

养殖水体高效氨氮脱除菌的分离及脱除特性研究

侯颖^{1a, 2}, 徐建强^{1b}, 孙军德²

(1 河南科技大学 a 食品与生物工程学院, b 林学院, 河南 洛阳 471003;

2 沈阳农业大学 土地与环境学院, 辽宁 沈阳 110161)

[摘要] 利用以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为惟一氮源的选择性培养基,从养鱼池塘水中分离筛选到1株高效氨氮脱除菌X2,当氨氮初始质量浓度为 50 mg/L 时,该菌株在24 h内的氨氮脱除率可达95%以上。初步鉴定该菌株为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),同时该菌株还具有硝酸和亚硝酸还原能力。对X2菌株的氨氮脱除特性进行初步研究结果表明,该菌株的生长与氨氮脱除同步进行;其脱除氨氮的最适温度和pH值分别为30℃和7.0;当氨氮初始质量浓度在 50 mg/L 以下时,X2菌株基本可将培养基中的氨氮完全脱除。

[关键词] 养殖水体;氨氮脱除菌;巨大芽孢杆菌;氨氮脱除率

[中图分类号] X131.2; X172

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0136-05

随着水产养殖业的集约式发展,养殖水体的污染问题越来越严重,特别是氨氮污染。近几年来,不断发生的养殖生物氨氮中毒事件给水产养殖业带来了严重的经济损失^[1]。如何解决养殖水体中的氨氮污染问题,已成为净化养殖水质的研究热点。目前,用来处理养殖水体氨氮污染及防治养殖生物氨氮中毒的方法主要有物理法、化学法和生物法3种^[2]。传统的物理法及化学法虽然见效快,但投入较大,且容易引起二次污染^[3],而生物法被认为是未来最有潜力、最有发展前景的方法,这是因为生物法在调节养殖水体水质的同时不会造成二次污染,且对养殖水体中的生态平衡还能起到一定的调节作用。本试验通过对养鱼池塘水中氨氮脱除菌的分离筛选及其脱除特性的初步研究,获得能脱除养殖水体氨氮的高效菌株,为养殖水体的氨氮污染问题提供了一种更为安全有效的防治措施。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

本试验的高效氨氮脱除菌由沈阳市东陵区后陵养鱼池塘水中分离得到。

1.2 培养基

富集培养基:葡萄糖5.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g,

NaCl 2.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, K_2HPO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.2~7.4;分离培养基:富集培养基加质量分数2%琼脂;菌种活化培养基:葡萄糖5.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 g, NaCl 1.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.2~7.4;筛选培养基:除其中添加质量浓度为 50 mg/L 的氨氮外,其余物质及其含量同活化培养基。各培养基均在121℃条件下灭菌15 min。

1.3 氨氮脱除菌的分离与筛选

量取10 mL水样,接入装有100 mL富集培养基的250 mL三角瓶中,于28℃下摇床培养7 d,且每隔1 d向其中加入 50 g/kg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液1 mL,以淘汰不能以 NH_4^+ 为惟一氮源的微生物。吸取富集培养液1 mL,用无菌水制成 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ..., 10^{-9} 的稀释液,再分别吸取0.1 mL 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 稀释液在分离培养基上涂平板,置28℃培养,观察氨氮脱除菌的生长情况。选取菌落大、数量多的氨氮脱除菌接种到活化培养基中进行活化培养。

吸取10 mL活化培养菌液,转入离心管中,在3 000 r/min条件下离心10 min,去除上清液;再用10 mL生理盐水洗涤沉淀,混匀,再次离心;如此重复3次,以除去活化培养基中的氨氮。最后用10 mL

· [收稿日期] 2005-11-08

[作者简介] 侯颖(1976-),女,辽宁海城人,讲师,主要从事环境微生物学研究。E-mail: houying76@126.com

生理盐水洗涤沉淀, 接入装有100 mL 筛选培养基的三角瓶中, 28 ℃ 摇床培养24 h。吸取10 mL 筛选培养液于3 000 r/min 下离心10 min, 去除菌体。用靛酚蓝分光光度法^[4]测定上清液中氨氮浓度, 同时测定未接菌筛选培养基中氨氮的初始质量浓度, 计算氨氮脱除菌的氨氮脱除率。选取脱除能力最强的氨氮脱除菌作进一步研究。

1.4 高效氨氮脱除菌的初步鉴定

根据文献[5]对1.3中分离筛选到的高效氨氮脱除菌的形态特征、生理生化特征等进行初步鉴定。

1.5 高效氨氮脱除菌生长量及氨氮质量浓度测定

取1.3中得到的高效氨氮脱除菌培养18~24 h 活化培养液, 并以未接种的活化培养液作为空白, 在380~600 nm 波长下, 对其最大吸收波长进行扫描^[6]。然后将高效氨氮脱除菌接入筛选培养基中, 28 ℃ 摇床培养24 h, 从接种后开始每隔2 h 取样1次, 每次取10 mL, 首先在其最大吸收波长下测定其OD 值, 然后离心取上清液测定氨氮质量浓度, 以时间为横坐标, OD 值与氨氮质量浓度为纵坐标作图。

1.6 温度对氨氮脱除菌脱除氨氮能力的影响

在氨氮初始质量浓度为50 mg/L, pH = 7.0 和接种量为100 mL/L 的条件下, 将接种后的筛选培养基分别在10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ℃ 环境中摇床培养24 h 后, 测定氨氮质量浓度, 计算氨氮脱除率。

1.7 pH 对氨氮脱除菌脱除氨氮能力的影响

在氨氮初始质量浓度为50 mg/L 和接种量为100 mL/L 的条件下, 配制pH 分别为4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 的筛选培养基, 接种后在28 ℃ 下摇床培养24 h 后, 测定氨氮质量浓度, 计算氨氮脱除率。

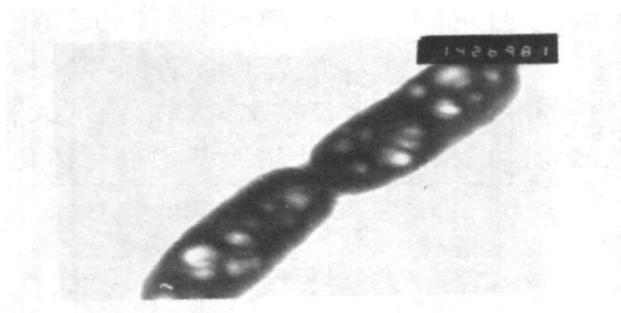


图1 X2菌株电镜照片(27 000 ×)

Fig 1 Photo of electron microscope of X2 Strain(27 000 ×)

根据X2菌株的生理生化特征(表2), 依据文献[5]和[7], 初步鉴定X2菌株为巨大芽孢杆菌

1.8 氨氮初始质量浓度对氨氮脱除菌脱除氨氮能力的影响

在温度为28 ℃、pH = 7.0 和接种量为100 mL/L 的条件下, 将菌液接种到氨氮初始质量浓度分别为10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 mg/L 的筛选培养基中, 摇床培养24 h 后, 测定氨氮质量浓度, 计算氨氮脱除率。

2 结果与分析

2.1 氨氮脱除菌的分离与筛选

通过富集分离, 从所采水样中共分离到5株生长良好, 且菌落直径在5 mm 以上的氨氮脱除菌, 分别编号为X1, X2, X3, X4 和X5, 这5株菌在氨氮初始质量浓度为50 mg/L 时的氨氮脱除率见表1。

表1 5株氨氮脱除菌的氨氮脱除率

Table 1 Removing rate of ammonianitrogen of five strains

测试菌株 Tested strain	氨氮脱除率 Removement rate of ammonia-nitrogen	测试菌株 Tested strain	氨氮脱除率 Removement rate of ammonia-nitrogen
X1	78.40	X4	79.70
X2	95.30	X5	87.90
X3	82.60		

由表1可知, 5株氨氮脱除菌均具有较强的氨氮脱除能力, 其中X2菌株的氨氮脱除率可达95%以上, 因而将X2菌株作为进一步研究的对象。

2.2 X2菌株的初步鉴定

X2菌株的菌落为圆形, 乳白色, 边缘整齐, 不透明; 其个体为长杆状(图1), 革兰氏染色阳性, 有芽胞(图2, 其中色浅者为芽胞, 色深者为菌体), 大小为2.3 μm × 5.3 μm。

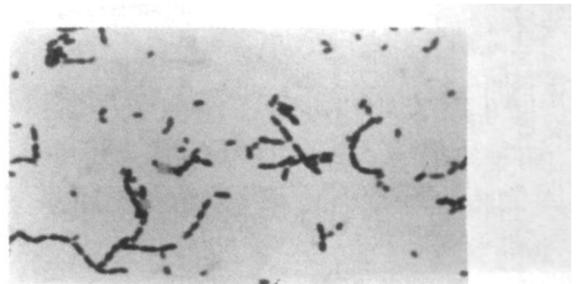


图2 X2菌株芽孢染色显微观察结果(1 600 ×)

Fig 2 Spore stain of X2 strain(1 600 ×)

(*Bacillus megaterium*)。由表2还可知, 该菌株具有硝酸和亚硝酸还原能力, 说明X2菌株可去除养殖水

体中多种形式的氮。

表2 X2 菌株的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of X2 strains

测试项目 Tested item	测试结果 Tested result	测试项目 Tested item	测试结果 Tested result	测试项目 Tested item	测试结果 Tested result
过氧化氢酶 Catalase	+	硝酸还原 Nitrate deoxidization	+	甘露醇 Mannitol	+
甲基红试验 Methyl red test	+	亚硝酸还原 Nitrite deoxidization	+	苯甲酸 Benzoic acid	+
V-P 试验 Voges-Proskauer test	-	氨的产生 Ammonia produce	+	苹果酸 Malic acid	+
淀粉水解 Starch hydrolyzation	+	反硝化作用 Denitrification	-	柠檬酸 Citric acid	-
纤维素水解 Cellulose hydrolyzation	-	硫化氢产生 Sulfureted hydrogen produce	-	碳酸钙 Calcium carbonate	-
明胶液化 Glutin liquefaction	+	脲酶试验 U rease test	-	乙酸 Acetic acid	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	+	葡萄糖 Glucose	+	草酸 Oxalic acid	+
甘露醇发酵 Mannitol fermentation	+	蔗糖 Sucrose	+	牛肉膏 Beef extract	+
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+	麦芽糖 Maltose	+	蛋白胨 Peptone	+
蔗糖发酵 Sucrose fermentation	+	淀粉 Starch	+	酵母膏 Yeast extract	+
乙醇发酵 Ethanol fermentation	-	甘油 Glycerine	+	硝酸钾 Potassium nitrate	+

注：“+”代表阳性，“-”代表阴性。

Note: “+” denote positive; “-” denote negative

2.3 X2 菌株生长量及氨氮质量浓度的变化

经扫描X2 菌株在420 nm 处具有最大吸收峰,因此在420 nm 处测定X2 菌株在不同培养时间的OD 值,结果见图3。图3 表明,X2 菌株在反应液中的适应时间很短,很快就进入对数生长期,在培养8 h 时即可达到最大生长量,此后生长量随时间的变化不大,即使在培养24 h 时生长量仍未出现明显的下降,表明X2 菌株可在较长时间内发挥氨氮脱除作用。由图3 还可见,在0~ 8 h 内,反应液中的氨氮质量浓度均呈线性下降,在8 h 后反应液中氨氮质量浓度继续呈下降趋势,但下降趋势平缓。对两种曲线进行比较发现,氨氮脱除菌生长量增长最快的时期亦是反应液中氨氮质量浓度下降最快的时期,表明

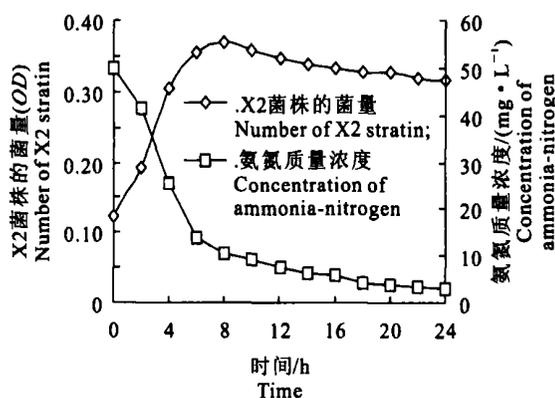


图3 X2 菌株的生长量和氨氮质量浓度随时间的变化

Fig. 3 Changes of number of X2 strain and the concentration of ammonia-nitrogen with time

2.5 pH 对X2 菌株脱除氨氮能力的影响

图5 表明,在酸性条件下,即pH 为4.0 和5.0 时

X2 菌株的生长与氨氮的脱除同步进行。

2.4 温度对X2 菌株脱除氨氮能力的影响

温度是影响微生物生长代谢的重要环境因子之一,不仅影响微生物的生长,还严重影响微生物对物质的吸收利用。由图4 可见,当温度低于30 ℃ 时,X2 菌株的氨氮脱除率随温度的升高而增加;而温度高于30 ℃ 后,氨氮脱除率反而随温度的升高而下降。这表明X2 菌株为中温性菌,其脱除氨氮的最适温度为30 ℃ 左右。这是由于微生物产生的酶具有最适温度,酶的活性在一定温度范围内随温度的升高而增加,但当温度超过其最适温度之后,酶活性会逐渐丧失,其所催化的酶促反应速率也相应下降^[2]。

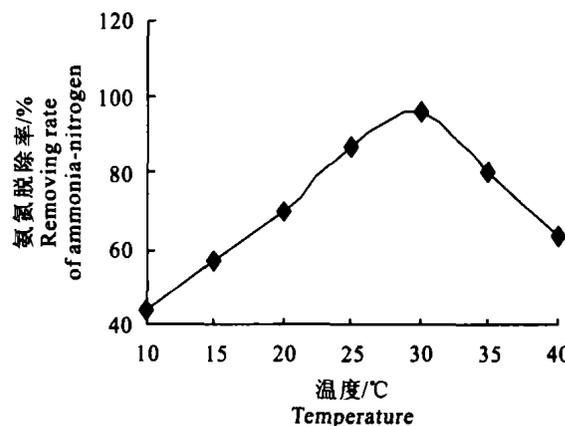


图4 温度对X2 菌株氨氮脱除率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on removing rate of ammonia-nitrogen of X2 strain

X2 菌株氨氮脱除率很低,均在20% 以下;而当pH 在6.0~ 9.0 时,其氨氮脱除率均较高,特别在pH 7.0

时,其氨氮脱除率在95%以上。说明pH对X2菌株脱除氨氮能力的影响较大,其生长和代谢均以中性或微碱性条件为好。这是因为当环境中氢离子浓度超过微生物酶的适应范围时,会引起微生物原生质膜的电荷变化,影响微生物对营养物质的吸收和酶的活性,进而影响酶促反应的速度^[8]。因此,在生物脱

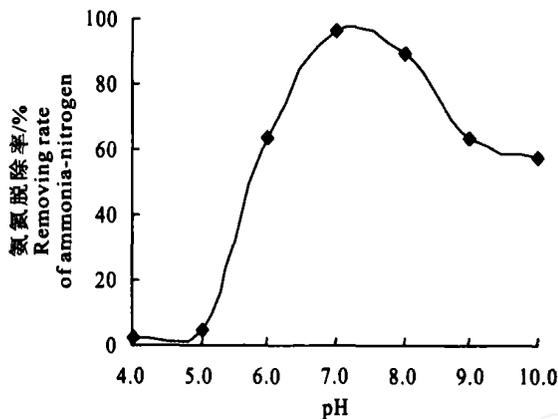


图5 pH对X2菌株氨氮脱除率的影响
Fig 5 Effect of pH on removing rate of ammonia-nitrogen of X2 strain

由图6可以看出,在氨氮初始质量浓度50 mg/L时,24 h内X2菌株的氨氮脱除率均达到95%以上,即基本可以将培养基中的氨氮全部脱除,但当氨氮初始质量浓度>50 mg/L时,其氨氮脱除率明显下降,当氨氮初始质量浓度为150 mg/L时,氨氮脱除率已降至30%以下。

氨氮初始质量浓度与X2菌株脱除氨氮总量的关系见表3。

表3 氨氮初始质量浓度与X2菌株脱除氨氮总量的关系
Table 3 Relationship between initial concentrations of ammonia-nitrogen and total ammonia-nitrogen of removal in X2 strain

氨氮初始质量浓度/(mg·L ⁻¹) Beginning mass concentration of ammonia-nitrogen	脱除氨氮总量/mg Total ammonia-nitrogen of removal
10	9.80
20	19.81
30	29.52
40	39.45
50	48.50
100	46.11
150	45.87

由表3可见,氨氮初始质量浓度50 mg/L时,X2菌株脱除的氨氮总量随氨氮初始质量浓度的增大而增加,当氨氮初始质量浓度>50 mg/L时,脱除的氨氮总量随氨氮初始质量浓度的增大而降低,表

除氨氮过程中,介质pH值的控制显得很重要。

2.6 氨氮初始质量浓度对X2菌株脱除氨氮能力的影响

氨氮初始质量浓度对X2菌株脱除氨氮能力的影响见图6。

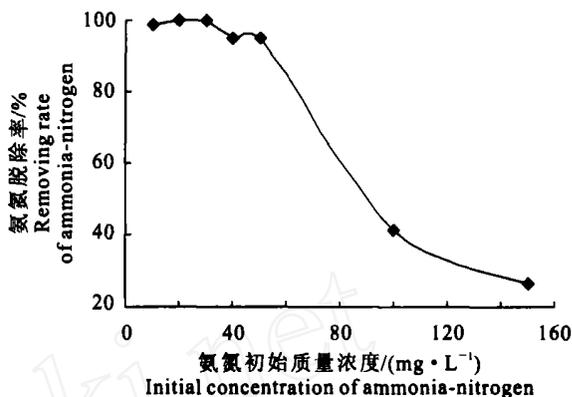


图6 氨氮初始质量浓度对X2菌株氨氮脱除率的影响
Fig 6 Effect of initial mass concentration on removing rate of ammonia-nitrogen of X2 strain

明一定数量微生物对氨氮的脱除量是有限的,当氨氮质量浓度超出其所能脱除的最大范围时,微生物就不能再脱除过多的氨氮,此外氨氮质量浓度过高时,会对微生物产生毒害作用,抑制其生长繁殖,进而影响其脱除氨氮的能力。

3 结论与讨论

本研究利用以(NH₄)₂SO₄为惟一氮源的选择性培养基,从养殖水体中分离到5株氨氮脱除菌,其中X2菌株在氨氮初始质量浓度为50 mg/L时,24 h内的脱除率可达95%以上;经初步鉴定X2菌株为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),同时该菌株还具有硝酸和亚硝酸还原能力,因此该菌株可去除养殖水体中多种形式的氮。对X2菌株氨氮脱除特性的研究表明,该菌株的生长与氨氮脱除是同步进行的,且X2菌株可在较长时间内发挥脱除作用;其脱除氨氮的最适温度和pH分别为30和7.0;当氨氮初始质量浓度在50 mg/L以下时,X2菌株基本可以将培养基中的氨氮完全脱除。

众所周知,养殖水体中的氨氮浓度过高时,对养殖生物有一定的毒害作用。研究表明^[9-10],养殖水体中NH₃-N及NO₂-N浓度过高是引起鱼虾致病的直接或间接因素。因此,对养殖水体中氨氮质量浓度的控制一直是水产科研工作者研究和探索的问题之

一。有研究表明,芽孢杆菌具有降低养殖水体中氨氮、亚硝酸盐含量^[11-12]及反硝化作用的能力^[13],可有效去除养殖水体中的氮;另外芽孢杆菌还可对养殖生物产生益生保护作用,增强其对病害的抵抗力^[14-15]。富丽静等^[16]研究表明,以芽孢杆菌为主的复合微生物制剂可显著降低池塘水中的氨氮总量及

分子氮浓度。这表明应用本研究筛选到的巨大芽孢杆菌去除养殖水体的氨氮,改善养殖水体环境具有广泛的应用前景。该菌株虽然在实验室条件下达到了理想的脱氮效果,但要将其应用于生产中还需对其是否产生毒素及其脱除机理、使用方法等作进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘社奇,刘诗训 养殖池塘含氮物质中毒及预防[J]. 科学养鱼, 2002(7): 45.
- [2] 吴伟,陈家长,瞿建宏,等 诺卡氏菌对养殖水体中氨氮的降解特性研究[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版, 2000, 19(1): 21-24.
- [3] 程开敏,龚 昀,齐雪娟 (亚)硝化细菌对水体中的氮化合物转化效果的研究[J]. 粤海通讯, 2002(3): 32-37.
- [4] 鲁如坤 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 129-130.
- [5] 东秀珠,蔡妙英 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] 沈 萍,范秀容,李广武 微生物学实验[M]. 3版 北京: 高等教育出版社, 1999: 95-97.
- [7] 中国科学院南京土壤研究所微生物室 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 90-152.
- [8] 耿金菊,刘登如,华兆哲,等 好氧脱氮微生物的混合培养条件[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(1): 78-82.
- [9] 李月萍 氨氮对鱼类的影响[J]. 内陆水产, 1998, 23(4): 26.
- [10] 刘梦霞,刘 岗 水产养殖生产中水质的监测与控制[J]. 海水养殖, 2000(1): 41-46.
- [11] 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[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 43-47.
- [12] 陈红菊,岳永生,丁 雷,等 生物净化剂对养殖水体亚硝酸盐含量影响的研究[J]. 淡水渔业, 2003, 33(1): 16-18.
- [13] 刘 波,刘文彬 微生物对水产养殖环境的生物修复作用[J]. 淡水渔业, 2003, 33(1): 50-53.
- [14] Kozasa M. Toyocerin (*B acillus toyoi*) as growth promotor for animal reeding[J]. M icrobial Alim ent Nutr, 1986, 4: 121-135.
- [15] Rengpipat S, Phianphik W. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *penaeus monodon* survival and growth[J]. A quacult, 1998, 167: 301-313.
- [16] 富丽静,王 雷,宋文华 复合微生物在高密度主养鲫池塘中的应用[J]. 水产科学, 2002, 21(1): 23-25.

Studies of isolation and removal characteristics of high effective microorganisms with ammonia-nitrogen removed in aquatic water

HOU Ying^{1a,2}, XU Jian-qiang^{1b}, SUN Jun-de²

(1 a. Food and Biological Engineering College, b. Forestry College, He'nan University of Science & Technology, Luoyang, Henan 471003, China; 2 Land and Environment College of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: A highly effective microorganism with the removal of ammonia-nitrogen X2 has been isolated and screened from a fishpond by the selected culture with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as exclusive nitrogen source. The removing rate of ammonia-nitrogen of X2 is over 95% within 24 h when the beginning mass concentration of ammonia-nitrogen is 50 mg/L. X2 strain is identified *Bacillus megaterium* primarily and it can reduce nitrate and nitrite simultaneously. The removal characteristics of X2 have been studied, and the results show that: the growth of X2 strain and the removal of ammonia-nitrogen are synchronous; the optimum temperature and pH of X2 strain with ammonia-nitrogen removed are 30 and 7.0 respectively; ammonia-nitrogen of culture medium can be removed completely when the initial mass concentration of ammonia-nitrogen is under 50 mg/L.

Key words: aquatic water; microorganisms with ammonia-nitrogen removed; *Bacillus megaterium*; removing rate of ammonia-nitrogen