

一株海水异养硝化-好氧反硝化菌系统发育及脱氮特性

孙雪梅, 李秋芬*, 张艳, 刘淮德, 赵俊, 曲克明

农业部海洋渔业资源可持续利用重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071

摘要: 【目的】确定一株分离自海水的异养硝化-好氧反硝化菌的系统发育地位并探索其脱氮特性和机理, 以期为解释异养硝化-好氧反硝化机理以及改进海水养殖及废水的生物脱氮工艺提供理论依据。【方法】通过形态观察、生理生化实验和 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定该菌株; 通过测定菌株在不同无机氮源降解测试液中的生长和脱氮效率, 分析其异养硝化和好氧反硝化性能。【结果】经鉴定该菌株属于盐单胞菌属 (*Halomonas*); 最适生长条件为盐度 3‰、pH 8.5、温度 28℃、碳氮比 10:1, 在盐度为 15‰ 的培养液中仍能生长; 可以同时去除氨氮、亚硝酸氮和硝酸氮, 24 h 时对 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的去除率可分别达到 98.29%、99.07%、96.48%。3 种形态无机氮同时存在时, 会优先利用 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, 且总无机氮去除率较单一存在时更高, 说明该菌株可实现同步硝化反硝化。【结论】该分离自海水的异养硝化-好氧反硝化菌属于盐单胞菌属 (*Halomonas*), 在高盐环境中仍能生长, 同时具有高效的异养硝化和好氧反硝化能力, 能够独立完成脱氮的全部过程。

关键词: 盐单胞菌, 异养硝化, 好氧反硝化, 生物脱氮

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)06-0687-09

近几年, 随着越来越多的异养硝化菌和好氧反硝化菌被分离到, 传统的生物脱氮理论正在逐步被打破, 研究表明异养硝化菌可在利用有机底物的同时将氨氮转化为羟胺、亚硝酸盐和硝酸盐^[1], 好氧反硝化菌可在有氧条件下, 将硝酸盐和亚硝酸盐还原为 N_2 或 N_2O 等气态产物^[2]。同时还有不少报道证明了同步硝化反硝化 (Simultaneous Nitrification and Denitrification, SND) 现象的存在^[3-4], 已报道能完成 SND 的主要有产碱菌属 (*Alcaligenes*)^[5]、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)^[6]、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[7]、戴尔夫特菌属 (*Delftia*)^[8] 等属的某些细菌, 但是否所有的好氧反硝化菌都同时具有异养硝化功能目前尚不能下定论。

由于异养硝化菌和好氧反硝化菌具有生长快、脱氮效率高、可容忍低溶解氧 (DO) 浓度和酸性环境、喜欢较高的 C/N 比、在污水处理中可避免好氧区和厌氧区隔开分别进行的麻烦等优点, 所以, 目前国内外对这类菌的研究非常热门。但目前对单一异养硝化作用或者好氧反硝化作用的研究报道较多, 且多在生活 and 工业污水处理领域中, 对其在养殖尤其是海水养殖中应用的报道很少, 对既耐盐又可同时完成硝化、反硝化功能, 并对其降解效率进行详细描述的海水菌株则更少, 仅见张培玉等^[9] 筛选出一株耐盐的同步硝化反硝化菌株 GYL, 对其反硝化能力作了详细的研究。随着养殖业的迅猛发展, 海水养殖已覆盖全国沿海地

基金项目: 海洋公益性行业科研专项经费项目 (200805069); 国家自然科学基金课题 (31170113)

* 通信作者。Tel: +86-532-85836341-8009; E-mail: liqf@ysfri.ac.cn

作者简介: 孙雪梅 (1983-), 女, 山东烟台人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物及生态毒理学研究。E-mail: rose3260503@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-11-30; 修回时间: 2012-03-12

区,水体污染的问题也日益严重,其中过高浓度的氨氮和亚硝酸氮等无机氮的积累会对养殖生物产生强烈的毒害作用,引起其窒息、死亡等^[10]。由于海水盐度高,会引起脱氮菌种的脱氢酶活性降低、细胞质壁分离、生长代谢受抑制等^[11],从而使一般淡水环境中分离出的常规脱氮菌的脱氮效率降低,而且,海水养殖的特点决定了在养殖的同时制造严格厌氧条件比较困难。因此,筛选出能适应高盐有氧环境、又能同时消除有机物、氨氮和亚硝酸氮的高效菌株,才是净化海水养殖废水的关键。本文报道一株本实验室从象山港浅海网箱养殖区富营养沉积环境中筛选到的中度耐盐异养硝化-好氧反硝化菌,从生理生化和分子生物学的角度分析了该菌株的系统发育地位,研究了其脱氮特性,以期丰富生物脱氮的理论及为海水养殖系统净化菌剂的开发和应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 实验用菌株 X3 分离自从象山港网箱鱼类养殖区富营养沉积环境富集、筛选到的一组可以高效降解有机物、氨氮和亚硝酸氮等的原生态复合净化菌群^[12],由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司,除特殊说明,均为分析纯;DNA 提取试剂盒、PCR 试剂购自北京博迈德科技发展有限公司,克隆用试剂购自宝生物工程(上海)有限公司,细菌通用引物由生工生物工程(上海)有限公司合成;Zealway GI54D 立式自动高压灭菌器(致微仪器有限公司);台式恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司);LP1200S 型电子天平(赛多利斯,德国);7230G 可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);PHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂);SIGMA 3-48K 高速冷冻离心机(Sigma,德国);5331 型梯度 PCR 仪(Eppendorf,德国);MF-chemiBIS 3.2 化学发光型凝胶成像系统(DNR,以色列);AIRTECH HD-650-U 型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);700 超低温冰箱(Thermo Scientific,美国)。

1.1.3 培养基 培养基和降解测试液的配方参照李洪鹏^[12]等的,并有所改进。分离和生长培养基:

NH₄Cl 0.5 g, MgSO₄ 0.1 g, NaH₂PO₄ 0.2 g, K₂HPO₄ 0.5 g, CaCO₃ 1 g, FeSO₄ 0.1 g, 葡萄糖 1 g, KNO₃ 1 g, 酵母浸出膏 0.03 g, Fe₃PO₄ 0.1 g, 沉积物海水浸出液 1000 mL, pH 7.8。其中沉积物海水浸出液配制方法为取海水养殖区底泥 50 g,加 1 L 海水振荡混匀 20 min,再沉淀后,取上清液。菌落观察培养基采用 Zobell 氏 2216E 海水培养基,加入 2% 琼脂粉。

氨氮降解测试液的配方: 160.5 mg NH₄Cl, 0.5 g 葡萄糖, 沉积物海水浸出液 1000 mL, pH 8.5。其他降解测试液的配方参照氨氮降解测试液的配方,将 160.5 mg/L NH₄Cl 分别替换为 207 mg/L NaNO₂、255 mg/L NaNO₃、80.25 mg/L NH₄Cl + 103.5 mg/L NaNO₂、0.25 mg/L NH₄Cl + 127.5 mg/L NaNO₂ 和 53.5 mg/L NH₄Cl + 69 mg/L NaNO₂ + 85 mg/L NaNO₃,使不同无机氮之间的含量比为 1:1 或者 1:1:1,其余的条件均不变。

1.2 形态和生理生化实验

菌株的形态和生理生化试验根据《常见细菌系统鉴定手册》^[13]和《伯杰细菌鉴定手册》^[14]进行。

1.3 生长条件实验

菌株 X3 的生长条件实验选择的因子包括温度、盐度、pH 和 C:N 项,所用培养基以分离培养基为基础。实验设计如下:

(1) 温度:在盐度 3%、C:N 比 10:1、pH 8.5、转速 60 r/min 的条件下,按 2% 接种量,将菌株 X3 接种于盛有 400 mL 培养基的锥形瓶中,分别置于 4℃、8℃、16℃、24℃、28℃、37℃ 和 41℃ 的培养箱中培养。

(2) 盐度:调节培养基 NaCl 的浓度分别为 0、5、20、30、50、80、130、150、170 g/L,按 2% 接种量,接种于盛有 400 mL 培养基的锥形瓶中,在 C:N 比 10:1、pH 8.5、转速 60 r/min 的条件下,25℃ 培养。

(3) pH:调节培养基的 pH 值分别为 5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5,其余条件为盐度 3%、C:N 比 10:1、转速 60 r/min、接种量 2%、25℃ 培养。

(4) C:N 值:向 400 mL 培养基中,加入葡萄糖,使其 C:N 比分别为 0.1:1、1:1、5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1,其余条件为盐度 3%、转速 60 r/min、接种量 2%、25℃ 培养。

培养前和 3 d 后,分别测量菌液在 600 nm 下的吸光值(*OD*₆₀₀),与各培养基的初始 *OD*₆₀₀ 比较,3 d 后提高 1 倍以上,认为可生长。

1.4 16S rRNA 基因的克隆测序及系统发育分析

1.4.1 基因的克隆 用离心柱型 DNA 提取试剂盒提取 DNA,用细菌通用引物扩增 16S rRNA 基因。正向引物 8F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3';反向引物 1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系^[15] (50 μ L):10 \times buffer (含 Mg^{2+}) 5 μ L, dNTPs 4 μ L,正向和反向引物各 1 μ L,模板 1 μ L, *Taq* 聚合酶 1 μ L,重蒸水 37 μ L。PCR 程序如下:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经克隆后送生工生物工程(上海)有限公司完成测序。

1.4.2 系统发育分析 将测序结果发送到网站 http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/ezt_identify^[16],与其库中已提交的模式菌株的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较,通过软件 MEGA 3.1 中的 Clustal X 程序进行多重序列比对分析,并以 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.5 异养硝化、好氧反硝化性能实验

在含有 0.5 g/L 葡萄糖、保持氮添加量为 42 mg/L 的条件下,分别配制含氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮、氨氮 + 亚硝酸氮、氨氮 + 硝酸氮、氨氮 + 亚硝酸氮 + 硝酸氮的降解测试液,每种做两个平行实验。从对数生长期菌液中移取 200 mL 的菌液,3300 \times g 离心 10 min,弃上清液,将沉淀用等体积的灭菌生理盐水重悬,分别取 8 mL,加入 400 mL 降解测试液中,置于恒温气浴振荡器(转速 100 r/min)中,28 $^{\circ}$ C 培养,每隔 6 h 取样,分别测定测试液中 $NH_4 - N^+$ 、 $NO_2 - N^-$ 和 $NO_3 - N^-$ 值,并计算氨氮、亚硝酸氮、硝酸氮和总无机氮(TIN, total inorganic nitrogen)去除率。每次同时测定各测试液的 OD_{600} 值。

1.6 无机氮及 pH 分析方法

参照《海洋监测规范》(GB17378.4-2007),氨氮的测定采用次溴酸盐氧化法;亚硝酸氮的测定采用盐酸萘乙二胺分光光度法;硝酸氮的测定采用钼-隔还原法。菌体生长量采用吸光度法,用可见分光光度计于 600 nm 处测量吸光度值(OD_{600});pH 值用 pH 计测定。

2 结果

2.1 形态特征和生理生化特性

经扫描电镜观察,菌株 X3 呈短杆状、无鞭毛、

无芽胞(图 1)。在 2216E 培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后,菌落大小约为 1 mm - 1.5 mm,边缘整齐,表面光滑、湿润,略隆起,比较透明、粘稠,培养 6 - 7 d 后成白色实心菌落,继续培养几天菌落会发黄变乌。

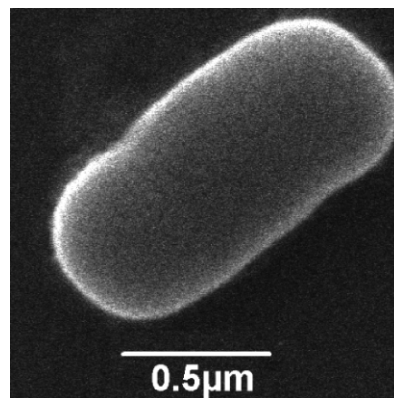


图 1 菌株 X3 的扫描电镜照片(40000 \times)

Fig. 1 Photograph of strain X3 under Scan Electronic Microscope(40000 \times).

菌株 X3 生理生化鉴定结果:兼性厌氧;硝酸盐还原、亚硝酸盐还原、过氧化氢酶、明胶酶、淀粉酶、甲基红实验阳性;吲哚实验、V-P、柠檬酸盐、脂酶实验、产 H_2S 实验阴性;可以在含有蔗糖、葡萄糖、甘露醇、乳糖、半乳糖、麦芽糖培养基上生长并产酸(表 1)。

2.2 生长条件测试结果

经测试发现,菌株 X3 可生长的温度范围为 8 $^{\circ}$ C - 37 $^{\circ}$ C,最适为 28 $^{\circ}$ C;pH 范围为 6.5 - 9.5,最适为 8.5;C:N 比范围为 1:1 - 30:1,最适为 10:1;盐度范围为 0.5% - 15%,最适为 3%(表 2)。

2.3 16S rRNA 基因的序列和系统发育分析

通过克隆、测序,获得的菌株 X3 的 16S rRNA 基因序列(1400 bp)已提交到 GenBank 网站(基因库登录号为 JN580997),通过在 EzTaxon public 数据库中比对,发现 X3 与 *Halomonas* sp. 的多株模式菌株的 16S rRNA 基因的相似性达 99% 以上,与 *Halomonas titanicae* strain BH1、*Halomonas neptunia* strain Eplume1、*Halomonas alkaliantarctica* strain CRSS 的相似性分别为 99.6%、99.1%、99.1%,结合菌株的形态学和生理学特性,可确定菌株 X3 属于 γ 变形菌(γ -Proteobacteria)盐单胞菌属(*Halomonas*)。通过检索和 X3 亲缘性相近的其他模式菌株,利用 MEGA3.1 等软件,以 Neighbor-joining 法绘制 16S rRNA 系统发育树(图 2)。

表 1 菌株 X3 的生理生化特征

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of strain X3

Characteristic	X3	BH1	GYL	Eplume1	CRSS
Growth properties					
Temperature: °C					
Range	4 – 44	4 – 42	ND	– 1 to 35	10 – 37
Optimum	28	30 – 37	25 to 30	30	30
Tolerance to NaCl concentrations: (%)					
Range	0.5 – 15	0.2 – 25	ND	0.5 – 27	2.2 – 22.2
Optimum	2 – 3	2 – 8	2 – 7	2 – 3	10
pH range					
Range	5.5 – 10	5.5 – 9.5	ND	5 – 12	7.4 – 9.6
Optimum	8.5	ND	7.5 – 8.5	ND	9.0
Other phenotypic characteristics					
Gram stain	–	–	–	ND	–
Aerobics	Facultative	+	+	Facultative	+
Motility	–	+	–	ND	ND
color	Cream	ND	ND	Cream	ND
Acid-producing by glucose	+	ND	+	+	ND
Aerobic nitrate reduction	+	ND	+	+	+
Aerobic nitrite reduction	+	ND	ND	–	–
H ₂ S-producing	–	ND	ND	–	ND
MR test	+	ND	+	ND	ND
VP test	–	ND	–	ND	ND
Indole test	–	ND	+	ND	+
Acid oxidation	+	ND	+	ND	+
Enzymes:					
Amylase	+	ND	–	–	–
Lipase	–	ND	+	ND	ND
Citric acid lyase	–	ND	–	ND	ND
Catalase	+	ND	–	ND	ND
Gelatinase	+	ND	ND	ND	+
Casease	–	ND	ND	–	–
Growth on:					
Sucrose	+	ND	+	+	+
Mannitol	+	ND	+	+	ND
lactose	+	ND	+	+	+
galactose	+	ND	+	+	ND
maltose	+	+	+	+	+

ND: not determined; +: positive; -: negative; X3: Data of strain X3; BH1: Data of *Halomonas titanicae* strain BH1 (FN433898)^[17]; GYL: Data of *Halomonas* sp. GYL^[9]; Eplume1: Data of *Halomonas neptunia* strain Eplume1^[18]; CRSS: Data of *Halomonas alkaliantarctica* strain CRSS^[19]. Except the data of X3 is from this study, the others are all from the references.

表 2 三天后不同生长条件下菌株 X3 菌体浓度测试结果

Table 2 The concentration (OD_{600}) of strain X3 under different growing conditions after 3 days

T/°C	OD_{600}	pH	OD_{600}	C: N	OD_{600}	S/%	OD_{600}
4	0.038 ± 0.012	5.5	0.028 ± 0.011	0.1:1	0.014 ± 0.027	0	0.021 ± 0.010
8	0.064 ± 0.021	6.5	0.194 ± 0.023	1:1	0.084 ± 0.011	0.5	0.048 ± 0.012
16	0.083 ± 0.009	7.5	0.268 ± 0.014	5:1	0.154 ± 0.012	2	0.228 ± 0.013
24	0.125 ± 0.013	8.5	0.283 ± 0.017	10:1	0.234 ± 0.021	3	0.264 ± 0.014
28	0.208 ± 0.015	9.5	0.278 ± 0.025	15:1	0.205 ± 0.019	5	0.234 ± 0.015
37	0.193 ± 0.017	10.5	0.023 ± 0.020	20:1	0.158 ± 0.013	8	0.205 ± 0.028
41	0.026 ± 0.012			25:1	0.043 ± 0.020	13	0.158 ± 0.012
				30:1	0.042 ± 0.023	15	0.043 ± 0.018
				35:1	0.022 ± 0.015	17	0.022 ± 0.024

“T” represents the temperature; “S” represents the salinity.

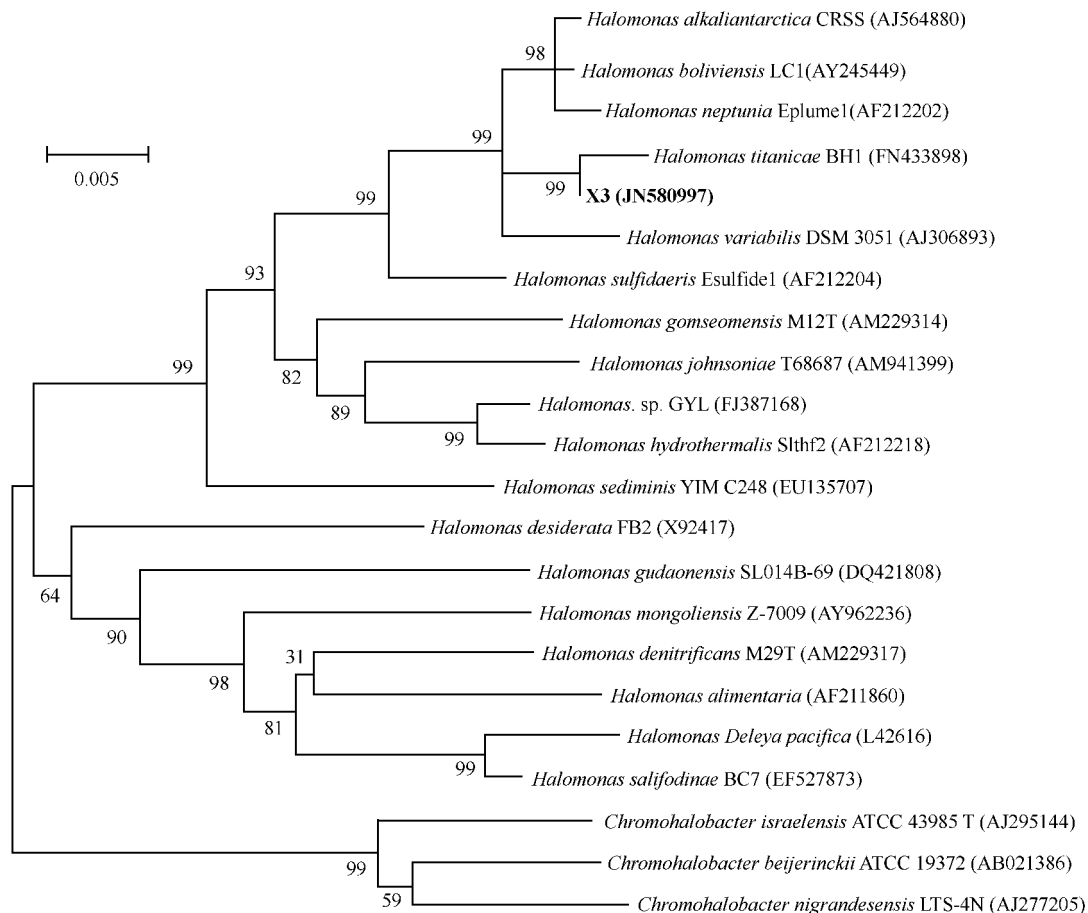


图 2 基于 16S rRNA 基因序列同源性构建的菌株 X3 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain X3 based on the complete sequences of 16S rRNA gene. Numbers in bracket are the sequences accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on neighbor-joining analysis. Bars represent 0.5% sequence divergence.

2.4 异养硝化与好氧反硝化性能

2.4.1 菌株 X3 的异养硝化能力:如图 3 所示,在氨氮含量为 42 mg/L 的测试液中,6 h、12 h、18 h、24

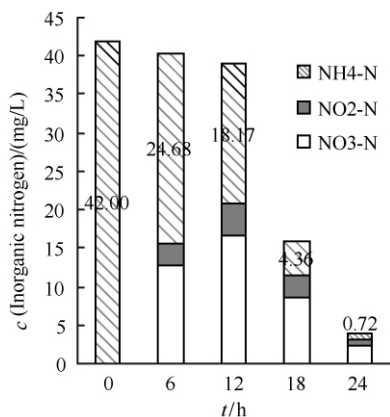


图 3 菌株 X3 去除氨氮能力测试结果

Fig. 3 The result of nitrification ability test of strain X3.

h 时氨氮去除率分别为 41.24%、56.74%、89.62%、98.29% ,在前期有亚硝酸氮和硝酸氮生成,但 30h 时已经检测不到氨氮、硝酸氮和亚硝酸氮。由此可以看出异养硝化在 24 h 内已基本完成,其中前 12 h 氨氮的去除速度高于后 12 h,而总无机氮的去除主要发生在 12 - 24 h。

2.4.2 菌株 X3 的反硝化能力:菌株在含亚硝酸氮或硝酸氮的测试液中,6h、12h、18h、24h 时,亚硝酸氮去除率分别为 41.98%、61.81%、91.05%、99.07% (图 4-A),硝酸氮去除率分别为 23.52%、29.05%、70.67%、96.48% (图 4-B),可见菌株 X3 对亚硝酸氮的去除率高于硝酸氮。由于亚硝酸氮是 3 种形态中最不稳定的形态,其中一部分可能会自动转化成氨氮或硝酸氮,所以在降解初期,测试液中出现了少量的氨氮。由图 4 还可以看出,反硝化反应主要发生在 12 - 24 h,同样在 30 h 也检测不到硝

酸氮和亚硝酸氮的存在。

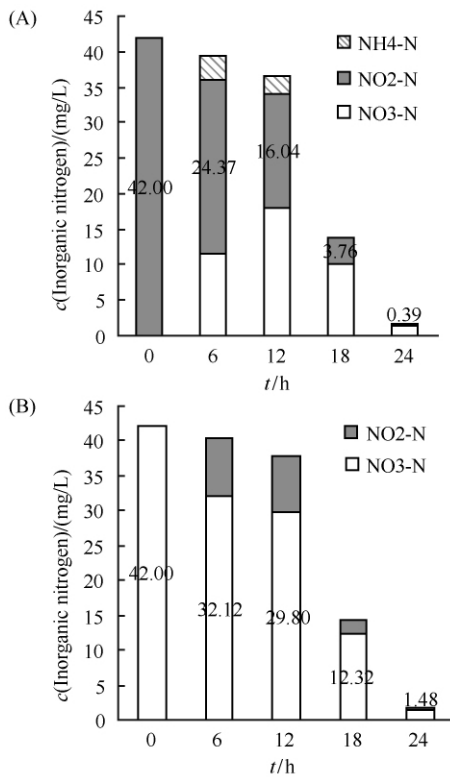


图4 菌株的反硝化能力测试结果

Fig. 4 The result of denitrification ability test of strain X3 in different test solutions. A: NO_2^- -N test solutions, B: NO_3^- -N test solutions.

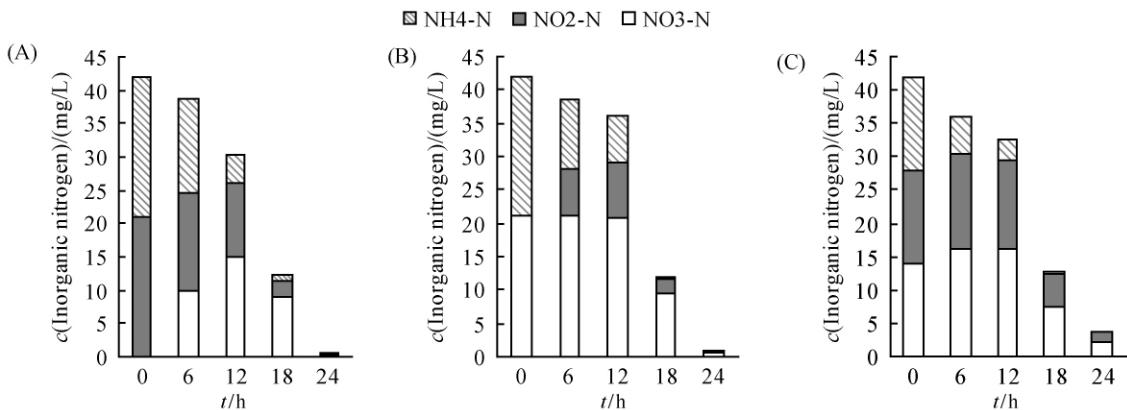


图5 在不同测试液中3种无机氮含量随时间的变化

Fig. 5 Change of the concentrations of inorganic nitrogen with time in different test solutions. A: NH_4^+ -N + NO_2^- -N test solutions, B: NH_4^+ -N + NO_3^- -N test solutions, C: NH_4^+ -N + NO_2^- -N + NO_3^- -N test solutions.

3 讨论

3.1 菌株的分类地位

迄今已报道的异养硝化和好氧反硝化细菌种类

2.4.3 菌株 X3 同时进行异养硝化与反硝化的能力:如图 5 所示,在同时含有氨氮和亚硝酸氮或硝酸氮的测试液中,3 种氮在 24 h 内均几乎被消除,其中氨氮含量在前 12 h 就出现明显下降,而亚硝酸氮和硝酸氮含量则在后 12 h 才明显下降,总无机氮含量明显下降也出现在 12-24 h,这说明该菌株可能先启动硝化反应,后启动反硝化反应。

从菌株 X3 总的脱氮效果看,氨氮 + 亚硝酸氮组的总氮去除率一直高于其他组,氨氮 + 硝酸氮组次之,而且在前 18 h 组合测试液的脱氮效率高于单一氮源测试液(图 6)。

2.4.4 菌株在脱氮测试液中的生长情况:如图 7 所示,在前 6 h,组合测试液和单一测试液中的菌体浓度差异不大,而在 12-30 h 组合测试液中菌体浓度始终高于单一测试液组,尤其是在 24-30 h 这一阶段。但是,18-24 h 阶段最后一组测试液的菌体浓度最高,而脱氮效率却最低,由此可见菌株在异养硝化和反硝化过程或者两种反应同时发生时,菌株的生长和总无机氮的去除在时间上并不是完全同步的,结合前述脱氮过程,可以认为该菌在前期主要进行氮代谢,后期进行菌体物质积累,有利于氮代谢的组合并不一定利于菌体的生长。

繁多、分布门类广泛,在变形菌门的 α 、 β 、 γ 变形菌纲、厚壁菌门的芽胞杆菌纲、广古菌门的盐杆菌纲、放线菌门的放线菌纲等均有发现,约有 50 多个属的细菌具有反硝化性能,8 个属的细菌具有异养硝化功能^[20-21]。本文报道的菌株 X3 属于变形菌门、 γ

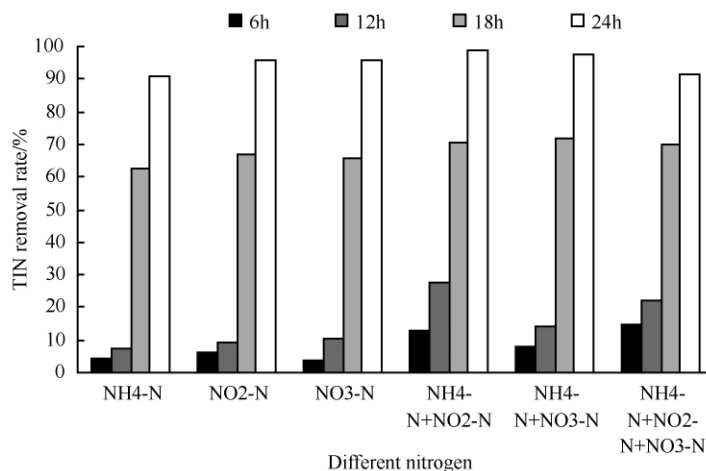


图6 菌株在硝化、反硝化和组合测试液中的脱氮能力比较

Fig. 6 The comparison of total inorganic nitrogen (TIN) removal abilities in nitrification, denitrification and combined test solutions.

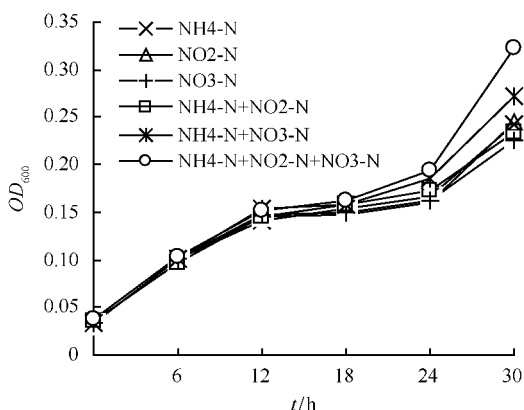


图7 菌株 X3 在硝化、反硝化及组合测试液中的生长情况

Fig. 7 The concentration of strain X3 in nitrification, denitrification and combined test solution.

变形菌纲、海洋螺菌目、盐单胞菌科的盐单胞菌属。该菌株与张培玉报道的菌株 GYL^[9] 菌体和菌落形态都十分相似,但该菌株属于兼性厌氧,可以利用乳糖、半乳糖产酸,而 GYL 属于严格好氧,并且不能利用乳糖半乳糖产酸;另外, X3 和 GYL 的 16S rRNA 基因序列相似性为 96% 在系统发育树中处于不同的分支,可以判定二者为同属不同种;菌株 X3 虽与盐单胞菌属的多株菌 *Halomonas titanicae* strain BH1、*Halomonas neptunia* strain Eplume1、*Halomonas alkaliantarctica* strain CRSS 相似性超过 99%,但在生长温度、盐度和 pH 范围方面都存在差异。Pilar Junier^[22] 曾经提到过不同种氨氧化细菌的 16S rRNA 的同源性很高,有时甚至超过 99%,所以,我们目前判定菌株 X3 属于 γ 变形菌纲 (γ -

Proteobacteria) 盐单胞菌属 (*Halomonas*),至于是否是一个尚未定名的新种,下一步将通过更多的生理生化及 DNA 杂交等实验来进行判定。

3.2 该菌株发现的意义

随着研究的不断深入,研究者发现许多异养硝化菌不但能完成氨氮的硝化反应,而且能够在无氧或有氧条件下完成反硝化反应,说明这些菌既具有硝化能力也具有反硝化能力。目前已经发现的细菌主要有盐单胞菌属 (*Halomonas*)^[9] 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的某些种及蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*)^[6]、粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*)、泛养副球菌 (*Paracoccus pantotrophus*) 和泛养硫球形菌 (*Thiosphaera pantotropha*)^[21] 等,从这些细菌中寻找生长迅速、脱氮效率高的菌株,进行深入研究,将会为废水的生物脱氮和生态净化菌剂研发带来更广阔的前景。本研究中发现的菌株 X3,在有机物存在的条件下生长快、脱氮性能好、环境适应性强,尤其是具有耐高盐、能在有氧条件下将无机氮从水体环境中完全清除的优点,这对海水养殖废水等高盐、高氮、高有机物废水的净化更具有重大意义,因此,该菌具有巨大的开发和应用价值。

3.3 异养硝化和好氧反硝化特性及机理探讨

我们通过实验发现,在氨氮降解测试液中加入硝酸盐或者亚硝酸盐后,菌株 X3 的脱氮能力有了显著提高,12h 时总氮去除率即提高 20% 左右,王欢^[8] 等人研究的戴尔福特菌中也发现了这一现象,说明该菌株的异养硝化和反硝化之间是相互促进

的,当硝化反硝化同时进行时,比单一的硝化或者反硝化过程中的脱氮效率和菌体生长速度都有所提高。对这种现象目前主要有两种解释,一种是由于硝酸氮作为一种代谢诱导物通过诱导硝酸盐还原酶而推动异养硝化反应的进行^[8,23];另外一种解释是,氨氮直接和亚硝酸盐或硝酸盐发生反应,生成了 N_2 等气态物质^[4]。生物脱氮的酶系统及其调控因子相当复杂,尤其是这类同时具有硝化反硝化双重功能的菌,它们也许有与自养硝化细菌和厌氧反硝化细菌完全不同的脱氮机制。我们选取了部分已发表的相关引物,通过PCR技术同时扩增到了氨单加氧酶、硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶的功能基因 $amoA$ 、 $nirK$ 、 $narG$ 的部分片段,可初步解释为什么该菌具有同时进行硝化和反硝化反应的能力,目前正在对扩增片段进行测序和比较等,作进一步的证实,并将通过一系列分子生物学手段,搞清楚该菌株行使其脱氮功能的基因及其表达调控机制,从而为揭示该类菌的脱氮机理提供依据。

参考文献

- [1] 何霞,赵彬,吕剑,何义亮,靳强,张文英. 异养硝化细菌 *Bacillus* sp. LY 脱氮性能研究. *环境科学 (Environmental science)*, 2007, 28(6): 1404-1408.
- [2] 李卫芬,傅罗琴,邓斌,陈南南,周绪霞. 1株好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究. *环境科学 (Environmental science)*, 2011, 32(8): 2403-2408.
- [3] Wei HJ, Zhang YX, Zhang C. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Environmental Science*, 2009, 30(8): 2342-2346.
- [4] Chen HH, Liu ST, Yang FL, Xue Y, Wang T. The development of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal. *Bioresource Technology*, 2009, 100(4): 1548-1554.
- [5] Joo SH, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2005, 100(2): 184-191.
- [6] 刘健楠,汪苹,尹明锐,王磊. 高效异养硝化-好氧反硝化菌株的分离鉴定与脱氮性能. *北京工商大学学报 (Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition))*, 2008, 28(2): 18-23.
- [7] 蒋静艳,胡正华,黄耀. 异养硝化/好氧反硝化菌的分离鉴定及其在不同培养条件下产 N_2O 研究. *环境科学 (Environmental science)*, 2009, 30(7): 2105-2111.
- [8] 王欢,汪萍,张海波. 一株戴尔福特菌的异养硝化与好氧反硝化性能研究. *北京工商大学学报 (Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition))*, 2008, 26(2): 1-5.
- [9] 张培玉,郭艳丽,于德爽,成广勇. 一株轻度嗜盐反硝化细菌的分离鉴定和反硝化特性初探. *微生物学报 (Microbiology)*, 2009, 36(4): 581-586.
- [10] 王志敏,张文香. 在循环养殖系统中添加微生态制剂去除氨氮和亚硝酸氮的试验. *水产科学 (Fisheries Science)*, 2006, 4: 28-31.
- [11] Shapovalova AA, Khijniak TV, Tourova TP, Muyzer G, Sorokin DY. Heterotrophic denitrification at extremely high salt and pH by haloalkaliphilic GammaProteobacteria from hypersaline soda lakes. *Extremophiles*, 2008, 12(5): 619-625.
- [12] 李洪鹏,李秋芬,张艳,李筠. 浅海养殖环境复合生态净化菌群的筛选及其净化功能研究. *渔业科学进展 (Progress in Fishery Sciences)*, 2009, 30(2): 46-53.
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 78-159.
- [14] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中科院微生物研究所《细菌鉴定手册》翻译组译. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984: 353-357.
- [15] Damiani G, Amedeo P, Bandi C, Fani R, Bellizzi D, Sgaramella V. Bacteria identification by PCR-based techniques. *Microbial Genome Methods*, 1996, 10: 167-177.
- [16] Chun J, Lee JH., Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2007, 57(10): 2259-2261.
- [17] Sanchez-Porro C, Kaur B, Mann H, Ventosa A. *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(12): 2768-2774.
- [18] Kaye JZ, Márquez MC, Ventosa A, Baross JA. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, 54(2): 499-511.

- [19] Poli A , Esposito E , Orlando P , Lama L , Giordano A , de Appolonia F , Nicolaus B , Gambacorta A. *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov. , isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica , an alkalophilic moderately halophilic , exopolysaccharide-producing bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*. 2007 , 30 (1) :31-38.
- [20] 郭艳丽. 三株轻度嗜盐反硝化菌的分离鉴定和降解特性初探. 青岛大学的硕士学位论文, 2009.
- [21] 赵诣. 三株异养硝化菌的分离、特征及其对水产养殖废水脱氮作用研究. 浙江大学的硕士学位论文, 2010.
- [22] Pilar J , Verónica M , Cristina D , Ora H , Ok-Sun K , Thomas J , Karl-Paul W , Johannes F. Imhoff. . Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2010 , 85 :425-440.
- [23] Muller EB , Stouthamer AH , van Verseveld HW. Simultaneous NH_3 oxidation and N_2 production at reduced O_2 tensions by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium. *Biodegradation* , 1995 , 6 : 339-349.

Phylogenetic analysis and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria strain from marine environment

Xuemei Sun , Qiufen Li* , Yan Zhang , Huaide Liu , Jun Zhao , Keming Qu

Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources , Ministry of Agriculture ; Yellow Sea Fisheries Research Institute , CAFS , Qingdao 266071 , China

Abstract: [**Objective**] We determined the phylogenetic position of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium X3 , and detected its nitrogen removal characteristics for providing evidence to explain the principle of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and to improve the process in purification of marine-culture wastewater. [**Methods**] The evolutionary position of the strain was determined based on its morphological , physiological , biochemical characteristics and 16SrRNA gene sequence. The nitrification-denitrification ability of this strain was detected by detecting its nitrogen removal efficiency and growth on different inorganic nitrogen source. [**Results**] Strain X3 was identified as *Halomonas* sp. It grew optimally at salinity 3% , pH 8.5 , C:N 10:1 at 28°C , and it could still survive at 15% salinity. The removal of $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and $\text{NO}_3^- \text{-N}$ was 98.29% , 99.07% , 96.48% respectively within 24 h. When three inorganic nitrogen existed simultaneously , it always utilized ammonia firstly , and the total inorganic nitrogen removal was higher than with only one nitrogen , suggesting that strain X3 has the ability of simultaneous nitrification and denitrification and completing the whole nitrogen removing process. [**Conclusion**] Strain X3 belonged to the genus of *Halomonas*. It had strong simultaneous nitrification and denitrification capability and could live in high-salinity environment.

Keywords: *Halomonas* sp. , heterotrophic nitrification , aerobic denitrification , biological nitrogen removal.

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Marine Public Welfare Research Project (200805069) and by the National Nature Science Fund (31170113)

* Corresponding author. Tel: + 86-532-85836341-8009 ; E-mail: liqf@ysfri.ac.cn

Received: 30 November 2011 / Revised: 12 March 2012