

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18364

一株高效氨氮及亚硝态氮去除功能菌株的分离鉴定及在生物絮团对虾养殖中的应用

丁雄祺^{1,2,4}, 谢媚^{1,2,4}, 陈偿^{1,2,3}, 管云雁^{1,2}, 方建相^{1,2,4}, 云龙^{1,2,4}

1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301;
2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301;
3. 中国科学院南海海洋研究所西沙、南沙深海海洋环境观测研究站, 广东 广州 510301;
4. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 从凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)养殖水体中分离出具有高效氨氮及亚硝态氮去除功能的菌株 Y2, 生理生化及 16S rRNA 基因序列比对分析结果显示该菌株为麦氏交替单胞菌(*Alteromonas macleodii*)。进一步通过生长实验进行温度、酸碱度、盐度的培养条件优化, 利用抗生素药敏实验筛选菌株特定抗性; 通过卤虫浸泡感染的方法检测麦氏交替单胞菌 Y2 的安全性, 并测定海水培养液 OD₆₀₀ 及含氮无机污染物的浓度, 探究菌株 Y2 生长与水体中氨氮、亚硝态氮、硝态氮之间的动态变化关系; 通过 28 d 对虾养殖试验, 监测水质、生物絮团形成量、致病菌数量及对虾成活率生长速率, 进一步阐明菌株在实际养殖中的功效。结果表明, 该菌株 Y2 对苯唑西林、克林霉素有抗性; 对卤虫的 48 h 半致死浓度高于 1.9×10^8 cfu/mL, 显著高于哈氏弧菌(10^2 cfu/mL)。此外, 该菌具有持续去除水体中氨氮、亚硝态氮的功能。在养殖实验中能抑制潜在病原菌弧菌生长、提高对虾存活率及生长率, 并且能在水体中稳定存活较长时间。综上所述, 菌株 Y2 是养殖用益生菌制剂的优良备选菌株, 可作为生物絮团养殖系统中调节水质的关键菌株。

关键词: 氨氮; 亚硝态氮; 去除; 麦氏交替单胞菌; 凡纳滨对虾; 菌株安全性

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)05-0959-12

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)自 1988 年引入中国, 因其生长周期短, 养殖收益可观, 已成为中国产量较高的养殖种类之一^[1]。然而, 随着生物絮团工厂化养殖技术(biofloc technology, BFT)的普及^[2], 养殖密度不断增大, 大量对虾残饵、代谢废物等含氮有机物分解产生的氨氮、亚硝态氮在水体中积累。高浓度的氨氮和亚硝态氮使得对虾进食率低, 生长减缓, 血淋巴蛋白浓度降低^[3], 直接危害对虾呼吸及免疫等生理功能^[4], 最终导致对虾死亡, 造成巨大的经济损失^[5]。因此, 控制水体中含氮无机污染物, 使其处于较低浓度是对虾养殖成功的关键。

研究表明, 生物絮团中的微生物通过吸收含氮化合物合成胞内蛋白, 可稳定养殖水质, 提高饲料转化率, 降低成本, 促进对虾生长^[6]。大量具有特定功能的菌株作为益生菌被应用于水产养殖领域。目前常见的益生菌有芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[7-8]、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[9]、乳酸菌(*Lactobacillus*)^[10]、硝化细菌(nitrifying bacteria)^[11]等, 甚至弧菌(*Vibrio* sp.)特定菌株也被发现可去除水体中的氨氮和亚硝态氮^[12]。大部分脱氮菌株分离自土壤、堆肥、活性污泥等区域^[13], 菌株的非土著性使得它们很难在水产养殖中高效地发挥作用。除此之外, 菌株功能单一, 分离到的既有脱

收稿日期: 2018-11-15; 修订日期: 2018-12-18.

基金项目: 国基自然科学基金面上项目(31872605); 广州市科技计划项目(201803020018).

作者简介: 丁雄祺(1993-), 男, 硕士研究生, 从事海洋生物学及相关微生物资源利用研究. E-mail: sevending1114@163.com

通信作者: 陈偿, 研究员. E-mail: chen.chang@sccsio.ac.cn

氨氮亚硝态氮特性又能抑制致病弧菌生长的复合型菌株较少。

为获得对虾养殖水体中高效去除氨氮及亚硝态氮的新型多功能益生菌,本研究通过配制特定的筛选培养基,从对虾养殖水体中分离出一株氨氮及亚硝态氮去除效果较好的菌株。菌株鉴定后对其生长特性、安全性及生长中氨氮、亚硝酸盐的去除过程进行探究,最终将该菌株应用于实际养殖水体中,研究该菌对养殖水质(氨氮、亚硝态氮)、水体中潜在致病菌数量、对虾生长以及存活的影响,测定其在养殖水体中的存活情况及效用,以期海水养殖中益生菌的开发和利用提供科学依据及备选菌株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

养殖试验所用凡纳滨对虾购自珠海强龙生物公司,约 300 尾,经暂养后测量体长为 (1.80 ± 0.17) cm,体重为 (0.096 ± 0.038) g。用于分离细菌的水样取自对虾养殖桶。实验中 2216E、LB、NaCl、KNO₃、NaNO₂、(NH₄)₂SO₄ 等主要试剂购自广州华彬生物科技有限公司。

1.2 菌株的筛选及鉴定

1.2.1 菌株采集与富集培养 在对虾养殖池中,用 50 mL 无菌离心管于水深 50 cm 处采集水样,立即带回实验室。在无菌条件下,以 1%(V/V)的接种量接种至装有 200 mL 液体筛选富集培养基的无菌锥形瓶中,于 30℃,200 r/min 摇床中培养。筛选富集培养基配制方法:0.22 μm 滤膜过滤养殖水中人工添加氨氮及亚硝酸盐至终浓度 5 mg/L,添加葡萄糖至终浓度 2 g/L, pH 8.0。

取适量富集培养 36 h 的培养液进行梯度稀释(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6}),取 100 μL 涂布于氨氮亚硝酸盐固体筛选培养基(1000 mL:含葡萄糖 2 g、NaNO₂ 1 g、(NH₄)₂SO₄ 2 g、KNO₃ 1 g、酵母提取物 0.1 g、NaCl 10 g、琼脂 15 g, pH 8.0)。置于 30℃ 恒温培养箱中培养 48 h 后,分别挑取菌落形态颜色大小不同的单菌落再次划线培养,经 3 次划线纯化后得到菌株纯培养。

1.2.2 菌株的筛选 在严格无菌的条件下,将初

筛得到的菌株以 1%接种量接种于装有 150 mL 液体筛选富集培养基的无菌锥形瓶,置于 30℃、200 r/min 振荡培养 24 h,采用 μMAC SMART 便携水质分析仪测定 NH₃-N、NO₂-N 值,选取对两种无机污染物去除效果最佳的菌株进行鉴定。

1.2.3 菌落形态特征及生理生化鉴定 将筛选到的菌株采用平板划线法接种于 2216E 固体培养基,置于 30℃ 恒温培养箱静置培养,待长出清晰单一菌落后,观察菌落形态。挑取单菌落进行生理生化鉴定,采用 Biolog 细菌鉴定系统,方法如下:取单菌落用 Biolog 接种液稀释至合适浊度(OD₆₀₀ 为 0.1),取稀释液 100 μL 加至 Biolog 全自动生化鉴定板中,30℃ 培养 20 h 后利用酶标仪(Thermo)测定 OD₅₉₀,分析菌株对 95 种不同碳源和其他化学物质的利用。

1.2.4 16S rRNA 基因序列测定 采用 DNA 提取试剂盒(天根)提取待测菌基因组,利用 16S rRNA 基因通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和 1492R(5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')进行 16S rDNA 扩增,扩增程序为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 1 min,56℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成,序列提交 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源比对,选取同源性较高的序列并采用软件 MEGA 5.0 进行多重序列比较,以邻接法构建系统发育树。

1.3 药敏实验

采用常规的琼脂扩散法,对筛选得到的菌株进行 30 种常用抗生素的敏感性测定。将培养过夜的菌液稀释 20 倍,取 600 μL 稀释液均匀涂布 2216E 平板,晾干后中心对称放置 3 片药敏纸片,30℃ 培养 20 h 后测量抑菌圈直径,以抑菌圈直径大小作为敏感与耐药的判定指标^[14]。

1.4 菌株最适生长条件初探

考察影响菌株生长的 3 个因素并设置适当的梯度,分别为初始 pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0)、温度(10℃、20℃、25℃、30℃、37℃、45℃)和 NaCl 质量分数(0、1%、2%、3%、4%、5%)。

以上实验除了考察因素外,均在接种量1%、30℃、200 r/min下培养24 h后,取样测定各条件下培养液的OD₆₀₀值,以不接菌的LB培养液作空白对照。所测数据以初始pH、培养温度和NaCl质量分数为横坐标,OD₆₀₀值为纵坐标绘制各自曲线。

1.5 菌株安全性检测及卤虫保护益生实验

参照Goulden等^[15]的方法,以卤虫(*Artemia-salina*)为动物模型,检测分离菌株对卤虫的毒性及感染致病菌后的保护性。称取1 g卤虫卵,75%无水乙醇消毒处理12 h,放入1000 mL灭菌海水,于25℃连续充氧曝气孵化20 h。取12孔板每孔随机取30尾卤虫于2 mL无菌海水中,室温下适应6 h,每孔加入细菌至终浓度 1×10^5 cfu/mL、 1×10^6 cfu/mL、 1×10^7 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL,以不加细菌的孔作为阴性对照,以加了相同浓度致病哈氏弧菌的孔作为阳性对照,所有处理设置3个重复,每隔12 h置于体视显微镜下,挑出死亡的卤虫,连续观察2 d,统计卤虫存活率并利用概率单位法^[16]计算分离菌株对卤虫的半致死浓度LC₅₀。

经上述方法孵化处理卤虫,设置4个组,分别为空白对照组、只加致病哈维弧菌、只加分离菌株、致病菌+分离菌株。所有处理组设置3个平行,每隔12 h于体表显微镜下挑出死亡的卤虫,连续观察2 d,计算卤虫存活率。

1.6 菌株生长与含氮无机物去除性能关系

配制盐度为1%的人工海水,添加葡萄糖至终浓度0.5 g/L,添加亚硝酸钠使得水体中亚硝酸盐浓度为5 mg/L,添加硫酸铵使得水体中氨氮浓度为5 mg/L,0.22 μm滤膜过滤除菌,分装至500 mL无菌锥形瓶中,每瓶250 mL。按1%的接种量将浓度为 2.5×10^9 cfu/mL的过夜培养菌液接种到分装好的培养液中,设置3个平行,置于30℃200 r/min恒温摇床振荡培养。3 h间隔取样,取不接菌的培养液为空白对照,测定OD₆₀₀值,培养液经稀释10倍后采用μMAC SMART便携水质分析仪测定水体中剩余的硝酸盐、亚硝酸盐及氨氮含量,记录数据,绘制硝酸盐、亚硝酸盐、氨氮浓度与细菌生长的关系曲线。

1.7 筛选菌株的对虾养殖实验

1.7.1 实验设计及日常管理 购买的凡纳滨对虾经暂养后测定体长为 (1.8 ± 0.17) cm,体重为 (0.096 ± 0.038) g。取6个8 L的透明玻璃缸,每个缸放入随机捞取的12尾健康个体,每日投喂对虾体重10%的统一对虾配合饲料,实验期28 d。实验期间,养殖水体溶解氧维持在6.10~6.40 mg/L,温度为29~30℃,pH为8.20~8.35,盐度为10。实验组每隔7 d添加筛选菌株至终浓度 1×10^6 cfu/mL,每天添加50%饲料量的蔗糖作为细菌利用的碳源;对照组除不添加细菌外其他条件均相同。

1.7.2 水质监测与潜在致病菌计数 使用手持式水质检测仪于每日12:00测定养殖水体温度、盐度、pH、溶解氧。每日于玻璃缸中央、距离水面10 cm处采集水样,立即带回实验室,稀释适当倍数取100 μL涂布TCBS平板,置于30℃恒温箱,静置培养20 h,待长出清晰单一菌落后,进行平板计数。剩余水样于11000 r/min离心2 min,取上清。参照纳氏试剂法进行氨氮的测定^[17],亚硝酸氮的测定采用盐酸萘乙二胺分光光度法(GB 17387.4)。生物絮团形成量由实验期中每周采集水样参照沉淀漏斗法^[13]进行测定。

1.7.3 菌株在养殖水体中的监测 根据菌株的生理生化表型以及对抗生素的敏感性,设计配制筛选该菌株的选择培养基。养殖实验结束时,取对照组、实验组水样稀释适当倍数100 μL涂布选择培养基,待长出单一清晰菌落后进行平板计数,再次确认筛选菌株在实际养殖水体中的存活情况。

1.7.4 对虾存活率和生长指标测定 养殖期间,每7 d记录对虾死亡情况,统计对虾存活率(SR)。养殖试验结束后,测量对虾起始和终末体重(W_0 , W_t),计算存活率(SR)。

1.8 数据统计分析

各项实验数据采用Excel 2013和SPSS 22.0软件中的单因素方差分析(ANOVA)和Duncan检验法进行统计分析,以0.05作为差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 筛选菌株生理生化特征与16S rDNA鉴定

养殖水样经富集及筛选分离后得到6株可利

用亚硝酸盐和氨氮的菌株, 以对两种无机污染物去除效果最佳为筛选条件, 得到一株菌株, 命名为 Y2。该菌株在 2216E 固体培养基上培养 24 h 后形成米白色不透明、边缘光滑、潮湿、形状规

则、直径小于 0.5 mm 的圆形菌落。Biolog 生理生化检测结果见表 1, 菌株 Y2 可利用糊精、麦芽糖、海藻糖、蔗糖、果糖等常见糖类, 也能利用甘油、乳酸钠, 8% NaCl 仍可生长。

表 1 菌株 Y2 的生化特征
Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of strain Y2

项目 item	结果 result	项目 item	结果 result	项目 item	结果 result	项目 item	结果 result
阴性对照 negative control	-	糊精 Dextrin	+	D-麦芽糖 D-Maltose	+	D-海藻糖 D-Trehalose	+
D-纤维二糖 D-Cellobiose	+	龙胆二糖 Gentiobiose	-	蔗糖 Sucrose	+	D-松二糖 D-Turanose	+
水苏糖 Stachyose	-	阳性对照 Positive control	+	pH 6	+	pH 5	-
蜜三糖 D-Raffinose	-	α -D-乳糖 α -D-Lactose	+	蜜二糖 D-Melibiose	-	β -甲酰-D-葡萄糖苷 β -Methyl-D-glucoside	+
D-水杨苷 D-Salicin	+	N-乙酰-D-葡萄糖胺 N-Acetyl-D-Glucosamine	+	N-乙酰- β -D-甘露糖胺 N-Acetyl- β -D-mannosamine	-	N-乙酰-D-半乳糖胺 N-Acetyl-D-galactosamine	-
N-乙酰神经氨酸 N-Acetylneuraminic acid	-	1% NaCl	+	4% NaCl	+	8% NaCl	+
α -D-葡萄糖 α -D-Glucose	+	D-甘露糖 D-Mannose	-	D-果糖 D-Fructose	+	D-半乳糖 D-Galactose	-
3-甲酰葡萄糖 3-Methyl glucose	-	D-岩藻糖 D-Fucose	-	L-岩藻糖 L-Fucose	-	L-鼠李糖 L-Rhamnose	-
肌苷 Inosine	-	乳酸钠 1% Sodium lactate	+	梭链孢酸 Fusidic acid	-	D-丝氨酸 D-Serine	-
D-山梨醇 D-Sorbitol	-	D-甘露醇 D-Mannitol	+	D-阿拉伯醇 D-Arabitol	-	肌醇 Myo-inositol	-
甘油 Glycerol	+	D-葡萄糖-6-磷酸 D-Glucose-6-PO ₄	+	D-果糖-6-磷酸 D-Fructose-6-PO ₄	-	D-天冬氨酸 D-Aspartic acid	-
D-丝氨酸 D-Serine	-	醋竹桃霉素 Troleandomycin	-	利福霉素 SV Rifamycin SV	+	二甲胺四环素 Minocycline	-
明胶 Gelatin	-	氨基乙酰-L-脯氨酸 Glycyl-L-proline	-	L-丙氨酸 L-Alanine	-	L-精氨酸 L-Arginine	-
L-天冬氨酸 L-Aspartic acid	-	L-谷氨酸 L-Glutamic acid	+	L-组胺 L-Histidine	-	L-焦谷氨酸 L-Pyroglutamic acid	-
L-丝氨酸 L-Serine	-	林肯霉素, 洁霉素 Lincomycin	+	盐酸胍 Guanidine HCl	-	硫酸四癸钠 Niaproof 4	-
果胶 Pectin	-	D-半乳糖醛酸 D-Galacturonic acid	+	L-半乳糖醛酸内酯 L-Galactonic acid Lactone	-	D-葡萄糖酸 D-Gluconic acid	+
D-葡萄糖醛酸 D-Glucuronic acid	-	葡萄糖醛酰胺 Glucuronamide	-	黏酸, 黏液酸 Mucic acid	-	奎宁酸 Quinic acid	-
糖质酸 D-Saccharic acid	-	万古霉素 Vancomycin	-	四唑紫 Tetrazolium violet	-	四唑蓝 Tetrazolium blue	-
p-羟基-苯乙酸 p-Hydroxy-phenylacetic acid	-	丙酮酸甲酯 Methyl pyruvate	-	D-乳酸甲酯 D-Lactic acid methyl ester	-	L-乳酸 L-Lactic acid	-
柠檬酸 Citric acid	-	α -酮-戊二酸 α -Keto-Glutaric acid	-	D-苹果酸 D-Malic acid	-	L-苹果酸 L-Malic acid	+
溴-丁二酸 Bromo-succinic acid	-	茶啉酮酸 Nalidixic acid	-	氯化锂 Lithium chloride	-	亚碲酸钾 Potassium tellurite	+
吐温 40 Tween 40	-	γ -氨基-丁酸 γ -Amino-butrylic acid	-	α -羟基-丁酸 α -Hydroxy-butrylic acid	-	β -羟基-D,L 丁酸 β -Hydroxy-D,L butyric acid	+
α -酮-丁酸 α -Keto-butrylic acid	-	乙酰乙酸 Acetoacetic acid	-	丙酸 Propionic acid	-	乙酸 Acetic acid	-
甲酸 Formic acid	-	氨基曲南 Aztreonam	-	丁酸钠 Sodium butyrate	-	溴酸钠 Sodium bromate	-

注: “+”代表“阳性”;“-”代表“阴性”。
Note: “+”means “positive”;“-”means “negative”.

挑取单菌落提取总 DNA 并进行 16S rDNA 扩增, 获得了长度约为 1.4 kb 的扩增产物, 产物纯化测序后进行同源性比对, 与麦氏交替单胞菌 (*Alteromonas macleodii*) 同源性达 99%。多重序列比对后采取邻接法构建系统发育树(图 1), 菌株 Y2 与登录号为 CP003841.1 的 *Alteromonas macleodii* ATCC 27126 的亲缘关系较为接近。

2.2 菌株 Y2 抗生素敏感性

供试的麦氏交替单胞菌 Y2 对 30 种抗生素类药物的敏感性试验结果见表 2。由表 2 可见, 麦氏交替单胞菌 Y2 对 28 种抗生素敏感, 仅对克林霉

素、苯唑西林 2 种抗生素产生耐药, 后续存在实验将以此作为筛选条件之一配制选择培养基。

2.3 菌株 Y2 最适生长条件

不同温度、pH、盐度培养实验结果如图 2 所示, 菌株 Y2 可生长范围为 25~37℃, 最适生长温度为 30℃, 当温度低于 20℃或过高于 45℃时, 培养液的 OD₆₀₀ 为 0, 几乎不生长; Y2 在初始 pH 6~8 的培养基中可以生长, 最适 pH 为 7, 在 pH 为 6 时生长较为缓慢, 当环境过酸(pH<6)或过碱(pH > 9)时几乎不生长; 在 NaCl 质量分数为 1%~5% 时, Y2 均能生长, 最适生长 NaCl 质量分数为 2%,

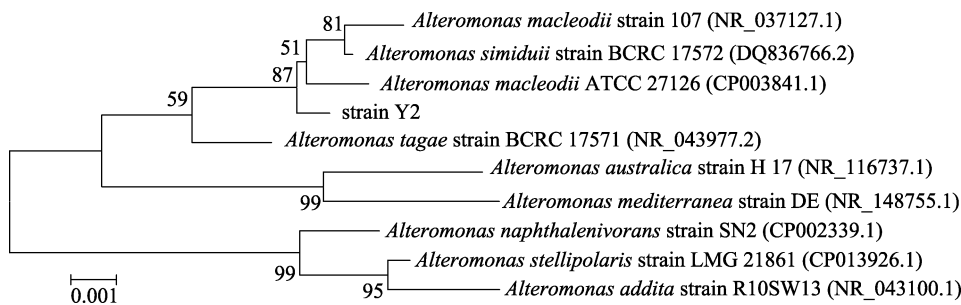


图 1 菌株 Y2 及相关菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析
Fig. 1 The phylogenetic tree derived from neighbour-joining analysis of isolated strain Y2 and other related strains using neighbour-joining method

表 2 麦氏交替单胞菌 Y2 药敏试验结果
Tab. 2 The results of antibiotic susceptibility test of *Alteromonas macleodii* Y2

药品 drug	剂量/(μg/片) dosage	抑菌圈直径/mm inhibition zone diameter	结果 result	药品 drug	剂量/(μg/片) dosage	抑菌圈直径/mm inhibition zone diameter	结果 result
青霉素 Penicillin	10	10	S	四环素 Tetracycline	30	11	S
苯唑西林 Oxacillin	1	5	R	多西环素 Doxycycline	30	15	S
氨苄西林 Ampicillin	10	15	S	米诺环素 Minocycline	30	14	S
羧苄西林 Carbenicillin	100	20	S	红霉素 Erythromycin	15	13	S
哌拉西林 Piperacillin	100	22	S	麦迪霉素 Midecamycinum	30	13	S
头孢氨苄 Cephalexin	30	18	S	诺氟沙星 Norfloxacin	10	15	S
头孢唑林 Cefamezin	30	16	S	氧氟沙星 Ofloxacin	5	13	S
头孢拉定 cefradine	30	17	S	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	18	S
头孢呋辛 Cefuroxim	30	13	S	万古霉素 Vancomycin	30	15	S
头孢他啶 Ceftazidime	30	15	S	多黏菌素 B Polymyxin B	300IU	18	S
头孢曲松 Ceftriaxone	30	20	S	复方新诺明	1.25	13	S
头孢哌酮 Cefoperazone	75	11	S	Compound Sulfamethoxazole			
丁胺卡那 Amikacin	30	20	S	呋喃唑酮 Furazolidone	300	15	S
庆大霉素 Gentamicin	10	21	S	氯霉素 Chloroamphenicol	30	12	S
卡那霉素 Kanamycin	30	18	S	克林霉素 Clindamycin	2	5	R
新霉素 Neomycin	30	21	S				

注: S 为敏感(抑菌圈直径>8 mm), R 为耐药(抑菌圈直径≤8 mm).
Note: S means sensitive (inhibition zone diameter >8 mm); R means resistance (inhibition zone diameter ≤8 mm).

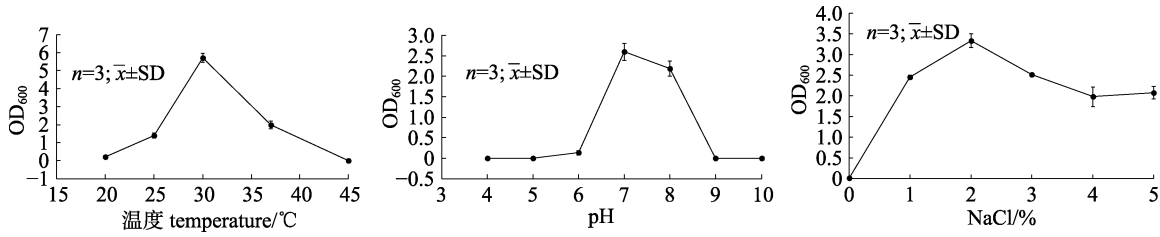


图 2 不同 pH、盐度、温度对菌株 Y2 生长的影响
Fig. 2 The growth of strain Y2 under different temperatures, initial pH and salinities

该菌株盐度耐受较广，为广盐性细菌。Y2 在温度 30℃、初始 pH 为 7.0、盐度为 2% 时生长最佳。

机氮源都存在的情况下，随着细菌生长，氨氮首先被去除，在接种后的 12 h，氨氮去除率达 90%，

2.4 菌株 Y2 安全性及保护性实验

根据对虾存活率与菌液浓度对数关系曲线，卤虫感染哈氏弧菌 48 h 后半致死浓度为 1.1×10^2 cfu/mL，感染麦氏交替单胞菌 Y2 的半致死浓度高于 1.9×10^8 cfu/mL (表 3)，空白对照组在 48 h 的死亡率为 69%。

表 3 不同浓度筛选菌株 Y2 和哈氏弧菌 NCIMB1280 感染 48 h 卤虫死亡率
Tab. 3 Effects of isolated strain Y2 with different concentrations and *Vibrio harveyi* NCIMB1280 on mortality rate of *Artemiasalina* within 48 h
 $n=3, \bar{x} \pm SD$

菌株 strain	浓度/(cfu/mL) concentration	存活率/% survival rate	半致死浓度 /(cfu/mL) half lethal concentration
麦氏交替 单胞菌 Y2	10^5	73 ± 3.33	1.9×10^8
<i>Alteromonas</i> <i>macleodii</i> Y2	10^6	66 ± 1.92	
	10^7	73 ± 3.33	
	10^8	73 ± 3.33	
哈维弧菌 NCIMB1280	10^5	12 ± 7.70	1.1×10^2
<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB1280	10^6	2.22 ± 1.92	
	10^7	4.44 ± 5.09	
	10^8	0	

卤虫保护性实验结果表明，在接种感染后的 48 h，对照组存活率为 69%，试验组菌株 Y2 存活率为 66%，试验组哈氏弧菌存活率仅为 2%，试验组 Y2+哈氏弧菌存活率为 46%(图 3)。只添加麦氏交替单胞菌 Y2 组与空白对照组无显著差异，其余组间均差异显著($P < 0.05$)。

2.5 菌株生长与含氮无机物去除性能

麦氏交替单胞菌 Y2 的生长与其去除水体中硝酸盐、亚硝酸盐、氨氮的关系见图 4，在 3 种无

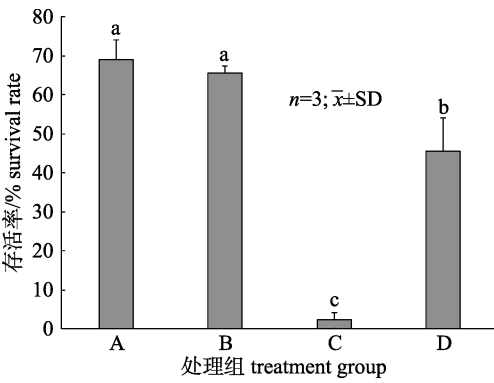


图 3 不同处理组中卤虫存活率
A: 对照组; B: 添加麦氏交替单胞菌 Y2;
C: 添加哈氏弧菌 NCIMB1280; D: 麦氏交替单胞菌 Y2+
哈氏弧菌 NCIMB1280. 不同字母代表差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 The survival rate of *Artemiasalina* in different treatment groups
A: control; B: *Alteromonas macleodii* Y2; C: *Vibrio harveyi* NCIMB1280; D: *Alteromonas macleodii* Y2+ *Vibrio harveyi* NCIMB1280. Different letters mean significant differences ($P < 0.05$).

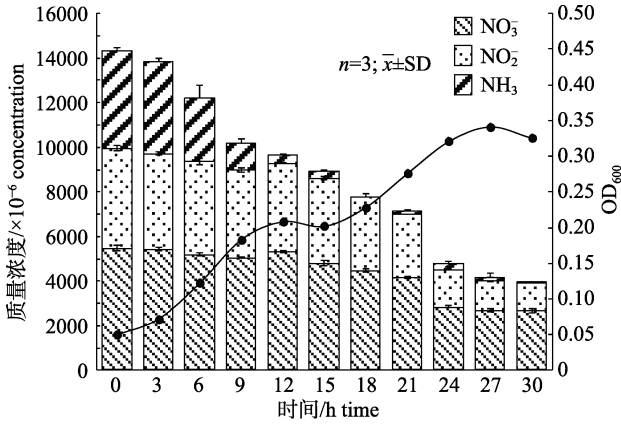


图 4 硝酸盐、亚硝酸盐、氨氮含量与菌株 Y2 生长之间的动态变化
Fig. 4 Dynamic changes about concentration of nitrate, nitrite, ammonia nitrogen and growth of strain Y2

氨氮含量处于较低水平。此后的3 h 细菌生长略微停滞, 15 h 后亚硝酸盐含量开始减少, 细菌再次进入对数生长期。自21 h 开始, 水体中硝酸盐含量开始明显降低。在接种后27 h 时, 亚硝态氮去除率为70%。27 h 后, 细菌进入衰亡期, 水体中无氨氮, 硝酸盐及亚硝酸盐含量保持不变。不加菌的空白对照在实验期间内氨氮、亚硝酸盐、硝酸盐含量均无明显变化。

2.6 凡纳滨对虾养殖实验结果

水体中氨氮、亚硝态氮含量的变化情况见图5。第1~3天, 实验组和对照组亚硝酸氮含量持续上升, 持续到第10天均维持在较高水平, 第11天各组亚硝酸氮含量有所降低, 至第19天, 各组亚硝酸氮显著下降并维持较低水平, 整个过程实验组与对照组水体中亚硝酸盐含量无显著差异

($P<0.05$); 各组氨氮含量第1~10天均维持在0.16 mg/L 的水平, 第11天, 对照组氨氮开始上升, 变化较大, 最高到达0.45 mg/L, 而实验组氨氮在整个养殖实验过程中均维持较低水平, 且差异显著($P<0.05$)。

养殖过程中水体弧菌数量变化见图6。第1~5天, 实验组弧菌数量比对照组多, 且各组弧菌数量均较多, 最高达 2.2×10^5 cfu/mL。之后的23 d 内, 实验组弧菌数量均比对照组少, 养殖后期实验组水体中几乎无弧菌存在。

生物絮团形成量见图7。随着养殖时间增长, 养殖水体中絮团不断增多, 实验组增多较快, 养殖结束时, 对照组生物絮团量为 (0.65 ± 0.13) mL/L, 实验组为 (2.87 ± 0.14) mL/L, 两组差异极显著($P<0.01$)。

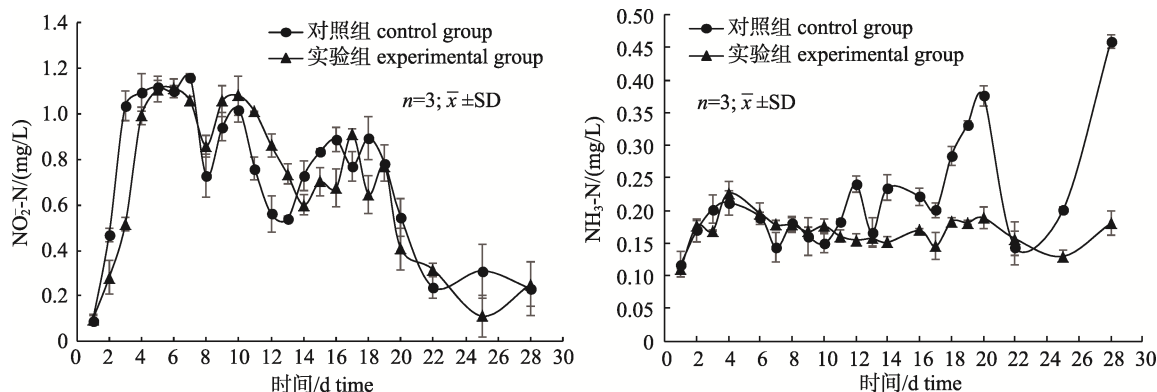


图5 凡纳滨对虾养殖过程中养殖水体中亚硝态氮及氨氮浓度变化

Fig. 5 Variation of nitrite and ammonia nitrogen concentration in water during *Litopenaeus vannamei* culture process

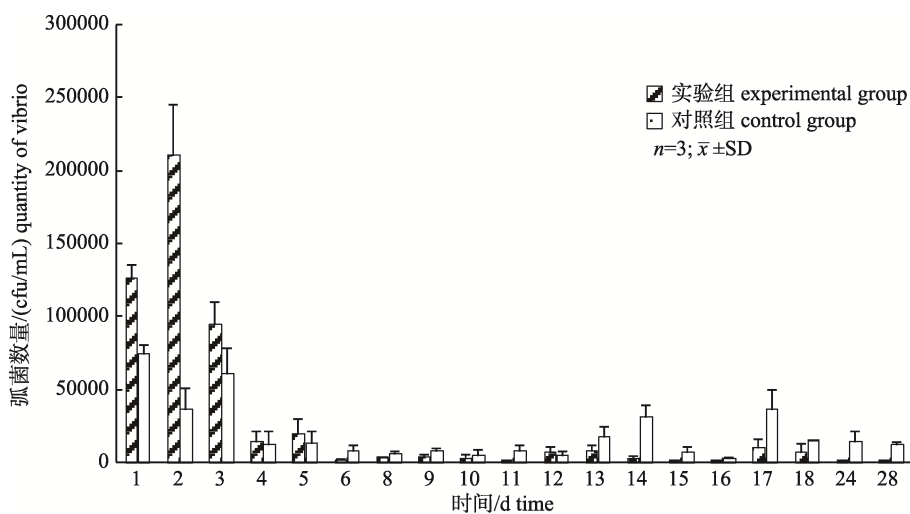


图6 凡纳滨对虾养殖过程中养殖水体中弧菌数量变化

Fig. 6 Variation of vibrio quantity in water during *Litopenaeus vannamei* culture process

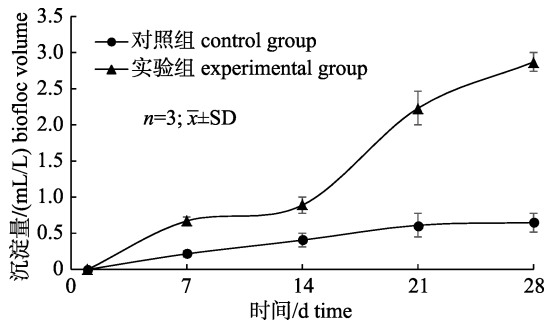


图 7 凡纳滨对虾养殖水体生物絮团形成量随养殖时间的变化

Fig. 7 Changes of biofloc formation in water during *Litopenaeus vannamei* culture process

菌株 Y2 在养殖试验中对凡纳滨对虾生长的影响见表 4。添加细菌的实验组在实验结束时体重较重,与对照组之间差异显著($P<0.05$);实验组对虾成活率达到 47.22%,与对照组之间差异极显著($P<0.01$)。

表 4 菌株 Y2 对凡纳滨对虾存活及生长的影响
Tab. 4 Survival rate and growth performance of *Litopenaeus vannamei* cultured with strain Y2

组别 group	n=3, $\bar{x}\pm SD$	
	对照组 control group	实验组 experimental group
初始体重/g initial body weight	0.096±0.038	0.096±0.038
终末体重/g final body weight	0.2521±0.12	0.5667±0.18*
存活率/% survival rate	11.11±4.81	47.22±4.81**

注: *代表差异显著($P<0.05$), **代表差异极显著($P<0.01$).
Note: * means the difference is significant at 0.05 level, and ** means the difference is significant at 0.01 level.

2.7 菌株 Y2 在对虾养殖水体中的存活情况

Y2 的药敏测试结果显示,其对苯唑西林及克林霉素耐药。在 LB 培养基中联合添加该两种抗生素配制成再次筛选的固体选择培养基,各组水样稀释相同倍数涂布后,对照组水样中无耐该两种抗生素的细菌存在,平板上无细菌生长;实验组有较多单一菌落长出(图 8),挑取单一菌落若干进行 16S rRNA 基因检测,均鉴定为筛选菌株 Y2。

3 讨论

本研究从养殖对虾生物絮团中筛选出菌株 Y2,通过生理生化表型分析并结合其 16S rRNA 基因序列比对结果,鉴定为麦氏交替单胞菌 *A. macleodii*。麦氏交替单胞菌标准菌株于 1972 年首次从海水中获得^[18]。目前仅有两项研究将该种菌应用于水产养殖领域, Kesarcodi-Watson 等^[19]分离到麦氏交替单胞菌(*A. macleodii*)0440,并发现其能抑制病原菌生长,提高被致病菌感染的绿壳贻贝(*Perna canaliculus*)的成活率;麦氏交替单胞菌(*A. macleodii*)SLNX₂与花津滩芽孢杆菌(*Bacillus hwajinpoensis*)SLWX₂、嗜碱盐单胞菌(*Halomonas alkaliphila*)X₃联用,可去除养殖水体中的氨氮、亚硝态氮含量^[20]。具有复合功能的麦氏交替单胞菌在水产养殖中的研究鲜有报道。本研究分离的麦氏交替单胞菌 Y2,不仅能去除养殖水体中的氨氮亚硝态氮,从而提高对虾存活率,而且对条件致病菌弧菌具有很好的拮抗作用,开发应用潜力巨大。

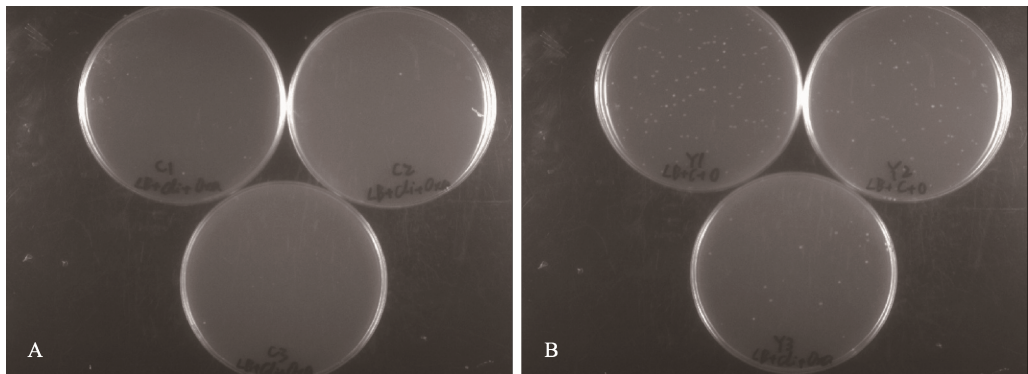


图 8 对照组与实验组中菌株 Y2 的数量对比
A: 对照组; B: 实验组.

Fig. 8 The number of strain Y2 in two groups
A: control group; B: experimental group.

确保菌株在水体中的安全性是将其应用于生产的前提,微生物致病性研究中,半致死浓度是评价菌株安全性的直接方法,“卤虫-细菌”共培养实验中, $LC_{50} \leq 10^3$ cfu/mL 的细菌被认为是高致病性,而 $LC_{50} \geq 10^7$ cfu/mL 被认为是无致病性^[21]。卤虫浸浴菌株 Y2 显示 $LC_{50} \geq 10^8$ cfu/mL,证实 Y2 无毒,且菌株 Y2 与致病菌共同孵育感染卤虫,存活率显著提高,提示该菌的存在可抑制哈维弧菌对卤虫的致死作用。

一般而言,细菌产生酶的浓度及进行各类代谢活动与其生长条件密切相关^[22],具有亚硝酸盐去除功能的益生菌在 20~30℃,pH 为 7.0~8.0 时,降解效率高达 70%^[23]。本研究中菌株 Y2 最适生长条件为温度 30℃、初始 pH 7.0、盐度 2%,与报道中具有亚硝酸盐最高去除效率的细菌生长条件一致。因菌株 Y2 分离自对虾养殖水体,其最适生长条件也是养殖水体的基本环境,且在养殖实验结束后能利用选择性培养基从水体中再次筛选到该菌株,证实菌株 Y2 可长期存活于养殖水体并发挥作用。

养殖水体中添加微生物及合适碳源,从而形成生物絮团是目前工厂化养殖普遍采取的手段之一^[24]。在生物絮团对虾养殖经验中,水体前期氨氮升高,且数值波动严重,之后缓慢下降,此时亚硝态氮开始积累,养殖后期水质氨氮浓度很低或几乎无氨氮,但亚硝酸盐含量处于较高水平^[25]。本研究中,养殖前期将菌株 Y2 添加至对虾养殖水体,氨氮、亚硝酸盐浓度均快速升高,实验组后期氨氮及亚硝态氮含量均处于较低水平,而对照组氨氮上下波动十分剧烈,对虾死亡率高达 90%。据此推测,对虾代谢产生的大量氨氮、亚硝态氮被水体中稳定存活的菌株 Y2 转化去除,维持了水体的健康状态,使得对虾健康状况好,摄食量大,生长快速,存活率高。

除水质外,环境中条件致病菌数量过多也是养殖中的巨大威胁,对虾大量死亡通常伴随弧菌爆发^[26],具有拮抗功能的益生菌不仅能够共培养时将弧菌限制在不可检测的水平,而且与没有益生菌的对照组相比,在很大程度上抑制了对虾

孵化环境中的天然弧菌的生长^[19]。菌株 Y2 接种于养殖水体 1~3 d,弧菌数量较多,自第 3 天起,弧菌数量急剧减少,且实验组弧菌始终比对照组少,表明菌株 Y2 抑制弧菌效果显著。

另外,对于微生物在调控养殖水质方面,不同菌属微生物去除氨氮及亚硝态氮的途径及各种含氮污染物的去向问题报道各不相同。芽孢杆菌通过反硝化作用去除亚硝态氮^[27],异养硝化细菌能在好氧条件下通过硝化作用将氨氮氧化为羟胺等^[28],而固氮细菌则通过氨同化作用吸收周围环境中的氨氮^[29]。本研究通过对所筛选菌株 Y2 的生长与培养液中各无机氮的连续监测,证明该菌通过氨同化作用去除水体中的氨氮,利用氨氮作为氮源合成谷氨酰胺,因此培养液中氨氮含量在降低的同时,亚硝态氮含量无积累,12 h 氨氮去除率达 90%;当水体中无氨氮后,细胞经过短暂调整,开始利用反硝化作用将亚硝态氮及硝态氮通过一系列中间产物(NO_2^- 、 NO 、 N_2O)还原为氮气。弓洵等^[30]通过构建 *nirS-lacZ* 融合载体发现 *nirS* 基因(亚硝酸盐还原酶结构基因)在固氮施氏假单胞菌反硝化过程中发挥重要作用,参与了亚硝酸盐的转化。对该种菌标准菌株 *Alteromonas macleodii* ATCC 27126 进行基因注释也发现其存在氨同化、硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶基因,再次印证该菌分别通过氨同化、反硝化两个过程实现去除水体中氨氮、亚硝态氮的功能。本研究后续将通过 PCR 等分子生物学技术探究或验证该菌去除含氮无机污染物的途径及机制,以期通过基因工程修饰改进获得更好的益生效果。

综上,本研究从对虾养殖系统中筛选出麦氏交替单胞菌 Y2,并在实验室养殖体系内验证了其去除氨氮、亚硝态氮,抑制病原菌生长、提高对虾存活率及生长速率的功能,是一株适应性广、功能丰富的水产益生菌备选菌株,为后续研究其作用分子机制和中试生产应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Li K, Liu L P, Clausen J H, et al. Management measures to control diseases reported by tilapia (*Oreochromis*, spp.) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guang-

- dong, China[J]. Aquaculture, 2016, 457: 91-99.
- [2] Crab R, Defoirdt T, Bossier P, et al. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges[J]. Aquaculture, 2012, 356-357: 351-356.
- [3] Valencia-Castañeda G, Frías-Espéricueta M G, Vanegas-Pérez R C, et al. Acute toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to shrimp *Litopenaeus vannamei*, postlarvae in low-salinity water[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2018, 101(2): 229-234.
- [4] Ge H X, Li J, Chen P, et al. Susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio parahaemolyticus*: The influence of environmental nitrite nitrogen[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 629-636. [葛红星, 李健, 陈萍, 等. 亚硝酸盐氮胁迫下凡纳滨对虾对副溶血弧菌的易感性[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 629-636.]
- [5] Su Z Z, Li Y, Pan L Q, et al. An investigation on the immunoassays of an ammonia nitrogen-degrading bacterial strain in aquatic water[J]. Aquaculture, 2016, 450: 17-22.
- [6] Arias-Moscó J L, Espinoza-Barrón L G, Miranda-Baeza A, et al. Effect of commercial probiotics addition in a biofloc shrimp farm during the nursery phase in zero water exchange[J]. Aquaculture Reports, 2018, 11: 47-52.
- [7] Wang X Y, Wang H, Zhao Y, et al. UV-mutated breeding of *Bacillus subtilis* strain with high protease activity and evaluation of its substrate degradation ability[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1351-1357. [王晓云, 王慧, 赵燕, 等. 紫外诱变选育高活性蛋白酶枯草芽孢杆菌及其降解饲料能力评价[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1351-1357.]
- [8] Yang S P, Zhou J H, Sun C B, et al. Effects of *Bacillus* strains producing lactic acid on water quality in a shrimp culture system[J]. Fisheries Science, 2018, 37(4): 489-493. [杨世平, 周嘉豪, 孙成波, 等. 产乳酸芽孢杆菌对对虾养殖水体水质的影响[J]. 水产科学, 2018, 37(4): 489-493.]
- [9] Pham D, Ansquer D, Chevalier A, et al. Selection and characterization of potential probiotic bacteria for *Litopenaeus stylirostris*, shrimp hatcheries in New Caledonia[J]. Aquaculture, 2014, 432: 475-482.
- [10] Le B, Yang S H. Probiotic potential of novel *Lactobacillus*, strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Microbiology, 2018, 56(2): 138-144.
- [11] Altmann D, Stief P, Amann R, et al. *In situ* distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment[J]. Environmental Microbiology, 2010, 5(9): 798-803.
- [12] Shan H W, Bao W Y, Ma S, et al. Ammonia and nitrite nitrogen removal in shrimp culture by *Vibrio alginolyticus*, VZ5 immobilized in SA beads[J]. Aquaculture International, 2016, 24(1): 357-372.
- [13] Avnimelech Y. Bio-filters: The need for a new comprehensive approach[J]. Aquacultural Engineering, 2006, 34(3): 172-178.
- [14] Wei L, Chen C, Long Y Y, et al. Isolation, identification and antimicrobial activity of *Bacillus pumilus* B1[J]. Fisheries Science, 2015, 34(3): 161-168. [韦露, 陈偿, 龙云映, 等. 一株短小芽孢杆菌 B1 的筛选鉴定及其抗菌特性研究[J]. 水产科学, 2015, 34(3): 161-168.]
- [15] Goulden E F, Hall M R, Bourne D G, et al. Pathogenicity and infection cycle of *Vibrio owensii* in larviculture of the ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(8): 2841-2849.
- [16] Yang Y B, Yang Q H, Xu N, et al. Isolation and identification of *Aeromonas media* from *Ictalurus punctatus* and its antibiotic sensitivity[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(6): 1199-1204. [杨移斌, 杨秋红, 胥宁, 等. 斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*) 源中间气单胞菌 (*Aeromonas media*) 分离鉴定及药敏特性[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(6): 1199-1204.]
- [17] Yan X H, Wang G Z, Chen D J. To detect $\text{NH}_3\text{-N}$ in sea water by Nessler's reagent colorimetry[J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2003, 15(3): 21-23. [闫修花, 王桂珍, 陈迪军. 纳氏试剂比色法测定海水中的氨氮[J]. 环境监测管理与技术, 2003, 15(3): 21-23.]
- [18] Baumann L, Baumann P, Mandel M, et al. Taxonomy of aerobic marine *eubacteria*[J]. Journal of Bacteriology, 1972, 110(1): 402-429.
- [19] Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Josie Lategan M, et al. *Alteromonas macleodii* 0444 and *Neptunomonas* sp. 0536, two novel probiotics for hatchery-reared Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*[J]. Aquaculture, 2010, 309(1-4): 49-55.
- [20] Kang C L, Li Q F, Zhang Y, et al. Purifying effect of three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains on the farming water of *Verasper variegates*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 42-48. [康传磊, 李秋芬, 张艳, 等. 三株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲷养殖水质的净化效果[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 42-48.]

- [21] Vinoj G, Vaseeharan B, Jayaseelan B D, et al. Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* (DAB1) and *Pseudomonas aeruginosa* (DAP1) against *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Fenneropenaeus indicus*[J]. Aquaculture International, 2013, 21(5): 1121-1135.
- [22] Song Z F, An J, Fu G H, et al. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus*, sp. YX-6 from shrimp culture ponds[J]. Aquaculture, 2011, 319(1-2): 188-193.
- [23] Zhang J S, Lu N, Tian C C, et al. Screening and identification of an efficient nitrogen-degrading strain and application of a potential analysis[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 757-765. [张家顺, 吕娜, 田长城, 等. 一株高效脱氮菌株的分离鉴定及应用潜力分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 757-765.]
- [24] Ahmad I, Babitha Rani A M, Verma A K, et al. Biofloc technology: An emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition[J]. Aquaculture International, 2017, 25(3): 1215-1226.
- [25] Chen S X. Relationship between bacterial density and the physical and chemical factors in higher-place ponds of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2014, 36(3): 219-226. [陈世祥. 高位虾塘细菌数量变化特点及其与理化因子的关系[J]. 福建水产, 2014, 36(3): 219-226.]
- [26] Sung H H, Hsu S F, Chen C K, et al. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation[J]. Aquaculture, 2001, 192(2-4): 101-110.
- [27] Nie H H, Zhao Q F, Li C H, et al. Identification and characteristics 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.]
- [28] Chen Q, Ni J R. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(9): 1305-1310.
- [29] Nagatani H, Shimizu M, Valentine R C. The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria[J]. Archiv für Mikrobiologie, 1971, 79(2): 164-175.
- [30] Gong P, Wang L Y, Shang L G, et al. The transcriptional regulation and functional identification of nitrite reductase *nirS* in *Pseudomonas stutzeri* A1501[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 93-100. [弓湃, 王丽英, 尚立国, 等. 固氮施氏假单胞菌亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 转录特性及功能鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 93-100.]

Isolation and identification of an ammonia-N- and nitrite-N-degrading strain and its application in bioflocs for shrimp culture system

DING Xiongqi^{1,2,4}, XIE Mei^{1,2,4}, CHEN Chang^{1,2,3}, GUAN Yunyan^{1,2}, FANG Jianxiang^{1,2,4}, YUN Long^{1,2,4}

1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
3. Xisha/Nansha Ocean Observation and Research Station, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In recent years, biofloc technology (BFT) has become an important water-saving and emission-reducing aquaculture model in aquaculture development. However, in high-density farming ponds, the concentrations of ammonia and nitrite are often much higher than established standards. High ammonia and nitrite concentrations are harmful in aquaculture, where they increase the stress experienced by shrimp, resulting in disease outbreaks. The removal of ammonia and nitrite is an effective method of reducing water pollution resulting from residual food and feces. The Y2 strain, which can efficiently remove ammonia and nitrite, was isolated from the culture water of *Litopenaeus vannamei*. Experiments investigating the physiology-biochemistry of this strain and the similarity of 16S rRNA gene sequences have been conducted. The safety of Y2 was evaluated by an immersion infection and antimicrobial susceptibility test. The fermentation conditions, including temperature, pH, and salinity, were optimized, and dynamic changes between bacterial growth and the concentration of pollutants in water were investigated. Water quality, the amount of bioflocs, the number of pathogenic bacteria, and the growth and survival rates of shrimps were monitored through a 28-day culture experiment. The Y2 strain was preliminarily identified as *Alteromonas macleodii*, based on physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis. The strain was resistant to oxacillin and clindamycin. Optimum fermentation of the Y2 strain was observed under conditions of 30°C, pH 7.0, and 2% salinity. The 48 h half-lethal concentration of the strain to *Artemia* was higher than that of *Vibrio harveyi*. The LC₅₀ of strain Y2 exceeded 10⁸ cfu/mL, and this strain was nontoxic to cultured animals. The Y2 strain continuously removed ammonia and nitrite from aquaculture water. It inhibited the growth of vibrios, increased the survival and growth rates of shrimps, and was able to survive in water for a long period of time. Therefore, the Y2 strain has high potential as a probiotic for aquaculture and may be used as the key bacterium to regulate water quality in bioflocs culture systems.

Key words: ammonia nitrogen; nitrite nitrogen; degrade; *Alteromonas macleodii*; *Litopenaeus vannamei*; safety

Corresponding author: CHEN Chang. E-mail: chen.chang@scsio.ac.cn