

1 株好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究

李卫芬, 傅罗琴, 邓斌, 陈南南, 周绪霞*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘要:经 BTB 培养基初筛和反硝化活力定量测定, 从草鱼养殖池水中分离得到 1 株具有较高脱氮效率的好氧反硝化菌 F1. 通过形态观察、生理生化特性及 16S rDNA 同源性分析, 确定该菌株为施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*). 反硝化特性研究结果表明, 该菌脱氮的最适碳源为乙酸钠、柠檬酸钠、葡萄糖和蔗糖, 对硝酸盐的去除率均达到 100%; 当 C/N 比不低于 10 时, 该菌的脱氮率可达到 96% 以上, 且无亚硝酸盐的积累; 最适生长和最佳脱氮的温度和 pH 值分别为 30℃ 和 7.0; 当 DO 值为 3.4 ~ 7.2 mg/L 时, 菌株 24 h 的脱氮率均可达到 85% 以上; 以 NaNO₃ 或 NaNO₂ 为氮源时, 菌株的反硝化过程主要发生在对数生长期, 32 h 的脱氮率分别达到 92.51% 和 82.73%. 结果提示, 菌株 F1 能直接以 NO₃⁻ 或 NO₂⁻ 为底物进行反硝化, 并能耐受较高的溶解氧, 可以作为调节养殖水体水质的候选菌株.

关键词:好氧反硝化菌; 脱氮率; 16S rDNA; 反硝化; 假单胞菌属

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)08-2403-06

Identification and Denitrification Characteristics of an Aerobic Denitrifier

LI Wei-fen, FU Luo-qin, DENG Bin, CHEN Nan-nan, ZHOU Xu-xia

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: An aerobic denitrifier named F1 was isolated from grass fish pond water by BTB culture medium preliminary screening and denitrification activity analysis. The isolate was identified as *Pseudomonas stutzeri* through morphological feature, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. Further studies showed that the optimal carbon resources for F1 denitrification were sodium acetate, sodium citrate, glucose and sucrose, with which the nitrate removal rate could reach 100%. When C/N ratio was above 10, the nitrogen removal rate of strain F1 was more than 96% and no nitrite was accumulated. The optimum condition for F1 growth and aerobic denitrification was temperature 30℃ and pH 7.0. The F1 could tolerate dissolved oxygen level of 3.4-7.2 mg/L, and its nitrogen removal rate was more than 85% in 24 hours. Denitrification process of F1 mainly occurred in the exponential phase with NaNO₃ or NaNO₂ as nitrogen resource, and its denitrification rate reached 92.51% and 82.73%, respectively after 32 h of culture. These results suggest that strain F1 can denitrify NO₃⁻ or NO₂⁻ directly, and can tolerant a high dissolved oxygen level, and these characteristics make it a good candidate for aquaculture water quality treatment.

Key words: aerobic denitrifier; nitrogen removal rate; 16S rDNA; denitrification; *Pseudomonas*

养殖水水质污染, 尤其是高浓度氨氮和亚硝酸氮不仅对许多水生动物有直接的毒害作用, 还会降低其免疫力, 导致水产病害频发, 给水产养殖业带来巨大损失. 反硝化作用是生物脱氮的一种有效途径^[1]. 传统观念认为, 反硝化只在厌氧条件下才能进行, 因为在有氧的条件下, 分子氧比硝酸盐氮或亚硝酸盐氮更容易成为电子受体, 从而抑制反硝化的发生^[2]. 但是自从 20 世纪 80 年代, Robertson 等^[3]在除硫和反硝化处理系统中首次分离出好氧反硝化菌后, 国内外研究者又陆续分离出一些好氧反硝化菌, 主要包括 *Alcaligenes*^[4]、*Paracoccus*^[5]、*Pseudomonas*^[6]、*Bacillus*^[7]、*Rhodococcus*^[8] 等. 在水产养殖中, 为了保证鱼虾的正常生长, 必须通过适时的充氧使水体中的溶解氧达到一定水平, 在这种情况下, 厌氧反硝化细菌的脱氮作用不能得到充分发挥, 为此, 好氧反硝化菌越来越受到人们的关注. 目前已

发现部分菌种能够在高密度养殖条件下, 有效地去除水体氮素的过度积累. 张小玲等^[9]将分离到的好氧反硝化芽孢杆菌 H2 投入模拟养殖水中, 发现有较好的脱氮效果. 但是由于来源于养殖水体的好氧反硝化菌基础数据积累较少, 制约了好氧反硝化应用于养殖水体除氮技术的发展. 因此, 开展该类好氧反硝化菌生物学特性的研究对其生产和应用具有重要的理论价值和实践意义.

本研究对草鱼养殖池水中筛选到的 1 株具有较强好氧反硝化能力的菌株 F1 进行了鉴定, 并在实验室条件下分析了该菌的反硝化特性, 在丰富好氧反硝化细菌种质资源的同时, 以期为该菌在养殖水体

收稿日期: 2010-09-02; 修订日期: 2010-11-06

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2009CB118705)
作者简介: 李卫芬(1965~), 女, 研究员, 主要研究方向为微生物与基因工程, E-mail: wfli@zju.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: xuxiazhou@yahoo.com

中的生物脱氮应用提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

菌株分离水样采自杭州某草鱼养殖池水。

1.2 培养基

DM 基础培养基^[10]: KH_2PO_4 1.5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L; Na_2HPO_4 7.9 g/L; 微量元素溶液 2 mL; 去离子水 1 000 mL; pH 7.0 ~ 7.5; 柠檬酸钠 5.66 g/L; NaNO_3 0.8415 g/L. 碳源和氮源根据实验要求进行调整。

BTB(溴甲基酚蓝)培养基:在 DM 培养基的基础上添加 1 mL BTB(1% 溶解于酒精)和 2.5% 琼脂,蒸馏水溶解并调节 pH 7.0 ~ 7.3。

LB 培养基:1% 胰蛋白胨; 0.5% 酵母膏; 0.5% NaCl ; 2.5% 琼脂; 蒸馏水溶解。

1.3 分析方法

菌体生长吸光度(A)的测定采用吸光度法,用 721 型可见分光光度计在光密度为 600 nm 处测吸光度值。 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 含量测定参照文献[11]进行,采用 721 型可见分光光度计进行定量分析。其中, NO_3^- -N 浓度的测定采用紫外分光光度法; NO_2^- -N 浓度的测定采用 N -(1-萘基)-乙二胺光度法; NH_4^+ -N 浓度的测定采用纳氏试剂分光光度计法;pH 值的测定采用 Mettler Toledo Delta 320 型 pH 计。

1.4 菌株分离与纯化

取 10 mL 草鱼养殖池水样加入到装有 100 mL 灭菌的 DM 培养液和 1 mL 微量元素溶液的锥形瓶中,30℃,150 r/min 摇床培养 3 d,富集 3 次。将得到的菌悬液在 BTB 固体培养基上划线培养,30℃ 培养 24 h。挑取使 BTB 培养基呈现蓝色的单菌落在 DM 固体培养基上划线,分离纯化 3 次。挑取单菌落测定反硝化能力,并选择反硝化能力较强的菌株进一步进行研究。

1.5 形态学鉴定与生理生化鉴定

菌株的形态学鉴定通过革兰氏染色及电子显微镜观察^[12]。细菌生理生化鉴定根据文献[12]进行。

1.6 16S rDNA 序列测定和同源性比较

以细菌基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA,扩增采用一对通用引物:上游引物(P1):5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAGAACGAACGCT-3';下游引物(P6):5'-TACGGCTACCTTGTACGACTTCA CCCC-3',PCR 反应体系(50 μL):10 \times Buffer 5.0

μL ,dNTPs 4.0 μL ,上游引物和下游引物各 1.0 μL ,重蒸水 38 μL ,离心混匀后加入 DNA 模板 0.5 μL , Taq 酶 0.5 μL 。PCR 程序如下:①94℃,5 min;②94℃ 变性 50 s;③52℃ 退火 60 s;④72℃ 延伸 90 s;⑤72℃,10 min;②~④步骤循环 30 次。琼脂糖凝胶电泳(1 \times TAE 电泳缓冲液,1% 凝胶)分析 PCR 结果。PCR 产物的纯化和测序由上海生物工程有限公司完成,测序结果通过 GenBank Blast 进行比对分析。

1.7 最适生长条件和反硝化特性研究

1.7.1 碳源

以 DM 基础培养基为母液,以 0.8415 g/L NaNO_3 为唯一氮源,调整 C/N 质量比为 10:1,分别以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乙酸钠、柠檬酸钠、乳糖作为唯一碳源。取 1 环已保存菌种接种于 LB 液体培养基中,30℃、150 r/min 恒温摇床活化培养 12 h 后,以 1% 接种量接入活化并洗涤干净的菌液于不同碳源培养基中。为保证瓶中空气与外界气体的交换,提高瓶中液相溶解氧浓度,以 8 层纱布代替橡胶塞封口,30℃、150 r/min 摇床培养 24 h 后检测培养基中菌体生长量及 NO_3^- -N 含量,实验设 3 个重复。

1.7.2 C/N 比、温度、PH、溶氧

将 1% 洗涤干净的菌液接种到装有高温灭菌过的 DM 液体培养基(添加最佳碳源为唯一碳源)的锥形瓶中,通过调节培养基的 C/N 比,摇床温度,pH 值,控制摇床转速的方式以调节培养液 DO,150 r/min 恒温摇床培养 24 h 后测定培养液中菌体生长量(D_{600})、 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 含量。考察条件变化对反硝化效果的影响。除不同温度实验外,其余均在 30℃ 下培养,实验设 3 个重复。

1.8 好氧反硝化活性测定

将 1% 洗涤干净的菌液接种到装有 100 mL DM 培养基(分别以 NaNO_3 和 NaNO_2 为唯一氮源)的 250 mL 锥形瓶中,每隔一定时间测定 DM 培养液中的菌体生长量、 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 含量。以未接种的 DM 培养基作为空白对照,实验设 3 个重复。

1.9 硝酸盐氮去除率计算、脱氮率计算方法

脱氮率 = (1 - 终总无机氮/初始总无机氮) \times 100%

硝酸盐氮去除率 = (1 - 终硝酸盐氮/初始硝酸盐氮) \times 100%

亚硝酸盐氮生成率 = (终亚硝酸盐氮 - 初始亚硝酸盐氮)/初始总无机氮 \times 100%

2 结果与分析

2.1 菌株分离与鉴定

2.1.1 菌株筛选

在反硝化过程中,硝酸盐的还原会使培养基 pH 值升高,使 BTB 培养基呈现蓝色反应,因此可以根据培养基的颜色变化初步判断菌株的好氧反硝化能力.在 BTB 培养基上初筛得到 5 株细菌,通过初步测定,选择 NO_3^- -N 去除率较高的 1 株作为研究对象,编号为 F1.

2.1.2 菌株形态与生理生化鉴定

菌株 F1 在 BTB 固体培养基上培养 24 h,菌落呈圆形,半透明,表面不光滑,边缘不整齐,菌落呈棕黄色.菌细胞短杆状,无芽孢,革兰氏染色呈阴性.对 F1 生理生化鉴定的结果表明,该菌的主要生化反应特征表现为,氧化酶反应阳性、具有分解葡萄糖和淀粉以及硝酸盐的还原能力.结果见表 1.

表 1 菌株 F1 的主要生理生化特征

Table 1 Main physiological and biochemical characteristics of strain F1

生理生化反应	反应结果	生理生化反应	反应结果	生理生化反应	反应结果
葡萄糖	+	尿素	-	明胶液化	-
淀粉	+	乙酰甲基醇	-	柠檬酸盐	+
油脂	+	氧化酶	+	硫化氢	-
接触酶	+	氰化钾	+	硝酸盐还原	+

2.1.3 菌株 16S rDNA 序列测定及鉴定

菌株 F1 的 16S rDNA 序列经 BLAST 分析,与 GenBank 中假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) (登录号为 HQ292192) 的 16S rDNA 序列具有 99% 同源性.结合该菌株的形态和生理生化特征,根据文献[12]可基本确定菌株为施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*),将该菌株命名为 *Pseudomonas stutzeri* F1.

2.2 最适生长和反硝化特性研究

2.2.1 碳源

由图 1 可见,以柠檬酸钠和蔗糖为碳源时,菌株 F1 生长最好,其次为葡萄糖和乙酸钠,再次为麦芽糖,当以乳糖为碳源时该菌几乎不生长.碳源对 F1 菌反硝化活性的影响与其生长情况相似,以柠檬酸钠、蔗糖、葡萄糖和乙酸钠为碳源时,硝酸盐氮的去除率均达到 100%,且无亚硝酸盐的累积,以麦芽糖为碳源时硝酸盐降解率仅为 31.91%.说明碳源通过影响菌的生长而影响其硝酸盐去除率.以下实验均采用柠檬酸钠作为碳源.

2.2.2 C/N

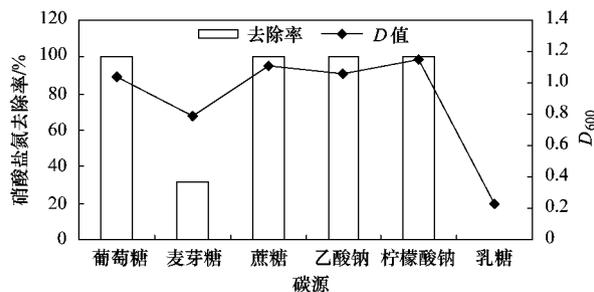


图 1 碳源对 F1 菌生长和反硝化率(硝酸盐去除率)的影响

Fig. 1 Effects of carbon resource on the growth and denitrification (nitrate removing rate) of strain F1

从图 2 可以看出,C/N 为 1 时,菌 D_{600} 值很小,脱氮率仅为 69.82%;当 C/N 增加到 5 时,菌体生长处于对数生长后期,脱氮率达到 95.32%.进一步加大 C/N,脱氮率基本不变,可达到 96% 以上,且无亚硝酸盐的积累,但菌体生长在 C/N 为 10 时才达到最大,之后趋于稳定.这是因为 C/N 值较高时,菌体生长和反硝化所需的能量充足,此时碳源已成非限制性因素,菌体的生长和反硝化活性处于稳定阶段.

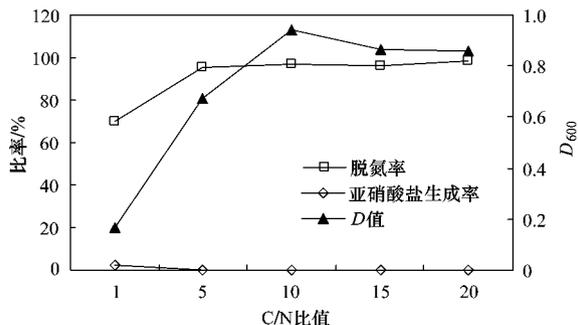


图 2 不同 C/N 比下的脱氮率、亚硝酸盐生成率和菌 D 值

Fig. 2 Effects of C/N ratio on denitrification rate, production rate of nitrite and D value of strain

2.2.3 初始 pH

如图 3 所示,当 pH 为 7 时,硝酸盐的脱氮率达到最大值 97.14%,菌体生长较好,在稍偏碱 (pH 7.5) 的条件下也有较好的脱氮率,为 95.30%,但亚硝酸盐的积累量增加明显.该菌在酸性 (pH ≤ 6.5) 和强碱 (pH > 8) 条件下,生长情况不好脱氮率也低,尤其是在酸性条件下菌株几乎不生长.

2.2.4 温度

如图 4 所示,培养温度为 20℃ 时菌株的生长受到限制,脱氮率只有 28.40%,且出现亚硝酸盐的累积.随着温度的升高,菌株生长良好,脱氮率增加,亚

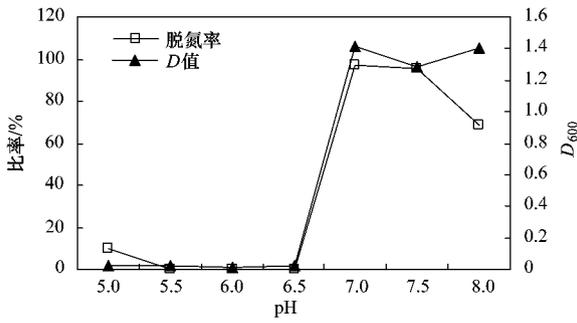
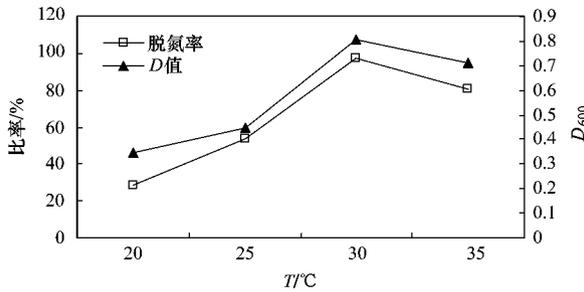
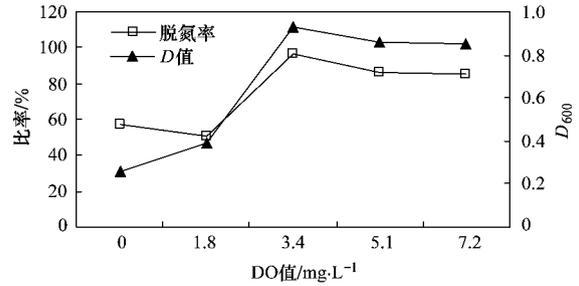
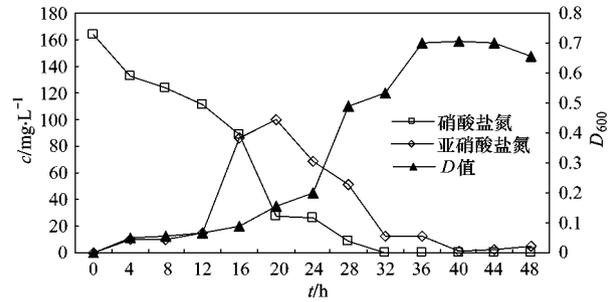
图3 不同 pH 的脱氮率和菌 D 值Fig. 3 Effects of pH on denitrification rate and D value of strain图4 不同温度的脱氮率和菌 D 值Fig. 4 Effects of temperature on denitrification rate and D value of strain图5 不同 DO 的脱氮率和菌 D 值Fig. 5 Effect of DO on denitrification rate and D value of strain

图6 硝酸盐的反硝化过程

Fig. 6 Process of nitrate denitrification

硝酸盐的累积量减少. 30°C 时脱氮率达到最高的 96.93%, 且基本无亚硝酸盐的累积; 到达 35°C 时, 脱氮率降低, 亚硝酸盐的累积量增加, 菌体 D_{600} 值也随之降低. 当温度低于 25°C 或高于 35°C 时, 脱氮率降低, 菌株的生长也受到限制, 该菌的最适生长和反硝化温度是 30°C 左右.

2.2.5 溶氧 (DO)

如图 5 所示, 随着 DO 值的增大, 菌株 F1 的脱氮率不断提高, 当 DO 值为 3.4 mg/L 时, 该菌的脱氮率达到最大, 为 96.45%. 随后菌株的脱氮率有所下降, 但差异不显著, 当 DO 值为 7.2 mg/L 时菌株 F1 24 h 的脱氮率仍可达到 85% 以上, 且没有发生显著的亚硝酸盐累积.

2.3 利用硝酸盐和亚硝酸盐为氮源进行反硝化的特性比较

分别以 NaNO_3 (初始氮浓度为 164.23 mg/L) 和 NaNO_2 (初始氮浓度为 155.80 mg/L) 为氮源, 测定菌株 F1 在好氧条件下 48 h 内的生长和脱氮率的动态变化. 如图 6 所示, 以 NaNO_3 为氮源时, 24 h 之前为 F1 菌生长的静止期, 24 ~ 40 h 为对数生长期, 40 h 后为平台期. NO_3^- -N 由初始的 164.23 mg/L 降低到 32 h 的 0 mg/L, 此时 NO_2^- -N 累积为 12.30

mg/L, 脱氮率达 92.51%. 在整个培养过程中出现了 NO_2^- -N 累积现象, 在第 20 h 达最大累计值为 99.497 mg/L, 随后逐渐降低, 至 48 h 时累积仅为 4.837 mg/L. NO_2^- -N 的积累及其消耗与 NO_3^- -N 不同步表明菌株在以硝酸盐为氮源时, 先将 NO_3^- -N 还原为 NO_2^- -N, 而 NO_2^- -N 的存在又能诱导产生亚硝酸盐还原酶, 从而将 NO_2^- -N 还原为气态氮. 从图 6 中还可看出, 反硝化作用主要发生在菌体的对数生长期, 这是因为该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.

菌株对亚硝酸盐的利用情况如图 7 所示: 菌株反硝化过程也主要发生在菌种培养的对数生长期, 菌株生长良好, 经历 8 h 的迟缓期后, 在培养的 8 ~ 32 h 进入对数生长期, NO_2^- -N 由初始的 155.80 mg/L 降低到 32 h 的 30.021 mg/L, 脱氮率达到 80.73%. 在稳定期和衰亡期亚硝酸盐浓度则基本没有变化, 这极可能是因为培养液中供菌株生长和反硝化作用的碳源耗尽所致, 这说明碳源在好氧反硝化菌的反硝化过程中起着至关重要的作用.

以上实验结果表明, 菌株以 NO_3^- -N 或 NO_2^- -N 为氮源时, 生长均良好且都具有较高的脱氮率. 从进入对数生长期的时间来看, 亚硝酸盐稍早于硝酸盐;

从反硝化发生的时间来看,硝酸盐早于亚硝酸盐;从脱氮率来看,硝酸盐脱氮率高于亚硝酸盐脱氮率.由此说明该菌株更容易利用硝酸盐进行反硝化作用,符合微生物的优先原则(即微生物应优先选择氧化还原电位高的硝酸盐作为电子受体,硝酸盐还原的产物亚硝酸盐不被优先利用).

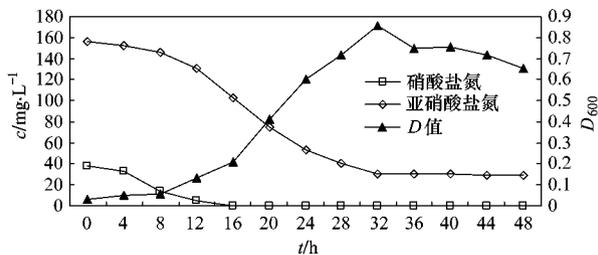


图7 亚硝酸盐的反硝化过程

Fig. 7 Process of nitrite denitrification

3 讨论

好氧反硝化细菌在自然界中广泛存在,现已有多种分离方法能够有效地筛选好氧反硝化菌^[9, 13].目前已分离出较多种类的好氧反硝化细菌,其中假单胞菌属是常见种类,如苏俊峰等^[14]从污泥中分离纯化的5株好氧反硝化细菌中有3株属于假单胞菌属.但关于适用在水产养殖中的好氧反硝化菌的报道较少.经最适生长和反硝化特性的研究发现,本实验筛选的菌株 *Pseudomonas stutzeri* F1 在各方面都能较好地适应养殖水环境.

碳源不仅是细菌赖以生长的重要能源,而且对细菌反硝化作用有重要影响. Richardson 等^[15]的研究发现,周质硝酸盐还原酶的活性很大程度上取决于碳源.安健等^[16]的研究结果表明 YX-6 菌对小分子碳源乙酸钠和丁二酸钠的利用率相对高于对大分子碳源乳酸、蔗糖和水杨酸钠的利用.而本实验研究表明,菌株 F1 在以柠檬酸钠和蔗糖为碳源时菌体生长最好,以柠檬酸钠、蔗糖、葡萄糖和乙酸钠为碳源时硝酸盐氮去除率达 100%;在以乳糖为碳源时几乎不生长.可见该菌对碳源的利用与碳源分子量大小无显著关系,因此,不同种属菌株之间的碳源利用特性不尽相同,需要今后开展进一步的研究.此外, Roberson 等^[3]研究证实在一定浓度范围内,作为能源的碳源浓度越高,好氧反硝化速率越快.这与本研究结果基本一致,菌株 F1 在 C/N 为 5 时,脱氮率大大提高,达到 95.32%;进一步增加 C/N,脱氮率增加不显著.

Gupta^[17]和 Timmermans 等^[18]的研究表明,细

菌生长及反硝化酶活性的最适 pH 值是中性或弱碱性, pH 过高或过低均会对菌株生长及反硝化性能的发挥产生影响.王弘宇等^[19]和廖绍安等^[20]分别对好氧反硝化菌株 C3 (*Pseudomonas* sp.) 和嗜麦芽寡养单胞菌 X0412 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 研究也同样表明, pH 为中性条件最有利于菌株生长及反硝化性能的发挥.这与本研究结果一致,过酸 (pH < 7) 和过碱 (pH > 8) 都会显著降低菌株 F1 的反硝化活性.分析原因主要是由于偏酸或偏碱会抑制反硝化还原酶的活性和微生物对营养物质的吸收.可见菌株 F1 适宜生长和反硝化的 pH 条件为中性至偏碱性,而养殖水体的 pH 一般也为中性偏碱性,在此范围该菌能发挥最佳的反硝化能力.

温度是影响反硝化还原酶活性的一个重要因素.研究表明反硝化作用最适温度范围为 25 ~ 35℃^[21],这与本实验研究结果一致.菌株 F1 在 25 ~ 35℃ 之间的脱氮率在 53% 以上,在 30℃ 时达到最高 96.93%.因此菌株 F1 反硝化的适宜温度范围与水产养殖水体的温度变动范围也相符.

研究 DO 对细菌的反硝化性能的影响表明,菌株 F1 在 DO 值 3.4 ~ 7.2 mg/L 内对 DO 浓度不敏感,都可以选择硝酸盐作为电子受体,氧既不会与硝酸盐竞争电子供体,也不会抑制硝酸盐还原酶及亚硝酸盐还原酶的活性.这与于爱茸等^[22]的研究结果不同,可见不同菌种的好氧反硝化机制存在较大差异.在水产养殖中,尤其是鱼类,养殖水体中的溶解氧一般维持在 4 ~ 8 mg/L 之间^[22],而根据所报道的好氧反硝化菌来看,部分菌种对水体中溶解氧的耐受性较差,反硝化效率偏低^[23].因此本研究筛选的好氧反硝化菌株 *Pseudomonas stutzeri* F1 在 3.4 ~ 7.2 mg/L 仍有较高的脱氮率 (> 85%),为好氧条件下降解硝态氮和亚硝态氮展示了良好的前景.

对菌株 F1 反硝化特性的研究表明其反硝化作用主要发生在细菌的对数生长期,随着菌体的快速增殖,水体中硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的量会迅速下降^[24].同时该菌株具有较高的反硝化能力,在 32 h 内能将 164.23 mg/L 的 NO_3^- -N 降解为 0, NO_2^- -N 累积仅为 12.30 mg/L,脱氮率达 92.51%;将 155.80 mg/L 的 NO_2^- -N 降解为 30.021 mg/L,脱氮率达到 80.73%.

菌株 F1 在以 NaNO_3 为氮源进行反硝化作用的过程中出现了 NO_2^- -N 累积现象,这与马放等^[25]报道过的菌株 X31 有所不同,他们发现菌株 X31 的反硝化过程基本无亚硝酸盐的累积.但 F1 菌株培养末期

NO_2^- -N 基本消耗完全,这说明微生物的好氧反硝化由菌种的反硝化酶系实现,即好氧反硝化菌的硝酸盐还原酶将硝酸盐还原为亚硝酸盐,而后亚硝酸还原酶和氮氧化物还原酶发挥作用将亚硝酸盐和氮氧化物还原为氮气.这与王弘宇等^[19]的研究结果较一致.

4 结论

(1)从草鱼池中筛选得到 1 株具有较高脱氮效率的好氧反硝化菌 *Pseudomonas stutzeri* F1.

(2)菌株 F1 能分别以适当浓度的柠檬酸钠、蔗糖、葡萄糖、乙酸钠为碳源进行较好的生长和脱氮,具有较广的碳源谱.其最适宜生长和反硝化的 pH 和温度分别为 7.0 和 30℃.该菌具有较好的耐氧性能,当 C/N 比值不低于 10 时,该菌株的生长和反硝化过程不再受碳源限制.

(3)该菌以硝酸盐或亚硝酸盐为氮源时生长良好,都具有较高的脱氮率,且反硝化过程都主要发生在对数生长期.从进入对数生长期的时间来看,亚硝酸盐稍早于硝酸盐;从反硝化发生的时间来看,硝酸盐早于亚硝酸盐;从脱氮率来看,硝酸盐高于亚硝酸盐,由此说明该菌更容易利用硝酸盐进行反硝化作用.

参考文献:

- [1] 杨希,刘德立,邓灵福,等.蜡状芽孢杆菌好氧反硝化特性研究[J].环境科学研究,2008,21(3):155-159.
- [2] Tavares P, Pereira A S, Moura J J G, et al. Metalloenzymes of the denitrification pathway [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006,100(12): 2087-2100.
- [3] Robertson L A, Kuenen J G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium[J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129(8): 2847-2855.
- [4] Pai S L, Chong N M, Chen C H. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment [J]. Bioresource Technology, 1999, 68(2): 179-185.
- [5] Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1 [J]. Biotechnology Letters, 1997, 11(19): 1157-1159.
- [6] Chen F, Xia Q, Ju L K. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(11): 6715-6722.
- [7] Joong K K, Kyoung J P, Kyoung S C, et al. Aerobic nitrification-

denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains [J]. Bioresource Technology, 2005, 96(17): 1897-1906.

- [8] 张亚光.一株好氧反硝化菌的特征及系统进化分析[J].华侨大学学报,2004,25(1):75-78.
- [9] 张小玲,张卫东,张玲,等.好氧反硝化菌的选育及其初步应用[J].微生物学通报,2008,35(10):1556-1561.
- [10] 翟茜,汪苹,李秀婷,等.活性污泥中好氧反硝化菌的富集筛选及鉴别[J].环境科学与技术,2007,30(1):11-13.
- [11] 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.
- [12] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M].(第八版).北京:科学出版社,1984.
- [13] 孔庆鑫,李君文,王新为,等.一种新的好氧反硝化菌筛选方法的建立及新菌株的发现[J].应用与环境生物学报,2005,11(2):222-225.
- [14] 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.
- [15] Richardson D J, Ferguson S J. The influence of carbon substrate on the activity of the periplasmic nitrate reductase in aerobically grown *Thiosphaera pantotropha* [J]. Archives of Microbiology, 1992,157(6):535-537.
- [16] 安健,宋增福,杨先乐,等.好氧反硝化细菌 YX-6 特性及鉴定分析[J].中国水产科学,2010,17(3):561-569.
- [17] Gupta A B. *Thiosphaera Pantotropha*: a sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21(8): 589-595.
- [18] Timmermans P, Van Haute A. Denitrification with methanol: Fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hypomicrobium* sp. [J]. Water Research, 1983, 17(10): 1249-1255.
- [19] 王弘宇,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.
- [20] 廖绍安,郑桂丽,王安利,等.养虾池好氧反硝化细菌新菌株的分离鉴定及特征[J].生态学报,2006,26(11):3718-3724.
- [21] 阎胜利,温淑瑶.土壤中反硝化作用的试验研究[J].河海大学学报:自然科学版,1998,26(2):90-94.
- [22] 于爱茸,李尤,俞吉安.一株耐氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性研究[J].微生物学杂志,2005,25(3):77-81.
- [23] Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1 [J]. Biotechnology Letters, 1997,19(11):1157-1159.
- [24] 刘晶晶,汪苹,王欢.一株异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮性能研究[J].环境科学研究,2009,21(3):121-125.
- [25] 马放,王弘宇,周丹丹,等.好氧反硝化菌株 X31 的反硝化特性[J].华南理工大学学报,2005,33(7):42-46.