

杀藻菌株 *Deinococcus* sp. Y35 的培养基优化及其杀藻菌剂的制备*

李祎^{1,2} 姜晓冰² 刘磊² 朱红¹ 王海磊² 郑伟¹ 郑天凌^{1**}

¹厦门大学生命科学学院, 滨海湿地生态系统教育部重点实验室, 厦门 361102

²河南师范大学生命科学学院 新乡 453007

摘要 塔玛亚历山大藻是一种有毒甲藻, 常引发赤潮, 严重威胁海洋生态的稳定和人类的健康, 细菌 *Deinococcus* sp. Y35 表现出对塔玛亚历山大藻的杀藻能力, 为促进菌株生长、提高杀藻效果并方便保存, 对菌株 Y35 培养条件进行优化, 并制备杀藻菌剂。分别确定菌株 Y35 生长所需的最适氮源、碳源、无机盐, 并确定其最适添加量, 在优化的基础上完成冻干菌剂的制备和最适冻干保护剂的选择。菌株 Y35 生长的最适培养基成分是 1.0% 胰蛋白胍和 0.5% 酵母粉。在优化的培养基基础上对菌株 Y35 进行发酵, 培养至对数期后进行冷冻干燥, 制备杀藻菌剂。菌株 Y35 需要添加 1.0 g/L 的蔗糖作为冻干保护剂。杀藻菌剂的杀藻添加量为 2.0 mg/mL。本研究可为下一步将细菌应用于赤潮治理奠定基础。(图 9 参 26)

关键词 *Deinococcus* sp. Y35; 塔玛亚历山大藻; 培养基优化; 杀藻菌剂

CLC Q939.9: X55

Culture medium optimization for algicidal strain Y35 and preparation of algicidal bacterial agents*

LI Yi^{1,2}, JIANG Xiaobing², LIU Lei², ZHU Hong¹, WANG Hailei², ZHENG Wei¹ & ZHENG Tianling^{1**}

¹School of Life Sciences, Xiamen University, Key Laboratory of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems, Xiamen 361102, China

²College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract *Alexandrium tamarense* is a toxic dinoflagellate, which causes harmful algal blooms (HABs), posing a serious threat on marine ecology and human health. *Deinococcus* sp. Y35 shows algicidal activity on *A. tamarense*. This research aimed to optimize its culture medium and improve the preparation of bacterial agents. We determined the optimum nitrogen source, carbon source and inorganic salts of strain Y35, then decided the optimum adding amount, prepared the freeze drying bacterial agents, and chose the optimum freeze-drying protective agent. The optimum culture medium composition of strain Y35 was found to be 1% tryptone and 0.5% yeast extracts. We needed to add 1.0 g/L sucrose as a protective agent for bacterial culture of strain Y35 before freeze-drying. The optimum amount of algicidal agent was 2.0 mg/mL. The optimization of culture conditions could ensure the bacterial growth and algicidal activity. The results of this research provide some foundation for HABs control in the future.

Keywords *Deinococcus* sp. Y35; *Alexandrium tamarense*; optimization of culture medium; algicidal bacterial agents

海洋是人类文明的摇篮, 人类为了发展从海洋获取了源源不断的生物资源、矿产资源、医药资源、能源等^[1-2]。在全球资源日益紧缺的今天, 对海洋资源的开发和保护是人类发展最有效的途径之一。然而在近 50 年, 工业化的高速发展、海洋资源的过度开发和化石燃料的大量消耗, 对海洋环境造成了严重的污染和破坏。目前, 海洋生态破坏主要表现在过度捕

捞造成渔业资源退化、陆源污染物的不合理排放、营养物质过盛造成的富营养化现象及石油等有机污染物对海洋长久的破坏等方面^[3]。在众多海洋污染之中, 与海洋生态系统的稳定和资源的可持续利用密切相关的赤潮已然成为研究的热点^[4]。

赤潮是藻类过度生长形成的海洋灾害, 赤潮的爆发对水体质量造成严重影响, 破坏海洋生态系统, 并最终影响海洋经济和人类健康。大多数藻类形成的赤潮并没有毒性, 只有少数的赤潮藻可以产生毒素, 其产生的藻毒素通过食物链传递, 很少生物量即可对海洋生物造成严重危害^[5]。甲藻作为赤潮原因种, 且常分泌毒素, 如塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 在形成赤潮时, 能够改变海水颜色发出腥臭味, 降低溶解氧含量, 并且分泌麻痹性贝毒, 造

收稿日期 Received: 2015-12-05 接受日期 Accepted: 2016-04-06

*国家自然科学基金项目 (41576109, 31500095) 和河南师范大学博士科研启动基金 (5101049170160) 资助 Supported by the National Nature Science Foundation of China (41576109, 31500095) and the Doctoral Scientific Research Start-up Foundation of Henan Normal University (5101049170160).

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: microzh@xmu.edu.cn)

成其他海洋生物的死亡^[6]。在我国沿海也常遭受塔玛亚历山大藻赤潮的危害,该藻能够快速繁殖,常引发赤潮,所分泌的麻痹性贝毒严重破坏海洋生态环境及威胁海洋生物的生长^[7]。

针对甲藻赤潮的危害,人们采取了大量的措施,而以安全高效著称的生物法应用最为普遍^[8]。生物法治理赤潮是指通过植物、原生动植物、鱼虾贝类及微生物对赤潮藻种的抑制作用,不利于赤潮生物的生长,从而达到治理赤潮的目的^[9]。其中,微生物与海洋藻类有着十分密切的关系,不仅调控着藻类的生长,还影响着能量和营养物质的分配^[10-11]。到目前为止,在实验室范围内开展了大量的杀藻细菌与有害藻类相互作用的研究,而如何将杀藻细菌应用于赤潮现场的研究并不多见。本课题组前期从富营养化湖水中筛选到一株杀藻菌株 *Deinococcus* sp. Y35,能够高效地作用于有毒甲藻——塔玛亚历山大藻^[12-13]。为了加强菌株Y35的杀藻效果和应用基础,本研究对菌株Y35培养基成分进行优化,并在此基础上完成杀藻菌剂的制备,为下一步将杀藻菌株应用于赤潮防治奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

杀藻菌株 *Deinococcus* sp. Y35 (GenBank no. KJ639011) 保藏于在中国海洋微生物菌种保藏管理中心,保藏编号为 MCCC 1F01224,菌株Y35在营养琼脂(蛋白胨10 g,牛肉膏3 g,氯化钠5 g,蒸馏水1 000 mL)中培养24 h后达到对数生长期;实验用藻种为塔玛亚历山大藻(*A. tamarense* ATGD98-006),由暨南大学水生生态研究所提供。采用f/2培养基^[14],于光强50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$,温度(20 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$,昼夜比 L:D = 12 h:12 h 的条件下培养。

1.2 主要试剂

胰蛋白胨,大豆蛋白胨,细菌蛋白胨,酵母粉,牛肉膏,琼脂,甘露糖,葡萄糖,蔗糖,淀粉,海藻酸钠, K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 , CaCl_2 , NaCl 。

1.3 实验仪器

超净工作台(SDJ-ZS,上海淀山湖净化设备厂);奥立龙酸度计(Thermo Orion, USA);电子分析天平(AL104, Mettler Toledo 仪器有限公司);超纯水制备装置(Millipore, USA);高温高压灭菌锅(Labtech);智能光照培养箱(宁波海曙赛福实验仪器厂);酶标仪(SPECTRA max M2, Molecular Devices, USA);双层可编程恒温摇床(ZHWY-2102, 上海智诚分析仪器有限公司);冷冻干燥机(FreeZone, Labconco, USA);光学显微镜(Olympus BX41, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan)。

1.4 实验方法

1.4.1 菌株Y35的活化 将菌株Y35接种于营养琼脂液体培养基中,在28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养中120 r/min培养24 h以上,待菌株Y35培养至对数生长期后,作为种子液。

1.4.2 杀藻效果验证 每隔一定时间分别取对照组和处理组中塔玛亚历山大藻培养液,200 μL 样品于96孔板,用酶标仪检测440 nm激发光激发下680 nm处的荧光强度^[15],根据测

定的对照组和处理组的藻细胞荧光强度,同时藻细胞形态变化进行观察。杀藻率计算:

$$\text{杀藻率 (Algicidal activity)} = (F_C - F_T) / F_C \times 100\%$$

其中, F_C 表示对照组藻细胞的荧光值, F_T 表示处理组藻细胞的荧光值。

1.4.3 不同氮源对菌株Y35生长及杀藻效果的影响 在基础培养基(磷酸高铁0.1 g,去离子1 L, pH 7.6-7.8)基础上分别添加牛肉膏(Beef extract)、细菌蛋白胨(Bacto peptone)、胰蛋白胨(Tryptone)和大豆蛋白胨(Soybean peptone)作为氮源,设置不同的处理组,每个处理组做3个平行。

以1.0%的接种量将菌株Y35的种子液接入含有100 mL上述不同处理组培养液的三角瓶中,于28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养120 r/min培养24 h以上。

将上述各组发酵液按照2.0%的添加量加入到对数生长期的塔玛亚历山大藻培养液中,添加同样体积无菌培养基的藻培养体系作为对照组,每个处理做3个平行,将处理组和对照组培养体系置于在藻正常培养条件下进行试验,测定不同氮源培养条件下菌株Y35的杀藻率。同时,取发酵完成后的菌液用酶标仪在OD_{600 nm}下测定不同培养液中细菌的吸光度值^[16],每个处理组做3个平行。

1.4.4 不同碳源对菌株Y35生长及杀藻效果的影响 将菌株Y35的种子液加入到含有不同碳源包括葡萄糖(Glucose)、蔗糖(Sucrose)、可溶性淀粉(Soluble starch)和酵母粉(Yeast extract)且添加了相同浓度最适氮源的基础培养基中,接种量、培养方法及取样检测方法如1.4.3的步骤所述。

1.4.5 不同无机盐对菌株Y35生长及杀藻效果的影响 将菌株Y35的种子液加入到含有不同无机盐包括 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 NaCl 和 K_2HPO_4 且添加了相同浓度最适氮源的基础培养基中,同时将Y35接种到不添加无机盐的且添加了相同浓度最适氮源的基础培养基中作为阳性对照,接种量、培养方法及取样检测方法如1.4.3的步骤所述。

1.4.6 不同氮源浓度对菌株Y35生长及杀藻效果的影响 分别将终浓度为0.7%、1.0%、1.5%、2.0%和3.0%的最适氮源添加入基础培养基中,作为含有不同氮源浓度的处理组。

将种子液接种在上述处理组中,在28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养中120 r/min培养24 h以上,按照1.4.3的步骤进行杀藻效果和菌株生长状况测定。

1.4.7 不同碳源浓度对菌株Y35生长及杀藻效果的影响 分别将终浓度为0.1%、0.3%、0.5%、0.7%和1.0%的最适碳源添加入含有相同浓度最适氮源的基础培养基中,作为含有不同碳源浓度的处理组。

将种子液接种在上述处理组中,在28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养中120 r/min培养24 h以上,按照1.4.3的步骤进行杀藻效果和菌株生长状况测定。

1.4.8 杀藻菌剂的制备 将菌株Y35的种子液接种于2 L上述优化后的液体培养基中,在28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养中120 r/min培养24 h以上。

将发酵产物在冷冻干燥机下进行冷冻干燥,将冻干产物以0.1、0.4、0.8、1.2、2.0、3.0、4.0和5.0 mg/mL的添加量加入到对数期生长的塔玛亚历山大藻培养液中,并测定不同添加量的杀藻效果,确定最适杀藻添加量。

按照0.1 g/L、0.5 g/L和1.0 g/L的添加量分别将海藻酸钠、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖作为冻干保护剂与菌株Y35的发酵液进行混合,在冷冻干燥机下进行冷冻干燥,按照上述最适杀藻添加量将不同冻干保护剂作用下的冻干菌剂添加到对数期生长的藻培养液中,并验证杀藻效果,从而确定最适的冻干保护剂类型和含量。

1.4.9 杀藻菌剂的杀藻过程 按照2.0 mg/mL的添加量将上述制备的杀藻菌剂加入到对数生长期的藻培养液中,每隔12 h取藻液在光学显微镜下观察藻细胞的形态变化。

2 结果与讨论

2.1 菌株Y35培养的最适氮源、碳源、无机盐及其添加量

氮源作为构成生物体的蛋白质、核酸及其他氮素化合物的材料,对于细菌的生长必不可少^[17]。除了少数细菌能够利用无机氮素化合物生存外,大部分的细菌均需要提供有机氮素才能生长^[18]。为了确定菌株Y35发酵的最适氮源,将牛肉膏(Beef extract)、细菌蛋白胨(Bacto peptone)、胰蛋白胨(Tryptone)和大豆蛋白胨(Soybean peptone)^[19]分别作为菌株Y35生长的唯一氮源,经过培养后测定菌株Y35的生长及杀藻效果(图1A)。结果表明,菌株Y35在胰蛋白胨和大豆蛋白胨条件下生长较好,其OD_{600 nm}值分别为1.32和1.37。菌株Y35在胰蛋白胨为唯一氮源培养条件下的杀藻效果最高,达到52.8%,而菌株Y35在以大豆蛋白胨为唯一氮源条件下杀藻效果非常低,仅为11.7%。因此,菌株Y35在胰蛋白胨为氮源条件下不仅生长较好且具有较高的杀藻效果,胰蛋白胨是菌株Y35发酵的最适氮源。胰蛋白胨包含丰富的氮源和氨基酸,被广泛用于微生物的培养,Kientz等用胰蛋白胨来分离培养细菌^[20],Li等也发现胰蛋白胨作为最适氮源用于细菌的培养^[21]。

碳源对微生物生长代谢有重要作用,为其提供细胞的碳架,提供生命活动所需的能量,提供合成产物的碳架,为微生物的正常生长、代谢、繁殖提供物质基础^[22]。除了少数化能合成或光合微生物外,绝大多数微生物的生长都需要提供有机碳源,而不同类群的微生物所需要的碳源种类不同。因此,为了确定菌株Y35培养的最适碳源,选择葡萄糖(Glucose)、蔗糖(Sucrose)、可溶性淀粉(Soluble starch)和酵母粉(Yeast extract)^[23]分别作为菌株Y35生长的唯一碳源,测定菌株Y35在不同碳源条件下的生长及杀藻效果(图1B)。结果表明,菌株在添加了酵母粉作为碳源的条件下有较高的生长效果,经过培养后其OD_{600 nm}值为1.63,均高于其他碳源条件下的生长效果。菌株在蔗糖、淀粉及酵母粉为碳源的条件下有相对较高的杀藻效果,杀藻率分别达到了86.4%、83.4%和87.0%。菌株Y35在酵母粉为碳源的条件,具有较高的杀藻效果,与其他几种碳源相比,更有利于菌株Y35的生长。因此,酵母粉是菌株Y35培养的最适碳源。

无机盐对于维持微生物的细胞内外渗透压有非常重要的作用。为了确定菌株Y35的生长是否需要添加无机盐以及最适的无机盐种类,选择FeSO₄·7H₂O、CaCl₂、MgCl₂、NaCl和K₂HPO₄分别作为菌株Y35生长的无机盐。但是由于菌株Y35

分离于淡水环境,因此我们设置了一组不添加任何无机盐的处理组,在培养一段时间以后,测定了菌株Y35的生长量及杀藻率(图1C)。结果表明,在添加了FeSO₄·7H₂O为无机盐的处理组,菌株Y35的生长量最高,其OD_{600 nm}值为1.46,然而其杀藻率均低于其他无机盐处理组。其他无机盐添加组和未添加处理组的生长量均比较接近,而不添加无机盐的处理组的生长量相对较高,其OD_{600 nm}值为1.04,同时未添加无机盐处理组的杀藻效果最高,均高于各添加无机盐处理组,达到了79.03%。这表明菌株Y35的生长不需要添加无机盐。

为了确定菌株Y35培养的最适胰蛋白胨添加量,将0.7%、1.0%、1.5%、2.0%和3.0%的胰蛋白胨添加到基础培养基中,研究不同胰蛋白胨浓度下的菌株Y35的生长及杀藻效果(图1D)。结果表明,菌株在胰蛋白胨添加量为1.0%和3.0%时有较高的生长量,其OD_{600 nm}值分别为1.49和1.52。菌株Y35的杀藻率在胰蛋白胨添加量为1.0%的时候达到最高水平,为60.4%。从添加量1.0%开始,随着胰蛋白胨添加量浓度的升高其杀藻效果逐渐降低。因此,菌株Y35培养的最适胰蛋白胨添加量为1.0%。

为了确定菌株Y35培养的最适碳源浓度,以0.1%、0.3%、0.5%、0.7%和1.0%添加量的酵母粉为唯一碳源对菌株Y35进行培养,经过一段时间后测定其生长和杀藻效果(图1E)。结果表明,菌株Y35在各添加量条件下的生长差异不大,但是杀藻效果表现出先升高后降低的趋势。在酵母粉添加量为0.5%的处理组,菌株Y35的杀藻效果达到最高水平,为63.0%。因此,菌株Y35培养的最适酵母粉浓度为0.5%。

经过优化后的培养基包括1.0%的胰蛋白胨添加量和0.5%的酵母粉添加量,将原始培养基与优化后的培养基对比分析,优化后的培养基能够更好地促进杀藻菌株Y35的生长,且显著降低了半致死剂量(LD₅₀),提高了杀藻效果。

2.2 杀藻菌剂的制备与最适添加量

为了使得杀藻菌株Y35在赤潮现场更方便高效地应用,需要将菌株Y35的发酵液经过冻干处理,得到杀藻冻干菌剂。杀藻菌株的细胞处于冻干状态,可以长期保存,待用于杀藻的时候,冻干菌剂中的细菌细胞在水体藻能够再次复苏,继续分泌杀藻物质,同时冻干菌剂中的杀藻物质能够更快发挥杀藻效果。将菌株Y35接种于优化后的培养基进行培养至对数期后,将菌株Y35的发酵产物进行冻干处理,得到冻干菌剂。菌株Y35的冻干菌剂呈絮状,颜色表现为橙红色(图2)。

为了确定不同添加量的冻干菌剂的杀藻效果,0.1、0.4、0.8、1.2、2.0、3.0、4.0和5.0 mg/mL的Y35冻干菌剂添加到藻培养液中(图3),结果表明,在处理18 h后0.1-1.2 mg/mL添加量的冻干菌剂的杀藻效果偏低,均低于50%。2.0 mg/mL添加量的冻干菌剂有最高的杀藻效果,达到62.5%,当添加量超过2.0 mg/mL时,杀藻率随着添加量的升高而逐渐降低。因此,Y35冻干菌剂的最适添加量为2.0 mg/mL。

冻干菌剂的制备有利于更好将杀藻细菌应用于赤潮的防治,在赤潮爆发时候,杀藻冻干菌剂的播洒也是有一定方法的,可以通过预先用海水梯度稀释进行喷洒,或者通过一定的方法将菌剂更加均匀播洒在赤潮区域海水的表面,可以使得杀藻菌剂更好地发挥效果,同时也降低了对杀藻菌剂的需求量,从而降低了成本。

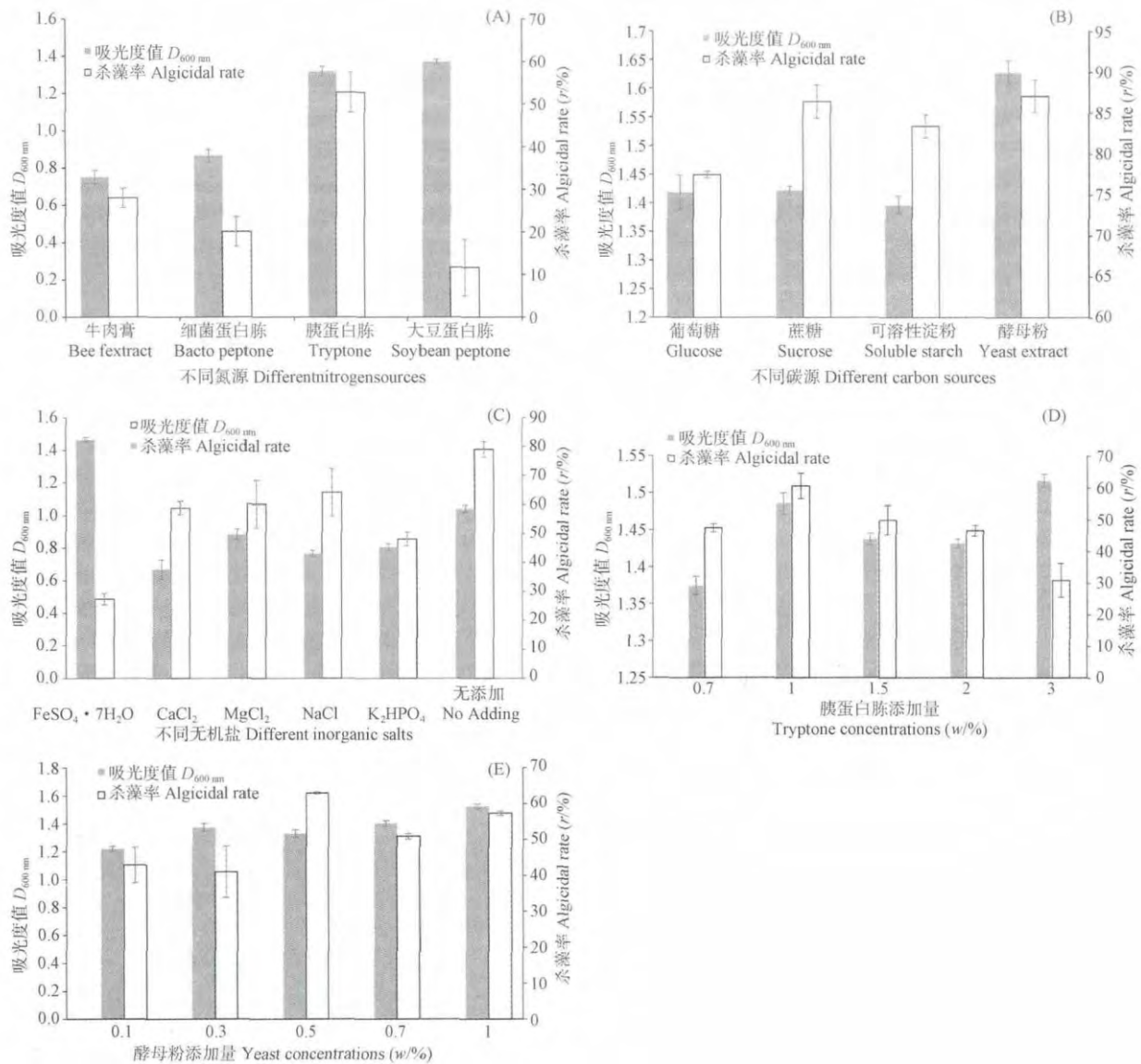


图1 不同氮源(A)、碳源(B)、无机盐(C)及不同胰蛋白胍(D)、酵母粉(E)添加量条件下菌株Y35的生长及杀藻效果。

Fig. 1 The growth and algicidal activity of strain Y35 under different nitrogen sources (A), carbon sources (B), inorganic salts (C) and different concentrations of tryptone (D) and yeast (E).



图2 杀藻菌株Y35发酵产物制备的冻干菌剂。

Fig. 2 Frozen dry bacterial agents.

2.3 冻干保护剂的选择

细菌的细胞活性在冷冻干燥过程会受到影响,因此在冻干之前需要加入一定的冻干保护剂,从而维持细菌的活性^[24]。为了保护冻干菌剂中杀藻细菌的活性,将甘露糖、葡萄

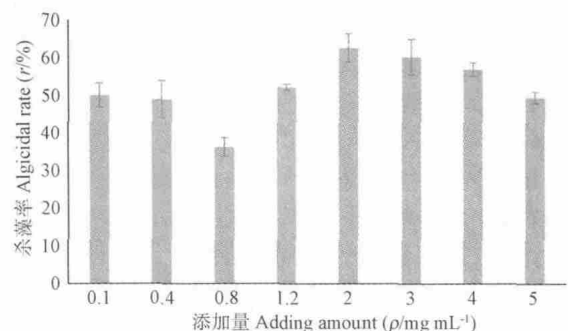


图3 不同添加量冻干菌剂的杀藻效果。

Fig. 3 Algicidal activity of frozen dry bacterial agents of different adding amount.

糖、海藻酸钠和蔗糖作为冻干保护剂与细菌发酵液一起进行冷冻干燥,并验证杀藻效果(图4)。图4A-C分别是菌株Y35的发酵液中分别添加了不同浓度的甘露糖、葡萄糖、海藻酸

钠后的冻干菌剂的杀藻效果,与未添加任何冻干保护剂的冻干产物的杀藻率相比,添加了冻干保护剂的冻干产物杀藻效果没有明显提升,均在处理66 h时才表现出较高杀藻效果。然而在添加了蔗糖作为冻干保护剂的冻干产物的杀藻效果与未添加保护剂的冻干产物相比有明显提高,在处理3 h时,添加蔗糖的冻干产物有明显的杀藻效果,并且杀藻效果随着添加量的提高而增加,在作用18 h后,添加1.0 g/L的蔗糖作为冻干保护剂的冻干产物有高效、稳定的杀藻效果(图4D)。因此,我们选择1.0 g/L的蔗糖作为菌株Y35菌剂的冻干保护剂。

蔗糖常被选作冻干保护剂,蔗糖的羟基能替代细菌蛋白表面的水的羟基,使得蛋白的主相变温度变化不大,从而避免了生物活性物质由于发生相变所造成的机械损伤^[25]。蔗糖是作为填充剂对粒子赋型,同时,它的空间位阻效应也使之更能有效地进行冷冻保护^[26]。

为了考虑到工业化生产杀藻菌剂的成本要求,可以用糖蜜来代替蔗糖作为冻干保护剂,糖蜜是制糖工业的副产品,比较廉价,含有较高含量的蔗糖,从而可以降低成本;同时,氮源和碳源也可以考虑用玉米浆或者黄豆粉等廉价的原料用于培养细菌。然而,本文研究目前停留在理论研究及实验室小试阶段,以后大规模应用可以着重放在如何高效、低成本的研发杀藻菌剂上,将在我们后续的研究中体现。

2.4 杀藻菌剂的杀藻过程

为了确定杀藻菌剂对塔玛亚历山大藻细胞的作用特点

和杀藻过程,在光学显微镜下对这一杀藻过程进行了研究。将冻干菌剂以2.0 mg/mL的添加量加入到对数生长期的藻培养液中,每隔12 h取样在光学显微镜下观察藻细胞的形态。刚加入杀藻菌剂的藻培养液(0 h)中的藻细胞形态正常,可以看到明显的近球形的藻细胞,细胞被横沟分成明显的上下壳,细胞质致密且均一,细胞壁与细胞膜紧密结合(图5A)。在杀藻菌剂作用12 h后,细胞形态发生明显改变,胞内物质收缩,细胞失水,发生明显的质壁分离现象(图5B)。随着杀藻菌剂作用时间延长,细胞壁和细胞膜破损,胞内物质明显外溢,失去完整的细胞形态(图5C)。当杀藻菌剂作用36 h后,藻细胞完全裂解,细胞壁破裂成碎片,胞内物质完全溢出,藻细胞死亡(图5D)。通过对杀藻过程的观察,确定了杀藻菌剂的作用特点,在杀藻菌剂的作用下,藻细胞的形态发生改变,细胞结构被破坏,胞内物质外溢,细胞裂解死亡。

3 结论

通过优化菌株Y35的培养条件,确定了Y35生长的最适氮源是胰蛋白胨,最适碳源是酵母粉,由于菌株Y35是淡水细菌,其生长过程中不需要添加无机盐。对最适氮源和最适碳源添加量进一步研究,确定最适胰蛋白胨添加量为1.0%,最适酵母粉添加量为0.5%。

利用优化后的培养基培养菌株Y35,将其发酵液进行冻

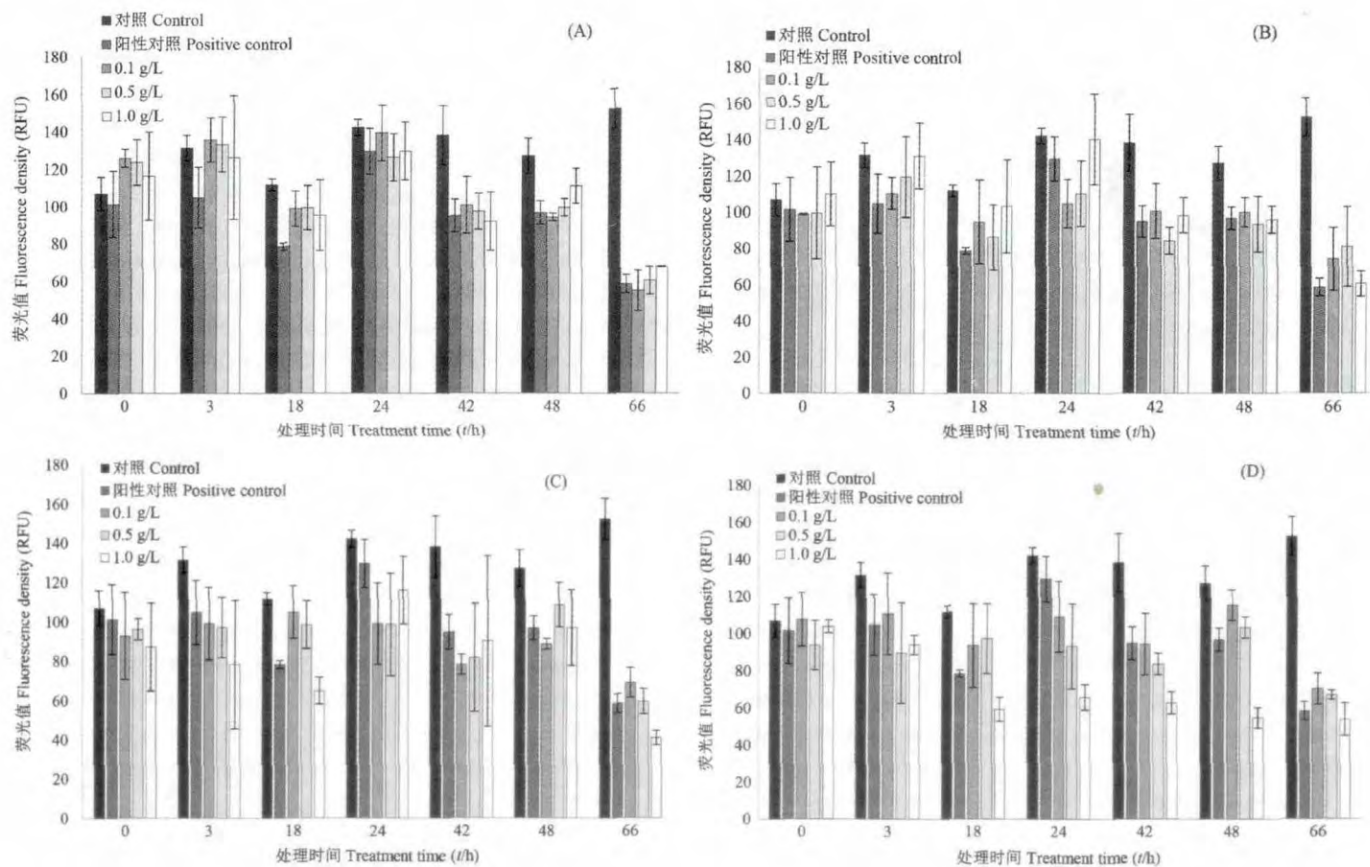


图4 添加了不同浓度甘露糖(A)、葡萄糖(B)、海藻酸钠(C)和蔗糖(D)作为冻干保护剂的冻干菌剂在不同处理时间的杀藻效果。

Fig. 4 Algicidal activity of frozen dry bacterial agents added with mannose (A), glucose (B), sodium alginate (C) and sucrose (D) as protective agent.

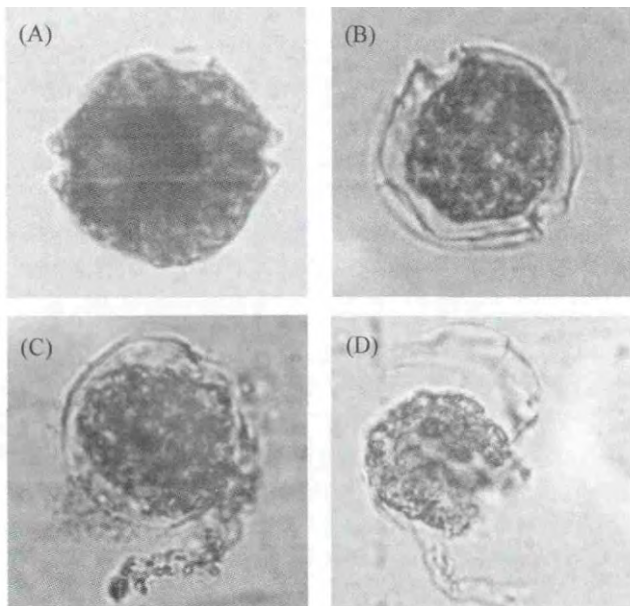


图5 杀藻菌剂作用下塔玛亚历山大藻细胞的死亡过程(400×)。

Fig. 5 The death procedure of *Alexandrium tamarensis* under the algicidal activity of bacterial agents (400×).

干处理,得到冻干菌剂。冻干菌剂的最适杀藻浓度为2.0 mg/mL。为了保护细菌细胞在冻干过程中的活性,确定蔗糖作为菌株Y35冻干过程中的冻干保护剂,并且添加量为1.0 g/L。

培养条件的优化保证了菌株Y35能够快速生长并且分泌大量的杀藻物质,为后续应用于赤潮现场的防治提供菌质资源。而冻干菌剂的制备不仅可以保证杀藻细菌细胞的长期保存,还能够便于杀藻菌株更方便高效地控制赤潮。本文研究对有害赤潮的细菌防治有重要意义,将细菌应用于赤潮的治理由实验室研究推向了应用实践。

参考文献 [References]

- 李祎, 郑伟, 郑天凌. 海洋微生物多样性及其分子生态学研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40 (4): 655-668 [Li Y, Zheng W, Zheng TL. Advances in research of marine microbial diversity and molecular ecology [J]. *Microbiol China*, 2013, 40 (4): 655-668]
- 薛山, 王森. 基于可持续发展的海洋资源保护与开发[J]. 中国渔业经济, 2013, 31 (6): 152-156 [Xue S, Wang M. The exploitation and protection of the ocean resource based on the sustainability [J]. *Chin Fish Econ*, 2013, 31 (6): 152-156]
- 郑天凌, 吕静琳, 周艳艳, 苏建强, 杨小茹, 张金龙, 田蕴, 熊小京, 章军, 蔡明刚, 郭东晖, 谢忠. 海洋有害赤潮调控功能菌的发现与研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2011, 50 (2): 445-454 [Zheng TL, Lv JL, Zhou YY, Su JQ, Yang XR, Zhang JL, Tian Y, Xiong XJ, Zhang J, Cai MG, Guo DH, Xie Z. Advance in study on microbial control of harmful algae blooms——exploitation and research on marine algicidal bacteria [J]. *J Xiamen Univ (Nat Sc)*, 2011, 50 (2): 445-454]
- Anderson DM. Turning back the harmful red tide [J]. *Nature*, 1997, 388 (6642): 513-514
- Collos Y, Jauzein C, Ratmaya W, Souchu P, Abadie E, Vaquer A. Comparing diatom and *Alexandrium catenella/tamarensis* blooms in Thau lagoon: importance of dissolved organic nitrogen in seasonally N-limited systems [J]. *Harmful Algae*, 2014, 37: 84-91
- 吴玉霖, 周成旭. 甲藻赤潮的海洋环境危害及其防治[J]. 海洋环境科学, 1997, 16 (4): 58-63 [Wu YL, Zhou CX. Dinoflagellates red tide impacts on marine environment and countermeasures [J]. *Mar Environ Sci*, 1997, 16 (4): 58-63]
- 李祎, 杨彩云, 李东, 田蕴, 郑天凌. 厦门海域2011年中肋骨条藻和血红哈卡藻赤潮期间细菌群落结构变化[J]. 微生物学报, 2012, 52 (10): 1268-1281 [Li Y, Yang CY, Li D, Tian Y, Zheng TL. Dynamics of bacterial community during the bloom caused by *Skeletonema costatum* and *Akashiwo sanguinea* in Xiamen sea area [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2012, 52 (10): 1268-1281]
- 王仁君, 唐学玺, 孙俊华. 鼠尾藻提取物对亚历山大藻的化感效应[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17 (5): 694-699 [Wang R, Tang X, Sun J. Allelopathic effects of *Sargassum thunbergii* extracts on red tide microalga *Alexandrium tamarensis* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2011, 17 (5): 694-699]
- 龚良玉, 李雁宾, 祝陈坚, 王修林, 曲宝涵. 生物法治理赤潮的研究进展[J]. 海洋环境科学, 2010 (1): 152-158 [Gong LY, Li YB, Zhu CJ, Wang XL, Qu BH. Research progress on biological control of HABs [J]. *Mar Environ Sci*, 2010 (1): 152-158]
- Stocker R. Marine microbes see a sea of gradients [J]. *Science*, 2012, 338 (6107): 628-633
- 邓建明, 陶勇, 李大平, 董娟. 溶藻细菌及其分子生物学研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15 (6): 895-900 [Deng J, Tao Y, Li D, Dong J. Advances in research of algicidal bacteria [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, 15 (6): 895-900]
- Li Y, Zhu H, Lei X, Zhang H, Cai G, Chen Z, Fu L, Xu H, Zheng T. The death mechanism of the harmful algal bloom species *Alexandrium tamarensis* induced by algicidal bacterium *Deinococcus* sp. Y35 [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 992
- Li Y, Zhu H, Lei X, Zhang H, Guan C, Chen Z, Zheng W, Xu H, Tian Y, Yu Z, Zheng TL. The first evidence of deinoxanthin from *Deinococcus* sp. Y35 with strong algicidal effect on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarensis* [J]. *J hazard Mater*, 2015, 290: 87-95
- Guillard RR. Culture of marine invertebrate animals [M]. Berlin: Springer, 1975: 29-60
- Zhang B, Cai G, Wang H, Li D, Yang X, An X, Zheng X, Tian Y, Zheng W, Zheng T. *Streptomyces alboflavus* RPS and its novel and high algicidal activity against harmful algal bloom species *phaeocystis globosa* [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (3): e92907
- Del Rio B, Linares DM, Ladero V, Redruello B, Fernández M, Martin MC, Alvarez MA. Putrescine production via the agmatine deiminase pathway increases the growth of *Lactococcus lactis* and causes the alkalization of the culture medium [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99 (2): 897-905
- 傅丽君, 李东, 景晓明, 安新丽, 郑天凌. 均匀设计法优化高效杀藻菌 *Microbulbifer* sp. BS03培养基及发酵条件[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18 (5): 761-767 [Fu L, Li D, Jing X, An X, Zheng T. Optimization of fermentation conditions of marine algicidal bacterium *Microbulbifer* sp. BS03 by uniform design [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2012, 18 (5): 761-767]
- Nguyen BT, Rittmann BE. Predicting dissolved inorganic carbon in photoautotrophic microalgae culture via the nitrogen source [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49 (16): 9826-9831
- Wang H, Jiang P, Lu Y, Ruan Z, Jiang R, Xing XH, Lou K, Wei D. Optimization of culture conditions for violacein production by a new

- strain of *Duganella* sp. B2 [J]. *Biochem Eng J*, 2009, **44** (2): 119-124.
- 20 Kientz B, Agogué H, Lavergne C, Marié P, Rosenfeld E. Isolation and distribution of iridescent *Cellulophaga* and other iridescent marine bacteria from the Charente-Maritime coast, French Atlantic [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2013, **36** (4): 244-251
- 21 Li Y, Zhu H, Zhang H, Chen Z, Tian Y, Xu H, Zheng T, Zheng W. Toxicity of algicidal extracts from *Mangrovimonas yunxiaonensis* strain LY01 on a HAB causing *Alexandrium tamarense* [J]. *J hazard Mater*, 2014, **278**: 372-381
- 22 Croese E, Jeremiase AW, Marshall IP, Spormann AM, Euverink G-JW, Geelhoed JS, Stams AJ, Plugge CM. Influence of setup and carbon source on the bacterial community of biocathodes in microbial electrolysis cells [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2014, **61**: 67-75
- 23 Lin J, Zheng W, Tian Y, Wang G, Zheng T. Optimization of culture conditions and medium composition for the marine algicidal bacterium *Alteromonas* sp. DH46 by uniform design [J]. *J Ocean U China*, 2013, **12** (3): 385-391
- 24 刘继馨, 王秀丽, 袁瑞娟, 彭琛, 徐焕焕. 不同冻干保护剂对利巴韦林冻干粉针的影响研究[J]. *现代药物与临床*, 2015 (7): 784-789 [Liu JX, Wang XL, Yuan RJ, Peng C, Xu HH. Effects of freeze-drying powder protective agents on ribavirin freeze-dried powder [J]. *Drugs Clinic*, 2015 (7): 784-789]
- 25 秦华明, 宗敏华, 梁世中. 糖在蛋白质药物冷冻干燥过程中保护作用的分子机制[J]. *广东药学院学报*, 2001, **17** (4): 305-307 [Molecular mechanism of the protective effect of sugar on protein drugs in the process of freeze drying [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2001, **17** (4): 305-307]
- 26 Kai Y, Roger C, Kelly C, Youmie P, Steve T, Kevin G. Strategies for maintaining the particle size peptide DNA condensates following freeze-drying [J]. *Int J Pharmaceut*, 2000, **203** (1-2): 81-88