

1 株亚硝酸盐降解菌的筛选、鉴定、降解条件及效果

熊焰, 刘力源, 罗睿, 朱欢

(动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川农业大学, 四川 雅安 625014)

摘要: 从养殖水体中筛选出 1 株对亚硝酸盐具有高效降解能力、增殖速度快、稳定和安全的优良菌株, 经细菌学常规检测和 16S rRNA 序列分析确定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), 并命名为 SZ-3。对 SZ-3 菌株降解条件的单因素实验发现, 其最佳降解条件是: pH 7.0, 温度 33 ℃, 降解所需的最低葡萄糖含量为 0.01 mg/L, 在 24 h 内对亚硝酸盐的降解率达 69.58%。在亚硝酸盐质量浓度为 5 mg/L 的 100 L 污染水体养殖实验中, 添加 1 000 mL 含量为 1×10^8 CFU/mL 的 SZ-3 培养菌液离心后的纯菌体, 在 28 ℃ 的水温条件下, 经 96 h, SZ-3 菌株对亚硝酸盐的降解率可达 91.78%。表明该菌株对污染水体中的亚硝酸盐具有较强的降解效果。[中国水产科学, 2010, 17(6):]

关键词: 菌株筛选; 巨大芽孢杆菌; 亚硝酸盐; 污染水体

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)00

随着中国水产养殖业的迅速发展, 养殖密度和规模的不断增大, 加之我国主要是投饵静水精养的饲养模式^[1], 导致养殖水体水质污染严重, 其中残留的亚硝酸盐是危害最为严重的成分之一。水体中浓度过高的亚硝酸盐对鱼类的毒性影响主要表现为, 血液中的亚铁血红蛋白(Fe^{2+})被氧化成高铁血红蛋白(Fe^{3+}), 从而抑制血液运载氧气的能力, 导致鱼类缺氧甚至窒息死亡^[2-5]。此外, 养殖水体是各种微生物生长的理想场所, 水体中杂菌营养需求低、含量高, 可与投放的降解菌竞争性吸取营养, 其结果加速了杂菌的生长, 使水体缺氧和腐败。

利用微生物降解水体中亚硝酸盐或许是一种可行的方法。目前国内研究的较多的是降解氨氮的菌株, 而有关亚硝酸盐降解菌株的研究尚不深入。一些研究是在普通肉汤、MRS 培养基及 37 ℃ 的条件进行的^[6-9], 实验水体的容量小, 距生产应用还有一段距离。从水产行业相关公司所发表的产品效果的报道看^[10-11], 相关产品对降解水体中

的亚硝酸盐有一定的效果, 但文献中对检测标准没有做详细的描述, 产品对亚硝酸盐的降解率差异也很大, 范围在 7%~77.7%。而国外对这方面的研究报道很少。杨艳等^[12]研究发现, 巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)能有效地改善饲养池水水质, 对养殖水体微生态结构的稳定有利, 添加巨大芽孢杆菌对水中的亚硝酸盐显著降解。研究认为, 巨大芽孢杆菌可以氨氮为唯一的氮源进行生长, 且该菌株的生长与氨氮降解是同步进行的^[13], 因此, 从自然水体条件下筛选对亚硝酸盐有较高降解能力的菌株, 以及解决添加目的菌株后, 避免水质迅速恶化的研究, 对以静水养殖模式的我国淡水渔业来讲, 是十分必要的和迫切的。本研究旨在寻找对亚硝酸盐具有高效降解能力、在自然水体环境中增殖速度快、稳定和安全的优良菌株, 并通过研究水中杂菌与目的菌株相互竞争营养及相互抑制生长的关系, 寻找一种有效的添加模式, 以达到有效地降解养殖水体中亚硝酸盐而不促进水体中杂菌快速生长和水质恶化

收稿日期: 2000-00-00; 修订日期: 2000-00-00

基金项目: 教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队基金资助项目(IRT0848)。

作者简介: 熊焰(1955-), 男, 教授。研究方向为: 动物病原及免疫、水产微生物。E-mail: xyan20042000@yahoo.com.cn

的应用方法,为最终研发出有效、实用和优良的降解亚硝酸盐的微生态活菌制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株分离材料来源于四川成都、雅安周边养殖池塘和湖泊的水样及泥样。实验用水为四川农业大学污水处理厂的废水。实验用鱼选用健康彭泽鲫鱼种,体长 6–8cm,购于四川省水产研究所(成都)。

1.2 菌株筛选

将水样或泥样按 10%比例接入亚硝酸盐富集培养基中,28℃ 120 r/min 水域振荡培养,每天加入 5%的亚硝酸盐溶液 2 mL,富集培养 1 周,用平板稀释法分离纯化。取分离纯化后的菌株培养液 1 mL 接入 100 mL 亚硝酸盐筛选培养基中,于 28℃ 120 r/min 水域振荡培养 48 h,采用重氮-偶氮法测定培养液中亚硝酸盐含量,测定重复 3 次。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 常规细菌学生理生化鉴定 参阅《伯杰细菌鉴定手册》^[14]。

1.3.2 16S rRNA 全序列分析 提取分离菌株 DNA,采用 16S rRNA 细菌通用引物^[15–16]进行扩增,正向引物为 5-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3,反向引物为 5-ACGGTTACCTTGT-ACGACTT-3,引物由大连宝生物工程有限公司合成。扩增体系为 25 μ L 的 PCR 反应体系:12.5 μ L Taq Mixture,上下游引物各 0.5 μ L (20 μ mol/L),模板 DNA 2 μ L,去离子水 9.5 μ L。扩增反应条件为:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,52℃退火 1.5 min,72℃延伸 2 min 30 s,35 个循环,72℃总延伸 10 min。扩增产物交大连宝生物工程有限公司测序,所得序列在 GenBank 数据库中利用 BLAST 进行在线同源性比对。将比对结果最相似的序列中挑选出七种不同菌株的序列进行系统发育树的构建。首先在软件 clustalx 8.0 进行多序列比对,再将比对好的序列在软件 Mega 4.0 上构建系统发育树,采用 Neighbor-Joining 算法与 1000 次 Bootstrap 的统计检验进行构建,以确定分离菌株

的分类地位。

1.4 菌株安全性实验

1.4.1 溶血实验 取分离菌株 28℃ 120 r/min 水域振荡培养 24 h 的培养液 0.1 mL,滴加到 5%兔鲜血营养琼脂培养皿上,涂抹均匀,28℃培养 48 h 后观察溶血情况,重复 3 次。

1.4.2 鱼种毒性实验 取浓度为 1.04×10^9 CFU/mL 的菌液 10 L,经 4℃、3 500 r/min 离心 10 min,将纯菌体加入到盛有 10 L 的已曝气的自来水的水族缸中,每缸投放 10 尾健康鱼种。实验期间,缸内不充氧、不换水,并持续观察鱼种活动情况 15 d。实验设 3 个重复。

1.5 菌株降解亚硝酸盐条件的单因素实验

1.5.1 最适降解 pH 值的测定 将分离菌株 24 h 培养菌液(1.04×10^9 CFU/mL)按 1%的接种量,接种到葡萄糖含量为 0.5 mg/L, pH 值分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的亚硝酸盐培养基,28℃,120 r/min 水域振荡培养 24 h,测定其降解率。实验重复 3 次。

1.5.2 最适降解温度的测定 按 1.5.1 所测最适培养 pH 值,将分离菌株 24 h 培养菌液按 1%的接种量,接种到葡萄糖含量为 0.5 mg/L 亚硝酸盐培养基,在 18℃、28℃、30℃、33℃、37℃、40℃、50℃,120 r/min 水浴振荡培养 24 h,测定其降解率。实验重复 3 次。

1.5.3 最适降解葡萄糖需求量的测定 在 1.5.1 和 1.5.2 所测最适 pH 和温度基础上,按 1%的接种量取分离菌 24 h 培养菌液,经 4℃,3 500 r/min 离心 10 min,将纯菌体接种到葡萄糖质量分数分别为 1mg/L、0.1mg/L、0.01mg/L、0.001mg/L,注水量为 10 L 的 4 个水族缸中。实验用水为四川农业大学污水处理厂的废水,亚硝酸盐浓度调整至 5 mg/L,每 24 h 测定亚硝酸盐的降解率,连续 7 d。实验重复 3 次。

1.6 污染水体养殖实验

实验设 3 个不同分离细菌浓度的实验组和 1 个对照组,每组设 3 个重复。实验用水为四川农业大学污水处理厂的废水,亚硝酸盐浓度调整至 5 mg/L。水族缸注水量为 100 L, pH 调整至 7,水

温用加热棒控制在 $(28\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ，葡萄糖含量为 0.01 mg/L。每缸投放体长 6~8 cm 的彭泽鲫鱼种 10 尾。投放鱼种后 3 d，按 1%的接种量分别取浓度为 10^6 CFU/mL、 10^7 CFU/ mL 和 10^8 CFU/ mL 的分离菌液各 1 000 mL， 4°C 、3 500 r/min 离心 10 min，将离心后的菌体分别接入实验组的 9 个水族缸。实验期间每日按每缸鱼体重的 3%投饵料 3 次。实验期间不充氧，不换水，每 24h 检测水体的 pH 值和亚硝酸盐浓度，连续测定 7 d。对照组不接分离细菌，其他条件与实验组一致。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

采集的水样和泥样经亚硝酸盐富集培养后，

共得到 42 株不同种类的微生物。经革兰氏染色镜鉴和菌落观察，其中大部分为芽孢杆菌，少数为酵母菌。

对 42 株分离菌株用亚硝酸盐筛选培养基培养，进一步筛选各菌株对亚硝酸盐的降解率，最终筛选到降解效果较好的 7 株细菌(表 1)，其中编号为 SZ-3 的菌株降解率高达 98.9%。SZ-3 菌株即为本实验的目的菌株。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株细菌学常规检测 SZ-3 菌株的生理生化测定结果为：V-P 实验和吲哚实验阴性，能水解蛋白质和淀粉，过氧化氢酶和硝酸盐还原均为阳性，能在 7%氯化钠中生长，初步鉴定为巨大芽孢杆菌。其细菌学鉴定详细结果见表 2。

表1 分离菌株对亚硝酸盐的降解率
Tab. 1 Degradation rate to nitrite of isolated strains

时间 Time	项目 Item	菌株 Strain							
		对照 Control	SZ-3 芽孢	SZ-4 芽孢	SZ-11 酵母	SZ-13 芽孢	SZ-24 芽孢	SZ-25 酵母	SZ-30 芽孢
0 h	OD	0.685	0.689± 0.057	0.683± 0.070	0.685± 0.044	0.687± 0.038	0.686± 0.041	0.686± 0.0053	0.687± 0.0035
	降解率/% Degradation rate	0	0	0	0	0	0	0	0
	OD	0.688	0.265± 0.035	0.304± 0.024	0.322± 0.040	0.321± 0.032	0.286± 0.038	0.315± 0.044	0.278± 0.024
24 h	降解率/% Degradation rate	0	61.52± 5.20	55.54± 3.647	53.27± 5.923	53.36± 4.739	58.36± 5.672	54.19± 6.601	59.53± 3.591
	OD	0.689	0.008± 0.004 ^c	0.01± 0.004 ^c	0.024± 0.005 ^b	0.012± 0.003 ^c	0.039± 0.007 ^a	0.023± 0.005 ^b	0.016± 0.005 ^{bc}
	降解率/% Degradation rate	0	98.93± 0.060a	98.65± 0.0538a	96.50± 0.746b	98.27± 0.395a	94.26± 1.127c	96.64± 0.684b	97.66± 0.789ab

注：降解率为 3 次重复实验数据的平均值；同一行不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: The degradation rate is the mean value of three times duplicate tests' data. Within a row, means with no common superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

表2 SZ-3菌株的形态及生化特性
Tab. 2 Morphological and biochemical characteristics of SZ-3 strain

测定项目 Item	测定结果 Result	测定项目 Item	测定结果 Result
革兰氏染色 Gram stain	+	吲哚实验 Indol test	-
芽孢形状 Shape of spore	R	孢子囊膨胀 Sporangium distention	-
芽孢位置 Position of spore	C	运动性 Motility	-
甘露醇 Manna sugar	+	蛋白质水解 Proteolysis	+
7%氯化钠 7%NaCl	+	淀粉水解 Amylolysis	+
葡萄糖产酸 Acid-producing by glucose	+	蔗糖 Saccharose	-
葡萄糖产气 Gas-producing by glucose	-	亚硝酸盐产气 Gas-producing by nitrite	-
V.P 实验 V.P test	-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
需氧性 Aerobism	兼性 Facultative	过氧化氢酶 Catalase	+

注：“+”为阳性；“-”为阴性；“R”为圆形；“C”为中生(芽孢位于菌体中央)。
Note: “+” represents the positive; “-” represents the negative; “E” represents the ellipse or columnar; “C” represents the mesozoic gemma.

2.2.2 SZ-3 菌株 16S rRNA PCR 扩增及比对结果
经 16S rRNA PCR 扩增, 获得分子量在 2 000 bp 与 1 000 bp 之间的单一扩增条带(图 1)。测序结果显示, 所获得的序列长度为 1441bp, 其部分序列已在 GeneBank 中注册, 登录号为: HM061611。利用 BLAST 进行同源性检测以及构建分离菌株的系统发育树, SZ-3 菌株与巨大芽孢杆菌聚成一支, 同源性达到 99.5%, 结果如图 2 所示。

根据菌株的染色、形态和生化实验结果, 参阅《伯杰细菌鉴定手册》第 8 版^[14], 并通过 16S rRNA 序列比对分析, 最终确定编号为 SZ-3 的分离菌为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), 并命名为 SZ-3。

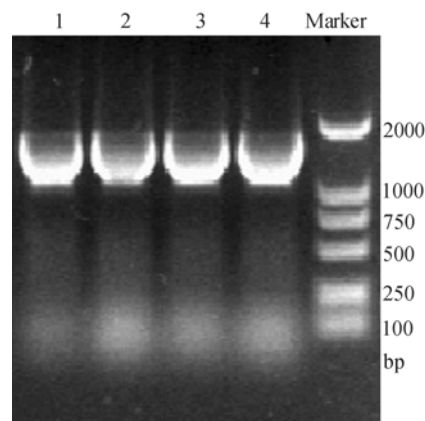


图 1 SZ-3 分离菌株扩增产物琼脂糖凝胶电泳图
注: 1、2、3、4 为 SZ-3 菌株。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis map of SZ-3 strain
Note: 1,2,3 and 4 represent the SZ-3 strain.

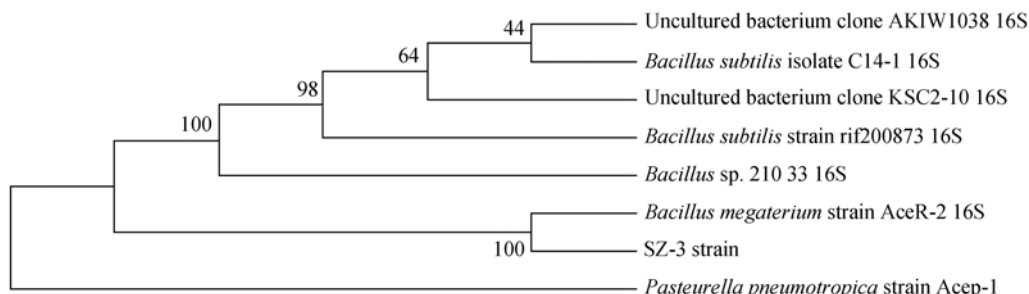


图 2 SZ-3 菌株 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 2 Molecular phylogenetic tree of SZ-3 strain based on 16S rRNA sequences

2.3 菌株安全性实验

2.3.1 溶血实验结果 在 5%兔鲜血平板上, 经 28℃培养 48 h, SZ-3 菌落周围无溶血现象出现。

2.3.2 鱼种毒性实验结果 将 10 L SZ-3 培养菌液离心后, 加入 10 L 的水族缸中, 使水体中菌液浓度达 1.04×10^9 CFU/mL。在 15 d 的观察期间, 鱼种游动正常, 抢食活跃, 反应敏捷, 未出现死亡和任何异常现象。

2.4 菌株降解亚硝酸盐条件的单因素实验

2.4.1 最适降解 pH 值 在葡萄糖含量为 0.5 mg/L, pH 值为 5.5~7.0 时, SZ-3 菌株对亚硝酸盐的降解率随 pH 的升高而上升; pH 值为 7.0~8.5 时, 菌株对亚硝酸盐的降解率随 pH 的升高而降低。降解率在 pH 值为 7.0 时最高, 降解率达 80.23%。

2.4.2 最适降解温度 在葡萄糖含量为 0.5 mg/L,

pH 为 7.0 的条件下, 温度从 18℃到 33℃过程中, SZ-3 菌株对亚硝酸盐的降解率逐步升高; 从 33℃到 50℃时, 菌株对亚硝酸盐的降解率呈下降趋势。在 28℃至 33℃范围内, 菌株的降解率最高, 平均达 88.94%, 且稳定。

表 3 SZ-3 菌株在不同温度下对亚硝酸盐的降解率

Table 3 Degradation rate to nitrite at different temperatures of SZ-3 stain

培养温度/℃ Incubation temperature	降解率/% Degradation rate
18	75.12±5.834 ^b
28	87.55±4.116 ^a
30	88.75±8.663 ^a
33	90.52±5.254 ^a
37	88.77±5.821 ^a
40	70.41±7.286 ^b
50	52.21±6.823 ^c

注: 降解率为 3 次重复实验数据的平均值; 同一列不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: The degradation rate is the mean value of three times duplicate tests' data. Within a column, means with no common superscript letters are significantly different($P < 0.05$).

2.4.3 最适葡萄糖需求量 在 pH 7.0、温度 33℃ 条件下, 菌株对亚硝酸盐的降解随葡萄糖浓度的降低而减弱。在第 7 天时, 葡萄糖含量为 1 mg/L、0.1 mg/L 和 0.01 mg/L 的实验组对亚硝酸盐的降解率分别达 79.64%、71.81%和 69.58%, 而葡萄糖含量为 0.001 mg/L 的实验组降解效果最差, 仅为

24.16%。实验结果见表 4。

2.5 污染水体养殖实验

2.5.1 分离菌株对水体 pH 值的影响 从图 3 可以看出, 实验组加入 SZ-3 菌株后, 水体 pH 值稳定, 在 7 天内最低 pH 值为 7.1, 最高为 7.5, 波动范围较小。而对照组的 pH 值随着实验天数的增加而

表 4 葡萄糖含量对 SZ-3 菌株亚硝酸盐降解率的影响
Tab.3 Influence of glucose content on degradability

项目 Item	葡萄糖含量 Glucose content			
	1 mg/L	0.1 mg/L	0.01 mg/L	0.001 mg/L
OD	0.143±0.027 ^c	0.198±0.030 ^b	0.214±0.027 ^b	0.533±0.022 ^a
降解率/% Degradation rate	79.64±3.825 ^a	71.81±4.245 ^b	69.58±3.854 ^b	24.163±3.187 ^c

注：降解率为 3 次重复实验数据的平均值；同一横排不同的小写字母表示差异显著(P < 0.05).
Note: the degradation rate is the mean value of three times duplicate tests' data. Within a row, means with no common superscript letters are significantly different(P < 0.05).

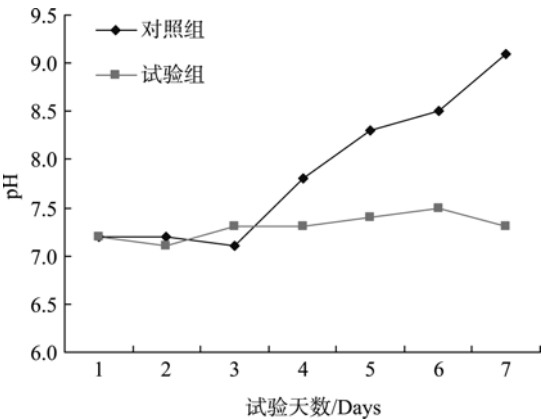


图 3 水体 pH 值的变化

图中 pH 值为 3 个添加不同浓度菌株实验组 pH 的平均值
Fig. 3 Fluctuation of pH value in the aquatic water
The pH value in fig. 2 is the mean value of three different thal-lus concentrations in the treatment group.

逐渐升高, 7 天后 pH 值达到了 9.0。

2.5.2 菌株接菌量对降解率和鱼存活率的影响 各实验组和对照组在第 0、1、2、3、4、5、6 天对亚硝酸盐的降解率见表 5。由表 5 可知, 接种 SZ-3 菌株量为 1×10⁸ CFU/ml 的实验组降解效果最好, 仅 4 天就可降解水体中 91.78%的亚硝酸盐, 7 天时可达到 93.15%, 而接菌量为 1×10⁶ CFU/ml 和 1×10⁷ CFU/ml 的实验组在第 4 天和第 7 天的降解率分别为 59.59%、71.92 和 68.49、74.66%(P<0.05), 对照组的降解率为 0%(P<0.05)。在第 5-7 天, 各实验组对亚硝酸盐的降解率趋于稳定, 降解幅度明显减缓。本实验中各实验组和对照组鱼种的存活率均为 100%。

表 5 添加菌量条件下的亚硝酸盐降解率

Tab. 5 Relationship between degradation rate of nitrite and additive amount of bacteria

项目 Item	添加菌量 Additive bac- terial amount	测定时间/dTest date						
		0	1	2	3	4	5	6
OD	1×10 ⁶	0.118±0.006 ^b	0.091±0.014 ^b	0.070±0.015 ^b	0.059±0.011 ^b	0.045±0.008 ^b	0.040±0.010 ^b	0.041±0.010 ^b
	1×10 ⁷	0.087±0.011 ^b	0.069±0.013 ^b	0.055±0.012 ^{bc}	0.046±0.007 ^{bc}	0.040±0.010 ^b	0.036±0.006 ^b	0.037±0.007 ^b
	1×10 ⁸	0.074±0.013 ^c	0.030±0.009 ^c	0.017±0.003 ^c	0.012±0.004 ^c	0.011±0.003 ^c	0.012±0.004 ^b	0.010±0.002 ^c
	对照 Control	0.146±0.021 ^a	0.143±0.025 ^a	0.130±0.045 ^a	0.162±0.037 ^a	0.162±0.015 ^a	0.170±0.044 ^a	0.168±0.012 ^a
降解率/% Degradation rate	1×10 ⁶	19.18±3.814 ^b	37.68±10.228 ^b	52.05±10.136 ^b	59.59±7.248 ^b	69.18±5.171 ^b	72.61±6.534 ^b	71.92±6.533 ^b
	1×10 ⁷	40.41±7.409 ^a	52.74±9.515 ^b	62.34±7.899 ^b	68.49±4.939 ^b	72.61±6.746 ^b	75.34±3.813 ^b	74.66±4.745 ^b
	1×10 ⁸	49.33±8.904 ^a	79.45±6.534 ^a	88.35±1.812 ^a	91.78±2.469 ^a	92.47±2.054 ^a	91.78±2.985 ^a	93.15±1.186 ^a
	对照 Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注：降解率为 3 次重复实验数据的平均值。同一列不同的小写字母表示差异显著(P < 0.05).
Note: the degradation rate is the mean value of three times duplicate tests' data. Within a column, means with no common superscript letters are significantly different (P < 0.05).

3 讨论

3.1 菌株的富集培养及筛选

直接从养殖水体和淤泥中筛选降解亚硝酸盐的菌株是寻找适合临床应用菌株的捷径。经该方法获取的菌株对养殖水体具有很强的适应性,对鱼体无危害,且属水中的正常菌群一员。张朋菲^[17]报道,富集培养可缩短分离目的菌株的时间。本实验显示,富集培养时间太短达不到筛选的目的,太长则因过量的亚硝酸盐及营养的缺乏而导致菌株的死亡,这是在亚硝酸盐富集培养时需注意的问题。

由于微生物的多样性及不同地区受气温、水环境等因素的影响,各地分离的菌株均有不同的特性。与相关报道^[6-9, 18]对比,本实验分离的 SZ-3 菌株具有很强的降解亚硝酸盐的能力,营养需求低,在夏季自然水体温度环境中繁殖速度快。

3.2 菌株降解条件的单因素实验

从菌株降解亚硝酸盐的 pH 和温度实验发现,当葡萄糖含量为 0.5 mg/L 时,在 pH7.0 和 28~33℃ 的条件下降解效果最佳,接种 1% 含量为 1.04×10^9 CFU/mL 离心的 SZ-3 菌体,经 24h,对亚硝酸盐的降解率可达 88.94%。这一结果说明, SZ-3 菌株符合夏季水温(28~33℃)及淡水中性养殖水体应用的条件。

研究发现,在 pH 为 7.0、温度为 33℃ 的条件下,葡萄糖添加量在 1 mg/L、0.1 mg/L、0.01 mg/L 和 0.001 mg/L 时,接种 1% 含量为 1.04×10^9 CFU/mL 的 SZ-3 离心菌体,经 7 d,对亚硝酸盐的降解率分别为 79.64%、71.81% 和 69.58%, 和 24.16%。虽然 SZ-3 对亚硝酸盐降解率随葡萄糖浓度的降低而下降,但向水体直接添加营养肉汤培养菌液和 1mg/L、0.1mg/L 的葡萄糖时,在添加第 2 天,部分鱼种就出现死亡。作者分析认为,培养菌液内的大量蛋白胨和葡萄糖是腐生性细菌繁殖所需的营养成分,会促进养殖水体中本身存在的大量杂菌的繁殖,造成水体缺氧和浑浊。这一实验现

象说明,葡萄糖的添加量对菌株降解亚硝酸盐的作用和避免杂菌的繁殖是一个极其重要的影响因素。而在 0.01mg/L 的葡萄糖条件下,添加离心菌体后一周,水质仍保持清净和透明。虽然在 0.01 mg/L 的葡萄糖添加量下, SZ-3 菌株对亚硝酸盐的降解率有所下降,但仍可达 69.58% 左右。而葡萄糖添加量为 0.001 mg/L,添加菌生长缓慢,菌株对亚硝酸盐的降解率仅为 24.16% 左右,不能起到有效地降解作用。

高海英等^[6]报道,接种 1% 的分离的枯草芽孢杆菌菌液(10^9 CFU/mL)到 300 mL 模拟养殖水的三角瓶中,置于 30℃ 培养箱中静置培养 3d,对亚硝酸盐氮降解率可达 72.10% 和 92.10%。但实验是在采用直接添加培养菌液条件下进行的,对是否有杂菌生长没有说明。王昌禄等^[7]报道,用分离的乳酸菌(肠膜明串珠菌)在 37℃ 经 36h 对亚硝酸盐的降解率可达 90%。虽然该实验结果显示乳酸菌具有降解亚硝酸盐的作用,但乳酸菌对营养需求高,培养和保存困难,在营养相对贫瘠的水体中,生长繁殖缓慢或不能生长,在生产应用上可行性不大。此外,夏季水体温度最高在 28-30℃ 左右,还因地域差异变化很大。若要利用微生物降解水体中的亚硝酸盐,实验研究所采用温度应尽量与夏季实际水体温度一致。

3.3 污染水体养殖实验

一般天然水体中亚硝酸盐含量低于 0.1 mg/L,当含量高于 0.5 mg/L 时,中毒症状明显,某些器官功能出现衰竭,严重时导致死亡^[19]。在严重污染的养殖水体中,亚硝酸盐浓度甚至可达 1 mmol/L(50 mg/L)或更高^[20-22]。高明辉等^[23]对武汉一带的水质调查结果表明,某些池塘中亚硝酸盐的含量在夏季竟高达 15 mg/L。从实验结果可以看出,添加 SZ-3 菌株的实验组在 0.01 mg/L 葡萄糖、pH7.0、28℃ 的条件下,对 100 L 自然污染水体中亚硝酸盐的降解效果显著,其降解率随接菌量的增加而升高(表 5)。当接菌量为 1×10^8 CFU/mL 时,仅 4d 就能使污染水体中亚硝酸盐含量从 5 mg/L 下降至 0.235 mg/L,降解率达

91.78%。处理后水体中亚硝酸盐的含量已达到养殖水体标准。这一结果与杨艳等的报道基本一致^[12]。杨艳等^[12]实验结果显示, 4×10^8 CFU/mL 的巨大芽孢杆菌(MPF- 906)为降解亚硝酸盐的最适使用浓度, 而过低的浓度无降解效果。此外我们发现, 对亚硝酸盐的降解主要发生在添加菌株后的 1~4 天期间, 第 5~7 天虽然低剂量的接种量实验组还有一定的降解作用, 但降解速度趋缓, 这主要因水体中高浓度的亚硝酸盐迅速被降解, 含量减少有关。

添加 SZ-3 菌株后, 水体 pH 值稳定, 7 d 均维持在 pH7.3 左右。这可能与 SZ-3 菌株在繁殖过程中的产酸、以及消耗了饵料残渣、鱼粪便中的蛋白质及含氮化合物有关。这一结果不仅起到了调节水体 pH 值的作用, 也促进了 SZ-3 菌株的生长。姚传付^[19]报道, 当亚硝酸盐含量高于 0.5 mg/L 时, 鱼体会出现明显的中毒症状。但在实验期间, 各实验组和对照组鱼种均存活。作者认为, 亚硝酸盐中毒是一个慢性过程, 中毒剂量以及鱼体中毒后临床症状的出现时间有待进一步探讨。

3.4 水体环境对降解作用的影响

在亚硝酸盐培养基中, 添加 0.5 mg/L 的葡萄糖, 24h 对亚硝酸盐的降解率为 80.23% 和 88.94%(见 2.4.1、2.4.2), 在 10L 水体模拟实验条件下, 添加 0.01mg/L 的葡萄糖, 7 天对亚硝酸盐的降解率为 69.58%(见 2.4.3), 在 100L 放养鱼种的污染水体中, 添加 0.01mg/L 的葡萄糖, 4 天对亚硝酸盐的降解率为 91.78%(见 2.5.2)。分析以上降解结果可以说明, 降解时间、水体容量、营养和鱼类活动都会显著影响菌株对亚硝酸盐的降解作用。在未放养鱼种的单纯水体环境中, 水体中的营养物仅来自添加的葡萄糖, 降解率仅与葡萄糖的添加量呈正相关。在污染水体实验中放养了鱼种, 进行了投饵, 增加了水体中的营养物质, 促进了投放细菌的繁殖, 提高了降解率, 减少了添加菌株的用量。此外, 大容量的水体和鱼种的活动也有助于缓解投放饵料造成的水质的恶化。

本实验重点研究了降解亚硝酸盐菌株的筛

选、降解条件、降解效果和应用方法。筛选的 SZ-3 菌株在夏季实际水体温度下对亚硝酸盐具有很强的降解能力, 且能维持水体 pH 的稳定。菌株营养需求低, 含芽孢, 培养及保存方便, 适合用于水质净化微生态制剂的研发。但在大规模养殖池塘或湖泊应用的降解效果、维持时间和使用量等, 还需做进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] 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, 2(1): 21-25
- [2] 王鸿泰, 胡德高. 池塘中亚硝酸盐对草鱼种的毒害及防治[J]. 水产学报, 1989, 13(3): 207-213
- [3] AM Hilmy, NA El-Domiaty, K Wershana. Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias Lazera*[J]. Comp Biochem Physiol C, 1987, 86(2): 247-254
- [4] 赵元凤, 祝国芹. 亚硝酸盐对尼罗罗非鱼的毒性及其机理的研究[J]. 大连水产学院学报, 1991, 6(1): 62-65
- [5] 王学明, 吴卫东, 刘福军. Cl-在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 对鲢鱼毒性实验中的拮抗作用的初探[J]. 淡水渔业, 1995, 25(6): 3-5
- [6] 高海英, 王占武, 李洪涛. 养殖水体耐盐高效降亚硝酸盐氮和氨氮芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 河北农业科学, 2008, 12(11): 59-6
- [7] 王昌禄, 隋志文, 武晋海. 亚硝酸盐降解菌的分离及其降解特性[J]. 中国酿造, 2008, 9: 33-36
- [8] 高海英, 王占武, 张翠绵等. 环境因子对净水芽孢杆菌生长及降解氮素活力的影响[J]. 中国生态农业学报 2009, 17(4): 384-386
- [9] 陈树勋, 周国良, 尹安伟. 微生物制剂对水体中亚硝酸盐降解的研究[J]. 科学养鱼 2009, 2: 42
- [10] 尹文林 沈锦玉 沈智华, 等. 枯草芽孢杆菌 B11 5 株对水质改良效果研究[J]. 渔业现代化 2006, 6: 9-20
- [11] 李金亮, 周玲, 赖秋明. 养殖水体中亚硝酸盐氮的降解实验[J]. 中国水产 2009, 6: 53-55
- [12] 杨艳, 刘萍, 马鹏飞, 等. 巨大芽孢杆菌 MPF- 906 对养鱼水质净化的初步研究[J]. 水产养殖, 2007, 28(3): 6-8
- [13] 侯颖, 孙军德, 徐建强, 等. 巨大芽孢杆菌对养殖水体氨氮降解特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37 (4): 607-610
- [14] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册: 第 8 版[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 677-830
- [15] 王振军, 刘玉霞, 刘新涛, 等. 用 16S rDNA 序列分析方法鉴定 4 个拮抗细菌[J]. 河南农业科学, 2006, 5: 59-61
- [16] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. J Bacteriol, 1991, 173(2): 697-703

- [17] 张朋菲. 微生态制剂在水产养殖中的应用[D]. 大连: 大连水产学院, 2001, 5
- [18] 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
- [19] 姚传付. 养鱼慎防亚硝酸盐[J]. 北京水产, 2006, 11(2): 44
- [20] Avnimelech Y, Weber B, Hephher B, et al. Studies in circulated fish ponds: organic matter recycling and nitrogen transformation[J]. Aquac Fish Manag, 1986, 17(13): 231–242
- [21] Kamstra A, Span J A, Van Weerd J H. The acute toxicity and sublethal effects of nitrite on growth and feed utilization of European eel, *Anguilla anguilla*(L.)[J]. Aquac Res, 1996, 27(2): 903–911
- [22] Kroupova H, Machova J, Svobodova Z. Nitrite influence on fish: a review[J]. Vet.Med-Czech. 2005, 50(11): 461–471.
- [23] 高明辉, 马立保, 葛立安, 等. 亚硝酸盐在水生动物体内的吸收机制及蓄积的影响因素[J]. 南方水产, 2008, 4(4): 73–79

Screening, identification, degradation condition and effects of a nitrite-degradating strain

XIONG Yan, LIU Li-yuan, LUO Rui, ZHU Huan

(Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: An efficient, rapid multiplicative, stable and safe nitrite-degradating strain was selected from aquatic water. According to the conventional physiological, biochemical measurement and the 16S rRNA sequence analysis, the strain was identified as *Bacillus megaterium* and named SZ-3. Based on the single-factor optimization tests to the strain, the optimum degradation conditions were found as follows, the optimal pH value is 7, the perfect temperature is 33 °C and the minimum glucose require of degradation is 0.01 mg/L. Under these circumstances, the degradation rate of SZ-3 strain to nitrite came up to 69.58% in 24 h. In breeding test of 100 L polluted water in which the concentration of nitrite is 5 mg/L, the degradation rate of SZ-3 strain on the nitrite achieved at 91.78% for 96 h in 28 °C via adding the pure thalli of SZ-3 which was obtained by centrifugated 1,000ml (1×10⁸ CFU/mL) culture fluid. All of these tests above indicated that the strain can degrade the nitrite in polluted water efficiently. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010,17(6):]

Key words: screening of microorganisms, *Bacillus megaterium*, nitrite; pollution water