

文章编号: 1000-0615(2019)04-1171-10

DOI: 10.11964/jfc.20180211191

一株亚硝酸盐降解菌的分离鉴定及其降解特性

刘玉廷^{1,2}, 刘文舒², 杨天俊¹, 郭小泽², 陈彦良²,
唐艳强², 肖海红², 黎德兵^{1*}, 李思明^{2*}

(1. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130;

2. 江西省农业科学院畜牧兽医研究所, 江西 南昌 330200)

摘要: 为获得高效降解亚硝酸盐菌, 从鄱阳湖水域筛选出1株新型反硝化细菌, 命名为X10。本实验对菌株进行16S *rDNA*基因序列分析, 构建系统发育树并结合生化指标对该菌株进行鉴定; 研究了亚硝酸盐浓度、pH值、温度、接种量对其生长及脱氮能力的影响, 以及菌株对养殖水体中亚硝酸盐氮的降解能力。结果显示, X10鉴定为木糖氧化无色杆菌; 温度30 °C、pH 7.0、接种量3%, 经48 h培养后菌株对筛选培养基中亚硝酸盐(浓度300 mg/L)的降解率最高, 达99.8%; 将该菌液(2×10^8 CFU/mL)按1%的接种量加入人工养殖池塘水中(亚硝酸盐质量浓度为0.45 mg/L, pH为6.7), 28 °C水温下经96 h后亚硝酸盐降解率达82.6%; 安全性评价实验显示, X10菌落周围无溶血现象, 并且高浓度菌液(5×10^8 CFU/mL)对斑马鱼无致死作用。研究表明X10在水产养殖中具有较好的应用前景。

关键词: 木糖氧化无色杆菌; 菌株筛选; 亚硝酸盐; 水产养殖

中图分类号: Q 938.8; S 917.1

文献标志码: A

目前, 中国高密度集约化水产养殖水体中存在的亚硝酸盐氮, 除了工业废水、农业面源污染等外源性输入外, 还包括残饵、代谢产物、药物等内源性输入^[1-3]。亚硝酸盐氮能氧化鱼、虾体内亚铁血红素使之失去载氧能力, 导致大批养殖动物患病甚至死亡, 严重影响水质和水产品安全^[4]。已有调查研究表明, 当前人工水产养殖池亚硝酸盐氮含量通常超过0.3 mg/L, 有的甚至高达15 mg/L^[5]。目前, 消除养殖水体亚硝酸盐氮是保障水产健康养殖的必要措施。

以微生物降解为基础的生物修复技术是消除环境中亚硝酸盐氮的有效办法, 反硝化除氮能将多种含氮化合物转化为气态含氮物质, 被认为是生物除氮最有效的方式^[6-7]。研究表明, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)等诸多反硝化细菌可降解水体中亚硝酸盐^[8-10],

但降解率差异性极大, 范围在7%~78%。从水产养殖水中筛选的目的菌株可显著降解水体中亚硝酸盐氮, 对养殖水体水质和微生态结构稳定具有明显保护作用^[11-12]。本研究从鄱阳湖水域筛选出一株新型高效降解亚硝酸盐菌, 通过探究该菌降解特性及养殖水净化能力, 为研发高效、实用的降解亚硝酸盐微生态制剂奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

样品来源 于鄱阳湖与信江交界处(28°49'46.69"N, 116°22'32.77"E), 取水500 mL和底泥300 g用于菌株筛选。

培养基 富集培养基(g): NaNO₂ 1.0, CH₃COONa 4.8, K₂HPO₄·3H₂O 1.2, Fe₃PO₄·4H₂O 0.01, 蒸馏水定容至1 L(固体培养基加2%的琼脂),

收稿日期: 2018-02-25 修回日期: 2018-10-10

资助项目: 国家自然科学基金(31660743); 江西省青年科学基金(20171BAB214015); 江西省特种水产产业技术体系专项(JXARS-10); 江西现代农业科研协同创新专项(JXXTCX2015004-09, JXXTCX2015001-01)

通信作者: 黎德兵, E-mail: ldb732605122@163.com; 李思明, E-mail: Lisiming16@163.com

pH 7.0, 121 °C高压灭菌 20 min;

筛选培养基(g): NaNO_2 0.5, CH_3COONa 3.4, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{Fe}_3\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, NaCl 30, 蒸馏水定容至1 L, pH 7.0, 121 °C高压灭菌 20 min;

测定培养基: 在筛选培养基基础上适当调整亚硝酸钠含量;

LB培养基(g): 酵母提取物 5, 蛋白胨 10, NaCl 10, 蒸馏水定容至 1 L, pH 7.0, 121 °C高压灭菌 20 min。

1.2 菌株筛选

将水样和底泥样本悬浮液充分混匀后, 按5%的比例接种到富集液体培养基中, 于30 °C, 180 r/min摇床振荡培养48 h, 重复操作3次, 淘汰弱势菌群。取100 μL 菌液涂布富集固体培养基, 30 °C孵育48 h。挑选单菌落, 在富集固体培养基上划线, 30 °C孵育48 h。挑选单菌落接种到筛选液体培养基, 于30 °C, 180 r/min摇床振荡培养48 h后, 筛选出生长情况良好的菌株接入LB培养基, 于30 °C, 180 r/min摇床振荡培养24 h, 制成 2.8×10^8 CFU/mL的分离菌株种子液, 与40%无菌甘油(质量比)等体积(500 μL)混合均匀, 于-80 °C冰箱保存。

1.3 菌株降解亚硝酸盐实验

将分离菌株种子液按3%的接种量接入筛选液体培养基中, 于30 °C, 180 r/min恒温摇床振荡培养, 分别在24、48 h取2 mL菌液, 经8 000 r/min离心取上清液测定 NO_2^- 浓度。以空白筛选培养基为对照, 计算菌株亚硝酸盐降解率。

1.4 菌株鉴定

形态和生化特性鉴定 分离菌株采用平板涂布法接种, 30 °C富集固体培养基培养, 待菌落长出后, 观察菌落的大小、形态、颜色等特征; 菌株生化特性鉴定参考《伯杰细菌鉴定手册》^[13]。

分子生物学鉴定 16S *rDNA*通用引物27f (SEQ ID NO.1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-AG-3')和1492r (SEQ ID NO.2: 5'-GGTTACCTT-GTTACGACTT-3'), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以筛选得到的菌株总DNA为模板进行PCR扩增, 扩增反应体系(50 μL): $10 \times$ buffer 5.0 μL , dNTP 4.0 μL , 上下游引物各1.0 μL ,

*Taq*酶0.5 μL , 模板1.0 μL , ddH₂O 37.5 μL 。反应程序: 95 °C预变性 5 min; 94 °C变性 30 s, 54 °C退火 30 s, 72 °C延伸 30 s, 32个循环; 72 °C终延伸 10 min。目的片段送深圳华大基因股份有限公司测序, 测序结果在GenBank数据库中利用BLAST进行在线同源性对比。将对比结果最为相似的序列与分离菌株的序列用MEGA version 5软件构建菌株的16S *rDNA*系统进化树。

1.5 菌株降解特性研究

菌株生长对亚硝酸盐降解的影响 将分离菌株种子液按3%的接种量接入筛选培养基中, 于30 °C、180 r/min恒温摇床振荡培养。每隔3 h取样, 测定亚硝酸盐的降解率及菌株生长量。实验重复3次。

亚硝酸盐初始浓度对菌株降解效应的影响 将分离菌株种子液按3%的接种量接入到高浓度亚硝酸盐组(25、50、100、200、300、400、500、600、700 mg/L)和低浓度亚硝酸盐组(5.0、2.0、1.0、0.5、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/L)的测定培养基中, 于30 °C、180 r/min恒温摇床振荡培养。分别于48 h和24 h后测定2组培养基中亚硝酸盐的降解率以及菌株生长量。实验重复3次。

pH值对菌株降解亚硝酸盐的影响 按上述所测最适亚硝酸盐初始浓度, 将分离菌株种子液按3%的接种量接入pH分别为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0的测定培养基中, 于30 °C、180 r/min恒温摇床振荡培养。48 h后测定培养基中亚硝酸盐的降解率以及菌株生长量。实验重复3次。

温度对菌株降解亚硝酸盐的影响 在上述所测最适亚硝酸盐初始浓度和pH基础上, 将分离菌株种子液按3%的接种量接入测定培养基中, 分别于20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C的恒温摇床上, 180 r/min振荡培养, 48 h后测定培养基中亚硝酸盐的降解率以及菌株生长量。实验重复3次。

接种量对菌株降解亚硝酸盐的影响 在上述所测最适亚硝酸盐初始浓度和pH基础上, 将分离菌株种子液分别按1%、2%、3%、5%、8%、10%的接种量接入到测定培养基中, 于30 °C、180 r/min恒温摇床振荡培养, 48 h后测定培养基中亚硝酸盐的降解率以及菌株生长量。实验重复3次。

1.6 人工养殖池塘水体亚硝酸盐降解实验

选用江西省农业科学院附近精养池塘水作为实验用水,经检测亚硝酸盐浓度为0.45 mg/L, pH为6.7。将水分装到12个水族缸中,每缸盛水20 L并分成2组,水温分别控制在(28±1) °C和(24±1) °C。每组随机选择3个缸按1%的接种量接种菌液(2×10⁸ CFU/mL)作为实验组,余下3个缸为不接种菌液的对照组。分别静置0、24、48、72、96 h后,每缸水取样2 mL,检测NO₂⁻浓度。

1.7 菌株安全性评价

溶血实验 取分离菌株于30 °C, 120 r/min水浴振荡培养24 h,平板涂布在5%兔鲜血营养培养基上,30 °C培养24 h后观察溶血情况,重复3次。

毒性实验 选用已曝气的自来水作为实验用水,分装到12个水族缸中,每缸水量10 L并随机分成4组,水温控制在(28±1) °C,每缸投放35尾健康斑马鱼(*Danio rerio*)。3 d后,按10%的接种量分别加入浓度为1×10⁸、2×10⁸、3×10⁸、5×

10⁸ CFU/mL的菌悬液。实验期间,缸内不充氧,不换水,持续观察鱼种活动情况7 d。

1.8 分析方法与数据处理

氨氮测定采用纳氏试剂分光光度法;亚硝态氮测定采用盐酸萘乙二胺分光光度法(GB/T5009.33-2008);菌体生长量采用光电比浊计数法(用分光光度计测定微生物悬浮液OD₆₀₀值)。实验结果用平均值±标准差(mean±SD, n=3)表示,运用软件SPSS 11.0,经One-Way ANOVA分析,采用Duncan氏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

2.1 菌株的筛选

采集的水样和泥样经硝化富集培养后,共得到63株菌株。对63株分离菌株用亚硝酸盐筛选培养基培养,进一步筛选出降解效果较好的6株细菌(表1),其中标号X10的菌株降解率最高,达62.28%,该菌株即为本实验的目的菌株。

表1 分离菌株对亚硝酸盐的降解

Tab. 1 Degradation rate of nitrite by isolated strains

作用时间/h time for treatment	菌株降解率/% degradation rate of strain					
	X3	X5	X10	X17	X34	D10
0	0	0	0	0	0	0
24	18.89±1.30 ^b	20.08±0.13 ^{bc}	21.93±2.01 ^{bcd}	20.73±1.21 ^{bc}	17.62±0.13 ^a	19.54±1.62 ^{bc}
48	49.53±2.94 ^b	50.62±0.27 ^b	62.28±1.09 ^{bc}	51.07±2.18 ^b	44.71±1.07 ^a	50.76±2.59 ^b

注:同一行不同的小写字母表示差异显著(P<0.05)

Notes: within a row, means with no common superscript letters are significantly different (P<0.05)

2.2 菌株鉴定

菌株X10经富集固体培养基培养,菌落凸起呈圆形,米黄色,表面光滑不透明,边缘整齐,质地较软,无晕环;分子生物学鉴定显示,16S rDNA PCR扩增产物电泳图获得分子量在1 000 bp与2 000 bp之间的单一扩增条带(图1),经测序发现,所获得的序列长度为1 407 bp。其部分序列已在GenBank中注册,登录号:MG645388。利用BLAST进行在线同源性对比并构建降解菌株的16S rDNA系统进化树(图2),X10与无色杆菌聚为一支,同源性达到100%,结合生化特性指标,菌株为革兰氏阴性菌,亚硝酸盐还原和硝酸盐还原均为阳性,明胶液化为阴性等,确定菌株为

木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*) (表2,表中“+”和“-”分别表示“阳性”和“阴性”)。

2.3 菌株降解亚硝酸盐特性实验

菌株生长对亚硝酸盐降解的影响 随着细菌的生长,3 h后菌株迅速增殖进入对数生长期,亚硝酸盐降解迅速,42 h后进入稳定生长期,此时降解率最高为63.9%,可将初始量为500 mg/L的亚硝酸盐氮降解至180.5 mg/L;后随时间增加,菌株生长量和降解率呈下降趋势(图3)。

亚硝酸盐初始浓度对菌株降解效应的影响 菌株X10在低亚硝酸盐浓度(0.025~5.0 mg/L)条件下,OD₆₀₀和降解率差异不显著(P>0.05),24 h后细菌降解率均达99%(图4)。在高亚硝酸盐浓度

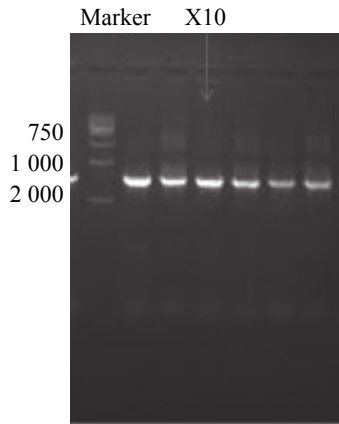


图 1 菌株X10 16S rDNA基因扩增产物
Fig. 1 Electrophore profile of PCR products of 16S rDNA of X10 strain

(25~700 mg/L)条件下, OD₆₀₀差异不显著($P>0.05$); 亚硝酸盐浓度25~300 mg/L内, 菌株48 h内降解率均达到99.8%, 且各组差异不显著($P>0.05$); 亚硝酸盐浓度300~700 mg/L内, 菌株降解率呈下降趋势, 显著低于亚硝酸盐浓度0.025~5.0 mg/L和25~300 mg/L范围内的菌株降解率($P<0.05$)(图5)。

pH值对菌株降解亚硝酸盐的影响 在亚硝酸含量300 mg/L测定培养基中, pH值3~11范围内, 随pH值增大, 菌株X10生长量和降解能力均先升高后降低, 在pH为7时同时达到了最大值, OD₆₀₀和降解率均显著提高($P<0.05$)(图6)。

温度对菌株降解亚硝酸盐的影响 在亚硝酸含量300 mg/L测定培养基中, pH为7时, 随温度升高, 菌株增殖速率先加快后变缓, 至30 °C

表 2 菌株X10的形态及生化特性

Tab. 2 Morphological and biochemical characteristics of X10 strain

测试项目 item	测定结果 result	测试项目 item	测定结果 result
革兰氏染色 gram stain	—	甘露醇 manna sugar	—
运动性 motility	+	木糖 xylose	—
亚硝酸盐还原 nitrite reduction	+	果糖 fructose	—
硝酸盐还原 nitrate reduction	+	葡萄糖 glucose	—
1% NaCl	+	蔗糖 sucrose	—
3% NaCl	—	精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	—
7% NaCl	—	赖氨酸水解酶 lysine hydrolase	+
明胶液化 gelatin liquefaction	—	鸟氨酸水解酶 ornithine hydrolase	+

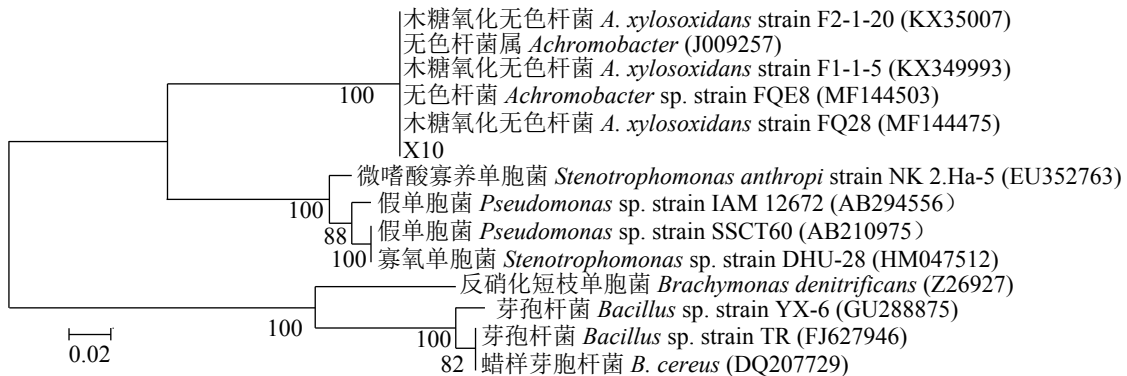


图 2 菌株X10基于16S rDNA序列同源性用NJ法构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain X10 based on 16s rDNA gene homology

时达到最大值, OD₆₀₀显著高于其余各组($P<0.05$); 对亚硝酸盐降解率先升高后降低, 在30 °C与35 °C条件下降解率无显著差异($P>0.05$), 亚硝酸盐的

降解率均达99.5%以上, 显著高于其余各组($P<0.05$)(图7)。

接种量对菌株降解亚硝酸盐的影响 在

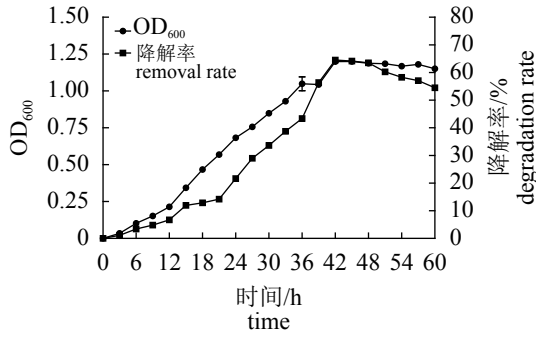


图3 菌株X10生长与亚硝酸盐氮降解曲线
 Fig. 3 Dynamics of X10 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen

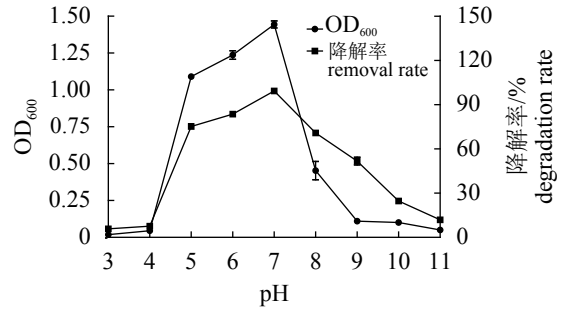


图6 不同pH条件下菌株X10生长及亚硝酸盐氮的降解曲线
 Fig. 6 Dynamics of X10 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen at different pH values

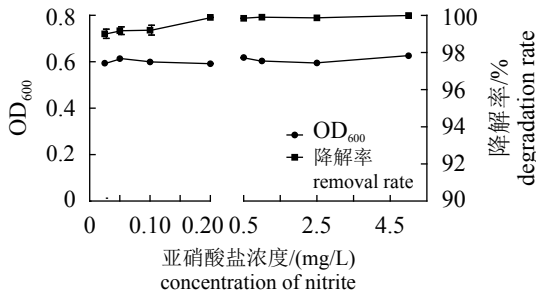


图4 低亚硝酸盐浓度条件下菌株X10生长及亚硝酸盐氮的降解曲线
 Fig. 4 Dynamics of X10 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen at low nitrite concentrations

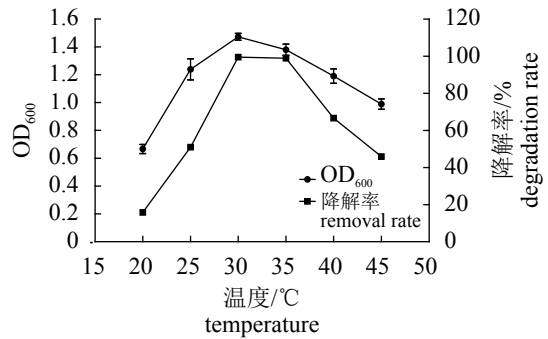


图7 不同温度条件下菌株X10生长及亚硝酸盐氮降解曲线
 Fig. 7 Dynamics of X10 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen at different temperature

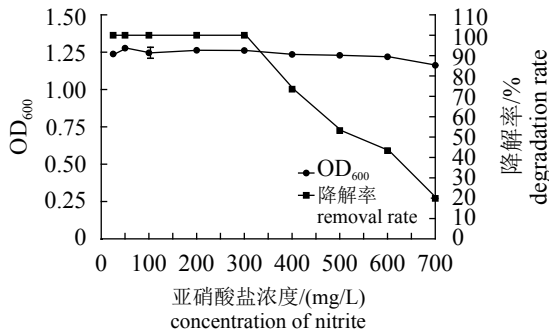


图5 高亚硝酸盐浓度条件下菌株X10生长及亚硝酸盐氮的降解曲线
 Fig. 5 Dynamics of X10 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen under high nitrite concentrations

平稳, 降解率则逐渐降低, 菌株X10最佳接种量为3%(图8)。

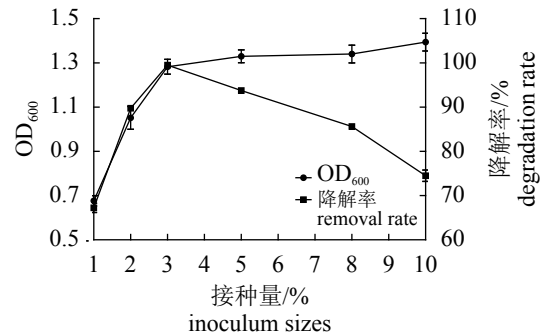


图8 不同接种量下菌株X10生长及亚硝酸盐氮降解曲线
 Fig. 8 Dynamics of X10 strain's growth and degradation curves of nitrite nitrogen under different inoculum sizes

亚硝酸含量300 mg/L, pH为7, 温度30 °C时, 接种量在1%~3%间, 菌株生长量与降解率均呈上升趋势; 接种量在3%时, 降解率最大为99.8% ($P < 0.05$), 后随接种量的增大, 菌株增长量趋于

上述结果显示,菌株X10在最适生长条件(温度30℃, pH为7.0, 接种量3.0%, 亚硝酸盐浓度小于300 mg/L)下, 24~48 h亚硝酸盐降解率达99.8%; 在温度范围25~40℃、pH值5.0~8.0水体, 仍能保持较高的亚硝酸盐降解活性(> 50.0%)。

2.4 人工养殖池塘水体亚硝酸盐降解实验

在0~96 h过程中, 菌株X10在28℃水温条件下的降解率显著高于24℃和对照组降解率($P < 0.05$), 且随着时间延长菌株的降解率不断升高, 72 h后进入稳定期, 至96 h达到最大值82.6%, 显著高于24 h和48 h降解率($P < 0.05$); 菌株X10在24℃水温条件下降解率也显著高于对照组降解率($P < 0.05$), 随着时间延长菌株的降解率不断升高, 至96 h达到最大值68.6%, 显著高于其余时间点($P < 0.05$)(图9)。

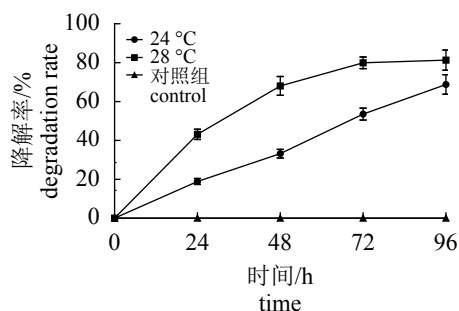


图9 菌株X10对养殖池塘水体中亚硝酸盐氮的降解效果

Fig. 9 The nitrite removal by strain X10 in pond water

2.5 菌株安全性评价

溶血实验 在5%兔鲜血平板上, 经过30℃培养48 h后, 菌落周围无溶血现象出现。

毒性实验 将10%的接种量浓度为 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 5×10^8 CFU/mL的菌液加入饲喂斑马鱼的水族缸中。7 d饲喂期间, 各水族缸中斑马鱼均游动正常、反应敏捷, 未出现死亡和任何异常现象。

3 讨论

3.1 菌株的筛选与鉴定

从同水域的水体或淤泥中筛选降解亚硝酸盐菌株是净化静水养殖水体的有效办法, 得到的菌株通常对水体具有很强的适应能力, 且对水生动植物无害^[14]。菌株X10经16S *rDNA*序列比

对和生化特征分析, 确定为木糖氧化无色杆菌, 菌落特征与已知木糖氧化无色杆菌P1、X_L等基本一致, 但与SQ-1菌株培养菌落颜色存在差异, 可能与培养环境条件不同有关^[15-17]。木糖氧化无色杆菌应用于金属及芳烃类有机物降解方面研究颇多: 土壤修复实验表明, 菌株LAX2不仅能降低土壤和小白菜中Pb含量, 还促使小白菜株高增加49.4%^[18]; FC32、SQ-1均能降解底物中80%以上的菲^[19]。但作为反硝化细菌降解氨氮仅见于实验室研究, 如Zhu等^[20]筛选出的一株无色杆菌1-8可显著降低水中 NH_4^+ -N和 NO_2^- -N, 可有效改善水体水质; Chen等^[21]从垃圾渗透液中分离得到GAD3无色杆菌在 NH_4^+ -N浓度为73.28 mg/L时, 降解率达100%; 本实验筛选的菌株X10能够以亚硝酸盐氮作为唯一氮源进行生长, 在亚硝酸盐浓度为500 mg/L时, 48 h内累积降低亚硝酸盐达310 mg/L, 不仅能修复贫营养生态系统, 更可高效降解亚硝酸盐, 大大缩短转化过程。

3.2 菌株降解亚硝酸盐特性

反硝化细菌降解亚硝酸盐的能力受亚硝酸盐浓度本身影响较大。假单胞菌53降解率在亚硝酸盐浓度为2~25 mg/L范围内先增大后减小, 在浓度为10 mg/L时, 降解率最高为95%, 低于2 mg/L或高于25 mg/L时, 降解率均在80%以下; 菌株NB-8降解率在亚硝酸盐浓度10 mg/L达到最高后呈下降趋势, 当亚硝酸盐浓度升至80 mg/L时, 降解率低至9.83%^[22]。本实验发现, 菌株X10在亚硝酸盐浓度0.025~5.0 mg/L和25~300 mg/L内均生长良好, 且降解率保持在99%以上, 表明该菌耐受亚硝酸盐浓度范围大, 适用亚硝酸盐污染水体广, 明显优于已报道的多数反硝化细菌。

环境中的pH主要作用于细胞膜电荷, 影响微生物对营养物质的吸收和代谢过程中酶的活性。研究表明, 细菌生长及反硝化酶活性的最适pH为中性或微碱性, 如寡养单胞菌、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)^[23-24]等。此外王燕等^[25]发现反硝化基因 $cnorB$ 和 $nirS$ 在pH 6~8时的表达水平最高且保持相对稳定。本研究发现, pH为7时, 菌株X10具有最佳生长特性及反硝化活性, 这与上述报道基本一致; 在pH 5时, 菌株仍具有较好的生长特性和降解效果, 是否与菌株反硝化酶具有一定的耐酸能力有关, 尚需进一步研究; 但pH值小

于5的酸性环境中,该菌的生长和反硝化活性受到明显抑制,可能与细菌表面的负电荷环境被改变,营养物质难于进入细胞,或者基质中H⁺浓度过高,相关酶结构不稳定,致酶活性降低有关^[26]。

与pH、低溶解氧浓度、有毒化合物、高有机负荷等因素相比,温度对生物脱氮的影响更显著。温度的改变会引起细胞酶活性及膜蛋白、不饱和脂肪酸的结构变化,从而影响细菌的生长及脱氮性能,温度过高或过低均能导致亚硝酸盐氮还原失败^[27]。本实验结果显示,水温在25~40℃,该菌可以正常生长,并保持较高的反硝化活性;水温范围为30~35℃,菌株生长及反硝化活性发挥最佳,降解率达99.5%以上,据此推断该菌株应用于夏季污染水体清除亚硝酸盐效果较好。该特性与已报道的施氏假单胞菌(*P. stutzeri*) LYS^[28]、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)C-4^[29]等菌株基本相似。

3.3 人工养殖池塘水体检测与安全性评价

为进一步探究细菌等微生物在水产养殖中实际应用效果,需进行人工养殖池塘水体与安全性评价实验。熊焰等^[14]研究发现,接种量为1×10⁸ CFU/mL的巨大芽孢杆菌在4 d内可将水体中5 mg/L亚硝酸盐降至0.235 mg/L;水体中接种假单胞菌53发酵菌液(A_{600 nm}≈0.4),4 d内能使污染水体中的亚硝酸盐含量降至0.174 mg/L^[30]。结果显示,接种量为2×10⁸ CFU/mL时,水温28℃,4 d后可将养殖水体中亚硝酸盐浓度0.45 mg/L降至0.081 mg/L,处理后水体已达到养殖水体标准,降解效果明显优于上述报道中细菌;同时安全性实验结果显示,菌落无溶血现象且高浓度X10菌液(5×10⁷ CFU/mL)在短期内(7 d)不会致死水中斑马鱼。

研究表明,X10在温度范围25~40℃,pH值5.0~8.0的水体中,具有很强的清除氨氮能力和很高的安全性。据江西、江苏^[31]和湖北^[32]等我国淡水水产动物主养区调研发现,6月末至9月初养殖池塘水温(水层50~100 cm)基本维持在27℃以上,同时此时节是鱼类摄食最旺盛的时间,易发生亚硝酸盐沉积,故该菌株具有降解此类养殖水体亚硝酸盐的潜力。此外,一般养殖水体中亚硝酸盐含量低于0.5 mg/L,而该菌耐受亚硝酸盐浓度范围大,在亚硝酸盐含量700.0 mg/L条件下可正常生长,所以亦适用于高浓度亚硝酸盐废

水的净化。

由于实验室环境影响因素相对单一,实验得到的脱氮效果并不能代表实际应用效果。何腾霞等^[33]用实验室条件下得到的恶臭假单胞菌Y-12(*P. putida*)处理自然景观水,48 h内亚硝酸盐的降解率仅为37.7%;何伟等^[34]以好氧反硝化无色杆菌BMB-N6(*A. denitrificans*)为基础制成的混合菌制剂在12 h内可去除90%的亚硝态氮,但在大田应用中7 d仅能去除80%的亚硝态氮。本实验筛选菌株X10在培养基中降解率达99.8%,但养殖水体实验中96 h内亚硝态氮降解率仅为82.6%,归结其原因可能有两点:第一,菌株X10的目标底物不再具有唯一性。养殖水体中物质组成成分复杂,除了亚硝态氮,还存在其他含氮物质;碳源结构的复杂化也不利于菌株的生长繁殖和功能基因的表达。第二,养殖水体中微生物种类的多样性。虽然菌株X10在水体中形成了竞争优势,但其他的微生物还会与其竞争营养物质,或将其他含氮物质转化成亚硝态氮和生物量,间接降低菌株X10的脱氮效率。总之,该菌营养需求低,培养及保存方便,可用于水质净化微生物生态制剂的研发,但大规模养殖池或湖泊应用的降解效果、维持时间和使用量等尚需进一步的研究。

参考文献:

- [1] 吴雅丽,许海,杨桂军,等.太湖水体氮素污染状况研究进展[J].湖泊科学,2014,26(1):19-28.
Wu Y L, Xu H, Yang G J, et al. Progress in nitrogen pollution research in Lake Taihu[J]. Journal of Lake Sciences, 2014, 26(1): 19-28(in Chinese).
- [2] 吴伟,范立民.水产养殖环境的污染及其控制对策[J].中国农业科技导报,2014,16(2):26-34.
Wu W, Fan L M. Pollution and control measures of aquaculture environment[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014, 16(2): 26-34(in Chinese).
- [3] 何腾霞,李振轮,杨珊.好氧反硝化细菌及其去除亚硝酸盐的作用机理研究进展[J].过程工程学报,2015,15(1):174-180.
He T X, Li Z L, Yang S. Research progress in aerobic denitrifier and its removing mechanism of nitrite[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2015, 15(1): 174-180(in Chinese).

- [4] 张卫强, 朱英. 养殖水体中氨氮的危害及其检测方法研究进展[J]. 环境卫生学杂志, 2012, 2(6): 324-327.
Zhang W Q, Zhu Y. Advances on the research of the hazard of ammonia nitrogen in aquaculture water and its determination method[J]. Journal of Environmental Hygiene, 2012, 2(6): 324-327(in Chinese).
- [5] 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.
Gao M H, Ma L B, Ge L A, et al. Nitrite uptake mechanism and the influencing factors of accumulation in aquatic animals[J]. South China Fisheries Science, 2008, 4(4): 73-79(in Chinese).
- [6] 李继洲, 程南宁, 陈清锦. 污染水体的生物修复技术研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2005, 6(1): 25-30.
Li J Z, Cheng N N, Chen Q J. Progress in the study of bioremediation for polluted water bodies[J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2005, 6(1): 25-30(in Chinese).
- [7] 刘道玉, 吴伟. 水产养殖水体污染及微生物修复的研究[J]. 现代农业科技, 2011(17): 253-256.
Liu D Y, Wu W. Research on water pollution and microbial remediation of aquaculture[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2011(17): 253-256(in Chinese).
- [8] 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.
Liu H L, Zhang H L, Li X Z. Degradation of nitrite by photosynthetic bacterium- I (PSB- I) isolated from shrimp culture ponds[J]. Fisheries Science, 2005, 24(6): 32-33(in Chinese).
- [9] Guo Y, Zhou X M, Li Y G, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(12): 2045-2049.
- [10] 安健, 宋增福, 杨先乐, 等. 好氧反硝化细菌YX-6特性及鉴定分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 561-569.
An J, Song Z F, Yang X L, et al. Characteristics of aerobic denitrifying strain YX-6 and identification[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 561-569(in Chinese).
- [11] 邓振山, 张春晓. 两株养殖污泥中亚硝酸盐降解菌的筛选及其降解条件[J]. 环境工程, 2016, 34(S1): 176-179, 234.
Deng Z S, Zhang C X. Identification and removal condition of two nitrite removing bacteria from aquaculture sediment[J]. Environmental Engineering, 2016, 34(S1): 176-179, 234(in Chinese).
- [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.
Yang Y, Liu P, Ma P F, et al. Research on the role of *B. megaterium* MPF-906 in purifying water quality of fish cultivating[J]. Journal of Aquaculture, 2007, 28(3): 6-8(in Chinese).
- [13] R E布坎南, N E吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 677-830.
Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Translation team of Berger Bacteria Identification Manual, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Trans. Beijing: Science Press, 1984: 677-830(in Chinese).
- [14] 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.
Xiong Y, Liu L Y, Luo R, et al. Screening, identification, degradation condition and effects of a nitrite-degrading strain[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1264-1271(in Chinese).
- [15] 田雪, 范鹏浩, 邹鹏, 等. 木糖氧化无色杆菌P₁对芪降解的研究及其在两相分配生物反应系统中的应用[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2016, 43(5): 63-68.
Tian X, Fan P H, Zou P, et al. Degradation of pyrene by *Achromobacter xylosoxidans* P₁ and its application in a two-phase partitioning bioreactor[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition), 2016, 43(5): 63-68(in Chinese).
- [16] 司美茹, 赵云峰, 苏涛. 高效降解烷烃的无色杆菌X_L株的分离鉴定及其降解特性[J]. 土壤通报, 2011, 42(3): 562-567.
Si M R, Zhao Y F, Su T. Isolation and identification of a high-efficiency alkane-degrading *Achromobacter insolitius* X_L strain and its degradation characteristics[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2011, 42(3): 562-567(in Chinese).
- [17] 唐玉斌, 孙常宇, 陈芳艳, 等. 一株[卅屈]高效降解菌的

- 分离鉴定及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 593-597.
- Tang Y B, Sun C Y, Chen F Y, *et al.* Isolation and identification of a chrysene-degrading strain and its degradation characteristics[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(4): 593-597(in Chinese).
- [18] 李哲, 陈潼樾, 冷粟, 等. 一株氧化木糖无色杆菌对 Pb 的生物矿化作用及其应用效果研究[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36(10): 2014-2020.
- Li Z, Chen T Y, Leng S, *et al.* Biomineralization of Pb by a strain of *Achromobacter xylosoxidans* and its practical application in bioremediation[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(10): 2014-2020(in Chinese).
- [19] 武凤霞, 范丙全, 刘建玲. 木糖氧化无色杆菌反硝化亚种细菌的分离鉴定及其降解特性研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2007, 13(4): 725-729.
- Wu F X, Fan B Q, Liu J L. Isolation of *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *Denitrificans* and its degradation of phenanthrene[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2007, 13(4): 725-729(in Chinese).
- [20] Zhu L, Ding W, Feng L J, *et al.* Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 108: 1-7.
- [21] Chen Q, Ni J R. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(9): 1305-1310.
- [22] 姚秀清, 刘秀梅. 反硝化细菌降解养殖水体亚硝酸盐的研究[J]. *应用化工*, 2014, 43(5): 871-873.
- Yao X Q, Liu X M. The research of degradation of nitrite by denitrifying bacteria in the aquaculture water[J]. *Applied Chemical Industry*, 2014, 43(5): 871-873(in Chinese).
- [23] 杨浩锋, 唐佳琦, 胡安辉, 等. 一株反硝化细菌的分离鉴定及其反硝化特性[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(1): 366-371.
- Yang H F, Tang J Y, Hu A H, *et al.* Identification and denitrification characteristics of a denitrifier[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(1): 366-371(in Chinese).
- [24] Šimek M, Jiřová L, Hopkins D W. What is the so-called optimum pH for denitrification in soil?[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(9): 1227-1234.
- [25] 王燕, 王淑莹, 孙洪伟, 等. pH和MLSS对短程反硝化过程NO₂-还原速率的影响[J]. *中国给水排水*, 2010, 26(13): 25-28.
- Wang Y, Wang S Y, Sun H W, *et al.* Effects of pH and MLSS on nitrite reduction rate in shortcut denitrification[J]. *China Water & Wastewater*, 2010, 26(13): 25-28(in Chinese).
- [26] 李卫芬, 郑佳佳, 张小平, 等. 反硝化酶及其环境影响因子的研究进展[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(1): 166-170.
- Li W F, Zheng J J, Zhang X P, *et al.* Progress in studies on denitrification enzymes and environmental impact factors[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(1): 166-170(in Chinese).
- [27] Carrera J, Vicent T, Lafuente F J. Influence of temperature on denitrification of an industrial high-strength nitrogen wastewater in a two-sludge system[J]. *Water SA*, 2004, 29(1): 11-16.
- [28] 李焱生, 魏民, 张艾晓, 等. 一株异养型亚硝酸盐氧化细菌的分离及其降解特性的研究[J]. *生物技术通报*, 2010(5): 196-202.
- Li Y S, Wei M, Zhang A X, *et al.* Isolation, identification and characterization of a nitrite-oxidizing bacterium[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(5): 196-202(in Chinese).
- [29] 杨小龙, 李文明, 陈燕, 等. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其除氮特性[J]. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1062-1070.
- Yang X L, Li W M, Chen Y, *et al.* Identification and denitrification of an aerobic bacterium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1062-1070(in Chinese).
- [30] 陈薇, 丁祥力, 贺月林, 等. 亚硝酸盐降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. *环境科学与技术*, 2011, 34(S2): 37-41.
- Chen W, Ding X L, He Y L, *et al.* Isolation, identification and degradation characteristics of nitrite degradation bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 34(S2): 37-41(in Chinese).
- [31] 邓爱娟, 刘敏, 刘志雄, 等. 洪湖地区养殖鱼塘春夏季水温变化及预报研究[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(29): 61-68.
- Deng A M, Liu M, Liu Z X, *et al.* Water temperature change and forecast in spring and summer in aquaculture

- fish pond's in Honghu Area[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(29): 61-68(in Chinese).
- [32] 孟翠丽, 杨文刚, 干昌林, 等. 淡水鱼塘分层水温的变化特征[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(11): 103-108.
- Meng C L, Yang W G, Gan C L, *et al.* Variation characteristics of water temperatures at different depths of fishpond[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(11): 103-108(in Chinese).
- [33] 何腾霞, 李振轮, 徐义. 耐冷亚硝酸盐型反硝化细菌 *Pseudomonas putida* Y-12脱氮特性[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(10): 3071-3077.
- He T X, Li Z L, Xu Y. Denitrification characteristics of a hypothermia nitrite-denitrifier *Pseudomonas putida* Y-12[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(10): 3071-3077(in Chinese).
- [34] 何伟, 王薇, 王洁, 等. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其混合应用特性研究[J]. *生态与农村环境学报*, 2009, 25(2): 88-93.
- He W, Wang W, Wang J, *et al.* Isolation, identification and its mixed application of a strain of aerobic denitrifying bacteria[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2009, 25(2): 88-93(in Chinese).

Isolation, identification and degradation characteristics of a nitrite-degrading strain

LIU Yuting^{1,2}, LIU Wenshu², YANG Tianjun¹, GUO Xiaoze², CHEN Yanliang²,
TANG Yanqiang², XIAO Haihong², LI Debing^{1*}, LI Siming^{2*}

(1. Institute of Animal Science, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

Abstract: In this paper, a new and highly efficient denitrifying bacterium strain from Poyang Lake was screened and named X10. The physiological and biochemical characteristics, 16S *rDNA* gene sequence analysis, and the effects of nitrite concentration, pH value, temperature and inoculum size on the growth and nitrogen removal ability of the strain were researched. Meanwhile, the nitrite degradation capacity of X10 in aquaculture water was also studied. The results showed that the strain X10 was identified as *Acinetobacter xylosoxidans*. The optimal incubation conditions for the aerobic denitrifying strain X10 were: pH, 7.0; inoculation size, 3%; temperature, 30 °C; nitrite concentration, 300 mg/L. Under this circumstance, the degradum rate of nitrite reached peak after 48 h, up to 99.8%. When X10 bacteria (2×10^8 CFU/mL) were added into cultured pond water (28°C), the degradation rate of nitrite was 82.6% after 96 h. The safety evaluation test showed that the high concentration of X10 (5×10^8 CFU/mL) had no lethal effect on *Danio rerio* and no hemolysis was found. These results indicated that X10 can be applied widely in aquaculture.

Key words: screening of microorganisms; *Acinetobacter xylosoxidans*; nitrite; aquaculture

Corresponding author: LI Debing. E-mail: ldb732605122@163.com;

LI Siming. E-mail: Lisiming16@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31660743); Youth Science Fund Project of Jiangxi (20171BAB214015); Earmarked Fund for Jiangxi Agriculture Research System (JXARS-10); Collaborative Innovation Model in Agriculture Scientific Research of Jiangxi (JXXTCX2015004-09, JXXTCX2015001-01)