

高效溶藻放线菌 BS01 发酵培养基及发酵条件优化

傅丽君^{1,2}, 安新丽^{1,3}, 李东², 许丽霞², 田蕴^{1,3}, 郑天凌^{1,3}

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, 福建 厦门 361005; 2. 莆田学院环境与生命科学系, 福建莆田 351100; 3. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005

摘要: 从漳江口红树林区采集的沉积物样品中分离到 1 株放线菌菌株 BS01 *Brevibacterium* sp., 其胞外活性产物对塔玛亚历山大藻 *Alexandrium tamarense* 具有明显的溶藻作用。采用单因素及均匀设计, 通过摇瓶培养对 BS01 产溶藻活性物质的发酵培养基及发酵条件进行优化。结果表明, 在可溶性淀粉为碳源、硝酸钠为氮源、装液量为 40%、起始 pH 值为 7.5、培养温度为 28 ℃、转速为 150 r·min⁻¹、振荡培养时间为 48 h 的条件时, BS01 发酵产物的杀藻活性最强。通过均匀设计进行最佳发酵培养基及培养条件优化的结果为: 可溶性淀粉为 20 g·L⁻¹, 硝酸钠为 0.5 g·L⁻¹, pH 为 7.7, 温度为 27.2 ℃。研究结果为杀藻活性物质高效提取及杀藻机制研究奠定了基础。

关键词: 溶藻放线菌; 塔玛亚历山大藻; 培养基优化; 单因子试验; 均匀设计

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2011)02-0109-06

Optimization of medium components and culture conditions of algicidal actinomycetes BS01

FU Li-jun^{1,2}, AN Xin-li^{1,3}, LI Dong², XU Li-xia², TIAN Yun^{1,3}, ZHENG Tian-ling^{1,3}

1. Key Laboratory of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Environment and Life Science, Putian University, Putian 351100, China; 3. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: A strain of actinomycetes BS01 capable of lysing the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* was isolated from mangrove area of Zhangjiangkou in Fujian province. The medium components and cultural conditions for algicidal activity of actinomycete strain BS01 were optimized by single-factor and uniform tests in shake-flask. The initial pH, fermentation temperature, fermentation time, and inoculum were optimized through single-factor tests. Results showed that BS01 exhibited the best algicidal activity by using soluble starch as carbon source, sodium nitrate as nitrogen source, initial pH at 7.7, temperature at 27.2℃, and shaking at 150 r·min⁻¹ in 100 mL of 250 mL conical flask for 48 h. The optimal fermentation parameters of BS01 were: soluble starch 20 g·L⁻¹, sodium nitrate 0.5 g·L⁻¹, pH value 7.7, and temperature 27.2℃ by using uniform design experiments.

Key words: algicidal actinomycete; *Alexandrium tamarense*; optimization of medium component; single-factor experiment; uniform design

随着全球水体富营养化的加剧, 有毒藻类所引起的水华和赤潮问题越来越引起人们的关注^[1]。目前, 解决赤潮和水华的方法主要为物理、化学和生物防治等, 由于物理和化学的方法未能有效解决问

题, 相对而言, 成本低、安全性好的生物防治技术引起越来越多研究人员的关注^[2-5]。溶藻细菌作为水生生态系统生物种群结构和功能的重要组成部分, 对防治赤潮和水华及维持生态平衡都具有非常重要的

收稿日期: 2010-07-26; 修订日期: 2010-09-15。蔡卓平编辑

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2008AA09Z408); 国家自然科学基金项目(40930847、40876061); 滨海湿地生态系统教育部重点实验室开放基金项目(CWe0902); 福建省自然科学基金项目(2010J01223); 福建省教育厅项目(JA10232)

作者简介: 傅丽君(1975—), 女, 福建省莆田市人, 博士, 副教授, 主要从事环境生态学研究。

通信作者: 郑天凌。E-mail: microzh@xmu.edu.cn

意义^[6-8]。溶藻细菌的作用方式主要有2种^[9]：直接溶藻和间接溶藻。直接溶藻即直接攻击宿主，它需要溶藻微生物与藻细胞直接接触，甚至侵入藻细胞内；间接溶藻即间接攻击宿主，主要包括溶藻生物与有害藻类竞争有限营养，或者通过释放胞外物质杀死藻细胞或抑制其生长，其中以分泌胞外物质溶藻作为主^[8]。据不完全统计，近年来50%以上新发现的海洋微生物活性物质是由海洋放线菌这个庞大的分类群产生，暗示了开发海洋放线菌具有巨大意义，使得利用放线菌控制水华和赤潮成为值得深入研究的领域^[10-11]。早在1962年，Saffeman等^[12]就从土壤中分离到微生物放线菌，发现在403株放线菌中有213株对微生物有抑制作用，这213株放线菌中有90%具有强烈的溶藻活性。国内外学者相继报道了从土壤或水体中分离出高效溶藻放线菌^[13-18]。

微生物发酵过程机理复杂，影响因素众多，且培养基成分和发酵条件等不同因素相互作用，因此针对微生物胞外产物的培养基及发酵条件的优化工作显得尤为重要。放线菌溶藻活性物质的产生与其培养条件有很大关系，为了得到更好的溶藻效果，必须寻找合适的条件以更有利于活性产物的产生。目前关于杀藻菌的研究多数局限于杀藻菌的分离鉴定，关于杀藻活性物质定性定量的工作非常有限，与杀藻活性物质产量提高相关的培养基及发酵条件的研究还很少^[19-20]。放线菌菌株 BS01 *Brevibacterium* sp. 是本课题组从漳江口红树林区分离到的对塔玛亚历山大藻具有强烈溶藻效果的放线菌，是关于塔玛亚历山大藻溶藻放线菌的首次报道(待发表)，已证实该菌通过分泌胞外活性产物间接杀藻。本文采用单因子及均匀设计方案优化 BS01 产溶藻活性物质的培养基组成及培养条件，为进一步研究杀藻物质的高效提取及杀藻机制研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌和供试藻

放线菌菌株 BS01 *Brevibacterium* sp. 由厦门大学应用与环境微生物研究所分离自漳江口红树林区，实验用的藻种为单细胞塔玛亚历山大藻 *Alexandrium tamarense*，由暨南大学水生生物研究所提供。

1.1.2 培养基

藻类培养基为 f/2 培养基；BS01 基础培养基为 2216 E 培养基。

1.1.3 主要仪器

光照培养箱(PYX-300G-A, 长春博盛量子科技有限公司); 生化培养箱(SHP-250, 上海精宏实验设备有限公司); 酸度计(PHS-25, 上海伟业仪器厂); 酶标分析仪(DNM-9602G, 北京普朗新技术有限公司); 电子天平(Sartorius BS224S, 德国赛多利斯); 移液枪(Eppendorf, 德国艾本德); 恒温摇床(ZHWY-211B, 上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.2 方 法

将保存好的菌株 BS01 接种到 2216E 培养基平板, 28 ℃ 培养 2—3d。取经活化的菌种按 1% 接种量接种到装有 100mL 2216E 培养基的 250mL 三角瓶中, 28 ℃、150r·min⁻¹ 条件下摇床培养 24h。塔玛亚历山大藻接种于 f/2 培养基中, 在(20±1) ℃、3500 lx, 光照为 12h 光照与 12h 黑暗条件下培养。取其发酵液的上清液按体积比 1:100 加入生长状况良好的指数生长期的塔玛亚历山大藻液中, 采用酶标仪测定塔玛亚历山大藻的细胞荧光值。抑藻率的计算公式为 $R = \left(\frac{A-B}{A} \right) \times 100\%$, 其中, R 表示抑藻率, A 表示对照组荧光强度值, B 表示处理组荧光强度值。

1.2.1 发酵最佳碳源和氮源的筛选

以 2216E 为基础培养基, 选取葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、果糖为供试碳源, 硝酸钠、硫酸铵、硝酸钾、氯化铵、尿素为供试氮源, 分别加入单一碳源和氮源, 其他成分不变, 将预先活化的菌种加入上述培养基中, 于 28 ℃ 摇床 150r·min⁻¹ 发酵培养 24h, 测定溶藻效果。

1.2.2 发酵最佳温度的确定

分别设定 24、26、28、30 和 32 ℃ 的温度, 摇床 150r·min⁻¹ 发酵培养 24h, 测定溶藻效果。

1.2.3 发酵最佳时间的确定

根据 BS01 的生长状态, 分别取培养 24、48、72、96、120h 的 BS01 发酵液进行溶藻效果测定。

1.2.4 发酵最佳 pH 值的确定

分别调整培养基 pH 值为 6、6.5、7、7.5 和 8, 于 28 ℃ 摇床 150r·min⁻¹ 发酵培养 24h 后, 测定溶藻效果。

1.2.5 发酵最佳溶氧量确定

在 250mL 三角瓶里分别装 50、75、100、125、150mL 发酵液, 于 28 ℃ 摇床 150r·min⁻¹ 发酵培养 24h, 测定溶藻效果。

1.2.6 发酵最佳转速确定

分别设定摇床振荡速度 90、120、150、180、

210r·min⁻¹, 28 °C 发酵 24h, 测定溶藻效果。

1.2.7 均匀设计优化发酵条件

采用 U₆(6⁴)均匀设计表^[21], 选取碳源用量、氮

源用量、温度和 pH 4 个因素进行发酵条件优化实验, 测定溶藻效果, 筛选最佳发酵条件。均匀设计表见下面表 1。

表 1 U₆(6⁴)均匀设计因素水平表

Tab. 1 Factor and level in the uniform design

| 因素 | 水平 | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 可溶性淀粉/(g·L ⁻¹) | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
| NaNO ₃ /(g·L ⁻¹) | 0.8 | 1.4 | 2.0 | 0.5 | 1.1 | 1.7 |
| pH | 7.1 | 8.0 | 6.8 | 7.7 | 6.5 | 7.4 |
| 温度/°C | 32.0 | 30.4 | 28.8 | 27.2 | 25.6 | 24.0 |

2 结果与讨论

2.1 单因素对放线菌菌株 BS01 抑藻活性的影响

2.1.1 碳源、氮源对 BS01 抑藻活性的影响

微生物发酵所需的基本营养包括碳源、氮源、无机离子等。其中速效碳源包括葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖等; 而糊精和可溶性淀粉等需要经过菌体胞外酶水解成单糖后才能被菌体利用为迟效碳源。在微生物培养中, 过多的速效碳源会加速菌体呼吸, 消耗过多氧气而不利于菌体生长; 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。另外, 过多的速效碳源会使菌体代谢过快, 使微生物后续生长缺乏营养。

选用葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、果糖作为碳源发酵 BS01 培养基, 以 2216E 培养基为基础培养基, BS01 菌株能够很好地利用可溶性淀粉, 溶藻率为 72.57%; 而对葡萄糖的利用最差, 溶藻率仅为 30.91%(图 1)。因此选用可溶性淀粉作为 BS01 发酵最佳碳源。

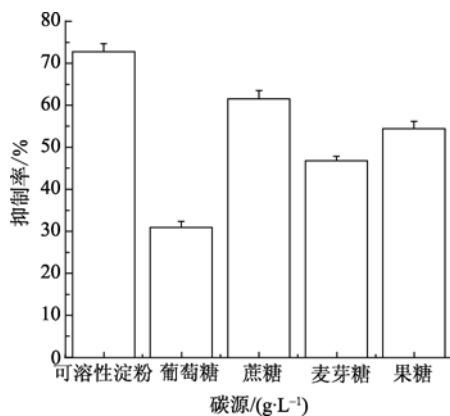


图 1 不同碳源对 BS01 抑藻活性的影响

Fig. 1 Effects of different carbon sources on algalicidal activity of BS01

作为 BS01 发酵培养基的氮源, 多种有机氮源和无机氮源所得发酵产物的杀藻活性都有较明显改善。选用硝酸钠、硫酸铵、硝酸钾、氯化铵、尿素作为氮源发酵 BS01 培养基, 以 2216E 培养基为基础培养基, 以硝酸钠为氮源时抑藻效果最好, 溶藻率达 54.73%(图 2)。因此选用硝酸钠作为 BS01 发酵最佳氮源。

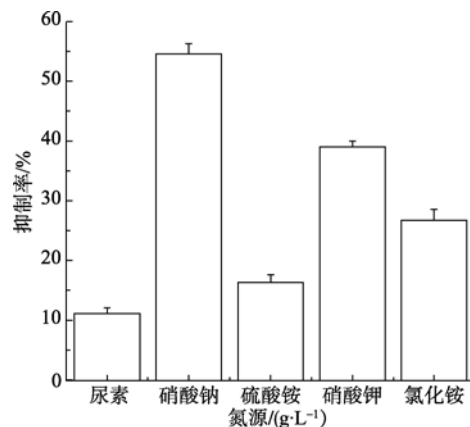


图 2 不同氮源对 BS01 抑藻活性的影响

Fig. 2 Effects of different nitrogen sources on algalicidal activity of BS01

2.1.2 温度对 BS01 抑藻活性的影响

图 3 结果表明, 温度对放线菌 BS01 发酵产物的杀藻活性影响较大, 温度为 28、30、32 °C 时表现出较好的杀藻效果, 抑藻率分别为 53.06%、44.06%、32.38%; 温度为 28 °C 时杀藻活性最高, 24 h 时杀藻活性最低, 抑藻率仅为 25.87%, 可能因为温度较低, 菌株生长减缓, 代谢产物的积累受到一定程度影响, 导致抑藻效果减弱。因此选择 28 °C 作为放线菌 BS01 的发酵最佳温度。

2.1.3 发酵时间对 BS01 抑藻活性的影响

图 4 结果表明, 放线菌 BS01 在发酵 2d 的抑藻

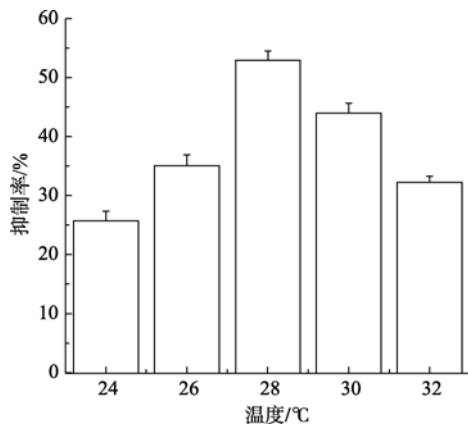


图3 不同温度对 BS01 抑藻活性的影响

Fig. 3 Effects of different temperatures on algicidal activity of BS01

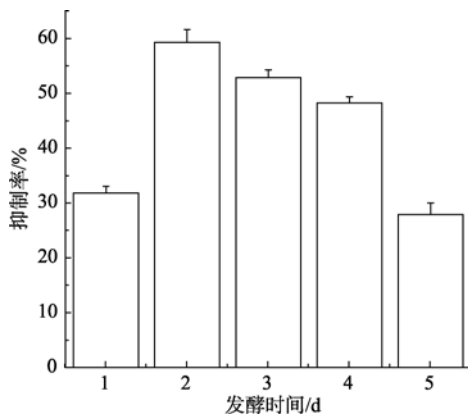


图4 不同发酵时间对 BS01 抑藻活性的影响

Fig. 4 Effects of different fermentation time on algicidal activity of BS01

效果最好, 抑制率为 59.30%; 随着发酵时间的延长, 杀藻效果逐渐减弱, 杀藻效果为 48h > 72h > 96h > 24h > 120h, 因此选择 48h 作为 BS01 最佳培养时间。

2.1.4 pH 值对 BS01 抑藻活性的影响

图 5 结果表明, 发酵液的不同初始 pH 值对 BS01 发酵产物杀藻活性影响较大。在 pH 值 7.5—8.0 时杀藻效果最好, 抑藻率为 49.91%—45.55%, 表明该 pH 范围最适合菌株 BS01 胞外产物的产生及积累, 其原因可能是放线菌适合于在弱碱性条件下生长, 即该 pH 值符合放线菌的生长要求^[22]。而 pH 为 6 和 6.5 时, 杀藻活性开始下降, 杀藻率仅为 18.12% 和 20.34%, 表明偏碱性或者酸性条件不利于 BS01 产生溶藻活性物质。因此选择 pH 值 7.5 进行放线菌 BS01 的发酵培养。

2.1.5 溶解氧对 BS01 抑藻活性的影响

图 6 结果表明, 250mL 三角瓶中装液量为 50—100mL 时, BS01 发酵产物抑藻率为 42.25%—55.63%; BS01 发酵产物的抑藻效果在装液量为

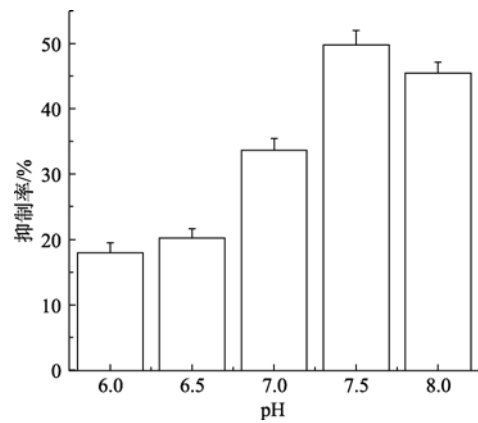


图5 不同 pH 对 BS01 抑藻活性的影响

Fig. 5 Effects of different pH on algicidal activity of BS01

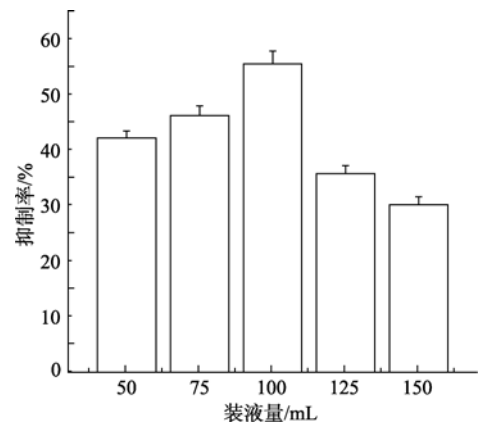


图6 不同装液量对 BS01 抑藻活性的影响

Fig. 6 Effects of medium volume per flask on algicidal activity of BS01

100mL 时最好, 并随着装液量的增加逐渐降低, 150mL 装液量的抑藻率仅为 30.12%。选择 100mL 作为 BS01 发酵的最佳装液量。

2.1.6 转速对 BS01 抑藻活性的影响

图 7 结果表明, 振荡速度为 150r·min⁻¹ 时的

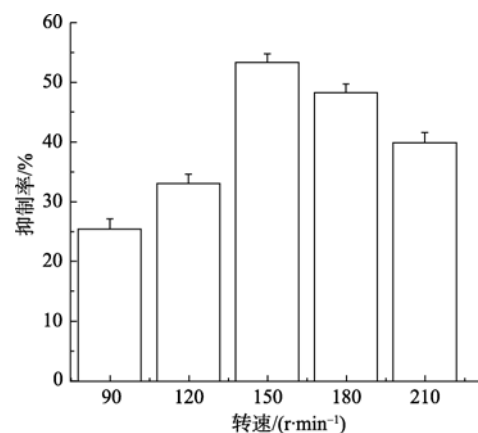


图7 不同转速对 BS01 抑藻活性的影响

Fig. 7 Effects of shaking speed on algicidal activity of BS01

BS01 发酵产物的溶藻效果最好, 溶藻率达 53.42%, 振荡速度为 90、120、180、210r·min⁻¹ 时, 发酵产物的杀藻率都较低。选择 150r·min⁻¹ 作为 BS01 发酵的最佳转速。

2.2 均匀设计优化发酵条件

正交设计和均匀设计是目前比较流行的试验设计方法^[23]。均匀设计法的最大优点就是使试验点均匀地分布在试验范围内, 以较少的试验点获取最多的试验信息, 可大幅度减少试验次数, 被广泛地应用于寻找最优的工艺条件和最好的配方^[21]。采用 U₆(6⁴) 均匀设计法对 BS01 的发酵培养基碳源、氮源添加量和发酵条件进行优化, 不同试验组溶藻效果见表

2, 在本实验中试验次数 $N=6$, 因素数 $K=4$, 应用数理统计软件 Uniform Design Version 3.00 对表 2 进行数据处理, 回归分析结果见表 3 和表 4。

回归分析采用全回归法, 拟建立回归方程:

$$y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4$$

相关系数 $R=0.9995$; 检验值 $F=262.1$; 显著性水平 $\alpha=0.05$; 剩余标准差 $S=1.00e^{-3}$; 调整后的相关系数 $R_a=0.9976$; 观测值与回归值及误差结果如表 4, 说明该方程能很好地拟合 BS01 的发酵过程。

各因素对实验结果影响程度大小结果见表 5。由表可知, 比较偏回归平方和 U_i 和偏相关系数 i , 可以得出因素 2 对实验结果影响最大, 因素 3 次之,

表 2 均匀设计分析结果

Tab. 2 Results of UD U₆(6⁴) for optimization of cell growth

| 实验号 | 可溶性淀粉/(g·L ⁻¹) | NaNO ₃ /(g·L ⁻¹) | pH | 温度/ | 荧光强度/RFU |
|-----|----------------------------|---|-------|-------|----------|
| | x_1 | x_2 | x_3 | x_4 | y |
| 1 | 5 | 0.8 | 7.1 | 32.0 | 0.084 |
| 2 | 10 | 1.4 | 8.0 | 30.4 | 0.086 |
| 3 | 15 | 2.0 | 6.8 | 28.8 | 0.111 |
| 4 | 20 | 0.5 | 7.7 | 27.2 | 0.083 |
| 5 | 25 | 1.1 | 6.5 | 25.6 | 0.109 |
| 6 | 30 | 1.7 | 7.4 | 24.0 | 0.112 |

表 3 变量方差分析表

Tab. 3 ANOVA of variable

| 模型 | 平方和 | 自由度 | 均方 | 检验值 |
|------|----------------|-----------|------------------------|-----------|
| 回归 | $U=1.05e^{-3}$ | $K=4$ | $U/K=2.62e^{-4}$ | |
| 回归剩余 | $Q=1.00e^{-6}$ | $N-1-K=1$ | $Q/(N-1-K)=1.00e^{-6}$ | $F=262.1$ |
| 总和 | $L=1.05e^{-3}$ | $N-1=5$ | | |

表 4 残差分析表

Tab. 4 ANOVA of residual

| 试验号 | 观测值 | 回归值 | 观测值-回归值 | (回归值-观测值)/观测值 |
|-----|--------------|--------------|---------------|---------------|
| 1 | $8.40e^{-2}$ | $8.35e^{-2}$ | $5.00e^{-4}$ | 0.595 |
| 2 | $8.60e^{-2}$ | $8.60e^{-2}$ | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 0.111 | 0.112 | $-1.00e^{-3}$ | 0.901 |
| 4 | $8.30e^{-2}$ | $8.35e^{-2}$ | $-5.00e^{-4}$ | 0.602 |
| 5 | 0.109 | 0.109 | 0.00 | 0.00 |
| 6 | 0.112 | 0.112 | 0.00 | 0.00 |

表 5 回归系数对抑藻活性的影响

Tab. 5 Regression coefficient on the algicidal activity

| 项目 | 偏回归平方和 U_i | 各方程项对回归的贡献/% | 偏相关系数 i |
|-------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| x_1 | $U_1 = 4.20e^{-20}$ | $U_1/U = 4.01e^{-15}$ | $i_1 = 2.050e^{-7}$ |
| x_2 | $U_2 = 3.10e^{-4}$ | $U_2/U = 29.6$ | $i_2 = 0.9984$ |
| x_3 | $U_3 = 1.76e^{-4}$ | $U_3/U = 16.8$ | $i_3 = -0.9972$ |
| x_4 | $U_4 = 2.11e^{-21}$ | $U_4/U = 2.01e^{-16}$ | $i_4 = 4.589e^{-8}$ |

其中第 4 方程项 x_4 对回归的贡献最小, 对其进行显著性检验分析, 检验值 $F_4 = 2.106e^{-15}$, 临界值 $F_{(0.05,1,1)} = 161.4$, $F_4 < F_{(0.05,1,1)}$, 此因素(方程项)不显著。利用上述建立的回归方程, 通过 Uniform Design Version 3.00 软件处理, 得出本研究中的最优发酵工艺为: 可溶性淀粉 $20g \cdot L^{-1}$ 、 $NaNO_3$ $0.5g \cdot L^{-1}$ 、温度 27.2 、 $pH7.7$ 。

3 结论

本研究通过单因素实验优化了 BS01 产溶藻活性物质的发酵条件, 筛选确定了 4 个培养基组分,

每个组分设置 6 个水平, 利用均匀设计的 6 个组合就达到了传统“析因实验设计”庞大试验次数的效果, 同时避免了大量人力与实验材料的耗费及实验过程中出现的实验条件不均一性等问题, 有效提高了试验的准确率, 降低了试验成本。综合分析发现, 各因素对菌株 BS01 产溶藻活性物质产生影响的顺序为可溶性淀粉 $> pH > NaNO_3 > 温度$; 菌株 BS01 的最优发酵培养基为可溶性淀粉 $20g \cdot L^{-1}$ 、 $NaNO_3$ $0.5g \cdot L^{-1}$ 、 $pH7.7$ 、温度 27.2 。该优化配方的确定不仅为进一步扩大 BS01 发酵规模奠定了良好的基础, 也为进一步分离纯化杀藻活性物质提供了依据。

参考文献

- [1] KRIENITZ L, BALLOT A, KOTUT K, et al. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious death of Lesser Flamingos at Lake Bogoria Kenya[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(2): 144–148.
- [2] IMAMURA N, MOTOIKEL, SHIMADA N, et al. An efficient screening approach for anti-microcystis compounds based on knowledge of aquatic Microbial ecosystem[J]. J Antibiot, 2001, 54(6): 582–587.
- [3] 赵以军, 刘永定. 有害藻类及其微生物防治的基础——藻菌关系的研究动态[J]. 水生生物学报, 1996, 20(2): 173–181.
- [4] 王新, 周艳艳, 郑天凌. 海洋细菌生态学的若干重要领域及其研究新进展[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 291–297.
- [5] 王新, 李志江, 郑天凌. 海洋浮游细菌在东海赤潮高发区的分布与活性[J]. 环境科学, 2010, 31(2): 287–295.
- [6] WANG XIN, LI ZHIJIANG, SU JIANQIANG, et al. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere[J]. Biological Control, 2010, 52(2): 123–130.
- [7] 郑天凌, 田蕴, 苏建强, 等. 海洋微生物研究的回顾与展望[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(增刊 2): 151–157.
- [8] 吴刚, 席宇, 赵以军. 溶藻细菌研究的最新进展[J]. 环境科学研究, 2002, 15(5): 43–46.
- [9] RASHIDAN K K, BIRD D F. Role of predatory bacteria in the termination of a cyanobacterial bloom[J]. Microb Ecol, 2001, 41(2): 97–105.
- [10] 姜怡, 唐蜀昆, 王永霞, 等. 海洋放线菌分离方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 153–155.
- [11] 曾湘, 郑天凌. 海洋活性肽研究的回顾与展望[J]. 世界科技研究与发展, 2009, 31(6): 1012–1016.
- [12] SAFFERMAN R S, MORRIS M E. Evaluation of natural products for algicidal properties[J]. Appl Environ Microbiol, 1962, 10(4): 289–292.
- [13] WHYTE LG, MAULE A, CULLIMORE D R. Method for isolating cyanobacteria-lysing *Streptomyces* from soil[J]. Journal of Applied Microbiology, 1985, 58(2): 195–197.
- [14] BIABANI M A, BAAKE M, LOVISETTO B, et al. Anthranilamides: new antimicrobial active substances from a marine *Streptomyces* sp.[J]. J Antibiot, 1998, 51(3): 333–340.
- [15] SIGEE D C, GLENN R, ANDREWS M J, et al. Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities[J]. Hydrobiologia, 1999, 395/396: 161–172.
- [16] CHOI H J. *Streptomyces neyagawaensis* as a control for the hazardous biomass of *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) in eutrophic freshwaters[J]. Biological Control, 2005, 3(2): 335–343.
- [17] 王慧玲, 叶新, 赵以军, 等. 一株高效溶藻放线菌的分子生物学鉴定[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(6): 17–19.
- [18] 崔妍, 李建宏, 汪燕, 等. 高效抑藻放线菌的筛选和活性[J]. 生态学报, 2008, 28(11): 5691–5697.
- [19] 许珂, 吴刚, 余文平, 等. 溶藻细菌 W5 培养条件优化及发酵培养[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(2): 12–15.
- [20] 肖慈琼, 姜红, 程凯, 等. 溶藻放线菌 AN02 的筛选及其培养条件的优化[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(4): 11–13.
- [21] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 1–62.
- [22] 孔贇, 缪礼鸿, 曾驰, 等. 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, 6(48): 1361–1364.
- [23] 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.