

双季铵盐与溶藻细菌协同控藻特性研究

郭惠娟¹, 孙再庆², 沈红池¹, 吴韵秋¹, 张文艺¹

(1. 常州大学 环境与安全工程学院, 江苏 常州 213164; 2. 常州市武进环境监测站, 江苏 常州 213000)

摘要: 针对夏季鱼塘藻类大量繁殖, 常规化学法除藻影响水生生物生长和水产品质量, 而生物控藻周期长、见效慢等难题, 利用自主研发的具有除藻作用的双十二烷基 γ -双季铵盐(DBAS)和从太湖激浪鱼肠道中筛选并培育的高效溶藻细菌 G6 进行协同控藻特性研究, 考察了投加 DBAS、G6 菌产生的协同控藻效果和 DBAS 对 G6 菌溶藻活性的影响。结果表明: 单独投加 10 mg/L 的 DBAS 时, 第 5 天除藻率达到 100%; 单独投加 G6 菌(菌藻比为 1:10), 第 3 天除藻率达到 42%; 协同控藻时 DBAS 投加量为 2 mg/L、G6 菌藻投加比为 1:8, 第 6 天除藻率为 82%, 协同控藻效果明显。DBAS、G6 协同控藻机制可能是: DBAS 先对 G6 菌产生作用, 降低了除藻效率, 当药剂与 G6 菌的作用达到平衡后, G6 菌与 DBAS 产生共同除藻作用, 侵蚀藻细胞壁, 破坏藻细胞结构, 藻细胞死亡、沉淀, 从而达到控藻目的。

关键词: 协同控藻; 双十二烷基 γ -双季铵盐; 溶藻细菌

中图分类号: TU992.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2020)03-0062-06

Synergistic Removal of Algae Using Bis-quaternary Ammonium Salt and Algicidal Bacteria

GUO Hui-juan¹, SUN Zai-qing², SHEN Hong-chi¹, WU Yun-qi¹, ZHANG Wen-yi¹

(1. School of Environmental & Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. Environmental Monitoring Station of Wujin District in Changzhou City, Changzhou 213000, China)

Abstract: In the prevention of algal bloom in summer, the conventional chemical method can remove algae but also affect the growth of aquatic organisms and the quality of aquatic products. A synergistic algae removal process using di-dodecyl γ -bis-quaternary ammonium salt (DBAS) and algicidal bacteria (G6) was developed. The separate and synergistic algae removal effect of DBAS and G6 were investigated. The results showed that: when 10 mg/L DBAS was added separately, the 5-day removal rate of algae reached 100%. For the G6 bacteria (G6 : algae was 1 : 10), the 3-day removal rate of algae reached 42%. When the DBAS was 2 mg/L and the G6 : algae was 1 : 8, the 6-day removal rate of algae was 82%. A possible mechanism of synergistic removal of algae was as follows: DBAS initially killed bacteria, reduced the removal efficiency of algae, until a balance was reached between the DBAS and G6 bacteria; then, G6 bacteria and DBAS worked together to kill algae, penetrated the algae cell

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41571471); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07202002)
通信作者: 张文艺 E-mail: zhangwenyi888@sina.com

wall, destroyed the structure of algae cell, which resulted in algae cell death and sedimentation.

Key words: synergistic removal of algae; di-dodecyl γ -bis-quaternary ammonium salt (DBAS); algicidal bacteria

水华会造成水体恶臭、溶解氧减少,最终破坏水体生态平衡^[1-2]。铜绿微囊藻是淡水体系中分布最广、生长最集中、暴发最频繁的藻类,也是造成水华的主要藻类之一^[3]。铜绿微囊藻会产生对肝脏具有损害力的微囊藻毒素(MCs),它的食用量超过一定指标会致癌^[4-5]。传统的除藻方法有人工打捞、曝气法、超声波灭藻、活性炭吸附等,这些物理方法成本高且除藻不彻底^[6-8]。在藻类繁殖旺季,通常会投加一些化学药剂如硫酸铜、高锰酸钾或者氯^[9-12]。化学试剂能快速除藻且效果显著,但是投加过多药剂会改变水体pH值,还会造成二次污染^[13]。菌剂除藻近年来受到广泛关注,其价格便宜、来源广泛,是一种价廉环保的除藻方式^[14-18]。

从环保性和价格方面考虑,菌剂除藻有一定的优势,但菌剂除藻见效慢,在蓝藻大量暴发时去除能力不够。综合化学除藻快速、高效和生物除藻周期长的特点,利用本课题组研发的具有杀藻作用的双十二烷基 γ -双季铵盐(DBAS)^[19]和从太湖激浪鱼肠道中筛选并培育的高效溶藻细菌G6^[20]进行协同控藻研究,在G6菌剂除藻的基础上投加DBAS,考察DBAS和G6菌的联合控藻效果,探究二者联合控藻的特性,旨在为养殖水体夏秋季节藻类治理提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用的藻种为铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)FACHB-905,购于中科院武汉水生生物研究所国家淡水藻种库。将购买的藻静置于光照培养箱中培养,培养箱条件:温度为28℃、光照度为2500 lx、光暗周期比为12 h : 12 h。

溶藻细菌LB液体培养基:蛋白胨为10 g/L,氯化钠为10 g/L,酵母浸膏为5 g/L,pH值为7.2。

1.2 试验方法

1.2.1 DBAS溶液配制

称取1 g DBAS样品于100 mL烧杯中,加30 mL蒸馏水与DBAS搅拌至完全溶解后倒入100 mL容量瓶,清洗两次烧杯并将清洗液引入容量瓶,定容,配成质量浓度为10 g/L的溶液,备用。

1.2.2 G6菌的培养

将实验室保藏的G6菌用接种环挑取一株接入已经高温灭菌且冷却后的液体培养基中。将接种过G6菌的培养液平稳放置在转速为130 r/min、温度为30℃并保持条件不变的振荡培养箱内振荡18 h。

1.2.3 藻类去除率的计算

利用乙醇法提取叶绿素,测定每天的叶绿素a(Chl-a)含量并计算藻类去除率。

$$\text{藻类去除率} = \frac{\text{空白组 Chl-a} - \text{处理组 Chl-a}}{\text{空白组 Chl-a}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 DBAS投加量对除藻的影响

向100 mL藻液中添加之前已经配制好的10 g/L的DBAS,使其在藻液中浓度分别为5、8、10、12 mg/L,并于温度为28℃、光照度为2500 lx、光暗周期比为12 h : 12 h的条件下在光照培养箱中静置培养,每天吸取10 mL液体测定Chl-a值,并与空白样比较,得到藻类去除率和剩余率。

1.2.5 投加DBAS对藻液OD₆₈₀的影响

向100 mL藻液中添加之前已配制好的10 g/L的DBAS,使其在藻液中浓度分别为5、8、10、12 mg/L,并于温度为28℃、光照度为2500 lx、光暗周期比为12 h : 12 h的条件下在光照培养箱中静置培养,每天取样测定不同DBAS浓度下藻液的OD₆₈₀值。

1.2.6 DBAS投加量对G6菌溶藻效果的影响

将培养18 h的菌液按照菌藻比为1 : 10投加在新鲜藻液中,并同时向藻液中投加DBAS,使其浓度分别为0、1、2、3、4、5 mg/L。将溶液置于光暗周期比为12 h : 12 h的光照条件下进行溶藻试验,并保持光照培养箱温度为28℃、光照度为2500 lx不变,每天吸取10 mL液体测定Chl-a值,并与空白样比较,得到藻类去除率和剩余率。

1.2.7 G6菌投加量对协同控藻的影响

向新鲜藻液中投加DBAS溶液使其浓度达到2 mg/L,将培养18 h的菌液分别按照菌藻比为1 : 50、1 : 25、1 : 16、1 : 12.5、1 : 50投加。于光暗周期比为12 h : 12 h的光照条件下进行溶藻试验,保持光照培养箱温度为28℃、光照度为2500 lx,每天吸

取10 mL液体测定Chl-a值,并与空白样比较,得到藻类去除率和剩余率。

1.2.8 DBAS投加时间对协同控藻的影响

分别在第1、3、5天添加2 mg/L的DBAS,于光暗周期比为12 h:12 h的条件下进行溶藻试验,保持光照培养箱温度为28 ℃、光照度为2 500 lx,每天吸取10 mL液体测定Chl-a值,并与空白样比较,得到藻类去除率和剩余率。

1.2.9 显微镜观察DBAS与G6菌感染的藻细胞

在新鲜藻液中分别投加3 mg/L的DBAS与10%的G6菌液,反应3 d后分别在新鲜藻液、投加DBAS与G6菌液的溶液中滴加鲁哥氏液,24 h后取一滴样品液滴在载玻片上用显微镜观察。

2 结果与讨论

2.1 DBAS的投加量对除藻的影响

试验结果表明,投加的DBAS浓度越高,对铜绿微囊藻的去除速率越快,去除率越大(见图1)。藻液中DBAS浓度介于5~12 mg/L,均能起到除藻作用。在第1天,5 mg/L的DBAS对藻的去除率就达到56.5%,随着药剂作用时间的增加,去除率呈先直线上升后趋于平缓的趋势,随着藻的死亡量剧增,消耗的DBAS也增加,在第7天时剩余药剂只能杀死新增长的藻,无法再进行进一步的去除。当加入浓度为8 mg/L的DBAS时,初始去除率高于DBAS为5 mg/L时的去除率,第8天藻全部死亡,并且随着时间的增加,藻没有重新生长的趋势,说明DBAS的除藻效果很彻底。当DBAS浓度为10、12 mg/L时,除藻能力相同,所以10 mg/L是DBAS的最佳浓度,比DBAS浓度为8 mg/L时去除速率更快,在第5天对藻类的去除率就达到100%,并且能够保持这种效果。

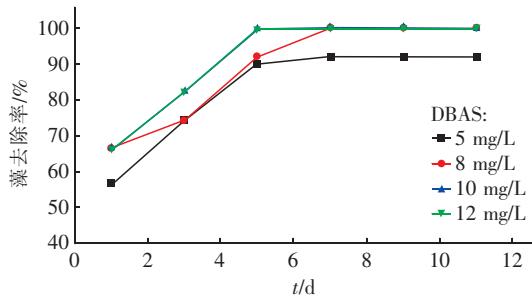


图1 不同DBAS浓度的除藻效果

Fig. 1 Removal effect of algae under different DBAS concentrations

2.2 投加DBAS对OD₆₈₀的影响

图2是投加不同浓度DBAS后藻液的OD₆₈₀值。可以看出,未投加药剂的藻液其OD₆₈₀值随着时间变化越来越大,可能是因为没有药剂的抑制,藻生长较快,观察到藻液颜色随着时间变化也越来越绿。投加DBAS后藻液OD₆₈₀值均比未加DBAS时的初始值低,并且在12 d时仍比空白样的OD₆₈₀值要低。加药后藻液绿色随时间变化慢慢消退,说明OD₆₈₀值减小的原因是藻在药剂作用下被抑制或杀死,并且效果比较持久。

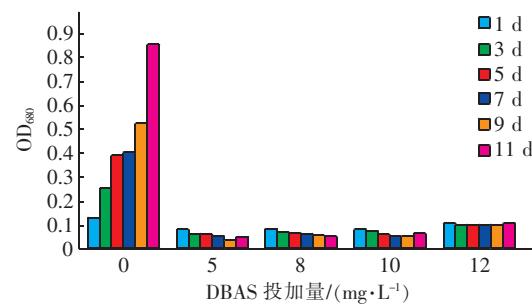


图2 不同DBAS浓度下的藻液OD₆₈₀

Fig. 2 OD₆₈₀ of algae under different DBAS concentrations

2.3 DBAS浓度对协同控藻效果的影响

单独投加G6菌,第3天去除率达到42%^[20],但是随着时间的增加,菌的生长会导致水体变浑浊,而药剂既可杀藻又可杀菌。所以本试验向菌藻比为1:10的藻液中投加浓度为1~5 mg/L的DBAS,试验结果见图3。

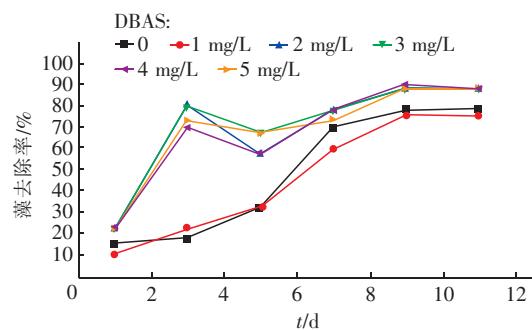


图3 DBAS浓度对G6菌和DBAS协同控藻效果的影响

Fig. 3 Effect of DBAS concentrations on synergistic removal of algae by strain G6 and DBAS

由图3可以看出,未加DBAS时,G6菌溶藻效果比较缓慢,到第9天时去除率为77.5%,较投加DBAS的去除效果略低。投加1 mg/L的DBAS以后,第1天的除藻效果反而比只加菌时更差,可能是

因为DBAS浓度较低时先选择杀灭量少的G6菌,从而导致菌对藻的去除效果下降,而随着G6菌的增加,菌对藻的去除作用增强,导致藻的生长速率低于藻的去除速率,藻含量越来越少;G6菌由于受到DBAS的影响,生长速率相应变慢,最后的去除效果要比只加菌时差。继续增加DBAS的浓度,可以很明显地看到藻的去除速率加快,当投加2~5 mg/L的DBAS时,菌药联用对藻的去除作用更加显著,第3天时去除率就能达到70%,但在第5天时去除率都有所下降,原因可能是第1天所加的DBAS先与藻液中含量更高的藻作用,使得去除率急剧上升,随着藻含量的减少以及G6菌的增加,DBAS开始对G6菌产生作用,菌与药剂相互作用,使得藻又得以生长;在第5天之后藻的去除率又平稳增加,可能是DBAS与G6菌之间的作用达到一个平衡,这个平衡使得G6菌能够正常繁殖,而不作用于G6菌的DBAS和G6菌能够一起对藻进行降解。

2.4 G6菌投加量对协同控藻效果的影响

单独投加菌液时,为了防止菌生长过度造成水体浑浊,菌藻比为1:10时除藻效果最佳。本试验投加的DBAS既能杀藻也能杀死一定量的菌,在确定DBAS浓度为2 mg/L时,投加不同量的G6菌观察溶藻效果,结果见图4。

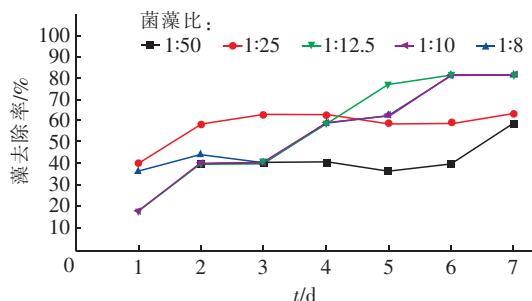


图4 G6菌投加量对G6菌和DBAS协同控藻效果的影响

Fig. 4 Effect of G6 dosage on synergistic removal of algae by strain G6 and DBAS

由图4可以看出,当菌藻比为1:50时,第1天的去除率较高,可能是因为菌浓度过低时DBAS优先选择与藻反应,而当菌繁殖到一定浓度后,DBAS开始杀菌;菌的初始浓度较低导致菌繁殖量不多,DBAS杀死了大量菌而消耗了药剂量,因此最终溶藻效果不佳。当菌藻比为1:25时,前4 d的溶藻效果较好,但是到第4天后藻的浓度又增加了,说明此后药剂和菌的溶藻效果减弱了,因为在第4天后

DBAS主要作用是抑制并杀死溶藻细菌G6,抑制藻生长的力量削弱了,藻的生长速率加快。当菌藻比为1:8、1:12.5和1:10时,去除率整体呈上升趋势,药剂和菌同时对藻产生抑制作用,在第6天时去除率达到了82%。从图4还可知,当菌藻比为1:12.5和1:10时,在前几天溶藻效果比菌浓度低的试验组差,说明投加的菌达到一定浓度后,DBAS先对菌产生作用,降低了其除藻率,等到药剂与菌的作用保持平衡后,菌与药剂共同杀藻。综上,当DBAS浓度为2 mg/L时,最适菌藻比为1:8。

2.5 DBAS投加时间对协同控藻的影响

向新鲜藻液中按照菌藻比为1:8投加G6菌液后,分别在第1、3、5天添加2 mg/L的DBAS,考察DBAS投加时间对协同控藻的影响,结果见图5。可以看出,最初未加药的试验组由于所加菌剂较少,在第1天的去除率为零,而既加菌又加药的试验组在初始阶段主要由药剂进行除藻。随着菌的增殖,去除率也得到提高,比较单独加菌和第5天投加药剂的去除率,前4 d的溶藻效果相同,但第5天加入DBAS后除藻效果反而被削弱,说明此时投加的DBAS主要与菌发生反应,并没有起到除藻效果,而大量菌被DBAS杀死,导致菌对藻的去除效果减弱。第3天投加DBAS,此时溶液中菌含量不高,少量菌被DBAS杀死,之后菌与药剂协同控藻。第1天加入DBAS,除藻效果除在第3天受到DBAS的抑制,其余时间均呈直线上升趋势,相较于单独投菌,去除率增加了21%。所以在藻类爆发时可以先加药控制再投加菌剂。

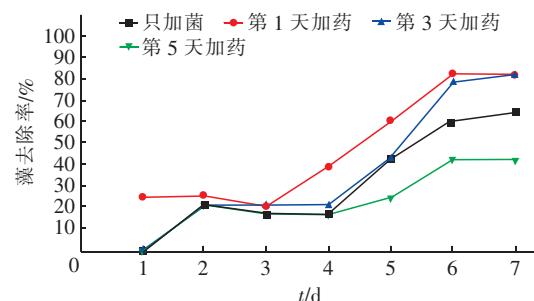


图5 DBAS投加时间对G6菌和DBAS协同控藻效果的影响

Fig. 5 Effect of DBAS dosing time on synergistic removal of algae by strain G6 and DBAS

2.6 藻细胞形态破坏的显微镜分析

利用倒置生物显微镜在1 000倍下可以观察到未加药或加菌前的铜绿微囊藻细胞是完整的藻细胞

形态,加了DBAS或G6菌之后藻细胞明显破碎(见图6),说明加药和加菌都能侵蚀藻的细胞壁,破坏藻细胞的结构。

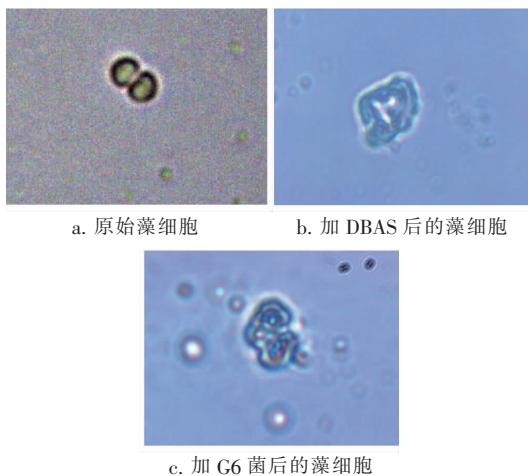


图6 加G6菌和DBAS前后藻细胞形态

Fig. 6 Morphology of algal cells before and after adding strain G6 and DBAS

2.7 DBAS与G6菌的除藻效果

在新鲜藻液中分别投加DBAS溶液和G6菌液,随反应时间的增加,藻液中绿色减少,同时测得叶绿素a含量降低。观察发现藻死亡率升高,瓶底的白色絮状物质增多,加入G6菌的瓶内沉积物更多,一部分为杀死的藻,另一部分则是生长过多的细菌。第6天时,两锥形瓶中的叶绿素a含量几乎为零,此时已完全看不到绿色。加入DBAS的藻液呈白色且较透明,而加入G6菌的锥形瓶内溶液较黄且较加入DBAS的溶液浑浊,生长的菌体大部分沉于瓶底。

3 结论

① 投加DBAS与G6菌协同控藻,当DBAS投加量为2 mg/L时,菌药联用对藻的去除作用更显著,但去除率先下降后平稳增加,可能是因为药剂DBAS与G6菌之间的作用达到平衡。

② DBAS与G6菌协同控藻机制可能是:DBAS先对G6菌产生作用,降低了其除藻效率;DBAS与G6菌的作用达到平衡后,二者共同灭藻,侵蚀藻细胞壁,破坏藻细胞结构,使得藻细胞死亡、沉淀。

参考文献:

- [1] 葛仙梅,朱铁才. 饮用水源地的水华对人体健康风险评价[J]. 环境与发展,2014,26(3):166-167.
- [2] 黄奕龙,王仰麟,谭启宇,等. 城市饮用水源地水环境健康风险评价及风险管理[J]. 地学前缘,2006,13(3):162-167.
- Huang Yilong, Wang Yanglin, Tan Qiyu, et al. Environmental health risk assessment and management for urban water supply sources [J]. Earth Science Frontiers, 2006, 13(3):162-167(in Chinese).
- [3] Chen Y Y, Li J, Wei J, et al. Vitamin C modulates *Microcystis aeruginosa* death and toxin release by induced Fenton reaction [J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 321(5):888-895.
- [4] 张庭廷,张胜娟. 微囊藻毒素的危害及其分析方法研究进展[J]. 安徽师范大学学报:自然科学版,2014,37(1):53-57.
- Zhang Tingting, Zhang Shengjuan. The research progress of microcystins's harm and its analysis techniques [J]. Journal of Anhui Normal University: Natural Science, 2014, 37(1):53-57(in Chinese).
- [5] Park J A, Yang B, Park C, et al. Oxidation of microcystin-LR by the Fenton process: Kinetics, degradation intermediates, water quality and toxicity assessment [J]. Chem Eng J, 2017, 309:339-348.
- [6] Biplob K P, Felicity A R, Fan L H. Treatment of secondary effluent with biological activated carbon to reduce fouling of microfiltration membrane caused by algal organic matter from *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Membrane Science, 2015, 496 (15): 125-131.
- [7] 周真明,黄廷林,丛海兵. 扬水曝气/生物接触氧化工艺的除藻效果研究[J]. 中国给水排水,2007,23(15):13-16.
- Zhou Zhenming, Huang Tinglin, Cong Haibing. Algae removal effect by combined process of water-lifting aeration and biological contact oxidation [J]. China Water & Wastewater, 2007, 23 (15): 13 - 16 (in Chinese).
- [8] 胡冬雯. 超声波对3种水华爆发主因蓝藻的控制[J]. 农业环境科学学报,2013,32(7):1432-1436.
- Hu Dongwen. The control of three species of blue algae causing algae bloom by ultrasonic [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(7):1432-1436 (in Chinese).

- [9] 汪小雄. 化学方法在除藻方面的应用[J]. 广东化工,2011,38(4):24-26.
Wang Xiaoxiong. Application of chemical method in algae removal technology [J]. Guangdong Chemical Industry,2011,38(4):24-26 (in Chinese).
- [10] 江敏,王婧,许慧. 蓝藻毒素去除方法研究进展[J]. 生态学杂志,2014,33(12):3455-3462.
Jiang Min,Wang Jing,Xu Hui. Research progress on the methods of cyanobacterial toxin removal [J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33 (12) : 3455 - 3462 (in Chinese).
- [11] Carvalho M S, Alves B R R, Silva M F, et al. CaCl_2 applied to the extraction of *Moringa oleifera* seeds and the use for *Microcystis aeruginosa* removal [J]. Chem Eng J,2016,304(15):469-475.
- [12] 柴仕淦,贾钗,李欣怡,等. 季铵盐型 Gemini 表面活性剂去除铜绿微囊藻[J]. 环境科学技术学报,2016,6(1):5-15.
Chai Shigan, Jia Chai, Li Xinyi, et al. Removal of *Microcystis aeruginosa* by using quaternary ammonium salt of Gemini surfactant [J]. Journal of Environmental Engineering Technology, 2016, 6 (1) : 5 - 15 (in Chinese).
- [13] 徐大伟,施永生,柳伟,等. 除藻技术的研究进展[J]. 云南化工,2007,34(3):76-78.
Xu Dawei, Shi Yongsheng, Liu Wei, et al. Research progress on algae removal technology [J]. Yunnan Chemical Technology, 2007, 34 (3) : 76 - 78 (in Chinese).
- [14] 黄现恩,谷青,史全良. 一株具有藻毒素降解和溶藻功能细菌的分离鉴定[J]. 环境工程学报,2016,10(7):3919-3924.
Huang Xian'en, Gu Qing, Shi Quanliang. Isolation and identification of a microcysts biodegrading and algae-lysing bacterial strain [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10 (7) : 3919 - 3924 (in Chinese).
- [15] 刘萍. 溶藻细菌及其溶藻活性物研究进展[J]. 环境污染与防治,2016,38(9):86-92.
Liu Ping. Progress of research on algicidal bacteria and their algicidal bioactive substance [J]. Environmental Pollution and Control, 2016, 38 (9) : 86 - 92 (in Chinese).
- [16] Somdee T, Sumalai N, Somdee A. A novel actinomycete *Streptomyces aurantiogriseus* with algicidal activity against the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. J Appl Phycol,2013,25(5):1587-1594.
- [17] Jung S W, Kim B H, Katano T, et al. *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 offers species-specific biological control of winter algal blooms caused by freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii* [J]. J Appl Microbiol,2008,105(1):186-195.
- [18] 张安妮,沈红池,陈雪珍,等. 溶藻细菌 F8 与藻毒素降解菌 T1 的原生质体融合研究[J]. 湖北农业科学,2017,56(6):1033-1036.
Zhang Anni, Shen Hongchi, Chen Xuezhen, et al. The study of protoplast fusion with algae-lysing bacteria F8 and microcystin degrading bacteria T1 [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2017, 56 (6) : 1033 - 1036 (in Chinese).
- [19] 陈萍,李文昱,姚立荣,等. 双十二烷基 γ -双季铵盐杀菌剂的制备及其性能[J]. 过程工程学报,2015,15(3):506-510.
Chen Ping, Li Wenyu, Yao Lirong, et al. Synthesis and antibacterial performance of didodecyl γ -biquaternary ammonium salt [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2015, 15 (3) : 506 - 510 (in Chinese).
- [20] 沈红池,潘瑞松,吴旭鹏,等. 太湖芦苇根系中溶藻菌的分离鉴定及溶藻效果[J]. 土木建筑与环境工程,2017,39(5):123-128.
Shen Hongchi, Pan Ruisong, Wu Xupeng, et al. Isolation and identification of algicidal bacteria from reed roots in Baidu Port of Taihu Lake and it's lytic effect [J]. Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering, 2017, 39 (5) : 123 - 128 (in Chinese).



作者简介:郭惠娟(1993-),女,江苏连云港人,硕士研究生,研究方向为水污染控制与生态修复。

E-mail:1143861808@qq.com

收稿日期:2019-06-12