

# 混合培养对益生菌和小球藻生长的影响

张元长<sup>1</sup>, 范明坤<sup>1</sup>, 谢仰杰<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 将海水小球藻分别与光合细菌、枯草芽孢杆菌、乳酸菌混合进行培养, 测量混合培养条件下小球藻和菌的生长情况, 分析藻和菌之间的相互影响。结果表明: 小球藻与光合细菌混合培养, 小球藻持续增长, 增殖速度显著快于其他各组, 培养到第7天时, 密度达到  $4.134 \times 10^7$  cells/mL, 平均日增长率为30.2%; 小球藻分别与枯草芽孢杆菌和乳酸菌混合培养, 前5天对小球藻的增长没有显著影响, 第6天后小球藻的增长均受到抑制; 小球藻与菌混合培养和菌单独培养这两种条件下菌的增殖速率没有显著差异。结论: 菌藻混合培养中, 光合细菌对小球藻的生长具有显著的促进作用, 而枯草芽孢杆菌和乳酸菌在前期不影响小球藻生长, 但是在后期培养中对小球藻的生长具有显著的抑制作用; 混合培养对益生菌的生长影响不显著。

**[关键词]** 小球藻; 益生菌; 混合培养

**[中图分类号]** S 963.21

## Effects of Mixed Cultivation on the Growth of Probiotics and *Chlorella pyrenoidosa*

ZHANG Yuanchang<sup>1</sup>, FAN Mingkun<sup>1</sup>, XIE Yangjie<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** The growth of *Chlorella pyrenoidosa* and probiotics were investigated when *C. pyrenoidosa* was cultured with Photosynthetic bacteria (PSB), *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus* sp. The results were as follows: The growth of *C. pyrenoidosa* was sustained when it cultivated with PSB, and the proliferation rate of *C. pyrenoidosa* was significantly faster than other groups. The concentration of *C. pyrenoidosa* was the highest ( $4.134 \times 10^7$  cells/mL) at the 7th day, and the average daily proliferation rate was 30.2%; Mixed cultivation of *C. pyrenoidosa* with *B. subtilis* or *Lactobacillus* sp. had no significant effect on the growth of *C. pyrenoidosa* at the previous 5d, but the growth of *C. pyrenoidosa* was inhibited after the 6th day. The proliferation rate of probiotics was not significantly different between experimental group and control group. Conclusion: The mixed cultivation of *C. pyrenoidosa* and PSB could promote the growth of *C. pyrenoidosa*; *B. subtilis* and *Lactobacillus* sp. did not affect the growth of *C. pyrenoidosa* in the early stage, but they had a significant inhibitory effect on the growth of *C. pyrenoidosa* in the later; while the mixed cultivation of *C. pyrenoidosa* and probiotics had no significant effect on the growth of probiotics.

**Keywords:** *Chlorella pyrenoidosa*; probiotics; mixed culture

[收稿日期] 2018-04-16

[修回日期] 2018-05-16

[基金项目] 福建省科技重大专项 (2016NZ0001-3)

[作者简介] 张元长 (1991—), 男, 硕士生, 从事水产养殖技术研究。通信作者: 谢仰杰 (1967—), 副教授, 博士, 主要从事水产增养殖技术研究。E-mail: yjxie@jmu.edu.cn

<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

## 0 引言

小球藻 (*Chlorella*) 属于绿藻门绿藻纲绿球藻目小球藻科, 是海水鱼类工厂化人工育苗中常用的基础生物饵料, 也是池塘水体重要的生物组分<sup>[1-2]</sup>。小球藻在鱼类育苗、养殖生产中, 不但可以吸收水体中的氨氮等有害物质, 同时也是轮虫等浮游动物的饵料<sup>[3-6]</sup>。在环境适宜时, 小球藻能快速繁殖, 而环境不适宜时, 可能导致小球藻密度大幅度下降。小球藻密度过高或过低, 均不利于水质和浮游动物数量的稳定, 进而影响鱼苗的存活与生长。因此, 采取措施保持育苗水体中小球藻密度的稳定, 对于提高育苗成活率起着重要作用。

水产养殖生产上常用一些益生菌来调节水质, 常见的有光合细菌、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.)<sup>[7-9]</sup>。益生菌的使用, 一方面可以降解氨氮、亚硝酸盐和硝酸盐, 分解有机物质, 同时也是轮虫等浮游动物的饵料。益生菌的使用必然对水体中单细胞藻类的繁殖产生影响。益生菌与单细胞藻类之间的相互影响如何, 尚缺乏深入研究。为此, 本研究选择生产上常用的光合细菌、枯草芽孢杆菌和乳酸菌, 分别与小球藻混合进行培养, 观察小球藻和益生菌的增长情况, 分析益生菌与单细胞藻类之间的相互影响, 为海产鱼类育苗水体的水质、饵料生物的调控提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用的小球藻为蛋白核小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa* Chick), 培养条件为温度 ( $25 \pm 1$ ) °C、光照 3000 lx、盐度 25, 采用经消毒的海水, 添加营养盐 ( $\text{KNO}_3$  50 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mg/L, 柠檬酸铁 0.5 mg/L) 后进行常规培养。取处于增殖期的藻液, 计数后用消毒海水稀释到  $1.0 \times 10^7$  cells/mL 后用于实验。实验所用的光合细菌 (photosynthetic bacteria, 简称 PSB) 购自诺可信 (厦门) 生物科技有限公司, 采用光合细菌培养基 (厦门普得生物科技有限公司), 在温度 ( $25 \pm 1$ ) °C, 光照 3000 lx 条件下进行扩大培养, 计数后用消毒海水稀释到  $1.6 \times 10^7$  cells/mL 后用于实验。枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.) 均为广州市微元生物科技有限公司生产, 实验前先将粉状菌用消毒过的海水进行溶解, 密封后放在温度 25°C 的培养箱内培养 1 天, 待菌从休眠期苏醒后取中间的悬液, 计数后用消毒海水稀释到  $1.6 \times 10^7$  cells/mL 后用于实验。菌藻密度测定均采用血球计数板在显微镜下进行计数的方法。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌藻混合培养试验

菌藻混合培养实验设置小球藻 + 光合细菌 (ZG)、小球藻 + 枯草芽孢杆菌 (ZK)、小球藻 + 乳酸菌 (ZR) 3 个实验组, 并设置小球藻 (Z)、光合细菌 (G)、枯草芽孢杆菌 (K) 和乳酸菌 (R) 单独培养 4 个对照组 (见表 1)。每个实验组和对照组各设置 3 个平行, 实验结果取其平均值。

表 1 菌和小球藻的初始密度

Tab. 1 The initial density of probiotics and *C. pyrenoidosa*

组别 Group	( $\times 10^6$ cells $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )						
	Z	G	K	R	ZG	ZK	ZR
小球藻 <i>C. pyrenoidosa</i>	5.0				5.0	5.0	5.0
益生菌 Probiotics		8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0

说明: Z—小球藻组, G—光合细菌组, K—枯草芽孢杆菌组, R—乳酸菌组, ZG—小球藻 + 光合细菌组, ZK—小球藻 + 枯草芽孢杆菌组, ZR—小球藻 + 乳酸菌组

Notes: Z—*C. pyrenoidosa*, G—PSB, K—*Bacillus subtilis*, R—*Lactobacillus* sp., ZG—*C. pyrenoidosa* + PSB, ZK—*C. pyrenoidosa* + *Bacillus subtilis*, ZR—*C. pyrenoidosa* + *Lactobacillus* sp.

参照养殖生产中的使用情况, 设置各实验组和对照组的小球藻的初始密度为  $5.0 \times 10^6$  cells/mL, 菌的初始密度为  $8.0 \times 10^6$  cells/mL (见表 1)。采用小球藻原液、各菌原液和消毒海水进行配制, 配制后添加营养盐 ( $\text{KNO}_3$  50 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mg/L, 柠檬酸铁 0.5 mg/L)。每组取 100 mL 溶液装入 100 mL 锥形瓶, 置于光照培养箱培养, 培养温度为  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照为 3000 lx, 光暗比为 12 h: 12 h。每天定时摇瓶 2 次, 并随机调换位置。实验为期 7 d。自接种起每日定时采样, 用血球计数板在显微镜下进行计数以测定菌、藻的密度。

藻细胞和菌的日增长率 ( $k$ ) 按公式  $k = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1) \times 100\%$  计算, 其中:  $k$  为增长率;  $t_1$ 、 $t_2$  为培养时间 ( $d$ );  $N_1$ 、 $N_2$  为培养  $t_1$ 、 $t_2$  时的生物个数 (cells/mL)。

### 1.2.2 数据处理

实验结果用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  作为差异显著性水平。

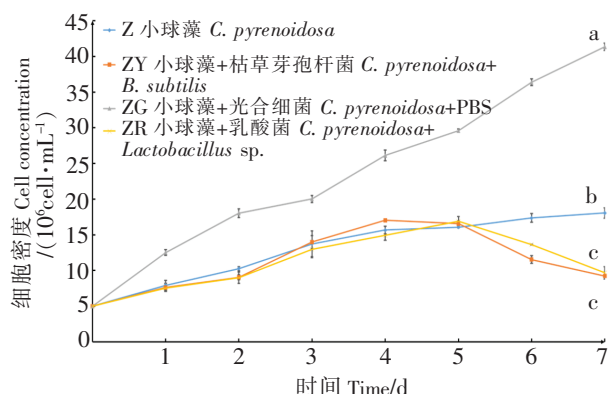
## 2 结果

### 2.1 三种菌对小球藻生长的影响

各混合培养实验组和小球藻单一培养组的小球藻密度变化情况如图 1 所示。Z 组 (小球藻单一培养) 的生长曲线呈缓慢递增趋势, 在培养第 7 天时小球藻密度最高, 为  $1.806 \times 10^7$  cells/mL, 平均日增长率为 18.3%。ZY 组 (小球藻 + 枯草芽孢杆菌) 和 ZR 组 (小球藻 + 乳酸菌) 分别在第 4 天和第 5 天时藻密度达到最大值, 分别为  $1.703 \times 10^7$  cells/mL 和  $1.689 \times 10^7$  cells/mL, 两组之间无显著差异。在实验第 1~5 天, ZY 组和 ZR 组与小球藻单独培养的 Z 组间无显著差异, 但在实验第 6 天和第 7 天, ZR 组和 ZY 组的小球藻密度均呈现下降趋势, 小球藻密度均显著低于 Z 组。ZG 组 (小球藻 + 光合细菌) 从第 1 天开始小球藻的增殖速度都显著高于其他各组 (见图 1), 在第 7 天藻密度达到最大 ( $4.134 \times 10^7$  cells/mL), 平均日增长率为 30.2%。

### 2.2 小球藻对芽孢杆菌增殖的影响

由图 2 可知, Y 组和 ZY 组芽孢杆菌的生长曲线呈递增趋势, 两组在培养第 7 天时芽孢杆菌的细胞密度分别为  $3.397 \times 10^7$  cells/mL 和  $3.667 \times 10^7$  cells/mL, 日增长率分别为 20.7% 和 21.8%。两组增长趋势大致相同, 统计分析结果表明, 两组之间差异不显著 (见图 2)。



说明: 不同字母间表示存在显著差异 ( $P < 0.05$ )

Note: Two groups with different letters indicates significant difference ( $P < 0.05$ )

图 1 小球藻密度变化情况

Fig.1 Variation of *C. pyrenoidosa* density

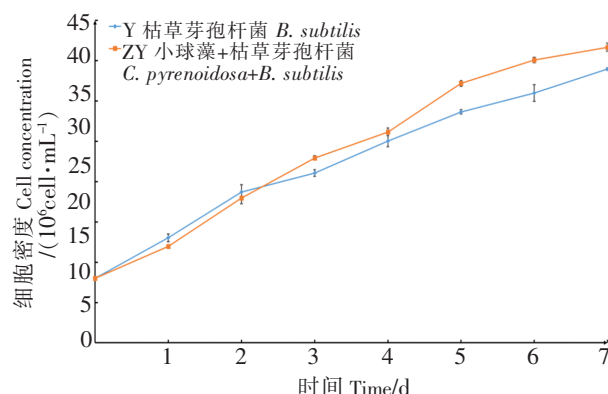


图 2 小球藻对枯草芽孢杆菌生长的影响

Fig.2 Effect of *C. pyrenoidosa* on *B. subtilis* growth

### 2.3 小球藻对光合细菌生长的影响

由图 3 可知, G 组和 ZG 组光合细菌的生长曲线呈递增趋势, 两组在培养第 7 时光合细菌的细

胞密度分别为  $2.522 \times 10^7$  cells/mL 和  $3.002 \times 10^7$  cells/mL, 平均日增长率分别为 16.4% 和 18.9%。统计分析结果表明, 两组之间差异不显著 (见图 3)。

## 2.4 小球藻对乳酸菌生长的影响

由图 4 可知, R 组和 ZR 组乳酸细菌的生长曲线呈递增趋势, 两组在培养第 7 天时乳酸菌的细胞密度分别为  $4.008 \times 10^7$  cells/mL 和  $4.593 \times 10^7$  cells/mL, 日增长率为 23% 和 25%。统计分析结果表明, 两组之间差异不显著 (见图 4)。

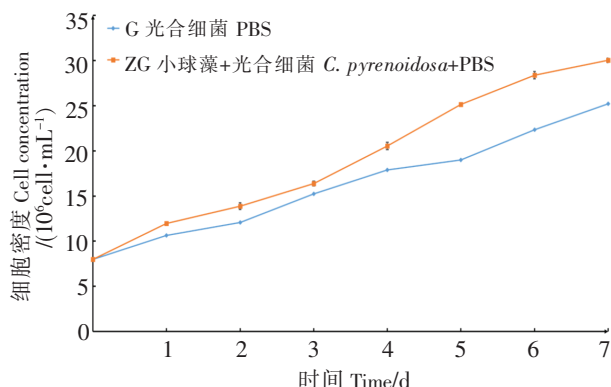


图 3 小球藻对光合细菌生长的影响

Fig.3 Effect of *C. pyrenoidosa* on *C. pyrenoidosa* + PBS growth

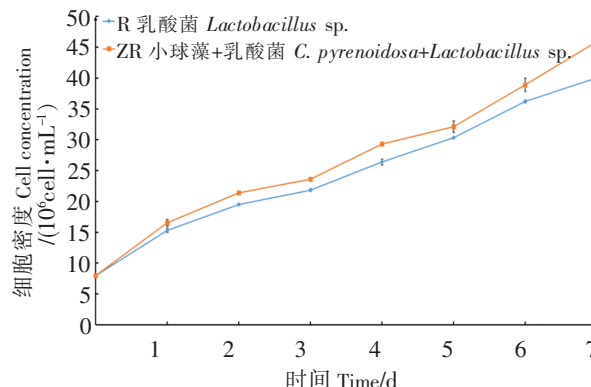


图 4 小球藻对乳酸菌生长的影响

Fig.4 Effect of *C. pyrenoidosa* on *Lactobacillus* sp. growth

## 3 讨论

本实验结果说明, 小球藻的初始密度为  $5.0 \times 10^6$  cells/mL, 菌的初始密度为  $8.0 \times 10^6$  cells/mL, 在温度 ( $25 \pm 1$ ) °C, 光照 3000 lx, 光暗比 12 h: 12 h 的条件下, 小球藻与光合细菌混合培养 (ZG 组) 时小球藻的增殖速度最好, 培养到第 7 天时藻密度达到  $4.134 \times 10^7$  cells/mL, 平均日增长率为 30.2% (见图 1), 显著高于小球藻单独培养的 Z 组, 说明光合细菌能有效促进小球藻的生长, 而与光合细菌单独培养的 (G 组) 相比, 光合细菌的密度变化没有显著差异, 说明光合细菌的繁殖受小球藻的影响不显著。李小霞等<sup>[10]</sup>认为, 光合细菌与小球藻混合形成了菌藻共生系统, 该系统利用两者的协同作用达到两者自身生长的目的。光合细菌在分解有机物的过程中为自身代谢提供能量, 也可以为小球藻提供无机盐。小球藻不仅吸收培养基的营养盐, 还能将细菌代谢分解的物质吸收同化成自身物质, 并通过光合作用释放氧气, 进而为光合细菌提供充足的溶氧, 以使其维持正常的生命代谢活动。光合细菌不仅能分解培养基中的有机物, 还具有脱氮、固氮、产氢和同化一定浓度的硫化氢的作用, 能净化水质, 为小球藻的生长提供良好的环境<sup>[11]</sup>。陈小晨等<sup>[12]</sup>的研究表明, 在营养浓度低时, 小球藻与光合细菌混合会表现出促进生长的效果。

本实验结果表明, 枯草芽孢杆菌和乳酸菌在前 5 天对小球藻的生长不产生显著影响, 但在后期小球藻密度均出现下降趋势 (见图 1)。观察发现, Y 组和 ZY 组在后期培养液变得混浊, 底部有沉淀。这可能是由于后期溶氧不足, 水质出现败坏, 导致芽孢杆菌沉淀和藻类死亡。王月霞等<sup>[13]</sup>的研究表明, 随着芽孢杆菌的大量繁殖, 加快了水体的溶氧量的消耗, 使小球藻产生的氧气不足以维持芽孢杆菌的有氧呼吸, 大量的芽孢杆菌沉淀和小球藻死亡分解进而产生有害物质, 破坏水质。此外, 程新等<sup>[14]</sup>的研究结果显示, 枯草芽孢杆菌产生的溶藻活性物质对小球藻的叶绿素 a 及藻体蛋白合成具有抑制效果。两种因素共同作用导致枯草芽孢杆菌与小球藻混合培养时, 小球藻的增殖受到抑制。乳酸菌和小球藻混合培养的后期, 观察到培养液变得透明, 藻颜色减弱, pH 偏酸性, 这应该是因为乳酸菌分泌的乳酸降低了溶液的 pH 值<sup>[15]</sup>, 抑制了小球藻的增殖, 甚至导致小球藻死亡。

本实验中实验组和对照组的有益菌都有增长增殖, 但是增殖速度较缓。这可能是因为本研究重点考察益生菌对小球藻的影响, 在实验所用的培养基中并未专门添加针对益生菌的营养液。在配制各组

培养液时,必然会有益生菌所需的营养物质随着原液带入,使得益生菌能够继续增长,但由于营养成分含量的限制导致增殖速度慢。

小球藻是海水池塘育苗期间最重要的单细胞藻类,小球藻的稳定是取得较高育苗成活率的基础。从以上结果可知,光合细菌对于小球藻的繁殖具有促进作用,一旦池塘小球藻密度下降,在养殖管理中可以适当添加光合细菌来促进小球藻的生长。同时光合细菌也是轮虫的优质饵料。如果小球藻密度偏大,则可以使用芽孢杆菌和乳酸菌,这样可以适当抑制小球藻的繁殖,但在使用时,需要采取增氧措施以确保溶氧充足。

### [参考文献]

- [1] 胡鸿钧,魏印心. 中国淡水藻类:系统、分类及生态 [M]. 北京:科学出版社,2006:602-605.
- [2] 王秋实,孙大江,赵春刚,等. 鲟亲鱼培育池塘中浮游生物的组成与变化特点的研究 [J]. 水产学杂志,2011,24(2):41-45.
- [3] HIRAYAMA K, MARUYAMA I, MAEDA T. Nutritional effect of freshwater *Chlorella* on growth of the rotifer *Brachionus plicatilis* [J]. *Hydrobiologia*, 1989, 186/187(1):39-42.
- [4] MARUYAMA I, NAKAO T, SHIGENO I, et al. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus* [J]. *Hydrobiologia*, 1997, 358(1/2/3):133-138.
- [5] 房宽,唐学玺,张璟,等. 饵料微藻的种类和密度差异对褶皱臂尾轮虫幼虫摄食和选食行为的影响 [J]. 海洋环境科学,2013,32(4):497-501.
- [6] SYRETT P J. Nitrogen metabolism of microalgae [J]. *Canadian Bulletin of Fisheries & Aquatic Sciences*, 1981, 67(210):182-210.
- [7] WU Q, CHEN Y, XU K, et al. Intra-habitat heterogeneity of microbial food web structure under the regime of eutrophication and sediment resuspension in the large subtropical shallow Lake Taihu, China [J]. *Hydrobiologia*, 2007, 581(1):241-254.
- [8] 石玉新,齐树亭,吕玉珊,等. 复合芽孢杆菌在海水养殖水体中脱氮的研究 [J]. 河北工业大学学报,2011,40(6):34-39.
- [9] 王刚. 微生态制剂在水产养殖上的应用 [J]. 水产科学,2002,21(3):34-36.
- [10] 李小霞,解庆林. 菌藻共生系统处理污水的研究及应用前景 [J]. 广西民族大学学报(自然科学版),2006,12(3):112-114.
- [11] 陈世阳,姜秀萍. 海洋光合细菌的培养及在饵料中的开发利用 [C] //中国微生物学会. 全国海洋微生物学术讨论会,1987:15. [2018-01-03]. [http://www.wangfangdata.com.cn/details/detail.do?\\_type=conference&id=125998](http://www.wangfangdata.com.cn/details/detail.do?_type=conference&id=125998).
- [12] 陈小晨,薛凌展,林泽,等. 光合细菌对铜绿微囊藻和小球藻生长的影响研究 [J]. 安徽农学通报,2010,16(23):29-31.
- [13] 王月霞,杨秀兰,杜荣斌,等. 枯草芽孢杆菌对海水鱼塘生态因子的影响 [J]. 渔业现代化,2016,43(1):1-6.
- [14] 程新,李昆太,黄林. 一株枯草芽孢杆菌的生长特性及抑藻效果研究 [J]. 生物技术通报,2017,33(7):120-125.
- [15] 王昊. 乳酸杆菌 (*Lactobacillus* spp.) 对微绿球藻、隐藻、颤藻生长和净水效果的影响研究 [D]. 湛江:广东海洋大学,2008:14-18.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)