

DOI: 10.11766/trxb201605080084

纯培养条件下蓝细菌形成腐殖物质的可能性研究*

李艳 窦森[†] 尹显宝 田相玲

(吉林农业大学资源与环境学院, 长春 130118)

摘要 采用红外光谱和元素分析, 初步研究了纯培养条件下水华鱼腥藻(一种常见蓝细菌)不同生长期的菌体和胞外代谢物以及作为唯一基质形成的菌体混合物的结构特征。结果表明: 蓝细菌样品的红外光谱图中均没有 $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$ 峰。 $2\ 926/1\ 650$ 比值显示, 水华鱼腥藻对数生长期与衰亡后期的菌体芳香物质含量高, 复杂度与土壤富里酸接近, 但低于土壤胡敏酸; 微生物处理能使菌体混合物具有更多芳香族物质, 但 $1\ 530\ \text{cm}^{-1}$ 峰消失, 表明部分C=C及氨基酸类物质被分解。相对于土壤腐殖物质, 水华鱼腥藻菌体的H/C比值及(O+S)/C比值均较大, 即缩合度较低而氧化度较高; 经微生物处理后, 其缩合度进一步降低, 氧化度升高。总之, 本实验条件下蓝细菌自发形成腐殖物质的可能性较低, 且其作为唯一基质在其他微生物作用下形成的菌体混合物与土壤腐殖物质在结构上存在差距, 但从蓝细菌的组成与结构上看, 其可为腐殖物质的形成提供物质条件。该结果为土壤腐殖物质的形成研究与起源探索提供了一定的科学依据。

关键词 水华鱼腥藻; 土壤腐殖质; 芳香度; 缩合度; 氧化度

中图分类号 S153 **文献标识码** A

在探索腐殖物质(HS)的形成研究中, 科学家们发现木质素并非唯一能够形成HS的初始碳源基质^[1-2], 而且在自然界没有木质素出现时土壤与沉积物中也能够积累HS^[3], 其中藻类物质发挥了重要作用。由于藻类能够依靠光合作用自养从而在水体中广泛存在, 水体悬浮物及水底沉积物中的腐殖类物质极有可能是其残骸转化来^[4-5]。在沧海桑田的历史变迁中这些沉积物经由海洋转移到陆地, 可以为某些地区土壤的形成与增肥提供物质基础。从结构上看, 海洋与陆地起源的HS有某些共同特征^[6]; 从物质组成上看, 这种可能性也是存在的。藻类的细胞壁含肽聚糖而没有纤维素, 并且藻类缺乏维管组织, 几乎不含木质素; 但其分泌液中均存在类蛋白化合物及类腐殖物质^[7-8]。蓝藻, 更

准确地说是蓝细菌, 虽被划分为原核生物^[9], 但其仍具有大量藻类特性。考古学家发现, 在距今约34亿年前原始海洋中出现蓝细菌, 随后开始了长达10多亿年的“蓝细菌时代”^[10]。在地球原始土壤形成之前, 蓝细菌作为能够进行光合作用自养的一类古老原核微生物, 在原始水环境中普遍存在, 人们不禁猜测它与地球上最初HS的形成有些关联。Verma和Martin^[11]从土壤样品中分离得到6种蓝细菌, 用¹⁴C标记的葡萄糖在光照通气状态下进行扩大培养后破碎细胞, 并经土壤微生物降解, 发现有大量藻类组分中的碳进入腐殖酸中, 这说明蓝细菌残体是HS形成的一类原材料, 和植物材料在HS形成中的作用类似。此外, 蓝细菌的细胞及胞外、胞内代谢物中均含有大量蛋白质、多糖, 有的甚至含

* 国家自然科学基金项目(41571231)和国家重点研发计划项目(2016YFD0200304)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41571231) and the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0200304)

[†] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: dousen1959@126.com

作者简介: 李艳(1984—), 女, 湖北人, 博士研究生, 讲师, 主要从事土壤微生物与环境化学研究。E-mail: lileah2012@163.com

收稿日期: 2016-05-08; 收到修改稿日期: 2016-08-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-09-05

类腐殖酸物质^[12-13]，那么蓝细菌的细胞可否自发合成HS？如需微生物作用，则不同类群微生物在其中发挥的作用存在哪些差异？这些问题还有待解决。

目前国内外针对HS的形成研究，主要集中在形成途径^[14-15]与形成环境^[16-17]上，较少关注HS的起源问题。在蓝细菌与HS的关系方面，主要研究蓝藻的固相堆肥发酵^[18]，很少研究液相纯培养条件下蓝细菌对HS形成的贡献。本文通过源头控制与液体培养实验，获得了水华鱼腥藻（蓝细菌的代表菌种之一）在不同生长时期的纯培养样本及作为唯一基质在不同微生物处理下的产物，采用元素组成和红外光谱法，初步研究其结构特征，旨在探索蓝细菌自身及作为基质参与HS形成的可能性，进而补充与丰富蓝细菌在土壤HS起源与形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验所用蓝细菌为水华鱼腥藻（*Anabaena flos-aquae*）。隶属蓝藻门（Cyanophyta）藻殖段纲（Hormogonophyceae）念珠藻目（Nostocales）鱼腥藻属（*Anabaena*）。于2012年3月购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库（编号FACHB-245），经进一步分离纯化而得。

实验所用细菌、放线菌和真菌提取自暗棕壤^[19]。细菌为巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）；放线菌为灰色链霉菌（*Sreptomycetes* sp.）；真菌为绿色木霉菌（*Trichoderma viride*）。

蓝细菌培养基采用调整后的BG11液体培养基^[20]，调整方法为去除传统BG11培养基中的柠檬酸成分，并将其中的CaCl₂及微量元素等的浓度减半，在保证蓝细菌正常生长条件下尽量减小培养液中有有机底物对实验结果的影响。主要配方为：磷酸氢二钾1.0 g、磷酸二氢钠0.5 g、硫酸镁0.2 g、硫酸亚铁0.05 g、氯化钙0.02 g、氯化锰0.02 g、钼酸钠0.001 g、硝酸钴0.001 g、硫酸铜0.001 g、硫酸锌0.001 g、蒸馏水1 000 ml。调整培养液pH约7.1。

1.2 实验设计

蓝细菌纯培养实验：将纯化扩培后的水华鱼腥藻批量接种至已灭菌的装有200 ml BG11液体培养基的500 ml锥形瓶中，接种密度约5 μg ml⁻¹。充

分混合振荡后塞上棉塞，在温度30 ℃、光照强度1 200 lx、转速140 r min⁻¹的连续光照摇床中稳定培养。分别在该菌的延滞期、对数生长期、稳定期及衰亡初期结束培养立即取样共4次，另增设衰亡后期培养取样1次。每个样品重复3次。将各样品在4 ℃、16 000 r min⁻¹下高速离心15 min，得到沉淀及上清液。生长周期中的4个阶段分别标记为a、b、c、d时期，其中沉淀即蓝细菌菌体样品分别标记为a1、b1、c1、d1，上清液即蓝细菌胞外代谢物样品分别标记为a2、b2、c2、d2。衰亡后期菌体和胞外代谢物分别标记为D1和D2。

蓝细菌作为基质实验：向处于对数生长期的水华鱼腥藻培养液中分别接种来自暗棕壤的细菌、放线菌、真菌菌悬液。每个三角瓶中接种10 ml菌悬液。同时设置不接种微生物的对照1个处理，共4个处理。在180 r min⁻¹的大容量摇床中震荡培养90 d后结束培养并取样处理。每个样品重复3次。将各样品在4 ℃、16 000 r min⁻¹下高速离心15 min，得到菌体混合物，分别标记为B-A、S-A、T-A和CK。

1.3 菌种的分离、纯化及菌悬液制备

蓝细菌的分离纯化采用微吸管镜检法，随后接种至灭菌后的培养基中于光照培养箱中静置光照增殖培养。培养条件为：温度30 ℃、光照强度1 200 lx、转速140 r min⁻¹、连续光照。培养基灭菌采用湿热灭菌法，于日本ALP CL-32全自动高压锅中121 ℃下灭菌20 min。细菌和放线菌的分离采用稀释平板法，纯化采用划线法；真菌的分离采用稀释平板法，纯化采用单孢子分离法。以上菌种采用DNA测序法与传统镜检结合进行鉴定^[19]。实验用细菌、放线菌和真菌的扩培采用涂布平板法。将扩培后的菌落用无菌刮铲刮取并用无菌水（每个平板用15 ml无菌水）洗出转移至100 ml锥形瓶中即可制得单一菌株悬液。菌悬液含碳量低，相对于碳源基质的碳量可忽略不计。

1.4 蓝细菌生长曲线测定

将水华鱼腥藻按照上述纯培养实验设置条件进行稳定培养，定期结束培养取样。取样频率为每周2次，后期每周1次，具体取样时间为接种后的0、4、7、11、14、18、21、25、28、32、35、39、42、46、49、56、63、70、77、84、91、98、105、112 d。每个样品设3个平行样。样品经培养基稀释1倍摇匀后立即采用紫外-可见分光光度仪在

680 nm处测其吸光值,并绘制生长曲线^[21-22]。

1.5 代谢物与菌体的处理及结构性质测定

将胞外代谢液用蒸馏水在低温下进行电渗析约48 h,然后在55 °C下旋转蒸发浓缩约30 min,最后于冻干机中冻干研磨过0.25 mm筛待用。菌体部分在50 °C恒温烘干箱中持续烘干并研磨过0.25 mm筛待用。代谢液冻干物及菌体的红外光谱(IR)采用KBr压片法测定,所用仪器为美国NICOLET-AV360型红外光谱仪,测试范围为4 000 ~ 500 cm⁻¹,扫描次数128次,分辨率8 cm⁻¹,利用仪器自带分析软件对IR谱图进行半定量分析,以峰面积相对代表峰强度。菌体及菌体混合物的元素组成采用元素分析仪Elementar Vario EL-CHN在C\H\N模式下进行测定,实测C、H、N元素含量,以差减法计算得到O、S元素含量之和。

1.6 数据处理

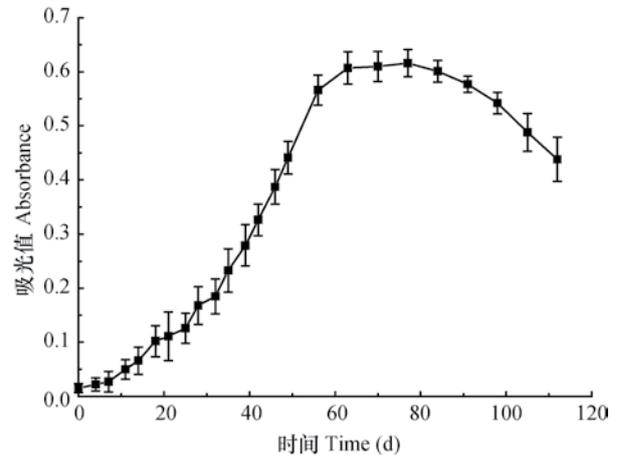
文中菌体产率表示离心后得到的菌体占加入菌体量的百分数;菌体和代谢液的含碳量指的是元素分析仪测得的碳含量。

数据采用Origin 8.0软件进行数据分析处理,红外光谱图采用OMNIC version 6.1软件分析处理、Origin 8.0软件进行图谱叠加。

2 结果

2.1 水华鱼腥藻生长曲线确定

图1表示由分光光度法测得的水华鱼腥藻生长曲线。从图中可看出,实验条件下水华鱼腥藻生命周期较长,经过约15 d的延滞期后进入长达约40 d的对数生长期,培养的60 ~ 80 d可看作稳定期,之后进入衰亡期。同时实验观察培养液颜色由淡绿逐渐加深,经浓绿、墨绿转化至黄绿、棕黄,延长培养还可观察到培养液最终变为灰黄色甚至灰白色,延续培养最长可至10个月,其中约7个月时培养液体积减半。培养液颜色变化与蓝细菌生长情况一致。结合生长曲线确定纯培养实验的取样时间,在水华鱼腥藻的延滞期、对数生长期、稳定期及衰亡期即11 d、42 d、70 d及112 d时分别取样进行分析。此外确定基质实验的微生物接种时间为培养42 d时即对数生长期,而衰亡后期则设定为纯培养9个月的时期。



注:采用调整后的BG11培养基,温度30 °C,光照强度1 200 lx,转速140 r min⁻¹,无强制空气输入 Note: Using modified BG11 medium, temperature 30 °C, light intensity 1 200 lx, rotate speed 140 r min⁻¹, no forced air input

图1 实验条件下水华鱼腥藻的生长曲线

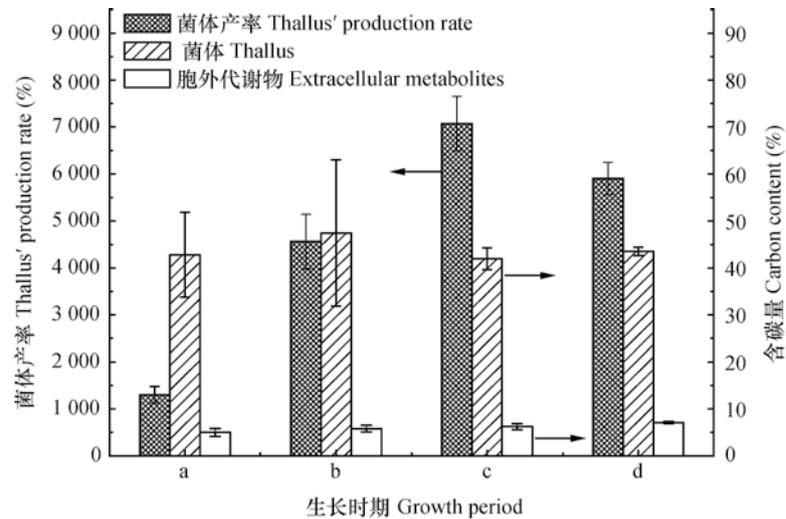
Fig. 1 Growth curve of *Anabaena flos-aquae* under experimental conditions

2.2 蓝藻生长周期内菌体产率及菌体与胞外代谢物含碳量

纯培养之初水华鱼腥藻接种量约为0.001 g,经温和培养后菌体得到大量繁殖(图2)。菌体产率从培养10 d的1 300%逐步上升,至稳定期达到最大值,经70 d培养水华鱼腥藻产量可达到加入量的70倍。进入衰亡期后菌体部分死亡,繁殖速率下降,产率随之降低。菌体产率走势符合生长曲线表现。从各阶段菌体和胞外代谢物的含碳量(图2)可看出,水华鱼腥藻菌体含碳量基本在40% ~ 50%之间,对数生长期菌体含碳量较高,可达到47.6%;胞外代谢液含碳量逐步提升,从延滞期的5.02%上升至衰亡期的7.11%,但相对于菌体而言仍然很低,表示代谢液中有有机物含量少。因此,在蓝细菌作为基质的实验中主要关注菌体混合物的相关性,但考虑到胞外代谢物中含有部分有机碳化合物,可作为异养微生物的碳源,在接种细菌、放线菌、真菌时以培养液整体包括菌体与胞外代谢液作为基质。

2.3 菌体与代谢物的红外光谱特征

利用红外光谱可以半定量判断和确定分子的



注：a、b、c、d分别表示延滞期、对数生长期、稳定期及衰亡期 Note: The letters a, b, c and d stands for lag phase, logarithmic phase, stable phase and decline phase, respectively

图2 水华鱼腥藻纯培养各生长时期的菌体产率及菌体与胞外代谢物含碳量

Fig. 2 Thallus production rate and carbon content in thallus and extracellular metabolites relative to growth period of *Anabaena flos-aquae*

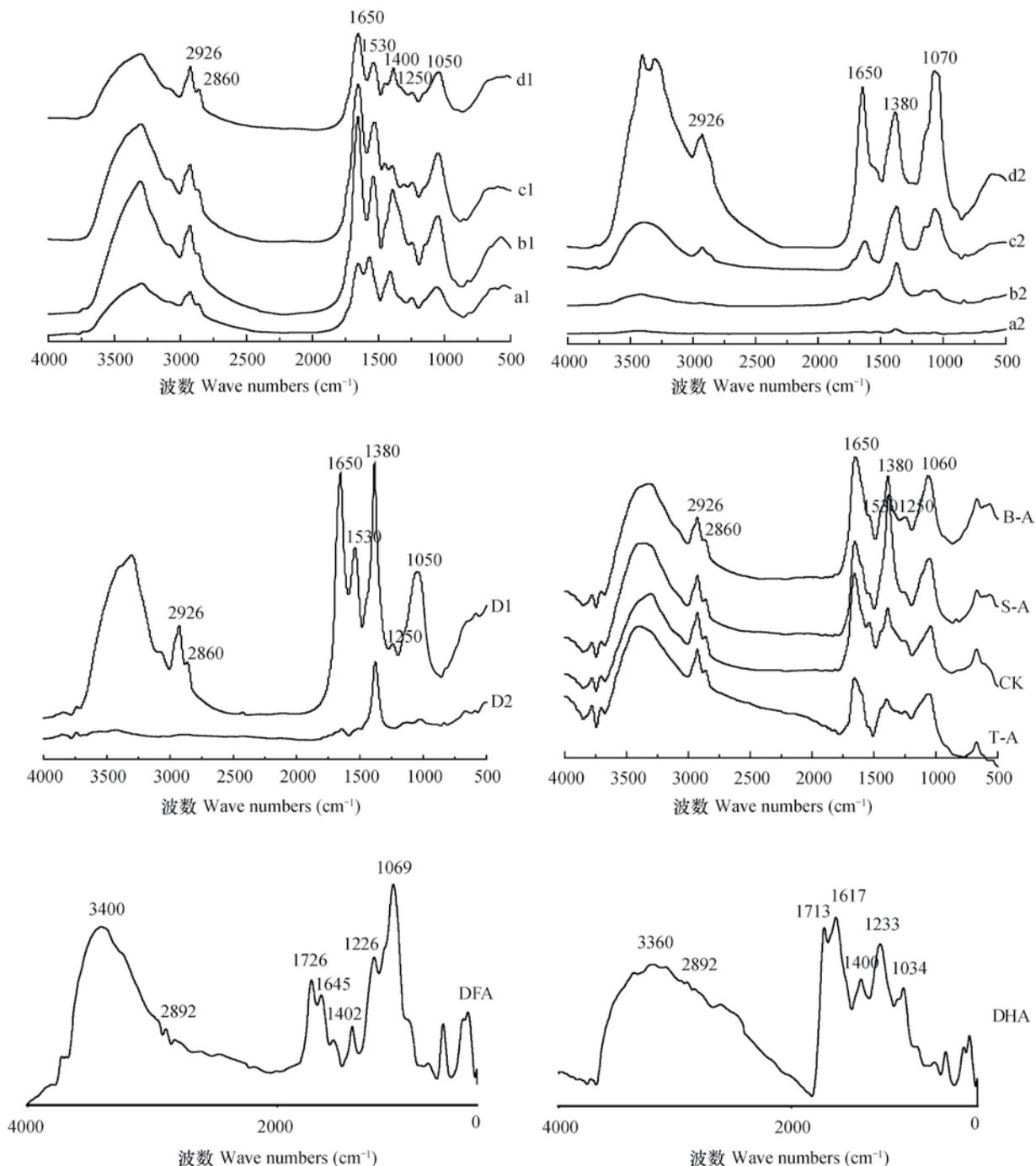
官能团特征，推断有机化合物的结构组成。图3显示了不同处理下水华鱼腥藻菌体及代谢液的红外光谱曲线。从图3中可看出，各阶段菌体红外光谱图类似，菌体与代谢液的红外光谱图具有明显差异，表现在各吸收峰的强弱上。各曲线的特征吸收峰主要出现在 2926 cm^{-1} （不对称脂族C-H伸展）、 2860 cm^{-1} （对称脂族C-H伸展）、 1650 cm^{-1} （芳香C=C及酰胺C=O伸展）、 1530 cm^{-1} （芳香C=C伸展，酰胺化合物及氨基酸N-H面内变形）、 $1380\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ （脂族C-H变形，邻位取代芳香环伸展）、 1250 cm^{-1} （醇酚C-O伸展）、 $1030\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ （多糖C-O伸展）处^[23]。其中 2926 cm^{-1} 、 1650 cm^{-1} 、 1380 cm^{-1} 、 1050 cm^{-1} 峰无论在菌体还是代谢物光谱中均有较强吸收，而 2860 cm^{-1} 、 1530 cm^{-1} 、 1250 cm^{-1} 峰表现较弱，在胞外代谢物光谱图中几乎不见。经微生物处理后蓝细菌菌体混合物红外光谱曲线类似但稍有差异，主要表现在各吸收峰的峰强上。图3中红外光谱各吸收峰的相对吸收强度见表1。

可以用某一吸收峰的面积占特征峰面积（ 3400 cm^{-1} ）的百分比（相对强度）来反映相应官能团的比例。结合表1与图3发现，水华鱼腥藻对数生长期主要吸收峰的相对强度最大，其次是稳定期；胞外代谢物各吸收峰强度随水华鱼腥藻的生长而逐步增强；基质实验中经微生物处理后，菌体

混合物红外谱图中代表芳香组分的 1650 cm^{-1} 峰及代表多糖组分的 1060 cm^{-1} 峰均增强，细菌处理增强幅度最大，其次是放线菌，然后是真菌。与土壤腐殖酸相比，水华鱼腥藻样品的红外谱图中普遍没有 1720 cm^{-1} （羰基及羧基C=O伸展）峰。代表脂族部分的 2926 cm^{-1} 峰与代表芳香组分的 1650 cm^{-1} 峰的比值可作为衡量物质芳构化或结构复杂化的一个指标。从表1中可看出蓝细菌菌体样品的 $2926/1650$ 比值大致在 $0.1\sim 0.4$ 之间，与土壤腐殖酸中腐殖化程度较低的FA（0.265）相近，远高于HA的指标值（0.025）。水华鱼腥藻菌体的 $2926/1650$ 比值较胞外代谢物低；蓝细菌作为基质形成的菌体混合物的 $2926/1650$ 比值大小顺序为细菌 < 放线菌 < 真菌 < CK。

2.4 菌体与代谢物的元素组成特征

不同处理下水华鱼腥藻菌体、菌体混合物及不同提取方式得到的土壤HS组分FA、HA与胡敏素（Hu）的元素组成特征（表3）显示，除对数生长期菌体（ 531 g kg^{-1} ）外，蓝细菌样品的含碳量（ $350.2\sim 466.6\text{ g kg}^{-1}$ ）与土壤HS含碳量（ $462.0\sim 739.3\text{ g kg}^{-1}$ ）相比普遍偏低。蓝细菌样品的含氮量（范围 $67.0\sim 99.0\text{ g kg}^{-1}$ ）远高于土壤HS含氮量（ $29.8\sim 55.4\text{ g kg}^{-1}$ ），且生长周期内各阶段菌体含氮量逐渐升高。经微生物处理后，蓝细菌菌体混合物的含碳量降低，以放线菌



注: a1、b1、c1、d1代表生长周期内各时期菌体; a2、b2、c2、d2代表生长周期内各时期胞外代谢物; D1、D2代表衰亡后期菌体及胞外代谢物; B-A、S-A、T-A、CK分别代表作为基质接种细菌、放线菌、真菌和无菌对照后形成的菌体混合物; DFA、DHA表示从暗棕壤中提取出来的富里酸和胡敏酸, 相关数据来源于文献 [19]; 下同 Note: a1, b1, c1 and d1 stands for thallus in different growth periods; a2, b2, c2 and d2 for extracellular metabolite in different growth periods; D1 and D2 for thallus and extracellular metabolite, respectively, in the late decline period; B-A, S-A, T-A and CK for thallus mixtures formed out of *Anabaena flos-aquae* as the substrate after inoculation of *Bacillus megaterium*, *Sreptomycetes* sp., *Trichoderma viride* and no microorganism as contrast check, respectively; DFA and DHA for fulvic acid and humic acid isolated from dark brown soil, respectively; and all the related data are cited from Item [19] of the Reference. The same below

图3 不同处理下水华鱼腥藻形成菌体及代谢物的红外光谱曲线

Fig. 3 FTIR spectra of the thallus mixture formed by and metabolites of *Anabaena flos-aquae* relative to treatment

表1 不同处理下水华鱼腥藻形成菌体及代谢物红外光谱主要吸收峰的相对强度

Table 1 Relative intensity of the main absorption peaks in the FTIR spectra of thallus formed by and metabolites of *Anabaena flos-aquae* relative to treatment

处理 Treatment		相对强度 Relative intensity (%)						比值 Ratio 2 926/1 650	
		2 926 cm ⁻¹	2 860 cm ⁻¹	1 650 cm ⁻¹	1 530 cm ⁻¹	1 400 cm ⁻¹	1 250 cm ⁻¹		1 080 cm ⁻¹
生长周期内菌体 Thallus in different growth periods	a1	4.46	0.92	12.70	13.15	19.01	2.67	24.22	0.351
	b1	5.44	0.53	28.07	9.78	17.40	1.00	23.09	0.213
	c1	4.80	0.60	23.70	6.97	1.20	1.07	20.55	0.228
	d1	7.41	1.14	25.36	7.20	5.04	0.97	22.81	0.337
生长周期内胞外代谢物 Extracellular metabolites in different growth periods	a2	4.12	—	11.33	—	40.23	—	9.83	0.364
	b2	3.00	—	7.94	—	109.13	—	37.19	0.378
	c2	6.31	—	16.12	—	35.94	—	44.02	0.391
	d2	7.34	—	16.66	—	12.13	—	36.34	0.441
衰亡后期菌体与胞外代谢物 Thallus and extracellular metabolites in the late decline period	D1	5.90	0.78	25.24	8.31	27.45	0.72	32.17	0.234
	D2	28.09	—	49.75	—	290.93	—	17.25	0.565
作为基质形成的菌体混合物 Thallus mixtures formed with <i>Anabaena flos-aquae</i> as the substrate	B-A	4.10	0.46	38.02	—	12.64	1.25	22.65	0.108
	S-A	4.72	0.75	28.97	—	27.20	0.36	22.20	0.163
	T-A	4.67	0.85	24.15	—	11.41	0.54	18.86	0.194
	CK	6.18	1.00	22.53	1.58	12.58	0.66	17.56	0.274

注：2 926/1 650指相应峰面积的比值。下同 Note: 2 926/1 650 represents ratio of the corresponding peak areas. The same below

表2 暗棕壤FA及HA的红外光谱主要吸收峰的相对强度^[19]

Table 2 Relative intensity of the main absorption peaks in the FTIR spectra of FA and HA extracted from dark brown soil

处理 Treatment	相对强度 Relative intensity (%)					比值 Ratio 2 926/1 650	
	2 926 cm ⁻¹	1 720 cm ⁻¹	1 650 cm ⁻¹	1 380 ~ 1 400 cm ⁻¹	1 250 cm ⁻¹		1 030 ~ 1 080 cm ⁻¹
DFA	0.60	4.41	2.25	2.92	5.27	13.36	0.265
DHA	0.32	8.42	12.93	2.42	17.47	3.77	0.025

为甚；含氮量降低，以真菌为甚；含氧量升高，以放线菌为甚。从表3的元素摩尔比来看，蓝细菌样品C/N比远低于土壤HS该比值。除对数生长期菌体（1.410）外，蓝细菌菌体和菌体混合物H/C比（1.719~1.918）均高于土壤HS该比值（0.733~1.553）；菌体混合物的H/C比中细菌>放线菌>真菌>CK。除对数生长期菌体（0.447）外，菌体（O+S）/C范围大致在0.6~1.0之间，基

本上较土壤HS该比值（0.189~0.694）高；经微生物腐解后的菌体混合物（O+S）/C升高。衰亡后期菌体的H/C比降低，（O+S）/C升高。

以O/C为横坐标，H/C为纵坐标，得到不同处理下蓝细菌菌体及菌体混合物的元素分析范式图（图4）。从图4中可看出，对数生长期的水华鱼腥藻菌体与土壤HS结构接近，其他阶段菌体与土壤HS结构相差较远。经微生物处理后，菌体混合物

表3 不同处理下水华鱼腥藻形成菌体及菌体混合物的元素组成

处理 Treatment		C (g kg ⁻¹)	H (g kg ⁻¹)	N (g kg ⁻¹)	(O+S) (g kg ⁻¹)	C/N	H/C	(O+S) / C
生长周期内菌体 Thallus in different growth periods	a1	428.1	66.4	86.0	419.5	5.809	1.861	0.735
	b1	531.0	62.4	90.1	316.5	6.876	1.410	0.447
	c1	419.7	67.1	93.5	419.7	5.237	1.918	0.750
	d1	435.3	67.3	99.0	398.4	5.128	1.856	0.686
衰亡后期菌体 Thallus in the late decline period	D1	367.6	54.5	98.5	479.6	4.351	1.779	0.978
作为基质形成的菌体混合物 Thallus mixtures formed with <i>Anabaena flos-aquae</i> as the substrate	B-A	402.7	63.7	87.6	445.9	5.362	1.897	0.830
	S-A	350.2	55.0	88.5	506.3	4.618	1.884	1.084
	T-A	444.8	68.1	67.0	420.2	7.741	1.836	0.709
	CK	466.6	66.8	96.2	370.4	5.657	1.719	0.595
土壤HS组分 FA, HA and Hu extracted from soil	SFA ^[24]	462.0	46.4	31.0	428.0	14.91	1.205	0.694
	SHA ^[24]	541.0	48.0	32.4	406.0	19.48	1.065	0.563
	DFA ^[19]	500.3	64.7	55.4	379.6	10.54	1.553	0.569
	DHA ^[19]	515.0	52.6	39.2	393.2	15.32	1.225	0.573
	BHu ^[25]	739.3	45.1	29.8	185.8	28.63	0.733	0.189

注: SFA、SHA分别表示采用国际腐殖物质协会推荐的方法从北京鹫峰国家森林公园土壤中提取出来的富里酸和胡敏酸样品, 相关数据来源于文献 [24]; DFA、DHA分别表示采用NaOH+Na₄P₂O₇提取法从暗棕壤中提取出来的富里酸和胡敏酸, 相关数据来源于文献 [19]; BHu表示采用HCl-HF提取法从黑土中提取出来的胡敏素, 相关数据来源于文献 [25]。下同 Note: SFA and SHA represents fulvic acid and humic acid isolated from soil of Jiufeng National Forest Park, Beijing, respectively, with the methods recommended by the International Humic Substances Society, and relevant data are cited from Item [24] in the Reference; DFA and DHA represents fulvic acid and humic acid isolated from dark brown soil with the NaOH+Na₄P₂O₇ extraction method respectively, and relevant data are cited from Item [19] in the Reference; BHu represents humin extracted from black soil with the HCl-HF extraction method, and relevant data are cited from Item [25] in the Reference. The same below

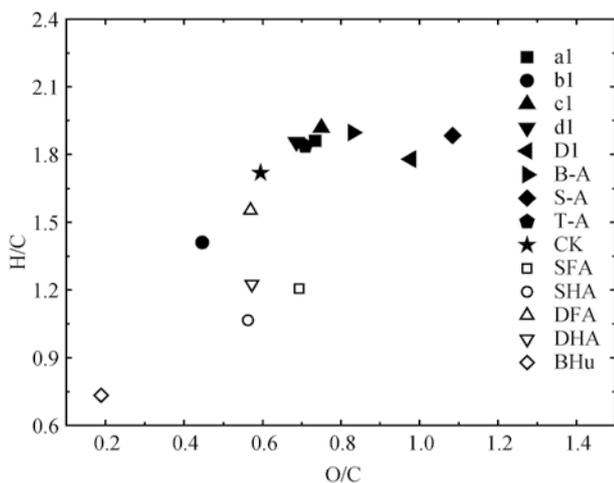


图4 不同处理下水华鱼腥藻形成菌体及菌体混合物的范氏图

Fig. 4 Van-Krevelen plot of the thallus and thallus mixture formed by *Anabaena flos-aquae* relative to treatment

的结构与土壤HS结构相差更大, 且从差距来看, S-A > B-A > T-A > CK。

3 讨论

3.1 从芳香结构及芳香度看蓝细菌形成腐殖物质的可能性

从红外光谱图及峰强可知, 蓝细菌样品均没有 1 720 cm⁻¹处的羧基C=O特征峰, 反而在 1 650 cm⁻¹及 1 530 cm⁻¹处有所加强, 这说明水华鱼腥藻代表的藻类有机物 (Algae Organic Matters, AOM) 较土壤腐殖酸具备更丰富的有机氮和较少的有机碳, 主要表现为蛋白质含量高^[24]。1 650 cm⁻¹峰可代表物质的芳香组分^[26], 从其强度来看, 对数生长期的菌体比其他时期要高, 表明这一时期菌体富集

了更多芳香族大分子物质，主要是一些酰胺类物质；而衰亡后期菌体的芳香成分增多，胞外代谢液芳香组分减少，可能是由于长期培养水分流失，胞外代谢液中有有机物质聚合成较大分子进入沉淀中和菌体混合造成的。用2 926/1 650比值表示脂族碳/芳香碳比值，比值高表明脂族性强，比值低表明芳香度高^[27]。相对于暗棕壤HA，蓝细菌菌体的2 926/1 650比值较大，说明蓝细菌自身的结构没有达到暗棕壤HA的芳香程度，脂族含量较高，对数生长期和稳定期的芳香度较暗棕壤FA稍高，总体而言和FA的复杂程度相当。Esteves等^[28]研究发现，海洋（水体）环境形成的腐殖质与陆地腐殖质相比，分子中含有更多支链脂肪族结构和更少芳香族结构。谷依露等^[29]利用三维荧光光谱对水华微囊藻不同生长时期藻液进行分析发现，从藻液中提取出来的腐殖酸具有类FA特征。这些均表明实验所得蓝细菌菌体在总体结构上更趋向较简单的FA，但与土壤FA之间仍存在一些官能团上的差异。经微生物处理后，菌体混合物的1 650 cm^{-1} 峰强度增大，2 926/1 650比值降低，甚至小于暗棕壤FA的值，不过仍然大于暗棕壤HA的值，这说明微生物处理能产生更多芳香族物质。同时微生物处理的1 530 cm^{-1} 峰减弱或消失，说明芳香组分中部分C=C及氨基酸类物质被分解了。元素组成分析中发现，经微生物处理后菌体混合物的C、N均降低，很好地验证了上述解释。

3.2 从缩合度和氧化度看蓝细菌形成腐殖物质的可能性

元素组成分析是判断物质结构与性质的一种重要方法，其中H/C比可表征样品缩合度，(O+S)/C比表征样品氧化度^[23]。前者比值越高，表示缩合度越低；后者比值越高，表示氧化度越高^[30]。缩合度低，氧化度高，则物质成熟度低，趋于“年轻化”^[31]。蓝细菌样品的H/C比值表现为菌体（菌体混合物）>土壤HS，(O+S)/C比值表现为菌体（菌体混合物）>土壤HA与Hu。说明菌体缩合度达不到土壤腐殖酸的程度，氧化度较土壤HA及Hu高，对数生长期菌体氧化度低于土壤腐殖酸。水华鱼腥藻对数生长期菌体的H/C比与(O+S)/C比均最低，说明对数生长期菌体复杂度与土壤腐殖酸较接近，如果如一些研究中报道的蓝藻可以在细胞裂解后释放HS^[29, 32]，那么这些HS极有可能是在该时期形成的，但形成的是否就是

HS还有待验证。林樱^[24]通过一系列复杂手段提取出了蓝藻中接近HS的两类有机质组分，对其中一个组分进行后续三维荧光光谱及核磁共振分析后得出其为类蛋白物质，而非HS。经微生物处理后菌体混合物的缩合度降低、氧化度升高。这说明在蓝细菌培养液中接种好氧微生物后，微生物首先利用培养液中的糖类组分进行细胞增殖，进而对蓝细菌菌体细胞具有一定分解作用，形成了结构较简单的有机物质。

范式图显示蓝细菌菌体及作为基质形成的菌体混合物的结构与土壤腐殖酸之间还有一定差距。这要求我们在今后要进一步分析菌体及菌体混合物的成分，尤其是数值比较突出的对数生长期菌体。虽然本研究发现蓝细菌自发形成HS的可能性较低，但由于其生长周期内能产生某些结构较为复杂的有机物，因此不排除在极端条件下（非常温常压）蓝细菌与其他高分子有机物结合形成HS的可能性或者在微生物作用下合成HS的可能性。通过范式图还可发现，相对于蓝细菌菌体，经微生物处理后形成的菌体产物的结构与土壤HS间差距更大。从差距来看，放线菌>细菌>真菌，差距越大，结构越简单，亦即放线菌与细菌降解蓝细菌的能力较强，菌体产物结构较简单，而真菌利用蓝细菌形成的菌体产物与土壤腐殖酸最接近，结构较复杂。研究发现，放线菌中的链霉菌属具有高效溶藻特性，孔赞^[33]从富营养化水体中分离出一株抑藻效果最佳的溶藻菌，经鉴定为链霉菌，其溶藻能力是从攻击蓝藻细胞壁开始的；此外，某些细菌（包括芽孢杆菌属）对蓝细菌具有溶藻效应，能够分解藻细胞^[34]。具有溶藻能力，正是本文细菌与放线菌对蓝细菌降解效果超过真菌的原因。

本研究利用水华鱼腥藻作为唯一基质接种微生物，发现微生物利用蓝细菌没有合成HS而是对蓝细菌具有分解作用，其原因可能在于以下两个方面。一是受环境条件所限，譬如厌氧环境比好氧环境更利于有机质增加芳构化碳骨架^[35]，而本研究的微生物主要处于好氧环境中。李永慧等^[36]在研究巢湖蓝藻死亡衰败过程中芳烃与饱和烃含量变化时发现，好氧处理过程中蓝藻被微生物降解，饱和烃含量持续增加，而厌氧处理过程中芳香烃含量有所上升。第二方面可能是缺少HS形成的“辅助物质”如有机调理剂或矿物黏粒等。在蓝藻的堆肥实验中，一般添加菜粕、麦麸、稻壳等作调理

剂^[18], 其成分中包含木质素等大分子物质。Duarte等^[37]研究发现, 矿物微粒可提高HA的芳香度。在自然界中, 土壤矿物可通过催化作用使酚类物质发生氧化偶联反应从而向腐殖聚合物转化。吕冬伟^[38]在进行藻类有机物在海洋沉积物中的氧化还原降解研究中发现, 黏土矿物对沉积有机物具有一定吸附作用, 可以保护藻类有机物免于降解。下一步研究将考虑上述影响。

4 结论

实验条件下, 水华鱼腥藻对数生长期与衰亡末期菌体芳香物质含量高, 芳香程度与土壤FA接近, 但较土壤HA低。微生物处理能使菌体混合物具有更多芳香族物质, 但也会分解其中部分C=C及氨基酸类物质。水华鱼腥藻菌体的缩合度较土壤HS低、氧化度较高; 经微生物处理后, 缩合度进一步降低, 氧化度升高, 部分菌体被微生物分解而非合成HS。蓝细菌自身及作为唯一基质形成的菌体混合物与土壤HS在组成与结构上存在差距, 但可以为HS的形成提供一定的物质条件, 其与土壤HS形成与起源的关系还需要进一步验证。

参考文献

- [1] Gonzalez J M, Laird D A. Role of smectites and Al-substituted goethite in the catalytic condensation of arginine and glucose. *Clays and Clay Minerals*, 2004, 52 (4) : 443—450
- [2] Allard B. A comparative study on the chemical composition of humic acids from forest soil, agricultural soil and lignite deposit: Bound lipid, carbohydrate and amino acid distributions. *Geoderma*, 2006, 130 (1/2) : 77—96
- [3] 斯蒂文森 F J. 腐殖质化学. 夏荣基, 译. 北京: 北京农业大学出版社, 1994
Stenvson F J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions (In Chinese). Xia R J, trans. Beijing: Beijing Agricultural University Publishing House, 1994
- [4] Misic C, Castellano M, Ruggieri N, et al. Dissolved organic matter characterisation and temporal trends in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2006, 70 (3) : 405—414
- [5] Calace N, Casagrande A, Mirante S, et al. Distribution of humic substances dissolved and particulated in water column in Ross Sea, Antarctica. *Microchemical Journal*, 2010, 96 (2) : 218—224
- [6] Sierra M M D, Giovanela M, Parlanti E, et al. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere*, 2005, 58 (6) : 715—733
- [7] Romera-Castillo C, Sarmiento H, Alvarez-Salgado X A, et al. Production of chromophoric dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr*, 2010, 55 (1) : 446—454
- [8] McIntyre A M, Guéguen C. Binding interactions of algal-derived dissolved organic matter with metal ions. *Chemosphere*, 2013, 90 (2) : 620—626
- [9] Whittaker R H, Margulis L. Protist classification and the kingdoms of organisms. *Biosystems*, 1978, 10 (1/2) : 3—18
- [10] Boeuf G. Marine biodiversity characteristics. *Comptes Rendus Biologies*, 2011, 334 (5/6) : 435—440
- [11] Verma L, Martin J P. Decomposition of algal cells and components and their stabilization through complexing with model humic acid-type phenolic polymers. *Soil Biology & Biochemistry*, 1976, 8 (2) : 85—90
- [12] Hong H C, Mazumder A, Wong M H, et al. Yield of trihalomethanes and haloacetic acids upon chlorinating algal cells, and its prediction via algal cellular biochemical composition. *Water Research*, 2008, 42 (20) : 4941—4948
- [13] Li L, Gao N Y, Deng Y, et al. Characterization of intracellular & extracellular algae organic matters (AOM) of *Microcystic aeruginosa* and formation of AOM-associated disinfection byproducts and odor & taste compounds. *Water Research*, 2012, 46 (4) : 1233—1240
- [14] Thevenot M, Dignac M F, Rumpel C. Fate of lignins in soils: A review. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, 42 (8) : 1200—1211
- [15] 窦森, 王帅. 不同微生物对形成不同腐殖质组分的差异性研究进展. *吉林农业大学学报*, 2011, 33 (2) : 119—125
Dou S, Wang S. Review of different microorganisms effect on humus formation (In Chinese). *Journal of Jilin Agricultural University*, 2011, 33 (2) : 119—125
- [16] He M C, Shi Y H, Lin C Y. Characterization of humic acids extracted from the sediments of the various rivers and lakes in China. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20 (11) : 1294—1299
- [17] Puga-Freitas R, Blouin M. A review of the effects of

- soil organisms on plant hormone signalling pathways. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, 114: 104—116
- [18] 王丽萍. 菜粕与蓝藻混合高温发酵过程中的物质转化与光谱特性. 南京: 南京农业大学, 2012
Wang L P. Organic matter transformation and spectra characteristics during high temperature co-fermentation of rapeseed meal and blue algae (In Chinese). Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [19] 刘艳丽. 添加有机物料后不同微生物对土壤腐殖质形成的影响. 长春: 吉林农业大学, 2011
Liu Y L. Effect of different microbial upon the formation of soil humus after application organic materials (In Chinese). Changchun: Jilin Agricultural University, 2011
- [20] 董妍玲. 鱼腥藻PCC7120外膜蛋白的鉴定及功能研究. 北京: 中国科学院研究生院, 2007
Dong Y L. Identification and functional studies of outer membrane proteins of *Anabaena* sp. PCC 7120 (In Chinese). Beijing: The Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2007
- [21] 胡先文, 董元彦, 张新萍, 等. 可见分光光度法测定水华鱼腥藻. 华中农业大学学报, 2002, 21 (3): 295—297
Hu X W, Dong Y Y, Zhang X P, et al. The measurement of *Anabaena flos-aquae* with visible spectrophotography (In Chinese). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2002, 21 (3): 295—297
- [22] 赵志敏, 洪小芹, 李鹏, 等. 污染水体中蓝藻叶绿素的光谱特征分析. 光谱学与光谱分析, 2010, 30 (6): 1596—1599
Zhao Z M, Hong X Q, Li P, et al. Spectral analysis of cyanobacteria chlorophyll in polluted water (In Chinese). *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, 30 (6): 1596—1599
- [23] Solomon D, Lehmann J, Kinyangi J, et al. Long-term impacts of anthropogenic perturbations on dynamics and speciation of organic carbon in tropical forest and subtropical grassland ecosystems. *Global Change Biology*, 2007, 13 (2): 511—530
- [24] 林樱. 土壤、沉积物以及蓝藻中有机质标准物质的提取与表征. 北京: 中国环境科学研究院, 2011
Lin Y. Isolation and characterization of reference organic matter from soil, sediment, and blue algae (In Chinese). Beijing: Chinese Research Academy of Environmental Sciences, 2011
- [25] 朱姝, 窦森. 秸秆深还对土壤团聚体中胡敏素结构特征的影响. 土壤学报, 2016, 53 (1): 123—133
Zhu S, Dou S. Effect of deep application of straw on composition of humin in soil aggregates (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2016, 53 (1): 123—133
- [26] Kalbitz K, Geyer W, Geyer S. Spectroscopic properties of dissolved humic substances—a reflection of land use history in a fen area. *Biogeochemistry*, 1999, 47 (2): 219—238
- [27] 郝翔翔, 窦森, 韩晓增, 等. 典型黑土区不同生态系统下土壤团聚体中胡敏酸的结构特征. 土壤学报, 2014, 51 (4): 824—833
Hao X X, Dou S, Han X Z, et al. Structure of humic acid in soil aggregates under different ecosystems in typical black soil region of Northeast China (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2014, 51 (4): 824—833
- [28] Esteves V I, Otero M, Duarte A C. Comparative characterization of humic substances from the open ocean, estuarine water and fresh water. *Organic Geochemistry*, 2009, 40 (9): 942—950
- [29] 谷依露, 高小峰, 李仁辉. 水华微囊藻 (*Microcystis flos-aquae*) 生长周期中腐殖酸的释放特性. 湖泊科学, 2015, 27 (4): 623—628
Gu Y L, Gao X F, Li R H. Characterization of humic acid release during the growth of *Microcystis flos-aquae* (In Chinese). *Journal of Lake Science*, 2015, 27 (4): 623—628
- [30] 梁重山, 刘丛强, 党志. 现代分析技术在土壤腐殖质研究中的应用. 土壤, 2001, 33 (3): 154—158
Liang C S, Liu C Q, Dang Z. Application of modern instruments on soil humus research (In Chinese). *Soils*, 2001, 33 (3): 154—158
- [31] 窦森. 土壤有机质. 北京: 科学出版社, 2010
Dou S. Soil organic matter (In Chinese). Beijing: Science Press, 2010
- [32] 叶琳琳, 史小丽, 吴晓东, 等. 西太湖秋季蓝藻水华过后细胞裂解对溶解性有机碳影响. 中国环境科学, 2011, 31 (1): 131—136
Ye L L, Shi X L, Wu X D, et al. The effect of cyanobacteria on dissolved organic carbon post the bloom in autumn in Western Lake Taihu (In Chinese). *China Environmental Science*, 2011, 31 (1): 131—136
- [33] 孔赞. 溶藻菌分离鉴定、溶藻特性及作用机理的研究. 杭州: 浙江大学, 2013
Kong Y. Research on the isolation, identification, antialgal characteristics and mechanism of antialgal bacterium (In Chinese). Hangzhou: Zhejiang University, 2013
- [34] 陈庆丽, 景澄茗, 付韵馨, 等. 寒区水体中溶藻铜绿假单胞菌的分离和性质研究. 环境科学学报, 2015, 35

- (3) : 692—698
- Chen Q L, Jing C M, Fu Y X, et al. Isolation and characteristics of algicidal *Pseudomonas aeruginosa* from water body in cold region (In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35 (3) : 692—698
- [35] 纪玉. 藻类有机质早期成岩作用模拟及其生烃潜力研究. 合肥: 安徽大学, 2015
- Ji Y. The early diagenesis simulation of algal organic matters and its hydrocarbon generation potential (In Chinese). Hefei: Anhui University, 2015
- [36] 李永慧, 李玉成, 王宁, 等. 巢湖蓝藻死亡衰败过程中典型有害成分形成及控制对策. *湖泊科学*, 2012, 24 (4) : 513—518
- Li Y H, Li Y C, Wang N, et al. Formation and control of the harmful ingredients during the decaying process of cyanobacteria from Lake Chaohu (In Chinese). *Journal of Lake Science*, 2012, 24 (4) : 513—518
- [37] Duarte R M B O, Fernandez-Getino A P, Duarte A C. Humic acids as proxies for assessing different Mediterranean forest soils signatures using solid-state CPMAS ^{13}C NMR spectroscopy. *Chemosphere*, 2013, 91 (11) : 1556—1565
- [38] 吕冬伟. 藻类有机物在富含粘土海洋沉积物中的氧化还原降解研究. 北京: 中国科学院研究生院, 2008
- Lü D W. Decomposition of algal organic matter in clay-enriched marine sediments under oxic and anoxic conditions (In Chinese). Beijing: Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2008

Possibility of Axenically Cultured Cyanobacteria Forming Humic Substances

LI Yan DOU Sen[†] YIN Xianbao TIAN Xiangling

(College of Resources and Environmental Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract 【Objective】Cyanobacteria are the oldest photoautotrophic organisms on the earth. As they lived commonly in the ancestral protohydrosphere and entered into the geosphere with geological changes, they got profoundly involved in the formation of primitive soil humic substances (HS). Since contain large volumes of protein, polysaccharide and even some humic-like acid substances in their cells, extra-and intracellular metabolites, is it possible for cyanobacteria cells to form HS spontaneously? If the formation process needs catalysis of some microorganisms, what are the differences between different groups of microorganisms in role in the process? These scientific problems need to be solved. 【Method】In view of the above-mentioned scientific problems, this research adopted the source control and shake-flask liquid axenic culture method to get axenically cultured samples of *Anabaena flos-aquae*, a representative species of cyanobacteria, in different growth stage and products of *Anabaena flos-aquae* used as the only substrate and treated with different microbes. The products were analyzed for structural characteristics, using the method of element composition and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), with a view to exploring possibility of cyanobacteria spontaneously forming HS or acting as substrate in HS formation and hence to make up and specifying the role of cyanobacteria in the origination and formation of soil HS. 【Result】The following findings were obtained. Under the experimental conditions, *Anabaena flos-aquae* had a long life cycle and remained quite constant in carbon content during their growing period. However, during the logarithmic phase, the carbon content in the thallus was relatively high, while in the extracellular metabolites it rose steadily but remained much lower than that in the thallus. None of the FTIR spectra of the cyanobacteria samples showed any peaks characteristic of the carboxyl C=O bonds at $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$, instead, the spectra intensified somewhat at $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ and $1\ 530\ \text{cm}^{-1}$. Relative to soil HS, cyanobacteria thallus were rich in organic nitrogen, but poor in organic carbon and high in protein and components of polysaccharide. The extracellular metabolites of cyanobacteria contained a large amount of hydroxy and carboxyl functional groups. The ratio of $2\ 926/1\ 650$ revealed that during the logarithmic period and the late decline phase, *Anabaena flos-aquae* thallus contained a high amount of aromatic substances, which were quite approximate to soil fulvic acid (FA), but lower than soil

humic acid (HA) in complexity. Relative to soil humus, *Anabaena flos-aquae* thallus were high in both H/C ratio and (O+S)/C ratio, which means that they were low in condensation degree and high in oxidation degree. Although it was found that the possibility of cyanobacteria spontaneously forming HS was very low, it could not be ruled out that under extreme conditions (abnormal temperature or pressure) cyanobacteria might get combined with other polymers, forming HS, or form HS by the action of microbes as during their long life cycle some organic substances complex in structure may be produced. Under aerobic conditions, *Anabaena flos-aquae* was used as the only carbon source and treated with *Bacillus megaterium*, *Sreptomyces* sp. and *Trichoderma viride* and the resultant thallus mixture contained more aromatic substances, but the peak at $1\ 530\ \text{cm}^{-1}$ disappeared in the FTIR spectra of the thallus mixtures, which indicates that part of the C=C bonds and amino acid-like materials in the mixture were decomposed by microorganisms. The thallus mixture was lower in aromaticity, higher in oxidation degree and simpler in structure, which indicates that once the cyanobacteria culture was inoculated with aerobic microbes, the microbes first made use of the sugar components in the culture for cell proliferation first, and then began to play their limited role in decomposing cyanobacteria cells. The Van-Krevelen plot shows that the thallus mixture formed after the treatment with aerobic microbes differed more sharply from soil HS in structure. By comparing how much they differed, it was learnt that actinomyces and bacteria were more capable of decomposing cyanobacteria, thus simplifying the thallus mixture in structure, while fungi made the thallus mixture of cyanobacteria closer to soil FA and more complicated in the structure. 【Conclusion】 In a word, under the lab conditions, the thallus mixture formed by cyanobacteria *per se* and/or using cyanobacteria as the only substrate does differ from soil HS, but the thallus mixture, thanks to its composition and structure, may serve as substrate for HS formation. The findings may provide a certain scientific basis for the research on formation and origin of soil HS.

Key words *Anabaena flos-aquae*; Soil humic substances; Aromaticity; Condensation degree; Oxidation degree

(责任编辑: 卢 萍)