

生物滤塔体系好氧反硝化菌的分离鉴定 与特性研究

范利荣 黄少斌* 杨 军 张永清

(华南理工大学环境科学与工程学院 广州 510006)

摘要: 从实验室生物滤塔填料的生物膜上, 经选择性培养基筛选, 分离出 4 株好氧反硝化菌。好氧状态下 4 种菌的 40 h 反硝化率均大于 80%, 其中菌种 A1 反硝化率可达到 99.05%。跟踪菌种反硝化过程中氮元素 24 h 变化过程, 发现 4 株菌除 A1 外都有亚硝酸根积累。菌种 A1 为短杆菌, 革兰氏阴性。生理生化特性研究与 16S rDNA 序列测定(GenBank 接受号 DQ836052.1)初步判定菌种 A1 为假单胞菌 *Pseudomonas putida*。适于菌 A1 生长的初始 pH 值是 7.0 左右, 温度 30℃ 左右, 当 DO 大于 2.0 mg/L 时, DO 的变化对菌种 A1 的反硝化效果影响很小。

关键词: 生物滤塔, 好氧反硝化菌, 菌种筛选, 菌种鉴定

Separating and Studying of the Aerobic Denitrifying Bacteria from Biofilter

FAN Li-Rong HUANG Shao-Bin* YANG Jun ZHANG Yong-Qing

(College of Environmental Science & Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006)

Abstract: Four strains of aerobic denitrifying bacteria were isolated from biomembrane of the laboratory biofilter by selective medium. The denitrifying rates of these four strains were found more than 80% under aerobic condition for 40 hours. The denitrifying rate of A1 was highest, which was 99.05%. When measuring the course of nitrogen element changing, it is found that they accumulated nitrite expect the strain A1. The strain A1 was gram positive and spherical. It is identified as *Pseudomonas putida* based on its biochemical and morphological characters and phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences(genbank accession NO.DQ836052.1). For the strain A1, the optimum beginning pH was 7.0 around, and the optimum temperature was 30℃ around, The change of DO did not influence the effect of denitrification when it was more than 2.0 mg/L.

Keywords: Biofilter, Aerobic denitrifying bacteria, Bacteria screening, Bacteria identification

脱氮是近年来废水处理研究的重要课题, 生物脱氮被认为是目前废水脱氮中最经济有效的方法之一。传统生物脱氮工艺将硝化和反硝化作为两个相互独立的阶段, 使二者在时间和空间上分开, 即硝

化反应发生在好氧条件下,反硝化反应则发生在严格缺氧或厌氧条件下。近年来,国内外的不少研究和报道已能充分证明^[1-4],反硝化可发生在有氧条件下,存在好氧反硝化。研究好氧反硝化可以实现同步硝化反硝化,即好氧反硝化可以和硝化反应在同一个反应器中发生,大大减少了系统空间和工程造价,也降低了操作难度和运行成本。目前已被发现具有好氧反硝化作用的菌种包括*Paracoccus*脱氮副球菌属、*Pseudomonas*假单胞菌属^[2,3]、*Bacillus*芽孢杆菌属^[5]、*Rhodococcus*红球菌属^[5]等。好氧反硝化菌在环境中不是优势菌种,自然界存在较少,因此筛选分离具有一定困难^[6]。

实验室在研究生物滤塔的脱氮性能时发现,该系统在一定溶解氧的状态下仍然具有很好的反硝化效果,即实现了好氧反硝化^[7],推断该系统内有好氧反硝化菌的存在。本研究从生物滤塔反应器的填料生物膜中利用选择性培养基方法分离出4种反硝化菌,测其40 h好氧反硝化率确定其为好氧反硝化菌,其中A1脱氮效果最高,可达到99.05%。通过形态观察、生理生化反应及部分长度16S rDNA序列分析对菌种A1进行了鉴定。还研究了温度、初始pH值、溶解氧等环境因素对菌种A1脱氮效果的影响,为该类菌种实际工程应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 培养基

反硝化菌培养基DM(g/L): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.9; KH_2PO_4 1.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; 琥珀酸钠 9.4; 微量元素溶液 2 mL; pH 7~7.5; KNO_3 1.0。

微量元素溶液(g/L): EDTA 50.0; ZnSO_4 2.2; CaCl_2 5.5; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.06; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{21} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61; pH 7.0。

1.2 菌种来源

实验室生物滤塔,塔内填料为多孔蜂窝陶瓷,比表面积大,具有多孔结构,使系统内微生物生长丰富。系统采用某污水处理厂的污泥接种挂膜,15 d后运行正常,COD去除率大于50%。该生物滤塔系统具有很好的耐氧反硝化性能,循环液DO为2.0 mg/L时,对硝态氮的脱除率可达到90%以上^[9]。因此推论该系统生物膜上有好氧反硝化菌的富集。

1.3 菌种分离

从反应器内取出一块长有生物膜的填料至装有90 mL 无菌水并装有玻璃珠的三角瓶中,振荡至生物膜脱落,取出填料。然后将三角瓶放入空气振荡器中,把生物膜充分摇匀打碎。打碎后的生物膜经倍比稀释,采用涂布平板法分离。平板培养基中加入溴百里酚蓝,菌落周围产生蓝色晕圈说明培养基pH值升高,发生了反硝化作用。24 h后挑选有蓝色晕圈的单菌落,在DM培养基经3次划线分离。

将上述分离纯化后得到的纯菌种菌落,接种于装有100 mL DM培养液的三角瓶中,并在每个三角瓶内加入几粒灭过菌的玻璃珠(尽量减小厌氧微环境对实验结果的影响),用9层纱布包好瓶口,放入振荡培养器,具体参数如下:培养时间40 h,温度30℃,转速160 r/min,此时三角瓶内溶解氧为5.0 mg/L左右。速取培养后的菌液检测硝态氮浓度,考察其对硝态氮的去除率。

将纯菌悬液以1:10的比例接种于装有高温灭菌过的DM液体培养基的锥形瓶中,用9层纱布包好瓶口,放入振荡培养器,具体参数如下:温度室温,转速160 r/min。每隔3 h测定培养液中的硝基氮和亚硝基氮浓度。同样条件下,空白培养基(未接种的-反硝化培养基)作为基准,用硝态氮去除率来评价菌株的反硝化作用。

1.4 A1 菌种鉴定

1.4.1 菌形态观察:纯菌扫描电镜观察。

1.4.2 生理生化反应:参照伯杰氏手册对筛选菌株做进一步鉴定。

1.4.3 16S rDNA的序列同源性分析:用于16S rDNA PCR反应的引物为一对通用引物,即正向引物为f27(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'),反向引物为R1522(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR反应体系(50 μL)为10 \times 5 μL PCR缓冲液,5 μL MgCl_2 (25 mmol/L),1 μL dNTPs,1 μL 引物f27和1 μL R1522,1 μL 模板DNA,0.5 μL Taq酶(5 U/ μL),35.5 μL 重蒸水。PCR条件:94℃,5 min;94℃,1 min;56℃,1 min;72℃,2 min;72℃,7 min。将得到的碱基序列在GenBank等国际核酸序列数据库内进行同源性序列搜索(接受号DQ836052.1),找出与该菌株同源性最高的模式菌株,由上海英骏生物技术有限公司

司完成。

1.5 环境条件对 A1 菌好氧反硝化效果的影响研究

将纯菌悬液以 1:10 的比例接种于装有高温灭菌过的 DM 液体培养基的锥形瓶中, 用 9 层纱布包好瓶口, 振荡培养, 24 h 后测定培养液中的硝基氮和亚硝基氮浓度。通过调节瓶内培养基的 pH 值, 培养箱温度, 控制振荡器转速及向锥形瓶内通入氧气的方式调节培养液 DO, 考察条件变化对反硝化效果的影响。

1.6 分析项目与检测方法

$\text{NO}_3\text{-N}$ 浓度测定采用酚二磺酸光度法; $\text{NO}_2\text{-N}$ 浓度测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法; 溶解氧 (DO) 测定使用 YSI5000 型 DO 测定仪; 菌体生长曲线(A)采用吸光度法, 用 721 分光光度计在 OD_{480} 处测吸光度值; 扫描电镜型号 Philips XL30 ESEM。

2 结果与分析

2.1 分离菌种及其反硝化率

稀释平板培养基筛选出有蓝色晕圈的 8 种菌落, 这 8 种菌在硝酸盐氮初始浓度为 125 mg/L 时, 好氧状态下的 40 h 反硝化效果如表 1 所示。可以看出, 其中 4 株菌好氧反硝化能力较强, 反硝化率均大于 80%, 说明这 4 种菌 A1、A2、A4 和 A5 都为好氧反硝化菌。其中 A1 菌的脱氮率达到 99.05%。保存各菌备后续试验用。

表 1 8 株反硝化菌的脱氮率
Table 1 Denitrifying rates of 8 strains of denitrifying bacteria

| 菌种(Strain) | 反硝化率(Denitrifying rates, %) |
|------------|-----------------------------|
| A1 | 99.05 |
| A2 | 82.33 |
| A3 | 33.21 |
| A4 | 80.54 |
| A5 | 88.62 |
| A6 | 41.42 |
| A7 | 44.83 |
| A8 | 48.19 |

2.2 菌种的好氧反硝化过程研究

图 1~图 4 为分离出的 4 种好氧反硝化菌在好氧状态下 24 h 内硝酸盐氮和亚硝酸盐氮及菌体的生长曲线随时间变化的过程。4 种菌反硝化过程的硝酸

盐氮初始浓度均为 125 mg/L。可以看出: 4 种好氧反硝化菌反硝化过程发生在菌种培养的延缓期和对数生长期, 对数反应生长期最快, 在稳定期和衰亡期则反硝化过程趋于平缓; A2、A4 和 A5 菌株的反硝化过程存在明显的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 累积的现象, 且反应末期亚硝酸盐仍有残余, 说明 $\text{NO}_3\text{-N}$ 先被这两种菌还原为 $\text{NO}_2\text{-N}$, 部分 $\text{NO}_2\text{-N}$ 被还原为气态产物放出。微生物的好氧反硝化由菌种的反硝化酶系实现^[10], 即好氧反硝化菌的硝酸盐还原酶将硝酸盐还原为亚硝酸盐或者直接还原为氮氧化物甚至氮气, 而后亚硝酸盐还原酶和氮氧化物还原酶发挥作用将亚硝酸盐和氮氧化物还原为氮气。A2、A4 和 A5 菌株的亚硝酸根积累现象说明这 3 种菌的亚硝酸还原酶活性不强; A1 菌株反硝化过程中 $\text{NO}_2\text{-N}$ 只有少量生成, 且很快消失, 说明该菌的各种还原酶都发生作用, 可以直接将 $\text{NO}_3\text{-N}$ 反硝化为气态产物放出。菌种 A1

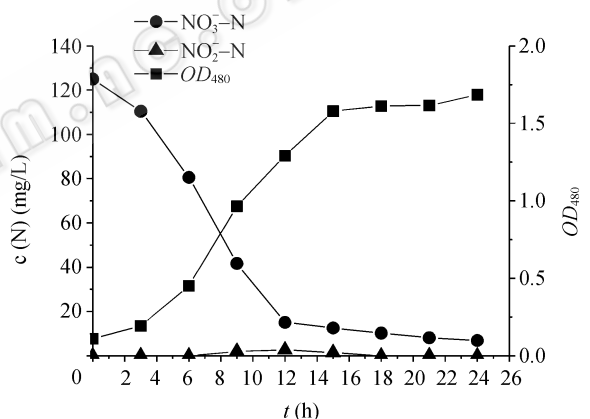


图 1 菌种 A1 反硝化过程

Fig.1 The denitrification process of strain A1

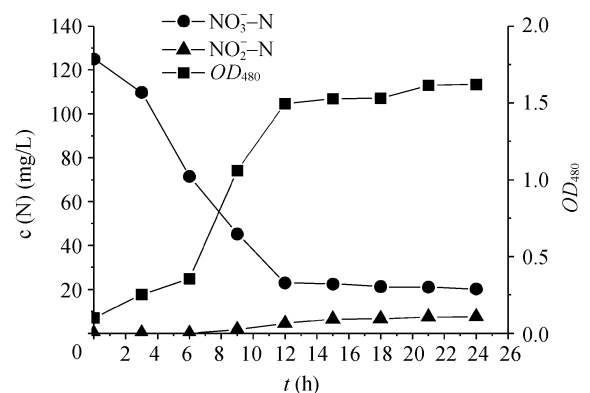


图 2 菌种 A2 反硝化过程

Fig.2 The denitrification process of strain A2

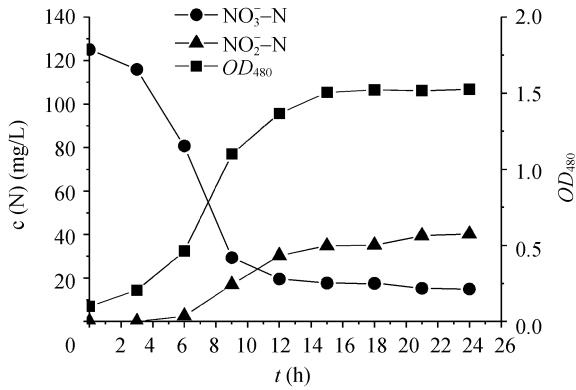


图3 菌种 A4 反硝化过程
Fig.3 The denitrification process of strain A4

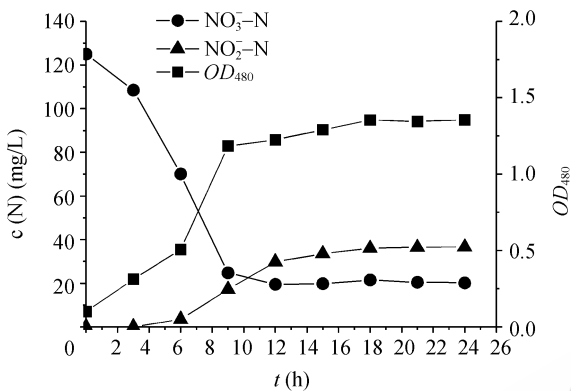


图4 菌种 A5 反硝化过程
Fig.4 The denitrification process of strain A5

具有最好的反硝化效果, 脱氮率达到 94.5%, 且该菌种没有明显的亚硝酸根积累。

2.3 菌种 A1 鉴定

2.3.1 形态观察: A1 的电镜照片如图 5 所示。

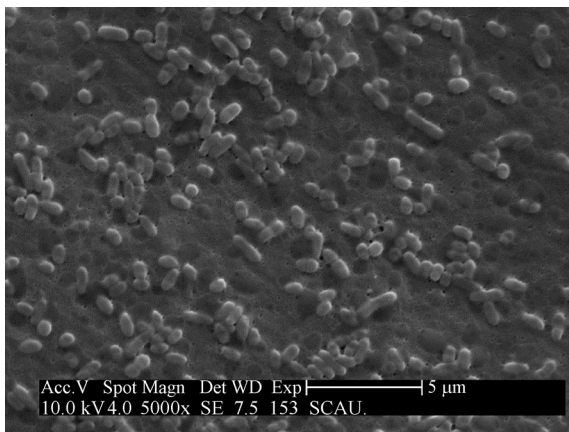


图5 菌种 A1 的电镜照片
Fig.5 The microscopy photograph of strain A1

2.3.2 生理生化鉴定: 菌株 A1 的菌落为圆形, 边缘整齐, 灰褐色胶状, 不透明。染色观察显示该菌为革兰氏阴性, 短杆菌。厌氧条件下可以生长, 为兼性厌氧菌; 葡萄糖发酵开管产酸, 属于非发酵型菌。接触酶阳性, 氧化酶阳性, 可进行反硝化反应, D-葡萄糖和果糖实验阳性, V-P 测定阴性, 糖醇类发酵实验阳性, 淀粉水解实验、甲基红(MR)实验阴性。据以上生理生化实验结果查《伯杰细菌鉴定手册》可知, 细菌 A1 与 *Pseudomonas putida* 最相似。

2.3.3 A1 菌株 16S rDNA 序列同源性分析: 将得到的碱基序列在 GenBank 等国际核酸序列数据库内进行同源序列搜索, 该菌株与数据库的模式菌株或保藏于 ATCC 或 DSM 等国际菌种保藏中心的菌株相比较, 结论细菌 A1 为 *Pseudomonas*(假单胞菌属), 其与 *Pseudomonas putida* 和 *Pseudomonas plecoglossicida* 具最高同源性均达 99.8%。结合生理生化分析, 菌种 A1 与 *Pseudomonas putida* 最相似。

2.4 初始 pH 值对反硝化效果的影响

pH 值影响多数微生物的生长, 好氧反硝化菌的反硝化过程本身会使体系的 pH 值不断升高, 培养基的缓冲体系可以减慢这种变化的速度。实验发现, 菌种反应有一个最佳的初始 pH 值, 低于或高于这个初始值, 反硝化效果都会受到影响。如图 6 所示, 不同初始 pH 值的培养液均有不同程度的好氧反硝化发生。在较低初始 pH 值下, A1 菌的反硝化效果比较低, 初始 pH 值为 4 时只有 5% 被脱除。随着初始 pH 值得升高, 脱氮率也逐渐升高, 当初始 pH 值为 7 时达到最好的脱氮效果 94.1%。初始 pH 值继续升高,

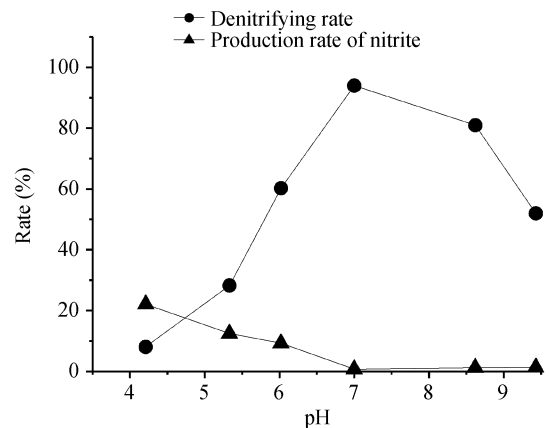


图6 不同初始 pH 值对脱氮率和亚硝酸根生成率的影响
Fig.6 The effect of beginning pH on denitrifying rate and the production rate of nitrite

脱氮率开始下降, 当初始 pH 值为 9.0 时, 还有 50.20% 的硝态氮被脱除。相对于碱性状态, 酸性状态下更难进行好氧反硝化。另外可以发现, 在酸性状态下 A1 菌好氧反硝化会产生亚硝酸盐的积累, 即一部分硝酸盐根被反硝化为亚硝酸根, 而亚硝酸根没有及时被反硝化为 N_2 从而产生积累。培养液为中性和碱性时没有亚硝酸盐的积累。由图 6 可以看出 pH 值会影响菌种 A1 反硝化酶的活性, pH 值较低或较高时, 硝酸根还原酶的活性都被抑制。而亚硝酸盐还原酶的活性在 pH 值较低时会得到抑制。由上可知, 菌种 A1 反硝化最适宜的 pH 值范围是 7.0 左右。

2.5 温度对反硝化效果的影响

如图 7 所示, 温度也是影响菌种反硝化效率的重要因素。温度较低和较高都不利于反硝化, 20℃ 时脱氮率只有 8.10%, 且有 18.3% 的亚硝酸盐积累; 温度大于 40℃ 后脱氮率将低于 20.0%。菌种适合生长的温度为 25℃~35℃, 30℃ 时脱氮率最高。另外可以发现, 在低温下 A1 菌好氧反硝化会产生少量亚硝酸盐的积累。反应温度大于 30℃ 时, 没有亚硝酸盐的积累。可知温度也会影响菌种 A1 反硝化酶的活性, 温度低于 25℃ 和高于 35℃ 时, 硝酸根还原酶的活性被抑制, 亚硝酸盐还原酶的活性会在温度低于 25℃ 时受到抑制。由上可知, 菌种 A1 最适宜的生长温度是 30℃ 左右。

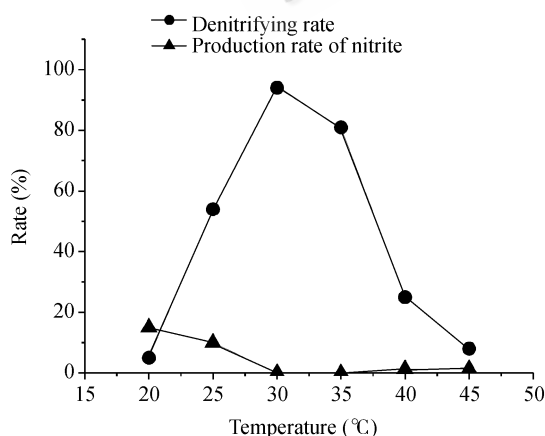


图 7 温度对脱氮率和亚硝酸根生成率的影响
Fig.7 The effect of temperature on denitrifying rate and the production rate of nitrite

2.6 溶解氧对反硝化效果的影响

如图 8 所示, DO 值由 2.0 mg/L 升至 11.2 mg/L

对菌种的反硝化效果没有太大的影响, 24 h 后脱氮率均可达到 90% 以上。且 DO 由 2.0 mg/L 升至 11.2 mg/L 没有发生显著的亚硝酸盐积累。说明溶解氧的浓度不会影响菌种 A1 硝酸根还原酶的及亚硝酸盐还原酶的活性。与目前报道的几种好氧反硝化菌相比^[4-7], 菌种 A1 具有更好的耐氧性能, 决定了该菌种应用于实际工程时具有更好的适应性。

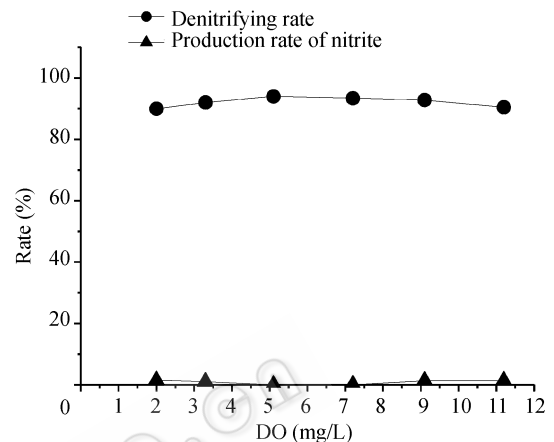


图 8 不同 DO 下的脱氮率和亚硝酸根生成率
Fig.8 The effect of DO on denitrifying rate and the production rate of nitrite

3 结论

1) 由实验室生物滤塔内的生物膜筛选反硝化菌, 经选择性培养基初筛, 好氧反硝化率测定复筛, 得到 8 种反硝化菌, 其中 4 种菌的 40 h 好氧脱氮率均达到 80% 以上, 确定为好氧反硝化菌。菌种 A1 的效果最好, 脱氮率可达到 99.05%。

2) 跟踪反硝化过程中的氮元素变化, 发现反硝化过程都发生在对数生长期, 在延缓期、稳定期和衰亡期都没有明显的反硝化过程。分离出的 4 种好氧反硝化菌当中, 菌种 A1 没有亚硝酸盐的积累, 而另外 3 种则有不同程度的亚硝酸盐积累。

3) 好氧反硝化菌 A1 为短杆菌, 革兰氏阴性菌。经 16S rDNA 序列同源性分析, 菌种 A1 与 *Pseudomonas putida* 和 *Pseudomonas plecoglossicida* 具最高同源性均达 99.8%, 结合生理生化分析, 菌种 A1 与 *Pseudomonas putida* 最相似。

4) 在酸性状态下 A1 菌好氧反硝化会产生亚硝酸盐的积累, 中性和碱性时没有亚硝酸盐的积累, 菌种 A1 最适宜的 pH 值范围是 7.0 左右。在低温下

A1 菌好氧反硝化会产生少量亚硝酸盐的积累, 菌种 A1 最适宜的生长温度是 30℃ 左右。菌种 A1 具有很好的耐氧性能, DO 值由 2.0 mg/L 升至 11.2 mg/L, 菌种 A1 的 24 h 脱氮率均可达到 90% 以上, 且 DO 变化不影响亚硝酸根还原酶的活性。

参 考 文 献

- [1] Hung SJ, Mitsuyo H, Makoto S. Characteristics of Ammonium Removal by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification. *Bioscience and Bioengineering*, 2005, **100**(2): 184-191.
- [2] Chen F, Xia Q, Ju LK. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(p) H fluorescence. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, **69**(11): 6715-6722.
- [3] Kesser ũ P, Kiss I, Bihari Z, et al. Biological denitrification in a continuous flow pilot bioreactor containing immobilizes *Pseudomonas butannovora* cells. *Bioresource technology*, 2003, **87**(9): 75-80.
- [4] Joong KK, Kyoung JP, Kyoung SC. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Biore-source Technology*, 2005, **96**(17): 1897-1906.
- [5] 张亚光. 一株好氧反硝化菌的特征及系统进化分析. 华侨大学学报, 2004, **25**(1): 75-78.
- [6] 周丹丹, 马 放, 王弘宇, 等. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究. 微生物学报, 2004, **44**(6): 837-839.
- [7] 王宝沂, 黄少斌. SBR-BAF 组合工艺好氧反硝化脱氮. 环境工程, 2006, **24**(5): 10-12.
- [8] 龙 雯, 陈存社, 汪 萍, 等. 一株好氧反硝化细菌的分离与鉴定. 中国酿造, 2006, **8**(161): 28-30.
- [9] 廖绍安, 郑桂丽, 王安利, 等. 养虾池好氧反硝化细菌新菌株的分离鉴定及特征. 生态学报, 2006, **26**(11): 3718-3724.
- [10] 李 平, 张 山, 刘德立. 细菌好氧反硝化研究进展. 微生物学杂志, 2005, **25**(1): 60-64.

编辑部公告

关于《微生物学通报》2008 年度开始专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 并在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: 邮件 tongbao@im.ac.cn 或电话 010-64807511。

《微生物学通报》编辑部

2007 年 8 月 29 日