

DOI: 10.12264/JFSC2021-0362

降解亚硝酸盐的大山芽孢杆菌 JY-1 的分离、鉴定及其作用

周敏, 宁文, 陈红菊, 季相山, 赵燕

山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018

摘要: 为得到稳定高效降解亚硝酸盐的益生菌, 通过菌株富集分离培养、菌株鉴定、发酵培养基优化等实验对菌株进行了分离、鉴定, 对菌株降亚硝酸盐效果进行了分析, 并克隆了亚硝酸盐还原酶基因。结果显示, 从养殖池塘、污水处理厂等 5 处混合水体中分离、筛选出一株具有亚硝酸盐降解能力的菌株, 命名为 JY-1。菌株生理生化和 16S rDNA 序列分析显示, JY-1 是大山芽孢杆菌(*Bacillus gaemokensis*); 发酵培养基优化显示, JY-1 的最适氮源和碳源分别是蛋白胨和葡萄糖。JY-1 降亚硝酸盐效果分析显示, 3 h JY-1 可将水体中 0.6 mg/L 的亚硝酸盐降到 0.0 mg/L。安全性评价检测显示, 菌株 JY-1 菌落周围无溶血环出现, 且高浓度 JY-1 (10^9 CFU/mL) 灌服尼罗罗非鱼对其无明显影响。克隆获得了 JY-1 亚硝酸盐还原酶基因, 结合 JY-1 对水体中氨氮、亚硝酸盐、总氮等的影响实验, 初步推测 JY-1 是通过酶降解途径把亚硝酸氮还原后将其移出水体的。本研究为制备高效降解亚硝酸盐的微生物制剂产品提供了重要原料。

关键词: 大山芽孢杆菌; 亚硝酸盐; 养殖水体; 分离; 鉴定

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2022)02–0284–11

近年来随着水产养殖业的集约化发展, 水产养殖密度逐渐增大, 造成单位水体中苗种投放量和饲料投喂量的增大, 使残饵、粪便、代谢产物也相应增加, 过量的残饵粪便等沉积在养殖水体的底部, 无法完全分解掉, 部分经过微生物的无氧分解产生大量亚硝酸盐、硫化氢等有害物质, 这些有害物质的积累造成池塘污染、水质恶化, 甚至水产动物死亡^[1-4]。高浓度的亚硝酸盐可以通过呼吸作用进入血液, 使水产动物体内的血红蛋白失去载氧能力, 对水生动物造成缺氧和器官损伤等健康威胁, 从而降低养殖水产品的产量和品质^[5-7]。

水体中动态稳定的氮循环是水体健康及养殖动物健康生长的保障^[8], 是养殖水体中有机质分解和能量循环的重要部分^[9], 要保证良好的养殖水质, 就必须把握和遵循水体中氮物质的转化规

律。水体中氮素的形态可分为有机氮和无机氮两大类, 经过不同的微生物分解为不同形式的氮, 这几种形式的氮在水体中处于相互转化的动态平衡中。残饵粪便是养殖环境中最主要的氮来源, 其中的有机氮首先在氨化菌的氨化作用下转化为氨氮, 氨氮再由亚硝化细菌的亚硝化作用很快转化为亚硝态氮, 后在水体溶解氧充足的情况下经过硝化细菌的硝化作用转化为硝态氮, 但硝化细菌的繁殖速度很慢, 因此限制了亚硝酸盐的转化, 溶氧不充足时硝酸盐又会变成亚硝酸盐^[10-11]。因此在氮循环中, 如果大量的氮短时间进入水体而难以被天然微生物完全利用, 可直接导致氮循环失衡, 增加水体环境污染的风险^[12]。

降低水体中的亚硝酸盐浓度的根本方法是解决养殖水环境中的氮失衡, 具体做法一方面是加速氮循环, 尤其是加速亚硝酸盐的降解^[13-14], 另

收稿日期: 2021-08-06; 修订日期: 2021-09-06.

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-13); 山东省农业重大应用技术创新项目(SD2019YY008); 山东省重点研发计划项目(2021CXGC010806).

作者简介: 周敏(1996–), 女, 硕士研究生, 专业方向为水生生物学. E-mail: 2978795597@qq.com

通信作者: 赵燕, 副教授, 研究方向为水产健康养殖. E-mail: yzhao@sdau.edu.cn

一方面是让亚硝酸盐彻底降解, 即亚硝态氮经过反硝化作用直接还原为气态的氨气、NO、N₂O 和 N₂, 将氮元素从养殖水体中去除^[15]。近年来, 研究者们筛选到的亚硝酸盐降解菌的种类较多, 多属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[16]、副球菌属(*Paracoccus*)^[17]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[18-20]等。熊焰等^[16]从养殖水体中筛选到巨大芽孢杆菌 SZ-3, 对污染水体里的亚硝酸盐有较强的降解效果; 真菌 *Aspergillus parasiticus* JFS 可强烈降解亚硝酸盐且将亚硝酸盐降解为无毒的硝酸盐和铵根离子^[21]; 从对虾养殖池塘的底泥中筛选到的光合细菌也能有效降解亚硝酸盐^[20]。但各种类别的菌株都有一定的局限性, 例如光合细菌、硝化细菌等增殖缓慢, 且易受到溶氧、有机物浓度等水体环境因素的影响^[22-23]; 还有一些反硝化细菌易造成硝酸盐的累积, 也易受水体中溶氧的影响, 这些菌株在实际养殖生产中效果不一^[17]。并且, 多数报道的

菌株在实验室条件下降解能力很强, 但由于实际养殖环境自身的复杂多变性、有益菌群难以形成、活菌数量和活性不佳等原因, 实际生产中的效果往往不是很理想^[24-25]。目前迫切需要开发出更多能高效降解亚硝酸盐, 且对不良环境高度耐受、适应性强的稳定安全的菌株。本研究从多个养殖水体中富集分离并筛选出一株对亚硝酸盐具有稳定高效降解能力、在自然水体中繁殖速度快、对水生动物安全的土著亚硝酸盐降解菌, 探究该菌的水质调控能力并对其发酵条件进行优化, 为今后深入研究和开发高效实用的亚硝酸盐微生物生态制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究共计采集 50 个样品, 来自泰安本地养殖场、污水处理厂等多处水域(表 1)。

表 1 采集样品相关信息

Tab. 1 The information of collecting sample

采样时间 sampling date	采样地点 sampling location	样品数量 sample number
2018-05-04	山东农业大学科技试验站 science and technology experimental station of Shandong Agricultural University	6
2018-05-22	泰安第二污水处理厂 the second sewage-treatment plant of Tai'an	18
2018-06-08	泰安南湖公园 Tai'an Nanhu Park	8
2018-06-19	泰安鑫源养殖场 Tai'an Xinyuan Farm	8
2018-07-25	泰安温泉养殖场 Tai'an Hot Spring Farm	10

富集培养基: C₆H₁₂O₆ 10 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 1 g, NaNO₂ 2.5 mg, 微量元素溶液 2 mL, 加水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.2~7.4, 高压灭菌(121 °C 灭菌 20 min)。

微量元素溶液: EDTA 50.0 g, ZnSO₄ 2.2 g, CaCl₂ 5.5 g, MnCl₂·4H₂O 5.06 g, FeSO₄·7H₂O 5.0 g, CuSO₄·5H₂O 1.57 g, (NH₄)₆-Mo₇SO₄·4H₂O 1.1 g, CoCl₂·6H₂O 1.61 g, 加水定容至 1 L, 调节 pH 至 7.0~7.5。

发酵培养基: 葡萄糖 2 g, 蛋白胨 2 g, MgSO₄ 0.02 g, NaCl 0.2 g, K₂HPO₄ 0.04 g, 加水定容至 200 mL。

1.2 菌株的富集、筛选

采集以上水域底层水样及水下 5 cm 内的泥

样, 混匀后按照 1% 的比例接种到生理盐水中, 37 °C 振荡器中振荡活化 45 min, 静置后取上清液, 制得悬浮液。在 100 mL NaNO₂ 富集培养基中加入 10 mL 悬浮液, 180 r/min、37 °C 培养 24 h 后重新接种到新鲜富集培养基中, 反复培养 6 代。将培养 6 代后的菌液进行梯度稀释后涂平板, 37 °C 培养 24 h, 选取生长良好、形态单一的单菌落进行液体培养, 依次纯化传代培养 4 代。将传代纯化培养的菌株在发酵培养基中培养 24 h 后, 以 1% 的比例接种到 NaNO₂ 初始浓度为 0.8 mg/L 的 20 L 水体中进行菌株降解 NaNO₂ 能力测定实验, 实验期间微充氧培养, 每隔 2 h 测定水体中亚硝酸盐的浓度。

1.3 菌株 JY-1 的鉴定

形态和生理生化鉴定: 将筛选到的菌株进行革兰氏染色、芽孢染色后, 观察其形态, 根据《伯杰细菌鉴定手册》^[26]对其进行生理生化鉴定。

分子生物学鉴定: 以纯化培养后的菌液为模板, 以 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTGAG-3' 和 5'-TACGGYTACCTTGTACGAGTT-3' 分别为上、下游引物, PCR 扩增 16S rDNA 部分序列。扩增程序为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 30 s, 56 °C 45 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

1.4 菌株 JY-1 的安全性检测

菌株溶血实验: 将筛选到的菌株接种于血琼脂平板上, 37 °C 倒置培养 24 h, 观察溶血现象。

菌株灌服罗非鱼实验: 将体重(50±5) g 的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 360 尾, 平均分成 6 组, 每组设 3 个重复。第 1 组作为对照组, 每尾灌服生理盐水 0.5 mL; 第 2~6 组分别灌服 10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹ CFU/mL 的 JY-1 菌液 0.5 mL, 3 d 后, 记录罗非鱼的摄食、行动状态, 统计 14 d 累计死亡率。

1.5 菌株 JY-1 发酵培养基中碳源和氮源的优化

将基础发酵液中的碳源葡萄糖替换为等量的玉米粉、蔗糖或可溶性淀粉, 接种 2% 的 JY-1 于发酵培养基中, 180 r/min, 37 °C 培养 48 h 后, 统计各组的芽孢数, 与葡萄糖添加组进行比较。类似地, 将基础发酵液中的氮源蛋白胨替换为酵母粉、硫酸铵或尿素, 接种 2% 的 JY-1 于发酵培养基中, 180 r/min, 37 °C 培养 48 h 后, 统计各组的芽孢数, 并与蛋白胨添加组进行比较。

1.6 菌株 JY-1 对养殖水体的水质调控效果研究

在 20 L 的水体中, 每缸放养罗非鱼 5 尾, 每天投喂 3 次。调整养殖水体中 NO₂⁻ 初始质量浓度为 0.6 mg/L, 接种菌株 JY-1 至终浓度为 10⁷ CFU/mL, 微充氧, 接种后 12 h 内, 每隔 3 h 测定亚硝酸盐、氨氮、硝酸盐和总氮含量, 实验重复 3 次。亚硝酸盐测定采用重氮-偶氮法, 氨氮测定采用奈氏试剂法, 硝酸盐与总氮用罗威邦 ET99732 多参数水质快速测定仪测定。

1.7 菌株 JY-1 亚硝酸盐还原酶基因的扩增与分析

根据 NCBI 中相关菌株亚硝酸盐还原酶基因(NIR)的编码区序列, 分别设计上下游引物: 5'-CCAGCTAGCATGAGTTATGAAAAGTATG-3' 和

5'-TGGCTCGAGAGACGCTATTACTTC-3', 以菌株 JY-1 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物送北京六合华大基因科技有限公司测序。根据菌株 JY-1 及相关菌株的 NIR 序列, 利用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树, 以初步推测菌株 JY-1 对亚硝酸盐的降解途径。

1.8 数据分析

所有的数据都以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。利用 SPSS 21.0 进行单因素方差分析和 Tukey 检验, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

从采集的 50 个样品(表 1)中, 采用定向富集分离的方法反复培养 6 代后, 再纯化培养 4 代, 共筛选到 6 株亚硝酸盐降解效果较好的菌株, 命名为 JY-1~JY-6。筛选菌株室内降解实验表明, 菌株 JY-1 在接种后 2 h 内可完全降解亚硝酸盐, 降解速度最快(图 1)。

2.2 菌株鉴定

对 JY-1 菌株进行形态学观察和革兰氏染色、芽孢染色鉴定, 发现菌株单菌落呈白色, 边缘整齐且光滑, 中间凸起, 菌体生长物可向四周呈云雾状扩散; 菌株呈杆状、无鞭毛, 少数聚合在一起呈短链状排列, 芽孢椭圆形, 中生, 不产生伴孢晶体, 革兰氏染色阳性。依据《伯杰细菌鉴定手册》^[26]和《常见细菌系统鉴定手册》^[27], 初步鉴定该菌为芽胞杆菌属。生理生化试验显示, 菌株 JY-1 能利用硝酸盐肉汤、淀粉、葡萄糖、甘露醇等, 溶菌酶活性等检验呈阳性(表 2)。

菌株 JY-1 的 16S rDNA 扩增产物长度为 1616 bp, 与 NCBI 数据库中的序列比对后发现, 与芽胞杆菌属的大山芽胞杆菌相似度达 98%; 利用 MEGA5.0 软件, 将 JY-1 与相关菌株构建菌株系统发育树, 发现 JY-1 与大山芽胞杆菌 M25 和 JN205 聚合在一起(图 2), 这进一步确认菌株 JY-1 为大山芽胞杆菌(*Bacillus gaemokensis*)。

2.3 菌株的安全性检测

在血琼脂平板上 37 °C 倒置培养 24 h, 菌株 JY-1 菌落周围无溶血环出现, 结果为阴性。菌株

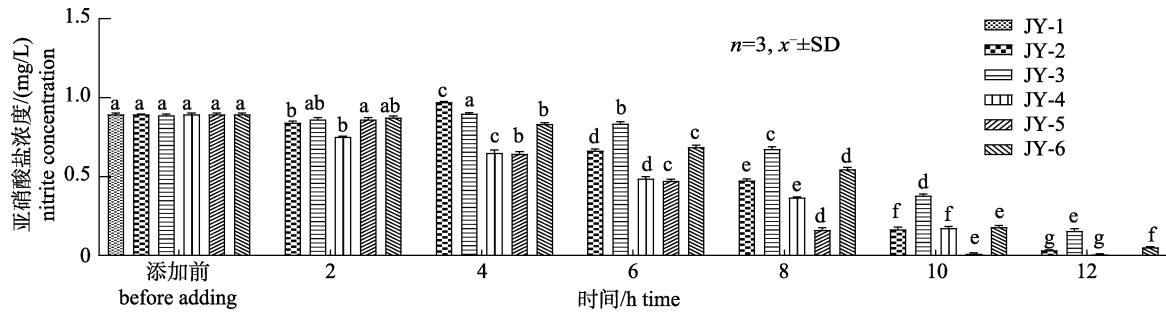


图 1 不同菌株降解亚硝酸盐效果对比

同一时间标有不同字母的组间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 1 Comparison of nitrite degradation effect of different strains

Groups with different letters at the same time are significantly different ($P < 0.05$).

表 2 菌株 JY-1 生理生化试验结果

Tab. 2 Physiological and biochemical test results of strain JY-1

项目 item	结果 result	项目 item	结果 result
硝酸盐肉汤 nitrate broth	+	甘露醇 manna sugar	+
淀粉水解 amylohydrolysis	+	溶菌酶 lysozyme	+
西蒙氏柠檬酸盐 Simmons citrate medium	+	动力培养基 dynamic medium	+
V-P 实验 V-P test	+	明胶 gelatin	+
葡萄糖 glucose	+	3%过氧化氢酶 3% catalase	+

注: “+” 代表“阳性”.

Note: “+” means “positive”.

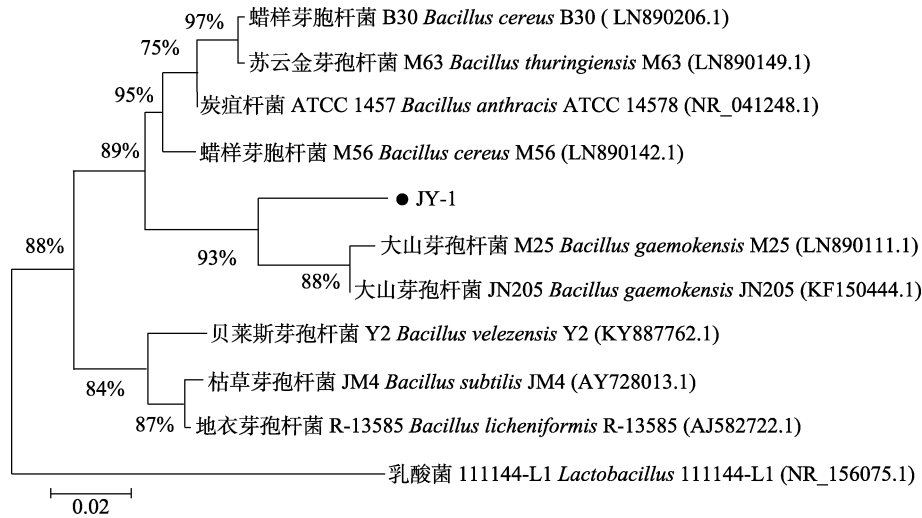


图 2 菌株 JY-1 的系统进化发育树

进化树的 Bootstrap 值在分支位点处标出(%), 用于评估分支的可信度. 距离标尺显示 0.02% 的序列差异.

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain JY-1

Bootstrap values for 1000 trees are shown at branch points (%) evaluating the credibility of the branch.

The bar represents a sequence divergence of 0.02%.

灌服实验显示, 灌服各浓度的菌株 JY-1 后, 14 d 的观察期内实验组与对照组的尼罗罗非鱼皆行动敏捷、正常摄食, 无死亡现象。

2.4 菌株 JY-1 发酵培养基中碳源和氮源的优化
发酵培养基的碳源类别比较实验显示, 葡萄糖作为碳源时, 芽孢浓度最高, 为 2.7×10^8 CFU/mL,

显著高于其他处理组。发酵培养基的氮源类别比较实验显示, 蛋白胨作为氮源时, 芽孢浓度最高, 为 2.26×10^8 CFU/mL, 显著高于其他处理组(图 3)。

2.5 菌株 JY-1 在养殖水体中的水质调控效果研究

添加菌株 JY-1 的实验组在 3 h 内亚硝酸盐质量浓度就从 0.6 mg/L 降到 0 mg/L, 而对照组亚硝酸盐的含量在 12 h 内变化不显著。实验组与对照

组的氨氮含量均随时间的推移逐渐下降, 但在各个时期实验组的氨氮浓度都低于对照组。对照组和实验组硝酸盐浓度变化趋势基本一致, 在各个时期都没有显著变化, 且两组间差异不显著 ($P < 0.05$)。对照组的总氮浓度总体呈上升趋势, 且上升幅度较大; 实验组的总氮浓度随着时间的推移略有上升, 但上升幅度比对照组显著小(图 4)。

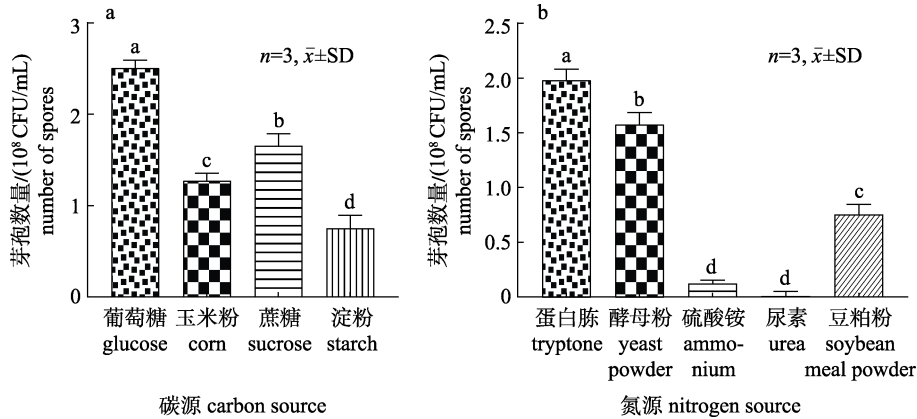


图 3 菌株 JY-1 发酵培养基中氮源和碳源的优化

a.. 不同碳源对菌株 JY-1 芽孢数量的影响; b. 不同氮源对菌株 JY-1 芽孢数量的影响. 不同组别中不同字母表明差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 3 Optimization of carbon source and nitrogen source in fermentation medium of strain JY-1

a. Effect of different carbon sources on spores numbers of JY-1; b. Effect of different nitrogen sources on spores numbers of JY-1. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

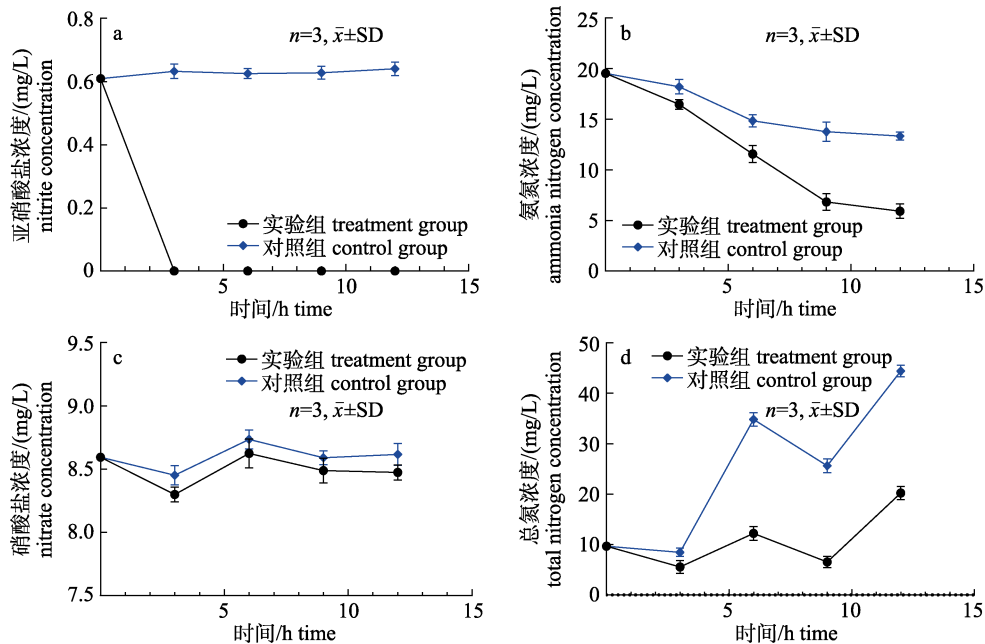


图 4 添加菌株 JY-1 的实验组和对照组的养殖水体在不同时间的水质变化

a. 亚硝酸盐浓度变化; b. 氨氮浓度变化; c. 硝酸盐浓度变化; d. 总氮浓度变化.

Fig. 4 Water quality change of aquaculture water in test group added with strain JY-1 and control group
a. Nitrite concentration; b. Ammonia nitrogen concentration; c. Nitrate concentration; d. Total nitrogen concentration in each period.

2.6 菌株 JY-1 亚硝酸盐还原酶基因的克隆与分析

利用作者设计的 NIR 引物, 以 JY-1 的 DNA 为模板扩增出 JY-1 亚硝酸盐还原酶基因序列共

1576 bp, 上传至 NCBI, 登录号为 MT127563。利用 MEGA7.0 软件构建系统发育树, 结果显示 JY-1 首先与萝卜(*Raphanus sativus*)的 NIR 聚合在一块, 接着再与其他物种的 NIR 聚合(图 5)。

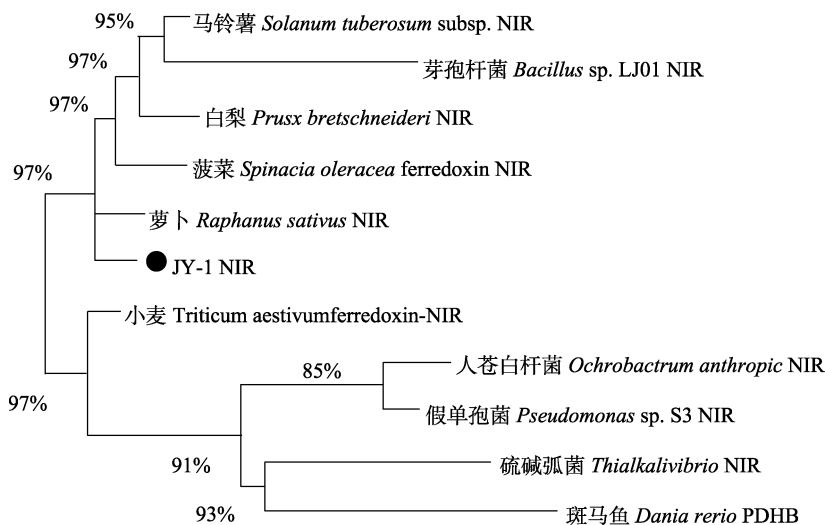


图 5 菌株 JY-1 中 NIR 的系统发育进化树

进化树的 Bootstrap 值在分支位点处标出(%), 用于评估分支的可信度。

Fig. 5 Phylogenetic tree of NIR in strain JY-1

Bootstrap values for 1000 trees are shown at branch points (%) evaluating the credibility of the branch.

3 讨论

3.1 菌株 JY-1 对亚硝酸盐的降解效果

已报道的亚硝酸盐降解菌可分为硝化细菌和反硝化细菌两大类。研究较多的硝化细菌多属于黄杆菌属、对杆菌属、硝化杆菌属等^[10,28-30]。这些硝化细菌在有氧条件下都能高效地将亚硝酸盐转化为硝酸盐, 但这一降解过程很容易受到水体中溶氧的影响, 目前对硝酸盐降解菌的研究并不多, 因为硝化作用并不能将氮完全从养殖水体中去除^[29]。并且, 这些硝化细菌繁殖速度慢, 在实际养殖中需要将硝化细菌的硝化作用与植物的同化作用联系起来达到去除水体亚硝酸盐的效果^[31]。近年来, 研究者更多地将关注点放在脱氮彻底、适应性强的反硝化细菌上。截至目前已报道的反硝化细菌多属于芽孢杆菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、红螺菌属等^[19,32-40]。研究发现不动杆菌 Sxf14、红螺菌 SP3 等能够降解低浓度亚硝酸盐, 如从水库沉积物中筛选到的不动杆菌 Sxf14, 当接种量为 2% 时, 48 h 内可将初始浓度

为(3.91±0.03) mg/L 的亚硝酸盐降解掉(40.52±1.49)%^[32], 这类亚硝酸盐降解菌可用于处理低中度污染的养殖池塘中的亚硝酸盐。而阴沟肠杆菌 DB-6、卓贝尔氏菌 F13-1、施氏假单胞菌 LYS-86、施氏假单胞菌 DB-33 和地衣芽孢杆菌 FP6 等可高效降解高浓度亚硝酸盐。如从舟山市水产研究所循环水生物滤池毛刷滤料上的少量污泥里筛选的阴沟肠杆菌 DB-6, 当接种量为 2% 时, 5 d 内可将硝态氮由 3570 mg/L 降至 22 mg/L, 去除率达 99.4%^[35]; 聂欢欢等^[36]从南美白对虾养殖塘底层水样中筛选到了地衣芽孢杆菌 FP6, 当接种量为 1% 时, 48 h 内可将约 26 mg/L 的硝态氮完全去除掉, 这类亚硝酸盐降解菌更适用于高度污染的养殖废水、工业废水等各种污水处理中。

由于养殖用水的亚硝酸盐含量应控制在 0.2 mg/L 以下, 筛选能将低浓度的亚硝酸盐降低到 0 的微生态菌株在水产养殖中意义较大, 而在已有的研究中, 尚未见针对 1 mg/L 以下的低浓度亚硝酸盐降解的报道。本研究从养殖池塘、污水处理厂等 5 处混合水体中筛选到一株降解亚硝酸

盐的大山芽孢杆菌 JY-1, 能够降低水体中亚硝酸盐、总氮和氨氮的含量, 在初始浓度为 1×10^7 CFU/mL 时, 能够在 3 h 内将 0.6 mg/L 的亚硝酸盐降为 0, 降解率达 100%, 并且不会造成水体中硝酸盐的积累。因此菌株 JY-1 更适合用于低浓度亚硝酸盐养殖水体中的亚硝酸盐的快速降解。此外, 芽孢杆菌繁殖快、代谢快, 产生的芽孢耐酸、耐碱、耐高温, 一旦遇到适宜的环境就产生大量的胞外酶类, 能降解养殖水体里的残饵和动物排泄物, 并为水体中光合细菌和其他微生物提供小分子物质, 产生良好的微生态环境^[41]。因此菌株 JY-1 在水产养殖中的应用前景十分广阔。

3.2 菌株 JY-1 发酵培养基中碳源和氮源的优化

对微生物培养条件进行优化是微生物应用的前提。碳源是菌液培养基的基本组分之一, 不仅为菌株的生长提供碳骨架, 供给生命活动所需要的能量, 而且在反硝化过程中, 作为微生物的电子供体, 其化学结构制约着反硝化过程的顺利进行^[42]。本研究显示, 不同碳源对菌株 JY-1 的生长影响显著, 主要表现为单糖优于双糖, 双糖优于多糖, 最佳碳源为葡萄糖。从理论上讲微生物更容易同化利用的碳源为葡萄糖, 淀粉等也最终分解为葡萄糖才能被利用。研究发现不同种属的菌株对碳源的选择差异很大, 如光合细菌的最佳碳源往往是小分子有机物乙酸钠, 而芽孢杆菌属则更易利用单糖或多糖^[43-45]。同一种属的不同种菌株对碳源的选择也不同, 如尹艳楠等^[46]和 Luo 等^[47]研究表明, 蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 的最佳碳源为可溶性淀粉, 巨大芽孢杆菌 SP1 的最佳碳源为葡萄糖。而张慧等^[48]研究显示, 枯草芽孢杆菌 CS27 的最佳碳源为糖蜜。总体上, 不同菌株的最优碳源种类有差异, 这可能与菌株本身特性有关。此外, 研究人员发现, 糖类经过不同方式的灭菌后, 糖的结构发生变化, 葡萄糖、果糖、半乳糖等还原糖含量差异较大^[49], 这也可能是不同菌株对碳源选择存在显著差异的原因之一。

氮源是微生物生长所必需的营养物质, 是微生物生长所必需的核酸、蛋白质的重要原料, 且无机氮源如硝酸盐和亚硝酸盐可作为电子受体^[42]。本研究筛选的菌株 JY-1 利用有机氮源远优于无机

氮源, 速效氮源(酵母粉, 蛋白胨)优于迟效氮源(豆粕粉), 当以蛋白胨作为氮源时, 菌株 JY-1 的芽孢产量达到最大值。这与尹艳楠等^[46]和龚燕川等^[50]的研究结果相似。许丽娟等^[51]的研究也发现以无机氮尿素作为唯一氮源时, 枯草芽孢杆菌 N419 活菌数和芽孢数均低于有机氮, 三种有机氮(牛肉膏、酵母膏、工业蛋白胨)作为氮源时, 活菌数和芽孢数没有显著性差异。JY-1 为氨基酸异养型菌株, 有机氮源的多肽和氨基酸可能是其易于在有机氮源培养基上生长的原因。

3.3 菌株 JY-1 降解亚硝酸氮的途径

作者在菌株 JY-1 中扩增出了亚硝酸盐还原酶基因, 且在菌株 JY-1 对养殖水体的水质调控实验中发现, 3 h 内亚硝酸氮含量就被迅速降解为 0, 同时水体中氨氮、硝酸盐、总氮等数值在此期间都有不同程度的下降, 未造成二次污染。已有研究发现一些反硝化细菌利用同化作用将亚硝酸盐转化为自身生长必须的氨基酸、蛋白质, 将养殖水体中的无机氮转变为生物体的有机氮, 但当该反硝化细菌死后有机氮又转变为水体中的总氮, 氮元素并未从养殖水体中去除^[52-53]。一些研究表明降解亚硝态氮的微生物含有亚硝酸还原酶(NIR), NIR 可将亚硝态氮还原为一氧化氮, 这是通过亚硝酸盐的酶降解途径完成的^[54-55]; 张庆芳等^[56]研究发现反硝化细菌如乳酸菌在发酵过程中 pH 逐渐降低, NIR 的活性被抑制, 在 pH 小于 4.0 时直接将亚硝酸氮还原成氮气, 表现为亚硝酸盐的酸降解。本研究中养殖水体的总氮水平下降, 且芽孢杆菌不产生有机酸, 因此推测菌株 JY-1 可能通过酶降解途径把亚硝酸氮还原为气体从而从水体中去除。

4 结论

本研究从多个养殖水体中筛选到一株亚硝酸盐降解菌 JY-1, 经鉴定为大山芽孢杆菌, 菌株 JY-1 可将实际养殖水体中的亚硝酸盐在 3 h 内完全降解, 降解率达 100%, 同时也降低了总氮和氨氮的含量, 并且不会造成水体中硝酸盐的积累。通过溶血实验和灌服实验证明该菌株对水生动物

无害。发酵条件优化显示 JY-1 的最适碳源为葡萄糖, 最适氮源为蛋白胨。

参考文献:

- [1] Evans A E V, Mateo-Sagasta J, Qadir M, et al. Ippolito agricultural water pollution: Key knowledge gaps and research needs[J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2019, 36: 20-27.
- [2] Ding Y W, Ai H. Applications of microorganisms in aquaculture[J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2000, 20(1): 68-73. [丁彦文, 艾红. 微生物在水产养殖中的应用[J]. 湛江海洋大学学报, 2000, 20(1): 68-73.]
- [3] Wang J P, Chen J G, Si L G, et al. Discussions on self-pollution and its prevention and cure in aquaculture[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2008, 27(2): 192-196, 200. [王建平, 陈吉刚, 斯烈钢, 等. 水产养殖自身污染及其防治的探讨[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2008, 27(2): 192-196, 200.]
- [4] Zakem E J, Haj A A, Church M J, et al. Ecological control of nitrite in the upper ocean[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1206.
- [5] Ren W M. The United States studies the mechanism and treatment methods of nitrite poisoning fish[J]. *Foreign Journal of Fisheries*, 1989(4): 45. [任维美. 美国研究亚硝酸盐使鱼中毒的机理和处理方法[J]. 国外水产, 1989(4): 45.]
- [6] Ferreira da Costa O T, dos Santos Ferreira D J, Presti Mendonça F L, Fernandes susceptibility of the amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite[J]. *Aquaculture*, 2004, 232: 627-636.
- [7] Huang X H, Li C L, Zheng L, et al. The toxicity of NO₂-N on *Litopenaeus vannamei* and effects of NO₂-N on factors relating to the anti-disease ability[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(4): 466-471. [黄翔鹤, 李长玲, 郑莲, 等. 亚硝酸盐氮对凡纳滨对虾毒性和抗病相关因子影响[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 466-471.]
- [8] Nie M, Li Z L. Bioprocess of nitrite accumulation in water—a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(8): 1493-1503. [聂铭, 李振轮. 水体中亚硝酸盐积累的生物过程及影响因素研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1493-1503.]
- [9] Fan J N, Zhao J W, Zhu D W. The research progresses on biological oxidation and removal of nitrogen in lakes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(15): 4924-4931. [范俊楠, 赵建伟, 朱端卫. 湖泊氮素氧化及脱氮过程研究进展[J]. 生态学报, 2012, 32(15): 4924-4931.]
- [10] Ma Y, Qian L M, Wang Y S, et al. Progress in molecular ecology of nitrifying bacteria[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007(05): 872-879. [马英, 钱鲁闽, 王永胜, 等. 硝化细菌分子生态学研究进展[J]. 中国水产科学, 2007(05): 872-879.]
- [11] Fang Xiuzhen, Guo Xianzhen, Yu Tongbing, et al. Bacteria involved in n-cycle in fish pond and sediment activity[J]. *Journal of Fisheries of China*. 1993, 17(2): 137-145. [方秀珍, 郭贤贞, 郁桐炳, 等. 鱼池淤泥中参与氮循环的细菌和淤泥活性. 水产学报, 1993, 17(2): 137-145.]
- [12] Mo Z L. Selection of organic-pollutants-degrading bacteria in shrimp ponds[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(4): 334-338 [莫照兰. 虾池有机污染物降解细菌的筛选[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 334-338.]
- [13] Li J Z, Cheng N N, Chen Q J. Progress in the study of bioremediation for polluted water bodies[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2005, 6(1): 25-30. [李继洲, 程南宁, 陈清锦. 污染水体的生物修复技术研究进展[J]. 环境工程学报, 2005, 6(1): 25-30.]
- [14] Yang X J, Cai G J, Zheng W Y, et al. Application of immobilized microorganism in bioremediation of polluted water involved in mariculture and harmful algal blooms[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(4): 712-720. [杨旭俊, 蔡冠竟, 郑伟, 等. 固定化微生物技术在受污养殖水体和水华水域生物修复中的应用[J]. 微生物学通报, 2015, 42(4): 712-720.]
- [15] Xie J, Fang X Z, Yu T B. Studies on the correlation among various bacteria and physicochemical factors in the nitrogen cycle in fishpond[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(2): 180-187. [谢骏, 方秀珍, 郁桐炳. 池塘氮循环中各种细菌与理化因子的相关性研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(2): 180-187.]
- [16] Xiong Y, Liu L Y, Luo R, et al. Screening, identification, degradation condition and effects of a nitrite-degrading strain[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(6): 1264-1271. [熊焰, 刘力源, 罗睿, 等. 1株亚硝酸盐降解菌的筛选、鉴定、降解条件及效果[J]. 中国水产科学, 2010, 17(6): 1264-1271.]
- [17] Liu Y, Gan L, Huang Z Q, et al. Study on denitrification characteristics of *Paracoccus* YF₁[J]. *Technology of Water Treatment*, 2010, 36(10): 61-65. [刘燕, 甘莉, 黄哲强, 等. 脱氮副球菌 YF₁的反硝化特性研究[J]. 水处理技术, 2010, 36(10): 61-65.]
- [18] Chen W, Ding X L, He Y L, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of nitrite degradation bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 34(S2): 37-41. [陈薇, 丁祥力, 贺月林, 等. 亚硝酸盐降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(S2):

- 37-41.]
- [19] Li Y S, Wei M, Zhang A X, et al. Isolation, identification and characterization of a nitrite-oxidizing bacterium[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(5): 196-202. [李焱生, 魏民, 张艾晓, 等. 一株异养型亚硝酸盐氧化细菌的分离及其降解特性的研究[J]. *生物技术通报*, 2010(5): 196-202.]
- [20] Liu H L, Zhang H L, Li X Z. Degradation of nitrite by photosynthetic bacterium-I (PSB-I) isolated from shrimp culture ponds[J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(6): 32-33. [刘慧玲, 张红莲, 李细钊. 光合细菌 I 的分离及其对水体中亚硝酸盐降解的研究[J]. *水产科学*, 2005, 24(6): 32-33.]
- [21] Liu B H, Guo X H, Yang L, et al. Screening and identification of the nitrite-degrading *Aspergillus parasiticus* JFS[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1556-1563. [刘冰花, 郭晓恒, 杨林, 等. 一株亚硝酸盐降解真菌 *Aspergillus parasiticus* JFS 的筛选及鉴定[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(8): 1556-1563.]
- [22] Wu W, Yu X L, Li Y M. Studies on the degradation characteristics of nitrite in the fishery water by *Candida* sp[J]. *China Environmental Science*, 2001, 21(1): 8-11. [吴伟, 余晓丽, 李咏梅. 假丝酵母对养殖水体中亚硝酸盐的降解特性[J]. *中国环境科学*, 2001, 21(1): 8-11.]
- [23] Wu W, Hu G D, Qu J H, et al. Removal of nitrite from aquacultural water with *Lactobacillus brevis*[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*[J]. 2007, 23(4): 37-40. [吴伟, 胡庚东, 瞿建宏, 等. 应用短乳杆菌去除养殖水体中亚硝酸盐[J]. *生态与农村环境学报*, 2007, 23(4): 37-40.]
- [24] He W, Wang W, Wang J, et al. Isolation, identification and its mixed application of a strain of aerobic denitrifying bacteria[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2009, 25(2): 88-93. [何伟, 王薇, 王洁, 等. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其混合应用特性研究[J]. *生态与农村环境学报*, 2009, 25(2): 88-93.]
- [25] Wang H C. Isolation, identification and safety evaluation of a nitrite removal bacterium AQ-3[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [王会聪. 亚硝酸盐降解菌 AQ-3 的分离鉴定及安全性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [26] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 677-830. [R E 布坎南, N E 吉本斯. 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]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 677-830.]
- [27] Dong X Z, Cai M Y. *Systemic Identification Manual of Familiar Bacteria*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 409-412. [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: 409-412.]
- [28] Su J F, Lu X, Ma C M, et al. Isolation, culture and identification of a heterotrophic nitrifying bacteria[J]. *Biological Chemical Engineering*, 2020, 6(4): 79-82. [苏金凤, 吕祥, 马传敏, 等. 一株异养硝化细菌的分离培养及鉴定[J]. *生物化工*, 2020, 6(4): 79-82.]
- [29] Pang D, Peng Z R, He W H, et al. Screening, identification and immobilized optimization of heterotrophic nitrifying bacteria[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(6): 2430-2437. [庞朵, 彭自然, 何文辉, 等. 异养高效硝化细菌的筛选鉴定与固定化最优化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(6): 2430-2437.]
- [30] Chen M J, Jiang J Y, Zhou Y X, et al. Separation, identification and phylogenetic analysis of autotrophic nitro bacteria[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2010, 23(3): 340-345. [陈梅娟, 蒋进元, 周岳溪, 等. 自养硝化细菌的分离、鉴定及系统发育分析[J]. *环境科学研究*, 2010, 23(3): 340-345.]
- [31] Zhao L Y. Mechanism of the phytoremediation of decabromodiphenyl ether in sediment by aquatic macrophyte *Scirpus validus* Vahl[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012: 154. [赵良元. 水生植物水葱对沉积物中十溴联苯醚的修复机制研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2012: 154.]
- [32] Huang T L, He X X, Zhang H H, et al. Nitrogen removal characteristics of the heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. Sxf14[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(2): 201-207. [黄廷林, 何秀秀, 张海涵, 等. 水库贫营养异养硝化-好氧反硝化菌 Sxf14 的脱氮特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(2): 201-207.]
- [33] Li W F, Du L B, Liu S Y, et al. Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifying bacterium[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 202-209. [李文甫, 杜柳冰, 刘思莹, 等. 一株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮性能研究[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 202-209.]
- [34] Zhang F F, Xie F X, Zhao Y J, et al. Identification and denitrification efficiency of a denitrifying bacteria[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2013, 7(11): 4415-4420. [张峰峰, 谢凤行, 赵玉洁, 等. 一株反硝化细菌的分离鉴定及脱氮能力[J]. *环境工程学报*, 2013, 7(11): 4415-4420.]
- [35] Peng Z L, Liu M H, Guo H B, et al. Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifier[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(4): 632-639. [彭志兰, 柳敏海, 郭海波, 等. 一株高效好氧反硝化细菌的分离与鉴定[J]. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(4): 632-639.]
- [36] Nie H H, Zhao Q F, Li C H, et al. Identification and charac-

- teristics of a strain of bacteria with highly-effective nitrite nitrogen removing[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(11): 2146-2155. [聂欢欢, 赵群芬, 李长红, 等. 一株高效去除亚硝酸氮细菌的分离鉴定及其脱氮特性研究[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(11): 2146-2155.]
- [37] Wang Y Y, Zhang Q Z. Isolation and identification of a photosynthetic bacterium strain and removal of ammonia nitrogen and nitrite by the bacterium species in water[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2512-2528. [王艺雅, 张其中. 一株光合细菌的分离鉴定及该菌对氨氮和亚硝酸盐氮的去除作用[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2512-2528.]
- [38] Li Q C, Zhu L M, Shen X H, et al. Isolation and characterization of a photosynthetic bacterium[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2017, 58(8): 1444-1446. [林启存, 朱丽敏, 沈小红, 等. 一株光合细菌的分离与鉴定[J]. *浙江农业科学*, 2017, 58(8): 1444-1446.]
- [39] Liu Y T, Liu W S, Yang T J, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of a nitrite-degrading strain[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 1171-1180. [刘玉廷, 刘文舒, 杨天俊, 等. 一株亚硝酸盐降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 1171-1180.]
- [40] Yang H F, Tang J Y, Hu A H, et al. Identification and denitrification characteristics of a denitrifier[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(1): 366-371. [杨浩锋, 唐佳琦, 胡安辉, 等. 一株反硝化细菌的分离鉴定及其反硝化特性[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(1): 366-371.]
- [41] Zhang X Y, Guo L D, Liu X Y. Research advances in the neutral protease of *Bacillus subtilis*[J]. *China Brewing*, 2018, 37(4): 12-15. 张晓燕, 国立东, 刘晓艳. 枯草芽孢杆菌中性蛋白酶的研究进展[J]. *中国酿造*, 2018, 37(4): 12-15
- [42] Wang S Y, Sun H W, Yang Q, et al. Biochemical reaction mechanism and kinetics of denitrification[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2008, 14(5): 732-736. [王淑莹, 孙洪伟, 杨庆, 等. 传统生物脱氮反硝化过程的生化机理及动力学[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(5): 732-736.]
- [43] Tian Q W. Isolation and identification of photosynthetic bacteria and optimization of fermentation conditions and their application in aquaculture[D]. Huaiyin: Huaiyin Institute of Technology, 2020. [田启文. 光合细菌的分离鉴定与发酵条件优化及在水产养殖中的应用[D]. 淮阴: 淮阴工学院, 2020.]
- [44] Zhang X X. Studied on the purified effect on *Litopenaeus vannamei* reared water for the photosynthetic bacteria isolated from Hainan[D]. Haikou: Hainan University, 2018. [张秀霞. 海南土著光合细菌筛选及其对凡纳滨对虾养殖废水净化效果研究[D]. 海口: 海南大学, 2018.]
- [45] Zheng J. Study on the fermentation production of coenzyme Q₁₀ by photosynthetic bacteria-*Rhodospseudomonas sphaeroides*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008. [郑君. 光合细菌(球形红假单胞菌)发酵产辅酶 Q₁₀ 的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.]
- [46] Yin Y N, Wu J W, Tan J J, et al. Optimization of medium and culture conditions for *Bacillus cereus* NJSZ-13[J]. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 2020, 40(6): 9-17. [尹艳楠, 吴佳雯, 谈家金, 等. 松树内生蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株发酵培养基及条件优化[J]. *浙江林业科技*, 2020, 40(6): 9-17.]
- [47] Luo L, Zhao Z, Huang X, et al. Isolation, identification, and optimization of culture conditions of a bioflocculant-producing bacterium *Bacillus megaterium* SP1 and its application in aquaculture wastewater treatment[J]. *BioMed Research International*, 2016, 2758168.
- [48] Zhang H, Lin C Q, Wu D H, et al. Optimization of liquid fermentation conditions of *Bacillus subtilis* CS27[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40(5): 995-1001. [张慧, 林陈强, 吴大华, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)CS27 液体发酵条件优化[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(5): 995-1001.]
- [49] Yi H, Wang L L, Feng H Y, et al. The color producing problem of glucose-containing medium during sterilization and its prevention measurements[J]. *Liquor Making*, 2003(02): 42-43. [仪宏, 王丽丽, 冯惠勇, 等. 含葡萄糖培养基高温灭菌变色及其防范措施的研究[J]. *酿酒*, 2003(02): 42-43.]
- [50] Gong Y C, Chen Y, Tang J, et al. Culture characteristics of *Morchella importuna* mycelium with different fruiting performance[J]. *Edible Fungi of China*, 2016, 35(4): 7-11. [龚燕川, 陈影, 唐杰, 等. 梯棱羊肚菌 M83 和 M101 菌株培养特性差异[J]. *中国食用菌*, 2016, 35(4): 7-11.]
- [51] Xu L J, Chen W, Wu Y B, et al. Optimization of culture media for a *Bacillus subtilis* of degrading nitrite[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2016(9): 10-11, 16. [许丽娟, 陈薇, 吴迎春, 等. 亚硝酸盐降解菌 N419 的培养基优化[J]. *湖南农业科学*, 2016(9): 10-11, 16.]
- [52] He T X, Li Z L, Xu Y. Denitrification characteristics of a hypothermia nitrite-denitrifier *Pseudomonas putida* Y-12[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(10): 3071-3077. [何腾霞, 李振轮, 徐义. 耐冷亚硝酸盐型反硝化细菌 *Pseudomonas putida* Y-12 脱氮特性[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(10): 3071-3077.]

- [53] He T X, Li Z L, Yang S. Research progress in aerobic denitrifier and its removing mechanism of nitrite[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2015, 15(1): 174-180. [何腾霞, 李振轮, 杨珊. 好氧反硝化细菌及其去除亚硝酸盐的作用机理研究进展[J]. 过程工程学报, 2015, 15(1): 174-180.]
- [54] Kartal B, Kuypers M M M, Lavik G, et al. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: Nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(3): 635-642.
- [55] Poth M, Focht D D. ^{15}N kinetic analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: An examination of nitrifier denitrification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(5): 1134-1141.
- [56] Zhang Q F, Chi N Y, Zheng Y, et al. The study on mechanism of nitrite degradation by lactic acid bacteria[J]. Food and Fermentation Industries, 2002, 28(8): 27-31. [张庆芳, 迟乃玉, 郑燕, 等. 乳酸菌降解亚硝酸盐机理的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(8): 27-31.]

Isolation, identification and function of a nitrite-degrading strain JY-1

ZHOU Min, NING Wen, CHEN Hongju, JI Xiangshan, ZHAO Yan

College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract: In the present study, to isolate and screen a probiotic that degrades nitrite stably and efficiently, we carried out experiments on enrichment, isolation, culture, and identification of a suitable strain. Then, biological characteristics of the identified strain were determined through optimization of fermentation medium, analysis of nitrite degrading effect, and gene cloning of nitrite reductase. The strain was isolated and screened from five mixed water bodies, including aquaculture projects and wastewater treatment plants, and named JY-1. Additionally, the strain JY-1 was identified using 16S rDNA gene sequence analysis and physiological and biochemical characteristics. The results revealed strain JY-1 to be *Bacillus gaemokensis*. Optimization of fermentation conditions for sporulation of JY-1 strain indicated that the best carbon source for JY-1 was glucose and the best nitrogen source was tryptone. Analysis of the nitrite-degrading effect of JY-1 showed that JY-1 could degrade 0.6 mg/L nitrite in aquaculture water to 0.0 mg/L in 3 h. Moreover, the safety evaluation test suggested that no hemolysis was found, and the high concentration of JY-1 (10^9 CFU/mL) had no significant effect on the survival of Nile tilapia. Based on the results of experiments of gene cloning of nitrite reductase and the effect of JY-1 on ammonia, nitrite, and total nitrogen in water bodies, it is preliminarily speculated that enzymatic degradation, operated by JY-1, was the pathway through which nitrite was degraded and removed from water. In summary, this study provides an important basis for the preparation of microecological preparations with high efficiency in degrading nitrite.

Key words: *Bacillus gaemokensis*; nitrite; aquaculture water; isolation; identification

Corresponding author: ZHAO Yan. E-mail: yzhao@sdau.edu.cn