



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105309479 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201410320879. 8

(22) 申请日 2014. 07. 08

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1号

(72) 发明人 张学振 陈元元 魏晋 吴康

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

A01N 63/00(2006. 01)

A01P 13/00(2006. 01)

A01P 1/00(2006. 01)

C02F 3/34(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种溶藻生物制剂及应用

(57) 摘要

本发明公开一种溶藻生物制剂及应用。该菌剂由枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌、粪链球菌、光合细菌、鞘氨醇单胞菌、维生素C、维生素E和乳糖混合而成。该产品具有良好的稳定性和高效性,施用过程中耗氧极低,迅速降解养殖水体中的微囊藻等污染物,有效改良水体环境。本发明对环境、人畜无毒无害、无残留,能够显著地改良及净化养殖水体环境,有效避免蓝藻水华的爆发,同时还能提高水产动物的免疫力,减少发病率,使整个养殖水体生态系统趋于平衡并向良好方向发展。

1. 一种溶藻生物制剂,其配方如下:

原料	重量份
枯草芽孢杆菌	0.3~4;
地衣芽孢杆菌	0.5~3;
侧孢芽孢杆菌	2~3;
粪链球菌	0.8~2;
光合细菌	2~4;
鞘氨醇单胞菌	0.5~1
维生素 C	0.1~2
维生素 E	0.1~1.5;
乳糖	0.1~0.5。

2. 根据权利要求 1 所述的溶藻生物制剂,其特征在于:

原料	重量份
枯草芽孢杆菌	1;
地衣芽孢杆菌	1;
侧孢芽孢杆菌	2;
粪链球菌	1;
光合细菌	2;
鞘氨醇单胞菌	1;
维生素 C	0.5;
维生素 E	1;
乳糖	0.3。

3. 根据权利要求 1 所述的溶藻生物制剂,其特征在于:所述的地衣芽孢杆菌和侧孢芽孢杆菌菌粉购自湖北绿天地生物科技有限公司,各菌含量 300 亿/g;鞘氨醇单胞菌、枯草芽孢杆菌菌粉购自上海勒布生物科技有限公司,菌含量是 300 亿/g;所述的粪链球菌、光合细菌菌粉购自湖北天辰生物科技有限公司,菌含量 50 亿/g。

4. 权利要求 1 所述的溶藻生物制剂在去除蓝藻中的应用。

一种溶藻生物制剂及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及富营养化水体中水华蓝藻的去除应用领域,更具体涉及一种溶藻生物制剂,还涉及该制剂在去除蓝藻中的应用。

背景技术

[0002] 近年来,随着全球水体富营养化程度的加剧,世界各地有害藻类水华事件发生的频率和幅度日趋增加。藻类水华已成为严重影响水环境质量和水体生态安全的全球性问题,不仅极大的危害人类健康和其他生物安全,也给全球经济造成巨大的损失。因此,如何快速的控制和消除藻类水华污染,成为水环境领域亟待解决的热点问题。水环境与人类生活有着非常紧密的联系,同时它也严重影响水产养殖业的发展。蓝藻毒素使各种哺乳动物、鱼类、鸟类中毒甚至死亡,对畜牧业和水产养殖业造成很大的经济损失,更严重的是,它能够通过各种方式影响人类自身的健康。有害藻类的水华是湖泊水体富营养化的一种表现,在另一方面,水体湖泊水华的暴发又会进一步加重水体的污染情况,对水生动植物、水体景观、水生生态安全、区域生态安全造成极大的危害。自上世纪 60 年代至今国内外许多单位对去除藻类水华进行了大量的实验和研究工作,一般可采用物理法、化学法、换水法除藻、生物处理法、组合工艺法和动物捕食等。除藻技术虽有快速高效除藻的优点,但是化学药剂的添加又会给水体带来新的污染,如果直接应用在饮用水源的湖泊、水库等则会带来二次污染的问题,甚至对区域饮用水安全造成威胁,因此,该法应受到限制或必须慎用。化学法所用药剂有多种,如硫酸铜,该药剂效果短暂,而且它本身也为一种污染物,不宜多次施用。换水法治标不治本。利用物理方法除藻由于处理能力有限,仅可作为水华控制的辅助性措施,局限于水处理工程应用。而生物方法是利用藻类的天敌及其产生的生长抑制物质对藻类的生长、繁殖进行抑制。由于其是从控制藻类繁殖和调整藻类群落结构方面着手,使整个水生生态系统趋于平衡并向良好方向发展,所以生物方法应作为解决藻类水华污染的主要方向开展研究。其中采用微生物制剂抑藻、溶藻是符合当今渔业发展方向的生物防治方法。微生物制剂又称“有益微生物”,利用有益微生物不仅可以有效的杀灭藻类同时对养殖水环境进行微生物调控,净化底泥,改善水质,越来越受到人们的重视。但仅仅使用单一微生物进行对藻类的控制却存在一定的局限性,如申请号为 200710045195.1 名称为“一种利用微生物降解铜绿微囊藻的方法”的专利采用从富营养化水体中筛选出的一株溶藻菌株,由于其对原水体生物群落结构的影响、对其它生物的胁迫作用以及对鱼和人致病性的影响不能确定,所以其是否可以大规模应用存在问题。其它一些申请专利微生物溶藻,它的起效时间很慢,而且作用时间长,用到实际水产养殖生产实践中具有一定的难度。一旦养殖水体爆发蓝藻水华,微生物对微囊藻的控制很难在有效地时间内达到很好的效果。

[0003] 因此,目前需要寻找一种既能快速有效的去除水体中微囊藻而且对水体无污染的溶藻配方。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种溶藻生物制剂,该制剂是枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌、粪链球菌、光合细菌、鞘氨醇单胞菌、维生素 C、维生素 E、乳糖的混合物,按照重量比为 0.3 ~ 4:0.5 ~ 3:2 ~ 3:0.8 ~ 2:2 ~ 4:0.5 ~ 1:0.1 ~ 2:0.1 ~ 1.5:0.1 ~ 0.5 混合制成。该产品具有良好的稳定性和高效性,施用过程中耗氧极低,迅速降解养殖水体中的微囊藻等污染物,有效改良水体环境。

[0005] 本发明的另一个目的在于提供了一种溶藻生物制剂在去除蓝藻中的应用。本发明对环境、人畜无毒无害、无残留,能够显著地改良及净化养殖水体环境,有效避免蓝藻水华的爆发,使整个养殖水体生态系统趋于平衡并向良好方向发展。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0007] 一种溶藻生物制剂,由以下原料按重量份配制而成:

[0008]

原料	重量份
枯草芽孢杆菌	0.3~4;
地衣芽孢杆菌	0.5~3;
侧孢芽孢杆菌	2~3;
粪链球菌	0.8~2;
光合细菌	2~4;
鞘氨醇单胞菌	0.5~1
维生素 C	0.1~2
维生素 E	0.1~1.5;
乳糖	0.1~0.5

[0009] 所述的原料市售的均可完成本发明。

[0010] 优选的:

[0011] 所述的地衣芽孢杆菌和侧孢芽孢杆菌菌粉购自湖北绿天地生物科技有限公司,各菌含量 300 亿 /g;鞘氨醇单胞菌、枯草芽孢杆菌菌粉购自上海勒布生物科技有限公司,菌含量是 300 亿 /g。

[0012] 所述的粪链球菌、光合细菌菌粉购自湖北天辰生物科技有限公司,菌含量 50 亿 /g。

[0013] 一种溶藻生物制剂,由以下原料按重量份配制而成:(优选范围)

[0014]

原料	重量份
枯草芽孢杆菌	0.3~2;
地衣芽孢杆菌	0.5~2;
侧孢芽孢杆菌	2~3;
粪链球菌	0.8~1.5;
光合细菌	2~4;
鞘氨醇单胞菌	0.5~1
维生素 C	0.1~1.8
维生素 E	0.5~1.5;
乳糖	0.2~0.5

[0015] 一种水产养殖用去除微囊藻的溶藻配方,由以下原料按重量份配制而成:(优选范围)

[0016]

原料	重量份
枯草芽孢杆菌	0.3~1;
地衣芽孢杆菌	0.5~1;
侧孢芽孢杆菌	2~2.5;
粪链球菌	0.8~1;
光合细菌	2~3;
鞘氨醇单胞菌	0.8~1;
维生素 C	0.1~1;
维生素 E	0.5~1;
乳糖	0.2~0.4

[0017] 一种水产养殖用去除微囊藻的溶藻配方,由以下原料按重量份配制而成:(最佳值)

[0018]

原料	重量份
枯草芽孢杆菌	1;
地衣芽孢杆菌	1;
侧孢芽孢杆菌	2;
粪链球菌	1;
光合细菌	2;

[0019]

赖氨酸单胞菌	1;
维生素 C	0.5;
维生素 E	1;
乳糖	0.3

[0020] 一种溶藻生物制剂在去除蓝藻中的应用,其应用步骤是:

[0021] 将本发明所述制剂按照 5 ~ 20mg/L 的比例投入蓝藻爆发的水面即可。

[0022] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0023] 1. 该溶藻配伍物质均为天然无公害的原料。配伍中的微生物菌剂,不但具有良好的溶藻效果,而且能够改良水质优化生态环境。芽孢杆菌可有效降解底泥中的有机磷,同时对水产养殖中的弧菌、大肠杆菌和杆状病毒等有害细菌有很强的抑制作用,并对水体净化有明显效果。

[0024] 2. 该溶藻配伍物质原料中的维生素 C 和维生素 E 不仅溶藻效果良好也是鱼类等生物的必需营养素。在生物体内,维生素 E 是一种抗氧化剂,因为它能够保护身体免于氧化剂的威胁。

[0025] 3. 该溶藻配伍物质原料配比合理,维生素 C 和维生素 E 溶藻效果明显且快速高效,微生物作为有效活菌,使用到水体之后,局部活菌浓度高,且各菌种之间具有协同作用,能够很好的发挥菌剂的作用,对微囊藻及水质起到非常好的降解和改良作用。

[0026] 4. 该溶藻配伍物质原料,均为商品化原料,成本较低且容易获得。产品制作简便且容易保存。

附图说明

[0027] 图 1 为实施例 1 的溶藻生物制剂对铜绿微囊藻抑制作用藻细胞浓度变化示意图。

[0028] 图 2 为实施例 2 的溶藻生物制剂对铜绿微囊藻抑制作用藻细胞浓度变化示意图。

[0029] 图 3 为实施例 3 的溶藻生物制剂对铜绿微囊藻抑制作用藻细胞浓度变化示意图。

[0030] 图 4 为实施例 4 的溶藻生物制剂对铜绿微囊藻抑制作用藻细胞浓度变化示意图。

[0031] 图 5 为实施例 7 中的溶藻生物制剂对铜绿微囊藻抑制作用叶绿素含量变化示意图。

[0032] 图 6 为实施例 7 中的溶藻生物制剂加入水体后水体中溶氧量 DO 含量变化示意图。

[0033] 图 7 为实施例 7 中的溶藻生物制剂杀灭铜绿微囊藻后水体中 MCs 含量变化示意图。

[0034] 图 8 为实施例 7 中溶藻生物制剂对铜绿微囊藻抑制作用藻细胞浓度变化示意图。

具体实施方式

[0035] 下面对本发明提供的实施方式做详细说明,但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,如对本发明技术方案的细节和形式进行的合理修改或替换,均落入本发明的保护范围内。

[0036] 实施例 1-4:

[0037] 一种溶藻生物制剂,由以下原料按重量份配制而成:

[0038]

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4
枯草芽孢杆菌	1	2	1	1
地衣芽孢杆菌	3	3	1	1
侧孢芽孢杆菌	2.5	2.8	2.5	2
粪链球菌	2	1.5	1	1
光合细菌	2.5	2	2	2
鞘氨醇单胞菌	0.8	0.5	1	1
维生素 C	0.5	1	1	0.5
维生素 E	0.5	0.5	0.6	1
乳糖	0.2	0.2	0.3	0.3

[0039] 本发明实施例所使用的地衣芽孢杆菌和侧孢芽孢杆菌菌粉购自湖北绿天地生物科技有限公司;鞘氨醇单胞菌、枯草芽孢杆菌菌粉购自上海勒布生物科技有限公司,各菌含量 300 亿/g。粪链球菌、光合细菌菌粉购自湖北天辰生物科技有限公司,各菌含量 50 亿/g。维生素 C、维生素 E、乳糖购买自武汉鼎国昌盛生物科技有限公司。

[0040] 按比例依次称取粉状微生物菌剂、维生素和乳糖,混合即可。

[0041] 利用实施例 1-4 所述的配方制得的溶藻生物制剂,用于以下实施例。

[0042] 实施例 5:

[0043] 不同配方的溶藻生物制剂的杀藻效果:

[0044] 500ml 的铜绿微囊藻 905 藻溶液,在藻浓度为 1×10^7 cell/ml 时,按照 10mg/L 的比例加入溶藻生物制剂,每个 12 小时监测一次,每个处理组分别做了 3 个平行。使用 BG11 藻类培养基进行铜绿微囊藻光照培养(12:12 小时光照/黑暗循环),计算溶藻生物制剂对微囊藻的去除效果。利用在波长 680nm 处的吸光度(OD_{680})作为微囊藻种群密度指标。数据增大代表藻类生长良好,数据下降代表藻类死亡,数据表示为平均值 \pm 标准误差(SE)。

[0045] 按照公式:去除率 = $(m-n)/m \times 100$ (m :未加入任何物质时的藻溶液 OD_{680} 的值; n = 加入溶藻生物制剂后藻溶液 OD_{680} 的值)进行计算。

[0046] 1) 500ml 的铜绿微囊藻 905 藻溶液,在藻浓度为 1×10^7 cell/ml ($OD_{680} = 0.57$) 时,按照 10mg/L 的比例加入实施例 1 中制备的溶藻生物制剂,每个 12 小时监测一次。72 小时后,铜绿微囊藻藻细胞 OD_{680} 由 0.57 剧减为 0.07,去除率:87.72% (图 1)。去除率 = $(m-n)/m \times 100$ (m :未加入任何物质时的藻溶液 OD_{680} 的值; n = 加入溶藻生物制剂后藻溶液 OD_{680} 的值)

[0047] 2) 500ml 的铜绿微囊藻 905 藻溶液,在藻浓度为 1×10^7 cell/ml ($OD_{680} = 0.57$) 时,按照 10mg/L 的比例加入实施例 2 中制备的溶藻生物制剂,每个 12 小时监测一次。72 小时后,铜绿微囊藻藻细胞 OD_{680} 由 0.57 剧减为 0.05,去除率:91.23%。其效果如图 2,去除率 = $(m-n)/m \times 100$ (m :未加入任何物质时的藻溶液 OD_{680} 的值; n = 加入溶藻生物制剂后藻溶液 OD_{680} 的值)。

[0048] 3) 500ml 的铜绿微囊藻 905 藻溶液,在藻浓度为 1×10^7 cell/ml ($OD_{680} = 0.57$) 时,按照 10mg/L 的比例加入实施例 3 中制备的溶藻生物制剂,每个 12 小时监测一次。72 小时后,铜绿微囊藻藻细胞 OD_{680} 由 0.57 剧减为 0.09,去除率:84.21% (图 3) 去除率 = $(m-n)/m \times 100$ (m :未加入任何物质时的藻溶液 OD_{680} 的值; n = 加入溶藻生物制剂后藻溶液 OD_{680} 的值)

[0049] 4) 500ml 的铜绿微囊藻 905 藻溶液, 在藻浓度为 1×10^7 cell/ml ($OD_{680} = 0.57$) 时, 按照 10mg/L 的比例加入实施例 4 中制备的溶藻生物制剂, 每个 12 小时监测一次。72 小时后, 铜绿微囊藻藻细胞 OD_{680} 由 0.57 剧减为 0.02, 去除率: 94.49% (图 4)。去除率 = $(m-n)/m \times 100$ (m: 未加入任何物质时的藻溶液 OD_{680} 的值; n = 加入溶藻生物制剂后藻溶液 OD_{680} 的值)

[0050] 实施例 6:

[0051] 一种溶藻生物制剂的应用, 其应用过程是:

[0052] 按照实施例 1 的比例依次称取粉状微生物菌剂、维生素和乳糖, 将混合而成的粉剂溶藻组合物按 0.01g/L 比例取适量, 投入铜绿微囊藻溶液, 其原液 $OD_{680} = 0.58$, 每隔 12 小时测水体藻细胞吸光度值, 共处理监测 72 个小时。

[0053] 实施例 2、3、4 具体制备和应用过程如实施例 1。

[0054] 实施例 7:

[0055] 一种溶藻生物制剂在去除铜绿微囊藻的应用, 其过程如下:

[0056] 一个处理组, 一个对照组, 对照组不做任何处理, 处理组做了 3 个平行。

[0057] 在 5L 的玻璃缸中加入 3L 铜绿微囊藻 905 藻溶液藻细胞浓度为 1×10^7 cell/ml 共 4 个缸, 在其中 3 个玻璃缸中按照 10mg/L 的比例加入以实施例 4 配方制得的溶藻生物制剂, 剩余 1 玻璃缸为对照组不做任何处理。每隔 12 小时监测一次, 共检测 72 小时。分别检测试验组和对照组水体中的叶绿素 a 含量 (μ g/L)、溶氧量 (DO)、MCs 含量、藻细胞浓度。

[0058] 叶绿素 a 含量 (μ g/L) 与吸光度 (OD_{680}) 一样都作为微囊藻种群密度指标, 数据增大代表藻类生长良好, 数据下降代表藻类死亡。其测定使用甲醇萃取法, 其步骤: 取 50ml 藻液, 3500r/min, 离心 15min, 弃上清液; 等体积加入 90% 甲醇倒入离心管中, 摇动后置于黑暗低温处 4°C , 6-8 小时; 4000r/min 下离心 15min, 以 90% 甲醇作参比, 在 665nm 波长处测定吸光度。

[0059] 并用以下公式计算出叶绿素 a 含量: $C(\mu\text{g/L}) = OD_{665} \times 13.9 \times 1000$

[0060] 铜绿微囊藻细胞叶绿素 a 含量的变化与藻细胞密度 (OD_{680}) 的变化基本上一致。随着时间的推移, 对照组的叶绿素 a 含量逐渐增加, 而处理组叶绿素 a 的含量较对照组有明显的下降, 结果见附图 5。处理组的叶绿素 a 含量由 1172 μ g/L 剧减为 47.65 μ g/L, 去除率: 95.93%。去除率 = $(m-n)/m \times 100$ (m: 未加入任何物质时的藻溶液 OD_{665} 的值; n = 加入溶藻生物制剂后藻溶液 OD_{665} 的值)。叶绿素 a 含量 (μ g/L) 与吸光度 (OD_{680}) 一样都作为微囊藻种群密度指标, 数据增大代表藻类生长良好, 数据下降代表藻类死亡。

[0061] 其中水体中溶氧量 (DO)mg/L 的测定使用溶氧仪 Dissolved oxygen mete, 处理组和对照组水体中溶氧量没有变化, 这表明本发明所述的溶藻生物制剂在处理水体杀灭铜绿微囊藻时, 并未消耗使水体中的氧结果见附图 6, 处理组和对照组的水体中溶解氧含量基本保持不变, 均保持在 6mg/L 左右。因此, 在使用产品时无需担心水体缺氧而对养殖造成危害。

[0062] 水体中 MCs 含量的测定, 采用微囊藻毒素 ELISA 检测试剂盒 (美国 Beacon 公司, cat. #20-0068) 检测。结果见附图 7, 处理组中 MCs 含量先升高后降低, 由 0.58 μ g/L 先升高到最高值 0.74 μ g/L, 然后最终下降到 0.61 μ g/L。对照组无明显变化。即使藻毒素含量达到最大值 0.74 μ g/L 时, 最终 MCs 含量也符合世界卫生组织推荐的限量 ($\leq 1 \mu$ g/L)。因

此不需担心微囊藻溶解后藻毒素残留问题。

[0063] 水体中藻细胞浓度的测量与计算如实施例 5, 结果见附图 8。对照组铜绿微囊藻藻细胞 OD₆₈₀ 由 0.62 到 0.63 基本保持不变, 而处理组铜绿微囊藻藻细胞 OD₆₈₀ 由 0.62 剧减为 0.03, 去除率: 95.16%。

[0064] 实施例 8:

[0065] 生物安全性检测

[0066] 产品对鱼幼苗成活率及生长率的影响:

[0067] 一个处理组, 一个对照组, 对照组不做任何处理, 处理组做了 3 个平行。

[0068] 利用实施例 4 所述配方制得的制剂, 按 0.01g/L 的比例投加到 40L 的塑料桶鱼缸中, 塑料桶鱼缸中投放 1500 尾鱼苗。共设置 3 个鱼缸作为处理组。对照组只投放 1500 尾鱼苗, 不做任何处理。一周后计算黄颡鱼鱼苗的成活率。使用该产品于黄颡鱼鱼苗的培育, 试验组鱼苗成活率达到 34.67%, 对照组的鱼苗成活率为 33.8%。试验组鱼苗与对照组鱼苗成长规格也相当 (详见表 1), 结果表明这种溶藻生物制剂在水体中安全、无毒害, 对水体中的养殖生物无影响。

[0069] 表 1

[0070]

指标	实验组	对照组
初始活苗数 (尾)	1500	1500
成活苗数 (尾)	520	507
苗体长 (cm)	2-3	2-3
成活率 (%)	34.67%	33.8%

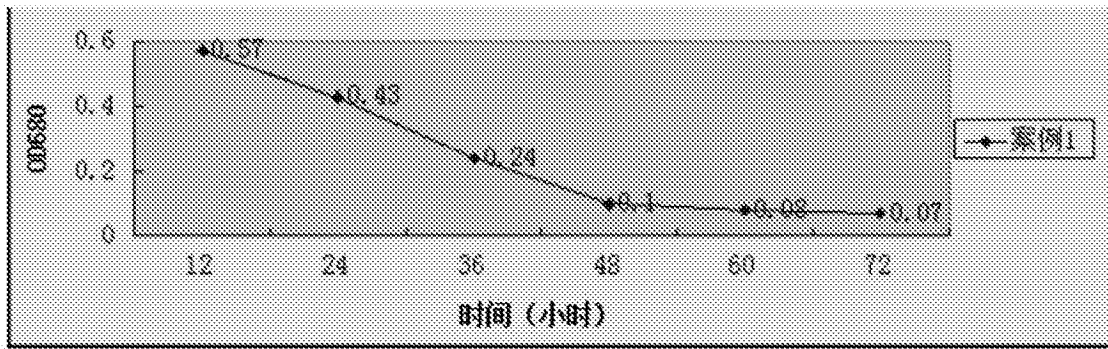


图 1

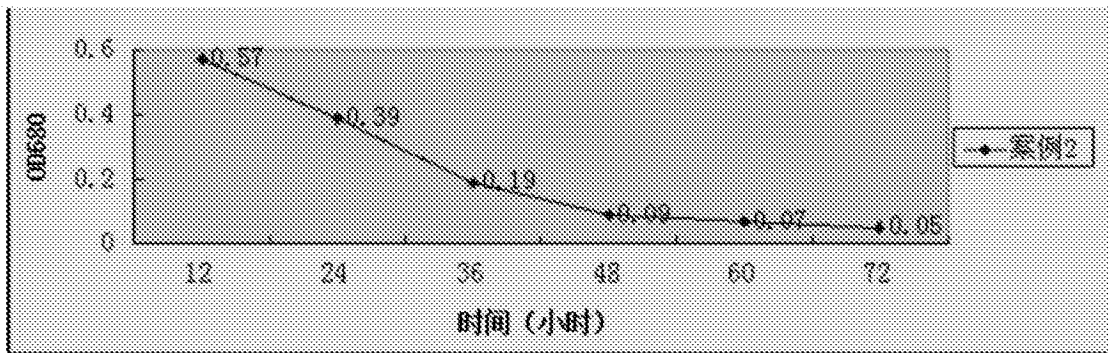


图 2

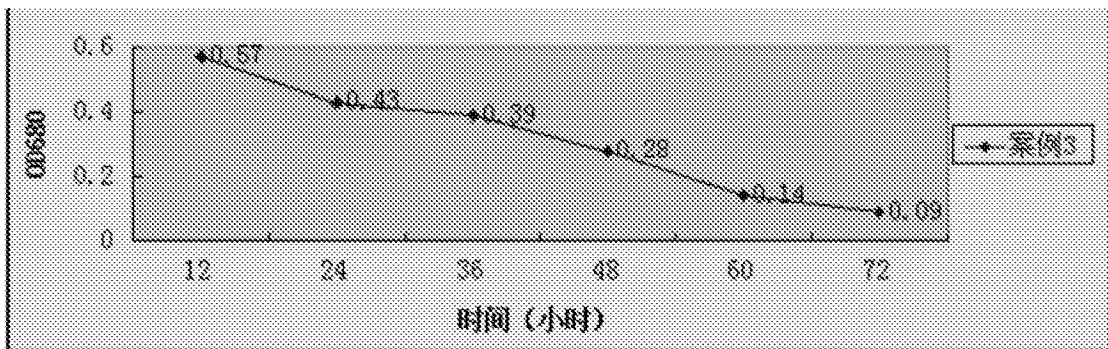


图 3

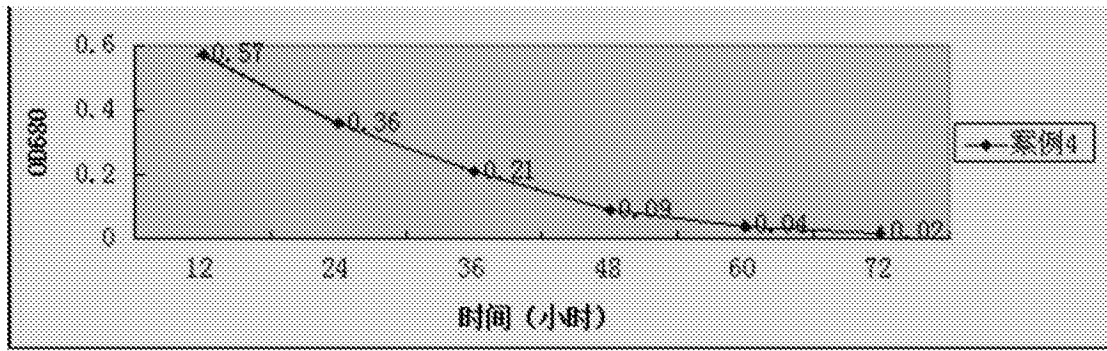


图 4

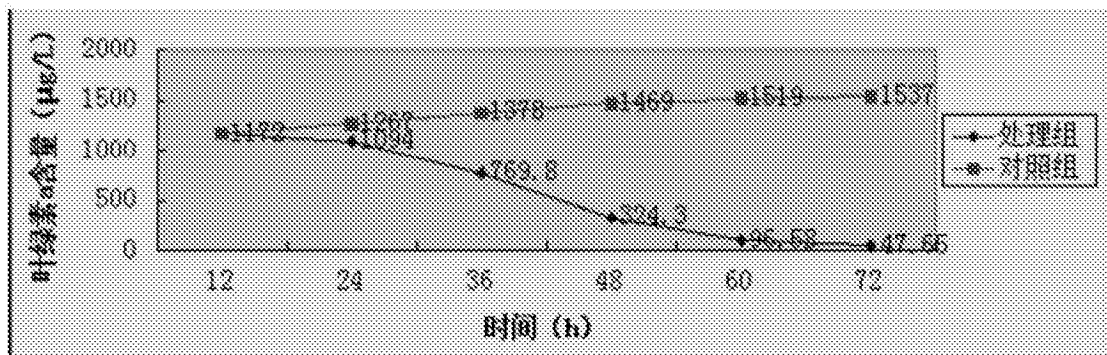


图 5

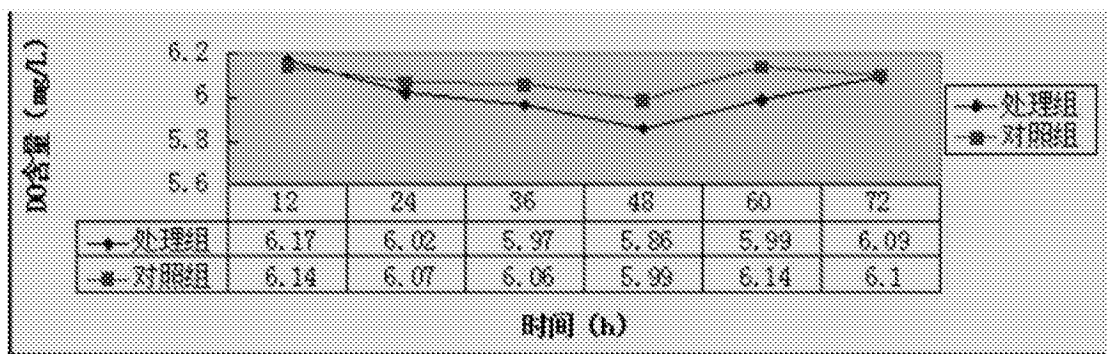


图 6

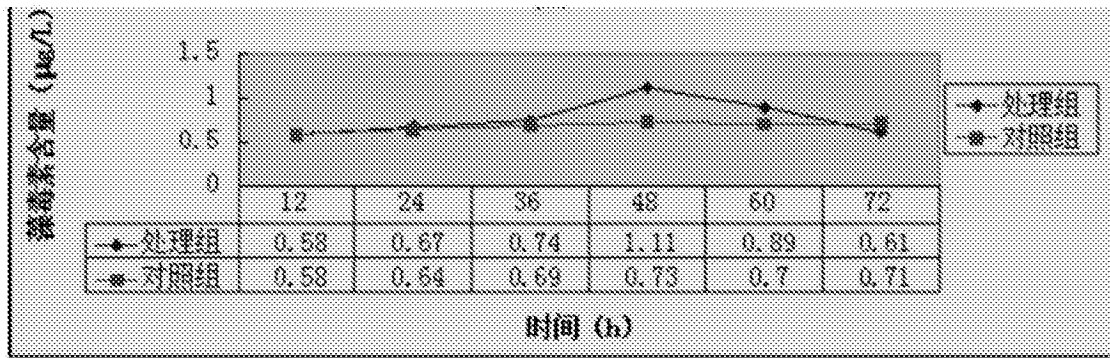


图 7

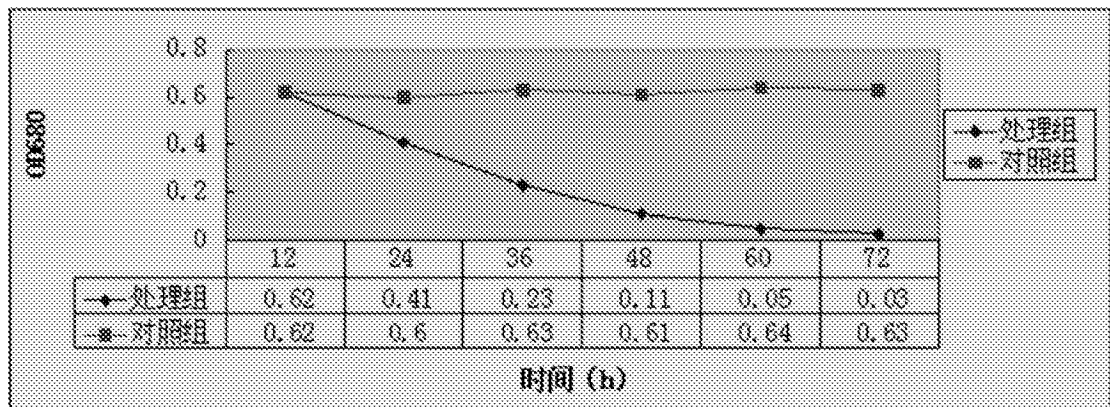


图 8