

一株轻度嗜盐反硝化细菌的分离 鉴定和反硝化特性初探

张培玉* 郭艳丽 于德爽 成广勇

(青岛大学环境科学与工程系 山东 青岛 266071)

摘要: 从处理高盐度废水的成熟活性污泥中分离筛选得到 1 株轻度嗜盐反硝化细菌 GYL, 通过对该菌株的形态观察、生理生化实验以及 16S rDNA 序列分析, 确定该菌株为盐单胞菌(*Halomonas* sp.). 该菌株能在盐度为 10% 的培养液中生长, 最适盐度为 2%~7%, 最适 pH 为 7.5~8.5, 最佳碳源为蔗糖, 在 25°C~30°C 的温度范围内脱氮效率达到 80% 以上。对该菌株的异养硝化能力进行了测定, 其对氨氮的去除率可达 98.3%, 说明该菌株可实现同步硝化反硝化, 即该菌可以独立完成生物脱氮的全部过程。

关键词: 耐盐, 好氧反硝化菌, 系统发育分析, 反硝化, 异养硝化

Isolation, Identification and Degradation Characteristics of a Slight Halophilic Denitrifying Bacteria

ZHANG Pei-Yu* GUO Yan-Li YU De-Shuang CHENG Guang-Yong

(Department of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract: A slight halophilic denitrifying bacteria (designated GYL) was screened from the activated sludge which was used to treat high-salinity wastewater. According to the results of morphological observation, physiological and biochemical test, sequence analysis of the 16S rDNA, strain GYL was identified as *Halomonas* sp.. This strain could survive at 10% salinity and the optimal salinity range for growth was 2%~7%. The suitable pH value for growth was 7.5~8.5 and sucrose was the most effective carbon source. The nitrogen removal efficiency exceeded 80% when the temperature ranged from 25°C to 30°C. Meanwhile heterotrophic nitrification characteristics of this strain were measured. Results showed that this strain was able to realize SND and ammonia removal rate was 98.3%. It showed that this strain could perform the whole process of bacteria denitrification independently.

Keywords: Halotolerant, Aerobic denitrifying bacteria, Phylogenetic analysis, Denitrification, Heterotrophic nitrification

基金项目: 国家自然科学基金(No. 50678085; 50878107); 山东省教育科技计划项目(No. J06I03); 山东省研究生教育创新计划资助项目(No. SDYY07091)

* 通讯作者: Tel: 86-532-83780155; E-mail: envbio@163.com

收稿日期: 2008-10-21; 接受日期: 2009-02-06

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

随着水体富营养化的日益严重, 水体中氮素的去除已经成为当今水体污染防治的重要内容。生物脱氮工艺因具有处理效果好、处理成本低、操作管理方便等优点而得到广泛应用, 为水体中氮的去除提供了有效手段。在石油、化工、海产品加工和养殖等行业中, 外排含氮废水大多具有高盐的特点。对于嗜盐微生物来说, 高盐环境下由于盐析作用会使微生物的脱氢酶活性降低; 盐度升高时, 水的渗透压也随之升高, 使微生物细胞脱水引起细胞原生质分离, 从而导致微生物细胞破裂而死亡^[1], 因此高盐浓度给生物脱氮效果带来不利影响。国外已有一些耐盐、嗜盐反硝化菌的研究报道^[2-4], 但是国内鲜有这方面的报道。高盐这一特殊生境中反硝化细菌的分离培养和特性研究将有助于了解高盐生物脱氮工艺的可行性, 是对高盐环境下生物脱氮新理论和新技术的有力补充, 能为国内的高盐废水生物脱氮提供指导和借鉴作用。

本实验分离细菌所用的活性污泥为实验室高盐度废水处理系统的成熟活性污泥。以硝酸钾为氮源, 进行耐盐反硝化菌的分离和筛选, 并对菌株进行形态观察、生理生化特性分析, 同时鉴定菌株的种类。以脱氮率为指标评价菌株的反硝化性能, 研究不同初始培养条件(盐度、温度、pH、碳源、碳氮比等)对菌株脱氮性能的影响。有研究表明^[5,6]: 好氧反硝化菌具有异养硝化性能, 本文初步研究了分离的耐盐反硝化菌的异养硝化性能。

1 材料和方法

1.1 培养基

耐盐反硝化培养基(g/L): KNO_3 1; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7.9; KH_2PO_4 1.5; CH_3COONa 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; NaCl 20; 微量元素 2 mL; pH 7.2~7.4。其中 CH_3COONa 、 KNO_3 的量可根据实验要求进行调整, 固体培养基加 2% 琼脂。

微量元素溶液(g/L): Na_2EDTA 63.7; ZnSO_4 2.2; CaCl_2 5.5; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.06; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61; pH 7.0。

异养硝化培养基(g/L): NH_4Cl 0.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7.9; KH_2PO_4 1.5; CH_3COONa 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; NaCl 20; pH 7.0~7.2。

1.2 耐盐反硝化菌的分离筛选

常规活性污泥在 30%、50%、70% 的海水比例

梯度废水中由 MBR 工艺经过长期驯化, 处理效果稳定后, 取反应器中的新鲜污泥, 用高速组织捣碎机处理获得含有大量游离细菌的泥水混合物。细菌泥水混合液自然沉降 1 h 后, 取上清液以 10^{-1} 梯度进行稀释, 分别取 0.1 mL 10^{-4} ~ 10^{-9} 稀释度的混合菌稀释液涂布到耐盐反硝化菌固体培养基上, 倒置于 30°C 的恒温培养箱中培养至长出单菌落, 划线纯化后优选反硝化性能最好的一株进行实验研究。

1.3 形态和生理生化试验

菌株的形态和生理生化试验根据《常见细菌系统鉴定手册》^[7]和《伯杰细菌鉴定手册》^[8]进行。

1.4 16S rDNA 测序和同源性比较

1) 用离心柱型 DNA 提取试剂盒提取 DNA。用于 16S rDNA 的 PCR 反应引物为一对通用引物。正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 反应体系^[9] (50 μL): 10 \times buffer(含 Mg^{2+}) 5 μL , dNTPs 4 μL , 正向和反向引物各 1 μL , 模板 1 μL , Taq 聚合酶缓冲液 1 μL , 重蒸水 37 μL 。

PCR 程序如下: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 2 min, 循环 30 次; 72°C 15 min。测序由上海生工生物工程有限公司完成。

2) 系统发育分析: 将测序结果用 Blast 软件与 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行同源性比较, 通过 Clustal X 和 BioEdit 等软件进行多重序列比对分析, 并以 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.5 菌株好氧反硝化性能测试

以硝酸钾为氮源, 取处于对数生长期的菌液按 2% 的接种量接种于装有 150 mL 培养液的 500 mL 三角瓶中(瓶塞为硅胶塞, 菌体好氧培养), 置于恒温气浴振荡器中 30°C 恒温培养(转速 180 r/min), 定时取培养液测定菌体生长量, 离心菌体后取上清液测定 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的变化。

1.6 菌株异养硝化性能测试

以氯化铵为氮源, 取处于对数生长期的菌液按 2% 的接种量接种, 置于恒温气浴振荡器中 30°C 恒温振荡培养(转速 180 r/min), 定时取样测定培养液中各指标的含量变化。

1.7 分析方法

NO_2^- -N: N-(1-萘基)乙二胺光度法; NO_3^- -N: 麝

香草酚分光光度法; NH_4^+-N : 钠氏试剂分光光度法; 菌体生长量: 吸光度法, 用 7200 型尤尼柯(UNIC)可见分光光度计于 600 nm 处测量吸光度值; pH 值: 采用 6010 型 pH 计测定。

2 结果与讨论

2.1 菌株的形态特征和生理生化特性

菌株 GYL 为革兰氏阴性杆菌, 大小为 $(0.5 \mu\text{m} \sim 0.7 \mu\text{m}) \times (1.4 \mu\text{m} \sim 1.6 \mu\text{m})$, 无鞭毛, 无芽胞。菌落初长成时略透明, 表面湿润, 长大后成白色实心菌落, 后期菌落发黄变乌, 菌落大小约为 1.5 mm, 边缘整齐, 表面光滑, 有隆起, 粘稠, 有淡淡的树根味道。菌株 GYL 的电镜照片如图 1 所示。

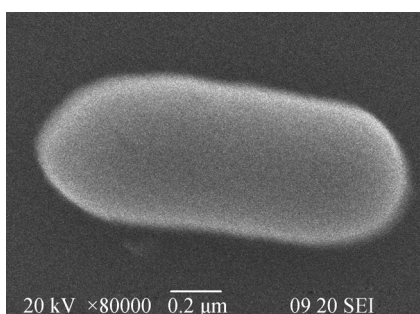


图 1 菌株 GYL 的扫描电镜照片($\times 80000$)

Fig. 1 Electronic microscope photograph of strain GYL ($\times 80000$)

菌株 GYL 的生理生化特性鉴定结果为: 严格好氧, 乙酸氧化、硝酸盐还原、甲基红、吲哚、油脂水解、明胶液化实验为阳性; V-P、纤维素、接触酶、

H_2O_2 酶、柠檬酸盐、淀粉水解、产氨实验、果胶水解为阴性; 石蕊牛乳实验为还原石蕊退色, 利用蔗糖、葡萄糖、甘露醇产酸; 不能利用麦芽糖、乳糖、半乳糖产酸。该菌株的最适盐度为 2%~7%, 在盐度 >10% 的培养液中不生长, 生长最适的温度范围为 $25^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$, 最适 pH 为 7.5~8.5。

2.2 16S rDNA 序列和系统发育分析

获得分离菌株 GYL 部分长度的 16S rDNA 序列 (1433 bp), 菌株的 GenBank 序列登录号为 FJ387168, GYL 与多株 *Halomonas* sp. 16S rDNA 的相似性达 99%, 结合菌株的形态学和生理学特性, 可基本确定分离菌株 GYL 为 *Halomonas* sp.。通过 GenBank 检索得到和 GYL 亲缘性相近的其他菌株, 利用 BioEdit 和 Phylip 等软件, 以 Neighbor-joining 法绘制 16S rDNA 系统发育树, 如图 2 所示。

2.3 菌株 GYL 的好氧反硝化特性

向已经灭菌的培养液以 2% 的接种量接种种子培养液, 30°C 恒温气浴培养, 每隔 3 h 检测反应过程中的菌体生长吸光度和 NO_3^--N 、 NO_2^--N 的变化, 考察菌株 GYL 在好氧条件下的反硝化效果(图 3 所示)。从图 3 可以看出, NO_3^--N 在培养的前 15 h 从 123.2 mg/L 降至 12.9 mg/L, NO_2^--N 含量在 12 h 时达到最大累积量 52.6 mg/L, 而后 NO_2^--N 含量逐渐降低, 最后降到 1.0 mg/L。与其他菌株^[10]的降解过程比较可得, 该菌降解过程中 NO_2^--N 的累积量较多, 分析原因可能是硝酸盐在菌体内硝酸盐还原酶的作用下还原为亚硝酸盐, 造成了 NO_2^--N 的大量积累, 而亚硝酸盐的大量积累又能诱导亚硝酸盐

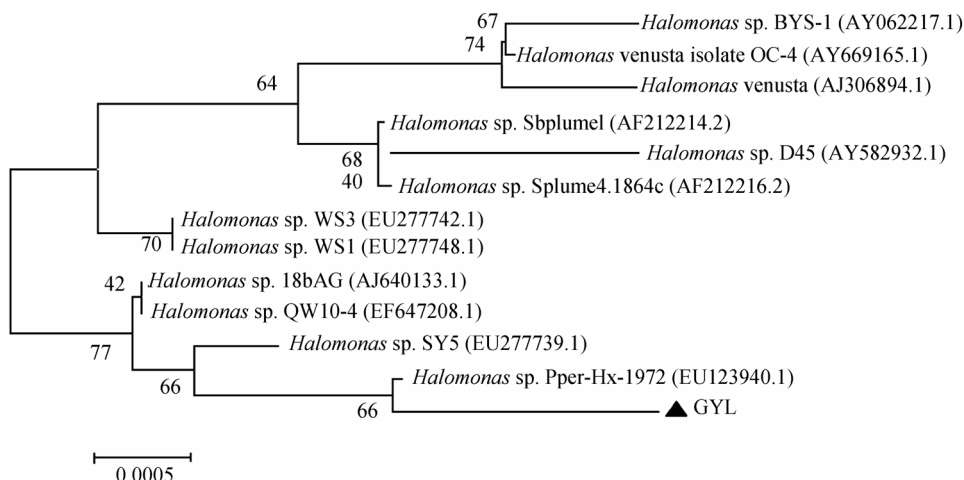


图 2 基于 16S rDNA 序列同源性构建的菌株 GYL 和亲缘性相近的其他细菌的系统发育树

Fig. 2 Unrooted phylogenetic trees based on the 16S rDNA sequences of strain GYL and related strains

还原酶的产生,从而将亚硝酸盐还原,在 18 h 时 NO_2^- -N 积累量降为 4.14 mg/L。从图 3 中还可以看出,反硝化作用主要发生在菌体生长的对数生长期,这个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也主要在这一阶段被消耗。

2.3.1 盐度对菌株 GYL 好氧反硝化效果的影响: 由图 4 可得,随着盐度的增加菌株 GYL 的脱氮率先增加后逐渐降低,盐度为 2%、5%、7% 时的脱氮率较高分别为 88.5%、93.2%、93.5%; 盐度为 10% 时的脱氮率相对降低分别为 51.1%; GYL 在盐度 15%、20% 菌体基本不生长,几乎没有反硝化作用,可见菌株 GYL 能在盐度为 10% 的溶液中生长但最适盐度为 2%~7%, 这与 Sachiko Yoshie^[11] 的研究结果相近。Sachiko Yoshie 也从处理高盐度废水的活性污泥中分离出 *Halomonas* spp., 并且该菌是盐度为 7% 的反应器中的优势反硝化菌。

菌株 GYL 在不含盐的培养液中生长量很少,可见该菌的生长依赖于一定的盐度。菌体需要一定浓

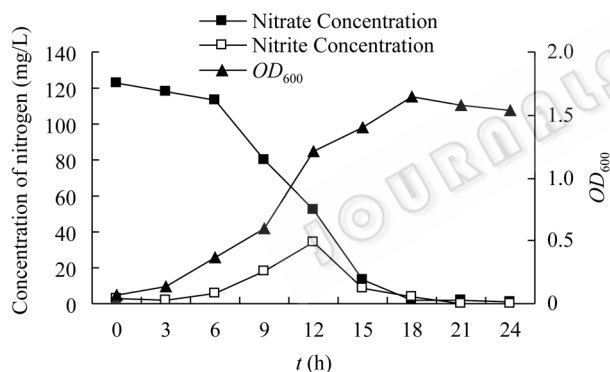


图 3 GYL 的反硝化特性

Fig. 3 Denitrification characteristics of strain GYL

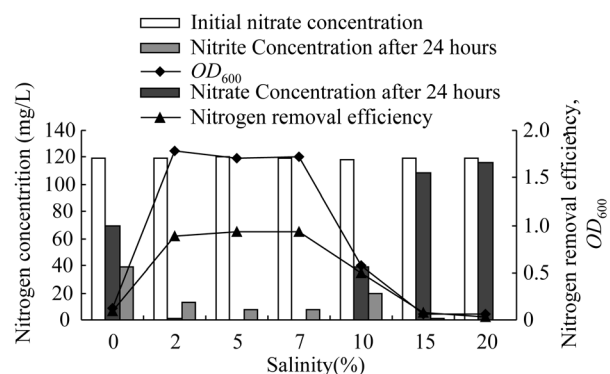


图 4 盐度对 GYL 好氧反硝化的影响

Fig. 4 Effects of salinity on denitrification for strain GYL

度的钠、镁、铝离子来维持细胞结构和硬度,在盐度太小或无盐的环境中,容易发生细胞壁溶解细胞膜破裂,因此菌株 GYL 在不含盐的环境中生长量很小导致该菌株的反硝化作用很弱。盐度为 10% 时菌株 GYL 的菌体生长和脱氮效果明显下降,盐度增加到 15% 后,菌株的生长和反硝化作用均受到明显的抑制,盐度过高造成溶液的渗透压增高,容易致使微生物细胞脱水引起细胞原生质分离,从而严重影响菌体的生长和去除效果。

2.3.2 pH 对菌株 GYL 好氧反硝化效果的影响: 由图 5 可得, pH 值对菌株 GYL 的反硝化能力影响显著,菌株 GYL 能在 pH 值 7.5 时获得最大的脱氮率 87.0%, pH 为 8.5 时脱氮率也很高为 85.5%, pH 为 9.5 时的脱氮率为 62.8%, 可见菌株 GYL 最适宜的 pH 值为 7.5~8.5, 在偏碱的条件下 (7.5~9.5) 有较好的反硝化效果,但在 pH 值为 5.5 和 10.5 时菌体生长量很小、基本没有反硝化现象。当 pH 低于 6.5 时, OD_{600} 很小、反硝化作用很弱,可见该菌的生长在酸性条件下受到抑制,致使该菌的反硝化功能下降。pH 在 7.5~9.5 时反硝化效果较好,但亚硝酸盐的积累量随 pH 逐渐增加,高 pH 值抑制了亚硝酸盐还原酶的活性,这与 Charles^[12] 和 LH Liu^[13] 的结论是一致的。与王弘宇^[14] 的研究结果比较可得,菌株 GYL 的 pH 适应范围较广,并且去除效果较好。

2.3.3 不同碳源对菌株 GYL 好氧反硝化的影响: 反硝化碳源通常分为 3 种类型: 第 1 类是易于生物降解的有机物,如实验中采用的蔗糖、葡萄糖等; 第 2 类为可慢速生物降解的有机物; 第 3 类为细胞物质,细菌会利用细胞成分进行内源反硝化。在培养液中添加 7 种不同碳源(碳源的含量相同均为 5 g/L),

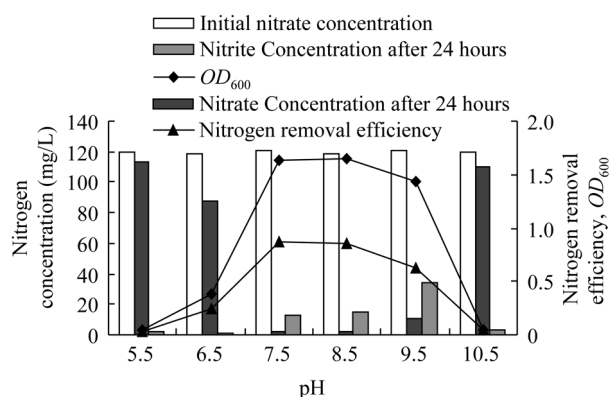


图 5 pH 值对 GYL 脱氮效果的影响

Fig. 5 Effects of pH on denitrification for strain GYL

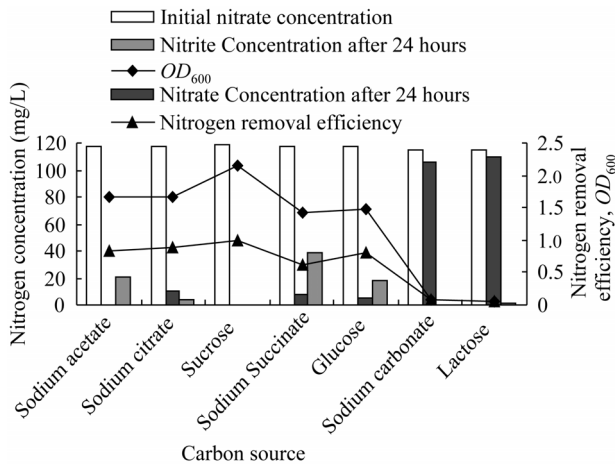


图6 不同碳源的影响

Fig. 6 Effects of different carbon sources on denitrification

在 24 h 时测定菌体生长量、 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的变化。由图 6 可得，不同碳源对菌株的生长和反硝化性能的影响是一致的。以蔗糖为碳源时 OD_{600} 最大、脱氮率最高达到 99.6%，乙酸钠、柠檬酸钠、葡萄糖的 OD_{600} 稍低、脱氮效果次之，但都达到 80% 以上，以丁二酸钠为碳源时脱氮率为 60.5%，菌株的硝态氮去除率较高，但是有大量的亚硝酸盐积累，以乳糖和碳酸钠为碳源时菌体几乎没有生长，硝态氮的去除率很低。可见蔗糖是菌株 GYL 的最佳碳源，碳源种类对菌株 GYL 的生长和反硝化活性有很大影响。蔗糖、乙酸钠、柠檬酸钠、葡萄糖均属于第 1 类碳源，在反硝化过程中它们易于生物降解，是较好的电子供体，不仅反硝化速率快，还能够提高生物处理装置的能力和效率，使反硝化过程稳定可靠。

2.3.4 温度对菌株 GYL 好氧反硝化的影响：本试验设置了 20℃、25℃、30℃、35℃ 和 40℃ 共 5 个不同的温度条件，以 2% 的接种量接种种子培养液，培养 24 h 之后，离心菌体取上清液测定各个条件培养液中的 NO_3^- -N、 NO_2^- -N 含量和菌体生长量，结果如图 7 所示。从图 7 中可以看出，温度对菌株 GYL 生长和反硝化效率的影响不是很显著。在温度为 20℃ 时， OD_{600} 为 1.09、脱氮率为 54%，温度在 25℃~30℃ 时， OD_{600} 达到 1.7 左右、脱氮率均达到 80% 以上，其中在 25℃ 时脱氮率达到最大脱氮率 85.5%，温度上升到 40℃ 时，脱氮率下降到 42.7%。在 25℃~35℃ 的温度范围内，菌株 GYL 生长较好，并且具有较高的脱氮效率。但温度偏低或偏高时菌株的生长受到抑制，反硝化性能受到明显的影响，

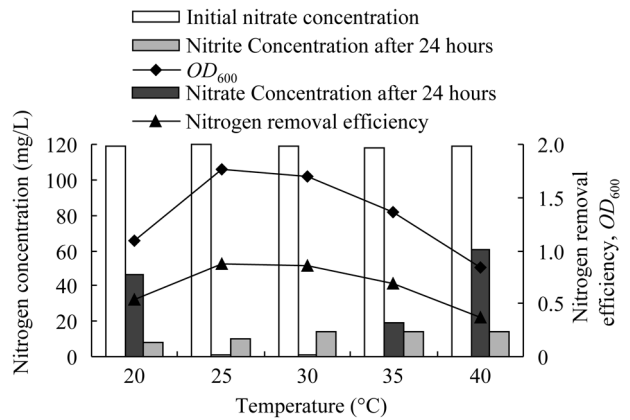


图7 不同温度的影响

Fig. 7 Effects of temperature on denitrification performance

这与 P Elefsiniotis^[15]的研究结果有较大差异。

2.4 菌株 GYL 的异养硝化性能

由图 8 可得，24 h 后培养液中的氨氮剩余仅为 2.2 mg/L，GYL 能将氨氮的 98.3% 去除，菌株的异养硝化作用主要发生在前 14 h 内，该菌株的异养硝化过程在菌体的对数生长期。该菌的异养硝化过程中 NO_2^- -N 的累积量很小，在 6 h 时内达到的最大累积量仅为 1.69 mg/L， NO_3^- -N 没有积累，原因可能有 2 点：1) 该菌株具有较强的好氧反硝化能力，异养硝化过程中产生的硝酸盐氮及亚硝酸盐氮迅速地被反硝化为气体产物逸出；2) 该菌株存在的氨氧化途径与自养硝化不同，可能是氨氮直接转化为气体逸出。

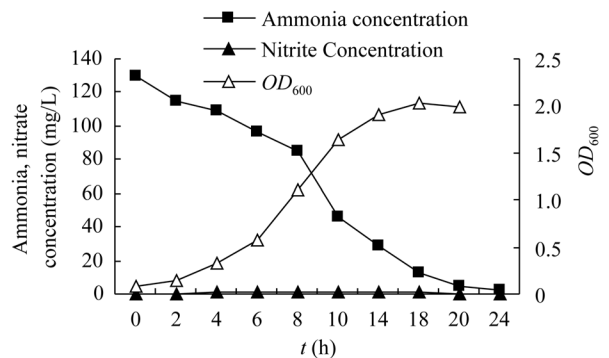


图8 异养硝化性能

Fig. 8 Heterotrophic nitrification performance

3 结论

1) 从驯化成熟的耐盐活性污泥中筛选得到 1 株轻度嗜盐反硝化细菌 GYL，经形态观察、生理生化

实验以及 16S rDNA 序列分析及同源性比对, 菌株 GYL 与 *Halomonas* sp. 的相似性为 99%, 可以初步判定为 *Halomonas* sp.。

2) GYL 能在盐度为 0~10% 的培养液中生长并有一定的去除率, 培养液盐度为 2%、5% 时的脱氮率均达到 80% 以上, 可见菌株 GYL 能耐受一定的盐度并有很好的反硝化效果, 适用于高盐度废水的脱氮处理。

3) GYL 在偏碱的条件下有较好的反硝化效果, 最适宜的 pH 值为 7.5~8.5。菌株可利用蔗糖、乙酸钠、柠檬酸钠、葡萄糖和丁二酸钠为碳源进行反硝化, 其中最适碳源为蔗糖。菌株 GYL 能适应较宽的温度范围, 在 25°C~35°C 的温度范围内都具有很高的脱氮效率。

4) 对该菌株的异养硝化能力进行了测定, 其对氨氮的去除率可达 98.3%, 可见该菌株可实现同步硝化反硝化, 即该菌株可以独立完成生物脱氮的全部过程。

致谢: 本实验部分工作在国家海洋局第一海洋研究所完成, 并得到林学政研究员和王长伟同学的支持和帮助, 在此深表感谢!

参 考 文 献

- [1] 刘 正. 高浓度含盐废水生物处理技术. 化工环保, 2004, 24(增刊): 209-211.
- [2] TM Caton, LR Witte, HD Ngyuen, *et al.* Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the great salt plains of oklahoma. *Microbial Ecology*, 2004, 48: 449-462.
- [3] AA Shapovalova, TV Khijniak, TP Tourova, *et al.* Heterotrophic denitrification at extremely high salt and pH by haloalkaliphilic gammaproteobacteria from hypersaline soda lakes. *Extremophiles*, 2008, 12: 619-625.
- [4] Charles Glass, Joann Silverstein. Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Wat Res*, 1999, 33(1): 223-229.
- [5] Castignetti D, Hollocher TC. Heterotrophic nitrification among denitrifiers. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47(4): 620-623.
- [6] Jung JengSu, Kuang ShengYeh, Pin WeiTseng. A strain of *Pseudomonas* sp. isolated from piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan. *Current Microbiology*, 2006, 53: 77-81.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.78-159.
- [8] RE 布坎南, NE 吉本斯编著. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 科学出版社, 1984.
- [9] Damiani G, Amedeo P, Bandi C, *et al.* Bacteria identification by PCR-Based Techniques. *Microbial Genome Methods*, 1996, 10: 167-177.
- [10] Li P, Zheng YL, Chen S, *et al.* Denitrification of an aerobic denitrifying bacterium and its potential application in wastewater treatment. *Appl Environ Biol*, 2005, 11(5): 600-603.
- [11] Sachiko Yoshie, Hiroshi Makino, Hidenobu Hirose, *et al.* Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72: 182-189.
- [12] Charles G, Joann S. Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Wat Res*, 1998, 32(3): 831-839.
- [13] Liu LH, A Koenig. Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: batch experiments. *Process Biochemistry*, 2002, 37: 885-893.
- [14] 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. 环境科学, 2007, 28(7): 1548-1552.
- [15] P Elefsiniotis, D Li. The effect of temperature and carbon source on denitrification using volatile fatty acids. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 28: 148-155.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。