

## 好氧反硝化细菌 YX-6 特性及鉴定分析

安健<sup>1,2</sup>, 宋增福<sup>1</sup>, 杨先乐<sup>1</sup>, 胡鲲<sup>1</sup>, 路怀灯<sup>2</sup>, 余林荣<sup>3</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 扬州绿科生物技术有限公司, 江苏 扬州 225600; 3. 广东海富药业有限公司, 广东 潮州 515700)

**摘要:** 从对虾池塘筛选得到1株高效的好氧反硝化细菌, 命名为 YX-6。对该菌生长及反硝化性能间的关系进行研究; 同时研究了不同温度、pH、盐度及碳源对该菌生长及反硝化性能的影响。结果表明, 该菌反硝化作用主要发生在对数生长期, 可将亚硝酸盐氮由 10 mg/L 降至 0; 该菌最适生长及反硝化温度为 30 °C; pH 值范围为 7~9 时最适于该菌生长及反硝化性能的发挥。该菌最适盐度范围为 0~15; 丁二酸钠、乙酸钠为该菌生长及反硝化的最适碳源。通过对 YX-6 菌株生理生化及 16S rRNA 分子鉴定, 初步鉴定为凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)。对该菌株亚硝酸还原酶基因进行序列分析, 结果表明, 该菌含有亚硝酸还原酶 *nirS* 基因。[中国水产科学, 2010, 17(3): 561-569]

**关键词:** 好氧反硝化; 凝结芽孢杆菌; 16S rRNA; 亚硝酸还原酶基因

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)03-0561-09

目前中国主要采取高密度集约化的养殖生产模式, 水体中过量的饲料残渣及水产动物代谢物的排放, 常常会导致水体亚硝酸盐氮的严重超标, 并有可能进一步诱发细菌病、病毒病等病害, 给水产养殖业造成巨大的经济损失。因此, 养殖水体亚硝酸盐氮的有效去除是水产业亟需解决的问题之一。

好氧反硝化细菌能够在有氧条件下, 将  $\text{NO}_3^-$  或  $\text{NO}_2^-$  还原为  $\text{N}_2$ , 是自然界氮素循环的重要途径之一。当前, 无论在养殖水体的生产应用还是基础研究方面, 氮素消除技术仍然停留在厌氧除氮的初级水平上。由于好氧反硝化细菌的基础研究薄弱, 基础数据积累少, 制约了好氧反硝化除氮技术的发展。

自 Robertson 等<sup>[1]</sup>首次分离出好氧反硝化细菌以来, 已有较多种类的细菌被报道具有好氧反硝化功能, 其中部分菌种能够在高密度养殖条件下, 有效地去除水体氮素的过度积累。目前已发现的好氧反硝

化细菌主要存在于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)<sup>[2-3]</sup>、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)<sup>[4-5]</sup>、副球菌属 (*Paracoccus*)<sup>[6-7]</sup> 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*)<sup>[8-9]</sup> 等。研究表明, 菌株的生长状况会影响反硝化作用效果<sup>[10-11]</sup>, 因此, 开展其生物学特性的研究对该类细菌的生产和应用具有重要的理论价值和实际意义。

本研究以对虾池塘分离的好氧反硝化细菌 YX-6 菌株为实验对象, 拟在对其部分生物学特性及反硝化性能进行研究的基础上, 确定该菌分类学和系统发育地位, 旨在为丰富好氧反硝化细菌种质资源的同时, 为该菌在养殖水体的实际应用提供理论基础和技术支撑。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株** 好氧反硝化细菌 YX-6 为本实验室从虾池中分离。

收稿日期: 2009-11-23; 修订日期: 2010-01-19.

基金项目: 国家公益性行业专项 (nyhyzx07-042); 国家公益性行业专项 (NYCYTX-49-17); 农业部行业专项 (200803013).

作者简介: 安健 (1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产微生态制剂研发. E-mail: anjian520@sohu.com

通讯作者: 杨先乐 (1948-), 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物免疫、鱼类药理学与渔药的检测与监控等研究. E-mail: xlyang@shou.edu.cn

**1.1.2 培养基** 牛肉膏蛋白胨液体培养基(LB): 蛋白胨10 g/L, 牛肉膏5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.0。反硝化培养基(测定性能): 琥珀酸钠4.72 g/L, NaNO<sub>2</sub> 0.05 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.42 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g/L, pH 7.2。所有培养基经0.11 MPa、121 °C灭菌20 min。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细菌生长与好氧反硝化性能测定** 实验菌株经纯培养18 h, 测其细菌光密度A<sub>600</sub>约为0.605后, 按1% (V/V) 菌液添加量接种到200 mL反硝化培养基中, 30 °C、200 r/min摇床振荡培养24 h, 每隔2 h取样1次, 每次取样10 mL, 先测定细菌光密度A<sub>600</sub>, 经8 000 r/min离心取其上清液测定培养液中亚硝酸盐氮的浓度。

**1.2.2 温度对细菌生长及反硝化性能的影响** 实验菌株经纯培养18 h, 测其细菌光密度A<sub>600</sub>约为0.605后, 按1% (V/V) 菌液添加量接种到100 mL反硝化培养基中, 分别在10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C条件下经200 r/min摇床振荡培养24 h后, 取样测定其A<sub>600</sub>, 同时测定其中亚硝酸盐氮的含量。

**1.2.3 pH对细菌生长及反硝化性能影响** 实验菌株经纯培养18 h, 测其细菌光密度A<sub>600</sub>约为0.605后, 按1% (V/V) 菌液添加量接种到pH值分别为3、5、7、9、11的100 mL反硝化培养基中, 30 °C、200 r/min摇床振荡培养24 h后, 取样测定其A<sub>600</sub>, 同时测定其中亚硝酸盐氮的含量。

**1.2.4 盐度对细菌生长及反硝化性能的影响** 配制盐度为5、10、15、20、25、30的人工海水, 并添加反硝化培养基, 将纯培养18 h后的菌株(光密度A<sub>600</sub>约为0.605)按1% (V/V) 菌液添加量分别接种到100 mL反硝化培养基中, 30 °C、200 r/min摇床振荡培养24 h后, 取样测定其A<sub>600</sub>, 同时测定其中亚硝酸盐氮的含量。

**1.2.5 不同碳源对细菌生长及反硝化性能的影响** 将相同物质量的8种碳源添加到反硝化培养基中, 取经纯培养18 h后的试验菌株悬液, 按1% (V/V) 菌液添加量分别接种于100 mL不同碳源的反硝化液体培养基中, 30 °C、200 r/min条件下振荡培养24 h后取样, 测定不同碳源条件下细菌A<sub>600</sub>值, 同时测定其中亚硝酸盐氮的含量。

**1.2.6 细菌生理生化鉴定** 采用API 50CH鉴定系统进行鉴定。

**1.2.7 16S rRNA序列分析及系统发育分析** 用于16S rRNA PCR反应的引物为通用引物, PF: 5' AGAGT TTGATCCTGGCTCAG3', PR: 5' GGTTACCTTGTTACC ACTT 3', 上海基康生物公司合成。PCR反应体系(25 μL): 2.5 μL 10×PCR缓冲液, 3.5 μL MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μL 模板DNA, 0.5 μL PF和PR, 1 μL dNTP, 0.5 μL *Taq* DNA聚合酶, 16 μL超纯水。PCR扩增条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 循环30次; 72 °C延伸10 min。PCR产物连接pMD18-T, 转化*E. coli* DH5α, 在含氨苄青霉素的LB平板上筛选阳性克隆, 提取质粒并测序。测序由Invitrogen公司完成。将16S rRNA所测序列通过BLAST检索程序与GenBank中已知16S rRNA序列进行分析, 利用Custal X1.8进行序列比对, 用MEGA4.0构建系统发育树。

**1.2.8 亚硝酸盐还原酶基因序列分析** 参照文献[12], 选取亚硝酸盐还原酶结构基因*nirS*、*nirK*特异性引物, 对该菌亚硝酸盐还原酶进行PCR扩增, 引物由上海基康生物公司合成。PCR反应体系及条件同1.2.7。PCR产物通过电泳检测及纯化后, 由Invitrogen公司测序并进行同源性分析。

**1.2.9 分析方法** 亚硝酸盐氮测定: 采用N-1萘-乙二胺比色法<sup>[13]</sup> A<sub>600</sub>: 紫外分光光度计法。

## 1.3 数据统计与分析方法

实验结果用平均数±标准差( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )表示, 运用软件SPSS.11.0, 经One-way ANOVA分析, 采用Duncan's多重检验分析实验结果的差异显著性,  $P < 0.05$ 为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌生长与反硝化性能测定结果

如图1所示, 随着细菌的生长, 4 h以后细菌得以迅速增殖, 此阶段为细菌对数生长期。同时, 该菌能够在14 h内将初始量为10 mg/L的亚硝酸盐氮降解为0, 去除率达100%。

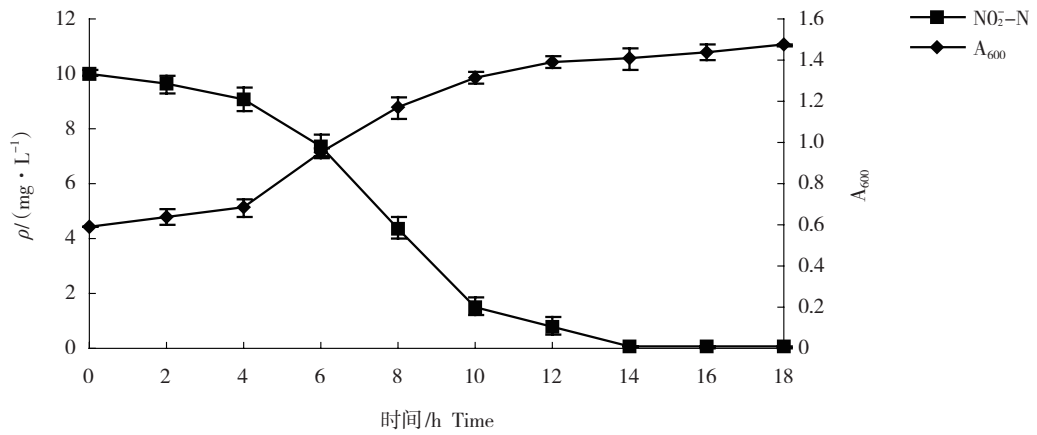


图1 细菌 YX-6 生长与亚硝酸盐氮降解曲线  
 Fig. 1 Dynamics of YX-6 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen

### 2.2 温度对细菌生长及反硝化性能的影响

如图2所示,随着温度的升高,细菌 YX-6 生长  $A_{600}$  值不断增大,当温度高于 20 °C 时,细菌均能正常生长,且可保持较高的亚硝酸盐氮去除率。温度为 30 °C 时,细菌生长  $A_{600}$  值和亚硝酸盐氮去除率均为

最高;在 40 °C 高温时,该菌生长虽相对减缓,但仍然可保持 90% 以上的亚硝酸盐氮去除率;当温度低于 20 °C 时,细菌几乎无法正常生长,此时亚硝酸盐氮去除率也较低。

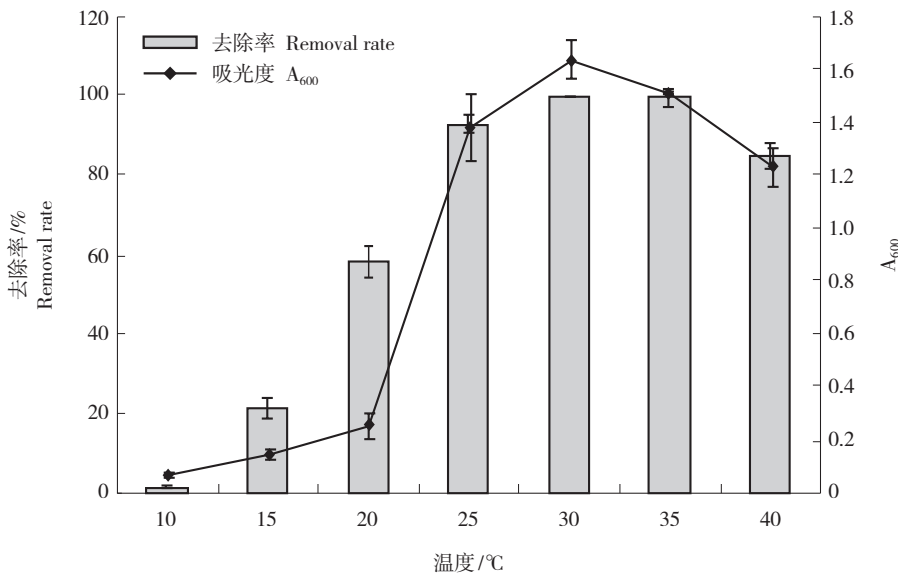


图2 不同温度条件下细菌 YX-6 生长及亚硝酸盐氮降解曲线  
 Fig. 2 Dynamics of YX-6 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen under different temperature

### 2.3 pH对细菌生长及反硝化性能的影响

如图3所示,细菌在 pH 值为 3 ~ 9 时均可以正常生长,同时保持较高的反硝化效率。pH 值为 5 ~ 9 时,细菌生长  $A_{600}$  值仍不断增大,但此 pH 范围内,细

菌对亚硝酸盐氮均可达到近 100% 的去除率;在 pH 值为 11 时,细菌生长极为缓慢,其亚硝酸盐氮去除率也较低。

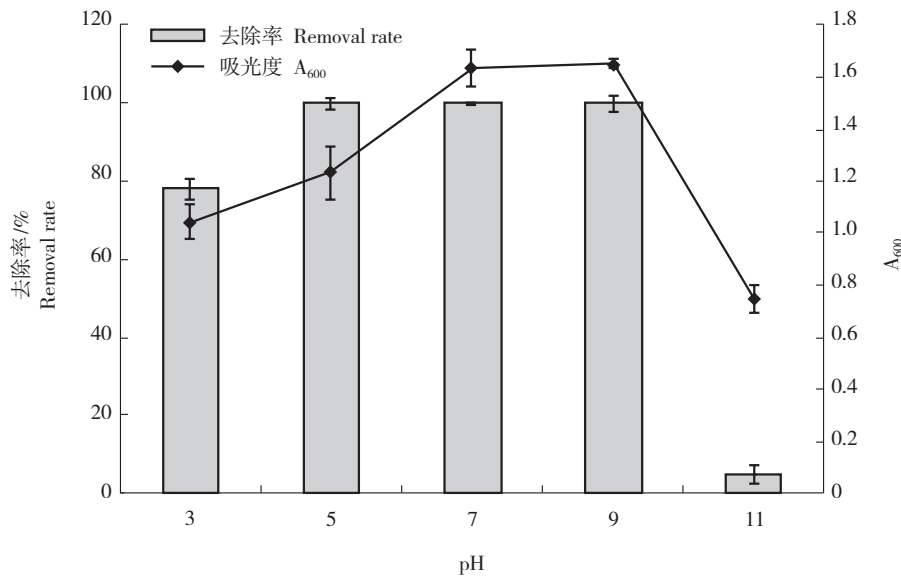


图3 不同pH值条件下细菌YX-6生长及亚硝酸盐氮的降解曲线

Fig. 3 Dynamics of YX-6 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen under different pH value

#### 2.4 盐度对细菌生长及反硝化性能的影响

如图4所示,随着盐度的不断增大,细菌生长  $A_{600}$  值依次降低。当盐度范围在5~15时,细菌对

亚硝酸盐氮的去除率几乎为100%,当盐度超过15时,细菌亚硝酸盐氮去除率逐渐降低。

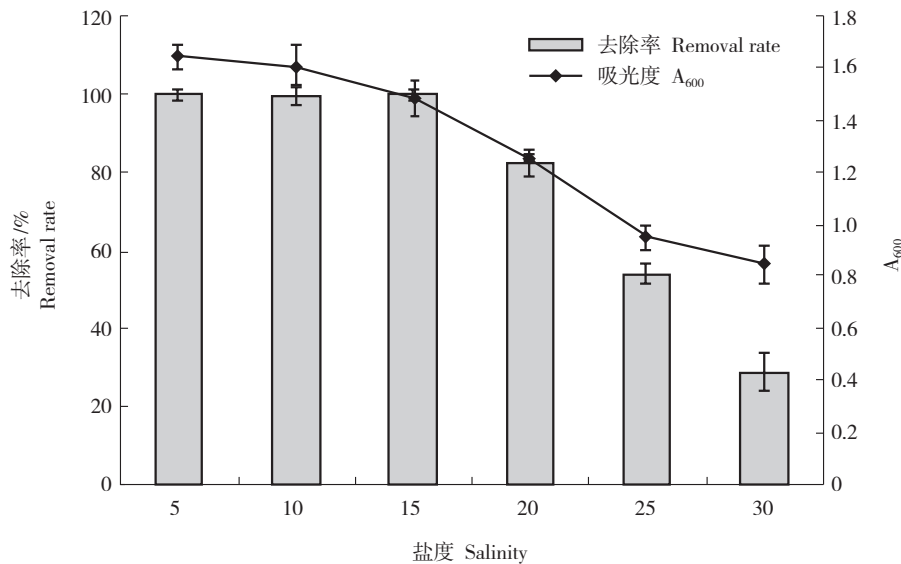


图4 不同盐度条件下细菌YX-6生长及亚硝酸盐氮的降解曲线

Fig. 4 Dynamics of YX-6 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen under different salinity

#### 2.5 不同碳源对细菌生长及反硝化性能的影响

结果见表1所示,条件相同,在乙酸钠和丁二酸钠为碳源的反硝化培养基中,细菌  $A_{600}$  值最大,同时

细菌对亚硝酸盐氮的去除量也最大,而该菌对蔗糖、乳酸等碳源的利用率相对较低,菌体生长相对缓慢,反硝化效率偏低。

表1 不同碳源对细菌 YX-6 生长及反硝化性能的影响  
Tab. 1 Growth of YX-6 strain and degradation of nitrite nitrogen in different carbon sources

碳源名称 Carbon source	$A_{600}$	起始 $\text{NO}_2\text{-N}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ Initial $\text{NO}_2\text{-N}$	最终 $\text{NO}_2\text{-N}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ Final $\text{NO}_2\text{-N}$	去除率/% Removal rate
乙酸钠 Sodium acetate	$1.149 \pm 0.036$	$10.011 \pm 0.026$	$0.068 \pm 0.034$	99.3
酒石酸钾钠 Potassium sodium tartrate	$0.371 \pm 0.027$	$10.011 \pm 0.034$	$4.833 \pm 0.141$	51.7
乳酸 Lactic acid	$0.220 \pm 0.003$	$10.005 \pm 0.054$	$7.011 \pm 0.153$	30.0
柠檬酸钠 Sodium citrate	$0.333 \pm 0.045$	$9.999 \pm 0.085$	$6.254 \pm 0.181$	37.5
水杨酸钠 Sodium salicylate	$0.179 \pm 0.006$	$10.000 \pm 0.017$	$7.862 \pm 0.192$	21.4
蔗糖 Sucrose	$0.111 \pm 0.006$	$10.011 \pm 0.026$	$8.415 \pm 0.156$	15.9
葡萄糖 Glucose	$0.340 \pm 0.007$	$10.006 \pm 0.009$	$5.640 \pm 0.079$	43.6
丁二酸钠 Sodium succinate	$1.067 \pm 0.064$	$10.017 \pm 0.017$	$0.085 \pm 0.017$	99.2

$n=3; \bar{x} \pm \text{SD}$

### 2.6 细菌生理生化鉴定

对细菌 YX-6 进行了 50 项生理生化指标测试, 初步鉴定该菌为凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) (鉴定结果略)。

### 2.7 16S rRNA 分子鉴定及系统发育分析

该菌 16S rRNA 序列全长 1 448 bp, GenBank 登录

号 GU288875, 同时该菌的 16S rRNA 序列经 BLAST 检索程序分析, 并选取 GenBank 中已知好氧反硝化细菌及部分硝化细菌基因序列通过 Clustal X1.8 进行多重比对, 并用 MEGA4.0 构建系统发育树, 初步确定该菌株为凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*), 同源性达 98%, 结果如图 5 所示。

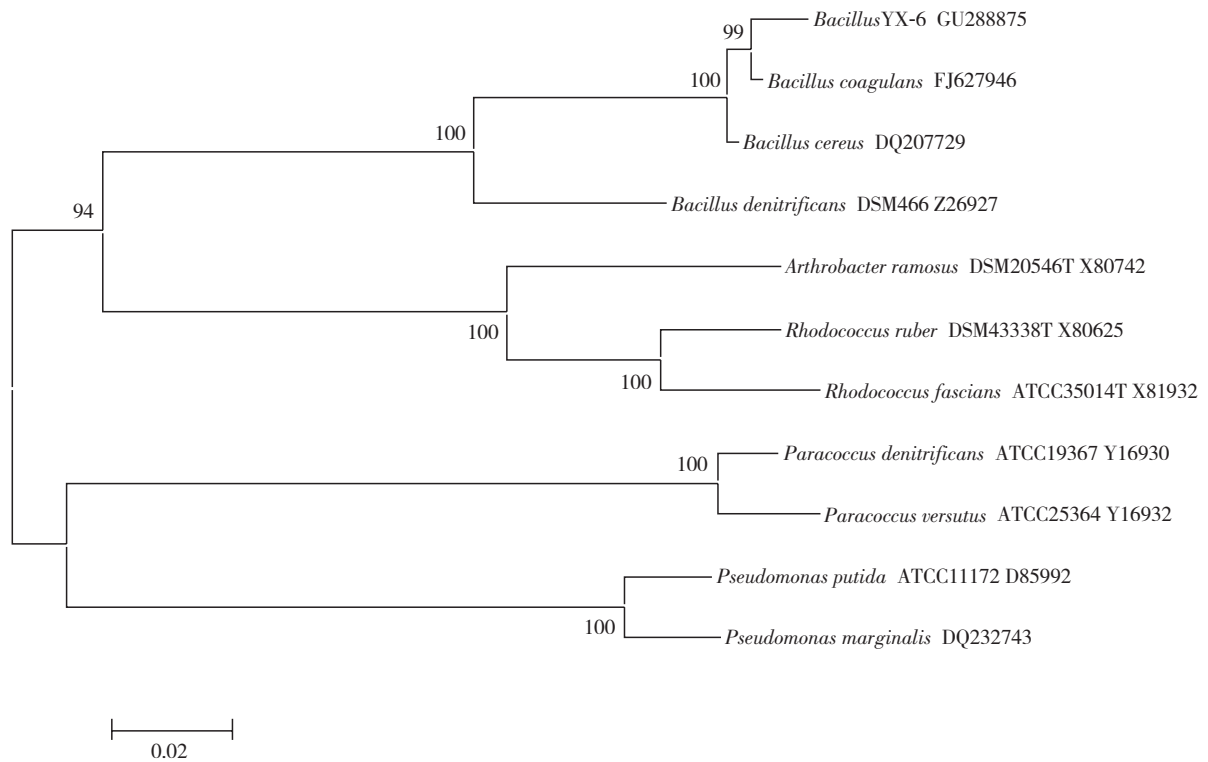


图5 菌株 YX-6 与其他细菌间基于 16S rRNA 序列同源性的系统发育树  
分支节点的数值表示自引导值 (bootstrap), 重复 1 000 次。

Fig. 5 Phylogenetic tree generated from an alignment of 16S rRNA of strain YX-6 and other bacteria  
Node values represent bootstrap values repeating 1 000 times.

## 2.8 亚硝酸盐还原酶基因序列分析

细菌 YX-6 亚硝酸盐还原酶基因 *nirS*、*nirK* 基因扩增结果如图 6 所示, *nirS* 扩增结果为阳性, 产物大小为 842 bp, 而 *nirK* 扩增结果为阴性。同源检测结果表明, 该菌 *nirS* 基因序列与 *Pseudomonas aeruginosa* LESB58 菌株的 *nirS* 基因序列相似, 同源性达 99%。

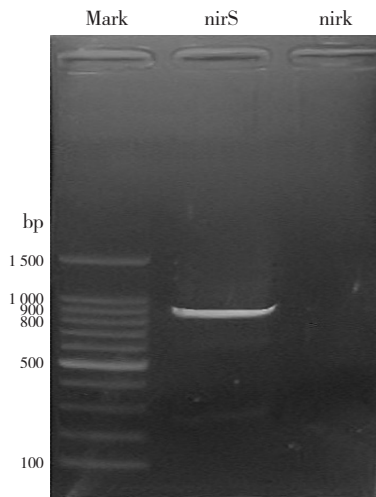


图 6 细菌 YX-6 亚硝酸盐还原酶基因 *nirS*、*nirK* 扩增结果  
Fig. 6 Amplification of *nirS* and *nirK* gene from strain YX-6

## 3 讨论

好氧反硝化细菌的发现与应用, 可有效地解决水体氮素污染。研究表明, 反硝化作用主要发生在细菌对数生长期, 这一阶段随着菌体的快速增殖, 水体中硝态氮、亚硝态氮的量会迅速的下降<sup>[14]</sup>。该实验结果与马放等<sup>[15]</sup>的研究结果相符。

细菌生长及反硝化活性最适温度范围是 25 ~ 35 °C, 当温度超过这一范围时, 均会抑制细菌快速生长及反硝化性能的正常发挥<sup>[16]</sup>。本研究结果表明, 水温在 20 ~ 40 °C, 该菌可以正常生长, 并保持较高的反硝化活性, 而水温 30 °C 是该菌生长及反硝化活性发挥的最适温度。此外, 该菌在 40 °C 的高水温条件下, 仍然生长良好, 同时还可以保持高达 90% 以上的亚硝酸盐去除率, 这一特性与曾报道过的好氧反硝化细菌特性不尽相同<sup>[4, 10]</sup>。当水温低于 20 °C 时, 细菌生长与反硝化性能发挥表现出了较明显的

抑制作用。可见, 温度对细菌生长及反硝化性能发挥着有着重要的影响, 而该菌更加适合高水温条件下的亚硝酸盐氮去除, 这可能与该菌生长及反硝化酶的耐热机制有关, 需进一步研究。

Gupta<sup>[17]</sup>、Timmermans 等<sup>[18]</sup>研究表明, 细菌生长及反硝化酶活性的最适 pH 值是中性或微碱性, pH 值过高或过低均会对菌株生长及反硝化性能的发挥产生影响。王宏宇等<sup>[19]</sup>、廖邵安等<sup>[20]</sup>对好氧反硝化菌株 C3 (*Pseudomonas* sp.)、嗜麦芽寡养单胞菌 X0412 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 研究也同样表明, pH 为中性条件最有利于菌株生长及反硝化性能的发挥。本研究表明, 该菌在 pH 3 ~ 9 时, 均可以较好生长, 同时保持较高的亚硝酸盐氮去除率, 其中, 在 pH 5 ~ 9 时, 该菌亚硝酸盐氮去除率可始终保持近 100%。在 pH 值为 11 的高碱性环境中, 该菌的生长及反硝化活性的发挥会受到一定的抑制。可见该菌对水体 pH 的改变显示出了较强的耐受能力, 可在较宽的 pH 范围内保持正常生长及反硝化性能的稳定发挥, 能应用于不同酸碱度的养殖水体。

养殖水体中, 盐度也是影响好氧反硝化细菌生长与反硝化性能发挥的重要因素。Yoshie 等<sup>[21]</sup>指出, 盐度对菌体生长及反硝化还原酶活性有一定的抑制作用。廖邵安等<sup>[20]</sup>对好氧反硝化菌株与盐度的影响关系也作了细致的研究, 发现当水体盐度过高时, 可对菌体反硝化活性产生抑制作用。本实验研究表明, 在盐度 0 ~ 30, 该菌株均可以正常生长并保持一定的反硝化活性, 其中盐度为 0 ~ 15, 是该细菌生长及反硝化活性发挥的最适盐度范围; 当盐度超过 15 时, 会对细菌的生长及反硝化性能产生一定的抑制作用。这一结果也与上述研究结果相同, 有关盐度与该菌生长及反硝化酶的作用机制, 仍需进行深入研究。

碳源不仅是细菌赖以生长的重要能源, 而且对细菌反硝化作用有重要影响。张光亚等<sup>[22]</sup>人对好氧反硝化赤红红球菌 (*Rhodococcus ruber*) HN 进行研究发现, 细菌对酵母膏、乙酸钠、蛋白胨等碳源有较高利用率, 其细菌生长  $A_{600}$  值较大, 而对衣康酸、

甲酸钠等碳源则不可利用。王宏宇等<sup>[23]</sup>比较了不同碳源对好氧反硝化细菌 X31 生长性能的影响发现,细菌在丁二酸钠、乙酸钠和苹果酸钠为碳源的反硝化培养基中均可以保持良好生长,其中细菌 X31 在苹果酸钠为碳源时的菌体生长量为最大。本实验研究表明,该菌均可以利用上述 8 种实验碳源进行生长,并表现出一定的反硝化性能;其中该菌在乙酸钠和丁二酸钠为碳源时菌体生长量最好,同时对亚硝酸盐氮的去除率也最高,而对乳酸、蔗糖和水杨酸钠的碳源利用率较低,其菌体生长量及亚硝酸盐氮去除率相对较小,可见该菌对小分子碳源的利用率较高,而对大分子碳源的利用率较低,这一研究结果也与 Her 等<sup>[24]</sup>的研究结果一致。

本实验对好氧反硝化细菌 YX-6 生理生化指标进行了测定,并结合该菌 16S rRNA 序列比对分析结果,初步确定该菌株为凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)。目前芽孢杆菌属的一些菌种如蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniform*) 均有文章报道其具有好氧反硝化性能<sup>[8-9]</sup>。凝结芽孢杆菌作为益生功能菌已在较多领域中有所应用,本研究发现,凝结芽孢杆菌也同样具有好氧反硝化性能,并对该菌生物学特性及反硝化性能进行了较为细致的研究,但有关该菌反硝化相关作用机制仍需要进一步研究。

反硝化还原酶功能基因与细菌反硝化性能的强弱密切相关,有关反硝化还原酶的构成及相关基因的研究,已有较多报道<sup>[12,25]</sup>,其中亚硝酸盐还原酶作为亚硝酸盐氮去除过程中至关重要的酶类之一,其相关基因及作用机制的研究更是当前研究的热点。Stouthamer<sup>[26]</sup>证实了 *T. pantotropha* 中的亚硝酸盐还原酶是由 *nirK* 基因编码的含铜型的酶,而不是由 *nirS* 基因编码的细胞色素 *cdl* 型。廖绍安等<sup>[20]</sup>对菌株 *S. maltophilia* strain X0412 亚硝酸盐还原酶基因进行了扩增,发现该菌的亚硝酸盐还原酶是由 *nirS* 基因编码的细胞色素 *cdl* 型。可见,不同种属菌株之间的反硝化还原酶构成及酶的催化机理也不尽相同<sup>[27]</sup>。目前

有关芽孢杆菌反硝化酶的相关研究国内外均未见报道。该实验对细菌 YX-6 亚硝酸盐还原酶基因进行扩增,结果表明,在该实验条件下,细菌 YX-6 亚硝酸盐还原酶中存在 *nirS* 基因,但有关该细菌中亚硝酸盐还原酶与亚硝酸盐氮去除之间的作用机制及影响因素方面的研究仍需要进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Robertson L A, Kuenen J G. Aerobic denitrification: A controversy revived [J]. Arch of Microbiol, 1984, 139 (4): 351-354.
- [2] Takaya N, Maria A B, Yasushi S, et al. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (6): 3152- 3157.
- [3] Su J J, Liu B Y, Liu C Y. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the active sludge of a piggery wastewater treatment system [J]. J Appl Microbiol, 2001, 90 (3): 457- 462.
- [4] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4 [J]. J Biosci Bioeng, 2005, 100 (2): 184-191.
- [5] Shwu L P, Chong N M, Chen C H. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment [J]. Biores Technol, 1999, 68 (2): 179-185.
- [6] Patureau D, Zumstein E, Delgenes J P, et al. Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems [J]. Microbial Ecol, 2000, 39 (2): 145- 152.
- [7] Robertson L A, Kuenen J G. *Thiosphaera pantotropha* gen nov sp nov a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium [J]. J Gen Microbiol, 1983, 129 (8): 2847- 2855.
- [8] Joong K K, Kyoung J P, Kyoung S C, et al. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains [J]. Biores Technol, 2005, 96 (17): 1897-1906.
- [9] 杨希,刘德立,邓灵福,等. 蜡状芽孢杆菌好氧反硝化特性研究 [J]. 环境科学研究, 2008, 21 (3): 155-159.
- [10] 马放,王弘宇,周丹丹,等. 好氧反硝化菌株 X31 的反硝化特性 [J]. 华南理工大学学报, 2005, 33 (7): 42-46.
- [11] 周丹丹,马放,王宏宇,等. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究 [J]. 微生物学报, 2004, 44 (6): 837-838.
- [12] Braker G, Zhou J, Wu L, et al. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying

- bacteria in pacific northwest marine sediment communities [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (5): 2096-2104.
- [13] 雷衍之. 养殖水环境化学实验 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 60-62.
- [14] 刘晶晶, 汪苹, 王欢. 一株异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮性能研究 [J]. 环境科学研究, 2009, 21 (3): 121-125
- [15] 马放, 王弘宇, 周丹丹, 等. 好氧反硝化菌株 X31 的反硝化特性 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2005, 33 (7): 42-46.
- [16] 阎胜利, 温淑瑶. 土壤中反硝化作用的试验研究 [J]. 河海大学学报: 自然科学版, 1998, 26 (2): 90-94.
- [17] Gupta A B. *Thiosphaera Pantotropha* a sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. Enzyme Microb Technol, 1997, 21 (8): 589-595.
- [18] Timmermans P, Van H A. Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp [J]. Water Res, 1983, 17 (10): 1249-1255.
- [19] 王宏宇, 马放, 苏俊峰, 等. 好氧反硝化菌株的鉴定及其反硝化特性研究 [J]. 环境科学, 2007, 28 (7): 1548-1552.
- [20] 廖绍安, 郑桂丽, 王安利, 等. 养虾池好氧反硝化细菌新菌株的分离鉴定及特征 [J]. 生态学报, 2006, 26 (11): 3718-3724.
- [21] Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, et al. Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70 (5): 3152-3157.
- [22] 张光亚, 陈培钦. 好氧反硝化菌的分离鉴定及特性研究 [J]. 微生物学杂志, 2005, 25 (6): 23-26.
- [23] 王宏宇, 马放, 苏俊峰, 等. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响 [J]. 环境科学学报, 2007, 27 (6): 968-972.
- [24] Her J J, Huang J S. Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate /nitrate denitrification and carbon breakthrough [J]. Biores Technol, 1995, 54 (1): 45-51.
- [25] Farver O, Brunori F, Cutruzzola S, et al. Intramolecular Electron Transfer in *Pseudomonas aeruginosa* cd1 nitrite reductase: Thermodynamics and kinetics [J]. Biophys J, 2009, 96 (7): 2849-2856.
- [26] Stouthamer A H. Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1992, 61 (1): 1-33.
- [27] Tocheva E I, Rosell F, Mauk A G, et al. Side-on copper-nitrosyl coordination by nitrite reductase [J]. Science, 2004, 30 (4): 836-842.



## Characteristics of aerobic denitrifying strain YX-6 and identification

AN Jian<sup>1,2</sup>, SONG Zengfu<sup>1</sup>, YANG Xianle<sup>1</sup>, HU Kun<sup>1</sup>, LU Huaideng<sup>2</sup>, SHE Linrong<sup>3</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, State Collection Centre of Aquatic Pathogen, Shanghai 201306, China; 2. Green Technology Co., LTD, Yangzhou 225600, China; 3. Guangdong Haifu Medicine Company, Chaozhou 515700, China)

**Abstract:** Nitrite is a matter of great concern for aquaculture since the excessive amount of nitrite poisons the aquatic animals, induces diseases outbreak and results in huge economic losses. This problem becomes more and more serious in intensive cultivation mode. Obviously, the conventional theory to remove nitrogen is based on the principle that denitrification is restricted to anoxic condition. It is not appropriate for aquaculture, because there is adequate oxygen in the culture water which is essential to aquatic animals. Although some probiotics are used in the aquaculture to improve the water quality in practice, their work mechanisms are described to reduce nitrite concentration indirectly by decomposing the organic matter. Probably the aerobic denitrifying microorganisms offer the suitable way to resolve this contradiction. In the present experiment, the aerobic denitrification of strain YX-6 screened from shrimp ponds was investigated under different temperature, pH, salinity and carbon sources. The results indicated that strain YX-6 removed the nitrite nitrogen from 10 mg/L to 0 mg/L within its logarithmic phase; The optimum temperature range was 25–35 °C and it even maintained higher denitrification efficiency (above 90%) at 40 °C; Its denitrification efficiency was approximately 100% at pH 7–9, while the optimum salinity ranged from 0 to 15. The results also proved that sodium acetate and sodium succinate were the best carbon sources for the strain YX-6. In this study, partial sequences of 16S rRNA of strain YX-6 were amplified and searched against GenBank using the Advanced BLAST similarity search option accessible from the homepage at the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The MEGA 4.0 version (Arizona State University 2007) software was used to check alignment and construct the phylogenetic tree. According to the physiological and biochemical properties, and 16S rRNA sequencing and alignment, the YX-6 was identified as *Bacillus coagulans* primarily. Furthermore, the nitrite reductase genes of *B. coagulans* YX-6 was amplified and confirmed that its nitrite reductase genes was *nirS*. As we know that temperature played an important role on the denitrification, the nitrite removal rate of *B. coagulans* YX-6 was over 90% even at 40 °C, so it was supposed that its nitrite reductase could endure high temperature and the strain YX-6 could be suitable to be used in high temperature. Salinity was another factor to influence denitrification. In the study, when the salinity was over 15, the denitrification efficiency decreased abruptly, which might be associated with the nitrite reductase. Different carbon resource may influence the denitrification of aerobic denitrifying bacteria. Eight kind of carbon sources, sodium acetate, sodium succinate, lactic acid, seignette salt, sodium citrate, sodium salicylate, saccharose, glucose were tested and the results showed *B. coagulans* YX-6 could use small molecular carbon resources with higher efficiency and on the contrary for the macromolecular carbon resources. Although the nitrite reductase gene was amplified in this study, the relationship between denitrification and the properties of nitrite reductase of *B. coagulans* YX-6 was not clear and further research was needed. In conclusion, *B. coagulans* YX-6 could remove nitrite with high efficiency under high temperature and salinity condition and could be used in the aquaculture industry. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 17 (4): 561–569]

**Key words:** aerobic denitrification; *Bacillus coagulans*; 16S rRNA; nitrite reductase gene

**Corresponding author:** YANG Xianle. E-mail: xlyang@shou.edu.cn