

半滑舌鲷养殖尾水处理系统中硝化细菌分离筛选及脱氮效果研究

马超, 陈春秀, 王宇, 刘皓, 于燕光, 殷小亚, 郑德斌, 贾磊*, 王群山, 周勇 (天津市水产研究所, 天津 300221)

摘要 从半滑舌鲷养殖尾水处理系统生物填料中分离纯化出 7 株细菌, 用 16S rDNA 序列分析对分离的菌株进行鉴定, 通过对 7 株菌株氨氮去除能力检测得到高效硝化菌株 2 株, 并对其进行形态学观察和对养殖尾水脱氮效果的初步研究。结果表明, 分离纯化得到的 7 株细菌分别为脱氮鲍曼氏菌(WY1)、麦氏交替单胞菌(WY3)、仙河盐单胞菌(WY4)、杜氏硫杆菌(WY5)、黄醇假交替单胞菌(WY6)、红色假交替单胞菌(WY8)和施氏假单胞菌(WY10)。经初步筛选, WY10 菌株和 WY4 菌株的氨氮去除能力显著, 去除率分别为 53.99% 和 64.52%。革兰氏染色结果表明 2 株菌株均为革兰氏阴性菌, 处理养殖尾水 24 h 后, WY4 菌株氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮去除率分别为 95.36%、99.65%、86.53%, WY10 菌株氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮去除率分别为 72.89%、94.40%、82.90%, 2 株菌的 24 h 脱氮效果显著。因此筛选出的 2 株硝化细菌具有调控海水养殖尾水的潜在应用价值。

关键词 养殖尾水; 硝化细菌; 分离纯化; 16S rDNA; 革兰氏染色; 脱氮效果

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)19-0110-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.19.026



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research on Isolation, Screening and Denitrification of Nitrifying Bacteria in Tail Water Treatment System of Half-smooth Tongue Sole

MA Chao, CHEN Chun-xiu, WANG Yu et al (Tianjin Fisheries Research Institute, Tianjin 300221)

Abstract Seven strains of bacteria were isolated and purified from the biological filler in the tail water treatment system of half-smooth tongue sole, and the isolated strains were identified by 16S rDNA sequence analysis. Two strains of high-efficiency nitrifying strains were obtained by detecting the ammonia nitrogen removal ability of the seven strains, and morphological observation and preliminary research on denitrification effect of aquaculture tail water were carried out. The results showed that seven strains of bacteria were isolated and purified, which were *Bowmanella denitrificans* (WY1), *Alteromonas macleodii* (WY3), *Halomonas xianhensis* (WY4), *Sulfitobacter dubius* (WY5), *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (WY6), *Pseudoalteromonas rubra* (WY8), *Pseudomonas stutzeri* (WY10). According to preliminary screening, strain WY10 and strain WY4 had significant ammonia nitrogen removal ability, with removal rates of 53.99% and 64.52%, respectively. The gram staining results showed that both strains were gram-negative bacteria. After 24 h treatment of tail water, the removal rates of ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen of WY4 strain were 95.36%, 99.65% and 86.53%, respectively. The removal rates of ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and nitric nitrogen of WY10 strain were 72.89%, 94.40% and 82.90%, respectively. The denitrification effect of the two strains in 24h was remarkable. Therefore, the two nitrifying bacteria screened in this study have potential application value in regulating the tail water of mariculture.

Key words Aquaculture tail water; Nitrifying bacteria; Isolation and purification; 16S rDNA; Gram staining; Denitrification effect

水产养殖快速发展在创造渔业经济的同时也产生了大量的含有有机物、含氮有害物质及抗生素等物质的养殖尾水^[1-3], 大量有害物质超标的水产养殖废水直接排放会对周围水生生态系统或近海生态系统造成显著影响^[4-5]。近年来, 开发高效的海产养殖废水治理技术成为水产养殖的热点问题, 而养殖废水中含氮元素的污染物是造成水体污染和富营养化的主要原因之一^[6-7], 因此如何去除养殖废水中的含氮有害物质对海水养殖废水排放及循环利用具有重要意义。为有效解决水产养殖尾水排放所引起的环境问题, 目前各界学者通过研究开发出各种水产养殖废水处理的技术, 包括物理处理、化学处理和生物处理等技术^[8-9], 其中生物处理技术具有环保、经济、高效等优点, 在水产养殖尾水处理中应用广泛^[10-12]。

氨氮主要来源于水产养殖动物的残饵、排泄物、尸体等

有机物, 亚硝酸盐氮则是氮元素在养殖水体循环中的一种中间产物, 含有一定毒性, 高浓度氨氮及亚硝酸盐氮的养殖水体不仅严重危害水产动物的正常生长发育及导致病害频发, 还会对周边生态环境造成恶劣的影响^[2,13-14]。而生物处理技术中主要是通过微生物调控来实现水产养殖尾水脱氮处理, 目前生物脱氮技术已经成为该领域的研究热点, 国内外学者从环境中分离筛选出多种高效脱氮细菌, 包括芽孢杆菌(*Bacillus*)^[15-17]、假单胞菌(*Pseudomonas*)^[18-19]、不动杆菌(*Acinetobacter*)^[20]、红球菌(*Rhodococcus*)^[21]等细菌, 因此筛选高效的脱氮细菌并应用到水产养殖尾水处理中, 是调控养殖水体、保持循环养殖水体水质良好、实现绿色养殖的有效途径。该研究通过对半滑舌鲷养殖尾水处理系统生物填料中细菌进行分离、筛选、鉴定, 并对其在养殖尾水中脱氮效果进行初步研究, 对提高海水养殖水体处理系统的脱氮效率具有指导作用。

1 材料与方法

1.1 样品来源 该试验菌株分离筛选自天津汉沽区半滑舌鲷工厂化养殖系统尾水处理中的生物填料。

1.2 菌株分离及纯化 取生物填料的水样悬液 10 mL, 用无菌水稀释制备成 10⁻¹ 的稀释液, 取 0.1 mL 涂布在异养硝化固体培养基上, 在培养箱中 28 ℃ 恒温培养 2~3 d, 再挑取不

基金项目 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-47-Z01); 天津市海水养殖现代农业产业技术体系-海水鱼养殖岗位项目(ITMRS2021001); 天津市农业发展服务中心青年科技创新项目(zxkj202118, zxkj202125); 天津市科技计划项目(21ZYCGSN00010)。

作者简介 马超(1986—), 男, 天津人, 工程师, 硕士, 从事海水养殖工程与技术研究。* 通信作者, 高级工程师, 硕士, 从事海水鱼养殖技术研究。

收稿日期 2021-11-10; **修回日期** 2021-11-30

同形态特点的菌落分离纯化 3 次以上直到获得单一的菌落为止。镜检验纯并采用甘油保存法-80 ℃ 保种。

1.3 16S rDNA 序列测定及同源性比较 将分离纯化的菌株送往上海微生物科技有限公司进行 16S rDNA 序列测序,所得结果与 NCBI 数据库进行同源性比对,最后得出同源性最高的物种。

1.4 高效硝化细菌筛选 将分离纯化的菌株分别接种至装有 100 mL 异养硝化液体培养基的 250 mL 锥形瓶中富集培养,在培养箱中 28 ℃、120 r/min 培养 24 h。再将富集后的菌悬液再次分别以 1% 的接种量接种至分别装有异养硝化培养基的 250 mL 锥形瓶中,于培养箱中 28 ℃、120 r/min 培养 24 h 后,移取摇匀的 10 mL 菌液,用离心机 8 000 r/min 离心后取上清液,检测其中氨氮浓度。测定方法参照海洋监测规范(GB 17378.7—2007)与《水和废水监测分析方法》进行。根据氨氮去除率,初筛出高效的硝化细菌。

1.5 高效硝化菌株形态学鉴定及脱氮性能初步研究

1.5.1 菌株形态学鉴定。将初筛的高效硝化细菌接种于固体培养基平板,在培养箱中 28 ℃ 条件下培养 24 h 后在显微镜下观察、记录菌落特征。在平板上选取单菌落挑于涂片上固定并进行革兰氏染色,在显微镜下观察、拍照和记录菌落形态特点,随后对筛选菌株进行扫描电镜观察并拍摄照片。

1.5.2 初筛菌株对养殖尾水的脱氮效果初步研究。从半滑舌鲷工厂化养殖系统尾水处理池取养殖尾水,抽滤后,分装到 18 个锥形瓶中,每瓶 250 mL,向各水样瓶中分别以 1% 的接种量接入 2 株筛选得到的菌株(每组 3 个平行)。接种后,将水样置于 28 ℃、120 r/min 培养箱中培养 24 h,24 h 后取出水样测定水体中氨氮、硝态氮、亚硝态氮的含量,测定方法参照海洋监测规范(GB 17378.7—2007)与《水和废水监测分析方法》进行。

1.6 数据分析 使用 SPSS 20.0 软件对所有试验数据进行单因素方差分析,试验数据均以平均值±标准差表示。采用 Excel 软件对试验数据进行统计分析并作图。

2 结果与分析

2.1 细菌分离纯化及初步鉴定 采集的生物滤池填料样品经分离纯化出 7 株形态大小不同的菌株,分别命名为 WY1、WY3、WY4、WY5、WY6、WY8、WY10,将所测 7 株菌株的 16S rDNA 测序结果与 GenBank 数据库中核酸序列进行比对,结果显示,WY1、WY3、WY4、WY5、WY6、WY8、WY10 分别与脱氮鲍曼氏菌(*Bowmanella denitrificans*)、麦氏交替单胞菌(*Alteromonas macleodii*)、仙河盐单胞菌(*Halomonas xianhensis*)、杜氏硫杆菌(*Sulfitobacter dubius*)、黄醇假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas luteoviolacea*)、红色假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas rubra*)和施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)同源性最高,其初步鉴定结果见表 1。

2.2 高效硝化菌株筛选 为进一步筛选出能够高效进行硝化作用的菌株,对 7 株菌株进行了氨氮去除能力检测,图 1 为 7 株菌株在氨氮初始浓度为 101 mg/L 的异养硝化培养基中接种 24 h 后的氨氮去除率,结果表明,分离纯化的 7 株菌

株对氨氮均有一定的去除能力,其中 WY10 的氨氮去除率最高,为 64.52%,其次为 WY4 的 53.99%。因此,选择 WY4 和 WY10 为目标菌株进行下一步研究。

表 1 不同菌株的 16S rDNA 同源性比较

Table 1 Homological comparison of 16S rDNA sequence in different strains

菌株 Strain	长度 Length bp	最相似已知菌株 Most similar known strain	同源性 Homology %
WY1	1 383	脱氮鲍曼氏菌 <i>Bowmanella denitrificans</i>	99.638
WY3	1 389	麦氏交替单胞菌 <i>Alteromonas macleodii</i>	99.496
WY4	1 393	仙河盐单胞菌 <i>Halomonas xianhensis</i>	99.713
WY5	1 336	杜氏硫杆菌 <i>Sulfitobacter dubius</i>	99.775
WY6	1 386	黄醇假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	98.196
WY8	1 384	红色假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas rubra</i>	99.277
WY10	1 396	施氏假单胞菌 <i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.928

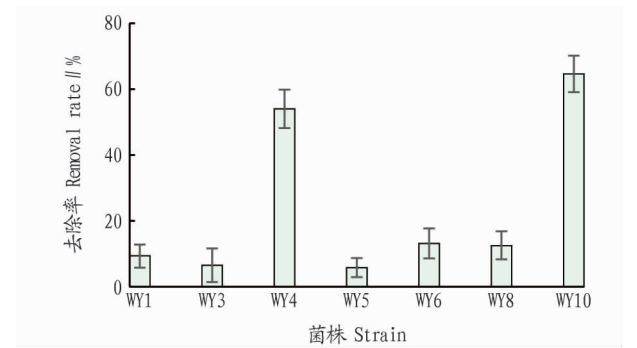


图 1 菌株在异养硝化培养基中培养 24 h 的氨氮去除率

Fig. 1 The NH₄⁺-N removal rates of each strain in heterotrophic nitrification medium at 24 h

2.3 高效硝化菌株形态鉴定及脱氮效果初步研究

2.3.1 菌株形态及染色。WY4 和 WY10 这 2 株菌株氨氮去除率效果较理想,对这 2 株细菌进行形态鉴定。将 2 株细菌在培养基平板上培养 24 h 后观察菌落形态特征,主要形态学特点见表 2。革兰氏染色结果如图 2 所示,2 株菌株均为革兰氏阴性菌。通过扫描电镜结果(图 3)观察到 WY4 菌株为球状,WY10 菌株为杆状。

表 2 菌株的菌落形态特征

Table 2 Colony morphological characteristics of strains

菌株 Strain	形状 Shape	隆起 Swelling	光泽 Shine	质地 Texture	表面 Surface	颜色 Colour	边缘 Edge
WY4	圆形	平台	无	膜状	褶皱	淡黄色	不规则
WY10	假根状	平台	无	膜状	同心环	白色	不规则

2.3.2 高效硝化细菌对养殖尾水脱氮效果。开展对养殖尾水脱氮效果初步研究,将筛选出的 2 株菌(WY4、WY10)接种到养殖尾水中(氨氮浓度为 0.819 mg/L,亚硝态氮浓度为 0.571 mg/L,硝态氮浓度为 0.193 mg/L,总氮浓度为 1.857 mg/L)培养 24 h,结果如图 4~5 所示。从图 4~5 可以看出,菌株处理养殖尾水 24 h 后,水体中氨氮、硝态氮和亚硝态氮浓度均出现明显下降,WY4 处理后水体中氨氮浓度为 0.038 mg/L(去除率 95.36%),亚硝态氮浓度为 0.002 mg/L

(去除率 99.65%), 硝态氮浓度为 0.026 mg/L (去除率 86.53%), 而菌株 WY10 处理养殖尾水 24 h 后, 水体中的氨氮浓度为 0.222 mg/L (去除率 72.89%), 亚硝态氮浓度为

0.032 mg/L (去除率 94.40%), 硝态氮浓度为 0.033 mg/L (去除率 82.90%), 表明 2 株菌株均具有好氧反硝化作用, 能够显著降低养殖水体中的硝态氮。

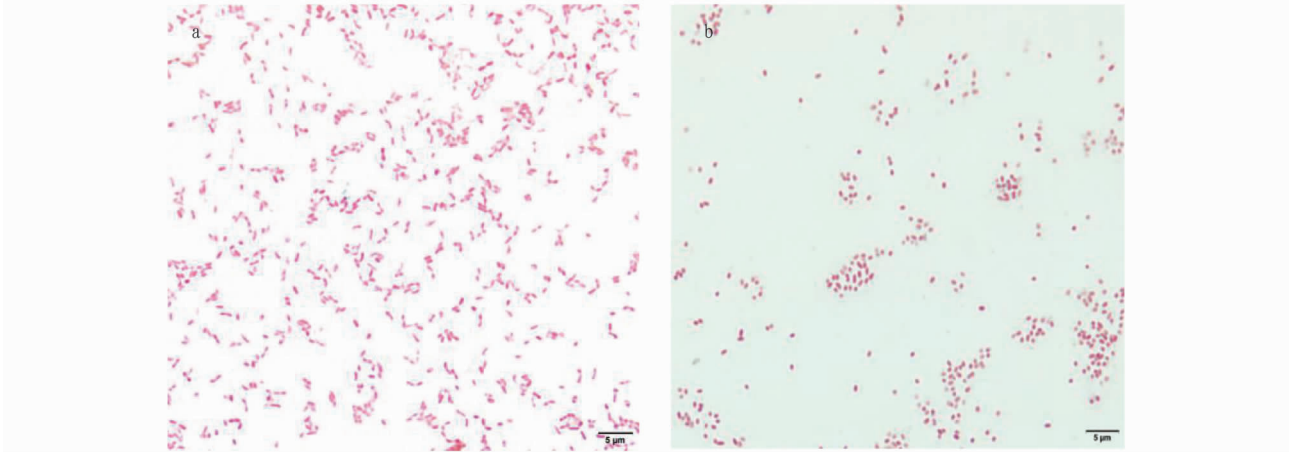


图2 菌株 WY4(a) 和 WY10(b) 的革兰氏染色
Fig.2 Gram stain graph for strains WY4(a) and WY10(b)

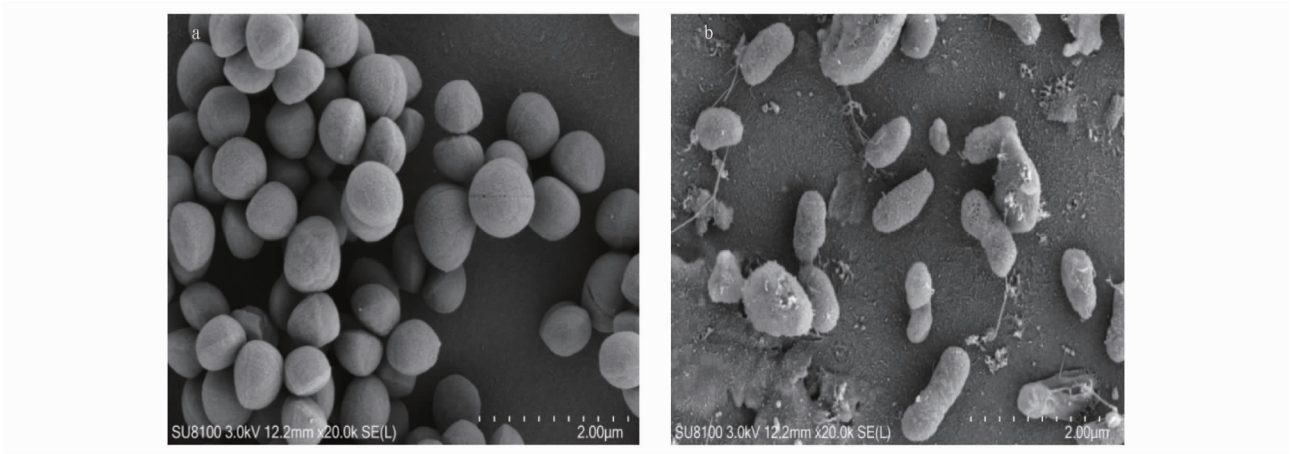


图3 菌株 WY4(a) 和 WY10(b) 的扫描电镜
Fig.3 The scanning electron micrograph of strains WY4(a) and WY10(b)

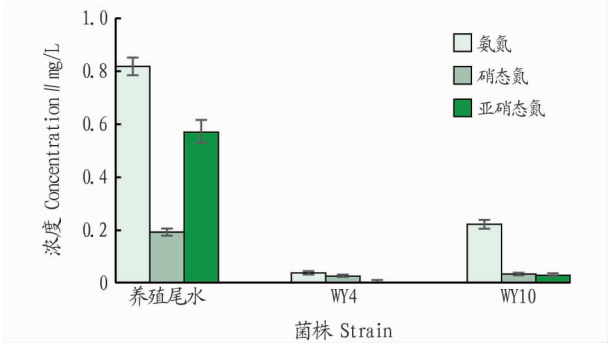


图4 接入菌株 24 h 后养殖尾水的氨氮、硝态氮、亚硝化氮浓度变化

Fig.4 Concentration changes of ammonia nitrogen, nitrate nitrogen and nitrite nitrogen in aquaculture tail water 24 hours after inoculated strains

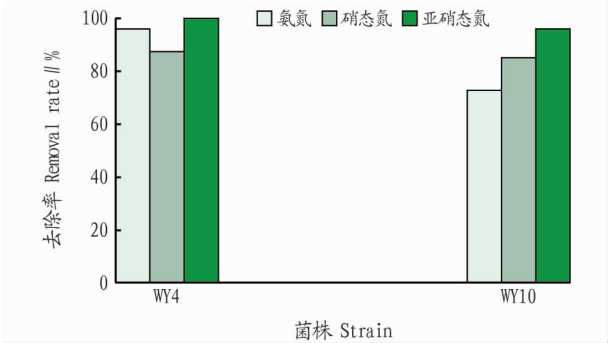


图5 不同菌株在养殖尾水中对氨氮、硝态氮、亚硝化氮的去除率
Fig.5 Removal rates of ammonia nitrogen, nitrate nitrogen and nitrous nitrogen by different strains in aquaculture tail water

3 讨论

施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 于 1895 年被 Burri 和 Stutzer 首次描述^[22], 近年来, 越来越多的施氏假单胞菌

株被从不同的环境中分离出来, 如 Su 等^[23] 从处理猪场废水处理系统中、Rezaee 等^[19] 从石油化工废水中都分离出施氏假单胞菌。此外有研究表明此细菌为异养硝化好氧反硝化细菌^[24], 此类细菌因以生长速度快、脱氮反应高效等优点^[25]

被广大研究人员关注并应用, Ji 等^[26]将施氏假单胞菌接种在生物滤池的硝酸盐废水中, 结果表明废水中硝态氮去除率达到 98.5%; 张达娟等^[18]用从凡纳滨对虾养殖池塘中分离出来的施氏假单胞菌净化模拟养殖水体, 结果表明, 氨氮、亚硝态氮、硝态氮去除率分别达到 91.73%、97.39%、91.22%。该研究从半滑舌鲷养殖尾水处理系统中分离筛选出的施氏假单胞菌菌株 WY10 通过鉴定为一株异养硝化-好氧反硝化革兰氏阴性菌, 具有良好的氨氮去除效果, 而且还有效降低了亚硝态氮和硝态氮的浓度, 表现出良好的脱氮能力, 施氏假单胞菌仅能以无机碳源为底物进行硝化-好氧反硝化脱氮^[22], 因此推断其代谢途径可能为完全硝化反硝化通路^[25], 与上述学者研究结果相似, 但去除率有所差异, 可能与菌株差异、培养温度、接种量等条件有关。

盐单胞菌(*Halomonas*)为中度嗜盐革兰氏阴性菌, 大多数菌株适合在 30℃ 和 pH 7.2~7.5 条件下生长^[27], 多数研究集中在盐碱环境中的石油烃降解^[28-29], 只有少数几株菌株的脱氮作用被报道, 如孙雪梅等^[30]在网箱鱼类养殖区沉积环境中分离出的盐单胞菌 X3 和沈辉等^[31]在海洋滩涂沉积物中分离出的盐单胞菌 MD5, 在高盐环境下均具有较强的脱氮能力。该试验中分离的菌株 WY4, 通过 16S rDNA 序列同源性分析与仙河盐单胞菌(*Halomonas xianhensis*)相似度最高, 且生长特点符合盐单胞菌, 有较强的脱氮能力, 同时研究表明盐单胞菌菌株 WY4 具有异养硝化好氧反硝化细菌的特点, 是一株具有潜力的海水养殖尾水净化菌株。通过试验发现, 在处理养殖尾水时菌株 WY4 氨氮 24 h 去除率(95.36%)比初筛(53.99%)有所提高, 王欢等^[32]研究表明细菌的异养硝化和反硝化作用是相互促进的, 当硝化反硝化同时进行, 比单一作用的脱氮效率和菌体生长速度都有所提高。而该试验中, 初筛时的溶液中氮主要以氨氮形式存在, 而养殖尾水中不仅含有氨氮, 还有一定浓度的亚硝态氮和硝态氮, 24 h 各形态氮的浓度都有所减少, 由此推断菌株 WY4 在处理养殖尾水的同时发生了硝化和反硝化作用, 从而提高了氨氮 24 h 去除率。

随着我国水产养殖的高速发展, 工厂化养殖密度逐渐加大, 残饵、粪便、养殖生物残骸等含氮有机物质不断积累, 使得养殖尾水难以循环使用, 加之环境资源保护意识不断提升及各种环保政策的落实, 也使得养殖尾水排放成为困扰养殖企业的重要问题^[33]。传统的微生态制剂仅为光合细菌、乳酸菌和芽孢杆菌中的一种或多种, 品种较为单一^[34], 且很少用于尾水处理, 因此寻找具有绿色、环保同时能改善水质的菌株制成微生态制剂成为近年来水产养殖的热点。众多研究也表明从养殖尾水或池塘底泥中分离筛选的土著菌种脱氮效果更高^[35]。该研究从半滑舌鲷养殖尾水处理系统中分离筛选出的假单胞菌和盐单胞菌是常见的脱氮细菌, 对养殖尾水也具有较强的脱氮能力, 因此, 它们具有广泛应用于工厂化养殖尾水处理的潜力, 具有广泛的市场应用前景。但对这 2 株土著硝化细菌的脱氮机理和性质还有待进一步研究, 尤其是作为微生态制剂的工艺和组合方式还有待探究。

4 结论

从半滑舌鲷养殖尾水处理系统中分离纯化出 7 株异养硝化细菌, 对分离的菌株用 16S rDNA 序列分析进行了鉴定, 7 株菌株同源性最高的分别为脱氮鲍曼氏菌(WY1)、麦氏交替单胞菌(WY3)、仙河盐单胞菌(WY4)、杜氏硫杆菌(WY5)、黄醇假交替单胞菌(WY6)、红色假交替单胞菌(WY8)和施氏假单胞菌(WY10)。通过对 7 株菌株氨氮去除能力检测得到高效硝化细菌 WY4 和 WY10, 氨氮去除率分别为 53.99% 和 64.52%, 并对其进行了形态学观察和处理养殖尾水 24 h 脱氮效果的初步研究, 结果表明 WY10 和 WY4 这 2 株菌株均为革兰氏阴性菌, 在处理养殖尾水 24 h 后, WY4 菌株氨氮、亚硝态氮、硝态氮去除率分别为 95.36%、99.65%、86.53%, WY10 菌株氨氮、亚硝态氮、硝态氮去除率分别为 72.89%、94.40%、82.90%。因此该研究筛选出的 2 株异养硝化细菌均为异养硝化-好氧反硝化细菌, 具有调控海水养殖尾水的潜在应用价值。

参考文献

- [1] 王园园, 泮进明, 谢可军, 等. 工厂化水产养殖废水处理的研究与展望[J]. 中国农机化, 2004(5): 54-56.
- [2] 臧淑梅. 氨氮在水产养殖中的产生、危害及控制[J]. 黑龙江水产, 2012(2): 38-39.
- [3] MICHAEL J H Jr. Nutrients in salmon hatchery wastewater and its removal through the use of a wetland constructed to treat off-line settling pond effluent[J]. Aquaculture, 2003, 226(1/2/3/4): 213-225.
- [4] 杨小琴, 郭正富, 胡玉国. 水产养殖与农业面源污染研究[J]. 北京农业, 2008(27): 41-43.
- [5] JEGATHEESAN V, SHU L, VISVANATHAN C. Aquaculture effluent: Impacts and remedies for protecting the environment and human health[M]//CHIEF J O. Encyclopedia of environmental health. Amsterdam: Elsevier, 2011: 123-135.
- [6] ZHOU M H, YE H R, ZHAO X W. Isolation and characterization of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* KTB for bioremediation of wastewater[J]. Biotechnology and bio-process engineering, 2014, 19: 231-238.
- [7] 2018 年《中国生态环境状况公报》(摘录二)[J]. 环境保护, 2019, 47(12): 50-55.
- [8] 郭安托. 水产养殖废水处理技术研究[J]. 中国农业信息, 2015(7): 150.
- [9] 方圣琼, 胡雪峰, 巫和昕. 水产养殖废水处理技术及应用[J]. 环境污染治理技术与设备, 2004(9): 51-55.
- [10] 范晓璐, 王佳敏, 李雪, 等. 利用菌类处理水产养殖废水技术研究[J]. 科学养鱼, 2021(2): 80-81.
- [11] 万红, 宋碧玉, 杨毅, 等. 水产养殖废水的生物处理技术及其应用[J]. 水产科技情报, 2006, 33(3): 99-103.
- [12] 许育新. 水产养殖废水生物处理技术研究进展[J]. 浙江农业科学, 2019, 60(8): 1306-1310.
- [13] 王鸿泰, 胡德高. 池塘中亚硝酸盐对草鱼种的毒害及防治[J]. 水产学报, 1989, 13(3): 207-214.
- [14] 余瑞兰, 袁湘平, 魏泰莉, 等. 分子氨和亚硝酸盐对鱼类的危害及其对策[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 73-77.
- [15] 张庆华, 封永辉, 王娟, 等. 地衣芽孢杆菌对养殖水体氨氮、残饵降解特性研究[J]. 水生生物学报, 2011, 35(3): 498-503.
- [16] 李海洁, 董小林, 郭国军, 等. 自养殖池塘中分离出的一株枯草芽孢杆菌对养殖水质的影响[J]. 水产学杂志, 2021, 34(4): 73-78.
- [17] 雷阳, 张倩, 陈钰, 等. 对虾养殖高效降解氨氮微生物的筛选与鉴定[J]. 福建农业科技, 2019(10): 16-20.
- [18] 张达娟, 张树林, 戴伟, 等. 凡纳滨对虾养殖池塘硝化细菌的分离鉴定及脱氮效果研究[J]. 水产科学, 2020, 39(2): 265-270.
- [19] REZAEE A, GODINI H, DEHESTANI S, et al. Isolation and characterization of a novel denitrifying bacterium with high nitrate removal: *Pseudomonas stutzeri*[J]. Iranian journal of environmental health, science and engineering, 2010, 7(3): 313-318.

异均显著。与 CK 相比,4 个处理树高、胸径和冠幅的提高率 均表现为第 3 年>第 2 年>第 1 年。

表 6 施肥 3 年后秃杉母树生长量方差分析
Table 6 Variance analysis of growth of *Taiwania flousiana* mother tree after 3 years of fertilization

性状 Character	差异源 Source of difference	SS	df	MS	F	P	$F_{\alpha=0.05}$	$F_{\alpha=0.01}$
树高 Tree height	处理	2.035 6	4	0.508 9	26.518 5**	0.000 1	3.837 9	7.006 1
	重复	4.115 9	2	2.057 9	107.240 2**	1.67E-06	4.459 0	8.649 1
	误差	0.153 5	8	0.019 2				
	总计	6.305 0	14					
胸径 DBH	处理	11.389 3	4	2.847 3	8.861 0**	0.004 9	3.837 9	7.006 1
	重复	19.956 0	2	9.978 0	31.051 9**	0.000 2	4.459 0	8.649 1
	误差	2.570 7	8	0.321 3				
	总计	33.916 0	14					
冠幅 Crown width	处理	1.908 1	4	0.477 0	6.145 1*	0.014 6	3.837 9	7.006 1
	重复	2.682 3	2	1.341 1	17.276 6**	0.001 2	4.459 0	8.649 1
	误差	0.621 0	8	0.077 6				
	总计	5.211 4	14					

注: ** 表示差异极显著($P<0.01$), * 表示差异显著($P<0.05$)
Note: ** indicates extremely significant difference($P<0.01$), * indicates significant difference($P<0.05$)

(3) 每年株施 1 kg 尿素对促进秃杉母树的生长效果最好,施肥第 1 年树高、胸径和冠幅分别为 5.43 m、13.13 cm 和 3.15 m,CK 的树高、胸径和冠幅分别为 4.73 m、12.40 cm 和 2.94 m,分别比 CK 提高 14.80%、5.89%和 7.14%;施肥第 2 年树高、胸径和冠幅分别为 5.84 m、14.51 cm 和 3.77 m,CK 的树高、胸径和冠幅分别为 4.97 m、12.72 cm 和 3.20 m,分别比 CK 提高 17.51%、14.07%和 17.81%;施肥第 3 年树高、胸径和冠幅分别为 6.53 m、15.93 cm 和 4.40 m,CK 的树高、胸径和冠幅分别为 5.50 m、13.47 cm 和 3.37 m,分别比 CK 提高 18.73%、18.26%和 30.56%。每年株施 1 kg 磷酸二铵对促进秃杉母树的生长效果较好,施肥第 1 年树高、胸径和冠幅分别比 CK 提高 10.15%、2.18%和 6.12%;施肥第 2 年树高、胸径和冠幅分别比对照提高 12.47%、8.41%和 11.56%;施肥第 3 年树高、胸径和冠幅分别比对照提高 13.27%、12.10%和 21.66%。

参考文献

[1] 陶国祥. 秃杉[M]. 昆明:云南科技出版社,2001.
[2] 王庆华,陈强,刘永刚,等. 基于数量化回归模型的秃杉优树选择[J]. 西南林业大学学报,2017,37(2):41-46.
[3] 朱火生,朱光汉,胡德活,等. 秃杉种子园营建和管理技术[J]. 广东林业科技,2004,20(2):26-29.
[4] 徐秀琴,刘金亮,马秀英. 种子园营建技术[J]. 河北林业科技,2006(3):48-49.
[5] 白中萍. 秃杉优树选择及无性系种子园营建技术研究[J]. 林业调查规划,2004,29(2):61-63,70.
[6] 楚永兴,张荣贵,陈有祥,等. 屏边县秃杉无性系种子园营建技术[J]. 林业调查规划,2017,42(1):106-110,142.
[7] 朱建华. 秃杉第 1 代无性系种子园营建技术研究[J]. 福建林业科技,2012,39(4):50-52,56.
[8] 王绍昌. 屏边县秃杉种子园的营建技术[J]. 西部林业科学,2009(增刊):95-98.
[9] 赖瑞政. 秃杉种子园植株养分测定初报[J]. 绿色科技,2018(19):192-193,202.
[10] 林贤山. 秃杉种子园不同坡位及坡向土壤化学性质分析初报[J]. 绿色科技,2018(13):16-20.

(上接第 113 页)

[20] 颜薇芝,张汉强,余从田,等. 1 株异养硝化好氧反硝化不动杆菌的分离及脱氮性能[J]. 环境工程学报,2017,11(7):4419-4428.
[21] 汤丽娟,罗固源,许晓毅,等. 好氧反硝化菌 T7 用于废水脱氮特性的研究[J]. 三峡环境与生态,2008,1(3):24-27.
[22] BURRI R,STUTZER A. Über nitrat zerstörende bakterien und den durch dieselben bedingten stickstoffverlust[J]. Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Abt II,1895,1:257-265.
[23] SU J J,LIU B Y,LIU C Y. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggyery wastewater treatment system[J]. Journal of applied microbiology, 2001,90(3):457-462.
[24] ZHANG J B,WU P H,HAO B,et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001[J]. Bioresource technology,2011,102(21):9866-9869.
[25] 陈均利,彭英湘,刘锋,等. 异养硝化-好氧反硝化菌脱氮特性研究进展[J]. 环境科学与技术,2020,43(5):41-48.
[26] JI B,WANG H Y,YANG K. Nitrate and COD removal in an upflow biofilter under an aerobic atmosphere[J]. Bioresource technology,2014,158:156-160.
[27] BARBER M J,DESAI S K,MAROHNIC C C,et al. Synthesis and bacterial expression of a gene encoding the heme domain of assimilatory nitrate reductase[J]. Archives of biochemistry and biophysics,2002,402(1):38-50.
[28] 张徐畅,陈超,刘秋. 5 株海洋石油降解菌 *Halomonas* spp. 的降解特性分析[J]. 大连民族大学学报,2021,23(1):16-20.
[29] 翟栓丽,侯心然,张强,等. 嗜盐石油降解菌 *Halomonas* sp. 1-3 降解石油烃特性研究[J]. 农业环境科学学报,2022,41(1):84-90.
[30] 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[J]. 微生物学报,2012,52(6):687-695.
[31] 沈辉,万夕和,蒋葛,等. 两株海洋异养好氧硝化-反硝化细菌的筛选、鉴定及能力测试[J]. 应用与环境生物学报,2017,23(1):157-163.
[32] 王欢,汪苹,张海波. 一株戴尔福特菌的异养硝化与好氧反硝化性能研究[J]. 北京工商大学学报(自然科学版),2008,26(2):1-5.
[33] 宋长太. 淡水养殖尾水达标排放相关知识解读[J]. 渔业致富指南,2018(20):20-22.
[34] 张元. 池塘养殖水体中土著反硝化细菌的分离与初步鉴定[J]. 水生生态学杂志,2018,39(5):111-115.
[35] 肖国华,高晓田,赵振良,等. 白洋淀网箱养殖环境微生物原位修复技术研究[J]. 河北渔业,2011(2):4-12,30.