中鱼科技 专栏

上海中鱼科技研究所协办

硝化细菌的分离和鉴定

黄 珏
(江苏省兽药监察所 ,南京市 210036)

水体中的氨氮和亚硝酸盐是水产养殖过程中的产物 ,对生物体有毒 ,亚硝酸盐还是强烈的致癌物质。如何降解这两种物质 ,是水产科技工作者一直所关注的研究课题。硝化细菌是一类具有硝化作用的自养菌 ,包括硝化菌和亚硝化菌两个生理菌群 ,其主要特性是生长速率低 ,具有好氧性、依附性和产酸性等 ,可通过 NH_4^+ ·NO_2^- ·NO_3^- 这一过程将 NH_4^+ 转化为 NO_3^- ,从而降低水中氨氮及亚硝酸氮的含量。因此 ,它对水产养殖业及环境保护具有重要意义。

硝化细菌是生物硝化脱氨中起着主要作用的微生物 ,它直接影响硝化效果和生物脱氨的效率。研究表明 ,水体中硝化细菌的浓度对生物脱氨至关重要。大多数硝化细菌生长缓慢 ,硝化及脱氨效果欠佳 ,要用于处理污水 ,须筛选出生长速率高、硝化作用强的硝化细菌。本试验研究着重于硝化细菌的富集培养和细胞固定化 ,有效提高其产率和利用率。通过富集培养 ,其浓度是未经富集培养的 12.5～20.0 倍 ;利用细胞固定化技术可使氨氮的去除率提高 16.5 个百分点。国外在硝化细菌培养方面的研究已有一些专利技术 ,其中一些已形成工业化生产 ,但产品价格较昂贵 ,并且必须不断向反应器中补充流失的硝化细菌。

硝化作用包括两个步骤 :将氨转化为亚硝酸盐和亚硝酸盐转化为硝酸盐 ,这两个步骤分别由亚硝化菌和硝化菌完成。至今尚未发现可将氨直接转化为硝酸盐的细菌。氨和亚硝酸同时也是降解过程中亚硝化菌和硝化菌的唯一能源。

环境温度对硝化细菌的生长影响较大 ,而 pH 值和盐度的影响则相对较小。大多数硝化细菌的适宜生长温度为 10～38 ℃,高于 20 ℃时其活性较高 ,但超过 38 ℃时硝化作用会消失。当环境温度低于 20 ℃时 ,氨的转化会受到影响。一般认为 ,硝化菌和亚硝化菌生长介质的适宜 pH 值分别为 6.0～8.5 和 6.0～8.0。水体中 DO 的高低影响到好氧、厌氧微生物的比例 ,大多数研究人员认为 ,DO 的浓度应当控制在 1.0～2.0 mg/L ,低于 0.5 mg/L 时硝化作用明显减弱。此外 ,碳氮比、碱度等对硝化及脱氨也有影响。

本试验筛选硝化细菌的主要依据是生长速率和硝化作用强度。生长速率采用活菌计数方法测定 ,因为硝化细菌的液体培养基中有沉淀 ,用 OD_{600} 测定误差较大。氨转化效率和硝化作用强度用比色法测定 ,利用亚硝酸根的显色反应。亚

收稿日期 :2004 - 03 - 10 ; 修回日期 :2004 - 04 - 23
作者简介 :黄 珏(1968 -) ,女 ,高级兽医师 ,从事动物药品检测、研究、管理等。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

硝化菌是测定其培养液中亚硝酸根的增加量,而对于硝化菌则是测定其亚硝酸根的减少量。

材料和方法

一、试验材料

1. 菌种 由海水中分离得到

2. 培养基

亚硝化菌培养基

$(NH_4)_2SO_4$	0.5 g
NaCl	0.3 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03 g
$CaCl_2$	7.5 g
蒸馏水	1000 ml
pH	自然

固体培养基加5%琼脂

硝化菌培养基

$NaNO_2$	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.01 g
K_2HPO_4	0.75 g
Na_2CO_3	1 g
NaH_2PO_4	0.25 g
蒸馏水	1000 ml
pH	自然

固体培养基加5%琼脂

肉汤培养基

牛肉膏	0.5%
蛋白胨	1%
氯化钠	0.5%
琼脂	2%

3. 试剂

牛肉浸膏	上海长阳生化制药厂
蛋白胨	上海东海制药厂
磷酸氢二钾	浙江临平化工试剂厂
磷酸二氢钠	南京化学试剂一厂
磷酸氢二钠	南京化学试剂一厂
氯化钠	南京化学试剂一厂
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	南京化学试剂一厂
琼脂	江苏疾病预防控制中心微生物试剂厂
$(NH_4)_2SO_4$	南京化学试剂一厂
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	上海试剂二厂
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	上海试剂四厂
$CaCl_2$	华东师范大学化工厂
Na_2CO_3	上海虹光化工厂
$NaNO_2$	淮安化工二厂
磺胺酸	天津瑞金特化学品有限公司
α-萘胺	上海泗联化工厂

二、试验方法

1. 硝化细菌的分离

将采集到的海水样本分放于两个培养皿中,分别加入亚硝化菌液体培养基和硝化菌液体培养基,在24 ℃的培养箱中培养5 d,取培养液在固体培养基上分区划线,得到单菌落,再挑取单菌落进行分区划线分离。

2. 形态结构鉴定

(1)将分离得到的单菌落分别接种到肉汤培养基的平板上,看其是否生长(硝化细菌是严格的自养菌,在肉汤培养基上不能生长)。

(2)镜检观察 采用单染色法

(3)在培养液中加入格利斯试剂,若亚硝化菌培养液变红,即可判断为阳性。而对于硝化菌培养液,需比色计算出其亚硝酸根浓度是否降低,然后才能判断是否为硝化菌。

3. 细菌的培养(摇瓶、发酵罐)

(1)摇瓶培养 将初步鉴定为硝化细菌的菌落接种到摇瓶中,20～28 ℃培养,转速为200 r/min。每隔5 d取样一次,测定硝化作用强度和菌浓度。

(2)发酵培养 将培养了5 d的种子加入发酵罐中,于20～28 ℃下培养,将pH控制在6.0以上。每隔12 h取样测定亚硝酸根浓度和菌浓度。

4. 硝化作用的测定

(1)试剂

①格利斯试剂

溶液Ⅰ 称取磺胺酸0.5 g,溶于150 ml醋酸溶液(30%)中,保存于棕色瓶中。

溶液Ⅱ 称取α-萘胺0.5 g,加入50 ml蒸馏水中,煮沸后,缓缓加入醋酸溶液中,保存于

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

棕色瓶中。

②2 %醋酸钠溶液

将 2 g 无水醋酸钠加入到 100 ml 蒸馏水中,混匀溶解。

(2) 方法

①标准曲线的绘制

·称取 4.500 g 分析纯亚硝酸钠,放入干燥的小烧杯中,加蒸馏水溶解后洗入 100 ml 容量瓶中,加蒸馏水至刻度定容,摇匀。溶液中 NO_2^- 的浓度为 30 mg/ ml,用时稀释至 0.03 mg/ ml。

·吸取 0、1、2、3、4、5 ml NO_2^- 标准液(0.03 mg/ ml),分别放入 50 ml 容量瓶中,各加入 1 ml 格利斯试剂 Ⅰ,放置 10 min,再加入 1 ml 格利斯试剂 Ⅱ和 1 ml 2 %的醋酸钠溶液,显色后稀释至刻度,各容量瓶中的 NO_2^- 的浓度分别为 0、0.6、1.2、1.8、2.4、3.0 mg/ ml。

·用分光光度计于 520 nm 处比色,以浓度为横坐标,以光密度值为纵坐标绘制标准曲线。

·培养液中 NO_2^- 的测定

·亚硝化菌氨转化作用测定

取 1 ml 培养液放入 50 ml 的容量瓶中,加入 1 ml 格利斯试剂 Ⅰ,放置 10 min,再加入 1 ml 格利斯试剂 Ⅱ和 1 ml 2 %醋酸钠溶液,显色后稀释至刻度。用分光光度计于 520 nm 处比色。

·硝化菌硝化作用强度测定

取 1 ml 培养液稀释 100 倍(视培养液中 NO_2^- 的浓度而定),取稀释后的培养液 1 ml 放入 50 ml 的容量瓶中,加入 1 ml 格利斯试剂 Ⅰ,放置 10 min,再加入 1 ml 格利斯试剂 Ⅱ和 1 ml 2 %醋酸钠溶液,显色后稀释至刻度。用分光光度计于 520 nm 处比色。

②结果计算

@标准曲线

以浓度为横坐标,以光密度值为纵坐标绘制标准曲线。回归得到方程 y = ax + b

@亚硝酸根浓度 = $\frac{(y - b) \times d}{a}$,mg/ ml

d = 稀释倍数

5. 细菌浓度测定

(1) 取 0.1 ml 培养液加到 0.9 ml 生理盐水中,混匀后就得到 10^{-1} 的菌悬液;再取出 0.1 ml 加到 0.9 ml 生理盐水中,得到 10^{-2} 的菌悬液。采用同样的方法依次稀释成 10^{-3}、10^{-4} 的菌悬液,具体情况视菌悬液浓度而定。

(2) 取 0.1 ml 稀释好的菌悬液,与冷却到 50 ℃的琼脂培养基混匀,于 24 ℃下培养 5 d 后进行计数。

结 果

一、亚硝酸盐浓度测定标准曲线

在亚硝酸根标准液中加入格利斯试剂,于 752 分光光度计上 520 nm 处比色。以亚硝酸根浓度为横坐标,A 值为纵坐标,绘制标准曲线(见图 1)。

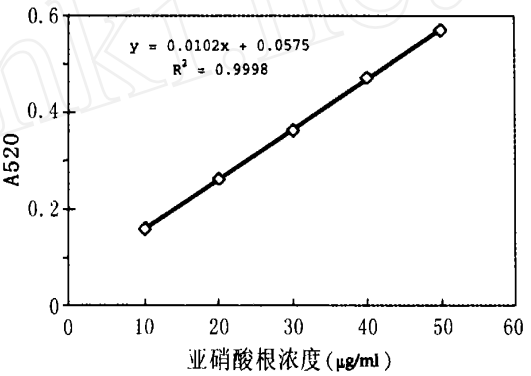

图 1 亚硝酸盐浓度测定的标准曲线

二、硝化细菌的鉴定

1. 形态结构鉴定 —单染色法

经单染色法观察,与文献所述相同,亚硝化菌为椭圆形球菌,体积较大,硝化菌体积较小。

2. 培养特征

将挑选出来的菌落接种到肉汤琼脂培养基上,没有生长,可以认为该菌为自养菌。(硝化细菌是严格的自养菌,不能在肉汤培养基上生长)

3. 硝化作用鉴定

将亚硝化菌和硝化菌接种到液体培养基中,于 24 ℃下培养 5 d,在亚硝化菌的培养液中加入格利斯试剂,若溶液变红,可以判断为亚硝化菌;将硝化菌的培养液取出 1 ml 稀释 100 倍,加入格利斯试剂,于 752 分光光度计上比色,若其中的亚硝酸根含量减少,可以断定为硝化菌。

三、氨转化作用和硝化作用

1. 亚硝化菌的氨转化作用

亚硝化菌经过 5 周的摇瓶培养,能使培养液中亚硝酸根的浓度上升到 300 μl/ ml 以上,说明

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

它具有亚硝化作用(见图 2)。

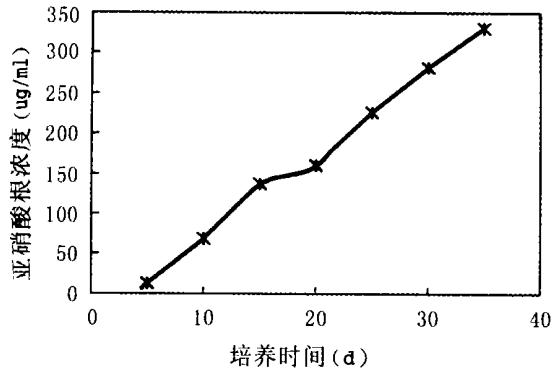

图 2 亚硝化菌的氨转化作用

2. 硝化菌的硝化作用

硝化菌经过 10 d 左右的发酵培养,可使发酵液中的亚硝酸根浓度下降 40 %左右(见图 3)。

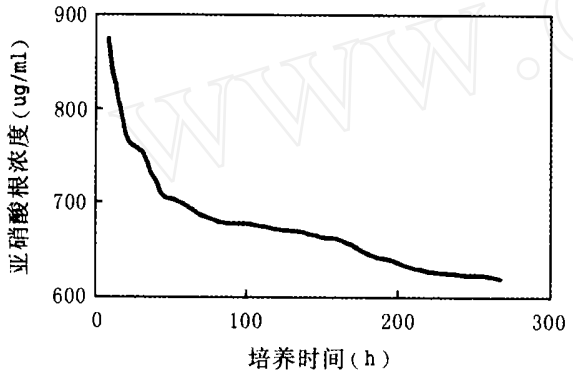

图 3 硝化菌的硝化作用

四、硝化细菌的培养

1. 发酵培养硝化细菌的 pH 值变化

由于硝化细菌产酸,发酵罐中的 pH 值一直呈下降趋势。酸性环境不利于硝化细菌的硝化作用,所以 pH 值最好控制在 6.0 以上。试验结果见图 4。

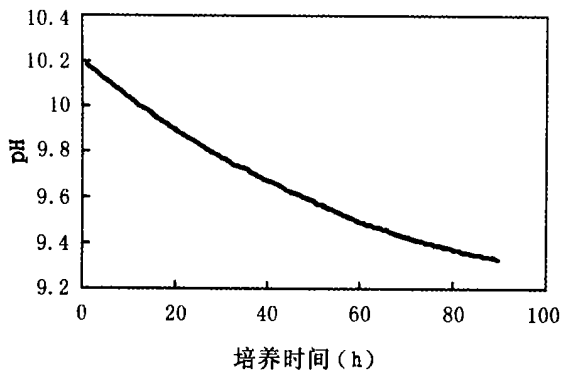

图 4 发酵罐培养硝化细菌的 pH值变化曲线

2. 发酵培养硝化细菌溶氧的变化

硝化细菌是一种好氧的自养菌,由于其生长速度缓慢,发酵液中的菌浓度一直较低,因此溶氧一直较高,最低时也有 68 %左右。在发酵后期随着菌体的自溶,溶氧还有上升的趋势(见图 5)。

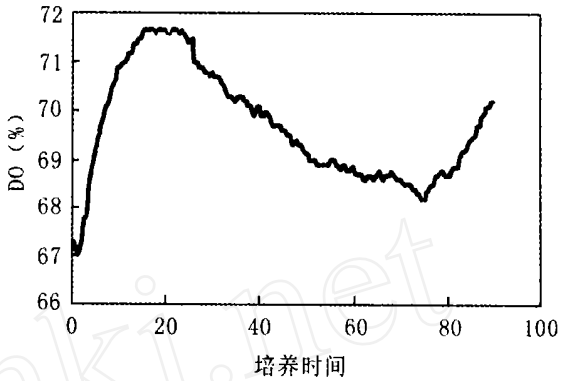

图 5 发酵罐培养硝化细菌的 DO 值变化曲线

3. 发酵培养硝化细菌的生长曲线

该生长曲线由发酵液活菌计数得到,横坐标为发酵时间,纵坐标为含菌量的对数值。由该生长曲线可以看出硝化细菌与一般的异养菌不同,

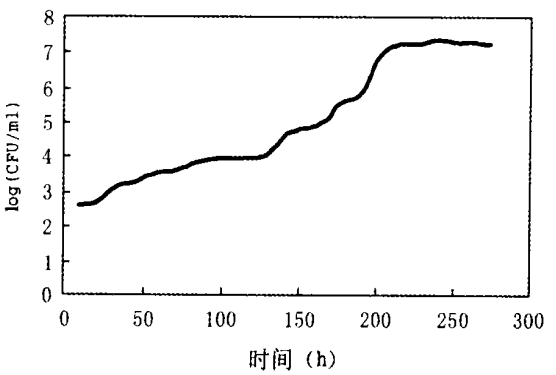

图 6 发酵培养硝化细菌的生长曲线

其生长较缓慢,对数生长期要 5 d 左右才能到达,菌浓度也很低(见图 6)。

讨 论

本研究的目的是筛选生长速度快、硝化作用强度大的硝化细菌。采取的主要步骤如下:

采集水样 →分离 →鉴定 →培养 →硝化作用测定

↓

菌种保存 ←发酵培养 ←细菌浓度测定

测定硝化作用强度的原理是:NO_2^- 能与格利斯试剂反应生成紫红色化合物,此反应不受 NO_3^- N 的干扰,因此可通过比色测定出培养基中亚

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

硝酸的含量。

$$C_{10}H_7NH_2 + NH_2H_4SO_3 + HNO_2 \rightarrow CH_4 \langle \begin{matrix} SO_3H \\ N:N- \end{matrix} C_{10}H_6NH_2 + H_2O$$

在摇瓶培养和发酵培养的后期,菌的亚硝化率和硝化率都有所下降,可能是培养液中的产物累积得太多,对亚硝化作用和硝化作用有抑制,特别是硝酸根对硝化作用的抑制,因此,对于硝化细菌最好采用连续培养方法。

随着水产养殖业的迅速发展,硝化细菌在水产养殖中的重要作用已引起广泛的关注。迄今为止,在集约化的水产养殖模式中,如果没有硝化细菌参与其中的净水作用,要想获得养殖的成功,几乎是不可能的。硝化细菌作为生物硝化脱氨的主要微生物,由于生长速率低,要想提高其工作效率,就要避免硝化细菌的流失,一般可做成固定化细胞,或进行富集培养。此外,对催化硝化细菌的酶也可以进行更多的研究。

参考文献

1. 宋吟玲,田永静. 固定化硝化细菌在不同条件下的硝化活性. 苏州城建环保学院学报,2001,14(2):5～7.
2. 黄 正,范 纬,李 谷等. 固定化硝化细菌去除养殖废水中氨氮的研究. 华中科技大学学报(医学版),2002,31(1):18～20.
3. 孙玉华,潘连德. 活性污泥中硝化细菌的分离及其硝化作用的初步研究. 工业微生物,1999,29(1):21～24.
4. 明振寰,岳春梅,徐炳森等. 用 PCR 技术检测生物硝化池污水中硝化细菌的研究. 浙江大学学报,1999,26(2):83～86.
5. Tappe W. Cultivation of nitrifying bacteria in the retentostat, a simple fermenter with internal mass retention. FEMS Microbiol, Eol, 1996, 19(1): 47～52.
6. 郑 平,冯孝善. 硝化作用的生化原理. 微生物学通报,1999,26(3):215～217.
7. 鲍 鹰,相建平. 温度、盐度和 pH 对生物过滤器去除氨氮效率的影响. 2001,25(6):42～43.

发稿编辑 汤惠明 校对 朱大白

(上接第 126 页)

1100 元(25 元/d),水电费 440 元(10 元/d),饵料费 78 元,共计费用 1618 元。试验中蒙古裸腹溞和卤虫的成本见表 1,蒙古裸腹溞的成本仅为卤虫的 23.8%。若改进培养方式和技术,蒙古裸腹溞的培养密度和产量会进一步提高,成本还可降低。

表 1 2002 年投喂赤点石斑鱼试验中蒙古裸腹溞和卤虫的成本比较

饵料品种	投喂密度(个/ml)	水体体积(L)	试验时间(d)	消耗总数($\times 10^6$ 个)	总成本(元)
卤虫无节幼体	3.5	100	15	5.25	245.3
蒙古裸腹溞	1.5	100	15	2.25	58.3

七、结论

从营养价值、个体大小、生产成本及大规模培养的可行性等因素综合考虑,蒙古裸腹溞是海水鱼类仔稚鱼大规模培养的适宜活饵料。

八、问题与展望

1. 在室内水泥池进行蒙古裸腹溞高密度培养,需占用大量池子,易造成育苗场池子、用水等周转紧张。从降低成本、提高效益方面考虑,应研究和推广室外土池的大规模培养。

2. 应加紧对蒙古裸腹溞休眠卵萌发规律的研究。该溞与其它枝角类一样,在环境恶化时从单性生殖转为两性生殖并产生休眠卵,休眠卵可抵抗各种恶劣的环境,在条件好转时能重新萌发。收集休眠卵,有利于溞种的保存和运输。

参考文献

1. Stottrup J G and Norsker N H. Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 1997, 155, 231～237.
2. 何志辉,秦建光,王 岩. 蒙古裸腹溞在我国的发现与分布[J]. 大连水产学院学报,1988,(2):9～13.
3. 童圣英,林成辉,王雪涛. 蒙古裸腹溞营养成分分析与评价[J]. 大连水产学院学报,1988,(3,4):29～33.
4. 何志辉,姜 宏,姜志强等. 蒙古裸腹溞作为海水鱼苗活饵料的试验[J]. 大连水产学院学报,1997,(4):1～6.
5. 陈学豪,周立红. 蒙古裸腹溞在海水鱼类育苗上的应用研究[J]. 海洋科学,1999(6):14～16.

发稿编辑 汤惠明 校对 朱大白

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net