

2 株氨氮去除菌的分离鉴定及去除率影响因素分析

张家顺, 苏真真, 薛菲菲, 李 赞*, 潘鲁青

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了获得养殖池塘中高效去除氨氮的菌株, 本研究采用富集培养分离的方法从虾贝混养池中筛选得到 2 株氨氮去除能力较高的菌株, 编号分别为 9A-7 和 9A-19。分子生物学及生理生化鉴定结果一致表明, 菌株 9A-7 为非典型弧菌, 菌株 9A-19 为魔鬼弧菌。分析 2 菌株不同生长时期的氨氮去除率, 结果显示, 氨氮去除与菌株的生长均显著相关, 菌株 9A-7 生长量与氨氮去除率之间的相关系数为 0.916, 菌株 9A-19 生长量与氨氮去除率之间的相关系数为 0.938。条件优化研究结果表明, 培养液盐度、pH 和培养温度对 2 菌株去除氨氮的效率均存在显著影响, 其中盐度对 2 菌株氨氮去除率的影响相似, 2 菌株去除氨氮的理想盐度均为 30, 但低 pH 和高温对菌株 9A-7 的去除能力影响较小, 高 pH 对菌株 9A-19 去除能力影响较小。当氨氮浓度为 50 mg/L, 在温度 25 ℃、盐度 30、pH7.5 条件下培养, 培养 24 h 的菌株 9A-7 和菌株 9A-19 除氨率分别高达 74.67% 和 90.67%。结果表明, 这 2 株筛选菌可作为氨氮去除的优良菌株。

关键词: 氨氮去除菌; 分离鉴定; 去除特性

中图分类号: Q 938.8; S 917.1

文献标志码: A

养殖水体中氨氮是危害养殖动物健康生长的主要理化因子之一。水体中的氨氮主要来自养殖动物的排泄物、未被动物摄食的腐败残饵和动物残体^[1]。水体中的氨氮因水温及 pH 的影响或者以离子态(NH₄⁺)形式存在, 或者以分子态(NH₃)形式存在, 氨氮危害主要来源于分子态的氨。氨氮调控是健康养殖中水质管理的重要内容。如果不能及时将水体中的氨氮水平降低, 就可能影响养殖动物的生长, 甚至发生氨中毒事件。

随着虾贝养殖技术的提高, 养殖密度不断增大, 投饵量势必加大, 水体中不断增加的氨氮对养殖动物的危害也在不断增强, 因而水体氨氮浓度的有效控制技术是对虾养殖业的迫切要求。目前, 对养殖水体氨氮的调控包括物理、化学和生物 3 种方法^[2]。换水、充氧或化学转化等物理和化学方法虽然见效快, 但投入大而且容易引发次生污染^[3]。生物方法是通过筛选微生物来有效利

用或转化水体中的氨氮, 从而降低水体中的氨氮浓度, 该方法因安全有效, 因而被认为是最有发展潜力的除氨方法。目前已在罗非鱼(*Tilapia*)^[4]、管海马(*Hippocampus kuda*)^[5]以及刺参(*Apostichopus japonicus*)^[6]养殖中取得了良好的氨氮去除效果。为获得虾贝养殖水体的除氨微生物, 本研究采集虾贝养殖池的水样, 通过富集及筛选分离, 获得了 2 株氨氮去除率较高的菌株, 在对分离菌株进行鉴定的基础上, 本研究对 2 菌株氨氮去除能力及其影响因素进行了分析, 以期为开发高效、实用的生物除氨技术提供备选菌株。

1 材料与amp;方法

1.1 水样的采集

用于分离细菌的水样于 2013 年 9 月在山东省日照市虾贝混养池用采水器在水深约 50 cm 处采集, 采集的水样低温运回实验室。

收稿日期:2015-03-21 修回日期:2015-06-26

资助项目:国家海洋公益性行业科研专项(201305005)

通信作者:李 赞, E-mail:sxsdwl@ouc.edu.cn

1.2 实验方法

菌株的富集、分离与纯化 首先对采集的水样进行富集处理。本研究的富集培养基参考 Yu 等^[7]和侯颖等^[8]制备。以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源,所用海水经孔径为 0.45 μm 混合膜(上海市新亚净水器件厂生产,上海)用 GM-100 隔膜真空泵抽滤(天津市津腾实验设备有限公司,天津),盐度为 30。在 1 000 mL 抽滤海水中分别加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75 g,葡萄糖 5.0 g, K_2HPO_4 1.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,调 pH 为 7.5。121 $^\circ\text{C}$ 下高压蒸汽灭菌 15 min 后用于去除氨氮菌株的富集。

为富集氨氮菌株,取采集水样 10 mL 加入到盛有 100 mL 富集培养基的锥形瓶中,25 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 条件下震荡培养 24 h 后,向培养基中再加入 10 mL 新鲜的富集培养基强化富集效果,如此强化富集 3 次以淘汰对氨氮耐受性差的菌株。随后取稀释倍数为 10^{-4} 和 10^{-5} 的富集培养液各 100 μL 分别涂布到分离培养基上(分离培养基为富集培养基中加 1.5%~2.0% 的琼脂制成),25 $^\circ\text{C}$ 恒温培养直至长出明显菌落。选取形态、颜色不同的单个菌落在分离培养基上划线分离,直至无杂菌出现。最后将筛选出的纯化菌株在斜面 2216E 琼脂培养基(海博生物,青岛)上划线保种,4 $^\circ\text{C}$ 保存。

菌株的筛选 将上述分离得到的菌株用接种环接种到 2216E 液体培养基中,25 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 震荡培养 24 h,离心收集菌株并用无菌海水洗涤 3 次。用 TA-2XJ 型细菌浊度计(北京天安联合科技有限公司,北京)测定各菌株密度并用无菌海水调整至 3×10^8 cfu/mL,以 1% 的比例分别将筛选菌株接种到氨氮筛选培养基中。用于本研究的筛选培养基与富集培养基基本相似,只是将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量调整为 0.25 g/L。25 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 筛选培养 24 h 后,12 000 r/min 离心菌液 10 min,取上清液测氨氮浓度。以未接种菌液培养基中氨氮浓度为对照。每个菌株筛选培养重复 3 次,计算平均值用于比较各菌株的氨氮去除率。

氨氮浓度的测定 菌液中氨氮浓度采用次溴酸盐氧化法(GB17378.4-2007)^[9]测定。氨氮浓度(mg/L) = $(\text{OD}_{543} - 0.0136) / 1.0986 \times 200$ 。氨氮去除率的计算采用如下公式:

氨氮去除率(%) = [未接种菌筛选培养基氨

氮浓度(mg/L) - 接种菌筛选培养基氨氮浓度(mg/L)] / 未接种菌筛选培养基氨氮浓度(mg/L) $\times 100$ 。

筛选菌株的鉴定 筛选菌株的种类鉴定综合采用形态学特征、DNA 序列信息及生理生化相关特征 3 个方面进行。

(1) 菌株的形态学特征观察^[10]:将筛选菌株涂布到 2216E 琼脂培养基中,25 $^\circ\text{C}$ 培养,待长出菌落后进行革兰氏染色并用肉眼观察菌落形状、大小、颜色、透明度、质地等特征。

(2) 菌株 16SrDNA 的序列分析水煮法^[11]提取细菌基因组 DNA,PCR 扩增 16SrDNA 部分片段。用于扩增 16SrDNA 序列的正向引物为(27F): 5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3', 反向引物为(1492R): 5' - TACGGCTACCTGTTACGACTT - 3'。25 μL 的 PCR 反应体系包括:模板 DNA 2 μL ,正向和反向引物各 1 μL , 2MasterMiX 12.5 μL ,超纯水 8.5 μL 。PCR 反应条件为,94 $^\circ\text{C}$ 解链 3 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s,55 $^\circ\text{C}$ 30 s 和 72 $^\circ\text{C}$ 1 min,循环 30 次,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min 后,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司直接测序。测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 比对,选取相似性高的序列信息与扩增序列以 MEGA5.0 软件使用 Neighbor-joining 法(邻位相连法)构建系统发育树,进行亲缘关系分析。

(3) 菌株的生理生化特征检测^[12-15]:菌株的生理生化特征检测方法参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[16]和《常见细菌系统鉴定手册》^[17]进行。本研究用于生理生化特征检测的指标共 11 项,包括葡萄糖氧化发酵实验、接触酶实验、甲基红实验(M.R)、V-P 实验、淀粉水解实验、产氨实验、明胶液化实验、耐盐性实验、硝酸盐还原实验、亚硝酸盐还原实验和脲酶。

菌株生长与去除率的关系分析 细菌密度采用光电比浊法^[18]测定,基于不同培养时间培养液中的细菌密度绘制筛选菌株的生长曲线。为比较菌株不同生长阶段氨氮去除率的差异,本研究首先在 2216E 液体培养基中培养筛选菌株至对数期,离心收集菌体,并用无菌生理盐水洗涤 3 次,最后将菌体密度调整为 3×10^8 cfu/mL 的菌液。随后按 1% 的比例将筛选菌株接种在筛选培养基

中以 25 °C、180 r/min 条件振荡培养,分别在培养的 0、6、12、24、48 h 取样 2 mL,测定培养液的菌株密度以及上清液的氨氮浓度,计算不同时期筛选菌株的氨氮去除率。

温度、盐度和 pH 对筛选菌株氨氮去除效率影响的分析 本研究用于比较的温度梯度分别为 20、25、30、35 °C (pH 为 7.5,盐度为 30),pH 梯度为 7.0、7.5、8.0、8.5 (温度为 25 °C,盐度为 30),盐度梯度为 20、25、30、35 (温度为 25 °C,pH 为 7.5)。实验所用培养基为筛选培养基,除用于比较的单一因子不同外,其他培养条件均保持一致。所有实验处理均培养 24 h 后取样离心,测定上清液氨氮浓度,分别计算菌株在不同温度、盐度和 pH 培养条件下的氨氮去除率。每个处理组设 3 个平行,计算平均值,以反映 3 个因子不同处理梯度对菌株氨氮去除能力的影响。实验数据使用 Excel(2007)和 SPSS 17.0 软件进行计算、作图、相关性分析和单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与筛选

日照虾贝养殖池中采集的水样经富集、分离和纯化得到 24 株可去除氨氮的菌株,编号分别为 9A-1~9A-24,筛选菌株氨氮的去除能力差别相当大,当筛选培养基中氨氮浓度为 42.07 mg/L

时,部分菌株去除率不足 35%,部分菌株最高可达 90% 以上。其中,菌株 9A-7 和 9A-19 的去除率最高,因此选择这 2 株菌作为候选菌株并进行后续实验。

2.2 候选菌株的种类鉴定

形态学特征 分别培养 2 株候选菌株 24 h 后,可观察到菌株 9A-7 形成圆形菌落,该菌落呈淡桔黄色,不透明,水润且凸起,菌落易挑起。菌株 9A-19 的菌落则为乳白色,菌落边缘不整齐,半透明,水润且凸起。2 株筛选菌株经革兰氏染色均显示为阴性、无芽孢。

菌株 16SrDNA 序列分析 从 2 株候选菌株基因组均扩增到长度为 1 230 bp 左右的 16SrDNA 序列,扩增序列经在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,结果显示,2 株菌株扩增序列分别与相应菌株 16SrDNA 序列的相似性在 97% 以上。选取与 2 株候选菌株相似性较高的已知菌株共 17 条序列信息,与 2 株筛选菌株测序结果同时进行分析,以菌株 *Bacillus pumilus* strain zyjl-3 (登录号:EU311209)作为外类群构建系统发育树。结果显示,菌株 9A-7 与 9A-19 分别与非典型弧菌 (*Vibrio atypicus* strain 5-4-6,登录号:JX867739)和魔鬼弧菌 (*Vibrio diabolicus* strain H041,登录号:KJ577036)在同一分支上,说明候选菌株分别与这 2 株菌的亲缘关系最近(图 1)。

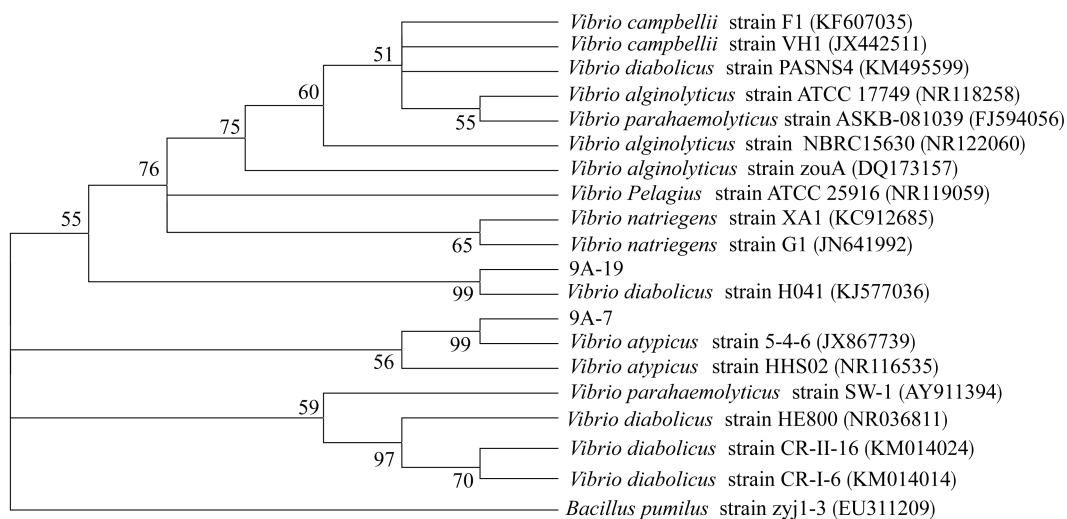


图 1 菌株 9A-7、9A-19 及相关菌株的 16SrDNA 基因序列的系统发育树分析
 Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16SrDNA gene sequences of strains 9A-7, 9A-19 and other related strains using Neighbor-joining method

生理生化试验 在 16SrDNA 序列分析基础上,本研究对 2 株筛选菌株进行了生理生化特征分析(表 1)。结果显示,2 株菌在检测的 11 个生理生化特征中,均显示阳性的指标有 6 个,均显示阴性的指标有 2 个,彼此表现不同的指标有 3 个。在盐度的耐受性方面,4 个盐度梯度的比较

显示,菌株 9A-19 对高盐的耐受性明显强于菌株 9A-9。基于《伯杰细菌鉴定手册》^[16]、《常见细菌系统鉴定手册》^[17] 和 Noguerola 等^[19] 的聚类标准,2 株筛选菌株仍分别与非典型弧菌和魔鬼弧菌有极高的相似性。

表 1 菌株 9A-7 和 9A-19 生理生化特征
Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of 9A-7 and 9A-19

项目 item	9A-7	9A-19
接触酶 catalase	-	+
运动性 motility	+	+
M. R 实验 M. R test	-	-
V-P 实验 V-P reaction	+	+
淀粉水解 amylohydrolysis	+	+
葡萄糖氧化发酵 oxidation and fermentation of glucose	+	+
产氨试验 production of ammonia test	-	+
2% 耐盐性 salt tolerance of 2%	+	+
5% 耐盐性 salt tolerance of 5%	+	+
7% 耐盐性 salt tolerance of 7%	(+)	+
10% 耐盐性 salt tolerance of 10%	-	(+)
硝酸盐还原 nitrate reduction test	+	+
亚硝酸盐还原 griess test	-	-
脲酶 urease	+	-

注:“+”代表阳性;“-”代表阴性;“()”表示轻微
Notes:“+” means positive;“-” means negative;“()” means slight

2.3 筛选菌株不同生长阶段氨氮去除能力分析

比较 2 株筛选菌株不同生长阶段氨氮去除率的变化,结果显示,2 菌株在培养初期均存在一段约 6 h 的缓慢生长期,随后进入对数生长期,菌株 9A-7 在培养 12 h 后进入稳定生长期,菌株 9A-19 则在培养 24 h 后才进入稳定生长期(图 2 - a)。在相同的培养条件下,培养 48 h 后,菌株 9A-7 培养液吸光值 OD_{600} 为 0.340,菌株 9A-19 的培养液吸光值 OD_{600} 达到 0.496(图 2 - b),这表明菌株 9A-19 生长速率更快。

随着菌株的生长,氨氮去除率逐渐升高。虽然在培养初期,2 株筛选菌株生长缓慢,菌体密度变化不大,但氨氮去除率均升高,培养至 6 h,菌株 9A-7 氨氮去除率升至 31.86%,菌株 9A-19 氨氮去除率升至 27.16%。进入对数生长期,氨氮去除率显著增大,培养至 12h 时,菌株 9A-7 氨氮去除率增加到 74.98%,而菌株 9A-19 氨氮去除率

已高达 93.63%,12 h 以后两株菌的氨氮去除率都变化不大。培养至 24 h 时,菌株 9A-19 氨氮去除率高达 99.14%。相关性分析结果显示,菌株 9A-7 生长量与氨氮去除率之间的相关系数为 0.916,菌株 9A-19 生长量与氨氮去除率之间的相关系数为 0.938,由此说明两株菌的生长量与各自氨氮去除率之间呈显著相关。

2.4 环境因子对菌株去除能力的影响

盐度对筛选菌株氨氮去除能力的影响 结果显示,当培养基盐度低于 30 时,随着盐度的升高 2 株菌株的去除能力均不断增大,至盐度为 30 时,菌株 9A-7 和 9A-19 的氨氮去除率分别达到 73.54% 和 90.25%(图 3),与其他低盐度实验组相比,菌株的去除能力显著增强($P < 0.05$)。但当盐度进一步升高至 35 时,2 株菌的去除能力均显著下降($P < 0.05$)。这说明盐度为 30 时,2 株筛选菌株除氨能力最强。

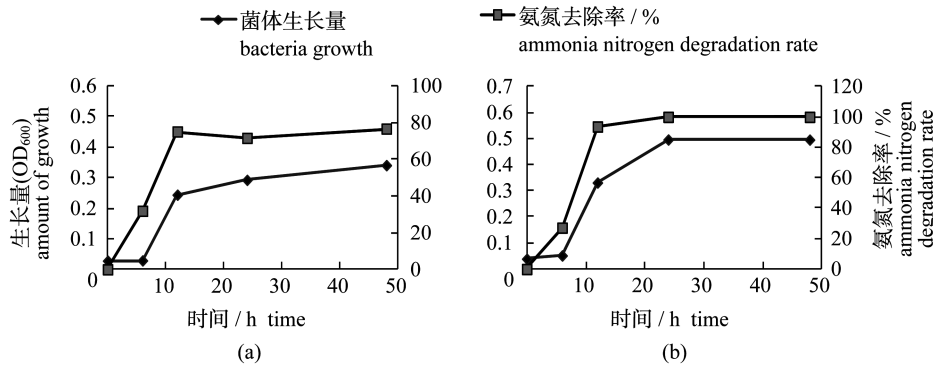


图2 菌株9A-7(a)和9A-19(b)不同生长时期的氨氮去除率
 Fig.2 The amount of growth and the ammonia nitrogen degradation rate of 9A-7(a) and 9A-19(b)

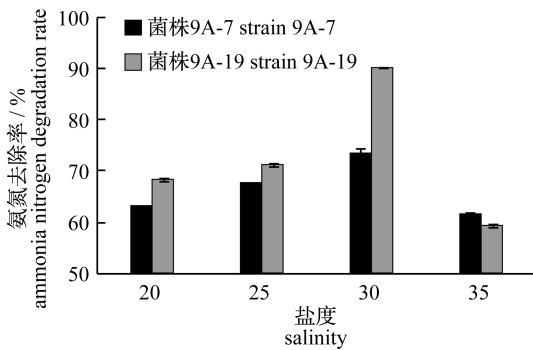


图3 盐度对菌株9A-7和9A-19氨氮去除能力的影响
 Fig.3 The influence of salinity on the ammonia nitrogen degradation ability

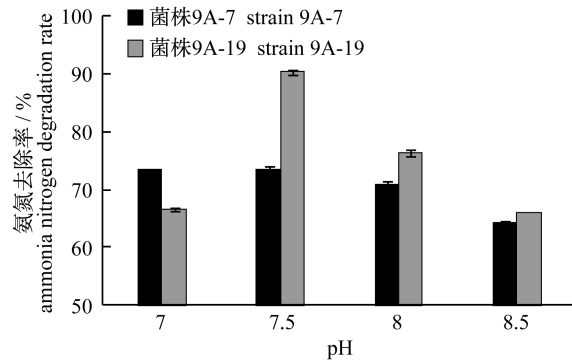


图4 pH对菌株9A-7和9A-19氨氮去除能力的影响
 Fig.4 The influence of pH on the ammonia nitrogen degradation ability

pH对氨氮去除能力的影响 将菌液按照1%的比例接种于不同pH的筛选培养基中,振荡培养24h,取样离心测定氨氮浓度并计算菌株的氨氮去除率,结果显示,菌株9A-7在pH为7.0~7.5时,去除能力受pH的影响较小,而在pH为8.0以及8.5时去除能力均呈现显著下降的趋势($P < 0.05$),最佳pH为7.0~7.5左右(图4)。菌株9A-19在pH为7.5时去除能力最高,去除率高达90.25%;pH大于7.5时,菌株9A-19去除能力虽有所降低,但pH8.0时的去除率显著高于pH7.0时的去除率($P < 0.05$),这说明菌株9A-19的除氨能力对弱碱环境有较强的耐受性。

温度对氨氮去除能力的影响 保持其他条件不变,将2株筛选菌株分别置于温度20、25、30、35℃震荡培养以比较温度对2株筛选菌株氨氮去除率的影响。结果显示,2株菌的去除率均在温度为25℃时最高,此时,9A-19的去除率高达90.67%,9A-7的去除率可达74.67%

(图5)。随着温度进一步升高,菌株9A-7在35℃时的去除率显著低于25℃时的去除率($P < 0.05$),但30与25℃以及35与30℃时的去除率并未达显著差异($P > 0.05$),这说明随着温度的升高,菌株9A-7氨氮去除率呈现逐渐下降的趋势。而菌株9A-19则在温度升至30℃时,去除率已降至54.67%,与25℃时的去除率呈现显著差异($P < 0.05$),而与35℃时的去除率差异不显著($P > 0.05$),结果说明高温对菌株9A-19的除氨能力影响较大,而对菌株9A-7的影响较小。

3 讨论

已有的研究表明,水体中的 NH_3 达到0.289 mg/L时鲤(*Cyprinus carpio*)即全部死亡,达到0.460 mg/L时尼罗罗非鱼(*T. nilotica*)就会全部中毒,达到0.970 mg/L时草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)鳃、肝、肾明显受到损伤^[1]。关于中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[20]

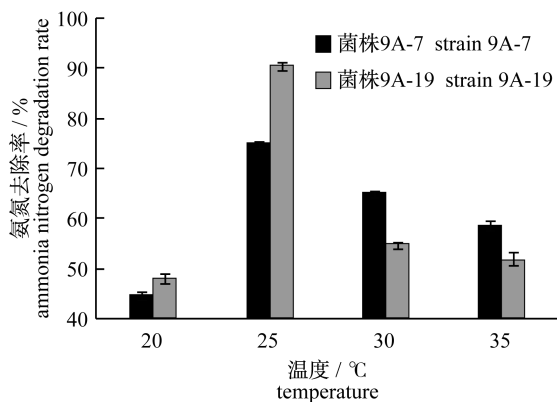


图5 温度对菌株9A-7和9A-19氨氮去除能力的影响
Fig. 5 The influence of temperature on the ammonia nitrogen degradation ability

的研究显示,氨氮对其不同生长时期 Z3、Z5 与 M 的安全浓度分别为 0.085、0.155 与 0.185 mg/L。而在虾池^[21]中,氨氮对日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 仔虾的安全浓度为 1.072 mg/L。中国《渔业水质标准》^[22]规定养殖水体中非离子氨 (NH₃) 允许的最高浓度为 0.02 mg/L。本研究在筛选培养基中加入 250 mg/L 硫酸铵用于筛选除氨菌,培养基中的氨氮浓度达到 50 mg/L,基本相当于 10 g 对虾饲料在 1 L 养殖水体中浸出的氨氮浓度^[23],这也是目前在除氨菌筛选中常用的浓度^[14,24-25]。

离子态氨 (NH₄⁺) 和分子氨 (NH₃) 在水中存在动态平衡, Ye 等^[26]研究表明,离子态氨一般通过氨单加氧酶的催化作用转化为羟胺,然后进一步转化为亚硝态氮和硝态氮等。Otte 等^[27]研究表明粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis* strain TUD) 能够生长在氨和二氧化碳中,并利用氨单加氧酶将氨转化为羟胺。王娟等^[24]从凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖池中筛选出一株巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*), 该菌株可将初始浓度为 50 mg/L 的氨氮在 24 h 内去除 96.6%。易弋等^[25]从鲤养殖池中也分离得到一株巨大芽孢杆菌, 24 h 氨氮去除率为 97.7%。Yu 等^[7]从工业废水中筛选的一株解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 24 h 氨氮去除率为 93%。可去除氨氮的假丝酵母 (*Candida* sp.)^[28], 在最适条件下的去除率接近 80%。符吴萸等^[14]分离得到一株沙雷氏菌 (*Serratia* sp.), 该菌培养至 72 h 氨氮去除率可达 97.4%。刘磊等^[29]和 Chiemchaisri 等^[30]利用 11 株光合细菌对氨氮的

去除表明,对氨氮的去除可从 364 mg/L 降到 210 mg/L 左右,最高的去除率为 42.6%。本研究从虾贝混养的养殖水体中分离的 2 株细菌 24 h 除氨率分别为 74.67% 和 90.67%, 经 16SrDNA 部分序列分析以及生理生化实验进行鉴定,结果均一致表明这 2 株筛选菌株分别属于非典型弧菌和魔鬼弧菌。关于弧菌类细菌在除氨方面的作用,目前还报道不多。

Zhang 等^[31]发现筛选的氨细菌不同生长阶段除氨率不同。Yu 等^[7]研究发现,筛选的芽孢杆菌除氨率受到培养温度、培养液 pH、培养液中的氨氮浓度和培养时的振荡速率等多种因素影响。本研究在 2 株弧菌上的研究表明,筛选菌株在培养初期及对数生长期是除氨的主要阶段,培养液盐度、pH 和培养温度对 2 株筛选菌株的除氨能力均具有显著影响,但同时也发现,2 株筛选菌的除氨能力对环境理化因子的适应性存在明显不同,如高温对菌株 9A-19 除氨能力影响较大,而菌株 9A-7 除氨能力则对高温的适应性较强。菌株 9A-19 除氨能力对偏碱性的培养液有较强的耐受性,而 pH 高于 7.5 时菌株 9A-7 除氨率则显著下降。

养殖水体的理化因子一直处于不断变化中,由于筛选微生物的除氨能力对这些理化因子的适应性存在差异,因此利用一种或一类微生物来达到调控水体中某一因子的目的显然是不可能的。因此,为了增强筛选微生物除氨的效果,一般将不同适应性的微生物混合使用。罗勇胜等^[32]研究发现,光合细菌对 NH₄-N 有明显去除效果,7 d 平均相对去除率为 17.71%,而与芽孢杆菌混合后,对 NH₄-N 7 d 平均相对去除率达到 35.38%。魏大鹏^[33]将 3 株芽孢杆菌和 1 株溶藻弧菌混合,该组合在 72 h 的氨氮去除率为 98.37%,均优于单一菌株的去除效果。从本研究的 2 株菌来看,在温度较高的夏季,水温高于 25 °C 时,利用菌株 9A-7 除氨具有优势,但在其他时间,去除能力强的菌株 9A-19 是潜在的候选菌。也许,这 2 株筛选菌配合使用去除效果及适应性能得到加强,这还有待从 2 株菌的配合比例等方面进行研究。

参考文献:

- [1] Zhang W Q, Zhu Y. Advances on the research of the hazard of ammonia nitrogen in aquaculture water and its determination method [J]. Journal of Environmental Hygiene, 2012, 2(6): 324 - 327. [张

- 卫强,朱英. 养殖水体中氨氮的危害及其检测方法研究进展. 环境卫生学杂志, 2012, 2(6): 324 - 327.]
- [2] Wu W, Chen J Z, Qu J H, *et al.* Study on the characteristics of ammonia biodegradation in the fishery water by nicardia [J]. Journal of Zhejiang Ocean University, 2000, 19(1): 21 - 24. [吴伟, 陈家长, 瞿建宏, 等. 诺卡氏菌对养殖水体中氨氮的去除特性研究. 浙江海洋学院学报, 2000, 19(1): 21 - 24.]
- [3] Zhou X, Wang S Y, Chi L Y, *et al.* Research on the screening of ammonia nitrogen degradation bacteria in marine culture wastewater and its culture condition [J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2009, 37(11): 4908 - 4910. [周鑫, 王素英, 池凌钰, 等. 海水养殖废水氨氮去除菌的筛选及培养条件研究. 安徽农业科学, 2009, 37(11): 4908 - 4910.]
- [4] Zhang Q, Li Z J, Chen K D. The effects of microbiological compound on ecological factors in culture waters [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1999, 8(1): 43 - 47. [张庆, 李卓佳, 陈康德. 复合微生物对养殖水体生态因子的影响. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 43 - 47.]
- [5] Lu J Y, Sun Y Y, Li B J, *et al.* Application of profitable microbe in healthy cultivation of *Hippocampus kuda* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(1): 46 - 50. [吕军仪, 孙燕燕, 李秉记, 等. 有益微生物在大海马健康养殖中的应用研究. 中国水产科学, 2003, 10(1): 46 - 50.]
- [6] Wu P, Zhao D Q, Cai H H, *et al.* Effects of three probiotics on water quality and growth in sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2013, 28(1): 21 - 26. [武鹏, 赵大千, 蔡欢欢, 等. 3种微生态制剂对水质及刺参幼参生长的影响. 大连海洋大学学报, 2013, 28(1): 21 - 26.]
- [7] Yu C H, Wang Y, Guo T, *et al.* Isolation and identification of ammonia nitrogen degradation strains from industrial wastewater [J]. Engineering, 2012, 4(11): 790 - 793.
- [8] Hou Y, Sun J D, Xu J Q, *et al.* Isolation and identification of high effective microorganisms degrading ammonia-nitrogen in aquaculture water [J]. Fisheries Science, 2005, 24(10): 22 - 24. [侯颖, 孙军德, 徐建强, 等. 养殖水体中高效氨氮去除菌的分离与鉴定. 水产科学, 2005, 24(10): 22 - 24.]
- [9] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (AQSIQ), Standardization Administration of the People's Republic of China (SAC). GB17378.4 - 2007 The specification for marine monitoring-Part 4: Seawater analysis [S]. Beijing: China Standard Press, 2008. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB17378.4 - 2007 海洋监测规范—第4部分: 海水分析. 北京: 中国标准出版社, 2008.]
- [10] Tao T S, Yang R F, Dong X Z. Systematics of prokaryotes [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007. [陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学. 北京: 化学工业出版社, 2007.]
- [11] Yan F J. Studies on screening and characterization of microorganisms with high organic-pollutants-degrading capability from sea cucumber (*Apostichopus japonicas* Selenka) culture ponds [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. [闫法军. 刺参养殖池塘有机物去除微生物的分离筛选及其特性研究. 青岛: 中国海洋大学, 2010.]
- [12] Miao M, Wang J H, Yang X C, *et al.* Isolation, identification and degradation of ammonia nitrogen degradation bacterium [J]. Journal of Engineering of Heilongjiang University, 2014, 5(1): 59 - 63. [苗苗, 王继华, 杨雪辰, 等. 氨氮去除菌的分离、鉴定及去除效果初步研究. 黑龙江大学学报, 2014, 5(1): 59 - 63.]
- [13] Li Y Q, Xu L L, Chen K W. Screening, identification and water purification effects of *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Hydroecology, 2013, 34(1): 96 - 100. [李永芹, 许乐乐, 陈克卫. 1株芽孢杆菌的筛选鉴定及其净水效果研究. 水生态学杂志, 2013, 34(1): 96 - 100.]
- [14] Fu W Y, Du L M, Yang P, *et al.* Isolation and identification of high effective bacteria degrading ammonia-nitrogen in aquaculture water and its biodegradation characteristics [J]. Journal of Guangdong University of Petrochemical Technology, 2013, 23(4): 22 - 26. [符吴英, 杜丽明, 杨平, 等. 养殖水体氨氮去除菌的分离与去除特性研究. 广东石油化工学院学报, 2013, 23(4): 22 - 26.]
- [15] Zhao B, He S J. Microbiology experiment [M]. Beijing: Science Press, 2002. [赵斌, 何绍江. 微生物学试验. 北京: 科学出版社, 2002.]
- [16] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 1984. [布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984]

- [17] Dong X Z, Cai M Y. Common bacteria system identification manual [M]. Beijing: Science Press, 2001:409-412. [东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001:409-412.]
- [18] Guo C Y, Gong Y S, Liu L L, *et al.* Measurement of yeast growth curve and genetic stability examination of recombinant yeast transferred grape stilbene synthase (STS) [J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2007, 35(7):1909-1910. [郭春叶, 龚月生, 刘林丽, 等. 酵母菌生长曲线的测定及其转葡萄芪合酶基因重组菌遗传稳定性的检测. 安徽农业科学, 2007, 35(7):1909-1910.]
- [19] Nogueroles I, Blanch A R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(1):175-185.
- [20] Shi J Y, Liu Z, Ding M C, *et al.* Toxic effects of nitrite, sulfide and ammonia on *Eriocheir sinensis* larvae [J]. Journal of Liaoning University, 1999, 26(1):93-97. [石俊艳, 刘中, 丁茂昌, 等. 亚硝酸盐、硫化物与氨对河蟹幼体的急性毒性实验. 辽宁大学学报, 1999, 26(1):93-97.]
- [21] Li J, Jiang L X, Wang W Q, *et al.* The toxic effect of ammonia nitrogen and sulfured hydrogen on the larvae of *Penaeus japonicus* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16(1):22-27. [李建, 姜令绪, 王文琪, 等. 氨氮和硫化氢对日本对虾幼体的毒性影响. 上海水产大学学报, 2007, 16(1):22-27.]
- [22] State Bureau of Environmental Protection. GB 11607-89 Water quality standard fisheries [S]. Beijing: China Standard Press, 1989. [国家环境保护局. GB11607-89 渔业水质标准. 北京:中国标准出版社, 1989.]
- [23] Zhao K. Preliminary study on screening and characterization of probiotic bacillus with high degrading capability from shrimp (*Penaeus vannamei* Boone) culture ponds [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014. [赵坤. 对虾养殖池塘有益芽孢杆菌的分离筛选及特性初步研究. 青岛:中国海洋大学, 2014.]
- [24] Wang J, Dai X L, Song Z F, *et al.* Isolation and identification of ammonifying bacterium and characteristics of degrading $\text{NH}_3\text{-N}$ [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(6):1198-1201. [王娟, 戴习林, 宋增福, 等. 一株氨化细菌的分离、鉴定及氨氮去除能力的初步分析. 水生生物学报, 2010, 34(6):1198-1201.]
- [25] Yi Y, Rong Y P, Cheng Q W, *et al.* Isolation and identification of ammonia nitrogen degradation strains from aquaculture water [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2011, 39(2):154-157. [易弋, 容元平, 程谦伟, 等. 养殖水体氨氮去除菌的分离和初步鉴定. 贵州农业科学, 2011, 39(2):154-157.]
- [26] Ye R W, Thomas S M. Microbial nitrogen cycles: Physiology, genomics and applications [J]. Current Opinion in Microbiology. 2001, 4(3):307-312.
- [27] Otte S, Schalk J, Kuenen J G, *et al.* Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology. 1999, 51(2):255-261.
- [28] Xie H, Qiu H D, Lin J, *et al.* Characteristics of degrading $\text{NH}_3\text{-N}$ in the fishery water by *Candida* sp. [J]. Transactions of the CSAE, 2005, 21(8):142-145. [谢航, 邱宏端, 林娟, 等. 假丝酵母去除养殖水体氨态氮的特性研究. 农业工程学报, 2005, 21(8):142-145.]
- [29] Liu L, Jin M, Jin Z X, *et al.* Photosynthetic bacteria degrade hazardous substances in wastewater [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2011, 17(3):45-47. [刘磊, 金梅, 黄遵锡, 等. 光合细菌对废水中几种常见有害物质的去除. 安徽农学通报, 2011, 17(3):45-47.]
- [30] Chiemchaisri C, Jaitrong L, Honda R, *et al.* Photosynthetic bacteria pond system with infra-red transmitting filter for the treatment and recovery of organic carbon from industrial wastewater [J]. Water Science and Technology, 2007, 56(7):109-116.
- [31] Zhang W Y, Tan F Y, Zhao T T, *et al.* Isolation and identification of ammoni bacteria and ammoniation characteristic analysis [J]. Advanced Materials Research, 2011, 340:280-286.
- [32] Luo Y S, Li Z J, Yang Y Y, *et al.* Synergism of photo-synthetic bacteria (PSB) and *Bacillus* sp. in purification of wastewater from aquatic farm [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2006, 25(Suppl. 1):206-210. [罗勇胜, 李卓佳, 杨莺莺, 等. 光合细菌与芽孢杆菌协同净化养殖水体的研究. 农业环境科学学报, 2006, 25(增刊1):206-210]
- [33] Wei D P. Study on removing ammonia and nitrite from wastewater using immobilized composite bacteria [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014. [魏大鹏. 固定化复合菌处理养殖水体中氨氮和亚硝氮的研究. 青岛:中国海洋大学, 2014.]

Screening and identification of two bacteria strains degrading ammonia-nitrogen and factors of degradation ammonia analysis

ZHANG Jiashun, SU Zhenzhen, XUE Feifei, LI Yun*, PAN Luqing

(The Key Lab of Mariculture of the Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In order to screen microorganisms of degrading ammonia-nitrogen in culture pond, the strain 9A-7 and 9A-19 were isolated from the shrimp-shellfish co-culture pond water of Rizhao by degrading ammonia-nitrogen via enrichment culture. The results of molecular biological, physiological and biochemical identification consistently showed that the strain of 9A-7 is *Vibrio atypicus* and the strain of 9A-19 is *Vibrio diabolicus*. The results showed that the ammonia degradation ability was related to the growth of the two isolated strains, whose correlation coefficient between the isolated strain cell density and ammonia removal rate is 0.916 (9A-7) and 0.938 (9A-19), respectively. The ability of degrading ammonia-nitrogen was significantly affected by salinity and pH of the culture solution and culture temperature, and the effect of salinity on ammonia removing rate of two strains was similar and the optimal salinity of both isolated strains was 30, however, the temperature has a less effect on the ammonia reduction rate of the strain 9A-7 than the strain 9A-19, and the weak alkalinity has more remarkable effect on that of the strain 9A-7 than the strain 9A-19. At salinity 30, pH 7.5, temperature 25 °C, the ammonia reduction rate of the strains 9A-7 and 9A-19 was 90.67%, and 74.67%, respectively. The present results showed that the two isolated bacteria strains are ideal strains for removing ammonia of the culture water.

Key words: ammonia nitrogen degradation bacteria; isolation and identification; degradation characteristic

Corresponding author: LI Yun. E-mail: sxsdwl@ouc.edu.cn