

养殖池底泥高效亚硝酸盐去除菌的分离及去除条件研究

苏艳秋, 符燕华, 伍翠芳, 顾继锐, 罗国强*

(通威股份有限公司, 成都 610041)

摘要: 以传统水产养殖池塘底泥为材料, 从中分离筛选得到 31 株亚硝酸盐去除菌, 从中筛选到 1 株亚硝酸盐去除能力最强的菌株 N-F-0117。该菌株对 $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硝酸盐的去除率高达 92%, 对 $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硝酸盐去除率仍有 53%; 初始 pH 值 5~10 时菌株对亚硝酸盐去除率保持在 80% 以上; 菌株去除亚硝酸盐时最适碳源为蔗糖, 浓度为 $>2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 去除亚硝酸盐时最佳菌液添加浓度为 $>0.05\%$ 。对菌株进行形态分析、生理生化鉴定, 确定该菌株为栖稻黄色单胞菌 (*Flavimonas oryzihabitans*)。

关键词: 亚硝酸盐; 栖稻黄色单胞菌; 鉴定; 去除条件

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)04-0604-04

Isolation of an efficient nitrite removal bacterium from aquaculture sediment and its removal conditions

SU Yanqiu, FU Yanhua, WU Cuifang, GU Jirui, LUO Guoqiang

(Tongwei Group Co. Ltd, Chengdu 610041)

Abstract: Traditional aquaculture pond sediments were taken as material and obtained 31 nitrite removal bacteria through isolation, a strain N-F-0117 with strong removal nitrite was screened from them. Its removal rate to $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrite was 92%, and $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nitrite still was 53%. The optimum initial pH rang for the strain was from 5-10, and the optimum carbon source for strain was sucrose, and the concentration of sources was greater than $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the optimum added concentration of bacteria was greater than 0.05%. It is confirmed that the strain was *Flavimonas oryzihabitans* by morphological analysis, physiological and biochemical experiment.

Key words: nitrite; *Escherichia coli*; identification; removal characteristics

亚硝酸盐是氨转化成硝酸盐过程中的中间产物, 其主要由残存在池底的饵料、粪便、死藻等物质分解转而来, 亚硝酸盐在水产养殖中是诱发各种疾病的重要环境因素。当水中亚硝酸盐浓度积累到 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 亚硝酸盐便会通过鳃和体表进入水产养殖动物的血液, 进而与血液中的携氧蛋白结合使之失去携氧能力而导致动物产生摄食量下降、呼吸困难、鳃损伤、浮头等症状, 严重时某些代谢器官功能失常, 体力衰退, 暴发疾病, 甚至出现大批死亡现象^[1-2]。随着集约化水产养殖的快速发展, 养殖池中亚硝酸盐普遍超标, 给养殖户造成严重经济损失, 也在一定程度上制约了水产养殖业的发展, 因而需要采取有效措施对亚硝酸盐进行防控。其中生

物法以其有效、廉价、危害小, 而且降低亚硝酸盐后不容易反弹的优点成为广大研究者关注的热点。据文献报道, 乳酸菌(*lactic acid bacteria*)^[2]、假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)^[3]、芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)^[4-6]、不动杆菌(*Acinetobacte*)^[7]等菌株都在降解亚硝酸方面表现出良好效果。但之前的研究菌株几乎都不是从水产养殖池塘底泥中进行分离、筛选, 因而在一定程度上限制了菌株在水产养殖中的应用和推广。本实验从传统水产养殖池塘底泥中分离、筛选亚硝酸盐降解菌株, 并对筛选出的菌株进行 API 生理生化鉴定, 对其去除亚硝酸盐的各项应用条件进行研究, 以期寻找最佳菌株及配套使用技术应用于水产养殖环境, 解决水产养殖池塘亚硝酸盐超标问题。

收稿日期: 2015-03-16

基金项目: 通威股份有限公司科技发展项目“微生态制剂产业化项目基金”资助。

作者简介: 苏艳秋, 助理研究员。E-mail: suyq@tongwei.com

* 通信作者: 罗国强, 高级畜牧师。E-mail: luogq@tongwei.com

1 材料与方法

1.1 试验材料

养殖池底泥, 采集于成都通威水产科技园区。

1.2 菌株的分离、纯化及初步筛选

参照文献方法, 将 1 g 泥样溶于 100 mL 亚硝酸盐降解培养基, 于 28℃, 180 r·min⁻¹, 富集培养 7 d 之后, 用格里斯试剂进行富集液的显色处理^[8]。发现富集液显红色后, 稀释富集液涂布于亚硝酸盐降解培养基平板上进行亚硝酸盐去除菌分离与纯化。然后挑取纯菌落进行液体培养(30℃, 180 r·min⁻¹), 7 d 后再次用格里斯试剂进行显色反应, 从而筛选出亚硝酸盐降解能力较强的菌株。

1.3 菌株对亚硝酸盐降解能力的测定

挑取初步筛选出的菌株单菌落以 2% 接种量接种于亚硝酸盐去除测定培养基中, 同时以空白硝酸盐去除测定培养基作为对照, 于 28℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床振荡培养 48 h 后参照邵晴等^[9]方法采用酒石酸钠法测定各实验组培养前后的亚硝酸盐含量(N_E)和空白对照组中的亚硝酸盐含量(N_C), 根据公式($R=N_C-N_E/N_C\times 100\%$) 计算各分离菌株对亚硝酸盐的去除率(R), 筛选出降解能力最强的菌株。

1.4 亚硝酸盐去除菌的鉴定

参照宋增福等^[10]方法, 用 API ID32GN 细菌鉴定系统对分离菌株进行生理生化鉴定, 同时将分离菌株进行革兰氏染色, 并进行透射电镜观察。

1.5 不同因素对亚硝酸盐去除效果的影响

1.5.1 亚硝酸盐底物浓度的影响 将终浓度为 2.0×10⁸ CFU·mL⁻¹ 的分离菌株菌悬液以 2% 接种量接种于亚硝酸盐氮浓度分别为 2、10、20、40、80 mg·L⁻¹ 亚硝酸盐去除测定培养基中, 然后于 30℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床振荡培养 48 h 后测定分离菌株对亚硝酸盐的去除率。

1.5.2 pH 值对去除亚硝酸盐效果的影响 将终浓度为 2.0×10⁸ CFU·mL⁻¹ 的分离菌株菌液以 2% 接种量接种于初始 pH 值为 5、6、7、8、9、10、11 的亚硝酸盐去除培养基中, 然后 30℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床振荡培养 48 h 后测定分离菌株对亚硝酸盐的去除率。

1.5.3 碳源种类对去除亚硝酸盐效果的影响 分别以相同含量乙酸钠、蔗糖、葡萄糖、柠檬酸钠代替亚硝酸盐去除测定培养基中的丁二酸钠, 然后将终浓度为 2.0×10⁸ CFU·mL⁻¹ 的分离菌株菌悬液以 2% 接种量接种于含不同碳源的亚硝酸盐去除测定培养基中, 并于 30℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床振荡培养

48 h 后测定分离菌株对亚硝酸盐的去除率。

1.5.4 最适碳源浓度对去除亚硝酸盐效果的影响 将终浓度为 2.0×10⁸ CFU·mL⁻¹ 的分离菌株菌悬液以 2% 接种量接种于含 0.5、1、2、3 g·L⁻¹ 最适碳源的亚硝酸盐去除测定培养基, 然后于 30℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床振荡培养 48 h 后测定分离菌株对亚硝酸盐的去除率。

1.5.5 菌液添加浓度对去除亚硝酸盐的影响 按照每 100 L 养殖水体中添加 0.05、0.15、0.3、1 mL 菌液的使用量, 将终浓度为 2.0×10⁸ CFU·mL⁻¹ 菌液与筛选出来的最适碳源一起接种到养殖废水中, 然后 30℃、180 r·min⁻¹ 条件下摇床振荡培养 48 h 后测定分离菌株对亚硝酸盐的去除率。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与鉴定

从养殖污泥中分离了 31 株亚硝酸盐去除菌, 通过进一步测定比较其对亚硝酸盐的去除率, 最终筛选出一株对亚硝酸盐具有良好去除效果的菌株, 暂命名为 N-F-0117, 其在终浓度为 2.0×10⁸ CFU·mL⁻¹ 时对 30 mg·L⁻¹ 亚硝酸盐的去除率 97% 以上。菌株 N-F-0117 革兰氏染色阴性, 呈球状(图 1), 在 LB 培养基上形成的菌落特征为: 圆形, 中央隆起, 边缘整齐, 灰色。通过 API ID32GN 细菌鉴定系统对菌株 N-F-0117 进行鉴定, 初步判定该菌株为栖稻黄色单胞菌 (*Flavimonas oryzihabitans*)。

2.2 亚硝酸盐底物浓度的影响

如图 2 所示, 实验结果表明随着亚硝酸盐底物浓度不断增大, 菌株 N-F-0117 对亚硝酸盐的去除率并没有明显降低, 2~40 mg·L⁻¹ 时, 菌株 N-F-0117 对亚硝酸盐的去除率仍然保持在 92% 以上。当亚硝酸盐浓度达到 80 mg·L⁻¹ 时, 菌株 N-F-0117 对亚硝酸盐去除率降到 53%, 且差异不显著 ($P>0.05$)。

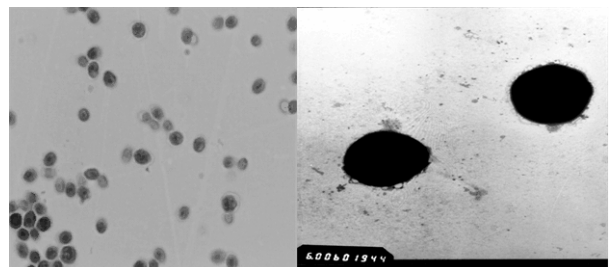


图 1 光学显微镜(100×)与透射电镜(6000×)下菌株 N-F-0117 的形态

Figure 1 The morphological character of strain N-F-0117 under light microscope (100×) and transmission electron Microscope (6000×)

2.3 pH 值对去除亚硝酸盐效果的影响

如图 3 所示, 当初始 pH 范围为 5-10 时, 菌株 N-F-0117 对亚硝酸盐的去除率呈现先升高, 再降低的情况, 变化显著 ($P < 0.05$), 其中 pH 为 6 和

7 时, 菌株对亚硝酸盐去除率最高, 都大于 80%。当初始 pH 值为 11 时, 菌株特性丢失严重, 对亚硝酸盐去除率仅为 8.2%。

表 1 API ID32GN 细菌鉴定系统鉴定的菌株 N-F-0117 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biological characteristics of strain N-F-0117 by API ID32GN bacterial identification system

鉴定项目	结果	鉴定项目	结果	鉴定项目	结果	鉴定项目	结果
Identification item	Result	Identification item	Result	Identification item	Result	Identification item	Result
精氨酸-精氨酸-AMC	—	L-色氨酸-AMC	—	甲基巴豆酸	—	D-半乳糖	—
甘氨酸-脯氨酸-AMC	—	赖氨酸-丙氨酸-AMC	—	4MU-N-乙酰-BD-氨基葡萄糖苷	—	D-葡萄糖酸	—
甘氨酸-AMC	—	乙酸	—	Gamma-谷氨酰-NA	—	D-蜜二糖	—
戊二酰-甘氨酸-精氨酸-AMC	—	核糖醇	—	L-脯氨酸-NA	—	山梨醇	—
L-精氨酸-AMC	—	枸橼酸	—	PNP-BD-糖苷	—	蔗糖	—
L-谷氨酸-AMC	—	粘菌素	—	PNP-磷酸盐	—	半乳糖醛酸	—
L-亮氨酸-AMC	+	D-甘露醇	—	Beta-阿洛糖	—	L-阿拉伯糖	—
L-苯丙氨酸-AMC	+	Alpha-酮戊二酸	—	Beta-葡二糖	—	L-鼠李糖	—
L-脯氨酸-AMC	+	丙二酸	—	葡萄糖	—	甲基-B-葡萄糖苷	—
L-焦谷氨酸-AMC	—	多粘菌素 B	—	D-果糖	—	尿素	—

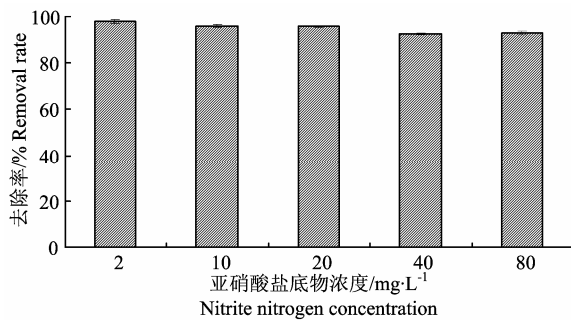


图 2 亚硝酸盐底物浓度对菌株 N-F-0117 去除效果的影响
Figure 2 Influence of nitrite nitrogen concentration on the nitrite removal effect of strain N-F-0117

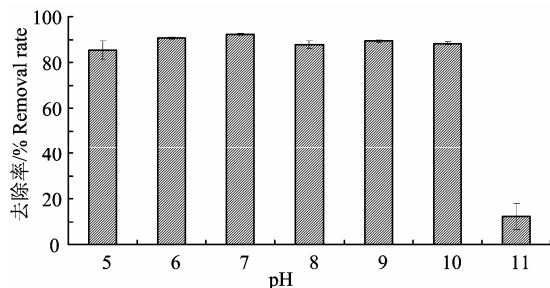
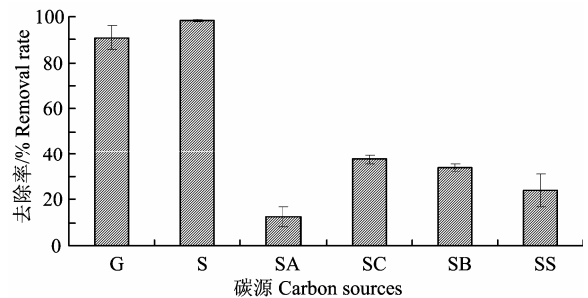


图 3 pH 值对菌株 N-F-0117 去除亚硝酸盐效果的影响
Figure 3 Influence of pH on the nitrite removal effect of strain N-F-0117

2.4 碳源种类对去除亚硝酸盐效果的影响

如图 4 所示, 以葡萄糖和蔗糖为唯一碳源时, 菌株 N-F-0117 对亚硝酸盐的去除率均达到 90% 以上, 其中以蔗糖为唯一碳源时, 菌株 N-F-0117 对亚硝酸盐去除率最高, 达到 98%。而当以乙酸钠、丁二酸钠、柠檬酸钠、碳酸氢钠为唯一碳源时, 菌株

N-F-0117 对亚硝酸盐的去除率仅为 12.7%、24.2%、37.6%、33.7%。因此, 菌株 N-F-0117 去除亚硝酸盐的最佳碳源为蔗糖。



SA: 乙酸钠; SS: 丁二酸钠; S: 蔗糖; G: 葡萄糖; SC: 柠檬酸钠; SB: 碳酸氢钠

SA: Sodium acetate; SS: Sodium succinate; S: Sucrose; G: Glucose; SC: Sodium citrate; SB: Sodium bicarbonate

图 4 碳源种类对菌株 N-F-0117 去除亚硝酸盐效果的影响
Figure 4 Influence of carbon sources on the nitrite removal effect of strain N-F-0117

2.5 蔗糖浓度对亚硝酸盐去除率的影响

如图 5 所示, 当蔗糖浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 菌株 N-F-0117 对亚硝酸盐去除率较低, 为 83.7%, 当蔗糖浓度逐渐升高时, 菌株 N-F-0117 对亚硝酸盐去除率逐渐升高, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。因而实际应用中, 考虑成本问题, 可选择加入 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖。

2.6 菌液添加浓度对去除亚硝酸盐的影响

如图 6 所示, 向养殖污水中加入不同浓度的菌株 N-F-0117 培养液, 其对污水中亚硝酸盐去除率都在 95% 以上, 其中加入菌液浓度越高, 对污水中亚

硝酸盐去除率越高,但变化差异不显著($P>0.05$)。因而实际应用中,考虑成本问题,可选择 0.05% 的菌液添加浓度。

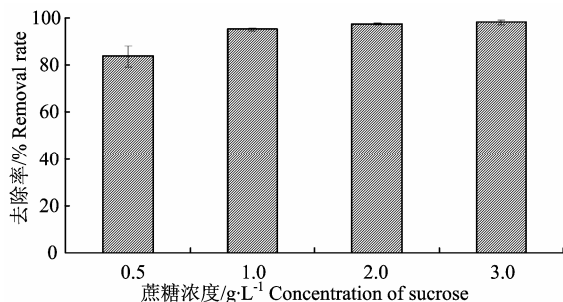


图 5 蔗糖浓度对菌株 N-F-0117 去除亚硝酸盐效果的影响
Figure 5 Influence of sucrose concentration on the nitrite removal effect of strain N-F-0117

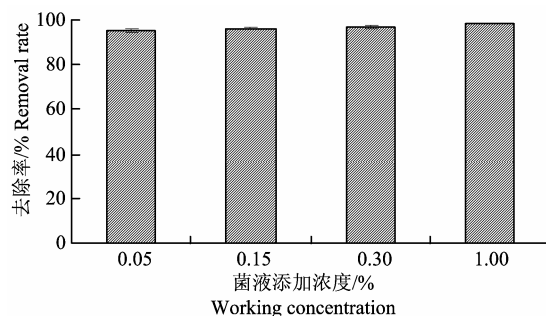


图 6 菌液添加浓度对去除亚硝酸盐的影响
Figure 6 Influence of effective concentration on the nitrite removal effect of strain N-F-0117

3 讨论

从四川地区养殖池底泥中分离到亚硝酸盐降解菌 N-F-0117,采用 API 细菌鉴定系统进行鉴定,发现该菌株为栖稻黄色单胞菌。据文献报道还没有发现能降解亚硝酸盐的栖稻黄色单胞菌,该菌株的发现拓展了大家对栖稻黄色单胞菌的常规认识。

菌株对亚硝酸盐的耐受能力和降解能力是评估菌株很重要一个指标。罗秀针等^[3]分离的菌株 JN1 对 1000-4000 mg·L⁻¹亚硝酸盐的去除率在 90%以上,这是目前亚硝酸盐去除能力最强的报道,该菌株是一株反硝化作用的假单胞菌。王会聪等^[7]分离的菌株 AQ-3 对 1~10 mg·L⁻¹亚硝酸盐去除率达到 99%,高于 20 mg·L⁻¹时去除率急剧降低,40 mg·L⁻¹时去除率小于 20%。而管世敏等^[2]报道的乳酸菌对亚硝酸盐耐受和作用浓度更低,仅为 400 ug·mL⁻¹。本实验发现的菌株 N-F-0117 对亚硝酸盐降解能力属于中上水平,其对 40 mg·L⁻¹亚硝酸盐去除率达 92%,对 80 mg·L⁻¹亚硝酸盐去除率达 53%,能够较好的满足水产养殖中对亚硝酸盐去除的应用需求。

水体中微生物对亚硝酸盐的去除率与 pH 值密

切有关。管世敏等^[2]实验结果表明,乳酸菌去除亚硝酸盐的初始最适 pH 值为 5.0~6.0,偏酸性。罗秀针等^[3]研究表明假单胞菌 JN1 对亚硝酸盐去除效果最好时 pH 值为 6.5~7.5。而在海水养殖后期 pH 值一般偏碱性,即水产养殖业会面临不同 pH 值的养殖水体。菌株 N-F-0117 在 pH 值范围为 5-10 时都能较好的发挥去除亚硝酸盐的作用,因而较乳酸菌和假单胞菌更适宜养殖水体 pH 环境。

碳源是亚硝酸盐去除菌非常重要的速率限制因子,在亚硝酸盐去除过程中提供所必需的能源。本实验发现蔗糖是菌株 N-F-0117 发挥去除亚硝酸盐作用时最有效的碳源,这一结果与李兵等^[11]、李慧颖等^[12]的研究结果有差异,前者发现芽孢杆菌最适碳源为乙酸钠,后者发现假单胞菌最适碳源为丁二酸盐和乙酸盐,这可能与菌株种属差异较大有关。

综上所述,从养殖池塘底泥中所分离的栖稻黄色单胞菌 N-F-0117,具有较强亚硝酸盐分解能力,且适用 pH 值范围广泛,适用碳源廉价易得,因此适合大规模开发用于水产养殖环境降解亚硝酸盐。

参考文献:

- [1] 宋余凤,杨宝圣. 亚硝酸盐在水产养殖中的危害及解决方法[J]. 科学养鱼,2010(7): 16~16.
- [2] 管世敏. 降解亚硝酸盐乳酸菌的分离筛选及其在泡菜发酵中的应用研究[D]. 上海: 上海师范大学,2009.
- [3] 罗秀针,徐长安,唐旭,等. 反硝化细菌的筛选及其亚硝酸盐降解特性研究[J]. 福建农业学报,2010,25(4): 513~516.
- [4] 孙君社,马鹏飞,刘萍,等. 一种降解亚硝酸盐的微生物以及分离、培养方法和应用[P]. 2006.
- [5] 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.
- [6] 高海英,王占武,李洪涛,等. 养殖水体耐盐高效降亚硝酸盐氮和氨氮芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 河北农业科学,2008,12(11): 59~61.
- [7] 王会聪,曹海鹏,何珊,等. 一株养殖水体中亚硝酸盐去除菌的鉴定及其去除条件[J]. 微生物学通报. 2012,39(2): 154~161.
- [8] 魏敬,党文玲. 亚硝酸盐测定方法的比较与分析[J]. 肉类工业,2004(7): 37-38.
- [9] 邵晴,余晓斌. 好氧反硝化细菌的筛选及反硝化特性研究[J]. 生物技术,2008,18(3): 63-65.
- [10] 宋增福,肖敏,吴静雯,等. 一株林蛙烂嘴病原菌的分离鉴定及防治药物筛选[J]. 安徽农业科学,2009,37(34): 16884~16885.
- [11] 李兵,林炜铁. 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.
- [12] 李慧颖,黄少斌,范利荣. 一株好氧反硝化菌的反硝化性能研究[J]. 环境科学与技术,2009,32(8): 9~12.