



## 基于生态风险评估探究溶藻细菌 2-4 的抑藻特性

叶益华<sup>1,2</sup>, 杨旭楠<sup>2\*</sup>, 陈进林<sup>2</sup>, 陈乐天<sup>1</sup>, 许玫英<sup>2\*</sup>

1 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642

2 广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

叶益华, 杨旭楠, 陈进林, 陈乐天, 许玫英. 基于生态风险评估探究溶藻细菌 2-4 的抑藻特性. 微生物学报, 2022, 62(9): 3631–3645.

Ye Yihua, Yang Xunan, Chen Jinlin, Chen Letian, Xu Meiyong. Algicidal characteristics of *Pseudomonas* 2-4: based on ecological risk assessment. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3631–3645.

**摘要:**【目的】基于生态安全评估, 探索溶藻细菌及其分泌物的抑藻效果与机制。【方法】分离获得溶藻细菌 2-4 (*Pseudomonas* sp.), 通过正交试验和动力学模型研究了菌株 2-4 及其分泌物的抑藻特性, 并通过急性毒性试验对菌株 2-4 及其分泌物进行生态风险评估。【结果】菌株 2-4 在最优条件下接种体积比(V/V)为 15%时对铜绿微囊藻的 4 d 抑制率达 92.81%, 抑藻反应符合一级动力学模型( $t_{1/2}=126$  h)。菌株 2-4 具有抑藻多样性, 首次报道了假单胞菌对斜生四链藻、蛋白核小球藻和丝藻的抑藻效果。菌株 2-4 分泌的抑藻活性物质分子量小于 500 Da, 不耐高温和强酸强碱。急性毒性试验结果显示, 高于 1.5%的菌液对大型溞有毒, 高于 2%的菌株分泌物对大型溞和稀有鮡鲫有毒, 但对明亮发光杆菌无毒。较安全的使用范围内, 菌株 2-4 (V/V=1.5%)及其分泌物(V/V=10%)对藻华湖泊水样的叶绿素 a 去除率为 4.83%–42.94%和 30.62%–68.69%。【结论】本研究客观分析了假单胞菌 2-4 及其分泌物在生态安全使用范围内的实际抑藻效果, 明晰了溶藻细菌生态毒性与抑藻效率的关系, 为生物控藻实践提供理论参考。

**关键词:** 溶藻细菌; 假单胞菌; 铜绿微囊藻; 叶绿素 a; 分泌物; 急性毒性

**基金项目:** 广东省重点领域研发计划(2019B110205004, 2020B1111530001); 广东省科学院建设国内一流研究机构行动专项资金(2020GDASYL-20200301003)

Supported by the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province, China (2019B110205004, 2020B1111530001) and by the Guangdong Academy of Sciences' Special Project of Science and Technology Development (2020GDASYL-20200301003)

\*Corresponding authors. Tel: +86-20-87137654; E-mail: YANG Xunan, yangxn@gdim.cn, XU Meiyong, xumy@gdim.cn

Received: 28 January 2022; Revised: 14 March 2022; Published online: 7 June 2022

## Algicidal characteristics of *Pseudomonas* 2-4: based on ecological risk assessment

YE Yihua<sup>1,2</sup>, YANG Xunan<sup>2\*</sup>, CHEN Jinlin<sup>2</sup>, CHEN Letian<sup>1</sup>, XU Meiyong<sup>2\*</sup>

1 College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

**Abstract:** [Objective] To explore the inhibitory effects of *Pseudomonas* 2-4 and its product on algae based on ecological risk assessment. [Methods] Algicidal bacterial strain 2-4 (*Pseudomonas* sp.) was isolated, and the suppression of strain 2-4 and its product on algae was examined based on orthogonal test and kinetic stimulation. Acute toxicity test was conducted to evaluate the ecological risks. [Results] Under the optimal conditions, strain 2-4 (V/V=15%) removed 92.81% of the *Microcystis aeruginosa* in 4 days, and the algal inhibition could be characterized by the first-order kinetic model ( $t_{1/2}$ =126 h). Strain 2-4 had a broad-spectrum inhibitory activity and the inhibitory effects of *Pseudomonas* sp. on *Ulothrix* sp., *Chlorella pyrenoidosa*, and *Tetradesmus obliquus* were reported for the first time. The product (<500 Da) from strain 2-4 had inhibitory effects on algae, but could be destroyed by high temperature and strong acid and alkali. The results of acute toxicity test showed the bacterial liquid at >1.5% (V/V) was toxic to *Daphnia magna* and the product at >2% (V/V) was toxic to *D. magna* and *Gobiocypris rarus* but nontoxic to *Photobacterium phosphoreum*. At the safe concentration, strain 2-4 (V/V=1.5%) and its product (V/V=10%) decreased chlorophyll a in the lake with algae bloom by 4.83%–42.94% and 30.62%–68.69%, respectively. [Conclusion] We analyzed the algicidal effect of strain 2-4 and its product in the safe concentration and clarified the relationship between the ecological toxicity and the inhibitory effects of strain 2-4, hoping to provide a reference for biocontrol of algae.

**Keywords:** algicidal bacteria; *Pseudomonas* sp.; *Microcystis aeruginosa*; chlorophyll a; bacterial product; acute toxicity

近年来, 由于水体富营养化和气候变暖, 有害藻华的发生频率日益增加。其中, 有害微囊藻(如铜绿微囊藻)分泌的微囊藻毒素威胁饮用水安全, 危害水生生态系统健康<sup>[1]</sup>。2016年, “全球变化下有害藻华研究计划”正式启动, 该计划旨在改进对藻华的认识和预测能力, 更全面地开展藻华的防控与治理<sup>[2]</sup>。目前, 微生物控藻技术因其环境友好性而备受环境管理部门和研究者的关注<sup>[3]</sup>。研究者分离筛选溶藻细菌, 将其应用于富营养化鱼塘<sup>[4]</sup>、虾养殖池塘<sup>[5]</sup>、湖泊<sup>[6]</sup>和河道<sup>[7]</sup>等环境的藻华防控中, 有效降低水

体藻细胞数量或叶绿素 a (chlorophyll a, Chl-a) 浓度。因此, 溶藻细菌具有广阔的应用前景。

溶藻细菌(algicidal bacteria)是一种以直接或间接的方式溶解破坏藻细胞结构或抑制藻生长的细菌。1942年 Geitler 最早发现了一株粘细菌 *Polyangium parasiticum* 能够杀死刚毛藻 (*Chladophora* sp.)<sup>[8]</sup>, 此后越来越多的溶藻细菌被报道出来。至今共报道了 5 个门、78 个属的溶藻细菌, 其中报道菌株数目最多的是芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、链霉菌(*Streptomyces* spp.)和假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)<sup>[9]</sup>。假单胞菌因其

较高的抑藻效率得到广泛关注。Wang 等<sup>[10]</sup>分离了一株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* ACB3)对铜绿微囊藻抑藻率可达 97.50%。黄姿等<sup>[11]</sup>发现了一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp. Z3)对链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)抑藻率为 95.00%。赵传鹏等<sup>[12]</sup>研究了一株假单胞菌对铜绿微囊藻培养液和太湖水样的抑藻效果, 1 d 后抑藻率分别为 91.00%和 85.90%。Zhou 等<sup>[13]</sup>发现一株铜绿假单胞菌通过分泌代谢物质阻碍了铜绿微囊藻细胞内蛋白质和碳水化合物的合成, 并通过膜脂过氧化来破坏铜绿微囊藻的细胞膜, 7 d 后 Chl-a 去除率为 83.84%。据统计, 假单胞菌属溶藻细菌可抑制金藻门(*Chrysophyta*)、褐藻门(*Ochrophyta*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、绿藻门(*Chlorophyta*)、硅藻门(*Bacillariophyta*)、甲藻门(*Pyrroptata*)共 6 个门、25 个属的藻生长<sup>[14-26]</sup>, 其抑藻多样性仅次于芽孢杆菌<sup>[9]</sup>, 具有很强的应用潜力。然而, 假单胞菌属中存在较多条件致病菌, 如溶藻效率较高的铜绿假单胞菌是一种水源性和食源性的条件致病菌, 可引起人类呼吸道感染、伤口感染、菌血症和败血症等<sup>[27]</sup>。因此, 在使用溶藻细菌控制藻华实践中应充分考虑其生态环境风险。

近年来, 研究者们开始研究溶藻细菌的生态环境风险。潘瑞松等<sup>[28]</sup>发现溶藻细菌 *Bacillus sphaericus* Y1 菌液对发光细菌具有轻微的急性毒性。孔赞等<sup>[29]</sup>用发光细菌检验了溶藻细菌 *Streptomyces* sp. HJC-D1 的过滤发酵液, 发现溶藻细菌分泌物同样具有一定的急性毒性。而童晶<sup>[30]</sup>发现溶藻细菌 *Arenibacter* sp. A61 的无菌滤液对大型溞(*Daphnia magna*)、褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)和南美白对虾(*Penaeus vannamei*)没有产生急性活动抑制。吴培枫等<sup>[31]</sup>用斑马鱼(*Brachydanio rerio*)和小鼠对溶藻细菌 *Halomona* sp. DH-e 的无菌滤液进行急性毒性检

验, 结果表明菌分泌物低毒或无毒。然而, 目前关于溶藻细菌生态风险的研究仍然较少, 且大多数研究报道的高抑藻率是在溶藻细菌投入量较高的条件下获得的, 未充分考虑高浓度溶藻细菌的潜在生态环境风险。因此, 有必要针对溶藻细菌的应用特性, 开展抑藻效果与溶藻细菌风险相关联的研究。本研究分离筛选出一株对铜绿微囊藻有高效抑藻活性的假单胞菌(*Pseudomonas* sp. 2-4), 探讨了其抑藻特性和水生急性毒性, 并基于其风险评估研究了其最佳的抑藻效果, 以期溶藻细菌治理藻类水华的应用实践提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 受试生物的来源与培养方法

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* FACHB-434)、近头状尖胞藻(*Raphidocelis subcapitata*)、斜生四链藻(*Tetrademus obliquus* FACHB-417)和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa* FACHB-10)购自中国科学院水生生物研究所; 丝藻(*Ulothrix* sp. FUSW6)购自暨南大学水生生物研究所。藻种活化后用 BG11 培养基扩大培养, 培养温度为 25 °C, 光照条件为 2 000–3 000 lx, 时间为 12 h 昼/12 h 夜。

明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum* T3)、大型溞(*Daphnia magna* Straus)和稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)由广东省微生物分析检测中心提供。大型溞用 M4 培养基培养, 培养条件为 25 °C、1 000 lx、12 h 昼/12 h 夜。稀有鮡鲫的培养条件为(23±2) °C、500–1 000 lx、14 h 昼/10 h 夜, 24 h 曝气。

### 1.2 溶藻细菌的分离与筛选

采集华南农业大学校内人工湖(洪泽湖, HZ 湖)水样, 涂布于藻粉无机盐培养基(1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.5 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g/L KNO<sub>3</sub>,

0.1%微量元素, 0.1%维生素, 1%高纯螺旋藻粉), 分离纯化获得待试菌株。后续试验使用 R2A 培养基扩大培养菌株, R2A 培养基成分包括 0.25 g/L 胰蛋白胨, 0.5 g/L 酸水解酪蛋白, 0.5 g/L 酵母浸粉, 0.5 g/L 可溶性淀粉, 0.3 g/L 磷酸氢二钾, 0.1 g/L 硫酸镁, 0.3 g/L 丙酮酸钠, 0.25 g/L 蛋白胨, 0.5 g/L 葡萄糖, pH 为 7.2。将待试菌株接种于含铜绿微囊藻的 BG11 培养基(菌藻比为 1:9), 在 25 °C、2 000–3 000 lx、

$$\text{Chl-a (mg/L)} = \frac{[11.85 \times (OD_{664} - OD_{750}) - 1.54 \times (OD_{647} - OD_{750}) - 0.08 \times (OD_{630} - OD_{750})] \cdot V_1}{L \cdot V_2} \quad (1)$$

其中, Chl-a 为样品的叶绿素 a 浓度(mg/L); OD 为不同波长下的吸光度;  $V_1$  为 90%丙酮提取液体积(mL);  $V_2$  为样品体积(L);  $L$  为比色皿光程(cm)。

$$R (\%) = \frac{(\text{Chl-a}_{\text{对照组}} - \text{Chl-a}_{\text{实验组}}) / \text{Chl-a}_{\text{对照组}} \times 100 \quad (2)$$

其中,  $R$  为叶绿素 a 去除率(%);  $\text{Chl-a}_{\text{对照组}}$  为藻液与无菌 R2A 培养基共培养后的叶绿素 a 浓度(mg/L);  $\text{Chl-a}_{\text{实验组}}$  为藻液与菌液共培养后的叶绿素 a 浓度(mg/L)。

### 1.3 菌株 2-4 的抑藻效果

#### 1.3.1 菌株 2-4 的抑藻多样性

将铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)、近头状尖胞藻(*R. subcapitata*)、斜生四链藻(*T. obliquus*)、蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)和丝藻(*Ulothrix* sp.)分别转接到 BG11 培养 10 d 后, 将 0.5 mL 菌株 2-4 菌液( $OD_{600}=0.72$ )与 4.5 mL 藻液( $OD_{680}=0.28$ )进行共培养, 设置 3 个平行, 4 d 后测定培养液 Chl-a 浓度, 计算 Chl-a 去除率。

#### 1.3.2 菌株 2-4 抑制铜绿微囊藻正交试验

以铜绿微囊藻为受试藻种, 采用  $L_9(3^3)$  正交试验, 设置 3 个变量和 3 个水平, 即藻细胞数目( $4.50 \times 10^6$ 、 $6.75 \times 10^6$  和  $13.50 \times 10^6$  个/mL)、菌接种量(5%、10%和 15%)和 pH (8、9 和 10)。

12 h 昼/12 h 夜的条件下培养 4 d。采用 90%丙酮提取方法<sup>[32]</sup>测定藻培养液的 Chl-a 浓度(公式 1), 再根据公式 2 计算抑藻率  $R$  (Chl-a 去除率), Chl-a 去除率大于 20%判定待试菌株具有抑藻潜力。本研究获得 1 株高抑藻潜力菌株 2-4, 通过 16S rRNA 基因序列鉴定为假单胞菌 *Pseudomonas* sp. (GenBank 登录号: OK465191)。根据《现代微生物学实验技术》<sup>[33]</sup>分析菌株 2-4 的生理生化特性。

每个处理设置 3 个平行, 4 d 后测量对照组(将菌液替换成无菌 R2A 培养基)和实验组的 Chl-a 浓度, 再计算其抑藻效果(Chl-a 去除率)。利用有效性统计<sup>[34]</sup> (公式 3)来测量各变量水平对抑藻效果的影响。

$$E_i = \frac{1}{3} \sum_{j=1}^3 q_{ij} \quad (3)$$

其中:  $E_i$  表示  $i$  水平所对应抑藻效果(Chl-a 去除率)的平均值,  $q_{ij}$  表示第  $j$  列  $i$  水平条件所对应抑藻效果。在  $i$  水平上,  $E_i$  值越高表示抑藻效果越高。采用极差统计方法比较各变量对抑藻效果的影响。计算各变量的极差统计值  $R_i = \max(E_i) - \min(E_i)$ , 极差统计值越高, 说明该变量对抑藻效果的影响越大。

### 1.4 菌株 2-4 的抑藻机制探索试验

#### 1.4.1 菌株 2-4 抑藻动力学试验

根据正交试验优化的条件进行菌藻共培养实验, 设置 3 个平行, 从 0 h 开始每隔 12 h 取样测定对照组(将菌液替换成无菌 R2A 培养基)和实验组的 Chl-a 含量, 并计算不同时间 Chl-a 的去除率, 持续 120 h。使用一级和二级反应动力学方程<sup>[35]</sup>模拟 Chl-a 随时间的变化规律, 计算 Chl-a 半衰期。一级(公式 4)和二级(公式 5)反应动力学方程如下:

$$[\text{Chl-a}] = [\text{Chl-a}]_0 \times e^{-t \cdot k_1} \quad (4)$$

$$[\text{Chl-a}] = 1 / (t \cdot k_2 + 1 / [\text{Chl-a}]_0) \quad (5)$$

其中,  $[\text{Chl-a}]_t$  表示时间为  $t$  时的 Chl-a 浓度,  $[\text{Chl-a}]_0$  表示时间为 0 时预测的初始浓度,  $t$  表示时间,  $k_1$  和  $k_2$  为一级和二级动力学参数。

#### 1.4.2 菌株 2-4 的抑藻作用方式

将培养到稳定期( $OD_{600}=0.72$ )的菌液 8 000 r/min 离心 15 min, 用 0.22  $\mu\text{m}$  针式滤头过滤, 得到无菌滤液(分泌物), 离心管底部的菌细胞用无菌水冲洗 3 次(洗去菌分泌物), 再用无菌水重悬, 得到清洗后的菌细胞。分别将菌液、无菌滤液(分泌物)和清洗后的菌细胞与铜绿微囊藻在相同条件下进行共培养, 设置 3 个平行, 4 d 后测定 Chl-a 含量并计算去除率。

#### 1.4.3 菌株 2-4 的无菌滤液对温度和 pH 的稳定性

不同温度(将无菌滤液分别置于-80、-28、4、30、60 和 98  $^{\circ}\text{C}$  处理 3 h, 待解冻或冷却)和 pH(用 1 mol/L HCL 和 1 mol/L NaOH 将无菌滤液的 pH 分别调为 3、5、7、9 和 11, 处理 3 h 后再调回初始 pH)处理后, 按 10% 体积比与铜绿微囊藻共培养, 将 10% 无菌滤液替换成 10% 无菌 R2A 培养基作为对照组 CK, 设 3 个平行, 4 d 后测定 Chl-a 含量并计算去除率。

#### 1.4.4 菌株 2-4 的抑藻活性物质分子量大小

分别取 5 mL 无菌滤液于不同分子量大小的透析袋中(0.5、3.5、7.0、15.0、25.0 和 45.0 kDa), 用 100 倍体积(500 mL)去离子水透析 24 h, 期间换水 3 次, 透析后的无菌滤液以 10% 体积接种到铜绿微囊藻培养液中进行抑藻实验, 设置空白组(加 10% 无菌 R2A 培养基)和对照组(加 10% 未处理的无菌滤液), 设置 3 个平行, 比较不同大小截留物质的抑藻效率(共培养 4 d 后测定 Chl-a 去除率)。

#### 1.4.5 扫描电子显微镜观察抑藻效果

将培养了 10 d 的铜绿微囊藻分为 3 组: A

组加入 10% 无菌 R2A 培养基, B 组加入 10% 菌液, C 组加入 10% 无菌滤液。共培养 4 d 后取样, 在扫描电子显微镜下观察藻细胞数量和形态变化并拍照。

### 1.5 菌株 2-4 及其无菌滤液的风险评估

#### 1.5.1 对大型溞的急性活动抑制试验

根据《化学品 溞类急性活动抑制试验》国家标准(GB/T 21830—2008)<sup>[36]</sup>, 将菌液(0.5%、1.5%、3.0%和 5.0%)或无菌滤液(2%、5%、10%和 15%)以不同体积比分别加入到装有大型溞(溞龄小于 24 h)和 50 mL M4 培养基的烧杯(100 mL)中, 每个烧杯装 5 头溞, 每组设置 4 个平行, 分别在试验开始后 24 h 和 48 h 观察并记录溞受抑制的情况。计算 48 h 的半数效应体积比(%), 将对应体积的菌液或无菌滤液烘干后称重, 换算成半数效应浓度(median effective concentration,  $EC_{50}$ , mg/L)。根据《化学品分类和标签规范第 28 部分: 对水生环境的危害》国家标准(GB 30000.28—2013)<sup>[37]</sup>, 急性水生危害甲壳纲毒性分为类别 1 (48 h  $EC_{50} \leq 1$  mg/L)、类别 2 (1 mg/L < 48 h  $EC_{50} \leq 10$  mg/L)和类别 3 (10 mg/L < 48 h  $EC_{50} \leq 100$  mg/L), 当 48 h  $EC_{50} > 100$  mg/L 时, 对大型溞低毒或无毒。同时, 分别测定不同体积比的菌液(0.5%、1.5%、3.0%和 5.0%)和无菌滤液(2%、5%、10%和 15%)对铜绿微囊藻的 Chl-a 去除率(4 d)。

#### 1.5.2 对明亮发光杆菌的急性毒性试验

根据《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》国家标准(GB/T 15441—1995)<sup>[38]</sup>, 以氯化汞标准溶液(0.02–0.24 mg/L)为参比, 以氯化钠溶液(30 g/L)为对照。将 10  $\mu\text{L}$  发光细菌, 分别加入到 2 mL 不同浓度(0%、2%、5%、10%、15%、20%和 30%)的无菌滤液、参比溶液和对照溶液中, 设置 3 个平行, 15 min 用生物发光光度计测定发光量( $mV$ ), 根据公式 6 和公式 7 分别计算相对发光度  $L$  和抑制发光率  $IL$ 。当样品的抑

制发光率低于最低检出限(0.02 mg/L 氯化汞标准溶液浓度对应的抑制发光率), 则判定该浓度的样品无毒。当样品的抑制发光率高于检出限, 通过标准曲线计算出对应的氯化汞标准溶液浓度, 相当于该浓度氯化汞标准溶液的毒性。同时, 分别测定不同体积比的(2%、5%、10%、15%、20%和 30%)无菌滤液对铜绿微囊藻 Chl-a 去除率(4 d)。

$$L(\%) = mV_{\text{标线组或样品组}} / mV_{\text{对照组}} \times 100 \quad (6)$$

$$IL(\%) = 100 - L \quad (7)$$

### 1.5.3 对稀有鮎鲫的急性毒性试验

根据《化学品 鱼类急性毒性试验》国家标准(GB/T 27861—2011)<sup>[39]</sup>, 将无菌滤液按 2%、5%和 10%体积比分别加入到装有稀有鮎鲫(鱼龄约 60 d)和 3 L 水的广口瓶(5 L)中, 每瓶装 5 尾鱼, 每组设置 3 个平行, 对照组加入 10% R2A, 分别在试验开始后 3、6、18、24、48、72、96 h 观察并记录各试验组幼鱼状态, 计算 96 h 的半数致死体积比(%), 并根据对应体积的无菌滤液烘干后称重(mg), 换算半数致死浓度(median lethal concentration,  $LC_{50}$ , mg/L)。根据《化学品分类和标签规范 第 28 部分: 对水生环境的危害》国家标准(GB 30000.28—2013)<sup>[37]</sup>, 急性水生危害鱼类毒性分为类别 1 (96 h  $LC_{50} \leq 1$  mg/L)、类别 2 (1 mg/L < 96 h  $LC_{50} \leq 10$  mg/L)和类别 3 (10 mg/L < 96 h  $LC_{50} \leq 100$  mg/L), 当 96 h  $LC_{50} > 100$  mg/L 时, 对稀有鮎鲫低毒或无毒。

### 1.6 菌株 2-4 及其无菌滤液对水华水样的抑藻效果

采集广东省广州市华南农业大学洪泽湖(HZ 湖)、鄱阳湖(PY 湖)和昭阳湖(ZY 湖)的水样, 测定 Chl-a 含量。分别将 10%无菌滤液和 1.5%的菌液加入到 3 个水样中, 对照组将无菌滤液和菌液替换成 10%和 1.5%无菌 R2A 培养

基, 设置 3 个平行, 4 d 后测定 Chl-a 含量并计算去除率。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 2-4 的抑藻特性

本研究分离的菌株 2-4 经 16S rRNA 基因序列分析和比对, 与铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa* NBRC12689)相似度达 99.60%, 结合生理生化特征分析, 鉴定该菌株为假单胞菌。菌株 2-4 杆状, 产荧光绿色水溶性色素, 有类似生姜气味。假单胞菌属溶藻细菌具有抑藻广谱性, 目前已报道该属的 8 个种的菌种可抑制 25 个藻种的生长<sup>[9]</sup>。菌株 2-4 同样显示出抑藻多样性, 如图 1A 所示, 菌株 2-4 对蓝藻纲的铜绿微囊藻(*M. aeruginosa*)、绿藻纲多细胞斜生四链藻(*T. obliquus*)、单细胞丝藻(*Ulothrix* sp.)和蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)都有显著的抑藻效果, 其中对斜生四链藻、蛋白核小球藻和丝藻的抑制效果此前未被报道, 说明假单胞菌的抑藻谱可能更为丰富, 也说明假单胞菌作为控制藻华的生物菌剂具有很强的应用潜力。

为研究菌株 2-4 抑藻的影响因素和优化抑藻反应条件, 本研究设计了 3 变量×3 水平的正交试验  $L_9(3^3)$  (表 1)。正交试验结果(表 2)显示, 菌液接种量对抑藻效果的影响最大, 随着细菌浓度的增加, 抑藻效果增强; 相反, 随着藻细胞数量的增加, 抑藻效果降低。pH 的影响仅次于菌液接种量, 其中 pH 最优值为 9, pH 增加或降低均影响抑藻效率。然而, 考虑到藻华发生时, 水环境的 pH 一般达到 10 以上, 为接近实际应用条件, 后续研究优选条件设为试验编号 3 (藻细胞数目  $4.50 \times 10^6$  个/mL, 菌液接种量为 15%, pH 10), 此时, 菌株 2-4 对 Chl-a 的去除率(抑藻率)为 92.81%。

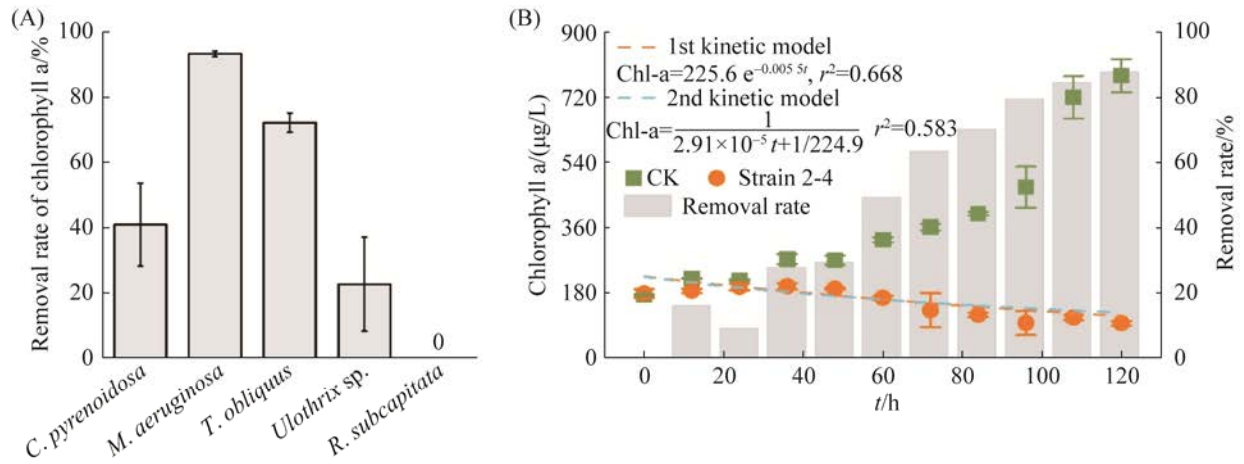


图 1 菌株 2-4 的抑藻多样性(A)和对铜绿微囊藻的动力学降解曲线(B)

Figure 1 Inhibitory effects of strain 2-4 on different algae (A) and kinetic degradation curve of *Microcystis aeruginosa* by strain 2-4 (B). Error bars indicate the standard deviation ( $n=3$ ). In Figure 1B, the fitted first-order and second-order reaction kinetics equation are  $Chl-a=225.6 \cdot e^{-0.005 \cdot t}$  and  $Chl-a=1/(2.91 \times 10^{-5} \cdot t+1/224.9)$ , respectively.

表 1  $L_9(3^3)$  正交试验的设计

Table 1 Design of the  $L_9(3^3)$  orthogonal array experiment

Group	Number of algal cells/( $\times 10^6$ /mL)	Inoculation volume ratio of bacteria/%	pH	Chlorophyll a removal rate/%
1	4.50	5	8	81.23
2	4.50	10	9	91.28
3	4.50	15	10	92.81
4	6.75	5	9	89.22
5	6.75	10	10	88.70
6	6.75	15	8	90.50
7	13.50	5	10	55.49
8	13.50	10	8	88.45
9	13.50	15	9	90.69

表 2  $L_9(3^3)$  正交试验的结果

Table 2 Results of the  $L_9(3^3)$  orthogonal array experiment

Effectiveness statistics	Number of algal cells/( $\times 10^6$ /mL)	Inoculation volume ratio of bacteria/%	pH
$E_1$	88.44	75.31	86.73
$E_2$	89.47	89.48	90.40
$E_3$	78.21	91.33	79.00
$R_i$	11.26	16.02	11.40

基于正交试验的优化条件,研究了菌株 2-4 的抑藻反应动力学过程。由图 1B 可见,空白对照中表征藻细胞丰度的 Chl-a 浓度随时间增长,而藻菌共培养体系中 Chl-a 浓度随时间降低,抑藻效率逐渐升高。应用一级和二级反应动力学方程模拟 Chl-a 随时间的衰减过程。结果显示, Chl-a 的衰减过程更符合一级反应动力学 ( $r_{1st}^2=0.668$  vs  $r_{2nd}^2=0.583$ ),说明菌株 2-4 对铜绿微囊藻的抑制作用更大可能是直接抑杀作用,与郭惠娟等<sup>[35]</sup>和许明宸等<sup>[40]</sup>的研究相符。根据菌株 2-4 的一级动力学方程模拟结果, Chl-a 的半衰期为 126 h ( $t_{1/2}=126$  h),相应的 Chl-a 去除率为 87.71%。

## 2.2 溶藻细菌 2-4 的抑藻作用方式

为了探究菌株 2-4 对铜绿微囊藻的抑藻作用方式,分别将菌液、无菌滤液、清洗后的菌细胞与铜绿微囊藻共培养。结果如图 2A 所示,4 d 后 Chl-a 去除率分别为 93.10%、60.34%和 10.62%,说明菌株 2-4 可分泌抑藻物质,进而抑制藻细胞的活性或破坏藻细胞。本研究通过

温度和 pH 条件检验了无菌滤液(分泌物)的抑藻功能稳定性。发现高温(60、80、98 °C)处理后的无菌滤液失去抑藻活性,而低温(-80、-28、4 °C)和 30 °C 常温处理的无菌滤液仍具有较强抑藻活性,4 d 后 Chl-a 去除率分别为 63.87%、70.35%、64.75%和 60.34% (图 2B)。此外,滤液在强酸(pH 3)和强碱(pH 9 和 11)处理后对铜绿微囊藻的抑制效果显著下降(图 2C)。以上结果说明无菌滤液中的抑藻活性成分可被高温和强酸强碱破坏而失活。如图 2D,菌株 2-4 的无菌滤液经不同分子量大小(0.5、3.5、7、15、25、

45 kDa)透析袋透析后的 Chl-a 去除率明显降低,与未透析的无菌滤液抑藻效果存在显著差异,由此推测,无菌滤液经 24 h 透析后有效抑藻活性成分流失,说明菌株 2-4 分泌的主要抑藻活性物质分子量小于 500 Da。

本研究通过扫描电镜进一步观察了菌株 2-4 及其无菌滤液对铜绿微囊藻的抑藻效果。接入无菌 R2A 培养基(A)、菌液(B)及其无菌滤液(C),4 d 后铜绿微囊藻细胞形态和数目的变化如图 3 所示。对比图 3 中的 A、B、C 这 3 个组别中的藻细胞数量可知,加入菌株 2-4 菌液及其

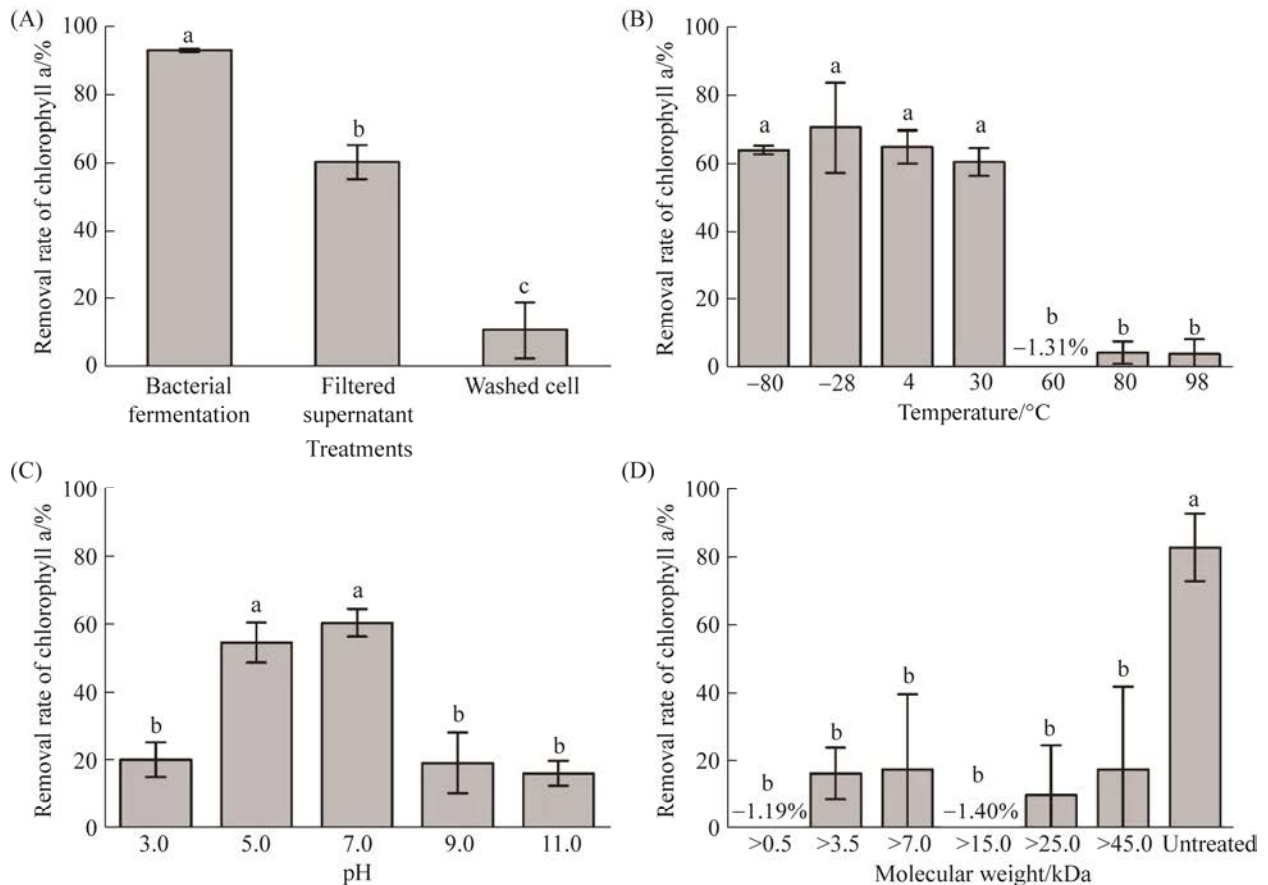


图 2 菌株 2-4 (V/V=10%)对铜绿微囊藻的抑藻作用方式(A)、抑藻物质对温度(B)和 pH (C)的稳定性及其分子量大小(D)

Figure 2 The inhibition mechanism of strain 2-4 (V/V=10%) on *Microcystis aeruginosa* (A), stability of algicidal substance to temperature (B) and pH (C), and molecular weight of strain 2-4 (D). Different lowercases indicate significant differences between groups ( $P<0.05$ ), the same lowercases indicate no significant differences between groups. Error bars indicate the standard deviation ( $n=3$ ).



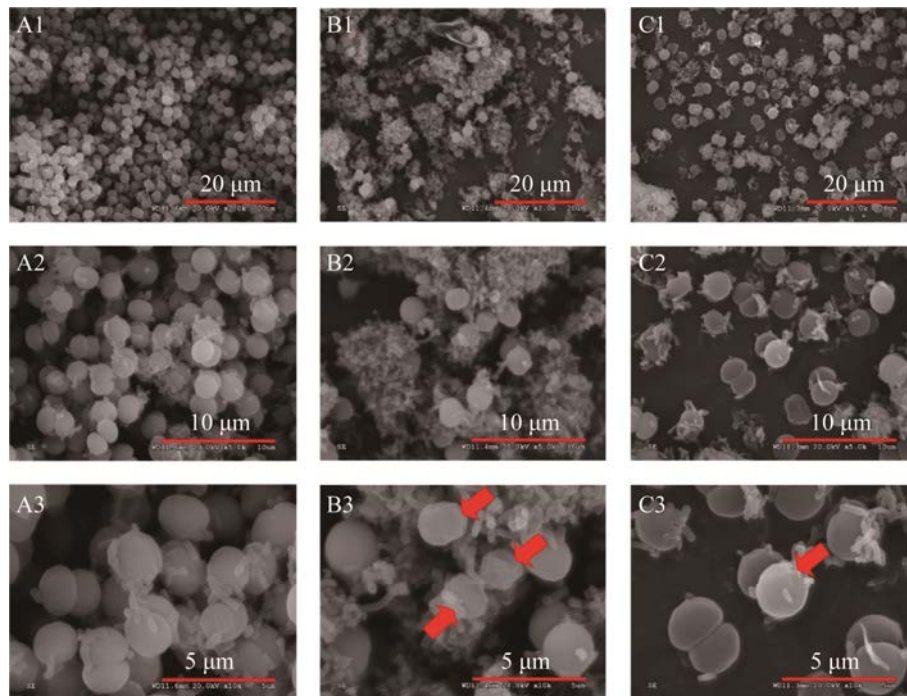


图 3 扫描电镜观察菌株 2-4 的菌液及其无菌滤液对铜绿微囊藻细胞形态和数目变化的影响

Figure 3 Scanning electron microscopic observations of *Microcystis aeruginosa* attacked by strain 2-4 and its filtrated supernatant. A: 10% sterile R2A culture was added; B: 10% strain 2-4 was added; C: 10% its filtered supernatant was added. Figure 3A1, Figure 3A2 and Figure 3A3 are photos taken at different magnifications of the same field of vision, with magnifications of 2 000, 5 000 and 10 000 times, respectively. (*Microcystis aeruginosa* culture contained harmless epiphytic bacteria).

无菌滤液后铜绿微囊藻数量明显较对照组的少, 进一步验证了菌株 2-4 及其分泌物的抑藻效果, 且菌液的抑藻效果相比无菌滤液更强。正常状态下的铜绿微囊藻呈规则圆球形、表面平滑(图 3A3); 加入无菌滤液后, 部分藻细胞表面皱缩(图 3C3), 而加入菌株 2-4 菌液后的藻细胞表面皱缩粗糙, 部分藻细胞变形, 甚至被破坏(图 3B3)。由此推测, 菌株 2-4 及其分泌物可通过破坏铜绿微囊藻细胞结构从而产生直接的杀抑效果, 印证了其一级抑藻动力学结果(图 1B)。

### 2.3 菌株 2-4 及其无菌滤液的风险与应用

铜绿假单胞菌是一种水源性和食源性的条件致病菌<sup>[27]</sup>。菌株 2-4 与铜绿假单胞菌相似度较高, 存在潜在的应用风险。因此, 本研究设置了明亮发光杆菌、大型溞和稀有鮡鲫 3 个营

养级的生物, 检测菌株 2-4 及其无菌滤液(分泌物)的生态风险, 客观评价其应用价值。

从菌株 2-4 菌液、无菌滤液与大型溞的剂量效应曲线可见, 菌株 2-4 菌液对大型溞 48 h 的半数效应体积比为 2.78% (图 4A), 换算成半数效应浓度( $EC_{50}$ )为 52.00 mg/L, 而无菌滤液对大型溞 48 h 的半数效应体积比为 10.92% (图 4B), 换算成半数效应浓度( $EC_{50}$ )为 31.33 mg/L, 都低于国家标准<sup>[37]</sup>规定的急性水生危害甲壳纲阈值 (100 mg/L), 说明菌株 2-4 菌液及其分泌物对大型溞都有毒性效应, 毒性级别为类别 3。

菌株 2-4 的无菌滤液对明亮发光杆菌的急性毒性试验显示(图 4C), 无菌滤液体积比为 2%、5%、10%和 15%时, 其抑制发光率均显著低于最低检出限, 而无菌滤液体积比为 20%和 30%

时,其抑制发光率与最低检出限处于同一水平,说明菌株 2-4 的无菌滤液体积比低于 15%时对明亮发光杆菌无毒性效应,而 20%和 30%的无菌滤液对明亮发光杆菌微毒,相当于 0.02 mg/L 氯化汞标准溶液的毒性。其中 15%体积比的无菌滤液在对明亮发光杆菌无毒性效应的前提下有较高的 Chl-a 去除率(85.71%)。

图 4D 展示了稀有鮟鮟暴露于各体积比的菌株 2-4 无菌滤液的累计死亡率。经计算稀有鮟鮟 96 h 半数致死体积比为 6%,换算成半数

致死浓度( $LC_{50}$ )为 74.22 mg/L,低于国家标准<sup>[37]</sup>规定的急性水生危害鱼纲阈值(100 mg/L),说明菌株 2-4 分泌物对稀有鮟鮟有毒,毒性为类别 3。需要说明的是,较高体积比的无菌滤液(5%和 10%)会导致稀有鮟鮟死亡,其原因除了菌株 2-4 分泌物的潜在毒性(如 10%无菌滤液),还因为过滤液中残留的培养基毒害稀有鮟鮟。以细菌培养基(10% R2A 培养基)为投加物时,同样导致了稀有鮟鮟的死亡,且死亡率大于 5%无菌滤液处理组。R2A 培养基对稀有鮟鮟的毒性可能

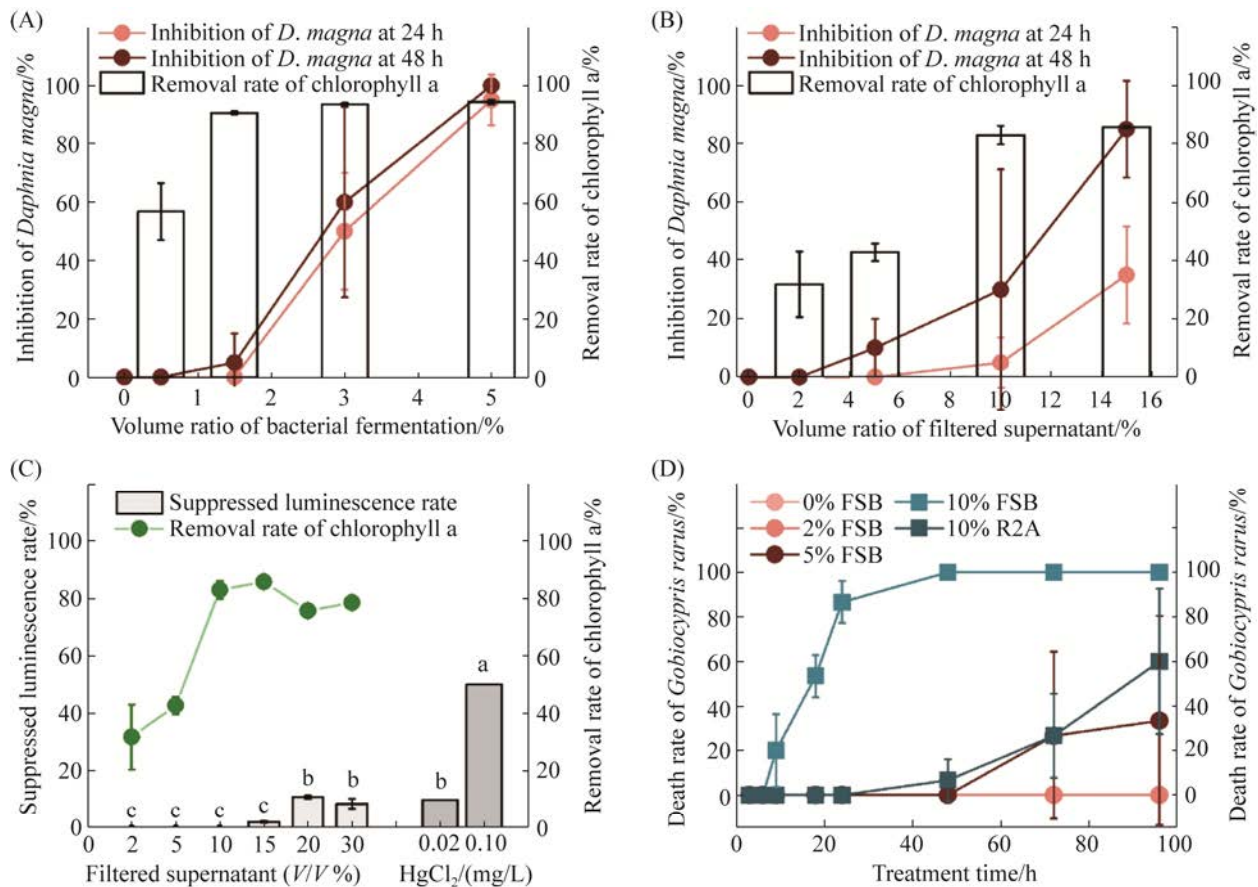


图 4 菌株 2-4 及其无菌滤液(分泌物)的生态风险

Figure 4 Ecological risk of strain 2-4 and their sterile filtrate (secretion). Inhibition of strain 2-4 (A) and its filtered supernatant (B) on *Daphnia magna* Straus and *Microcystis aeruginosa*, acute toxicity of filtered supernatant on *Photobacterium phosphoreum* T3 and inhibition of filtered supernatant on *Microcystis aeruginosa* (C), acute toxicity of filtered supernatant (FBA) and R2A culture on *Gobiocypris rarus* (D). Different lowercases indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), the same lowercases indicate no significant differences between groups. Error bars indicate the standard deviation ( $n = 3$ ).

是由培养基大量和复杂的有机物及其滋生的有害微生物引起的<sup>[41]</sup>。刘璇<sup>[42]</sup>在研究硝化细菌对多刺果腹溞急性毒性试验中也出现过类似情况, 定期用牛奶喂养溞导致测试体系水质浑浊, 48 h 后对照组的溞均死亡解体; 后改用小球藻液喂养溞, 水质清澈, 对照组的溞生长良好。

综合明亮发光杆菌、大型溞和稀有鮡鲫 3 种受试生物的毒性效应结果, 1.5% 的菌株 2-4 菌液和 10.0% 的无菌滤液显示出较低的水生生物毒性。此时, 1.5% 的菌株 2-4 菌液和 10.0% 的无菌滤液的抑藻率分别为 90.60% 和 82.98%。

为了解菌株 2-4 及其无菌滤液(分泌物)的实用效果, 采集了 3 个轻度水华<sup>[43]</sup>的人工湖水样进行测试。HZ 湖、PY 湖和 ZY 湖原始水样的 Chl-a 浓度分别为 54.65、84.34 和 115.26  $\mu\text{g/L}$ 。初步镜检发现 3 个湖泊的藻类群落组成存在差异, 其中 HZ 湖以栅藻和盘星藻为主, PY 湖以纤维藻为主, ZY 湖以微囊藻和色球藻为主。如图 5 所示, 接种 1.5% 菌株 2-4 菌液对 ZY 湖和 PY 湖的 Chl-a 去除率分别为 42.94% 和 28.04%, 但对

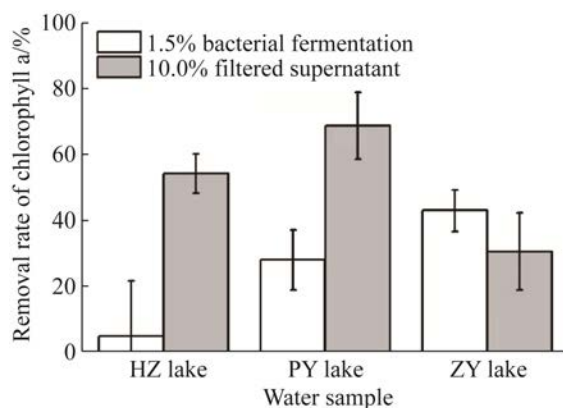


图 5 菌株 2-4 菌液及其无菌滤液对不同水华水样的抑藻效果

Figure 5 Inhibitory effects of strain 2-4 and its filtered supernatant on water samples from different lakes. Error bars indicate the standard deviation ( $n=3$ ).

HZ 湖水样的抑藻效果较低(4.83%)。藻类组成和水质差异可能是导致菌株 2-4 菌液对 3 个湖泊水样抑藻效率不同的原因。此结果说明了纯培养菌液在实际应用中容易受目标环境的影响, 抑藻效果具有较高的不确定性。与菌液相比, 10.0% 无菌滤液的抑藻效果更佳, 对 PY 湖和 HZ 湖水样的 Chl-a 去除率显著高于 1.5% 的菌液, 分别达 68.69% 和 54.15%, 且对不同湖泊水样的抑藻效果较为接近, 受目标环境的影响程度较低, 表现出更高的稳定性。

### 3 讨论

#### 3.1 适用性是溶藻细菌应用的前提

治理藻华是溶藻细菌研究的主要目的之一。因此, 溶藻细菌的抑藻效率及其适用性是主要考察指标。然而, 目前大多数研究过分强调溶藻细菌的抑藻效率, 而忽视了溶藻细菌的适用性。适用性主要体现在: (1) 溶藻细菌在实际环境中的适应性; (2) 溶藻细菌对应用环境的生态安全性。

溶藻细菌在实验室培养条件下往往能表现出较优的生长效率和抑藻效率。以本研究的菌株 2-4 为例, 其在最优培养条件下对铜绿微囊藻的抑制率达 92.81% (表 1), 优于大部分已报道的假单胞菌属溶藻细菌(表 3); 但在实际水样中的抑藻率则显著降低至 42.94% (图 5)。一方面由于实际水样的营养水平不及培养基; 另一方面, 实际水样中存在多种藻类, 菌株 2-4 并非对每种藻都表现出抑藻优势(图 1A)。因此, 实际水样中获得的抑藻率更具工程参考价值。

溶藻细菌能抑制或杀灭藻细胞是基于菌细胞的攻击性或细菌分泌物的毒性<sup>[44]</sup>。溶藻细菌是否对其他水生生物具有威胁却鲜有了解。本研究发现, 当溶藻细菌 2-4 菌液的接种体积比高于 1.5% 时对大型溞产生毒性, 其无菌滤液

表 3 假单胞菌属溶藻细菌的抑制效果与风险评估报道

Table 3 Reports of inhibiting effect and risk assessment of algicidal bacteria (*Pseudomonas* sp.)

Algicidal bacteria	Application scenario	Inhibiting effect/%	Input volume ratio of bacteria/%	Risk assessment	References
<i>Pseudomonas</i> sp.	Taihu Lake water	85.90 (1 d)	9.10	Unknown	[12]
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Microcystis aeruginosa</i> culture	91.00 (1 d)	9.10	Unknown	[12]
<i>Pseudomonas</i> sp. Z3	<i>Alexandrium catenella</i> culture	95.00 (5 d)	9.10	Unknown	[11]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ACB3	<i>Microcystis aeruginosa</i> culture	82.60–97.50 (6 d)	Bacteria:algae=10:1	Unknown	[10]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JM1	<i>Microcystis aeruginosa</i> culture	76.00 (5 d)	20.00	Unknown	[45]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i> culture	83.84 (7 d)	5.00	Unknown	[13]
<i>Pseudomonas</i> sp. THW7	<i>Microcystis aeruginosa</i> culture	84.61 (6 d)	10.00	Unknown	[46]
<i>Pseudomonas</i> sp. THW7	Taihu Lake water	31.50 (20 d)	6.70	Unknown	[46]
<i>Pseudomonas</i> sp. W10	<i>Microcystis aeruginosa</i> culture	80.05 (7 d)	10.00	Unknown	[47]
<i>Pseudomonas</i> sp. 2-4	<i>Microcystis aeruginosa</i> culture	94.36 (4 d)	5.00	Toxic	This study
<i>Pseudomonas</i> sp. 2-4	<i>Microcystis aeruginosa</i> culture	90.60 (4 d)	1.50	Microtoxic	This study
<i>Pseudomonas</i> sp. 2-4	<i>Microcystis aeruginosa</i> culture	56.77 (4 d)	0.50	Nontoxic	This study

的接种比高于 2% 时对大型溞和稀有鮡鲫产生毒性但对明亮发光杆菌无毒，而无菌滤液的接种比高于 15% 时才对明亮发光杆菌产生低毒性，与潘瑞松等<sup>[28]</sup>和孔赟等<sup>[29]</sup>的研究结果相似。以上这些结果显示，溶藻细菌的安全使用范围有限，如菌株 2-4 菌液的安全使用范围为 <1.5%，其相应的抑藻效率为 90.60%。菌株 2-4 无菌滤液的安全使用范围为 <2%，其相应的抑藻效率仅为 31.82%。因此，在客观评价溶藻细菌的效果时，不可仅强调抑藻效率而忽视其生态安全性。

### 3.2 抑藻活性物质具有更低的生态风险

溶藻细菌的作用方式分为 4 种：(1) 直接接触藻细胞进行裂解；(2) 释放抑藻物质杀死藻类；(3) 与藻类竞争营养物质；(4) 絮凝沉降藻细胞，限制藻类吸收营养物质和光<sup>[44]</sup>。本研究中菌株 2-4 通过分泌抑藻物质破坏藻细胞的活性(图 2A)，抑藻活性物质耐低温和弱酸，但不耐高温和强酸强碱(图 2B–2C)，且活性成分分子量小于 500 Da (图 2D)。前人总结了溶藻细菌分泌的抑藻物质包括抗生素、多肽、蛋白质、氨基酸及小分子化合物等<sup>[48]</sup>。王修林团队<sup>[17,19–20]</sup>从

铜绿假单胞菌 O-2-2 中分离出吩嗪类色素(1-羟基吩嗪, 180 Da)、绿脓菌素(1-羟基-5-N-甲基吩嗪, 210 Da)和鼠李糖脂(476 Da)，分别对赤潮异湾藻、具齿原甲藻、东海原甲藻、中肋骨条藻和湛江叉鞭金藻等藻类具有抑制效果。Kodani 等<sup>[25]</sup>从假单胞菌 K44-1 中分离出了哈曼碱(1-甲基-β-咪啉, 182 Da)，能抑制蓝藻生长。这些抑藻活性物质的应用可解决溶藻细菌的应用劣势。一方面，抑藻物质受应用环境变化的影响较小，且便于存储运输；另一方面，抑藻物质具有更低的生态风险。比较 2-4 菌液及其分泌物的半数效应浓度大小(10 mg/L <  $EC_{50}$  菌液 <  $EC_{50}$  分泌物 < 100 mg/L)可知菌株 2-4 的分泌物对大型溞的急性毒性低于菌株本身(图 4A、4B)，且毒性不一定由抑藻物质产生。后续将针对菌株 2-4 抑藻分泌物(分子量 < 500 Da)，利用硅胶柱、葡聚糖凝胶柱、高效液相色谱等<sup>[49]</sup>分离纯化技术和质谱法、核磁共振等<sup>[50]</sup>化合物分析技术，开展靶向抑藻物质的分离纯化与化学结构分析，研究抑藻化合物的抑藻生理机制和生态风险特征，为研发低生态风险的靶向抑藻物质提供理论支持。

## 4 结论

本研究筛选出了一株假单胞菌(*Pseudomonas* sp. 2-4)在最优条件下对铜绿微囊藻的抑制率达92.81%，在湖水中抑藻率为42.94%，并首次报道了假单胞菌对斜生四链藻、蛋白核小球藻和丝藻的抑藻效果。菌株2-4通过分泌小于500 Da的活性物质直接作用于藻细胞，抑藻活性物质(无菌滤液)对铜绿微囊藻的抑制率可达85.71%。急性毒性试验结果显示，菌株2-4及其分泌物对大型蚤有毒，其较安全使用范围分别是1.5%和2.0%，相应抑藻率为90.60%和31.82%。本文提出了溶藻细菌应用应以生态安全为前提的观点，客观分析了溶藻细菌2-4及其分泌物在生态安全使用范围内的实际抑藻效果，为未来生物抑藻研究提供参考。

## 参考文献

- [1] Pal M, Yesankar PJ, Dwivedi A, Qureshi A. Biotic control of harmful algal blooms (HABs): a brief review. *Journal of Environmental Management*, 2020, 268: 110687.
- [2] 于仁成, 吕颂辉, 齐雨藻, 周名江. 中国近海有害藻华研究现状与展望. *海洋与湖沼*, 2020, 51(4): 768–788.  
Yu RC, Lü SH, Qi YZ, Zhou MJ. Progress and perspectives of harmful algal bloom studies in China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(4): 768–788. (in Chinese)
- [3] Gallardo-Rodríguez J, Astuya-Villalón A, Llanos-Rivera A, Avello-Fontalba V, Ulloa-Jofré V. A critical review on control methods for harmful algal blooms. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(3): 661–684.
- [4] 王琼, 瞿建宏, 张骞月, 吴伟. 侧孢芽孢杆菌的抑藻效应及对养殖水体中蓝藻水华的生态防控. *生物灾害科学*, 2013, 36(1): 61–65.  
Wang Q, Qu JH, Zhang QY, Wu W. The algal inhibiting effect of *Brevibacillus laterosporus* and its ecological prevention and control for algae blooms in aquaculture water. *Biological Disaster Science*, 2013, 36(1): 61–65. (in Chinese)
- [5] 曹煜成, 李卓佳, 文国樑, 胡晓娟, 徐煜, 徐创文. 一种溶解养殖池塘颤藻的蜡芽孢杆菌制剂的工业化液体—固体复合发酵方法. 中国: CN105087426A. 2015-11-25.
- [6] 丁英庆, 付煜鑫, 徐波, 薛树平, 张炯, 刘萍. 高效溶藻菌对富营养化水体的治理效果. *湖北农业科学*, 2016, 55(20): 5214–5217.  
Ding YQ, Fu YX, Xu B, Xue SP, Zhang J, Liu P. Control effect of efficient algicidal bacteria strain on eutrophic water bodies. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(20): 5214–5217. (in Chinese)
- [7] 贺欣, 李明慧, 穆琳, 王晶晶, 韩子乾, 邵海波, 高姗姗, 张哲, 于雷. 复合微生物制剂及其在水华爆发水体处理中的应用. 中国: CN105002110B. 2018-09-11.
- [8] 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. *水生生物学报*, 1996, 20(2): 173–181.  
Zhao YJ, Liu YD. Possible microbial control on the adverse impacts of algae-current information about the relationship between algae and microbes. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(2): 173–181. (in Chinese)
- [9] 叶益华, 杨旭楠, 胡文哲, 许玫英, 陈乐天. 溶藻细菌的功能多样性及其菌剂应用. *微生物学报*, 2022, 62(4): 1171–1189.  
Ye YH, Yang XN, Hu WZ, Xu MY, Chen LT. Advances in functional diversity and application of algicidal bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1171–1189. (in Chinese)
- [10] Wang XY, Xie MJ, Wu W, Shi LM, Luo L, Li PF. Differential sensitivity of colonial and unicellular *Microcystis* strains to an algicidal bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Plankton Research*, 2013, 35(5): 1172–1176.
- [11] 黄姿, 李春强, 于晓玲, 廖文彬, 孙建波, 彭明. 一株溶藻细菌(*Pseudoalteromonas* sp.)的分离鉴定及溶藻活性初探. *海洋技术*, 2008, 27(3): 56–60.  
Huang Z, Li CQ, Yu XL, Liao WB, Sun JB, Peng M. Isolation of a strain of *Pseudoalteromonas* sp. and the study on the characteristics of its algicidal effect. *Ocean Technology*, 2008, 27(3): 56–60. (in Chinese)
- [12] 赵传鹏, 浦跃朴, 尹立红, 吕锡武, 李先宁. 溶微囊藻菌的分离与溶藻作用. *东南大学学报: 自然科学版*, 2005, 35(4): 602–606.  
Zhao CP, Pu YP, Yin LH, Lü XW, Li XN. Isolation and algicidal effect of a lytic *Microcystis* bacterium from Taihu Lake. *Journal of Southeast University: Natural Science Edition*, 2005, 35(4): 602–606. (in Chinese)
- [13] Zhou S, Yin H, Tang SY, Peng H, Yin DG, Yang YX, Liu ZH, Dang Z. Physiological responses of

- Microcystis aeruginosa* against the algicidal bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 127: 214–221.
- [14] 徐玲玲. 一株赤潮异弯藻溶藻细菌的分离与溶藻特性研究. 华中师范大学硕士学位论文, 2010.
- [15] Kang YK, Cho SY, Kang YH, Katano T, Jin ES, Kong DS, Han MS. Isolation, identification and characterization of algicidal bacteria against *Stephanodiscus hantzschii* and *Peridinium bipes* for the control of freshwater winter algal blooms. *Journal of Applied Phycology*, 2008, 20(4): 375–386.
- [16] 史顺玉, 刘永定, 沈银武, 李根保. 细菌DC<sub>10</sub>的溶藻作用及环境因子对该作用的影响. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2004, 34(6): 564–568.  
Shi SY, Liu YD, Shen YW, Li GB. The algicidal effect of bacteria DC<sub>10</sub> and its environmental factors. *Science in China, SerC*, 2004, 34(6): 564–568. (in Chinese)
- [17] 龚良玉, 王修林, 李雁宾, 张传松, 梁生康, 祝陈坚. 铜绿假单胞菌产吩嗪类色素的分离纯化及其对赤潮生物生长的影响. 复旦学报: 自然科学版, 2004, 43(4): 494–499, 506.  
Gong LY, Wang XL, Li YB, Zhang CS, Liang SK, Zhu CJ. Isolation and purification of phenazine pigments produced by *Pseudomonas aeruginosa* and its effects on the growth of red tide organisms. *Journal of Fudan University*, 2004, 43(4): 494–499, 506. (in Chinese)
- [18] 李春梅, 梁生康, 王修林, 李雁宾, 祝陈坚, 赵静, 孙兴年. 鼠李糖脂对东海典型甲藻赤潮生物生长抑制作用的影响. 应用与环境生物学报, 2007, 13(5): 657–661.  
Li CM, Liang SK, Wang XL, Li YB, Zhu CJ, Zhao J, Sun XN. Inhibitory effect of rhamnolipid biosurfactant on growth of dinoflagellates in the East China Sea. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2007, 13(5): 657–661. (in Chinese)
- [19] 李雁宾, 龚良玉, 王修林, 梁生康, 韩秀荣, 祝陈坚. 细菌产绿脓菌素对东海原甲藻生长的影响. 海洋环境科学, 2005, 24(3): 33–36.  
Li YB, Gong LY, Wang XL, Liang SK, Han XR, Zhu CJ. Effects of pyocyanine on the growth of *Prorocentrum donghaiense*. *Marine Environmental Science*, 2005, 24(3): 33–36. (in Chinese)
- [20] 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. 中国环境科学, 2004, 24(6): 692–696.  
Gong LY, Li YB, Wang XL, Liang SK, Zhu CJ, Han XR. The influence of biosurfactant on the growth of *Prorocentrum donghaiense*. *China Environmental Science*, 2004, 24(6): 692–696. (in Chinese)
- [21] 邓春芳, 崔岩, 成家杨. 溶藻菌破碎微拟球藻细胞及其对油脂提取效果的影响研究. 可再生能源, 2017, 35(11): 1581–1587.  
Deng CF, Cui Y, Cheng JY. The effects of algicidal bacteria on cell disruption and oil extraction of *Nannochloropsis* sp.. *Renewable Energy Resources*, 2017, 35(11): 1581–1587. (in Chinese)
- [22] 邓春芳, 崔岩, 章莹颖, 成家杨. 不同溶藻菌对小球藻破碎及油脂提取效果的影响. 中国油脂, 2017, 42(7): 106–110.  
Deng CF, Cui Y, Zhang YY, Cheng JY. Effects of algicidal bacteria on cell disruption and oil extraction of microalgae *Chlorella vulgaris*. *China Oils and Fats*, 2017, 42(7): 106–110. (in Chinese)
- [23] Shi SY, Tang DS, Liu YD. Effects of an algicidal bacterium *Pseudomonas mendocina* on the growth and antioxidant system of *Aphanizomenon flos-aquae*. *Current Microbiology*, 2009, 59(2): 107–112.
- [24] He L, Lin ZY, Wang YM, He XJ, Zhou J, Guan MQ, Zhou J. Facilitating harmful algae removal in fresh water via joint effects of multi-species algicidal bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 403: 123662.
- [25] Kodani S, Imoto A, Mitsutani A, Murakami M. Isolation and identification of the anti-algal compound from algicidal bacterium *Pseudomonas* sp. K44-1. *Fisheries Science*, 2002, 68(sup1): 623–624.
- [26] Kim JD, Kim B, Lee CG. Alga-lytic activity of *Pseudomonas fluorescens* against the red tide causing marine alga *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*). *Biological Control*, 2007, 41(3): 296–303.
- [27] 龙彦, 武丹. 近3年铜绿假单胞菌临床来源及耐药趋势探讨. 中国实验诊断学, 2021, 25(11): 1664–1666.  
Long Y, Wu D. Clinical origin and drug resistance trend of *Pseudomonas aeruginosa* in recent 3 years. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2021, 25(11): 1664–1666. (in Chinese)
- [28] 潘瑞松, 沈红池, 吴旭鹏, 蔡庆庆, 王明新, 张文艺. 双效工程菌 Y1 溶藻产物的急性毒性与健康风险评估. 土木建筑与环境工程, 2018, 40(5): 141–146.  
Pan RS, Shen HC, Wu XP, Cai QQ, Wang MX, Zhang WY. Acute toxicity of the algae-lytic products and assessment on health risks of microcystin in drinking water sources. *Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering*, 2018, 40(5): 141–146. (in Chinese)
- [29] 孔赞, 朱亮, 徐向阳, 戚韩英, 陆慧锋. 溶藻菌发酵液及其溶藻产物的生物急性毒性试验. 生态环境学报, 2012, 21(5): 913–918.  
Kong Y, Zhu L, Xu XY, Qi HY, Lu HF. Acute toxicity

- of the fermentation broth of algae-lysing bacteria and its products. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(5): 913–918. (in Chinese)
- [30] 童晶. 一株高效溶藻菌的筛选及其溶藻作用机理的研究. 深圳大学硕士学位论文, 2018.
- [31] 吴培枫, 韩光耀, 谢丽玲, 黄锦源, 唐开铭, 卢金桓. 溶藻菌 *Halomona* sp. DH-e 无菌滤液对东海原甲藻抗氧化系统的影响及急性毒性检验. *海洋环境科学*, 2018, 37(2): 228–232.  
Wu PF, Han GY, Xie LL, Huang JY, Tang KM, Lu JH. Effects of the *Halomona* sp. DH-e aseptic filtrate on the antioxidant enzyme system of *Prorocentrum donghaiense* and its acute toxicity. *Marine Environmental Science*, 2018, 37(2): 228–232. (in Chinese)
- [32] 中华人民共和国水利部. 水质 叶绿素的测定 分光光度法: SL 88—2012[S]. 2011.
- [33] 朱旭芬. 现代微生物学实验技术. 杭州: 浙江大学出版社, 2011.
- [34] Yang XN, Guo MT, Wu YH, Wu QH, Zhang RD. Removal of emulsified oil from water by fruiting bodies of macro-fungus (*Auricularia polytricha*). *PLoS One*, 2014, 9(4): e95162.
- [35] 郭惠娟, 张伟, 张小梅, 毛林强, 张文艺. 溶藻细菌 *Microbacterium oleivoran* 的溶藻进程与叶绿素降解动力学. *环境化学*, 2019, 38(6): 1274–1281.  
Guo HJ, Zhang W, Zhang XM, Mao LQ, Zhang WY. Process of algae-lysis and chlorophyll degradation kinetics of *Microbacterium oleivoran* bacteria. *Environmental Chemistry*, 2019, 38(6): 1274–1281. (in Chinese)
- [36] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 化学品 藻类急性活动抑制试验: GB/T 21830—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [37] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 化学品分类和标签规范 第28部分: 对水生环境的危害: GB 30000.28—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [38] 国家环境保护局, 国家技术监督局. 水质 急性毒性的测定 发光细菌法: GB/T 15441—1995[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
- [39] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 化学品 鱼类急性毒性试验: GB/T 27861—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [40] 许明宸, 张文艺, 毛林强. 太湖土著田螺消化道中溶藻菌 XMC 溶藻进程与叶绿素 a 降解动力学研究. *环境化学*, 2021, 40(6): 1855–1861.  
Xu MC, Zhang WY, Mao LQ. Study on algae-lysing process and chlorophyll-a degradation kinetics of algicidal bacteria XMC in the digestive tract of indigenous field snails of Taihu Lake. *Environmental Chemistry*, 2021, 40(6): 1855–1861. (in Chinese)
- [41] 李阔宇, 潘鲁媛, 孙永华. 斑马鱼鱼房和养殖系统建设标准. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 121–127.  
Li KY, Pan LY, Sun YH. Standards for constructing zebrafish houses and breeding systems. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2020, 30(6): 121–127. (in Chinese)
- [42] 刘璇. 硝化细菌菌剂生态安全性研究. 青岛理工大学硕士学位论文, 2010.
- [43] 夏婷婷, 尚广萍. 基于地表水环境质量的富营养化评价方法. *皖西学院学报*, 2010, 26(5): 98–101.  
Xia TT, Shang GP. Lake eutrophication evaluation based on “environmental quality standards for surface water”—the case for Chaohu Lake. *Journal of West Anhui University*, 2010, 26(5): 98–101. (in Chinese)
- [44] Yang CY, Hou XP, Wu DH, Chang WY, Zhang X, Dai XZ, Du HX, Zhang XH, Igarashi Y, Luo F. The characteristics and algicidal mechanisms of cyanobactericidal bacteria, a review. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2020, 36(12): 188.
- [45] 陈庆丽, 张秀芳, 付韵馨, 景澄茗, 李明堂. 1株铜绿假单胞菌 JM1 的溶藻特征. *吉林农业大学学报*, 2014, 36(4): 416–420, 428.  
Chen QL, Zhang XF, Fu YX, Jing CM, Li MT. Algicidal characteristics of a strain of *Pseudomonas aeruginosa* JM1. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2014, 36(4): 416–420, 428. (in Chinese)
- [46] 甘南琴, 宋立荣, 陈莉婷. 具有溶藻活性的假单胞菌及其应用. 中国: CN111471609A. 2020-07-31.
- [47] 王美娟. *Pseudomonas* sp. W10 溶藻机理及其溶藻活性成分特性解析研究. 常州大学硕士学位论文, 2021.
- [48] 焦彦凯, 严小军, 李小兵. 溶藻细菌及溶藻化合物研究进展. *工业微生物*, 2018, 48(4): 56–62.  
Jiao YK, Yan XJ, Li XB. Advances in research of algicidal bacteria and algae-lysing compounds. *Industrial Microbiology*, 2018, 48(4): 56–62. (in Chinese)
- [49] Zhang BH, Ding ZG, Li HQ, Mou XZ, Zhang YQ, Yang JY, Zhou EM, Li WJ. Algicidal activity of *Streptomyces eurocidicus* JXJ-0089 metabolites and their effects on *Microcystis* physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(17): 5132–5143.
- [50] Tan S, Hu XL, Yin PH, Zhao L. Photosynthetic inhibition and oxidative stress to the toxic *Phaeocystis globosa* caused by a diketopiperazine isolated from products of algicidal bacterium metabolism. *Journal of Microbiology: Seoul, Korea*, 2016, 54(5): 364–375.