

养殖池塘系统脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)的分离、生长特性及脱氮特征研究

范立民, 裘丽萍, 陈家长, 宋超, 胡庚东, 瞿建宏, 孟顺龙, 吴伟*

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部长江下游渔业生态环境监测中心, 中国水产科学研究院内陆生态环境和资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 分别采集集约化养殖吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的池塘底泥、表层水、塘边裸露土壤样品, 采用脱氮硫杆菌选择培养基富集培养、分离得到3株细菌, 通过菌落特征、形态学特征、生理生化检验和16S rDNA序列分析等手段, 鉴定为脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*), 命名为TD1、TD2和TD3。在30℃下, 采用静置、厌氧培养实验研究这3株脱氮硫杆菌的生长繁殖特征、对硝酸盐氮的去除速率特征、硫酸根产生状况、亚硝酸盐产生情况、培养液pH值和氧化还原电位变化特征等方面的差异进行研究, 探索养殖环境修复中应用的可能性。结果表明: 在一定的时间内菌株生长速率、介质pH降低速率和氧化还原电位上升幅度均表现为TD1>TD2>TD3; 菌株硝态氮脱除效率和硫酸根浓度升高速率均表现为TD1>TD2>TD3, 亚硝酸盐产生情况则表现为TD1<TD2<TD3; TD1更适合异位修复, TD2更适合原位修复。

关键词: 养殖池塘系统; 脱氮硫杆菌; 生长特性; 脱氮效能

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)01-0153-07 doi:10.11654/jaes.2013.01.022

Isolation and Culture of *Thiobacillus denitrificans* from Different Area of the Intensive Pond System and Their Capacities of Removing Nitrate

FAN Li-min, QIU Li-ping, CHEN Jia-zhang, SONG Chao, HU Geng-dong, QU Jian-hong, MENG Shun-long, WU Wei*

(Freshwater Fisheries Research Centre, Chinese Academy of Fishery Sciences, Fishery Eco-Environment Monitoring Center of Lower Reaches of Yangtze River, Ministry of Agriculture, Key Open Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Wuxi 214081, China)

Abstract: In this study, an intensive pond in which GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) were cultured was used. And sampling were done in different areas of the pond system, including sediments of the pond, the waters 50 centimeters below the surface and the bare soil at the edge of the pond. After that, enrichment and elective cultures were prepared anaerobically on these samples in 30 centigrade by incubating glass-stoppered bottles with the medium for *Thiobacillus denitrificans* full filled. After the culture, by using the spread-plate method, three strains were got. Through the appearance of the colonies, the shape of the strains, the detection of physiological and biochemical indicators, and the analysis of the sequences of 16S rDNA, the strains was identified as *Thiobacillus denitrificans*, and they were named as TD1, TD2 and TD3. Through the studies on the characteristics of growth and reproduction, of the removing rates of the nitrate, of the production of the sulfate and nitrite, and of the change of the pH and redox potential in medium, the possibilities of being used in repairing of the aquaculture pond environment were determined to some extent. The results showed that: in most of the time of the experiment, the growth rates, the pH decreasing rates, and the redox potential increasing extent of the strains were all performed as TD1>TD2>TD3; and the trends of the nitrate removing rates and the increasing rates of the three strains were the same as above, however, the production of nitrite by the three strains showed different trends, which was TD1<TD2<TD3. To sum up, TD1 was more suitable for ex-situ bioremediation technology, while TD2 might be much better for in-situ bioremediation technology.

Keywords: aquaculture pond system; *Thiobacillus denitrificans*; growth characteristics; denitrifying effect

收稿日期: 2012-06-28

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2011JBFA15); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-49)

作者简介: 范立民(1978—), 男, 河北滦平人, 硕士, 助理研究员, 主要从事渔业生态环境保护技术研究。E-mail: fanlm@ffrc.cn

* 通信作者: 吴伟 E-mail: wuw@ffrc.cn

池塘养殖是目前我国淡水养殖的主要方式,据统计,2009年全国池塘养殖总面积达到2 331.90千 hm^2 ,占淡水养殖总面积的42.99%^[1]。同时池塘养殖无论是在满足广大消费者对动物蛋白的需求上,还是在农业出口创汇上都占有重要的地位。然而,集约化养殖方式使得养殖生态系统十分脆弱,病害问题严重,养殖风险大幅提高,水产品质量下降。造成这一问题的根本原因在于高密度本身严重挤压鱼类的生存空间,造成应激反应;同时高密度养殖下投饵量大,鱼类粪便产生量也大,残饵和粪便分解耗氧,同时产生氨氮、硫化氢等有害物质。这些因素除了直接对鱼类造成伤害之外,还会降低鱼类的抵抗力,使得病原微生物有机可乘,所有这些都是暴发鱼病的重要原因^[2]。为了解决这些问题,除了在养殖方式上进行优化以外,还应该对池塘自身对于饵料、粪便等投入品的降解规律,以及降解产物中所含的、容易造成池塘生态系统恶化的关键元素的代谢规律进行研究,进而探索强化代谢能力的方式方法。在这些元素中N元素无疑是非常重要的元素之一,而反硝化作用是在不排水的情况下,池塘生态系统多余N释放的最主要的通路。因此,研究池塘生态系统的反硝化作用显得尤为重要。而且,池塘中有的反硝化菌还具有在厌氧条件下降解吡啶、喹啉甚至苯的能力^[3],这对于养殖池塘抵御一定程度的外源性有机化合物也至关重要。

脱氮硫杆菌是一种广泛分布于土壤、水体、底泥等各种环境中的自养反硝化菌,厌氧条件下以反硝化反应的方式同时参与硫、氮循环,以硝酸盐中的氧来氧化硫化物,NO₃⁻被还原为氮氧化物或N₂,低价态的硫(如硫化氢)被氧化为硫酸根^[4-6]。目前,应用脱氮硫杆菌净化垃圾填埋场废水、地下水、城市污水等方面的研究已取得一些有用的结果^[7-9]。在水产养殖上,车轩等^[10]研究论述了在循环水养殖系统中以脱氮硫杆菌为代表的自养反硝化菌的应用,对于池塘养殖系统中脱氮硫杆菌应用的研究目前未见报道。已有的研究表明,不同环境来源的脱氮硫杆菌在生长繁殖和脱氮效能等方面存在显著差异^[11]。基于以上考虑,笔者拟从养殖池塘系统不同区域分离脱氮硫杆菌,对其生长特性、脱氮效能和特征等方面进行研究对比,为池塘养殖中对脱氮硫杆菌的应用进行必要的探索。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

Autoclave SS-325 全自动高压灭菌锅(日本 TO-

MY 公司),SHP-80 生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司),Eclipse 90i 光学显微镜(日本 Nikon 公司),PCR 反应扩增仪(加拿大 BBI 公司),3730 测序列分析仪(美国 ABI 公司),ZHJH-1214 双面气流式超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司),YXJ-2 离心机(湘仪离心机仪器有限公司),H6-1 微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂),Bio Spectium AC system 凝胶成像系统(美国 UVP 公司),U-3010 紫外-可见分光光度计(日本 Hitachi 公司),ICS 3000 型离子色谱仪(美国 DIONEX 公司),YQX-II 型厌氧培养箱(上海跃进医疗器械有限公司)。

1.2 培养基组成及配制方法

基本选择培养基:在 Baalsrud K 等^[12]采用过的经典的脱氮硫杆菌选择性培养基组成基础上略作修改,组成如下:无菌去离子水,0.05%NH₄Cl,0.05%MgCl₂·6H₂O,0.2%KH₂PO₄,0.5%Na₂S₂O₃·5H₂O,0.4%KNO₃,0.1%NaHCO₃,0.001%FeSO₄·7H₂O。

配制方法:脱氮硫杆菌选择、富集培养基配制方法为,先将 FeSO₄·7H₂O 溶于 0.1 mol·L⁻¹ HCl 中,KH₂PO₄ 和 NaHCO₃ 分别溶于双蒸去离子水中,分别高压灭菌锅灭菌;其他成分溶解在去离子水中,灭菌。灭菌完毕后混合,用 0.01 mol·L⁻¹ NaOH 调节 pH 至 7 左右,封口,置于超净台中用紫外灯再次灭菌、备用。固体培养基再加 2%琼脂。

1.3 样品采集及细菌的富集和分离

样品采自江苏宜兴市屺亭水产养殖场,集约化养殖吉富罗非鱼的池塘(N 31°27'54.2",E 119°51'55.0")。用直径 5 cm 左右的柱状有机玻璃管采集底泥和水样,表层水(至表面 50 cm 处)虹吸入无菌瓶中保存;用灭菌金属勺从塘边裸露土壤中采集距表面 10 cm 层土壤于无菌瓶中保存备用。

分别将底泥样品 2~3 g、表层水 1 mL 和塘边裸露土壤样品 2~3 g 置于灭过菌的 150 mL 三角瓶中,加满选择培养基,混匀后,用硅胶塞盖住,置于生化培养箱中,30℃静置培养。定时转接,富集培养物平板划线,根据文献[13]描述的菌落特征差异,挑取具备这些特征的单克隆菌落制成悬液,再次划线。如此重复,直至在显微镜下为同一形态的纯种菌落。将纯化菌种斜面划线培养后保存,备用。如此,得到 3 株脱氮硫杆菌菌株,依次编号为 TD1、TD2、TD3,如表 1 所示。

1.4 细菌的鉴定

细菌的初步生理生化指标测定参照文献[13]进行;菌落特征、细菌微观形态及运动特征通过肉眼和光

表 1 来源不同的脱氮硫杆菌菌株

Table 1 Three strains of *Thiobacillus denitrificans* from different area of the intensive pond

编号	来源
TD1	底泥样品
TD2	表层水
TD3	塘边裸露土壤样品

学显微镜进行观察。16S rDNA 同源性分析步骤如下。

(1)总 DNA 提取

采用上海生工生物工程有限公司提供的 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 SK1201 提取,操作步骤按说明书进行。

(2)细菌 16S rDNA 全长序列的扩增

扩增方法在 Bosshard 等^[14]的基础上进行一定改动,细菌通用引物序列如下:8f(5'-AGAGTTTGATC-CTGGCT-3')和 1492r(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。50 μ L PCR 反应体系中,包括:5 μ L 10xPCR 反应缓冲液,1 μ L 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTP,0.25 μ L 5 U $\cdot$ μ L⁻¹ Taq 酶,各 1 μ L 10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 的上下引物。DNA 模板为 10 pmol。PCR 反应经 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,循环 95 $^{\circ}$ C 35 s、55 $^{\circ}$ C 35 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,共 35 个循环,延伸 8 min。

(3)测序

由 PCR 产物电泳结果切割所需 DNA 目的条带,采用上海生工生物工程有限公司提供的 UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒 SK1131 进行产物的纯化回收,采用 ABI 公司的 3730 型基因测序仪进行测序。最后将测定的序列提交 GenBank 数据库,与数据库中已有的 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。

1.5 生长特性研究

将保存备用的 3 种脱氮硫杆菌菌株分别进行两次活化、划线分离至平板表面为均一的脱氮硫杆菌菌落,分别用无菌生理盐水洗下菌苔,采用细菌比浊仪

调节三者至相同浊度(每种脱氮硫杆菌制备 5 个平行备用),后经稀释平板计数法(培养 48 h)定量验证、选择^[10],选择标准 $P<0.05$ 。新鲜培养基中按 5%(V/V)接种上述相应菌悬液,然后于厌氧培养箱中静置培养,设置 3 个平行,测定其在培养基中的生长曲线,同时测定生长过程中培养基介质的 pH 和氧化还原电位(ORP)的变化。根据生长过程中培养基变浑浊特性,利用分光光度计间接检测脱氮硫杆菌培养后的 OD (Optical Density)值代表生长情况($\lambda=420$),pH 和氧化还原电位采用玻璃电极法。差异显著性检验应用 Excel 软件, t 检验。

1.6 厌氧条件下脱氮硫杆菌自养反硝化特征

同样采用 1.5 中制备的菌悬液,将菌悬液分别接种至新的脱氮硫杆菌培养基,每 100 mL 接种 5 mL 菌液,每个菌液做 3 个平行,置于 30 $^{\circ}$ C 生化培养箱中静置培养,每隔 24 h 取样,离子色谱法测硝酸盐氮、亚硝酸盐氮和硫酸根。

2 结果与分析

2.1 细菌的鉴定

2.1.1 外观及部分生理生化指标

对经选择性富集培养、划线分离纯化过的菌落进行观察,同时对细菌的细胞形状、运动性进行观察,并对几种理化指标进行检测。图 1 为 TD1 经结晶紫染色后油镜下的显微照片,表 2 所示为三种来源的菌株的共性特征,与伯杰氏细菌鉴定手册所述脱氮硫杆菌部分的一些特征相符合。

2.1.2 16S rDNA 序列分析

分别提取 TD1~TD3 总基因组 DNA,按 1.4 提到的方法扩增,得到 16S rDNA 全长 PCR 扩增结果。图 2 为 TD1 的 16S rDNA 全长 PCR 扩增结果。

将 TD1、TD2、TD3 的 16S rDNA 序列与 GenBank

表 2 脱氮硫杆菌菌株、菌落特征

Table 2 Features of the three strains in appearance and some physiological characteristics

项目 Item	TD1	TD2	TD3
革兰氏染色 Gram stain	阴性	阴性	阴性
细胞形状 Cells shape	短杆状	短杆状	短杆状
鞭毛/运动性 Flagellum & motility	有鞭毛、运动	有鞭毛、运动	有鞭毛、运动
细胞大小 Cells size	0.5~1 μ m	0.5~1 μ m	0.5~1 μ m
产气状况 Gas production	产生	产生	产生
硝酸盐(还原)Nitrate reduction	是	是	是
菌落特征 Colonies characteristics	白色半透明、扁平润湿、圆形菌落,直径 0.5~1 mm	白色半透明、扁平润湿、圆形菌落,直径 0.5~1 mm	白色半透明、扁平润湿、圆形菌落,直径 0.5~1 mm

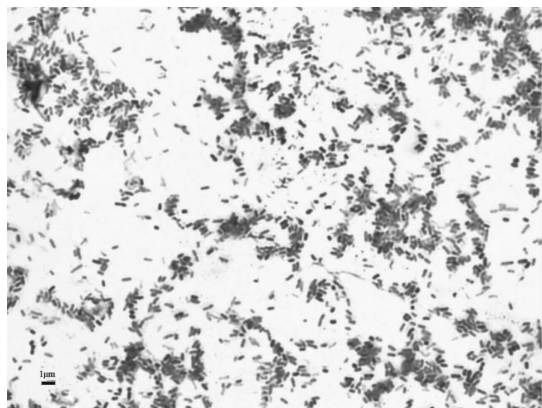
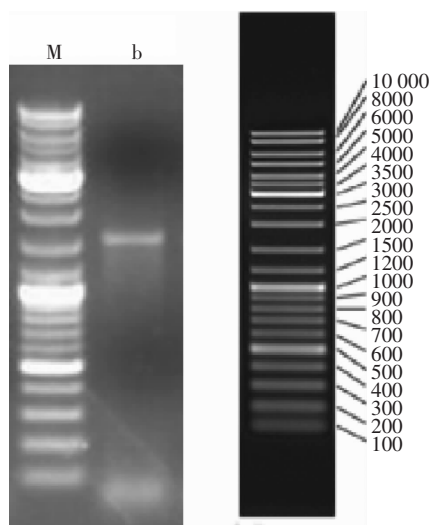


图1 油镜下(100×)TD1 结晶紫染色结果

Figure 1 Strain of TD1 stained with crystal violet under oil lens(100×)



M:分子量标记;b:16S rDNA 全长扩增结果

M:Marker; b:complete sequence of 16S rDNA

图2 TD1 的 16S rDNA 全长扩增结果

Figure 2 Result of complete sequence of 16S rDNA amplification for TD1

上已经登录的基因序列进行比对,均与脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)具有较高的同源性(三者同源性均为97%)。结合菌落特征、生理生化结果和16S rDNA序列分析结果,可以判定所分离到3株菌均为脱氮硫杆菌。

2.2 细菌的生长特性

图3所示为TD1~TD3 3株脱氮硫杆菌在厌氧条件下的生长曲线(图中所示结果均为平均值,以下同),TD1、TD2和TD3具有相似的生长特征,延滞期均为1 d,然后进入对数生长期,均没有明显的稳定期,很快进入衰亡期,这与有关脱氮硫杆菌的报道相

类似^[15]。图4和图5分别为脱氮硫杆菌自养反硝化过程中介质pH和氧化还原电位(Eh)的变化。图4表明在实验的大部分时间里,分别在第2 d、第3 d、第5~7 d时pH(TD1)显著低于pH(TD2)和pH(TD3)($P < 0.05$),pH(TD2)和pH(TD3)两者之间差异不显著($P > 0.05$),这可能与菌株来源地环境的厌氧程度有关,TD1来源地的厌氧程度最高,使得实验大多数时间里pH下降幅度更大,TD2和TD3来源地环境的厌氧程度差别没有大到使其厌氧反硝化过程中介质pH下降幅度差异显著的程度;图5表明,厌氧条件下,脱氮硫杆菌自养反硝化过程中,氧化还原电位先下降后上升,其原因可能为先期较高的氧化还原电位中硝酸根贡献了一定的比例,在硝酸根被还原减少的过程中,硫代硫酸盐首先更多的被氧化为单质硫,造成氧化还原电位的下降,随着介质中硫酸根浓度的升高,氧化还原电位逐渐升高,同时伴随着反硝化反应逐渐进入尾声。进一步比较TD1、TD2、TD3氧化还原电位的变化,还可以发现在整个反应周期内, $Eh(TD3)$ 均低于另外两者($P < 0.05$),而且在大多数时间里表现出 $Eh(TD1) > Eh(TD2) > Eh(TD3)$,结合图3和图4,表明3株脱氮硫杆菌的反硝化脱氮潜能可能存在着这样的关系:TD1>TD2>TD3。

以上可以说明,分别来自底泥、表层水和塘边裸露土壤中的脱氮硫杆菌在生长特性上存在着一定的差别,可能和这3株菌所在环境的厌氧程度有关,来自厌氧程度比较高的环境的脱氮硫杆菌在厌氧条件下会表现出更快的生长速度,来自表层土壤和表层水的脱氮硫杆菌更多的表现出了脱氮硫杆菌的兼性厌氧属性。

2.3 脱氮特征研究

图6为本试验中厌氧条件下脱氮硫杆菌对硝酸盐氮(NO_3^- -N)的去除结果。在第1 d NO_3^- -N的去除效率并不明显,随即 NO_3^- -N的浓度快速下降,三者相比,经TD1作用的 NO_3^- -N下降最快,TD3作用下的 NO_3^- -N下降速率偏慢,TD2作用下 NO_3^- -N浓度的下降速度虽然慢于TD1,但两者保持了非常相似的下降趋势。试验至第8 d NO_3^- -N的去除率分别达到55.97%(TD1)、57.07%(TD2)和53.34%(TD3),三者差异并不明显,差别在于反应的进程,厌氧程度更高来源的TD1用更短的时间将 NO_3^- -N脱除到一个比较低的水平。需要说明的是许多学者在研究脱氮硫杆菌脱氮的过程中,均采用Baalsrud K等^[12]采用过的脱氮硫杆菌培养基,其相对应的氮、硫摩尔比约为1:2,

在此比例下, NO_3^- -N 去除率可以达到 100%。本试验中, 笔者为了进一步了解同等条件下反应体系中氮、硫的比例关系, 在此基础上提高了 NO_3^- -N 的比例至氮、硫摩尔比约为 1:1, 最终 NO_3^- -N 脱除至约 50%, 表明多出来的 NO_3^- -N 没有被脱除掉。图 7 所示为厌氧反硝化过程总介质硫酸根 (SO_4^{2-}) 浓度的变化, TD1、TD2 和 TD3 作用下 SO_4^{2-} 浓度升高的趋势可以很好地

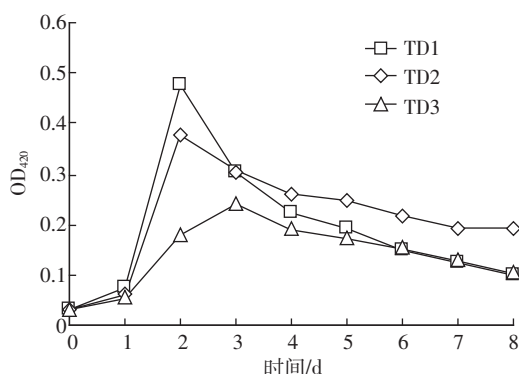


图 3 厌氧反硝化条件菌株 TD1~TD3 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of the strains TD1 to TD3 under anaerobic conditions

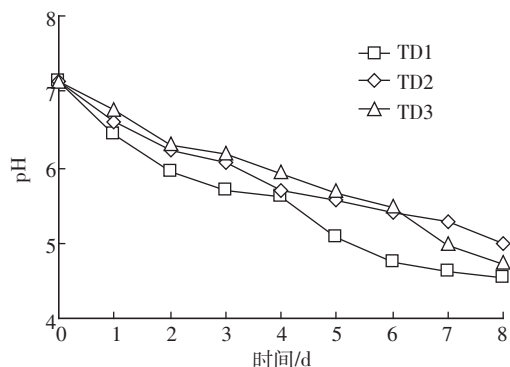


图 4 厌氧反硝化条件下 pH 的变化

Figure 4 Change of pH under anaerobic conditions

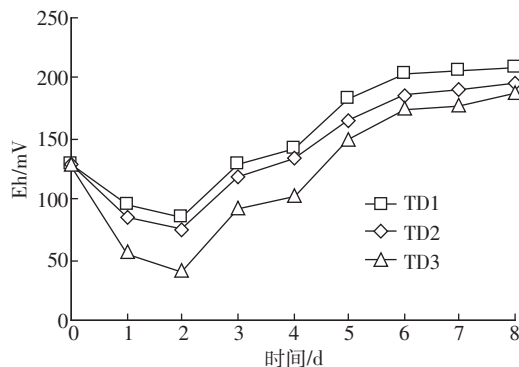
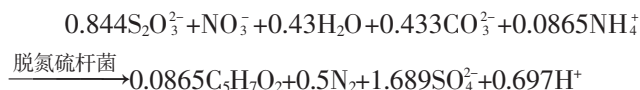


图 5 厌氧反硝化条件下菌株 TD1~TD3 介质氧化还原电位的变化

Figure 5 Change of redox potential under anaerobic conditions

和图 6 所示的 NO_3^- -N 浓度的下降趋势对应起来。在第 1 d 之前两者浓度都没有明显的变化, 随之 NO_3^- -N 浓度的快速下降对应 SO_4^{2-} 浓度的快速上升, TD3 作用下的 NO_3^- -N 下降速率偏慢阶段与 SO_4^{2-} 浓度的缓慢上升相对应, 表明不同厌氧程度来源的脱氮硫杆菌在自养反硝化过程中均表现出严格的氮硫依存关系; 图 8 所示为脱氮硫杆菌 TD1、TD2 和 TD3 厌氧反硝化条件过程中 NO_2^- -N 的产生情况。结果表明 3 株脱氮硫杆菌反硝化过程中均有亚硝酸盐氮产生, 并且浓度一直在升高, 至第 8 d 终浓度分别达到 19.46、31.03、33.99 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别占硝酸盐氮减少量的 5.28%、8.26% 和 9.67%, 占介质中硝酸盐氮初始浓度的 2.95%、4.71% 和 5.16%。Baalsrud K 等^[12]的研究表明, 虽然亚硝酸盐氮对脱氮硫杆菌也会产生毒性, 但是仍然可以作为氮源进行反硝化反应, 本试验中出现的亚硝酸盐氮的堆积, 可能是因为以硫代硫酸盐或单质硫形式存在的电子供体的消耗殆尽造成的, 在这一条件相同的情况下, 来自厌氧环境更高环境的脱氮硫杆菌反硝化造成的亚硝酸盐氮的堆积量更少。

进一步分析本实验中硝酸盐氮减少和硫酸根硫增加所对应的氮硫摩尔比, TD1、TD2 和 TD3 所对应的结果分别为 1:1.43、1:1.40 和 1:1.40。而根据 Bisogni 和 Driscoll^[16]确定的脱氮硫杆菌反硝化反应方程式:



式中硝酸盐氮彻底还原为氮气所对应的氮硫摩尔比为 1:1.689, 算上试验结束时那部分没有反应完的亚硝酸盐氮, 应该还有一部分氮元素以氮氧化物的形式释放出去了, 在这一点上 TD1、TD2 和 TD3 之间没有显著差别, 进一步说明不同厌氧环境来源的脱氮硫杆菌对反硝化反应的最终结果没有影响, 差别在于反应的进程。

3 讨论

从 3 株脱氮硫杆菌在生长特性方面的结果来看, 三者具有相似的趋势, 根本原因当然是都属于脱氮硫杆菌。然而, 在厌氧条件下的生长速率、对介质 pH 和氧化还原电位的影响等方面却产生了比较明显的分化, 来源于底泥中的菌株 TD1 在厌氧条件下具有更快的生长繁殖速度, 并使得介质 pH 下降得更多、氧化还原电位上升得更多。这可能是由于不同的环境来源造成菌株在厌氧条件下具有不同的适应性和生长特性造成的。如果在厌氧条件下以生长繁殖速度作为

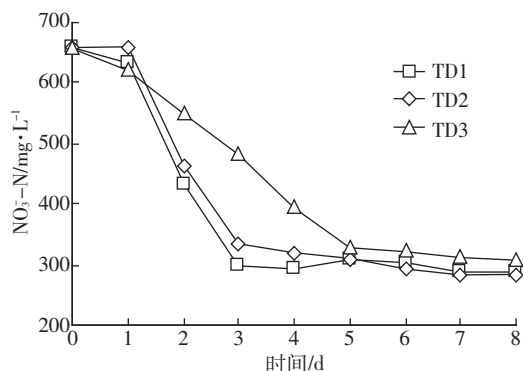
图6 厌氧条件下菌株对 NO_3^- -N 的去除

Figure 6 Removing of the nitrate nitrogen under anaerobic conditions

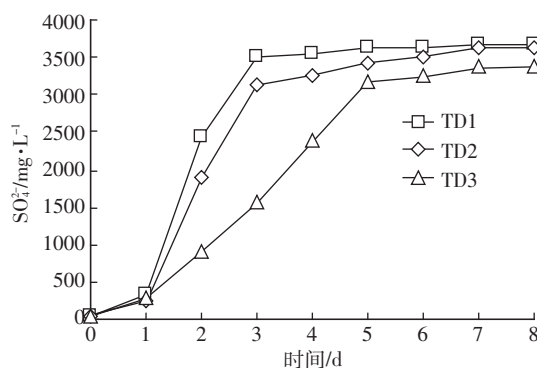
图7 厌氧反硝化条件下菌株介质 SO_4^{2-} 浓度的变化

Figure 7 Change of sulfate concentration under anaerobic conditions

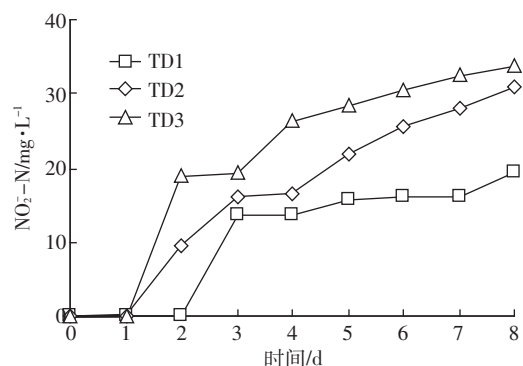
图8 厌氧反硝化条件下菌株介质 NO_2^- -N 浓度的变化

Figure 8 Change of nitrite nitrogen concentration under anaerobic conditions

唯一选择标准,筛选最合适的脱氮硫杆菌菌株,用于养殖池塘修复,很显然应该选择 TD1,当然,TD1 会使 pH 降得更低、使氧化还原点位升得更高,这可能是追求更快的生长繁殖速度不可避免的代价。

从 3 株脱氮硫杆菌的脱氮特征来看,三者同样产生了比较明显的分化,这既与在厌氧条件下各自的生

长繁殖特征相对应有关,又可能与其各自在长期不同厌氧条件下形成的特定的基因表达特性有关。

(1)在一定的时间内,硝酸盐氮的脱除效率 $\text{TD1} > \text{TD2} > \text{TD3}$,主要表现在脱除速率上的差异,时间足够长时,脱除率差别不明显。

(2)实验大部分时间里,硫酸根浓度升高速率 $\text{TD1} > \text{TD2} > \text{TD3}$,硫酸根浓度升高不是我们追求的目标,如果硫源是有毒的硫化物,硫酸根浓度升高的速率也不能代表硫化物的清除速率,因为中间还会形成单质硫。若时间足够长的话,最终浓度没有明显差别,这应该是由介质硫氮比决定的。

(3)亚硝酸盐氮的产生情况 $\text{TD1} < \text{TD2} < \text{TD3}$,来源于厌氧程度最高的脱氮硫杆菌产生最少的亚硝酸盐。由于亚硝酸盐是对养殖生物具有毒性的化合物,是我们不希望得到的,而在脱氮硫杆菌反硝化过程中又很可能会产生,这应该作为菌株筛选的指标之一。但是本实验的结果表明,这 3 株菌产生的亚硝酸盐氮占脱除硝态氮均低于 10% 的水平,因此在养殖水体中,特别是在硝态氮浓度不太高的情况下,三者不会对养殖生物造成毒性影响。如果在高温低压等比较极端的条件下,容易造成亚硝酸盐中毒时可能就要考虑这一问题。

综合以上两方面的考量,结合生产实际,可能针对不同的实际情况选择不同来源的菌株作为养殖氮清除生物更为恰当。在异位修复技术中,强化接种 TD1,并创造相对严格的局部厌氧环境,辅以相关技术手段增加碱度来中和反硝化过程中产生的氢离子,可能会显著增加硝态氮的清除效率;在原位修复中,养殖环境条件可能更接近 TD2 本来生存环境的厌氧程度,在这种情况下强化使用 TD2 有关产品可能会兼顾脱氮效率与相对减少亚硝酸盐的产生。当然无论在哪种情况下,都应该关注水体中氮硫的比例,这不仅影响到氮和硫化物的脱除能力,还会影响到氮素溢出的形态,进而影响温室气体的排放。

4 结论

养殖池塘系统中,来自厌氧程度最高的底泥中的脱氮硫杆菌,在厌氧环境下具有更高的生长繁殖速率和更高效硝态氮脱除效率(具体表现在更短的时间将硝态氮脱除到较低的水平,最终的脱除率差别不大),同时产生相对最少的亚硝酸盐,但介质 pH 下降也最多,引起介质氧化还原电位升高也最大。适合于养殖水体异位修复技术中,在构建相对严格的局部厌

氧环境中的强化接种。

来自厌氧程度居中环境的脱氮硫杆菌,在厌氧条件下,无论是生长繁殖速率还是硝态氮脱除效率以及亚硝酸盐的产生情况、介质 pH 的下降情况和氧化还原电位的升高情况,均居于中间,更适合于在养殖水环境的原位修复中采用。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 中国渔业年鉴 (2010)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- Fisheries Bureau, Ministry of Agriculture. China fishery statistical year-book, 2010[M]. Beijing: China Agriculture Publishing House, 2010.
- [2] 汪为均. 鱼类生病原因及预防措施[J]. 中国水产, 2005(11): 58-59.
- WANG W J. The causes of fish diseases and prevention measures[J]. *China Fisheries*, 2005(11): 58-59.
- [3] Bai YH, Sun QH, Xing R, et al. Analysis of denitrifier community in a bioaugmented sequencing batch reactor for the treatment of coking waste water containing pyridine and quinoline[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90: 1485-1492.
- [4] 张忠智, 鲁莽, 魏小芳, 等. 脱氮硫杆菌的生态特性及其应用[J]. 化学与生物工程, 2005(3): 52-54.
- ZHANG Zhong-zhi, LU Mang, WEI Xiao-fang, et al. Ecological characters and application of *Thiobacillus denitrificans* [J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2005(3): 52-54.
- [5] 冯策, 暴海霞, 郎序菲, 等. 脱氮硫杆菌的生物学特性及应用研究进展[J]. 金属世界, 2009(增刊): 80-82.
- FENG Ce, BAO Hai-xia, LANG Xu-fei, et al. The research development of biological characteristics and application of *Thiobacillus denitrificans*[J]. *Metal World*, 2009(Suppl): 80-82.
- [6] 叶良涛, 左胜鹏. 脱氮硫杆菌自养反硝化及其影响因素研究进展[J]. 环境科学与管理, 2011, 36(3): 58-63.
- YE Liang-tao, ZUO Sheng-peng. Research advances in autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans* and its influencing factors [J]. *China Environmental Science and Management*, 2011, 36(3): 58-63.
- [7] 刘玲花, 王占生, 王志石. 硫/石灰石滤柱去除地下水中硝酸盐的研究[J]. 环境工程, 1995, 13(3): 11-15.
- LIU Ling-hua, WANG Zhan-sheng, WANG Zhi-shi. Nitrate removal from groundwater by sulfure/limestone filter column[J]. *Environmental Engineering*, 1995, 13(3): 11-15.
- [8] Koenig Albert, 刘玲花. 脱氮硫杆菌处理垃圾填埋场渗滤污水的研究[J]. 环境科学, 1997, 18(5): 51-54.
- Koenig Albert, LIU Ling-hua. Denitrification of landfill leachate by *Thiobacillus denitrificans*[J]. *Environmental Science*, 1997, 18(5): 51-54.
- [9] 杨秀山, Garuti G, Tilche A. 厌氧-缺氧-好氧处理城市废水[J]. 环境科学, 1994, 14(6): 51-54.
- YANG Xiu-shan, Garuti G, Tilche A. *Thiobacillus denitrificans* in the anoxic phase of a combined anaerobic-anoxic-oxic municipal wastewater treatment process[J]. *Environmental Science*, 1994, 14(6): 51-54.
- [10] 车轩, 罗国芝, 谭洪新. 脱氮硫杆菌的分离鉴定和反硝化特性研究[J]. 环境科学, 2008, 29(10): 2931-2937.
- CHE Xuan, LUO Guo-zhi, TAN Hong-xin. Isolation, identification and denitrification characterization of *Thiobacillus denitrificans* [J]. *Environmental Science*, 2008, 29(10): 2931-2937.
- [11] 牛建敏, 李睿华. 不同环境中脱氮硫杆菌的分离、培养及其去除硝酸盐的研究[J]. 环境工程, 2009, 27(增刊): 226-229.
- NIU Jian-min, LI Rui-hua. Isolation and culture of *Thiobacillus denitrificans* derived from different environments and their capacities of removing nitrate[J]. *Environmental Engineering*, 2009, 27(Suppl): 226-229.
- [12] Baalsrud K, Kjellrun S Baalsrud. Studies on *Thiobacillus denitrificans* [J]. *Archives of Microbiology*, 1954, 20(1): 34-62.
- [13] Group of Translation on "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Institute of Microbiology, Chinese Academy. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (8th ed)[M]. Beijing: Scientific Press, 1984: 643-650.
- [14] Bosshard PP, Gruter D, Stettler R, et al. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine lake Cadagno a revealed by 16S rDNA analysis[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, 31: 173-182.
- [15] 刘宏芳, 汪梅芳, 许立铭. 脱氮硫杆菌生长特性及其对 SRB 生长的影响[J]. 微生物学通报, 2003, 30(3): 46-49.
- LIU Hong-fang, WANG Mei-fang, XU Li-ming. Characteristics of *Thiobacillus denitrificans* and the effect on the growth of SRB[J]. *Microbiology China*, 2003, 30(3): 46-49.
- [16] Bisogni J J, Driscoll C T. Denitrification using thiosulfate and sulfide[J]. *J Environ Eng Div Am Soc Civ Eng*, 1977, 103(1): 593-604.