

好氧反硝化菌株的鉴定及其反硝化特性研究

王弘宇^{1,2}, 马放^{1*}, 苏俊峰¹, 左薇¹, 张献旭¹, 张佳¹

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 2. 武汉大学市政工程系, 武汉 430072)

摘要:从活性污泥中分离得到 1 株好氧反硝化细菌 C3, 并对其反硝化能力进行了研究. 结果表明, C3 菌株在好氧条件下能有效去除培养液中的硝酸盐氮, 其脱氮率可达 90% 以上. 通过对该菌株的形态观察, 生理生化实验以及 16S rDNA 序列分析, 确定菌株 C3 为假单胞菌(*Pseudomonas* sp.), 同时分析了其在系统发育中的分类地位. 对菌株 C3 的生态影响因子研究表明, 其反硝化最适宜的温度和 pH 值分别为 30℃ 和 7.0. 和其他已报道的好氧反硝化菌相比, C3 菌株有着更高的氧耐受浓度. C/N 对菌株 C3 的好氧反硝化能力有很大影响, 其最适宜的碳氮比是在 5.5~6.0, 在此区间能进行完全的反硝化.

关键词:好氧反硝化菌; 生物脱氮; 16S rDNA 测序; 系统发育

中图分类号: X172; X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)07-1548-05

Identification and Characterization of a Bacterial Strain C3 Capable of Aerobic Denitrification

WANG Hong-yu^{1,2}, MA Fang¹, SU Jun-feng¹, ZUO Wei¹, ZHANG Xian-xu¹, ZHANG Jia¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. Department of Municipal Engineering, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: A bacterial strain C3 screened from the activated sludge was found capable of aerobic denitrification and the denitrifying capability of the strain was studied in batch culture under aerobic condition. The results showed that the nitrate in the culture could be efficiently removed by strain C3 and the nitrogen removal rate was up to above 90%. According to the morphological observation, physiological biochemical test and sequence analysis of the 16S rDNA, strain C3 was identified as *Pseudomonas* sp.. And the phylogentic position of the strain was performed based on the phylogenetic tree. The factors affecting aerobic denitrification by strain C3 were also discussed. The results indicated that the most suitable temperature and pH value for aerobic denitrification were 30℃ and 7.0, respectively. The denitrification performance of strain C3 was almost not affected by the presence of oxygen and the strain C3 had a higher tolerance of dissolved oxygen concentration than other aerobic denitrifiers reported previously. The optimal C/N ratio was 5.5~6.0 and nearly complete denitrification can be obtained at the range of C/N ratio.

Key words: aerobic denitrifier; biological nitrogen removal; 16S rDNA sequencing; phylogenetic analysis

随着水体富营养化的日益严重, 去除水中氮素污染已经成为当今水污染防治领域的一个热点问题. 传统生物脱氮包括硝化和反硝化 2 个过程. 一直以来反硝化被认为是一个严格的厌氧过程^[1], 在此过程中, 硝酸盐依次被还原为亚硝酸盐、NO、N₂O 和氮气. 先前的一些研究也认为反硝化的酶系统会被氧气所抑制^[2]. 然而, 最新的研究表明, 一些微生物在不同的溶氧条件下, 也能表现出反硝化能力^[3]. 近年来, 好氧反硝化现象不断被报道, 一些好氧反硝化菌也已被筛选出来, 国外已报道的好氧反硝化菌有 *Thiosphaera pantotropha*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas nautical*, *Thaurea mechernichensis*, *Pseudomonas stutzeri* 和 *Microvirgula aerodenitrificans* 等^[4~7]. 国内目前对好氧反硝化菌的筛选和研究还处于起步阶段.

好氧反硝化菌的出现为生物脱氮提供了一条全新的途径, 它是对传统生物脱氮理论有力的补充. 本

研究分离出能在好氧条件下进行高效反硝化的菌株 C3, 并对其形态、生理生化特征和反硝化特性进行了研究, 以期为好氧反硝化细菌应用于工程实践提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 菌株来源

从本实验室经驯化后的脱氮污泥中筛选出的, 在好氧条件下具有良好的反硝化效果的菌株, 编号为 C3.

1.2 培养基

反硝化培养基 DM^[5] (g/L): Na₂HPO₄ · 7H₂O 7.9;

收稿日期: 2006-07-27; 修订日期: 2006-09-06

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目 (50521140075); 黑龙江省科技攻关计划项目 (GB05C202)

作者简介: 王弘宇 (1976~), 男, 博士, 主要研究方向为环境生物技术和水污染控制, E-mail: cwwflybutter@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: mafang@hit.edu.cn

KH_2PO_4 1.5; NH_4Cl 0.3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; 琥珀酸钠 4.7; 微量元素溶液 2 mL; pH 7.0 ~ 7.5; KNO_3 根据试验要求进行调整.

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; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 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.

1.3 生理生化试验

菌株鉴定的生理生化试验参照文献[8,9]进行.

1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增、序列测定及系统发育分析

以基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA, 扩增采用的引物是一对通用引物^[10]. 正向引物 BSF8/20: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*Escherichia coli* 对应位置为 8 ~ 27); 反向引物 BSR1541/20: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (*Escherichia coli* 对应位置为 1 541 ~ 1 522). 引物由上海生工生物工程有限公司合成. PCR 反应体系^[11] (50 μL): 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 4 μL , dNTP 2 μL , 引物 BSF8/20 和引物 BSR1541/20 各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , *Taq* 酶 (10 000 U/mL) 0.5 μL , 重蒸水 35.5 μL . PCR 程序如下: ① 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; ② 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; ③ 第 2 步循环 29 次; ④ 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; ⑤ 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 min. PCR 产物的纯化和测序由大连宝生物有限公司完成.

将菌株 C3 细胞的 16S rDNA 序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行序列同源性比较, 通过 CLUSTAL X、BIOEDIT 和 MEGA 等软件进行多重序列比对分析, 并以 Neighbor-Joining 法^[12] 构建系统发育树, 分支聚类的稳定性用 Bootstrap 方法进行评价.

1.5 菌株好氧反硝化能力测定

采用间歇培养反应器, 通过检测反应过程中硝氮、亚硝氮和氮气量的变化来测定菌株的好氧反硝化能力. 试验装置由 2 L 具塞密闭的试剂瓶及管件组成 (图 1), 整个反应器是密闭的, 进出口 2 端配有孔径为 0.25 μm 的滤菌器. 反应器装入 1 L DM 培养基后, 以 10% 的接菌量接菌后密封, 与氧气罐连接, 打开进气口和排气口, 以 3 L/min 的流量通入纯氧 3 min, 驱走反应器和管路内的空气, 以尽量避免空气中所含氮气对测量结果的干扰. 关闭排气口, 通入氩气, 通过气体压力表的读数确定反应器内压力为正压, 停止通入氩气, 关闭进气口. 与此同时, 打开磁力搅拌器, 目的是使培养液均质并与上部氧气充分接

触 (培养过程中测定 DO 一般在 8 ~ 10 mg/L). 通入氩气的目的是制造有压条件: 一是使反应器内形成正压, 使氧能够更充分地溶解到培养液中, 确保绝对好氧; 二是正压能够阻止空气中的氮气进入反应器, 使所取的气体样中的气态氮的量绝对代表反硝化产物的量. 温控仪用以控制反应器外部水浴温度, 通过反应器内磁力搅拌子搅拌传热, 使培养液温度与水浴温度相同. 取样口 1 用以取气体样, 来监测培养过程中氮气生成量, 取样口 2 用以取培养液样品, 用来监测培养过程中 pH 值和 DO 的变化, 样品经离心后取其上清液监测 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的变化.

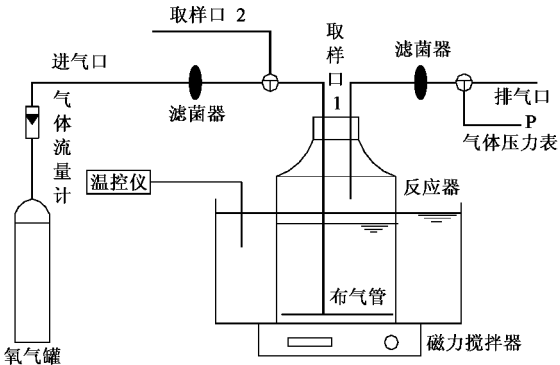


图 1 好氧反硝化性能试验装置
Fig.1 Experimental setup for aerobic denitrification

1.6 分析方法

$\text{NO}_2^- - \text{N}$: *N*-(1-萘基)-乙二胺光度法; $\text{NO}_3^- - \text{N}$: 麝香草酚分光光度法; 氮气 (N_2): Agilent HP4890D 型气相色谱仪, 气相色谱的色谱柱编号 GS-03-106 型, 条件为: 载气流量 He 20 mL/min, 柱前压 0.08 MPa, 柱温 60 $^{\circ}\text{C}$, 检测器温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 气化室温度 120 $^{\circ}\text{C}$; 菌体生长吸光度: 吸光度法, 用 721 分光光度计在光密度为 480 nm 处测吸光度值; 溶解氧 (DO): 采用 YSI5000 型 DO 测定仪测定; pH 值和 ORP: 采用 320 型 pH 计测定.

2 结果与讨论

2.1 分离菌株的形态学特征

菌株 C3 为革兰氏阴性菌, 杆菌, 大小为 0.5 μm $\times$ 2.0 μm , 周生鞭毛. 形成的菌落呈现浅黄色, 形状不规则, 边缘呈锯齿状, 表面皱纹, 半透明. 菌株 C3 的电镜照片见图 2.

2.2 分离菌株的生理生化鉴定

菌株 C3 的生理生化测定结果为: 接触酶反应呈阳性, 严格好氧, 葡萄糖发酵产酸, 硝酸盐还原、淀



图 2 菌株 C3 的形态特征

Fig.2 Electron and microscopy photograph of strain C3

粉水解、油脂水解、产吡啉试验、柠檬酸盐利用、尿素水解试验、产氨试验阳性,伏-普试验(V.P.)、甲基红试验(M.P.)、明胶液化试验、产硫化氢试验反应阴性,石蕊牛奶试验结果为还原和凝乳酶凝固。

2.3 16S rDNA 序列测定及系统发育分析

通过 GENE BANK 检索得到和菌株 C3 亲源性相近的及其他具有典型好氧反硝化功能的相关参比菌株,利用 BIOEDIT 和 PHYLIP 等软件,以 Neighbor-Joining 法绘制 16S rDNA 系统发育树,如图 3 所示。从图 3 中可以看出,菌株 C3 和 *Pseudomonas* sp. SN1, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chloritidis*mutans 及 *Pseudomonas* cf. 在同一发育分支中,菌株 C3 归属于 *Pseudomonas* 类群中,和 C3 菌株亲缘关系最近的是 *Pseudomonas* sp. SN1, 二者的 16S rDNA 序列的相似性为 99%。

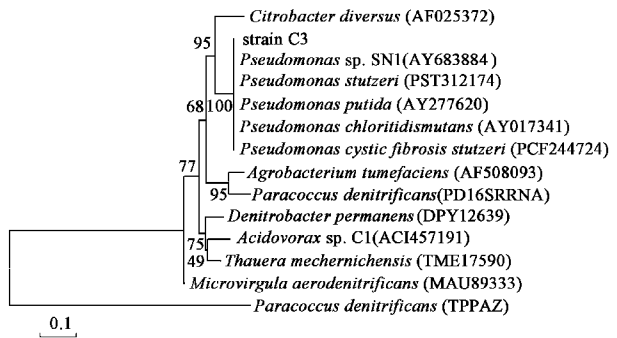


图 3 基于 16S rDNA 序列同源性用最大似然法构建的菌株 C3 和亲源性接近的及其他好氧反硝化细菌的系统发育树

Fig.3 Unrooted phylogenetic trees based on the partial 16S rDNA sequences of strain C3 and related bacteria

2.4 菌株的好氧反硝化特性

试验初始向灭菌后的装置(图 1)中接入 C3 种

子培养液,30 ℃水浴培养,而后通过定时检测装置反应过程中 NO_3^- -N、 NO_2^- -N 的变化和氮气的生成量,考察菌株 C3 在好氧条件下的反硝化效果(图 4)。从图 4 中可以看出,菌株 C3 在培养的前 9 h,将 NO_3^- -N 浓度从 110.98 mg/L 降至 2.31 mg/L。在整个培养过程中,出现了明显的亚硝酸盐积累,在第 9 h 达到其最大积累值为 28.40 mg/L, NO_2^- -N 的积累过程可以理解为硝酸盐首先在菌体内硝酸盐还原酶的作用下还原为亚硝酸盐的结果。而亚硝酸盐的存在又能快速诱导产生亚硝酸盐还原酶,从而将亚硝酸盐还原成氮气。到培养的第 12 h,亚硝酸盐浓度降为 0.4 mg/L。可见最终硝酸盐被完全转变成了氮气。从图 4 中还可以看出,反硝化作用主要发生在菌体生长的对数生长期,这个时期是细菌生长和繁殖最旺盛的时期,细胞合成所需要的能量和还原力主要在这一阶段被消耗。因此反硝化作用主要在这一时期完成。

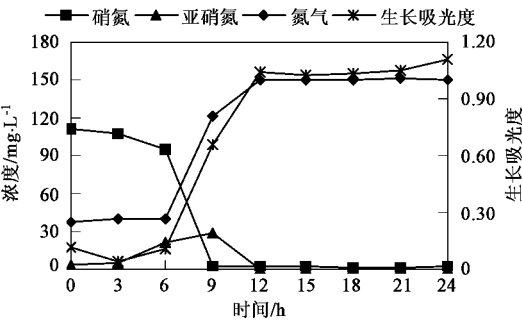


图 4 菌株 C3 的好氧反硝化特性

Fig.4 Aerobic denitrification performance of strain C3

2.5 pH 值对好氧反硝化的影响

调整培养液的初始 pH 值后,等量接种对数期生长的细菌,在 30 ℃条件下培养。图 5 表明,pH 值对 C3 菌株的反硝化能力影响显著。不同 pH 值下,反硝化效能不同。pH 为 7 时能获得最大的反硝化效率,其脱氮率能达到 92.71%。pH 为 8 时脱氮率为 69.04%;pH 为 9 时其脱氮率为 59.58%。可见在偏碱(pH 7~9)的条件菌株 C3 也有较好的反硝化效果。但在酸性(pH≤6)和碱性(pH≥10)的条件下,菌株生长状况不好,对硝酸盐基本没有多少去除。可见 pH 值能直接影响反硝化酶的活性,环境中的氢离子浓度如果超过了微生物酶的适应范围,微生物对营养物质的吸收和酶的活力都相应受到影响。由上可知,菌株 C3 的反硝化最适宜的初始 pH 值为 7.0 左右。

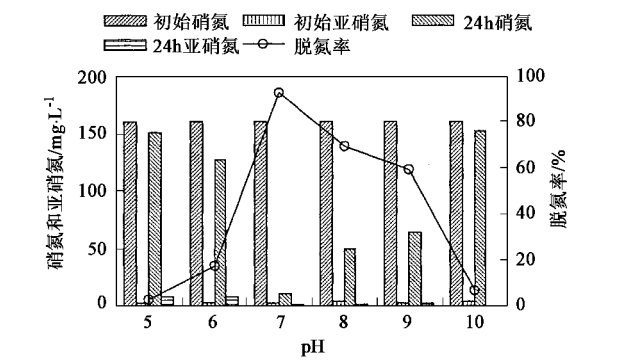


图5 pH值对C3菌株好氧反硝化的影响

Fig.5 Influence of pH on aerobic denitrification by strain C3

2.6 温度对好氧反硝化的影响

本试验中用温控仪控制培养瓶外部水浴的温度,通过磁力搅拌子搅拌传热,使培养液的温度与水浴温度相同.本试验设置了20、25、30、35、40℃共5个不同的温度条件,将处于对数生长期的C3菌株接种到培养液中,培养24h之后,找出温度与好氧反硝化菌反硝化效率的关系,结果如图6所示.

从图6中可以看出,温度对C3菌株的反硝化效率的影响不是很显著.当初始NO₃⁻-N控制在120mg/L左右时,在温度为20℃时候,脱氮率在40%以上.温度在25℃时,脱氮率达到在78%左右.当温度在30~35℃,脱氮率达到90%以上,其中在30℃时达到最大脱氮率93.39%.温度上升到40℃时,脱氮率下降到75.26%.因此,在25~35℃的温度范围内,C3菌株都具有很高的脱氮效率.可见,这样的宽温度范围有利于菌株在环境中的竞争与存活,能够有效地发挥该菌的好氧反硝化能力.

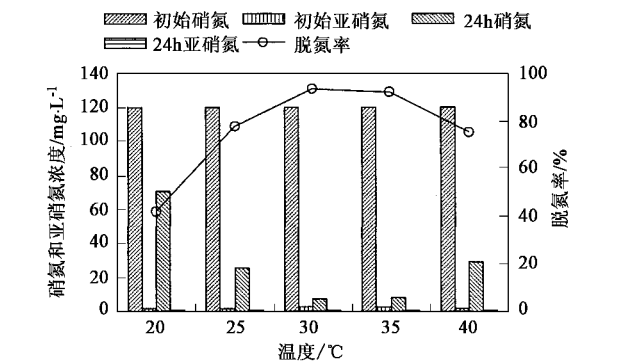


图6 温度对C3菌株好氧反硝化的影响

Fig.6 Influence of temperature on aerobic denitrification by strain C3

2.7 DO浓度对好氧反硝化的影响

对好氧反硝化菌来说,DO是至关重要的一个生

态指标.试验中通过向反应装置中吹入不同时间的纯氧,来实现培养液中不同的DO浓度,DO值在培养24h后用DO测定仪测得.试验中控制温度在30℃左右.表1所示为不同溶解氧浓度对菌株C3的反硝化特性的影响.

从表1中可以看出,在不同的溶解氧条件下,当培养液中初始的氧化态氮质量浓度为120mg/L左右时,30℃水浴培养24h后,菌株C3的脱氮率都可达到90%以上.可见,在该氧化态氮浓度下DO值对C3菌株的反硝化脱氮效果没有显著的影响.传统反硝化理论认为,生物反硝化只有在严格厌氧的条件下才能进行,氧气的存在阻止了电子传递给NO₃⁻或NO₂⁻,从而抑制了反硝化的进行.但是从试验结果可以看出,DO对C3菌株的反硝化基本没有抑制作用,在DO值2.3~11.3mg/L内,都可以选择硝酸盐作电子受体,氧的存在不会抑制硝酸盐还原酶活性.可见,菌株C3的反硝化酶系和有氧呼吸系统同时存在,氧不是抑制反硝化酶活性和反硝化酶生成的直接因素,这和Wilson的研究是一致的^[13].和目前已经报道的一些好氧反硝化菌相比^[14~16],菌株C3有着更高的氧耐受浓度.

表1 不同DO浓度下C3菌株的反硝化效果

DO /mg·L ⁻¹	初始氮浓度		培养24h后氮浓度		脱氮率 /%
	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	
	/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	/mg·L ⁻¹	
11.3	117.39	1.34	10.20	0.61	90.89
8.5	118.52	1.32	10.66	0.29	90.86
5.6	116.83	0.98	8.67	0.98	91.81
3.2	117.91	1.15	8.12	0.59	92.68
2.3	118.39	1.41	7.25	0.26	93.73

2.8 C/N对好氧反硝化的影响

C/N对细菌的物质和能量代谢影响很大.为了探求C/N对菌株C3的好氧反硝化能力的影响,试验中以琥珀酸钠提供碳源,固定碳源浓度(TOC)为720mg/L,通过调整培养液中的硝酸氮浓度来改变碳氮比(TOC/N),使C/N质量比分别为1、2、3、4、5、5.5、6、9和15.图7所示为不同碳氮比条件下菌株C3的脱氮效果.

从图7中可以看出,在C/N为1时,总氮去除率仅为20.48%;当C/N增加到5.5时,总氮去除率达到了90.4%.在C/N小于5.5的情况下,脱氮率随着C/N的增加而快速增长.这主要是因为初始的碳源越充足,菌体的生长速度越快,其反硝化能力也越强.当C/N为6时,脱氮率增加到94.3%,进一步增

加碳氮比,脱氮率基本上没有多大变化.可见当 C/N 大于 5.5 时,基本能够进行完全的反硝化.分析原因,可知有机碳源的量对菌体生长和反硝化效率起着重要的作用.如果碳源不足,就没有足够的电子流来提供足够的能源以供菌体生长,相应地反硝化效率也会变低.但是当提供的碳源远高于菌体的需求,此时碳源已非限制性因素,菌体的生长和代谢活性处于稳定阶段,反硝化脱氮效率也增加不多.从试验结果可以看出,最佳的碳氮比为 5.5~6.0.

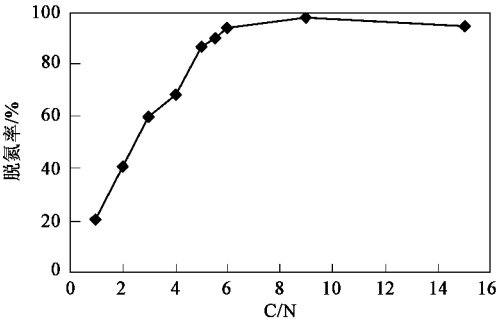


图 7 不同碳氮比情况下 C3 的反硝化能力

Fig.7 Effect of the C/N ratio on denitrification performance by strain C3

3 结论

(1)从活性污泥中筛选得到 1 株高效好氧反硝化细菌,经形态观察、生理生化实验以及 16S rDNA 序列分析等确定其属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.).

(2)C3 菌株能在完全好氧的条件下以硝酸盐作为电子受体进行反硝化,最终将硝酸盐转化为氮气.在此过程中,会出现亚硝酸盐的积累,但随后亚硝酸盐能被完全还原.在间歇培养条件下,其脱氮率能达到 90% 以上.

(3)C3 菌株进行反硝化时的最适初始 pH 值为 7.0,最适温度为 30 ℃.DO 对 C3 菌株的好氧反硝化基本没有抑制作用,在 DO 浓度为 2.3~11.3 mg/L 的范围内,均能进行高效的反硝化.C/N 对好氧反硝化的影响很大,最佳的碳氮比为 5.5~6.0.

参考文献:

[1] Zumft W G, Viebroc A, Komer H. Biochemical and physiological aspects of denitrification[A]. In: Cole J A, Ferguson S J. (eds). The Nitrogen and Sulphur Cycles[M]. Cambridge: Press Syndicate

of the University of Cambridge, 1988.245~279.

[2] Bonin P, Gilewicz M, Bertrand J C. Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*[J]. Can J Microbiol, 1989, **35**:1061~1064.

[3] Robertson L A, Kuenen J G. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1990, **57**:139~152.

[4] Patureau D, Godon J J, Dabert P, et al. *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions[J]. Int J Sys Bacteriol, 1998, **48**:775~782.

[5] Robertson L A, Van Niel E D W J, Torremans Rob A M, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha* [J]. Appl Envir Microbiol, 1988, **54**(11):2812~2818.

[6] Scholten E, Lukow T, Auling G, et al. *Thaurea mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant[J]. Int J Sys Bacteriol, 1999, **49**:1045~1051.

[7] Takaya N, Catalan-Sakairi M A B, Sakaguchi Y, et al. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide [J]. Appl Envir Microbiol, 2003, **69**(6):3152~3157.

[8] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.349~399.

[9] 马放,任南琪,杨基先.污染控制微生物学实验[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2002.

[10] Devereux R, Willis S G. Amplification of ribosomal RNA sequences. Molecular microbial ecology manual[M]. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1995. 1~11.

[11] Damiani G, Amedeo P, Bandi C, et al. Bacteria identification by PCR-Based Techniques[A]. In: Chapter 10, Microbial Genome Methods[M]. CRC Press, 1996. 167~177.

[12] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. Mol Biol Evol, 1987, **4**:406~425.

[13] Wilson L P, Bouwer E J. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 1997, **18**:116~130.

[14] Huang H K, Tseng S K. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, **55**(1): 90~94.

[15] Patureau D, Bernet N, Delgenes J P, et al. Effect of dissolved oxygen and carbon-nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, **54**: 535~542.

[16] Su J J, Liu B Y, Lin J, et al. Isolation of an aerobic denitrifying bacterial strain NS-2 from the activated sludge of piggery wastewater treatment systems in Taiwan possessing denitrification under 92% oxygen atmosphere [J]. J Appl Microbiol, 2001, **91**:853~860.