

牛粪堆肥中溶解性有机物对铜绿微囊藻生理生化及产毒特性的影响

林毅青, 吴根义, 许振成, 邵继海*

(湖南农业大学资源环境学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 提取牛粪堆肥中的溶解性有机物(dissolved organic matter, DOM), 并将 DOM 转移至含有铜绿微囊藻 *Microcystis aeruginosa* FACHB905 细胞的培养液中, DOM 含量以溶解性有机碳(DOC)质量浓度进行衡量, 分别控制培养液中 DOC 的终质量浓度为 0、15、30、60、90、120 mg/L(分别记为 CK、T1、T2、T3、T4、T5)。通过测定藻细胞密度、色素含量和藻毒素含量, 研究 DOM 对铜绿微囊藻生理生化及产毒特性的影响。结果表明: 1) *M. aeruginosa* FACHB905 受 DOM 影响, 在处理第 2 天, 各 DOM 处理的细胞密度与 CK 相比均有所增加, T4 处理的细胞密度(5.97×10^6 个/mL)最大, 比 CK 增加了 21.67%, 处理后第 4 天, T1、T2、T3 处理均能够促进细胞生长, T2 处理的细胞密度(9.23×10^6 个/mL)最大, 比 CK 增加了 15.27%, 而 T4、T5 处理抑制细胞生长, 处理后第 6 天, 仅 T1 及 T2 处理能够促进细胞生长, T1 处理的细胞密度(13.34×10^6 个/mL)最大, 比 CK 增加了 10.35%, 而 T3、T4、T5 处理抑制细胞生长; 2) 堆肥来源 DOM 能够抑制藻毒素的合成, 单位细胞藻毒素 Microcystin-LR 含量在处理第 2 天 T5 处理的最低, 比 CK 下降了 53.13%, 而 Dha7-Microcystin-LR 含量在处理第 4 天 T5 处理的最低, 与 CK 比较下降了 78.51%; 3) 各 DOM 处理对单位细胞内 Chl- α 和 Carotenoid 的合成无明显影响。

关 键 词: 牛粪堆肥; 溶解性有机物(DOM); 铜绿微囊藻; 藻细胞密度; 藻毒素

中图分类号: X713

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)03-0315-05

Effects of DOM in compost of cattle's manure on the physiological and toxin-producing characteristics of *Microcystis aeruginosa* FACHB905

LIN Yiqing, WU Genyi, XU Zhencheng, SHAO Jihai*

(College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Dissolved organic matter (DOM) originated from compost of cattle manure had been extracted and added to *Microcystis aeruginosa* FACHB905 to study its effects on the physiological and toxin-producing characteristics via the determination of cell growth, pigments content and algal toxins content. The concentration of DOM was evaluated by using dissolved organic carbon (DOC). The final concentrations of DOC designed for cultural medium, marked as CK, T1, T2, T3, T4 and T5, were 0, 15, 30, 60, 90 and 120 mg/L, respectively. The results showed that: 1) Cell density influenced by DOM increased in treatments T1 to T5 at day 2; The maximum growth rate occurred in treatment T4 (5.97×10^6 cells/mL) at day 2, with a 21.67% increase than that of CK. DOM could increase cell growth in treatments T1 to T3 but inhibit cell density in treatments T4 and T5 at day 4, the maximum growth rate occurred in treatment T2 (9.23×10^6 cells/mL) with a 15.27% increase than that of CK. DOM could only promote the cell growth in treatments T1 and T2, but inhibit cell density in treatments T3 to T5 at day 6, the maximum growth rate occurred in treatment T1 (13.34×10^6 cells/mL) with a 10.35% increase than that of CK. 2) Compost source of DOM inhibited the synthesis of algal

toxins, the lowest content of Microcystin-LR in cells was occurred in treatment T5 at day 2, with a 53.13% decrease than that of CK. The lowest content of Dha7-Microcystin-LR in cells was occurred in treatment T5 at day 4, with a 78.51% decrease than that of CK. 3) There was no significant effect among DOM treatments on the synthesis of Chl-a or carotenoid in cells.

Keywords: compost of cattle manure; dissolved organic matter (DOM); *Microcystis aeruginosa* FACHB; cell density; microcystins

近年来, 农业面源污染已超过工业生产污染。农业生产所造成的环境问题日益突出^[1-2]。随着中国农业产业结构的调整和新型畜禽养殖模式的构建, 规模化养殖技术水平得以提升, 大量畜禽粪便随之产生。这些粪便如果不经处理就难以被周边土地消纳。畜禽粪便随意堆放已对大气环境、水质安全和土壤微生物多样性造成了严重影响^[3-4]。

粪便高温堆肥与利用是农业可持续发展的重要组成部分, 也是目前世界上实现畜禽粪便资源化最常见和最有效的方法之一^[5]。畜禽粪便和粪便堆肥中丰富的 N、P 等营养元素及溶解性有机物质(dissolved organic matter, DOM)可随灌溉排水、降水等向自然水体、湖泊迁移, 水体富营养化和水质方面的问题随之出现。目前, 有关堆肥的研究主要是针对 N、P、K 等营养元素含量以及不同 C/N 调控对农作物生长的影响等^[6-9], 而针对堆肥来源 DOM 对水生生物影响的研究尚少。蓝藻水华优势种 *Microcystis aeruginosa* FACHB905 属于蓝藻门(Cyanophyta)微囊藻属(*Microcystis*)。笔者对牛粪堆肥中 DOM 进行提取, 以 1 株 *M. aeruginosa* FACHB905 为受试对象, 对堆肥中 DOM 作用于蓝藻细胞的生理生化和产毒特性进行研究。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

牛粪堆肥采自湖南畜牧兽医研究所内的有机肥厂。试验菌株 *M. aeruginosa* FACHB905 由中科院水生生物研究所(武汉)提供。

1.2 方法

1.2.1 藻细胞的培养与计数

将接种于 BG-11 培养基^[10]中的 *M. aeruginosa*

FACHB905 置于人工气候培养箱中扩大培养。培养温度为(25±1)℃, 光照度为 30 μmol/(m²·s), 明暗周期比为 12 h : 12 h。采用血球计数板法测定细胞密度, 在显微镜下记录细胞数。

1.2.2 各 DOM 处理的设计

将风干、研磨后的堆肥肥料过 2 mm 筛, 按 1 : 20(W/V)的比例将肥料(干重)和超纯水混合, 于(22±2)℃、200 r/min 震荡 24 h, 随后以 12 000 g、4℃离心 20 min, 收集上清液, 过 0.45 μm 滤膜, 滤液即为堆肥 DOM 溶液。将 DOM 转移至含有铜绿微囊藻 *M. aeruginosa* FACHB905 细胞的培养液中, 测定 DOM 中溶解性有机碳(DOC)的质量浓度, 按 DOC 质量浓度设置 0、15、30、60、90、120 mg/L 共 6 个处理(分别记为 CK、T1、T2、T3、T4、T5)。DOC 浓度采用 Vario TOC select 仪器测定。

1.2.3 藻细胞中色素浓度的测定

M. aeruginosa FACHB905 细胞内叶绿素(Chl-a)、类胡萝卜素(Carotenoid)浓度采用紫外可见分光光度计测定^[11]。取 4 mL 藻液于 10 mL 离心管中, 在 10 000 g、4℃条件下离心 10 min, 弃上清液, 加入 4 mL 80%的丙酮, 于 4℃静置 24 h, 在此期间不定时取出待测试样, 手动摇匀。24 h 后取出待测样品, 离心, 收集上清液, 用紫外可见分光光度计测定 663、645、470 nm 处的吸光度值。Chl-a、Carotenoid 浓度分别参照文献[12]中方法进行计算。

1.2.4 藻细胞内毒素含量的测定

细胞内藻毒素的提取与检测参照文献[13]中方法进行改良。取适量藻液于 10 000 g、4℃离心 10 min, 弃上清。各样品中加入 1.5 mL 80%甲醇溶液, 超声 5 min, 摇床震荡 1 h。收集甲醇溶液过 0.45 μm 滤膜, 采用高效液相色谱(HPLC)进行检测。

HPLC(Agilent 1200 series, 美国)配有 C_{18} 柱(Hypersil GOLD, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)和紫外检测器(G1314B),检测波长为 238 nm,柱温 35 $^{\circ}$ C,流动相为甲醇(A)和水(0.05% TFA, B),A、B 体积比为 45 : 55,流速为 1 mL/min。线性梯度洗脱程序为 0~20 min,A、B 体积比为 45 : 55 至 90 : 10; $>$ 20~21 min,A、B 体积比为 90 : 10 至 45 : 55; $>$ 21~25 min,A、B 体积比为 45 : 55。

2 结果与分析

2.1 DOM 对藻细胞生长的影响

由图 1 可知,处理第 2 天,各 DOM 处理的细胞密度均比 CK 的大,其中 T4 处理的最大,为 5.97×10^6 个/mL,比 CK 高 21.67%;处理第 4 天,T1、T2、T3 处理的细胞密度均比 CK 的大,其中 T2 处理细胞的密度最大(9.23×10^6 个/mL),比 CK 的高 15.27%,而 T4、T5 处理的细胞密度均比 CK 的小;处理第 6 天,仅 T1、T2 处理的细胞密度比 CK 的大,其中,T1 处理的细胞密度最大(13.34×10^6 个/mL),比 CK 的高 10.35%,而 T3、T4、T5 处理的细胞密度均比 CK 的小,T5 处理的细胞密度最小,为 6.91×10^6 个/mL,比 CK 的低 42.79%。可见,短期内(2 d)各 DOM 处理均可促进细胞生长,而随时间推移,仅低浓度 DOM 处理(T1、T2 处理)可促进细胞生长,高浓度 DOM 处理(T3、T4、T5 处理)抑制细胞生长。

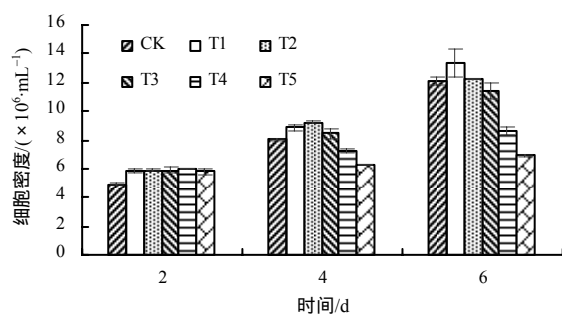


图 1 不同处理时间各处理细胞的密度

Fig.1 Cell density with times at different treatments

2.2 DOM 对藻细胞色素合成的影响

Chl-*a* 和 Carotenoid 是 *M. aeruginosa* FACHB905 细胞内重要的色素组成成分。由图 2、图 3 可知,DOM 对 *M. aeruginosa* FACHB905 单位细胞中 Chl-*a*、Carotenoid 合成的影响不明显。处理第 2 天,

T4、T5 处理中虽然单位细胞的 Chl-*a* 含量与 CK 相比略有降低,但在处理后第 4、第 6 天,T4、T5 处理 Chl-*a* 含量比 CK 的高。处理后第 2 天和第 4 天,各处理 Carotenoid 的含量没有明显变化;处理后第 6 天,除 T3 处理的数值较低外,其他处理的 Carotenoid 含量与 CK 基本相当。

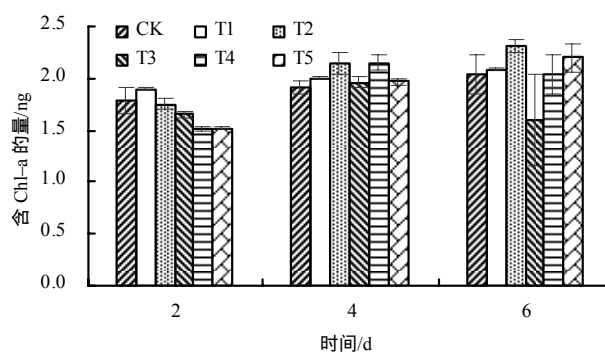


图 2 不同处理时间各处理每 1 万个细胞中含 Chl-*a* 的量

Fig.2 Chl-a content of each 1×10^4 cells with times at different treatments

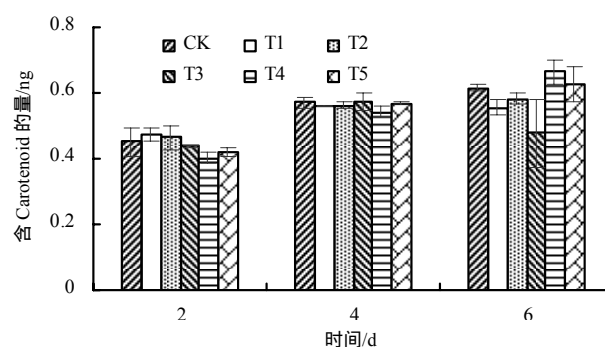


图 3 不同处理时间各处理每 1 万个细胞中含 Carotenoid 的量

Fig.3 Carotenoid content of each 1×10^4 cells with times at different treatments

2.3 DOM 对藻毒素合成的影响

由图 4 可知,处理后第 2 天,各处理每 1 万个细胞内含藻毒素 MC-LR 的量均比 CK 的低,T5 处理的最低(0.15 ng),比 CK(0.32 ng)下降了 53.13%;

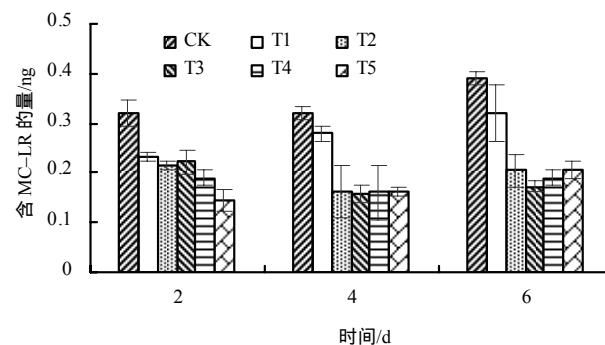


图 4 不同处理时间各处理每 1 万个细胞中含 MC-LR 的量

Fig.4 MC-LR content of each 1×10^4 cells with times at different treatments

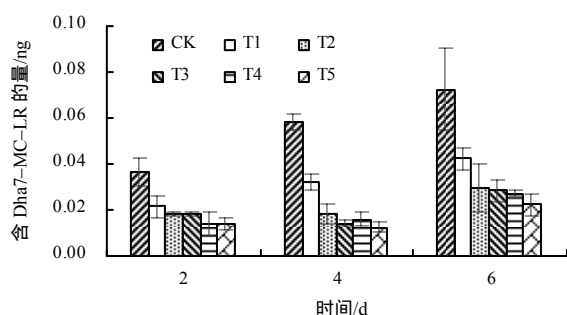


图 5 不同处理时间各处理每 1 万个细胞中含 Dha7-MC-LR 的量

Fig.5 Dha7-MC-LR content of each 1×10^4 cells with times at different treatments

在处理第 4 天, T2、T3、T4、T5 处理对 MC-LR 合成的抑制作用加强, MC-LR 含量几乎维持在试验初期(处理后第 2 天)的最低含量; 处理后第 6 天, T3 处理的 MC-LR 含量最低, 仅为 0.17 ng, 比 CK 下降了 56.41%。由图 5 可知, 单位细胞内 Dha7-MC-LR 含量变化受 DOM 影响下降明显; 处理后第 2 天的 T4 处理 Dha7-MC-LR 含量最低, 比 CK 下降了 62.18%; 处理后第 4 天和第 6 天, T5 处理的 Dha7-MC-LR 含量最低, 比 CK 分别下降了 78.51% 和 69.11%。可见, 牛粪堆肥 DOM 对于 *M. aeruginosa* FACHB905 细胞内 2 种藻毒素合成的抑制作用明显。

3 结论与讨论

堆肥 DOM 的主要成分为木质素类化合物、含 N 杂环类化合物、脂肪酸类物质、蛋白质和其他有机酸类物质^[14-15], 其中含 N 化合物和其他有机酸类物质(如碳水化合物、氨基酸等)均有助于蓝藻细胞的生长^[16-18]。随着 DOM 浓度的升高和处理时间的延长, DOM 中木质素类化合物对于蓝藻细胞生长的抑制作用明显^[19]。本研究中, 处理后第 4 天和第 6 天, 高浓度 DOM 处理(T4、T5 处理)使培养液中 *M. aeruginosa* FACHB905 细胞密度下降。

牛粪堆肥来源 DOM 对 *M. aeruginosa* FACHB905 细胞内 Chl-a 和 Carotenoid 合成的影响不大^[20]。蓝藻细胞内 Chl-a 与 Carotenoid 的合成途径非常复杂, 受到 Mg、Cu、Zn、Ni、Mn 等多种微量金属元素的影响^[21-22], 而 DOM 对该类金属的迁移转化影响明显^[23]。本研究中虽然没有对培养液中金属离子含量、形态等进行测定, 但各 DOM 处

理 *M. aeruginosa* FACHB905 细胞内 Chl-a 和 Carotenoid 含量与 CK 差异不明显, 推测 DOM 对培养液中金属离子的调控对蓝藻细胞内色素的合成具有重要作用。

牛粪堆肥来源 DOM 能够抑制 *M. aeruginosa* FACHB905 单位细胞内藻毒素的合成。随处理时间的延长, T2、T3、T4、T5 处理可明显抑制单位细胞内 MC-LR 的合成, 其含量与试验初期(处理 2 d)的最低含量无明显变化。DOM 处理对 Dha7-MC-LR 合成的抑制作用明显。藻毒素合成受 Mcy 基因家族的控制, 且合成路径极为复杂^[24], 而堆肥来源 DOM 可能对其代谢途径和相关控制基因造成破坏, 进而抑制细胞内 MC-LR 和 Dha7-MC-LR 的合成。

由本试验结果及其分析可得到如下结论: 当牛粪堆肥来源 DOM 中 DOC 的质量浓度为 15 ~ 120 mg/L 时, 处理后第 2 天, 各 DOM 处理均促进 *M. aeruginosa* FACHB905 细胞的生长, 而在处理后第 4 天, T4、T5 处理抑制细胞生长, 第 6 天仅 T1 处理能够促进细胞生长, T3、T4、T5 处理抑制细胞生长的作用明显。各 DOM 处理均抑制细胞内藻毒素的合成, 在 6 d 的处理中, 单位细胞藻毒素中 Microcystin-LR 的含量以处理后第 2 天 T5 处理的最低, 比 CK 低 53.13%; Dha7-Microcystin-LR 含量以处理后第 4 天 T5 处理的最低, 比 CK 低 78.51%。DOM 对细胞内色素合成无明显影响。畜禽粪便污染是农业面源污染的主要来源, 所以, 控制牛粪堆肥中 DOM 的排放和延长 DOM 对藻细胞处理的时间, 可有效抑制蓝藻细胞的生长和蓝藻细胞中藻毒素的合成。

参考文献:

- [1] 周丽娟. 重庆市循环农业测度与农业面源污染负荷的关系[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [2] 雷蕾, 梁勤爽, 陈玉成, 等. 模拟水田环境下畜禽粪便对氮磷释放的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(5): 546-550. DOI:10.3724/SP.J.1238.2011.00546.
- [3] 张鹏飞. 基于畜禽粪便不同处理方式的农业生态系统能值分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2015.
- [4] 曾鹏宇, 但浩, 王昌全, 等. 施用猪粪对稻麦产量和土壤磷素积累与淋失的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2016, 42(2): 202-207. DOI:10.13331/j.cnki.jhau.2016.02.018.
- [5] 易境. 猪场废弃物堆肥中芽孢杆菌属和梭菌属细菌的

- 分子生态学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [6] 杨雪, 连宾, 朱晓玲, 等. 添加钾矿粉对鸡粪堆肥中 N、P、K 含量的影响[J]. 地球与环境, 2012, 40(2): 286–292. DOI:10.14050/j.cnki.1672–9250.2012.02.018.
- [7] 张建华, 田光明, 姚静华, 等. 不同调理剂对猪粪好氧堆肥效果的影响[J]. 水土保持学报, 2012, 26(3): 131–135. DOI:10.13870/j.cnki.stbxb.2012.03.025.
- [8] 徐路魏. 蔬菜废弃物堆肥化过程中碳氮转化规律[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [9] 宋小林, 刘强, 荣湘民, 等. 猪粪堆肥与化肥配施对水稻产量及氮素利用率的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(4): 440–445. DOI:10.3724/SP.J.1238.2011.00440.
- [10] RIPPKA R, DERUELLES J, WATERBURY J B, et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria[J]. Microbiology, 1979, 111(1): 1–61. DOI:10.1099/00221287–111–1–1.
- [11] SHAO J, HE Y, CHEN A, et al. Interactive effects of algicidal efficiency of *Bacillus* sp. B50 and bacterial community on susceptibility of *Microcystis aeruginosa* with different growth rates[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 97: 1–6. DOI:10.1016/j.ibiod.2014.10.013.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 135.
- [13] SHAO J, WU X, LI R. Physiological responses of *Microcystis aeruginosa* PCC7806 to nonanoic acid stress[J]. Environmental Toxicology, 2009, 24(6): 610–617. DOI:10.1002/tox.20462.
- [14] AMIR S, LEMEE M H, MERLINA G, et al. Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by thermochemolysis–gas chromatography–mass spectrometry[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(2): 410–422. DOI:10.1016/j.procbio.2005.07.005.
- [15] KILLOPS S D, KILLOPS V J. Introduction to organic geochemistry[M]. London: Blackwell Publishing, 2005.
- [16] 叶琳琳, 张民, 孔繁翔, 等. 水生生态系统蓝藻固氮作用研究进展与展望[J]. 湖泊科学, 2014, 26(1): 9–18.
- [17] 王玉萍, 袁宪正, 师晓爽, 等. 碳源对铜绿微囊藻生理特性及微囊藻毒素产率的影响[J]. 环境工程学报, 2014, 8(7): 2714–2718.
- [18] DAI R, LIU H, QU J, et al. Effects of amino acids on microcystin production of the *Microcystis aeruginosa*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 161(2): 730–736. DOI:10.1016/j.jhazmat.2008.04.015.
- [19] PILLINGER J, COOPER J, RIDGE I. Role of phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw[J]. Journal of Chemical Ecology, 1994, 20(7): 1557–1569. DOI:10.1007/BF02059880.
- [20] ROSSINI-OLIVA S, MINGORANCE M, PE A A. Effect of two different composts on soil quality and on the growth of various plant species in a polymetallic acidic mine soil[J]. Chemosphere, 2017, 168: 183–190. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.040.
- [21] KÜPPER H, ŠETLÍK I, SPILLER M, et al. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation[J]. Journal of Phycology, 2002, 38(3): 429–441. DOI:10.1046/j.1529–8817.2002.01148.x.
- [22] 史典义, 刘忠香, 金危危. 植物叶绿素合成、分解代谢及信号调控[J]. 遗传, 2009, 31(7): 698–704. DOI:10.3724/SP.J.1005.2009.00698.
- [23] ZHANG M, ZHANG H. Co-transport of dissolved organic matter and heavy metals in soils induced by excessive phosphorus applications[J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(4): 598–606. DOI:10.1016/S1001–0742(09)60151–0.
- [24] 谭啸峰. 铜绿微囊藻中微囊藻毒素合成蛋白的结构研究[D]. 北京: 中国科学技术大学, 2014.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库