

高效硝化与反硝化功能菌株的分离筛选 及其性能研究*

郭少鹏^{1,2} 江兴龙^{1,2} 王泽旭^{1,2} 魏金生^{1,2}

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心 厦门 361021)

摘要 本研究利用选择培养基从鳗鲡精养殖池和循环水水处理系统中分离筛选出二株脱氮细菌,应用 16S rRNA 分子生物学鉴定,确定菌株的种属。菌株 NB-1 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、菌株 DB-1 是恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。对菌株硝化及反硝化作用性能的研究结果表明:菌株 NB-1 具有良好的亚硝化及硝化作用性能,在投菌量为 0.025%时,氨氮降解率为 69.5%,亚硝酸盐氮降解率为 99.2%。菌株 DB-1 在厌氧条件下表现出良好的反硝化作用性能,最适投菌量为 0.6%,最佳 C/N 为 12,对硝酸盐氮的降解率为 94.6%,对总氮的降解率为 64.0%。因此本研究筛选出的二株脱氮细菌可以广泛应用于养殖水体水质调控,具有良好的市场应用前景。

关键词 硝化作用;反硝化作用;C/N;功能菌株

中图分类号 S949;S955 doi: 10.11693/hyhz20200400106

氮元素在水中的积累是养殖水体恶化的主要原因,其中氨氮和亚硝态氮对养殖动物具有很强的毒性(易弋等,2011)。氨氮会影响养殖动物体内的酶反应和细胞膜的稳定,还会影响鳃对氧的传递性,破坏水生动物的排泄系统和渗透平衡(薛菲菲,2014)。亚硝酸盐氮是水环境生态系统循环中的一种中间产物(王鸿泰等,1989;余瑞兰等,1999;高明辉等,2008),是诱发水产动物暴发性疾病的重要环境因子(凌歌,2010)。而在局部缺氧环境中,硝酸盐氮会被转化为亚硝酸盐氮,亚硝酸盐氮的致癌性使得原本毒性很小的污染物毒性增强,造成水质恶化,伴随着滋生大量的病毒、细菌、浮游生物等微生物(邵可,2017)。传统的生物脱氮过程分为硝化作用($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$)和厌氧反硝化作用($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)两个过程,需要分别在好氧和厌氧条件下完成(Khardenavis *et al.*, 2007; Takenaka *et al.*, 2007)。反硝化细菌是去除环境中对生物有毒害作用亚硝酸盐氮的重要菌群,通过好氧或厌氧反硝化过程将硝酸盐

氮或亚硝酸盐氮转化成 N_2O 或 N_2 ,从根本上解决水体中氮污染的问题(何腾霞等,2015; Guo *et al.*, 2016)。由集美大学江兴龙教授发明的生物膜净水栅(专利号 CN201120032516.6)已广泛应用于改善鳗鲡及对虾养殖水体水质,在凡纳滨对虾养殖池塘中设置生物膜净水栅,结果表明水体的氨氮和亚硝酸盐氮等浓度显著降低,水质得到显著改善,达到了节水减排、增产增收的效果(江兴龙等,2013);通过使用生物膜净水栅建立室内工厂化花鳗鲡生物膜低碳养殖新模式,结果表明减少换水量 85%,氨氮和亚硝酸盐氮等浓度显著降低,达到了节水减排、改良水质、提高单产的效果(尼逸伦,2015)。进入 21 世纪以来,循环水养殖模式的相关研究取得突破性的进展,循环水处理工艺与养殖种类日益丰富,并逐渐规模化、工厂化。工厂化循环水养殖设备主要由养殖桶、集水池、反冲过滤器、生物滤池等组成(王峰等,2013)。循环水养殖系统不仅可以显著改善养殖水体水质,而且可以将养殖水的循环率提高到 95%以上(朱峰,2015)。生

* 国家重点研发计划“池塘尾水生态治理技术及工程设施研发”项目,2019YFD0900302 号;福建省科技厅区域发展项目,2016N3002 号。郭少鹏,硕士研究生, E-mail: 736890393@qq.com

通信作者: 江兴龙, 博士, 教授, E-mail: xinlongjiang@jmu.edu.cn

收稿日期: 2020-04-02, 收修改稿日期: 2020-04-29

物膜净水栅及循环水水处理系统的净水原理,除了物理过滤之外,微生物处理是其主要的作用方式。在养殖过程中,生物膜净水栅的生物膜和循环水水处理系统的生物滤池中存在大量硝化细菌与反硝化细菌,但罕有研究报道对脱氮细菌开展筛选、分离、扩增和强化,以提高其脱氮性能。

本研究通过应用选择培养基的方法,分别从鳗鲡精养殖水体的生物膜净水栅和循环水水处理系统生物滤池生物填料的生物膜上,分离筛选出具有高效硝化与反硝化功能的两个菌株 NB-1 和 DB-1,对其进行菌种鉴定及硝化与反硝化性能的研究,探索提高脱氮效率的方法,为提高养殖水体水质调控效果及水处理系统的脱氮效率提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本试验中的硝化细菌菌株 NB-1、厌氧反硝化细菌菌株 DB-1 分别分离筛选于鳗鲡精养殖水体中设置的生物膜净水栅及鳗鲡循环水水处理系统反硝化处理单元的生物填料。

1.1.2 培养基 应用硝化细菌培养基(周鲜娇等, 2016)筛选生物膜净水栅生物膜上的硝化细菌。应用厌氧反硝化细菌培养基(蒋欣然, 2017)筛选生物填料生物膜上的厌氧反硝化细菌。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选、分离与鉴定

1.2.1.1 硝化细菌的筛选分离与菌种鉴定 用无菌剪刀剪下 10g 生物膜净水栅尼龙丝,并装入盛有 100mL 灭菌水的蓝盖瓶中,超声波震荡 30min 后获得菌悬液。参考类似研究方法(熊焰等, 2010; 李永芹等, 2013),将菌悬液按 10%比例接入已灭菌的亚硝酸盐富集培养基中, 30°C, 180r/min 恒温振荡培养,每天加入 5%的亚硝酸钠溶液 2mL,富集培养 1 周,用平板稀释法分离纯化。取分离纯化后得到的单菌落菌株置于装有 50mL 普通肉汤培养基中, 80°C 水浴加热处理 30min,杀死微生物营养体细胞。然后 30°C, 180r/min 恒温振荡培养 24h,将增殖培养液置于 80°C 水浴加热 30min,再次杀死不形成芽孢的营养体细胞。取 1mL 处理液以梯度稀释法分别稀释到 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 等。分别取 0.1mL 菌液涂布于普通肉汤固体培养基上,于 30°C 恒温培养箱中培养 24h 后,挑选单菌落,划线接种至普通肉汤固体培养基中培养 24h,并分离纯化三次。接种至固体斜面培养基中培养并 4°C 保藏,备用。

挑取菌株单菌落接种在 LB 液体培养基中 30°C 条件下 170r/min 振荡培养 12h 后,离心收集菌体,利用细菌 DNA 提取试剂盒(天根生化,北京)提取菌株的基因组 DNA,利用通用引物 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增,PCR 反应条件为: 95°C 预变性 5min, 30 个循环(95°C 1min, 53°C 1min, 72°C 1.5min), 72°C 延伸 10min。用胶回收试剂盒(天根生化,北京)纯化大约 1.5kb 的目的片段,将纯化后的 PCR 产物送至美吉生物进行测序,将所得序列经 NCBI 网站的 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行在线比对分析,利用 MEGA X 软件中的 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树,确定菌株的种属。

1.2.1.2 厌氧反硝化细菌的筛选分离与菌种鉴定 取 10g 鳗鲡循环水水处理系统生物滤池底部(环境溶解氧低于 1.0mg/L)的生物填料,加入装有 100mL 富集培养液体培养基的灭菌蓝盖瓶中,在低温摇床上 20°C 培养 48h 后取菌液,每 24h 测定培养基中硝酸盐氮浓度,当硝酸盐氮转化达 90%以上时,菌液用于细菌分离。通过系列稀释法和平板划线法从富集后的菌液中分离反硝化细菌,并选取 BTB 培养基上菌落周围出现蓝色晕圈的菌株,在分离纯化培养基上进行划线分离,如此数次操作,直到单菌落长出。

厌氧反硝化细菌的基因组 DNA 提取、基因组测序、菌种鉴定步骤同 1.2.1.1。

1.2.2 菌株的硝化及反硝化性能研究

1.2.2.1 硝化细菌的硝化性能研究 挑取菌株 NB-1 单菌落接于灭菌 LB 液体培养基中, 30°C 条件下 170r/min 振荡培养 24h。在 1L 养殖废水中接种 0.025% NB-1 菌液,另一组同时还添加红糖,定时采集水样离心取上清液测定 24h 氨氮和 COD_{Mn} 浓度的变化情况。

按 0.025%的接种量接种菌液于 1L 养殖废水中后培养 24h,定时采集水样离心取上清液测定亚硝酸盐氮的降解率。

在 1L 养殖废水中接种 0.025% NB-1 菌液,并添加梯度浓度(800, 400, 200, 100, 10, 1, 0mg/L)的红糖,测定亚硝酸盐氮降解率的变化情况。

1.2.2.2 厌氧反硝化细菌的反硝化性能研究 挑取菌株 DB-1 单菌落接于灭菌 LB 液体培养基中, 30°C 条件下 170r/min 振荡培养 24h 后,按照 1%的接种量接于 1L 养殖废水中进行厌氧培养 24h,定时采集水

样离心取上清液,测定氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、总氮的浓度,并测算降解率。以对菌株生长和脱氮影响比较显著的接种量、C/N 和硝酸盐氮浓度为单因素变量,对菌株 DB-1 的脱氮条件进行优化。接种量分别按照 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%和 1%的比例添加菌液;C/N 利用红糖将 1L 试验水体的 C/N 调整为 4、8、12、16、20;硝酸盐氮浓度则将 1L 试验水体的硝酸盐氮浓度设置为 5、10、15、20、25mg/L,菌株 DB-1 的接种量为 0.6%,试验水体的本底养殖废水 C/N 为 12。脱氮优化试验的测量指标为硝酸盐氮和总氮。

1.2.3 水质检测方法 氨氮的测定用纳氏试剂光度法,亚硝酸盐氮的测定用分光光度法,硝酸盐氮的测定用紫外分光光度法,总氮的测定用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法,COD_{Mn} 测定用高锰酸钾法(国家环境保护总局等,2002)。

1.2.4 数据统计与分析

$$D = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%, \\ C/N = C_{TC} / C_{TN}$$

式中, D 为水质因子(例如氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、总氮、高锰酸盐指数)的降解率(%); C_0 为水质因子起始浓度(mg/L); C_1 为水质因子终浓度(mg/L)。C/N 为碳氮比; C_{TC} 为高锰酸盐指数浓度(COD_{Mn}) (mg/L); C_{TN} 为总氮浓度(TN) (mg/L)。

采用 Excel 软件对试验数据进行统计分析,并作图。应用 SPSS 22.0 统计分析软件进行分析,视情况对处理组与对照组的试验数据进行差异显著水平的单因素方法分析或 t -test 检验。

2 结果

2.1 菌株的筛选及鉴定

2.1.1 菌株 NB-1 的筛选及鉴定 经富集培养、平板初筛和摇瓶培养测定菌株脱氮效率的复筛,最终

确定一株硝化细菌菌株,编号为 NB-1。以菌株 NB-1 的基因组 DNA 为模板,以 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经测序后获得 1412bp 的碱基序列,将该序列在 NCBI 网站进行 BLAST 同源序列比对,菌株 NB-1 与 *Bacillus* 相似性高达 99.93%,利用 MEGA X 构建的系统发育进化树见图 1。

2.1.2 菌株 DB-1 的筛选及鉴定 经富集培养、平板初筛和摇瓶培养测定菌株脱氮效率的复筛,最终确定一株厌氧反硝化细菌菌株,编号为 DB-1。以菌株 DB-1 的基因组 DNA 为模板,以 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经测序后获得 1389bp 的碱基序列,将该序列在 NCBI 网站进行 BLAST 同源序列比对,菌株 DB-1 与 *Pseudomonas putida* JCM 13061 相似性高达 100%,利用 MEGA X 构建的系统发育进化树见图 2。

因此,确定已筛选的菌株 NB-1 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),菌株 DB-1(*Pseudomonas putida*)是恶臭假单胞菌。

2.2 菌株 NB-1 的硝化作用性能

2.2.1 亚硝化及硝化作用的能力 开展水体氨氮降解对照试验,按 0.025%的接种量接种菌株 NB-1 到 1L 养殖废水中(氨氮浓度为 2.28mg/L,DO 浓度为 5.0mg/L),另一组同时还添加 100mg/L 红糖,对照组为不接种菌及不加红糖。结果见图 3,24h 添加菌液组的氨氮浓度降至 0.695mg/L(降解率 69.5%),添加菌液和红糖组的氨氮浓度降至 0.208mg/L(降解率 90.8%),而对照组的氨氮浓度降至 2.18mg/L(降解率 4.39%)。添加菌液组和添加菌液红糖组的氨氮浓度分别极显著低于对照组 43.8%和 52.0%($P < 0.01$)。表明菌株 NB-1 具有亚硝化作用性能,进行了亚硝化反应: $\text{NH}_4^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$ 。

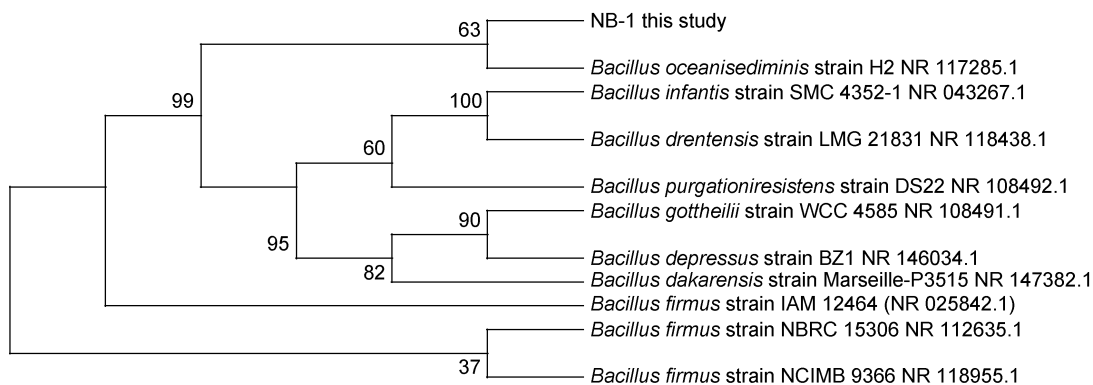


图 1 菌株 NB-1 基于 16S rRNA 基因序列的的系统发育进化树
Fig.1 Phylogenetic tree of NB-1 strain based on 16S rRNA gene sequence

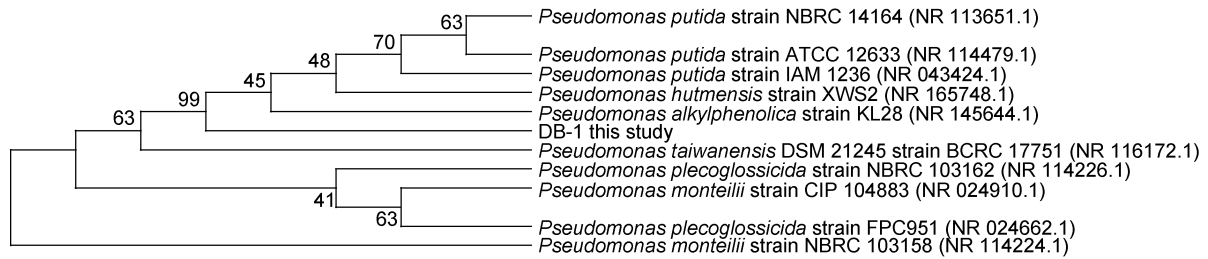


图 2 菌株 DB-1 基于 16S rRNA 基因序列的的系统发育进化树
 Fig.2 Phylogenetic evolutionary tree of DB-1 strain based on 16S rRNA gene sequence

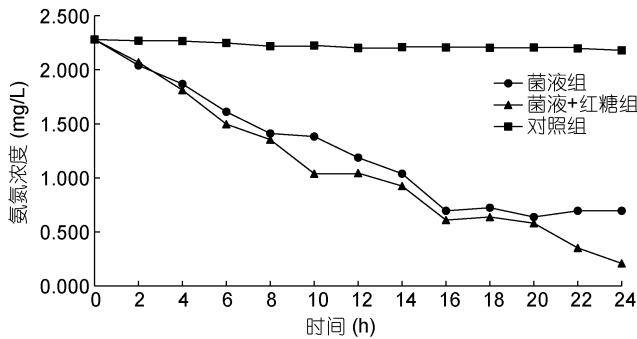


图 3 24h 氨氮降解情况

Fig.3 Ammonia nitrogen concentration degradation in 24h

应用菌株 NB-1 开展水体亚硝酸盐氮降解对照试验, 按 0.025% 的接种量接种菌株 NB-1 到 1L 养殖废水中(亚硝酸盐氮浓度为 2.28mg/L, DO 浓度为 5.0mg/L), 对照组不接种菌。结果见图 4, 亚硝酸盐氮的浓度在第 12h 时低于 0.2mg/L, 第 16h 时低于 0.05mg/L, 至 24h 亚硝酸盐氮一直保持极低的状态(降解率为 99.2%); 对照组的亚硝酸盐浓度在 24h 时为 2.144mg/L(降解率为 6.32%)。添加菌液组的亚硝酸盐氮浓度极显著低于对照组 57.1% ($P < 0.01$)。表明菌株 NB-1 具有良好的硝化作用性能, 发生硝化反应: $\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ 。综上, 表明菌株 NB-1 具有良好的

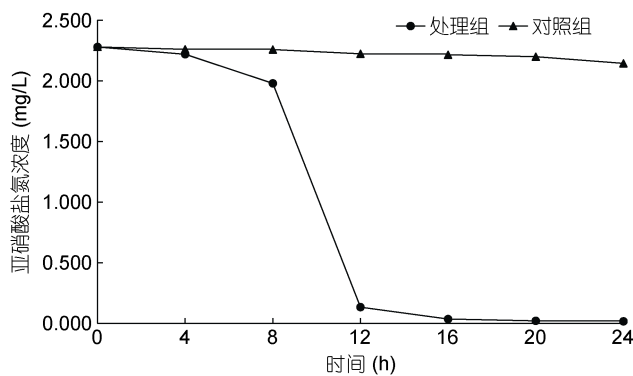


图 4 24h 亚硝酸盐氮降解情况

Fig.4 Degradation of nitrite nitrogen concentration in 24h

亚硝化作用及硝化作用的功能, 在投菌量为 0.025% 时, 24h 对氨氮和亚硝酸盐氮的降解率为 69.5% 和 99.2%。

2.2.2 菌株 NB-1 的自养型特性 为确定菌株 NB-1 是自养菌或异养菌, 应用菌株 NB-1 开展水体 COD_{Mn} 降解对照试验, 按 0.025% 的接种量接种菌株 NB-1 到 1L 养殖废水中(COD_{Mn} 浓度为 5.3mg/L, 低碳组), 另一组处理同时添加 100mg/L 红糖为高碳组, 对照组不做处理。检测 24h 的 COD_{Mn} 浓度的变化情况。结果见图 5, 高碳组的 COD_{Mn} 为 32.00mg/L, 24h COD_{Mn} 逐渐降低至 18.09mg/L。而低碳组 COD_{Mn} 浓度无明显变化, 终浓度仍为 5.16mg/L, 对照组的 COD_{Mn} 和低碳组无显著差异。表明菌株 NB-1 没有利用有机物, 属于自养菌。而在高碳组中, 高浓度的有机碳源导致水体中的异养菌数量迅速扩增, 通过同化利用有机物而降低了 COD_{Mn} 浓度。综上, 结果表明, 菌株 NB-1 属自养菌, 进行硝化反应时不消耗水中的碳源。

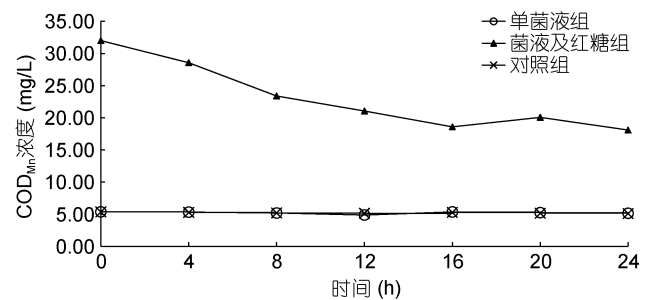


图 5 24h COD_{Mn} 变化情况

Fig.5 Variation of COD_{Mn} concentration in 24h

2.2.3 补充碳源对硝化作用的影响 图 3 的试验结果, NB-1 菌液和红糖组的氨氮降解率高于 NB-1 菌液组, 表明高浓度的有机碳源导致水体中的异养菌数量迅速扩增, 异养菌同化利用氨氮而进一步降低了氨氮浓度。应用菌株 NB-1 开展 16h 水体亚硝酸盐

氮降解试验, 在 1L 养殖废水中, 添加菌株 NB-1 和梯度浓度的红糖(红糖浓度由高到低分别编号为 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅、A₆、A₇、A₈ 组, A₈ 组为不添加菌液的对照组)。碳源红糖浓度对亚硝酸盐降解率的影响见表 1 及图 6, 8h 亚硝酸盐的降解率, A₁、A₂、A₄ 组显著高于 A₃ 组, A₃ 组又显著高于 A₅ 组, A₅ 组又显著高于 A₆ 组, A₆ 组又显著高于 A₇ 组, A₇ 组又显著高于 A₈ 组; 16h 亚硝酸盐的降解率, A₁、A₂、A₃ 组均显著高于 A₄、A₅、A₆、A₇ 组, 它们又显著高于 A₈ 组。

表 1 红糖浓度对亚硝酸盐氮降解率的影响

Tab.1 Effect of brown sugar concentration on nitrite nitrogen degradation rate

组别	亚硝酸盐氮起始浓度 (mg/L)	8h 浓度(mg/L)	16h 浓度(mg/L)	8h 降解率(%)	16h 降解率(%)
A ₁	2.281±0.005 ^a	0.097±0.002 ^a	0.010±0.002 ^a	96.1±0.4 ^a	99.6±0.1 ^a
A ₂	2.284±0.002 ^a	0.045±0.002 ^b	0.015±0.003 ^a	97.7±0.4 ^a	99.4±0.1 ^a
A ₃	2.278±0.002 ^a	0.709±0.013 ^c	0.012±0.004 ^a	69.1±0.9 ^b	99.5±0.2 ^a
A ₄	2.276±0.001 ^a	0.058±0.009 ^b	0.023±0.003 ^a	97.4±1.1 ^a	99.0±0.2 ^b
A ₅	2.276±0.004 ^a	0.807±0.012 ^d	0.024±0.003 ^a	64.8±16 ^c	99.0±0.1 ^b
A ₆	2.284±0.007 ^a	1.424±0.014 ^e	0.031±0.002 ^b	37.7±1.6 ^d	98.6±0.2 ^b
A ₇	2.279±0.011 ^a	1.498±0.015 ^f	0.024±0.002 ^a	34.2±0.3 ^e	99.0±0.2 ^b
A ₈	2.280±0.002 ^a	2.218±0.017 ^g	2.141±0.033 ^c	2.6±0.3 ^f	5.2±0.8 ^c

注: 同一列中不同上标字母表示数值之间有显著差异($P < 0.05$), 相同上标字母表示无显著差异($P > 0.05$)

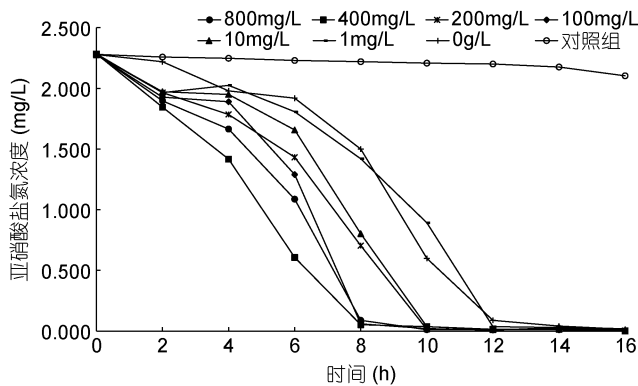


图 6 16h 红糖浓度和添加 NB-1 菌对亚硝酸盐氮降解情况
Fig.6 Degradation on nitrite nitrogen concentration by brown sugar and NB-1 strain in 16h

2.3 DB-1 菌株的厌氧反硝化性能

2.3.1 厌氧反硝化能力 应用菌株 DB-1 开展水体硝酸盐氮及总氮降解试验, 按 1% 的接种量在 1L 养殖废水(硝酸盐氮浓度为 15.8mg/L, 总氮浓度为 18.7mg/L, DO 浓度 < 0.5mg/L, COD_{Mn} 为 288.60mg/L, C/N=15.43)中接种菌株 DB-1 后进行厌氧培养 24h, 对照组不接种菌。24h 水质因子浓度的变化情况见表 2 及图 7, 处理组硝酸盐氮和总氮的降解率均极显著高

结果表明, 补充碳源红糖的投加, 促进了亚硝酸盐氮降解。由于菌株 NB-1 是自养型细菌, 碳源应该是促进了水中异养细菌的数量扩增, 之后异养细菌同化利用了亚硝酸盐氮; 当补充碳源红糖浓度在 100mg/L 以上时, 对亚硝酸盐氮的降解无显著差异, 表明水体中的异养细菌对有机碳源的同化利用已达上限, 上限浓度是 100mg/L。综上, 结果表明添加有机碳源可以提高菌株 NB-1 在 8h 时对亚硝酸盐氮的降解率。

于对照组($P < 0.01$), 处理组 24h 水体中硝酸盐氮降解率为 88.3%, 总氮降解率为 63.3%, 氨氮无积累, 产生的亚硝酸盐氮积累为硝酸盐氮降解量的 13.7%; 而对对照组的各水质因子浓度无明显变化, 变化幅度不超过 5%。综上, 结果表明菌株 DB-1 具有良好的厌氧反硝化作用功能, 发生反硝化反应: $2\text{NO}_3^- + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O}$, $2\text{NO}_2^- + 4\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{NO} + 2\text{H}_2\text{O}$, $2\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$, $\text{N}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$ (Wilson *et al.*, 1997)。

2.3.2 提高 DB-1 菌株反硝化能力的因素 应用菌株 DB-1 开展水体硝酸盐氮及总氮降解试验, 按 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% (分别编号为 B₁、B₂、B₃、B₄、B₅ 组) 的接种量在 1L 养殖废水中接种菌株 DB-1 后进行厌氧培养 48h, 并调节试验水体的 C/N 为 16。24h 不同接种量硝酸盐氮和总氮的降解效果见表 3, B₃、B₄、B₅ 组的硝酸盐氮降解率显著高于 B₁、B₂ 组; B₅ 组的总氮降解率显著高于 B₃、B₄ 组, 他们又显著高于 B₂ 组, B₂ 组又显著高于 B₁ 组。48h 不同接种量硝酸盐氮和总氮的降解效果见表 4, B₅ 组的硝酸盐氮降解率显著高于 B₃ 组, B₃ 又显著高于 B₄ 组, B₄ 又显著高于 B₂ 组, B₂ 组又显著高于 B₁ 组; B₅ 组的总

表 2 24h 水质因子浓度变化情况

Tab.2 Variation in concentration of water quality factor in 24h

水质因子	起始浓度(mg/L)	处理组浓度(mg/L)	对照组浓度(mg/L)	处理组降解率(%)	对照组降解率(%)
氨氮	1.134±0.014	1.171±0.014	1.153±0.011	-3.3±2.3 ^a	-1.7±2.2 ^b
亚硝酸盐氮	1.589±0.011	3.495±0.059	1.641±0.012	-120±5.2 ^c	-3.3±1.5 ^d
硝酸盐氮	15.813±0.026	1.847±0.029	15.679±0.036	88.3±0.2 ^e	0.8±0.1 ^f
总氮	18.747±0.024	6.881±0.056	18.597±0.056	63.3±0.3 ^g	0.8±0.4 ^h

注: 处理组和对照组的硝酸盐氮和总氮 24h 的降解率均有极显著差异($P<0.01$)

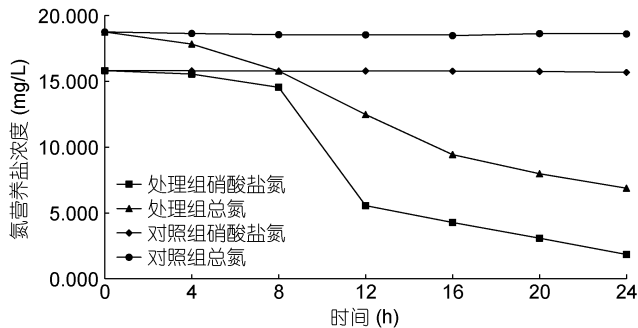


图 7 24h 氮营养盐浓度变化情况

Fig.7 Variation of nitrogen nutrient concentration in 24h

氮降解率显著高于 B₄ 组, B₄ 又显著高于 B₃ 组, B₃ 又显著高于 B₂ 组, B₂ 组又显著高于 B₁ 组。接种量在 0.4%

以下时, 反硝化作用不明显。接种量在 0.6% 时, 硝酸盐氮 24h 的降解率为 83.9%, 提高接种量或者增加 24h 的反应时间, 1% 接种量对硝酸盐氮的降解率提高到 91.6%; 而总氮的降解率随接种量的增多而升高, 在接种量为 1% 时, 总氮 48h 时的降解率为 56.1%。因此, 得出菌株 DB-1 降解硝酸盐氮及总氮的适宜接种量为 0.6%。

应用菌株 DB-1 开展水体硝酸盐氮及总氮降解试验, 按 0.6% 的接种量在 1L 养殖废水中接种菌株 DB-1 后进行厌氧培养 48h, 并调节试验水体的 C/N 为 4、8、12、16、20 (分别编号为 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅ 组)。不同 C/N 在 24h 对菌株 DB-1 降解硝酸盐氮和总氮的影响见表 5, C₃ 组的硝酸盐氮降解率显著高于 C₅ 组,

表 3 24h 不同接种量硝酸盐氮和总氮的降解效果

Tab.3 Degradation effects of nitrate nitrogen and total nitrogen in different inoculation amounts in 24h

组别	硝酸盐氮 初始浓度(mg/L)	总氮 初始浓度(mg/L)	COD _{Mn} 初始浓度(mg/L)	C/N	硝酸盐氮降解率 (%)	总氮降解率 (%)
B ₁	19.621±0.030 ^a	21.904±0.026 ^a	349.71±0.57 ^a	16.0±0.0 ^a	0.2±0.1 ^a	8.8±0.5 ^a
B ₂	19.620±0.017 ^a	21.916±0.014 ^a	350.33±0.92 ^a	16.0±0.1 ^a	16.4±0.4 ^a	10.8±0.6 ^b
B ₃	19.630±0.018 ^a	21.924±0.020 ^a	350.58±0.97 ^a	16.0±0.1 ^a	83.7±0.7 ^b	16.8±0.9 ^c
B ₄	19.631±0.012 ^a	21.930±0.022 ^a	350.18±0.70 ^a	16.0±0.0 ^a	83.3±0.6 ^b	16.4±0.8 ^c
B ₅	19.636±0.011 ^a	21.886±0.020 ^a	350.41±0.38 ^a	16.0±0.0 ^a	83.5±0.4 ^b	42.5±0.8 ^d

注: 同一列中不同上标字母表示数值之间有显著差异($P<0.05$), 相同上标字母表示无显著差异($P>0.05$)

表 4 48h 不同接种量硝酸盐氮和总氮的降解效果

Tab.4 Degradation effects of nitrate nitrogen and total nitrogen in different inoculation amounts in 48h

组别	硝酸盐氮 初始浓度(mg/L)	总氮 初始浓度(mg/L)	COD _{Mn} 初始浓度(mg/L)	C/N	硝酸盐氮降解率 (%)	总氮降解率 (%)
B ₁	19.621±0.030 ^a	21.904±0.026 ^a	349.71±0.57 ^a	16.0±0.0 ^a	0.6±0.2 ^a	12.8±0.4 ^a
B ₂	19.620±0.017 ^a	21.916±0.014 ^a	350.33±0.92 ^a	16.0±0.1 ^a	25.2±1.0 ^b	18.4±0.8 ^b
B ₃	19.630±0.018 ^a	21.924±0.020 ^a	350.58±0.97 ^a	16.0±0.1 ^a	88.6±0.8 ^c	30.3±0.9 ^c
B ₄	19.631±0.012 ^a	21.930±0.022 ^a	350.18±0.70 ^a	16.0±0.0 ^a	85.5±1.0 ^d	33.8±1.2 ^d
B ₅	19.636±0.011 ^a	21.886±0.020 ^a	350.41±0.38 ^a	16.0±0.0 ^a	91.6±0.5 ^e	56.4±0.5 ^e

注: 同一列中不同上标字母表示数值之间有显著差异($P<0.05$), 相同上标字母表示无显著差异($P>0.05$)

C₅组又显著高于C₂、C₄组,它们又显著高于C₁组;C₅组的总氮降解率显著高于C₃、C₄组,他们又显著高于C₁、C₂组。不同C/N在48h对菌株DB-1降解硝酸盐氮和总氮的影响见表6,C₃、C₅组的硝酸盐氮降解率显著高于C₁、C₄组,他们又显著高于C₂组;C₄、C₅组的总氮降解率显著高于C₃组,C₃组又显著高于C₁、C₂组。在接种量为0.6%的条件下,C/N为12组在24h

的硝酸盐氮的降解率为93.4%,总氮降解率为65.3%;在48h时,硝酸盐氮和总氮的降解率也仅提高为94.6%和65.2%。继续提高C/N,C/N为20时48h硝酸盐氮的降解率为95.8%,总氮降解率为64.2%。而C/N为4和8时,硝酸盐氮和总氮降解速率较慢,且总氮的最终降解率也偏低。因此,得出菌株DB-1降解硝酸盐氮及总氮的适宜C/N为12。

表5 不同C/N对24h硝酸盐氮和总氮降解率的影响
Tab.5 Effect of different C/N on nitrate nitrogen and total nitrogen degradation rate in 24h

组别	硝酸盐氮初始浓度 (mg/L)	总氮初始浓度(mg/L)	COD _{Mn} 初始浓度 (mg/L)	C/N	硝酸盐氮降解率 (%)	总氮降解率 (%)
C ₁	19.633±0.008 ^a	21.905±0.018 ^a	87.86±0.07	4.0±0.1	66.3±0.6 ^a	44.2±0.8 ^a
C ₂	19.637±0.012 ^a	21.907±0.011 ^a	173.24±0.08	7.9±0.1	82.6±0.4 ^b	43.7±1.0 ^a
C ₃	19.636±0.009 ^a	21.914±0.017 ^a	258.60±0.20	11.8±0.2	93.4±0.6 ^c	62.8±1.0 ^b
C ₄	19.625±0.008 ^a	21.906±0.004 ^a	346.59±0.06	15.8±0.1	83.6±0.4 ^b	62.6±0.6 ^b
C ₅	19.634±0.009 ^a	21.909±0.014 ^a	436.18±0.29	19.9±0.3	90.9±0.9 ^d	65.2±0.3 ^c

注:同一列中不同上标字母表示数值之间有显著差异($P<0.05$),相同上标字母表示无显著差异($P>0.05$)

表6 不同C/N对48h硝酸盐氮和总氮降解率的影响
Tab.6 Effect of different C/N on nitrate nitrogen and total nitrogen degradation rate in 48h

组别	硝酸盐氮初始浓度 (mg/L)	总氮初始浓度(mg/L)	COD _{Mn} 初始浓度 (mg/L)	C/N	硝酸盐氮降解率 (%)	总氮降解率 (%)
C ₁	19.633±0.008 ^a	21.905±0.018 ^a	87.86±0.07	4.0±0.1	90.5±1.2 ^a	61.9±0.7 ^a
C ₂	19.637±0.012 ^a	21.907±0.011 ^a	173.24±0.08	7.9±0.1	88.6±0.7 ^b	60.9±0.4 ^a
C ₃	19.636±0.009 ^a	21.914±0.017 ^a	258.60±0.20	11.8±0.2	94.6±0.6 ^c	64.0±0.2 ^b
C ₄	19.625±0.008 ^a	21.906±0.004 ^a	346.59±0.06	15.8±0.1	91.6±0.9 ^a	68.6±0.9 ^c
C ₅	19.634±0.009 ^a	21.909±0.014 ^a	436.18±0.29	19.9±0.3	95.8±0.6 ^c	67.8±0.6 ^c

注:同一列中不同上标字母表示数值之间有显著差异($P<0.05$),相同上标字母表示无显著差异($P>0.05$)

应用菌株DB-1开展水体硝酸盐氮及总氮降解试验,按0.6%的接种量在1L养殖废水中接种菌株DB-1,调节水体的C/N为12后进行厌氧培养24h,并调节试验水体的硝酸盐氮浓度为5、10、15、20、25mg/L(分别编号为D₁、D₂、D₃、D₄、D₅组)。不同浓度的硝酸盐及总氮的降解效果见表7。D₃组的硝酸盐氮降解率显著高于D₂组,D₂组又显著高于D₅组,D₅组又显著高于D₁组,D₁组又显著高于D₄组;D₃组的总氮降解率显著高于D₂组,D₂组又显著高于D₄、D₅组,它们又显著

高于D₁组。对15mg/L的硝酸盐氮和总氮的降解率均为各处理组中最高。因此表明,菌株DB-1对硝酸盐氮及总氮均有良好的降解效果,对硝酸盐氮的降解率为73.3%—90.1%,对总氮的降解率为56.8%—76.4%。

综上,试验结果表明菌株DB-1具有良好的厌氧反硝化作用功能,降解硝酸盐氮和总氮最适接种量为0.6%,最适C/N为12,且对硝酸盐氮及总氮均有良好的降解效果,对硝酸盐氮的降解率为73.3%—90.1%,对总氮的降解率为56.8%—76.4%。

表7 不同浓度的硝酸盐及总氮降解效果
Tab.7 Degradation effect of nitrate and total nitrogen at different concentrations

组别	硝酸盐氮初始浓度 (mg/L)	总氮初始浓度 (mg/L)	COD _{Mn} 初始浓度 (mg/L)	C/N	硝酸盐氮24h降解率 (%)	总氮24h降解率 (%)
D ₁	4.872±0.013	5.474±0.016	65.83±0.43	12.0±0.1	75.9±0.6 ^a	56.8±0.6 ^a
D ₂	9.847±0.018	10.936±0.017	133.71±0.51	12.2±0.0	84.3±1.2 ^b	68.4±1.2 ^b
D ₃	14.882±0.010	16.643±0.015	196.77±0.31	11.8±0.0	90.1±0.7 ^c	76.4±1.1 ^c
D ₄	19.820±0.008	21.891±0.008	264.27±0.51	12.1±0.0	73.3±1.2 ^d	60.9±1.7 ^d
D ₅	24.971±0.011	27.366±0.007	325.19±0.34	11.9±0.0	81.9±0.7 ^c	61.3±1.0 ^d

注:同一列中不同上标字母表示数值之间有显著差异($P<0.05$),相同上标字母表示无显著差异($P>0.05$)

3 讨论

3.1 菌株 NB-1 的硝化性能分析

氨氮与亚硝酸盐氮是危害水产养殖水体水质及养殖生物最严重的水质理化因子, 浓度过高时容易导致鱼虾大批患病甚至死亡, 严重影响水质和水产品安全(万红等, 2006; 张卫强等, 2012)。很多水产养殖者都通过选择采用微生物制剂来改善水体环境, 缓解水质恶化产生的经济损失及环境污染。众多研究也发现, 从养殖废水或养殖污泥中筛选出的土著微生物的脱氮性能更加高效。从养殖尾水中筛选的菌株, 按 5% 的接种量接种于亚硝酸盐氮浓度为 5mg/L 的水体中进行培养 72h, 亚硝酸盐氮的降解率为 98.5% (周鲜娇等, 2016)。从养殖水体中分离出一株巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*), 将已活化的菌株接种到 50mg/L 的氨氮培养基中, 24h 氨氮的降解率为 97.7% (易弋等, 2011)。自养硝化与异养硝化的区别是其不需要任何有机营养物, 以无机碳(CO₂)作为唯一碳源(郑士民等, 1983)。本研究分离筛选出的 NB-1 菌株属于自养型细菌。菌株 NB-1 在投菌量为 0.025% 时, 24h 对氨氮的降解率为 69.5%。表明, NB-1 具有良好的亚硝化功能, 而再增添 100mg/L 红糖后, 氨氮的降解率提高为 90.8%, 可能是试验水体中的异养细菌获得碳源后迅速扩增种群, 增加了吸收同化氨氮的量。传统的亚硝化细菌一般都是营自养亚硝化的, 但目前已有一些研究从环境中分离出了异养亚硝化细菌(肖维伟等, 2008; 胡修贵等, 2013)。菌株 NB-1 在投菌量为 0.025% 时, 24h 对亚硝酸盐氮的降解率为 99.2%, 表明 NB-1 菌株具有良好的硝化作用功能。在试验水体中添加碳源(红糖)可以加快亚硝酸盐氮的降解速率, 原因可能是水体中的异养细菌吸收亚硝酸盐氮, 促进了亚硝酸盐氮的降解(温东辉等, 2003)。本试验水体中的亚硝酸盐氮的降解率在一定范围内和碳源(红糖)添加量成正比关系, 但碳源添加量大于 100mg/L 后, 亚硝酸盐氮降解率没有进一步提高, 可能是在高碳源浓度条件下水体中的异养硝化细菌已扩增至较大数量, 抑制了自养硝化细菌的种群扩增, 抑制了硝化细菌的硝化作用。综上, 本研究分离筛选出的菌株 NB-1 可同时营自养亚硝化及自养硝化, 且对氨氮和亚硝酸盐氮的降解率都较高, 类似研究的报道较少。

3.2 菌株 DB-1 的厌氧反硝化性能分析

硝酸盐氮是含氮有机物硝化反应的最终产物,

毒性较低, 只在较高浓度的时候才会对鱼虾产生毒害作用(宋协法等, 2019)。但随着环境资源保护意识的提升及环保政策的落实, 养殖尾水排放标准对总氮浓度的要求日益严格(宋长太, 2018), 这就要求水产养殖者需要关注排放水体中硝酸盐氮浓度的变化情况。硝酸盐氮的去除方式主要是反硝化细菌通过反硝化反应将硝酸盐氮经过一系列中间产物最终产生氮气排出水体, 需要在厌氧条件下进行($2\text{NO}_3^- + 10\text{e}^- + 12\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$)。从海水循环水养殖系统中的水处理单元分离出的厌氧反硝化细菌 *Vibrio* 及 *Halomonas*, 在接种量为 400% 及厌氧条件下, 硝态氮和亚硝态氮在 3h 的降解率分别为 82.9% 和 82.8% (蒋欣燃, 2017)。从红树林中筛选出的厌氧反硝化细菌 *Pseudomonas* 等 7 个菌属在 1% 接种量的条件下表现出对硝酸盐氮的高效降解(林娜等, 2012)。本研究菌株 DB-1 在接种量为 1% 时, 24h 对硝酸盐氮的降解率为 89.5%, 也有中间产物亚硝酸盐氮的积累, 积累量为硝酸盐氮降解量的 13.7%, 不能实现完全充分的反硝化反应。分离筛选出的异养反硝化细菌在脱氮试验时投菌量均在 1% 以上, 甚至高达 10%, 且需要额外添加碳源(何芳等, 2008; 陈朋, 2009; 康鹏亮等, 2018)。本研究在 C/N 为 16 的条件下, 菌株 DB-1 24h 降解 90.0% 硝酸盐氮的接种量仅需 0.6%, 优于其他类似研究报告结果。反硝化细菌一般营异养反硝化, 其反硝化性能受到 C/N 的制约, 反硝化细菌的普遍最适 C/N 为 14—16 (赵惊鸿等, 2015; 孙智毅, 2017; 张婷月等, 2018; 张霓, 2019)。如果 C/N 太低, 硝酸盐氮无法转化或者大量转化为亚硝酸盐氮, 无法真正脱氮; 如果 C/N 太高, 也会造成资源浪费和环境污染。本研究在投菌量为 0.6% 的基础上, 菌株 DB-1 在 C/N 为 4 以下时反硝化速率较低, 而在 C/N 为 12 时对硝酸盐氮降解率为 93.4%, 继续提高 C/N 对反硝化性能没有提升。本研究菌株 DB-1 的最适 C/N 为 12, 与其他研究结果不同的原因可能是菌株的新陈代谢的特征和面临的环境不同(Chiu *et al.*, 2003), 菌株 DB-1 的最适 C/N 较其他研究报告的 C/N 14—16 更低, 可有效降低补充碳源的使用成本。水产养殖的主要模式有池塘养殖和工厂化养殖等, 养殖水体中的 C/N 一般不大于 2。本研究的菌株 DB-1 对硝酸盐氮和总氮均有显著的降解效果, 且所需要的投菌量低, 补充碳源量低, 可以降低使用成本。综上, 表明该菌株可广泛应用于水产养殖水质调控, 具有应用推广价值。

3.3 高效硝化和反硝化细菌在水体原位修复中的应用前景

在水产养殖中,最初所使用的微生态制剂成分大多数仅为光合细菌、乳酸菌和芽孢杆菌中的一种或多种,品种较为单一(张元,2018)。有研究发现,将具有硝化和反硝化功能的不同菌种按照合理的比例配比复合后使用,对无机氮的降解效果十分显著。当光合细菌、枯草芽孢杆菌和反硝化细菌按菌液体积比为1:2:1进行复配利于水中溶解氧的提高和COD、氨氮、亚硝态氮、硝态氮的降解(谢凤行等,2012)。推测其原因,可能是生物特性的互补(施大林等,2009)。本研究分离筛选的硝化细菌NB-1同时具有自营亚硝化和自营硝化的功能,在投菌量0.025%时,24h对氨氮的降解率为69.5%,对亚硝酸盐氮的降解率为99.2%,具有投菌比例低,可大幅度降解氨氮和亚硝酸盐氮的优点。厌氧反硝化菌株DB-1具有营养反硝化作用的功能,在投菌量为0.6%,C/N为12时,对硝酸盐氮和总氮的降解率为94.6%和65.3%。具有投菌量低、补充碳源量低、降低使用成本的优点。水产养殖水体中存在着低溶氧区域(陈仲晗等,2016)。因此,它们都可以广泛应用于池塘和工厂化养殖水体的原位水质调控。也可应用于养殖水的水处理系统的硝化单元和反硝化单元中,提高相应的水处理能力,具有广泛的市场应用前景。

4 结论

本研究分离筛选出的菌株NB-1和DB-1,经16S rRNA基因的序列分析和鉴定分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。

菌株NB-1属自养型细菌,可同时营自养亚硝化和自养硝化,在投菌量为0.025%时对氨氮的降解率为69.5%,对亚硝酸盐氮的降解率为99.2%。

菌株DB-1属异养厌氧反硝化细菌,营营养反硝化,最适投菌量为0.6%,最适C/N为12,对硝酸盐氮和总氮的降解率分别为94.6%和65.3%。

参 考 文 献

万红,宋碧玉,杨毅等,2006.水产养殖废水的生物处理技术及其应用.水产科技情报,33(3):99—103
王峰,雷霖霖,高淳仁等,2013.国内外工厂化循环水养殖研究进展.中国水产科学,20(5):1100—1111
王鸿泰,胡德高,1989.池塘中亚硝酸盐对草鱼种的毒害及防治.水产学报,13(3):207—214
尼逸伦,2015.池塘生物膜低碳养殖新模式应用研究.厦门:集美大学硕士学位论文

朱峰,2015.大黄鱼工厂化循环水养殖技术研究.厦门:集美大学硕士学位论文
江兴龙,邓来富,2013.凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)池塘生物膜低碳养殖技术研究.海洋与湖沼,44(6):1536—1543
孙智毅,2017.一株异养硝化-好氧反硝化 *Cupriavidus* sp.S1 的筛选及降解特性研究.太原:太原理工大学硕士学位论文
李永芹,许乐乐,陈克卫,2013.1株芽孢杆菌的筛选鉴定及其净水效果研究.水生态学杂志,34(1):96—100
肖维伟,曹立群,喻其林等,2008.鸡粪好氧发酵中异养亚硝化细菌的筛选及转化能力.中国农业大学学报,13(3):85—89
何芳,康贻军,单君等,2008.一株高耐氧反硝化细菌的筛选及其反硝化产物确定.微生物学通报,35(1):35—39
何腾霞,李振轮,杨珊,2015.好氧反硝化细菌及其去除亚硝酸盐的作用机理研究进展.过程工程学报,15(1):174—180
余瑞兰,聂湘平,魏泰莉等,1999.分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及其对策.中国水产科学,6(3):73—77
宋长太,2018.淡水养殖尾水达标排放相关知识解读.渔业致富指南,(20):20—22
宋协法,杨晓晗,黄志涛,2019.硝酸盐对鱼类毒性研究进展.中国海洋大学学报 自然科学版,49(9):34—41
张元,2018.池塘养殖水体中土著反硝化细菌的分离与初步鉴定.水生态学杂志,39(5):111—115
张霓,2019.异养硝化-好氧反硝化细菌 *Pseudomonas putida* ZN1 的脱氮及耐重金属特性研究.太原:太原理工大学硕士学位论文
张卫强,朱英,2012.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,2(6):324—327
张婷月,丁钰,黄民生,2018.异养硝化-好氧反硝化细菌的筛选及其脱氮性能研究.华东师范大学学报(自然科学版),(6):22—31,87
陈朋,2009.反硝化细菌的筛选、鉴定及其强化处理硝酸盐废水的研究.济南:山东大学硕士学位论文
陈仲晗,徐海升,刘翔等,2016.南方某水库底层溶解氧分布特征及低氧成因分析.水资源保护,32(1):108—114
邵可,2017.好氧反硝化菌的筛选及其脱氮性能的研究.北京:中国石油大学(北京)硕士学位论文
林娜,郭楚玲,郭延萍等,2012.红树林湿地中好氧-厌氧反硝化菌脱氮特性及其种群结构分析.环境科学学报,32(1):173—181
国家环境保护总局,2002.水和废水监测分析方法.4版.北京:中国环境科学出版社
易弋,容元平,程谦伟等,2011.养殖水体氨氮降解菌的分离和初步鉴定.贵州农业科学,39(2):154—157
周鲜娇,全丽谦,2016.一株芽孢杆菌降解亚硝酸盐的特性研究.岭南师范学院学报,37(6):77—85
郑士民,钱新民,颜望明,1983.自养细菌在处理工业废水中的作用.环境保护,(11):20—22
赵惊鸿,黄少斌,2015.一株耐高温好氧反硝化菌的筛选及特性研究.环境科学与技术,38(1):6—10,67
胡修贵,赵培,李玉宏等,2013.生物絮团中异养亚硝化菌的分离鉴定及其特性.渔业科学进展,34(5):97—103
施大林,何义进,孙梅等,2009.四联活菌制剂对养殖水体

- 中氮氮及亚硝酸盐的降解. 水产科学, 28(11): 663—666
- 凌 歌, 2010. 一种亚硝酸盐降解新方案及其在水产养殖上的应用. 渔业致富指南, (12): 27—28
- 高明辉, 马立保, 葛立安等, 2008. 亚硝酸盐在水生动物体内的吸收机制及蓄积的影响因素. 南方水产, 4(4): 73—79
- 康鹏亮, 陈胜男, 黄廷林等, 2018. 好/厌氧条件下反硝化细菌脱氮特性与功能基因. 环境科学, 39(8): 3789—3796
- 蒋欣然, 2017. 厌氧反硝化细菌的分离鉴定及其对水产养殖废水脱氮作用的初步研究. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文
- 温东辉, 唐孝炎, 2003. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用. 环境污染与防治, 25(5): 283—285
- 谢凤行, 张峰峰, 周 可等, 2012. 水质净化高效复合微生态制剂的研制. 环境工程学报, 6(2): 477—482
- 熊 焰, 刘力源, 罗 睿等, 2010. 1 株亚硝酸盐降解菌的筛选、鉴定、降解条件及效果. 中国水产科学, 17(6): 1264—1271
- 薛菲菲, 2014. 养殖池塘中氮氮降解有益微生物的分离与鉴定. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文
- Chiu Y C, Chung M S, 2003. Determination of optimal COD/Nitrate ratio for biological denitrification. International Biodeterioration & Biodegradation, 51(1): 43—49
- Guo L J, Zhao B, An Q *et al*, 2016. Characteristics of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Enterobacter cloacae* strain HNR. Applied Biochemistry and Biotechnology, 178(5): 947—959
- Khardenavis A A, Kapley A, Purohit H J, 2007. Simultaneous nitrification and denitrification by diverse *Diaphorobacter* sp. Applied Microbiology and Biotechnology, 77(2): 403—409
- Takenaka S, Zhou Q, Kuntiya A *et al*, 2007. Isolation and characterization of thermotolerant bacterium utilizing ammonium and nitrate ions under aerobic conditions. Biotechnology Letters, 29(3): 385—390
- Wilson L P, Bouwer E J, 1997. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 18(2): 116—130

ISOLATION AND SCREENING OF HIGH-EFFICIENCY NITRIFICATION AND DENITRIFICATION FUNCTIONAL STRAINS AND EFFECT EVALUATION

GUO Shao-Peng^{1,2}, JIANG Xing-Long^{1,2}, WANG Ze-Xu^{1,2}, WEI Jin-Sheng^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China)

Abstract Two strains of nitrification and denitrification functional strains were isolated and screened from eel culture ponds and recirculating water treatment system by selective medium, and the selected strains were determined by 16S rRNA molecular biological identification. NB-1 strain was belonged to the genus *Bacillus*, DB-1 strain belonged to the genus *Pseudomonas putida*. The results show that NB-1 strain had good nitrosation and nitrification performance, and the degradation rate of ammonia nitrogen and nitrite were 69.5% and 99.2% respectively, where the ratio of NB-1 strain was 0.025%. DB-1 strain showed good denitrification performance under anaerobic condition. The optimal dosage ratio of DB-1 strain was 0.6%, and the optimal C/N ratio was 12, where the degradation rate of nitrate was 94.6% and that of total nitrogen was 64.0%. Therefore, the two strains would be widely used in aquaculture to improve water quality and have good application potential.

Key words nitrification; denitrification; functional strains; C/N