

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(9):1164-1171; 4 September 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 一株海洋好氧反硝化细菌的鉴定及其好氧反硝化特性

高喜燕<sup>1</sup>, 刘鹰<sup>2</sup>, 郑海燕<sup>1</sup>, 刘缨<sup>1</sup>, 刘志培<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(<sup>2</sup> 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**摘要:**【目的】从处理海洋养殖循环水的生物滤器生物膜中分离到 1 株具有好氧反硝化活性的细菌(菌株 2-8),并进一步研究了该菌的分类地位及反硝化特性。【方法】采用 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行初步鉴定,采用好氧培养技术,探讨了碳源种类、起始 pH、NaCl 浓度、C/N、温度和摇床转速对菌株 2-8 好氧反硝化活性的影响。【结果】该菌株的 16S rRNA 基因序列与 *Pseudomonas segetis* FR1439<sup>T</sup> (AY770691) 的相似性最高,达到 99.9%,因此初步鉴定菌株 2-8 属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp. 2-8)。碳源类型和 C/N 对其好氧反硝化作用的影响最为显著,以柠檬酸钠为唯一碳源,C/N 为 15 时脱氮效率最高,低 C/N 导致亚硝酸盐的积累;其好氧反硝化的最适温度和 pH 分别为 30℃ 和 7.5;菌株 2-8 在摇床转速为 160 r/min 下脱氮效果最好;NaCl 浓度对其反硝化活性的影响不明显。【结论】在初始硝酸氮浓度为 140 mg/L,以柠檬酸钠为唯一碳源、C/N 为 15、pH 为 7.5、NaCl 浓度为 30 g/L,30℃ 以及 160 r/min 摇床培养的条件下,菌株 2-8 在 48h 内脱氮率可达 92% 且无亚硝酸盐积累。

**关键词:** 海洋环境;氮素去除;生物脱氮;好氧反硝化菌

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 09-1164-08

随着水体富营养化的日益严重,生物脱氮去除水中氮素污染已经成为当今水污染防治领域的一个热点问题。传统生物脱氮包括硝化和反硝化两个过程。已知有 50 属以上的微生物能够进行反硝化作用<sup>[1]</sup>,其中绝大多数是细菌。传统上认为反硝化作用只有在厌氧或缺氧条件下发生<sup>[2]</sup>,在此过程中,硝酸盐依次被还原为亚硝酸、NO、N<sub>2</sub>O 和氮气。先前的一些研究也认为反硝化的酶系统会被氧气所抑制<sup>[3]</sup>。然而,最新的研究表明,一些微生物在较高的氧分压条件下也能表现出反硝化能力<sup>[4-8]</sup>,即好氧反硝化作用,这一类微生物称为好氧反硝化菌(aerobic denitrifier)。好氧反硝化菌的发现对于生物圈的氮素循环研究具有重要意义,更重要的是为

生物脱氮提供了一条全新的途径,既可以在一个反应器中同时实现硝化和反硝化作用,不仅简化了脱氮处理工艺还可以节省投资。另外,这种新型处理工艺具有在硝化过程中无需加碱中和、对氨态氮的耐受力强、脱氮处理效率高等优点,表现出传统的废水脱氮处理方法所不及的优越性<sup>[9-11]</sup>,这些都为好氧反硝化细菌的工程应用奠定了坚实基础。目前已报道相当数量的好氧反硝化细菌,如 *Thiosphaera pantotropha*<sup>[4,12]</sup>、*Pseudomonas stutzeri*<sup>[13]</sup>、*Alcaligenes faecalis*<sup>[14]</sup>、*P. nautical*<sup>[15]</sup>、*Thaurea mechernichensis*<sup>[16]</sup> 和 *Microvirgula aerodenitrificans*<sup>[17]</sup> 等均被证明具有好氧反硝化能力,并探讨了这些菌株好氧反硝化的特性。研究表明,影响好氧反硝化作用的主要因素有碳源、

基金项目:国家“863 计划”(2006AA100305)

\* 通信作者。E-mail: liuzhp@sun.im.ac.cn

作者简介:高喜燕(1985-),女,山东聊城人,硕士研究生,主要从事环境微生物以及循环海水养殖水处理方面研究。E-mail: gaoxiyan88@126.com

收稿日期:2010-04-10;修回日期:2010-05-17

DO 和 C/N。迄今为止,好氧反硝化菌都是分离自淡水或土壤环境,尚未见分离自海洋环境的好氧反硝化细菌的报道。

本研究从处理海水养殖循环水的生物滤器中的生物膜上分离得到一株具有高效脱氮性能的好氧反硝化菌株 2-8,对其进行了初步鉴定,并探讨了该菌株的好氧反硝化特性与影响因素,以期为该菌株在新型脱氮处理工艺中的应用奠定基础,同时也为好氧反硝化机理研究以及海洋环境的氮素循环理论研究提供了良好材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源:**实验菌株分离自处理海洋养殖循环水的生物滤器的生物膜中,在好氧条件下具有良好的反硝化效果,编号为 2-8。该菌株在中国普通微生物菌种保藏管理中心的保藏号为 CGMCC 1.10249。

**1.1.2 培养基:**(1)反硝化培养基<sup>[12]</sup> DM (g/L): KNO<sub>3</sub> 1.01; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2; CaCl<sub>2</sub> 0.01; EDTA (0.5 mol/L) 0.5 mL; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0; FeSO<sub>4</sub> 0.01; 微量元素 5 mL。pH, 碳源, 根据实验要求添加。(2)微量元素溶液 (g/L): EDTA 50.0; ZnSO<sub>4</sub> 2.2; CaCl<sub>2</sub> 5.5; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 5.06; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 5.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 1.1; CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1.57; CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.61; pH = 7.0。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**对氨基苯磺酰胺溶液 (10 g/L); 盐酸奈乙二胺 (1 g/L) 氨基磺酸铵溶液 (20 g/L); 麝香草酚乙醇溶液 (5 g/L); 硫酸银硫酸溶液 (10 g/L); Taq 酶; 普通 PCR 仪 (Biometra, 德国); 7200 可见分光光度计 (UNICO, 上海); UV-2802H 紫外分光光度计 (UNICO, 上海); 凝胶成像系统 (BINTA 2020D); pH 计 (Sartorius, 德国); 台式摇床 (DHZ-031, 上海申能博彩)。

### 1.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增、序列测定与分析

以菌株 2-8 基因组 DNA 为模板、采用细菌通用引物 27F 和 1492R<sup>[18]</sup> 扩增 16S rRNA 基因。引物序列为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GATACC TTGTTACGACTT-3'。PCR 产物的序列测定由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

PCR 反应体系 (50 μL): 10 × PCR 缓冲液 5 μL, dNTP Mixture (10mM each) 1 μL, 引物 27F 和引物

1492R 各 1 μL, 模板 DNA 2 μL, Taq 酶 (2.5 U/μL) 0.5 μL, 重蒸水补至 50 μL。PCR 程序如下: (1) 95℃ 2 min; (2) 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min; (3) 第 2 步循环 30 次; (4) 72℃ 10 min。 (5) 4℃ 保存。

将菌株 2-8 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行序列同源性比较, 通过 CLUSTAL X、BIOEDIT 和 MEGA 等软件进行多重序列比对分析, 并以 Neighbor-Joining 法<sup>[18]</sup> 构建系统发育树, 分支聚类的稳定性用 Bootstrap 方法进行评价。

### 1.3 分析方法

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 测定采用萘乙二胺分光光度法<sup>[19]</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 测定采用麝香草酚分光光度法<sup>[20]</sup>; 菌体生长的测定采用浊度法 (OD<sub>600</sub>)。菌体总氮测定采用硫酸钾氧化—紫外分光光度法<sup>[21]</sup>。

脱氮率 = [c(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)<sub>i</sub> - c(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)<sub>f</sub> - c(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)<sub>f</sub>] / c(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)<sub>i</sub>, 其中, c(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)<sub>i</sub> 为体系初始 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度, c(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)<sub>f</sub> 为培养后的体系 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度, c(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)<sub>f</sub> 为培养后的体系 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 浓度。

### 1.4 菌株 2-8 好氧反硝化影响因素分析

好氧条件下, 对菌株 2-8 进行纯培养, 研究了在不同碳源、起始 pH、NaCl 浓度、C/N、温度、摇床转速条件下的好氧反硝化活性。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌株 2-8 的 16S rRNA 基因序列测定与分析

通过 PCR 扩增、序列测定得到菌株 2-8 的 16S rRNA 基因序列, 该序列在 GenBank 登录号为 HM155111。在 GenBank 中通过 Blastn 比较, 发现其与多株假单胞菌的序列相似性都在 99% 以上, 其中相似性最高的为 *Pseudomonas segetis* FR1439<sup>T</sup> (AY7706911), 达到 99.9%。系统发育分析 (图未给出) 表明, 菌株 2-8 与 *P. segetis* 类聚在一起, 并具有 99% 的支持率。因此, 初步鉴定菌株 2-8 属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp. 2-8)。迄今为止, 尚未见该种微生物具有好氧反硝化作用的报道。

### 2.2 碳源对菌株 2-8 生长及好氧反硝化的影响

分别以酒石酸钾钠 (7.05 g/L)、乙酸钠 (4.1 g/L)、丁二酸钠 (6.75 g/L)、柠檬酸钠 (4.9 g/L)、葡萄糖 (3.3 g/L)、蔗糖 (2.85 g/L)、麦芽糖 (2.85 g/L)、甲醇 (3.2 g/L) 为唯一碳源, 在初始硝酸氮浓度为 140 mg/L、C/N = 10、pH 7.0、NaCl 为 30 g/L、30℃、160 r/min 摇床培养的条件下, 培养

3天,分别测定菌株2-8的生长、剩余硝酸-氮以及亚硝酸-氮。结果如表1所示。表1的结果表明,不同碳源导致菌株2-8生长情况和反硝化作用差异很大,合适的碳源可以提高硝酸盐及亚硝酸盐的去除率。该菌株几乎不能利用酒石酸钾钠、蔗糖、麦芽糖、甲醇,脱氮效果也很差;在以乙酸钠、丁二酸钠、柠檬酸钠为唯一碳源时能够生长但不是很好,而脱

氮率较高。在以葡萄糖为唯一碳源时,虽然生长很好( $OD_{600}$ 达到0.55左右),但是脱氮率相对较低。表1的结果还表明,在脱氮效率较高的几组实验中,也具有相当量的亚硝酸积累,明显区别于同化硝酸盐还原几乎不积累亚硝酸盐的情况。综合考虑菌株生长、脱氮率以及亚硝酸的积累,以柠檬酸钠为菌株2-8好氧反硝化的最佳碳源。

表1 碳源对菌株2-8生长及好氧脱氮的影响

Table 1 Effects of carbon source on the growth and aerobic denitrifying ability of strain 2-8

Carbon sources	Growth/( $OD_{600}$ )	$NO_3^-$ -N/(mg/L)	$NO_2^-$ -N/(mg/L)	Nitrogen removal efficiency/%
Sodium potassium tartrate	0.017 ± 0.004	137.84 ± 12.70	0.61 ± 0.03	1.10
Sodium acetate	0.15 ± 0.013	8.61 ± 1.81	36.93 ± 0.17	67.92
Sodium succinate	0.15 ± 0.007	6.78 ± 1.13	36.27 ± 2.55	71.00
Sodium citrate	0.29 ± 0.002	2.50 ± 0.83	34.59 ± 3.04	74.88
Glucose	0.55 ± 0.021	9.34 ± 1.83	38.63 ± 3.41	67.09
Sucrose	0.028 ± 0.006	138.30 ± 6.52	0.75 ± 0.07	0.68
Maltose	0.036 ± 0.01	137.66 ± 3.93	0.88 ± 0.06	1.04
Methanol	0.051 ± 0.004	135.56 ± 2.90	1.10 ± 0.15	2.38

碳源是好氧反硝化作用的重要影响因素<sup>[22-23]</sup>,一般认为,在影响好氧反硝化的多个因素中,最主要的因素之一就是有机碳。在反硝化作用中,反硝化细菌利用碳源作为电子供体,将硝酸盐逐步还原成氮气,同时达到去除有机物的效果。Her<sup>[24]</sup>等人的研究表明,所用碳源的结构和分子量明显影响反硝化的效率,通常结构越简单、分子量越小的碳源越有利于反硝化的进行,我们的结果也与之类似。另外,前人研究表明<sup>[25]</sup>,反硝化细菌在不同碳源下,不仅产生的能量不同,而且细胞的产率也大不相同,细胞产率与所采用的碳源的性质间的关系非常密切。因此通常建议在反硝化过程中使用低生长量(即细胞产率低)的有机物质作为碳源。

### 2.3 初始 pH 值对菌株 2-8 生长及好氧反硝化的影响

在初始硝酸氮浓度为 140 mg/L、柠檬酸钠为唯一碳源、C/N = 10、NaCl 浓度 30 g/L、调节培养基的初始 pH 值为 5 - 10(间隔 0.5 单位),接种后在 30℃、160 r/min 摇床培养 3 天,然后取样测定菌株生长、剩余硝酸-氮和亚硝酸-氮。图 1 的结果表明,在 pH 为 6.0 - 9.0 范围内,pH 对菌株 2-8 的生长和好氧反硝化作用影响不大,脱氮率均在 85% 以上,尤以 pH 7.5 时的脱氮率最高,达到了 90%;pH 低于 5.5 和高于 9.5 菌株 2-8 几乎不生长,脱氮率也很低。与此相似,许尚营等<sup>[26]</sup>研究发现,pH 为 7.0 时一株好氧反硝化沙门氏菌的好氧反硝化效率最高,其脱氮率达到 95%,但在酸性(pH < 5.5)和碱性(pH > 9)的条件下,基本丧失反硝化能力。

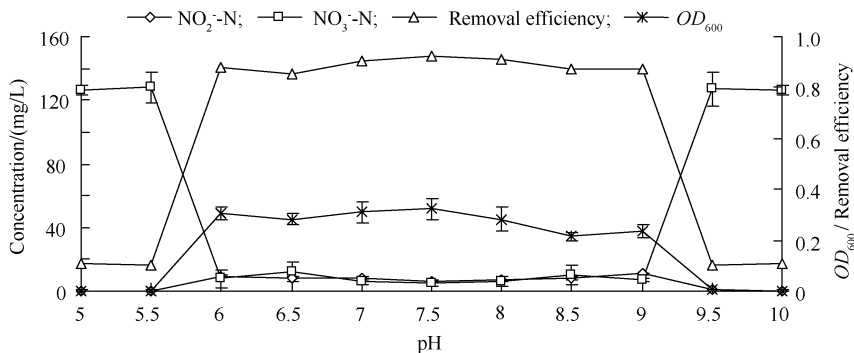


图1 pH 值对菌株 2-8 生长和好氧反硝化的影响

Fig. 1 Effect of pH on the growth and aerobic denitrification of strain 2-8.

## 2.4 NaCl 浓度对菌株好氧反硝化的影响

设定 NaCl 浓度分别为 0, 10, 20, 30 g/L, 在初始硝酸氮浓度为 140 mg/L、柠檬酸钠为唯一碳源、C/N = 10、pH = 7.5、30℃、摇床转速 160 r/min 的条件下, 培养 3 天, 测定菌株生长、剩余硝酸-氮和亚硝酸-氮。结果 (图 2) 表明, 4 条曲线比较平稳, 在 NaCl 浓度为 0 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L 时, 脱氮率没有显著差异, 分别为 71.56%、71.97%、

68.9%、72.30%; NaCl 浓度为 40 g/L 时, 菌株 2-8 长势稍差, 脱氮率下降到 58%, 50 g/L 及更高盐度时菌株不生长。由此可见, 2-8 虽然筛选分离自海水环境, 但 NaCl 浓度在 0-30 g/L 范围内对其好氧反硝化特性影响不大, 该菌株可利用盐度范围较广, 适用于不同盐度水平的自然水体的氮素去除, 应用前景广阔。

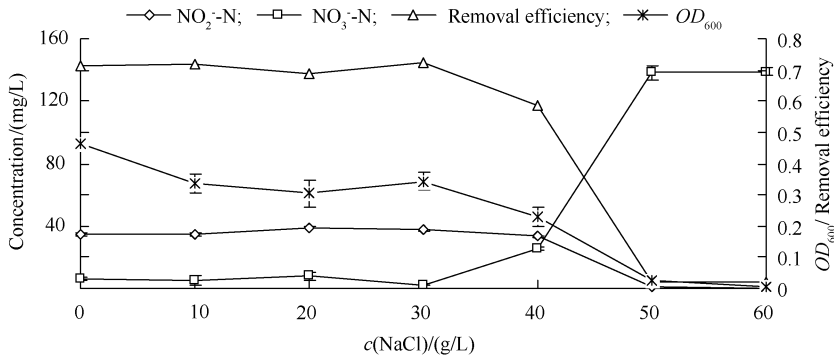


图 2 NaCl 浓度对菌株 2-8 的生长和好氧反硝化效果的影响

Fig. 2 Effect of NaCl concentration on the growth and aerobic denitrification of strain 2-8.

## 2.5 C/N 对好氧反硝化的影响

设定 C/N 分别为 2.5、5、10、15、20, 在初始硝酸氮浓度为 140 mg/L、柠檬酸钠为唯一碳源、pH = 7.5、NaCl 浓度 30 g/L、培养温度 30℃、摇床转速 160 r/min 的条件下, 培养 3 天, 测定菌株生长、剩余硝酸-氮和亚硝酸-氮。结果如图 3 所示。试验结果表明, 菌株 2-8 在不同 C/N 条件下反硝化能力相差较大, 碳源过低或不足 (C/N < 5), 菌株的脱氮率仅为 20% - 35%, C/N < 10, 亚硝酸盐积累比较严重; 菌株 2-8 进行好氧反硝化作用的最适 C/N 为 15, 此时的好氧反硝化脱氮率在 92% 以上, 同时没有亚硝酸盐的积累。反应体系最终亚硝酸氮浓度随着 C/N 的降低而升高, 这主要是因为碳源受限的

情况下, 菌株无法获得足够的还原力, 而使得反硝化不能完全所致。

C/N 是好氧反硝化过程能否进行彻底的关键影响因素。在实际污水处理中, 确定好氧脱氮的最佳 C/N (碳源浓度), 一方面既可以保证高效去除硝酸盐的同时没有亚硝酸盐的积累; 另一方面也可以避免造成不必要的浪费。另外, 根据 Chiu 等<sup>[27]</sup> 的研究, 对于特定的菌株, 选择不同碳源时相应的会存在不同的最佳 C/N, 这是因为其新陈代谢途径和面临的竞争在选用不同的碳源时都会存在不同。

在已有的关于 C/N 对好氧反硝化的影响研究中, 很多研究结果和本实验结果是一致的。吕锡武等<sup>[8]</sup> 研究认为, 碳源越充足, 好氧反硝化效率越高,

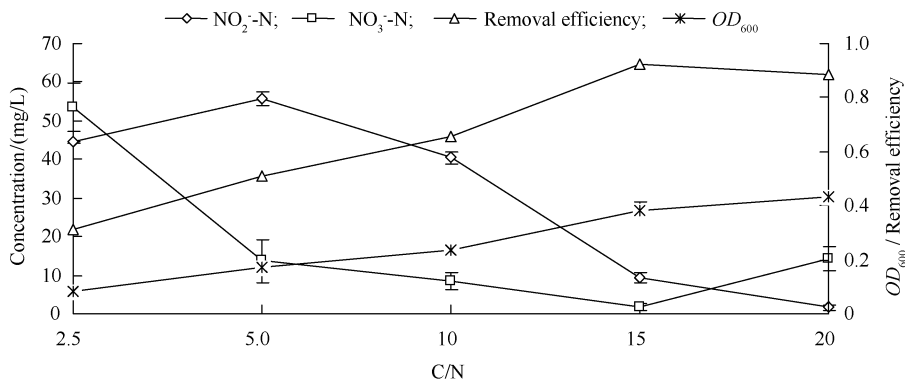


图 3 C/N 比值对菌株 2-8 生长和好氧反硝化效果的影响

Fig. 3 Effect of C/N ratio on the growth and aerobic denitrification of strain 2-8.

对总氮的去除率越高。Joo 等<sup>[11]</sup>发现 C/N 为 5 时, 异养硝化好氧反硝化细菌 *A. faecalis* No. 4 的异养硝化作用进行不完全, 同时好氧反硝化作用进行不彻底; 而 C/N 为 10 时, 异养硝化作用和好氧反硝化作用可以进行完全, 当 C/N 达到一定程度时, 反硝化率就不再增加。但也有研究<sup>[28]</sup>发现, C/N 不总是越高越好, 对于假单胞菌 X31 来说, C/N 为 5 时, 脱氮率为 89.50%; 当 C/N 为 6 时, 脱氮率增加到 95.30%; 但进一步提高 C/N 比值, 脱氮率基本上没有多大变化。

## 2.6 温度对菌株好氧反硝化的影响

设定培养温度分别为 4、12、20、25、30、37℃, 在初始硝酸氮浓度为 140 mg/L、柠檬酸钠为唯一碳源、C/N 为 15、pH 为 7.5、NaCl 浓度 30 g/L、摇床转速 160 r/min 的条件下, 培养 3 天, 测定菌株生长、剩余硝酸-氮和亚硝酸-氮。结果如图 4 所示。在所设定的温度范围内, 菌株 2-8 不能在 4℃ 和 37℃ 生长, 在 12℃-30℃ 温度范围内, 该菌株的生长随着温度的升高而增加, 脱氮率也呈现一致的变化趋势, 并在 30℃ 达到脱氮率最大值。特别是在 20℃-30℃ 范围内, 菌株 2-8 都具有很高的脱氮效率, 说明其具有较好的应用潜力。

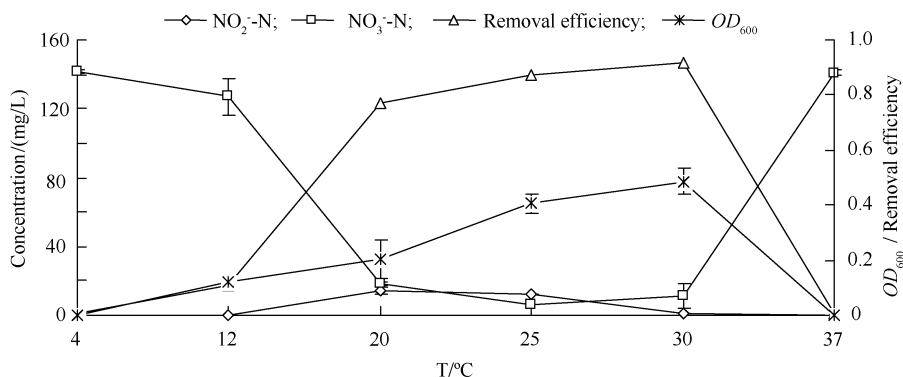


图 4 温度对菌株 2-8 生长和好氧反硝化效果的影响

Fig. 4 Effect of the temperature on the growth and aerobic denitrification of strain 2-8.

## 2.7 摇床转速对菌株菌株 2-8 生长和好氧反硝化的影响

设定摇床转速分别为 0、100、160、200 r/min, 在初始硝酸氮浓度为 140 mg/L、柠檬酸钠为唯一碳源、C/N 为 15、pH = 7.5、NaCl 浓度 30 g/L、培养温度 30℃ 的条件下, 培养 3 天, 测定菌株生长、剩余硝酸-氮和亚硝酸-氮。结果如图 5 所示。结果表明, 摇床转速对 2-8 好氧反硝化作用影响较大, 0-100 r/min 时, 脱氮率只有 20% 左右, 而且亚硝酸盐积累严重; 160 r/min 时, 脱氮率较高, 达到

90% 以上; 200 r/min 时, 脱氮率下降到 66.9%。

不同的细菌对溶氧影响的反应有所不同, 从而反映不同细菌进行好氧反硝化作用的机制有所不同, 目前溶氧对好氧反硝化细菌的影响没有定论, 有待进一步研究。Joo 等<sup>[10]</sup>认为氧的供应对于反硝化作用很关键。目前一般认为, 溶解氧应满足含碳有机物的氧化以及硝化反应的需要, 但浓度不宜过高, 不致于因为系统中有机物过度消耗而影响反硝化反应的顺利进行。

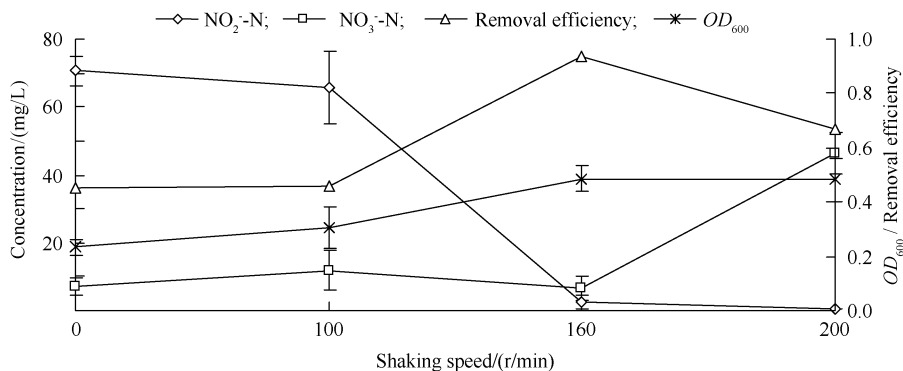


图 5 摇床转速对菌株 2-8 生长和好氧反硝化效果的影响

Fig. 5 Effect of shaker speed on the growth and aerobic denitrification of strain 2-8.

## 2.8 最优条件下菌株 2-8 的生长曲线及好氧反硝化效果

综上,对于菌株 2-8 的培养条件,采用初始硝酸氮 140 mg/L,柠檬酸钠为唯一碳源,C/N 为 15, pH = 7.5, NaCl 浓度 30 g/L,培养温度 30℃,摇床转速为 160 r/min 的条件下测定其生长曲线,并同步检测反应体系中硝酸氮和亚硝酸氮的浓度,计算脱氮率,结果如图 6 所示。结果表明,0-13 h 为延滞期,此时体系中硝酸盐氮没有太大变化,无亚硝酸盐

氮的生成。13-33 h,菌株处于对数生长期,硝酸盐氮也成直线下降的趋势。值得注意的是,在硝酸盐氮大幅下降的同时,并没有亚硝酸盐氮的积累,只在对数期末期,检测到微量的亚硝酸盐氮生成。33-48 h,菌株处于生长稳定期,脱氮率达 92%。同时在培养 48 h 后离心收集菌体测定其氮素含量,结果表明,培养液菌体的含氮量为  $30.16 \pm 0.008$  mg/L,作为氮源利用的硝酸氮只占原体系总氮的 21.5%。

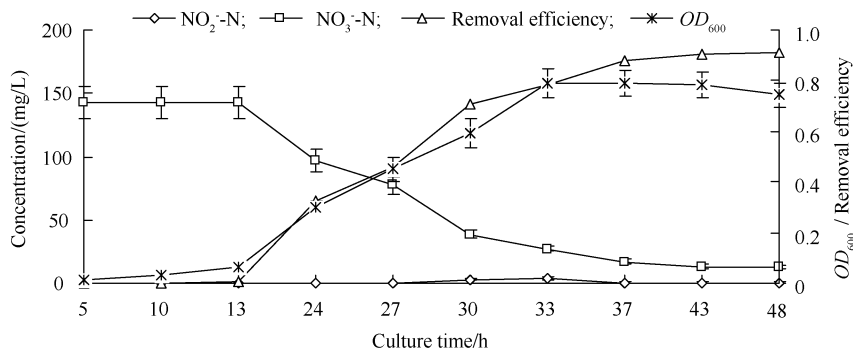


图 6 菌株 2-8 的生长曲线及好氧反硝化效果

Fig. 6 Growth curve and efficiency of aerobic denitrification of strain 2-8.

## 3 结论

(1) 从海洋养殖循环水生物滤器的生物膜中分离到好氧反硝化细菌菌株 2-8,该菌株与假单胞菌属 *Pseudomonas segetis* FR1439<sup>T</sup> (AY770691) 亲缘关系最近,16S rRNA 基因序列相似性达到 99.9%,因此初步鉴定菌株 2-8 属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp. 2-8)。

(2) 在好氧条件下,对菌株 2-8 进行好氧反硝化特性研究,在初始硝酸氮源约为 140 mg/L 的反应体系中,以柠檬酸钠为碳源、C/N 为 15、pH 为 7.5、NaCl 浓度为 30 g/L、培养温度为 30℃ 且摇床转速为 160 r/min 时,2-8 在 48 h 内脱氮率达 92%,且无亚硝酸盐积累。

## 参考文献

[1] 李卓棣,胡正嘉. 微生物学. 北京: 中国农业出版社, 2000.

[2] Zumft WG, Viebroc A, Korner H. Biochemical and physiological aspects of denitrification. In: Cole JA, Ferguson SJ. (eds). The nitrogen and sulphur cycles. Cambridge: Press Syndicate of the University of Cambridge, 1988. 245-279.

[3] Bonin P, Gilewicz M, Bertrand J C. Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautica*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1989, 35: 1061-1064.

[4] Robertson LA, Kuenen JG. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1990, 57: 139-152.

[5] Ding AZ, Fu JM, Sheng GY. Evidence of aerobic denitrification. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(3): 2779-2782.

[6] Xie SG, Zhang XJ, Wang ZS. Integrated study on biochemical mechanism in biofiber system. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2002, 22(5): 557-561.

[7] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*, 1984, 13(9): 351-354.

[8] 吕锡武,李峰,稻森悠平,水落元之. 氨氮废水处理过程中的好氧反硝化研究. 给水排水 (*Water & Wastewater Engineering*), 2000, 26(4): 17-20.

[9] 乔楠,刘文超,张贺,张金榜,于大禹. 一株好氧反硝化菌的异养硝化及脱氮性能. 化工进展 (*Chemical Industry and Engineering Progress*), 2010, 29(4): 767-771.

- [10] 朱晓宇, 王世梅, 梁剑茹, 周立祥. 两株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮效率. *环境科学学报 (Acta Scientiae Circumstantiae)*, 2009, 29 (1): 111-117.
- [11] 高秀花, 刘宝林, 李昌林, 沈照理. 好氧反硝化生物脱氮研究进展. *给水排水 (Water & Wastewater Engineering)*, 2009, 35: 58-61.
- [12] Robertson LA, Van Niel Ed WJ, Torremans Rob A M, Kuenen J. Gijss. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54(11): 2812-2818.
- [13] Takaya N, Catalan-Sakairi MAB, Sakaguchi Y, Kato I, Zhou Z, Shoun H. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (6): 3152-3157.
- [14] Joo HS, 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.
- [15] Bonin P, Gilewicz M, Denis M, Bertrand JC. Salt requirements in the denitrifying bacterium *Pseudomonas nautica* 617. *Research in Microbiology*, 1989, 140(2): 159-169.
- [16] Scholten E, Lukow T, Auling G, Kroppenstedt R M, Rainey F A, Diekmann H. *Thaurea mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49: 1045-1051.
- [17] Patureau D, Godon JJ, Dabert P, Bouchez T, Bernet N, Delgenes JP, Moletta R. *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48: 775-782.
- [18] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing// *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Edited by: Stackebrandt E and Goodfellow M). Chichester, United Kingdom: John Wiley, 1991.
- [19] 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. 第三版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989, 260-263.
- [20] 刘圣昔, 李斌. 麝香草酚分光光度法的应用. *中国现代医药杂志 (Modern Medicine Journal of China)*, 2006, 8(4): 57-59.
- [21] 朱智, 刘新民. 过硫酸钾氧化—紫外光度法测定总氮方法的改进. *环境科学与管理 (Environmental Science and Management)*, 2006, 31(5): 135-137.
- [22] 谢珊, 李小明, 曾光明, 杨国靖, 杨麒. SBR系统中好氧颗粒污泥脱氮特性研究. *中国环境科学 (Chinese Environmental Science)*, 2004, 24 (3): 355-359.
- [23] Gupta A B, Gupta SK. Simultaneous carbon and nitrogen removal from high strength domestic wastewater in aerobic RBC biofilm. *Water Research*, 2001, 35 :1714-1722.
- [24] Her JJ, Huang JS. Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Bioresource Technology*, 1995, 54: 45-51.
- [25] 王毓仁. 提高废水生物反硝化效果的理论和实践. *石油化工环境保护 (Environment Protection in Petrochemical Industry)*. 1995, 2: 1-7.
- [26] 许尚营, 张华, 李娜, 李凤, 杨俊忠, 郑永良, 刘德立. 一株好氧反硝化菌的鉴定及反硝化特性研究. *环境科学与技术 (Environmental Science & Technology)*, 2010, 33(2): 10-13.
- [27] Chiu YC, Chung MS. Determination of optimal COD/nitrate ratio for biological denitrification. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2003, 51: 43-49.
- [28] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 左薇, 张献旭, 张佳. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响. *环境科学学报 (Acta Scientiae Circumstantiae)*, 2007, 27 (6): 968-972.

# Identification and characteristics of a marine aerobic denitrifying bacterium

Xiyan Gao<sup>1</sup>, Ying Liu<sup>2</sup>, Haiyan Zheng<sup>1</sup>, Ying Liu<sup>1</sup>, Zhipei Liu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(<sup>2</sup> Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266701, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] An aerobic denitrifying bacterium, strain 2 – 8, was isolated from a biological aerated filter in a recirculating marine aquaculture system, phylogeny and characteristics of the strain was further studied. [ **Methods** ] Sequence of the 16S rRNA gene was analyzed and the factors affect the denitrifying ability of strain 2 – 8 were investigated, including carbon source, C/N ratio, initial pH, NaCl concentration, temperature and shaker speed. [ **Results** ] Strain 2 – 8 was identified as *Pseudomonas* sp. based on the analysis of its 16S rRNA gene sequence which showed highest similarity (99.9%) to *Pseudomonas segetis* FR1439<sup>T</sup> (AY770691). The results indicated that carbon source and C/N ratio exhibited significant influences on aerobic denitrifying capacity of strain 2 – 8. Strain 2 – 8 could grow a little on acetate, succinate and citrate as sole carbon source, and the removal rates of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N at 140 mg/L were higher than 65% despite of the accumulation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N around 35 mg/L. It grew quite well on glucose as sole carbon source, however, the removal rate of nitrate was not so high as on other carbon source. The optimum C/N ratio was 15, as lower C/N ratios may lead to nitrite accumulation. The optimum temperature and pH for its aerobic denitrification were 30°C and 7.5, respectively. Strain 2 – 8 could grow and exhibit aerobic denitrifying ability at a wide range of NaCl concentrations (0 – 30 g/L). The highest nitrogen removal appeared under the condition of 160 r/min shaking culture. [ **Conclusion** ] When cultured in the conditions of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N at 140 mg/L, sodium citrate as sole carbon source, C/N ratio at 15, pH 7.5, NaCl at 30g/L, 30°C and 160 r/min of the shaker, strain 2 – 8 removed up to 92% of the nitrogen within 48 hours, and no nitrite accumulation.

**Keywords:** marine environments; nitrogen removal; biological denitrification; aerobic denitrifier

(本文责编:张晓丽)