

网络优先数字出版时间: 2016-08-26

【DOI】10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20160826.008

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20160826.1048.016.html>

芽孢杆菌组合对海水养殖水体 COD 的降解效果^{*}

Study on COD Degradation Capability of *Bacillus* Combinations

辛美丽, 宋爱环, 王志刚, 胡凡光, 逢劲楠, 孙福新^{**}

XIN Meili, SONG Aihuan, WANG Zhigang, HU Fanguang, PANG Shaonan, SUN Fuxin

(山东省海洋生物研究院, 山东青岛 266104)

(Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao, Shandong, 266104, China)

摘要:【目的】获得一种降解性能优于单菌株的菌株组合, 更好地改善目前工业化密度养殖的水体水质。【方法】从刺参(*Stichopus japonicus*)养殖池塘分离降解效果良好的单菌株, 根据菌株之间的拮抗效应, 按照 2 株菌或 3 株菌进行组合, 研究各组合菌株的降解效果。【结果】2 株菌的组合第 6 天时 COD 含量的均值为 422.57 mg/L, 标准差为 63.85, 3 株菌的组合第 6 天时 COD 含量的均值为 365.61 mg/L, 标准差为 67.63, 说明 3 株菌的组合整体降解效果比 2 株菌的组合好, 且更容易获得降解效率高的组合, 但并不是所有 3 株菌的组合降解效果都优于 2 株菌的组合。【结论】确定最优菌株组合为 C14(菌株 B2, 菌株 B6, 菌株 B11), COD 降解率为 64.29%。经鉴定, 菌株 B2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), 菌株 B6 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), 菌株 B11 为嗜碱性芽孢杆菌(*Bacillus alcalophilus*), 为今后的实践应用提供参考。

关键词: 芽孢杆菌 降解性能 组合

中图分类号: S968.9 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2016)03-0215-06

Abstract:【Objective】To improve the water quality in high stocking density of industrial aquaculture, a kind of strain combination, with degradation capability better than single strain, was found.【Methods】Several bacterial strains with good degradation property were separated from *Stichopus japonicus* culture ponds. Antagonistic effect between strains was studied. According to the results of the antagonistic effect, the degradation capability of COD of the combinations of 2 or 3 strains were studied.【Results】The mean COD of the combinations of two strains at the 6th day was 422.57 mg/mL, and standard deviation was 63.85. The mean COD of the combinations of three strains at the 6th day was 365.61 g/mL and the standard deviation was 67.63. The results showed that combinations of three strains compared to combinations of two strains were easier to get a combination with better degradation efficiency.

【Conclusion】Finally, the optimal combination was C14(strain B2, strain B6, strain B11) with

COD degradation rate of 64.29%. The strain B2, strain B6 and strain B11 were separately identified as *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus alcalophilus*. The result was a reference for future applications of strains.

Key words: *Bacillus*, degradation capability, combination

收稿日期: 2016-04-10

作者简介: 辛美丽(1985—), 女, 助理研究员, 主要从事海藻生物学研究。

^{*} 海洋公益性行业科研专项经费项目(201305005)和海洋经济创新发展区域示范项目资助。

^{**} 通讯作者: 孙福新(1960—), 男, 研究员, 主要从事海水健康养殖技术, 水产优良品种引进、选育及产业化开发技术, 海洋生态环境修复与保护技术研究, E-mail: sunfx817@163.com。

0 引言

【研究意义】随着工厂化密度养殖的迅速发展,大量残饵、粪便严重破坏了养殖水体水质,从而造成养殖生物病害频发。微生态制剂因其对水质中有机质及氨氮等降解效果良好,能增强养殖生物免疫力,并且无污染、无残留等优势,逐渐被人们所接受并在各方面使用^[1-4]。芽孢杆菌(*Bacillus*)的稳定性使其广泛应用于水产养殖中。【前人研究进展】研究人员发现,用地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)进行投喂,草鱼的肠道胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性都比对照组显著提高^[5-6];应用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),硝化细菌(*Nitrifying bacteria*)与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)于养殖水体中,对水体中的氨氮、有机质、有机磷、亚硝态氮等有明显的降低效果^[7-10]。【本研究切入点】单一菌株的降解性能已无法满足实际应用。【拟解决的关键问题】将刺参(*Stichopus japonicus*)养殖池塘中获得的单菌株分别以2株菌或3株菌进行组合,研究不同组合对COD的降解效果,以期获得在COD降解方面优于单菌株的菌株组合,对实践应用进行一定程度的指导。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株来源:从即墨盐厂刺参养殖池塘中分离得到16株芽孢杆菌(表1),保种于-80℃冰箱中。使用前用灭菌的接种针接种于液体培养基,在28℃,160 r/min条件下培养24 h,得到种子液。

固体培养基:蛋白胨10 g,牛肉膏3.5 g,氯化钠5 g,溶于1 000 mL的海水中,调节pH值为8.2,并加入12 g琼脂,121℃下灭菌15 min。

刺参饵料液体培养基:取20 g刺参饵料装于1 L过滤海水中,静置过夜,过滤,取滤液定容至1 L,在121℃下灭菌15 min。

1.2 方法

1.2.1 单菌株降解效果研究

将-80℃超低温保存的16株菌活化划线接种于营养琼脂斜面培养基上,28℃下培养24 h,用无菌生理盐水将平板菌落洗入灭菌的富集培养基,于振荡培养箱内振荡培养2 d后,将菌株依次接种于装有100 mL刺参饵料培养基的250 mL锥形瓶中,以血球计数板计数,使菌株初始浓度都为 1×10^6

cfu/mL。于28℃下,160 r/min振荡培养6 d,每天记录饵料中COD含量的变化。

表1 16株芽孢杆菌的来源

Table 1 The resources of 16 bacterial strains

菌株 Bacterial strains	来源 Resources
B1	底泥 Sediment
B2	底泥 Sediment
B3	底泥 Sediment
B4	粪便 Feces
B5	粪便 Feces
B6	粪便 Feces
B7	粪便 Feces
B8	肠道 Feces
B9	肠道 Intestinal
B10	肠道 Intestinal
B11	肠道 Intestinal
B12	肠道 Intestinal
B13	肠道 Intestinal
B14	水 Water
B15	水 Water
B16	水 Water

1.2.2 菌株拮抗效果研究

采用平板交叉划线法,将降解效果良好的菌株培养于固体平板培养基中。28℃、160 r/min条件下培养48 h后,查看其拮抗效果。

1.2.3 组合菌株的降解效果研究

综合考虑单菌株的降解效果及菌株间的拮抗作用,取2株菌或3菌株进行组合,各菌株按照密度比1:1或1:1:1比例接种于刺参饵料培养基内,采用血球计数板计数使培养基中各组合菌体总浓度为 1×10^6 cfu/mL。在28℃、160 r/min摇床振荡培养,分别于第1天、第2天和第6天测定培养基中的COD含量。

1.2.4 最优组合菌株的鉴定

菌株生理生化指标的测定:采用北京陆桥技术有限责任公司生产的细菌微量生化鉴定管对菌株的生理生化指标进行测定,具体操作方法参照说明书。按照《伯杰细菌鉴定手册》^[11],对菌株进行鉴定。

菌株16S rDNA序列分析:采用水煮法^[12]提取细菌基因组DNA后,进行扩增,选择正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 27F),反向引物:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (*E. coli* 1492R)。PCR产物(1.5 kb左右)由上海生工生物工程股份有限公司进行测序。将测序结果在NCBI库中进行Blast,得到与目标菌株相似性高的序列,再用CLUSTAL X程序进行比对,最后

采用 MEGA 4.1 工具构建 Neighbor-Joining 树^[13]。

综合菌株的生理生化指标及 16S rDNA 序列分析,鉴定菌株。

2 结果与分析

2.1 单菌株降解效果

从图 1 可以看出,16 株菌对于培养液中 COD 的降解均有明显效果,菌株在第 1~2 天时,对培养液中 COD 降解效果比较明显,大部分菌株在第 2 天时,使培养液中 COD 含量达到相对比较低的点,少部分菌株在第 3 天时达到这个低点。这应该与菌株的对数生长期有关。到第 6 天时,对 COD 的降解趋于平稳。在后续的试验时,选择第 2 天与第 6 天作为取样时间点。

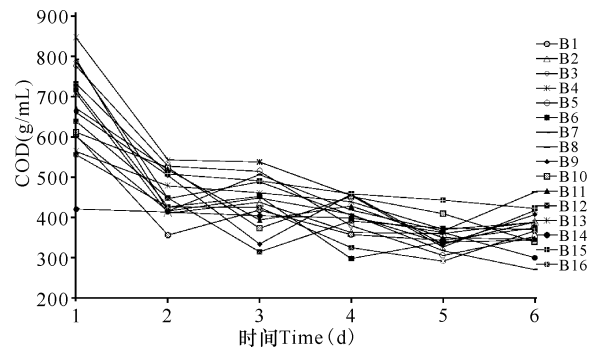


图 1 16 株菌株培养液中 COD 含量变化

Fig. 1 The change of COD content in culture solution with strain B1, strain B2, ..., stain B16

表 2 显示,部分菌株在第 2 天时对于 COD 的降解能达到最终降解率的 80% 以上(B1, B2, B3, B6, B8),部分菌株在第 2 天时达到最终降解率的 50% 以上(B4, B5, B7, B9, B12, B13, B15, B16),从而看出菌株在液体培养基的扩繁速率。对比菌株第 6 天和第 1 天的降解率,部分菌株(B3, B4, B5, B6, B7)降解率达 50% 以上,其中 B7 降解率最高为 65.84%。综合考虑菌株的生长速率与第 6 天的降解率,最终确定初筛菌株 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B9, B11, B12 进行后续实验。

2.2 单菌株拮抗作用

根据表 3 结果,选取相互之间没有生长抑制作用的菌株进行后期组合实验。

2.3 组合菌株降解实验

综合表 2 和表 3 的结果,对菌株进行组合,具体设计见表 4。从表 5 可以看出,并不是所有 3 株菌组合降解效果优于 2 株菌组合。但 2 株菌组合第 6 天时 COD 含量的均值为 422.57 mg/L,标准差为 63.85,3 株菌组合第 6 天时 COD 含量的均值为

365.61 mg/L,标准差为 67.63。这说明,3 株菌组合的整体降解效果比 2 株菌组合的好,且更容易获得降解效率高的组合。

表 2 16 株菌株的降解率(%)

Table 2 The degradation rate of strain B1, strain B2, ..., strain B16(%)

编号 Number	降解率(第 2 天 比第 1 天) Degradation rate (2 d comparison of 1 d)	降解率(第 6 天 比第 1 天) Degradation rate (6 d comparison of 1 d)
B1	40.93	37.88
B2	42.03	45.07
B3	43.15	50.66
B4	35.97	50.75
B5	32.13	54.65
B6	40.67	52.20
B7	47.61	65.84
B8	30.90	23.06
B9	23.72	38.49
B10	14.38	44.44
B11	22.77	48.45
B12	29.84	42.00
B13	15.19	31.44
B14	11.62	28.66
B15	30.54	42.25
B16	23.31	34.05

表 3 10 株菌间拮抗作用结果

Table 3 The antagonistic effect between 10 stains

编号 Number	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B9	B11	B12
B1		×	×	×	×	○	○	○	○	○
B2			○	×	×	○	×	○	○	×
B3				○	○	○	○	○	○	×
B4					○	○	○	○	○	×
B5						×	×	○	○	×
B6							○	○	○	○
B7								○	○	×
B9									○	○
B11										○
B12										

注:×代表有拮抗作用,○代表无拮抗作用

Note:× represents an antagonistic effect,○ represents non antagonistic effect

表4 菌株组合设计

Table 4 The design of combinations of strains

组合编号 Combination number	菌株组合 Strain combination	组合编号 Combination number	菌株组合 Strain combination
C1	(B1, B6)	C9	(B2, B7)
C2	(B1, B7)	C10	(B1, B6, B7)
C3	(B1, B11)	C11	(B1, B6, B11)
C4	(B2, B6)	C12	(B1, B7, B11)
C5	(B2, B11)	C13	(B2, B6, B7)
C6	(B6, B7)	C14	(B2, B6, B11)
C7	(B6, B11)	C15	(B2, B7, B11)
C8	(B7, B11)		

表5 组合菌株 COD 变化规律 (mg/L)

Table 5 Variation law of COD of combined strains

组合编号 Combination number	第1天 The first day	第2天 The second day	第6天 The sixth day
C1	639.74±8.13	454.72±6.52	536.26±36.87
C2	653.86±17.23	481.38±8.97	396.70±26.11
C3	666.40±35.76	501.76±29.82	392.00±78.54
C4	588.00±7.54	650.72±33.45	388.86±79.44
C5	642.88±6.09	446.88±56.41	512.74±56.90
C6	658.56±27.89	492.00±33.17	405.25±32.99
C7	680.51±28.91	572.32±68.03	445.31±42.79
C8	548.80±29.64	495.49±77.85	384.16±43.56
C9	611.52±30.76	508.03±95.67	341.82±44.75
C10	603.68±28.71	434.34±24.54	426.50±46.78
C11	611.52±18.91	486.08±13.61	373.18±47.10
C12	666.40±17.34	404.54±35.72	392.00±35.78
C13	635.04±24.55	481.38±36.51	363.78±45.60
C14	658.56±78.90	580.16±15.62	235.20±46.74
C15	620.93±56.83	401.41±34.77	402.98±5.98

表6 菌株组合降解率 (%)

Table 6 The degradation rate of strain combinations

组合编号 Combination number	降解率 Degradation rate		
	第2天比第1天 2 d comparison of 1 d	第6天比第2天 6 d comparison of 2 d	第6天比第1天 6 d comparison of 1 d
C1	28.92	-17.93	16.18
C2	26.38	17.59	39.33
C3	24.71	21.88	41.18
C4	-10.67	40.24	33.87
C5	30.49	-14.74	20.24
C6	40.48	-54.40	8.10
C7	15.90	22.19	34.56
C8	9.71	22.47	30.00
C9	16.92	32.72	44.10
C10	28.05	1.81	29.35
C11	20.51	23.23	38.97
C12	39.29	3.10	41.18
C13	24.20	24.43	42.72
C14	11.90	59.46	64.29
C15	35.35	-0.39	35.10

根据表6结果,确定最优菌株组合为C14(B2, B6, B11), COD降解率为64.29%。

2.4 最优组合菌株鉴定

2.4.1 菌株的生理生化

结果显示:菌株B2,革兰氏阳性,有芽孢,杆状,菌落圆形,边缘不整齐,表面隆起呈白色,VP反应阳性,接触酶阳性,可水解淀粉;菌株B6,革兰氏阳性,有芽孢,杆状,菌落白色,边缘整齐,表面光滑,凸状隆起,VP反应阴性,可水解淀粉;菌株B11,革兰氏阳性,有芽孢,杆状,圆头,菌落白色,表面粗糙,边缘不整齐,接触酶阳性,水解淀粉,VP反应阳性。

2.4.2 菌株的系统发育树

从图 2 可以看出,菌株 B2 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的亲缘关系最近,菌株 B6 与巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 的亲缘关系最近,菌株 B11 与嗜碱性芽孢杆菌 (*Bacillus alcalophilus*) 的亲缘关系最近。综合考虑菌株的生理生化指标结果,最终确定菌株 B2 为枯草芽孢杆菌,菌株 B6 为巨大芽孢杆菌,菌株 B11 为嗜碱性芽孢杆菌。

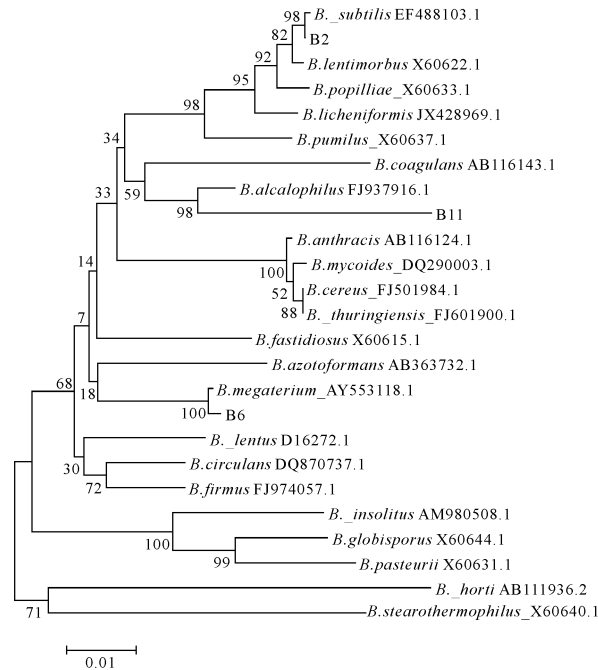


图 2 菌株 B2、B6、B11 系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree of strain B2, strain B6, strain B11

3 结论

单菌株对 COD 的降解与菌株的生长曲线存在相关性,在第 1~2 天时,菌株处于对数期间,随着菌浓度的直线增长,COD 的含量也直线下降,当菌株达到稳定期后,COD 的含量变化也趋于平稳。当菌株达到衰亡期时,因细胞代谢产物的积累,死亡细胞裂解,造成培养基内的 COD 含量升高。

不同菌株间存在拮抗作用,综合考虑其拮抗作用及其降解特性进行菌株组合设计,得到的结果显示,并不是所有 3 株菌的组合降解效果优于 2 株菌的组合,但 2 株菌的组合第 6 天时 COD 含量的均值为 422.57 g/mL,标准差为 63.85,3 株菌的组合第 6 天时 COD 含量的均值为 365.61 g/mL,标准差为 67.63,这说明,3 株菌的组合整体降解效果比 2 株菌的组合要好,且更容易获得降解效率高的组合。

最终确定最优菌株组合为 C14(B2, B6, B11),

对 COD 降解率为 64.29%。经鉴定,菌株 B2 为枯草芽孢杆菌,菌株 B6 为巨大芽孢杆菌,菌株 B11 为嗜碱性芽孢杆菌,为今后在利用菌株组合进行工厂化密度养殖水体水质改善时,提供一定的参考和指导。

参考文献:

- [1] 辛美丽,吕芳,孙福新,等.一株具有降解性能的巨大芽孢杆菌的鉴定与发酵条件优化[J].广西科学院学报,2015,31(4):247-252.
XIN M L, LV F, SUN F X, et al. Identification and optimization of fermentation condition for *Bacillus megaterium* from sea cucumber ponds[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2015, 31(4): 247-252.
- [2] 樊海平,曾占壮,林煜,等.养殖鳗肠道益生菌的筛选[J].水产学报,2006,30(1):97-102.
FAN H P, ZENG Z Z, LIN Y, et al. Selection of probiotics from intestinal tract of cultured eel[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 97-102.
- [3] 孙云章,杨红玲,马如龙,等.斜带石斑鱼消化道乳酸菌在模拟胃肠道环境中的存活[J].中国水产科学,2010,17(1):128-135.
SUN Y Z, YANG H L, MA R L, et al. Survival of lactic acid bacteria isolated from gut of *Epinephelus coioides* in mimic gastrointestinal environments[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(1): 128-135.
- [4] 曹煜成,李卓佳,林黑着,等.地衣芽孢杆菌 De 在优质草鱼养殖中的应用研究[J].南方水产,2008,4(3):15-19.
CAO Y C, LI Z J, LIN H Z, et al. Applied research of *Bacillus licheniformis* De in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) culture[J]. South China Fisheries Science, 2008, 4(3): 15-19.
- [5] 姚东林,邹青,刘文斌,等.地衣芽孢杆菌和低聚木糖对草鱼生长性能肠道菌群和消化酶活性的影响[J].大连海洋大学学报,2014,29(2):136-140.
YAO D L, ZOU Q, LIU W B, et al. Effects of *Bacillus licheniformis* and xylo-oligosaccharide on growth performance, intestinal microflora and enzyme activities in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(2): 136-140.
- [6] 田相利,赵坤,王军,等.泼洒和投喂芽孢杆菌对刺参生长以及消化和免疫相关酶活性的影响[J].中国海洋大学学报,2015,45(1):18-25.
TIAN X L, ZHAO K, WANG J, et al. Influence of water additive and feed supplementary *Bacillus cereus* on the growth and activity of digestive and immune rela-

- ting enzyme of sea cucumber[J]. Periodical of Ocean University of China, 2015, 45(1):18-25.
- [7] 高金伟,张海红,陈瑞楠,等. 硝化细菌与枯草芽孢杆菌对养殖水质调控作用研究[J]. 天津农学院学报, 2014, 21(1):5-8.
- GAO J W, ZHANG H H, CHEN R N, et al. Effects of Nitrifying bacteria and *Bacillus subtilis* on controlling aquaculture water qualities[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2014, 21(1):5-8.
- [8] 汤保贵,徐中文,张金燕,等. 枯草芽孢杆菌的培养条件及对水质的净化作用[J]. 淡水渔业, 2007, 37(3):45-48.
- TANG B G, XU Z W, ZHANG J Y, et al. Cultivation conditions and application in water purification effect of *Bacillus subtilis* [J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37(3):45-48.
- [9] 李卫芬,邓斌,陈南南,等. 芽孢杆菌对草鱼生长和肠粘膜抗氧化功能及养殖水质的影响[J]. 水生态学杂志, 2012, 33(1):65-70.
- LI W F, DENG B, CHEN N N, et al. Effects of *Bacillus* on water quality, growth and antioxidant activity of intestinal mucosa of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Journal of Hydroecology, 2012, 33(1):65-70.
- [10] 李永芹,许乐乐,陈克卫. 1株芽孢杆菌的筛选鉴定及其净水效果研究[J]. 水生态学杂志, 2013, 34(1):96-100.
- LI Y Q, XU L L, CHEN K W. Screening, identification and water purification effects of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Hydroecology, 2013, 34(1):96-100.
- [11] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984:729-794.
- BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th Edition, Beijing: Science Press, 1984:729-794.
- [12] 赵伟伟,王秀华,孙振,等. 一株产絮凝剂芽孢杆菌的分离鉴定及絮凝剂特性分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(4):647-653.
- ZHAO W W, WANG X H, SUN Z, et al. Isolation and identification of a flocculant-producing *Bacillus* sp. and analysis of the properties of the bioflocculant [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(4):647-653.
- [13] 陶天申,杨瑞馥,东秀珠. 原核生物系统学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007:63.
- TAO T S, YANG R F, DONG X Z. Systematics of Prokaryotes[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007:63.

(责任编辑:竺利波)