

doi:10.3969/j.issn.1674-4764.2012.05.022

同步硝化反硝化细菌的鉴定与脱氮特性研究

张巍

(辽宁省环境科学研究院 国家环境保护村镇污水处理与资源化工程研究中心, 沈阳 110031)

摘要:依据同步硝化反硝化脱氮原理,以生活污水处理厂污泥为种泥,利用 15 °C 低温摇床富集并分离出同步硝化反硝化细菌(SNDB-5),采用传统与现代分子生物学相结合的手段对其鉴定,以确定其分类地位;利用水浴摇床研究 SNDB-5 对硝化细菌液体培养基 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的去除效果。结果表明:SNDB-5 与 *Pseudomonas mendocina* 同源性达 99.0%,形态特征、革兰氏染色及生理生化与 *Pseudomonas mendocina* 最相似,属假单胞菌属;摇床培养反应条件显示,当 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度加大到 150 mg/L 时,菌株 SNDB-5 的活性受到了抑制。

关键词:同步硝化反硝化; 16S rDNA 序列; 好氧脱氮

中图分类号:X703.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-4764(2012)05-0136-05

Identification and Characteristics Analysis of Simultaneous Nitrifying-Denitrifying Bacteria and Nitrogen Removing

ZHANG Wei

(National Environmental Protection Engineering Research Center for Rural Wastewater Treatment and Resources, Liaoning Academy of Environmental Science, Shenyang 110031, P. R. China)

Abstract: Based on the principle of simultaneously nitrifying-denitrifying nitrogen removing, sewage treatment plant wastewater sludge was used as inoculum, and the continuous low temperature shaker was used to enrich the simultaneously nitrifying-denitrifying nitrogen removing bacteria (SNDB-5) at 15 °C. Traditional and modern molecular biology methods were adopted to determine the taxonomic status of the isolated bacteria which was named SNDB-5. Water bath shaker was used to analyze the $\text{NO}_2^- - \text{N}$ removal in the nitrifying bacteria culture medium. The results show that SNDB-5 has 99.0% homology with *Pseudomonas mendocina*. Morphological, gram staining and biochemical characteristics are also similar to *Pseudomonas mendocina*. Incubating reaction conditions in shaker shows that SNDB-5 activity is inhibited when the concentration of $\text{NO}_2^- - \text{N}$ increases to 150 mg/L.

Key words: simultaneous nitrifying-denitrifying; 16S rDNA sequence; aerobic denitrifying

近年来,中国广泛开展了脱氮方面的研究,并且取得了阶段性的进展。在已经开发的废水脱氮方法中,生物脱氮法是目前公认的最为经济有效的方法

之一。在硝化-反硝化生物脱氮过程中,参与硝化的主要微生物硝化菌为自养菌,生长缓慢,世代时间长,需要较长的污泥龄,使得硝化成为城市污水处理

收稿日期:2012-03-05

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07208-005);国家“十一五”科技支撑计划(2009BAD2B01、2010BAC68B00)

作者简介:张巍(1975-),男,高级工程师,博士,主要从事环境微生物和污染水体的生态修复研究,(E-mail)wzhang1215@163.com。

厂的制约因素^[1]。

不少研究和报道^[2-4]已充分证明,反硝化可发生在有氧条件下,使得有关好氧硝化-反硝化生物脱氮的研究日趋活跃。目前已知的好氧硝化-反硝化菌有:粪产碱菌^[5] (*Alcaligenes faecalis*), 泛养硫球菌^[6] (*Thiosphaera pantotropha*), 现更名为脱氮副球菌^[7] (*Paracoccus denitrificans*) 和赤红红球菌^[8] (*Rhodococcus ruber*) 等,它们能同时利用氧和硝酸作为电子受体以获得高生长率。已有报道^[9] *Pseudomonas mendocina* 是典型的反硝化细菌,具有较强的反硝化活性,当硝酸盐浓度为 88.5 mg/L 时,反硝化速率最大,为 26.2 mg/(L·d),显现出较强的厌氧氨氧化能力。利用好氧同时硝化-反硝化菌发展好氧脱氮技术具有以下优点:1)使硝化/反硝化反应在同1个反应器中进行,可以大大减少占地面积和建设资金;2)使用好氧反硝化细菌可以减少处理过程中加入调节系统 pH 的化学物质,降低成本;3)在处理过程中好氧反硝化菌更容易控制^[10]。因此新型好氧反硝化微生物的筛选和好氧同时硝化-反硝化生物脱氮技术已经成了生物脱氮领域新的研究和发展趋势。同时,污水处理中微生物的代谢情况与温度有关,随着温度降低微生物活性下降,当温度低于 4 °C 时,微生物的生理活动几乎停止。北方冬季的低温条件会对微生物的生存造成很大影响,水温过低,会影响细菌的增殖速率和生理活性,同样会使硝化-反硝化作用停止。少数微生物会因为基因突变而产生抗寒性,因此可以通过人工选择的方式来培养耐低温优势菌种,使其在低温下仍有较强的脱氮能力^[11]。

笔者依据好氧硝化-反硝化脱氮的原理,采用低温摇床富集、筛选具有硝化作用的反硝化脱氮菌,利用传统与现代分子生物学相结合手段进行同步硝化-反硝化短程脱氮菌分离并鉴定确定其分类地位。为富集高效硝化-反硝化短程脱氮菌,提高硝化-反硝化脱氮过程的效率,开发高效节能低耗的硝化-反硝化短程脱氮工艺提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用菌种来源于辽宁省昌图污水处理厂 A/O 装置中的好氧活性污泥。其他化学试剂均为市售分析纯。基因组 DNA 抽提试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 分析仪器

分光光度计(UNICO UVTU-1901);电子天平

(LP502A);pH 计(上海雷磁, pHs-3c),离心机(TDZ5-WS);生化培养箱(SPX-100B-Z);高压灭菌锅(HVE-50 AUTOCLAVE);电子显微镜(OLYMPUS CX41KF);BIOLOG 微生物鉴定系统(美国 microLog);恒温水浴摇床(英国 OLS200)。

1.3 分析方法

菌体浓度测定采用分光光度法测定^[12]。COD_{Cr} 测定采用重铬酸钾法,NH₄⁺-N 采用纳氏分光光度计法^[13]。

1.4 培养基

用于富集培养降解同步硝化反硝化细菌的培养基配方为:NaNO₂ 0.5 g、牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、pH 7.0^[14]。

用于分离纯化同步硝化反硝化菌的培养基配方为:NaNO₂ 1.0 g、Na₂CO₃ 1.0 g、NaH₂PO₄ 0.25 g、CaCO₃ 1.0 g、K₂HPO₄ 0.75 g、MnSO₄ 0.01 g、MgSO₄·4H₂O 0.03 g、H₂O 1 000 mL、琼脂 15 g。

1.5 菌株的富集与分离

将好氧污泥接种于 4 瓶 250 mL 富集培养基中,每瓶污泥接种 1.0 mL,摇床培养,摇床温度为 15 °C,转速 120 r·min⁻¹。4 d 后,将富集好的菌液稀释后涂布于 20 个装有分离培养基的平板上。将平板置于温度为 15 °C 的培养箱中培养,定期观察菌体的生长情况。用接种环将平板上生长良好的菌落挑出,划线培养于分离培养基中,翻接 8~10 次,将菌株分离。将分离出的菌株,划线于普通肉汁斜面,4 °C 冰箱保藏。

1.6 菌株的生理生化鉴定

参照《菌种保藏手册》^[15]和《伯杰细菌鉴定手册》^[16],对 SNDB-5 进行生理生化实验。

1.7 BIOLOG 鉴定

BIOLOG 鉴定系统由浊读仪、读数仪、数据库、软件、微孔鉴定板组成,其实验方法参考文献^[17]。

1.8 细菌的基因组 DNA 提取

采用宝生物工程(大连)有限公司的基因组 DNA 抽提试剂盒提取。

1.9 16S rDNA 扩增与测序

以 SNDB-5 总 DNA 为模板,以用 DNASTAR 软件分析设计的引物 P1(188bp 左右有一段 21bp 片断:5'-CGCTAATACCGCAT ACGTCCT-3')和 P2(1 128 bp 左右有 1 段 20 bp 片断:5'-CCATG-CAGCACCTGTGTCTG-3')进行扩增,反应液为 50 μL,含有 ddH₂O 40 μL, dNTP 1 μL, 10× buffer 5 μL, TaqE 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 50 pmol·μL⁻¹引物 2 μL。PCR 反应条件为 94 °C 预变性

5 min, 94 °C 1 min, 53 °C 40 s, 72 °C 40 s, 35 个循环, 最后 72 °C 保温 6 min。测序由宝生物工程(大连)有限公司完成, 将测序结果用 Blast 软件与 Genbank 中 16S rDNA 序列进行同源性比较。

1.10 菌株 SNDB-5 脱氮效能实验(以下实验均在好氧条件下进行)

将 SNDB-5 以 10% 的接菌量分别接种到经高压灭菌的同步硝化反硝化培养基和 NaNO_2 模拟废水中, 在 15 °C 下, 120 r/min 进行摇瓶培养, 实验装置如图 1。每 12 h 监测同步硝化反硝化培养基中 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、菌体生长吸光度(OD_{600})的变化; 硝化培养基及 NaNO_2 模拟废水中 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、菌体生长吸光度(OD_{600})的变化。

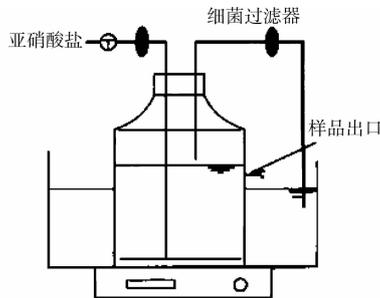


图 1 菌株实验装置

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离与鉴定

2.1.1 菌株分离纯化 经过富集分离, 筛选出一株同步硝化反硝化脱氮效果好的菌株 SNDB-5, 其在肉汁琼脂平板上生长旺盛, 菌落较大, 呈乳白色。光滑, 湿润, 中间隆起, 不透明, 无核, 边缘整齐。通过革兰氏染色, 鉴定为革兰氏阴性菌, 在显微镜下观察菌株, 发现该菌均为杆状菌, 大小为 $(1.5 \sim 1.8) \mu\text{m} \times (0.4 \sim 0.6) \mu\text{m}$ (如图 2 所示)。

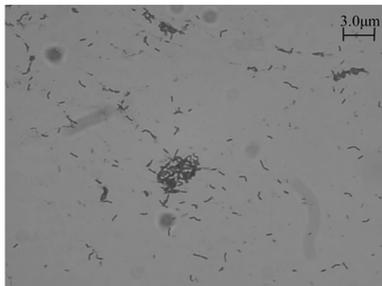
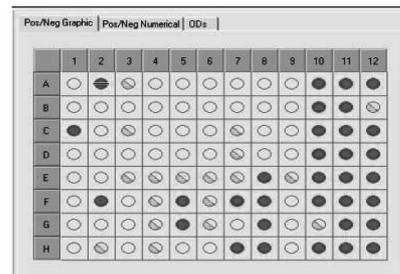


图 2 菌株 SNDB-5 的显微照片(1000×)

2.1.2 BIOLOG 鉴定结果 使用 Biolog 自动菌种鉴定系统对该菌株进行鉴定, 该菌株鉴定种属为 *Pseudomonas mendocina* (如图 3 所示)。



	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.879	0.574	6.514	GN-NENT	<i>Pseudomonas mendocina</i>
2	0.066	0.039	7.446	GN-NENT	<i>Pseudomonas thutzei</i>
3	0.049	0.028	7.558	GN-NENT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4	0.006	0.003	8.323	GN-NENT	<i>Pseudomonas fulva</i>

图 3 SNDB-5 菌的代谢指纹特征和鉴定结果

2.1.3 SNDB-5 菌株的 16S rDNA 基因序列、基因克隆分析 在以 16S Forward、16S Internal 和 16S Reverse 为引物进行 DNA 测序时, 发现测序结果均出现连续套峰, 怀疑是菌种不纯所致, 因此采取了克隆测序。

质粒 CTD445-XT1-2 测序结果符合实验要求。登陆 NCBI 网站, 将质粒进行序列比对, 分别筛选出 10 余种与其相似的菌种, 利用 MEGA4 软件, 采取邻近法对质粒构建系统进化树。

将测得的 CTD445-XT1-2 的 16SrDNA 序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对, 所获得的同源序列均为 *Pseudomonas* 属的 16SrDNA 序列。

将 CTD445-XT1-2 的 16SrDNA 序列与 GenBank 中相似的 14 种已知菌的序列进行多序列比对, 运用 MEGA4 软件做出进化树, 如图 4 所示。

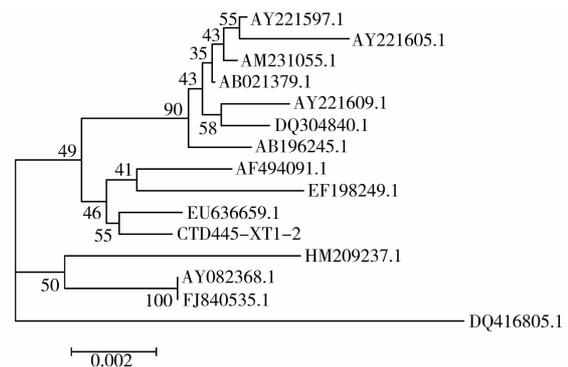


图 4 依据 16S rDNA 序列构建的 SNDB-5 及相关种的系统发育树

由图 3 可知 CTD445-XT1-2 与 EU636659.1 (*Pseudomonas mendocina*) 同源性最近, 相似性高达 99%。

通过 BIOLOG 和分子生物学鉴定, 结合菌株的形态学和生理学特性, 可基本确定分离的菌株为 *Pseudomonas mendocina*。菌株 SNDB-5 与现已报

道的好氧同步硝化反硝化菌均不相同。目前已报道的 *Pseudomonas mendocina* 具有反硝化作用,而关于硝化作用尚无报道。

2.2 菌株 SNDB-5 的硝化作用

以 NaNO_2 (浓度为 0.1%) 为唯一的氮源,培养基在 121 °C 灭菌 20 min 后,取 20 mL 放入 120 mL 的培养瓶中,菌株活化后接种于该液体培养基中,菌株在以 NaNO_2 为氮源的培养基上生长时,菌体生长曲线及溶液中 NO_3^- 浓度的变化曲线如图 5 示。由图 4 可知,菌体的硝化主要是在菌体的对数生长期发生的,而在菌体进入衰亡期后,溶液中的 NO_3^- 的浓度一直处于很低的浓度水平。碳酸钠在好氧硝化过程中起着非常重要的作用,它不但作为细菌 *Pseudomonas mendocina* 生长所需的碳源,也是菌株进行硝化过程中能量的来源,在 C/N 比为 2~3 时,硝化速率达到最大^[18]。本实验中 C/N 约为 1.6,可能尚未达到该菌株最佳 C/N 比,需要进一步研究,以确定此时它的最大硝化速率。

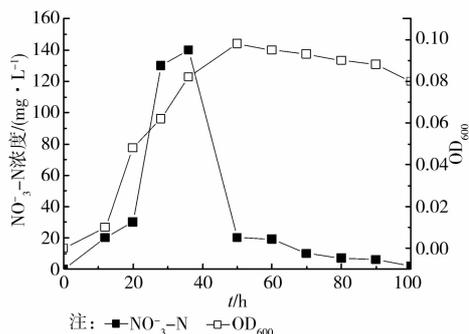


图 5 菌株 SNDB-5 的硝化作用

2.3 不同亚硝酸盐负荷对菌株 SNDB-5 的硝化作用的影响

以不同浓度 NaNO_2 (25、50、100、150 mg/L) 为唯一的氮源,培养基在 121 °C 灭菌 20 min 后,取 20 mL 放入 120 mL 的培养瓶中,菌株活化后接种于该液体培养基中,菌株在以不同浓度 NaNO_2 为氮源的培养基上生长时,溶液中 NO_2^- 浓度的变化曲线如图 6 示。由图 6 可知,菌株 SNDB-5 在亚硝酸盐负荷为 50 mg/L 时,亚硝酸盐去除率最高为 66%。在亚硝酸盐负荷为 25 mg/L 时,亚硝酸盐去除率只有 19%。当亚硝酸盐负荷大于 50 mg/L 时,亚硝酸盐去除率随之下降,在亚硝酸盐负荷为 100 mg/L 时,亚硝酸盐去除率为 64%,亚硝酸盐负荷为 150 mg/L 时,亚硝酸盐去除率为 48%。

随着亚硝酸盐负荷的提高,亚硝酸盐去除率降低,可以推断出随着水中的亚硝酸盐的浓度加大,菌

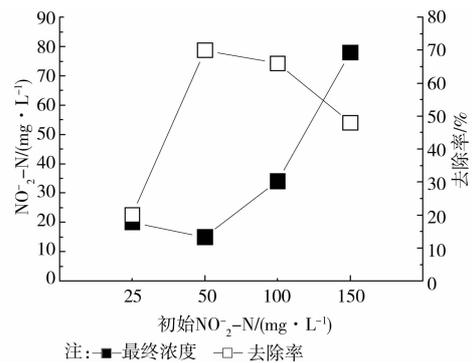


图 6 亚硝酸盐负荷对 SNDB-5 生长的影响

株 SNDB-5 的活性受到了抑制。

3 结 语

1) 分离的菌株 SNDB-5 经鉴定为 *Pseudomonas mendocina*, 它与目前所报道的好氧硝化反硝化菌均不相同,表明了自然界中好氧硝化反硝化菌的生物多样性,对揭示好氧硝化反硝化菌群的生态学有重要的意义。

2) 菌株 SNDB-5 能分别适应不同的亚硝酸盐浓度,当亚硝酸盐负荷大于 50 mg/L 时,亚硝酸盐去除率随之下降,在亚硝酸盐负荷为 100 mg/L 时,亚硝酸盐去除率为 64%,亚硝酸盐负荷为 150 mg/L 时,亚硝酸盐去除率为 48%。使得该菌株适应力较强,可能存在于含有高氮素浓度的活性污泥中,有应用于污水好氧硝化反硝化脱氮处理的潜力。随着亚硝酸盐负荷的提高,菌株 SNDB-5 的活性受到了抑制。

3) 低温条件下硝化反硝化脱氮菌的分离成功为后续高效工程菌的构建及工程应用研究提供了理论支撑和前提条件,使低温地区污水处理厂在冬季运行时提高脱氮率成为可能。

参考文献:

- [1] Blum D J W, Speece R E. A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations [J]. Research Journal of the Water Pollution Control Federation, 1991, 63(3): 198-207.
- [2] Ding A Z, Fu J M, Sheng G Y. Evidence of aerobic denitrification [J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(3): 2779-2782.
- [3] Xie S G, Zhang X J, Wang Z S. Integrated study on biochemical mechanism in biofilter system [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2002, 22(5): 557-561.
- [4] Robertson L A, Kuenen J G. Aerobic denitrification: a controversy revived [J]. Archives of Microbiology,

- 1984,139:351-354.
- [5] Sckalk O J, Kuenen J G. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51(2):255-261.
- [6] Robertson L A, van Niel E W J, Torremans R A M, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54:2812-2818.
- [7] Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1 [J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 11(19):1157-1159.
- [8] 张光亚, 方柏山, 闵航, 等. 好氧同时硝化-反硝化菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(2):226-228.
ZHANG Guangya, FANG Baishan, MIN Hang, et al. Identification and phylogenetic analysis of an isolated aerobic simultaneous nitrifier-denitrifier [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2005, 11(2):226-228.
- [9] 胡宝兰, 郑平, 徐向阳, 等. 一株反硝化细菌的鉴定及其厌氧氨氧化能力的证明[J]. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2006, 36(6):493-499.
HU Baolan, ZHENG Ping, XU Xiangyang, et al. Identification of a denitrifying bacterium and the anaerobic ammonia oxidation proof of ability [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2006, 36(6):493-499.
- [10] Artan N, Wilderer P, Orhon D, et al. The mechanism and design of sequencing batch reactor systems for nutrient removal the state of the art [J]. *Water Science and Technology*, 2001, 43(3):53-60.
- [11] Pochana K, Keller J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND) [J]. *Water Science and Technology*, 1999, 39(6):61-68.
- [12] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [13] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [14] Halling S B, Hjulter H. Simultaneous nitrification and denitrification with and upflow fixed bed reactor applying clinoptilolite as media [J]. *Water Treatment*, 1992, 7:77-88.
- [15] 中国科学院微生物研究所. 菌种保藏手册[M]. 北京: 科学出版社, 1980:293-294.
- [16] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. 8th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1974.
- [17] 李运, 盛慧, 赵荣华. Biolog 微生物鉴定系统在菌种鉴定中的应用[J]. *酿酒科技*, 2005, 7:84-85.
LI Yun, SHENG Hui, ZHAO Ronghua. Utilization of biolog microbes identification system in the identification of microbial species [J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2005, 7:84-85.
- [18] Huang H K, Tseng S K. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55:90-94.

(编辑 王秀玲)