

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00626

刺参池塘低温有机污染物降解细菌的分离筛选及其降解特性

闫法军, 田相利, 董双林, 武心华, 柳柄俊

中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要: 利用刺参(*Apostichopus japonicus*)饵料培养基, 在低温(16±1) °C 下, 从刺参养殖池塘环境中富集驯化分离有机污染物低温降解细菌; 根据菌株生长情况、好氧性和生物安全性进行了初步筛选, 然后在菌体接种密度 1×10^6 CFU/mL、(16±1) °C、pH 8.0、160 r/min 条件下, 通过检测菌株对饵料中有机物(COD)和氨态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)成分的去除率来最终筛选获得优良低温有机污染物降解细菌, 并对其降解特性进行研究。菌株筛选结果表明, 从分离的 17 株低温细菌中共获得 3 株菌株 DR7、DR8 和 DR11, 它们能同时高效降低和去除饵料浸出物中 COD 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$, 5 d COD 去除率分别为 37.7%、50.0%和 21.0%, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率分别为 95.0%、98.0%和 99.8%。根据菌株的形态特征、生理生化特性以及 16S rRNA 序列分析, 初步鉴定 DR7 和 DR11 属于假单胞菌属细菌(*Pseudomonas* sp.), DR8 属于副球菌属细菌(*Paracoccus* sp.)。菌株降解特性研究结果表明, 菌株培养时间对饵料降解有显著影响($P < 0.05$), 在 0 ~ 6 d 内 3 菌株对饵料中有机物和氨态氮的去除过程明显, 其中 DR8 降解力最强; 各组合菌株的饵料降解效果差异显著($P < 0.05$), 但并不完全优于对照单菌株, 其中最佳组合为 DR8-DR11。研究认为, 筛选的 3 株低温有机污染物降解细菌为良好的菌种资源, 在刺参养殖池塘污染环境调控及刺参微生态制剂的研制方面具有较好的潜在应用前景。

关键词: 刺参; 池塘; 低温有机污染物降解菌; 筛选; 细菌鉴定; 降解特性

中图分类号: S917.1

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)04-0626-09

刺参(*Apostichopus japonicus*)属棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothroidea), 是中国北方一个新形成的经济效益很高的优良养殖种类^[1]。目前刺参池塘养殖主要有两种方式, 一种是不投饵养殖, 即全程不投喂人工饲料, 另一种是投饵养殖, 在生长季节补充投喂人工饲料。在刺参的投饵养殖中, 由于饲料黏着性差, 在养殖过程中会产生大量残饵。同时, 因为池底设置有大量的人工附着基, 残饵和粪便等有机污染物无法通过换水有效排出, 导致其大量积累在池底。这些累积有机污染物经分解后会向养殖环境中不断释放有害物质, 不仅恶化水质, 对养殖对象的危害也极大^[2]。其中, 蛋白质等含氮有机物经异养微生物

分解矿化, 首先会产生大量的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 等有害物质, 之后部分 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 在一定条件下会经硝化作用转变为中间氧化产物 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 以及终氧化产物 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 等。这些无机态氮不仅污染水质, 易导致水体富营养化, 还对养殖对象具有直接或间接的毒害作用^[3-6]。因此, 养殖水体中的有机物和氨态氮成分是形成养殖污染、危害养殖动物的重要源头, 为主要的去除目标^[7-8]。另一方面, 池塘底部有机物和 N、P 等营养元素丰富, 为有害微生物的繁殖提供了条件, 使养殖对象处于一个不利的环境中, 极易暴发流行性疾病^[9]。因此, 研究刺参养殖环境中有机污染物的快速解决途径, 对解决刺参养殖的污染问题, 改善养殖状况, 促进该产业

收稿日期: 2011-10-26; 修订日期: 2012-02-17.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10Z409); 教育部新世纪优秀人才计划项目(NCET-08-0503); 山东省杰出青年基金项目(JQ201009); 国家“十二五”支撑计划课题(2011BAD13B03).

作者简介: 闫法军(1984-), 男, 博士生, 主要从事水产微生物学研究. E-mail: yanfajun2007@163.com

通信作者: 田相利, 教授. E-mail: xianglitian@ouc.edu.cn

的健康持续发展具有重要的理论和实践意义。

细菌种类繁多, 生长迅速, 在环境污染控制和修复方面的功能应用已屡见不鲜^[10-12], 在水产养殖方面亦有颇多研究^[13-15]。目前, 国内外学者已倾向于从养殖环境及养殖对象本身分离土著菌作为高效降解细菌的开发研究来源, 取得了很大的成果^[7, 16-17]。而这些研究大多集中于鱼虾方面, 对于刺参却报道甚少。本研究针对目前刺参养殖环境中的主要有机污染源—残饵及饵料溶出物, 以刺参饵料浸出液为基础培养基, 以其中的COD(海水有机物污染的常用综合性指标^[3])和 NH_4^+-N 含量为检测指标, 旨在分离筛选适于低温16℃(刺参生长适宜温度)^[18-19]生长的优良有机污染物降解细菌, 并研究其降解特性, 为进一步施用于刺参养殖环境控制及刺参池塘微生态制剂的研制工作创造条件。

1 材料和方法

1.1 培养基

刺参饵料(“海森特”牌, 青岛长生中科饲料有限公司出品): 含粗蛋白20.0%, 粗脂肪3.0%, 碳水化合物16.0%, 能值13.78 kJ/g。

富集培养基: 取刺参饵料20 g研成细粉, 于1 000 mL无菌海水中煮沸, 浸泡48 h后离心取上清, pH 8.0, 121℃, 灭菌20 min备用。

驯化培养基: 在富集培养基的基础上, 按10%的比例逐级提高饵料质量浓度, 浸泡48 h后离心取上清, pH 8.0, 121℃, 灭菌20 min备用。

分离培养基: 富集培养基1 000 mL, 琼脂20 g, pH 8.0, 121℃, 灭菌20 min后倒平板备用。

1.2 样品采集与处理

2008年5月从山东省青岛市胶南原琅琊第二虾场的3个刺参投饵养殖池塘用无菌器皿采集水样、泥样和刺参肠道样。取1 g泥样置于盛有9 mL无菌生理盐水的试管中, 充分打匀后取上清, 取1 g刺参肠道样置于盛有9 mL无菌生理盐水的研磨器中, 充分研磨后取上清, 分别制备泥和肠道样品液。水样不做任何处理, 直接作为样品液备用。

1.3 菌株富集驯化与分离

将各样品液分别接种于100 mL富集培养基中, 置于 (16 ± 1) ℃下摇床振荡培养7 d, 然后按10%的接种量转接驯化培养基中继续振荡培养7 d, 对菌株进行富集驯化。连续富集驯化6次, 取最后1次的培养液采用平板涂布法在分离培养基上涂布分离培养, 挑取生长快速良好的单菌落, 经多次划线纯化获得单菌株, 编号保种。

1.4 菌株筛选

1.4.1 初筛 将细菌活化后采用平板划线法在分离培养基上划线, (16 ± 1) ℃培养48~72 h, 记录细菌的生长情况, 选取能在48~72 h内生长良好的细菌, 作为二筛的菌株备用。

1.4.2 二筛 菌株的好氧性检测^[20]。将活化的菌悬液以10%的接种量接于盛有富集培养基的试管中, 摇匀后 (16 ± 1) ℃静置培养48~72 h, 选取在上层液面生长良好的菌株进行下一步筛选。

1.4.3 三筛 菌株的致病性检测。以体腔注射^[21]方法检测菌株对刺参的安全性。将培养48 h的新鲜菌体细胞用无菌生理盐水洗剂2次后重悬, 制得 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL的菌悬液; 取大(10~15 g)、中(5~10 g)、小(1~5 g)3种不同规格的健康刺参, 分别用1 mL无菌注射器体腔注射上述浓度的菌悬液, 每组6只, 每只注射0.1 mL, 对照组注射同等剂量的无菌生理盐水; 将刺参分别置于不同的水族箱中, 期间不换水, 不投饵, 充气, 连续观察7 d, 发现刺参有化皮、吐脏或者死亡等现象及时捞出并作记录, 选取对刺参无上述症状现象的菌株进行下一步筛选。

1.4.4 四筛 检测细菌对刺参饵料的降解能力, 检测项目为COD和 NH_4^+-N 。通过测定菌株在一定时间内对富集培养基中的COD和 NH_4^+-N 含量的去除率大小来衡量细菌降解刺参饵料的能力。每株菌为一个处理, 初始菌浓度皆为 1.0×10^6 cfu/mL(即时以血球计数板计数^[22]), 以不加菌的处理为对照, 每个处理设4个重复, (16 ± 1) ℃、160 r/min摇床振荡培养5 d, 取样于6 000 r/min离心10 min后取上清, 立即测定上清液中COD和

NH_4^+-N 值, 选取降解效果好的菌株进行研究。

1.5 菌株鉴定

1.5.1 菌株形态观察及生理生化鉴定^[22-23] 初步鉴定菌株的形态学特征及生理生化特性。

1.5.2 菌株 16S rDNA 序列测定与分析 采用水煮法^[24]提取细菌基因组 DNA。16S rDNA 扩增引物为细菌 16S rDNA 通用引物, 正向引物: 5'-AGAGTT TGA TCC TGG CTC AG-3'(E. coli 27F), 反向引物: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(E. coli 1492R)。PCR 产物(1.5 kb 左右)送至北京三博远志生物技术有限公司进行测序。将测序结果用 Blast 程序与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中的相关属种的 16S rRNA 序列进行同源性比对, 获得相似性最高的序列。将这些序列与本实验所得菌株序列一并采用 CLUSTAL X 和 MEGA 4.1 工具进行比对和系统进化分析, Kimura2-Parameter Distance 模型计算进化距离, Bootstrap 值为 1 000 Replications, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树^[25]。

1.6 菌株降解特性研究

1.6.1 生长曲线测定 采用光电比浊法^[26], 将菌株活化培养 24 h 后按 1% 的接种量接种传统 2216E 海水培养基, 在(16±1)、160 r/min 下恒温振荡培养, 每 2 h 取 3 个重复样测定 OD_{600} 值, 以平均值绘制生长曲线, 确定菌株的快速指数生长周期。

1.6.2 单菌株降解特性研究 将菌体接种于 2216E 海水培养基, 恒温振荡培养至指数生长期(本研究中培养 24 h, 图 2), 离心收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤 2 次后重悬作为接种菌液。降解试验以富集培养基为菌培养液, 体积为 100 mL, 菌体接种量为 0.1%~0.5%(初始菌体密度为 1.0×10^6 cfu/mL), (16±1), 160 r/min 摇床振荡培养, 以不加菌的处理作为对照, 每个处理 4 次重复, 每天定时取样测定样品液中 COD 和 NH_4^+-N 的含量, 连测 6 d, 研究培养时间对菌株降解刺参饵料的影响。

1.6.3 组合菌株降解特性研究 十字交叉划线法^[21]研究菌株间的拮抗作用, 选取相互之间没有生长抑制作用的菌株进行优化组合, 然后将各组合菌

株按照密度比 1:1(血球计数板计数)接种至富集培养基, 菌体接种量为 0.1%~0.5%(组合菌初始菌体密度为 1.0×10^6 cfu/mL), 于(16±1), 160 r/min 摇床振荡培养, 以降解性能最好的单菌株处理作为对照, 每个处理 4 次重复, 培养 5 d 后测定样品液中 COD 和 NH_4^+-N 的含量, 研究组合菌株对刺参饵料的降解能力。

1.7 分析方法

COD 采用碱性高锰酸钾法进行测定, NH_4^+-N 采用靛酚兰比色法进行测定^[27]。菌株对饵料中 COD 和 NH_4^+-N 的去除率计算公式如下:

$$\text{COD 去除率} = (1 - \text{COD}_5 / \text{COD}_0) \times 100\%;$$

$$\text{NH}_4^+-\text{N 去除率} = (1 - \text{NH}_4^+-\text{N}_5 / \text{NH}_4^+-\text{N}_0) \times 100\%;$$

其中, COD_0 和 COD_5 分别表示饵料渗出液中有机物的初始含量和在 5 d 时的含量; NH_4^+-N_0 和 NH_4^+-N_5 分别表示饵料渗出液中氨态氮的初始含量和在 5 d 时的含量。

数据统计分析采用 SPSS13.0 for Windows 软件进行, 数据结果以平均值±标准偏差(means ± SD)表示。各处理之间的差异采用单因子方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 多重比较法进行, 当 $P < 0.05$ 时认为差异达到显著水平。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

经富集驯化, 从刺参养殖池塘环境(水体、底泥和刺参肠道)分离纯化到 17 株低温有机污染物降解细菌。初筛、二筛和三筛后, 获得 11 株细菌。以刺参饵料培养基为唯一营养源对此 11 株细菌进行四筛, 结果见表 1。结果发现, 各菌株对饵料中 COD 或 NH_4^+-N 成分均有显著的降解去除效果(菌株 DR3 除外), 但不同菌株之间有差异($P < 0.05$)。比较而言, 有些菌株对 NH_4^+-N 的去除效果很好, 但对 COD 没有显著降解作用(DR5 和 DR6); 有些对 COD 和 NH_4^+-N 二者均有较好的去除作用, 但效果一般(DR1、DR2、DR4、DR6、DR12 和 DR13); 而 DR7、DR8 和 DR11 三菌株能同时高效去除 COD 和 NH_4^+-N 成分, 饵料降解效果最强, 且对 NH_4^+-N 几乎达到 100% 的去除率。

表 1 有机污染物降解菌不同菌株对刺参饵料的降解
Tab.1 Biodegradation of the sea cucumber feed by different strains of bacteria

菌株编号 strain code	COD 去除率/% removal rate of COD	氨态氮去除率/% removal rate of NH ₄ ⁺ -N	菌株来源 source of strains
DR1	19.8±2.2 ^d	33.7±0.3 ⁱ	底泥 bottom mud
DR2	12.9±1.1 ^e	45.2±1.2 ^g	底泥 bottom mud
DR3	9.2±1.8 ^f	-103.4±3.3 ^k	底泥 bottom mud
DR4	24.3±2.4 ^b	39.8±1.0 ^h	底泥, 肠道 bottom mud, intestines
DR5	9.5±2.7 ^f	90.5±1.6 ^c	水体 water
DR6	3.8±1.4 ^g	83.5±0.9 ^d	水体 water
DR7	37.7±1.1 ^a	95.0±1.2 ^b	底泥, 肠道 bottom mud, intestines
DR8	50.0±2.0 ^a	98.0±0.4 ^a	底泥, 肠道 bottom mud, intestines
DR11	21.0±0.7 ^{cd}	99.8±0.4 ^a	水体 water
DR12	21.4±0.5 ^{bcd}	57.5±0.9 ^f	肠道 intestines
DR13	23.0±2.4 ^{bc}	67.3±1.2 ^e	水体 water
对照 cont.	6.7±0.9 ^{fg}	1.7±0.1 ^j	

注：表中同列数据不同上标字母表示数据之间差异显著(P<0.05).
Note: Data with different superscript letters in lowercase are significantly different from each other (P<0.05).

根据上述分析, 本研究选取 DR7、DR8 和 DR11 三株细菌进行进一步研究。

2.2 菌株鉴定

菌株 DR7 为杆状, 于 2216E 固体平板、(16±1) 培养 48~72 h, 菌落呈浅绿色、圆形、隆起、不透明、边缘整齐、表面较湿润光滑; 菌株 DR8 为球状, 于 2216E 平板、(16±1) 培养 48~72 h, 菌落呈橘红色、圆形、隆起、不透明、边缘整齐、表面较湿润光滑; 菌株 DR11 为杆状, 于 2216E 平板、(16±1) 培养 48~72 h, 菌落呈鲜黄色、圆形、隆起、不透明、边缘整齐、表面较湿润光滑。菌株生理生化特性见表 2。

将 DR7、DR8 和 DR11 的 16S rRNA 核苷酸序列(已提交至 GenBank 核酸数据库, 序列号分别为: JN210570、GU338411、JN210571)与 GenBank 中的相关属种的 16S rRNA 序列进行比对和系统发育分析(图 1), 结果发现菌株 DR7 和 DR11 属于假单胞菌属细菌(*Pseudomonas* sp.), DR8 属于副球菌属细菌(*Paracoccus* sp.)。结合形态特征和生理生化特性, 将 DR7 和 DR11 初步鉴定为假单胞菌属细菌(*Pseudomonas* sp.), DR8 为副球菌属细菌(*Paracoccus* sp.)。

2.3 菌株降解特性

2.3.1 生长曲线 采用光电比浊法测定了菌株

DR7、DR8 和 DR11 在传统 2216E 海水培养基中的部分生长曲线, 包括延滞期、指数期和平稳期(图 2)。可以推测, 3 菌株的生长曲线与细菌的典型生长曲线相似, 基本呈现“S”型。在 0~10 h 内 3 菌株均处于生长的延滞期, 之后开始进入快速生长指数期。在指数期间各菌株生长特征开始出现差异。两菌株 DR7 和 DR8 的指数生长周期

表 2 有机污染物降解菌 3 个菌株的生理生化特性
Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of 3 bacterial strains

检测项目 test item	菌株 bacterial strain		
	DR7	DR8	DR11
革兰氏染色 gram stain	-	-	-
鞭毛 flagellum	+	-	+
芽孢 spore	-	-	-
油脂水解酶 lipase	+	+	-
淀粉水解酶 amylase	-	+	-
酪蛋白酶 casease Enzyme	+	+	+
过氧化氢酶 catalase test	+	+	+
氧化酶 oxidase test	-	+	+
甲基红 methyl red test	-	+	-
V-P 试验 Vagex-Proskauer test	-	-	-
葡萄糖产酸 acid from glucose fermentation	-	+	-
葡萄糖产气 gas from glucose fermentation	-	+	-

注：“+”：阳性反应；“-”：阴性反应。
Note：“+”：positive reaction;“-”：negative reaction.

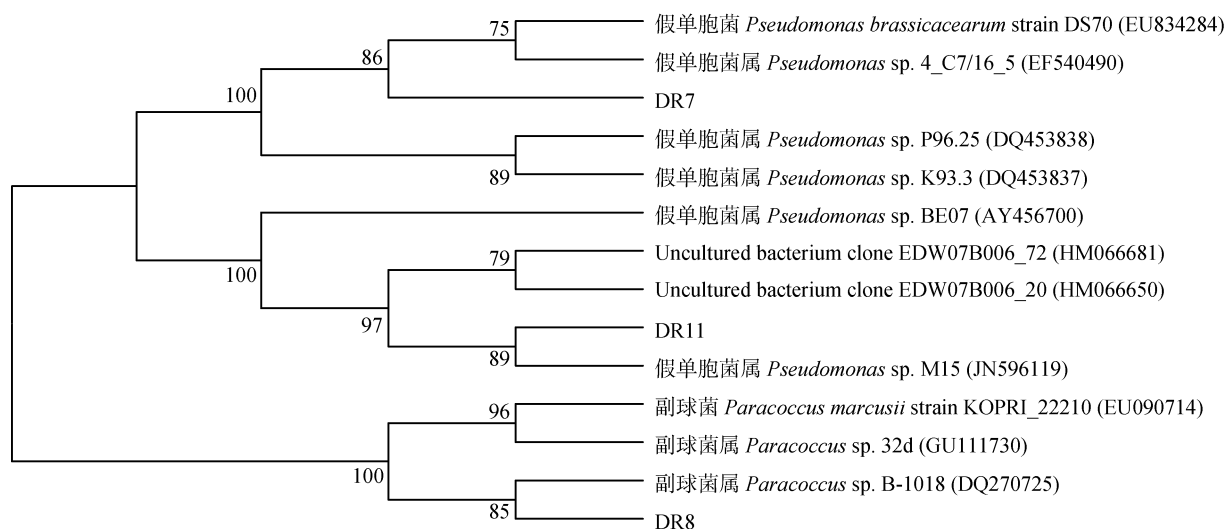


图 1 菌株 DR7、DR8 和 DR11 的 16S rDNA 系统发育树

节点处数字为 Bootstrap 1 000 个循环的置信度(只显示 50%以上)。

Fig. 1 Phylogenetic tree of the bacterial isolates DR7, DR8 and DR11 based on 16S rDNA gene sequences
Bootstrap test was based on 1 000 replicates and the bootstrap values less than 50% were omitted.

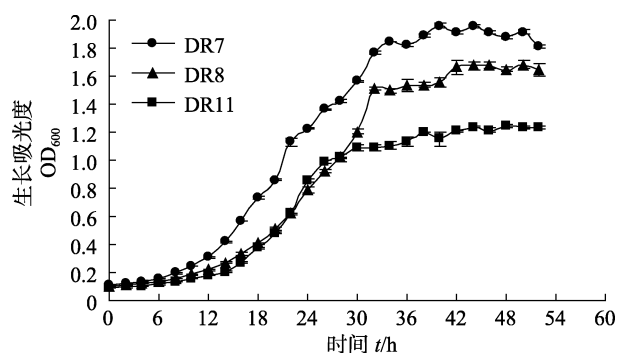


图 2 三菌株生长曲线

Fig. 2 Growth curves of 3 bacterial strains

长,二者分别在 16~32 h、20~32 h 生长最快,32 h 之后生长速率均明显降低,开始逐渐进入平稳期;菌株 DR11 指数生长周期短,在 22~26 h 生长最快,26 h 之后逐渐进入平稳期。这些差异可能最终导致了以 OD 值表示的菌株生长量方面的不同(DR7>DR8>DR11)。

2.3.2 菌株培养时间对刺参饵料降解的影响 菌株培养时间对刺参饵料中 COD 降解有显著影响 ($P<0.05$)(图 3)。在整个实验周期(0~6 d),与对照相比,3 个菌株对 COD 有着显著的连续的降解过程,但降解程度因菌株不同而有差异。其中以 DR8 降解效果最好,降解曲线下下降程度最大,其 COD 最大去除率出现在第 5~6 天,为 54.4%;

其次为 DR7,其 COD 最大去除率出现在第 5 天,为 35.5%;菌株 DR11 降解效果最差,曲线下下降程度明显不如 DR7 和 DR8,其于第 4 天达到 COD 最大去除率为 18.3%。

菌株培养时间对刺参饵料中 NH_4^+-N 去除有显著影响($P<0.05$)(图 4)。在整个试验周期(0~6 d),与对照相比,3 菌株对 NH_4^+-N 均有明显的去除效果,其中在 0~3 d 内菌株对 NH_4^+-N 急剧利用,于

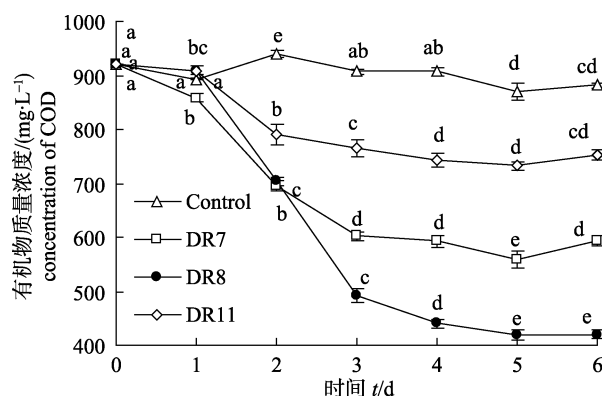


图 3 菌株培养时间对刺参饵料中有机物(COD)降解的影响
图中相同处理下的不同字母表示数据之间有显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 3 Effects of incubation time of bacteria on degradation of COD in sea cucumber feed
Data with different letters at the same treatments are significantly different from each other ($P<0.05$).

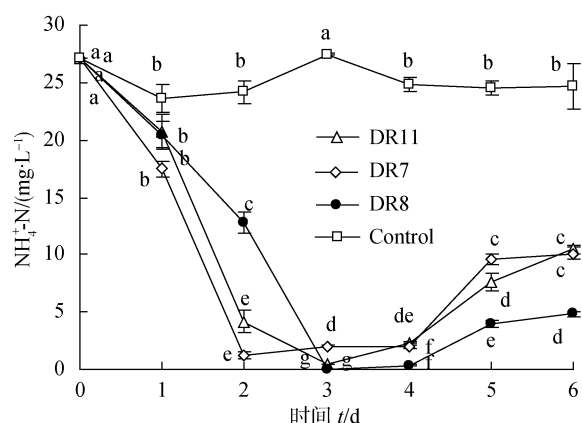


图4 菌株培养时间对刺参饵料中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除的影响
图中相同处理下的不同字母表示数据之间有显著性差异 ($P < 0.05$).

Fig. 4 Effect of incubation time of bacteria on removal of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in sea cucumber feed

Data with different letters at the same treatments are significantly different from each other ($P < 0.05$).

第3~4天达到最大去除率为92.9%~99.9%, 而到第5~6天饵料中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量有所上升(可能与菌株进入衰亡期有关), 但仍显著低于对照; 各菌株对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的利用程度有所差异, 其中以菌株DR8去除效果最好, 在第3~4天最大去除率达到99.9%, 而且之后其对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量一直控制在最低水平。

2.3.3 组合菌株对刺参饵料的降解 经十字交叉划线拮抗研究, 发现菌株DR7、DR8和DR11三者之间无任何拮抗作用, 菌株间的生长互不影响。以降解性能最好的单菌株DR8为对照, 对DR7-DR8、DR8-DR11、DR7-DR11、DR7-DR8-DR11 4个菌组合进行饵料降解效果试验, 结果见图5。结果表明, 各组合菌株的饵料降解效果差异显著, 但并不一定优于对照单菌株($P < 0.05$)。在降解COD方面, 组合菌DR7-DR11的降解效果不如单菌株DR8($P < 0.05$), 其余3个组合菌与单菌株的降解效果无显著差异($P > 0.05$), 5 d内COD去除率均在50%以上; 在去除 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 方面, 各组合菌彼此之间差异显著($P < 0.05$), 其中组合菌DR8-DR11的去除效果最好, 5 d内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率为92.4%, 显著高于单菌株DR8, 其余组合菌不如DR8($P < 0.05$)。综上分析, 组合菌DR8-DR11为饵料降解的最佳组合。

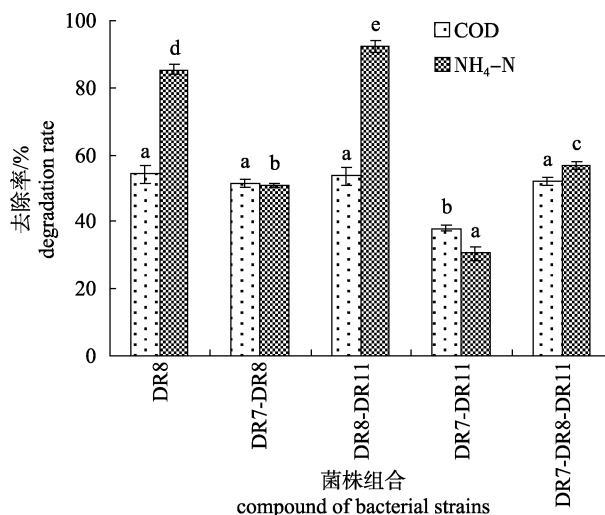


图5 组合菌株对刺参饵料的降解
图中同类型数据不同上标字母表示数据之间有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Biodegradation of the sea cucumber feed by compound bacteria

Data with different superscript letters at the same column are significantly different from each other ($P < 0.05$).

3 讨论

要获得某一种或某一类微生物, 先对环境样品进行有目的的富集和驯化, 如定时定量添加目标化合物, 可以大大提高分离筛选效率^[28]。本研究从多年的刺参投饵养殖池塘中(现场测定的环境水体温度为22℃)采集样品, 以刺参饵料培养基为唯一营养源, 在低温[(16±1)℃]下对样品进行了富集驯化, 以筛选出低温有机污染物高效降解细菌。在富集驯化过程中, 所用富集培养基是参考文献[7]和[29]的相关研究设定的, 刺参饵料质量浓度为20 g/L, 饵料浸出液的COD含量为(1 083±35) mg/L, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量为(28.36±2.53) mg/L。样品连续富集驯化6次, 7 d/次, 每次按10%的比例添加刺参饵料, 以提高饵料质量浓度, 分离出能在高浓度饵料液中生长的优势菌种, 从而为后续的筛选工作奠定基础。可以看出, 在低温分离培养过程中, 大部分菌株的生长速度越来越快, 在刺参饵料固体平板上由最开始的5~7 d至最终均能在48 h内长成直径为1~2 mm的菌落。经筛选, 最终获得3株能同时高效降解去除刺参饵料中有机物(COD)和氨态氮的优良低温有机污

染物降解菌株 DR7、DR8 和 DR11。在 (16 ± 1) 、pH 8.0、菌体密度 (1.0×10^6) cfu/mL 下, 菌株 DR7、DR8 和 DR11 在 5 d 时对富集培养基中 COD 去除率分别为 37.7%、50.0%和 21.0%, NH_4^+-N 去除率分别为 95.0%、98.0%和 99.8%(表 1)。

目前多数降解筛选研究多以 1%~10%的接种量进行的^[7, 14, 16, 29], 接种后初始菌体密度较高, 估计在 $10^7\sim 10^9$ cfu/mL 之间。这可能是因为较低的菌体密度会影响菌株最终的降解效果, 因此要在保证高初始菌体密度条件下进行菌株筛选以排除这种影响。但在自然状态下, 刺参池塘水体环境中菌体密度不会太高, 大致在 $10^4\sim 10^6$ cfu/mL^[30], 单一菌株的菌体密度会更低。因此, 为了力求与刺参养殖池塘的自然状况相接近, 本研究接种比例为 0.1%~0.5%, 接种后初始菌体密度近似在一个相对实际的中等的水平 (1.0×10^6) cfu/mL。在该菌体密度条件下, 本研究发现菌株 DR7、DR8 和 DR11 对 20 g/L 的刺参饵料液降解效果非常可观。

一般认为, 菌株的降解性能与它们的生长繁殖能力密切相关, 处于指数生长期的细菌细胞生长繁殖能力最强, 因此接种该期的菌细胞可以大大缩短菌株生长的延滞期, 提高降解效率。为此, 本研究在确定了各菌株指数生长时期的基础上, 将处于指数生长期的细菌细胞悬浮于饵料液中研究菌株培养时间对饵料降解效果的影响, 最终明确了 3 菌株去除饵料中 COD 和氨态氮的动态过程(图 3, 图 4), 进一步确定了饵料降解最佳菌株(DR8)。本研究中, DR7 和 DR8 筛选于底泥和刺参肠道, 刺参属于底栖生物, 二者极可能因刺参的摄食作用而进入刺参肠道, 故二者均来源于池塘底质, 而 DR11 从养殖水体中筛选获得, 水体中有机物含量与池塘底质相差悬殊, 因此, 与本研究实验结果相一致, 菌株 DR7 和 DR8 对有机物的降解能力远远高于 DR11。

莫照兰等^[7]从对虾养殖环境中分离筛选到 10 株高效有机污染物降解细菌, 其中 3 株为假单胞菌属细菌, 研究表明该属细菌具有高效降解有机污染物的能力。本研究结果与其相一致, 所筛选的菌株 DR7 和 DR11 皆属于假单胞菌属细菌, 它

们具有高效降解刺参饵料的能力。已有研究表明, 假单胞菌属细菌是刺参养殖池塘环境中的优势菌之一, 其广泛存在于水体、底泥和刺参肠道中^[30], 而菌株 DR7 和 DR11 属于刺参养殖池塘环境中的土著菌, 因此, 作者推测二菌株非常适合在刺参养殖池塘中繁殖生长, 发挥其环境有机污染物降解调控作用。菌株 DR8 属于副球菌属细菌, 该属的某些细菌种类能够利用各种有机化合物作为碳源异养生长^[23], 因此, 可以推测菌株 DR8 是吸收利用了刺参饵料中各种有机因子进行生长来达到高效降解 COD 的作用。本研究中各菌株对饵料中氨态氮成分的降解作用机制尚不明确, 还需要进一步深入探讨。

本研究结果表明某些组合菌株的饵料降解效果并不优于单一菌株。分析原因可能是本身的组合没有协同作用, 不能相互促进饵料的降解, 如 DR7-DR8 和 DR7-DR8-DR11 的 COD 降解效果与单菌株 DR8 无差异, NH_4^+-N 降解效果显著低于 DR8; 另一方面可能是因为不同菌株之间的差异, 如 DR7 和 DR11 单一菌株的饵料降解能力不如对照 DR8, 因此组合菌如 DR7-DR11 的降解效果远不及对照单菌株 DR8(图 5)。本研究最终确定降解菌最佳组合为 DR8-DR11, 其在刺参池塘复合微生物制剂的研制方面可能具有较大的应用前景。

刺参生长的适宜水温一般在 15~20 之间^[18-19], 在这一温度范围内, 人工饵料的投喂比较集中, 但由于大部分细菌的生长较慢, 因此水体中的残饵的分解率也较低, 导致大量的残饵积累在刺参养殖池塘中。而进入高温季节后, 这些积累的残饵会大量分解, 不仅恶化底质和水体环境, 也严重影响即将或已进入夏眠的刺参的生长和存活。本研究筛选的 3 株菌在 (16 ± 1) 低温条件下对刺参饵料中有机物和氨态氮高效的降解去除能力, 表明菌株在刺参养殖业中可能具有较大的潜在应用价值。因此, 如果能将此 3 菌株应用到刺参养殖生产中, 则可以及时降低刺参生长季节中池塘有机残饵积累, 大大减少高温季节有机污染物分解对池塘环境的污染, 从而有效缓解因环境恶化对刺参生长和存活造成的危害。

综上所述, 本研究筛选的3株菌株DR7、DR8和DR11对刺参饵料中的有机物和氨态氮具有很好的降解去除效果, 在刺参养殖生产实践中具有较大的潜在应用价值, 不仅可以应用于残饵分布较多的刺参养殖池塘底质的修复, 还可以应用于人工饵料投喂较多的刺参工厂化养殖和育苗水体中, 因此具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 国内外海参自然资源、养殖状况及存在问题[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(3): 89-97.
- [2] Funge S, Briggs M R P. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: Implications for sustainability[J]. Aquaculture, 1998, 164 (18): 117-133.
- [3] 雷衍之. 养殖水环境化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 119-124, 220-221.
- [4] 马爱军, 雷霖霖, 高淳仁. 氨对真鲷幼鱼生长的危害[J]. 海洋科学, 2000, 24(1): 14-15.
- [5] 臧维玲, 江敏, 张建达, 等. 亚硝酸盐和氨对罗氏沼虾幼体的毒性[J]. 上海水产大学学报, 1996, 5(1): 15-22.
- [6] 王明学, 吴卫东. NO_2^- -N对鱼类毒性的研究概况[J]. 中国水产科学, 1997, 4(5): 85-89.
- [7] 莫照兰, 王祥红, 于勇, 等. 虾池有机污染物降解细菌的筛选[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 334-338.
- [8] 刘瑜. 海水养殖水体模块净化技术[J]. 中国水产, 2002, 9: 68-69.
- [9] 黄凤莲. 滩涂海水种植-养殖系统微生物修复研究[D]. 广州: 中山大学, 2005.
- [10] 陈亚丽, 张先恩. 甲基对硫磷降解假单胞菌 WBJ23 的筛选及其降解性能的研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(4): 490-497.
- [11] Milanese M, Chelossi E, Manconi R. The marine sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an elective candidate for bioremediation in integrated aquaculture[J]. Biomolecular Engineering, 2003, 20 (6): 363-368.
- [12] Cao N D, Pham M C, Nguyen H V, et al. Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 3787-3791.
- [13] 刘卫东, 苏浩, 邓立康. 微生物在水产养殖中的应用[J]. 水产科学, 2001, 20(2): 28-31.
- [14] 谢航, 邱宏端, 王秀彬, 等. 地衣芽孢杆菌降解水产养殖中残余饵料的特性研究[J]. 福建水产, 2008, 118(3): 31-35.
- [15] Zhou Q L, Li K M, Jun X, et al. Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture[J]. Biores Technol, 2009, 100: 3780-3786.
- [16] 李秋芬, 曲克明, 幸福言, 等. 虾池环境生物修复作用菌的分离与筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(3): 281-285.
- [17] Wada M, Zhang D, Do H K, et al. Co-inoculation of *Capitella* sp. I with its synergistic bacteria enhances degradation of organic matter in organically enriched sediment below fish farms[J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 57: 86-93.
- [18] Liu Y, Li F, Song B, et al. Study on aestivating habit of sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka of ecological characteristic of aestivation[J]. Fish Sci China, 1996, 3: 41-48.
- [19] 董云伟, 董双林, 田相利. 不同水温对刺参幼参生长、呼吸及体组成的影响[J]. 中国水产科学, 2005, 12(1): 33-37.
- [20] 周德庆. 微生物学教程[M]. 第2版. 高等教育出版社, 2003: 162-163.
- [21] Austin B L F, Stuckey P A W, Roberson I, Effendi D R W. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*[J]. J Fish Dis, 1995, 18: 93-96.
- [22] 杨文博. 微生物学实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 37-40, 79-82.
- [23] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-379.
- [24] 陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学[M]. 化学工业出版社, 2007: 63.
- [25] 高菲, 孙慧玲, 许强, 等. 刺参消化道内含物细菌群落组成的 PCR-DGGE 分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 671-680.
- [26] 陈金春, 陈国强. 微生物学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005: 36-38.
- [27] 雷衍之. 养殖水环境化学实验[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 31-59.
- [28] Lu J, Wang S J, Zhao L H. Acclimatization and selection of benzene compound Arabic degradation bacteria [J]. J Environ Sci, 1996, 17(6): 1-4.
- [29] 俞勇, 李会荣, 李筠, 等. 虾池养殖环境有机污染物降解细菌的筛选[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 65-70.
- [30] 牛宇峰. 刺参养殖池塘异养菌数量变动及区系组成的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.

Isolation, selection and characterization of low-temperature organic-pollutant-degrading bacteria in sea cucumber ponds

YAN Fajun, TIAN Xiangli, DONG Shuanglin, WU Xinhua, LIU Bingjun

The Key Laboratory of Mariculture Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: Low-temperature organic-pollutant-degrading bacteria were isolated from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) outdoor rearing ponds after enriching the liquid sea cucumber feed-medium and acclimating at $(16\pm 1)^\circ\text{C}$. All of the bacterial strains were preliminarily selected by evaluating their aerobic growth on sea cucumber feed-medium and verifying their specificity for the sea cucumber. The bacteria were finally selected by evaluating their ability to degrade organic pollutants (COD) and ammonia nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) in the feed-medium, with an inoculation of 1.0×10^6 cfu/mL. Culture conditions were $(16\pm 1)^\circ\text{C}$, pH 8.0 and a shaking rate of 160 r/min. After screening of 17 bacterial isolates, three bacterial strains (DR7, DR8 and DR11) were selected. These strains were able to degrade the feed over 5 d with COD removal rates of 37.7%, 50.0% and 21.0%, and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ removal rates of 95.0%, 98.0% and 99.8%, respectively. From morphological and physio-biochemical analyses, and 16S rRNA sequence similarity analysis, strains DR7 and DR11 were identified as *Pseudomonas* sp., and strain DR8 as *Paracoccus* sp. The time course of degradation of the feed was observed by examination of the concentrations of the organic pollutants and ammonia-nitrogen in the liquid sea cucumber-feed-medium between 0 d and 6 d. Bacterial cultivation time had a significant effect on the feed-degrading activities of the three strains ($P<0.05$). Based on the dynamics of feed degradation, strain DR8 was considered to be the most effective of the three strains. Significant differences ($P<0.05$) were also observed in the combined feed-degrading capacities of mixtures of the strains. The optimal combination was considered to be DR8 + DR11. However, the overall feed-degrading abilities of the combined strains were not much better than that of the single strain. We conclude that the 3 low-temperature organic-pollutant-degrading bacteria screened in this study are useful bacterial resources, which could show good potential for pollution control in sea cucumber culture ponds and the development of probiotics for sea cucumber culture.

Key words: *Apostichopus japonica*; rearing ponds; low-temperature organic-pollutant-degrading bacteria; screening and selection; bacterial identification; degrading characteristics

Corresponding author: TIAN Xiangli. E-mail: xianglitian@ouc.edu.cn