

文章编号:1000-582X(2012)09-139-04

SUFR-UCT 系统中一株好氧反硝化菌的 鉴定与反硝化性能分析

张 园, 罗固源, 许晓毅, 杨 洋

(重庆大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400045)

摘 要:从螺旋升流式 SUFR-UCT 系统好氧反应器的活性污泥中分离得到一株好氧反硝化菌 Y4, 经 16S rDNA 系列相似性比较和系统发育分析初步鉴定属于 *Gordonia*. sp(戈登氏菌属)。对菌株 Y4 反硝化能力进行试验研究, 结果表明菌株 Y4 可以在好氧条件下有效去除培养液中的硝酸盐氮, 在初始硝酸盐氮质量浓度为 286 mg/L 时, 48 h 脱氮效率可达 61.2%。另外试验考察了溶解氧和温度对菌株 Y4 反硝化效果的影响, 结果显示 Y4 有较高的氧耐受力, 在 DO 为 2~11.8 mg/L 时都可保持较高的脱氮率; 菌株 Y4 对温度适应性强, 在 30 ℃ 时脱氮效率高达 90%。试验证明在螺旋升流式 SUFR-UCT 系统中存在有较好反硝化性能的好氧反硝化菌。

关键词: SUFR-UCT 系统; 螺旋升流式反应器; 好氧反硝化菌; 生物脱氮

中图分类号: X505

文献标志码: A

Analysis on denitrification characteristics of an aerobic denitrifier in the system of SUFR-UCT

ZHANG Yuan, LUO Guyuan, XU Xiaoyi, YANG Yang

(Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education,
Chongqing University, Chongqing 400045)

Abstract: An aerobic denitrifier Y4 is isolated from the activated sludge of UCT system's aerobic reactor, which is identified as *Gordonia*. sp according to the 16S rDNA similarity comparison and analysis. The study on denitrification capability of strain Y4 shows that strain Y4 could effectively remove the nitrate nitrogen in the culture under aerobic conditions, and the nitrogen removal efficiency within 48 hours up to 61.2% when the initial concentration of nitrate nitrogen is 286 mg/L. Another test investigated the effects of denitrification on DO and temperature, the results show that strain Y4 has a high oxygen tolerance. When the DO is 2~11.8 mg/L, the denitrification rate could be maintained at a high level. Strain Y4 also has a high temperature adaptation, the denitrifying rates is up to 90% at 30 ℃. The tests prove that there is aerobic denitrifier which has good performance of aerobic denitrification in the SUFR-UCT system.

Key words: SUFR-UCT system; spiral up-flow react (SUFR); aerobic denitrifier; biological nitrogen removal

近年来,好氧反硝化现象不断被报道^[1], Takaya 等^[2]、Baek 等^[3]、Ebru Celen 等^[4]、Lucija 等^[5] 和

Rabah 等^[6]学者都通过试验从污泥中分离出了有好氧反硝化功能的细菌,国内报道的有 *Rhodococcus* 红

收稿日期:2012-04-18

基金项目:科技部国际合作项目(2007DFA90660);重庆市科技攻关计划项目(CSTC2006AA7003;CSTC2006BB7305)

作者简介:张园(1982-),女,重庆大学博士研究生,主要研究方向为水污染控制理论与技术。

罗固源(联系人),男,重庆大学教授,博士生导师,(E-mail)gyluo@cqu.edu.cn.

球菌属^[7]、Delftia 戴尔福特菌属等^[8]。螺旋升流式 SUFR-UCT 系统是在螺旋升流反应技术的基础上将 SUFR 反应器与 UCT 工艺相结合而提出的。有研究表明此系统具有较好的脱氮效果,且好氧反应器中存在反硝化现象^[9]。为深入考察 SUFR-UCT 系统的反硝化机理,本课题组在该系统好氧反应器的活性污泥中筛选得到 1 株有反硝化能力的菌株 Y4,并对其进行分子生物鉴别和反硝化能力研究,进一步对溶解氧和温度对其反硝化处理效果的影响进行试验分析。

1 试验材料与方法

1.1 菌株来源

从实验室运行稳定的螺旋升流式 SUFR-UCT 系统好氧反应器活性污泥筛选而来,在好氧条件下具有良好的反硝化效果的菌株,编号为 Y4。

1.2 主要仪器及试剂来源

HP-6010 型紫外分光光度仪;XMT-152C 生化恒温培养箱;YSI5100 型溶解氧测定仪;XSZ-G 型光学显微镜;高压灭菌锅;PCR 仪器;721 可见分光光度计;超净工作台。16SrDNA 测序引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,其余药剂购于重庆东方化玻有限责任公司。

1.3 培养基的制备

1)好氧反硝化培养基:KNO₃ 2 g、柠檬酸钠 5 g;KH₂PO₄ 1 g;K₂HPO₄ 1 g;MgSO₄ 0.2 g;微量元素溶液 2 mL;蒸馏水 1 000 mL;PH 值 7.2~7.5;固体培养基另加琼脂 2%(20 g/1 000 mL)。

2)液体培养基:Na₂HPO₄ 7.9 g;KH₂PO₄ 1.5 g;NH₄Cl 0.3 g;MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g;琥珀酸钠 4.7 g;硝酸钾 1 g;微量元素溶液 2 mL;蒸馏水 1 000 mL;Ph 值 7.2~7.5。

3)微量元素溶液(g/L):EDTA(乙二胺四乙酸) 50.0;ZnSO₄ 2.2;CaCl₂ 5.5;MnCl₂ · H₂O 5.06;FeSO₄ · 7H₂O 5.0;(NH₄)₆Mo₇O₂ · 4H₂O 1.1;CuSO₄ · 5H₂O 1.57;CoCl₂ · 6H₂O 1.61;pH 值 7.0。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体形态学及染色试验

将菌种 Y4 接种在好氧培养基的试管斜面上,置于 30 ℃ 恒温箱培养。待长出菌落后,观察其颜色和大小等特征。并采用革兰氏染色,在油镜下观察菌体形态。

1.4.2 需氧性测定

将培养 18~20 h 的幼龄菌种穿刺接种于融化并冷却至 50 ℃ 左右的培养基中(培养基组成:蛋白

胨 10 g;酵母膏 5 g;葡萄糖 1 g;琼脂 15~20 g;蒸馏水 1 000 mL;pH7.0),并使其冷却凝固,30 ℃ 恒温培养 3~7 d,观察细菌生长情况及部位。

1.4.3 16S rDNA 的 PCR 扩增及序列测定

菌落 PCR 简易模板的制备:无菌牙签挑取 Y4 单菌落,悬于 30 μL 无菌水中,PCR 仪上 98 ℃ 加热 5 min,转移到 1.5 mL 离心管,于 10 000 r/min,离心 5 min,取上清备用。

测序引物采用一对通用引物^[10]:正向引物正向引物 8F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG(对应于 E. coli 16SrRNA 基因的 8~27 个碱基);反向引物 1495R:CTACGGCTACCTTGTACGA(对应于 E. coli 16SrRNA 基因的 1514~1495 个碱基)。

50 μL PCR 反应体系^[11]:35 μL 灭菌超纯水,10×buffer(Mg²⁺)5.0 μL,10 pmol/L 引物各 2 μL,10 mmol/L dNTPs 1.0 μL,DNA 模板 4 μL,和 1.0 μL 2.5U TaqDNA 聚合酶(Takara 公司)。

PCR 反应温度设置:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min;56 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min 30 s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min 结束反应。取 5 μL PCR 产物作琼脂糖电泳检测。PCR 产物送上海博尚生物技术有限公司纯化并单向测序,测序结果提交 GenBank 进行 blast 检索分析。

1.4.4 反硝化能力分析

取培养 24~48 h 的试验菌种 Y4 接种到装有 30 mL 液体培养基的中,活化 12 h 后,以 10% 的接种量接种到装有 50 mL 液体培养基的锥形瓶中,并同时以未接种菌作对照处理(CK)。为提高瓶中气体的溶解氧含量,用封口膜封口。置于 30 ℃,140 r·min 的摇床下,振荡培养 4 d。第 1 天每 2 小时取样,之后每 24 小时取样以检测剩余亚硝态氮、硝态氮及总氮的浓度。同时测定菌体 OD₆₀₀ 值,以确定菌体生长曲线与反硝化过程的联系^[12]。本试验培养基中的氮完全以硝态氮形式存在,且测定的氮为溶液中总氮,包括微生物氮,因此排除了微生物同化引起溶液中硝态氮减少的可能,也不存在微生物作用下硝态氮异化成铵的途径。

1.4.5 DO 对反硝化效果的影响

将处于对数生长期的菌种 Y4 接种到培养液,通过向反应装置中通入不同时间氧气来实现培养液中不同的 DO 浓度,实验中控制温度为 30 ℃,初始硝酸盐氮浓度为 150 mg/L。测定 24 h 后 TN 和亚硝酸盐氮的含量,研究 DO 浓度对菌株 Y4 好氧反硝化效果的影响。

1.4.6 温度对反硝化效果的影响

试验温控仪加热水浴的方法来保持不同的反应

温度,实验设置温度分别为 20、25、30、35 和 40 ℃,将处于对数生长期的菌种 Y4 接种到培养液,初始硝酸盐氮浓度仍为 150 mg/L,在培养 24 h 后测定 TN 含量,研究温度对好氧反硝化效果的影响。

2 结果与分析

2.1 菌体形态学及染色试验结果

Y4 菌落呈圆形、橙红色。进行革兰氏染色后,然后用光学显微镜进行菌体形态观察,结果发现,菌株 Y4 均革兰氏阳性、杆状菌(见图 1)。

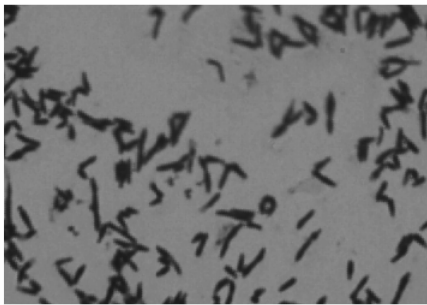


图 1 菌株 Y4 革兰氏染色形态

2.2 需氧性及 16S rDNA 测序分析

需氧性测定发现,菌株 Y4 在培养基的中上部接近表面 4 mm 处的位置生长。且在用甘油-凡士林密封的培养基的试管中培养 5 d 后,镜检进一步证实,菌株 Y4 不能在厌氧环境中生长繁殖。说明 Y4 为好氧菌。

通过菌株的 16SrDNA 测序并进行相似性比对分析,测定结果显示 Y4 属于 *Gordonia. sp*(戈登氏菌属)。

2.3 反硝化能力测定

菌株 Y4 以硝酸盐为底物的还原情况如图 2 所示。图中所示为试验期间 TN 的质量浓度变化及菌株 Y4 的生长吸光度。

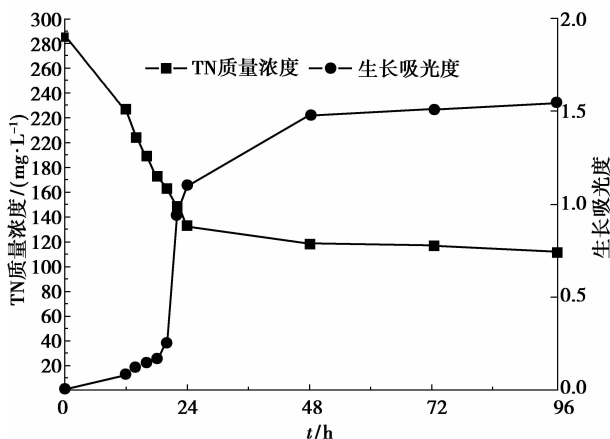


图 2 菌株 Y4 的好氧反硝化特性

在 4 d 的好氧培养过程中,菌株 Y4 生长状况良好,对培养液中总氮的去除率为 61.2%,而对照处理(CK)溶液中的总氮几乎没有变化且溶液的 pH 并非酸性,说明对照处理(CK)溶液中不存在反硝化作用。在图中可以看出,总氮的去除过程与菌株 Y4 的生长曲线基本相对应。在好氧培养 12~24 h 时,菌株 Y4 较快进入其对数生长期,此时总氮浓度降低尤其明显,之后趋于稳定。其原因可能是好氧反硝化作用主要发生在对数生长期,细胞合成所需要的能量和还原力主要在这一阶段被消耗,之后,细胞生长进入平稳期和衰亡期,细胞合成停止甚至出现衰亡^[13-14]。同时,试验还发现,底物去除最快的时期也是菌体进入对数生长期的时期,说明 COD 在反硝化这一阶段被大量消耗。试验结果表明,菌株 Y4 均具有较强的好氧反硝化能力。

2.4 DO 对菌种 Y4 好氧反硝化的影响

表 1 为不同溶解氧浓度对菌株 Y4 的反硝化特性的影响。从表 1 可以看出,在不同的溶解氧浓度下,在培养 24 h 之后,各样中 Y4 的脱氮率都在 90% 以上,因此可以看出,DO 对菌株 Y4 的好氧反硝化脱氮效果并没有显著的影响。此外试验中 DO 为 2~11.8 mg/L 对菌株 Y4 的反硝化作用都未见明显抑制,因此菌株 Y4 有较高的氧耐受浓度。

表 1 不同 DO 浓度下菌株 Y4 的反硝化效果

| DO/ (mg·L ⁻¹) | 初始氮质量浓度/ (mg·L ⁻¹) | | 培养 24 h 后氮质 量浓度/(mg·L ⁻¹) | | 脱氮 率/% |
|------------------------------|-----------------------------------|-----|--|------|-----------|
| | 硝氮 | 亚硝氮 | 硝氮 | 亚硝氮 | |
| 2.0 | 150 | 0 | 12.57 | 1.31 | 90.7 |
| 3.6 | 150 | 0 | 12.46 | 0.82 | 91.1 |
| 6.2 | 150 | 0 | 13.39 | 0.35 | 90.8 |
| 8.5 | 150 | 0 | 13.57 | 0.26 | 90.8 |
| 9.7 | 150 | 0 | 13.81 | 0.10 | 90.7 |
| 11.8 | 150 | 0 | 13.70 | 0.10 | 90.8 |

2.5 温度对菌种 Y4 好氧反硝化能力的影响

从图 3 可以看出,温度对菌株 Y4 的反硝化效果的影响不是非常显著,在 20~40 ℃ 的范围内其脱氮效率均高于 70%,在 30 ℃ 左右最高,达到 90.32%。当温度为 20 ℃ 和 40 ℃ 时,菌株 Y4 的反硝化活性受温度的影响略有下降,但也仍保持着较高的总氮去除率。因此在温度为 20~40 ℃ 时,Y4 都有较好的脱氮效果。较宽的温度适应范围也有利于菌株 Y4 对环境的耐受能力,使其能够有效进行

反硝化作用。

通过上述试验可以看出,菌株 Y4 有较高的好氧反硝化活性,且受 DO 和温度的影响不大。因此,在螺旋升流式 SUFR-UCT 系统中存在着有较好反硝化能力的好氧反硝化菌。

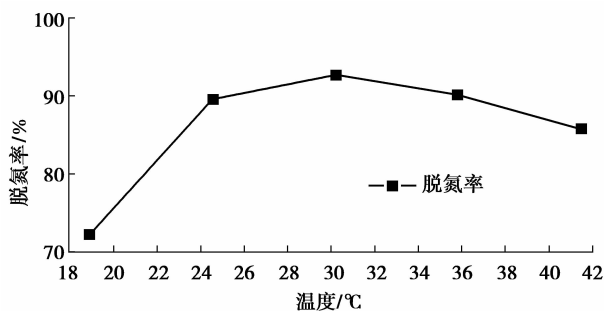


图 3 温度对菌株 Y4 好氧反硝化的影响

3 结 论

1)通过对 UCT 工艺好氧反应器的活性污泥筛选而来的菌株 Y4 形态学、染色试验及 16S rDNA 测序,结果表明 Y4 属于 *Gordonia. sp*(戈登氏菌属)。

2)菌株 Y4 可以在好氧条件下以硝酸盐作为电子受体进行反硝化,有效去除培养液中的硝酸盐。

3)DO 对菌株 Y4 的好氧反硝化效果影响并不显著,且 Y4 有较高的氧耐受力,在 DO 为 2~11.8 mg/L 时都可保持较高的脱氮率。

4)菌株 Y4 对温度适应性强,在室温下有较高的脱氮效率,在 30 °C 时脱氮效率高于 90%。

5)通过对菌株 Y4 的鉴定和反硝化性能的研究,证明在螺旋升流式 SUFR-UCT 系统中存在着有较好反硝化性能的好氧反硝化菌。

参考文献:

[1] Ding A Z, Fu M, Sheng G Y. Evidence of aerobic denitrification[J]. Chin Scie Bull, 2000, 45(3): 2779-2785.

[2] Takaya N, Catalan-Sakairi M A B, Sakaguchi Y, et al. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3152-3157.

[3] Baek S H, Yin C R, Lee S T. Aerobic nitrate respiration by a newly isolated phenol-degrading bacterium, *Alcaligenes* strain P5 [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(8): 627-630.

[4] Çelen E, Kiliç M A. Isolation and characterization of aerobic denitrifiers from agricultural soil [J]. Turk J Biol, 2004, 28(1): 9-14.

[5] Foglar L, Briški F, Sipos L, et al. Nitrate removal from synthetic wastewater with the mixed bacterial culture [J]. Bioresource Technology, 2005, 96(8): 879-888.

[6] Rabah F K J, Dahab M F. Nitrate removal characteristics of high performance fluidized-bed biofilm reactors [J]. Water Research, 2004, 38(19): 3719-3728.

[7] 张亚光, 方柏山, 闵航, 等. 一株好氧反硝化菌的特征及系统进化分析 [J]. 华侨大学学报, 2004, 25(1): 75-78.

ZHANG Yaguang, FANG Baishan, MIN Hang, et al. Characteristics and phylogenetic analysis of a strain of aerobic denitrifier [J]. Journal of Huaqiao University, 2004, 25(1): 75-78.

[8] 刘晶晶, 汪莘, 马洁峰. 一株产生低水平量 N_2O 的好氧反硝化菌 [J]. 环境科学与技术, 2008, 31(5): 26-29.

LIU Jingjing, WANG Ping, MA Jiefeng. An aerobic denitrifier with low levels production of nitrous oxide [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 31(5): 26-29.

[9] 罗固源, 豆俊峰, 吉芳英, 等. 螺旋升流式反应器脱氮除磷效果及其特性研究 [J]. 环境科学学报, 2004, 24(1): 16-20.

LUO Guyuan, DOU Junfeng, JI Fangying, et al. Study on the characteristic of spiral Up-flow reactor system and its performance on biological nitrogen and phosphorus removal [J]. ACTA Scientiae Circumstantiae, 2004, 24(1): 16-20.

[10] Devereux R, Wilkinson S S. Amplification of ribosomal RNA sequences [C] // Molecular Microbial Ecology Manual. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995: 509-522.

[11] 周德庆. 微生物学实验教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.

[12] 奥斯伯 F, 布伦特 R. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.

[13] 周丹丹, 马放, 王弘宇, 等. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究 [J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 837-839.

ZHOU Dandan, MA Fang, WANG Hongyu, et al. Study on screening method of aerobic denitrifiers [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 837-839.

[14] 郑平. 环境微生物学教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.

(编辑 郑洁)