

三株溶藻细菌胞外溶藻活性物质若干分离特性的研究

李 燕 潘伟斌* 杨丽丽

(华南理工大学环境科学与工程学院 广州 510640)

摘 要: 为了探索新分离到的 3 株溶藻细菌胞外溶藻活性物质的分离特性, 选择了对水华鱼腥藻生长无抑制作用的淀粉培养基培养溶藻细菌。采用透析、乙醇沉淀、有机溶剂萃取、活性炭吸附与解吸等方法对其分离特性进行了研究。溶藻细菌 L7 的溶藻活性物质的分子量小于 3.5 kD, 溶藻细菌 L8、L18 的溶藻活性物质的分子量在 3.5 kD~7 kD 之间; 3 株溶藻细菌的胞外溶藻活性物质不能用乙醇沉淀法完全分离; 3 株溶藻细菌的溶藻活性物质具较好的亲水性和较强的极性, 且都不能被活性炭吸附。

关键词: 水华, 溶藻细菌, 溶藻活性物质, 分离

Research on Separation Characteristics of the Extracellular Algae-lysing Components from Three Algae-lysing Bacteria

LI Yan PAN Wei-Bin* YANG Li-Li

(College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract: Three algae-lysing bacteria (L7, L8, L18) have been isolated. We used starch medium, which has no passive effect on growth of the *Anabaena flos-aquae* as cultivate medium. After being cultivated for 4d on a reciprocal shaker at 30°C and a speed of 100 r/min, the cultivate broth were centrifugated at a speed of 4000 r/min for 20min, filtrated with 0.22 μ m membrane, and condensed by vacuum rotary evaporator at 65°C. The sterile condensed bacteria-free filtrate obtained are dialysed, sedimentated by ethanol, extracted by organic solvents, absorbed by activated carbon. The molecular weight of the extracellular algae-lysing components of L7 are less than 3.5 kD, while the molecular weight of extracellular algae-lysing components of L8 and L18 are between 3.5 kD~7 kD; ethanol can not separate extracellular algae-lysing components from other componets efficiently; carbon tetrachloride can separate the extracellular algae-lysing components of L7 into water-layer efficiently, while petroleum ether can separate the extracellular algae-lysing components of L8 and L18 into water-layer efficiently, the extracellular algae-lysing

Keywords: Eutrophication, Algae-lysing bacteria, Extracellular algae-lysing components, Separation

* 通讯作者: Tel: 020-31803936; ✉: ppwbpan@scut.edu.cn
收稿日期: 2007-06-22; 接受日期: 2007-07-24

作为富营养化水体藻类生物防治的可能途径之一,利用溶藻细菌来防治水华和赤潮,已受到广泛关注^[1-3]。国内外已报道了十几种溶藻细菌。国外对溶藻细菌的溶藻机理、溶藻活性物质的分离、提纯和鉴定有较为深入地研究^[1-13],且已有相关专利的申请^[13]。目前国内文献主要集中于对溶藻细菌的分离、鉴定及溶藻现象的描述^[14-17],对其溶藻活性物质有关性质的研究尚处于起步阶段^[18-20]。大部分溶藻细菌的溶藻活性物质尚未被纯化和鉴定,从而限制了对溶藻细菌溶藻机制的进一步研究和应用。作者所在课题组曾分离鉴定出 3 株新的溶藻细菌^[17],本文采用透析袋透析、乙醇沉淀、有机溶剂萃取、活性炭吸附与解吸等方法初步探索了 3 株溶藻细菌胞外溶藻活性物质的分离特性,为有效地分离、纯化溶藻活性成分奠定基础。

1 材料与方法

1.1 溶藻细菌

来自我们课题组从广州城区某富营养化池塘筛选出的 3 株溶藻细菌,编号分别为 L7、L8 和 L18。L7 和 L8 属于蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*); L18 属于短小芽孢杆菌^[17](*Bacillus pumilus*)。L7、L8 和 L18 菌株 PCR 扩增产物的长度分别为 1454bp, 925bp, 1438bp。各菌株在 GenBank 的登录号分别为 DQ459876(strain L7)、DQ486872(strain L8)和 DQ459877(strain L18)。菌种以牛肉膏蛋白胨斜面培养基于 4℃ 冷藏保存。

1.2 供试藻种

选用的藻种为蓝藻中的水华鱼腥藻(*Anabaena flos-aquae*),来源于中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心。藻种经活化后,在 23 ± 0.5 ℃,光照强度 3000 Lux,光暗周期比 14 h:10 h 条件下,用 BG11 培养液^[19]培养,且各操作步骤均在无菌条件下进行。

1.3 仪器和试剂

人工气候箱(LRH-250-GS);生化培养箱(LRH-250-A);大容量恒温摇床(DHZ-CA);紫外可见分光光度计(TU-1800SPC);低速台式离心机(TDL-40B);旋转蒸发器(Heidolph LABOROTA 4011 digital);旋片真空泵(ZXZ-2);透析袋(RC-25-3500、RC-16-7000,上海绿鸟科技发展有限公司);真空干燥箱(DZF-6051)。

实验所用药品均为分析纯。包括可溶性淀粉、

K_2HPO_4 、NaCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、 $NaNO_3$ 、EDTA、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 Na_2CO_3 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、柠檬酸、柠檬酸铁铵、 H_3BO_3 、 $MnCl_2 \cdot H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、 $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 、石油醚、乙酸乙酯、四氯化碳、无水乙醇、异戊醇、颗粒活性炭。

1.4 溶藻细菌培养基的选择

为了方便后续溶藻活性物质的分离、纯化和鉴定工作,培养基的成分应该尽量简单明确。相对于牛肉膏蛋白胨和 PY 培养基^[6]等培养基而言,淀粉培养基^[22]成分简单、明确,利于后续分离、纯化工作的进行。

为了判断溶藻细菌的溶藻活性物质对水华鱼腥藻生长的影响,就必须选用对水华鱼腥藻生长无明显抑制作用的培养基。为此,设计 $L_8(2^7)5$ 因素 2 水平的正交实验,考察淀粉培养基及其中各成份对水华鱼腥藻生长的影响。对照为无菌水,每组设置两个平行。正交实验因素设置见表 1,实验设置见表 2。

表 1 正交实验的因素设置表						
Table 1 Factor setup in orthogonal test (g)						
Levels	Factors					
	Starch medium	K_2HPO_4	NaCl	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$(NH_4)_2SO_4$	
	A	B	C	D	E	
	10	1	1	1	2	
	0	0	0	0	0	

表 2 正交实验设置							
Table 2 Setup of the orthogonal test							
Arrangements	Factors						
	A	B	C	D	E		
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

1.5 无菌滤液和无菌浓缩液的制备

分别用 5 mL 无菌水从每支保存有溶藻细菌的斜面培养基上洗脱菌苔,菌悬液再按 1 : 10 的比例接种入液体淀粉培养基中。将接种后的液体培养基装入已灭菌的具塞锥形瓶中,置于大容量恒温摇床

中。以 30 °C 恒温、100 r/min 转速, 振荡培养 4d 后, 以 4000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。上清液再经 0.22 μ m 微孔滤膜抽滤 2 次, 以平板法检验无菌后, 制成溶藻细菌无菌滤液(以下简称无菌滤液)。

取无菌滤液, 经旋转蒸发仪 65 °C 真空旋蒸浓缩、至约原体积的 1/2, 得 2 倍无菌浓缩液; 继续浓缩至原体积的 1/10, 得 10 倍无菌浓缩液。将所得无菌浓缩液装入已灭菌的具塞锥形瓶中, 于 4 °C 冷藏备用。

1.6 活性物质的分离特性研究

1.6.1 透析: 取 10 倍无菌浓缩液 10mL, 装入截留分子量分别为 3.5 kD 和 7 kD 的透析袋中, 将透析袋放入盛有 300 mL 蒸馏水的 1000 mL 塑料杯中。以 30 °C 恒温、100 r/min 的转速在摇床中振荡透析 24 h。透析期间每隔 8 h 更换 1 次蒸馏水。透析完成后, 收集透析袋内溶液(透析样), 经 1×10^5 Pa 高压灭菌 20 min 后, 用无菌水定容至 20 mL。

另取 10 倍无菌浓缩液 10 mL, 经 1×10^5 Pa 高压灭菌 20 min 后, 用无菌水定容至 20 mL, 作为对照。比较定容后的透析样和无菌浓缩液的溶藻效果。

1.6.2 乙醇沉淀: 取 2 倍无菌浓缩液 100 mL, 加入 300 mL 无水乙醇, 常温下静置 10 min, 以 4000 r/min 转速离心 20 min, 收集上清液和沉淀。

取上清液, 经 65 °C 真空旋蒸浓缩至 100 mL 后, 再次加入 300 mL 的无水乙醇, 常温下静置 10 min, 在 4000 r/min 条件下, 离心 20 min, 收集上清液和沉淀。将上述步骤再重复 1 次。取上清液, 经 65 °C 真空蒸发至干后, 用少量蒸馏水溶解残留固体, 得到溶解相。

将上述各沉淀用蒸馏水溶解后合并, 经 65 °C 真空蒸发掉残留的乙醇, 得到沉淀相。将溶解相和沉淀相分别经 1×10^5 Pa 高压灭菌 20 min 后, 用无菌水定容到相同体积, 比较两相的溶藻效果。

1.6.3 有机溶剂萃取: 一些学者采用不同的有机溶剂, 通过萃取的方法实现对溶藻活性物质的初步分离。Ehud^[4], Yoshikawa^[3], Shinya^[5]用乙酸乙酯处理菌液, Yamamoto^[21]用 50%甲醇-水(1.25L/0.7L; V/V)处理菌液, Wang^[20]将无菌滤液酸化后, 用 CHCl_3 -MeOH(1:1, V/V)萃取, 龚良玉^[18]用氯仿萃取菌液中的溶藻活性物质。本研究中, 我们采用了 3 种极性不同的有机溶剂(石油醚、四氯化碳、乙酸乙酯)处理 3 株菌的无菌浓缩液, 以判明活性物质的极性。

取 3 份 50 mL 的 2 倍无菌浓缩液, 每份分别用 100 mL 石油醚、四氯化碳、乙酸乙酯反复两次进行过夜静置萃取, 分别收集水相和有机相。水相经旋转蒸发仪 65 °C 真空蒸发掉残留的有机溶剂。有机相经 65 °C 真空蒸发至干后, 用少量蒸馏水溶解残留固体。两相分别经 1×10^5 Pa 高压灭菌 20 min 后, 用无菌水定容至相同体积。比较两相的溶藻效果。

1.6.4 活性炭吸附与解吸: 取 10 倍无菌浓缩液 10 mL, 加入 30 g 活性炭和 100 mL 蒸馏水, 以 30 °C 恒温、100 r/min 转速在摇床中振荡 24 h 后, 以 4000 r/min 转速离心 20 min, 收集上清液(上清液 A)和 活性炭。用蒸馏水漂洗活性炭, 搅拌摇匀后静置 30 min, 以 4000 r/min 转速离心 20 min, 收集活性炭。在活性炭中加入 300 mL 异戊醇, 搅拌、摇匀, 静置 24 h, 以 4000 r/min 转速离心 20 min, 收集上清液(上清液 B)。

上清液 A 经 65 °C 真空旋蒸浓缩至小于 20 mL, 上清液 B 经 65 °C 真空蒸发至干后, 用少量蒸馏水溶解残留固体。上清液 A 和上清液 B 分别经 1×10^5 Pa 高压灭菌 20 min, 用无菌水定容至 20 mL。比较两者的溶藻效果。

1.7 溶藻效果的判断

将 1.6.1 至 1.6.4 中定容后的样液(透析样、无菌浓缩液、溶解相、沉淀相、水相、有机相、上清液 A、上清液 B)均分别与藻液以 1:1 的体积比混合, 立即测定混合液叶绿素 a 的含量, 作为初始值。各菌株的不同处理组均以液体淀粉培养基替代样液作为对照。5 d 后测各混合液的叶绿素 a 含量。通过对比 5 d 前后叶绿素 a(Chla)含量的变化来考察溶藻效果^[8]。

叶绿素 a 含量的测定采用胡先文等使用的测定方法^[23], 只是将测定步骤中的“用 90%乙醇手工研磨萃取”改成“用 90%乙醇直接萃取”^[24]。

2 结果与讨论

2.1 溶藻细菌培养基的选择

正交实验的结果见表 3。5 d 后对照的叶绿素 a 含量为 1.10 mg/L, 对表 3 的数据进行方差分析: 培养基各组分与对照间均不存在显著性差异($P < 0.05$), 但淀粉培养基与对照间存在显著性差异($P < 0.05$), 对水华鱼腥藻的生长具有促进作用, 5 d 后叶绿素 a 含量相比对照增加了 66.78%。可见, 淀粉培养基及其中各组分对藻生长均没有明显抑制作用, 藻在淀

粉培养基中可以正常生长。因此,本研究选用淀粉培养基作为溶藻细菌的培养基。

吕伟英等通过基本培养基各成分对铜绿微囊藻DS的作用研究发现,培养基中的葡萄糖成分对藻有抑制作用,且这种抑制作用与培养基中的葡萄糖浓度密切相关,当培养基中葡萄糖的浓度在 0.1g/L~0.4 g/L 时,藻细胞生长受到抑制。当用柠檬酸三钠取代葡萄糖后,铜绿微囊藻在改良后的培养基中生长正常,与对照组相比无显著性差异($P<0.05$)。用改良的培养基富集水样中的溶藻微生物,并用此培养液直接感染宿主藻,一周内即可初步快速检测是否含有溶藻细菌。此种方法既排除了培养基的干扰因素,又迅速增加了溶藻细菌的生物量,并可大量收集细菌分泌的胞外物质,为溶藻细菌尤其以分泌物质的溶藻细菌初步筛选提供了一条快捷、有效的途径^[16]。结合本研究,可以考虑使用淀粉培养基作为将来筛选新溶藻细菌的一种培养基。但是,这种培养基对某些细菌来说可能属于一种寡营养成分的培养基,不能满足其生长。因此,若想有效筛选到多种溶藻细菌,还需摸索培养基的改良。

表 3 正交实验结果

Table 3 results of the orthogonal test

Arranger	ant	1	2	3	4	5	6	7	8
Chla (mg/L)		21	64	79	81	01	80	98	21

2.2 透析

10 倍无菌浓缩液经截留分子量为 7 kD 的透析袋透析后,透析样都无溶藻效果(图 1)。经截留分子量为 3.5 kD 的透析袋透析后, L7 的透析样仍无溶藻效果, L8、L18 的透析样的溶藻效果和各自的无菌浓缩液无显著性差异($P<0.05$)。据此判断:除 L7 的溶藻活性物质的分子量小于 3.5 kD 外, L8 和 L18 的溶藻活性物质的分子量都在 3.5 kD~7 kD 之间。

Lee 等发现的一株假交替芽孢杆菌,其产生的对硅藻有溶藻效果的丝氨酸蛋白酶,分子量为 50 kD^[1]。Nobuyuki 等人发现一株蜡状芽孢杆菌,其产生的胞外非蛋白质类物质对铜绿微囊藻具有溶藻效果,通过透析判断出其分子量在 2 kD 以下^[6]; Kim 等分离出一株溶藻细菌(AFK-13),其无菌滤液中分子量为 50 kD~100 kD 的蛋白质类物质,对水华鱼腥藻具有显著溶藻效果^[11]。与他们的研究不同, L8 和 L18 的溶藻活性物质的分子量在 3.5 kD~7 kD 之间,

推断其可能是一种新的活性物质。

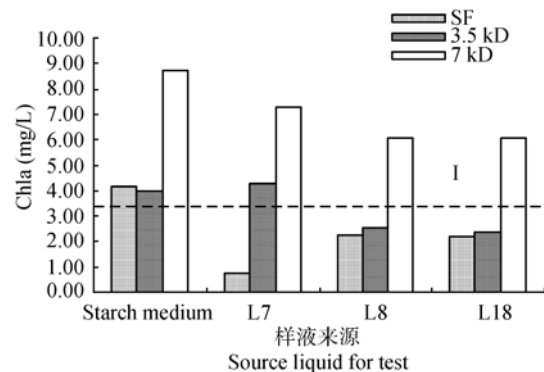


图 1 无菌浓缩液和透析样的溶藻效果

Fig.1 Algae-lysing effect of sterile bacteria-free filtrate and dialysate

L7、L8、L18: 来源于各菌的无菌浓缩液; starch medium: 对照; I: 初始值; SF: 无菌浓缩液; 3.5 kD: 经 3.5 kD 透析袋透析所得透析样; 7 kD: 经 7 kD 透析袋透析所得透析样

L7、L8、L18: from sterile condensed bacteria-free filtrate of each bacterium; starch medium: control; I: initial data; SF: sterile condensed bacteria-free filtrate; 3.5 kD: dialysate after dialysed by 3.5 kD membrane; 7 kD: dialysate after dialysed by 7 kD membrane

2.3 乙醇沉淀

经乙醇处理后, 3 株溶藻细菌的 2 倍无菌浓缩液的溶解相和沉淀相均有一定的溶藻效果(图 2): L7、L18 的溶解相较沉淀相有更好的溶藻效果, 而 L8 相反, 其沉淀相比溶解相有更好的溶藻效果。3 株菌的溶藻活性物质不能用乙醇沉淀法完全分离, 且 L8 的溶藻活性物质可能与 L7、L18 的溶藻活性物质有所不同。

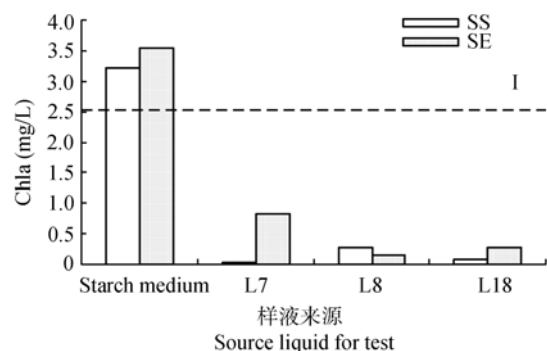


图 2 溶解相和沉淀相的溶藻活性

Fig. 2 Algae-lysing effect of soluble solids and sedimentation L7、L8、L18: 来源于各菌的无菌浓缩液; starch medium: 对照; I: 初始值; SS: 溶解相; SE: 沉淀相

L7、L8、L18: from sterile condensed bacteria-free filtrate of each bacterium; starch medium: control; I: initial data; SS: soluble solids; SE: sedimentation

在水溶液中,乙醇会使许多蛋白质、核酸、多糖等沉淀下来^[25],3株溶藻细菌的溶藻活性物质不排除有上述物质的可能,也许它们是由多种物质组成,也可能是某种不能被乙醇分离的单个物质。

2.4 有机溶剂萃取

2倍无菌浓缩液经石油醚、四氯化碳和乙酸乙酯萃取后,水相都有一定的溶藻效果,有机相都无溶藻效果(图3)。在上述3种有机溶剂萃取后所得的水相中,对于L7菌液,5d后叶绿素a去除率分别为:23.98%、55.25%、45.73%,以四氯化碳水相溶藻效果最好、乙酸乙酯次之;对于L8菌液,5d后叶绿素a去除率分别为:84.79%、9.86%、15.35%,以石油醚水相效果最好;对于L18菌液,5d后叶绿素a去除率分别为:80.06%、11.92%、14.80%,和L8类似,以石油醚水相效果最好。四氯化碳可以有效地将L7中的溶藻活性物质分离到水相,石油醚可以有效地将L8和L18的活性物质分离到水相。3种有机溶剂的极性由小到大为:石油醚<四氯化碳<乙酸乙酯。乙酸乙酯为中等极性的有机溶剂^[26],其有机相不能萃取到3株溶藻细菌的活性物质,表明这3株溶藻细菌的活性物质都具有较强的极性。

已报道的溶藻细菌产生的溶藻活性物质中,既有亲脂性的、也有亲水性的,还有的同时具备亲脂和亲水两亲性。Ehud发现1株弧菌(*Vibrio shiloi*)能合成并分泌一种亲脂性的胞外多肽(毒素P),该毒素能够导致虫黄藻的死亡^[4]。Shinya发现1株假单胞属的细菌K44-1,其产生的胞外亲脂性物质Harmane,对蓝藻、绿藻门的部分藻类具有溶藻活性^[5]。

Yoshikawa筛选出一株对蓝藻有溶藻效应的细菌(*Vibrio* sp.),其溶藻活性物质在以下3种溶剂系统:乙酸乙酯-异丙醇-菌液(5:6:4, V/V/V)、二氯甲烷-甲醇-菌液(8:3:10, V/V/V)、n-丁醇-乙酸-菌液(4:1:5, V/V/V)中表现出强亲水性,不能被萃取到溶剂系统的有机相^[3]。Nobuyuki发现一株蜡状芽孢杆菌,其无菌滤液中的亲水性非蛋白质类物质,对铜绿微囊藻和绿色微囊藻具有溶藻效果^[6]。本研究中的3株溶藻细菌产生的溶藻活性物质,同样具有亲水性。

Wang等发现的1株铜绿假单胞菌,其所产生的鼠李糖脂类生物表面活性剂,对许多海洋赤潮藻如东海原甲藻、赤潮异湾藻等有抑制和杀伤作用,该表面活性剂具备亲脂和亲水两亲性^[20]。

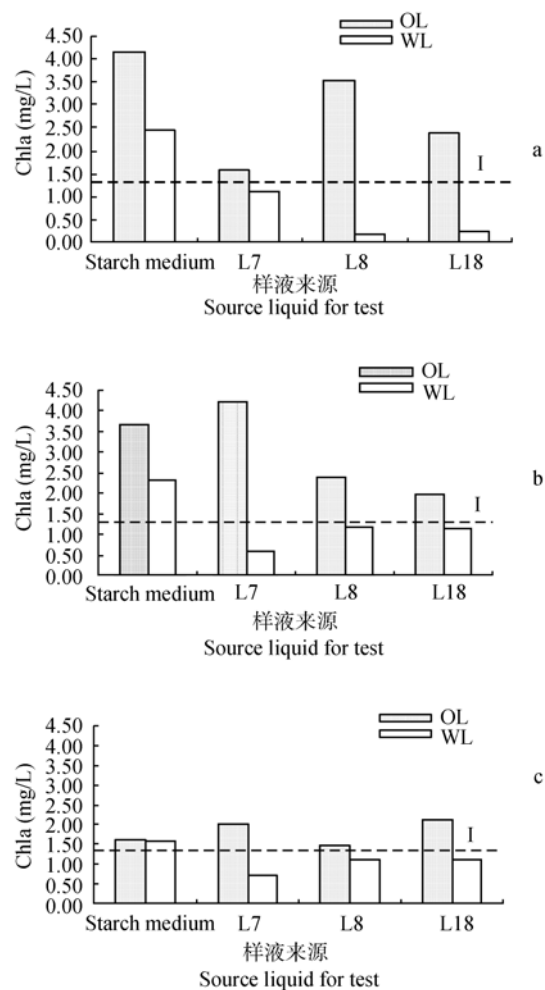


图3 有机相和水相的溶藻效果

Fig. 3 Algae-lysing effect of water-layer and organic-solvent-layer

a: 石油醚萃取结果; b: 四氯化碳萃取结果; c: 乙酸乙酯萃取结果

a: results of petroleum ether; b: results of carbon tetrachloride; c: results of ethyl acetate

L7、L8、L18: 来源于各菌的无菌浓缩液; starch medium: 对照; I: 初始值; OL: 有机相; WL: 水相

L7、L8、L18: from sterile condensed bacteria-free filtrate of each bacterium; starch medium: control; I: initial data; OL: organic-solvent-layer; WL: water-layer

2.5 活性炭吸附与解吸

10倍无菌浓缩液经活性炭吸附后,上清液A仍有较好的溶藻活性,但相对于原浓缩菌液,溶藻活性有所降低(图4)。可能是处理过程中存在一定的损失。而经异戊醇洗脱、解吸后,离心所得的上清液B没有溶藻活性。这表明3株溶藻细菌产生的溶藻活性物质不能被活性炭吸附。这与Yoshikawa的研究结果相似,他筛选出1株对蓝藻有溶藻效应的细菌(*Vibrio* sp.),其产生的亲水性溶藻活性物质β-氨基-

L-丙氨酸,也不能被活性炭所吸附^[3]。

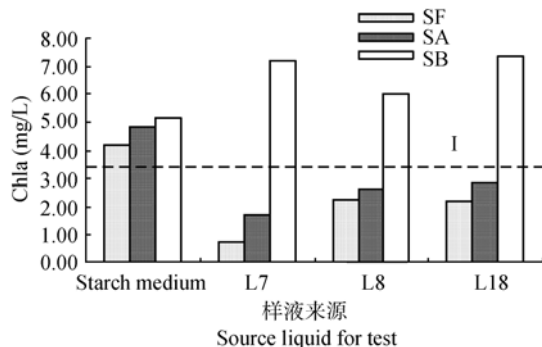


图4 上清液A和上清液B的溶藻效果

Fig. 4 Algae-lysing effect of supernatant A and supernatant B L7、L8、L18: 来源于各菌的无菌浓缩液; starch medium: 对照; I: 初始值; SF: 无菌浓缩液; SA: 上清液A; SB: 上清液B L7、L8、L18: from sterile condensed bacteria-free filtrate of each bacterium; starch medium: control; I: initial data; SF: sterile condensed bacteria-free filtrate; SA: supernatant A; SB: supernatant B

3 结论

1) 溶藻细菌 L7 的溶藻活性物质的分子量小于 3.5 kD, 而 L8, L18 的溶藻活性物质的分子量在 3.5 kD~7 kD 之间。

2) 3 株溶藻细菌的溶藻活性物质和非活性物质不能用乙醇沉淀法完全分离。对于 L7 和 L18, 溶解相溶藻活性物质居多, 而对于 L8, 沉淀相中溶藻活性物质居多。

3) 四氯化碳和乙酸乙酯可以有效地将 L7 菌液中的活性物质分离到水相, 石油醚可以有效地将 L8 和 L18 菌液中的活性物质分离到水相。3 株溶藻细菌的活性物质都具有较好的亲水性物质, 具有较强的极性。

4) 3 株溶藻细菌的活性物质不能被活性炭吸附。

参考文献

- [1] Lee S, Kato J, Takiguchi N, *et al.* Involvement of an Extracellular Protease in Algicidal Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain A28. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(1): 4334–4339.
- [2] Jeong SY, Ishida K, Ito Y, *et al.* Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful *dinoflagellate*, *Cochlodinium polykrikoides*. *Tetrahedron Letters*, 2003, **44**(43): 8005–8007.
- [3] Yoshikawa K, Adachi K, Nishijima M, *et al.* β -Cyanoalanine

production by marine bacteria on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(2): 718–722.

- [4] Banin E, Khare SK, Naider F, *et al.* Proline-rich Peptide from the Coral Pathogen *Vicrio shiloi* that Inhibits Photosynthesis of *Zooxanthellae*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(4): 1536–1541.
- [5] Kodani S, Imoto A, Mitsutani A, *et al.* Isolation and identification of the antialgal compound, harmaline(1-methyl- β -carboline), produced by the algicidal bacterium, *Pseudomonas* sp. K44-1. *J Appl Phycol*, 2002, **14**(2): 109–114.
- [6] Nobuyuki N, Kazunori N, Norio S, *et al.* A Novel Cyanobacteriolytic Bacterium, *Bacillus cereus*, isolated from a Eutrophic Lake cereu. *J Biosci technol*, 2003, **95**(2): 179–184.
- [7] Baker KH, Herson DS. Interactions between the diatom *Thalassiosira pseudonanna* and an associated *Pseudomonad* in a mariculture system. *Appl Environ Microbiol*, 1978, **35**(6): 791–796.
- [8] Nakashima T, Miyazaki Y, Matsuyama Y, *et al.* Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium γ -proteobacterium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **73**(3): 684–690.
- [9] Kang YH, Kim JD, Kim BH, *et al.* Isolation and characterization of a bioagent antagonistic to diatom, *Stephanodiscus hantzschii*. *J Appl Microbiol*, 2005, **98**(5): 1030–1038.
- [10] Imai I, Fujimaru D, Nishigaki T, *et al.* Algicidal bacteria isolated from the surface of seaweeds from the coast of Osaka Bay in the Seto Inland Sea, Japan. *Afri. J Mar Sci*, 2006, **28**(2): 319–323.
- [11] Kim JD, Kim B, Lee CG. Alga-lytic activity of *pseudomonas fluorescens* against the red tide causing marine alga *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*). *Bio Control*, 2007, **41**(3): 296–303.
- [12] 张勇, 席宇, 吴刚. 溶藻细菌杀藻物质的研究进展. *微生物学通报*, 2004, **31**(1): 127–131.
- [13] Kato J. Novel peptide having algicidal activity with respect to red tide algae, derived from *Pseudolteromonas* species, useful for inhibiting algicidal activity. *Japan: JP2006296318-A*, 2006, **11**: 2.
- [14] 裴海燕, 胡文容, 曲音波, 等. 一株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性. *环境科学学报*, 2005, **25**(6): 796–802.
- [15] 彭超, 吴刚, 席宇, 等. 3 株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻效应. *环境科学研究*, 2003, **16**(1): 37–40.
- [16] 吕伟英, 赵以军, 周瑞, 等. 一种快速检测分离溶藻细菌方法的初探. *微生物学通报*, 2007, **34**(1): 119–122.

- [17] 刘 晶, 潘伟斌, 秦玉洁, 等. 两株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性. 环境科学与技术, 2007, **30**(2): 17–22.
- [18] 龚良玉, 王修林, 李雁宾, 等. 铜绿假单胞菌产吩嗪类色素的分离纯化及其对赤潮生物生长的影响. 复旦大学学报(自然科学版), 2004, **43**(4): 494–498.
- [19] 史顺玉. 溶藻细菌对藻类的生理生态效应及作用机理研究. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006, pp. 66–77.
- [20] Wang XL, Gong LY, Liang SK. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful algae*, 2005, **4**(2): 433–443.
- [21] Yamamoto Y, Kouchiwal T. Distribution and identification of actinomycetes lysing cyanobacteria in a eutrophic lake. *J Appl Phycol*, 1998, **10**(4): 391–397.
- [22] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002, pp. 29–35.
- [23] 胡先文, 董元彦, 张新萍, 等. 可见分光光度法测定水华鱼腥藻. 华中农业大学学报, 2002, **21**(3): 295–297.
- [24] 韩桂春, 谷 丰, 张忠臣. 淡水中叶绿素 a 测定方法的探讨. 中国环境监测, 2005, **21**(1): 55–57.
- [25] 孙 彦. 生物分离工程. 北京: 化学工业出版社, 2005, pp. 42–44.
- [26] 汪家鼎, 陈家镛. 溶剂萃取手册. 北京: 化学工业出版社, 2001, pp. 928–945.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依据提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不接受。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 突出重点。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内, 研究报告 4–6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

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。我刊的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。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p. 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞, 等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp. 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2008-00-00; 接受日期: 2008-00-00

(下转 p. 182)

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>