

抗弧菌光合细菌的分离鉴定及对氨氮和亚硝态氮的降解特性

王雨婷¹, 周荣翔², 李霁虹¹, 张 瑶², 周婷婷²,
陈文才³, 彭 云², 汤曼利⁴, 马桂珍¹, 许建和⁴

(1. 江苏海洋大学环境与化学工程学院, 江苏 连云港 222000; 2. 江苏海洋大学食品科学与工程学院,
江苏 连云港 222000; 3. 永清县农业农村局种植业技术推广站, 河北 廊坊 065000;
4. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222000)

摘要: 该研究采用双层平板涂布法和划线法, 从不同地区的海洋环境样品中分离纯化光合细菌, 以副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、鳗弧菌 (*V. anguillarum*) 为指示菌, 采用牛津杯法测定海洋光合细菌菌株的抑菌作用, 采用靛酚蓝分光光度法和盐酸萘乙二胺分光光度法测定不同菌株对氨氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 和亚硝态氮 ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) 的降解作用, 筛选出具有抗弧菌并高效降解 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 复合功能的优良菌株。结果显示, 从 30 个海水、海泥等样品中分离得到 3 株光合细菌, 分离自连云港车牛山岛海水样品的菌株 P-3, 对 3 种弧菌均具有较强的抑制作用, 其中对鳗弧菌的作用最强, 抑菌圈直径为 5.3 mm。3 株光合细菌均具有一定的降解 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 作用, 菌株 P-3 的降解作用最强, 在含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的培养基中培养 4 d, 降解率分别为 89.68% 和 94.98%。经形态学观察、生理生化试验和 16S rDNA 序列分析, 确定 P-3 为沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*)。

关键词: 光合细菌; 沼泽红假单胞菌; 分离鉴定; 拮抗作用; 亚硝态氮降解; 氨氮降解

中图分类号: Q 93-33

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Isolation and identification of vibrio resistant photosynthetic bacteria and degradation of nitrite nitrogen and ammonia nitrogen

WANG Yuting¹, ZHOU Rongxiang², LI Jihong¹, ZHANG Yao², ZHOU Tingting²,
CHEN Wencai³, PENG Yun², TANG Manli⁴, MA Guizhen¹, XU Jianhe⁴

(1. School of Environmental and Chemical Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 252000, China; 2. School of Food Science and Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000, China; 3. Yongqing County Agricultural and Rural Bureau of Plantation Technology Extension Station, Langfang 065000, China; 4. School of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000, China)

Abstract: In this study, photosynthetic bacteria (PSB) were isolated and purified from marine environmental samples from different areas by double-layer plate coating method and scribing method. *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. anguillarum* were used as control. The inhibition of marine photosynthetic bacteria was determined by Oxford cup method, and the degradation of nitrite nitrogen ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) and ammonia nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) by different strains was determined by naphthalene ethylenediamine hydro-

收稿日期: 2021-01-12; 修回日期: 2021-03-09

资助项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX (19) 3107]; 江苏省研究生科研创新计划项目 (KYCX20-2959)

作者简介: 王雨婷 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化工。E-mail: 2570557092@qq.com

通信作者: 马桂珍 (1963—), 女, 博士, 教授, 从事抗菌微生物研究。E-mail: guizhenma@sohu.com

许建和 (1976—), 男, 博士, 副教授, 从事水产动物遗传育种和营养调控研究。E-mail: anhexu218@163.com

chloride spectrophotometry and indophenol blue spectrophotometry. The results show that three strains of photosynthetic bacteria were isolated from 30 sea water and mud samples, and the P-3 strain isolated from the seawater samples of Cheniushan Island in Li-anyungang had strong inhibitory effect on three kinds of *Vibrio*, especially for *V. anguillarum*, with the inhibition zone diameter of 5.3 mm. The results show that all the three photosynthetic bacteria have certain ability to degrade NO_2^- -N and NH_4^+ -N, and P-3 strain had the strongest ability. The degradation rates of P-3 strain were 89.68% and 94.98% respectively, when being cultured in the medium containing $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4^+ -N and NO_2^- -N for 4 d. P-3 strain was identified as *Rhodospseudomonas palustris* by morphological observation, physiological and biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis.

Key words: Photosynthetic bacteria; *Rhodospseudomonas palustris*; Isolation and identification; Antagonism; Aitrite nitrogen degradation; Ammonia nitrogen degradation

弧菌病是常见的水产养殖病害^[1]。近年来随着水产养殖品种的增加和养殖规模的扩大,尤其是高密度养殖使水体自身调节能力降低,弧菌病害和氨氮(NH_4^+ -N)过量对水产养殖的负面影响越来越严重,有关水产养殖过程中弧菌病防治和水体污染治理的研究备受关注^[2]。目前主要采用化学、物理手段进行弧菌病的防治,但物理手段会造成水体二次污染,化学手段会导致病原菌的抗药性,打破水域生态平衡,而生物手段则弥补了化学手段的不足,这类生态友好型的治理手段已成研发热点^[3],生产上亟需更多的微生物制剂用于水产病害和水污染治理^[4]。

光合细菌(Photosynthetic bacteria, PSB)是在厌氧条件下以光为能源,以二氧化碳(CO_2)或有机物为碳源,进行不产氧光合作用的原核生物^[5]。目前所知的光合细菌可分为着色杆菌科、外硫红螺菌科、紫色非硫细菌、绿色硫细菌、多细胞丝状绿细菌、螺旋杆菌科、含细菌叶绿素的专性好氧菌7大菌群,其中在水产养殖方面应用最多的为紫色非硫细菌^[6-8]。光合细菌将水体中的有机物转化为自身生长所需的能量,与病原微生物形成竞争关系,从而成为优势菌群,抑制病原菌的生长繁殖^[9],降低水产养殖病害的发生率,而且光合细菌所含的营养物质能够提高养殖鱼虾的免疫力,大幅提升其产量^[10]。光合细菌作为生防菌株,已有研究主要针对其能够高效降解水体中的三态氮、硫化氢等有害物质^[11],而对同时具有弧菌拮抗作用和降解 NH_4^+ -N、亚硝态氮(NO_2^- -N)复合功能的光合细菌的研究较少。本研究通过分离筛选对弧菌具有抑制作用并能降解 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 的优良光合细菌,以期为水产养殖病害的生物防治和养殖水污染治理提供优良菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试培养基 光合细菌富集培养基为氯化

钠(NaCl) 2 g, 七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2 g, 氯化铵(NH_4Cl) 1 g, 磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 1.75 g, 乙酸钠(CH_3COONa) 3 g, 酵母粉 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 灭菌后加入 2 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)。光合细菌分离培养基为光合细菌富集培养基添加 1.7% 琼脂。光合细菌发酵培养基为 LB 培养基。弧菌的培养及抑菌作用测定培养基为 2216E 培养基(蛋白胨 5 g、酵母膏 1 g、磷酸高铁 0.01 g, 琼脂 20 g, 陈海水 1 000 mL, pH 8.0)。 NH_4^+ -N 降解培养基为 NaCl 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 0.235 8 g, KH_2PO_4 1.75 g, CH_3COONa 3 g, 酵母粉 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 灭菌后加入 2 g NaHCO_3 (NH_4^+ -N 质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。 NO_2^- -N 降解培养基为 NaCl 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaNO_2 0.246 4 g, KH_2PO_4 1.75 g, CH_3COONa 3 g, 酵母粉 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 灭菌后加入 2 g NaHCO_3 (NO_2^- -N 质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。柠檬酸盐利用培养基为 NaCl 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NH_4Cl 1 g, KH_2PO_4 1.75 g, 柠檬酸钠 3 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 灭菌后加入 2 g NaHCO_3 。

1.1.2 病原菌 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)由本实验室保藏提供。

1.2 样品的采集与富集

从连云港海域海州湾、车牛山岛、灌河入海口等区域采集海水样品 20 个,海泥样品 4 个,从南通市如东、启东地区海域采集海水样品 4 个,海泥样品 2 个。

取 5 mL 样品于 25 mL 富集培养基中,置于 50 mL 螺口离心管中,再加 5 mL 无菌液状石蜡, 30°C , 2 000 lx 光照条件下富集培养,至培养物出现不同颜色。取 1 mL 培养物接种于新的富集培养基中继续培养,重复 3~4 次,得到深色培养液。

1.3 海洋光合细菌的分离纯化

采用双层平板涂布法和双层平板划线法。取不同的样品富集液,进行梯度稀释,分别取不同样品 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释浓度的稀释液 0.2 mL 涂布于光合细菌分离培养基平板上,用一层融化后冷却至约 45 ℃ 的分离培养基覆盖,静置凝固后,30 ℃ 光照条件下培养 4 d。挑取红色、紫色、棕色和绿色等不同颜色菌落至新的分离培养基的平板上进行三区划线,进一步纯化,至在显微镜下观察菌体形态一致。

1.4 海洋光合细菌对弧菌的抑制作用测定

1.4.1 光合细菌菌悬液的制备 将分离得到的光合细菌菌株接种于装有 25 mL LB 液体培养基的 50 mL 离心管内,加入 5 mL 灭菌石蜡,在 30 ℃、光照强度 2 000 lx 下培养 4 d,菌液用无菌液体培养基调整光密度 ($OD_{660\text{ nm}}$) 相等且 $OD_{660\text{ nm}} \geq 1.5$ 。

1.4.2 对弧菌的抑菌作用测定 采用牛津杯法。将在 2216E 培养基斜面上培养 24 h 的供试 3 种弧菌用无菌生理盐水洗下,制备成浓度为 10^7 个·mL⁻¹ 的菌悬液,取 0.1 mL 菌悬液涂布在 2216E 培养基平板上。在距离培养皿边缘 1.5 cm 处的含菌平板四周均匀放置牛津杯,每个牛津杯中注入 200 μL 光合细菌不同菌株浓度为 10^7 个·mL⁻¹ 的菌悬液,以等量的无菌培养基为对照,28 ℃ 恒温培养 48 h,观察测定抑菌圈直径。每个菌株 3 个重复。

1.5 不同光合细菌菌株降解 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 作用测定

1.5.1 标准工作曲线制作 分别采用靛酚蓝分光光度法和盐酸萘乙二胺分光光度法 (GB/T 11889—1989) 测定溶液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度。分别以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 质量浓度和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度为横坐标, $OD_{637\text{ nm}}$ 和 $OD_{538\text{ nm}}$ 为纵坐标,制作标准曲线,建立回归方程。

1.5.2 降解率测定 将光合细菌菌悬液 ($OD_{660\text{ nm}} \geq 1.5$) 按 10% 的接种量接入装有 25 mL 液体降解培养基的 50 mL 离心管中,加入 5 mL 灭菌石蜡,每个菌株 3 个平行,在 30 ℃、光照强度 2 000 lx 下静置培养 4 d。发酵液于 4 ℃、5 000 r·min⁻¹ 条件下离心 20 min,取上清液,测定不同菌株上清液的吸光值,根据标准曲线计算不同菌株发酵液中的氮质量浓度,以未接种的培养基作为对照,计算不同菌株的降解率。

$$R = (C_t - C_0) / C_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: R 为降解率; C_t 为对照浓度; C_0 为处

理浓度。

1.6 抑菌并高效降解 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 光合细菌菌株的初步鉴定

1.6.1 形态学观察 将筛选出的抑菌并高效降解 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的光合细菌菌株接种于光合细菌分离培养基上,在 30 ℃、光照强度 2 000 lx 下静置培养 4 d,通过解剖镜观察培养基上菌落形态及颜色,挑取单菌落,进行革兰氏染色和鞭毛染色,显微镜观察菌体大小、形态和染色结果。

1.6.2 生理生化试验 挑取菌株 3 个单菌落至含 2 mL 无菌水的离心管中,振荡均匀并制成 0.5 麦氏浊度的均一菌悬液,吸取 50~100 μL 菌悬液接种至不同的生化管中,按照说明书于不同条件下培养,观察反应管的显色结果,将显色结果与《结果诠释表》比对,确定反应结果,以大肠杆菌为对照菌。

柠檬酸盐利用试验: 将光合细菌菌悬液 ($OD_{660\text{ nm}} \geq 1.5$) 按 10% 的接种量接入装有 25 mL 柠檬酸盐利用培养基的 50 mL 离心管中,加入 5 mL 灭菌石蜡,在 30 ℃、2 000 lx 下静置培养 4 d,观察培养基颜色变化,确认菌株是否生长。

根据形态观察和生理生化反应结果,对照《伯杰细菌鉴定手册》《常见细菌系统鉴定手册》对菌株进行初步鉴定。

1.6.3 16S rDNA 序列分析 将 P-3 菌株样品送至上海生工生物工程有限公司,测定菌株的 16S rDNA 序列。所得的基因序列拼接完整后与 NCBI 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对,选取近源序列,采用 MEGA 7.0 软件构建 16S rDNA 基因序列系统发育树。

2 结果

2.1 海洋光合细菌的富集

在光照厌氧条件下 30 个不同样品多次富集培养,有 6 个样品出现了颜色变化,分离自灌河入海口海泥 (A) 为棕色,车牛山岛海水 (B) 和南通如东海泥 (C) 均为深红色,南通启东海水 (D) 和连云港高公岛表层海水 (E) 为红色,海州湾海水 (F) 为绿色 (图 1),其他样品浑浊,未变色。

2.2 海洋光合细菌的分离纯化

将富集的 30 个样品涂布于光合细菌平板上,从连云港高公岛海域海水分离纯化得到了橙红色的 P-1 菌株,从南通如东海泥中分离得到红色的

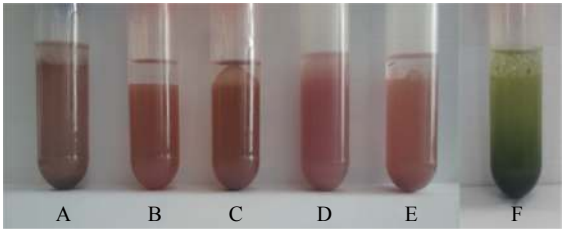


图1 富集筛选培养后的培养液

A. 灌河入海口海泥; B. 车牛山岛海水; C. 南通如东海泥; D. 南通启东海水; E. 连云港高公岛表层海水; F. 海州湾海水。

Figure 1 Culture medium after enrichment and screening

A. Sea mud of the river empties into the sea; B. Cheniushan Island sea water; C. Sea mud of Rudong, Nantong; D. Sea water of Qidong, Nantong; E. Surface water of Gaogong Island, Lianyungang; F. Sea water of Haizhou Bay.

P-2 菌株, 从连云港车牛山岛海域海水分离得到深红色 P-3 菌株。3 个菌株的形态特征见表 1、图 2 和图 3, 符合光合细菌的特征。

2.3 光合细菌菌株对 3 种弧菌的抑制作用

菌株 P-3 对 3 种弧菌均有抑制作用, 对鳗弧菌的抑菌圈较明显, 抑菌圈平均直径为 (5.26±0.03) mm。菌株 P-1、P-2 在平板对峙试验中, 牛津杯周围基本上未现抑菌圈, 说明这 2 株菌对副溶血弧菌、鳗弧菌和创伤弧菌没有拮抗作用 (表 2、图 4)。

2.4 具有抑菌作用的光合细菌菌株降解 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 作用的测定

将光合细菌菌液加入含 50 mg·L⁻¹ NH₄⁺-N、

NO₂⁻-N 降解培养基中, 光照厌氧条件 30 ℃ 培养 4 d, 测定发酵液的吸光值, 并通过回归方程计算氮浓度, 结果见表 3。3 株菌株降解氮的能力较强, 其中菌株 P-2 的 NH₄⁺-N 降解率最高 (93.39%), 菌株 P-3 的 NO₂⁻-N 降解率最高 (94.98%)。

2.5 抑菌并高效降解 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 光合细菌菌株的鉴定

根据不同菌株抑菌作用、NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 降解作用结果, 菌株 P-3 对 3 种弧菌的抑制作用以及对 NO₂⁻-N 的降解作用最强, 同时对 NH₄⁺-N 的降解率较高, 作为高效抑菌降解 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 的优良菌株进行初步鉴定。

2.5.1 形态学观察 菌落形态为红色圆球状, 边缘整齐, 表面低突 (图 5); 该菌为革兰氏阴性菌, 细胞短杆状, 大小为 (1.34~1.62) × (0.33~0.59) μm, 单根极生鞭毛 (图 6-a); 菌株 P-3 在光照厌氧条件下, 培养液呈深红色 (图 6-b)。

2.5.2 生理生化特性 菌株 P-3 在麦芽糖、阿拉伯糖生化鉴定管颜色变为黄色、阳性, 葡萄糖管颜色无变化, 说明该菌具有分解阿拉伯糖和麦芽糖的能力, 不能利用葡萄糖作为碳源; 尿素酶、赖氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶实验呈阳性, 表明菌株 P-3 能分解氨基酸使其脱羧生成胺; 苯丙氨酸、肌醇试验为阴性; 柠檬酸钠作为唯一碳源培养 4 d,

表1 分离得到的3个光合细菌菌株的形态特征
Table 1 Morphological characteristics of three isolates of photosynthetic bacteria

菌株编号 Strain No.	菌体形态 Mycelial morphology	细胞大小 Cell size/μm	革兰氏染色 Gram stain	液体培养 Liquid culture	菌落形态 Colony morphology
P-1	短杆状	1.47×0.83	G-	橙红色	橙色, 边缘整齐, 圆形, 高突起
P-2	卵球状	1.02×0.23	G-	红色	深红色, 边缘整齐, 圆形, 低突起, 表面有光泽
P-3	细杆状	1.49×0.15	G-	深红色	红色, 边缘整齐, 圆形, 表面低突

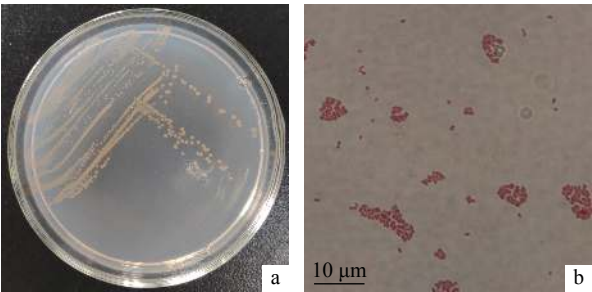


图2 菌株P-1形态特征观察
a. 菌落特征; b. 菌株形态。

Figure 2 Morphological characteristics of P-1 strain
a. Colony characteristics; b. Strain morphology.

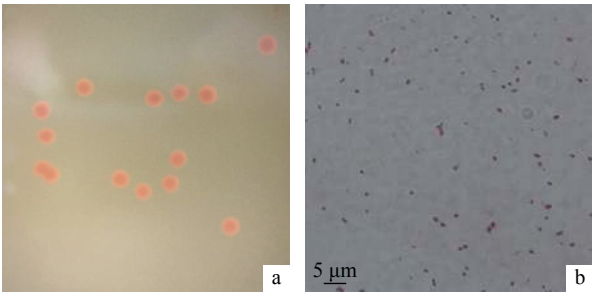


图3 菌株P-2形态特征观察
a. 菌落特征 (15×); b. 菌株形态。

Figure 3 Morphological characteristics of P-2 strain
a. Colony characteristics (15×); b. Strain morphology.

表2 不同光合细菌菌株对弧菌的抗菌效果
Table 2 Antibacterial effect of strains against *Vibrios*

指示菌 Indicator bacteria	抑菌圈平均直径 Average diameter of inhibition zone/mm		
	P-1	P-2	P-3
副溶血弧菌 <i>V. Parahemolyticus</i>	—	—	2.27±0.04
鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	—	—	5.26±0.03
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	2.40±0.01	—	2.10±0.08

注：—, 无明显抑菌圈。
Note: —, No obvious bacteriostatic zone.

培养液颜色变为红色，为阳性，表明菌株 P-3 可以利用柠檬酸盐 (表 4)。

根据形态观察结果和生理生化试验，参照《伯杰细菌系统鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》对菌株 P-3 进行初步鉴定。

在厌氧光照条件下培养物为深红色的光合细菌有红假单胞菌属、红螺菌属和红微菌属，红螺菌属菌体为螺旋状，不具有脱氮能力，生境为淡水环境；红微菌属菌体为卵圆形至柠檬状，依靠周生鞭毛运动，且不能利用柠檬酸盐为碳源；红假单胞菌属的菌体为球形或杆状，单根极生鞭毛运动，不能

利用葡萄糖，可以利用柠檬酸盐且具有脱氮作用，生境为海水环境，菌株 P-3 细胞形态、生理生化特性等与红螺菌属和红微菌属不同，而与红假单胞菌属的形态和生理生化特性一致，初步认为菌株 P-3 为红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas* sp., 表 5)。

2.5.3 菌株 P-3 16S rDNA 序列分析 将菌株 P-3 的 16S rDNA 基因序列与 NCBI 中的序列进行比对，选取同属内同源相似性较高的不同菌株的 16S rDNA 序列，采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树，菌株 P-3 的 16S rDNA 与多株沼泽红假单胞菌 (*R. palustris*) 的相似性为 99.31%，结果见图 7。

3 讨论

有学者认为光合细菌具有类胡萝卜素^[12-13]、细菌叶绿素^[14]等光合色素，在光照培养条件下，其培养液大多呈红色、紫色或者绿色等^[5]，如张小倩等^[15]从辽河入海口筛选出 1 株产红色色素能力较强的红假单胞菌属菌株，王蕊等^[16]从凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 池塘水样、底泥中分离到 1 株类胡萝卜素含量较高的粪红假单胞菌 (*R. faecalis*)。本研究分离到的 3 株光合细菌厌氧培养

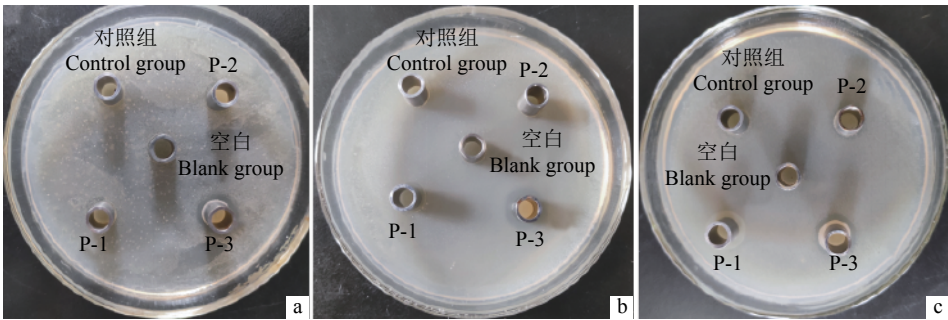


图4 不同光合细菌菌液对副溶血弧菌 (a)、鳃弧菌 (b) 和创伤弧菌 (c) 的抑菌效果
Figure 4 Antibacterial effect of against *V. parahemolyticus* (a), *V. anguillarum* (b) and *V. vulnificus* (c)

表3 3株海洋光合细菌对氨氮和亚硝态氮的降解率
Table 3 Ammonia nitrogen and nitrite nitrogen degradation rate of three marine photosynthetic bacteria

菌株 编号 Strain No.	氨氮 NH ₄ ⁺ -N		亚硝态氮 NO ₂ ⁻ -N	
	质量浓度 Concentration/ (mg·L ⁻¹)	降解率 Degradation rate/%	质量浓度 Concentration/ (mg·L ⁻¹)	降解率 Degradation rate/%
CK	48.78±0.00	—	48.91±0.35	—
P-1	6.02±0.21	87.66±0.42	7.12±1.39	85.44±1.27
P-2	3.22±0.08	93.39±0.16	15.24±0.42	68.83±0.85
P-3	5.03±0.36	89.68±0.73	0.98±0.29	94.98±0.60

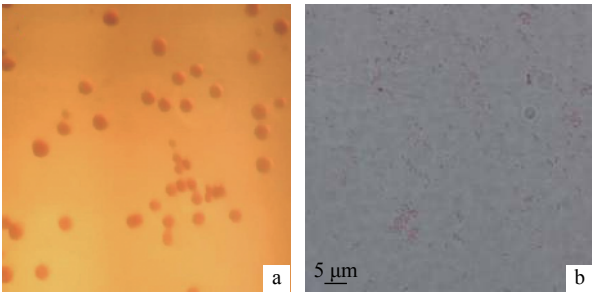


图5 菌株P-3形态特征
a. 菌落特征 (25×); b. 菌株形态。
Figure 5 Morphological characteristics of P-3 strain
a. Colony characteristics (25×); b. Strain morphology.

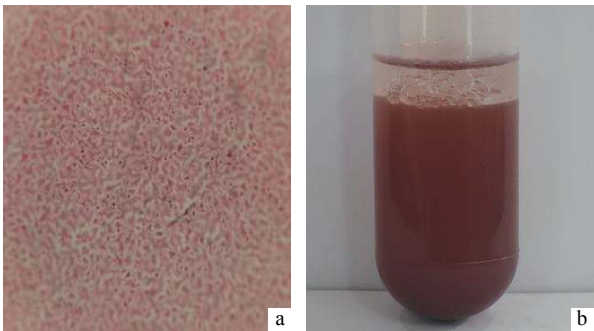


图6 菌株P-3鞭毛染色 (a) 和液体培养物 (b)
Figure 6 Flagella stained (a) and liquid culture (b) of P-3 strain

液颜色均为红色，与已有的研究中菌液颜色相符，利用这一特性初步筛选菌株，有助于寻找到更多的光合菌株资源。

弧菌属是水产养殖中一种常见的细菌性病原^[17-18]，目前用于弧菌病的拮抗菌主要有乳酸菌^[19]、芽孢杆菌^[20]、光合细菌^[21]等。张信娣等^[22]研究发现球形红假单胞菌 X3 在平板扩散法中对水产致病菌有微弱的抑制作用。本研究中的沼泽红假单胞菌对副溶血弧菌、鳃弧菌和创伤弧菌均具有拮抗作用，与张信娣等^[22]的研究结果相似。

光合细菌可以吸收水体中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、硝态氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ，起到改善水质、修复水环境的作用^[23-25]。目前对改善养殖环境的光合细菌种类研

表4 菌株P-3生理生化试验结果
Table 4 Physiological and biochemical characteristics of P-3 strain

测定项目 Parameter	反应结果 Reaction	
	菌株P-3 P-3 strain	大肠杆菌 (对照) <i>Escherichia coli</i> (Control)
肌醇 Inositol	—	—
明胶 Gelatin	+	—
尿素酶 Urease	+	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	—
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+
苯丙氨酸 Phenylalanine	—	—
葡萄糖 Glucose	—	—
阿拉伯糖 Arabinose	+	+
麦芽糖 Malt dust	+	+
柠檬酸盐 Citrate	+	—

注：+，阳性；—，阴性；下同。
Note: +, Positive; —, Negative; the same below.

究颇多，如海洋着色菌 (*Marichromatium gracile*)^[26]、红假单胞菌^[27]、类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*)^[28]、沙氏外硫红螺菌 (*Ectothiorhodospira shaposhnikovii*)^[29]等，这些光合菌降解效率各不相同。本试验分离筛选得到的菌株 P-3 与金春英等^[30]和刘珍珠等^[31]研究的沼泽红假单胞菌降解效果相

表5 红假单胞菌属菌株P-3鉴别特征
Table 5 Identification characteristics of Rhodopseudomonas P-3

性状 Characteristics	菌株P-3 P-3 strain	红假单胞菌属 <i>Rhodopseudomonas</i> sp.	红螺菌属 <i>Rhodospirillum</i> sp.	红微菌属 <i>Rhodomicrobium</i> sp.
细胞大小 Cell size/ μm	$(1.34\sim1.62) \times (0.33\sim0.59)$	$(0.6\sim5.0) \times (0.4\sim0.5)$	0.8~1.5	$(2\sim2.8) \times (1\sim1.2)$
革兰氏染色 Gram stain	G—	G—	G—	G—
菌体形态 Strain morphology	杆状	球形或杆状	螺旋状	卵圆形至柠檬状
厌氧光照培养物颜色 Anaerobic lighting culture colour	深红色	深红色	红色至棕色	深红至红褐色
光照厌氧生长 Anaerobic growth under light	+	+	+	+
利用葡萄糖 Utilization of glucose	—	—	—	—
肌醇 Inositol	—	—		
生境 Habitat	海水	淡水、海水和泥土	淡水	淡水和海水
明胶 Gelatin	+	±		
柠檬酸钠 Sodium citrate	+	+	±	—
脱氮 Denitrification	+	+	—	±
鞭毛 Flagella	极生	极生	极生	周生

注：G—，革兰氏阴性；±，部分菌株阳性，部分菌株阴性。
Note: G—, Gram-negative; ±, Some were positive and some were negative.

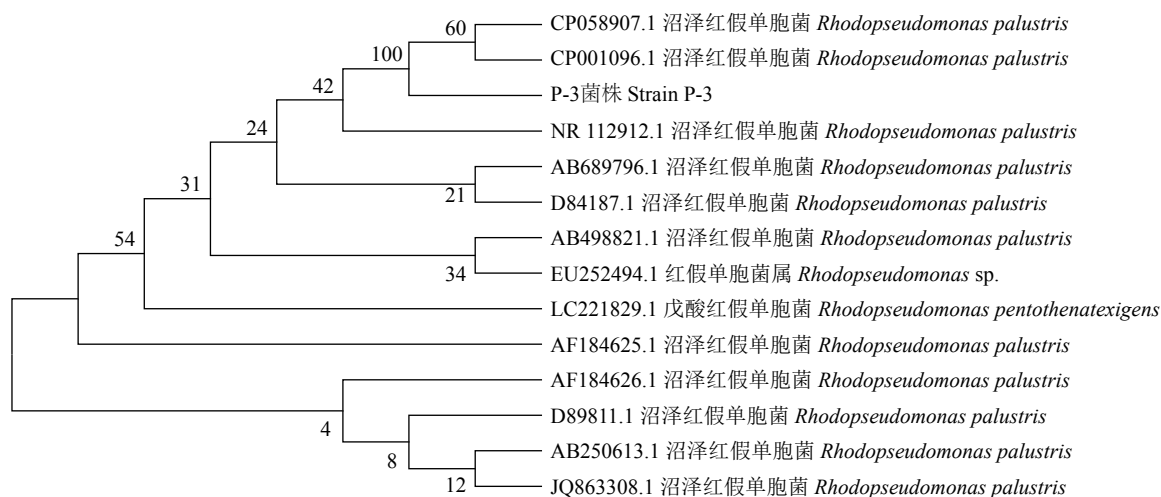


图7 基于P-3菌株的16S rDNA基因序列构建的系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree of P-3 strain based on 16S rDNA gene sequences

近。金春英等^[30]分离出 1 株沼泽红假单胞菌 CQV97, 其对不同质量浓度的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 最大去除率分别为 35%~96% 和 46.850%~99.998%; 刘珍珠等^[31]从冰川前缘原生裸地土壤中分离出 1 株为沼泽红假单胞菌 LG, 菌株对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的转化率最高为 65.71%, 对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的转化率为 95.58%, 已有的研究表明光合细菌在养殖水体的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和亚硝酸盐降解中发挥了重要作用。

本试验分离筛选得到的菌株 P-3 在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的降解率分别达 89.68% 和 94.98%, 同时对副溶血弧菌、鳃弧菌和创伤弧菌均具有抑制作用, 具有复合功能, 表现出潜在的开发应用前景。

参考文献:

- [1] 李欣, 吴健灏, 乔雪飞, 等. 水产品养殖销售环节致病性弧菌污染状况和病原特征分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(17): 2069-2073.
- [2] 王凤青, 孙玉增, 任利华, 等. 海水养殖中水产动物主要致病弧菌研究进展 [J]. 中国渔业质量与标准, 2018, 8(2): 49-56.
- [3] 荣若男, 覃超, 黄鑫, 等. 海洋沉积物中拮抗菌的筛选及发酵特性研究 [J]. 化学与生物工程, 2019, 36(9): 24-29.
- [4] MUKHERJEE A, GHOSH K. Antagonism against fish pathogens by cellular components and verification of probiotic properties in autochthonous bacteria isolated from the gut of an Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton)[J]. Aquacult Res, 2016, 47(7): 2243-2255.
- [5] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 9-42.
- [6] 李美洁, 夏青青, 杨建明, 等. 沼泽红假单胞菌作为微生物细胞工厂的应用 [J]. 生物加工过程, 2020, 18(1): 27-34.
- [7] 张杰, 周易, 邢玉花. 光合细菌对水产养殖水质和水生生物的影响 [J]. 当代畜禽养殖业, 2018(5): 8.
- [8] 王光玉, 韩亚萌, 冯亚丽, 等. 海洋光合细菌筛选及其对养殖水体修复效果的测定 [J]. 渔业现代化, 2019, 46(3): 22-29.
- [9] 朱鑫, 张恩栋, 王萍, 等. 光合细菌应用研究进展 [J]. 广东化工, 2015, 42(24): 82-84.
- [10] 苏艳秋, 罗国强, 顾继锐, 等. 光合细菌对水产养殖环境细菌群落结构的影响 [J]. 淡水渔业, 2013, 43(5): 75-80.
- [11] 冯亚利. 海洋光合细菌在水产养殖中的应用基础研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017: 32-39.
- [12] 李尽哲, 王伟, 黄雅琴. 光合细菌类胡萝卜素的提取工艺优化及抗氧化活性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2016(6): 80-86.
- [13] LOPEZ R J, SALGADO M E, TORRES L, et al. Enhanced carotenoid production by *Rhodopseudomonas palustris* ATCC 17001 under low light conditions[J]. J Biotechnol, 2020, 323: 159-165.
- [14] 张海涵, 王燕, 刘凯文, 等. 水域生境好氧不产氧光合细菌研究进展 [J]. 湖泊科学, 2020, 32(6): 1585-1598.
- [15] 张晓倩, 杨阔, 王宁, 等. 一株红假单胞菌的分离及对 Cu^{2+} 的去除 [J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2392-2398.
- [16] 王蕊, 付维来, 汪攀, 等. 1 株水产饵料用光合细菌粪红假单胞菌的分离筛选 [J]. 微生物学杂志, 2019, 39(5): 35-42.
- [17] ESTANTE S E G, PAKINGKING R V, CORRE V L, et al. *Vibrio harveyi*-like bacteria associated with fin rot in farmed milkfish *Chanos chanos* (Forsskal) fingerlings in the Philippines[J]. Aquaculture, 2021, 534: 1-6.
- [18] PENG Y, HAI B Y, SHEN M, et al. Study of quorum quenching bacteria *Cobetia* sp. reducing the mortality of *Penaeus vannamei* infected with *Vibrio harveyi*: in vitro and in vivo tests[J]. Aquaculture, 2021, 534: 1-12.
- [19] 孙梦桐, 吕欣然, 崔天琦, 等. 鱼类肠道中抑制哈维氏弧菌群体感应及生物膜形成的乳酸菌的筛选和鉴定 [J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 255-263.

- [20] 刘晓燕, 王玲玲, 栾会妮, 等. 一株枯草芽孢杆菌的分离鉴定、生物学特性及其对水质净化的作用 [J/OL]. 微生物学通报: 1-15 [2021-01-26]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.200182>.
- [21] 林姿君, 蔡中华, 林光辉, 等. 健康与白化状态下珊瑚共生菌的群落组成与功能差异 [J]. 海洋学报, 2018, 40(2): 104-116.
- [22] 张信娣, 金叶飞, 陈瑛. 光合细菌对鱼病原细菌生长的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2008(3): 659-663.
- [23] 信艳杰, 胡晓娟, 曹煜成, 等. 光合细菌菌剂和沼泽红假单胞菌对实验水体氮磷营养盐和微生物群落的影响 [J]. 南方水产科学, 2019, 15(1): 31-41.
- [24] 朱洪波, 彭永臻, 马斌, 等. 光源、氮源和碳源对紫色非硫细菌生长特性的影响 [J]. 中国环境科学, 2019, 39(1): 290-297.
- [25] 张光明, 孟帆, 曹可凡等. 光合细菌污水资源化研究进展 [J]. 工业水处理, 2020, 40(3): 1-6.
- [26] JIANG P, ZHAO C G, JIA Y Q, et al. Inorganic nitrogen removal by a marine purple sulfur bacterium capable of growth on nitrite as sole nitrogen source[J]. Microbiol China, 2014, 41(5): 824-831.
- [27] 刘样珍, 凌梅燕, 史宝军. 6株光合细菌的分离及水质净化效果的研究 [J]. 广东饲料, 2016, 25(9): 22-24.
- [28] 朱凌宇, 戴爱敏, 董明倩, 等. 中华鳖养殖水体光合细菌的分离、鉴定与固化 [J]. 水产科学, 2014, 33(8): 493-497.
- [29] 王艺雅, 张其中. 一株光合细菌的分离鉴定及该菌对氨氮和亚硝态氮的去除作用 [J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2512-2528.
- [30] 金春英, 朱笔通, 赵春贵. 沼泽红假单胞菌对养殖水体无机三态氮的去除机制 [J]. 华侨大学学报 (自然科学版), 2019, 40(6): 779-785.
- [31] 刘珍珠, 樊振, 高雁, 等. 天山号冰川前缘土壤中光合细菌的分离鉴定及氮转化能力分析 [J]. 西南农业学报, 2019, 32(12): 2842-2847.