

# 溶藻细菌 NP23 液体培养基的优化及 生物安全性的研究

廖春丽<sup>1</sup> 李冰冰<sup>1</sup> 吴创业<sup>1</sup> 胡继勇<sup>2</sup> 姬晓娜<sup>1</sup> 单林娜<sup>1\*</sup>

(1. 河南城建学院 生物工程系 河南 平顶山 467036)

(2. 河南城建学院 化学与化工系 河南 平顶山 467036)

**摘要:** 【目的】为快速培养高浓度菌液以治理水体富营养化导致的藻类水华。【方法】首先用 Plackett-Burman (PB)法筛选出影响 NP23 菌浓的 3 个重要因素  $\text{KNO}_3$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 然后对筛选出的重要因素在最佳值区域里用响应面方法(RSM)来优化 NP23 菌培养条件, 最后用急性毒性试验和致突变试验对 NP23 菌液投入水体的生物安全性进行评价。【结果】优化后菌浓达到  $10^{13}$  CFU/mL, 比优化前菌浓大 4 个数量级。NP23 菌液即使在大剂量下对鱼类也无急性毒性, 对鱼类无致突变效应。【结论】研究结果为 NP23 菌实际应用提供参考。

**关键词:** 溶藻细菌 NP23, 富营养化, 响应面方法, 急性毒性试验, 致突变试验

## Optimization of liquid media and study of biological safety for algicidal bacteria NP23

LIAO Chun-Li<sup>1</sup> LI Bing-Bing<sup>1</sup> WU Chuang-Ye<sup>1</sup> HU Ji-Yong<sup>2</sup>

JI Xiao-Na<sup>1</sup> SHAN Lin-Na<sup>1\*</sup>

(1. Department of Biology Engineering, Henan Institute of Urban Construction,  
Pingdingshan, Henan 467036, China)

(2. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Institute of Urban Construction,  
Pingdingshan, Henan 467036, China)

基金项目: 河南省科技攻关重点项目(No. 092102310069)

\*通讯作者: Tel: 86-375-2089072; 邮箱: linnashan@qq.com

收稿日期: 2012-06-20; 接受日期: 2012-10-09

**Abstract: [Objective]** In order to cultivate high concentration of bacteria to deal with algal blooms caused by water eutrophication of algal blooms quickly. **[Methods]** Firstly, three important factors:  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  which played important roles in NP23 bacteria concentration were selected based on the Plackett-Burman (PB) design experiments. Then, the best value of the selected important factors was picked out using response surface methodology (RSM) to optimize the process conditions of NP23. At Last, biological safety of NP23 bacteria liquid was evaluated by the acute toxicity and mutagenicity test. **[Results]** The bacteria concentration got  $10^{13}$  CFU/mL after optimization, which were four orders of magnitude more compared with bacteria concentration before optimization and which showed that NP23 had no poisoning effect and no mutagenic effect on fish even in large doses. **[Conclusion]** The results provide reference to practical applications of NP23.

**Keywords:** Algicidal bacteria NP23, Eutrophication, Response surface methodology, Acute toxicity test, Mutagenicity test

进入工业化以来,向环境中排放的营养物质日趋增多,水体的富营养化现象日益加剧,由此造成的有害藻类水华爆发也日趋频繁<sup>[1]</sup>,因此寻求有效的水华防治途径势在必行。而物理、化学和其它生物方法治理水华都不是很理想,而且容易造成二次污染。在此情况下,利用溶藻细菌(Algae-lysing bacteria)对水华和赤潮的控制有非常重要的作用。

本实验从河南省平顶山市白龟山水库大坝下游水体中分离、筛选到一株具高效溶藻能力的细菌 NP23,通过生理生化和 16S rDNA 测序分析,鉴定该菌为肠杆菌属<sup>[2]</sup>。很多研究报道:菌液的初始浓度对溶藻效果有很大的影响,细菌溶藻的发生对细菌有一个初始浓度的要求,当低于这个浓度时,溶藻现象延迟或不明显,初始浓度越大则溶藻现象越明显。因此要达到良好的溶藻效果,菌液的起始浓度必须大于某一下限值(如: $4.8 \times 10^5$  CFU/mL<sup>[3]</sup>,  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL<sup>[4]</sup>),而在实际投菌的大型水体中,菌液的浓度一般很难达到这一数量级<sup>[5]</sup>。因此如何培养出高浓度的菌液是溶藻菌成功用于治理水体富营养化藻类水华的

关键之一。本实验用 Plackett-Burman (PB)法筛选出影响 NP23 菌浓的 3 个重要因素( $\text{KNO}_3$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),然后对筛选出的重要因素在最佳值区域里用响应面方法(Response surface methodology, RSM)拟合因素与结果间的全局函数关系,从而得到一个准确有效和稳定的工艺条件。优化后菌浓达到  $10^{13}$  CFU/mL,比优化前菌浓大 4 个数量级。最后用急性毒性试验和致突变试验对 NP23 菌液投入水体的生物安全性进行评价,了解高浓度 NP23 菌液是否会引起鱼类在短时间内死亡和对鱼类遗传物质是否有诱变损伤作用,为 NP23 菌液实际应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** 溶藻细菌 NP23,来自课题组从河南省平顶山市白龟山水库大坝下游水体中经富集、分离纯化得到的一株野生细菌。

**1.1.2 藻种:** 藻种选用小球藻、栅藻、惠氏微囊藻、蛋白核小球藻,这些藻种来自中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心。藻种经活化后,在

25 °C、光照强度为 2 500 Lux、光暗期为 12 h:12 h 的条件下培养。藻种的接种及传代过程均严格按照无菌操作规则进行。

**1.1.3 试验鱼:** 急性毒性试验: 鱼类体长 < 3 cm 的鲤鱼鱼苗若干条; 致突变试验: 鱼类 150±10 g 的鲤鱼若干条。试验前驯养 10 d 以上。

**1.1.4 培养基:** 起始溶藻菌 NP23 液体培养基: 葡萄糖 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03%, KNO<sub>3</sub> 0.5%, NaCl 0.03%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.002%, 酵母膏 0.04%, CaCl<sub>2</sub> 0.03%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, pH 7.5。

优化后溶藻菌 NP23 液体培养基: 葡萄糖 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03%, KNO<sub>3</sub> 0.6%, NaCl 0.03%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.003%, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.001%, 酵母膏 0.04%, CaCl<sub>2</sub> 0.03%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%, pH 7.5。

藻培养基: 绿藻使用 SE 培养基<sup>[6]</sup>; 蓝藻使用 BG11 培养基<sup>[7]</sup>。

## 1.2 方法

**1.2.1 NP23 菌发酵培养:** 摇床转数为 150 r/min, 发酵液摇床培养时间为 21 h, 装液量为 50 mL/250 mL, 接菌量为 10%。

**1.2.2 细菌溶藻效果的测定:** 将培养至对数期的 NP23 菌液稀释不同浓度, 按菌藻 1:9 (V/V) 的接种量投入到对数生长期的惠氏微囊藻、小球藻、蛋白核小球藻和栅藻的藻液中, 培养条件与藻的相同。设置对照和加菌样各 3 组平行。加菌溶藻 4 d 后测定各个不同浓度菌液供试藻的叶绿素 a 含量, 计算出不同浓度菌液对不同藻的溶藻率。

根据下面的公式计算出菌的溶藻率:  $R=(C_0-C_e)/C_0$ 。式中:  $C_0$  为对应时刻对照样藻中叶绿素 a 的含量, mg/m<sup>3</sup>;  $C_e$  为对应时刻处理样藻中叶绿素 a 的含量, mg/m<sup>3</sup>。

注: 叶绿素 a 的含量计算公式为:

叶绿素 a (mg/m<sup>3</sup>)=[11.64×(OD<sub>663</sub>-OD<sub>750</sub>)-2.16×(OD<sub>645</sub>-OD<sub>750</sub>)+0.10×(OD<sub>630</sub>-OD<sub>750</sub>)]V<sub>1</sub>/V/δ

式中:  $V$  为取样体积(L),  $OD$  为吸光度,  $V_1$  为提取液定容后的体积(mL),  $\delta$  为比色皿光程(cm)。

**1.2.3 鱼类急性毒性试验:** (1) 取驯养 10 d 以上实验鱼若干条, 在每组含 10 L 水的容器中放 10 尾鱼, 共分 6 组, 设置对照和加菌样各 3 组平行;

(2) 把培养的高浓度菌液, 加入到含试验鱼水体容器中, 每组菌浓控制为 0、10<sup>1</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>9</sup> CFU/mL 做急性毒性试验。每天观察鱼的健康和死亡情况, 连续观察 4 d。

**1.2.4 鱼类致突变试验:** (1) 取驯养 10 d 以上实验鱼若干条, 在每组含 10 L 水的容器中放 10 尾鱼, 共分 6 组, 设置对照和加菌样各 3 组平行;

(2) 用 0.8% 的生理盐水对高浓度菌液进行不同程度的稀释(菌浓为 0、10<sup>1</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>9</sup> CFU/mL);

(3) 用不同浓度的菌液对每组试验鱼进行腹腔注射染毒, 每天定时染毒 1 次, 连续 4 d;

(4) 微核率计算。将染毒 4 d 的试验鱼断尾取血, 制成血涂片。晾干后经甲醇固定 10 min, 将固定好的血涂片放入 Giemsa 工作液<sup>[8]</sup>染色 15 min 后脱色, 自然晾干后镜检, 镜检时在目镜中安放一中间有小孔的黑纸圈, 以缩小视野, 便于观察<sup>[9]</sup>。每个观察点记录 5 000 个左右红细胞中带有微核的细胞数, 以千分率表示。按下式计算微核率千分率(MCN‰)。微核千分率=各试验组(或各对照组)观察到的微核数/各试验组(或各对照组)观察的血红细胞总数。

## 1.3 实验设计

**1.3.1 Plackett-Burman 设计法筛选主要因素:** Plackett-Burman (PB)法能用最少试验次数估计出因素的主效应, 以从众多的考察因素中快速有效地筛选最为重要的几个因素供进一步研究。本文根据对溶藻细菌 NP23 发酵特性的研究, 选用实验次数  $N=12$  的实验设计, 对葡萄糖( $X_1$ )、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $X_2$ )、KNO<sub>3</sub> ( $X_3$ )、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ( $X_4$ )、

NaCl ( $X_5$ )、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $X_6$ )、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $X_7$ )、酵母膏( $X_8$ )、 $\text{CaCl}_2$  ( $X_9$ )、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $X_{10}$ ) 10 个因素进行考察, 每个因素分别取 2 个水平, 低和高水平, 响应值为菌体浓度  $Y$  ( $10^7$  CFU/mL) (菌体浓度采用稀释平板计数法<sup>[10]</sup>计数)为试验指标, 其水平编码表见表 1。

**1.3.2 响应面法试验设计:** 在 Plackett-Burman 设计法筛选主要因素的基础上, 根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理, 选取  $\text{KNO}_3$  ( $X_1$ )、

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $X_2$ )、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $X_3$ )为试验因素, 菌体浓度为试验指标, 其水平编码表见表 2。

## 2 结果

### 2.1 Plackett-Burman 设计法实验结果

Plackett-Burman 法是一种近饱和的 2 水平试验设计方法, 它基于非完全平衡块原理, 能用最少试验次数估计出因素的主效应, 实验设计及实验结果见表 3。

表 1 实验因素水平编码  
Table 1 Level coding of experimental factors

编码值 Coding value	$X_1$ (%)	$X_2$ (%)	$X_3$ (%)	$X_4$ (%)	$X_5$ (%)	$X_6$ (%)	$X_7$ (%)	$X_8$ (%)	$X_9$ (%)	$X_{10}$ (%)
-1	0.9	0.3	0.4	0.02	0.02	0.002	0.001	0.03	0.02	0.1
0	1.0	0.4	0.5	0.03	0.03	0.003	0.002	0.04	0.03	0.2
1	1.1	0.5	0.6	0.04	0.04	0.004	0.003	0.05	0.04	0.3

表 2 实验因素水平编码  
Table 2 Level coding of experimental factors

编码值 Coding value	$X_1$ (%)	$X_2$ (%)	$X_3$ (%)
-1	0.55	0.000 8	0.25
0	0.60	0.001 0	0.30
1	0.65	0.001 2	0.35

表 3  $N=10$  的 PB 实验设计与响应值表  
Table 3 Result and design of Plackett-Burman ( $N=10$ )

实验号 Experimental number	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$Y_1$ ( $\times 10^6$ CFU/mL)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	5
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	880
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1 000
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1 200
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	5
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	60
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	20
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	800
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	20
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	650
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	720
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	10

## 2.2 根据 Plackett-Burman 实验结果筛选主要因素

采用 SAS 进行各因素主效应分析结果见表 4。从表 4 可以看出, 10 个因素中  $\text{KNO}_3$  ( $X_1$ )、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $X_2$ )、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $X_3$ ) 这 3 个因素的可信度都在 90% 以上, 另外 7 个因素可信度则低于 90%。因此, 在做响应面实验时把其他 7 个因素固定在较好水平上, 选择可信度大于 90% 的  $\text{KNO}_3$  ( $X_1$ )、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $X_2$ )、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $X_3$ ) 这 3 个因素进一步做响应面实验。

## 2.3 确定实验点

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理, 进一步进行 3 因素 3 水平的响应面分析实验, 15 个实验点给出的实验结果如表 5 所示。15 个实验点可以分为两类, 其一是析因点, 自变量取值在  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  所构成的三维顶点, 共有 12 个析因点; 其二是零点, 为区域的中心点, 零点试验重复 3 次, 用以估计试验误差。

## 2.4 数据分析

以菌体浓度为响应值, 根据表 5 的试验结果, 用 SAS 统计分析软件进行多元回归分析, 所得的

主要分析结果见表 6、表 7。经回归拟合后, 实验因子对响应值的影响可用回归方程表示为:

$$Y_1 = 40.333 - 4.25X_1 + 2.125X_2 - 1.625X_3 - 11.79167X_1^2 + 1.5X_1X_2 - X_1X_3 - 1.541667X_2^2 - 1.25X_2X_3 - 3.541667X_3^2$$

由表 6 可以看出, 用上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系时, 其因变量和自变量之间的线性关系是显著的, 决定系数为 97.36%, 说明回归方程的拟合程度很好。从表 7 中可以看出, 方程一次项、二次项的影响都是显著的, 交互项作用影响不显著, 故交互项可以省略, 也可以看出各具体实验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。

## 2.5 寻取最优值

通过岭脊分析后, 得出回归模型存在最大值点,  $Y$  的最大估计值为  $7.3 \times 10^{13}$  CFU/mL, 各因素取值分别为:  $\text{KNO}_3$  0.6%,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3%, 在以上优化条件下进行验证试验, 共进行 3 批次 250 mL 摇瓶试验。证明预测值  $7.3 \times 10^{13}$  CFU/mL 与试验平均值  $8.1 \times 10^{13}$  CFU/mL 非常接近的, 而且比优化前菌浓大 4 个数量级。

表 4 各因素的主要效应  
Table 4 Main effect of all factors

因素 Factors	水平 Level (%)		$t$ 值 $t$ value	$P_{r> t }$	重要性 Important
	-1	1			
$X_1$	0.900	1.100	0.433 962	0.739 344	>0.5
$X_2$	0.300	0.500	0	1	>0.5
$X_3$	0.300	0.500	1.509 434	0.372 494	<0.5
$X_4$	0.020	0.040	0.905 660	0.531 490	>0.5
$X_5$	0.020	0.040	-0.566 040	0.672 094	>0.5
$X_6$	0.002	0.004	-0.056 600	0.964 003	>0.5
$X_7$	0.002	0.004	-1.830 190	0.318 354	<0.5
$X_8$	0.002	0.004	-0.754 720	0.588 417	>0.5
$X_9$	0.020	0.040	-0.415 090	0.749 522	>0.5
$X_{10}$	0.200	0.400	9.679 245	0.065 539	<0.5

表 5 响应面实验分析结果  
Table 5 Results of response surface analysis

实验号 Experimental number	$X_1$	$X_2$	$X_3$	菌体浓度 $Y$ Concentration of bacteria $Y$ ( $\times 10^{12}$ CFU/mL)
1	-1	-1	0	30
2	-1	1	0	32
3	1	-1	0	19
4	1	1	0	27
5	0	-1	-1	33
6	0	1	-1	34
7	0	-1	1	39
8	0	1	1	35
9	-1	0	-1	31
10	1	0	-1	24
11	-1	0	1	28
12	1	0	1	17
13	0	0	0	38
14	0	0	0	40
15	0	0	0	43

表 6 回归方程偏回归系数的估计值  
Table 6 Estimation of partial regression coefficient in regression equation

参数 Parameter	自由度 Degree of freedom	参数估计 Parameter estimation	大于 $ t $ 的概率 More than $ t $ probability
$X_1$	1	-4.250 00	0.001 918
$X_2$	1	2.125 00	0.031 000
$X_3$	1	-1.625 00	0.072 030
$X_1X_1$	1	-11.791 70	0.000 100
$X_1X_2$	1	1.500 00	0.197 772
$X_1X_3$	1	-1.000 00	0.367 747
$X_2X_2$	1	-1.541 67	0.202 553
$X_2X_3$	1	-1.250 00	0.270 953
$X_3X_3$	1	-3.541 67	0.019 937
Root	离回归偏差		2.020 726
R-square	决定系数		97.36%

表 7 回归方程方差分析表

Table 7 Variance analysis table of regression equation

回归项 Regression item	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of square	F 值 F value	大于 F 的概率 More than F probability
一次项 An item	3	0.054 2	7.11	0.027 66
二次项 Quadratic items	3	0.100 0	15.20	0.009 80
交互项 Interactive items	3	0.003 2	0.31	0.459 60
总回归 Total regression	9	0.180 0	5.67	0.032 10

### 2.6 确定最优溶藻菌液浓度

溶藻实验前, 用优化培养基培养 NP23, 菌液浓度达到  $7.6 \times 10^{13}$  CFU/mL, 然后进行梯度稀释, 投入到藻溶液中进行溶藻效果的测定。

从图 1 可以看出溶藻菌 NP23 对惠氏微囊藻的溶藻率随着菌浓的变化是先增大后减小; 最大溶藻率时菌的浓度为  $7.6 \times 10^8$  CFU/mL, 这可能是由于菌浓低时, 菌竞争不住藻, 进而影响其溶藻; 在菌浓合适时, 由于作用方式是直接溶藻, 大部分的藻细胞被细菌结合后细菌破坏了藻的生长, 进而溶藻率较大; 当菌浓较大时, 由于受到环境

营养物质有限的限制, 菌与菌之间对营养物质的竞争力增强, 菌的活度下降, 进而降低了与藻结合的程度, 减弱了对藻类的破坏。

对小球藻、蛋白核小球藻、栅藻的溶藻率随着菌液浓度的增大呈上升趋势。这与菌对这 3 种藻的间接溶藻作用方式密切相关。菌浓越大, 菌释放的溶藻物质越多, 溶藻作用越强, 直观的现象就是溶藻率呈上升趋势。因此在实际溶藻中, 考虑到经济成本和溶藻效果, 可以将培养的高浓度菌液稀释到  $10^6$ – $10^8$  CFU/mL 时再投入水体中。

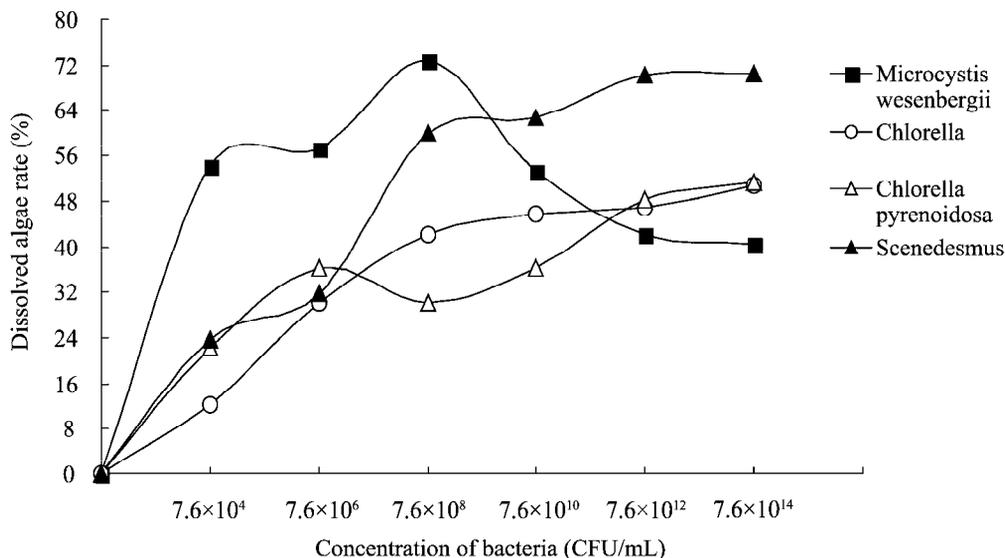


图 1 不同浓度梯度菌液对 4 种藻的溶藻效果

Fig. 1 Algicidal effects of different concentration gradient of bacteria on four algae

## 2.7 NP23 菌液对鲤鱼鱼苗的急性毒性试验结果

从表 8 可以看出, 对照组鱼的存活率为 90%, 5 个实验组鱼的存活率分别为 90%、100%、90%、100%、100%。实验组鱼的死亡率的平均值为 4%, 在自然死亡率 10% 的范围之内。就是说, NP23 菌液即使在大剂量下对鱼类也无中毒的效应。

## 2.8 NP23 菌液对鲤鱼的致突变变性试验结果

图 2 和图 3 是对照组和实验组血红细胞经过

吉姆萨染色的涂片在 NIKON-551 正置显微摄像系统中视野观察的一部分截图。在实际的数据统计中, 大约 4 880 个血细胞中, 才有一个含有微核的血红细胞存在。表 9 的实验数据表明, 试验鱼类和对照鱼类基本相同, 微核率在 0.204 0‰–0.204 8‰之间。另外实验组和对照组的微核率均小于正常值 0.5‰, 结果说明 NP23 菌液对水生生物无诱发微核作用, 因此对鱼类无致突变效应。

表 8 NP23 菌液对鲤鱼鱼苗的急性毒性试验结果  
Table 8 Results of NP23's acute toxicity test on carp fish

试验鱼 Test fishes	菌浓 Concentration of bacteria (CFU/mL)					
	对照 Contrast	10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>
放鱼尾数 Fish number	30	30	30	30	30	30
24 h 鱼存活数 24 h fish survival	30	30	30	30	30	30
48 h 鱼存活数 48 h fish survival	27	27	30	30	30	30
72 h 鱼存活数 72 h fish survival	27	27	30	30	30	30
96 h 鱼存活数 96 h fish survival	27	27	30	30	30	30
鱼存活率 Survival rate of fish (%)	90	90	100	90	100	100

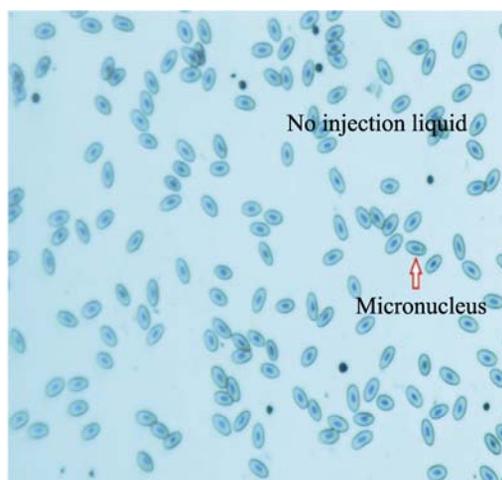


图 2 对照组的鱼血红细胞吉姆萨染色图片  
Fig. 2 The contrast group of fish red blood cells stained with Giemsa pictures

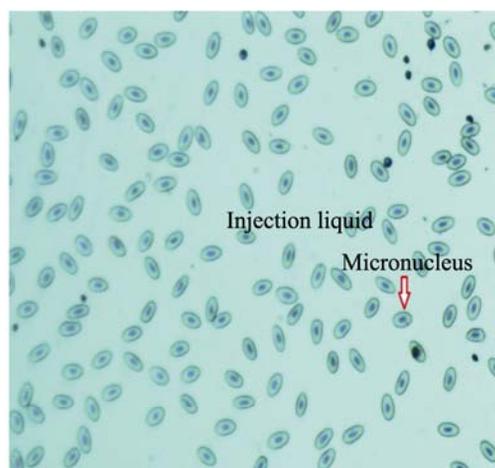


图 3 实验组的鱼血红细胞吉姆萨染色图片  
Fig. 3 The experimental group of fish red blood cells stained with Giemsa pictures

表 9 NP23 菌液对鲤鱼的致突变变性试验结果  
Table 9 Results of NP23's mutagenicity test on carp fish

微核率 Micronucleus rate (‰)	菌浓 Concentration of bacteria (CFU/mL)					
	对照 Contrast	10 <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>
鱼体重 Fish weight (g)	150±10	150±10	150±10	150±10	150±10	150±10
微核率(对照组) Micronucleus rate (the contrast group, ‰)	0.204 6	0.204 8	0.204 5	0.204 0	0.204 6	0.204 2
微核率(实验组) Micronucleus rate (the experimental group, ‰)	0.204 6	0.204 8	0.204 5	0.204 0	0.204 6	0.204 2

### 3 讨论

微生物具有繁殖快、效率高和寄主特异性等特点,被认为是最具前途的控藻方法之一。国外对溶藻细菌的研究已经有几十年的历史,国内的相关研究虽起步较晚,但也取得了一定的研究进展。目前主要集中在溶藻菌种类和溶藻效果的研究、溶藻机理和溶藻物质的研究、溶藻细菌浓度对溶藻效果影响的研究、细菌溶藻过程中伴生作用的研究等,但对如何提高溶藻菌的浓度研究不多。本实验采用响应面方法优化溶藻细菌 NP23 液体培养基,因为培养基成分种类繁多,各成分间的相互作用也错综复杂,所以,微生物培养基的优化工作就显得尤为重要,其中以响应面方法的效果最为显著, RSM 在优化研究中应用频繁,是降低开发成本、优化加工条件、提高产品质量、解决生产过程中的实际问题的一种有效方法。本文通过响应面方法优化 NP23 液体培养基得到一个稳定的工艺条件。优化后菌浓达到 10<sup>13</sup> CFU/mL,比优化前菌浓大 4 个数量级。

细菌在溶解有害藻种的同时不能危害其它水生生物,所以本文对 NP23 菌液投入水体的生物安全性进行评价。首先实验对象是鲤鱼,因为鱼类是水生食物链的重要环节,对水质变化很敏感,而鲤鱼全年易于获得,易于保存和驯养。本实验采用急性毒性试验和致突变试验来评价

NP23 菌液是否对生物安全性造成影响。运用鱼类急性毒性实验法能够观察鱼类在毒水环境中的变化,根据变化可以比较不同菌液浓度含毒性的高低。致突变试验是利用鱼类对环境致癌、致畸、致突变物质等诱变剂进行检测的一种方法,这种方法在美国、日本、欧盟的环保监测部门应用的比较多。水中的一切有害物质均会直接影响到鱼的造血器官,使细胞发生异常,鱼的红细胞是有核细胞,水中有害物阻碍鱼血液干细胞的正常分裂,引起染色体发生畸变断裂,造成许多断片残留于红细胞胞质内,在血液细胞分裂形成新细胞时,形成微核。微核试验是根据在细胞质内产生额外核小体的现象来判断化学物质诱发染色体异常作用的一种简便的体内试验方法,鱼吸收了水中致突变物质后,其外周血有核红细胞微核率会明显升高,可以用鱼的红细胞微核率指示水污染状况,评价水体致突变性污染。本文通过急性毒性试验和致突变试验证明高浓度 NP23 菌液没有引起鱼类在短时间内死亡和没有对鱼类遗传物质有诱变损伤作用。

目前,有关本课题溶藻细菌的研究还处在实验室研究阶段,在实验阶段的溶藻效果是不是能在实际水体中得到实现还是个未知数。如何得到具有实际应用价值的溶藻细菌以及如何把它们实际应用到水华和赤潮防治当中,尚需更深入的调查研究。

## 4 结论

(1) 影响 NP23 菌浓的 3 个重要因素是  $\text{KNO}_3$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 。

(2) 优化后溶藻菌 NP23 液体培养基: 葡萄糖 1%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.4%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03%,  $\text{KNO}_3$  0.6%,  $\text{NaCl}$  0.03%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.003%,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.001%, 酵母膏 0.04%,  $\text{CaCl}_2$  0.03%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.3%, pH 7.5。优化后菌浓达到  $10^{13}$  CFU/mL, 比优化前菌浓大 4 个数量级。

(3) 优化后溶藻菌 NP23 菌液, 可以稀释到  $10^6$ – $10^8$  CFU/mL 时再投入水体中。

(4) 通过急性毒性试验和致突变试验证明高浓度 NP23 菌液不会引起鱼类在短时间内死亡, 对鱼类遗传物质没有诱变损伤作用。

## 参 考 文 献

- [1] Hitzfeld BC, Höger SJ, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108(S1): 113–122.
- [2] 廖春丽, 杨闪闪, 许晨, 等. 一株溶藻细菌 NP23 的初步分离鉴别及其溶藻作用研究[J]. *生物技术通报*, 2012, 24(8): 163–167.
- [3] 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.
- [4] 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): 37–40.
- [5] 李维, 张灼. 人工制备菌剂净化富营养化湖泊的研究[J]. *四川师范大学学报: 自然科学版*, 2001, 24(6): 610–613.
- [6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [7] 汪辉, 刘兆普, 魏微, 等. 一株溶藻菌的分离、鉴定及其溶藻物质的研究[J]. *中国环境科学*, 2008, 28(5): 461–465.
- [8] 郑丽艳, 张衍俊, 常维山. 附红细胞体病瑞氏、姬姆萨、吖啶橙染色法及 PCR 检测法的比较研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(3): 243–245.
- [9] 刘爱华, 施立明. 鱼类血细胞的微核测定[J]. *动物学研究*, 2007, 6(1): 8–10.
- [10] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 220–227.