

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01066

不同 C:N 条件下一株溶藻弧菌对不同种类氮源的吸收特性

单洪伟¹, 高磊², 马甦¹, 魏大鹏¹, 张家松³

1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 辽宁省海洋水产科学研究院 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023;

3. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300

摘要: 在不同 C:N(5、10、15、20)条件下研究了一株溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)Z5 对单一氮源(有机氮源、NH₄-N、NO₂-N)及混合氮源(有机氮源与 NH₄-N、有机氮源与 NO₂-N、NH₄-N 与 NO₂-N)的吸收利用特性及蛋白酶、谷氨酰胺合成酶(GS)和亚硝酸还原酶(NiR)等 3 种氮代谢相关酶的活力响应。研究表明, 溶藻弧菌 Z5 对有机氮与无机氮的吸收均受到环境中碳含量的影响, 在 C:N=20 时, 对 NH₄-N 和 NO₂-N 的吸收率分别是 C:N=5 时吸收率的 3.39 倍和 2.25 倍。在 C:N=15 和 C:N=20 的水平下, 溶藻弧菌 Z5 对 NH₄-N 和 NO₂-N 的吸收均没有显著性差异($P>0.05$)。溶藻弧菌(Z5)吸收利用 NH₄-N 和 NO₂-N 的途径分别为 NH₄-N→细菌菌体蛋白和 NO₂-N→NH₄-N→细菌菌体蛋白。在高 C:N 条件下, 溶藻弧菌 Z5 对无机氮源(NH₄-N 和 NO₂-N)的吸收增强, 细菌菌体蛋白中来自 NH₄-N 和 NO₂-N 的量分别由 C:N=5 时的 25.0%和 19.4%上升到 C:N=20 时的 41.3%和 43.0%。GS 酶活力受 NH₄-N 调控明显, 相比之下, 蛋白酶和 NiR 酶受氮源种类调控不明显。

关键词: 溶藻弧菌; 氮源; 吸收; 酶调控; C:N

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)05-1066-10

在密度水产养殖中, 水体中氨态氮(NH₄-N)与亚硝态氮(NO₂-N)的大量积累会对养殖动物造成巨大危害, 是影响池塘水质的主要问题^[1-3]。水体中的细菌在调控水质方面起到重要作用, 其可以通过不同的途径, 如同化吸收、硝化/反硝化等减少 NH₄-N 和 NO₂-N 在水体中的积累^[4-5]。细菌吸收利用氮源是一个复杂的过程, 受到水体中碳含量的影响和多种酶的调控。已有研究发现, 向养殖池塘中添加额外碳源能够刺激水体中异养细菌的生长从而减少水体中无机氮(NH₄-N 和 NO₂-N)的积累^[6-7]。蛋白酶(protease)、谷氨酰胺合成酶^[8](glutamine synthetase, GS)和亚硝酸还原酶^[9](nitrite reductase, NiR)是 3 种主要的参与细菌氮代谢的酶, 在细菌吸收氮源过程中起到重要

作用。

有益菌已经在水产养殖实际生产中得到大规模的应用, 在优化养殖环境、促进养殖动物生长、提高养殖动物抗病力等方面效果显著^[10-13]。目前, 水产养殖中常见的有益菌种类包括光合细菌、芽孢杆菌和 EM 菌等。溶藻弧菌属于弧菌科, 弧菌属, 被大多数学者认定为一种病原菌。但是, 其也可作为有益菌应用于水产养殖中, 在促进养殖动物生长、提高抗病力等方面效果显著^[14-17]。但是, 溶藻弧菌作为有益菌对养殖环境水质的影响研究较少。

本实验室前期工作中发现一株能够有效降解水体中 NH₄-N 和 NO₂-N 的菌株, 经中国科学院微生物研究所鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyti-*

收稿日期: 2012-12-29; 修订日期: 2013-04-28.

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2011BAD13B10); 农业部公益性行业科研专项经费资助项目(201103034).

作者简介: 单洪伟(1984-), 男, 博士研究生, 主要从事甲壳类动物增殖研究. E-mail:3306245@163.com

通信作者: 马甦, 教授. E-mail:mashen@ouc.edu.cn

cus)。本实验研究了该株溶藻弧菌 Z5 在不同 C:N(5、10、15、20)条件下, 对单一氮源(有机氮源、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$)及混合氮源(有机氮源与 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、有机氮源与 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 与 $\text{NO}_2\text{-N}$)的吸收利用特性; 以及不同种类氮源(有机氮源、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$)存在的条件下, 溶藻弧菌(Z5)对氮源的吸收利用及蛋白酶、GS 酶和 NiR 酶等 3 种参与细菌氮代谢酶的活力比较。以期深入探讨溶藻弧菌对养殖环境水质的调控作用以及有益菌在调控水质方面的作用机理和功能等研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 细菌培养

实验所用菌株(Z5)筛选自对虾养殖池塘, 经中国科学院微生物研究所鉴定为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。溶藻弧菌(Z5)使用 LB 液体培养基培养, 培养基配置: 1 000 mL 水中, 溶解 30 g 氯化钠、10 g 蛋白胨、5 g 酵母粉, pH 为 7.2~7.6。接种后的细菌在 30℃ 恒温培养箱中的摇床上培养 24 h 后, 离心(3 000 r/min, 5 min)获得菌体, 备用。

1.2 实验设计

1.2.1 不同 C:N 条件下, 溶藻弧菌(Z5)对单一氮源的吸收 葡萄糖作为碳源, 蛋白胨(有机氮源)、 NH_4Cl 和 NaNO_2 分别作为氮源加入到 100 mL 海水中, 通过调节葡萄糖的加入量, 把溶液 C:N 比调为 5、10、15 和 20。海水预先经过滤膜抽滤(Whatman, GF/C)及灭菌(121℃, 20 min)处理。加入溶藻弧菌(Z5)后, 溶液 30℃ 恒温下摇床培养 12 h, 摇床转速为 120 r/min。每隔 3 h 测定溶液的 OD_{600} 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 质量浓度和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度。每个处理设置 3 个重复。

1.2.2 不同 C:N 条件下, 溶藻弧菌(Z5)对混合氮源的吸收 葡萄糖作为碳源, 3 组混合氮源(蛋白胨与 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、蛋白胨与 $^{15}\text{NaNO}_2$ 、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 与 NaNO_2)分别作为氮源加入到 100 mL 海水中, 通过调节葡萄糖的加入量, 把溶液 C:N 比调为 5、10、15 和 20。海水处理同 1.2.1。加入溶藻弧菌(Z5)后, 溶液 30℃ 恒温下摇床培养 12 h, 摇床转速为 120

r/min。12 h 后, 离心收集溶液中的菌体用来测定细菌体内的 ^{15}N 含量。每个处理设置 3 个重复。

1.2.3 溶藻弧菌(Z5)对有机氮源、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 吸收的比较 设置溶液 C:N 为 10:1, 氮源处理组分别为有机氮源(蛋白胨)组、 $\text{NH}_4\text{-N}$ (NH_4Cl)组和 $\text{NO}_2\text{-N}$ (NaNO_2)组。加入溶藻弧菌(Z5)后, 溶液 30℃ 恒温下摇床培养 12 h, 摇床转速为 120 r/min。12 h 后, 测定溶液 OD_{600} 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 质量浓度、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度、总氮(TN)质量浓度以及 GS 酶、NiR 酶和蛋白酶活力。每个处理设置 3 个重复。

1.3 样品分析

1.3.1 OD_{600} 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度和 TN 浓度的测定 采用光电比浊法测定溶液中 OD_{600} 值以表示细菌在溶液中的生长情况^[18]。 $\text{NH}_4\text{-N}$ 质量浓度和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度依照海洋监测规范采用靛酚蓝分光光度法和萘乙二胺分光光度法进行测定^[19]。TN 质量浓度的测定依照文献[20]的方法: 过硫酸钾-硼酸-氢氧化钠作为消化剂, 采用紫外分光光度法测定。

1.3.2 同位素含量的测定 实验结束时, 收集 45 mL 溶液离心(8 000 r/min, 10 min), 去除上清液得到湿菌体后用无菌蒸馏水使菌体再悬浮, 再次离心, 反复两次后, 烘干得到的菌体, 放入-80℃冰箱内保存。利用 Gasbench-IRMS(Delta V advantage), 测出菌体内的 δ 值。代入公式 $\delta(\text{‰}) = (R_{\text{sq}}/R_{\text{st}} - 1) \times 1000$, R_{sq} 为样品中 ^{15}N 与 ^{14}N 的比值, R_{st} 为标准品中 ^{15}N 与 ^{14}N 的比值, 换算出 ^{15}N 含量占菌体总氮的百分比。

1.3.3 酶活力的测定 实验结束时, 收集 45 mL 溶液离心(8 000 r/min, 20 min), 取上清液放入-80℃冰箱中保存用于蛋白酶活力的测定。离心得到的湿菌体加入质量分数为 1% 的 KCl 溶液, 使菌体再悬浮, 再次离心, 得到湿菌体, 放入-80℃冰箱中保存用于 GS 酶活力和 NiR 酶活力测定。

蛋白酶活力的测定按照参考文献[21]中胰蛋白酶的测定方法进行。按照参考文献[22]的方法制备粗酶液用于 GS 酶活力和 NiR 酶活力测定。GS 酶活力和 NiR 酶活力的测定分别按照参考文献[22]和[9]中的方法进行, 其中粗酶液中蛋白浓

度的测定采用考马斯亮蓝法^[23]测定,以牛血清蛋白为标准物。3种酶的活力单位分别定义为:1 min 水解干酪素产生 1 μg 酪氨酸定义为 1 个蛋白酶活力单位,比活力为 U/mg (蛋白)。1 min 催化形成 1 μmol γ -谷氨酰羟肟酸所需要的酶量定义为 1 个 GS 酶活力单位,比活力为 U/mg (蛋白)。1 min 所还原 1 μmol $\text{NO}_2\text{-N}$ 所需要的酶量定义为 1 个 NiR 酶活力单位,比活力为 U/mg (蛋白)。

1.4 数据处理

OD_{600} 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 质量浓度、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度、TN 质量浓度、蛋白酶活力、GS 酶活力和 NiR 酶活力用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) 表示。数据通过 SPSS19.0 进行统计分析,先将数据作单因子方差分析(ANOVA),如果处理组间有显著性差异,再用 Tukey 多重比较法进行两两间差异显著性分析,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同 C:N 条件下,溶藻弧菌(Z5)对单一氮源的吸收

2.1.1 溶藻弧菌(Z5)对有机氮源的吸收 C:N 对细菌在有机氮源中的生长产生显著性影响($P < 0.05$),随着 C:N 的升高,各组中 OD 值升高(图 1a)。12 h 后, C:N 5、C:N 10、C:N 15 和 C:N 20 这 4 组中的 OD 值分别达到 0.22、0.29、0.44 和 0.56,细菌增长率分别为 56.64%、100.40%、204.20% 和 288.11%,各组中细菌的增长率差异显著($P < 0.05$)。C:N 20 组中 OD 值保持上升趋势,其他各组中的 OD 值

在后期保持稳定。

细菌在吸收有机氮源时,会有 $\text{NH}_4\text{-N}$ 生成(图 1b)。12 h 后,各组中的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 质量浓度差异显著($P < 0.05$)。在 C:N 20 组中, $\text{NH}_4\text{-N}$ 质量浓度在 9 h 后有上升的趋势,12 h 达到 2.68 mg/L。在 C:N 5、C:N 10 和 C:N 15 这 3 组中, $\text{NH}_4\text{-N}$ 质量浓度 6 h 之后保持稳定状态,并且 C:N 越高, $\text{NH}_4\text{-N}$ 浓度越小。12 h 后,以上 3 组中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 质量浓度分别为 3.74 mg/L、1.82 mg/L 和 0.60 mg/L。

2.1.2 溶藻弧菌(Z5)对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸收 不同 C:N 条件下,各组中细菌的增长率差异性显著($P < 0.05$) (图 2a)。在 C:N=5、C:N=10 和 C:N=15 组中, OD 值在前 3 h 上升,3 h 之后略微有所下降。在 12 h 之后以上 3 组中的 OD 值为 0.19、0.32 和 0.46,增长率分别为 24.67%、112% 和 206.77%。在 C:N=20 组中, OD 值在 6 h 之后开始略微下降,12 h 之后 OD 值为 0.67,增长率为 344.77%。

C:N 对细菌吸收 $\text{NH}_4\text{-N}$ 有显著性影响($P < 0.05$) (图 2b),高 C:N 有利于细菌对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸收。12 h 后, $\text{NH}_4\text{-N}$ 吸收率最低出现在 C:N=5 组,仅为 29.49%, C:N=10 组中的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 吸收率达到 80.42%。12 h 之后, C:N=15 和 C:N 20 组中的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 被吸收完全,且 $\text{NH}_4\text{-N}$ 吸收速率相似,差异不显著($P > 0.05$)。C:N=20 组中细菌对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的吸收率是 C:N=5 组中的 3.39 倍。

2.1.3 溶藻弧菌(Z5)对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的吸收 C:N 对细菌的增长率有显著性影响($P < 0.05$) (图 3a)。在 C:N=5 组中, OD 值呈下降趋势,在 12 h 之后为

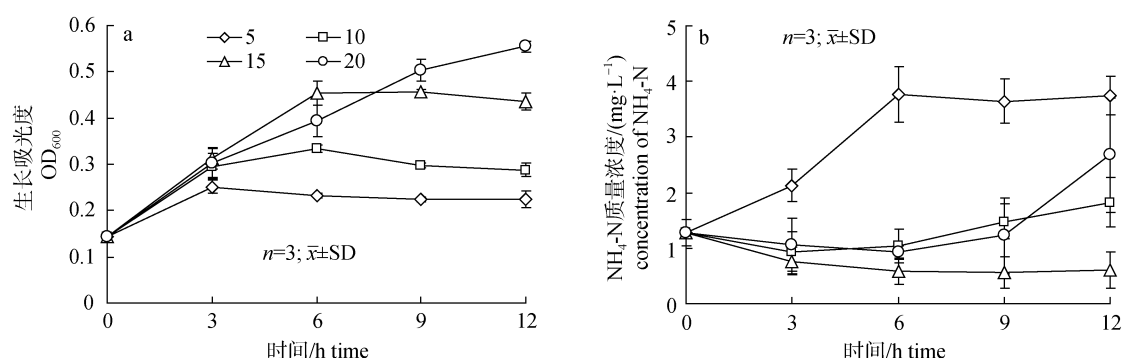


图1 不同 C:N 条件下溶藻弧菌(Z5)在有机氮源中的生长情况(a)和水中 $\text{NH}_4\text{-N}$ 质量浓度(b)变化

Fig.1 The variation of water OD_{600} (a) and $\text{NH}_4\text{-N}$ concentration(b) under different C:N ratios When *Vibrio alginolyticus* (Z5) absorbs organic nitrogen

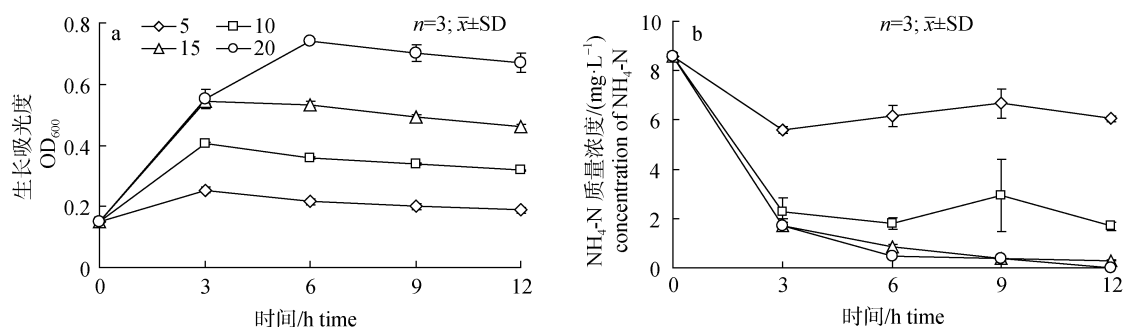


图2 不同 C:N 条件下溶藻弧菌(Z5)在 NH₄-N 中的生长情况(a)和水体中 NH₄-N 浓度(b)变化

Fig.2 The variation of water OD₆₀₀(a) and NH₄-N concentration(b) under different C:N when *Vibrio alginolyticus* absorbs NH₄-N

0.16, 增长率为-29.82%。C:N=10、C:N=15 和 C:N=20 组中 OD 值均有所上升, 12 h 之后 OD 值达到了 0.30、0.49 和 0.59, 增长率分别为 24%、114.91%和 158.77%, 差异显著($P < 0.05$)。此外, 在 C:N 20 组中, OD 值保持着上升的趋势。

细菌吸收 NO₂-N 时, 各组中均有 NH₄-N 生成(图 3b)。在 C:N 5 组中生成的 NH₄-N 质量浓度始终保持着上升趋势, 在 12 h 后达到了 2.19 mg/L。在 C:N 15 和 C:N 20 组中生成的 NH₄-N 浓度较低, 在 3 h 之后保持平稳趋势, 且两组之间 NH₄-N 浓度变化不存在显著性差异($P > 0.05$)。12 h 后, 以上 2 组中的 NH₄-N 质量浓度分别为 0.84 mg/L 和 0.66 mg/L, 差异不显著($P > 0.05$)。C:N 10 组中的 NH₄-N 质量浓度在 6 h 之后开始上升, 12 h 之后达到 1.56 mg/L。

C:N 对细菌吸收 NO₂-N 有显著性影响($P < 0.05$, 图 3c), C:N=20 组中细菌对 NO₂-N 的吸收是 C:N=5 组中的 2.25 倍。各组中 NO₂-N 质量浓度在 3 h 之后开始下降。C:N=5 组中的 NO₂-N 浓度在 6 h 之后稳定, 12 h 之后为 8.00 mg/L, 吸收率为 29.89%。C:N=10 组中的 NO₂-N 浓度 9 h 之后降低缓慢, 12 h 之后达到 5.46 mg/L, 吸收率达到 52.15%。C:N=15 和 C:N=20 在 3 h 之后始终呈直线下降趋势, 12 h 之后达到 3.74 mg/L 和 3.71 mg/L, 吸收率分别为 67.22 和 67.48%, 差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 不同 C:N 条件下, 溶藻弧菌(Z5)对混合氮源的吸收

有机氮源与 ¹⁵NH₄-N 同时存在时(图 4a), 随着 C:N 的升高, 细菌体内的 ¹⁵N 含量逐渐升高,

C:N=5、C:N=10、C:N=15 和 C:N=20 这 4 组中 ¹⁵N 含量所占细菌体内总氮含量的比例分别为 25.09%、36.12%、40.25%和 41.26%。C:N=15 和 C:N=20 组中 ¹⁵N 所占细菌体内总氮含量的比例差异不显著($P > 0.05$)。有机氮源与 ¹⁵NO₂-N 同时存在时(图 4b), 随着 C:N 的升高, 细菌体中的 ¹⁵N 含量逐渐升高, C:N=5、C:N=10、C:N=15 和 C:N=20 组中 ¹⁵N 含量所占细菌体内总氮含量的比例分别为 19.44%、30.20%、36.89%和 43.03%。各组之间差异显著($P < 0.05$)。¹⁵NH₄-N 和 NO₂-N 同时存在时(图 4c), C:N=5 组中 ¹⁵N 元素所占细菌体内总氮含量的比例最高, 达到 57.53%, 与其他 3 组差异显著($P < 0.05$); C:N=10、C:N=15 和 C:N=20 组中 ¹⁵N 元素所占细菌体内总氮含量的比例分别为 49.17%、47.90%和 48.92%, 3 组之间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 溶藻弧菌(Z5)对于不同种类氮源吸收效果的比较

2.3.1 不同氮源组中水体 OD 值和 NH₄-N、NO₂-N 和 TN 质量浓度的变化

有机氮源组和 NH₄-N 组中 OD 值增长最快, 达到 0.27 和 0.28, 增长率分别为 84.25%和 87.67%, 2 组 OD 值变化差异不显著($P > 0.05$, 图 5a)。NO₂-N 组中 OD 为 0.23, 增长率为 56.85%, 低于上述 2 组($P < 0.05$)。NH₄-N 组中 NH₄-N 被细菌所吸收, NH₄-N 浓度下降(图 5b)。有机氮源组和 NO₂-N 组中均有 NH₄-N 的生成。有机氮源组及 NH₄-N 组没有 NO₂-N 生成(图 5c)。NO₂-N 组中 NO₂-N 被吸收, 其质量浓度下降到 1.74 mg/L, 吸收率为 84.83%。各组中 TN 浓度

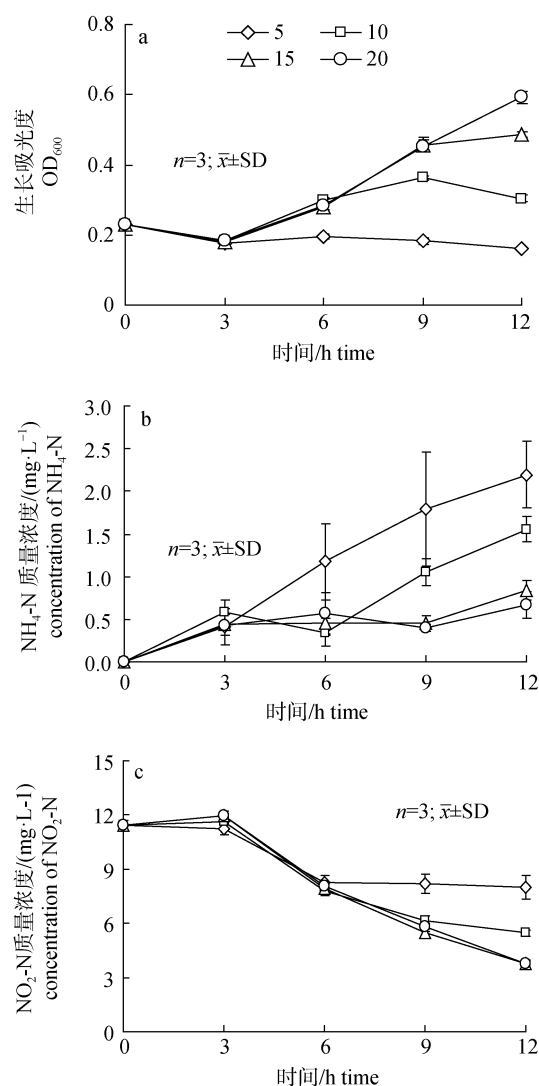


图3 不同 C:N 条件下溶藻弧菌(Z5)生长情况(a)以及水体中 NH₄-N(b)和 NO₂-N 质量浓度(c)变化

Fig.3 The variation of OD₆₀₀(a), NH₄-N concentration (b) and NO₂-N concentration (c) under different C: N ratios when *Vibrio alginolyticus* (Z5) absorbs NO₂-N

在 12 h 前后变化差异不显著($P>0.05$, 图 5d)。

2.3.2 不同氮源组中菌体蛋白酶活力、GS 酶活力和 NiR 酶活力的变化 各氮源组中溶藻弧菌的蛋白酶和 NiR 酶活力没有显著性差异($P>0.05$, 图 6a、图 6c)。有机氮源组中 GS 酶活力为 0.95 U/mg (蛋白), 显著性高于 NO₂-N 组中 GS 酶活力($P<0.05$, 图 6b)。NH₄-N 组中 GS 酶活力达到 0.91 U/mg (蛋白), 与有机氮源组中的 GS 酶活力差异不显著($P>0.05$)。NO₂-N 组中的 GS 酶活力为 0.78 U/mg (蛋白), 显著低于其他 2 组($P<0.05$)。

3 讨论

大多数学者认为弧菌是条件致病菌, 但溶藻弧菌也可被作为有益菌, 应用于水产养殖中。从 1992 年开始, 厄瓜多尔就把溶藻弧菌作为有益菌, 用于对虾育苗过程中, 既缩短了孵化时间, 又提高了虾苗产量。一些学者的研究发现, 溶藻弧菌能够提高养殖动物的成活率和体质量, 降低感染其他弧菌的死亡率^[15-16]。

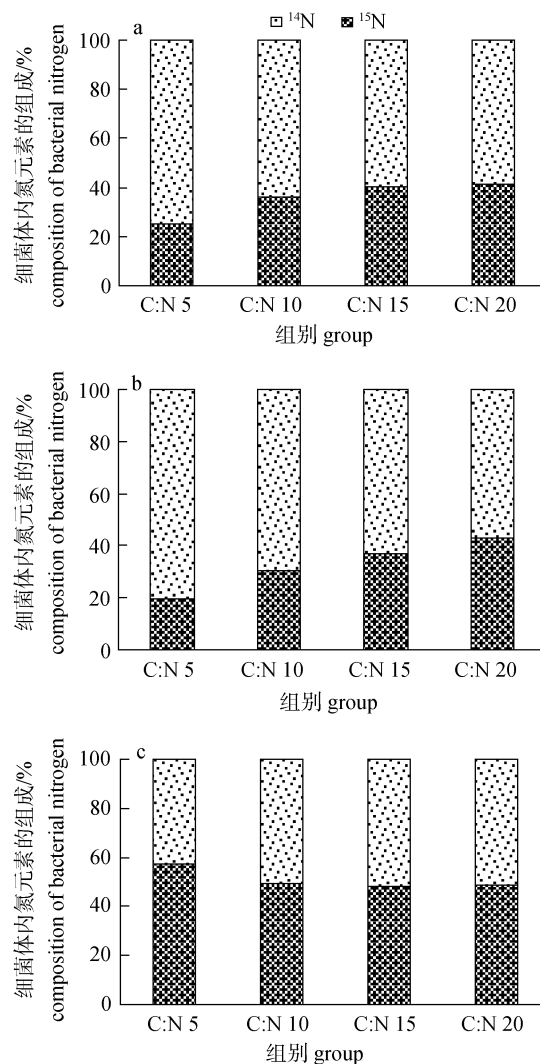


图4 不同 C:N 条件下, 溶藻弧菌(Z5)对混合氮源吸收时菌体内氮元素的组成

a、b 和 c 分别代表细菌对有机氮源与 ¹⁵NH₄-N、有机氮源与 ¹⁵NO₂-N 和 ¹⁵NH₄-N 与 NO₂-N 吸收时菌体内氮元素的组成。n=3

Fig.4 Composition of bacterial nitrogen when *Vibrio alginolyticus* (Z5) absorbs mixed nitrogen under different C:N ratios a, b and c stand for the composition of bacterial nitrogen when bacteria absorbs organic nitrogen+¹⁵NH₄-N, organic nitrogen + ¹⁵NO₂-N, and ¹⁵NH₄-N + NO₂-N, respectively. n=3

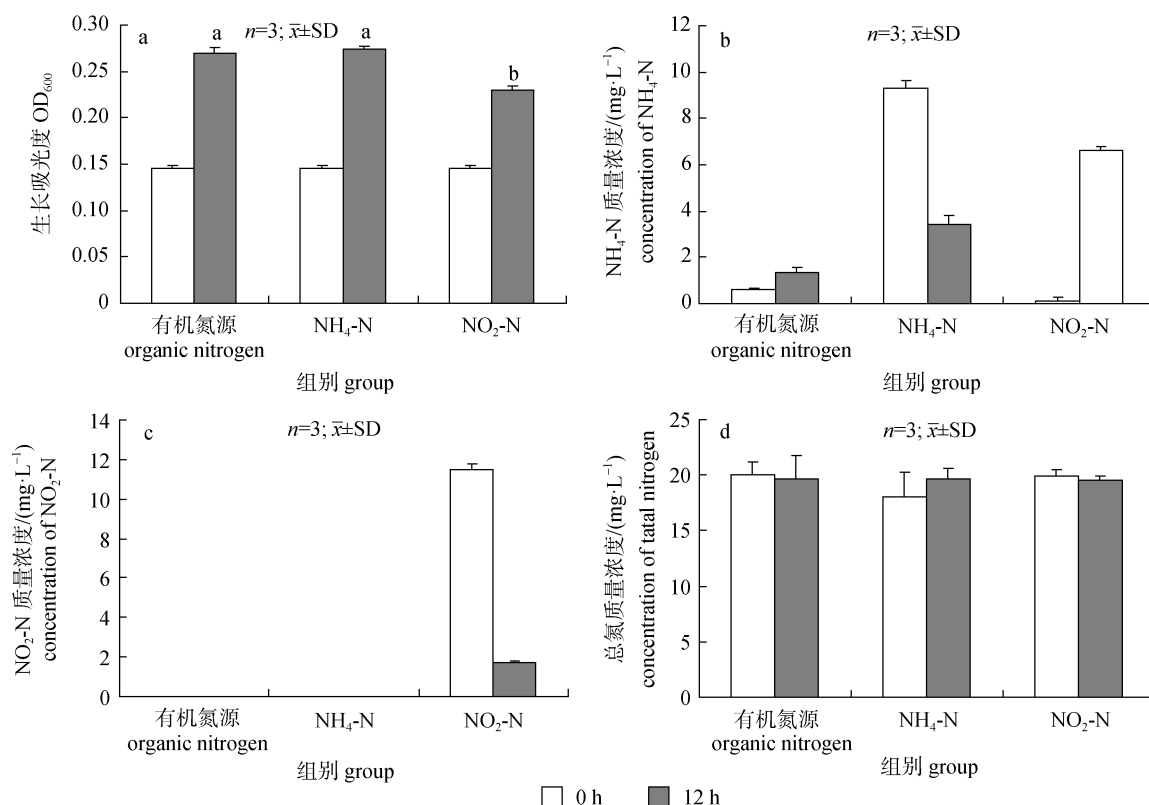


图 5 不同氮源组细菌的生长情况以及水体 NH₄-N、NO₂-N、TN 质量浓度的变化

a、b、c 和 d 分别代表细菌生长吸光度、NH₄-N 质量浓度、NO₂-N 质量浓度和 TN 质量浓度。

Fig.5 The variation of OD₆₀₀, NH₄-N concentration, NO₂-N concentration and total nitrogen (TN) concentration of water in groups with different nitrogen sources

a, b, c, and d stand for the variation of OD₆₀₀, NH₄-N concentration, NO₂-N concentration and TN concentration, respectively.

氮元素是细菌基本组成元素, 为细菌生长所必需。细菌可以通过不同途径吸收利用环境中的不同形式的氮源来满足自身生长需求。细菌具有氨化功能, 能够通过氨化作用将有机氮分解成氨基酸、氨氮^[24]。实验结果表明, 在添加额外碳源的情况下, 氨化作用产生的氨氮被吸收用于细菌生长, 且额外碳源添加量越多, 氨化作用产生的氨氮被吸收利用得越多。因此, 溶藻弧菌(Z5)利用有机氮源的途径可以归纳为 2 种: 首先, 利用胞外酶把有机氮源分解成氨基酸等, 直接利用; 其次, 利用环境中的碳元素与氨化作用产生的氨氮合成菌体蛋白。环境中的碳含量对溶藻弧菌(Z5)吸收有机氮源的影响很大, 在碳含量较低时, 细菌增长缓慢, 利用有机氮源的量不多。本研究结果表明, 溶藻弧菌(Z5)对氨氮的吸收利用主要是利用氨氮合成自身的菌体蛋白; 细菌利用亚硝态氮时, 首先把亚硝态氮转化成氨氮, 而后将转化

的氨氮吸收用于细菌生长。溶藻弧菌(Z5)是否存在其他氮源利用途径有待进一步验证。环境中的碳含量对无机氮源的吸收同样影响很大, 在高 C:N 下, 溶藻弧菌(Z5)对氨氮和亚硝态氮的吸收速率增强, 这与已有研究结果相似。Gao 等^[7]的研究发现, 额外碳源的添加提高了水体中的 C:N 比, 刺激了异养细菌的生长, 因而会减少无机氮的积累。C:N=15 和 C:N=20 组中溶藻弧菌(Z5)对氨氮和亚硝态氮的吸收转化速率基本相同, 表明在 C:N=15 水平下, 碳的含量已经能够满足细菌对这两种氮的吸收所用。

实验结果显示, 菌体氮元素的含量来自 3 种氮源的量由高到低依次为有机氮源、氨氮、亚硝态氮, 因此推测溶藻弧菌(Z5)对不同种类氮源的吸收有所差异。额外碳源的添加能够增强溶藻弧菌(Z5)对无机氮源的吸收。溶藻弧菌(Z5)通过上文所叙述的 2 种途径利用有机氮源, 提高了对有机氮

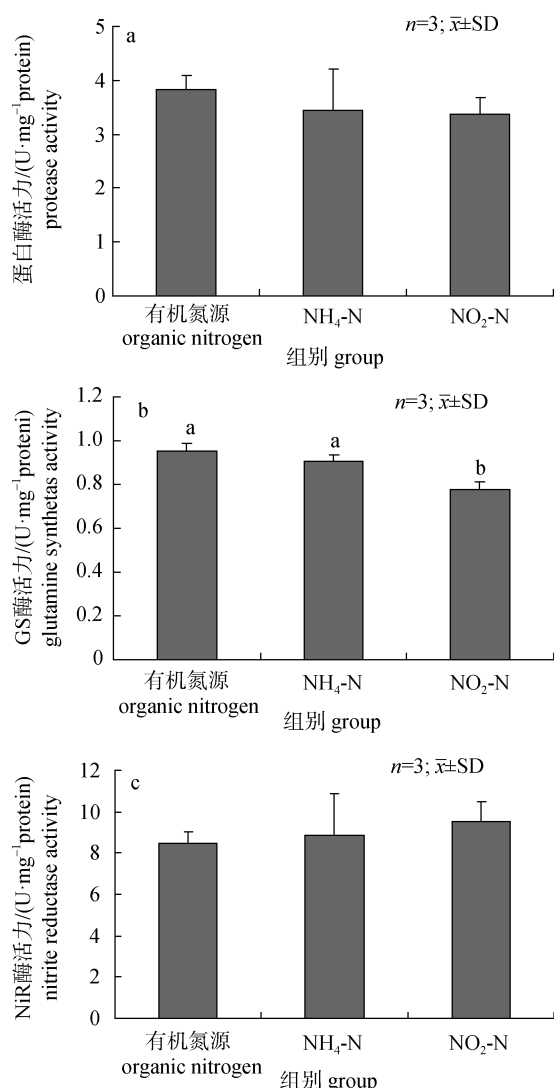


图 6 不同氮源组细菌蛋白酶活力、GS 酶活力和 NiR 酶活力

a, b 和 c 分别代表细菌蛋白酶活力、GS 酶活力和 NiR 酶活力。
柱图上方不同字母表示数据之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig.6 Glutamine synthetase activity, nitrite reductase activity and protease activity of *Vibrio alginolyticus* (Z5) in groups with different nitrogen sources

a, b, and c stand for glutamine synthetase activity, nitrite reductase activity and protease activity, respectively. Data with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

源的利用效率。此外,有机氮源中既包含氮元素,又含有大量的碳元素,所以,相对于无机氮源,菌体吸收利用有机氮源较多。与亚硝态氮相比,溶藻弧菌(Z5)优先利用氨氮,这与 Fisher^[25]的研究结果相似,后者认为其原因如下:(1) 氨氮能够满足细菌快速生长的需求;(2) 在有氨氮存在时,

细菌利用其他氮源的调节机制被抑制;(3) 同利用其他氮源相比,细菌生长利用氨氮的酶(GS 酶)在细菌体内具有高效的催化作用。在氨氮与亚硝态氮同时存在的条件下,溶藻弧菌(Z5)对氨氮的吸收率显著高于对亚硝态氮的吸收率,由于加入的氨氮已经被吸收完全,所以,菌体蛋白中氮元素来自于氨氮的量呈下降趋势(图 4c)。

芽孢杆菌是应用在水产养殖中最常用的有益菌,一些菌株具有反硝化的能力,种类包括坚硬芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)^[26]、软化芽孢杆菌(*B. macerans*)^[27]、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)^[28]、凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)^[29]和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)^[30]等。由于芽孢杆菌种类不同,利用氮的途径也不同。Xiao 等^[30]的研究发现,枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* AYC)去除氨氮的途径为 $\text{NH}_4\text{-N} \rightarrow \text{NO}_2\text{-N} \rightarrow \text{NO}_3\text{-N} \rightarrow \text{NO}_2\text{-N} \rightarrow \text{N}_2$ 。Schirawski 等^[27]的研究发现,软化芽孢杆菌(*B. macerans*)能够把亚硝态氮和硝态氮反硝化成氨氮。此外,在有氧条件下芽孢杆菌也能够直接把氨氮转化成 N_2 ,并且不会有 N_2O 生成^[31]。溶藻弧菌(Z5)同样也具有反硝化的功能,能够把 $\text{NO}_2\text{-N}$ 反硝化成 $\text{NH}_4\text{-N}$ 。在研究中发现,溶藻弧菌(Z5)吸收利用氮源的过程中没有 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的生成(数据未列出),同时,水体中的总氮浓度没有发生变化,只是细菌密度增加。因此,推断溶藻弧菌(Z5)利用氨氮的途径可能是 $\text{NH}_4\text{-N} \rightarrow$ 细菌菌体蛋白,利用亚硝态氮的途径可能是 $\text{NO}_2\text{-N} \rightarrow \text{NH}_4\text{-N} \rightarrow$ 细菌菌体蛋白。

实验结果可以看出,当氨氮被细菌大量吸收时,GS 酶的活力较高,说明 GS 酶在溶藻弧菌(Z5)吸收氨氮过程中调控作用明显。GS 酶是氨氮吸收过程中的关键酶,它催化谷氨酸盐的形成,在细菌体内,这是形成谷氨酸盐的唯一途径^[25]。已有研究也发现,GS 酶的合成和活力受到环境氮元素调控,当细菌的生长受到氮元素限制的时候,其活力必会加强以确保细菌体内有足够的谷氨酸盐存在^[32]。相比之下,蛋白酶和 NiR 酶受氮源调控不明显,这可能与细菌体内存在的分解代谢阻碍作用有关。Wacker 等^[33]研究芽孢杆菌(*B. subtilis*)时发现,其优先利用葡萄糖和谷氨酸盐作为

碳源和氮源, 如果环境中存在这 2 种物质, 细菌体内利用其他碳源与氮源的酶的表达就会受抑制。

综上所述, 溶藻弧菌(Z5)吸收有机氮源与无机氮源都受到环境中碳含量的影响, 当碳含量高时能够增强细菌对有机氮源和无机氮源的吸收。溶藻弧菌(Z5)在 C:N 15 的水平下, 碳含量已经可以满足细菌对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 吸收的需求。溶藻弧菌(Z5)利用 $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的途径可能为 $\text{NH}_4\text{-N} \rightarrow$ 细菌菌体蛋白和 $\text{NO}_2\text{-N} \rightarrow \text{NH}_4\text{-N} \rightarrow$ 细菌菌体蛋白。GS 酶活力受 $\text{NH}_4\text{-N}$ 调控明显, 相比之下, 蛋白酶和 NiR 酶受氮元素种类调控不明显。以上研究结果初步阐明了不同 C:N 条件下溶藻弧菌(Z5)对不同种类氮源的吸收特性, 关于不同 C:N 条件下菌体内蛋白酶、GS 酶和 NiR 酶活力的变化以及溶藻弧菌(Z5)的致病性等有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] Colt J E, Armstrong D A. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish and molluscs[C]//Allen L J, Kinney E C. Proceedings of the bio-engineering symposium for fish culture. Bethesda, MD: Fish Culture Section of the American Fisheries Society, 1981: 34–47.
- [2] 孙国铭, 汤建华, 仲霞铭. 氨氮和亚硝酸氮对南美白对虾的毒性研究[J]. 水产养殖, 2002, 1: 22–24.
- [3] 王彦波, 许梓荣, 邓岳松. 水产养殖中氨态和亚硝酸盐氮的危害及治理[J]. 饲料工业, 2002, 23(12): 46–48.
- [4] Ebeling J M, Timmons M B, Bisogni J J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems[J]. Aquaculture, 2006, 257: 346–358.
- [5] Khin T, Annachhatre A P. Novel microbial nitrogen removal processes[J]. Biotechnol Adv, 2004, 22: 519–532.
- [6] Avnimelech Y. C/N ratio as a control element in aquaculture systems[J]. Aquaculture, 1999, 176: 227–235.
- [7] Gao L, Shan H W, Zhang T W, et al. Effects of carbohydrate addition on *Litopenaeus vannamei* intensive culture in a zero-water exchange system[J]. Aquaculture, 2012, 342–343: 89–96.
- [8] Eisenberg D, Gill H S, Pfluegl G M, et al. Structure-function relationships of glutamine synthetases[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1477: 122–145.
- [9] Martínez-Espinosa R M, Marhuenda-Egea F C, Bonete M J. Purification and characterisation of a possible assimilatory nitrite reductase from the halophile archaeon *Haloferax mediterranei*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 196: 113–118.
- [10] Ziaei-Nejad S, Rezaei M H, Takami G A, et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. Aquaculture, 2006, 252: 516–524.
- [11] Wang Y B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2007, 269: 259–264.
- [12] Wang Y, He Z. Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds [J]. Aquaculture, 2009, 287: 94–97.
- [13] 刘忠颖, 刘洋, 鲍相渤, 等. 水产养殖益生菌的研究进展[J]. 水产科学, 2010, 29(8): 500–504.
- [14] Austin B, Stuckey L F, Robertson P A W, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*[J]. J Fish Dis, 1995, 18: 93–96.
- [15] Garriques D, Arevalo G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador[C]//Browdy C L, Hopkins J S. Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Prawn Farming, Aquaculture'95. Baton Rouge: World Aquaculture Society, 1995: 53–59.
- [16] Gatesoupe F J. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*[J]. Aquat Liv Res, 1997, 10: 239–246.
- [17] 孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异免疫基因表达量和抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43 (4): 845–851.
- [18] 陈金春, 陈国强. 微生物学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2005: 36–38.
- [19] 中华人民共和国国家标准, 海洋监测规范, GB 17378.4-2007 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [20] 邢殿楼, 霍堂斌, 吴会民, 等. 总磷、总氮联合消化的测定方法[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(3): 220–225.

- [21] 潘鲁青, 王克行. 中华绒螯蟹幼体消化酶活力与氨基酸组成的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(2): 13–20.
- [22] 刘川顺, 李平, 李键. 谷氨酰胺合成酶产酶菌株的筛选及酶学性质[J]. 农产品加工学刊, 2010, 7: 4–7.
- [23] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248–254.
- [24] 李辉, 徐新阳, 李培军, 等. 人工湿地中氨化细菌去除有机氮的效果[J]. 环境工程学报, 2008, 2(8): 1044–1047.
- [25] Fisher S H. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! [J] Mol Microbiol, 1999, 32(2): 223–232.
- [26] Urata K, Satoh T. Enzyme localization and orientation of the active site of dissimilatory nitrite reductase from *Bacillus firmus*[J]. Arch Microbiol, 1991, 156: 24–27.
- [27] Schirawski J, Uden G. Anaerobic respiration of *Bacillus macerans* with fumarate, TMAO, nitrate and nitrite and regulation of the pathways by oxygen and nitrate[J]. Arch Microbiol, 1995, 163: 148–154.
- [28] 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.
- [29] 安建, 宋增福, 杨先乐, 等. 好氧反硝化芽孢杆菌筛选及其反硝化特性[J]. 环境科学研究, 2010, 23(1): 100–105.
- [30] Xiao J J, Zhu C X, Sun D Y, et al. Removal of ammonium-N from ammonium-rich sewage using an immobilized *Bacillus subtilis* AYC bioreactor system[J]. J Environ Sci, 2011, 23(8): 1279–1285.
- [31] Kim J K, Park K J, Cho K S, et al. Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic *Bacillus strains*[J]. Biores Technol, 2005, 96 (17): 1897–1906.
- [32] Reitzer L J. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine[C]// Neidhardt F C, Curtiss III R, Ingraham J L, et al. *Escherichia coli* and Salmonella: Cellular and molecular biology. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1996: 391–407.
- [33] Wacker I, Ludwig H, Reif I, et al. The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA[J]. Microbiology, 2003, 149 (10): 3001–3009.

Nitrogen source assimilation of a *Vibrio alginolyticus* strain under different C/N ratios

SHAN Hongwei¹, GAO Lei², MA Shen¹, WEI Dapeng¹, ZHANG Jiasong³

1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003, China;

2. Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology, Liaoning Ocean and Fishery Science Institute, Dalian 116023, China;

3. Key Laboratory of South China Sea Fishery Researches Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China

Abstract: Nitrogen assimilation characteristics of a *Vibrio alginolyticus* strain (Z5) were investigated under both single (organic nitrogen, $\text{NH}_4\text{-N}$, or $\text{NO}_2\text{-N}$) and mixed nitrogen sources (organic nitrogen and $\text{NH}_4\text{-N}$, organic nitrogen and $\text{NH}_4\text{-N}$, or $\text{NH}_4\text{-N}$, and $\text{NO}_2\text{-N}$) at C/N ratios of 5, 10, 15, and 20 respectively. Activity of protease, glutamine synthetase, and nitrite reductase, which are all involved in nitrogen metabolism, was also determined. The results showed that both organic and inorganic nitrogen assimilation rates of *V. alginolyticus* were affected by C/N ratio. $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ assimilation rates under a C/N ratio of 20 were 3.39 and 2.25 times higher, respectively, than those under a C/N ratio of 5. There were no significant differences in the assimilation of $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ between C/N ratios of 15 and 20 ($P>0.05$). The $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ assimilation processes may be $\text{NH}_4\text{-N}\rightarrow\text{bacterial protein}$ and $\text{NO}_2\text{-N}\rightarrow\text{NH}_4\text{-N}\rightarrow\text{bacterial protein}$, respectively. Inorganic nitrogen ($\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$) assimilation rates increased with higher C/N; the protein nitrogen content of the bacteria enriched from $\text{NH}_4\text{-N}$ and $\text{NO}_2\text{-N}$ increased from 25.0% and 19.4% under a C/N of 5 to 41.3% and 43.0% under a C/N of 20, respectively. In addition, glutamine synthetase activity was significantly regulated by $\text{NH}_4\text{-N}$ while protease and NiR activity were not regulated significantly by the nitrogen species.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; nitrogen source; assimilation; enzyme regulating; C:N ratio

Corresponding author: MA Shen. E-mail: mashen@ouc.edu.cn