

草鱼养殖水体中参与氮转化途径的异养菌分析

傅罗琴, 孙健栋, 邓斌, 梁权, 张小平,
郑佳佳, 胡彩虹, 李卫芬*

(浙江大学动物科学学院饲料科学研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要:为分析草鱼池塘中参与氮代谢的异养细菌比例及其代谢途径,从杭州郊区取得4个草鱼池塘的水样,每个水样通过涂布随即挑选100株菌株进行定性显色试验,并据此选取11株异养菌进行16S rRNA序列分析。结果表明,4个草鱼养殖池塘中 NH_4^+ -N和 NO_2^- -N的平均水平分别为5.597 mg/L和0.135 mg/L。池塘中可培养的异养菌平均为 3.26×10^5 cfu/mL,其中的89.75%参与了氮的不同代谢途径,其中31.25%的氨化菌和33.50% NO_3^- -N(NO_2^- -N)还原菌参与了 NH_4^+ -N的生成,32.45%的氨氧化菌参与了 NH_4^+ -N的降低; NO_2^- -N生成途径主要包括蛋白质直接转化(11.26%)、氨氧化(4.25%)和硝酸盐氮还原(10.75%),而 NO_2^- -N降低主要通过15.50%的亚硝酸氧化菌、8.75%的 NO_2^- -N还原菌和10.75%的反硝化菌实现。结果提示,草鱼养殖水体中存在大量的异养硝化菌参与不同的氮代谢途径,且产生氨氮的异养菌比例远高于去除氨氮的菌,这是草鱼养殖水体中氨氮含量易偏高的原因。同时,11株不同功能的异养菌16S rRNA鉴定结果为寡养食单胞菌(*Stenotrophomonas*)6株、假单胞菌(*Pseudomonas*)3株、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)和肠杆菌(*Enterobacter*)各1株,而且细菌对氮源的利用具有菌株特异性。

关键词:草鱼; 养殖水体; 氨氮; 亚硝酸盐氮; 异养菌

中图分类号: Q 938.8; S 965

文献标志码: A

近年来,水产养殖业在全球范围内迅速发展,我国水产养殖产量已达到世界养殖总产量的50%以上^[1]。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国的四大家鱼之一,据统计,2006年的产量已超过3.96百万t,占世界总产量的95%^[2]。随着水产养殖业的快速发展,尤其是高密度和单一品种池塘养殖模式的推广,水产养殖的生态环境日趋恶化,养殖水体中生物耗氧量、氨氮、亚硝酸盐、硫化物等水质指标易发生超标,其中以氨氮和亚硝酸盐氮等氮素含量超标现象尤为严重^[3]。

人工池塘养殖主要依靠投喂饲料提高养殖产量,但随饵料进入水体的氮素只有部分被鱼类摄取,其余则直接进入水体;加之鱼类所摄入氮素的相当部分又以排泄物形式进入池塘,因此,养殖水体中氮素负荷显著增加,水质易受污染^[4]。氨氮

和亚硝酸盐氮是水产养殖的水体中化合态氮的两种存在形式,对动物均有较大的毒性^[5]。水中浓度过高的氨氮对鱼虾体内酶的催化作用和细胞膜的稳定性产生严重影响,并破坏排泄系统和渗透平衡,水中亚硝酸盐浓度过高对鱼虾也会产生毒害,主要表现在影响鱼虾体内氧的运输、重要化合物的氧化及损坏器官^[5-7]。因此,控制养殖水体中氨氮和亚硝酸盐氮的含量,维持水体中各种氮素的正常比例和水平,成为当前水产养殖业迫切需要解决的问题。

池塘中的氮循环主要通过水体中各种氮代谢相关细菌完成,研究养殖水体中参与氮转化的微生物(主要是细菌)对于控制水体中的氮素循环意义重大^[8]。目前有关养殖水体氮的研究主要集中在氮素的收支平衡以及氨氮、亚硝酸盐和硝

收稿日期:2012-03-02 修回日期:2012-07-23

资助项目:国家“九七三”重点基础研究发展规划(2009CB118705);公益性行业(农业)科研专项(201203083)

通讯作者:李卫芬,E-mail:wfli@zju.edu.cn

酸盐对鱼类毒性等方面^[9-12],而对养殖池塘中与氮素生物转化相关菌群及其代谢途径的研究甚少,本实验首次研究不同草鱼池中水样中微生物菌群组成及其在氮素转化中的作用,分析其中产生氨氮和亚硝酸盐氮或转化氨氮和亚硝酸盐氮的主要微生物组成,并为筛选出可高效转化氨氮及亚硝酸盐氮的候选菌提供基础。

1 材料与方法

1.1 培养基与试剂

水样中总可培养细菌数的测定用营养琼脂培养基(LB培养基):1%胰蛋白胨;0.5%酵母膏;0.5% NaCl;2.5%琼脂;蒸馏水溶解。液体营养培养基不加琼脂,其他都相同。细菌利用不同氮源情况的鉴定培养基的基本成分如下:Na₂HPO₄ 7.9 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.01 g/L、微量元素 2 mL/L、柠檬酸钠 5.66 g/L,调节 pH = 7.0 ~ 7.5,根据检测氮源的不同,分别向以上培养基中添加 0.841 5 g/L NaNO₃、0.1 g/L NaNO₂、0.25 g/L 蛋白胨或 NH₄Cl 0.529 6 g/L,以检测不同菌株利

用硝酸盐、亚硝酸盐、蛋白胨和氨氮为氮源的能力。其中微量元素成分如下:EDTA 50.0 g/L; ZnSO₄ 2.2 g/L; CaCl₂ 5.5 g/L; MnCl₂·4H₂O 5.06 g/L; FeSO₄·7H₂O 5.0 g/L; (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O 1.1 g/L; CuSO₄·5H₂O 1.57 g/L; CoCl₂·6H₂O 1.61 g/L, pH = 7.0。

基因组提取试剂盒、PCR 试剂盒、割胶回收试剂盒、T₄ DNA 连接酶及其它试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, pUCm-T Vector 购自 Promega。

1.2 实验鱼池与水样采集

杭州市 4 个草鱼养殖水池系典型的精养鱼池,面积 1.33 hm²,平均水深 2.5 m。鱼池分别标记为 CY1、CY2、CY3、CY4。样品采集时间为 2008 年 9 月。4 个草鱼养殖池塘的基本水质参数如表 1 所示。水样用柱状玻璃管采集,采取池塘 6 个点,取混合样。样品置于 4 °C 保存和运输,并在取样后的 12 h 内分析总可培养细菌数,并进一步进行菌株分离及分析不同菌株对氮源的利用情况。

表 1 草鱼养殖池塘的基本水质参数

Tab.1 Water quality parameters of grass carp culturing ponds

池塘编号 pond number	温度/°C temperature	pH	COD/ (mg/L)	NO ₂ ⁻ -N/ (mg/L)	NO ₃ ⁻ -N/ (mg/L)	NH ₄ ⁺ -N/ (mg/L)	可培养菌的浓度/(个数/mL) concentration of culturable bacteria
CY1	28.8	8.5	20.13	0.113	0	5.016	6.44 × 10 ⁵
CY2	29.0	8.2	23.22	0.144	0.382	5.682	2.92 × 10 ⁵
CY3	28.8	8.5	19.48	0.184	0	5.872	1.84 × 10 ⁵
CY4	29.0	8.5	20.05	0.100	0	5.818	1.84 × 10 ⁵

1.3 水体化学指标测定

水体中 NO₃⁻-N、NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 含量测定参照《水和废水检测分析方法》(第四版)^[13]进行,采用 721 型可见分光光度计进行定量分析。其中,NO₃⁻-N 浓度的测定采用紫外分光光度法、NO₂⁻-N 浓度的测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法、NH₄⁺-N 浓度的测定采用纳氏试剂分光光度法。

1.4 菌株分离及不同菌株利用不同氮源情况分析

菌株分离及培养 水样分别稀释 1 倍、10 倍、100 倍和 1 000 倍,取 200 μL 均匀涂布于用营养琼脂平板上,于 37 °C 恒温培养 24 h,进行细菌计数。同时,每份水样涂布的平板都随机挑取 100 个单菌落接种于液体营养培养基中,37 °C 恒温培养 24 h。

按照 1% 的接种量将以上单菌落的培养液接种到含不同氮源的液体鉴定培养基中,37 °C 恒温

箱内培养 24 h,通过定性显色反应检测不同菌株利用不同氮源的情况。

定性显色反应检测方法 根据不同氮源的化学性质,用相应的的显色剂分别与每个菌种利用这些氮源后产生的代谢产物进行反应,根据颜色的有无或深浅,定性地鉴定该菌种是否参与水体氮转化以及在氮循环中的具体作用。

亚硝酸盐氮(NO₂⁻-N)的定性检测:培养液用亚硝酸盐显色剂点样,若出现红色则说明培养液中存在亚硝酸根,且颜色越深代表浓度越大。

氨氮(NH₄⁺-N)的定性检测:用纳氏试剂点样,若出现黄色反应,说明培养液中存在氨氮,且颜色越深代表浓度越大。

硝酸盐氮(NO₃⁻-N)的定性检测:

(1) 对于含有亚硝酸盐氮的培养液检测硝酸盐氮时,对于 1 mL 培养液中残余的亚硝酸盐氮

(浓度 ≤ 150 mg/L),首先加入 1 mol/L 的盐酸 50 μ L,混匀,再加入 50 g/L 的氨基磺酸铵溶液 50 μ L,混匀,以消除亚硝酸盐氮对硝酸盐氮显色的影响。然后将 2 μ L 的该培养液滴入 10 μ L 的二苯胺溶液中,根据是否显示蓝色及蓝色的深浅,初步判断培养液中硝酸盐氮含量的多少。

(2) 对于不含有亚硝酸盐氮的培养液检测硝酸盐氮时,对于 1 mL 的待检测培养液,由于已知培养液中不含有亚硝酸盐氮,可直接将 2 μ L 的该培养液滴入 10 μ L 的二苯胺溶液中,根据是否显示蓝色及蓝色的深浅,初步判断培养液中硝酸盐氮含量的多少。

菌株 16S rRNA 序列测定和同源性比较
根据定性显色反应检测结果,从挑取的 400 个单菌落中,随机选取了 11 株进行菌株 16S rRNA 序列的鉴定。以细菌基因组 DNA 为模板扩增 16S rRNA,扩增采用一对通用引物。上游引物(P1):5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAGAACGAACGCT-3';下游引物(P6):5'-TACGGCTACCTTGTTACG-ACTTCACCCC-3'。PCR 反应体系(50 μ L):10 \times

Buffer 5.0 μ L,dNTPs 4.0 μ L,上游引物和下游引物各 1.0 μ L,重蒸水 38 μ L,离心混匀后加入 DNA 模板 0.5 μ L,Taq 酶 0.5 μ L。PCR 反应程序如下:(1)94 $^{\circ}$ C,5 min;(2)94 $^{\circ}$ C 变性 50 s;(3)52 $^{\circ}$ C 退火 60 s;(4)72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s;(5)72 $^{\circ}$ C,10 min;(2)-(4)步骤循环 30 次。琼脂糖凝胶电泳(1 \times 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工生物工程有限公司完成,测序结果通过 GenBank Blast 进行比对分析。

1.5 数据分析

试验数据用平均数 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 4 个草鱼养殖池塘的氨氮及参与氮转化的菌群分析

从每个草鱼池塘可分离的总细菌中随机挑取 100 个菌株,分析了其生成、降低氨氮及亚硝酸盐的特性及其参与不同氮代谢途径不同功能菌的比例(表 2)。

表 2 草鱼池塘参与氮转化途径的菌群分析

氮转化 nitrogen transformation		途径 pathway	比例/% ^a ratio
NH ₄ ⁺ -N 转化 transformation	NH ₄ ⁺ -N 生成 production	蛋白质氨化 protein ammoniation	31.25 \pm 17.10
	NH ₄ ⁺ -N 降低 reduction	NO ₃ ⁻ -N/NO ₂ ⁻ -N 还原 reduction	33.50 \pm 23.27
		氨氧化 ammoxidation	32.45 \pm 8.98
NO ₂ ⁻ -N 转化 transformation	NO ₂ ⁻ -N 生成 production	蛋白质直接转化 protein direct transformation	11.26 \pm 7.04
		氨氧化 ammoxidation	4.25 \pm 5.25
	NO ₂ ⁻ -N 降低 reduction	NO ₃ ⁻ -N 还原 reduction	10.75 \pm 6.87
		NO ₂ ⁻ -N 氧化 oxidation	15.50 \pm 14.39
		NO ₂ ⁻ -N 还原 reduction	8.75 \pm 7.34
	反硝化 denitrification	10.75 \pm 8.04	
不参与氮转化 out of circulation with nitrogen			10.25 \pm 9.00

注:a.参与该途径的菌占总分离菌的比例。

Notes:a. the rate of bacteria participating in the pathway.

结果发现,草鱼养殖池塘中平均 89.75% 的异氧菌参与了氮的不同代谢途径,其中能利用有机氮的菌为 35.50%。NH₄⁺-N 生成途径主要有蛋白质氨化(氨化菌)和 NO₃⁻-N/NO₂⁻-N 还原。氨化菌有 31.25%,其中 5.25% 的菌可同时生成 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N;NO₃⁻-N(NO₂⁻-N)还原生成氨氮的菌有 33.50%,其中 17.25% 的属于氨化菌。NH₄⁺-N 降低主要通过氨氧化实现,32.45% 的氨

氧化菌中有 7.5% 属于氨化菌,4.25% 的菌在降氨的同时有 NO₂⁻-N 积累。

NO₂⁻-N 生成途径主要蛋白质直接转化(蛋白质直接转化的菌占总分离菌的 11.26%,其中只生成 NO₂⁻-N 菌为 4.25%)、氨氧化(氨氧化菌为 4.25%,其中 1.5% 属于氨化菌)和硝酸盐氮还原(硝酸盐氮还原菌为 10.75%,其中 2.0% 的菌能从蛋白质直接生成 NO₂⁻-N,1.0% 为有氨氧化功

能的非氨化菌,7.25%为不具降氨和亚硝酸盐氮功能的非氨化菌)。NO₂⁻-N降低主要通过NO₂⁻-N氧化(亚硝酸氧化菌15.50%)、NO₂⁻-N还原(NO₂⁻-N还原菌为8.75%)和反硝化实现(反硝化菌有10.75%,大多数具硝化功能)。

此外,草鱼池塘中有平均有72.25%的异养菌参与了蛋白质、NH₄⁺-N、NO₂⁻-N和NO₃⁻-N之间的转化,其中29.75%的异养菌只参与了一个转化过程,44.42%的异养菌参与多个(一个以上)转化过程(表3)。

表3 草鱼池塘中参与蛋白质、NH₄⁺-N、NO₂⁻-N和NO₃⁻-N之间转化的菌群分析
Tab.3 Analysis of cultivable heterotrophic bacteria involved in the transformation among protein, ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen in grass carp pond

参与的转化过程数量 amount of processes participated	0	1	2	3	4	5	6
比例/% ^a ratio	27.75 ± 3.56	29.75 ± 9.36	20.25 ± 4.97	14.25 ± 7.08	7.67 ± 2.49	2.00 ± 1.87	0.25 ± 0.43

注:a.参与该途径的菌占总分离菌的比例。

Notes:a. the rate of bacteria participating in the pathway.

2.2 菌株16S rRNA序列及参与氮转化途径分析

为了获得更多草鱼养殖水体中参与氮转化的菌株信息,从以上所获得的400株菌中随机选取了11株菌进行16S rRNA序列的鉴定,并进一步分析它们利用氮源及其产生氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的情况,结果如表4所示。从菌株的同源性分析结果可以看出,选取的11株菌分别属于

克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、寡养食单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)和肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)。其中寡养食单胞菌所占的比例最大,11株菌中有6株属于寡养食单胞菌,而克雷伯氏菌和肠杆菌只有1株,其余3株为假单胞菌。从利用氮源的情况可以看出,细菌对氮源的利用具有菌株特异性。

表4 不同菌种16S rRNA序列鉴定结果及其在参与氮转化途径分析
Tab.4 Analysis of bacteria 16S rRNA sequences and their role in nitrogen cycling process

菌株编号 strain number	同源性分析 ^a homology analysis	产生不同态氮情况 generation of different nitrogen	利用氮源情况 ^b utilization of different nitrogen			
			有机氮 organic nitrogen	氨氮 ammonia nitrogen	亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	硝酸盐氮 nitrate nitrogen
F1	寡养食单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i> sp. 100%	氨氮 ammonia nitrogen	-		-	+
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	-	+		+
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	
F2	假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. 98%	氨氮 ammonia nitrogen	-		+	+
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	+	+		+
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	
F3	寡养食单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i> sp. 99%	氨氮 ammonia nitrogen	-		-	-
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	+	+		+
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	
F4	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp. 98%	氨氮 ammonia nitrogen	-		-	-
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	-	+		+
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	
F5	克雷伯氏杆菌 <i>Klebsiella</i> sp. 100%	氨氮 ammonia nitrogen	-		-	+
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	-	+		-
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	
F6	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i> 96%	氨氮 ammonia nitrogen	-		-	-
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	-	+		+
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	

续表 4

菌株编号 strain number	同源性分析 ^a homology analysis	产生不同态氮情况 generation of different nitrogen	利用氮源情况 ^b utilization of different nitrogen			
			有机氮 organic nitrogen	氨氮 ammonia nitrogen	亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	硝酸盐氮 nitrate nitrogen
F7	寡养食单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i> sp. 99%	氨氮 ammonia nitrogen	-		-	-
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	-	+		+
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	
F8	寡养食单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i> sp. 99%	氨氮 ammonia nitrogen	-		-	-
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	±	+		+
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	
F9	肠杆菌 <i>Enterobacter</i> sp. 97%	氨氮 ammonia nitrogen	±		+	+
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	+	±		+
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	
F10	嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 96%	氨氮 ammonia nitrogen	-		-	-
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	-	-		+
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	
F11	寡养食单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i> sp. 97%	氨氮 ammonia nitrogen	±		-	-
		亚硝酸盐氮 nitrite nitrogen	-	-		-
		硝酸盐氮 nitrate nitrogen	-	-	-	

注:a.与 GenBank 中登陆的序列进行比对,所得到的同源性百分数及所代表的菌株。b.表中的行代表菌株利用不同的氮源,列代表利用对应的氮源产生氨氮、亚硝酸盐氮及硝酸盐氮的情况。“-”表示不能产生,“±”表示少量产生,“+”表示产生。如菌株 F1 的功能为:有机氮不产氨,氨产亚硝酸,亚硝酸不产氨,硝酸产氨和不产亚硝酸。

Notes:a. the homology percentages and representative strains via comparing with the sequences in GenBank. b. the rows in the table show different nitrogen sources the strains utilized by the strains; the columns indicate the level of ammonia, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen produced by corresponding nitrogen source. “-” means no production, “±” means a small amount of production, “+” means having production. For example, the function of strain F1 is that couldn't use organic to produce ammonia, could use ammonia to produce nitrite, could not use nitrite to produce ammonia, could use nitrate to produce ammonia but no nitrite.

3 讨论

3.1 草鱼养殖池塘中氨氮和亚硝酸盐氮浓度分析

氮循环是水产养殖生态系统中物质循环的重要环节,养殖水体氮的多少能促进或限制水产养殖生态系统中能量的转化,并在很大程度上影响着养殖水体的水质^[14]。在水产养殖过程中,氮素能够被生态环境中的土著微生物通过氨化、硝化等转化为氨态氮、亚硝态氮等有害物质,并且水产养殖动物一般是排氨类的生物,饵料中的氮素在其体内代谢并排除体外的最终产物是氨态氮,这样必然增加水体中氨态氮的含量。过高的氨态氮和亚硝酸氮对养殖动物具有很强的毒性^[7,15]。就集约化养殖水体而言,氨氮和亚硝氮等的污染已成为制约水产养殖环境的主要胁迫因子^[16]。

一般情况下,养殖水域中 NH_4^+ -N 浓度超过 5 mg/L、 NO_2^- -N 浓度达到 0.1 mg/L,就会对养殖生物产生危害。而水体中 NO_3^- -N 只有在浓度较

高(60 mg/L)时间较长时,才会产生一定的危害^[17]。不同草鱼养殖池塘中不同态氮的含量差异较大。高攀等^[12]在以草鱼为主要养殖品种的 8 个标准池塘中分别投喂两种商品饲料,进行了为期 283 d 的养殖试验,测定了期间池塘水中 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 的含量分别为 0.28 ~ 0.92 mg/L、0.03 ~ 0.13 mg/L 和 0.08 ~ 0.75 mg/L。胡庆杰^[18]试验测得 7—9 月草鱼养殖池塘中以上 3 个指标含量分别为 0.40 ~ 0.53 mg/L、0.076 ~ 0.102 mg/L 和 0.52 ~ 0.66 mg/L。而本实验所检测的 4 个草鱼养殖池塘中总 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 的平均含量分别为 (5.597 ± 0.395) mg/L、(0.135 ± 0.037 5) mg/L 和 (0.095 5 ± 0.191) mg/L,可以看出,本实验所测定的 4 个草鱼养殖池塘中的 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 浓度都在一定程度上高出了对养殖生物的安全浓度范围,需要采取一定的控制措施。

3.2 草鱼养殖池塘中参与氮转化异养菌分析

异养细菌在水产养殖系统中占有重要的位

置,Hovanec 等^[19]的研究表明,养殖水体中的异养菌约占总细菌的 80%,远远优势于自养菌的数量。van Rijin 等^[20]研究表明,罗非鱼循环水养殖水体中异养菌平均为 10^5 cfu/mL,但细菌在水体中并非均匀分布。Leonard 等^[22]也分析了海鲈鱼循环水养殖系统中的异养菌菌群,发现该系统水体中的可培养菌介于 $10^4 \sim 10^5$ cfu/mL 之间。目前对天然草鱼养殖池塘中可培养异养菌的数量方面尚无相关数据可参考,本实验对 4 个典型草鱼养殖池塘中总的细菌数量的测定结果表明,池塘中可培养细菌平均为 $(3.26 \pm 2.18) \times 10^5$ cfu/mL,这与 Hovane 等^[19]的研究结果基本一致。

氮的各种形式的转化是参与构成整个养殖环境循环的动态过程,而在这个过程中其决定性作用的是微生物,微生物参与氮素代谢相关的多种过程,包括氨化作用、硝化作用、反硝化作用及固氮作用等。针对以上实验结果所得到的草鱼养殖池塘中的 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 浓度均在一定程度上高出对养殖生物的安全浓度范围,研究该池塘中参与氮转化的微生物(主要是细菌)对于合理控制水体中的氮素循环以降低氨氮和硝酸盐氮含量具有重要意义。但目前为止,仍未有针对草鱼养殖池塘的参与氮循环的异养菌的研究数据可参考。本实验对草鱼池塘参与氮代谢途径的结果表明,草鱼养殖池塘中平均 89.75% 的异养菌参与了氮的不同代谢途径,说明氮循环在整个生态系统中发挥着重要的作用。水体中细菌主要通过蛋白质氨化、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的还原生成氨氮,并通过氨氧化途径降解氨氮,随机选取的 100 株菌中大约 65.75% 的菌参与了氨氮的合成,而只有 31% 的菌参与了氨氮的降解,推测这也是草鱼养殖水体中氨氮含量易偏高的原因。同样,水体中约 26.26% 和 35.0% 的菌分别参与了水体亚硝酸盐氮的生成和降解。

养殖池塘中细菌的组成受到养殖水体各种环境因子的影响,如溶氧、pH、温度及养殖池塘的生物群落等,而不同养殖池塘中的菌落组成差异也较大。Leonard 等^[21]随机鉴定了 20 株海鲈鱼循环水养殖系统中的异养菌菌群主要为假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida*)、海洋螺菌属 (*Oceanospirillum*)、海杆菌 (*Marinobacter*)、副球菌 (*Paracoccus*)、赤细菌 (*Erythrobacter*)、弧菌 (*Vibrionaceae*) 及气单胞菌 (*Aeromonas*)。本实

验随机选取了 400 株菌中的 11 株菌进行了鉴定,11 株菌中有 6 株属于寡养食单胞菌 (*Stenotrophomonas*),3 株属于假单胞菌 (*Pseudomonas*),而克雷伯氏菌 (*Klebsiella*) 和肠杆菌 (*Enterobacter*) 各 1 株,而且细菌对氮源的利用具有菌株特异性。对其中降氨氮或亚硝酸盐氮效果较好的菌进行进一步的研究可为应用于水产养殖中净化水质高效菌的筛选提供原材料。

参考文献:

- [1] 谢思义. 依靠科技进步推动我国水产养殖业现代化[J]. 渔业现代化,2001(5):11-13.
- [2] Chen J X, Guang C T, Xu H, et al. A review of cage and pen aquaculture: China[M] // Halwart M, Soto D, Arthur J R, Eds. Cage aquaculture-regional reviews and global overview FAO Fisheries Technical Paper. No. 498. Rome. 2007:53-66.
- [3] 蔡继哈,沈奇宇,郑向勇,等. 氨氮污染对水产养殖的危害及处理技术研究进展[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2010,29(2):167-172.
- [4] 李谷,吴振斌,侯岩松,等. 养殖水体氮的生物转化及其相关微生物研究进展[J]. 中国生态农业学报,2006,14(1):11-15.
- [5] 王彦波,许梓荣,邓岳松. 水产养殖中氨氮和亚硝酸盐氮的危害及治理[J]. 饲料工业,2002,23(12):46-48.
- [6] 余瑞兰,聂湘平. 分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及对策[J]. 中国水产科学,1997,6(3):73-77.
- [7] Tilak K S, Veeraiah K, Raju J M. Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) [J]. Journal of Environmental Biology, 2007, 28(1):45-47.
- [8] Schtoedera G L. Autotrophic and heterotrophic production of micro-organisms in intensely-manured fish ponds, and related fish yields[J]. Aquaculture, 1978, 14(4):303-325.
- [9] 於叶兵,陆伟,黄金田,等. 亚硝酸盐和硫化物对克氏原螯虾幼虾的毒性效应研究[J]. 水生生态学杂志,2011,32(1):111-114.
- [10] 李波,樊启学,张磊,等. 不同溶氧水平下氨氮和亚硝酸盐对黄颡鱼的急性毒性研究[J]. 淡水渔业,2009,39(3):31-35.
- [11] 王鸿泰,胡德高. 池塘亚硝酸盐对草鱼种毒害及防治[J]. 水产学报,1989,11(3):207-213.
- [12] 高攀,蒋明,赵宇江,等. 主养草鱼池塘水质指标的变化规律和氮磷收支[J]. 云南农业大学学报:自

- 然科学版,2009,24(1):71-77.
- [13] 国家环保局制《水和废水监测分析方法》编委会. 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.
- [14] 肖国华. 微生物在水产养殖环境生物修复中的作用机制[J]. 河北渔业,2006,154(10):1-3.
- [15] Tilak K S, Lakshmi S J, Susan T A. The toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the fish, *Catla catla* (Hamilton) [J]. Journal of Environmental Biology, 2002, 23(2):147-149.
- [16] Aatonio T, Carlos M, Manuel P M, et al. Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters [J]. Water Research, 2000, 34(1):334-342.
- [17] Miranda-Filho K C, Pinho G L, Wasielesky Jr W, et al. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis* [J]. Comparative Biochemistry Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(3):377-382.
- [18] 胡庆杰. 利用EM复合菌调控草鱼高产池塘水质试验[J]. 现代渔业信息, 2010, 25(6):22-26.
- [19] Hovanec T A, DeLong E F. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(8):2888-2896.
- [20] van Rijin J, Sich H. Nitrite accumulation by denitrifying bacteria isolated from fluidized bed reactors operated in an aquaculture unit [C] // Moav B, Hilge V, Rosenthal H, Eds. Progress in Aquaculture Research. Spec. Publ. No. 17, European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, 1992:39-54.
- [21] Leonard N, Blancheton J P, Guiraud J P. Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system [J]. Aquacultural Engineering, 2000, 22(1-2):109-120.

Analysis of cultivable heterotrophic bacteria involved in nitrogen cycle in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) pond

FU Luo-qin, SUN Jian-dong, DENG Bin, LIANG Quan, ZHANG Xiao-ping,
ZHENG Jia-jia, HU Cai-hong, LI Wei-fen*

(Institute of Feed Science, College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The aim of the present study was to detect the levels of NH_4^+ -N, NO_2^- -N and NO_3^- -N, and to determine the numbers of ammonifying, nitrifying, and denitrifying bacteria, which are responsible for the nitrogen cycling process in four representative grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) ponds. After sampling water from 4 grass carp ponds, one hundred strains selected randomly from each sample were tested by qualitative color reaction, and on the basis of the test, 11 strains of heterotrophic bacteria were selected for 16S rRNA sequence analysis. Results showed that the mean levels of NH_4^+ -N and NO_2^- -N was 5.597 mg/L and 0.135 mg/L, respectively. The cultivable heterotrophic bacteria density in fish pond was 3.26×10^5 cfu/mL and 89.75% of them were involved in nitrogen cycle, 65.75% and 31% of which were involved in NH_4^+ -N production and degrading, respectively. This result indicated that the overwhelming majority of nitrite-producing bacteria resulted in high level of nitrite in grass fish pond. The identification results of 11 strains of heterotrophic bacteria were as follows: six of them were related to *Stenotrophomonas*, three of them were related to *Pseudomonas*, and the other two strains were *Klebsiella* and *Enterobacter*, respectively. Moreover, there might be strain differences on utilization of nitrogen resources.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; cultivating water; ammonia nitrogen; nitrite nitrogen; heterotrophic bacteria

Corresponding author: LI Wei-fen. E-mail: wfli@zju.edu.cn