

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16252

一株高效脱氮菌株的分离鉴定及应用潜力分析

张家顺, 吕娜, 田长城, 李贇, 潘鲁青

中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要: 为了获得对虾养殖池塘中高效去除亚硝态氮和氨氮的菌株, 采用富集培养分离的方法, 从养殖水体中筛选得到 1 株去除亚硝态氮和氨氮的菌株, 培养 24 h 后的去除率分别为 96.17% 和 88.27%, 编号为 O-11。基于形态学、分子生物学及生理生化鉴定结果, 明确了该菌株基本生物学特征以及可能的分类地位。分离菌株在 20~30℃ 时有利于亚硝态氮的去除, 而温度为 20~35℃ 时对氨氮的去除效果较好; 分离菌株在盐度小于 30 的环境中对亚硝态氮的去除能力受盐度变化的影响不大; 在碱性环境中分离菌株对氨氮的去除能力较高。安全性检验可知, 在菌浓度为 $10^5 \sim 10^8$ cfu/mL 的菌株 O-11 对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是安全的, 且在菌浓度为 10^5 cfu/mL 时能显著提高对虾的存活率, 促进对虾生长。这说明, 分离菌株 O-11 在水产养殖水体中有害氮脱除方面具有潜在的应用价值。

关键词: 亚硝态氮; 氨氮; 分离鉴定; 海单胞菌; 应用潜力; 对虾养殖池

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0757-09

伴随对虾集约化养殖模式的快速发展, 高密度养殖残饵及养殖动物排泄物等成为养殖水体的主要污染源。所投放饵料中的氮、磷分别仅有 9.1% 和 17.4% 能被养殖动物同化利用, 积累的残饵比例相当高^[1-2]。这些污染物分解产生的亚硝态氮和氨氮是养殖水体中危害最为严重的成分之一^[3]。亚硝态氮危害主要是与血红素结合形成高铁血红素, 影响血液运载氧气的能力, 从而造成鱼、虾等养殖动物的慢性中毒甚至死亡^[4-7]。氨氮能够引起养殖动物体内酶的活力丧失、免疫力下降、机体代谢功能失调等, 从而影响养殖动物生长, 甚至导致死亡^[8]。因此, 水体中亚硝态氮和氨氮浓度的有效控制技术是养殖业的迫切要求。

研究发现, 微生物能有效去除养殖水体中的亚硝态氮和氨氮^[9], 并以无毒副作用、无药物残留、不污染环境等特点备受关注。目前报道的有关去除亚硝态氮或氨氮的微生物主要有假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、

副球菌属(*Paracoccus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、硝化细菌(nitrifying bacteria)等^[10], 并均在水产养殖中取得了一定的应用效果。

为了获得对虾养殖池塘中高效去除亚硝态氮和氨氮的微生物, 本研究采集对虾养殖池塘水样, 通过富集和分离筛选, 获得 1 株去除效果较好的菌株, 在对该菌株进行鉴定的基础上, 研究了环境因素(温度、盐度和 pH)对菌株去除能力的影响, 并进行了对筛选菌株凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的安全性检验, 以期开发水质调控剂提供备选菌株和理论支持。

1 材料与方法

1.1 水样的采集

用于分离细菌的水样于 2014 年 8 月在山东省日照市对虾养殖池塘中用采水器在养殖池塘水深 50 cm 处采集, 采集的水样低温运回实验室。水质指标的检测结果见表 1。

收稿日期: 2016-09-07; 修订日期: 2017-01-17.

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项课题(201305005).

作者简介: 张家顺(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水生生物生态学. E-mail: zjs1989370@126.com

通信作者: 李贇, 教授. Tel: 0532-82032649; E-mail: sxsdlwl@ouc.edu.cn

表 1 养殖池塘水质指标
Tab. 1 Water quality indicators of poly-culture ponds

养殖池塘 aquaculture ponds	温度/℃ temperature	盐度 salinity	pH	亚硝态氮/(mg·L ⁻¹) nitrite nitrogen	氨氮/(mg·L ⁻¹) ammonia nitrogen	溶氧/(mg·L ⁻¹) dissolved oxygen
1	24	29	7.91	0.165	0.456	6.19
2	26	30	8.42	0.124	0.349	6.28

1.2 菌株的富集与分离

为富集亚硝态氮菌株,将采集的水样按 10% (v/v)的比例加入盛有富集培养基的锥形瓶中,在 25℃、180 r/min 条件下震荡培养 24 h 后,为强化富集效果,按 10%(v/v)的比例向培养液中再加入新鲜的亚硝态氮富集培养基,如此富集 3 次以淘汰不能利用亚硝态氮的菌株。富集培养基成分包括: C₆H₁₂O₆ 5.0 g, NaNO₂ 0.25 g, Fe₃PO₄·4H₂O 0.01 g, CH₃COONa 4.8 g, K₂HPO₄·3H₂O 1.2 g, 抽滤海水 1000 mL(盐度为 30, 海水经孔径为 0.45 μm 混合膜用隔膜真空泵抽滤),调 pH 为 7.5。115℃ 下高压蒸汽灭菌 30 min。

将富集液进行梯度稀释后,取稀释倍数为 10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 的富集培养液各 100 μL 分别涂布到亚硝态氮分离培养基上(分离培养基为富集培养基中加 1.5%~2%的琼脂制成),进行菌株的分离纯化,并在-80℃ 条件下甘油保种。

1.3 菌株的筛选

本研究以菌株对亚硝态氮和氨氮的综合去除效果为筛选指标。将上述分离获得的菌株活化培养 24 h,调整各菌株浓度使其在 3×10⁸ cfu/mL 左右。培养菌液按 1%(v/v)的比例分别接种到亚硝态氮筛选培养基(将 NaNO₂ 含量调整为 0.05 g 富集培养基)和氨氮筛选培养基(培养基成分为 (NH₄)₂SO₄ 0.25 g, 葡萄糖 5.0 g, K₂HPO₄ 1.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 抽滤海水 1000 mL, 并调 pH 为 7.5)中, 25℃、180 r/min 培养 24 h 后离心取上清液,分别测定上清液的亚硝态氮浓度和氨氮浓度,计算亚硝态氮和氨氮的去除率。

亚硝态氮浓度采用萘乙二胺分光光度法 (GB17378.4-2007)^[10]测定,氨氮浓度采用次溴酸盐氧化法(GB17378.4-2007)^[11]测定。亚硝态氮和氨氮的去除率分别以如下公式计算:

亚硝态氮去除率(%)=(未接种菌筛选培养基

亚硝态氮浓度(mg/L)-接种菌筛选培养基亚硝态氮浓度(mg/L))/未接种菌筛选培养基亚硝态氮浓度(mg/L)×100%

氨氮去除率(%)=(未接种菌筛选培养基氨氮浓度(mg/L)-接种菌筛选培养基氨氮浓度(mg/L))/未接种菌筛选培养基氨氮浓度(mg/L)×100%

1.4 菌株的鉴定

菌株的鉴定综合采用形态学特征观察、16S rDNA 序列分析以及生理生化特征实验进行。

菌落形态学特征观察参考陶天申等^[12]进行。将筛选菌株稀释后涂布到 2216E 琼脂培养基中, 25℃ 培养,待长出单个菌落后进行革兰氏染色并用肉眼观察菌落形状、大小、颜色、透明度、质地等特征。

为获得菌株的 16S rDNA 序列,参考闫法军^[13]水煮法提取细菌基因组 DNA,PCR 扩增 16S rDNA 部分片段。扩增 16S rDNA 序列所使用的引物为细菌通用引物^[13],正向引物为(27F): 5'-AG-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为(149-2R): 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。25 μL 的 PCR 反应体系包括,模板 DNA 2 μL,正向和反向引物各 1 μL, 2MasterMiX 12.5 μL,超纯水 8.5 μL。PCR 反应条件为,94℃ 解链 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s 和 72℃ 1 min,循环 30 次; 72℃ 延伸 5 min。扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,扩增产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司直接进行测序,测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析,使用 MEGA5.2 软件并采用 Neighbor-joining 法(邻位相连法)进行系统发育树分析,以确定菌株分类地位。

菌株的生理生化特征检测方法参照《伯杰细菌鉴定手册》^[14]和《常见细菌系统鉴定手册》^[15]进行。用于生理生化特征检测的指标主要包括葡萄糖氧化发酵实验、接触酶实验、甲基红实验

(M.R)、V-P 实验、淀粉水解实验、产氨实验、明胶液化实验、耐盐性实验、硝酸盐还原实验、亚硝酸盐还原实验和脲酶实验。

1.5 温度、盐度和 pH 对筛选菌株亚硝态氮和氨氮去除效率的影响

实验所选择的影响因子分别为温度、盐度和 pH^[16]，每个处理 3 个重复。菌株培养及亚硝态氮和氨氮的测定方法同 1.3。

实验中除设定的单一因子外，其他实验条件分别为：温度 25℃，盐度 30，pH 7.5 以及恒温摇床转速 180 r/min。各因子设置的梯度如下：

- 1) 温度：15℃、20℃、25℃、35℃、35℃、40℃(通过台式全温振荡器控制)
- 2) 盐度：10、15、20、25、30、35、40(通过加超纯水或氯化钠控制)
- 3) pH：6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0(通过盐酸和氢氧化钠调节)

1.6 筛选菌株对凡纳滨对虾的安全性检验

实验所用凡纳滨对虾于 2015 年 10 月购于山东省青岛市崂山区沙子口对虾养殖厂，对虾体色正常，健康活泼。暂养 5 d，体重(9.22±1.12) g，温度(18±1)℃，盐度(32±1)，pH 7.69±0.23，日换水一次，每次全部换水，并连续充气，每天分 3 次投喂一定量对虾配合饲料。

本实验所采用的方法是浸浴法，菌株浸染浓度设置为 0、10⁵ cfu/mL 和 10⁸ cfu/mL，所有实验组设 3 个平行。每个平行随机选取暂养后的凡纳

滨对虾 20 尾放在 50 cm×40 cm×30 cm 的塑料水箱内，实验期间的管理与暂养期间的相同，每次换水后添加相应的细菌至所设定的浓度，实验连续进行 21 d。

实验开始后每天观察凡纳滨对虾的存活情况，计算第 7 天凡纳滨对虾的存活率。

存活率=终末对虾尾数/初始对虾尾数×100%

在实验的第 21 天分别称量每个水箱中的对虾总体重，计算增重率、特定生长率，分析菌株对凡纳滨对虾生长的影响。

增重率(WG)=(终末体重-初始体重)/初始体重×100%

特定增长率(SGR)=(终末体重-初始体重)/21×100%

1.7 数据处理

上述对比实验，每组重复 3 次，所有数据均使用 Excel 2010 和 SPSS 17.0 软件进行计算、作图和统计分析。采用单因素方差分析(ANVOA)和 Duncan 多重比较的方法对数据进行统计分析，差异显著水平以 $P<0.05$ 为衡量标准。所以数据采用平均值±标准误($\bar{x}\pm SE$)的形式表示。

2 结果与分析

2.1 菌株 O-11 的分离与筛选

从采集的水样中分离出 16 株可去除亚硝态氮的菌株，去除率最高为 96.17%，最低仅有 28.29%(表 2)。分别将分离菌株编号为 O-1 至

表 2 筛选菌株对亚硝态氮和氨氮的去除率
Tab. 2 The nitrite and ammonia degradation rate of screening strains

n=3; $\bar{X}\pm SE$; %

菌株编号 strain number	亚硝态氮去除率 nitrite degradation rate	氨氮去除率 ammonia degradation rate	菌株编号 strain number	亚硝态氮去除率 nitrite degradation rate	氨氮去除率 ammonia degradation rate
O-1	84.42±3.57	90.23±2.47	O-9	80.54±2.52	76.76±2.84
O-2	94.55±2.85	64.17±1.80	O-10	20.33±4.54	86.47±5.17
O-3	84.41±1.28	72.56±4.12	O-11	96.17±2.4	88.27±2.14
O-4	73.74±1.21	72.70±8.16	O-12	6.63±0.17	95.38±1.66
O-5	0.48±3.89	82.04±4.32	O-13	71.11±2.72	88.07±3.59
O-6	95.91±1.55	30.32±3.19	O-14	93.87±4.71	94.90±1.14
O-7	90.63±3.47	86.47±5.17	O-15	84.24±4.69	84.24±4.84
O-8	96.03±2.23	70.97±1.41	O-16	91.08±2.43	42.30±3.47

O-16。同时比较分离菌株氨氮的去除能力,结果发现,菌株 O-11 对 2 种有毒氮的去除率均最高,当亚硝态氮浓度为 10.0 mg/L 时,其亚硝态氮去除率为 96.17%,当氨氮浓度为 50.0 mg/L 时,其氨氮去除率为 88.27%。随后对菌株 O-11 进行了鉴定。

2.2 菌株 O-11 的鉴定

2.2.1 形态学特征 经在 2216E 琼脂培养基上培养 24 h 后,可观察到菌株 O-11 形成圆形小菌落,菌落边缘整齐,表面呈淡黄色,不透明,水润且平坦。革兰氏染色表明菌株 O-11 显示为阴性。

2.2.2 16S rDNA 序列分析 经基因扩增后获得大小为 1204 bp 的 16S rDNA 基因序列,测序完成后,将获得的序列信息在 NCBI 数据库进行相似性搜索,选取与 16S rDNA 基因序列相似度在

94%以上共 8 株菌株的基因序列,与菌株 O-11 的测定序列进行系统发育树分析,以菌株 *Bacillus korlensis* strain V5.8(登录号: KT720281.1)的相应序列作为外类群。结果显示,菌株 O-11 与普遍海单胞菌(*Marinomonas communis* strain AN32, 登录号: JQ409376.1)在同一分支上,相似性达 96%。

2.2.3 生理生化特征检测 菌株 O-11 的生理生化特征分析结果如表 3 所示。结果显示,菌株 O-11 具有很强的耐盐性,葡萄糖氧化发酵、硝酸盐还原以及接触酶试验结果均显示为阳性,而脲酶、亚硝酸盐还原及产氨试验等为阴性。基于《伯杰细菌鉴定手册》^[14]、《常见细菌系统鉴定手册》^[15]和 Noguera 等^[17]的聚类标准,菌株 O-11 与普遍海单胞菌(*Marinomonas communis* strain)的亲缘关系最近。

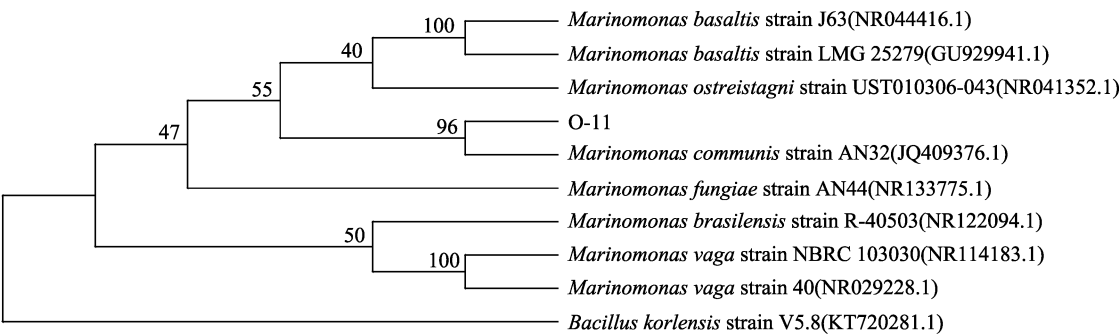


图 1 菌株 O-11 与其相关菌株的 16S rDNA 基因序列的系统发育树分析
节点数字表示 1000 次重复抽样检测的 bootstrap.

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences of strain O-11 and other related strains using Neighbor-joining method
Numbers on the nodes indicate bootstrap value of 1000 repeats.

表 3 菌株 O-11 的生理生化特征
Tab. 3 Physio-biochemical characteristics of strain O-11

项目 item	O-11	项目 item	O-11
接触酶 catalase	(+)	2%耐盐性 salt tolerance of 2%	+
脲酶 urease	-	5%耐盐性 salt tolerance of 5%	+
M.R 实验 M.R test	-	7%耐盐性 salt tolerance of 7%	+
V-P 实验 V-P test	-	10%耐盐性 salt tolerance of 10%	+
亚硝酸盐还原 griess test	-	淀粉水解 amylolhydrolysis	-
产氨试验 production of ammonia test	-	硝酸盐还原 nitrate reduction test	+
明胶液化 liquefaction of gelatin	-	葡萄糖氧化发酵 oxidation and fermentation of glucose	+

注:“+”代表阳性;“-”代表阴性;“(+)”表示轻微。
Note: “+” means positive; “-” means negative; “(+)” means slight.

2.3 环境因素对菌株 O-11 去除亚硝态氮和氨氮能力的影响

2.3.1 温度 基于 15~40℃ 范围,比较温度对分离菌株 2 种氮源去除能力的影响。结果显示(图 2),分离菌株在 25℃ 时,对亚硝态氮和氨氮均具有最高的去除能力,去除率分别为 99.13% 和 86.39%。当温度低于 25℃ 时,菌株的去除能力随温度的升高而增强,但高于 25℃ 时,对 2 种氮源的去除能力均逐渐减弱。在温度 20~30℃ 时,菌株对亚硝态氮和氨氮的去除率都在 70% 以上。

相比而言,高温对菌株去除亚硝态氮的能力影响较大,如温度在 35℃ 时,去除率仅为 47.47%,而此时菌株对氨氮的去除率仍高达 68.14%,与 30℃ 时的去除能力差异不显著($P<0.05$)。综合实验

结果, 分离菌株去除亚硝态氮的最适温度范围是 20~30℃, 去除氨氮的最适温度为 20~35℃。

2.3.2 盐度 盐度对菌株去除亚硝态氮的影响不大(图 3a), 如盐度为 30 时, 亚硝态氮去除率达到最大值 99.13%;当盐度小于 30 时, 亚硝态氮的去除率均在 83.26%以上;当盐度大于 30 时, 菌株对亚硝态氮的去除效果显著下降($P<0.05$), 去除率仍可维持在 70%左右。

但盐度对该菌株去除氨氮的影响相对较大, 当盐度小于 30 时, 随着盐度的升高去除率逐渐增大(图 3b), 当盐度在 30 时, 去除率达到最大值, 为 81.98%, 之后便显著下降, 如盐度 35 时, 其氨氮去除率仅与盐度 20 时的相似。结果表明, 该菌株去除氨氮的最适盐度仅在 30 左右。

2.3.3 pH 当 pH 为 7.5 时, 菌株对亚硝态氮的去除率达到最大值 99.13%, 之后随着 pH 的升高,

亚硝态氮去除率呈现阶梯型降低(图 4a), 且差异显著, 而低于 7.5 时, 其去除率不足 50%。结果显示, pH 对菌株去除亚硝态氮的影响相当大, 其优化 pH 为 7.5。

而菌株对氨氮的去除受 pH 的影响相对较小, 如当 pH 小于 8.5 时, 随着 pH 的升高, 氨氮去除率逐渐升高(图 4b), 在 pH 为 8.5 时达到最大值 92.00%, 且与 pH 为 8.0 时差异不显著($P>0.05$), 而当 pH 为 9.0 时, 其去除率不足 70%, 与 pH 为 8.5 时的去除率差异显著($P<0.05$)。结果显示, 分离菌株氨氮去除的优化 pH 为 8.5。

2.4 菌株 O-11 对凡纳滨对虾存活率和生长的影响

2.4.1 对凡纳滨对虾存活的影响 通过向凡纳滨对虾养殖池内添加不同浓度的菌株, 养殖 7 d 后, 与未加菌株的对照组相比, 当菌株浓度为 10^5 cfu/mL 时, 能够显著提高对虾存活率($P<0.05$)(表 4), 而

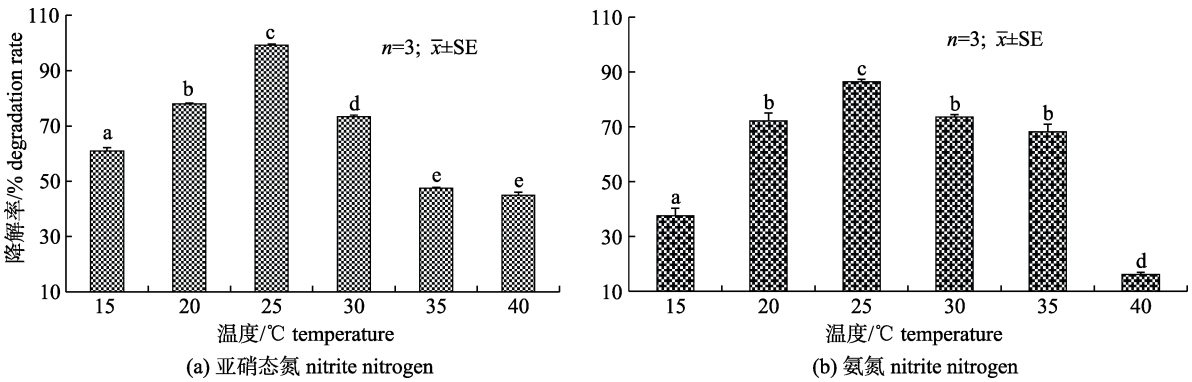


图 2 温度对菌株 O-11 去除亚硝态氮(a)和氨氮(b)能力的影响
柱上不同字母表示温度组间差异显著($P<0.05$).
Fig. 2 Effect of temperature on the degradation ability of strain O-11
Values with different letters mean significant difference between groups ($P<0.05$).

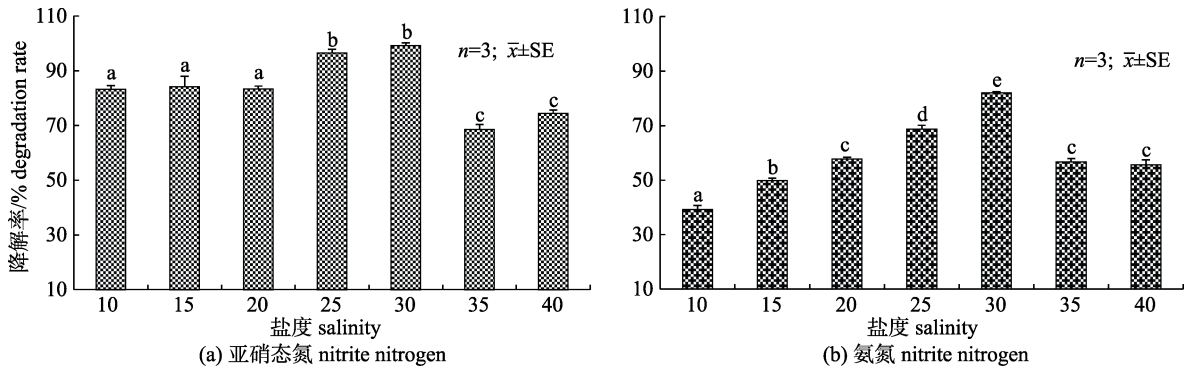


图 3 盐度对菌株 O-11 去除亚硝态氮(a)和氨氮(b)能力的影响
柱上不同字母表示盐度组间差异显著($P<0.05$).
Fig. 3 Effect of salinity on the degradation ability of strain O-11
Values with different letters mean significant difference between groups ($P<0.05$).

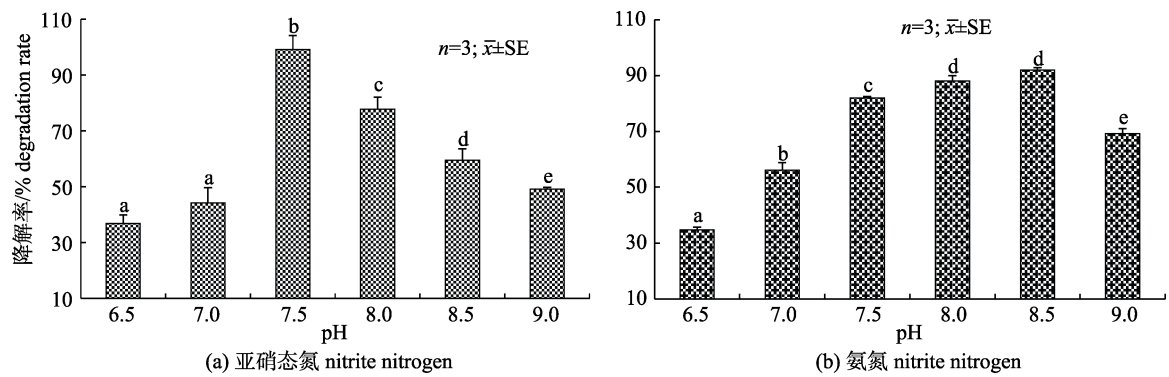


图 4 pH 对菌株 O-11 去除亚硝态氮(a)和氨氮(b)能力的影响
柱上不同字母表示组间差异显著(P<0.05).

Fig. 4 Effect of pH on the degradation ability of strain O-11
Values with different letters mean significant difference between groups (P<0.05).

当菌浓度在 10^8 cfu/mL 时, 菌株对凡纳滨对虾存活率的影响不显著($P>0.05$).

2.4.2 菌株对凡纳滨对虾生长的影响 筛选菌株 O-11 对凡纳滨对虾生长的影响见表 5。与对照相比, 当菌浓度在 10^5 cfu/mL 时, 对虾的增重率和

特定生长率均有明显的提高($P<0.05$), 而菌浓度为 10^8 cfu/mL 时, 对虾的增重率和特定生长率虽有所提高, 但与对照组相比差异不显著($P>0.05$)。结果表明, 菌株 O-11 能有效促进凡纳滨对虾的生长, 其最佳使用菌浓度为 10^5 cfu/mL。

3 讨论

亚硝态氮和氨态氮是养殖水体中影响养殖动物健康生长发育的 2 个重要因子。Jensen^[18-19]的研究表明, 亚硝态氮能够引起甲壳动物多种生理紊乱和免疫抑制。Li 等^[20]的研究表明, 亚硝态氮的积累能够引起养殖动物慢性中毒, 并出现摄食量下降、呼吸受阻等症状。当亚硝态氮含量高于 0.5 mg/L 时, 鱼体中毒症状明显, 某些器官功能出现衰竭, 严重时导致死亡^[21]。虽然在虾池^[22]中, 氨氮对日本对虾(*Penaeus japonicus*)仔虾的安全浓度为 1.072 mg/L, 但贾旭颖^[23]研究发现, 当氨氮浓度超过 0.1 mg/L 时, 就能够引起对虾体内血红蛋白含量的降低, 造成对虾机体生理代谢紊乱、抗病能力下降。目前, 中国《渔业水质标准》^[24]中规定养殖水体中非离子氨(NH₃) 允许的最高浓度仅为 0.02 mg/L。

关于水体中可脱除氨氮和亚硝态氮微生物的分离筛选, 王会聪等^[25]从养殖污泥中筛选到 1 株不动杆菌 AQ-3, 当亚硝态氮初始浓度是 50 mg/L、菌株终浓度为 1.0×10^7 cfu/mL 时, 对亚硝态氮的去除率能达到 99.47%。熊焰等^[26]从养殖水体中筛选出 1 株对亚硝酸盐具有高效降解能力的优良菌

表 4 菌株对凡纳滨对虾存活率的影响

Tab. 4 Survival of *Litopenaeus vannamei* under the different concentrations of strain
 $n=3; \bar{x}\pm SE; \%$

项目 item	菌浓度/(cfu·mL ⁻¹) bacterial concentration		
	0	10 ⁵	10 ⁸
存活率 survival rate	91.67±1.67 ^a	98.33±1.67 ^b	93.33±1.67 ^{ab}

注: 数据右上方不同字母表示差异显著(P<0.05).
Note: Values with the different letters mean significant differences (P<0.05).

表 5 菌株对凡纳滨对虾生长的影响

Tab. 5 Growth of *Litopenaeus vannamei* under the different concentrations of strain
 $n=3; \bar{x}\pm SE$

参数 index	菌浓度/(cfu·mL ⁻¹) bacterial concentration		
	0	10 ⁵	10 ⁸
初始体重/g initial body weight	9.22±0.05 ^a	9.22±0.05 ^a	9.22±0.05 ^a
终末体重/g final body weight	10.07±0.12 ^a	10.99±0.55 ^b	10.51±0.27 ^a
增重率/% weight gain ratio	9.22±1.28 ^a	19.16±5.99 ^b	13.99±2.94 ^a
特定增长率/(%·d ⁻¹) SGR	4.05±0.56 ^a	8.41±2.63 ^b	6.14±1.29 ^a

注: 同行数据右上方不同字母表示组间差异显著(P<0.05).
Note: Values with the different letters mean significant differences (P<0.05).

株 SZ-3, 在亚硝酸盐质量浓度为 5 mg/L 时, 添加浓度为 1×10^8 cfu/mL 的 SZ-3 纯菌体, 在 28℃ 的水温条件下 96 h 后菌株对亚硝酸盐的降解率可达 91.78%。孙庆花等^[27]从海底沉积物中分离获得 1 株异养硝化-好氧反硝化细菌 y5, 对亚硝态氮 36 h 的去除率为 64.14%。易弋等^[28]从鲤养殖池中分离得到 1 株巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), 24 h 氨氮去除率为 97.7%。Zhang 等^[29]将 1 株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)应用于水处理中, 培养 18 h 后, 菌株对氨氮的去除率为 95.0%。这些研究筛选到的菌株仅针对一种有害氮源的脱除。至于对 2 种氮源的脱除, 何沅滨等^[30]从泥鳅(*Misgurnus guillicaudatus*)养殖池塘中分离获得 1 株芽孢杆菌(*Bacillus* sp.), 向养殖水体中加入菌浓度为 1×10^7 cfu/mL, 14 d 后氨氮和亚硝酸盐含量分别降低了 34.97% 和 89.46%, 该分离菌株对亚硝态氮的去除能力远高于对氨氮的去除能力。本研究从对虾养殖池塘中分离筛选获得的菌株 O-11 能够同时高效去除亚硝态氮和氨氮, 在优化条件下, 其亚硝态氮去除率高达 99.16%, 氨氮去除率可达 92.00%。

结合分子生物学及生理生化特征的鉴定结果, 本研究发现所分离的菌株 O-11 与普遍海单胞菌的亲缘关系最近。海单胞菌属原属于交替假单胞菌属, 1983 年, van Landschoot 等^[31]在研究交替假单胞菌属中的 *A. communis* 和 *A. vaga* 时发现, 无论是在生理学特征还是遗传学等方面, 这两株细菌与该属其他细菌都不相同, 因而单独建立了海单胞菌属。目前已报道海单胞菌属的细菌广泛分布于海洋环境中^[32], 闫志勇等^[33]从双齿围沙蚕消化道内分离获得 1 株海单胞菌属细菌 Y5, 该菌株具有纤维蛋白溶解活性。任雪芸等^[34]从南极海水中分离到 1 株海单胞菌(*Marinomonas*), 该菌株对植物病原真菌、细菌和海洋病原弧菌等 15 种微生物都具有较好的抑制作用。这些研究结果表明, 海单胞菌不仅分布广泛, 功能也相当强。

本研究还发现, 水体温度、盐度和 pH 对分离菌株 O-11 去除亚硝态氮和氨氮的效率均有显著影响, 而且菌株去除亚硝态氮和氨氮的最适条件也并不相同。如菌株 O-11 亚硝态氮去除率在 70%

以上的温度是 20~30℃, 盐度为 10~30, pH 则为 7.5, 氨氮去除率在 70% 以上的温度为 20~35℃, 盐度 30, pH 则为 7.5~8.5。结合养殖池水样的采集, 我们曾连续 2 年对山东省日照市和东营市对虾养殖池塘水样的温度、盐度和 pH 进行了测定, 结果显示, 日照地区养殖水体温度在 20~34℃, 盐度在 18~34, pH 在 7.14~8.42; 东营地区养殖水体温度在 18~30℃, 盐度在 31~37, pH 在 7.74~8.12。与分离菌株 O-11 可有效去除氨氮和亚硝态氮的影响因子适用范围比较, 这 2 个地区养殖池水理化因子的波动变化对该菌株去除有害氮(亚硝态氮和氨氮)并不会造成显著影响, 这说明本研究筛选的菌株 O-11 在这 2 个地区的养殖水体中可以有效去除亚硝态氮和氨氮这 2 种有害氮。

2 种菌株浓度进行的对凡纳滨对虾存活及生长影响的实验结果显示菌株 O-11 在浓度为 10^5 cfu/mL 时不仅能显著提高对虾的存活率, 还能促进对虾生长。在菌浓度为 10^8 cfu/mL 时, 菌株对凡纳滨对虾的存活和生长并无显著性影响 ($P > 0.05$), 这说明菌株 O-11 不仅可高效去除水体中的亚硝态氮和氨氮, 对对虾的存活也是安全的, 而且对其生长具有一定的促进作用。

参考文献:

- [1] Fang S Q, Hu X F, Wu H X. Technology of aquaculture wastewater treatment and application[J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2004, 5(9): 51-55. [方圣琼, 胡雪峰, 巫和听. 水产养殖废水处理技术及应用[J]. 环境污染治理技术与设备, 2004, 5(9): 51-55.]
- [2] Ackefors H, Enell M. Discharge of nutrients from Swedish fish farming to adjacent sea areas[J]. Ambio, 1990, 19(1): 28-35.
- [3] Xiong Y, Liu L Y, Luo R, et al. Screening, identification, degradation condition and effects of anitrite-degradating 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.]
- [4] Hilmy A M, El-Domiaty N A, Wershana K. Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera*[J]. Comp Biochem Phys C, 1987, 86(2): 247-253.
- [5] Wang H T, Hu D G. Toxicity of nitrite to grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) in ponds and its way of prevention[J]. Journal of Fisheries of China, 1989, 13(3): 207-213. [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.]
- [6] Dong Y B, Dai Y Y. Research survey of toxic effects of nitrite to aquatic animals[J]. Journal of Aquaculture, 2011, 32(4): 28–32. [董玉波, 戴媛媛. 亚硝酸盐氮对水产经济动物毒性影响的研究概况[J]. 水产养殖, 2011, 32(4): 28–32.]
- [7] Huang X H, Li C L, Zheng L, et al. The toxicity of $\text{NO}_2\text{-N}$ on *Litopenaeus vannamei* and effects of $\text{NO}_2\text{-N}$ 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] Song F Q. Microbial Ecology[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008. [宋福强. 微生物生态学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.]
- [9] Haberl R, Perfler R. Nutrient removal in a reed bed system[J]. Water Sci Technol, 1991, 23(4–6): 729–737.
- [10] Wang W, Cai Z C, Zhong W H, et al. Research advances in aerobidic nitrifiers[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2007, 18(11): 2618–2625. [王薇, 蔡祖聪, 钟文辉, 等. 好氧反硝化菌的研究进展[J]. 应用生态学报, 2007, 18(11): 2618–2625.]
- [11] State Oceanic Administration. GB17378.4-2007, The Specification for Marine Monitoring-Part 4: Seawater Analysis[S]. Beijing: China Standard Press, 2008. [国家海洋局. GB17378.4-2007, 海洋监测规范-第4部分: 海水分析[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.]
- [12] Tao T S, Yang R F, Dong X Z. Systematics of Prokaryotes[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 63. [陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 63.]
- [13] Yan F J. Studies on screening and characterization of microorganisms with high organic pollutants degrading capability from sea cucumber (*Apostichopus japonicas* Selenka) culture ponds[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. [闫法军. 刺参养殖池塘有机物降解微生物的分离筛选及其特性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.]
- [14] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Beijing: Science Publishing House, 1984.
- [15] Dong X Z, Cai M Y. Common Bacteria System Identification Manual[M]. Beijing: Science Publishing House, 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.]
- [16] Sun X M, Li Q F, Zhang Y, et al. Phylogenetic analysis and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria strain from marine environment[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(6): 687–695. [孙雪梅, 李秋芬, 张艳, 等. 一株海水异养硝化-好氧反硝化菌系统发育及脱氮特性[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 687–695.]
- [17] Noguerola I, Blanch A R. Identification of *Vibrio*, spp. with a set of dichotomous keys[J]. J Appl Microbiol, 2008, 105(1): 175–185.
- [18] Jensen F B. Uptake and Effects of Nitrite and Nitrate in Animals[M]. Nitrogen Metabolism and Excretion. Boca Raton: CRC Press, 1995: 289–303.
- [19] Jensen F B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals[J]. Comp Biochem Phys A, 2003, 135(1): 9–24.
- [20] Li S Y, Li J, Zhang Q F. Water quality assessment in the rivers along the water conveyance system of the Middle Route of the South to North Water Transfer Project (China) using multivariate statistical techniques and receptor modeling [J]. J Hazardous Mater, 2011, 195(5): 306–317.
- [21] Frances J, Allan G L, Nowak B F. The effects of nitrite on the shorten growth of silver perch (*Bidyanus bidyanus*)[J]. Aquaculture, 1998, 163(1–2): 63–72.
- [22] Li J, Jiang L X, Wang W Q, et al. The toxic effect of ammonia nitrogen and sulfurated hydrogen on the larvae of *Penaeus japonicus*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16(1): 22–27. [李建, 姜令绪, 王文琪, 等. 氨氮和硫化氢对日本对虾幼体的毒性影响[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(1): 22–27.]
- [23] Jia X Y. The Ecophysiological Responses of *Litopenaeus-vannamei* under Freshwater Condition to Environmental Stresses[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014. [贾旭颖. 淡水养殖凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)对环境胁迫的生理生态响应[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.]
- [24] State Buareau of Environmental Protection. GB 11607-1989, Water quality standard fisheries[S]. Beijing: China Standard Press, 1989. [国家环境保护局. GB11607-1989, 渔业水质标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1989.]
- [25] Wang H C, Cao H P, He S, et al. Identification and removal condition of a nitrite removing bacterium from aquaculture sediment[J]. Microbiology China, 2012, 39(2): 154–161. [王会聪, 曹海鹏, 何珊, 等. 一株养殖水体中亚硝酸盐去除菌的鉴定及其去除条件[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 154–161.]
- [26] Xiong Y, Liu L Y, Luo R, et al. Screening, identification, degradation condition and effects of a nitrite-degradatins-train[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.]
- [27] Sun Q H, Yu D S, Zhang P Y, et al. Identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain isolated from marine environment[J]. Environmental Science, 2016, 37(2): 647–654. [孙庆花, 于德爽, 张培玉, 等. 1株海洋异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. 环境科学, 2016, 37(2): 647–654.]
- [28] Yi Y, Rong Y P, Cheng Q W, et al. Isolation and identification of ammonia nitrogen degradation strains from aquaculture water[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(2):

- 154–157. [易弋, 容元平, 程谦伟, 等. 养殖水体氨氮去除菌的分离和初步鉴定[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(2): 154–157.]
- [29] Zhang J B, Wu P X, Hao B, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001[J]. *Biores Technol*, 2011, 102(21): 9866–9869.
- [30] He Y B, Li Y, Chen Y J, et al. Screening *Bacillus subtilis* to use for improving water quality in loach (*Misgurnus anguilli caudatus*) culture ponds[J]. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(4): 86–91. [何沅滨, 李义, 陈亚军, 等. 泥鳅养殖水体中一株芽孢杆菌的筛选及其净水效果研究[J]. 水生态学杂志, 2015, 36(4): 86–91.]
- [31] Landschoot A V, Ley J D. Intra and intergeneric similarities of the rRNA cistrons of *alteromonas*, *marinomonas* (gen. nov.) and some other gram-negative bacteria[J]. *Gen Microbiol*, 1983, 129(10): 3057–3074.
- [32] Yang L, Yan Z Y, Song X X, et al. Isolation and phylogenetic analysis of a *Marinomonas* sp. Isolated from *Perinereis* *saibuhitensis*[J]. *Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis*, 2009, 45(3): 283–288. [杨丽, 闫志勇, 宋旭霞, 等. 海单胞菌 1 株的分离和系统发育分析[J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 45(3): 283–288.]
- [33] Yan Z Y, Wang B, Song X X, et al. Isolation and identification of a *Marinomonas* sp. strain with fibrinolytic activity[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2007, 20(10): 717–732. [闫志勇, 王斌, 宋旭霞, 等. 一株具有纤维蛋白溶解活性的海单胞菌的分离和鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(10): 717–732.]
- [34] Ren X Y, Wang W, Guo S H, et al. Bioactive substance of *Marinomonas* sp. BSw10005 from Antarctic ocean and its effects on plant pathogens[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37(6): 654–659. [任雪芸, 王伟, 郭少华, 等. 南极海单胞菌 BSw10005 代谢活性物质及对植物病原菌抑制作用[J]. 植物病理学报, 2007, 37(6): 654–659.]

Screening and identification of an efficient nitrogen-degrading strain and application of a potential analysis

ZHANG Jiashun, LU Na, TIAN Changcheng, LI Yun, PAN Luqing

The Key Laboratory of Mariculture of the Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: Nitrogen accumulation is one of the major causes of water pollution and eutrophication in aquaculture. Excessive amounts of the toxic forms of nitrogen (ammonia and nitrite) have a considerable effect on the survival and growth of aquatic organisms and thus lead to huge economic loss in aquaculture. Biological nitrogen removal technology is an efficient process for nitrogen removal from water in aquatic habitats, wherein probiotic bacteria convert nitrite-N into nitrate nitrogen (nitrate-N) or nitrogen gas. Moreover, owing to lower energy consumption and operation cost, this technology is commonly used in aquaculture. Many studies have used several kinds of bacteria to reduce the toxic effects of nitrogen and demonstrated an improvement in water quality. The present study aimed to identify bacteria that efficiently removed nitrite nitrogen and ammonia nitrogen. The strain O-11 was isolated from shrimp culture water after enrichment culture and had removal efficiency for nitrite nitrogen and ammonia nitrogen of 96.17% and 88.27%, respectively, in 24 h. Molecular biological and physiological and biochemical identification revealed that the strain was closely related to *Marinomonas communis*. The isolated strain O-11 removed nitrite nitrogen more efficiently when the temperature ranged from 20°C to 30°C, while ammonia nitrogen removal was better when the temperature ranged from 20°C to 35°C. The nitrite nitrogen removal ability of the isolated strain was stable when salinity was less than 30, while the ammonia nitrogen removal ability was considerably higher in alkaline conditions. A safety assessment revealed that the strain O-11 was safe for *Litopenaeus vannamei* when the initial bacterial concentration ranged from 10^5 to 10^8 cfu/mL. The survival rate and growth rate of experimental *L. vannamei* significantly increased when the initial bacteria concentration was 10^5 cfu/mL. These results demonstrated great potential value of the isolated strain O-11 as a suitable candidate for the removal of harmful forms of nitrogen from aquaculture water.

Key words: nitrite nitrogen; ammonium nitrogen; isolation and identification; *Marinomonas*; potential application; shrimp culture pond

Corresponding author: LI Yun, E-mail: sxsdlwl@ouc.edu.cn