

河流沉积物中反硝化细菌的分离及脱氮除磷研究

王琳^{1,2}, 李季^{2*}, 康文力², 陈云增¹, 郭廷忠¹

(1. 河南大学环境与健康工程研究中心, 开封 475001; 2. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094)

摘要:采用常规细菌分离方法,从河流沉积物中筛选出20株具有反硝化作用的细菌菌株,研究了其反硝化强度,对反硝化强度最大的菌株进行了鉴定,并进一步研究了其不同浓度下脱氮除磷的性能.结果表明,筛选的菌株均具有一定的脱氮能力,但不同菌株的脱氮能力不同,反硝化强度在50%以上的有10株,其中F10菌株的脱氮能力最强为63.2%,通过形态学、革兰氏染色结合16S rDNA序列同源性分析鉴定,其鉴定结果为粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*);不同浓度的F10净化生活污水,其中100 mg/L的处理效果最好,在第10d时,总氮、总磷的去除率最大,分别为76.2%、93.8%.

关键词:反硝化细菌;富营养化;河流沉积物;生活污水;生物修复

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2009)01-0091-05

Denitrifying Bacteria Isolated from River Sediment and Its Nitrogen and Phosphorus Removal Capacity from River Water

WANG Lin^{1,2}, LI Ji², KANG Wen-li², CHEN Yun-zeng¹, GUO Ting-zhong¹

(1. Environmental and Healthy Engineering Research Center, Henan University, Kaifeng 475001, China; 2. College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: 20 strains of bacteria were isolated from river sediment using enrichment culture medium for denitrification, and the denitrification intensity was determined. F10, one of bacteria strain, was identified having the highest denitrifying intensity, and further used to test its role in the removing of nitrogen and phosphorus from wastewater in laboratory. By checking the individual morphology, colony culture characteristics, DNA sequencing and 16S rDNA gene bank, F10 was identified as *Alcaligenes faecalis*, and its denitrifying intensity was 63.2%. The highest removal of TN (76.2%) and TP (93.8%) were observed in a 10 days period with an addition of F10 at a rate of 100 mg/L.

Key words: denitrifying bacteria; eutrophication; river sediment; domestic wastewater; bioremediation

近年来,国内外已做过不少通过反硝化细菌去除水体中营养物质的研究^[1-4].反硝化脱氮技术主要集中在发展生物脱氮技术的新工艺和新概念^[5-9]、污水处理系统中微生物群落结构^[10,11]、菌株选育^[12-14]等方面.在菌种的选育方面,虽然已经发现了多种不同类型的反硝化细菌,这些反硝化细菌在消除污水中氮的同时又消除了含氮的有毒有害物质,主要是通过诱导产生硝酸还原酶和亚硝酸还原酶对硝酸盐和亚硝酸盐进行还原.不同反硝化细菌的反硝化作用能力不同.如何获得高效的降解菌株以及如何使其成为反应体系中的优势种群而发挥反硝化作用仍然是研究的热点.本试验从接纳生活污水的河流沉积物中分离、筛选反硝化细菌高效降解菌株,并采用形态学特征、分子生物学等多种方法进行鉴定,以期为进一步研究其在富营养化水体中的脱氮除磷性能和相关污水的处理提供微生物基础.

1 材料与方法

1.1 富集培养

北京市清河主要是生活污水的受纳水体,其特点是氮、磷含量很高,其中TN的浓度为9.46 mg/L(以N计),TP浓度为0.96 mg/L(以P计).取清河的底泥5~10 g,接种于无菌反硝化细菌富集培养液中,置于30℃培养箱中静置培养.培养4~5 d后,以20%的接种量接入新鲜的富集培养液中,如此反复3~4次,直到获得优势种.

反硝化细菌富集培养基:KNO₃ 2 g,柠檬酸钠5 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g,蒸馏水1 000 mL, 121℃,灭菌20 min.

1.2 分离纯化

利用硅胶胶平板分离.在每个硅胶平板上加反硝化细菌富集培养基2 mL,轻轻转动培养皿,使培养液分布均匀,打开皿盖,置于50℃烘箱内,到平板

收稿日期:2008-01-02;修订日期:2008-03-20

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD17B05);北京市生态学重点学科项目(XK10019440);北京市都市农业学科群建设项目(XK100190553)

作者简介:王琳(1980~),女,博士,讲师,主要研究方向为污水的生物处理, E-mail: wlenglish@163.com

* 通讯联系人, E-mail: lijia@cau.edu.cn

上无水流动为止.然后,打开皿盖,将平板置于无菌操作台中,灭菌 20 min 后待用.

将反硝化细菌富集培养液 0.1 mL 涂布于烘烤后的硅胶平板培养基上,置于 30℃ 培养箱中,培养至菌落生长良好,用灭菌后的牙签挑取单菌落,在 2 mL 液体富集培养基中进行扩增培养.重复上述操作,直至获得纯菌种.通过其反硝化强度测定^[15],对反硝化能力最强的菌株进行生长规律研究、菌种鉴定和富营养化水体的预处理研究.

1.3 菌种的生长规律试验

在菌种筛选试验的基础上,对获得的菌种进行细胞生长测定及其生长规律的试验研究.测定各菌种的生长曲线,掌握它们的生长规律.在反硝化细菌的富集培养基中按 20% 的接种量接种,在 30℃ 培养箱中静止培养,每天同一时间取 3 个重复于波长 600 nm 处,测其吸光度(D 值),以培养时间为横坐标, D 值为纵坐标作曲线,以便将菌体培养到对数生长期的初期或在对数生长期到稳定期之间.

1.4 菌种的鉴定

对所筛选到的菌株进行鉴定,通过观察菌落形态、显微镜下菌体形态观察、革兰氏染色、16S rDNA 扩增以及 DGGE 等分子生物学手段相结合的方法进行了菌株的鉴定等,依照微生物学细菌分类鉴定实验方法,对获得的菌株进行初步鉴定.

1.5 DNA 提取及 PCR-DGGE 技术

1.5.1 样品准备和细菌 DNA 提取

取分离纯菌株的液体培养液于 8 mL 离心管中,8 000 r/min,4℃,离心 20 min,弃上清液,取沉淀,加入 0.5 mL DNA 提取缓冲液(1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0)备用.

单菌株 DNA 的提取采用 Benzyl Chloride 方法^[16].

1.5.2 PCR 扩增

PCR 扩增采用 AmpliTaqGold™ 反应系统(Perkin Elmer, Applied Biosystems, NJ, USA).引物为 357F 和 517R,它们的序列分别为 5'-CCTACGGGAGGCAGC-AG-3'和 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'.

PCR 的反应程序:95℃ 10 min;接下来是下面的程序进行 25 个循环,93℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 1 min 30 s,之后,93℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 5 min.反应体系(50 μ L):1 μ L dNTP(10 mmol/L)、5 μ L 10 $\times$ PCR Gold Buffer、4 μ L MgCl₂(25 mmol/L)、0.5 μ L 357F (45 pmol/ μ L)、0.5 μ L 517R(45 pmol/ μ L)、1 μ L 模板 DNA(10 ng/ μ L)和 0.5 μ L Taq 酶(2 U/mL),其余体积

用无菌水补充.PCR 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,经纯化后送测序公司测序,所获得的 DNA 序列与 BLAST 程序的数据库序列比较,确定菌株的分类地位.

1.5.3 DGGE 电泳及分析

采用 DCode 系统(Bio-Rad, Laboratories, Hercules, Calif)对 PCR 扩增产物用双变性法进行 DGGE 分析^[17].聚丙烯酰胺凝胶浓度为 6% ~ 12%,尿素变性梯度为 20% ~ 55%(尿素为 7 mol/L,甲酰胺为 40% 时的变性浓度为 100%),在 61℃ 恒温下,电压为 200 V 时电泳 5 h,采用 SYBRGREEN I (Molecular Probes, Eugene, Ore)染色 30 min,紫外凝胶成像系统分析结果^[18].

1.6 生活污水中氮、磷的去除试验

试验从北京市清河取水.在 25 L 的水桶内,每个水桶装 20 L 水,各水桶敞口并按序排列在试验塑料大棚里,大棚气温略高于室外温度,各水箱的环境条件基本一致.该试验采用连续投菌,反硝化液体菌液进行 4 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,并用 0.8% 的生理盐水洗涤 3 次,加入到 20 L 水体中,使其在水体中的浓度分别为处理水体积的 100、500、1 000 mg/L,每个处理均设 3 个平行组.根据其的对数生长期进行处理,共处理 5 次,每次处理之前取样,测定水质指标,研究不同浓度下的净化效果.

1.7 化学指标测定方法

总氮(TN):紫外分光光度法,总磷(TP):钼锑抗分光光度法^[19].

2 结果与讨论

2.1 反硝化细菌的富集培养

将采集的清河中的沉积物接种到反硝化细菌液体富集培养基中,培养 3 ~ 14 d,培养液变浑浊并产生气泡,说明有反硝化细菌生长.

2.2 反硝化强度

采用硅胶平板稀释分离的办法,分离到 20 株具有反硝化作用的纯菌株.用 TN 的去除率表示反硝化强度,筛选出的 20 株菌,均具有一定的脱氮能力,但不同菌株的脱氮能力不同,反硝化强度在 50% 以上的有 10 株(表 1),其中 F10 菌株的脱氮能力最强,达到 63.2%.故以 F10 作为继续研究的菌株,进一步研究其生长规律.

2.3 所筛菌株 F10 的菌落特征和细胞形态特征

F10 菌株在分离培养基平板上形成圆形、无色透明、边缘整齐、表面光滑湿润的菌落,革兰氏染色

表 1 筛选出的对 TN 除去率超过 50% 的菌株
Table 1 Strains that TN removal rate was over 50%

菌株编号	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
反硝化强度/%	57.1	51.2	51.2	51.5	50.2	55.7	60.5	50.0	50.0	63.2

为阴性,细胞呈球杆状,(0.6~1.2) μm × (0.7~2.6) μm,单个存在,见图 1.

2.4 F10 菌株的生长曲线

在 0~2 d,这一时期为反硝化细菌的延滞期(图 2),在 2~5 d,活菌数迅速增加,处于对数生长期,在此阶段,F10 菌株生长活跃,大量繁殖;在 5~7 d,处于稳定期,从第 8 d 开始,一小部分菌体死亡后,菌体浓度没有太大的变化.在应用中常选择既保持旺盛增殖能力,又达到较高的浓度以缩短发酵周期^[20].因此,选取培养至 5 d 的菌体进行去除污水中的营养盐类负荷试验.

2.5 DGGE 分析

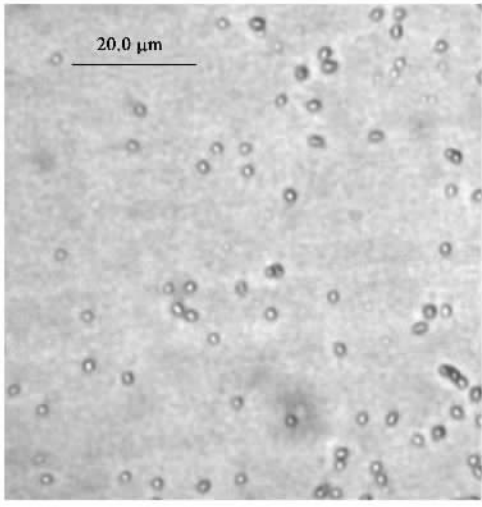


图 1 F10 的个体形态特征

Fig.1 Individual morphology character of strain F10

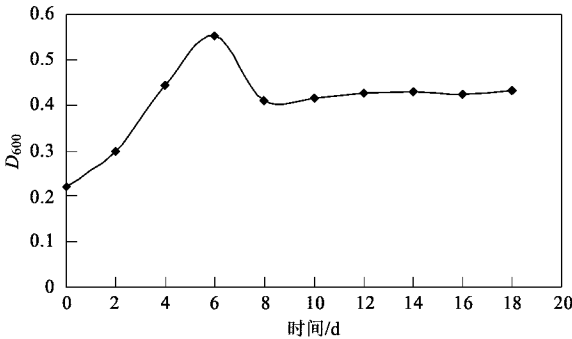


图 2 反硝化细菌的生长曲线

Fig.2 Growth curve of denitrifying bacteria when it was cultured

将反硝化细菌液体培养液收集后用氯苯法提取 DNA,将提取的 DNA 进行 2%琼脂糖电泳,然后进行 16S rDNA V3 区序列 PCR 扩增,将 PCR 扩增产物进行 DGGE 电泳,电泳图谱如图 3,从 DGGE 图中可以检测到只有一条带.

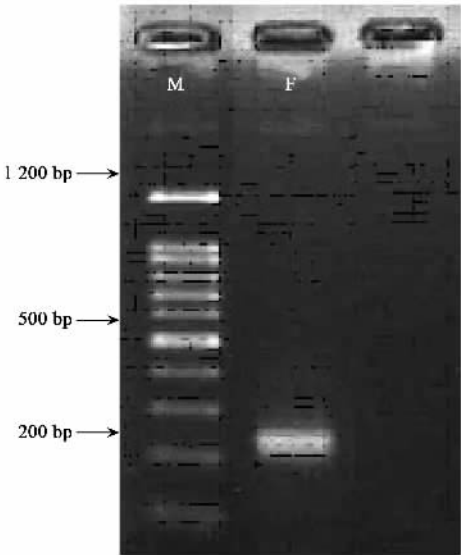


图 3 F10 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE profile of V3 region of 16S rDNA from F10

2.6 菌种鉴定

同一菌株的 DNA 条带在胶上的位置相同,而不同菌株的 DNA 的条带位置不同,因此可以利用 DGGE 方法对获得的菌株进行筛选.经过平板分离纯化和 DGGE 筛选,确定获得的菌株 F10 是纯菌种.通过 16S rDNA 基因测序并与 NCBI 基因数据库中已有菌种的 16S rDNA 序列进行同源性分析和相似性分析,在分子水平对 F10 进行系统发育、种属鉴定.

在显微镜下观察菌体的形态如图 1,单个菌的形状主要为球杆状.通过 16S rDNA 基因序列并与数据库进行比较分析.比对结果表明:近缘种为 *Alcaligenes faecalis* (AY866407),相似率为 99.9%,根据同源性检索和相似性分析鉴定菌株 F10 为粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*),登录号为 EU169605.

目前,Nishio 等^[21]研究了固定化的异养硝化细菌粪产碱杆菌 OKK 17 硝化作用和反硝化作用的条件.Potivichayanon 等^[22]对生物反应器中粪产碱杆菌

和不动杆菌混合培养时对硫化氢的去除进行了研究.Joo 等^[23]研究了粪产碱杆菌具有异养硝化作用和好氧反硝化作用,用其处理猪舍废水具有很高的除去铵态氮和 COD 的能力.Joo 等^[24]研究了粪产碱杆菌以及它的突变体以及废水中铵氮的去除效率.

2.7 菌种 F10 生活污水中总氮、总磷的去除

2.7.1 总氮的去除

使用不同浓度的反硝化细菌 F10 进行处理清河水,考察其反硝化能力以及不同投加量的脱氮效果.TN 随时间的变化如图 4 所示,添加 F10 菌种的 3 个处理中,TN 的浓度均低于空白对照,说明该菌具有脱氮效果.在前 10 d 内,脱氮效果明显,其中浓度为 100 mg/L 的效果最好,TN 的最高去除率为 72.6%.然而,浓度为 500 mg/L、1 000 mg/L 的处理效果反而没有 100 mg/L 的处理效果好,而且 10 d 后,随着菌体的加入,各处理中的 TN 浓度呈上升趋势,可能是由于添加的微生物数量多,一些死亡的菌体进行分解引起水体中 TN 的升高.

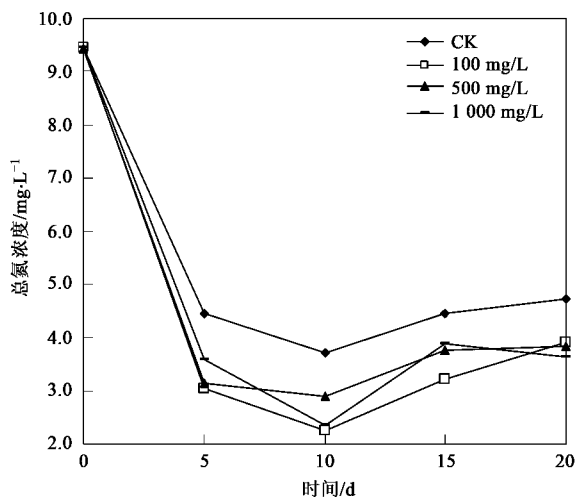


图 4 各处理水体中总氮随时间的变化

Fig.4 Total nitrogen changes between treatments

2.7.2 总磷的去除

试验水体中 TP 的变化见图 5,各处理中的除磷趋势基本一致,不同投菌量的 3 个处理对 TP 的去除均有明显效果.各试验处理中,TP 均在第 10 d 达到最大去除率,随着投菌浓度的增加,对 TP 的去除效果降低,其中接种浓度为 100 mg/L 的除去率最大为 93.8%,和对照相比,将近提高了 10 个百分点,而且在处理期间,TP 浓度均低于其他处理.该现象表明,F10 在有效脱氮的同时过量摄磷.

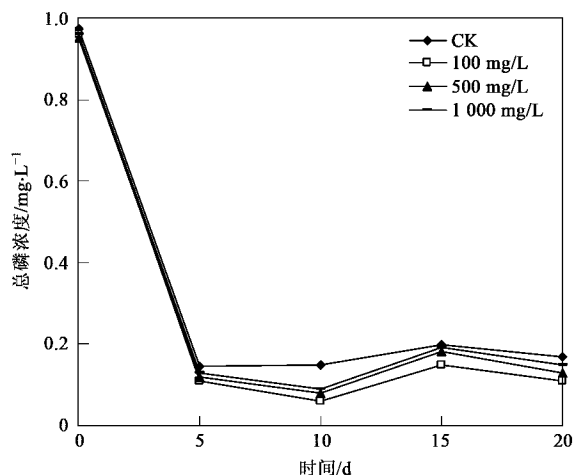


图 5 各处理水体中总磷随时间的变化

Fig.5 Total phosphorus changes between treatments

3 结论

(1)采用常规细菌分离方法,从接纳生活污水的河流沉积物中分离出了 20 株反硝化细菌,进行了其分离、纯化,通过其反硝化强度的测定,这些菌株均具有较高的反硝化能力,其中脱氮能力最强的菌株为 F10,反硝化强度为 63.2%.通过对 F10 菌株进行形态学、革兰氏染色、16S rDNA 序列同源性分析,鉴定为粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*).进一步研究其生长规律,发现反硝化细菌 F10 在 2~5 d,活菌数迅速提高,处于对数生长期,在 5~7 d,处于稳定期,为水质净化提供依据.

(2)利用不同投加量的反硝化细菌 F10 对清河水进行处理,当投加量为 100 mg/L 时,处理效果最好,总氮、总磷的去除率最大可达 76.2%、93.8%.这表明 F10 在有效脱氮的同时过量摄磷,是一种反硝化聚磷菌,这对于城市污水脱氮除磷工艺的发展具有重要意义.分析投加反硝化细菌后水质的变化特点,前期处理效果明显,TN、TP 前 5 d 变化速率最大,从第 5~10 d,变化速率相对较小,可能是由于添加的微生物数量增多,一些死亡的菌体进行分解引起水体中 TN、TP 的升高.该试验还表明,并不是投放菌体的浓度越高处理效果越好.在一定的浓度范围内,浓度越高处理效果越好.需要对不同富营养化程度的水体进一步研究,探索出富营养化程度和投菌浓度的线性关系,以便达到经济、有效.

(3)对于污水处理系统,采用投加特殊菌种,可以确保处理设施的正常运行,提高耐冲击能力,该方法简便、费用低.对于大面积的自然水体,则可以提

高水体的自净能力,维持水生生态平衡.由于采用直接投菌,会导致菌体的流失,可考虑采用固定化技术,进一步提高其净化富营养化水体的效果.

参考文献:

- [1] 张小玲, 梁运祥. 一株反硝化细菌的筛选及其反硝化特性的研究[J]. 淡水渔业, 2006, **36**(5): 28-32.
- [2] Stouthamer A H, de Boer A P N, van der Oost J, *et al.* Emerging principles of inorganic nitrogen metabolism in *Paracoccus denitrificans* and related bacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 1997, **71**: 33-41.
- [3] Pai S L, Chong N M, Chen C H. Potential application of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment [J]. Bioresource Technology, 1999, **68**: 179-185.
- [4] Schmidt I, Slikkers O, Schmid M, *et al.* New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, **27**: 481-492.
- [5] Ovez B. Batch biological denitrification using *Arundo donax*, *Glycyrrhiza glabra*, and *Gracilaria verrucosa* as carbon source[J]. Process Biochemistry, 2006, **41**: 1289-1295.
- [6] Aslan S, Cakici H. Biological denitrification of drinking water in a slow sand filter[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, **148**: 253-258.
- [7] Rocca C D, Belgiorno V, Meric S. Heterotrophic/autotrophic denitrification (HAD) of drinking water: prospective use for permeable reactive barrier[J]. Desalination, 2007, **210**: 194-204.
- [8] Fernandez N, Alvarez R S, Field J A, *et al.* Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge[J]. Chemosphere, 2008, **70**: 462-474.
- [9] Su C, Puls R W. Removal of added nitrate in cotton burr compost, mulch compost, and peat: Mechanisms and potential use for groundwater nitrate remediation[J]. Chemosphere, 2007, **66**: 91-98.
- [10] Hoshino T, Terahara T, Tsuneda S, *et al.* Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, **99**: 1165-1175.
- [11] 孙寓娇, 左剑恶, 陈莉莉. 同时产甲烷反硝化颗粒污泥中微生物群落结构[J]. 中国环境科学, 2007, **27**(1): 44-48.
- [12] 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.
- [13] Takaya N, Catalan-Sakairi M A B, Sakaguchi Y, *et al.* Aerobic denitrification bacteria that produce low levels of nitrous oxide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(6): 3152-3157.
- [14] 龙雯, 陈存社, 汪萍, 等. 一株好氧反硝化细菌的分离与鉴定[J]. 中国酿造, 2006, **8**: 28-30.
- [15] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 126-127.
- [16] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride [J]. Nucleic Acids Research, 1993, **21**: 5278-5280.
- [17] Haruta S, Cui Z, Huang Z, *et al.* Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, **59**: 529-534.
- [18] Pedro M S, Haruta S, Hazaka M, *et al.* Official Methods of Analysis—15th ed [M]. Arlington, Virginia, USA: Association of Analytical Chemists, 1990. 70-80.
- [19] 国家环境保护总局. 水和废水检测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 243-257.
- [20] Stanbury P F. Principles of Fermentation Technology[M]. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1984. 13-33.
- [21] Nishio T, Yoshikura T, Mishima H, *et al.* Conditions for nitrification and denitrification by an immobilized heterotrophic nitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* OKK 17 [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, **86**(4): 351-356.
- [22] Potivichayanon S, Pokethitiyook P, Kruatrachue M. Hydrogen sulfide removal by a novel fixed-film bioscrubber system [J]. Process Biochemistry, 2006, **41**: 708-715.
- [23] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Water Research, 2006, **40**: 3029-3036.
- [24] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Improvement in ammonium removal efficiency in wastewater treatment by mixed culture of *Alcaligenes faecalis* No.4 and LI[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, **103**(1): 66-73.