

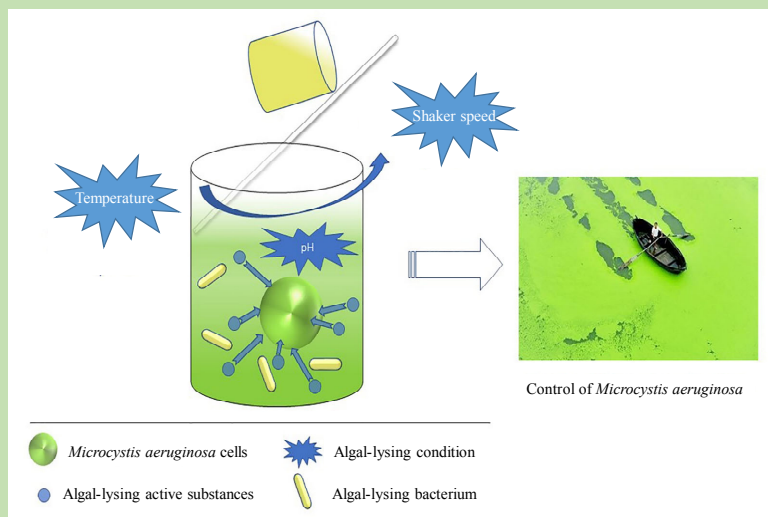
Isolation and identification of XXG a strain of *Paenibacillus* with algae-lysing ability and study on algae-lysing characteristics

Jingjing XUE¹, Meijuan WANG¹, Linqiang MAO¹, Mingfei ZHAN², Jun NING², Wenyi ZHANG^{1*}

1. School of Environmental & Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou, Jiangsu 213164, China

2. Anhui shuiyun environmental protection Co., Ltd., Wuhu, Anhui 241000, China

Abstract: A strain of bacteria XXG was isolated from rice fields irrigated from Taihu Lake. The bacterial genus was determined by analyzing its morphological characteristics, physiology biochemistry experiment and 16SrDNA sequence. Single factor test was conducted on the addition ratio of medium, the volume ratio of bacteria to algae, the density of bacteria and density of algae to study the effect of each factor on the effect of lysing algae. Box-Behnken Design (BBD) was used to design three major factors, namely, temperature (X_1), pH (X_2) and shaker speed (X_3), to optimize the



environmental factors that affect the lysing rate of algae. The method of lysing algae was initially examined by comparing the effect of bacterial weight suspension and sterile fermentation liquid on algal liquid. The experimental results showed that the similarity degree between XXG and *Paenibacillus* sp. KU573975 was 99.27%, and was initially identified as *Paenibacillus*. When the optimum volume ratio of bacterial to algal was 5.6%, the lysing rate of XXG bacteria to *Microcystis aeruginosa* solution at the early logarithmic growth stage reached at 77.1% after 6 d. Three important environmental factors that affected the efficiency of XXG algal lysing had a cross effect. The quadratic regression model of lysing rate of algae with the temperature, pH and shaker speed was established with $P < 0.0001$ and R^2 was 0.9727. Under the optimal algae-lysing characteristics, the lysing rate of algae was the highest when the temperature was 30 °C, the pH was 7.5, and the shaking speed was 150 r/min, and the lysing rate of algae was up to 92.02%. Aseptic fermentation liquid without algal bacterial still had algae-lysing effect. It was speculated that the main algae-lysing processing of XXG bacteria was indirect effect. The reduction in algae-lysing effect produced by aseptic fermentation liquid compared with bacterial fermentation liquid may be achieved by the bacteria in bacterial fermentation liquid continuing to secrete some algae-lysing active substances.

Key words: algae-lysing bacterium; *Microcystis aeruginosa*; algae-lysing condition; algae-lysing characteristics; *Paenibacillus*

收稿日期: 2019-09-17, 修回日期: 2019-12-24, 网络发表: 2020-02-05, Received: 2019-09-17, Revised: 2019-12-24, Published online: 2020-02-05
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 41571471); 水体污染控制与治理科技重大专项资助项目(编号: 2017ZX07202-003/004)
作者简介: 薛静静(1992-), 女, 山东省海阳市人, 硕士研究生, 环境工程专业, E-mail: 1512847491@qq.com; 张文艺, 通讯联系人, E-mail: zhangwenyi888@sina.com.

引用格式: 薛静静, 王美娟, 毛林强, 等. 一株具有溶藻功能的 *Paenibacillus* sp. XXG 的分离鉴定及溶藻特性研究. 过程工程学报, 2020, 20(9): 1097-1105

Xue J J, Wang M J, Mao L Q, et al. Isolation and identification of XXG a strain of *Paenibacillus* with algae-lysing ability and study on algae-lysing characteristics (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2020, 20(9): 1097-1105, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.219303.

一株具有溶藻功能的 *Paenibacillus* sp. XXG 的分离鉴定及溶藻特性研究

薛静静¹, 王美娟¹, 毛林强¹, 占明飞², 宁军², 张文艺^{1*}

1. 常州大学环境与安全工程学院, 江苏 常州 213164

2. 安徽水韵环保股份有限公司, 安徽 芜湖 241000

摘要: 从太湖水系灌溉的水稻田中分离出一株细菌 XXG 作为受试菌株, 通过分析其形态特征表现、生理生化实验及 16SrDNA 序列确定菌属; 对培养基投加比、菌藻体积比、菌密度、藻密度进行单因素试验, 研究各因素对溶藻效果的影响; 选择温度(X_1)、pH(X_2)、摇床转速(X_3)3 个主要因素采用 Box-Behnken Design (BBD) 设计, 优化影响溶藻率的环境因素; 通过对比菌体重悬液和无菌发酵液对藻液的影响, 初步探究其溶藻方式。实验结果表明, XXG 菌与 *Paenibacillus* sp. KU573975 相似高达 99.27%, 初步判定该菌株为类芽孢杆菌(*Paenibacillus*); 最佳菌藻体积比为 5.6%, XXG 菌对处于对数生长期前期的铜绿微囊藻液的 6 d 溶藻率达 77.1%; 影响 XXG 溶藻率的 3 个重要环境因素具有交叉作用, 得出溶藻率与温度、pH、摇床转速的二次回归模型, 该模型 $P < 0.0001$, $R^2 = 0.9727$, 在最佳溶藻特性下, 当温度为 30℃、pH=7.5、摇床转速为 150 r/min 时溶藻率最高, 溶藻率可达 92.02%; 无菌发酵液仍有溶藻效应, 推测 XXG 菌的主要溶藻方式为间接溶藻, 无菌发酵液相较于细菌发酵液产生溶藻效应的减弱可能由细菌发酵液中的菌体继续分泌某种溶藻活性物质来实现。

关键词: 溶藻细菌; 铜绿微囊藻; 溶藻条件; 溶藻特性; 类芽孢杆菌

中图分类号: X703

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2020)09-1097-09

1 前言

每年夏秋季节太湖、巢湖等我国一些重要流域水华频发, 有害水藻水华(HAB)严重影响渔业生产、居民用水安全及区域生态安全^[1,2]。铜绿微囊藻是太湖流域 HAB 的优势藻种之一, 因其产生的藻毒素毒性大、难降解、可被生物富集, 已成为水环境中的公害^[3-5]。微生物(溶藻细菌、噬菌体)作为控藻的有效手段具有标本兼治、易从湖泊水体中分离、生态安全性好等优点, 引起国内外研究者的关注^[6-8]。

近年来筛菌成果众多, 针对控制铜绿微囊藻水华的细菌, 目前已报道的有水单胞菌属(*Aquimonas*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)、剑菌属(*Ensifer*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)等, 而类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)作为溶藻细菌的报道鲜少, 且溶藻过程中各个菌株的溶藻方式、溶藻条件及溶藻效果还需进一步探讨和分析^[9-15]。

本课题组发现太湖水系 HAB 爆发时期, 当地农民用含 HAB 的藻水灌溉水稻田, 而在水稻田的水中并未发现蓝藻, 猜测稻田中的植物根部或微生物具有溶藻作用。本研究从上述土壤中分离出一株高效溶藻菌 XXG, 通过生理生化实验及 16SrDNA 序列分析鉴定其为类芽孢杆菌, 并测定其生长曲线, 然后对培养基投加比、菌

藻体积比、菌密度、藻密度等溶藻条件进行单因素试验, 探究 XXG 菌的溶藻特性。随后对温度、pH、摇床转速进行响应面实验设计, 通过优化温度、pH、摇床转速等因素确定最佳溶藻环境因素。最后通过对比菌体重悬液和无菌发酵液对藻液的影响, 初步探讨了 XXG 菌的溶藻方式。

2 实验

2.1 材料与试剂

铜绿微囊藻(FACHB905, 中国科学院武汉水生生物研究所)。在 50 mL 三角瓶(高压灭菌且干燥)中加入 15 mL 铜绿微囊藻液, 在温度 25℃、光照强度为 2500 lux、光暗比为 12 h:12 h 的条件下培养 2~3 d 后, 加入 BG-11 培养基 15 mL, 相同条件下继续培养 20~30 d, 待藻液变成深绿色, 再进行转接, 转接比为 1:5。

菌种来源: 菌株 XXG 为本课题组从蓝藻爆发时期(2018 年 8 月 7 日)水稻田(含 HAB 的藻水灌溉)的水稻根部土壤中筛得。

藻类培养基: BG11 培养基见表 1。

细菌培养基: 牛肉膏 5 g、鱼粉蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、蒸馏水 1000 mL, 调节 pH=7.2, 高温灭菌冷却; 固体培养基再加入 20 g/L 琼脂粉, 加热溶解, 调节 pH=7.2, 高温灭菌冷却。

表 1 BG11 培养基成分表			
Table 1 Composition of BG11 medium			
Number	Composition	Concentration/(g/L)	Dosage/(mL/L)
1	NaNO ₃	1.500	100
2	K ₂ HPO ₄	0.040	10
3	MgSO ₄ ·2H ₂ O	0.075	10
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	10
5	C ₆ H ₈ O ₇	0.006	10
6	(NH ₄) ₃ C ₆ H ₅ O ₇	0.006	10
7	EDTANa ₂	0.001	10
8	Na ₂ CO ₃	0.020	10
9	H ₃ BO ₃	2.860	1
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.860	1
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.220	1
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.039	1
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.080	1
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.050	1

2.2 实验设备与分析仪器

GZP-250 数显光照培养箱(上海精宏实验设备有限公司),XYJ-A 离心机(金坛市杰瑞电器有限公司),SW-CJ-1F 净化工作台(上海贺德实验设备厂),HZQ-X100A 恒温振荡培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂),TL4 倒置显微镜(日本奥林巴斯),UV-1800 紫外分光光度计(日本岛津公司)等。

2.3 实验方法

2.3.1 高效溶藻细菌的分离与培养

(1) 富集培养

在 150 mL 的三角瓶(高压灭菌且干燥)中加入 100 mL 一定浓度的铜绿微囊藻液、5 g 水稻田中水稻根系土壤,置于温度为 28~30℃、转速为 120~150 r/min 摇床中振荡培养 5~10 d,发现藻液发生黄化。取黄化藻液 10 mL 加铜绿微囊藻液至 100 mL 相同条件下重复 3 次,获得富集菌液。

(2) 分离单菌落

取黄化藻液梯度稀释,分别取 0.1 mL 不同浓度的黄化藻液进行平板涂布,倒置于固体培养基(2.1 节)中,培养 2~3 d,获得 5 种不同颜色的单菌落。

(3) 分离纯化细菌

用无菌接种环分别挑取 5 种单菌落在固体培养基(2.1 节)上分别划线分离纯化,重复划线得到 5 个纯菌。

(4) 高效溶藻细菌筛选

用无菌接种环分别挑取少量(每次约 6.9×10⁶ cells)5 株(1#, 2#, 3#, 4#, 5#)纯化的菌体与 100 mL 叶绿素 a (Chl-a)浓度为 1648 μg/L 的铜绿微囊藻液混合,置于温度 28~30℃、转速为 120~150 r/min 摇床中振荡培养 20~30

d,发现藻液出现不同程度的黄化(如图 1 所示),其中 4# 菌株黄化程度最高,确定为高效溶藻细菌,命名为 XXG。



图 1 5 株菌的溶藻效果
Fig.1 Algae-lysing effect of 5 strains

2.3.2 XXG 菌的鉴定

用上海生工 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒对 XXG 菌进行 DNA 提取,PCR 扩增及序列测定由上海生工生物工程有限公司完成。将所测的序列在 EzBioCloud 数据库中进行 BLAST 比对,初步判断菌株的种属,在 EzBioCloud 上查找其分类属的模式菌种并下载 16SrDNA 基因序列。将下载的基因序列和 XXG 的基因序列用 ClustalW 进行分析,得到多重序列匹配排列阵(Multiple alignment)。通过 MAGE7 软件采用 N-J 法对多重序列匹配排列阵进行分析,构建出系统发育树并确定菌株的种属。

2.3.3 XXG 菌生长曲线的测定

采用比浊法进行 XXG 菌的生长曲线测定,以未接菌的液培为空白,菌悬液为样品,每 2 h 测一次 OD₆₀₀ 的吸光度值,绘制成图。

2.3.4 XXG 菌溶藻特性的单因素实验

在铜绿微囊藻液中加入灭菌牛肉膏蛋白胨培养液和菌悬液,对培养基投加比(灭菌牛肉膏蛋白胨培养液与铜绿微囊藻液的体积比)、菌藻体积比(菌悬液与铜绿微囊藻液的体积比)、菌密度、藻密度进行单因素实验。通过平行对比试验,培养基投加比(0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 体积比)、菌藻体积比(1%, 2%, 2.5%, 3.3%, 5%, 5.2%, 5.4%, 5.6%, 5.8%, 6.0%, 10%)、菌密度(OD₆₀₀ 分别为 0.20, 0.75, 1.30)、藻密度(Chl-a 浓度分别为 659.68, 1294.22, 4259.88 μg/L)对溶藻效果的影响,最终确定最佳溶藻条件。利用乙醇法提取 Chl-a,每 24 h 测 1 次 Chl-a 浓度,通过 Chl-a 浓度和溶藻率表征溶藻效果^[16]。溶藻率通过式(1)计算:

$$\eta = \frac{C_c - C_t}{C_c} \times 100\% \tag{1}$$

式中， η 为溶藻率(%); C_c 为初始 Chl-a 浓度($\mu\text{g/L}$); C_t 为处理后 Chl-a 浓度($\mu\text{g/L}$)。

2.3.5 响应面实验设计

将 Chl-a 浓度为 1294.22 $\mu\text{g/L}$ 的铜绿微囊藻液，OD₆₀₀ 为 0.75 的 XXG 菌悬液以菌藻体积比为 5.6%混合，利用 Design-Expert 8.0 软件，选择温度(X_1)、pH(X_2)、摇床转速(X_3)3 个主要因素，每个因素取 3 个水平，采用 Box-Behnken Design (BBD)设计，以无菌铜绿微囊藻液的 Chl-a 浓度为 C_c ，加菌的铜绿微囊藻液的 Chl-a 浓度为 C_t ，对影响溶藻率环境因素进行优化。BBD 设计原理的设计因素水平表见表 2。

表 2 因素与水平表			
Table 2 Factors and levels table			
Factor	Level		
	-1	0	1
Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	15	30	45
pH	6.5	7.5	8.5
Shaker speed/(r/min)	100	150	200

2.3.6 XXG 菌溶藻方式研究

将 XXG 菌接种在液体培养基中，在温度 28~30 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 120~150 r/min 的摇床中振荡培养 2 d(此时 XXG 菌处于对数生长期)，取菌悬液于离心管中，室温 8000 r/min 离心 8 min，沉淀物为菌体。用 0.22 μm 针式滤器过滤上清液得到 5 mL 无菌发酵液，将离心后的菌体用无菌盐水洗涤 2 遍，与 5 mL 新鲜培养基重悬得到菌体重悬液。分别将菌体重悬液和无菌发酵液加入 100 mL 处于对数生长期的铜绿微囊藻液中，考察 Chl-a 浓度变化。

3 结果与讨论

3.1 XXG 菌的分离与鉴定

从受太湖水系灌溉的水稻田中取水稻根部土壤样品，在实验室条件下分离出 5 株(分别命名为 1#, 2#, 3#, 4#, 5#)溶藻菌，溶藻能力如图 2 所示。其中，挑取多次纯化的菌株 XXG 接种至牛肉膏蛋白胨液体培养基，在温度为 28~30 $^{\circ}\text{C}$ ，转速为 120~150 r/min 的摇床中振荡培养 24 h 后得到富集菌液。5 mL XXG 富集菌液能够在 10 d 内将 100 mL 铜绿微囊藻溶液 Chl-a 初始浓度为 1240 $\mu\text{g/L}$ 降解至 397 $\mu\text{g/L}$ ，而 10 d 后未加 XXG 富集菌液的铜绿微囊藻溶液 Chl-a 浓度为 1533 $\mu\text{g/L}$ 。因此，将高效溶藻菌 XXG 作为实验菌株。

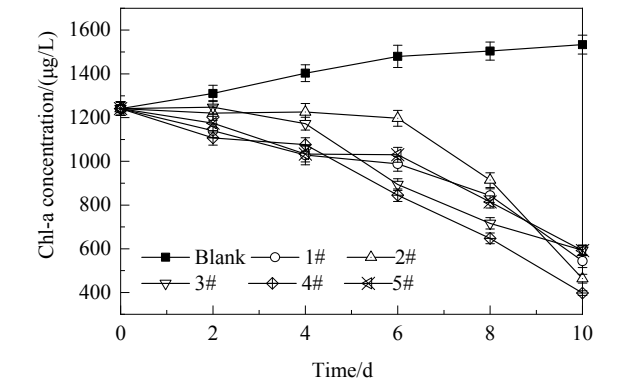


图 2 5 株菌的溶藻效果比较
Fig.2 Comparisons of algae-lysing effect of 5 strains

XXG 菌经固体培养基培养 48 h 后，菌落形状不规则，白色，表面光滑，凸起，黏稠状，边缘整齐，生长迅速；革兰氏染色呈紫色，为阳性菌，如图 3 所示，经生理生化(表 3)及 16SrDNA 序列分析，该菌株与 *Paenibacillus* sp. KU573975 相似高达 99.27%(图 4)，判定该菌株为类芽孢杆菌属。菌株 *Paenibacillus* sp. XXG 已在“中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心”保藏，保藏编号为 17503。

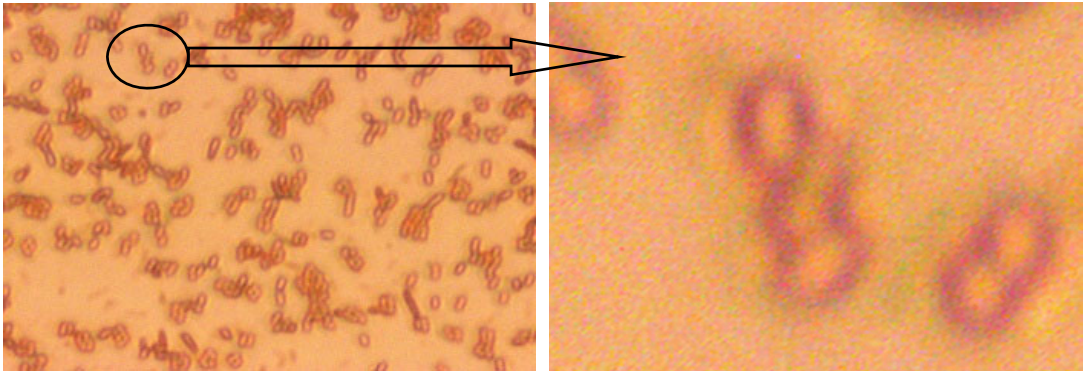


图 3 XXG 革兰氏染色(目镜 10×、物镜 40×)
Fig.3 XXG gram staining (eyepiece 10×, objective 40×)

表 3 菌株 XXG 生理生化特性
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain XXG

Physiological and biochemical characteristics	Result	Physiological and biochemical characteristics	Result
Gram stain	+	V.P	+
Glucose utilization	+	Methyl red	—
Starch hydrolysis	+	Produce indoles	—
Gelatin liquefaction	+	Nitrate reduction	+
Tyrosine	—	Citrate utilization	—
Twain's 80	+	4 ℃	—
Oxidase	—	37 ℃	+
Catalase	+	2% NaCl	+
Phenylalanine decarboxylase	—	7.5% NaCl	—

Note: + positive; — negative.

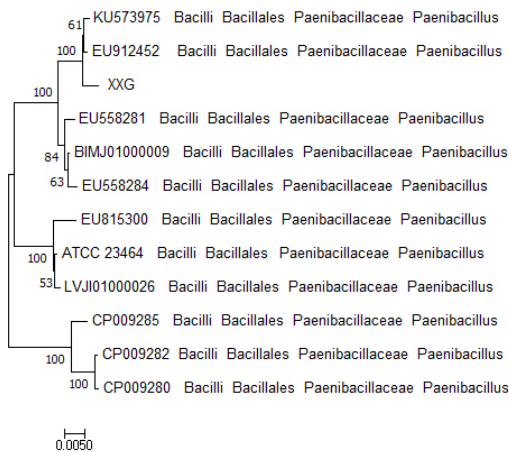


图 4 XXG 菌系统发育树
Fig.4 phylogenetic tree of XXG bacteria

3.2 XXG 菌生长曲线测定

图 5 为 XXG 菌的生长曲线。由图可知，0~8 h XXG 菌处于生长迟缓期，10~52 h XXG 菌进入对数生长区，52 h XXG 菌浓度最高，随后进入稳定期，64 h 后进入衰亡期。

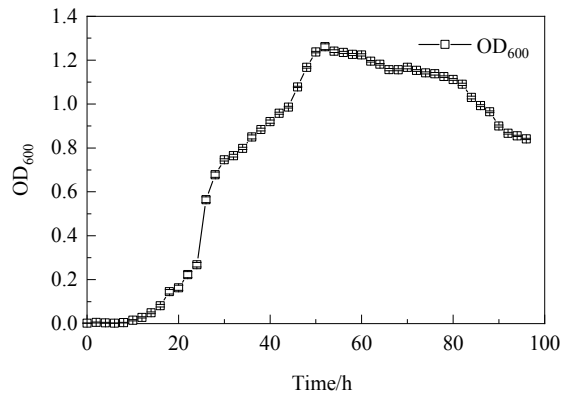


图 5 XXG 菌生长曲线
Fig.5 Growth curve of XXG bacteria

3.3 XXG 菌溶藻特性

加入不同体积的灭菌牛肉膏蛋白胨培养液对铜绿微囊藻的生长产生不同的影响，如图 6 所示。0~4 d，培养基投加比的改变对溶藻效果几乎没有影响；4~6 d，培养基投加比为 2%, 4%, 6% 的铜绿微囊藻与未投加培养基的铜绿微囊藻正常生长，而培养基投加比为 8%, 10% 的铜绿微囊藻逐渐死亡；6~10 d，培养基投加比为 2%, 4%, 6%, 8%, 10% 的铜绿微囊藻均出现不同程度的死亡。考虑到排除培养基对溶藻效果的影响，实验可以考察少于 6% 的培养基投加比生长 6 d 的溶藻效果。

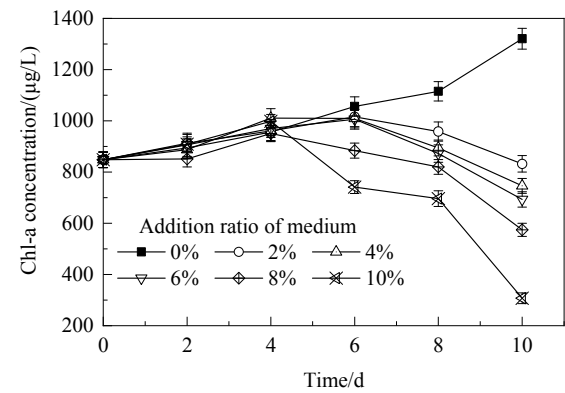


图 6 培养基投加比对溶藻效果的影响
Fig.6 Effect of addition ratio of medium on algae-lysing effect

通过投加不同体积的菌悬液实现控制菌藻体积比分别为 10%, 5%, 3.3%, 2.5%, 2%, 1%，结果见图 7(a)，不同的菌藻体积比均能起到溶藻作用，菌藻体积比越大，溶藻效果越好。投菌 1 d 时，菌藻体积比为 10%, 5%, 3.3% 的铜绿微囊藻液 Chl-a 浓度均开始下降，但菌藻体积比为 2.5%, 2%, 1% 的铜绿微囊藻液 Chl-a 浓度反而上升，可能是投菌少导致 XXG 菌溶藻速率小于铜绿微囊藻的生长速率。

考虑到细菌培养基的干扰，菌藻体积比应小于 6%，

为得到最大的溶藻效应, 菌藻体积比应大于 5%, 故在菌藻体积比为 5%~6%再次设置菌藻体积比(5.0%, 5.2%, 5.4%, 5.6%, 5.8%, 6.0%)以求获得最佳菌藻体积比。结果如图 7(b)所示, 0~1 d, 菌藻体积比越大, 溶藻效果越好, 第 6 d 时, 菌藻体积比为 5.6%溶藻效果最好。

如图 8 所示, 在铜绿微囊藻液中加入 $OD_{600}=0.75$ 的对数生长期 XXG 菌悬液时, 溶藻效果最好, 6 d 溶藻率为 50.13%, 加入 $OD_{600}=1.30$ 生长稳定期的 XXG 菌悬液, 溶藻效果次之, 6 d 溶藻率为 47.19%; 加入 $OD_{600}=0.20$ 生长迟缓期的 XXG 菌悬液, 由于细菌数量少, 溶藻效果较差, 6 d 溶藻率为 40.28%, 实验表明, 溶藻细菌的溶藻能力与细菌活性和细菌浓度呈正相关。投加生长迟缓期菌悬液的铜绿微囊藻液的溶藻率在 1, 2 d 时出现负增长, 可能是投菌少导致 XXG 菌溶藻速率

小于铜绿微囊藻的生长速率。

不同初始 Chl-a 浓度的铜绿微囊藻液中分别加入等量处于对数生长期($OD_{600}=0.75$)的 XXG 菌悬液, XXG 菌的溶藻效果如图 9 所示。XXG 菌在初始 Chl-a 浓度为 659.68 $\mu\text{g/L}$ 的铜绿微囊藻液中溶藻效果最好, 6 d 溶藻率为 77.1%, 此时藻液处于快速生长期之前, 藻生长速度较快但藻细胞数量较少; 初始 Chl-a 浓度为 1294.22 $\mu\text{g/L}$ 的藻液进入快速生长期, 此时藻具有很强的生长活力, 6 d 溶藻率为 49.5%; 初始 Chl-a 浓度为 4259.88 $\mu\text{g/L}$ 的藻液处于生长稳定期, 此时藻液生长活力衰弱, 藻细胞浓度饱和, 生长速度缓慢甚至降低, 6 d 溶藻率为 18.6%。实验表明, 溶藻细菌的溶藻能力与藻细胞生长活力均有相关性, 与藻浓度具有负相关性。

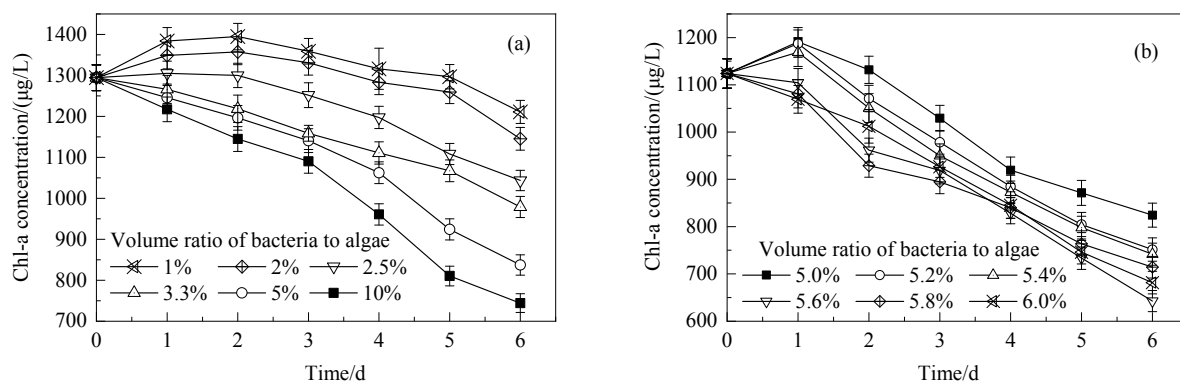


图7 菌藻体积比对溶藻效果的影响

Fig.7 Effect of the volume ratio of bacteria to algae on algae-lysing effect

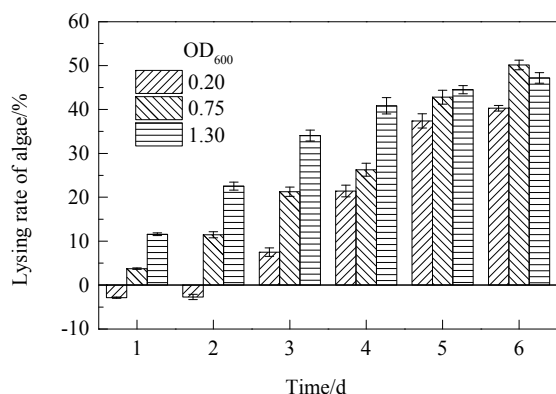


图8 菌密度对溶藻效果的影响

Fig.8 Effect of bacterial density on algae-lysing effect

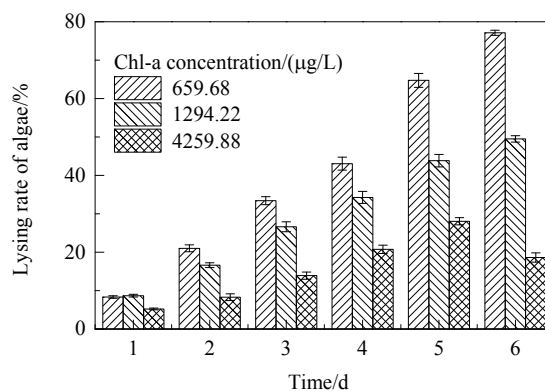


图9 藻密度对溶藻效果的影响

Fig.9 Effect of algal density on algae-lysing effect

3.4 响应面设计与结果

XXG 菌溶藻条件的单因素优化实验结果如图 10 所示, 溶藻率随温度、pH、摇床转速的增加先增大后变小, 在外界环境条件温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, pH 为 7.5、摇床转速为

150 r/min 时溶藻率最高, 可达 92.02%。

响应面实验设计及相应溶藻率结果见表 4, 以溶藻率(Y)为因变量得到二次回归方程, 见式(2), 并对各变量的回归系数进行显著性分析, 结果如表 5 所示。

$$Y = 90.36 - 3.97X_1 + 3.73X_2 + 2.03X_3 - 1.36X_1X_2 + 4.80X_1X_3 - 2.11X_2X_3 - 17.19X_1^2 - 10.18X_2^2 - 3.77X_3^2$$

(2)

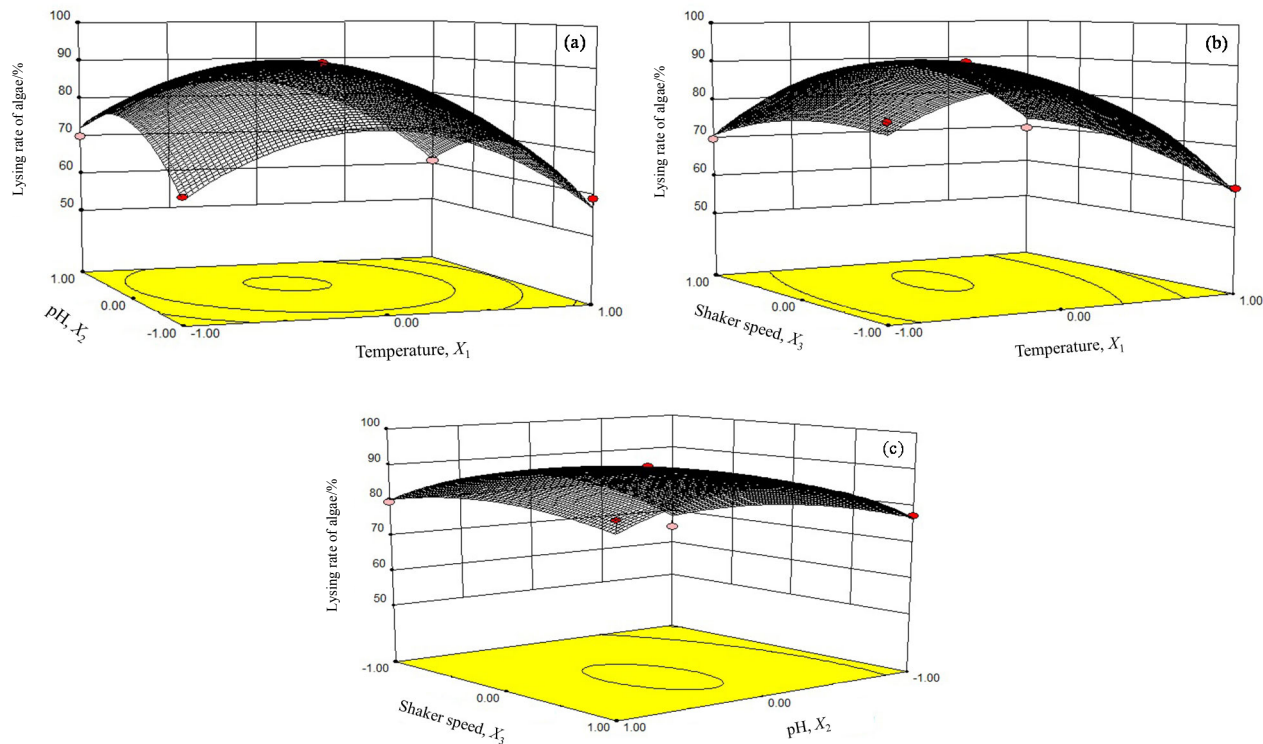


图 10 各因素交互作用对 XXG 菌溶藻效果的影响
Fig.10 Effects of interaction of various factors on algae-lysing effect of XXG bacteria

表 4 响应面实验设计及相应溶藻率结果
Table 4 Response surface experiment design and corresponding lysing rate of algae results

Number	Factor			Algal-lysing rate/%		Relative error/%
	X_1	X_2	X_3	Measured value	Predicted value	
1	0	-1	1	77.42	76.82	0.77
2	-1	1	0	69.83	72.05	3.18
3	0	1	1	83.43	80.06	4.04
4	1	0	1	69.43	72.26	4.08
5	0	1	-1	65.18	80.22	23.07
6	0	0	0	89.01	90.36	1.52
7	1	1	0	60.86	61.39	0.87
8	1	0	-1	59.75	58.6	1.92
9	0	0	0	91.56	90.36	1.31
10	0	0	0	91.04	90.36	0.75
11	0	0	0	92.02	90.36	1.80
12	-1	0	1	69.45	70.6	1.66
13	-1	0	-1	78.96	76.14	3.57
14	0	0	0	88.17	90.36	2.48
15	1	-1	0	58.88	56.65	3.79
16	-1	-1	0	62.40	61.87	0.85
17	0	1	-1	79.62	80.22	0.75

表 5 回归显著性分析
Table 5 Regression significance analysis

Variate	Coefficient	Mean square	F	P
Constant	9	252.09	27.70	<0.0001
X_1	1	125.77	13.82	0.0075
X_2	1	111.45	12.25	0.0100
X_3	1	32.89	3.61	0.0991
X_1X_2	1	7.43	0.82	0.3964
X_1X_3	1	92.06	10.12	0.0155
X_2X_3	1	17.77	1.95	0.2051
X_1^2	1	1244.38	136.72	<0.0001
X_2^2	1	436.03	47.91	0.0002
X_3^2	1	59.88	6.58	0.0373

从表 4 和表 5 可知，当 X_1, X_2, X_3 分别为 0 时，响应面设计得到最佳溶藻率为 90.36%。通过 Origin 响应面实验设计得到的回归模型 $P < 0.0001$ ，失拟的 $P = 0.0551$ ，表明回归模型高度显著 ($P \leq 0.05$)，但失拟检验不显著 ($P > 0.05$)，模型稳定；XXG 菌溶藻条件优化的回归模型的校正决定系数 $R^2(\text{adj}) = 0.9376$ ，表明模型能解释约 93.76% 的响应值的变化，仅有 6.24% 的总变异不能用该

模型解释; 决定系数 $R^2=0.9727$, 表明模型拟合程度良好, 误差小, 可用于分析和预测 XXG 菌溶藻条件的优化情况。

3.5 XXG 菌溶藻方式初探

如图 11 所示, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 针式滤器除去菌体后的无菌发酵液仍有溶藻效应, 6 d 溶藻率为 74.56%, 表明 XXG 菌的溶藻作用并未因菌体的去除而失去溶藻效应, 推测是 XXG 菌的主要溶藻方式为间接溶藻; 细菌发酵液 6 d 溶藻率为 77.05%, 无菌发酵液溶藻效应比细菌发酵液的溶藻效应减弱, 可能是因为细菌发酵液中的菌体继续分泌某种溶藻活性物质。菌体重悬液在溶藻过程的前 3 天没有产生明显的溶藻效应, 第 4 天开始产生轻微效应(溶藻率为 5.15%), 可能是菌体在新鲜培养基中再发酵分泌溶藻活性物质所致, 这也验证了无菌发酵液相较于细菌发酵液产生的溶藻效应减弱的原因。加无菌发酵液和细菌发酵液的藻液在第 1 天时 Chl-a 浓度仍增加, 说明此时藻细胞的生长速率大于死亡速率。目前已分离鉴定的溶藻活性物质有氨基酸、抗生素、多肽及生物碱等^[17,18], 本课题组^[19,20]曾研究过加热、离心、超声破碎等方式, 证明某些溶藻菌分泌的溶藻活性物质具有耐热性。

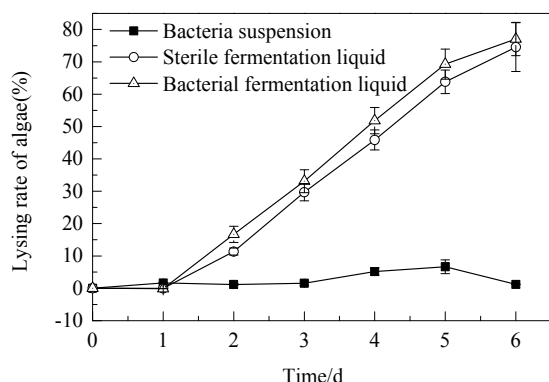


图 11 XXG 菌体重悬液和无菌发酵液对溶藻率的影响

Fig.11 Effect of XXG bacterial suspension and sterile fermentation liquid on lysing rate of algae

4 结 论

本研究从 HAB 污染湖水、河水灌溉的水稻田中筛选出一种高效溶藻菌, 并考察其溶藻条件和溶藻特性对溶藻效果的影响, 并初步探究溶藻方式, 得到如下结论:

(1) 从 HAB 污染水灌溉稻田中筛选出一株具有溶藻功能的类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)XXG 菌。菌藻体积比为 5.6%、对数生长期的 XXG 菌液对初始 Chl-a 浓度

为 $1294.22\ \mu\text{g/L}$ 铜绿微囊藻液的 6 d 溶藻率为 49.5%; 菌藻体积比为 5.6%、对数生长期的 XXG 菌液对处于对数生长期前期的初始浓度为 $659.68\ \mu\text{g/L}$ 铜绿微囊藻液的 6 d 溶藻率可达 77.1%。

(2) BBD 试验设计及响应面结果表明, XXG 菌在温度为 30°C 、pH 为 7.5、摇床转速为 $150\ \text{r/min}$ 溶藻率最高, 溶藻率为 92.02%, 溶藻条件优化回归模型为三元二次线性模型($P<0.0001$, $R^2=0.9727$), 可再现 XXG 溶藻进程。

(3) 无菌发酵液仍能溶藻(6 d 溶藻率为 74.56%), 较细菌发酵液(溶藻率为 77.05%)低, 推测 XXG 可能溶藻方式为间接溶藻。菌体重悬液在溶藻过程的前 3 天没有产生明显的溶藻效应, 第 4 天开始产生轻微效应(溶藻率为 5.15%), 可能是菌体在新鲜培养基中再发酵分泌溶藻活性物质所致, 其溶藻机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Costa R P. Impact and effects of paralytic shellfish poisoning toxins derived from harmful algal blooms to marine fish [J]. Fish & Fisheries, 2014, 17(1): 226–248.
- [2] 张艳会, 李伟峰, 陈求稳. 太湖水华程度及其生态环境因子的时空分布特征 [J]. 生态学报, 2016, 36(14): 4337–4345.
Zhang Y H, Li W F, Chen Q W. Spatial-temporal variance of the intensity of algal bloom and related environmental and ecological factors in Lake Taihu [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(14): 4337–4345.
- [3] 胡小贞, 金相灿, 储昭升, 等. 太湖铜绿微囊藻与四尾栅藻的光竞争及模拟优势过程初探 [J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(3): 538–543.
Hu X Z, Jin X C, Chu Z S, et al. Light competition between *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda* from Taihu Lake and the dominance process simulation in microcosm [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2005, 24(3): 538–543.
- [4] Michael J T, Emily D R, Theodore B H. Global gene expression profiling in larval zebrafish exposed to microcystin-LR and *Microcystis* reveals endocrine disrupting effects of cyanobacteria [J]. Environmental Science & Technology: ES&T, 2011, 45(5): 1962–1969.
- [5] Dieter I M, De C, Stephen G, et al. Identification of pathways, gene networks, and paralogous gene families in daphnia pulex responding to exposure to the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. Environmental Science & Technology: ES&T, 2012, 46(15): 8448–8457.
- [6] Choi H J, Kim B H, Kim J D, et al. Streptomyces neyagawaensis as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) in eutrophic freshwaters [J]. Biological Control, 2005, 33(3): 335–343.
- [7] 牛丹丹, 郑青松, 刘兆普, 等. 溶藻细菌 YZ 对铜绿微囊藻的溶藻特性研究 [J]. 中国环境科学, 2011, 31(2): 321–326.
Niu D D, Zheng Q S, Liu Z P, et al. Algicidal effect of an algae-lysing bacterium YZ on *Microcystis aeruginosa* [J]. China Environmental Science, 2011, 31(2): 321–326.

- [8] 郭惠娟, 张伟, 张小梅, 等. 溶藻细菌 *Microbacterium oleivoran* 的溶藻进程与叶绿素降解动力学 [J]. 环境化学, 2019, 38(6): 1274–1281.
Guo H J, Zhang W, Zhang X M, et al. Process of algae-lysis and chlorophyll degradation kinetics of *Microbacterium oleivoran* bacteria [J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(6): 1274–1281.
- [9] 史顺玉. 溶藻细菌对藻类的生理生态效应及作用机理研究 [D]. 北京: 中国科学院水生生物研究所, 2006: 78–87.
Shi S Y. Study on physiological and ecological effects of algal bacteria on algae and their mechanism [D]. Beijing: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2006: 78–87.
- [10] 董小娜, 陈泽慧, 毛林强, 等. 溶藻菌 R1 的溶藻特性 [J]. 土木建筑与环境工程, 2018, 40(5): 117–123.
Dong X N, Chen Z H, Mao L Q, et al. Algicidal characteristics of algicidal bacteria R1 [J]. Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering, 2018, 40(5): 117–123.
- [11] Luo J F, Wang Y, Tang S S. Isolation and identification of algicidal compound from streptomycetes and algicidal mechanism to *Microcystis aeruginosa* [J]. Plos One, 2013, 8(10): e76444.
- [12] Li Y, Liu L, Xu Y. Stress of algicidal substances from a bacterium *Exiguobacterium* sp. H10 on *Microcystis aeruginosa* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2016, 64(1): 57–65.
- [13] 王媛媛, 张恒峰, 樊乾龙, 等. 粘着杆菌溶藻效能与溶藻过程藻胞内物质释放 [J]. 环境科学与技术, 2018, 41(7): 6–13.
Wang Y Y, Zhang H F, Fan Q L, et al. The algicidal efficiency and release of algal intracellular substance during the algae-lysing process by *ensifer adhaerens* [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 41(7): 6–13.
- [14] 洪桂云, 马少雄, 王佳, 等. 高效铜绿微囊藻溶藻菌 WJ6 的分离鉴定及溶藻特性 [J]. 中国环境科学, 2018, 38(11): 4269–4275.
Hong G Y, Ma S X, Wang J, et al. Isolation and identification of an efficient algicidal bacteria strain and algicidal characteristics on *Microcystis aeruginosa* [J]. China Environmental Science, 2018, 38(11): 4269–4275.
- [15] 马宏瑞, 章欣, 王晓蓉, 等. 芽孢杆菌 Z5 溶铜绿微囊藻特性研究 [J]. 中国环境科学, 2011, 31(5): 828–833.
Ma H R, Zhang X, Wang X R, et al. Characteristics study of lysis of *Microcystis aeruginosa* by *Bacillus*.Z5 [J]. China Environmental Science, 2011, 31(5): 828–833.
- [16] 陈宇炜, 陈开宁, 胡耀辉. 浮游植物叶绿素 a 测定的“热乙醇法”及其测定误差的探讨 [J]. 湖泊科学, 2006, 18(5): 550–552.
Chen Y W, Chen K N, Hu Y H. Discussion on possible error for phytoplankton chlorophyll-a concentration analysis using hot-ethanol extraction method [J]. Journal of Lake Sciences, 2006, 18(5): 550–552.
- [17] 汪辉. 溶藻细菌对水华与赤潮微藻的抑制效应研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 108–109.
Wang H. Study on inhibition effect of alginolytic bacteria on microalgae in bloom and red tide [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011: 108–109.
- [18] 刘伯雅, 魏东芝, 鲁思然, 等. 灵菌红素对有害藻类的除藻活性研究 [J]. 中国环境科学, 2010, (4): 477–482.
Liu B Y, Wei D Z, Lu S R, et al. Algicidal activity of prodigiosin against harmful algae [J]. China Environmental Science, 2010, (4): 477–482.
- [19] 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 H C, Pan R S, Wu X P, et al. Isolation and identification of algicidal bacteria from reed roots in Baidu Port of Taihu Lake and its lytic effect [J]. Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering, 2017, 39(5): 123–128.
- [20] 董小娜, 陈泽慧, 毛林强, 等. 太湖土著激浪鱼内脏中溶藻菌 R1 的筛选及其特性研究 [J]. 工业安全与环保, 2018, 44(8): 73–76.
Dong X N, Chen Z H, Mao L Q, et al. Isolation and identification of algicidal bacteria from internal organs of the surf fish in Taihu Lake and its features [J]. Industrial Safety and Environmental Protection, 2018, 44(8): 73–76.