

溶藻细菌 L7 的高密度培养及溶藻活性物质提纯鉴定*

杨丽丽^{1,2}, 潘伟斌¹, 温勇², 陈群^{1,3}

(1. 华南理工大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510640;

2. 环境保护部华南环境科学研究所, 广东 广州 510655;

3. 广东省建筑科学研究所, 广东 广州 510500)

摘要: 针对一株溶藻细菌 L7, 探索溶藻细菌高密度培养的工艺参数及溶藻活性物质提纯鉴定的关键技术, 为生物杀藻剂的研制奠定理论基础。在溶藻细菌 L7 的高密度培养阶段, 通过设置单因素实验及正交实验、应用摇瓶及自动发酵罐筛选出适宜培养溶藻细菌 L7 的培养基(碳源葡萄糖、氮源氯化铵、C/N 质量比 3:1、初始 pH 值 7.5)、细菌接种量 3.1×10^7 cfu/mL、DO [30% ($\pm 10\%$)] 及搅拌速率 [(160 ± 10) r/min]; 在溶藻细菌 L7 溶藻活性物质的提纯鉴定阶段, 通过透析、凝胶柱层析、高效液相色谱、液质联用仪等物质提纯鉴定手段, 获得 2 种溶藻活性物质, 相对分子质量分别为 588.2、365.0, 相较而言, 相对分子质量为 365.0 的物质的溶藻作用更强。

关键词: 溶藻细菌; 溶藻活性物质; 高密度培养; 提纯鉴定; 水华鱼腥藻

中图分类号: X52 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2013) 01-0083-06

High Cell Density Culture, Purification and Identification of Algicidal Components of An Indigenous Algicidal Bacteria L7

YANG Lili^{1,2}, PAN Weibin¹, WEN Yong², CHEN Qun^{1,3}

(1. College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2. South China Institute of Environmental Sciences, Guangzhou 510655, China;

3. Guangdong Provincial Academy of Building Research, Guangzhou 510500, China)

Abstract: Base on an indigenous algicidal bacteria L7, technical and process parameters for high cell density culture and the research and development of biological algicide were investigated. In the stage of high cell density culture, we selected the appropriate cell culture medium of bacteria L7 (carbon and nitrogen source are glucose + NH₄Cl, C/N ratio is 3:1, pH 7.5), bacterial load (3.1×10^7 cfu/mL), DO (30% ($\pm 10\%$)) and agitation speed (160 (± 10) r/min) through the setting of single factor experiment and orthogonal experiment, the application of shake flask and automatic fermentor. The process of purify and identify algicidal components of L7 included dialysis, gel chromatography, HPLC, MS and et al. Finally two algicidal components were received, the molecular weights were 588.2 and 365.0 respectively, and the algicidal effect of the latter one was better.

Key words: algicidal bacteria; algicidal component; high cell density culture; purification and identification; *Anabaena flos-aqua*

* 收稿日期: 2012-07-19

基金项目: 广州市黄埔区环境保护局资助项目 (302D804212)

作者简介: 杨丽丽 (1985 年生), 女, 工程师, 通讯作者: 潘伟斌; E-mail: ppwbpan@scut.edu.cn

随着全球水体富营养化程度的加剧,有害藻类水华的爆发日趋频繁,其造成的环境和经济等问题日益引起人们关注。目前,对藻类水华的治理主要有物理、物理化学、化学、生物等方法。物理、物理化学及化学等方法存在能耗大、投资高、对水生生态系统的破坏效应大以及可能产生二次污染等问题,而生物调控在富营养化湖泊的治理中已体现出明显的效果,且具有费用低的优点,但许多成功的实例往往是短期的。

随着微生物工程的崛起,细菌^[1-2]、真菌^[3-4]、病毒^[5]、藻类和放线菌等微生物成为调节有害藻类种群动态的重要潜在因子。其中,溶藻细菌(algicidal bacteria)作为一种有特异性杀藻作用的微生物,具有潜在的水体富营养化治理应用价值,国内外在此领域开展了广泛的研究,研究内容主要集中在溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性^[6]、溶藻活性物质的分离鉴定^[7]和溶藻机制^[8]等方面,利用溶藻细菌治理水体虽略有报道^[9],但利用溶藻细菌开发生物杀藻剂的工程应用实例鲜有报道。

目前报道的生物杀藻剂或生物抑藻剂多从两方面制备:一是将水生植物体^[10]或其它植物体^[11]粉碎后提取制备;二是将具有一定杀藻或抑藻作用的单种或多种细菌菌体连同培养基等其它物质混合后制成菌剂,并直接投放到水体中使用,该菌剂多有应用报道^[12],但直接向水体中投放菌剂存在潜在的生物安全性、引入外来营养等环境风险。

可见,开发一种高效、安全、具特异性的生物活性杀藻剂并将其应用于藻类水华的应急治理具有重要意义。与直接投加富含溶藻细菌的菌剂相比,将溶藻活性物质分离提纯后制成生物杀藻剂,其生态安全性更高。

作者针对一株溶藻细菌 L7 (以下简称“L7”),从细菌高密度培养、物质提纯鉴定两方面着手,探索溶藻细菌高密度培养的工艺参数及溶藻活性物质提纯鉴定的关键技术,为生物杀藻剂的研制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 溶藻细菌

L7 为研究组于 2005 年从广州市黄埔区某富营养化池塘水华暴发后期的水样中分离出的一株溶藻细菌^[6],该溶藻细菌对藻的作用时间短、针对性强,避免了外来微生物不适应本土富营养化水体、难以获得理想的溶藻效果、与将来工程实际应用相距甚远的弊端。L7 属于蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus ce-*

reus),其在 GeneBank 的登录号为 DQ459876 (strain L7)。

1.2 溶藻细菌培养基

L7 菌种以牛肉膏蛋白胨斜面培养基^[13]于 4 ℃ 冷藏保存。在 L7 高密度培养阶段,以淀粉培养基^[13]为参考培养基,考察适宜高密度培养 L7 的碳源、氮源、C/N 质量比、初始 pH 值及培养条件,最终确定的细菌培养基配方及培养条件详见结论。

1.3 无菌浓缩液

取无菌滤液^[14],经旋转蒸发器 65 ℃ 真空旋蒸浓缩至原体积的 1/2,得 2 倍无菌浓缩液;相同方法制得 10 倍、100 倍无菌浓缩液。将所得无菌浓缩液装入已高温灭菌的具塞锥形瓶中,于 4 ℃ 冷藏备用。

1.4 供试藻种及藻苔制备

选用的藻种为水华鱼腥藻 (*Anabaena flos-aquae* FACHB-245),来源于中国科学院水生生物研究所淡水藻种保藏中心,以 BG11 为培养基^[15],在温度 (23 ± 0.5) ℃,光照强度 3 000 lux,光暗周期比为 14 h:10 h 的条件下培养,藻液备用。

在液体 BG11 培养基中加入 $w = 1.5\%$ 的琼脂条,高温灭菌。取 10 mL 水华鱼腥藻液,在 4000 r/min 下离心 5 min,弃去上清液,在培养基尚处于液体状态时,将其倒入离心管,使藻液再悬浮,然后倒平板,每个平板倒 15 mL,静置待其冷却凝固后获得水华鱼腥藻固体平板,即供试藻苔。将藻苔放于人工气候箱中,在与供试藻液相同的培养条件下倒置培养,藻苔备用。

1.5 仪器及试剂

本研究中选用的仪器包括:LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅,TDL-40B 低速台式大容量离心机,LRH-250 生化培养箱,LRH-250-GS 人工气候箱,DHZ-CA 大容量恒温振荡器,TU-1800SPC 紫外可见分光光度计,HH-6 数显恒温水浴锅,YGF300-10 L 微生物发酵罐,RE-2000 旋转蒸发器,Leica DME 显微镜,VP32 真空抽滤泵,戴安 U3000 液相色谱仪,Thermo Heto Ultra Freeze 3410 超低温冰箱,大容量离子阱 LC/MSn 液相色谱-质谱联用仪等。

本研究中使用的主要试剂包括:葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 购自 GE Healthcare,甲醇(色谱纯)购自上海凌峰化学试剂有限公司。

1.6 溶藻效果的判定

对比叶绿素 a 含量变化的方法(叶绿素 a 去除率^[9])只适用于量大的供试液,检测量少的供试

液的溶藻效果则用杯碟法。检测凝胶柱层析各洗脱组分的溶藻效果的具体方法为: 取 2 mL 洗脱组分, 80 °C 水浴蒸干 (目的是去甲醇, 因为甲醇具有很强的杀藻能力), 灭菌后加入 0.5 mL 无菌水, 震荡溶解, 再按照杯碟法检测溶藻活性。

1.7 溶藻细菌 L7 的高密度培养

1.7.1 绘制 L7 菌液的吸光度与细菌浓度的标准工作曲线 取细菌浓度不同的 10 个样, 用比浊法测定其在 450 nm 下的吸光度 (A 应在 0.1 ~ 1.5 范围), 同时用平板菌落计数法计算其细菌数, 从而得到标准工作曲线。

1.7.2 筛选适宜 L7 生长的碳源、氮源 以淀粉培养基为参比, 以相同的量将其中的碳源 (淀粉) 分别换成葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、半乳糖; 以相同的量将其中的氮源 [(NH₄)₂SO₄] 分别换成 KNO₃、NH₄NO₃、NH₄Cl、尿素。将 L7 在牛肉膏蛋白胨斜面培养基上培养 24 h, 每个斜面用 10 mL 无菌水洗脱菌苔, 将菌悬液以 5.4×10^7 cfu/mL 的接种量接种到 200 mL 含有各种不同碳源、氮源的液体培养基中, 将接种后的液体培养基装入 250 mL 已灭菌的具塞锥形瓶, 置于恒温振荡器中。以 30 °C 恒温、100 r/min 转速, 振荡培养 7 d, 每隔 12 h 取 15 mL 样, 应用比浊法测定细菌浓度。每组实验组设 2 个平行。

选取对 L7 生长具有最大促进作用的碳源、氮源作为下一步考察适宜 L7 生长的培养基配比、细菌接种量及培养条件的营养成分。

表 1 正交实验设置表
Table 1 Setup the orthogonal test

实验号	初始 pH 值	细菌接种量/ (cfu · mL ⁻¹)	C/N 质量比
1	6.5	1.22×10^8	3:1
2	6.5	6.1×10^7	4:1
3	6.5	4.1×10^7	5:1
4	6.5	3.1×10^7	6:1
5	7.0	1.22×10^8	4:1
6	7.0	6.1×10^7	3:1
7	7.0	4.1×10^7	6:1
8	7.0	3.1×10^7	5:1
9	7.5	1.22×10^8	5:1
10	7.5	6.1×10^7	6:1
11	7.5	4.1×10^7	3:1
12	7.5	3.1×10^7	4:1
13	8.0	1.22×10^8	6:1
14	8.0	6.1×10^7	5:1
15	8.0	4.1×10^7	4:1
16	8.0	3.1×10^7	3:1

1.7.3 考察适宜 L7 生长的培养基配比及细菌接种量 设置 3 因素 4 水平正交实验, 考察不同初始 pH 值 (6.5、7.0、7.5、8.0)、细菌接种量 (1.22×10^8 、 6.1×10^7 、 4.1×10^7 、 3.1×10^7 cfu/mL)、C/N 质量比 (3:1、4:1、5:1、6:1) 对 L7 生长的影响。

1.7.4 考察适宜 L7 生长的 A 值及搅拌速率 利用 10 L 自动玻璃发酵罐, 装液量 6 L, 除 A 值及搅拌速率外, 培养基配方如结论所示, 考察两种条件组合对 L7 生长的影响, 这两组条件分别是 A 30% ($\pm 10\%$) + 搅拌速率 160 (± 10) r/min、 A 80% ($\pm 10\%$) + 搅拌速率 30 (± 10) r/min。

1.8 溶藻细菌 L7 溶藻活性物质的提纯鉴定

1.8.1 透析 将 10 mL 10 倍无菌浓缩液分别装入截留相对分子质量为 1 000、2 000、3 500 的透析袋中, 将透析袋放入盛有 500 mL 蒸馏水的 1 000 mL 玻璃烧杯中, 置于恒温振荡器 30 °C、100 r/min 条件下振荡透析。透析 24 h, 透析期间每 8 h 换一次蒸馏水。透析完成后, 收集透析袋内保留液, 用旋转蒸发器将其浓缩至 10 mL, 取 5 mL 浓缩液稀释至 20 mL, 测定其溶藻效果, 每组实验设 2 个平行。以未经任何处理的 2.5 倍无菌浓缩液和无菌水作为对照。

1.8.2 凝胶柱层析 经四氯化碳萃取^[14]后的 35 mL 100 倍无菌浓缩液分装入 3 个 34 × 200 mm 的透析袋 (截留的相对分子质量为 3 500) 中, 将透析袋放入装 1 L 蒸馏水的 2 L 烧杯中, 置于恒温振荡器 30 °C、100 r/min 条件下振荡透析。透析 24 h, 透析期间每 8 h 换一次蒸馏水, 最终收集袋外所有的透析液。

将袋外透析液浓缩至 20 mL, 用一次性 0.22 μm 针头过滤器过滤除菌及杂质, 真空冷冻干燥制得冻干粉。称取 3 g 冻干粉, 溶于 10 mL 甲醇中, 取甲醇溶解相过 0.22 μm 的微孔滤膜 (有机系), 上样 2.5 mL, 凝胶柱层析的洗脱剂为甲醇, 洗脱速度为 2 mL/min。用 10 mL 的比色管对洗脱组分进行逐一收集, 最终共获得 50 个洗脱组分 (分别编号 1 号 ~ 50 号)。

对所获得的 50 个洗脱组分进行紫外光谱扫描, 用杯碟法检测具有特征吸收峰的洗脱组分的溶藻活性, 从而筛选出具有溶藻活性的洗脱组分。

1.8.3 高效液相色谱 利用高效液相色谱分析 1.8.2 中所选出的有溶藻活性的洗脱组分 (7 号、9 号、11 号、12 号、14 号) 的物质成分分离情况, 以甲醇 (AR) 为空白对照。高效液相色谱的分离

条件为: 柱温 35 ℃、流速 1.0 mL/min、流动相 v (甲醇): v (水) = 70: 30、柱压 130×10^5 Pa、进样量 10 μ L。

1.8.4 液质联用 利用液相色谱—质谱联用仪, 分析 7 号、12 号洗脱组分中所含物质的相对分子质量, 以甲醇 (AR) 为空白对照。

2 结果与讨论

2.1 溶藻细菌 L7 的高密度培养

2.1.1 绘制 L7 菌液的吸光度与细菌浓度的标准工作曲线 L7 菌液的吸光度 ($A_{450\text{nm}}$) 与细菌浓度的数学关系为

$$A_{450\text{nm}}(\text{AU}) = 0.47334 \times \text{bacterial concentration} \times 10^{-8}$$

比浊法只适用于测定生长处于稳定期之前 (包括稳定期) 的菌液, 同时, 在测定细菌浓度的过程中要通过镜检关注细菌的生长形态, 以确保培养的细菌细胞形态正常。

2.1.2 筛选适宜 L7 生长的碳源、氮源 在供试碳源中, 当碳源为葡萄糖时, L7 生长情况最好, 约 108 h 到达稳定期, 菌液最高细菌浓度为 1.83×10^8 cfu/mL, 与淀粉培养基相比, 能使细菌生长量提高 34.86%; 在供试氮源中, 当氮源为氯化铵时, L7 生长情况最好, 约 48 h 后进入稳定期, 菌液最高细菌浓度为 1.87×10^8 cfu/mL, 与淀粉培养基相比, 能使细菌生长量提高 37.74%; 当硫酸铵作为氮源时, 对 L7 的生长促进作用较好, 但不及氯化铵; 其余供试碳源和氮源对 L7 生长的促进影响不显著。

2.1.3 考察适宜 L7 生长的培养基配比及细菌接种量 取培养第 3 d 的数据做正交分析, 正交实验结果详见表 2。影响水平为初始 pH 值 > C/N 质量比 > 接种量, 三个因素的水平都具有显著性差异 ($P < 0.05$), 确定最适宜 L7 生长的条件为: 初始 pH 值 7.5、C/N 质量比 3: 1, 细菌接种量 3.1×10^7 cfu/mL。

2.1.4 考察适宜 L7 生长的 A 值及搅拌速率 A 30% ($\pm 10\%$) + 搅拌速率 160 (± 10) r/min 条件下, L7 细菌浓度呈不断升高的趋势, 最高可达 5.30×10^8 cfu/mL, 约为初始细菌浓度的 19 倍。 A 80% ($\pm 10\%$) + 搅拌速率 30 (± 10) r/min 条件下, L7 细菌浓度最高达到 1.25×10^8 cfu/mL, 且 24 h 后生长略呈下降趋势。由图 1 可知, A 30% ($\pm 10\%$) + 搅拌速率 160 (± 10) r/min 的条件较适宜 L7 的高密度培养。

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of the orthogonal test

实验号	$A_{450\text{nm}}$	实验号	$A_{450\text{nm}}$
1	1.246 4	9	1.507 2
2	0.870 0	10	0.543 7
3	0.533 8	11	1.738 6
4	0.755 3	12	1.864 9
5	1.393 2	13	0.261 6
6	1.326 8	14	0.324 3
7	0.491 0	15	0.313 2
8	1.392 6	16	0.863 4

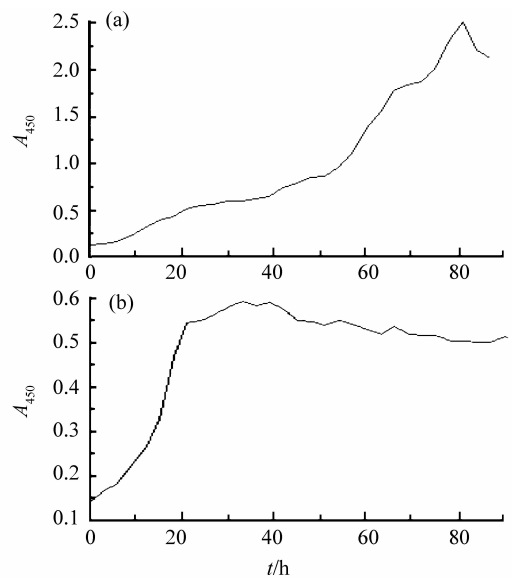


图 1 两种条件下 L7 菌液的 A 值变化

Fig. 1 Curves of $A_{450\text{nm}}$ (AU) of L7 under two different conditions

(a) A 30% ($\pm 10\%$) + 搅拌速率 160 (± 10) r/min

(b) A 80% ($\pm 10\%$) + 搅拌速率 30 (± 10) r/min

2.2 溶藻细菌 L7 溶藻活性物质的提纯鉴定

2.2.1 透析 经过不同规格的透析袋处理后, 各透析袋内保留样加入藻液 5 d 后的叶绿素 a 含量情况见图 2。2.5 倍无菌浓缩液 (以下简称“原样”) 的叶绿素 a 去除率为 79.3%, 截留相对分子质量分别为 3 500、2 000、1 000 的透析袋内的保留样的叶绿素 a 去除率分别为 -33.7%、-49.7%、-71.7%。通过用 SPSS 软件进行显著性差异分析, 各透析袋内保留样和原样的叶绿素 a 去除率都存在显著性差异 ($P < 0.05$), 故判断 L7 溶藻活性物质的相对分子质量小于 1 000。

2.2.2 凝胶柱层析 凝胶柱层析的分离效果良好, 9 号、10 号在 220 nm 处有吸收峰 (肩峰), 12 号、13 号在 220、270 nm 处有明显吸收峰, 19 号以后

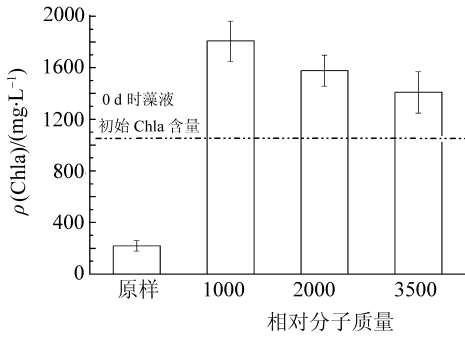


图 2 原样和各透析袋内保留样加入藻液 5 d 后叶绿素 a 含量对比

Fig. 2 Effect of dialysis samples on the content of Chla after 5 d

的洗脱组分不具强吸收峰，且峰形几乎一致。

选择 7 号~14 号作为检测溶藻活性的洗脱组分，溶藻活性检测结果见图 3。7 号~14 号都有一定的溶藻效果，其中 12 号最早出现溶藻效果，11 号的溶藻效果最强，无菌水无抑藻圈，无菌滤液有明显抑藻圈，可以判定 7 号~14 号的洗脱组分都具有溶藻效果。

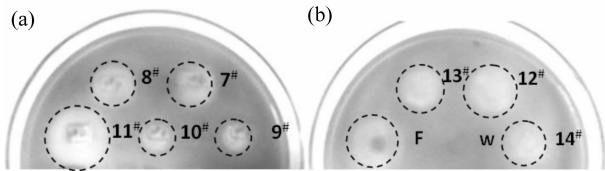


图 3 7 号~14 号、无菌水 (W)、无菌滤液 (F) 溶藻效果对比图

Fig. 3 Algicidal effect of No. 7 ~ No. 14, sterile water and sterile filtrate

(a) 7, 8, 9, 10, 11 号溶藻效果图

(b) 12, 13, 14 号、无菌水 (W)、无菌滤液 (F) 溶藻效果图

(虚线圆圈代表应用杯碟法检测所获得的抑藻圈，直径越大，表示溶藻效果越强；无菌水无抑藻圈)

2.2.3 高效液相色谱 7 号在 3.476 min 处有较强吸收峰，9 号在 2.533 min、3.075 min 处有较强吸收峰，11 号在 2.658 min、3.067 min 处有较强吸收峰，12 号在 2.550 min 处有较强吸收峰，14 号在 2.592 min 处有较强吸收峰。由此推断 7 号、12 号中的物质成分单一，而 9 号、11 号中分别含有 7 号和 12 号不同的物质成分，14 号与 12 号的物质成分一致。

2.2.4 液质联用 7 号、12 号详细的质谱图见图 4。由图 4 可知，7 号内所含溶藻活性物质的相对分子

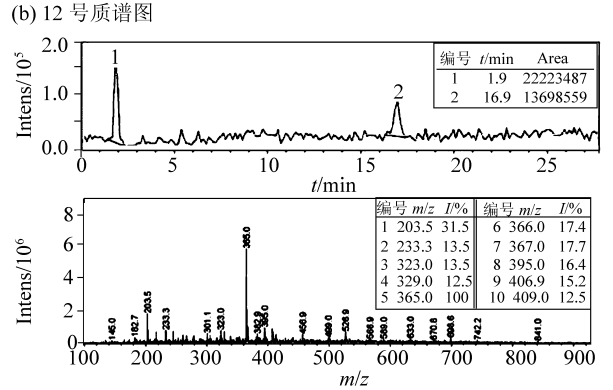
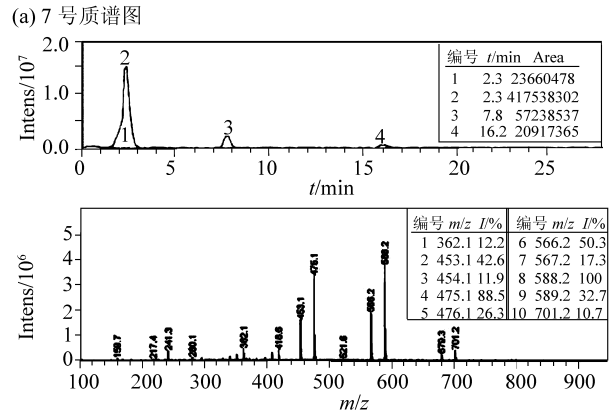


图 4 7 号、12 号质谱图

Fig. 4 Mass spectra of samples No. 7 and No. 12

质量约为 588.2，12 号内所含溶藻活性物质的相对分子质量约为 365.0，精确相对分子质量的确定还需对这两种物质进一步提纯后应用更精密的鉴定仪器。由此可知，L7 分泌的溶藻活性物质可能有两种，其相对分子质量分别约为 588.2、365.0。结合图 3 分析，12 号内所含溶藻活性物质的溶藻活性比 7 号内所含溶藻活性物质的溶藻活性强。

3 结论

1) 在 L7 的高密度培养阶段，培养基配方及其培养条件：葡萄糖 6 g，K₂HPO₄ 1 g，NaCl 1 g，MgSO₄·7H₂O 1 g，NH₄Cl 2 g，蒸馏水 1 L，pH 7.5，细菌接种量为 3.1 × 10⁷ cfu/mL，A 值为 30% (±10%)，搅拌速率为 160 (±10) r/min。在此情况下，细菌生长量最高能达到 5.30 × 10⁸ cfu/mL，约为初始细菌浓度的 19 倍。

2) 在溶藻活性物质的提纯鉴定阶段，对四氯化碳萃取后的无菌滤液进行透析处理（用相对分子质量为 3 500 的透析袋）并收集、浓缩袋外透析液，继而将样品通过 Sephadex LH-20 凝胶柱层析分离，所获得的不同洗脱组分分别在 220、270 nm 处或同时在该两个波长处有紫外吸收峰，最终获得

两种溶藻活性物质, 其相对分子质量分别约为 588.2、365.0, 相较而言, 相对分子质量为 365.0 的物质的溶藻作用更强。

参考文献:

- [1] KIM J D, KIM J Y, PARK J K, et al. Selective control of the *Prorocentrum minimum* harmful algal blooms by a novel algal-lytic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* AFMB-008041 [J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11 (4): 463 - 472.
- [2] ROTH P B, TWINER M J, MIKULSKI C M, et al. Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* [J]. *Harmful Algae*, 2008, 7(5): 682 - 691.
- [3] QIN S, HUSSAIN H, SCHULZ B, et al. Two new metabolites, epoxydine A and B, from *Phoma* sp. [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2010, 93(1): 169 - 174.
- [4] KROHN K, KOUAM S F, KUIGOUA G M, et al. Xanthones and oxepino[2,3-b]chromones from three endophytic fungi [J]. *Chemistry-A European J*, 2009, 15 (44): 12121 - 12132.
- [5] TOMARU Y, SHIRAI Y, NAGASAKI K. Ecology, physiology and genetics of a phycodnavirus infecting the noxious bloom-forming raphidophyte *Heterosigma akashiwo* [J]. *Fisheries Sci*, 2008, 74(4): 701 - 711.
- [6] 刘晶, 潘伟斌, 秦玉洁, 等. 两株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性[J]. *环境科学与技术*, 2007, 30 (2): 17 - 19, 22.
- [7] WANG X L, GONG L Y, LIANG S K, et al. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudo-*
monas aeruginosa [J]. *Harmful Algae*, 2005, 4(2): 433 - 443.
- [8] BANIN E, KHARE S K, NAIDER F, et al. Proline-rich peptide form the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of *Zooxanthellae* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1536 - 1541.
- [9] LEE B K, KATANO T, KITAMURA S I, et al. Monitoring of algicidal bacterium, *Alteromonas* sp. strain A14 in its application to natural *Cochlodinium polykrikoides* blooming seawater using fluorescence in situ hybridization [J]. *J Microbiology*, 2008, 46(3): 274 - 282.
- [10] 洪喻. 一种从苦草中制备抑藻总生物碱的方法: 中国, 200910177989.2 [P]. 2009 - 10 - 23.
- [11] PURCARO R, SCHRADER K K, BURANDT C, et al. Algicide constituents from *Swinglea glutinosa* [J]. *J Agricultural Food Chemistry*, 2009, 57 (22): 10632 - 10635.
- [12] 王琳, 王迎春, 李季, 等. 微生物菌剂处理富营养化景观水体的室内试验研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(1): 88 - 91.
- [13] 林敏, 潘伟斌, 张太平, 等. 三株溶藻细菌溶藻活性代谢产物的初步研究[J]. *生态环境*, 2007, 16(2): 358 - 362.
- [14] 李燕, 潘伟斌, 杨丽丽. 三株溶藻细菌胞外溶藻活性物质若干分离特性的研究[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(2): 171 - 177.
- [15] 裴海燕, 胡文容, 曲音波, 等. 一株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻特性[J]. *环境科学学报*, 2005, 25 (6): 796 - 802.