

# 一株好氧反硝化菌的分离及特性研究

朱月琪<sup>1,2</sup> 卫晋波<sup>1</sup> 曾国驱<sup>1</sup> 孙国萍<sup>1\*</sup>

(1. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)

(2. 广东工业大学 广东 广州 510070)

**摘要:** 从土壤中分离得到一株好氧反硝化细菌 CY1, 该菌株在厌氧和好氧条件下均具有反硝化能力。硝酸盐氮初始浓度为 137.25 mg/L, 30 h 内硝酸盐氮去除率分别为 99.98%(厌氧)和 60.16%(好氧)。通过形态学特征、生理生化特性及 16S rDNA 同源性比较对菌株 CY1 进行鉴定, 初步判断 CY1 为泛养副球菌(*Paracoccus pantotrophus*)。

**关键词:** 好氧反硝化, 硝酸盐, 亚硝酸盐

## Isolation and Characterization of an Aerobic Denitrifier

ZHU Yue-Qi<sup>1,2</sup> WEI Jin-Bo<sup>1</sup> ZENG Guo-Qu<sup>1</sup> SUN Guo-Ping<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. Guangdong University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

**Abstract:** An aerobic denitrifying bacterial strain CY1 was isolated from soil. The denitrifying experiment results showed that under anaerobic or aerobic conditions the reduction efficiency within 30 hours was up to 99.98% (anaerobic) and 60.16% (aerobic) respectively with initial NO<sub>3</sub>-N concentration of 137.25 mg/L. On the basis of its physiological and molecular properties, strain CY1 was identified as *Paracoccus pantotrophus*.

**Keywords:** Aerobic denitrification, Nitrate, Nitrite

随着工业化和城市化进程的加快, 我国水体中氮素污染日益严重。传统理论认为, 水中氮素的去除是将氨氧化形成的硝酸盐氮在缺氧条件下被反硝化菌类还原为氮气和N<sub>2</sub>O, 即必须通过好氧硝化、缺氧反硝化这两个相对独立的过程。然而, 好氧反硝化现象自 20 世纪 50 年代以来被不断报道<sup>[1-3]</sup>, 在许多实际运行的好氧硝化池中发现总氮损失的现象, 损失量甚至高达 30%。1988 年Robertson<sup>[4]</sup>在除硫和反硝化处理系统出水中首次分离出好氧反硝化菌泛养副球菌(*Paracoccus pantotrophus*)、假单胞菌属的某一

种(*Pseudomonas* spp.)和粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)等, 随后好氧反硝化细菌被不断分离得到<sup>[5-7]</sup>。这意味着, 在好氧反硝化菌的作用下, 硝酸盐氮也可在有氧情况下还原为氮气, 即硝化反硝化可以在同一环境下同时进行。这不仅节约了投资和运行成本, 缩短脱氮周期, 而且反硝化释放出的OH<sup>-</sup>可补偿硝化反应所消耗的碱, 很好地解决了传统工艺中硝化产酸、反硝化产碱均需投加试剂中和的弊病, 避免了二次污染。这对突破生物脱氮的困境、研究生物脱氮工艺具有重要意义。

好氧反硝化功能菌在自然界氮循环中的重要意义正为人们逐步重视。本文介绍一株好氧反硝化细菌 CY1 的分离鉴定, 并对其进行好氧反硝化活性的测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

**1.1.1 反硝化菌分离培养基:** 酒石酸钾钠 20 g,  $\text{KNO}_3$  1.2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 蒸馏水定容至 1 L。

**1.1.2 LB 培养基:** 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 酵母提取物 5 g, 蒸馏水定容至 1 L, pH 7.0。

### 1.2 好氧反硝化菌的筛选

**1.2.1 富集培养:** 称取含有枯枝落叶的堆肥泥土 1 g, 放入装有 100 mL 反硝化培养基的 250 mL 三角瓶中, 用八层纱布封住瓶口, 在  $33^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床中培养, 7 d 后取样。

**1.2.2 分离纯化:** 接种环取上述富集培养物于反硝化培养基上划线分离, 单菌落长出后挑单菌落作稀释涂平板纯化, 获得一菌株, 编号为 CY1, 并接种于斜面, 于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中保藏。

### 1.3 菌株的硝酸盐还原能力测试

将菌株 CY1 接种于 LB 培养基中, 在  $33^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床中培养 12 h, 此时  $OD_{600}$  值为 1.5 左右。将菌液按 2% (V/V) 的接种量接于装有 50 mL 反硝化培养基的 250 mL 三角瓶中, 分别在好氧、厌氧条件下培养, 定时测定培养前后基质变化量。好氧培养时将三角瓶置于  $33^\circ\text{C}$ 、200 r/min 摇床中; 厌氧培养时, 先将反硝化培养基用氮气吹脱 15 min, 接入菌液后将三角瓶放入厌氧工作站(Ruskinn, Bugbox)中。每组实验设置 3 个重复。

**分析项目及方法:** 硝酸盐氮采用酚二磺酸分光光度法<sup>[8]</sup>, 亚硝酸盐氮采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法<sup>[9]</sup>, 菌体量采用比浊法, pH 用精密 pH 试纸测定, DO 用溶解氧测定仪(JENCO, 9173)测定。

### 1.4 菌株的鉴定

**1.4.1 形态学鉴定:** 将菌株 CY1 于 LB 平板上划线, 获得单菌落, 观察其菌落形态; 用透射电镜负染法(SEM)观察其形态、大小等; 并对其进行革兰氏染色。

**1.4.2 生理生化鉴定:** 依据《常见细菌系统鉴定手

册》<sup>[10]</sup>进行鉴定。

**1.4.3 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序:** 用一对通用引物即正向引物 f27(5'-AGAGTTGATCCTGGCT CAG-3') 和反向引物 r1492(5'-GGTTACCTTGT ACGACTT-3') 对菌株 CY1 的总 DNA 模板进行 16S rDNA 扩增, 引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 反应程序:  $94^\circ\text{C}$  5 min;  $94^\circ\text{C}$  1 min,  $56^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  2 min, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10 min。扩增产物由上海生工生物技术有限公司进行测序。

## 2 结果

### 2.1 菌株 CY1 的硝酸盐还原能力测试

分别在厌氧和好氧条件下对菌株的硝酸盐降解能力进行测定, 每隔 6 h 取样测定 1 次。

由图 1、2 可知, 厌氧条件下硝酸盐氮由 137.25 mg/L 降至 0.03 mg/L, 去除率达 99.98%; 好氧条件下降至 54.68 mg/L, 去除率为 60.16%, 培养过程中测得 DO 维持在  $5.28 \text{ mg O}_2/\text{L} \sim 4.60 \text{ mg O}_2/\text{L}$ 。

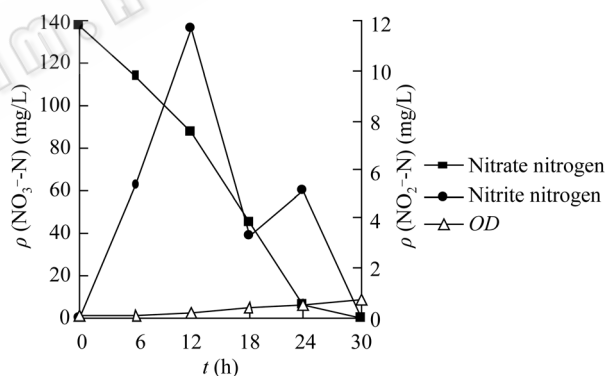


图 1 菌株 CY1 的厌氧反硝化活性曲线

Fig. 1 Anaerobic denitrification of strain CY1

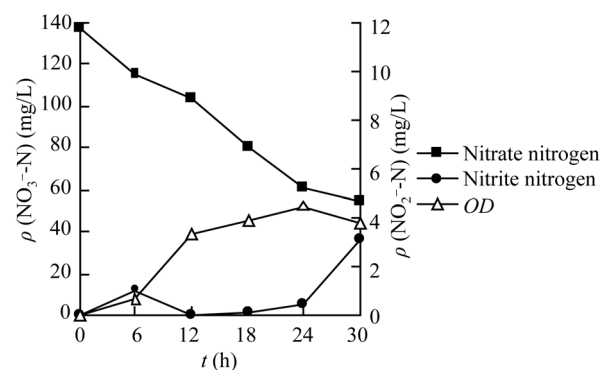


图 2 菌株 CY1 的好氧反硝化活性曲线

Fig. 2 Aerobic denitrification of strain CY1

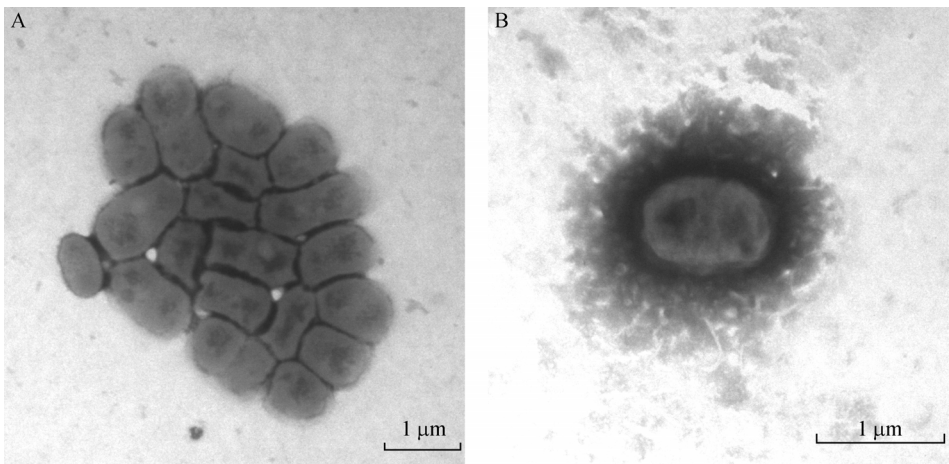


图3 菌株CY1的负染透射电镜照片  
Fig. 3 Micrograph of TEM of strain named CY1

Note: A: (×3000); B: (×5000).

由于反硝化要经历 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2$ 的过程,所以在厌氧和好氧条件下的反硝化过程中均产生了亚硝酸盐的积累,且亚硝酸盐氮的积累量在细菌生长的延滞期时达到最高。厌氧条件下,亚硝酸盐氮的积累量在12 h时达到最高,为11.74 mg/L,但随着菌量的增长,亚硝酸盐氮的积累量减少,在30 h时下降为零。好氧反硝化的亚硝酸盐积累量在6 h为1.06 mg/L,在细菌生长旺盛的对数期(12 h~24 h),积累量极少,在30 h时细菌生长进入衰亡期,积累量也达到最大(3.17 mg/L)。

2.2 菌株CY1的鉴定

2.2.1 形态学鉴定:菌株CY1的菌落形态表观为边缘整齐、圆形隆起、光滑、呈淡黄白色。用透射电镜负染色法观察,发现该菌株为短杆至球形,长度约为1 μm,无鞭毛。革兰氏染色阴性。

2.2.2 生理生化鉴定:生理生化鉴定结果如表1所示。

2.2.3 16S rDNA的同源性比较:将测得的菌株CY1的16S rDNA基因序列在GenBank数据库中通过Blast方法比对,用NJ法构建进化树(Kimura法估算遗传距离)(图4)。结果表明,菌株CY1与*Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512<sup>T</sup>(Y16933)的同源性达100%。根据形态特征、生理生化特性和16S rDNA的同源性分析,初步鉴定菌株CY1为泛养副球菌(*Paracoccus pantotrophus*)。

3 结论

1) 从富含氮氮的堆肥泥中用以酒石酸钾钠为

碳源的反硝化培养基在好氧条件下进行富集、分离,得到一株菌株CY1。

表1 菌株CY1的生理生化特性  
Table 1 Physio-biochemical characteristics of the strain CY1

鉴定指标 Identification index	鉴定结果 Identification result
接触酶试验 Catalase test	+
氧化酶试验 Oxidase test	+
甲基红试验 Methyl red test	-
伏-普试验 Voge-Proskauer test	-
明胶液化 Gelaune liquefaction	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-
纤维素分解 Cellulose decomposition	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+
蔗糖发酵 Sucrose fermentation	+
甘露糖发酵 Mannose fermentation	+
乳糖发酵 Lactose fermentation	+
半乳糖发酵 Galactose fermentation	-

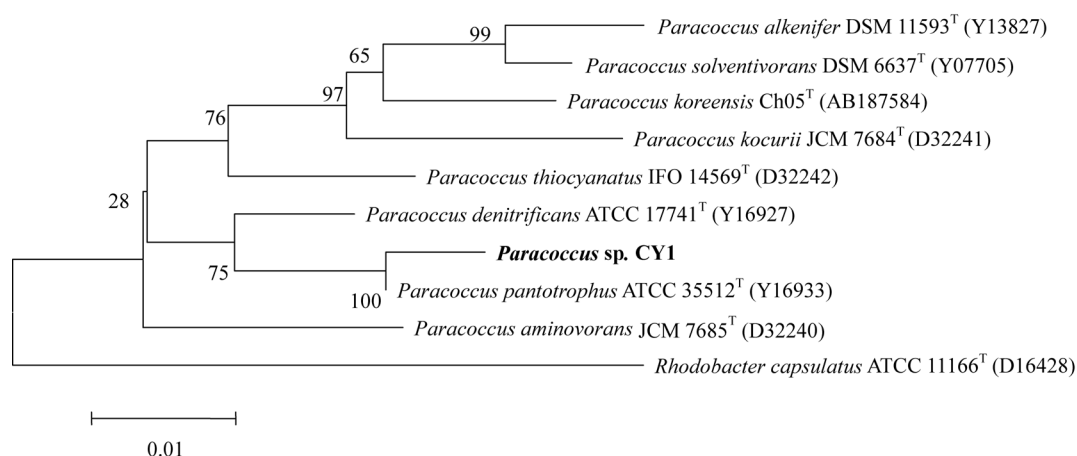


图4 CY1菌株的16S rRNA系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of strain CY1

注: 括号中的序号表示该菌株在 GenBank 中的登录序列号; 树枝上的数字表示在 bootstrap 验证中该树枝可信度的百分比; 条形标尺: 0.01 核苷酸碱基替换率。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank; The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap; Bar, 0.01 nucleotide substitutions per site.

2) 通过实验, 发现菌株 CY1 无论是在厌氧条件还是在好氧条件下都具有反硝化功能。好氧反硝化反应的溶解氧维持在 5.28 mg/L~4.60 mg/L, 硝酸盐氮由 137.25 mg/L 下降到 54.68 mg/L, 去除率为 60.16%。虽然在厌氧条件下 CY1 的硝酸盐还原率 (99.98%) 比在好氧条件下更高, 但当溶解氧较高时 CY1 仍具有较强的硝酸盐还原能力。这与孔庆鑫等<sup>[11]</sup>筛选的菌株 *Pseudomonas* sp. Y2-1-1 的反硝化情况相同。

3) 根据形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 的同源性分析, 初步鉴定菌株 CY1 为泛养副球菌 (*Paracoccus pantotrophus*), 这是继国际上 Robertson<sup>[4]</sup>和 Patureau<sup>[12]</sup>后国内首次报道副球菌属细菌具有好氧反硝化功能的 *Paracoccus pantotrophus*, 是环境整治领域重要的多功能菌。

## 参考文献

- [1] Marshall RO, Dishburger HJ, MacVicar R, et al. Studies on the effect of aeration on nitrate reduction by *Pseudomonas* species using  $N^{15}$ . *J Bacteriol*, 1953, **66**(3): 254–258.
- [2] Mechsner K, Wuhrmann K. Beitrag zur kenntnis der mikrobiellen denitrifikation. *Pathol Microbiol*, 1963, **26**: 579–591.
- [3] Krul JM. Dissimilatory nitrate and nitrite reduction under aerobic conditions by an aerobically and anaerobically grown *Alcaligines* sp. and by active sludge. *J Appl Bacteriol*, 1976, **40**(3): 245–260.
- [4] Robertson LA, van Neil EWJ, Torremans RAM, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotroph*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(11): 2812–2818.
- [5] Frette L, Gejlsbjerg B, Westermann P. Aerobic denitrifiers isolated from an alternating activated sludge system. *FEMS Microbiol Ecol*, 1997, **24**(4): 363–370.
- [6] Pai SL, Chong NM, Chen CH. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in wastewater treatment. *Bioresour Technol*, 1999, **68**(2): 179–185.
- [7] Meiberg JBM, Bruinenberg PM, Harder W. Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in *Hyphomicrobium* X in the absence and presence of nitrate: evidence for “aerobic” denitrification. *J Gen Microbiol*, 1980, **120**: 453–463.
- [8] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 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.259–261.
- [9] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 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.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, pp.364–398.
- [11] 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. 应用与环境生物学报, 2005, **11**(2): 222–225.
- [12] Patureau D, Zumstein E, Delgenes JP, et al. Aerobic denitrification isolation from diverse natural and managed ecosystems. *Microb Ecol*, 2000, **39**: 145–152.