

# 均匀设计法优化高效杀藻菌 *Microbulbifer* sp. BS03 培养基及发酵条件\*

傅丽君<sup>1, 2\*\*</sup> 李东<sup>3</sup> 景晓明<sup>1</sup> 安新丽<sup>2</sup> 郑天凌<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup>莆田学院环境与生命科学系 莆田 351100)

<sup>2</sup>厦门大学生命科学学院, 近海海洋环境科学国家重点实验室及滨海湿地生态系统教育部重点实验室 厦门 361005)

<sup>3</sup>华侨大学化工学院生物工程与技术系 厦门 361021)

**摘要** 采用均匀设计法设计和二次多项式逐步回归分析, 对一株高效杀塔玛亚历山大藻微泡菌 BS03 (*Microbulbifer* sp.) 产杀藻活性物质的发酵培养条件进行优化. 通过单因素实验筛选出碳源、氮源、pH、培养时间和接种量为显著影响因子, 并对5个显著影响因子采用  $U_{15}(15^5)$  水平对培养基进行优化. 结果表明 BS03 最适发酵培养条件为: 蔗糖 8 g/L, 蛋白胨 10.50 g/L, 初始 pH 值 7.5, 培养时间 32 h, 接种量 3.00%. 验证试验结果显示, 在此条件下该菌发酵液的干重为 4.725 g/L, 较优化前增加了 31.35%,  $LD_{50}$  为 0.768%, 较优化前降低了 25.14%. 研究结果为杀藻活性物质以及杀藻机理的研究奠定了理论基础. 图 7 表 5 参 20

**关键词** 杀藻细菌; 单因素试验; 均匀设计; 塔玛亚历山大藻; 发酵条件

CLC X55: TQ920.1

## Optimization of Fermentation Conditions of Marine Algicidal Bacterium *Microbulbifer* sp. BS03 by Uniform Design\*

FU Lijun<sup>1, 2\*\*</sup>, LI Dong<sup>3</sup>, JING Xiaoming<sup>1</sup>, AN Xinli<sup>2</sup> & ZHENG Tianling<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environment and Life Sciences, Putian University, Putian 351100, Fujian, China)

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Marine Environmental Science and Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

<sup>3</sup>Department of Bioengineering & Biotechnology, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China)

**Abstract** The optimal parameters of fermentation conditions of marine bacterium *Microbulbifer* sp. BS03 producing algicidal substances against *Alexandrium tamarense* were obtained by using Uniform Design and quadric polynomial regression methods. Five main factors were achieved through single factor experiments, that is, carbon source, nitrogen source, pH, incubation time and inoculum size. The  $U_{15}(15^5)$  design result showed the optimum conditions of experiment were as follows: sugar 8 g/L, peptone 10.5 g/L, initial pH 7.5, incubation time 32 h, and inoculum size of 3.00%. According to the verification experiment, under the optimal conditions, the dry biomass was 4.725 g/L which was increased by 31.35% and  $LD_{50}$  was 0.768% which was decreased by 25.14% compared with those of the basic fermentation conditions. This outcome will help us to separate active substances from complex components in medium and thus to reveal the mechanism of algicidal activity in the future. Fig 7, Tab 5, Ref 20

**Keywords** algicidal bacterium; single factor experiment; Uniform Design; *Alexandrium tamarense*; fermentation condition

CLC X55: TQ920.1

收稿日期: 2011-08-31 接受日期: 2011-09-23

\*国家自然科学基金项目 (Nos. 40930847, 31070442)、福建省自然科学基金项目 (Nos. 2012J01150, 2010J01223)、福建省教育厅项目 (No. JA10232) 和莆田市科技计划项目 [No. 2011S09(4)] 资助 Supported by the National Nature Science Foundation of China (Nos. 40930847, 31070442), the Open Fund of the Key Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems of Xiamen University (CWe10902), the Natural Science Foundation of Fujian, China (Nos. 2012J01150, 2010J01223), the Educational Project of Fujian (No. JA10232) and the Science and Technology Program of Putian, Fujian [No. 2011S09(4)]

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: lijun\_fu@sina.com; microzh@xmu.edu.cn)

溶藻细菌 (Algae-lysing bacterium) 是指通过直接或间接方式抑制藻类生长或杀死藻类, 溶解藻细胞的细菌<sup>[1]</sup>. 在利用物理、化学和其它生物方法治理水华不甚理想的情况下, 研究利用溶藻细菌防治水华和赤潮成为一个新的方向, 已经引起世界各国越来越多学者的关注<sup>[2-5]</sup>. 目前国内外已报道的溶藻细菌有弧菌、假单胞菌、黄杆菌、交替单胞菌、交替假单胞菌<sup>[4-7]</sup>等, 这些溶藻细菌多数是通过分泌胞外物质到环境中抑制藻的生长, 导致藻细胞的溶解<sup>[8]</sup>, 如分泌氨基酸<sup>[7]</sup>、蛋白质<sup>[9]</sup>、抗生素<sup>[10]</sup>、多肽<sup>[11]</sup>、羟胺<sup>[12]</sup>和含氮化合物<sup>[13]</sup>等. 提高溶藻细菌的分离效率, 分离筛选出特异性抑制或杀死赤潮藻的活性物质将是未来一段时期内溶藻细菌研究的热点.

微生物发酵是一个极其复杂的生物过程, 涉及到许多相互影响的因素, 产物生物合成水平除受微生物内部代谢机理、调控机制等影响外, 适宜的培养基配方成为微生物发酵的关键因素, 而一般的培养基种类多且各成分相互作用复杂, 因此, 培养基的优化工作显得尤为重要. 目前比较成熟的培养基优化的方法有单因素法、正交设计法、均匀设计法. 采用单因素试验设计法时, 只是讨论一种因素, 不考虑因素间的交互作用, 而培养基中包含多种复杂的成分, 使得该方法不能获得最佳优化结果, 往往达不到预期的效果<sup>[14]</sup>. 响应面法优化可以达到较佳的效果, 但是须几个阶段完成, 而且实验组数较多, 周期比较长, 容易造成误差<sup>[15-16]</sup>. 正交实验设计在有交互作用时都能使用, 且能通过少的实验次数找到好的试验点, 但其不能在给出的整个区域上找到因素与响应值的回归方程, 从而无法找到整个区域上因素的最佳组合和最优值<sup>[17]</sup>. 均匀设计法是一种试验次数少、周期短、求得的回归方程精度高、能研究因素间交互作用的回归分析方法, 能在最大程度上满足以上要求, 它采用多元统计法分析数据, 减少实验次数, 最低程度减少误差, 使实验结论更有可信度<sup>[18-19]</sup>. 本研究利用均匀设计法对一株从漳江口红树林区分离筛选出来通过分泌胞外代谢产物的高效杀藻菌 *Microbulbifer* sp. BS03 进行研究, 确定及优化该菌大规模发酵产杀藻活性物质的培养条件, 以期对杀藻活性物质分离鉴定和溶藻机制研究提供理论基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株和藻种 细菌菌株 BS03 (*Microbulbifer* sp.) 由厦门大学应用环境微生物研究所分离自福建漳江口云霄红树林区沉积物.

塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 无菌株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得到塔玛亚历山大藻无菌株.

1.1.2 培养基及培养条件 塔玛亚历山大藻所用培养液为 f/2 培养液<sup>[20]</sup>, 采用三角瓶置于 (20 ± 1) 光照生化培养箱, 光照周期 12L 12D, 光照强度为 3 000 lx.

2216E 培养基: 蛋白胨 5 g, 酵母粉 1 g, 磷酸高铁 0.1 g, 用海水定容至 1 L, pH 调至 7.5 左右.

### 1.2 方法

1.2.1 生物量测定 取适当原液或稀释的菌体发酵液, 以 2216E 培养基为对照, 在波长 600 nm 下测定光密度 ( $D_{600\text{ nm}}$ ) 值.

1.2.2 杀藻率计算 取发酵培养后的菌株 BS03 无细胞滤液, 按照 1% 的比例加入塔玛亚历山大藻中, 12 h 后用鲁戈氏碘液固定染色, 在光学显微镜下计数.

杀藻率 ( $r/\%$ ) =  $(N_c - N_t)/N_c \times 100$ , 式中,  $N_c$  表示对照组中的活细胞数,  $N_t$  表示实验组中的活细胞数.

### 1.3 实验设计

1.3.1 基础培养基的确定 PYS 培养基、B 培养基、PY 培养基、BK 培养基、LBK 和 2216E 6 种常用细菌培养基, 选用 250 mL 的三角瓶, 分装 100 mL/瓶, 121 灭菌 30 min, 备用. 将活化好的 BS03 菌液按 1% 的比例接入上述培养基中, 设 3 次平行, 150 r/min, 28 摇床培养 12 h, 取样测定  $D_{600\text{ nm}}$ . 剩余样品 7 000 r/m 离心后取上清液进行杀藻活性测定, 以灭菌蒸馏水进行杀藻测定设为对照, 采用蓝亩工作室 LD<sub>50</sub> 数据处理软件计算不同培养基发酵菌株 BS03 后上清液对塔玛亚历山大藻的半数致死剂量 LD<sub>50</sub>.

1.3.2 单因素实验确定显著因子 改变基础培养基中发酵条件, 单因素条件下分别对不同碳源、氮源、无机盐、初始 pH、发酵时间、初始盐度、初始接种量进行试验, 测定  $D_{600\text{ nm}}$  和 LD<sub>50</sub>, 确定显著影响因子.

1.3.3 均匀设计 前期试验发现, 转速为 150 r/min 最适宜菌株生长, 无机盐对发酵结果和杀藻效果影响较小, 细菌生长的最适盐度为海水的盐度, 因此选取 pH ( $X_1$ )、培养时间 ( $X_2$ )、氮源用量 ( $X_3$ )、碳源用量 ( $X_4$ )、接种量 ( $X_5$ ) 5 个因素为考察对象, 将各个组分分为 15 个水平, 以菌体生长的  $D_{600\text{ nm}}$  ( $Y_1$ )、菌体干重 ( $Y_2$ )、LD<sub>50</sub> ( $Y_3$ ) 为评价指标值, 用  $U_{15}$  ( $15^5$ )<sup>[19]</sup> 均匀设计表进行试验, 对结果进行回归分析, 筛选出最佳发酵条件, 均匀设计表见表 1.

## 2 结果与分析

### 2.1 基础培养基的确定

图 1 结果表明, PYS 与 B 培养基不适合菌株 BS03 生长且杀藻效率低; 菌株 BS03 在 LBK 培养基中生长状况最好,  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.905, 且表现出较强的杀藻效果, LD<sub>50</sub> 为 0.838; 在 2216E 培养基中 BS03 生长状况较在 LBK 中差 ( $D_{600} = 0.852$ ), 而 LD<sub>50</sub> 却低于 LBK 培养基, 即表现出较强的杀藻效果. 因本

表1  $U_{15}(15^5)$ 均匀设计因素水平  
Table 1 Factors and levels in the uniform design  $U_{15}(15^5)$

实验组 Experimental group	pH	培养时间 Culture time (t/h)	蛋白胨 ( $\rho/g L^{-1}$ )	蔗糖 Sucrose ( $\rho/g L^{-1}$ )	接种量 Inoculation ( $\rho/\%$ )
N <sub>1</sub>	6.0	28	11.860	11	5.700
N <sub>2</sub>	8.5	56	2.357	6	5.314
N <sub>3</sub>	11.0	20	14.570	1	4.929
N <sub>4</sub>	5.5	48	5.071	12	4.543
N <sub>5</sub>	8.0	12	17.290	7	4.157
N <sub>6</sub>	10.5	40	7.786	2	3.771
N <sub>7</sub>	5.0	4	20.000	13	3.386
N <sub>8</sub>	7.5	32	10.500	8	3.000
N <sub>9</sub>	10.0	60	1.000	3	2.614
N <sub>10</sub>	4.5	24	13.210	14	2.229
N <sub>11</sub>	7.0	52	3.714	9	1.843
N <sub>12</sub>	9.5	16	15.930	4	1.457
N <sub>13</sub>	4.0	44	6.429	15	1.071
N <sub>14</sub>	6.5	8	18.640	10	0.686
N <sub>15</sub>	9.0	36	9.143	5	0.300

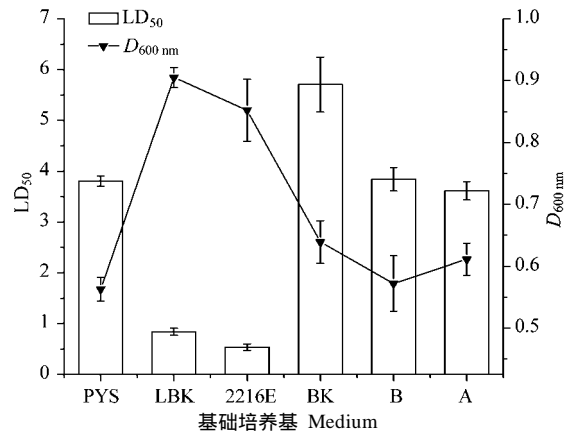


图1 不同基础培养基对BS03溶藻效力的影响

Fig. 1 Effects of different mediums on algicidal activity of BS03  
实验主要以杀藻效果作为评价指标对高效杀藻培养基进行优化,故综合考虑选择2216E为优化设计的基础培养基.

### 2.2 不同碳源和氮源对菌株BS03溶藻效力的影响

以蔗糖作为碳源培养菌株BS03发酵上清液的杀藻效果最好 (LD<sub>50</sub> = 0.965),葡萄糖次之 (LD<sub>50</sub> = 1.021),虽然以麦芽糖作为碳源最适合BS03生长, D<sub>600 nm</sub>高达1.171,但杀藻效果最差 (LD<sub>50</sub> = 7.374). 因本实验主要以杀藻效果作为评价指标,综合分析选择蔗糖为BS03菌株培养基中的最佳碳源,结果见图2.

BS03在有机氮源中生长状况优于无机氮源,其中牛肉膏>蛋白胨>大豆蛋白胨>酵母粉. 而以杀藻效果作为评价指标则为蛋白胨>酵母粉>牛肉膏>大豆蛋白胨,综合分析选择蛋白胨作为BS03发酵培养的最佳氮源,结果见图3.

### 2.3 不同初始pH对菌株BS03溶藻效力的影响

图4结果表明,不同初始pH值对菌株BS03的生长和杀藻效力影响较大. 初始pH值为8.0时菌株BS03生长状况最好,

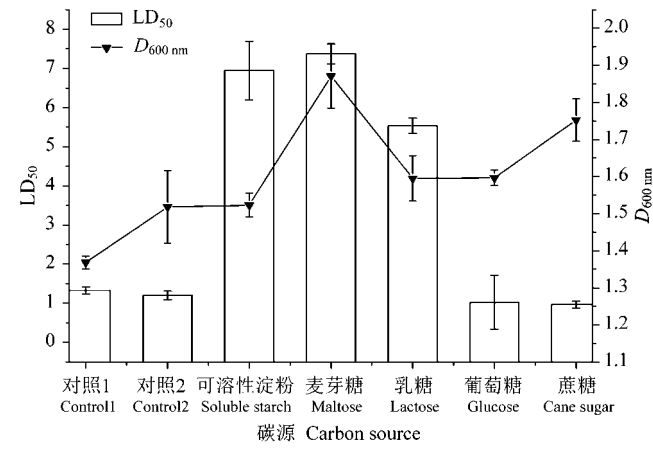


图2 不同碳源对BS03溶藻效力的影响

Fig. 2 Effects of different carbon sources on algicidal activity of BS03

D<sub>600 nm</sub>值最高,但LD<sub>50</sub>较高,即未表现出较好的杀藻效果. 菌株 BS03在初始pH值为7.0时LD<sub>50</sub>最低,表现出最好的杀藻效果. 虽然大多数细菌适合生长pH为6.5~7.5环境中,但菌株BS03在中性条件下最有利于溶藻活性物质的产生,LD<sub>50</sub>最低,表明偏酸性或偏碱性条件都不利于菌株BS03产生溶藻活性物质.

### 2.4 发酵时间对菌株BS03溶藻效力的影响

图5结果表明,培养时间显著影响菌体的生长和杀藻效力. 菌株BS03在0~4 h菌体处于延滞期,4~28 h处于指数期,28~40 h为进入稳定期,40 h后进入衰亡期,结合BS03的生长曲线可得,BS03从稳定期开始表现出最高的杀藻效力,其原因可能是稳定期是微生物代谢产物合成分泌的时期,进入衰亡期菌体胞外活性代谢产物分泌下降. D<sub>600 nm</sub>与LD<sub>50</sub>表现出相反的变化趋势,即D<sub>600 nm</sub>值高,LD<sub>50</sub>低. 因此,发酵时间可作为后期实验的一个因素.

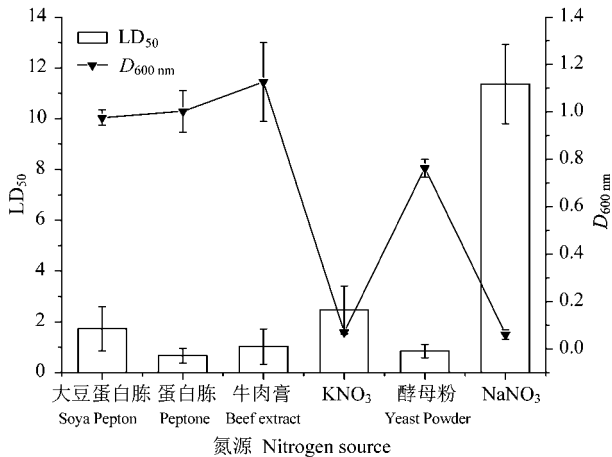


图3 不同氮源对BS03溶藻效力的影响

Fig. 3 Effects of different nitrogen sources on algal activity of BS03

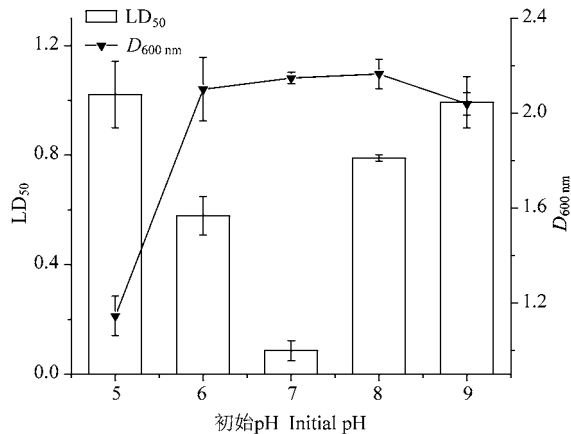


图4 不同初始pH对BS03溶藻效力的影响

Fig. 4 Effects of different initial pH on algal activity of BS03

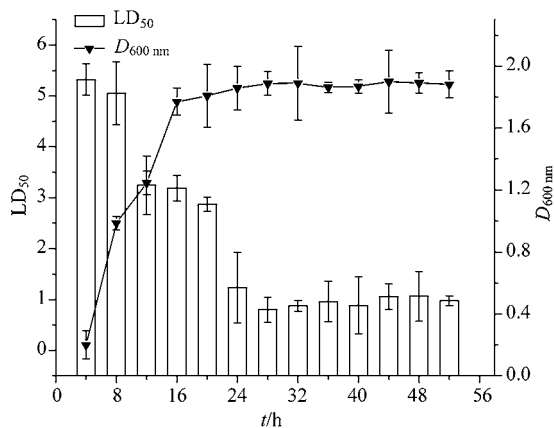


图5 不同发酵时间对BS03溶藻效力的影响

Fig. 5 Effects of different fermentation time on algal activity of BS03

## 2.5 不同盐度对菌株BS03溶藻效力的影响

由图6可知, 盐度显著影响菌体的生长和杀藻效力. 当盐度为3%时, 菌株BS03生长状况最好,  $D_{600\text{ nm}}$ 为1.845, 杀藻效力

也最高,  $LD_{50}$ 为0.997, 这可能是由于BS03分离自福建漳江口云霄红树林区沉积物中, 其本身就生长在海洋环境中, 当盐度接近海水浓度时最适宜BS03生长和分泌胞外活性物质, 因此实验可直接选用海水进行无需调节盐度.

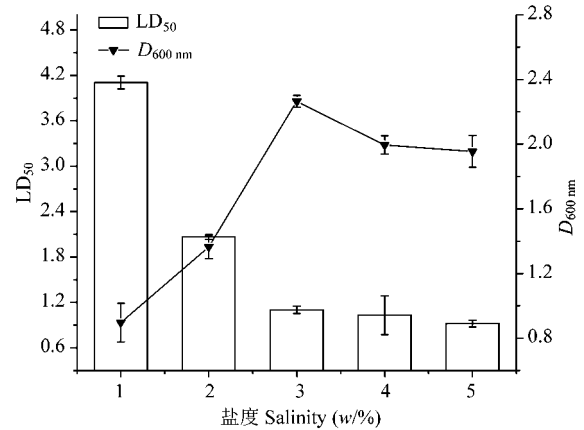


图6 不同盐度对BS03溶藻效力的影响

Fig. 6 Effects of different salinity concentrations on algal activity of BS03

## 2.6 不同接种量对菌株BS03溶藻效力的影响

图7结果表明, 不同接种量影响菌株BS03生长和杀藻效力, 当接种量为2%时, BS03的生长状况最好,  $D_{600\text{ nm}}$ 为1.762, 且表现出较强的杀藻效果,  $LD_{50}$ 为1.038; 当接种量为3%时, 虽然BS03的 $D_{600\text{ nm}}$ 略低于2%接种量, 但是 $LD_{50}$ 却更低, 表现出更强的杀藻效力, 因此选用3%接种量作为后期实验的一个因素.

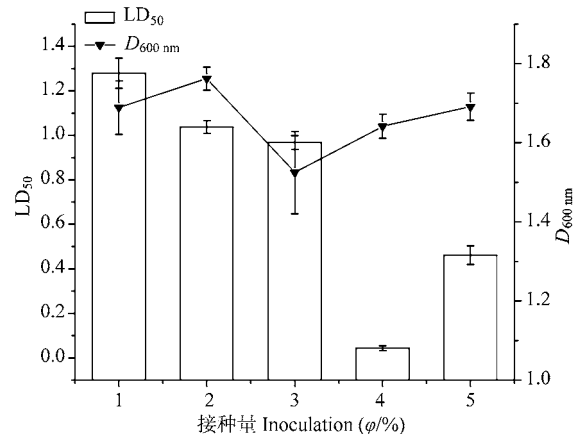


图7 不同接种量对BS03溶藻效力的影响

Fig. 7 Effects of medium volume per flask on algal activity of BS03

## 2.7 发酵培养基均匀设计

采用 $U_{15}$  ( $15^5$ ) 均匀设计表安排实验, 并测量培养基至稳定期的菌 $D_{600\text{ nm}}$ 、干重和 $LD_{50}$ , 其结果见表2.

由表2可以看出, 各个组合中,  $D_{600\text{ nm}}$ 最高为 $N_8$  ( $D_{600\text{ nm}} = 2.611$ ), 最低为 $N_{13}$  ( $D_{600\text{ nm}} = 0.549$ ), 其中 $D_{600\text{ nm}}$ 大于2.500的有

表2 5因素15水平均匀设计表 $U_{15}(15^5)$ 及试验结果  
Table 2 Results of UD  $U_{15}(15^5)$

实验组 Experimental group	因子 Factor					指标值 Index		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$
N <sub>1</sub>	6.00	28.00	11.86	11.00	5.70	2.5131	2.930	0.8682
N <sub>2</sub>	8.50	56.00	2.36	6.00	5.31	0.9643	2.170	1.8385
N <sub>3</sub>	11.00	20.00	14.57	1.00	4.93	1.1367	1.361	2.1008
N <sub>4</sub>	5.50	48.00	5.07	12.00	4.54	1.8766	2.520	1.4823
N <sub>5</sub>	8.00	12.00	17.29	7.00	4.16	2.5106	3.211	0.7758
N <sub>6</sub>	10.50	40.00	7.79	2.00	3.77	1.5236	2.600	1.7856
N <sub>7</sub>	5.00	4.00	20.00	13.00	3.39	0.652	0.931	2.6094
N <sub>8</sub>	7.50	32.00	10.50	8.00	3.00	2.611	3.471	0.4482
N <sub>9</sub>	10.00	60.00	1.00	3.00	2.61	0.9316	2.140	2.3758
N <sub>10</sub>	4.50	24.00	13.21	14.00	2.23	0.5826	1.010	1.8175
N <sub>11</sub>	7.00	52.00	3.71	9.00	1.84	2.219	2.950	0.9685
N <sub>12</sub>	9.50	16.00	15.93	4.00	1.46	2.155	3.011	1.1048
N <sub>13</sub>	4.00	44.00	6.43	15.00	1.07	0.549	1.123	2.6386
N <sub>14</sub>	6.50	8.00	18.64	10.00	0.69	1.3043	2.580	1.1422
N <sub>15</sub>	9.00	36.00	9.14	5.00	0.30	2.1983	2.940	0.9863

3组(N<sub>1</sub>、N<sub>5</sub>、N<sub>8</sub>)。

对表2结果采用DPS软件进行二次多项式逐步回归分析,得到回归方程: $Y_1=10.8350-172.8014X_3+432.5156X_5+8.0676X_3^2X_5-0.0323X_4^2X_5-0.0149X_1^2X_2-0.0358X_1^2X_5+2.7406X_2^2X_3-6.8685X_2^2X_5+0.0178X_3^2X_4-20.2324X_3^2X_5$ ;相关系数 $R=0.9834$ , $F=11.7502$ ,显著水平 $P=0.0149$ ,剩余标准差 $S=0.2566$ ,调整后的相关系数 $R_a=0.9406$ ,Durbin-Watson统计量 $d=2.91$ ,说明该方程能很好地拟合BS03发酵过程.对该模型进行显著性检验,结果见表3.

表3 二次多项式逐步回归法处理结果(以 $D_{600nm}$ 为指标)  
Table 3 Quadric polynomial regression results ( $D_{600nm}$  as index)

影响因子 Factor	偏相关 Partial correlation	$t$	$P$
$X_2$	0.98656	6.03885	0.02634
$X_1X_1$	0.99589	11.00078	0.00816
$X_2X_2$	-0.9907	7.28214	0.01834
$X_3X_3$	-0.99823	16.79165	0.00353
$X_4X_4$	-0.9959	11.01558	0.00814
$X_5X_5$	-0.99926	26.03492	0.00147
$X_1X_5$	-0.99675	12.37491	0.00647
$X_2X_3$	-0.99282	8.30243	0.0142
$X_2X_4$	0.9959	11.00575	0.00815
$X_2X_5$	0.99675	12.3749	0.00647
$X_3X_4$	0.9959	11.00348	0.00816
$X_3X_5$	0.99675	12.37801	0.00646
$X_4X_5$	-0.99675	12.37063	0.00647

由表3各变量显著性检验 $P$ 值的大小可知: $X_2 > X_2^2X_2 > X_2^2X_3 > X_3^2X_4=X_1^2X_1 > X_2^2X_4 > X_4^2X_4 > X_4^2X_5=X_2^2X_5=X_1^2X_5 > X_3^2X_5 > X_3^2X_3 > X_5^2X_5$ ,各因素之间存在交互作用.根据上述数据处理及回归分析可得BS03菌株发酵的最优组合为实验设计N<sub>8</sub>,即条件为:pH 7.5,培养时间32 h,蛋白胨10.50 g/L,蔗糖8.0 g/L,接种量为3.0%.

由表2可以看出,各个组合中,菌体干重大于3.000的有3个(N<sub>5</sub>、N<sub>8</sub>、N<sub>12</sub>),最高为N<sub>8</sub>(3.471),最低为N<sub>13</sub>(0.931).

对表2实验结果采用DPS软件数据处理系统二次多项式逐步回归分析,得到回归方程: $Y_2=5.3813+113.6018X_1^2X_1-3.7930X_2^2X_2+2.5854X_3^2X_3-28.4224X_4^2X_4-0.1509X_5^2X_5-65.9823X_1^2X_3-270.2522X_1^2X_5-10.2984X_2^2X_3+20.7583X_2^2X_4+49.3866X_2^2X_5+28.1850X_3^2X_4+145.5242X_3^2X_5-135.0979X_4^2X_5$ ;相关系数 $R=0.9998$ , $F=209.8485$ ,显著水平 $P=0.0540$ ,剩余标准差 $S=0.0604$ ,调整后的相关系数 $R_a=0.9974$ ,Durbin-Watson统计量 $d=1.72$ ,说明该方程能很好地拟合BS03发酵过程.对该模型进行显著性检验,结果见表4.

表4 二次多项式逐步回归法处理结果(以干重为指标)  
Table 4 Quadric polynomial regression results  
(Dry weight as index)

影响因子 Factor	偏相关 Partial correlation	$t$	$P$
$X_2$	0.99993	87.36461	0.00013
$X_5$	-0.99997	141.0021	0.00005
$X_1X_1$	0.99998	143.2523	0.00005
$X_2X_2$	-0.99996	109.7762	0.00008
$X_4X_4$	-0.99998	143.3260	0.00005
$X_5X_5$	-0.99999	231.1903	0.00002
$X_1X_3$	-0.99998	162.8885	0.00004
$X_2X_3$	-0.99996	109.7622	0.00008
$X_2X_4$	0.99998	143.2768	0.00005
$X_2X_5$	0.99997	141.0239	0.00005
$X_3X_4$	0.99997	130.5257	0.00006
$X_3X_5$	0.99997	141.0277	0.00005
$X_4X_5$	0.99985	57.51551	0.00030

由表4各变量显著性检验 $P$ 值的大小可知:

$X_4^2X_5 > X_2 > X_2^2X_2 = X_2^2X_3 > X_3^2X_4 > X_5 = X_1^2X_1 = X_4^2X_4 = X_2^2X_4 = X_2^2X_5 = X_3^2X_5 > X_1^2X_3 > X_5^2X_5$ ,各因素之间存在交互作用.根据上述

数据处理及回归分析可得BS03菌株发酵的最优组合条件为：pH 7.5，培养时间32 h，蛋白胨10.50 g/L，蔗糖8.0 g/L，接种量为3.0%。这与以 $D_{600\text{nm}}$ 值为指标的结果一致。

经实验验证，在优化条件下发酵BS03的干重为2.416 g/L，与回归模型的预测值2.3962的相对误差为0.826%，说明利用均匀设计优化实验是可行性的。

通过实验得到BS03的最适培养基配方和最佳培养条件，通过验证得出：优化后的BS03生长和杀藻效果显著，如表2在摇瓶中培养32 h后，其稳定期的菌体干重值可高达4.725 g/L，超过回归模型预测值(3.498 0 g/L)，为优化前基础培养基的1.4倍；优化后的菌株 $D_{600\text{nm}}$ 值达2.807，亦超过回归模型预测值2.619，结果如表5。

表5 发酵培养基优化前后效果对比

Table 5 Comparison of medium before and after optimization

指标 Index	原始培养条件 Before optimization	优化后的培养条件 After optimization
干重 Dry weight ( $\rho/\text{g L}^{-1}$ )	3.464±0.06	4.775±0.07
$D_{600\text{nm}}$	1.832±0.09	2.807±0.08
$LD_{50}$	1.026±0.11	0.768±0.09

### 3 讨论与结论

微生物培养所需的基本营养包括碳源、氮源、无机盐离子等。在微生物培养过程中，碳源的投入要适量，因为过多的碳源会加速菌体呼吸，消耗过多氧气，不利于菌体生长；同时产生的一些酸性中间代谢产物不能完全氧化而积累在菌体和培养基中，导致培养基pH值降低而影响微生物生长和产物的合成。本实验首先采用单因素实验得出蔗糖能够很好地被BS03用于生长和产代谢物，筛选出以8.0 g/L蔗糖为碳源时杀藻效力最高，这可能是因为过少的蔗糖不利菌体后期的生长和代谢产物的合成，而过多的蔗糖会使菌体代谢过快，使微生物后续生长缺乏营养<sup>[19]</sup>。氮源是微生物生长必不可少的营养物质，微生物可利用的氮源可分为有机氮源和无机氮源，本实验得出有机氮源更适合菌株BS03生长，当选用10.50 g/L蛋白胨为氮源时杀藻效果最好。除了培养基成分外，培养条件也影响微生物的生长代谢，其中pH与发酵的关系极为密切，发酵过程中pH会影响菌体的形态，同时影响菌体对营养物质的吸收和代谢产物的形成，pH值为7.5左右时BS03生长和杀藻效力最好。微生物生长分4个时期，其中稳定期是代谢产物分泌的主要时期，因此培养时间也影响菌体的杀藻效力，实验得出培养时间为32 h时显著影响杀藻活性物质的分泌，其杀藻效力最高，与处于BS03生长的稳定期时间一致。均匀设计法是一种试验次数少、周期短、求得的回归方程精度高、能研究因素间交互作用的回归分析方法。本研究通过 $U_{15}$  ( $15^5$ )均匀设计表对培养菌株BS03的基础培养基2216E培养基的5个不同培养条件进行均匀设计实验，确定了BS03的最

优发酵培养条件为：pH 7.5，培养时间32 h，蛋白胨10.50 g/L，蔗糖8.0 g/L，接种量为3.0%，在该条件下该菌发酵液的生物量增加了31.35%， $LD_{50}$ 为0.768，较优化前降低了25.14%，这将为下一步的分离纯化杀藻活性物质以及杀藻机理研究奠定良好的基础。

### References

- Zhang Y (张勇), Xi Y (席宇), Wu G (吴刚). Advances on algicidal substances produced by algicidal bacteria. *Microbiology* (微生物学通报), 2004, **31** (1): 127-128
- Hallegraeff GM. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 1993, **32** (2): 79-99
- Sohn JH, Lee JH, Yi H, Chun J, Bae KS, Ahn TY, Kim SJ. *Kordia algicida* gen.nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54** (3): 675-680
- Wang X (王新), Zhou YY (周艳艳), Zheng TL (郑天凌). Recent advances in marine bacterial ecology - A review. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2010, **50** (3): 291-297
- Bai SJ, Huang LP, Zheng TL. Algicidal effects of a novel marine actinomycete on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Curr Microbiol*, 2011, **12** (5): 26-31
- Kim J H, Park J H, Song Y H, Chang DS. Isolation and characterization of the marine bacterium *Ateromonas* sp. SR-14inhibiting the growth of diatom *Chaetoceros* species. *J Korean Fish Soc*, 1999, **32**: 155-159
- Lee SO, Kato J, Takiguchin 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. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (1): 4334-4339
- Wang X, Li ZJ, Su JQ, Tian Y, Ning XR, Hong HS, Zheng TL. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere. *Biol Control*, 2010, **52**: 123-130
- Amaro AM, Fuentes MS, Ogalde SR, Venegas JA, Suárez-Isla BA. Identification and characterization of potentially algal-lytic marine bacteria strongly associated with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *J Eukaryot Microbiol*, 2005, **52** (3): 191-200
- Mitsutani A, Yamasaki I, Kitaguchi H, Kato J. Analysis of algicidal proteins of a diatom-lytic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A25 by two-dimensional electrophoresis. *Phycologia*, 2001, **40** (3): 286-291
- Dakhama A, Noüe JD, Lavoie MC. Isolation and identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Phycol*, 1993, **5** (3): 297-306
- Yoshikawa K, Adachi K, Nishijima M, Takadera T, Tamaki S, Harada KI, Mochida K, Sano H.  $\beta$ -cyanoalanine production by marine bacteria

- on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (2): 718~22
- 13 Paul SB, Jinnque R, Haim G. Bacterial suppression of *Chlorella* by hydroxylamine production. *Water Res*, 1979, **13** (1): 267~2731
- 14 Wang XH (王晓辉), Cha SH (蔡少华), Chi NY (迟乃玉), Zhang QF (张庆芳). Selective breeding of marine low-temperature bacterial strain BS070623 and optimization of its fermentation medium (I). *J Bohai Unive Nat Sci Ed* (渤海大学学报自然科学版), 2009, **30** (2): 97~100
- 15 Lü JL (吕静琳), Zheng W (郑伟), Wang BX (王宾香), Tian Y (田蕴), Zheng TL (郑天凌). Optimization of high cell density medium compositions of marine algicidal bacteria *Vibrio* sp. DHQ25. *J Xiamen Univ Nat Sci* (厦门大学学报自然科学版), 2011, **50** (3): 617~623
- 16 Zhang L (张良), Jin YL (靳艳玲), Chen Q (陈谦), Fang Y (方扬), Wang ZY (王忠彦), Guan JF (官家发), Zhao H (赵海). Optimization of ethanol production by thermotolerant and high alcohol-producing yeast using response surface analysis. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2011, **17** (3): 311~316
- 17 Zhong W (钟为章), Luo YJ (罗一菁), Zhang ZZ (张忠智), Lu M (鲁莽). Optimization of liquid medium for rhodospirillum branch of photosynthetic bacterium.. *Chem & Bioeng* (化学与生物工程), 2009, **26** (7): 67~69
- 18 Fang KT (方开泰), Ma CX (马长兴). Orthogonal and Uniform Design. Beijing, China: Science Press (北京: 科学出版社), 2001. 11~325
- 19 Fu LJ (傅丽君), An XL (安新丽), Li D (李东), Xu LX (许丽霞), Tian Y (田蕴), Zheng TL (郑天凌). Optimization of medium components and culture conditions of algicidal actinomycetes BS01. *J Trop Oceanogr* (热带海洋学报), 2011, **30** (2): 1~7
- 20 Li YH (李永函), Zhao W (赵文). Aquatic Bait Biology. Dalian, China: Dalian Press (大连: 大连出版社), 2002