

黄晓凤, 刘安芳, 杨旭生, 等. 水生植物-微生物组合工艺对鹅场污水的净化效果[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(13): 195-200.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.13.048

水生植物-微生物组合工艺对鹅场污水的净化效果

黄晓凤¹, 刘安芳², 杨旭生², 王启贵^{1,3}, 王阳铭¹, 刘作兰¹, 冷安斌⁴, 汪超^{1,3}

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 西南大学, 重庆 402460; 3. 农业部西南设施养殖工程科学观测实验站, 重庆 402460;
4. 重庆清水湾良种鹅业有限公司, 重庆 408307)

摘要:旨在研究水葫芦与不同微生物组合处理鹅场污水的作用效果, 将污水经水葫芦处理 4、8 d, 以不加水葫芦作为对照组; 再使用微生物处理 3、6、9、12 d, 分别以光合细菌、枯草芽孢杆菌及 2 种菌等量混合进行处理, 以不添加菌为对照, 观察其对鹅场污水中各污染物的去除效果。结果表明, 水葫芦组污水中各指标的去除率较对照组均显著升高 ($P < 0.05$), 8 d 的污水净化效果优于 4 d; 微生物处理组以 12 d 后效果最优, 各菌种的污水净化效果优劣顺序为混合菌 > 光合细菌 > 枯草芽孢杆菌。水葫芦处理 8 d + 混合菌处理 12 d 效果最佳, 对鹅场污水中浊度、氨氮、总氮、总磷、化学需氧量 (COD) 的最终去除率分别达到了 93.31%、99.65%、50.63%、74.22%、77.32%。由试验结果可知, 采用水葫芦-微生物组合工艺对鹅场污水具有较好的净化效果, 最终含量远低于国家要求的污水排放标准。

关键词:水葫芦; 微生物; 鹅场污水; 污水净化

中图分类号: X713; X703 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)13-0195-05

我国是世界第一鹅业生产大国, 鹅养殖量占世界总量的 90% 以上, 2014 年我国鹅存栏量已达到 2.85 亿羽, 出栏量超过 5.6 亿羽^[1-2]。随着养殖量的增加, 鹅场粪污的排放量同比增长, 鹅场的污水中除了传统的排泄物外, 还因其戏水的习性而产生大量污水, 主要含饲料、泥沙及鹅毛等污染物, 因此加大了鹅场污水处理的难度^[3], 污水直接排放会对环境造成严重污染, 粪污的处理问题已成为阻碍养鹅业快速健康发展主要问题之一。然而, 目前关于鹅场污水处理工艺的研究尚少。

对于鹅场高浓度的污水, 传统单一的污水处理技术的处理效率仍较低, 难以满足现代化、集约化养殖场的处理要求, 而复合式污水处理工艺已成为污水处理的主要研究方向^[4-5]。目前, 微生物及水生植物处理法在畜禽污水中研究的较多且具有较好的处理效果, 邹文娟等将枯草芽孢杆菌与光合细菌混合后加入污水中, 能够显著去除亚硝酸盐氮、氨氮 ($\text{NH}_3\text{-N}$)、化学需氧量 (COD) 及活性磷酸盐^[6]; Lu 等研究表明, 水葫芦人工湿地对养鸭废水具有良好的净化能力^[7]; 吴淑杭等通过研究认为, 水葫芦可作为畜禽污水处理的首选水生植物^[8]。然而, 微生物与水葫芦复合处理工艺对鹅场污水处理效果的研究甚少。本试验将微生物与自然生态处理法相结合, 通过水葫芦处理后, 结合微生物进行二次处理, 探究其最佳组合方式及其组合工艺对污水中各污染物的去除效率。

收稿日期: 2018-03-16

基金项目: 国家水禽产业技术体系专项资金 (编号: CARS-42-22);
重庆市社会事业与民生保障专项 (编号: cstc2017shms-xdny80047); 重庆市农业发展资金 (编号: 17405、18501-4)。

作者简介: 黄晓凤 (1989—), 女, 四川眉山人, 硕士, 助理研究员, 主要从事家禽养殖及粪污处理研究。E-mail: 869432555@qq.com。

通信作者: 汪超, 博士, 副研究员, 主要从事水禽生产技术研究。

E-mail: wangccq@foxmail.com。

1 材料与方法

本试验于 2017 年 3—4 月在重庆市畜牧科学院家禽科研基地进行, 试验污水取于基地污水沉淀池, 污水中各水质指标: 浊度 (NTU)、氨氮、总氮 (TN)、总磷 (TP)、COD 含量分别为 217.93、163.13、21.51、2.50、345.13 mg/L, pH 值为 9.25。水葫芦, 采于科研基地附近的水渠; 光合细菌 (10×10^8 CFU/g)、枯草芽孢杆菌 (10×10^8 CFU/g), 购自重庆诺沃生物科技有限公司。

污水处理试验共设有 2 级处理: 第 1 阶段为水葫芦处理, 第 2 阶段为微生物处理 (枯草芽孢杆菌、光合细菌及枯草芽孢杆菌与光合细菌等量混合处理)。各处理设 3 个重复, 试验期为 20 d (水葫芦处理 8 d, 微生物处理 12 d)。

1.1 水葫芦处理

选用盛水量为 150 L 的塑料水箱 6 个, 将 150 L 污水经 60 目滤筛后注入水箱, 标记水位便于用蒸馏水补偿蒸发损失; 每个水箱里放入恒温控制器, 水温控制在 $26 \sim 32$ °C; 处理组放入鲜质量为 2.0 kg 的水葫芦, 对照组不放置水葫芦, 每组 3 个重复; 分别在放入水葫芦前和放入水葫芦后 4 d 和 8 d, 用 250 mL 无菌采样袋于液面下 5 cm 处无空气接触条件下采取水样。

1.2 微生物处理

选用 9 个盛水量为 120 L 的蓝色塑料水桶, 分别注入 50 L 水葫芦组处理 8 d 后的污水, 标记水位并用蒸馏水补给蒸发损失; 处理组分别为光合细菌、枯草芽孢杆菌、光合细菌与枯草芽孢杆菌等量混合组, 每组 3 个重复, 每个重复一次性投放 10×10^9 CFU 菌种, 对照组不添加微生物。每个水桶里放入恒温控制器, 控制水温在 26 °C 左右, 同时由增氧机供氧; 分别在 0、3、6、9、12 d 用 250 mL 无菌采样袋于液面下 5 cm 处进行无空气接触采取水样。

1.3 水质指标检测

污水中 pH 值、化学需氧量、氨氮含量、总磷含量、浊度和总氮含量参照水样化学分析方法^[9]测定。根据测定的结果,计算第 1 阶段 4 d 和 8 d 及第 2 阶段 3、6、9、12 d 各指标的去除率,计算公式如下:去除率=(初始指标浓度-测定指标浓度)/初始指标浓度×100%。

1.4 数据分析

使用 Excel 2016 进行数据整理,应用 SPSS 19.0 进行方差分析,统计结果以均值±标准差表示。多组间两两比较应用 *q* 检验;分组和时间的整体效应分析应用重复测量方差分析;利用多指标综合平衡分析法进行污水净化最优组合工艺的筛选^[10]。

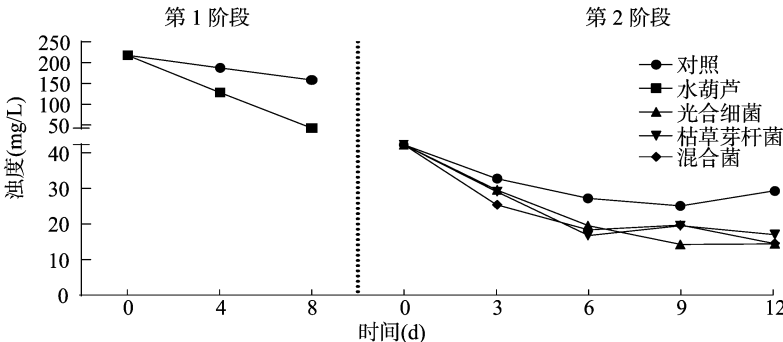


图1 组合工艺对鹅场污水中浊度的去除效果

表 1 水葫芦处理污水试验重复测量方差分析结果

指标	P 值		
	时间	时间×分组	分组
浊度去除率	<0.001	<0.001	<0.001
总磷去除率	<0.001	0.001	0.033
氨氮去除率	<0.001	0.001	0.001
COD 去除率	<0.001	<0.001	<0.001
pH 值降低率	<0.001	0.262	0.950
总氮去除率	<0.001	0.168	0.006

2.2 微生物处理污水结果分析

2.2.1 微生物对污水浊度的去除效果 由表 3、表 4 和图 1 可见,第 2 阶段微生物对污水中浊度的去除效果随处理和时间不同而差异显著($P<0.05$),且两者之间存在交互作用,混合菌和光合菌组的浊度在 12 d 时达到最低值。在 3 d 时,光合细菌组的浊度去除率显著优于对照组,而与混合菌、枯草芽孢杆菌组的浊度去除率无显著性差异。6 d 时,光合细菌与枯草芽孢杆菌组去除效果显著高于混合菌组,处理组均显著

2 结果与分析

2.1 水葫芦处理污水试验结果分析

由图 1~图 6 第 1 阶段和表 1、表 2 可知,与对照组相比,水葫芦对污水的浊度、氨氮、总氮、总磷、COD 去除率显著升高($P<0.05$),去除效果与处理时间存在交互作用;4 d 时,水葫芦对污水中浊度、氨氮、总氮、总磷、COD 的去除率分别为 41.11%、34.18%、18.69%、10.39%、40.92%,8 d 时的去除率分别为 80.58%、62.06%、41.68%、27.51%、48.12%,8 d 时的去除效果明显优于 4 d 时的效果。污水中 pH 值随处理时间延长而降低($P<0.05$),但水葫芦处理对 pH 值无显著的降低作用,4 d 和 8 d 时的去除率分别为 2.32%、3.98%。

表 2 水葫芦处理试验各指标方差的分析结果

指标	处理	4 d	8 d
浊度去除率(%)	水葫芦	41.11±2.45a	80.58±4.41a
	对照组	13.87±2.30b	27.18±3.92b
氨氮去除率(%)	水葫芦	34.18±1.06a	62.06±1.30a
	对照组	9.76±0.81b	21.03±2.62b
总氮去除率(%)	水葫芦	18.69±9.06a	41.68±3.17a
	对照组	5.81±3.69b	28.36±5.77b
总磷去除率(%)	水葫芦	10.39±6.90a	27.51±5.57a
	对照组	-0.43±11.50b	-0.53±17.52b
COD 去除率(%)	水葫芦	40.92±0.71a	48.12±2.62a
	对照组	0.02±5.70b	0.16±4.11b
pH 值降低率(%)	水葫芦	2.32±2.71a	3.98±3.20a
	对照组	1.51±3.92a	2.69±2.67a

注:表中不同小写字母表示同一指标不同处理间差异显著($P<0.05$)。表 4 至表 8 同。

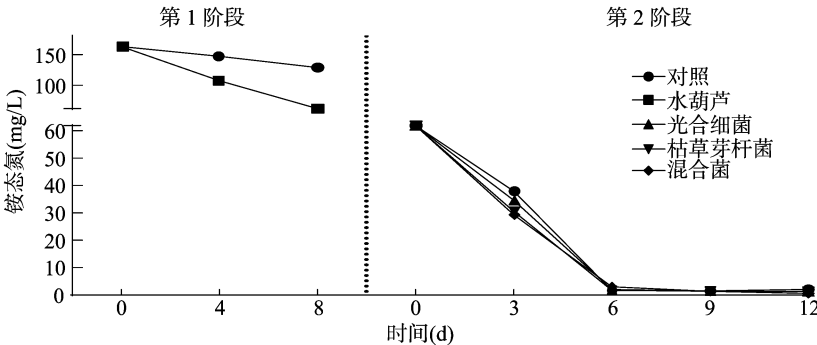


图2 组合工艺对鹅场污水中氨氮的去除效果

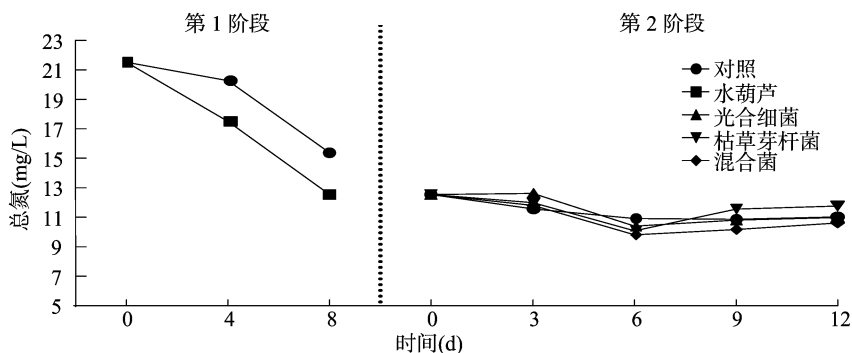


图3 组合工艺对鹅场污水中总氮的去除效果

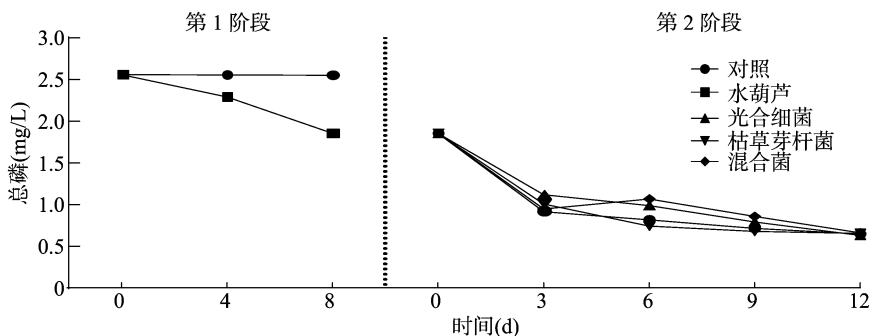


图4 组合工艺对鹅场污水中总磷的去除效果

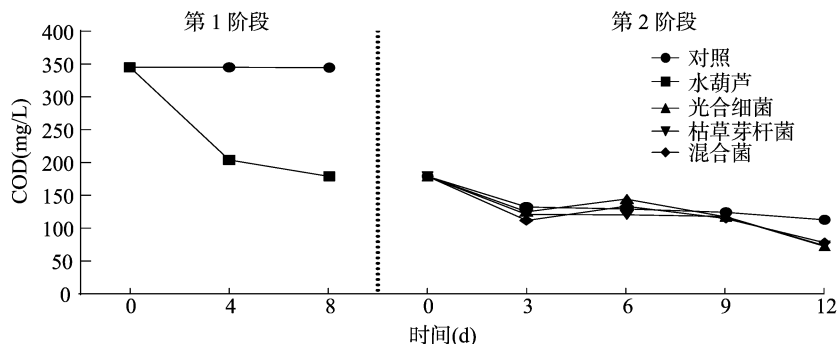


图5 组合工艺对鹅场污水中 COD 的去除效果

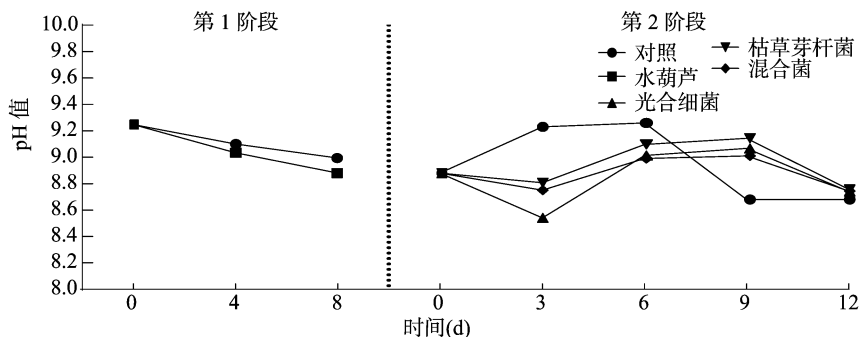


图6 组合工艺对鹅场污水中 pH 值的降低效果

高于对照组。9 d 时,光合细菌组显著高于其余 3 组 ($P < 0.05$)。12 d 时各处理组均显著高于对照组,以光合细菌组的去除效率最高,为 76.02%,其余依次为混合菌组 (67.20%)、枯草芽孢杆菌组 (66.86%)。

2.2.2 微生物对污水氨氮的去除效果 由表 5 和图 2 的第 2 阶段可知,微生物对氨氮的去除效果随处理时间不同出现

显著差异,0~6 d 氨氮的含量呈明显下降趋势,6~12 d 下降趋势平缓,在 12 d 时达到最低值。在 3 d 时,各组间的作用效果无显著差异。6 d 时,混合菌组显著低于其他 3 组 ($P < 0.05$)。12 d 时,各处理组均显著高于对照组 ($P < 0.05$),处理组间无显著差异,去除效果优劣顺序为混合菌组 > 光合细菌组 > 枯草芽孢杆菌组。

表 3 微生物处理污水试验重复测量方差分析结果			
指标	P 值		
	时间	时间 × 分组	分组
总磷去除率	<0.001	0.001	0.001
浊度去除率	<0.001	0.013	<0.001
氨氮去除率	<0.001	0.234	0.085
COD 去除率	<0.001	<0.001	0.008
pH 降低率	<0.001	0.327	0.219
总氮去除率	<0.001	<0.001	0.033

处理	浊度去除率(%)			
	3 d	6 d	9 d	12 d
光合细菌	50.76 ± 3.34b	67.55 ± 0.14c	76.30 ± 3.89c	76.02 ± 8.13b
混合菌	42.08 ± 15.58ab	58.39 ± 6.82b	55.30 ± 8.37ab	67.20 ± 4.97b
枯草芽孢杆菌	43.58 ± 3.97ab	67.57 ± 0.93c	62.12 ± 3.7b	66.86 ± 5.28b
对照组	31.05 ± 0.18a	42.42 ± 1.51a	46.17 ± 1.3a	37.47 ± 1.79a

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著。下表同。

处理	氨氮去除率(%)			
	3 d	6 d	9 d	12 d
光合细菌	45.36 ± 6.21a	96.91 ± 0.08b	97.68 ± 0.36a	98.10 ± 0.40b
混合菌	48.45 ± 2.55a	94.76 ± 0.17a	97.65 ± 0.02a	98.99 ± 0.08b
枯草芽孢杆菌	50.67 ± 14.39a	97.26 ± 0.11b	97.80 ± 0.04a	98.01 ± 0.36b
对照组	35.91 ± 1.64a	96.45 ± 0.94b	96.26 ± 1.69a	96.20 ± 1.02a

处理	总氮去除率(%)			
	3 d	6 d	9 d	12 d
光合细菌	-4.56 ± 4.11b	13.84 ± 1.24a	10.42 ± 1.27a	8.95 ± 1.13ab
混合菌	5.97 ± 0.57a	21.89 ± 0.56b	19.03 ± 2.79a	15.44 ± 2.53b
枯草芽孢杆菌	2.55 ± 8.39ab	18.10 ± 1.56a	6.06 ± 6.56b	4.32 ± 7.43a
对照组	6.33 ± 0.20a	10.14 ± 1.73a	11.52 ± 1.13a	10.06 ± 1.75ab

组>光合细菌组>枯草芽孢杆菌组。

2.2.4 微生物对污水总磷的去除效果 由表 7 和图 4 的第 2 阶段可知,各处理在部分时间点的总磷去除效果差异显著,且两者之间存在交互作用,各处理的总磷含量在 12 d 时最低。3 d 时,各组间的作用效果无显著差异。6 d 时,枯草芽孢杆菌组的总磷去除效果显著高于其余各组,去除率为

2.2.3 微生物对污水总氮的去除效果 由表 6 和图 3 的第 2 阶段可知,微生物絮凝剂对总氮的去除效果随处理时间不同差异显著($P<0.05$),6 d 时,污水中总氮含量达到最低值,但在 6~12 d,含量开始增加。在 3 d 时,光合细菌菌组的总氮去除率显著低于混合菌组和对照组。6 d 时,混合菌组的去除效果显著优于光合细菌组和枯草芽孢杆菌组,去除率为 21.89%。9 d 时,枯草芽孢杆菌组的去除率显著低于其他 3 组。12 d 时,混合菌组的去除率显著高于枯草芽孢杆菌组,与对照组和光合细菌组相比,无显著优势,优劣顺序为混合菌

62.2%,混合菌组的去除效果最差。9 d 时,混合菌组的总磷去除率显著低于其余组($P<0.05$),各组对总磷去除效果的优劣顺序依次为枯草芽孢杆菌组>光合细菌组>对照组>混合菌组,去除率分为 65.52%、64.09%、60.44%、52.90%。12 d 时,各组间总磷去除效果无显著差异,总磷去除率达到最高值,均值为 67.26%。

处理	总磷去除率(%)			
	3 d	6 d	9 d	12 d
光合细菌	48.84 ± 3.31a	54.87 ± 2.71b	64.09 ± 2.94b	71.50 ± 3.08a
混合菌	47.83 ± 2.45a	41.13 ± 0.71a	52.90 ± 5.93a	63.43 ± 5.33a
枯草芽孢杆菌	48.70 ± 3.59a	62.20 ± 2.80c	65.52 ± 1.52b	66.84 ± 5.57a
对照组	46.32 ± 2.73a	53.95 ± 2.19b	60.44 ± 0.61b	62.96 ± 1.66a

2.2.5 微生物对污水 COD 的去除效果 由表 8 和图 5 的第 2 阶段可知,微生物对 COD 的去除效果随处理时间不同存在显著差异($P<0.05$),各处理组在 12 d 时 COD 含量最低。在 3 d 时,混合菌组的去除率明显高于其他 3 组。6 d 时,混合菌组的 COD 去除率显著优于对照组和光合细菌组,而与枯草芽孢杆菌组无显著性的差异。9 d 时,混合菌组的去除率显著

高于对照组,而 3 个处理组间无显著差异。12 d 时,各处理组的去除率均高于对照组,COD 的去处效果优劣顺序为混合菌组>光合细菌组>枯草芽孢杆菌组。

2.2.6 微生物絮凝剂对污水 pH 值的影响 由图 6 的第 2 阶段可知,处理时间对污水 pH 值有明显影响,处理间对 pH 值的影响无显著差异,处理时间与不同絮凝剂间无交互作用。

表 8 微生物处理污水试验 COD 去除率的方差分析结果

处理	COD 去除率(%)			
	3 d	6 d	9 d	12 d
光合细菌	27.15 ± 3.92ab	15.77 ± 0.62ab	31.53 ± 7.16ab	57.66 ± 5.79b
混合菌	42.87 ± 15.69b	32.47 ± 14.87c	41.91 ± 12.45b	59.83 ± 12.63b
枯草芽孢杆菌	27.44 ± 6.67ab	27.45 ± 9.36bc	29.07 ± 7.44ab	55.83 ± 2.49b
对照组	8.37 ± 0.00a	10.58 ± 0.68a	13.97 ± 0.01a	22.44 ± 0.78a

2.2.7 组合工艺对污水的净化效果 水葫芦处理污水研究表明,水葫芦对污水中污染物的去除效果明显,且处理 8 d 的效果明显优于 4 d 的效果。微生物处理污水的结果表明,微生物对污水中各污染物的去除效果以 12 d 为最佳,各微生物处理组对污水各指标净化效果的优劣顺序为混合菌组 > 光合细菌组 > 枯草芽孢杆菌组。根据多指标综合平衡分析,本试验最优的组合为水葫芦处理 8 d 混合菌处理 12 d,最终污水中各水质指标的含量及去除率见表 9,远低于 GB 18596—2001《畜禽养殖业污染物排放标准》中规定的污染物排放浓度。

表 9 鹅场污水经处理后各水质指标的含量及最终去除率

类别	浊度 (mg/L)	氨氮 含量 (mg/L)	总氮 含量 (mg/L)	总磷 含量 (mg/L)	COD (mg/L)	pH 值
处理后	14.57	0.57	10.62	0.66	78.26	8.74
去除率	93.31%	99.65%	50.63%	74.22%	77.32%	5.51%

3 讨论

水葫芦在处理污水中的应用比较早,被用于生活污水、工艺污水、混合污水、养殖污水等各种污水的净化处理,对污水中的污染物质有很强的吸收净化力^[11]。本试验采用水葫芦对鹅场污水进行净化处理,各污染物去除率较对照组显著升高,以 8 d 的处理效果最为明显,污水浊度、氨氮、总氮、总磷及 COD 的去除率分别达到了 80.58%、62.06%、41.68%、27.51%、48.12%,这与在猪场及鸭场污水上的研究结果^[7,12]相似,表明水葫芦对鹅场污水中的污染物有较好的去除效果。本试验中水葫芦对总氮及总磷的去除率相对较低,这可能与污水的 pH 值较高有关。黄明意等认为,酸性条件下水葫芦的去除效果优于碱性条件,在碱性范围内,pH 值越高对污水中总氮、总磷的去除率越低^[13],而本试验中的污水 pH 值均在 8 以上,这可能是导致去除效率较低的原因。

利用微生物处理畜禽污水,具有占地少、能耗低、投资小、使用简单、有机负荷高等优点^[14]。本试验中,微生物对污水中的浊度和 COD 去除效果显著,12 d 时的去除率分别达到了 67.20% 和 59.83%。研究认为枯草芽孢杆菌可以降解污水中的大分子有机物质,而光合细菌可以将小分子有机物降解为简单物质,从而达到降低浊度和 COD 的目的^[15-17]。然而,本试验中单菌及混合菌对鹅场污水中总氮、总磷、氨氮去除及 pH 值的降低效果不显著,这与前人研究^[18-19]不相符。Zhou 等认为,pH 值为 7 时,光合细菌的污水净化能力最好^[20]。陈尚智等研究发现,枯草芽孢杆菌受 pH 值的影响极为明显,当 pH 值为 5~7 时枯草芽孢杆菌净化效果最佳^[21],而本试验污水 pH 值均在 8 以上,这可能导致光合细菌和枯草芽孢杆菌无法发挥显著效果,说明鹅场污水可能需要通过调节污水 pH 值来增加微生物的净化效果。另外,本试验为一次性投放

10 × 10⁹ CFU 菌种,何剑丹研究认为,持续投放光合细菌的效果显著高于一次性的投放效果^[22]。因此,菌种的投放次数需进一步优化,而且适宜的使用剂量也有待进一步研究。

4 结论

水葫芦对鹅场污水中的各有机污染物(浊度、氨氮、总氮、总磷、COD)均有较好的去除效果;枯草芽孢杆菌、光合细菌及其混合菌对鹅场污水中的浊度和 COD 去除效果显著,但对总氮、氨氮、总磷的去除及 pH 值的降低效果不显著;水生植物与微生物组合工艺对鹅场污水中浊度、氨氮、总氮、总磷、COD 的去除率分别达到了 93.31%、99.65%、50.63%、74.22%、77.32%,最终含量远低于国家规定的污染物排放浓度。

参考文献:

- [1] 韩文宝. 我国鹅养殖业的现状及未来发展方向[J]. 家禽科学, 2017(8): 42-44.
- [2] 朱士仁. 我国养鹅业发展现状、存在问题分析及对策[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报, 2013, 33(3): 17-19.
- [3] 王秀茹. 养鹅场废弃物对环境的污染及处理与利用[J]. 家禽科学, 2017(9): 38-40.
- [4] 冷庚, 但德忠. 畜禽废水处理技术及其应用进展[J]. 四川环境, 2009, 28(1): 68-72.
- [5] 洪和琪. 浅析畜禽养殖废水处理技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(32): 109-110.
- [6] 邹文娟, 许晓慧, 王国武, 等. 光合细菌和枯草芽孢杆菌在污水处理中的应用[J]. 广东农业科学, 2010, 37(9): 199-201.
- [7] Lu J B, Fu Z H, Yin Z Z. Performance of a water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) system in the treatment of wastewater from a duck farm and the effects of using water hyacinth as duck feed[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(5): 513-519.
- [8] 吴淑杭, 姜震方. 水葫芦深度净化猪粪便污水研究[J]. 上海农业学报, 2003, 19(4): 76-80.
- [9] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [10] 韦小庆. 玉米秸秆与畜禽粪便堆料发酵技术研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [11] 陈彬, 曹伟华. 水葫芦对中高浓度畜禽废水的净化效果研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(2): 95-97.
- [12] 程燕, 龙峥, 姜无边, 等. 水葫芦对猪场废水的净化作用[J]. 养猪, 2014(4): 86-87.
- [13] 黄明意, 林梦婕, 江波, 等. pH 对水葫芦净化水质的影响[J]. 化学工程与装备, 2015(8): 7-8.
- [14] 王兰, 邓良伟, 王霜, 等. 畜禽养殖废水厌氧消化液好氧处理研究与应用现状[J]. 中国沼气, 2015, 33(5): 3-10.
- [15] 杨珊. 微生物复合及固定化处理景观水体污染的研究[D].

余艳玲, 彭 昊, 冯世文, 等. 罗非鱼无乳链球菌环介导等温扩增(LAMP)检测技术的建立及应用[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(13): 200–203. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.13.049

罗非鱼无乳链球菌环介导等温扩增(LAMP) 检测技术的建立及应用

余艳玲¹, 彭 昊², 冯世文², 张永德¹, 罗洪林¹, 李 军²

(1. 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;

2. 广西兽医研究所/广西兽医生物技术重点实验室, 广西南宁 530001)

摘要:针对罗非鱼无乳链球菌 *Sip* 基因建立了 LAMP 检测方法, 并对野外样本进行了无乳链球菌的调查研究。结果表明, 目标 *Sip* 基因可在 63 ℃ 40 min 内被 LAMP 检测到, 比 PCR 快约 2 h, 其 DNA 检测最低浓度为 3.55×10^{-5} ng/μL, 灵敏度比 PCR 高 100 倍, 且对参考细菌无扩增。野外样品检测结果表明, 运用 LAMP 检测技术对 GBS 的检出率为 81.3%, 比 PCR 高约 20.0%。应用 LAMP 和 PCR 分别检测健康罗非鱼 GBS 检出率 4.4% 和 2.2%, 检测池塘水样品 GBS 检出率分别为 10.0% 和 6.7%。

关键词: 罗非鱼; 无乳链球菌(GBS); 环介导等温扩增(LAMP)

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)13-0200-04

链球菌病已成为全球罗非鱼最严重的疾病之一^[1], 每年造成的经济损失达 4 000 多万美元^[2-3]。过去数十年, 我国罗非鱼链球病逐年增长, 其优势种类已经从海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)转变为无乳链球菌(*S. agalactiae*, 也称 B 族链球菌或 GBS)。过去 5 年, 由链球菌导致的罗非鱼死亡率达 15%~95%^[2]。GBS 不仅会引起水生或半水生生物^[4-5], 包括野生鱼类^[6-7]和养殖鱼类^[8-9]严重的疾病, 也可导致新生儿严重的脑膜炎^[10]和成人败血症^[11-12]。人类或牲畜的 GBS 对罗非鱼具有潜在的感染性^[13], 而来自罗非鱼的 GBS 也可能导致人类感染^[14]。因此, 罗非鱼和/或水环境中 GBS 菌株的存在增加了公共卫生安全的风 险, 这就需要研发采取一种快速、灵敏和可靠的污染链球菌检测方法, 通过采取适当的防控措施, 保护易感染群体免受这种人畜共患病原体的侵袭。

环介导等温扩增技术(LAMP)是一种敏感、快速和低成本 的检测方法, 在等温条件下扩增靶基因核苷酸, 通常在 1 h 内完成^[15-16], 扩增产物可通过浊度或荧光染料监测。此外, LAMP 检测可在野外进行, 因此可用于现场测定^[16]。基于 LAMP 的优点, 本研究开发了一种针对 GBS *Sip* 基因可用于野外现场检测的单步 LAMP 法, 并对其特异性和灵敏性进行评价。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细菌菌株 罗非鱼 GBS 菌株、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)、哈氏弧菌(*Briohatveyi*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)与海豚链球菌(*S. iniae*), 均由广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室鉴定和保存。

1.1.2 主要试剂 细菌全基因组 DNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; Loopamp DNA 扩增试剂盒购自日本荣研生物科技有限公司; PCR Master Mix、DNA Marker、钙黄绿素等, 购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 待检样品 2014 年 7—9 月, 从野外共收集样品 490

收稿日期: 2018-04-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 31372553); 广西自然科学基金(编号: 2015GXNSFAA139068)。

作者简介: 余艳玲(1976—), 女, 陕西咸阳人, 硕士, 工程师, 主要从事水产动物分子生物学研究。E-mail: yaeling@126.com。

通信作者: 李 军, 副研究员, 主要从事动物疫病防控与病原分子生物学研究工作。E-mail: jlee9981@163.com。

重庆: 西南大学, 2015。

[16] Talaiekhazani A, Rezania S. Application of photosynthetic bacteria for removal of heavy metals, macro-pollutants and dye from wastewater: a review[J]. Journal of Water Process Engineering, 2017, 19: 312–321.

[17] Li L X, Yang X M, Li A, et al. Research progress of photosynthetic bacteria in wastewater treatment[J]. Applied Mechanics & Materials, 2011, 71/72/73/74/75/76/77/78: 2831–2835.

[18] 涂玉佩, 陈玉凤, 韩贤菁, 等. 筛选高效光合细菌菌株处理猪场污水试验[J]. 环境工程, 2016, 34(增刊 1): 358–361.

[19] 宋协法, 潘玉兰, 马 真, 等. 单菌种和混合菌处理养殖污水的效果[J]. 环境工程学报, 2015, 9(7): 3281–3287.

[20] Zhou Q, Zhang G M, Lu Y F, et al. Feasibility study and process optimization of citric acid wastewater treatment and biomass production by photosynthetic bacteria[J]. Desalination & Water Treatment, 2015, 57(14): 1–7.

[21] 陈尚智, 胡勇有. 枯草芽孢杆菌对微污染水体的净化作用[J]. 环境科学学报, 2011, 31(8): 1594–1601.

[22] 何剑丹. 光合细菌处理生活污水和垃圾渗滤液的研究[D]. 成都: 四川师范大学, 2005.