

假丝酵母菌降解养殖水体氨氮的特性研究

谢 航, 邱宏端, 林 娟, 陈朝洋

(福州大学生物科学与工程学院, 福州 350002)

摘 要: 为筛选降解养殖水体氨氮的功能菌, 从海水中取样, 用 212mg/L 氨氮浓度的分离培养基进行培养, 筛选获得了一株能高效降解养殖水体氨氮功能的菌株, 经鉴定为假丝酵母菌。通过研究养殖水体氨氮浓度、pH 值、温度等因素对菌株降解氨氮作用的影响, 结果表明, 菌株降解氨氮较适宜的条件为: 养殖水体氨氮 20mg/L , pH 值 $6\sim 7$, 温度 $25\sim 30$, 盐浓度 $0\sim 1\%$, 溶氧 2mg/L 以上。假丝酵母菌在这种水体生态条件下接种 5% , 氨氮降解率接近 80% 。

关键词: 假丝酵母菌; 养殖水体; 氨氮; 降解

中图分类号: S949

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2005)08-0142-04

谢 航, 邱宏端, 林 娟, 等. 假丝酵母菌降解养殖水体氨氮的特性研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(8): 142- 145

Xie Hang, Qiu Hongduan, Lin Juan, et al. Characteristics of degrading $\text{NH}_3\text{-N}$ in the fishery water by *Candida* sp. [J].

Transactions of the CSAE, 2005, 21(8): 142- 145 (in Chinese with English abstract)

0 引 言

长期以来, 在养殖水体中如何有效控制氨氮浓度, 一直是水产养殖工作者研究和探索的问题。养殖水体中高浓度的氨氮不仅直接危害养殖生物, 而且还会引起养殖动物发生病害^[1-3]。近年来, 去除养殖水体高浓度氨氮, 报道较多的是采用光合细菌^[4]与硝化细菌^[5], 但在这两类菌中, 光合细菌降解氨氮功能较不稳定, 而硝化细菌由于是严格的化能自养菌, 其生长条件较为苛刻, 存在细胞难以培养的缺点, 同时这两类菌还存在生长周期较长的弊端。目前, 在降氨氮作用的其他微生物开发方面, 也有报道采用诺卡氏菌降解养殖水体氨氮^[6], 但其接种量为 20% , 存在接种量过大、应用成本过高等缺点。为此, 养殖水体氨氮的生物转化与去除仍需要深入进行研究, 对菌种选育而言尤其要注重筛选具有高效降解氨氮作用, 且易于培养、生长周期短的异养细菌与酵母菌等。基于此出发点, 本文研究降解养殖水体氨氮作用的酵母菌的筛选与降解特性。该研究为养殖水体氨氮的净化, 及开展研制多菌种养殖水体净化制剂应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 水样 分离菌水样: 海水取自连江小埕鲍鱼养殖水体与本校生态养殖实验室南美白对虾养殖水体; 实验室配制培养基的养殖水样: 淡水取自校园附近鱼塘。

收稿日期: 2004-10-15 修订日期: 2005-04-05

基金项目: 福建省海洋与渔业局资助项目(闽海渔科 0411 号)

作者简介: 谢 航(1980-), 女, 硕士研究生, 从事微生物遗传育种研究。福州市工业路 523 号 福州大学生物科学与工程学院, 350002。Email: xiehang_11@sina.com

通讯作者: 邱宏端(1955-), 女, 教授, 从事应用微生物研究。福州市工业路 523 号 福州大学生物科学与工程学院, 350002。Email: hongduanlq@163.com

2) 培养基

分离培养基: KH_2PO_4 2g , NaCl 20g , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g , 葡萄糖 10g , MgSO_4 0.5g , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 微量, 蒸馏水 1L , pH 值 $7.0\sim 7.2$ 。固体培养基添加 2% 琼脂。

菌种鉴定培养基: 参照《微生物分类学》^[7]中的菌种鉴定培养基配方配制。

酵母菌培养基: 葡萄糖 20g , 酵母膏 10g , 蛋白胨 10g , 蒸馏水 1L , pH 值自然。

3) 主要设备

超净工作台(SP-DJ 型, 上海浦东物理光学仪器厂); 高压蒸汽灭菌锅(YXSG41280 型, 上海医用核子仪器厂); 生化培养箱(LRH-190 型, 广东医疗器械厂); 721 分光光度计(SP-1105 型, 上海光谱仪器有限公司); 精密数显酸度计(METER PHSF-3 0.01 级)。

1.2 方法

1) 菌种的分离与筛选

取海水水样 20mL , 接入装有 200mL 分离培养基的三角瓶中, 置于 30°C 下静置培养 $2\sim 3\text{d}$, 待培养液呈现混浊后, 以 10% 接种量转接入新的分离培养基中培养, 如此重复 $2\sim 3$ 次。后吸取培养液, 用无菌水适当稀释, 分别涂布在含有 2% 的 NaCl 盐浓度(以下简称盐浓度)的固体分离培养基上, 挑取优势生长菌落, 划线在 0.5% 盐浓度的固体培养基上。最后挑取在 0.5% 与 2% 盐浓度下均能良好生长的菌株进行降解氨氮功能的筛选。其步骤为将分离菌株分别接种于 212mg/L 氨氮浓度(硫酸铵 1g)的分离培养基中, 于 30°C 下静置培养 2d 后测定氨氮的降解率, 选取降解氨氮作用最好的菌株斜面保藏。

2) 菌种鉴定

参照文献[7], 采用形态学特征和部分生理生化实验相结合的方法, 并依据《酵母菌的特征与鉴定手册》^[8]鉴定到属。

3) 菌株细胞生长与降解氨氮的关系

斜面保藏菌种经酵母培养基活化培养后, 接种于添加一定氨氮浓度的淡水养殖水体中, 灭菌后接种 5% 菌液, 于 30 、100 r/min 条件下振荡培养, 并定期取样检测菌体数量与氨氮浓度。其中, 氨氮测定采用纳氏分光光度法^[9]; 细胞数量采用平板菌落计数法。

4) 环境因素对菌株降解氨氮的影响

以校园鱼塘中的养殖水体为基质配制培养液, 灭菌接种后探讨氨氮浓度、pH 值、温度、溶氧与接种量等对功能菌株降解氨氮的影响。

5) 氨氮降解率、氨氮平均降解速率计算

降解率(%) = [(培养前氨氮初始浓度 - 培养后氨氮浓度) / 培养前氨氮浓度] × 100%

平均降解速率($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) = (培养前氨氮初始浓度 - 培养后氨氮浓度) / 培养时间

2 结果与分析

2.1 降解氨氮功能菌的分离与筛选

经分离培养基富集培养、分离纯化, 从两种海水水样中分离到 A1~A4 和 B 共 5 株分离株, 它们在 0.5%、2% 盐浓度下均能生长。通过进一步测定 5 株分离菌对培养基中氨氮的降解能力, 筛选出降解氨氮功能最好的为 B 菌株(图 1)。B 菌株在含 2% 盐浓度的分离培养基中, 30℃ 下静置培养 2 d, 降解培养基氨氮(212 mg/L) 达到 92%。

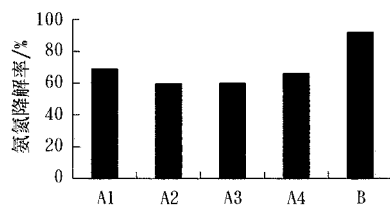


图 1 不同分离株的氨氮降解率

Fig 1 Degradation rate of $\text{NH}_3\text{-N}$ of different isolated strains

2.2 B 菌株菌种鉴定

B 菌株经形态观察判断为酵母菌, 后结合其他特征与生理生化试验结果(表 1), 参考巴尼特 A, 佩恩 RW, 亚罗 D 著的《酵母菌的特征与鉴定手册》^[6], 初步鉴定为假丝酵母属(*Candida sp.*)。

2.3 假丝酵母菌细胞生长与降解氨氮关系

为了解假丝酵母菌在养殖水体中的生长与降解氨氮作用, 在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 鱼塘养殖水体, 并配制成有 20 mg/L 氨氮浓度、pH 值 7 的淡水养殖水体。灭菌后将假丝酵母菌以 5% 接种量接入, 于 30℃ 温度、100 r/min 的条件下振荡培养, 测定培养过程菌体的生长与降解氨氮作用。结果(图 2)显示, 菌体培养 6 h 内, 其数量略有下降, 这可能由于养殖水体营养与环境不适宜, 导致部分菌体死亡所致, 为此, 基本上认为 0~6 h 为菌体生长缓慢期, 而培养 6 h 后菌体进入对数生长期, 菌体细胞数量快速增多; 从氨氮降解情况看, 培养 6 h 内菌体降解氨氮作用较小, 而培养 6 h 后氨

氮快速降解, 当培养至 12 h 氨氮降解率达 100% (以下试验均以培养 12 h 进行测定)。该结果表明, 在养殖水体中菌体生长与降解氨氮作用是同步关系。

表 1 酵母菌的鉴定

Table 1 Identification of the yeast	
项 目	特 征
菌落	乳白色, 大而且厚, 不透明, 表面湿润, 边缘整齐, 易挑起
菌膜	具膜
环	具环
细胞形态	卵圆形
细胞大小(μm)	3.4 × 3.8
无性繁殖方式	芽殖
假菌丝	假丝酵母属型
子囊孢子	无
葡萄糖发酵	+
生理	NaNO_3 同化
特征	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 同化
	尿素分解
	+

注: 表中“+”为阳性。

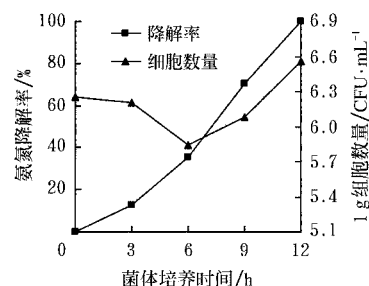


图 2 菌体细胞生长与降解氨氮曲线

Fig 2 Curves of the growth of *Candida sp.* and the degradation of $\text{NH}_3\text{-N}$

2.4 养殖生态因子对假丝酵母菌降解氨氮作用的影响

1) 氨氮初始浓度

配制氨氮浓度为 5~30 mg/L, pH 值 7 的淡水养殖水体, 灭菌接种 5% 菌液, 后同上述条件下振荡培养。结果(图 3)显示, 氨氮浓度在 5~20 mg/L 时, 其氨氮降解率基本上均达到 100%; 但当氨氮浓度超过 20 mg/L 时, 其降解率明显下降, 如氨氮为 25 mg/L 时, 降解率为 56.65%; 氨氮浓度 30 mg/L 时, 降解率为 20.53%。这表明在养殖水体中, 过高的氨氮浓度对菌体生长与降解氨氮作用具有较大的影响。该结果与上述分离氨氮菌在高氨氮浓度(212 mg/L)的分离培养基中降解氨氮达 92% 的结果有较大出入, 这可能是由于养殖水体营养不丰富或营养成分比例不合适, 从而不能使菌株持续生长, 导致菌体降解氨氮功能下降。

2) 初始 pH 值

配制氨氮浓度为 20 mg/L 的淡水养殖水体, 分别调节 pH 值 5~9 进行试验。结果(图 4)显示, pH 值为 6~7 时, 降解率达到 90% 以上, 其平均降解速率也达到 $1.59 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 相对而言, pH 值 6 的降解氨氮作用优于 pH 值 7。但在过酸与过碱下, 菌株降解氨氮作用

均大幅度下降, 相比之下, 菌株对碱性 pH 值更为敏感。这表明筛选菌株符合酵母菌的生理特征: 适合在偏酸性至中性 pH 值下生长和代谢。

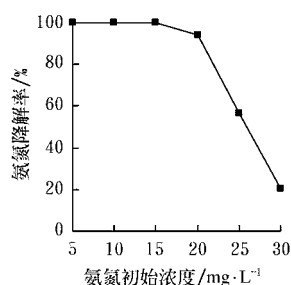


图 3 氨氮初始浓度对氨氮降解的影响

Fig 3 Influence of the original concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ on the degradation of $\text{NH}_3\text{-N}$

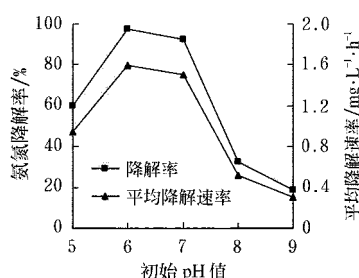


图 4 初始 pH 对氨氮降解的影响

Fig 4 Influence of the original pH value on the degradation of $\text{NH}_3\text{-N}$

3) 温度

养殖水温季节波动较大。为此, 研究假丝酵母菌在 15~30 养殖水温下对 20 mg/L (pH 值 7) 氨氮浓度的降解率。结果(图 5)显示, 水温在 15~30 时, 随着水温的升高, 氨氮降解率与平均降解速率均明显上升。如 30 时菌株降解氨氮达 99.07%, 25 时达 82.06%, 而 15~20 时氨氮降解率很低。这表明菌株降解氨氮较适宜的温度为 25~30。

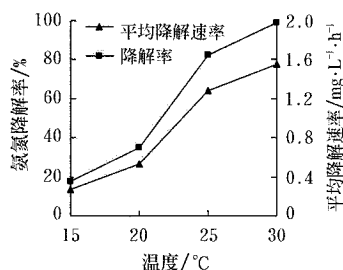


图 5 温度对氨氮降解的影响

Fig 5 Influence of the temperature on the degradation of $\text{NH}_3\text{-N}$

4) 盐浓度

设置不同盐浓度的养殖水体进行菌株降解氨氮(氨氮 20 mg/L, 下同)功能试验。结果(图 6)显示, 在淡水养殖水体中, 氨氮的降解率达 90% 以上。但随着盐浓度增加, 降解率逐渐降低, 如盐浓度为 1% 时, 降解率达

77%; 盐浓度为 2% 时, 降解率为 62%; 盐浓度为 3% 时, 降解率仅为 42%。这表明, 盐浓度对假丝酵母菌的降解氨氮活性具有较大的影响, 一般情况下在淡水中降解氨氮的效能比在海水中好。但该结果与分离筛选菌株在 2% 盐浓度下对高浓度氨氮(212 mg/L)分离培养基的氨氮降解率达到 92% 的结果也存在较大出入, 这可能是由于菌种对 2% 盐浓度耐受力较差, 使分离菌种在培养过程中适应较高盐浓度的能力下降。

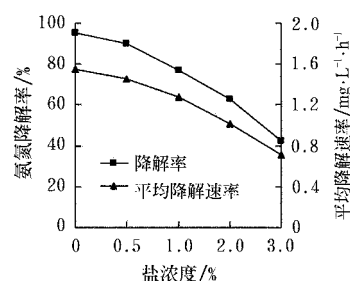


图 6 盐浓度对氨氮降解的影响

Fig 6 Influence of the salinity on the degradation of $\text{NH}_3\text{-N}$

5) 溶氧浓度

分别在静置(溶氧浓度为 1.31 mg/L)、振荡(100 r/min: 2.06 mg/L; 200 r/min: 2.10 mg/L)条件下进行菌株降解氨氮功能试验。结果(图 7)显示, 静置培养时降解率仅为 31.82%, 而采用振荡培养后, 降解率达 97% 以上, 这表明假丝酵母菌在有氧条件下降解氨氮作用较强。这是由于振荡培养后增加了培养液中溶氧浓度, 使菌体快速生长和利用氨氮, 同时也提高了菌体同氨氮的接触机会, 加快了氨氮的降解。

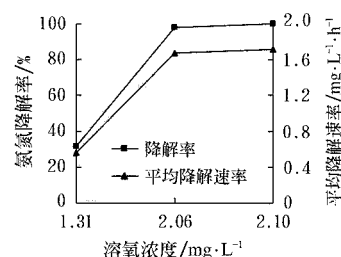


图 7 溶氧浓度对氨氮降解的影响

Fig 7 Influence of the dissolved oxygen concentration on the degradation of $\text{NH}_3\text{-N}$

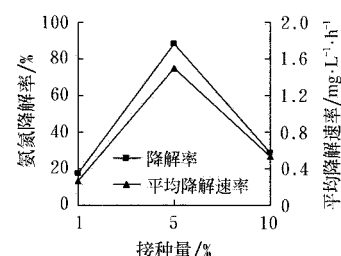


图 8 接种量对氨氮降解的影响

Fig 8 Influence of the inoculum on the degradation of $\text{NH}_3\text{-N}$

6) 接种量

分别以 1%、5%、10% 的接种量进行菌株降解氨氮功能试验。结果(图 8)表明, 接种菌量从 1% 增加到 5% 时, 平均降解速率相应提高了近 5 倍, 但当接种量继续增加时, 降解率与平均降解速率反而大幅度下降。这可能是由于接种量增大导致底物与供氧不足, 使菌体死亡细胞增加, 降解率下降。该结果表明, 应用假丝酵母菌降解养殖水体氨氮的适宜接种量为 5%。

3 结论与讨论

1) 降解氨氮功能菌的筛选与菌株耐盐性能

通过从海水中取样, 在氨氮浓度为 212 mg/L 、盐浓度为 0.5% ~ 2% 的分离培养基中培养, 筛选获得了一株能高效降解氨氮的假丝酵母菌。该菌株在 2% 盐浓度下, 对培养基中的高浓度氨氮降解率达到 92%。但后续研究中该菌株在 2% 盐浓度、氨氮浓度为 20 mg/L 的养殖水体中对氨氮的降解率只有 62%, 而盐浓度低于 1% 时, 氨氮降解率达到了近 80%。由此认为, 假丝酵母菌虽为海水中分离获得, 但耐盐性能不稳定, 菌种在培养过程中耐盐性能下降, 表明菌种对盐度的生理适应性仍是低浓度盐。为此, 从应用角度看, 假丝酵母菌作为降解氨氮的菌剂可在淡水与低盐浓度的水产养殖中应用。

2) 假丝酵母菌降解养殖水体氨氮的特性

假丝酵母菌在高浓度氨氮(212 mg/L)的分离培养基上, 氨氮降解率达 92%, 但在配制有不同氨氮浓度的淡水养殖水体中, 低于 20 mg/L 降解率达到 100%, 高于 20 mg/L 时则反映出降解能力下降的现象。这种试验结果差异可能是环境中营养成分差异所致。根据美国环保局制定的水质评价标准, 养殖水体中氨氮对鱼类致死浓度为 $0.2 \sim 2 \text{ mg/L}$ [10], 中国养殖水体及污染水体氨氮浓度一般也多在 5 mg/L 之内, 为此, 本文筛选的假丝酵母菌为降解高浓度氨氮的功能菌株, 这对养殖水体及污泥中的氨氮降解具有重要意义。

养殖水体生态因子如 pH 值、温度、溶氧以及接种量对菌株降解氨氮也有重要的影响, 其较适合的条件为偏酸性至中性 pH 值(6~7)、适温(25~30℃)以及有氧

条件(溶氧 2 mg/L 以上)和接种量 5%。碱性及低温的环境条件不利于假丝酵母菌降解氨氮。而对于溶氧因子, 由于养殖水体鱼虾生长的溶氧浓度为 2 mg/L 以上 [11], 因此, 这对假丝酵母菌在养殖水体中生长繁殖与净化氨氮作用是非常有利的, 即溶氧浓度提高, 菌体生长速率与氨氮降解速率也相应提高。假丝酵母菌于适宜条件下降解氨氮作用在 12 h 达到最大(90% 左右), 因而具有降解氨氮作用时间较短且效率高的优点。

[参 考 文 献]

- [1] 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国虾抗病力的影响[J]. 海洋与湖泊, 1999, 30(3): 367-372
- [2] Chen J C, Nan F H. Effects of ammonia on oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* after prolonged exposure to ammonia[J]. Bull Environ Contam Toxicol, Jul 1, 1993, 51(1): 122-129
- [3] Chinni S, Khan R N, P R Yallapragada. Acute toxicity of lead on tolerance, oxygen consumption, ammonia-N excretion, and metal accumulation in *Penaeus indicus* postlarvae [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2002, 51(2): 79-84
- [4] 王立华, 于沛芬, 战培荣, 等. 固定化光合细菌去除水中氨氮效果的初步研究[J]. 水产学杂志, 1995, 8(1): 63-65
- [5] 王歆鹏, 陈 坚, 华兆哲, 等. 硝化菌群在不同条件下的增殖速率和硝化活性[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(1): 64-68
- [6] 吴 伟, 陈家长, 瞿建宏, 等. 诺卡氏菌对养殖水体中氨氮的降解特性研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2000, 19(1): 21-24
- [7] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 425-427, 384-389
- [8] 巴尼特 A, 佩恩 RW, 亚罗 D, 著. 胡瑞卿译. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋出版社, 1991: 33-52
- [9] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 第 3 版, 北京: 中国环境科学出版社, 1989: 254-256
- [10] 美国环保局. 许宗仁译. 水质评价标准[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1981: 13-17
- [11] 曾训江. 池塘养鱼三要素与渔业现代化[J]. 内陆水产, 2000, 25(7): 4-5

Characteristics of degrading $\text{NH}_3\text{-N}$ in the fishery water by *Candida* sp.

Xie Hang, Qiu Hongdun, Lin Juan, Chen Chaoyang

(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A strain which can effectively degrade $\text{NH}_3\text{-N}$ in the fishery water was obtained from sea water by culturing in the isolating medium in which the concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ was 212 mg/L . It was identified as *Candida* sp. The factors affecting the degradation of $\text{NH}_3\text{-N}$ by *Candida* sp. such as the concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$, pH value, temperature were studied. The results showed that the suitable conditions were as follows: the concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ 20 mg/L , pH value 6~7, temperature 25~30℃, the salinity 0~1% and the dissolved oxygen concentration $> 2 \text{ mg/L}$. under this condition, the degradation rate of $\text{NH}_3\text{-N}$ can reach 80% when the inoculum of *Candida* sp. was 5%.

Key words: *Candida* sp.; fishery water; $\text{NH}_3\text{-N}$; degradation