

一株异养硝化-反硝化不动杆菌的分离鉴定及脱氮活性

辛玉峰¹, 曲晓华¹, 袁梦冬¹, 荆延德^{2*}

曲阜师范大学,¹生命科学学院,²地理与旅游学院, 曲阜 273165

摘要:【目的】分离筛选并鉴定一株异养硝化-反硝化细菌,并探讨其在脱氮中的作用。【方法】富集培养分离筛选微生物,通过形态观察和生理生化特征及16S rDNA鉴定细菌,定时测定其 OD_{600} 研究生长曲线,正交试验研究其脱氮影响因素和最佳条件,与污水处理厂活性污泥共同作用检验其脱氮活性。【结果】分离到一株异养硝化-反硝化细菌,鉴定结果表明是一株不动杆菌,命名为 *Acinetobacter* sp. YF14,这是已知报道的第一株进行异养硝化和好氧反硝化的不动杆菌。该菌在12 h时进入对数期,22 h时进入稳定期,45 h以后进入衰亡期。该菌能进行异养硝化,3 d后氨氮和总氮的去除率可以达到92%和91%,且无硝酸盐氮和亚硝酸盐氮积累。好氧条件下该菌能进行反硝化,在硝酸盐和亚硝酸盐培养基中均能将氮几乎完全去除。对该菌脱氮的影响程度大小依次为转速>接种量>碳源>碳氮比>pH。当转速为160 r/min,碳源取葡萄糖,接种量1%,碳氮比为8:1,pH为6.5时,脱氮效果最好。该菌株可以提高活性污泥对于生活污水总氮脱除率约30%。【结论】菌YF14可以明显加强活性污泥脱氮效果,显示了良好的应用前景。

关键词: 异养硝化细菌,好氧反硝化,脱氮,不动杆菌

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2011)12-1646-09

氮类污染物是造成水体污染和富营养化的主要原因,因此水体中氮的去除对于清洁水体有着重要的意义^[1-2]。最初研究者们认为只有自养硝化细菌才能进行高效的硝化作用,近来由于监测手段的优化,有证据表明,异养硝化微生物同样在生物硝化过程中起着不可忽视的作用^[3],特别是在酸性森林土壤中,异养硝化作用占主导地位^[4-6]。有的异养硝化微生物同时又具有好氧反硝化的能力,如 *Alcaligenes faecalis* ATCC19718^[7]、*Bacillus* sp. LY^[8]、*Pseudomonas putida*^[9]、*Thiosphaera pantotropha* A2^[10]等,这种同步硝化-反硝化的能力,使微生物能够实现硝化-反硝化作用在同一时空上的统一,大大简化了传统生物脱氮的过程,节约了运行成本和基

建费用^[11],因此,异养硝化微生物相比传统的自养微生物在废水生物脱氮中占有明显优势,具有良好的发展前景。本文从养殖池塘的底泥中经过分离筛选得到一株异养硝化-好氧反硝化的细菌,并对其进行了鉴定,研究了该菌的生长曲线,重点研究了该菌的硝化及反硝化特性,以及该菌脱氮的影响因素,并探索其在实际污水脱氮中的应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:土样采自山东肥城某养殖池塘的底泥中,用梅花布点法采集,每个点采集5 g,等量混

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2009NY022);山东省重点实验室开放课题

* 通信作者。Tel: +86-537-4458576; E-mail: jingyande@163.com

作者简介:辛玉峰(1981-),男,山东潍坊人,研究方向为环境微生物学。E-mail:xinyufeng520@163.com

收稿日期:2011-07-06;修回日期:2010-09-15

合后迅速带回实验室,置于4℃冰箱中备用。

1.1.2 培养基:① 异养硝化细菌培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g,琥珀酸钠 5.62 g,维氏盐溶液 50 mL,加水溶解,补充蒸馏水至 1 L,pH 7.0。其中:维氏盐溶液为 K_2HPO_4 5.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, NaCl 2.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g,溶解后加水定容至 1 L^[12];② 硝酸盐反硝化培养基: NaNO_3 0.5 g,乙酸钠 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, K_2HPO_4 0.2 g, NaCl 0.12 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g,加水定容至 1 L。③ 亚硝酸盐反硝化培养基: NaNO_2 0.5 g,乙酸钠 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, K_2HPO_4 0.2 g, NaCl 0.12 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g,加水定容至 1 L。

1.2 菌种分离筛选

在 250 mL 的锥形瓶中加入 100 mL 异养硝化培养基,称取 5 g 新鲜土样研磨过筛接种至培养基中,1-1.5 d 后,取上清液 5 mL 至新鲜培养基中,如此反复 3-5 次。将富集培养物通过多次平板涂布分离,获得 15 株较纯的菌株,观察其菌落形态和特征。根据 1.4 的方法,考察 15 株菌株在异养硝化培养基中的脱氮效果,确定效果最好的一株为试验菌株。

1.3 菌种鉴定

为鉴定菌种,对其进行了基本菌落观察、扫描电镜观察和基本的生理生化性状鉴定^[13]以及 16S rDNA 序列测定^[14]。PCR 扩增所用的引物分别是:上游引物是 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物是 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。

1.4 菌种异养硝化及反硝化功能鉴定方法

菌株异养硝化效果测定:将 5% 的接种量接种于 100 mL 新鲜液体硝化培养基中,30℃、150 r/min 振荡培养,每隔一定时间检测氨氮浓度(NH_4^+-N)、亚硝酸盐氮浓度(NO_2^--N)、硝酸盐氮浓度(NO_3^--N)以及总氮(TN)浓度。菌株反硝化效果测定:将 5% 的接种量分别接种于 100 mL 硝酸盐反硝化培养基和亚硝酸盐反硝化培养基中,30℃、150 r/min 振荡培养,每隔一定时间检测硝酸盐氮浓度、亚硝酸盐氮浓度。在上述测定过程中均随时检测培养液的 OD_{600} 值。

1.5 生长曲线测定

将 5% 的活化后的菌液接种于 100 mL 新鲜液

体硝化培养基中,30℃、150 r/min 振荡培养,每隔一定时间取样在 600 nm 处检测菌体细胞的吸光度值,绘制生长曲线图。

1.6 最适脱氮条件及影响因素

为了研究菌株 YF14 最适脱氮能力及其影响因素,设计 $L_{32}(4^9)$ 正交试验,共 5 个因素:碳源、碳氮比、接种量、pH、摇床转速,分别编号 A、B、C、D、E;取 4 个水平,碳源取乙酸钠、柠檬酸钠、琥珀酸钠、葡萄糖,碳氮比取 8:1、16:1、24:1、32:1,接种量取 0.5%、1%、1.5%、2% (菌种 $OD_{600} \approx 1$),pH 取 5、6.5、7、8,摇床转速取 75、120、160、200 r/min。氮以 TN 计量。以脱氮率为依据,检验菌株的最适条件及影响因素。

1.7 强化污泥脱氮应用实验

为检测菌株的实际脱氮应用效果,取曲阜市污水处理厂进水经预处理后的水作为水样(该水样的平均 NH_4^+-N 浓度为 38.7 mg/L, NO_3^--N 浓度为 1.62 mg/L, NO_2^--N 浓度为 0.101 mg/L),另取污水处理厂曝气池活性污泥,根据水样:污泥:菌 YF14 ($OD_{600} \approx 0.5$) 体积比为 100:25:2 (mL) 的比例进行配比成试验组,30℃、160 r/min 摇床振荡培养,pH 取自然值(经多次测量,该值的平均值为 6.7),连续培养,测量 3 d 的总氮含量。取只加水样和污泥为 100:25 (mL) 的为对照组。

1.8 水质分析方法

氨氮采用靛酚蓝分光光度法;硝酸盐氮采用紫外分光光度法;亚硝酸盐氮采用重氮化偶合分光光度法;总氮采用过硫酸钾紫外分光光度法^[15]。

2 结果和分析

2.1 菌种分离、筛选与鉴定

经富集和分离,获得在异养硝化培养基上生长良好的菌株 15 株,将这些菌株接种至硝化培养基中,培养后经分光光度计法检测,得到 1 株既能异养硝化又能好氧反硝化的菌株,其编号为 YF14。该菌株菌落颜色为褐色,杆状,不透明,菌株大小约为 $0.5 \mu\text{m} \times 1.2 \mu\text{m}$,扫描电镜下观察无芽孢,无鞭毛。革兰氏染色阴性,葡萄糖氧化为阳性,V-P 试验及甲基红试验为阳性,不能水解淀粉,不利用柠檬酸,不产 H_2S ,过氧化氢试验、吲哚试验、氧化酶试验均呈阴性。根据菌株形态及生理特征,结合伯杰氏手册

初步鉴定该菌属于不动杆菌属 (*Acinetobacter*)^[16]。对菌株 16S rDNA 进行序列测定,得到长度为 1450 bp 的序列,序列提交 NCBI,序列号为 HQ684847。NCBI 数据库中 Blast 检索显示,GenBank 中与该序列相似性大于 95% 的序列全部来自于不动杆菌属,进一步确定了该菌株为不动杆菌属 (*Acinetobacter*),命名为 *Acinetobacter* sp. YF14。这是已知报道中,第一株能进行异养硝化和好氧反硝化的不动杆菌。

2.2 菌株生长曲线

从图 1 中可以看出,该菌株在 12 h 左右进入对数期,这比王弘宇等研究的菌 ZW2 的对数期 8 h^[17] 以及马放等研究的菌 X31 的 9 h^[18] 均要晚一些,推测这与菌种的特性有关。在 22 h 左右进入稳定期,大约在 45 h 以后进入衰亡期。

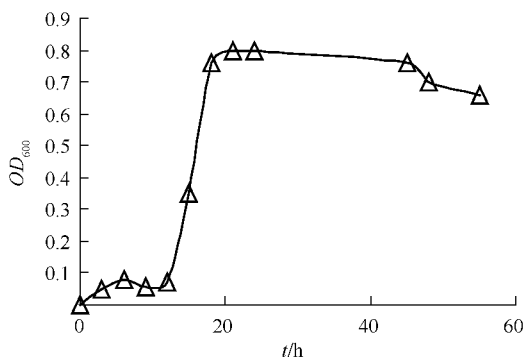


图 1 菌株 YF14 的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of strain YF14.

2.3 菌株的异养硝化特性

在以琥珀酸钠为唯一碳源,以硫酸铵为氮源的异养硝化培养基中生长时,培养液的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 及 TN 浓度变化见图 2, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 及 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度变化见图 3。从图 2 中可以看出,经过 3 d 的培养, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 TN 浓度持续下降,3 d 后降解率可达到 92% 和 91%,这证实了菌 YF14 具有良好的脱氮性能。从图 3 看出, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 与 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 均是先有少量积累,再下降,3 d 后基本无积累。这说明该菌是通过硝化作用去除氮而不是通过同化作用积累氮。 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 与 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 的升高可能是因为硝化作用引起的,而下降至到无积累可能是由于菌株在异养硝化的同时发生了反硝化引起的,Robertson 等认为通过测定异养硝化细菌中积累的亚硝酸的量来确定菌体的硝化强度,得出的资料往往很小,主要是因为异养硝化的同

时发生了反硝化作用,硝化与反硝化作用处于平衡状态^[19],本研究结果与之相符,故需要检测菌株的反硝化作用。张光亚等^[20]和 Verstraete^[21]报道异养硝化发生在老龄细胞中;曹喜涛等筛选到一株芽胞杆菌 NH921,6 h 时亚硝态氮就迅速增加^[22],将图 2 与图 1 相比,可以看出,菌株发生异养硝化主要发生在 1-2 d 之间,即基本在菌株的稳定期,这与前者的研究不同,说明不同的微生物发生异养硝化的时期不同,可能在生长的任何一个时期,因为某种生理需求而出现的一种微生物属性。从菌种的生长量上看出,在氨态氮大量转化的同时,菌数量并没有明显积累,这说明氮的脱除有相当大一部分是由于异养硝化引起的,由于未检测生物质的量,故还不能确定异养硝化所占有氮去除的具体比例。

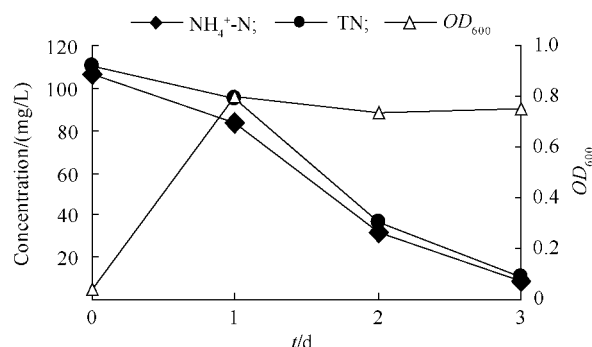


图 2 在异养硝化培养基中氨态氮及总氮浓度变化

Fig. 2 Changes of the $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ concentration and total N concentration in the Heterotrophic nitrification medium.

2.4 异养硝化菌株的好氧反硝化特性

异养硝化菌株 YF14 在硝酸盐和亚硝酸盐反硝化培养基中的培养特征见图 4、图 5。从图 4 中可以看出,利用硝酸盐作为唯一氮源的培养基中培养时,发现硝酸盐 12 h 以内下降较少,仅有 2% 不到的硝酸盐损失,推测这一阶段主要是菌种处在生长前期,需要的氮基本都是作为同化作用吸收,未进行反硝化导致损失量较少,也有可能是因为菌浓度不够导致。从 24 h 开始发生大幅度下降,至 84 h 几乎降为零,在此过程检测到了少量的亚硝酸盐存在,其浓度最大值为 17.6 mg/L,出现在第 48 h,之后亚硝酸盐至 84 h 也降为零,最终硝酸盐和亚硝酸盐均不积累,有亚硝酸盐的存在说明菌种可以把硝酸盐转化为亚硝酸盐,这充分证明了菌种的反硝化特性。在培养的过程中发现有气泡生成,由于客观的原因,未对气泡中的气体进行检测,推测有可能是 N_2 或

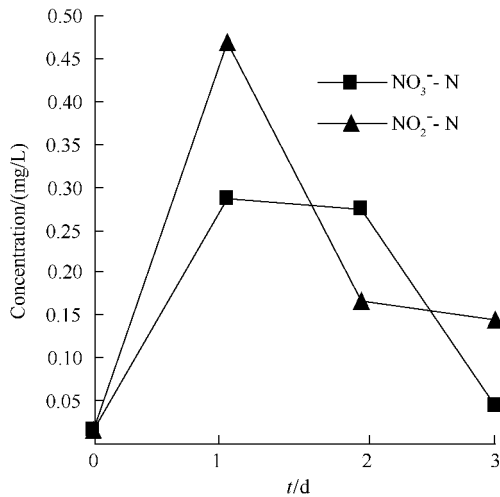


图3 在异养硝化培养基中硝态氮和亚硝态氮浓度变化

Fig. 3 Changes of the NO₃⁻-N concentration and NO₂⁻-N concentration in the Heterotrophic nitrification medium.

N₂O。从图5中可以看出,利用亚硝酸盐为氮源的培养基中培养菌种时,亚硝酸盐浓度持续下降,至最终培养96 h以后检测不到,在此过程中检测不到硝酸盐氮的存在,有少许气体生成。无论是以硝酸盐还是亚硝酸盐为氮源进行培养时,都可以从菌种的生长量上看出,反硝化发生在菌种的稳定期,并且在反硝化过程中,菌种没有明显积累,说明在该菌种脱氮的过程中,好氧的反硝化占有一定的比例,类似的,由于种种原因未测量生物质氮,故从该实验中尚无法得知异化脱氮所占有的比例。

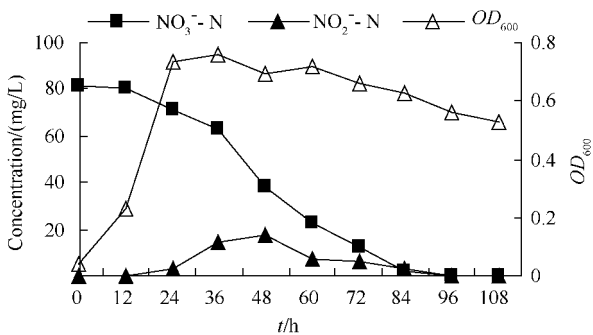


图4 在硝酸盐反硝化培养基中的硝态氮和亚硝态氮浓度变化

Fig. 4 Changes of the NO₃⁻-N concentration and NO₂⁻-N concentration in the nitrate denitrification medium.

2.5 最适脱氮条件及影响因素

大多数研究都从硝化或反硝化的领域讨论了其

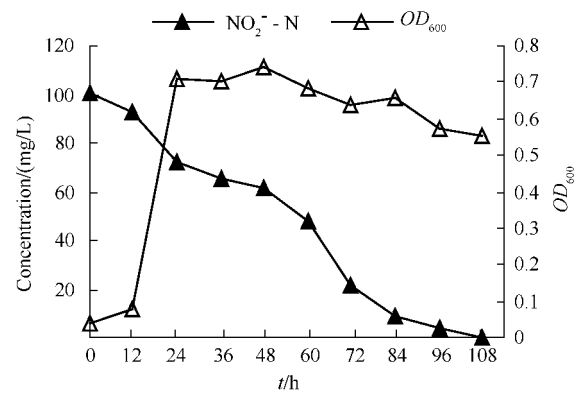


图5 在亚硝酸盐反硝化培养基中亚硝态氮浓度变化

Fig. 5 Changes of the NO₂⁻-N concentration in the nitrite denitrification medium.

影响因素,因为研究的目的在于最终的氮脱除,因此,直接研究脱氮有利于从整体上了解其影响因素和最适条件,更有利于实际应用中控制把握各种环境条件。从表1中可以看出,影响菌YF14脱氮的因素依次是转速 > 接种量 > 碳源 > 碳氮比 > pH。当转速为160 r/min,碳源取葡萄糖,接种量1%,碳氮比为8:1,pH为6.5时,脱氮效果最好。为进一步验证正交试验结果,将上述最佳脱氮条件应用于脱氮,结果脱氮率均达到99%以上,基本无硝酸盐和亚硝酸盐的积累,说明正交试验结果与实际脱氮效果相吻合。

2.6 菌种强化污泥脱氮应用

接种活性污泥前用显微镜观察,活性污泥无过量丝状菌,有少量原生动物。将试验组和对照组分别曝气3 d,二者对生活污水的TN去除效果如图6所示。由图6中可以看出,对照组,即只有活性污泥的水样,运行以后,TN从45.63 mg/L下降至17.34 mg/L左右,氮的去除率为60%左右,并且可以观察到活性污泥的明显生长,说明有一部分的氮去除是通过细菌的同化作用去除的,运行过程可以检测出少量的亚硝酸盐,可见仅有活性污泥的对照组很难将氮完全去除。而添加了菌YF14的试验组运行后TN从45.63 mg/L下降至4.8 mg/L左右,氮的去除率为90%以上,提高氮的去除幅度约为30%,这说明投加的异养硝化菌YF14确实能够大幅提高活性污泥对于TN的去除能力,并且未检测到硝酸盐和亚硝酸盐,这说明该菌在与活性污泥共同作用过程中还发挥了其好氧反硝化的功能。投加

的菌 YF14 未对原活性污泥的生长造成较大的影响,也未造成生长量的明显增长。

表 1 正交试验结果

Table 1 Results of orthogonal experiment

Statistical indexes	Carbon source (A)	Carbon nitrogen ratio (B)	Inoculation percentages (C)	pH (D)	Rotate speed (E)
K ₁	6.948	7.189	6.894	6.985	6.832
K ₂	7.089	7.186	7.359	7.187	6.802
K ₃	7.08	7.164	7.263	7.146	7.532
K ₄	7.289	6.867	6.890	7.088	7.240
k ₁	0.868	0.898	0.861	0.873	0.854
k ₂	0.886	0.898	0.919	0.898	0.850
k ₃	0.885	0.895	0.907	0.893	0.941
k ₄	0.911	0.858	0.861	0.886	0.905
R	0.042	0.040	0.058	0.025	0.091
F value	3.335	4.285	10.95	1.43	21.90
F critical value	3.49	3.49	3.49	3.49	3.49
significance	×	× ×	× ×	×	× ×
Optimal combination	E ₃ C ₂ A ₄ B ₁ D ₂				

× × : highly significant; × : non significant.

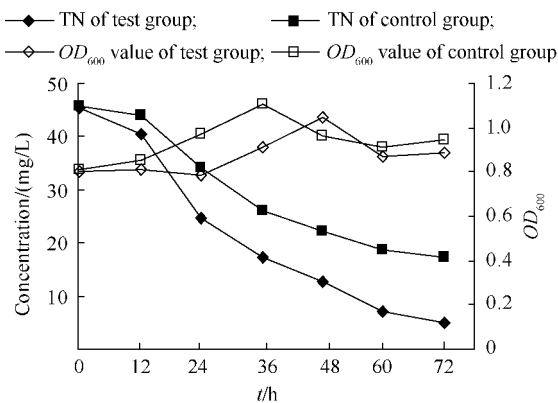


图 6 菌株 Y14 强化活性污泥脱氮效果

Fig.6 N-removal effects of strain YF14 strengthen activated sludge.

3 讨论

3.1 菌种

Hu 和 Kung 报道从 ABS 废水处理系统中分离得到一株不动杆菌,这是第一株在异养硝化领域中的不动杆菌属微生物,但未对该菌株作进一步鉴定^[23]。孔庆鑫通过极限稀释的方法获得一株去除氨氮效果较好的不动杆菌 *A. sp.* YY-5,该菌株鉴定为鲍曼不动杆菌 (*A. baumannii*)^[24]。本研究中菌株 YF14 与琼氏不动杆菌 (*A. junii*) (AM184279.1) 具有更高的相似性,是目前所知报道的第一株具有异养硝化和好氧反硝化功能的琼氏不动杆菌,这与前者等研究有区别,研究者在近二十年的时间,分

离出多株具有异养硝化的细菌^[10, 20, 23, 25-27],其中不动杆菌的数量较少,尚在研究的初级阶段。

最早观察到好氧反硝化现象的是 Robertson 等,他们在实验室观察到有氧存在的条件下发生了反硝化现象,甚至有的可以在氧浓度达到 7 mg/L 的环境下进行^[28]。国内有许多学者在类似的实验中发现了好氧反硝化现象,但是关于好氧反硝化的不动杆菌尚未见报道。本研究中发现菌 YF14 能在好氧的条件下将 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 通过反硝化去除,这意味着菌 YF14 具备应用于同时硝化反硝化 (Simultaneous Nitrification and Denitrification, SND) 的可能性。

传统反硝化理论认为,生物反硝化过程只有在缺氧的条件下才能进行,DO 的存在会对反硝化过程起到抑制作用。这主要是因为氧会与硝酸盐竞争电子供体或是阻碍硝酸盐向膜内硝酸还原酶的传递,而好氧反硝化过程被认为是由于菌体中存在周质硝酸盐还原酶的缘故,菌株因此可利用硝态氮和氧气同时作为电子受体进行协同呼吸^[29]。菌 YF14 可以实现在好氧条件下的反硝化。在该菌中推测可能也存在周质硝酸盐还原酶,使得菌株能同时利用氧和硝酸盐进行共呼吸,从而实现了菌株好氧条件下的反硝化。好氧反硝化使得菌株应用于废水脱氮处理更具有重要价值。

本研究检测了菌 YF14 在氨氮、硝酸盐、亚硝酸盐培养基中的培养特征,在氨氮培养基中生长时,硝酸盐和亚硝酸盐均有先升后降的变化趋势,最后无

积累的硝酸盐和亚硝酸盐,这说明硝酸盐和亚硝酸盐是氨氮代谢过程中的中间产物;利用硝酸盐进行培养时,硝酸盐氮能在84 h内被去除100%,有少量的亚硝酸盐积累,说明硝酸盐能进行反硝化,并且中间要经过生成亚硝酸盐这一步骤;利用亚硝酸盐进行培养时,亚硝酸盐能在数小时内被去除100%,未检测到硝酸盐,并且在硝酸盐和亚硝酸盐中培养时均有气泡生成。Richardson等在对可以脱氮的异养硝化菌研究后,对脱氮途径作出了推测,其中第一条途径是细菌先经历1个硝化阶段,随后进行反硝化脱氮^[30]。结合该研究,依据以上的研究结果,推测菌YF14的脱氮途径有可能符合Richardson等提出的模型,即为 $\text{NH}_4^+ \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。要进一步的确定其脱氮途径,需要从酶学的角度研究,如寻找关键酶基因等,这也是未来努力的方向。

3.2 菌 YF14 脱氮的影响因素

转速体现的是溶解氧 DO,传统的脱氮是好氧、缺氧的交替,氧气对于脱氮来说必须要控制到合适的浓度,过大虽然有利于好氧的硝化,可是对于缺氧反硝化来说是不利的。菌 YF14 能够进行好氧条件下的硝化和反硝化,对于氧的需要高于传统的反硝化细菌。因此,可以看到,随着转速的逐渐升高,溶解氧含量增加,脱氮效果会提高,而当转速从160 r/min提高至200 r/min时,脱氮效果下降,推测原因此时溶解氧已经饱和,提高的转速无助于溶解氧增加,反而破坏污泥的絮凝影响脱氮。这说明絮凝对于菌 YF14 的脱氮是必要的,良好的絮凝不仅提供了较好的沉降基础,更为微生物提供了一种较好的结构^[31],有利于菌对于氧气的合理利用与分配,因此在具体应用时应注意保持适当转速且不能影响絮凝。

接种量决定了培养液中的菌种数量,理论上讲接种量越大,菌种数量越大,脱氮效果会越好,但菌种又受制于营养条件的限制,过多的菌种会消耗大量的营养,这对于脱氮来说是不利的,因此,可以看出,接种量变化对于脱氮的影响是随着接种量增大,脱氮率呈现先升后降,其原因推测是1%的接种量恰好是一个临界点,小于1%时,营养供给不受限制,此时随着接种量增大,菌种数量大,硝化反硝化强度也大,脱氮率会提高,而高于1%,对营养需要的竞争超过了对于硝化反硝化的要求,此时脱氮率

反而会下降。这与王成林等研究对于亚硝化细菌的影响因素结果一致^[14]。

Wehrfritz等提出异养硝化代谢理论,认为异养菌在利用氨单加氧化酶氧化氨成亚硝酸盐的过程中,并没有把电子通过细胞色素复合物传递给辅酶 Q,因此辅酶 Q 是通过外加还原性有机碳源的氧化来得到电子,从而恢复进行催化反应后的氨单加氧酶(Ammonia monooxygenase, AMO)^[32]。因此,异养硝化菌和自养硝化菌不同,其菌体新陈代谢和生长繁殖也需要碳源代谢产生的 ATP 作为能源。传统的反硝化菌也离不开碳源,因此菌 YF14 作为一种同时硝化反硝化细菌,碳源对其生长以及氮利用有着重要的影响。从试验的4种碳源来看,利用葡萄糖时的脱氮率最高,其它3种碳源则相差不大。这说明该菌较容易利用葡萄糖作为碳源。试验中也发现,利用葡萄糖作为碳源时,氮脱除率高,但是相应的时间也较长,需要60 h以上,这比起乙酸钠的时间(36 h)要长的多,是由于微生物需要将葡萄糖分解为小分子的有机酸后才能利用的原因。

碳氮比体现的是培养液中的碳与氮之间的关系。大部分的细菌组成的碳氮比在6-10。当碳氮比小于6,细菌的生长才受到营养供应的限制,此时提高碳氮比既有利于细胞生长,也就有利于硝化反硝化,而当碳的供应量超过细菌的同化作用需求较多时,提高碳氮比对细菌生长的影响不大。从试验中可以看出,菌 YF14 最适的 C/N 比为8:1,这与Lalucat等^[33]以及Niel等^[34]的研究结果相符。

在 pH = 6.5 时菌 YF14 的脱氮效果最好,异养微生物降解有机物通常会把有机物酸化,这样会降低环境的 pH 值,因此,该菌在酸性条件下有较好的脱氮效果是比较有利的,这也是异养硝化细菌较之自养硝化细菌的优势之一。但从表1看出,其 R 值仅有0.025,说明 pH 对菌 YF14 的脱氮效果影响不大,Joe等发现在 *Alcaligenes faecalis* No. 4 在 pH 为6、7、8时的脱氮活性基本一致^[35],本研究结果与之相似,因此在实际脱氮中调节 pH 值意义不大。

3.3 脱氮活性

目前许多脱氮研究都仅仅局限在试验的初级阶段,如杨宗政等^[36]、林燕等^[8]分别利用分离的异养硝化菌进行人工合成的污水的脱氮研究,取得了较好的效果。陈赵芳等^[12]在摇床培养条件下利用异养硝化菌 YY4 对生活污水和化工厂废水进行了脱

氮实验,取得了95.79%(36 h)的最高脱氮率。真正投入废水处理的较少,这一方面与异养硝化理论不成熟有关,另一方面还与菌种不能与原有污泥生物相互融合有关,相互融合的一个关键是固定化。牟丽娉等将两株异养硝化菌 *Stenotrophomonas maltophilia* strain DN1.1 和 *Pseudomonas putida* DN1.2 构成的微生物脱氮菌剂应用于废水处理的开放系统中,发现添加了 CaCO_3 的反应器的脱氮效果总是优于没有添加的反应器, Ca^{2+} 有利于功能菌在反应器中的滞留,从而指出功能菌株在反应器中的固定化是一个很重要的问题^[26]。本研究采集曲阜城市生活污水,利用菌 YF14 与生活污水处理厂活性污泥共同作用,发现菌 YF14 可以加强活性污泥的 TN 去除率,并且未发现有硝酸盐和亚硝酸盐的积累,这说明该菌能很好的与原活性污泥中的土著微生物融为一体,共同作用,这是该菌可能应用于实践的一个重要前提。

绝大多数异养硝化-好氧反硝化微生物是在自然界中分离到的。如 Robertson 等分离出的泛养硫球菌 (*Thiosphaera*) 即是从污水处理厂的反硝化单元中^[37] Joo 等分离 *Alcaligenes faecalis* 是从活性污泥中^[35] 等等,这些都说明异养硝化和好氧反硝化微生物不是外来的或者由于突变导致的变异种,而是一类环境中自然存在的土著种,在自然界的氮循环中发挥了重要的作用,本研究中分离的菌 YF14 来自于养殖池塘的底泥,这扩展了分离异养硝化反硝化菌种的领域,也为该类微生物存在于自然中提供了又一佐证。为发挥该类微生物的作用,将来要做的是尽可能地挖掘菌种的潜力,研究其机理,并在废水脱氮中进行人工强化和具体应用。

参考文献

- [1] Xia SQ, Li JY, Wang RC. Nitrogen removal performance and microbial community structure dynamics response to carbon nitrogen ratio in a compact suspended carrier biofilm reactor. *Ecological Engineering*, 2008, 32 (3): 256-262.
- [2] Kim JK, Park KJ, Cho KS, Nam SW, Park TJ, Baipai R. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 2005, 96 (17): 1897-1906.
- [3] Killham K. Heterotrophic nitrification. IRL Press, 1986: 117-126.
- [4] Schimel JP, Firestone MK, Killham KS. Identification of heterotrophic nitrification in a sierran forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48 (4): 802-806.
- [5] Adams JA. Identification of heterotrophic nitrification in strongly acid larch humus. *Soil Biology & Biochemistry*, 1986, 18 (3): 339-341.
- [6] Duggin JA, Voigt GK, Bormann FH. Autotrophic and heterotrophic nitrification in response to clear-cutting northern hardwood forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 1991, 23 (8): 779-787.
- [7] Pedersen H, Dunkin KA, Firestone MK. The relative importance of autotrophic and heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by ^{15}N tracer and pool dilution techniques. *Biogeochemistry*, 1999, 44: 135-150.
- [8] 林燕,孔海南,何义亮,严立,李春杰. 异养硝化细菌的分离及其硝化特性实验研究. *环境科学 (Environmental Science)*, 2006, 27 (2): 324-328.
- [9] Daum M, Zimmer W, Papen H, Kloos K, Nawrath K, Bothe H. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Current Microbiology*, 1998, 37 (4): 281-288.
- [10] Gupta SK, Kshirsagar M. Quantitative estimation of *Thiosphaera pantotropha* from aerobic mixed culture. *Water Research*, 2000, 34 (15): 3765-3768.
- [11] Moriyama K, Sato K, Harada Y, Washiyama K, Okamoto K. Renovation of an extended aeration plant for simultaneous biology removal of nitrogen and phosphorus using oxic-anaerobic-oxic process. *Water Science and Technology*, 1990, 22 (7-8): 61-68.
- [12] 陈赵芳,尹立红,浦跃朴,李先宁,谢详峰. 一株异养硝化菌的筛选及其脱氮条件. *东南大学学报 (Journal of Southeast university)*, 2007, 37 (3): 486-490.
- [13] 王兰,王忠. 环境微生物学实验方法与技术. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [14] 王成林,周巧红,王亚芬,梁威,吴振斌. 一株异养硝化细菌的分离鉴定及其亚硝化作用研究. *农业环境科学学报 (Journal of Agro-Environment Science)*, 2008, 27 (3): 1146-1150.
- [15] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会编. 水和废水监测分析方法. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 258-282.
- [16] George MG, Julia AB, Timothy GL. Bergey's manual of systematic bacteriology (second edition). New York Berlin Heidelberg: Springer, 2004: 103-104.

- [17] 王弘宇,马放,杨开,魏利,苏俊峰,张献旭. 两株异养硝化细菌的氮氮去除特性. 中国环境科学 (*China Environmental Science*), 2009, 29(1): 47-52.
- [18] 马放,周丹丹,王宏宇,董双石. 一株好氧反硝化细菌生理生态特征的研究. 哈尔滨工业大学学报 (*Journal of Harbin Institute of Technology*), 2006, 38(4): 575-577.
- [19] Robertson LA, Van Niel EWJ, Torremans RAM, Kuenen JG. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(11): 2812-2818.
- [20] 张光亚,陈美慈,韩如暘,闵航. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2003, 43(2): 156-161.
- [21] Verstraete W, Alexander M. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. *Journal of Bacteriology*, 1972, 110(3): 955-961.
- [22] 曹喜涛,常志州,黄红英,沈中元,徐莉. 1株高温异养硝化细菌的分离鉴定和特性研究. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agriculture Science*), 2006, 34(19): 4833-4834.
- [23] Hu TL, Kung KT. Study of heterotrophic nitrifying bacteria from wastewater treatment systems treating acrylonitrile, butadiene and styrene resin wastewater. *Water Science and Technology*, 2000, 42(3-4): 315-321.
- [24] 孔庆鑫. 一株新型脱氮微生物的分离鉴定及其脱氮机制. 中国人民解放军军事医学科学卫生学环境医学研究所硕士学位论文 2004.
- [25] Emiko M, Nobuhilko N, Toshiaki NK, Norihisa O, Tadaatsu N. A simple screening procedure for heterotrophic nitrifying bacteria with oxygen-tolerant denitrification activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(4): 409-411.
- [26] 牟雨婷,黄钧,苟莎. 异养硝化微生物菌剂及其好氧颗粒污泥的脱氮试验. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*), 2009, 15(3): 356-360.
- [27] Mével G, Prieur D. Thermophilic heterotrophic nitrifiers isolated from Mid-Atlantic Ridge deep-sea hydrothermal vents. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, 44(8): 723-733.
- [28] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*, 1984, 139(4): 351-354.
- [29] Berks BC, Richardson DJ, Robinson C, Reilly A, Aplin RT, Ferguson SJ. Purification and characterization of the periplasmic nitrate reductase from *Thiosphaera pantotropha*. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 220(1): 117-124.
- [30] Richardson DJ, Wehrfritz JM, Keech A, Crossman LC, Roldan MD, Sears HJ, Butler CS, Reilly A, Moir JW, Berks BC, Ferguson SJ, Thomson AJ, Spiro S. The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Biochemical Society Transactions*, 1998, 26(3): 401-408.
- [31] Jenkins D. Towards a comprehensive model of activated sludge bulking and foaming. *Water Science and Technology*, 1992, 25(6): 215-230.
- [32] Wehrfritz JM, Reilly A, Spiro S, Richardson DJ. Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*: identification of electron acceptors that couple heterotrophic nitrification to aerobic denitrification. *FEBS Letters*, 1993, 335(2): 246-250.
- [33] Lalucat J, Bennisar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(2): 510-547.
- [34] Van Niel EWJ, Braber KJ, Robertson LA, Kuenen JG. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1992, 62(3): 231-237.
- [35] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Nitrification and denitrification in high-strength ammonium by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(11): 773-778.
- [36] 杨宗政,王鑫,庞金钊,孙铁军. 异养硝化菌的分离及其强化活性污泥脱氮效果. 中国给水排水 (*China Water & Wastewater*), 2006, 22(21): 67-70.
- [37] Robertson LA, Kuenen JG. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonia van Leeuwenhoek*, 1990, 57(3): 139-152.

Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Acinetobacter* sp. YF14 and its denitrification activity

Yufeng Xin , Xiaohua Qu ¹ , Mengdong Yuan ¹ , Yande Jing ^{2*}

¹ College of Life Science , ² Department of Geography and Tourism , Qufu Normal University , Qufu 273165 , China

Abstract: [Objective] We separated , screened and identified a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium from the surface sediment of a culture pool. Furthermore , we studied the role it plays in denitrification. [Methods] We separated the bacterium through enrichment culture , identified it by observing its morphological characteristics , studying its physiological and biochemical properties and making phylogenetic analysis of its 16S rDNA sequences. Then we studied the growth curve by regularly measuring the OD_{600} value , studied the influencing factors and optimum conditions of denitrification through orthogonal experiment , and examined its denitrification activity through interaction with the activated sludge of sewage treatment plant. [Results] The strain was identified as *Acinetobacter* and named *A.* sp. YF14 , which is the first known *Acinetobacter* that carries out heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. It reached the logarithmic growth phase after 12 hours , the stationary phase after 22 hours , and the decline phase after 45 hours. Using strain YF14 in a reactor under heterotrophic conditions , the $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ and total nitrogen removal rates reached 92% and 91% respectively within 3 days. In addition , nitrate and nitrite nitrogen were not observed during the incubation. Under aerobic incubation conditions , almost all of the nitrogen was removed through denitrification in the nitrate or nitrite culture medium inoculated with strain YF14. The orthogonal experiment results indicated that the denitrification effect was optimal when the rotate speed , carbon source , inoculation percentages , carbon nitrogen ratio and pH were 160 r/min , glucose , 1% , 8:1 and 6.5 , respectively. Sorting Order of the factors on the denitrification effect was rotate speed > inoculation percentages > carbon source > carbon nitrogen ratio > pH. The strain YF14 could improve the denitrification rate by about 30% when interacting with active sludge. [Conclusion] The strain YF14 coupling of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification is feasible and is of practical value in water treatment.

Keywords: heterotrophic nitrifier , aerobic denitrification , nitrogen removal , *Acinetobacter*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Young and Middle-Aged Scientists Research Awards Fund of Shandong Province (BS2009NY022) and by the Open project of Key Laboratory of Shandong Province

* Corresponding author. Tel: +86-537-4458576; E-mail: jingyande@163.com

Received: 6 July 2011 / Revised: 15 September 2011