

刘珍珠,樊振,刘欢欢,等. 枯草芽孢杆菌的筛选及其与光合细菌复配对养殖水体的净化[J]. 江苏农业科学,2020,48(6):164-167.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.06.033

枯草芽孢杆菌的筛选及其与光合细菌 复配对养殖水体的净化

刘珍珠¹,樊振²,刘欢欢¹,马贵军²,娄恺³,晁群芳¹,曾军³

(1. 新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046; 2. 新疆天康饲料科技有限公司生物添加剂分公司,新疆乌鲁木齐 830013;
3. 新疆农业科学院微生物应用研究所新疆特殊环境微生物实验室,新疆乌鲁木齐 830091)

摘要:以光合细菌和枯草芽孢杆菌为试验菌种,研究二者最优浓度配比,应用在实际生产中提高降解水体氨氮、 NO_2^- 和化学需氧量(COD)浓度的能力。测定7种枯草芽孢杆菌的生长曲线,选取生长性能较好的菌株 K_1 、 K_2 、 K_3 进行产酶活性检测,筛选出菌株 K_3 进行复配试验,试验设置1个对照组(CK)和7个复合菌组(P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 、 P_5 、 P_6 、 P_7),7个复合菌组(光合细菌:枯草芽孢杆菌)的浓度配比分别为 $P_1(1:0)$ 、 $P_2(0:1)$ 、 $P_3(1:1)$ 、 $P_4(2:1)$ 、 $P_5(3:1)$ 、 $P_6(1:2)$ 、 $P_7(1:3)$,分析各试验组的氨氮、 NO_2^- 和化学需氧量等水质指标,选取处理结果最优的复合菌组。结果表明,复合菌能够明显降低水体氨氮,其中 P_6 降解能力最强,降解效果高于对照组4.9倍;能去除亚硝酸根浓度和水体中的化学需氧量。复合菌组的最佳浓度配比为1:2,该浓度配比组较对照组和其他试验组能够明显净化养殖水质,有效提高净化水质能力。

关键词:光合细菌(*Photosynthetic bacteria*);枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);复合菌;养殖水体;净化水质

中图分类号: S182;X52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)06-0164-04

近年来随着我国水产养殖业的迅速发展,工业化的高密度养殖不断扩大,与此同时,未处理养殖废水和工业、生活污水的排放不仅使环境受到严重的污染,还影响人们的生活用水卫生问题。养殖生态环境遭到破坏,致使养殖业病害频繁发生^[1]。池塘自净与调节能力并不能满足清除残饵、鱼虾排泄物等富营养因子的需要,养殖水体中氨氮、硝酸盐、亚硝酸盐、硫化物等严重超标,池塘水质恶化,鱼虾病害频频发生^[2]。为了解决上述问题,抗生素和各类化学药剂在养殖池塘中大量而频繁的施用,严重破坏了养殖环境的生物体系,不仅使养殖池塘的微生物生态失调,而且使农药残留超标,污染养殖水环境^[3]。微生物制剂净水以其高效率、低成本、见效

快成为最有前景的净水方法。目前应用的净水微生物制剂主要种类有光合细菌、芽孢杆菌、硝化细菌和酵母菌等。光合细菌能够改善水质,增加溶氧,降低氨氮,增加生产力^[4]。枯草芽孢杆菌可以减少病害,降低氮磷,增加溶氧,增产增效^[5-6]。两者结合起来使用会产生不一样的效果。有关光合细菌和芽孢杆菌协同净化水质的研究已有报道,罗勇胜等研究认为,光合细菌与枯草芽孢杆菌二者协同净化作用效果较好^[7];李君华等研究认为,二者协同作用能净化水质,提高刺参免疫能力^[8];姜海明等研究发现,光合细菌和芽孢杆菌使用浓度比例为3:1时,对乌鳢养殖水的氨氮和化学需氧量(COD)去除率最高^[9]。因此,本研究拟通过对光合细菌和枯草芽孢杆菌2种菌设置不同浓度配比进行水质指标检测,来确定养殖水质净化作用的最优配比,以期得到养殖生产中复合菌的最佳浓度配比。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种与水体来源 试验所用光合细菌为新疆农业科学院微生物应用研究所生态实验室保藏,

收稿日期:2018-12-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660028);新疆农业科学院青年基金(编号:xjnkq-2017005)。

作者简介:刘珍珠(1992—),女,新疆塔城人,硕士研究生,研究方向为微生物生态学。E-mail:427790432@qq.com。

通信作者:晁群芳,博士,副教授,研究方向为微生物生态学, E-mail:xjchqf@sina.com;曾军,博士,副研究员,研究方向为微生物生态学, E-mail:Leo924.student@sina.com。

枯草芽孢杆菌菌粉、养殖废水由新疆昌吉天康畜牧科技有限公司提供。

1.1.2 培养基 本试验所使用的光合细菌培养基为 RCVBN 培养基。RCVBN 培养基配方:乙酸钠 3.00 g,丙酸钠 1.00 g,硫酸铵 1.00 g,硫酸镁 0.20 g,氯化钠 1.00 g,磷酸二氢钾 0.30 g,磷酸氢二钾 0.50 g,氯化钙 0.05 g,酵母膏 0.10 g,微量元素 1.00 mL,蒸馏水 1 000 mL,pH 值调至 7.0。

枯草芽孢杆菌活化、生长培养基为 LB 培养基。LB 培养基配方:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,蒸馏水 1 000 mL。

枯草芽孢杆菌活性检测培养基。淀粉酶培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,可溶性淀粉 2 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值调至 7.0~7.2,琼脂粉 20 g。蛋白酶培养基:葡萄糖 1 g,酵母膏 1 g,酪素 5 g,磷酸氢二钾 1 g,磷酸二氢钾 0.5 g,硫酸镁 0.1 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值调至 7.0~7.2,琼脂粉 20 g。纤维素酶培养基:羧甲基纤维素钠 2 g,蛋白胨 10 g,酵母膏 5 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值调至 7.2~7.4,琼脂粉 20 g。

1.1.3 试验仪器 单人双面净化工作台(SW-CJ-1F),购自苏州净化设备有限公司;恒温培养振荡器(ZWY-2102C),购自上海智城分析仪器制造有限公司;电热恒温培养箱(SPX-250BF2),购自上海福玛实验设备有限公司;电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9070),购自上海鸿都电子科技有限公司;立式压力蒸汽灭菌器(YXQ-LS-75 SII),购自上海博迅实业有限公司医疗设备厂;电子天平(JW-B5003,0.001 g),购自诸暨市超泽衡器设备有限公司;调速型迷你离心机(Super Mini Dancer),购自生物工程(上海)股份有限公司;pH 计(MT-5000),购自上海精密科学仪器有限公司;紫外分光光度计(UV-2550),购自日本岛津自动化设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 生长性能良好的枯草芽孢杆菌筛选

1.2.1.1 生长曲线的测定 将笔者所在实验室选购的 7 种菌粉标记为 K_1 、 K_2 、 K_3 、 K_4 、 K_5 、 K_6 、 K_8 ,称取 0.1 g 用无菌梯度稀释法,稀释涂布于 LB 培养基,置于 37 °C 培养箱中培养,直至长出明显的单菌落,挑取单菌落于 LB 培养液中分别在 20、25 °C 2 种温度的培养箱里培养,每 2 h 取样测量 1 次菌液浓度,并观察这 7 种枯草芽孢杆菌的生长情况。

1.2.1.2 产酶活性的检测 选取其中生长活性最好的枯草芽孢杆菌,用打孔法检测其产淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶等 3 种酶的活性,分别在淀粉酶培养基、蛋白酶培养基和纤维素酶培养基上用打孔法将培养 24 h 后的枯草芽孢杆菌菌液用移液枪吸入孔中,置于 37 °C 培养箱中培养 24 h 后观察产酶圈。

1.2.2 枯草芽孢杆菌和光合细菌的复配试验

1.2.2.1 复配菌的制备 将纯化培养的 2 种菌按照比例配制,试验设置 1 个对照组(不添加菌)和 7 个复配菌组,7 个复配菌组(光合细菌:枯草芽孢杆菌)浓度配比分别为 $P_1(1:0)$ 、 $P_2(0:1)$ 、 $P_3(1:1)$ 、 $P_4(2:1)$ 、 $P_5(3:1)$ 、 $P_6(1:2)$ 、 $P_7(1:3)$ 。光合细菌活菌数为 1.3×10^9 CFU/mL,枯草芽孢杆菌活菌数为 5.17×10^{11} CFU/g。枯草芽孢杆菌每份加菌量为 0.002 5 g,光合细菌添加量每份为 13 mL。

1.2.2.2 实验室模拟生物降解试验设计 取塑料箱(0.5 m × 0.4 m × 0.5 m),每个加入养殖池塘水(稀释猪粪水)13 L,复合菌剂投放量为 50 mL(浓度 3.85 mL/L),试验组除对照外共有 7 组,每组 2 个平行。在室内光照,温度控制在 30 °C 条件下培养并观察。分析各试验组的化学需氧量浓度(高锰酸钾法)、氨氮含量(纳氏试剂)、亚硝酸根含量等水质指标。每隔 1 d 测定 1 次,连续测定 8 d。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌的筛选

如图 1 所示,在培养时间为 26 h 内,当培养温度为 20 °C 时,菌种 K_1 的生长速率最快,在培养 26 h 时,菌液浓度最高;菌种 K_2 的生长速率次之,其次是菌种 K_3 。当培养温度为 25 °C 时,菌种 K_1 、 K_2 和 K_3 的生长速率较快,菌液浓度较高。因此,选择 K_1 、 K_2 和 K_3 这 3 株菌进行产酶活性检测。

2.2 产酶活性能力检测结果

对 K_1 、 K_2 和 K_3 这 3 株枯草芽孢杆菌进行产蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性能力检测,结果如表 1 所示,菌种 K_1 产蛋白酶圈直径为 1.680 cm,产淀粉酶圈直径为 0.832 cm,产纤维素酶圈直径为 0.000 cm;菌种 K_2 产蛋白酶圈直径为 1.836 cm,产淀粉酶圈直径为 0.828 cm,产纤维素酶圈直径为 0.000 cm;菌种 K_3 产蛋白酶圈直径为 2.160 cm,产淀粉酶圈直径为 1.236 cm,产纤维素酶圈直径为 0.000 cm。菌株 K_3 的产蛋白酶和产淀粉酶活性能力比菌种 K_1 和 K_2 强,菌种 K_1 和 K_2 产蛋白酶与产

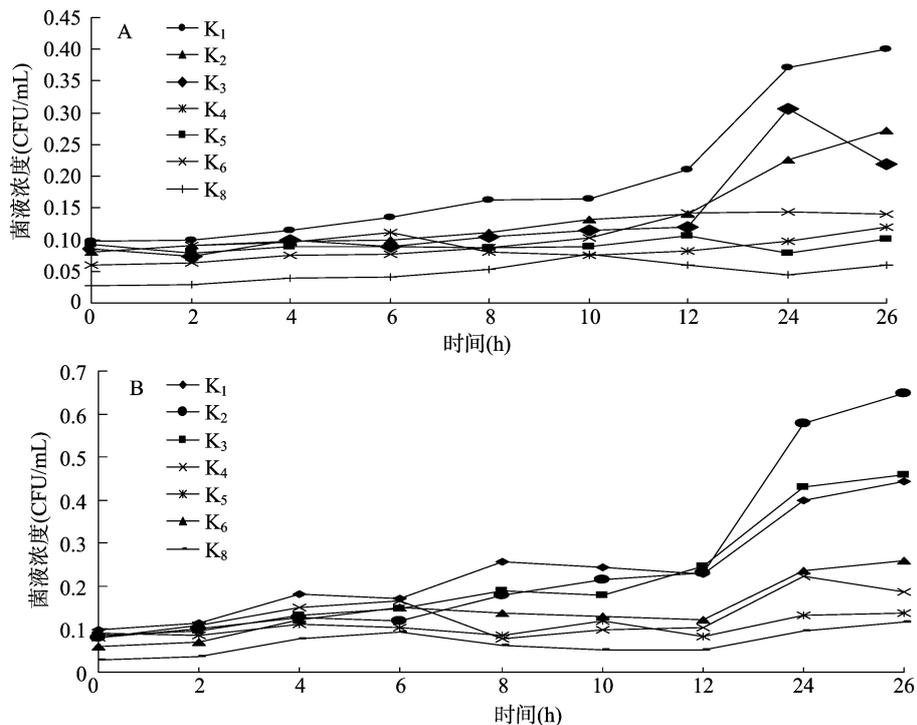


图1 20℃条件下枯草芽孢杆菌的生长曲线(A)和25℃条件下枯草芽孢杆菌的生长曲线(B)

表1 3种枯草芽孢杆菌产酶圈直径

产酶种类	产酶圈直径 (cm)		
	K ₁	K ₂	K ₃
蛋白酶	1.680	1.836	2.160
淀粉酶	0.832	0.828	1.236
纤维素酶	0.000	0.000	0.000

淀粉酶的活性能力相当,3株菌的产纤维素酶活性能力都很弱,产纤维素酶圈直径都为0.000 cm。因此选择K₃菌株与光合细菌进行复配。

2.3 不同处理对NH₄⁺降解效果的影响

如图2所示,CK(对照组)对NH₄⁺浓度的降解趋势最缓,最终结果与原始相差不大。而其他复合菌组对NH₄⁺浓度的降解速率在前8 d均快于CK,其中P₆组的降解速率比其他组快,P₃和P₇组降解速率为7组复合菌组中最慢。

2.4 不同处理对NO₂⁻降解效果的影响

如图3所示,CK的降解速率比复合菌组的慢,但是总体差异不明显,各组对NO₂⁻的降解速率差异不明显。

2.5 不同处理对COD降解效果的影响

如图4所示,CK的COD随培养时间的延长呈上升趋势,与复合菌组呈现差异明显,P₁与P₇组对COD的降解能力较强。

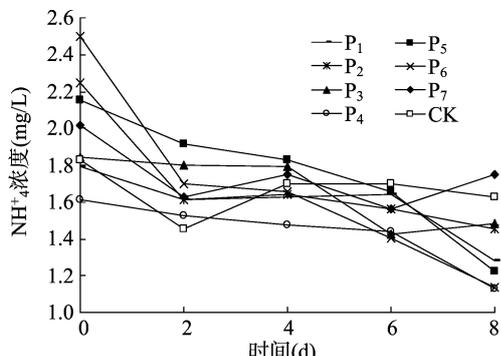


图2 NH₄⁺浓度随时间变化曲线

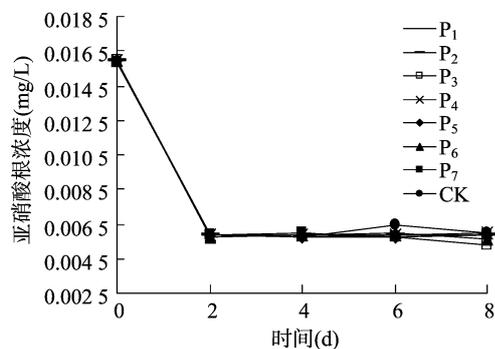


图3 NO₂⁻浓度随时间变化曲线

3 讨论与结论

本研究结果表明,光合细菌、枯草芽孢杆菌以及

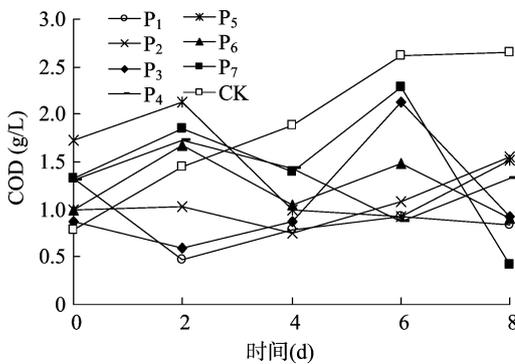


图4 COD 随时间变化曲线

复合菌都能有效降低水体氨氮、化学需氧量和 NO_2^- 浓度的能力。光合细菌：芽孢杆菌 = 1 : 2 (P_6) 时,对水中氨氮的降解效果最好,比对照组高出 4.9 倍,比单一光合细菌 (P_1) 与单一枯草芽孢杆菌 (P_2) 分别高出 1.9、1.5 倍,复合菌效果明显优于单一菌。因为养殖池塘水体中饲养鱼类喂食的饵料较多,所以水体中的氨氮含量增加,氨氮容易引起水中藻类及其他微生物大量繁殖,形成富营养化污染,使水中溶解氧含量下降,鱼类大量死亡,甚至会导致湖泊干涸。由于氨氮对养殖水体的危害较大,就不得不寻找其他方法来解决现存的高密度养殖后果。

光合细菌：芽孢杆菌 = 1 : 2 (P_6) 时,对水体中亚硝酸盐降解效果最好,其降解率是 CK 组的 1 倍,但与其他复合菌组处理效果差异不明显。养殖池塘由于大规模高密度的养殖,很容易造成水体缺氧,在厌氧状态下,水体中的硝酸根离子还原成亚硝酸根离子,亚硝酸根离子大量积累,对养殖水体的环境与养殖动物造成严重危害。而光合细菌与芽孢杆菌对于水体中氨氮的去除能力较强,因此,在养殖池塘中添加微生态制剂是一种较好的解决方案。

光合细菌：芽孢杆菌 = 1 : 3 (P_7) 时,对水体中化学需氧量降解效果最好,在培养时间内,对照组的 COD 呈现上升趋势, P_7 组对 COD 的降解明显,降解效率高于单一组 1.9 倍。COD 是评价水体质量的重要指标,COD 的高低在很大程度上反映水环境的有机污染或水体的清洁度^[10]。光合细菌在厌氧条件下可以固定 CO_2 ,也可以利用低级脂肪酸、氨基酸等作为碳源进而降低 COD^[10]。芽孢杆菌是具有高活性消化酶系的异养菌,能迅速将养殖水体中的有机物分解为小分子有机酸、氨基酸及氨,从而降

低 COD。2 种细菌都具有降解有机物的能力,二者存在共生关系^[11-12]。 P_7 组中复合菌浓度比例取得最好的 COD 降解效果,说明两者共生达到平衡,都能够发挥各自的有机物降解能力,达到最佳降低 COD 的效果。

微生态制剂的使用不但提高了水产养殖业中降解有机污染的能力,还大大节省了养殖成本,其中光合细菌既能发挥高效的降解作用,利用水体中有毒的胺、 H_2S 等,还能分泌一些对养殖动物有益的活性物质^[13]。枯草芽孢杆菌除了可以限制养殖水体中有害菌的生存和繁殖,养殖动物食用后可改善体内生态环境,并对动物某些疾病有防治作用。复合菌的使用既可以使各类微生物都各自发挥优势,又能相互利用、取长补短,使利益最大化。

参考文献:

- [1] 孙德文,詹勇,许梓荣. 微生态制剂在水产养殖中的应用[J]. 淡水渔业,2002,32(3):54-57.
- [2] 王兴礼,叶志慧. 鱼类健康养殖的技术措施[J]. 内陆水产,2008,33(6):8-9.
- [3] 李南充. 微生态制剂在池塘养殖中的应用研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [4] 谢德兵,朱思华,谷融,等. 光合细菌在鳊鱼养殖中应用效果[J]. 科技创业月刊,2017,30(5):117-119.
- [5] Wang Y B, Xu Z R, Xia M S. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds[J]. Fisheries Science,2005,71(5):1036-1041.
- [6] 张克强,李野,李军幸. 芽孢杆菌菌剂在水产养殖中的应用初探[J]. 海洋科学,2006,30(9):88-91.
- [7] 罗勇胜,李卓佳,杨莺莺,等. 光合细菌与芽孢杆菌协同净化养殖水体的研究[J]. 农业环境科学学报,2006,25(增刊1):206-210.
- [8] 李君华,刘佳亮,曹学彬,等. 芽孢杆菌与光合细菌协同作用对养殖刺参的影响[J]. 渔业现代化,2013,40(1):7-12.
- [9] 姜海明,杨腾腾,冯磊,等. 芽孢杆菌与光合细菌对乌鳢养殖水的净化作用研究[J]. 湖北农业科学,2010,49(6):1428-1430.
- [10] 柯细勇,康旭,赵志伟,等. 水质指标 COD 的优缺点及其测量方法发展[J]. 环境科学与技术,2011,34(6):255-258.
- [11] 杭小英,叶雪平,施伟达,等. 枯草芽孢杆菌制剂对罗氏沼虾养殖池塘水质的影响[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版),2008,27(2):197-200.
- [12] 汤宝贵,徐中文,张金燕,等. 枯草芽孢杆菌的培养条件及对水质的净化作用[J]. 淡水渔业,2007,37(3):45-48.
- [13] 何若天,何勇强,农友业. 农用益生菌生产与应用手册[M]. 北京:金盾出版社,2015:35-124.