

反硝化菌株 GW1 的筛选及特性研究

李海波, 廉 静, 李 敏, 陈建荣, 赵丽君, 姜宗姗, 许志芳, 王晓磊, 郭建博

(河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018)

摘 要: 研究利用反硝化培养基, 从实验室厌氧反硝化颗粒污泥中分离、筛选出 1 株反硝化优势菌株 GW1, 通过 16S rDNA 序列分析对其初步鉴定, 并研究了温度、pH 值、碳源、碳氮比和硝酸盐氮质量浓度对菌株 GW1 反硝化特性的影响。研究表明, 菌株 GW1 的 16S rDNA 基因序列与 *Paracoccus versutus* 有最大相似性, 达到 99.9%, Genbank 登录序列号为 GU111570; 分离菌株呈革兰氏阳性; 最佳反硝化条件: 丁二酸钠为碳源, 温度为 35 ~ 40 °C, pH 值为 7.0 ~ 8.0, 建议工程应用碳氮比为 3 : 1 (质量比)。该菌株特性的研究为解决反硝化速率过慢问题提供了技术支持。

关键词: 反硝化细菌; 16S rDNA; 筛选; 生物脱氮

中图分类号: X703 文献标志码: A

Isolation and characteristics of denitrifying bacterium strain GW1

LI Hai-bo, LIAN Jing, LI Min, CHEN Jian-rong, ZHAO Li-jun, JIANG Zong-shan,

XU Zhi-fang, WANG Xiao-lei, GUO Jian-bo

(College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

Abstract: A highly active denitrifier named GW1 was isolated from the denitrification granule sludge, and 16S rDNA identification of the strain was performed. Influencing factors such as temperature, pH, carbon source and C/N ratio were optimized through batch experiments, and the effect of nitrate concentration on the denitrification was also studied. The phylogenetic analysis based on 16S rDNA suggests that strain GW1 is the closest relative of *Paracoccus versutus* with 99.9 % sequence similarity and high homology. Genbank sequence number is GU111570. Strain GW1 is Gram-positive. The optimal conditions for the denitrification by strain GW1 are sodium succinate as carbon source, temperature 35 ~ 40 °C, pH(7.0 ~ 8.0) and proposed project use of C/N ratio 3, respectively. Strain GW1 can remove nitrate effectively. The study may help solve the problem of slow denitrifying rate.

Key words: denitrifying bacteria; 16S rDNA; isolation; biological nitrogen removal

近年来, 含氮工业废水的大量排放及农业氮肥的过量施用, 导致硝酸盐污染广泛存在于地下水及地表水中。在饮用水中, 硝酸盐氮及其衍生产物具有致病、致癌作用而影响人类健康; 含氮废水进入水体可引起受纳水体的富营养化^[1-2]。硝酸盐氮污染已成为许多国家和地区所面临的一个重要环境问题^[3-5]。目前国内外对含硝酸盐氮废水的处理方法主要可分为物化法和生物法 2 大类。物化法如离子交换法和反渗透膜法等, 这些方法运行费用高且会产生二次污染, 使其在处理废水的实际应用中具有一定局限性^[6-8]。生物脱氮技术解决了物化法中运行费用较高的问题, 而且不会造成二次污染。传统生物脱氮技术主要包括硝化和反硝化 2 个过

收稿日期: 2011-10-24; 责任编辑: 王海云

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50978082); 2010 年教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-10-0127)

作者简介: 李海波(1985-), 男, 山东广饶人, 硕士研究生, 主要从事水污染控制方面的研究。

通讯作者: 郭建博教授。E-mail: jianbguo@163.com

程,其中反硝化作用在厌氧或兼氧条件下进行,是脱氮作用的限速步骤。因此提高反硝化过程速率成为目前生物脱氮研究的热点之一。而培养和筛选高效反硝化菌(群)是解决此问题的有效途径^[9-11]。

本研究从定向驯化的厌氧反硝化颗粒污泥中分离出1株高效反硝化菌株,通过16S rDNA序列分析对菌株进行鉴定,并考察温度、pH值、碳源、碳氮比和硝酸盐氮质量浓度对反硝化特性的影响,为其在含氮废水处理中的实际应用提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 污泥来源

所用厌氧反硝化颗粒污泥,是由某淀粉厂 UASB 厌氧反应器颗粒污泥经过实验室定向反硝化驯化后得到的。

1.2 培养基

1) 分离培养基为溴百里酚蓝富集培养基^[12]:KNO₃(1 g/L),KH₂PO₄(1 g/L),FeCl₂·6H₂O(0.5 g/L),MgSO₄·7H₂O(1 g/L),CaCl₂·7H₂O(0.2 mg/L),琥珀酸钠(8.5 g/L),琼脂(20 g/L),1 mL 质量分数为10%的溴百里酚蓝(15 g/L),用1 mol/L的NaOH或HCl调节pH值至7.0,于121℃灭菌25 min。

2) 富集培养基:丁二酸钠(1.447 g/L),NaNO₃(1.214 g/L),KH₂PO₄(0.013 2 g/L),MgSO₄(0.12 g/L),酵母粉(0.5 g/L),胰蛋白胨(1.5 g/L)和微量元素(2 mL/L),用1 mol/L的NaOH或HCl调节pH值至7.0,于121℃灭菌25 min。

3) 反硝化培养基:KH₂PO₄(0.013 2 g/L),MgSO₄(0.12 g/L),微量元素(2 mL/L),NaNO₃、丁二酸钠和pH值根据实验条件而定,用1 mol/L的NaOH或HCl调节pH值至7.0,于121℃灭菌25 min。

4) 微量元素组成:EDTA二钠盐(63.68 mg/L),ZnSO₄(2.2 mg/L),CaCl₂(5.5 mg/L),MnSO₄(4.32 mg/L),FeSO₄·7H₂O(5.0 mg/L),Na₂MoO₄·2H₂O(2.11 mg/L),CuSO₄·5H₂O(1.57 mg/L)和CoCl₂·6H₂O(1.61 mg/L)。

1.3 反硝化菌株 GW1 的分离及纯化

从厌氧反硝化颗粒污泥中取出50 mL泥水混合物,将颗粒污泥研磨后,取10 mL混合物接种于富集培养基中。置于空气摇床上,于35℃,120 r/min振荡培养,24 h后得到富集菌液,以10倍浓度梯度逐步进行稀释一直到原有浓度的10⁻⁸,分别吸取各稀释度菌液0.1 mL至分离培养基平板上,涂布均匀,30℃下在培养箱中培养3 d后,出现显著菌落。挑取培养基上出现蓝色晕圈的单菌菌落作为初筛菌,并将其接种于富集培养基中扩大培养。将初筛菌按5%的接种量(100 mL液体培养基接种660 nm处OD值为1.0左右的菌液5 mL,后面液体接种量相同)接种在反硝化培养基中,120 r/min,35℃,培养15 h得到反硝化细菌菌液。

1.4 反硝化菌株 GW1 的形态观察及鉴定

将筛选出的反硝化细菌 GW1 接种到反硝化培养基,35℃,120 r/min培养15 h,所得菌液用于革兰氏染色。同时,从平板上挑取单菌,进行液体培养,提取菌株总DNA,并以此为模板,利用细菌16S rDNA通用引物进行PCR扩增,将回收产物进行DNA测序,将反硝化菌株 GW1 在Genebank进行登记,其序列号为GU111570,序列在Genebank上进行同源性比对。

1.5 反硝化菌株 GW1 的反硝化特性研究

在250 mL锥形瓶中加入270 mL灭菌后的反硝化培养基,按体积比5%接种预配养15 h的接种液,加橡胶塞密封后放入培养箱。使初始细菌浓度660 nm处OD值控制在0.1左右,考察反硝化菌株 GW1 在不同温度、pH值、硝酸盐氮质量浓度、碳源和碳氮比下对硝酸盐氮的降解情况,及不同初始硝酸盐氮质量浓度对菌株的影响,确定反硝化菌株 GW1 的最佳降解硝酸盐氮的条件。

1.6 分析项目及方法

1) 菌体生长量测定 微生物浓度采用660 nm处OD值表示,紫外分光光度法测定(上海天美UV-2600紫外分光光度计)。

2) 硝酸盐氮质量浓度测定 采用紫外分光光度法(上海天美UV-2600紫外分光光度计)^[13]。

2 结果与讨论

2.1 反硝化细菌 GW1 形态观察和鉴定

从厌氧反硝化颗粒污泥中分离、筛选出的 1 株优势反硝化菌,在利用丁二酸钠为碳源,水浴恒温 35 ℃,培养基 pH 值为 7.0,初始硝酸盐质量浓度为 230 mg/L 条件下,6 h 后硝酸盐去除率为 87%,见图 1a)。因而选此菌为考察对象,考察其反硝化特性,并将其命名为 GW1。菌株 GW1 的菌落呈白色突起状,表面光滑无褶皱,其具体外部形态见图 1b),将细菌进行革兰氏染色,在显微镜 100 倍油镜下观察,GW1 单菌形态见图 1c)。

图 1c) 表明,菌株 GW1 在进行革兰氏染色后呈紫色,为革兰氏阳性菌;细菌呈球形,为球菌。该细菌 16S rDNA 碱基数为 1 416 bp,反硝化菌株 GW1 序列(Genebank 登录序列号为 GU111570),与 *Paracoccus versutus* 相似性达到 99.9%,菌株 GW1 为脱氮副球菌,系典型的反硝化细菌。

2.2 菌株 GW1 反硝化特性研究

考虑到影响菌株 GW1 反硝化作用的因素,实验分别从温度、pH 值、硝酸盐氮质量浓度、碳源、碳氮比等方面考察了菌株 GW1 的反硝化特性。

2.2.1 温度和 pH 值对菌株 GW1 反硝化作用的影响

温度和 pH 值是影响微生物活性的重要因素,对于某一种特定的微生物,它只能在特定的温度和 pH 值条件下进行生命代谢活动。本实验采用丁二酸钠为碳源、碳氮比为 6:1(质量比,下同)、初始硝酸盐氮质量浓度为 310 mg/L 和 pH 值为 7.0 的反硝化培养基。分别考察了 20,25,30,35,40,45,50 ℃ 下菌株 GW1 的反硝化特性,反应过程中体系的硝酸盐氮质量浓度的变化见图 2。图 2 表明,在不同温度下,菌株 GW1 反硝化速率不同,温度为 35 ℃ 和 40 ℃ 时,菌株 GW1 的硝酸盐氮的降解速率非常快,在反应进行 4 h 后,硝酸盐氮质量浓度从 310 mg/L 迅速降到 100 mg/L 以下,温度低于 30 ℃ 后反硝化速率开始减慢,温度为 20 ℃ 时 4 h 的硝酸盐氮去除率不到 15%,速率明显降低。反应温度超过 40 ℃ 后,硝酸盐氮降解速率变小,这说明高温可能影响了菌株 GW1 反硝化酶的活性,从而使反硝化反应速率降低。实验结果表明,菌株 GW1 反硝化适宜温度范围为 35 ~ 40 ℃。

采用丁二酸钠为碳源、碳氮比为 6:1 的反硝化培养基,分别考察了 pH 值为 5.0,6.0,7.0,7.5,8.0 和 9.0 时对菌株 GW1 反硝化过程中硝酸盐氮质量浓度变化的影响,见图 3。图 3 表明,在不同 pH 值条件下,菌株 GW1 的反硝化速率不同。当反应体系 pH 值为 7.0 ~ 8.0 时,硝酸盐氮的降解速率最快。反应进行 4 h 后,硝酸盐氮质量浓度从 310 mg/L 迅速降到 80 mg/L 左右。当反应体系 pH 值低于 7.0 时,细菌反硝化速率明显降低,pH 值在 5.0 时反应体系硝酸盐不降解,pH 值在 9.0 时反硝化速率略有降低。因此,菌株 GW1 反硝化过程中适宜 pH 值范围为 7.0 ~ 8.0。

2.2.2 硝酸盐氮质量浓度对菌株 GW1 反硝化速率的影响

采用丁二酸钠为碳源、碳氮比为 6:1,温度为 38 ℃,pH 值为 7.0 的反硝化培养基,分别考察了初始硝酸盐氮质量浓度为 100,200,300,400,500,600,800 mg/L 对菌株 GW1 反硝化速率的影响,见图 4。

图 4 表明,硝酸盐氮质量浓度为 800 mg/L 时,在反应开始后的 2 h,体系反硝化速率很低,说明高质量浓度的硝酸盐氮对反硝化细菌造成一定抑制,随后细菌适应后,系统反硝化速率加快。硝酸盐氮质量浓度较高时,反硝化反应速率较低,可能是因为硝酸盐氮质量浓度过高影响反硝化细菌细胞渗透压和其他生命活动,反硝化酶活动不能正常发挥功能,经过驯化适应后,反硝化速率得以正常进行。

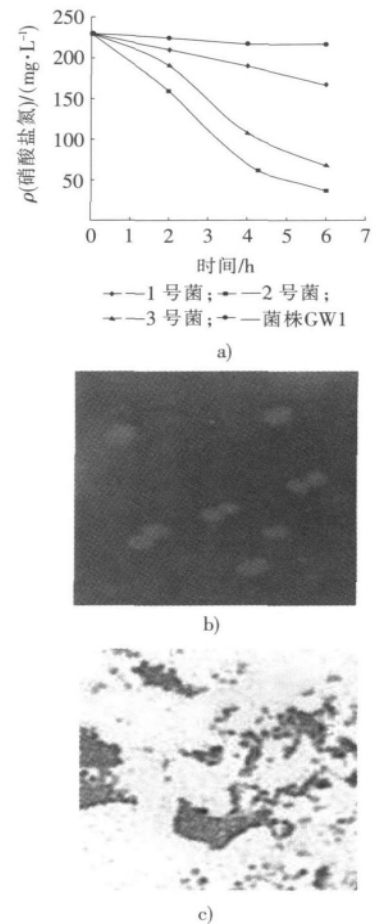


图 1 反硝化细菌菌落形态特征

Fig. 1 Colony morphology of the strains separated from anaerobic denitrification sludge

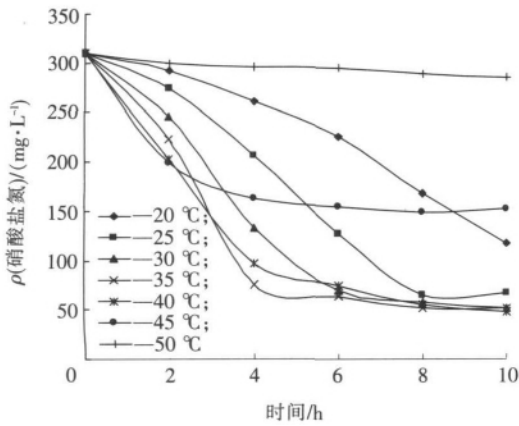


图 2 不同温度下反硝化体系硝酸盐氮质量浓度变化

Fig. 2 Degradation curve of denitrification system under different temperature

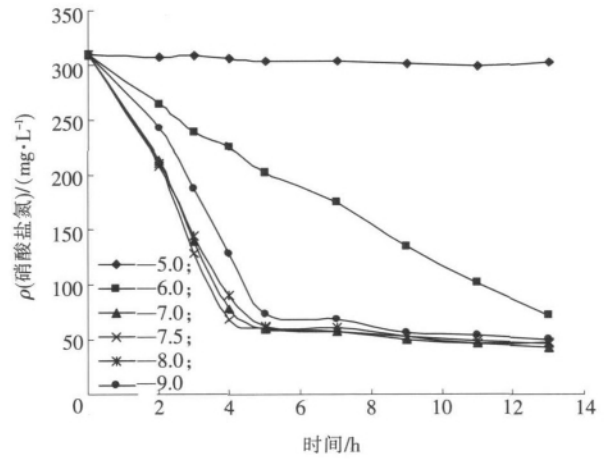


图 3 不同 pH 值下反硝化体系硝酸盐氮质量浓度变化

Fig. 3 Degradation curve of denitrification system under different pH

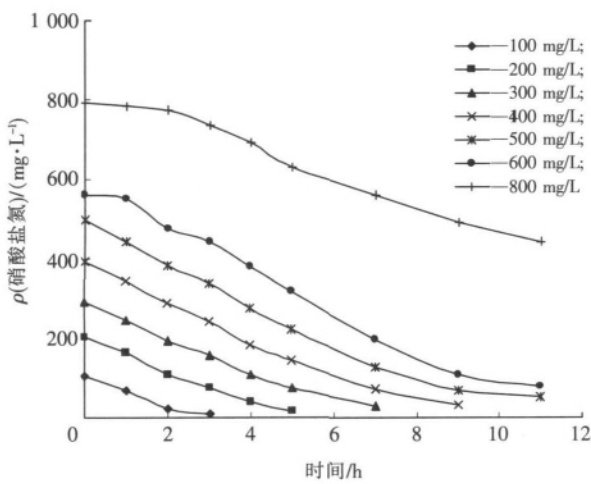


图 4 硝酸盐氮质量浓度对菌株 GW1 反硝化的影响

Fig. 4 Effect of nitrate concentration on the denitrification by strain GW1

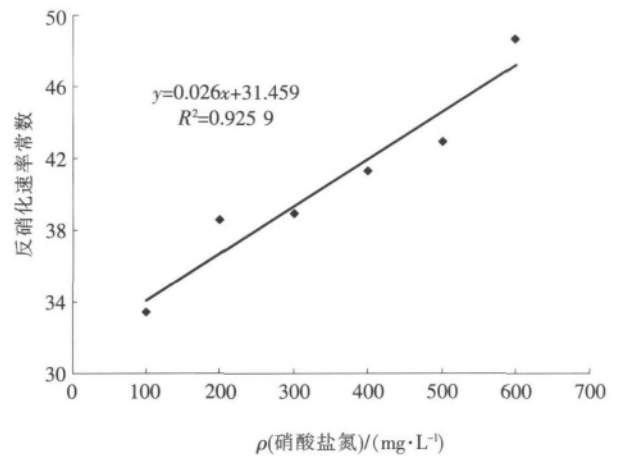


图 5 硝酸盐氮质量浓度与反硝化速率常数的关系曲线

Fig. 5 Nitrate concentration and denitrification rate constant curve

硝酸盐氮质量浓度与反硝化速率常数的关系曲线,见图 5。图 5 表明,在实验所选的硝酸盐氮质量浓度(100 ~ 600 mg/L)下基质浓度为限制反硝化速率的主要影响因素,降解方程符合一级反应动力学。

2.2.3 碳源对菌株 GW1 反硝化作用的影响

生物反硝化过程中,碳源的种类对微生物的反硝化速率起着关键的作用。本实验采用碳氮比为 6 : 1、初始硝酸盐氮质量浓度为 200 mg/L、温度为 38 °C 和 pH 值为 7.0 的反硝化培养基,分别考察了以蔗糖、乳糖、柠檬酸钠、丁二酸钠、葡萄糖、甲醇和混合碳源(酵母粉、胰蛋白胨)为碳源时,对菌株 GW1 的反硝化作用的影响。不同碳源下反硝化体系硝酸盐氮质量浓度变化见图 6。

图 6 表明,不同碳源对 GW1 反硝化作用影响不同,丁二酸钠为碳源时细菌反硝化速率最高,5 h 硝酸盐氮降解率达 94.2%。柠檬酸钠为碳源时硝酸盐氮降解缓慢,因此,柠檬酸钠最不适合作为碳源。

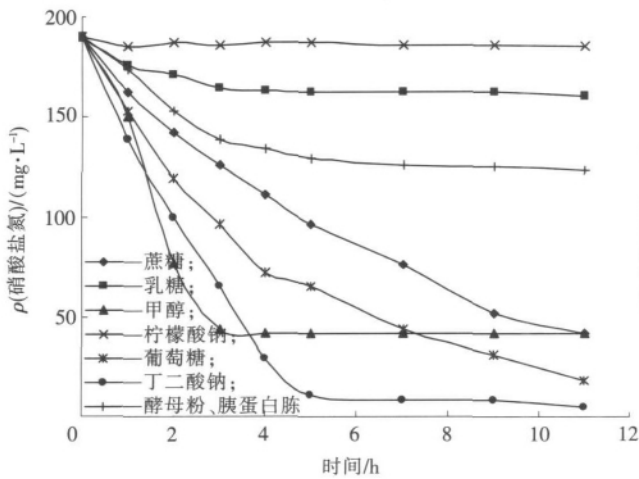


图6 不同碳源下反硝化体系硝酸盐氮质量浓度变化

Fig. 6 Degradation curve of denitrification system under different carbon sources

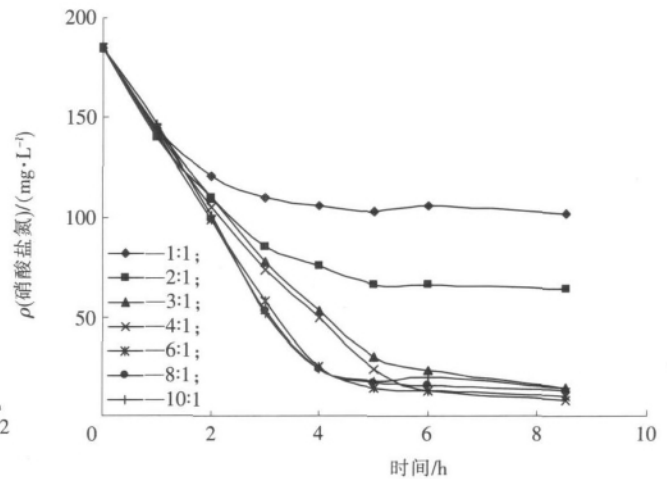


图7 不同碳氮比下反硝化体系硝酸盐氮质量浓度变化

Fig. 7 Degradation curve of denitrification system under different C/N ratio

2.2.4 碳氮比对菌株 GW1 反硝化作用的影响

采用丁二酸钠为碳源,温度为 38 °C, pH 值为 7.0 的反硝化培养基。分别考察了碳氮比为 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 6:1, 8:1 和 10:1 时,对细菌 GW1 反硝化的影响,见图 7。

图 7 表明,低碳氮比时,细菌反硝化速率较低,而且由于碳源不足,不能将所有的硝酸盐还原。碳氮比越大,细菌反硝化速率越高,当碳氮比达到 3 时,硝酸盐氮降解基本完全。当碳氮比达到 6:1 时,细菌反硝化速率达到最大,再增加碳氮比对菌株 GW1 的反硝化速率影响较小。因此菌株 GW1 反硝化过程中的最适宜碳氮比为 6:1。但碳氮比高通常会增加反硝化费用,而在 6 h 后碳氮比为 3:1 时硝酸盐氮降解也比较完全,而且反硝化反应速率与碳氮比为 6:1 时相差不大,因此建议工程上控制碳氮比为 3:1。

3 结 论

从厌氧反硝化颗粒污泥中,筛选了 1 株反硝化菌株 GW1,水中初始硝酸盐氮质量浓度为 230 mg/L 时,6 h 硝酸盐氮去除率为 87%,能够有效去除水中硝酸盐氮,通过对菌株 GW1 的形态观察、革兰氏染色、16S rDNA 分子鉴定,并对菌株 GW1 反硝化温度、pH 值、碳源、碳氮比和硝酸盐氮质量浓度等影响因素进行考察,确定出菌株 GW1 的最佳反硝化条件。结论如下:

1) GW1 的菌落呈白色、圆形、边缘整齐、纵剖面隆起,革兰氏阳性菌;通过鉴定,确定 GW1 与脱氮副球菌 *Paracoccus versutus* 有最大相似度,菌株 GW1 在 Genebank 的登录的序列号为 GU111570。

2) 菌株 GW1 的反硝化适宜 pH 值范围为 7.0 ~ 8.0,反应温度为 35 ~ 40 °C,最佳碳源为丁二酸钠,以丁二酸钠为碳源时最适碳氮比为 6:1,为节省费用,建议工程上应用碳氮比为 3:1;在所选的硝酸盐氮质量浓度条件下,反硝化细菌 GW1 能够直接承受的硝酸盐氮质量浓度为 600 mg/L。

参考文献:

- [1] KLEINJANS J C, ALBERING H J, MARX A, et al. Nitrate contamination of drinking water: Evaluation of genotoxic risk in human population[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1991, 94(8): 89-193.
- [2] 范 彬, 曲久辉, 刘锁祥, 等. 饮用水中硝酸盐的脱除[J]. *环境污染治理技术与设备* (Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control), 2000, 1(3): 44-50.
- [3] MANDPI M A, ELLOITT D J, MEMENY-MAZDK A. Denitrification of groundwater using acetic acid as a carbon source[J]. *Water Science and Technology*, 1999, 40(2): 53-59.
- [4] GREEN M, SCHNIZER M, TARRE S, et al. Groundwater denitrification using an upflow sludge blanket reactor[J]. *Water Research*, 1994, 28(3): 631-637.

- [5] LIN Y F, JING S R, WANG T W, et al. Effects of macrophytes and external carbon sources on nitrate removal from groundwater in constructed wetlands[J]. Environmental Pollution, 2002, 119(3): 413-420.
- [6] HOA T T H, KHANH L N, LIU Z J, et al. Nitrogen removal by immobilized anammox sludge using PVA gel as biocarrier[J]. Japanese Journal of Water Treatment Biology, 2006, 42: 139-149.
- [7] 赵 昕, 夏文香, 陈丽丽, 等. 海水反硝化细菌富集培养及性能研究[J]. 生物技术(Biotechnology), 2010, 20(4): 75-77.
- [9] 蔡昌凤, 梁 磊. 高效好氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性的研究[J]. 环境科学与技术(Environmental Science & Technology), 2011, 34(1): 41-44.
- [10] 胡朝松, 李春强, 刘志昕, 等. 海洋沉积物中反硝化细菌的分离鉴定及反硝化性能研究[J]. 环境科学研究(Research of Environmental Sciences), 2009, 22(1): 114-118.
- [11] TAKAYA N, CATALAN-SAKAIRI M A B, SAKAGUCHI Y, et al. Aerobic denitrification bacteria that produce low levels of nitrous oxide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3 152-3 157.
- [12] 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[M]. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

(上接第 149 页)

$$e = \sqrt{\frac{(X_m - X_w)^2 + (Y_m - Y_w)^2 + (Z_m - Z_w)^2}{3}} \quad (19)$$

计算结果作图如图 6 所示。由图 6 可知靶标上圆孔中心坐标的实际测量误差小于 0.015 mm, 测量结果的标准差为 0.008 5 mm。说明本文提出的基于空间矩的最小二乘法曲线拟合椭圆边缘亚像素提取算法具有较高的测量精度。

4 结 语

提出了基于空间矩的最小二乘法曲线拟合亚像素基元特征提取的新方法, 并进行了相关的实验研究, 实验结果说明, 提出的基元特征提取方法具有较高的精度。

参考文献:

- [1] 张洪涛, 段发阶, 叶声华. 一种快速亚像素边缘检测方法研究[J]. 计量学报(Acta Metrologica Sinica), 2002, 23(4): 263-266.
- [2] 佟庆彬, 丁振良, 王 艳, 等. 基于视觉图像的石英摆片参数精密测量方法[J]. 光电子·激光(Journal of Optoelectronics · Laser), 2008, 19(4): 521-524.
- [3] LIU Xiang-dong, EHRICH R W. Subpixel edge location in binary images using dithering[J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1995, 17(6): 629-634.
- [4] 张永宏, 胡德金, 徐俊杰. 基于视觉图像的机加工零部件亚像素边缘定位[J]. 机械工程学报(Chinese Journal of Mechanical Engineering), 2004, 40(6): 179-182.
- [5] SHEN Li-qin, SHEN Ding-gang, QI Fei-hu. Edge detection on real time using LOG filter[A]. 1994 International Symposium on, Image Processing and Neural Network[C]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 1994, 1: 37-40.
- [6] EDWARD P L, MITCHELL O R, MARK L A. Subpixel measurements using a moment-based edge operator[J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1989, 11(12): 1 293-1 309.
- [7] 曲迎东, 李荣德, 袁晓光, 等. 两级 Zernike 矩算子在喷射沉积坯尺寸检测中的应用[J]. 光电子·激光(Journal of Optoelectronics · Laser), 2006, 17(5): 600-603.
- [8] 岁 波, 都 东, 陈 强, 等. 基于双目视觉的工业机器人运动轨迹准确度检测[J]. 机械工程学报(Chinese Journal of Mechanical Engineering), 2003, 39(5): 88-91.

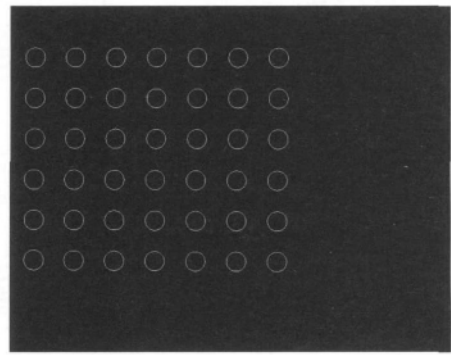


图 5 椭圆边缘亚像素提取后的结果
Fig. 5 Subpixel edge extraction of ellipse

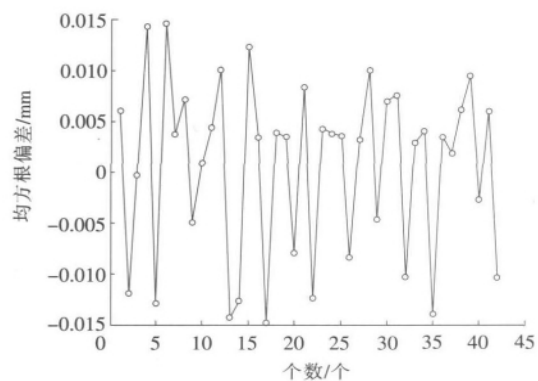


图 6 椭圆中心坐标偏差

Fig. 6 Deviation of the ellipse center coordinates