

1 株好氧脱氮菌的筛选与脱氮特性研究

王景峰^{1,2}, 金敏^{1,2}, 谌志强^{1,2}, 邱志刚^{1,2}, 张斌^{1,2}, 孔庆鑫^{1,2}, 李君文^{1,2*}

(1. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050; 2. 天津市环境与食品安全风险监控技术重点实验室, 天津 300050)

摘要: 研究好氧反硝化菌的筛选、生物脱氮机制及代谢特征. 采用极限稀释及平板划线法对好氧条件下能同步硝化/反硝化的细菌进行广泛筛选, 分离到 6 株具有好氧脱氮效果的异养菌, 其中 YY-5 菌具有高效的好氧脱氮能力. 对该菌株好氧脱氮过程气相和液相中可能生成的气态产物以及硝态氮等形式的含氮产物变化进行定量检测分析, 探讨脱氮过程氮素的去向及其脱氮途径. YY-5 菌好氧条件下脱氮过程中总氮的去除与氮气生成量之间基本保持平衡, 并且在脱氮过程中没有检测到 N₂O 气体生成, 液相中也没有出现硝酸盐和亚硝酸盐的积累; YY-5 菌羟胺氧化酶提取液具有较高活性, 其羟胺降解率可达到 70.9%. 采用 16S rRNA 同源性比对法对分离到的细菌进行分析, 结果显示与不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.) 同源性较高.

关键词: 脱氮; 异养菌; 筛选; 气态产物; 羟胺氧化酶

中图分类号: X172; X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)08-2409-05

Screening of the Aerobic Simultaneous Denitrobacteria and Its Denitrification Characteristics

WANG Jing-feng^{1,2}, JIN Min^{1,2}, SHEN Zhi-qiang^{1,2}, QIU Zhi-gang^{1,2}, ZHANG Bin^{1,2}, KONG Qing-xin^{1,2}, LI Jun-wen^{1,2}

(1. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Risk Assessment and Control for Environment & Food Safety, Tianjin 300050, China)

Abstract: To screen aerobic heterotrophic denitrifying bacteria from various samples and detect metabolites quantitatively during their denitrification process. The bacteria were screened by limit dilution and crossed separation. Nitrate and nitrite were determined using phenol disulfonic acid and *N*-(1-naphthyl)-ethylene diamine by ultraviolet spectrophotometry. The N₂ was detected by gas chromatography. Six aerobic heterotrophic bacteria were isolated and YY-5 was demonstrated to be the greatest denitrifier. The degradation rate of its hydroxylamine oxidoreductase can reached to 70.9%. Above all, there is a good balance between the removal of total nitrogen and production of N₂ in process. No N₂O was produced and no nitrate or nitrite were accumulated. The high ability of aerobic heterotrophic bacterium YY-5 for denitrification was screened, which showed higher homology with *Acinetobacter* genus through 16S rRNA blast.

Key words: denitrification; heterotrophic bacteria; screening; gaseous products; hydroxylamine oxidoreductase

氮是造成水体污染的重要污染物之一. 传统生物脱氮理论认为硝化反应是由专性化能自养菌完成的, 反硝化反应是由异养菌在缺氧条件下完成的. 然而, 20 世纪 80 年代, 国内外研究发现 *Pseudomonas fluorescens*、*Alcaligenes faecalis*、*Pseudomonas aeruginosa* 等可以对有机或无机氮化合物进行异养硝化^[1~4]. 不仅如此, 有研究发现^[5,6]许多异养硝化菌具有好氧反硝化能力, 可以将 NH₄⁺-N 转化为气态产物而去除, 其分离到的好氧反硝化菌有 *T. pantotropa*、*P. stutzeri* SU 等. 异养硝化菌以及好氧反硝化细菌的发现对于解决传统生物脱氮处理系统启动时间长, 硝化环节条件要求苛刻, 硝化和反硝化不能同步进行等缺点具有重要的科学意义^[7~9]. 然而, 目前对于好氧反硝化的反应机制还存在着不同的认知观点, 并且缺乏好氧反硝化菌的有

效筛选、驯化方法. 本研究的目标是利用稀释分离法对好氧条件下能同步硝化/反硝化的细菌进行广泛筛选, 并对获得的 1 株高效脱氮细菌的生物脱氮代谢产物进行定量分析, 同时对其羟胺氧化酶活性进行初步探讨, 对该菌株 16S rRNA 同源性进行比对分析, 进而明确好氧反硝化菌的脱氮机制, 并完善其菌种信息.

1 材料与方法

1.1 培养基

异养硝化培养基: (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, 琥珀酸钠

收稿日期: 2010-08-17; 修订日期: 2010-10-10
基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2009AA06Z312)
作者简介: 王景峰 (1974 ~), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为污水生物处理理论, E-mail: wangjingfeng0116@163.com
* 通讯联系人, E-mail: junwen9999@hotmail.com

2. 17 g, 维氏盐溶液 50 mL, 加水溶解, 补充蒸馏水至1 000 mL (若需固体培养基, 则加入 2% 琼脂). 维氏盐溶液: K_2HPO_4 5.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5 g, $NaCl$ 2.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.05 g, 溶解后加水定容至1 000 mL.

1.2 细菌的初筛与复筛

从样品富集液中吸取 1 mL 培养液, 加入新鲜液体异硝化培养基中30℃、120 r/min摇床培养 3 d. 然后将氨氮降低较明显的样品稀释 10^7 倍, 将稀释液移入新鲜培养基中, 30℃、120 r/min摇床培养 3 d. 选取氨氮降低最多的样品划线接种在异硝化固体培养基表面, 30℃ 培养 3 d, 挑取单菌落, 作为初筛菌.

将初筛菌接种于新鲜液体培养基中, 30℃、120 r/min摇床培养 3 d, 进行复筛. 将氨氮降低最明显的菌落划线接种在异硝化固体培养基表面, 挑单菌落纯化 2 次, 即得到所筛选菌株.

1.3 筛选菌株 16S rRNA 同源性比对分析

采用通用正向引物 P_1 : CCg gatccAGAGTTTGA TCCTGGTCAGAACGAACGCT 和反向引物 P_3 : CGgg atccTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC^[10]. 纯化后的 PCR 产物测序. 将测序结果提交到 GenBank 进行 BLAST 分析, 将其与不动杆菌属以及 16S rRNA 同源性相近属的基因利用 DNAMAN 进行同源性分析, 建立菌株的发育树.

1.4 测试指标与方法

1.4.1 代谢产物定量及平衡实验

将 50 mL 的异硝化培养基加入到 150 mL 血清瓶中, 接种细菌, 胶塞密封. 将注射器针头通过胶塞刺入瓶中, 针头另一端连接真空泵. 抽真空后, 向瓶中注入氧气, 如此重复 3 次, 使瓶中的空气被氧气置换出来. 将针孔密封, 30℃, 120 r/min摇床培养 72 h. 抽取顶气, 检测 N_2 、 O_2 及 N_2O 的含量, 以及培养基中氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮和总氮的变化.

硝酸盐采用酚二磺酸紫外分光光度法测定, 亚硝酸盐测定方法为 *N*-(1-萘基)-乙二胺光度法, 氨氮采用纳氏试剂光度法测定, 总氮采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法测定^[11]; CO_2 、 N_2 及 O_2 定量测定: 气相色谱仪 (GC-9A 日本岛津公司) GC/TCD 检测^[4]; N_2O 定量测定: 利用 GC/ECD 检测^[12,13].

1.4.2 羟胺氧化酶的粗提液活性检测

将菌体重悬于 10 mL 10 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5); 置冰水浴中超声破碎. 将破碎液 4℃, 6 000 r/min离心 20 min. 上清液经 0.22 μm 滤

膜过滤, 分装, -80℃ 保存待用.

在 15 mm × 125 mm 的试管内加入 0.5 mL 上述酶反应液, 用水将体积补足为 2.8 mL. 加入 0.2 mL 12% 的三氯乙酸溶液终止酶促反应, 然后加 1.0 mL 1% 的 8-羟基喹啉的乙醇溶液, 轻柔振荡. 加入 1.0 mL 1.0 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液, 剧烈振荡. 密封, 沸水浴 1 min, 自然冷却 15 min. 使用分光光度计测定 705 nm 检测其吸光度值, 计算羟胺浓度^[14].

2 结果与讨论

2.1 好氧脱氮细菌的分离与效果比较

通过稀释分离法获得了 6 株具有异硝化能力的细菌, 接种于液体异硝化培养基, 于 30℃、120 r/min摇床培养 24 h, 对氨氮的去除效果如表 1.

表 1 筛得不同菌株降解氨氮效果比较

Table 1 Comparison of denitrifying ability to screened bacteria	
菌株号	氨氮浓度/mg · L ⁻¹
空白对照	58.49
YY-1	11.96
YY-2	3.58
YY-3	6.12
YY-4	13.11
YY-5	未检出
YY-6	14.17

从表 1 可以看出, 分离的菌株中, YY-5 脱氮效果最好, 培养 24 h 培养液中的氨氮几乎全部脱除, 因此本研究选定 YY-5 为研究菌株. 将菌株 YY-5 接种于液体培养基, 30℃、120 r/min摇床培养 72 h, 每隔一定时间对培养基的氨氮、硝态氮、亚硝态氮进行测定 (图 1). 可以看出, 随着氨氮的大量去除 (与图 1 对照浓度比较), 系统中没有明显的硝态氮 (硝酸盐氮和亚硝酸盐氮总量之和) 的累积.

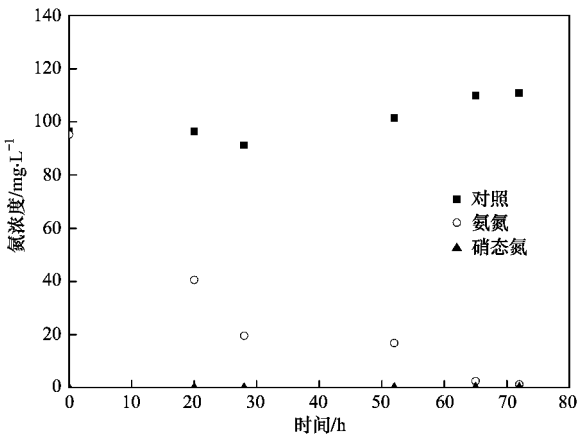


图 1 菌株 YY-5 好氧降解氨氮曲线

Fig. 1 Ammonia removal and nitrite and nitrate accumulation of YY-5

2.2 YY-5 脱氮代谢产物的定量及总氮平衡

生物脱氮过程中氨氮可以被转化为硝酸盐氮、亚硝酸盐氮、含氮气体 (NH₃、N₂、N₂O 等) 以及有机氮等形式。而图 1 中,培养基中的氨氮能够被快速去除,并且没有硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的积累,故有可

能被转化为含氮气体以及有机氮。因此,本研究对 YY-5 降解氨氮代谢可能生成的气态产物以及硝态氮等形式的含氮产物变化进行检测,探讨脱氮过程氮素的去向及其脱氮途径,主要结果如表 2、表 3 所示。

表 2 YY-5 以氨氮为唯一氮源脱氮过程中主要气体质量变化/mg
Table 2 Gas production of YY-5 during denitrification in ammonia media/mg

样品名称	O ₂	CO ₂	N ₂	N ₂ O
对照 1	5.128	0.012 7	4.231	0.027 9
对照 2	5.190	0.009 0	3.734	0.012 4
YY-5-1	3.290	0.386	5.541	0.012 4
YY-5-2	3.065	0.321	5.357	0.017 7
平均增加量	-1.689	0.343	1.417	-0.005 1

表 3 氨氮培养基中主要含氮物质浓度变化/mg·L⁻¹
Table 3 Changes in nitrogen compound concentration in ammonia medium/mg·L⁻¹

样品	氨氮	硝酸盐氮	亚硝酸盐氮	总氮
对照-1	119.70	未检出	未检出	114.30
对照-2	121.40	未检出	未检出	115.44
YY-5-1	51.36	未检出	未检出	89.65
YY-5-2	55.49	未检出	未检出	88.01
浓度变化量	-67.125	无	无	-26.04

结果表明,菌株 YY-5 在以氨氮为唯一氮源的培养基中培养 72 h 后,氨氮减少 3.356 2 mg,生成氮气 1.417 mg,培养基内总氮减少 1.302 mg,无硝酸盐氮、亚硝酸盐氮的生成,也未检测到 N₂O。培养基内总氮的减少量与氮气产生量基本持平,说明整个过程中所产生的含氮气体为 N₂。又因为在整个过程中未检测出硝酸盐氮和亚硝酸盐氮,所以培养基总氮剩余量减去氨氮剩余量应为同化的氮量,即氨氮同化量 = 总氮量_{72 h} - 氨氮量_{72 h} = 88.83 × 0.05 - 53.43 × 0.05 = 1.770 (mg); 新生成总氮量 = 氨氮同化量 + N₂ = 1.770 + 1.417 = 3.187 (mg); 由此可见,氮气的产生量达到生成总氮量的 44% 左右,并且新生成总氮量与氨氮的去除量之间基本能够达到平衡。

2.3 羟胺氧化酶粗提液酶活分析

在对异养硝化菌脱氮相关酶的研究中发现,异养硝化菌可利用氨单加氧酶 (AMO) 将氨氮氧化为羟胺,而羟胺可在一类异养硝化菌特有的不含血红素的羟胺氧化酶 (HAO) 的作用下转化为亚硝酸盐或 N₂O^[15-17]。羟胺氧化酶可以将中间代谢产物氧化成多种代谢终产物,这是异养硝化菌与其他硝化细菌相区别最大的一个酶,也是决定好氧脱氮特性的关键酶。笔者对 YY-5 细菌羟胺氧化酶进行分离纯化及活性研究,为 YY-5 细菌的氨氮代谢途径提供

有力的证据(表 4)。

表 4 YY-5 中 HAO 酶粗提液酶活分析($\bar{X} \pm S, n = 3$)
Table 4 Enzyme activity analysis on HAO of YY-5 ($\bar{X} \pm S, n = 3$)

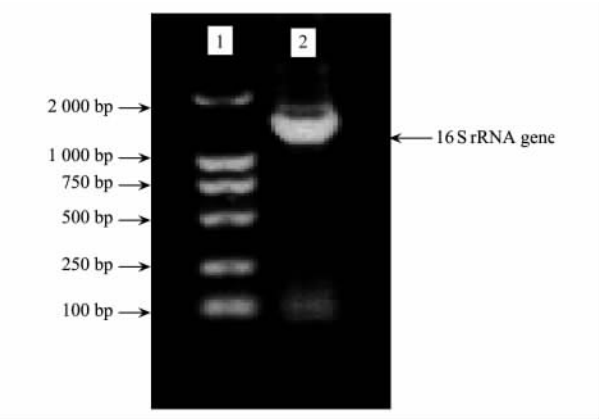
组别	羟胺浓度 /nmol·mL ⁻¹	亚硝酸盐 /mg·L ⁻¹
对照组	86.4 ± 4.7	未检出
牛血清白蛋白组	72.1 ± 1.2	未检出
煮沸过的粗提液组	74.6 ± 3.2	未检出
粗提液组	25.1 ± 4.9	未检出

实验表明,在反应体系中加入 BSA 蛋白质能够促进羟胺少量降解。在 15 min 内,牛血清白蛋白组羟胺浓度下降了 14.3 nmol/L,降解率为 16.6%;煮沸过的粗提液组下降了 11.8 nmol/L,降解率为 13.7%;但未煮沸的粗提液羟胺浓度比对照组降低了 61.3 nmol/L,降解率为 70.9%,表明该粗提液具有较强的 HAO 活性。另外,在酶反应体系中未检测出亚硝酸盐,表明羟胺氧化产物并非亚硝酸盐而是气态产物。

2.4 16S rRNA 的同源性比较

利用引物 P₁、P₃ 对分离得到的 YY-5 菌株的 DNA 样品进行扩增,扩增产物作琼脂糖凝胶电泳,在约 1 500 bp 处出现特异性条带为 16S rRNA 基因片段扩增条带,见图 2。

对其进行测序,序列长度为 1 436 bp。将该 16S rRNA 序列提交 GenBank,序列号为 gi: AY639376。



1. Marker(DL2000) 2. 16S rRNA 基因

图2 菌株 YY-5 16S rRNA 基因电泳图

Fig.2 Amplification of 16S rRNA gene of YY-5 by PCR

经 BLAST 同源性检索,它与 *Acinetobacter* sp. 同源性较高,与 *A. haemolyticus* 同源性为 99%. 将其与不动杆菌属以及 16S rRNA 同源性相近属的基因(表 3)利用 DNAMAN 进行同源性分析,绘制同源树(图 3).

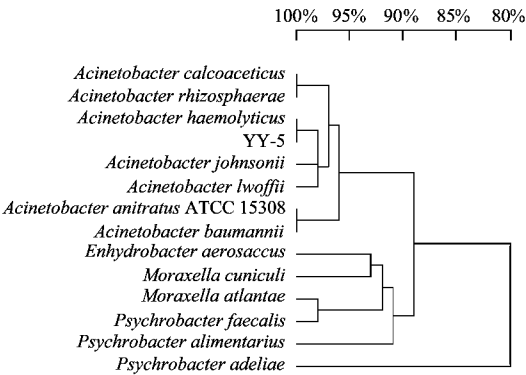


图3 菌株 YY-5 16S rRNA 基因同源进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of YY-5 based on 16S rRNA sequences homology

由图 3 可知,YY-5 与不动杆菌属同源性较高,而与其他几个不动杆菌近源的属同源性相差较大.

3 结论

(1)采用极限稀释及平板划线法分离到 6 株具有好氧脱氮效果的异养菌. 其中 YY-5 具有较好的好氧脱氮能力,好氧阶段随着氨氮的去除未发现硝酸盐和亚硝酸盐的积累.

(2)对 YY-5 好氧条件下脱氮素过程中的各种代谢产物进行了定量检测. 总氮去除与氮气生成量之间基本平衡,另外,在整个脱氮过程中没有 N₂O 的生成.

(3)对 YY-5 中的 HAO 进行粗提及酶活测定,粗提液氨氮浓度比对照组降低了 61.3 nmol/L,氨氮降解率为 70.9%,表明该粗提液具有较强的 HAO 活性.

(4)通过 16S rRNA 的同源性比较,菌株 YY-5 与不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)同源性较高.

参考文献:

[1] Robertson L A, Van Neil E W J, Torremans Rob A M, *et al.* Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **54**(1): 2812-2818.

[2] Geneviève M, Prieur D. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, **46**(5): 465-473.

[3] 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.

[4] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No.4 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, **100** (2): 184-191.

[5] 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**: 2847-2855.

[6] Su J J, Liu B Y, Liu C Y. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, **90**(3): 457-462.

[7] Ebru C, Mehmet A K. Isolation and characterization of aerobic denitrifiers from agricultural soil [J]. Turkish Journal of Biology, 2004, **28** (1): 9-14.

[8] Jetten M S M. New pathways for ammonia conversion in soil and aquatic systems [J]. Plant and Soil, 2001, **230**: 9-19.

[9] Joong K K, Kyoung J P, Kyoung S C, *et al.* Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains [J]. Bioresource Technology, 2005, **96**: 1897-1906.

[10] 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. 409-412.

[11] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法 [M]. (第三版). 北京:中国环境科学出版社,1989. 252-255.

[12] Otte S, Grobhen N G, Robertson L A, *et al.* Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(7): 2421-2426.

[13] Wehrfritz J M, Reilly A, Spiro S, *et al.* Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*: Identification of electron acceptors that couple heterotrophic

nitrification to aerobic denitrification [J]. FEBS Letters , 1993 , **335** (2) : 246-250.

[14] Yamanaka T , Shinra M . Cytochrome c-552 and cytochrome c-554 derived from *Nitrosomonas europaea* : Purification , properties , and their function in hydroxylamine oxidation [J]. Journal of Biochemistry , 1974 , **75** (6) : 1265-1273.

[15] Terry K R , Hooper A B . Hydroxylamine oxidoreductase : a 20-heme , 200 000 molecular weight cytochrome c with unusual denaturation properties which forms a 63 000 molecular weight monomer after heme removal [J]. Biochemistry , 1981 , **20** (24) : 7026-7032.

[16] Schmid M C , Hooper A B , Klotz M G , *et al.* Environmental detection of octahaem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria [J]. Environmental Microbiology , 2008 , **10** (11) : 3140-3149.

[17] Kostera J , Youngblut M D , Slosarczyk J M , *et al.* Kinetic and product distribution analysis of NO center dot reductase activity in *Nitrosomonas europaea* hydroxylamine oxidoreductase [J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry , 2008 , **13** (7) : 1073-1083.