

氮循环菌群的构建鉴定及其脱氮性能研究

肖晶晶¹, 朱昌雄¹, 郭 萍¹, 田云龙¹, 黄亚丽², 于 江¹

(1.中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081; 2.河北省科学院生物研究所, 石家庄 050081)

摘 要:由氨化菌、亚硝化菌、硝化菌和反硝化菌构成的氮循环菌,在代谢过程中可将含氮物质最终转化为无害的氮气释放到空气中,有效地降低水体中氮的浓度。利用从活性污泥、猪粪发酵液、鱼塘水及土壤等多种环境样品中分离得到效果较好的氨化细菌5株、亚硝化细菌4株、硝化细菌4株及反硝化细菌5株,选取不存在拮抗作用的不同氮循环功能的菌株构建菌群,并对其脱氮能力进行测定研究。结果表明,AGIQ和AGMR两个组合的脱氮能力较强,在室内模拟富营养化水样中,4 d内脱氮率分别可以达到80.92%和82.36%,这两个组合不仅能够降低总氮和氨氮浓度,而且不积累亚硝酸盐氮和硝酸盐氮。对效果最好的AGMR组合的4个菌株进行了菌种鉴定,确定分离的菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudocaligenes*)。

关键词:氮污染的富营养化水;氮循环菌;拮抗作用;菌群构建;菌株鉴定

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)12-2680-08

Construction, Identification and Its Denitrogenate Ability of Nitrogen-Cycling Bacterium Functional Group

XIAO Jing-jing¹, ZHU Chang-xiong¹, TIAN Yun-long¹, GUO Ping¹, HUANG Ya-li², YU Jiang¹

(1.Institute of Agricultural Environment and Sustainable Development, CAAS, Beijing 100081, China; 2.Biological Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050081, China)

Abstract: In the past few years, water eutrophication due to high concentration of nitrogen(N) and phosphorous(P) have become increasingly severe and a global problem. Thus, it is immediate to control and remedy N pollution in water environment. Now eutrophic water is restored mostly by artificial environment created by plant. While from the perspective of N cycle, since the nitrogen-cycling bacteria could promote the N cycle and reduce nitrogen concentration in eutrophic water, microbial restoration based on such relevant functional bacteria is a good way to control N. But, there are many nitrogen forms in the eutrophic water and one single microbe hardly transform or removal of all nitrogen. So nitrogen-cycling bacteria functional group that composed of ammonifier, nitrosobacteria, nitrobacteria and denitrifying bacteria, could convert nitrogen-containing material into nitrogen gas through its metabolism process. Five ammonifiers, four nitrosobacteria, four nitrobacteria and five denitrifying bacteria involved in nitrogen cycling were screened from various environmental samples, such as activated sludge, pig manure fermentation liquid, fish pond water and soil. The nitrogen-cycling functional groups were no antagonisms each other. The nitrogen removal abilities were then assessed. And two groups, AGIQ and AGMR, perform better than others with the removal rates of 80.92% and 82.36% within 4 days, respectively. No nitrite or nitrate nitrogen were accumulated in the treated water. The four strains comprising the group AGMR were identified as *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas mendocina*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas Pseudocaligenes*, respectively.

Keywords: eutrophic water; identification; nitrogen-cycling bacteria; antagonism; nitrogen removal ability

对水体氮素污染的治理方法已有很多,其中微生物

脱氮是较为经济和环保的方法。目前研究较多的是单一菌株在降低污染水体氮浓度方面的成效,但单靠一种微生物的降解作用很难实现各种形式氮的完全脱除,并且其在应用于修复过程中易受到环境因素的影响。因此,构建高效混和脱氮菌群,使其可通过代谢过程降低污染水体中氨氮和总氮浓度,而且不积累亚硝酸盐氮和硝酸盐氮,将是一条很有应用前景的途径。

收稿日期:2009-05-22

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研项目,国家水专项受农业面源污染入湖河流污染控制与生态修复技术及工程示范课题(2009ZX07103-002);国家科技支撑(2006BAD17B02)

作者简介:肖晶晶(1982—),女,辽宁人,博士研究生,从事富营养化水体修复的研究。E-mail:jingjls2007@sohu.com

通讯作者:朱昌雄 E-mail:zhucx120@163.com

目前国内关于混菌脱氮方面的报道不多,已有的研究如李正魁^[1-2]等通过固定化氨化菌、自养亚硝化菌、硝化菌和反硝化菌净化富营养化水体氮营养盐。结果表明,其出水水质得到明显改善;李海云^[3]利用自养亚硝酸菌和反硝化菌制成固定化微生物颗粒净化污水,结果表明其对氨氮具有较好的去除作用。以上均采用传统氮循环菌株构建菌群,虽具有较好的效果,但其存在一些缺点,如菌株生长缓慢,容易受外界环境影响,尤其是对毒物冲击非常敏感,对C/N低的废水需外加碳源。并且由于硝化细菌和反硝化细菌生长条件不同,硝化和反硝化过程一般在两个不同的反应器内进行,系统复杂,管理不便。近些年来,氮循环菌中的新型功能菌倍受关注,如异养硝化菌,其具有生长速度快,细菌产量高,要求的溶氧浓度低,并消除了碳源的限制^[4-7],硝化反硝化过程可在同一反应器内完成,各自产生的酸碱能部分相互中和,对氮源和碳源污染均有去除作用^[8-9]。

本研究筛选了异养亚硝化菌和硝化菌,与氨化菌和反硝化菌配合,共同构建不同氮代谢功能的微生物菌群,使在修复过程中能够实现同时硝化反硝化,以期实现混和菌群对多种形式氮的有效脱除。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 富集样品来源

活性污泥,从高碑店污水处理厂二沉池以及硝化段取活性污泥。

养殖场猪粪发酵液、鱼塘水及土壤样品。

1.1.2 培养基

①亚硝化菌培养基,改良的斯蒂芬逊(Stephenson)培养基 A^[10]。

②硝化菌培养基,改良的斯蒂芬逊(Stephenson)培养基 B^[10]。

③反硝化菌培养基配制:葡萄糖 1 g,酒石酸钾钠 10 g, CaCl₂ 0.5 g, KNO₃ 2.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.4~7.6。

④氨化菌培养基配制:蛋白胨 5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

⑤PDA 培养基^[10],用于保存菌种。

⑥模拟富营养化水配制:葡萄糖 169 mg, 蛋白胨 88.88 mg, KCl 63 mg, 无水 CaCl₂ 23 mg, KH₂PO₄ 23 mg, MgSO₄ 23 mg, NaHCO₃ 65 mg, (NH₄)₂SO₄ 37.71 mg, 微量元素 (FeSO₄, MnSO₄, CuSO₄, CoCl₂) 0.2 mg, 蒸馏水

1 000 mL。

1.1.3 试剂

市售分析纯试剂;格利斯试剂和二苯胺试剂的配制见文献[10]。

1.2 方法

1.2.1 富集、分离及初筛方法

将富集样品分别加入到盛有 100 mL 氨化、亚硝化、硝化富集培养基的 250 mL 锥形瓶中,在 28 ℃ 恒温摇床以 180 r·min⁻¹ 进行富集培养(反硝化菌静置培养),每隔 4 d 从培养液中吸出 10 mL 培养液转入到新鲜的富集培养基中,连续富集三次。

在相应的固体选择性培养基上采用稀释涂布平板法分离培养单个菌落(反硝化菌采用夹层平板法),置于 28 ℃ 生化培养箱内培养 3~5 d。挑取具有代表性的单菌株经纯化后接到斜面上,4 ℃ 保存。

1.2.2 菌种复筛

①亚硝化菌的复筛:挑取初筛的亚硝化菌一环,接种于装有 100 mL 亚硝化液体培养液的 250 mL 锥形瓶中,28 ℃、180 r·min⁻¹ 摇床培养 4 d。用格利斯试剂检测,若有亚硝酸盐存在,则呈红色,证明此菌可能有亚硝化作用。再利用化学定量测量的方法测定培养液中氨氮浓度的变化情况^[11],依据培养液氨氮浓度变化大小判定菌株的亚硝化能力强弱^[12]。

②硝化菌的复筛:挑取初筛的硝化菌一环,接种于装有 100 mL 硝化液体培养液的 250 mL 锥形瓶中,28 ℃、180 r·min⁻¹ 摇床培养 4 d。用格利斯试剂测试培养基中亚硝酸消失情况,如不呈红色,则表示亚硝酸盐已完全消失,再用二苯胺试剂检测,若培养液呈蓝色,表示有硝酸盐氮生成,证明此菌有硝化作用。再测定培养液中 NO₂-N 浓度的变化情况^[11],依据培养液亚硝酸盐氮浓度变化大小判定其硝化能力的强弱。

③氨化菌的复筛:挑取初筛的氨化菌一环,接种于装有 100 mL 氨化液体培养液的 250 mL 锥形瓶中,28 ℃、180 r·min⁻¹ 摇床培养 4 d,测定生成氨氮的浓度。由于枯草芽孢杆菌是典型的氨化菌株,将其作为对照,筛选出氨化能力强于对照的菌株。

④反硝化菌的复筛:挑取初筛的反硝化菌接入装有 10 mL 反硝化培养液的试管(内倒置杜氏小管)中,静置培养 4 d 后,观察小管中的产气情况,对产气快和产气量较大的菌株测定 NO₃-N 的浓度变化^[11,13-16]。

1.2.3 菌种鉴定

对以上筛出的用于构建菌群的菌株进行鉴定,参照《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》和《常见细菌系

统鉴定手册》^[17-18],观察细菌的形态学特征和生理生化特征。

对各菌株进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。采用细菌基因组抽提试剂盒(北京全式金生物技术公司)提取菌株的总 DNA,以其为模板,采用细菌通用引物 PB 5'-TACGGCTACCTTGTTCACGACTT-3' 和 PA 5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 分别对菌株总 DNA 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。

PCR 反应体系 50 μL ;10 $\times$ PCR buffer 5 μL ;2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 4 μL ;10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 反向和正向引物各 2 μL ;2.5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 Taq 酶 1 μL ;DNA 2 μL ;ddH₂O 补足至 50 μL 。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 2 μL PCR 产物用 1%(w/v)的琼脂糖凝胶电泳分离,检测其质量和浓度,送到北京三博远至生物技术公司进行测序。测序结果在 Genbank 中采用 BLAST 程序进行同源性检索,利用 Cluastx2.0、MEGA4.0 等相关软件进行系统发育分析,用 NJ 法构建系统发育树^[19]。

1.2.4 拮抗作用试验

采用杯碟法^[20]对筛选得到的功能菌株进行菌株间拮抗性能的测定,将灭菌牛津杯放入涂有某一菌株的 PDA 平板上,杯中加入 200 μL 另一菌株的发酵液,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后观察是否有抑菌圈产生,并测量记录,每个菌株做 3 个重复。

1.2.5 脱氮菌群的构建

利用经过复筛和拮抗性筛选的氮循环菌株为基础菌株,从具有不同功能菌株(包括氨化菌、亚硝化菌、硝化菌和反硝化菌)中各选一株进行组合,将组合的菌株按 1:1:1:1 的比例接种于装有 100 mL 模拟富营养化水样的 250 mL 锥形瓶中,经 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温振荡培养 4 d 后,测定总氮、氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的变化情况。确定具有较好的总氮和氨氮脱

除效果并能够使水体中亚硝酸盐氮和硝酸盐氮维持较低浓度的菌群组合。

1.2.6 脱氮菌群的降解性能研究

将筛选出的优化组合接种到装有 100 mL 的模拟富营养化水样的 250 mL 锥形瓶中(初始氨氮浓度为 8.06 mg $\cdot\text{L}^{-1}$,总氮浓度为 16.93 mg $\cdot\text{L}^{-1}$),培养条件同上,每隔 24 h 取样测定总氮、氨氮、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮浓度。

1.2.7 脱氮菌群修复富营养化水体的室内研究

取清河水样,测定原水中的总氮、氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的浓度,取 100 mL 水样分装于 250 mL 锥形瓶中,3 个重复。接种比例和培养条件同上,4 d 后测定各氮指标。

2 结果与讨论

2.1 氮循环菌株的分离和筛选

经富集、分离初筛得到氨化菌 112 株,亚硝化菌 71 株,硝化菌 44 株,反硝化菌 13 株,以上菌株均为细菌。为进一步筛选高效菌株,采用化学方法定量分析复筛得到氨化细菌 5 株,亚硝化细菌 4 株,硝化细菌 4 株,反硝化菌 5 株,这些菌株对氮的转化能力较强(表 1),为微生物修复氮污染水体提供了菌种资源。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 各菌株的形态学特征

对 A 亚-C-3、G 硝-3、M 氨-4、R 反-5 进行的菌落形态和菌体形态进行观察,详见表 2 和表 3。

2.2.2 各菌株生理生化特征

A 亚-C-3、G 硝-3、M 氨-4、R 反-5 各菌株的生理生化特征试验结果见表 4~6。

2.2.3 各菌株的 16S rDNA 序列分析

菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增产物在 1.5kb 处有特异性条带,与预期大小一致,送到公司测序。将测序结果用 BLAST 程序对各菌株的 16S rDNA 序列和

表 1 已筛选的氮循环菌及转化氮的效果

Table 1 The nitrogen cycle bacteria screened and their abilities of transforming nitrogen

亚硝化菌 编码及名称	氨氮 去除率/%	硝化菌 编码及名称	亚硝酸盐氮 去除率/%	氨化菌 编码及名称	生成氨氮浓度/ mg $\cdot\text{L}^{-1}$	反硝化菌 编码及名称	硝酸盐氮 去除率/%
A 亚-C-3	91.60 $\pm$ 0.83aA	E 硝-HA-B-1	93.33 $\pm$ 3.84aA	I 氨-86	329 $\pm$ 15aA	N 反-活-B-2	100aA
B 亚-4	84.61 $\pm$ 6.02bAB	F 硝-4	91.11 $\pm$ 4.10abA	J 氨-5	322 $\pm$ 15aA	O 反-活-B-4	100aA
C 亚-C-2	77.42 $\pm$ 2.59cB	G 硝-3	88.89 $\pm$ 2.51abA	K 氨-80	271 $\pm$ 8bB	P 反-活-B-6	100aA
D 亚-7	67.74 $\pm$ 2.32dC	H 硝-1	84.44 $\pm$ 4.05bA	L 氨-90	251 $\pm$ 8bB	Q 反-4	100aA
				M 氨-4	249 $\pm$ 11bB	R 反-5	100aA

注:小写字母表示 0.05 显著水平,大写字母表示 0.01 显著水平。

表 2 菌株在土豆培养基(PDA)上的培养特征

Table 2 The colonial morphology characteristics of bacteria on PDA

菌株名称	形状	菌落大小/mm	颜色	边缘状况	光泽	质地	高度	透明度
A 亚-C-3	圆形	0.5~2	乳白色	整齐	蜡质状	光滑、湿润	低凸	半透明
G 硝-3	圆形	1~2	乳白色	整齐	蜡质状	光滑、湿润	低凸	半透明
M 氨-4	圆形	0.5~5	乳白色	整齐	蜡质状	光滑、湿润	低凸	半透明
R 反-5	圆形	0.2~1	浅黄色	整齐	蜡质状	光滑、半湿润	扁平	不透明

表 3 细菌菌体形态特征

Table 3 The mycelial morphology characteristics of bacteria

编号及菌株名称	菌体		革兰氏染色	芽孢	
	形状	大小/ μm		有无及形状	位置
A 亚-C-3	短杆,单杆或成堆	2.5~6 $\times$ 1~2.5	阳性	有,椭圆	中生
G 硝-3	长杆,单杆	3.0~4.0 $\times$ 0.2~0.7	阴性	无	
M 氨-4	短杆,单杆	0.6~2 $\times$ 0.5~1.0	阳性	有,椭圆	中生
R 反-5	短杆,成对,链状	0.5~1.5 $\times$ 0.8~1.2	阴性	无	

表 4 各菌株的生理及生化特征

Table 4 The physiological and biochemical characteristics of bacteria

编号及菌株名称	生长温度			耐盐性				需氧性	氧化酶	H ₂ O ₂ 酶	硝酸盐还原	运动性
	20 ℃	37 ℃	60 ℃水浴 30 min	2%	5%	7%	10%					
A 亚-C-3	+	+	+	+	+	-	-	微好氧	+	+	+	+
G 硝-3	+	+	+	+	+	-	-	好氧	-	+	+	w+
M 氨-4	+	+	+	+	+	-	-	兼性好氧	-	-	+	+
R 反-5	+	+	+	+	+	+	-	兼性好氧	+	+	+	+

注:“+”表示生长;“-”表示不生长;“w+”表示弱生长;“+…”表示阳性更显著。

表 5 各菌株的生理及生化特征

Table 5 The physiological and biochemical characteristics of bacteria

编号及菌株名称	M-R 反应	V-P 反应	H ₂ S	葡萄糖氧化发酵	石蕊牛奶试验					
					产酸(红)	产碱(蓝)	胨化(澄清透明)	酸凝(变红且凝固)	还原(石蕊褪色)	酶凝(不变或蓝色其中牛奶结块凝固)
A 亚-C-3	-	-	-	发酵	-	-	+++	-	+	+
G 硝-3	-	w+	w+	-	-	-	+++	-	+	-
M 氨-4	-	+	w+	-	-	-	++++	-	+	-
R 反-5	+	-	+	发酵	-	-	+	-	+	+++

注:同表 4。

表 6 各菌株的生理及生化特征

Table 6 The physiological and biochemical characteristics of bacteria

编号及菌株名称	明胶液化 (20 ℃)	淀粉水解	碳源利用												
			鼠李糖	果糖	木糖	阿拉伯糖	山梨醇	乳糖	麦芽糖	蔗糖	肌醇	甘露醇	棉籽糖	糊精	甘油
A 亚-C-3	++++	—	—	w+	w+	—	—	—	—	—	—	w+	—	+	—
G 硝-3	+	++	w+	+	+	w+	w+	w+	+	w+	w+	w+	+	—	—
M 氨-4	++++	+++	—	+	—	+	—	—	—	—	—	+	—	+	w+
R 反-5	+	+++	+	+	w+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w+

注:同表 4。

Genbank 中已登录的序列进行核苷酸同源性比较,结果表明:A 亚-C-3 与多株 *Bacillus subtilis* 的序列同源性达到 100%,如 *Bacillus subtilis* HDYM-11;G 硝-3 与多株 *Pseudomonas mendocina* 的序列同源性达到 99%,如 *Pseudomonas mendocina* PC7;R 反-5 与多株 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 同源性分别达到 99%,如 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* SW05;M 氨-4 与多株 *Bacillus cereus* 的同源性为 94%,如 *Bacillus cereus* QAR-01d 等。

利用 Cluastx2.0、MEGA4.0 等相关软件鉴定菌株与部分参考菌株,基于 16S rDNA 序列构建系统发育树(图 1),可以看出,A 亚-C-3 与 *B. subtilis* 和 *B. velezensis*、M 氨-4 与 *Bacillus cereus*、G 硝-3 和 *Pseudomonas* A17、R 反-5 和 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 的亲缘关系最密切。

经 16S rDNA 测序及同源性比较,结合菌株的形态学和生理学特性,可确定菌株 A 亚-C-3 为 *Bacillus subtilis*、G 硝-3 为 *Pseudomonas mendocina*、M 氨-4 为 *Bacillus cereus*、R 反-5 为 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*。

据报道,蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌具有氨化作用,枯草芽孢杆菌对氨氮和亚硝酸盐的浓度均有降低作用^[21-22],目前枯草芽孢杆菌在水产上净化水质的应用也较为广泛。朱晓宇^[23]等也分离筛选得到了门多

萨假单胞菌 ZW27 和类产碱假单胞菌 ZW23,两者均是典型的高效兼性好氧反硝化细菌,并且反应过程中没有检测到亚硝态氮和氨态氮的积累,这与本研究的结论一致。

2.3 氮循环菌株间拮抗性测定

对各菌株之间的拮抗性进行测定(表 7),发现菌株 C 亚-C-2、D 亚-7、L 氨-90、J 氨-5 和其他菌株存在拮抗作用,其周围会产生明显的透明圈。其他菌株之间不存在拮抗作用。因此,这些菌可用于构建菌群。

2.4 脱氮菌群的构建

在上述筛选基础上,选取 3 株氨化菌(编号分别为 I、K、M)、2 株亚硝化菌(编号分别为 A、B)、3 株硝化菌(编号分别为 E、G、H)和 4 株反硝化菌(编号分别为 O、P、Q、R)用于组合构建氮循环菌群,共计 72 个组合。依以下原则:

- (1) 选择具有不同功能的脱氮菌株构建含 4 株菌的混和菌群,包括氨化菌、亚硝化菌、硝化菌及反硝化菌。
- (2) 选取没有明显拮抗作用的菌株。
- (3) 选择具有较好的氨氮和总氮脱除效果的菌群。
- (4) 选择不积累亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的菌群。

接种 4 mL 混和菌液于初始总氮浓度为 $23.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氨氮浓度为 $7.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的模拟富营养化水样中,结果表明,有 11 个组合的脱氮效果较好(表 8),4

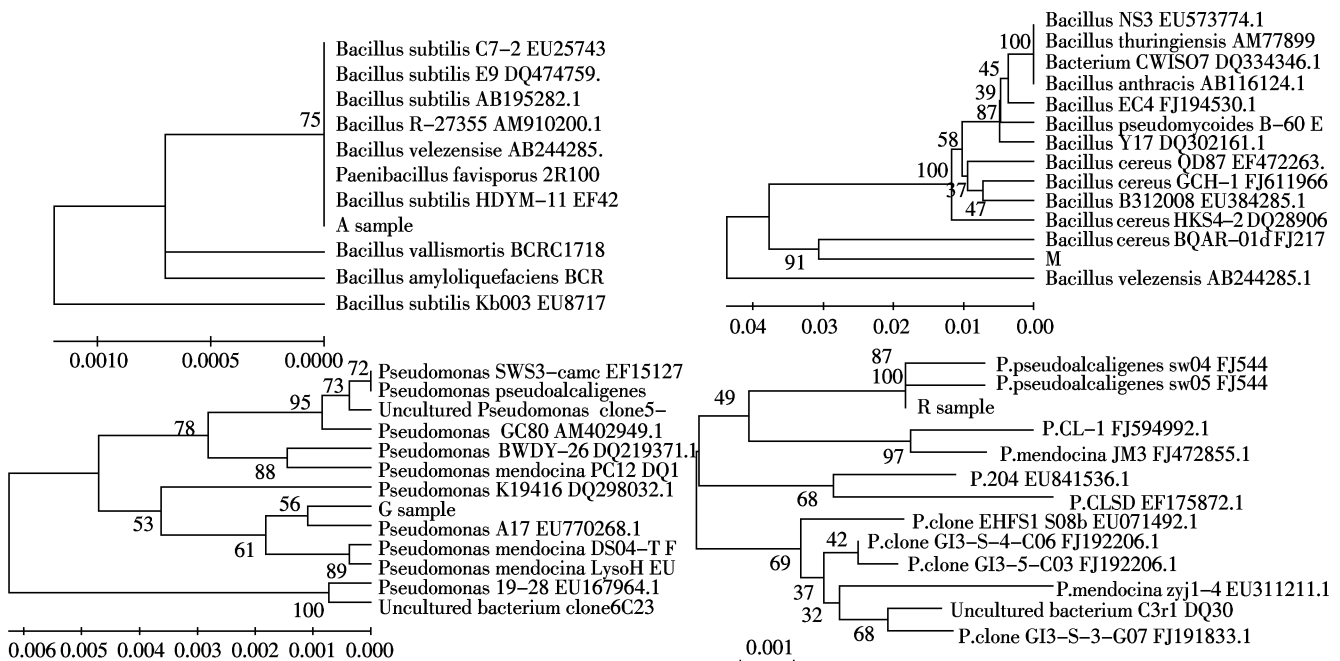


图 1 菌株 A 亚-C-3、G 硝-3、M 氨-4 和 R 反-5 的系统发育树状关系图(NJ 法)

Figure 1 Phylogenetic trees based on strain A、G、M and R(NJ)

表 7 各单菌株的拮抗性试验结果

Table 7 The result of antagonistic action test between bacteria

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
A																		
B	-																	
C	+	-																
D	+	-	-															
E	-	-	-	-														
F	-	-	-	-	-													
G	-	-	-	-	-	-												
H	-	-	-	-	-	-	-											
I	-	-	-	-	-	-	-	-										
J	++	-	-	-	-	-	-	-	-									
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
L	++	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-						
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注:“A、B、C……”均为各菌株编号,各编号代表的菌株名称详见表 1。“+”表示抑制圈直径<10 mm;“++”表示抑菌圈直径 10~15 mm;“+++”表示抑菌圈直径>15 mm;“-”表示无拮抗。

d 内这些组合的氨氮去除率在 50%以上,总氮去除率在 75%以上。对氨氮和总氮的降解效果较好的菌群组合为 AGIQ 和 AGMR,4 d 内脱氮率分别可以达到 80.92%和 82.36%,对氨氮的转化率分别为 79.66%和 79.79%,并且生成或维持较低浓度的亚硝酸盐氮和硝酸盐氮。

表 8 混和菌群的脱氮效果试验部分结果

Table 8 Some results of the community's denitrogenation abilities

编号	组合名称	氨氮去除率/%	总氮去除率/%	硝酸盐氮浓度/mg·L ⁻¹	亚硝酸盐浓度/mg·L ⁻¹
3	AHIO	53.15±1.41fE	83.88±1.56bB	0.08±0.02	0.04±0.01
8	AGMO	55.25±2.10fE	92.60±2.04aA	0.25±0.06	0.04±0.03
12	AHIP	61.02±1.15eD	79.61±1.37cdeBCD	0	0.05±0.02
13	AEKP	66.40±1.51dC	78.43±1.90deCD	0.06±0.01	0.04±0.01
14	AGKP	55.51±3.08fE	90.40±1.06aA	0	0.06±0.01
20	AGIQ	79.66±1.04aA	80.92±1.98bcdBCD	0	0
22	AEKQ	73.36±4.65cB	76.44±2.92eD	0	0.04±0.02
27	AHMQ	77.69±1.84abAB	76.61±1.77eD	0.64±0.08	0.02±0.01
34	AEMR	75.46±3.28bcAB	76.27±1.95eD	2.21±0.09	0.01
35	AGMR	79.79±2.14aA	82.36±3.02bcBC	0	0.03±0.01
36	AHMR	75.46±2.43bcAB	80.92±1.68bcdBCD	0.04±0.01	0.06
	CK			0	0.03±0.01

注:组合名称中的“A、B、C……”均为各菌株编号,各编号代表的菌株名称详见表 1。小写字母表示 0.05 显著水平;大写字母表示 0.01 显著水平。

2.5 脱氮菌群处理模拟富营养化水样过程中各种含氮化合物变化情况

AGIQ 和 AGMR 两个组合处理模拟富营养化水样过程中,氮素随时间变化情况见图 2 和图 3。

对这两个组合在处理含氮污水过程中的总氮浓度与时间分别进行 Pearson 相关性分析,结果均呈显著负相关,相关系数分别为-0.952 67,-0.956 10($\alpha=0.05$)。这两个组合对模拟富营养化水样的总氮均具有较好的处理效果,使氨氮浓度也有所降低,均能使亚硝酸盐氮和硝酸盐氮维持较低的浓度。组合 AGIQ 在处理污水 24 h 后脱氮率即可达到 66.15%,对氨氮的转化率达到 67.49%;组合 AGMR 在处理污水 24 h 后脱氮率即达到 62.57%,对氨氮的转化率达到 87.22%。随着处理时间的增长,总氮和亚硝酸盐氮浓度均呈下降趋势,其中 AGMR 组合在较短的时间内有较好的处理效果。

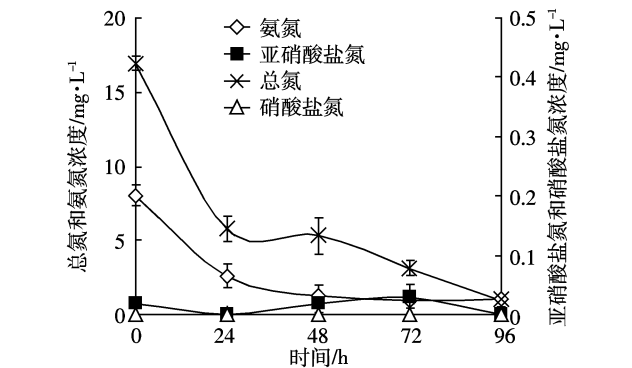


图 2 AGIQ 组合在处理水样过程中氮素随时间变化

Figure 2 The nitrogen concentrations variation of AGIQ community in treating water sample

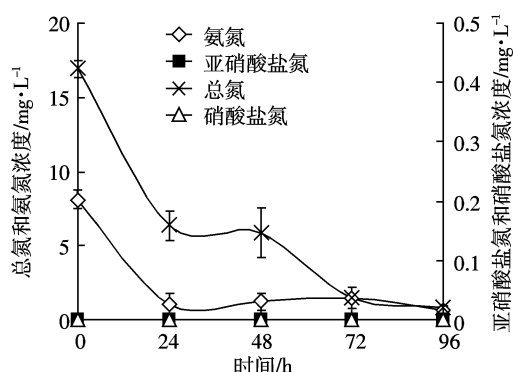


图3 AGMR组合在处理水样过程中氮素随时间变化

Figure 3 The nitrogen concentrations variation of AGMR community in treating water sample

2.6 脱氮菌群修复富营养化水体的室内研究

取清河水质样,经测定总氮浓度为 $33.77 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,氨氮浓度为 $30.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,亚硝酸盐氮浓度为 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,硝酸盐氮浓度为 $2.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。接入混和菌群 AGMR,4 d 后测定:总氮浓度为 $11.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,去除率为 65.80%;氨氮浓度为 $10.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,去除率为 66.25%;亚硝酸盐氮浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;硝酸盐氮浓度为 0。表明此组合具有较强的去除总氮和氨氮的能力,并且较少积累亚硝酸盐氮和硝酸盐氮。对于氮污染严重的水体,从氮循环的角度看,采用微生物修复水体,促进氮素的循环和释放,降低水中氮素的浓度,也是一种有效的方法。为实现氮循环菌群对实际水体修复,仍需进行深入研究。

3 结论

(1)本研究筛选出了氨化菌 112 株,亚硝化菌 71 株,硝化菌 44 株,反硝化菌 13 株,为微生物修复氮污染水体提供了菌种资源。

(2)经试验得到了具有高效脱氮功能的 AGMR 菌组合,对模拟富营养化水进行处理,4 d 内使总氮下降 82.36%、氨氮下降 79.79%,水质明显改善;取清河水质样,对其进行处理,4 d 内对总氮的去除率为 65.80%,氨氮的去除率为 66.25%,很少积累亚硝酸盐氮和硝酸盐氮。经鉴定这 4 株菌分别为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、门多萨假单胞菌 (*Pseudomonas mendocina*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 和类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)。

(3)所得菌株虽对各种形式的氮具有转化作用,但其代谢利用氮的过程仍不清楚,有待于进行进一步研究;一些反硝化细菌在有氧条件下产生 N_2O ,而不

是 N_2O 是一种温室气体,会带来新的环境问题。因此,该氮循环菌群代谢是否产生 N_2O 以及如何能够降低 N_2O 的产生还有待于深入研究。

(4)笔者正将构建的氮循环菌群采用细胞固定化的方法应用于室外富营养化水体中进行中试试验,测试其实地修复富营养化水体的效果。

参考文献:

- [1] 李正魁,濮培民. 净化湖泊水体氮污染的固定化硝化-反硝化菌研究[J]. 湖泊科学, 2000, 12(2): 119-123.
LI Zheng-kui, PU Pei-min. Purification of lake water by immobilized nitrobacteria-denitrifying bacteria[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2000, 12(2): 119-123.
- [2] 李正魁,濮培民. 固定化增殖氮循环细菌 SBR 法净化富营养化湖水[J]. 核技术, 2001, 24(8): 476-481.
LI Zheng-kui, PU Pei-min. Purification for eutrophic lake with immobilized nitrogen cycle bacteria[J]. *Nucleartechniques*, 2001, 24(8): 476-481.
- [3] 李海云. 脱氮微生物制剂的研制[D]. 太原: 山西大学, 2004: 4-6.
LI Hai-yun. Research and development the microbial preparation for nitrogen removal[D]. *Shanxi University*, 2004: 4-6.
- [4] Killham K. Heterotrophic nitrification[G]// Prosser Nitrification J I. Special publication for society for general microbiology. Oxford: IRL Press, 1986: 117-126.
- [5] 温东辉,唐孝炎. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用[J]. 环境污染与防治, 2003, 25(5): 283-285.
WEN Dong-hui, TANG Xiao-yan. Heterotrophic nitrification and its role in the nitrogen removal in wastewater treatment[J]. *Environmental Pollution and Control*, 2003, 25(5): 283-285.
- [6] Steven W E, Drysdale G D, Bux F. Evaluation of nitrification by heterotrophic bacteria in biological nutrient removal processes[J]. *South African Journal of Science*, 2002, 98(5-6): 222-224.
- [7] 何霞,赵彬,吕剑. 等. 异养硝化细菌 *Bacillus* sp. LY 脱氮性能研究[J]. 环境科学, 2007, 28(6): 1403-1408.
HE Xia, ZHAO Bin, LV Jian, et al. Nitrogen removal by *Bacillus* sp. LY with heterotrophic nitrification ability[J]. *Environment Science*, 2007, 28(6): 1403-1408.
- [8] 杨航,黄钧,刘博. 异养硝化-好氧反硝化菌 *Paracoccus pantotrophus* ATCC35512 的研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 585-592.
YANG Hang, HUANG Jun, LIU Bo. Advances in research of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, 14(4): 585-592.
- [9] Schmidt I, Slikkers O, Schmid M, et al. New concepts of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27: 481-492.
- [10] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 349-355.
DU Lian-xiang, LU Fu-ping. Experimental technique in microbiology

- [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006: 349–355.
- [11] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 243–285. The National Environmental Protection Agency Editorial Committee. Standard methods for water and wastewater monitoring and analysis[M]. the 4th Edition, Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 243–285.
- [12] 张光亚, 陈美慈, 韩如旸, 等. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 156–160. ZHANG Guang-ya, CHEN Mei-ci, HAN Ru-yang, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a heterotrophic nitrifier[J]. *Acta Microbiological Sinica*, 2003, 43(2): 156–160.
- [13] 张小玲, 梁运祥. 一株反硝化细菌的筛选及其反硝化特性的研究[J]. 淡水渔业, 2006, 36(5): 28–32. ZHANG Xiao-ling, LIANG Yun-xiang. Screening of a strain denitrifying bacteria and its denitrification characteristic[J]. *Freshwater Fisheries*, 2006, 36(5): 28–32.
- [14] 左 薇. 一株好氧反硝化菌的筛选鉴定及其脱氮特性分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2006. ZUO Wei. An aerobic denitrifier screened identification and denitrification characteristic[D]. Harbin Institute of Technology, 2006.
- [15] 李 卿. 好氧反硝化细菌的筛选和生理特性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2006. LI Qing. Study on screening physiological character of aerobic denitrification bacteria[D]. Changchun: Jilin University, 2006.
- [16] Patureau D, Zumstein E, Delgenes J P, et al. Aerobic denitrification isolation from diverse natural and managed ecosystems[J]. *Microb Ecol*, 2000, 39: 145–452.
- [17] 布坎南 RE, 吉本斯 NE, 等. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984. Buchanan R E, Gibbons N E, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. the 8th edition, Beijing: Science Press, 1984.
- [18] 东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. DONG Xiu-zhu, CAI Miao-ying. Manual of systematic bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [19] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(11): 3389–3402.
- [20] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. ZHOU De-qing. Manual of microbiology experiments [M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press, 1986.
- [21] 曾地刚, 雷爱莹, 彭 敏, 等. 枯草芽孢杆菌的分离及其净化水质的研究[J]. 水利渔业, 2007, 27(6): 55–56. ZENG Di-gang, LEI Ai-ying, Peng Min, et al. Screening of the *Bacillus subtilis* and study on water purification[J]. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(6): 55–56.
- [22] 尹文林, 沈锦玉, 沈智华, 等. 枯草芽孢杆菌 B115 株对水质改良效果研究[J]. 渔业现代化, 2006, 6: 9–11. YIN Wen-lin, SHEN Jin-yu, SHEN Zhi-hua, et al. Study on water purification of *Bacillus subtilis* B115[J]. *Fishery Modernization*, 2006, 6: 9–11.
- [23] 朱晓宇, 王世梅, 梁剑茹, 等. 两株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮效率[J]. 环境科学, 2009(1): 111–117. ZHU Xiao-yu, WANG Shi-mei, Liang Jia-ru, et al. Isolation and identification of two aerobic denitrifiers with high efficiency in the removal of N from simulated wastewater[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009(1): 111–117.