

溶藻菌发酵液及其溶藻产物的生物急性毒性试验

孔赞¹, 朱亮¹, 徐向阳^{1, 2*}, 戚韩英¹, 陆慧锋¹

1. 浙江大学环境工程系, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江大学-西澳大学水环境综合管理与保护联合研究中心, 浙江 杭州 310058

摘要: 应用发光细菌(*Photobacterium phosphoreum*)急性毒性试验, 研究了溶藻菌(*Streptomyces* sp. HJC-D1)发酵液及其对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)抑制产物的生物急性毒性。结果表明, 溶藻菌发酵液本身对发光细菌具有一定的低毒性, 发酵 3~5 d 时其相对发光度为 $(67.59\% \pm 3.11\%) \sim (72.35\% \pm 2.76\%)$; 体积分数 5% 的溶藻菌发酵液可有效抑制初始质量浓度高达 $(0.148 3 \pm 0.003 2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铜绿微囊藻生长, 其抑藻率达 85% 以上, 且藻液毒性明显低于对照组; 以微囊藻毒素为主要溶藻产物进行毒性试验发现, 其半抑制质量浓度为 $1 096.92 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 水体藻毒素质量浓度低于 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时其生物毒性较低。

关键词: 溶藻菌; 铜绿微囊藻; 溶藻产物; 生物急性毒性; 藻毒素

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-5906 (2012) 05-0913-06

据调查, 我国城镇饮用水多取自湖泊、水库, 但由于水环境污染日益加剧以及水源地保护力度不够, 导致湖库水体富营养化严重, 其中水源地营养化带来的危害极为严峻^[1]。目前, 成熟的环境水体控藻技术大多采用化学法, 因其运行成本高、二次污染风险大, 实际应用存在诸多问题。生物控藻则具有环境友好型、专一性强、成本较低等优点, 已成为近年来水环境修复领域的研究重点之一, 并将其用于水华和赤潮防治^[2-4]。已有研究报道, 病毒、细菌及真菌等均能够有效抑制蓝藻水华的爆发^[3], 但有关溶藻机理及溶藻产物毒理学研究不多。

课题组前期从杭州某富营养自然水体分离获得一株溶藻菌 *Streptomyces* sp. HJC-D1, 其发酵液对铜绿微囊藻具有明显抑制作用。鉴于饮用水安全是全世界一直以来关注的焦点, 结合已在工业废水^[5-10]、受污染自然水体^[11-16]等处应用的发光细菌法, 以产毒藻株铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)为对象, 研究了溶藻菌(*Streptomyces* sp. HJC-D1)发酵液及其对铜绿微囊藻抑制产物的生物急性毒性以期开发湖库富营养化和饮用水安全保障新技术提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

溶藻菌(*Streptomyces* sp. HJC-D1)由本实验室分离并保藏; 铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)-905 购于中国科学院水生生物研究所藻种保藏中心, 经活化后于光照强度 2 000 lux、光暗比 14:10, 25 °C 条件下培养; 明亮发光杆菌

(*Photobacterium phosphoreum*)T₃ 变种购于中国科学院南京土壤研究所。

1.1.2 培养基

放线菌用高氏一号培养基^[17]; 铜绿微囊藻用培养基(BG₁₁), 配方由中国科学院水生生物研究所提供; 发光细菌菌液制备方法参见文献^[7]。

1.1.3 微囊藻毒素(MC-LR)

MC-LR 标准样品购于瑞典 Alexis 公司(分子式 C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂, 分子量 995.12 g, 纯度>95%)。标准样品 200 μg 用超纯水定容至 100 mL, -20 °C 保存; 用前分别稀释至相应质量浓度;

1.1.4 其他试剂

硫酸铜购于上海振欣试剂厂(分析纯)。

1.2 仪器

DXY-2 型生物毒性(污染)测试仪(中国科学院南京土壤所); YXQ-LS-S II 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司); UV-2401 PC 型紫外可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司)。

1.3 试验方案

1.3.1 溶藻菌培养及其发酵液制备

采用高氏一号培养基, 28 °C 培养 3~4 d; 发酵液制备采用液体培养基, 150 r·min⁻¹ 摇床培养 4 d 后静置取上清液备用。

1.3.2 不同发酵时间的菌液急性毒性试验

分别取不同发酵时间(1~6 d)的发酵液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 用 3% NaCl 稀释配制成不同质量浓度梯度, 每个质量浓度设 3 组平行, 以 3% NaCl 作为空白对照。

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAJ08B01; 2012BAJ25B07); 浙江省教育厅科研项目(Y200909172)

作者简介: 孔赞(1983 年生), 男, 博士研究生, 主要从事环境污染生物修复研究。

*责任作者, 教授, E-mail: ky020241@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-03-12

1.3.3 不同发酵液投加比例对溶藻产物的急性毒性试验

取一定质量浓度处于对数生长期的铜绿微囊藻液 5 mL 加入装有 90 mL BG₁₁ 培养基的 250 mL 三角瓶中, 分别添加培养 4 d 的溶藻菌发酵液 1、3、5 和 10 mL, 对照组加入 10 mL 无菌水, 最后全部取无菌水补足总体积至 100 mL, 每组设 3 个平行, 置于光照培养箱内培养 5 d (培养条件见 1.1.1 节)。期间, 每隔 24 h 取样测定叶绿素 a 质量浓度及培养液急性毒性;

1.3.4 不同初始藻液质量浓度的溶藻产物急性毒性试验

分别取一定质量浓度处于对数生长期的铜绿微囊藻液 1、3 和 5 mL, 加入装有 90 mL BG₁₁ 培养基的 250 mL 三角瓶中, 投加培养 4 d 的溶藻菌发酵液 5 mL, 对照组加入 10 mL 无菌水, 最后全部用无菌水补足至总体积 100 mL, 每组设 3 个平行, 置于光照培养箱内培养 5 d (培养条件见 1.1.1 节)。期间, 每隔 24 h 取样测定叶绿素 a 质量浓度及培养液急性毒性;

1.3.5 铜离子抑藻及其产物急性毒性试验

取一定质量浓度处于对数生长期的铜绿微囊藻液 5 mL, 加入装有 90 mL BG₁₁ 培养基的 250 mL 三角瓶中, 分别添加 100 mg·L⁻¹ 硫酸铜溶液各 0.5、1.0 和 2.0 mL, 以无菌水和发酵液 (5 mL) 设置 2 组对照, 最后全部用无菌水补足至总体积 100 mL, 每组设 3 个平行, 置于光照培养箱内培养 5 d (培养条件见 1.1.1 节)。期间, 每隔 24 h 取样测定叶绿素 a 质量浓度及培养液急性毒性;

1.4 检测方法

1.4.1 叶绿素 a 质量浓度测定^[18]

采用丙酮提取法测定, 叶绿素 a 抑制率计算公式如下:

$$I = \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

其中, I 为叶绿素 a 抑制率; C_0 和 C_t 分别为 t d 时对照组和实验组中叶绿素 a 质量浓度。

1.4.2 发光细菌急性毒性测定

待测水样经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 用 3% NaCl 稀释配制制成 5 个质量浓度梯度, 每个质量浓度设 3 组平行, 以 3% NaCl 作为空白对照; 取 10 μL 试验菌剂于各玻璃管中, 振荡混匀, 15 min 后用生物毒性测试仪测定发光强度; 利用空白对照发光亮度的平均值 LU_0 和各质量浓度组的发光亮度平均值 LU , 计算发光杆菌的相对发光亮度 RLU, 即:

$$RLU = \frac{LU}{LU_0} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 不同发酵时间的菌液急性毒性试验

不同培养时间的溶藻菌对铜绿微囊藻的抑制试验发现, 溶藻菌株 *Streptomyces* sp. HJC-D1 在 28 °C、150 r·min⁻¹ 条件下分别培养 1 至 6 d, 其发酵液对铜绿微囊藻均有抑制作用, 其中发酵 4 d 的菌液抑藻效果最佳。在此基础上, 研究了不同培养时间的溶藻菌发酵液的发光细菌急性毒性变化, 具体见图 1。结果表明, 不同发酵时间的溶藻菌发酵液对发光细菌均有一定毒性, 发酵 1~2 d 的菌液其相对发光度为 (58.72%±3.15%)~(62.13%±1.88%); 发酵 3~5 d 的菌液毒性较低, 其相对发光度为 (67.59%±3.11%)~(72.35%±2.76%); 发酵 6 d 后菌液毒性反而有所增加, 其相对发光度降至 (51.36%±2.37%)。可见, 溶藻菌发酵液的生物急性毒性随发酵时间变化较为明显, 以发酵时间 4 d 的菌液急性毒性最低。

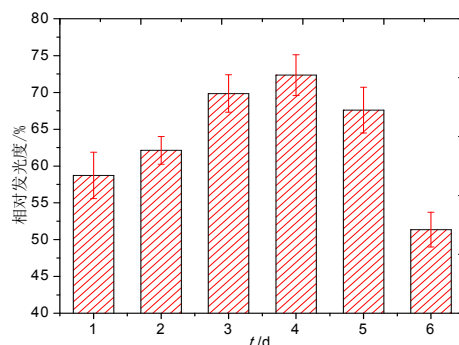


图 1 不同发酵时间对菌液急性毒性的影响

Fig.1 Effect of fermentation time on the acute toxicity of inocula

2.2 不同发酵液投加比例对抑藻产物急性毒性的影响

以未添加发酵液的铜绿微囊藻液为对照, 考察了不同发酵液投加比例对铜绿微囊藻的抑制作用及其产物生物急性毒性。由图 2a 可见, 随着菌液投加量的增加, 铜绿微囊藻的生长(以叶绿素 a 质量浓度为表征指标)受抑制程度加剧; 发酵液投加体积比小于 3% 时, 处理过程体系藻细胞叶绿素 a 质量浓度变化不明显, 抑藻率仅为 (4.03%±0.58%); 当发酵液投加体积比大于 3% 时, 藻类生长受到明显抑制, 不同质量浓度处理组的抑藻率分别为 (68.49%±1.84%)、(86.84%±2.19%) 和 (91.66%±1.79%)。分析溶藻产物的生物急性毒性发现, 随着溶藻菌发酵液投加比例的

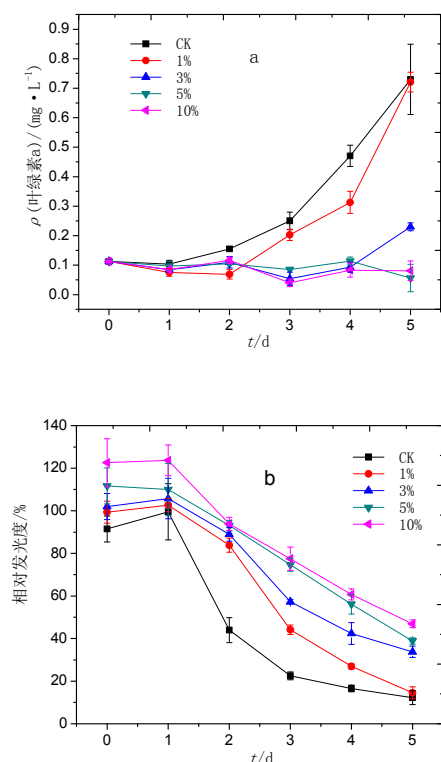


图2 发酵液投加比例对溶藻产物急性毒性的影响
(a. 体系叶绿素 a 质量浓度; b. 溶藻产物急性毒性)

Fig.2 Effect of the dosage of fermentation broth on the acute toxicity of algae-lying products

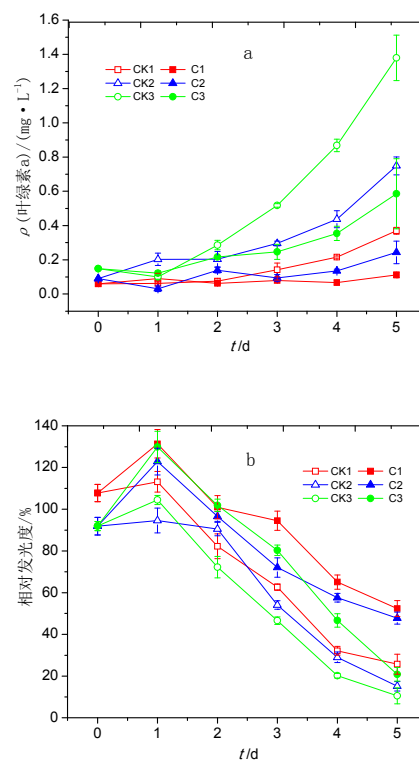


图3 初始藻液质量浓度对溶藻产物急性毒性的影响
(a. 体系叶绿素 a 质量浓度; b. 溶藻产物急性毒性)

Fig.3 Effect of the initial *Microcystis aeruginosa* concentration on the acute toxicity of algae-lying products

增加, 溶藻产物对发光细菌的急性毒性随之降低, 即溶藻产物的急性毒性与藻细胞叶绿素 a 质量浓度呈正相关; 当菌液投加比例为体积分数 1% 时, 溶藻产物对发光细菌的抑制作用较弱; 菌液投加比例为体积分数 5% 时(图 2b), 其抑藻产物的相对发光度为 $(12.22\% \pm 3.28\%)$, 明显低于对照组的 $(46.93\% \pm 1.80\%)$, 表明藻细胞经溶藻菌处理后生成的溶藻产物对发光细菌的急性毒性较低。

2.3 初始藻液质量浓度对溶藻产物急性毒性的影响

为考察抑藻菌液对不同富营养程度水体的抑藻效果, 考察了体积分数为 5% 菌液投加比例下的不同铜绿微囊藻初始质量浓度, 分别为 (0.0595 ± 0.0029) , (0.0901 ± 0.0016) 和 (0.1483 ± 0.0032) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的抑藻性能及其产物毒性试验, 结果见图 3。由图 3a 可知, 溶藻菌发酵液对不同初始质量浓度的藻液均有明显抑制作用, 抑制效果随初始藻液质量浓度的增加而增加, 处理 3 d 后平均抑藻率分别为 $(44.09\% \pm 2.06\%)$ 、 $(68.04\% \pm 6.65\%)$ 和 $(52.33\% \pm 8.44\%)$, 处理 5 d 后平均抑藻率进一步增至 $(69.82\% \pm 4.45\%)$ 、 $(67.49\% \pm 8.78\%)$ 和 $(57.53\% \pm 14.87\%)$ 。由图 3b 可知, 不同初始藻液质量浓度下

处理组与对照组之间的发光强度差异显著(95%置信区间, 数据未显示), 处理 5 d 后各处理组的体系发光强度分别为 $(52.39\% \pm 3.80\%)$ 、 $(47.78\% \pm 2.90\%)$ 和 $(20.84\% \pm 3.24\%)$, 而对照组仅为 $(25.7\% \pm 4.84\%)$ 、 $(15.11\% \pm 2.20\%)$ 和 $(10.56\% \pm 3.80\%)$, 表明菌液溶藻后其产物的生物毒性不大。

2.4 铜离子抑藻及其产物急性毒性比较试验

选用目前常用的铜离子抑藻法为对比, 研究了不同质量浓度 Cu^{2+} (以硫酸铜计) 和溶藻菌发酵液的抑藻效果及溶藻产物生物急性毒性。从图 3a 和 4a 可见, Cu^{2+} 的抑藻效果要优于溶藻菌发酵液, 反应 4 d 后不同质量浓度 Cu^{2+} 处理组的平均抑藻率在 $(82.10\% \pm 4.08\%)$ 至 $(90.52\% \pm 2.02\%)$ 。图 4b 是溶藻产物的相对发光度在 0~6 d 内的变化趋势, 可以看出其溶藻产物的生物急性毒性变化与藻细胞叶绿素 a 质量浓度的变化趋势相反, 处理组的相对发光度分别为 $(46.45\% \pm 3.89\%)$ 、 $(120.29\% \pm 4.29\%)$ 、 $(124.02\% \pm 5.11\%)$ 和 $(125.47\% \pm 4.88\%)$, 明显高于对照组的 $(22.61\% \pm 2.22\%)$, 这与溶藻菌抑藻结果相一致。表明藻细胞经溶藻菌液或铜离子处理后产物的毒性较低, 其相对发光度随着藻细胞叶绿素 a 质量浓度的增加而减小。

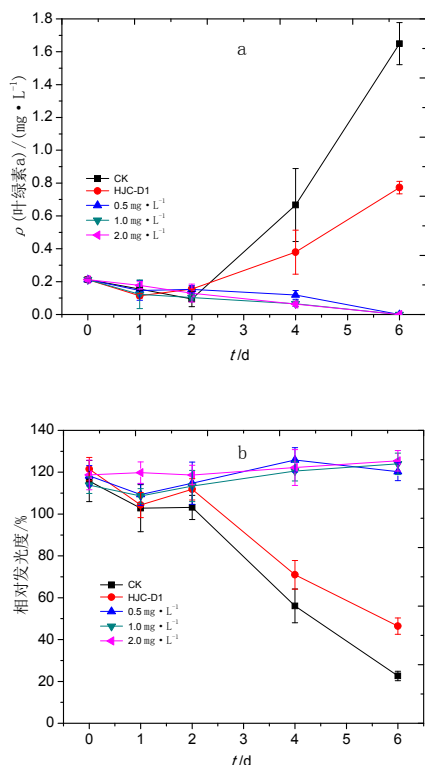


图4 Cu^{2+} 离子质量浓度对产物急性毒性的影响
(a. 体系叶绿素 *a* 质量浓度; b. 溶藻产物急性毒性)
Fig.4 Effect of Cu^{2+} concentration on the acute toxicity

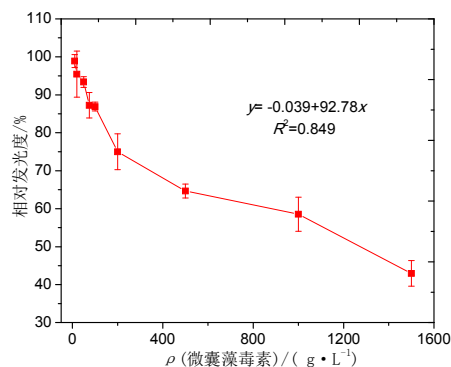


图5 微囊藻毒素对发光细菌的急性毒性影响
Fig.5 Effect of Microcystin-LR on the acute toxicity

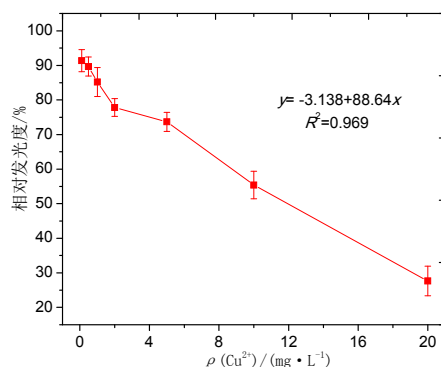


图6 铜离子对发光细菌急性毒性的影响
Fig.6 Effect of Cu^{2+} on the acute toxicity

3 讨论

3.1 溶藻产物的急性毒性解析

放线菌是生物活性物质的重要产生菌属,目前有关溶藻放线菌的研究大多集中于菌株分离鉴定与溶藻物质分析等方面^[3-4,19],而对抑藻物质或溶藻产物的生物毒理学研究较少。而众多研究表明^[20-21],导致水体富营养化的藻类为微囊藻属、鱼腥藻属、颤藻属、束丝藻属和节球藻属等,其在代谢过程或藻体破裂后会分泌藻毒素,严重威胁水体安全和人类健康。鉴于铜绿微囊藻降解后易产生藻毒素,本研究以微囊藻毒素(Microcystin-LR)典型的产物组分研究其对发光细菌的急性毒性,具体见图5。研究发现,标准藻毒素的发光细菌 EC_{50} 值约为 $1096.92 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;当藻毒素质量浓度低于 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其对发光细菌抑制作用不明显。Lawton 等^[22]利用发光细菌对 PCC7806 藻种中提纯的 MC-LR 进行了急性毒性研究,其 EC_{50} 为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,同样表明低质量浓度 MC-LR 对发光细菌无急性毒性。由于自然水体中藻毒素质量浓度普遍低于 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (核实),故本研究测得的生物毒性主要为铜绿微囊藻属及其溶藻产物的生物毒性。

3.2 Cu^{2+} 对急性毒性的影响

本研究发现,低质量浓度 Cu^{2+} 即具有较好的杀

藻效果,且杀藻后的产物对发光细菌的急性毒性也较对照组低(图 4a, 4b),同时 Cu^{2+} 质量浓度低于 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时其对发光细菌的急性毒性亦高于 $(77.82\% \pm 2.56\%)$ (图 6)。分析认为,铜绿微囊藻本身对发光细菌具有一定的抑制作用,故生物急性毒性与藻细胞叶绿素 *a* 质量浓度呈正相关;尽管铜离子的杀藻效果较好,但重金属的投加会对水生生态系统带来较大的副作用。因此,具有明显抑藻效果的微生物技术势必在富营养化湖库水体原位修复中具有较大的应用潜力^[23-24]。

已有关于溶藻微生物对铜绿微囊藻的研究报道将其溶藻作用方式^[3]分为直接溶藻(在溶藻过程中活菌直接进攻宿主,与藻细胞直接接触甚至侵入藻细胞内,从而溶藻)和间接溶藻(活菌通过分泌某种代谢产物,溶解藻类或者通过营养竞争从而抑制藻类生长)两大类。其中,多数溶藻菌是通过间接溶藻方式抑制藻类生长,其分泌的杀藻物质主要有蛋白质、氨基酸和多肽类、抗生素、含氮化合物及其它一些未确定物质^[3,19]。由于溶藻菌分泌物属于微生物次生代谢物质,其在自然水体中能进一步被水

生系统中其他微生物所利用, 因此导致水体二次污染的风险较小。此外, 尽管溶藻菌发酵液添加比例为体积分数 5% 时其对 $(0.112\ 5 \pm 0.008\ 5)\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的铜绿微囊藻液抑藻率可达 85% 以上, 且溶藻产物的生物急性毒性明显低于对照组, 但藻体破裂后释放的藻毒素仍会对生态系统构成一定威胁, 因此关于溶藻产物中藻毒素的去除的研究有待进一步开展。

4 结论

(1) 溶藻菌发酵液对发光细菌具有一定的急性毒性, 发酵 3~5 d 时其相对发光度为 $(67.59\% \pm 3.11\%) \sim (72.35\% \pm 2.76\%)$;

(2) 在铜绿微囊藻初始质量浓度高达 $(0.148\ 3 \pm 0.003\ 2)\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 体积分数 5% 溶藻菌发酵液的抑藻率达 85% 以上; 随着溶藻菌液投加比例的增加, 体系藻细胞叶绿素 a 质量浓度逐渐降低, 溶藻产物对发光细菌的急性毒性亦随之降低; 分析认为, 溶藻产物对发光细菌无明显急性毒性, 而藻体本身对发光细菌具有一定的急性毒性;

(3) 以微囊藻毒素为主要溶藻产物的毒性试验结果表明, 其半抑制质量浓度为 $1\ 096.92\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 当藻毒素质量浓度低于 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时其对发光细菌基本无抑制作用。

参考文献:

- [1] 中国环境状况公报[R]. 国家环境保护部, 2010. <http://jcs.mep.gov.cn/hjzl/zkgb/> State Environmental Protection Administration of China, The State of Environment in China in 2010. <http://jcs.mep.gov.cn/hjzl/zkgb/>
- [2] 晋利, 刘兆普, 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.
JIN Li, LIU Zhaopu, ZHAO Gengmao, et al. Effects of an algae-lysing bacterium on the growth of *Microcystis aeruginos* and its identification[J]. China Environmental Science, 2010, 30(2): 222-227.
- [3] LOVEJOY C, BOWMAN J P, Hallegraeff GM. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(8): 2806-2813.
- [4] SHI SY, LIU YD, SHEN YW, et al. Lysis of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacterium) by a bacterium *Bacillus cereus*[J]. Biological Control, 2006, 39(3): 345-351.
- [5] PARVEZ S, VENKATARAMAN C, MUKHERJI S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals[J]. Environmental International, 2006, 32(2): 265-268.
- [6] 陈婷婷, 唐崇俭, 郑平. 制药废水厌氧氨氧化脱氮性能与毒性机理的研究[J]. 中国环境科学, 2010, 30(4): 504-509.
CHEN Tingting, TANG Chongjian, ZHENG Ping. Nitrogen removal performance of anammox process and toxic mechanism of pharmaceutical wastewater[J]. China Environmental Science, 2010, 30(4): 504-509.
- [7] 陆慧锋, 赖玢洁, 蔡靖, 等. 同步脱氮除硫工艺基质及产物对发光细菌的急性毒性[J]. 环境科学学报, 2010, 30(5): 972-978.
LU Huifeng, LAI Binjie, CAI Jing, et al. Acute toxicity of the substrates and products in a simultaneous denitrification desulfurization process to *Photobacterium*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 30(5): 972-978.
- [8] HONG Y, CHEN Z, ZHANG B, et al. Isolation of *Photobacterium* sp. LuB-1 and its application in rapid assays for chemical toxicants in water[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(3): 308-312.
- [9] GARCIA M T, CAMPOS E, MARSAL A, et al. Biodegradability and toxicity of sulphonate-based surfactants in aerobic and anaerobic aquatic environments[J]. Water Research, 2009, 43(2): 295-302.
- [10] VETROVA E, ESIMBEKOVA E, REMMEL N, et al. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water[J]. Luminescence, 2007, 22: 206-214.
- [11] 塔春红, 王丽莎, 胡洪营, 等. 二氧化氯消毒前后污水毒性的变化及消毒条件的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(1): 124-128.
TA Chunhong, WANG Lisha, HU Hongying, et al. Change in genotoxicity of wastewater after chlorine dioxide disinfection and the influence of disinfection conditions[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(1): 124-128.
- [12] 白晓慧, 马良, 张晓红, 等. 黄浦江水源及净水过程中水质的生物急性毒性分析[J]. 中国给水排水, 2008, 24(1): 1-4.
BAI Xiaohui, MA Liang, ZHANG Xiaohong, et al. Analysis of biological acute toxicity of water from Huangpu River and waterworks[J]. China Water and Wastewater, 2008, 24(1): 1-4.
- [13] 陈洪斌, 东刘成, 唐贤春. 受污染水源水生物处理中微型后生动物的研究[J]. 中国环境科学, 2008, 28(12): 1105-1110.
CHEN Hongbin, DONG Liucheng, TANG Xianchun. Metazoans in polluted raw water biological treatment system[J]. China Environmental Science, 2008, 28(12): 1105-1110.
- [14] PEREGO P, FANARA L, ZILLI M, et al. Applications of Luminous Bacteria on Environmental Monitoring[J]. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2002, 16(2): 87-92.
- [15] KIVIRANTA J, SIVONENI K, NIEMEL SI, et al. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay[J]. Environmental Toxicology and Water Quality, 1991, 6(4): 423-436.
- [16] TARCZYNSKA M, NALECZ J G, ROMANOWSKA D Z, et al. Tests for the toxicity assessment of cyanobacterial bloom samples[J]. Environmental Toxicology, 2001, 16(5): 383-390.
- [17] 郑平. 环境微生物学实验指导[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2005.
ZHENG Ping. Laboratory Manual for Environmental Microbiology[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2005.
- [18] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水分析检测方法[M]. 4th ed. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
State Environmental Protection Administration of China. Standard Methods for Testing Water and Wastewater[M]. 4th Ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [19] 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.

- WANG Hui, LIU Zhaopu, WEI Wei, et al. Studies of separation and appraisal of an algae-lysing bacteria and its dissolved algae matter[J]. China Environmental Science, 2008, 28(5): 461-465.
- [20] SONG LR, CHEN W, PENG L, et al. Distribution and bioaccumulation of microcystins in water columns: a systematic investigation into the environmental fate and the risks associated with microcystins in Meiliang Bay, Lake Taihu[J]. Water Research, 2007, 41(13): 2853-2864.
- [21] KAGALOU I, PAPADIMITRIOU T, BACOPOULOS, V, et al. Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelio*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2008, 137(11/3): 185-195.
- [22] LAWTON L A, CAMPBELL D L, BEATTIE K A, et al. Use of a rapid bioluminescence assay for detecting cyanobacterial microcystin toxicity[J]. Letters in Applied Microbiology, 1990, 11(4): 205-207.
- [23] HULLEBUSCH E V, DELUCHAT V, CHAZAL P M, et al. Environmental impact of two successive chemical treatments in a small shallow eutrophied lake: Part II. Case of copper sulphate[J]. Environmental Pollution. 2002, 120: 627-634.
- [24] GARCIA-VILLADA L, RICO M, ALTAMIRANO M, et al. Occurrence of copper resistant mutants in the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*: characterisation and future implications in the use of copper sulphate as algacide[J]. Water Research, 2004, 38(8): 2207-2213.

Acute toxicity of the fermentation broth of algae-lysing bacteria and its products

KONG Yun¹, ZHU Liang¹, XU Xiangyang^{1, 2*}, QI Hanying¹, LU Huifeng¹

1. Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. ZJU-UWA Joint Centre in Integrated Water Management and Protection, Hangzhou 310058, China

Abstract: The acute toxicity of fermentation broth of algae-lysing bacteria *Streptomyces* sp. HJC-D1 and its products treating *Microcystis aeruginosa* was studied with *Photobacterium phosphoreum*. The results indicated that the fermentation broth of algae-lysing bacteria had certain biotoxicity via photobacteria tests, and the relative luminosity was at $(67.59\% \pm 3.11\%) - (72.35\% \pm 2.76\%)$ after 3~5 days' fermentation. The inhibitory efficiency of *M. aeruginosa* was above 85% at the initial concentration of $(0.1483 \pm 0.0032) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ by adding fermentation broth (5%, *V/V*), and it was obviously that the acute toxicity of the test groups was lower than the control groups. The toxicity tests with Microcystin-LR as the main algae-lysing product showed that, the EC_{50} value (half inhibition concentration for 15 min) of Microcystin-LR is $1096.92 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and there's no inhibited effect when the concentration of Microcystin-LR is lower than $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: algae-lysing bacteria; *Microcystis aeruginosa*; algae-lysing products; acute toxicity; Microcystin-LR