

文章编号 : 1004 - 7271(2003) 04 - 0293 - 05

水质净化作用菌光合细菌 PS2 的生物学特性 及环境因子对其生长的影响

杨莺莺, 李卓佳, 贾晓平, 陈永青, 陈康德, 杨 铿

(中国水产科学研究院南海水产研究所 广东 广州 510300)

摘 要 : PS2 菌株是从虾塘富集、分离、筛选出的一株光合菌, 具有高效净化养殖水质的作用。经形态学观察及生理生化特性的实验, 鉴定其为荚膜红假单胞菌。PS2 菌株可利用的底物范围较广, 可利用大多数低分子的有机酸、糖醇类等, 这对养殖水质的净化具有重要的作用。实验采用光吸收法测定了环境因子温度、盐度、pH、光照度及溶氧对菌株生长的影响。结果表明: PS2 菌株可适应的温度、盐度、pH 范围分别为 20 ~ 40℃、0 ~ 40.0、6.0 ~ 9.0。最适的温度 30℃、盐度 10、pH 为 7.0, 光照度 500 ~ 5000lx 范围内菌都可生长, 在此范围内, 光照度越强, 菌生长越快; PS2 菌株可在明处进行厌气性光合生长, 在暗处进行需氧性兼性生长, 养殖池塘的环境条件适宜 PS2 菌生长的条件。实验测定的 PS2 菌株的最适生长条件可作为本菌株大规模生产培养的技术参数。

关键词 : 光合细菌 ; 菌种鉴定 ; 环境因子 ; 生长 ; 影响

中图分类号 : S917.1 文献标识码 : A

Effect of biochemical characteristics and environmental factor of water purification photosynthetic bacteria PS2 on its growth

YANG Ying-ying, LI Zhuo-jia, JIA Xiao-ping, CHEN Yong-qing, CHEN Kang-de, YANG Keng
(South China Sea Fisheries Institute, CAFS, Guangzhou 510300, China)

Abstract : Nonsulfuric purple bacteria PS2 is a strain isolated from sediment of shrimp aquaculture ponds. Based on morphological, physiological and biochemical experiments, it was identified to be *Rhodospseudomonas capsulate*. The strain can effectively utilize broad categories of substrates including most small molecules such as organic acids, sugars and alcohols, and thus has great potential in purifying aquaculture waters. Influences of environmental factors on growth of the strain were studied using light absorption method. Results showed that the strain can grow under 20 - 40℃, salinity of 0 - 40.0 and pH 6.0 - 9.0, with optimum of 30℃, 10 and pH 7.0. Its growth rate increases with light intensity, under illumination of 500 - 5000lx. The strain can grow both anaerobically in dark and aerobically in light. The environment conditions in aquaculture ponds are favorable for growth of the strain, and the optimal growth conditions obtained from this study can be used for large-scale bacteria production.

Key words : photosynthetic bacteria ; species identification ; environment factor ; growth ; influence

收稿日期 2003-08-19

基金项目 : 中国水产科学研究院科研基金项目(2001 - 4 - 2) 广东省科技创新百项工程项目(2KB05401N)

作者简介 : 杨莺莺(1963 -) 女, 广东揭阳人, 理学学士, 副研究员, 主要从事水产养殖生态环境微生物修复技术、水产养殖生物病害防治技术研究。

紫色非硫光合细菌是一类在厌氧条件下进行不放氧光合作用的特殊菌群,具多样、灵活的代谢途径及广泛的生态意义和应用价值,它广泛分布于海洋、湖泊等自然水环境中,是所在的环境物质循环和能量流动的主要参加者之一^[1]。光合细菌在水产养殖中的应用国内外已有不少报导^[2],但在实际应用中效果不一,这除了与菌种的特性、使用方法、使用量有关外^[3],还与菌株能否在污染环境条件下生长繁殖有关,本文选择一株能高效净化养殖水质的光合细菌,研究其生物学特性及环境因子对其生长的影响,旨在为本菌株的水质净化提供理论依据,及菌株的大规模生产提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

PS2 菌株由本实验室富集、分离。菌株的富集、分离及净化水质的试验另文报道。

1.2 培养基

NH_4Cl 1.0g, CH_3COONa 3.0g, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COONa}$ 0.3g, MgSO_4 0.2g (NH_4)₂ SO_4 0.3g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.3g, NaCl 1.0g, CaCl_2 50mg, MnSO_4 2.5mg, FeSO_4 5.0mg, 酵母膏 0.1g, 蛋白胨 10mg, 谷氨酸 0.2mg, H_2O 1000mL, 培养基的 pH 用 1mol/L HCl 或 NaOH 调至 7.4^[4]。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态观察及生理生化特性测定

参见文献 5、6 进行。

1.3.2 基质利用实验

基础培养基: NH_4Cl 1.0g, MgSO_4 0.2g (NH_4)₂ SO_4 0.3g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.3g, NaCl 1.0g, CaCl_2 50mg, MnSO_4 2.5mg, FeSO_4 5.0mg, 酵母膏 0.1g, 谷氨酸 0.2mg, H_2O 1000mL, 加入基质浓度为 0.2%, 培养基的 pH 用 1mol/L HCl 或 NaOH 调至 7.0。将生长于分离培养基斜面上的菌体用无菌生理盐水制成菌悬液(10^8 个/mL), 接种量为 1%, 于 30℃ 2000lx 光照强度下, 静置培养, 7d 天后于未加碳源的对照培养相比, 参见伯杰氏手册(第八版)将菌体鉴定到种。

1.4 环境因子对光合菌生长的影响

选用 1000mL 的白色磨口试剂瓶, 装入上述灭菌培养基, 无菌操作接种光合菌至满瓶, 接种量 10%, 2000lx 光照, 28~30℃ 静置培养, 定时取样, 采用 722 型分光光度计 660nm 波长处, 测定培养物的光密度 OD 值。

1.4.1 温度

基本培养条件下, 将温度设计为 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃, 定时取样, 测定培养物的 OD。

1.4.2 盐度

基本培养条件下, 将培养基的盐度设计为 0、10、20、30、35、40, 定时取样, 测定培养物的 OD。

1.4.3 pH 值

基本培养条件下, 将培养基的初始 pH 值设计为 5.5、6.0、7.0、8.0、9.0, 定时取样, 测定培养物的 OD。

1.4.4 光照度

基本培养条件下, 光照度设计为 500、1000、1500、2000、2500lx, 96h 取样, 测定培养物的 OD。

1.4.5 溶解氧

基本培养条件下, 接种后, A 组装 1/3 容量, 在玻璃瓶外罩有黑色牛皮纸, 摇床振荡培养(120r/min); B 组 1/2 容量; C 组装满密封, 静置培养, 96h 取样, 测定培养物的 OD。

2 结果

2.1 菌种的生物学特性与鉴定

本菌株为革兰氏染色阴性,端生单鞭毛,二分分裂繁殖,氧化酶、过氧化氢酶阳性,淀粉酶、脂肪酶、明胶酶、硝酸还原反应及吲哚反应阴性,对不同基质的利用情况见表 1。

菌株可进行光合作用,不能利用硫化物为电子供体,菌体形状为杆状,单个或链状排列,在上述分离培养基上,菌落呈鲜红色,圆形、光滑湿润、稍突起,边缘整齐、有光泽,不形成丝状体,能利用丙酸盐、乙醇、丙氨酸、谷氨酸、苹果酸钠、丁酸钠、苯甲酸钠、葡萄糖、甘露糖、果糖、甘油、琥珀酸钠,不能利用酒石酸钠、柠檬酸钠、天冬氨酸、山梨醇等,将菌鉴定为荚膜红假单胞菌(*Rhodospseudomonas capsulata*)

2.2 环境因子对光合菌生长的影响

2.2.1 温度对光合菌生长的影响

温度对菌株生长的影响见图 1。菌株在 20~40℃ 范围内均可生长,温度越低,生长速度越慢;温度达到 40℃,前期生长速度很快,但继续培养,很快培养液有大量结块,菌体老化下沉死亡,本菌株生长的最适温度为 30℃ 左右。

2.2.2 盐度对光合菌生长的影响

从图 2 可看出,本株光合菌在 NaCl 浓度为 0~

40 的培养基中都可生长,适宜的盐度范围为 0~30,最适盐度为 10。随着培养基盐度的增加,适应期延长,盐度 35 以上菌生长较慢。试验表明本株光合菌对盐度具有较广的耐受性,可在淡、海水域中应用。

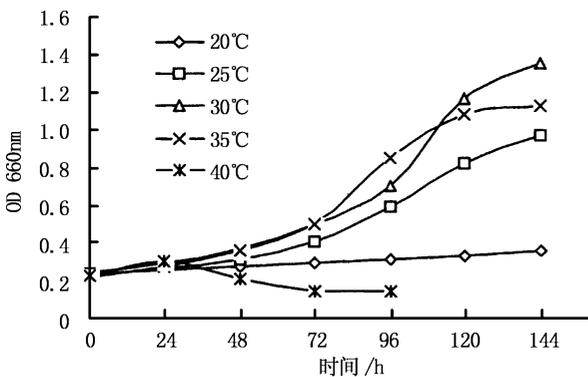


图 1 PS2 在不同温度条件下的生长

Fig.1 The growth of PS2 in different temperatures

基质	利用
甲酸钠	+
硫代硫酸钠	±
乙醇	++
丙酸钠	++
丙氨酸	+
天冬氨酸	-
天冬酰胺	-
亮氨酸	-
谷氨酸	+
蛋白胨	++
酵母膏	++
酒石酸钠	-
柠檬酸钠	-
苹果酸钠	++
丁酸钠	++
苯甲酸钠	+
葡萄糖	+
甘露糖	+
果糖	+
甘油	+
蔗糖	±
乳糖	-
山梨醇	-
甘露醇	-
琥珀酸钠	+
乙酸钠	++

注:++表示生长良好,+表示生长,±表示弱生长,-表示不生长

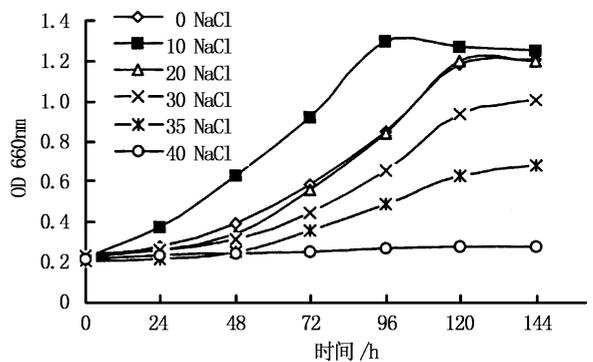


图 2 PS2 在不同盐度条件下的生长

Fig.2 The growth of PS2 in media with different salinity

2.2.3 pH 对光合菌生长的影响

从图 3 可看出,光合菌在 pH 为 6.0~9.0 范围均可生长,适宜范围为 6.0~8.0,最适为 pH 7。随着培养时间的延长,菌数不断增加,培养液的 pH 值也不断升高,至 pH 9.0 以上不再增高,菌生物量也已进

入稳定期而不再增加。

2.2.4 光照度对光合菌生长的影响

PS2 菌株在光照 500 ~ 5000lx 范围内,光照度弱时,生长较慢,光照强度越强,菌生长越好(图 4)。

2.2.5 溶解氧对光合菌生长的影响

从图 5 可看出 A、B、C 3 组的生物量,C 组 > B 组 > A 组,本菌株在厌氧、微氧、好氧条件下均可生长,但在厌氧条件下生长好于微氧或好氧。氧对光合菌色素的形成有明显的抑制作用,通气量影响到光合菌液的颜色,3 组菌液的颜色有所不同,C 组为紫红色,B 组为红色,A 组为粉红色。

3 讨论

3.1 PS2 菌株对有机物的利用与水质的净化

从碳源的利用情况来看,PS2 菌株对一些较大分子的有机物,如淀粉、纤维素等不能利用,但能利用大多数低分子的有机酸、糖醇类(如乙酸盐和乙醇等),PS2 菌株除可利用其它光合菌可利用的乙酸钠、丙酸钠、乙醇、苹果酸钠等,还可利用苯甲酸钠、葡萄糖、甘油等,表明本菌株可利用的底物范围较广,这对养殖水质的净化具有重要的作用。养殖池塘由于残饵、排泄物、生物尸体的不断沉积,池底有机物随着养殖时间的延长不断增多,又因为池底常处于缺氧状态,有机物在异养细菌的作用下分解产生大量的有机酸,在养殖过程中通过施放光合菌,光合菌利用其它异养细菌分解有机物产生大量的有机酸及氨作为合成菌体的基质而增殖,从而达到水质净化的效果。

3.2 PS2 菌株对养殖池塘环境条件的适应

养殖池塘施入外源菌要起到净化水质的作用,前提是菌必须能在此环境中生长繁殖,一般水产养殖在养成期间环境温度、盐度、pH 的变动范围分别为 20.0 ~ 35.0℃、0 ~ 38.1、6.9 ~ 8.7^[7-10],通过环境因子对 PS2 菌株生长的影响的研究,发现本实验菌株可生长的温度范围 20.0 ~ 40.0℃,盐度范围为 0 ~ 40, pH 范围 6.0 ~ 9.0,有氧或厌氧条件下均可生长,养殖池塘的环境条件适宜菌株生长的条件,因此,从理论上讲本菌株施用于养殖池后可生长、繁殖起净化水质的作用。

本菌株具有在光照厌氧条件下利用有机物生长的能力,在无光有氧条件下亦能异养生长,说明该菌株具多种获取能量的方式,具有在不同的环境条件下迅速转换代谢途径进行生长的能力。虾塘底常有丰富的有机质,含氧量很低,阳光也可微弱射到,这给光合菌提供了适宜的生态环境,有利于本菌株在养殖池塘的生长、繁殖。

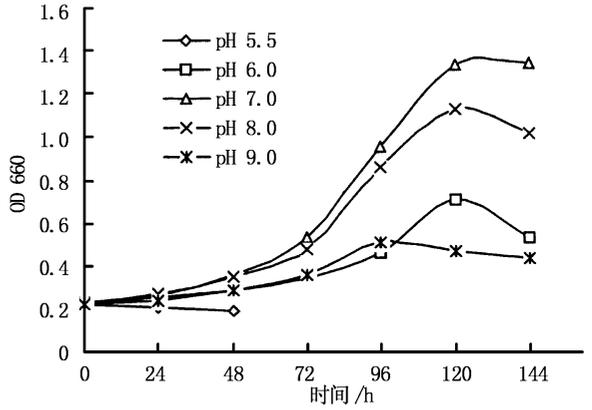


图 3 PS2 在不同 pH 条件下的生长

Fig.3 The growth of PS2 in media with different pH

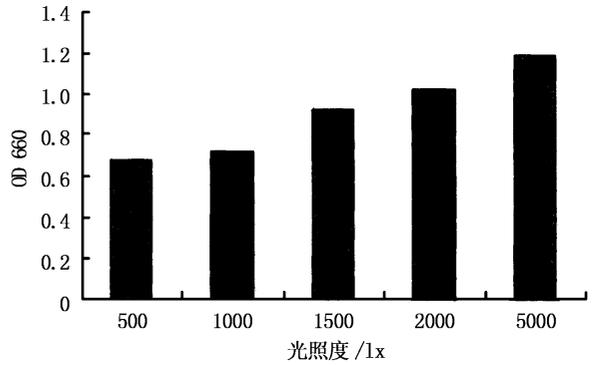


图 4 PS2 在不同光照度下 96h 的生物量

Fig.4 The growth of PS2 under different illumination for 96h

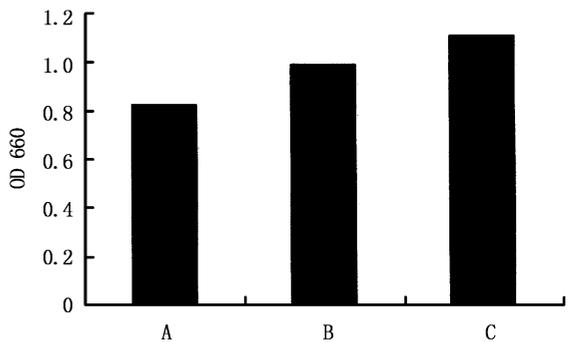


图 5 PS2 在不同溶解氧下 96h 的生物量

Fig.5 The growth of PS2 in different dissolve oxygen for 96h

3.3 PS2 菌株生产性培养

温度是光合菌生长的一重要条件。在广东等较暖和的地方冬季大规模培养光合菌,最好选用透光率好的小容器,易有效地利用光能、热能,有利于菌体的生长。密封、透明的容器放在有阳光的室外,白天阳光持续照射,培养液的温度可达到 25~30℃。若在夏季室外培养光合菌,由于阳光的持续照射,菌液温度可升至 40℃ 以上,温度过高,菌体易老化死亡,在这种情况下,可采用透光率好的大容器,避免温度升得太高。

在光合细菌大规模生产中,最优化的培养条件可最大限度提高生产效率和降低生产成本,实验表明 PS2 菌株生长的最适温度为 30℃,盐度为 10, pH 为 7.0,适宜的光照度为 5000lx,厌氧好于微氧,这些可作为大规模生产的培养条件,当然,在此条件下,还可提高光照度、较高的光照度有利于菌体的快速生长,可在短时间内使菌浓度达到商品的要求。

参考文献:

- [1] 陈世阳,席振乐.光合细菌的特性及其开发利用[J].海洋通报,1991,10(1):24-31.
- [2] 朱章玉,俞吉安,林志新.光合细菌的研究及应用[J].上海:上海交通大学出版社,1991.40-50,242-292.
- [3] 祝国芹,姜静颖,刘卫,等.高活性光合细菌的分离培养及应用[J].水产科学,1994,13(1):6-10.
- [4] 张道南,孙其焕,陈乃松,等.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[J].水产学报,1988,12(4):367-369.
- [5] 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译.伯杰细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1984.
- [6] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编.一般细菌常用鉴定方法[M].北京:科学出版社,1978.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 赖胜勇编著.对虾生态养殖技术[M].北京:中国农业出版社,2001.12.
- [10] 苏永全主编.虾类的健康养殖[M].北京:海洋出版社,1998.50-55.