

研究简报

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

ISOLATION AND CULTIVATION OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIA OF RHODOSPIRILLACEAE AND ITS APPLICATION AS ADDITIVE IN FEEDS OF FISH AND PRAWN

张道南 孙其焕 陈乃松

(上海水产大学)

乔振国

(东海水产研究所)

Zhang Daonan, Shan Qihuan and Chen Naisong

(Shanghai Fisheries University)

Qiao Zhenguo

(East China Sea Fisheries Research Institute)

红螺菌科细菌,其细胞内含有菌叶绿素 a 或 b 和各类胡萝卜素,能进行不放氧的光合作用。其大多数种类能以有机物作为光合作用的供氢体兼碳源,故在自然界里被有机物污染的地方它们广泛存在,在净化环境中起着重要的作用。由于它们在不同的条件下能以不同的代谢方式,高效地降低污水中的 BOD,故在处理高浓度有机废水中有着独特的优点和广泛的应用前途^[1-3]。对其菌体成份分析表明:它们有很高的蛋白质含量(65.45%),还含有对动物生长发育起促进作用的生理活性物质(辅酶 Q 和相当完全的 B 族维生素等)。据国外有关报导,它们对鱼类具有明显的促进生长作用,并且还有防治鱼虾疾病、净化养殖水质等多方面的功能,已被认为是一个能促进水产生产很有价值的开发性研究对象^[4]。但在国内尚未见报导。我们从 1983 年以来,对这类光合细菌进行了分离、培养,同时进行了较多的应用试验。本文重点介绍对这类光合细菌的分离、鉴定和实验室扩大培养的方法,同时对养殖上的应用也作初步的研究报导,以期引起水产界重视这一开发性的工作。

材料和方 法

1. 菌株的分离和鉴定

(1) 分离材料 取材于豆制品厂废水排出沟处,呈橙黄色的块状沉积物。

(2) 分离用的培养基 其成份如下:

CH ₃ COONa	3.0g,	CH ₃ CH ₂ COONa	0.3g,	NaCl	0.1g,
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3g,	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g,	KH ₂ PO ₄	0.5g,
K ₂ HPO ₄	0.3g,	CaCl ₂	50mg,	MnSO ₄	2.5mg,
FeSO ₄	5mg,	酵母膏	0.1g,	蛋白胨	10mg,
谷氨酸	0.2mg,	蒸馏水	1000ml,		
pH	7.4,	8磅20分钟	蒸压灭菌。		

(3) 分离方法 橙黄色块状沉积物 1 克,在装有玻璃珠的 50ml 无菌水锥形瓶中,振荡使充分打

碎。加入装有液体培养基的大试管中(悬浊液与培养液之比为1:5),在液面上滴加灭菌液体石蜡进行厌氧培养,保温28~30°C,光照强度5000Lux左右。十四天后培养液呈明显红色,如此培养液重复进行富集培养二次,即得到深红色的培养液。以富集培养液进行琼脂平板划线分离,以常规的化学去氧法和物理去氧法相结合进行厌氧培养,在28~30°C,光照(5000Lux左右)三天,开始出现红色小菌落,五天单菌落生长良好。挑取单菌落重复分离三次,直至得到纯培养单菌株。

(4) 鉴定方法 在上述合成培养基中观察单菌落形态、菌体形态,并进行电镜观察;用以上合成培养基为基础,通过改变碳源及光合供氢体或在各种不同环境下进行菌株的生理代谢特性的观察。

2. 实验室扩大培养^[5]

(1) 培养装置 根据光合细菌的生物学特性,笔者设计光合细菌实验室中扩大培养装置每个单体容量7升,可平行进行培养或串连进行连续培养。控温仪用来控制培养液的温度。注射器和分离漏斗用来取样和向培养液中添加有机酸,以防止培养过程中pH值的过度升高。碘钨灯提供光源。磁力加热搅拌器用来加热和保持培养液受光、受热均匀。此装置不仅能够为光合细菌的增殖提供厌气和适宜的光照、温度、pH等良好的生态环境,而且操作也很方便。

(2) 培养基 将豆制品厂培养白地霉后的排放废液用浓氨水调pH值至7.0,通气,使好氧性异养菌大量增殖,将废液中的大分子有机物进行分解。然后煮沸5分钟,再调pH值至7.4。

(3) 培养环境的控制 在培养时接种量与新培养液的体积按1:3的比例较为合适。光照强度控制在5000Lux左右,温度恒温于28~30°C左右,pH值维持在7.4左右对其增殖最佳。

3. 强化枝角类喂养金鱼的试验

(1) 材料 受试鱼苗是用孵化后能够开始摄食淡水枝角类的金鱼苗作为受试对象。这些鱼苗是来自同一对金鱼亲体繁殖的后代,遗传学特性基本一致。饵料是淡水枝角类,用浮游动物网在野外水域中捞取,这些枝角类是金鱼良好的饵料,不存在营养上的缺陷。

(2) 方法 将受试鱼苗随机分成两组,即实验组和对照组,鱼苗的饵料是野外捞来并经一定浓度的光合细菌强化的淡水枝角类。强化方法是让枝角类饱食光合细菌,对照组鱼苗则直接用野外捞来的淡水枝角类进行饲养。其它养殖条件均一致。

4. 在虾类育苗上的应用试验

试验的虾类是脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*),共选用体长5~8cm的抱卵亲虾200尾左右,获得同时孵出的溞状幼体1.2万尾,分别饲养于115×50×45cm有效水体为0.1m³的塑料水槽中,每槽4000尾。试验海水盐度9~10‰,水温25~27°C,试验共进行十九天。

试验前期,各槽均以鸡蛋黄为饵料,每槽投饵量为每天3~4.5克,从幼体发育为溞状II期后开始投以卤虫无节幼体。投喂量以水中至少维持每毫升3尾以上卤虫幼体为准;每天投喂4次,时间为8:00、13:00、18:00、21:00。换水量各槽相同,一般占全部水量的25~30%;每天一次,经200目筛绢网过滤后使用。光合细菌的投喂量分为140ml试验组、100ml试验组(菌液浓度为每升中含干菌体2克左右)和对照组,每天换水后分二次直接投于育苗水体中。

试验期间,对各槽的氨氮、化学耗氧量、pH等因子每天测定一次。

结果与讨论

1. 菌株鉴定

(1) 菌落形态 琼脂平板厌氧、光照、28~30°C五天培养,菌落圆形、边缘整齐,表面凸面状,呈深红色至暗红色,不透明,无粘滞性,略具光泽,直径为0.2~0.4mm。

(2) 菌体形态 菌体杆状,两端钝圆,有时稍弯曲,大小为0.6~0.9μ×1.5~3.5μ。革兰氏染色阴

性,幼龄菌体亚极生鞭毛。菌体内含较多的聚 β -羟基丁酸。在老龄培养物中常呈玫瑰花簇状聚集生长。芽生繁殖,能明显见到呈哑铃状的菌体。

(3) 生理性状和代谢方式的测定

a. 在含有有机物的培养基中,生长良好(如以醋酸钠及丙酸钠作碳源的合成培养基、经可溶化处理的豆制品废水等),在培养基中不加 NaHCO_3 同样得到良好生长。证明具有以有机物作光合作用的供氢体,同时作为碳源使用的性能,是属于能进行光能异养生长的光合细菌。

b. 以元素硫 $0.05\sim 0.1\text{Na}_2\text{S}$ 作唯一光合供氢体的合成培养基上不生长,以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 作唯一光合供氢体的合成培养基上生长微弱,但加入酵母膏则能生长。

c. 在以低级脂肪酸为光合供氢体兼碳源的合成培养基上,无论在厌氧、光照或好氧、黑暗条件下均生长良好。说明此菌株在不同条件下,能通过不同的代谢方式进行生长和获得能量。

d. 最适宜 pH 生长范围 $6\sim 8$; 在 $\text{pH}5\sim 5.5$ 的培养基中不生长,在 $\text{pH}5.8$ 的培养基中少量生长,细胞均为杆状。最适生长温度 $28\sim 30^\circ\text{C}$ 。

e. 在 0.2% 丙酸钠中生长良好,不利用柠檬酸盐、甘露醇、山梨醇、不液化明胶。

根据以上的形态、生理及生态特点,主要特征附合红螺菌科的沼泽红假单胞菌 [*Rhodospseudomonas palustris* (Molisch) Van Nill 1944]^[6]

2. 实验室扩大培养结果 用比浊法测定此菌株培养液的菌体含量,即在 $660\text{m}\mu$ 的波长下测得的菌液消光值同菌体浓度呈线性关系,10D相当于 1.0769 克/升的菌液浓度。用这样的方法计算,我们在进行该菌株培养时的产量为: 1m^3 豆制品废水(培养白地霉后)可培养出 2 公斤的干菌体。同时原废液的 COD_{Mn} 去除率达 90% 左右。这样在废水处理上能一举二得,可得到大量廉价的光合细菌菌体。

3. 在金鱼苗促长试验上的结果 经过15天的投喂试验,用电子秤将两组鱼苗逐一称重,将实验数据(每组 80 尾)代入生物统计学公式。对平均增重进行均值差异显著性检验后发现,实验组鱼苗的平均增重量(0.494 克)及成活率(98.74%)显著的高于对照组(分别为 0.342 克, 96.3%)。这显示了光合细菌体中含有较高的可消化蛋白质及丰富的叶酸、辅酶 Q、B 族维生素群、类胡萝卜素等营养成分,通过被鱼苗摄食后,对其生长有显著的促进作用。

4. 在虾类育苗上试验结果 经过十九天培养,投喂光合细菌菌液 140ml 试验组,虾苗由涨状幼体变为幼体的变态率为 94.1% ,成活率 63.7% 。投喂光合细菌菌液 100ml 试验组变态率为 91.4% ,成活率为 53.9% ,对照组变态率为 77% ,成活率为 44.4% 。表明:光合细菌菌液添加在虾类育苗水体中,具有提高虾苗成活率,促进生长发育,是一种比较理想的育苗添加剂。同时从各育苗水槽的水质情况看,虽各组均在正常范围内,但相比之下,光合细菌 140ml 试验组的氮含量平均值要比对照组高出 30% 左右, COD 值高出 4% 左右,而 100ml 试验组则与对照组基本接近。pH 值的变化是对照组略高于两试验组。根据这些情况,我们认为,菌液主要起了强化营养的效果;同时由于虾苗和幼虫幼体大量摄入菌体,其净化水质的作用也大大减弱。经我们实验观察,菌液投喂 3 小时后,水体由褐色变清而在幼体肠胃中均出现红色。

参 考 文 献

- [1] 土壤微生物研究会编(叶维青等译), 1983. 土壤微生物实验法, 科学出版社。
- [2] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著, 1978. 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社。
- [3] 翁稣颖等, 1982. 进行光合作用的细菌. 微生物通报, 9(3):144-149.
- [4] 小林正泰, 1981. 养鱼和光合成细菌. 养殖, 8:56-59.
- [5] 小林达治, 1967. 光合成细菌的大量培养方法. 特许公报. 昭42-11979
- [6] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., 24-33. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.