

一株假单胞菌的亚硝酸盐降解特性及其对鱼池底泥的净化作用

陈瑞芳¹, 徐长安², 刘丽梅¹, 方卫东³

(1. 广西海洋研究所 生物工程技术研究中心, 广西 北海 536000; 2. 国家海洋局 第三海洋研究所 海洋生物资源化学与化工研究中心, 福建 厦门 361005; 3. 福建省海新集团有限公司, 福建 漳州 363102)

摘要: 从海水养殖池的底泥中筛选到一株对亚硝酸盐有强降解作用的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)SF1, 在实验室条件下研究了 SF1 的亚硝酸盐降解特性及其对高污染鱼池底泥的净化作用。研究表明, SF1 具有高效降解转化高浓度亚硝酸钠的能力, 其适宜降解条件为: 亚硝酸钠质量浓度范围为 1~1 000 mg/L; 菌种接种量为 10%; 中量充气发酵; 发酵时间为 12~36 h; 发酵 pH 值为 6.5~8.0。直接接种 SF1 发酵液(接种量 10%, 菌液 A 值 0.36)到鱼池底泥, 36 h 后, 底泥的亚硝酸盐去除率达到 67%, 显示了 SF1 对鱼池底泥较强的净化作用。

关键词: 假单胞菌(*Pseudomonas* sp.); 亚硝酸盐; 降解

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2011)06-0030-05

水产养殖特别是高密度、集约化养殖过程中, 经常会发生水体中亚硝酸盐含量过高现象, 其主要原因往往是投饵管理不善引起的。另外, 养殖池底淤泥过多, 特别是老化的池底, 也会导致养殖水体中的亚硝酸盐浓度超标。水体中过高浓度的亚硝酸盐, 不仅直接危害养殖生物, 而且直接导致养殖品种频繁发生病害, 严重威胁养殖的成功和养殖产品的质量, 是当前困扰养殖业者的主要问题之一^[1-3]。因此如何控制、降低养殖水体中的亚硝酸盐浓度是养殖业者和水产养殖技术人员关心和需要研究、解决的问题。本实验室长期跟踪福建龙海养殖区亚硝酸盐对水产养殖动物的影响, 并从那里持续性地筛选反硝化细菌。作者对其中一株高效降解菌 SF1 进行了降解特性研究并进行了 SF1 用于该养殖区鱼池底泥亚硝酸盐的降解试验, 为该菌株将来在养殖环境生物修复方面的应用做技术准备。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及主要仪器、试剂

供试菌株筛选自福建省龙海养殖区鱼池底泥, 根据菌株的 16S rDNA 测序, 结合有关细菌形态和生理生化特性, 初步鉴定其为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.), 命名 SF1。

主要仪器、试剂: SpectraMax M5/M5^e 多功能酶

标仪; 格利斯试剂。

1.2 亚硝酸盐浓度的测定

绘制标准曲线^[4], 然后通过测定测试样品中的吸光度(A)值, 比对标准曲线计算相应的 NO₂-N 浓度。如果测试样品中的 NO₂-N 浓度较高, 则先进行稀释, 使相关数值落在标准曲线范围内, 比对后所得数值再乘以稀释倍数。

1.3 菌株 SF1 利用亚硝酸钠的特性研究

1.3.1 基础培养条件

250 mL 三角瓶中装入 100 mL 无机盐培养基(KH₂PO₄ 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.2 g、CaCl₂ 0.1 g、NaCl 0.2 g、MnSO₄·H₂O 微量、NaNO₂ 1.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0), 按 10% 接种量接入预培养的 SF1 菌液, 36 180 r/min 摇床振荡培养或静态培养。

1.3.2 亚硝酸钠初始浓度对降解的影响

以基础培养条件, 设定亚硝酸钠起始浓度分别为 10、50、100、500、1 000、2 000 mg/L, 摇床振荡培养 48 h 后测量培养液的吸光度(A₅₃₄)值和 NO₂-N

收稿日期: 2010-11-10; 修回日期: 2011-04-13

基金项目: 厦门海洋研究开发院资助项目(K10102(1))

作者简介: 陈瑞芳(1978-), 浙江温州人, 女, 工程师, 从事水产养殖技术研究, 电话: 13907799206, E-mail: sunflower982000@sohu.com; 徐长安, 通信作者, E-mail: changan_xu@yahoo.com.cn

浓度。

1.3.3 培养时间对降解的影响

以基础培养条件, 并选择亚硝酸钠质量浓度为 500 mg/L 摇床振荡培养, 在 6、12、24、36 和 48 h 时取样测量培养液的吸光度(A_{534})值和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度。

1.3.4 接种量对降解的影响

以基础培养条件, 设定亚硝酸钠质量浓度为 500 mg/L, 选择梯度为 1%、5%、10% 和 15% 的接重量接种, 振荡摇床培养, 36 h 时测量培养液的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度。

1.3.5 静置和摇床培养对降解的影响

以基础培养条件, 选择亚硝酸钠质量浓度为 500 mg/L, 分别进行振荡摇床培养和静态培养, 在 12、24、36 和 48 h 时取样测量培养液的吸光度(A_{534})值和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度。

1.4 菌株 SF1 对鱼池底泥亚硝酸盐的降解作用

取高污染的鱼池底泥, 等量放入体积为 0.1 m^3 的两个敞口玻璃水槽, 然后加入两倍于底泥体积的网滤海水(取自于鱼池进水口), 测本底亚硝酸盐浓度, 在其中的一个水槽(实验组)接种 SF1 菌液 10%(体积比), 另一个空白对照, 36 恒温并中速搅拌, 分别于 12、24、36、48 h 时取样测 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度。

以上实验, 每个水平设置 3 个平行样, 数值取平均值。

1.5 数据处理

采用 SPSS 11.5 软件进行相关数据的处理和分析。

2 结果与分析

2.1 亚硝酸盐浓度测定标准曲线

配置系列亚硝酸根标准液, 加入格利斯试剂显色, 在多功能酶标仪上选择 $A_{534} \text{ nm}$ 进行比色。以亚硝酸根浓度为横坐标, A 值为纵坐标, 绘制标准曲线(图 1)。

2.2 亚硝酸钠初始浓度对降解的影响

48 h 后培养结束, 取样所测得的 A_{534} 值和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 降解率列成如下表 1。从表 1 可以看出 SF1 对亚硝酸钠的初始质量浓度适应范围很广, 在 10~1 000 mg/L 范围内, SF1 均可进行高效降解, 并且随着亚硝酸钠浓度的升高, 菌体浓度也升高, 但当亚硝酸钠质量浓度超过 1 000 mg/L, 尤其是达到 2 000 mg/L 时, 菌体浓

度大幅度下降, 降解率也迅速下降。

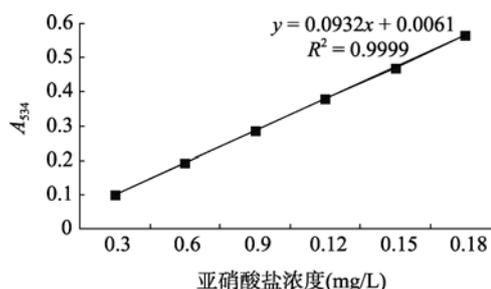


图 1 亚硝酸盐浓度测定的标准曲线

Fig. 1 Standard curve for nitrite determination

表 1 $\text{NO}_2\text{-N}$ 初始质量浓度对降解效果的影响

Tab. 1 Effects of the initial concentration on nitrite degradation

初始质量浓度(mg/L)	$\text{NO}_2\text{-N}$ 降解率(%)	A_{534}
10	87.40 ± 1.412	1.075
50	91.10 ± 1.493	1.112
100	96.20 ± 2.011	1.176
500	96.40 ± 2.105	1.293
1000	90.00 ± 1.339	1.214
2000	59.20 ± 0.861	0.572

2.3 培养时间对 $\text{NO}_2\text{-N}$ 降解效果的影响

不同培养时间对应的 A 值变化和亚硝酸钠降解情况表述为图 2 和图 3。从图 2 可以看出, 菌株对亚硝酸钠的利用良好, 表现为生长旺盛, 约 7 h 后即进入对数生长期, 24 h 时进入生长稳定期, 稳定期持续约 12 h, 然后进入衰亡期。图 4 基本反映了菌株生长过程与 $\text{NO}_2\text{-N}$ 降解的对应关系。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度随着培养时间的延长而不断降低, 当菌株生长处于迟缓期和衰亡期时, $\text{NO}_2\text{-N}$ 的降解率较低, 而当菌株处于快速增殖时, $\text{NO}_2\text{-N}$ 快速降解。

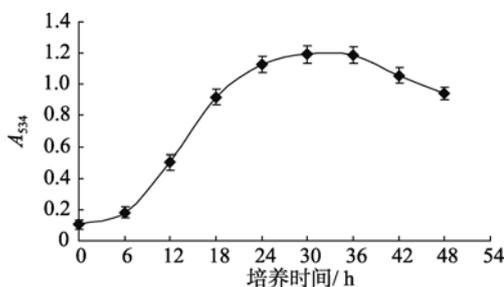


图 2 SF1 在不同培养时间的 A_{534} 值

Fig. 2 A_{534} value of SF1 in different culture times

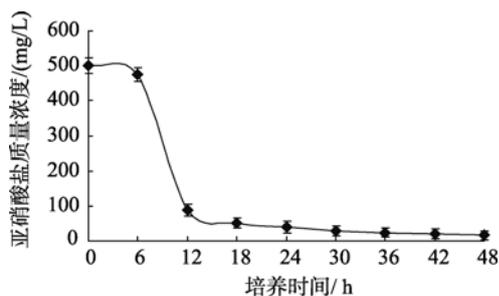


图3 不同培养时间亚硝酸盐降解效果

Fig. 3 Effects of culture times on nitrite degradation

2.4 接种量对NO₂-N降解效果的影响

图4表明,菌株SF1对NO₂-N的降解率随着接种量的增加而升高,但递增关系止于10%的接种量之后,即当接种量为10%时,其降解率最高,达到91.2%,当接种量超过该数值时,降解率不再随之上升。根据图4所示,实验室条件下,SF1降解亚硝酸盐的最佳接种量为10%。

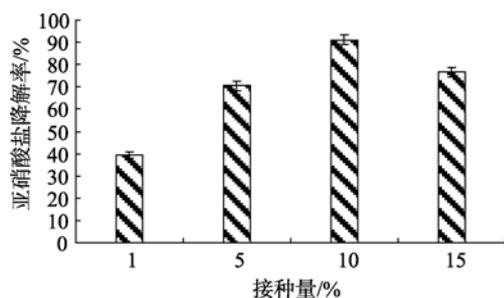


图4 接种量对亚硝酸盐降解率的影响

Fig. 4 Effects of inoculum volumes on nitrite degradation

2.5 静置和摇床振荡培养对降解的影响

静置培养和摇床振荡培养两种方式所测得的菌液A值和亚硝酸盐降解率变化情况如图5和图6所示。显然,振荡培养下菌液的A值明显高于静置培养,其亚硝酸盐的降解效果也好于静置培养,其中振荡培养下,12h之后的降解率都很高,24h的降解率显著高于12h($P < 0.01$),但24~48h之间的时间段,降解率差异不显著($P > 0.05$)。

2.6 菌株SF1对鱼池底泥亚硝酸盐的降解作用

经测量,底泥液体的初始亚硝酸盐质量浓度为16.3 mg/L。接种SF1之后,降解情况如图7所示,可以看出,SF1对底泥中的亚硝酸盐同样具有很强的降解作用,36h后去除率可达67.3%,但比起作用于亚

硝酸盐溶液,降解效果明显下降,原因可能有:(1)底泥成分复杂,可以提供SF1更多的底物利用选择性;(2)SF1对高浓度的亚硝酸盐降解更加有效和迅速。从图7还可看出,对照组的亚硝酸盐也有少量降解(水体中溶解氧促使的硝化、反硝化正常循环),36h后去除率为7.7%,但其亚硝酸盐的去除率远不如实验组。考虑到实验组也存在本底降解,因此其亚硝酸盐的去除率实际值为57.3%。

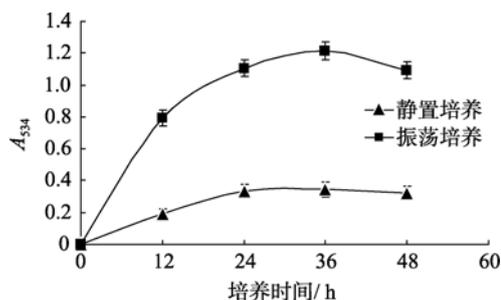


图5 不同培养方式(静置或振荡)各时间段的A值

Fig. 5 A values of each culture mode (standstill or shaking) on nitrite degradation

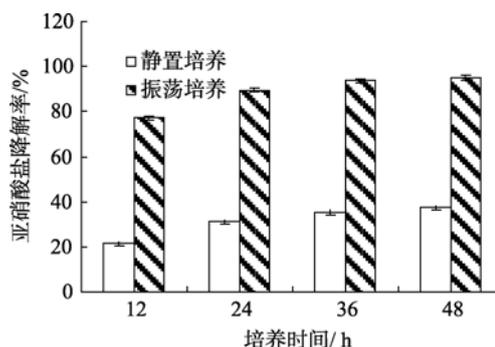


图6 不同培养方式(静置或振荡)对亚硝酸盐降解的影响

Fig. 6 Effect of culture mode (standstill or shaking) at different times

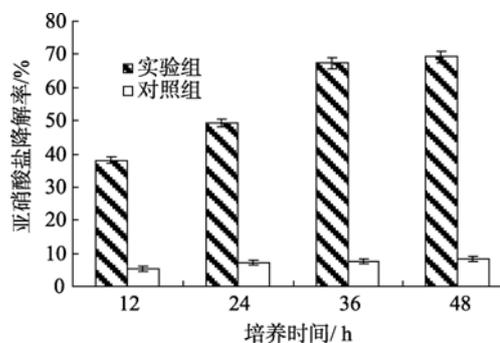


图7 SF1对鱼池底泥亚硝酸盐的降解作用

Fig. 7 Nitrite degradation in fish pond sediment by strain SF1

3 讨论

利用微生物方法来降解养殖环境中的亚硝酸盐, 解决因亚硝酸盐浓度过高而给养殖带来的一系列问题, 被认为是一种治标又治本的可行方法及有效途径。近几年已在这方面开展大量的研究^[5-7], 但见于报道的功能性微生物多以厌氧菌为主, 好氧性功能菌则较少^[8], 但厌氧反硝化菌在养殖环境中的应用有很大的局限性, 原因是在养殖过程往往进行充气增氧, 以保证水中一定量的溶解氧, 满足高密度、集约化养殖的需要, 因此厌氧反硝化细菌的反硝化作用就很难充分地发挥。本研究筛选到的 SF1 为好氧性反硝化菌, 其好氧属性在筛选过程已表现出来, 而在进行静置培养和摇床振荡培养的对比实验时, 振荡培养的菌株生长活跃, 菌量快速增加, 降解率也随之升高, 这也证明了菌株 SF1 为好氧反硝化菌。

最早对好氧反硝化菌的研究是 20 世纪 80 年代的 Robertson^[9], 他报道了好氧反硝化细菌和好氧反硝化酶系的存在, 并首次分离到多株好氧反硝化菌, 其中就有一株隶属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。近年来国内外也陆续筛选到一些好氧反硝化菌, 其降解特性和在实际生产中的应用情况各不相同^[10-12], 如亚硝酸盐浓度耐受程度, 需氧情况及降解效率等, SF1 为海洋源中度需氧的反硝化菌, 适合于应用在当前的海水高密度充气养殖模式, 并且其适宜的亚硝酸盐质量浓度范围很广, 最高耐受上限可达 1 000 mg/L, 因此该菌株还可用于高污染的、特别是严重老化的养殖池底净化。

好氧反硝化菌的反硝化作用除了受溶解氧影响外, 另一个重要影响因素是反硝化菌的接种量, 本研究中当接种量为 10% 时, SF1 的反硝化作用最强, 高于 10% 的接种量, 亚硝酸盐的降解率不升反降, 原因可能是接种量超过一定数值时, 由于营养竞争关系, 抑制了菌的增长, 甚至造成菌体死亡数增加, 从而使其降解率下降。另外, 好氧反硝化菌的反硝化作用还与所作用的底物关系很大, 实际应用时, 由于养殖水体、养殖池底泥或污水污泥等作用底物, 成分非常复杂, 因此菌株对其中的亚硝酸盐的降解效果比起实验室中单纯的亚硝酸盐作用底物要小很多, 本研究中 SF1 对鱼池底泥亚硝酸盐降解试验, 36 h 后

的去除率为 57.3%, 虽然已具有相当的实际应用价值, 但造成降解效果下降的原因有待作进一步研究。

另外, 假单胞菌属中的某些菌, 如荧光假单胞菌等, 具有一定的致病性, 因此在对 SF1 的应用开发之前, 还需做进一步的相关评估和研究。

参考文献:

- [1] 王鸿泰, 胡德高. 池塘中亚硝酸盐对草鱼种的毒害及防治[J]. 水产学报, 1989, 13(3): 207-214.
- [2] 黄翔鹤, 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]. 水生生物报, 2006, 30(4): 466-470.
- [3] 曲克明, 徐勇, 马绍赛, 等. 不同溶解氧条件下亚硝酸盐和非离子氨对大菱鲆的急性毒性效应[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(4): 83-88.
- [4] 国家环保局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法(第 3 版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989: 260-263.
- [5] 刘双红, 孙燕, 岑运华, 等. 采用光合细菌控制水体中亚硝酸盐的研究[J]. 环境科学, 1995, 16(6): 21-23.
- [6] 吴伟. 应用复合微生物制剂控制养殖水体水质因子初探[J]. 湛江海洋大学学报, 1997, 17(1): 17-20.
- [7] 吴美仙, 李科, 张萍华. 反硝化细菌及其在水产养殖中的应用[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2008, 31(4): 467-471.
- [8] 于爱茸, 李尤, 俞吉安. 一株耐氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 77-81.
- [9] Robertson L A, Van Nie E W J, Tnrrmans R A M, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of thiosphaera pantotropha[J]. Applied Anti Environment Microbiology, 1988, 54(11): 2812-2818.
- [10] 安健, 宋增福, 杨先乐, 等. 好氧反硝化芽孢杆菌筛选及其反硝化特性[J]. 环境科学研究, 2010, 23(1): 100-105.
- [11] 景晟, 张洪英, 张海彬. 亚硝酸盐高效利用菌的分离及其特性研究[J]. 南京农业大学学报 2006, 29(3): 73-78.
- [12] Otani Y, Hasegawa K, Hanaki K. Comparison of aerobic denitrifying activity among three cultural species with various carbon sources[J]. Water Sci Technol, 2004, 50(8): 15-22.

Nitrite degradation of a *Pseudomonas* sp. strain SF1 and its applicaiton in fish pond sediment

CHEN Rui-fang¹, XU Chang-an², LIU Li-mei¹, FANG Wei-dong³

(1. Bioengineering Research Centre, Guangxi Institute of Oceanography, Beihai 536000, China; 2. Chemical Research Centre of Marine Biological Resource, The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 3. Fujian Provincial Haixin Group Co., Ltd., Zhangzhou 363102, China)

Received: Nov., 10, 2010

Key words: *Pseudomonas* sp.; nitrite; degradation

Abstract: A strain of *Pseudomonas* sp., named as SF1, which showed high capacity of nitrite degradation, was screened from the mud of marine culturing pond. SF1 nitrite-degrading property and its application in fish pond sediment were carried out under lab environment. SF1 showed a high ability to degrade sodium nitrite at the following conditions, 1~1000 mg/L of sodium nitrite concentrate, 10% of denitrifying bacteria inoculums, median aerating during fermentation; pH ranging between 6.5-8.0, and 12~36 h of fermentation time. Introducing SF1 fermentation broth (*A* value 0.36) into fish pond sediment at the ratio of 10% removed 67% of nitrite after 36 h. Our results indicate that SF1 can be used to treat fish pond sediment.

(本文编辑: 谭雪静)

《海洋科学》杂志 2011 年征订启事

《海洋科学》是由中国科学院海洋研究所主办、科学出版社出版的学术性期刊，是中国自然科学核心期刊、华东地区优秀期刊、山东省优秀期刊。本刊以密切联系生产实际、服务于我国现代化建设为宗旨，及时、快速报道海洋学及其分支学科的新成果、新理论、新观点、新工艺及新进展等，对重大科研和应用性研究成果特别予以优先报道。主要刊载内容有：海洋生物、海洋水产生产、海洋活性物质提取、海洋环境保护、海洋物理、物理海洋、海洋地质、海洋化学、海洋工程、海洋仪器研制等方面的学术论文、研究报告、研究简报、专题综述、学术讨论和争鸣、学术动态以及新产品介绍（有偿刊登）等。

本刊为月刊，每月 15 日出版，大 16 开本，96 页，每期定价 30 元，全年定价 360 元。本刊国内外公开发行（国际刊号：ISSN1000-3096；国内刊号：CN37-1151/P；国内邮发代码：2-655；国外发行代号：M6666）。全国各地邮局均可订阅。欢迎各科研机构、高等院校、生产厂家和从事该领域研究的科技人员踊跃订阅。邮局订阅不便者可直接向本刊编辑部订购。本刊发行量在同类期刊中名列前茅，订户遍及全国 20 多个省、市、自治区，影响面广，宣传力大，欢迎广大的广告客户在本刊刊登广告，价格优惠。

欢迎订阅《海洋科学》 欢迎广告惠顾

《海洋科学》编辑部地址：山东省青岛市南海路 7 号，266071

电话及传真：0532-82898755

E-mail：pxzhang@qdio.ac.cn