

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170102001

http://www.yykxjz.cn/

康传磊, 李秋芬, 张艳, 陈世波, 王越. 三株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈养殖水质的净化效果. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 42-48

Kang CL, Li QF, Zhang Y, Chen SB, Wang Y. Purifying effect of three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains on the farming water of *Verasper variegates*. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 42-48

三株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈 养殖水质的净化效果*

康传磊^{1,2} 李秋芬^{1①} 张艳¹ 陈世波³ 王越^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛市卓越海洋集团有限公司 青岛 266408)

摘要 为了考察 3 株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈(*Verasper variegates*)养殖废水的净化效果,选择初始体重为(98±6) g 的圆斑星鲈 240 尾,随机分为 8 组。分别接种花津滩芽孢杆菌(*Bacillus hwajinpoensis*)SLWX₂、嗜碱盐单胞菌(*Halomonas alkaliphila*)X₃和麦氏交替单胞菌(*Alteromonas macleodii*)SLNX₂的不同组合。测定了不同组合中各项无机氮及有机物的变化情况。结果显示,在实验过程中,对照组氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、总氮和化学需氧量的浓度均呈持续上升趋势,分别从 0.21 mg/L 升至 15.94 mg/L, 0.08 mg/L 升至 5.68 mg/L, 1.10 mg/L 升至 7.05 mg/L, 1.74 mg/L 升至 38.86 mg/L, 1.19 mg/L 升至 22.87 mg/L。而加菌组的各指标浓度一直低于对照组,其中,SLWX₂+X₃+SLNX₂组合对圆斑星鲈养殖废水净化效果最佳,氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、总氮、化学需氧量的浓度分别低于对照组 68.55%、48.36%、58.38%、40.02%和 27.47%,SLWX₂+X₃组合的净化效果次之。此外,第 21 天时,对照组出现大量死鱼现象,各实验组中仅有少量死鱼。研究表明,添加的异养硝化-好氧反硝化细菌可在不添加碳源的情况下实现脱氮功能,有效维护养殖水质,并且对圆斑星鲈无毒害及致病作用。

关键词 异养硝化-好氧反硝化细菌;净化效果;细菌组合;圆斑星鲈

中图分类号 X55 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0042-07

近年来,水产养殖业的发展实现了由粗放式到集约化的转变,高密度养殖模式带来高产量、高收益,但同时存在水体残饵、粪便等有机物积累较快的问题。养殖水体氮浓度的快速上升,导致水体自净能力严重下降(刘道玉等,2011)。由于氨氮和亚硝酸氮等物质对水生动物的毒性较大,严重影响了水产动物的健康和生长,给水产养殖业带来巨大损失。同时,未经处理的含高氮、高有机物的养殖废水排入沿海水域,也会加剧近海的富营养化,反过来影响养殖水质。因

此,降低养殖系统中氮浓度是提高养殖水质的关键。

生物脱氮技术被认为是去除养殖污水氮元素最为有效且经济的方式,且无二次污染(Padhi *et al.*, 2013; 姜磊等, 2013; Layva-Diaz *et al.*, 2015)。Kozasa(1986)首次将微生物制剂应用于水产养殖业,此后,越来越多的硝化细菌从不同环境中分离筛选出来,并用于后续脱氮特性研究(汪晓晨等, 2014; 陆洪省等, 2014),但传统自养硝化细菌去除水体氨氮和亚硝酸氮之后,存在硝酸氮积累的问题,同时硝化细菌生长缓慢、培

* 海洋公益性行业科研专项(201305043)和国家自然科学基金项目(31170113)共同资助 [This work was supported by the National Marine Public Welfare Research Project (201305043), and National Natural Science Foundation of China (31170113)] 康传磊, E-mail: kangcl91@163.com

① 通讯作者: 李秋芬, 研究员, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-02, 收修改稿日期: 2017-01-20

养困难且价格高(罗小溪等, 2013)。

水产养殖的特殊模式决定了脱氮过程中的硝化作用和反硝化作用只存在于好氧情况下(张小玲等, 2011)。但传统理论认为, 自养硝化作用与厌氧反硝化作用是两个独立的部分, 因此, 硝化作用与反硝化作用不能在同一条件下进行(潘玉瑾等, 2016)。Robertson 等(1984)在除硫和反硝化处理系统中首次分离出好氧反硝化菌泛养副球菌(*Paracoccus pantotropha*), 异养硝化-好氧反硝化细菌的出现表明在好氧情况下可实现同时硝化反硝化(SND)。目前, 筛选到的异养硝化-好氧反硝化细菌种类越来越多, 已报道的脱氮细菌有假单胞菌属(*Pseudomonas*) (Myahara et al, 2012)、盐单胞菌属(*Halomonas alkaliphila*) (孙雪梅等, 2012)、芽孢杆菌属(*Bacillus*) (何伟等, 2009)、不动杆菌属(*Acinetobacter*) (辛玉峰等, 2011)和产碱菌属(*Alcaligenes*) (余润兰等, 2012)等。目前, 大多数研究集中在异养硝化-好氧反硝化细菌的分离筛选以及脱氮特性(Ren et al, 2014; 梁贤等, 2015; 孙庆花等, 2016; 石小彤等, 2013; 成钰等, 2016), 将异养硝化-好氧反硝化细菌应用于实际海水养殖环节的报道尚少。本研究将实验室筛选的 3 株高效异养硝化-好氧反硝化细菌进行不同组合后应用到圆斑星鲷(*Verasper variegates*)养殖过程中, 以探究其在实际生产中的脱氮效果, 并为其应用技术的建立提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

3 株异养硝化-好氧反硝化细菌均由本实验室筛选、保存, 具有异养硝化-好氧反硝化功能。嗜碱盐单胞菌(*Halomonas alkaliphila*) X₃ 筛选自浙江象山港网箱鱼类养殖区富营养沉积环境, 在氨氮含量为 42 mg/L 的测试液中, 24 h 时, 对氨氮、亚硝酸氮和硝酸氮的去除率分别为 98.29%、99.07% 和 96.48% (孙雪梅等, 2012)。花津滩芽孢杆菌(*Bacillus hwajinpoensis*) SLWX₂ 筛选自青岛市红岛刺参养殖池塘的水体环境, 24 h 对氨氮、亚硝酸氮和硝酸氮的去除率分别达到 100%、99.5% 和 85.6%, 在 1%~8% NaCl 条件下均能生长(成钰等, 2016)。

麦氏交替单胞菌(*Alteromonas macleodii*) SLNX₂ 筛选自青岛市红岛刺参养殖池塘的沉积环境, 24 h 对氨氮、亚硝酸氮的去除率分别达到 100%、36.1%, 72 h 对硝酸氮的去除率达到 82.2% (拟另文发表)。下文以 W 代表 SLWX₂, X 代表 X₃, N 代表 SLNX₂。

圆斑星鲷由青岛卓越海洋集团有限公司提供, 规格为(98±6)g。

实验所用饲料: 碟类慢沉颗粒配合饲料, 由常熟泉兴营养添加剂有限公司生产提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计与日常管理 实验在青岛卓越海洋集团有限公司养殖车间进行, 选取规格一致的圆斑星鲷, 在养殖池中暂养 10 d 后, 从中挑选健康、有活力的 240 尾进行实验, 每个规格为 50 L 的塑料整理箱中加入 30 L 消毒海水和 10 尾已消毒圆斑星鲷; 设置 8 个处理组, 以不添加脱氮细菌的为对照组, 细菌投放组合类型如表 1 所示, 每个处理组 3 个平行。实验期间, 第 5、11、17 天各投菌 1 次, 菌液终浓度控制在 1.3×10^6 CFU/ml。实验共进行 21 d。

实验期间, 各池保持不换水, 定时补充新鲜淡水, 维持水体体积不变。使用充气泵充氧, 使溶氧维持在 7~9 mg/L。每日 09:00 投喂饲料。

1.2.2 水样采集与检测 每 2 天 09:00 投饵前, 使用 YSI-556 多功能水质分析仪测定水质 pH、溶解氧、温度和盐度。将箱内水混合均匀后, 在中央距离水面 10 cm 处采集水样。使用离心机将水样 6000 r/min 离心 5 min, 取上清液。参照中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局等《海洋监测规范》(GB 17378.4-2007), 氨氮的测定采用次溴酸盐氧化法, 亚硝酸氮的测定采用盐酸萘乙二胺分光光度法, 硝酸氮的测定采用锌-镉还原法, 化学需氧量(COD)的测定采用碱性高锰酸钾法, 总氮测定使用总有机碳(Total organic carbon, TOC)分析仪(TOC-VCPH, TNM-1)。

1.3 数据处理

利用 Excel 软件进行数据处理, 实验数据用平均数±标准差(Mean±SD)表示; 采用 SPSS 19 统计软件对数据作统计分析, 显著水平 *P* 采用 0.05, 极显著水平 *P* 采用 0.01。

表 1 实验设计

Tab.1 The experimental design				
处理组 Treatments	生理 盐水 Normal saline (ml)	花津滩 芽孢杆菌 <i>Bacillus hwajinpoensis</i> (ml)	嗜碱盐 单胞菌 <i>Halomonas alkaliphila</i> (ml)	麦氏交替 单胞菌 <i>Alteromonas macleodii</i> (ml)
CK	30			
W		30		
X			30	
N				30
W+X		15	15	
W+N		15		15
X+N			15	15
W+X+N		10	10	10

2 结果与分析

2.1 各组 pH、溶氧、温度和盐度的变化

实验期间, pH、溶氧(DO)、温度(T)和盐度(S)指

标各组之间无显著差异($P>0.05$)。pH 为 7.69 ± 0.23 、DO 为 (8.325 ± 0.385) mg/L、 T 为 $(21.95\pm 0.55)^\circ\text{C}$ 、 S 为 29.7 ± 0.6 。各组各项指标值均处于正常范围内, 满足圆斑星鲃养殖条件。具体指标测定数值见表 2。

表 2 指标测定值

Tab.2 The determined value of each parameter

项目 Items	时间 Time/d											Mean \pm SD
	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	
pH	7.7	7.46	7.49	7.62	7.73	7.87	7.92	7.84	7.73	7.67	7.61	7.69 \pm 0.23
溶解氧 DO(mg/L)	8.14	8.71	8.29	8.47	8.38	8.02	7.94	8.32	8.46	8.21	8.37	8.325 \pm 0.385
温度 T ($^\circ\text{C}$)	21.5	22.1	22.5	21.5	21.7	21.4	21.7	21.4	21.7	21.5	21.7	21.95 \pm 0.55
盐度 S	29.1	29.4	29.6	29.4	29.8	29.6	29.8	30.2	30.3	29.7	29.4	29.7 \pm 0.6

2.2 不同组合的氨氮去除效果

随着养殖时间的推移, 各组氨氮浓度呈逐渐升高的趋势。如图 1 所示, 第 5 天第 1 次加菌后, 各加菌组氨氮浓度上升幅度均低于对照组, 并于第 7~9 天, 各实验组氨氮浓度与对照组出现极显著性差异($P<0.01$), 说明第 5 天投加不同组合菌液之后, 氨氮去除效果显著。从第 11 天开始, 实验组中单菌组对氨氮的去除效果开始下降, 但复合组的去除能力持续有效, 其中, W+X+N 组合优势最为明显, 与其他各实验组存在极显著性差异($P<0.01$), 尤其在第 17 天第 3 次加菌后, 氨氮浓度明显下降。到第 21 天时, W+X+N 组、W+X 组、W+N 组、X+N 组、X 组、W 组及 N 组氨氮浓度比对照组分别降低 68.55% ($P<0.01$)、54.38% ($P<0.01$)、52.61% ($P<0.01$)、44.93% ($P<0.01$)、40.74% ($P<0.01$)、33.48% ($P<0.01$) 和 26.16% ($P<0.01$), 说明异养硝化-好氧反硝化细菌对氨氮有很好的去除效果, 其中, W+X+N 组去除效果最明显, 能将氨氮浓度维持在较低水平。

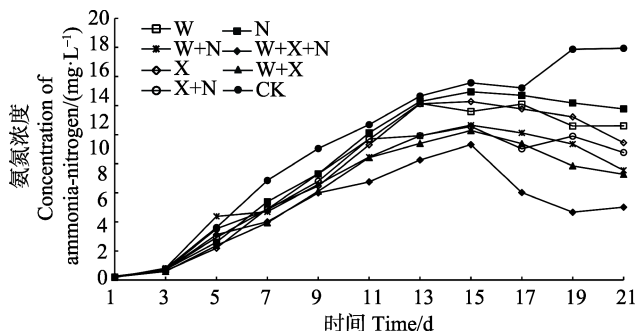


图 1 各组氨氮浓度的变化

Fig.1 The variation of ammonia-nitrogen concentration in different groups

2.3 不同组合的亚硝酸氮去除效果

实验期间, 各加菌组与对照组亚硝酸氮浓度 9 d

前均处于较低浓度, 第 11 天开始逐渐积累增加。如图 2 所示, 第 5 天第 1 次加菌后, 加菌组的亚硝酸氮浓度始终低于对照组, 第 7~15 天, 除单菌组(W 组、X 组和 N 组)之外, 复合菌组均与对照组存在显著性差异($P<0.05$)。从第 17 天第 3 次加菌后开始, 各加菌组均与对照组产生显著性差异($P<0.05$), 可能是 3 株细菌已经逐步适应养殖环境。到第 19 天时, W+X+N 组、W+X 组、W+N 组、X+N 组、X 组、W 组及 N 组亚硝酸氮浓度与对照组差异达到最大值, 分别比对照组降低 48.36% ($P<0.01$)、41.25% ($P<0.01$)、35.56% ($P<0.01$)、25.42% ($P<0.01$)、26.38% ($P<0.01$)、29% ($P<0.01$) 和 17.99% ($P<0.01$), 说明复合细菌在去除氨氮的同时, 对亚硝酸氮也有良好的去除效果。

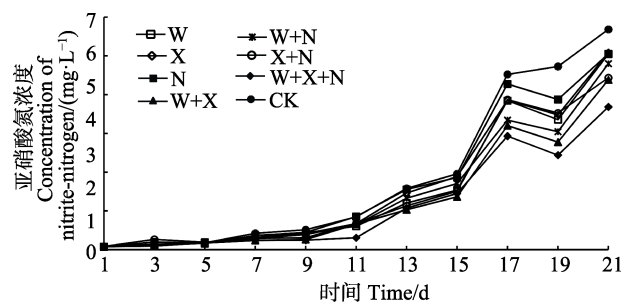


图 2 各组亚硝酸氮浓度的变化

Fig.2 The variation of nitrite-nitrogen concentration in different groups

2.4 不同组合的硝酸氮去除效果

整个养殖期间, 各组硝酸氮浓度的变化呈现大致先升高后下降再升高的规律(图 3)。第 5 天第 1 次加菌后, 第 7 天开始, 除 N 组外, 各加菌组硝酸氮浓度均低于对照组, 说明投加的菌液起到反硝化的作用。其中, W+X+N 组反硝化作用最好, 第 1~13 天将水体硝酸氮浓度维持在较低水平, 并于第 13 天达

到最低浓度 0.51 mg/L。到第 21 天时, 对照组的硝酸氮已达到 7.05 mg/L, 各加菌组均与对照组存在显著差异($P<0.05$) (除 N 组外), 但各加菌组间差异不显著($P>0.05$)。第 21 天时, W+X+N、W+X、W+N、X+N、X、W 及 N 组的硝酸氮浓度分别比对照组降低 58.38%、31.66%、53.04%、53.20%、50.97%、42.61% 和 14.26%。说明复合细菌对硝酸氮也有良好的去除效果。

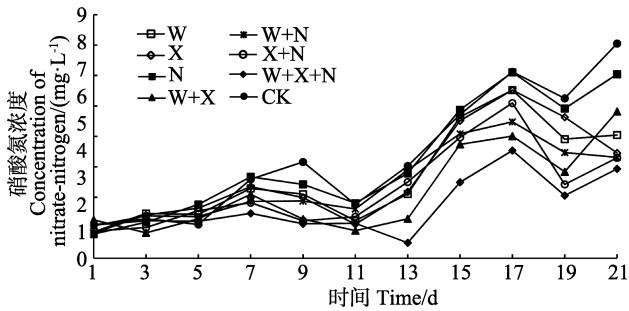


图 3 各组硝酸氮浓度的变化

Fig.3 The variation of nitrate-nitrogen concentration in different groups

2.5 不同组合的有机物去除效果

如图 4 所示, 第 1~5 天, 对照组与各加菌组之间重合度高, 不存在显著性差异($P>0.05$)。第 5 天第 1 次加菌后, 第 7 天开始, 除 N 组外, 各加菌组 COD 浓度始终低于对照组, 且均与对照组存在显著性差异($P<0.05$), 说明投加异养硝化-好氧反硝化细菌对 COD 有一定的降解作用。实验期间, W+X+N 组对 COD 的去除效果最佳, 与对照组存在极显著差异($P<0.01$), W+X 组次之。第 13 天时, W+X+N 组、W+X 组、W+N 组、X+N 组、X 组、W 组及 N 组的 COD 浓度与对照组达到最大差异值, 分别与对照组降低 27.47%、23.08%、14.29%、17.58%、10.99%、8.79% 和 3.30%。说明复合细菌在去除无机氮的同时, 对有机物也有一定去除效果。

2.6 不同组合的总氮去除效果

随着实验进行, 各组总氮浓度缓慢上升, 如图 5 所示, 除 N 组外, 其余各加菌组总氮浓度均低于对照组。整个实验期间, W+X+N 组及 W+X 组的总氮浓度均与对照组有极显著差异($P<0.01$)。第 15 天, W+X+N、W+X、W+N、X+N、X、W 及 N 组的总氮浓度分别比对照组降低 40.02%、29.61%、18.58%、12.34%、29.45%、11.3% 和 2.65%。结果表明, 3 株细菌可在养殖环境中去除一定的总氮。

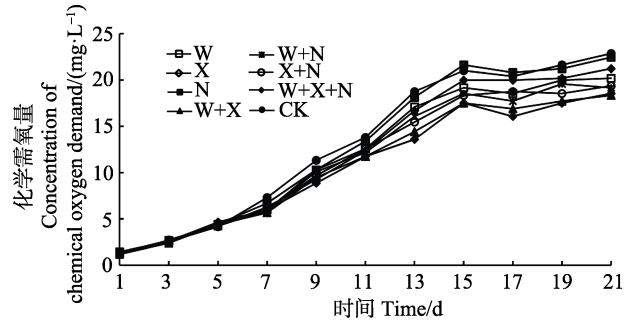


图 4 各组化学需氧量的变化

Fig.4 The variation of chemical oxygen demand in different groups

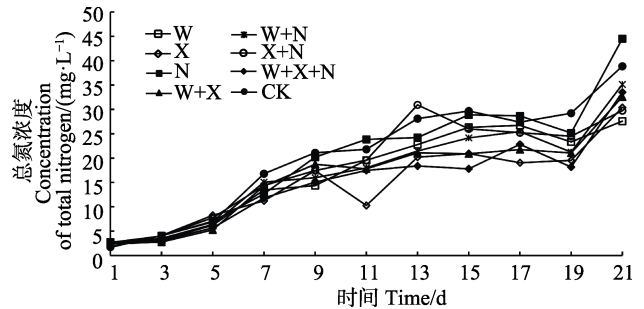


图 5 各组总氮浓度的变化

Fig.5 The variation of total nitrogen concentration in different groups

2.7 不同实验组中圆斑星鲈的存活情况

实验初始, 各养殖箱中放入圆斑星鲈 10 尾。第 21 天, 对照组出现大量死亡现象。如表 3 所示, 圆斑星鲈存活数量分别为 4、5 和 4 尾, 存活率为 40%、50% 和 40%, 随即停止实验。各加菌组除 W 组、N 组、X+N 组出现少量死亡外, 其余组均无死亡现象。表明添加的 3 株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈无毒害及致病作用, 并通过改善水体环境保证了圆斑星鲈的存活率。

3 讨论

研究结果显示, 与未添加异养硝化-好氧反硝化细菌的对照组相比, W+X+N 组合对氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、总氮及化学需氧量的去除效果优于其他组合, 分别低于对照组 68.55%、48.36%、58.38%、40.02% 及 27.47%, 该组合与赵留群等(2014)投加 EM 菌实验结果相比, 对氨氮和亚硝酸氮去除率分别提高了 11.63% 和 166.01%, 与郑佳佳等(2013)复合菌实验结果相比, 硝酸氮的去除率提高了 3.16%。预示这些菌构成的复合异养硝化-好氧反硝化细菌菌剂能有效地降低水体中氮素含量, 改善水质。各种无机氮指标基本可维持在较低水平, 满足养殖的水质要求, 在海水

表3 不同实验组中圆斑星鲮的存活率
Tab.3 The survival rate of *V. variegatus* in different experimental groups

项目 Items	CK			W			X			N			W+X			W+N			X+N			W+X+N		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
起始总数 Initial number	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
存活个体数 Survival number	4	5	4	10	9	10	10	10	10	8	8	9	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10
存活率 Survival rate(%)	40	50	40	100	90	100	100	100	100	80	80	90	100	100	100	100	100	100	100	90	100	100	100	100

养殖生产上具有很好的应用前景。

3株细菌对化学需氧量有一定的去除作用,虽然最大去除率仅为27.47%,不及马梦雪等(2016)利用硝化细菌和反硝化细菌的复合菌剂处理模拟污水的效果,但优于自养硝化细菌,且3株细菌对COD的去除仅为辅助功能,相对于传统异养反硝化菌而言,但不需添加额外碳源,反而可消除原有的有机物。

花津滩芽孢杆菌(SLWX₂)和嗜碱盐单胞菌(X₃)对各项指标的去除效果均优于麦氏交替单胞菌(SLNX₂),这与3株细菌前期进行的脱氮特性研究所取得的结果一致。同时,相同接种浓度、不同细菌组合对氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、总氮及化学需氧量均有去除作用,但去除效果不一。总体而言,3株菌复合组优于2株菌复合组,并优于单株菌组,说明3株细菌复合之后有很好的协同作用,但协同作用效果不一。

3株细菌对硝酸氮和总氮均有去除效果,3株细菌在实际生产中可起到反硝化作用。为探究脱氮细菌反硝化机制,黄廷林等(2014)利用PCR技术从3株好氧反硝化细菌中均成功检测到周质硝酸盐还原酶亚基基因(*napA*),表明其可以利用*napA*还原硝酸氮实现反硝化功能。Li等(2012)利用斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)T13对硝酸盐还原酶进行检测,检测到硝酸盐还原酶占脱氮酶基因的30%以上。目前,被分离筛选出的众多异养硝化-好氧反硝化细菌均能实现生物脱氮功能,但不同种类菌株在脱氮途径和酶学特征上有较大的差异(吴伟等,2013;李嘉伟等,2015;李鹏章等,2015)。此外,本研究3株细菌的脱氮途径和机制尚不清楚,3株细菌组合效果最优的原因可能为3株细菌存在的脱氮酶系不同,具有互补作用,下一步需要通过分子生物学技术,对其相关基因进行深入研究,探究3株细菌的脱氮途径与机制,来加以验证。

4 结论

3株细菌在养殖环境中均具有硝化-反硝化作用,

可实现生物脱氮功能,但对圆斑星鲮养殖水质各项指标的去效果不一,其中,SLWX₂单株效果最佳。组合菌效果好于单株菌,其中,SLWX₂+X₃+SLNX₂组合对圆斑星鲮养殖水质净化效果最佳,可使养殖水体3种无机氮的浓度维持在较低范围,SLWX₂+X₃组合净化效果次之。3株细菌对圆斑星鲮生长无毒害作用,使用安全。

参 考 文 献

- Cheng Y, Li QF, Fei YT, *et al.* Screening and nitrogen removing characteristics of heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria SLWX₂ from sea water. *Environmental Science*, 2016, 37(7): 2681-2688 [成钰, 李秋芬, 费聿涛, 等. 海水异养硝化-好氧反硝化芽孢杆菌 SLWX₂ 的筛选及脱氮特性. *环境科学*, 2016, 37(7): 2681-2688]
- He W, Wang W, Wang J, *et al.* Isolation, identification and its mixed application of a strain of aerobic denitrifying bacteria. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2009, 25(2): 88-93 [何伟, 王薇, 王洁, 等. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及其混合应用特性研究. *生态与农村环境学报*, 2009, 25(2): 88-93]
- Huang TL, Zhou N, Zhang HH, *et al.* Isolation and identification of three oligotrophic aerobic denitrifying bacteria and denitrification characteristics. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(12): 5507-5513 [黄廷林, 周娜, 张海涵, 等. 3株贫营养好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化特性. *环境工程学报*, 2014, 8(12): 5507-5513]
- Jiang L, Xu CB, Ma XP, *et al.* Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier. *Environmental Science & Technology*, 2013, 36(3): 12-15 [姜磊, 徐成斌, 马溪平, 等. 1株好氧反硝化菌的分离鉴定和反硝化特性研究. *环境科学与技术*, 2013, 36(3): 12-15]
- Kozasa M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. *Microbiology Aliment Nutrition*, 1986, 4(1): 121-135
- Layva-Diaz JC, Gonzalez-Martinez A, Gonzalez-Lopez J, *et al.* Kinetic modeling and microbiological study of two-step nitrification in a membrane bioreactor and hybrid moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor for wastewater

- treatment. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 259: 692–702
- Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: A controversy revived. *Archives of Microbiology*, 1984, 139(4): 351–354
- Li A, Gai Z, Cui D, *et al.* Genome sequence of a highly efficient aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* T13. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(20): 5720
- Li JW. SND biological denitrification process N₂O generation and key enzymes and their activity. *Guangdong Chemical Industry*, 2015, 42(1): 91–93 [李嘉伟. SND 生物脱氮过程 N₂O 的产生与关键酶及其活性. *广东化工*, 2015, 42(1): 91–93]
- Li PZ, Wang SY, Liu Y, *et al.* Effect of electron competition on N₂O production during domestic sewage biological denitrification process. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2015, 23(4): 645–655 [李鹏章, 王淑莹, 刘越, 等. 生活污水生物脱氮反硝化过程中电子竞争对 N₂O 产生的影响. *应用基础与工程科学学报*, 2015, 23(4): 645–655]
- Liang X, Ren YX, Yang L, *et al.* Characteristics of nitrogen removal by a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium YL. *Environmental Science*, 2015, 36(5): 1749–1756 [梁贤, 任勇翔, 杨垒, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 YL 的脱氮特性. *环境科学*, 2015, 36(5): 1749–1756]
- Liu DY, Wu W. Research on water pollution and microbial remediation of aquaculture. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2011(17): 253–256 [刘道玉, 吴伟. 水产养殖水体污染及微生物修复的研究. *现代农业科技*, 2011(17): 253–256]
- Lu HS, Zhao XS, Wang YS, *et al.* Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying strain from saline-alkali soil and analysis of its nitrification abilities. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2014, 41(1): 164–168 [陆洪省, 赵晓舒, 王亚舒, 等. 盐碱地中 1 株硝化细菌的分离、鉴定及其硝化能力的分析. *安徽农业大学学报*, 2014, 41(1): 164–168]
- Luo XX, Gao JZ, Chen ZZ. Research progress on enrichment culture and application of nitrifying bacteria. *Fisheries Science & Technology Information*, 2013, 40(6): 320–323 [罗小溪, 高建忠, 陈再忠. 硝化细菌富集培养及应用研究进展. *水产科技情报*, 2013, 40(6): 320–323]
- Ma MX, Yang XY, Jia RM, *et al.* Research on the complex microbial community for biological denitrification. *Shandong Chemical Industry*, 2016, 45(10): 12–19 [马梦雪, 杨欣玥, 贾茹梦, 等. 生物脱氮复合菌剂研究. *山东化工*, 2016, 45(10): 12–19]
- Myahara M, Kim SW, Zhou S, *et al.* Survival of the aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2 during co-culture with activated sludge under denitrifying conditions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2012, 76(3): 495–500
- Padhi SK, Tripathy S, Sen R, *et al.* Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 78(3): 67–73
- Pan YJ, Liu F, Meng S, *et al.* Isolation and characterization of an aerobic denitrifying-heterotrophic bacterium. *Environmental Engineering*, 2016, 34(1): 41–46 [潘玉瑾, 刘芳, 孟爽, 等. 好氧反硝化菌 *P. chengduensis* ZPQ2 的筛选及其反硝化条件优化. *环境工程*, 2016, 34(1): 41–46]
- Ren YX, Lei Y, Liang X. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB. *Bioresource Technology*, 2014, 171: 1–9
- Shi XT, Li YQ, Xing GW, *et al.* Screening and primary identification of an aerobic denitrifier isolate with salt tolerance. *Biotechnology Bulletin*, 2013(3): 175–180 [石小彤, 李彦芹, 邢国伟, 等. 一株耐盐好氧反硝化细菌的分离筛选及鉴定. *生物技术通报*, 2013(3): 175–180]
- State Administration of quality supervision, inspection and Quarantine, People's Republic of China. GB17378.4-2007, Marine monitoring standard. Beijing: China Standard Press [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 海洋监测规范, GB17378.4-2007. 北京: 中国标准出版社]
- Sun QH, Yu DS, Zhang PY, *et al.* Identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain isolated from marine environment. *Environmental Science*, 2016, 37(2): 648–654 [孙庆花, 于德爽, 张培玉, 等. 1 株海洋异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及脱氮特性. *环境科学*, 2016, 37(2): 648–654]
- Sun XM, Li QF, Zhang Y, *et al.* Phylogenetic analysis and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria strain from marine environment. *Acta Micro Biologica Sinica*, 2012, 52(6): 687–695 [孙雪梅, 李秋芬, 张艳, 等. 一株海水异养硝化-好氧反硝化菌系统发育及脱氮特性. *微生物学报*, 2012, 52(6): 687–695]
- Wang XC, Yu DS, Li J, *et al.* Separation of nitrifying bacterium from anammox reactors with different substrates and characteristics of heterotrophic AOB. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(6): 2617–2625 [汪晓晨, 于德爽, 李津, 等. 不同基质条件下厌氧氨氧化反应器中硝化细菌的分离及选育异养 AOB 菌株的特性. *环境工程学报*, 2014, 8(6): 2617–2625]
- Wu W, Liu DY, Qu JH, *et al.* The changes of nitrate and nitrite reductase activity of *Paracoccus denitrificans* and its inorganic nitrogen removal for aquaculture water. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(6): 1244–1252 [吴伟, 刘道玉, 瞿建宏, 等. 脱氮副球菌硝酸盐/亚硝酸盐还原酶的活性变化及对养殖水体中无机氮素的转化. *农业环境科学学报*, 2013, 32(6): 1244–1252]
- Xin YF, Qu XH, Yuan MD, *et al.* Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Acinetobacter* sp. YF14 and its denitrification activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(12): 1646–1654 [辛玉峰, 曲晓华, 袁梦冬, 等. 一株异养硝化-反硝化不动杆菌的分离鉴定及脱氮活性. *微生物学报*, 2011, 51(12): 1646–1654]
- Yu RL, Miao L. Character of ammonia removal by heterotrophic nitrifying bacteria *Alcaligenes* sp. S3 and its kinetics. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(3): 869–872 [余润兰, 苗雷. 异养硝化细菌 *Alcaligenes* sp. S3

- 除氮特性及动力学. 环境工程学报, 2012, 6(3): 869–872]
- Zhang XL, Zhang X. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium *Bacillus* sp. H2. Environmental Science & Technology, 2011, 34(10): 53–57 [张小玲, 张霞. 好氧反硝化菌 *Bacillus* sp. H2 脱氮特性研究. 环境科学与技术, 2011, 34(10): 53–57]
- Zhao LQ, Xiao S, Liu T, *et al.* Effect of three probiotics on cultured water quality for sea cucumber *apostichopus japonicus*. Journal of dalian polytechnic university, 2014, 33(6): 391–394 [赵留群, 肖珊, 刘彤, 等. 3 种微生态制剂对幼刺参养殖水体水质的影响. 大连工业大学学报, 2014, 33(6): 391–394]
- Zheng JJ, Peng LS, Zhang XP, *et al.* Effects of complex probiotics on water quality and microbial communities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) culture. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(3): 457–464 [郑佳佳, 彭丽莎, 张小平, 等. 复合益生菌对草鱼养殖水体水质和菌群结构的影响. 水产学报, 2013, 37(3): 457–464]

(编辑 冯小花)

Purifying Effect of Three Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacteria Strains on the Farming Water of *Verasper variegates*

KANG Chuanlei^{1,2}, LI Qiufen^{1①}, ZHANG Yan¹, CHEN Shibo³, WANG Yue^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Qingdao Excellence Ocean Group Co., Ltd., Qingdao 266408)

Abstract High nitrogen concentration in intensive aquaculture systems has recently become a serious problem to impact the survival of farmed animals and the marine environment. The newly found heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria showed several advantages in removing the nitrogen in the waster waters. To investigate the purifying effect of three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains on waste water of *Verasper variegates* farming, 240 *Verasper variegates* (98±6) g were divided into 8 groups randomly. Simultaneously, the various combinations of *Bacillus hwajinpoensis* (SLWX₂), *Halomonas alkaliphila* (X₃), and *Alteromonas macleodii* (SLNX₂) were inoculated into the culture tanks respectively. Different inorganic nitrogen and organic matter of the various combinations were determined. The results showed that the concentrations of ammonia-nitrogen, nitrite-nitrogen, nitrate-nitrogen, total nitrogen, and chemical oxygen demand in the control group during the whole experiment were from 0.21 mg/L to 15.94 mg/L, 0.08 mg/L to 5.68 mg/L, 1.10 mg/L to 7.05 mg/L, 1.74 mg/L to 38.86 mg/L, and 1.19 mg/L to 22.87 mg/L, respectively. The concentrations of the indices in the trial groups were significantly lower than those of the control group. Among the trial groups, the group SLWX₂+X₃+SLNX₂ showed the best purifying effect with the concentrations of ammonia-nitrogen, nitrite-nitrogen, nitrate-nitrogen, total nitrogen and chemical oxygen demand 68.55%, 48.36%, 58.38%, 40.02%, and 27.47% lower than those in the control group, respectively. The group SLWX₂+X₃ showed the second best purifying effect. All trial groups had significantly lower fish death at the 21st day compared with the control group. The results indicated that these three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains can effectively improve the water quality through nitrification and denitrification without adding carbon sources, and have no toxic or morbidity effect on *Verasper variegatus*.

Key words Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains; Purification effect; Bacteria combinations; *Verasper variegates*

① Corresponding author: LI Qiufen, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn