

文章编号: 1000- 0615(2000)04- 0334- 05

虾池有机污染物降解细菌的筛选

莫照兰, 王祥红, 于 勇, 李会荣, 纪伟尚, 徐怀恕
(青岛海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 在实验室条件下对 612 株海洋细菌和 10 株海水驯化淡水菌进行筛选, 检测其快速降解水体中富营养有机物的能力。利用对虾饵料培养基、BOD 仪、胞外酶检测等方法进行筛选, 最后筛选到 10 株对富营养有机物具有较高降解性能的细菌。所有的细菌均能产生明胶酶和脂酶(Tween- 80), 其中 9 株细菌能产生淀粉酶, 8 株产生卵磷脂酶, 2 株产生酪蛋白酶, 1 株产生褐藻胶酶。通过测量 BOD 来衡量 10 株细菌利用对虾饵料的效果, 2 天时能消化 46.6%~59.5% 的对虾饵料, 5 天时能消化 50.8%~70.2% 的对虾饵料。用常规生理生化方法将细菌鉴定到属, 其中 3 株为弧菌属细菌(*Vibrio* spp.), 3 株为假单胞菌属细菌(*Pseudomonas* spp.), 2 株为发光杆菌属细菌(*Photobacterium* spp.), 1 株为气单胞菌属细菌(*Aeromonas* spp.), 1 株为枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)。

关键词: 有机污染物降解细菌; 对虾饵料培养基; 生物需氧量; 胞外酶; 细菌鉴定

中图分类号: S968.22 文献标识码: A

Selection of organic-pollutants-degrading bacteria in shrimp ponds

MO Zhao-lan, WANG Xiang-hong, YU Yong, LI Hui-rong, JI Wei-shang, XU Hua-shu
(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: 612 bacterial strains from shrimp ponds and 10 freshwater strains which had been transplanted on the 2216E marine agar repeatedly were checked for their degrading abilities to the organic pollutants. 10 strains were selected by evaluating the growth on the shrimp-feed medium, BOD in the liquid media and their extracellular enzyme activities. All these 10 strains were able to produce gelatinase, lipase (Tween-80) and 8 of these strains produced lecithinase, 9 produced amylase, 2 produced caseinase, 1 produced alginase. All of them were able to degrade the feed of shrimp from 46.5% to 59.5% in two days and from 50.8% to 72.2% in five days. By the traditional physical and chemical methods, 3 of these strains were identified as *Vibrio* spp., 3 as *Pseudomonas* spp., 2 as *Photobacterium* spp., 1 as *Aeromonas* spp., and 1 as *Bacillus subtilis*.

Key words: organic-pollutants-degrading bacteria; shrimp-feed medium; BOD; extra-enzyme; bacterial identification

近年来, 世界范围内的海水养殖业包括对虾、扇贝、鱼类养殖相继发生病害, 大面积的死亡给养殖业造成了巨大损失, 严重影响了水产业的发展, 其中对虾养殖业受到的影响最为突出。究其原因是因为目前对虾养殖多采用人工投饵方式, 在养殖过程中会有大量残饵、粪便及死亡动植物沉于池底, 必然造成池内有机物和有害无机物的累积, 形成严重污染。虾病发生除病原因素外, 根本原因之一是池底淤泥累积和水质恶化, 使生态平衡遭到破坏。这不但直接对养殖对象造成危害, 而且排出的养殖废水又形成新

收稿日期: 1999- 08- 23

基金项目: 国家“九五”科技攻关资助项目(96- 005- 03- 01- 03)

作者简介: 莫照兰(1967-), 女, 广西南宁人, 博士, 主要从事海洋微生物学研究。Tel: 0532- 2879062- 2107, E-mail: devbiol@ms.

的污染,造成恶性循环。因此,研究对虾养殖环境中有机污染物的快速降解转化方法,对解决当前对虾养殖的环境问题,彻底改善养殖状况,保持对虾养殖业健康持续地发展有重要的意义。

微生物种类繁多,繁殖迅速,可高效地分解有机物。国内外已将其广泛用于工业污水、生活污水以及生活垃圾的处理,并且已形成一整套完善的工艺和理论^[1-3]。在水产养殖方面,东南亚和我国台湾应用微生物改善虾池底质和水质环境^[4],我国大陆也有报道应用光合细菌、复合微生物制剂控制水质因子^[5,6]。随着现代生物技术的快速发展,将传统的微生物学与现代技术有机结合,大大提高了微生物的降解效力,扩大了降解范围。因此,通过微生物来降解虾池富营养有机污染物来解决对虾养殖业面临的环境问题,从经济效益和生态效益方面来说将比目前应用的机械清污和化学净化方法更有效。本研究针对目前对虾养殖水体中主要的富营养有机污染物之一——残饵及饵料溶出物,筛选、驯化适合在海水养殖水体中生长并能快速降解有机污染物的细菌,为进一步施用于对虾养殖环境创造条件。

1 材料和方法

1.1 培养基

对虾饵料:含粗蛋白 45%,粗脂肪 6%,碳水化合物 20%,能值 $314\text{J}\cdot(100\text{g})^{-1}$ 干料。

培养基 A:对虾饵料 2g(研成细粉),陈海水 1 000mL,琼脂 20g。

培养基 B:对虾饵料 2g,陈海水 1 000mL。

1.2 实验菌株

1996-1997年从山东省莱州市大华养殖公司对虾育苗厂沙滤池、育苗池、养成池分离到 602 株细菌,海水驯化淡水菌 10 株,共 612 株细菌用于筛选。

1.3 有机污染物降解菌的筛选

1.3.1 初筛

将活化的细菌划线接种在培养基 A 上,28℃培养 24~48h,记录细菌的生长情况,选取 24~48h 内能在培养基上生长的细菌,作为进行二筛的菌株。

1.3.2 二筛

用差压式 BOD 仪(Model- IIA 型,广东省环境保护仪器设备厂)对初筛得到的菌株进行二筛,对其在培养基 B 中利用对虾饵料的能力进行测定。测试时选择量程 $240\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,投样量 120mL,量程系数 $K_1=2.415$ 。接种水为在 B 培养基培养 24~48h 的菌液,接种量为 10%。标液与样品液相同,即 B 培养基。选择每一测量周期中 BOD_2 读数最高的细菌作为三筛的菌株。

1.3.3 三筛

对二筛得到的菌株进行胞外酶活力的检测。检测项目有卵磷脂酶、Tween-80 酶、明胶酶、淀粉酶、酪蛋白酶、几丁质酶。参照文献[7]的实验方法进行,将培养 18h 左右的菌悬液取 10 μL 点种到含有各种底物的平板上,以细菌利用底物产生的直径大小表示产酶能力。

1.4 细菌利用对虾饵料的能力

通过测定培养一定时间后的 BOD 值来衡量三筛得到的细菌利用对虾饵料能力,用不同时间 BOD_2/COD 和 BOD_5/COD 分别表示 2d 和 5d 时间里细菌利用对虾饵料的能力,样品液 COD 用碱性高锰酸钾法进行测定。每株菌设三个平行,选取初筛中读数较低的一株细菌作为对照,记录各菌株 BOD_2 和 BOD_5 的读数。

1.5 细菌鉴定

参照文献[8]的方法对所分离的海洋细菌鉴定到属。鉴定项目包括:形态观察、革兰氏染色、鞭毛染色、氧化酶反应、过氧化酶反应、运动性试验、葡萄糖氧化发酵、O/129 敏感性试验等。

2 结果

2.1 有机污染物降解菌的筛选

2.1.1 初筛

将在 2216E 海水培养基斜面上活化的待筛菌株接种在培养基 A 上,观察发现大部分菌株在 24~48h 内不能生长或生长很慢。有 112 株菌在饵料培养基上生长旺盛,可作为进行二筛的菌株。

2.1.2 二筛

选择合适的测量量程,测定初筛得到的 112 株菌的培养 2d 和 5d 的 BOD 值。本实验选择水样不稀释,但需扣除接种水的 BOD₅ 的测定方案。按说明书方法,实际的 BOD 的计算公式如下:

$$\text{BOD} = (R_1 \times K_1 - R_2 \times K_2 \times f_1) \times f_2$$

式中, R_1 为接种后水样的差压计读数;

K_1 为接种后水样所选测定量程系数;

R_2 为接种水的差压计读数,刻度格;

K_2 为接种水所选测定量程系数;

f_1 为接种水的比例;

f_2 为 $1 - f_1$ 。

能快速降解对虾饵料的菌株应在较短的时间内分解和利用饵料,利用较多的 O₂,使 BOD 瓶内的气压下降,读数升高。因此接种后每天观察 BOD 仪的差压计读数,选择 BOD₂ 读数在 50~62 的 45 株菌作为下一步筛选的菌株。

2.1.3 三筛

检测了 45 株菌产生胞外酶的情况,其中 10 株菌产胞外酶能力较强(表 1)。筛选得到的 10 株菌几乎均能产生卵磷脂酶、Tween-80 酶、明胶酶、淀粉酶;不同菌株产酶能力不一样;WE69 和 MT83 产明胶酶的能力最强,STD₃-90 产 Tween-80 酶的能力较其它菌株高;WE69 不仅能产生较强的利用 Tween-80、明胶和淀粉的胞外酶,而且能分解褐藻胶和利用几丁质。

表 1 细菌胞外酶的活力(mm)

Tab. 1 Activities of extracellular enzyme of bacteria(mm)

菌号	卵磷脂酶	明胶酶	淀粉酶	Tween-80 酶	褐藻胶酶	酪蛋白酶	几丁质酶
STD ₃ -90	5	14	5	10	0	4	0
WT65	5	13	13	12	0	5	0
SSC12	6	8	5	7	0	0	0
WT908	7	7	12	5	0	0	0
WT82	0	6	10	4	0	0	0
SSY11	5	12	0	5.5	0	0	0
J2-3	7	9	6	6	0	0	0
MT83	4	20	16	3	0	0	0
WE69	0	20	12	9	7	0	7
枯草杆菌	7	2	4.5	6	0	0	0

注:细菌胞外酶的活力以细菌利用底物产生的直径大小表示酶的活力。

2.2 10株菌利用饵料的能力

用 KMnO_4 作为氧化剂测得样品液的COD为 $(274.5 \pm 8.64) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,包括了可生物降解和不可生物降解两部分,以此作为样品液的总有机物含量,记为 COD_{Mn} 。三筛得到的10株菌用BOD仪测定其利用对虾饵料的能力,对照为在培养基A中生长缓慢的一株菌,结果如表2。

表2 菌株降解对虾饵料的能力

Tab. 2 Degradation activities of shrimp fed by bacteria

菌株	BOD ₂ 读数	BOD ₂ 与对照相比 P值(t检验)	BOD ₂ /COD _{Mn} (%)	BOD ₅ 读数	BOD ₅ 与对照相比 P值(t检验)	BOD ₅ /COD _{Mn} (%)
WT82	163.3 ± 4.62	$P < 0.01^*$	59.5	173.3 ± 11.59	$P < 0.01^*$	63.1
WT908	155.5 ± 10.85	$P < 0.01^*$	56.6	192.7 ± 10.69	$P < 0.01^*$	70.2
MT83	145.5 ± 18.15	$P < 0.01^*$	52.9	184.3 ± 7.05	$P < 0.01^*$	67.1
J2-3	145 ± 13.45	$P < 0.01^*$	52.8	156.8 ± 9.82	$P < 0.01^*$	57.1
WT65	153.2 ± 10.02	$P < 0.01^*$	55.7	171.0 ± 5.90	$P < 0.01^*$	62.3
SSY11	151.5 ± 10.81	$P < 0.01^*$	55.2	187.2 ± 4.51	$P < 0.01^*$	68.2
STD3-90	133.5 ± 10.69	$P < 0.01^*$	48.6	139.5 ± 4.09	$P < 0.01^*$	50.8
SSC12	218.0 ± 7.94	$P < 0.01^*$	46.6	143.8 ± 9.04	$P < 0.01^*$	52.4
枯草杆菌	162.5 ± 20.59	$P < 0.01^*$	59.3	181.5 ± 13.33	$P < 0.01^*$	66.1
WE69	154.6 ± 17.20	$P < 0.01^*$	56.3	180.2 ± 20.90	$P < 0.05^*$	65.6
对照	35.2 ± 11.70	-	12.8	74.9 ± 10.19	-	3.7

注: * 为差异显著。

在以对虾饵料为营养物质的情况下,各细菌利用对虾饵料有机物的能力不一样。在2d的时间里,菌株能消化46.6%~59.5%的对虾饵料有机物,其中WT82和枯草杆菌的利用能力最强;到第5d时,细菌能利用一半以上的饵料有机物,降解范围为50.8%~70.2%。以 $\text{BOD}_2/\text{COD}_{\text{Mn}}$ 的百分率大于45%表示菌株降解富营养有机物能力强,所有筛选菌株的降解性均超过了45%,除SSC12和STD3-90外,其它9株菌的降解能力超过50%。

2.3 菌株鉴定

对细菌进行了形态、革兰氏染色、鞭毛染色、氧化酶及过氧化氢酶反应、泳动现象、葡萄糖氧化发酵、O/129敏感性、色素产生、精氨酸脱羧及青霉素敏感实验,根据Oliver海洋细菌鉴定方法^[8],WE69、MT83和SSY11归属为假单胞菌属细菌(*Pseudomonas* spp.);WT65和WT908归属为发光杆菌属细菌(*Photobacterium* spp.);WT82和J2-3归属为弧菌属细菌(*Vibrio* spp.);SSC12归属为气单胞菌细菌(*Aeromonas* spp.)。STD3-90为溶藻胶弧菌,由利时根特大学赠送的用于厄瓜多尔对虾育苗的有益菌(Lorena S M, et al. A strain of *Vibrio alginolyticus* as a candidate for prevention of vibriosis in *Penaeus vannamei* shrimp larvae. 1997.);枯草杆菌为淡水菌株,经海水驯化而成。

3 讨论

本实验利用对虾饵料配制成的固体海水培养基作为筛选菌株的第一步,用此方法可以排除大部分不能利用对虾饵料或利用率低的菌株,得到可在上述培养基迅速生长的菌株。在平板上容易观察到细菌的生长,但不能对其利用有机物的情况进行定量分析。在水体中有机物浓度的变化可以用化学方法检测到,而在实际测定中常用化学需氧量(COD)和生物需氧量(BOD)来表示水体中有机物的含量。如果水体不经过去菌而直接用氧化剂处理测定得到的COD包含了细菌在内的有机物含量,不能确切反映水体中有机物被细菌利用的情况。BOD反映的是水中有机物被微生物氧化分解过程中所消耗的氧量,消耗的氧愈多,微生物利用的有机物愈多,因此只要通过测定处理前后水中溶解氧之差,便可计算出微生物利用有机物的情况。该原理为筛选可利用富营养有机物能力的菌株提供了一种定量的手段。我们用48h实验水体有机物的含量为指标,筛选出BOD₂读数高的细菌以备进一步的筛选。细菌利用环境

中有机物的能力与其分泌到细胞外的酶有关,通过检测其在培养基中的产酶能力,最终筛选得到能适应海水环境并能较快利用有机物的细菌。

用高锰酸钾法测定得到的 COD 包括了可生物降解和不可生物降解的有机物两部分,因此用 COD_{Mn} 作为对虾饵料培养基的总有机物含量。工业中常用 BOD_5/COD_{Mn} 来评定工业废水的可生化性,如果 BOD_5/COD_{Mn} 的百分率大于 45%,可生化性好,大于 30% 表示可以进行生化处理,小于 30% 表示难以进行生化处理,小于 25% 则不宜采用生化处理^[9]。根据上述方法,本实验测定的 BOD_5/COD_{Mn} 均超过 45%,一方面表示对虾饵料的可生化性好,另一方面表明细菌降解饵料有机物的能力强。为了更准确地表示菌株快速利用对虾饵料有机物的情况,以 BOD_2/COD_{Mn} 考察菌株的降解效率。结果表明所筛选的菌株均有较高的降解效率,大部分细菌在 2d 内能把 50% 以上的对虾饵料降解,在 5d 内把 60% 以上的对虾饵料降解。用此法在实验室条件下评定细菌处理海水中的对虾饵料的方法简便,易操作,结果明了,可适用于其它特定水环境中的细菌降解有机物废水中污染物的情况。

本实验是针对对虾养殖水体中最主要的富营养有机物之一——对虾饵料的分解能力而设计的,结果表明筛选得到的 10 株细菌对对虾饵料有较好的降解性能。但养殖水体中除了残饵外,还有动物粪便及死亡动植物残骸等其它有机污染物,因此还需要进一步研究这些菌株降解其它有机污染物的能力。此外,明确这些细菌对对虾、鱼或人等的致病情况也是十分重要的,因为不同的细菌,或同一菌属中不同的种,甚至同种菌的不同株系的致病性存在极大的差异。如弧菌类的溶藻胶弧菌可能是养殖动物和人的潜在病原,而欧洲和南美一些国家却将溶藻胶弧菌及其他细菌作为有益菌来保护和促进对鱼虾贝的生长^[10-12],因而在施用这些有机物降解菌之前还需明确它们是否人和动物真正的病原。实验初步证明了这 10 株来源于对虾养殖环境的细菌对虾无致病性^[13]。

参考文献:

- [1] 李月中, 陈世和. 固定化微生物细胞处理含氰废水的研究[J]. 上海环境科学, 1991, 10(2): 2- 4.
- [2] 肖庚富. 曝气浸没固定性生物膜法及其在污水处理中的应用[J]. 环境科学与技术, 1993, (4): 1- 5.
- [3] Clark J H, Moseng E M. Performance of a rotating biological contractor under varying wastewater flow[J]. J WPCF, 1978, 50(3): 1005- 1009.
- [4] 陈秀男. 养殖环境的管理与经营[J]. 养鱼世界, 1990, (10): 51- 55.
- [5] 吉海平, 陈金山. 光合细菌在净化水质的应用实验研究[J]. 生物工程进展, 1998, 18(2): 29- 32.
- [6] 吴 伟. 应用复合微生物制剂控制养殖水体水质因子初探[J]. 湛江海洋大学学报, 1997, 17(3): 16- 20.
- [7] 徐怀恕. 水产养殖动物弧菌病害研究方法[A]. 欧盟欧洲委员会资助项目论文集[C]. 北京: 海洋出版社, 1999. 166- 190.
- [8] Oliver J D. Instrument and methods, taxonomic scheme for the identification of marine bacteria[J]. Deep Sea Res, 1982, 29: 795- 798.
- [9] 秦麟源. 废水生物处理[M]. 上海: 同济大学出版社, 1989. 108- 110.
- [10] Austin B, Stuckey L F, Robertson P A, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*[J]. J Disease, 1995, 18: 93- 96.
- [11] Gibson L F, Woodworth, George A M. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*[J]. Aquac, 1998, 169: 111- 120.
- [12] Sirirat R, Wannipa P, Somkiat P, et al. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth[J]. Aquac, 1998, 167: 301- 313.
- [13] 莫照兰. 虾池有益细菌的研究[D]. 青岛海洋大学博士学位论文, 1999.