

杭小英,周冬仁,罗毅志,等.地衣芽孢杆菌的生长及对养殖水体中残饵的降解特性[J].江苏农业科学,2015,43(3):206-208.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.067

地衣芽孢杆菌的生长及对养殖水体中残饵的降解特性

杭小英^{1,2,3},周冬仁^{1,2,3},罗毅志^{1,2,3},施伟达^{1,2,3},叶雪平^{1,2,3},汤美锋¹

(1. 浙江省淡水水产研究所,浙江湖州 313000; 2. 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室,浙江湖州 313000;
3. 浙江省鱼类健康与营养重点实验室,浙江湖州 313000)

摘要:从自然养殖池塘中筛选获得了 1 株能有效抑制水产养殖常见致病菌的功能菌株 DSY002-2011,经鉴定为地衣芽孢杆菌。通过人工模拟养殖水体中残饵浓度,研究地衣芽孢杆菌对饲料中蛋白质、淀粉的降解特性。结果表明,分离株 DSY002-2011 在水温 28 ℃、pH 值 7 的 1% 饲料培养液中培养 24 h 后,对饲料蛋白质、淀粉的降解率分别达到 58.8%、62.9%,说明在养殖水体中添加地衣芽孢杆菌对水体残余饵料的降解是非常有效的。地衣芽孢杆菌降解蛋白质、淀粉的合适条件为 pH 值 6~7、盐度 0~1.0%。

关键词:地衣芽孢杆菌;降解;盐度;pH 值

中图分类号: X714 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0206-02

在高密度、集约化的水产养殖过程中,由于缺乏科学规范的养殖管理,养殖户一味追求高产量往往会过度投饵,导致养殖水体中积存了大量残余饵料,加上养殖动物的排泄物,使得养殖水体中的有机物浓度增加,水质环境恶化,从而诱发各类水产疾病。微生态制剂的调控技术已成为解决养殖水体污染病害问题的有效手段之一^[1-2]。以往研究表明,硝化细菌^[3]、光合细菌^[4]、芽孢杆菌^[5-6]等有益菌在减少病害、净化水质和促进动物生长等方面均有显著效果,但对降解水体残余饵料蛋白质、淀粉的功能研究报道较少。本试验用从自然养殖池塘筛选到的 1 株地衣芽孢杆菌 DSY002-2011,对其饵料蛋白质、淀粉的降解特性进行研究,获得其降解规律,为养殖水体的饲料残饵去除探求一种更为有效的办法,也为今后在水产养殖中科学使用地衣芽孢杆菌制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformi*) DSY002-2011 由笔者所在实验室分离、鉴定并保存。

1.1.2 饲料 市售鳖配合饲料,由优质白鱼粉、淀粉、酵母粉、维生素、矿物质等组成。

1.1.3 药品与试剂 菌株生长及试验所需药品与试剂:营养肉汤培养基、0.85% 无菌生理盐水、氯化钠、蒸馏水、氢氧化钠溶液、稀盐酸等。

淀粉测定所需药品与试剂:碘、碘化钾、硝酸钙 [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$]、可溶性淀粉。

蛋白质测定所需药品与试剂:硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、

硫酸钾、硫酸、20 g/L 硼酸溶液、混合指示液(1 份 1 g/L 甲基红乙醇溶液与 5 份 1 g/L 溴甲酚绿乙醇溶液临用时混合)、400 g/L 氢氧化钠溶液、0.050 0 mol/L 硫酸标准溶液。所有试剂均用不含氨的蒸馏水配制。

1.1.4 仪器 生化培养箱、振荡培养箱、离心机、分光光度计、凯氏定氮仪、高压灭菌锅、超净工作台、取样器、试管、培养皿等。

1.2 方法

1.2.1 1% 饲料培养基 鳖饲料 1.0 g,纯净水 100 mL,混合后溶解均匀。

1.2.2 菌株生长与养殖水体中饲料残饵降解的关系 将保存的地衣芽孢杆菌 DSY002-2011 在普通营养肉汤培养基上培养 24 h,接种于 pH 值为 7、灭菌后的 1% 鳖饲料培养基,28 ℃ 振荡培养。接种后在 0、24、48、72、96、120 h 时取样测定(从 24 h 时开始测定)、蛋白质含量、淀粉含量。

1.2.3 初始 pH 值对地衣芽孢杆菌降解饲料残饵能力的影响 配制 1% 鳖饲料培养基 5 份,pH 值分别调为 5、6、7、8、9,灭菌后接种地衣芽孢杆菌,28 ℃ 振荡培养,培养至 72 h 时取样测定蛋白质、淀粉含量。

1.2.4 盐度对地衣芽孢杆菌降解饲料残饵能力的影响 配制 pH 值为 7 的 1% 鳖饲料培养基 6 份,盐度分别为 0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%,灭菌后接种地衣芽孢杆菌,28 ℃ 振荡培养,培养至 72 h 时取样测定蛋白质、淀粉含量。

1.2.5 细菌计数及细菌蛋白氮测定 地衣芽孢杆菌 DSY002-2011 接种于普通营养肉汤中,28 ℃ 摇床培养 24 h。将细菌培养液于 4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用生理盐水反复吹打,重复以上步骤 3 次。将细菌悬液进行适当稀释,分别用血球计数板法(此方法可测得活菌和死菌的总量)和平板菌落计数法(此方法测得活菌数量即细菌生长量)进行计数,计算两者的比例。

细菌培养液润洗后于 10 000 r/min 离心 10 min,弃液体,平铺在滤纸上,37 ℃ 鼓风干燥 30 min,称质量,计算 1 g 细菌的数量(活菌和死菌的总量),并通过干燥恒重法(105 ℃)测定细菌水分含量,从而得出 1 g 细菌干物质的质量,再测定

收稿日期:2014-05-06

基金项目:国家星火计划(编号:2011GA700001);浙江省湖州市科技攻关计划(编号:2011GG12)。

作者简介:杭小英(1981—),女,浙江德清人,工程师,主要从事水产病害防治工作。E-mail:qingqing19811201@sina.com。

通信作者:叶雪平,推广研究员,主要从事水产病害防治工作。E-mail:yxp900@sina.com。

1 g 细菌干物质中的氮元素,采用半微量凯氏定氮法^[7]。

1.2.6 饲料蛋白质降解率的计算 地衣芽孢杆菌的生长并不会使培养液中氮总量发生变化,只是将饲料蛋白质转化成了细菌蛋白质,所以转化的饲料蛋白质可以根据地衣芽孢杆菌培养前后含量变化来换算。培养前的初始饲料蛋白质含量由半微量凯氏定氮法测定,氮换算为蛋白质的系数是 6.25。

饲料蛋白质降解率 = 细菌生长转化的饲料蛋白质含量 / 培养前饲料蛋白质含量 × 100%。

1.2.7 饲料淀粉降解率的测定 淀粉含量的测定采用碘显色法^[8]。饲料淀粉降解率 = (培养前淀粉浓度 - 培养后淀粉浓度) / 培养前淀粉浓度 × 100%。

2 结果与分析

2.1 细菌计数及细菌蛋白氮测定

平板计数法测得地衣芽孢杆菌活菌浓度为 9.8×10^{10} CFU/mL,血球计数板法测得 24 h 培养的地衣芽孢杆菌数量为 3.0×10^{11} CFU/mL,两者比例为 1 : 3.06。测得 1 g 地衣芽孢杆菌为 5.3×10^{11} 个,细菌菌体水分含量为 76%。半微量凯氏定氮法测得 1 g 地衣芽孢杆菌干物质中含氮量为 12.8%。测得 2 mL 模拟残饵培养基蛋白质含量为 0.010 2 g, 100 mL 培养瓶中饲料蛋白含量为 0.51 g。

2.2 地衣芽孢杆菌生长与水体中饲料残饵降解的关系

经半微量凯氏定氮法测定,1% 鳖饲料培养基中的初始饲料蛋白质含量为 5.1 mg/mL。在 pH 值为 7 的含 1% 鳖饲料培养基中,接种地衣芽孢杆菌后于 28 ℃ 振荡培养,表 1 结果表明,在培养液中,细菌数量迅速增加,并在 96 h 达到最大值;接种后 24 h 饲料蛋白质、淀粉降解率分别为 58.8%、62.9%;蛋白质降解率在 96 h 时达到最大值 74.5%,淀粉降解率在 72 h 时达到最大值 72.1%。由此说明,在培养液中地衣芽孢杆菌的生长与蛋白质、淀粉的降解具有同步的相关性。

表 1 细菌生长量与饲料蛋白质降解率的换算

| 培养时间 (h) | 细菌生长量 ($\times 10^8$ CFU/mL) | 细菌含量 (mg/mL) | 转化的饲料蛋白质含量 (mg/mL) | 蛋白质降解率 (%) | 淀粉含量 (mg/mL) | 淀粉降解率 (%) |
|----------|-------------------------------|--------------|--------------------|------------|--------------|-----------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.40 | 0 |
| 24 | 6.5 | 3.75 | 3.0 | 58.8 | 0.52 | 62.9 |
| 48 | 7.8 | 4.50 | 3.6 | 70.6 | 0.44 | 68.6 |
| 72 | 8.0 | 4.62 | 3.7 | 72.5 | 0.39 | 72.1 |
| 96 | 8.3 | 4.79 | 3.8 | 74.5 | 0.40 | 71.4 |
| 120 | 8.2 | 4.73 | 3.8 | 74.5 | 0.39 | 72.1 |

2.3 初始 pH 值对地衣芽孢杆菌降解饲料残饵能力的影响

图 1 结果表明,pH 值为 6~7 时,地衣芽孢杆菌对蛋白质和淀粉的降解效果比较好,在 pH 值为 7 时,蛋白质、淀粉降解率达到最大值,分别为 72.5%、72.1%。另外,pH 值为 5~9 条件下,地衣芽孢杆菌饲料蛋白质、淀粉降解率均接近或高于 60%,说明菌株降解饲料残饵能力受 pH 值影响较小。

2.4 盐度对地衣芽孢杆菌降解饲料残饵能力的影响

由图 2 可见,盐度为 0~2.0% 条件下,地衣芽孢杆菌的蛋白质降解率在 50.2%~72.5% 之间,淀粉降解率在 61.7%~72.1% 之间;盐度为 0 时,地衣芽孢杆菌的蛋白质、淀粉降解率均最高,随着盐度增加,蛋白质、淀粉降解率均逐渐下降;盐度超过 1.0% 后,蛋白质降解率下降更快。试验结

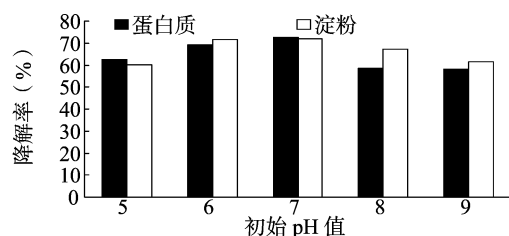


图 1 初始 pH 值对地衣芽孢杆菌降解蛋白质、淀粉能力的影响

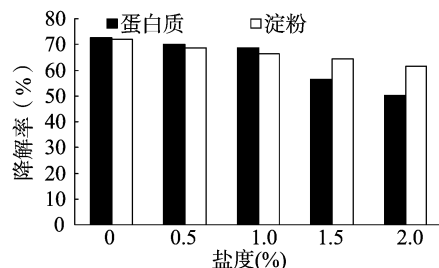


图 2 盐度对地衣芽孢杆菌降解蛋白质、淀粉能力的影响

果表明,在盐度为 0~1.0% 条件下,地衣芽孢杆菌对饲料蛋白质、淀粉的降解效果较好。

3 结论与讨论

高密度的养殖水体中,水质的污染主要来源于大量残余饵料、养殖动物的粪便以及浮游生物的尸体等^[9],这些有机物的主要成分是蛋白质和淀粉。这种水质污染情况会随着养殖期的发展越来越严重,尤其到养殖后期,成为各种病害频发的诱因。本试验从自然养殖池塘筛选到 1 株地衣芽孢杆菌 DSY002-2011,对其饲料蛋白质、淀粉的降解特性进行研究,结果表明,该菌株在水温 28 ℃、pH 值为 7 的 1% 饲料培养液中培养 24 h 后,对饲料蛋白质、淀粉的降解率分别达到 58.8%、62.9%,说明在养殖水体中添加地衣芽孢杆菌对水体残余饵料的降解是非常有效的。有研究报道,地衣芽孢杆菌能产生多种具有重要生物活性的胞外产物,如肽类或非肽类的抗菌物、小分子活性物质及多种胞外消化酶^[10],因此它可促进养殖水体的营养循环,从而净化水质^[11-13]。

在实际应用中,地衣芽孢杆菌的生长、产酶能力及胞外产物的活性均会受到水质环境因子的影响^[14],如温度、盐度和 pH 值等除了影响菌株的生长,也会影响菌株的酶活性^[15],从而影响菌株对饲料蛋白质、淀粉的降解能力。本试验中,较合适的降解条件为偏酸性至中性 (pH 值 6~7)、适温 (25~30 ℃)、低盐浓度 (0~1.0%),这与谢航等的研究结果^[16]一致。朱彦博等研究表明,随着盐度增加,菌株相对蛋白酶的活性趋于减弱^[17],这与本研究蛋白降解率随着盐度增加而降低的结果一致。另外,从很多报道看,不同菌株在相同 pH 值条件下蛋白酶活性存在显著差异^[14,17-18],最大酶活性出现在 pH 值 7.0~10.5 之间不等,这可能是由于涉及了不同地衣芽孢杆菌菌株,说明不同菌株的最适 pH 值是存在差异的,在今后工作中,要特别注意不同菌株环境因子的研究。

参考文献:

- [1] 杨学芬,杨瑞斌,齐振雄. 微生态制剂在水质调控中的应用[J]. 水利渔业,2003,23(3):40-42.

韩耀全,何安尤,施 军,等. 岩滩水域渔业生态环境及鱼类物种多样性现状[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):208-212.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.068

岩滩水域渔业生态环境及鱼类物种多样性现状

韩耀全,何安尤,施 军,王大鹏,吴伟军,雷建军

(广西水产科学研究院/广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室,广西南宁 530021)

摘要:通过对岩滩水域的水质、浮游生物、鱼类资源、鱼类物种多样性分析,评估岩滩水域渔业生态环境的质量现状。调查共记录渔民半年全部渔获物 52 365 尾、1 410.2 kg,超过 98% 渔获物是小型鱼类。岩滩水域的 Shannon - Weiner 指数为 0.162,Willm 改进指数为 1.814, D_{G-F} 指数为 0.083,鱼类多样性指数远低于其他水域。浮游植物单位平均数量为 101.34 万 ind./L,单位平均生物量为 1.115 1 mg/L;浮游动物单位平均数量为 459.6 ind./L,单位平均生物量为 0.642 2 mg/L。评估结果显示:岩滩水域的水质及浮游生物指标基本正常,但鱼类资源枯竭,鱼类资源构成不合理,鱼类物种多样性极低。从生物操控角度,应从恢复水生生物正常构成入手修复库区渔业生态环境。

关键词:岩滩水域;渔业生态环境;鱼类;物种多样性;浮游生物;修复

中图分类号:S932.2;X826 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)03-0208-05

渔业生态环境是渔业生物资源赖以生存、生长、繁衍的基础,渔业生态环境的优劣或变动会对渔业生物资源产生一系列短期或长期、直接或间接的影响,优质的渔业生态环境需要良好的水生生态自然环境及合理的水生生物群落构成相互支持^[1]。包括岩滩水域所在的红水河是西江流域上游最重要的渔业水域,是《全国水生生物增殖放流总体规划》划定的重

点增殖放流水域^[2],拥有西江流域最复杂的水生态环境和最大的鱼类产卵场^[3]。岩滩水库是红水河干流第二大水库,由岩滩水电站工程大坝阻隔、原红水河水位抬高渠化河道而成,渠化原河段 166 km,库区水面面积 107.5 km²,控制流域面积 10.7 万 km²。由于水利大坝建设及渔业发展不够科学有序等原因,红水河流域水域生态环境发生巨大改变,曾出现库区渔业生态环境严重恶化、大量死鱼及淡水壳菜泛滥成灾的渔业生态安全事故。开展库区渔业生态环境现状评估,科学修复水域生态环境,是库区生产和生态安全的重要课题。近 30 年来研究者对红水河流域及岩滩水域不同断面进行过多次调查研究,取得了大量基础研究数据,但未进行过库区鱼类多样性评价分析,特别是库区形成且开展鱼类工人增殖放流后未进行过调查评估。2003 年岩滩水域淡水壳菜出现问题;2006 年后淡水壳菜大量繁殖,库区渔业生产受到重大损失,生态安

收稿日期:2014-05-14

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201303048);广西自然科学基金重大项目(编号:2013GXNSFEA053003);广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室系统性研究项目(编号:13-A-02-01)。

作者简介:韩耀全(1969—),男,广西南宁人,高级工程师,主要从事水生生物自然资源及水生生态调查、保护与修复工作。Tel:(0771)5316254;E-mail:hyqao@sohu.com。

[2]王彦波,邓岳松. 微生态制剂对虾池水质影响的研究[J]. 水利渔业,2003,23(2):16-17.

[3]张 巍,赵 军,郎咸明,等. 硝化细菌在不同温度下对氮素的去除效能研究[J]. 环境科学与管理,2010,35(6):83-86.

[4]丁爱中,陈繁忠,雷剑泉,等. 光合细菌调控水产养殖业水质的研究[J]. 农业环境保护,2000,19(6):339-341,344.

[5]尹文林,沈锦玉,沈智华,等. 枯草芽孢杆菌 B115 株对水质改良效果研究[J]. 渔业现代化,2006,06(6):9-11,20.

[6]Lin Y, Kong H N, He Y L, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor and isolation of heterotrophic nitrifying bacteria[J]. Japanese Journal of Water Treatment Biology, 2004,40(3):105-114.

[7]马广慈,唐任寰,郑斯成. 药物分析方法与应用[M]. 北京:科学出版社,2000:189-190.

[8]沈 萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,1999.

[9]曹煜成,李卓佳,林小涛,等. 地衣芽孢杆菌 De 株对凡纳滨对虾粪便的降解效果[J]. 热带海洋学报,2010,29(4):125-131.

[10]曹煜成,李卓佳,冯 娟,等. 地衣芽孢杆菌胞外产物消化活性

的研究[J]. 热带海洋学报,2005,24(6):6-12.

[11]Moriarty D J. The role of microorganisms in aquaculture ponds[J]. Aquaculture,1997,151(1):333-349.

[12]Sahu M K, Swarnakumar N S, Sivakumar K, et al. Probiotics in aquaculture:importance and future perspectives[J]. Indian Journal of Microbiology,2008,48(3):299-308.

[13]曹煜成,李卓佳,林黑着,等. 地衣芽孢杆菌 De 在优质草鱼养殖中的应用研究[J]. 南方水产,2008,4(3):15-19.

[14]曹煜成,李卓佳,吴灶和,等. 地衣芽孢杆菌胞外蛋白酶的纯化及特性分析[J]. 水生生物学报,2006,30(3):262-268.

[15]张庆华,封永辉,王 娟,等. 地衣芽孢杆菌对养殖水体氨氮、残饵降解特性研究[J]. 水生生物学报,2011,35(3):498-503.

[16]谢 航,邱宏端,王秀彬,等. 地衣芽孢杆菌降解水产养殖中残余饲料的特性研究[J]. 福建水产,2008,26(3):31-35.

[17]朱彦博,唐叶玲,陈圣丰,等. 盐度、温度和 pH 对 2 株海南地衣芽孢杆菌相对蛋白酶活性的影响[J]. 海南大学学报:自然科学版,2013,31(2):133-138.

[18]袁 铸,王忠彦,胡 承,等. 地衣芽孢杆菌 JF-UN122 碱性蛋白酶的分离纯化与性质[J]. 工业微生物,2003,33(3):25-29.