



分离于河口区芦苇湿地1株好氧反硝化菌的鉴定及其反硝化特性

陈玲¹, 白洁^{1,2}, 赵阳国^{1,2}, 田伟君^{1,2}, 张颖¹, 党佳佳¹, 李岿然^{3*}

¹ 中国海洋大学环境科学与工程学院, 青岛 山东 266100

² 中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 青岛 山东 266100

³ 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 山东 266100

摘要: 【目的】筛选高效脱氮且N₂O释放量少的好氧反硝化细菌, 并对菌株的反硝化特性进行研究, 可为河口湿地富营养化水体的生物修复提供技术支撑。【方法】经BTB培养基初筛和反硝化能力测定, 从辽河河口区芦苇湿地土壤中分离得到1株具有较高反硝化能力的好氧反硝化菌C3。经形态观察、生理生化鉴定和16S rRNA序列分析, 对菌株进行鉴定。研究温度、碳源、pH及C/N对其生长量、反硝化能力及N₂O释放的影响。【结果】筛选得到的高效好氧反硝化细菌C3, 经鉴定属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。反硝化特性研究结果表明, 该菌最适碳源为柠檬酸三钠, 在温度为30 °C、pH为7.0、C/N为10时生长速率和脱氮效率最高且N₂O释放量较少。在此条件下, 该菌在36 h内使NO₃⁻由179.55 mg/L降至5.08 mg/L, 脱氮率高达97.17%。该菌株在整个反硝化过程中中间产物N₂O的最大累积量较低, 为0.22 mg/L。【结论】从湿地土壤中分离所得好氧反硝化菌C3为假单胞菌属的1个种(*Pseudomonas* sp.), 该菌株在高效除氮和低N₂O累积方面均具有明显优势, 对后续河口湿地富营养化水体治理具有重要意义。

关键词: 河口湿地, 好氧反硝化细菌, 反硝化能力, N₂O, 假单胞菌属

生物脱氮由于其效率高、成本低而被广泛采用, 也是目前最有效的脱氮途径。传统的生物脱氮包括硝化作用与反硝化作用两个独立过程。在有氧的条件下, 分子氧比硝酸盐氮或亚硝酸盐氮更容易成为电子受体, 从而抑制反硝化的发生^[1], 因此, 在好氧条件下进行硝化作用时, 只有在厌

氧条件下才能发生的反硝化作用受到抑制, 对好氧条件下的生物脱氮效果产生严重影响。

好氧反硝化菌(aerobic denitrifier)是一类在有氧条件下利用周质硝酸盐还原酶(Periplasmic nitrate reductase)等好氧反硝化酶进行脱氮反应的异养微生物, 其分布广泛, 可适应多种生境, 多为好

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2013ZX07202-007)

*通信作者。Tel: +86-532-82031853; E-mail: likr@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-11-09; 修回日期: 2016-01-16; 网络出版日期: 2016-02-17

氧或兼性好氧^[2]。与传统的厌氧反硝化作用相比, 新型的好氧反硝化作用具有以下优点: (1) 可以同时进行硝化与反硝化作用; (2) 产碱的好氧反硝化作用可以中和产酸的硝化作用, 这将减少受pH控制的化学物质的累积, 并降低处理这类物质的成本; (3) 好氧反硝化细菌更易控制。好氧反硝化细菌的发现打破了传统观念的限制, 好氧反硝化作为一种新型生物脱氮技术, 可成功克服由于不同的氧气浓度要求而导致无法同时进行硝化与反硝化作用, 为生物脱氮提供了新的途径, 近年来受到广泛关注。对于好氧反硝化细菌的研究始于20世纪80年代, Robertson和Kuene第一次从除硫和反硝化处理系统中分离出好氧反硝化菌 *Paracoccus pantotropha*, *Pseudomonas* sp. 和 *Alcaligenes faecalis*^[3]。此后人们在各种不同的环境下诸如土壤、沟渠、池塘、沉积物和活性污泥等分离出了好氧反硝化菌^[4-6], 但在北方河口区芦苇湿地土壤中的研究还鲜有报道。

本研究从辽河河口区芦苇湿地土壤中筛选出6株具有好氧反硝化能力的菌株, 对其中生物活性和反硝化能力最强的C3菌株进行16S rRNA鉴定, 对其生长能力和脱氮效率的影响因素进行了研究, 并分析了其反硝化过程N₂O的释放量。本研究可为河口湿地富营养化水体的生物修复提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 样品来源

土壤样品取自辽宁省盘锦市境内的辽河河口区芦苇湿地, 样品采集后装入无菌封口袋内, 带回实验室立即进行筛选分离。

1.2 菌株的分离与纯化

分别采用DM (反硝化)基础培养基、BTB (溴甲基酚蓝)培养基、LB (液体)培养基进行菌株的筛选、分离和纯化^[7]。

1.3 细菌形态与生理生化鉴定

采用扫描电子显微镜(JEOL 7500F型)结合革兰氏染色观察细菌形态和染色特性, 细菌的生理生化鉴定根据文献[8]进行。

1.4 16S rRNA 序列测定和同源性比较

利用离心柱型DNA提取试剂盒提取细菌基因组DNA, 并以此为模板采用16S rRNA的通用引物进行PCR扩增。其中, 上游引物(27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物(1492R): 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR反应体系(50 μL): 10×Buffer 5.0 μL, dNTPs 4.0 μL, 上游引物和下游引物各1.0 μL, 重蒸水38 μL, 离心混匀后加入DNA模板0.5 μL, *Taq*酶0.5 μL。PCR程序如下: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 25个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳(1×TAE电泳缓冲液, 1%凝胶)分析PCR结果。PCR产物的纯化和测序由哈尔滨博仕生物测序公司完成。

将测序得到的16S rRNA序列经BLAST分析, 与GenBank中的核酸序列进行同源性对比, 利用BIOEDIT 7.0和MEGA 4.0等软件, 采用邻位加入法(Neighbor-Joining)绘制16S rRNA系统发育树, 进化树分枝稳定性用Bootstrap分析, 重复1000次。

1.5 环境因素对细菌生长和反硝化能力的影响实验

将分离得到的单菌落接种于LB培养基中, 30 °C、150 r/min振荡培养12 h后, 按10%接种量接入DM液体培养基中。在不同碳源、温度、初始pH和C/N条件下, 将培养基于150 r/min摇床培养24 h后, 研究其菌体生长量、反硝化能力及N₂O释放量。

1.6 好氧反硝化活性测定

取处于对数生长期的活化培养液接种到以NaNO₃为唯一氮源的DM液体培养基中, 菌株

C3在30 °C、150 r/min条件下培养，每隔3 h取样，测定DM培养液中的 OD_{600} 、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N的变化。

1.7 N_2O 释放量测定

反硝化中间产物 N_2O 释放量的测定参照张玉等^[9]的方法。定期采集培养体系的气体，用GC-14C气相色谱仪测定 N_2O 含量。色谱条件：进样口温度85 °C，柱温50 °C，ECD检测器温度为300 °C^[9]。

1.8 其它环境因子的测定

NO_3^- -N：紫外分光光度法； NO_2^- -N：N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法；细菌生长量：吸光度法；pH值的测定采用Multi 3430型pH计。

每个实验均设计3次重复，所有样品均测定3个平行样，结果取平均值。

1.9 数据分析

利用单因素方差分析(One-way ANOVA)处理所得数据差异的显著性，采用SPSS 19.0软件进行，以 $P < 0.05$ 视为差异显著。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离与筛选

依据Takaya等^[10]建立的有氧反硝化菌平板分离方法对细菌进行初筛，得到13个使BTB培养基变蓝的单菌落。对筛选、纯化得到的菌株进行硝酸盐还原实验，依据 NO_3^- -N的去除率，复筛得到6株具有反硝化能力的菌株。挑选其中反硝化能力最强的菌株作为研究对象，编号为C3。

2.2 菌株C3的鉴定

2.2.1 形态学特征：菌株C3为革兰氏阴性杆菌，大小为(0.48–0.57) μm × (1.15–1.70) μm ，菌体无鞭毛，无芽孢；形成的菌落表面光滑，呈圆形，边缘规则，不透明，在BTB培养基培养2 d后呈深蓝色，在DM培养基上呈淡黄色。

2.2.2 生理生化鉴定：菌株C3的主要生理生化特性为：好氧，能够利用葡萄糖、麦芽糖和乳糖等产酸，并具有还原硝酸盐的能力，具体生理生化试验结果见表1。

表1. 菌株C3的生理生化特性

Table 1. The physiological and biochemical characteristics of strain C3

Physiological and biochemical reactions	The reaction results	Physiological and biochemical reactions	The reaction results
Glucose	+	Lysine decarboxylase activity	+
Maltose	+	Ornithine decarboxylase activity	+
Lactose	+	Arginine decarboxylase activity	+
Xylose	+	DNA enzyme activity	+
Starch hydrolysis	+	Catalase test	+
Oxidase activity	+	Tartrate utilization test	–
Acetamide utilization test	+	Methyl red utilization test	–
Citrate utilization test	+	Cellulose	–
Nitrate reduction test	+	Fructose	–
Nitrite reduction test	+	Indole production	–
Urease activity	–	Phenylalanine deaminase activity	–
Arginine dihydrolase activity	–	Gelatin liquefaction test	–
Phosphatase activity	–	H_2S production	–
Lipase activity	–	Ethanol oxidation test	–
Tryptophan deaminase activity	–	Syntrophic acetate oxidation test	–

The symbol “+” means positive or can be used, “–” means negative or can not be used.

该菌在0%–25%的NaCl培养基中能够生长, 当培养基的盐度 > 25‰时, 菌株无法正常生长。

2.2.3 16S rRNA序列和系统发育分析: 菌株C3的16S rRNA序列在GenBank的序列登录号为KT983814。将该序列利用BLAST与数据库中的基因序列比较, 构建系统发育树(图1)。从发育树上可以看出, 菌株C3与多株*Pseudomonas* sp.的16S rRNA序列具有99%同源性。结合菌株的形态学、生理生化特性及16S rRNA序列比对结果, 鉴定菌株C3属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

2.3 不同环境因素对菌株C3的生长、反硝化能力及N₂O释放的影响

2.3.1 温度: 本实验分别设置菌株培养温度为20、23、25、30、32、35、40 °C, 将处于对数生长期的菌株接种到以柠檬酸三钠为唯一碳源的培养基中, 起始pH为6.5, C/N值为10, 探讨不同温度下菌株的生长情况与反硝化能力, 结果如图2所示。

由图2-A可见, 菌株C3在温度20–35 °C的范围内均能明显生长, 在30 °C时迅速进入对数生长

期, 且生长最为良好。结合图2-B可见, 随着温度的上升, 细菌的生长量和脱氮率均呈现上升趋势, 当培养温度为30 °C时, 该菌转化NO₃⁻-N的能力最强, 脱氮率可达到95.69%, 之后温度继续上升, 生长率和脱氮率均呈现下降趋势。当培养温度分别为20 °C和40 °C时, 菌株C3生长极为缓慢, 脱氮率仅为29.32%和32.36%。

不同温度下菌株C3的N₂O释放量见表2。温度主要是通过影响微生物代谢及相关反应中酶的活性等影响N₂O释放。在一定的温度范围内, 环境温度的升高会促进N₂O的产生与释放^[11]。由表2可见, 当培养温度为25 °C和30 °C时, N₂O释放虽略高于其它温度组, 但二者相差不大, 综合考虑该菌的生长及反硝化能力, 确定菌株C3生长和反硝化的最适温度应在30 °C左右。

2.3.2 碳源: 有机碳作为提供能源和电子供体的物质^[12], 是影响细菌生长和反硝化过程的重要因素之一。NO₃⁻-N被反硝化细菌还原的过程, 除了被菌体生长所利用及完成呼吸作用外, 还在反硝

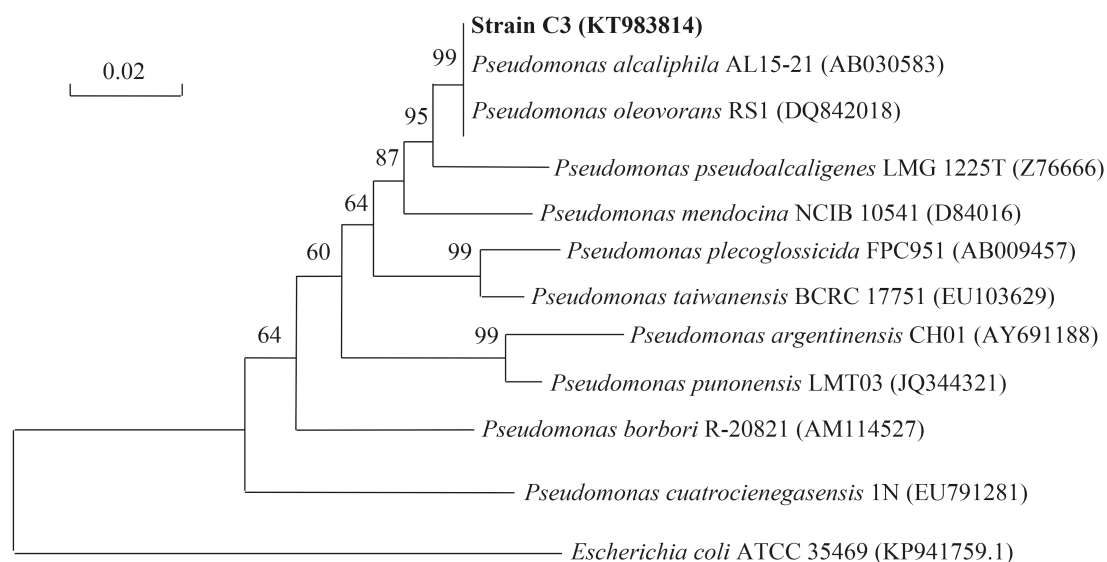


图 1. 基于16S rRNA的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence homology. The numbers at each node that indicate the percentage of bootstrap supporting and bootstrap values calculated from 1000 resamplings. The numbers in parentheses after each bacterial name represent the sequences accession number in GenBank. Bar, 0.5% sequence divergence.

化过程中充当硝酸盐和亚硝酸盐中氧原子的电子供体，从而完成反硝化作用^[12]。本实验分别以柠檬酸钠、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、丁二酸

钠、乙酸钠及酒石酸钾钠为碳源，将菌株接入起始pH为6.5、C/N为10的培养基中，30 °C条件下培养，研究不同碳源条件下菌株C3的生长情况及反硝化能力，结果见图3。

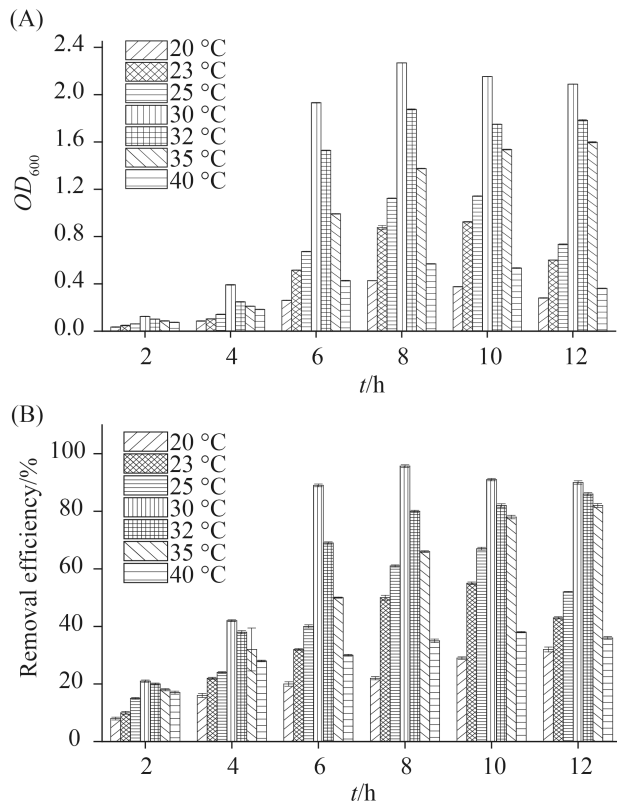


图 2. 不同温度对菌株C3生长(A)及反硝化能力(B)的影响(±SD)

Figure 2. Influence of different temperature on the growth (A) and denitrifying ability (B) of strain C3. Data are expressed as mean values ±SD.

由图3可以看出，菌株C3在以柠檬酸钠为唯一碳源的培养基中生长量最大，且对NO₃⁻-N的去除率最高，在8 h时可达到98.24%。葡萄糖、蔗糖和麦芽糖次之，脱氮率分别为90.14%、85.89%、83.75%。再次为乳糖、丁二酸钠和乙酸钠，最高脱氮率只有30%–40%，且细菌生长明显较为缓慢。当以酒石酸钾钠为碳源时，细菌几乎不生长，对NO₃⁻-N的去除率最低，仅有12.11%。碳源对菌株C3的反硝化能力和生长量的影响情况极为相似，说明碳源作为必须能源和电子供体，是通过影响细菌的生长从而影响其反硝化能力。

不同碳源下菌株C3的N₂O释放量见表3。可以看出，当碳源分别为柠檬酸钠、葡萄糖及蔗糖时，N₂O释放量均较低，最大释放量均未超过0.3 mg/L。而分别以乙酸钠和酒石酸钾钠为碳源时，N₂O释放量相对较高。考虑到菌株C3在以柠檬酸三钠为唯一碳源的培养基中生长最好、脱氮率最高、N₂O释放量较少，且柠檬酸三钠成本较低，故以下实验均选用柠檬酸三钠作为碳源。

2.3.3 初始pH: 环境中的pH值对微生物的生命活

表2. 不同温度下菌株C3的N₂O释放量 (mg/L)

Table 2. Nitrous oxide production of strain C3 in different temperature (mg/L)

t/h	T/ °C						
	20	23	25	30	32	35	40
2	0.04	0.06	0.09	0.08	0.06	0.05	0.03
4	0.07	0.09	0.13	0.12	0.13	0.08	0.06
6	0.13	0.18	0.16	0.17	0.18	0.14	0.11
8	0.18	0.20	0.20	0.21	0.16	0.19	0.15
10	0.17	0.22	0.25	0.22	0.15	0.15	0.17
12	0.14	0.17	0.19	0.20	0.11	0.10	0.07

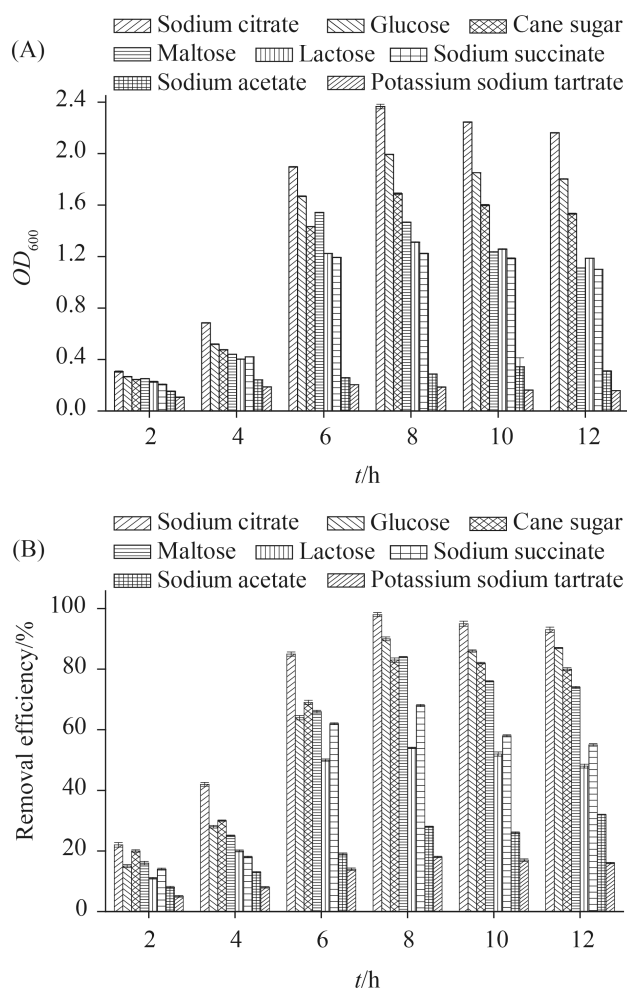


图 3. 不同碳源对菌株C3生长(A)及反硝化能力(B)的影响(±SD)

Figure 3. Influence of different carbon source on the growth (A) and denitrifying ability (B) of strain C3. Data are expressed as mean values ±SD.

动影响很大, 主要在于其引起细胞膜的电荷变化, 从而影响微生物对营养物质的吸收^[13]。本研究通过调整培养基的初始pH值(5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5和9.0), 等量接种对数生长期的细菌, 以柠檬酸三钠为碳源, C/N为10, 在30 °C条件下培养, 探讨pH值对菌株C3的生长情况及反硝化能力的影响, 结果如图4所示。

由图4-A可知, 在培养基pH为5.0–8.5的范围内, 菌株C3均能生长。由于反硝化过程是一个不断产碱的过程, pH会逐渐上升, 这对细菌的生长造成了极大的影响^[10,14–15]。当起始pH为6.0–7.0时, 菌株C3的生长量能够在短时间内达到较高水平, 当起始pH超过8.0时, 培养基中开始产生不同程度的沉淀, 导致细菌的生长明显受到抑制; 而当起始pH为9.0时, 菌株C3几乎不生长, 故起始pH过高不利于该菌株进行正常的生长代谢。由图4-B可知, 当pH为6.5和7.0时, 菌株C3的脱氮效率最高, 在12 h内的脱氮率分别为99.03%和99.31%。起始pH为6.5或7.5时, 脱氮率也基本上达到了90%左右。该菌在强碱性(pH > 8.0)条件下, 脱氮效果明显下降, 尤其是在pH为9.0时几乎不再脱氮。

由表4可见, 当培养基起始pH为6.0–7.0时, N₂O释放量较少, 而当pH低于5.0和高于7.5后

表3. 不同碳源下菌株C3的N₂O释放量 (mg/L)

Table 3. Nitrous oxide production of strain C3 in different carbon source (mg/L)

t/h	Carbon source							
	Sodium citrate	Glucose	Cane sugar	Maltose	Lactose	Sodium succinate	Sodium acetate	Potassium sodium tartrate
2	0.03	0.05	0.09	0.11	0.08	0.12	0.17	0.22
4	0.12	0.15	0.13	0.20	0.14	0.25	0.29	0.45
6	0.18	0.17	0.24	0.37	0.28	0.45	0.51	0.62
8	0.22	0.20	0.29	0.46	0.33	0.65	0.58	0.81
10	0.29	0.23	0.28	0.55	0.35	0.51	0.68	0.69
12	0.24	0.18	0.26	0.51	0.36	0.44	0.59	0.62

N_2O 释放量显著增加,这可能是由于 nosZ 基因表达与 N_2O 还原酶受到抑制^[16],因此中性和微酸性环境有利于该菌的生长及反硝化作用。

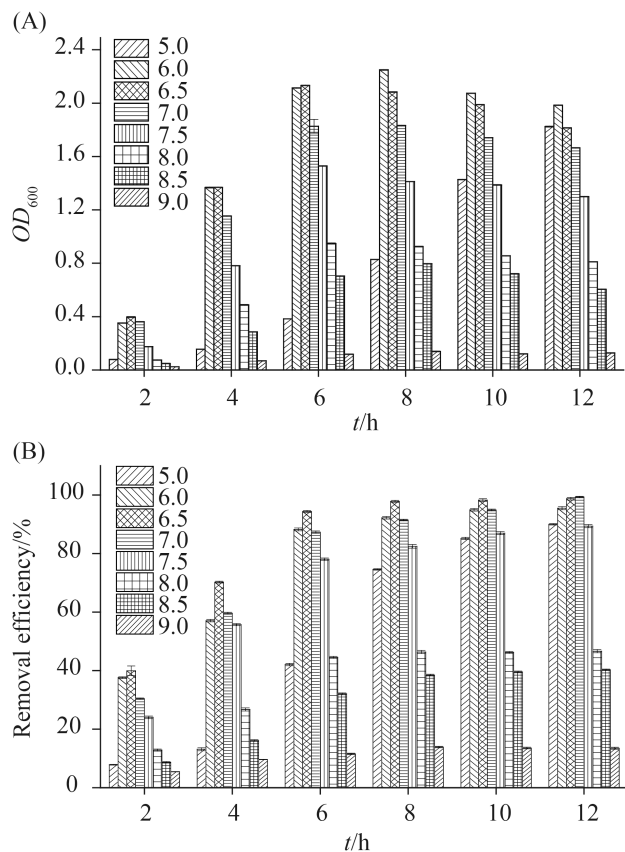


图 4. 不同起始pH对菌株C3生长(A)及反硝化能力(B)的影响(\pm SD)

Figure 4. Influence of different initial pH on the growth (A) and denitrifying ability (B) of strain C3. Data are expressed as mean values \pm SD.

2.3.4 C/N: 本研究以柠檬酸三钠为碳源,浓度(TOC)为660 mg/L,通过调节培养液中的硝态氮浓度改变C/N,使C/N值分别为1、5、10、15及20,在30 °C、起始pH为6.5的条件下培养,研究C/N值对菌株C3生长和反硝化能力的影响,结果见图5。

从图5可以看出,当培养基的碳源不足($\text{C/N} < 5$)时,该菌的 OD_{600} 值很小,脱氮率相对较低(9%–13%)。当C/N值达到10时,菌株C3迅速进入对数生长期,细菌生长量达到最大值,之后趋于稳定, NO_3^- -N的去除率明显增加,12 h内最大脱氮率可达到99.22%。当 $\text{C/N} > 10$ 时,该菌的脱氮率下降。因此,从该菌反硝化能力考虑,该菌培养的最佳C/N值应为10。

不同C/N下菌株C3的 N_2O 释放量见表5。在5种C/N值不同的培养基中,C/N值为1时,菌株C3的 N_2O 释放量最高,最大释放量超过0.5 mg/L。继续增大C/N值至15–20, N_2O 释放量与C/N值为5–10时无明显差异,结合菌株C3的生长与反硝化能力等因素,故该菌生长及反硝化作用的最适C/N值应为10。

2.4 最适条件下菌株C3的脱氮效率及 N_2O 释放量

由于反硝化细菌对 NO_3^- -N的去除过程包括生长利用及还原作用^[13],培养液在初始阶段消耗的 NO_3^- -N主要供菌体代谢所需,之后细菌的生长代谢过程与硝酸盐还原作用同时进行。从图6-A可

表4. 不同起始pH下菌株C3的 N_2O 释放量 (mg/L)

Table 4. Nitrous oxide production of strain C3 in different initial pH (mg/L)

t/h	Initial pH							
	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
2	0.09	0.04	0.06	0.07	0.13	0.16	0.19	0.22
4	0.17	0.08	0.11	0.10	0.19	0.23	0.29	0.32
6	0.26	0.14	0.17	0.15	0.28	0.38	0.41	0.40
8	0.30	0.20	0.23	0.21	0.33	0.55	0.47	0.55
10	0.33	0.17	0.20	0.24	0.46	0.50	0.55	0.67
12	0.38	0.11	0.15	0.20	0.44	0.48	0.62	0.69

见, 菌株C3在最适培养条件下可在短时间内进入对数生长期, 并进行反硝化作用。在以 NaNO_3 为唯一氮源的培养基中, 随着细菌的快速增殖,

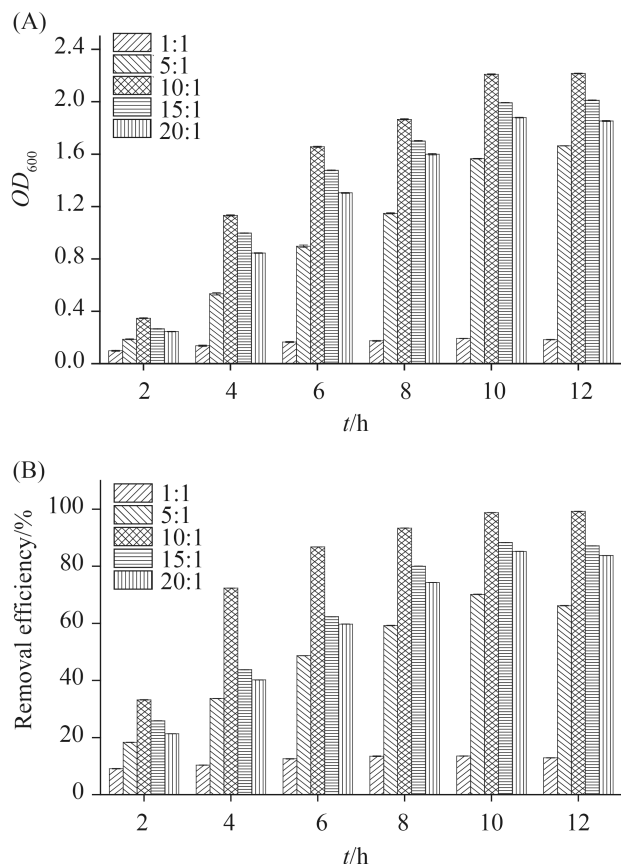


图 5. 不同C/N对菌株C3生长(A)及反硝化能力(B)的影响(\pm SD)

Figure 5. Influence of different C/N ratio on the growth (A) and denitrifying ability (B) of strain C3. Data are expressed as mean values \pm SD.

表5. 不同C/N下菌株C3的 N_2O 释放量(mg/L)

Table 5. Nitrous oxide production of strain C3 in different C/N ratio (mg/L)

t/h	C/N				
	1 : 1	5 : 1	10 : 1	15 : 1	20 : 1
2	0.14	0.08	0.05	0.10	0.09
4	0.22	0.11	0.09	0.18	0.16
6	0.29	0.18	0.14	0.26	0.25
8	0.42	0.26	0.21	0.33	0.28
10	0.58	0.31	0.26	0.30	0.30
12	0.51	0.25	0.28	0.28	0.27

NO_3^- -N的浓度迅速下降。在36 h内, NO_3^- 浓度从179.55 mg/L下降到5.08 mg/L, 脱氮率可达到97.17%, 说明菌株C3具有较强的反硝化能力。

该菌株C3在反硝化过程中出现了亚硝酸盐的累积现象, 在12 h内达到最大累积量6.83 mg/L, 但该菌株在培养末期亚硝酸盐已被大量消耗, 含量为2.24 mg/L。亚硝酸盐的积累过程可能是由于菌体内硝酸盐还原酶的作用, 致使硝酸盐转化为亚硝酸盐。而亚硝酸盐的存在又会诱导菌株在亚硝酸盐还原酶和氮氧化物还原酶的作用下, 将亚硝酸盐还原为 N_2O , 最终将硝酸盐完全转化为 N_2 , 这与王弘宇等^[17]的研究结论基本一致。

由图6-B所示, 培养体系中 N_2O 浓度在12 h达到最大值0.22 mg/L。前12 h内 N_2O 浓度上升可能与培养环境中亚硝酸盐的升高有关。随着硝酸盐和亚硝酸盐的不断消耗, N_2O 浓度迅速降低, 36 h时含量仅为0.02 mg/L。整个反硝化过程中 N_2O 的释放量较低, 说明菌株C3在进行反硝化作用时对温室效应的贡献较低。

3 讨论

好氧反硝化细菌在自然界中广泛存在, 不同菌株的生长及反硝化的最适条件存在差异, 反硝化作用的最适宜温度范围为25–35 °C^[18], 本研究中菌株C3在30 °C时脱氮率最高的结果与此一致。

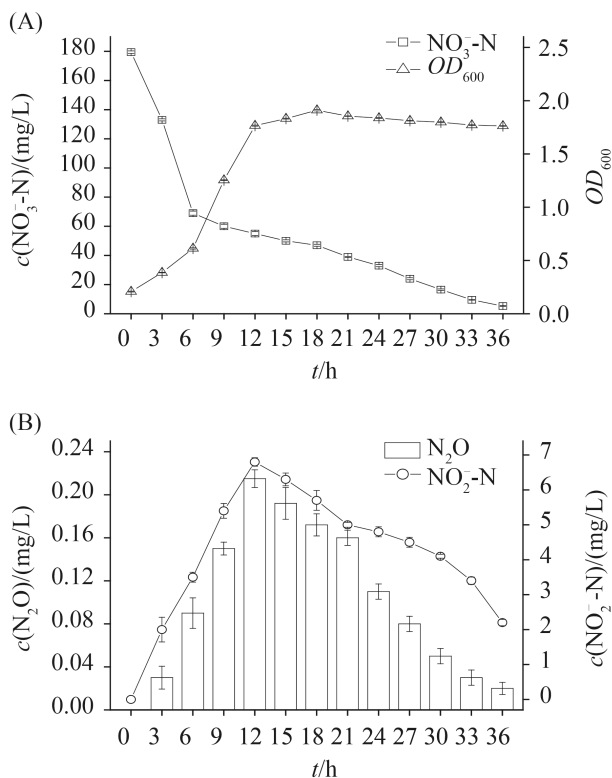


图 6. 菌株C3的好氧反硝化过程(\pm SD)

Figure 6. Aerobic denitrification process of strain C3. Data are expressed as mean values \pm SD. A: growth and removal of nitrate nitrogen; B: nitrous oxide and nitrite nitrogen accumulation.

据文献报道, 碳源的化学结构和分子量对脱氮效率的影响很大^[12,19], 细菌能够更好利用化学结构简单、分子量小的碳源。但在本研究中, 菌株C3以柠檬酸钠、葡萄糖为碳源时生长最好、脱氮效率最高, 而以化学结构简单、分子量较小的丁二酸钠和乙酸钠为碳源时脱氮率较低, 说明该菌对碳源的利用与碳源化学结构及分子量的关系不密切, 可见不同种类的细菌对碳源的利用特性存在差异。

Timmermans等^[20]研究表明, 细菌生长及反硝化酶活性的最适pH是中性或微碱性, pH值过高或过低均会对细菌生长及反硝化能力产生影响, 反硝化酶的活性降低和微生物对营养物质的吸收受到抑制而使细菌转化 NO_3^--N 的能力下降, 本研究

中培养基碱性过高时菌株C3的反硝化能力显著下降可能与此有关。

Roberson等^[21]研究证实, 当C/N值在一定的范围内, 培养基的有机碳浓度越高, 其脱氮效率越高^[21]。本研究结果表明, 培养基的C/N值为10时, 菌株C3长势较好且反硝化能力较强。当培养基中C/N值较小时, 因电子流数量不足, 从而无法为细菌生长提供足够的能源, 相应地脱氮效率亦会下降; 但在一定范围内, 向培养基提供碳源的量高于细菌的需求时, 供给菌体生长和反硝化作用的能量充足, 细菌的生长量和反硝化活性均能达到稳定水平。可见, 碳源的量对细菌的生长代谢和反硝化能力起着重要的作用。

N_2O 是一种重要的温室气体, 其具有增温潜能大、滞留大气时间长和破坏臭氧层等环境特征。筛选脱氮效率高且 N_2O 释放量少的好氧反硝化细菌可为河口湿地氮的去除提供新的途径。近几年来已分离出大量的好氧反硝化细菌, 但对好氧反硝化过程中产生 N_2O 的研究并不多, 部分报道^[22-23]中好氧反硝化细菌产生的 N_2O 均高于本研究的菌株C3, 故该菌株在高效脱氮率和低 N_2O 产量方面明显优于其它已报道的好氧反硝化细菌。

已有研究发现, N_2O 还原酶与亚硝酸盐还原酶对电子的竞争和游离亚硝酸盐(FNA)对 N_2O 还原酶的抑制会引起 N_2O 比还原速率下降, 致使反硝化过程中 N_2O 累积^[24-27]。本研究中随着 NO_2^--N 浓度的增加, N_2O 的累积量有所增加可能与此有关。

本研究从辽河口芦苇湿地土壤中筛选所得的菌株C3具有生长代谢快、反硝化能力强、 N_2O 释放量少等特点, 明显优于其他好氧反硝化细菌, 因此该菌株可以作为净化湿地水质的优质候选菌株。

参考文献

- [1] Tavares P, Pereira AS, Moura JJG, Moura I. Metalloenzymes of the denitrification pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, 100(12): 2087-2100.

- [2] Ding W, Zhu L, Xu J, Feng LJ, Xu XY. Progress of researches on aerobic denitrifiers and their application in bioremediation. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(6): 923–929. (in Chinese)
丁炜, 朱亮, 徐京, 冯丽娟, 徐向阳. 好氧反硝化菌及其在生物处理与修复中的应用研究进展. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(6): 923–929.
- [3] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*, 1984, 139(4): 351–354.
- [4] Patureau D, Bernet N, Delgenès JP, Moletta R. Effect of dissolved oxygen and carbon-nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium. *Applied of Microbiology Biotechnology*, 2000, 54(4): 535–542.
- [5] Su JJ, Liu BY, Liu CY. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90(3): 457–462.
- [6] Okada N, Nomura N, Kambe T, Uchiyama H. Characterization of the aerobic denitrification in *Mesorhizobium* sp. strain NH-14 in comparison with that in related rhizobia. *Microbes and Environments*, 2005, 20(4): 208–215.
- [7] Li WF, Fu LQ, Deng B, Chen NN, Zhou XX. Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier. *Environmental Science*, 2011, 32(8): 2403–2408. (in Chinese)
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*, 2011, 32(8): 2403–2408.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 370–386, 390–391.
- [9] Zhang PY, Qu Y, Yu DS, Du SS, Yang RX. Comparison of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification system by strain qy37 and its accelerating removal characteristic of NH_4^+ -N. *Environmental Science*, 2010, 31(8): 1819–1826. (in Chinese)
张培玉, 曲洋, 于德爽, 郭沙沙, 杨瑞霞. 菌株qy37的异养硝化/好氧反硝化机制比较及氨氮加速降解特性研究. *环境科学*, 2010, 31(8): 1819–1826.
- [10] Takaya N, Catalan-Sakairi MAB, Sakaguchi Y, Kato I, Zhou ZM, Shoun H. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3152–3157.
- [11] 尧波. 鄱阳湖典型湿地氧化亚氮释放特征. 南昌: 江西师范大学硕士学位论文, 2014.
- [12] Xiu HF, Zhu ZY, Ding AZ, Zheng L, Zhao X. Isolation and identification of the aerobic denitrifying strain DF2 and its physiological and biochemical analysis. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(8): 1307–1314. (in Chinese)
修海峰, 朱仲元, 丁爱中, 郑蕾, 赵轩. 好氧反硝化菌种DF2的分离鉴定及生理生化特性分析. *生态环境学报*, 2011, 20(8): 1307–1314.
- [13] Yang XL, Li WM, Chen Y, Cao YS. 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.
- [14] Yang JX, Gao SS, Ma F, Su JF, Wang Q. Identification and phylogenetic analysis of an isolated aerobic denitrifier. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(7): 1302–1307. (in Chinese)
杨基先, 高珊珊, 马放, 苏俊峰, 王强. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化能力. *环境科学学报*, 2008, 28(7): 1302–1307.
- [15] Liu Y, Gan L, Huang ZQ, Chen ZL, Cheng Y, Lin C. Study on denitrification characteristics of paracoccus YF1. *Technology of Water Treatment*, 2010, 36(10): 61–65. (in Chinese)
刘燕, 甘莉, 黄哲强, 陈祖亮, 程迎, 林晨. 脱氮副球菌YF1目的反硝化特性研究. *水处理技术*, 2010, 36(10): 61–65.
- [16] Zheng MS, He D, Ma T, Chen Q, Liu ST, Ahmad M, Gui MY, Ni GR. Reducing NO and N_2O emission during aerobic denitrification by newly isolated *Pseudomonas stutzeri* PCN-1. *Bioresource Technology*, 2014, 162(6): 80–88.
- [17] Wang HY, Ma F, Su JF, Zuo W, Zhang XX, Zhang J. Identification and characterization of a bacterial strain C3 capable of aerobic denitrification. *Environmental Science*, 2007, 28(7): 1548–1552. (in Chinese)
王弘宇, 马放, 苏俊峰, 左薇, 张献旭, 张佳. 好氧反硝化菌株的鉴定及其反硝化特性研究. *环境科学*, 2007, 28(7): 1548–1552.
- [18] Yan SL, Wen SY, Wang S. Experimental study on

- denitrification in soil. *Journal of Hohai University*, 1998, 26(2): 90–94. (in Chinese)
- 阎胜利, 温淑瑶, 王瑚. 土壤中反硝化作用的试验研究. *河海大学学报*, 1998, 26(2): 90–94.
- [19] Her JJ, Huang JS. Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Bioresource Technology*, 1995, 54(1): 45–51.
- [20] Timmermans P, Van Haute A. Denitrification with methanol: fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp.. *Water Research*, 1983, 17(10): 1249–1255.
- [21] Robertson LA, Kuenen JG. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium. *Microbiology*, 1983, 129(9): 2847–2855.
- [22] Wan CL, Yang X, Lee DJ, Du MA, Wan F, Chen C. Aerobic denitrification by novel isolated strain using NO_2^- -N as nitrogen source. *Bioresource Technology*, 2011, 102(15): 7244–7248.
- [23] Zhang QL, Liu Y, Ai GM, Miao LL, Zheng HY, Liu ZP. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresource Technology*, 2012, 108(3): 35–44.
- [24] Ye L, Pijuan M, Yuan ZG. The effect of free nitrous acid on key anaerobic processes in enhanced biological phosphorus removal systems. *Bioresource Technology*, 2013, 130(17): 382–389.
- [25] Zhang JR, Wang SY, Shang HL, Peng YZ. Production of nitrous oxide from nitrite nitrogen oxidation during nitrification of domestic sewage. *China Water & Wastewater*, 2010, 26(3): 25–29. (in Chinese)
- 张静蓉, 王淑莹, 尚会来, 彭永臻. 硝化过程亚硝态氮氧化阶段的 N_2O 产生情况. *中国给水排水*, 2010, 26(3): 25–29.
- [26] Kampschreur MJ, Temmink H, Kleerebezem R, Jetten MSM, Loosdrecht MCMV. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research*, 2009, 43(17): 4093–4103.
- [27] Wei Y, Wang SY, Ma B, Li XY, He YL, Peng YZ. The effect of nitrite on N_2O reduction during denitrification process using external carbon source. *China Environmental Science*, 2014, 34(7): 1722–1727. (in Chinese)
- 委燕, 王淑莹, 马斌, 李夕耀, 何岳兰, 彭永臻. 亚硝酸盐对外碳源反硝化过程 N_2O 还原的影响. *中国环境科学*, 2014, 34(7): 1722–1727.

Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier in estuary phragmites wetland

Ling Chen¹, Jie Bai^{1,2}, Yangguo Zhao^{1,2}, Weijun Tian^{1,2}, Ying Zhang¹, Jiajia Dang¹, Kuiran Li^{3*}

¹ College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

² The Key Laboratory of Marine Environmental Science and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

³ College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] We isolated an aerobic denitrifier with affinity for nitrogen removing and low accumulation of nitrous oxide, and analyzed its denitrification activity to provide technical support for controlling eutrophic wetland lakes. [Methods] An aerobic denitrifier named C3 was isolated from phragmites wetland soil in Liaohe estuary by BTB medium preliminary screening and denitrification activity analysis. We used morphological and physiological characteristics as well as sequence analysis of the 16S rRNA to identify the strain. Effects of culture conditions, such as temperature, carbon source, initial pH, C/N ratio were evaluated regarding removal of nitrite nitrogen and accumulation of nitrous oxide under aerobic condition. [Results] The highly effective strain C3 was identified as *Pseudomonas* sp., for which the best carbon source was sodium citrate, optimal growth and denitrification occurred at 30 °C, pH 7.0, and a C/N ratio of 10. Under these conditions, the concentration of nitrate was reduced from 179.55 mg/L to 5.08 mg/L by strain C3 in 36 hours, a reduction in NO₃⁻ of more than 97.17%. In the process of denitrification, nitrous oxide as an intermediate accumulated at a level of 0.22 mg/L. [Conclusion] Strain C3, an aerobic denitrifying agent, was isolated from wetland soil and has obvious advantages in efficient removal of nutrients with low accumulation of nitrous oxide, representing a great potential to treat eutrophic wetland lakes.

Keywords: estuary wetland, aerobic denitrifier, denitrifying capacity, nitrous oxide, *Pseudomonas*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Water Pollution Control and Management Technology Projects (2013ZX07202-007)

*Corresponding author. Tel: +86-532-82031853; E-mail: likr@ouc.edu.cn

Received: 9 November 2015; Revised: 16 January 2016; Published online: 17 February 2016