

一株耐高温高盐亚硝化单胞菌特性的初步研究

王 艳^{1,2} 李大平^{2*} 王晓梅² 刘世贵^{1**}

(¹ 四川大学生命科学院 成都 610064)

(² 中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

摘 要 从某污水处理站高温高盐外排水中分离出一株严格自养的特殊亚硝化单胞菌。它为革兰氏染色阴性,不产芽孢,细胞椭圆形或短杆状,呈单个排列或排列成圆形、直线形,细胞大小为(0.7~0.9) μm ×(1.2~1.8) μm 。在扫描电镜下发现单个或多个菌体被绒毛状不明物质包裹。该菌株能将氨氮氧化成亚硝酸盐,导致体系中的总氮减少,但是氨氮的减少与亚硝酸盐的增加并不能形成对应,而体系中几乎检测不到硝酸盐氮。在分离菌株 50℃培养 12 d 时,约有 10%的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 转变为 $\text{NO}_2^- - \text{N}$,15%的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 未发生转变,剩下的 75%的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 被去除,包括挥发掉的 17%的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 。气相色谱分析表明,菌株培养过程产生气体中氮气含量较对照气体(室内空气)增加了 3.5%。

关键词 高温,高盐,亚硝化单胞菌,硝化作用

中图分类号:Q939.1 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2003)01-0094-05

氨氮是引起水体富营养化的物质之一,生物脱氮原理是通过硝化细菌将氨氮氧化为亚硝酸盐至硝酸盐,反硝化细菌将硝酸盐还原为氮气。生物脱氮工艺因具有处理效果好,处理过程稳定可靠,处理成本低,操作管理方便等优点而得到广泛应用,为水体中氮的去除提供了有效手段。目前的生物脱氮工艺均是在常温 28℃~36℃左右的条件下进行的,这是文献^[1,2]报道的硝化细菌最适生长及硝化反应温度。在石油、化工、化肥等行业中,外排含氮废水大多具有高温、高盐的特点,由于现有常温生物脱氮技术的限制,对这类废水需要进行冷却处理,增加了处理费用。尽管目前的硝化细菌的研究中有少量涉及高盐生境的报道^[3],但只涉及菌种鉴定的技术方面,未涉及其硝化特性,而对高温硝化细菌的研究尚未见报道。高温高盐这一特殊生境中硝化细菌的特性研究将有助于了解高温高盐生物脱氮工艺的可行性。从高温高盐生境中分离出一株好氧、严格自养的亚硝化细菌,发现其在高温条件下的硝化特性与一般的亚硝化细菌不同,因此对其进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 样品来源

实验样品采集于山东东营胜利油田王家岗污水处理站外排水。水样温度为 47℃~63℃,DO = 0.7mg·L⁻¹~1.4mg·L⁻¹,含盐 2.5%~3.0%,氨氮 35mg·L⁻¹~60mg·L⁻¹,COD_{Cr} 含量 260mg·L⁻¹~600mg·L⁻¹。

* 通讯作者,** 第一作者的硕士导师, E-mail: LiDP@cib.ac.cn

作者简介:王 艳(1977-),女,侗族,广西省人,四川大学生命科学院研究生,研究方向为现代遗传与生物工程。

收稿日期:2002-01-11,修回日期:2002-07-30

1.2 亚硝化细菌培养基组成

1.2.1 亚硝化细菌培养基 N_a :每升培养基中含 1 g NH_4Cl , 0.7g KH_2PO_4 , 25g $NaCl$, 1g $NaHCO_3$, 500mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 500mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1mL 微量元素溶液。每 100mL 微量元素溶液含 320mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 320mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 240mg $(NH_4)_2Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 440mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g $EDTA$, 1g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 870mg $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。调节 pH 为 8.0。121℃ 灭菌 20min。

1.2.2 亚硝化细菌培养基 N_b :每 1000mL 中含 0.5g NH_4Cl , 0.7g KH_2PO_4 , 259g $NaCl$, 1g $NaHCO_3$, 500mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 500mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1mL 微量元素溶液。调节 pH 为 8.0。121℃ 灭菌 20min。本实验采用的亚硝化细菌培养基根据水样的特殊性质作了部分改变。

1.3 亚硝化细菌的富集、分离与纯化

将所采水样以 25% 比例加入上述亚硝化细菌培养基 N_a 振荡培养 12 d, 温度 50℃, 转速 200r/min, 其间同样以 25% 比例转接两次新鲜培养基 N_a 。然后取 12 d 培养物于硅胶平板上进行划线分离, 挑取单菌落保存于斜面。采用肉膏蛋白胨酵母膏培养基和马铃薯葡萄糖培养基检查亚硝化细菌纯度^[4]。硅胶平板的制备参照文献 5]。

1.4 亚硝化细菌的鉴定

参照文献^[6]对该菌进行鉴定。将分离的菌种接入装有亚硝化细菌培养基 N_a 的试管中, 于 50℃, 200 r/min 振荡培养 7 d, 用 Griess 试剂检测。然后对呈 Griess 阳性反应的菌株作菌落形态观察, 革兰氏染色^[4]、芽孢染色^[4]、鞭毛染色^[4,7]、荚膜染色^[4]实验, 用光学显微镜及扫描电镜观察细胞形态。生理生化实验如下:亚硝酸盐的生成及氢氧化检测^[4];硝酸盐的生成检测^[4];需氧性测定^[4];细菌细胞上铁的沉积实验^[8]。采用 Griess 试剂检测 NO_2^- , 奈氏试剂检测 NH_4^+ , 二苯胺-硫酸试剂检测 NO_3^- , 需氧性测定采用穿刺接种法^[4]。

1.5 菌株生长的测定

采用最大可能计数法 (MPN 法)。操作步骤参照孙玉华等人^[9]的研究工作, 所涉及的数量指标的计算参照文献 10]。

1.6 化学分析

氨氮测定采用纳氏试剂光度法^[11];亚硝酸盐氮采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法^[11];硝酸盐氮采用紫外分光光度法^[11];氮气采用气相色谱法, 气相色谱条件:Φ3mm × 1.5m 不锈钢填充色谱柱, 填充 30~60 目 13 × 分子筛, 柱温 40℃, 载气 (H_2) 流速为 50mL/min, 热导池检测器 (TCD) 桥电流 120mA, 进样量 0.5mL。

2 结果

2.1 形态和培养特征

一株亚硝化细菌从山东东营胜利油田王家岗污水处理站高温高盐外排水分离得到, 在亚硝化培养基上 50℃ 培养 2~4d 以后, 菌落呈乳白色或乳黄色, 圆形, 边缘整齐, 低凸面, 湿润, 半透明, ϕ1.0mm~1.5mm。常常附着于培养液中碳酸钙或碳酸氢钙颗粒上, 沉淀于瓶底或粘附在瓶壁上, 培养物中含桔红色色素。细胞革兰氏染色阴性, 不产芽孢, 无鞭毛, 荚膜, 穿刺培养实验观察到菌株生长在距培养基表面约 0.3cm~0.8cm 处, 为好氧性细菌。不氧化亚铁, 也不于细胞内外沉积铁的氧化物。不能在复合有机培养基上生长, 严格

自养菌,可在无碳源培养基中生长,说明该菌能够同化空气中的 CO_2 ,喜中性或微偏碱性环境,能将无机氮氮转化为亚硝酸盐,但不产生硝酸盐。在光学显微镜下该菌呈椭圆或短杆状,单个排列或排列成圆形、直线形,细胞大小为 $(0.7 \sim 0.9) \mu\text{m} \times (1.2 \sim 1.8) \mu\text{m}$ (图 1)。在扫描电镜下发现单个或两个菌体被绒毛状物质所包裹(图 2),但无荚膜染色特征。根据文献^[4],初步鉴定为亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)。

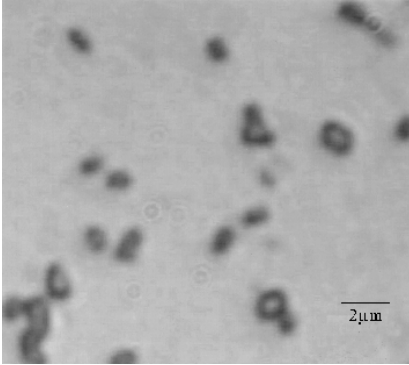


图 1 分离菌株的光学显微照片
(1 000 ×)

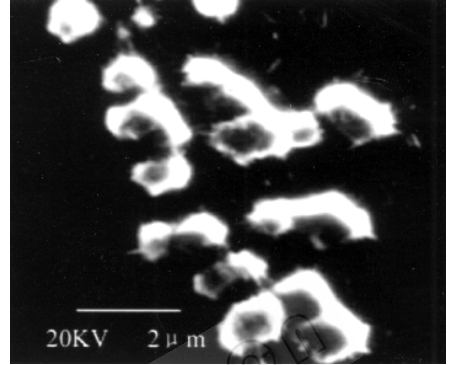


图 2 分离物的扫描电子显微照片
(27 000 ×)

Fig.1 Optical microscopy of the isolates(1 000 ×)

Fig.2 SEM of the isolates(27 000 ×)

2.2 生长与硝化特性

该菌生长 pH 范围 6.5 ~ 8.9,最适生长 pH 为 7.5 ~ 8.4。pH 对该菌株的硝化特性影响较明显,在 pH7.5 ~ 8.4 时,氮氮去除率为 $18.93 \sim 19.78 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,在 pH6 和 9.4 时则分别为 9.45 和 $11.05 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。从接种该菌后 12d 内培养液中 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 及 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 浓度的变化:与对照相比,1 ~ 7d 内 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度变化缓慢,第 8d 后变化加快,4d 以内 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度从 $92.58 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降至 $17.99 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度从 $105.26 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降至 $97.35 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 浓度从 $6.3 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升为 $16.15 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,到第 12d 时,有 10% 的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 转变为 $\text{NO}_2^- \text{-N}$,15% 的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 未发生转变,剩下的 75% 的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$

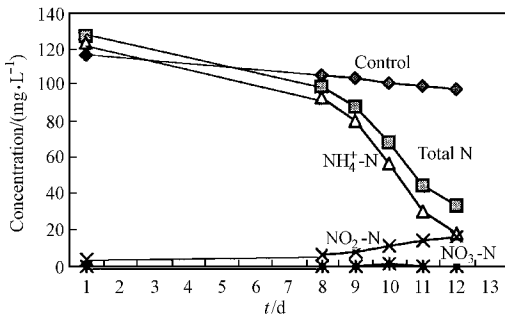


图 3 12 d 内样品氮氨、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮和总氮的变化

Fig.3 Changes of the concentration of $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and $\text{NO}_3^- \text{-N}$ during 12 days

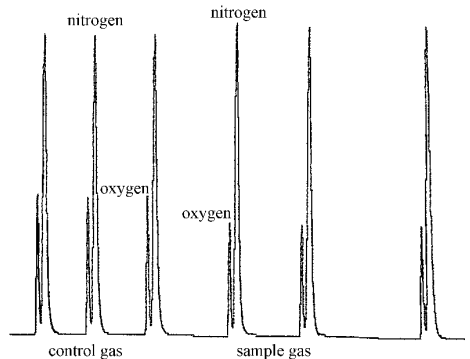


图 4 分离菌株纯培养物所产气体氮气、氧化含量的气相色谱图

Fig.4 Gas chromatography of the gas produced by pure culture

被去除。除有一次检测到 $\text{NO}_3^- \text{N}$ ($1.38\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 外,未发现有 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的生成(图 3)。空白培养基对照实验表明,有 17% 的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 挥发。将收集培养过程中产生的气体进行气相色谱分析,结果表明,对照气体(室内空气,室温 26°C 、相对湿度 68%)氮气、氧气浓度分别为 76.3% 和 20.4%,水蒸气浓度为 2.26%;样品气体氮气、氧气浓度分别为 79.8% 和 16.5%,与对照气体相比,氮气浓度增加了 3.5%,氧浓度相应降低了 3.9%(图 4)。

3 讨论

从山东胜利油田王家岗污水处理站外排水中分离所得的此菌株在扫描电镜下细胞形态不规则,并被绒毛状物质所包裹,但不具荚膜染色特征,说明该物质可能不是多糖类物质,有待对该绒毛状物质进一步分析。该菌的硝化特性与一般的亚硝化细菌不同,其氨氮的消耗大于亚硝酸盐氮的生成,但又检测不出硝酸盐氮,可见,氨氮以非传统亚硝化途径进行了转变。培养过程中所产气体的分析表明,所研究气体中的氮气浓度比对照气体的氮气浓度增加了 3.5%,由于空气中的氮气浓度很高,因此 3.5% 的增幅是相当显著的,说明在本实验体系中,该菌在高温条件下,确实将氨氮转化为氮气,导致了前述结果。目前有研究表明,*Nitrosomonas* 等一些自养菌能在某些条件下,如缺氧、限氧、积累亚硝酸盐或存在 NO_2^- 能同时进行硝化和反硝化作用,氨氮以亚硝酸盐氮为电子受体,转变为氮气或其它含氮气体^[12-15]。Kuai 等^[16]发现以亚硝酸盐氮为氧化剂氧化氨氮为氮气的过程中需要某种酶的参与,而这种酶需在氨氮以氧为电子受体转变为亚硝酸盐氮的过程中产生,在严格缺氧的情况下则不可能。早在 1972 年,Ritchie 和 Nicholas^[17]就用欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)及其无细胞抽提物进行¹⁵N 标记 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NH_2OH 的跟踪研究,发现该菌能够以 NH_2OH 为电子供体还原 NO_2^- 为 N_2O ,而且该现象在有氧及无氧条件下都可发生。经纯度检查,该氨氧化过程是在氨氧化细菌的纯培养物的作用下发生,其体系特征为较高氨氮含量、较高 pH 和高温。根据目前研究,产生该现象的原因可能有(1)高氨氮含量可促进亚硝化细菌的生长和氨氧化代谢,引起亚硝酸盐的积累,另外高 pH 也会引起亚硝酸盐的积累,而亚硝酸盐对细菌而言是一种有害物质,亚硝化细菌必须除去亚硝酸盐,从而发生反硝化现象;(2)反硝化过程既可去除有害的亚硝酸盐,又能保留氧气以供前面氨的氧化步骤所用。(3)高温条件下溶氧明显低于中温条件下的溶氧,但足以保证氨氧化细菌进行氨氧化反应,另外氨氧化细菌的氧饱和系数较低,所以发生前述设想的过程是可能的。(4)实验证明氨氧化细菌在高温条件下仍然能够维持较高的生长速率。高温水环境中饱和溶解氧浓度显著低于常温条件,对王家岗水样溶解氧监测结果表明,水温在 $57^\circ\text{C} \sim 58^\circ\text{C}$ 条件下,溶解氧浓度约 $0.8\text{mg/L} \sim 1.0\text{mg/L}$,由于水环境中溶解氧浓度较为有限,亚硝化细菌可能先利用 O_2 进行呼吸获取能量,当电子受体 O_2 供应不足时,亚硝化细菌可能会利用原先产生的亚硝酸盐氮作为新的电子受体,或者也同时利用 O_2 氧化氨氮,转变成氮气或其它含氮气体。如能对该菌从分子水平对相关蛋白或酶及功能基因的研究,将有助于揭开高温生物脱氮的过程机制。

参 考 文 献

[1] 陈 坚. 环境生物技术. 北京:中国轻工业出版社,1999. 186~193.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] 夏淑芬, 张甲耀. 微生物生态学. 武汉: 武汉大学出版社, 1988. 268 ~ 272.
- [3] Ward B B, Martino D P, Diaz S B, *et al.* Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol*, 2000 **66**: 2873 ~ 2881.
- [4] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1999.
- [5] 郭爱莲, 李振海, 黄淑菊. 硝化细菌的分离研究. 西北大学学报(自然科学版), 1996 **26**(1): 83 ~ 86.
- [6] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984. 622 ~ 630.
- [7] 陈绍铭, 郑福寿. 水生微生物学实验法. 北京: 海洋出版社, 1985.
- [8] 斯克尔曼 V B D(蔡妙英译). 细菌属的鉴定指导. 北京: 科学出版社, 1978.
- [9] 孙玉华, 潘连德. 活性污泥中硝化细菌的分离及其硝化强度的初步研究. 工业微生物, 1999 **29**(1): 21 ~ 24.
- [10] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985.
- [11] 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. 北京: 中国环境科学出版社, 1998.
- [12] Abeliovich A, Vonshak A. Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol*, 1992 **158**: 267 ~ 270.
- [13] Bock E, Schmidt I, Zart D, *et al.* Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch Microbiol*, 1995 **163**: 16 ~ 20.
- [14] Schmidt I, Bock E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch Microbiol*, 1997 **167**: 106 ~ 111.
- [15] Van de Graaf A A, Mulder A, De Bruijn P, *et al.* Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol*, 1995 **61**: 1246 ~ 1251.
- [16] Kuai L, Verstraete W. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl Environ Microbiol*, 1998 **64**: 4500 ~ 4506.
- [17] Ritchie G A F, Nicholas D J D. Identification of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. *Biochem J*, 1972 **126**: 1181 ~ 1191.

Preliminary Study of Characteristics of a Special *Nitrosomonas*

Wang Yan^{1,2} Li Daping^{2*} Wang Xiaomei² Liu Shigui^{1***}

(¹ College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(² Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract: A special obligately-autotrophic *Nitrosomonas* was isolated from high temperature and hypersaline drainage water obtained off a wastewater treatment plant. It was Gram-negative, non-sporulating, ellipsoidal or short-rod shaped bacterium that singly arranged or arranged in a circle or in a row. Cells were 0.7 to 0.9 μm wide and 1.2 to 1.8 μm long. Electron-microscopic scanning of these cells indicated that they were wrapped by unknown fluff-like matter. They oxidized ammonium to nitrite and caused the removal of nitrogen from the system. But the decrease of NH_4^+ -N did not accord with the increase of NO_2^- -N and NO_3^- -N was almost not detected. After 12 d of cultivation at 50°C, about 10% of the NH_4^+ -N was converted to NO_2^- -N, 15% remained as NH_4^+ -N, and the other 75% was removed from the system, including 17% of NH_4^+ -N volatilized.

Key words: High temperature, Hypersaline, *Nitrosomonas*, Nitrification

* To whom correspondence should be addressed

** The master advisor of the first author