

光合细菌分离鉴定及其对草鱼鱼苗养殖水质的影响

宋东莹, 张石云, 张建新, 李学军, 刘莹丽, 连跃斌

(河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007)

摘要:从养殖池塘底泥样品中分离纯化得到紫色非硫光合细菌 1 株,通过观察分离菌株的细胞形态结构和 16S rDNA 序列分析,鉴定该株光合细菌属于沼泽红假单胞菌(*Rhodops eudomonas palusteris*).采用三级扩大培养法生产光合细菌,活菌数达 3×10^9 cfu/mL.在草鱼鱼苗养殖池塘投加光合细菌,可维持池塘透明度,明显降低亚硝酸盐和氨氮含量.

关键词:光合细菌;草鱼鱼苗;氨氮;亚硝酸盐

中图分类号:Q178;Q945

文献标志码:A

我国的水产养殖以池塘养殖为主,基本上是静水、不排污或排污能力较弱,养殖对象摄食、排泄等活动在同一区域内完成.近年来,人们对水产品需求逐年增加,养殖户为了追求经济利益,而加大单位池塘面积的养殖密度,同时人工饵料的大量投喂、有机肥料的施加以及养殖对象的粪便、死亡的残骸成了水体中有机物来源^[1].池塘水体的有机物的分解,产生很多有害物质,例如氨、亚硝酸盐、硫化氢等,同时水体中的溶解氧被大量的消耗,导致底质和水质的严重污染,养殖对象在外界环境突变的情况下,极易患病,为池塘养殖业制造巨大的危险因素^[2].因此,养殖水质的有效调控成为池塘养殖业的一个关键的问题.

池塘水产养殖中,防控养殖动物疾病的药物繁多,其中,抗生素是养殖户最常使用的药物,并且存在乱用、滥用的现象,易产生诸多不良后果,例如引起病原菌的耐药性,有益微生物菌群的正常生长得到抑制,促进有害微生物的生长繁殖,水产动物的药物残留可能会危害人体的健康等^[3].近年来,微生物制剂用于改良和调控养殖水体已经广泛推广,常见的有光合细菌^[3]、芽孢杆菌^[4]、乳酸菌和 EM 菌^[5]等.光合细菌(Photosynthetic bacteria, PSB)广泛分布于湖泊、海洋及土壤中,是一类光能自养或异养微生物,能够利用养殖池塘水体中的有机物,可净化水质、防止养殖水体富营养化、抑制有害微生物生长繁殖,可有效改善水体的生态环境^[6].光合细菌的蛋白质含量高达 60% 以上,同时富含多种维生素,可作为养殖对象的天然饵料,促进其生长及增强免疫力,提高养殖对象的成活率^[2].

本实验室从草鱼养殖池塘底泥中分离纯化到一株光合细菌,用于草鱼鱼苗养殖池塘中,初步探讨光合细菌对草鱼鱼苗养殖水体水质的影响.

1 材料方法

1.1 光合细菌培养鉴定

光合细菌分离自河南师范大学水产养殖实训基地养殖池塘底泥中.光合细菌分离和富集所用到的培养基见表 1,湿热灭菌 20 min,用磷酸调节 pH 至 7.0,光照强度 1000~2000 lx,28 ℃ 厌氧培养一周.菌种采用培养特征、显微镜观察个体形态特征以及分子生物学 16S rDNA 片段序列方法鉴定.

光合细菌的规模生产采用三级培养法,一级培养采用三角瓶,无菌条件下接种,接种量为 10%;二级培

收稿日期:2016-09-10;修回日期:2017-06-10.

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(16B240002)

作者简介(通信作者):宋东莹(1984—),男,河南新乡人,河南师范大学工程师,主要从事水产动物增殖养殖方面的研究,E-mail:songdongying@126.com.

养采用 5 L 塑料桶,培养液需煮沸消毒,接种量为 20%;三级培养采用 25 塑料袋,培养液用漂白粉消毒 12 h,再用硫代硫酸钠处理后接种,接种量为 30%。培养温度为 28~30 ℃。培养基组成成分包括:醋酸钠 15%,硫酸盐 20%,磷酸盐 30%,EDTA 0.01%,KOH 0.1%,FeSO₄·7H₂O 1.0%,煮沸消毒 30 min。

1.2 草鱼鱼苗养殖实验

草鱼鱼苗,购于新乡市龙泉渔场,共分 4 组,每组 1000 尾,体长为 3 cm。

试验在河南师范大学水产养殖实训基地进行。试验鱼池 300 cm×400 cm×150 cm,水深 100 cm,分 6 组,每组 1000 尾,其中 1 号、2 号、3 号池加灭菌后的生产培养基 1 L 作为对照池,4 号、5 号、6 号池加等量光合细菌培养液作为试验池。光合细菌施用后 1 周内每天从各池中取水水面下 30 cm 的水样,采样时间为 9:00~10:00,以后每星期取 1 次水样。测定水样中的 pH、透明度、溶氧、氨氮和亚硝酸盐氮等各项指标。在整个养殖试验中,每 3 d 换水 1 次,每次换水量约为总水量的 1/3。每天上午 8:30~9:00,12:00~12:30,4:00~4:30 各投喂 1 次饵料,日投喂量为鱼体质量的 3%~5%,以投喂后 20~30 min 吃完为宜。饵料是草鱼鱼苗专用膨化饲料,粗蛋白为 32%,由河南澳华饲料有限公司提供。

1.3 水质分析

试验测定的水质指标为 pH、溶氧、透明度、亚硝酸盐、氨氮。pH 测定使用 pHS-3C-02 台式 pH 计,溶氧(DO)用碘量法,透明度用透明度盘测定,亚硝酸盐用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定,氨氮测定采用纳氏剂比色法测定。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离与鉴定、规模化生产

从底泥样品中分离、纯化得到 1 株光合细菌,命名为 YB01。其菌落为红色,革兰氏染色显示阴性,杆状菌,初步判断为紫色非硫细菌。16S rDNA 片段序列分析鉴定其为沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*),与标准菌株 ATCC17001(GenBank: AF123087.1)相似度高达 98.57%。

采用三级培养法生产光合细菌 YB01,计数显示其活菌数为 3×10^9 cfu/mL。

2.2 光合细菌在草鱼鱼苗养殖中的净水效果

将分离菌株 YB01 生产后,每次投加 1 L 到草鱼鱼苗试验池中,而对照池仅投加 1 L 消毒的三级培养液。每周测定养殖水体的水质指标。从图 2 和图 3 可看出,试验组和对照组的 pH 和溶氧均呈现出一定波动,但两组数值接近,趋势基本相同,光合细菌 YB01 对草鱼鱼苗养殖水体的 pH 和溶氧影响不显著,这与沈锦玉等报道的光合细菌对水产养殖水质的改良结论一致^[7],而邢华利用光合细菌净化虾池水质,可提高溶氧 84.8%^[8],陆永新等报道光合细菌可以提高养殖水体的 pH 值,还可以通过吸收利用水体中的有机物等耗氧因子,进而间接增加水体中的溶解氧量^[9]。有关光合细菌与水产养殖水体 pH 和溶氧的关系,有待进一步研究。

图 3 显示,对照组水体透明度在第 2 周急剧下降,从 56 cm 下降至 28 cm,实验组下降比对照慢,从第 1 周 50 cm 下降至第 4 周的 33 cm,之后维持在 32~34 cm 之间,由此可见,光合细菌 YB01 可一定程度上维持养殖水体的透明度。图 5 和图 6 显示,投加光合细菌 YB01 的草鱼鱼苗养殖水体,亚硝酸盐和氨氮单位水体含量均有所降低。氨氮含量是衡量养殖水体污染程度的重要指标,氨氮含量过高会损害水产养殖动物的鳃组织,产生极强毒害作用,易受到病原微生物的感染,同时影响呼吸,阻碍氧气在体内的运输^[10]。养殖水体过高的氨氮含量可以促进有害微生物的生长,并成为养殖水体的优势种群,抑制有益微生物的生长繁殖,从而引

表 1 光合细菌分离和富集培养基配方

	质量浓度/(g·L ⁻¹)	质量浓度/(g·L ⁻¹)
NH ₄ Cl	1.0	1.0
MgCl ₂	0.2	—
酵母膏	0.1	—
K ₂ HPO ₄	0.5	0.2
NaCl	2.0	2.0
NaHCO ₃	—	1.0
CH ₃ COONa	—	5.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	0.2

起养殖水产动物发病死亡.我国水产养殖的池塘大多数以静水养殖为主,不排污的或排污能力较差,养殖对象的一切生命活动,如摄食、排泄等均在一个水域中进行.常规改善养殖水体主要是通过更换养殖用水,改善养殖水体的时间较短,池底依然存留大量有机物,被分解后产生有毒有害物质严重污染水体^[1].实验数据表明,水产饲料中的13.9%的氮和25.4%的磷被养殖动物有效利用,剩余部分在水中积累或者沉到水底,可引起水体富营养化及水华、水中溶氧量极大的消耗、疾病暴发、产量降低,以及水生态系统的恶化^[1-2].光合细菌可有效利用池塘养殖用水的有机物质,迅速分解其中的氨态氮、硫化物等有毒有害物质.于沛芬等研究表明,光合细菌可使养殖水体除氮率达到90%以上^[11-12].

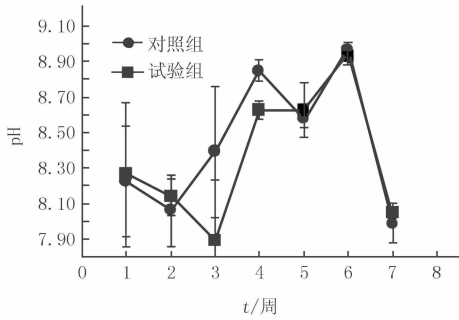


图1 添加光合细菌后草鱼鱼苗养殖池中pH的变化(n=3)

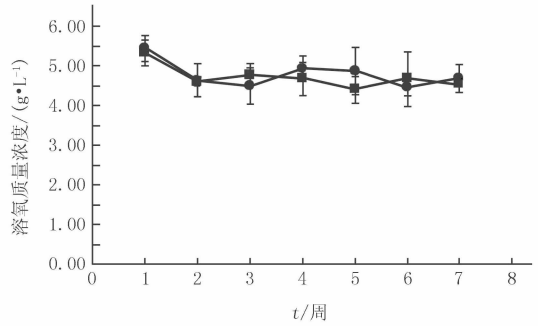


图2 添加光合细菌后草鱼鱼苗养殖池中溶氧的变化(n=3)

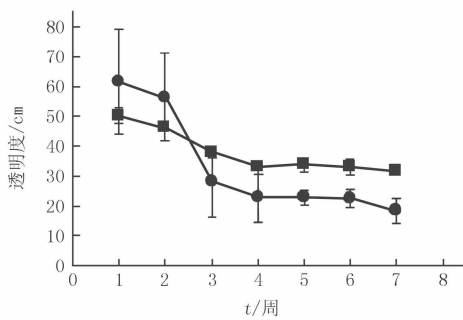


图3 添加光合细菌后草鱼鱼苗养殖池中透明度的变化(n=3)

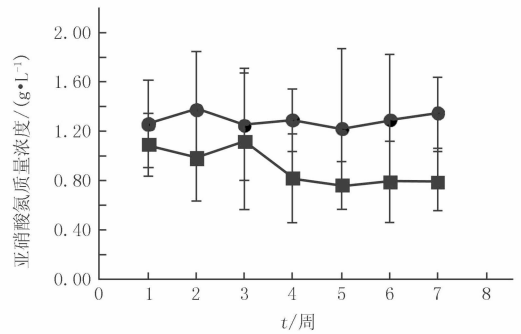


图4 添加光合细菌后草鱼鱼苗养殖池中亚硝酸盐的变化(n=3)

抗生素通常用来预防及控制养殖动物的疾病发生,已被广泛应用于水产养殖中.抗生素的过度使用易造成诸多不良后果,如药物残留危害人体健康、引起病原菌的耐药性,影响有益微生物的正常菌群等^[3].因此,光合细菌作为抗生素的替代物已广泛应用于水产动物的养殖.光合细菌含有丰富的蛋白质、维生素,可以直接或间接地作为水产动物幼体的开口饵料,可促进水产动物苗种生长发育,提高成活率^[15].同时,光合细菌含多种免疫促进因子,可激活养殖动物体内免疫系统,提高机体抗应激能力^[13-14].

综上所述,作为水质净化剂,光合细菌 YB01 可以改善草鱼鱼苗养殖水体的水质,减少抗生素等药物的用量.本研究开发的三级培养法,为光合细菌的规模化生产提供了技术支持,有利于推动光合细菌在养殖水体水质调控方面的科学应用.

参 考 文 献

[1] Zhang X P, Shu M, Wang Y B, et al. Effect of photosynthetic bacteria on water quality and microbiota in grass carp culture[J]. World J

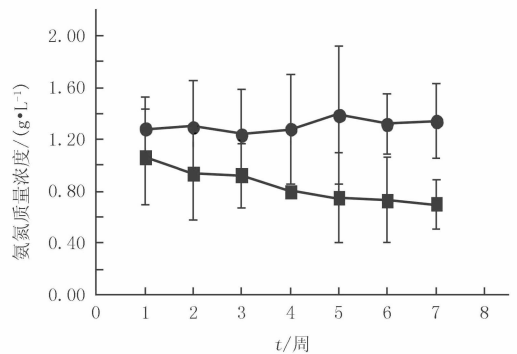


图5 添加光合细菌后草鱼鱼苗养殖池中氨氮的变化(n=3)

Microbiol Biotechnol, 2014, 30: 2523-2531.

- [2] Ahmad I, Muhamad II M, Mohd FAW, et al. Photosynthetic bacteria: an ecofriendly and cheap tool for bioremediation[J]. Rev Environ Sci Biotechnol, 2015, 14: 271-285.
- [3] 刘慧玲, 张红莲, 李细钊. 光合细菌的分离及其对水体中亚硝酸盐降解的研究[J]. 水产科学, 2005, 24(6): 32-33.
- [4] 易力, 汪洋. 4株光合细菌对病原菌的拮抗功能研究[J]. 齐鲁渔业, 2008, 25(8): 8-9.
- [5] 马同锁. 几种益生菌复合制剂在鲤鱼养殖中的应用研究[J]. 河北渔业, 2005(4): 14-16.
- [6] 郑耀通, 胡开辉, 高树芳, 等. 高效净化水产养殖水域紫色非硫光合细菌的分离和筛选[J]. 福建农业大学学报, 1998, 27(3): 342-346.
- [7] 沈锦玉, 尹文林, 刘问, 等. 光合细菌 IIZPSB 对水产养殖水质的改良和对鱼类促生长作用[J]. 科技通报, 2004, 20(6): 481-484.
- [8] 邢华. PSB 在水产养殖上的开发应用(一)[J]. 利学养鱼, 1994(2): 20-25.
- [9] 陆永新, 王蔚森, 张家学, 等. 光合细菌在水产养殖上的应用[J]. 饲料博览, 2007(21): 56-58.
- [10] 鲁林仓. 谨防氨氮中毒[J]. 内陆水产, 2001(7): 12-14.
- [11] 于沛芬. 光合细菌的分离、鉴定和固定化及其在净化鱼虾水质中的应用研究[J]. 生物技术, 1995, 5(3): 5-36.
- [12] 战培荣, 王丽华, 于沛芬, 等. 光合细菌固定化及其净化养鱼水质的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 97-100.
- [13] 万夕和. 水产养殖慎用抗生素[J]. 科学养鱼, 2001(4): 34-36.
- [14] 王有基, 胡梦红, 朱焕青, 等. 光合细菌对鲤鱼非特异性免疫功能的影响[J]. 水产学报, 2005, 25(6): 38-39.
- [15] 张道南, 孙其焕, 陈乃松, 等. 红螺菌科光合细菌的分离培养及其作为鱼虾类饵料添加剂的初步研究[J]. 水产学报, 1988, 12(4): 367-369.

Isolation and Identification of Photosynthesis Bacteria and Its Effect on the Water Quality in Aquaculture Ponds of Grass Carp Fry

Song Dongying, Zhang Jianxin, Zhang Shiyun, Liu Yingli, Lian Yuebin, Shi Boshen, Wang Xiaomin

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: A strain of purple non-sulfur photosynthetic bacteria was isolated from the mud samples of aquaculture ponds. According to the cell morphology and the sequence analysis of 16S rDNA, the strain was identified as *Rhodospseudomonas palustris*. The number of living bacterium were 3×10^9 cfu/mL through a three-stage progressive scale-up culture. After adding the bacteria to aquaculture ponds of grass carp fries, the transparency of the experiment ponds can be kept, and the contents of ammonia and nitrite nitrogen obviously decreased.

Keywords: photosynthesis bacteria; grass carp fry; water quality

[责任编辑 王凤产]