

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00111307.0

[43]公开日 2002年3月20日

[11]公开号 CN 1340462A

[22]申请日 2000.8.25 [21]申请号 00111307.0
 [71]申请人 中国水产科学研究院黄海水产研究所
 地址 266071 山东省青岛市市南区南京路106号
 [72]发明人 袁有宪 李秋芬 辛福言
 邹玉霞 曲克明

[74]专利代理机构 青岛联智专利事务所有限公司
 代理人 袁和善

权利要求书1页 说明书3页 附图页数0页

[54]发明名称 利用枯草芽孢杆菌的水产养殖环境生物修复方法

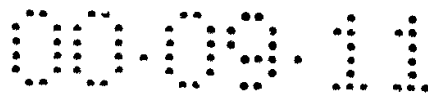
[57]摘要

利用枯草芽孢杆菌的水产养殖环境修复方法。是将
 从养殖池中筛选到的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)通
 过发酵、分离、固定化,制成固体产品,投放到水产养殖
 池中,作用菌沉于池底后,快速繁殖并分解或转化残饵、
 粪便等有机污染物,修复水产养殖环境,为养殖动物营造
 一个良好的生长 栖息环境。本发明具有操作性强、成本
 低廉、效果显著、无二次环境污染、对养殖动物无害的
 特点。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的水产养殖环境修复方法，其特征在于作用细菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)，通过规模化发酵生产、经分离、固定化后，制成固体产品，投入水产养殖池中，降解或转化残饵、粪便等有机污染物。



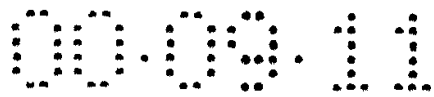
说明书

利用枯草芽孢杆菌的水产养殖环境生物修复方法

本发明属于一种新的水产养殖环境保护方法，详细地说就是利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)降解或转化养殖池有机污染物、修复水产养殖环境的方法。

水产养殖业的环境污染主要是有机物污染，养殖池塘中的有机污染物主要来自残饵、粪便等。通过袁有宪等(1999, 2000)对我国对虾养殖区虾池沉积环境的研究，发现虾池沉积物中的有机物及总氮的含量随池龄而积累，池底污染程度与池龄呈正相关关系，一般池龄在 10 年以上的池塘已经严重污染。日本学者堤裕昭等(1993)报道有 30 年发展历史的日本沿海网箱养鱼业，也受到了来自底质环境有机污染的困扰。美国学者 Munsiri 等(1995)也报道了淡水鱼塘的有机污染问题。

养殖环境的恶化，已经成为制约我国水产养殖业健康持续发展的关键因素，而传统的机械清淤、化学降解、换水等养殖环境净化方法，有净化不彻底、易产生二次污染、危害养殖功能等缺点。养殖环境的有机污染问题也已开始引起各国科学家的高度重视，正在致力于探索新的治理方法。日本有利用快速繁殖的多毛类 *Caprella* sp 来消除养殖池底有机污染的研究报道(堤裕昭等, 1993)，但降解效率较低。近年，一种行之有效、操作性强、利用微生物降解有机污染物而消除污染和净化环境的生物修复技术的研究正在兴起，如将菌种投放到被污染环境中的原位生物修复(*In-situ* bioremediation)，将污染物集中起来进行处理的异位生物修复(*Ex-situ* bioremediation)。前者主要应用于水域、耕地的环境恢复，如美国环保局对阿拉斯加石油泄漏的生物修复(Prichard et al., 1991; Prichard et al., 1992)和密执安 Grayling 空军基地柴油贮罐破裂造成深层土壤和地下水污染的生物修复(Hicks et al., 1993)；后者主要应用于工业和生活废水的处理，如苯及其衍生物(John et al., 1992)、含氯有机物(傅旭庆等, 1994)、木质



素 (Fett et al, 1992)、制药废水 (王蕾等, 1994; 罗国维等, 1994) 印染废水 (王增夫等, 1996) 等的工厂化生物处理。在淡水小规模养殖的循环水处理上用了固定化生物膜。国外有 Probiltics” (Enviro-Reps Internatonal L. C.)、Epicin (加拿大 Epicore 网络公司) 等几种水质净化菌剂 (粉), 但未公布菌种, 使用方式也不相同。国内曾有应用光合细菌改善水质的报道 (于伟君等, 1991), 可消除水中小分子有机物, 但对池底有机物降解的作用受到限制。而利用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 降解水产养殖环境中有机污染物、对养殖环境进行修复的研究迄今未见报道。自 1996 年以来, 袁有宪等开展了海水养殖环境有机污染物的生物降解技术研究, 得到了国家自然科学基金和国家 863 高技术发展计划及国家 “九五” 攻关计划的资助, 已经研制成功系列养殖环境修复产品, 并成功地应用于对虾养殖中, 显示出诱人的应用前景。

本发明目的是利用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 建立一种水产养殖环境生物修复方法, 以快速消除养殖池底部残饵、粪便等有机污染物, 为水产养殖动物营造一个良好的生长栖息环境。

本发明的技术方案是这样实现的: 利用从养殖环境中分离、筛选到的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 通过规模化发酵生产, 等电点沉降法收集菌体, 选择合适的固定化材料和方法, 将活菌体固定化后, 制成便于保藏、运输的产品。在不同养殖时期, 按一定量投入养殖池, 从而对污染的养殖环境进行修复。

下面结合实施例详细叙述本发明的操作技术内容, 本发明的实施例是利用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 修复对虾养殖池沉积环境。

选用的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是从对虾养殖池沉积环境中分离筛选的广温、广盐种, 在温度 16~40℃、盐度 10~40、pH6.4~9.0、有氧或微氧的环境条件下均可生长。该菌可在对虾养殖池底部快速繁殖, 降解沉积多年的有机污染物及不断沉降的残饵、粪便等, 使其及时转化为可被浮游植物利用的无机营养盐, 浮游植物又可作为养殖对虾的基础饵料而被利用。具体操作方法是:



(1) 通气发酵法生产菌液: 基料配方为工业蛋白胨 2.5%、酵母膏 0.5%、磷酸高铁 0.02%、用 4:1 的陈海水和蒸馏水配制, 盐度为 25 左右, pH 调至 8.0。120℃ 蒸汽灭菌 30min, 接种量为 3.0%, 发酵时间为 18~20hr。经 1000ml 三角瓶和 50L 发酵罐两级放大种子培养后, 用 700L 发酵罐发酵生产菌液。

(2) 等电点沉降法收集菌体: 用 1mol/L 的稀盐酸调节发酵液 pH 值至该菌等电点 4.02, 使菌体沉降 24hr, 虹吸法吸去上清液, 再将浓缩菌液离心, 得湿菌体。

(3) 沸石吸附法固定化菌体: 首先筛取 40~80 目的沸石, 经灼烧活化, 冷却备用。将湿菌体用海水配成浓度为 3g/L 的菌悬液, 加入等重量处理好的沸石, 搅拌均匀, 振摇 30min, 静置 2hr, 使细菌吸附于沸石表面和孔隙中。倒入容器中空干水分, 装袋, 真空包装。

(4) 产品保藏: 采用常温保藏。

(5) 修复产品施用: 在养殖期间, 按每公顷 150kg 菌粉用量, 将产品均匀撒入对虾养殖池, 每 10 天左右施用一次, 该产品可沉入养殖池底部, 作用菌可在底部快速繁殖, 降解沉积的和陆续沉降的有机污染物, 使其及时转化为可被浮游植物利用的无机营养盐, 从而达到了修复养殖环境, 为养殖动物营造良好生长栖息条件的目的。

本发明的特点在于: 1. 所选用的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是广温、广盐种, 在温度 16~40℃、盐度 0~40、pH6.9~9.0、有氧或微氧的环境下均可生长; 2. 该菌对养殖动物无致病性; 3. 该菌单株降解残饵的 72hrCOD_{Mn} 去除率可达 73%以上, 与环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)和坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)配合使用对残饵的降解率可提高到 80%以上; 4. 该菌经固定化后仍可保持活性, 并能顺利沉入养殖池底部, 在养殖池底部快速繁殖, 更有利于降解沉积多年的有机污染物及不断沉降的残饵、粪便等, 使其及时转化为可被浮游植物利用的无机营养盐, 浮游植物又可作为养殖动物的基础饵料而被利用; 5. 本生物修复技术可与养殖生产同时进行或在养殖前后进行, 操作性强、成本低廉、效果显著、无二次污染。