

分离自养殖水体的异养硝化-好氧反硝化菌及其脱氮作用研究

王永红^{1,2}, 李安章^{1,3}, 张明霞¹, 陈猛^{2,3}, 朱红惠¹

(1. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物菌种保藏中心, 广东广州 510070)

(2. 广东博沃特生物科技有限公司, 广东肇庆 526238) (3. 广州王道生物科技有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 本研究从 8 份养殖水体样品中富集、分离、纯化、鉴定能脱除亚硝态氮、硝态氮和氨氮的菌株资源, 获得 8 株亚硝态氮脱除菌、8 株硝态氮脱除菌和 11 株氨氮脱除菌, 分布在 *Pseudomonas*、*Paracoccus*、*Zobellella*、*Achromobacter*、*Bosea*、*Paenarthrobacter*、*Corynebacterium*、*Bacillus*、*Delftia* 和 *Gordonia* 等属。对这 27 株菌进行脱氮特性分析, 筛得 2 株异养硝化-好氧反硝化菌, 分别鉴定为 *Pseudomonas stutzeri* j-1 和 *Zobellella denitrificans* 2G-5。这 2 株菌脱氮性能优越, 在 3 种氮素培养基中培养 18 h 后, 对亚硝态氮、硝态氮和氨氮的脱除率在 99.53%~99.89% 之间。将之用于未灭菌的养殖水脱氮, 菌株 j-1 表现出一定的定殖和增殖能力, 发挥出良好的脱氮效果; 但菌株 2G-5 增殖能力较弱, 脱氮效果不明显。本研究发掘了一批脱氮菌株资源, 获得了 2 株具有重要应用潜力的异养硝化-好氧反硝化菌, 为细菌氮循环代谢机制研究和脱氮技术研发积累了物质基础。

关键词: 反硝化; 硝化; 脱氮; 同步硝化反硝化; 养殖水体; 氨氧化

文章编号: 1673-9078(2019)07-36-46

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.007

Isolation of Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification Bacteria from Aquaculture Water and Study of Their Denitrification Efficiency

WANG Yong-hong^{1,2}, LI An-zhang^{1,3}, ZHANG Ming-xia¹, CHEN Meng^{2,3}, ZHU Hong-hui¹

(1. Guangdong Microbial Culture Collection Center (GDMCC), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China) (2. Guangdong Bewote Biotechnology Co. Ltd., Zhaoqing 526238, China)

(3. Guangzhou Wangdao Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract: The present study collected 8 samples from aquaculture ponds for performing enrichment, isolation, purification and identification of bacteria strain capable of removing NO_2^- -N, NO_3^- -N and NH_4^+ -N. We obtained 8, 8 and 11 bacteria strains which could remove NO_2^- -N, NO_3^- -N and NH_4^+ -N, respectively. These bacteria were classified into the genera *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Zobellella*, *Achromobacter*, *Bosea*, *Paenarthrobacter*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Delftia* and *Gordonia*. After analysis of denitrification characteristics, two heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria strains with excellent denitrification effects were obtained and identified as *Pseudomonas stutzeri* j-1 and *Zobellella denitrificans* 2G-5, respectively. After incubated in 3 nitrogen media for 18 hours, the removal rates of NO_2^- -N, NO_3^- -N and NH_4^+ -N by strain j-1 and 2G-5 were ranged from 99.53% to 99.89%. When applied in non-sterile aquaculture water, strain j-1 was successfully colonized and showed efficient denitrification. Whereas, strain 2G-5 didn't proliferate well and its denitrification effect was unremarkable. This study exploited a collection of denitrification bacteria, obtained two heterotrophic nitrification and aerobic denitrification strains with important

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A020210057; 2018A030313476); 广州市珠江科技新星专项 (201806010065); 广东省科学院项目 (2019GDASYL-0401002); 广东省科技创新领军人才项目 (2015TX01N036); 广东省农业厅项目 (2016LM3158); 广州市科技计划项目 (201704020088); 肇庆市科技计划项目 (2018N003)

作者简介: 王永红 (1981-), 女, 工程师, 研究方向: 氮循环微生物

通讯作者: 朱红惠 (1970-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物资源发掘与创新利用

application potential, and provided biological materials for further study on bacterial mechanisms of nitrogen circulation and metabolism, and on research and development of denitrification techniques.

Key words: denitrification; nitrification; nitrogen removal; simultaneous nitrification and denitrification; aquaculture water; ammonoxidation

随着高密度、集约化养殖技术的发展和推广,氮素污染已成为限制我国水产养殖业可持续发展的重大问题^[1-4]。微生物脱氮技术具备经济、高效、无残留污染等优点,在污水处理和环境工程领域已成为应用最为普遍的脱氮技术^[5]。但是,目前的污水脱氮技术将脱氮过程分为硝化和反硝化等不同过程,序列进行,需要依次经过厌氧、缺氧、好氧等不同的设备或过程,各个步骤需要分别添加碳源、产酸或产碱等,不适合养殖水体脱氮^[6,7]。

近年来,随着同步硝化反硝化现象的发现,利用异养硝化-好氧反硝化菌研发养殖水体脱氮技术日益成为研究热点。这种技术实现了在同一个生态系统中同步完成硝化和反硝化反应,同时去除水体中的有机污染物、氨氮、亚硝态氮和硝态氮^[8]。另外,同步硝化反硝化过程中分别产生的酸和碱能部分相互中和,从而保护生态环境酸碱平衡。

然而,目前异养硝化-好氧反硝化菌及其脱氮技术尚未在水产养殖中推广使用。主要原因在于,异养硝化-好氧反硝化菌分离筛选和功能评价工作不足,菌株有效性、定殖力和竞争力较差,在实际应用中存在脱氮效果不稳定等问题。因此,继续加强分离和筛选脱氮性能优良的异养硝化-好氧反硝化菌,研究其脱氮特性,评价其在养殖水体脱氮中的使用效果,具有重要的理论和实践意义。

从微生物生活的环境中分离和筛选特定功能微生物是筛选功能菌株的常用策略。由于长期的适应与进化,在养殖环境中存在着适应养殖环境、定殖力和竞争力强、对养殖环境的污染物有针对性降解能力的菌株,具有更好的应用潜力。因此,从养殖环境中分离脱氮菌株,经过科学研究后再用于养殖环境,是水产养殖脱氮菌剂开发的一大趋势。

本研究计划从8份养殖池水样品中分离、纯化、鉴定异养硝化-好氧反硝化菌株,对其脱氮特性进行研究,并评估其在养殖水体脱氮中的应用效果,以期对养殖水体脱氮提供性能优越、适应性强的功能菌株。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究共采集样品8份。其中,汕头南澳岛、莱

莞港附近鱼虾混养池塘水样5份:ST03(116.8493 E, 23.4326 N)、ST04(116.8471 E, 23.4096 N)、ST05(116.8707 E, 23.4210 N)、ST06(116.8623 E, 23.4301 N)、ST07(116.8555 E, 23.4307 N);佛山市三水区大塘镇六一村罗非鱼鱼塘(23.4558 E, 112.8736 N)水样1份FS01;汕尾市海丰县海城镇金瑞丰生态农业有限公司曝气池塘(115.2229 E, 22.9706 N)水样3份:SW01、SW02、SW03。

1.2 培养基和溶液

基础培养基:丁二酸钠2.5 g、二水合柠檬酸钠2.5 g、 K_2HPO_4 1 g、 KH_2PO_4 1 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、pH 7.4,定容至1 L,高压湿热灭菌,冷却后添加1%(V/V)的复合碳源、0.2%(V/V)的复合维生素溶液、0.2%(V/V)的微量元素混合液。

3种氮素培养基:分别在基础培养基中添加 KNO_3 (1.1 g/L)、 $NaNO_2$ (0.69 g/L)、 $(NH_4)_2SO_4$ (0.66 g/L)为唯一氮源,使N浓度均为140 mg/L。制备固体平板时,添加琼脂至1.7%(m/V)。

发酵培养基:工业葡萄糖20 g、玉米浆干粉8 g、 K_2HPO_4 0.8 g、 $MnSO_4$ 0.8 g、酵母膏1 g、海盐10 g,加自来水至1 L, pH 7.3,罐内蒸汽灭菌。

复合碳源:D-葡萄糖6.9 g、D-果糖6.9 g、D-乳糖6.9 g、醋酸钠9.5 g、90%乳酸6.4 mL、甘露醇7 g、无水乙醇7 mL、甘油6.3 mL、苯甲酸钠4.8 g、水杨酸4.6 g,溶于500 mL水中, pH 7.4, 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

复合维生素溶液:生物素(VH)10 mg、叶酸(VB_9)100 mg、吡哆醇(VB_6)100 mg、硫胺素(VB_1)200 mg、烟酸(VB_3)200 mg、泛酸钙(VB_5)100 mg、钴胺素(VB_{12})2 mg、核黄素(VB_2)20 mg、硫辛酸20 mg、EDTA-Na 400 mg,溶于200 mL水中, pH 7.5, 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

微量元素混合液: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.4 g、 H_3BO_3 1.24 g、 $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 g、 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.5 g、 $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.02 g、 $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4 g、KI 0.2 g、 $CaCl_2$ 5 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.1 g、EDTA-Na 10 g,溶于1000 mL水中, pH 7.4, 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

1.3 脱氮菌富集培养

取 2 mL 样品,分别移入装有 3 种氮素培养基(100 mL)的三角摇瓶(容积 250 mL)中,28 °C,180 r/min,进行富集培养。培养 5~7 d 后将培养液按 1:100 (V/V)的比例转接至新的装有氮素培养基的三角瓶中,28 °C,180 r/min,继续培养 5~7 d,进行二次富集。重复上述步骤进行第三次富集。

1.4 脱氮菌分离纯化及菌种保藏

将三次富集后的培养液依次稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 浓度,各取 100 μ L 稀释液涂布于三种氮素培养基固体平板上,28 °C 恒温培养箱培养 3 d。肉眼观察菌落形态、颜色、大小、质地等特征,挑取单菌落划线纯化。将纯化后的菌株进行编号并保藏(制成 20%甘油悬液,保藏于 -80 °C 冰箱)。

1.5 定性分析菌株脱氮特性

将已纯化的菌株分别接种至装有氮素培养基和倒扣杜氏管的试管中,28 °C,180 r/min 振荡培养。2 d 后,观察产气情况。另取部分培养液,定性检测每份培养液中硝态氮、亚硝态氮、氨氮共 3 种无机氮素的存在情况。具体检测方法如下:检测亚硝态氮采用格里斯试剂显色法;检测硝态氮采用二苯胺显色法;检测氨氮采用纳氏试剂显色法。

1.6 脱氮菌初步鉴定

采用 CTAB 法提取细菌基因组 DNA。采用通用引物 27F/1492R 扩增菌株 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(25 μ L)为:2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μ L,10 μ M 浓度的 27F 和 1492R 引物各 1 μ L,基因组 DNA 1 μ L, H_2O 9.5 μ L。扩增反应程序为:105 °C 热盖,95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 40 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1.5 min,共 33 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。所得序列与 EzBioCloud 网站数据库中的 16S rRNA 基因序列进行在线比对分析^[10]。使用 MEGA 7.0.28 软件和 Neighbor-Joining(NJ)算法构建基于 16S rRNA 基因的系统发育树^[11]。

1.7 定量检测菌株 j-1 和 2G-5 的脱氮能力

挑取菌株 j-1 和 2G-5 的单菌落接种于装有 4 mL 不同氮素培养基的试管中,28 °C,180 r/min 振荡培养。当菌液摇至 OD_{600} 为 0.8 左右,取出培养液 1 mL,4000 r/min 离心 10 min,收集菌体,并用对应的氮素培养基清洗 2 次后再次重悬。将菌悬液按 4%的接种量移入装有 100 mL 氮素培养基的三角瓶中,28 °C,

180 r/min 振荡培养。分别在培养 0、12、18、24、36、48 h 时,取出培养液测定培养液 OD_{600} ;同时取 1.5 mL 培养液,8000 r/min 离心,保留上清液与菌体。采用 4-氨基苯磺酰胺分光光度法(GB 7493-1987)测定亚硝态氮浓度;采用紫外分光光度法(HJ/T 346-2007)测定硝态氮浓度;采用纳氏试剂分光光度法(HJ 535-2009)测定氨氮浓度;采用碱性过硫酸钾消解-紫外分光光度法(HJ 636-2012)测定总氮浓度。

1.8 脱氮菌株 j-1 和 2G-5 对养殖水体的应用效果

采集中山市沙仔镇南鸿水产育苗场养殖用水。由于该养殖场用涌水+海水+地下深井水调配养殖用水,因此新调配的养殖水氨氮含量较高。将养殖水分装至 250 mL 三角瓶中,每瓶 100 mL。使用发酵培养基发酵制备 j-1 和 2G-5 菌液,分别接种到 5 组养殖水中,1 组为对照,4 组为实验组。实验组接菌量分别为:水体量的 1% (10^7 cfu/mL)、0.1% (10^6 cfu/mL)、0.01% (10^5 cfu/mL) 和 0.001% (10^4 cfu/mL),对照组接无菌水。每组设置 3 个重复。放置于 28 °C,180 r/min,培养 7 d。每 24 h 取一次水样,一部分样品用于检测 OD_{600} 值,另一部分培养液离心取上清,定量检测上清液中氮素浓度。

1.9 数据统计分析

定量测定菌株 j-1 和 2G-5 在氮素培养基和养殖水中的脱氮效果时,每个处理设 3 个平行,每次测定重复 3 次,取平均值,并使用 Excel 计算标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离纯化与筛选

经过 3 轮富集、稀释涂布和划线纯化,从亚硝态氮、硝态氮、氨氮 3 种氮素培养基平板上分别获得 40、37 和 34 株纯菌。

对亚硝态氮培养基上纯化获得的 40 株好氧反硝化菌,定性检测其在亚硝态氮液体培养基中培养 2 d 后的底物和产物。结果如表 1,共有 8 株菌可明显脱除亚硝态氮,其中菌株 2C-1、2C-4、2C-6、2G-4、2G-5 和 2G-8 对亚硝态氮的脱除效果较好,培养 2 d 后可将 140 mg/L 的亚硝态氮完全脱除,且脱氮过程不积累硝态氮和氨氮,只产生气体产物,具有重要应用潜力。菌株 a-1 和 b-1 也具有一定的亚硝态氮脱除效果,但未检测到气体产物。

表1 亚硝酸盐脱除菌株的分离与筛选

Table 1 Isolation and screening of nitrite-removing bacteria

样品	菌株	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	产气
ST03	2C-1	-	-	-	+
	2C-2	+++	-	-	-
	2C-3	+++	-	-	-
	2C-4	-	-	-	+
	2C-5	+++	-	-	-
	2C-6	-	-	-	+
	2C-7	+++	-	-	-
ST04	2D-1	+++	-	-	-
	2D-2	+++	-	-	-
	2D-3	+++	-	-	-
	2D-4	+++	-	-	-
	2D-5	+++	-	-	-
ST05	2E-1	+++	-	+	-
	2E-2	+++	-	+	-
	2E-3	+++	-	-	-
ST06	2F-1	+++	-	+	-
	2F-2	+++	-	-	-
	2F-3	+++	-	-	-
ST07	2G-1	+++	-	+	-
	2G-2	+++	-	+	-
	2G-3	+++	-	-	-
	2G-4	-	-	-	+
	2G-5	-	-	-	+
	2G-6	+++	-	-	-
	2G-7	+++	-	+	-
	2G-8	-	-	-	+
	2G-9	+++	-	+	-
SW01	a-1	+	-	-	-
	a-2	+++	-	-	-
	a-3	+++	-	-	-
SW02	b-1	+	-	-	-
	b-2	+++	-	-	-
	b-3	+++	-	-	-
	b-4	+++	-	-	-
SW03	c-1	+++	-	-	-
	c-2	+++	-	-	-
	c-3	+++	-	-	-
FS01	d-1	+++	-	-	-
	d-2	+++	-	-	-
	d-3	+++	-	-	-

注: +++, ++和+分别表示检测到高、中、低浓度的氮素;

-表示未检测到对应氮素。表2、3、4同。

表2 硝酸盐脱除菌株的分离与筛选

Table 2 Isolation and screening of nitrate-removing bacteria

样品	菌株	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	产气
ST03	3C-1	+	+++	-	-
	3C-2	-	+++	-	-
	3C-3	-	+++	-	-
	3C-4	+++	+++	-	-
	3C-5	++	+++	-	-
	3C-6	-	+++	-	-
	3C-7	-	+++	-	-
ST04	3D-1	-	+++	-	-
	3D-2	-	+++	-	-
	3D-3	-	+++	-	-
	3D-4	-	+++	-	-
	3D-5	-	+++	-	-
	3D-6	-	+++	-	-
	3D-7	-	+++	-	-
ST05	3E-1	-	+	-	-
	3E-2	-	+++	-	-
	3E-3	-	+++	-	-
	3E-4	-	+++	-	-
ST06	3F-1	-	+++	-	-
	3F-2	+	+++	-	-
	3F-3	+	+++	-	-
ST07	3G-1	-	+++	-	-
	3G-2	-	+	-	-
	3G-3	-	+++	-	-
	3G-4	-	+	-	+
SW01	j-1	-	-	-	-
	j-2	+	++	-	-
SW02	k-1	++	+++	-	-
	k-2	++	++	-	-
	k-3	-	+	-	-
SW03	m-1	++	+++	-	-
	m-2	-	+++	-	-
	m-3	+++	+++	-	-
	m-4a	-	-	-	-
	m-5	-	+++	-	-
FS01	n-1	-	+++	-	-
	n-2	+++	+++	-	-
	n-3	+++	+++	-	-

表3 亚硝态氮脱除菌株的分离与筛选

Table 3 Isolation and screening of ammonia-removing bacteria

样品	菌株	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	产气
ST03	4C-1	-	-	-	-
	4C-2	-	-	+	-
	4C-3	-	-	+++	-
	4C-4	-	-	+++	-
	4C-5	-	-	-	-
ST04	4D-1	-	-	-	-
	4D-2	-	-	+++	-
	4D-3	-	-	-	-
	4D-4	-	-	+++	-
	4D-5	-	-	+++	-
ST05	4E-1	-	-	+++	-
	4E-2	-	-	+++	-
	4E-3	-	-	+++	-
	4E-4	-	-	+++	-
	4E-5	-	-	++	-
	4E-6	-	-	+++	-
	4E-7	-	-	+	-
ST06	4F-1	-	-	+++	-
	4F-2	-	-	+++	-
ST07	4G-1	-	-	+++	-
	4G-2	-	-	+++	-
	4G-3	-	-	+++	-
SW01	e-1	-	-	-	-
	e-2	-	-	+++	-
	e-3	-	-	+++	-
	e-4	-	-	+++	-
SW02	f-1	-	-	+++	-
	f-2	-	-	+++	-
SW03	g-1	-	-	+++	-
	g-2	-	-	+++	-
	g-3a	-	-	++	-
FS01	h-1	-	-	+++	-
	h-2	-	-	+	-
	h-3	-	-	+++	-
	h-4	-	-	+	-

对从硝态氮培养基平板上纯化获得的 37 株好氧反硝化菌, 定性检测其在硝态氮培养基中培养 2 d 后的底物和产物。如表 2 所示, 共有 8 株菌可明显脱除硝态氮。其中菌株 j-1 和 m-4a 的脱除效果较好, 培养 2 d 后可将 140 mg/L 的硝态氮基本脱除, 不积累亚硝态氮和氨氮, 但脱氮过程中未检测到明显的气体; 菌株 3E-1、3G-2、3G-4、k-2、k-3 和 j-2 具有一定的

硝态氮脱除效果, 但不如菌株 j-1 和 m-4a; 菌株 3C-1、3C-4、3C-5、3F-2、3F-3、k-1、m-1、m-3、n-2、n-3 具有反硝化能力, 但过程中会有亚硝态氮积累, 说明这些菌株亚硝酸盐还原能力缺失或较弱; 其中菌株 j-2 的亚硝态氮积累量较少, 说明该菌株也具有一定的亚硝态氮还原能力。

对于从氨氮培养基平板上分离纯化的 34 株异养氨氧化菌, 同样定性检测其在氨氮液体培养基中培养 2 d 后的底物和产物。如表 3 所示, 具有氨氮脱除效果的菌有 11 株, 其中菌株 4C-1、4C-5、4D-1、4D-3、e-1 对氨氮的脱除效果较好, 培养 2 d 后可将 140 mg/L 的氨氮完全脱除, 且未发现亚硝态氮及硝态氮积累; 菌株 4C-2、4E-5、4E-7、g-3a、h-2 具有一定的氨氮脱除效果。

2.2 菌株脱氮特性分析

为了评估 2.1 节所得 8 株亚硝态氮脱除菌、8 株硝态氮脱除菌、11 株氨氮脱除菌对 3 种无机氮素的综合脱除能力、筛选具备同步硝化反硝化能力的功能菌株, 将上述 27 株纯菌分别接入亚硝态氮、硝态氮、氨氮培养基中, 培养 2 d 后, 定性检测培养体系中的亚硝态氮、硝态氮、氨氮、气体产物的存在情况。

结果如表 4 所示, 菌株 2C-1、j-1、m-4a 和 2G-5, 对亚硝态氮、硝态氮和氨氮都有脱除效果, 且脱氮效率高; 培养 2 d 后, 可将 140 mg/L 的亚硝态氮、硝态氮和氨氮完全脱除干净, 且不积累中间产物, 具有良好的应用前景。菌株 2C-6、2G-4、2G-8 和 k-3 同样对 3 种无机氮都有明显的脱除效果, 但是这 4 株菌培养 2 d 后不能完全脱除硝态氮, 且 2G-4 脱除硝态氮时能检测到中间产物亚硝态氮, 而 2G-8 对在亚硝态氮培养基中培养 2 d 不能完全脱除亚硝态氮。除上述菌株之外, 其他菌株对 3 种底物中的 1 种或多种底物的脱除效果不明显。

2.3 脱氮菌株初步鉴定

对于分离筛选所得的 27 株脱氮菌, 进行 16S rRNA 基因扩增、测序和比对分析。如表 5 所示, 27 株纯菌与模式菌株的 16S rRNA 基因相似性全部在 99.15%~100%之间, 按照不同细菌种 (species) 之间分类界限为 98.65%的标准^[12], 初步将这 27 株菌鉴定为与表 4 中对应模式菌株相同的属和种。

本研究所获得的亚硝态氮脱除菌包括 *Pseudomonas stutzeri*、*Paracoccus pantotrophus*、*Zobellia denitrificans* 和 *Achromobacter insuavis*。根据文献报道, 这 4 种菌具有好氧反硝化能力, 可以还原

亚硝态氮产生气体^[13~16]；本研究筛选得硝态氮脱除菌包括 *Bosea thiooxidans*、*Paenarthrobacter ureafaciens*、*Paracoccus pantotrophus*、*Pseudomonas stutzeri*、*Achromobacter mucicolens*、*Achromobacter marplatensis* 和 *Paracoccus denitrificans*；其中，*Bosea thiooxidans*、*Paracoccus pantotrophus*、*Pseudomonas stutzeri*、*Achromobacter mucicolens* 和 *Paracoccus denitrificans* 已被报道具有好氧反硝化能力，但是生理生化实验表明 *Paenarthrobacter ureafaciens* 和 *Achromobacter marplatensis* 不能还原硝态氮^[17~21]。因此，*Paenarthrobacter ureafaciens* 3G-2 和 *Achromobacter marplatensis* k-2 的硝酸盐脱除能力和机制尚需进一步研究。本研究获得的氨氮脱除菌包

括 *Corynebacterium glutamicum*、*Bacillus flexus*、*Achromobacter marplatensis*、*Delftia lacustris*、*Gordonia rubripertincta* 和 *Achromobacter insuavis*。其中，前四种菌被报道可以固氮和同化氨氮，但是未发现具备氨氧化能力^[22~25]。因此，推测其氨氮脱除机制为同化作用。*Gordonia rubripertincta* 则具备氨氧化酶基因，可能是通过氨氧化-反硝化途径脱氮^[26]。对于 *Achromobacter insuavis*，未见其能氨氧化和同化氨的报道，但是根据 *Achromobacter* 属其他细菌的特征，推测其通过同化作用脱氮^[16,20,24]。综上所述，本研究结果表明，养殖水体中可培养脱氮菌具有较高的多样性，其中一些菌的氮循环过程和脱氮机制尚不明确，未来值得深入研究。

表4 菌株对亚硝态氮、硝态氮和氨氮的综合脱除效果

Table 4 The overall removal effects of obtained bacteria on nitrite, nitrate and ammonia

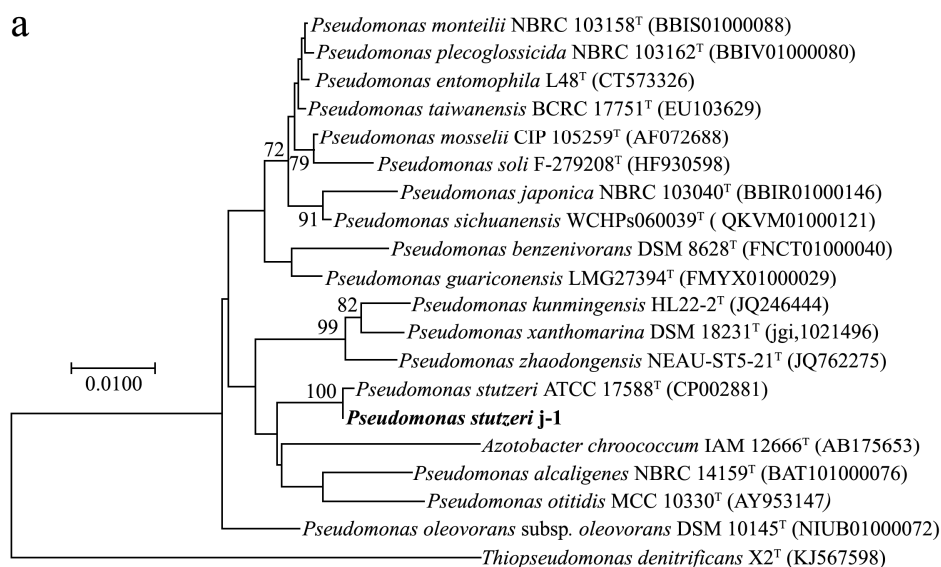
菌株类型	菌株编号	亚硝态氮培养基				硝态氮培养基				氨氮培养基			
		NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	产气	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	产气	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	产气
亚硝态氮脱除菌	2C-1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	2C-4	++	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
	2C-6	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	2G-4	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2G-5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2G-8	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
	a-1	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
	b-1	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
硝态氮脱除菌	3E-1	+++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	++	-
	3G-2	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	3G-4	+++	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	j-1	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	j-2	+	-	-	-	+	++	-	-	-	-	+	-
	k-2	++	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+	-
	k-3	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	m-4a	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
氨氮脱除菌	4C-1	+++	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-
	4C-2	+++	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	-
	4C-5	+++	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+	-
	4D-1	+++	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+	-
	4D-3	+++	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	+	-
	4E-5	+++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-
	4E-7	+++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	+	-
	e-1	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
	g-3a	++	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+	-
	h-2	+++	-	-	-	-	++	-	-	+	-	+	-
	h-4	+++	-	-	-	-	++	-	-	+	-	+	-

表 5 16S rRNA 基因序列比对分析

Table 5 Alignment analysis of 16S rRNA gene sequences

菌株类型	菌株编号	最高相似度模式菌株	相似度/%
亚硝态氮脱除菌	2C-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	99.89
	2C-4	<i>Paracoccus pantotrophus</i> DSM 11073 ^T	99.89
	2C-6	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	99.89
	2G-4	<i>Zobellelladenitrificans</i> ZD1 ^T	99.33
	2G-5	<i>Zobellelladenitrificans</i> ZD1 ^T	99.33
	2G-8	<i>Zobellelladenitrificans</i> ZD1 ^T	99.33
	a-1	<i>Achromobacter insuavis</i> LMG 26845 ^T	99.49
	b-1	<i>Achromobacter insolitus</i> DSM 23807 ^T	99.67
硝态氮脱除菌	3E-1	<i>Bosea thiooxidans</i> DSM 9653 ^T	100
	3G-2	<i>Paenarthrobacter ureafaciens</i> DSM 20126 ^T	99.31
	3G-4	<i>Paracoccus pantotrophus</i> DSM 11073 ^T	100
	j-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	99.58
	j-2	<i>Achromobacter mucicolens</i> LMG 26685 ^T	99.42
	k-2	<i>Achromobacter marplatensis</i> B2 ^T	99.42
	k-3	<i>Paracoccus denitrificans</i> DSM 413 ^T	99.26
	m-4a	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 ^T	99.58
氨氮脱除菌	4C-1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	99.40
	4C-2	<i>Gordonia rubripertincta</i> NBRC 101908 ^T	100
	4C-5	<i>Gordonia rubripertincta</i> NBRC 101908 ^T	100
	4D-1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	99.40
	4D-3	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 ^T	99.40
	4E-5	<i>Bacillus flexus</i> NBRC 15715 ^T	99.87
	4E-7	<i>Bacillus flexus</i> NBRC 15715 ^T	99.87
	e-1	<i>Achromobacter insuavis</i> LMG 26845 ^T	99.59
	g-3a	<i>Achromobacter marplatensis</i> B2 ^T	99.64
	h-2	<i>Delftia lacustris</i> LMG 24775 ^T	99.15
	h-4	<i>Delftia lacustris</i> LMG 24775 ^T	100

a



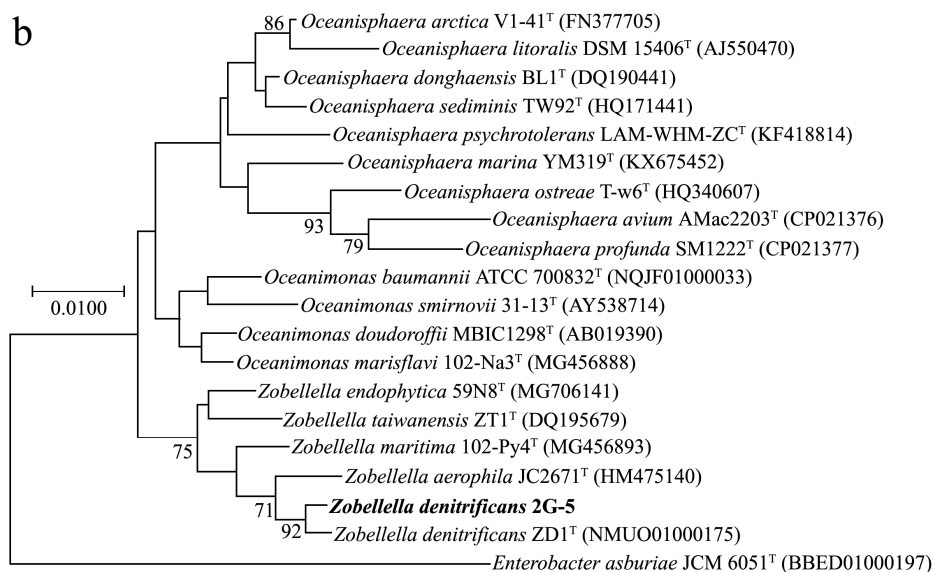


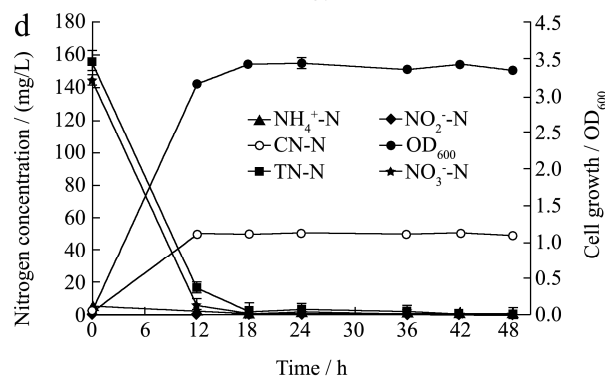
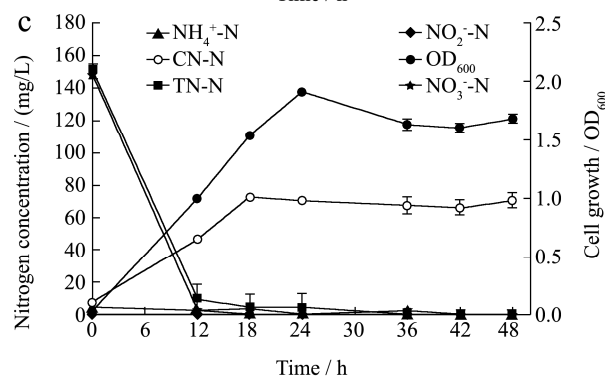
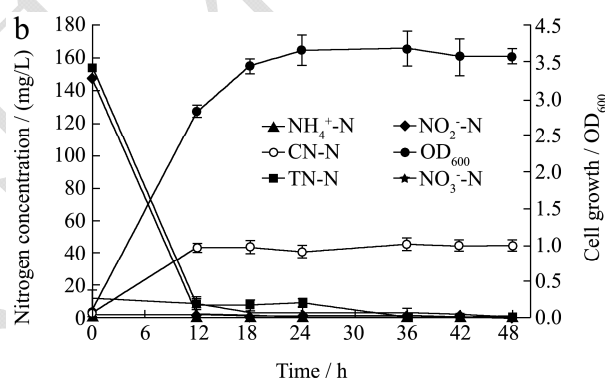
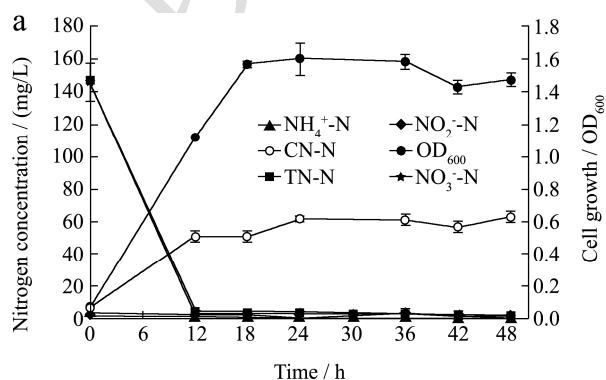
图1 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

注: a: 菌株 j-1; b: 菌株 2G-5。以 Kimura-2 模型计算遗传距离, 以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 建树, bootstrap 自展 1000 次检验进化树拓扑结构置信区间。

因为菌株 j-1、2C-1 和 m-4a 的 16SrRNA 基因相似性为 100%, 因此选择菌株 j-1 作为代表进行下一步研究。对于 2 株高效脱氮菌株 j-1 和 2G-5, 构建基于 16S rRNA 基因的系统发育树。菌株 j-1 与模式菌 *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588^T 处于同一分支, 且 bootstrap 系数为 100 (图 1a); 菌株 2G-5 与模式菌 *Zobellella denitrificans* ZD1^T 聚在同一分支上, 且 bootstrap 系数为 92 (图 1b); 系统发育分析支持菌株 j-1 和 2G-5 分别被鉴定为 *Pseudomonas stutzeri* 和 *Zobellella denitrificans*。*Pseudomonas stutzeri* 是被广泛报道的异养硝化-好氧反硝化菌, 且其脱氮效率较高, 被认为具有良好的应用前景^[27]。*Zobellella denitrificans* 也具有好氧反硝化作用, 但是目前尚无文献报道其异养硝化作用^[28,29]。不过, Lei 等人最近首次报道 *Zobellella* 属中的 *Zobellella taiwanensis* 具有异养硝化-好氧反硝化能力^[30]。

2.4 定量检测菌株 j-1 和 2G-5 的脱氮速率



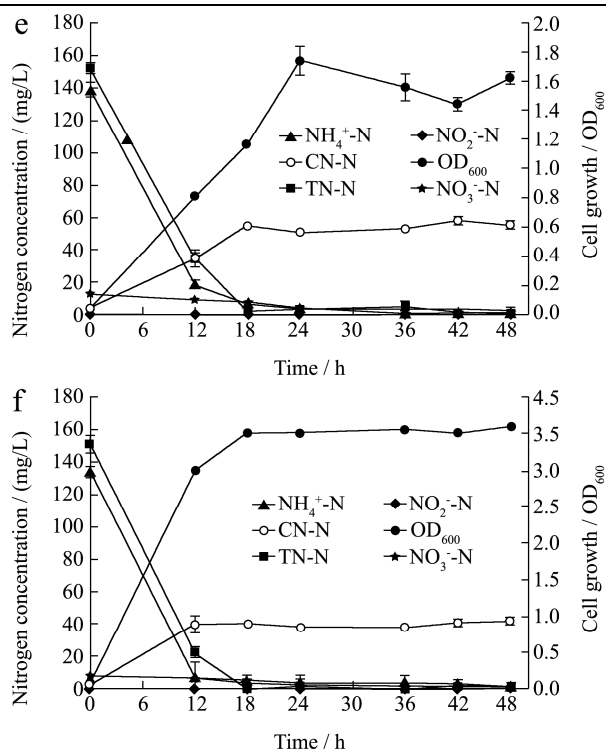


图2 定量检测菌株 j-1 和 2G-5 对无机氮素的脱除效果

Fig.2 Quantitative determination of the removal effects of strain j-1 and 2G-5 on inorganic nitrogen

注: a、c、e 分别展示菌株 j-1 在亚硝态氮、硝态氮和氨氮培养基中的生长趋势与脱氮效果; b、e、f 在分别展示菌株 2G-5 在亚硝态氮、硝态氮和氨氮培养基中的生长趋势与脱氮效果。

定量测定高效脱氮菌 j-1 和 2G-5 的脱氮速率。结果显示(图 2), 在亚硝态氮培养基中, 菌株 j-1 和 2G-5 培养 18 h 后对无机氮的脱除率为 99.53%和 99.80%, 其中 38.45%和 27.08%的无机氮被同化为菌体有机氮; 在硝态氮培养基中, 菌株 j-1 和 2G-5 培养 18 h 时对无机氮的脱除率为 99.84%和 99.77%, 其中 41.55%和 29.72%的无机氮被同化为菌体有机氮; 在氨氮培养基中, 菌株 j-1 和 2G-5 培养 18 h 时对无机氮的脱除率为 99.80%和 99.89%, 其中 33.90%和 26.35%的无机氮被同化为菌体有机氮。上述结果说明这 2 株脱氮菌是具有重要应用潜力的异养硝化-好氧反硝化菌。

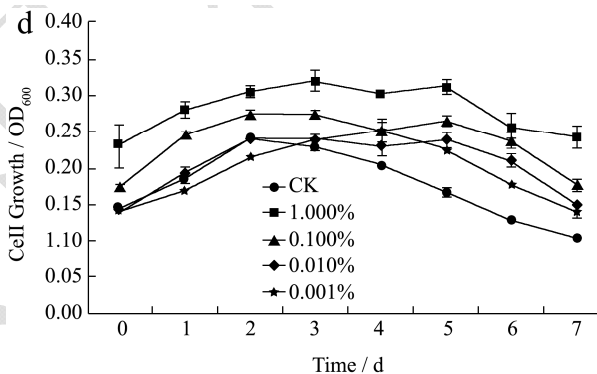
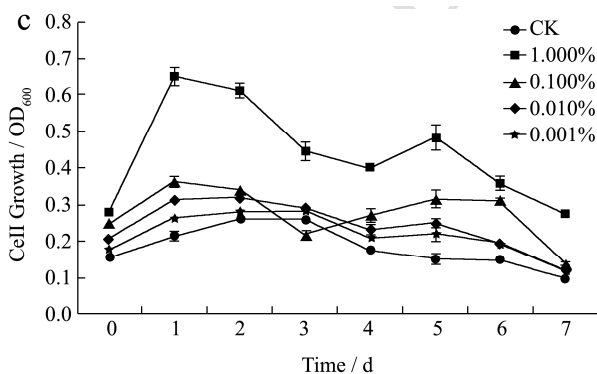
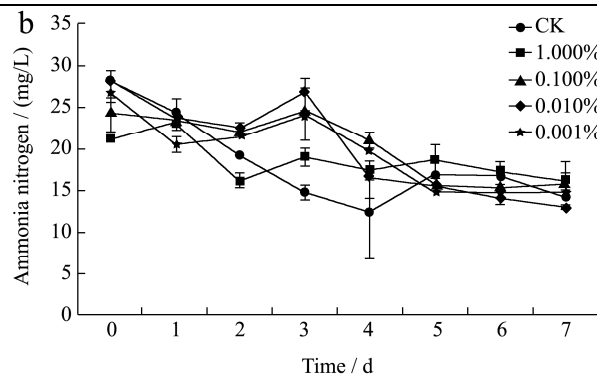
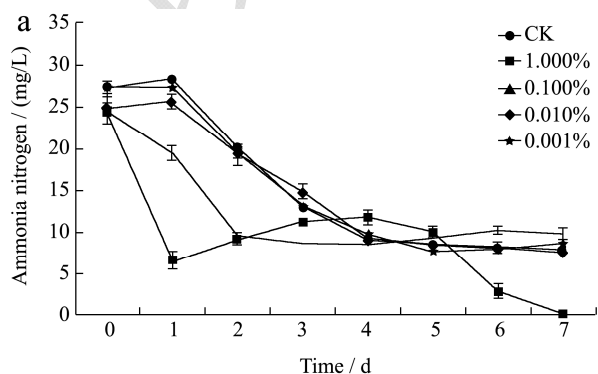


图3 菌株 j-1 和 2G-5 在养殖水中的应用效果

Fig.3 Application effects of strain j-1 and 2G-5 in aquaculture water

注: a 和 b 分别展示菌株 j-1 和 2G-5 的脱氮效果; c 和 d 分别展示菌株 j-1 和 2G-5 的定殖情况。

2.5 菌株 j-1 和 2G-5 对养殖水体的应用效果

将菌株 j-1 和 2G-5 按照不同接种浓度加入未灭菌的对虾养殖水样中培养, 评估其脱氮效果。如图 3 所示, 不同接种浓度对菌株 j-1 的脱氮效果影响显著。当接种量为 0.1% (10^6 cfu/mL) 时, 培养过程中氨氮浓度快速降低, 说明菌株 j-1 表现出比较稳定的氨氮脱除效果, 且未出现反弹(图 3a)。接种量为 1% (10^7 cfu/mL) 时, 虽然只出现小幅度反弹, 随后又快速降低接近 0, 但处理过程中定性检测到亚硝态氮积累。再考虑到菌剂使用浓度越高, 成本越高, 因此最佳接种量为 0.1%。菌株 j-1 在未灭菌的养殖水中表现出一定的定殖能力, 不同接种浓度处理组在 7 d 的试验周

期内, 菌体浓度普遍高于对照组(图 3c)。按 1% 浓度接种时, 培养体系的 OD_{600} 普遍在 0.4 以上, 甚至一度大于 0.6, 说明接入养殖水的 j-1 经过了明显的增殖。与对照组相比, 菌株 2G-5 不同接种浓度处理组氨氮浓度变化趋势差别不大, 都在逐渐下降。对照组氨氮浓度下降的趋势可能是因为曝气培养过程中氨氮逐渐被氧气氧化导致的。菌株 2G-5 在不同浓度的接种处理组中增殖不明显, 按 1% 浓度接种时, 培养体系 OD_{600} 也仅仅在 0.3 左右。这可能是菌株 2G-5 在养殖水中脱氮效果不明显的原因。

3 结论

3.1 从 8 份养殖水体样品中分离、纯化、筛选得到 8 株亚硝态氮脱除菌、8 株硝态氮脱除菌、11 株氨氮脱除菌, 说明本研究“从养殖水体中分离纯化脱氮菌并应用于养殖水体脱氮”的思路是可行的。

3.2 经过鉴定, 本研究所获得的亚硝态氮脱除菌包括 *Pseudomonas stutzeri*、*Paracoccus pantotrophus*、*Zobellella denitrificans* 和 *Achromobacter insuavis*; 硝态氮脱除菌包括 *Bosea thiooxidans*、*Paenarthrobacter ureafaciens*、*Paracoccus pantotrophus*、*Pseudomonas stutzeri*、*Achromobacter mucicolens*、*Achromobacter marplatensis* 和 *Paracoccus denitrificans*; 氨氮脱除菌包括 *Corynebacterium glutamicum*、*Bacillus flexus*、*Achromobacter marplatensis*、*Delftia lacustris*、*Gordonia rubripertincta* 和 *Achromobacter insuavis*。这说明养殖水体中可培养脱氮菌具有较高的多样性, 其中一些菌的氮循环过程和脱氮机制尚不明确, 值得深入研究。

3.3 本研究获得 2 株高效脱氮菌 *Pseudomonas stutzeri* j-1 和 *Zobellella denitrificans* 2G-5, 在 3 种氮素培养基中培养 18 h 后, 对亚硝态氮、硝态氮和氨氮的脱除率都在 99.53%~99.89% 之间, 具有重要的应用潜力。这 2 株菌可能具有异养硝化-好氧反硝化能力, 其具体氮循环代谢机制尚需进一步研究。

3.4 脱氮菌株在应用环境下的定殖和增殖能力对其脱氮功能影响巨大。菌株 j-1 在未灭菌的养殖水中表现出一定的定殖和增殖现象, 发挥出良好的脱氮效果, 最佳施用量为水体体积的 0.1%。但菌株 2G-5 在未灭菌的养殖水中增殖能力较弱, 脱氮效果不明显。

参考文献

[1] 陈敏, 康萍萍, 李永平. 海水养殖氮磷污染负荷对莱州湾东岸水质的影响[J]. 水电能源科学, 2017, 2: 58-60
CHEN Min, KANG Ping-ping, LI Yong-ping. The effect of nitrogen and phosphorus loads in mariculture on the coastal

water quality in east coast of Laizhou Bay [J]. Water Resources and Power, 2017, 2: 58-60

- [2] 孙振中, 刘金金, 张玉平. 上海市淡水养殖水体中氮、磷的分布研究[J]. 水产科学, 2018, 37(4): 512-521
SUN Zhen-zhong, LIU Jin-jin, ZHANG Yu-ping. Distribution of nitrogen and phosphorus in waters of freshwater aquaculture in Shanghai [J]. Fisheries Science, 2018, 37(4): 512-521
- [3] 国家统计局, 环境保护部. 中国环境统计年鉴. 2016[M]. 北京: 中国统计出版社, 2017
National Bureau of Statistics, Ministry of Environmental Protection. China Statistical Yearbook on Environment 2016 [M]. Beijing: China Statistics Press, 2017
- [4] GAO M, CHANG J, LI S, et al. Modeling nitrogen loading from a watershed consisting of cropland and livestock farms in China using Manure-DNDC [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2014, 185: 88-98
- [5] Ahmed M B, Zhou J L, Ngo H H, et al. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review [J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 323(Part A): 274-298
- [6] 韩雅红, 邱珊, 马放, 等. 强化脱氮技术在污水处理中的研究进展[J]. 水处理技术, 2018, 44(10): 6-10
HAN Ya-hong, QIU Shan, MA Fang, et al. Research progress of strengthening nitrogen removal technology for wastewater treatment [J]. Technology of Water Treatment, 2018, 44(10): 6-10
- [7] 闫旭, 郭东丽, 刘礼涛, 等. 不同污水处理工艺 N_2O 减排方法研究进展[J]. 环境工程, 2017, 35(9): 24-28
YAN Xu, GUO Dong-li, LIU Li-tao, et al. Research progress on N_2O emission reduction methods in different wastewater treatment processes [J]. Environmental Engineering, 2017, 35(9): 24-28
- [8] 王学文, 李世军. 同步硝化反硝化高效菌脱氮性能研究与工程应用[J]. 环境污染与防治, 2017, 39(5): 530-533
WANG Xue-wen, LI Shi-jun. Nitrogen removal performance and engineering application of simultaneous nitrification and denitrification efficient bacteria [J]. Environmental Pollution & Control, 2017, 39(5): 530-533
- [9] 李权斌, 荣宏伟, 张朝升, 等. pH 对生物膜同步硝化反硝化脱氮及其 N_2O 产量的影响[J]. 水处理技术, 2016, 42(1): 121-124, 135
LI Quan-bin, RONG Hong-wei, ZHANG Chao-sheng, et al. Effect of pH on simultaneous nitrification and denitrification and N_2O production by biofilm [J]. Technology of Water

- Treatment, 2016, 42(1):121-124, 135
- [10] Yoon S H, Ha S M, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617
- [11] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [12] Kim M, OH H S, Park S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351
- [13] Wittorf L, Jones C M, Bonilla-Rosso G, et al. Expression of *nirK* and *nirS* genes in two strains of *Pseudomonas stutzeri* harbouring both types of NO-forming nitrite reductases [J]. Research in microbiology, 2018, 169(6): 343-347
- [14] Fujii H, Yamaki D, Ogura T, et al. The functional role of the structure of the dioxo-isobacteriochlorin in the catalytic site of cytochrome cd 1 for the reduction of nitrite [J]. Chemical Science, 2016, 7(4): 2896-2906
- [15] Lin Y T, Shieh W Y. *Zobellella denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Zobellella taiwanensis* sp. nov., denitrifying bacteria capable of fermentative metabolism [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(6): 1209-1215
- [16] Vandamme P A, Peeters C, Inganäs E, et al. Taxonomic dissection of *Achromobacter denitrificans* Coenye et al. 2003 and proposal of *Achromobacter agilis* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter pestifer* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter kerstersii* sp. nov. and *Achromobacter deleyi* sp. nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(9): 3708-3717
- [17] Das S K, Mishra A K, Tindall B J, et al. Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: Analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1996, 46(4): 981-987
- [18] Read-daily B L, Sabba F, Pavissich J P, et al. Kinetics of nitrous oxide (N₂O) formation and reduction by *Paracoccus pantotrophus* [J]. AMB Express, 2016, 6(1): 85
- [19] Gao F Z, Liao S A, Liu S S, et al. The combination use of *Candida tropicalis* HH8 and *Pseudomonas stutzeri* LZX301 on nitrogen removal, biofloc formation and microbial communities in aquaculture [J]. Aquaculture, 2019, 500: 50-56
- [20] Su J, Liang D, Lian T. Comparison of denitrification performance by bacterium *Achromobacter* sp. A14 under different electron donor conditions [J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 333: 320-326.
- [21] Olaya Abril A, Hidalgo-Carrillo J, Luque-Almagro V M, et al. Exploring the denitrification proteome of *Paracoccus denitrificans* PD1222 [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1137
- [22] Guo J, Man Z, Rao Z, et al. Improvement of the ammonia assimilation for enhancing L-arginine production of *Corynebacterium crenatum* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(3): 443-451
- [23] Wang T T, Ding P, Chen P, et al. Complete genome sequence of endophyte *Bacillus flexus* KLBMP 4941 reveals its plant growth promotion mechanism and genetic basis for salt tolerance [J]. Journal of Biotechnology, 2017, 260: 38-41
- [24] Abdel Rahman H M, Salem A A, Moustafa M M A, et al. A novice *Achromobacter* sp. EMCC1936 strain acts as a plant-growth-promoting agent [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2017, 39(2): 61
- [25] Rani R, Kumar V, Gupta P, et al. Effect of endosulfan tolerant bacterial isolates (*Delftia*acustris IITISM30 and *Klebsiella aerogenes* IITISM42) with *Helianthus annuus* on remediation of endosulfan from contaminated soil [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 168: 315-323
- [26] Osborne C D, Haritos V S. Horizontal gene transfer of three co-inherited methane monooxygenase systems gave rise to methanotrophy in the Proteobacteria [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2018, 129: 171-181
- [27] Sun Y, Li A, Zhang X, et al. Regulation of dissolved oxygen from accumulated nitrite during the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(7): 3243-3248
- [28] 李小义,王丽萍,赖其良,等.一株卓贝尔氏菌 F13-1 好氧反硝化特性及其反硝化基因的初步研究[J].应用海洋学报, 2016,1:122-129
- LI Xiao-yi, WANG Li-ping, LAI Qi-liang, et al. Preliminary study on aerobic denitrification characteristics of *Zobellella* sp. F13-1 [J]. Journal of Applied Oceanography, 2016, 1: 122-129

(下转第 81 页)

现代食品科技