



零换水条件下 3 种异养硝化细菌对底部充氧池塘水质和尼罗罗非鱼生长、抗氧化能力的影响

王 淼, 李忠徽, 衣萌萌, 卢迈新*, 王瑞宁, 高风英, 刘志刚

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东广州 510380)

摘要: 为了研究 3 株异养硝化细菌对底部充氧尼罗罗非鱼养殖池塘水质的净化效果, 选择初始体质量为 (2.66 ± 0.94) g 的尼罗罗非鱼 600 尾, 随机平均放入 20 个水泥池, 实验设对照组 1(普通曝气头)、对照组 2(底部盘式微孔曝气器)、嗜吡啉红球菌 (P1-2) 实验组(底部盘式微孔曝气器)、粪产碱杆菌 (P3-1) 实验组(底部盘式微孔曝气器)、巨大芽孢杆菌 (P5-2) 实验组(底部盘式微孔曝气器), 每组各 4 个重复, 分别在养殖池塘定期泼洒浓度为 5×10^5 CFU/mL 的异养硝化细菌菌液。测定了不同组中各项水质指标及鱼体生长、抗氧化能力指标的变化情况。结果显示, 在实验过程中, 所有组的总氮浓度均呈持续上升趋势, 而加菌组的各指标积累量始终低于对照组, 其中, P5-2 对尼罗罗非鱼养殖水体的处理效果最为理想。P5-2 组水体中的总氮积累量在整个养殖周期始终低于对照组 1 和对照组 2。P3-1 组水体中的总氮积累量在整个养殖周期始终低于对照组 2。P1-2 组水体中的总氮积累量在第 8 周和第 10 周显著低于对照组 1 和对照组 2。P5-2、P3-1 和 P1-2 组水体中的氨氮积累量在整个养殖周期始终低于对照组 1 和对照组 2。P5-2 组池塘水体中的亚硝酸盐氮积累量在第 2 周、第 6 周和第 8 周显著低于对照组 2。养殖水体中泼洒异养硝化细菌可以提高尼罗罗非鱼的抗氧化功能。与对照组 1 相比, P3-1 和 P5-2 组中尼罗罗非鱼血清中的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性分别提高了 12.10% 和 8.05%, 与对照组 2 相比, P3-1 和 P5-2 组中尼罗罗非鱼血清中的 SOD 活性分别提高了 21.25% 和 16.87%。与对照组 1 相比, P1-2、P3-1 和 P5-2 组中尼罗罗非鱼血清中的总抗氧化能力 (T-AOC) 分别提高了 82.78%、98.68% 和 245.70%, 与对照组 2 相比, P3-1 和 P5-2 组中尼罗罗非鱼血清中的 T-AOC 分别提高了 1.69% 和 76.95%。研究表明, 在养殖池塘中添加异养硝化细菌, 可有效维护养殖水质, 提高尼罗罗非鱼的抗氧化能力, 对鱼体生长无影响。

关键词: 尼罗罗非鱼; 嗜吡啉红球菌; 粪产碱杆菌; 巨大芽孢杆菌; 池塘; 水质; 抗氧化能力

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

中国的池塘养殖模式从 20 世纪 70 年代末开始, 随着养殖水平的不断提高, 单位水体的鱼承载力也随之增加, 大量的饲料投入和鱼类代谢

物的积累导致池塘内源性污染加重, 养殖废水的排放也大大加剧了周围水体的富营养化程度。其中氮是造成水体污染及富营养化的主要原因

收稿日期: 2019-07-29 修回日期: 2020-04-25

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-46); 广东省基础与应用基础研究基金 (2019A1515111046); 广东省促进经济发展专项 (粤农 2019B13)

通信作者: 卢迈新, E-mail: mx-lu@163.com

之一,因此氮的去除对于改善养殖水环境具有重要意义^[1-2]。

目前,微生物法脱氮是处理污水最经济有效的方法之一^[3]。微生物法脱氮包括硝化作用和反硝化作用两个过程,其中自养型硝化细菌在硝化作用过程中占据主要地位^[4],随着技术手段的不断优化,许多研究表明,某些异养细菌也能进行硝化作用,如粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)^[5]、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[6]和红球菌(*Rhodococcus* sp.)^[7]等,与自养硝化细菌相比,异养硝化细菌生长速率快,环境适应能力强^[8],在生物脱氮法处理污水中更有优势,发展前景良好,但需要大量的研究去解决硝化细菌在实际应用中存在的问题,如将游离菌投放到养殖池后,由于环境条件发生改变,菌的生存、生长及其稳定性常常难以控制,从而导致对水体的净化效果不稳定;一些应用前景良好的好氧硝化菌在相对厌氧的底质中的定植问题等。近年来,池塘底部增氧方式得到了广泛推广^[9],相比传统的增氧方式,底部增氧可以有效改善池塘底部的水质条件,增加池塘底部的溶解氧含量。因此,本实验拟通过在零换水条件下,研究本实验室筛选的3株异养硝化细菌对底部增氧池塘环境及鱼体生长和免疫的影响,本研究有望为池塘养殖中异养硝化细菌的有效使用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验菌种及其硝化活性的测定

实验所用菌种包括巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)(P5-2)、粪产碱杆菌(P3-1)及嗜吡啉红球菌(*R. pyridinivorans*)(P1-2),均为本实验室从广州市番禺良种场尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)循环水养殖车间用水中筛选获得。

将菌株接种于150 mL异养硝化培养基[(NH₄)₂SO₄ 0.4 g/L,柠檬酸钠 5 g/L,NaCl 0.01 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.05 g/L, K₂HPO₄ 0.2 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L, MnSO₄ 0.01 g/L, pH 7.0]中,置于32 °C、180 r/min的恒温摇床中培养。每隔4 h取样测定上清液中氨氮和总氮的含量。

1.2 菌液的准备

挑取单菌落接种至锥形瓶中,置于32 °C、180 r/min的恒温摇床中培养,根据每株菌的生长曲线培养至对数生长期,将菌液浓缩至5×10¹¹ CFU/mL,4 °C保存备用。

1.3 养殖实验设计

将600尾尼罗罗非鱼幼鱼[体质量(2.66±0.94)g,全长(5.29±0.56)cm]分别投入20个水泥池(1.50 m×1.20 m×0.70 m,水泥池底部有约10 cm厚的底泥),每池30尾。实验设对照组1(CK1,普通曝气头)、对照组2(CK2,盘式微孔曝气器)、P1-2实验组(盘式微孔曝气器)、P3-1实验组(盘式微孔曝气器)、P5-2实验组(盘式微孔曝气器),每组设4个重复。盘式微孔曝气器安装于池塘底部,离底泥约10 cm。鼓风机设置在池塘池体的外侧,鼓风机与送风管连通,送风管与微孔曝气头连接,鼓风机将空气经过送风管输送到微孔曝气头从微孔排出。各个实验组每周泼洒1次异养硝化细菌菌液,菌液在养殖水体中的终浓度为5×10⁵ CFU/mL,实验周期为10周。投喂饲料为尼罗罗非鱼商品浮性膨化饲料,每天于16:00投喂1次,每次投喂量为鱼体质量的4%。

1.4 样品的采集

分别在养殖实验开始的第0、2、4、6、8和10周取水样(泼洒菌液前取样),冰上保存,带回实验室进行分析检测。实验结束时,即养殖实验开始的第10周采集尼罗罗非鱼样品,每个池塘随机捞取3尾尼罗罗非鱼,称量鱼的体质量并测量全长,同时用无菌注射器进行尾静脉采血,4 °C、3 500 r/min离心15 min,吸取血清于-80 °C冰箱保存备用。

1.5 水质分析

氨氮的测定采用纳氏试剂光度法;亚硝酸盐氮的测定采用N-(1-萘基)-乙二胺光度法;硝酸盐氮的测定采用酚二磺酸光度法;总氮的测定采用过硫酸钾紫外分光光度法。某采样时间点总氮、氨氮、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮变化量是由该时间点的总氮、氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮的含量分别减去池塘的总氮、氨氮、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的初始含量。

1.6 尼罗罗非鱼血清抗氧化能力的测定

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒,测定尼罗罗非鱼血清过氧化物酶(POD)、总抗氧化能力(T-AOC)和超氧化物歧化酶(SOD)活性,具体步骤参照说明书。

1.7 数据分析

水质、实验鱼体质量和酶活性等数据用

SigmaPlot for Windows(v. 11.0, Systat Software, Inc., Germany) 软件作图, 用 IBM SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), Duncan 氏多重比较检验各组间的差异。数据采用平均值±标准误 (mean±SE) 表示, 显著水平为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 菌株硝化活性

菌株在异养硝化培养基中的硝化活性研究结果显示, 在 28 h, P5-2、P3-1 和 P1-2 对氨氮的去除率分别达到了 94.29%、98.35% 和 98.17% (图 1), P5-2、P3-1 和 P1-2 对总氮的去除率分别达到了 87.53%、88.32% 和 84.48%(图 2), 说明这 3 株菌均具有良好的脱氮性能, 但 3 株菌对总氮

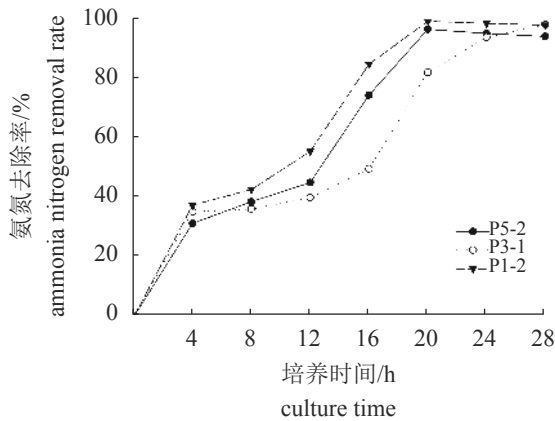


图 1 菌株 P5-2、P3-1 和 P1-2 对氨氮的去除率
Fig. 1 Ammonia nitrogen removal rate of strains of P5-2, P3-1 and P1-2

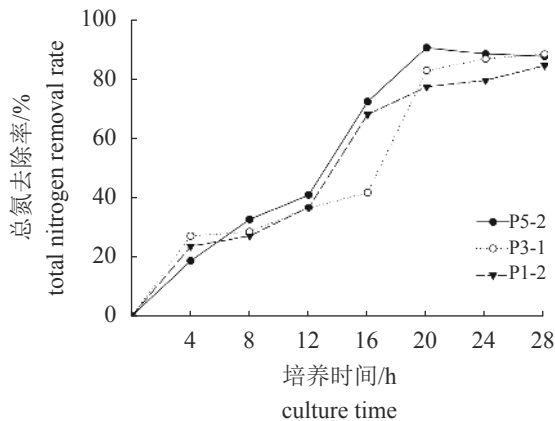


图 2 菌株 P5-2、P3-1 和 P1-2 对总氮的去除率
Fig. 2 Total nitrogen removal rate of strains of P5-2, P3-1 and P1-2

和氨氮的去除率均无显著性差异。

2.2 异养硝化细菌对尼罗罗非鱼养殖池塘水质的影响

随着养殖时间的增加, 尼罗罗非鱼养殖池塘水体中的总氮、氨氮、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮含量均有所积累, 底部充氧曝气处理和异养硝化细菌处理均可降低池塘水体中总氮、氨氮和亚硝酸盐氮的含量。P5-2 组水体中的总氮累积量在整个养殖周期始终低于对照组 1(普通曝气头) 和对照组 2(盘式微孔曝气器), 和对照组 1 相比, 第 8 周和第 10 周差异显著 ($P<0.05$), 和对照组 2 相比, 第 2 周、第 8 周和第 10 周差异显著 ($P<0.05$)。P3-1 泼洒组水体中的总氮累积量在整个养殖周期始终低于对照组 2, 第 10 周差异显著 ($P<0.05$), 该组水体中的总氮累积量在第 8 周和第 10 周显著低于对照组 1 ($P<0.05$)。P1-2 组水体中的总氮累积量在第 8 周和第 10 周显著低于对照组 1 ($P<0.05$) 和对照组 2 ($P<0.05$)。P5-2、P3-1 和 P1-2 组水体中的氨氮累积量在整个养殖周期始终低于对照组 1 和对照组 2, 其中 P5-2 组在 5 个采样时间点均差异显著 ($P<0.05$), P3-1 和 P1-2 组水体中的氨氮累积量在第 2 周、第 6 周、第 8 周和第 10 周显著低于对照组 1 ($P<0.05$), 在第 2 周、第 6 周和第 10 周显著低于对照组 2 ($P<0.05$)。P5-2 组池塘水体中的亚硝酸盐氮累积量在第 2 周、第 6 周和第 8 周显著低于对照组 2 ($P<0.05$)。在第 8 周和第 10 周, 对照组 2 水体中的硝酸盐氮累积量显著高于对照组 1 ($P<0.05$) (图 3)。

2.3 异养硝化细菌对尼罗罗非鱼生长的影响

在养殖 10 周后, 称量各组尼罗罗非鱼的体质量, 平均体质量分别为 (104.51±3.12) g (CK1)、(104.32±8.05) g (CK2)、(118.38±9.37) g (P1-2)、(97.54±6.50) g (P3-1) 和 (110.32±8.50) g (P5-2), 各组之间无显著性差异。

2.4 异养硝化细菌对尼罗罗非鱼抗氧化能力的影响

养殖水体中泼洒异养硝化细菌可以提高尼罗罗非鱼的抗氧化能力。与对照组 1 相比, P3-1 和 P5-2 组中尼罗罗非鱼血清中的 SOD 活性分别提高了 12.10% 和 8.05% ($P>0.05$), 与对照组 2 相比, P3-1 和 P5-2 组中尼罗罗非鱼血清中的 SOD 活性分别提高了 21.25% 和 16.87% ($P<0.05$)。与对照组 1 相比, P1-2、P3-1 和 P5-2 组中尼罗罗非鱼

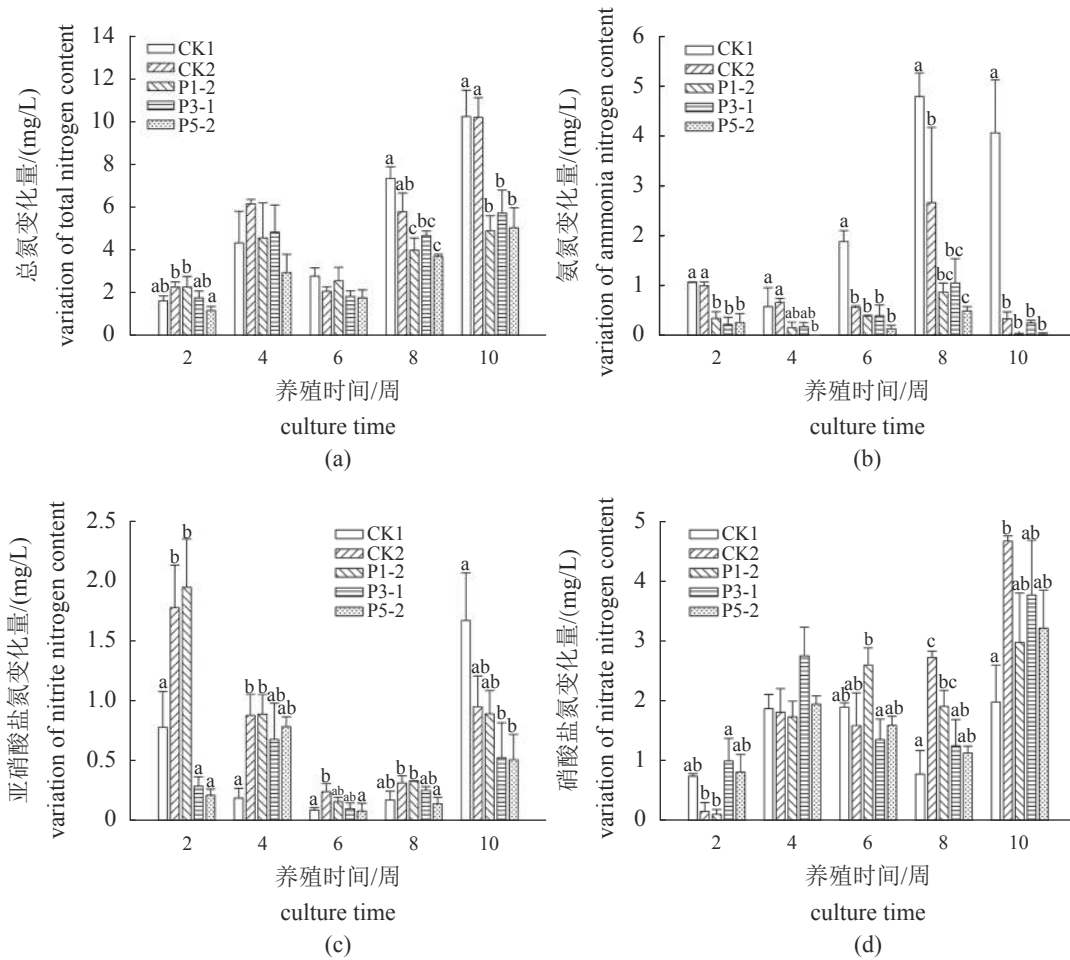


图 3 不同养殖时期池塘水体中总氮、氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的累积量

CK1. 对照组 1, CK2. 对照组 2, P1-2. 嗜吡啉红球菌, P3-1. 粪产碱杆菌, P5-2. 巨大芽孢杆菌; 不同小写字母表示同一采样时间点的不同处理组差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Temporal variation of accumulation of total nitrogen, ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen of pond water

CK1. control 1, CK2. control 2, P1-2. *R. pyridinivorans*, P3-1. *A. faecalis*, P5-2. *B. megaterium*; different small letters mean significant difference between different groups within the same sampling time ($P < 0.05$)

血清中的 T-AOC 分别提高了 82.78%、98.68% 和 245.70% ($P < 0.05$), 与对照组 2 相比, P3-1 和 P5-2 组中尼罗罗非鱼血清中的 T-AOC 分别提高了 1.69% ($P > 0.05$) 和 76.95% ($P < 0.05$) (图 4)。各组尼罗罗非鱼血清中的 POD 活性无显著性差异。

3 讨论

近年来, 已有大量研究报道了异养硝化细菌分离和鉴定, 包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[10-12]、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)^[13-14]、芽孢杆菌属^[15-16]、粪产碱杆菌属^[17-18]、红球菌属^[7]、副球菌属 (*Paracoccus*)^[19]、代尔夫特菌属 (*Delftia*)^[20] 和根瘤菌属 (*Rhizobium*)^[21]。本研究利用本实验室筛选到的 3

种异养硝化细菌, 包括巨大芽孢杆菌、粪产碱杆菌和嗜吡啉红球菌对尼罗罗非鱼养殖池塘水环境进行调节, 研究发现, 这 3 株菌在异养硝化培养基中 28 h 时对氨氮的去除率均可达到 94% 以上, 在 28 h 时对总氮的去除率均可达到 84% 以上。周国庆等^[22] 筛选了 3 株芽孢杆菌, 对氨氮的去除率最大达到 60.54%。黄石等^[23] 研究报道了 1 株巨大芽孢杆菌 Y907 在 72 h 对氨氮的去除率达到 90%。本研究使用的巨大芽孢杆菌 P5-2 对氨氮的去除效果更好。刘芳芳等^[24] 研究了 4 株粪产碱杆菌的脱氮能力, 其在 48 h 对氨氮的去除率达到 44% 以上, 对总氮的去除率达到 38% 以上。本研究使用的粪产碱杆菌 P3-1

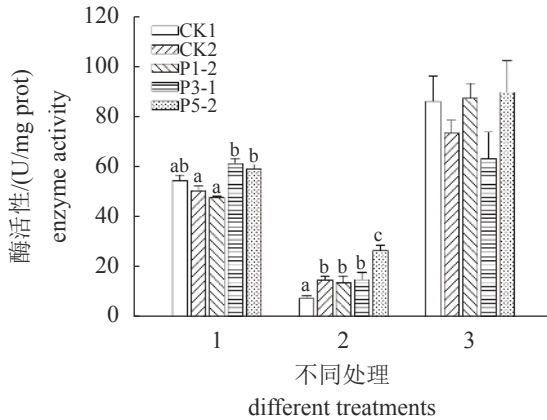


图 4 异养硝化细菌对尼罗罗非鱼血清 SOD、T-AOC 和 POD 活性的影响

1. SOD, 2. T-AOC, 3. POD; 不同小写字母表示同一指标的不同处理组之间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 4 Effect of heterotrophic nitrifying bacteria on SOD, T-AOC and POD activities of *O. niloticus*

1. SOD, 2. T-AOC, 3. POD; different small letters mean significant difference between different groups within the same enzyme activity ($P < 0.05$)

的脱氮效果显著高于上述 4 株菌。而陈青云等^[18]报道的粪产碱杆菌也具有较强的脱氮能力, 24 h 对氨氮的去除率达到 95%。陈咄圳等^[7]发现了 1 株高效脱氮的嗜吡啶红球菌, 可将培养基中的氨氮全部去除, 对总氮的去除率可达 98.70%, 略高于本研究中的 P1-2。本研究使用的 3 种异养硝化细菌有较强的脱氮能力, 在废水的脱氮处理方面有较好的应用前景。

目前, 异养硝化细菌的应用主要集中在污水处理方面^[25]。在养殖水的处理方面, 醋酸钙不动杆菌 (*A. calcoacetic*) 能够有效处理循环水养殖系统水体中的氨氮、硝酸态氮、总氮和总有机碳, 去除率分别达到了 43.31%、91.70%、83.56% 和 67.57%^[14]。花津滩芽孢杆菌 (*B. hwajinpoensis*)、嗜碱盐单胞菌 (*Halomonas alkaliphila*) 和麦氏交替单胞菌 (*Alteromonas macleodii*) 对圆斑星鲈 (*Verasper variegatus*) 养殖废水有较好的净化效果, 对圆斑星鲈无毒害及致病作用^[26]。在养殖废水中泼洒浓度为 10^8 CFU/mL 的枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*), 10 d 后, 其对养殖废水氨氮的去除率达到 81.9%^[27]。本研究发现, 在实际的养殖应用中, P5-2 对尼罗罗非鱼养殖水的处理效果最为理想, 在养殖的第 10 周, P5-2 组的总氮浓度分别比对照组 1 低 38.87%, 比对照组 2 低 23.99%, 同时 P5-2 对池塘水体中的亚硝酸盐氮也有较好的降解效果。

本研究使用的菌液终浓度为 5×10^5 CFU/mL, 在较低的菌液浓度下, 对氨氮和总氮仍可以达到较好的去除效果。本研究中的 3 个实验组和对对照组 2 均使用了底部增氧方式, 结果表明, 底部增氧较普通增氧方式, 可以显著降低养殖池塘中的总氮和氨氮的积累, 配合异养硝化细菌同时使用效果更佳。

T-AOC 是用于衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标, SOD 是一种重要的抗氧化酶, 以往的研究主要集中在益生菌拌料投喂对鱼体的抗氧化能力的影响, 如在饲料中添加巨大芽孢杆菌可以提高杂交鲟幼鱼血清中 T-AOC 和 SOD 活性^[28]。而向水中泼洒益生菌也是水产养殖中益生菌的主要施用方式之一。已有研究发现, 在水体中添加芽孢杆菌制剂, 可将草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 血清的 T-AOC 活性从 4.07 U/mL 提高到 6.08 U/mL, 但并未影响草鱼血清的 SOD 活性^[29]。本研究同样表明, 在养殖水体中泼洒异养硝化细菌可以提高尼罗罗非鱼血清的 T-AOC 和 SOD 活性。本研究尝试将异养硝化细菌泼洒到尼罗罗非鱼养殖水体中, 作为水质调节剂和鱼体免疫调节剂使用, 操作相对简便, 为异养硝化细菌的使用提供新的思路。

4 结论

本研究通过在底部增氧的尼罗罗非鱼养殖池塘中添加异养硝化细菌, 有效降低了养殖水体中总氮和氨氮的积累, 同时研究了异养硝化细菌的添加对养殖尼罗罗非鱼生长及抗氧化能力的影响, 结果发现, 添加异养硝化细菌未影响尼罗罗非鱼的生长, 且显著提高了尼罗罗非鱼的抗氧化能力, 表明异养硝化细菌可在尼罗罗非鱼的养殖过程中作为益生菌使用。

参考文献:

[1] 蔡继略, 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]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2010, 29(2): 167-172, 195.
Cai J H, Shen Q Y, Zheng X Y, et al. Advancement in researches of ammonia pollution hazards on aquaculture and its treatment technology[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2010, 29(2): 167-172, 195(in Chinese).

- [2] 王申, 高珊珊, 蒋力, 等. 水产养殖系统氮磷营养盐收支及其生态影响研究[J]. *水产学杂志*, 2018, 31(5): 50-57.
Wang S, Gao S S, Jiang L, *et al.* A review of budget and ecological impact of nutrients nitrogen and phosphorus in an aquaculture ecosystem[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2018, 31(5): 50-57(in Chinese).
- [3] 周小愿, 金卫荣, 高宏伟, 等. 水产养殖环境生物除氮脱氮技术的研究现状与展望[J]. *水产科技情报*, 2011, 38(1): 22-26.
Zhou X Y, Jin W R, Gao H W, *et al.* Research and perspectives of biological nitrogen removal technology in aquacultural environment[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2011, 38(1): 22-26(in Chinese).
- [4] 温东辉, 唐孝炎. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用[J]. *环境污染与防治*, 2003, 25(5): 283-285.
Wen D H, Tang X Y. Heterotrophic nitrification and its role in the nitrogen removal in wastewater treatment[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2003, 25(5): 283-285(in Chinese).
- [5] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. *Water Research*, 2006, 40(16): 3029-3036.
- [6] 何霞, 赵彬, 吕剑, 等. 异养硝化细菌 *Bacillus* sp. LY 脱氮性能研究[J]. *环境科学*, 2007, 28(6): 1404-1408.
He X, Zhao B, Lü J, *et al.* Nitrogen removal by *Bacillus* sp. LY with heterotrophic nitrification ability[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(6): 1404-1408(in Chinese).
- [7] 陈咄圳, 王立刚, 王迎春, 等. 异养硝化—好氧反硝化菌的筛选及脱氮性能的实验研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(12): 3614-3618.
Chen P Z, Wang L G, Wang Y C, *et al.* Screening and denitrification characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrifier bacteria[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(12): 3614-3618(in Chinese).
- [8] Matsuzaka E, Nomura N, Nakajima-Kambe T, *et al.* A simple screening procedure for heterotrophic nitrifying bacteria with oxygen-tolerant denitrification activity[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(4): 409-411.
- [9] 胡松学, 唐建华. 池塘底部增氧技术的应用效果和推广前景的初步研究[J]. *渔业信息与战略*, 2009, 24(6): 25-26.
Hu S X, Tang J H. Elementary study on application effect and extension perspective of aerobic technology on bottom of pond[J]. *Modern Fisheries Information*, 2009, 24(6): 25-26(in Chinese).
- [10] 周英萍, 唐美珍, 曹彦雪, 等. 一株耐冷异养硝化菌的分离鉴定及脱氮特性[J]. *湖泊科学*, 2019, 31(3): 746-754.
Zhou Y P, Tang M Z, Cao Y X, *et al.* Isolation and denitrification characteristics of a psychrotrophic and heterotrophic nitrification bacterium[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2019, 31(3): 746-754(in Chinese).
- [11] 刘淳, 李永红, 刘颖颖, 等. 1株高效异养硝化细菌的分离鉴定及硝化特性[J]. *环境科学与技术*, 2019, 42(3): 152-157.
Liu C, Li Y H, Liu Y Y, *et al.* Screening and identification of a efficient heterotrophic nitrifying bacteria and the study of its nitrification characterization[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 42(3): 152-157(in Chinese).
- [12] 汪旭晖, 杨垒, 任勇翔, 等. 异养硝化细菌 *Pseudomonas putida* YH 的脱氮特性及降解动力学[J]. *环境科学*, 2019, 40(4): 1892-1899.
Wang X H, Yang L, Ren Y X, *et al.* Nitrogen removal by heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas putida* YH and its kinetic characteristics[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(4): 1892-1899(in Chinese).
- [13] 杨垒, 陈宁, 任勇翔, 等. 异养硝化细菌 *Acinetobacter junii* NP1 的同步脱氮除磷特性及动力学分析[J]. *环境科学*, 2019, 40(8): 3713-3721.
Yang L, Chen N, Ren Y X, *et al.* Simultaneous nitrogen and phosphorus removal and kinetics by the heterotrophic nitrifying bacterium *Acinetobacter junii* NP1[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(8): 3713-3721(in Chinese).
- [14] 罗国芝, 陈家捷, 于文杰, 等. 一株新型异养硝化细菌处理养殖水的效果[J]. *环境工程学报*, 2016, 10(8): 4206-4212.
Luo G Z, Chen J J, Yu W J, *et al.* A new heterotrophic nitrifying bacteria effect of aquaculture water treatment[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(8): 4206-4212(in Chinese).
- [15] 陈猛, 李安章, 张明霞, 等. 一株异养硝化—好氧反硝

- 化菌的分离鉴定及其对养殖废水中氮的去除特性[J]. 农业资源与环境学报, 2020(37): 270-279.
- Chen M, Li A Z, Zhang M X, *et al.* Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying strain and its removal characteristics of nitrogen in breeding wastewater[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2020(37): 270-279(in Chinese).
- [16] 王越, 成钰, 李秋芬, 等. 不同氮源和环境因子对天津滩芽孢杆菌SLWX₂脱氮性能的影响[J]. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 133-140.
- Wang Y, Cheng Y, Li Q F, *et al.* Effects of different nitrogen sources and environmental factors on the nitrogen removal performance of *Bacillus hwajinpoensis* SLWX₂[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 133-140(in Chinese).
- [17] 方海洋, 王智, 李建华, 等. 异养硝化—好氧反硝化菌粪产碱杆菌的脱氮特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(2): 983-988.
- Fang H Y, Wang Z, Li J H, *et al.* Denitrifying characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain *Alcaligenes faecalis* No.4[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(2): 983-988(in Chinese).
- [18] 陈青云, 江林峰, 陈建奇, 等. 高效异养硝化细菌 *Alcaligenes faecalis* Ni3-1的分离及其脱氮特性研究[J]. 环境工程, 2015, 33(5): 48-53.
- Chen Q Y, Jiang L F, Chen J Q, *et al.* Isolation and NH₄⁺-N removal characteristics of a high-efficient heterotrophic nitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* Ni3-1[J]. *Environmental Engineering*, 2015, 33(5): 48-53(in Chinese).
- [19] 孙将, 李建章, 袁月祥, 等. 高效除氨氮异养硝化细菌的分离鉴定及其脱氮条件优化[J]. 农业工程学报, 2018, 34(S1): 35-41.
- Sun J, Li J Z, Yuan Y X, *et al.* Study on isolation and identification of heterotrophic nitrifying bacteria and optimal denitrification conditions[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, 34(S1): 35-41(in Chinese).
- [20] 黄廷林, 白士远, 张海涵, 等. 一株贫营养异养硝化—好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(12): 5665-5671.
- Huang T L, Bai S Y, Zhang H H, *et al.* Identification and denitrification characteristics of an oligotrophic heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(12): 5665-5671(in Chinese).
- [21] 邹艳艳, 张宇, 李明智, 等. 一株异养硝化—好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮活性研究[J]. 中国环境科学, 2016, 36(3): 887-893.
- Zou Y Y, Zhang Y, Li M Z, *et al.* Isolation and identification of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its denitrification ability[J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(3): 887-893(in Chinese).
- [22] 周国庆, 李华, 张东升, 等. 3株芽孢杆菌对刺参池塘有机物的降解效果及鉴定[J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(1): 19-23.
- Zhou G Q, Li H, Zhang D S, *et al.* Identification and evaluation of degradation of organic material pollutants in sea cucumber *Apostichopus japonicus* culture ponds by three *Bacillus* strains[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2016, 31(1): 19-23(in Chinese).
- [23] 黄石, 张翠绵, 胡栋, 等. 一株高效亚硝化芽孢杆菌的分离鉴定及脱氮特性研究[J]. 河北师范大学学报自然科学版, 2014, 38(2): 190-194.
- Huang S, Zhang C M, Hu D, *et al.* Isolation and identification of a nitrite bacteria and study of its denitrifying pathway[J]. *Journal of Hebei Normal University Natural Science Edition*, 2014, 38(2): 190-194(in Chinese).
- [24] 刘芳芳, 周德平, 吴淑杭, 等. 养殖废水中异养硝化细菌的分离筛选和鉴定[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(11): 2232-2237.
- Liu F F, Zhou D P, Wu S H, *et al.* Isolation and identification of heterotrophic nitrifiers from cultivation wastewater[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(11): 2232-2237(in Chinese).
- [25] 赵思琪, 任勇翔, 杨垒, 等. 异养硝化复合菌强化处理含氮废水脱氮性能研究[J]. 工业微生物, 2018, 48(1): 22-29.
- Zhao S Q, Ren Y X, Yang L, *et al.* Nitrogen removal characteristics of heterotrophic nitrifying compound bacteria by bioaugmentation for treatment of nitrogenous wastewater[J]. *Industrial Microbiology*, 2018, 48(1): 22-29(in Chinese).
- [26] 康传磊, 李秋芬, 张艳, 等. 三株异养硝化—好氧反硝化

- 细菌对圆斑星鲃养殖水质的净化效果[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 42-48.
- Kang C L, Li Q F, Zhang Y, *et al.* Purifying effect of three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains on the farming water of *Verasper variegates*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 42-48(in Chinese).
- [27] 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[J]. 水生态学杂志, 2013, 34(1): 96-100.
- 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(in Chinese).
- [28] 王金革, 王连生, 王常安, 等. 植物蛋白质饲料中添加巨大芽孢杆菌对杂交鲟幼鱼组织抗氧化能力和血清生化指标的影响[J]. 生物学杂志, 2018, 35(2): 38-42.
- Wang J G, Wang L S, Wang C A, *et al.* Effects of adding *Bacillus megaterium* to plant protein meal on tissue antioxidant capacity and serum biochemical indices of juvenile hybrid sturgeon[J]. Journal of Biology, 2018, 35(2): 38-42(in Chinese).
- [29] 李卫芬, 张小平, 宋文辉, 等. 养殖水体中添加芽孢杆菌对草鱼免疫和抗氧化功能的影响[J]. 中国水产科学, 2012, 19(6): 1027-1033.
- Li W F, Zhang X P, Song W H, *et al.* Effects of *Bacillus* preparation added to culture water on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(6): 1027-1033(in Chinese).

Effects of three heterotrophic nitrifying bacteria on water quality of *Oreochromis niloticus* pond with bottom aeration, and growth and antioxidative abilities of fish under zero water exchange condition

WANG Miao, LI Zhonghui, YI Mengmeng, LU Maixin*,
WANG Ruining, GAO Fengying, LIU Zhigang

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China)

Abstract: In order to study the effect of three heterotrophic nitrifying bacteria on water quality of tilapia pond with bottom aeration, 600 *Oreochromis niloticus* with initial body weight of (2.66±0.94) g were randomly divided into 20 ponds. Five treatments included control group 1 (with air stone), control group 2 (with bottom microporous aerator), *Rhodococcus pyridinivorans* (P1-2) group (with bottom microporous aerator), *Alcaligenes faecalis* (P3-1) group (with bottom microporous aerator), and *Bacillus megaterium* (P5-2) group (with bottom microporous aerator), and each group had four replicates. Heterotrophic nitrifying bacteria with a final concentration of 5×10^5 CFU/mL were added into the ponds every week. Water quality, growth and antioxidative abilities of fish were determined. The concentration of total nitrogen in water of all groups showed a continuous increasing trend during the experiment, while the accumulation of all indexes in the experiment groups were always lower than that in the control groups. The effect of P5-2 on improving the water quality of *O. niloticus* pond was the best. The accumulation of total nitrogen in pond water of P5-2 group was lower than that of control group 1 and control group 2 during the whole experiment. The accumulation of total nitrogen in pond water of P3-1 group was always lower than that of control group 2 during the whole experiment. The accumulation of total nitrogen in pond water of the P1-2 group was significantly lower than that of control group 1 and control group 2 at the 8th and 10th weeks. The accumulation of ammonia nitrogen in pond water of P5-2, P3-1 and P1-2 groups was lower than that of control group 1 and control group 2 during the whole experiment. The accumulation of nitrite nitrogen content in pond water of P5-2 group was significantly lower than that of control group 2 at the 2nd, 6th and 8th weeks. Adding heterotrophic nitrifying bacteria in pond water improved the antioxidative abilities of *O. niloticus*. Compared with control group 1, total superoxide dismutase (SOD) activity in serum of tilapia in P3-1 and P5-2 groups increased by 12.10% and 8.05%, respectively. Compared with control group 2, SOD activity in serum of *O. niloticus* in P3-1 and P5-2 groups increased by 21.25% and 16.87%, respectively. Compared with the control group 1, total antioxidant capacity (T-AOC) activity in serum of *O. niloticus* in P1-2, P3-1 and P5-2 groups increased by 82.78%, 98.68% and 245.70% respectively. Compared with control group 2, T-AOC activity in serum of *O. niloticus* in P3-1 and P5-2 groups increased by 1.69% and 76.95%, respectively. The results showed that adding heterotrophic nitrifying bacteria into pond could effectively improve the water quality and the antioxidative abilities of *O. niloticus*, but had no effect on the growth of *O. niloticus*.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *Rhodococcus pyridinivorans*; *Alcaligenes faecalis*; *Bacillus megaterium*; pond; water quality; antioxidative ability

Corresponding author: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-46); Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2019A1515111046); Special Funds for Promoting Economic Development in Guangdong Province (Yue Nong 2019B13)