ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第39卷 第7期

Vol.39 No.7

2018

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第39卷 第7期
2018年7月15日

目 次

第 39 卷第 7 期
2018 年 7 月
环 境 科 学
ENVIRONMENTAL SCIENCE
Vol. 39, No. 7
Jul. ,2018

耐冷嗜碱蒙氏假单胞菌 H97 的鉴定及其好氧反硝化特性

蔡茜,何腾霞,冶青,李振轮*
(西南大学资源环境学院, 土壤多尺度界面过程与调控重庆市重点实验室, 重庆 400716)

摘要: 结合形态、磷脂脂肪酸及 16S rRNA 基因序列分析鉴定了分离自贵州冬水田的好氧反硝化菌株 H97,采用模拟废水探讨了不同温度、接菌量、C/N、初始 pH 和碳源种类对菌株 H97 反硝化能力的影响. 结果表明,菌株 H97 为蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*),目前国内外尚无蒙氏假单胞菌具有耐冷嗜碱好氧反硝化作用的研究报道,是对好氧反硝化菌的补充; 该菌的最适脱氮条件为 15℃、pH 9.0、C/N 15、接种量 1.5×10^{6} CFU·(100 mL)$^{-1}$,碳源丁二酸钠. 此外,菌株 H97 在 pH 为 7.0~11.0 时,均表现出良好的脱氮能力,对硝酸盐氮和总氮的去除率分别可达 91.21% 和 79.10% 以上,初始 pH 为 12.0 时,对硝酸盐氮和总氮的去除率仍分别达 64.75% 和 36.78%,表现出了较强耐碱能力. 在初始硝酸盐氮浓度为 50.0 mg·L^{-1} 和最适脱氮条件下,菌株 H97 在 48 h 内对硝酸盐氮和总氮的去除率可达 97.69% 和 96.32%. 同时, H97 对温度适应范围广,在 15~40℃ 均具有较强好氧反硝化能力,是 1 株耐冷嗜碱好氧反硝化细菌,在碱性氮污染水体处理中具有较好的应用潜力.

关键词: 耐冷; 嗜碱; 蒙氏假单胞菌; 脱氮; 反硝化特性
中图分类号: X172 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2018)07-3314-07 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201709265

Identification and Characterization of a Hypothermic Alkaliphilic Aerobic Denitrifying Bacterium *Pseudomonas monteilii* Strain H97

CAI Xi, HE Teng-xia, YE Qing, LI Zhen-lun*
(Chongqing Key Laboratory of Soil Multiscale Interfacial Process, College of Resources and Environments, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Low temperatures and high pH generally inhibit bio-denitrification. Thus, it is important to explore psychrotrophic and alkali-resistant microorganisms for nitrogen degradation. This study mainly focused on the identification of an alkaliphilic strain and preliminary exploration of its denitrification characteristics. Based on morphological observations, phospholipid fatty acids and 16S rRNA gene sequence analysis, strain H97, which was isolated from the winter paddy field in Guizhou province, was identified as *Pseudomonas monteilii*. Till date, there were few reports about the denitrification characteristics of *Pseudomonas monteilii*. The effects of environmental factors such as temperature, inoculation quantity, C/N ratio, initial pH, and carbon source were investigated using simulated wastewater. The optimum conditions for nitrate and total nitrogen removal by H97 were: inoculum size 1.5×10^{6} CFU·(100 mL)$^{-1}$; initial pH 9.0; C/N = 15; 15℃; and sodium succinate as the carbon source. The nitrate and total nitrogen removal efficiencies were 97.69% and 96.32%, respectively, at optimum conditions with an initial nitrate nitrogen concentration of 50.0 mg·L^{-1}. The temperature experiments indicated that the optimal temperature for highest nitrogen removal efficiency was 15℃, and that the strain H97 could survive in a wide range of 15-40℃. Additionally, the nitrate and total nitrogen efficiencies at the initial pH value of 7.0-11.0 were 91.21% and 79.10%, respectively, and the denitrification capacity then decreased to 64.75% at the initial pH 12.0. These results indicated that strain H97 showed cold and alkali resistance, which suggests an application potential for the treatment of alkaline nitrogen polluted water in the southern winter.

Key words: hypothermia; alkaliphilic; *Pseudomonas monteilii*; nitrogen removal; denitrification characteristics

好氧反硝化细菌因其具有适应性较强、生长速度快、容易控制等优点,而受到国内外研究者的青睐[1]. 目前,已有大量好氧反硝化细菌的研究报道,其中以假单胞菌属最多[2],主要有斯氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)[3]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)[4]、托拉斯假单胞菌(*Pseudomonas tolaasii*)[5] 和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)[6]等. 而国内外关于好氧反硝化蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*)的研究报道很少,仅有张文艺等[7]和冯雅丽等[8]的研究报道. 而张文艺等未报道该蒙氏假单胞菌 N1 的反硝化特性; 冯雅丽等发现的蒙氏假单胞菌 YL-1 在 pH 大于 9.0,温度低于 25℃ 或高于 35℃ 时,基本丧失

收稿日期: 2017-09-28; **修订日期**: 2018-01-12
基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC0404705); 重庆市研究生科研创新项目(CYB17063)
作者简介: 蔡茜(1992~),女,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物,E-mail:yxcaix@163.com
* 通信作者,E-mail:lizhlun4740@sina.com

对硝酸盐氮的反硝化能力.

事实上,脱氮生物菌易受外在环境影响,环境中的温度和酸碱性就是影响生物脱氮的重要因素. 目前报道的脱氮微生物大多数是在 20 ~ 35℃、中性或微碱性条件下进行,对低温、过酸或过碱的环境条件耐受性较弱. 如菌株 *Pseudomonas stutzeri* F1[9]在温度低于20℃或 pH 值大于 8.0 的条件下,其生长与反硝化脱氮作用均受到抑制; 菌株 *Pseudomonas* sp. 2-8[10]在温度低于20℃或 pH 值大于 9.0 的条件下,基本丧失反硝化能力. 而现实中碱性氮污染废水的来源广泛,如生产化肥的废水 pH 值达 8.0 ~ 10.0[11]; 生产石油树脂的废水 pH 值可达 11.0 ~ 13.0[12]. 因此,研究耐冷嗜碱高效生物脱氮菌对处理南方地区冬季碱性废水中的氮污染具有重要意义.

本实验从贵州冬水田中分离获得 1 株具有好氧反硝化作用的菌株 H97,结合形态学、磷脂脂肪酸及 16S rRNA 基因序列分析,该菌被鉴定为蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*),通过环境因子对菌株生物脱氮的影响发现,该菌在 15 ~ 40℃ 和 pH 7.0 ~ 12.0 范围内均能进行高效的脱氮作用,研究结果为南方地区冬季碱性废水中氮污染生物处理提供了一种选择,以期为此后该菌的具体应用奠定基础.

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株来源

新分离菌株 H97 为本实验室从贵州省冬水田中分离筛选获得.

1.1.2　培养基

(1) BTB 培养基(bromothymol blue, BTB)[13]: $NaNO_2$ 1.0 g·L^{-1}, KH_2PO_4 1.0 g·L^{-1}, $FeCl_2·6H_2O$ 0.5 g·L^{-1}, $CaCl_2·7H_2O$ 0.2 g·L^{-1}, $MgSO_4·7H_2O$ 1.0 g·L^{-1},琥珀酸钠 8.5 g·L^{-1}(固体加 2.0% 的琼脂),BTB(1.5% 溴百里酚蓝溶于无水乙醇)1mL,调节 pH 至 7.2.

(2) 反硝化培养基(DM)[14]: 乙酸钠 2.56 g·L^{-1}, $NaNO_3$ 0.31 g·L^{-1}, KH_2PO_4 1.5 g·L^{-1}, Na_2HPO_4 0.42 g·L^{-1}, $MgSO_4·7H_2O$ 1.0 g·L^{-1}, $FeSO_4·7H_2O$ 0.05 g·L^{-1},调节 pH 至 7.2.

(3) LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g·L^{-1},酵母粉 5.0 g·L^{-1}, NaCl 10.0 g·L^{-1},固体加 2.0% 的琼脂,调节 pH 至 7.2.

将上述所有培养基在 0.11 MPa、121℃ 条件下灭菌 30min,冷却后备用.

1.2　细菌鉴定

1.2.1　形态学特征观察

将分离纯化的菌株 H97 于 BTB 固体培养基上划线,在 15℃ 条件下培养,待长出菌落后观察其菌落形态,采用 AFM 原子力显微镜(DIMENSION ICON WITH SCANASYST,美国 BRUKER 公司)扫描观察菌体形态.

1.2.2　特异性磷脂脂肪酸鉴定

取纯化菌株 H97 进行皂化、甲基化、萃取以及碱洗涤后获得上机样品,用 Agilent 6850 气相色谱仪(FID 检测器)分析特异性磷脂脂肪酸(Phospholipid fatty acid, PLFA)的成分. 各脂肪酸成分通过 MIDI Sherlock 微生物鉴定系统(Version6.1, MIDI, Inc., Newark, DE)进行检测.

1.2.3　菌株 H97 的 16S rRNA 基因序列检测

以纯化菌株 H97 的基因组 DNA 为模板,采用通用引物 27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1492R(5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)进行 16S rRNA 聚合酶链式反应(PCR)扩增,将克隆产物送测序公司测序,将 16S rRNA 基因序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源性比较,以 Neighbor-Joining 法[15]构建系统发育树.

1.3　影响菌株 H97 好氧反硝化特性的因素分析

向装有 100 mL 反硝化培养基的 250 mL 三角瓶中接入菌株 H97,研究不同温度(5、10、15、20、25、30、35 和 40℃)、接菌量[0.5×10^6、1.0×10^6、1.5×10^6、2.0×10^6 和 2.5×10^6 CFU·(100 mL)$^{-1}$]、C/N 值(0、5、10、15、20 和 25)、初始 pH 值(6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 和 13.0)和碳源种类(柠檬酸钠、丁二酸钠、葡萄糖、蔗糖和乙酸钠)对菌株 H97 反硝化特性的影响. 以上处理均在 150 r·min^{-1}摇床条件下培养 48 h 后,测定菌株 H97 的生长、硝酸盐氮和总氮的浓度,并计算硝酸盐氮和总氮的去除率.

1.4　分析方法

本研究中,硝酸盐氮的测定采用紫外分光光度法[16],总氮的测定采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法[17],菌株的生长采用光度比浊法(D_{600}). 脱氮率计算方法如下:

$$R = [1 - (c_t/c_0)] \times 100\% \tag{1}$$

$$V = (c_0 - c_t)/t \tag{2}$$

式中,R 为氮的去除率,c_t 为终态氮浓度(mg·L^{-1}),c_0 为初始氮浓度(mg·L^{-1}),V 为氮的去除速率[mg·(L·h)$^{-1}$],t 为时间.

采用 Excel、SPSS Statistics 19.0、MEGA 6.0 和

Origin 8.6 软件对实验数据进行统计分析与作图.

2 结果与分析

2.1 细菌鉴定

2.1.1 形态学特征

在 BTB 固体培养基上观察到菌株 H97 的菌落形态特征为：圆形，呈黑色，表面湿润光滑，边缘整齐，中央略凸起，革兰氏染色为阴性. 经原子力显微镜扫描观察，结果如图 1 所示，菌体呈短杆状或椭球状，不产芽孢，无鞭毛.

2.1.2 特异性磷脂脂肪酸鉴定

磷脂脂肪酸(PLFAs)是微生物细胞膜的主要成分，不同类群微生物细胞膜的 PLFAs 存在差异，同种类群微生物 PLFAs 含量比较恒定[18]，它的种类和含量是细胞分类法的重要依据之一. 气相色谱能快速、灵敏、精确地检测出细菌细胞内的脂肪酸[19].

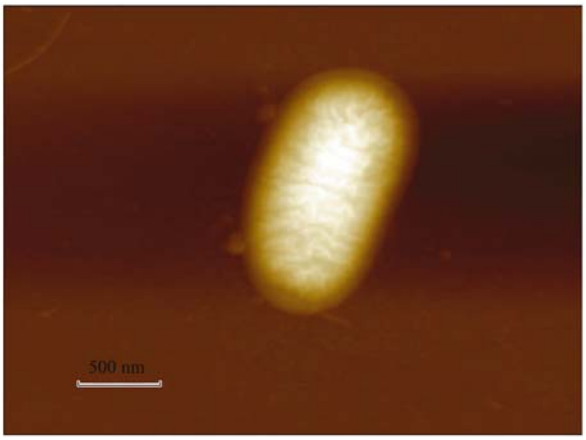

图 1 原子力显微镜扫描下的菌株 H97

Fig. 1 Strain H97 under the scanning atomic force microscope

本研究中，菌株 H97 的磷脂脂肪酸鉴定结果如表 1 所示，该菌株与 *Pseudomonas syringae* tomato 的相似性为 0.569.

表 1 特异性磷脂脂肪酸的鉴定结果

Table 1 Result of the specific phospholipid fatty acid identification

数据库	相似指数	菌种名称
RTSBA66.21	0.569	*Pseudomonas syringae* tomato
	0.444	*Pseudomonas fluorescens* biotype A
	0.432	*Pseudomonas syringae* maculicola
	0.423	*Pseudomonas syringae* syringae
	0.377	*Photobacterium angustum*
	0.368	*Pseudomonas fluorescens* biotype C/P
	0.444	*Pseudomonas fluorescens* biotype A
	0.432	*Pseudomonas syringae* maculicola
	0.423	*Pseudomonas syringae* syringae
	0.377	*Photobacterium angustum*
RCLIN66.20	0.359	*Neisseria cinerea* GC subgroup B
	0.300	*Chromobacterium violaceum*
	0.286	*Aeromonas veronii* GC subgroup B
	0.271	*Pseudomonas putida* biotype A
	0.232	*Arcobacter cryaerophilus*
MI7H103.80		(没有匹配)

2.1.3 16S rRNA 基因序列分析

菌株 H97 的 16S rRNA 基因全长 1 392 bp，在 GenBank 中的登录号为 KY927410，系统发育树如图 2 所示，该菌与 *Pseudomonas monteilii* 的同源性达

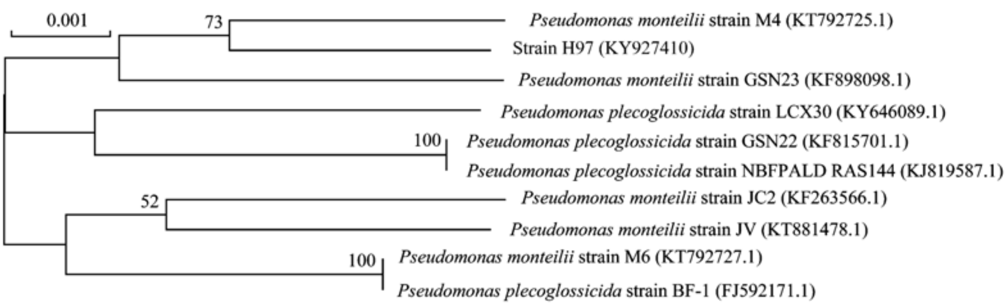

图 2 菌株 H97 的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain H97

99%. 基于磷脂脂肪酸鉴定的结果,在传统分类学上, *Pseudomonas monteilii* 属于丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)[20],这与该菌 16S rRNA 基因序列分析的结果一致. 因此,结合形态学、磷脂脂肪酸和 16S rRNA 基因序列分析的结果,可以将菌株 H97 确定为蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*).

2.2　影响菌株 H97 好氧反硝化特性的因素分析

2.2.1　温度对菌株 H97 反硝化特性的影响

如图 3 所示,当温度为 5℃和 10℃时,菌株 H97 几乎不能生长; 但当温度上升到 15℃时, 48 h 内,硝酸盐氮浓度由 52.73 $mg \cdot L^{-1}$ 下降至 11.02 $mg \cdot L^{-1}$,平均反硝化速率为 0.87 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,总氮的平均去除速率为 0.81 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,菌株 H97 对硝酸盐氮和总氮的去除率分别达 80.55% 和 73.18%; 当温度为 15 ~ 30℃范围内时,菌株 H97 的生长和脱氮效率基本保持不变; 当温度继续上升至 40℃时,菌株 H97 的生长和脱氮率逐渐降低,对硝酸盐氮和总氮的去除率分别为 63.60% 和 48.65%.

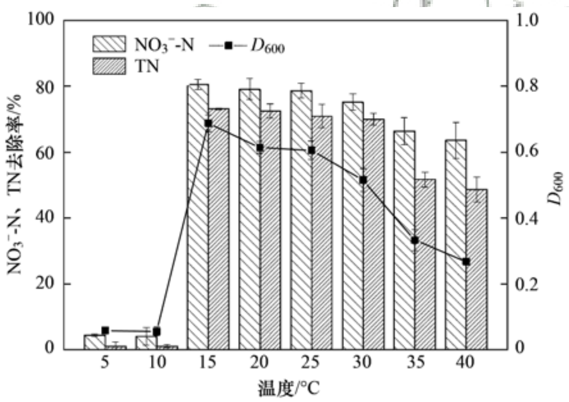

图 3　温度对菌株 H97 反硝化特性的影响

Fig. 3　Effects of temperature on the denitrification ability of strain H97

2.2.2　接菌量对菌株 H97 反硝化特性的影响

如图 4 所示,当接菌量为 0.5×10^6 CFU 时(每 100 mL 培养基),硝酸盐氮和总氮的去除率仅为 18.01% 和 17.23%; 但当接菌量上升至 1.5×10^6 $CFU \cdot (100\ mL)^{-1}$时, 48 h 内,硝酸盐氮浓度由 48.46 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$下降至 5.76 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,平均反硝化速率为 0.89 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,总氮的平均去除速率为 0.68 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,菌株 H97 对硝酸盐氮和总氮去除率分别达 88.12% 和 59.07%; 将接菌量继续增大到 2.5×10^6 $CFU \cdot (100\ mL)^{-1}$时,总氮的去除率下降到 57.82%. 因此,在实际应用中可以将菌株 H97 的接菌量控制在 $1.5 \sim 2.0 \times 10^6$ $CFU \cdot (100\ mL)^{-1}$.

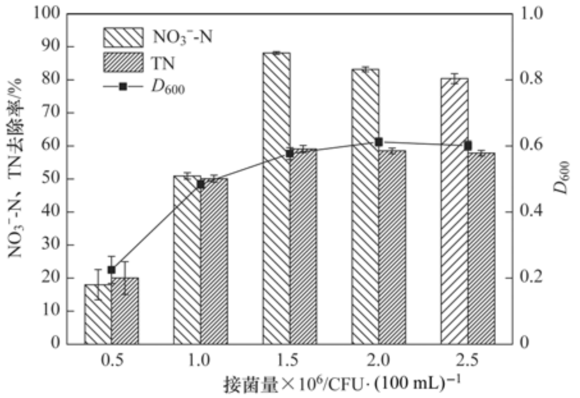

图 4　接菌量对菌株 H97 反硝化特性的的影响

Fig. 4　Effects of inoculation quantity on the denitrification ability of strain H97

2.2.3　C/N 对菌株 H97 反硝化特性的影响

如图 5 所示,当 C/N 小于 10 时,菌株 H97 的生长和反硝化活性受到一定程度的抑制,对硝酸盐氮的去除不完全,几乎不能去除总氮; 当 C/N 上升至 15 时,硝酸盐氮浓度由 50.93 $mg \cdot L^{-1}$ 下降至 0.44 $mg \cdot L^{-1}$,平均反硝化速率为 1.05 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,总氮的平均去除速率为 0.7 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,该菌对硝酸盐氮和总氮的去除率分别达 99.13% 和 61.42%; 当 C/N 大于 15 时,脱氮率呈下降趋势. 综合考虑,菌株 H97 的最佳 C/N 为 15.

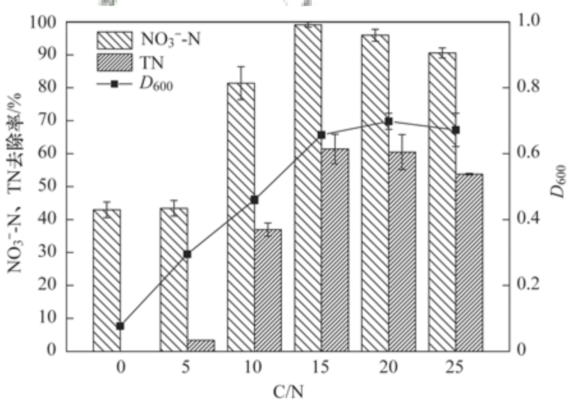

图 5　C/N 对菌株 H97 反硝化能力的影响

Fig. 5　Effects of C/N on the denitrification ability of strain H97

2.2.4　初始 pH 对菌株 H97 反硝化特性的影响

如图 6 所示,当 pH 为 6.0 时,不利于菌株 H97 的生长; 当 pH 7.0 ~ 11.0 时,菌株 H97 能很好生长,对硝酸盐氮和总氮的去除率较高,尤其 pH = 9.0 时,硝酸盐氮浓度由 50.92 $mg \cdot L^{-1}$ 下降到 0.47 $mg \cdot L^{-1}$,平均反硝化速率为 1.05 $mg \cdot (L \cdot h)^{-1}$,总氮由 53.44 $mg \cdot L^{-1}$下降至 4.39 $mg \cdot L^{-1}$,平均去除

速率 1. 02 mg·(L·h)$^{-1}$,该菌对硝态氮和总氮的去除率分别达 99. 07% 和 91. 78%; pH = 11. 0 时,菌株 H97 生长较好,脱氮效果较强; pH = 12. 0 时,其生长变弱,仍具有一定脱氮能力,对硝酸盐氮和总氮的去除率分别为 64. 75% 和 36. 78%.

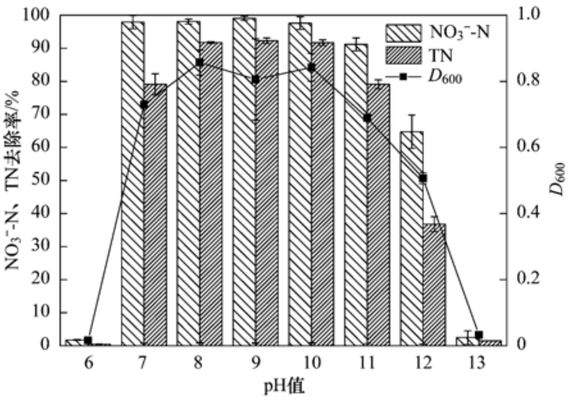

图 6 pH 对菌株 H97 反硝化能力的影响

Fig. 6 Effects of pH on the denitrification ability of strain H97

2. 2. 5 碳源种类对菌株 H97 反硝化特性的影响

如图 7 所示,碳源种类对菌株 H97 的生长及脱氮率的影响存在很大差异. 当以柠檬酸钠、丁二酸钠和乙酸钠为碳源时,菌株 H97 均能很好地生长,尤其以丁二酸钠为碳源时, 48 h 内,硝酸盐氮浓度由 50. 40 mg·L^{-1}下降至 1. 17 mg·L^{-1},平均反硝化速率达 1. 03 mg·(L·h)$^{-1}$,总氮由 55. 53 mg·L^{-1}下降至 2. 05 mg·L^{-1},平均去除速率为 1. 11 mg·(L·h)$^{-1}$,其对硝酸盐氮和总氮的去除率分别达 97. 69% 和 96. 32%; 当以葡萄糖为碳源时,其对总氮的去除率仅为 46. 42%; 而以蔗糖为碳源时,该菌几乎不能生长. 因此,综合考虑菌株 H97 的生长和脱氮效果,以及丁二酸钠价格昂贵,在实际污水处理中可以将柠檬酸钠或乙酸钠作为菌株 H97 的最佳碳源.

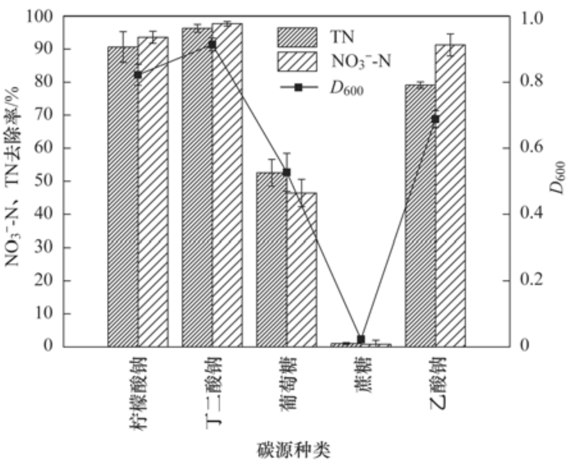

图 7 碳源种类对菌株 H97 反硝化能力的影响

Fig. 7 Effects of carbon source on the denitrification ability of strain H97

3 讨论

温度是影响微生物反硝化特性的重要因素之一,主要是通过影响微生物细胞结构来影响其生长和新陈代谢[21]. 一般地,好氧反硝化细菌的最适温度为 20 ~ 35℃, 如 Ye 等[22]报道了菌株 *Providencia rettgeri* strain YL 的最适脱氮温度为 25℃; 李卫芬等的研究表明[23],菌株 *Pseudomonas stutzeri* F1 在温度高于 35℃时,其生长和脱氮能力均受到抑制. 上述结论与本研究结果不同,菌株 H97 能够适应 15 ~ 40℃的环境温度,优于目前分离出的大多数好氧反硝化细菌; 该菌在 15℃时生长最好,脱氮率最高. 这可能是因为该菌分离自贵州长期淹水的冬水田泥土中,在 15℃实验条件下分离筛选获得,对低温环境的适应能力较强,在低温环境下能较好地进行脱氮作用. 因此,该菌为处理南方地区冬季氮污染水体提供了选择.

接菌量是影响细菌反硝化特性的重要因素之一. 在反硝化过程中,若接菌量不足则不能充分发挥微生物生长繁殖的潜力,导致脱氮效果差; 而接菌量过多会导致细菌对营养物质的竞争,部分细菌死亡,脱氮率降低. He 等的研究发现[24],当接菌量为 1.5×10^6 CFU 时,好氧反硝化细菌 *Arthrobacter arilaitensis* strain Y-10 对总氮的去除率最高(52. 5%),当接菌量上升至 2.5×10^6 CFU 时,总氮的去除率下降至 32. 27%,与本研究结果相似.

C/N 是菌株能否进行完全反硝化的关键因素,碳氮源的比例直接影响细菌的生长和对有机物质的去除效果. 若初始碳源充足,则能为细菌脱氮提供足够的能量; 若碳源不足,则不能提供足够的能量供细菌生长,导致反硝化效率降低[25]. 但当碳源高于细菌的需求时,其生长和脱氮率会保持在一个稳定水平,若继续增加碳源,脱氮效率不会有太大变化,甚至有下降趋势[26]. Duan 等的研究发现[27],菌株 *Vibrio diabolicus* SF16 对氮的去除率首先随 C/N 值的增大而升高,当 C/N 达 10 时去除率最高(93. 00% ±2. 31%),之后随 C/N 值的增大而降低. 菌株 H97 的最佳 C/N 为 15,但当 C/N 为 10 时,该菌依然可以表现出良好的脱氮效果,因此,在实际应用过程中,可通过延长生物脱氮时间,而达到良好的脱氮效果.

一般来说,过酸或过碱都会影响细菌的酶活性,

导致反硝化能力降低. 目前分离出的大多数好氧反硝化细菌最适 pH 为中性或偏碱性,在 pH = 11.0 时几乎不能生长,不表现反硝化活性或反硝化活性很低. Wang 等[28]对好氧反硝化假单胞菌 HS-N62 的研究表明,当 pH 达 10.0 时,其对硝酸盐氮的去除率不足 50%,与本研究结果不同,菌株 H97 能在 pH = 11.0 的碱性条件下高效脱氮, pH = 12.0 时,仍能生存和脱氮,具嗜碱特性,表明菌株 H97 对处理碱性环境中的氮污染水体具有应用价值.

在反硝化过程中,碳源作为电子供体和供微生物生长繁殖所需的营养物质,最终将硝酸盐氮还原成含氮气体,达到除氮效果[29]. 不同碳源在微生物代谢过程中的地位不同,菌株对其的利用率也不同[30]. 在本研究中,菌株 H97 对柠檬酸钠、丁二酸钠和乙酸钠的利用率较高,对葡萄糖的利用率较低,几乎不能利用蔗糖. 可能是由于结构越简单,分子量越小的碳源越容易被微生物降解,而且柠檬酸钠、丁二酸钠和乙酸钠是三羧酸循环的中间产物,更容易被菌株 H97 利用[31].

4　结论

(1)本实验从贵州冬水田中分离获得 1 株具有好氧反硝化作用的菌株 H97,结合形态学、磷脂脂肪酸及 16S rRNA 基因序列分析,该菌被鉴定为蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*).

(2)菌株 H97 具有较强好氧反硝化能力,在初始硝酸盐氮为 50 $mg \cdot L^{-1}$时,其最佳脱氮条件为:温度 15℃,接菌量为 1.5×10^6 CFU·(100 mL)$^{-1}$, pH 9.0, C/N = 15,碳源丁二酸钠.

(3)菌株 H97 能在 15 ~ 40℃范围内生存和脱氮,具有一定的耐冷特性,对环境温度适应范围较广; 在 pH = 12.0 时,仍能生长和脱氮,具嗜碱特性,表明菌株 H97 是 1 株耐冷嗜碱好氧反硝化细菌.

参考文献:

[1] Jin R F, Liu T Q, Liu G F, *et al*. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the marine origin bacterium *Pseudomonas* sp. ADN-42[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, **175**(4): 2000-2011.

[2] Ji B, Yang K, Wang H Y, *et al*. Aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* C3 incapable of heterotrophic nitrification [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, **38**(2): 407-409.

[3] Sun Y L, Feng L, Li A, *et al*. Ammonium assimilation: an important accessory during aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13[J]. Bioresource Technology, 2017, **234**: 264-272.

[4] 梁贤, 任勇翔, 杨垒, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 YL 的脱氮特性[J]. 环境科学, 2015, **36**(5): 1749-1756.
Liang X, Ren Y X, Yang L, *et al*. Characteristics of nitrogen removal by a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium YL[J]. Environmental Science, 2015, **36**(5): 1749-1756.

[5] 何腾霞, 徐义, 李振轮. 耐冷亚硝酸盐型反硝化菌 *Pseudomonas tolaasii* Y-11 的鉴定及其脱氮特性[J]. 微生物学报, 2015, **55**(8): 991-1000.
He T X, Xu Y, Li Z L. Identification and characterization of a hypothermia nitrite bacterium *Pseudomonas tolaasii* Y-11[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, **55**(8): 991-1000.

[6] Xu Y, He T X, Li Z L, *et al*. Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas putida* Y-9 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature[J]. BioMed Research International, 2017, **2017**: 1429018.

[7] 张文艺, 陈雪珍, 陆丽巧, 等. BAF 反应器中好氧反硝化菌的分子鉴定及分析[J]. 土木建筑与环境工程, 2012, **34**(1): 118-123.
Zhang W Y, Chen X Z, Lu L Q, *et al*. Molecular classification, identification and phylogenetic analysis of aerobic denitrifier N1 in the BAF reator[J]. Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering, 2012, **34**(1): 118-123.

[8] 冯雅丽, 李洪珊, 李浩然. 一株深海反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J]. 环境污染与防治, 2016, **38**(12): 27-30.
Feng Y L, Li H S, Li H R. Identification and denitrification characteristics of a deep sea denitrifier[J]. Environmental Pollution & Control, 2016, **38**(12): 27-30.

[9] Zhang H N, Wang H Y, Yang K, *et al*. Nitrate removal by a novel autotrophic denitrifier (*Microbacterium* sp.) using Fe(Ⅱ) as electron donor[J]. Annals of Microbiology, 2015, **65**(2): 1069-1078.

[10] 高喜燕, 刘鹰, 郑海燕, 等. 一株海洋好氧反硝化细菌的鉴定及其好氧反硝化特性[J]. 微生物学报, 2010, **50**(9): 1164-1171.
Gao X Y, Liu Y, Zheng H Y, *et al*. Identification and characteristics of a marine aerobic denitrifying bacterium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, **50**(9): 1164-1171.

[11] 孟范平, 姚瑞华, 刘强, 等. 利用纳米材料复合膜处理高浓度氯化铵废水[J]. 水处理技术, 2006, **32**(9): 52-55.
Meng F P, Yao R H, Liu Q, *et al*. Treatment of wastewater containing high strong ammonium chloride by nano membrane device[J]. Technology of Water Treatment, 2006, **32**(9): 52-55.

[12] 李积云. 浅析碱性废水处理方法[J]. 中国化工贸易, 2012, (11): 147.

[13] Guo Y, Zhou X M, Li Y G, *et al*. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*[J]. Biotechnology Letters, 2013, **35**(12): 2045-2049.

[14] Song Z F, An J, Fu G H, *et al*. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds[J]. Aquaculture, 2011, **319**(1-2): 188-193.

[15] 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.
Wang Z Y, Chen G Y, Jiang K, *et al*. Identification and denitrification characteristics of a psychrotolerant facultative basophilic aerobic denitrifier[J]. Environmental Science, 2014,

35(6): 2341-2348.

[16] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[17] HJ 636-2012, 水质 总氮的测定 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法[S].

[18] 李南洁, 曾清苹, 何丙辉, 等. 缙云山柑橘林土壤微生物磷脂脂肪酸(PLFAs)及酶活性的季节变化特征[J]. 环境科学, 2017, **38**(1): 309-317.
Li N J, Zeng Q P, He B H, *et al*. Seasonal variations of soil microbial PLFAs and soil enzyme activity under the citrus plantation in Mt. Jinyun, Chongqing [J]. Environmental Science, 2017, **38**(1): 309-317.

[19] 李正义, 贾俊涛, 曹际娟, 等. 一株分离自美国龙虾的麦氏弧菌的鉴定及其低温状态下细胞脂肪酸的变化[J]. 微生物学报, 2013, **53**(6): 628-634.
Li Z Y, Jia J T, Cao J J, *et al*. Identification of *Vibrio metschnikovii* from *Homarus americanus* and its changes in membrane fatty acid composition in response to low temperature [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, **53**(6): 628-634.

[20] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe E. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2 [M]. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1986.

[21] Qin W, Li W G, Zhang D Y, *et al*. Ammonium removal of drinking water at low temperature by activated carbon filter biologically enhanced with heterotrophic nitrifying bacteria[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, **23**(5): 4650-4659.

[22] Ye J, Zhao B, An Q, *et al*. Nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Environmental Technology, 2016, **37**(17): 2206-2213.

[23] 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.
Li W F, Fu L Q, Deng B, *et al*. Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier [J]. Environmental Science, 2011, **32**(8): 2403-2408.

[24] He T X, Li Z L. Identification and denitrification characterization of a novel hypothermia and aerobic nitrite-denitrifying bacterium, *Arthrobacter arilaitensis* strain Y-10[J]. Desalination and Water Treatment, 2016, **57**(41): 19181-19189.

[25] Kim J K, Park K J, Cho K S, *et al*. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains[J]. Bioresource Technology, 2005, **96**(17): 1897-1906.

[26] 孙庆花, 于德爽, 张培玉, 等. 1 株海洋异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. 环境科学, 2016, **37**(2): 647-654.
Sun Q H, Yu D S, Zhang P Y, *et al*. Identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain isolated from marine environment [J]. Environmental Science, 2016, **37**(2): 647-654.

[27] Duan J M, Fang H D, Su B, *et al*. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater [J]. Bioresource Technology, 2015, **179**: 421-428.

[28] Wang P, Yuan Y Z, Li Q, *et al*. Isolation and immobilization of new aerobic denitrifying bacteria [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, **76**: 12-17.

[29] Zheng H Y, Liu Y, Gao X Y, *et al*. Characterization of a marine origin aerobic nitrifying-denitrifying bacterium[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, **114**(1): 33-37.

[30] Yang X P, Wang S M, Zhou L X. Effect of carbon source, C/N ratio, nitrate and dissolved oxygen concentration on nitrite and ammonium production from denitrification process by *Pseudomonas stutzeri* D6 [J]. Bioresource Technology, 2012, **104**: 65-72.

[31] 杨新萍, 钟磊, 周立祥. 有机碳源及 DO 对好氧反硝化细菌 AD6 脱氮性能的影响[J]. 环境科学, 2010, **31**(6): 1633-1639.
Yang X P, Zhong L, Zhou L X. Effect of carbon source and dissolved oxygen on denitrification by aerobic denitrifier *Pseudomonas mendocina* AD6 [J]. Environmental Science, 2010, **31**(6): 1633-1639.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 39 No. 7

Jul. 15, 2018

CONTENTS