

doi:10.11835/j.issn.1674-4764.2018.05.015



# 溶藻菌 R1 的溶藻特性

董小娜, 陈泽慧, 毛林强, 王明新, 张文艺

(常州大学 环境与安全工程学院, 江苏 常州 213164)

**摘要:**以铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)为受试对象,考察了从太湖土著激荡鱼内脏中筛选的溶藻菌 R1 菌(*Lysinibacillus macroides*)的溶藻特性,通过 chl-a 测定、三维荧光技术,采用高温处置、酸碱处置、透析处置手段,HPLC 分离技术,考察了溶藻效果、溶藻产物、溶藻机制及溶藻活性物质。结果表明:菌株 R1 具有较强的溶藻特性,10 d 内 chl-a 含量从 205.11 mg/L 降至 35.61 mg/L,溶藻率达 82.64%;采用荧光强度表征溶藻率,10 d 溶藻率达 89.80%,与 chl-a 表征的溶藻率 82.64%相近;R1 溶藻活性物质是细菌分泌的胞外耐高温类物质,为小分子物质( $M_r < 500$  da),具有耐酸性碱性;荧光图谱 EMMs 结合平行因子 PARAFAC 模型谱分析显示溶藻过程中色氨酸增加,腐殖酸大量减少;主要溶藻产物为长波类色氨酸类物质,主要为细胞的胞内物质;推测溶藻活性物质疏水性氨基酸(hydrophobic acid);通过 HPLC 分离技术,从 R1 粗提液中分离出 1 馏分溶藻活性物质,成分还需要进一步的鉴定。

**关键词:**溶藻细菌;铜绿微囊藻;荧光图谱;平行因子模型;溶藻机制

**中图分类号:**X703;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-4764(2018)05-0117-07

## Algicidal characteristics of algicidal bacteria R1

Dong Xiaona, Chen Zehui, Mao Linqiang, Wang Mingxin, Zhang Wenyi

(College of Environmental & Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, P. R. China)

**Abstract:** *Microcystis aeruginosa* was used as the experimental subject to examine the algae-lysing characteristics of algicidal bacteria R1 (*Lysinibacillus macroides*), which was isolated and purified from Taihu fish innards, named Surf fish. The ability of algae-lysing, the degradation products, algae-lysing mechanism and active algicidal substances were studied with the measurement of chlorophyll a and the three dimensional fluorescence technology, the whole experimental process was carried out through high temperature treatment, acid and alkali treatment, dialysis treatment and HPLC separation technique. The results show that the strain R1 can remove *Microcystis aeruginosa* effectively. The contents of chl-a decrease from 205.11 mg/L to 35.61 mg/L in 10 days, with degradation rate of 82.64%. The degradation

**收稿日期:**2017-11-13

**基金项目:**国家自然科学基金(41571471),江苏省高校自然科学基金项目(16KJB610001),江苏省及常州市科技项目(BE2016653,CE20175009)

**作者简介:**董小娜(1992-),女,主要从事环境工程水处理研究,E-mail: 170856287@qq.com。

张文艺(通信作者),男,博士,教授,E-mail: zwy@cczu.edu.cn

**Received:**2017-11-13

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China(No. 41571471), University Natural Science Research Project in Jiangsu Province(No. 16KJB610001), Science and Technology Project of Jiangsu Province and Changzhou City(No. BE2016653, No. CE20175009)

**Author brief:** Dong Xiaona(1992-), main research interests: water treatment and environmental engineering, (E-mail): 170856287@qq.com.

Zhang Wenyi(corresponding author), PhD, professor, (E-mail): zwy@cczu.edu.cn.

rate is 89.8% measured by 3-D fluorescence technology in 10 d, which is similar to the result measured by measuring Chlorophyll-a. The fluorescence spectrometric analysis shows that the tryptophan increases and the humic acid decreases significantly. The main dissolved algal products are long-wave class tryptophan, which are mainly intracellular substances. The soluble alga may be hydrophobic acid. The active algae-lysing substances produced by R1 with molecular weight less than 500 da, are identified as bacteria secretion, could resist acid and be promoted in alkaline conditions. Active substance was separated from R1 crude extract by HPLC, and a further identification was necessary to be processed.

**Keywords:** algicidal bacteria; microcystis aeruginosa; fluorescence spectrum; PARAFAC mode; algicidal mechanism

每年夏秋季一些水体均发生有害藻华(HAB)暴发,给水环境生态带来极大威胁,探索行之有效的溶藻方法迫在眉睫。利用溶藻菌(algicidal bacteria)溶藻安全高效,具有广阔前景。近年来,学者们在溶藻菌的筛选、溶藻活性代谢产物分析、溶藻微生物的溶藻机理等方面的研究相当活跃,包括溶藻菌株的分离鉴定、溶藻性质的描述、溶藻方式的探讨、溶藻活性物质的分离与纯化<sup>[1-2]</sup>以及溶藻机理的研究等。尤其溶藻机理的研究更是深入到基因水平(分子水平):藻细胞的细胞水平<sup>[3-4]</sup>、功能酶和蛋白水平<sup>[5-6]</sup>等。近年来溶藻菌的筛选成果颇多<sup>[7]</sup>,已分离鉴定出来的菌属有粘细菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属等<sup>[8]</sup>,因藻类的暴发与溶藻菌的生长息息相关,这些溶藻菌多来自藻华频繁暴发地带。细菌溶藻方式主要有2种:直接溶藻与间接溶藻,见诸报道的溶藻菌多具有间接溶藻特性<sup>[9]</sup>。对溶藻能力的测定方法有:藻细胞数量的变化、chl-a含量的变化及其采用藻胆蛋白(某些藻类如蓝藻)的含量变化等。对溶藻机理的研究越来越多,众多分析方法被用于揭示溶藻产物溶藻机理,如:傅里叶红外光谱、荧光光谱、透射电镜等<sup>[10]</sup>。细菌分泌的物质(如氨基酸、抗生素、多肽等)<sup>[11]</sup>成分复杂,不同的溶藻菌分泌有效溶藻成分也不尽相同,这让溶藻活性物质的分离纯化非常困难,目前分离纯化出有效溶藻物质罕见报道。报道的溶藻活性物质的分离纯化主要有2种方法:硅胶柱层析<sup>[12]</sup>与高效液相色谱(HPLC)方法<sup>[13]</sup>。对活性物质的鉴定方法有液质联用(LC-MS)<sup>[13]</sup>、液相二级质谱(LC-MS-MS)等。但这还仅仅只是限于实验室研究阶段,在实践中直接利用的效果并不理想,其活性物质的分离纯化困难且收集率低,这使得生物菌剂投产与使用都难以实现。

采用三维荧光技术对藻胆蛋白的测定来表征溶藻效果,借助三维荧光光谱解析溶藻降解产物;通过对菌液进行热处置、破碎处置、酸碱处置、透析处置等手段研究了菌株 R1 *Lysinibacillus macroides* 的

溶藻机理;并通过 HPLC 技术初步分离提取了有效溶藻物质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料 藻种来源:铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)购自中国科学院武汉水生生物研究所。

菌种来源:从太湖激浪鱼内脏(鱼鳃、鱼肠等)中筛选出了1株溶藻效果较佳的菌株 R1,培养 2 d 后,菌落呈圆形,直径大约 1~2 mm,白色,表面光滑,微微凸起,边缘光滑,生长快速;革兰氏染色呈紫色,为阳性菌(如图 1),经生理生化及 16S rDNA 序列分析,其与 *Lysinibacillus macroides* 相似性最高,达 99.50%。

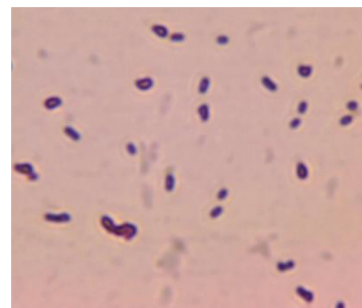


图 1 R1 革兰氏染色

Fig. 1 Gram's stain of R1

1.1.2 主要仪器和试剂 1)试剂:试剂均为中国产分析纯试剂。

2)仪器:离心机、超声波细胞粉碎机、高压蒸汽灭菌锅、倒置显微镜、岛津紫外分光光度计 UV-1800、Cary Eclipse 荧光分光光度计等。

1.1.3 培养基及其他试剂 LB 培养基<sup>[14]</sup>、铜绿微囊藻培养基 BG-11<sup>[15]</sup>

### 1.2 方法

1.2.1 菌株溶藻能力考察 为探索菌株 R1 的溶藻效果,取 10 mL 培养 24 h 的 R1 菌液接种到

100 mL铜绿微囊藻溶液中(初始 chl-a 含量为 205.11 mg/L),27 ℃、光暗比 12 h:12 h 周期下培养,每天定期手动摇晃 2~3 次,每隔 2 d 测得 chl-a 含量变化,通过式(1)<sup>[16]</sup>计算溶藻率并绘制曲线,同时做空白对照。

$$\eta = (C_c - C_t) / C_c \times 100\% \quad (1)$$

式中: $\eta$ 为溶藻率,%; $C_c$ 为初始 chl-a 含量,mg/L; $C_t$ 为后期 chl-a 含量,mg/L。

1.2.2 三维荧光考察溶藻效果 通过测定 chl-a 含量的方法考察溶藻效果较为繁琐,测定时间较长,且需要耗费许多提取物;使用显微镜观察藻细胞形态数量是最传统的浮游藻类分析方法,该方法工作量大,比较繁琐,且有时辨别不清<sup>[17]</sup>。铜绿微囊藻有很强的荧光特性的藻胆蛋白,是一种卟啉类色素蛋白,卟啉具有  $\pi$  电子结构<sup>[9]</sup>,在特定的波长照射下有很强的荧光反应。荧光光谱分析方法快速、准确、样品不需要特别处置、简单高效。铜绿微囊藻细胞具有如下荧光特性:藻密度与发射波长无关<sup>[18]</sup>,在低浓度下,荧光强度与溶液浓度成正比,可进行定量分析<sup>[18-20]</sup>。

为表征菌株溶藻过程,对菌藻混合液(参照 1.2.1)进行了三维荧光光谱图分析,取菌藻混合液,进行三维荧光扫描,发射波长(简称 Em)280~900 nm/280~550 nm,激发波长(简称 Ex)220~800 nm/220~400 nm;狭缝宽度为 5 nm;

每隔一段时间收集混合液测 Em 为 650 nm 的三维荧光光谱,通过式(2)<sup>[21]</sup>计算溶藻率并绘制曲线。

$$\eta = (F_c - F_t) / F_c \times 100\% \quad (2)$$

式中: $\eta$ 为溶藻率,%; $F_c$ 为藻胆蛋白初始光强,A.U; $F_t$ 为后期藻胆蛋白的光强,A.U。

1.2.3 三维荧光图谱 EEMs 结合平行因子分析考察溶藻产物 为表征菌株溶藻产物,对降解后的藻液进行了三维荧光光谱图分析,发射波长(简称 Em)280~550 nm,狭缝宽度为 2 nm;激发波长(简称 Ex)220~400 nm;狭缝宽度为 5 nm;同时,考察纯藻液及其菌液的荧光特性。EEMs 分析物质鉴定,主要采用目视鉴定,无法避免光谱重叠带来的误差且具有主观性。采用三维荧光图谱结合平行因子分析考察溶藻产物:1)数据预处理:并用 Delauay 三角形内插值法瑞利散射及拉曼散射。2)平行因子分析:平行因子算法是基于三线性分解理论,采用交替最小二乘原理,进行迭代的三维数阵分解算法。可以将一个由多个三维荧光光谱矩阵分解为 3 个方向的载荷矩阵。通过对半检验法(split-half analysis),残

差平方和的最小,及核一致性检验来确定模型的有效性。采用 MATLAB 软件中的 Nway toolbox 运行<sup>[22-24]</sup>。

1.2.4 菌株的溶藻特性 为探讨溶藻细菌的溶藻机制,将培养 24 h 溶藻细菌 R1 培养液进行如下处理:

1)离心过滤上清液(8 000 r/min,10 min;过 0.22  $\mu$ m 滤膜)、高热处理上清液(121 ℃,20 min)、菌体破碎液(取离心后的菌体沉淀超声波破碎)<sup>[16]</sup>。

2)酸碱化处置<sup>[12]</sup>:为考察 pH 对溶藻物质活性的影响,分别调节菌液 pH 为 4、7、10,处置 1 h 后调回中性,同时做不加菌的空白对照,接菌量为 10%(体积),采用多孔细胞培养板(biologix 24 孔板)进行溶藻实验,并采用显微镜计数法检查溶藻效果。

3)截留分子量<sup>[12]</sup>:为考察溶藻活性物质的分子大小,分别采用截留分子量为 100、500、1 000 da 的透析袋对培养 24 h 后的菌液进行透析 1 d,取透析袋中截留液于装载铜绿微囊藻溶液的 24 孔板中,检查溶藻效果。

1.2.5 溶藻活性物质的纯化与分离<sup>[13]</sup>

1)菌液前处理:接种菌株 R1 至 500 mL 的 LB 液体培养基中,30 ℃、135 r/min,培养 24 h;采用 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤;收集菌液并加入 4 倍体积的乙醇进行萃取,磁力搅拌 30 min,后静置 2 h;使用 0.22  $\mu$ m 的滤膜过滤;收集菌液 60 ℃旋转蒸发;无菌水重溶,4 ℃保存。

2)HPLC:通过液相色谱初步确定可能性溶藻物质。色谱条件为:色谱柱 wonda sil C18(4.6  $\times$  250 mm),流动相 A(甲醇):B(1%乙酸)为 1:9,检测波长为 UV200 nm。

3)为考察这几个物质是否含有溶藻活性物质,每隔一段时间收集 1 馏分,氮气吹干,超纯水重溶,并采用 24 孔板进行溶藻效果检验。对有溶藻活性的收集液,再次使用 HPLC 检查其纯度及其峰值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株 R1 的溶藻能力

将 R1 菌液到铜绿微囊藻溶液中(初始 chl-a 为 205.11 mg/L)进行实验,通过肉眼观察颜色变化及 chl-a 含量测定检验溶藻效果,如图 2。实验 4 d 后,肉眼可见混合液发生黄化现象,chl-a 含量不断减少,10 d 后剩余 chl-a 含量仅为 35.61 mg/L,降解率达 82.64%;同时观察到空白样颜色更加深绿,经测定 chl-a 含量,从初始 205.11 mg/L 增长到

324.56 mg/L。

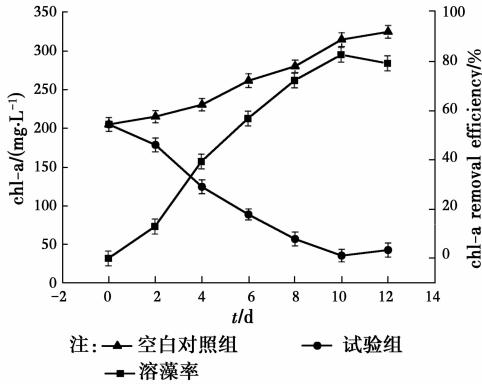


图 2 溶藻细菌 R1 对 chl-a 含量的影响  
Fig. 2 Effects of R1 on chlorophyll a

2.2 三维荧光分析 R1 溶藻能力

取 0、3、7、10、12 d 的菌藻混合液进行三维荧光光谱扫描并分析,如图 3。溶藻过程中藻胆蛋白荧光峰 Em/Ex 为 650 nm/630 nm,荧光光强不断减少。为表征其溶藻效果,通过固定 Em 为 650 nm,将得到的荧光光谱减去离子水的荧光光谱以去除瑞利散射的影响,将瑞利散射峰置零<sup>[18]</sup>,采用 oringin8.6 拟合得到光强与激发波长的关系图,如图 4。按照式 2)计算,10 d 溶藻率为达 89.80%,与通过 chl-a 表征的溶藻率 82.64%相近,可作为溶藻细菌溶藻效率的一种评价方法。

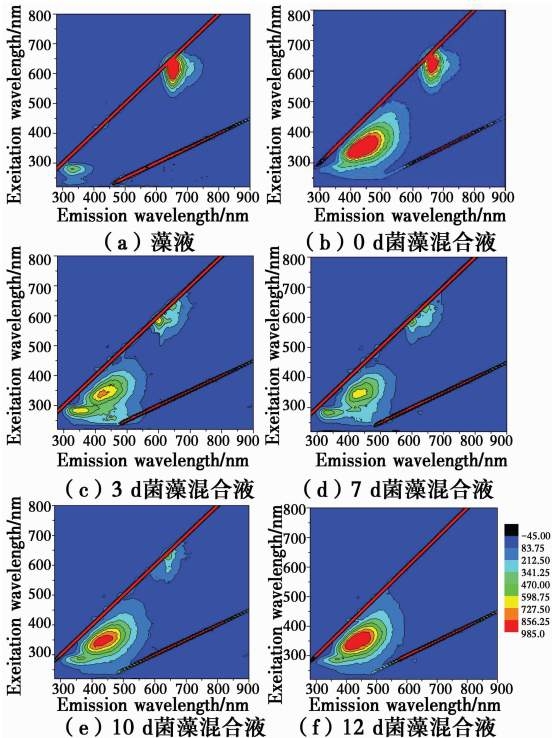


图 3 菌藻液的三维荧光图

Fig. 3 Three-dimensional fluorescence of algal and bacterium fluid

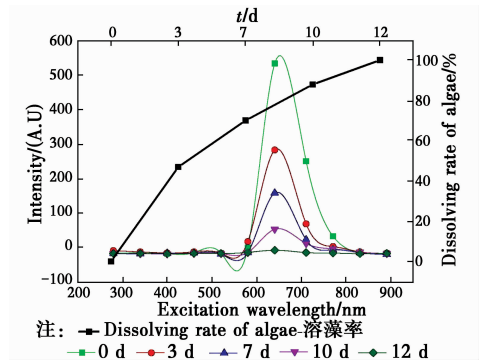


图 4 Em 650 nm 的激发光谱及溶藻效果图

Fig. 4 The excitation spectra at the transmitting wavelength of 650 nm and Dissolving rate of algae

2.3 菌株 R1 溶藻机制研究

1)由表 1 及图 5(1)看出:R1 菌原液、离心上清液、高温灭菌液都发生了明显的黄化现象,溶藻效果显著;菌体破碎液及菌体没有溶藻效果;可见,其溶藻物质并不是胞内物质,也不是菌株本身,而是细菌分泌的胞外物质,具有耐高温的特性,推测为非蛋白质类物质。

2)由表 2 及图 5(2)看出,经过不同处置的 R1 菌液都具有很强的溶藻效果,与空白对比,藻液均发生明显的黄化现象;显微镜计数结果见表 2,从表中可见,藻细胞数量都明显减少,由此可见,溶藻活性物质性质稳定,具有耐酸耐碱性。

3)经 100、500、1 000 da 的透析袋截留分子量后袋中截留液,显微镜计数结果见表 3,发现溶藻能力强弱顺序依次为 100 da>500 da>1 000 da,其中,1 000 da 溶藻活性很低,由此可见,细菌分泌的有效溶藻物质为小分子物质,分子量小于 500 da。

表 1 不同菌体处理方式对溶藻效果的影响

Table 1 Effect of different gloop treatment methods on algae-lysing efficiency (cell · mL<sup>-1</sup>)

空白	菌原液	高温处置	细胞破碎	离心上清	菌体
2.67 × 10 <sup>7</sup>	2.74 × 10 <sup>7</sup>	8.12 × 10 <sup>6</sup>	1.16 × 10 <sup>7</sup>	2.55 × 10 <sup>6</sup>	9.67 × 10 <sup>6</sup>

表 2 不同 pH 处置方式对溶藻效果的影响

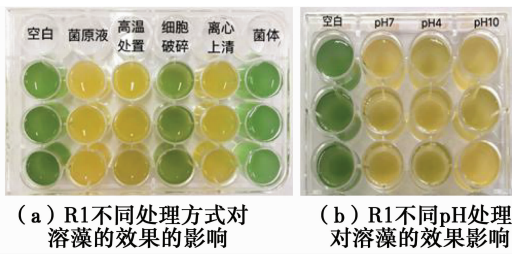
Table 2 Effect of different pH disposal methods on algae-lysing efficiency (cell · mL<sup>-1</sup>)

空白	pH 7	pH 4	pH 10
2.97 × 10 <sup>7</sup>	8.12 × 10 <sup>6</sup>	9.86 × 10 <sup>6</sup>	7.75 × 10 <sup>6</sup>

表 3 不同截留分子量对溶藻效果影响

Table 3 Effect of different molecular weight on algae-lysing efficiency (cell · mL<sup>-1</sup>)

空白	100	500	1 000
2.56 × 10 <sup>7</sup>	7.32 × 10 <sup>6</sup>	1.32 × 10 <sup>7</sup>	1.95 × 10 <sup>7</sup>



(a) R1不同处理方式对溶藻的效果影响 (b) R1不同pH处理对溶藻的效果影响

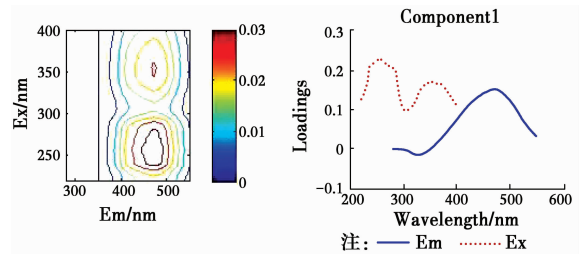
图 5 R1 菌液经不同处理对溶藻的效果影响

Fig. 5 The algae-lysing efficiency of R1 bacteria solution by different treatment methods

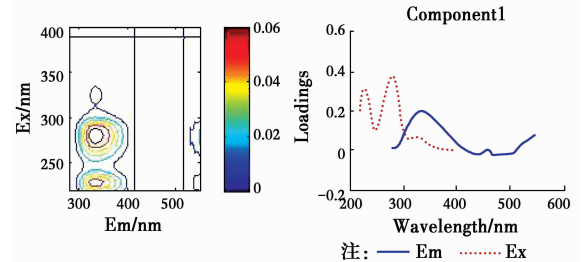
个激发峰和 1 个发射峰,主要体现了长波类腐殖质及色氨酸类物质,分析其溶藻过程中,长波类类色氨酸类物质增加,为主要溶藻产物。根据其成分可推测出,藻细胞死亡后,胞内的物质及细胞组分大量释放到混合液中。长波类类腐殖酸减少,根据其化学形成原理(由-COOH、-OH 基团的有机化合物合成的结果),其中可能含有迫使藻死亡的有效成分,结合其分子量及极性特征猜测可能为小分子的疏水性氨基酸(hydrophobic acid)。

### 2.4 三维荧光图谱结合平行因子模型分析 R1 溶藻产物

菌株 R1 溶藻过程中,Em/Ex 为 400~600 nm/250~450 nm 处出现了大面积的荧光反应,荧光光谱不成规则的圆形,成分复杂,如图 3。分别对铜绿微囊藻分泌物、菌液及其降解后的菌藻共培液液进行三维荧光光谱扫描,三维矩阵图谱见图 6,分别为藻细胞产生的溶解性代谢性产物(EOM)(Em/Ex 335 nm/280 nm)、R1 菌液的主要溶解性荧光组分(Em/Ex 335 nm/280 nm、Em/Ex 435~475 nm/350~380 nm、Em/Ex 475 nm/280 nm)及溶藻产物组分(Em/Ex 335 nm/280 nm、Em/Ex 335 nm/230 nm)。



(a) 混合液中主要减少物质



(b) 混合液中主要增加物质

图 7 PARAFAC 分析溶藻组分及其激发发射波长载荷

Fig. 7 Fluorescence components identified by the PARAFAC model and their excitation and emission wavelengths loading

### 2.5 溶藻活性物质的分离与纯化

溶藻活性物质的分离难度大,目前溶藻物质的分离纯化的报道目前还很少。本研究通过采用高效液相色谱(HPLC)技术分离提纯粗提液,扫描波长 200 nm 的色谱图,见图 8。图中具有多个物质峰,可见经前处理的菌液成分仍很复杂。每分钟收集 1 馏分,旋转蒸发,超纯水重溶,并采用 24 孔板进行溶藻效果检验。其中有 1 馏分具有溶藻效果,见如 9,其在既定条件下有个主要峰,保留时间分别为 6.005。结合荧光光谱分析,结合荧光光谱分析,其属于某种

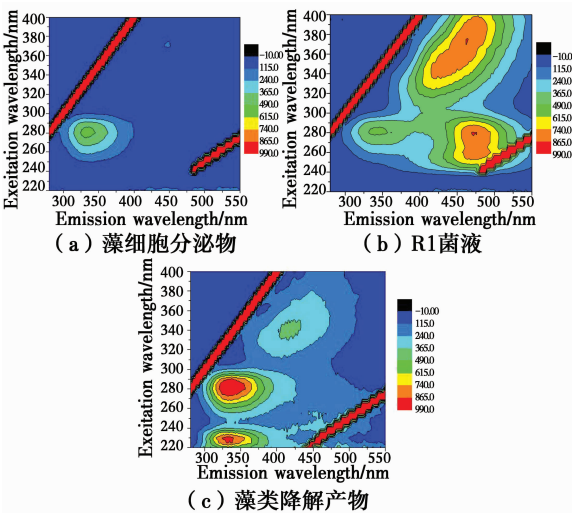


图 6 菌藻混合液的三维荧光光谱 EMMs

Fig. 6 Three-dimensional fluorescence spectra of algal mixture

运用 PARAFAC 模型结合 EMMs 图谱对溶藻产物的三维荧光矩阵进行解析,并通过残差和最小分析法及裂半分析法,识别出溶藻混合液共含有可分为 2 个类型。分别为:475 nm/250~350 nm;330 nm/220~270 nm,对应及类色氨酸类物质<sup>[22-24]</sup>。这 2 个成分的荧光图谱及激发发射波长载荷见图 7。从图中可见,2 个荧光成分的激发载荷图谱具有 2

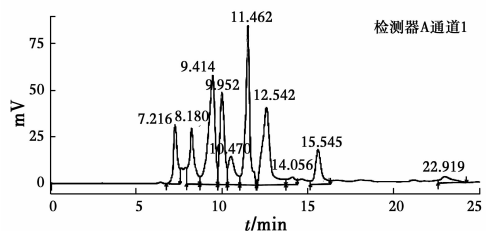


图 8 粗提液的 HPLC-200 nm 扫描图

Fig. 8 HPLC-200 nm scan of crude extract

疏水性酸类。由于 HPLC 分离效率低,分离量极少而且成本很高,分离的馏分中仍还有其他成分,其溶藻物质仍需进一步分离及鉴定。

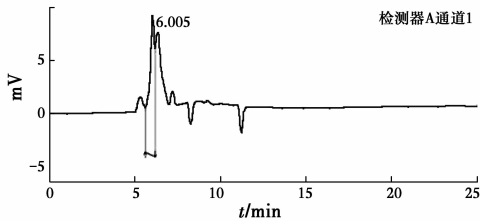


图9 溶藻活性物的 HPLC-200 nm 扫描图

Fig. 9 The HPLC-200 nm scan of the lytic active substance

### 3 结论

1) 从太湖土著激荡鱼内脏中筛选的 R1 菌 (*Lysinibacillus macroides*), 以铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 为受试对象, 10 d 内 chl-a 含量从 205.11 mg/L 降至 35.61 mg/L, 溶藻率达 82.64%。高温处置、酸碱处置、透析处置手段确定 R1 菌通过分泌耐高温的非蛋白类物质溶藻, 属于间接溶藻, 且该物质具有耐酸耐碱性, 其分子量小于 500 da。

2) 荧光光谱能够很好的表征铜绿微囊藻含量的变化, 其荧光物质为藻胆蛋白。溶藻过程中其强度不断减少, 可见藻细胞不断被破坏, 数量被不断减少。固定 Em 为 650 nm, 通过荧光激发光谱图对藻细胞密度进行定量分析。通过荧光光强表征溶藻效果, 避免了传统藻类测量过程的繁琐, 具有重要意义。荧光光谱分析表明溶藻活性物质可能为疏水性酸。溶藻过程中, 长波类氨基酸类物质增加, 为主要溶藻产物。根据其成分可推测出, 藻细胞死亡后, 胞内的物质及细胞组分大量释放到混合液中。长波类腐殖酸减少, 根据其成分(含有一COOH、—OH基团的有机化合物)猜测, 其中可能含有迫使藻死亡的有效成分, 可能为某种疏水性氨基酸(hydrophobic acid)。

3) 采用高效液相色谱(HPLC)技术分离提纯粗提液(扫描波长 200 nm), 分离结果表明, 从 R1 粗提液中分离出的 1 馏分溶藻活性物质, 其在既定条件下其出峰时间为 6~8 min 左右, 推测其为某种酸类物质, 但这需要进一步的分离和鉴定。

#### 参考文献:

- [1] JIA W, HUANG X, LI C. A preliminary study of the algicidal mechanism of bioactive metabolites of *Brevibacillus laterosporus* on *Oscillatoria* in prawn ponds [J]. The Scientific World Journal, 2014 (4):869149.
- [2] SONG B, RONG Y J, ZHAO M X, et al. Antifungal activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* anti-CA against *Candida albicans* isolated from clinic [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2013, 97(16):7141-7150.
- [3] WANG X L, GONG L Y, LIANG S K. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Harmful Algae, 2005, 4 (2):433-443.
- [4] SUN X X, CHOI J K, KIM E K. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 304 (1):35-49.
- [5] WANG H, BUTT L, ROOKS P, et al. Characterisation of algicidal bacterial exometabolites against the lipid-accumulating diatom *skeletonema*, sp [J]. Algal Research, 2016, 13:1-6.
- [6] WANG L, ZHENG B. Toxic effects of *fluoranthene* and copper on marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* [J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(11):1363-1372.
- [7] SUN H Y, ZHANG Y, CHEN H R, et al. Isolation and characterization of the marine algicidal bacterium *Pseudoalteromonas*, S1 against the harmful alga *Akashiwo sanguinea* [J]. Marine Biology, 2016, 163 (3):1-8.
- [8] GUAN C, GUO X, CAI G, et al. Novel algicidal evidence of a bacterium *Bacillus*, sp. LP-10 killing *Phaeocystis globosa*, a harmful algal bloom causing species [J]. Biological Control, 2014, 76(3):79-86.
- [9] CAI G, YANG X, LAI Q, et al. Lysing bloom-causing alga *Phaeocystis globosa* with microbial algicide: An efficient process that decreases the toxicity of algal exudates [J]. Scientific Reports, 2016, 6:20081.
- [10] 孔赞, 陈剑, 徐向阳, 等. Streptomyces sp. HJC-D1 溶藻过程产物光谱学特征及机理[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(1):167-171.
- KONG Y, CHEN J, XU X Y, et al. Spectra characteristic of degradation products and inhibition mechanism of *streptomyces* sp. HJC-D1 on *microcystis aeruginosa* [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2013, 33(1):167-171. (in Chinese)
- [11] 汪辉. 溶藻细菌对水华与赤潮微藻的抑制效应研究 [D]. 南京:南京农业大学, 2011.
- WANG H. Inhibiting effects of algae-lysing bacteria on water bloom and red tide [J]. Nanjing: Nanjing

- Agriculture University, 2011. (in Chinese)
- [12] YANG F, LI X Q, LI Y H, et al. Lysing activity of an indigenous algicidal bacterium sp. against spp. isolated from Lake Taihu [J]. *Environmental Technology*, 2013, 34(9-12):1421.
- [13] LU X, ZHOU B, XU L, et al. A marine algicidal *Thalassospira* and its active substance against the harmful algal bloom species *Karenia mikimotoi* [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 100(11):5131-5139.
- [14] LI H, AI H, KANG L, et al. Simultaneous microcystis algicidal and microcystin degrading capability by a single *acinetobacter* bacterial strain [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(21):11903-11911.
- [15] 母锐敏,贾静静,张盛至. 溶藻细菌 FS1 的溶藻效果与机制初探[J]. *微生物学杂志*, 2015, 35(6):16-20.  
MU R M, JIA J J, ZHANG S Z. Initial investigation on algicidal effect and mechanism of algae-lytic bacteria FS1 [J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 5(6):16-20. (in Chinese)
- [16] 刘征宇, 宁喜斌, 李文利, 等. 3 株太湖溶藻细菌的分离及溶藻特性的初步研究[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(2):59-64.  
LIU Z Y, NING X B, LI W L, et al. Isolation and primary study of three algicidal bacteria strains of Tai lake [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(2):59-64. (in Chinese)
- [17] 张翠. 我国主要湖泊浮游藻的荧光分析技术[D]. 山东青岛:中国海洋大学, 2012.  
ZHANG C. The fluorescence analytical technology for the planktonic algae in major lakes of china [D]. Qingdao, Shandong: Ocean University of China, 2012. (in Chinese)
- [18] 吕洪刚, 张锡辉, 龚纯英, 等. 藻类的三维荧光光谱辨别及算法研究[J]. *中国环境科学*, 2005, 25(5):581-584.  
LU H G, ZHANG X H, GONG C Y, et al. Studies on the algorithm and identification of three dimensional fluorescence spectroscopy of algae [J]. *China Environmental Science*, 2005, 25(5):581-584. (in Chinese)
- [19] 康红利. 荧光法测定水体中的蓝藻[D]. 石家庄:河北科技大学, 2015.  
KANG H L. Determination of *Cyanobacteria* in the water by Fluorecense [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2015. (in Chinese)
- [20] 刘璐. 微生物代谢产物的三维荧光光谱分析[J]. *化学工程与装备*, 2010, (2):144-146.  
LIU L. The analysis of microbial metabolites by three-dimensional fluorescence spectrometric [J]. *Chemical Engineering & Equipment*, 2010, (2):144-146. (in Chinese)
- [21] ZHANG B, CAI G, WANG H, et al. *Streptomyces alboblavus* RPS and Its novel and high algicidal activity against harmful algal bloom species *phaeocystis globosa* [J]. *Plos One*, 2014, 9(3):e92907.
- [22] 蔡文良, 许晓毅, 杜娟, 等. 嘉陵江重庆段 DOM 三维荧光光谱的平行因子分析[J]. *环境科学研究*, 2012, 25(3):276-281.  
CAI W L, XU X Y, DU X, et al. Parallel factor analysis with EEM on dissolved organic matter in chongqing section of Jialing River [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2012, 25(3):276-281. (in Chinese)
- [23] 韩宇超, 郭卫东. 九龙江河口有色溶解有机物的三维荧光光谱特征[J]. *环境科学学报*, 2009, 29(3):641-647.  
HAN Y C, GUO W D. The fluorescence excitation emission matrix spectroscopy of chromophoric dissolved organic matter in the Jiulong River Estuary [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(3):641-647. (in Chinese)
- [24] 刘笑菡, 张运林, 殷燕, 等. 三维荧光光谱及平行因子分析法在 CDOM 研究中的应用[J]. *海洋湖沼通报*, 2012(3):133-145.  
LIU X H, ZHANG Y L, YIN Y, et al. Application of three-dimensional fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis in CDOM study [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2012(3):133-145. (in Chinese)

(编辑 胡玲)