



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202301075 中图分类号 X524 文献标识码 A

方娜, 车荣晓, 高婕, 等. DSF 型群体感应系统的缺失导致嗜根寡养单胞菌溶藻作用的增强[J]. 环境工程学报, 2023, 17(7): 2380-2390. [FANG Na, CHE Rongxiao, GAO Jie, et al. Enhancement of algicidal activity of *Stenotrophomonas rhizophila* induced by the absence of DSF quorum-sensing system[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(7): 2380-2390.]

DSF 型群体感应系统的缺失导致嗜根寡养单胞菌溶藻作用的增强

方娜^{1,2}, 车荣晓¹, 高婕^{2,3}, 刘颖^{2,4}, 邓君怡², 庄绪亮^{2,3,5}, ✉

1. 云南大学, 国际河流与生态安全研究院, 昆明 650500; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 环境生物技术重点实验室, 北京 100085; 3. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049; 4. 北京大学现代农业研究院, 潍坊 261000; 5. 中国科学院青藏高原研究所, 青藏高原地球系统与资源环境重点实验室, 北京 100101

摘要 水环境中的微藻与藻际微生物之间关系复杂多变, 而微生物的群体感应(QS)作用会影响并调控菌藻的共生关系。以嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)野生株(WT)和QS扩散信号因子(DSF)合成酶基因-*rpfF*基因敲除株($\Delta rpfF$)为实验菌株, 阐明DSF型群体感应是否调控嗜根寡养单胞菌对铜绿微囊藻的溶藻效果。结果表明:嗜根寡养单胞菌野生株和*rpfF*基因敲除株的溶藻特性相似, 均具有针对铜绿微囊藻的溶藻特异性, 主要通过分泌溶藻物质间接作用于藻细胞;野生株和敲除株培养48 h后的无菌滤液均有显著的溶藻作用, 在投加体积分数10%无菌滤液条件下,野生株和敲除株7 d溶藻率分别为53%和78%。此外,实验菌株分泌的溶藻活性物质具有热稳定性和酸碱耐受性,且不容易被乙醇沉淀;三维荧光光谱、紫外可见光光谱、傅里叶变换红外光谱分析表明菌株胞外滤液中主要以类腐殖酸物质为主,芳香化程度较高;通过比较荧光强度和吸光度可知DSF合成酶基因缺失的嗜根寡养单胞菌的无菌滤液中类腐殖酸物质含量显著高于野生株。结果表明,DSF-QS缺失的嗜根寡养单胞菌生物量增多,能分泌更多的溶藻物质,增强了嗜根寡养单胞菌的溶藻作用。本研究拓宽了对菌藻互作的认识,有助于更好地理解溶藻菌对有害藻华的抑制机制,同时为以微生物菌剂治理水华的技术体系提供参考。

关键词 嗜根寡养单胞菌;铜绿微囊藻;群体感应;扩散信号因子

随着全球气候变暖,大气中CO₂体积分数持续升高,氮磷等营养物质大量输入,水体富营养化愈发严重,有害藻华频发^[1-2]。致密的水华会消耗水中氧气,与水生生物竞争养分,破坏水产资源,导致水生态失衡^[3-4]。此外,有些水华还会产生多种毒素或生物活性化合物,影响食品安全,危害人群健康^[5]。水华已成为淡水湖泊面临的生态灾难,亦会对生态、环境和健康构成威胁^[6]。因此,亟需寻找高效环保的方法来控制有害藻华。

在水生态环境中,藻细胞并不是独立存在的,其与微生物之间存在着物质交换与信息交流^[7]。近年来,已有研究发现部分细菌及其分泌物具有强而特异的抑藻活性,这些细菌来源于藻际环境,在调节微藻的群落结构组成及生物量方面发挥着重要作用。因此,利用藻际细菌控制藻类水华成为研究者关注热点^[8]。一些溶藻细菌在淡水水华爆发和消退过程中发挥了决定性作用^[9],而部分溶藻细菌和相应的溶藻物质已被证实能有效控制有害藻华^[10-11],且部分微生物的群体感应作用也能影响并调控菌藻的共生关系^[12-13]。群体感应(quorum sensing, QS)是微生物化学信号传导的一种

收稿日期:2023-01-18;录用日期:2023-04-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(42230411,42177099);北京市自然科学基金资助项目(5222025)

第一作者:方娜(1997—),女,硕士研究生,wyjafn@163.com;✉通信作者:庄绪亮(1970—),男,博士,研究员, xlzhuang@rcees.ac.cn

常见形式,主要通过释放一定量的胞外信号分子使个体获得有关邻近群落的细胞密度和物种组成信息,并相应地调整基因表达谱,实现个体无法进行的某些生理活动或者调节机制,如毒力因子产生、胞外聚合物合成、生物膜形成等^[14-16]。在水华爆发过程中,溶藻细菌会跟随藻细胞的数量增长而增加,随水华的消亡而逐渐减少,但溶藻细菌在增殖初期并不表现出溶藻特性,只有数量达到一个阈值才能溶解藻细胞。因此,微生物的溶藻作用很可能受到QS的调控^[17]。QS也参与溶藻物质代谢的调控。从太湖分离出一株气单胞菌GLY-2107,该菌能分泌3-甲基吲哚和3-苄基哌嗪-2,5-二酮两种溶藻活性物质,且证实该溶藻化合物的产生由AHL介导的QS调控,C₄-HSL是溶藻功能菌溶藻活性的关键QS信号^[11]。

扩散信号因子(diffusible signaling factor, DSF)家族群体感应是常见的群体感应系统之一,广泛存在于革兰氏阴性细菌中,可调节细菌种间与种内的多种与环境适应性相关的生物学功能^[18]。DSF-QS信号的产生和响应主要由*rpf*基因簇完成。其中,*rpfF*基因负责合成DSF信号分子;*rpfC/rpfG*基因负责DSF信号识别与传导;*rpfB*基因负责降解DSF信号分子^[19-20]。目前,DSF信号分子的生物化学功能调控机制基本上得以阐明,同时发现部分分泌DSF信号分子的微生物具有溶藻特性。周素等^[21]用铜绿假单胞菌及其发酵液作用于铜绿微囊藻,发现用48h的铜绿假单胞菌发酵液处理铜绿微囊藻7d后,其溶藻率达到83.83%,对藻毒素的降解率达到71.35%。阴盼晴等^[22]从赤潮中分离出一株能高效抑制锥状斯氏藻的嗜麦芽寡养单胞菌,该菌株能抑制藻细胞光合磷酸化电子传递过程,显著降低锥状斯氏藻的生物量。但这些报道中均未提及DSF-QS介导的群体感应对菌藻关系的影响机理,DSF-QS在微生物抑藻机制中的作用亦尚不清楚。

嗜根寡养单胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)是一株革兰氏阴性菌,广泛存在于土壤、水体中,已有研究证实嗜根寡养单胞菌具有潜在抑藻能力^[23-24],且其基因组中具有产生和响应DSF信号的*rpf*基因簇^[19]。目前,嗜根寡养单胞菌的溶藻机制还不明晰,故*S. rhizophila*可作为DSF-QS调控溶藻作用和效果的模式菌株进行研究。基于此,本课题组以有害水华常见优势藻铜绿微囊藻为研究对象,以溶藻菌*S. rhizophila*野生型菌株(WT)和DSF合成酶基因-*rpfF*基因敲除株($\Delta rpfF$)为实验菌株,通过溶藻实验及基于光谱学手段,探讨DSF-QS存在或缺失条件下*S. rhizophila*的溶藻作用及溶藻物质特性的差异,以期DSF-QS调控的微生物溶藻机制提供科学依据,亦为微生物技术治理有害水华提供菌种资源及技术参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1) 菌种培养及无菌滤液的制备。实验所用菌株*S. rhizophila* WT购于美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC),保藏编号:ATCC BAA-473T。菌株*S. rhizophila* DSF信号合成酶基因缺陷突变体 $\Delta rpfF$ 是由本实验室前期敲除*S. rhizophila* WT中的*rpfF*基因得到。实验菌株均用NB液体培养基(牛肉膏1.5 g·L⁻¹,蛋白胨5 g·L⁻¹,NaCl 2.5 g·L⁻¹)在30℃、150 r·min⁻¹条件下震荡培养。在培养到特定时间段后,取OD₆₀₀为1.0的菌液,于8000 r·min⁻¹条件下离心5 min后,收集上清液,过0.22 μm滤膜制备无菌滤液。

2) 藻种来源与培养方法。实验所用藻种铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*, FACHB-905)、凯氏拟小球藻(*Parachlorella kessleri*, FACHB-729)、斜生四链藻(*Tetradesmus obliquus*, FACHB-416)均购买自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(FACHB)。所有藻株均用BG11培养基并放于人工气候培养箱培养,培养温度为25℃,光照条件为2000 Lux,光照周期为12 h/12 h(白/黑)。藻液在培养7d后,取OD₆₈₀为0.4的藻液进行后续实验。

1.2 *S. rhizophila* 溶藻特性实验方法

1) 溶藻方式。在实验菌株培养的第48 h取样,于8000 r·min⁻¹条件下离心5 min后分别收集上清液和菌体沉淀。所得上清液过0.22 μm滤膜制备无菌滤液,菌体沉淀用0.01 mol·L⁻¹无菌PBS洗涤3遍后加BG11培养液重悬。将所得菌液、重悬菌液、无菌滤液以体积分数10%比例添加到藻液中混匀培养,于培养第7天取样测铜绿微囊藻叶绿素a(Chla)质量浓度。

2) 不同培养时间对菌溶藻效果的影响。实验菌株*S. rhizophila* WT和 $\Delta rpfF$ 在1.1所述的培养条

件下培养, 分别在第 12 h、24 h、48 h 取菌液, 制备无菌滤液, 并以体积分数 10% 比例添加到藻液中混匀培养, 于培养第 7 天取样测铜绿微囊藻 Chla 质量浓度。

3) 不同投加量对菌溶藻效果的影响。在实验菌株培养的第 48 h 取样离心, 制备无菌滤液。将所得无菌滤液分别以体积分数 5%、10%、15% 比例添加到藻液中混匀培养, 并于培养第 7 天取样测铜绿微囊藻 Chla 质量浓度。

4) 溶藻特异性。将 48 h 无菌滤液以体积分数 10% 添加到铜绿微囊藻、凯氏拟小球藻、斜生四链藻液中混匀培养, 于第 7 天取样测铜绿微囊藻 Chla 质量浓度, 评估 *S. rhizophila* 的溶藻特异性。

1.3 *S. rhizophila* 溶藻物质性质实验方法

1) *S. rhizophila* 溶藻物质热稳定性。取 48 h 无菌滤液于 5 个离心管中, 分别在 -40 ℃、40 ℃、80 ℃、100 ℃ 水浴处理 2 h, 并用高压蒸汽灭菌锅 121 ℃ 处理 20 min, 冷却至室温后将各处理组上清液按体积分数 10% 加入藻液中进行溶藻实验, 并于 7 d 后取样测铜绿微囊藻 Chla 质量浓度。

2) *S. rhizophila* 溶藻物质酸碱稳定性。取 48 h 无菌滤液, 用 2 mol·L⁻¹ 的 NaOH 及 2 mol·L⁻¹ 的 HCl 溶液分别调节 pH 至 3 和 12, 室温处理 2 h 后, 再回调至初始 pH, 以未处理的无菌上清液作为实验对照, 各处理组的上清液以体积分数 10% 的比例加入藻液中进行溶藻实验, 并于培养第 7 天取样测铜绿微囊藻 Chla 质量浓度。

3) *S. rhizophila* 溶藻物质乙醇沉淀。取 48 h 无菌滤液, 加入 3 倍体积的无水乙醇, 混匀震荡 10 min, 4 ℃ 静置 2 h 后, 于 8 000 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min, 分别收集上清和沉淀。上清用氮吹仪吹干后, 用同体积的无菌水复溶残留物和沉淀, 并以体积分数 10% 的比例加入藻液中进行溶藻实验, 于培养第 7 天取样测铜绿微囊藻 Chla 质量浓度。

1.4 分析方法

1) 叶绿素 a 提取方法。取 10 mL 藻液在 4 000 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min, 然后弃上清, 加入 90% 丙酮, 涡旋 10 s, 放在 4 ℃ 黑暗环境下萃取 24 h, 然后于 4 000 r·min⁻¹ 条件下离心 20 min, 上清转移至 10 mL 比色管中, 用 90% 丙酮固定体积至 10 mL, 摇匀。最后, 将上清液分光光度计比色皿置于 1 cm 光程下, 用 90% 丙酮调零, 分别读取 750、663、645 和 630 nm 波长的吸光度。Chla 质量浓度计算公式如 (1) 所示^[25], 并通过计算溶藻率来评估菌的溶藻效率, 计算公式如 (2) 所示。

$$C = 11.64 \times (A_{663} - A_{750}) - 2.16 \times (A_{645} - A_{750}) + 0.10(A_{630} - A_{750}) \quad (1)$$

$$\text{溶藻率} = \frac{(C - C_t)}{C} \times 100\% \quad (2)$$

式中: C_t 为某个时间点处理组 Chla 质量浓度, mg·L⁻¹; C 为该时间点空白对照组 Chla 质量浓度, mg·L⁻¹。

2) 无菌滤液光谱解析。紫外-可见光光谱分析: 取 48 h 的无菌滤液, 用紫外分光光度计扫描波长 190~600 nm 的紫外光谱图, 其中以去离子水作为空白参照。三维荧光光谱分析: 取 48 h 的无菌滤液, 使用荧光光谱仪 (FluoroMax-4, 美国 HORIBA 公司) 进行三维荧光光谱扫描。激发波长 (λ_{ex}) 扫描范围为 240~450 nm, 发射波长 (λ_{em}) 扫描范围为 290~500 nm, 步长为 5 nm, 狭缝为 1 nm。傅里叶红外光谱分析: 取 48 h 的无菌滤液, 使用真空冷冻干燥仪 (BIOBASE, 山东科博生物产业有限公司) 冻干去除样品中的水分, 然后研磨成细粉, 用傅里叶变换显微红外光谱仪 (Nicolet iN10MX, 美国赛默飞公司) 采集 4 000~400 cm⁻¹ 波段内样品的红外光谱信息, 共扫描 64 次, 取平均值。

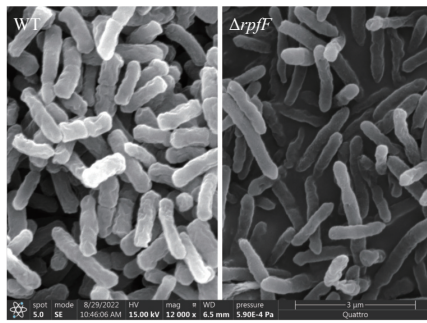
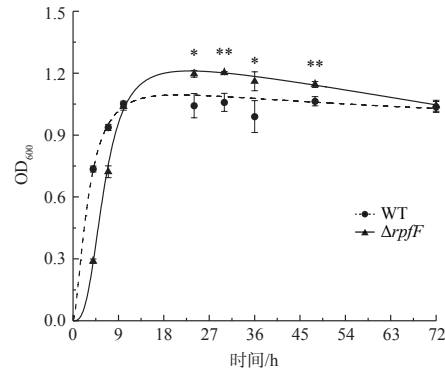
1.5 数据分析

本研究采用单因素方差分析对实验结果进行统计分析。其中, 以不添加菌液的作为空白对照组, 以添加 NB 培养基的作为实验对照组, 而所有添加了无菌滤液的统一作为实验处理组, 每个实验组均设置 3 个重复。统计分析软件为 SPSS statistic 20.0, $p < 0.05$ 表示实验数据有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 *S. rhizophila* 的生理特性

S. rhizophila 的菌体特征和生长曲线如图 1 所示。图 1 (a) 为菌体形态。在 30 ℃、150 r/min 的培

(a) *S. rhizophila* 的扫描电镜图 (左: WT, 右: $\Delta rpfF$)(b) *S. rhizophila* 的生长曲线图 1 *S. rhizophila* 的表型及生长特性Fig. 1 Phenotype and growth characteristics of *S. rhizophila*

养条件下, WT 菌体短小, 两端大多呈钝圆形, 菌长为 1~2 μm ; $\Delta rpfF$ 形态呈直杆状, 菌体细长, 菌长 2~4 μm 。在培养的 72 h 以内, 每隔一段时间用紫外分光光度计测其 OD₆₀₀, 估计菌的生长状况。在培养初期, WT 增长速率较快, 而 $\Delta rpfF$ 具有一段延滞期; 在培养至 10 h 后, $\Delta rpfF$ 的生物量显著高于 WT ($p < 0.05$), 在 48 h 后 $\Delta rpfF$ 进入衰亡期, 而 WT 依旧处于稳定期。因此, DSF-QS 缺失的嗜根寡养单胞菌菌体形态与野生株不同, 而敲除株在进入稳定期后会生成更多的生物量, 但会更快进入衰亡期。

2.2 *S. rhizophila* 的溶藻特征

2.2.1 溶藻方式的探究

微生物的溶藻方式主要分为 2 种: 一种是通过微生物接触攻击藻细胞或吞噬藻细胞达到溶藻目的^[26]; 另一种是通过营养竞争限制藻细胞必需的营养物质或者分泌具有溶藻活性的代谢产物进行间接溶藻, 在现已发现的溶藻功能菌中约 70% 的微生物都是通过间接方式来溶藻^[27]。为探究 *S. rhizophila* 对铜绿微囊藻的作用方式, 分别取 WT 和 $\Delta rpfF$ 的重悬菌体和无菌滤液进行溶藻实验, 结果如图 2 所示。在连续培养 7 d 后, WT 重悬菌体处理组 Chla 质量浓度为 (6.134±0.091) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 菌液处理组 Chla 质量浓度为 (3.063±0.267) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 无菌滤液处理组 Chla 质量浓度仅为 (3.469±0.101) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 菌体处理组几乎没有溶藻活性, 无菌滤液的溶藻效果与菌液处理组无明显差异; 而 $\Delta rpfF$ 重悬菌体处理组 7 d 后 Chla 质量浓度为 (6.274±0.169) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 菌液处理组 Chla 质量浓度为 (1.819±0.158) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 无菌滤液处理组 Chla 质量浓度仅为 (1.515±0.009) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\Delta rpfF$ 的重悬菌体与无菌滤液的溶藻效果呈现出与 WT 一样的趋势。上述结果表明, WT 和 $\Delta rpfF$ 无菌滤液的溶藻活性并没有因为菌体的去除而降低。这说明 WT 和 $\Delta rpfF$ 主要通过分泌具有溶藻活性的代谢产物进行溶藻, 属于间接溶藻方式。

2.2.2 不同生长时期对溶藻效果的影响

微生物在不同的生长阶段生物活性及代谢产物会存在差异, 进而可能会影响到溶藻效果^[28]。分别取 12 h、24 h 和 48 h 的无菌滤液进行溶藻实验, 结果如图 3 所示。培养 7 d 后, WT 的 12 h、24 h 和 48 h 无菌滤液处理组的 Chla 质量浓度分别为 (3.330±0.103) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(3.318±0.093) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(3.469±

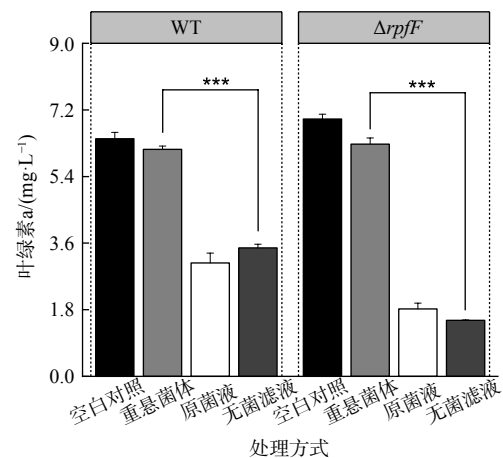


图 2 嗜根寡养单胞菌溶藻方式探究

Fig. 2 Study on algicidal methods of *S. rhizophila*

0.101) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶藻率分别为 48%、48%、46%, WT 在 3 个时期的无菌滤液溶藻效果相近, 无明显差异; 而 $\Delta rpfF$ 的 12 h、24 h 和 48 h 无菌滤液处理组的 Chla 质量浓度分别为 $(3.482\pm 0.147)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(1.674\pm 0.189)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(1.515\pm 0.009)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶藻率分别为 50%、76%、78%, 12 h 无菌滤液处理组的溶藻率显著低于 24 h 和 48 h 处理组 ($p < 0.05$)。从整体上来看, WT 和 $\Delta rpfF$ 的 48 h 无菌滤液溶藻效果最佳, 故后续研究将选择 48 h 的无菌滤液进行验证。

2.2.3 不同投加量对溶藻效果的影响

不同投加量对菌溶藻效果具有较大的影响, 选取合适的投加量对评估菌的溶藻特性十分重要。本实验选取 3 种不同的投加量 (即体积分数分别为 5%、10%、15%) 进行溶藻实验, 结果如图 4 所示。对于 WT 来说, 处理 7 d 后投加量为 5%、10%、15% 处理组中 Chla 质量浓度分别为 $(5.453\pm 0.178)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(3.469\pm 0.101)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(2.244\pm 0.095)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶藻率分别为 15%、46%、65%, 溶藻效果随投加量的增加而增大。而在 $\Delta rpfF$ 处理组中, 到实验第 7 天投加量为 5%、10% 和 15% 处理组的 Chla 质量浓度分别为 $(1.721\pm 0.031)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(1.515\pm 0.009)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(1.561\pm 0.037)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶藻率分别为 75%、78%、78%, 溶藻效果趋于稳定。基于上述结果及可行性分析, 后续研究将选择体积分数 10% 的投加量进行验证。

2.2.4 *S. rhizophila* 溶藻特异性探究

基于微藻种类多样性及生理生化结构的不同, 菌的溶藻作用也可能表现出不一样的效果^[29-30]。为研究 *S. rhizophila* 对不同藻株的溶藻作用, 选取了水华常见藻中的凯氏拟小球藻和斜生四链藻作为对照测试藻株, 结果如图 5 所示。WT 与 $\Delta rpfF$ 的无菌滤液与凯氏拟小球藻共培养 7 d 后, Chla 质量浓度分别增至 $(11.886\pm 0.168)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(12.091\pm 0.074)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。*S. rhizophila* 对小球藻并没有表现出显著的溶藻作用; WT 与 $\Delta rpfF$ 的无菌滤液与斜生四链藻共培养 7 d 后, Chla 质量浓度分别增至 $(11.507\pm 0.134)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(11.753\pm 0.102)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。*S. rhizophila* 同样对斜生四链藻没有表现出显著的溶藻作用。相反, 实验菌株对铜绿微囊藻的溶藻作用显著 ($p < 0.001$), 在共培养的第 7 天, WT 处理组的 Chla 质量浓度降至 $(2.928\pm 0.135)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 而 $\Delta rpfF$ 处理组的 Chla 质量浓度降至 $(0.951\pm 0.025)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。综上所述, *S. rhizophila* 具有针对铜绿微囊藻的溶藻特异性, 而不是普适性溶藻功能菌。

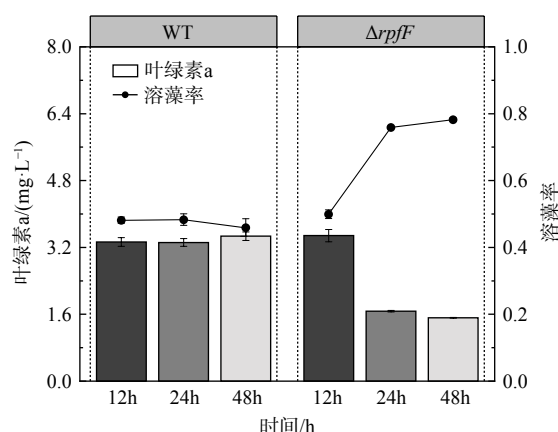


图 3 *S. rhizophila* 不同生长时间对溶藻效果的影响

Fig. 3 The influence of algicidal effect treated with different *S. rhizophila* growth stages

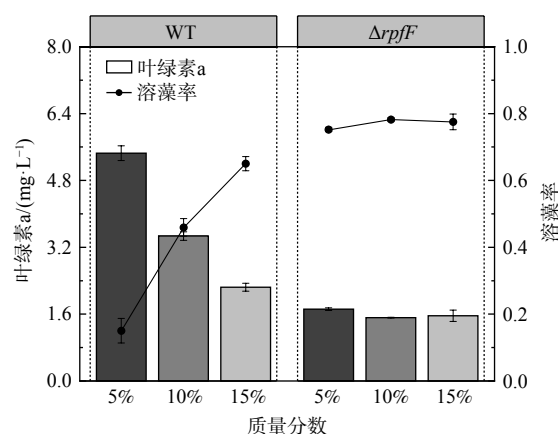


图 4 *S. rhizophila* 的无菌滤液不同投加量对溶藻效果的影响

Fig. 4 The influence of different dosages of sterile filtrate of *S. rhizophila* on algicidal effect

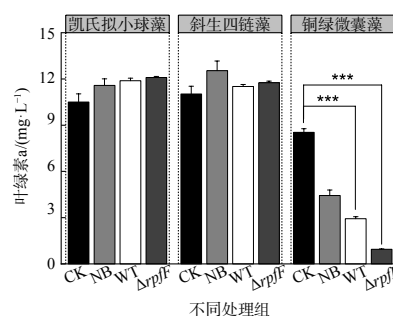


图 5 *S. rhizophila* 对不同藻类的溶藻效果

Fig. 5 The algicidal influence of *S. rhizophila* on different algae

2.3 *S. rhizophila* 溶藻物质的特性

2.3.1 高温对溶藻物质活性的影响

为探究 *S. rhizophila* 溶藻物质的热稳定性, 在不同温度梯度下处理了无菌滤液并进行溶藻实验。由图 6 (a) 可知, WT 无菌滤液未处理组的 7 d 溶藻率为 65.65%, 在低温-40 °C 处理 2 h 后, 溶藻率为 46.74%, 与未处理组相比下降了 28%; 而在高温处理下, 溶藻率保持在 55%~65%。由图 6 (b) 可知, $\Delta rpfF$ 无菌滤液未处理组的溶藻率为 88.43%, 在各处理温度作用后, 溶藻率仍保持约 88%, 几乎未受到任何影响。结果表明, $\Delta rpfF$ 分泌的溶藻物质不管在低温还是高温处理后仍能保持较好的溶藻率, 热稳定性较好, 而 WT 的溶藻物质活性易受温度影响, 稳定性相对 $\Delta rpfF$ 较差。

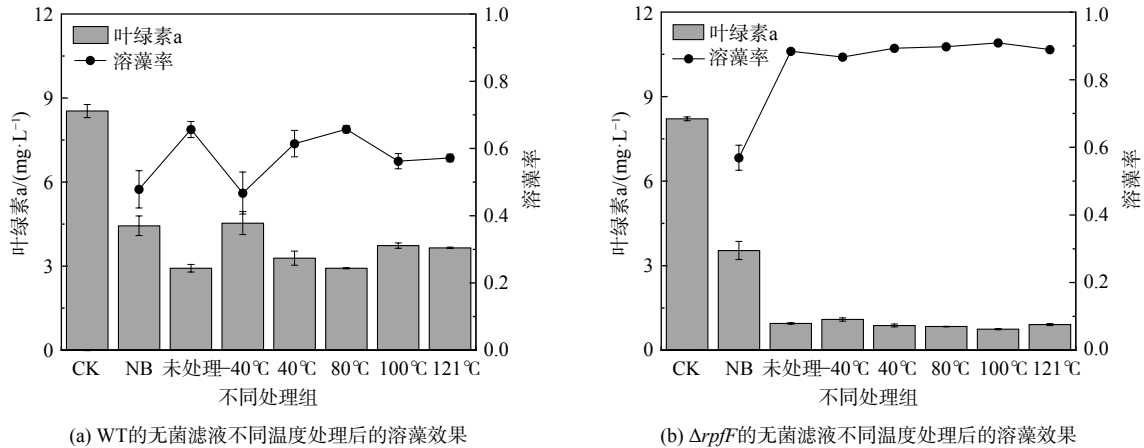


图 6 不同温度处理后 *S. rhizophila* 无菌滤液的溶藻效果

Fig. 6 The algicidal effect of the sterile filtrate of *S. rhizophila* treated at different temperatures

2.3.2 强酸强碱对溶藻物质活性的影响

部分溶藻物质在强酸强碱的条件下也容易失活变性^[31]。为探究 *S. rhizophila* 溶藻物质酸碱稳定性, 在强酸 (pH = 3) 强碱 (pH = 9) 条件下处理无菌滤液并进行溶藻实验, 结果如图 7 所示。WT 未经过任何处理的无菌滤液处理组 7 d 后 Chl a 质量浓度为 (3.242±0.248) mg·L⁻¹, 溶藻率为 56.6%; 而经过强酸强碱处理过后的无菌滤液处理组 Chl a 质量浓度分别为 (3.019±0.077) mg·L⁻¹、(3.237±0.225) mg·L⁻¹, 溶藻率分别为 59.6% 和 56.7%; 而 $\Delta rpfF$ 的未经过任何处理的无菌滤液 7 d 后 Chl a 质量浓度为 (0.861±0.040) mg·L⁻¹, 溶藻率为 88.5%; 经过强酸强碱处理过后, 无菌滤液处理组 Chl a 质量浓度分别为 (1.066±0.027) mg·L⁻¹、(0.997±0.025) g·L⁻¹, 溶藻率分别为 85.7% 和 86.6%。因此, 对照组与处理组之间无显著性差异, 这说明 *S. rhizophila* 分泌的溶藻物质具有较好的酸碱稳定性, 在强酸强碱处理后依然能保持较好的溶藻作用。

2.3.3 乙醇沉淀对溶藻物质活性影响

乙醇是渗透性很强的有机溶剂, 能与氨基酸、核酸、蛋白等物质反应生成絮凝沉淀^[32], 故利用乙醇沉淀无菌滤液并进行溶藻实验可确认 *S. rhizophila* 分泌的溶藻成分中这些物质的存在。

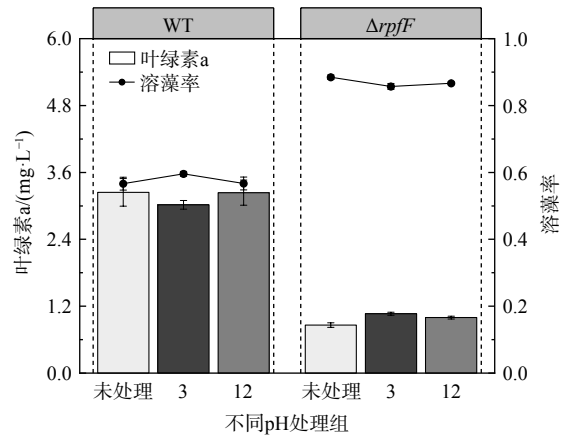


图 7 强酸强碱处理后 *S. rhizophila* 无菌滤液的溶藻效果

Fig. 7 The algicidal effect of the sterile filtrate of *S. rhizophila* treated with strong acid and strong base

图8表明, WT的无菌滤液经乙醇沉淀后, 沉淀部分处理组7d后 Chla 质量浓度为 $(5.47 \pm 0.215) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 溶藻率仅为 17%, 而上清液处理组 Chla 质量浓度为 $(3.97 \pm 0.114) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 溶藻效率为 40%; $\Delta rpfF$ 的无菌滤液经乙醇沉淀后, 沉淀部分处理组7d后 Chla 质量浓度为 $(5.18 \pm 0.326) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 溶藻率仅为 22%, 而上清液处理组 Chla 质量浓度为 $(1.34 \pm 0.048) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 溶藻效率仍保持在约 79.8%。以上结果表明, WT 和 $\Delta rpfF$ 的主要溶藻物质存在上清液, 在乙醇作用下仍表现出较好的溶藻活性, 溶藻物质的稳定性较好; 但同时, 乙醇沉淀部分仍具有较弱的溶藻作用, 故不排除部分溶藻物质为氨基酸、蛋白、核酸等物质。

2.4 无菌滤液的光谱解析

2.4.1 三维荧光光谱分析结果

三维荧光光谱 (3D-EEMs) 是一种强有力的荧光基团分析方法, 可表征产物中的荧光有机物。根据荧光区域积分, 荧光光谱可表征以下几类物质: 类色氨酸物质、类酪氨酸物质、类富里酸物质、类腐殖酸物质^[33]。图9表明, 在 WT 和 $\Delta rpfF$ 的无菌滤液中均检测到激发和发射 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$) 中心位置为 360 nm/430 nm 的类腐殖酸荧光峰。类腐殖酸物质是微生物对大分子有机物的代谢产物, 且这类物质不能被二次代谢^[34]。同时, 从图谱中可看出, $\Delta rpfF$ 中类腐殖酸荧光峰强度高于 WT, 这说明 $\Delta rpfF$ 的生物活性高于 WT, 能在相同时间里在培养液中积累更多的类腐殖酸物质。

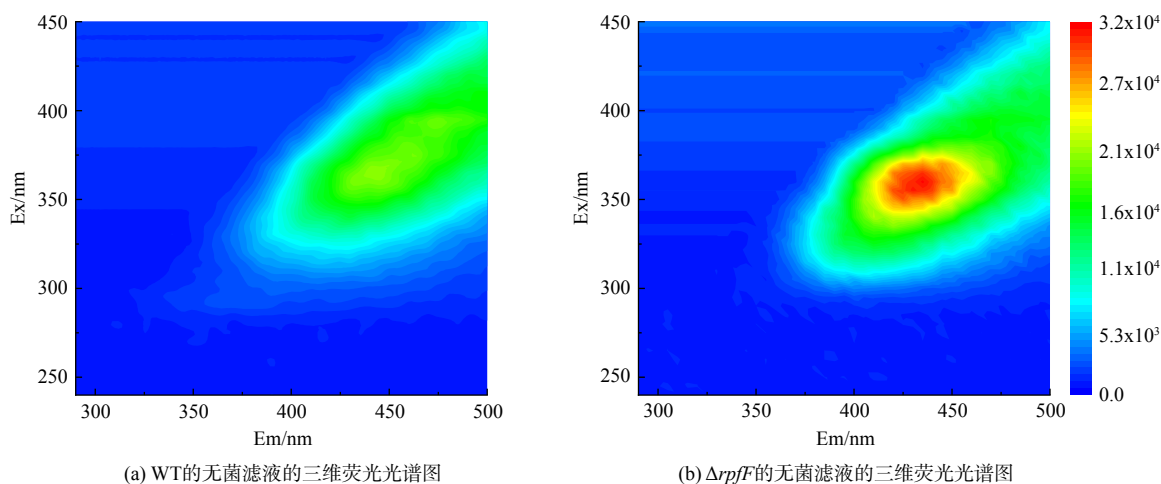


图9 无菌滤液的三维荧光光谱图

Fig. 9 Three-dimensional fluorescence spectra of algal substances

2.4.2 紫外-可见光光谱分析结果

紫外-可见光谱是分子吸收紫外-可见光区域的电磁波而产生的吸收光谱, 可反映无菌滤液在芳香族化合物和共轭体系方面的特性, 并且吸光度与溶液中物质浓度成正比^[35]。图10表明, WT 和 $\Delta rpfF$ 的无菌滤液紫外可见光谱图趋势一致, 在 190~300 nm 范围内的吸收峰密集杂乱, 整个波段内最大吸收峰分别出现在 297 nm 和 299 nm 处。这说明 WT 和 $\Delta rpfF$ 的无菌滤液都含有丰富的芳香结构^[36], 而且在最大吸收峰处 $\Delta rpfF$ 的吸光度要显著高于 WT。这说明 $\Delta rpfF$ 芳香族类化合物质量浓度显著高于 WT, 与三维荧光图的结果一致。同时 A_{250}/A_{365} 的比值一般与样品的腐殖化程度和芳香化程度呈负相关^[37]。在本实验中, WT 的 A_{250}/A_{365} (0.362) 大于 $\Delta rpfF$ (0.104) 即说明后者的芳香化

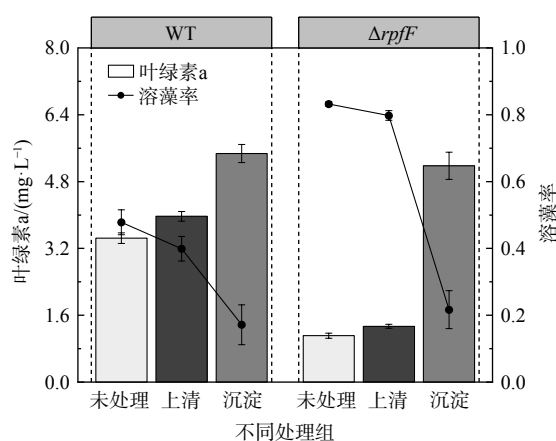


图8 乙醇沉淀后 *S. rhizophila* 无菌滤液的溶藻效果

Fig. 8 The algalicidal effect of *S. rhizophila* sterile filtrate treated with ethanol

程度大于前者, 与上述结果一致。

2.4.3 傅里叶红外光谱分析结果

利用傅里叶转换红外光谱仪对 *S. rhizophila* 的无菌滤液进行分析, 可表征产物的官能团性质及相对浓度^[38]。图 11 记录了无菌滤液在 4 000~500 cm^{-1} 的红外光谱吸收曲线, 对比分析发现 WT 和 $\Delta rpfF$ 的无菌滤液红外光谱图趋势一致, 官能团属性相似。从特征峰的归属来看, 3 200~2 900 cm^{-1} 附近出现了酚羟基或醇羟基的伸缩振动; 1 629 cm^{-1} 附近出现了芳环骨架 (C=C) 的叠加振动或羧酸类化合物 (COO—) 的伸缩振动; 1 400 cm^{-1} 附近出现了脂肪烃类中甲基 (—CH₃) 的弯曲振动; 在 1 000 cm^{-1} 附近显示的是脂类骨架 (C—C) 的伸缩振动^[39-40]。这些峰主要来自无菌滤液中的碳水化合物、脂肪族烷烃、多糖类、核酸等物质^[41]。同时, 从谱图中还发现, 与 WT 相比, 在最大吸收峰处 $\Delta rpfF$ 的红外吸收强度相对较高, 这与三维荧光光谱以及紫外可见光谱的强度变化一致。

3 讨论

本研究通过生理生化实验及光谱学手段探究 DSF-QS 系统对 *S. rhizophila* 溶藻作用的调控, 探明了 DSF-QS 调控菌体表型及生长代谢情况 (图 1)。DSF-QS 缺失的 *S. rhizophila* 菌体形态与野生株不同, 而敲除株在进入稳定期后会生成更多生物量, 但会更快地进入衰亡期。QS 信号分子的识别和传导对于细菌生理代谢和适应性至关重要^[42]。前期研究表明, WT 和 $\Delta rpfF$ 之间的转录调节因子和信号传导相关基因的表达存在较大差异。在 DSF-QS 缺失的情况下, $\Delta rpfF$ 的 DNA 复制相关的基因表达量下调, 细胞增殖能力减弱, 相对于 WT 而言会更快进入衰亡期; 同时, 与细菌趋化性相关基因的表达显著上调, $\Delta rpfF$ 表现出更强的趋化性和生物膜形成能力^[43]。而这些生理代谢的改变可能直接影响了 *S. rhizophila* 的溶藻作用。

WT 能在较短时间内进入生长稳定期, 故 WT 的 3 个生长时期的无菌滤液溶藻效果趋于稳定, 无明显差异 (图 3)。而 $\Delta rpfF$ 具有一段延滞期, 生长前期生物活性较低, 细胞代谢较弱, 分泌到胞外的溶藻物质质量浓度相对较低, 故 12 h 无菌滤液处理组的溶藻作用弱; 而 $\Delta rpfF$ 随着生长进入稳定期, $\Delta rpfF$ 大量增殖, 细胞代谢增强, 培养液中积累了大量溶藻物质, 溶菌效果随之显著提升; 而在 24 h 和 48 h 这 2 个处理组中溶藻效果基本相持平, 这说明 $\Delta rpfF$ 的溶藻效果已趋于稳定, 细菌进入生长后期细胞代谢减弱, 只能依靠前期培养液中累积的溶藻物质来溶藻^[44]。此外, 不同投加量的无菌滤液对 *S. rhizophila* 的溶藻效果也具有较大差异 (图 4)。对于 WT 来说, 处理 7 d 后投加量为 5%、10%、15% 处理组的溶藻率分别依次增加, 溶藻效果随着投加量的增加而加强, 呈现出一定的剂量效应^[45]; 而在 $\Delta rpfF$ 处理组中, 投加量为 5%、10% 和 15% 处理组溶藻效果相近。 $\Delta rpfF$ 在稳定期的生物量显著高于 WT, 这可能导致 WT 的溶藻活性弱于 $\Delta rpfF$, 需依靠较高的无菌滤液溶藻物质浓度才能发挥溶藻作用, 而 $\Delta rpfF$ 分泌的溶藻物质活性较强, 在低浓度下能达到较好的溶藻效果。

从整体上来看, WT 和 $\Delta rpfF$ 的溶藻特性较为相似。WT 和 $\Delta rpfF$ 都对小球藻和栅藻均未表现

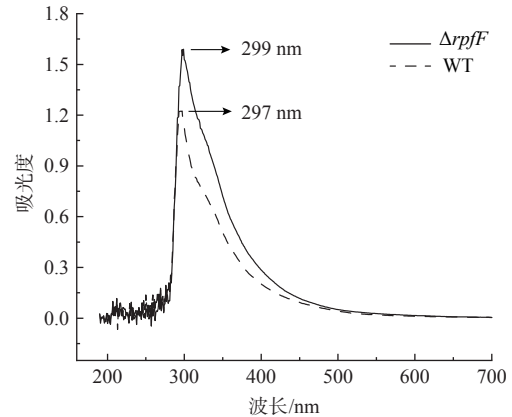


图 10 溶藻物质的紫外-可见光谱

Fig. 10 UV-vis absorption spectrum of algicidal substances

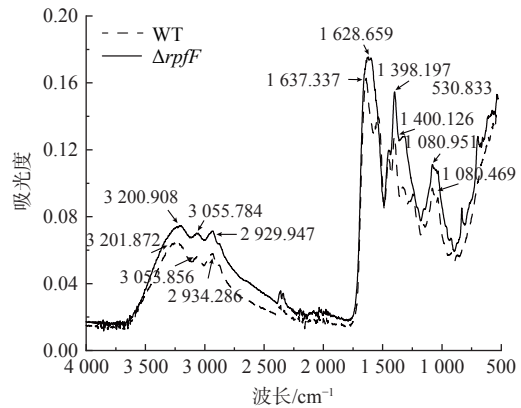


图 11 溶藻物质的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 11 Fourier transform infrared spectroscopy of algicidal substances

出溶藻作用, 具有针对铜绿微囊藻的溶藻特异性(图5), 推测是由于小球藻和栅藻的细胞壁结构及生理代谢不同于铜绿微囊藻, 对溶藻物质具有较强的抗性^[46-47]。此外, WT和 $\Delta rpfF$ 的无菌滤液展现出与菌液一样的溶藻效果, 溶藻活性并没有因为菌体的去除而降低。这说明WT和 $\Delta rpfF$ 主要通过分泌具有溶藻活性的物质进行溶藻, 属于间接溶藻方式(图2)。目前, 从溶藻菌中分离纯化出来的溶藻物质多为蛋白质、氨基酸、抗生素、多肽、生物碱等物质, 部分物质耐高温高压、稳定性好, 方便后续提取和保存^[48]。本研究结果表明, WT和 $\Delta rpfF$ 的溶藻物质都具有热稳定性(图6)、耐强酸强碱(图7), 且经乙醇沉淀后上清依旧保持较好的溶藻活性(图8)。这表明WT和 $\Delta rpfF$ 的主要溶藻物质并非蛋白、糖类、核酸等易变性物质。此外, WT的溶藻物质受温度影响的波动较大, 特别在-40℃处理组中其溶藻率降低了28%, 而 $\Delta rpfF$ 并无此现象。这说明WT和 $\Delta rpfF$ 的溶藻物质在种类上可能存在差异。

溶藻菌的溶藻物质在结构和作用方式上复杂多样, 故进一步通过光谱学技术对WT和 $\Delta rpfF$ 的溶藻物质进行探究。结合三维荧光光谱(图9)、紫外可见光光谱(图10)、傅里叶变换红外光谱图(图11)结果分析发现, *S. rhizophila* WT和 $\Delta rpfF$ 的无菌滤液中主要以类腐殖酸物质为主, 含有芳香基团, 附带羧基、羟基等官能团。类腐殖酸物质是一种具有芳香基团的大分子多聚物, 能与铁元素形成络合物, 降低其生物利用度^[49]。而铁元素参与藻类光合作用中电子传输蛋白的合成以及还原有机化合物, 铁耗竭会抑制藻的生长^[50], 这为WT和 $\Delta rpfF$ 抑制铜绿微囊藻生长的机制提供了一个合理解释。然而, 类腐殖酸物质是一类弱酸性大分子有机物, 具有热稳定性但在碱性环境中并不稳定, 这与上述酸碱稳定性结果并不符, 由此说明类腐殖酸物质络合铁并不是WT和 $\Delta rpfF$ 主要的溶藻方式, 可能存在其他溶藻物质。这也表明*S. rhizophila*并不是代谢某一类单一物质进行溶藻, 而是通过分泌多种溶藻物质共同作用的结果^[11]。此外, 从荧光强度及吸光度看, $\Delta rpfF$ 无菌滤液中类腐殖酸物质含量和芳香化程度均高于WT, 结合WT和 $\Delta rpfF$ 的生长代谢差异分析表明, WT和 $\Delta rpfF$ 的溶藻物质在浓度上也存在差异。

综上所述, DSF-QS与*S. rhizophila*的溶藻作用密切相关。当DSF-QS缺失后, *S. rhizophila*的生物量显著增加, 代谢活性增强, 在相同的生长周期内能代谢出更多的溶藻物质, 进而增强了*S. rhizophila*的溶藻能力。

4 结论

1) *S. rhizophila*是一株溶藻功能菌, 不同生长时期的无菌滤液和不同的投加量会对菌的溶藻效果有较大影响。其中, 当采用48h的无菌滤液且投加量为10%时, WT和 $\Delta rpfF$ 的溶藻效果最优, 溶藻率分别为53%和78%。2) *S. rhizophila* WT和 $\Delta rpfF$ 主要通过分泌胞外溶藻物质进行溶藻, 且溶藻物质稳定性较好, 不易降解和失活, 在高温高压及强酸强碱的处理下依然能保持较好的溶藻活性; 同时, *S. rhizophila*产生的溶藻物质并非蛋白质、糖类、核酸等单一物质, 不易被乙醇沉淀。3) *S. rhizophila* WT和 $\Delta rpfF$ 的无菌滤液主要以类腐殖酸物质为主, 且该物质含有芳香基团, 附带羧基、羟基等官能团, 能络合铜绿微囊藻所必需的微量元素, 进而限制铜绿微囊藻的生长。从荧光强度及吸光度看, $\Delta rpfF$ 无菌滤液中类腐殖酸物质的质量浓度高于WT。这说明DSF-QS缺失使菌体代谢出更多溶藻物质, 进而增强了*S. rhizophila*的溶藻能力。DSF-QS系统对*S. rhizophila*溶藻作用的调控模式为溶藻菌的应用提供了新思路。

参考文献

- [1] ULLAH H, NAGELKERKEN I, GOLDENBERG S U, et al. Climate change could drive marine food web collapse through altered trophic flows and cyanobacterial proliferation[J]. *PLoS biology*, 2018, 16(1): e2003446.
- [2] RAVEN J A, GOBLER C J, HANSEN P J. Dynamic CO₂ and pH levels in coastal, estuarine, and inland waters: Theoretical and observed effects on harmful algal blooms[J]. *Harmful Algae*, 2020, 91: 101594.
- [3] HUISMAN J, CODD G A, PAERL H W, et al. Cyanobacterial blooms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(8): 471-483.
- [4] MOUSTAKA-GOUNI M, SOMMER U. Effects of harmful blooms of large-sized and colonial cyanobacteria on aquatic food webs[J]. *Water*, 2020, 12(6): 1587.
- [5] KARLSON B, ANDERSEN P, ARNEBORG L, et al. Harmful algal blooms and their effects in coastal seas of Northern Europe[J]. *Harmful algae*, 2021, 102: 101989.
- [6] YU R, LU S, QI Y, et al. Progress and perspectives of harmful algal

- bloom studies in China[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(4): 768-788.
- [7] COYNE K J, WANG Y F, JOHNSON G. Algicidal bacteria: a review of current knowledge and applications to control harmful algal blooms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 871177.
- [8] CRUMP B C, WOJAHN J M, TOMAS F, et al. Metatranscriptomics and amplicon sequencing reveal mutualisms in seagrass microbiomes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 388.
- [9] ZHANG P, ZHAI C M, CHEN R Q, et al. The dynamics of the water bloom-forming *Microcystis aeruginosa* and its relationship with biotic and abiotic factors in Lake Taihu, China[J]. *Ecological Engineering*, 2012, 47: 274-277.
- [10] LIN S Q, GENG M X, LIU X L, et al. On the control of *Microcystis aeruginosa* and *Synechococcus* species using an algicidal bacterium, *Stenotrophomonas* F6, and its algicidal compounds cyclo-(Gly-Pro) and hydroquinone[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(1): 345-355.
- [11] GUO X L, LIU X L, WU L S, et al. The algicidal activity of *Aeromonas* sp strain GLY-2107 against bloom-forming *Microcystis aeruginosa* is regulated by N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11): 3867-3883.
- [12] SEYEDSAYAMDOST M R, CASE R J, KOLTER R, et al. The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*[J]. *Nature chemistry*, 2011, 3(4): 331-335.
- [13] QIXIN L, XUAN F, ZHIYA S, et al. Enhanced wastewater treatment performance by understanding the interaction between algae and bacteria based on quorum sensing[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 354: 127161.
- [14] WHITELEY M, DIGGLE S P, GREENBERG E P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research[J]. *Nature*, 2018, 555(7694): 126-126.
- [15] EICKHOFF M J, BASSLER B L. Snapshot: bacterial quorum sensing[J]. *Cell*, 2018, 174(5): 1328-1328.e1.
- [16] PAPPENFORTH K, BASSLER B L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-588.
- [17] LIU J, LEWITUS A J, KEMPTON J W, et al. The association of algicidal bacteria and raphidophyte blooms in South Carolina brackish detention ponds[J]. *Harmful Algae*, 2008, 7(2): 184-193.
- [18] ZHOU L, ZHANG L H, CAMARA M, et al. The DSF family of quorum sensing signals: diversity, biosynthesis, and turnover[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(4): 293-303.
- [19] HUEDO P, YERO D, MARTINEZ-SERVAT S, et al. Decoding the genetic and functional diversity of the DSF quorum-sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 761.
- [20] 宋凯, 周莲, 何亚文. DSF-家族群体感应信号生物合成途径与调控机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(4): 1239-1248.
- [21] ZHOU S, YIN H, TANG S, et al. Physiological responses of *Microcystis aeruginosa* against the algicidal bacterium *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 127: 214-221.
- [22] 阴盼晴. 海洋嗜麦芽寡养单胞菌JX14对锥状斯氏藻抑藻机理的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2019.
- [23] ZHANG Q, WANG Y, ZHOU J. Complete genome sequence of *Stenotrophomonas Rhizophila* kc1 a quorum sensing-producing algicidal bacterium isolated from Mangrove *Kandelia candel*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2021, 34(7): 857-861.
- [24] YIN P Q, ZHANG Q, ZHU J M, et al. The data of genomic and phenotypic profiles of the N-acyl homoserine lactone-producing algicidal bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* GA1[J]. *Data in Brief*, 2018, 21: 966-971.
- [25] ZENG G M, ZHOU J, HUANG T, et al. Extraction of chlorophyll-a from eutrophic water by repeated freezing and thawing-extraction method[J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2014, 26(8): 2289-2292.
- [26] 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(7): 1-12.
- [27] ROTH P B, TWINER M J, MIKULSKI C M, et al. Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*[J]. *Harmful Algae*, 2008, 7(5): 682-691.
- [28] YU Y, ZENG Y D, LI J, et al. An algicidal *Streptomyces amritsarensis* strain against *Microcystis aeruginosa* strongly inhibits microcystin synthesis simultaneously[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 34-43.
- [29] MEYER N, BIGALKE A, KAULFUSS A, et al. Strategies and ecological roles of algicidal bacteria[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2017, 41(6): 880-899.
- [30] 张嗣萍. 一株广谱性溶藻细菌的筛选鉴定、溶藻特性及溶藻机理的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [31] ZHENG X W, ZHANG B Z, ZHANG J L, et al. A marine algicidal actinomycete and its active substance against the harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(20): 9207-9215.
- [32] 范德朋, 胡亚冬, 杨敏志, 等. 鱼腥藻藻华水体一株溶藻菌BWFA55的鉴定及溶藻特性[J]. *广东海洋大学学报*, 2021, 41(6): 9-17.
- [33] CHEN W, PAUL W, LEENHEER J A, et al. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(24): 5701-5710.
- [34] JIAO N, HERNDL G J, HANSELL D A, et al. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(8): 593-599.
- [35] ZHAO X Y, ZHAO K, SUN P Q. A method to describe the shapes of UV-vis absorbance spectra during the aggregation process of conjugated polymer solutions quantitatively[J]. *Chemical Physics Letters*, 2019, 730: 582-586.
- [36] 李岩岩, 赵娜, 马丽娟, 等. 土壤腐殖酸的紫外-可见光谱表征[J]. *大连民族学院学报*, 2011, 13(5): 538-539.
- [37] SUN B, LI Y S, SONG M J, et al. Molecular characterization of the composition and transformation of dissolved organic matter during the semi-permeable membrane covered hyperthermophilic composting[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 425: 127496.
- [38] CHAVEZ-VERGARA B, MERINO A, VAZQUEZ-MARRUFO G, et al. Organic matter dynamics and microbial activity during decomposition of forest floor under two native neotropical oak species in a temperate deciduous forest in Mexico[J]. *Geoderma*, 2014, 235: 133-145.
- [39] 段漓童, 刘正猛. 红外光谱图的分区[J]. *华北煤炭医学院学报*, 2006, 8(3): 336-337.
- [40] 张明洋, 朱兆龙, 李好好, 等. 不同傅里叶变换红外光谱法研究土壤光谱特征的比较与应用[J]. *水土保持研究*, 2022, 29(6): 121-128.
- [41] 倪文海, 刘欢, 刘振涛, 等. 水稻秸秆腐解过程溶解性有机质红外光谱研究[J]. *土壤*, 2013, 45(2): 1220-1226.
- [42] KROL E, SCHAPER S, BECKER A. Cyclic di-GMP signaling controlling the free-living lifestyle of alpha-proteobacterial rhizobia[J]. *Biological Chemistry*, 2020, 401(12): 1335-1348.
- [43] LIU Y, GAO J, WANG N, et al. Diffusible signal factor enhances the saline-alkaline resistance and rhizosphere colonization of *Stenotrophomonas rhizophila* by coordinating optimal metabolism[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 834: 155403.
- [44] 司晓光, 张晓青, 郝建安, 等. 芽孢杆菌dhs-330-021对链状亚历山大藻

- 的溶藻机理研究[J]. *生物技术通讯*, 2017, 28(4): 485-489.
- [45] 卢露, 马金玲, 牛晓君, 等. 铜绿微囊藻溶藻菌EA-1的分离鉴定及溶藻特性[J]. *中国环境科学*, 2021, 41(11): 5372-5381.
- [46] 李超, 惠晓梅, 潘子鹤, 等. 四尾栅藻和蛋白核小球藻对模拟生活污水的处理性能研究[J]. *太原理工大学学报*, 2021, 52(6): 880-886.
- [47] SARANYA D, SHANTHAKUMAR S. Green microalgae for combined sewage and tannery effluent treatment: performance and lipid accumulation potential[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 241: 167-178.
- [48] LI Z H, LIN S Q, LIU X L, et al. A freshwater bacterial strain, *Shewanella* sp Lzh-2, isolated from Lake Taihu and its two algicidal active substances, hexahydropyrrolo 1, 2-a pyrazine-1, 4-dione and 2, 3-indolinedione[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(10): 4737-4748.
- [49] SUN B K, TANJI Y, UNNO H. Influences of iron and humic acid on the growth of the cyanobacterium *Anabaena circinalis*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2005, 24(3): 195-201.
- [50] IMAI A, FUKUSHIMA T, MATSUSHIGE K. Effects of iron limitation and aquatic humic substances on the growth of *Microcystis aeruginosa*[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1999, 56(10): 1929-1937.

(责任编辑: 靳炜)

Enhancement of algicidal activity of *Stenotrophomonas rhizophila* induced by the absence of DSF quorum-sensing system

FANG Na^{1,2}, CHE Rongxiao¹, GAO Jie^{2,3}, LIU Ying^{2,4}, DENG Junyi², ZHUANG Xuliang^{2,3,5,*}

1. Institute of International Rivers and Eco-security, Yunnan University, Kunming 650500, China; 2. CAS Key Laboratory of Environment Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 3. College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Institute of Advanced Agricultural Sciences, Peking University, Weifang 261000, China; 5. State Key Laboratory of Tibetan Plateau Earth System, Environment and Resources (TPESER), Institute of Tibetan Plateau Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

*Corresponding author, E-mail: xlzhuang@rcees.ac.cn

Abstract There are complicated and volatile interrelationships between algae and microorganisms in aquatic environments, of which quorum sensing (QS) of microorganisms can influence and regulate the symbiotic relationship between bacteria and algae. In this study, *S. rhizophila* wild-type (WT) and an incompetent DSF production *rpfF*-knockout mutant ($\Delta rpfF$) were used to illustrate whether DSF-QS could regulate the algicidal effects of *S. rhizophila* on *Microcystis aeruginosa*. The results showed that *S. rhizophila* WT and $\Delta rpfF$ had similar algicidal characteristics. Both strains had algicidal specificity for *Microcystis aeruginosa*, mainly via secreting extracellular algicidal substances indirectly against algae. After 48 h of culture, the sterile filtrate of *S. rhizophila* WT and $\Delta rpfF$ showed significant algicidal effects. The algicidal rate of wild and knockout strains was 53% and 78% after a 7-day incubation when feeding 10%(v/v) sterile filtrate. The algicidal substances had better thermal stability and acid-base tolerance and were not easy to precipitate using ethanol. Three-dimensional fluorescence spectroscopy, UV-vis absorption spectrum, and Fourier transform infrared spectroscopy showed that the extracellular filtrate of the strain was mainly composed of humic acid-like substances with a high degree of aromatification. Meanwhile, the content of humic acid-like substances in the sterile filtrate of *S. rhizophila* $\Delta rpfF$ was significantly higher than *S. rhizophila* WT by comparing fluorescence intensity and absorbance. The above experimental results verified that the *S. rhizophila* lacking DSF quorum-sensing system had more biomass and could secrete more algicidal substances, which enhanced the algicidal effects of *S. rhizophila*. In this study, the understanding of bacteria-algal interaction was broadened, thus a better understanding of the inhibition mechanism of algicidal bacteria on harmful algal blooms was achieved. The results of this study can provide a reference for the technical system of bacteriological agents to control blooms.

Keywords *Stenotrophomonas rhizophila*; *Microcystis aeruginosa*; quorum sensing; diffused signal factor