糖电泳检测。

6) DNA 纯化回收。对于细菌扩增的 PCR

产物和正常扩增片段在 400 bp 以上的 PCR 产物, 采用 0.6 倍的磁珠处理。

7) 定量混合。利用 Qubit3.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量, 以便按照 1:1 的等量混合后测序。等量混合时, 每个样品 DNA 量取 10 ng , 最终上机测序浓度为 20 pmol/L 。

1.4.6 OTU 和多样性指数分析方法

操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 是在系统发生学研究或群体遗传学研究中, 人为给某一个分类单元 (品系、种、属、分组等) 设置的同一标志。本文以 97% 的相似度对所有序列进行 OTU 划分并进行生物信息统计分析。

α 多样性 (α -diversity) 指数是衡量单一微生物样本内部物种丰富度和均匀度的指标, 用于分析独立样品内部微生物种群多样性。本文表示群落分布丰度的指数采用 Chao1 指数和基于丰度的覆盖估计值 (abundance-based coverage estimation, ACE) 指数, 表示群落分布多样性的指数采用香农 (Shannon) 指数、覆盖率 (Coverage) 指数。

2 实验结果与分析

2.1 污泥细菌对微藻聚集的影响

微藻在加入污泥细菌后培养共 6 d, 培养过程中菌藻逐渐聚集, 如图 1 所示。

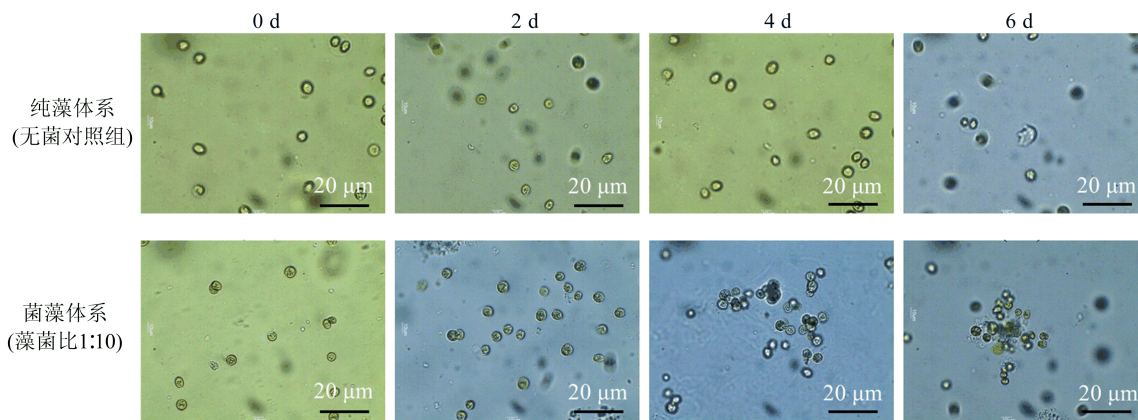


图 1 培养时间内 2 种体系中聚集体的显微图像

从图 1 可以看出:

1) 无菌对照组的小球藻在 6 d 的培养周期内并无显著的变化, 大致呈分散的分布状态, 小部分微藻的聚集可能是由微藻自身的重力聚集导致的。

2) 在藻菌比 1:10 的菌藻体系中, 微藻在 2 d 就已呈现较大的聚集倾向, 随后菌藻聚集体大量形成, 在 4 d 的显微图像可见 4~8 个小球藻团聚在一起, 尺寸为 $10 \sim 15 \mu\text{m}$, 形状较不规则;

在 6 d 的图像中小球藻的聚集数量增多, 尺寸达到 $20 \mu\text{m}$ 以上, 细胞相互紧贴, 并在聚集体周围发现有类似 EPS 的物质。这说明污泥细菌的存在决定了微藻聚集体的形成, 并且随着时间的延长, 聚集体逐渐增大, 微藻聚集数量增加。这与文献[17]的研究结果一致。

藻菌比 1:10 实验组的菌藻聚集体 SEM 图像如图 2 所示。

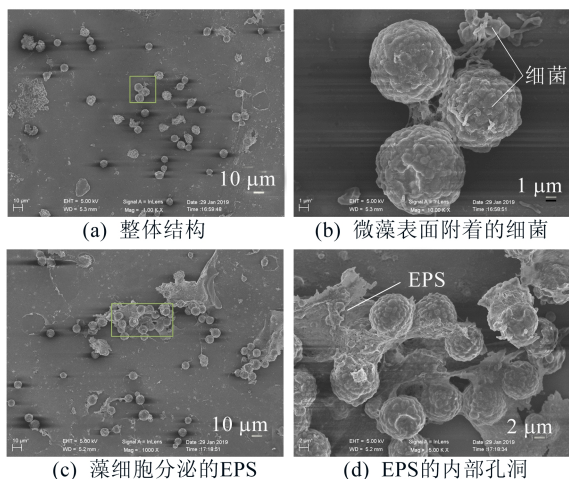


图 2 藻菌比 1:10 实验组的聚集体 SEM 图像

从图 2a 可以看出,发生聚集的小球藻呈 3~5 个细胞聚集状态;图 2b 是图 2a 中黄色方框内图像的放大图,由图 2b 可见微藻聚集体及其上附着的杆状、球状污泥细菌。共生菌成簇生长,并以杆菌为主。已有文献报道菌藻共生体均是以细菌或者微藻作为共生体骨架,且它们以两者间的吸附连结作用形成^[18]。从图 2c 可以看出,在聚集体内部,不均匀分布的 EPS 同样成为小球藻与污泥细菌之间的桥梁, EPS 如微藻的“贴身卫士”分布在聚集体周围,将细菌包裹起来。由图 2d 可知, EPS 内部有较分散的孔洞结构,这为营养物质的进入提供了交换通道,确保了菌藻聚集体的生长代谢。

不同藻菌比下小球藻的聚集率如图 3 所示。从图 3 可以看出,在加入污泥细菌后小球藻的聚集率均有一定提高,且聚集率随时间延长而增大。对照组在整个培养周期内的聚集率未有明显变化,在 8.20%~12.94% 内上下波动,这是由于微藻在实验过程中长时间静止,自身会产生一定的重力沉降。在加入不同比例的细菌后,微藻聚集率显著提升。当藻菌比为 1:0.1 时,小球藻在 1 d 的聚集率已达到 26.99%, 2 d 稍下降为 25.90%, 在 4、6 d 分别降到 11.77%、12.94%。在藻菌比为 1:0.1、1:1 实验组中,有限的污泥细菌数量影响了菌藻聚集体的形成,而造成聚集率上下波动。但是对于藻菌比 1:2、1:5、1:10 的菌藻体系,4 d 的聚集率分别为 24.14%、35.05%、47.73%, 6 d 的聚集率分别上升至 36.77%、55.79%、62.92%。

由此可知,当加入的污泥细菌数量增大时,微藻聚集率上升更加稳定、上升的趋势愈加明显,并

且污泥细菌数量越多,微藻聚集效果越好。

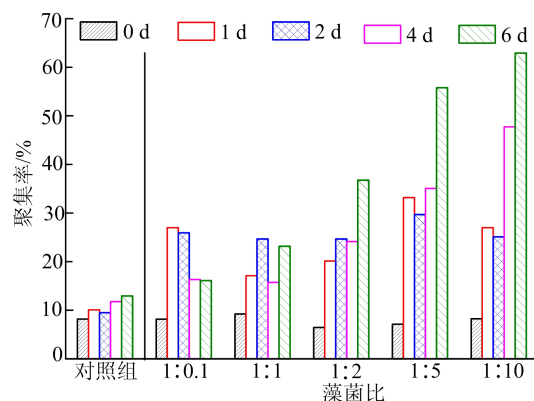


图 3 不同藻菌比下的小球藻聚集率变化

2.2 菌藻 EPS 作用分析

为了进一步揭示菌藻聚集原理,采用 CLSM 对菌藻聚集体 EPS(蛋白质、多糖和脂质)进行分析。

小球藻聚集体的 CLSM 图像如图 4 所示。

从图 4 可以看出,聚集体中 EPS 具有各自的荧光特性,其中蛋白质、 β -多糖、脂质几乎贯穿了整个聚集体。在图 4e 的总细胞图中,可以清楚地看出团聚在一起的菌藻混合物及其周围分布的污泥细菌。蛋白质主要在聚集体外围,主要起到牢不可破的“骨架”作用; β -多糖在聚集体内部均匀分布,这说明多糖对于菌藻聚集的内部稳定性起到支撑作用,而 α -多糖几乎不存在;脂质在整个 EPS 中所占比例较小。

分析细菌聚集的原因,可能是细菌会战略性地移动至食物源处,利用多糖等大分子物质来满足自身生存需要。从图 4f 的合成图可以看出,图像边缘未聚集的藻类蛋白质分布较多,也可能是由于蛋白质导致的高疏水性提高了聚集率。

不同藻菌比下菌藻体系 EPS(蛋白质和多糖)的分泌量、蛋白质与多糖质量浓度之比(ρ (蛋白质)/ ρ (多糖))如图 5 所示。

从图 5 可以看出,总体而言,菌藻 EPS 的分泌量随着时间延长而逐渐增大,污泥细菌数量越多, EPS 分泌量越大。

在 0 d,各藻菌比实验组的 EPS 分泌量无较大差别,蛋白质和多糖的质量浓度分别在 73.85、42.05 mg/L 上下波动。在 2 d, EPS 分泌量稳步上升,随着污泥细菌数量增多,蛋白质的质量浓度从 83.90 mg/L 增大至 117.95 mg/L;同时多糖质量浓度也较 0 d 时有所增加,在藻菌比 1:5 体系中突增至 102.46 mg/L。

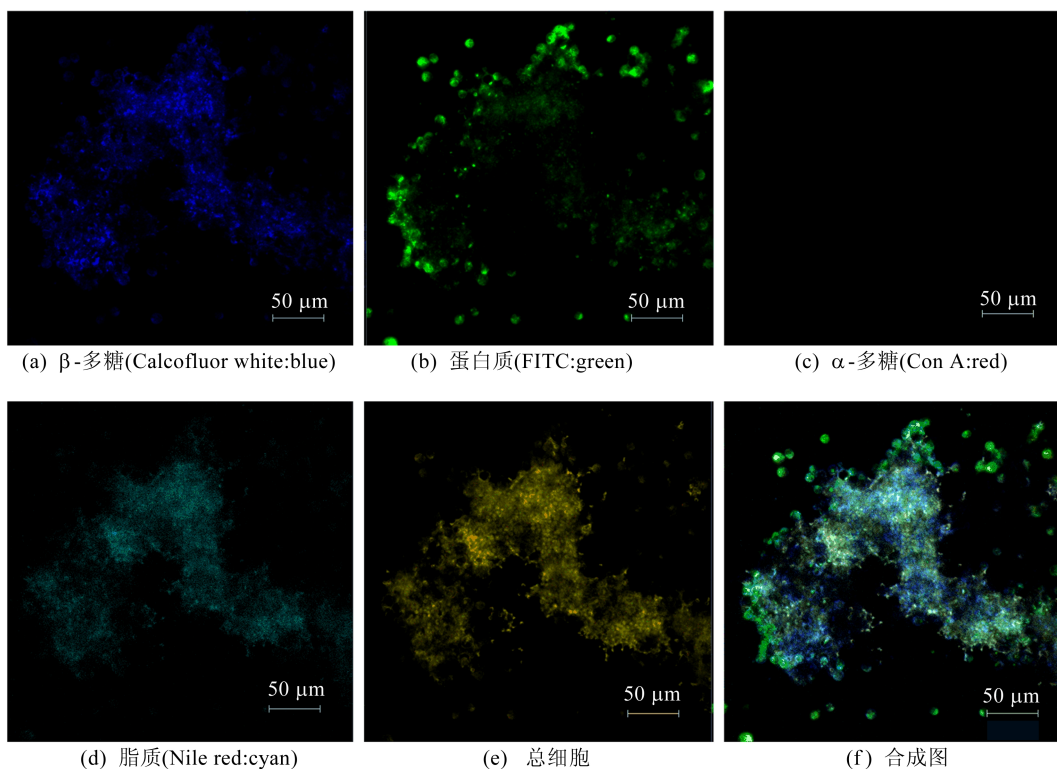


图 4 小球藻聚集体的 CLSM 图像

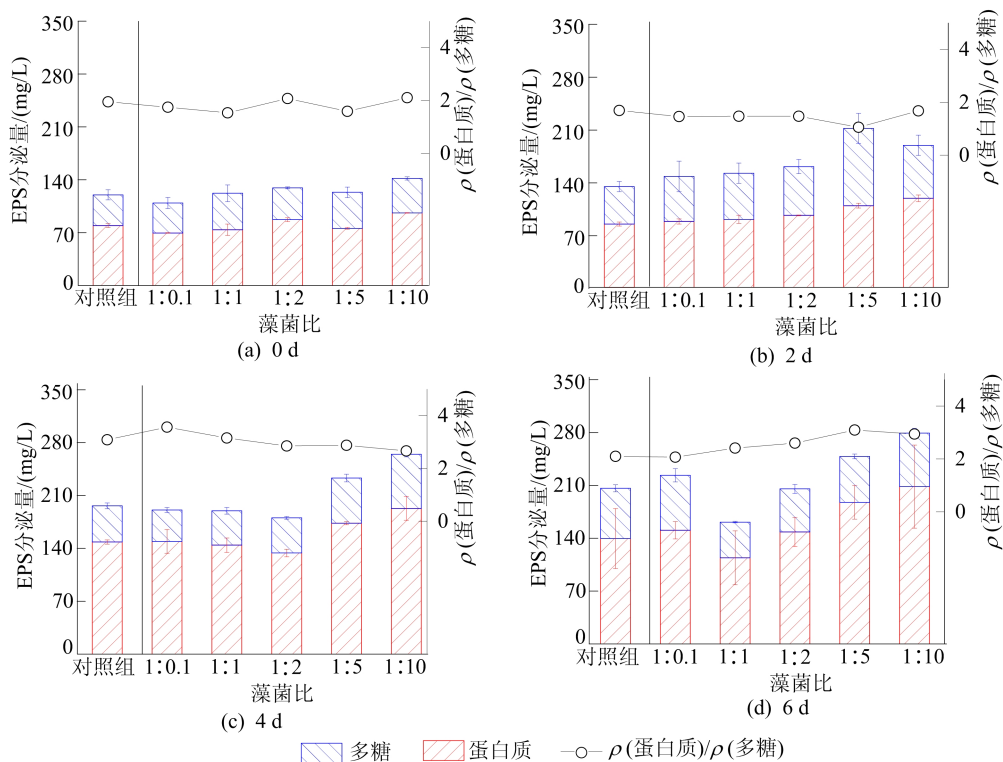


图 5 菌藻体系分泌的多糖和蛋白质质量浓度变化

然而在 4 d, 蛋白质的质量浓度激增, 在藻菌比 1 : 10 体系中达到 192.93 mg/L; 此时多糖质量浓度呈稳定趋势, 与 0、2 d 时相比无显著差别; 由此导致 $\rho(\text{蛋白质})/\rho(\text{多糖})$ 的变化趋势与蛋白质的质量浓度变化趋势相同, 即 $\rho(\text{蛋白质})/\rho(\text{多$

糖) 增大。 $\rho(\text{蛋白质})/\rho(\text{多糖})$ 在 2 d 时约为 1.7, 在 4 d 急剧上升至 2.6 左右, 该比值随细菌数量增大而上升。在 6 d, 微藻 EPS 分泌量继续增大, 蛋白质的质量浓度从 0 d 的 114.11 mg/L 增大至 6 d 的 208.40 mg/L, 增幅为 82.65%, 达到蛋白

质分泌量顶峰;此时多糖质量浓度从 0 d 的 47.29 mg/L 增大至 6 d 的 70.88 mg/L,增幅为 49.88%,蛋白质分泌量始终大于多糖;菌藻体系 $\rho(\text{蛋白质})/\rho(\text{多糖})$ 依旧保持高值,从 0 d 的 2.09 上升到 6 d 的 2.94,增长 40.67%,此时菌藻体系的 EPS 分泌量比纯藻体系上升约 163.38 mg/L。结合小球藻聚集率结果分析,可认为菌藻的蛋白质、多糖分泌量与聚集率呈正相关。

2.3 藻菌环境中细菌多样性分析

利用高通量宏基因组测序技术分别检测 3 个样品(S1、S2、S3)的微生物群落结构,样品的 OTU 分析结果和 α 多样性指数见表 1 所列。

实验共测得 133 611 条有效 16S rRNA,其中对照组细菌样品 S1 有效序列为 41 503 条,接种前污泥细菌样品 S2 有效序列为 52 597 条,接种后污泥细菌样品 S3 有效序列为 39 511 条。对测序结果进行 OTU 分类,相似度为 97%。

由表 1 可知,S1、S2、S3 样品的覆盖率均大于

0.90,说明样品测序结果具有显著代表性,能够代表所测样品的实际情况。

从表 1 可以看出:3 个样品 OTU 数量从大到小依次为接种前污泥细菌样品 S2、对照组细菌样品 S1、接种后污泥细菌样品 S3,这说明污泥细菌加入藻液后完成了激烈的细菌筛选过程;3 个样品 Chao1 指数反映的物种丰度从大到小依次为 S2、S1、S3,ACE 大小比较结果也与 Chao1 指数相同。结合 OTU 数量分布规律,可以看出 3 个样品物种丰度从大到小依次为 S2、S1、S3。

由表 1 可知,3 个样品的香农(Shannon)指数从大到小依次为 S2、S3、S1,未接种污泥细菌多样性明显大于对照组和接种后细菌。这说明在藻菌共生环境下,藻类是有机碳源唯一的生产者,部分不能利用此有机碳源的细菌将被残酷的自然竞争所淘汰,这也是接种后细菌多样性降低的原因;对照组菌液,其处于新限制性有机碳环境里,部分细菌会被自然淘汰,物种多样性严重下降。

表 1 样品 OTU 分析和 α 多样性指数统计分析结果

样品编号	序列条数	OTU 数量	丰度指数		多样性指数	
			ACE	Chao1	覆盖率	Shannon
S1	41 503	3 336	126 838.51	43 604.07	0.93	2.64
S2	52 597	4 163	197 903.15	65 549.11	0.93	3.59
S3	39 511	2 647	92 756.90	37 412.76	0.94	2.80

2.4 藻菌环境中微生物群落结构分析

S1、S2、S3 样品在门水平与属水平上的微生物群落结构柱状图如图 6 所示。图 6 中共列举 6 种丰度超过 1% 的菌门和 15 种丰度超过 1% 的菌属。

在门水平下,变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、装甲菌门(Armatimonadetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)为主要菌门,其中变形菌门(相对丰度占总菌门 46.61%~93.86%)和拟杆菌门(占总菌门 15.25%~38.84%,只在 S2、S3 中出现)为优势菌门,在 S1 中基本没有发现拟杆菌门。次优势菌门有装甲菌门、浮霉菌门、厚壁菌门,其在 S2 中占比分别为 3.20%、0.97%、2.38%,而在 S3 中占比分别为 0.99%、1.71%、1.82%。在限制碳源环境下(S1、S3 样品),变形菌门成为污泥细菌中占比最大的菌门(S1、S3 中分别为 93.86%、77.69%);在接种前污泥细菌样品 S2 中,变形菌门也是优势菌门(46.61%),拟杆菌门成为次优势菌门(38.84%)。由此可知,变形菌门在限制碳源

环境下(S1、S3)和正常环境下(S2)均是占比最高的菌门,说明变形菌门的生长基本上不受碳源的影响;而装甲菌门和芽单胞菌门在限制碳源环境下(S1、S3 样品)占比很小(S1 中分别为 0.08%、0.99%,S3 中分别为 0、0.18%),在 S2 中占比上升(分别为 3.20%、7.05%),说明在菌藻环境的激烈竞争中,装甲菌门和芽单胞菌门利用藻类产生的有机碳得以存活。

在属水平下,假单胞菌属 *Pseudomonas*(占总菌属的 11.57%~55.44%)和金黄杆菌属 *Chryseobacterium*(占总菌属 13.48%~30.46%,只在 S2、S3 中出现)为优势菌属,在 S1 中基本没有发现金黄杆菌属。次优势菌属有丛毛单胞菌属 *Comamonas*、肠杆菌属 *Enterobacter*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*,其在 S2 中占比分别为 13.84%、8.88%、3.81%;其在 S3 中占比相应降低,分别为 3.47%、0.86%、3.96%。厌氧醋菌属 *Acetoanaerobium*、*Soonaerobium* 在 S2 中占比分别为 4.36%、3.70%,其在 S3 中占比为 0(未发现)。紫小杆菌属 *Janthinobacterium* 和微小杆菌属

Exiguobacterium 是 S1 中特有的菌种,在 S1 中占比分别为 33.18%、4.23%。根瘤菌属 *Rhizobium* 在 S3 中占比为 8.32%,而在 S1、S2 中占比

分别为 0、0.3%,近乎消失,这说明根瘤菌属 *Rhizobium* 成功地被藻菌环境筛选出来,可能对藻菌的聚集行为产生积极的影响。

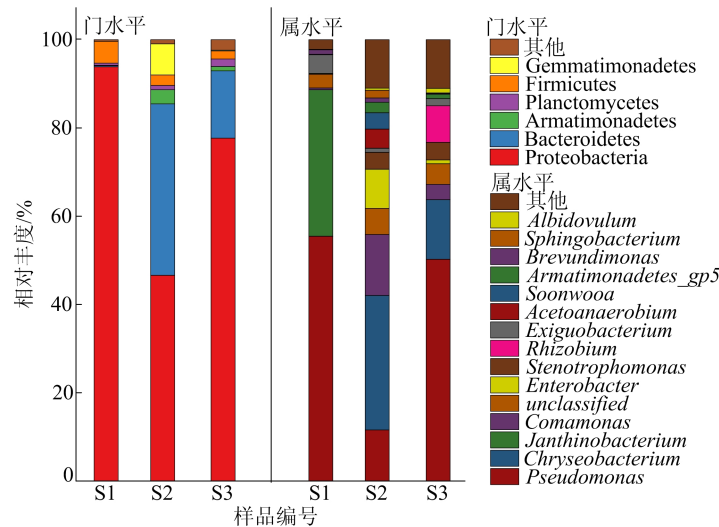


图 6 3 个样品污泥细菌群落结构柱状图

3 讨 论

本文通过实验着重讨论在不同藻菌比下,小球藻聚集率随着时间延长的变化及其机理。实验结果证明,污泥细菌有助于促进小球藻的聚集,且随着污泥细菌的增多,聚集率变大。事实上从简单层次上看,藻类与细菌之间的关系基于资源导向,微藻与细菌之间的相互作用既包括生长所需资源(例如营养素和维生素)的相互交换,也包括限制性无机营养素、颗粒有机碳等的相互竞争^[6]。

对于微藻细胞来说,污泥细菌的加入扰动了原本由单细胞物种组成的体系,从而藻类自身会对此环境变化作出响应。文献[19]发现衣藻在与 *Brachionus calyciflorus* (轮虫) 共培养时会形成四集藻型,通过增加聚集体尺寸的手段来逃避被捕捉的命运。而污泥细菌中异养菌所占比例很大,故其在进入有限碳源环境(微藻)后会竭尽所能地寻找它们可以利用的能源,战略性地移动到微藻聚集体中,与微藻细胞进行着资源互换。

本文实验中 CLSM 图像和微藻 EPS 分泌量显示蛋白类物质在藻菌 EPS 中占主导位置。文献[20]发现,微生物的高疏水性和黏附性通常与细胞表面和蛋白质的存在有关,而高疏水性和黏附性也是聚集体形成的因素之一。另外,本文实验结果显示 $\rho(\text{蛋白质})/\rho(\text{多糖})$ 值在高聚集率下

显著增大,恰恰验证了文献[21]的研究结论, EPS 组分(特别是蛋白质)改变了聚集体的电荷和疏水性,较高的 EPS 分泌量和 $\rho(\text{蛋白质})/\rho(\text{多糖})$ 值有利于聚集体的稳定性。基于这些观察,本文的假设是微藻细胞为了逃避污泥细菌的捕捉加快运动速度,细胞间碰撞几率加大,碰撞时会由于 EPS 分泌量增加和表面电荷的减小而黏附在一起,逐渐形成藻菌聚集体。

结合图 6 分析可知, *Pseudomonas* 和 *Rhizobium* 成为菌藻共生体系下占比较多的菌属。 *Pseudomonas* 菌属表现出大量的代谢多样性,因此能够在广泛的生态系统中生存,并且 *Pseudomonas* 菌群可以产生大量与生物膜形成相关的胞外多糖,有助于微生物的黏附聚集。根瘤菌属 *Rhizobium* 是与豆科植物共生、形成根瘤并固定空气中的氮气供给营养的一类杆状细菌,是能促使植物异常增生的一类革兰氏染色阴性需氧杆菌。文献[22]研究发现,衣藻与根瘤菌共培养一段时间后,其会向衣藻细胞聚集,形成特殊的“团聚体”;文献[23]的研究也揭示了根瘤菌对于布朗葡萄藻的生长具有促进作用。本文猜测在菌藻体系内,根瘤菌通过固氮作用为微藻提供氮源,同时,根瘤菌汲取衣藻所分泌的多糖和释放的氧气供给自身生存所需,两者依靠营养物质相互吸引聚集,形成互利共生关系。因此,根瘤菌在菌藻团聚过程中起着重要的促进作用。

4 结 论

1) 污泥细菌的出现能显著促进小球藻的聚集。纯培养小球藻的聚集率仅为 12.94%,混合培养时其聚集率随着污泥细菌数量的增加而上升,在藻菌比为 1:10 时,聚集率可达 62.92%。

2) 菌藻聚集体的 EPS 分泌量比纯培养微藻上升约 163.38 mg/L,污泥细菌数量越多, EPS 分泌量越大。

3) 菌藻环境致使污泥细菌种群多样性降低,部分细菌被筛选出来参与菌藻共生。占据优势的 *Pseudomonas* 菌群有助于细胞黏结,而固氮菌 *Rhizobium* 在菌藻聚集体中被大量发现,与藻类互生,有助于菌藻聚集体的形成和稳定。

【参 考 文 献】

[1] SUN X M, REN L J, ZHAO Q Y, et al. Enhancement of lipid accumulation in microalgae by metabolic engineering[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, 1864(4): 552-566.

[2] OH H M, LEE S J, PARK M H, et al. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 1229-1234.

[3] ALAM M A, VANDAMME D, CHUN W, et al. Bioflocculation as an innovative harvesting strategy for microalgae [J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2016, 15: 573-583.

[4] 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.

[5] CHRISTENSON L, SIMS R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 686-702.

[6] SEYMOUR J R, AMIN S A, RAINA J B, et al. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17065.

[7] CROFT M T, LAWRENCE A D, RAUX-DEERY E, et al. Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria[J]. *Nature*, 2005, 438: 90-93.

[8] 郭建博,周集体,王栋,等.降解偶氮染料耐盐菌 GTY 的分离鉴定及特性研究[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(2): 201-205.

[9] LEHTOLA M J, LAXANDER M, MIETTINEN I T, et al. The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes[J]. *Water Research*, 2006, 40(11): 2151-2160.

[10] YE J F, LIANG J Y, WANG L, et al. Operation optimization of a photo-sequencing batch reactor for wastewater

treatment: study on influencing factors and impact on symbiotic microbial ecology[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 252: 7-13.

[11] CHEN G W, ZHU N, TANG Z B, et al. Resource availability shapes microbial motility and mediates early-stage formation of microbial clusters in biological wastewater treatment processes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98: 1459-1467.

[12] SHEN G Z, QU D, LI K P, et al. Composition of extracellular and intracellular polymeric substances produced by *Scenedesmus* and *Microcystis*[J]. *Environmental Engineering Science*, 2017, 34(12): 887-894.

[13] XU H C, YU G H, JIANG H L. Investigation on extracellular polymeric substances from mucilaginous cyanobacterial blooms in eutrophic freshwater lakes [J]. *Chemosphere*, 2013, 93(1): 75-81.

[14] CHEN X H, ZHANG C, TAN L J, et al. Toxicity of Co nanoparticles on three species of marine microalgae[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 454-461.

[15] WONG D M, FRANZ A K. A comparison of lipid storage in *Phaeodactylum tricorutum* and *Tetraselmis suecica* using laser scanning confocal microscopy[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 95(2): 122-128.

[16] CHEN M Y, LEE D J, TAY J H, et al. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75: 467-474.

[17] 赵冉冉.单细胞藻类在水体中聚集行为的环境因子解析[D].合肥:合肥工业大学,2017.

[18] VAN DEN HENDE S, VERVAEREN H, DESMET S, et al. Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment[J]. *New Biotechnology*, 2011, 29(1): 23-31.

[19] KHONA D K, SHIROLIKAR S M, GAWDE K K, et al. Characterization of salt stress-induced palmelloids in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Algal Research*, 2016, 16: 434-448.

[20] KOS B, ŠUŠKOVIĆ J, VUKOVIĆ S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 94(6): 981-987.

[21] ZHANG Z, QIU J, XIANG R, et al. Organic loading rate (OLR) regulation for enhancement of aerobic sludge granulation: role of key microorganism and their function[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 653: 630-637.

[22] 许丽丽. 莱茵衣藻与根瘤菌共培养提高产氢及其生理生态学机理[D].上海:华东师范大学,2014.

[23] RIVAS M O, VARGAS P, RIQUELME C E. Interactions of *Botryococcus braunii* cultures with bacterial biofilms [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60: 628-635.

(责任编辑 张淑艳)