

好氧反硝化细菌 N6-1 亚硝酸盐还原活性的研究

陈 松 洪秀娟 黄雷鸣 窦 洁 周长林*

(中国药科大学生命科学与技术学院 南京 210009)

摘 要: 针对本实验室筛选得到的 1 株好氧反硝化细菌(Aerobic Denitrifying Bacteria)N6-1, 研究了培养条件和培养基组分对菌株亚硝酸盐还原活性的影响。结果表明, 其最适培养条件为 30℃、摇床转速 120 r/min、初始 pH 8.5, 分别以 NaNO₂ 和乙酸钠为唯一氮源和碳源时, 最适碳氮比为 12; 初始 NaNO₂ 浓度为 2 g/L 时, 培养 20 h 后 NO₂⁻-N 全部被还原, 平均还原速率可达 20.3 mg/L·h; 1.5% NaCl 和 1% 蛋白胨对其亚硝酸盐还原活性没有明显影响; 10 L 发酵罐培养 24 h 后菌体浓度高达 1.2×10¹¹ CFU/mL。

关键词: 好氧反硝化细菌, 亚硝酸盐还原, 还原速率

Study on the Nitrite-reducing Activity of Aerobic Denitrifying Bacterial Strain N6-1

CHEN Song HONG Xiu-Juan HUANG Lei-Ming DOU Jie ZHOU Chang-Lin*

(School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

Abstract: The nitrite-reducing activity of aerobic denitrifying bacterial strain N6-1 was studied. It showed that the nitrite-reducing activity reached the highest at 30℃, 120 r/min, pH 8.5 and C/N ratio 12, using CH₃COONa and NaNO₂ as the sole carbon source and nitrogen source, respectively. When the initial NaNO₂ concentration was 2 g/L, NO₂⁻-N was reduced completely after 20 hours cultivation with the reducing rate of 20.3 mg/L·h. There would be no effect on its nitrite-reducing activity in the present of 1.5% NaCl or 1% peptone. The cell concentration could reach 1.2×10¹¹ CFU/mL after 24 hours cultivation in 10 L fermentor.

Keywords: Aerobic denitrifying bacteria, Nitrite-reducing, Reducing rate

反硝化细菌(Denitrifying Bacteria)是将硝态氮或亚硝态氮还原为气态氮的细菌的总称。一般认为反硝化细菌是异养性兼性厌氧细菌, 在有氧条件下以 O₂ 为电子受体, 只有在缺氧条件下才以硝酸盐或亚硝酸盐为电子受体, 进行反硝化作用。随着研究的进展, Robertson 和 Kuenen^[1] 发现了好氧反硝化细菌(Aerobic Denitrifying Bacteria)的存在, 即在有氧条件下也可进行反硝化作用。国内也开始对好氧反

硝化细菌分离、鉴定、培养和应用等方面进行了研究^[2-5]。

好氧反硝化细菌具有还原亚硝酸盐的活性, 可应用于治理水体中累积的亚硝酸盐。水产养殖中普遍采用封闭式循环流水的养殖方式, 长期闭路循环导致水体中氨氮和亚硝酸盐的累积, 特别是亚硝酸盐的累积对水产养殖动物的危害极大。本实验研究了 1 株筛选获得的好氧反硝化细菌, 在不同培养条

件和不同培养基组分下的亚硝酸盐还原活性, 并进行了 10 L 发酵罐培养工艺的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 好氧反硝化细菌 N6-1, 由本实验室筛选得到。

1.1.2 仪器: 发酵罐 Biostat C10-3(B. Braun Biotech International, Germany); 恒温摇床 C-25 Incubactor Shaker(New Brunswick Scientific, USA); 752N 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.1.3 试剂: 均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基: 种子培养基 :NaNO₂ 0.5 g, CH₃COONa 5.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.03 g, MnSO₄·4H₂O 0.01 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, K₂HPO₄ 0.75 g, NaH₂PO₄ 0.25 g, 蒸馏水定容至 1 L, pH 8.5。发酵培养基 :MgSO₄·7H₂O 0.03 g, MnSO₄·4H₂O 0.01 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, K₂HPO₄ 0.75 g, NaH₂PO₄ 0.25 g, NaNO₂ 0.5 g~5 g, 碳源及碳源浓度根据实验要求调整, NaCl 0 g~35 g, 蛋白胨 0 g~10 g, 蒸馏水定容至 1 L, pH 6.0~10.0。

1.2.2 NO₂⁻-N测定方法: N-(1-萘基)-乙二胺光度法^[6]。

1.2.3 菌体浓度测定方法: 平板活菌计数法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 初始 pH 对亚硝酸盐还原活性的影响

温度、溶氧、pH对好氧反硝化细菌的生长及其还原活性均有影响。培养温度为 30 时, 菌株生长和进行反硝化过程各类酶的活性较高。好氧反硝化细菌对溶氧的要求非常严格。溶氧过高时, 菌体以 O₂为电子受体, 反硝化作用减弱; 溶氧过低时, 菌体生长受限制, 反硝化作用亦减弱。研究表明, 250 mL 摇瓶装液量为 100 mL, 摇床转速为 120 r/min时, 溶氧较适宜。pH可影响酶活、菌体对培养基组分的

利用及菌体细胞的结构, 从而影响菌株的生长和还原活性。pH还会影响反硝化作用的终产物, pH高于 7.3 时终产物为 N₂, pH低于 7.3 时终产物为 N₂O^[8]。实验考察了初始pH对还原活性的影响(图 1)。结果表明, pH 7.0~10.0 均可进行反硝化作用, pH 8.5 时还原活性最强。菌株适宜在偏碱性的条件下生长和进行反硝化作用。

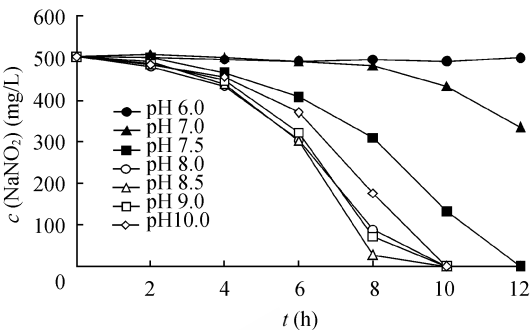


图 1 初始 pH 对菌株亚硝酸盐还原活性的影响
Fig. 1 Effect of initial pH on the nitrite-reducing activity of strain N6-1

2.2 碳源对亚硝酸盐还原活性的影响

好氧反硝化细菌为异养菌, 须添加有机碳源才能正常生长和进行反硝化作用。实验考察了分别以 5.0 g/L 乙酸钠、葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、蔗糖和可溶性淀粉为唯一碳源, 0.5 g/L NaNO₂为唯一氮源时, 对还原活性的影响(表 1)。结果表明, 菌株以乙酸钠为碳源时, 培养 12 h后NO₂⁻-N全部被还原, 即最适碳源为乙酸钠。

2.3 碳氮比对亚硝酸盐还原活性的影响

好氧反硝化细菌除以有机碳源为电子供体外, 还需碳源合成细胞物质。实验中NaNO₂浓度定为 0.5 g/L, 通过改变乙酸钠浓度来改变C/N(摩尔比), 考察了C/N对还原活性的影响(表 2)。结果表明, C/N 不低于 12 时, 培养 12 h后NO₂⁻-N全部被还原, 菌体生长和反硝化作用不再受碳源限制。

表 1 不同碳源培养时的NO₂⁻-N还原率
Table 1 The reducing ratio of NO₂⁻-N with different carbon sources

Time (h)	Reducing ratio (%)					
	Sodium acetate	Glucose	Mannitol	Maltose	Sucrose	Starch soluble
12	100	72.8	30.4	1.6	3.2	83.2
24	100	100	100	6.8	21.6	100
36	100	100	100	38.0	53.2	100
48	100	100	100	100	100	100

表 2 不同C/N培养时的NO₂⁻-N还原率
Table 2 The reducing ratio of NO₂⁻-N with different C/N

C/N	1	4	8	12	16	20
Reducing ratio (%)	4.6	28.4	64.2	100	100	100

2.4 初始NaNO₂浓度对还原活性的影响

实验中保持C/N为 12, 改变NaNO₂浓度, 考察了初始NaNO₂浓度对还原活性的影响(图 2)。结果表明, 菌株在初始NaNO₂浓度不高于 4 g/L时, 对还原活性影响不大, 初始NaNO₂浓度高于 5 g/L时, 会抑制菌株的生长而影响其还原活性。初始NaNO₂浓度为 2 g/L时, NO₂⁻-N平均还原速率最高, 可达 20.3 mg/L·h(表 3)。

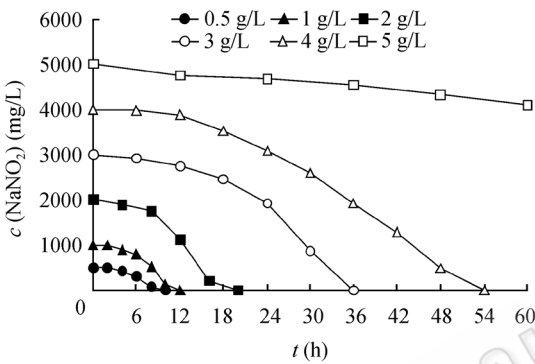


图 2 初始NaNO₂浓度对菌株亚硝酸盐还原活性的影响
Fig. 2 Effect of initial NaNO₂ concentration on the nitrite-reducing activity of strain N6-1

表 3 不同初始NaNO₂浓度时的NO₂⁻-N平均还原速率
Table 3 The average reducing rate of NO₂⁻-N with different initial NaNO₂ concentration

Initial NaNO ₂ concentration (g/L)	Initial NO ₂ ⁻ -N concentration (mg/L)	Residual NO ₂ ⁻ -N concentration (mg/L)	Time (h)	Average reducing rate (mg/L·h)
0.5	101	0	10	10.1
1	203	0	12	16.9
2	406	0	20	20.3
3	609	0	36	16.9
4	812	0	54	15.0
5	1014	828	60	3.1

2.5 NaCl 对亚硝酸盐还原活性的影响

水产养殖的水体中存在一定的盐浓度, 淡水盐浓度一般不超过 0.5 g/L, 海水平均盐浓度为 35 g/L。实验考察了 NaCl 浓度对还原活性的影响(图 3)。结果表明, NaCl 浓度不高于 15 g/L 时, 对菌株的还原

活性没有明显影响; NaCl 浓度过高时, 则会影响菌株生长而抑制其反硝化作用。菌株由土壤中筛选得到, 并不适应海水的高盐浓度。但就普通淡水养殖的水体, 并不影响其还原活性, 可快速去除水体中的亚硝酸盐。

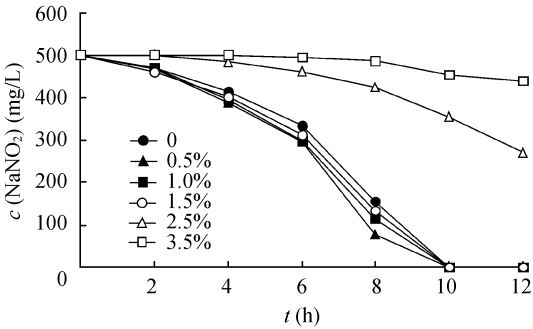


图 3 NaCl 对菌株亚硝酸盐还原活性的影响
Fig. 3 Effect of NaCl on the nitrite-reducing activity of strain N6-1

2.6 蛋白胨对亚硝酸盐还原活性的影响

好氧反硝化细菌以硝酸盐或亚硝酸盐为唯一氮源时, 通过同化硝酸盐还原(Assimilatory Nitrate Reduction)来合成细胞物质。当培养基中存在其它含氮有机物时, 菌体可将含氮有机物分解后合成细胞物质。实验以蛋白胨为含氮有机物, 考察了蛋白胨对还原活性的影响(图 4)。结果表明, 蛋白胨浓度在 0 g/L~10 g/L 的范围内对菌株的还原活性没有明显影响。水体中存在一定浓度的含氮有机物时, 不影响菌株对亚硝酸盐的还原。

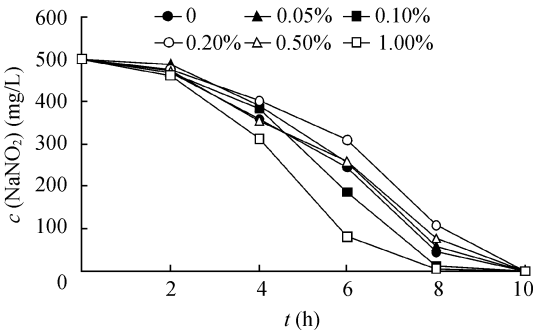


图 4 蛋白胨对菌株亚硝酸盐还原活性的影响
Fig. 4 Effect of peptone on the nitrite-reducing activity of strain N6-1

2.7 发酵罐培养与亚硝酸盐还原活性的研究

根据摇瓶实验的研究结果, 确定发酵罐的培养条件: 30 ℃、搅拌转速 100 r/min、通气量 0.05 vvm、接种量 5%, 发酵培养基组成(g/L): NaNO₂ 0.5,

CH_3COONa 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, K_2HPO_4 0.75, NaH_2PO_4 0.25, 初始 pH 调节至 8.5. $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 在 10 h 内全部被还原, 而 pH 在 0 h~10 h 内上升(图 5), 与反硝化作用产碱吻合。由于菌株以 NaNO_2 为唯一氮源, 10 h 后以 $5 \text{ mg/L} \cdot \text{h}$ 的速度补加 NaNO_2 。补加 NaNO_2 后仍检测不到 $\text{NO}_2^- - \text{N}$, NaNO_2 加入后立即被反硝化作用转化或利用合成细胞物质。培养 24 h 后, 菌浓度达到最大值 1.2×10^{11} CFU/mL, 而 pO_2 在 24 h 后开始回升(图 6), 菌株生长进入平台期。培养 24 h 可收获较高浓度的菌体, 有利于实际应用中的大规模使用。

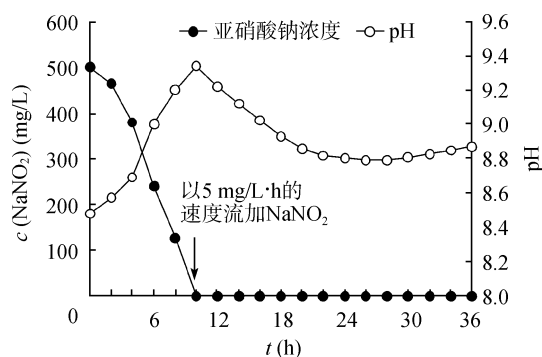


图 5 发酵过程中 NaNO_2 浓度和 pH 变化

Fig. 5 Fermentation time curves of NaNO_2 concentration and pH

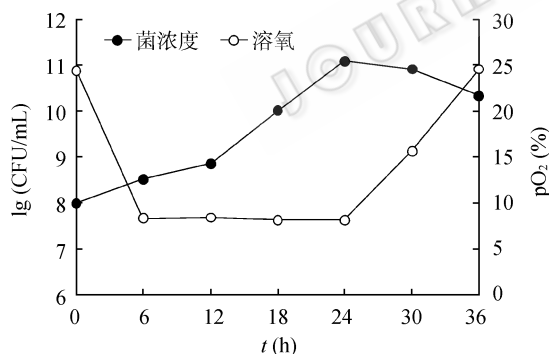


图 6 发酵过程中菌浓度和 pO_2 变化

Fig. 6 Fermentation time curves of bacteria concentration and pO_2

3 结论

水产养殖中产生的亚硝酸盐主要通过以下 3 条

途径去除, 包括通过硝化作用将亚硝酸盐氧化为硝酸盐, 通过硝酸盐还原作用将亚硝酸盐还原为铵盐, 以及通过反硝化作用将亚硝酸盐还原为氮气。就通过硝化作用的途径而言, 本实验室曾筛选得到的 1 株亚硝酸盐氧化细菌(Nitrite Oxidizing Bacteria) N6^[9], 虽生长速度和亚硝酸盐转化速率较高, 但与反硝化细菌相比仍相差甚远。另外, 通过前 2 条途径产生的硝酸盐或铵盐仍然残留在水体中, 而通过反硝化作用产生氮气则可完全去除亚硝酸盐, 故利用反硝化细菌还原亚硝酸盐具有明显的优势。

研究表明, 筛选得到的好氧反硝化细菌 N6-1 菌株, 具有快速有效还原亚硝酸盐的活性, 经发酵罐培养能获得高浓度菌体, 可应用于去除水产养殖中累积的亚硝酸盐, 具有良好的经济效益和社会效益。

参考文献

- [1] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch Microbiol*, 1984, **139**: 351-354.
- [2] 周丹丹. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究. *微生物学报*, 2004, **44**(6): 837-839.
- [3] 孔庆鑫. 一种新的好氧反硝化菌筛选方法的建立及新菌株的发现. *应用与环境生物学报*, 2005, **11**(2): 222-225.
- [4] 李平. 一株好氧反硝化细菌的鉴定及其在废水处理中的应用(英文). *应用与环境生物学报*, 2005, **11**(5): 600-603.
- [5] 王弘宇. 好氧反硝化菌株的鉴定及其反硝化特性研究. *环境科学*, 2007, **28**(7): 1548-1552.
- [6] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002, pp. 271-274.
- [7] 周长林编著. 微生物学实验与指导. 北京: 中国医药科技出版社, 2004, p. 86.
- [8] 叶建锋编著. 废水生物脱氮处理新技术. 北京: 化学工业出版社, 2006, p. 27.
- [9] 琚姝, 周长林, 奚洁. 高硝化活性亚硝酸盐氧化细菌的培养和应用研究. *微生物学通报*, 2005, **32**(5): 56-61.