

络合协同 RDB 处理 NO_x 系统中 1 株反硝化菌的分离鉴定

徐飞, 陈浚*, 吴石金, 蒋轶锋, 陈建孟

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310032)

摘要:从处理效率稳定在 85% 的 NO_x 废气络合处理系统——生物转鼓(rotating drum biofilter, RDB)中分离到 1 株异养型兼氧反硝化细菌,命名为菌株 ND1。理化分析表明,ND1 为革兰氏染色阴性杆菌,在培养基上可形成特征性干燥、皱缩样菌落,黏附于琼脂表面,并产生黄色色素,以单极生鞭毛运动。其 16S rDNA 基因序列与典型的反硝化菌 *Pseudomonas stutzeri* 具有 97% 的相似性,综合其外部形态特征、生理生化特征、Biolog 碳源利用特性以及 16S rDNA 系统发育学分析,ND1 鉴定为 *Pseudomonas stutzeri*。在 30℃, pH 7.2 的培养条件下,以琥珀酸钠为碳源,5 d 后该菌对硝酸根离子的去除率可以达到 100%,对相同浓度的亚硝酸根离子的去除率达到 85%。

关键词:生物转鼓;兼氧反硝化细菌;16S rDNA 序列;*Pseudomonas stutzeri*;系统发育学

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)07-1667-05

Identification and Phylogenetic Analysis of an Isolated Denitrifier from Rotating Drum Biofilter

XU Fei, CHEN Jun, WU Shi-jin, JIANG Yi-feng, CHEN Jian-meng

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China)

Abstract: A heterotrophic denitrifying strain named ND1 has been isolated from rotating drum biofilter(RDB) which was mainly used for the treatment of exhaust gas such as NO_x . It was proved to be Gram-negative. In addition, it was able to form dry and wrinkled colonies on the medium, adhere on the agar surface, produce yellow pigments and be motile with a single polar flagellum. It was indentified as the *Pseudomonas stutzeri* according to morphological and physiological biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. Under the conditions of pH 7.2 and temperature 30℃, the NO_3^- -N removal efficiency by ND1 was up to 100% in 5 days, while the NO_2^- -N degradation ratio was only 85% by the strain DN1 when subjected to the same condition as the above.

Key words: rotating drum biofilter(RDB); heterotrophic anoxic denitrifier; 16S rDNA sequence; *Pseudomonas stutzeri*; phylogenetic analysis

氮氧化物(NO_x ,其中 NO 占 95%)是导致酸雨、光化学烟雾等一系列严重大气污染的主要污染物之一,我国不少地区 NO 污染日益严重,沿海部分工业发达地区大气污染物中 NO 浓度从 1996~2002 年增加了 42%^[1],若不采取有效控制措施,到 2020 年将达到 2 363~2 914 万 t,将超过美国成为世界第一大 NO_x 排放国^[2]。随着 NO_x 污染问题的日趋严重和人们对环境质量要求的不断提高,有关废气脱氮技术的研究已迫在眉睫,利用微生物技术处理废气的研究始于 20 世纪 80 年代,由于其具有投资运行成本低、无二次污染、适用于大气量低浓度废气净化等优点,已经成为国际上工业废气净化研究的热点课题^[3]。生物转鼓过滤器^[4~6](rotating drum biofilter, RDB)由密封外壳、内置生物填料转鼓和营养液槽 3 个部分构成。气态污染物进入外壳内空腔,经过生物转鼓中微生物的降解后,由转鼓内空心轴轴向排出。由于烟气中的 NO_x 主要以难溶于水的 NO 存在,NO

在液相中的低溶解度降低了 NO 在 RDB 中的传质效果,不能更好地被微生物降解利用,从而影响其去除效率。乙二胺四乙酸(EDTA)是一种重要的络合剂,它能与 NO 结合成络合物,使 NO 从气相转入液相,络合物协同强化了 NO 气液传质的过程,减小了 NO 传质过程中的液膜阻力,大大加快了气液传质速率^[7,8],然后 NO_x 在微生物代谢作用下被转化为无害的物质^[9~11]。因此采用微生物学和分子生物学方法分离、筛选、鉴定本系统内的反硝化菌种,可为 RDB 反硝化净化 NO 废气的实际应用奠定基础^[12]。

本研究在 RDB 实现稳定处理 NO_x 效果的基础上,对系统中的主要反硝化细菌进行了分离筛选,获

收稿日期:2009-09-15;修订日期:2010-01-06

基金项目:国家自然科学基金项目(20776134);浙江省自然科学基金项目(Y5080142)

作者简介:徐飞(1983~),男,硕士研究生,主要研究方向为含氮废气的处理,E-mail:xfddhx@163.com

* 通讯联系人,E-mail:bec@zjut.edu.cn

得了1株兼氧反硝化细菌,命名为菌株ND1.通过生理生化实验、Biolog碳源利用特性、16S rDNA序列分析,对分离筛选获得菌株进行了鉴定.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

取自稳定运行的RDB系统(图1),选用多孔泡沫聚醚型聚氨酯(PU-foam)作为生物填料,孔径为2.5孔·cm⁻¹.

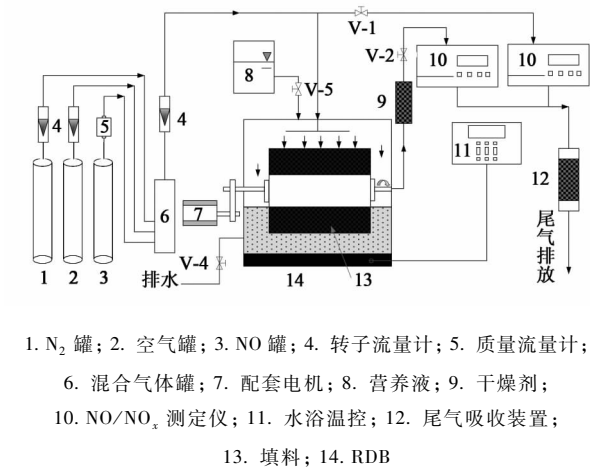


图1 RDB系统流程示意

Fig.1 Diagram of RDB system

运行条件如下:以葡萄糖作为碳源(C/N比为2.5),NO进气浓度400 mg·L⁻¹,进气流量0.1 m³·h⁻¹,温度为30℃,转速0.5 r·min⁻¹、pH维持在7~8、营养液2 L(表1),更换率0.5 L·d⁻¹,EDTA浓度为500 mg·L⁻¹.

表1 营养液的组成

Table 1 Component of nutrient solution

物质	浓度/mg·L ⁻¹	物质	浓度/mg·L ⁻¹
C ₆ H ₁₂ O ₆	10 000	CuSO ₄	1
KH ₂ PO ₄	500	FeSO ₄	1
K ₂ HPO ₄	500	MnSO ₄	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100	Na ₂ MoO ₄	1
CaCl ₂	50	ZnCl ₂	2

1.2 反硝化菌的分离筛选

1.2.1 培养基的组成

分离培养基:琥珀酸钠10 000 mg·L⁻¹,KH₂PO₄ 1 000 mg·L⁻¹,K₂HPO₄ 1 000 mg·L⁻¹,MgSO₄·7H₂O 200 mg·L⁻¹,CuSO₄ 1 mg·L⁻¹,FeSO₄ 1 mg·L⁻¹,MnSO₄ 5 mg·L⁻¹,Na₂MoO₄ 1 mg·L⁻¹,ZnCl₂ 2 mg·L⁻¹,BTB(1%溴百里酚蓝溶于酒精) 1 mg·L⁻¹,琼脂 20 000 mg·L⁻¹,NaNO₃ 1 000

mg·L⁻¹,pH 7.2,121℃灭菌20 min.

复筛培养基:琥珀酸钠10 000 mg·L⁻¹,KH₂PO₄ 1 000 mg·L⁻¹,K₂HPO₄ 1 000 mg·L⁻¹,MgSO₄·7H₂O 200 mg·L⁻¹,CuSO₄ 1 mg·L⁻¹,FeSO₄ 1 mg·L⁻¹,MnSO₄ 5 mg·L⁻¹,Na₂MoO₄ 1 mg·L⁻¹,ZnCl₂ 2 mg·L⁻¹,NaNO₃ 1 000 mg·L⁻¹,pH 7.2,121℃灭菌20 min.

1.2.2 反硝化菌的筛选

从转鼓中取1 g生物填料投入99 mL无菌水并带有玻璃珠的三角瓶中,振荡使样品与水充分混匀然后用无菌吸管吸取1 mL悬液到另一个盛有9 mL的无菌水试管中,混合均匀依此类推制成10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷不同稀释度的溶液,取不同浓度的溶液50 μL涂布到分离培养基上,然后30℃培养1~3 d,挑取周围有蓝色晕圈的单菌落.经多次划线纯化后分别接入复筛培养基中测定反硝化能力,将筛出的菌株斜面保存.

1.2.3 形态学观察

将ND1接种至固体斜面培养基上,30℃培养12 h后进行扫描电镜观察.

1.3 16S rDNA的PCR扩增和测序

PCR扩增:吸取一定量培养24 h的菌悬液到eppendorf管中,离心之后用DNA提取试剂盒获得菌株的DNA用于PCR扩增.16S rDNA的PCR反应的引物为一对通用引物正向引物BSF8/20:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(Escherichia coli的16S rDNA对应位置为8-27);反向引物BSR1541/20:5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'(Escherichia coli的16S rDNA对应位置为1541-1522).PCR反应体系^[13](50 μL):引物BSF8/20和引物BSR1541/20各1 μL,模板DNA 1.75 μL,10×PCR缓冲液5 μL,MgCl₂(25 mmol·L⁻¹)3 μL,dNTP(2.5 mmol·L⁻¹)4 μL,Taq酶(5 U·μL⁻¹)0.25 μL,重蒸水34 μL.PCR程序如下:94℃预变性2 min;94℃ 1 min,54℃退火1 min,72℃延伸3 min,经30个循环后72℃延伸10 min.PCR产物纯化和测序由宝生物工程(大连)有限公司完成,自备引物.

系统发育分析:通过测序获得1 438 bp长度的片段,将获得的16S rDNA序列通过Blast程序与GenBank中核酸数据进行比对分析,用多序列对比工具ClustalX 1.8对选取的序列进行对比,然后通过MEGA 4软件用N-J法构建进化树.

1.4 反硝化活性测试

分别以硝酸根和亚硝酸根为唯一氮源(初始浓度 400 mg·L⁻¹),按 1% 接 ∇ 加入 D_{600} 为 0.4 的菌液于复筛培养基中,摇床培养,隔 24 h 用分光光度法测定菌体生长量,用离子色谱法检测硝酸根及亚硝酸根离子浓度.

2 结果与分析

2.1 菌株 ND1 的形态特征

菌株 ND1 在分离培养基平板上培养 24 h 后形成特征性干燥、皱缩样菌落,黏附于琼脂表面,可产生黄色色素,以单极生鞭毛运动.革兰氏染色阴性,长杆状,菌体大小为(0.5~1.1×1.5~2.3)μm(图 2).



图 2 菌株 ND1 的电镜扫描图(×50 000)
Fig.2 SEM photo of strain ND1

2.2 生理生化特征

经 Biolog 碳源利用特性检测,菌株 ND1 可以利用 96 种碳源中的 34 种,与数据库中的 *Pseudomonas stutzeri* 匹配可能性为 100%,在有氧条件下可还原硝酸盐和亚硝酸盐,具有反硝化作用.具体的生化特征^[14]见表 2.

表 2 ND1 主要的生化特征¹⁾

Table 2 Chemical and physical characteristic of ND1	
鉴定指标	ND1 菌株
接触酶试验	+
氧化酶试验	+
荧光色素试验	-
甲基红试验	-
V-P 试验	-
明胶液化试验	-
硫化氢试验	-
淀粉水解试验	+
精氨酸双水解试验	-

1) +:阳性或有反应;-:阴性或没有反应

2.3 菌株的系统发育分析

测序后,得到长度为1 438 bp 菌株的 16S rDNA 的序列.通过 Blast 比对发现 ND1 与假单胞菌属中的 *Pseudomonas stutzeri* 相似性达 97%,申请序列号

GQ401024,得到的系统进化发育树结构如图 3,其中脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)被定义为外群.从系统发育树上来,菌株 ND1 与 *Pseudomonas stutzeri* 菌的遗传距离最近,而且结合生理生化特征分析,故确定菌株 ND1 与 *Pseudomonas stutzeri* 菌关系最近,与之前相关文献报道的结果相似^[15-17],这对于生物转鼓中菌落结构的组成是一种新的探索.

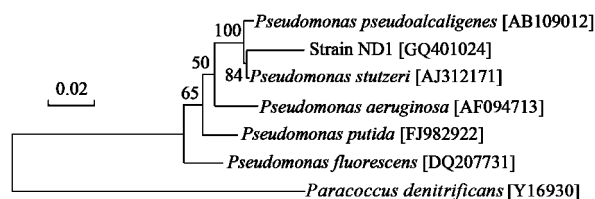


图 3 基于 16S rDNA 序列同源性用 Neighbor-Joining 法构建的菌株 ND1 和其他相关细菌的系统发育树

Fig.3 Phylogenic tree of strain ND1 and other closely related species based on the 16S rDNA sequence by Neighbor-Joining

2.4 菌株 ND1 的反硝化能力

在分别以硝酸钠和亚硝酸钠为唯一氮源的复筛培养基中,按 1% 接 ∇ 加入 D_{600} 为 0.4 的菌液,利用离子色谱检测硝酸及亚硝酸根离子浓度,同时 D_{600} 测定菌体生长量.菌体生长曲线及溶液中硝酸根、亚硝酸根浓度的变化曲线如图 4 所示.由图 4(a)可知,在以硝酸钠为唯一氮源时,48 h 内硝酸盐浓度被降解 80% 左右,亚硝酸盐浓度在这一时期内达到 40 mg·L⁻¹ 的最高值,4 d 后硝酸盐被完全降解.由图 4(b)可知,在以亚硝酸钠为唯一氮源时,48 h 内也能达到 80% 左右的降解率,但在培养的第 1 d 只降解了 12%,这与硝酸钠为氮源第 1 d 的降解率 36% 形成鲜明对比,这说明在以亚硝酸这种具有毒性的物质作为氮源时,ND1 需要一定的适应时间,而从接下来的降解效率来看,高浓度的亚硝酸盐并没有杀死或抑制其反硝化过程,反而在适应之后菌体生长达到峰值,从而使亚硝酸浓度迅速下降.在两组实验中,其反硝化作用都主要发生在对数生长期,这是因为细菌在这个时期生长速度达到最大,细胞合成所需要的能量和还原力主要在这一阶段被消耗,所以对数生长期是反硝化效率最高的时期.在转鼓环境中由于 NO_x 废气在络合作用下转入液相形成离子形式的硝酸根亚硝酸根,亚硝酸根离子对于一般微生物具有毒性作用,而 ND1 在含有高浓度的亚硝酸根溶液中虽然开始需要一定时间的适应,但在短时间内依然可以达到较高的降解能力,这对于保护转鼓中其他菌群的活性以及反硝

化过程中从离子状态的亚硝酸根到气态的氮化物的转变非常重要. 亚硝酸盐在几天后依然维持在一定浓度, 这可能是培养中营养物质如碳源等被不断利用, 营养物浓度逐渐降低, 最后成为限制性因素, 故细菌无法获得足够的营养物质来合成足够的酶系, 因此它的降解能力受限, 从而导致亚硝酸盐的浓度保持不变.

2.5 讨论

ND1 菌株是典型的兼氧反硝化细菌, 在不同氧

浓度的条件下反硝化作用并无明显变化, 氧不是抑制反硝化酶活性和反硝化酶生成的直接因素, 这和文献[18,19]的研究具有相似性. ND1 的反硝化作用主要发生在指数期, 在分别以 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸根和亚硝酸根作为唯一氮源时, 2 d 内降解率可以达到 80% 左右, 5 d 后硝酸根降解完全, 亚硝酸根也达到了 85% 的降解效果. ND1 对亚硝酸这种具有毒性的物质具有一定的适应性, 能够降解高浓度的亚硝酸盐.

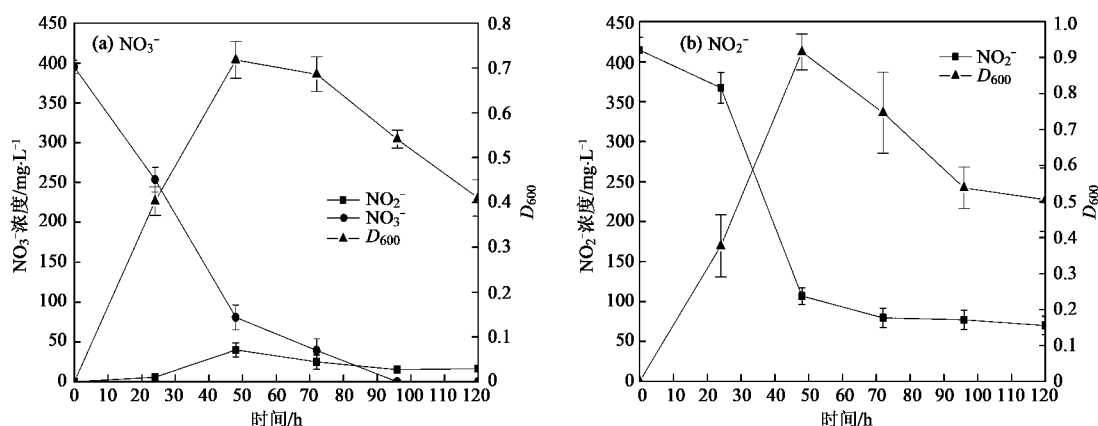


图4 菌株分别以 NO_3^- 和 NO_2^- 为唯一氮源的反硝化作用

Fig.4 Denitrification of strain ND1 utilizing different sole nitrogen source

3 结论

(1) 综合菌株的外部形态特性、生理生化特性、Biolog 碳源利用特性以及菌株的 16S rDNA 系统发育分析, 从处理效率稳定在 85% 的厌氧 NO_x 生物转鼓过滤器中筛选到的 ND1 菌株为施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*).

(2) 对微生物的纯培养以及反硝化性能的测定, 再还原回生物转鼓系统, 这既是对生物转鼓中菌落结构的组成是一种新的探索, 也为反硝化工艺的设计提供生物学参数.

参考文献:

- [1] Richter A, Burrows J P, Nuss H, et al. Increase in tropospheric nitrogen dioxide over China observed from space [J]. Nature, 2005, **437** (7055): 129-132.
- [2] 郝吉明, 田贺忠. 中国氮氧化物排放现状、趋势及控制对策 [EB/OL]. <http://www.dsdne.org.cn/html/jishuwenzhang/2006/0809/848.html>, 2006.
- [3] Jin Y M, Veiga M C, Kennes C. Bioprocesses for the removal of nitrogen oxides from polluted air [J]. J Chem Technol Biot, 2005, **80** (5): 483-494.
- [4] Patwardhan A W. Rotating biological contactors: A review [J]. Ind Engineering Chemistry Research, 2003, **42**: 2035-2051.

- [5] Yang C, Suidan M T, Zhu X. Comparison of single-layer and rotating drum biofilters for VOC removal [J]. Environl Progr, 2003, **22**: 87-94.
- [6] Yang C, Suidan M T, Zhu X. Removal of a volatile organic compound in a hybrid rotating drum biofilter [J]. J Environ Eng, 2004, **130**: 282-291.
- [7] Li W, Wu C Z, Zhang H S. Evaluation of microbial reduction of $\text{Fe}(\text{III})$ EDTA in a chemical absorption-biological reduction integrated NO_x removal system [J]. Environ Sci Technol, 2007, **2**: 639-644.
- [8] Van Der Maas P, Harmsen L, Weelink S. Denitrification in aqueous FeEDTA solutions [J]. J Chem Technol Biot, 2004, **79**: 835-841.
- [9] Wang J D, Wu C Q, Chen J M. Denitrification removal of nitric oxide in a rotating drum biofilter [J]. Chem Eng J, 2006, **121**: 45-49.
- [10] Chen J, Jiang Y F, Sha H L, et al. Effect of key parameters on nitric oxide removal by an anaerobic rotating drum biofilter [J]. Environ Technol, 2008, **29** (11): 1241-1247.
- [11] Chen J, Jiang Y F, Chen J M, et al. Dynamic model for nitric oxide removal by a rotating drum biofilter [J]. J Hazard Mater, 2009, **168**: 1047-1052.
- [12] Chen J, Wang Z Y, Jiang Y F, et al. Assessment of the bacterial community for denitrifying removal of nitric oxide in a Rotating Drum Biofilter by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis [J].

- Environ Eng Sci, 2009, **26**(7):1189-1196.
- [13] Geets J, Cooman M D, Wittebolle L, *et al.* Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **75**:211-221.
- [14] 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.
- [15] Kariminiaae-Hamedani H R, Kanda K, Kata F. Denitrification activity of the bacterium *Pseudomonas* sp. ASM-2-3 isolated from the Ariake Sea Tideland [J]. J Biosci Bioeng, 2004, **97**(1):39-44.
- [16] Diep C N, Cam P M, Vung N H, *et al.* Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment [J]. Bioresource Technol, 2009, **100**:3787-3791.
- [17] Shi H Z, Li W, Cheng Z W, *et al.* Reduction of Fe(II)EDTA-NO by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain DN-2 in NO_x scrubber solution [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **76**:1181-1187.
- [18] 王宏宇, 马放, 苏俊峰, 等. 好氧反硝化菌株的鉴定及其反硝化特性研究[J]. 环境科学, 2007, **28**(7):1548-1552.
- [19] 苏俊峰, 王继华, 马放, 等. 好氧反硝化细菌的筛选鉴定及处理硝酸盐废水的研究[J]. 环境科学, 2007, **28**(10):2332-2335.

关于反对个别作者一稿两投行为的联合声明

为保证所发表论文的首创性和学术严谨性,《环境科学》、《中国环境科学》、《环境科学学报》编辑部和《Journal of Environmental Sciences》编辑部特发表如下联合声明。

我们明确反对个别作者的一稿两投或变相一稿两投行为。自即日起,我们各刊在接受作者投稿时,要求论文全体作者就所投稿件作出以下承诺(附在投稿上):

1) 来稿所报道的研究成果均系全体作者的原创性研究成果,文中报道的研究成果(含图、表中数据的全部或部分)未曾发表亦未曾投其它科技期刊。

2) 在接到所投期刊编辑部关于稿件处理结果之前,所投稿件的全部或部分内容不再投其它科技期刊。

我们将认真对待作者所作的上述承诺,并建立信息共享机制,对违背上述承诺的作者(包括在文中署名的全体作者)采取联合行动。

净化学术环境、促进学术繁荣是学术期刊作者和编者的共同责任。我们诚恳地希望广大作者能够了解我们的上述立场和做法,并积极宣传和配合。

《环境科学》编辑部

《中国环境科学》编辑部

《环境科学学报》编辑部

《Journal of Environmental Sciences》编辑部