

侧孢短芽孢杆菌溶藻活性代谢产物对虾池颤藻的溶藻效果

贾 雯, 黄翔鹄*, 李长玲, 张嘉辉

(广东海洋大学水产学院, 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室, 广东 湛江 524088)

摘要: 为改善对虾养殖水环境, 研究了不同阶段的侧孢短芽孢杆菌无菌滤液和颤藻对溶藻效果的影响。通过测定溶藻过程中藻体干重、叶绿素 a 含量以及藻蓝蛋白含量, 探究了溶藻效果的最佳作用阶段及其作用机理。结果显示, 稳定期和衰亡期的无菌滤液对颤藻的溶藻效果极为显著, 7 d 后颤藻干重分别减少了 51.77%、47.04%, 叶绿素 a 含量分别降低了 67.60%、59.13%, 藻蓝蛋白含量分别增加了 33.51%、30.97%; 溶藻细菌无菌滤液对延滞期颤藻的溶藻效果极显著, 7 d 后颤藻干重减少了 63.90%, 叶绿素 a 含量下降了 69.72%, 藻蓝蛋白含量升高了 54.17%。结果表明, 侧孢短芽孢杆菌培养至稳定期的无菌滤液对延滞期颤藻的溶藻效果最好。

关键词: 溶藻细菌; 颤藻; 无菌滤液; 叶绿素 a; 藻蓝蛋白

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

近年来, 现代化的高密度养殖使得对虾产业迅猛发展。但同时, 大量残余饵料及水产动物的排泄物进入养殖水体, 导致养殖水域环境质量急剧恶化, 有害微藻(以蓝藻为主)和病原微生物大量滋生, 抑制对虾的健康生长, 甚至造成死亡^[1-2]。传统上, 利用化学制剂(铜制剂、除草剂)可以直接杀死藻类, 但其效果往往不明显, 并且专一性差, 容易造成二次污染, 影响水产品质量。目前, 微生物调控法^[3-4]已越来越多地受到人们的关注。溶藻细菌^[5-8]因其具有安全、经济、特异、高效、无二次污染等优点, 已成为改善水质环境的热点。此外, 通过从溶藻细菌中分离提取高效专一、可生物降解的溶藻活性代谢产物^[9-13]已经成为研发杀藻剂的一个新思路。

本课题组从湛江海滨公园的土壤中分离出一株溶藻细菌, 经 16S rDNA 测序分析, 为侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*), 实验研究了该菌株的溶藻活性代谢产物对虾池颤藻的溶藻效果, 以期对对虾养殖环境水质的改善提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验藻种

颤藻(*Oscillatoria* sp.), 由广东海洋大学水域生态与养殖环境实验室提供, 分离于湛江中联养殖有限公司对虾养殖基地的高位池。

1.2 实验菌种

一株溶藻细菌, 分离自湛江海滨公园表层以下 5~10 cm 处的土样中, 经生理生化及 16S rDNA 测序分析为侧孢短芽孢杆菌。该菌株由广东海洋大学水域生态与养殖环境实验室保存。

1.3 培养基

藻类培养基: BG11 培养液^[5]; 细菌培养基: 营养肉汤培养基(NB)^[14]。

1.4 溶藻细菌不同生长阶段的无菌滤液对颤藻的溶藻效果

藻类培养 将颤藻藻液按照 3% 接种量接入新鲜的、经过灭菌的 BG11 培养液中。培养条件: 温度 28 ℃, 光照强度 54 μmol/(m²·s), 盐度 28, 光暗周期 14 h:10 h, pH 7.8 ± 0.2。每天定时

收稿日期:2012-07-22 修回日期:2012-12-06

资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201203083);广东省自然科学基金项目(9152408801000003, 8152408801000003);广东省科技计划项目(2011A020202009)

通信作者:黄翔鹄, E-mail:hxh166@126.com

摇瓶3次,预培养时间为7 d,实验前使颤藻藻液 OD_{660} 在0.22~0.26之间。接种过程严格按照无菌操作规范进行。

细菌培养及无菌滤液制备 挑取一环经斜面培养的溶藻细菌,接入新鲜的营养肉汤培养基(100 mL三角瓶装液量为50 mL),于30℃,120 r/min条件下振荡培养12 h,得到种子菌悬液。将种子菌悬液按3%接种量转接于新鲜的营养肉汤培养基,于30℃,120 r/min条件下分别继续振荡培养4 h(延滞期)、24 h(对数期)、36 h(稳定期)、60 h(衰亡期)^[15],得到各生长阶段的细菌发酵液。将培养好的发酵液于4℃,10 000 r/min离心20 min,弃菌体收集上清液,然后用0.22 μm滤膜过滤两次。划平板,确定无菌,保存于4℃冰箱中备用。实验前以无菌水调各阶段无菌滤液浓度,使其 OD_{660} 在0.03~0.04之间。

溶藻实验 分别取细菌不同生长阶段的无菌滤液各10 mL加入到10 mL预培养7 d后的颤藻藻液中,并用新鲜BG11培养液定容至100 mL,进行溶藻实验。对照组中加入10 mL无菌水,实验组和对照组各设3个平行。每天定时取样,测定溶藻效果。

1.5 溶藻细菌无菌滤液对不同生长阶段颤藻的溶藻效果

藻类培养 预培养时间分别为3 d(延滞期)、10 d(对数期)、15 d(稳定期)、20 d(衰亡期)^[15]。实验前颤藻藻液分别用各阶段BG11培养液调浓度,使其 OD_{660} 在0.22~0.26之间。各阶段BG11培养液是各阶段藻液经离心去除藻体后的培养液。

细菌培养及无菌滤液制备 发酵液振荡培养时间为30 h。实验前以无菌水调无菌滤液浓度,使其 OD_{660} 在0.03~0.04之间。

溶藻实验 设3个平行的实验组和对照组,定容所用BG11培养液分别为各阶段BG11培养液。每天定时取样,测定溶藻效果。

1.6 测定指标

藻体干重的测定 每瓶取80 mL藻液,用中速定性滤纸(已于60℃下烘干24 h,并称重,记为 M_0)抽滤收集藻细胞体,然后将其置于60℃条件下烘干24 h,之后称其干重,记为 M_T 。则得到颤藻干重 $M(g) = M_T - M_0$ 。

叶绿素a质量浓度的测定 每瓶吸取10

mL藻液在4 000 r/min条件下离心10 min,吸弃上清,再离心5 min,吸弃剩余上清,尽量获得干燥藻细胞,放入-20℃冰箱中冷冻处理1~2 d,待藻细胞完全裂解后,加入10 mL体积分数为90%的丙酮,充分混匀后,黑暗静置于4℃冰箱,提取叶绿素a。24 h后的提取液4 000 r/min再离心10 min,取上清液以90%的丙酮为参比,测定其在630、647、664、750 nm下的吸光度值。

叶绿素a质量浓度(mg/L)的计算公式^[16]如下:

$$\rho_{chl-a} = [11.85(D_{664} - D_{750}) - 1.54(D_{647} - D_{750}) - 0.08(D_{630} - D_{750})] \times \frac{V_1}{V_2 \cdot d} \quad (1)$$

式中, D_{664} 、 D_{647} 、 D_{630} 、 D_{750} 分别为在波长664 nm、647 nm、630 nm、750 nm下的吸光度值, V_1 为提取液定容后体积(mL), V_2 为藻液体积(L), d 为比色皿光程(cm)。

溶藻细菌无菌滤液对不同生长阶段颤藻的叶绿素a影响效果用藻体去除率(R)表示。计算公式^[18]如下:

$$R = [(C_0 - C_e)/C_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中, C_0 为对照组的叶绿素a质量浓度, C_e 为实验组的叶绿素a质量浓度。

藻蓝蛋白含量的测定 取10 mL藻液,4 500 r/min离心20 min,弃上清,加入10 mL磷酸缓冲液(pH 7.0),充分摇匀,放入-20℃冰箱冷冻1 h,取出于4℃解冻后,在4℃条件下4 500 r/min离心10 min,取上清液以磷酸缓冲液为参比,在652、620 nm处比色,测其吸光度值,根据下式计算藻蓝蛋白(PC)含量^[18]:

$$C_{PC} = 0.187A_{620} - 0.089A_{652} \quad (3)$$

式中, A_{652} 、 A_{620} 分别为提取液在652、620 nm处的吸光度; C_{PC} 为藻蓝蛋白质量浓度(mg/L)。

1.7 数据分析

采用SPSS 17.0软件对实验数据进行ANOVA方差分析和LSD多重比较。

2 结果

2.1 溶藻细菌不同生长阶段的无菌滤液对颤藻的溶藻效果

对干重的影响 溶藻细菌不同生长阶段的无菌滤液对颤藻干重影响极显著($P < 0.01$)。其中,培养至稳定期的细菌无菌滤液对颤藻干重影

响最大,7 d 后的颤藻干重为 0.012 2 g,与对照组(0.025 4 g)相比减少了 51.77%,与初始(0.003 3 g)相比仅增加了 270.71%,远小于对照组的增加量 477.27%。细菌延滞期、对数期和衰亡期的无菌滤液分别使颤藻干重减少了 10.78%、29.17%、47.04%(图 1)。

LSD 多重比较结果表明,细菌对数期、稳定期和衰亡期的无菌滤液对颤藻干重的抑制作用同对照组相比存在极显著差异($P < 0.01$),而延滞期的无菌滤液对颤藻干重的抑制作用同对照组相比差异显著($P < 0.05$)。4 个实验组之间除了稳定期和衰亡期的组间差异不显著之外,其余组间差异均极显著($P < 0.01$)。因此,细菌各生长时期的无菌滤液对颤藻干重的抑制效果为稳定期 = 衰亡期 > 对数期 > 延滞期。

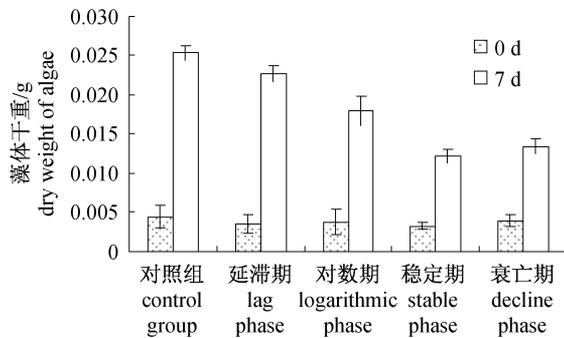


图 1 溶藻细菌不同生长阶段的无菌滤液对颤藻干重的影响

Fig. 1 Effects of the sterile filtrate of algae-lysing bacteria in its different growth stages on dry weights of *Oscillatoria* sp.

对叶绿素 a 含量的影响 溶藻细菌不同生长阶段的无菌滤液对颤藻叶绿素 a 含量影响极显著($P < 0.01$)(图 2)。其中,培养至稳定期的细菌无菌滤液对颤藻叶绿素 a 含量的影响最为强烈,6 d 后开始呈现下降趋势,7 d 后颤藻叶绿素 a 含量为 0.714 mg/L,与对照组(2.201 mg/L)相比减少了 67.60%,与初始(0.166 mg/L)相比仅增加了 330.31%,远小于对照组的增加量 1 146.19%。细菌延滞期、对数期和衰亡期的无菌滤液分别使颤藻叶绿素 a 含量减少了 18.44%、42.01%、59.13%。

LSD 多重比较结果表明,细菌 4 个时期的无菌滤液对颤藻叶绿素 a 含量的影响效果同对照组相比差异极显著($P < 0.01$),4 个实验组之间除了

稳定期和衰亡期的组间差异不显著之外,其余组间均差异极显著($P < 0.01$)。因此,细菌各生长时期的无菌滤液对颤藻叶绿素 a 的抑制效果为稳定期 = 衰亡期 > 对数期 > 延滞期。

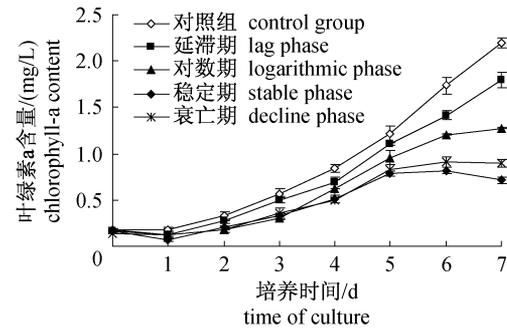


图 2 溶藻细菌不同生长阶段的无菌滤液对颤藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 2 Effects of the sterile filtrate of algae-lysing bacteria in its different growth stages on chlorophyll-a contents of *Oscillatoria* sp.

对藻蓝蛋白含量的影响 溶藻细菌不同生长阶段的无菌滤液对颤藻藻蓝蛋白含量影响极为显著($P < 0.01$)(图 3)。整个实验过程中,各实验组的藻蓝蛋白含量始终高于对照组。其中,培养至稳定期和衰亡期的细菌无菌滤液对藻蓝蛋白含量的影响较大,呈现出先升高后降低的变化趋势,最大值均出现在第 5,7 天后藻蓝蛋白含量分别为 0.014 9、0.014 6 mg/L,与对照组(0.011 1 mg/L)相比仍分别增加了 33.51%、30.97%。细菌延滞期和对数期的无菌滤液分别使藻蓝蛋白含量增加了 10.90%、20.67%。

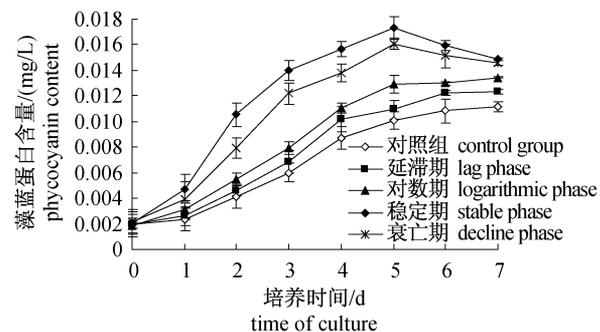


图 3 溶藻细菌不同生长阶段的无菌滤液对颤藻藻蓝蛋白含量的影响

Fig. 3 Effects of the sterile filtrate of algae-lysing bacteria in its different growth stages on phycocyanin contents of *Oscillatoria* sp.

LSD 多重比较结果表明,细菌 4 个时期的无菌滤液对颤藻藻蓝蛋白含量的影响同对照组相比均差异极显著 ($P < 0.01$), 4 个实验组中除了稳定期和衰亡期的组间差异不显著之外,其余组间均差异极显著 ($P < 0.01$)。因此,细菌各生长时期的无菌滤液对颤藻藻蓝蛋白的影响效果为稳定期 = 衰亡期 > 对数期 > 延滞期。

2.2 溶藻细菌无菌滤液对不同生长阶段颤藻的溶藻效果

对干重的影响 溶藻细菌无菌滤液对不同生长阶段颤藻的干重影响极显著 ($P < 0.01$) (图 4)。其中,无菌滤液对延滞期颤藻的干重影响最

大,7 d 后的颤藻干重为 0.007 8 g,与对照组 (0.021 7 g) 相比减少了 63.90%,与初始 (0.003 9 g) 相比仅增加了 99.14%,远小于对照组的增加量 400.77%。无菌滤液导致对数期、稳定期和衰亡期颤藻干重分别减少了 41.50%、25.29%、52.39%。

LSD 多重比较结果表明,细菌无菌滤液对延滞期、对数期、稳定期和衰亡期颤藻的干重抑制作用的组间差异均极为显著 ($P < 0.01$)。进而得出,该株溶藻细菌的无菌滤液对 4 个生长时期颤藻的干重抑制效果为延滞期 > 衰亡期 > 对数期 > 稳定期。

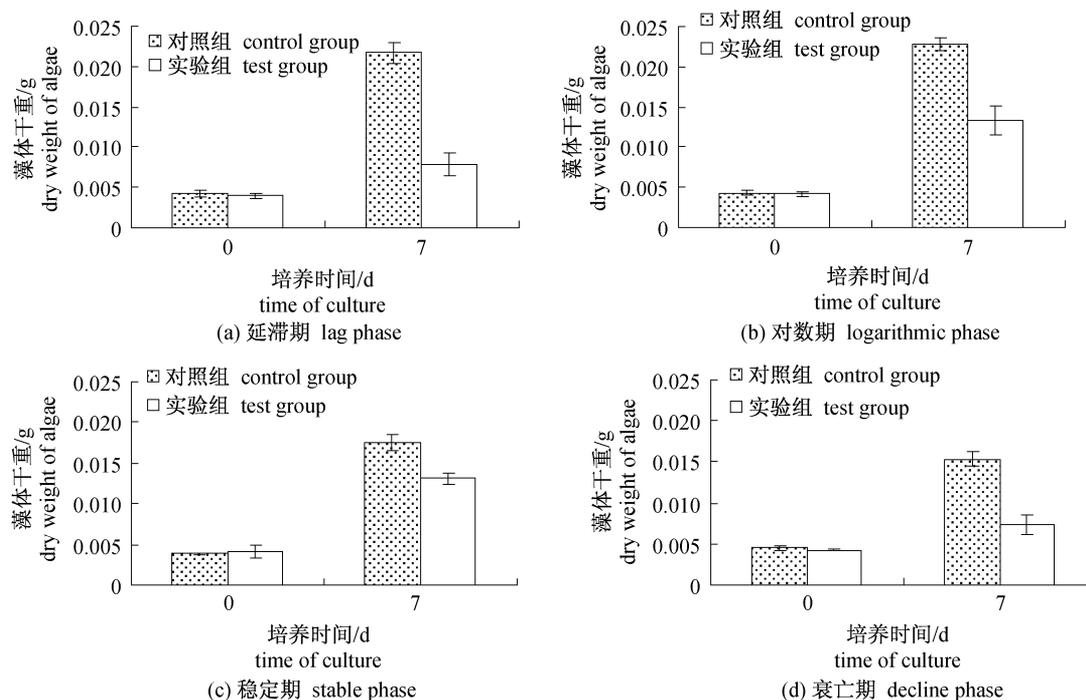


图 4 溶藻细菌无菌滤液对不同生长阶段颤藻的干重影响

Fig. 4 Effects of the sterile filtrate of algae-lysing bacteria on dry weights of *Oscillatoria* sp. in its different growth stages

对叶绿素 a 含量的影响 溶藻细菌无菌滤液对不同生长时期颤藻的叶绿素 a 含量影响极为显著 ($P < 0.01$) (图 5)。细菌无菌滤液对 4 个生长时期颤藻的叶绿素 a 均有去除效果,并随着溶藻时间的延长呈上升趋势。其中无菌滤液对延滞期颤藻的叶绿素 a 去除效果最好,7 d 后叶绿素 a 的去除率达到 69.72%。无菌滤液对处于对数期、稳定期和衰亡期颤藻的叶绿素 a 去除率分别为 42.57%、29.71%、50.73%。

LSD 多重比较结果表明,细菌无菌滤液对处

于延滞期、对数期、稳定期和衰亡期颤藻的叶绿素 a 去除率的组间差异均极为显著 ($P < 0.01$)。进而得出,该株溶藻细菌的无菌滤液对 4 个生长时期颤藻的叶绿素 a 去除效果为延滞期 > 衰亡期 > 对数期 > 稳定期。

对藻蓝蛋白含量的影响 细菌无菌滤液对不同生长阶段颤藻的藻蓝蛋白含量具有极显著影响 ($P < 0.01$) (图 6)。整个实验过程中,延滞期和对数期的对照组中藻蓝蛋白含量持续快速平稳地上升;稳定期和衰亡期的对照组中藻蓝蛋白含

量上升缓慢,并逐渐趋于平稳。4个时期下的实验组中藻蓝蛋白含量均始终高于对照组,并呈现出先升高后降低的变化趋势,最大值均出现在第5天,7 d后藻蓝蛋白含量分别为0.015 8、0.015 1、0.010 7、0.011 3 mg/L,与各对照组相比分别增加了54.17%、35.72%、91.55%、87.75%。

LSD多重比较结果表明,细菌无菌滤液对4个生长时期颤藻的藻蓝蛋白含量的影响同对照组相比均差异极显著($P < 0.01$),4个实验组中除了延滞期和衰亡期的组间差异显著($P < 0.05$)之外,其余组间差异均达到极显著($P < 0.01$)水平。总结得出,细菌无菌滤液对4个时期颤藻的藻蓝蛋白影响效果为延滞期 > 衰亡期 > 对数期 > 稳定期。

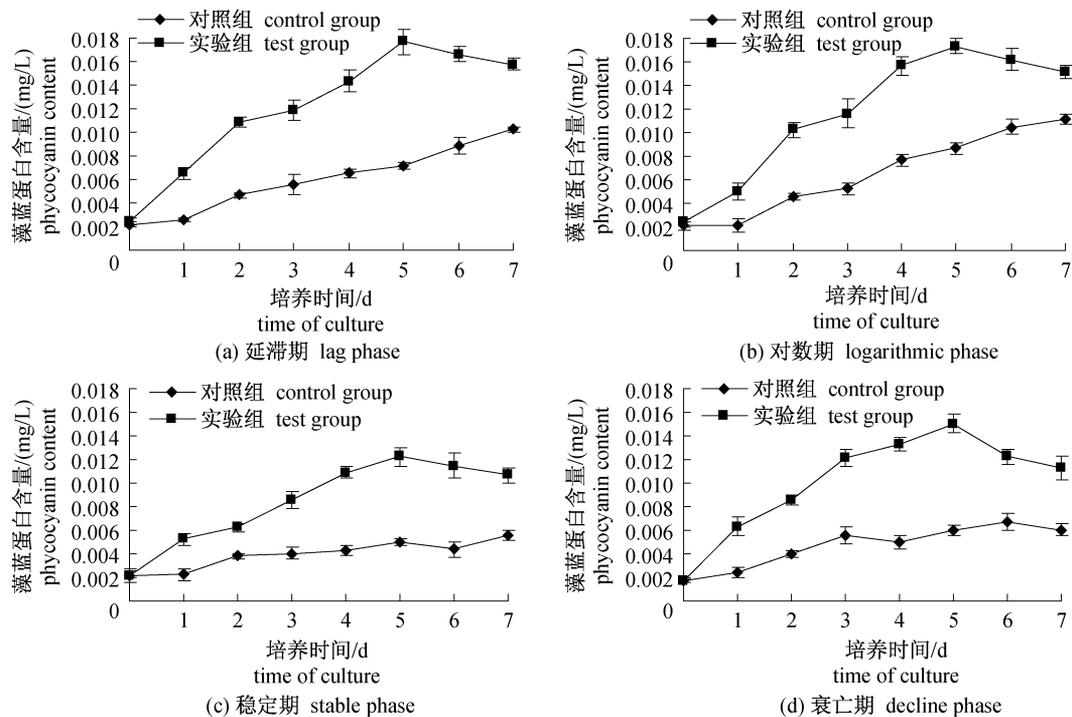


图6 溶藻细菌无菌滤液对不同生长阶段颤藻的藻蓝蛋白含量影响
Fig. 6 Effects of the sterile filtrate of algae-lysing bacteria on phycocyanin contents of *Oscillatoria* sp. in different growth stages

3 讨论

3.1 溶藻细菌不同生长阶段的无菌滤液对颤藻的溶藻效果

不同阶段的细菌,其生长和生理代谢状况均存在很大的差异,细菌的溶藻能力受到细菌所处生长阶段的影响^[19]。晋利等^[17]发现一株溶藻细菌 J1 在对数期能够分泌较多的胞外溶藻物质,对铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 有较好的溶

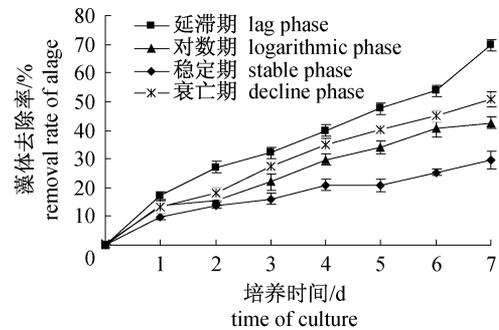


图5 溶藻细菌无菌滤液对不同生长阶段颤藻的叶绿素 a 含量影响
Fig. 5 Effects of the sterile filtrate of algae-lysing bacteria on Chlorophyll-a contents of *Oscillatoria* sp. in different growth stages

藻效果。Mitsutani 等^[20]报道了一株海洋假交替单胞菌 A25 能够在稳定期产生大量的蛋白质杀死骨条藻 (*Skeletonema costatum*)。刘晶等^[8]研究发现两株溶藻细菌 L7 和 L18 在衰亡期的细菌滤液对铜绿微囊藻和水华鱼腥藻 (*Anabaena flosaquae*) 的溶藻效果好于对数期和稳定期。

本实验表明,该株溶藻细菌的无菌滤液对颤藻的抑制作用受到了细菌所处生长阶段的影响。其中,稳定期和衰亡期的无菌滤液对颤藻的抑制

效果明显好于延滞期和对数期。这说明,该株溶藻细菌能够在稳定期向胞外分泌大量的溶藻活性物质,并且这些活性物质在衰亡期仍得到了大量积累(极少部分作为二次营养物被再利用)^[17],使得稳定期和衰亡期的无菌滤液对颤藻有较高的抑制作用。对比结果表明,不同种属间的溶藻细菌向胞外分泌溶藻活性物质的时期以及活性物质在胞外的累积情况存在很大差异,是影响溶藻效果的一个重要因素。

3.2 溶藻细菌无菌滤液对不同生长阶段颤藻的溶藻效果

微藻在一定生长阶段和条件下能够释放抗生素类物质等胞外分泌物^[21-22],降低或消除外界的干扰迫害。因此,细菌(或其溶藻活性代谢物)对不同时期微藻的抑制效果不同。据报道,一株溶藻细菌 J1 对处于延滞期的铜绿微囊藻具有较好地去除作用^[17]。周键等^[23]指出,细菌 B7 滤液对延滞期的塔马亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)和中肋骨条藻的抑藻作用要明显高于指数期。

本实验结果表明,该株溶藻细菌的无菌滤液对颤藻的抑制作用受到了颤藻所处生长阶段的影响。其中,无菌滤液对延滞期的颤藻具有极高的抑制作用,并相继高于衰亡期、对数期和稳定期。延滞期的颤藻,藻细胞对外界的抗性极差,同时极少或不分泌保护物质,伴随着藻体的生长,营养物质减少,胞外分泌物逐渐增加;到稳定期,颤藻胞外分泌物数量达到最大,对外界抗性最强;衰亡期因藻细胞活力下降,死亡增多,导致胞外分泌物数量急剧下降。对比结果表明,微藻在不同生长阶段对溶藻效果的影响同微藻的种属特性间无明显的相关性,溶藻细菌(或其活性代谢产物)对延滞期的微藻有极好的溶解作用。

3.3 叶绿素 a 和藻蓝蛋白变化特点

叶绿素 a 和藻胆素是蓝藻中重要的光合色素。藻胆素因其同蛋白质紧密结合在一起,故又总称为藻胆蛋白(phycobiliprotein, PBP),主要有三大类:藻蓝蛋白(phycoyanin, PC)、别藻蓝蛋白(allphycoyanin, APC)和藻红蛋白(phycoerythrin, PE)。在细胞中,PBP 作为重要的光合作用捕光色素蛋白,其捕获的光能仅按一个方向传递:PE→PC→APC→Chl. a^[24],继而引起光化学反应。近年来研究显示,逆境胁迫对微藻

光合作用体系的影响是多方面的,它不仅造成光合机构的损伤,影响光合电子的传递和光合磷酸化及其暗反应的相关酶活性^[25],也可引起反应光合强度的色素的变化^[26]。

本研究得出,相较于对照组,实验组中颤藻叶绿素 a 含量下降,而 PC 含量呈现出先增高后降低的变化趋势,且最终含量仍高于对照组。该结果同 Gerber^[27]、于海涛等^[28]的研究结果一致。实验认为,溶藻活性物质的介入,导致颤藻细胞内光合系统 II (PS II) 的 D1 蛋白被破坏,电子传递受阻,严重影响了光能的分配,改变了各色素间的正常含量和相对比例,致使光合作用效率下降,最终抑制并溶解颤藻^[30]。另外,有研究表明,降低捕光色素比例可以增强光合作用^[30-31],本实验进一步表明,捕光色素比例的降低可增强光合作用,而捕光色素比例的升高可抑制光合作用。

3.4 蓝藻生物控制与对虾健康养殖

对虾养殖池塘富营养化的日益加剧,严重影响了养殖水体中浮游植物的群落结构。颤藻因具有极高的生命力和竞争力,已成为对虾养殖水体中常见的优势种,大大消耗了对虾生长所需的溶解氧。同时,颤藻也能够产生毒素(微囊藻毒素及其类似物^[32]、蛋白类物质^[33]等),使对虾神经受到毒害^[34]。贺春花等^[35]报道了温度、盐度、光照及 pH 对颤藻生长的限制性条件,以期通过环境因子的调控作用抑制颤藻的生长。利用生物控藻技术,向虾池中添加有益菌、藻、菌藻复合物或活性代谢物质,能够加速对虾养殖水体中的物质和能量循环,改善养殖水环境,并且抑制病原微生物的生长,提高对虾的存活率、免疫酶活性及抗病力^[36]。本研究综合分析显示,侧孢短芽孢杆菌培养至稳定期的无菌滤液对延滞期的颤藻有极强的抑制效果,这为对虾养殖环境中蓝藻的控制提出了一个有效的生物技术方法。

参考文献:

- [1] 查广才,周昌清,牛晓光. 铜绿微囊藻对凡纳滨对虾低盐度养殖的危害研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2007,46(2):64-67.
- [2] 曹平,黄翔鹤,李长玲,等. 颤藻对凡纳滨对虾生长和免疫相关酶活力的影响[J]. 渔业现代化,2011,38(5):25-30.
- [3] 沈南南,李纯厚,贾晓平,等. 小球藻与芽孢杆菌对对虾养殖水质调控作用的研究[J]. 海洋水产研

- 究,2008,29(2):48-52.
- [4] Zhao Y J, Liu Y D. Possible microbial control on the adverse impacts of algae-current information about the relationships between algae and microbes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(2):173-181.
- [5] 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.
- [6] 彭超,吴刚,席宇,等.3株溶藻细菌的分离鉴定及其溶藻效应[J]. *环境科学研究*, 2003, 16(1):37-41.
- [7] 吕伟英,赵以军,周瑞,等.一种快速检测分离溶藻细菌方法的初探[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(1):119-122.
- [8] 刘晶,潘伟斌,秦玉洁.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):17-23.
- [9] 张勇,席宇,吴刚.溶藻细菌杀藻物质的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(1):127-131.
- [10] Lee S O, Kato J, Takiguchi N, et al. Involvement of an extracellular protease in Algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoal teromonas* sp. strain A28 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10):4334-4339.
- [11] Nakashima T, Miyazaki Y, Matsuyama Y, et al. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium γ -proteobacterium [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(3):684-690.
- [12] Kang Y H, Kim J D, Kim B H, et al. Isolation and characterization of a bio-agent antagonistic to diatom, *Stephanodiscus hantzschii* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(5):1030-1038.
- [13] Kim J D, Kim B, Lee C G. Alga-lytic activity of *Pseudomonas fluorescens* against the red tide causing marine algae *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) [J]. *Biological Control*, 2007, 41(3):296-303.
- [14] 赵斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002.
- [15] 颜小丹.一株溶藻细菌的分离鉴定及其对虾池两种蓝藻溶藻效果的研究[D].湛江:广东海洋大学,2011:10-20.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会主编.近海污染生态调查和生物监测[M].北京:中国标准出版社,2008:24-25.
- [17] 晋利,刘赵普,赵耕毛,等.一株溶藻细菌对铜绿微囊藻生长的影响及其鉴定[J]. *中国环境科学*, 2010, 30(2):222-227.
- [18] 张薇君,郝纯彦.出口螺旋藻粉中藻胆蛋白测定方法的研究[J]. *光谱仪器与分析*, 1999(3):8-11.
- [19] Fraleigh P C, Burnham J C. Myxococcal predation on cyanobacterial populations: nutrient effects [J]. *Limnology and Oceanography*, 1988, 33(3):476-483.
- [20] Mitsutani A, Takesue K, Kirita M. Lysis of *Skeletonema costatum* by *Cytophaga* sp. isolated from the coastal water of the Ariake Sea [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1992, 58(2):2158-2167.
- [21] 林伟.海洋微藻与细菌相互关系的研究——正负相互作用的几个例证[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2005:70-74.
- [22] Costerton J W, Cheng K J, Geesey G G, et al. Bacterial biofilms in nature and disease [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1987, 41:435-464.
- [23] 周键,李春强,廖文斌,等.几种海洋溶藻菌溶藻效果研究[J]. *海洋技术*, 2008, 27(3):51-55.
- [24] 姚南瑜.藻类生理学[M].大连:大连工学院出版社,1987.
- [25] 冯建灿,胡秀丽,毛训甲.叶绿素荧光动力学在研究植物逆境生理中的应用[J]. *经济林研究*, 2002, 20(4):14-19.
- [26] 刘碧云,周培疆,李佳洁,等.丙体六六六对斜生栅藻生长及光合色素和膜脂过氧化影响的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(1):204-207.
- [27] Gerber S, Hader D P. Effects of solar radiation on motility and pigmentation of three species of phytoplankton [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1993, 33(4):515-521.
- [28] 于海涛,潘伟斌.溶藻细菌 L8 的溶藻活性代谢产物对水华鱼腥藻光合特性的影响研究[J]. *环境污染与防治*, 2010, 32(11):25-29.
- [29] 陈善文,武宝玕.藻类对 UV-B 增强的响应及其分子基础[J]. *暨南大学学报:自然科学与医学版*, 2000, 21(5):88-94.
- [30] 王高鸿,陈兰洲,李根保,等.改变捕光色素比例用于提高微藻光合效率[J]. *科学通报*, 2005, 50(14):1475-1479.
- [31] Nakajima Y, Ueda R. Improvement of microalgal photosynthetic productivity by reducing the content of light harvesting pigment. [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1999, 11(2):195-201.
- [32] Brittain S, Mohamed Z A, Wang J, et al. Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont [J]. *Toxicon*, 2000, 38(12):1759-1771.

- [33] Eriksson J E, Meriluoto J A O, Kujari H P, *et al.* A comparison of toxins isolated from the cyanobacteria *Oscillatoria agardhii* and *Microcystis aeruginosa* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Comparative Pharmacology*, 1988, 89 (2): 207 - 210.
- [34] Smith P T. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*) [J]. *Toxicology*, 1996, 34 (8): 857 - 869.
- [35] 贺春花, 黄翔鹤, 李长玲, 等. 温度、光照度、盐度和 pH 对颤藻生长的限制条件研究 [J]. *渔业现代化*, 2011, 38 (6): 20 - 35.
- [36] 黄翔鹤, 李长玲, 郑莲, 等. 固定化微藻对改善养殖水质和增强对虾抗病力的研究 [J]. *海洋通报*, 2005, 24 (2): 57 - 62.

Research on algicidal effect of bioactive metabolites of *Brevibacillus laterosporus* on *Oscillatoria* sp. in shrimp pond

JIA Wen, HUANG Xianghu*, LI Changling, ZHANG Jiahui
(Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: *Oscillatoria* sp. is a common and harmful cyanophyte in shrimp culture pond. In this study, the sterile filtrate of *Brevibacillus laterosporus* and *Oscillatoria* sp. were used to study the algicidal effects in their different growth stages. The algae dry weight, chlorophyll-a and phycocyanin content were measured in order to explore the best algae-lysing period and the algicidal mechanism. The final aim was to provide the basic theory for improving water environment in shrimp pond. The results showed that algicidal effects of the sterile filtrate on *Oscillatoria* sp. were very significant ($P < 0.01$) when the algae-lysing bacteria was in the stable and decline phases. After 7 days, the algae dry weights were reduced by 51.77%, 47.04% respectively, the contents of chlorophyll-a were decreased by 67.60%, 59.13% respectively; the phycocyanin contents were increased by 33.51%, 30.97%, respectively. Similarly, the algicidal effect of the sterile filtrate of algae-lysing bacteria was so conspicuous ($P < 0.01$) on the lag phase *Oscillatoria* sp.. 7 days later, the algae dry weight was reduced by 63.90%; the content of chlorophyll-a was decreased by 69.72%; the phycocyanin content was increased by 54.17%. The conclusion was that the sterile filtrate of *Brevibacillus laterosporus* in the stable phase had the best algicidal effect on the lag phase *Oscillatoria* sp..

Key words: algae-lysing bacteria; *Oscillatoria* sp.; sterile filtrate; chlorophyll-a; phycocyanin

Corresponding author: HUANG Xianghu. E-mail: hxh166@126.com.