

研究报告

一株荧光假单胞杆菌的分离鉴定与反硝化特性

魏荷芬¹ 韩保安¹ 王田野¹ 汪顺利¹ 柴化建² 胡子全² 赵海泉^{1*}

(1. 安徽农业大学生命科学学院 安徽 合肥 230036)

(2. 安徽清明环保科技有限公司 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】从污水厂的活性污泥中获得一株高效反硝化细菌。【方法】采用低温驯化,进行初筛、复筛选取一株反硝化活性最高的菌株,命名为L2,通过形态学、生理生化特征及16S rRNA基因序列分析研究其分类地位,系统研究理化因素对该菌株反硝化性能的影响。【结果】菌株在低温条件下能够稳定高效地进行反硝化,鉴定该菌株为荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*),其反硝化最适接种量为10%,温度为20℃,pH为7.0,盐浓度为0.5%,碳源为葡萄糖,C/N为5.0,能够耐受较高初始硝态氮浓度。【结论】菌株L2是一株耐低温、耐高浓度初始硝态氮、耐低C/N、兼性厌氧、高效反硝化的荧光假单胞杆菌。

关键词: 分离鉴定, 低温, 反硝化, 荧光假单胞杆菌

Identification and characterization of a denitrifying bacterium *Pseudomonas fluorescens*

WEI He-Fen¹ HAN Bao-An¹ WANG Tian-Ye¹ WANG Shun-Li¹ CHAI Hua-Jian²
HU Zi-Quan² ZHAO Hai-Quan^{1*}

(1. College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

(2. Anhui Qingming Environmental Technology Co., Ltd., Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: [Objective] In order to isolate a bacterium, with high efficiency denitrifying, from activated sludge samples. [Methods] The strain, was named L2, isolated through domestication enrichment, purification, preliminary and secondary screening, which was identified based on its morphology characteristics, and 16S rRNA gene sequence analysis. We systematic studied its various denitrification characteristics as follows: inoculation volume, temperature, pH, salt concentration, carbon source, dissolved oxygen (DO), carbon nitrogen ratio (C/N) and initial nitrate concentration. [Results] The strain was identified as *Pseudomonas fluorescens*, and the results showed that the most suitable denitrification conditions of the strain are inoculation volume of 10%, temperature of 20℃, with the poor thermal stability, pH of 7.0, salt concentration of 0.5%, carbon source of glucose, C/N of 5.0, and it can tolerate high initial nitrate concentration. [Conclusion] This *Pseudomonas fluorescens*, which had good resistance to low temperature, high tolerance to initial nitrate concentration, tolerance low

Foundation item: The Environmental Protection Scientific Research Projects of Anhui Provincial (No. 11008727)

*Corresponding author: E-mail: swjs12@ahau.edu.cn

Received: September 22, 2015; Accepted: December 03, 2015

基金项目: 安徽省省级环保科研课题项目(No. 11008727)

*通讯作者: E-mail: swjs12@ahau.edu.cn

收稿日期: 2015-09-22; 接受日期: 2015-12-03

carbon nitrogen ratio, was a facultative anaerobic efficient denitrifying bacterium.

Keywords: Identification, Low-temperature, Denitrification, *Pseudomonas fluorescens*

硝酸盐(NO_3^- -N)是工农业和生活污水中普遍存在的污染物,硝酸盐及其衍生物会破坏生物圈氮素的平衡且诱发人类的高铁血红蛋白^[1-2]。反硝化脱氮是通过微生物作用将环境中的硝态氮(NO_3^- -N)转化为气体 NO 、 NO_2 、 N_2 的过程,具有高效率、低成本、无二次污染等优点,已成为污水厂处理的主要技术^[3-4]。

低温是生物污水处理效率的限值因子,针对低温条件污水处理系统中微生物数量减少、活性降低,导致冬季低温城镇污水处理厂的 TN 排放难达标、处理周期长、费用高等问题^[5-7]。辛明秀等^[8]提到在实验室条件下,5 °C 分离的具有反硝化活性的反硝化细菌未见发表;马放等^[7]筛选的耐冷假单胞菌 Den-05 在 10 °C 条件下,将初始硝态氮 120 mg/L 在 15 h 内去除到 20 mg/L;王兆阳等^[9]分离的菌株在 15 °C 时,菌体 20 h 将 NO_3^- -N 完全去除, NO_3^- -N 反应速率最高达 8.31 mg/(L·h),TN 去除率约 94.3%,最终无 NO_2^- -N 积累。

对于异养反硝化细菌,当污水中的有机碳源缺乏时,异养反硝化作用就会受到抑制或产生大量中间代谢产物^[10]。已报道的异养反硝化菌株对 C/N 的要求都比较高,王兆阳等^[9]发现的耐冷兼性嗜碱好氧反硝化菌的 C/N 不低于 15。刘天琪等^[11]发现异养硝化-好氧反硝化菌 ADN-42 在 C/N 为 12 的条件下, NH_4^+ -N 去除率为 75.4%,无硝态氮产生,亚硝态氮最大积累量为 8.3 mg/L;在低 C/N 条件下能够高效、快速脱氮的菌株报道较少。

在传统的脱氮处理工艺中,对高浓度含氮污水脱氮效果不理想,常需要对高浓度的含氮废水先进行稀释和吹脱,但该工艺处理时间长、费用高,同时反硝化作用也会因碳源不足而受到限制,很难保持处理连续高效稳定进行^[12]。因此,筛选耐受高浓度氮的高效脱氮菌已成为亟待解决的任务。

此外,好氧反硝化菌对 DO 浓度要求较低,具

有适应性强,生长速度快,产量高,反硝化速度快且彻底,在环境生物修复系统运行中更容易被调控,较好的经济性等诸多优点。据报道好氧反硝化细菌多数是兼氧细菌,目前发现的高效兼氧反硝化细菌为数不多^[13],如何芳等^[14]筛选出一株耐氧反硝化细菌,王兆阳等^[9]筛选出一株好氧反硝化细菌。因此有必要筛选高效、耐高溶氧、反硝化产物以 N_2 为主的好氧反硝化菌株。

南方冬季或者北方大多数地区的最低水温在 10 °C 左右,因此本实验以 10 °C 为研究条件。本实验筛选出一株耐低温、耐高浓度初始硝态氮、耐低 C/N、兼性厌氧、高效反硝化细菌,系统地研究了理化因素对该菌株反硝化能力的影响,该菌株具有重要的现实和经济意义。

1 材料与方法

1.1 材料来源

合肥望塘污水处理厂回流池中的活性污泥。

1.2 培养基

反硝化(DM)液体培养基(g/L):柠檬酸钠 5.0, KNO_3 2.0, K_2HPO_4 1.0, KH_2PO_4 1.0, NaCl 5.0, 微量元素 1.0 mL/L。微量元素(g/L): MnSO_4 1.0, MgSO_4 1.0, CuSO_4 1.0, FeSO_4 1.0。pH 7.0-7.2, 0.1 MPa 灭菌 20 min。

溴百里酚蓝(BTB)固体培养基:培养基配方同 DM,另加 BTB 1.0 mL/L,琼脂 20.0 g/L。BTB:先用少量 95%乙醇溶解后,加水配成 1%的水溶液。

生理生化及常规培养基:参考《微生物学实验教程》^[15]。

1.3 试剂及测定方法

硝酸盐:紫外分光光度法^[16];亚硝酸盐: N-(1-萘基)-乙二胺光度法^[16];氨氮:纳氏试剂光度法^[16];总氮:碱性过硫酸钾法^[16]; pH:玻璃电极法; OD_{600} :菌浊度法。

1.4 主要试剂和仪器

PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。细菌基因组提取试剂盒, 上海生工生物工程有限公司; 实验试剂均使用分析纯。

可见分光光度计(723 型), 上海光谱仪器有限公司; 紫外分光光度计(G-10s), 塞默飞世尔科技公司; 玻璃电极(MP523-01 型), 上海三兴仪表厂; 恒温培养箱(LRH-250), 上海恒兴科学仪器有限公司; 高速冷冻离心机(HC-2518R), 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.5 富集驯化

1.5.1 耐低温反硝化细菌的富集驯化与分离纯化: 将采集的活性污泥加玻璃珠打碎摇匀, 按照 10% (体积比) 的接种量接种于装液量含 200 mL DM 培养基的 250 mL 三角瓶液体中, 在 10 °C、静置缺氧(模拟自然状态下的缺氧条件)条件下富集驯化, 驯化培养过程的温度梯度为: 25、20、15、10 °C, 每静置 5 d 按照接种量 10% 转接, 将最后一次富集液通过梯度稀释涂布在 BTB 平板上, 由于反硝化细菌在反硝化过程中对 NO₃⁻-N 的消耗, 培养基的 pH 不断升高, 从而使溴百里酚蓝从黄绿色变为蓝色, 进而进行分离纯化^[8]。挑取菌落周围出现蓝色晕圈和形态有明显差异的菌落进行划线分离纯化。

1.5.2 耐低温高效反硝化细菌筛选: 经过 3-5 次纯化后, 分别挑取两环单菌落接种于试管液体 DM 培养基中静置培养 5 d, 观察液体浑浊度和产气现象, 筛选出反硝化能力较强的菌株, 并对反硝化能力强的优势菌株接种到斜面保藏, 以备做进一步研究。将筛选出的优势菌再次挑取单菌落接种于液体 DM 培养基培养 5 d, 测定其总氮的脱除率作为复筛指标(TN 的去除率可以很全面地反映菌株的反硝化情况)。

1.5.3 菌株的鉴定: (1) 形态学观察和鉴定。扫描电镜(SEM): 取菌株连续传代 5 次以上处于对数期的菌液, 用 5% 的戊二醛固定 12 h, 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)室温冲洗浸泡 3 次, 每次 20 min; 依次用 30%、50%、70%、80%、95%、100%乙醇

4 °C、20 min 置换脱水; 然后再置换到 100% 丙酮(或乙酸异戊酯), 4 °C、20 min, 重复前一步一次; 临界点干燥过夜放气, 第 2 天上午, 镀膜后进行扫描电镜观察。透射电镜(TEM): 取菌株连续传代 5 次以上并处于对数期的菌液, 首先用 10% 的戊二醛固定 12 h, 然后用 PBS (磷酸缓冲盐) 清洗 3 遍 15 min/次, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 钨酸铵负染色, 干燥, 透射电镜观察。(2) 生理生化鉴定: 参照《微生物学实验指导》^[17]和《伯杰细菌鉴定手册》^[18]对菌株进行生理生化试验。(3) 分子生物学鉴定: 用试剂盒提取菌株的基因组 DNA 为模板, 采用通用引物进行扩增, 正向引物 27F 为: 5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3', 反向引物 1492R 为: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 引物由上海生工生物有限公司合成。PCR 反应体系(50 μL): 引物 27F (100 μmol/L) 2 μL, 引物 1492R (100 μmol/L) 2 μL, 10×PCR buffer 5 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 3 μL, dNTPs (各 10 mol/L) 1 μL, *Taq* DNA polymerase (5 U/μL) 1 μL, 基因组 DNA 2 μL, ddH₂O 34 μL。PCR 反应体系: 95 °C 7 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物的测序委托上海生工生物有限公司完成, 并将 16S rRNA 基因所测得双向序列进行拼接, 然后上传到 GenBank 中获取登录号。

1.6 菌株的生长及反硝化性能

1.6.1 菌株悬液的制备: 挑取两环单菌落接种于液体 DM 培养基中, 在低温 10 °C、缺氧条件下静置培养 3 d, 制得菌悬液。

1.6.2 菌株生长曲线: 分别在 LB 和 DM 培养基中, 按照 10% 的接种量在 10 °C 静置培养, 每隔 2 h 测定一次 OD₆₀₀。

1.6.3 反硝化过程: 在 10 °C、静置条件下, 按照 10% 的接种量, 每隔 12 h 测定一次各项指标(TN、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N、NH₄⁺-N、pH), 连续 132 h。

1.6.4 理化因素对菌株反硝化性能的影响: 制得菌悬液同 1.6.1, 其他培养基和培养条件保持不变, 分别改变接种量为 1%、3%、5%、10%、15%、20%;

分别改变培养温度为 4、10、15、20、30、40 °C；分别调整初始 pH 为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0；盐浓度调为 0、0.5%、1%、3%、5%、7%；碳源分别为葡萄糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、羧甲基纤维素钠、甘露醇、柠檬酸钠、酒石酸钾钠、醋酸钠、碳酸钠；溶解氧实验 50 mL/250 mL、100 mL/250 mL、150 mL/250 mL 在 150 r/min 摇床，150 mL/250 mL 静置，150 mL/250 mL 厌氧；C/N (质量比，以本实验碳源为柠檬酸三钠、氮源为硝酸钾，C/N 摩尔比是质量比的二倍)分别为 0.5、1、2、3、5、10、15、20；初始氮浓度(保持 C/N 在 3) KNO_3 为 1、2、3、4、5、6 (g/L)；在第 3 天测定 TN (TN 的去除率可以很全面的反映菌株的反硝化细菌能力)。

2 结果与分析

2.1 初筛结果

初筛获得 11 株具有反硝化能力的菌株(图 1)，菌株对总氮的脱除率都能达到 50%以上，说明通过观察产气现象作为反硝化能力的定性指标是一种快速、有效的初步判断方法。其中 L2 对总氮的去除率达 88.53%，选择该菌株作为进一步研究对象。

2.2 菌株 L2 的鉴定

2.2.1 菌株 L2 的个体形态：图 2 是菌株在扫描电镜的个体形态图，图 3 是菌株在透射电镜个体形态图，可以看出该菌株呈短杆状，无鞭毛，长 1.13 μm –1.51 μm ，宽 0.32 μm –0.40 μm 。

2.2.2 菌株 L2 的菌落特征：图 4 是按照点种接种的方式将菌株 L2 接种在 BTB 培养基上，10 °C 培养 5 d 产生蓝色晕圈 40 mm–50 mm。图 5 是菌株 L2 在 BTB 平板上的菌落图，该菌落的特征为灰褐色圆点，有光泽，半透明，湿润，易挑起，微凸，菌落直径 20 mm–30 mm，边缘整齐(但长时间放置在低温 4 °C 保藏，边缘呈煎鸡蛋状的一层薄薄一圈透明边缘)。

2.2.3 菌株的生理生化特征：图 6A 是该菌株的产气图，图 6B 是该菌株荧光实验图，与已报道的荧光假单胞菌株产生的黄绿色荧光一致^[3]。图 6C 中

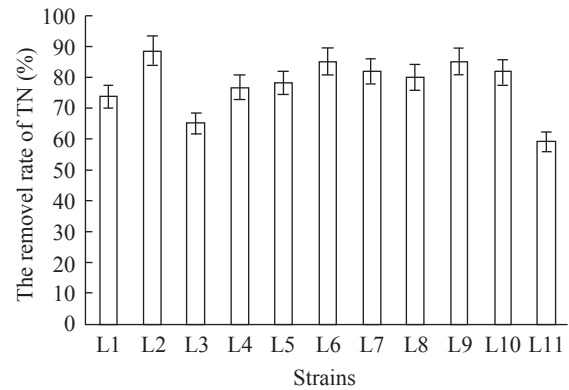


图 1 反硝化能力的初筛结果

Figure 1 The results of the preliminary screening for the denitrification

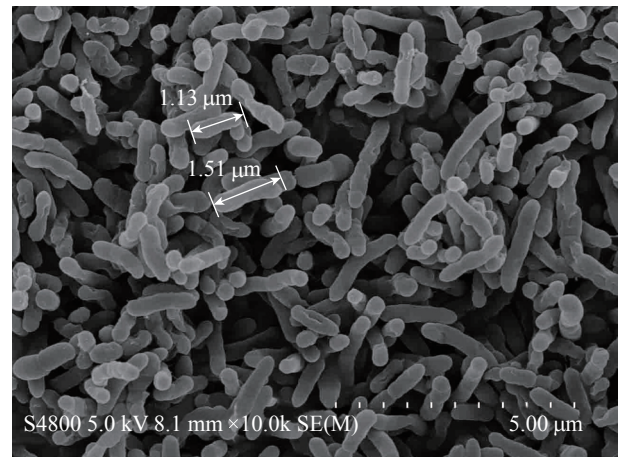


图 2 扫描电镜

Figure 2 Scanning electron microscope (SEM)

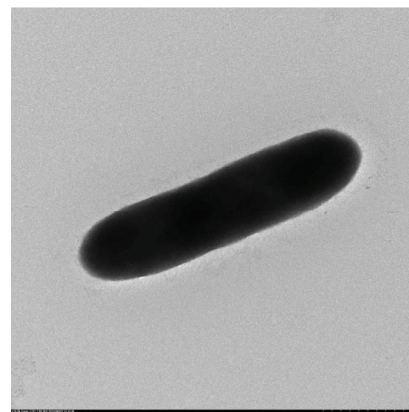


图 3 透射电镜(10 000×)

Figure 3 Electron micrograph (TEM) (10 000×)

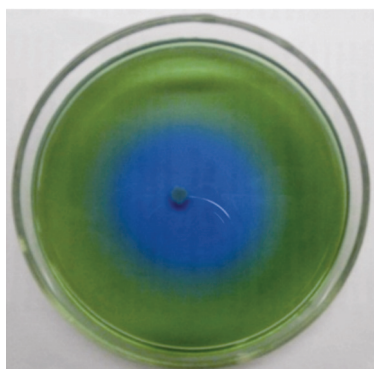


图 4 BTB 培养基
Figure 4 BTB culture medium

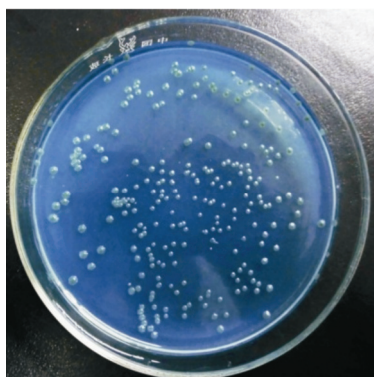


图 5 菌落形态
Figure 5 Colonies morphology

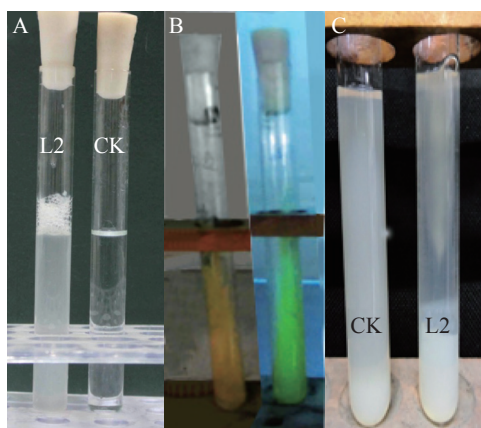


图 6 生理生化特性
Figure 6 The characteristics of physiological and biochemical

菌株在半固体琼脂培养基上能沿着穿刺线扩散生长,呈羽毛状,说明菌株是兼性厌氧菌^[13]。

菌株 L2 的生理生化实验结果如表 1 所示,由生理生化实验结果可以初步鉴定该菌株为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

2.2.4 分子生物学鉴定:通过上海生工测得菌株的 16S rRNA 基因长度为 1 230 bp,将测序结果在核酸数据库 NCBI 中进行比对,并选取相应的模式菌株进行 16S rRNA 基因序列分析,用 MEGA 5.0 中的 N-J 法构建系统发育树,如图 7 所示。发现菌株与多株 *Pseudomonas fluorescens* 一致性达 97%,如菌株 KF317887、AB680092、KP126778。结合生理生化特征,确定该菌株为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),在 GenBank 的登录号为 KR265329。

2.3 菌株的生长

2.3.1 菌株的生长曲线:图 8 是菌株 L2 分别在 LB 和 DM 培养基中的生长曲线,可以看出菌株在 LB 培养基上可以快速生长,几乎没有延滞期,而在 DM 培养基中则出现较长的延滞期,菌株在 LB 中的最大 OD 值也比 DM 中高出许多。在工业应用中用 LB 培养基制作种子液,可以大大缩短培养周期,更加方便、快捷,为该菌株实际应用提供数据支持。

2.3.2 反硝化过程:菌株的反硝化过程如图 9 所示,反硝化过程是个产碱过程, pH 从中性逐步变成弱碱性, NO_3^- -N 浓度迅速降低,在 48 h 左右几乎完全去除。可能由于该菌株体内的硝化酶活力比亚硝化酶活力强,出现了 NO_2^- -N 的短暂积累,在 96 h 左右完全去除。由于培养液里存在低浓度的 NH_4^+ -N,在反硝化过程中逐步被去除,说明较低浓度的 NH_4^+ -N 对反硝化过程影响不大,该菌株可以利用较低浓度的 NH_4^+ -N, TN 是所有的有机氮和无机氮的总和。随着无机氮被完全去除, TN 也在逐步降低,最终维持在较低浓度的 TN 即为菌株自身合成的内源氮。

表 1 生理生化实验结果
Table 1 The results of physiological and biochemical characteristics

鉴定试验 Tests	实验结果 Results	鉴定试验 Tests	试验结果 Results
MR test	-	Oxidase	+
Indole test	+	Urea enzymes	+
VP test	-	Citrate test	+
Gram test	-	Lipase	-
pH 6.0	+	Sulphydylase	-
pH 11.0	-	Amylase	-
Aerobics	+	Catalase	+
Anaerobics	+	Motility test	+
5% NaCl	+	Gelatin liquefaction	+
4 °C	+	Flocculation activity	-
40 °C	-	Nitrate reduction enzyme	+
Gas production test	+	Nitrite reduction enzyme	+
Glucose fermentation test	-	Fluorescent pigments	+

Note: +: Positive; -: Negative.

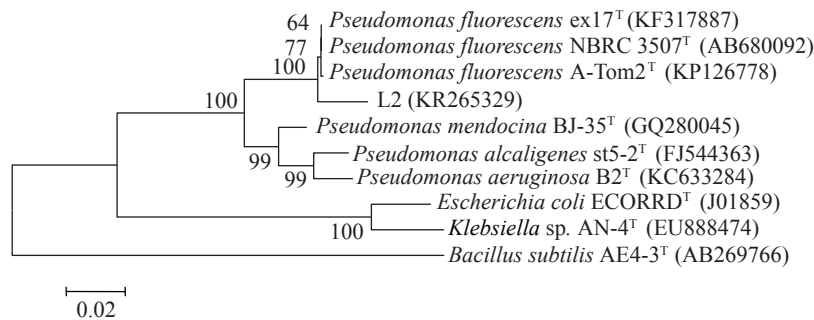


图 7 菌株 L2 及相关菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequences

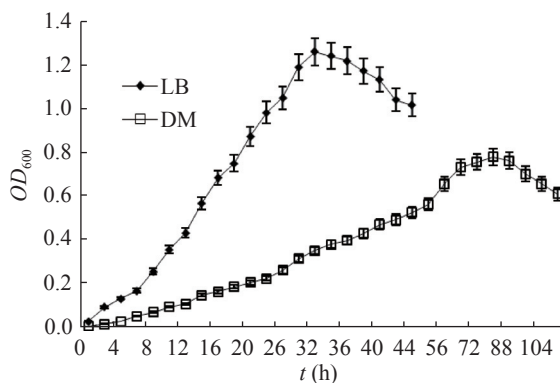


图 8 菌株 L2 的生长曲线

Figure 8 Growth curve of the strain L2

2.4 菌株反硝化性能的研究

2.4.1 接种量对反硝化性能的影响: 如图 10 所示, 接种量在 1%–10% 之间变化, 随着接种量的增加, 对 TN 的去除率也逐步增加, 当接种率大于 10% 时, 对 TN 的去除率没有太大的影响, 反而略有降低, 因此最佳接种量为 10%。

2.4.2 温度对反硝化性能的影响: 按照 10% 的接种量 (处于对数期的菌株 L2) 接种于 DM 液体培养基中, 分别放在 4、10、15、20、25、30、35、40 °C 静置培养 3 d, 测得对 TN 的去除情况如图 11 所示。该菌株能够在低温 4 °C 下进行反硝化反应, 低温降

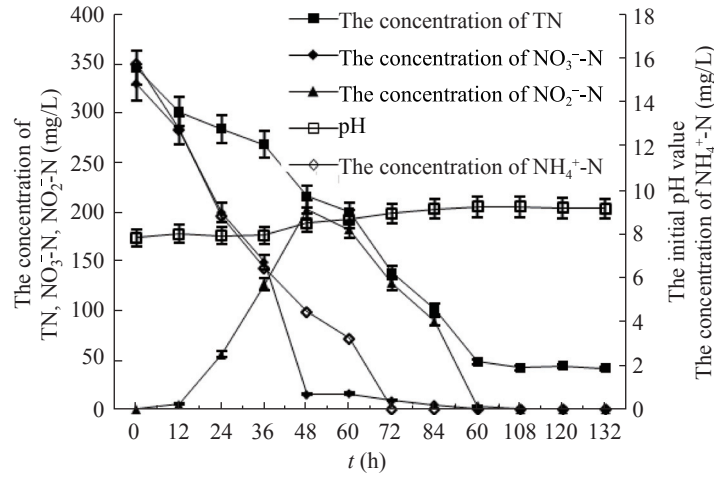


图 9 反硝化过程

Figure 9 Process of denitrification

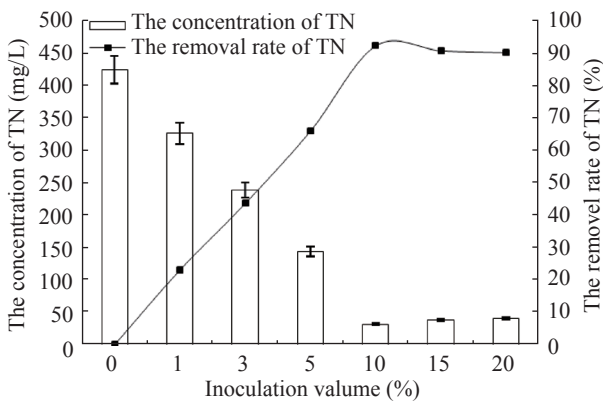


图 10 接种量对反硝化性能的影响

Figure 10 Influence of different inoculating ratio on the denitrifying ability

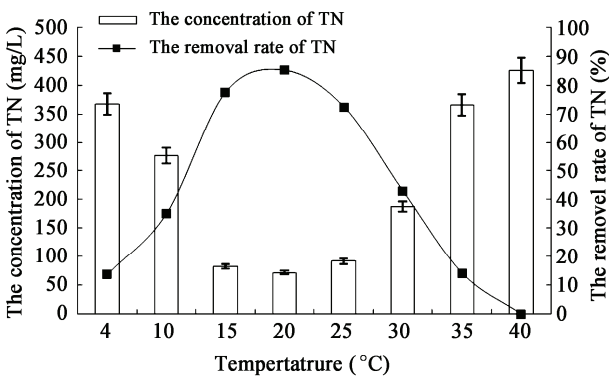


图 11 不同温度对反硝化性能的影响

Figure 11 Influence of different temperature on the denitrifying ability

低了酶活性,影响了反硝化速率,随着温度的升高,反硝化活性大大提高,并在 20 °C 时对 TN 的去除率达到最高,但是该菌株在温度超过 30 °C 时反硝化活性受到显著的抑制,在 40 °C 不生长,没有反硝化能力,该菌株的热稳定性差。文献^[19]报道,一般低于 15 °C 菌株的反硝化能力大大降低,而菌株 L2 在温度为 15 °C 仍具有很好的反硝化能力,甚至在 10 °C 和 4 °C 仍具有较好的反硝化能力,说明该菌株具有耐低温进行反硝化能力,属于耐冷菌,耐冷菌能够耐受温度波动,比较适合低温废水的处理^[20]。

2.4.3 初始 pH 对反硝化性能的影响: 环境中的 pH 对微生物的生命活动影响很大,主要是通过引起细胞膜的电荷变化,从而影响微生物对营养物质的吸收^[21]。按照 10% 的接种量,其他成分保持一致,初始 pH 调为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 10 °C 静置培养,在第 3 天测得对 TN 的去除情况如图 12 所示,该菌株在初始 pH 为 5.0 和 11.0 时不生长也没有反硝化能力,酸性或者碱性条件下均对菌株的反硝化能力影响较大,在 pH 为 6.0–8.0 之间对 TN 的去除率均达 60% 以上,具有很好的反硝化能力,该菌株反硝化的最适初始 pH 为 7.0,过酸或者过碱可以使酶的空间结构破坏,引起酶构象的改

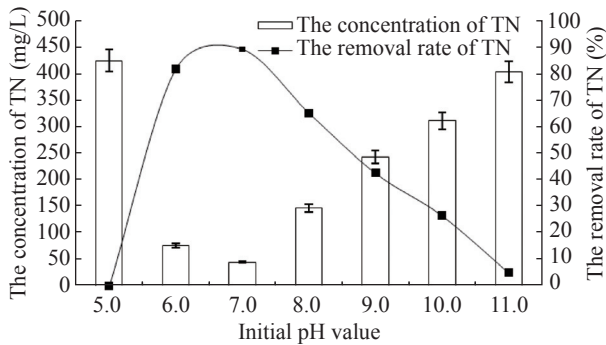


图 12 不同初始 pH 对反硝化性能的影响

Figure 12 Effect of different initial pH on the denitrifying ability

变, 酶活性的丧失^[5]。

2.4.4 盐浓度对反硝化性能的影响: 盐浓度对细菌生长具有重要作用, 高盐浓度可导致细胞原生质分离, 还可使微生物酶活性受到抑制^[22]。按照 10% 的接种量, 其他成分保持一致, 盐浓度分别为 0、0.5%、1%、2%、3%、5%、7%、10%, 10 °C 静置培养, 在第 3 天测得对 TN 的去除情况如图 13 所示, 可以看出该菌株随着盐浓度在 1%–10% 之间增加, 反硝化能力受到显著的抑制; 当盐浓度为 2% 时, 对 TN 的去除率约为 40%, 说明该菌株具有一定的耐盐性; 当盐浓度达到 10% 时, 菌株完全失活, 该菌株的最适盐浓度为 0.5%。

2.4.5 碳源对反硝化性能的影响: 有机碳源主要为反硝化过程中提供能源和电子供体, 不同菌株对不同有机碳源的利用率不同^[22]。按照 10% 的接种量, 其他成分保持一致, 碳源分别为葡萄糖、麦芽糖、乳糖、可溶性淀粉、羧甲基纤维素钠、甘露醇、柠檬酸钠、酒石酸钾钠、醋酸钠、碳酸钠, 10 °C 静置培养, 在第 3 天测得对 TN 的去除情况如图 14 所示, 该菌株对碳源的利用较广, 菌株对碳源的利用率依次为: 葡萄糖>柠檬酸钠>甘露醇>麦芽糖, 对其他的碳源利用率较低或者没有, 尤其当乳糖为碳源时菌株几乎不生长, 说明菌株对碳源的利用与碳源分子的大小无显著关系^[23]。该菌株的最适碳源为葡萄糖, 由于葡萄糖在实际应用中存在容易焦化弊端, 后续实验仍用柠檬酸钠为碳源。

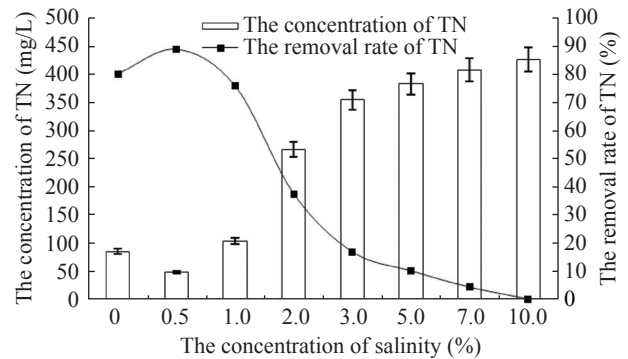


图 13 不同盐浓度对反硝化性能的影响

Figure 13 Effect of different salinity on the denitrifying ability

2.4.6 溶解氧对反硝化性能的影响: 参与反硝化过程的细菌主要是兼性厌氧和好氧菌, 很少有专性厌氧菌, 缺氧和少氧是反硝化的必要条件^[23]。按照 10% 的接种量、10 °C 培养条件下, 其他成分保持一致, 50 mL/250 mL、100 mL/250 mL 和 150 mL/250 mL 的样品在 150 r/min 摇床培养, 两份 150 mL/250 mL 样品(其中一份在厌氧条件下)分别静置培养, 在第 3 天测得对 TN 的去除情况如图 15 所示, 该菌株在相同转速下(150 r/min)的装液量对菌株的溶解氧的影响, 随着装液量的增加菌株的反

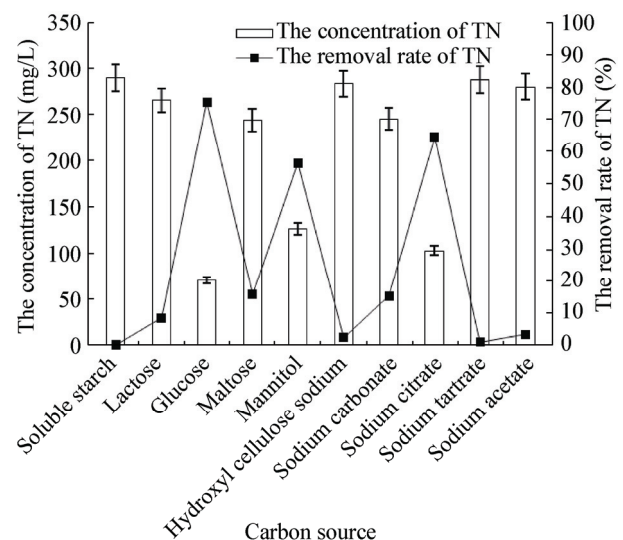


图 14 不同碳源对反硝化性能的影响

Figure 14 Effect of different carbon source on the denitrifying ability

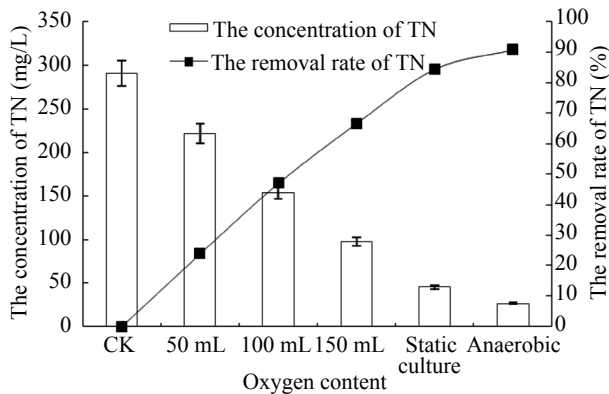


图 15 溶解氧对反硝化性能的影响

Figure 15 Effect of different dissolved oxygen on the denitrifying ability

硝化能力越好, 其中在密闭容器的厌氧条件下的反硝化能力最强, 与王晋宇等^[24]研究的荧光假单胞菌结果一致。由以上现象及结果可以看出, 该菌株对氧浓度具有一定的耐受性, 为兼性厌氧菌。

在反硝化过程中, DO 的存在会对反硝化过程起到抑制作用, 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盐还原酶的传递^[25]。菌株 L2 能够耐受一定浓度的 DO, 在实际运用中比较广泛。

2.4.7 C/N 对反硝化性能的影响: 按照 10% 的接种量, 其他成分保持一致, C/N 分别为 0.5、1、2、3、5、10、15、20 时 10 °C 静置培养, 在第 3 天测得对 TN 的去除情况如图 16 所示。目前有研究表明 C/N 在 2-12 之间, C/N 越大则反硝化效果越好, 高 C/N 能够保证碳源的充足使得反硝化作用更加彻底, 而低 C/N 时碳源快速消耗, 会造成硝化与反硝化之间的不平衡^[26]。从结果可以看出, 菌株 L2 在较小范围内出现最适 C/N 为 5.0, 与李卫芬等^[23]已报道的反硝化细菌一致。菌株 L2 在 C/N 为 0.5-2.0 时对 TN 的去除率达 60% 左右, C/N 为 3.0-5.0 时对 TN 的去除率达 90% 左右, 在 C/N 为 10.0-20.0 时对 TN 的去除率仍能达到 60% 左右, 说明菌株 L2 可以承受高 C/N 和极低 C/N, 在贫营养条件下具有很好的反硝化能力, 为贫营养条件下反硝化菌在污水中

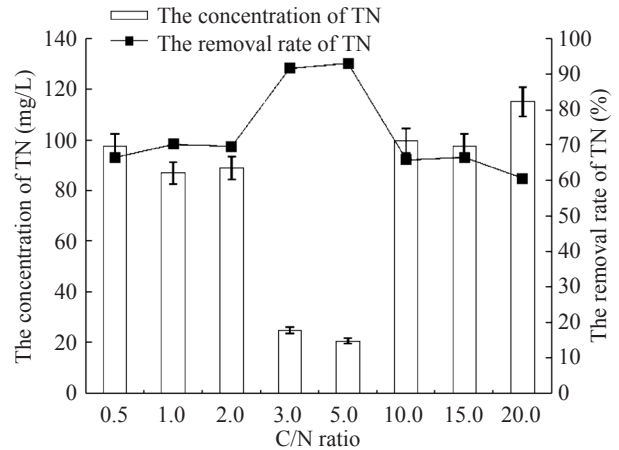


图 16 不同 C/N 比值对反硝化性能的影响

Figure 16 Effect of different C/N ratio on the denitrifying ability

的应用提供了有力的科学依据。

2.4.8 初始硝态氮浓度对反硝化性能的影响: 按照 10% 的接种量, 其他成分保持一致, 初始氮浓度(保持 C/N 在 3) KNO_3 为 1、2、3、4、5、6 g/L, 10 °C 静置培养, 在第 3 天测得对 TN 的去除情况如图 17 所示。当溶液中 $\text{TN} < 500 \text{ mg/L}$ 时, 菌株对 TN 的去除率达到 80% 以上, 当溶液中 $\text{TN} > 500 \text{ mg/L}$ 时, 对 TN 的去除率有所抑制, 原因可能是在反硝化过程中产生高浓度 $\text{NO}_2^- \text{-N}$, 对菌株的反硝化产生一定的抑制作用, 但该菌株仍能够生存并且反硝化率仍能达到 60% 左右。说明该菌株能够耐受较高的初始

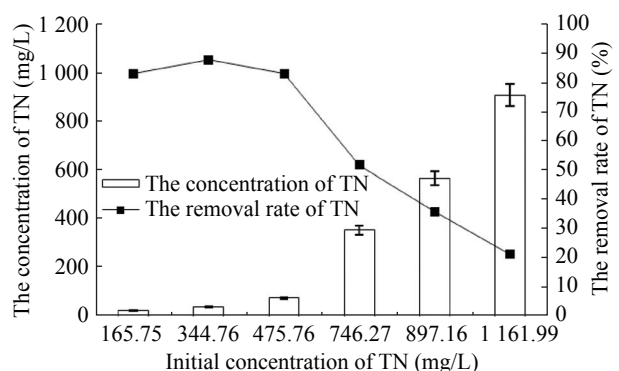


图 17 初始硝态氮浓度对反硝化性能的影响

Figure 17 Effect of different initial nitrate concentration on the denitrifying ability

硝态氮负荷, 比较已经报道的菌株具有更高的耐受性^[4], 能够在较大范围的硝态氮浓度内进行反硝化作用, 在污水中的应用中具有很大的应用潜力。

3 讨论

目前已有许多人筛选低温反硝化细菌, 其中被筛选的菌株主要有施氏假单胞杆菌^[2]、荧光假单胞杆菌^[3,7]、无色脱氮菌^[27]等。但是系统研究荧光假单胞杆菌在低温(10 °C)条件下的反硝化性能较少。本实验筛选的荧光假单胞杆菌, 经过了较全面的鉴定过程, 通过多个单因素的试验, 发现该菌株能够在较低的 C/N 下经行高效的反硝化过程, 李卫芬等^[23]的反硝化细菌在温度为 20 °C 时, 反硝化率只有 28.40%; 在温度为 30 °C, C/N 为 5 时, 反硝化率达到 95.32%, 菌株 L2 在 10 °C, C/N 为 5 时, 反硝化率达到 92.93%, 说明本实验的菌株能够在较低温度、C/N 条件下还能保持很高的反硝化能力。不同菌种的好氧反硝化机制存在较大差异, 王兆阳等^[9]研究的反硝化细菌 DO 对反硝化能力的影响不大, 何芳等^[14]的反硝化细菌在培养基中连续通气的情况下, 出现硝态氮的积累即硝化反应现象, 本实验的菌株随着 DO 的增加, 反硝化能力受到显著性抑制, 在完全厌氧条件下的反硝化能力达 90.81%, 说明菌株 L2 是典型的兼性厌氧反硝化细菌。王有乐等^[27]从土壤中分离出的反硝化菌 LD3, 在初始 NO₃⁻-N 为 140 mg/L, 降解过程中 NO₂⁻-N 最大积累量达 54.13 mg/L, 本实验的初始 NO₃⁻-N 为 329 mg/L, 降解过程中 NO₂⁻-N 最大积累量达 161.68 mg/L, 比菌株 LD3 的 NO₂⁻-N 积累略高一些, 总体来说 NO₂⁻-N 的积累大致为初始 NO₃⁻-N 浓度的一半左右, 二者具有一致性。

4 结论

(1) 从合肥望塘污水处理厂回流污泥中筛选得到一株耐低温兼性厌氧高效反硝化菌 L2, 革兰氏阴性, 呈短杆状, 通过形态特征观察、生理生化试验和 16S rRNA 基因同源性分析, 确定该菌为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。

(2) 菌株在 LB 培养基中的生长速度大大高于 DM 培养基, 为该菌株的实际运用提供了一定的理论支持; 在反硝化过程中, 该菌株出现了亚硝态氮的短暂积累, 但最终没有无机氮积累的情况。

(3) 该菌株反硝化的最适接种量为 10%; 能够在较低温度下高效快速进行反硝化, 最适温度为 20 °C, 属于低温菌; pH 在 6.0–8.0 之间, 反硝化能力较好; 盐浓度为 0–1% 时, 对菌株的反硝化能力影响不显著; 菌株能够很好地利用葡萄糖、柠檬酸钠、甘露醇、麦芽糖进行反硝化, 菌株的最适 C/N 比值为 5.0, 过高反而有所抑制; 该菌株能够耐受较高硝态氮浓度进行反硝化。

荧光假单胞杆菌是一株高效反硝化细菌。该菌株既耐受高浓度硝酸盐负荷又对 C/N 需求较低, 在污水处理中, 可以降低运行成本, 提高处理效率; 该菌株的耐低温特性和兼性厌氧特性可以扩大菌株的应用范围和应用潜能。

参考文献

- [1] Wu ZB, Zhang XQ, Zhang Y, et al. The application of an aerobic denitrifying bacteria in wastewater treatment: China, CN103667168A[P]. 2014-03-26 (in Chinese)
吴振斌, 张雪琪, 张燕, 等. 一种好氧反硝化细菌及其在污水处理中的应用: 中国, CN103667168A[P]. 2014-03-26
- [2] Zhou CL, Jia YB, Zhang N. A salt-tolerant and low temperature-tolerant denitrifying bacteria of *Pseudomonas stutzeri*: China, CN 103773723A[P]. 2014-05-07 (in Chinese)
周长林, 贾源宾, 张宁. 一种耐盐并具有低温生物脱氮功能的施氏假单胞菌: 中国, CN 103773723A[P]. 2014-05-07
- [3] Zhang SM, Jiang W, Gao W, et al. A low temperature-tolerant denitrifying bacteria of *Pseudomonas fluorescens*: China, CN103275908A[P]. 2013-10-08 (in Chinese)
张淑梅, 姜威, 高娃, 等. 一株低温脱氮荧光假单胞杆菌: 中国, CN103275908A[P]. 2013-10-08
- [4] Zhou YR, Lu YF, Shi WM. Bioaugmentation on nitrate removal from simulated wastewater by aerobic denitrifying bacterium RWX31[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(10): 2047-2054 (in Chinese)
周影茹, 陆玉芳, 施卫明. 好氧反硝化菌 RWX31 强化污染废水脱氮的研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(10): 2047-2054
- [5] Gao XX, He SY, Yang LZ, et al. Isolation and identification of an efficient psychrotrophic bacterium and its characteristics of organic matter degradation[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2015, 35(4) 1006-1011 (in Chinese)
高新新, 何世颖, 杨林章, 等. 一株高效降解废水有机质耐冷菌的筛选、鉴定及特性研究[J]. 环境科学, 2015, 35(4): 1006-1011
- [6] Wang AH. Discussion on some problems in upgrading and reconstruction of municipal wastewater treatment plant[J]. China water & Wastewater, 2010, 26(2): 19-22 (in Chinese)

- 王阿华. 城镇污水处理厂提标改造的若干问题探讨[J]. 中国给水排水, 2010, 26(2): 19-22
- [7] Ma F, Pang CL, Cui D, et al. Identification and application of a hypothermia bacterium *Pseudomonas* Den-05: China, CN102776140B[P]. 2013-11-06 (in Chinese)
马放, 庞长泷, 崔迪, 等. 一株耐冷假单胞菌 Den-05及其筛选方法和应用: 中国, CN102776140B[P]. 2013-11-06
- [8] Xin MX, Zhao Y, Zhou J, et al. The application of denitrifying bacteria in denitrification of wastewater[J]. Microbiology China, 2007, 34(4): 773-776 (in Chinese)
辛明秀, 赵颖, 周军, 等. 反硝化细菌在污水脱氮中的作用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 773-776
- [9] Wang ZY, Chen GY, Jiang K, et al. Identification and denitrification characteristics of a psychrotolerant facultative basophilic aerobic denitrifier[J]. Environmental Science, 2014, 35(6): 2341-2348 (in Chinese)
王兆阳, 陈国耀, 姜珂, 等. 1株耐冷兼性嗜碱好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性[J]. 环境科学, 2014, 35(6): 2341-2348
- [10] Chang YM, Yang Q, Hao CB, et al. Experimental study of autotrophic denitrification bacteria through bioaugmentation of activated sludge from municipal wastewater plant[J]. Environmental Science, 2011, 32(4): 1210-1216 (in Chinese)
常玉梅, 杨琦, 郝春博, 等. 城市污水厂活性污泥强化自养反硝化菌研究[J]. 环境科学, 2011, 32(4): 1210-1216
- [11] Liu TQ, Jin RF, Zhou JT, et al. Nitrogen-removal characteristic of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium ADN-42[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(2): 989-996 (in Chinese)
刘天琪, 金若菲, 周集体, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 ADN-42的脱氮特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(2): 989-996
- [12] Zhu XY, Wang SM, Liang JR, et al. Isolation and identification of two aerobic denitrifiers with high efficiency in the removal of N from simulated wastewater[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2009, 29(1): 111-117 (in Chinese)
朱晓宇, 王世梅, 梁剑茹, 等. 两株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮效率[J]. 环境科学学报, 2009, 29(1): 111-117
- [13] Ding W, Zhu L, Xu J, et al. Progress of researches on aerobic denitrifiers and their application in bioremediation[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2011, 17(6): 923-929 (in Chinese)
丁炜, 朱亮, 徐京, 等. 好氧反硝化菌及其在生物处理与修复中的应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(6): 923-929
- [14] He F, Kang YJ, Shan J, et al. An oxygen-tolerant denitrifying strain and its denitrifying processes[J]. Microbiology China, 2008, 35(1): 35-39 (in Chinese)
何芳, 康贻军, 单君, 等. 一株高耐氧反硝化细菌的筛选及其反硝化产物确定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 35-39
- [15] Zhou DQ. Experimental Microbiology[M]. 2nd Edition. Beijing: Higher Education Press, 2006: 372-376 (in Chinese)
周德庆. 微生物学实验教程[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 372-376
- [16] The State Environmental Protection Administration of Editorial Board. Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods[M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 258-282 (in Chinese)
国家环境保护总局, 《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 258-282
- [17] Zhao HQ. Microbiology Experimental Guidance[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2008: 133-138 (in Chinese)
赵海泉. 微生物学实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 133-138
- [18] Buchanan RE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984: 274-278 (in Chinese)
布坎南. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 274-278
- [19] Ma C, Jin RC. Research progress in the biological denitrification from low temperature wastewater[J]. Industrial Water Treatment, 2012, 32(6): 1-5 (in Chinese)
马春, 金仁村. 低温废水生物脱氮工艺的研究进展[J]. 工业水处理, 2012, 32(6): 1-5
- [20] Han YH, Zhang WX, Zhuang ZG, et al. Isolation and characterization of the salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain A-13[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(1): 47-58 (in Chinese)
韩永和, 章文贤, 庄志刚, 等. 耐盐好氧反硝化菌 A-13菌株的分离鉴定及其反硝化特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(1): 47-58
- [21] Xu CB, Zhao Q, Wang WY, et al. Identification and characteristics of a low temperature-resistant petroleum-degrading bacterium[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2014, 34(8): 1961-1967 (in Chinese)
徐成斌, 赵全, 王闻辉, 等. 一株耐低温石油降解菌的鉴定及降解特性[J]. 环境科学学报, 2014, 34(8): 1961-1967
- [22] Chu SY, Jiang HX, Xiao JB, et al. Screening, denitrification characteristics, and anaerobic ammonium oxidation ability of denitrifying bacterium aHD7[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(11): 3096-3102 (in Chinese)
褚淑祎, 江惠霞, 肖继波, 等. 高效反硝化菌 aHD7的筛选、脱氮特性及厌氧氨氧化性[J]. 应用生态学报, 2012, 23(11): 3096-3102
- [23] Li WF, Fu LQ, Deng B, et al. Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier[J]. Environmental Science, 2011, 32(8): 2403-2408 (in Chinese)
李卫芬, 傅罗琴, 邓斌, 等. 1株好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 环境科学, 2011, 32(8): 2403-2408
- [24] Wang JY, Fan WP, Li S, et al. A strain of pseudomonas fluorescens with multi-paths of nitrogen metabolism[J]. Acta pedologica sinica, 2007, 44(1): 144-149 (in Chinese)
王晋宇, 范伟平, 李霜, 等. 一株具有多途径氮代谢功能的荧光假单胞菌[J]. 土壤学报, 2007, 44(1): 144-149
- [25] Xin YF, Qu XH, Yuan MD, et al. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Acinetobacter* sp. YF14 and its denitrification activity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(12): 1646-1654 (in Chinese)
辛玉峰, 曲晓华, 袁梦东, 等. 一株异养硝化-反硝化不动杆菌的分离鉴定及脱氮活性[J]. 微生物学报, 2011, 51(12): 1646-1654
- [26] Huang TL, He XX, Zhang HH, et al. Nitrogen removal characteristics of the heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. Sxf14[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2015, 21(2): 201-207 (in Chinese)
黄廷林, 何秀秀, 张海涵, 等. 水库贫营养异养硝化-好氧反硝化菌 Sxf14 的脱氮特性[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(2): 201-207
- [27] Wang YL, Lei XL, Chen LJ, et al. Screening aerobic denitrifiers from soil and study on characteristics of denitrification[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2011, 5(8): 1902-1906 (in Chinese)
王有乐, 雷兴龙, 陈连军, 等. 土壤中好氧反硝化菌的分离及脱氮特性研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(8): 1902-1906