

脱氮硫杆菌的分离鉴定和反硝化特性研究

车轩^{1,2}, 罗国芝¹, 谭洪新^{1*}, 吴嘉敏¹, 蒋燕¹, 齐巨龙¹, 孙大川¹

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090; 2. 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 上海 200092)

摘要:从土壤中分离到 1 株高活性自养反硝化菌 TD, 并对其进行了鉴定和硝酸盐还原特性研究. 该菌株为革兰氏阴性短杆菌, 严格自养. 16S rDNA 序列分析表明, 该菌株与 *Thiobacillus denitrificans* 相似性为 99.85%. 结合生理生化特性和 16S rDNA 序列分析, 确定菌株 TD 为脱氮硫杆菌. 通过对该菌的生长特性和反硝化特性的研究表明, 该菌在初始 pH 为 6.85, 32.8℃ 培养条件下脱氮效果最佳; 在初始 pH 为 6.90, 29.5℃ 培养条件下生长最快. 该菌生长比较缓慢, 没有明显的稳定期, 对数生长期阶段的反硝化能力最强, 反硝化速率最快, 达到了 $2.245 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, 在培养过程中培养基 pH 值明显下降. 较高盐度对该菌株的反硝化活性有抑制作用. 该菌株的急性毒性实验结果显示, 脱氮硫杆菌对健康鱼体几乎无毒, 属于无毒性菌株.

关键词: 自养反硝化; 脱氮硫杆菌; 生理生化特性; 16S rDNA; 反硝化特性; 硝酸盐氮; 盐度; 毒性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)10-2931-07

Isolation, Identification and Denitrification Characterization of *Thiobacillus denitrificans*

CHE Xuan^{1,2}, LUO Guo-zhi¹, TAN Hong-xin¹, WU Jia-min¹, JIANG Yan¹, QI Ju-long¹, SUN Da-chuan¹

(1. College of Aqua-life and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 2. Fishery Machinery and Instrument Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200092, China)

Abstract: A autotrophic denitrifying bacterial strain, TD, was isolated from soil and the strain was identified and characterized. The strain was gram negative, strictly chemolithoautotrophic, and short rod shaped bacterium. The 16S rDNA sequence analysis revealed that strain TD had a similarity of 99.85% with *Thiobacillus denitrificans*. According to the morphologic, physiobiochemical characteristics and the analysis of its 16S rDNA, the strain was identified as *Thiobacillus denitrificans*. Studies showed that the optimal conditions for denitrification were pH 6.85 and 32.8℃, while the optimal growth conditions were pH 6.90 and 29.5℃. The bacteria grew slowly with no apparent stable phase. The maximal denitrification rate reached $2.245 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, which was found in exponential phase. In the process of the culture, the medium pH decreased significantly. Relatively high salinity restrained the denitrification activity of *Thiobacillus denitrificans*. The acute toxicity test results showed that *Thiobacillus denitrificans* was non-toxic.

Key words: autotrophic denitrification; *Thiobacillus denitrificans*; biochemical and physiological characters; 16S rDNA; denitrification characteristic; nitrate; salinity; toxicity

在循环水养殖系统 (recirculating aquaculture system, RAS) 的水环境控制中, 过去主要通过硝化作用将氨态氮转化为硝酸盐氮, 积累的最大硝酸盐氮浓度可高达 $400 \sim 500 \text{ mg/L}^{[1,2]}$, 而大量积累的硝酸盐氮主要通过换水等方式排出循环水养殖系统^[3]. 近年来, 硝酸盐氮对水生动物的毒性及净化工艺成为研究热点, 大量研究表明, 高浓度硝酸盐氮易导致水生动物的生长速度降低、易患病、发育迟缓、繁殖力降低、成活率降低^[4], 并建议将循环水养殖系统中的硝酸盐氮浓度控制在 $50 \text{ mg/L}^{[4]}$. 因此, 循环水养殖系统中硝酸盐氮浓度的控制十分重要.

尽管异养反硝化工艺研究较多, 但对于循环养殖水这种 C/N 低于 1 的特殊水体, 采用该工艺将导致运行费用高及运行管理困难等问题. 自养反硝化细菌, 特别是脱氮硫杆菌 (*Thiobacillus denitrificans*) 的发现引起了研究者的普遍关注^[5], 对自养反硝化的

报道, 主要集中在反硝化工艺方面, 而对于脱氮硫杆菌生理生化以及反硝化特性方面的报道较少^[6]. 脱氮硫杆菌作为硫自养反硝化菌, 其生物特性和硝酸盐降解特性的研究对于该菌在实际生产中的开发应用具有重要指导意义. 本研究通过定向富集, 从土壤中分离获得 1 株具有较高反硝化活性的化能自养菌 TD, 生理生化和分子生物学鉴定其为脱氮硫杆菌, 并在实验室条件下对该菌的反硝化特性进行了分析, 以期对循环水养殖系统中高浓度硝酸盐氮的控制提供理论依据.

收稿日期: 2007-10-20; 修订日期: 2007-12-11

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD03B06); 上海市重点学科建设项目 (Y1101)

作者简介: 车轩 (1981 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为养殖水污染控制, E-mail: dandan_zw@tom.com

* 通讯联系人, E-mail: hxtan@shfu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 细菌的富集、分离

1.1.1 培养基组成

基本培养基: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 g, KNO_3 2 g, KH_2PO_4 2 g, NaHCO_3 1 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 用蒸馏水定容至 1 L, 121℃ 灭菌 30 min 备用。

富集培养基按照 2× 基本培养基组成配制。

向基本培养基中加入 18 g/L 琼脂粉, 加热溶解后 121℃ 灭菌 20 min, 制作分离平板培养基。

1.1.2 样品来源与富集及分离

取上海市复兴岛公园内的土壤(约地表下 15 cm), 以 1 g/L 的比例放入富集培养基, 静态培养, 培养温度 28℃。定时转接, 富集培养物被系列稀释后涂布平板, 28℃ 培养, 根据菌落特征差异挑取单菌落于液体培养基再次培养。如此重复直至在显微镜下只能观察到单一的目的菌。将纯化菌种斜面划线培养并保存, 以备后用。

1.2 菌种的鉴定

1.2.1 分离菌株的透射电镜观察

1.2.2 菌种的生理生化鉴定

采用生化反应管测定分离菌株 TD 的生理生化指标, 并参考文献[7]进行鉴定。

1.2.3 16S rDNA 同源性

(1) 总 DNA 提取

取对数期的菌液 50 mL, 离心收集菌体, 抽提基因组总 DNA。加 500 μL 裂解缓冲液(50 mmol/L Tris pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Sucrose)重悬细胞, 再加入溶菌酶至终浓度 10 mg/mL, 37℃ 水浴 10 min。加入 SDS 至终浓度为 1% (质量分数), 蛋白酶 K 至终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 37℃ 继续处理 30 min。酚: 氯仿: 异戊醇(25:24:1)抽提, 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 最后用不含 DNase 的 RNase A 除去 RNA。DNA 样品可直接进行 PCR 扩增。

(2) 细菌 16S rDNA 全长序列的扩增

参照 Bosshard 等^[8]的方法进行。细菌通用引物序列如下: 8f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', 产生相应于大肠杆菌(*Escherichia coli*) 16S rDNA 序列核苷酸位置 8~1510 的 PCR 产物。25 μL PCR 反应体系中, 包括: 2.5 μL 10× PCR 反应缓冲液, 1 μL 2.5 mmol/L dNTP, 1 U *Taq* 酶, 各 1 μL 6.25 mmol/L 的上下引物, DNA 模板为 50 ng。PCR 反应经 95℃ 预变性 5 min

后, 进行 30 个循环: 95℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 延伸 2 min。最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物置于 -20℃ 下保存备用, 作为扩增分离菌种 16S rDNA 片断的模板。

(3) 16S rDNA 序列的鉴定

PCR 产物经连接, 转化, 阳性克隆筛选, 将含有正确转化片断的菌体培养液送至上海生物工程服务公司测序。最后将测定的序列提交 GenBank 数据库, 与数据库中已有的 16S rDNA 序列进行相似性比较分析, 并构建系统进化树。

1.3 温度和 pH 值对分离菌株生长和反硝化代谢的影响

1.3.1 分离菌株 TD 的最适生长 pH 值和最适反硝化 pH 值

在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 培养液, 硝酸盐氮浓度设定为 35 mg/L, 初始 pH 值依次调控至为 1、2、3、4、5、6、7、8、9, 在 28℃ 下以 120 r/min 振荡培养, 通过测定培养液的 *D* (optical density, $\lambda = 610$ nm) 值和硝酸盐氮降解率的变化来判断菌体的生长和代谢情况。

1.3.2 分离菌株 TD 的最适生长温度和最适反硝化温度

试验设计同 1.3.1, 温度依次设定为 10、15、20、25、30、35、40℃。

1.4 分离菌株的生长特性和反硝化活性检测

以硝酸盐氮为唯一氮源, 将菌种按体积分数 1% 的量接种到含有 35 mg/L 硝酸盐氮的液体培养基中, 30℃ 振荡培养, 100 h 补加硝酸盐氮至 89.44 g/L, 继续培养。每隔 8h 检测其中硝酸盐氮、亚硝酸盐氮的含量、菌体的浊度以及培养基的 pH 值。

1.5 分离菌株在不同盐度条件下的反硝化活性

用去离子水配制盐度分别为 0%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的人工海水, 加入 1.1.1 所述培养基成分制作液体培养基, 将菌种按体积分数 1% 的量接种到含有 35 mg/L 硝酸盐氮液体的培养基中, 28℃ 振荡培养。每 8 h 检测 1 次硝酸盐氮, 记录硝酸盐完全去除所需时间和 72 h 内的硝酸盐氮降解率。

1.6 分离菌株的急性毒性实验

1.6.1 菌悬液制备

将已纯化的菌株接种在平板上, 28℃ 培养 72 h 后, 用无菌生理盐水洗下菌苔, 用细菌比浊仪依次调整菌液浓度至 $10 \times 10^9 \sim 10 \times 10^3$ CFU/mL^[9,10]。

1.6.2 致病性试验

选择无外伤、游动活泼的鲫鱼(平均体长 12

cm, 平均体重 55 g) 为供试鱼, 饲养 5 d 后, 以肌肉注射和鱼体擦伤浸泡进行攻毒感染. 肌肉注射菌株 TD 的不同浓度菌液, 分为 5 个试验组和 1 个对照组, 对照组用无菌生理盐水. 浸泡感染试验 2 个试验组, 用菌液以擦伤鱼体感染, 1 个对照组同环境养殖. 每组用鱼均为 10 尾. 试验期间不喂饲料, 水温控制在 25℃. 人工感染试验结束后, 连续观察 2 周, 记录死亡情况, 如出现供试鱼死亡现象, 采用 Reed-Muench 法计算半致死浓度 LC_{50} .

1.7 检测方法

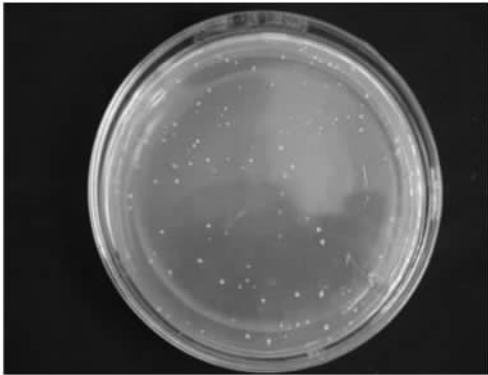


图 1 菌株 TD 的菌落和电镜照片(×19 000)
Fig.1 Lawn and electron micrograph images(×19 000) of strain TD

菌株 TD 的细胞呈短杆状, 单个或短链状排列, 以单根极生鞭毛运动, 大小约为 $(0.5 \sim 0.8) \mu\text{m} \times (1.5 \sim 2) \mu\text{m}$.

2.2 分离菌株的鉴定结果

2.2.1 生理生化鉴定

分离菌株的生理生化鉴定结果见表 1, 根据形态、生理生化特征, 初步鉴定该菌株属于硫杆菌属 (*Thiobacillus*).

表 1 菌株 TD 的生理生化特性¹⁾

Table 1 Physiological characteristics of strain TD			
项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	-	产生 H ₂ S	-
运动性	+	产生 N ₂	+
氧化酶	-	异养生长(葡萄糖, 蔗糖)	-
硝酸盐(还原)	+	赖氨酸	-
硝酸盐(产气)	+	精氨酸	-
亚硝酸盐(锄气)	+	鸟氨酸	-

1)“+”表示反应呈阳性,“-”表示反应呈阴性

2.2.2 16S rDNA 序列分析

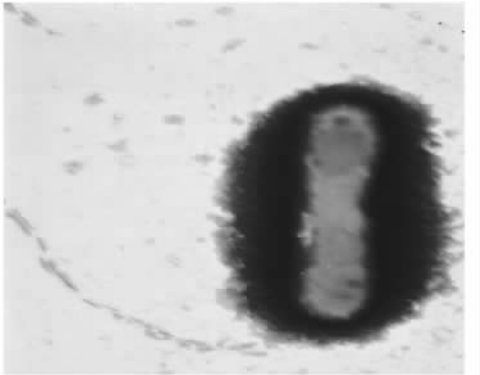
细菌总 DNA 与 16S rDNA 全长 PCR 扩增结果如图 2、图 3 所示, 其中 1、2、3 为该菌的 3 个重复. 将测序结果与 GenBank 上已登录的基因序列进行比

硝酸盐氮: 紫外分光光度法; 亚硝酸盐氮: *N*-(1-萘基)-乙二胺光度法.

2 结果与分析

经过定向富集, 得到 1 株在接种后 72 h 即产生大量气泡, 迅速降解硝酸盐氮的菌株, 命名为 TD. 该菌好气下生长缓慢, 菌落仅有针尖大小, 透明; 厌氧培养菌落直径约 0.5 ~ 1 mm, 圆形, 白色或半透明, 扁平且润湿(图 1). 异养培养不生长.

2.1 分离菌株的透射电镜观察



对, 发现与 *Thiobacillus denitrificans* 同源性最高, 为 99.85%. 利用 MEGA3.1 软件, 将分离菌株与部分参考菌株基于 16S rDNA 序列构建系统进化树(如图 4). 综合生理生化特性和分子生物学特性, 确定该菌株为脱氮硫杆菌 *Thiobacillus denitrificans*.

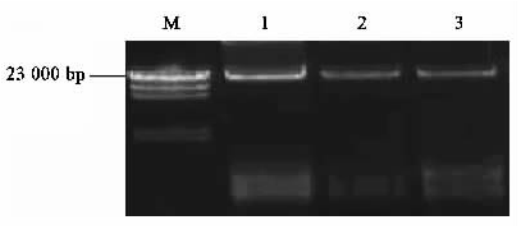


图 2 细菌总 DNA 的检测结果
Fig.2 Result of genomic DNA detection

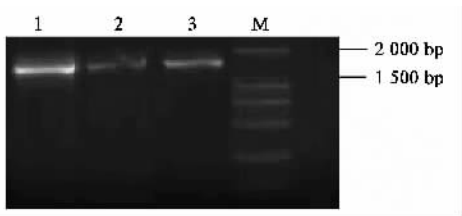


图 3 16S rDNA 全长的扩增结果
Fig.3 Result of complete sequence of 16S rDNA amplification

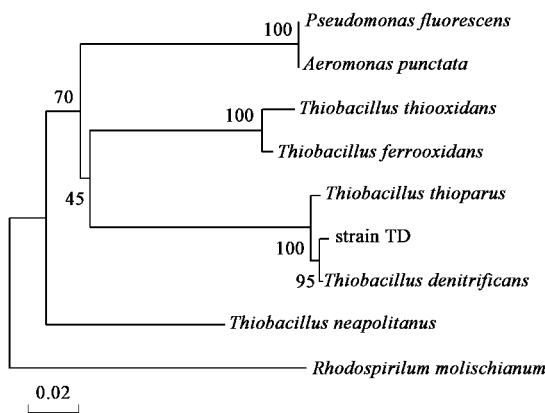


图 4 菌株 TD 与参考菌株基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain TD and the references

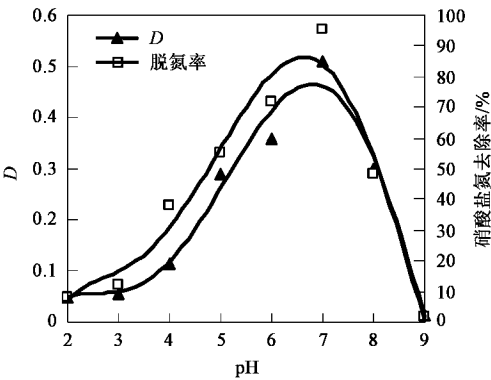


图 5 pH 和温度对菌株 TD 生长速率和反硝化速率的影响

Fig.5 Effect of pH value and temperature on growth rate and denitrification rate of strain TD

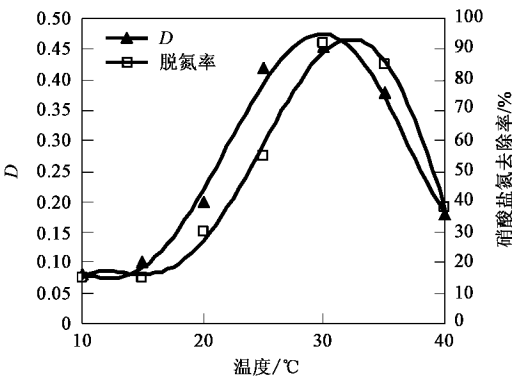
2.3 温度和 pH 值对脱氮硫杆菌生长和反硝化代谢的影响

2.3.1 脱氮硫杆菌的最适生长 pH 值和最适反硝化 pH 值

不同起始 pH 对脱氮硫杆菌生长速率和反硝化速率的影响实验(图 5)发现, pH 对其生长和反硝化活性的影响基本一致,当 pH 从 2 升至 7 时,该菌的生长速率和反硝化速率逐渐提高;但当 pH 继续升至 9 时,其生长速率和反硝化速率都不断下降. 对图 5 结果进行非线性拟合,可得脱氮硫杆菌的最适生长 pH 为 6.90,最适反硝化 pH 为 6.82,二者基本一致.

2.3.2 脱氮硫杆菌的最适生长温度和最适反硝化温度

从图 5 可以看出,温度对脱氮硫杆菌的生长和



反硝化代谢活性均有明显影响;温度对生长的影响不同于对反硝化活性的影响.当温度从 10℃ 升到 30℃ 时,菌体的生长速率逐渐增大;温度继续升高后,菌体生长速率减慢.菌体的最适反硝化温度高于最适生长温度.对图 5 结果进行非线性拟合,可得菌株的最适生长温度为 29.5℃,最适反硝化温度为 32.8℃.

2.4 脱氮硫杆菌的生长特性和反硝化特性

2.4.1 脱氮硫杆菌的生长曲线

脱氮硫杆菌生长比较缓慢,没有明显的稳定期,这与有关报道一致^[6],生长曲线如图 6 所示,该菌要经过约 100 h 的延滞期才能进入对数生长期,由反应式(1)可知,脱氮硫杆菌的反硝化过程会产生 H^+ ,该时期细菌的高速增殖产生的大量 H^+ 导致了培养基 pH 迅速由 6.37 下降到 5.1.经过大约 38 h 的对数生长期之后,由于营养物质-硝酸盐氮的逐渐

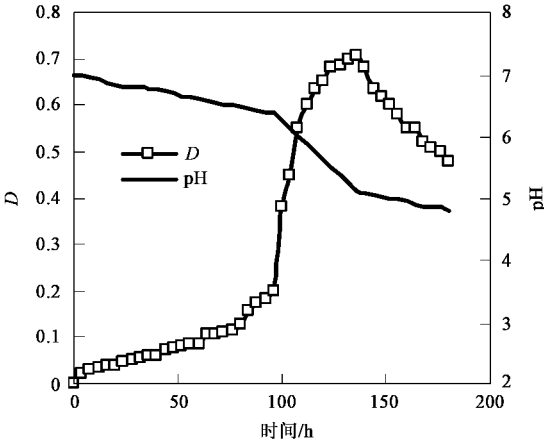
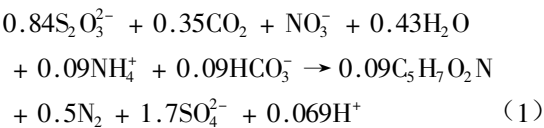


图 6 脱氮硫杆菌的生长曲线

Fig.6 Growth curve of *Thiobacillus denitrificans*

消耗,加之培养基酸性增加,改变了细菌的最佳生长环境,细菌的生长进入衰亡期,逐渐死亡.



2.4.2 脱氮硫杆菌的反硝化特性

(1)反硝化过程中硝酸盐氮的变化特性

菌株在以硝酸盐氮为唯一氮源的培养基中生长时,溶液中硝酸盐氮浓度的变化曲线如图 7 所示,可以看出,在菌体的整个生长过程中,脱氮硫杆菌均具有降解硝酸盐氮的能力,但在菌体生长的不同阶段所表现出的硝酸盐氮降解速率却明显不同(如图 8),该菌在对数生长期阶段的反硝化能力最强,硝酸盐氮的降解速率最快,达到了 $2.245\text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$,大约是其延滞期的硝酸盐氮降解速率的 5 倍,到了衰亡期,随着底物浓度的减少,同时也由于酶的耐受时间过长,硝酸盐氮降解速率最慢,只有其在对数生长期的 1/10.

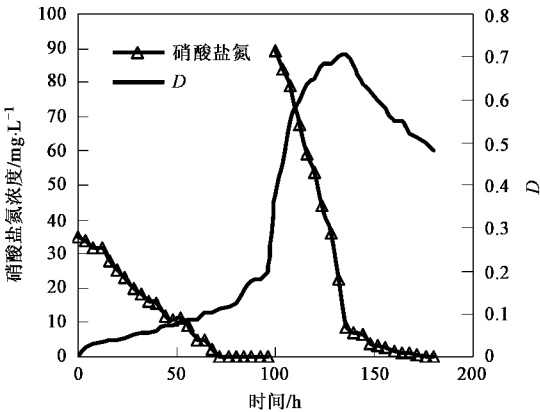


图 7 硝酸盐氮的变化
Fig.7 Varied curve of nitrate

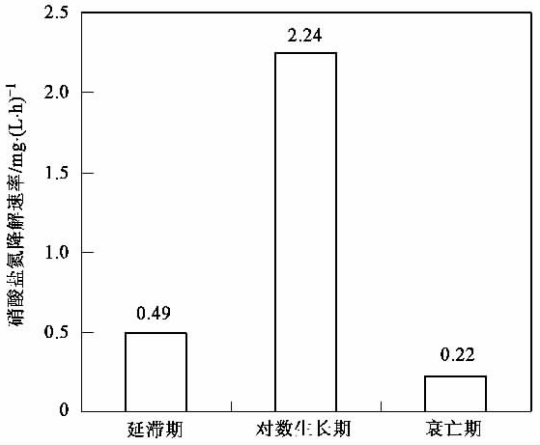


图 8 生长各个阶段的硝酸盐氮降解速率

Fig.8 Degradation efficiencies of nitrate in different growth period

(2)反硝化过程中亚硝态氮的变化特性

菌株在以硝酸盐氮为唯一氮源的培养基中生长时,溶液中亚硝酸盐氮浓度的变化曲线如图 9 所示,可以看出,在脱氮硫杆菌生长的延滞期,随着硝酸盐氮浓度的下降,亚硝酸盐氮的含量迅速上升,于 40 h 达到峰值后逐渐下降,但下降速度比较慢,直到 72 h 硝酸盐氮降为 0 mg/L 后,亚硝氮的降解速度才明显加快,并于 96 h 时降为 0 mg/L,该现象说明菌株先利用硝酸盐氮作为反硝化电子的供体,即硝酸盐的还原先于亚硝酸盐的还原.这一现象在 Blaszczyk^[11]将 1 个从活性污泥中分离的 *Paracoccus denitrificans* 菌株培养于无机盐培养基时也被观察到.他发现只有当培养基中的硝酸盐完全耗尽时,亚硝酸盐才开始被还原.目前,对于这种现象的解释主要有 2 种,一种与生物的优先利用原则有关:和亚硝酸盐相比,以硝酸盐作为电子受体时,基质释放的能量较高,故菌株优先利用硝酸盐;另一种解释与反硝化酶系的合成顺序有关: Kucera 等^[12]在 *Paracoccus denitrificans* 中检出的反硝化酶合成顺序为硝酸盐还原酶、N₂O 还原酶和亚硝酸盐还原酶.在对数生长期补加硝酸盐氮至 89.44 mg/L 后,溶液中的亚硝酸盐浓度在 4 h 内即达到峰值,并于 8 h 内迅速降为 0 mg/L,之后溶液中的亚硝酸盐含量一直保持在很低的浓度,未出现积累.

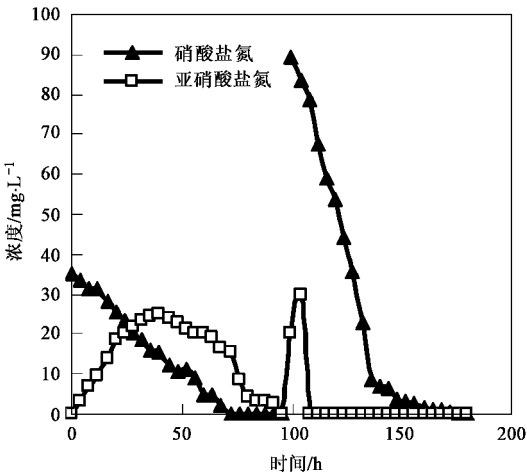


图 9 亚硝酸盐氮的变化
Fig.9 Varied curve of nitrite

2.5 不同盐度条件下的反硝化活性

不同盐度下脱氮硫杆菌 72 h 内的硝酸盐氮降解率如图 10 所示.由图 10 可知,在盐度 0% ~ 1.5% 条件下,盐度的增加对于该菌的硝酸盐氮降解率几乎没有影响,72 h 内的硝酸盐氮降解率均达到

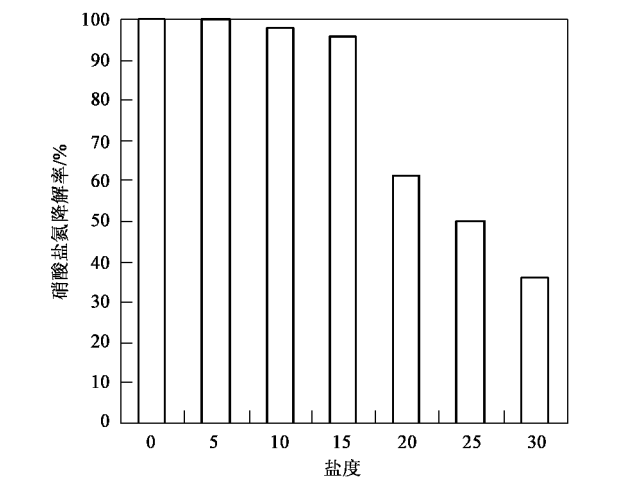


图 10 不同盐度下 72 h 内的硝酸盐氮降解率

Fig. 10 Nitrate degradation rate under different salinity within 72 h

95.51% 以上,当盐度继续增加至 2.0% 以及更高时,细菌的硝酸盐氮降解率出现了逐渐下降的趋势,当盐度升至 3.0% 时,硝酸盐氮降解率降到了 35.8%.推测较高盐度对该菌株的反硝化活性有抑制作用.但从图 11 的不同盐度下硝酸盐氮完全去除时间看,在盐度 2.0% ~ 3.0% 条件下,硝酸盐氮完全去除时间差异并不明显,估计这是该菌对高盐度适应的结果,说明该菌对于较高盐度具备一定的适应性和耐受性.

2.6 脱氮硫杆菌的急性毒性实验

由表 2 和表 3 结果可知,在为期 2 周的实验期

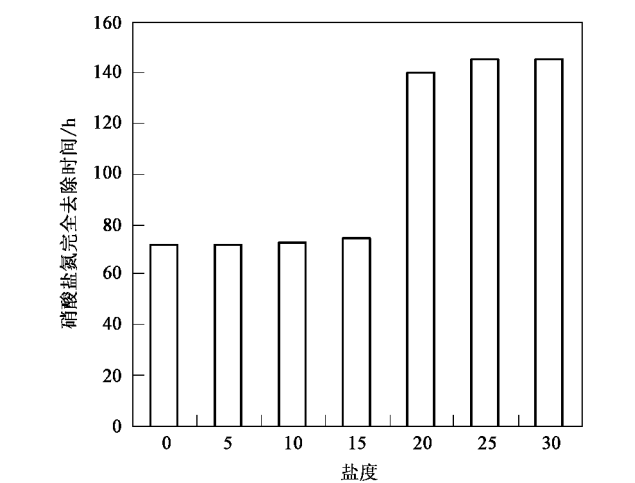


图 11 不同盐度下硝酸盐氮安全去除时间

Fig. 11 Complete nitrate removal time under different salinity

间没有出现供试鱼死亡现象,脱氮硫杆菌对健康鱼体几乎无毒性.

3 讨论

生物脱氮以其无污染、脱氮彻底和安全等优点被认为是目前最经济、有效、可行性高的水体除氮方法^[13,14].与异养反硝化相比,自养反硝化不需向水体引入有机物,可避免对水的再次污染.近几年对于应用脱氮硫杆菌的自养反硝化特性进行饮用水、地下水和废水脱氮的研究活跃,而将其应用于 RAS 系统的养殖用水国内外尚无报道,这是一个亟待解决的问题.

表 2 人工感染实验结果											
Table 2 Results of artificial infection experiment											
组别	菌液浓度 /CFU•mL ⁻¹	注射剂量 /mL	感染天数的死亡数						实验数	死亡数	死亡率 /%
			1 d	2 d	8 d	11 d	12 d	14 d			
实验组	5×10 ⁹	0.2	0	0	0	0	0	0	10	0	0
	5×10 ⁸	0.2	0	0	0	0	0	0	10	0	0
	5×10 ⁷	0.2	0	0	0	0	0	0	10	0	0
	5×10 ⁶	0.2	0	0	0	0	0	0	10	0	0
	5×10 ⁵	0.2	0	0	0	0	0	0	10	0	0
对照组	0	0.2	0	0	0	0	0	0	10	0	0

表 3 浸泡感染实验结果											
Table 3 Results of artificial infection by immersion											
组别	感染方式	菌液浓度 /CFU·mL ⁻¹	感染天数的死亡数						实验数	死亡数	死亡率 /%
			1 d	2 d	8 d	11 d	12 d	14 d			
实验组	浸泡感染	5 × 10 ⁴	0	0	0	0	0	0	10	0	0
	浸泡感染	5 × 10 ³	0	0	0	0	0	0	10	0	0
对照组		0	0	0	0	0	0	0	10	0	0

由于硫杆菌属的种类较多,种间的生化特性差异不大,对于这些生化特性不典型的菌株,往往很难确定是某一种菌,通过分子生物学的方法对其进行进一步分类鉴定,成为另一种更具优势的鉴定手段.

本研究在常规鉴定的基础上,进一步利用分子生物学的方法对菌株 TD 进行了鉴定,得出了一致的鉴定结果,说明这 2 种方法在硫杆菌属内种水平的鉴定中可以相互补充,得出更为可靠的鉴定结果.

较高盐度(> 2.0%)对脱氮硫杆菌的反硝化活性表现出抑制作用.嗜盐反硝化细菌数量较少,主要包括古细菌中的 *Haloarcula*、*Halobacterium*、*Haloferax* 及细菌中的 *Halomonas* 和 *Bacillus* 等几个属的某些种^[15].Yoshie 等^[16]指出盐度降低了污水处理系统中亚硝酸盐还原酶基因的多样性,从而将反硝化过程阻断在亚硝酸盐向氮气转化的阶段.但脱氮硫杆菌在盐度 0%~2.0% 之间显示有较高的反硝化活性,并且对 2.0% 以上的盐度表现出了一定的逐渐适应的能力,此特点使得该菌在海水水体的生物脱氮领域具备了巨大的潜力.

作为自养菌,该菌在生长上受到一些限制,比如生长较慢,菌浓度较化能异养菌低,对环境的变化(如温度、pH 等)较为敏感等缺点,有待研究者利用现代各种分子生物学技术手段进一步的深入分析和改造.本实验分离得到的脱氮硫杆菌具有较高的自养反硝化活性,并经初步毒理实验表明,无急性毒性反应,故在污水处理,生态环境治理,以及在 RAS 系统的水质控制等应用中具有十分广阔的发展前景.

4 结论

(1)从土壤中分离得到的高活性自养反硝化菌 TD,综合其生理生化特性以及 16S rDNA 同源性分析,确定该菌株为硫杆菌属的脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*).

(2)脱氮硫杆菌对温度和 pH 等环境的变化敏感.最适生长条件为 pH 6.90,温度 29.5℃.在初始 pH 为 6.85,32.8℃ 培养条件下脱氮效果最佳.

(3)该菌生长比较缓慢,没有明显的稳定期,对数生长期的反硝化活性最高,反硝化速率最快,达到了 2.245 mg•(L•h)⁻¹.

(4)该菌株属于无毒性菌株.

参考文献:

[1] Honda H, Watanaba Y, Kikuchi K, *et al.* High density rearing of Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* with a closed seawater

recirculation system equipped with a denitrification unit [J]. Suisanzoshoku, 1993, **41**: 19-26.

[2] Otte G, Rosenthal H. Management of closed brackish-water system for high density fish culture by biological and chemical water treatment[J]. Aquaculture, 1979, **18**: 169-181.

[3] van Rijn J, Tal Y, Schreier H J. Denitrification in recirculating systems: theory and applications [J]. Aquacultural Engineering, 2006, **34**: 364-376.

[4] Gutierrez-Wing M T, Malone R F. Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications [J]. Aquacultural Engineering, 2006, **34**: 163-171.

[5] 车轩,吴嘉敏,谭洪新,等.自养反硝化研究进展及在循环水养殖系统中的应用[J].渔业现代化,2007, **1**: 13-16.

[6] 刘宏芳,汪梅芳,许立铭.脱氮硫杆菌生长特性及其对 SRB 生长的影响[J].微生物学通报,2003, **30**(3): 46-49.

[7] 布坎南 R E, 吉本斯 N E.中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译.伯杰细菌鉴定手册[M]. (第八版). 北京: 科学出版社, 1984. 643-650.

[8] Bosshard P P, Santini Y, Grütter D, *et al.* Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine lake Cadagno a revealed by 16S rDNA analysis[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2000, **31**: 173-182.

[9] 石亚素, 王建跃, 王世意, 等. 海水网箱养殖大黄鱼烂尾病病原研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2006, **12**(4): 7-9.

[10] 胡学峰, 石存斌, 潘厚军, 等. 海水养殖斜带石斑鱼溃疡病病原菌(溶藻弧菌)的初步研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, **32** (2): 232-236.

[11] Błaszczyk M. Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans* [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, **59**: 3951-3953.

[12] Kucera I, Matyasek R. Aerobic adaptation of *Paracoccus denitrificans*: Sequential formation of denitrification pathway and changes in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri* [J]. Appl Environ Microbiol, 1989, **55**: 1670-1676.

[13] 李军, 杨秀山, 彭永臻. 微生物与水处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 378-380.

[14] Moreno B, Gómez M A, González-López J, *et al.* Inoculation of a submerged filter for biological denitrification of nitrate polluted groundwater: a comparative study[J]. J Hazard Mater, 2005, **117** (2-3): 141-147.

[15] Zumft W G. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1997, **61**(4): 533-616.

[16] Yoshie S, Noda N, Tsuneda S, *et al.* Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, **70**(5): 3152-3157.