



一株耐酸微藻的分离鉴定及其对锰离子胁迫的生理响应

张露^{1,2}, 邵锐^{1,2}, 潘鑫^{1,2}, 王绍平³, 王广成³, 李伟³, 岳正波^{1,2}, 王进^{1,2*}

¹合肥工业大学资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230009

²纳米矿物与污染控制安徽普通高校重点实验室, 安徽 合肥 230009

³安徽马钢矿业资源集团南山矿业有限公司, 安徽 马鞍山 243000

摘要: 【目的】探讨在酸性含锰极端水环境中油球藻的生长特性及其对环境 pH 和 Mn^{2+} 的影响。【方法】从某硫铁矿山的酸性废水库中分离获得纯化藻株, 通过形态观察及 18S rRNA 基因测序对其进行鉴定, 并着重考察了不同 pH 和典型金属离子 Mn^{2+} 浓度对其生长特性的影响, 并通过测定藻生物量、光合色素、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)含量以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)比活力的变化, 分析该藻对 Mn^{2+} 胁迫的生理响应机制。【结果】分离得到的藻株经鉴定为 *Graesiella* sp. MA1; pH 对该藻的生长有显著影响, 其最低耐受初始 pH 为 3.5; 在初始 pH 为 3.5 和 Mn^{2+} 浓度分别为 5、30 和 55 mg/L 时, 藻细胞生物量随着 Mn^{2+} 浓度的增加而下降, 各试验组中的 Mn^{2+} 浓度亦分别降低了 28.62%、21.90% 和 18.84%, 且 pH 值分别升高至 5.7、5.6、5.4, 对照组 pH 则高达 9.1; 在培养 24 d 后, 藻细胞叶绿素 a/b 值随 Mn^{2+} 浓度增加而下降, 而 MDA、GSH 含量以及 SOD、APX 比活力则显著增加。结果表明, 从酸性矿山废水库中分离纯化获得的油球藻能够同时耐受低 pH 和一定浓度范围内的 Mn^{2+} , 在这种极端环境下, 其细胞内的抗氧化系统缓减了膜脂质过氧化作用, 从而在耐受重金属离子与解毒方面起到了重要作用。【结论】*Graesiella* sp. MA1 具有耐受低 pH、重金属离子以及产碱的作用, 研究结果为利用油球藻开展酸性矿山废水原位生物修复提供了一定的理论依据。

关键词: 锰离子, 酸性条件, 油球藻, 抗氧化机制, 酸性矿山废水

金属矿山开采产生的酸性矿山废水(acid mine drainage, AMD)因其低 pH、高硫酸盐和高溶解态有毒金属浓度等特性, 成为矿区周边水土环境污染和生态破坏的首要因素^[1]。AMD 作为典

基金项目: 国家自然科学基金(U20A20325, 41772361)

*通信作者。E-mail: sophiawj@hfut.edu.cn

收稿日期: 2021-03-26; 修回日期: 2021-04-27; 网络出版日期: 2021-05-10

型地球极端环境之一,是大量极端耐酸/嗜酸微生物的生存环境,因此亦成为生物学研究的重要模式系统^[2-3]。AMD 体系微生物群落主要包括细菌、古菌、真核生物(真菌和藻类为主)和病毒,在铁、碳、硫、氮等元素循环中具有重要的作用^[3]。嗜酸性藻类作为初级生产者,能够固定空气中 CO₂ 并和异养微生物发生信号传导、营养交换和基因转移等,进而间接影响微生物群落组成^[4]。藻类的代谢活动还可以产生碱性物质,提高系统 pH 值,影响金属离子的迁移转化过程^[5]。如螺旋藻、小球藻等对 AMD 中不同重金属元素具有高选择性,可作为“超蓄能器”和“超吸附剂”^[6]。因此,利用藻类的生物修复技术在治理重金属污染中得到广泛应用^[7-8]。

然而,利用藻类修复矿山酸性水体面临着许多尚未解决的问题。如 AMD 中大量的 Cu²⁺、As⁵⁺、Mn²⁺、Zn²⁺等溶解性(重)金属离子和低 pH、高酸度等环境条件均对藻类等微生物的高效处理能力构成威胁和挑战^[9]。前人的研究表明,重金属离子会损害藻类细胞膜功能、抑制光合作用、诱导氧化应激释放过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致膜脂质过氧化并产生有毒物质丙二醛(malondialdehyde, MDA)^[10-13],进而影响微藻的生长代谢过程。另一方面,ROS 的产生能促进微藻释放超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)等抗氧化酶,以及与 ROS 作用的抗氧化分子,如抗坏血酸(ascorbic acid, ASA)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)和生育酚(tocopherol)等,它们可防止细胞过氧化并维持细胞的氧化还原状态^[10]。这些物质能够缓解重金属离子或高 H⁺浓度对微藻的毒性作

用,增加其对 AMD 的环境适应性。

理解嗜酸/耐酸微藻如何适应 AMD 极端环境是实现利用微藻进行生物修复的研究基础。安徽东部某铁硫矿山酸性废水库形成至今已有 50 年左右,其生物多样性较丰富,藻的丰度较高,且其最典型的高浓度有毒金属离子为锰离子^[14]。因此,本文从该酸性矿山废水库中筛选获得一株耐酸油球藻,并以其作为研究对象,着重考察不同 pH 和 Mn²⁺浓度对其生长特性的影响,并通过测定藻生物量、光合色素、MDA 和 GSH 含量以及 SOD、APX 比活力的变化,分析其对 Mn²⁺胁迫的生理响应机制,以期为酸性矿山废水原位生物修复提供藻株资源,并为其进一步研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 水样采集

样品取自安徽东部某铁硫矿山酸性废水库,样品于 4 °C 下储存并在 24 h 内带回实验室。

1.2 藻种分离及鉴定

1.2.1 富集和分离: 将采集水样经离心后使用 BG11 培养基进行培养富集,培养温度 25 °C,光照强度为 2500 lx,光照周期为 14 h/10 h。对富集获得的样品进行分离纯化,主要步骤为:①取一定量微藻进行梯度稀释,选取适宜稀释度的稀释液注入无菌 BG11 固体培养基中进行涂布,平板倒置放入光照下培养;②挑取上述培养皿中长出的单藻落,经平板划线法直至分离纯化。利用光学显微镜(Olympus, BX53)观察藻株形态。

用于分离纯化的 BG11 培养基配方为(g/L): NaNO₃ 1.5, K₂HPO₄ 0.04, MgSO₄·7H₂O 0.075,

CaCl₂·2H₂O 0.036, 柠檬酸 0.006, 柠檬酸铁铵 0.006, EDTA 0.001, Na₂CO₃ 0.02, H₃BO₄ 0.00286, MnCl₂·H₂O 0.00181, ZnSO₄·7H₂O 0.000222, CuSO₄·5H₂O 0.000079, Na₂MoO₄·2H₂O 0.00039, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.000049。

1.2.2 藻株 18S rRNA 基因提取与测序: 将纯化的藻种用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取该藻 DNA, 所用 18S rRNA 基因通用引物为 NS1 和 NS6 (上海生物工程股份有限公司), PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min; 72 °C 10 min。扩增结果用 1% 琼脂糖电泳, 150 V、100 mA 20 min 电泳观察。

1.2.3 分离藻株 18S rRNA 基因: 序列的测定及系统发育树的构建: PCR 扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将获得的序列提交至国家微生物科学数据中心 (National Microbiology Data Center), 编号为 NMDCN0000M5U。并将序列通过 NCBI 的 BLAST 进行比对后, 利用软件 MEGA-X 对测序结果和 GenBank 中所下载的序列进行对位排列, 采用邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统发育树。

1.3 pH 对微藻生长过程的影响

以对数生长期的微藻为接种物, 接种至 150 mL 锥形瓶, 采用 BG11 培养基, 藻初始接种 OD₆₈₄ 为 0.1, 对应细胞干重为 0.02 g/L, 设置 8 组实验, 初始 pH 分别为 7.0、6.0、5.0、4.5、4.0、3.5、3.0 和 2.5。定时取样用可见分光光度计(722E, 上海精仪)测定 684 nm 处吸光度, 转化为干重表示细胞生物量^[15], 计算公式为预实验得到的藻细胞干重(DW, g/L)与对应吸光值(A)关系的标准曲线 DW=0.4365A-0.0256 R²=0.9975。比生长速率 μ

(d⁻¹)计算公式为: $\mu=(\ln N_2-\ln N_1)/(t_2-t_1)$ 。式中 N₁、N₂ 分别代表 t₁、t₂ 时刻微藻干重。

1.4 锰离子浓度对微藻生长过程的影响

以对数生长期的微藻为接种物, 设置初始 pH 3.5, Mn²⁺初始浓度为 5、30 和 55 mg/L, 以不加 Mn²⁺为对照组, 藻初始接种 OD 为 0.3, 对应细胞干重为 0.11 g/L, 每隔 3 d 取样测定其吸光度(684 nm), 转化为干重表示细胞生物量。使用 pH 计(PHS-3E, 上海雷磁)测定培养基 pH 值, 火焰原子吸收分光光度计(WYS2200, 安徽皖仪)测定培养基中残余的 Mn²⁺浓度。

1.5 水质理化指标和微藻生理生化指标测定

水样 pH、温度(T)、氧化还原电位(ORP)和溶解氧(DO)使用六位参数仪(MYRONL 6PFC)于采样现场测定, 其他指标于实验室内分析。硫酸盐含量采用离子色谱仪(戴安 ICS-900, 美国)测定, 锰离子等金属离子含量采用电离耦合等离子体原子发射光谱仪(安捷伦 7500)测定。

取适量藻液 3000 r/min 离心 5 min 弃上清液, 蒸馏水洗涤 2 次后, 再次离心, 取沉淀加入 2 mL 磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.8), 反复冻融破碎藻细胞, 12000 r/min 离心 10 min (4 °C), 上清液即为粗酶液。

叶绿素含量采用 95% 乙醇法测定^[16]。MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定^[17]。SOD 比活力采用氮蓝四唑法测定^[17]。APX 比活力采用紫外分光光度法测定^[17]。GSH 含量采用 DTNB-GSH 还原酶循环法测定^[18]。可溶性蛋白质含量采用福林酚法测定^[18]。

1.6 数据分析方法

Microsoft Excel 2010 用于数据前期处理。

SPSS 18 软件用于统计学分析, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA)分析组间的差异显著性, $P < 0.05$ 时有显著差异。

2 结果和分析

2.1 水样理化性质

采集水样的酸性矿山废水 pH 为 3.3, 硫酸盐含量超过 10 g/L, 含有多种金属离子。同国内外其他酸性矿山废水如广东大宝山横石河流域 (pH 2.0, $Mn^{2+} < 100$ mg/L)^[19]、Iberian Pyrite Belt (IPB)酸性矿山废水 (pH < 2.5, $Mn^{2+} < 150$ mg/L)^[20] 相比, 本研究酸性矿山废水中 Mn^{2+} 含量高, 酸性稍弱 (pH > 3), 水体中的溶解氧 (DO) 浓度显著高于一般环境水体, 且水样中检测到一定浓度的叶绿素 a (表 1)。这说明, 该酸性矿山废水库中含有藻类, 且藻类的生长代谢可能对该酸性水体的水质变化产生影响。

2.2 分离藻株鉴定结果分析

如图 1 所示, 通过多次平板划线和纯化后, 分离获得的藻种 MA1 为球形或近球形单细胞绿

表 1. 酸性矿山废水样品理化性质

Table 1. Characteristics of surface water of acid mine drainage

Parameter	Value
pH	3.3±0.036
$T/^{\circ}C$	24.9±0.84
Oxidation-reduction potential (ORP)/mV	332.4±1.52
Dissolved oxygen (DO)/(mg/L)	9.17±0.21
SO_4^{2-} /(mg/L)	10924.1±12.49
Chlorophyll a/(μ g/L)	230±2.49
Mn^{2+} /(mg/L)	336.7±5.83
Cu^{2+} /(mg/L)	41.2±0.49
Zn^{2+} /(mg/L)	17.7±0.71
Fe/(mg/L)	106.9±0.68
Fe^{2+} /(mg/L)	18.3±0.02

藻。藻种 MA1 的 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳染色获得条带位于 1000–3000 bp (图 2)。18S rRNA 基因序列和 NCBI 的 BLAST 比对结果表明其与油球藻 (*Graesiella emersonii*) 相似度达到 99.93%。其系统发育树结果表明 MA1 与 *Graesiella emersonii* NIES-2151 (GenBank 登录号: AB488562.1) 的自展值为 84 (图 3)。因此可认为 MA1 属 *Graesiella* sp., 故命名为 *Graesiella* sp. MA1。

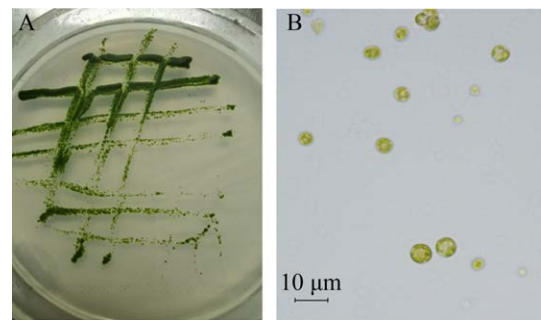


图 1. *Graesiella* sp. MA1 平板划线 (A) 及显微镜观察 ($\times 400$) (B)

Figure 1. Scribing (A) and microscope image ($\times 400$) (B) of *Graesiella* sp. MA1.

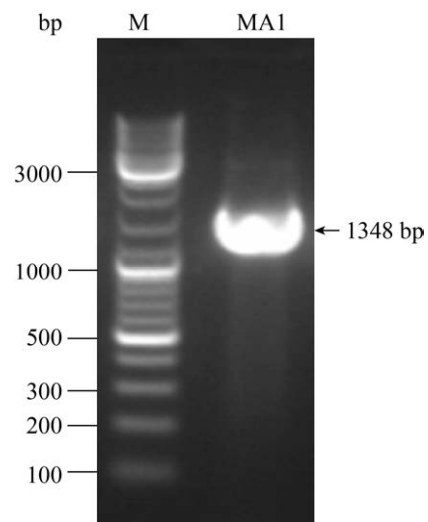


图 2. *Graesiella* sp. MA1 18S rRNA 基因的 PCR 产物
Figure 2. PCR product of *Graesiella* sp. MA1 18S rRNA gene. M: marker.

2.3 初始 pH 对 *Graesiella* sp. MA1 生长过程的影响

图 4 为 *Graesiella* sp. MA1 在不同初始 pH 条件下的生长曲线和比生长速率。结果表明, *Graesiella* sp. MA1 在初始 pH 7.0–3.5 条件下均能生长(图 4-A), 且初始 pH 对该藻的生长抑制作用随 pH 的降低逐渐增加。 *Graesiella* sp. MA1 的比生长速率随着初始 pH 的降低呈降低趋势(图 4-B), 在 pH

7.0–2.5, 比生长速率从 0.20 d^{-1} 降低至 0.0029 d^{-1} , 且各组间均存在显著差异($P<0.05$)。 *Graesiella* sp. MA1 在 pH 3.5 条件下的生长虽然受到了很大程度的抑制, 但经过 20 d 的培养其生物量达到了 0.13 g/L , 比生长速率也达到了 0.082 d^{-1} 。初始 pH 低于 3.5 时, *Graesiella* sp. MA1 生长情况不佳。因此认为 *Graesiella* sp. MA1 最低耐受 pH 为 3.5。

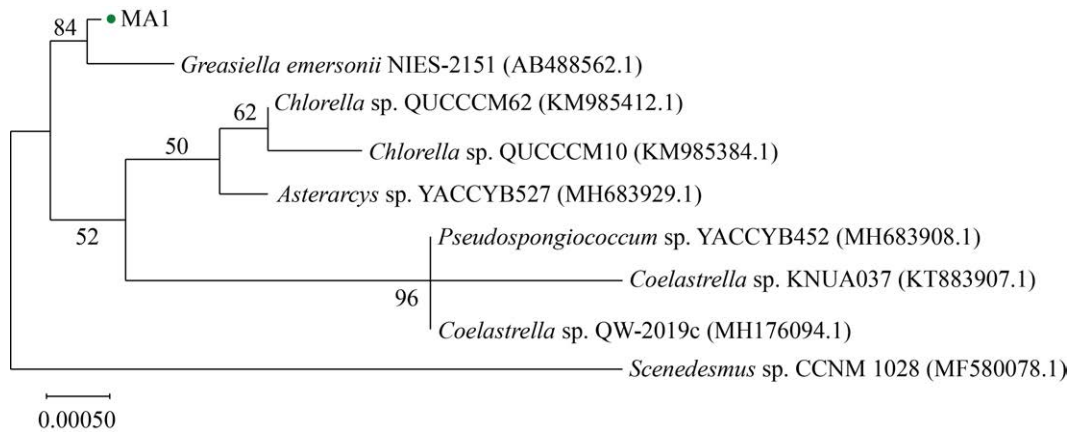


图 3. *Graesiella* sp. MA1 基于 18S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequence of *Graesiella* sp. MA1.

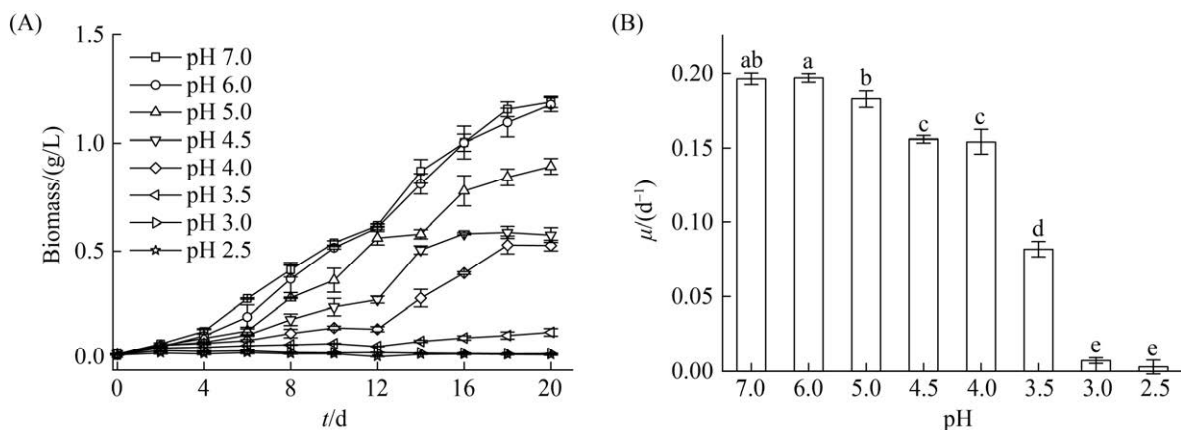


图 4. 不同初始 pH 条件下 *Graesiella* sp. MA1 生长(A)及比生长速率(B)

Figure 4. Growth (A) and specific growth rate (B) of *Graesiella* sp. MA1 at different initial pH. Error bars in figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

2.4 Mn^{2+} 浓度对 *Graesiella* sp. MA1 生长过程的影响

如图 5 所示, 当培养基初始 pH 为 3.5 时, 不同浓度 Mn^{2+} 对 *Graesiella* sp. MA1 生长具有显著影响。培养至第 21 天时, 与对照组的干重值 (0.36 g/L) 相比, 各实验组生物量仅为其 83.21%、65.28% 和 52.81% (图 5-A), 这表明在试验浓度范围内, Mn^{2+} 的存在抑制了 *Graesiella* sp. MA1 的生长, 且抑制作用随着锰离子浓度的增加而提高。

随着 *Graesiella* sp. MA1 的生长, 各实验组 pH 分别从初始的 3.5 升高至 5.7、5.6 和 5.4, 对照组 pH 高达 9.1 (图 5-B)。这说明 *Graesiella* sp. MA1 在生长过程中提高了培养基的碱度, 在一定程度上可以中和酸度, 提高培养基的 pH。 Mn^{2+} 的存在对该过程具有抑制作用, 但不影响 pH 升高的趋势。

图 5-C 所示结果表明, 培养至第 24 天时, 5、30、55 mg/L 试验组培养基中残余 Mn^{2+} 浓度分别为 3.66、23.98、44.79 mg/L, 其去除率分别为 28.62%、21.90% 和 18.84%。这说明, *Graesiella* sp. MA1 具有一定生物除锰的作用。

2.5 Mn^{2+} 胁迫对 *Graesiella* sp. MA1 叶绿素 a/b 的影响

如图 6 所示, pH 3.5 时 Mn^{2+} 浓度对 *Graesiella* sp. MA1 的叶绿素 a/b 值影响显著 ($P < 0.05$)。对照及 5 mg/L Mn^{2+} 实验组叶绿素 a/b 值随培养时间逐渐增加, 相比于初始值分别增加了 2.95 倍和 1.76 倍。而 30 和 55 mg/L Mn^{2+} 实验组叶绿素 a/b 值则随培养时间逐渐降低, 培养结束时相对于初始值分别降低了 16.11% 和 19.15%。此外, 在所试浓度范围内, 随着 Mn^{2+} 浓度的增加, *Graesiella* sp. MA1 叶绿素 a/b 逐渐下降。

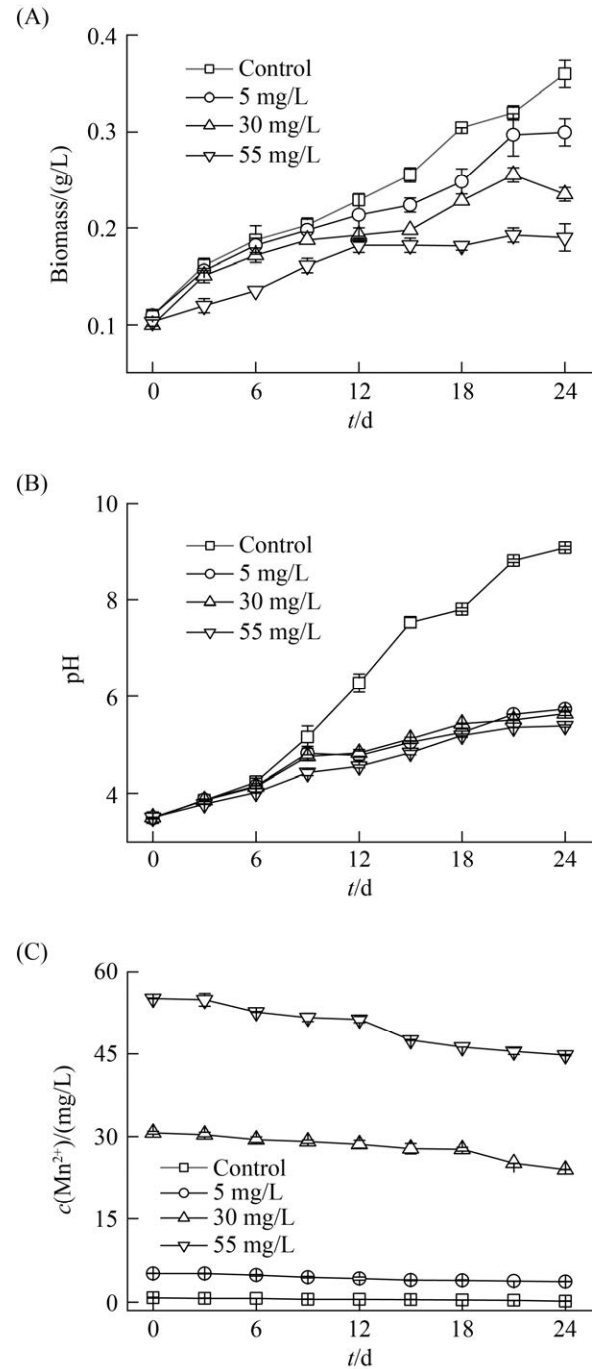


图 5. *Graesiella* sp. MA1 在含 Mn^{2+} 培养基中的生长 (A)、pH 变化 (B) 及培养基残余 Mn^{2+} 浓度 (C)

Figure 5. Analysis of microbial growth (A), variation of the pH value (B), and residual Mn^{2+} ions concentration (C) in the Mn^{2+} -containing medium with *Graesiella* sp. MA1. Error bars in this figure represent standard deviation.

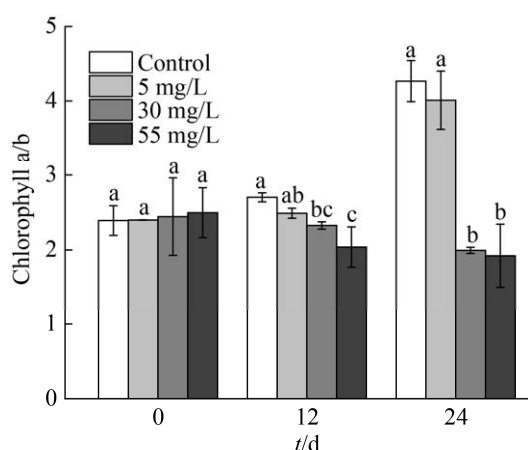


图 6. pH 3.5 时不同初始 Mn^{2+} 浓度对 *Graesiella* sp. MA1 叶绿素 a/b 的影响

Figure 6. Effects of initial Mn^{2+} concentrations on the chlorophyll a/b of *Graesiella* sp. MA1 at pH 3.5. Error bars in the figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.6 Mn^{2+} 胁迫对 *Graesiella* sp. MA1 抗氧化系统的影响

在培养过程中, 对照组、5 mg/L 和 30 mg/L Mn^{2+} 实验组 MDA 含量先降低后升高(图 7-A), 55 mg/L 实验组 MDA 则随时间呈上升趋势, 表明 Mn^{2+} 对 *Graesiella* sp. MA1 毒害作用随时间逐渐增强。 Mn^{2+} 浓度对 MDA 含量有显著影响 ($P < 0.05$)。 在第 12 天时, 5 mg/L 和 30 mg/L 实验组 MDA 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而 55 mg/L 实验组 MDA 含量则显著高于对照组; 在第 24 天时, MDA 含量随 Mn^{2+} 浓度的增加而增加。

各组 GSH 含量随时间变化呈现逐渐升高的趋势(图 7-B)。 在第 12 天时, GSH 含量随 Mn^{2+}

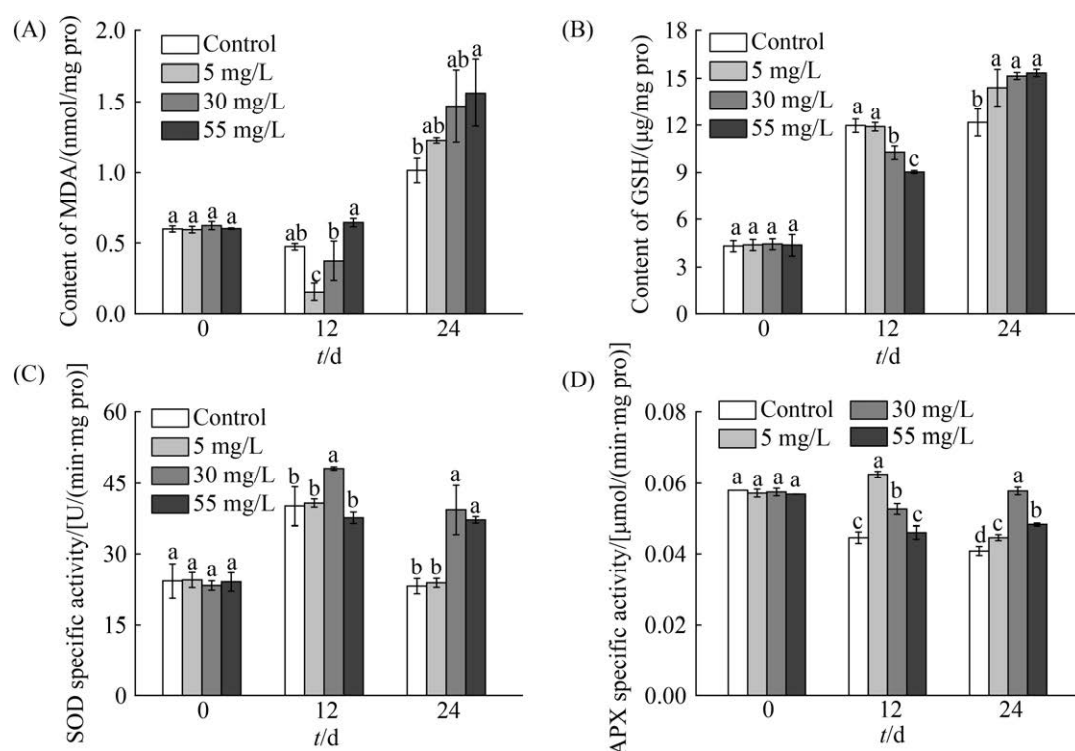


图 7. pH 3.5 条件下不同初始 Mn^{2+} 浓度对 *Graesiella* sp. MA1 MDA (A)、GSH (B) 含量及 SOD (C)、APX (D) 比活力的影响

Figure 7. Influence of initial Mn^{2+} concentrations on the MDA (A), GSH (B) content and SOD (C), APX (D) specific activity of *Graesiella* sp. MA1 at pH 3.5. Error bars in the figure represent standard deviation, and different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

的增加而降低,第24天时GSH含量则呈现出了相反的趋势。

SOD比活力随时间变化明显,各组SOD比活力呈现出先升高后降低的趋势(图7-C)。在第12天时,SOD比活力在30 mg/L时出现最大值(48.13 U/min/mg pro);在第24天时, Mn^{2+} 浓度为0和5 mg/L时的SOD比活力要显著低于30和55 mg/L实验组($P < 0.05$)。

APX比活力随时间变化如图7-D所示,对照组APX比活力在培养过程中逐渐降低,5 mg/L实验组APX比活力呈现先增加后降低的趋势,而30和55 mg/L实验组的APX比活力呈现出先降低再增加的趋势。 Mn^{2+} 对APX比活力影响显著($P < 0.05$),在第12天时APX比活力随 Mn^{2+} 浓度的增加而降低,且最大值出现在5 mg/L实验组,而在第24天时APX比活力最大值出现在30 mg/L实验组。

3 讨论

有研究者从碱性湖泊、热泉等极端环境中筛选获得油球藻,例如从半碱性的云南程海湖分离获得的*Graesiella* sp. WBG-1^[21]、从水温60 °C突尼斯北部某温泉分离获得的*Graesiella* sp. CINS 60^[22],这表明油球藻属对环境适应能力强。而本研究从安徽东部某硫铁矿山酸性废水中分离获得的*Graesiella* sp. MA1有助于进一步丰富对油球藻属的认识。

当培养基初始pH小于5.0时*Graesiella* sp. MA1生长受到不同程度的抑制(图4),这主要是由于高浓度的 H^+ 对藻细胞有直接破坏作用,能够降低碳酸酐酶活性,并使微藻细胞质和叶绿体内

pH值降低^[23],进而影响其光合作用。但培养基初始pH为3.5时,*Graesiella* sp. MA1仍能够缓慢生长,因此认为其最低耐受pH为3.5。Abinandan等^[24]研究也表明培养基pH为3.5时,*Desmodesmus* sp. MAS1和*Heterochlorella* sp. MAS3可以在20 mg/L的 Mn^{2+} 浓度中有良好生长。在本研究中,*Graesiella* sp. MA1具有提高环境pH的作用(图5-B),这是由于微藻在光合作用过程中同化无机碳,不断消耗碳酸根和碳酸氢根离子,进而产生大量的 OH^- 从而提高了培养基的碱度^[25]。*Spirulina* sp.生长产生的碱度使得酸性矿山废水中的主要金属离子(Zn、Pb、Fe、Cu)以金属氢氧化物的形式沉淀,并使废水pH从1.8升高至9.0^[5]。此外,*Graesiella* sp. MA1在酸性条件下对 Mn^{2+} 具有一定的去除作用(图5-C),这是由于微藻能通过细胞表面官能团与 Mn^{2+} 结合^[7],或是通过生物氧化作用将 Mn^{2+} 氧化成 Mn^{3+} 或 Mn^{4+} 从而析出锰氧化物^[5],还有研究发现*Desmodesmus* sp. WR1通过提高溶液pH和溶解氧浓度间接加速了 Mn^{2+} 的去除或氧化^[26]。*Graesiella* sp. MA1具体的生物除锰机制尚不明确,有待进一步深入研究。

叶绿素a和叶绿素b是藻细胞中吸收和传递光能的主要物质,其比值叶绿素a/b反映植物光合作用能力的强弱^[27]。在本实验中,5 mg/L Mn^{2+} 对藻细胞叶绿素a/b影响不显著,30和55 mg/L Mn^{2+} 显著降低了叶绿素a/b,这主要是由于Mn是藻类生长所需微量元素之一,因此*Graesiella* sp. MA1对低浓度的锰离子具有一定的耐受能力,而其过量存在时会影响藻类对P、Mg、Ca及Fe等其他元素的吸收,不利于叶绿素的合成,从而抑制藻类的生长^[12]。

MDA 是膜脂质过氧化过程产生的重要标志物。随着 Mn^{2+} 浓度的增加 *Graesiella* sp. MA1 细胞中 MDA 含量升高(图 7-A), 这表明藻细胞受到氧化损害^[28]。微藻通过启动抗氧化系统, 包括酶促和非酶促防御系统来降低过量 ROS 的毒性作用, 从而维持细胞正常的生理代谢过程^[13]。GSH 作为生物体内重要的抗氧化分子, 可以保护巯基免受 ROS 对其破坏、降解过量 ROS^[28]。*Graesiella* sp. MA1 在 Mn^{2+} 胁迫过程中 GSH 的含量呈现出波动上升的趋势(图 7-B), 表明 GSH 是其应对氧化应激的重要策略。以往的研究也发现 *Chlorella vulgaris* 和 *Chlorella sorokiniana* 在重金属胁迫时 GSH 水平会有所上调^[28-29]。在本研究中, SOD 和 APX 比活力随 Mn^{2+} 浓度的增加而升高(图 7-C, 7-D), 表明抗氧化系统在 *Graesiella* sp. MA1 应对 Mn^{2+} 胁迫过程中具有重要作用, SOD 通过催化 $O_2^{\cdot-}$ 发生歧化反应转化为 H_2O_2 和氧分子^[13], APX 通过参与抗坏血酸-谷胱甘肽循环过程中将 ASA 氧化, 并还原 H_2O_2 为水分子^[9], 以降低细胞内 ROS 的浓度, 从而保护机体免受重金属的毒害。

4 结论

从酸性矿山废水库分离得到一株 *Graesiella* sp. MA1, 在 pH 3.5 时仍能够生长, 表现出较好的耐酸性能, 同时该微藻表现出一定的生物产碱和生物除锰作用。 Mn^{2+} 显著抑制 *Graesiella* sp. MA1 生长, 藻细胞生物量随着 Mn^{2+} 浓度的增加而下降, 当 Mn^{2+} 浓度超过 30 mg/L 时会对 *Graesiella* sp. MA1 产生毒害作用, 影响其叶绿素合成。*Graesiella* sp. MA1 的抗氧化系统在其对 Mn^{2+} 的耐受与解毒方面起到了重要作用。

参考文献

- [1] Wang J, Zhang SY, He C, She ZX, Pan X, Li YY, Shao R, Shi Q, Yue ZB. Source identification and component characterization of dissolved organic matter in an acid mine drainage reservoir. *Science of the Total Environment*, 2020, 739: 139732.
- [2] Zhang SY, Yue ZB, She ZX, Pan X, Shao R, Shi Q, He C, Li YY, Wang J. Characteristics analysis of dissolved organic matter in the acid mine drainage. *China Environmental Science*, 2020, 40(8): 3401-3407. (in Chinese)
张思宇, 岳正波, 余智祥, 潘鑫, 邵锐, 史权, 何晨, 李运, 王进. 某酸性矿山排水水中溶解性有机物的特征分析. *中国环境科学*, 2020, 40(8): 3401-3407.
- [3] Quatrini R, Johnson DB. Microbiomes in extremely acidic environments: functionalities and interactions that allow survival and growth of prokaryotes at low pH. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 43: 139-147.
- [4] Huang LN, Kuang JL, Shu WS. Microbial ecology and evolution in the acid mine drainage model system. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(7): 581-593.
- [5] Li YC, Xu Z, Ma HQ, Hursthouse AS. Removal of manganese(II) from acid mine wastewater: a review of the challenges and opportunities with special emphasis on Mn-oxidizing bacteria and microalgae. *Water*, 2019, 11(12): 2493.
- [6] Mangal V, Phung T, Nguyen TQ, Guéguen C. Molecular characterization of mercury binding ligands released by freshwater algae grown at three photoperiods. *Frontiers in Environmental Science*, 2019, 6: 155. DOI:10.3389/fenvs.2018.00155.
- [7] Ahmad S, Pandey A, Pathak VV, Tyagi VV, Kothari R. Phycoremediation: Algae as Eco-friendly Tools for the Removal of Heavy Metals from Wastewaters. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*, 2020: 53-76. DOI: 10.1007/978-981-13-3426-9_3.
- [8] Pi YR, Lv YH, Liu Y, Tang YZ, Gao L, Bao MT. Application of microalgae-bacteria symbiosis system in wastewater

- treatment. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(6): 1188-1196. (in Chinese)
- 皮永蕊, 吕永红, 柳莹, 唐永政, 高丽, 包木太. 微藻-细菌共生体系在废水处理中的应用. *微生物学报*, 2019, 59(6): 1188-1196.
- [9] Abinandan S, Subashchandrabose SR, Venkateswarlu K, Megharaj M. Microalgae-bacteria biofilms: a sustainable synergistic approach in remediation of acid mine drainage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(3): 1131-1144.
- [10] Hirooka S, Hirose Y, Kanesaki Y, Higuchi S, Fujiwara T, Onuma R, Era A, Ohbayashi R, Uzuka A, Nozaki H, Yoshikawa H, Miyagishima SY. Acidophilic green algal genome provides insights into adaptation to an acidic environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(39): E8304-E8313.
- [11] Dean AP, Hartley A, McIntosh OA, Smith A, Feord HK, Holmberg NH, King T, Yardley E, White KN, Pittman JK. Metabolic adaptation of a *Chlamydomonas acidophila* strain isolated from acid mine drainage ponds with low eukaryotic diversity. *Science of the Total Environment*, 2019, 647: 75-87.
- [12] Wang ML, Jiang YL. Effects of manganese on the growth and fluorescence induction kinetics of *Conticribra weissflogii*. *Environmental Science*, 2018, 39(12): 5514-5522. (in Chinese)
- 王木兰, 姜玥璐. 微量元素锰对威氏海链藻生长及叶绿素荧光的影响. *环境科学*, 2018, 39(12): 5514-5522.
- [13] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373-399.
- [14] Cao ZM, Banda JF, Pei LX, Wei PF, Xin RR, Dong HY, Hao CB. Microbial community structure characteristics in different mine drainage lakes of an iron mine in Anhui Province. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(6): 1076-1088. (in Chinese)
- 曹子敏, Joseph Frazer Banda, 裴理鑫, 卫朋飞, 辛瑞瑞, 董慧渊, 郝春博. 安徽某铁矿不同矿山废水库中微生物群落结构特征. *微生物学报*, 2019, 59(6): 1076-1088.
- [15] Sarrafzadeh MH, La HJ, Seo SH, Asgharnejad H, Oh HM. Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification. *Journal of Biotechnology*, 2015, 216: 90-97.
- [16] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [17] Wu M, Zhang WH, Zhou JY, Ma C, Han WJ. Effects of drought stress on growth, physiological and biochemical parameters in fine roots of *Quercus variabilis* Bl. seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(15): 4223-4233. (in Chinese)
- 吴敏, 张文辉, 周建云, 马闯, 韩文娟. 干旱胁迫对栓皮栎幼苗细根的生长与生理生化指标的影响. *生态学报*, 2014, 34(15): 4223-4233.
- [18] Fu RY, Chen J, Li Y. Glutathione plays an anti-oxidant role in *Lactococcus lactis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(3): 379-384. (in Chinese)
- 傅瑞燕, 陈坚, 李寅. 谷胱甘肽在乳酸乳球菌抵抗氧胁迫中的保护作用. *微生物学报*, 2006, 46(3): 379-384.
- [19] Bao YP, Guo CL, Wang H, Lu GN, Yang CF, Chen MQ, Dang Z. Fe- and S-metabolizing microbial communities dominate an AMD-contaminated river ecosystem and play important roles in Fe and S cycling. *Geomicrobiology Journal*, 2017, 34(8): 695-705.
- [20] Gomes P, Valente T, Geraldo D, Ribeiro C. Photosynthetic pigments in acid mine drainage: Seasonal patterns and associations with stressful abiotic characteristics. *Chemosphere*, 2020, 239: 124774.
- [21] Wang ZJ, Wen XB, Xu Y, Ding Y, Geng YH, Li YG. Maximizing CO₂ biofixation and lipid productivity of oleaginous microalga *Graesiella* sp. WBG-1 via CO₂-regulated pH in indoor and outdoor open reactors. *Science of the Total Environment*, 2018, 619/620: 827-833.
- [22] Ben Ouada S, Ben Ali R, Leboulanger C, Zaghden H, Choura S, Ben Ouada H, Sayadi S. Effect and removal of bisphenol A by two extremophilic microalgal strains (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(3): 1765-1776.
- [23] Wu YD, Wu YY, Li Q, Zhao K. Effect of pH and fluoride on extracellular carbonic anhydrase activity and photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella*

- pyrenoidosa*. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(10): 1972–1977. (in Chinese)
- 吴运东, 吴沿友, 李潜, 赵宽. pH 与氟对莱茵衣藻和蛋白核小球藻胞外碳酸酐酶活性及光合效率的影响. *农业环境科学学报*, 2011, 30(10): 1972–1977.
- [24] Abinandan S, Subashchandrabose SR, Panneerselvan L, Venkateswarlu K, Megharaj M. Potential of acid-tolerant microalgae, *Desmodesmus* sp. MAS1 and *Heterochlorella* sp. MAS3, in heavy metal removal and biodiesel production at acidic pH. *Bioresource Technology*, 2019, 278: 9–16.
- [25] Wallace J, Champagne P, Hall G. Multivariate statistical analysis of water chemistry conditions in three wastewater stabilization ponds with algae blooms and pH fluctuations. *Water Research*, 2016, 96: 155–165.
- [26] Wang R, Wang S, Tai YP, Tao R, Dai YN, Guo JJ, Yang Y, Duan SS. Biogenic manganese oxides generated by green algae *Desmodesmus* sp. WR1 to improve bisphenol A removal. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 339: 310–319.
- [27] Luo SS, Cao Y, Ji XS, Xu LM, Wang JY, Wang WL. Effects of water depth on chlorophyll content and antioxidant enzyme activity of *Hydrilla verticillata*. *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(1): 221–228. (in Chinese)
- 罗姗姗, 曹昀, 纪欣圣, 许令明, 王佳艺, 王文林. 水深对黑藻叶绿素含量和抗氧化酶活性的影响. *生态学杂志*, 2019, 38(1): 221–228.
- [28] Suman TY, Radhika Rajasree SR, Kirubakaran R. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 113: 23–30.
- [29] Hamed SM, Zinta G, Klöck G, Asard H, Selim S, Abdelgawad H. Zinc-induced differential oxidative stress and antioxidant responses in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus acuminatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 140: 256–263.

Isolation and identification of an acid-tolerant microalgae and its physiological response to manganese ion stress

Lu Zhang^{1,2}, Rui Shao^{1,2}, Xin Pan^{1,2}, Shaoping Wang³, Guangcheng Wang³, Wei Li³, Zheng-bo Yue^{1,2}, Jin Wang^{1,2*}

¹ School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui Province, China

² Key Laboratory of Nanominerals and Pollution Control of Anhui Higher Education Institutes, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui Province, China

³ Masteel (Group) Holding Co., Ltd. Nanshan Mining Company, Ma'anshan 243000, Anhui Province, China

Abstract: [Objective] The purpose of this study was to investigate the growth characteristics of *Graesiella* sp. and the influence of pH and Mn²⁺ in acidic manganese-containing extreme water environments. **[Methods]** The purified algae was isolated from an acid mine drainage in a pyrite mine and identified by morphological observation and 18S rRNA gene sequencing. Firstly, we investigated the effects of pH and typical metal ion Mn²⁺ concentration on its growth characteristics. Then, with the determination of algae biomass, photosynthetic

Supported by the National Natural Science Foundation of China (U20A20325, 41772361)

*Corresponding author. E-mail: sophiawj@hfut.edu.cn

Received: 26 March 2021; Revised: 27 April 2021; Published online: 10 May 2021

pigment, malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) content and the specific vitalities of superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX), we analyzed the physiological response mechanism of the algae to Mn^{2+} stress. **[Results]** The isolated algae strain was identified and named as *Graesiella* sp. MA1. The medium pH had a significant effect on the growth of *Graesiella* sp. MA1, and its minimum initial tolerance pH was 3.5. When the initial pH was 3.5 and the concentration of Mn^{2+} was 5, 30 and 55 mg/L, the biomass of algal decreased with the increase of Mn^{2+} concentration. The Mn^{2+} concentration in experimental groups also decreased by 28.62%, 21.90% and 18.84%, respectively, and the pH value increased to 5.7, 5.6 and 5.4, respectively, while the pH value in control group was 9.1. After 24 days, the chlorophyll a/b value of algal decreased with the increase of Mn^{2+} concentration, while the contents of MDA and GSH, and the specific activities of SOD and APX increased significantly. The results showed that *Graesiella* sp. isolated and purified from acidic mine drainage could tolerate both low pH and Mn^{2+} in a certain concentration range. Under such extreme environment, the intracellular antioxidant system of *Graesiella* sp. could reduce membrane lipid peroxidation, and thus play an important role in tolerance of heavy metal ions and detoxification. **[Conclusion]** *Graesiella* sp. MA1 can tolerate low pH and heavy metal ions and generate alkalinity, thus this study provides a theoretical basis for in situ bioremediation of acidic mine drainage by using *Graesiella* sp..

Keywords: manganese ion, acidic condition, *Graesiella* sp., antioxidant mechanism, acid mine drainage

(本文责编: 张晓丽)



王进, 教授, 博士生导师。2007 年获中国科学技术大学博士学位, 2007–2008 年在香港科技大学从事博士后研究, 2009–2010 年在密歇根州立大学任访问学者。主要从事环境科学与技术领域的教学与科研工作。主持国家自然科学基金项目 4 项, 作为科研骨干参加其他省部级以上科研项目 10 余项。获安徽省科技进步一等奖 1 项、教育部科技进步二等奖 1 项, 申请和授权国家发明专利 20 余项, 授权国际专利 1 项。公开发表 SCI/EI 收录论文 100 多篇。