

一株异养脱硫反硝化菌株的筛选及其生物脱硫脱氮特性研究

马晓丹¹ 高灵芳² 谭文博¹ 远野¹ 黄聪¹ 赵友康¹ 徐熙俊¹ 盛涛¹ 王爱杰^{1*}

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院 城市水资源与水环境国家重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150090)

(2. 中国科学院生态环境研究中心 中国科学院环境生物技术重点实验室 北京 100085)

摘要:【目的】从生物脱硫脱氮 EGSB-DSR 反应器的污泥中分离筛选出具有生物脱硫脱氮特性的细菌, 并对其生物脱硫脱氮的性能进行研究。【方法】采用 Hungate 厌氧滚管技术筛选功能微生物, 从稳定运行的生物脱硫脱氮 EGSB-DSR 反应器的污泥中分离筛选出一株高效的生物脱硫脱氮细菌 A2。【结果】经过 16S rRNA 基因序列鉴定, 菌株 A2 为固氮弧菌属(*Azoarcus* sp.)。其典型特征为能够以有机碳作为电子供体, 将亚硝酸盐或者硝酸盐转化为氮气的同时还能将硫化物氧化为硫单质。因此具备了高效同步代谢有机碳、NO₃⁻和 S²⁻的特征。这是首次关于固氮弧菌属能够进行反硝化脱硫的相关报道。对菌株 A2 的生物脱硫脱氮能力的分析表明, 在硫化物 S²⁻浓度 200 mg/L, NO₃⁻浓度 87.5 mg/L, 乙酸根离子浓度 200 mg/L 的条件下, 菌株 A2 在 20 h 内完成对碳、氮、硫的脱除。菌株对于碳、氮去除率均达到 99%, 对于硫的去除率达到 95%。【结论】结果表明固氮弧菌属 A2 具有高效的生物脱硫脱氮功能, 将有望成为强化生物脱硫脱氮工艺的潜在微生物资源。

关键词: 同步脱硫反硝化, 筛选, 特性, 固氮弧菌属

Isolation and characterization of a functional strain with the highly efficient of biological desulfurization and denitrification

MA Xiao-Dan¹ GAO Ling-Fang² TAN Wen-Bo¹ YUAN Ye¹ HUANG Cong¹
ZHAO You-Kang¹ XU Xi-Jun¹ SHENG Tao¹ WANG Ai-Jie^{1*}

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

(2. CAS Key Laboratory of Environmental Biotechnology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: [Objective] To isolate a functional strain with the highly efficient of biological desulfurization and denitrification from EGSB-DSR reactor, and study the characterization of the strain. [Methods] In this study, using the Hungate anaerobic roll tube technique a strain with the function of desulfurization and denitrification, A2, was isolated from EGSB-DSR reactor. [Results] Identification based on 16S rRNA sequence indicates that the isolate has a homologous similarity of

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 51408591)

*通讯作者: ✉: ajwang@rcees.ac.cn

收稿日期: 2014-11-06; 接受日期: 2015-01-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-01-22

99% with *Azoarcus* sp.. In metabolic of A2, sulfide was adopted for its electron donor and nitrate for electron acceptor. This is the first report about the function of *Azoarcus* sp. in the desulfurization and denitrification process. The desulfurization and denitrification characterization of the strain shows that strain A2 degraded acetate, nitrate and sulfate in 20 hours completely, with the S^{2-} concentration of 200 mg/L, NO_3^- concentration of 87.5 mg/L and the Ac^- concentration of 200 mg/L. The removal rate of sulfate, nitrate and acetate is 95%, 99% and 99%, respectively. **[Conclusion]** This result indicates that newly isolated strain A2 with a high capability of desulfurization and denitrification. Strain A2 is a potential microbiology resource for the efficiency improvement of simultaneous desulfurization and denitrification process.

Keywords: Simultaneous desulfurization and denitrification, Isolation, Characterization, *Azoarcus*

近年来,随着我国化工、制药、食品加工、石油精炼等行业的迅速发展,高浓度、难降解含硫含氮有机废水排放量逐年增多。此类废水中含硫含氮化合物浓度高、毒性大、污染重,严重威胁环境和人体健康,成为导致我国水体灾难性生态破坏的主要污染源之一^[1]。目前,此类废水处理普遍存在“适用性处理技术缺乏、工艺系统复杂、工程投资巨大、运行成本高昂、达标排放困难”等问题,尤其是硫系物难以有效去除导致的环境污染隐患更为突出^[2]。因此,治理含硫含氮有机废水,遏制其对水体环境的恶劣影响对生态安全和社会经济可持续发展意义重大。在众多的处理方法中,生物脱硫具有投资少、成本低、能耗少、不产生二次污染等优点,与化学和物理方法脱硫相比,确实更适合作为主要的脱硫手段^[3]。自然界中能够氧化硫化物的微生物主要为丝状硫细菌、光合硫细菌和无色硫细菌^[4]。2004年,王爱杰等提出了同步脱硫脱氮工艺系统^[5],并且分离筛选出同步脱硫脱氮的菌株^[6]。2011年,陈川分离筛选到高效脱硫异养菌株 *Pseudomonas* sp. C27^[7]。筛选具有高效的脱硫脱氮功能微生物,是推动同步脱硫反硝化工艺的关键。

本研究筛选得到了一株高效的脱硫脱氮细菌,其典型特征为能够以有机碳作为电子供体将亚硝酸盐或者硝酸盐转化为氮气,同时还能将硫化物氧化为硫单质。所筛菌株具备了高效同步代谢有机碳、 NO_3^- 和 S^{2-} 的特征。因此该功能微生物有望成为强化生物脱硫脱氮工艺的潜在微生物资源,并将

对废水处理工艺中硫、氮、碳的同步脱除研究提供新思路。

1 材料与amp;方法

1.1 菌源和培养基

从稳定运行的生物脱硫脱氮 EGSB-DSR 反应器的不同高度采集污泥。将采集的样品 50 mL (固体 5.0 g)放入 500 mL 灭菌的锥形瓶中,加入无菌水稀释到 250 mL,放入玻璃珠 20–25 个,在摇床中以 220 r/min 振荡 24 h。将菌胶团或土壤颗粒振碎,制成菌悬液。

采用 Hungate 厌氧滚管技术筛选功能微生物,培养基^[8-9]的配方(g/L): $Na_2S \cdot 9H_2O$ 0.50, 无水乙酸钠 0.28, $NaHCO_3$ 1.50, NH_4Cl 0.05, KNO_3 0.15, K_2HPO_4 0.05。采用 4 mol/L NaOH 将 pH 调至 7.5。在配制培养基过程中全程采用 80%氮气吹脱以保证厌氧环境。制作固体培养基时,在液体培养基中加入 2%左右的琼脂。

1.2 菌种的分离与筛选

吸取 1 mL 的污泥菌悬液,用无菌水稀释至 10^{-4} 。接入固体培养基中在恒温培养箱 30 °C 培养 5 d 至培养基上出现单菌落为止。挑取培养基上的单菌落转入液态分离培养基,进行扩大培养,在恒温培养箱 30 °C 培养,培养周期为 5 d 左右,培养基出现白色混浊为宜。用接种针粘取液态培养基的菌种,在固态培养基上进行平板划线培养。在恒温培养箱 30 °C 进行培养,然后挑取单菌落转入液态培养基中。重复以上分离步骤 5 个周期,直至分离出单一菌落。

1.3 菌株 A2 形态特征以及 16S rRNA 基因的测序鉴定

采用透射电镜的方法观察菌株的形态特征: 取纯化的液体培养物一滴置于铜网上, 15–20 min 后取铜网于 2% 的磷钨酸钠溶液中负染色 40 s, 取出铜网置于干燥的滤纸上划线分区, 晾干。将此铜网置于透射电镜的样品室, 观察细菌形貌。之后进行革兰氏染色实验。

采用天根公司的细菌基因组提取试剂盒提取菌株 A2 的细菌基因组 DNA, 然后用正向引物 F8 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和反向引物 R1492 (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行细菌的 16S rRNA PCR 扩增, 反应体系(50 μ L): 模板 DNA 3 μ L, 正向引物(20 pmol/L) 2 μ L, 反向引物(20 pmol/L) 2 μ L, dNTP mixture (1.95 mmol/L) 2.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 1.5 μ L, 10 \times Buffer 3 μ L, ddH₂O 36 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

将 PCR 扩增的产物进行测序, 测序结果在 NCBI 数据库中比对分析, 并用软件 Mega 5.0 进行系统进化分析。

1.4 菌株 A2 的异养反硝化脱硫特性

将菌株 A2 对数期的菌液 10 mL 转接入配制好的液体培养基 50 mL 中, 立即用离子色谱和分光光度计检测 S²⁻、S₂O₃²⁻、SO₄²⁻、NO₃⁻、NO₂⁻ 和碳源浓度并记录, 再按原筛选的条件进行培养。每隔 3 h 检测一次, 直至这 6 个指标的浓度不再变化。

2 结果与讨论

2.1 菌株鉴定结果

将菌株 A2 的 16S rRNA 基因的测序结果与 NCBI 数据库进行比对, 结果显示, 菌株 A2 的 16S rRNA 基因序列和固氮弧菌属(*Azoarcus* sp.) 最为接近, 相似性达 99%。菌株 A2 在系统中的位置如图 1 所示。固氮弧菌属(*Azoarcus* sp.) 是一类革兰氏阴性细菌, 属于 Betaproteobacteria 纲的红环菌目、红环菌科, 目前发现的有 7 个代表种, 具有生物固氮的功能, 一般情况下每消耗 1 g 碳水化合物, 非共生固定大气氮至少 10 g。固氮弧菌属(*Azoarcus* sp.) 属于兼性厌氧菌^[10]。固氮弧菌属(*Azoarcus* sp.) 细菌是一类广泛存在于自然界、在生物固氮过程中起到重要作用的微生物^[11]。从生态的角度, 固氮弧菌属(*Azoarcus* sp.) 可分为土壤固有的细菌和植物根系的内生菌^[8]。近年来, 有很多关于植物根系内部的固氮弧菌属的细菌进行生物固氮的研究被报道^[12], 但固氮弧菌属在脱硫反硝化工艺中同步脱除碳氮硫的功能尚未见报道。

2.2 菌株 A2 的形态特征

在固体培养基上, 菌株 A2 单个圆形菌落, 边缘透明且规则, 表面湿润且光滑, 菌落中心呈白色, 边缘半透明。在透射电镜下观察, 菌株 A2 的形态如图 2 所示。由图 2 可见, 细胞呈大卵圆形或者杆状, 周生或单极生运动型鞭毛, 无芽孢, 无胞外聚合物, 菌体大小为长(0.8–1.5) μ m \times 宽(0.5–0.6) μ m。随后对菌株 A2 进行了生理生化实验, 结果如表 1 所示。研究表明, 菌株 A2 能够将硝酸盐还原成氮

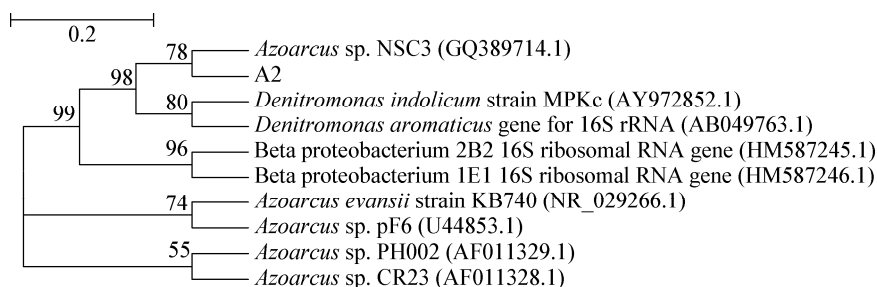


图 1 菌株在系统进化中的位置
Figure 1 Phylogenetic tree of strain

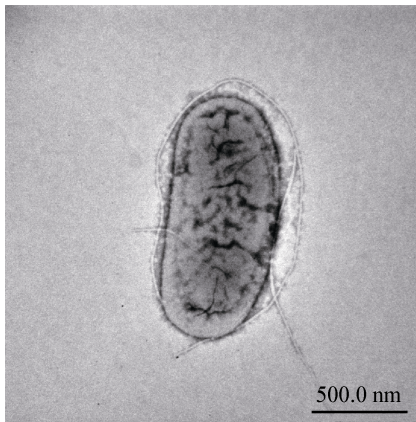


图2 菌株 A2 在透射电镜下的细胞形态照片
Figure 2 Transmission electron micrograph of cell of strain A2

表1 菌株 A2 的生理生化特性	
实验	结果
Experiments	Results
硝酸盐还原成亚硝酸盐	+
Reduction from nitrate to nitrite	
亚硝酸盐还原成氮气	+
Reduction from nitrite to nitrogen	
乙酸盐 Acetates	+
柠檬酸盐 Citrate	+
乳酸盐 Lactate	-
淀粉 Starch	-
凝胶(牛源) Gel	-
L-苹果酸 L-MLT	+
苯甲酸 Benzoic acid	+
革兰氏染色实验 Gram test	-

Note: +: Positive; -: Negative.

气,并且可以利用乙酸盐、柠檬酸盐、L-苹果酸和苯甲酸这4种碳源,革兰氏染色实验的结果显示菌株 A2 为革兰氏阴性菌。

2.3 菌株 A2 的异养反硝化脱硫特性

经过 40 h 的连续取样测定,得到了 S^{2-} 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 NO_2^- 和碳源浓度变化的数据,将这些数据整理后得到硫、氮和碳浓度变化见图 3-5。

菌株 A2 利用硫化钠的情况如图 3 所示,初始 S^{2-} 浓度约为 200 mg/L,菌株 A2 对硫化钠的利用没有经历停滞期,前 6 h 菌株 A2 对硫化物的去除速率恒定,第 6-9 h 硫化物的去除速率明显增加,前

12.5 h S^{2-} 的浓度大幅减小,而 SO_4^{2-} 的浓度变化不大,同时有少量的 $S_2O_3^{2-}$ 生成。经历 20 h,硫化物几乎完全被去除,最终 S^{2-} 的去除率达到了 95%,平均去除速率约为 9.5 mg/(L·h)。

菌株 A2 对硝酸盐的利用情况如图 4 所示, NO_3^- 初始浓度为 87.5 mg/L,前 10 h,菌株 A2 将 NO_3^- 大量去除,同时有少量 NO_2^- 生成。15 h NO_2^- 的浓度达到最大,随后被去除。15 h 后 NO_3^- 几乎被全部去除。20 h 后 NO_2^- 几乎全部被去除,硝酸盐去除率为 99%,平均去除率为 4.33 mg/(L·h)。

图 5 中乙酸根(Ac^-)初始浓度为 200 mg/L,前 2.5 h 菌株 A2 对 Ac^- 的利用缓慢,从第 6-10 h 菌株 A2 对乙酸根的利用速率明显增大,2.5-15 h Ac^- 被菌株 A2 大量去除,20 h 后几乎全部被去除,去除率为 99%,平均去除速率约为 9.9 mg/(L·h)。

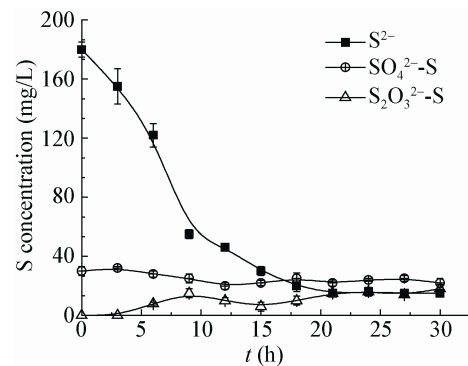


图3 硫浓度的变化曲线
Figure 3 The concentration curve of sulfur

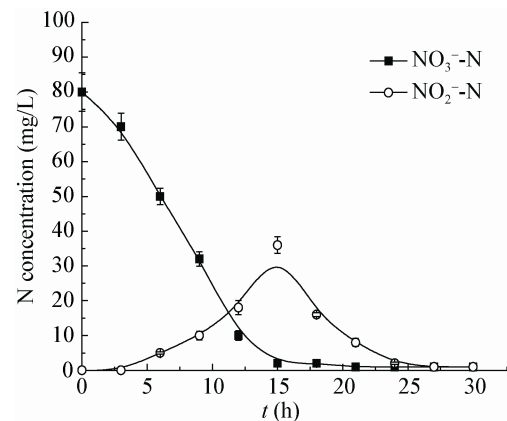


图4 氮浓度的变化曲线
Figure 4 The concentration curve of nitrogen

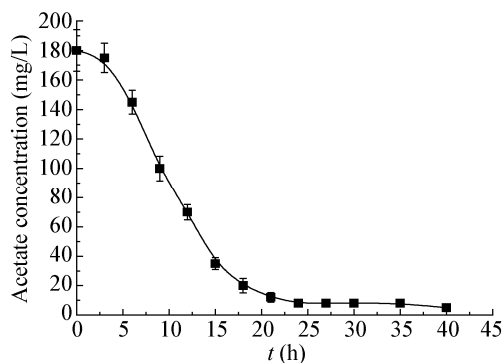


图5 碳浓度的变化曲线

Figure 5 The concentration curve of carbon

对图3-5所显示的数据进行分析表明,开始的3-5 h内菌株A2对培养基中 S^{2-} 、 NO_3^- 和乙酸根(Ac^-)的利用并不存在停滞期,第6-10 h左右,菌株A2对 S^{2-} 、 NO_3^- 和乙酸根(Ac^-)的利用速率明显增加,且在20 h后, S^{2-} 、 NO_3^- 和 Ac^- 几乎全部去除。从 S^{2-} 、 NO_3^- 和 Ac^- 的浓度变化的相同趋势表明,菌株A2能够以有机碳作为电子供体,将亚硝酸盐或者硝酸盐转化为氮气的同时还能将硫化物氧化为硫单质,即实现了硫氮碳的同步脱除,且菌株A2同步脱除硫氮碳的速率较快、性能较高。

3 结论

(1) 从稳定运行的生物脱硫脱氮EGSB-DSR反应器的污泥中分离筛选出一株高效的生物脱硫脱氮细菌A2,该菌株为兼性厌氧菌。菌株A2能够以有机碳作为电子供体,将亚硝酸盐或者硝酸盐转化为氮气的同时还能将硫化物氧化为硫单质,因此具备了高效同步代谢有机碳、 NO_3^- 和 S^{2-} 的特征。经过16S rRNA基因鉴定,菌株A2为固氮弧菌属(*Azoarcus* sp.)。而在脱硫反硝化工艺中,固氮弧菌属(*Azoarcus* sp.)同步脱除碳氮硫的功能尚未见报道。

(2) 根据菌株A2的生长特性和硫氮碳的代谢特征表明:在硫化物 S^{2-} 浓度200 mg/L, NO_3^- 浓度87.5 mg/L,乙酸根离子浓度200 mg/L的条件下,菌株A2在大约20 h内完成对碳、氮、硫的去除。

(3) 这株同步脱硫脱氮细菌的筛选,为建立脱

硫反硝化菌株文库奠定了基础,为研究同步脱硫反硝化工艺并通过生物强化方式提高工艺的效能提供了微生物资源。

参 考 文 献

- [1] Wang AJ, Wang LY, Ren NQ, et al. Bio-treatment of sulfate-laden wastewater[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2004, 36(11): 1446-1501 (in Chinese)
王爱杰, 王丽燕, 任南琪, 等. 硫酸盐废水生物处理工艺研究进展[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 36(11): 1446-1501
- [2] Wu N, Wang SF, Mu YX, et al. Study on technology and application of sulfur-contained wastewater treatment[J]. Guangdong Chemical Industry, 2013, 40(8): 100-101 (in Chinese)
吴楠, 王三反, 穆永信, 等. 含硫废水处理技术的研究及应用[J]. 广东化工, 2013, 40(8): 100-101
- [3] Su QH, Li SH. Experimental study of sulfur wastewater treatment process[J]. Zhejiang Chemical Industry, 2008, 5: 4-7 (in Chinese)
苏巧红, 李淑辉. 含硫废水处理工艺实验研究[J]. 浙江化工, 2008, 5: 4-7
- [4] Meng JY, Zhang SC. Study on screening desulfurization bacterium and desulfurization performance of the strain[J]. Journal of Inner Mongolia University, 2012, 43(1): 69-72 (in Chinese)
孟建宇, 张守城. 一株高效脱硫菌的筛选及脱硫性能的研究[J]. 内蒙古大学学报, 2012, 43(1): 69-72
- [5] Wang AJ, Du DZ, Ren NQ, et al. Application of *Thiobacillus* denitrificans in wastewater denitification and desulfide treatment processes[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2004, 36(4): 425-429 (in Chinese)
王爱杰, 杜大仲, 任南琪, 等. 脱氮硫杆菌在废水脱硫、脱氮处理工艺中的应用[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2004, 36(4): 425-429
- [6] Wang AJ, Wan CL, Ren NQ, et al. Identification and metabolic characterization of a strain with function of simultaneous desulfurization and denitification[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2008, 40(4): 536-539 (in Chinese)
王爱杰, 万春黎, 任南琪, 等. 一株同步脱氮脱硫菌的分离鉴定及其代谢特征[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2008, 40(4): 536-539
- [7] Chen C. The performance and control strategy for autotrophic and heterotrophic denitrifying sulfide removal[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2011 (in Chinese)
陈川. 自养菌-异养菌协同反硝化脱硫工艺的运行与调控策略[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2011
- [8] Lee DJ, Wong BT, Adav SS. *Azoarcus taiwanensis* sp. nov., a denitrifying species isolated from a hot spring[J]. Environmental Biotechnology, 2014, 98(3): 1301-1307
- [9] Lee DJ, Pan XL, Wang AJ, et al. Facultative autotrophic denitrifiers in denitrifying sulfide removal granules[J]. Bioresource Technology, 2013, 132: 356-360
- [10] Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic Outline of the Prokaryotes: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd Edition. New York: Springer-Verlag, 2004: 76-77
- [11] Wang XJ, He CP, Wang Z, et al. Screening and characteristics of an efficient nitrobacterium[J]. China Environmental Science, 2013, 33(2): 286-292 (in Chinese)
王小菊, 何春平, 王震, 等. 高效硝化细菌的筛选及特性研究[J]. 中国环境科学, 2013, 33(2): 286-292
- [12] Hurek T, Reinhold-Hurek B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes[J]. Journal of Biotechnology, 2003, 103(2/3): 169-178