

固定化光合细菌在中华绒螯蟹人工育苗中的应用

王怡平 蒺荣 梅贤君 任重
(安徽大学生命科学院, 合肥 230039)

赵乃刚 汪朝辉
(安徽省水产新技术研究所, 合肥 230088)

摘要 用包埋法制备固定化光合细菌, 并通过制备方法及使用方法的改进, 使净化水质效果得到改善。四种不同包埋载体的试验结果表明, 含3%沸石的海藻酸钙凝胶珠强度最大, 净化水质活性最高。水体中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的含量及COD值的下降幅度随包埋比的增大而增大。对固定化光合细菌的用量及活化处理方法进行了探讨。生产规模试验在 50m^3 育苗池中进行。一次性投入固定化光合细菌19kg, 十天蟹苗存活率40.6%, 比泼洒相同浓度游离光合细菌的对照池提高11.2%, 多产大眼幼体15.75万个。

关键词 中华绒螯蟹, 苗种培育, 固定化光合细菌, 水质净化

光合细菌具有特殊的代谢特性和菌体化学组成, 在水域的物质循环和食物链结构中起着重要作用。红螺菌科光合细菌因其无论在光照或黑暗, 有氧或无氧条件下均能大量利用水中有机物、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 H_2S 及硫化物而使水质得到净化[刘如林等1991]。近年来, 在鱼、虾、贝的养殖及育苗生产中利用光合细菌降低水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的浓度已收到良好效果[战培荣等1997, 刘双江等1996]。在高密度工厂化的中华绒螯蟹(河蟹)人工育苗生产中, 水质管理是最重要的环节之一, 蟹状幼体的排泄物、死亡幼体及剩余饵料的腐败分解都会导致水中有机物、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 等有害物质的积累, 进而导致病菌滋生和蟹苗大量死亡。直接向育苗水体中泼洒光合细菌菌液时, 由于水中光合细菌的浓度会因换水及蟹苗吞食而降低, 不能稳定地发挥净化水质的功能; 而加大菌液用量时, 与菌体一起进入养殖水体中的培养液可能对水质和蟹苗生长产生某些不良影响[张道南1988, 王育峰等1990]。为此, 1996~1998年我们在安徽繁昌河蟹苗种基地进行了应用固定化光合细菌的试验, 本文主要研究固定化光合细菌的制备方法对菌体活性的影响以及其在河蟹育苗生产中的应用。

1 材料与方 法

1.1 光合细菌菌液

试验所使用的菌液主要由红假单胞菌属的球形红假单胞菌(*Rhodospseudomonas Sphaeroides*)和荚膜红假单胞菌(*Rhodospseudomonas Capsulatus*)组成, 培养方法参照[Weaver等1975]的方法,

以河蟹育苗用人工半咸水为基质配制培养液, 扩大培养至菌体密度达 5×10^9 个/mL 时收获, $6\ 000\text{r}/\text{min}$ 离心, 弃去上层清液, 使收获的光合细菌浓缩液菌体密度达 5×10^{10} 个/mL, 作为试验用菌液。

1.2 固定化光合细菌的制备及用量计算

光合细菌的固定化采用凝胶包埋法。使用上述离心后收集的光合细菌 10 倍浓缩液浓度以不同体积比与包埋剂混和, 在固定剂中成球。收获的凝胶珠测得湿重后用无菌水洗涤, 保存在 0.85% 生理盐水中。在使用前, 转移到培养液中, $28\text{ }^\circ\text{C}$ 光照条件下活化 24 小时后投放养殖水体。为使投入固定化光合细菌的试验水体中光合细菌的密度与游离菌对照组相等, 可引入包埋系数 K 进行换算。

即 $W = V \times 1 / K$

W: 需投入的固定化光合细菌凝胶珠湿重(克)

V: 使用浓度相同的游离菌对照组所投入光合细菌菌液的毫升数

K: 包埋系数, $K = \text{被包埋光合细菌菌液毫升数} / \text{收获凝胶珠湿重(克)}$

1.3 固定化光合细菌的活性测定

实验室小型试验在 5 000mL 烧杯中进行。在有蟹苗及无蟹苗两种情况下, 投入光合细菌后, 定时对试验水体中 COD、DO、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 及 $\text{NO}_2\text{-N}$ 进行测定, 作为光合细菌的活性指标。 $\text{NH}_3\text{-N}$ 测定用纳氏试剂比色法, $\text{NO}_2\text{-N}$ 测定用对氨基苯磺酸比色法, COD 用碱性高锰酸钾法, DO 测定用碘量法。

1.4 河蟹育苗生产中应用固定化光合细菌的试验

试验地点在安徽繁昌河蟹种苗基地。育苗池为长方型水泥池, 底面积 $7.60\text{m} \times 4.85\text{m}$, 水深 1.2m, 人工半咸水盐度为 13~17。蟹苗密度约 300 个/升。在 4-2 池投放固定化光合细菌 19kg, 分成六份, 装在 6 个直径为 25cm, 高 10cm 的圆柱形网箱中, 在育苗池不同部位沉入池底。4-1 号池全池泼洒光合细菌 10 倍浓缩液 5 000mL, 使水体中光合细菌浓度为 $1\ 000 \times 10^{-6}$, 每次换水后, 按换水量补足。4-7 号池作为不加光合细菌对照。育苗期的投饵、通气、换水等管理参照[赵乃刚等 1988]的方法, 三池尽可能一致。定时测定水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 及 COD 值作为水质的主要指标。蟹苗存活率的计算采取随机取样法, 在育苗池不同地点随机取样, 计算 1 000mL 水中活苗率(5 点平均值)。

2 结果

2.1 固定化方法对水质及蟹苗生长的影响

2.1.1 包埋比对光合细菌活性的影响

不同包埋比(光合细菌浓缩液与包埋剂体积比)的试验设计见表 1。

在 2 000mL 育苗污水中按表 1 设计投入光合细菌的海藻酸钙凝胶珠, 以使用浓度相同($1\ 500 \times 10^{-6}$)的游离菌为对照。各组的水质分析结果如图 1, 2, 3 所示: 在水中光合细菌浓度相等的前提下, A 试验组水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的浓度及化学耗氧量(COD)的下

降幅度最大,即包埋比为 1:4 的凝胶珠中光合细菌的活性最强。以上结果说明,制备固定化光合细菌时,使单位重量的固定化凝胶珠中含有较多的活细胞可以提高净化水质的效果。

表 1 不同包埋比试验的设计

Tab.1 The experiment design of changing embedding ratio

试验组别	3%海藻酸钠 (mL)	光合细菌加量 (mL)	包埋比 (V/V)	收获凝胶珠湿重 (g)	K 值 (mL/g)	应投入固定化光合细菌重量 (g)
A	40	10	1:4	39.3	10/39.3	1.18
B	60	10	1:6	56.2	10/56.2	1.69
C	80	10	1:8	71.5	10/71.5	2.15
CK	游离菌对照			投入光合细菌浓缩液 0.3mL		

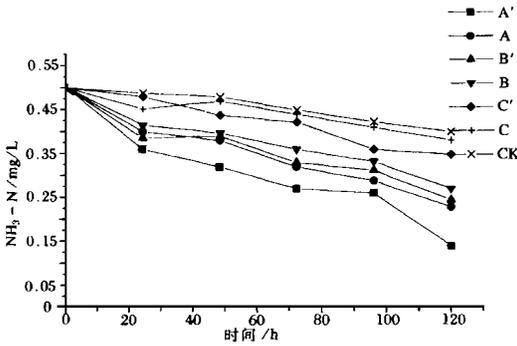


图 1 不同包埋比对 NH₃-N 浓度的影响

Fig. 1 The effect of changing embedding-ratio on NH₃-N concentration

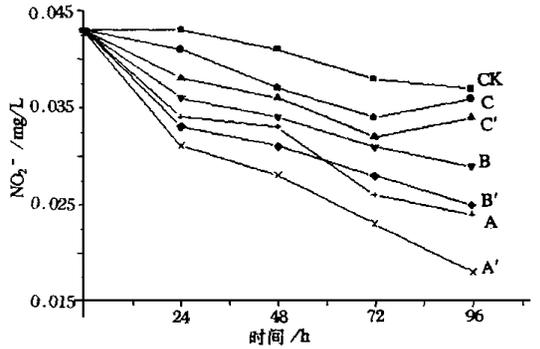


图 2 不同包埋比对 NO₂-N 浓度的影响

Fig. 2 The effect of changing embedding-ratio on NO₂-N concentration

2.1.2 固定化光合细菌的活化处理

在离心、冷藏及凝胶包埋过程中,光合细菌的活性受到不同程度损伤。因此,在使用前将固定化光合细菌放在营养液中活化 24 小时可使凝胶珠内光合细菌的活性得到恢复和强化。

表 1 中 A, B, C 三种包埋比不同的固定化光合细菌经活化处理后依次标记为 A', B', C'。图 1, 2 显示,水中 NH₃-N 和 NO₂-N 含量下降情况均是 A' > A > B' > B > C' > C, 即投入经活化处理的固定化光合细菌的 A', B', C' 组, 水中 NH₃-N 和 NO₂-N 含量下降的幅度分别比投入未经活化处理的固定化光合细菌的 A, B, C 组大。

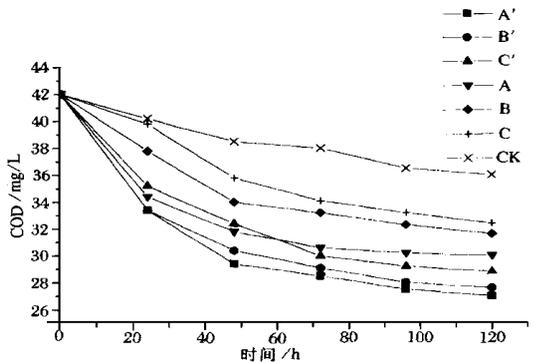


图 3 不同包埋比对 COD 浓度的影响

Fig. 3 The effect of changing embedding-ratio on the value of COD

而图 3 显示,水中 COD 的下降情况却是 A' > B' > C' > A > B > C, 即凝胶珠中光合细菌含量最低,包埋比 1:8 的 C 组,经 24 小时活化处理后,净化水质的活性比凝胶珠中含菌量最大但未经活化处理的 A 组还要强。这可能是因为凝胶珠在营养液中活化 24 小时不但使光合细菌的活性增强,同时由于细胞增殖还导致细胞数量的增多。

2.1.3 包埋剂与固定剂对固定化光合细菌活性的影响

在 5 000mL 烧杯中投入用不同包埋剂和固定剂制备的固定化光合细菌,使水体中光合细菌浓度成 500×10^{-6} (表 2), 每个烧杯中投入 Z_1 藻苗 200 个。每天一次把水底污物及死苗去除,基本不换水,测定水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ (起始值 0.45mg/L), DO (起始值 11.6mg/L) 及存活藻苗数。

表 2 不同包埋剂与固定剂的试验设计

Tab. 2 The experiment design of different embedding media and solidifying media

组别	包埋剂	固定剂	K 值(mL/g)	投入小球重 (g)
A	10%PVA+2%海藻酸钠	饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +1% CaCl_2	10/39	0.98
B	12%PVA+1%海藻酸钠	饱和硼酸+1% CaCl_2	10/39	0.98
C	10%PVA+3%沸石	饱和硼酸+1% CaCl_2	10/33.2	0.96
D	3%海藻酸钠+3%沸石	3% CaCl_2	10/33.1	0.95
CK ₁	游离菌对照	加光合细菌浓缩液 0.25mL		
CK ₂	不加光合细菌对照			

表 3 所列试验结果显示,光合细菌活性最高的是 D 组,即最佳的包埋载体是海藻酸钠+沸石。其他三个试验组均以聚乙烯醇作包埋载体,但只有在 PVA 中加入 3% 沸石的 C 组藻苗存活率比游离菌对照有明显提高。由于沸石的加入不但使凝胶珠的抗盐性和沉降性得到强化,而且使凝胶珠的通透性得到改善,增加了凝胶中所包埋的光合细菌与外界水环境的物质传递与交换,因而加强了水质净化的效果。

2.2 固定化光合细菌的用量对水质的影响

表 4 为在 2 000mL, 已知 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度为 0.49mg/L, $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度为 0.084mg/L 的育苗水体中投入不同量固定化光合细菌后 96 小时水质分析的结果。可以看出: $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的去除率随水中光合细菌浓度的升高而升高。图 4 显示光合细菌使用浓度在 $1\,500 \times 10^{-6}$ 到 $2\,500 \times 10^{-6}$ 范围内变化时,水中 COD 在 36 小时内就从 24mg/L 下降到 5.7~4.95mg/L。但同一时刻光合细菌浓度为 $1\,500 \times 10^{-6}$, $2\,000 \times 10^{-6}$, $2\,500 \times 10^{-6}$ 的三个试验组间水中 COD 的差别却不大。而光合细菌浓度在 700×10^{-6} 到 $1\,000 \times 10^{-6}$ 范围内变化时,水中 COD 在 48 小时内变化很小,48 小时后 COD 才有较大下降,从 21mg/L 左右下降到 8.7mg/L 左右,而同一时刻光合细菌浓度为 400×10^{-6} , 700×10^{-6} , $1\,000 \times 10^{-6}$ 的三个试验组间水体中 COD 的差别也不大。

2.3 固定化光合细菌在 50m³ 大池河蟹育苗生产中的应用结果

图 5 显示在育苗生产期间,育苗池水中总 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的变化因受 pH、温度、投饵、换水及藻苗代谢活动等多种因素的影响而呈现锯齿形的变化。只有在既无藻状幼体存在又不换水的情况下,水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 才会因光合细菌的投入而呈现直线下降的趋势。不加光合细菌的 7 号池,水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 在较高水平变化,最高点超过 1.2mg/L; 而加入固定化光合细菌的 2 号池水中

表 3 不同包埋剂与固定剂对光合细菌活性的影响

Tab. 3 The effects of different embedding media and solidifying media on the activity of PSB

组别	$\text{NH}_3\text{-N}$ 含量 (mg/L)	DO 值	7 天存活藻苗数	存活率 (%)	强度
A	0.379	6.27	6	3	+上浮
B	0.395	6.40	4	2	+上浮
C	0.365	7.35	37	18.5	++
D	0.294	7.94	52	26	+++
CK ₁	0.412	7.68	15	7.5	
CK ₂	0.617	6.40	6	3	

NH₃-N 变化处于较低水平,最高不超过 0.78mg/L。加游离菌的 1 号池水中变化介于前二者之间。以上结果可以说明与游离菌相比,被包埋于凝胶中的光合细菌不易受养殖水体中各种复杂因素的影响,并且凝胶珠中的微环境更有利于光合细菌发挥净化水质的作用。

表 4 光合细菌使用浓度对水质的影响

Tab. 4 The effect of changing the concentration of PSB on the quality of the water

PSB 浓度($\times 10^{-6}$)	固定化 PSB 用量(g)	NH ₃ -N(mg/L)	NH ₃ -N 去除率	NO ₂ (mg/L)	NO ₂ 去除率
400	0.30	0.22	55%	0.041	51.2%
700	0.53	0.164	66%	0.019	77.4%
1000	0.76	0.072	85.3%	0.010	87.4%
1500	1.14	0.052	89.4%	0.008	90.4%
2000	1.52	0.025	92.9%	0.004	95.2%
2500	1.90	0.003	99.3%		

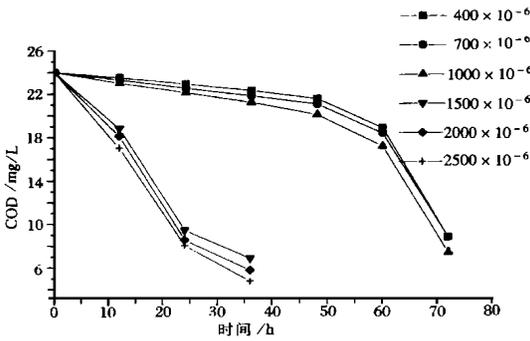


图 4 不同光合细菌使用浓度对 COD 的影响
Fig. 4 The effect of changing the concentration of PSB on the value of COD

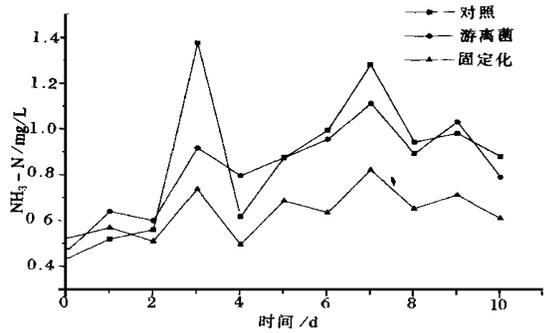


图 5 固化光合细菌对 50m³ 育苗池中 NH₃-N 浓度的影响
Fig. 5 The effect of applying immobilized PSB on NH₃-N concentration in 50m³ zoeae rearing pond

表 5 显示,三个育苗池初始的育苗密度基本一致,在 300 个/L 水平。投入固定化光合细菌的 2 号池,十天育苗存活率 40.6% 比不加菌的 7 号对照池提高 15.7%,比游离菌 1 号池提高 11.2%。从最终大眼幼体育成率看,加固定化光合细菌的 2 号池比不加菌的对照池多产大眼幼体 23.25 万个,比加游离菌的对照池多产 15.75 万个。

表 5 50m³ 大池河蟹育苗生产中应用固定化光合细菌的结果

Tab. 5 The result of applying immobilized PSB on the zoeae rearing of *Eriocheir sinensis* in 50m³ pond

池号	4-1	4-2	4-7
	投放光合细菌 10 倍浓缩液 5000mL	投放固定化光合细菌 19kg	不加光合细菌
育苗起始密度(个/L)	310	320	301
10 天存活育苗(个/L)	91	130	75
10 天存活率	29.4%	40.6%	24.9%
育成大眼幼体(万个)	97.5	113.25	90
育成率	6.3%	7.4%	5.8%

由于固定化光合细菌既不会被育苗吞食也不会因换水而流失,只要一次性投入便可连续重复使用,按一个育苗周期 20 天计,如每池每天换水一次,每次更换 1/2 则泼洒游离菌需消耗的光合细菌菌液量为固定化光合细菌的 10 倍。

3 讨论

由于河蟹育苗用水为流动的半咸水, 盐度较高, 固定化光合细菌凝胶珠较易受损, 为延长使用寿命, 进一步研究凝胶珠的强化方法是十分必要的。聚乙烯醇(PVA)无毒价廉, 强度较高, 抗盐性优于海藻酸钙凝胶, 是一种新型的包埋剂, 但目前尚存在成球难、易发胀粘连及包埋细胞活性下降等问题。在河蟹工厂化育苗的封闭式水循环系统中, 应用固定化光合细菌的反应器进行水质净化将是今后的发展方向。为提高水质净化效率, 固定化光合细菌的用量应大些为好。由于固定化光合细菌不能被 苗吞食, 为发挥光合细菌作为饵料强化营养的作用, 直接向育苗池内适量地泼洒光合细菌浓缩液应仍是有益的。

参 考 文 献

- 王育锋, 宫修清, 彭秀真等. 1990. 用光合细菌菌液池塘培育淡水鱼种的试验. 水产学报, 14(4): 347~350
 刘双江, 孙 燕, 岑运华等. 1996. 采用光合细菌控制水体中亚硝酸的研究. 环境科学, 16(6): 21~23
 刘如林, 刁虎欣, 梁凤来等. 1991. 光合细菌及其应用. 北京: 中国农业科技出版社. 156~157
 张道南. 1988. 红螺菌科光合细菌的分离培养及作为鱼虾类饵料添加剂的初步研究. 水产学报, 12(4): 367~369
 赵乃刚, 堵南山, 包祥生等. 1988. 河蟹的人工繁殖与增养殖. 合肥: 安徽科技出版社. 199~208
 战培荣, 屈延阳, 王丽华等. 1997. 光合细菌固定化及其净化养鱼水质的研究. 水产学报, 21(1): 97~100
 Weaver P F, Wall J D, Gest H. 1975. Characterization of *Rhodospseudomonas capsulata* Arch. Microbiol. 105: 207~216

THE APPLICATION OF IMMOBILIZED PHOTOSYNTHETIC BACTERIA IN THE ZOEAE REARING OF *ERIOCHEIR SINENSIS*

WANG Yi-Ping, JIA Rong, MEI Xian-Jun, REN Zhong

(Life Science College of Anhui University, Hefei 230039)

ZHAO Nai-Gang, WANG Zhao-Hui

(Anhui Fisheries New Technology Research Institute, Hefei 230088)

ABSTRACT Through the improvement of both the ways of preparation and the methods of application, better effects of the immobilized PSB on the purification of water quality were achieved. Four kinds of immobilized carrier were tested. The results showed that the calcium alginate gel pellets containing 3% permutite was better than others in the aspects of both pellet strength and the activity of purifying water quality. The decrease of $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ concentration and the value of COD in the water varied in step with the increase of the embedding-ratio. The proper dosage of the immobilized PSB and the methods of activating immobilized PSB were studied. The experiments in production scale was carried out in 50m^3 zoeae rearing ponds. The highest zoeae survival rate of 40.6% was found in the pond where 19kg of immobilized PSB were added. Compared to the pond where free PSB were added in the same dosage, the zoeae survival rate was increased by 11.2%. Thus, the harvest of megalopa increased by 157.5 thousands pieces of larvae per pond.

KEYWORDS *Eriocheir sinensis*, Seed culture, Immobilized photosynthetic bacteria, Purification of water quality