

一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其除氮特性

杨小龙, 李文明, 陈燕, 曹郁生*

食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047

摘要 【目的】生物除氮中反硝化菌具有重要的作用, 需氧反硝化菌研究较少, 有着很好的应用潜力, 本研究主要从环境样品中分离具有高效去除铵氮和亚硝酸盐氮活性的好氧反硝化菌, 并对其分类及除氮特性进行研究。【方法】以高效去除铵氮、除亚硝酸盐氮和好氧反硝化能力为主要指标, 从富营养化的池塘淤泥水和工厂污泥样品中进行菌株分离筛选。通过生理生化特点以及 16S rRNA 序列分析对活性最好的菌株进行初步鉴定。在好氧条件下, 分别以 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 作为唯一氮源, 考察菌株的好氧反硝化特性、去除铵氮和亚硝酸盐氮特性, 以及不同初始 pH 值、温度、碳源、摇床转速对该菌去除铵氮和亚硝酸盐氮特性的影响。【结果】得到的细菌中, 以菌株 C-4 的活性最好, 其 16S rRNA 序列与不动杆菌的同源性达 99%, 结合生理生化特点, 初步确定菌株 C-4 属于不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)。以柠檬酸钠作为碳源, 30℃、120 r/min 振荡培养, 种龄为 18 h, 用初始 pH 为 8.5 的 200 mg/L NH_4^+ -N 培养基和初始 pH 为 7.5 的 100 mg/L NO_2^- -N 培养基进行测定, 分别培养 15 h 与 12 h, 净除氮率分别达到 65.8% 和 47.8%。【结论】从鱼塘水样中分离到一株好氧反硝化菌 C-4, 初步鉴定为不动杆菌属的一个种 (*Acinetobacter* sp.), 具有较高的反硝化特性和高效去除铵氮与亚硝酸盐氮的能力, 在处理实际池塘污水时中, 净除氮率可达 73.04% 以上。

关键词: 好氧反硝化细菌, 铵氮和亚硝酸盐氮, 分离鉴定, 同源分析

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 08-1062-09

由于未达标的工业废水、生活污水的大量任意排放, 水环境中氮污染的问题日趋严重, 成为国际社会面临的一个重大问题。国内水体中氮的污染以铵态氮和亚硝酸盐形式氮的污染最为严重, 并常有硝酸盐形式氮的大量积累, 而生物除氮是去除水体中氮污染的最有效的方法之一。传统生物除氮的作用包括硝化和反硝化两个作用^[1-2], 反硝化是指反硝化细菌将 NO_3^- 、 NO_2^- 、NO 还原为 N_2 的过程, 它的原理是在呼吸过程中产生了 ATP, 而氧化态氮在此电子呼吸链中被作为电子受体。一般硝化作用发生在好氧条件下, 反硝化作用发生在厌氧或兼性厌氧环境, 随着研究的不断深入, 多种好氧反硝化微生物陆

续从不同环境中筛选出来。这不但弥补了厌氧反硝化菌在有氧情况下难以充分发挥反硝化作用的不足^[3], 而且为生物除氮提供了新的途径, 在高密度水产养殖水体净化中有着很好的应用前景。

目前国内外报道的好氧反硝化菌包括产碱杆菌 (*Alcaligenes*)^[4-5]、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)^[6-7]、异养球硫菌 (*Thiosphaera pantotropha*)^[8]、丛毛单胞菌属 (*Comamonas*)^[9]、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[10-11]、草螺菌属 (*Herbaspirillum*)^[12]、副球菌属 (*Paracoccus*)^[13] 和代尔夫特菌属 (*Delftia*)^[14] 等。筛选出既具有高效去除铵氮和亚硝酸盐氮能力, 又可在好氧条件下将硝酸盐经反硝化还原成其他氮态

* 通信作者。Tel: +86-791-8327754, E-mail: yysccc@hotmail.com

作者简介: 杨小龙 (1987-), 男, 甘肃天水人, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: yxl327813040@163.com

收稿日期: 2011-01-19; 修回日期: 2011-04-01

的微生物,是生物除氮中一个好的思路。本研究从富营养化的鱼塘水及污水处理厂反应器活性污泥中共分离筛选出5株有较强去除 NH_4^+-N 和 NO_2^--N 能力的菌株,其中C-4菌株活性最强。在此基础上,对菌株C-4进行了生理生化鉴定和16S rRNA同源性分析,并对该菌的好氧反硝化特性、去除铵氮和亚硝酸盐氮效能以及影响除氮的条件进行了考察。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:样品采于南昌市区富营养化的鱼塘,以及污水处理厂反应器中活性污泥,样品立即置于灭菌容器并进行分离。

1.1.2 培养基:富集培养基: KNO_3 2 g/L,柠檬酸钠 5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, pH 7.2-7.6; 所用的反硝化培养基^[15],溴百里酚(BTB)培养基^[16],硝酸盐培养基^[17]均按参考文献说明配制; NO_2^--N 测定培养基:使用反硝化培养基,但以0.25 g/L的 NaNO_2 代替其中的 KNO_3 ; NH_4^+-N 测定培养基:使用反硝化培养基,但以0.47 g/L的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 代替其中的 KNO_3 ; 净除氮率 $A = [c_i - c_f - c_e] / c_i$, 其中 c_i 为体系中所添加氮的初始浓度, c_f 为培养后体系中所添加的该形式氮和其他无机盐形式氮浓度的总和, c_e 为菌体生长所消耗的氮浓度。

1.2 高效去除铵氮和亚硝酸盐氮好氧反硝化菌的分离筛选

富集驯化。采用含有高浓度铵氮和亚硝酸盐氮的培养基进行好氧富集,以淘汰掉不能在高浓度氮环境中生存的微生物。分装100 mL富集培养基于250 mL三角瓶中,加入玻璃珠,灭菌后接入5 mL样品,做2份平行样,30℃、150 r/min摇床中振荡培养,每隔24 h向培养液中加入5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液和5% NaNO_2 溶液各1 mL,富集培养5 d。

分离纯化。依据Takaya^[18]等人建立的有氧反硝化菌平板分离方法进行初筛,其原理是BTB培养基的指示剂溴百里酚蓝在pH大于7.6时呈蓝色,细菌的反硝化是一个产碱过程,当平板中有反硝化菌生长时,会因pH升高菌落出现蓝色或蓝色晕圈。取10 mL上述富集培养液至90 mL无菌水中,梯度稀释,取适宜的稀释度涂布于BTB培养基平板上,30℃培养2-3 d。从BTB平板上挑选出蓝色晕圈的

单菌落,并在硝酸盐固体培养基上继续分离,以得到纯培养。

复筛。以对铵氮和亚硝酸盐氮的去除率为标准,筛选出可高效去除铵氮和亚硝酸盐氮的菌株。分离得到的单菌接种于硝酸盐培养基中,30℃,150 r/min培养24 h,取10 mL菌液,7064 × g离心10 min,菌体用无菌水洗涤,离心后接入分别以200 mg/L NH_4^+-N 和100 mg/L NO_2^--N 为唯一氮源的培养基中,30℃,150 r/min振荡培养24 h,取5 mL培养液7064 × g离心10 min,以未接菌的培养基作对照,测定上清液中 NH_4^+-N 和 NO_2^--N 含量。并将个单菌接入硝酸盐液体培养基中,取1、3、5 d菌液做硝酸盐还原实验。

在分离的活性菌株中选取一株活性最好者用于进一步研究。

1.3 目的菌株的活化

选取的菌株接到反硝化培养基中30℃和150 r/min活化培养15 h后,所得培养液用于后续实验。

1.4 菌株好氧反硝化特性

取10 mL目的菌株活化培养液,7064 × g、10 min离心,菌体用无菌水洗涤后接入以 KNO_3 为唯一氮源、氮初始浓度为161.61 mg/L的反硝化培养基中,30℃,150 r/min培养,每隔3 h取样测定培养液的 OD_{600} 以及培养液中的 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 NO_2^--N 和菌体细胞中的氮含量。检测菌株的反硝化活性。

如上其它培养条件相同条件下,改变不同的摇床转速,分别培养18 h后,取样测定培养液中 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 NO_2^--N 以及菌体细胞中的氮含量,检测菌株在不同溶氧水平时的反硝化能力。

1.5 菌株对铵氮和亚硝酸盐氮的去除能力

以10%的接种量,取目的菌株活化培养液离心后,菌体分别接入200 mg/L NH_4^+-N 和100 mg/L NO_2^--N 测定培养基中,30℃,150 r/min培养,设置3个平行样,每隔3 h取样测定培养液的 OD_{600} 以及培养液中的 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 NO_2^--N 和菌体细胞中的氮含量。

1.6 菌株C-4去除铵氮和亚硝酸盐氮影响因素分析

以10%的接种量,取目的菌株活化培养液离心,所得菌体分别接入100 mL 200 mg/L的 NH_4^+-N 与100 mL 100 mg/L的 NO_2^--N 测定培养基中,研究菌株在不同初始pH、温度、碳源、摇床转速条件下对铵氮和亚硝化氮的去除能力。

1.7 菌株 C-4 对池塘污水的净化

采集富营养化的池塘淤泥水混合液,充分搅拌后,静置 2-3 d。取上清液过滤,装量 1 L 于 3 L 三角瓶中。以 5% 接种量,菌体用无菌水洗涤后接入经 121℃、20 min 灭菌的上述污水中,设置 3 个平行样,30℃、120 r/min 培养,每隔 24 h 取样测定培养液的 OD_{600} 以及培养液中的 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 NO_2^--N 和菌体细胞中的氮含量。

1.8 分析方法^[19]

NO_3^--N 的测定采用紫外分光光度法, NO_2^--N 的测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法, NH_4^+-N 的测定采用纳氏试剂比色法进行检测,菌体生长的测定采用浊度法(OD_{600}),菌体总氮的测定采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法。

1.9 细菌的鉴定

形态及生理生化鉴定:透射电子显微镜下观察菌体形态与运动特性,采用革兰氏染色,30℃ 培养 24 h 观察菌落形态;生理生化鉴定根据文献[20]和[21]。

16S rRNA 序列测定及同源性分析:(1) 菌体 DNA 的提取和纯化参见文献^[22]。PCR 反应引物采用 16S rRNA 通用引物(上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物:5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 45 s,53.5℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 1 min,进行 30 个循环,72℃ 延伸 7 min。采用琼脂糖电泳分析 PCR 产物的浓度和质量。(2) 测序及序列分析。采用 TaKaRa TA 克隆试剂盒进行克隆后送往上海生物工程技术有限公司进行测序,测序所获序列信息通过 Blast 程序与 GenBank 的核酸数据库中序列进行联配,用进行 BLAST 比对,搜索相关性序列同所测序列用 MEGE 软件进行系统发育分析。首先用 Clustal X 进行多序列匹配,按 Kimura 2-parameter 计算进化距离,最后构建 Neighbour-Joining(NJ) 系统发育树,进化树分枝稳定性用 Bootstrap 分析,重复 1000 次。

2 结果和分析

2.1 高效去除铵氮和亚硝酸盐氮好氧反硝化菌的分离和筛选

从南昌市两处富营养化鱼塘淤泥水和一个污水

处理厂反应器活性污泥中采集样品,富集培养,根据 Naoki Takaya 方法进行初筛,得到 13 个 BTB 阳性反应菌落,经硝酸盐还原实验验证,具有反硝化能力;原因是反硝化还原硝酸盐的第一步是先将硝酸盐氮还原为亚硝酸盐氮。进而根据菌株去除 NO_2^--N 和 NH_4^+-N 的能力,复筛得到 5 株具 NO_2^--N 和 NH_4^+-N 去除能力的菌株(表 1),其中 C-4 的去除能力最强,在以 200 mg/L 的 NH_4^+-N 和 100 mg/L 的 NO_2^--N 为唯一氮源的测定液中培养 15 h,对 2 种形式氮的减少率分别可达到 93.3% 和 80%。选择 C-4 做进一步研究。造成这种差异的原因可能有 2 个:(1) 所采集的样品来源不同。本研究选用的富营养化的鱼塘水和长期进行污水处理的污水处理厂反应器活性污泥样品中的氮、磷含量高,所以样品本身已含有大量的可在高浓度氮环境下生长的菌种。(2) 好氧条件下,通过在高浓度氮环境中驯化的方法,已经使好氧型除氮菌得到了大量的富集。而且好氧反硝化菌由于世代周期短、生长繁殖迅速、对环境变化的适应能力强等原因,对高浓度的氮环境具有更好的耐受力。

表 1 高效去除铵氮和亚硝酸盐氮好氧反硝化菌菌株的筛选

Table 1 Screening of aerobic denitrifying bacteria strain with removing ammonium and nitrite nitrogen ability

Strain	Reduce efficiency of NO_2^--N /%	Reduce efficiency of NH_4^+-N /%	Denitrification
J-2	81.4	51.9	+
J-5	26.7	63.4	+
J-6	75	67.7	+
C-4	80	93.3	+
C-43	45.6	82.4	+

2.2 菌株 C-4 的好氧反硝化特性

以 KNO_3 为唯一氮源,30℃,150 r/min 条件下培养,测定菌株生长过程中体系中 NO_3^--N 、 NO_2^--N 和 NH_4^+-N 的变化,确定菌株 C-4 的好氧反硝化能力。从图 1-A 可见,菌株 C-4 可迅速进入对数生长期,同时对 NO_3^--N 进行反硝化作用,在 24 h 内可将 NO_3^--N 从 161.61 mg/L 降至 55.69 mg/L,但其中有 31.28 mg/L 的氮被用于菌株的生长需要,此时菌株净除氮率可达 48.73%,具有较强的好氧反硝化能力。在整个培养过程中,未出现铵氮的积累,出现了亚硝酸盐的少量积累,但由于菌株对 NO_2^--N 具有很强的去除能力,始终稳定在 1.0-1.3 mg/L;培养 48

h 后,菌株的反硝化能力并未由于菌体的死亡而逐渐下降,除氮率为 49.9%,这是因为 48 h 后菌体中氮减少量大于培养液中氮升高量,从而导致除氮率反而升高。

采用如上同样的培养液,改变不同的摇床转速培养 18 h 后,从图 1-B 可见,发现菌株 C-4 在厌氧和静置培养时几乎不生长, NO_3^- -N 的减少量分别为 4.92 mg/L 和 10.09 mg/L,除氮率很低,反硝化作用很小;而在 100–200 r/min 的溶氧水平下培养时,菌株均具有较好的反硝化作用,且当摇床转速为 120 r/min 时,菌株的除氮率达到最大,为 50.06%;在 120 r/min 以上培养时,随着摇床转速的增大,菌株的除氮率保持不变。因此,说明菌株具有较好的好氧反硝化能力,且对好氧水平要求不苛刻。

2.3 菌株 C-4 对铵态氮和亚硝酸盐氮的去除能力

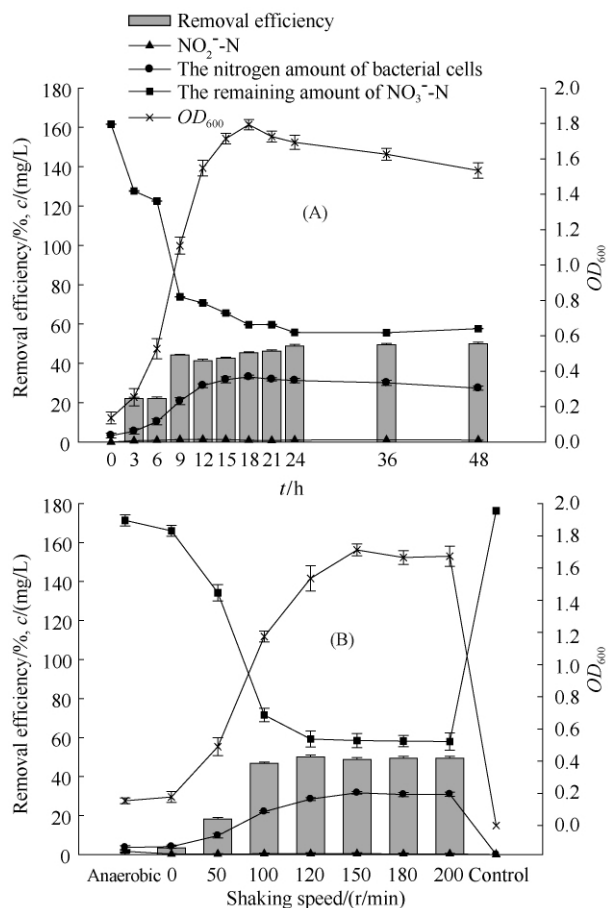


图1 菌株 C-4 在不同培养时间 (A) 和不同溶氧水平 (B) 条件下的反硝化特性

Fig. 1 Aerobic denitrification performance of strain C-4 under differently cultivate time (A) and differently dissolves oxygen level (B) conditions.

菌株 C-4 在两种测定培养基中, 30℃, 150 r/min 条件下培养, 生长趋势基本一致, 可迅速进入对数生长期。随着菌株生长, 培养液中铵氮量迅速下降, 在 15 h 内 NH_4^+ -N 浓度由 220.24 mg/L 降至 14.78 mg/L, 其中有 43.42 mg/L 的氮量被用于菌株生长, 15 h 内菌株的净除氮率可达 64.38%; 在整个过程中出现了硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的积累, 但含量较少, 最大时分别为 18.32 mg/L 和 3.28 mg/L (见图 2-A)。对亚硝酸盐氮的去除, 12 h 内, 培养液中 NO_2^- -N 浓度由 101.27 mg/L 降至 21.85 mg/L, 同时菌体中的氮量也随之增多, 有 22.0 mg/L 的氮被用于菌株生长, 12 h 内菌株净除氮率可达 44.54%; 在整个过程中也出现了硝酸盐氮和铵氮的少量积累, 最大时分别为 15.77 mg/L 和 2.01 mg/L (见图 2-B)。这说明菌株 C-4 具有高效的去除铵氮

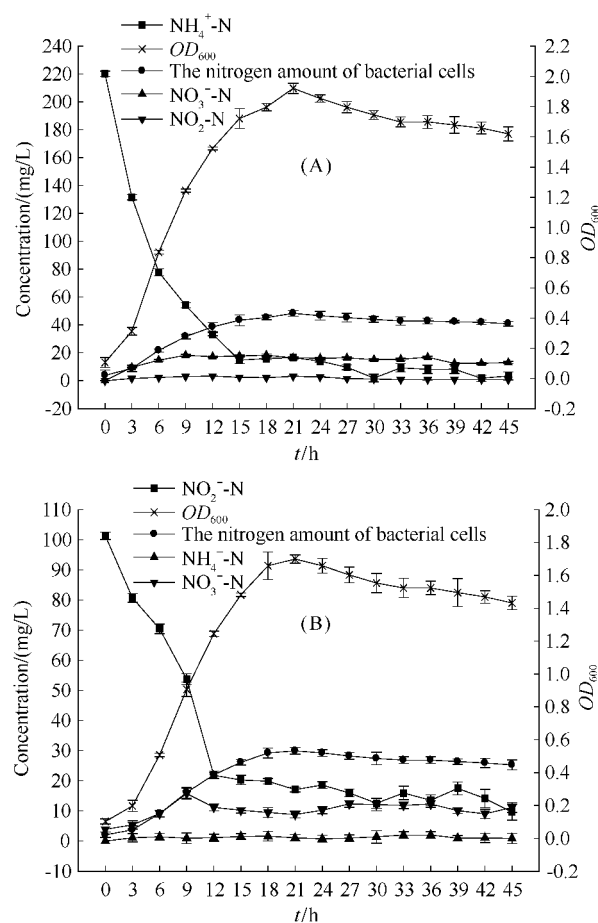


图2 菌株 C-4 对 NH_4^+ -N (A) 和 NO_2^- -N (B) 的去除能力

Fig. 2 Removal activity of strain C-4 to ammonium (A) and nitrite (B) nitrogen.

和亚硝酸盐氮的能力,其中有 25% – 33% 的是用菌体生长所需。

2.4 影响菌株 C-4 去除铵氮和亚硝酸盐氮的因素

2.4.1 不同初始 pH 对菌株 C-4 去除铵氮和亚硝酸盐氮的影响:

菌株 C-4 在两种测定液中均可在初始 pH 为 6 – 9 的条件下生长,在初始 pH 为 5 时菌株生长缓慢或几乎不生长,适宜生长 pH 偏碱性。其去除铵氮和亚硝酸盐氮特性,在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 测定液中当初 pH 为 8.5 时,铵氮的减少量达到最大;在 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 测定液中当初 pH 为 7.5 时,亚硝酸盐氮减少量最大(见图 3),这提示该菌株适宜用于偏碱性环境氮污染的处理。

2.4.2 不同温度对菌株 C-4 去除铵氮和亚硝酸盐氮的影响:

温度是影响微生物生长和生存的重要因素之一。当温度适宜时,微生物生长快,相关活性和代谢产物达到较高水平。从图 4 可以看出,菌株 C-4

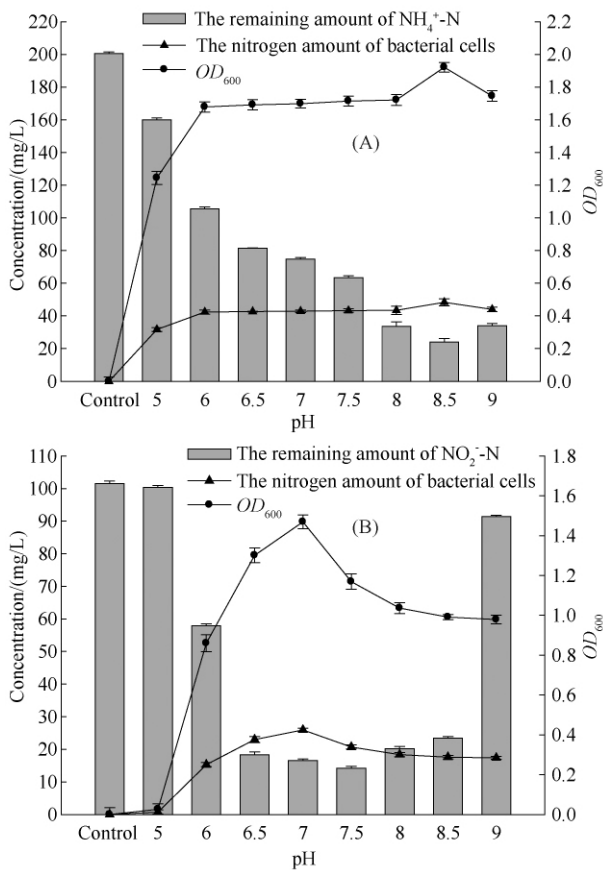


图 3 初始 pH 对菌株 C-4 去除 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (A) 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (B) 能力的影响

Fig. 3 Influence of initial pH on the growth and ammonium (A) and nitrite (B) nitrogen reduction of strain C-4.

在两种测定液中培养时,在 25℃ – 35℃ 的范围内均能生长,20℃ 时不生长,40℃ 时菌株 C-4 在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 测定液中生长缓慢,在 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 测定液中不生长,最佳生长温度为 30℃。其去除铵氮和亚硝酸盐氮特性,菌株 C-4 对两种形式的氮的去除作用与菌体生长情况基本相符,也是在 25℃ – 35℃ 的范围内铵氮和亚硝酸盐氮的减少量比较显著,在 30℃ 时最大。

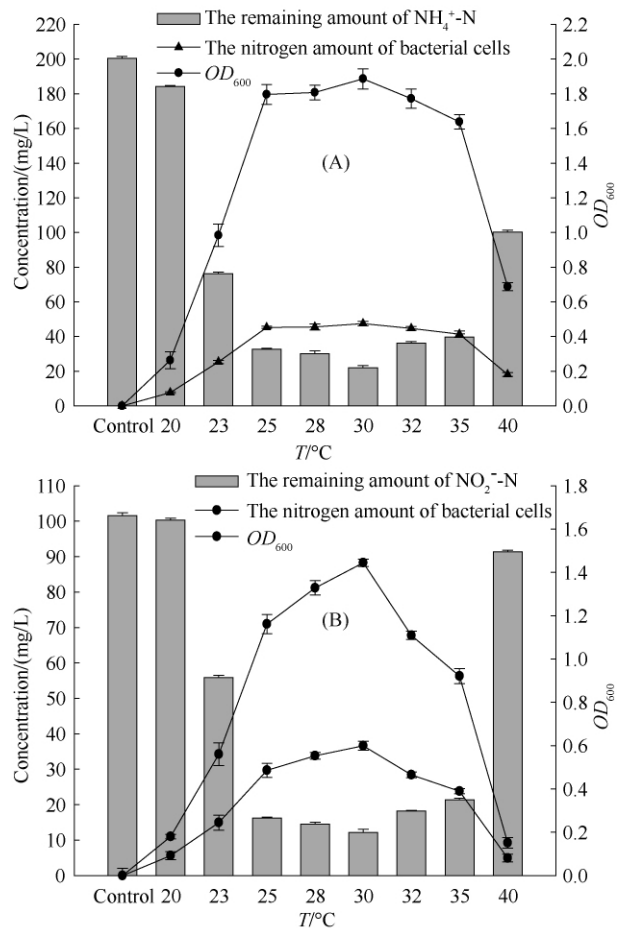


图 4 温度对菌株 C-4 去除 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (A) 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (B) 能力的影响

Fig. 4 Influence of temperature on the growth and ammonium (A) and nitrite (B) nitrogen reduction of strain C-4.

2.4.3 不同碳源对菌株 C-4 去除铵氮和亚硝酸盐氮的影响:

菌株 C-4 在两种测定液培养时,以柠檬酸钠为唯一碳源时生长量和氮减少量均达到最大,丁二酸钠时次之,而分别以酒石酸钾钠、蔗糖、葡萄糖为碳源时,菌株几乎不生长,去除效果也最低(见图 5)。因此,在试验的 5 种碳源中,柠檬酸钠为菌株 C-4 生长的最佳碳源。且从图中可以看出菌株生长较好时,菌体中的氮含量随之增加,去除效果也较

好,这也进一步验证了之前提到的菌株 C-4 菌体生长量与其培养液中添加氮减少量成正相关的理论。

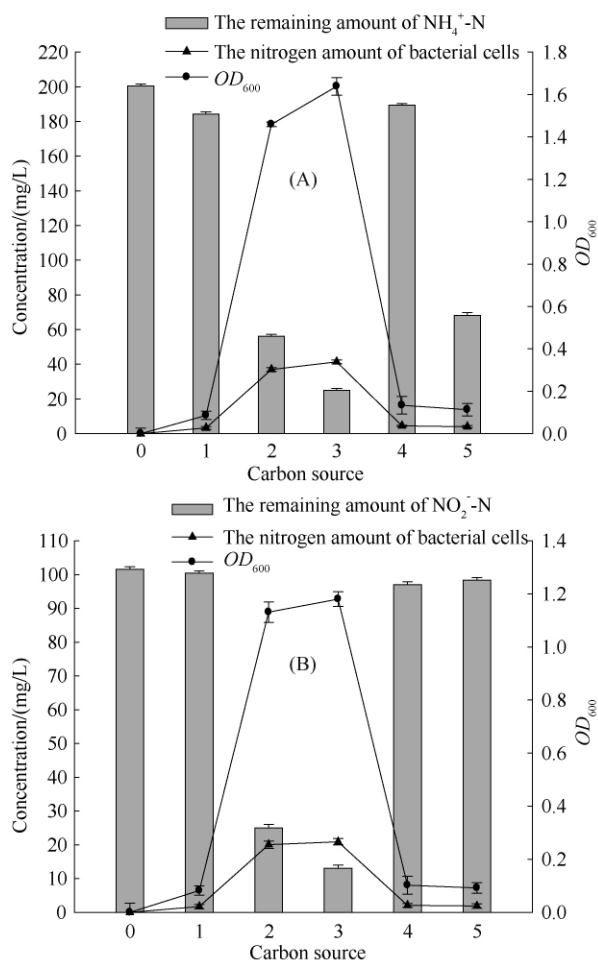


图5 碳源对菌株 C-4 去除 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (A) 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (B) 能力的影响

Fig.5 Influence of carbon source on the growth and ammonium (A) and nitrite (B) nitrogen reduction of strain C-4. 0: Control; 1: Seignette salt; 2: Sodium succinate dibasic hexahydrate; 3: Trisodium citrate dehydrate; 4: Glucose; 5: Sucrose.

2.4.4 不同的摇床转速对菌株 C-4 去除铵氮和亚硝酸盐氮的影响: 菌株 C-4 在两种测定液中培养时, 厌氧和静置条件下几乎不生长, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的减少量较低, 对铵氮和亚硝酸盐氮的去除作用较小; 对铵氮测定液, 菌株在 120 r/min 的溶氧水平下培养时, 培养液中铵氮的减少量为 82.43 mg/L, 净除氮率达 65.8%; 对亚硝酸盐氮测定液, 随着摇床转速的增大, 培养液中亚硝化氮的减少量也增大, 120 r/min 时净除氮率达 47.8%, 但当 120 r/min 后培养液中亚硝化氮的减少量基本保持不变 (图 6)。

因此,说明菌株 C-4 在好氧条件下对铵氮和亚硝酸盐氮具有较好的去除能力, 且对好养条件不太苛刻。

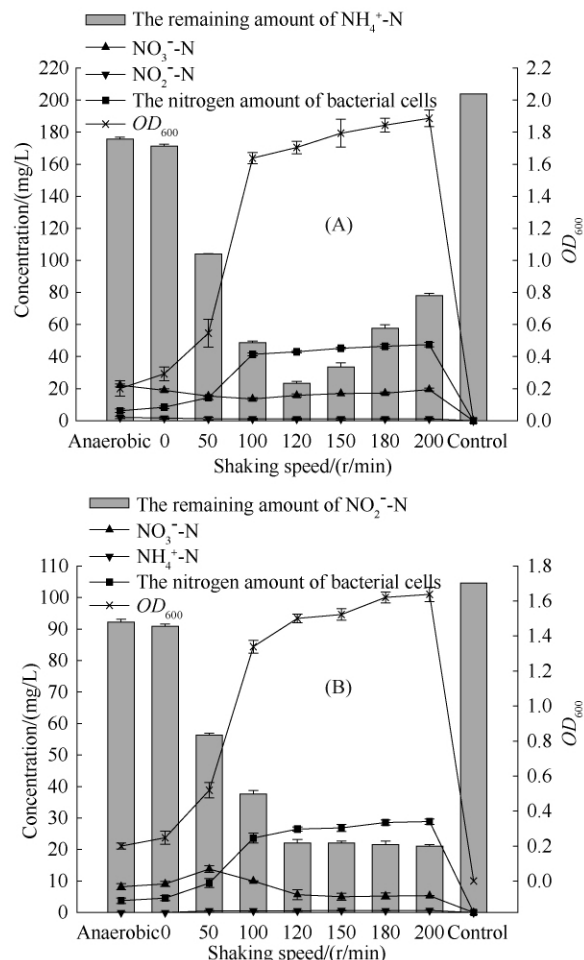


图6 摇床转速对菌株 C-4 去除 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (A) 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (B) 能力的影响

Fig.6 Influence of shaking speed on the growth and ammonium (A) and nitrite (B) nitrogen reduction of strain C-4.

2.5 菌株 C-4 对池塘污水的净化效果

由表 2 可以看到, 菌株 C-4 对采集的高浓度氮池塘污水处理 2 d 后, 发现 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度由初始的 57.78、5.34 mg/L 分别降至 5.62、1.38、1.16 mg/L, 同时出现了少量 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的积累, 其净除氮率达 73.04%; 同时, 菌株还对污水的 COD 具有一定的去除效果, 处理 2 d 后的去除达 31.8%, 处理 5 d 后, 其净除氮率和 COD 去除率基本保持不变。因此, 菌株 C-4 在处理实际污水中具有较好的效果, 在工业化应用中具有广阔的前景。

2.6 菌株 C-4 的鉴定

菌株 C-4 在反硝化培养基上, 菌落呈白色, 湿

表 2 菌株 C-4 对池塘污水的净化效果

Table 2 The purification ability of strain C-4 on eutrophicated pond water

t/d	Concentration/(mg/L)					pH	OD ₆₀₀
	COD	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	NH ₄ ⁺ -N	Cell-N		
0	137.45	57.78	5.34	33.63	3.02	7.95	0.073
1	104.3	19.1	1.15	6.9	13.31	8.01	0.493
2	93.7	5.62	1.38	1.16	18.74	7.8	0.755
3	94.07	7.07	0.95	1.49	18.29	7.96	0.696
4	94.8	6.24	0.73	1.31	17.68	7.87	0.671
5	93.92	6.02	0.75	1.5	16.01	7.81	0.603

润,菌落表面光滑,边缘形状规则。革兰氏染色为阴性,短杆状,直径为 0.5 – 0.67 μm,长度为 1.2 – 1.4 μm,无鞭毛,无芽孢(见图 7),不产 H₂S,硝酸盐还原阳性,不抗酸,不分解纤维素,不耐高温,在 5% 的脱脂牛奶中 65℃ 加热 30 min 即可死亡,最适生长温度为 30℃。

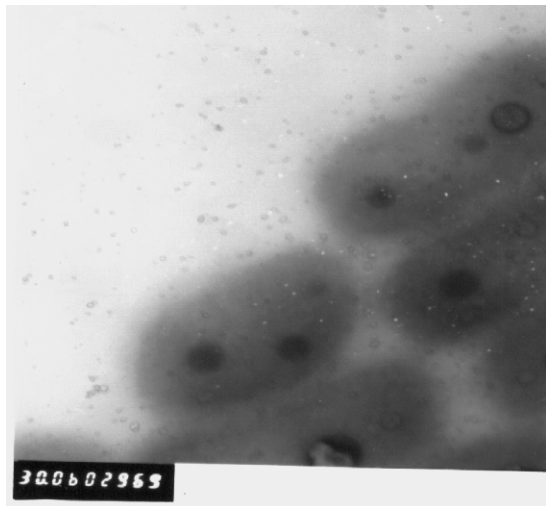


图 7 菌株 C-4 的负染透射电镜图片(×30000 ,75 kV)

Fig.7 Micrograph of TEM of strain C-4 (×30000 ,75 kV) .

对提取的细菌 DNA 采用 16S rRNA 引物进行扩增,得到 1500 bp 大小的扩增片段。对扩增片段采用 TaKaRa TA 克隆试剂盒进行克隆,提取质粒 DNA 运用 M13 通用引物进行扩增,扩增产物进行测序,并将序列与 GenBank 中相关序列比对,构建系统发育树发现菌株 C-4 的序列与 *Acinetobacter* sp. 的同源性达到 99.9%。结合生理生化特征,初步确定其为 *Acinetobacter* sp.,在国际基因库 GenBank 中的 Accession No. 为 HQ896038。属中有高效去除铵氮,并有除亚硝酸盐氮能力的好氧反硝化菌尚未见到报道。

3 讨论

近年来,随着研究者对好氧反硝化菌研究的不

断深入,许多具有较强除氮能力的好氧反硝化菌纷纷从环境中筛选出来。如张培玉等从 MBR 和 A/O 反应器污泥中筛选到 1 株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 qy37(假单胞菌属),以 NH₄Cl 为氮源的异养硝化系统内,该菌 32 h 内使 NH₄⁺-N 由 138.52 mg/L 降至 7.88 mg/L,在以 NaNO₂ 为氮源的好氧反硝化系统内,该菌 24 h 内使 NO₂⁻-N 由 109.25 mg/L 降至 2.59 mg/L^[23];陈咄圳等从畜禽养殖废水中筛选分离到 1 株异养硝化-好氧反硝化菌(嗜吡啶红球菌),在好氧反硝化中该菌株对初始浓度为 50 mg/L 的总氮和硝酸盐氮去除率分别达 66.74% 和 64.27%,具有较强的除氮能力^[24];高喜燕等从处理海洋养殖循环水的生物滤器生物膜中分离出 1 株好氧反硝化菌(假单胞菌属),该菌株对初始浓度为 140 mg/L 的硝酸盐氮 48 h 内去除率达 92%^[25]。但由于环境中具有高活性多效除氮能力的好氧反硝化菌存在相对较少,采用一般方法筛选高活性多效除氮能力的好氧反硝化菌存在一定的困难。本研究采用在高浓度的铵氮和亚硝酸盐氮溶液中进行驯化,结合 Takaya 等人建立的有氧反硝化菌平板分离的方法对其进行初筛,再以对铵氮和亚硝酸盐氮的去除能力为指标进行复筛,取得了较理想的效果。在分离到的 5 株菌中,菌株 C-4 的去氮活性达到了较高的水平。这说明所采用的多种因子(好氧反硝化、去除铵、去除亚硝酸盐)结合筛选的方法,具有很好的实践意义,避免了单一因素筛选的局限性,可以得到较理想的目的菌株。

通过生理生化鉴定,16S rRNA 序列分析,初步鉴定菌株 C-4 为不动杆菌属的一个种(*Acinetobacter* sp.)。菌株 C-4 在分别以 KNO₃、(NH₄)₂SO₄、NaNO₂ 为唯一氮源的培养液中,可在 24 h 内将培养液中 NO₃⁻-N 从 161.61 mg/L 降至 55.69 mg/L,15 h 内将 NH₄⁺-N 由 220.24 mg/L 降至 14.78 mg/L,12 h 内 NO₂⁻-N 浓度由 101.27 mg/L 降至 21.85 mg/L,且对总氮浓度为 96.75 mg/L 池塘污水 48 h 净除氮率达 73.04%。该菌株具有适应性强、生长速度快、

生长条件温和,铵氮和亚硝酸盐氮去除速度快,净除氮率较高等特点,可结合其他微生物以及固定化技术,用于氮污染水域治理。这为生物去除铵氮和亚硝酸盐氮提供了一个很好的思路。在不动杆菌属中,同时具有高效去除铵氮、高效去除亚硝酸盐和好氧反硝化能力的菌株发现的甚少,本研究中分离到的菌株 C-4 同时具备此三种能力,且具有较高的去除活性,因此可以在高效去除铵氮和亚硝酸盐的同时,还可通过反硝化作用还原水体中的硝酸盐,减少硝酸盐的积累。对温度、初始 pH、摇床转速等条件对菌株去除铵氮和亚硝酸盐氮能力的影响进行了考察。发现在以柠檬酸钠为 C 源、30℃、120 r/min 振荡培养条件下,pH 值分别为 8.5 和 7.5,菌株 C-4 对 200 mg/L $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 100 mg/L $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 的净除氮率分别达 65.8% 和 47.8%。

目前,对于好氧反硝化菌的除氮机理尚意见不一,其对它的生物学理论,谈论较多的是由 Robertson 等人根据实验现象,提出的“协同呼吸”理论和“反硝化酶系”理论^[26-28]。在本文通过对菌株去除铵氮和亚硝酸盐氮能力的考察中,发现在整个过程中有一定量的硝酸盐的积累,因此推测菌株可能具有一定的异养硝化作用;在对菌株的好氧反硝化特性的考察中,发现在整个反硝化的过程中并未发现有大量的亚硝酸盐氮的积累,因此推测菌株 C-4 在将部分氮用来构建细胞自身的同时将大部分的氮直接转化为 N_2 、 NO 等气态形式的氮除去,其除氮机理,可能和菌株的反硝化酶系相关,但要了解其真正的除氮机制,仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] 许尚营,张华,李娜,李风,杨俊忠,郑永良,刘德立. 一株好氧反硝化菌的鉴定及反硝化特性研究. 环境科学与技术(*Environmental Science & Technology*), 2010, 33(2): 10-13.
- [2] Kim JK, Park KJ, Cho KS, Nam SW, Park TJ, Bajpai R. Aerobic nitrification denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 2005, 96(17): 1897-1906.
- [3] Knowles R. Denitrification. *Microbiology Reviews*, 1982, (46) 1: 43-70.
- [4] Patumau D, Zumstein E, Delgenes J P. Aerobic denitrification isolation from diverse natural and managed ecosystems. *Microbiology Ecology*, 2000, 39: 145-152.
- [5] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Water Research*, 2006, 40(16): 3029-3036.
- [6] 杨希,刘德立,邓灵福,朱德锐,高强,魏艳红,刘松,邹煜平,熊丽. 蜡状芽胞杆菌好氧反硝化特性研究. 环境科学研究(*Research of Environmental Sciences*), 2008, 21(3): 155-159.
- [7] Lin Y, Kong HN, He YL, Inamori Y. Simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor and isolation of heterotrophic nitrifying bacteria. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 2004, 40(3): 105-114.
- [8] Robertson LA, VAN Niel EWJ, Torremans RAM, Kuenen JG. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 54(11): 2812-2818.
- [9] Patureau D, Bernet N, Moletta R. Effect of oxygen on denitrification in continuous chemostat culture with *Comamonas* sp. strain SGL Y2. *Journal of Industrial Microbiology*, 1995, 16(6): 124-128.
- [10] 杨基先,高珊珊,马放,苏俊峰,王强. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化能力. 环境科学学报(*Acta Scientiae Circumstantiae*), 2008, 28(7): 1302-1307.
- [11] 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.
- [12] 汪苹,项慕飞,翟茜. 从不同反应器筛选、鉴别好氧反硝化菌. 环境科学研究(*Research of Environmental Sciences*), 2007, 20(4): 120-124.
- [13] Moir JWB, Crossman LC, Spiro S, Richardson DJ. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS letters*, 1996, 387(1): 71-74.
- [14] 翟茜,汪苹,李秀婷,项慕飞. 活性污泥中好氧反硝化菌的富集筛选及鉴别. 环境科学与技术(*Environmental Science & Technology*), 2007, 30(1): 11-13.
- [15] 郑巧东,钟丽娜,姚善泾. 硝化菌和反硝化菌混合培养生物脱氮的研究. 化学工程(*Chemical Engineering*), 2010, 38(3): 64-67.
- [16] 林娜,郭楚玲,柯林,党志. 富营养化池塘中好氧反硝化菌的分布及脱氮研究. 中国科技论文在线(*Sciencepaper Online*), 2010, 5(5): 369-373.
- [17] 邱文芳. 环境微生物学技术手册. 北京: 学苑出版社, 1990, 177-179.
- [18] Takaya N, Catalan-Sakairi MAB, Sakaguchi Y, Kato I,

- Zhou ZM, Shoun H. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3152-3157.
- [19] 国家环保总局. 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.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [21] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [22] 江晓, 贾力敏, 张磊, 江汉湖, 董明盛. 双歧杆菌基因组 DNA 提取几种方法的比较. *中国卫生检验杂志 (Chinese Journal of Health Laboratory Technology)*, 2004, 14(5): 641-642.
- [23] 张培玉, 曲洋, 于德爽, 郭莎莎, 杨瑞霞. 菌株 qy37 的异养硝化/好氧反硝化机制比较及氨氮加速降解特性研究. *环境科学 (Environmental Science)*, 2010, 31(8): 1819-1826.
- [24] 陈咄圳, 王立刚, 王迎春. 异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及脱氮性能的实验研究. *环境科学 (Environmental Science)*, 2009, 30(12): 3614-3618.
- [25] 高喜燕, 刘鹰, 郑海燕, 刘纓, 刘志培. 一株海洋好氧反硝化细菌的鉴定及其好氧反硝化特性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2010, 50(9): 1164-1171.
- [26] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*, 1984, 1(39): 351-354.
- [27] Patureau D, Bernet N, Delgenes J P. Effect of dissolved oxygen and carbon-nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium. *Applied of Microbiology Biotechnology*, 2000, 54: 535-542.
- [28] Wilson LP, Bouwer EJ. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, 18: 116-130.

Identification and denitrification of an aerobic bacterium

Xiaolong Yang, Wenming Li, Yan Chen, Yusheng Cao*

State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China

Abstract [Objective] Denitrifying bacteria play an important role in the biological nitrogen removal process, especially the aerobic denitrifying bacteria. However, there are few studies on aerobic denitrifying bacteria. The present study aimed at the isolation of aerobic denitrifying bacteria with high ammonium and nitrite nitrogen removing ability from environmental samples, and its phylogeny and denitrifying characteristics. **[Methods]** Based on the aerobic denitrifying activity, ammonium and nitrite nitrogen removing ability, the strains were isolated from sludge, water and sediment in a eutrophicated pond. A strain with the highest activities was identified according to its morphological, physiological and biochemical properties and phylogenetic analysis of its 16S rRNA sequence. By using NO_3^- -N, NH_4^+ -N and NO_2^- -N as the sole nitrogen source respectively, its denitrifying characteristics, and the effects of culture conditions such as initial pH of medium, temperature, carbon source, shaking speed on the ability of removing ammonium and nitrite nitrogen, were investigated under aerobic condition. **[Results]** Among the isolated strains, strain C-4 showed the highest ability of removing ammonium and nitrite nitrogen. Strain C-4 was identified as *Acinetobacter* sp.. Under the conditions of sodium citrate as carbon source, temperature 30°C, shaking speed 120 r/min, cell age of 18 h, pH 8.5 for 200 mg/L NH_4^+ -N medium and pH 7.5 for 100 mg/L NO_2^- -N medium, the net removal efficiency of nitrogen were 65.8% and 47.8% after 15 h and 12 h, respectively. **[Conclusion]** An aerobic denitrifying strain *Acinetobacter* sp. C-4 (HQ896038) was isolated from water pond, and it exhibited high net removal efficiency of nitrogen in relative media. The net removal efficiency of nitrogen of strain C-4 was 73.04% in dealing with a eutrophicated pond water.

Keywords: Aerobic denitrifying bacteria, Ammonium and nitrite nitrogen, Isolation and identification, Homology analysis

(本文责编: 张晓丽)

* Corresponding author. Tel: +86-791-8327754; Fax: +86-791-82333708; E-mail: yysccc@ hotmail. com

Received: 19 January 2011/Revised: 1 April 2011