

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其它个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(郑天凌)课题(组)的研究成果,获得(郑天凌)课题(组)经费或实验室的资助,在(郑天凌)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 林婧

2011 年 6 月 5 日



厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ☒ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于2013年12月30日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：林靖

2011年6月5日

目 录

摘 要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言.....	6
1 赤潮的成因、危害及发生趋势.....	6
1.1 赤潮的定义与分类.....	6
1.2 赤潮的成因.....	8
1.2.1 生物因素.....	8
1.2.2 化学因素.....	9
1.2.3 物理因素.....	10
1.3 我国赤潮的发生趋势.....	10
1.3.1 频率增大, 面积增加.....	11
1.3.2 持续时间长、范围广、危害增大.....	12
1.3.3 新记录和有毒种类增多.....	12
1.3.4 赤潮类型多样.....	13
1.4 赤潮的危害与海洋健康.....	13
1.4.1 影响海洋生态系统结构.....	14
1.4.2 对海洋渔业和水产资源的破坏.....	14
1.4.3 对人类健康的危害.....	14
1.4.4 对旅游业和娱乐业的影响.....	14
2 赤潮的防治.....	15
2.1 赤潮的预防.....	15
2.2 赤潮的监测预报.....	15
2.3 赤潮的治理.....	15
2.3.1 物理法.....	15
2.3.2 化学法.....	16

2.3.3 生物法	17
3 抑藻细菌及抑藻活性物质的研究进展	19
3.1 细菌抑藻现象的发现	19
3.2 抑藻细菌的种类	20
3.3 抑藻细菌的作用方式	20
3.4 抑藻活性物质的种类	20
3.5 国内藻菌关系研究概况	22
4 抑/杀藻菌的培养条件优化与方法设计	22
4.1 单因次实验法(One Variable at a Time).....	23
4.2 均匀设计 (Uniform design)	23
5 环境微生物制剂的开发和利用	24
5.1 环境微生物制剂的应用	24
5.2 微生物固定化技术	25
5.2.1 生物固定化方法	26
5.2.2 固定化载体的特点	27
6 本论文的研究内容及意义	28
第二章 材料与方法	30
1 材料	30
1.1 菌种	30
1.1.1 形态特征	30
1.1.2 菌种保藏、活化和扩大	31
1.2 藻种	31
1.3 培养基	31
1.4 主要试剂和材料	33
1.5 主要软件	33
1.6 主要溶液配制	33
1.7 主要仪器	34

2 基本方法	35
2.1 培养条件对抑藻菌 DH46 生长及抑藻效果的影响	35
2.2 复合营养源对抑藻菌 DH46 生长及抑藻效果的影响	35
2.3 均匀设计法优化培养基组成	36
2.4 海藻酸钠-微孔淀粉包埋固定化抑藻菌的研究	37
2.4.1 包埋固定化方法	37
2.4.2 包埋固定化小球性能研究	38
2.4.3 包埋固定化制备条件的确定	38
2.4.4 固定化细胞发酵	39
2.4.5 固定化包埋小球抑藻实验	39
2.5 聚氨酯泡沫固定化研究	39
2.5.1 聚氨酯泡沫载体的前处理	39
2.5.2 固定化载体内菌体计数方法的比较	39
2.5.3 抑藻菌 DH46 在 PUF 上的固定化生长	40
2.5.4 固定化载体上吸附情况的测定	40
2.5.5 PUF 固定化培养抑藻菌的菌体分布	40
2.5.6 固定化影响因子的考察	41
2.5.7 扫描电镜观察聚氨酯泡沫固定化培养的抑藻菌 DH46	41
2.6 分析测定方法	42
2.6.1 抑藻菌生长状况评价	42
2.6.2 抑藻效果评价	42
第三章 结果与分析	43
1 不同培养条件对 DH46 生长和抑藻效果的影响	43
1.1 培养时间对菌体生长和抑藻效果的影响	43
1.2 培养温度对菌体生长和抑藻效果的影响	43
1.3 培养基不同初始 pH 值对菌体生长和抑藻效果的影响	44
1.4 不同盐度对菌体生长和抑藻效果的影响	45
1.5 不同转速对菌体生长和抑藻效果的影响	46

2 复合营养源对抑藻菌 DH46 生长及抑藻效果的影响.....	47
3 基于均匀设计的培养基成分优化.....	49
4 海藻酸钠-微孔淀粉包埋固定化研究.....	52
4.1 影响包埋固定化因素的考察.....	52
4.1.1 海藻酸钠浓度的影响.....	52
4.1.2 微孔淀粉浓度的影响.....	53
4.1.3 氯化钙浓度的影响.....	54
4.2 包埋固定化后形态观察.....	55
4.3 包埋固定化对抑藻菌 DH46 生长特性的影响.....	56
4.4 包埋固定化小球抑藻实验.....	57
5 利用聚氨酯泡沫固定化抑藻菌 DH46.....	58
5.1 固定化载体内菌体计数方法的比较.....	58
5.2 抑藻菌 DH46 在聚氨酯泡沫固定化载体上的吸附情况.....	59
5.3 抑藻菌在 PUF 固定化载体上的生长分布情况.....	60
5.4 影响固定化因子的考察.....	61
5.4.1 聚氨酯泡沫载体尺寸对固定化培养的影响.....	61
5.4.2 聚氨酯泡沫添加量对固定化培养的影响.....	63
5.4.3 接种量对固定化培养的影响.....	65
5.5 PUF 固定化抑藻菌的抑藻实验.....	66
5.5.1 菌株 DH46 抑藻过程中藻细胞形态变化.....	66
5.5.2 电镜观察抑藻菌在 PUF 表面的生长状况.....	68
5.5.3 实验室现场模拟.....	70
第四章 讨论.....	71
1 海洋微生物在赤潮生物防治中的应用.....	71
2 均匀设计在微生物发酵条件优化试验中的应用.....	73
3 环境微生物制剂的开发和应用.....	75

第五章 结论与展望.....	81
1 结论	81
2 论文创新点	82
3 展望	82
参考文献.....	84
附录	98
参与的科研课题	98
发表和待发表的学术论文及专利	98
缩略语对照表	99
实验用菌种、藻种照片	100
致 谢	102

Contents

Chinese abstract	1
English abstract	3
Chapter 1 Introduction	6
1 Influence and cause of red-tide	6
1.1 Definition and classification of red tide	6
1.2 Cause of red-tide	8
1.2.1 Biological factors	8
1.2.2 Chemical factors	9
1.2.3 Physical factors	10
1.3 Current status of red-tide in China	10
1.3.1 Increase in frequency and affected area	11
1.3.2 Increase in duration, range and damage	12
1.3.3 New records and poisonous species	12
1.3.4 Various types of algal bloom	13
1.4 The hazards of red tide and ocean health	13
1.4.1 Effect on marine ecological system	14
1.4.2 Effect on marine fishery and aquatic resource	14
1.4.3 Effect on human health	14
1.4.4 Effect on tourism and entertainment	14
2 Prevention and management of red-tide	15
2. 1 Prevention and management of red-tide	15
2. 2 Monitoring and prediction of red-tide	15
2. 3 Management of red-tide	15
2.3.1 Physical method	15
2.3.2 Chemical methods	16
2.3.3 Biological methods	17
3 Advance in the study on algicidal bacterial and active substances	19

3.1 The foundation of algicidal bacteria.....	19
3.2 The species of algicidal bacteria.....	20
3.3 The mode of action between bacteria-alga interactions	20
3.4 The types of algicidal active substances.....	20
3.5 Relative research on bacteria-alga interactions in China	22
4 The optimization design of culture conditions	22
4.1 One Variable at a Time	23
4.2 Uniform design.....	23
5 The exploration and exploitation of environmental biological agents... 24	24
5.1 The application of environmental biological agents.....	24
5.2 Immobilized microorganisms technology	25
5.2.1 The immobilization methods.....	26
5.2.2 The characteristics of immobilized carrier	27
6 Significance of this study.....	28
Chapter 2 Materials and methods	30
1 Materials.....	30
1.1 Bacterial strain.....	30
1.1.1 Morphological characteristics	30
1.1.2 Preservation, activation and incubation of bacterium	31
1.2 Algal specie	31
1.3 Culture medium	31
1.4 Reagents and materials	33
1.5 Processing softwares	33
1.6 Reagents preparation	33
1.7 Instrument.....	34
2 Methods	35
2.1 The effect of culture condition on on the growth and algal lysis effect of <i>Alteromonas</i> sp. DH46	35
2.2 The effect of different complex nutrients on the growth and agae-lying	

effect of <i>Alteromonas</i> sp. DH46	35
2.3 Uniform design for optimizing fermentation medium	36
2.4 The research on immobilization of DH46 by sodium alginate –microporous starch.....	37
2.4.1 Immobilization methods.....	37
2.4.2 Properties of calcium alginate gel beads	38
2.4.3 Determination of preparation conditions with entrapment method.....	38
2.4.4 The fermentation of immobilized cells.....	38
2.4.5 Algicidal test with immobilized gel beads.....	39
2.5 The research on immobilization of DH46 on polyurethane foam	39
2.5.1 The pretreatment of polyurethane foam	39
2.5.2 The comparison of elute the immobilization cells.....	39
2.5.3 The algicidal bacteria DH46 immobilized in polyurethane foam	40
2.5.4 The adsorption conditions of immobilized cell on PUF.....	40
2.5.5 The distribution of algicidal bacteria DH46 immobilized on PUF.....	40
2.5.6 The effect factors of PUF on immobilized algicidal bacteria.....	41
2.5.7 The observation of immobilized cell on PUF with SEM	41
2.6 analysis measure	42
2.6.1 Evaluation of the bacterial growth	42
2.6.2 Evaluation of algicidal activity.....	42
Chapter 3 Results and Analysis	43
1 The effect of different culture condition on the growth and algal lysis of <i>Alteromonas</i> sp. DH46	43
1.1 The effect of different culture time on DH46	43
1.2 The effect of culture temperature on DH46.....	43
1.3 The effect of culture initial pH on DH46.....	44
1.4 The effect of different salinity on DH46	45
1.5 The effect of rotation speed on DH46	46
2 The effect of complex nutrients on the growth and algicidal activity of	

DH46	47
3 Uniform design for optimizing fermentation medium	49
4 The research on immobilization of DH46 with entrapment method	52
4.1 Influence factors of entrapment method.....	52
4.1.1 The effect of the concentration of sodium alginate	52
4.1.2 The effect of the concentration of microporous starch.....	53
4.1.3 The effect of the concentration of calcium chloride.....	54
4.2 The morphology of calcium alginate gel beads.....	55
4.3 The effect of immobilization on growth characteristics of DH46	56
4.4 Algicidal test with immobilized gel beads.....	57
5 The research on immobilization of DH46 on PUF.....	58
5.1 The comparison of elute the immobilization cells with ultrasonic and squeezing methods.....	58
5.2 Sorption percentage of algicidal bacteria DH46 on PUF	59
5.3 The distribution of algicidal bacteria DH46 immobilized on PUF	60
5.4 The effect factors of PUF on immobilized algicidal bacteria.....	61
5.4.1 The effect of PUF shapes on immobilized cell.....	61
5.4.2 The effect of PUF quantities on immobilized cell.....	63
5.4.3 The effect of inoculum concentration on immobilized cell.....	65
5.5 The inhibition test on <i>Alexandrium tamarense</i>	66
5.5.1 The algicidal test in conical flask	66
5.5.2 The observation of immobilized cells on PUF by SEM	68
5.5.3 The field test with PUF-immobilized cell	70
Chapter 4 Discussion.....	71
1 Application of marine microorganisms in red tides control with biological treatment	71
2 The application of uniform design in the optimization of microorganism fermentation	73
3 The development and application of environmental microbial agents..	75

Chapter 5 Conclusions and Future directions.....	81
1 Conclusions	81
2 Innovative points	82
3 Future directions.....	82
References	84
Appendix	98
Scientific research project and funds.....	98
Papers and patent.....	98
Abbreviations	99
Pictures of bacterium strain and algae.....	100
Acknowledgements.....	102

摘 要

有害赤潮已经成为当今全球性的海洋灾害,与沙尘暴并列为我国目前面临的、由于人类活动而造成的两大自然灾害之一。赤潮的频繁爆发已使我国滨海地区生态安全和沿海经济的可持续发展面临着极为严峻的挑战。近年研究表明,菌-藻关系在种群演替和有害藻华动力学中起着重要作用,而诸多抑/杀藻细菌的发现为微生物防治赤潮提供了可能的途径。

目前国内外抑/杀藻细菌及其活性物质的研究虽然取得了一些进展,但在实际的工作中仍存在除藻效能不高、有效细菌浓度不高等缺陷,因此,通过优化发酵条件和固定化技术,研发一种新型高效的生物除藻技术,以提高抑藻细菌的生物量和抑藻效果显然具有重要的现实意义。本论文以实验室前期获得的高效抑藻菌 *Alteromonas* sp. DH46 为研究对象,通过优化培养条件和培养基组成的方法改善其培养,提高细胞密度及抑藻效果,并通过固定化方式加强抑藻微生物制剂的效果。获得的主要结果如下:

- 1、以 ZoBell 2216E 为基础培养基,采用单因素法探索优化培养条件,结合菌体生长量(干重)和抑藻率,考察碳源、氮源、温度、初始 pH 值、转速、盐度等因素的改变对抑藻菌生物量和产活性物质的影响。结果表明该菌的最佳培养条件为:初始 pH 为 7,盐度为 30‰,温度为 28℃,转速为 180r/min,培养时间 24h。
- 2、通过均匀设计实验优化其培养基组分,考察了不同添加组分的影响,从中选择重要影响因子进行均匀设计。即选择胰蛋白胨、可溶性淀粉、酵母粉、 NaNO_3 、 MgSO_4 为重要影响因子,以菌体干重为评价指标,进行混合均匀设计,利用 DPS 软件对实验值进行回归分析,建立回归模型。优化后的培养基组成为(g/L):胰蛋白胨 14.0,酵母粉 1.63,淀粉 5.0, NaNO_3 1.6, MgSO_4 2.3。在最适培养条件下采用优化培养基进行培养,获得菌体干重和杀藻率分别为 7.36 g/L 与 98.4%,比优化前分别提高了 107% 和 10%。
- 3、采用海藻酸钠-微孔淀粉复合固定法固定化抑藻菌 *Alteromonas* sp. DH46。通过考

察包埋固定化抑藻菌的影响因素,优化了固定化细胞的制备条件。当控制海藻酸钠溶液浓度为 20g/L,微孔淀粉浓度 20g/L 和 CaCl_2 浓度为 30g/L 时,可制得粒径为 $3.20 \pm 0.08 \text{ mm}$ 、机械强度良好的凝胶微球。探讨了包埋固定化对抑藻菌 DH46 生长特性的影响,并利用该复合载体固定化抑藻菌 DH46 进行抑藻测试,为其在工业上的应用提供参考。

4、采用聚氨酯泡沫吸附法固定化培养 *Alteromonas* sp. DH46。通过分析抑藻菌 DH46 在 PUF 载体中的固定化情况,菌体在载体中的分布,并结合电镜扫描结果,确定聚氨酯泡沫与抑藻菌 DH46 生物相容,并能有效的吸附固定 DH46 菌细胞。通过考察载体尺寸、添加量和接种量等因素对菌体固定化培养的影响,优化了聚氨酯泡沫固定化培养抑藻菌的条件,添加 5mm^3 PUF 泡沫 1.0g, 28°C , 150r/min 条件下固定化培养 DH46, 24h 后载体内菌体密度达到 $5.26 \times 10^{10} \text{ cell/g}$, 为悬浮培养的 4 倍左右,投加 2.0g 风干后的固定化载体 48h 后抑藻率可达 86.1%。

关键词: 抑/杀藻细菌; 培养条件优化; 固定化技术

Abstract

With increasing eutrophication of water bodies throughout the world, the occurrence of harmful algal blooms (HABs) has led to extensive ecological and environmental issues and huge economic losses, and a significant increases have occurred in their frequency, scale and damage every year, which is also one of the two main natural disasters as a result of human activities coupled with the dust storms. Currently, HABs have become a worldwide public hazard, affecting more than 30 countries and regions. Therefore, the study of HAB control methods, and the development of relevant countermeasures has become a priority in many countries and regions. Of the factors that regulate the red tide dynamics, algal-bacterial interactions are increasingly cited as potentially regulators in recent studies. And a series of the exploitation and identification of algicidal bacteria open a promising passage for the treatment of red tide with biological methods.

At present, research on algicidal bacteria and their active compounds is mostly in the preliminary stage. Although some achievements have been obtained in this field, the utilization of algicidal bacteria is still flawed in actual practice as a result of the lower algicidal activity and efficient biomass. Thus, the studies on optimization of the fermentation conditions and immobilization technology to develop a novel technology for removing the harmful algae with biological method are of practical and theoretical importance.

In this paper, a metabolite which was strongly toxic to the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* was produced by strain DH46 of the alga-lysing bacterium *Alteromonas* sp. Aiming to improve cell density and algicidal activity, the effects of shaking-culture conditions and components of culture medium were studied, combining with single factor method and uniform design method. And microorganism immobilization technology was applied to enhance the effect of anti-algae microbial agent which was prepared for the application of algicidal bacteria against HABs. The main results were as

follows:

The culture conditions were first optimized using a single-factor test method. Factors including carbon source, nitrogen source, temperature, initial pH value, rotational speed and salinity were studied. Results showed that 28°C, pH 7, 180r/min and 30‰ salt content favored both the cell growth and the lysing effect of DH46. Next, the optimum medium composition for DH46 was determined by means of uniform design experimentation, and the most important components influencing the cell density were tryptone, yeast extract, soluble starch, NaNO₃ and MgSO₄. When the culture medium was (g/L): tryptone 14.0, yeast extract 1.63, soluble starch 5.0, NaNO₃ 1.6, MgSO₄ 2.3, the largest bacterial dry weight (7.36 g L⁻¹) was obtained, which was an enhancement of 107% compared to the initial medium; and the algal lysis rate was as high as 98.4%, an increase of nearly 10% after optimization.

Sodium alginate and microporous starch were selected to immobilize algicidal bacterium *Alteromonas* sp. DH46. By examining the factors affecting the immobilization, the optimized preparation conditions of algicidal bacterium DH46 were obtained. The optimum entrapment conditions of SA-MS were introduced as followed, the concentration of sodium alginate 20g/L, microporous starch 20g/L, CaCl₂ 30g/L. Under this condition, the beads were 3.20±0.08 mm in diameter with excellent mechanical strength and permeability. And the effect of immobilized operation on the growth characteristic of algicidal bacterium DH46 were studied, and the immobilized beads were also applied to algicidal test for the industrial application in the future.

The immobilization of *Alteromonas* sp. DH46 on PUF was proposed in the present work. The results indicated that PUF was a suitable carrier of the efficient immobilization for DH46. Electron micrograph images also showed that how DH46 was immobilized on PUF carriers. And the factors affecting the adsorption were optimized to attain high density of *Alteromonas* sp. DH46, including PUF particle size, the adding dosage of PUF and inoculation quantity. The commercially available polyurethane foam (density 65 kg

m⁻³, porosity >90%) was cut into 5×5×5 mm cubes, and 1% (v/v) algicidal bacterium DH46 seed was inoculated into the flasks containing 1.0g pretreated PUF carriers with a cell density of $1\sim 2 \times 10^6$ cell/ml and, cultured at 28°C for 24h with a rotational speed of 150 min⁻¹. Under the condition of optimization, the highest cell density of DH46 (5.26×10^{10} cell/g) was achieved which was about 4 times higher than that of free-cell culture in medium. During the algae-lysing test, algicidal activity can be as high as 86.1% after added 2.0g PUF-immobilized bacteria with air-dried treatment for 48h.

Key words: Algicidal bacteria; Optimization of culture medium; Immobilized technology

第一章 前言

海洋是生命的摇篮,覆盖着地球表面的 71%,从太空中看到的地球并非是“地”球,而是一个蓝色的“水球”,可以说地球因为海洋而美丽。海洋还蕴藏着丰富的宝贵资源,是人类社会发展的重要支撑。但是,世界沿海地区的快速发展极大地改变了海岸带的生态环境甚至生态系统,导致近海海域严重富营养化。在受人类活动强烈干扰的地区,赤潮的爆发频率、强度和赤潮生物的种类都在快速增加^[1]。从卫星照片上看,赤潮就像地球蔚蓝色皮肤上的伤口,令人触目惊心。

近年来,赤潮的频繁爆发已使我国滨海地区生态安全和沿海经济的可持续发展面临着极为严峻的挑战。2008 年,我国全海域共发生赤潮 68 次,累计面积 13 738 平方公里,与上年相比,增加 2128 平方公里,造成直接经济损失约为 0.02 亿元。全海域共发生 500 平方公里以上的大面积和较大面积赤潮 9 次,有毒、有害赤潮生物引发的赤潮 11 次,累积面积 610 平方公里。2009 年,全海域共发现赤潮 68 次,累积面积 14100 平方公里,比上年度增加 362 平方公里,造成直接经济损失 0.65 亿元。2010 年 1-6 月份,全国海域共发现 45 起赤潮,累计面积约 10 000 平方公里,造成直接经济损失共计约 72.7 万元^[2-5]。

如何缓解并逐步治愈赤潮这个“海洋癌症”,为子孙后代留下一片健康的蓝色海洋,已成为生物学、海洋学和环境学等领域面临的亟需解决的重大生态环境问题之一^[6]。当今赤潮生消机制的探讨中,人们越来越多地关注菌-藻相互关系、相互作用的内在规律的揭示。在赤潮防治策略中,“以菌治藻”作为一种清洁的、绿色的、环境友好型的生物控制方法已成为国际上治理有害赤潮的研究热点^[7],其应用前景相当广阔。

1 赤潮的成因、危害及发生趋势

1.1 赤潮的定义与分类

赤潮(Red tide)是指在一定的环境条件下,海水中的某些浮游植物、原生动物、或细菌在短时间内突发性增加或高度聚集而导致水体变色的生态异常现象。大多数赤潮是无害的,那些有毒或能导致危害的赤潮又被称为有害藻华(Harmful algal blooms, HAB)或有害赤潮(Harmful red tide),它能够通过产生毒素、造成物理损伤、改变水体理化特征等给海洋生态系统、渔业生产、海水养殖,旅游业以及人类健康

带来严重威胁。赤潮生物毒素种类繁多，结构复杂。根据人体中毒症状，主要有麻痹性贝毒(PSP)，神经性贝毒(NSP)，腹泻性贝毒(DSP)，失忆性贝毒(ASP)，西加鱼毒(CFP)等(表 1.1)。目前被确定的有毒赤潮生物有 83 种，其中以甲藻纲居多，有 16 个属，66 个种；硅藻纲有 1 个属，6 个种；绿色鞭毛藻纲有 3 个属，6 个种；定鞭藻纲有 3 个属，5 个种。

表 1.1 藻毒素种类^[8]

Table 1.1 Toxin-derived Human Toxicoses

毒素种类	溶解性	作用
麻痹性贝毒(PSP)	水溶性	神经、脑
神经性贝毒(NSP)	脂溶性	神经、肌肉、心脏、脑
腹泻性贝毒(DSP)	脂溶性	酶
失忆性贝毒(ASP)	水溶性	脑
西加鱼毒(CFP)	脂溶性/水溶性	神经、肌肉、心脏、脑

赤潮的分类依据主要包括赤潮的毒性、发生海域、引发赤潮的生物种类、营养来源、水动力条件、与营养状况的关系、成因和来源等几个方面。张有份^[9]根据赤潮的毒性将赤潮分为有毒赤潮和无毒赤潮，根据赤潮的成因和来源将赤潮分为外来型和原发型赤潮，根据引发赤潮的生物种类多少将赤潮分为单相型、双相型和复合型赤潮等。而齐雨藻则根据赤潮藻的毒性特征^[10]，将赤潮分类进一步细化，分为无毒赤潮、有毒赤潮和对人无害但对鱼类及无脊椎动物有害的赤潮，同时根据赤潮发生海域的地理特征将赤潮分为河口、近岸、内湾型、外海(或外洋)型，外来型和养殖区型赤潮等 4 类。赵冬至^[11]等综合考虑赤潮发生的空间位置、营养物质来源以及水动力条件，将赤潮划分为河口型、海湾型、养殖型（近岸型和岸滩型）、上升流型、沿岸流型和外海型。Fukuyo^[12]将赤潮分为有害赤潮和有毒赤潮两大类型，江天久^[13]等综合齐雨藻和 Fukuyo 的分类思想，进一步根据赤潮原因种的性质及对养殖水体的破坏程度，将赤潮分为无害赤潮、有害赤潮、鱼毒赤潮、有毒赤潮 4 类，以便于有效预警赤潮灾害及赤潮结束后评估其经济损失情况。

1.2 赤潮的成因

赤潮是一种生态异常现象，它的成因及形成机制十分复杂。它涉及到相应海域的生物因素、化学因素、物理因素、水文条件、气象条件及海底的地形、地貌、底质等多方面。一次赤潮由形成到消亡的全过程，大致可分为 4 个阶段：起始阶段，发展阶段，维持阶段，消亡阶段，如图 1.1，趋势犹如单细胞微生物的生长曲线。

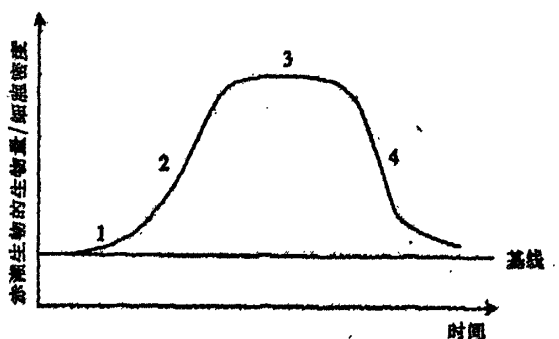


图 1.1 赤潮生消过程示意图

1.起始阶段 2.发展阶段 3.维持阶段 4.消亡阶段

Fig 1.1 Schematic drawing of the dynamics in the Red tide blooms

在赤潮整个生消过程中，其主要影响因素可分为：生物因素、化学因素和物理因素。

1.2.1 生物因素

赤潮的发生首先要有赤潮生物的存在，赤潮生物是赤潮爆发的内因。

赤潮生物主要包括了浮游植物、原生动物和细菌三大类，引发赤潮的生物中甲藻居多。据统计，海洋中现有浮游植物 4024 种，其中 260 余种赤潮生物中已知有毒的 78 种。截至目前，在我国沿海曾经引发的赤潮的原因种有 40 余种，其中有毒赤潮种类约 10 种。

赤潮生物的生长速度十分惊人，如常见赤潮生物骨条藻，其最大群增长速度为每天分裂 3 次，以起始细胞为 10 cell/mL，那么 3 天后即可发生赤潮。赤潮生物的另外一个特点就是不同阶段的生长速度各不相同，赤潮形成后，它的生长速度比赤潮形成前要快。赤潮生物这样高的繁殖速度，再加上适宜的环境条件的话，爆发性增殖将为赤潮的发生提供足够的生物量。除海水中存在的大量赤潮生物之外，海底沉积物中存在的赤潮生物孢囊也是赤潮发生的一个重要生物因素。Hyun-Jin Cho^[14]

等于 2001 年报道，在黄海、东海的广阔海域海底，确实存在大范围的赤潮藻孢囊。只要有足够的营养盐，以及水温达到 15℃~20℃时，沉积于海底的孢囊就会萌发，形成赤潮生物。

其次，赤潮的爆发还受到其它非赤潮生物的影响。海洋生态系统中，通常存在着多种赤潮生物，它们中的某些种可能通过种间竞争成为系统中的优势种从而形成赤潮；海洋浮游动物对赤潮生物的摄食作用也可能改变浮游植物的群落结构^[15]；海洋微生物（细菌、病毒等）^[16]对赤潮生物的增殖有错综复杂的抑制或促进作用，从而影响了赤潮的生消。

1.2.2 化学因素

近岸海域的污染引起水体富营养化是赤潮频发的最直接原因。随着沿海地区工农业发展和城市化进程加快，陆源污染（如工业废水、生活污水、农业排水等的排放）、养殖业自身污染以及大气沉降是近岸海域营养的主要来源^[17]，这为赤潮生物的爆发性增殖提供丰富的物质基础。

与工业化以前相比，世界范围内近海磷的输入量增加了约 3 倍，氮的输入量增加更多，这显著提高了近海营养物质的浓度，促进了海水中藻类的生长，也有利于赤潮的形成。研究表明，可溶性氮浓度大于 0.1 mg·L⁻¹，可溶性磷大于 0.02 mg·L⁻¹时，发生赤潮的可能性将大为增加^[18]。某些污染严重的海域，营养盐的比率(N：P 和 Si：P) 是制约赤潮生物生长的决定性因素，N、P、Si 相对供应量的改变对浮游植物群落演替具有显著影响。调查发现,经济动物养殖水域的营养水平明显高于非养殖水域,养殖区的赤潮发生频率要比非养殖区高得多^[19]。

表 1.2 近年中国沿海鱼类养殖污染物排放量估算

Table 1.2 Rough discharge amount of pollutants produced by fish culture
in the China Sea areas of resent years ×10⁴ t

年份	海水鱼类总产量	N	P	BOD
1999	1057.9	15.08	2.72	36.61
2000	1033	14.72	2.65	35.75
2001	1014.7	14.46	2.61	35.12
2002	1022.3	14.57	2.63	35.38
2003	1028.4	14.65	2.64	35.59

其它因素如某些微量物质往往是诱发和促进赤潮发生的因素,有时甚至起决定作用。比较重要的微量金属有 Fe、Mn、Cu、Mg、Mo、Co, 它们作为辅助因子参与生物生化反应以促进生物增殖。当赤潮发生时, 常伴随着可溶性铁、锰量异常升高, 并与赤潮生物量在数值上存在某种程度相关的情况^[20]。其他有机物质还包括 VB₁、VB₁₂、DNA、嘌呤、嘧啶、植物激素及其他一些有机物质分解产物^[21]。通常溶解有机质可与微量金属螯合, 提高金属利用率或使之无毒化, 从而与赤潮发生关系密切^[22]。

1.2.3 物理因素

赤潮的形成还受到各种物理环境因子的影响。从宏观效应来看, 赤潮的扩散、分布和动态过程受到环流、潮汐、上升流、水体层化、锋面, 以及水温、盐度、光照等环境因子的影响。从微观效应来看, 赤潮藻种的生长也会受到温度、盐度、光照, 乃至水体扰动等因素的影响, 因此海区水文气象状况能影响到赤潮的发生^[23-25]。

日本 Dokai 海湾全年都处于高度富营养化状态, 但赤潮仅仅是在夏季才发生, 对化学、物理、水文、生物等因素的调查结果表明温度和光照强度是该海湾浮游植物生长的限制因素^[26]。广东沿海的赤潮发生期主要集中在东北季风向西南季风转换的 3~5 月份^[27]。春夏季, 当海平面气压和盐度出现下降趋势, 气温、水温和相对湿度呈上升趋势, 风速呈减弱趋势时容易发生赤潮^[28]。大气铁输送^[29]和沙尘暴^[30]同赤潮的爆发也有一定的相关性。

气候的短期波动和长期变化, 也会通过对水温、盐度、营养物质等环境因子的控制而影响有害赤潮的发生。厄尔尼诺等导致的短期气候波动对赤潮发生规模和时间的影响在许多区域都有报道。对于以往记录的分析显示, 水温升高对于赤潮发生频率和规模都有影响, 有学者推断全球变暖这一长期气候变化趋势对于有害赤潮在全球范围内的增加可能也起到了一定的促进作用^[31]。

1.3 我国赤潮的发生趋势

早在 2000 多年前我国就有关于赤潮的记载, 一些古代文献或文艺作品, 如清代蒲松龄在《聊斋志异》的一文中也形象地记载了与赤潮有关的海水发光现象。我国近代首次有记载的赤潮发生于 1933 年, 原浙江水产实验场费鸿年报道有关镇海至台州、石浦一带发生的夜光藻赤潮^[32]。但截至 20 世纪 70 年代以前, 赤潮的记录

是不连续的。1970 年以后，几乎每年都有赤潮的记录。据不完全统计，从 1933 年至 2010 年 6 月份，我国沿海共记录赤潮 1144 起，每年记录的次数如图 1.2 所示。

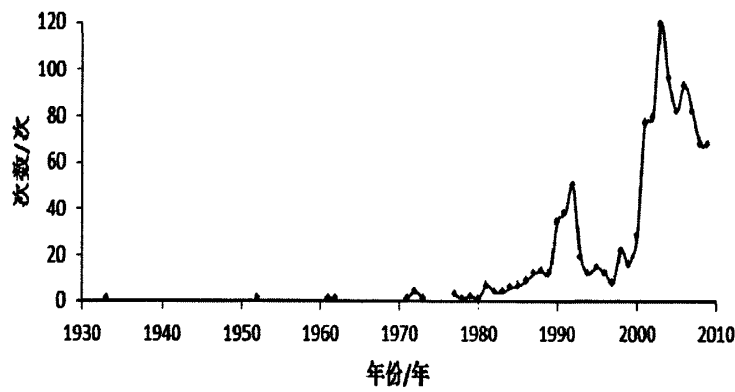


图 1.2 1933-2009 年中国沿岸赤潮事件统计

Fig 1.2 Statistics on coastal red tide events in China from 1933 to 2009

1.3.1 频率增大，面积增加

从图 1.2 中可以看出赤潮发生次数呈上升趋势，越来越频繁。据不完全统计，1970 年以前的 38 年中仅有 4 起记录，1970-1979 年记录 12 起，而 80 年代起，赤潮的爆发愈演愈烈，其中 1980-1989 年记录了 75 次，1990-1999 年记录了 226 次，2000-2009 年记录了 792 次，赤潮爆发频率以每十年增加愈三倍的速度递增，这与我国沿海经济发展、人类活动呈同步增长趋势。

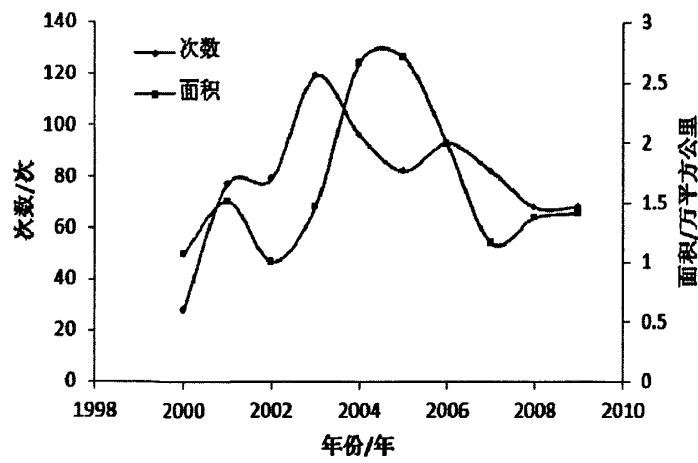


图 1.3 2000-2009 年中国赤潮发生情况

Fig.1.3 Occurrences of red tide in China from 2000 to 2009

我国近海赤潮从 1998 年至今,每年都发生过面积超过 1000 km² 的大规模赤潮。2004 和 2005 年赤潮年累计面积达到约 27000 平方公里,三倍于 2000 年的赤潮累积面积,但此后数年,赤潮记录次数和年累积面积均逐渐下降(图 1.3),对海洋生态环境、资源和公众健康构成了严重威胁。

1.3.2 持续时间长、范围广、危害增大

据资料显示,20 世纪 90 年代以前,我国发生的赤潮一般只持续几天甚至几小时,1998 年后赤潮发生的时间跨度增大。2003 年长江口及浙江近岸和近海海域从 4 月份中旬至 7 月初共发生赤潮 40 次,且持续时间长。福建省连江黄岐半岛附近海域赤潮持续 35 天,这一次赤潮造成的直接经济损失高达 2500 万元。1998-2000 年连续三年,在渤海、东海发生了面积达到几千米的特大赤潮,世界罕见^[33]。2000-2009 年十年间赤潮带来的直接经济损失累计高达 15 亿。而且,有毒赤潮对人类健康构成严重危害,据统计我国由于有毒赤潮造成的贝毒事件,已使 1800 多人中毒至少造成 30 人死亡。

另外,从赤潮爆发海域的多年变化趋势看,总体上赤潮的发生期和多发期由南向北逐渐推迟,且赤潮发生有从局部向全部近岸海域扩展的趋势。

1.3.3 新记录和有毒种类增多

过去我国赤潮种类主要为夜光藻、中肋骨条藻、束毛藻、笔尖根竹藻、尖刺拟菱形藻、海洋原甲藻、义角藻、赤潮异湾藻、海链藻、裸甲藻、红色中缢虫等。近几年来,一些新记录种赤潮增多,如海洋褐胞藻、多纹膝沟藻、多边漆沟藻、密氏裸甲藻、棕囊藻等,此外还发现了有毒的塔马亚历山大藻、链状亚历山大藻、链状裸甲藻、旋沟藻孢囊。大鹏湾还发现了仅在东南亚菲律宾及文莱至达鲁萨兰等地分布的巴哈马梨甲藻(*Pyrodinium bahamense*)孢囊^[34],外来种在我国近海引起的赤潮今年出现增加趋势,有资料表明,这些有毒藻的来源可能与国际海运业的传播有关^[35]。

2001-2008 年,有毒藻类赤潮发生次数和面积变化趋势基本一致(如图 1.4),都是呈现先升后降的趋势。2006 年有毒藻类引发赤潮次数和面积的记录为今年最高,发生次数为 41 次,影响面积近 15000 km²。从 2007 年开始,有毒赤潮的记录次数和面积持续下降,2008 年爆发 11 次有毒赤潮,累计面积为 610 平方公里。

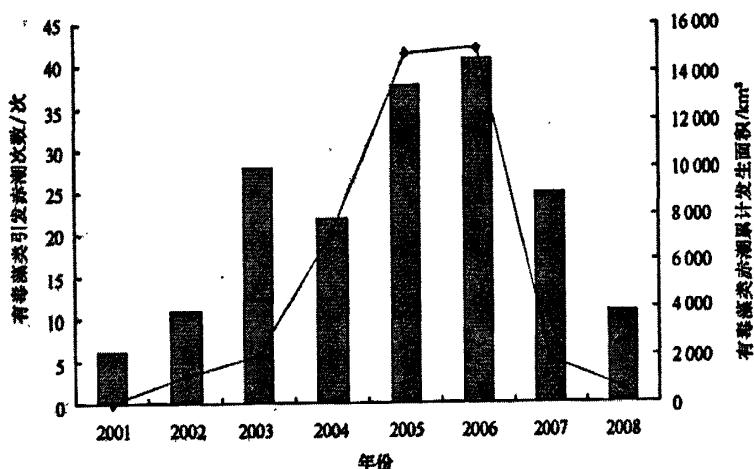


图 1.4 2001-2008 年有毒藻类赤潮发生情况

Fig.1.4 Occurrences of toxic red tide in China from 2001 to 2008

1.3.4 赤潮类型多样

据我国现有的赤潮报道,大多数属于单相型赤潮,即在赤潮发生时,所采得的赤潮样品中,只有一种赤潮生物占绝对优势;而有两种共存的赤潮占优势的双相型赤潮仅占少数。近十多年来双相型赤潮有上升趋势,如 1989 年 7 月长江日外构祀海域中肋骨条藻和蓝色裸甲藻赤潮^[36], 1991 年 3 月 20—22 日大鹏湾的海洋褐胞藻和夜光藻赤潮^[37], 2002 年 6 月 4 日—13 日在珠江口赤湾至桂山岛一带海域发生无纹环沟藻(*Gyrodinium instriatum*)和中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)引起的双相赤潮^[38], 2006 年 6 月 24—27 日浙江中部渔山列岛至韭山列岛海域发生由旋链角毛藻、米氏凯伦藻引起的赤潮等就是例证。

综上所述,我国赤潮发生频率快速增加,赤潮发生规模急剧扩大,发生海域向全部近岸海域扩展,时间跨度逐渐加大,有毒、有害的赤潮生物持续增多,这些趋势均表明了我国赤潮问题的严重性和复杂性。

1.4 赤潮的危害与海洋健康

有害赤潮能够通过产生毒素、造成物理损伤、改变水体理化特征等对人类健康、海洋生物和生态系统等多方面造成严重危害。有害赤潮藻产生的毒素,如麻痹性贝毒、腹泻性贝毒、记忆缺失性贝毒、神经性贝毒、西加鱼毒等,会直接导致鱼虾贝等富集毒素或死亡,威胁人类健康。除产生毒素之外,也有部分微藻具有特殊构造,对鱼类和无脊椎动物造成物理性损伤。有的藻大量繁殖,会导致水体理化特征的改

变,如水体溶解氧水平、酸碱度的改变等,对海洋生物和生态系统造成间接危害。

根据 Zingone 等的总结^[39],有害赤潮的危害效应可以分成四类:

1.4.1 影响海洋生态系统结构

海洋是一种生物与环境、生物与生物之间相互依存、相互制约的复杂生态系统,在正常情况下,系统中的物质循环和能量流动都处于相对稳定的动态平衡中,而赤潮爆发必然干扰和破坏这种平衡^[40]。有毒赤潮藻种产生的毒素能够经由海洋食物链传递到较高营养级,导致高营养级海洋生物中毒和死亡,如石房蛤毒素、短裸甲藻毒素、软骨藻酸等都曾造成海洋哺乳类或鸟类中毒事件。无毒赤潮也会危害海洋生态系统,在赤潮藻种达到一定密度之后,会降低光线透过率,影响海草床或珊瑚礁。而且,在大规模赤潮消退之后,死亡的藻细胞向下沉降,造成底层溶解氧的消耗,使海底出现低氧甚至无氧区,威胁底栖生物的生存。

1.4.2 对海洋渔业和水产资源的破坏

赤潮对海洋生态环境的巨大破坏力最直观的表现对渔业和水产资源的危害上,特别是海水养殖业常遭受灭顶之灾,造成惨重的经济损失。赤潮对海洋渔业和水产资源的威胁主要表现在^[41]:一方面,有害赤潮能够直接作用于海洋经济生物,导致养殖生物的大量死亡,带来严重的经济损失;另一方面,有毒赤潮藻种产生的毒素会对这些经济生物造成污染,使人们对水产品食用安全性产生怀疑,会间接危害养殖业的发展^[42]。有害赤潮导致的养殖鱼类、贝类、甲壳类生物的大量死亡事件在世界各地都有报道,严重制约着海水养殖业的持续发展。

1.4.3 对人类健康的危害

有毒赤潮藻种产生的毒素可以在滤食性贝类及植食性鱼类体内累积,造成水产品污染,如果不慎食用这些鱼虾、贝类,就会引起人体中毒,严重时可导致死亡。赤潮生物毒素引起人体中毒事件在世界沿海地区时有发生,对人类健康构成了很大威胁。研究表明,我国近海广泛分布产生 PSP、DSP 毒素的有毒赤潮藻,所产毒素已广泛积累在食用海洋贝类中。

1.4.4 对旅游业和娱乐业的影响

赤潮发生后海水水质会受到影响,水色改变,而且部分赤潮能够产生浮沫、异味等。一些赤潮的发生严重破坏了近岸海洋生态环境和生态景观,使海岸海域使用价值降低。如 2010 年深圳东部海域爆发了一起面积约 15 平方公里,持续时间长达

20 天的赤潮, 导致接待游客下降 50%, 赤潮退去后才缓慢回升。

综上, 赤潮对我国沿海造成了严重的生态、资源、环境问题和重大的经济损失。另外, 赤潮频发其实是大自然的一个危险信号, 它预示着赤潮高发区的海洋生态环境已经受到了严重的干扰, 而生态环境一旦失衡恶化将很难在短期内恢复。

2 赤潮的防治

2.1 赤潮的预防

近年来赤潮表现出频率增加、影响面积增大等趋势, 这在很大程度上是由于全球范围内的水体富营养化, 而正是人类的活动大大加速了水体富营养化的进程。因此, 预防赤潮, 首先要增强全民的环保意识, 加大宣传力度, 呼吁全社会高度重视, 保护海洋环境。其次, 控制水体营养输入和减缓富营养化是预防赤潮的有效途径: 一方面可以制订水质标准和排放标准, 推广科学养殖方式, 以控制渔业污染源输入; 另一方面可以在富营养区域养殖某些固定氮和磷能力较强的海藻^[43, 44]、高等水生植物、鱼类等, 从而建立良好的水生生态系统, 或采用海底耕耘法^[45]、挖掘底泥沉积物、水体深层曝气^[46]等工程性措施来改良底质, 以减缓富营养化状况。

2.2 赤潮的监测预报

要成功的进行赤潮预报预测, 首先要对监测海区中存在的赤潮生物种类定性识别和鉴定及对赤潮生物的数量变化分析和检测。目前用于赤潮预测的方法很多, 但综合起来可以分为 3 类: 经验预测法、统计预测法和数值预测法。赤潮的监测和预报须依靠多层次的海洋观测系统和多学科的综合研究才能实现。其中多层次海洋观测手段是关键, 建立有效的海洋综合观测系统是预报赤潮的必要条件^[47]。

2.3 赤潮的治理

目前国际上治理赤潮的主要方法是: 物理法、化学法和生物法。利用海洋微生物治理赤潮的研究刚刚兴起, 海洋微生物由于本身的种群多样性、生理生化类群多样性、生态功能多样性、遗传多样性等特点及其同赤潮藻类错综复杂的生态关系, 因而在赤潮生消过程中有着极其重要的作用。“以菌治藻”做为一种崭新的方法在治理赤潮中具有良好的应用前景。

2.3.1 物理法

赤潮发生时, 赤潮生物一般密集于水体表层(0~3m), 表层以下较少。物理方法治理赤潮就是利用物理方法和手段, 分离或杀死赤潮生物。目前国内外消除赤潮

常用的物理方法有：围隔法，利用围隔栅或者气幕，将赤潮水团同其它区域隔离^[48]；利用超声波^[49]、紫外线^[50]等杀死赤潮生物，此类方法通常难以应用于较大面积的有害赤潮防治，因此在实际应用中受到限制。

2.3.2 化学法

化学方法具有见效快的特点，是采用最早、使用最多、发展最快的一种方法。化学法包括直接杀灭法、凝聚剂沉淀法和天然矿物絮凝法。

2.3.2.1 直接杀灭法

(1) 无机除藻剂

直接杀灭法是利用特定化学药品直接杀死赤潮生物。硫酸铜是最早被用来治理赤潮的化学药物，但硫酸铜具有一定的毒性，仅适合内湾、小面积赤潮的应急措施，且存在成本高和效果短暂等缺点^[51]。市川精一（1992）对不同浓度的过氧化氢考察表面，30 mg/L 的剂量就可以使得浸泡 48h 的链状亚历山大藻孢囊失去萌发能力，而塔玛亚历山大藻孢囊在浸泡 49h 后，所有孢囊的原生质收缩，孢囊脱色^[10]。羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 具有极强的氧化特征，它可以极快的杀灭赤潮生物，同时又具有除臭、脱色的特性^[52,53]，所以是无毒、无残留物的理想药剂。此外，次氯酸钠、高锰酸钾、氯气、甲醛等化学药品可用于治理赤潮生物。

(2) 有机除藻剂

相对于上述无机除藻剂，目前研究较多的是有机除藻剂，分为人工化学物质和天然提取物两类。日本东京筑波大学从束丝藻中提取了一种生理活性物质——十八碳五烯酸， 1×10^{-6} 的该物质在 1min 内就能杀死引起赤潮的浮游生物，并且对其他生物无害。Barret 等和 Welch 等^[54-55] 利用大麦秆对蓝藻、硅藻等进行了实验研究，并证明了其良好的抑藻效果；Pillinger 等^[56] 进一步研究发现，降解过程中产生的醌类物质，是大麦秆抑藻作用的主要活性物质。王洪亮等^[57]通过对小麦秸秆进行化学改性，考察对赤潮异弯藻去除作用和机制。结果表明，在用量为 0.10 g/L、120 min 时，去除率从未改性时的 10% 提高到 80%以上，并且随着用量的增加，其去除效率进一步增强。

相对无机化合物而言，有机除藻剂具有药力持续时间长、对非赤潮生物影响小等优点，但其速效性较差，易受潮流及扩散等因素影响，使用量较大。

2.3.2.2 凝聚剂沉淀法

利用物质的胶体化学性质,使赤潮生物凝聚、沉淀后收集是该方法主要目的。现在国际上使用的凝聚剂有三大类:无机凝聚剂、表面活性剂和高分子凝聚剂^[58]。无机凝聚剂又称为电解质凝聚剂,普遍使用的是铝和铁的化合物,主要利用铝盐和铁盐在海水状态下形成胶体粒子对赤潮生物产生凝聚作用。由于赤潮生物具有昼伏夜出的趋光性质,治理时的凝聚过程主要在表层进行,所以表面活性剂和高分子凝聚剂成为发展较快的赤潮凝聚剂。此外,PAC、聚丙烯酰胺等高分子凝聚剂也在市场上占有重要市场。凝聚沉淀法在赤潮生物密集时极为有效,能迅速消除赤潮生物且对非赤潮生物的影响较小,同时还具有净化水质的作用。但凝聚剂的价格较高,难以大范围内推广使用。

2.3.2.3 天然矿物絮凝法

利用粘土矿物治理赤潮是目前国内外首选的赤潮治理方法之一,在赤潮发生时撒布粘土在海水中,使水中的有机悬浮物凝聚(尤其是蒙脱土的凝聚作用最强),沉淀后被覆在底泥上。就其抑制机理主要有两种观点:一种认为以吸附作用为主,一种则认为由于粘土中溶出的铝离子杀死赤潮生物所致^[59,60]。日本是研究应用天然矿物治理赤潮的主要国家,20世纪80年代初,日本在鹿儿岛海面上进行过具有一定规模撒播粘土治理赤潮的实验。俞志明等人^[61]进行了粘土微粒表面改性研究,提高了粘土对赤潮生物的絮凝力,粘土用量大大降低。但粘土絮凝法仍存在用量大、成本高及沉降物及其毒素对底栖生物生存有影响等问题。

2.3.3 生物法

在利用物理、化学方法不甚理想的情况下,越来越多的研究者将目光投向了生物防治技术。生物法主要是利用生物相互之间的生态关系来消除赤潮,这些生物包括动物、植物和微生物。

2.3.3.1 利用浮游动物和海洋滤食性贝类去除赤潮生物

大多数赤潮生物如硅藻和甲藻等,通常是浮游动物及滤食性贝类的直接饵料。Turnerh 和 Anderson^[62]研究证实,科德角海湾的桡足类在晚春季节种群数量很大,因而对塔玛亚历山大藻的摄食率增大,从而有效控制水华的发生。也有报道在养殖区内投入以浮游生物为食的沙蚕和卤虫来净化水质,防止赤潮发生。Takeda 等^[63]利用滤食性贝类 *Mytilus edulis* 其快速的滤食作用将水体中高密度的浮游生物有效的滤食、消化并排泄。该系统具有很强的去除赤潮生物能力,但赤潮毒素可能在

动物体内累积。

2.3.3.2 利用大型水生植物间的拮抗作用抑制赤潮生物的生长

多种生活类型的水生植物对藻类均有化感抑制作用,具有抑藻作用的化感物质主要属于植物的次生代谢产物,这些代谢产物分布于植物的根、茎、叶、花、果实或种子中,并通过挥发、根的分泌或淋溶等方式释放到周围环境中。Jin 和 Dong^[64]报道了孔石莼 *Ulva pertusa* 与赤潮异湾藻 *H. akashiwo* 和塔玛亚历山大藻 *A. tamarense* 共培养时能有效抑制这两种微藻生长,而且证明抑藻作用是因为孔石莼在生长过程中产生了抑藻物质。Singh 等^[65] 实验发现铜绿微囊藻 *M. aeruginosa* 能释放一种活性物质—肝毒素(hepatotoxin),该物质能抑制某些绿藻和蓝藻的生长。张信连等^[66]研究了杉木粉及其多酚提取物对塔玛亚历山大藻生长的影响,结果显示杉木粉用量为 0.5 g/L 时,3d 后对塔玛亚历山大藻的抑制率可达 80%。

以上研究结果表明,大型水生植物对藻类的相互抑制作用是广泛存在的,大型水生植物除了能通过竞争光、营养盐的竞争来抑制藻类的生长,同时也能分泌特异性的化感物质来抑制甚至杀死藻类。因此,可以在水体中栽种一些高等植物,包括漂浮植物、沉水植物等,利用化感作用来去除藻类,达到净化水质、恢复水生态系统的目的。

2.3.3.3 以藻抑藻或杀藻

海洋微藻在生长过程中会不断向周围环境中释放多种代谢产物,这些产物统称为胞外产物(Extracellular products, ECPs)。以 ECPs 介导的藻间拮抗作用有可能是藻华种群演替的重要原因之一。有报道在 35 种不同微藻培养液的提取物中筛选杀藻化合物,发现哈氏节球藻(*Nodularia harveyana*)和念珠藻属的 *Nostoc insulare* 的提取物具有很强的广谱的藻细胞毒性。日本学者发现将绿藻(*Dunaliella* sp.) 固定在高分子上与赤潮藻结合,4d 后 50%的赤潮藻死亡。赤潮藻通常呈梨形,与绿藻结合后变为圆形,随后细胞破裂,这可能是绿藻的外代谢物破坏了赤潮藻细胞^[67]。微绿球藻(*Nanochloris eucaryotum*)分泌的 Aponins,也可溶解产毒赤潮藻(*Gymnodinium breve*)^[68]。

2.3.3.4 利用微生物抑制有害藻类

利用对赤潮藻类具有特异性抑制甚至杀死作用的细菌、病毒等海洋微生物进行赤潮的防治,即为赤潮的微生物防治。

(1) 利用藻类病毒防治赤潮

上世纪九十年代, 研究人员发现病毒是水体中最丰富的生物^[69], 在海水表层的数量高达 $10^{10}/\text{L}$ 。它们是海洋生态系统中的活跃分子, 海洋浮游植物包括原核浮游植物和真核浮游植物都会受到病毒的感染^[70], 因而第一株藻类病毒的分离引起了极大的关注, 人们期望通过藻类病毒达到控制有害赤潮的目的。Nagasaki 等^[71,72]对赤潮异弯藻 (*Heterosigma akashiwo*) 做了较系统研究, 认为病毒裂解在 *H. akashiwo* 赤潮消亡中可能扮演重要的角色, 他们还研究了 *H. akashiwo* virus clone 01(Ha V01) 病毒生长特征, 初步探讨了利用 Ha V01 来治理赤潮异弯藻的可能性。

(2) 利用真菌抑制微藻的生长

一些真菌可以释放抗生素或抗生素类物质抑制藻类的生长。Chen 等^[73]从海洋真菌镰孢霉菌 *Fusarium* sp. 和枝顶霉菌 *Acremonium* sp. 中分离出化合物 Halymecin A, 该物质对海洋绿藻和中肋骨条藻有毒性作用。Jenkins 等^[74]从一种尚未鉴定的丝状真菌中提取了三种能有效抑制杜氏藻 *Dunaliella* sp. 的物质 Solanapyroneseg。

(3) 利用细菌抑制微藻的生长

自上世纪 70 年代开始藻际环境微生物研究以来, 人们已经认识到海洋微藻对细菌生长的影响, 也慢慢发现了海洋细菌对微藻生长的调控作用。一方面细菌吸收藻类产生的有机物质, 并为藻类的生长提供营养盐和必要的生长因子, 从而调节藻类的生长; 另一方面, 细菌也能抑制藻类的生长, 甚至裂解藻细胞, 从而表现为杀藻效应, 这类细菌一般称为抑/杀藻细菌。有关抑/杀藻细菌及其活性物质的内容, 将在下文继续阐述。

3 抑藻细菌及抑藻活性物质的研究进展

微藻分泌的有机物质使得微藻的周围聚集了大量的细菌以及其它的微生物, 并形成一个具有独特结构和功能的藻际微生物群落, 藻菌关系在种群演替和有害藻华动力学中起着重要作用^[75]。

3.1 细菌抑藻现象的发现

1924 年, Geitler 报道了一种寄生在刚毛藻 *Cladophora* 上, 并可使之死亡的黏细菌 *Polyangium parastium*。抑藻细菌通常通过直接或间接作用方式溶藻。直接溶藻是指细菌与藻细胞直接接触, 甚至侵入藻细胞内攻击宿主。间接溶藻是指细菌同藻竞争有限营养或通过分泌胞外物质而溶藻。Furuki 和 Kobayashi 发现, 当卡盾氏藻

(*Chattonella antiqua*)水华达到最大细胞密度时,该区域中存在着能促进该藻生长的细菌类群,而相反的,当 *C. antiqua* 水华衰退时,其周围的细菌类群则抑制该藻的生长^[76]; Fukami 等也发现细菌对某种藻类的抑制作用同藻类密度呈负相关;同时随着优势藻种的变化,细菌种群不断替换^[77];从此藻菌关系越来越引起科学家的重视,已成为近 30 年来赤潮科学研究的热点。

3.2 抑藻细菌的种类

通过对藻菌关系的不懈研究,科学家们分离并鉴定了许多株杀藻细菌。经过菌落形态的观察、生化特征的测定和分子手段的分析,这些杀藻细菌主要属于四个类群和一些其它类群^[78]。这四种类群分别是:拟杆菌门(Bacteroidetes)的噬纤维菌属(*Cytophaga*)和腐螺旋菌属(*Saprospira*),变形菌门(Proteobacteria) γ -变形菌纲(γ -proteobacteria)的假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)和交替单胞菌属(*Alteromonas*)。另外还有拟杆菌门的黄杆菌属(*Flavobacterium*)、*Zobellia* 属, γ -变形菌纲的弧菌属(*Vibrio*)和希万氏菌属(*Shewanella*)、革兰氏阳性菌中厚壁菌门(Firmicutes)芽孢杆菌纲(Bacilli)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)和 *Planomicrobium* 属、放线菌门(Actinobacteria)放线菌纲(Actinobacteria)的微球菌属(*Micrococcus*)。

众多抑藻细菌的发现为微生物抑藻工程的实施打下了良好的基础。

3.3 抑藻细菌的作用方式

抑藻细菌的作用方式一般分为两种^[79]:一是直接抑藻,即直接进攻宿主(direct attack),它需要细菌与藻细胞直接接触,甚至侵入藻细胞内。一些抑藻菌直接与藻细胞接触,通过释放可溶解纤维素的酶而消化藻细胞的细胞壁,进而逐渐溶解整个藻细胞。如黏细菌对蓝藻、鱼腥藻、束丝藻、微囊藻以及多种颤藻的溶解作用;噬胞菌属(J18/M01)和腐生螺旋体属(SS98O5)能够特异性地与横裂甲藻和硅藻接触溶解藻细胞等菌属直接接触溶藻。

二是间接抑藻,即间接进攻宿主(indirect attack),主要包括细菌同藻竞争有限营养或细菌分泌胞外物质溶藻。其中假交替单胞菌是报道较多的一种分泌胞外物质杀藻的细菌^[80]。研究抑藻细菌的作用方式不仅可以了解抑藻细菌的作用机制,而且可以指导我们尝试分离和研制高效的抑藻剂。

3.4 抑藻活性物质的种类

细菌可以通过释放特异性或非特异性的胞外物质,如蛋白质、多肽、氨基酸、

抗生素和羟胺等杀死藻细胞^[81]，其中分泌胞外物质抑藻文献报道较多，是抑藻细菌的主要作用方式。目前报道的细菌抑藻物质主要有以下几类：

(1) 蛋白质与多肽类物质

Lee 等^[82]从 *Pseudoalteromonas* A25 菌株培养滤液中分离到一种能杀死骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 的胞外蛋白酶，分子量约为 50kD，N 末端的氨基酸序列经测定为 Ala-Thr-Pro-Asn-Asp-Pro。Imamura 等^[83]从 Biwa 湖中分离到一株鞘氨醇单胞菌属细菌 (*Sphingomonas* sp.)，该菌株能够分泌一种对微囊藻有强烈杀灭活性的五肽 Argimicin A，分子式为 $C_{32}H_{62}N_{12}O_8$ ，Argimicin A 是一种高效的、选择性的杀藻物质。Banin^[84]报道一株珊瑚褪色弧菌 (*Vibrio shiloi*) 能合成并分泌一种胞外多肽，称之为毒素 P，该毒素能够促进 NH_3 转入细胞内，破坏 pH 梯度并阻断光合作用，导致虫黄藻死亡，从而引起珊瑚褪色。王宾香、郑天凌等^[85]采用双筛法筛选得到一株产杀藻蛋白的海洋细菌 DHQ25，该弧菌可分泌胞蛋白 P71 特异性杀灭有害赤潮藻—塔玛亚历山大藻 (*A. tamarense*)，鉴定表明 P71 为单链蛋白，分子量 14.5 kD。

(2) 表面活性剂

Wang 等^[86]从铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 培养液中分离到的鼠李糖脂对赤潮异湾藻 (*H. akashiwo*) 有强烈的生长抑制作用，鼠李糖脂也能抑制东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 的生长^[87]。枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) C1 株的培养液中含有表面活性剂，该表面活性剂能抑制铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 和鱼腥藻 (*Anabaena affinis*) 的生长^[88]。

(3) 抗生素

Dakhama 等^[89]从铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 分离到吩嗪色素类物质能抑制藻类的生长。Nakashima 等^[90]从日本 Nagasaki 海域分离得到 1 株细菌 MS-02-063，发现该细菌所产生的色素 PG-L-1 (属于灵菌红素) 能够杀死不同的赤潮藻，并研究了该色素的产生机制，发现这种色素的产生是由高丝氨酸内酯介导的群体感应调控系统 (homoserine lactone quorum sensing) 控制的。

(4) 其他抑藻物质

Yoshikawa^[91]在 2000 年首次报道了一株海洋弧菌 *Vibrio* Sp. C-979 在没有氰化物存在的情况下产生的 β -氰丙氨酸，能够溶解铜绿微囊藻、绿色微囊藻和聚球藻等

多种微藻。Ishio 等研究发现弧菌 *Vibrio. alginifestus* 能产生抑藻物质甲藻生长抑制剂(DGI), 从而能抑制甲藻的生长。Kodani 等^[92]从分离得到的 1 株抑藻细菌假单胞菌 K44-1 (*Pseudomonas* sp. K44-1) 中分离纯化出一种抑藻物质, 并鉴定为哈尔满碱(harmane, 1-methyl-beta-carboline), 是一种生物碱。

3.5 国内藻菌关系研究概况

目前研究者们已分离到多株原核藻类的抑藻细菌; 对真核藻类的研究较少, 此外对抑藻物质的研究也处于初步阶段, 已经报道的抑藻菌并不少, 但定性的杀藻化合物甚少, 因此抑藻化合物的分离鉴定研究极为迫切。另一个研究难题是抑藻机制的开展研究。抑/杀藻作用受到多种因素的影响, 如营养物质、细菌和藻类的浓度和生理状态以及微生物群落^[93]、尤其是复杂的自然环境因子等。但目前也还未能详尽的解释细菌杀藻的机制和作用过程。

至今在赤潮科学领域, 人们对藻菌关系的研究仍不足: ①未能获得种类丰富的具有稳定高效的赤潮生防菌株; ②尚未阐明海洋细菌抑藻的作用机制及过程; ③需进一步描述海洋细菌同赤潮藻之间的相互关系并深入研究其相互作用的机理; ④缺乏抑藻化合物的定性研究。

4 抑/杀藻菌的培养条件优化与方法设计

纵观现阶段的杀藻细菌研究, 见诸报道最多的是倚靠释放胞外物质抑藻, 而分泌胞外物质的多少通常与细胞密度的高低相关联系, 优化培养基则是一种提高细胞密度的有效方法。为使菌体细胞生长达到高密度, 有必要设计一种含有必需成分的平衡性营养培养基, 以维持细胞生长, 同时增加活性物质的分泌。为了获取一定量的抑藻物质用于后续活性物质的有效分离及抑藻机制研究工作的展开, 因此, 选择适当的试验设计和优化方法, 设计合理的培养及优化方案就显得尤为重要^[94]。

培养基组分是人为提供给微生物生长的最重要的培养环境, 是影响微生物生长增殖和代谢产物合成的重要因素。影响微生物生长过程的因素包括培养组成(成分、浓度)以及培养条件(温度, pH 值, 摇床转速, 接种量等)^[95-97], 由于发酵培养基成份众多, 且各因素常存在交互作用, 很难建立理论模型; 另外, 由于测量数据常包含较大的误差, 也影响了培养基优化过程的准确评估, 因此培养基优化工作的量大且复杂。

培养基的优化通常包括以下几个步骤: ①所有影响因子的确认; ②影响因子的

筛选,以确定各个因子的影响程度;③根据影响因子和优化的要求,选择优化策略;④ 实验结果的数学或统计分析,以确定其最佳条件;⑤ 最佳条件的验证。现数学统计学中的多种优化方法已开始广泛的应用于微生物培养基的优化工作中,其中比较常用的实验方法有单因素法、正交实验设计、均匀设计、全因子实验设计和响应面方法等^[98]。

目前国内外关于培养基优化的文献仅仅局限于一种或少数几种试验设计和优化方法^[99-101],鉴于培养基优化的特殊性,仅仅依靠单一方法很难取得满意的效果。近年的条件优化研究中也有一些研究结合两种统计学方法^[102]进行优化试验,实验结果可靠性更高。

4.1 单因次实验法(One Variable at a Time)

简称“单因素”,这种方法是在假设因素间不存在交互作用的前提下,通过一次改变一个因素的水平而其它因素保持不变,然后逐个因素进行考察。该优点是简单、容易,结果很明了,不需要专门的统计分析,因此一直都是发酵培养基组分优化的常用方法。王晓辉^[103]等人利用单因素试验对 BS070623 蛋白酶高产突变株进行了发酵培养基优化试验,取得了良好效果。肖慈琼^[104]等利用单因素实验法考察了不同培养条件(培养温度、培养时间、培养基的 pH、装液量和震荡速度)对溶藻放线菌 AN02 溶藻活性的影响。结果发现 pH 为 7.5, 28℃, 培养 6d 时的溶藻效果最好。此外,较强烈的振荡和充分的溶氧也有利于提高溶藻效果。

单因素试验法是以因素间没有交互作用为前提,而对于大多数培养基而言,其中包含多种复杂的成分。特别是在试验因素很多的情况下,需要进行较多的试验次数和试验周期才能完成各因素的逐个优化筛选^[105]。因此单因素法在培养基优化过程中常常用于初步的筛选试验,且主要用于筛选最佳碳源、氮源、无机盐和金属离子等营养成分,筛选出主要因素后,再利用正交、均匀或者响应面设计对主要因素着重考察^[106,107]。

4.2 均匀设计 (Uniform design)

均匀设计是我国数学家方开泰等独创的一种多因素试验优化法^[108,109]。该方法将数论的原理和多元统计相结合,近几年在微生物培养基的优化方面已取得不少成功的例子^[110]。与正交设计不同,正交设计具有“均匀分散,整齐可比”的特点。均匀设计方法从试验点在试验范围内充分“均匀分散”出发^[111],不考虑“整齐可比”,

可提高单次试验的效率,减少试验次数。均匀设计有以下几个特点:(1)布点均匀,均衡性好。(2)每个因素的每个水平做一次且仅做一次试验。(3)当因素的水平数增加时,试验数按水平数的增加量而增加。如当水平数从9增加到10时,试验数也从9增加到10;(4)均匀设计由于每个因素水平较多,而试验次数又较少,分析试验结果时不能采用一般的方差分析方法,可以通过计算机进行多项式逐步回归。

均匀设计最适合于多因素多水平试验,它可以用较少的试验次数,安排多因素、多水平的析因试验,是在均匀性的度量下最好的析因试验设计方法。虽然均匀设计节省了大量的试验处理,但仍能反映事物变化的主要规律。由于每个因素每一水平只作一次试验,因此,当试验条件不易控制时,不宜使用均匀设计法^[112];对波动相对较大的微生物培养试验,每一试验组最好重复2~3次以确定试验条件是否易于控制,此外,适当地增加试验次数可提高回归方程的显著性。孙利芹^[113]等将均匀设计的方法应用于紫球藻(*Porphyridium cruentum*)培养基的优化。在单因素实验的基础上,采用 $U_{12}(12^3 \times 6)$ 均匀设计表对影响紫球藻生长显著的四种主要营养因素进行了优化,获得了以海水为基础的优化培养基配方,有效地提高了紫球藻的生物量产量和生长速率。王剑锋^[114]等人利用均匀设计、二次多项式逐步回归分析对烟管菌 *Bjerkandera adusta* WZFF.W-Y11 产漆酶液态发酵培养基进行优化,在优化条件下进行液态培养可稳定获得9672 U/L的漆酶活力。

5 环境微生物制剂的开发和利用

5.1 环境微生物制剂的应用

利用微生物对赤潮藻的灭活作用及藻类病毒的有效降解,可使海洋环境长期保持稳定的生态平衡,从而达到防治赤潮的目的,因而是理想的防治方式。在物理、化学方法控藻各有弊端的形式下,近年来悄然兴起的微生物抑藻技术的研究与应用拥有无限发展的空间。“藻菌关系”理论的提出和推广,为研究与开发多种高效微生物抑藻技术提供了理论基础。

环境微生物制剂是将从自然界中筛选出的或人工培育、具有特定降解功能的微生物制成菌液制剂,或将其附着在麦麸等载体上制成干粉制剂。环境生物制剂在生物修复中的应用,主要体现在水体的生物修复与土壤的生物修复两方面。在富营养化的水体中投加对环境安全的生物制剂,可以有效的脱氮除磷抑藻,同时不会对其他的水生生物造成不良影响。生物制剂商品有干粉状,也有液态的,商业制品多为

多种菌株的混合配方。

目前,国内外已将多种治理各种类型污染的生物产品推向市场。1992年,美国一公司已研制出 Clear-Flo 系列菌剂专门用于湖泊和池塘生物清淤、养殖水体净化、河流修复及潮汛去除。1992年美国 Moulin Vert 水渠使用 Clear-Flo 1200 三个月, NH_4^+-N 从 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降为 0, COD 降低 84%, BOD_5 降低 74%, 无毒性检出^[115]。近几年,美国生态实验室研发的液可清(ACF32) (Aqua Clean ACF32)是一种由 32 种专性活菌构成的混合微生物制剂,已获得美国环保局、卫生部和农业部的认证,在美国等国家已有许多成功应用。国内方面,王立刚等^[116]将国外引进的海藻提取物 EClean 及其配套技术应用在富营养化养殖水体中,结果表明:应用该项技术可以有效降低水体的 COD、总氮和总磷,抑制蓝藻生长,减缓养殖水体富营养化的进程。李雪梅等^[116]将 EM 应用于富营养化的中国科学院华南植物园人工湖内,有效微生物群对水体的透明度、叶绿素 a 含量的改善有明显效果,可有效抑制藻类的生长,防止水华的发生,改善景观。王丽凤、邓柳等^[117]通过应用液可清制剂对受污染的昆明城市西南部西坝河进行修复,试验结果表明:投加液可清制剂 3 周后,修复河段内的 BOD_5 、总氮、总磷和浊度分别下降 43.9%、46.3%、25.5%和 43.6%。由此可见,微生物制剂在减轻水体 BOD_5 、总氮、总磷、COD、 NH_4^+-N 、浊度污染,控制水体富营养化具有显著效果。

生物制剂的应用常遇到两个问题,一是如何保持菌种的高效性,这可以通过诱变育种或基因工程手段加以解决;二是如何在使用过程中保持菌种的高效性。投加后的微生物面临着一个复杂的生态环境,既有种间斗争,也有被原生动物捕食的可能,在实际应用中亦会逐渐的流失、数量减少,从而影响使用效果。采用固定化技术可增强微生物的竞争性和抗毒物能力,减少菌体流失,有效的增加单位体积内的菌体浓度,因而是一种有效保持生物制剂活性的方法。

5.2 微生物固定化技术

生物固定化技术 (immobilized biotechnology) 是从 20 世纪 60 年代开始迅速发展起来的一项新技术,它是通过利用物理或化学手段将游离细胞或酶定位于限定的空间区域,并使其保持活性和可以反复使用的一种基础技术。固定化微生物技术具有微生物密度高、反应迅速、微生物流失少、产物易分离以及反应过程易控制等优点^[118]。结合课题需要及技术进展,我们期待将其应用于环境保护领域。

先前的诸多实验证明游离的抑藻菌可有效的抑制有害赤潮藻类的生长,但由于自然水体环境的复杂性使得这些成果很难应用在实际生境中^[119]。将能够抑制藻类生长的抑藻菌固定在一定的材质上,一则可以增加单位水体中的菌体浓度,二则可以给杀藻细菌形成一个保护环境有利其生长,再则方便于制备稳定性良好的杀藻制剂,易于规模化扩大^[120]。鉴于微生物固定化技术已经广泛应用于工业中,如酒精生产,有毒化学品的生物修复,废水处理与食品工程等,故而抑藻菌固定化技术不失为取代游离细菌控制赤潮治理的有效手段。

5.2.1 生物固定化方法

按照固定化载体与作用方式的不同,可分为吸附法、包埋法、共价结合法、交联法四大类。其中以包埋法研究最多,应用最广。另有截留固定法、自絮凝等。以下就本文所用的两种固定化方法进行简要介绍。

(1) 包埋法

包埋法是将微生物细胞包埋在凝胶的微小空格内或埋于半透膜聚合物的超滤膜内。根据载体材料和方法的不同,包埋法可分为凝胶包埋法和微胶囊法两种。此法简单,条件温和,稳定性好,包埋细胞容量高,是目前应用最广泛的固定化方法。但它也存在一些缺点,如载体存在限制扩散作用,许多载体形成凝胶后对高分子底物的通透性变差,机械强度往往也较低^[121]。

徐新阳^[122]等利用改进的聚乙烯醇-海藻酸钠联合包埋法固定化微球菌 *Micrococcus* sp. 可以获得固定化效果,制得的粒子机械强度高,使用寿命长,且弹性好对污水处理效果理想。

(2) 吸附法

又称载体结合法,是依据带电的微生物细胞和载体之间的静电、表面张力和粘附力的作用,而使微生物细胞固定在载体表面和内部形成生物膜的方法,可分为物理吸附法和离子吸附法。物理吸附法是使用具有高吸附能力的物质,如硅胶、活性炭、多孔玻璃、碎石、硅藻土、多孔砖、陶瓷片、木屑等吸附剂将微生物吸附在表面使其固定化;离子吸附法是利用微生物在解离状态下离子键合作用而固定于带有相反电荷的离子交换剂上,吸附比较牢固些,常见的离子交换剂有 DEAE-纤维素、CM-纤维素等。该方法操作简单,微生物固定过程对细胞活性的影响小,但细胞与载体作用力小,抗冲击负荷相对较低,易脱落,所固定的微生物数目受所用载体

的种类及其表面积的限制^[123]。

(3) 复合固定化法固定化微生物技术

即将两种或多种固定化微生物方法结合起来使用,从而提高整个微生物系统的处理性能,同时克服单一固定化法的种种缺陷与不足。如先用吸附法将微生物结合到载体上,再利用交联法将微生物细胞交联起来形成“细胞网”结构,或先用吸附法处理微生物细胞后再用高分子聚合物进行包埋处理^[124]。这样可以克服吸附法强度低和交联法影响微生物活性的问题。复合固定化技术的方法多种多样,主要有吸附—包埋法,包埋—交联法,聚集—交联法以及三法合用的吸附—包埋—交联法等。

5.2.2 固定化载体的特点

(1) 海藻酸盐载体

海藻酸钠(ALG)是一种从海藻中提取的天然多糖聚合物,结构是直链型(1-4)链合的古罗糖醛酸与甘露糖醛的共聚物^[125],是一种广泛应用的固定化介质,具有化学稳定性好、无毒、包埋效率高且价格低廉等优点,海藻酸钠易与二价阳离子 Ca^{2+} 络合,形成“蛋壳”结构,从而得到比较稳定的海藻酸钙凝胶体系。在海藻酸钠包埋法中,海藻酸钠的浓度、 CaCl_2 浓度、交联时间、凝胶小球的直径等各因素对细胞活性均有影响。

(2) 聚氨酯

聚氨酯泡沫(Polyurethane Foam, PUF)是吸附法固定化常用载体之一。它具有孔径与细胞尺相比较,内外表面都能作为固定化吸附界面;空隙率高,便于传质;载体为化学惰性,对细胞不具毒害作用;可与培养基共同灭菌,培养结束后易于迅速获取细胞;处理方便,价格低廉,适合作为工业化固定化载体等特点。由于物理吸附对菌体伤害小,相对包埋法,微胶囊等固定化方法,聚氨酯泡沫固定化培养菌体可以使菌体保持较强的生命力作为固定化载体,聚氨酯泡沫在环保、发酵及生物柴油制备领域中的应用正受到广泛关注^[126-129]。

Hiroshi 等人^[130]通过利用聚氨酯泡沫膜在固定床生物反应器中培养大鼠肝细胞,最高细胞密度达到了 $5 \times 10^7 \text{ cells/cm}^3$ PUM。如图 1.5,他们认为 PUM 中孔隙类似手指的结构,随着深度增加其直径逐渐减少。这种结构有利于大鼠肝细胞能逐步稳定地吸附在手指结构附近的小孔中,达到 99%以上的吸附效率。

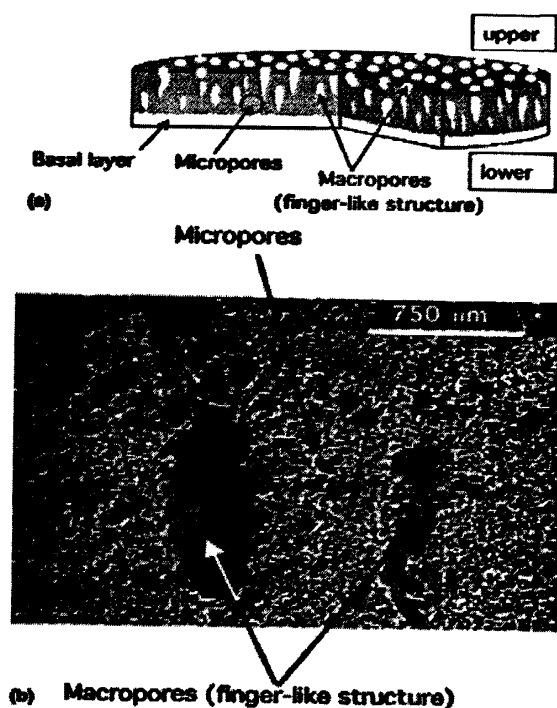


图 1.5 图 聚氨酯泡沫微观结构的示意图

Fig 1.5 Diagrammatic illustration of PUM

6 本论文的研究内容及意义

利用微生物防治赤潮及水体富营养化已逐渐被国内外学者所重视，菌藻关系的研究是当前赤潮科学研究的热点。诸多抑/杀藻细菌的发现为微生物抑藻工程的实施打下了良好的基础。海洋环境的特殊性造就了微生物及其活性物质的多样性，海洋中存在着丰富的抑/杀藻微生物资源亟待开发利用。

目前针对细菌胞外产物的发酵优化的报道已有很多，但针对抑藻菌和抑藻物质的优化方面的研究较少。本课题组前期分离得到了一株海洋抑藻细菌，鉴定为交替单胞菌属 (*Alteromonas*, CCTCC NO: M 2010177)，定名为 DH46。为开发 DH46 菌的抑藻产品和进一步提高其抑藻效果，本文拟对其发酵条件和培养基组分进行优化研究。研制高效环保型的海洋抑藻制剂，并用固定化技术加强效果，为实现其应用提供前期技术支持。

本文选取典型有害赤潮藻——塔玛亚历山大藻作为主要研究藻种，研究的主要内容如下：

(1) 通过单因子和均匀设计法, 对高效抑藻菌 DH46 的发酵条件和培养基组分进行优化。考察摇瓶培养条件, 如培养时间、温度、pH 值、盐度、摇床转速等对 DH46 生长及抑藻活性的影响。

(2) 在 Zobell 2216E 培养基的基础上, 再分别考察各成分(碳源、氮源及无机盐)的效应, 并筛选出显著因子, 然后采用均匀设计法确定培养基组成的最佳配方。

(3) 采用吸附—包埋的复合固定化方式和聚氨酯泡沫吸附法, 对抑藻细菌 *Alteromonas* sp. DH46 进行固定化的研究。

(4) 考察影响菌体生长和吸附固定化的各种重要因素, 确定较优的固定化条件, 建立一套合理可行的抑藻生物制剂制备工艺。

第二章 材料与方法

1 材料

1.1 菌种

实验所用的抑藻细菌 *Alteromonas* sp. DH46 是由本实验组苏建强博士于 2003 年赤潮 973 项目 MC2003-2 航次从东海赤潮区采集到的海水样品中分离并筛选得到, 前期研究表明该菌可通过间接抑藻方式, 对于引发赤潮的部分藻类具有一定的杀灭作用。鉴定为交替单胞菌, 革兰氏染色阴性, CCTCC 编号 M 2010177。

1.1.1 形态特征

将细菌于 2216E 平板上划线, 25℃ 培养 24h 后观察菌落形态。菌株电镜照片如图 3.1 所示。

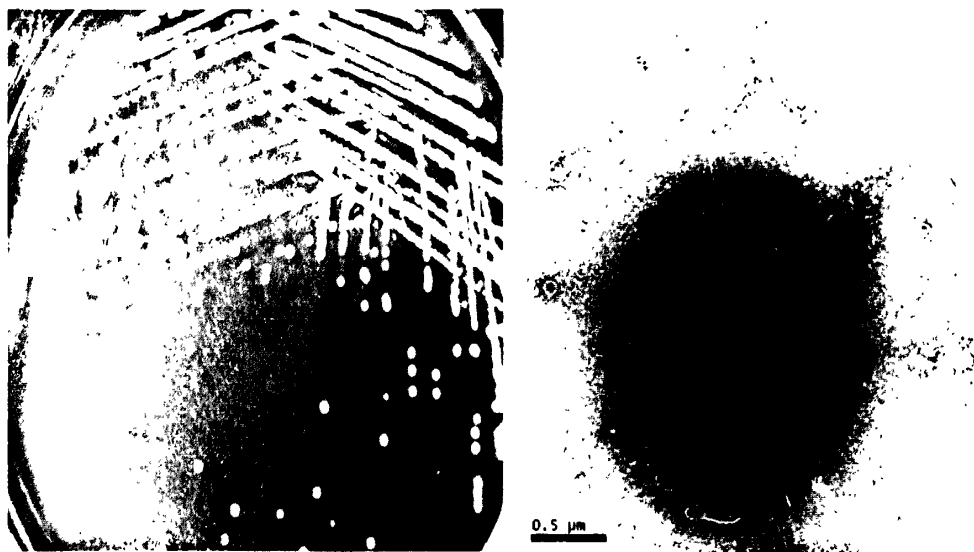


图 2.1 菌株 DH46 的菌落形态和电镜照片

Fig. 2.1 Colonial morphology and electron micrograph of algicidal bacteria DH46

DH46 形态表述: 菌落呈近圆形, 直径 3-4 mm, 平展, 边缘整齐, 表面光滑湿润有光泽, 白色不透明; 油镜下观察为革兰氏染色阴性, 分散排列; 电镜下观察菌体为杆状, 周围有粘液层, 大小为 $0.8-1.0\ \mu\text{m} \times 2.0-2.3\ \mu\text{m}$, 顶端有一根鞭毛, 长约 $7\ \mu\text{m}$ 。

DH46 分子鉴定：提取细菌基因组 DNA，PCR 扩增出约 1.5 kb 的 16S rRNA 片段，回收 PCR 产物并同 pMD18-T 载体相连，连接产物转化后挑取阳性克隆子，验证有正确插入片段后，进行测序。获得序列在 GeneBank 中进行比对，*Alteromonas* sp. KC98716-13，AB072388 与其同源性达 99%，结果表明菌株属于 γ 变形菌纲 (γ -Proteobacteria)，交替单胞菌目 (Alteromonadales)、交替单胞菌科 (Alteromonadaceae)、交替单胞菌属 (*Alteromonas*)。

1.1.2 菌种保藏、活化和扩大

菌种冷冻保藏：收获处于对数生长期的菌体细胞，加入终浓度为 15% 的甘油、10% 的 DMSO 及 1mL 培养基，重悬细胞转移入冻存管液氮速冻后于 -80℃ 长期保存。

活化：从斜面保存的菌株 DH46 中挑取一接种环接入装有 5mL 2216E 液体培养基 (蛋白胨 5g，酵母提取物 1g，磷酸高铁 0.1g，pH7.6-7.8，陈海水定容到 1 L) 的试管中，摇床培养 12-16 小时。

菌种扩大：取 1mL 活化好的菌液接入 100mL 培养基中摇瓶培养，培养温度 25℃，转速 150r/min。

1.2 藻种

实验主要用的藻种为单细胞塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) (ATGD98-006)，系由暨南大学水生生物研究所提供，经本实验室无菌藻技术除菌后得到的无菌株。藻类所用培养液为 f/2 培养液。藻类置于室内三角瓶中培养，温度为 $20\pm 1^\circ\text{C}$ ，光照条件为 12h 光照：12h 黑暗。

1.3 培养基

(1) f/2 培养基

主要成分见表 2.1

表 2.1 f/2 培养基主要成分

Table 2.1 Ingredients of f/2 medium

成分	含量	成分	含量
陈海水	定容到 1 L	微量元素	
主要营养盐		NA ₂ EDTA.2H ₂ O	4.36 mg
NaNO ₃	75 mg	FeCl ₂ .6H ₂ O	3.15 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5 mg	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01 mg
维生素		ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022 mg
Thiamine.HCl	0.1 mg	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01 mg
Biotin	0.5 µg	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18 mg
B ₁₂	0.5 µg	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.006 mg

(2) Zobell 2216 E 培养基

蛋白胨	5 g
酵母提取物	1 g
磷酸高铁	0.1 g
琼脂粉	10 g (固体培养基)
陈海水	定容到 1 L
pH	7.6-7.8

基础培养基即 Zobell 2216 E 培养基去除氮源和碳源

(3) LB 培养基

NaCl	10 g
胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
琼脂粉	10 g (固体培养基)
去离子	水定容到 1 L
pH	7.0-7.2

4) LB-Amp 培养基:

LB 培养基灭菌后, 冷却到 50℃, 加入氨苄青霉素至终浓度为 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 。

5) 胰蛋白胨-NaCl 培养基

胰蛋白胨	5 g
NaCl	26.5 g
蒸馏水	定容至 1L
pH	7.0

1.4 主要试剂和材料

蛋白胨、胰蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖、牛肉膏、可溶性淀粉、大豆蛋白胨、酸水解酪蛋白胨、 NaNO_3 、KBr、 MgSO_4 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、NaOH、HCl 为 OXOID 产品; 海藻酸钠购自国药集团化学试剂有限公司, 粘度(10g/L, 20℃)/(Pa·S) ≥ 0.02 ; 其余试剂均为国产分析纯。

8 μm 、3 μm 、0.22 μm 微孔滤膜为上海半岛实业有限公司产品。

多孔淀粉购自辽宁立达生物科技有限公司, 细度 200 目, 开孔率 $\geq 90\%$, 吸水率 (g/g) ≥ 1.6 , 吸油率 (g/g) ≥ 1.2 。

聚氨酯泡沫: 市售聚氨酯泡沫, 密度为 $65\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$, 空隙率大于 90%, 将其剪切成不同尺寸立方体待用。

1.5 主要软件

DPS V_{3.01} 专业版: 均匀设计及回归分析;

Origin 7.5、Photoshop 7.0 及 Microsoft office excel: 数据处理和作图。

1.6 主要溶液配制

1) 0.1M 磷酸缓冲液 (pH 7.4)

称取 2.28g NaH_2PO_4 和 11.502g Na_2HPO_4 溶于 1L 蒸馏水中。

2) 0.01M PBS 磷酸缓冲液 (pH 7.4)

称取 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na_2HPO_4 , 0.24g KH_2PO_4 , 溶于 1 L 蒸馏水中, 用 1M HCl 调节 pH 至 7.4。

3) 鲁哥氏溶液

称取 6g 碘化钾溶于 20 mL 蒸馏水中, 搅拌到溶解后加入 4g 碘, 待碘充分溶解,

再加入 80 mL 蒸馏水，贮存在棕色试剂瓶内；

4) 2.5%戊二醛固定液

称取 20 mL 25%戊二醛溶液混合 180 mL 0.1M 磷酸缓冲液，蒸馏水定容至 200 mL。

5) 生理盐水

称取 9g 分析纯 NaCl，溶入 1000mL 蒸馏水中，121℃ 高压灭菌 20min。

1.7 主要仪器

表 2.2 主要仪器

Table 2.2 Apparatus

仪器名称	产商
SHZ-82 恒温振荡器	常州国华电器有限公司
HH-2 数显恒温水浴锅	常州国华电器有限公司
DYX-250S-C 生化培养箱	科力仪器
LRH-250A 生化培养箱	广东省医疗器械厂
Universal 32R 冷冻离心机	Hettich zentrifug.en, Germany
SDJ-ZS 洁净工作台	上海淀山湖净化设备厂
828 奥立龙酸度计	Thermo Orion, USA
752 型分光光度计	上海光谱仪器有限公司
WZ-202 盐度计	北京万成北增精密仪器有限公司
KQ-100DE 型超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
AL104 电子分析天平	Mettler Toledo 仪器有限公司
SPECTRA max M2 酶标仪	Molecular Devices, USA
正置荧光显微镜	Olympus BX41
UNICAM UV300 紫外分光光度计	Thermon Spetronic
高温高压灭菌锅	Labtech

BioFlo 110 台式发酵罐	NBS, USA
WH-1 微型旋涡混合仪	上海沪西分析仪器厂
超纯水制备装置	Millipore
JSM6390 扫描电子显微镜	日本株式会社
微量离心机	HANIL Micro-12

2 基本方法

2.1 培养条件对抑藻菌 DH46 生长及抑藻效果的影响

①培养时间对抑藻菌抑藻能力的影响：设定摇床培养温度为 28℃、调节培养基 pH7.0~7.2、1%接种量，250mL 三角摇瓶装液量为 100mL，150r/min，培养期间定时取样，测定生物量和抑藻率，测定方法同上；

②温度对抑藻菌抑藻能力的影响：分别设定培养温度为 20、25、28、30 和 32℃，调节培养基 pH7.0~7.2，1%接种量，250mL 三角摇瓶装液量为 100mL，150r/min 摇床培养 24h 后，取菌液于波长 600nm 下测定光密度值（即 OD₆₀₀）和抑藻率；

③ 培养基初始 pH 的影响：分别设定培养基的初始 pH 值为 3、5、7、9、11，培养温度为 28℃，1%接种量，250mL 三角摇瓶装液量为 100mL，150r/min 摇床培养 24h 后，测定生物量和抑藻率，测定方法同上；

④ 盐度的影响：用人工海水分别调节培养基的盐度为 0、10、20、30、40 和 68‰，28℃，初始 pH7.0，其余条件与上述相同，然后取发酵液测定生物量和抑藻率；

⑤ 转速的影响：分别设定摇床震荡速度为 120、150、180 和 210r/min，培养温度为 28℃，初始 pH7.0，培养 24h 后取发酵液测定生物量和抑藻率，测定方法同上。

2.2 复合营养源对抑藻菌 DH46 生长及抑藻效果的影响

以 Zobell 2216E 培养基为筛选优化的基础（去除碳源、氮源），采用单因素试验方法对不同碳源、氮源和无机盐对 *Alteromonas* sp. DH46 的生长及其发酵上清液抑藻效果进行考察。

1) 以 5g/L 牛肉膏，酵母粉，胰蛋白胨和蛋白胨为复合营养源，其余组分含量

同于基础培养基。培养条件为：接种量为 1%，28℃，180r/min，pH 为 7，盐度为 30‰，摇瓶培养 24h 后测定生物量和抑藻率。

2) 在 5g/L 胰蛋白胨的基础上分别加入 1g/L 的葡萄糖，蔗糖，柠檬酸钠，可溶性淀粉，酵母粉，大豆蛋白胨，酸水解酪蛋白胨，甘氨酸，NaNO₃，MgSO₄。其余组分含量同于基础培养基。培养条件为：接种量为 1%，28℃，180r/min，pH 为 7，盐度为 30‰，摇瓶培养 24h 后测定 OD₆₀₀ 和抑藻率。结合生长量和抑藻率考察加入的组分是否对抑藻菌 DH46 存在促进作用。

2.3 均匀设计法优化培养基组成

依据单因子实验结果，选取对抑藻菌 DH46 生长及抑藻影响显著的因子，即胰蛋白胨、淀粉、酵母粉、NaNO₃、MgSO₄，采用均匀设计方法，参考文献^[6]，选取 U₁₅(5⁴×15)均匀设计表考察培养基最佳配方组成，并测定菌体干重作为评价指标。五个因素分别设为自变量 X₁、X₂、X₃、X₄ 和 X₅，考察菌体干重(Y) 的变化。培养条件选择最适条件：接种量为 1%，28℃，180r/min，pH 为 7，盐度为 30‰。胰蛋白胨设置 15 水平，其余皆设置 5 水平。实验设计如表 1 所示。取各组发酵液进行抑藻试验，考察培养基组分及其浓度对菌株发酵产活性物质抑藻效果的影响。

表 2.3 U₁₅(5⁴×15)实验因素及其水平

Table 2.3 Experimental design table U₁₅(5⁴×15) from the uniform design

实验组	自变量				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
1	10	1	3	1	5
2	11	3	5	5	5
3	14	5	2	3	4
4	9	3	1	4	1
5	4	4	1	3	5
6	1	2	4	2	4
7	8	5	5	1	3
8	12	2	1	2	3
9	5	1	5	3	1

10	3	3	2	1	2
11	7	1	2	5	3
12	2	5	3	5	2
13	15	2	4	4	2
14	6	4	4	4	4
15	13	4	3	2	1

$X_1 - X_5$ 分别代表自变量胰蛋白胨、可溶性淀粉、酵母粉、 NaNO_3 和 MgSO_4 , Y 代表因变量菌体干重。

利用软件均匀设计版本 3.0, 设计混合水平实验方案。将各因素的各水平对目标函数进行多元回归, 得到回归方程。

预测并验证优化条件:

- (1) 根据求得的回归方程式, 确定一个优化条件。
- (2) 将优化条件代入所得的回归方程, 求得预测结果, 并计算出区间估计。
- (3) 按优化条件进行试验, 其结果应在预测范围内, 一般能得到比以前较好的试验结果。

2.4 海藻酸钠-微孔淀粉包埋固定化抑藻菌的研究

2.4.1 包埋固定化方法

1、菌悬液的制备

将保藏菌株活化, 接入已灭菌的培养基中, 于 28°C 、 150r/min 震荡培养 $12\sim 16\text{h}$, 经低温离心(8000r/min , 10min)收集菌体, 去除上清。加少量生理盐水制成菌悬液 (10^8cell/ml), 添加适量甘油作为保护剂, 使之终浓度为 10g/L 。

2、制备乳化液

无菌操作条件下, 称取一定量的微孔淀粉于烧杯中, 加入菌悬液, 冰上缓慢搅拌、静置 15min 使菌体吸附完全, 包菌量为 $60/100$ (即每 100mL 包埋剂中含有相当于 60mL 菌液的菌量)。

3、包埋固定化

按质量体积比, 将一定量的海藻酸钠溶于去离子水, 在 90°C 水浴中搅拌溶解, 置于超声波清洗仪超声处理 5min 后取出降至室温, 形成均质、无气泡胶体溶液。

将上述乳化液倒入冷却的海藻酸钠溶液中, 缓慢搅拌均匀, 用注射器将混合液挤入一定浓度、预先制冷的 CaCl_2 溶液中, 形成大小均匀的固定化胶珠。固化一段时间后取出, 用生理盐水清洗胶珠 2-3 次, 去除 CaCl_2 残液; 于 4°C 下在生理盐水悬浮保存备用。

2.4.2 包埋固定化小球性能研究

1、凝胶小球的机械强度测定

采用按压法, 以固定化载体的正面所能承受的压力来表征机械强度。随机选取制得的固定化胶珠 3 粒, 置于自制正方形小盒内, 均匀分布, 上面盖上轻的玻璃片往轻玻璃片上加 50g 砝码, 计时 60s, 用 0~150mm 游标卡尺分别测量施压前后的载体直径, 然后计算其施压直径变化率。形变率(Degree of deformation)定义为:

$Dd = Dt / Do$, 其中 Dt 为胶珠在 t 时刻的平均粒径, Do 为初始时刻的平均粒径。

2、凝胶小球的传质性能测定

选择数量相同、粒度均匀的凝胶小球分别放入等量的惰性蓝墨水中, 放置 24h 后取出后冲洗, 切开观察其内部染色程度, 以此作为评价颗粒的传质性能。

3、凝胶小球的破损率测定

取 50 颗制得的空白凝胶小球装于 10ml 生理盐水的摇瓶中, 加入少量直径为 3mm 的玻璃珠, 放入摇床以 28°C , 150r/m 的条件进行破坏性实验。连续进行 20 天后观察小球破损情况。

2.4.3 包埋固定化制备条件的确定

1、海藻酸钠制备浓度的确定

固定微孔淀粉 MS 浓度为 20g/L 及 CaCl_2 浓度为 30g/L, 配制不同浓度的海藻酸钠 SA 溶液, 按 2.4.1 描述的方法制备固定化抑藻菌 DH46 的包埋胶球, 考察不同浓度的 SA 对胶球粒径的影响。

2、微孔淀粉浓度的影响

选取 SA 浓度为 20g/L 及 CaCl_2 浓度为 30g/L, 改变胶球制备液中 MS 的浓度, 考察其对胶球粒径的影响。

3、 CaCl_2 溶液浓度影响

选取海藻酸钠 SA 溶液为 20g/L 及微孔淀粉 MS 浓度为 20g/L, 配制不同浓度的

CaCl₂ 固化溶液，考察不同浓度的氯化钙对胶球粒径的影响。

2.4.4 固定化细胞发酵

无菌条件下，将游离菌体与含等量的固定化胶珠接于装有 50ml 培养基的 250ml 三角瓶中，于 28℃，150r/m 恒温摇床中进行培养，隔时取样，测定发酵液的 OD₆₀₀ 值，考察固定化对抑藻菌生长的影响。

2.4.5 固定化包埋小球抑藻实验

为考察包埋固定化小球对塔玛亚历山大藻的抑制效果，采取三种不同添加方式作用于目标藻：

1、选择优化条件制备固定化小球，分别取固定化小球 1g, 3g, 5g 直接加入 100ml 塔玛亚历山大藻液中，对应空白小球作为对照，隔时取样，观察抑藻效果并计算抑制率；

2、取固定化小球 1g, 3g, 5 加入 100ml 塔玛亚历山大藻液中，同时补充 1ml 2216E 培养基，隔时取样，观察抑藻效果并计算抑制率；

3、称取 1g 包埋固定化小球，置于 50ml 2216E 培养基中，28℃，150r/m 条件下培养 48h。取发酵液离心获得无细胞滤液，按 0.5%，1%和 2% (v/v) 加入 100ml 目标藻中，观察抑藻效果并计算抑制率。

2.5 聚氨酯泡沫固定化研究

2.5.1 聚氨酯泡沫载体的前处理

将聚氨酯泡沫其剪成不同大小的立方体，使用前用去离子水清洗除杂质，沸水煮 30 min 以上，60 ℃烘干至恒重，灭菌备用。

聚氨酯泡沫载体使用后回收处理，将聚氨酯泡沫反复挤压清洗数次后，超声波清洗 1 小时，经去离子水清洗，煮沸 30 min 后烘干，回收备用。

2.5.2 固定化载体内菌体计数方法的比较

根据文献介绍，测定吸附固定化菌体生物量的方法主要有如下三种：

(1) 干重法：将已知质量的固定化载体和吸附在其上的细胞于 80℃烘干恒重，扣除载体重量，即为菌体干重。

(2) 超声法：取吸附有菌体的固定载体浸没在 25mL PBS 缓冲液中，25℃超声波浴 10min。而后取样稀释计数。

(3) 挤压法：将吸附有菌体的 PUF 载体用 PBS 缓冲液冲挤压数次，收集洗涤液

测定体积，稀释计数。

由于在固定化培养过程中聚氨酯泡沫因相互摩擦的剪切力作用会出现物理磨损，致使利用质量变化来考察生物量变得不准确，故舍弃该法，只比较超声法和挤压法对菌体计数的影响，每次平行比较重复 3 次操作。

2.5.3 抑藻菌 DH46 在 PUF 上的固定化生长

1) 取一定质量预处理过的聚氨酯泡沫加入到含有 50mL 培养基的 250mL 三角瓶中，共同灭菌，接入对数生长期的菌体，使之终浓度为 $1\sim 2 \times 10^6$ cell/mL，150rpm, 28℃摇床中振荡培养 24h，获得固定化菌体备用。

2) 取一定数量前处理且灭菌的聚氨酯泡沫加入一定体积培养到稳定期的菌悬液中，于 28℃，150r/min 摇床转速下进行吸附，随时间取样测定菌体在载体中的固定化情况。

2.5.4 固定化载体上吸附情况的测定

取培养好的菌液加入含聚氨酯泡沫载体的摇瓶，28℃，150r/min 摇床转速下进行吸附实验，定时取样测定载体外菌体浓度 C_{out} ，载体外游离细菌的体积为 V_{out} ；挤压法测定载体内菌浓度 C_{into} 和菌液体积 V_{into} ，则载体内菌的固定化比率为：

$$\text{Adsorption rate (\%)} = \frac{C_{into} * V_{into}}{C_{out} * V_{out} + C_{into} * V_{into}} * 100$$

2.5.5 PUF 固定化培养抑藻菌的菌体分布

PUF 内部丰富的微孔结构可以为菌体提供悬浮培养的微环境，而载体的内外表面又可以为菌体提供固定化培养的吸附界面。为了更好的了解抑藻菌在 PUF 载体内的生长状态，设计了以下实验，来确定固定化培养过程中抑藻菌 DH46 在载体外表面，载体微孔中以及载体内部的菌体分布情况。

250mL 摇瓶中装有 50mL 培养基，加入 PUF 1.0g，联合灭菌后接种初始浓度为 10^6 cell/mL 对数期的菌体，28℃, 150r/min 条件下培养 24h 后，收获固定化培养的菌体。

(1) 分离载体外菌液，测定菌浓度及体积，即得载体外的菌体分布情况；

(2) 将固定有菌体的 PUF 泡沫捞出，加入 25mL PBS 溶液，放入转速为 150r/min 的摇床振荡，取样测定缓冲液中菌浓度的变化，当菌浓度不再变化时，分

离缓冲液与载体，测定菌浓度，即得 PUF 载体表面菌分布；

(3) 载体置于 25mL PBS 缓冲液中，反复挤压洗脱后测定液中菌浓度，即得到载体内部固定化的菌分布。

2.5.6 固定化影响因子的考察

为了更好地为 PUF 固定化培养抑藻菌 DH46 的条件摸索作准备，进一步设计了一系列实验，尝试研究了不同的载体尺寸，载体添加量，接种量等对菌体在 PUF 载体中固定化效果及抑藻效果的影响。

2.5.6.1 聚氨酯泡沫载体尺寸对固定化培养的影响

1) 聚氨酯泡沫分别切成 5mm³、10mm³、15mm³、20mm³大小的立方体，各取相同质量的 PUF 置于装有 50mL 2216E 液体培养基的 250mL 三角瓶中，120℃ 高压灭菌；

2) 取对数生长期的菌体 1%(v/v)接种于上述含有 PUF 的培养基中，每组设置 6 个平行，28℃，150r/min 恒温摇床摇培 24h，其中 3 瓶按平行挤压式方法计数洗脱出的聚氨酯泡沫内的菌体；

3) 将另外三个平行 PUF 取出，超净台内风干 24h，加入到 100mL 无菌塔玛藻液中，各组相应尺寸的空白 PUF 做对照，培养 24h 后，取样、固定，计算抑藻率。

2.5.6.2 PUF 添加量对固定化培养的影响

1) 取不同质量的 5mm³聚氨酯泡沫(0.5g, 1.0g, 1.5g, 2.0g)置于装有 50mL 2216E 液体培养基的 250mL 三角瓶中，121℃ 高压灭菌；

2) 取对数生长期的菌体 1%接种于上述含有 PUF 的培养基中，每组设置 6 个平行，28℃，150r/min 恒温摇床摇培 24h，其中 3 瓶按平行挤压式方法计数洗脱出的聚氨酯泡沫内的菌体；

3) 抑藻测试如 2.4.6.1。

2.5.6.3 接种量对固定化培养的影响

在 50mL 培养基中加 1.0g、剪切为 5mm³的 PUF 载体，按照不同比例(0.05%，0.5%，1%，5%和 10%)接入对数生长期的菌体，28℃，150r/min 培养 24h。分别进行计数固定化聚氨酯泡沫内的菌体和抑藻试验，方法如 2.4.6.1。

2.5.7 扫描电镜观察聚氨酯泡沫固定化培养的抑藻菌 DH46

利用电镜扫描分析抑藻菌 DH46 在聚氨酯泡沫载体中固定化培养的情况。小心

切割下小块的固定有菌体的聚氨酯泡沫载体，然后按下列步骤处理样品：

(1) 固定：

① 前固定：2.5%戊二醛(磷酸缓冲液配制) 固定 2h，用 0.1M pH7.4 磷酸缓冲液漂洗 3 次，每次 10min；

②后固定：1%锇酸固定 2-3h，用 0.1M pH7.4 磷酸缓冲液漂洗 3 次，每次 10min；

(2) 脱水：乙醇梯度脱水 30%、50%、70%、90%、95%、100% ，每次 10min，然后逐步过渡到纯叔丁醇，而后置于 4℃冰箱过夜，样品结晶；

(3) 冷冻干燥；

(4) 将干燥好的样品表面喷金，采用 JSM6390 扫描电子显微镜观察样品。

2.6 分析测定方法

2.6.1 抑藻菌生长状况评价

1) 浊度测定法 (Optical density, OD)

取原液或适当稀释的菌体发酵液，以空白培养基做对照，使用 SPECTRA max M2 酶标仪测定菌悬液的 OD₆₀₀ 值，反映菌体生长情况；

2) 菌体干重 (DCW)

吸单位体积发酵液经 8000r/min，离心 10min 后，弃去上清后用去离子水洗涤菌体 3 次，置于 80℃恒温烘，称重直至恒重，计算每升发酵液的菌体干重 (g/L)。

2.6.2 抑藻效果评价

取发酵培养后的无细胞滤液添加入测试藻类中，作用 24h 后用鲁戈氏液固定，在光学显微镜下计数。计算式如下：

$$\text{Algicidal activity}(\%) = \frac{N_c - N_T}{N_c} \times 100$$

式中，N_c 表示对照组中的细胞数，N_T 表示实验组中的细胞数。

第三章 结果与分析

1 不同培养条件对 DH46 生长和抑藻效果的影响

1.1 抑藻菌 *Alteromonas* sp. DH46 的生长曲线测定

1.1 培养时间对菌体生长和抑藻效果的影响

随着培养时间的延长,图 3.1 中的抑藻效果呈现上升趋势,进入稳定期后(16h)抑藻率稳定在 75%以上。摇床培养 24h 时,培养物的抑藻效果最为明显。伴随菌体生长的整个阶段,其细胞上清液都表现出不同程度的抑藻效果,推测该活性物质可能是细菌的次生代谢产物,在细胞内增长积累,稳定期时达到一个较高的水平。因此,相同条件下选择培养 24h 之后的发酵液进行抑藻测试。

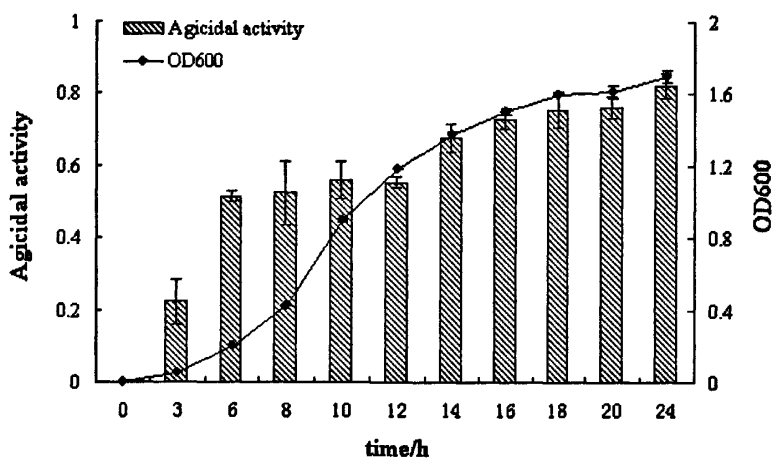


图 3.1 不同培养时间对杀藻菌 DH46 的生长及杀藻效果影响

Fig. 3.1 The effect of different culture times on the growth and algal lysis effect of *Alteromonas* sp. DH46

1.2 培养温度对菌体生长和抑藻效果的影响

温度对于微生物的生长有重要影响。适宜的温度不仅能促进微生物生长,也有利于抑藻活性化合物的产生和积累。因此考察了 20℃、25℃、28℃、32℃ 条件下抑藻菌 DH46 的生长状况。实验结果见图 3.2 所示。

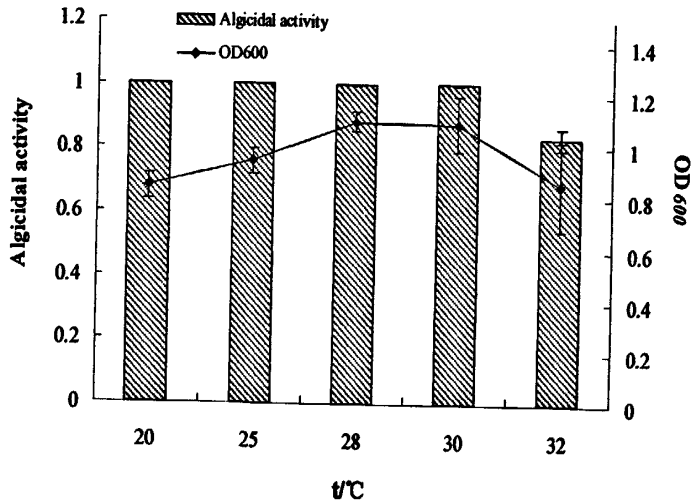


图 3.2 不同培养温度对抑藻菌 DH46 的生长及抑藻效果影响

Fig. 3.2 The effect of different culture temperature on the growth and algal lysis effect of *Alteromonas* sp. DH46

由图 3.2 可见, 该菌在 28~30℃ 培养条件下, 其生物量和抑藻率都可达到较高值, 菌体产活性物质的能力在 20~30℃ 间内受温度影响较小, 但细胞密度先随着温度的升高而增大, 随后下降。温度改变过程中, 菌体生长和杀藻物质的产生规律是一致的。28℃ 的抑藻效果与 30℃ 相差不大, 考虑到节省能源故选择 28℃ 为今后培养条件。

1.3 培养基不同初始 pH 值对菌体生长和抑藻效果的影响

pH 值对微生物生长繁殖的影响是多方面的, 不仅影响细胞的外环境和内环境, 而且 pH 对某些生物合成途径有显著影响。因此微生物发酵有其最适生长 pH 值和最适产活性物质 pH 值。分别考察了不同培养基初始 pH 时, 抑藻菌 DH46 的生长状况。实验结果如图 3.3 所示。

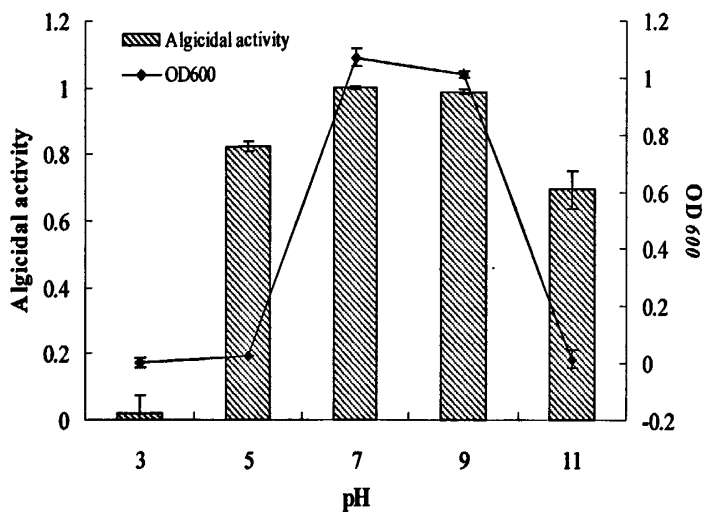


图 3.3 不同初始 pH 值对抑藻菌 DH46 的生长及抑藻效果影响

Fig. 3.3 The effect of the initial pH on the growth and algal lysis effect of *Alteromonas* sp. DH46

实验结果表明抑藻菌 DH46 生长的最适 pH 为 7，其生物量和抑藻率均获得最高值。当 pH 值高于 9 或低于 5 的偏酸及偏碱环境下菌体生长均受抑，但 pH 5~11 范围内其抑藻效果仍可维持在 69%以上，推测该抑藻活性物质对酸碱有较高的耐受性。

1.4 不同盐度对菌体生长和抑藻效果的影响

抑藻菌 DH46 是分离自海洋的交替单胞菌，高盐度的生活环境对其生长繁殖有着重要意义。盐度对于海洋细菌的作用主要在于影响渗透压，渗透压的剧烈变化可使细胞破裂或质壁分离，损坏细胞正常结构，从而影响微生物的新陈代谢，甚至影响存活。

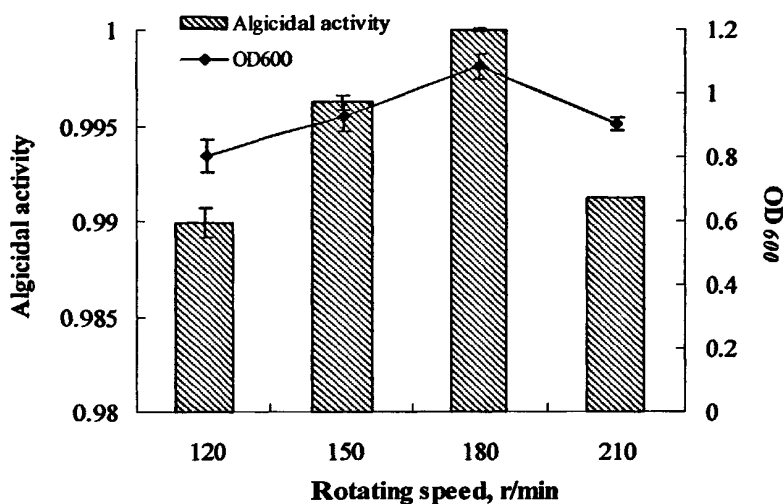


图 3.5 不同转速对抑藻菌 DH46 的生长及杀藻效果影响

Fig. 3.5 The effect of different rotation speeds on the growth and algal lysis effect of *Alteromonas* sp. DH46

转速改变直接影响的就是微生物的溶氧量值，溶氧量的增加可促使菌体生长速度加快，但超速的生长堆积过多的代谢废物反而影响其生长和活性物质的产生。所以过高或过低的溶氧速率都不利于菌体生长。图 3.5 显示在转速为 180r/min 时，生物量和抑藻率分别为 1.085，100%，该值为适宜菌体生长和产活性物质的摇床转速。

综上所述，单因子实验表明 DH46 在以下条件下培养，生长较佳：培养温度为 28℃，适宜的培养基初始 pH 为 7，盐度为 30‰，转速为 180r/min。

2 复合营养源对抑藻菌 DH46 生长及抑藻效果的影响

由于复合营养源，既可以做为碳源又可作氮源的营养物质（如蛋白胨、酵母粉等），可以有效满足菌体生长的正常需求，因此在本实验中，在复合营养源的基础上分别加入各种物质成分，考察它们对复合营养源的营养补充效果，为筛选优化培养基做进一步准备。结果表明胰蛋白胨中的营养成分较适合抑藻菌 DH46 生长，在菌体生物量和抑藻率两方面表现均较佳(OD₆₀₀ 为 1.18，抑藻效率可达 96.9%)，可以作为筛选的初始营养物。

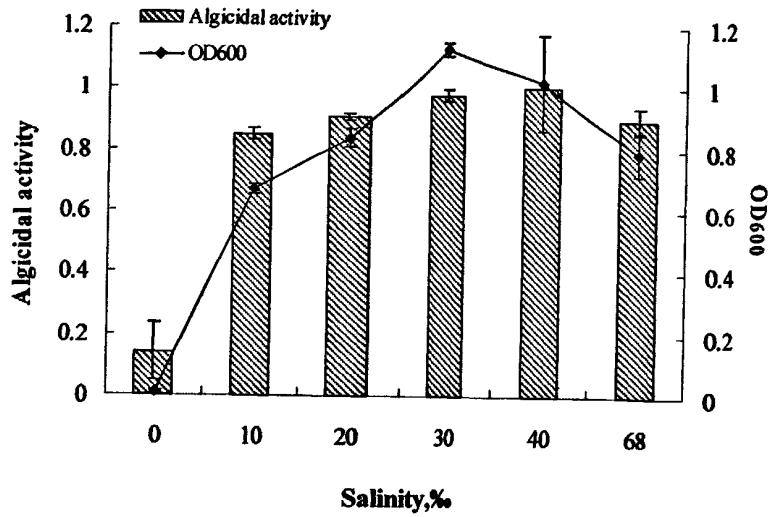


图 3.4 不同盐度对抑藻菌 DH46 的生长及抑藻效果影响

Fig. 3.4 The effect of different salinities on the growth and algal lysis effect of

Alteromonas sp. DH46

图 3.4 显示, DH46 生长及其抑藻活性物质的产生均受到盐浓度显著影响。培养基盐度为 0 时, 菌体几乎不生长, 抑藻率仅为 14.1%; 随着盐度增加菌体生长迅速, 抑藻效果明显增强; 当盐度大于 30‰, 该菌的抑藻率虽有略微增加, 生长明显减慢。因此 30~40‰ 为抑藻菌 DH46 适宜的生长盐度范围。

1.5 不同转速对菌体生长和抑藻效果的影响

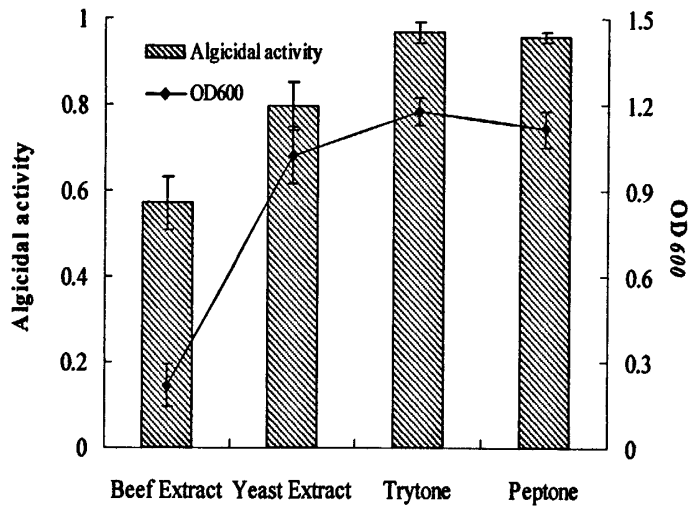


图 3.6 不同复合营养成分对抑藻菌 DH46 的生长及抑藻效果影响

Fig. 3.6 The effect of different complex nutrients on the growth and algal lysis effect of *Alteromonas* sp. DH46

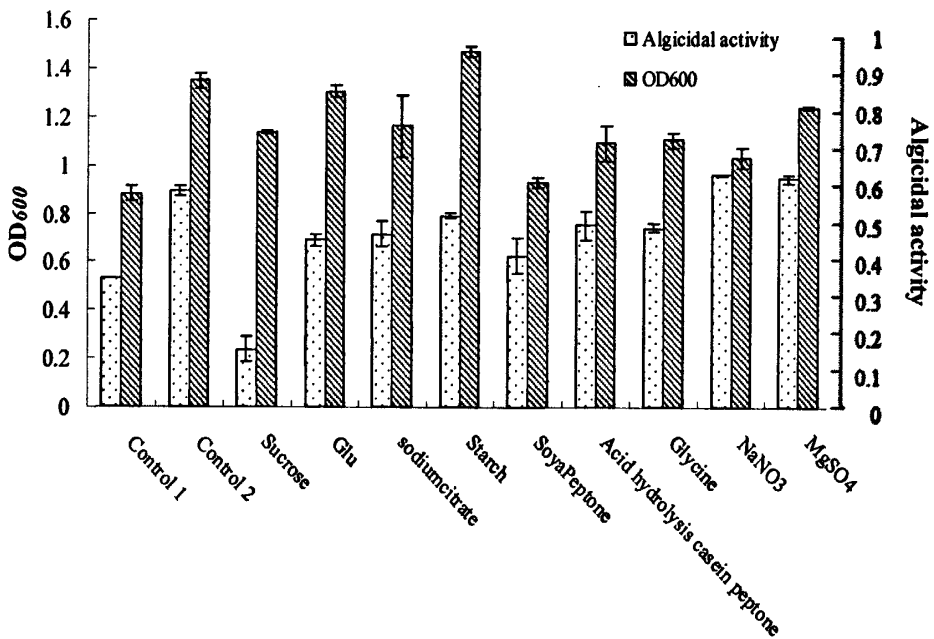


图 3.7 不同添加成分对抑藻菌 DH46 的生长及抑藻效果影响

Fig. 3.7 The effect of adding different supplementary ingredients on the growth and algal lysis effect of *Alteromonas* sp. DH46

图 3.7 中, 对照 1 中仅只加入胰蛋白胨一种成分, 对照 2 为在胰蛋白胨基础上加入酵母粉 (即 Zobell 2216E 培养基)。结果表明, 不同实验组培养基 DH46 的发酵液生物量差别不大, 但是抑藻效果区别明显, 可能由于培养基成分及配比不同影响了 DH46 产活性抑藻物质的能力, 其中原理有待进一步的研究。

仅加有胰蛋白胨的对照 1 无论是生长量还是抑藻率都明显低于对照 2, 即基础培养基; 碳源添加组分中, 添加蔗糖的培养基收获的菌体细胞滤液抑藻率仅为 23.6%, 葡萄糖为 68.9%, 柠檬酸钠为 71.6%, 皆低于原基础培养基的 89.3% 的杀藻率, 表明这些碳源成分对抑藻菌 DH46 分泌活性物质无促进作用; 氮源添加组分中的大豆蛋白胨, 酸水解酪蛋白胨, 甘氨酸的菌体生物量和抑藻率亦不及原基础培养基效果。添加两种无机盐 NaNO_3 、 MgSO_4 的培养基的杀藻率都达到 95% 以上, 有效地提高了菌体产生抑藻物质的能力。考虑到可溶性淀粉对菌体生物量的巨大贡献 (其 OD_{600} 为 1.47), 合用胰蛋白胨、酵母粉、 NaNO_3 、 MgSO_4 都列入影响考虑范围, 参与后续培养基优化过程。

3 基于均匀设计的培养基成分优化

筛选优化抑藻菌复合培养基, 根据单因子实验结果确定胰蛋白胨、淀粉、酵母粉、 NaNO_3 、 MgSO_4 为重要影响因子, 以菌体干重为评价指标, 采用均匀设计法确定该培养基最佳配方组成, 实验设计及结果见表 3.1。

表 3.1 5 因素 15 水平均匀设计表 $U_{15}(5^4 \times 15)$ 及试验结果
 Table 3.1 Uniform design for optimizing fermentation medium
 and experimental results

实验号	胰蛋白胨 (g/L)	淀粉 (g/L)	酵母 (g/L)	NaNO_3 (m/v,%)	MgSO_4 (m/v,%)	DCW (g/L)
1	6	3.86	3.88	0.22	0.23	4.92
2	10	0.5	2.75	0.01	0.3	3.81
3	12	1.63	0.5	0.082	0.16	4.92
4	3	2.75	1.63	0.01	0.083	4.05
5	15	1.63	3.875	0.23	0.083	4.81
6	14	5	1.63	0.16	0.23	5.73
7	7	0.5	1.63	0.3	0.16	3.27
8	1	1.63	3.88	0.083	0.23	3.51
9	5	0.5	5	0.16	0.01	3.63
10	11	2.75	5	0.3	0.3	5.41
11	4	3.88	0.5	0.16	0.3	4.67
12	13	3.88	2.75	0.083	0.01	5.43
13	8	5	5	0.01	0.16	5.65
14	9	2.75	0.5	0.23	0.01	4.63
15	2	5	2.75	0.3	0.083	4.61

由于均匀设计表不具有整齐可比性,故数据处理不能采用方差分析。以下将实验结果经 DPS V_{3.01} 数据软件处理^[7],以调整相关系数 R 最大为原则,进行变量的引入或删除,并对该模型进行显著性检验。通过二次多项式逐步回归分析,建立回归方程为:

$$Y=3.22+0.097X_1+0.48X_2-0.54X_3-0.054X_5+0.0017X_1 \times X_1-0.033$$

式中:调整后的相关系数 $R_a=0.99999$, F 值=38461.5,显著水平 $p=0.004$,剩余标准差 $S=0.00015$,Durbin-Watson 统计量 $d=1.78$ 。该方程能很好地拟合以上营养成分对抑藻菌 DH46 生长及抑藻效果的影响过程,说明该方程对菌体生长的模拟

预测是可信的。对该模型的显著性检验结果，如表 3.2 所示。

表 3.2 回归模型的显著性检验

Table 3.2 The significance test of regression model

因素	偏相关	t 检验值	p 值	因素	偏相关	t 检验值	p 值
X ₁	1	1825.06653	0	X ₄ *X ₄	-1	317.42886	0.00001
X ₂	1	1576.85232	0	X ₁ *X ₄	-1	935.00321	0
X ₃	-1	2620.79079	0	X ₂ *X ₃	1	586.15807	0
X ₅	-0.99978	47.38144	0.00045	X ₂ *X ₄	-0.99987	62.50111	0.00026
X ₁ *X ₁	1	472.74626	0	X ₃ *X ₄	1	1321.30416	0
X ₂ *X ₂	-1	772.99653	0	X ₃ *X ₅	0.99999	281.63626	0.00001
X ₃ *X ₃	1	3182.24638	0				

由表 3.2 变量显著性检验 p 值的大小可以知道，因素之间存在交互作用。

根据回归方程得到优化方案：X₁（胰蛋白胨）14.0g/L，X₂（可溶性淀粉）5.0g/L，X₃（酵母粉）1.63g/L，X₄（NaNO₃）1.6g/L，X₅（MgSO₄）2.3g/L 时，Y 值（菌体干重）达最大，为 6.37g/L。

将初始培养基和优化后配方分别用于 DH46 的摇瓶培养，培养条件均采用优化培养条件。根据以上优化配方进行 3 次重复试验，并与原培养基进行比较，结果如表 3.3。在摇瓶中培养 24h 后，获得菌体干重和抑藻率分别为 7.36g/L 与 98.4%，比优化前提高分别提高了 107% 和 10%。验证实验说明通过均匀设计优化抑藻菌培养基成分的合理性，并获得了较高的活菌数。

表 3.3 优化前后培养效果对比

Table 3.3 The comparison effects between the original and the optimization media

	菌体干重 g/L			杀藻率 %	
	1	2	3	平均值	平均值
原始培养基	3.41	3.67	3.59	3.56	89.3
优化培养基	7.22	7.41	7.44	7.36	98.4

4 海藻酸钠-微孔淀粉包埋固定化研究

4.1 影响包埋固定化因素的考察

海藻酸钠是一类天然高分子多糖,对微生物无毒害作用。但其浓度会影响固定化细胞的机械强度、物料传递等,进而影响微生物的活性。利用生物相容性良好的材料包埋菌体,形成直径较小、分布均匀的固定化胶珠,每一颗固定化胶球如同一个微型反应器,而胶珠的大小决定该生物反应界面。理论上粒径越小,其比表面积就越大,反应速率也越快;营养物质等的扩散路径缩短,氧气和营养物质能够迅速进入球内,同时代谢产物也可及时地扩散到外,减小产物抑制作用。另一方面,机械强度不仅决定固定化胶珠在制备过程中的稳定性,而且决定其在生物环境应用期间能否保持完整性,以保证球内微生物及其活性物质发挥反应功能。故该实验,综合胶珠粒径及表征机械强度的形变率考察各制备条件对抑藻菌包埋效果的影响。

4.1.1 海藻酸钠浓度的影响

实验中仅改变海藻酸钠溶液的质量分数,考察其对包埋胶珠直径及机械强度的影响。实验结果表明,随着海藻酸钠浓度的增加,固定化胶珠粒径从 2.63mm 增加到 3.36mm。而胶珠的曲径形变率则随着 SA 浓度的增加而逐渐减小,表明其强度增强,制备得的胶珠内部环境越接近于固态环境,弹性较弱。当 SA 浓度高于 30g/L,微球成球形较差,继续增加到 40g/L,则溶液粘度增大,滴加时阻力大;但并非浓度越低越好,浓度过低,如 10g/L,滴加速度难以控制。

因此,合适浓度的海藻酸钠易形成机械强度适宜的凝胶微珠,同时传质效果良好,胞外代谢产物易于从凝胶微孔扩散通过。综合考察,优化出合适的海藻酸钠浓度为 20g/L。

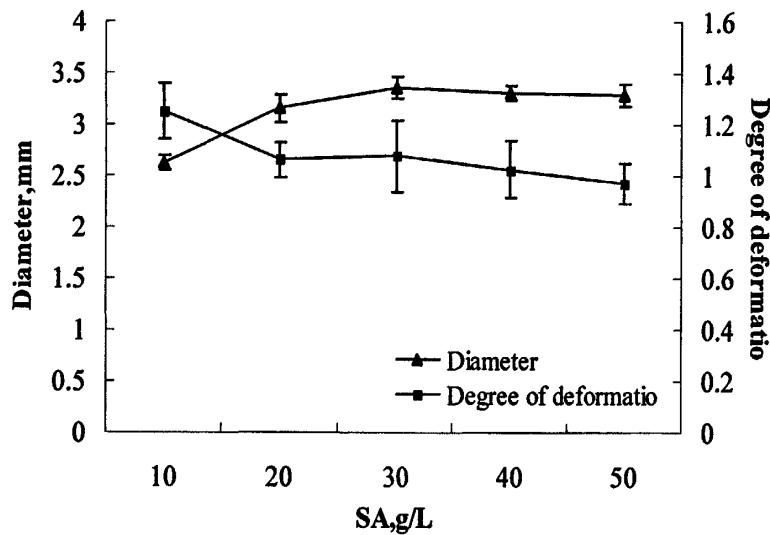


图 3.8 固定化微珠平均粒径与海藻酸钠浓度的关系

Fig. 3.8 The diameter of immobilized beads versus the cocentration of alginate

表 3.4 海藻酸钠浓度对固定化颗粒包埋效果的影响

Table3.4 The effect of concentration of alginate on immobilized beads

实验号	海藻酸钠 (g/L)	溶液粘度	制备难易 程度	成型情况	破损率	颗粒传质 性能
1	10	粘度过稀	容易	米粒状，颗粒较小	5%	++
2	20	粘度适合	容易	均匀球状，无拖尾	0	+++
3	30	粘度中等	较容易	球形颗粒，大小均匀， 略拖尾	1%	+++
4	40	粘度大	不太容易	近小球状，拖尾	2%	+
5	50	粘度过大	较困难	近球状，大颗粒，拖尾较严重	2%	+

注：颗粒传质性能，+差，++较好，+++好。

4.1.2 微孔淀粉浓度的影响

微孔淀粉由于其表面具有很多伸向中心的小孔，因而具有良好的吸附性能，在本实验中它不仅对抑藻菌起吸附作用，也作为芯材增加胶球的强度。实验结果显示随着微孔淀粉浓度的增大，微球的粒径小幅度增加，机械强度则明显增强。提高芯

材的质量分数，可有效增加吸附的菌体数量，但继续增大 MS 的量会使得底物运动扩散更加困难，降低细胞活力。由图 3.9 可知，适宜的微孔淀粉的浓度在 20~25 g/L 之间，以 20 g/L 为宜。

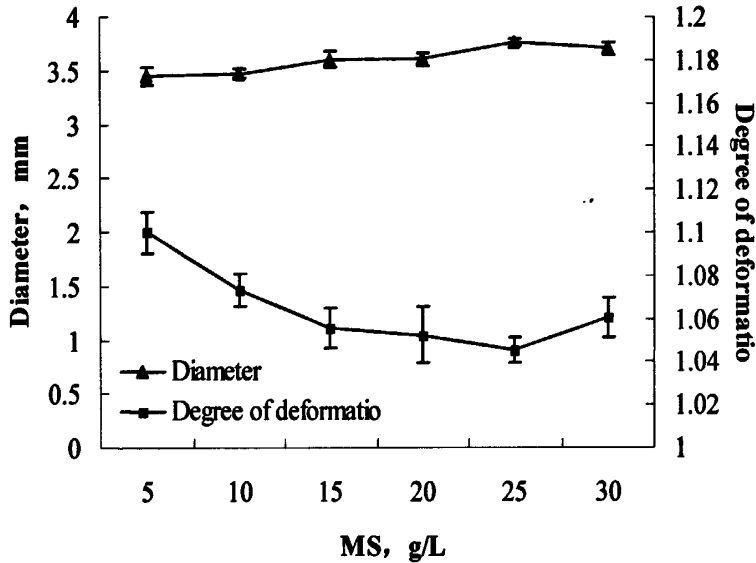


图 3.9 固定化微珠平均粒径与微孔淀粉浓度的关系

Fig. 3.9 The diameter of immobilized beads versus the cocentration of microporous starch

4.1.3 氯化钙浓度的影响

在海藻酸钠包埋固定化过程中，固化液 CaCl_2 中的钙离子与海藻酸根离子螯合形成不溶于水的“蛋格”结构。钙离子浓度较低时，蛋格结构较为疏松，微球粒径大；钙离子浓度增加，蛋格结构紧致，粒径减小，当蛋格中钙离子饱和时，微球粒径趋于稳定。因此 CaCl_2 的浓度对形成胶珠的机械强度有重要影响。从图 3.10 中可以看出，在考察浓度范围内， CaCl_2 对于包埋固定化微珠的粒径影响较小。当 CaCl_2 溶液浓度低于 30g/L 时，固定化胶珠较软、强度较差；大于 50g/L 时，胶珠弹性差且又部分聚积。考虑到钙盐的高渗透压作用可能对抑藻菌的生物活性造成不良影响，因此选择适宜的 CaCl_2 浓度为 30g/L。

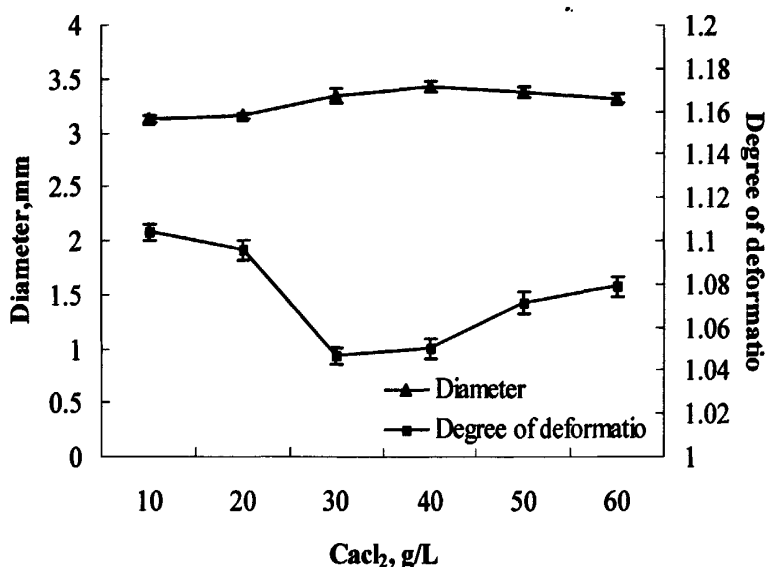


图 3.10 固定化微珠平均粒径与氯化钙浓度的关系

Fig. 3.10 The diameter of immobilized beads versus the cocentration of calcium chloride

4.2 包埋固定化后形态观察

上述实验结果得出优化的包埋固定化方案为：海藻酸钠浓度 20g/L，微孔淀粉浓度 20g/L，CaCl₂ 浓度为 30g/L。采用该条件，利用挤压法制备出抑藻菌 DH46 的固定化胶珠，其形态如图所示，胶珠呈圆形、无粘连的紧实球状结构，白色不透明，粒径大小 3.20 ± 0.08 mm，具有一定的弹性和强度，通透性较佳。

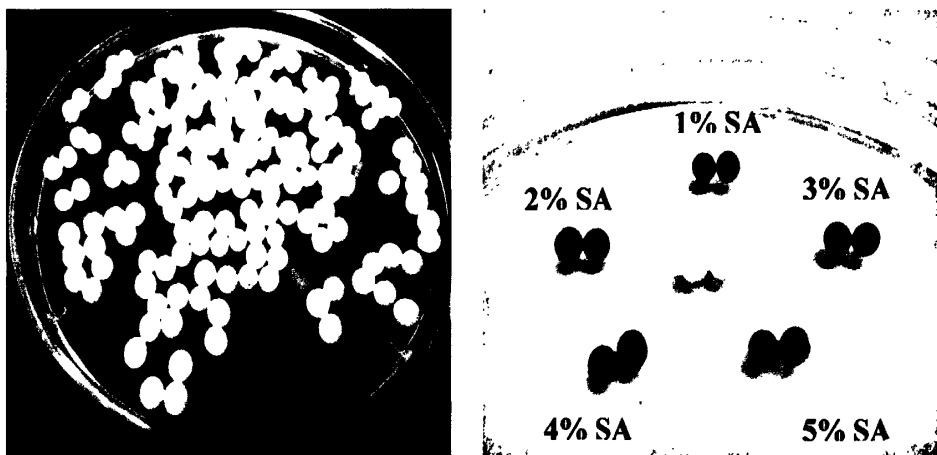


图 3.11 海藻酸钠-微孔淀粉包埋固定化凝胶小球及其性质

Fig. 3.11 The morphology and properties of the alginate - microporous starch immobilized gel beads

4.3 包埋固定化对抑藻菌 DH46 生长特性的影响

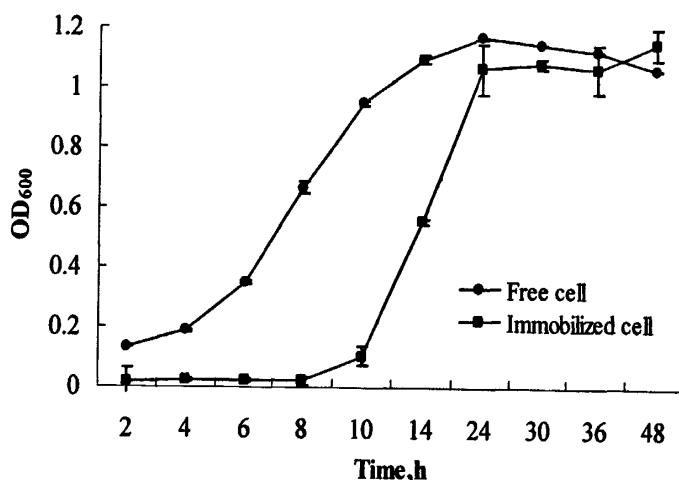


图 3.12 游离培养与包埋固定化对抑藻菌 DH46 生长的影响

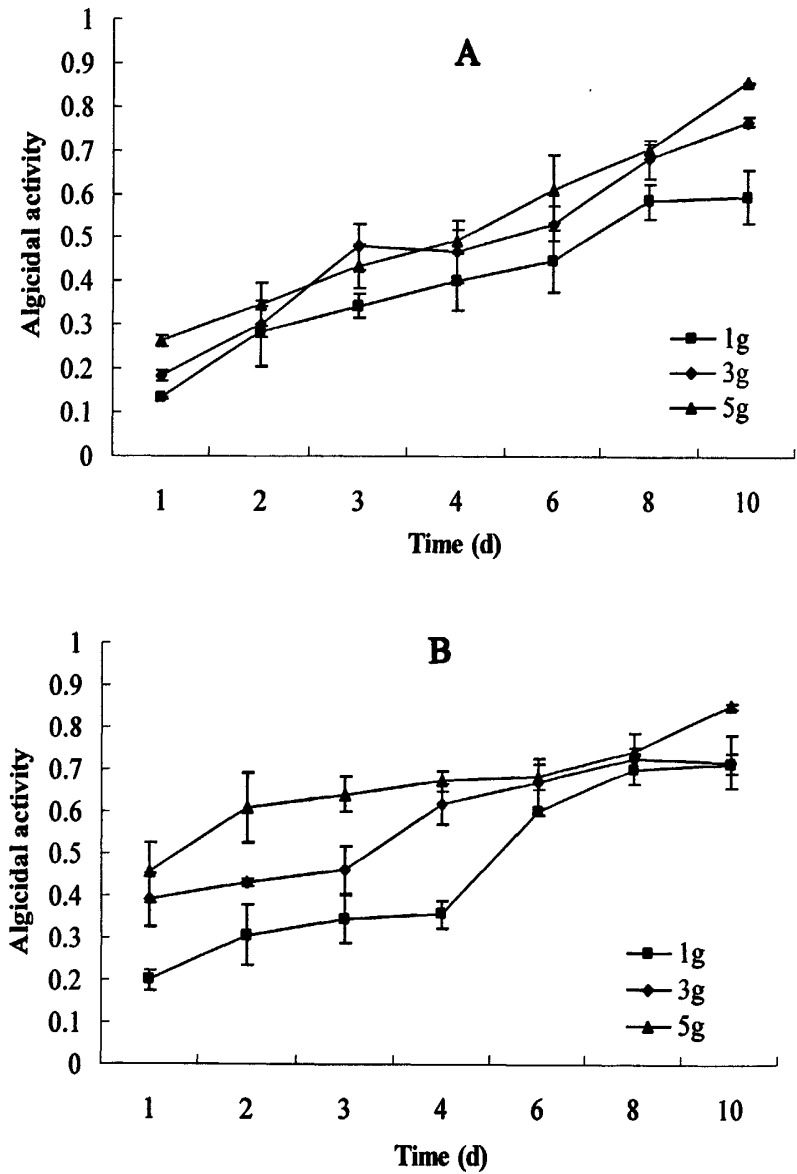
Fig. 3.12 The effect of free culture and immobilization culture on growth of algicidal bacterium DH46

图 3.12 为抑藻菌 DH46 游离培养和海藻酸钠-微孔淀粉复合固定化培养生长曲线。结果表明, 2 种培养方式的细胞生长规律相似, 均呈现“S”型生长规律, 表明 SA-MS 包埋体系能够维持抑藻菌 DH46 的正常生长, 具有良好的生物相容性。固定化培养初期的菌体生长速度低于游离方式, 在经历了一段较长的延滞期后菌体快速生长, 进入稳定期后两种方式培养的细胞密度都维持在相近的范围内。

这可能是由于海藻酸钠微囊膜及其内部多孔结构的微孔淀粉对物质扩散具有一定的阻滞作用, 同时包埋胶珠内部结构对抑藻菌生长也有一定程度的空间限制作用, 使得包埋固定化细胞进入对数期略微滞后。当菌细胞经历了适应阶段后, 在浓度梯度推动下, 细胞生长进入稳步增长阶段。此时包埋微球能够给菌体提供一个相对稳定、均匀的微环境, 消除代谢产物抑制、降低物理损伤。使得培养后期菌细胞密度与游离培养基本接近。

4.4 包埋固定化小球抑藻实验

为考察包埋固定化小球的运行方式，采取三种不同添加方式作用于塔玛亚历山大藻，测试藻细胞初始浓度 1.5×10^4 cell/ml。将包埋固定化小球直接投入藻体，记为方式 A；投入包埋小球，并添加适量 2216E 培养基，记为方式 B；采用包埋固定化微球活化后的无细胞滤液进行抑藻测试，记为 C。通过连续几天的测量，监测作用期间塔玛亚历山大藻细胞密度的变化，结果如图所示。



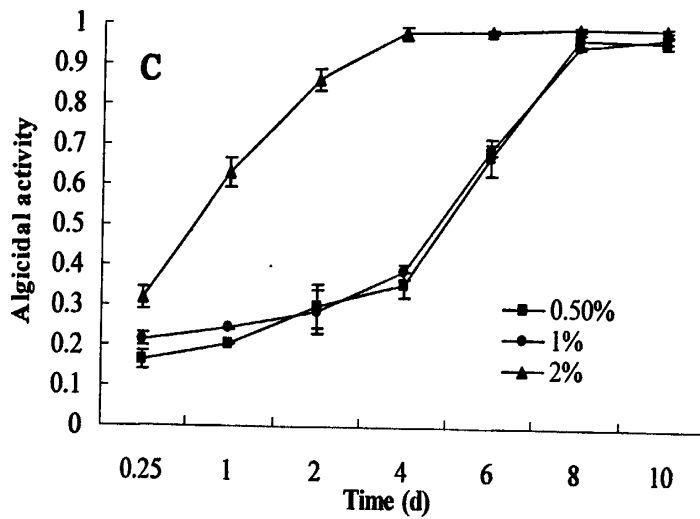


图 3.13 包埋固定化凝胶微球的抑藻实验

Fig. 3.13 The algicidal effect of the alginate - microporous starch immobilized gel beads with different operations

图 3.13 A 显示，向藻体中直接投加 1g，3g 和 5g 的包埋固定化微球，作用 10d 后抑藻率分别为 59.6%，76.7%和 85.7%。随着投加的固定化微球数量的增加和作用时间的延长，抑藻效果呈逐渐增加的趋势。补充 1ml 2216E 培养液的 B 组中，投加 1g，3g 和 5g 的包埋固定化微球，作用 10d 后抑藻率分别为 71.5%，78.8%及 91%，较之 A 组抑藻率略有提高。利用固定化微球的发酵上清进行抑藻实验，C 组结果显示添加量较低，如 0.5%和 1%时，抑藻作用前期效果不明显，10d 后抑藻率分别提高至 96.5%和 97.1%；添加量提高至 2%后抑藻率在 24h 就达到了 63.2%，随着作用时间的增加抑制效果持续增强，10d 抑藻率达到了 99.6%。综上，抑藻菌 DH46 的包埋固定化小球三种运行方式中，其发酵滤液最快表现出抑藻效应，直接投加固定化微球对塔玛亚历山大藻具有较好的抑制作用，在添加适量菌体培养液后抑藻率有所提升。

5 利用聚氨酯泡沫固定化抑藻菌 DH46

5.1 固定化载体内菌体计数方法的比较

采用 PUF 载体固定化培养细菌时，细胞既可以在载体内外表面及载体内部丰富的空隙结构中生长，也可以在载体外的培养基中悬浮生长。因此有必要建立一种较

为稳定可靠的方法来测定固定化的抑藻菌菌体密度。为此设计了两种不同的获得固定化 PUF 内菌体的方法：挤压法和超声法，分别独立进行 3 次实验。

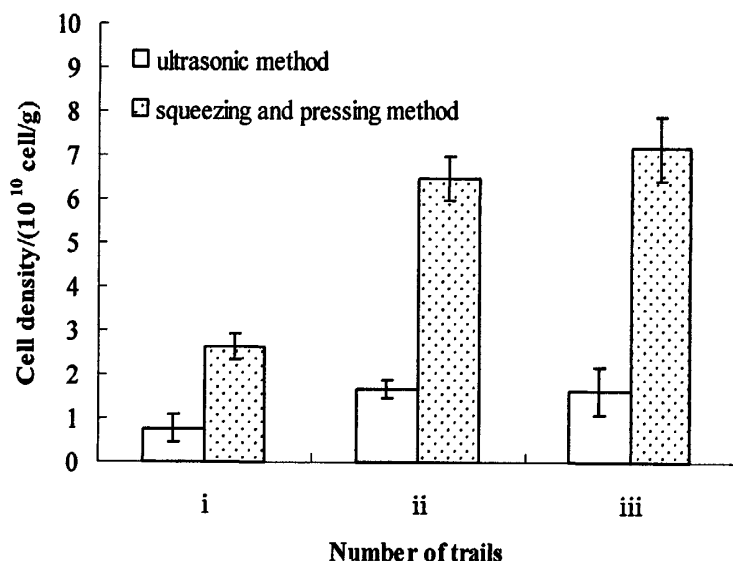


图 3.14 固定化载体内菌体计数方法的比较

Fig.3.14 The comparison of elute the immobilization cells with ultrasonic and squeezing methods

由图 3.14 可知，采用挤压的方式洗脱 PUF 内的固定化细胞效果比较好，效率大约是超声法的 3-4 倍。连续挤压、洗脱两三次后，洗脱液内的菌体浓度已经较低。可见，利用反复挤压载体的方式洗脱固定化的细胞是可行的。经过外力的挤压，悬浮于载体空隙中的菌体很容易洗脱下来，而吸附于载体表面的菌体也会因为外力的作用打破原来的吸附平衡，逐渐解吸附至洗脱液中。

分析比较以上两种洗脱方式的实验结果，确定了测定载体内固定化菌体浓度的方法。即分离得到载体后，每次加入 25mL PBS 缓冲液，连续两、三次挤压洗脱载体，测定洗脱液内的菌体总和为固定化的总菌体量。

5.2 抑藻菌 DH46 在聚氨酯泡沫固定化载体上的吸附情况

研究了抑藻菌 DH46 在聚氨酯泡沫固定化载体上的吸附，将 25mL 预先培养好、菌体密度为 3.0×10^8 cell/mL 的菌悬液加入到含有 1.0g 聚氨酯立方颗粒的 250mL 摇瓶中，28℃，150r/min 摇床转速下进行吸附实验，定时取样测定载体内外的菌体

密度，计算吸附率。结果如图 3.16 所示。

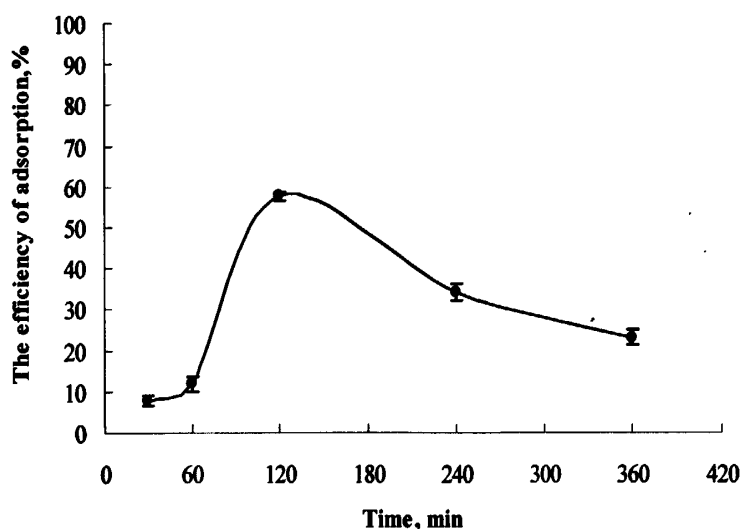


图 3.15 抑藻菌 DH46 在聚氨酯泡沫固定化载体上的吸附情况

Fig. 3.15 Sorption percentage of algicida bacterium *Alteromonas* sp. DH46 onto PUF as a function of time

由图 3.15 可知，菌体在固定化载体上的吸附率先随吸附时间的增加而急剧升高，在 120min 达到 57.8% 的最高吸附率，吸附菌细胞数可达 1.44×10^{11} cell/g，而后吸附率逐渐降低。经过 360min 左右载体内外菌体浓度变化不再明显，吸附率趋于稳定，即固定化载体上的吸附基本达到平衡。这说明 PUF 载体疏松多孔的结构和较高的比表面积可有效的物理吸附抑藻菌细胞，较短平衡时间内即可吸附较多菌体。尽管数值上吸附率并不高，可能的原因是 PUF 固定属于不完全固定方式，除了吸附的菌体外，还有一部分菌体是以悬浮的形式半固定化在泡沫空隙中。由于泡沫载体给细胞生长提供了一个良好的支持和保护的环境，且疏松多孔的特质使得吸附的菌体细胞均与外界良好相通，故而处于一种吸附的动态平衡状态，相较于游离培养效果，聚氨酯泡沫吸附的细胞数量上又是极为可观的。这说明采用简单的物理吸附固定化方法培养抑藻菌 DH46 存在一定的优势。

5.3 抑藻菌在 PUF 固定化载体上的生长分布情况

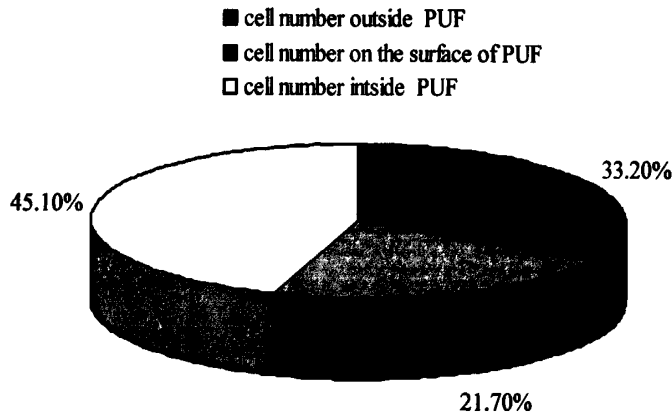


图 3.16 PUF 固定化培养抑藻菌的菌体分布

Fig 3.16 The distribution of algicidal bacterium DH46 immobilized on PUF

测定结果显示载体内吸附菌体数明显高于游离细胞数，而载体内部和表面的菌分布则占到了 66.8%，说明 PUF 载体可以为菌体提供丰富的生存空间。由于载体外游离的细菌仍占到了 33.2%，说明在摇床振荡培养的实验条件下，菌体在 PUF 载体与液体培养基之间可能处于一种动态平衡中，部分菌体与载体结合不太紧密，或大部分悬浮于微孔结构中，因此固定化比率不是太高。所以从严格意义上讲，PUF 固定化属于半固定化培养方式，不仅内外 PUF 表面为菌体提供了一个良好的吸附界面，而且充分的微孔结构也为菌体提供了适宜的微型悬浮生长空间。

5.4 影响固定化因子的考察

5.4.1 聚氨酯泡沫载体尺寸对固定化培养的影响

不同尺寸的固定化载体将导致不同的传质阻力，载体颗粒之间、载体与摇瓶壁的摩擦力也不相同。为此考察了添加量为 1g PUF 时，不同尺寸固定化培养杀藻菌 DH46 的情况。将 PUF 分别切成 5mm³、10mm³、15mm³、20mm³大小的立方体，取 1.0g 聚氨酯泡沫置于装有 50mL 2216E 液体培养基的 250mL 三角瓶中。采用平行挤压式方法洗脱聚氨酯泡沫内的菌体，而后稀释涂布计数。实验结果如图 3.17 示。

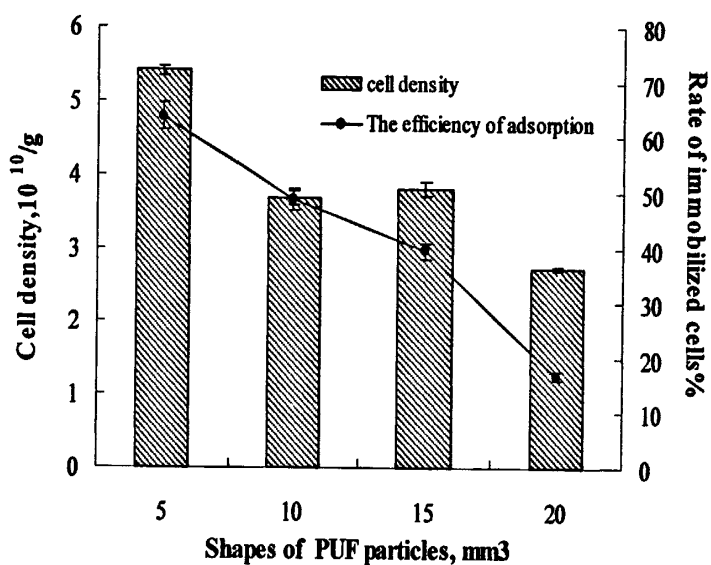


图 3.17 聚氨酯泡沫载体尺寸对固定化培养的影响

Fig.3.17 The effect of PUF shapes on immobilized algicidal bacteria of *Alteromonas* sp. DH46 growth

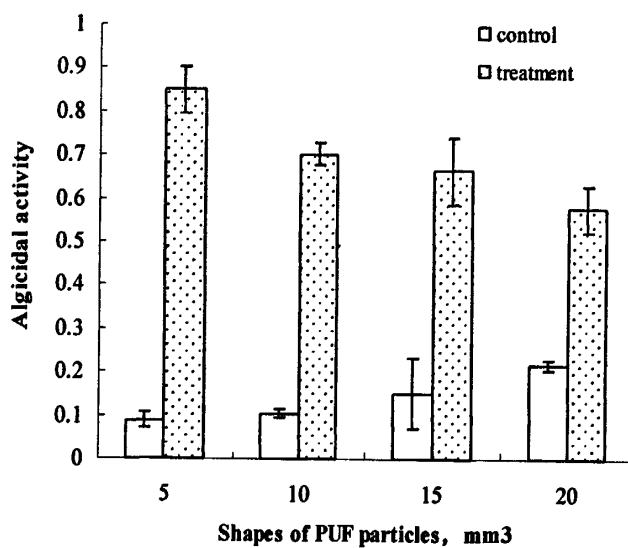


图 3.18 不同尺寸的聚氨酯泡沫载体杀藻效果

Fig.3.18 The effect of PUF shapes on algicidal effect of immobilized *Alteromonas* sp. DH46

由图 3.17 可知,不同尺寸的 PUF 固定化效果差别非常明显。各种载体中,5 mm³ 立方体泡沫吸附的菌体密度最大,载细胞数达到了 5.4×10^{10} cell/g, 吸附效率为 63.8%, 固定化效果最好。这与原先预测相符,尺寸越小其固定化效果越好,即 PUF 载体中的吸附菌体密度越高。因尺寸越小其比表面积越大,较小的 PUF 载体的营养物质传递路径较短,有利于菌体生长,且小颗粒载体在摇瓶震荡培养过程中的碰撞摩擦力较之大颗粒要小的多。

对不同尺寸 PUF 固定化的 *Alteromonas* sp. DH46 的抑藻效果进行了比较,图 3.18 显示体积越小的 PUF 其抑藻效果也越好,5mm³ 的 PUF 杀藻率可达 84.9%。图中对照是通过添加同中密度等质量的空白泡沫实现的,表明空白泡沫载体对藻细胞也存在一定的吸附效应。比较不同尺寸 PUF 对照组杀藻率在总杀藻率中占的比重,可知在同等密度相同添加量的条件下,PUF 对藻细胞的吸附能力随体积的增大而减少。这与其对抑藻菌细胞的吸附能力的变化规律是一致的。故而选择 5mm³ 的 PUF 颗粒作为固定化载体。

5.4.2 聚氨酯泡沫添加量对固定化培养的影响

在一定体积的反应体系中,固定化载体的数量不仅对菌体细胞的吸附量有影响,过多的泡沫载体也会增加培养环境中的剪切力或摩擦力,并且占据摇瓶培养空间,影响各方面的传质及流通。因此在确定了 PUF 载体的大小后,继续考察 PUF 的添加量对固定化杀藻菌的影响。不同泡沫载体添加量下抑藻菌 DH46 的生长情况如图 3.20 所示。

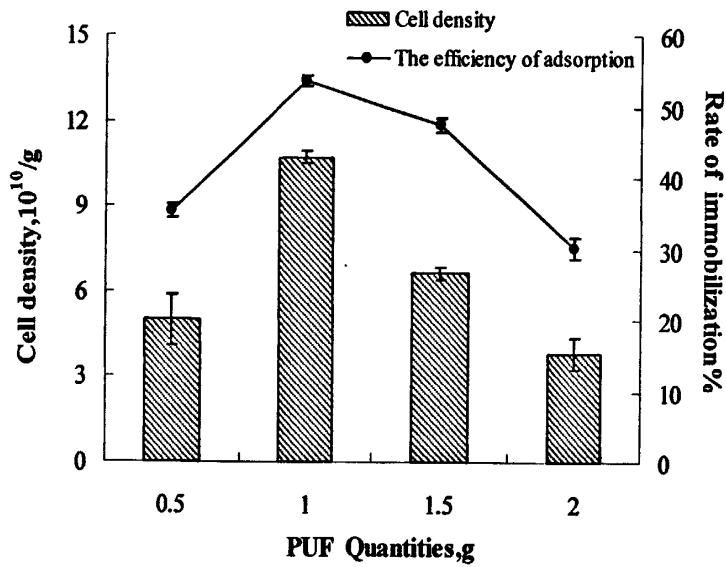


图 3.19 聚氨酯泡沫添加量对固定化培养抑藻菌 DH46 的影响

Fig. 3.19 The effect of PUF quantities on immobilized algicidal bacterium of *Alteromonas* sp. DH46 growth

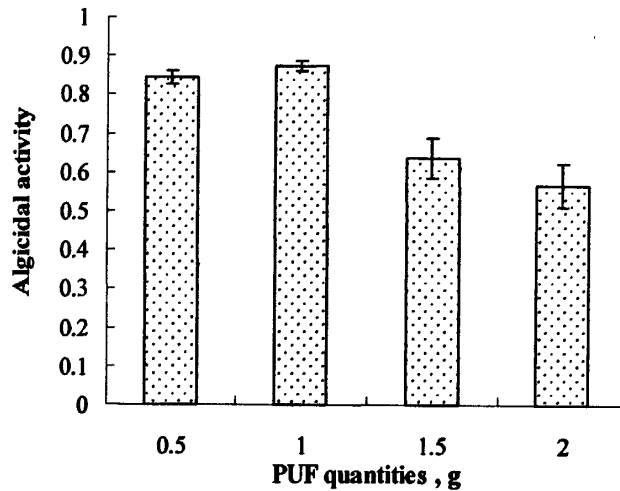


图 3.20 不同添加量的聚氨酯泡沫载体对抑藻效果影响

Fig. 3.20 The effect of PUF quantities on algicidal effect of immobilized *Alteromonas* sp. DH46

由图所知,随着 PUF 载体添加量的增加,抑藻菌 DH46 固定化培养密度先逐渐提高而后下降,添加量为 1g PUF 时,固定化菌体密度和吸附率最大,分别为 1.07×10^{11} cell/g 和 53.6%。过多的添加 PUF 固定化载体将会增加泡沫的物理磨损,减

少吸附面积，频繁的撞击也增加了剪切力，不利于菌体吸附生长，故而得不到较高的菌体密度。添加 0.5g, 1.0g 固定化泡沫的抑藻效果分别为 84.6%和 87.4%，相差不大，继续增加载体的量则其对藻体的抑制效果明显下降，皆因添加较多载体其载菌数下降所致。此处的抑藻率是扣除空白泡沫对藻体的吸附率后的数值。因此选定 PUF 添加量为 1.0g。

5.4.3 接种量对固定化培养的影响

聚氨酯泡沫对于菌体细胞的吸附固定存在饱和效应，故考虑了初始接菌的浓度大小的影响。在 50mL 培养基中加 1g PUF 载体，初始菌体浓度为 2×10^6 cell/mL，按照不同比例（0.05%，0.5%，1%，5%和 10%）接入含有 50ml 培养基的 250mL 锥形瓶中，28℃，150r/min，培养 24h，结果如图 3.21 所示。

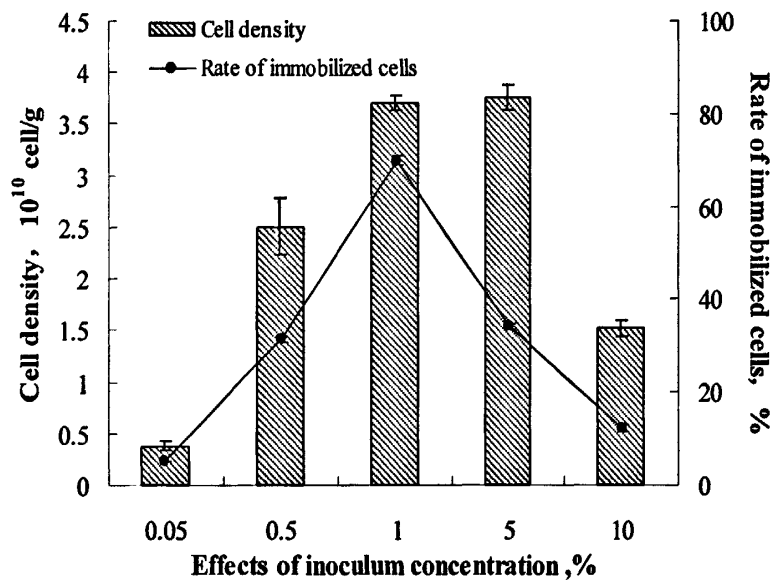


图 3.21 接种量对固定化培养的影响

Fig. 3.21 The effect of inoculum concentration on immobilized algicidal bacterium of *Alteromonas* sp. DH46 growth

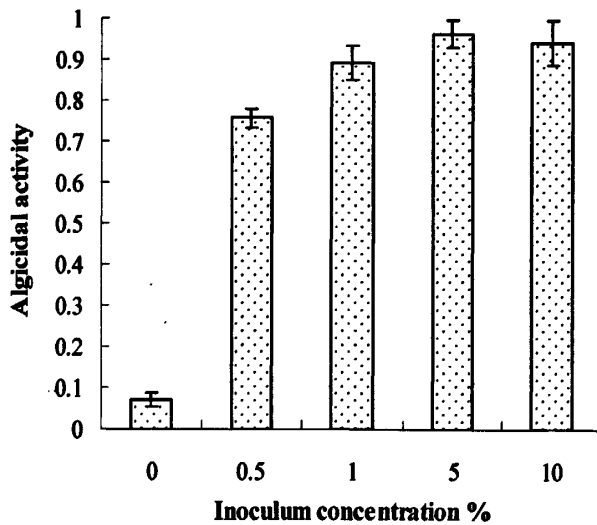


图 3.22 不同接种量对抑藻效果的影响

Fig.3.22 The effect of inoculum concentration on algicidal effect of immobilized *Alteromonas* sp. DH46

如图 3.22 所示接种量对于菌体固定化培养及抑藻效果皆有较大影响。增大接种量，由于细胞初始密度大则其增殖速度也快，泡沫载体吸附的固定化细胞数相应增加，但过多的菌体相互竞争养料和生活空间，随着培养时间的延长菌体自溶增加，其吸附效率反而下降。1%的菌体接种量可吸附 3.7×10^{10} cell/g 的菌体，吸附率为 69.8%，其抑藻效果亦较为明显，可去除 89.1% 的藻细胞数。择优选择 1% 的接种量。

5.5 PUF 固定化抑藻菌的抑藻实验

根据已经确定的固定化条件，在 250mL 摇瓶中添加 1.0g 的 5mm^3 PUF 载体，接入 1% 初始菌体浓度为 $1-2 \times 10^6$ cell/mL 的抑藻菌 *Alteromonas* sp. DH46，在 28°C ，150r/min 摇床转速下培养，取固定化颗粒进行抑藻测试。

5.5.1 菌株 DH46 抑藻过程中藻细胞形态变化

通过显微镜直接镜检，观察了添加 PUF 固定化抑藻细菌 DH46 后藻细胞在不同取样时间的形态。在藻培养液中添加空白聚氨酯泡沫对塔玛亚历山大藻生长没有明显影响，同样显微镜下观察，添加空白 PUF 后藻细胞形态（图 3.24a）同对照（图 3.24b）相似，藻细胞结构完整、饱满。随着 PUF 固定化培养 DH46 的加入和抑藻活性的表现，塔玛藻有明显的凝聚现象，藻细胞先是细胞收缩，胞质变得较为致密，

24h 时细胞已经丧失运动性，沉于锥形瓶底部；其后细胞变得松垮，接着甲壳破裂，释放内容物，分解殆尽最后仅存下破裂的甲壳。

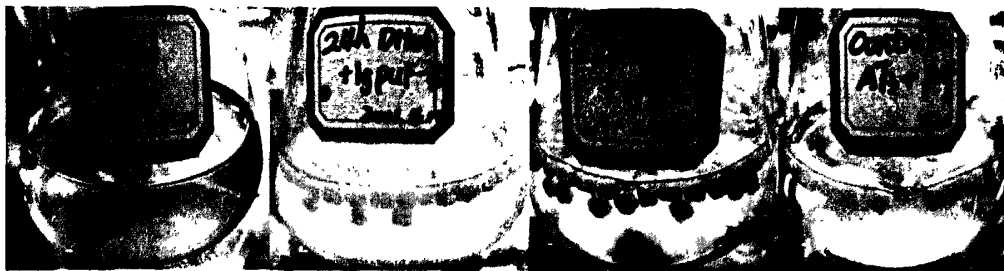


图 3.23 锥形瓶抑藻实验现象 a：空白藻液；b：作用 24h 后的藻液 c：作用 48h 后的藻液；d：加有空白 PUF 载体的藻液

Fig. 3.23 Algae-lying effect by bacterium DH46 on *Alexandrium tamarense* in the flasks

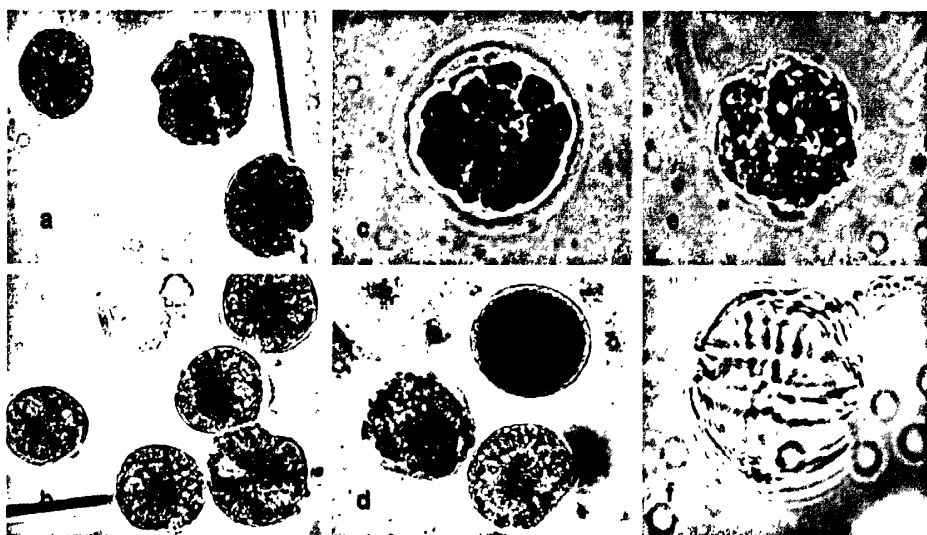


图 3.24 PUF 固定化细菌 DH46 抑藻效果图。a：正常藻细胞；b：添加空白 PUF 的藻细胞；c、d：作用 24h 后的藻液；e、f：作用 48h 后的藻液

Fig. 3.24 Algicidal effects of immobilized strain DH46 on *Alexandrium tamarense* with the fluorescence microscopy

将培养 24h 的固定化有 DH46 菌细胞的 PUF 载体于风机下阴干 20-24h, 吸附有

菌体的聚氨酯泡沫质量较之吸附前增加了 6-8 倍。取风干后不同质量的固定化泡沫载体(0.5g, 1.0g, 2.0g)加入 100mL 处于稳定期生长的塔玛亚历山大藻液中 ($1-2 \times 10^4 \text{ cell/mL}$), 作用期间取样计数, 观察抑藻效果。结果如图 3.25 示。观测发现, 增加固定化菌体的投加量, 塔玛亚历山大藻的凝聚现象越明显, 对其抑制作用也越强。添加量为 2.0g 的实验组反应 48h 后抑藻率达到了 86.1%, 随着作用时间逐渐延长, 抑藻效果进一步增加, 凝聚的藻细胞会进一步裂解、减少。

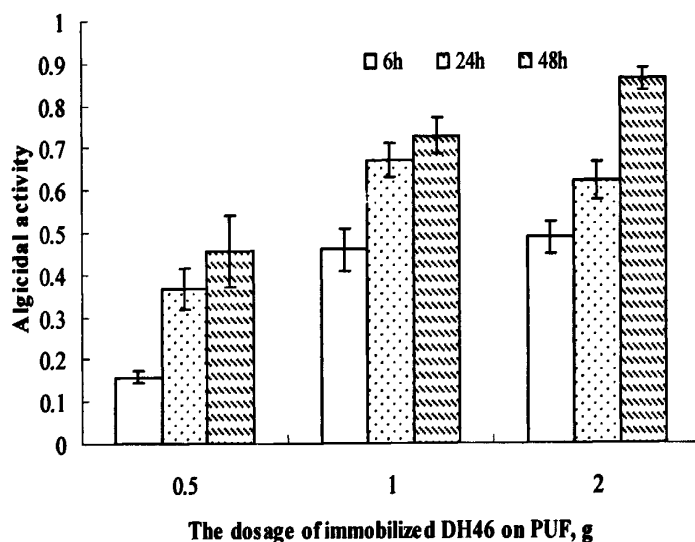


图 3.25 固定化培养抑藻菌 DH46 的投加量对抑藻效果的影响

Fig. 3.25 Influence of immobilized DH46 dosage on the algae-lying effect

5.5.2 电镜观察抑藻菌在 PUF 表面的生长状况

根据已经确定的固定化条件, 在 250mL 摇瓶中添加 1.0g 5mm^3 PUF 立方状载体, 接种抑藻菌 DH46 后在 28°C , 150r/min 条件下培养 24h 和 48h。取样测定载细胞数, 并于扫描电镜下观察表面。

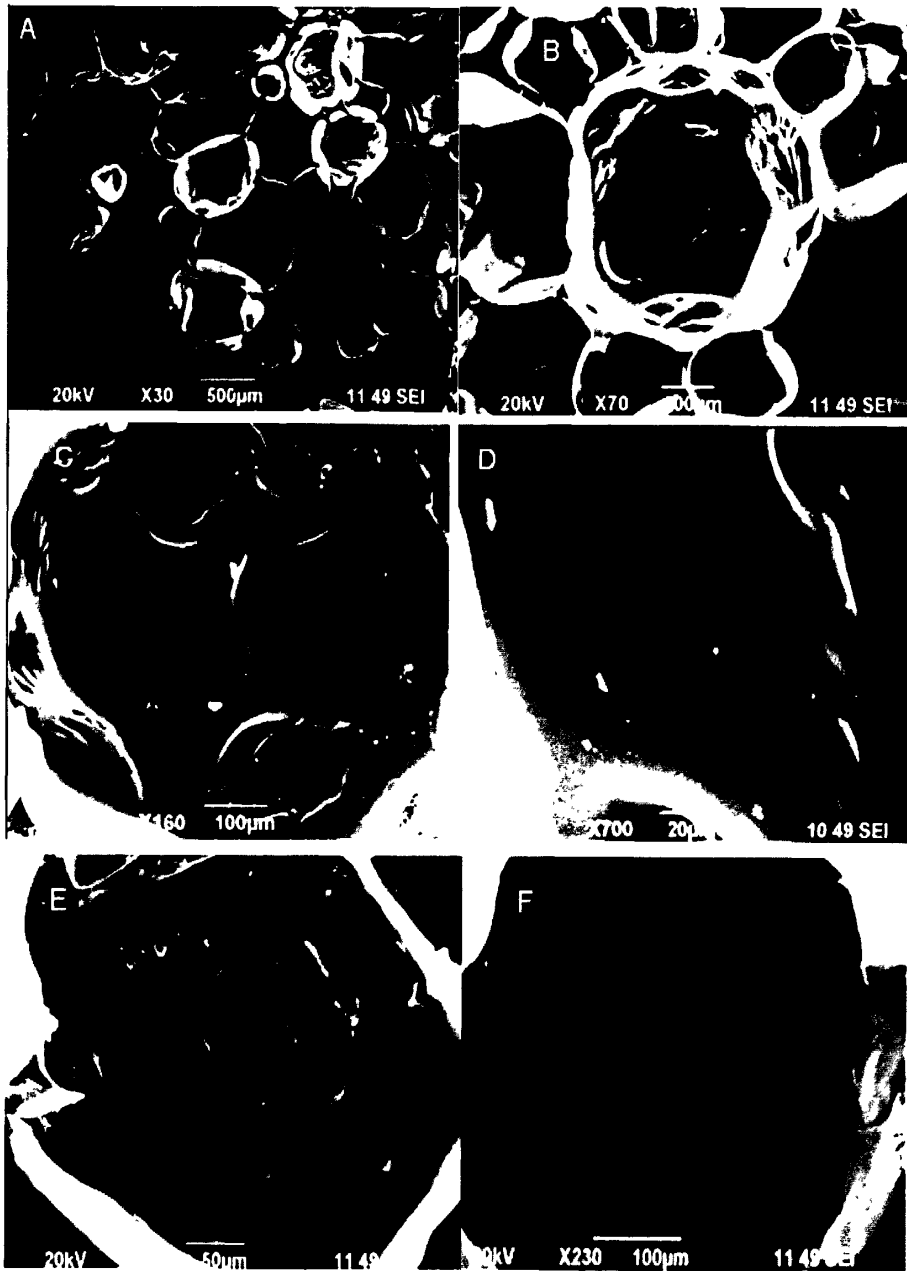


图 3.26 聚氨酯泡沫固定化抑藻菌 DH46 的扫描电镜图。A、B 空白泡沫载体， C、D 培养 24h 的固定化载体， E、F 培养 48h 的固定化载体

Fig. 3.26 The observation of immobilized *Alteromonas* sp. DH46 on PUF by SEM

由图 3.26 可知抑藻菌 DH46 在聚氨酯泡沫中生长良好，在培养初期 12-24 h 即有菌体吸附到了载体上，结果显示，培养 12h 的固定化泡沫载体可吸附 1.47×10^{10} cell/g 的菌细胞，24h 吸附细胞数达 5.26×10^{10} cell/g，培养 48h 后随菌体

衰亡及解吸附其固定化细胞有所下降,为 $2.44 \times 10^9 \text{ cell/g}$ 。游离培养 24h 后菌细胞密度为 $2.45 \times 10^8 \text{ cell/mL}$, 相同条件下 1.0g 固定化培养的 PUF 载体可载细胞 $1.05 \times 10^9 \text{ cell/mL}$, 较之游离培养方式细胞数提高了近 4 倍。扫描电镜下显示聚氨酯泡沫具有疏松多孔的特性,但孔径大小和粗糙程度各异,孔径与细胞尺寸相比较大,且内外表面都能作为固定化吸附的界面。菌细胞在固定化材质表面分布并不均匀,既有单个成簇存在,生长的后期结团积聚现象明显,泡沫表面和内部都吸附有菌体细胞。

5.5.3 实验室现场模拟

为了实现聚氨酯泡沫吸附法固定化抑藻菌的实际应用,将藻培养规模扩大至 10L,按照 PUF:藻液=2g:1L 的比例进行抑藻实验。模拟实验的抑藻结果如图 3.27 所示。

在实验室条件下模拟的单细胞赤潮藻塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 的生长环境,PUF 固定化细菌作用于目标藻 4d 后抑藻率达到了 88.7%。连续观察检测 10d,抑藻率稳定在 96~99%。使用过的聚氨酯泡沫可通过反复挤压清洗、超声波清洗、去离子水清洗及煮沸后烘干的方法进行回收再利用,这也降低了使用成本,提高了该固定方法的经济效益。

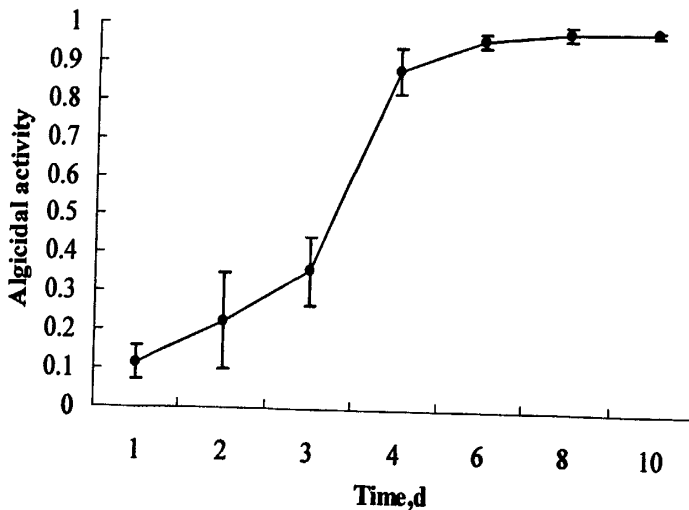


图 3.27 PUF 固定化抑藻菌模拟实验的抑藻效果

Fig. 3.27 Field experiment with PUF immobilized cell

第四章 讨论

1 海洋微生物在赤潮生物防治中的应用

海洋覆盖着地表大部分面积,生物量约占地球生物总量的 80%,海洋区域环境的复杂多变,高盐、高压、低温、低营养和无光照等特殊区域生态环境使得海洋微生物在物种、基因组成和生态功能上具有多样性^[131]。正是由于海洋的特殊生境,所以往往能产生许多结构特殊的生命活性物质和代谢产物。海洋微生物来源的新化合物数量正以令人难以置信的速度被发现,并且不断有新骨架的化合物被报道^[132,133]。近年来,日本对海洋微生物进行了广泛的研究,发现约 27%种族的海洋微生物具有抗菌活性^[134],据报道,已有近万种新的海洋天然产物被发现。目前人们对海洋生物的认识仍相当有限,利用率仅为 1% 左右,还有大部分不易培养微生物及其特殊产物不被人们认识和利用。

海洋微生物不仅能够为人类提供种类繁多、分子结构新颖、化学组成复杂和生理活性特异的海洋天然产物^[135],而且在海洋生态环境保护、地球物质循环和能量转换等方面具有非常显著的作用。特别是利用以微生物为主体的生物修复在治理海洋有毒有害污染物中的作用日显重要,已成为当今国际海洋环境科学与工程研究的热点之一。生物修复(Bioremediation)指生物尤其是微生物催化降解环境污染物,减少或最终消除环境污染的受控或自发过程^[136]。

赤潮灾害及其污染的生物修复的可能途径有^[137]:一方面,在赤潮衰亡的海水中,分离出对赤潮藻类有特殊抑制效果的菌株;另一方面,采用基因工程手段,将细菌中产生抑藻因子的基因或质粒引入工程菌如大肠杆菌,并进行大规模生产。我国已步入赤潮灾害多发国家行列,如何有效防治已成为亟待解决的重大问题。利用微生物,如细菌的抑藻作用及赤潮毒素的有效降解作用,使海洋环境保持长期地生态平衡,从而达到防治赤潮的目的,这也是微生物防治的优越性。

近年来我们课题组加大力度地开展这一课题的研究,取得一些研究工作成果:对塔玛亚历山大藻藻际微生物群落进行了分析,揭示了特殊藻际环境细菌的群落结构特征^[138];并成功获得无菌塔玛亚历山大藻^[139];从东海海域分离、筛选和鉴定了多株能杀死塔玛亚历山大藻的海洋细菌,对其开展抑藻机制的研究^[140];研究了高效杀藻细菌—*Pseudoalteromonas* sp. SP48 的抑藻活性物质的基本性质,并分离提取

得到一个具抑藻活性的小分子化合物—抑藻素 YXR, $C_{12}H_{10}N_4O_2$ 。这是关于塔玛亚历山大藻天然抑藻化合物的首次报道, 为我们“以菌治藻(赤潮)”理论的提出提供有力理论和实践依据。

几年来藻菌关系研究发现, 尽管我们课题组已经分离得到许多株海洋抑/杀藻细菌, 但它们仅属于海洋细菌的几个主要类群, 且所检测到的抑藻活性结果也表明只有少数几个类群的海洋细菌能够杀死藻类。已知的抑藻细菌主要属于 Bacteroidetes 和 γ -Proteobacteria, 这些细菌都是革兰氏阴性细菌, 偶有革兰氏阳性细菌的报道。杨晓茹博士筛选得到多株塔玛亚历山大藻的抑藻细菌, 除 DHQ1 属于厚壁菌门(Firmicutes)的芽孢杆菌属(*Bacillus*)外, 其它均属于变形菌门(Proteobacteria)的 γ 变形菌纲(γ -Proteobacteria), 分属于 7 个属。其中, DHQ16 属于交替单胞菌目(Alteromonadales)、交替单胞菌科(Alteromonadaceae)的 *Pseudidiomarina* 属, 这是首次报道该属的细菌具有抑藻活性。这表明在已知的细菌中很可能有部分具有抑藻活性, 同时考虑到海洋中绝大多数细菌尚未能被培养, 因此海洋环境中可能还存在着大量未被挖掘的杀藻微生物资源。

目前国内外对抑/杀细菌及其活性物质进行大量研究, 已取得一定的成果。通过对菌藻关系的不懈研究, 科学家们已经分离并鉴定了许多株抑/杀藻细菌, 并积极的开展活性物质的分离、鉴定和作用机制研究。如清华大学的胡洪营等^[141,142]从芦苇中分离提取了一种化感物质—thyl-2-methylacetoacetate(EMA)(2-甲基乙酰乙酸乙酯), 该物质对藻类的抑制具有种属特异性, 它能引起受测藻类细胞膜完整性的变化和原生质体中的离子泄漏, 从而抑制藻类生长。本课题组郑小伟等从海洋环境中筛选得到的一株海洋放线菌 *Streptomyces* sp. O4-6, 它能产生活性物质 NIG 对产溶血毒素的球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)起抑制作用, 经鉴定为尼日利亚菌素, 分子式为 $C_{40}H_{68}O_{11}$, 分子量为 724。众多研究成果表明这些抑/杀藻细菌及其活性物质在防治有害藻类水华、生物防污等方面展示了诱人的应用前景。

早些时候, 病毒在生态环境方面的作用并没有得到重视。随着技术手段的不断发展, 尤其是透射电镜技术 (TEM)和荧光技术的应用, 人们对其有了新的认识。它们是海洋生态系统中的活跃分子, 海洋浮游植物包括原核和真核都会受到病毒的感染, 因而第一株藻类病毒的分离给人们很大启发, 利用病毒来治理赤潮应该是非常有发展潜力的。

现阶段, 实验室研究面临着活性化合物含量偏低, 活性成分不易萃取、分离、纯化等一系列的难题。特别是代谢产物的含量偏低、细胞生长缓慢等这些问题都将直接影响到活性化合物的应用和工业化前景。在提取 SP48 抑藻活性物质的过程中我们发现由于发酵产物成分复杂, 不仅影响了活性物质的纯度, 也增加了提取的难度。且最后得到的活性物质质量很有限, 极大地限制了后续抑藻机制工作的展开。因此, 本研究针对高效抑藻菌 *Alteromonas* sp. DH46 培养基及其发酵条件进行研究, 以期获得高密度细胞、提高活性物质产量, 为有效治理赤潮及揭示抑藻机理提供物质基础。

目前针对细菌胞外产物的发酵优化的报道已有很多, 但针对杀藻菌和杀藻物质的优化方面的研究较少。为了将其活性产物应用于实践中, 首先遇到的问题就是培养过程的优化。发酵产物的多少通常与细胞密度的高低关联, 而优化培养基及其培养条件则是一种提高细胞密度的有效方法。本论文以 ZoBell 2216E 培养基(一种常用的培养海洋细菌的简单复合培养基)为基础, 考察了培养基组成和浓度, 以及培养条件等对抑藻菌 DH46 摇瓶培养的影响, 并利用均匀设计对培养基进行了优化, 开发出一个适合高密度培养抑藻菌 DH46 的复合培养基。筛选优化培养基成分过程中发现, 胰蛋白胨既可作为碳源又可作为氮源供菌体利用, 在菌体生物量和抑藻率两方面表现均较佳, 是较适合抑藻菌 DH46 生长的复合营养源。研究结果显示, 碳源(蔗糖, 葡萄糖, 柠檬酸钠, 可溶性淀粉)添加组分中, 收获的菌体细胞滤液抑藻率普遍偏低, 表明碳源可能对于菌体分泌代谢产物影响不显著, 这与国内外一些文献报道一致^[143,144]; 有机氮源如大豆蛋白胨, 酸水解酪蛋白胨, 甘氨酸等组分及无机氮 NaNO_3 则有效地提高了菌体产生抑藻物质的能力, 说明添加氮源可促进活性物质的产生, 这与本实验室杨小茹博士分离得到的氮素含量较高的杀藻活性物质具有一致性, 这一发现可能为之后的抑藻活性物质的分离提取及抑藻机制的研究有所启发。

2 均匀设计在微生物发酵条件优化试验中的应用

海洋微生物不仅种类丰富, 又具有生长周期短、代谢易于调控、菌种较易选育、可通过大规模发酵实现工业化等特点, 故其活性产物开发具有潜在产业化优势。另一方面, 海洋微生物天然活性物质结构复杂多样, 有效成分含量低和生产提取成

本高等问题在一定程度上制约了海洋微生物天然活性物质的工业化进程和实际应用。因而,发酵培养优化工作显得尤为重要,优化的内容主要是指对培养基成分和发酵条件进行优化设计。孔赞等^[145]从土壤中分离得到一株对铜绿微囊藻有抑制作用的橄榄网状链霉菌 SG-001,通过对其基础培养基的成分和发酵条件进行优化,确定了该溶藻菌的最优发酵培养基及条件,优化后的铜绿微囊藻的叶绿素 a 去除率较之基础培养基提高了 26.29%。

培养基是人工配制的适合微生物生长、繁殖或积累代谢产物的营养物质。培养基的组成和对比对菌体生长增殖、提炼工艺及发酵产物的产量和质量,均有相当大的影响^[146]。Zobell 2216E 培养基作为常用的海洋好气性细菌分离培养基,是由代海洋微生物学之父—佐贝尔(C.E.ZoBell)发明,它作为分离、培养海洋细菌的传统培养基在实践中具有重要作用,但不同的细菌有不同的营养需求,DH46 作为一株具有特殊生理功能的细菌,其生长可能受到各种外界条件的影响,如温度、pH、盐度、溶氧量等。故而急需对抑藻菌培养基及培养条件进行优化,从而促进抑藻物质的产生和抑藻剂的研制。本论文采用单因子法对 DH46 的摇瓶培养条件进行研究,得到最佳培养条件为:培养温度为 28℃,适宜的培养基初始 pH 为 7,盐度为 30‰,转速为 180r/min。实验中曾尝试应用该优化条件进行发酵罐扩大培养抑藻菌 DH46,结果显示菌体生长量及抑藻效果与摇瓶培养结果相似,并未获得大幅提高,导致该结果的原因可能是由于不同发酵体系中的培养条件,如装液量、溶氧、营养物质吸收和代谢产物的传质等对细菌的生长代谢产生的影响不同所致。在实际应用过程中,应选择合适的培养体系及相应的优化条件进行发酵试验。

由于发酵培养基成份众多,且各因素常存在交互作用,因此培养基优化工作量且复杂。现数学统计学中的多种优化方法已开始广泛的应用于微生物培养基的优化工作中,其中以正交设计、均匀设计、响应面优化设计、人工神经网络等最为常用。在实际优化工作中,可以根据不同的研究目的,选用不同的优化设计,以达到最佳的效果。在筛选优化抑藻菌复合培养基的过程中,本实验选择胰蛋白胨、淀粉、酵母粉、 NaNO_3 、 MgSO_4 为重要影响因子,以菌体干重为评价指标,采用均匀设计法确定其最佳配方组成法。

均匀设计是我国数学家方开泰等独创的一种多因素试验优化法。基本思路就是尽量使实验点均匀分散,使每个实验点具有更好的代表性,但同时舍弃整齐可比的

要求,以减少实验次数,这是均匀设计与正交试验设计法的最大不同之处;然后通过多元统计的方法来弥补这一缺陷,使得实验结果同样可靠有效。在实验数相同的条件下,均匀设计的偏差远比正交设计小。由于均匀设计不再考虑正交试验的整齐可比性,因此其实验结果的处理要采用回归分析方法—线性回归或多项式回归分析,从中找出各因素与目标函数之间的统计学关系,建立定量的回归方程。

将实验结果经 DPS V_{3.01} 数据软件处理,以调整相关系数 R 最大为原则,进行变量的引入或删除,并对该模型进行显著性检验。通过二次多项式逐步回归分析,建立了回归方程得到优化方案 (g/L): 胰蛋白胨 14.0, 酵母粉 1.63, 淀粉 5.0, NaNO₃ 1.6, MgSO₄ 2.3。在最适培养条件下采用优化培养基进行培养,获得菌体干重和抑藻率分别为 7.36g/L 与 98.4%,比优化前分别提高了 107%和 10%。这说明应用均匀设计理念优化培养基组成的思路是可行的,应用均匀设计法不仅大大缩短了培养基配方的摸索周期,也为进一步放大培养和工业化生产提供了依据。

3 环境微生物制剂的开发和应用

赤潮问题困扰人类已很久,而且至今越演越烈,已经成为全球性的环境问题之一。尤其是有害赤潮藻种可以通过产生毒素、改变水体理化特征等对人类健康、水产养殖和海洋生态系统带来危害。因此迫切需要协调人类活动与环境的关系,建立和发展赤潮应急治理技术,以降低有害赤潮的规模及其危害效应。目前赤潮的治理包括化学方法、物理方法和生物方法。其中,化学方法容易产生二次污染,且剂量难以掌握,物理方法则(如底泥疏浚)费用较高,故而人们将更多的目光投向了利用生物修复技术等生物方法治理富营养化水体。

生物修复(Bioremediation)是一种利用特定的生物(植物、微生物或原生动物)吸收、转化、清除或降解环境污染物,实现环境净化、生态效应恢复的生物措施。已有研究表明,病毒、细菌等微生物是调节有害赤潮藻类种群动态的重要因子,与赤潮的生消有着密不可分的联系,因此可利用赤潮藻类拮抗微生物作为未来预防赤潮的潜在工具。利用细菌、病毒等微生物进行生物修复主要是应用原位技术以及向水体投加有效微生物群从而改善污染水体的透明度、高锰酸盐指数(CODMn)、溶解氧(DO)、总氮(TN)、总磷(TP)、叶绿素 a 等以达到减轻水体富营养化程度的效果^[147]。近些年兴起的微生物制剂作为以改善环境状况和强化处理系统稳定、高效为目标,

通过菌群构建等科学方法得到的具有特殊功能的生物制品,在水体修复领域已得到广泛应用。

从已经尝试进行的水体微生物修复技术的实践经验看,与传统的物理、化学修复技术相比,水体微生物修复技术具有以下优点^[148]:节省费用,仅为传统环境工程技术的 30%~50%;环境影响小,遗留问题少,无二次污染和污染物转移;可有效降低污染物浓度;修复时间较短;操作者与污染物直接接触机会减少,不致对人产生危害;控制操作简单,对周围环境干扰少。

目前国内外研究学者已经分离到一系列的抑/杀藻细菌,对其活性物质的研究也取得了一定的进展。如何利用这些已取得有效的资源,研制成相关产品制剂应用于赤潮水体治理,实现从实验室向实际应用的转变,成为摆在研究人员面前的一道难题。借助微生态制剂的启发,我们提出利用抑藻菌制备成环境友好型的无毒、安全、高效的环境微生物制剂。

环境微生物制剂是旨在利用从自然界筛选出的或人工培育、具有特定降解功能的微生物,以生物修复的方式迅速去除污染物质,改善环境质量。近年来水体生物修复技术发展迅速,利用安全高效的环境生物制剂治理水体富营养化(赤潮)已成为目前研究的热点。

近年,美国生态实验室研发的液可清(ACF32) (Aqua Clean ACF32)是一种由 32 种专性活菌构成的混合微生物制剂,已获得美国环保局、卫生部和农业部的认证,在美国等国家已有许多成功应用。Wang 等^[149]利用乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)原位修复富营养化水体,总磷去除率达 37%,且藻类生长基本得到控制。庞金钊^[150]等对富营养化湖泊水体进行实验,当投加复合微生物菌剂浓度为 200mg/L 时,投菌一周后其浊度去除达 35.3 %, 叶绿素的去除率达到 54.7%,墨绿色水体变澄清。为节省运输费用及延长菌液保存期,使用惰性粒子流化床干燥生物制剂,制得无载体干燥的粉末,可在室温下长期保存,不失活性,并可节约人力和电力费用。本实验室前期已从抑藻菌 *Pseudoalteromonas* sp. SP48 发酵液中分离出对塔玛亚历山大藻具有灭杀作用的活性化合物,并对其进行了结构鉴定;同时,尝试将抑藻菌的发酵液制成干粉形式,经抑藻测试验证其抑藻效果与发酵液相近。

利用抑藻细菌治理赤潮或者水华是一个很有潜力的方向,然而实际应用中不得不考虑该环境制剂对周围环境及生物的安全性。前期的科学研究大多是利用抑藻菌

以游离培养的方式抑制单一赤潮藻类,但由于自然水体中的抑藻细菌浓度相对较低及水体环境的复杂性等原因,这些科研成果并不能很好的得到发挥和应用^[151]。因此,寻求加强抑藻环境生物制剂效用的方法变得尤为迫切。将细菌固定在特定载体上,可以使局部水环境中的抑藻细菌浓度大幅度增高,并对菌体细胞起保护作用,同时更便于微生物制剂的制备、运输和规模化生产。事实上,固定化技术已经在酒精生产、有毒化学物的生物降解、水处理工程及食品医药上取得了诸多应用。因此,我们有理由相信,将固定化微生物技术应用于赤潮水体污染的生物治理有着极大的应用潜力和发展前景。

固定化微生物技术是从 20 世纪 60 年代开始兴起的一项新技术,80 年代后期,国内外开始关注应用固定化技术处理污水。将之应用到环境生物修复中,不仅可以大幅度提高参加反应的微生物浓度,提高其菌体有效浓度,还可以增强抗毒能力和耐受力,提高其对不良环境的耐受力,延长降解效应时间,成为应用微生物制剂解决水体富营养化的强化手段。

国内外关于抑/杀藻菌固定化研究的报道极少。2007 年 Y.H.Kang 等^[151]对一株抑藻菌 *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 在琼脂、海藻酸盐、聚氨酯泡沫和纤维素海绵上的固定化效果进行了比较,并模拟原位低温环境对固定化抑/杀藻菌进行杀藻效果测试,结果显示以纤维素海绵为介质的固定化载体,可吸附 $5.93 \times 10^9 \text{ cell/cm}^3$ 菌体,其杀藻率高达 95%。

利用藻类治理污染水体的研究亦取得了不少进展,而固定化技术则为其在实际工程应用方面提供了一个更开阔的方向。菌藻共生的藻类生物转盘是最早见于报道的藻类固定化技术,水力藻类床 ATS 也是藻类附着固定化的一种工程化应用。香港大学 P. S. Lau 等利用卡拉胶固定小球藻处理初沉污水,对正磷酸盐取得了 90% 以上的去除率。张向阳等^[152]利用海藻酸钙对蛋白核小球藻进行固定,并用于去除人工污水中的氮磷,4 d 内对氯化铵和尿素的去除率分别达到了 100 % 和 89.3 % ,对正磷酸盐和偏磷酸盐去除率分别是 100 % 和 73.9 % 。Sashenka Fierro 等^[153]以及 Endong Zhang 等^[154]将栅藻固定后去除污水中的氮磷 都取得了较好的效果,藻类固定后提高了对氮磷的吸收和富集能力。一般认为固定化提高了藻类的合成代谢活性、延迟衰老,并在一定程度上降低了藻类的分解代谢活性^[155]。固定化细胞与非固定化细胞相比,对氨毒性的抵制力强、系统稳定。

病毒同藻类和细菌的关系表明,病毒是由这些微型生物体产生的,同时,又能对细菌及浮游植物的数量产生特异性影响。俄罗斯列宁格勒大学 B.Gromov 教授发现了类似蛭弧菌功能的噬藻细菌,这为研制菌剂治理水藻提供了重要的信息。*Heterosigma akashiwo* (异弯藻)是一种最具代表性的赤潮藻类, Nagasaki 等^[68]对 Ha V01 作了进一步研究,初步探讨了利用 Ha V01 来治理赤潮异弯藻的可能性。研究发现, Ha V01 比其他几种微型藻类病毒的潜伏期和裂解量都更长更大,且 Ha V01 专一性感染 *H. akashiwo*, 不会对其他生物产生任何影响。因此从理论上来说, Ha V01 是控制赤潮异弯藻 *H. akashiwo* 的一个很有前景的微生物制剂,因为它满足了作为控制有害藻华的微生物制剂必须满足的 3 个条件。首先,它有高的生长速度,因此能应用于天然环境中,这满足了规模上的需要;其次它的生产费用低;第三,它能够特异性地感染引起赤潮的目标生物,不会对其他生物产生影响,因此有了安全性保证。此外,它是来源于自然沿海水域,是没有经过遗传操作和改变的自然形态。但是, Ha V 作为微生物制剂来控制赤潮异弯藻的最大障碍在于 Ha V 的种内专一性。当然,要把 Ha V 真正应用到赤潮异弯藻的控制中,许多具体的问题还有待于深化和细致评估。

本文中采用包埋与吸附两种不同方式固定化 *Alteromonas* sp. DH46。包埋法中以海藻酸盐为壁材,以微孔淀粉为芯材, CaCl_2 做固化液,采用挤压法制备固定化微球。该法实际上是先利用微孔淀粉进行吸附,然后以海藻酸钠包埋形成固定化复合载体,以进一步提高菌体的吸附量与稳定性。

海藻酸钠作为固定化包埋载体材料,具有固化成型方便,价格低廉,对微生物的毒性很小,对微生物细胞的富集程度高等优点,所以是目前天然高分子凝胶载体中研究最多、使用最广的载体之一。而微孔淀粉则是一种新型的变性淀粉,由于其表面具有很多伸向中心的小孔,因而具有良好的吸附性能,可用作功能性物质的吸附包埋。微孔淀粉能赋予其所包埋物质的缓释或肠溶性物质的特定释放,为一种高效、无毒、安全的吸附剂,作为一种新型的微胶囊壁材,以其独特的优势越来越引起人们的注意。国内有研究证明^[156],用海藻酸钙包埋固定优势降解菌 (*Alcaligenes* sp) 降解 2,6-二叔丁基 (2,6-2DTBP),在 100.0 mg/L 的初始质量浓度下,其降解率在 12 d 可达到 86%,与未固定菌株相比,菌株经固定化包埋后其降解的能力大大提高,且固定化菌株对 pH 值和温度的适应范围更宽,对底物具有更高的降解

能力。姚卫蓉等^[157]用微孔淀粉吸附双歧杆菌后进行喷雾干燥制备活菌粉,并将得到的活菌粉制成肠溶性胶囊,结果表明,在喷雾干燥以及存储过程中,微孔淀粉对双歧杆菌都有保护作用。Ishii^[158]将不溶于水的 2,4-D 和微孔淀粉一起分散到水中,经抽滤后干燥沉淀物的产品,作为除草剂使用时可明显延长其使用时间。

文中通过考察微球的直径及机械强度,获得最佳制备工艺条件,即海藻酸钠浓度 20g/L,微孔淀粉浓度 20g/L, CaCl_2 浓度为 30g/L,制得的凝胶小球形状规则、通透性好。实验结果表明,随着海藻酸钠浓度的增加,固定化胶球粒径逐渐增大,机械强度增强,但当包埋剂浓度过高时,其粘稠性增加,影响成球性及固定化细胞的传质,不利于菌体生长。 CaCl_2 的质量分数对形成凝胶的机械强度有重要影响,浓度过高可能因高盐渗透作用而致使微生物活性降低,若太低又导致凝胶强度太小。据文献^[159]报道,细胞增殖大多数处于颗粒外表层,其细胞质量分数要远大于内部质量分数,接近凝胶表面处细胞生长旺盛,这一分布可能与胶球粒径的大小有关。胶珠粒径小,营养物质等的扩散路径短,氧气和营养物质能够迅速进入球体内部,同时细胞代谢产物也可及时地扩散到外侧,产物抑制作用减小,即增大包埋小球的比表面积有利于细胞生物量提高。但是若粒径过小,细胞生长空间有限,亦不利于细胞生长。因此,作为细胞生长代谢的微尺度反应器,选择合适的粒径大小对包埋固定化小球很重要。

通过考察包埋固定化对抑藻菌DH46生长特性的影响,结果表明其生长曲线与游离培养曲线接近重叠,且均呈现典型的微生物细胞“S型”生长特征,可见海藻酸钠-微孔淀粉包埋体系对抑藻菌DH46的生长特性和状态无明显影响。并采取三种不同的运行方式,考察包埋固定化微球对目标藻塔玛亚历山大藻的抑制效果,直接投加固定化微球对塔玛亚历山大藻具有较好的抑制作用,在添加适量菌体培养液后抑藻率有所提升,而投加发酵滤液则是抑藻效应最快、最高效的方式。

本实验还采用聚氨酯泡沫作为固定化载体吸附培养 *Alteromonas* sp. DH46,取得了良好的固定化和抑藻效果。在比较了载体尺寸、添加量和接种量等因素对菌体固定化培养的影响后,采用 5mm^3 立方体 1.0g,接种 1%处于对数生长期的细菌,28℃,150r/min 条件下固定化培养 24h 左右,载体内菌体密度达到了 $5.26 \times 10^{10}\text{cell/g}$,为悬浮培养平均密度的 4 倍左右。比较固定化培养条件下菌体的分布与吸附情况,结果表明吸附 120min 后达到最高吸附比率,360min 左右吸附固定化趋于稳定,载

体内、表面吸附的菌体数量略高于载体外游离的菌体数。

根据优化条件固定化培养抑藻菌 DH46, 加入藻液中观察抑藻效果, 投加 2.0g 风干后的固定化载体 48h 后抑藻率可达 86.1%, 抑藻效果显著。结合扫描电镜观察结果, 表明聚氨酯泡沫固定化载体与菌体有良好的生物相容性, 并能有效的吸附固定 DH46 菌细胞。由于物理吸附作用力较弱, 亦有部分菌体悬浮于微孔结构中, 属半固定化方式, 因此固定化比率不是太高, 但 PUF 吸附的细胞数量又是极为可观的。加之 PUF 载体廉价, 处理方便, 适合大规模工业化生产的需要。

陈杰等^[160]采用聚氨酯泡沫固定化培养盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*), 获得吸附率在 85%以上, 并在 5L 发酵罐的基础上研制了以聚氨酯泡沫为固定化载体的旋转式生物反应器, 最高菌体密度达到了 $4.2 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 高于悬浮培养的 2-4 倍。结合本实验结果, 比较吸附率的差异: 盘基网柄菌具有伪丝或伪足可以在固体表面附着移动, 电镜结果亦清晰显示该菌以伪足吸附于 PUF 载体的内表面, 因而有利的增加了吸附力, 所以吸附效率较高。Zhen Wang 等^[161]在棉布的基础上研制了星状纤维固定化基质, 实现了对稻根霉菌(*Rhizopus oryzae*, 真菌)生长的控制和乳酸产量的提高。普通发酵当中, 丝状真菌生长容易由菌丝形成沉淀块从而影响发酵效果, 但该复杂生长形态却在纤维固定化培养上转变成为优势, 萌发的孢子和菌丝紧紧的缠绕住固定化基质, 提高吸附效率。

因此, 在今后的微生物固定化工作中, 应重视菌体本身特性的差异, 因地制宜选择合适的固定化基质, 并且积极拓展固定化材料, 不拘泥于原有材质及形式。

第五章 结论与展望

1 结论

本论文以实验室前期获得的一株高效抑藻菌 *Alteromonas* sp. DH46 为研究对象, 通过单因子试验和均匀设计相结合的方法对其发酵条件和培养基组分进行优化, 提高细胞密度及抑藻效果, 并通过固定化方式加强抑藻微生物制剂的效果。获得的主要结论如下:

(1) 采用单因素法探索优化培养条件, 结合菌体生长量(干重)和抑藻率, 考察碳源、氮源、温度、初始 pH 值、转速、盐度等因素的改变对杀藻菌生物量和产活性物质的影响。确定了摇瓶的最佳培养条件: 初始 pH 为 7, 盐度为 30‰, 温度为 28 ℃, 转速为 180r/min, 培养时间 24h。

(2) 在此基础上, 应用均匀设计实验法优化其培养基组分, 考察了不同培养基组分对菌体生长及抑藻效果的影响: 选择胰蛋白胨、可溶性淀粉、酵母粉、 NaNO_3 、 MgSO_4 选择为重要影响因子, 以菌体干重为评价指标, 进行混合均匀设计。利用 DPS 软件对实验值进行回归分析, 建立回归模型。优化后的培养基组成为(g/L): 胰蛋白胨 14.0, 酵母粉 1.63, 淀粉 5.0, NaNO_3 1.6, MgSO_4 2.3。采用优化培养条件进行验证实验, 获得菌体干重和抑藻率分别为 7.36 g/L 与 98.4%, 比优化前分别提高了 107%和 10%。

(3) 本文以海藻酸盐为壁材, 以微孔淀粉为芯材, CaCl_2 做固化液, 采用挤压法制备固定化微球。通过考察微球的直径及机械强度, 获得最佳制备工艺条件, 即海藻酸钠浓度20g/L, 微孔淀粉浓度20g/L, CaCl_2 浓度为30g/L, 制得平均粒径为 3.20 ± 0.08 mm的均质小球, 强度和通透性良好。并考察了包埋固定化对抑藻菌DH46生长特性的影响, 结果表明其生长代谢规律与游离培养相似, 海藻酸钠-微孔淀粉包埋体系能够维持抑藻菌DH46的正常生长, 具有良好的生物相容性。采取三种不同的运行方式, 考察包埋固定化微球对塔玛亚历山大藻的抑制效果, 直接投加固定化微球对目标藻具有较好的抑制作用, 在添加适量2216E培养液后抑藻率有所提升, 而投加发酵滤液则是抑藻效应最快、最高效的方式。

(4) 采用聚氨酯泡沫作为吸附载体固定化培养 *Alteromonas* sp. DH46。考察了载体尺寸、添加量和接种量等因素对菌体固定化培养的影响, 得到了聚氨酯泡沫固定

化培养抑藻菌的优化条件: 即添加 1.0g 5mm³ PUF 泡沫于 50ml 反应体系中, 接种 1%处于对数生长期的细菌, 在 28℃, 150r/min 条件下固定化培养 24h 后, 载体内菌体密度可达到 5.26×10^{10} cell/g, 高于悬浮培养密度的 4 倍左右。

(5) 结合电镜结果表明聚氨酯泡沫 PUF 具有良好的生物相容性, 载体的内外表面及微孔结构为菌体提供了一个良好的吸附界面和微型悬浮生长空间, 因而为细胞生长提供了一个良好的支持和保护的环境。根据优化条件固定化培养抑藻菌 DH46, 加入藻液中观察抑藻效果, 投加 2.0g 风干后的固定化载体 48h 后抑藻率可达 86.1%, 抑藻效果显著。

2 论文创新点

(1) 当前关于细菌胞外产物的发酵优化的报道已有很多, 但针对抑藻菌和抑藻物质的优化方面的研究鲜有报道。本研究结合了单因子试验法和均匀设计法, 对培养基组成和培养条件进行了较细致的研究, 以提高抑藻菌和抑藻活性物质的产量, 为今后研究该物质的抑藻机理和大规模化生产应用奠定物质基础。

(2) 通过实验证明海藻酸钠-微孔淀粉复合包埋体系及聚氨酯泡沫与抑藻菌 *Alteromonas* sp. DH46 有良好的生物相容性, 对影响固定化培养的因素及固定化特性进行了较全面的研究。建立了一种固定化培养抑藻菌的新方法, 抑藻效果显著。SA-MS 包埋微珠具有良好的机械强度, 在长期发酵中保持形态的完整, 可保持高浓度和高活性, 且产物易于分离, 适合连续化生产。聚氨酯泡沫廉价易得, 处理简单, 且其漂浮特性和可回收性, 为将来应用于开放水体、实现“以藻治菌”的实施提供一定的参考价值。

3 展望

本论文优化了抑藻菌 *Alteromonas* sp. DH46 的发酵条件和培养基组分, 同时探索固定化方法及载体对该菌株的固定化效果影响。结合本研究领域的国内外研究趋势及本论文研究成果, 对今后相关工作展望如下:

(1) 本文中的培养优化研究工作是在摇瓶中进行的, 较适合实验室条件下培养和提取高品质的抑藻物质, 以便开展鉴定和抑藻机制研究工作。要获得大量的活性物质、实现规模化生产, 需要进一步在大/中型发酵罐中探索发酵条件。在实际生产中, 可进一步结合混合发酵、流加发酵、分批培养等策略实现细胞的高密度培养。考虑

到生产成本的问题,应在提高抑藻活性物质的产量的同时采用玉米浆、黄豆粉、麸皮、纤维物质等廉价易得的发酵组分,适量添加有机及无机氮源,以节约生产成本、提高产量。

(2) 影响固定化微球/泡沫运行效果的因素很多,在以后的研究中还应考虑其他因素如温度、pH、运行次数、保存方式等对其活性的影响。由于时间和条件的限制,在论文中未能对包埋微球内的抑藻菌生物量进行有效的测定,建议在以后的工作中对该方面内容进行更深入研究。

(3) 文中仅对一株抑藻菌 DH46 进行固定化研究,今后可以利用实验设计方法,研制多种组合(如抑藻活性物质粗产物;抑藻菌、活性物质的混合菌剂),构建安全高效的复合抑藻微生物制剂,并采用多种固定化方式(包埋、交联、截留、自絮凝等)加强效果,为实现其应用提供前期技术支持。

(4) 环境微生物制剂的研究已具有良好的开端,并表现出了明显的优势,但目前大部分研究成果仅局限于实验室研究。要实现大规模的工程应用与产品生产,还需要扩大实验规模,模拟考察开放水体下抑藻微生物制剂的实际运行情况,并进行抑藻制剂的生物安全评价及其配套反应器研究。

参考文献

- [1] Hallegraeff, G.M. A review of harmful algal blooms and their apparent global Increase [J]. *Phycologia*, 1993, 32: 79-99.
- [2] 国家海洋局. 2008 年中国海洋环境质量公报[Z].北京: 国家海洋局, 2009.
- [3] 国家海洋局. 2008 年中国海洋灾害公报[Z].北京: 国家海洋局, 2009.
- [4] 国家海洋局. 2009 年中国海洋环境质量公报[Z].北京: 国家海洋局, 2010.
- [5] 国家海洋局. 2009 年中国海洋灾害公报[Z].北京: 国家海洋局, 2010.
- [6] 周名江, 朱明远, 张经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展[J]. *生命科学*, 2001, 13(2): 54-59, 53.
- [7] Wang X, Li Z J, Su J Q, Tian Y, Nin X R, Hong H R, Zheng T L. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere. *Biological Control*, 2010(52): 123-130.
- [8] Anderson D M, Galloway S B, Joseph J D. Marine biotoxins and harmful algae: A national plan. Woods Hole Oceanographic Institution Report: WHOI-93-02, 1993.
- [9] 张有份. 海洋赤潮知识 100 问[M]. 北京: 海洋出版社, 2000.
- [10] 齐雨藻. 中国沿海赤潮[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [11] 赵冬至等. 我国海域赤潮灾害的类型、分布与变化趋势[J]. *海洋环境科学*, 2003, 22(3): 7-11.
- [12] Y. Fukuyo. Harmful algal blooms in Japan: Japanese perspective. IOC-FAO/IPHAB-I/3, 1992, 6: 17 — 21.
- [13] 江天久, 齐雨藻等. 赤潮的分类分级标准及预警色设置[J]. *生态学报*, 2006, 26(6): 2035-2040.
- [14] Hyun-jin Cho, Matsuoka K. Distribution of dinoflagellate cysts in surface sediments from the Yellow Sea and East China Sea[J]. *Marine Micropaleontology*, 2001, 42: 103-123.
- [15] 孙军, 刘东艳, 王宗灵, 石晓勇, 李瑞香, 朱明远. 春季赤潮频发期东海微型浮游动物摄食研究[J]. *应用生态学报*, 2003, 14(7): 1073-1080.

- [16] 王慧, 柏仕杰, 蔡雯蔚, 郑天凌. 海洋病毒—海洋生态系统结构与功能的重要调控者[J]. 微生物学报, 2009, 49(5): 551-559.
- [17] 徐宁, 段舜山, 李爱芬, 刘振乾. 沿岸海域富营养化与赤潮发生的关系[J]. 生态学报, 2005, 25(7): 1782-1787.
- [18] Hodgkiss I J, Ho K C. Are changes in N : P ratios in coastal waters the key to increased red tide blooms[J]. Hydrobiologia, 1997, 352: 141 - 147.
- [19] Qian P Y, Wu M C S, Ni H. Comparison of nutrients release among some maricultured animals[J]. Aquaculture, 2001, 200: 305 - 316.
- [20] Siu G K Y. Environmental and nutrimental factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*[J]. Hydrobiologia, 1997, 352 (1): 117 -140.
- [21] Ikegami S, Imai I, Kato J. Chemotaxis toward inorganic phosphate in the red tide alga *Chattonella antiqua*[J]. J Plankton Res, 1995, 17 (7):1587 - 1591.
- [22] Sanders J G, Riedel G F. Trace element transformation during the development of an estuarine algal bloom[J]. Estuaries, 1993, 16 (3A): 521 - 532.
- [23] 陈国斌, 李奶姜, 戴红. 福建闽东海域具齿原甲藻赤潮与生态因子关系的初步分析[J]. 台湾海峡, 2003, 22(4): 431-436.
- [24] 吴迪生, 黎广媚, 赵雪, 张俊峰, 庞海龙, 冯伟忠, 马毅. 广东沿海赤潮与海洋水文气象关系研究[J]. 海洋通报, 2005, 24(5).
- [25] 周名江, 颜天, 邹景忠. 长江口邻近海域赤潮发生区基本特征初探[J]. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1031-1038.
- [26] Tada, K., Morishita, M., Hamada, K., Montani, S., Yamada, M. Standing stock and production rate of phytoplankton and a red tide outbreak in a heavily eutrophic embayment, Dokai Bay, Japan[J]. Marine Pollution Bulletin, 2001, 42(11): 1177-1186.
- [27] 钱宏林, 梁松, 齐雨藻. 广东沿海赤潮的特点及成因研究[J]. 生态科学, 2000, 19(3): 8-16.
- [28] 吴迪生, 黎广媚, 赵雪, 张俊峰, 庞海龙, 冯伟忠, 马毅. 广东沿海赤潮与海洋水文气象关系研究[J]. 海洋通报, 2005, 24(5): 16-22.

- [29] 田荣湘, 翁焕新. 赤潮灾害与大气尘埃铁输送的关系[J]. 自然灾害学报, 2005, 14(3): 38-43.
- [30] 邢磊, 张正斌, 林彩, 吴真真, 谭丽菊. 我国沙尘暴与赤潮的相关性研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(2): 245-252.
- [31] MU DIE P J, ROCHON A, LEVAC E. Palynological records of red tide-producing species in Canada: past trends and implications for the future[J]. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 2002, 180: 159-186.
- [32] 梁松, 钱宏林, 齐雨藻. 中国沿海的赤潮问题[J]. 生态科学, 2000, 4(19): 44-50.
- [33] 赵冬至等. 中国典型海域赤潮灾害发生规律[M]. 北京: 海洋出版社, 2010.
- [34] 郑磊, 齐雨藻, 骆育敏. 大鹏湾有毒赤潮生物孢囊研究[J]. 暨南大学学报, 1995, 1(16): 121-126.
- [35] 杨清双, 熊焕昌, 陈帆, 马启和, 杨浩, 刑小丽, 高亚辉, 梁君荣. 赤潮藻经船舶压舱水输入厦门港的风险分析[J]. 检验检疫科学, 2004, 14: 96-99.
- [36] 欧阳怡然, 等. 嵎山列岛养殖区的赤潮麻痹性贝毒检测[J]. 海洋环境科学, 1993, 12 (1): 42-45.
- [37] 梁松, 钱宏林, 等. 南海海洋资源与环境研究文集[D]. 广州: 中山大学出版社, 1998.
- [38] 朱小山, 易斌, 董燕红, 杨炼锋. 珠江口赤湾一次双相赤潮成因初探[J]. 海洋环境科学, 2004, 23(4): 41-44.
- [39] ZINGONE A, ENEV OL DSEN H O. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management [J]. *Ocean and coastal management*, 2000, 43: 725-748.
- [40] 李士虎, 吴建新, 李庭古, 朱明, 郑伟. 赤潮的危害、成因及对策[J]. 水利渔业, 2003, 2 (6) : 38-54.
- [41] 全先庆, 曹善东. 赤潮的危害、成因及防治[J]. 山东教育学院学报, 2002, 90: 87-91.
- [42] 周名江, 于仁成. 有害赤潮的形成机制、危害效应与防治对策[J]. 自然杂志, 2007, 29 (2) : 72-79.
- [43] Anderson R J, Smit A J, Levitt G J. Upwelling and fish-factory waste as nitrogen

- sources for suspended cultivation of *Gracilaria gracilis* in Saldanha Bay, South Africa [J]. *Hydrobiologia*, 1999, 398/ 399: 455-462.
- [44] Fei X G. Solving the coastal eutrophication problem by large scale seaweed cultivation [J]. *Hydrobiologia*, 2004, 512: 145 -151.
- [45] Van Breemen LWCA, Ketelaars HAM and Visser P. A new method to control growth of geosm in producing benthic cyanobacteria[J]. *Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie*, 1991, 24(4): 2168-2173.
- [46] Lu Douding, Zhang Zhi dao. Countermeasures to the calamity of HAB in prawn cultivating pools [J]. *Donghai Marine Science*, 1995, 13(1): 39-43.
- [47] 王娟. 赤潮的预测预报模型[J]. *生物学通报*, 2005, 40(2): 20-22.
- [48] Tu Jian. Review on technology of prophylaxis and treatment to red tide at home and abroad [J]. *Marine Science Bulletin*, 1991, 10(6): 91-94.
- [49] 俞志明, 曹西华. “九五”期间中国沿海有害赤潮灾害状况及其防治对策[J]. *安全与环境学报*, 2002, 2(6): 15-17.
- [50] Iseri Yasush i, Tano Joh ich iro and Kawabata Zen'ich iro. Suppression of dinoflagellate peridinium bipes bloom in a reservoir by ultraviolet radiation [A]. In: *Waterpower Proc Int Conf Hydropower*[C]. ASCE, New York, 1995, 2: 1265-1273.
- [51] 梁想, 尹平河, 赵玲, 杨培慧, 谢隆初. 生物载体除藻剂去除海洋赤潮藻[J]. *中国环境科学*, 2001, 21(1): 15-17.
- [52] 白敏冬, 白希尧, 杨波, 张芝涛. 羟基自由基治理海洋赤潮的研究[J]. *中国基础科学*, 2004,(6): 18-25.
- [53] 邓淑芳, 周晓见, 白敏冬, 白希尧, 邢琳, 高敏. 羟基对赤潮单胞生物的致死生化过程[J]. *大连海事大学学报*, 2003, 29(1): 60-76.
- [54] Barrett P R F, Litt lejohn JW, Curnow J. Long term algal control in a reservoir using barley straw [J]. *Hydrobiologia*, 1999, 415:309-313.
- [55] Welch IM, Barrett P R F, G ib son M T, et al. Barley straw as an inhibitor of algal growth I: Studies in the Chesterfield Canal [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1990, 2: 231-239.

- [56] Pillinger JM, Cooper JA, Ridge I. Role of phenolic compounds in the antialgal activity of barley straw [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1994, 20(7): 1557-1569.
- [57] 王洪亮, 俞志明, 宋秀贤, 曹西华. 改性小麦秸秆去除赤潮异弯藻的实验研究[J]. *环境科学*, 2010, 2 (31) : 296-300.
- [58] 俞志明, 邹景忠, 马锡年, 等. 治理赤潮的化学方法[J]. *海洋与湖沼*, 1993, 24 (3): 213-318.
- [59] 曹西华, 俞志明. 有机絮凝剂在赤潮治理中的应用展望[J]. *海洋科学*, 2001, 25(5): 12-14.
- [60] 俞志明, 曹西华. “九五”期间中国沿海有害赤潮灾害状况及其防治对策[J]. *安全与环境学报*, 2002, 2(6): 15-17.
- [61] 俞志明, 宋秀贤, 张波, 孙晓霞. 粘土表面改性及对赤潮生物絮凝作用研究[J]. *科学通报*, 1999, 44 (3) : 308-311.
- [62] TURNER JT, ANDERSON DM. Zooplankton grazing during dinoflagellate blooms in a Cape Cod embayment with observations of predation upon tintinnids by copepods[J]. *Mar Ecol*, 1983, 4(4): 359-374.
- [63] TAKEDA S, KUR IHARA Y. Preliminary study of anagement of red tide water by the filter feeder. *Mytilus edulis galloprovincialis* [J]. *Marine pollution bulletin*, 1994, 28(11) : 662-667.
- [64] JIN Q, DONG S. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *Ulva pertusa* on *Heterosiga akashiwo* and *Alexandrium tamarense* [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 293: 41-55.
- [65] SINGH D P, TYAGIM B, KUMAR A, et al. Antialgal activity of a hepatotoxin-producing cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2001, 17(1): 15-22.
- [66] 张信连, 杨维东, 刘洁生, 等. 杉木粉对塔玛亚历山大藻生长的影响[J]. *海洋环境科学*, 2005, 24 (2) : 23-25.
- [67] PerezE ,Saw yers W G. Lysis of *Gyromonium breve* by cultures of green alga *Nanochloris eucaryotum*[J]. *Cytobias*, 2001, 104(405): 25-31.

- [68] 曹晓星, 苏建强, 郑天凌, 俞志明, 宋秀贤. 海洋微生物的多样性在赤潮调控中的利用[J]. 研究综述, 2007, 31 (5): 63-69.
- [69] 杨小茹, 郑天凌, 苏建强, 俞志明, 宋秀贤. 海洋病毒——一种新的、潜力巨大的赤潮防治工具[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(5): 651-656.
- [70] Lu, J., Chen, F., Hodson, R.E. Distribution, isolation, host specificity, and diversity of cyanophages infecting marine *Synechococcus* spp. in river estuaries [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(7): 3285-3290.
- [71] Nagasaki, K. Possible use of algicidal viruses as microbiological agents against harmful algal blooms [J]. Microb Environ, 1998, 13: 109-113.
- [72] Nagasaki, K., Tarutani, K., Yamaguchi, M. Growth characteristics of *Heterosigma akashiwo* virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(3): 898-902.
- [73] CHEN C, IMAMURA N, NISHIJIMA M, et al. Halymecins, new antimicroalgal substances produced by fungi isolated from marine algae[J]. J Antibiotics, 1996, 49(10): 998-1005.
- [74] JENKINS K M, TOSKE S G, JENSEN P R, et al. Solanapyrones, antialgal metabolites produced by a marine fungus [J]. Phytochemistry, 1998, 49(8): 2299-2304.
- [75] Doucette, G.J. Assessment of the interaction of prokaryotic cells with harmful algal species.[M], in Harmful Marine Algal Blooms., P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien, and C. Marcaillou, Editors. 1995, Lavoisier Science Publ.: Paris. 385-394.
- [76] Furuki, M., Kobayashi, M. Interaction between *Chattonella* and bacteria and prevention of this red tide-EMECs '90[J]. Marine Pollution Bulletin, 1991, 23: 189-193.
- [77] Fukami, K., Nishijima, T., Murata, H., Doi, S., Hata, Y. Distribution of bacteria influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1991, 57: 2321-2326.
- [78] Mayali, X., Azam, F. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal

- blooms [J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2004, 51(2): 139-144.
- [79] 张勇, 席宇, 吴刚. 溶藻细菌杀藻物质的研究进展[J]. 微生物学通报, 2004, 31(1): 127-131.
- [80] Su, J.Q., Yang, X.R., Zheng, T.L., Tian, Y., Jiao, N.Z., Cai, L.Z., Hong, H.S. Isolation and characterization of a marine algicidal bacterium against the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. Harmful Algae, 2007, 6(6): 799-810.
- [81] 王飞, 李燕. 溶藻细菌胞外溶藻活性物质分离的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(17): 7071-7073.
- [82] Lee, S.O., Kato, J., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ikeda, T., Mitsutani, A., Ohtake, H. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp strain A28 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4334-4339.
- [83] Imamura, N., Motoike, I., Noda, M., Adachi, K., Konno, A., Fukami, H. Argimicin A, a novel anti-cyanobacterial compound produced by an algae-lysing bacterium [J]. Journal of Antibiotics, 2000, 53(11): 1317-1319.
- [84] Banin, E., Khare, S.K., Naider, F., Rosenberg, E. Proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of Zooxanthellae [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(4): 1536-41.
- [85] Wang Binxiang, Yang Xiaoru, Lu Jinling, Su Jianqiang, Tian Yun, Lin Zhonghui, Zheng Tianling. A novel marine bacterium producing protein with algicidal activity against *Alexandrium tamarense*. Harmful algae (Under review) .
- [86] Wang, X.L., Gong, L.Y., Liang, S.K., Han, X.R., Zhu, C.J., Li, Y.B. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Harmful Algae, 2005, 4(2): 433-443.
- [87] 龚良玉, 李雁宾, 王修林, 梁生康, 祝陈坚, 韩秀荣. 生物表面活性剂对东海原甲藻生长的影响[J]. 中国环境科学, 2004, 24(6): 692-696.
- [88] Ahn, C.Y., Joung, S.H., Jeon, J.W., Kim, H.S., Yoon, B.D., Oh, H.M. Selective control of cyanobacteria by surfactin-containing culture broth of *Bacillus subtilis* C1 [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(14): 1137-1142.
- [89] Dakhama, A., Nölle, J.d.l., Lavoie, M.C. Isolation and identification of antialgal

- substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Applied Phycology, 1993, 5(3): 297-306.
- [90] Nakashima, T., Miyazaki, Y., Matsuyama, Y., Muraoka, W., Yamaguchi, K., Oda, T. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium gamma-proteobacterium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(3): 684-690.
- [91] YOSH IKAWA K, ADACH I K, N ISH IJIM A M , et al. b-cyanoaianene production by marine bacteria on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacteria[J]. Appl Environ Microbio, 2000, 66(2): 718-722.
- [92] Kodani, S., Imoto, A., Mitsutani, A., Murakami, M. Isolation and identification of the antialgal compound, harmane (1-methyl-beta-carboline), produced by the algicidal bacterium, *Pseudomonas* sp. K44-1[J]. Journal of Applied Phycology, 2002, 14(2): 109-114.
- [93] Mayali, X., Doucette, G.J. Microbial community interactions and population dynamics of an algicidal bacterium active against *Karenia brevis* (Dinophyceae) [J]. Harmful Algae, 2002, 1: 277-293.
- [94] 何培青, 田黎, 李友光, 等. 海洋细菌 B-9987 发酵条件的优化及胞外抑菌物质的理化特性[J]. 中国海洋药物. 2001, 2 (80) : 8-12.
- [95] 卢丽丽, 肖敏, 徐晓东. *Enterobacter cloacae* B5 产转糖基 β -半乳糖苷酶发酵条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(1): 118-121.
- [96] Zhi-Wen Wang, Xun-Li Liu. Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response surface methodology[J]. Bioresource Technology , 2008, 99:8245-8251.
- [97] 代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 894-903.
- [98] Xia Li , Tongcheng Xu , Xiaohang Ma, et al. Optimization of culture conditions for production of *cis*-epoxysuccinic acid hydrolase using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2008, 99, 5391-5396.
- [99] Zhi Wen Wang, Xun-Li Liu. Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response

- surface methodology [J]., *Bioresource Technology*, 2008, 99, 8245-8251.
- [100] 袁哲明, 左斌, 泗桥, 等. 基于均匀设计与支持向量回归的发酵配方优化[J]. *过程工程学报*, 2009, 9(1):148-152.
- [101] Lara EF, Link H, Botz DW. Evaluation of artificial neural networks for modelling and optimization of medium composition with a genetic algorithm[J]. *Proc Biochem*, 2006, (41): 2200-2206.
- [102] Chen, D., Han, Y., Gu, Z. Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(8): 1773-1778.
- [103] 晓辉, 蔡少华, 迟乃玉, 等. 海洋低温BS070623菌株选育及其发酵培养基优化 [J]. *渤海大学学报*, 2009, 30(2): 97-100.
- [104] 肖慈琼, 姜红, 程凯, 赵以军. 溶藻放线菌AN02的筛选及其培养条件的优化 [J]. *微生物学*, 2007, 27(4): 11-14.
- [105] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其OPTI 优化软件[J]. *国外医药抗生素分册*, 1999, 20 (2): 58-66.
- [106] Liu C, Ruan H, Shen H, et al. Optimization of the fermentation medium for alpha-galactosidase production from *Aspergillus Foetidus* ZU-G1 using response surface methodology[J]. *J. food Sci*, 2007, 72(4): 120-125.
- [107] Saudagar P S, Singhal R S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* [J]. *Bioresour technol*, 2007, 98 (10): 2010-2017.
- [108] 方开泰, 王元. 数论方法在统计中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [109] 方开泰, 王元. 均匀设计与均匀设计表 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [110] 杨丽英, 马国顺. 均匀设计在微生物发酵条件优化试验中的应用[J]. *太原师范学院学报*, 2009, 8(3): 23-25.
- [111] LIU D, WANG P, L I F. Application of Uniform Design in Liso-leucine Fermentation [J]. *China J Biotechnol*, 1991, 7(3): 207-212.
- [112] WANG F Q, GAO C J, YANG C Y. Optimization of an Ethanol Production Medium in very High Gravity Fermentation [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(2): 233-236.

- [113] 孙利芹, 林剑, 王长海, 等. 均匀设计在紫球藻培养基优化中的应用[J]. 海洋通报, 2004, 23(6): 66-70.
- [114] 王剑锋, 李江, 王璋. 均匀设计法优化烟管菌产漆酶培养基[J]. 微生物学报, 2007, 34(4): 625-628.
- [115] 王立刚, 王迎春, 任天志, 耿旭, 马文林. 海藻提取物 EClean 在富营养化养殖水体上的应用研究[J]. 中国农业科技导报, 2005, 7(1): 18-21.
- [116] 李雪梅, 杨中艺, 简曙光, 等. 有效微生物群控制湖泊富营养化蓝藻的效应[J]. 中山大学学报, 2000, 39(1): 81-85.
- [117] 王丽风, 邓柳, 胡开林, 等. 液可清微生物制剂修复西坝河水试验[J]. 水资源保护, 2006, 22(6): 64-67.
- [118] 闫志明, 普红平, 阳立平. 生物固定化技术研究及应用评述[J]. 四川化工, 2004, 7(1): 12-14.
- [119] Y.-H. Kang¹, B.-R. Kim, H.J. Choi, et al. Enhancement of algicidal activity by immobilization of algicidal bacteria antagonistic to *Stephanodiscus hantzschii* (Bacillariophyceae) [J]. Applied Microbiology, 2007, 1983-1994.
- [120] Peilian Wei, Jie Chen, Yinghua Lu, et al. High density cultivation of *Dictyostelium discoideum* in a rotating polyurethane foam-bed bioreactor[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2010, 26: 1117-1123.
- [121] 王建龙. 生物固定化技术与水污染控制[M]. 北京: 科学技术出版社, 2002.
- [122] 徐新阳, 张轶, 李海波, 等. 污染地表水修复用微球菌的化学包埋法固定化工艺[J]. 东北大学学报, 2006, 27(10): 1146-1148.
- [123] 沈耀良, 黄勇, 赵丹. 固定化微生物污水处理技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 265-266.
- [124] 曲洋, 张培玉, 郭沙沙, 等. 复合固定化法固定化微生物技术在污水生物处理中的应用[J]. 四川环境, 2009, 28(3): 78-84.
- [125] Thu B, Bruheim P, Espevik T, et al. Alginate polycation microcapsules I: interaction between alginate and polycation[J]. Biomaterials, 1996, 17: 1031-1040.
- [126] Ory, I.d., Romero, L.E., Cantero, D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for

- Acetobacter aceti[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(5): 547-555.
- [127] 欧阳军梅, 段学辉, 傅奇, 牛春铃. 聚氨酯泡沫固定产脂肪酶粗状假丝酵母 (*Candida valida* T2) 细胞的研究[J]. 生物加工过程, 2008, 6(6): 52-57.
- [128] Eugene Quek, Yen-Peng Ting, Hai Meng Tan. *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products[J]. Bioresource Technology, 2006, 97(1): 32-38.
- [129] Ban, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Fukuda, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 8(1): 39-43.
- [130] Hiroshi Kurosawa, Kouichirou Yasumoto, Tetsuhiro Kimura, et al., Polyurethane membrane as an efficient immobilization carrier for high-density culture of rat hepatocytes in the fixed-bed reactor[J]. Biotechnology and bioengineering, 2000, 70(2): 160-166.
- [131] Delong E F. Diversity of naturally occurring prokaryotes[A]. Microbial Diversity in Time and Space[C]. New York: Plenum Press, 1996.
- [132] 郭跃伟. 海洋天然产物和海洋药物研究的历史、现状和未来[J]. 自然杂志, 2008, 31(1): 27-32.
- [133] 刘伟, 徐涛, 蔡敬民, 潘仁瑞. 海洋微生物抗菌活性产物研究进展[J]. 包装与食品机械, 2010, 28(4): 45-50.
- [134] 刘雪莉, 钱伯初. 日本海洋天然活性物质研究简况[J]. 中国海洋药物, 1997, 1: 45-49.
- [135] PROKSCH P, EDRA DA R A, EBEL R. Drugs from the seas-current status and microbiological implications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(23): 125-134.
- [136] Madsen E L. Determining in situ biodegradation: Facts and Challenges [J]. Environ Sci Technol, 1991, 25(10): 1663-1672.
- [137] 郑天凌, 庄铁城, 蔡立哲, 田蕴, 郭楚玲, 徐美珠, 李少菁. 微生物在海洋污染环境中的生物修复作用[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(2): 523-534.

- [138] Wang, X., Li, Z. J., Su, J. Q., Tian, Y., Ning, X. R., Hong, H. S. and Zheng, T.L.*, Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere[J]. *Biological Control*, 2010. 52: 123-130.
- [139] JianQiang Su, XiaoRu Yang, TianLing Zheng, HuaSheng HONG. An efficient method to obtain axenic cultures of *Alexandrium tamarense*--a PSP-producing dinoflagellate[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69(3): 425-430.
- [140] JianQiang Su, XiaoRu Yang, TianLing Zheng, et al. Isolation and identification of a marine algicidal bacterium against toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*[J]. *Harmful Algae*, 2007, 6(6): 799-810.
- [141] Feng-Min Li, Hong-Ying Hu. Isolation and Characterization of a Novel Antialgal Allelochemical from *Phragmites communis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 6545-6553.
- [142] Yu-Jie Men, Hong-Ying Hu, Feng-Min Li. Effects of the novel allelochemical ethyl 2-methylacetoacetate from the reed (*Phragmites australis Trin*) on the growth of several common species of green algae[J]. *J Appl Phycol*, 2007, 19: 521-527.
- [143] 詹萍, 梁静娟, 庞宗文, 张琳, 岳翰林. 假交替单胞菌 J IV - 49 产抗真菌活性物质的发酵条件研究[J]. *生物技术*, 2007, 17(1): 69-72.
- [144] Okami, Y., Okazaki, T., Kitahara, T., Umezawa. Studies on marine microorganisms. V. A new antibiotic, aplasmomycin, produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1976, 29(10): 1019-1025.
- [145] 孔赞, 缪礼鸿, 曾驰, 宋瑶, 王爽. 溶藻链霉菌 SG-001 发酵条件的优化及溶藻活性物质的理化性质[J]. *湖北农业科学*, 2009, 48 (6) : 1361-1364.
- [146] Sadik Ali S, Bibhu Prasad P, Saleem J, et al. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 73(5): 1054-1058.
- [147] 顾宗濂. 中国富营养化湖泊的生物修复[J]. *农村生态环境*, 2002, 18(1): 42-45.

- [148] 郑焕春, 周青. 微生物在富营养化水体生物修复中的作用[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(1): 197-202.
- [149] Wang L, Li J, Kang W L. Bioremediation of eutrophicated water by *Acinetobacter calcoaceticus*[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2007, 78(6): 527-530.
- [150] 庞金钊等. 微生物制剂在城市湖泊水体生物修复中的作用[J]. 环境污染与防治, 2003, 25(5): 301-305.
- [151] Y.-H.Kang, B.-R.Kim, H.J.Choi, J.G.Seo, B.-H.Kim, M.-S.Han. Enhancement of algicidal activity by immobilization of algicidal bacteria antagonistic to *Stephanodiscus hantzschii*(Bacillariophyceae)[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103: 1983-1984.
- [152] 张向阳, 邢丽贞. 固定化藻类去除污水中氮磷的试验研究[J]. 中国给水排水, 2008, 24(1): 95-97.
- [153] Sashenka Fierro, Maria del Pilar Sanchez Saavedra, Carmen Copalcua. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(5): 1274-1279.
- [154] Endong Zhang, Bing Wang, Qihua Wang, et al. Ammonia nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(5): 3787-3793.
- [155] De Bashan, Luz E., Moreno, et al. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth promoting bacterium[J]. Water Research, 2002, 36(12): 2941-2948.
- [156] 张志刚, 徐德强, 李光明, 等. 固定化优势菌种降解2, 6-二叔丁基酚[J]. 中国环境科学, 2005, 25(1): 57-60.
- [157] 姚卫蓉, 姚惠源. 多孔淀粉包埋益生菌的工艺研究[J]. 广州食品工业科, 2004, 20: 31-33.
- [158] Ishii, Takanori, Hasegawa, et al. Powder preparation and a process for preparing the same [P]. US Patent 5919486, 1997.

- [159] Wang D I C.Recent advances in immobilized cells[J].Biotechnol Bioeng,1991, 38 :261~269.
- [160] Peilian Wei , Jie Chen , Yinghua Lu, Xingchao Liang, Heming Chen, Zhinan Xu.High density cultivation of *Dictyostelium discoideum* in a rotating polyurethane foam-bed bioreactor[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2010, 26: 1117-1123.
- [161] Zhen Wang, Yuanliang Wang , ShangTian Yang, Runguang Wang, Huiqing Ren. A novel honeycomb matrix for cell immobilization to enhance lactic acid production by *Rhizopus oryzae*[J].Bioresource Technology,2010, 101: 5557-5564.

附录

参与的科研课题

1. 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)“海洋抑藻活性物质的发现与研究 (No. 2008AA09Z408)”, 2008.5-2010.12;
2. 高等学校博士点专项基金“厦门海域微生物生态过程及其调控赤潮藻生长作用 (No. 20050383002)”, 2006.1-2008.12;
3. 国家科技部国家自然科技资源平台建设项目“特殊生境/特殊功能微生物菌种资源整理整合 (No. 2005DKA21209)”, 2008.1-2008.12;
4. 国家自然科学基金重点项目“我国近海海洋细菌的生态过程及关键菌群影响赤潮生消的机理 (No. 40930847)”, 2010.1-2013.12;

发表和待发表的学术论文及专利

1. Jing Lin , Xiao-wei Zheng, Yun Tian, Tian-ling Zheng. The Application of Uniform Design in the Optimizaition of Cultivation Conditions and Medium Compositions of Marine Algicidal Bacteria DH46. Preparation.
2. Jing Lin , Xiao-wei Zheng, Qian Guo, Yun Tian, Tian-ling Zheng. Biodegradation of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by immobilization of a marine algicidal bacterium in polyurethane foam. Preparation.
3. Zhou Yuexia, Li Xinyi, Zhang Youyu, Lin Jing, Tian Yun, Zheng Tianling. Optimization of Medium and Fermentation Conditions for *Pseudoalteromonas* sp. SP48 Producing Algicidal Substances. Submitted to Applied Microbiology.
4. Xiaowei Zheng, Bangzhou Zhang, Jinlong Zhang, Liping, Huang, Jing Lin, Xinyi Li, Xiaoru Yang, Tianling Zheng. Discovery and study on a novel marine algicidal actinomycete and its' active substance against the harmful algal bloom specie *Phaeocystis globosa*. Submitted to ISME Journal.
5. Xiaowei Zheng^{1,2*}, Xiaoru Yang^{1,3*}, Hui Wang¹, Liping Huang¹, Jing Lin¹, Xinyi Li¹, Bangzhou Zhang¹, Jinlong Zhang¹, Tian Yun¹, Tianling Zheng. Algicidal bacterium

proxidant algicidal compound. Submitted to Environmental Microbiology 2011.

6. 郑天凌, 林婧, 田蕴, 周艳艳, 郑小伟, 周月霞, 杨小茹, 苏建强, 张帮周, 章军。一种杀藻菌的复合培养基及其制备方法 (国家发明专利, 申请号: 201010258067.7)。

7. 郑天凌, 郑小伟, 张帮周, 黄丽萍, 林婧, 张金龙。一种强效抑藻活性化合物及其制备方法与应用 (国家发明专利, 申请号: 201110067581.7)。

缩略语对照表

HAB: Harmful algal bloom, 有害赤潮

ECPs: Extracellular products, 胞外产物

FDA: Fluorescein diacetate, 双醋酸荧光素

CFB: Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides

PVA: Polyethylene alcohol, 聚乙烯醇

PUF: Polyurethane foam, 聚氨酯泡沫

EM: Effective Microorganisms, 有效微生物菌群

EMP: 12EEnvironmental microbial preparations, 环境微生物制剂

DMF: N,N-Dimethyl formamide, N,N-二甲基甲酰胺

FDA: Fluorescein diacetate, 双醋酸荧光素

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindolestain

EDTA: Ethylene diamine tetraaceticacid, 乙二胺四乙酸

IPTG: Isopropyl β -D-thiogalactoside, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷

X-Gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

MDA: Malondialdehyde, 丙二醛

ROS: Reactive oxygen species, 活性氧

SOD: Superoxide dismutase, 超氧化物歧化酶

TLC: Thin layer chromatography, 薄层色谱法

NMR: Nuclear magnetic resonance, 核磁共振

^1H -NMR: 核磁共振氢谱

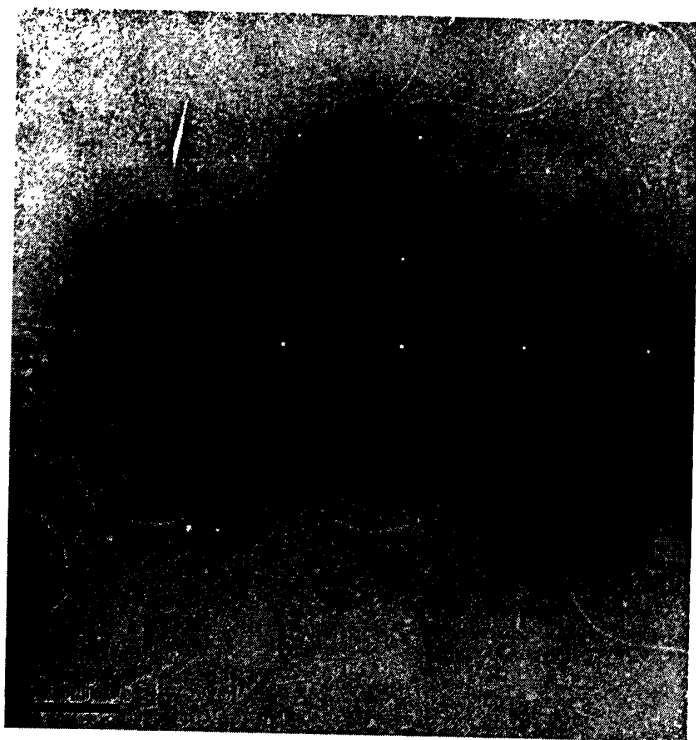
^{13}C -NMR: 核磁共振碳谱

MS: mass spectrometry, 质谱

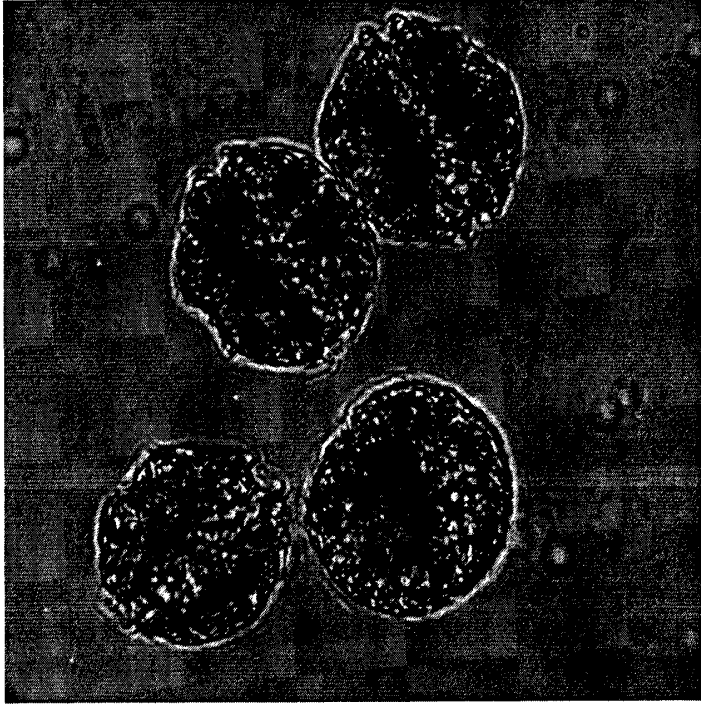
ESI-MS: electrospray ionization mass spectrometry, 电喷雾电离质谱

实验用菌种、藻种照片

细菌 *Alteromonas* sp. DH46 电镜照片



藻种荧光显微镜照片 (1000×) *Alexandrium tamarense*



致 谢

论文定稿之际,回想研究生三年的点滴,谨向硕士期间悉心帮助指导我实验并始终关心支持我的老师、同学和朋友表示衷心的感谢。

首先要感谢我的导师郑天凌教授对我的悉心指导。郑老师渊博的学识、严谨求实的科学态度使我受益非浅,令我在顺利完成学业的同时也收获了科学的思维与工作方法。老师虚怀若谷的胸怀、磊落的品格和积极进取的人生态度都是我一生学习的榜样。

感谢田蕴副教授在生活上给我的关心和鼓励,以及在实验过程给予的建议和指导,使我的毕业论文得以顺利完成,在此谨表达我真诚的谢意。

感谢本实验室苏建强老师和杨小茹博士。他们为本研究的顺利开展奠定了基础,包括菌种的分离鉴定、无菌藻株的获得、研究方法的建立等。

本论文得以顺利完成,期间得到了很多老师热心指导和帮助。感谢学院 211 分析测试中心谢忠老师及中心其他老师们对实验工作的大力支持。还要特别感谢本课题组的郑伟和郑小伟博士在实验思路和方法上的耐心指导,他们在基础实验技术,困难问题得解决,数据处理,论文写作上都给予了极大的帮助。尤其感谢实验室的各位兄弟姐妹们的关心和支持:赖其良、王宾香、王慧、柏仕杰、杨彩云、周月霞、原雅纬、周艳艳、蔡雯蔚、黄丽萍、李欣毅、吕意华、李姜维、郭倩、张帮周、于杨阳、安新丽、吕静琳、张金龙、马占军、孙静、董培艳、杨晓永、张化俊、陈章然、李祎、李虎等同学,与你们相处的时光将是我弥足珍贵的回忆。

最后由衷地向我的父母家人致以最高的敬意,感谢你们一直用宽容的心、深厚的爱包容着我,我成长的每一步都浸渍着你们的心血,在此顺祝他们永远健康快乐!

本论文的顺利完成,得到了国家高技术研究发展计划(863)项目“海洋微生物抑藻(有毒赤潮藻)活性化合物的发现与利用”(2008AA09Z408)与国家自然科学基金重点项目“我国近海海洋细菌的生态过程及关键菌群影响赤潮生消的机理”(No. 40930847),长江学者和创新团队发展计划项目(40821063)和近海海洋环境科学国家重点实验室资助的资助。在此表示深深的感谢!

林 婧

2011 年 6 月

