

一株异养硝化细菌的分离鉴定及其亚硝化作用研究

王成林^{1,2}, 周巧红¹, 王亚芬^{1,2}, 梁 威¹, 吴振斌¹

(1.中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072; 2.中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要:从复合垂直流人工湿地表层基质中分离出一株硝化活性较强的异养硝化细菌 H-1, 进行 biolog 菌种鉴定, 鉴定系统中没有与该菌株特性相似的数据记录。16S rDNA 的序列分析结果显示, 菌株 H-1 与产碱杆菌属(*Alcaligenes*)粪产碱杆菌(*A. faecalis*)有 98% 相似性, 认为分离菌株 H-1 可能为 *Alcaligenes A. faecalis*。通过 4 因素 3 水平的正交试验, 结果显示, 当温度为 30 ℃, pH 为 7.5, 接种量为 10⁷ CFU, 溶氧 2.25 mg·L⁻¹ 时, 该菌株亚硝化反应效果最佳; 影响亚硝化反应效果的因素顺序为: 溶氧>温度>pH>接种量; 温度和溶氧影响极显著, pH 和接种量影响相对不显著。

关键词:人工湿地; 异养硝化细菌; 16S rDNA; 正交试验

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)03-1146-05

Studies on the Identification and Nitrosification of a Heterotrophic Nitrifier Bacterial Strain

WANG Cheng-lin^{1,2}, ZHOU Qiao-hong¹, WANG Ya-fen^{1,2}, LIANG Wei¹, WU Zhen-bin¹

(1.State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2.Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: A strain of heterotrophic nitrifier, named H-1, which had higher nitrification potential, was isolated from the surface layers of the integrated vertical flow constructed wetland. The identification result of Biolog Microbial Identification System indicated that there were no similar records as the isolated bacterial strain in the system. The phylogenetic analysis based on 16S rDNA suggested that the bacterial strain was 98% homology at the nucleotide level compared with 16S rDNA of *Alcaligenes faecalis*. It was thought that bacterial strain H-1 was possibly *Alcaligenes A. faecalis*. Orthogonal experiments of four factors and three levels were designed to screen out the optimum nitrosification condition. The experiment results indicated that the nitrosification effect was optimal when the temperature, pH, inoculation quantities and dissolved oxygen were 30 ℃, 7.5, 10⁷ CFU and 2.25 mg·L⁻¹, respectively. Sorting Order of the factors on the nitrosification effect was dissolved oxygen> temperature>pH> inoculation quantities; The influences of temperature and dissolved oxygen on nitrosification effect were highly significant, but the influences of pH and inoculation quantities on nitrosification effect were relatively insignificant.

Key words: constructed wetland; heterotrophic nitrifier; 16S rDNA; orthogonal experiments

废水生物脱氮是目前水处理领域关注和研究的热点。关于异养硝化作用, 虽然目前仍有很多机理未得到解释, 对一些现象的解释也不尽圆满, 但异养硝化作用的重要性日益受到关注^[1-4]。相对于自养硝化菌而言, 异养硝化细菌的分解效率较低, 但是由于它们在环境中的数量以及生长速率上往往远大于自养菌,

因此在某些环境之中, 异养硝化细菌作用的贡献可以与自养菌相当。在人工湿地系统中, 微生物的硝化、反硝化作用在氮的去除中有重要作用^[5], 根据 Oostrom 报道人工湿地系统对氮的去除, 从贡献上看依次为: 微生物降解>基质吸附>植物的吸收^[6]。硝化作用是指将 NH₃-N 氧化为 NO₃⁻-N 的生物化学反应, 包括亚硝化反应和硝化反应两个步骤。本试验拟从人工湿地系统中分离能进行异养硝化反应的菌株, 并通过正交试验试图找出影响亚硝化反应效果的主要因素和最佳条件, 从微生物角度来说, 丰富了高效菌种库, 为提高湿地处理效率和强化湿地的功能提供技术支持,

收稿日期: 2007-09-18

基金项目: 国家“十五”科技项目 (2002AA601021); 国家杰出青年基金项目 (69925007); 湖北省科技攻关重大项目 (2006AA305A03)

作者简介: 王成林 (1979—), 男, 湖北浠水人, 硕士研究生, 研究方向为环境微生物。E-mail: wclhznzdx@tom.com
通讯作者: 吴振斌 E-mail: wuzb@ihb.ac.cn

并为湿地人工强化技术提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 采样位点

取自中国科学院水生生物研究所复合垂直流人工湿地系统表层基质，采样方法采用梅花布点法,样品混合后立即置于 4℃下保存。

1.2 异养硝化细菌的分离筛选

1.2.1 选择性培养基组成

乙酰胺 2 g,NaOH 1.6 g,KH₂PO₄ 8.2 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,KCl 0.5 g,CuSO₄·5H₂O 0.5 mg,CaSO₄·2H₂O 0.5 mg,ZnSO₄·7H₂O 0.5 mg,FeCl₃·6H₂O 0.5 mg,用蒸馏水定容至 1 L,pH7.0。

1.2.2 富集培养

取基质样品 10 g 于盛有 250 mL 灭菌选择性培养液的锥形瓶中,在恒温震荡培养箱中富集培养 7 d,温度设置为 30℃,转速 100 r·min⁻¹。

1.2.3 细菌的分离与纯化

吸取富集培养液 10 mL 加入到盛有 100 mL 无菌蒸馏水的 250 mL 锥形瓶中，于恒温振荡器上以 100 r·min⁻¹ 转速,在 30℃下振荡 4 h,进行稀释涂布,于生化培养箱 30℃下培养。进行 3 次纯化与分离。形成单菌落后,依据不同的形态、质地、边缘、光学特性和颜色,初选出 21 株纯菌株,斜面保存,用于进一步硝化活性检验。

1.2.4 硝化活性验证

将斜面上生长的菌苔用接种环挑取适量接种用于硝化活性鉴定^[7],将具有硝化活性的细菌用石蜡液封保藏备用。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 biollog 分析

采用美国产 biollog 微生物全自动分析仪,挑选一株硝化活性较强的细菌 H-1 进行 biollog 菌种鉴定。

1.3.2 16S rDNA 序列分析

用 CTAB 方法提取该细菌 H-1 的 DNA, 并进行 PCR 扩增。细菌通用引物 27f-1492r 序列:27f:

AGACTTTGATCCTGGCTCAG;1492r:CGGCTACTTGT TACGACTTC。PCR 反应体系为 25 μL,其中包括 0.5 μL dNTP (2.5 mmol·L⁻¹),正反向引物各 0.5 μL (2.5 μmol·L⁻¹),2.5 μL 10×缓冲液,MgCl₂ 1.5 μL (25 mmol·L⁻¹),0.5 μL Taq 聚合酶 (2 U·μL⁻¹),18 μL 无菌去离子水,2 μL DNA;各成分充分混合后,进行如下反应:94℃预变性 5 min, 再进行 40 个循环,94℃变性 30 s,50℃复性 30 s,72℃延伸 120 s, 最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖进行电泳,EB 染色,扫描成像。结果分析:DNA 序列同源性分析在 NCBI (National Centre for Biotechnology Information) 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 采用 Blast 软件检索。参考序列取自 Genbank,EMBL (European Molecular Biology Laboratory),DDBJ (DNA Data Bank of Japan) 等数据库。并将搜寻到的同源序列用 Clustal X[®]软件进行序列排序,然后用 Mega3.1[®]软件进行系统进化树构建和分析。

1.4 异养硝化细菌硝化效果的正交试验设计

1.4.1 样品的配备

挑取一接种环 H-1 细菌菌苔于上述液体培养基中扩大培养 7 d,在无菌条件下取 100 mL 处于对数生长期的实验菌液以 3 000 r·min⁻¹ 的转速离心 8 min,去除上清液,用无菌水冲洗后再离心,重复 3 次,最后用无菌水配成 5 mL 的菌悬液用于试验定量接种备用。

1.4.2 正交试验营养溶液配方

为了研究纯化菌株在好氧条件下的亚硝化作用效果,进行亚硝态氮监测,实验中应用培养基的具体配比见表 1。

1.4.3 控制因素选择

本试验为了研究异养硝化细菌亚硝化作用效果,设计 L9 (3⁴) 正交试验,共 4 因素:温度、pH、接种量和溶解氧,分别编号为 A、B、C、D,取 3 个水平:温度(T)取 20℃、25℃、30℃,pH 取 4.5、7.5、8.0,接种量取 10⁷ CFU, 10⁸ CFU,10⁹ CFU,溶氧 (DO) 1.16、2.25、3.76 mg·L⁻¹。

1.4.4 试验装置和监测方法

试验主体装置为 3 个可控温摇床,10 个 500 mL

表 1 营养溶液成分配比列表

Table 1 the average concentration of substrates in culture in the batch test

成分	浓度/g·L ⁻¹	成分	浓度/g·L ⁻¹
葡萄糖	0.467	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.214
氯化铵	0.191	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.006
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.009	CaCl ₂	0.111
H ₃ BO ₃	0.011	NaCl	8.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.010		

锥形瓶,编号 0~9,0 为空白样品,用于亚硝化效果测定的营养溶液配方见表 1, 营养溶液在接种前为无菌。按照正交试验设计方案要求,将 9 个样品分到 3 个可控温摇床中培养 20 d,NO₂⁻-N 标按国家标准方法进行测定^[10],亚硝化反应速率为单位时间 NO₂⁻-N 浓度的改变。

2 结果与讨论

2.1 菌株分离与 biolog 微生物全自动分析仪鉴定结果

从 21 株纯化菌株中检验出两株具有硝化活性的异养硝化菌,编号为 H-1、H-2,通过硝化活检验中的显色反应,发现 H-1 活性较强。biolog 微生物全自动分析仪结果显示 Biolog 微生物鉴定系统中没有与菌株 H-1 特性相似的数据记录。作者将 GN2 碳源利用情况建立指纹档案,进一步用分子手段进行分析以期找出更多该菌种的信息。

2.2 16S rDNA 基因序列分析

经 NCBI Blast 检索,所筛选菌株 H-1 和 *Alcaligenes faecalis* (DQ110882)有 98%的同源性,因此作者初步认为本研究分离得到的一株异养硝化细菌 H-1 属于产碱杆菌属粪产碱菌种,又选择了多种产碱杆菌属的 16S rDNA 全序列:*Alcaligenes latus* (D88007),*Alcaligenes piechaudii*(AB010841),*Alcaligenes aquatilis* (AJ937889),*Alcaligenes xylosoxidans* (Y14908)进行系统分析(见图 1),结果也显示该菌株和产碱杆菌属粪产碱杆菌显示出更高的同源性。Anderson 等^[11]报道粪产碱杆菌为异养硝化细菌,该菌在低碳条件下进行硝化作用,也可以在有机环境中进行硝化作用。

根据伯杰鉴定细菌学手册介绍,产碱杆菌属(*Al-*

caligenes) 有下列菌种:粪产碱杆菌(*A.faecalis*);皮氏产碱杆菌(*A.piechaudii*);木糖氧化产碱杆菌脱硝亚种(*A. xylosoxidans* sub sp.*denitrificans*);木糖氧化产碱杆菌木糖氧化亚种(*A. xylosox idans* sub sp.*xylosoxidans*);真养产碱杆菌(*A.eutrophus*);广泛产碱杆菌(*A.latus*);争论产碱杆菌(*A.paradoxus*)。从 16S rDNA 基因序列分析结果来看,作者从人工湿地中分离的一株异养硝化细菌 H-1 属于产碱杆菌属,一般认为凡是 16S rDNA 序列同源性大于 97%的两株细菌即可确定为同一种,在本试验中测试的株菌 H-1 与粪产碱菌 16S rRNA 序列同源性大于 97%,所以认为从人工湿地中分离的一株异养硝化细菌 H-1 属于产碱杆菌属粪产碱菌种。

2.3 正交试验结果分析

2.3.1 温度的影响

从图 2 可看出,在亚硝化反应中,25℃是该菌株亚硝化速率趋势改变的分界点,当温度在 30℃时,亚硝化效果达到最佳。符合 Hultman^[12]提出硝化细菌的生长速率 *U* 和温度之间的关系, $U= (U_{n,20}) [10^{0.03(T-20)}] d^{-1}$ 大多数硝化细菌的合适生长温度在 25~30℃之间,低于 25℃或高于 30℃硝化细菌生长和硝化作用减慢。因此温度对硝化细菌生长和亚硝化反应速率有很大影响。

2.3.2 pH 的影响

从图 2 可看出,在亚硝化反应中,随着 pH 升高,亚硝化速率先升后降,当 pH=7.5 时,亚硝化反应效果达到最佳。pH 是影响亚硝化作用重要环境因素之一,在 pH 中性或微碱性下,亚硝化反应过程迅速,若 pH 进一步升高,从 $NH_4^+ \longleftrightarrow NH_3$ 平衡关系中知道,NH₃ 浓度会迅速提高^[14]。由于硝化菌对氨很敏感,从而会

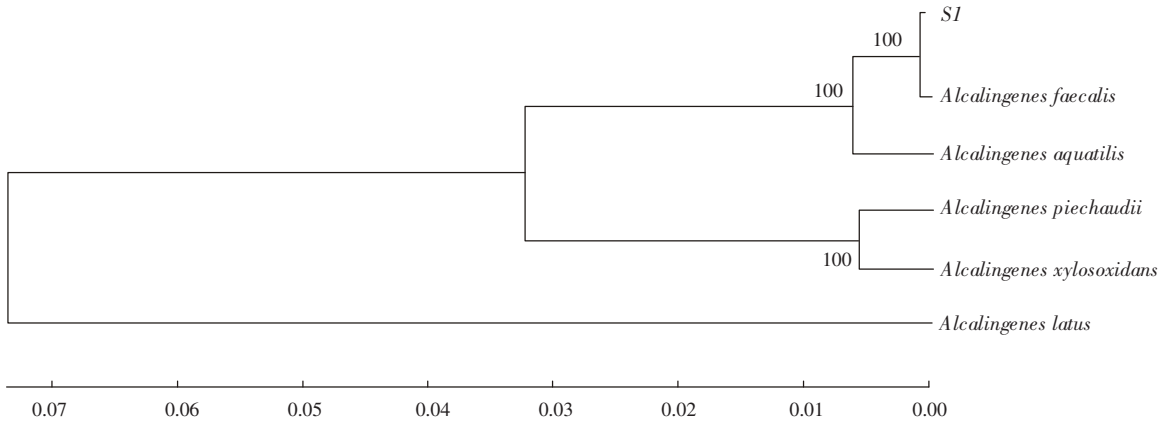


图 1 基于 16S rDNA 构建的系统发育树
Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA

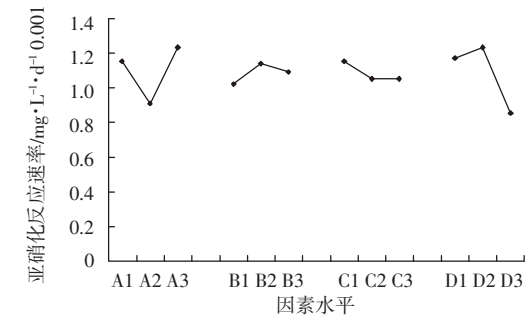


图 2 亚硝化反应速率在 4 因素 3 水平条件下变化趋势图

Figure 2 Relationship of nitrosification condition with different factors

影响到亚硝化作用速率。

2.3.3 接种量的影响

从图 2 可看出,在亚硝化反应过程中,随着接种量增加,亚硝化反应速率降低,硝化细菌繁殖的速率极大地受到营养条件和所处环境的影响,基数大,营养条件不同,不一定繁殖速度快。本试验接种量较小时,亚硝化速率较大,接种量较大时,亚硝化速率较小,可能接种量刚好处在营养竞争限制的范围内。接种量小反而利于异养硝化细菌生长,接种量大,由于营养竞争,不利于异养硝化细菌生长。

2.3.4 溶解氧的影响

从图 2 可看出,在亚硝化反应中,随着 DO 升高,亚硝化反应速率先升后降,当溶解氧为 2.25 mg·L⁻¹ 时,亚硝化反应效果达到最佳。硝化细菌为了获得足够的能量用于生长,必需氧化大量的 NH₄⁺ 和 NO₂⁻,环境中的溶解氧浓度大小会极大地影响亚硝化反应速度和硝化细菌的生长速率,溶解氧浓度与硝化细菌生长速率公式^[3]为 $Un=(Un\ max)(DO/DO+K_0)$,从公式可知,当 DO 增大时,硝化细菌生长速率增大,当环境 $DO\gg K_0$ 时, $Un=Unmax$ 。大多数学者认为溶氧应控制

在 1.5~2.0 mg·L⁻¹,低于 0.5 mg·L⁻¹,则硝化作用趋于停止,在 DO 远远大于 2.0 mg·L⁻¹ 时,溶解氧浓度对亚硝化反应的影响不予考虑。从图 2 可看出,溶解氧水平的变化对亚硝化反应速率的影响较大。

2.3.5 亚硝化作用效果分析

由表 2 最优组合结果可看出:当温度为 30 ℃,pH 为 7.5,接种量为 10⁷ CFU,溶氧 2.25 mg·L⁻¹ 时,亚硝化反应效果最佳。Kuenen^[14]在他的研究基础上总结出了异养硝化菌在进行硝化作用时的代谢通式,包括无机氮硝化代谢途径(即 NH₄⁺→NH₂OH→NO₂⁻→NO₃⁻)和有有机氮硝化代谢途径 (即 RNH₂→RNHOH→R-NO→RNO₂→NO₃),本试验异养硝化菌在进行硝化作用时的代谢通式是 NH₄⁺→NH₂OH→NO₂⁻→NO₃⁻,其中 NH₄⁺→NH₂OH→NO₂⁻ 途径反映了亚硝化作用,无机态氮的形态转化由异养硝化菌在进行硝化作用时的代谢情况决定。研究湿地菌株亚硝化反应效果最佳条件,进一步探索如何提高全程硝化反应效率,将对如何人为控制人工湿地运行条件及提高人工湿地高氨氮废水去除效果提供参考和理论依据。

由表 2、表 3 可看出:亚硝化反应中,溶氧对亚硝化反应效果影响最大,其次是温度和 pH,而接种量影响较小,温度和溶氧影响高度显著,pH 和接种量不显著。一般的潜流湿地,污水主要经过厌氧环境,在处理氨氮含量高的污水时往往因为硝化作用不足,不能将氨氮充分转化为反硝化作用的原料硝酸盐氮和亚硝酸盐氮,从而限制了湿地的除氮能力^[5]。复合垂直流人工湿地的结构以及下行流至上行流的水流方式,形成了基质床内好氧-厌氧的溶解氧状态变化,从而保证了硝化作用-反硝化作用的充分进行,利于污水的高效脱氮,湿地的表层微生物具有较强的硝化作用,也是硝化作用作为氮素主要作用途径的基质^[6]。由影

表 2 试验结果级差分析

Table 2 The Range analysis of experimentation

因素	A	B	C	D	最优组合	因素影响主次顺序
级差	K3>K1>K2	K2>K3>K1	K1>K2=K3	K2>K1>K3	A3B2C1D2	RD>RA>RB>RC, D>A>B>C

表 3 试验结果方差分析

Table 3 The Variance analysis of experimentation

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F	F0.05(2,6)	显著性
A	5.12E-08	2	3.60E-10	81.01	5.14	**
B	6.03E-09	2	7.16E-9	0.421	5.14	*
C	5.83E-09	2	7.19E-9	0.405	5.14	*
D	3.14E-08	2	2.92E-9	5.380	5.14	**

注:** 表示极显著,* 表示相对不显著。

响因素排序和显著性可知,溶氧和温度对亚硝化反应的影响最大,提高湿地表层溶解氧和控制合适的温度,能够提高湿地的硝化效率和处理高含量氨氮污水的能力。因此为了提高氨氮的去除率,可以考虑把主要影响因素选出,控制好条件,忽略次要影响因素,从而在强化人工湿地功能的条件选择上提供指导,避免造成浪费。

3 结论

(1)用传统微生物方法从复合垂直流人工湿地中分离筛选出一株硝化活性较强的异养细菌 H-1,进行 biolog 菌种鉴定,鉴定系统中没有与该菌株特性相似的数据记录,可能该菌株信息不在鉴定系统数据库中,进一步采用分子方法,16S rDNA 扩增,经 NCBI Blast 检索,该菌株和 *Alcaligenes faecalis* (DQ110882) 有 98%的同源性,因此作者初步认为本研究分离得到的一株异养硝化细菌 H-1 属于产碱杆菌属粪产碱菌种。

(2)通过正交试验结果显示当温度为 30 ℃,pH 为 7.5,接种量为 10^7 CFU,溶氧 $2.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,亚硝化反应效果最佳;亚硝化反应中,溶氧对亚硝化反应效果影响最大,其次是温度和 pH,而接种量影响较小,温度和溶氧影响高度显著,pH 和接种量影响相对不显著。因此将影响异养硝化细菌代谢的因素控制在一定值,可以达到最佳亚硝化效果,控制好主要影响因素和条件,可以提高湿地的硝化效率和降低运行成本。

参考文献:

- [1] Brierley E D R, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterisation of a nitrifying bacterium[J]. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33:1403-1409.
- [2] Lin Y, Kong H N, He Y L, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor and isolation of heterotrophic nitrifying bacteria[J]. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 2004, 40 (3):105-114.
- [3] 杨宗政,王鑫,庞金钊,等. 异养硝化菌的分离及其强化活性污泥脱氮效果[J]. 中国给水排水, 2006, 21(1):68-72.
YANG Zong-zheng, WANG Xin, PANG Jin-zhao, et al. Separating of heterotrophic nitrification bacteria and intensifying of nitrogen removal efficiency of activated sludge system[J]. *China Water & Wastewater*, 2006, 21(1):68-72.
- [4] Béline F, Boursier H, Daumer M L, et al. Modelling of biological processes during aerobic treatment of piggery wastewater aiming at process optimization[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 42:3298-3308.
- [5] 刘超翔,董春宏.潜流式人工湿地污水处理系统硝化能力研究[J].环

境科学, 2003, 24(1):80-83.

- LIU Chao-xiang, DONG Chun-hong, et al. Study on ability of nitrification in a subsurface constructed wetland system treating sewage[J]. *Environmental Science*, 2003, 24(1):80-83.
- [6] J van Oostro. Nitrogen removal in constructed wetlands treating nitrified meat processing effluent[J]. *Water Science and Technology*, 1995, 3(32): 137-147.
- [7] 中国科学院南京土壤研究所微生物室编著. 土壤微生物研究方法[M]. 科学出版社出版, 1985.
NanJin Institute of soil Science, Chinese Academy of Sciences, Book-making. The methods of soil microbe [M]. Science publishing company, 1985.
- [8] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24(6):4876-4882.
- [9] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5:150-163.
- [10] 《水和废水监测分析方法》编委会, 水和废水检测分析方法 (第三版) [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1997.
Water and Waste Water Monitor Analysis Method (Third edition) [M]. Chinese Environmental Science publishing company In Beijin. 1997.
- [11] Anderson I C, Poth M, Homstead J, et al. DA comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59 (11): 3525-3533.
- [12] 李沛霖, 李大平, 何晓红. 生物膜处理无机氮废水及其好氧反硝化现象[J]. 水处理技术, 2007, 2 (1): 78-81.
LI Pei-lin, LI Da-ping, HE Xiao-hong. Treatment of inorganic ammonia nitrogen wastewater by biofilm and its aerobic denitrification phenomenon [J]. *Technology of Water Treatment*, 2007, 2 (1): 78-81.
- [13] Liu Hongbo, Yang Changzhu, Pu Wenhong, et al. Removal of nitrogen from wastewater for reusing to boiler feed-water by an anaerobic/aerobic/membrane bioreactor[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2007, 15: 109-117.
- [14] Kuenen J G, Robertson L A. Combined nitrification denitrification processes[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 15: 109-117.
- [15] Gonzalías A E, Kusch P, Wiessner A, et al. Treatment of an artificial sulphide containing wastewater in subsurface horizontal flow laboratory-scale constructed wetlands[J]. *Ecological Engineering*, 2007, 4(3): 259-268.
- [16] 贺锋, 吴振斌, 陶菁, 等. 复合垂直流人工湿地污水处理系统硝化与反硝化作用[J]. 环境科学, 2005, 26(1): 471-474.
HE Feng, WU Zhen-bin, TAO Jing, et al. Nitrification and denitrification in the integrated vertical flow constructed wetlands[J]. *Environmental Science*, 2005, 26 (1): 471-474.

致谢:感谢詹发萃老师、张甬元老师、刘保元老师对论文设计及写作所给予的指导,感谢武汉大学生科院蒋婧同学及课题组其他同学在实验过程中所给予的帮助。