

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720091152147

UDC_____

厦门大学

硕士 学位 论 文

抑藻表面活性剂产生菌的高通量筛选及
其发酵条件优化

Study on the high through-put screening of
surfactant-producing algicidal bacteria and optimization of its
fermentation conditions

姓名: 张金龙

指导教师姓名: 郑天凌

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2013年5月

论文答辩日期: 2013年6月3日

学位授予日期:

答辩委员会主席: 于昌平

评 阅 人: _____

2013年5月

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()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()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): 张金龙

2013年 6月 10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 年 月 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)：张金龙

2013年 6月 10日

目 录

目 录.....	1
Contents	5
摘 要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言.....	5
1.赤潮的危害	5
2.赤潮的治理	6
3.赤潮的生消机理	7
4.海洋细菌与赤潮生物的原位生态关系.....	9
5.海洋微生物来源的表面活性物质.....	10
6.微生物表面活性剂产生菌的筛选方法.....	12
7.生物表面活性剂应用于赤潮防控的研究进展.....	14
8.生物表面活性剂与质膜作用机制的研究进展.....	16
9.本论文的研究内容及意义.....	16
第二章 材料与方法.....	18
1. 材料	18
1.1 藻种	18
1.2 菌株、质粒、载体和引物	19
1.3 试剂盒	19
1.4 工具酶	19
1.5 培养基	19
1.6 主要试剂	20
1.7 主要溶液	20
1.8 主要耗材	21
1.9 主要仪器	21
1.10 主要软件	22
2. 方法	23
2.1 藻的培养	23
2.2 海洋细菌的分离	23
2.3 表面活性物质产生菌的筛选	23
2.3.1 菌株活化及保存	23
2.3.2 96 深孔微孔板培养可行性验证	24
2.3.3 96 孔板盖的洗涤	24
2.3.4 96 孔板盖加油量的选择	25
2.3.5 待选菌株的高通量培养	25

2.3.6 产表面活性剂菌株的高通量筛选	25
2.3.7 产表面活性剂菌株的复筛	27
2.3.7.1 表面张力的测定	27
2.3.7.2 乳化指数的测定	27
2.4 产表面活性剂菌株的分子鉴定	28
2.4.1 细菌基因组 DNA 制备	28
2.4.2 16S rRNA 基因片段的 PCR 扩增	28
2.4.3 PCR 产物纯化	29
2.4.4 PCR 产物与 T-vector 连接	29
2.4.5 转化	29
2.4.6 DNA 序列测序和分析	30
2.5 单因子试验法优化 <i>Halomonas</i> sp.DHQ19 乳化剂发酵条件	30
2.5.1 基础发酵培养基的选择	30
2.5.2 发酵时间对 <i>Halomonas</i> sp.DHQ19 发酵液乳化活性的影响	30
2.5.3 氮源种类对 <i>Halomonas</i> sp.DHQ19 发酵液乳化活性的影响	31
2.5.4 碳源种类对 <i>Halomonas</i> sp.DHQ19 发酵液乳化活性的影响	31
2.5.5 盐度对 <i>Halomonas</i> sp.DHQ19 发酵液乳化活性的影响	31
2.5.6 镁离子浓度对 <i>Halomonas</i> sp.DHQ19 发酵液乳化活性的影响	31
2.5.7 初始 pH 对 <i>Halomonas</i> sp.DHQ19 发酵液乳化活性的影响	31
2.5.8 装液量对 <i>Halomonas</i> sp.DHQ19 发酵液乳化活性的影响	32
2.6 乳化剂的分离纯化	32
2.6.1 细菌的发酵	32
2.6.2 乳化剂的分级醇析、洗涤和冻干	32
2.6.3 各醇析组分乳化活性和总糖量的检测	33
2.6.4 乳化剂粗提物制备	33
2.6.5 乳化剂的 DEAE-Sepharose FF 离子交换层析	34
2.6.6 离子交换层析组分的抑藻活性实验	34
第三章 结果与分析.....	35
1.表面活性物质产生菌高通量筛选.....	35
1.1 简易高通量培养可行性验证	35
1.2 表面活性剂产生菌的高通量初筛	35
1.3 表面张力和乳化活性的测定	36
1.4 表面活性物质产生菌的分子鉴定	38
2 菌株 DHQ19 发酵条件的优化.....	38
2.1 基础发酵培养基的选择	38
2.2 培养基成分和培养条件对 DHQ19 发酵液乳化活性的影响	39
2.2.1 发酵时间对 <i>Halomonas</i> sp. DHQ19 发酵液乳化活性的影响	39
2.2.2 无机氮源对 <i>Halomonas</i> sp. DHQ19 生长及杀藻效果的影响	40

2.2.3 不同碳源对 <i>Halomonas</i> sp. DHQ19 发酵液乳化活性的影响	41
2.2.4 盐度对 <i>Halomonas</i> sp. DHQ19 发酵液乳化活性的影响	42
2.2.5 镁离子浓度对 <i>Halomonas</i> sp. DHQ19 发酵液乳化活性的影响	43
2.2.6 初始 pH 对 <i>Halomonas</i> sp. DHQ19 发酵液乳化活性的影响.....	44
2.2.7 装液量对 <i>Halomonas</i> sp. DHQ19 发酵液乳化活性的影响	45
3. DHQ19 乳化剂粗提物的分离纯化.....	46
3.1 乳化剂的醇析分级沉淀	46
3.2DHQ19 乳化剂的热稳定性	48
3.3DHQ19 乳化剂的分子大小	49
3.4DHQ19 乳化剂粗提物抑藻谱	50
3.5 乳化剂的离子交换层析及各组分的抑藻活性	50
第四章 讨论.....	51
1. 表面活性剂产生菌的高通量筛选	51
2. 表面活性剂产生菌发酵条件的优化	52
3. 高分子量微生物表面活性剂的分离纯化	53
第五章 结论与展望.....	54
1. 结论	54
2. 本论文创新点	55
3. 展望	55
参考文献	56
附录	62
致谢	68

Contents

Chinese abstract	1
English abstract.....	3
Chapter 1 Introduction.....	5
1.Influence and cause of red-tide	5
2.Prevention and mitigation of red-tide	7
3.Processing mechanism of red-tide	8
4.The in-situ algea-bacteria relationship	9
5.Biosurfactants from marine bacteria	10
6.Screening methods of surfactant-producing bacteria.....	13
7.Adavance in application of biosurfactants in regulation of red-tide	16
8.Adavance in membrane-permeabilizing mechanism of biosurfactants.....	18
9.Objective and significance of this study.....	19
Chapter 2 Materials and methods	21
1. Materials	21
1.1 Algal species	21
1.2 Strain, plasmids and vectors	22
1.3 Kits	22
1.4 Enzymes.....	22
1.5 media	22
1.6 Reagents	23
1.7 Solutions	23
1.8 Consumptive material	24
1.9 Apparatus	24
1.10 Softs	25
2. Methods.....	26
2.1Culturing algae.....	26
2.2 Isolate of marine bacteria.....	26
2.3 Screening of surfactant-producing bacteria	26
2.4 Molecular identification of surfactant-producing bacteria	30
2.5 The optimization of culture condition.....	33
2.6 Isolation and purification of biosurfactant	35
Chapter 3 Results and Analysis	38
1 High through-put screening of surfactant-producing bacteria	38
2 The optimization of culture condition.....	41

3 Isolation and purification of biosurfactant.....	47
Chapter 4 Discussions.....	52
1. High through-put screening of surfactant-producing bacteria.	52
2. Optimization of culture condition	53
3. Isolation and purification of high molecular weigh biosurfactant	54
Chapter 5 Conclusions and Future directions.....	55
1. Conclusions.....	55
2. New insights	56
3. Future directions	56
References.....	57
Appendix.....	65
Acknowledgement.....	68

摘要

赤潮是一种严重的全球性海洋灾害，它会造成严重的生态、资源、环境问题和重大的经济损失。近年来，赤潮发生次数增多，发生区域扩大，赤潮危害加剧。因此，寻求有效的赤潮防治方法成为当务之急。海洋细菌在赤潮生消过程中有着极其重要的作用，而细菌杀藻现象的发现也为微生物防治赤潮提供了新的可能途径，“菌藻关系”研究已经成为当前赤潮研究的重点和热点。

本论文选取典型有害赤潮藻——锥状斯氏藻 (*Scrippsiella trochoidea*) 作为主要研究藻种，基于高通量培养-筛选方法，从实验室保存的东海海域赤潮高发区分离菌株中筛选到能产表面活性物质的 3 株海洋杀藻细菌。研究了其中 1 株杀藻菌发酵条件，并对其分泌的杀藻表面活性物质的分离纯化进行了初步研究。本文选取乳化效果最好的菌株 *Halomonos* sp. DH77-1，以乳化活性为导向从其发酵液提取物中分离、纯化具有杀藻活性的化合物。主要结论如下：

1. 整合高通量培养和液滴崩塌表面活性剂产生菌筛选法，建立了表面活性剂产生菌的高通量筛选流程。采用该方法从实验室保存的 300 余株东海海域赤潮高发区所分离到的菌株中筛选获得 3 株产表面活性剂海洋细菌，经鉴定分属于盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*)，其中 *Halomonas* sp. DHQ19 发酵液具有优良的乳化活性，其 24h 乳化指数 EI₂₄(emulsification index) 高达 69%。

2. 采用单因子优化方法对菌株 *Halomonas* sp. DHQ19 合成乳化活性物质的发酵条件进行了初步优化。考察了氮源、碳源、镁、盐度、初始 pH，装液量，发酵时间等因素对 *Halomonas* sp. DHQ19 发酵液乳化活性的影响。初步确定发酵培养基为：甘露醇 10g，谷氨酸 0.6g，硫酸铵 2g，磷酸二氢钾 2g，磷酸氢二钾 5g，七水合硫酸镁 1g，氯化钠 8g，pH7.5，蒸馏水定容至 1L；培养条件为：转速 150rpm，装液量 1/5，30℃ 培养 72h。

3. 采用多级醇析法、超滤法和 DEAE-琼脂糖离子柱层析法对发酵液中的乳化活性物质进行初步分离，并对分离获得的层析组分进行了最小抑藻浓度的检测。通过多级醇析分离获得 5 个不同级分，合并具有乳化活性的 40% 和 50% 醇析级分后，进行超滤除去小分子物质收集 100KD 截留物，再通过 DEAE-琼脂糖离子柱层析进一步分离纯化，获得组分 A 和组分 B，通过超滤方法除盐后冻干

保存。组分 A 的最小抑藻浓度为 50mg/L，组分 B 的最小抑藻浓度为 200mg/L。

关键词：杀藻细菌；表面活性剂产生菌；乳化剂；杀藻活性物质；

厦门大学博硕士论文数据库

Abstract

Harmful algal blooms (HABs) is a serious global marine disaster. It causes a series of ecological, resource, environmental problem and major economic losses. The apparent increasing occurrence of HABs throughout the world has led to extensive researches to mitigate the blooms. As a result, some management strategies have been developed. Outbreak and termination of HABs in marine environment was affected by physical and chemical factors, and biological factors as well. In the factors that regulate the red tide dynamics, algal-bacterial interactions are increasingly cited as potentially regulators in the sense of both decreasing and developing algal blooms. This gave us the suggestions that these algicidal bacteria may play a major role in controlling HABs dynamics, specifically near the end of the blooms.

In this research, we chose the typic toxic dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* as the main study algal strain. A high through-put screening strategy for surfactant-producing strains were developed and three marine bacterial strains with high surfactant production were selected from about 300 isolates from Donghai waters. *Halomonos* sp. DHQ19, which has the best emulsifying activity, was furtherly studied. According to the emulsifying activity-guided assay, the fermentation condition was preliminarily optimized and the emulsifying agent was purified. The main results were as follows:

1. Based on the high through-put bacterial fermentation method and the drop-collapsing test for surfactant production, a novel integrated high through-put screening procedure for surfactant-producing strains was developed. Surfactant production of 300 marine strains were detected and three of them were demonstrated to have high surfactant-producing activity, which were identified as *Bacillus* sp. SF-7, *Halomonas* sp. HH10, and *Halomonas* sp. DHQ19 by sequence analysis of 16S rRNA gene.
2. The culture conditions for *Halomonas* sp. DHQ19 were optimized using a

single-factor test method. Factors including carbon source, nitrogen source, magnesium, temperature, initial pH value, liquid volume, fermentation time and salinity were studied. Results showed that pH 7.5, 1/5 liquid volume in flask, 8‰ salt content, 0.1% magnesium sulfate, 1% mannitol , 0.2% ammonia sulfate and 72-hour fermentation favored the biosurfactant production of strain DHQ19.

3. Crude emulsifying agent were prepared from fermentation supernatant by cold centrifugation, alcohol precipitation, deproteinization and 100KD-ultrafiltration. Crude emulsifying agent were finally purified by the DEAE-Sepharose fast flow ion exchange chromatography. Two fractions were obtained and MIC of the algicidal fraction was 50mg/L.

Key words: algicidal bacteria; surfactant-producing bacteria; emulsifying agent; algicidal substance

第一章 前言

藻类爆发是目前频繁出现在海水与淡水水域的一种灾害现象，在海洋中称为赤潮，在淡水中称为藻华。通常是指水体中某些微小的浮游藻类、原生动物或细菌，在一定的条件下暴发性增殖或聚集而引起水体变色现象。早在 1990 年赤潮就被联合国列为当今世界三大近海污染问题之一。

赤潮作为一种严重的全球性海洋灾害，已经引起世界各国和地区的高度关注。20 世纪以来，随着工农业迅速发展，大量污水排入水域，使得湖泊、内湾、河口和沿海水域受到了严重的有机污染，水体富营养化现象加剧^[1]，导致赤潮发生规模和频度呈急剧上升趋势，造成了严重的生态、资源、环境问题和重大的经济损失^[2]。近年来，我国有害赤潮的发生有以下趋势：频率增加，规模扩大，新的赤潮藻种不断出现，有毒赤潮藻种比例上升，发生海域向全部近岸海域扩展，时间跨度逐渐加大，有害赤潮危害程度日益增加^[2]。赤潮灾害给沿海地区带来了严重的生态、资源和环境问题^[4]，并时常造成惨重的经济损失（表 1.1 和表 1.2），是海滨生态安全和沿海经济可持续发展的重大威胁^[5]，这些严重威胁着我国经济的持续发展和社会的安定。因此，寻求有效的赤潮防治途径，研究新型高效环保的赤潮调控方法，制定有关防治对策，是当前赤潮防控领域中亟须解决的重大问题之一^[6]。

1. 赤潮的危害

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）。有害藻华拥有巨大的破坏性，加之至今难以预测和控制，因而常被形容为“海洋幽灵”或“海洋癌症”。

赤潮能通过产生毒素、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^[5]。赤潮灾害严重影响涉及经济民生的多个行业和领域，如海水养殖业、海洋捕捞业、滨海旅游业、食品安全。一旦在近岸养殖区或海洋渔场附近爆发有毒有害赤潮，海洋经济和海

产品安全都受到严重威胁。赤潮的危害具体体现在以下几个方面^[6]：赤潮造成养殖区经济鱼贝类死亡，重创养殖经济；干扰海洋鱼类的洄游路线，破坏渔场的铒料基础，影响索饵活动，造成渔业减产；破坏旅游区的秀丽风光，限制海水浴场的水上活动，减少零售业、住宿餐饮业等收入；赤潮发生海域的水产品能富积赤潮毒素，人们不慎食用能对身体健康产生威胁。

表 1.1. 2007-2012 年造成重大经济损失的赤潮发生情况^[7,8,9,10,11,12]

时间	海域	赤潮原因种	面积/平方公里	直接经济损失/万元
2007.1	汕头市近岸海域 福建平潭东澳一级渔港码头西海域及龙王	球形棕囊藻	35	贝类 40 吨
2007.6	头海域	米氏凯伦藻	—	500.0
2007.9	广东汕尾港区及附近海域	棕囊藻	30	100.0
2008.6	辽宁丹东市附近海域	夜光藻	500	200.0
2009.5	福建莆田南日岛附近海域	夜光藻	10	6000.0
2009.5	福建平潭龙王头海水浴场及流水码头海域	夜光藻	20	500.0
2010.5	秦皇岛昌黎沿海海域	—	—	20000.0
2010.7	秦皇岛北戴河～抚宁沿海海域	红色中缢虫	20	500.0
2010.5	台州大陈海域	东海原甲藻	30	68.7
2011.8	珠海渔女、海滨浴场、九洲列岛附近海域	双胞旋沟藻	89	316.0
2012.6	福建连江黄岐	米氏凯伦藻	40	105 390.0
2012.6	福州福清东翰海域	米氏凯伦藻	6	11 996.1
2012.6	福州罗源碧里乡吉壁·新沃海域	米氏凯伦藻	10	1 170.0
2012.6	福建平潭海域	米氏凯伦藻	80	63 151.2
2012.5	莆田湄洲岛洋屿海域	米氏凯伦藻	2	1050.0
2012.5	莆田坑口、石城、湄洲岛洋屿海域	米氏凯伦藻	32	14549.5
2012.5	泉州惠安	米氏凯伦藻	7	3700.0
2012.5	浙江温州	米氏凯伦藻 东海原甲藻	40	280.4

表 1.2 2007-2012 每年全国赤潮造成的直接经济损失^[7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21]

年份	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
直接经 济损失/ 亿元	2.5	9.3	-	3	10	0.23	0.4281	0.00065
年份	2005	2006	2007	2008	2009	2010.	2011	2012
直接经 济损失/ 亿元	0.69	0.1	0.06	0.02	0.65	2.06	0.0325	20.15

2.赤潮的治理

鉴于近年来赤潮造成巨大经济损失，各国政府均在赤潮科学领域投入大量人力、物力和财力，其最终目的就是有效的控制赤潮，降低赤潮灾害所带来的负面影响。但很不幸的是，到目前为止，完全符合“高效、无毒、价廉、易得”的要求并真正能付诸应用的赤潮治理方法却寥寥无几。

目前国内外已提出多种赤潮治理方法，可将其归纳为化学法、物理法和生物法。物理方法治理赤潮就是利用物理方法和手段分离、去除或杀死赤潮生物，如围隔法、人工过滤打捞法、超声波法^[22]、电磁波法、紫外法^[23]、引水稀释法等等。物理法虽然对环境干扰较小，但是通常难以应用于大面积有害赤潮。而化学方法则是向水体中投入特定的化学药物^[24,25]、凝聚剂或絮凝剂^[26,27,28,29](如羟基药剂、硫酸铜、表面活性剂、黏土等)来杀灭或抑制赤潮生物。化学方法易于操作、见效快，而且某些药剂成本较低，但是不得不提的是该方法极易造成二次污染、给业已脆弱的海洋生态环境造成难以挽回的不利影响^[30]。因此，人们开始越来越多地将目光投向生物治理技术。

生物治理方法主要是利用赤潮生物与其它生物在长期进化过程中形成的竞争、抑制或捕食等关系，通过向赤潮高发区引入某种生物以达到抑制或杀死赤潮生物的目的，从而减少赤潮的发生及其造成的危害。其中，利用无害藻类的化感作用或其对营养的竞争来抑制有害藻类称为“以藻治藻”^[31,32]；利用微生物（细菌^[33,34,35,36,37]、放线菌、真菌^[38,39]等）分泌抑藻活性物质或通过藻菌胞间接触抑藻称为“以菌治藻”；另外，还可利用藻病毒^[40,41,42,43]或噬藻体专一性裂解赤潮

生物、利用滤食性贝类和浮游动物^[44,45]等捕食赤潮生物。与传统的物理和化学法相比，生物治理方法具有显著的优势，如安全可靠、环境污染少、没有二次污染、高效快速、经济实用、可操作性强等。因此，这些基于生物活性的抑藻方法具有非常广阔的应用前景。

海水富营养化的有效控制是解决赤潮问题的治本之计，而生物活性抑/杀藻则是在赤潮爆发或临界爆发情况下采用的一种环境友好型的高效灾害应急处理策略，二者相辅相成，不可偏废，只有这样才能标本兼治，最大限度地消除赤潮灾害对海洋生态系统和人类健康的威胁^[6]。

3.赤潮的生消机理

赤潮多发于水体交换差、富含营养物质的河口、港湾、内海或有上升流的海域，尤其是海水养殖区发生频率最高。赤潮的生消过程受到各种生物因素、化学因素和物理因素的影响，下面以最近的三个典型实例来解释赤潮生消机理的复杂性和不确定性。

D.M. Anderson 等以美国一个温带半封闭性浅港湾 Perch pond 作为研究海域，从产孢囊甲藻的生活史着手，研究了温度对多种甲藻孢囊萌发和形成的影响，结合所研究海域的全年水温变化和甲藻种类的演替发现，甲藻赤潮的爆发可以根据孢囊成熟期长短和温度对甲藻孢囊萌发的影响进行有效的预测^[46]。许卫忆等根据浙江象山港的赤潮监测发现，赤潮发生过程不是富营养化条件下赤潮藻细胞异常增殖的生物化学过程，而仅仅是由海底赤潮孢囊在适当的温度下萌发上升至上层水体集聚而成的。在这种情况下，赤潮最初的形成与富营养化水平无直接关系，而更多的取决于表层水流辐散作用的强弱^[47]。周名江等以开阔的中国东海为研究海域，从关键物理海洋学过程在赤潮生消过程中的生态作用角度出发，根据现场和实验室的研究结果也发现，海洋暖流和上升流对赤潮生物的运输、聚集和生长有很重要的作用^[48]。

需要特别指出的是，以上三个研究海域特征迥异，具有很好的代表性。其中，Perch pond 是富营养程度较高的小型封闭性浅港湾；象山港则是一个狭长型半封闭型深水港湾，水深在 10-15 米之间；而周名江等的研究海域则是东海 27~31° N 沿水深 30~50 m 等深线的海底地形陡变区海域。其中，Perch pond 的封

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文数据库