

# 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

聂欢欢 赵群芬\* 李长红 王一农 张德民

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室 浙江 宁波 315211)

**摘要:**【目的】从南美白对虾养殖塘中分离到高效去除亚硝酸氮的细菌,对其分类和脱氮特性进行了研究。【方法】以除亚硝酸氮为主要指标,取养殖塘底层水样分离筛选菌株;依据 16S rRNA 基因序列和生理生化特征初步鉴定菌株;研究不同碳源、碳氮比、起始 pH、温度、摇床转速和氯化钠浓度对反硝化除亚硝酸氮的影响,并考查了菌株对硝酸氮和氨氮的利用情况。【结果】得到的菌株中菌株 FP6 活性最高,初步鉴定菌株 FP6 属于地衣芽孢杆菌。菌株 FP6 的生长最适脱氮碳源为蔗糖,菌株 FP6 去除亚硝酸氮有高活性的条件范围为: C/N 值 15–25、起始 pH 7.0–10.0、温度 20 °C–37 °C、摇床转速 0–200 r/min 和氯化钠浓度 0–40 g/L。菌株 FP6 对硝酸氮和氨氮都有一定的去除能力,利用硝酸氮时不积累亚硝酸氮。【结论】地衣芽孢杆菌 FP6 具有优良的除亚硝酸氮特性,适宜的温度、pH 和盐度范围较宽。

**关键词:** 亚硝酸氮, 地衣芽孢杆菌, 分离鉴定, 脱氮

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA092001); 宁波市科技计划项目(No. 2012C91028); 浙江省自然科学基金人才培养项目(No. R305333)

\*通讯作者: Tel: 86-574-87600164; 信箱: zhaoqunfen@nbu.edu.cn

收稿日期: 2012-11-28; 接受日期: 2012-12-24

# Identification and characteristics of a strain of bacteria with highly-effective nitrite nitrogen removing

NIE Huan-Huan ZHAO Qun-Fen\* LI Chang-Hong

WANG Yi-Nong ZHANG De-Min

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

**Abstract:** [Objective] A strain of bacterium, strain FP6, with the high ability of removing nitrite nitrogen was isolated from the bottom of the shrimp pond, and its phylogeny and denitrifying characteristics were studied. [Methods] Sequence of the 16S rRNA gene, physiological and biochemical properties were analyzed. Factors that affected the denitrifying ability of strain FP6 were investigated, including carbon sources, C/N ratio, initial pH, temperature, shaker speed and NaCl concentration. Moreover, the ability to remove ammonia and nitrate of the strain was also studied. [Results] Among the isolated strains, strain FP6 showed the highest ability to remove nitrite nitrogen and was identified as *Bacillus licheniformis*. Sucrose was identified as the best carbon source for its growth and denitrification. Under the conditions of C/N ratio 15–25, initial pH 7.0–10.0, temperature 20 °C–37 °C, shaker speed 0–200 r/min and NaCl concentration 0–40 g/L, strain FP6 kept high removing nitrite nitrogen ability. Strain FP6 showed the ability of removing ammonia and nitrate and no nitrite nitrogen was accumulated when removing nitrate. [Conclusion] Strain FP6 possesses excellent removing nitrite nitrogen ability, with wide range of temperature, pH and salinity.

**Keywords:** Nitrite nitrogen, *Bacillus*, Isolation and identification, Denitrification

近年来,水产养殖业得到迅速发展,集约式工厂化养殖逐渐成为发展趋势。然而,这种高密度养殖方式依赖于大量投加的高蛋白饲料(氮含量高达 5.0%–6.5%),其中的氮大部分(约 70%)却以未吃完的饲料和鱼类粪便的形式进入养殖水体中<sup>[1]</sup>。这些未被利用的氮在细菌的作用下大量转化为有害氮素,如氨或亚硝酸氮,导致水质恶化,并可能引起病害暴发,造成巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。亚硝酸盐是细菌硝化铵盐或者反硝化硝酸盐的中间产物<sup>[3]</sup>,同时也是水产动物致病的主要根源之一。亚硝酸盐对鱼虾的主要毒性是影响其

呼吸,它能使鱼类血液中的亚铁血红蛋白氧化成高铁血红蛋白,使虾类血淋巴中的氧合血蓝蛋白转化成脱氧血蓝蛋白,导致血红蛋白或血蓝蛋白对氧的亲和力降低,进而降低机体的输氧能力,对机体产生毒害<sup>[4–5]</sup>。

亚硝酸盐的去除主要有 3 种方式,物理法、化学法和生物法。物理法和化学法由于各自的缺陷而越来越少使用,生物法因其安全、无残留等优点备受关注。反硝化细菌可将亚硝酸氮转化为气态氮(NO、N<sub>2</sub>O 和 N<sub>2</sub>)<sup>[6]</sup>,使有害氮素最终脱离养殖水体,在生物除氮中具有重要作用。已报道

的反硝化细菌有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、副球菌属(*Paracoccus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、红球菌属(*Rhodococcus*)等<sup>[7]</sup>。其中,芽孢杆菌由于具有独特的优势已被广泛用于养殖水体除氮,其反硝化能力也越来越引起研究者的重视<sup>[2,8-13]</sup>。然而,目前关于反硝化细菌的分离及脱氮特性的研究多以硝酸盐作为电子受体,而以亚硝酸盐为目标的反硝化研究却很少,尤其在海水反硝化研究领域。本研究以亚硝酸盐作为电子受体,从海水南美白对虾养殖塘分离筛选具有高效亚硝酸氮去除活性的芽孢杆菌,并进一步研究了影响菌株脱氮活性的主要因素,以期开发去除海水养殖水体亚硝酸盐的水质调控菌剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:**取舟山南美白对虾养殖塘底层水样进行分离。

**1.1.2 培养基:**富集培养基(g/L):牛肉膏粉 3,蛋白胨 10, NaCl 5, NaNO<sub>2</sub> 0.13, pH 7.5。反硝化培养基(g/L): NaNO<sub>2</sub> 0.13, 蔗糖 1.08, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.5, NaCl 25, pH 7.5。固体培养基加琼脂 20 g/L。

### 1.2 高效去除亚硝酸氮细菌的分离筛选

(1) 富集。将水样混匀后,取 10 mL 于含 90 mL 富集培养基的 250 mL 三角烧瓶中,30 °C、150 r/min 富集培养 48 h。

(2) 分离纯化。将富集液于 80 °C 水浴 10 min,然后对富集液梯度稀释至 10<sup>-4</sup>,取 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>和 10<sup>-4</sup>的稀释菌液 100 μL 涂布于反硝化培养基平板。30 °C 培养 1-2 d。从平板上挑选颜色、形状、大小和透明度不同的菌落,继续分离纯化,直至得到纯的单菌落。

(3) 筛选。将纯化的单菌接种于反硝化培养

基中,30 °C、150 r/min 活化培养 24 h。培养菌液按 1% (V/V)接种于反硝化培养基,30 °C、150 r/min 培养 72 h,每 24 h 用 Griess 试剂定性检测亚硝酸氮含量,对在 48 h 内将亚硝酸氮完全去除的菌株,定量检测 0 和 48 h 时培养基中亚硝酸氮、硝酸氮和总氮含量,筛选出快速去除亚硝酸氮并利用亚硝酸氮进行反硝化作用的菌株,并对活性最佳者做进一步研究。

### 1.3 细菌鉴定

**1.3.1 菌株生理生化鉴定:**参照常见细菌系统鉴定手册<sup>[14]</sup>。

**1.3.2 分子鉴定:**16S rRNA 基因序列测定和同源性分析: (1) 酚氯仿异戊醇法提取 DNA。引物为 27F 和 1492R, 序列为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACG ACTT-3'。PCR 反应体系(50 μL): 10×Buffer 5 μL, 27F (20 μmol/L) 1 μL, 1492R (20 μmol/L) 1 μL, 模板 DNA (50 mg/L) 1 μL, dNTPs (2.5 mmol/L Each) 4 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 重蒸水补至 50 μL。PCR 程序: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物测序由上海生物工程技术有限公司完成。(2) 16S rRNA 序列利用 EzTaxon 在线比对服务(<http://www.eztaxon.org/>)进行有效种的相似性搜索,下载相关序列,并利用 MEGA 4.0 软件进行系统发育分析。通过 ClustalX 进行多重序列比对,以 Kimura 2-parameter 计算进化距离,构建 Neighbour-Joining (NJ)系统发育树,用 Bootstrap 分析进化树分支的稳定性,重复 1 000 次。

### 1.4 菌株 FP6 除亚硝酸氮活性的影响因素

以反硝化培养基为基础,碳源分别设置为葡萄糖、蔗糖、柠檬酸钠、酒石酸钾钠、醋酸钠和丁二酸钠,碳氮比分别定为 1、4、10、15、20 和 25,初始 pH 分别定为 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0、10.0 和 11.0,温度分别设置为 15 °C、

20℃、25℃、30℃、37℃和45℃,摇床转速分别设置为0、50、100、150和200 r/min,氯化钠浓度分别定为0、5、15、25、30、35、40、50、60、70和100 g/L,如无特殊说明,培养条件为30℃、150 r/min,培养时间为48 h,接种量为1% (V/V),研究不同碳源、碳氮比、初始pH、温度、摇床转速和氯化钠浓度对菌株FP6除亚硝酸氮活性的影响。

1.5 菌株 FP6 对氨氮、硝酸氮和亚硝酸氮的去除能力

分别以NH<sub>4</sub>Cl、KNO<sub>3</sub>和NaNO<sub>2</sub>为唯一氮源,设置不同的氮源浓度,并设定C/N值为20,其它营养成分同反硝化培养基,30℃、150 r/min培养菌株FP6,测定培养液的OD<sub>600</sub>、以及相应培养液中的NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N和TN含量。

1.6 分析方法

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N测定采用重氮偶氮法<sup>[15]</sup>,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N的测定采用次溴酸钠氧化法<sup>[15]</sup>,总氮(TN)测定采用过硫酸钾氧化法<sup>[15]</sup>。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N测定采用紫外分光光度法<sup>[16]</sup>,菌体生长测定采用浊度法(OD<sub>600</sub>)。

2 结果与分析

2.1 高效去除亚硝酸氮菌株的分离筛选

从舟山南美白对虾养殖塘采取水样,富集培养,并在反硝化固体培养基上分离,得到19个纯化的单菌落。比较各个菌株的亚硝酸氮利用能力,筛选出一株亚硝酸氮利用能力最强的菌株FP6。如表1所示,菌株FP6可以在48 h内将约26 mg/L的NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N完全去除,实验前后没有检测到NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N,表明菌株FP6并没有将NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N转化为NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N。

实验结束时总氮(TN)减少约26%,表明菌株FP6具有利用NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N进行反硝化作用的能力。

2.2 菌株鉴定

菌株FP6的菌落在反硝化培养基上呈淡黄色,老培养物有芽孢形成,判断其为芽孢杆菌,依据生理生化鉴定结果(表2)初步确定菌株FP6为地衣芽孢杆菌。

提取菌株FP6的DNA,PCR扩增得到其部分16S rRNA基因序列,在EzTaxon数据库中进行有效种的序列相似性搜索,结果显示菌株FP6与地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)的相似性最高,达到98.25%。构建系统发育树分析显示(图1),菌株FP6与地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)类聚在一起,相似性为99%。因此初步确定菌株FP6为地衣芽孢杆菌。迄今为止,以亚硝酸盐为电子受体研究该种中细菌的反硝化作用的报道还比较少见。

2.3 影响菌株 FP6 除亚硝酸氮活性的因素

2.3.1 碳源种类对菌株 FP6 除氮活性的影响:如图2所示,不同的碳源对菌株FP6的生长、去除亚硝酸氮的能力有很大影响,其中以蔗糖为碳源时,菌株FP6生长最好(OD<sub>600</sub>为0.381),亚硝酸氮和总氮去除率最高(分别达到100%和38.46%),而以葡萄糖、酒石酸钾钠和丁二酸钠为唯一碳源时,菌株FP6几乎不能生长,亚硝酸氮和总氮去除率效果也最差,以柠檬酸钠和醋酸钠为碳源时,菌株FP6能生长,但亚硝酸氮和总氮去除率均较低。在菌株FP6可利用的3种碳源中,都呈现出生长越好,亚硝酸氮和总氮去除率越高的现象。表明亚硝酸氮和总氮的去除与菌的生长可能正相关。

表 1 菌株 FP6 组中 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N、NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N 和 TN 含量			
Table 1 Concentration of NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N and TN in the group strain FP6			
Time (h)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	TN (mg/L)
0	26.375±0.197	0	27.319±0.582
48	0	0	20.317±0.582

表 2 菌株 FP6 生理生化特征			
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain FP6			
测定项目 Item	结果 Results	测定项目 Item	结果 Results
革兰氏染色 Gram stain	+	柠檬酸盐 Citrate	+
细胞直径 Cell diameter >0.1	—	丙酸盐 Propionate	+
接触酶 Catalase	+	水解酪朊 Hydrolyze casein	+
厌氧生长 Anaerobic growth	+	水解明胶 Hydrolyze gelatin	+
V-P 测定 V-P test	+	水解淀粉 Hydrolyze starch	+
V-P 培养物终 pH		生长 pH Growth pH	
Final pH of V-P culture: <6.0	+	6.8 营养肉汤 6.8 nutrient broth	+
>7.0	—	5.7 营养肉汤 5.7 nutrient broth	+
D-葡萄糖 D-glucose	+	生长 NaCl growth NaCl 7%	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	10%	—
D-木糖 D-xylose	+	生长温度 Growth temperature 40 °C	+
D-甘露醇 D-mannitol	+	55 °C	+
		硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
		亚硝酸盐还原 Nitrite reduction	+

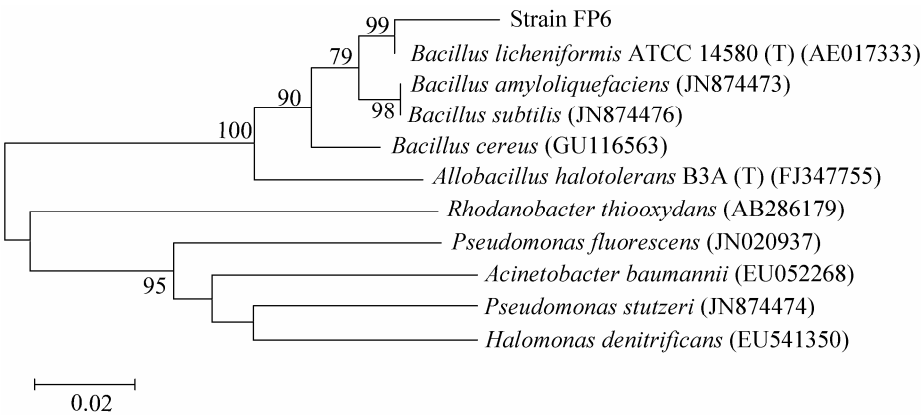


图 1 基于菌株 FP6 及相关菌株 16S rDNA 序列的系统发育树

**Fig. 1 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain FP6 and other related strains**

注: 括号中的序号表示该菌株在 GenBank 中的序列登录号; 分叉处数值表示 1 000 次重复抽样所得到的置信度, 只显示置信度 60% 以上的数值; 标尺长度表明每个位点发生 0.02 次置换。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1 000 replicates; shown only when >60%). The scale bar shows the number of substitutions per base.

**2.3.2 碳氮比对菌株 FP6 除氮活性的影响:** 当培养基中 C/N 值在 1–25 之间时, 随着 C/N 值的增加, 菌株 FP6 的生长和除氮活性总体表现为先增强后平缓或下降的趋势(图 3)。C/N 值为 4 时, 菌株 FP6 的生长虽不是很好, 但其对亚硝酸氮的去除率仍达到 48%, 表明菌株 FP6 在较低的碳源浓

度下仍具有较强的亚硝酸氮去除能力。C/N 值为 10 时, 菌株 FP6 对亚硝酸氮的去除率即达到 80%, 而 C/N 值为 15 及以上时, 菌株 FP6 对亚硝酸氮的去除率都达到 100%, 但 C/N 值为 15 及以下时总氮去除率均较低。当 C/N 值为 20 时, 菌株 FP6 菌的生长达到最好( $OD_{600}$  为 0.551), 总氮去除率

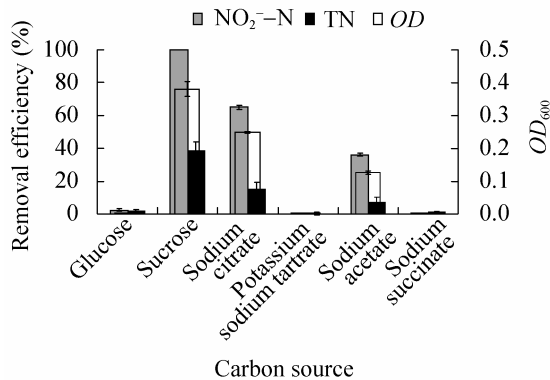


图2 碳源对菌株 FP6 生长和除氮的影响

Fig. 2 Effects of carbon source on the growth and nitrogen removal of strain FP6

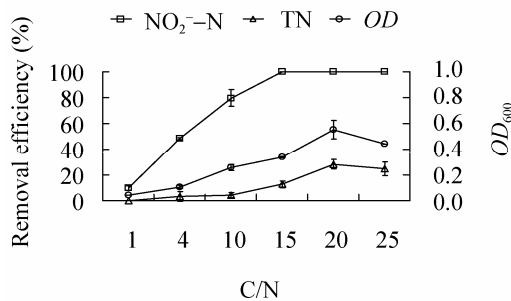


图3 C/N 比值对菌株 FP6 生长和除氮的影响

Fig. 3 Effects of C/N ratio on the growth and nitrogen removal of strain FP6

最高(28%)。而 C/N 值为 25 时, 总氮的去除活性略有降低, 表明菌株 FP6 的除氮活性并不随 C/N 值的增加而无限增强。

**2.3.3 起始 pH 对菌株 FP6 除氮活性的影响:** 从图 4 可以看出, pH 低于 7.0 时, 菌株 FP6 的生长和除氮活性都很差, 而当 pH 为 7.0 时, 菌株 FP6 的生长和除氮活性突然增强, 亚硝酸氮和总氮去除率达到 99.57% 和 24.39%,  $OD_{600}$  为 0.180, 表明 pH 值 7.0 是菌株 FP6 具有高生长和除氮活性的最低值。pH 为 7.5 时, 菌株 FP6 的生长和除氮活性即达到最高( $OD_{600}$  在 0.3 左右, 亚硝酸氮去除率为 100%, 总氮去除率在 37% 左右), 且在 pH 7.5–10.0 之间时基本保持稳定。而 pH 为 11.0 时, 菌株 FP6 的生长和除氮活性出现急剧下降, 表明 pH 值 10.0 是菌株 FP6 具有高生长和除氮活

性的最高值。由结果可知偏碱性环境是菌株 FP6 适宜的生长和除氮条件。

**2.3.4 温度对菌株 FP6 除氮活性的影响:** 如图 5 显示, 在温度 15 °C–37 °C 之间时, 菌株 FP6 的生长活性随温度的升高而增加, 37 °C 时达到最高, 而当温度继续升高至 45 °C 时, 菌株 FP6 的生长受到很大抑制, 表明菌株 FP6 不耐高温。在温度 20 °C 时, 菌株 FP6 的除氮活性已达到最高(亚硝酸氮去除率为 100%, 总氮去除率在 25%–30% 之间), 且在 20 °C–37 °C 时其除氮活性基本保持稳定。当温度为 45 °C 或 15 °C 时, 菌株 FP6 的生长较差( $OD_{600}$  值低于 0.03), 但仍具有一定的亚硝酸氮和总氮去除活性, 亚硝酸氮去除率分别为 16.32% 和 12.17%, 总氮去除率分别为 9.67% 和 12.86%。总体而言, 菌株 FP6 在 20 °C–37 °C 均

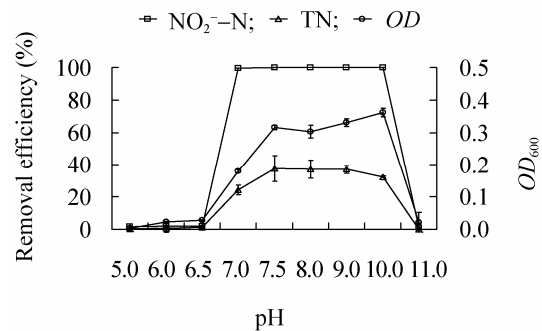


图4 起始 pH 对菌株 FP6 生长和除氮的影响

Fig. 4 Effects of initial pH on the growth and nitrogen removal of strain FP6

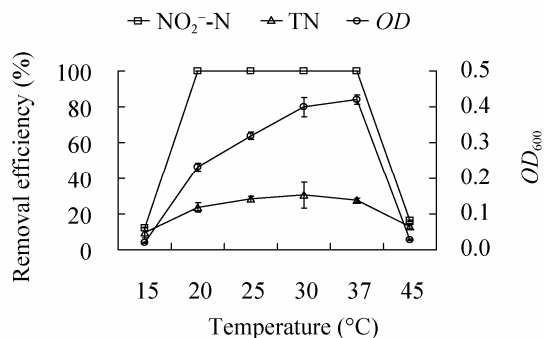


图5 温度对菌株 FP6 生长和除氮的影响

Fig. 5 Effects of temperature on the growth and nitrogen removal of strain FP6

表现出很高的除氮活性,表明其具有较广的温度适应范围。

**2.3.5 摇床转速对菌株 FP6 除氮活性的影响:**如图 6 所示,摇床转速为 0–200 r/min 之间时,菌株 FP6 对亚硝酸氮的去除率都为 100%,对总氮的去除率则呈现出随摇床转速的增加而先升高后略有下降的趋势,菌株 FP6 的生长活性也一直都很高。但摇床转速为 0 和 200 r/min 时,菌液的  $OD_{600}$  值均有所减小,表明溶解氧浓度过高或者过低都会影响菌的生长,但对菌的除氮活性影响并不明显。总体看来,菌株 FP6 在摇床转速 0–200 r/min 之间都表现出较高的生长和除氮活性,表明菌株 FP6 具有很广的溶解氧适应范围。

**2.3.6 氯化钠浓度对菌株 FP6 除氮活性的影响:**从图 7 可以看出,菌株 FP6 对亚硝酸氮的去除率表现出从稳定不变( $\text{NaCl}$  浓度 0–40 mg/L 时均为 100%)到逐渐下降的趋势,对总氮的去除率则呈

现出由上升( $\text{NaCl}$  浓度 0–5 mg/L)到基本平稳( $\text{NaCl}$  浓度 15–40 mg/L)再到逐渐下降的趋势,而菌株 FP6 的生长活性则表现为先逐渐升高( $\text{NaCl}$  浓度 0–15 mg/L)到略微下降( $\text{NaCl}$  浓度 15–30 mg/L)再到基本平稳( $\text{NaCl}$  浓度 0–15 mg/L)最后逐渐下降的趋势。

**2.4 菌株 FP6 对氨氮和硝酸氮的利用以及对亚硝酸氮的耐受性**

**2.4.1 菌株 FP6 对氨氮的利用:**由表 3 可以看出,菌株 FP6 对氨氮的去除率随氨氮浓度的升高而降低。当氨氮浓度较低(20 mg/L)时,菌株 FP6 对氨氮的去除率可达 96%,而当氨氮浓度高于 50 mg/L 时,菌株 FP6 对氨氮的去除率明显降低,生长也受到了一定程度的抑制。但是,菌株 FP6 在氨氮浓度高达 200 mg/L 时仍能生长和除氮,表明其不仅具有去除氨氮的能力,且其对氨氮的耐受能力也很强。

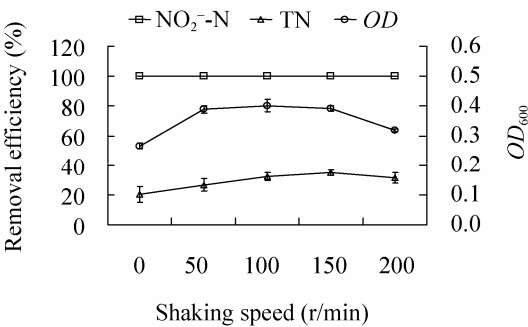


图 6 摇床转速对菌株 FP6 生长和除氮的影响  
Fig. 6 Effects of shaker speed on the growth and nitrogen removal of strain FP6

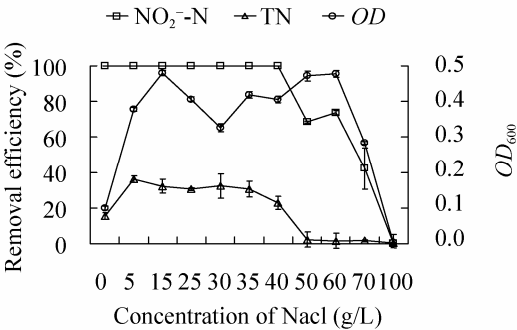


图 7  $\text{NaCl}$  浓度对菌株 FP6 生长和除氮的影响  
Fig. 7 Effects of  $\text{NaCl}$  concentration on the growth and nitrogen removal of strain FP6

表 3 不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度下菌株 FP6 的生长情况及除氮率		
Table 3 The growth and nitrogen removal efficiency of strain FP6 at different concentration of $\text{NH}_4^+\text{-N}$		
Initial $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration (mg/L)	Growth ( $OD_{600}$ )	Removal efficiency of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (%)
20.91±0.63	0.305±0.003	96.57±0.31
50.93±1.01	0.187±0.003	20.31±2.57
101.82±0.25	0.187±0.003	18.41±4.17
201.80±2.78	0.192±0.006	8.48±1.89

表 4 不同 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N 浓度下菌株 FP6 的生长情况和除氮率			
Table 4 The growth and nitrogen removal efficiency of strain FP6 at different concentration of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N			
Initial NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N Concentration (mg/L)	Growth (OD <sub>600</sub> )	Removal efficiency of NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (%)	Removal efficiency of TN (%)
26.85±0.33	0.589±0.014	96.59±0.06	0.75±0.63
139.58±2.47	0.694±0.018	28.87±3.47	0.57±0.40

**2.4.2 菌株 FP6 对硝酸氮的利用：**如表 4 所示，硝酸氮浓度分别约为 25 mg/L 和 140 mg/L 时，菌株 FP6 对硝酸氮的去除率分别为 96%和 28%，而对总氮去除率则很低，依次为 0.75%和 0.57%，但菌株 FP6 在这两个浓度下生长很好。表明菌株 FP6 对硝酸氮的去除主要是生长吸收，而不是反硝化脱氮。在实验过程中，每 12 h 定性检测培养液中的亚硝酸氮含量，发现 12 h 和 24 h 时都有少量亚硝酸氮产生(Griess 试剂检测为很淡的红色)，但在 36 h 之后没有检测到亚硝酸氮，表明此时亚硝酸氮已被菌株利用。综上表明，菌株 FP6 利用硝酸氮几乎全部用于生长，只有极少量用作反硝化，所以不会积累亚硝酸氮。这在养殖水处理中具有重要意义。

**2.4.3 菌株 FP6 对亚硝酸氮的耐受性：**由图 8 可以看出，随着亚硝酸氮浓度的增加：(1) 菌株 FP6 的生长活性逐渐减弱，当达到 280 mg/L 时，其生长被完全抑制；(2) 亚硝酸氮和总氮的去除率逐渐降低，当亚硝酸氮浓度高于 140 mg/L 时，菌株 FP6 的亚硝酸氮去除活性被完全抑制；(3) OD<sub>600</sub> 的变化趋势与亚硝酸氮和总氮去除率的变化趋势相同，表明菌株 FP6 的生长活性与后两者的去除活性具有一致性。

3 讨论

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 是反硝化作用的电子受体之一。Verbaendert 等<sup>[8]</sup>对大量芽孢杆菌的研究发现，反硝化作用普遍存在于芽孢杆菌属中，其中一些仅利用 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 进行反硝化作用。Sorokin 等<sup>[17]</sup>也发

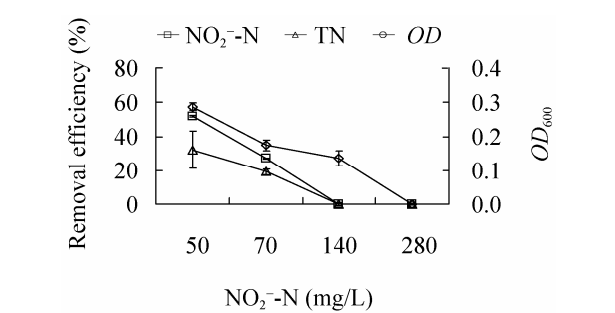


图 8 菌株 FP6 对 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的耐受能力  
Fig. 8 The tolerance capability of strain FP6 to NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N

现一株脱氮硫杆菌(*Thioalkalivibrio denitrifican*) ALJD 在含有还原态的硫化物中厌氧生长时利用 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 而不是 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 作为电子受体, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 仅作为氮源被利用。菌株 FP6 在 48 h 内可将 25 mg/L 的亚硝酸氮完全去除，总氮去除率达 26%，与 Kim 等<sup>[9]</sup>的总氮去除率 33%比较接近。菌株 FP6 对氨氮和硝酸氮均有一定的去除能力，且其利用硝酸氮时并不积累亚硝酸氮。这在实际应用中具有重要意义：(1) 可以去除养殖水体中的硝酸氮；(2) 避免了养殖水体中的硝酸氮向亚硝酸氮的转化，不会增加水体中的亚硝酸氮负荷。菌株 FP6 对氨氮的利用能力相对较弱，高浓度的氨氮甚至对其有一定的抑制作用，但是实际养殖水体中的氨氮浓度一般低于 20 mg/L，不足以抑制菌株 FP6 的生长和除氮活性。

碳源既是反硝化细菌生长的营养物质，也是反硝化作用的电子供体。碳源种类对菌株 FP6 的反硝化活性有很大影响。菌株 FP6 可以在以蔗糖、柠檬酸钠和醋酸钠为碳源的培养基中生长，但以蔗糖为碳源时其生长、亚硝酸氮去除率和反硝化

活性均达到了最高,这与反硝化细菌更倾向于利用简单小分子碳源的研究结果比较相似<sup>[18-19]</sup>。在实际应用中,可以额外补充碳源从而达到较好的除氮或脱氮效果<sup>[20-21]</sup>。考虑到蔗糖是一种廉价、安全的碳源,可以将其作为营养素连同菌一起投加到养殖水体中,提高菌株 FP6 的使用效果。

微生物质的 C/N 值范围很广,从低至 3 到高达 20。而对于异养微生物来说, C/N 的临界值要高于微生物体的 C/N 值,因为它们要利用碳源进行产能和合成细胞物质<sup>[22]</sup>。C/N 也是影响反硝化细菌脱氮效率的重要因素。一定的碳源浓度内,反硝化作用随碳源浓度的增加而增强,但过量的碳源并不会使反硝化作用继续增强。不同的细菌其反硝化的最佳 C/N 并不同。李静等<sup>[23]</sup>对一株蜡状芽孢杆菌的研究认为,  $C/N \geq 6$  为适宜的反硝化条件。陈松等<sup>[24]</sup>分别以  $\text{NaNO}_2$  和乙酸钠为唯一氮源和碳源研究一株好氧反硝化细菌 N6-1 的反硝化活性,得出其最适碳氮比为 12。而本研究中的地衣芽孢杆菌菌株 FP6,从反硝化活性角度看,其对碳源的要求较高(C/N 为 20);但从去除亚硝酸氮的角度看,菌株 FP6 在 C/N 为 10 时对亚硝酸氮的去除率即达 100%,表明其在较低的碳氮比下即具有很高的亚硝酸氮去除活性。

菌株 FP6 在偏碱性条件下(pH 7.0–10.0),表现出较好的生长、去除亚硝酸氮和反硝化活性,而当 pH 低于 6.5 或者高于 11.0 时,菌株 FP6 的生长和除氮活性均受到很大抑制。而养殖水体的 pH 一般也是中性或者偏碱性的,表明菌株 FP6 非常适合于养殖水处理。菌株 FP6 在温度为 20 °C–37 °C 范围内均保持较高的反硝化活性,且亚硝酸氮去除率均达到了 100%,与 Song 和李兵等报道的 30 °C–40 °C 比较接近<sup>[2,10]</sup>,但在 20 °C 时仍具有较高的亚硝酸氮去除活性,较其他芽孢杆菌<sup>[2,10]</sup>更广,在水产养殖领域具有较广的应用前景。菌株 FP6 的反硝化作用似乎受氧气

的影响很小,它在摇床转速 0–200 r/min 范围内,对亚硝酸氮的去除率均达到 100%,对总氮的去除率也均在 20%以上。菌株 FP6 对氧气的广泛适应性使其完全可以适应水产养殖环境中的各种溶解氧状况。盐度影响反硝化细菌的活性,高盐度则会抑制反硝化作用<sup>[25]</sup>。菌株 FP6 对盐度具有很广的适应性,在氯化钠浓度 40 g/L 以下时,生长活性、亚硝酸氮去除能力和反硝化活性均较高;在氯化钠浓度 50–70 g/L 时,仍能很好的生长,亚硝酸氮去除活性也较高,但反硝化活性很弱。但是,养殖水体的盐度一般不会高于 40,所以菌株 FP6 既适用于淡水养殖也适用于海水养殖。

总之,菌株 FP6 具有很好的亚硝酸盐去除活性,并具有一定的反硝化能力,且反硝化作用不积累亚硝酸氮,其自身具备的安全性,以及其对温度、pH、溶解氧和盐度的适应性使其在养殖水处理中具有巨大的潜在应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Gross A, Abutbul S, Zilberg D. Acute and chronic effects of nitrite on white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in low-salinity brackish water[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2004, 35(3): 315–321.
- [2] Song ZF, An J, Fu GH. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds[J]. Aquaculture, 2011(319): 188–193.
- [3] Lin YC, Chen JC. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels[J]. Aquaculture, 2003(224): 193–201.
- [4] 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.
- [5] 黄翔鹄, 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.
- [6] 廖绍安, 郑桂丽, 王安利, 等. 养虾池好氧反硝化细菌新菌株的分离鉴定及特征[J]. 生态学报, 2006, 26(11): 3718–3724.
- [7] 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.
- [8] Verbaendert I, Boon N, Vos PD, et al. Denitrification is a common feature among members of the genus *Bacillus*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2011(34): 385–391.
- [9] Kim JK, Park KJ, Cho KS, et al. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains[J]. Bioresource Technology, 2005(96): 1897–1906.
- [10] 李兵, 林伟铁. 1株好氧反硝化芽孢杆菌的脱氮特性研究[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(3): 48–52.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 梁晓华, 杨莺莺, 李卓佳, 等. 芽孢杆菌 K1降解亚硝酸盐的特性研究[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(3): 228–230, 235.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 北京科学出版社, 2001: 62–63.
- [15] 国家技术监督局. GB/T 12763.4–2007海洋调查规范—第四部分: 海水化学要素调查[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 17–19, 21–23, 26–29.
- [16] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法[M]. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 266–268.
- [17] Sorokin DY, Kuenen JG, Jetten MSM. Denitrification at extremely high pH values by the alkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio denitrificans* strain ALJD[J]. Archives of Microbiology, 2001(175): 94–101.
- [18] 高喜燕, 刘鹰, 郑海燕, 等. 一株海洋好氧反硝化细菌的鉴定及其好氧反硝化特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1164–1171.
- [19] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 等. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(6): 968–972.
- [20] Davidsson TE, Leonardson LG. Effects of nitrate and organic carbon additions on denitrification in two artificially flooded soils[J]. Ecological Engineering, 1996, 7(2): 139–149.
- [21] Lei G, Shan HW, Zhang TW, et al. Effects of carbohydrate addition on *Litopenaeus vannamei* intensive culture in a zero-water exchange system[J]. Aquaculture, 2012, 342(343): 89–96.
- [22] Philip GT, Alan RT. Stoichiometric control of organic carbon-nitrate relationships from soils to the sea[J]. Nature, 2010(464): 1178–1181.
- [23] 李静, 王文文, 梁磊, 等. 耐盐好氧反硝化菌筛选及其反硝化特性的研究[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(6): 48–52.
- [24] 陈松, 洪秀娟, 黄雷鸣, 等. 好氧反硝化细菌 N6-1亚硝酸盐还原活性的研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1007–1010.
- [25] Shapovalova AA, Khijniak TV, Tourova TP, et al. Heterotrophic denitrification at extremely high salt and pH by haloalkaliphilic Gammaproteobacteria from hypersaline soda lakes[J]. Extremophiles, 2008(12): 619–625.