



## 生物实验室

响应面法优化细菌 EHB01 对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的溶藻条件

蒺玉琴\* 张明旭 成宏斌 孔维宝 贾凌云

西北师范大学生命科学学院 甘肃 兰州 730070

**摘要:**【背景】水体富营养化导致的蓝藻水华对淡水资源造成了严重污染。利用环境友好型的溶藻菌可有效控制蓝藻的生长,是防治蓝藻水华形成的有效途径之一。【目的】优化溶藻细菌 EHB01 对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的溶藻条件,以期治理蓝藻水华污染提供高效的溶藻菌制剂。【方法】采用单因素试验对溶藻的发酵液浓度、温度、光照以及 C:N 和 N:P 进行分析,并对溶藻细菌 EHB01 发酵液的碳源、氮源和 pH 进行优化。基于单因素试验,选用中心组合试验设计(central composite design, CCD)确定关键因子的最佳数量水平,并以 Desig-Expert 8.0.5 进行回归分析,通过响应面分析获得溶藻效果最佳的参数。【结果】发酵液浓度对溶藻率的影响表现为持续上升;温度对溶藻率表现为先上升后下降;而光照、C:N 和 N:P 均对细菌 EHB01 发酵液溶藻率的影响表现为先降低后上升的趋势。溶藻细菌 EHB01 发酵液所需的最佳碳源为蔗糖,氮源为硝酸钾, pH 为 7.5,优化条件下溶藻率达 86.97%,与优化之前相比提高了 21.72%。【结论】采用响应面法优化得出溶藻细菌 EHB01 发酵液最优的培养条件,且模型拟合效果较好,可为溶藻菌制剂工业化发酵提供有效依据。

关键词:溶藻细菌,铜绿微囊藻,溶藻条件,响应面优化法

Optimization of alginolytic conditions of *Microcystis aeruginosa* by bacteria EHB01 using response surface methodology

XI Yu-Qin\* ZHANG Ming-Xu CHENG Hong-Bin KONG Wei-Bao JIA Ling-Yun

College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China

**Abstract:** [Background] Cyanobacterial bloom caused by eutrophication has caused serious pollution to freshwater resources. The use of environmentally friendly alginolytic bacteria can effectively control the growth of cyanobacteria, which is one of the effective ways to prevent and control the formation of cyanobacteria bloom. [Objective] To optimize the alginolytic conditions of *Microcystis aeruginosa* by bacteria EHB01, so as to produce alginolytic agents for controlling the pollution of cyanobacterial bloom. [Methods] The concentration, temperature, light, C:N and N:P of alginolytic fermentation broth were analyzed by single factor test, and the carbon source, nitrogen source and pH of alginolytic bacteria EHB01 fermentation broth were optimized. Based on single factor test, the optimal quantity levels of key factors were determined by central composite design (CCD), and regression analysis was conducted by

Foundation item: Science and Technology Support Plan of Gansu Province (1504FKCA025)

\*Corresponding author: E-mail: xiyuqin@nwnu.edu.cn

Received: 28-06-2019; Accepted: 10-09-2019; Published online: 06-11-2019

基金项目: 甘肃省科技支撑计划(1504FKCA025)

\*通信作者: E-mail: xiyuqin@nwnu.edu.cn

收稿日期: 2019-06-28; 接受日期: 2019-09-10; 网络首发日期: 2019-11-06

Desig-Expert 8.0.5. The parameters with the best alginolytic effect were obtained by response surface methodology (RSM). **[Results]** The effect of fermentation liquid concentration on the algicidal ratio was increasing continuously. The effect of temperature on the algicidal ratio was first increased and then decreased. However, the effects of light, C:N and N:P on the algicidal ratio of bacteria EHB01 fermentation broth showed a tendency of decreasing first and then increasing. The best carbon source for EHB01 fermentation liquid was sucrose, nitrogen source was potassium nitrate and pH was 7.5. Under the optimized conditions, the algicidal ratio was up to 86.97%, which was 21.72% higher than before optimization. **[Conclusion]** RSM was used to optimize the optimal culture conditions of alginolytic bacteria EHB01 fermentation broth, and the model fitting effect was good, which could provide an effective basis for industrial preparation of alginolytic agent.

**Keywords:** Alginolytic bacteria, *Microcystis aeruginosa*, Alginolytic conditions, Response surface methodology

微藻生长受环境中多方面因素的影响,其中光照、温度、pH 是藻类生长的重要影响因素<sup>[1]</sup>。氮、磷等营养元素大量进入自然水体中,会导致某些有害优势藻类等浮游生物的异常增殖,致使水体腥臭难闻、透明度下降、溶氧量降低及水生生物大量死亡的现象<sup>[2]</sup>。

据资料显示,全球约有 75%以上的淡水湖泊均处于不同程度的富营养化状态,水体富营养化的主要特征是有藻类水华的大规模暴发;自 1960 年起,随着水体富营养化的加重及全球气候的变化,全球范围内水生态系统藻类水华的暴发频率和影响程度逐年递增,尤其是有害蓝藻水华发生的范围最广,造成的危害最大<sup>[3]</sup>。目前已知引起有害蓝藻水华的优势藻种有固氮型藻种如鱼腥藻(*Anabaena*)、束丝藻(*Aphanizomenon*)、束毛藻(*Trichodesmium*)和颤藻(*Oscillatoria*)等,以及微囊藻(*Microcystis*)和浮丝藻(*Planktothrix*)等非固氮型藻种,其中微囊藻是淡水水体中最常出现的优势蓝藻种属之一<sup>[4-5]</sup>。

关于蓝藻水华的形成机理,学者普遍认为是外部的环境因子和蓝藻自身的特殊生理特点相结合而发生的生态学结果<sup>[6]</sup>。研究表明:导致蓝藻水华消失的主要原因是真菌寄生、溶藻细菌、浮游动物捕食和噬藻体等与物理-化学因素的结合<sup>[7]</sup>。Wu 等<sup>[8]</sup>对 24 株芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)的杀铜绿微囊藻活性进行测试,发现培养 7 d 后均对铜绿微囊藻表现出不同程度的溶藻活性。Luo 等<sup>[9]</sup>从表层土壤

中分离出 117 株放线菌,发现其中有 6 株菌对铜绿微囊藻表现出溶藻活性,尤其是链霉菌(*Streptomyces* sp. L74)的溶藻效率最高。溶藻菌在调节水环境中的微藻组成、藻种丰富度和生理过程中发挥重要作用。细菌在自然环境中具有高度的多样性,加上细菌自身功能丰富、便于培养等优点,因此探究溶藻菌发酵培养工艺,以期为溶藻菌工业化发酵生产提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株和藻种

实验所需的溶藻细菌 EHB01 从富营养化水体中通过分离鉴定所得,结合形态学、生理生化试验和 16S rRNA 基因序列鉴定其隶属于罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*)<sup>[10]</sup>。铜绿微囊藻购自中科院水生生物研究所淡水藻种库(FACHB-8)。

### 1.2 主要试剂、仪器和培养基

蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖、蔗糖、醋酸钠、柠檬酸、硝酸钾和碳酸氢钠等,上海泰坦科技股份有限公司。光照生物培养箱,帕西瓦仪器公司;超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;紫外可见分光光度计,岛津公司。LB 培养基(菌株培养)和 BG11 培养基(微藻培养)的配制参照文献<sup>[11]</sup>。

### 1.3 藻细胞叶绿素含量和溶藻率的测定

采用热乙醇和超声波结合的方法<sup>[12]</sup>,每隔 12 h 取样测定叶绿素浓度。溶藻率<sup>[13]</sup>的计算公式为: $A_e = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100\%$ ,其中, $A_e$ 表示溶藻率, $C_0$ 表

示对照组叶绿素含量,  $C_t$  表示实验组叶绿素含量。

## 1.4 溶藻条件优化

### 1.4.1 溶藻细菌 EHB01 发酵液的制备

通过预试验判断该菌株溶藻方式为间接作用, 即溶藻活性物质主要在其代谢产物中。后期将溶藻细菌 EHB01 在 LB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h, 获得处于对数期( $OD_{600}=0.546\pm0.002$ )的细菌发酵产物, 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  的无菌纤维素酯微孔滤膜过滤, 收集上清液待用。发酵培养基优化过程中按要求确定培养基各组分浓度。

### 1.4.2 发酵液浓度对溶藻率的影响

将溶藻菌无菌滤液以 0%、1%、3%、5%、10% 的体积比加到对数生长期( $OD_{685}=0.629\pm0.002$ )藻液中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 以等量的 BG11 培养基为对照组, 通过测定溶藻率的变化来确定溶藻菌的作用效果。

### 1.4.3 最佳溶藻温度的筛选

将溶藻细菌发酵液在 10 000 r/min 离心 10 min 后所得的上清液, 以 5% 的接种量分别加入到 100 mL 处于对数生长期的藻液中。采样主要集中在 5–10 月份, 实际水面温度在 20–35 °C 之间, 所以设置光照培养箱温度分别为 19、22、25、28、31、34 °C<sup>[14]</sup>, 每个处理 3 个重复, 测定溶藻率。

### 1.4.4 最佳溶藻光照的筛选

将溶藻细菌发酵液在 10 000 r/min 离心 10 min, 离心后所得的上清液以 5% 的量分别加入到 100 mL 处于对数生长期的藻液中, 考虑到实际水环境 5–10 月份光照范围为 18–63  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ <sup>[15]</sup>, 培养箱光照分别设置为 20、30、40、50、60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ , 每个处理 3 个重复, 测定溶藻率。

### 1.4.5 不同碳氮比对溶藻率的影响

参考 BG11 培养基<sup>[11]</sup>将碳源( $\text{NaHCO}_3$ )固定为 2 mg/L, 按照碳氮比例为 CK、5:1、10:1、15:1、30:1、60:1 分别添加不同浓度  $\text{NaNO}_3$  为氮源, 将溶藻细菌发酵液在 10 000 r/min 离心 10 min, 离心后所得上清液以 5% 的量分别加入到 100 mL 处于对数生长期的藻液中, 测定不同碳氮

比对溶藻菌 EHB01 溶藻效果的影响; 固定氮源( $\text{NaNO}_3$ )为 150 mg/L, 按照氮碳比例 CK、5:1、10:1、15:1、30:1、60:1 分别添加不同浓度  $\text{NaHCO}_3$ , 测定相应的溶藻率。以不加碳和氮作为对照, 每个条件设置 3 个平行。

### 1.4.6 不同氮磷比对溶藻率的影响

参照 1.4.5 的方法将氮源( $\text{NaNO}_3$ )固定为 150 mg/L, 磷源( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )固定为 4 mg/L, 分别测定氮磷比例为 CK、5:1、10:1、15:1、30:1、60:1 下的溶藻率。

## 1.5 溶藻菌培养基优化

### 1.5.1 最佳溶藻初始 pH 的筛选

使溶藻细菌 EHB01 其他培养条件不变, 只改变细菌 LB 培养基的 pH 值, 将已经制备好的发酵液按 5% 的量分别接入 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的 LB 培养基中, 于 28 °C、160 r/min 振荡培养 48 h, 每个处理 3 个重复, 研究发酵液的溶藻活性。

### 1.5.2 最佳溶藻碳源和氮源的筛选

分别选择胰蛋白胨、蔗糖、可溶性淀粉、葡萄糖和甘油为碳源; 以酵母提取物、尿素、硫酸铵、硝酸钾和牛肉膏为氮源; 以 5% 的接种量加入发酵液, 于 28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 每个处理 3 个重复, 研究发酵液溶藻活性。

### 1.5.3 响应面法优化溶藻条件

根据单因素试验结果, 选取 pH、蔗糖、硝酸钾的用量 3 个因素作为响应变量, 利用 Design-Expert 8.0.5 软件进行 3 因素 3 水平的中心组试验 (Box-Behnken) 设计, 以溶藻率为响应值(表 1)。通

表 1 响应面分析因素与水平表

Table 1 Factors and coding level of response surface analysis

因素 Factors	代码 Code	编码水平 Coding level		
		-1	0	1
pH	A	7.0	7.5	8.0
蔗糖 Sucrose (mg/L)	B	0.5	1.0	1.5
硝酸钾 Potassium nitrate (mg/L)	C	10.0	15.0	20.0

过响应面曲面分析进行溶藻细菌 EHB01 发酵产抑藻活性物质的最佳培养条件,为溶藻微生物菌剂的规模化发酵培养提供理论依据。

## 1.6 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析,用 Origin 7.5 软件绘图,利用 Design-Expert 8.0.5 软件进行中心组试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 不同发酵液浓度对抑藻效果的影响

通过比较不同投加比的发酵液对溶藻率的变化,图 1 结果表明,随着发酵液浓度的不断增高,溶藻率也逐渐上升。浓度为 3% 的处理组溶藻率与对照组相比提高了 28.24%,处理组 5% 和 10% 抑制效果最明显,高达 71.59% 和 84.05%。考虑到溶藻效果和应用可行性,选择 5% 的投加量开展后期研究。

#### 2.1.2 不同温度对细菌 EHB01 抑藻效果的影响

将溶藻细菌发酵液离心后加入到等量的藻液中培养,测定在不同培养温度下细菌溶藻率的变化。如图 2 所示,溶藻率在温度为 19–28 °C 范围内上升了 33.61%,说明随着温度的不断上升,溶藻菌活性物质逐渐达到最优条件,所以溶藻率增高<sup>[16]</sup>。由于铜绿微囊藻是喜温生物,其最适温度为 30–35 °C<sup>[15]</sup>,所以温度大于 31–34 °C 时藻细胞繁殖快,生物量急剧增多,溶藻率有所降低。

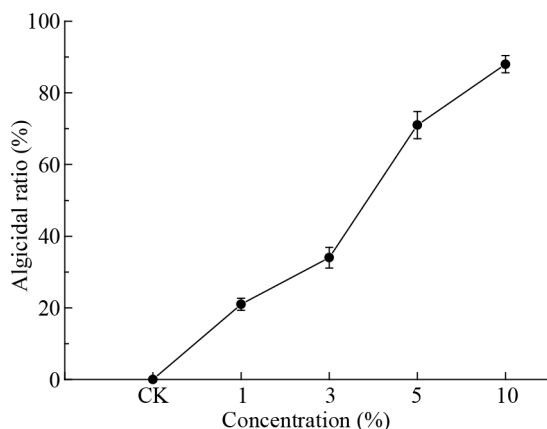


图 1 发酵液浓度对溶藻率的影响

Figure 1 Effects of fermentation concentration on the algicidal ratio

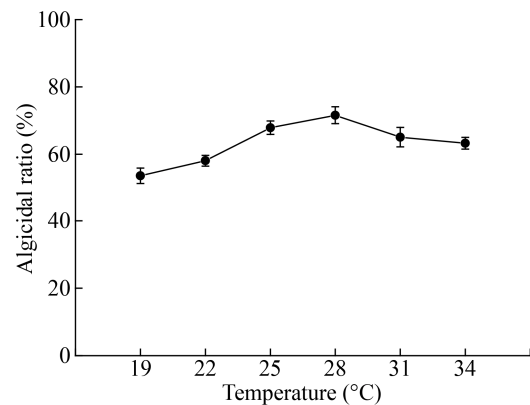


图 2 不同培养温度对溶藻率的影响

Figure 2 Effects of different temperature on the algicidal ratio

#### 2.1.3 不同光照对细菌 EHB01 抑藻效果的影响

如图 3 所示,当光照在 20–40  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  时,铜绿微囊藻的光合作用逐渐增强,藻细胞生物量逐渐增多,溶藻率下降,且在光照为 40  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  时溶藻率达到最低(45.26%);光照在 50–60  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$  时,部分藻细胞由于光照过强,导致藻细胞新陈代谢受阻,生物量急剧下降且发生部分藻细胞黄化死亡,另一部分则是由于溶藻菌产生抑藻作用而死亡,因而溶藻率上升显著<sup>[15]</sup>。

#### 2.1.4 不同碳氮比对细菌 EHB01 抑藻效果的影响

从图 4 可知,以 2 mg/L 的  $\text{NaHCO}_3$  为固定碳源、C:N 为 5:1–15:1 时铜绿微囊藻生长均较好,C:N 为 15:1 时铜绿微囊藻获得最大生长密度,其所对应的溶藻率达到最低(37.23%)。而 C:N 在 10 时铜绿微囊藻生物量最大,相应的溶藻率为 53.61%,说明藻细胞对氮源的吸收要大于碳源<sup>[17]</sup>。当 N:C 和 C:N 分别在 15:1–60:1 和 30:1–60:1 时藻细胞生长缓慢,且部分藻细胞由于氮源浓度过高而发生黄化死亡,所以溶藻率均逐渐上升。因此,铜绿微囊藻生长最适的 N:C 为 10:1,所对应的  $\text{NaNO}_3$  浓度为 1 500 mg/L,而 C:N 则为 15:1,所对应的  $\text{NaHCO}_3$  为 30 mg/L。

#### 2.1.5 不同氮磷比对细菌 EHB01 抑藻效果的影响

不同比例氮磷浓度对溶藻率的影响如图 5 所示,随着 N:P 和 P:N 比值的不断增大,铜绿微囊

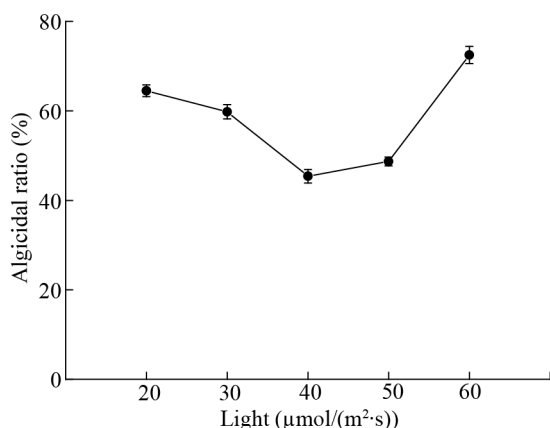


图3 不同光照对溶藻率的影响

Figure 3 Effects of different light on the algal ratio

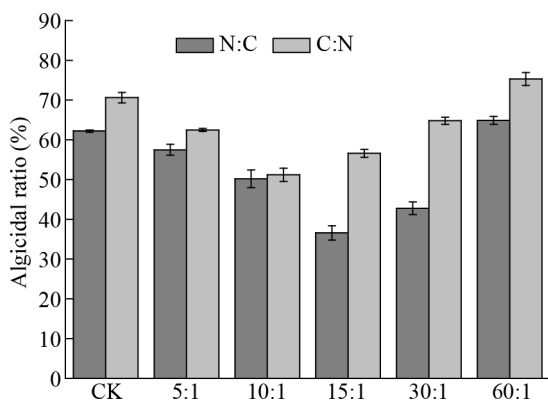


图4 不同碳氮比对溶藻率的影响

Figure 4 Effects of different carbon and nitrogen ratios on algal ratio

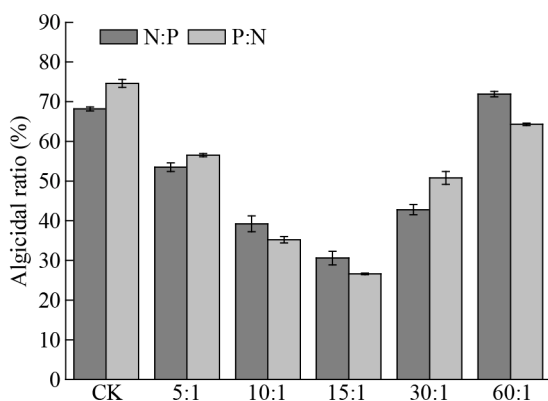


图5 不同氮磷比对溶藻率的影响

Figure 5 Effects of different nitrogen and phosphorus ratios on algal ratio

藻的生物量均表现为先上升后下降的趋势,且P:N的生物量变化要明显于N:P,所对应的溶藻率则先降低后上升。其中,磷源( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )固定在4 mg/L时,N:P在15:1时溶藻率达到最低(31.05%),此时的藻细胞生物量最多。而将氮源( $\text{NaNO}_3$ )固定为150 mg/L时,P:N在15:1时溶藻率也有最小值。当N:P和P:N在30:1–60:1时,部分铵盐和磷酸盐会对藻细胞产生一定的毒害作用,导致藻类死亡<sup>[18]</sup>。Redfield定律认为,藻细胞组成的N:P原子比为16:1,如果氮磷比超过16:1,磷被认为是限制性因素,反之氮通常被考虑为限制性因素<sup>[19]</sup>。

#### 2.1.6 不同pH发酵液对细菌EHB01抑藻效果的影响

pH是影响溶藻率的重要因素,通常pH的变化会影响细胞膜电荷和营养物质与代谢产物的解离,进而影响溶藻菌发酵液对铜绿微囊藻的溶藻效果<sup>[20]</sup>。对培养基初始pH从5.5–8.0进行优化,由图6可知,当培养基的初始pH从5.5增加到8.0时,溶藻细菌EHB01发酵液对铜绿微囊藻的抑制作用先上升后下降,溶藻率也先上升后下降;当培养基pH为7.5时,EHB01发酵液溶藻效果最明显,溶藻率高达68.75%,说明溶藻菌EHB01发酵液溶藻最适pH为7.5。

#### 2.1.7 不同碳源发酵液对细菌EHB01抑藻效果的影响

溶藻菌EHB01在不同的碳源培养下,其发酵液的溶藻作用发生明显的差异性,从图7可知,细菌发酵液对铜绿微囊藻叶绿素含量影响大小依次为:葡萄糖>蔗糖>甘油>胰蛋白胨>可溶性淀粉。当溶藻菌EHB01选用葡萄糖为碳源时,溶藻率高达71.62%,比选用蔗糖为碳源的培养基溶藻率高4.74%,考虑到蔗糖的经济性,最终确定蔗糖为最佳碳源。

#### 2.1.8 不同氮源发酵液对细菌EHB01抑藻效果的影响

如图8所示,不同氮源培养基对溶藻菌EHB01溶藻率有一定的影响,在供试的5种氮源中,EHB01对铜绿微囊藻叶绿素含量抑制大小依次为:

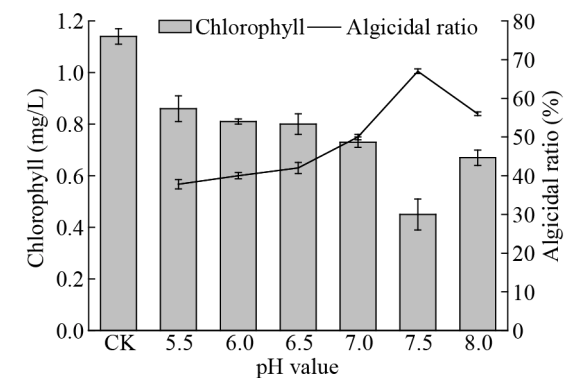


图 6 不同初始 pH 对溶藻菌发酵液溶藻率的影响  
 Figure 6 Effect of different pH on the algicidal ratio in algae-lysing bacteria

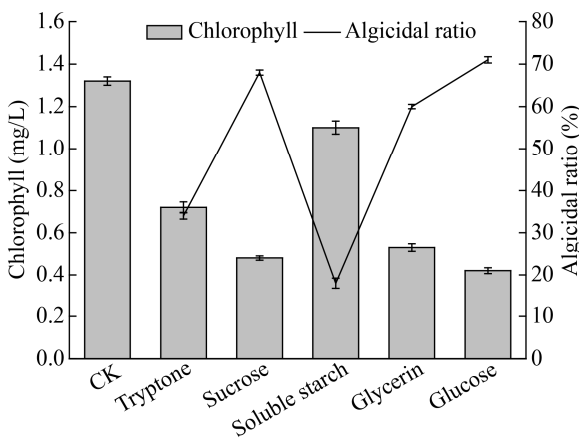


图 7 不同碳源对溶藻菌发酵液溶藻率的影响  
 Figure 7 Effect of different carbon sources on the algicidal ratio in algae-lysing bacteria

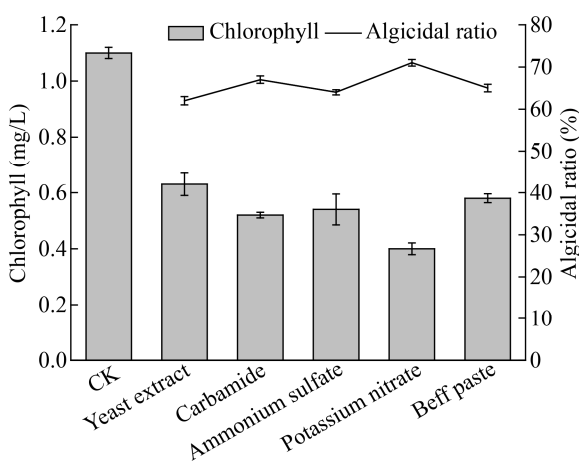


图 8 不同氮源对溶藻菌发酵液溶藻率的影响  
 Figure 8 Effect of different nitrogen sources on the algicidal ratio in algae-lysing bacteria

硝酸钾>尿素>硫酸铵>牛肉膏>酵母提取物；以硝酸钾为氮源时,细菌发酵液对铜绿微囊藻抑制最明显,溶藻率高达 71.30%,因此选择硝酸钾作为 EHB01 发酵液最佳的氮源培养基。

2.2 响应面法优化结果

2.2.1 中心组合试验设计(central composite design, CCD)试验结果

通过 CCD 设计的 pH (5.5–8.0)、蔗糖(10–20 mg/L)和硝酸钾(0.5–1.5 mg/L)的 3 因素 3 水平试验,得到 17 组试验结果,其中溶藻率最大值为 86.97%,最小值为 39.56% (表 2)。

2.2.2 二次回归拟合及方差分析结果

以溶藻率(algicidal ratio)为响应值,利用 Design-Expert 8.0.5 对表 2 数据进行回归分析,得到二次回归模型方程为: Algicidal ratio (%)=86.21–3.41A+0.62B–0.5C–4.73AB+2.88AC+1.38BC–21.6A<sup>2</sup>–16.59B<sup>2</sup>–21.27C<sup>2</sup>。

通过回归模型分析响应面的参数,由表 3 可知,模型极显著( $P<0.000\ 1$ ),失拟项的  $P=0.002\ 8$ ,说明失拟不显著( $P>0.05$ ,下同);其中 A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>对溶藻率影响较大,达到了极显著( $P<0.000\ 1$ )。表 4 中

表 2 响应面试验设计结果

序号 No.	A: pH	B: 蔗糖 Sucrose (mg/L)	C: 硝酸钾 Potassium nitrate (mg/L)	溶藻率 Algicidal ratio (%)
1	7.5	20	0.5	48.09
2	7.0	15	1.5	46.36
3	8.0	10	1.0	41.36
4	7.5	10	1.5	57.41
5	8.0	15	0.5	47.59
6	7.0	20	1.0	39.56
7	7.5	15	1.0	86.33
8	7.5	20	1.5	40.23
9	7.5	15	1.0	86.97
10	8.0	15	1.5	51.22
11	7.5	15	1.0	85.91
12	7.5	15	1.0	86.00
13	7.5	10	0.5	46.35
14	7.5	15	1.0	85.85
15	7.0	15	0.5	48.26
16	7.0	10	1.0	51.23
17	8.0	20	1.0	41.22



表 3 模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
Model	5 836.60	9	648.51	206.41	<0.0001 Significant
A	92.82	1	92.82	29.54	0.001 0
B	3.04	1	3.04	0.97	0.358 2
C	2.02	1	2.02	0.64	0.449 0
AB	89.49	1	89.49	28.48	0.001 1
AC	33.24	1	33.24	10.58	0.014 0
BC	7.65	1	7.65	2.43	0.162 7
A <sup>2</sup>	1 965.10	1	1 965.10	625.46	<0.000 1
B <sup>2</sup>	1 158.65	1	1 158.65	368.78	<0.000 1
C <sup>2</sup>	1 904.18	1	1 904.18	606.07	<0.000 1
残差 Residual	21.99	7	3.14		
失拟值 Lack of fit	21.14	3	7.05	32.94	0.002 8 Significant
纯误差 Pure error	0.86	4	0.21		
总离差 Cor total	5 858.60	16			

表 4 模型  $R^2$  综合分析Table 4 Analysis of model  $R^2$ 

项目 Item	数值 Value
标准差 Std. Dev	1.77
平均值 Mean	132.07
变异系数 C.V.%	3.04
预测平方和 PRESS	339.53
系数 $R^2$	0.996 2
校正 $R^2$ Adj $R^2$	0.991 4
预测 $R^2$ Pred $R^2$	0.942 0
信噪比 Adeq precisic	35.790

$R^2=0.996\ 2$ , 说明此模型能解释 99.62% 响应值变化, 校正系数为 0.991 4, 预测系数为 0.942 0, 预测值与校正值很接近, 说明该模型拟合度很好, 可以用来分析和预测溶藻细菌 EHB01 最佳的溶藻条件。

### 2.2.3 各因素间的交互作用

由图 9 可知, 不同的响应面和等高线图表示不同的两个因素间的相互作用, 响应曲面开口向下表示响应值存在稳定的极大值; 等高线呈椭圆形则表明因素之间交互作用对响应值影响显著<sup>[21]</sup>。图 9A、B 反映了 pH 和硝酸钾对 EHB01 溶藻率的影响,

其响应曲面图曲线较陡, 等高线呈椭圆形, 即 pH 和硝酸钾对溶藻率的交互效应显著。图 9C、D 反映了硝酸钾和蔗糖对 EHB01 溶藻率的影响, 其响应曲面图曲线较陡, 等高线呈椭圆形, 即硝酸钾和蔗糖对溶藻率的交互效应显著。图 9E、F 反映了 pH 和蔗糖对 EHB01 溶藻率的影响, 其响应曲面图曲线较陡, 等高线呈椭圆形, 即 pH 和蔗糖对溶藻率的交互效应显著。

### 2.3 响应面法优化验证试验结果

在该 CCD 软件的预测结果下, 所得理论最佳发酵条件为: pH 7.5, 蔗糖 15 mg/L, 硝酸钾 1.0 mg/L, 此模型预测的最大溶藻率为 86.97%。为了检验模型预测的准确性, 综合考虑溶藻菌作为有效的工业菌剂治理水体富营养化的可行性和经济性, 确定最佳的模型为: pH 7.5、蔗糖 15 mg/L、硝酸钾 1.0 mg/L, 在最佳的培养条件下溶藻菌 EHB01 实际溶藻率为 85.33%, 与预测值误差为  $\pm 1.64\%$ , 无显著性差异, 可见该模型较好地预测了实验结果。

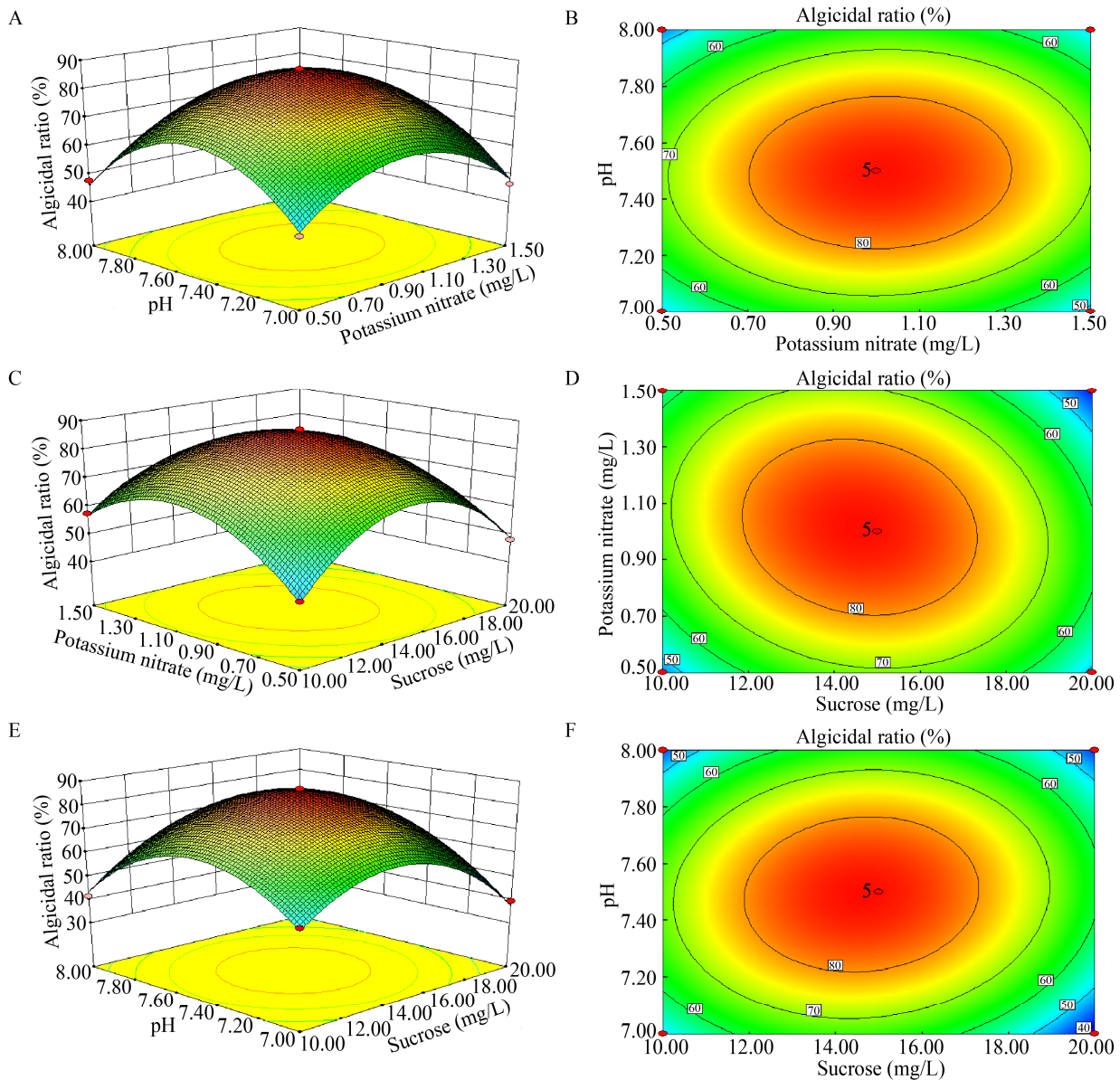


图 9 因素交互作用对溶藻率影响的响应曲线和等高线图

Figure 9 Response surface plot and contour plot showing effects of algicidal ratio

注: pH 和硝酸钾对溶藻率交互影响的响应曲面图(A)与等高线图(B); 硝酸钾和蔗糖对溶藻率交互影响的响应曲面图(C)与等高线图(D); pH 和蔗糖对溶藻率交互影响的响应曲面图(E)与等高线图(F).

Note: The response surface plot (A) and contour plot (B) of the interaction between pH and potassium nitrate on the algicidal ratio. The response surface plot (C) and contour plot (D) of the interaction between potassium nitrate and sucrose on the algicidal ratio. The surface plot (E) and contour plot (F) of the interaction of pH and sucrose on the algicidal ratio.

### 3 讨论与结论

应用微生物学方法获得高效溶藻菌去除蓝藻水华是一种环境友好型的生物方法。目前研究报道的溶藻菌种类主要有细菌和放线菌类,其溶藻效果也有一定的差异性。张晖等<sup>[22]</sup>从巢湖中分离得到

一株高效的溶藻菌株 C1138, 隶属于溶杆菌属 (*Lysobacter*), 共培养 7-10 d 时, 溶藻率高达 50% 以上。Xuan 等<sup>[23]</sup>分离得到一株隶属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的溶藻菌 AF-1, 其对铜绿微囊藻有强烈的杀灭作用, 5 d 的溶藻效率为 93%。



本研究从富营养化水体中获得一株高效的溶藻菌 EHB01, 72 h 的溶藻率可达 62.25%, 其溶藻作用方式为间接溶藻。王琪等<sup>[24]</sup>筛选了与有害藻华形成有关的多种杀藻细菌, 通过进一步实验判断其为间接溶藻作用方式, 本研究中溶藻菌 EHB01 也属于间接溶藻。

通过添加不同浓度的发酵液可知, 浓度是影响溶藻效果的关键因素, 其浓度越高, 溶藻率越高, 这与 Yang 等<sup>[25]</sup>探究杀藻细菌群落级生理研究结果相一致。Yu 等<sup>[26]</sup>研究了一种抗微囊藻的杀藻链霉菌, 随着添加量的不同, 其杀藻具有明显的差异性。铜绿微囊藻的生长与环境因子密不可分, 当温度达到铜绿微囊藻繁殖的最适温度时藻细胞生物量急剧增多, 溶藻菌 EHB01 的溶藻效果明显降低; 随着光合作用的逐渐增强, 藻细胞繁殖加快, 生物量增多; 当光照过强时, 藻细胞代谢途径受到抑制, 导致部分细胞黄化死亡, 所以溶藻率会有所降低。微藻类的经验分子式说明藻类健康生长及维持生理平衡所需的碳、氮、磷原子比为 106:16:1, 但不同种类藻细胞的元素组成存在着差异, 对各类营养物质的需求也不尽相同<sup>[27]</sup>。当增加碳氮和氮磷比例时, 铜绿微囊藻数量先上升后下降, 因而溶藻菌对其溶藻效果也表现为先下降后上升的趋势。本研究考虑到铜绿微囊藻在实际水环境中生长受各种因素影响是不可控的, 而溶藻菌的浓度又是决定溶藻率的关键因素, 因此对溶藻菌 EHB01 发酵液进行了条件优化, 通过发酵培养工艺得到高浓度、高品质的菌剂产品<sup>[28]</sup>。发酵培养基中的碳源和氮源既能给 EHB01 提供生长所需的能量, 又能为其合成蛋白质、核酸等化合物提供原材料, 因此 EHB01 对不同的碳氮源吸收具有一定的选择性<sup>[29]</sup>。

本研究通过单因素试验选择蔗糖为最佳碳源; 由于硝酸盐有利于铜绿微囊藻生长并最终导致水体富营养化, 考虑到氨氮和硝酸盐为水体中的主要氮源, 且环境中氨氧化细菌可将氨态氮转化为硝酸

盐, 所以选择硝酸钾为最佳的氮源<sup>[30]</sup>。pH 也是影响 EHB01 生长的重要因素, 其变化不但影响细胞膜电荷, 而且影响细菌代谢产物的生成和溶藻率<sup>[31]</sup>。因此选择碳源、氮源和 pH 作为溶藻菌 EHB01 发酵培养的关键因素, 采用 3 因素 3 水平的参数值进行了响应面的分析, 最终确定发酵液的最佳培养条件: pH 7.5、蔗糖(15 mg/L)、硝酸钾(1.0 mg/L)。在最优培养下, EHB01 的溶藻率为 86.97%, 无显著性差异, 说明该模型较好地预测了溶藻率结果, 可用于后期指导溶藻菌菌剂的工业化生产, 治理蓝藻水华所带来的水环境污染。

## REFERENCES

- [1] Jin XC, Chu ZS, Yi WL, et al. Influence of phosphorus on *Microcystis* growth and the changes of other environmental factors[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2005, 17(6): 937-941
- [2] Dalu T, Wasserman RJ, Magoro ML, et al. River nutrient water and sediment measurements inform on nutrient retention, with implications for eutrophication[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 684: 296-302
- [3] Xu H, Paerl HW, Zhu GW, et al. Long-term nutrient trends and harmful cyanobacterial bloom potential in hypertrophic Lake Taihu, China[J]. *Hydrobiologia*, 2017, 787(1): 229-242
- [4] Paerl HW, Paul VJ. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria[J]. *Water Research*, 2012, 46(5): 1349-1363
- [5] Zheng NN, Sun L, Ding N, et al. Diversity of algicidal bacteria associated with harmful microalgae and the algicidal mechanisms[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1204-1219 (in Chinese)  
郑宁宁, 孙丽, 丁宁, 等. 有害微藻抑藻细菌多样性及抑藻机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1204-1219
- [6] Ma JR, Deng JM, Qin BQ, et al. Progress and prospects on cyanobacteria bloom-forming mechanism in lakes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(10): 3020-3030 (in Chinese)  
马健荣, 邓建明, 秦伯强, 等. 湖泊蓝藻水华发生机理研究进展[J]. *生态学报*, 2013, 33(10): 3020-3030
- [7] Zhang P, Zhai CM, Chen RQ, 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
- [8] Wu LM, Wu HJ, Chen LN, et al. Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity

- against harmful algal bloom species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7512-7520
- [9] Luo JF, Wang Y, Tang SS, et al. Isolation and identification of algicidal compound from *Streptomyces* and algicidal mechanism to *Microcystis aeruginosa*[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76444
- [10] Hu JD, Zhang YC, Lin ZH, et al. Effect on bio-degumming of banana pseudo-stem by *Ralstonia* sp. ZLXH-4[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(12): 23-29 (in Chinese)  
胡佳丹, 张玉苍, 林昭华, 等. 皮氏罗尔斯顿菌对香蕉假茎脱胶研究[J]. 食品科技, 2017, 42(12): 23-29
- [11] Xu H, Chen D, Chen J, et al. Effects of nitrogen and phosphorus forms and concentrations on the growth of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus obliquus*[J]. China Environmental Science, 2019, 39(6): 2560-2567 (in Chinese)  
许海, 陈丹, 陈洁, 等. 氮磷形态与浓度对铜绿微囊藻和斜生栅藻生长的影响[J]. 中国环境科学, 2019, 39(6): 2560-2567
- [12] Weng XY, Lin MA, Yan Y. Comparison of determination of phytoplankton chlorophyll a by spectroscopic methods in freshwater[J]. Environmental Monitoring in China, 2009, 25(3): 36-38,76 (in Chinese)  
翁笑艳, 林美爱, 严颖. 地表水浮游植物叶绿素 a 测定方法比较研究[J]. 中国环境监测, 2009, 25(3): 36-38,76
- [13] Wintermans JFGM, de Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biophysics including Photosynthesis, 1965, 109(2): 448-453
- [14] Zhang LT. Review on the main genesis and mechanism of eutrophication cyanobacteria bloom[J]. Water Resources Development Research, 2019, 19(5): 28-33 (in Chinese)  
张兰婷. 富营养化蓝藻水华发生的主要成因与机制研究综述[J]. 水利发展研究, 2019, 19(5): 28-33
- [15] Jin P, Guo M, Xu TT, et al. Influences of temperature and illumination on co-cultivation among *Microcystis aeruginosa*, *Daphnia magna* and *Ceratophyllum demersum*[J]. Journal of Hydroecology, 2013, 34(5): 65-70 (in Chinese)  
靳萍, 郭萌, 徐婷婷, 等. 温度和光照对铜绿微囊藻、大型溲和金鱼藻共同培养的影响[J]. 水生态学杂志, 2013, 34(5): 65-70
- [16] Zhang XQ, Zhang W, Lu YP, et al. The inhibitory effect of the fermentation filtrate of *Brevibacillus brevis* on *Microcystis aeruginosa*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2017, 40(4): 625-631 (in Chinese)  
张小倩, 张伟, 卢亚萍, 等. 短芽孢杆菌发酵液对铜绿微囊藻的抑制效应[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(4): 625-631
- [17] Hu HY, Zhang J, Xu J, et al. Optimization of carbon, nitrogen and phosphorus in spirulina culture medium and its effect[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(1): 29-33 (in Chinese)  
胡海燕, 张静, 徐晶, 等. 螺旋藻培养液中碳、氮、磷的优化及其效应评价[J]. 食品科技, 2012, 37(1): 29-33
- [18] Ma FF, Li X, Lü SH. Influence of inorganic nitrogen and phosphorus on the growth of *Cochlodinium geminatum*[J]. Journal of Safety and Environment, 2012, 12(4): 1-4 (in Chinese)  
马方方, 李霞, 吕颂辉. 无机氮磷对双胞旋沟藻(*Cochlodinium geminatum*)生长的影响[J]. 安全与环境学报, 2012, 12(4): 1-4
- [19] Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA. The influence of organisms on the composition of sea-water[A]//Hill MN. The Composition of Seawater: Comparative and Descriptive Oceanography. The Sea: Ideas and Observations on Progress in the Study of the Seas[M]. New York: Interscience Publication, 1963: 26-77
- [20] Chen L, Cai YF, Wu RH, et al. Optimization of phosphate-solubilizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* HL-1[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(13): 71-76 (in Chinese)  
陈令, 蔡燕飞, 吴荣辉, 等. 枯草芽孢杆菌 HL-1 解磷发酵条件的优化[J]. 广东农业科学, 2014, 41(13): 71-76
- [21] Bhattacharjee K, Joshi SR. A selective medium for recovery and enumeration of endolithic bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 129: 44-54
- [22] Zhang H, He Y, Cao CC, et al. Isolation, identification and algicidal characteristics of an efficient-algicidal bacterium from Lake Chaohu[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 41(7): 1-5,13 (in Chinese)  
张晖, 何颖, 曹驰骋, 等. 1株巢湖高效溶藻菌的分离鉴定及其溶藻特性研究[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(7): 1-5,13
- [23] Xuan HL, Dai XZ, Li J, et al. A *Bacillus* sp. strain with antagonistic activity against *Fusarium graminearum* kills *Microcystis aeruginosa* selectively[J]. Science of the Total Environment, 2017, 583: 214-221
- [24] Wang Q, Simon P, Liu JY, et al. Identification of algicidal bacterium Sp37[J]. Microbiology China, 2018, 45(12): 2614-2623 (in Chinese)  
王琪, Simon P, 刘锦钰, 等. 滇池中溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻效应[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2614-2623
- [25] Yang YF, Hu XJ, Zhang J, et al. Community level physiological study of algicidal bacteria in the phycospheres of *Skeletonema costatum* and *Scrippsiella trochoidea*[J]. Harmful Algae, 2013, 28: 88-96
- [26] Yu Y, Zeng YD, 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
- [27] Sun L, Jin XC, Zhong Y, et al. Changes of algal communities in water body with different proportions of nitrogen and phosphorus[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(7): 1218-1223 (in Chinese)

- 孙凌, 金相灿, 钟远, 等. 不同氮磷比条件下浮游藻类群落变化[J]. 应用生态学报, 2006, 17(7): 1218-1223
- [28] Behle RW, Jackson MA. Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule[J]. Journal of Economic Entomology, 2014, 107(2): 582-590
- [29] Kong Y, Zhu L, Xu XY, et al. Acute toxicity of the fermentation broth of algae-lying bacteria and its products[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2012, 21(5): 913-918 (in Chinese)
- 孔赞, 朱亮, 徐向阳, 等. 溶藻菌发酵液及其溶藻产物的生物急性毒性试验[J]. 生态环境学报, 2012, 21(5): 913-918
- [30] Prosser JI, Nicol GW. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 2931-2941
- [31] Zheng NN, Ding N, Gao PK, et al. Diverse algicidal bacteria associated with harmful bloom-forming *Karenia mikimotoi* in estuarine soil and seawater[J]. Science of the Total Environment, 2018, 631-632: 1415-1420

(上接 p.800)

## 征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。本刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
- 王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
- 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
- 刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

## 4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录本刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>