

# 溶藻活性物质对棕囊藻溶藻及其脂肪酸影响的模拟

杨秋婵<sup>1</sup> 赵玲<sup>1\*</sup> 尹平河<sup>2</sup> 谭烁<sup>2</sup> 舒万姣<sup>1</sup> 侯少玲<sup>1</sup>

(1. 暨南大学环境学院 广东省普通高校水土环境毒害性污染防治与生物修复重点实验室 广州 510632; 2. 暨南大学生命科学技术学院 广州 510632)

**摘要:** 为了探讨芽孢杆菌 B1 分泌的胞外溶藻活性物质对球形棕囊藻的溶藻特性和藻毒素物质脂肪酸的影响, 比较了模拟自然水体中叶绿素 a、pH、溶解氧 DO、高锰酸盐指数和营养元素 N、P 浓度在溶藻前后的变化, 并利用 GC-MS 检测了球形棕囊藻脂肪酸的成分和含量。用体积比 1:100 的芽孢杆菌 B1 胞外活性物质处理模拟水体 14 d, 发现水体中叶绿素 a、pH 值和高锰酸盐指数随处理时间的增加而降低, DO 和 N、P 浓度随处理时间的增加而增加。在第 14 d 时, 处理组水体中 pH 值由 8.50 降低到 7.51, 叶绿素 a 降低 82.3% ( $P < 0.05$ ), DO 增加 29.5% ( $P < 0.05$ ), 高锰酸盐指数降低 55.2% ( $P < 0.01$ )。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 浓度分别增加了 0.46、1.50、6.24 和 1.30 倍。投加活性物质处理 14 d 后, 球形棕囊藻藻毒素中的主要 3 种脂肪酸 C<sub>18:2</sub>、C<sub>16:0</sub> 和 C<sub>18:1</sub> 分别降低了 100%、97.7% 和 85.4% ( $P < 0.01$ ), 总脂肪酸含量降低 83.4% ( $P < 0.01$ )。结果表明, 芽孢杆菌 B1 胞外溶藻活性物质在模拟自然水体中能有效抑制球形棕囊藻的生长, 并降低藻毒素脂肪酸的含量。研究结果为芽孢杆菌 B1 胞外活性物质的生态安全性应用提供理论基础。

**关键词:** 芽孢杆菌; 胞外活性物质; 球形棕囊藻; 水质参数; 脂肪酸

中图分类号: X55 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2015)09-3255-07 DOI: 10.13227/j.hjks.2015.09.017

## Effects of Algicidal Substance on *Phaeocystis globosa* and Its Fatty Acids by the Simulation Experiment

YANG Qiu-chan<sup>1</sup>, ZHAO Ling<sup>1\*</sup>, YIN Ping-he<sup>2</sup>, TAN Shuo<sup>2</sup>, SHU Wan-jiao<sup>1</sup>, HOU Shao-ling<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Water/Soil Toxic Pollutants Control and Bioremediation of Guangdong Higher Education Institutes, School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** In order to evaluate the effects of algicidal substance on *Phaeocystis globosa* (*P. globosa*) and its algal toxin-fatty acids, the changes of chlorophyll-a, pH, dissolved oxygen, permanganate index and N, P concentration were evaluated by the simulation experiment. Fatty acids composition in *P. globosa* was detected by GC-MS. After adding algicidal substance in simulative water with the volume ratio 1:100, the levels of chlorophyll-a, pH and permanganate index were reduced, while the concentrations of dissolved oxygen and N, P were increased significantly within 14 days. Comparing with control group after 14 days, pH was reduced to 7.51 from 8.50, chlorophyll-a and permanganate index were reduced by 82.3% ( $P < 0.05$ ) and 55.2% ( $P < 0.01$ ), respectively. Dissolved oxygen was significantly increased by 29.5% ( $P < 0.05$ ). The concentrations of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P were respectively 0.46, 1.50, 6.24 and 1.30 times higher than that in control group. 14 days after the addition of algicidal substance, the total fatty acids of *P. globosa* were reduced by 83.4%. The major fatty acids C<sub>18:2</sub>, C<sub>16:0</sub> and C<sub>18:1</sub> were reduced by 100%, 97.7% and 85.4% ( $P < 0.01$ ), respectively. Our results indicated that algicidal substance from *Bacillus* sp. B1 can effectively inhibit the growth of *P. globosa* and reduce the concentration of algal toxin-fatty acid in the simulation experiment. This study provides a theoretical basis for ecological safety of algicidal substance from *Bacillus* sp. strain B1.

**Key words:** *Bacillus* sp.; algicidal substance; *Phaeocystis globosa*; water parameters; fatty acid

棕囊藻是我国广东沿海地区赤潮暴发的高发藻种, 棕囊藻的暴发严重破坏海洋环境, 已给我国沿海地区的经济和水产养殖业带来了严重的损失<sup>[1]</sup>, 寻找控制及治理棕囊藻赤潮的有效方法及技术已迫在眉睫。基于高效、低成本和二次污染的考虑, 利用溶藻细菌抑制或杀灭赤潮的生物控藻技术已成为赤潮治理最有应用前景的新热点。

溶藻细菌是指能够分解和抑制藻细胞生长的细菌, 细菌溶藻有直接和间接两种溶藻方式。间接溶

藻是指溶藻细菌通过分泌胞外活性物质导致藻细胞死亡, 多数的报道表明细菌溶藻是以间接方式抑制或杀死藻细胞的<sup>[2,3]</sup>。目前对溶藻细菌的研究主要集中在溶藻细菌的筛选、胞外活性物质的分离鉴定

收稿日期: 2015-02-05; 修订日期: 2015-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(41076068); NFSC-广东联合基金重点项目(U1133003)

作者简介: 杨秋婵(1989~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋赤潮与藻类, E-mail: annling0513@163.com

\* 通讯联系人, E-mail: zhaoling@jnu.edu.cn

及溶藻机制的探讨<sup>[4-6]</sup>,这些研究都是在实验室的水装置或烧杯中进行的. 自然水体中的水环境是动态的,水质状况较为复杂. 细菌在实际水体中的溶藻情况及水体水质参数的变化、环境因子的影响等,未见有相关报道. 因此就会有以下情况:溶藻细菌虽然在实验室研究中有显著的溶藻效果,但在自然水体中的效果却并不好,有的溶藻细菌抑制藻细胞生长的同时,会增加水体中营养元素的浓度<sup>[7,8]</sup>. 因此,研究溶藻细菌在自然水体中的溶藻作用对开发生物控藻技术、研发生物杀藻剂具有重要意义.

多数赤潮藻在暴发时会产生大量毒素物质,包括糖类<sup>[9,10]</sup>、溶血毒素<sup>[11]</sup>和脂肪酸类<sup>[12,13]</sup>. 研究表明球形棕囊藻所含毒素是以1'-O-十七碳二烯酰基-3'-O-(6-O- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖- $\beta$ -D-吡喃半乳糖基)-甘油为主的糖脂混合物,分子中含有C<sub>14:0</sub>、C<sub>16:0</sub>和C<sub>17:2</sub>的脂肪酸<sup>[14]</sup>,该毒素释放到水体中会造成鱼类大面积死亡. 彭喜春等<sup>[15]</sup>利用薄层层析法发现实验室培养的球形棕囊藻毒素中含有4种糖脂类化合物. 赤潮藻在受到环境胁迫条件下,容易分泌藻毒素来抵抗外界环境的变化. 溶藻细菌的投加,使赤潮藻的生长受到抑制,在抑制赤潮藻过程中,藻毒素是否也能够得到抑制或降解,目前还尚未见到相关的报道.

课题组前期研究已从珠海赤潮发生水体中分离得到1株能够抑制球形棕囊藻生长的芽孢杆菌B1,该菌株是通过分泌以氨基酸、肽类为主的胞外活性物质来抑制球形棕囊藻生长,该类物质具有热稳定、亲水性,在pH为6.0~9.0范围内具有较高溶藻率,对球形棕囊藻的最佳投加体积比是1:100<sup>[16-18]</sup>. 本研究通过模拟自然水体,探究B1菌胞外活性物质在自然水体中对球形棕囊藻的溶藻效

果、溶藻前后水体水质参数的变化、藻毒素成分和含量的变化,以期研制生物抑藻剂应用于赤潮治理提供理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 溶藻细菌及其胞外活性物质

芽孢杆菌B1(GenBank登录号是JN228893)由课题组从珠海香洲球形棕囊藻赤潮暴发水域中分离得到,用2216E固体培养基于4℃冷藏保存. 细菌在1000 mL 2216E液体培养基中于160 r·min<sup>-1</sup>,30℃恒温振荡培养4 d后,以6000 r·min<sup>-1</sup>离心8 min,上清液经0.22  $\mu$ m滤膜过滤后得到胞外活性物质.

### 1.2 藻种

供试藻种为球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*),由暨南大学赤潮与水环境研究中心藻种室吕颂辉教授提供. 藻种培养液采用f/2培养基,培养温度为20℃ $\pm$ 1℃,光照强度为4000 lx,光暗比为12 h:12 h.

### 1.3 溶藻实验

模拟水样取自珠海香洲棕囊藻赤潮高频暴发海域,水质指标见表1. 用100  $\mu$ m筛网过滤掉悬浮物和漂浮物后,各取10 L过滤水样加入到2个20 L塑料水箱中,投加球形棕囊藻,控制初始浓度均为1.0 $\times$ 10<sup>6</sup> cells·L<sup>-1</sup>,培养条件与1.2节中藻种培养条件一致. 一个水箱添加体积比为1:100的B1菌胞外活性物质作为处理组,另一个水箱不投加活性物质作为对照组. 溶藻实验周期为14 d,每两天采集水样进行水质检测,检测方法参照《海洋监测规范》(GB 17378.4-2007),分析方法见表2. 取样检测时对照组与处理组光照强度同为4000 lx,实验设置3个平行.

表1 采集水样的水质指标

Table 1 Water quality index of collecting water samples

指标	水温/℃	盐度/‰	浊度/NTU	pH	DO/mg·L <sup>-1</sup>	TN/mg·L <sup>-1</sup>	TP/mg·L <sup>-1</sup>
初始值	20	20	0.88	8.02	8.01	0.91	0.21

表2 水质指标测定方法

Table 2 Methods for the determination of water quality index

指标	测定方法	指标	测定方法
叶绿素 a	丙酮萃取分光光度法 <sup>[19]</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	靛酚蓝分光光度法
pH	pH计	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	萘乙二胺分光光度法
高锰酸钾盐指数	碱性高锰酸钾法	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	锌-镉还原法
DO	溶解氧测定仪	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	磷钼蓝分光光度法

## 1.4 脂肪酸的检测分析

### 1.4.1 脂肪酸的提取

投加活性物质溶藻 14 d 后, 分别从处理组和对照组中各取 1 000 mL 水样, 经  $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 后收集藻细胞. 加入氯仿: 甲醇: 水 (体积比为 13:7:5) 混合溶液 10 mL, 450 W,  $4\ ^\circ\text{C}$  超声破碎 30 min, 静置. 待完全分层后取下层溶液, 真空干燥后即得脂肪酸粗提物, 溶于 1 mL 甲醇于  $4\ ^\circ\text{C}$  保存待用.

### 1.4.2 脂肪酸甲酯化

取 5 mg 脂肪酸粗提物, 加入 0.5 mL 0.1% NaOH-甲醇溶液,  $55\ ^\circ\text{C}$  加热 15 min 后加入 1 mL 5% HCl-甲醇溶液,  $55\ ^\circ\text{C}$  加热 15 min, 再加 0.5 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . 冷却后, 脂肪酸甲酯用 6 mL 正己烷萃取 3 次, 合并提取液置于试剂瓶中, 用氮气吹至 0.5 mL 进行 GC-MS 检测.

### 1.4.3 GC-MS 分析

色谱条件: 进样口温度  $250\ ^\circ\text{C}$ , 检测器温度  $280\ ^\circ\text{C}$ ; 色谱柱及升温程序: TG-1MS 毛细管色谱柱 ( $30\ \text{m}\times 0.25\ \text{mm}\times 0.25\ \mu\text{m}$ ), 初始柱温  $75\ ^\circ\text{C}$ , 保持 1 min, 以  $30\ ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  速度升温至  $150\ ^\circ\text{C}$ , 然后以  $1.5\ ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  速度升温至  $250\ ^\circ\text{C}$ , 保持 5 min, 再以  $10\ ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升温至  $280\ ^\circ\text{C}$ , 保持 3 min; 载气: 氮气, 恒流模式, 流速  $1.2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱前压 0.1 MPa; 进样方式: 不分流进样, 进样量  $1\ \mu\text{L}$ , 溶剂延迟 4 min.

质谱条件: EI 离子源  $70\ \text{eV}$ , 阱温  $280\ ^\circ\text{C}$ , 接口温度  $260\ ^\circ\text{C}$ , 离子扫描范围为  $50\sim 500\ \text{u}$ , 数据采集方式为全扫描模式.

## 1.5 数据统计分析

实验数据均以平均值  $\pm$  标准误表示, 用 Origin 8.0 进行数据处理, 用 SPSS10.0 软件进行数据统计分析, 采用单因素方差分析比较不同数据组间的差异,  $P < 0.05$  表明差异显著,  $P < 0.01$  表明差异极显著.

## 2 结果与分析

### 2.1 叶绿素 a 的变化

水体中叶绿素 a 含量的变化可以反映藻生物量变化的情况, 是测定藻生物量的一个指标. 在模拟自然水体溶藻实验中, 投加活性物质后, 水体中叶绿素 a 的变化呈显著下降趋势 (图 1). 第 14 d 时, 处理组叶绿素 a 的含量比对照组降低了 82.3% ( $P < 0.01$ ). 叶绿素 a 降低, 表明芽孢杆菌 B1 胞外活性物质能有效抑制球形棕囊藻的生长, 降低藻生物量.

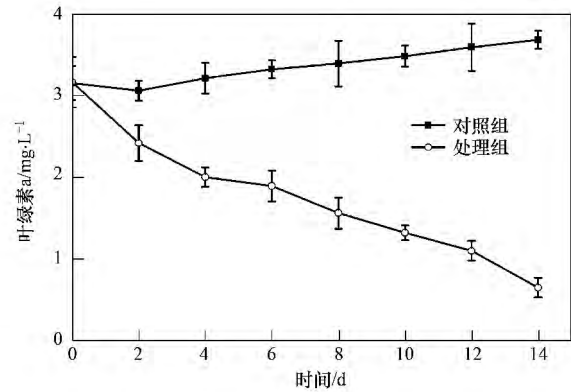


图 1 添加活性物质对模拟水体叶绿素 a 的影响

Fig. 1 Effect of algalicidal substance on chlorophyll-a in the simulative water

### 2.2 pH、DO 和高锰酸盐指数的变化

水体中 pH、DO 和高锰酸盐指数的变化如图 2. 由图 2(a) 可知, 在溶藻的 14 d 内, 处理组 pH 从初始值 8.50 降低至 7.51. pH 值的变化与藻类的光合作用有关, pH 值越高表明藻类光合作用越强<sup>[18]</sup>. 模拟自然水体的溶藻实验表明, 投加活性物质后, 球形棕囊藻的生长受到抑制、光合作用减弱, 从而导致水体 pH 值的降低.

水体中溶解氧的浓度变化如图 2(b), 从中可知, 随着实验时间的增加, 对照组中 DO 浓度也增加, 处理组中 DO 浓度下降. 实验至 14 d 时, 对照组中 DO 浓度由  $8.51\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  降低至  $7.14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 处理组中 DO 浓度由  $8.51\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  升高至  $10.12\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 相对于对照组增加了 29.5% ( $P < 0.05$ ). 推测这可能是由于活性物质抑制或杀死了水体中藻细胞后, 致使藻细胞消耗水中的 DO 能力下降, 水体富氧能力增强、水体中溶解氧浓度增加.

投加活性物质的处理组, 水体中高锰酸盐指数随实验时间的增加而降低; 未投加活性物质的对照组中高锰酸盐指数随实验时间的增加而增加 [图 2(c)]. 实验至 14 d 时, 处理组中高锰酸盐指数由最初的  $7.40\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  减少到  $4.23\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比对照组降低了 55.2% ( $P < 0.01$ ).

### 2.3 水体中 N、P 元素的变化

#### 2.3.1 $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 、 $\text{NO}_3^--\text{N}$ 和 $\text{NO}_2^--\text{N}$ 的变化

溶藻过程中水体中 N 元素的变化如图 3. 从中可知, 在投加活性物质后, 处理组的  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  和  $\text{NO}_3^--\text{N}$  的浓度呈增加趋势, 在溶藻的第 14 d,  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  由初始的  $0.30\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  增加至  $0.47\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比对照组增加了 0.46 倍 [图 3(a)], 处理组的  $\text{NO}_3^--\text{N}$  和  $\text{NO}_2^--\text{N}$  浓度随处理时间的延长而增加, 第

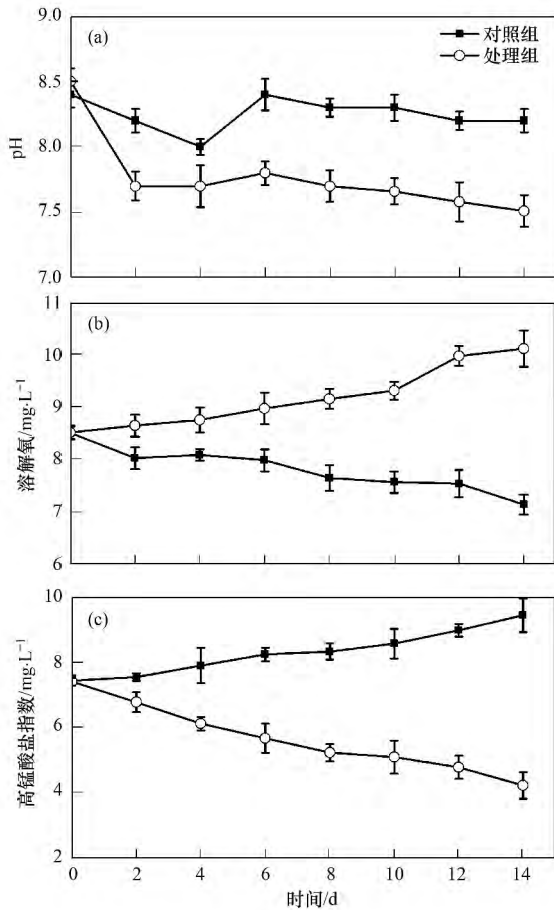


图2 添加活性物质对模拟水体 pH、DO 和高锰酸盐指数的影响  
Fig. 2 Effect of algicidal substance on pH, DO and permanganate index in the simulative water

14 d 时,处理组中NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N和NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N浓度分别增加到 2.68 mg·L<sup>-1</sup>和 0.05 mg·L<sup>-1</sup>,相对于对照组 (0.37 mg·L<sup>-1</sup>和 0.02 mg·L<sup>-1</sup>) 分别增加了 6.24 和 1.50 倍 ( $P < 0.01$ ) [图 3 (b) 和 3 (c)].

### 2.3.2 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 的变化

水体中 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 浓度的变化如图 4 所示. 从中可知,处理组中 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 浓度随处理时间的增加而增加. 溶藻 14 d 后,由初始的 0.12 mg·L<sup>-1</sup> 增加至 0.23 mg·L<sup>-1</sup>,比对照组 (0.10 mg·L<sup>-1</sup>) 增加了 1.30 倍 ( $P < 0.05$ ). 对照组中 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 浓度变化不大,在 0.05 ~ 0.10 mg·L<sup>-1</sup> 附近浮动.

### 2.4 球形棕囊藻脂肪酸的变化

球形棕囊藻在赤潮暴发时会分泌脂肪酸类毒素,对海洋生物造成危害. 利用溶藻细菌胞外活性物质抑制球形棕囊藻生长时,测定溶藻前后脂肪酸类毒素的变化对其未来的安全性应用具有重大意义. 在溶藻实验的第 14 d,分别测定了对照组和处理组水体中球形棕囊藻分泌的藻毒素——脂肪酸成

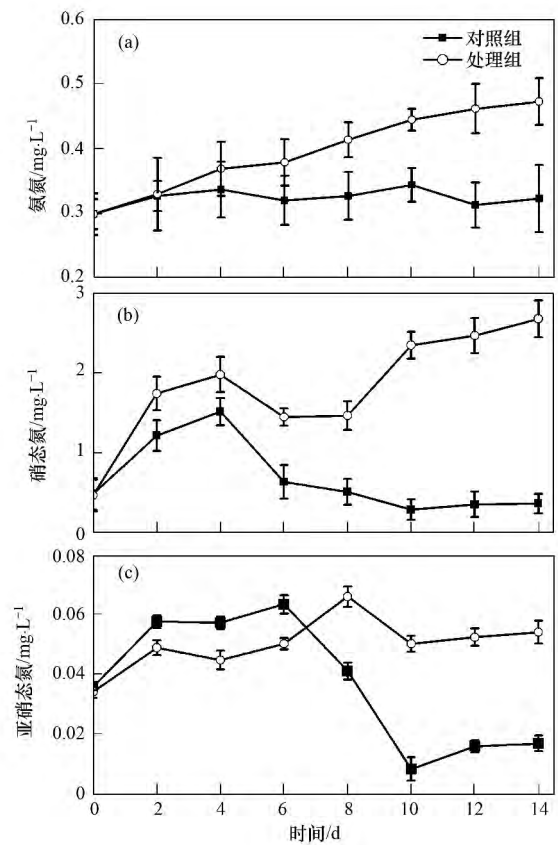


图3 添加活性物质对模拟水体中 N 元素形态的影响  
Fig. 3 Effect of algicidal substance on N element forms in the simulative water

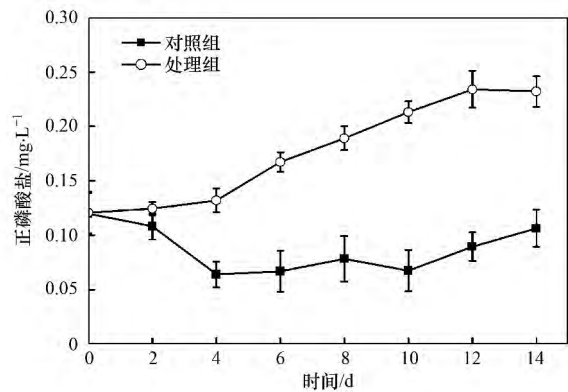


图4 添加活性物质对模拟水体中 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 浓度的影响  
Fig. 4 Effect of algicidal substance on PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P in the simulative water

分和浓度的变化(表 3). 由表 3 可知,未投加活性物质的对照组中球形棕囊藻分泌的藻毒素总共含有 7 种脂肪酸,为 C<sub>14:0</sub>、C<sub>16:0</sub>、C<sub>16:1</sub>、C<sub>18:0</sub>、C<sub>18:1</sub>、C<sub>18:2</sub> 和 C<sub>18:3</sub>,总含量为 2.29 mg·L<sup>-1</sup>,以 C<sub>18:2</sub>、C<sub>16:0</sub> 和 C<sub>18:1</sub> 的含量最高,分别为 0.63、0.44 和 0.41 mg·L<sup>-1</sup>. 投加活性物质的处理组中,在溶藻后的第

14 d, 只检测出 6 种脂肪酸, 其中  $C_{18:2}$  未检测出来, 脂肪酸的总含量只有  $0.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 相比对照组降低了 83.4% ( $P < 0.01$ ), 其中  $C_{16:0}$  降低了 97.7%,  $C_{18:1}$  降低了 85.4% ( $P < 0.01$ ), 表明芽孢杆菌 B1 胞外活性物质在模拟自然水体中能有效降低球形棕囊藻毒素——脂肪酸的含量。

表 3 活性物质对球形棕囊藻脂肪酸的影响  
Table 3 Effect of algicidal substance on fatty acids

from <i>Phaeocystis globosa</i>			
脂肪酸	对照组/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	处理组/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	降解率/%
14:0	$0.37 \pm 0.05$	$0.15 \pm 0.03$	59.5
16:0	$0.44 \pm 0.03$	$0.01 \pm 0.01$	97.7
16:1	$0.11 \pm 0.02$	$0.06 \pm 0.02$	45.5
18:0	$0.10 \pm 0.01$	$0.06 \pm 0.03$	40.0
18:1	$0.41 \pm 0.03$	$0.06 \pm 0.01$	85.4
18:2	$0.63 \pm 0.06$	未检出	100
18:3	$0.20 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.02$	85.0
其他	$0.03 \pm 0.01$	$0.01 \pm 0.01$	66.7

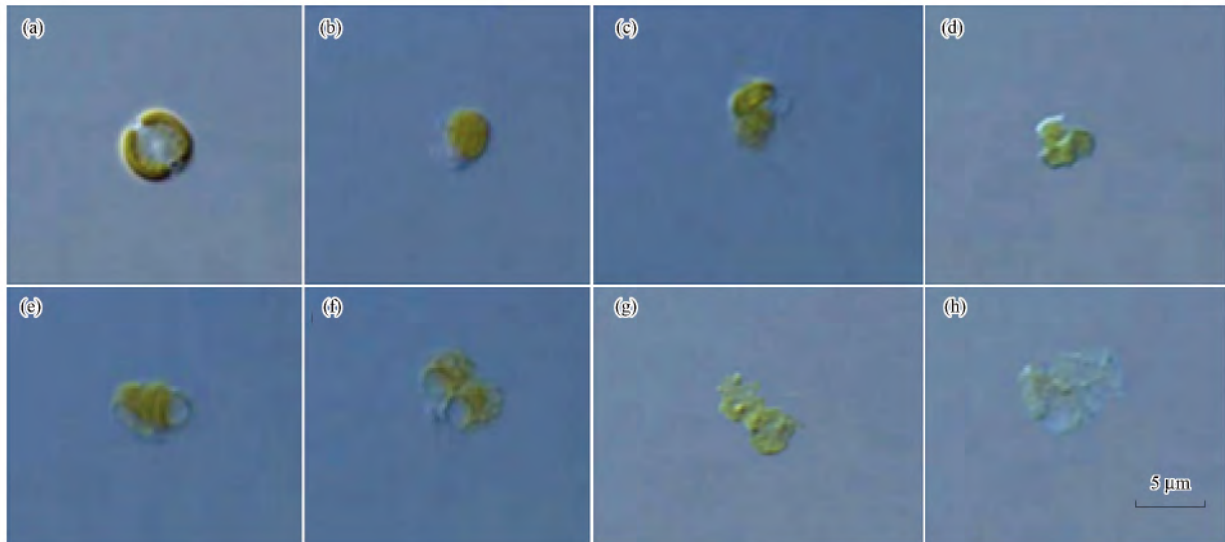
### 3 讨论

赤潮暴发过程水体中 pH、DO 和 COD 等都会随着赤潮的生消过程发生变化, 如 pH 值和 COD 在赤潮暴发时较高, 赤潮消退后降低<sup>[20]</sup>. 利用溶藻细菌治理赤潮, 通过监测水体水质参数的变化, 可反映其溶藻特性, 反映赤潮受到抑制后的消退过程. 本研究中, 投加活性物质到模拟自然水体溶藻 14 d 后, 叶绿素 a 降低 82.3% ( $P < 0.05$ ), DO 升高 29.5% ( $P < 0.05$ ), pH 降低至 7.51, 高锰酸盐指数降低 55.2% ( $P < 0.01$ ). 李蕾等<sup>[16]</sup>研究表明, 在实验室理想条件下, 芽孢杆菌 B1 胞外活性物质在 5 d 内能使球形棕囊藻的叶绿素 a 降低 94.9%. 活性物质在模拟自然水体中的溶藻效果相对在实验室理想条件下有所下降, 可能是由于球形棕囊藻在复杂水体的耐受力比在单一水体中更强. DO 升高一方面可能是由于活性物质溶解藻细胞后, 水体浊度降低, 大气向水体复氧增强, 另一方面是由于藻细胞溶解, 藻类呼吸作用减弱, 氧的消耗量降低. pH 降低, 可能是由于球形棕囊藻受到活性物质的抑制, 光合作用减弱, 藻类对水体中  $\text{CO}_2$  的吸收降低, 水体酸度增加, pH 下降. 高锰酸盐指数降低一方面可能是由于活性物质在溶解藻细胞的过程中, 氧化降解了水中的还原性物质, 与水中有机物发生反应, 有机物被分解, 有机物含量下降. 另一方面可能是由于投加的活性物质含有氨基酸, 氨基酸类营养物质可直接被微生物吸收利用, 促进水体中净化功能微生物的生长, 进一步使水体得到净化. Kurbanoglu 等<sup>[21]</sup>研

究表明, 投加蜡芽孢杆菌 NRRL B-3711 后, 可使水体中 COD 显著下降, 通过对其细胞内物质检测发现含有大量的氨基酸. 本研究结果与 Schmack 等<sup>[22]</sup>类似, 其在水槽实验中研究表明, 利用生物制剂来控制藻华时, 水体中 DO 升高, pH 和高锰酸盐指数降低.

氮、磷营养物质是海洋生源要素, 为藻类的生长提供物质条件. 海水中 N、P 浓度随赤潮的发生呈规律性变化, 其含量在赤潮潜伏期较高, 高峰期下降, 消散期回升<sup>[23]</sup>. 本研究表明活性物质在抑制球形棕囊藻生长的同时, 能使水体中 N、P 浓度增加. 原因可能是: ①在富营养化条件下藻细胞吸收了大量营养元素, 活性物质作用后, 藻细胞解体, N、P 元素被释放到水体中. 赵玲等<sup>[5]</sup>研究发现芽孢杆菌 B1 胞外活性物质能使球形棕囊藻丙二醛含量 (MDA) 显著上升, 降低其超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性, 通过降低机体中保护酶的活性和加剧膜脂质过氧化的程度等来抑制球形棕囊藻的生长. 李蕾等<sup>[16]</sup>研究表明, B1 菌活性物质抑制球形棕囊藻的过程是: 细胞壁分解——细胞外边缘物溶出——细胞膜破裂——细胞质内含物溢出——藻体死亡 (图 5). ②由于水箱条件的限制, 释放出来的 N、P 营养物质无法经过完整的食物链进行物质循环, 始终残留在水体中, 导致 N、P 浓度增加. ③水箱缺乏底泥沉积物对 N、P 元素的吸收, 底泥中底栖生物对去除水体中营养元素具有重大的贡献<sup>[24, 25]</sup>. 张木兰等<sup>[26]</sup>研究表明改性沉积物能使富营养化水体中 TN、TP 分别降低 70% 和 80%. Jung 等<sup>[8]</sup>将荧光假单胞菌 HYK0210-SK09 投加到硅藻水体中进行小试, 结果表明该细菌能增加水体 N、P 元素浓度.

球形棕囊藻暴发时会产生大量毒素, 对海洋生物造成危害<sup>[27]</sup>, 何家苑等<sup>[14]</sup>研究表明其毒素中含有脂肪酸. 脂肪酸的毒性与不饱和键的数目有关, 随不饱和键的增加而增加<sup>[28]</sup>. 投加芽孢杆菌 B1 胞外活性物质到模拟自然水体中处理 14 d 后, 总脂肪酸浓度降低 83.4% ( $P < 0.01$ ), 3 种主要脂肪酸  $C_{18:2}$ 、 $C_{16:0}$  和  $C_{18:1}$  分别降低了 100%、97.7% 和 85.4% ( $P < 0.01$ ). 推测一是由于球形棕囊藻的生长受到活性物质的抑制, 藻生物量降低, 合成脂肪酸也降低; 推测二可能是投加的活性物质能够降解球形棕囊藻脂肪酸, 导致脂肪酸含量降低. 另外,  $C_{18:2}$  又称亚油酸, 9, 12-十八碳二烯酸, 结构如图 6. 亚油酸是一种重要的化感物质, 能够对海洋浮游植物产生抑



(a) ~ (h) 分别为 B1 菌活性物质作用于球形棕囊藻 0、8、16、24、32、40、48、56 h 后的藻细胞

图 5 溶藻过程中球形棕囊藻细胞的显微结构 (10 × 100)

Fig. 5 Microstructure of *Phaeocystis globosa* in the lysing process (10 × 100)

制<sup>[29,30]</sup> 对多刺裸腹蚤具有毒性作用<sup>[31]</sup>。投加芽孢杆菌 B1 胞外活性物质后,球形棕囊藻脂肪酸 C<sub>18:2</sub> 得到了完全抑制或降解,研究结果为芽孢杆菌 B1 作为生物控藻剂应用于棕囊藻赤潮的治理生态安全性提供理论依据。



图 6 9,12-十八碳二烯酸的结构

Fig. 6 Chemical structure of 9,12-Octadecadienoic acid

#### 4 结论

(1) 在模拟自然水体中,芽孢杆菌 B1 分泌的胞外活性物质能有效抑制球形棕囊藻的生长,溶藻 14 d 时,相对于对照组,处理组中 pH 降低至 7.51,叶绿素 a 降低 82.3% ( $P < 0.05$ ),DO 增加 29.5% ( $P < 0.05$ ),高锰酸盐指数降低 55.2% ( $P < 0.01$ ),活性物质的存在对水质指标会产生影响。

(2) 投加芽孢杆菌 B1 胞外活性物质后,水体中 N、P 浓度随处理时间的增加而增加,14 d 时, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 浓度分别增加了 0.46、1.50、6.24 和 1.30 倍。

(3) 活性物质抑制球形棕囊藻生长后,总脂肪酸含量降低 83.4% ( $P < 0.01$ ),主要脂肪酸 C<sub>18:2</sub>、C<sub>16:0</sub> 和 C<sub>18:1</sub> 含量分别降低了 100%、97.7% 和 85.4% ( $P < 0.01$ ),表明芽孢杆菌 B1 胞外活性物

质能有效降低球形棕囊藻毒素物质脂肪酸的含量,实验结果为其安全性应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] 韦桂秋,王华,蔡伟叙,等. 近 10 年珠江口海域赤潮发生特征及其原因初探[J]. 海洋通报,2012,31(4): 466-474.
- [2] Somdee T, Sumalai N, Somdee A. A novel actinomycete *Streptomyces aurantiogriseus* with algicidal activity against the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(5): 1587-1594.
- [3] 张涵之,潘伟斌,马超. 溶藻细菌 L7 溶藻活性代谢产物的分离鉴定[J]. 中国环境科学,2010,30(Suppl.): 19-23.
- [4] Zhang H J, An X L, Zhou Y Y, et al. Effect of Oxidative Stress Induced by *Brevibacterium* sp. BS01 on a HAB Causing Species-*Alexandrium tamarens* [J]. PLoS ONE, 2013, 8(5): e63018.
- [5] 赵玲,陈森银,尹平河,等. 细菌 B1 胞外活性物质对球形棕囊藻的溶藻机制初探[J]. 环境科学学报,2013,33(5): 1286-1291.
- [6] Yang X R, Li X Y, Zhou Y Y, et al. Novel insights into the algicidal bacterium DH77-1 killing the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarens* [J]. Science of the Total Environment, 2014, 482-483: 116-124.
- [7] Daft M J, McCord S B, Stewart W D P. Ecological studies on algal-lysing bacteria in fresh waters [J]. Freshwater Biology, 1975, 5(6): 577-596.
- [8] Jung S W, Kang Y H, Katano T, et al. Testing addition of *Pseudomonas fluorescens* HYK0210-SK09 to mitigate blooms of the diatom *Stephanodiscus hantzschii* in small-and large-scale mesocosms [J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22(4): 409-419.
- [9] Alderkamp A C, Nejtgaard J C, Verity P G, et al. Dynamics in carbohydrate composition of *Phaeocystis pouchetii* colonies during spring blooms in mesocosms [J]. Journal of Sea Research,

- 2006, **55**(3): 169-181.
- [10] Rijssel M V, Janse I, Noordkamp D J B, *et al.* An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa* [J]. *Journal of Sea Research*, 2000, **43**(3-4): 297-306.
- [11] Van Rijssel M, Alderkamp A C, Nejstgaard J C, *et al.* Haemolytic activity of live *Phaeocystis pouchetii* during mesocosm blooms [J]. *Biogeochemistry*, 2007, **83**(1-3): 189-200.
- [12] Mooney B D, Nichols P D, De Salas M F, *et al.* Lipid, fatty acid, and sterol composition of eight species of *Karenia* (Dinophyta): Chemotaxonomy and putative lipid phycotoxins [J]. *Journal of Phycology*, 2007, **43**(1): 101-111.
- [13] Sellem F, Pesando D, Bodenec G, *et al.* Toxic effects of *Gymnodinium* cf. *mikimotoi* unsaturated fatty acids to gametes and embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus* [J]. *Water Research*, 2000, **34**(2): 550-556.
- [14] 何家苑, 施之新, 张银华, 等. 一种棕囊藻的形态特征与毒素分析 [J]. *海洋与湖沼*, 1999, **30**(2): 172-179.
- [15] 彭喜春, 杨维东, 刘洁生, 等. 实验室培养球形棕囊藻溶血毒素的提取、分离及其生成特征 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2005, **13**(1): 25-28.
- [16] 李蕾, 赵玲, 尹平河. 芽孢杆菌 B1 胞外活性物质对球形棕囊藻的溶藻特性研究 [J]. *环境科学*, 2012, **33**(3): 838-843.
- [17] Zhao L, Chen L N, Yin P H. Algicidal metabolites produced by *Bacillus* sp. strain B1 against *Phaeocystis globosa* [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, **41**(3): 593-599.
- [18] Yang Q C, Chen L N, Hu X L, *et al.* Toxic effect of a marine bacterium on aquatic organisms and its algicidal substances against *Phaeocystis globosa* [J]. *PLoS ONE*, 2015, **10**(2): e01144933.
- [19] Stein J R. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1973.
- [20] 孙东, 赵冬至, 文世勇, 等. 夜光藻赤潮与环境因子关系的模糊分析 [J]. *海洋环境科学*, 2010, **29**(1): 70-75.
- [21] Kurbanoglu E B, Algur O F. Single-cell protein production from ram horn hydrolysate by bacteria [J]. *Bioresource Technology*, 2002, **85**(2): 125-129.
- [22] Schmack M, Chambers S, Dallas S. Evaluation of a bacterial algal control agent in tank-based experiments [J]. *Water Research*, 2012, **46**(7): 2435-2444.
- [23] 张传松, 王修林, 石晓勇, 等. 东海赤潮高发区营养盐时空分布特征及其与赤潮的关系 [J]. *环境科学*, 2007, **28**(11): 2416-2424.
- [24] Hutchinson G E. A treatise on limnology, vol. 3 [M]. New York: Wiley, 1975.
- [25] Lerman A, Lietzke T A. Uptake and migration of tracers in lake sediments [J]. *Limnology and Oceanography*, 1975, **20**(4): 497-510.
- [26] 张木兰, 潘纲, 陈灏, 等. 改性沉积物除藻对水质改善的效果研究 [J]. *环境科学学报*, 2007, **27**(1): 13-17.
- [27] Eilertsen H C, Raa J. Toxins in seawater produced by a common phytoplankter: *Phaeocystis pouchetii* [J]. *Journal of Marine Biotechnology*, 1995, **3**: 115-119.
- [28] Wu J T, Chiang Y R, Huang W Y, *et al.* Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **80**(4): 338-345.
- [29] Alamsjah M A, Hirao S, Ishibashi F, *et al.* Isolation and structure determination of algicidal compounds from *Ulva fasciata* [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2005, **69**(11): 2186-2192.
- [30] Alamsjah M A, Hirao S, Ishibashi F, *et al.* Algicidal activity of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* and *U. pertusa* (Ulvaceae, Chlorophyta) on phytoplankton [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2008, **20**(5): 713-720.
- [31] 郑春艳, 张哲, 胡威, 等. 三种化感物质对水华混合藻类以及多刺裸腹蚤的毒性作用 [J]. *中国环境科学*, 2010, **30**(5): 710-715.