

一株产生氨氮和亚硝酸盐氮菌的筛选鉴定及特性研究

傅罗琴, 邓 斌, 郑佳佳, 张小平, 梁 权, 李卫芬*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

摘 要:从 4 个草鱼池塘中分离和定性筛选获得 29 株能够产生氨氮和亚硝酸盐氮的菌株。通过对编号为 C95 的菌株进行菌落形态学观察和 16S rDNA 序列分析,表明该菌株为革兰氏阴性杆状菌,与寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)的同源性达 98%。采用单因素多水平试验对菌株的产氨氮和产亚硝酸盐氮特性进行研究发现:(1)氮源、碳源、温度和摇床转速都能显著影响菌株的生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的含量,但 pH(5~9)对其无显著影响($P>0.05$);(2)该菌株生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮最适宜的培养基以及培养条件为:LB、pH 5~9、25 °C、150 r·min⁻¹。由 C95 作为指示菌株筛选得到 SC01、SC07 两株(2/33)去除氨氮和亚硝酸盐氮效果较好的菌株。因此,C95 可作为筛选具有降氨氮和亚硝酸盐氮功能的有益菌的指示菌株。

关键词:异养硝化菌;氨氮;亚硝酸盐氮;寡养单胞菌属

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)08-1616-08

Isolation, Identification and the Characteristics of a Strain with Ability of Producing Ammonia and Nitrite

FU Luo-qin, DENG Bin, ZHENG Jia-jia, ZHANG Xiao-ping, LIANG Quan, LI Wei-fen*

(Department of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Twenty nine strains with ability of producing ammonia and nitrite were isolated from culture water of 4 grass carp ponds through qualitative filtration. One of them, named C95, was identified as a Gram negative, rod-shaped strain exhibiting the highest sequence homology to *Stenotrophomonas* sp. (98%) according to its colony morphological properties and the 16S rRNA sequence analysis. Characterization of growth and ammonia nitrogen and nitrite nitrogen production revealed that: (1) nitrogen resource, carbon resource, temperature and rotation speed could significantly affect the strain properties; (2) the optimal substrate, pH, temperature and rotation speed were LB, pH 5~9, 25 °C, 150 r·min⁻¹, respectively. Two strains (2/33) named SC01 and SC07 that can degrade ammonia and nitrite better were isolated by the strain C95 as an indicator strain for the beneficial bacteria with ammonia and nitrite nitrogen removal function, which has potential application value to improve the quality of culture water.

Keywords: heterotrophic nitrifier; ammonia nitrogen; nitrite nitrogen; *Stenotrophomonas* sp.

氨氮和亚硝酸盐氮含量是反映养殖水体污染的两个重要指标^[1],它们不仅可以直接影响鱼类等水生生物的生长,导致水产动物代谢功能失调,免疫力下降,也会间接地影响到人类的健康,甚至会导致水体富营养化,引起水质恶化^[2-8]。氨氮和亚硝酸盐氮的积累与众多的微生物代谢活动相关,根据在有机物含量高的

养殖池中常发生亚硝酸盐氮突然升高的现象,推测异养硝化菌的作用是造成亚硝酸盐氮的重要原因。1977年 Alexander 将异养硝化(Heterotrophic nitrification)定义为有机和无机氮化合物从还原态经生物氧化为多种氧化态的过程。因此,某些异养硝化菌在代谢过程中能同时产生氨氮和亚硝酸盐氮,对养殖水体中氨氮和亚硝酸盐氮的积累具有重要的贡献。然而至今关于异养亚硝化菌的研究还较少。本课题从草鱼养殖池水样中筛选出一株产生氨氮和亚硝酸盐氮含量较高的菌株,研究其产生氨氮和亚硝酸盐氮的特性并优化生长条件,最终为筛选益生菌及其在养殖水体污水脱氮方面的应用提供理论依据和指示菌种。

收稿日期:2012-02-20

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)项目(2009CB118705);
国家水体污染控制与治理重大专项项目(2008ZX07101-006)

作者简介:傅罗琴(1987—),女,浙江宁波人,博士研究生,主要从事有益微生物的应用和机理研究。E-mail:fuluoqin@gmail.com

* 通讯作者:李卫芬 E-mail:wfli@zju.edu.cn

1 材料与方法

1.1 样品来源

本实验所用水样来源于杭州梅家坞某草鱼养殖池塘。

1.2 培养基

Luria-bettrain(以下简称LB)培养基用于分离纯化菌种。主要成分为:1%胰蛋白胨、0.5%酵母膏、0.5% NaCl、2.5%琼脂、蒸馏水溶解。

选择性培养基的母液成分为: Na_2HPO_4 $7.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、微量元素 $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柠檬酸钠 $5.66 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、去离子水 1000 mL , pH 7.0~7.5。微量元素溶液成分为($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): EDTA 50.0、 ZnSO_4 2.2、 CaCl_2 5.5、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.06、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.1、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57、 $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61, pH 7.0。

分别加入4种氮源: NaNO_3 $0.8415 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NaNO_2 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NH_4Cl $0.5296 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 分析方法

菌株定性筛选方法:分别用钠氏试剂、亚硝酸盐显色剂和硝酸盐显色剂与菌株利用4种氮源后产生的代谢产物(含氮化合物)进行显色反应,根据颜色的有无或深浅,筛选出产生氨氮和亚硝酸盐氮效果较好的菌株。

菌体生长量采用吸光度法测定,用721型可见分光光度计在光密度为600 nm处测吸光度值。 NO_3^--N 、 NH_4^+-N 和 NO_2^--N 含量测定参照文献[9],采用721型可见分光光度计进行定量分析; NO_2^--N 浓度的测定采用N-(1-萘基)-乙二胺光度法; NH_4^+-N 浓度的测定采用纳氏试剂分光光度计法。pH值采用Mettler Toledo Delta 320型pH计测定。

1.4 菌种的分离筛选

1.4.1 菌种的分离与纯化

取4个草鱼养殖水池水样,稀释并分别涂布于固体LB平板上。30℃恒温培养。每份水样随机挑选100个单菌落分别接种到100个含有1 mL LB培养基的离心管中,于30℃恒温箱内培养24 h。

1.4.2 菌株的定性筛选

分别用亚硝酸盐氮、氨氮、硝酸盐氮、蛋白胨提供氮源,配制培养基,经灭菌处理后分装到400个离心管中。将上述培养过夜的LB菌液接种于盛有不同氮源培养基的离心管中,每管接种100 μL (接种量为1%),分别培养在4管不同培养基中,于30℃恒温箱内培养24 h。利用显色反应定性筛选出一株产氨氮、

产亚硝酸盐氮能力较强的菌。

1.5 菌株鉴定

1.5.1 形态学观察

菌株的形态学鉴定通过菌株的革兰氏染色及电子显微镜观察。

1.5.2 16S rDNA 序列测定和同源性比较

以细菌基因组DNA为模板扩增16S rDNA,采用一对通用引物。上游引物(P1):5'-AGAGTTTGATC-CTGGTCAGAACGAACGCT-3';下游引物(P6):5'-TACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCC-3'。PCR反应体系(50 μL):10×Buffer 5.0 μL , dNTPs 4.0 μL , 上游引物和下游引物各1.0 μL , 重蒸水 38 μL , 离心混匀后加入DNA模板0.5 μL , Taq酶0.5 μL 。PCR程序如下:①94℃, 5 min;②94℃变性50 s;③52℃退火60 s;④72℃延伸90 s;⑤72℃, 10 min。其中步骤②至④循环30次。琼脂糖凝胶电泳(1×TAE电泳缓冲液, 1%凝胶)分析PCR结果。

PCR产物的纯化和测序由上海生物工程有限公司完成,测序结果通过GenBank blast进行比对分析。

1.6 菌株产氨氮产亚硝酸盐氮的特性研究

1.6.1 不同氮源对菌株生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的影响

在选择性培养基的母液中,分别加入蛋白胨、酵母膏、氯化铵、羟胺和亚硝酸钠,其中氯化铵和亚硝酸钠根据摩尔比C/N=10计算,其余按1%(质量体积比)添加,配制成培养基。另外配制复合氮源(LB)培养基,把所有培养基分装到200 mL三角瓶中(每组3个重复),每瓶50 mL。按1%(体积比)的接菌量接种于上述6种培养基中,于150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、30℃恒温振荡培养12 h。测定波长600 nm的吸光度值及氨氮和亚硝酸盐氮含量。

1.6.2 不同碳源对菌株生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的影响

根据不同氮源的试验结果选取效果较好的氮源,按1%(质量体积比)的比例,分别用淀粉、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸钠、醋酸钠和碳酸钠作为碳源配制培养基,分装到200 mL三角瓶中(每组3个重复),每瓶50 mL。按1%(体积比)的接菌量接种于上述6种培养基中,150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、30℃恒温振荡培养12 h。测定波长600 nm的吸光度值及氨氮和亚硝酸盐氮含量。

1.6.3 不同外界环境条件对菌株生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的影响

根据上文(1.6.1和1.6.2)的试验结果,选择优化

的氮源和碳源配制 pH 为 5、6、7、8、9 的培养基,按 1%(体积比)的接菌量接种后,于 150 r·min⁻¹、30 ℃恒温振荡培养 12 h,测定 pH 对菌株生长及产氨氮和亚硝酸盐氮的影响。然后根据试验结果选择适当 pH 的培养基,接种后一组分别置于 15、20、25 ℃和 30 ℃,200 r·min⁻¹ 恒温振荡摇床中培养 12 h,另一组分别置于 0、50、100、150、200 r·min⁻¹,30 ℃恒温振荡摇床中培养 12 h,分别测定温度和溶解氧对菌株生长及产氨氮和亚硝酸盐氮的影响。以上实验全部 3 次重复。

1.7 菌株作为指示菌筛选益生菌

在液体 LB 培养基中同时接种 C95 菌及不同候选益生菌,连续培养 12 h 后,测定其中亚硝酸盐氮和氨氮的变化情况,并由此筛选降亚硝酸盐氮和氨氮的益生菌。

1.8 数据处理与统计

运用 SPSS16.0 软件对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和多重比较(LSD 法),结果用平均数±标准差表示, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选与鉴定

2.1.1 菌株筛选

经过富集分离和定性筛选获得了 29 株能够产生氨氮和亚硝酸盐氮的菌株,选择其中产氨氮和亚硝酸盐氮量较高的 C95 作为目标菌株。

2.1.2 菌株鉴定

C95 菌株在固体 LB 培养基上培养 24 h,菌落呈圆形,黄色,不透明,表面凸起,边缘光滑。油镜下观察该细菌呈红色,为革兰氏阴性菌(G⁻),菌体呈杆状。菌株 C95 的 16S rDNA 序列经blast 分析,与 GenBank 中登录号为 EF491967.1 的寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.) 的 16S rDNA 序列同源性为 98%(登录号为 JQ925936)。结合该菌株的形态特征初步判定该菌株为寡养单胞菌属,命名为 *Stenotrophomonas* sp. C95。

2.2 菌株产氨氮产亚硝酸盐氮的特性

2.2.1 不同氮源对菌株生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的影响

如表 1 所示,不同氮源对 C95 的生长及产生氨氮含量具有极其显著影响($P<0.01$),对产生亚硝酸盐氮的含量无显著影响($P>0.05$);菌株在 LB 培养基中产氨氮含量极显著大于其他培养基($P<0.01$),其次是蛋白胨和酵母膏,但产生亚硝酸盐氮的能力没有显著

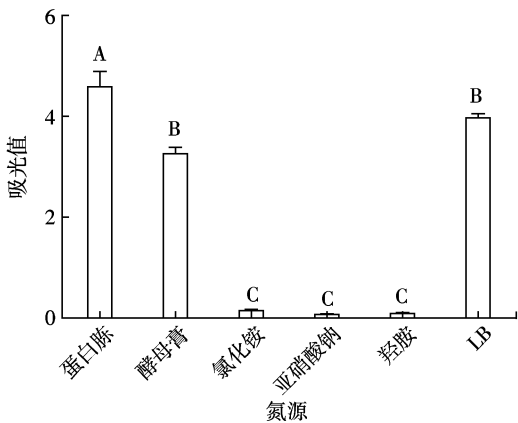
差异。由图 1 可知,菌株在有机氮源培养基中的生长远远优于无机氮源,其中 LB 和蛋白胨培养基中极显著优于其他氮源培养基($P<0.01$)。

可见,复合有机氮源比无机氮源及单一有机氮源更有利,即 LB 培养基优于其他氮源培养基。故之后的“不同碳源对菌株生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的影响”试验采用在 LB 培养基的基础上添加不同碳源的方法来研究。

表 1 不同氮源对菌株产生氨氮和亚硝酸盐氮的影响

Table 1 The ability of producing ammonium nitrogen nitrite nitrogen in different nitrogen source media		
氮源	氨氮浓度变化/mg·L ⁻¹	亚硝酸盐氮浓度变化/mg·L ⁻¹
蛋白胨	113.615±8.871b	0.006±0.002
氯化铵	—	0.104±0.052
酵母膏	69.744±8.687c	0.364±0.004
亚硝酸钠	-3.245±0.251d	—
羟胺	-0.566±2.438d	0.396±0.579
LB	243.504±4.138a	0.222±0.005

注:a,b,c,d 表示多重分析结果,字母不同代表差异显著。下同。



不同字母代表差异显著。下同

图 1 菌株在不同氮源培养基中的生长特性

Figure 1 The growth characteristics in different nitrogen source media

2.2.2 不同碳源对菌株生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的影响

碳源是构成微生物细胞的重要组成物质,能供给微生物生长繁殖所需的能量,不同碳源对菌株的性能有不同影响。经分析,结果表明不同碳源对 C95 的生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮具有极显著影响($P<0.01$)。如表 2 和图 2 所示,无论是生长特性还是产生氨盐和亚硝酸盐的能力,在 LB 基础上添加了蔗糖或淀粉的培养基中的菌株生长都极显著地优于添加了

其他碳源的培养基($P<0.01$),然而与对照组(即不外加碳源,只是 LB 培养基)比较却都无显著差异。这说明,在 LB 培养基中外加单一碳源并不能促进该菌的生长或产生氨盐和亚硝酸盐的特性。因此,接下去的试验都采用 LB 培养基。

此外,试验结果显示,C95 菌株在添加不同碳源的培养基中生长及产生氨盐和亚硝酸盐的特性由高到低排列为多糖(淀粉)>二糖(蔗糖)>单糖(葡萄糖)>有机酸盐(柠檬酸钠>醋酸钠)>无机碳源(碳酸钠)。证明对于复杂有机碳源的培养基,菌株生长更好。但其中添加碳酸钠的菌株几乎不生长,可能是因为碳酸钠的 pH 过大($\text{pH}>11$)抑制菌株生长。

表 2 不同碳源对菌株产氨氮和亚硝酸盐氮的影响

Table 2 The ability of producing ammonium nitrogen nitrite nitrogen in different carbon source media

碳源	氨氮浓度变化/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	亚硝酸盐氮浓度变化/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
碳酸钠	$-6.787\pm0.593\text{c}$	$-0.001\pm0.001\text{c}$
醋酸钠	$0.586\pm1.364\text{c}$	$-0.002\pm0.001\text{c}$
柠檬酸钠	$6.326\pm0.979\text{c}$	$0.005\pm0.002\text{c}$
葡萄糖	$126.665\pm36.630\text{b}$	$0.176\pm0.005\text{b}$
蔗糖	$232.789\pm17.166\text{a}$	$0.237\pm0.008\text{a}$
淀粉	$234.504\pm5.476\text{a}$	$0.244\pm0.009\text{a}$
LB	$243.504\pm4.138\text{a}$	$0.222\pm0.005\text{a}$

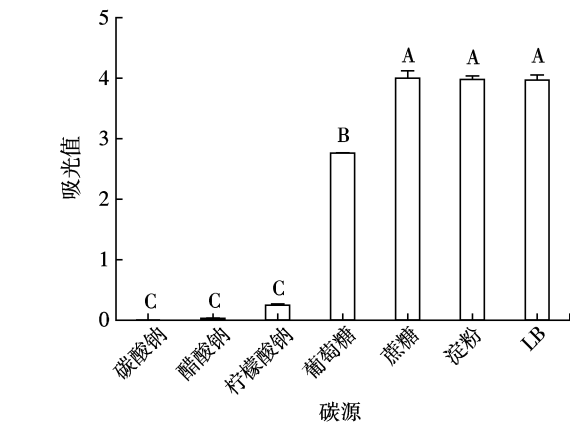


图 2 菌株在不同碳源培养基中的生长特性

Figure 2 The growth characteristics in different carbon source media

2.2.3 不同外界环境条件对菌株生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的影响

2.2.3.1 不同 pH

如表 3 和图 3 所示,菌株在不同 pH 的培养基中生长以及产生氨氮和产生亚硝酸盐氮含量都无显著变化($P>0.05$)。说明该菌株在 pH 5~9 范围内都能够较好地生长和产生氨氮及亚硝酸盐氮。

表 3 不同 pH 对菌株产氨氮和亚硝酸盐氮的影响

Table 3 The ability of producing ammonium nitrogen nitrite nitrogen in the media of different pH

pH	氨氮浓度变化/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	亚硝酸盐氮浓度变化/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
5	171.901 ± 4.876	0.184 ± 0.007
6	183.982 ± 1.608	0.207 ± 0.001
7	209.242 ± 9.554	0.196 ± 0.013
8	172.414 ± 10.395	0.255 ± 0.045
9	198.442 ± 11.721	0.228 ± 0.004

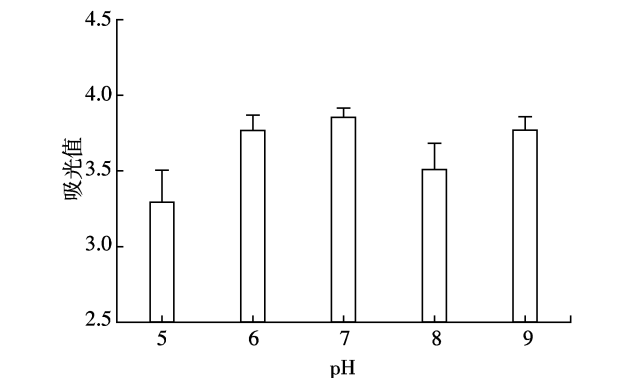


图 3 菌株在不同 pH 的培养基中的生长特性

Figure 3 The growth characteristics in the media of different pH

2.2.3.2 不同温度

如表 4 和图 4 所示,在 15~30 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,随着温度的上升,菌株的生长量增大。统计分析发现,温度对菌株的生长和产氨氮的量有极显著影响($P<0.01$),对产亚硝酸盐氮的量有显著影响($P<0.05$)。30 $^{\circ}\text{C}$ 时,菌株的生长和产氨氮都显著优于其他温度($P<0.05$),而产亚硝酸盐氮的特性却显著低于 15 $^{\circ}\text{C}$ ($P<0.05$)。

2.2.3.3 不同摇床转速

如表 5 和图 5 所示,在 0~200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 范围内,摇床转速越高,菌株的生长越好。统计分析发现,增大摇床转速与对照组相比对菌株的生长以及产氨氮和亚硝酸盐氮特性都有极显著提高($P<0.01$)。当摇床转速达到 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,菌株的生长和产氨氮特性都极显著优于其他转速($P<0.01$),而产亚硝酸盐氮特性最优

表 4 不同温度对菌株产氨氮和亚硝酸盐氮的影响

Table 4 The ability of producing ammonium nitrogen nitrite nitrogen at different temperature

温度/ $^{\circ}\text{C}$	氨氮浓度变化/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	亚硝酸盐氮浓度变化/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
15	$46.446\pm17.407\text{c}$	$0.199\pm0.008\text{a}$
20	$153.632\pm8.472\text{b}$	$0.141\pm0.024\text{ab}$
25	$226.797\pm7.008\text{b}$	$0.148\pm0.01\text{ab}$
30	$440.191\pm29.972\text{a}$	$0.100\pm0.016\text{b}$

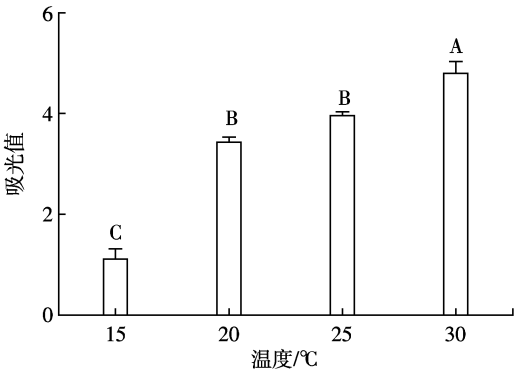


图 4 菌株在不同温度下的生长特性
Figure 4 The growth characteristics at different temperature

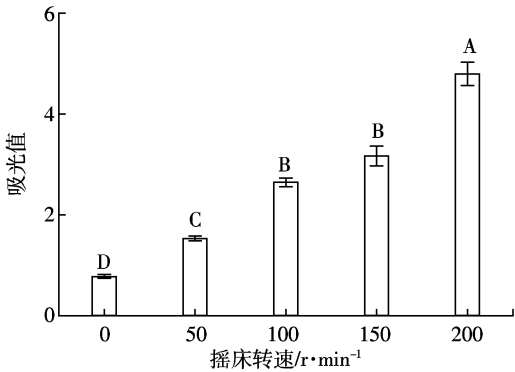


图 5 菌株在摇床转速下的生长特性
Figure 5 The growth characteristics at different rotation speed

的摇床转速为 150 r·min⁻¹,其次为 200 r·min⁻¹。

在本试验中,所有培养液的体积相同,并在相同温度下培养,所以溶解氧浓度随着转速的增加而增大(水中溶解氧未饱和时)。结果表明,通过适当增大摇床转速来增加水中溶解氧的含量,有助于提高菌株的生长以及产氨氮和亚硝酸盐氮的特性。

2.3 C95 菌株作为指示菌筛选益生菌

由图 6 可知,SC01、SC02、SC05、SC07、SC11、SC13、SC14、SC17、SC19 去除 LB 培养基中亚硝酸盐氮较高;SC01、SC04、SC07、SC16 去除其中的氨氮较高。因此,

去除亚硝酸盐氮和氨氮均较高的是 SC01 和 SC07。

3 讨论

3.1 寡养单胞菌属

本研究筛选得到的菌株 C95,通过形态学观察和分子生物学鉴定基本确定该菌株属于寡养单胞菌属。寡养单胞菌属是 1993 年建立的一个新属,属于假单胞菌科的 RNA 同源群 V,在当时该属只有嗜麦芽寡养单胞菌(*S. maltophilia*)一个种^[10],目前已发现了一些其他的种或亚种如 *S. africana*^[11]、*S. nitritireducens*^[12]、*S. acidaniphila*^[13]、*S. dokdonensis*^[14]等。C95 菌株在 LB 培养基上的菌落形态与 Palleroni 描述的寡养单胞菌属的菌落形态(菌落光滑、有光泽,边缘完整,颜色为白色、灰白色或灰黄色)相符^[10]。经革兰氏染色后在油镜下发现细胞呈红色,且为杆状菌。这与 Hugh 等所描述的相同^[15]。

当然本研究对该菌株的鉴定还有欠缺,比如鉴定方法比较单一,但其 16S rDNA 同源性为 98%,大于一般认为的可以确定属别的同源性(97%)^[16]。因此,

表 5 不同摇床转速对菌株产氨氮和亚硝酸盐氮的影响		
Table 5 The ability of producing ammonium nitrogen nitrite nitrogen at different rotation speed		
摇床转速/r·min ⁻¹	氨氮浓度变化/mg·L ⁻¹	亚硝酸盐氮浓度变化/mg·L ⁻¹
0	57.374±2.637c	-0.038±0.017c
50	108.479±3.715c	-0.047±0.015c
100	217.222±9.060b	0.039±0.014bc
150	276.029±7.010b	0.288±0.044a
200	440.191±29.972a	0.100±0.016b

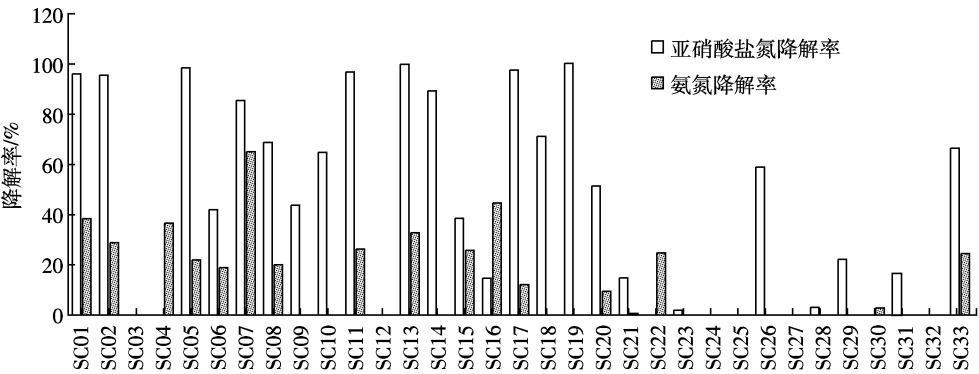


图 6 C95 与益生菌在 LB 中共培养 12 h 后亚硝酸盐氮和氨氮的降解率
Figure 6 The degradation rate of nitrite-N and ammonia-N in LB medium by coculture of C95 and probiotics for 12 h

该鉴定结果相对可信。今后还可进一步研究该菌株特性以验证 16S rDNA 的鉴定结果。

此外,据 Palleroni 等^[10]报道寡养单胞菌属不具有反硝化能力,但能够消耗硝酸盐,这从另一侧面支持了 C95 菌具有产氨氮和亚硝酸盐氮的特性。

3.2 异养硝化菌

异养硝化作用和异养硝化微生物其实早在 1886 年、1894 年和 1908 年就有报道,但由于 Winogradsky 的强烈批判和否定,在此后的很多年几乎没有研究报道。自 1949 年,Quastel 和 Sc. holefield 以丙酮酸脒作为选择性培养基分离获得具有产生 NO_2^- (不经过氨化)的异养菌以来,研究者相继从不同类型的土壤、污泥、湖水、深海火山口等处发现并分离出多种具有硝化活性的异养微生物(包括细菌、放线菌和真菌),这些微生物能进行硝化作用,生成 NO_2^- 、 NO_3^- 或含氮气体^[17],真菌被认为是其中数量最大、效率最高的异养硝化菌^[18],如黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)、青霉菌(*Penicillium* sp.)、轮枝菌(*Verticillium* sp.)等;异养硝化细菌中已报道的有反硝化假单胞菌(*Pseudomonas denitrificans*)、铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*P.fluorescens*)、产碱杆菌(*Alcaligenes* sp.)、节杆菌(*Arthrobacter* sp.)、粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)、PB16 假单胞菌以及一些新发现的菌种(或属)^[19-20]。

本研究发现 C95 为异养细菌,即在好氧条件下能将氨/铵或有机态氮氧化为亚硝酸盐^[20-21]。目前已被正式描述的硝化细菌(包括自养和异养)分为三类:一类属于 *Alcaligenes* sp.,一类属于 *Nitrosomonas* sp.,另一类属于 *Rhodococcus* sp.、*Arthrobacter* sp.、*Bacillus* sp.、*Nitrobacter* sp.和 *Pseudomonas* sp.^[22]。至今报道的异养硝化菌几乎都是从土壤或堆肥中分离出来的。如曹喜涛等^[23]从高温堆肥中分离出 1 株高温异养硝化芽孢杆菌,经研究发现该菌株以乙酰胺为唯一碳源和氮源时,能通过氨化和硝化作用产生亚硝酸氮。而本研究从草鱼养殖水体中分离鉴定的 C95 菌株属于 *Stenotrophomonas* sp.,目前为止还未见诸报道。

3.3 影响异养硝化菌生长硝化的主要因素

众多文献^[23-24]阐述影响异养硝化菌生长硝化的主要因素有温度、pH、溶解氧浓度、碳源和氮源等,本研究也着重对这 5 种因素进行研究,发现除 pH 以外,其他因素都对 C95 生长及氨化硝化作用有显著的影响。本实验中 pH(5~9)对 C95 菌株的生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮无显著影响。这与 Joo 等^[25]的研究结果一致:*Alcaligenes faecalis* No.4 在 pH 为 6、7、8 时的

脱氮活性基本相同。本研究中温度(15~30℃)对菌株生长及产生氨盐和亚硝酸盐的特性产生显著影响,且最适生长温度为 30℃,符合对一般异养硝化菌最适培养温度的描述^[26]。

有机碳源对于异养硝化活性很重要,不仅为生长提供能量,也影响着对无机氮源的硝化活性^[27]。异养硝化菌能够利用并维持生长的碳源类型十分广泛,能够被用来进行硝化反应的碳源类型却有所限制。如 *Alcaligenes faecalis* No.4 只能利用有机酸来进行硝化反应^[28]。*Arthrobacter* B_D 只能利用有机酸盐和 α -酮戊二酸、丙酮酸脒进行硝化反应^[29]。本文所筛选的 C95 菌株在添加不同碳源的培养基中生长及产生氨盐和亚硝酸盐的特性研究显示,糖类远远优于有机酸盐,且糖类中多糖的利用更优。这也说明,异养硝化菌种类多样,且碳源喜好各不相同。

研究不同氮源对 C95 菌株生长产氨产亚硝酸盐氮的影响结果显示,以羟胺为氮源产生亚硝酸盐氮特性最好,可能是因为羟胺是该菌株产生亚硝酸盐的中间产物,这与 Vertraete 等^[30]的研究结果一致。就生长和产氨特性而言,有机氮远远优于无机氮。以亚硝酸钠为唯一氮源时,菌株生长很少,不产氨,这表明该菌株无反硝化特性,与 Palleroni 等^[8]对寡养单胞菌的描述一致。

3.4 C95 在水产养殖中的应用

微生态制剂在水产养殖中的应用已经引起科研人员的广泛关注。目前我国用于生产的微生态制剂包括芽孢杆菌制剂、乳酸杆菌制剂和酵母类制剂等^[31]。近年来,异养硝化菌和好氧反硝化菌的不断发现和研究,利用微生态制剂降低水体中的氨氮和亚硝酸盐氮含量逐渐成为热点^[32-34]。然而,目前利用微生物脱氮的研究主要针对工业污水生物脱氮技术,本课题组参考工业污水生物脱氮技术,致力于将异养硝化菌和好氧反硝化菌应用于养殖水体水质改良的研究工作。其中建立筛选能降解氨氮和亚硝酸盐氮的有益微生物的方法是微生态制剂应用于养殖水体改良的重要内容。本研究所筛选鉴定的 C95 菌株能够在养殖水环境中产生大量氨氮和亚硝酸盐氮,是养殖水体中产生氮污染的罪魁祸首之一,能抑制该菌株生长或产生氨氮和亚硝酸盐氮特性的菌株就能在养殖水体中发挥降低氨氮和亚硝酸盐氮的作用。通过实验室里将候选益生菌与 C95 在培养基中共培养,测定其中的亚硝酸盐氮和氨氮的去除率,由此筛选水产益生菌。因此,C95 菌株能成为筛选水产益生菌的指示菌株。

4 结论

(1)从草鱼池中筛选得到1株具有较高产氨氮和亚硝酸盐氮的异养硝化菌 *Stenotrophomonas* sp. C95。

(2)碳源、温度和摇床转速都能显著影响 C95 菌株的生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的含量($P<0.05$),氮源只对其生长和产氨氮有显著影响($P<0.05$),对其产亚硝酸盐氮无显著影响($P>0.05$),pH(5~9)对其生长及产生氨盐和亚硝酸盐均无显著影响($P>0.05$)。

(3)C95 菌株在 LB 和蛋白胨培养基中生长最好,在 LB 培养基中产生氨氮最多,但产生亚硝酸盐氮的能力无显著差异。

(4)在 LB 培养基中外加单一碳源并不能促进 C95 菌株的生长及产生氨氮和亚硝酸盐氮的能力,添加无机碳源反而会抑制这些特性。

(5)在 15~30 ℃ 范围内,温度越高,C95 菌株生长量和产氨氮量越大,但 30 ℃ 时产亚硝酸盐氮的含量显著低于 15 ℃ ($P<0.05$),综合考虑 25 ℃ 为最佳温度。

(6)在 0~200 r·min⁻¹ 范围内,摇床转速越大,C95 菌株生长量和产氨氮量越大,摇床转速为 150 r·min⁻¹ 时,产亚硝酸盐氮的含量最高。综合考虑 150 r·min⁻¹ 为最宜转速。

(7)C95 作为指示菌筛选出两株去除氨氮和亚硝酸盐氮效果较好的菌株 SC01、SC07。

参考文献:

- [1] 吴保承,沈国强,杨春霞,等.微生态制剂在水质净化中的应用现状及展望[J].环境科学与技术,2010,33(12F):408-410.
WU Bao-cheng, SHEN Guo-qiang, YANG Chun-xia, et al. The application status and prospects about the probiotics used in water purification[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(12F):408-410.
- [2] 洪美玲,陈立侨,孙新谨,等.亚硝酸盐急性胁迫对中华绒螯蟹幼体相关免疫指标和应激蛋白(HSP70)表达的影响[J].应用与环境生物学报,2011,17(5):688-693.
HONG Mei-ling, CHEN Li-qiao, SUN Xin-jin, et al. Effects of acute nitrite exposure on immunity indicators and HSP70 expression in Chinese Mitten-hand Crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2011, 17(5):688-693.
- [3] 陈家长,简纪常,胡庚东,等.水体中 NH₃-N 对建鲤非特异性免疫功能的影响[J].湛江海洋大学学报,2000,20(3):12-15.
CHEN Jia-zhang, JIAN Ji-chang, HU Geng-dong, et al. Effects of NH₃-N on non-specific immunity of jian carp [J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2000, 20(3):12-15.
- [4] Adelman I R, Kusilek L I, Koehle J, et al. Acute and chronic toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the endangered Topeka shiner (*Notropis*

- Topeka*) and the fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(10):2216-2223.
- [5] 周永欣,张甫英,周仁珍.氨对草鱼的急性和亚急性毒性[J].水生生物学报,1986,10(1):32-38.
ZHOU Yong-xin, ZHANG Fu-ying, ZHOU Ren-zhen. The acute and subacute toxicity to ammonia on grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, 10(1):32-38.
- [6] 郭国强,孙红飞,张永耀.分子氨对草鱼鱼种红细胞渗透脆性的影响[J].2010,29(8):489-491.
GUO Guo-qiang, SUN Hong-fei, ZHANG Yong-yao. The influence of molecular ammonia on erythrocyte osmotic fragility in grass carp fingerlings [J]. 2010, 29(8):489-491.
- [7] 郭国强,杨治国,张永耀,等.亚硝酸盐对草鱼红细胞渗透脆性的影响[J].淡水渔业,2011,41(4):66-69.
GUO Guo-qiang, YANG Zhi-guo, ZHANG Yong-yao, et al. The influence of nitrite on erythrocyte osmotic fragility of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. 2011, 41(4):66-69.
- [8] 余瑞兰,聂湘平,魏泰莉,等.分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及对策[J].中国水产科学,1999,6(3):73-77.
YU Rui-lan, NIE Xiang-ping, WEI Tai-li, et al. Toxicity of molecular ammonia & nitrite to fishes and the control measures [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, 6(3):73-77.
- [9] 国家环境保护局.水和废水监测分析方法[M].第四版.北京:中国环境科学出版社,2002.
State Environmental Protection Administration of China. The methods of water and wastewater monitor [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [10] Palleroni N J, Bradbury J F. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983 [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1993, 43(3):606-609.
- [11] Drancourt M, bollet C, Raoult D. *Stenotrophomonas Africana* sp. Nov. an opportunistic human pathogen in Africa [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(1):160-163.
- [12] Wolfgang F, Karlheinz A, Erko S, et al. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitrereducens* sp. Nov. *Luteimonas mephitis* gen. Nov. sp. Nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernesis* gen. Nov. sp. Nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(2):273-282.
- [13] Essokazi A A, Aboubakar S O, Thierry S, et al. *Stenotrophomonas acidiniphila* sp. Nov. a strictly aerobic bacterium isolated from an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(3):559-568.
- [14] Yoon J H, Kang S J, Oh H W, et al. *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. Nov., isolated from soil [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56, 1363-1367.
- [15] Hugh R, Ryschenkow E. *Pseudomonas maltophilia*, an *Alcaligenes*-like species [J]. *Journal of General Microbiology*, 1961, 26:123-132.
- [16] Janda. Bacterial identification for publication: When is enough [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(6):1887-1891.

- [17] Castignetti D, Hollocher T C. Heterotrophic nitrification among denitrifiers[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1984, 47(4):620–623.
- [18] Laughlin R J, Rütting T, Müller C, et al. Effect of acetate on soil respiration, N₂O emissions and gross N transformations related to fungi and bacteria in a grassland soil[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 42(1):25–30.
- [19] 温东辉, 唐孝炎. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用[J]. 环境污染与防治, 2003, 25(5):283–285.
WEN Dong-hui, TANG Xiao-yan. Heterotrophic nitrification and its role in the nitrogen removal in wastewater treatment[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2003, 25(5):283–285.
- [20] Schmidt I, Slickers O, Schmid M, et al. New concepts of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27:481–492.
- [21] Papen H, Berg R V. A most probable number method(MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil[J]. *Plant and Soil*, 1998, 199:123–130.
- [22] 张光亚, 陈美慈, 韩如昉, 等. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2003, 43(2):156–161.
ZHANG Guang-ya, CHEN Mei-ci, HAN Ru-yang, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a heterotrophic nitrifier[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2):156–161.
- [23] 曹喜涛, 常志州, 黄红英, 等. 1株高温异养硝化细菌的分离鉴定和特性研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19):4833–4834.
CAO Xi-tao, CHANG Zhi-zhou, HUANG Hong-ying, et al. Isolation, identification and characterization of the thermophilic heterotrophic nitrifier[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2006, 34(19):4833–4834.
- [24] 王成林, 周巧红, 王亚芬. 一株异养硝化细菌的分离鉴定及其亚硝化作用研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(3):1146–1150.
WANG Cheng-lin, ZHOU Qiao-hong, WANG Ya-fen. Studies on the identification and nitrosification of a heterotrophic nitrifier bacterial strain[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(3):1146–1150.
- [25] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Nitrification and denitrification in high-strength ammonium by *Alcaligenes faecalis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(11):773–778.
- [26] 苟莎, 黄钧. 异养硝化细菌脱氮特性及研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2):256–260.
GOU Sha, HUANG Jun. Advances in denitrification characteristics of heterotrophic nitrification bacteria[J]. *Microbiology*, 2009, 36(2):256–260.
- [27] 马放, 王宏宇, 周丹丹. 好氧反硝化生物脱氮机理分析及研究进展[J]. 工业用水与废水, 2005, 36(2):11–14, 59.
MA Fang, WANG Hong-yu, ZHOU Dan-dan. An analysis of mechanism of bioremoval of nitrogen by aerobic denitrification process and development of study thereof[J]. *Industrial Water & Wastewater*, 2005, 36(2):11–14, 59.
- [28] Verstrate W, Alexander M. Mechanism of nitrification by *Arthrobacter* sp.[J]. *The Journal of Bacteriology*, 1972, 110:962–967.
- [29] Brierley E D R, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: Isolation and characterization of a nitrifying bacterium[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(10):1403–1409.
- [30] Vertraete W. Heterotrophic nitrification in soils and aqueous media[J]. *Biology*, 1974, 4:541–558.
- [31] 蒲红宇, 胡兆群, 王福强. 微生态制剂及其在水产养殖中的应用研究现状[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(4):80–84.
PU Hong-yu, HU Zhao-qun, WANG Fu-qiang. Status quo of application and study of probiotics in aquaculture[J]. *Marine Fisheries Research*, 2003, 24(4):80–84.
- [32] 李卫芬, 张小平, 宋文辉, 等. 芽孢杆菌对草鱼养殖水质调控作用的研究[J]. 渔业现代化, 2011, 38(4):22–26.
LI Wei-fen, ZHANG Xiao-ping, SONG Wen-hui, et al. Application of *Bacillus* to water quality control in grass carp culture[J]. *Fishery Modernization*, 2011, 38(4):22–26.
- [33] 沈南南, 李纯厚, 贾晓平, 等. 小球藻与芽孢杆菌对对虾养殖水质调控作用的研究[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(2):48–52.
SHEN Nan-nan, LI Chun-hou, JIA Xiao-ping, et al. Application of *Chlorella pyrenoidosa* and *Bacillus licheniformis* for water quality control in shrimp culture[J]. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(2):48–52.
- [34] 张小玲, 袁科平, 耿康, 等. 好氧反硝化菌对水质和鱼体饲喂效果的影响研究[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(3):114–119.
ZHANG Xiao-ling, YUAN Ke-ping, GENG Kang, et al. Effect of aerobic denitrifying bacteria on water quality and cyprinus carpio feeding effects[J]. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(3):114–119.