

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (8) :991 – 1000; 4 August 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140597

耐冷亚硝酸盐型反硝化菌 *Pseudomonas tolaasii* Y-11 的鉴定及其脱氮特性

何腾霞, 徐义, 李振轮*

西南大学资源环境学院, 土壤多尺度界面过程与调控重庆市重点实验室, 重庆 400716

摘要: 【目的】反硝化细菌在生物脱氮中具有重要作用, 而耐冷亚硝酸盐型反硝化细菌研究较少, 本文从长期淹水的冬水田泥土分离获得一株耐冷高效去除亚硝酸盐氮和总氮的好氧反硝化细菌 Y-11, 明确其分类地位以及除氮特性, 以期为后续利用该菌在初冬到春末处理亚硝酸盐水体污染奠定基础。【方法】通过形态学特征、特异性磷脂脂肪酸以及 16S rRNA 基因测序分析对该菌株进行鉴定; 在好氧条件下以亚硝酸钠为唯一氮源, 分别研究不同初始温度、转速、pH、碳源、接种量以及亚硝酸盐氮浓度对该菌去除亚硝酸盐氮和总氮的影响, 确定最适降解条件。【结果】分离得到的菌株 Y-11, 经鉴定归于托拉斯假单胞菌 (*Pseudomonas tolaasii*); 在国内外尚无该种菌具有反硝化作用的报道, 是对亚硝酸盐型反硝化细菌的进一步补充。Y-11 菌株的最适脱氮条件为 15 °C, 200 r/min, pH7.0, 100 mL 反硝化培养基中最适接种量为 1.5×10^8 CFU, 最佳碳源为乙酸钠, 亚硝酸盐氮为 10 mg/L; 以乙酸钠为电子供体, 15 °C、初始 pH 为 7.2、150 r/min 振荡培养, 48 h 对亚硝酸盐氮和总氮的去除率分别为 100% 和 61.28%。【结论】Y-11 是一株具有较高反硝化能力的托拉斯假单胞菌, 能高效地去除亚硝酸盐氮和总氮, 其最适温度是 15 °C 左右, 是一株耐冷反硝化细菌。

关键词: 亚硝酸盐型反硝化细菌, 耐冷, 分离与鉴定, 托拉斯假单胞菌

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 08-0991-10

亚硝酸盐氮不仅是水体富营养化因素之一, 而且对水产动物养殖以及人类健康产生极大威胁, 过量亚硝酸盐氮会引起机体窒息、致癌、致畸甚至致死^[1-4]。据报道亚硝酸盐氮已是国内水体最严重的氮污染物之一^[5], 因此, 采用有效方法去除水体中亚硝酸盐氮显得尤其重要。

好氧反硝化除氮因其成本低廉、无二次污染受到广大研究者青睐。目前国内外报道的好氧反硝化细菌主要为产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、假单胞菌属

(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)^[6]、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)^[7]、和副球菌属 (*Paracoccus*)^[8] 等, 已报道的假单胞菌属中主要有施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*)^[9-10]、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)^[11]、海洋假单胞菌 (*Pseudomonas nautical*)^[12] 和恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)^[13-14] 等。这些反硝化细菌多以硝酸盐为电子受体在 30 °C 左右的条件下进行反硝化作用, 而对于亚硝酸盐氮作为唯一电子受体的

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2013BAJ11B03)

* 通信作者。E-mail: lizhlun4740@sina.com

作者简介: 何腾霞 (1988 -), 女, 贵州铜仁人, 硕士研究生, 研究方向为应用微生物。E-mail: hetengxia5153@163.com

收稿日期: 2014-12-16; 修回日期: 2015-02-01

反硝化细菌报道甚少,2011年Wan等^[15]首次报道 *Pseudomonas* sp. yy7 菌株能以亚硝酸盐氮为唯一氮源,在25℃条件下36 h内去除80%亚硝酸盐氮,但耐冷性亚硝酸盐型好氧反硝化细菌还未见报道。本实验室分离获得一株耐冷亚硝酸盐型反硝化细菌不仅能有效去除水体中亚硝酸盐氮,而且还能显著降低水体中的总氮含量,命名为Y-11,采用形态学观察、特异性磷脂脂肪酸检测和16S rRNA基因序列分析对该菌进行鉴定,同时考察了影响该菌去除亚硝酸盐氮和总氮的因素,实验结果表明,该菌株属于托拉斯假单胞菌(*Pseudomonas tolaasii*),能以亚硝酸盐氮作为电子受体在15℃条件下高效地进行反硝化作用,在国内外尚无该种菌株具有反硝化作用的报道,是对亚硝酸盐型反硝化细菌的进一步补充。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:新分离菌株Y-11(本实验室分离筛选获得)

1.1.2 培养基:(1) BTB酸碱指示剂培养基(bromothymol blue, BTB)^[16]:1 g/L NaNO₂代替1 g/L KNO₃,1.5% BTB代替1.0% BTB,调pH至7.2。(2)反硝化培养基^[17]:4.72 g/L乙酸钠代替4.72 g/L丁二酸钠。(3) LB培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母提取物5,氯化钠10,调pH至7.2,固体培养基加2.0%的琼脂粉。以上所有培养基均在 1.1×10^5 Pa下灭菌30 min,冷却后备用。

1.1.3 主要试剂和仪器:主要化学试剂购买于国药集团化学试剂有限公司;DNA提取试剂盒购买自Thermo Scientific公司;PCR试剂购买自重庆沐生生物科技有限公司;凝胶回收试剂盒购买自BioFlux公司;克隆试剂购买自宝生物(大连)有限公司;细菌通用引物由Invitrogen公司合成。Milli Q Plus超纯水系统(Millipore);ZHWHY-211B恒温培养振荡器(上海智诚分析仪器有限公司);EDC-810双槽PCR仪(东胜创新生物科技有限公司);DYY-6C水平电泳装置(北京市六一仪器厂);Gel Doc XR凝胶成像系统(Bio-Rad);722可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);UV755B可见紫外分光光度计(上海分析仪器总厂);DU800紫外/可见分光光度计(BECKMAN COULTER);扫描电子显微镜

(HITACHI S-3000N)。

1.2 细菌的鉴定

1.2.1 形态学观察:15℃条件下于BTB培养基上划线培养48 h后观察菌落形态,采用革兰氏染色和电镜扫描观察细菌的形态。

1.2.2 特异性磷脂脂肪酸鉴定:取约40 mg纯菌,进行皂化、甲基化、萃取以及碱洗涤后获得上机样品,用Agilent 6850气相色谱仪(FID检测器)分析特异性磷脂脂肪酸(Phospholipid fatty acid, PLFA)的成分。色谱条件为:(25.0 m × 200 μm × 0.33 μm),进样量1 μL,分流比10:1,载气(H₂),尾吹气高纯N₂,助燃气空气,流速0.8 mL/min。二阶程序升高柱温:170℃起始,5℃/min升至260℃,而后40℃/min升温至310℃,维持1.5 min。各成分脂肪酸通过MIDI Sherlock微生物鉴定系统(Version 6.1, MIDI, Inc., Newark, DE)进行检测,标准品购买于美国MIDI公司,PLFA用C19:0做内标换算PLFA的绝对含量。

1.2.3 菌株16S rRNA基因序列检测:以纯化细菌的基因组DNA为模板,采用通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')进行聚合酶链式反应(PCR)扩增。扩增体系(50 μL):模板2 μL,引物27F和1492R各2 μL,2 × Taq PCR Master Mix 25 μL,无菌水19 μL。扩增程序:94℃ 5 min;94℃ 1 min,50.5℃ 30 s,72℃ 1 min,循环30次;72℃ 10 min。扩增获得的目的条带经切胶回收克隆后,送Invitrogen公司测序,将测序获得的16S rRNA基因序列提交到国际基因库GenBank获取基因登录号。

1.2.4 细菌的系统发育分析:测序结果在NCBI网站进行BLAST同源性分析,采用软件MEGA 6.0中Clustal X程序进行多重序列比对分析,通过Neighbor-Joining方法与1000次Bootstrap的统计检验进行系统树的构建,以确定新分离菌的系统发育地位。

1.3 各因素对亚硝酸盐氮和总氮去除效果的影响

将含 1.0×10^8 CFU的菌悬液分别接入装有100 mL反硝化培养基的250 mL锥形瓶中,研究Y-11菌株在不同初始温度(5、10、15、20、25、30、35和40℃)、pH值(5.0、6.0、7.0、8.0和9.0)、转速(0、50、100、150和200 r/min)、碳源(柠檬酸钠、丁二酸

钠、乙酸钠、蔗糖和葡萄糖) 以及不同亚硝酸盐氮浓度 (10、50、100、150 和 200 mg/L) 条件下对亚硝酸盐氮和总氮的去除能力, 同时考察了不同接种量 (0.5×10^8 、 1.0×10^8 、 1.5×10^8 、 2.0×10^8 和 2.5×10^8 CFU) 对亚硝酸盐氮和总氮去除率的影响, 以上实验均在 48 h 后分别测定其亚硝酸盐氮浓度和总氮浓度, 并计算亚硝酸盐氮和总氮的去除率, 确定不同因素对该菌株脱氮的影响。

用以下公式计算亚硝酸盐氮和总氮的去除率: $R_v = (T_1 - T_2) / T_1 \times 100\%$; 其中 R_v 为亚硝酸盐氮或总氮的去除率, T_1 为反硝化培养基中亚硝酸盐氮或总氮的初始浓度, T_2 为培养 48 h 后亚硝酸盐氮或总氮的终浓度。

为明确细菌生长情况, 保证脱氮试验在细菌处于对数期时进行, 本研究采用灭菌的 $10 \mu\text{L}$ 枪头从 10°C 培养的平板培养基上挑取一个单菌落于反硝化培养基中, 于 20°C 、 150 r/min 条件下振荡培养, 每 12 h 测定该细菌的 OD_{600} 值, 绘制细菌的生长曲线。

1.3.1 检测方法: 总氮浓度采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定^[18]; 亚硝酸盐氮浓度采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定^[19]; 菌体生长量采用 OD_{600} 光电比浊法。

1.3.2 数据处理与分析: 每组实验设 3 组平行, 采用 Excel、SPSS Statistics 17.0 和 Origin 8.6 软件对实验结果进行统计分析并作图。

2 结果

2.1 形态学特征

将菌株 Y-11 划线于 BTB 培养基上, 15°C 培养

48 h 后, 菌落呈淡绿色、表面光滑、边缘整齐、中央略隆起, 革兰氏染色为阴性。经电镜扫描观察, 如图 1 所示, 菌株 Y-11 呈短杆状或连珠状, 无鞭毛, 无芽孢。

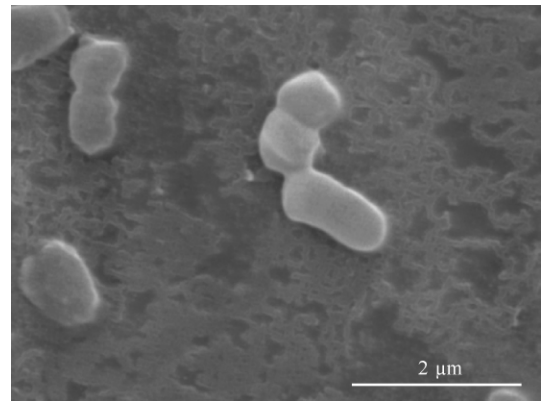


图 1. 电镜扫描下的 Y-11 菌株 (20000 ×)

Figure 1. Y-11 strain under the scanning electron microscope (20000 ×).

2.2 特异性磷脂脂肪酸鉴定

磷脂脂肪酸是生物体重要组成部分之一, 在不同微生物类群中具有差异性, 同种微生物类群中比较恒定, 且具有微生物特异性和结构多样性, 这是磷脂脂肪酸图谱分析方法的重要依据。气象色谱能够简单、快速、灵敏且精确地检测出细胞所含有的特异性磷脂脂肪酸^[20-22]。本研究对 Y-11 的特异性磷脂脂肪酸鉴定结果如表 1 所示, 该菌与 *Pseudomonas fluorescens*-biotype B 的相似指数为 0.523, 为典型的荧光假单胞菌 II 类型, 在传统分类学上 *Pseudomonas tolaasii* 属于 *Pseudomonas fluorescens*-biotype II^[23], 这与该菌的 16S rRNA 基因鉴定结果相符合。

表 1. 特异性磷脂脂肪酸的鉴定结果

Table 1. The result of the specific phospholipid fatty acids identification

Library	Sim index	Entry name
RTSBA66.21	0.159	<i>Ewingella-americana</i>
	0.144	<i>Pantoea-agglomerans</i> -GC subgroup C (Enterobacter)
RCLIN66.20	0.523	<i>Pseudomonas-fluorescens</i> -biotype B
M17H103.80	0.410	<i>Pseudomonas-putida</i> -biotype A
		(No Match)

2.3 16S rRNA 序列与系统发育分析

结果表明该菌的 16S rRNA 基因全长为 1440 bp, 将其进行 BLAST 同源性分析, 发现菌株 Y-11 与

托拉斯假单胞菌 (*Pseudomonas tolaasii*) 的相似性达 98%, 在 NCBI 中查找与 Y-11 同源性高的菌株序列, 利用 MEGA 6.0, 以 Neighbor-Joining 方法绘制该

菌的 16S rRNA 基因系统发育树。由图 2 可知,该菌与 *Pseudomonas tolaasii* 的系统发生地位最近,结合菌株 Y-11 的形态学和特异性磷脂脂肪酸,可确定该

菌为托拉斯假单胞菌 (*Pseudomonas tolaasii*),在国际基因库中的 Accession number 为 KP410741,该种菌在低温高效脱氮方面还未见报道。

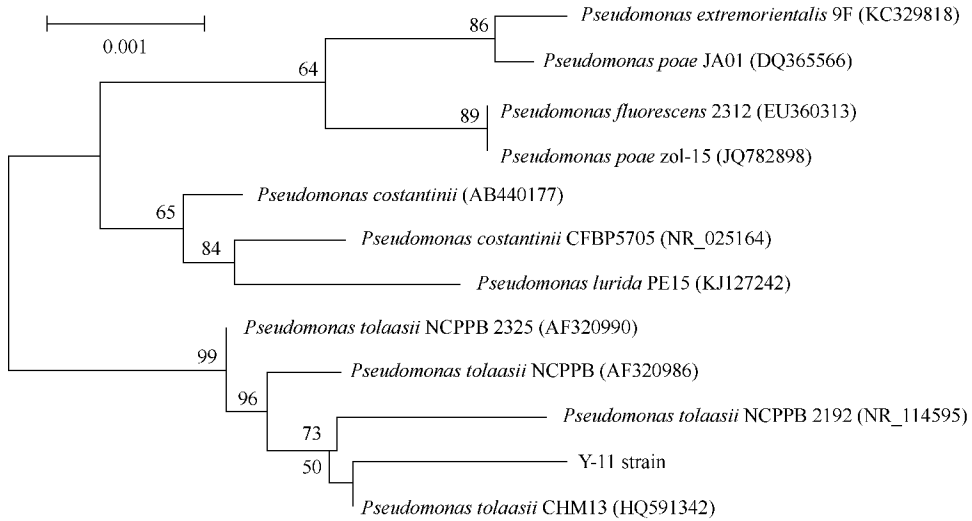


图 2. 菌株 Y-11 的系统发育进化树

Figure 2. Phylogenetic tree of the Y-11 strain. Numbers in parentheses represent the sequences in GenBank. The number at each branch points is percentage supported by bootstrap (1000 re-samplings). Bar: 0.1% sequence divergence.

2.4 环境条件对 Y-11 菌株去除亚硝酸盐氮和总氮的影响分析

根据 Y-11 菌株在反硝化培养基中的生长特点绘制生长曲线,如图 3 所示。该菌株在反硝化培养基中 48 h 内可达对数生长期,且平台期时间较长,180 h 内未见其衰亡期。

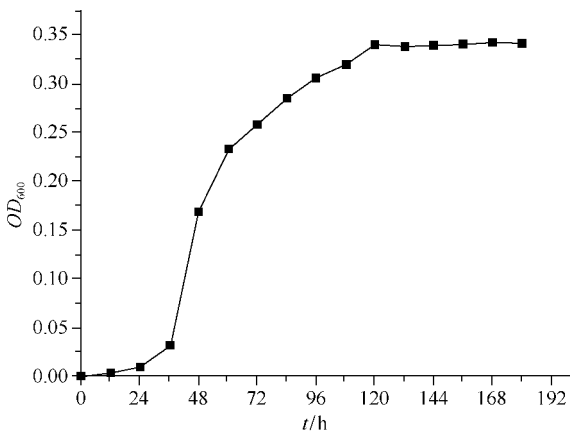


图 3. 反硝化细菌 Y-11 菌株在反硝化培养基中的生长曲线

Figure 3. The growth curve of Y-11 aerobic denitrifier in the denitrification medium.

2.5 不同温度对去除亚硝酸盐氮和总氮的影响

温度是影响微生物生长代谢的重要因素之一,也是影响生物脱氮的关键因素,据报道,温度比其它因素(pH、低溶解氧浓度、有毒化合物、高有机负荷等)对生物脱氮影响更显著,温度过高或过低均能导致亚硝酸盐氮还原失败^[24-25]。本研究考察了 Y-11 菌株在不同温度条件下去除亚硝酸盐氮和总氮的能力,结果如图 4 所示,表明该菌在 5-40 °C 条件下均能去除亚硝酸盐氮和总氮,在 10-35 °C 范围内能高效地去除亚硝酸盐氮和总氮,但在 15 °C 对亚硝酸盐氮和总氮去除率最大,分别为 100% 和 60.33%。

2.6 不同转速对去除亚硝酸盐氮和总氮的影响

好氧反硝化细菌能以硝酸盐氮、亚硝酸盐氮以及溶解氧作为电子受体进行反硝化作用,不同的氧浓度可能对反硝化作用产生不同影响,从图 5 可以看出该菌在不同溶解氧的条件下均能有效去除亚硝酸盐氮和总氮,随着转速的增加,该菌对亚硝酸盐氮和总氮的去除率增加,在 50-200 r/min 的溶解氧水平下,对亚硝酸盐氮的去除率均达 100%,200 r/min 的溶解氧水平下,对总氮的去除率最大,为 66.53%,表明 Y-11 是一株嗜氧菌。

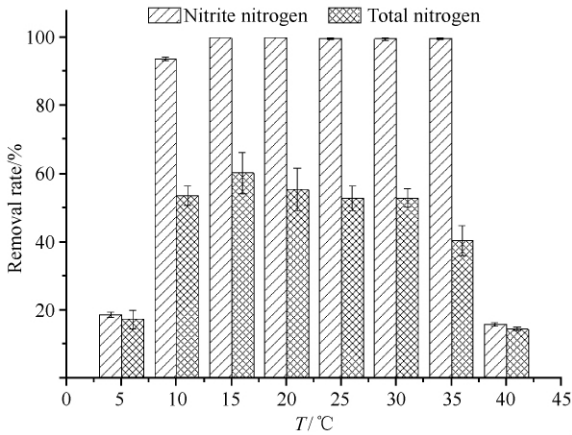


图 4. 温度对菌株 Y-11 除氮的影响

Figure 4. Effects of temperature on nitrogen removal of strain Y-11.

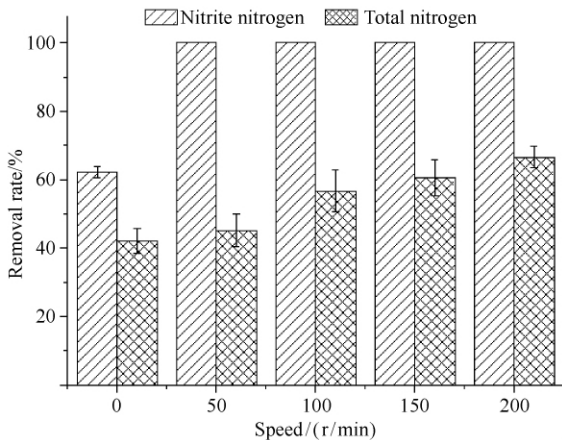


图 5. 转速对菌株 Y-11 去除亚硝酸盐氮的影响

Figure 5. Effects of shaking speed on nitrite nitrogen removal of strain Y-11.

2.7 不同初始 pH 对去除亚硝酸盐氮和总氮的影响

环境中氢离子浓度超过微生物的适宜范围将会引起微生物的原生质膜电位变化, 从而影响微生物生存和酶活性^[26], 此外, 反硝化作用是一个产碱过程^[27], 促使环境中氢氧根离子增加, 进而影响酶促反应, 因此研究 pH 值对反硝化作用的影响十分重要。菌株 Y-11 在不同 pH 条件下除氮能力如图 6 所示, 在 pH 为 5.0 和 6.0 时, 对亚硝酸盐氮和总氮的去除量少, 培养基中亚硝酸盐氮含量基本不变; pH 值为 7.0 - 9.0 时, 该菌能 100% 地去除亚硝酸盐氮, 但 pH 为 7.0 时对总氮去除率最大, 为 62.13%, 表明该菌对高 pH 具有一定的耐受性。

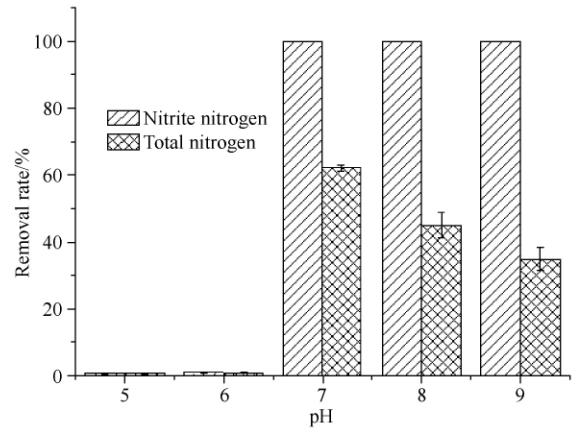


图 6. pH 对菌株 Y-11 除氮的影响

Figure 6. Effects of pH on nitrogen removal of strain Y-11.

2.8 不同接种量对去除亚硝酸盐氮和总氮的影响

菌株生物量的大小是影响生物除氮的重要因素, 接种量不足达不到反硝化除氮的作用, 接种量过多会引起生物竞争营养物而致使部分细菌死亡, 导致环境总氮含量去除不明显, 适量的接种对提高反硝化除氮的能力具有重要意义。由图 7 可看到, 随着接种量的增大, 该菌对亚硝酸盐氮和总氮的去除率升高, 当接种量为 1.0×10^8 CFU 以上时, 48 h 内均能将亚硝酸盐氮 100% 去除, 对总氮的去除率高达 61.75% 以上, 其接种量为 1.5×10^8 CFU 时, 对总氮去除率最大, 为 65.20%, 再增大接种量, 对总氮的去除率没有显著差异。

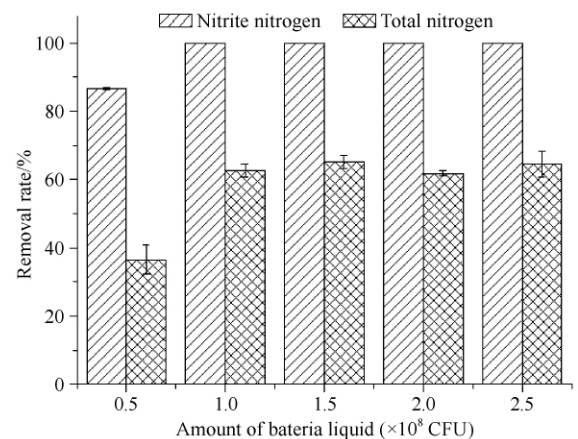


图 7. 接种量对菌株 Y-11 除氮的影响

Figure 7. Effects of inoculated quantity on nitrogen removal of strain Y-11.

2.9 不同碳源对去除亚硝酸盐氮和总氮的影响

碳源不仅是微生物除氮的能源, 还作为脱氮过

程中的电子供体,直接或间接地影响微生物的生长速度和脱氮效率。图 8 表明该菌能够利用的碳源种类较为广泛,除蔗糖外,该菌可利用余下四种碳源 100% 地去除亚硝酸盐氮,但对总氮的去除率不尽相同,以柠檬酸钠、丁二酸钠和乙酸钠为碳源时对总氮去除率较高,可达 58.68% 以上,其中以乙酸钠为碳源对总氮去除率最高,为 61.28%;该菌虽然能以葡萄糖为碳源有效地去除亚硝酸盐氮,但对总氮的去除不显著。

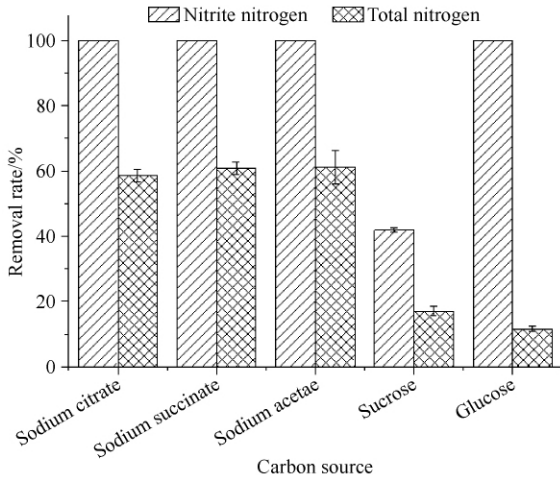


图 8. 碳源对菌株 Y-11 除氮的影响

Figure 8. Effects of carbon source on nitrogen removal of strain Y-11.

2.10 不同初始亚硝酸盐氮浓度对去除亚硝酸盐氮和总氮影响

不同种类的细菌对亚硝酸盐氮浓度耐受程度具有差异,亚硝酸盐氮浓度过低不能满足微生物生长代谢所需要的氮源,过高可能会导致生物毒害作用,二者对微生物生长代谢均会产生不利影响。初始亚硝酸盐氮浓度影响如图 9 所示,表明起始亚硝酸盐氮浓度为 10 mg/L 时,该菌对亚硝酸盐氮和总氮的去除率最高,分别为 100% 和 63.10%,随着起始亚硝酸盐氮浓度增加,该菌对亚硝酸盐氮和总氮的去除率降低,但并未出现细菌大量死亡的现象,且对亚硝酸盐氮和总氮均具有一定的去除率,表明该菌对高浓度的亚硝酸盐氮具有一定的耐受性,如果延长长时间,也许同样能够较好地表现出生物脱氮能力。

3 讨论

环境条件不但会影响细菌的生长代谢,而且会

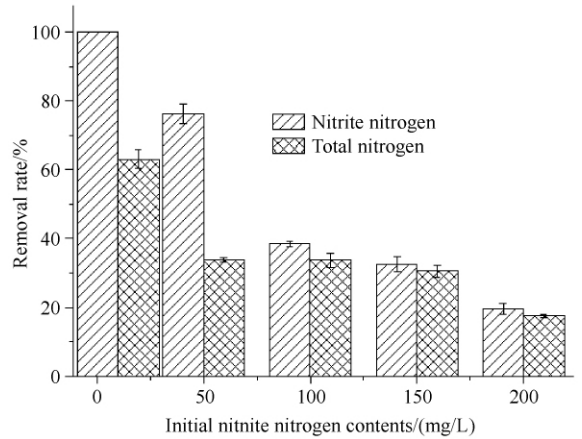


图 9. 亚硝酸盐氮对菌株 Y-11 除氮的影响

Figure 9. Effects of nitrite contents on nitrogen removal of strain Y-11.

影响脱氮效率,适宜的环境条件和营养物质是促进微生物生长代谢和提高生物脱氮的必要条件。通常认为温度、pH 值、溶解氧、碳源等都会影响反硝化除氮速率,但对不同种类的细菌生长以及脱氮速率的影响程度不尽相同,本研究探讨了温度、溶解氧、pH 值等六大因素对 Y-11 菌株去除亚硝酸盐氮的影响,能为该菌在实际应用中提供理论基础。

细菌在反硝化培养基中生长繁殖要经过四个时期,即延滞期、对数生长期、稳定期和衰亡期,当细菌处于对数期时其个体形态与生理特性都比较稳定,且对环境适应能力强,因此为了保证本实验均在细菌处于对数期进行,根据该菌在反硝化培养基中的生长情况绘制生长曲线对研究生物脱氮具有必要性。

随着对好氧反硝化细菌研究的不断深入,大量假单胞菌属中具有好氧反硝化作用的细菌及其脱氮效率相继报道,如 Guo 等^[28]从富营养化的太湖中分离出的好氧反硝化细菌 (*Pseudomonas stutzeri* strain T1),在最优条件下,对太湖中铵态氮和硝酸盐氮的去除率分别为 60% 和 75%;Wong 等^[29]从温泉中分离到一株好氧反硝化细菌 (*Pseudomonas yangmingensis* sp. nov.),但其好氧反硝化能力还未见报道;Guo 等^[30]分离得到了一株异养硝化好氧反硝化细菌,能同时去除多种无机氮,对硝酸盐氮、亚硝酸盐氮和铵氮每小时去除速率分别为 87.5、68.3 和 8.33 mg/L;Ji 等^[31]从活性污泥中分离出的一株好氧反硝化细菌 (*Pseudomonas stutzeri* X31),在 24 h 内对硝酸盐氮的去除率可达 93.7%。假单胞菌属

作为最常见的好氧反硝化细菌在不断被发现, 本研究分离获得的好氧反硝化细菌 Y-11, 属于托拉斯假单胞菌 (*Pseudomonas tolaasii*), 迄今为止, 还未见该种菌能进行好氧反硝化作用除氮的相关报道。

温度是影响硝化作用和反硝化作用的重要因素之一, Huang 等^[32] 对所分离获得的一株耐冷菌 (*Acinetobacter* sp.) Y16 研究显示, 该菌株在其最适温度 (20 °C) 条件对铵氮的去除率为 (61.40 ± 1.01) %。Zheng 等^[33] 对所分离的耐冷菌 (*Psychrobacter* sp.) 研究表明, 该菌在其最适温度 (20 °C) 条件下, 对亚硝酸盐氮的去除率为 63.50%, 对总氮的去除率只有 31.89%。本研究所分离的耐冷好氧反硝化细菌 Y-11 在 15 °C 条件下能够以 100% 和 60.33% 的去除率高效地去除亚硝酸盐氮和总氮, 表现出了较高的耐冷反硝化能力。但在野外应用方面还有待进一步研究。

溶解氧不仅作为反硝化过程的电子受体, 还能抑制反硝化相关还原酶基因的活性^[34], 不同种类的反硝化细菌对溶解氧的耐受程度具有差异, 如于爱茸等^[35] 对反硝化细菌的耐氧特性研究表明, 菌株 W2 和 YJ06 在溶解氧小于 1 mg/L 时表现出显著的反硝化能力, 但当溶解氧大于 2 mg/L 时, YJ06 基本丧失反硝化能力, 而 W2 在溶解氧达到 4.9 mg/L 的条件下除氮率还可达 92%。本实验研究的 Y-11 菌株在 200 r/min 转速对应的溶解氧水平下并未表现出受抑制作用, 其原因有待进一步探索。

碳源主要为反硝化过程提供能源和电子, 能直接或间接影响反硝化脱氮过程和脱氮产物, 如傅利剑等^[36] 的研究结果表明, 相对柠檬酸钠而言, 甘油促进异养反硝化细菌 HP1 (*Pseudomonas alcaligenes*) 产生 N₂O, N₂O 是一种导致臭氧层空洞的强烈温室气体, 对环境温室效应潜势是 CO₂ 的 300 多倍^[35-38], 本实验研究了多种碳源对菌株 Y-11 脱氮能力的影响, 但未对其脱氮产物进行分析, 为了在实际应用过程中减轻反硝化脱氮产物对环境带来危害, 还应对是否会产生 N₂O 做进一步探索。

4 结论

通过形态学观察、特异性磷脂脂肪酸检测和

16S rRNA 基因测序分析, 本实验室分离的反硝化菌株 Y-11 为托拉斯假单胞菌 (*Pseudomonas tolaasii*)。

菌株 Y-11 进行生物脱氮的最适温度为 15 °C, 对亚硝酸盐氮和总氮的去除率分别为 100% 和 60.33%, 在 5-40 °C 温度范围内均能进行反硝化作用, 是一株耐冷亚硝酸盐型反硝化细菌; 该菌对高溶解氧、高 pH 值和高亚硝酸盐氮浓度具有一定的耐受性, 且具有丰富的碳源多样性, 能利用柠檬酸钠、丁二酸钠、乙酸钠等进行高效的生物脱氮作用。

参考文献

- [1] Kroupova H, Machova J, Svobodova Z. Nitrite influence on fish: a review. *Veterinari Medicina*, 2005, 50(11): 461-471.
- [2] Wang Z, Chen Y, Lin Y, Su X, He J, Zhou T, Chen W, Chen B, Liu X, Pan S. Relationship between quality of drinking water and gastric cancer mortality from 11 counties in Fujian Province. *Chinese Journal of Public Health*, 1997, 16(2): 79-80. (in Chinese)
王志强, 陈昱, 林育纯, 王志红, 苏筱碧, 何坚, 周天枢, 陈文, 陈碧珠, 刘杏媚, 潘圣土. 福建省 11 个县饮用水质与胃癌死亡率的关系. *中国公共卫生学报*, 1997, 16(2): 79-80.
- [3] Deng X, Lin Q, Gu J. Correlation between concentration of nitrate, nitrite in drinking water source and cancer mortality for Guangzhou city. *Ecologic Science*, 2004, 23(1): 38-41. (in Chinese)
邓熙, 林秋奇, 顾继光. 广州市饮用水源中硝酸盐亚硝酸盐含量与癌症死亡率联系. *生态科学*, 2004, 23(1): 38-41.
- [4] Huang F, Xu J, Qin M, Ma T. The relationship of nitrite and cancer. *Journal of Henan University (Natural Science)*, 2009, 39(1): 35-41. (in Chinese)
皇甫超申, 许清华, 秦明周, 马同森. 亚硝酸盐与癌的关系. *河南大学学报(自然科学版)*, 2009, 39(1): 35-41.
- [5] Yang X, Li W, Chen Y, Cao Y. Identification and denitrification of an aerobic bacterium. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1062-1070. (in Chinese)
杨小龙, 李文明, 陈燕, 曹郁生. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其除氮特性. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1062-1070.

- [6] Liu Y, Kong HN, He YL, Liu BB, Inamori Y, Yan L. Isolation and characterization of a new heterotrophic nitrifying *Bacillus* sp. strain. *Biomedical and Environmental Science*, 2007, 20 (6) : 450-455.
- [7] Yao S, Ni J, Ma T, Li C. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresource Technology*, 2013, 139: 80-86.
- [8] Wang W, Cai Z, Zhong W, Wang G. Research advances in aerobic denitrifier. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 18 (11) : 2618-2625. (in Chinese)
王薇, 蔡祖聪, 钟文辉, 王国祥. 好氧反硝化菌的研究进展. 应用生态学报, 2008, 18 (11) : 2618-2625.
- [9] 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.
- [10] Li Y, Wei M, Zhang A, Wu B, Zhong W. Isolation, Identification and characterization of a nitrite-oxidizing bacterium. *Biotechnology Bulletin*, 2010, 5: 196-202. (in Chinese)
李焱生, 魏民, 张艾晓, 武斌, 钟卫鸿. 一株异养型亚硝酸盐氧化细菌的分离及其降解特性的研究. 生物技术通报, 2010, 5: 196-202.
- [11] Ridgway HF, Safarik J, Phipps D, Carl P, Clark D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56: 3565-3575.
- [12] Bonin P, Gilewicz M. A direct demonstration of " co-respiration " of oxygen and nitrogen oxides by *Pseudomonas nautical*: some spectral and kinetic properties of the respiratory components. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 80 (2/3) : 183-188.
- [13] Wang H, Wang P, Liu J. Characteristics of heterotrophic nitrification by aerobic denitrifiers. *Environmental Science & Technology*, 2008, 31 (11) : 45-47. (in Chinese)
王欢, 汪莘, 刘晶晶. 好氧反硝化菌的异养硝化性能研究. 环境科学与技术, 2008, 31 (11) : 45-47.
- [14] Qiu X, Du G, Chen J. Performance of nitrogen removal by *Pseudomonas* sp. WSH 1001. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2012, 18 (5) : 768-774. (in Chinese)
邱晓帆, 堵国成, 陈坚. 一株假单胞菌 WSH1001 的脱氮特性. 应用与环境生物学报, 2012, 18 (5) : 768-774.
- [15] Wan CL, Yang X, Lee DJ, Du MA, Wan F, Chen C. A denitrification by novel isolated strain using NO₂-N as nitrogen source. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (15) : 7244-7248.
- [16] Shao Q, Yu X. Isolation and characterization of a strain denitro bacteria. *Biotechnology*, 2008, 18 (3) : 63-65. (in Chinese)
邵晴, 余晓斌. 好氧反硝化细菌的筛选及反硝化特性研究. 生物技术, 2008, 18 (3) : 63-65.
- [17] Song ZF, An J, Fu GH, Yang XL. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture*, 2011, 319 (1) : 188-193.
- [18] H J636. 水质总氮的测定碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法, (Doctoral dissertation), 2012.
- [19] 魏复盛, 毕彤, 齐文启. 水和废水检测分析方法. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 268-271.
- [20] Zhang G, Wu W, Pan R. Determination of fatty acids in cells by GC-MS and its application in bacterium identification. *Journal of Hefei Union University*, 2005, 10 (4) : 92-96. (in Chinese)
张国赏, 吴文鹃, 潘仁瑞. 气相色谱-质谱法检测细胞脂肪酸及其在细菌鉴定上的应用. 合肥联合大学学报, 2005, 10 (4) : 92-96.
- [21] Lan J, Liu B, Chen L, Xiao R, Shi H, Su M. Characteristics of PLFA biomarkers for the endophytic bacteria inside musa plants. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43 (10) : 2045-2055. (in Chinese)
蓝江林, 刘波, 陈璐, 肖荣凤, 史怀, 苏明星. 芭蕉属植物内生细菌磷脂脂肪酸 (PLFA) 生物标记特性研究. 中国农业科学, 2010, 43 (10) : 2045-2055.
- [22] Pratt B, Riesen R, Johnston CG. PLFA analyses of microbial communities associated with PAH-contaminated riverbank sediment. *Microbial Ecology*, 2012, 64 (3) : 680-691.
- [23] Goor M, Vantomme R, Swings J, Gillis M, Kersters K, Deley J. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *Microbiology*, 1986, 132 (8) : 2249-2264.
- [24] Carrera J, Vicent T, Lafuente FJ. Influence of temperature on denitrification of an industrial high-strength

- nitrogen wastewater in a two-sludge system. *Water SA*, 2003, 29 (1) : 11-16.
- [25] Rodriguez-Caballero A, Hallin S, Pahlson C, Odlare M, Dahlquist E. Ammonia oxidizing bacterial community composition and process performance in wastewater treatment plants under low temperature conditions. *Water Science & Technology*, 2012, 66 (2) : 197-204.
- [26] 赵燕. 耐冷氨氮降解菌的分离、鉴定及其在废水处理中的应用研究. 兰州交通大学硕士学位论文, 2013.
- [27] Wang R, Zheng P, Li W, Chen H, Chen T. Identification and function test of an alkali-tolerant denitrifying bacterium. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (4) : 372-378. (in Chinese)
王茹, 郑平, 厉巍, 陈慧, 陈婷婷. 耐碱反硝化菌株的分离鉴定和功能检测. 微生物学报, 2013, 53 (4) : 372-378.
- [28] Guo LY, Chen QK, Fang F, Hu ZX, Wu J, Miao AJ, Xiao L, Chen XF, Yang LY. Application potential of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier for nitrate and ammonium removal of eutrophic lake water. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 45-51.
- [29] Wong BT, Lee DJ. *Pseudomonas yangmingensis* sp. nov., an alkaliphilic denitrifying species isolated from a hot spring. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 117 (1) : 71-74.
- [30] Guo Y, Zhou XM, Li YG, Li K, Wang CX, Liu JF, Yan DJ, Liu YL, Yang DH, Xing JM. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis*. *Biotechnology Letters*, 2013, 35 (12) : 2045-2049.
- [31] Ji B, Wang HY, Yang K. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O₂ concentrations. *Biotechnology Letters*, 2014, 36 (4) : 719-722.
- [32] Huang XF, Li WG, Zhang DY, Qin W. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 44-50.
- [33] Zheng Hy, Liu Y, Sun GD, Gao XY, Zheng QL, Liu ZP. Denitrification characteristics of a marine origin psychrophilic aerobic denitrifying bacterium. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23 (11) : 1888-1893.
- [34] Bonin P, Tamburini C, Michotey V. Determination of the bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. *Water Research*, 2002, 36 (3) : 722-732.
- [35] Yu A, Li Y, Yu J. Denitrification of a newly isolated *Bacillus* strain W2 and its application in aquaculture. *Journal of Microbiology*, 2005, 25 (3) : 77-81. (in Chinese)
于爱茸, 李尤, 俞吉安. 一株耐氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性研究. 微生物学杂志, 2005, 25 (3) : 77-81.
- [36] Fu LJ, Guo DZ, Shi CL, Huang W. Effect of carbon source and C/N ratio on heterotrophic denitrification of pure culture. *Rural Ecological Environment*, 2005, 21 (2) : 42-45. (in Chinese)
傅利剑, 郭丹钊, 史春龙, 黄为一. 碳源及碳氮比对异养反硝化微生物异养反硝化作用的影响. 农村生态环境, 2005, 21 (2) : 42-45.
- [37] Hu Z, Lee J W, Chandran K, Kim S, Khanal SK. Nitrous oxide (N₂O) emission from aquaculture: a review. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46 (12) : 6470-6480.
- [38] Kim SW, Miyahara M, Fushinobu S, Wakagi T, Shoun H. Nitrous oxide emission from nitrifying activated sludge dependent on denitrification by ammonia-oxidizing bacteria. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (11) : 3958-3963.

Identification and characterization of a hypothermia nitrite bacterium *Pseudomonas tolaasii* Y-11

Tengxia He, Yi Xu, Zhenlun Li*

Chongqing Key Laboratory of Soil Multiscale Interfacial Process, College of Resources and Environments, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: [Objective] Denitrifying bacteria play an important role in the biological nitrogen removal process. However, there are few studies about hypothermia nitrite denitrifying bacteria. We isolated a hypothermia and aerobic nitrite-denitrifying bacterium (named as Y-11) from the long-term flooded paddy soil. Aims of this paper were to clarify the phylogeny and denitrifying characteristics of strain Y-11. [Methods] Morphological observation, specific phospholipid fatty acid and 16S rRNA analysis were employed to identify strain Y-11. Denitrification characteristics of strain Y-11, such as temperature, shaking speed, initial pH and carbon source were investigated by using shaking culture in Erlenmeyer flask. [Results] Strain Y-11 with high removal efficiency of nitrite and total nitrogen was identified as *Pseudomonas tolaasii*. The optimum conditions of Y-11 effectively removing nitrite nitrogen and total nitrogen were: initial pH 7.0; 15 °C; shaking speed 200 r/min; inoculum size 1.5×10^8 CFU per 100 mL medium; sodium acetate as carbon source; and nitrite nitrogen 10 mg/L. Strain Y-11 can remove nitrite nitrogen and total nitrogen up to 100% and 61.28% within 48 h. [Conclusion] Strain Y-11 was identified as *Pseudomonas tolaasii* with its potential nitrite polluted water treatment during early winter and late spring.

Keywords: nitrite denitrifying bacterium, hypothermia, isolation and identification, *Pseudomonas tolaasii*

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the National Key Program for Technology Research and Development of China Plan Grant (2013BAJ11B03)

* Corresponding author. E-mail: lizhlun4740@sina.com

Received: 16 December 2014/Revised: 1 February 2015