

文章编号: 1000-0615(2001)05-0438-05

## 虾池环境生物修复作用菌生长影响因子的研究

李秋芬, 辛福言, 邹玉霞, 袁有宪

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:**采用吖啶橙荧光染色计数法和吸光度法,测定了不同温度、盐度、初始 pH、溶解氧、接种量及不同培养基配方对虾池环境生物修复作用菌生长的影响。结果表明,大部分作用菌在 16~40℃、盐度 0~40、pH 6.6~9.0 的范围内有氧或微氧条件下均可生长,能适应一般虾池的环境条件,培养基中磷酸盐是必不可少的。在 28~34℃、盐度 20~30、pH 7.4~8.2 的有氧条件下生长最好,可作为大规模生产时的培养条件。为增加菌体产量和活力,可适当增加接种量,提高蛋白胨和酵母膏的浓度至 2216E 配方浓度的五倍,培养时间以 18~20h 为宜。

**关键词:**养殖环境;生物修复;作用菌

**中图分类号:**S968.22 **文献标识码:**A

### Study of factors influencing the growth of functional bacteria in bioremediation of shrimp culture environment

LI Qiu-fen, XIN Fu-yan, ZOU Yu-xia, YUAN You-xian

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Influences of temperature, salinity, pH, soluble oxygen, inoculation volume and composition of medium on the growth of functional bacteria in bioremediation of shrimp culture environment were studied with acridine orange direct count (AODC) and light absorption methods. The results indicated that most functional bacteria strains can grow in aerobic or semi-aerobic condition at 16-40°C, salinity 0-40 and pH 6.6-9.0. Phosphate was indispensable for growth and most shrimp ponds can meet this condition. 28-34°C, salinity 20-30, pH 7.4-8.2 with rich soluble oxygen can be used as culture conditions in large-scale bacteria production, and the concentration of peptone, yeast extract should be raised 5 times and inoculation volume may increase properly. To increase the amount of bacteria, best time period for culture is 18-20h.

**Key words:** aquacultural environment; bioremediation; functional bacteria

生物修复技术是一项新兴的环保技术,在世界范围内正在日益得到广泛的重视和应用<sup>[1]</sup>。针对目前我国对虾养殖池底部有机污染严重、水质恶化,并已成为近年来制约对虾养殖业发展的重要因素之一<sup>[2,3]</sup>,我们分离、筛选了数株虾池环境生物修复作用菌(此处略),以期用来消除虾池底部的有机污染物,修复对虾的养殖环境(aquacultural environment)。微生物的生长受诸多因素的影响,不同微生物的最

收稿日期:2000-10-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670581);国家高技术计划项目(819-01-07);国家“九五”攻关项目(96-922-02-02-02)

第一作者:李秋芬(1969-),女,河北石家庄人,助理研究员,青岛海洋大学在职博士研究生,从事环境微生物学研究。Tel:0532-5836341

佳生长条件和耐受的环境条件变化范围也不同<sup>[4-6]</sup>,而原位生物修复的成功常依赖于作用生物能否在污染地的环境条件下生长繁殖<sup>[7,8]</sup>。本文着重研究了多种因子对作用菌生长的影响,旨在考察所筛选的作用菌能否在天然虾池环境条件下良好生长,并为将来生物修复过程中进行虾池环境调控和大规模工业化发酵生产菌体提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与仪器

作用菌株:Lt7132、Lt7222、Lt7451、Lt7511、Fc6308、Gy7018由本课题组分离、筛选;仪器:UV-365紫外可见分光光度计(日本岛津),SYC2-2实验室盐度(青岛海洋大学仪器厂制),PHS-3C精密pH计(上海雷磁仪器厂制),HZQ-Q恒温振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司制)等。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 温度对作用菌生长的影响

配制2216E培养基<sup>[9]</sup>,0.2 $\mu$ m微孔滤膜过滤后,灭菌备用。取培养18~24h的斜面菌种,用无颗粒生理盐水洗下,离心洗涤二次,制成菌悬液,浓度为100mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>,每瓶接种量为0.1mL,每株菌每个条件接种两瓶作为平行,分别培养于16 $^{\circ}$ C、22 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、34 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C培养箱中。48h后取培养液样品,无颗粒甲醛固定,吖啶橙荧光染色计数法(AODC)<sup>[10]</sup>计数。同时以各自不接菌的培养基作参比,测OD<sub>600nm</sub>值。

#### 1.2.2 盐度对作用菌生长的影响

按2216E配方配制基础培养基,加蒸馏水、海水或NaCl,分别配成盐度为0、10、20、30、40的使用培养基,调pH为7.5,接种(方法及接种量同上)后,28 $^{\circ}$ C振荡培养,48h后取培养液,测OD<sub>600nm</sub>值。

#### 1.2.3 初始pH对作用菌生长的影响

配2216E液体培养基<sup>[9]</sup>,分装入锥形瓶,分别调至pH至5.8、6.6、7.4、8.2、9.0,经0.2 $\mu$ 的微孔滤膜抽滤灭菌。接种(方法及接种量同上),28 $^{\circ}$ C振荡培养,48h后取培养液,测OD<sub>600nm</sub>值。

#### 1.2.4 溶解氧对作用菌生长的影响

配制2216E液体培养基<sup>[9]</sup>,调节盐度为30,pH为7.4,接种后,分装入三组锥形瓶中,其中一组装1/3容量,振荡培养箱中振荡培养(120r $\cdot$ min<sup>-1</sup>),一组装1/2容量,另一组装满密封,静置培养,分别作为好氧、微好氧、厌氧条件,28 $^{\circ}$ C培养,48h后分别测OD<sub>600nm</sub>值。

#### 1.2.5 接种量对作用菌生长的影响实验

取海马牌市售对虾饵料,用陈海水浸泡过夜,滤去残渣,加蒸馏水补充至原体积,加酵母膏,调pH至7.4,灭菌,分装。分别接种菌株Lt7511的菌悬液,使各瓶菌体初始浓度分别为16 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、33 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、67 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、134 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>、268 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>。于28 $^{\circ}$ C振荡培养,每2h取样一次,测OD<sub>600nm</sub>值。

#### 1.2.6 培养基浓度及成分对菌体产量的影响

以2216E培养基为基础,调整各成分含量,配制出系列培养基(表1)各400mL,加葡萄糖的,115 $^{\circ}$ C高压灭菌30min,其余的培养基121 $^{\circ}$ C高压灭菌20min,取上清液,接种Gy7018的菌悬液,于28 $^{\circ}$ C振荡培养,从第12h开始,每2h取样一次,测定OD<sub>600nm</sub>值及pH值。

表1 培养基配方

Tab.1 Recipes of media

培养基编号	蛋白胨(g)	酵母膏(g)	磷酸高铁(g)	葡萄糖(g)	pH
1	4	0.8	0.04	0	8.0
2	8	1.6	0.08	0	8.0
3	12	2.4	0.12	0	8.0
4	8	1.6	0	0	8.0
5	8	1.6	0	1.6	8.0
6	8	1.6	0.08	1.6	8.0

## 2 结果

### 2.1 温度对作用菌生长的影响

不同环境温度对各株菌生长的影响情况见图1。除菌株 Lt7132 Fc6308 在 16℃ 条件下几乎不生长外,其余菌株在 16~40℃ 范围均可生长。菌株 Fc6308 的最佳生长温度为 28℃, Lt7132 和 Lt7511 的最佳生长温度为 34℃,其余菌株的居于 28~34℃ 之间。

### 2.2 盐度对作用菌生长的影响

盐度实验结果表明,各作用菌株均在盐度为 30 的条件下,菌量增长倍数最高,盐度为 20 时次之;菌株 Fc6308 和 Lt7511 对盐度变化较敏感,而菌株 Lt7132、Lt7222 和 Gy7018 则不敏感,在盐度 0~40 的范围内均可生长,菌量增长相差不大;只有菌株 Lt7451 不能在淡水中生长(图2)。

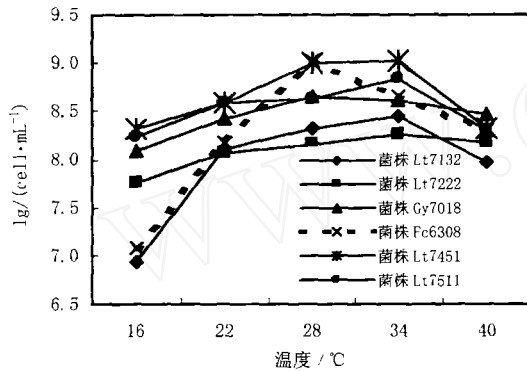


图1 不同温度条件下各作用菌的生长  
Fig.1 The growth of functional bacteria at different temperatures

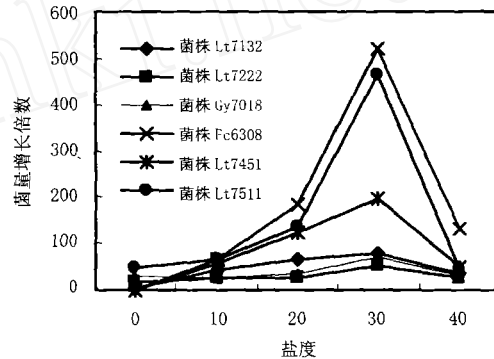


图2 不同盐度对作用菌生长的影响  
Fig.2 Effect of different salinity on the growth of functional bacteria

### 2.3 初始 pH 对作用菌生长的影响

培养基的不同初始 pH 对作用菌生长的影响见图3,菌株 Fc6308 和 Lt7451 对 pH 的变化较敏感,在初始 pH 值为 7.4 的培养基中生长最好,pH 低于 6.6 或高于 8.2,生长明显受到影响;菌株 Lt7132、Lt7222 对环境 pH 的变化不太敏感,pH 为 6.6~9.0 的范围内均可生长,但在初始 pH 值为 7.4 的培养基中生长较好;菌株 Gy7018 的生长最佳 pH 条件为 6.6,在中性偏酸的条件下生长较好;而菌株 Lt7511 生长的最佳 pH 为 8.2,在中性偏碱的范围内生长较好。

### 2.4 溶解氧对作用菌生长的影响

从图4可看出,振荡培养组的菌量增长明显高于静置培养的两个组,未加满的组又高于加满密封培养的组。由此可知,培养基中的溶解氧含量对降解菌的生长有影响,菌体生长需要氧气,但在微好氧的条件下亦可生长。

### 2.5 不同接种量对菌量增长的影响

如图5所示,适当提高接种量,可缩短作用菌生长的延滞期,较短时间内可达到对数生长期和稳定生长期。接种量从  $33 \mu\text{mL}^{-1}$  提高到  $268 \mu\text{mL}^{-1}$  时,达到稳定增长期的时间从 18h 缩短到 12h。但 16h 后,各组的菌量基本达到一致。

### 2.6 培养基浓度和成分对作用菌生长的影响

培养基成份实验表明(图6),在一定范围内,提高培养基各成分浓度可增加菌体产量,提高到原来

的 4 倍时, 增加最明显(比同期 2 倍组高 30%~40%), 提高到原来的 6 倍时, 产菌量反而下降, 说明浓度过高, 反而抑制菌体生长; 作用菌在一定范围的高浓度培养基中可较长时间地保持菌量增长趋势, 而在低浓度或过高浓度的培养基中细菌生长很快就达到稳定期; 未加  $\text{FePO}_4$  的培养基中的菌体增长明显低于同浓度加  $\text{FePO}_4$  的培养基中的, 说明磷酸高铁是菌体生长所必需的。而在加葡萄糖的培养基中, 菌生长反而较不加葡萄糖的培养基中差。试验结束时测培养液 pH 值, 发现 5 号、6 号的 pH 已降至 6.72 和 5.28, 其余均在 7.37 以上。

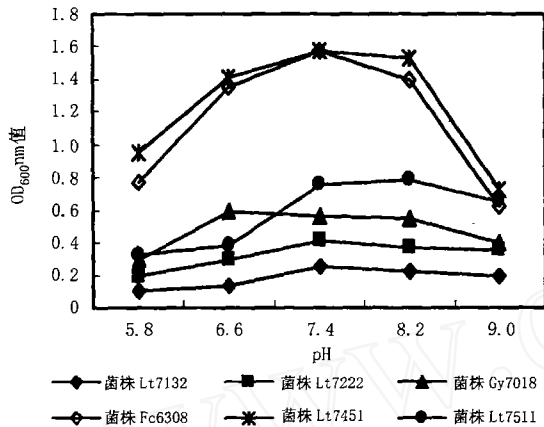


图 3 不同初始 pH 对作用菌生长的影响  
Fig.3 Effect of different pH on the growth of functional bacteria

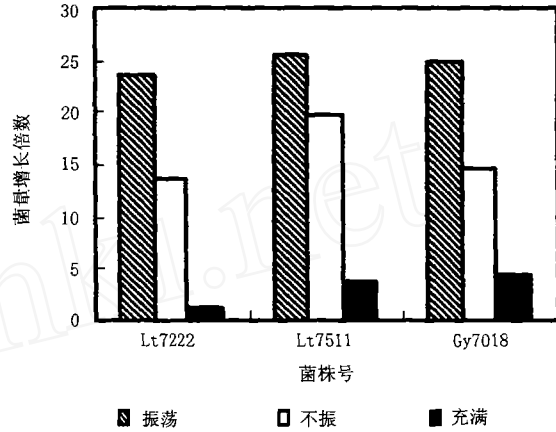


图 4 溶解氧对作用菌生长的影响  
Fig.4 Effect of soluble oxygen on the growth degrading bacteria

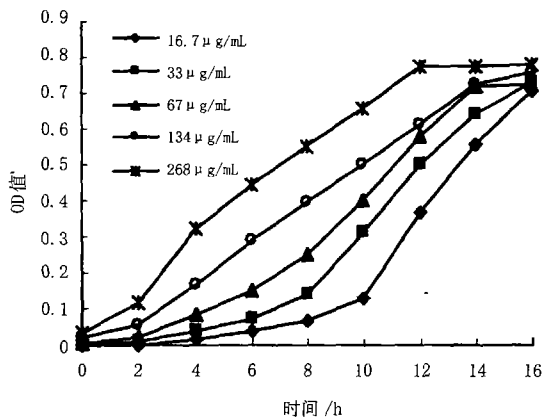


图 5 不同接种量对作用菌生长的影响  
Fig.5 The growth of degrading bacteria with different inoculation volumes

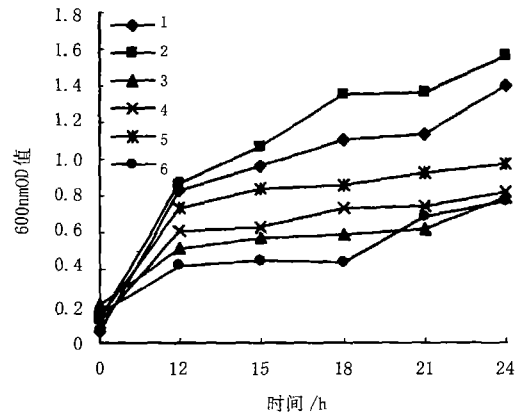


图 6 作用菌在不同培养基中的生长  
Fig.6 The growth of degrading bacteria in different media

### 3 讨论

细菌量的测定, 目前有多种指标、多种测定方法, 如平板培养计数、吡啶橙荧光染色计数法(AOPC)、活菌直接计数法(DVC)、吸光度法、颗粒计数法、三磷酸腺肝(ATP)法等<sup>[11]</sup>, 但每种方法各有优缺点, 计数结果也有一定差异, 方法之间有待统一。吡啶橙荧光染色计数法可直接反映培养液中总细胞数, 具有直观、准确的优点, 但对操作技术、仪器要求高。吸光度法则通过浊度间接反映细菌生物量, 具有操作简便、迅速的优点。本文测定的是液体纯培养的细菌生物量, 采用了吡啶橙荧光染色直接计数法和吸光度

法两种方法,发现两者有显著的正相关系( $\lg_{\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}} = 3.338\text{OD} + 7.673$ ,  $n = 19$ ,  $r = 0.76$ ,  $P < 0.005$ )。因此,在以后的实验中,均用  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  值来表示细菌生物量。

要对一环境进行原位生物修复,前提是所施入的外源微生物能在此环境中生长繁殖<sup>[12]</sup>。一般虾池在养成期间环境温度、pH、盐度的变动范围分别为  $20.0 \sim 35.0^\circ\text{C}$ 、 $6.9 \sim 8.7$ 、 $16.0 \sim 38.1$ <sup>[13-15]</sup>。通过研究多种因子对作用菌生长的影响,发现我们所筛选的作用菌可生长的温度范围  $16 \sim 40^\circ\text{C}$ ,盐度范围为  $0 \sim 40$ ,pH 范围为  $6.6 \sim 9.0$ ,有氧或微氧条件下均可生长。可见这些菌具有广温、广盐性,对环境条件具有较强的耐受力。因此,从理论上,这些作用菌施用于虾池后能够良好地生长、繁殖,可作为虾池环境原位生物修复的作用菌。

发酵生产中,培养条件的优劣直接影响生产效率和成本,培养条件的最优化是成功进行菌体生产的必要条件<sup>[16]</sup>,本文实验结果表明所选用菌在  $28 \sim 34^\circ\text{C}$ 、盐度  $20 \sim 30$ 、pH  $7.4 \sim 8.2$ 、有氧条件下,生长最好,可作为规模化生产的培养条件。一般发酵中常添加葡萄糖做碳源来提高菌体产率<sup>[17]</sup>,但本实验中发现葡萄糖在发酵过程中会产酸而导致培养基 pH 值下降,反而影响了菌体生长,因此培养基中最好不加或少加葡萄糖,其它碳源物质有待进一步筛选,在大规模生产中,为提高菌体产量和设备利用率,可适当加大接种量、提高培养基各成分的浓度。为保持菌种活力,种子培养时间以  $16 \sim 18\text{h}$  为宜。

#### 参考文献:

- [1] 张甲耀,李静,夏威夷林,等.生物修复技术研究进展[J].应用与环境生物学报,1996,2(2):193-199.
- [2] 袁有宪,幸福言,孙耀,等.对虾养殖池沉积环境中 TOC、TP、TN 和 pH 及质量评价模型[J].水产学报,2000,24(3):247-253.
- [3] 李秋芬,袁有宪.海水养殖环境生物修复技术研究展望[J].中国水产科学,2000,7(2):90-92.
- [4] 许兵,李秋芬,刘嘉蓉,等.海洋光合细菌的分离鉴定及其生长条件的研究[J].海洋湖沼通报,1993,(3):67-73.
- [5] Parekh N R, Walker A, Roberts S J, et al. Rapid degradation of the trizinone herbicide metamitron by *Rhodococcus* sp. isolated from treated soil [J]. Applied Bacteriology, 1994, 77:467-475.
- [6] Wittich R-M. Degradation of dioxin-like compound by microorganisms[J]. Microbio Biotechnol, 1998, 49:489-499.
- [7] Tomas A E. The basics of bioremediation [J]. Pollution Engineering, 1994, 26(6):46-47.
- [8] Hicks B N, et al. Bioremediation: A natural solution [J]. Pollution Engineering, 1993, 25(2):30-33.
- [9] 国家海洋局.海洋调查规范[S].北京:海洋出版社,1991.
- [10] Hobbie J E, Daley R J, Jasper S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy [J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 33: 1225-1228.
- [11] 许兵,徐怀恕.几种细菌计数方法[J].青岛海洋大学学报,1992,22(3):43-47.
- [12] Pritchard P H. Use of inoculation in bioremediation [J]. Current Opinion in Biotechnology. 1992, 3:232-243.
- [13] 高尚德,陈旭仁,吴以平.中国对虾养成期间虾池水体和底泥中细菌含量的变化[J].水产学报,1994,18(2):138-142.
- [14] 郭平,许美美.对虾养殖水域环境细菌的动态变化[J].海洋与湖沼,1994,25(6):625-630.
- [15] 曲克明,陈碧鹃,李秋芬,等.鱼虾混养对中国对虾养殖体系环境的影响[J].水产学报,1999,23(增刊):39-45.
- [16] 尹光琳,占立克,赵根楠.发酵工业全书[M].北京:中国医科技出版社,1996.106.
- [17] 俞俊堂,唐孝宣.生物工艺学[M].上海:华东理工大学出版社,1991.99.