

王震,刘标,陈薇,等. 养殖污水中氨氮降解菌的分离、筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):377-378.

养殖污水中氨氮降解菌的分离、筛选及鉴定

王震,刘标,陈薇,肖翰,许丽娟,贺月林

(湖南省微生物研究所,湖南长沙 410009)

摘要:为研究微生物降解养殖水体中氨氮的能力,从池塘污泥中分离筛选出 12 株具有降解氨氮能力的菌株。其中,菌株 JM14 降解氨氮能力最强,当初始氨氮浓度为 212 mg/L 时,氨氮降解率达到 91.4%。经形态鉴定以及生理生化试验,确定该菌为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。该菌株降解水体中氨氮能力显著,为生物降解养殖污水中的氨氮又提供了一种新型菌株。

关键词:氨氮降解;分离鉴定;酿酒酵母

中图分类号: X52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0377-02

随着水产养殖业的发展,养殖水体的污染已成为制约水产养殖可持续发展的瓶颈。其中,水体中高浓度的氨氮不仅可直接危害养殖生物^[1],同时也是引起养殖品种发生病害的间接因素,对农业生产和水产养殖带来极大的损失^[2]。水体中氨氮的毒性主要取决于游离 NH_3 。据美国环保局制定的水质评价标准, NH_3 对不同鱼类的致死浓度在 0.2 ~ 2.0 mg/L 之间。因此对养殖水体中氨氮浓度的控制一直是科研工作者研究和探索的问题。

微生物作为一种生态调节剂,用于治理养殖水体环境,能增加溶解氧,降低氨氮($\text{NH}_4^+ - \text{N}$)^[3-5],抑制有害微生物的繁殖,改善养殖生态环境,同时具有成本低、收效大等优点而日益受到重视。为了治理养殖水体中严重的氨氮污染,本研究从养殖水体中通过富集、筛选、驯化等方法,筛选出高效的土著降氨氮菌株,以期能够应用这些微生物控制氨氮污染。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 样品来源于湖南省长沙市某克氏原螯虾养殖基地。

1.1.2 培养基 分离培养基: KH_2PO_4 2 g、NaCl 20 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g、葡萄糖 10 g、 MgSO_4 0.5 g、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 微量、蒸馏水 1 000 mL,调 pH 值至 7.0 ~ 7.2。固体培养基中添加 2% 琼脂。

菌种鉴定培养基:参照《微生物分类学》中的菌种鉴定培养基配方配制;酵母菌培养基:葡萄糖 20 g、酵母膏 10 g、蛋白胨 10 g、蒸馏水 1 000 mL,自然 pH 值;细菌培养基:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、蒸馏水 1 000 mL,调 pH 值至 7.2。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的富集和驯化 将 10 mL 养殖污水接种于装有 90 mL 分离培养基的三角瓶中,在 30 ℃、180 r/min 的条件下

培养 2 d 后,取 5 mL 加至 100 mL 新鲜富集培养基中,在相同条件下培养,如此反复 5 次。

1.2.2 菌株的筛选与纯化 富集驯化完成后,利用梯度稀释法分离单个菌株。将分离纯化得到的各菌株用生理盐水制成终浓度为 1.0×10^8 CFU/mL 的菌悬液,以 3% 接种量接种于 212 mg/L 氨氮浓度的分离培养基中 30 ℃、180 r/min 摇床振荡培养 48 h。菌悬液经 5 000 r/min 离心 3 min 后,取上清液,测定氨氮的含量,同时测定未接菌的培养基中氨氮含量。每个菌株做 3 个重复,选择氨氮降解率相对较高且效果稳定的菌株进行进一步研究。

1.2.3 分析方法 氨氮的测定采用纳氏试剂分光光度法(GB 7479—1987)^[6],氨氮降解率 = (未接种的培养基中的氨氮浓度 - 已接种的培养基中的氨氮浓度) / 未接种的培养基中的氨氮浓度 $\times 100\%$ 。

1.2.4 氨氮降解菌的鉴定 (1) 菌株的形态观察及生理生化鉴定。降解菌株采用平板涂布法接种,30 ℃ 培养。待长出菌落后,观察菌落的大小、形状、颜色等特征。酵母菌同时观察子囊孢子、假菌丝及掷孢子的形成和形态。生理生化鉴定方法参见《常见细菌系统鉴定手册》和《酵母菌的特征与鉴定手册》。(2) ITS 序列分析。用试剂盒提取 JM14 的基因组 DNA,并进行 PCR 扩增。引物为: ITS1: 5' - TCCGTAGGT-GAACCTGCGG - 3', ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3';PCR 反应体系(50 μL): dNTP(25 mmol/L) 1 μL ,正向和反向引物(1 mmol/L) 各 2 μL , 10 \times buffer 5 μL ,模板 DNA 1 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L) 3 μL , *Taq* 酶(5 U/ μL) 1 μL ,超纯水 35 μL 。聚合酶链式反应条件: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 40 s, 72 ℃ 1 min,循环 30 次; 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物采用纯化试剂盒纯化,测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。测序结果提交 GenBank 进行 BLAST 比对。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

经多次富集培养和分离,获得 12 株氨氮降解菌(表 1)。其中, JM14 对氨氮的降解效果最好,在氨氮初始浓度为 212 mg/L 时,降解率为 91.4%,因此,最后选择了 JM14 作为后面试验的备选菌。

收稿日期: 2013-02-28

作者简介: 王震(1977—),男,湖南长沙人,工程师,主要从事环境微生物研究。E-mail: 13507479979@163.com。

通信作者: 贺月林,男,硕士,工程师,从事环境微生物学方面的研究。E-mail: hyl200866@yeah.net。

表 1 不同菌株降氨氮效果

菌株	氨氮降解率(%)
N-1	33.4
N-2	26.7
N-3	41
AT	75.7
XD	80.3
EM-2	42.2
EM-3	23.9
EM-4	43.9
EM-5	30.6
ZZH	23.1
JM14	91.4
ST	53.1

2.2 功能菌株鉴定

2.2.1 菌株的形态观察及生理生化鉴定结果 从图 1 可看出,JM14 菌落圆形,边缘整齐,呈乳白色,不透明,湿润。菌体呈椭圆形,产子囊孢子,形成原始菌丝或成短链状,无掷孢子掷出。菌株 JM14 的生理生化结果见表 2。

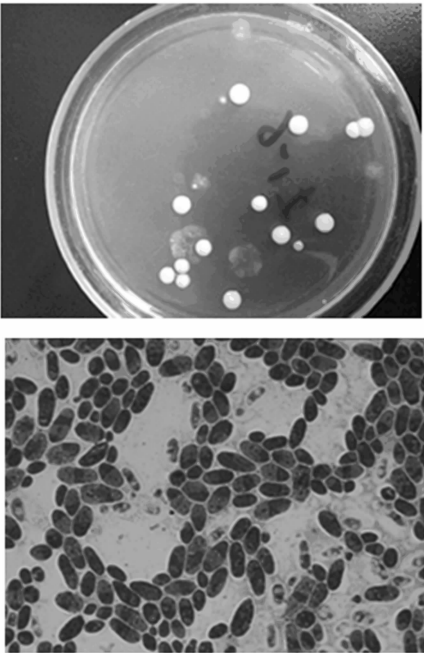


图1 菌株JM14菌落及菌体形态

表 2 菌株 JM14 生理生化鉴定

测定项目	结果	测定项目	结果
葡萄糖	+	半乳糖	+
蔗糖	+	木糖	+
产类淀粉化合物	-	明胶液化	-
1% 醋酸生长	+	产酸	微量
石蕊牛奶试验	+	产脂	微量
尿素分解	-	无维生素培养基生长	+

注:“+”表示阳性或生长;“-”表示阴性或不生长。

2.2.2 ITS 序列分析 采用 PCR 扩增菌株 JM14 的 ITS 基

因,其序列长为 797 bp,将其与 GenBank 上的其他序列进行同源性比对,JM14 的 ITS 序列与 *Saccharomyces cerevisiae* 序列相似性达到 99%。因此,综合菌落形态、菌体形态、生理生化特征及 ITS 序列分析,将菌株 JM14 鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

AGGTATTTGATACTTTTGAAATGGATTTTTTTGTTTTGGCA
AGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGAT
GGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTT
GCTAGGCTTGTAAGTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTG
AGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTAACCGGT
TTCAATACAACACACTGTGGAGTTTTTCATATCTTTGCAAC
TTTTTCTTTGGGCATTGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAA
CAAAACACAAACAATTTTATCTATTTCATTAATTTTTGTCA
AAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAATTTTAAATATTA
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
CTTGGTATTCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCT
CTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTACTCTTTTGG
AGTTAACTTGAAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTT
TTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGC
AAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCT
TTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAG
AGAGCGTCTAGGCGAACAAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCA
AATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACCTTAAGCATAAAAA

图2 菌株JM14 ITS全序列

3 小结与讨论

通过对养殖污水进行富集和培养,共筛选到 12 株具有氨氮降解活性的菌株。在这 12 株菌株中,菌株 AT、XD 和 JM14 降解活性都在 75% 以上,其中菌株 JM14 的降解活性最高,达到 91.4%,通过对菌株 JM14 的形态特征、生理生化鉴定及 ITS 序列分析,将菌株 JM14 鉴定为酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。目前已有研究报道表明很多菌属具有降解氨氮的能力,如假单胞菌、硝化细菌、巨大芽孢杆菌^[7]等,而关于酿酒酵母能降解水体中的氨氮还未见报道,因此酿酒酵母在养殖水体修复方面具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1] 乔顺风,刘恒义,靳秀云,等. 养殖水体氨氮积累危害与生物利用[J]. 河北渔业,2006(1):20-22.
[2] 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.
[3] 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.
[4] Larsen P, Nielsen J L, Svendsen T C, et al. Adhesion characteristics of nitrifying bacteria in activated sludge[J]. Water Research,2008,42(10-11):2814-2826.
[5] Tsang Y F, Sin S N, Chua H. Nocardia foaming control in activated sludge process treating domestic wastewater[J]. Bioresource Technology,2008,99(9):3381-3388.
[6] 周耀明,张恒. 生活垃圾降解菌除臭效果比较研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(26):8312-8313.
[7] 侯颖,孙军德,徐建强,等. 巨大芽孢杆菌对养殖水体氨氮降解特性研究[J]. 沈阳农业大学学报,2006,37(4):607-610.