

# [研究报告] 苹果酵素对微囊藻的溶藻特征研究

2015-07-09 倪兆林、申元英等 酵道孝道



基于环保酵素在中国的普及，相信针对环保酵素的研究报告会越来越多，环保酵素造福人民群众的愿望实现指日可待。感恩广大环保酵素爱好者、推广者的付出，更感恩各界人士的支持与理解。酵道孝道会一如既往地普及环保酵素、健康养生而努力。

下面这个研究报告是针对治理河流富营养化的研究，转载分享给大家，为大家推广环保酵素助一臂之力。感恩大理学院作研究的师生、也感恩为我们提供资讯的王楠学长。

研究结论：该方法安全无毒，简单易做，溶解效率高，符合生态系统的规律，可以实现生态友好型控藻，将会是一种治理河流、湖泊富营养化的新型环保制剂。



## 苹果酵素对微囊藻的溶藻特征研究

倪兆林<sup>1</sup>, 申元英<sup>1,2</sup>, 王涛<sup>2</sup>, 艾志琼<sup>1</sup>, 杨冠英<sup>1</sup>, 袁芝琼<sup>1</sup>, 林丽佳<sup>1</sup>, 张义<sup>2</sup>

1.大理学院公共卫生学院, 云南 大理 671000; 2.大理学院基础医学院

**摘要:**目的 研究自制苹果酵素对微囊藻的溶解作用, 并探讨其溶藻机制。方法 在微囊藻液中加入不同体积 (0-3 ml)、不同稀释度 (0-10<sup>-5</sup> 倍) 及经不同处理 [原液、经 0.22 μm 滤膜抽滤 2 次、高温灭菌 (121 °C, 0.1 MPa 灭菌 20 min)、以 12 000 r/min 离心 (离心半径 3 cm) 15 min、0.25% 的胰蛋白酶处理 15 min] 的苹果酵素进行溶藻实验, 测定叶绿素 a 的含量并计算清除率。结果 随着加入苹果酵素量的增加, 叶绿素 a 的清除率先升高后下降, 在加入 0.6 ml 时除藻作用最强, 第 4 天的清除率达到最大, 为 94.48%; 随稀释倍数的增加, 叶绿素 a 的清除率先升高后下降, 稀释 10<sup>-1</sup> 倍时的清除率最强, 在第 4 天达最大, 为 95.27%; 经过不同处理的苹果酵素都能产生溶藻作用, 第 4 天原液、经 0.22 μm 滤膜抽滤 2 次、高温灭菌、以 12 000 r/min 离心 (离心半径 3 cm) 15 min、0.25% 的胰蛋白酶处理 15 min 的叶绿素 a 清除率分别为 81.40%, 84.36%, 80.18%, 79.52% 和 79.30%。结论 该苹果酵素具有溶解微囊藻的作用, 其溶藻机制为产生一种耐高温的非蛋白类物质间接作用溶藻。

**关键词:** 苹果酵素; 微囊藻; 溶藻机制

中图分类号: R123.3 文献标志码: A 文章编号: 1001-5914(2014)01-0057-03

### Research on algicidal characteristic of apple enzyme for lysis of *Microcystis*

NI Zhao-lin<sup>\*</sup>, SHEN Yuan-ying, WANG Tao, AI Zhi-qiong, YANG Guan-ying, YUAN Zhi-qiong, LIN Li-jia, ZHANG Yi

<sup>\*</sup>College of Public Health, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

Corresponding author: SHEN Yuan-ying, E-mail: yuanyingshen@163.com

**Abstract: Objective** To study the algicidal effect of homemade apple enzyme to *Microcystis*, and discuss the algicidal mechanism. **Methods** The content of chlorophyll-a and the clearance rate were determined on adding apple enzyme with the volume from 0 to 3 ml, the dilution of 0 to 10<sup>-5</sup> times, and different processing [the stoste, the stoste needs to be collated twice through the filter of 0.22 μm, high-temperature sterilization (121 °C, 0.1 MPa, 20 minutes), centrifugation of 15 minutes with 12 000 r/min (r=3 cm), and 0.25% trypsin treatment for 15 minutes in *Microcystis*]. **Results** With the increasing of apple enzyme, the clearance of chlorophyll-a increased and then decreased, and the function was maximum when added 0.6 ml apple enzyme into the fluid of *Microcystis*, the clearance of chlorophyll-a reached 94.475% at the fourth day. The apple enzyme was diluted with distilled water, and the clearance of chlorophyll-a increased and then decreased with the increasing dilution multiple, when it was diluted by 10<sup>-1</sup> times, the clearance of chlorophyll-a reached 95.27% at the fourth day. The clearance of these different treatments at the fourth day was as follows: 81.40% for stoste, 84.36% for twice filtration by 0.22 μm filter, 80.18% for high-temperature sterilization (121 °C, 0.1 MPa, 20 minutes), 79.52% for 15-minute centrifugation with 12 000 r/min (r=3 cm), 79.30% for 15-minute treatment with 0.25% trypsin. **Conclusion** The apple enzyme used in the study has effect on algicidal *Microcystis*, the algicidal mechanism is indirect action by producing a high temperature resistance of nonprotein substance.

**Key words:** Apple enzyme; *Microcystis*; Algicidal mechanism

水体的富营养化污染不仅破坏了水生生态系统的平衡, 而且产生有毒有害的藻类 (蓝藻、甲藻、硅藻、异弯藻等) 引起水华或赤潮, 释放有毒物质<sup>[1]</sup>, 对公众健康、牲畜和水源供给带来负面影响, 甚至严重危害生态安全<sup>[2]</sup>。因此, 寻找合理有效的水华藻类防治方法迫在眉睫。环保酵素技术是泰国乐素昆·普潘翁博士

经过 30 多年努力所研发的一种果皮蔬菜厨余酵素, 是对混合了糖和水的厨房鲜垃圾经过厌氧发酵后产生的棕色液体的通俗称法。环保酵素的产生过程并不使用任何化学合成物质, 在酿制过程中, 互相促进, 共同构成一个复杂而稳定的具有多元功能的酵素生态系统, 可抑制有害微生物 (尤其是病原微生物和腐败细菌) 的活动, 具有促进植物生长、净化水流等作用; 然而国内外尚未见环保酵素在湖泊富营养化中应用的文献报道。因此, 本研究初步探讨了苹果酵素对微囊藻的作用特征及其作用机制, 以期苹果酵素在环境治理中的应用提供理论依据。

基金项目: 国家科技重大专项 (ZX07105-004-001-002); 云南省教育厅科学研究基金 Q0120049; 2013 年度大理市科技局科研计划项目; 大理学院洱海保护研究专项课题 (KYRH201009)

作者简介: 倪兆林 (1987-), 男, 硕士研究生, 从事流行病学与卫生统计学研究。

通讯作者: 申元英, E-mail: yuanyingshen@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种及其培养条件 实验藻种为 2011 年 7 月大理洱海蓝藻暴发期间分离纯化。藻种经活化后,于 25 ℃、2 级光照、光暗比 12 h/12 h 条件下,采用藻通用 BG11 培养基在光照培养箱中预培养 3~7 d,备用。

1.1.2 苹果酵素的制备<sup>[2]</sup> 将红糖、苹果、水按 1 kg:3 kg:10 L 混合后发酵 5 个月,得到苹果酵素,备用。

1.1.3 仪器与试剂 LC-300 光照培养箱(中国广州康恒仪器有限公司),SW-CJ-2FD 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),JA1203N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司),YXQ-LS-50S11 立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),TGL-16G 菲恰尔台式离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司),Powerwave XS 连续波长酶标仪(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。丙酮(AR,云南滇滇药业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 叶绿素 a (Chla) 含量的测定<sup>[4-5]</sup> 每天定时取 1 ml 待测藻液,以 4 000 r/min 离心(离心半径为 3 cm) 10 min,弃去上清液,加入等体积 90% (V/V) 的丙酮,混合均匀,将混匀的液体于 4 ℃、黑暗条件下抽提 24 h,再以 4 000 r/min 离心(离心半径为 3 cm) 10 min,取上清液连续波长酶标仪分别测定 665、649 nm 处的吸光度(A)值,并计算叶绿素 a (μg/ml) 的含量(叶绿素 a 含量=13.7×A<sub>665</sub>-5.76×A<sub>649</sub>) ;以叶绿素 a 的清除率表征溶藻效果,叶绿素 a 的清除率=(初始溶液中叶绿素 a 含量-反应后溶液中叶绿素 a 含量)/初始时溶液中叶绿素 a 含量×100%。

1.2.2 加入不同体积的苹果酵素对微囊藻的溶解作用 分别取 30 ml 初始叶绿素 a 为 1.121 μg/ml 的微囊藻液于 100 ml 三角烧瓶中,再依次加入 0 (对照)、0.1、0.3、0.5、0.6、1、2、3 ml 的苹果酵素进行溶藻实验,培养条件同“1.1.1”,每天定时取样测定叶绿素 a 的含量变化,连续观察 4 d。每组做 3 个平行。

1.2.3 将苹果酵素稀释后对微囊藻的溶解作用 将苹果酵素用灭菌蒸馏水梯度稀释(0 (原液)、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>),分别取不同梯度的稀释液各 3 ml,分别加入 30 ml 初始叶绿素 a 为 1.121 μg/ml 的微囊藻液中进行溶藻实验,空白组加入 3 ml 蒸馏水,每个梯度设立 3 个平行,培养条件同“1.1.1”,每天定时取样测定叶绿素 a 的含量变化,连续观察 4 d。

1.2.4 苹果酵素的溶藻方式 分别取原液、经 0.22 μm 滤膜抽滤 2 次、高温灭菌(121 ℃、0.1 MPa 灭菌 20 min)、以 12 000 r/min 离心(离心半径为 3 cm) 15 min、0.25%胰蛋白酶处理 15 min 的苹果酵素 3 ml,分别加入 30 ml 初始叶绿素 a 为 1.121 μg/ml 的微囊藻液中进行溶藻实验,空白组加入 3 ml 蒸馏水,每组设立 3 个平行,培养条件同“1.1.1”,每天定时取样测定叶绿素 a 的含量,连续观察 4 d。

2 结果与讨论

2.1 加入不同体积的苹果酵素对微囊藻的溶解效果与对照组相比,随加入苹果酵素量的增加,叶绿素 a 的含量先下降后上升,尤其在加入 0.6 ml 时叶绿素 a 含量下降较大,且第 4 天叶绿素 a 的清除率最大(为 94.48%),而加入 0.1 ml 苹果酵素组的叶绿素 a 含量没有下降,说明苹果酵素在该浓度下无溶藻作用,见表 1。

表 1 加入不同体积苹果酵素对微囊藻的溶解作用结果 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

体积 (ml)	1 d		2 d		3 d		4 d	
	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)
0	1.122±0.001	-0.14	1.521±0.002	-35.68	1.828±0.007	-63.10	1.861±0.002	-66.06
0.1	1.079±0.006	3.72	1.648±0.013	-47.07	1.664±0.012	-48.48	1.631±0.002	-45.53
0.3	0.335±0.011	70.13	0.200±0.145	90.15	0.323±0.004	71.22	0.671±0.010	40.14
0.5	0.154±0.015	86.23	0.150±0.001	86.61	0.142±0.003	87.32	0.063±0.004	94.40
0.6	0.126±0.013	88.68	0.103±0.005	90.81	0.095±0.006	91.57	0.062±0.003	94.48
1	0.156±0.013	86.04	0.140±0.003	87.50	0.132±0.002	88.22	0.098±0.013	91.25
2	0.337±0.011	69.88	0.182±0.015	83.72	0.208±0.038	81.40	0.177±0.045	84.23
3	0.293±0.015	73.94	0.243±0.009	78.25	0.222±0.010	80.18	0.209±0.020	81.40

注:微囊藻液为 30 ml,溶液中叶绿素 a 的初始浓度为 1.121 μg/ml。

2.2 将苹果酵素稀释后对微囊藻的溶解效果 随着苹果酵素稀释度的增加,叶绿素 a 的含量先下降后升高,尤以稀释 10<sup>-1</sup> 倍的叶绿素 a 含量下降最大,到第 4 天苹果酵素的除藻率达到最大(为 95.27%)。这与有关溶藻细菌的溶藻作用报道结果<sup>[6-7]</sup>一致,稀释度对溶藻效果有影响。见表 2。

2.3 苹果酵素的溶藻方式 细菌的溶藻方式主要包括直接接触溶藻和间接接触溶藻;其中,间接接触溶藻又可释放特异性或非特异性的胞外物质抑制和溶解藻细胞,包括通过释放蛋白质、氨基酸、羟胺、含氮化合物、多肽类和抗生素等杀藻物质<sup>[8-9]</sup>。

本研究结果显示,加入不同处理的苹果酵素后,

与对照组相比,经 0.22 μm 滤膜抽滤 2 次、高温灭菌、以 12 000 r/min 离心(离心半径为 3 cm) 15 min、0.25% 胰蛋白酶处理 15 min 的藻液颜色变黄,几乎看不到绿色藻颗粒物质,叶绿素 a 含量下降。苹果酵素经过 0.22 μm 滤膜过滤和高速离心后仍然具有溶藻作用,

说明该苹果酵素产生了一种特殊物质间接作用于藻颗粒,而且经过高温处理和 0.25% 的胰蛋白酶处理后仍然能溶解藻颗粒。说明该苹果酵素产生溶藻作用的物质具有很强的热稳定性,且不属于蛋白质类。见表 3。

表 2 在 30 ml 微囊藻中加入不同稀释度的苹果酵素对微囊藻的溶解作用结果 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

梯度	1 d		2 d		3 d		4 d	
	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)
空白	1.122±0.001	-0.14	1.521±0.002	-35.68	1.828±0.007	-63.10	1.861±0.002	-66.06
0	0.293±0.015	73.94	0.243±0.009	78.25	0.222±0.010	80.18	0.209±0.020	81.40
10 <sup>-1</sup>	0.291±0.002	74.07	0.130±0.001	88.42	0.100±0.002	91.08	0.053±0.002	95.27
10 <sup>-2</sup>	0.843±0.012	24.77	1.106±0.007	1.33	1.635±0.011	-45.92	1.589±0.017	-41.79
10 <sup>-3</sup>	0.776±0.002	30.75	1.477±0.005	-31.82	1.762±0.006	-57.26	2.057±0.016	-83.56
10 <sup>-4</sup>	0.812±0.014	27.53	1.279±0.004	-14.12	1.348±0.023	-20.30	1.583±0.074	-41.28
10 <sup>-5</sup>	1.193±0.003	-6.45	1.483±0.018	-32.33	1.552±0.001	-38.51	1.919±0.002	-71.20

注:微囊藻藻液为 30 ml,溶液中叶绿素 a 的初始浓度为 1.121 μg/ml。

表 3 在 30 ml 微囊藻中加入不同处理的苹果酵素对微囊藻的溶解作用结果 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

处理方式	1 d		2 d		3 d		4 d	
	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)	叶绿素 a (μg/ml)	清除率 (%)
空白	1.122±0.001	-0.14	1.521±0.002	-35.68	1.828±0.007	-63.10	1.861±0.002	-66.06
原液	0.293±0.015	73.94	0.243±0.009	78.25	0.222±0.010	80.18	0.209±0.020	81.40
热处理	0.477±0.004	57.47	0.236±0.001	78.96	0.222±0.002	80.18	0.221±0.002	80.18
膜过滤	0.389±0.003	65.31	0.204±0.001	81.79	0.193±0.003	82.82	0.175±0.003	84.36
高速离心机	0.296±0.001	73.62	0.279±0.001	75.09	0.198±0.002	82.30	0.229±0.001	79.52
0.25%胰蛋白酶处理	0.343±0.002	69.37	0.195±0.002	82.62	0.240±0.010	78.59	0.232±0.001	79.30

注:微囊藻藻液为 30 ml,溶液中叶绿素 a 的初始浓度为 1.121 μg/ml。

### 3 小结

本研究制备了一种能溶解微囊藻的新型苹果酵素,其对微囊藻的作用方式为分泌一种非蛋白质类物质间接作用于藻细胞,在 30 ml 藻液中加入 0.6 ml 苹果酵素时能产生较强的溶藻作用,而且将苹果酵素稀释后 10<sup>-1</sup> 倍的梯度组显示了较强的溶藻作用。

该方法安全无毒,简单易做,溶解效率高,符合生态系统的规律,可以实现生态友好型控藻,将会是一种治理河流、湖泊富营养化的新型环保制剂。

### 参考文献

[1] Qian HF, Hu BL, Yu SQ, et al. The effects of hydrogen peroxide on the circadian rhythms of *Microcystis aeruginosa* [J]. PLoS One, 2012, 7: e33347.  
 [2] Anderson DM. Approaches to monitoring, control and management of

harmful algal blooms (HABs) [J]. Ocean Coast Manage, 2009, 52: 342.  
 [3] 水苏. 环保酵素自制全攻略 [J]. 中国保健营养, 2012 (7): 47-49.  
 [4] 艾琪. 溶藻细菌 770SH、802SH 的分离、鉴定及溶藻特性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008: 20-21.  
 [5] Bideh S, Lal CR. Potassium-induced inhibition of nitrogen and phosphorus metabolism as a strategy of controlling *Microcystis* blooms [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2007, 23: 317-322.  
 [6] 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 (6): 163-167.  
 [7] Kim JD, Kim JY, Park JK, Lee CG. Selective control of the protoecentrum minimum harmful algal blooms by a novel algal-lytic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* AFMB-008041 [J]. Marine Biotechnol, 2009, 11: 463-472.  
 [8] Jeong-li O, Min-Ju K, Ji-Young L, et al. Isolation and characterization of algicidal bacteria from *Coccolodinium polykrikoides* culture [J]. Biotechnol Bioproc Engineer, 2011, 16: 1124-1133.  
 [9] Wm C, Sheu FS, Sheu SS. A novel algicidal bacterium isolated from a saltpan [J]. Arch Microbiol, 2012, 194: 103-112.

收稿日期: 2013-11-21 责任编辑: 韩威



信息补充:

在《如何让游泳成为酵素浴》一文中提到，环保酵素可以“对6种细菌4种霉菌起作用”，更完整的说法应该是：“环保酵素可以杀灭多种细菌与霉菌，其中包括马来西亚大学的研究结论中的4种霉菌和6种细菌”。



环保酵素大学化验报告，发现它可以很有效的杀死四种霉菌如下；

- a) 白色念珠菌 (**Candida albicans**)
- b) 近平滑念珠菌 (**Candida parapsilosis**)
- c) 新型隐球菌 (**Cryptococcus neoformans**)
- d) 黑曲霉 (**Aspergillus brasiliensis**)

酵道孝道



**环保酵素也很有效的杀死六种细菌如下；**

- a) 大腸桿菌 (*Escherichia coli*)
- b) 克雷伯氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*)
- c) 綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa* )
- d) 鮑氏不動桿菌或鮑曼不動桿菌  
(*Acinetobacter baumannii* )
- e) 金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)
- f) 蠟樣芽孢桿菌 (*Bacillus cereus*)

酵道孝道

### 系统自动回复：

发送：制作与使用，系统会自动回复环保酵素的制作使用的文章

### 查看酵道孝道历史纪录的方法：

- 1、首先登录微信账号。
- 2、点击订阅号，选择“酵道孝道”公众号。
- 3、点击右上角的头像。
- 4、点击查看历史消息。
- 5、直接看到的是最新收到的微信，往下拉动即可看到历史信息。

【酵道孝道注重分享，所发布的文字及图片除原创外,其余均摘自网络、其他公众账号等平台。其版权归原作者及网站等平台所有，对原文作者深表敬意。如有版权异议 及其他任何问题

敬请及时告之，我们会立即删除或做其他妥善处理。另外本平台的一切原创内容，公益传播者无需授权，欢迎转载，**用作商业者请与我们联系方可使用。】**

---

---

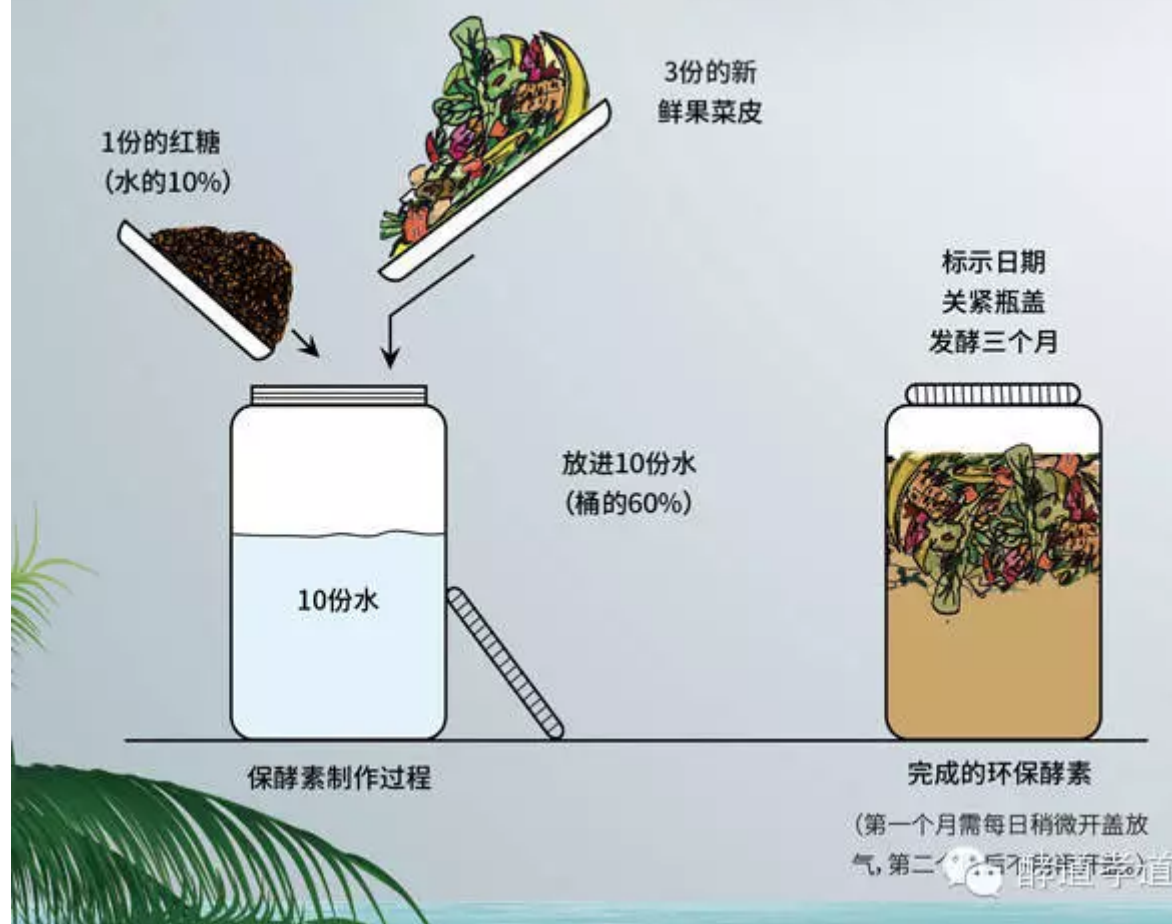
# 环保酵素的制作方法

## 环保酵素的配方

原料	比率	例子1	例子2	例子3
红糖	1	1KG	2KG	10KG
新鲜果蔬残余 (其他植物类残余)	3	3KG	6KG	30KG
水	10	10KG	20KG	100KG

1. 容器:有密封盖口的塑料容器
2. 材料:纯红糖、新鲜果蔬残余(其他植物类残余)、水
3. 比例:1:3:10

## 环保酵素制作过程



酵素公益 健康饮食 自然疗法 孝道文化



愿地球母亲健康美丽  
愿一切众生和谐圆满

网站: [www.xdtd.net](http://www.xdtd.net)

博客: <http://blog.sina.com.cn/u/3403272012>

微信公众号: 酵道孝道 xdtd-ai



酵道孝道