

一株根际好氧反硝化菌的筛选及其反硝化条件研究^①

周影茹^{1,2}, 陆玉芳^{1,2}, 施卫明^{1*}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为丰富好氧反硝化菌株种类, 本文从不同环境样品中富集筛选好氧反硝化细菌, 最终得到一株高效根际菌株 RWX31, 其在初始 NO_3^- -N 浓度 140 mg/L 时 24 h 去除率为 82%, 并在好氧条件下可进行反硝化作用产生 N_2O 。通过单因素试验研究该菌株进行反硝化作用的条件和特性, 结果表明, 菌株 RWX31 最适培养基条件分别为: 以柠檬酸钠为碳源, 接种量为 1%, Mg^{2+} 浓度为 0.05 g/L, 反硝化初始氮源中 NO_2^- -N 比例为 0。最适培养条件为: 温度 $28^\circ\text{C} \sim 32^\circ\text{C}$, pH 为 7.0 ~ 7.5, C/N 为 8 ~ 12, DO 浓度约 6.5 ~ 7.0 mg/L。在这些培养条件下菌株 NO_3^- -N 去除率可增至 90% 以上。菌株 RWX31 的 NO_3^- -N 去除能力高于以往报道的反硝化菌株, 是一株具有实际应用价值和潜力的菌株。

关键词: 根际; 好氧反硝化菌; 硝态氮去除率; 条件研究

中图分类号: X52

由于农业生产过程中肥料的大量施用, 使得硝酸盐污染地表水体和地下水源的现象日益严重^[1]。饮用水中高浓度的硝酸盐氮含量会引起儿童高铁血红蛋白症, 通过一系列化学和微生物过程硝酸盐还可以转化为亚硝胺, 对人体有致癌危害, 因此水体硝酸盐污染问题已经得到了广泛的重视^[2-4]。目前国内外已经发展出很多技术手段用以去除水体中的硝酸盐, 其中生物反硝化作用由于其省时、省力并且对环境无二次污染的特点而被认为是最可取的方法。生物反硝化是通过微生物作用将硝态氮转化为氧化亚氮气体或者氮气的过程。传统认为反硝化过程需要绝对的厌氧环境, 直到 1983 年 Robertson 等^[5]分离出著名的好氧反硝化菌株 *Thiosphaera pantotropha*, 之后越来越多的学者开始关注好氧反硝化的研究, 并且从不同环境下诸如土壤、沟渠、沉积物和活性污泥中分离筛选的好氧反硝化菌株不断被报道出来^[6-9]。

与厌氧反硝化相比, 好氧反硝化菌的优势在于, 它可以使得硝化和反硝化过程在同一体系中进行, 从而简化废水处理过程; 并且硝化作用的产物可以直接被反硝化菌利用, 避免脱氮过程中间产物如亚硝氮的积累对脱氮过程的抑制效应; 同时反硝化过程中释放的碱可以补偿硝化过程中释放的酸, 维持体系中 pH

的稳定。随着好氧反硝化菌功能在自然界氮素循环中的意义被人们逐步重视, 国内外对于好氧反硝化的研究日趋活跃^[10]。因此, 筛选高效菌株来丰富好氧反硝化菌株库并探明其最佳生长环境条件, 不仅具有理论意义, 而且具有一定的实际应用价值。

本文从不同的环境样品中筛选并分离好氧反硝化细菌, 最后得到一株高效根际细菌 RWX31, 再对其最佳反硝化培养体系条件进行考察和优化, 目的在于使该菌株最大程度地发挥其好氧反硝化潜力, 为深入开发和利用该菌进行生态处理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 培养基

1.1.1 富集培养基(EM, g/L) 柠檬酸钠 5, KNO_3 2, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 0.5, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, 微量元素溶液 1 ml, pH 7.2。添加 1.5 % 的琼脂制备成 EM 平板。

1.1.2 微量元素溶液(g/L) EDTA 50.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.5, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.06, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.61, pH 6.0。

1.1.3 反硝化培养基(DM, g/L) 柠檬酸钠 5, KNO_3

①基金项目: 公益性行业(农业)科研专项课题项目(201003014-1)和国家自然科学基金重大国际合作项目(30821140542)资助。

* 通讯作者(wmshi@mail.issas.ac.cn)

作者简介: 周影茹(1985—), 女, 陕西户县人, 博士研究生, 主要从事面源污染控制方面的研究。E-mail: zhouyingru1985@163.com

1.011, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 0.5, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, pH 7.2。

1.1.4 Luria-Bertani 培养基(LB, g/L) 蛋白胨 10, 酵母萃取物 5, NaCl 5, pH 7.0。添加 1.5% 的琼脂制备成 LB 平板。

1.1.5 修正的 Steinberg 溶液(mg/L) NH_4Cl 12.5, KH_2PO_4 1.756, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 98.9, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.18, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.18, H_3BO_3 0.12, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.76, pH 6.8。

1.2 高效除氮菌株的富集和分离

1.2.1 水体和土壤中脱氮菌株的分离 分别取 10 g 宜兴菜地和稻田土壤(约表层 5 cm)、10 ml 稻田面水及河流水样置于 250 ml 的三角瓶中,加入灭菌 EM 后在 160 r/min 摇床 28℃ 震荡 1 h 使其混合均匀,取 1 ml 混合液加入 9 ml 无菌 EM 中, 28℃ 恒温培养 3 天后再取 1 ml 菌液加于新鲜 EM 中, 如此多次富集后将菌液划线分离纯化直至出现单菌落。

1.2.2 浮萍根际脱氮菌株的分离 成熟浮萍植物 *Lemna minor* 用灭菌的去离子水小心冲洗 3 次后, 培养在无菌的修正 Steinberg 培养液中, 培养液以 15 mg/L 的 KNO_3 为唯一氮源, 温室培养条件为: 温度 23℃, 湿度 65%, 白炽灯照明, 光照时间/黑暗时间为 16 h/8 h。3 周富集培养后, 取 10 个健康的浮萍植株以灭菌的去离子水冲洗, 转移到 1.5 ml 离心管中, 离心管内含有 1 ml 的 5 mg/L 的三聚磷酸钠($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), 150 W 超声处理 6 次, 每次时间为 5 s, 以使浮萍植物根际表面附着的细菌分离, 菌悬液梯度稀释后涂布于 EM 平板上, 纯化几次直至出现单菌落^[1]。

1.2.3 菌株好氧反硝化产 N_2O 能力的验证 在 250 ml 的三角瓶中, 加入 100 ml 的 DM 培养基, 接种 1 ml 经富集分离得到的高效脱氮菌株 RWX31 菌液 ($\text{OD}_{600} = 0.5$), 三角瓶用丁基橡胶塞密封并在周围结合处涂抹 704 以防止漏气。培养之前, 瓶内不断地通过 0.22 μm 的滤膜抽真空和充入氦气和氧气的混合气体(80% $\text{He} + 20\% \text{O}_2$)(每次充气 15 min, 共进行 3 次, 以利用气液相内气体的平衡)。瓶内过量的气压通过针孔释放, 等内外大气压平衡后再用 704 胶封住针孔, 开始培养。培养在 160 r/min, 30℃ 的条件下进行 24 h, 培养结束后采培养液测 NO_3^- -N 和 TN, 并采集气体样品测定 N_2O 浓度。

1.3 菌株生长和脱氮曲线的测定

菌株 RWX31 接种至 LB 培养基中预培养至对数期(约 12 h), 按体积比 1% 的量接入 100 ml 反硝化培养基中, 于 30℃ 和 160 r/min 摇床下培养, 定期检

测菌液 OD_{600} 、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N 和 TN。以未接入菌的空白 LB 培养基为对照。

1.4 反硝化培养基组分对 RWX31 反硝化作用的影响

除了以下试验设置的因素外, 其余试验条件均固定为: 取 1 ml 菌液($\text{OD}_{600} = 0.5$)接种于 100 ml 反硝化培养液中, 在温度 30℃ 和 160 r/min 摇床培养 24 h 后取上清液测 OD_{600} 、 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N。

1.4.1 最适碳源试验 DM 培养液中碳源分别替换为等碳量的柠檬酸钠、蔗糖、果糖、甲醇、淀粉和葡萄糖, 研究其对菌株好氧反硝化作用的影响。

1.4.2 最适接种量试验 分别接种 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 ml 的菌液至上述培养体系中, 研究初始接种量对菌株好氧反硝化作用的影响。

1.4.3 最适 Mg^{2+} 浓度试验 DM 培养液中 Mg^{2+} 浓度分别设置为 0、0.05、0.10、0.15、0.20 和 0.25 g/L, 研究其对菌株好氧反硝化作用的影响。

1.4.4 NO_2^- -N 在初始氮源中的比例试验 DM 培养液中 TN 为 140 mg/L 的条件下调节初始 NO_2^- -N 比例分别为 0、20、40、60、80 和 100, 研究 NO_2^- -N 在初始氮源中的比例对菌株好氧反硝化作用的影响。

1.5 反硝化条件培养条件对 RWX31 反硝化作用的影响

1.5.1 温度对反硝化作用的影响 试验中温度条件分别设置为 20℃、25℃、28℃、30℃、32℃、35℃ 和 40℃。

1.5.2 pH 对反硝化作用的影响 试验中初始培养液 pH 分别设置为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0。

1.5.3 C/N 对反硝化作用的影响 试验中初始培养液 C/N 分别设置为 2、4、6、8、8.7、10 和 12。

1.5.4 溶解氧(DO)对反硝化作用的影响 试验中 DO 的变化通过摇床转速的改变来实现, 摇床转速分别设置为 0、50、100、150、200 和 250 r/min。

1.6 分析检测项目和方法

菌体生物量采用比浊法测定, 即用分光光度计(Bio-Rad 3000 ;USA)测定菌体在 600 nm 波长处的吸光度, NO_3^- -N 测定采用紫外分光光度法, NO_2^- -N 测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法, TN 测定采用过硫酸钾消解-紫外分光光度法。DO 含量通过雷磁 JPB-607 型溶解氧仪测定。 N_2O 气体测定采用带电子捕获器的气相色谱(柱子: Porapak Q, 3 m × 3 mm)测定。所有的试验均设置 3 个重复。试验数据用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件进行数理统计分析, 并用 Duncan 检验进行多重比较($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 高效除氮菌株的富集与分离

经过富集培养，从土壤、水体和浮萍根际样品中共分离到菌株 128 株，其中具有除氮潜力的菌株为 69 株。定量复筛试验显示，在 140 mg/L 的初始 NO_3^- -N 体系中培养 24 h 后，有 6 株菌株 NO_3^- -N 去除率在 70% 以上，它们的来源及除氮效率如表 1 所示。由表 1 中结果可以看出，从土壤、水体和浮萍根际共分离得到菌株 25、10 和 34 株，其中除氮率高于 75% 的菌株数为 4 株，有 3 株来自浮萍根际。

已有相关研究证明，植物根际分泌物能为微生物

提供营养和能量来源，从而使得微生物数量、组成和活性显著增加^[12]，而本人之前研究结果也发现，太湖地区高效浮萍品种去除水体氮素的机理可能是由于微生物与化学作用共同引起的^[13]，可见根际环境对微生物活性的影响。而从数量上来讲，李振高等^[14]早在 1987 年就发现，从水稻根际土壤分离得到的反硝化细菌占到细菌总数的 50% ~ 70% 以上，本研究经初筛在浮萍根际分离的菌数(34)占总菌数的 50%，再一次验证了这一结论在水生植物浮萍根际也成立。由于根际菌株 RWX31 具有最高的除氮效率及相对稳定性，因此后续试验以 RWX31 菌株为研究对象。经 16S rRNA 鉴定，菌株 RWX31 为 *Pseudomonas* 属^[15]。

表 1 环境样品中分离反硝化菌株
Table 1 Denitrifying bacteria isolated from different samples

菌株来源	经初筛所得菌株总数	除氮率变幅(%)	高效除氮菌株数(除氮率>75%)	高效菌株所占比例(%)
土壤	25	3.1 ~ 56.3	0	0
水体	10	32.9 ~ 79.7	1	10
浮萍根际	34	15.3 ~ 81.3	3	9
总和	69	3.1 ~ 81.3	4	6

将 RWX31 菌液接种至 DM 培养基中，在 80% He + 20% O₂ 的条件下培养 24 h，反应结束后，测得三角瓶培养基内 DO 浓度为 3.8 ~ 5.9 mg/L，因此整个反应过程中 O₂ 并未被消耗完，所以认定反应是在好氧条件下进行的^[16]。经气相色谱检测到菌株 RWX31 可进行反硝化脱氮作用，将体系中硝态氮转化为 N₂O 逸出。体系中初始和结束时 NO_3^- -N 浓度分别为 140 和 25 mg/L，TN 浓度分别为 144 和 58 mg/L，N₂O 浓度分别为 0 和 197 mg/kg。根据氮平衡计算，可见 24% 的初始 NO_3^- -N 转化为生物氮，18% 的初始 NO_3^- -N 残留在液体培养基中，剩余 58% 以气态形式逸出体系，而 N₂O-N 仅占到气体形式的不到 1%，剩余的则可能是以没有测出的 N₂ 形式逸出，从而从体系中脱除。菌株 RWX31 不仅可用于反硝化脱氮，并且对于抑制温室气体排放也有很大的作用。

2.2 菌株 RWX31 生长和脱氮曲线

测定生长和脱氮曲线了解其生长繁殖规律，将有效利用和控制细菌的生长及反硝化作用提供重要的理论依据。将 RWX31 预培养液以 1% 的接种量接种至 DM 培养液中培养，定期取样检测其 OD₆₀₀、 NO_3^- -N 和 TN 浓度。细菌生长表现出明显不同的 4 个时期：延滞期、对数生长期、稳定生长期和衰亡期。由图 1 可看出，RWX31 经过 9 h 的延滞期后进入对数生长期，21 h 到达稳定期，之后其生物量缓慢下降。

在实际生产中若需要大规模生产则可选择 18 ~ 21 h 的菌液做接种液。而根据 NO_3^- -N 浓度曲线则可发现，RWX31 在初始的 12 h 内 NO_3^- -N 浓度下降极为有限，这与菌株初期的延滞期有关，体系中未长出大量菌体，氮素浓度下降缓慢。从 12 h 到 21 h 之间，体系中氮素不断下降，到 24 h 时， NO_3^- -N 浓度仅为 25 mg/L。这阶段是微生物生长和繁殖最旺盛的对数生长期，也是其所需能量和还原力最多的时期，因此反硝化脱氮主要在这个阶段完成，这也与马放等^[17]分离得到的好氧反硝化菌 X31 的脱氮发生时间特性是一致的。菌株培养至 36 h 时，体系中 NO_3^- -N 浓度略有上升，这可能与菌体衰亡后自溶现象以及反硝化产生的高浓度 N₂O 气体在培养液中的重新溶解有关。由于菌株 24 h NO_3^- -N 去除率可达到最大 82%，因此之后试验均选择 24 h 为培养时间。体系中 TN 浓度的测定是取培养液直接消解并测定，这部分浓度包括培养液中的 NO_x-N 和菌体细胞内同化生物氮素的氮，因此通过 TN 浓度变化曲线，可以排除微生物同化引起的氮素减少的可能^[18]。从图 1 中可以看出，试验进行至 36 h 时，体系中 NO_3^- -N 的去除率为 80%，而 TN 的去除率达到 76%，由此可以合理推测，这部分的氮素是通过菌体反硝化作用产生气体逸出体系而并非微生物同化作用所减少。

不同的反硝化菌的脱氮率差异较大。王慧荣等^[19]

从活性污泥中分离到的好氧反硝化菌 CW, 培养 24 h 后对初始浓度 108 mg/L 的 NO_3^- -N 去除率为 75%, 郭艳丽等^[4]分离到的轻度嗜盐反硝化菌 YL-1 培养 24 h 对初始 115 mg/L 的 NO_3^- -N 去除率则为 50% 左右, 而高喜燕等^[20]分离出的假单胞菌属菌株 2-8, 在初始 NO_3^- -N 浓度为 140 mg/L 的体系中培养 48 h 脱氮率达到 92%, 本研究中菌株 RWX31 在 140 mg/L 的初始 NO_3^- -N 浓度下仅用 24 h 其脱氮率便可达到 82%, 通过比较可以认为 RWX31 是一株高效的好氧反硝化菌株, 具有实际应用价值和潜力。

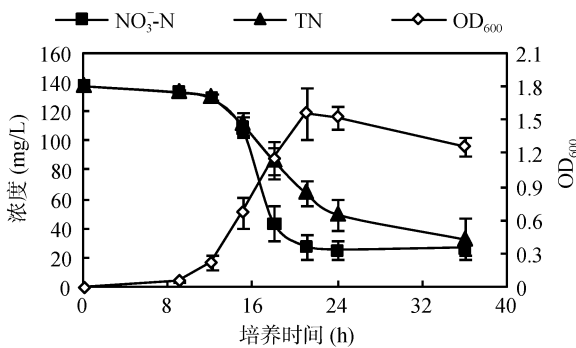


图 1 菌株 RWX31 生长与 NO_3^- -N 和 TN 去除曲线
Fig.1 Growth curve and NO_3^- -N and TN remove performance of strain RWX31

2.3 单因素试验确定最佳培养基组分条件

2.3.1 不同碳源对菌株 RWX31 反硝化作用的影响

目前发现的绝大多数好氧反硝化菌为异养细菌, 碳源是影响其反硝化能力的重要因素。由于不同菌株代谢机理、电子传递途径的差异, 所需碳源种类也呈现出多样性。表 2 结果表明菌株 RWX31 能利用果糖、柠檬酸钠和葡萄糖作为电子供体。在这些碳源中, 柠檬酸钠能够最有效维持菌体生长和反硝化作用, 其培养 24 h 的硝酸盐还原率可高达 91.5%。另一报道中的 *P. stutzeri* D6 也喜欢以柠檬酸作为碳源来进行反硝化过程^[21], 而芽孢杆菌 D5 则以乙酸钠为碳源时反硝化能力更强^[22]。这些研究结果表明虽然葡萄糖被作为碳源广泛使用, 但它并非是所有微生物反硝化的最佳碳源, 因为它需要在微生物体内经过一系列的酶转化才能被插入代谢过程中, 而有机酸可以不需转化而直接插入代谢过程。表 2 的结果也显示出其他碳源并不支持菌株 RWX31 的生长, 因此其 NO_3^- -N 去除率很低。

2.3.2 不同接种量对菌株 RWX31 反硝化作用的影响

将 RWX31 菌株分别按照不同的体积分数接种到 DM 培养基, 在已确定的培养条件下培养 24 h 后测其菌体生长量 OD_{600} 和其对 NO_3^- -N 的去除率, 结

表 2 菌株 RWX31 在不同碳源中的反硝化活性
Table 2 Denitrification activity of strain RWX31 in different carbon sources

碳源	OD_{600}	NO_3^- -N 浓度 (mg/L)	NO_2^- -N 浓度 (mg/L)	NO_3^- -N 去除率(%)
蔗糖	0.013	138.4	0	13.80
果糖	0.563	92.8	4.89	30.43
柠檬酸钠	1.534	11.3	5.50	91.54
甲醇	0.021	138.8	0	4.13
淀粉	0.025	134.9	0	1.15
葡萄糖	0.874	67.6	5.41	49.33

果如图 2 所示。当接种体积大于 0.5% 时, OD_{600} 便开始下降, 而只有当接种体积大于 1.0% 时 NO_3^- -N 的去除率才开始下降, 这是因为大量的接种会使微生物对营养物质的需求增加, 从而单个微生物可以利用的营养减少, 限制了其生长, 但是对于反硝化作用而言, 菌体生长的适量增加会加强其反硝化作用, 因此反硝化效率的下降略慢于菌体生长 OD_{600} 的下降, 但若增加过多, 反倒所有菌体生长状态不佳, 从而影响其反硝化特性的发挥。李俊叶等^[23]研究 AM-4 菌株对丙烯酰胺的降解时候也同样发现, 当接种体积超过 2% 时, 其降解率反而快速下降。

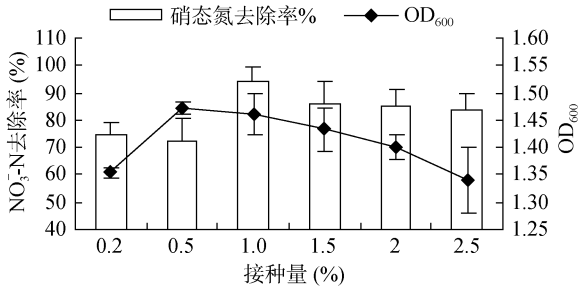


图 2 初始接种量对 RWX31 生长和反硝化效率的影响
Fig. 2 Effects of inoculation size on growth and denitrification performance of strain RWX31

2.3.3 不同 Mg^{2+} 浓度对菌株 RWX31 反硝化作用的影响

Mg^{2+} 一般是作为好氧反硝化酶的激活剂来影响代谢的流量控制系数的。流量控制系数是由于酶的变化所引起的某分支稳态代谢流量的变化, 用来衡量某一步酶反应对整个反应体系的控制程度^[24]。本实验通过改变 Mg^{2+} 浓度而使控制好氧反硝化反应的周质硝酸盐还原酶的活性发生改变, 从而研究该酶的活性对好氧反硝化反应体系的控制程度。由表 3 可以看出, 在 Mg^{2+} 浓度为 0 时, 反硝化酶活性很低, 菌株 NO_3^- -N 去除率仅为 6.8%, 而当 Mg^{2+} 浓度等于 0.05 g/L 时, 酶活性开始显现, 之后再升高 Mg^{2+} 浓度活性提升便不明显, 可见 Mg^{2+} 浓度在 0.05 g/L 时即可充分激活酶。且无论 Mg^{2+} 浓度多大, NO_2^- -N 的积累均无较大变化。左薇^[24]认为, Mg^{2+} 应该为好氧反硝化

第一步即硝酸盐还原酶的激活剂,而对亚硝酸盐还原酶作用无影响。本研究结果验证了其观点。

表 3 Mg^{2+} 浓度对 RWX31 反硝化作用的影响
Table 3 Effect of Mg^{2+} concentration on denitrification of strain RWX31

Mg^{2+} 浓度 (g/L)	OD ₆₀₀	NO_2^- -N 浓度 (mg/L)	NO_3^- -N 浓度 (mg/L)	NO_3^- -N 去除率 (%)
0	0.03	0.33	155.71	6.81
0.05	1.58	13.56	22.42	85.60
0.10	1.51	16.36	48.08	69.12
0.15	1.45	0	38.69	75.15
0.20	1.38	8.55	31.15	79.99
0.25	1.38	15.58	42.72	72.56

2.3.4 不同 NO_2^- -N 在初始氮源中的比例对菌株 RWX31 反硝化作用的影响 NO_2^- -N 是反硝化过程硝酸盐还原的第一步产物,其在反硝化底物中的浓度可以反映反硝化酶系的活性分布。如表 4 所示,反应底物中 NO_2^- -N 比例为 0 时,其反硝化效率最高,可达到 79.9%,之后随着 NO_2^- -N 比例的增高反硝化效率降低,说明在 NO_2^- -N 比例较低时候,体系中 NO_2^- -N 会对微生物细胞产生毒害作用而影响其反硝化的效率,而当 NO_2^- -N 比例超过 50%时,RWX31 的反硝化效率又会增高,说明较高浓度的 NO_2^- -N 会诱导亚硝酸还原酶的活性。在初始底物含有 NO_2^- -N 的所有处理中,培养结束后 NO_2^- -N 浓度均在 20~30 mg/L 左右,说明随着 NO_2^- -N 的浓度增加,其酶系中的亚硝酸还原酶活性逐渐增大。王少坡等^[25]研究发现,在固定的 NO_x -N 浓度下, NO_2^- -N 所占比例越大,则硝酸盐还原所需的时间越短,并且在反硝化结束时候所达到的 pH 最大值越高,证明 NO_2^- -N 所占比例对反硝化的碱度补充具有重要作用,这对于同步硝化反硝化是非常有益的。但本文的结论与其不同,可能原因是由于初始 NO_2^- -N 浓度的差异所致,他们的研究中初始 NO_x -N 浓度设定为 20 mg/L 左右,而本研究中浓度则固定为 140 mg/L,本研究中高浓度的 NO_2^- -N 可能会对微生物相关酶产生毒害作用。而王会聪等^[26]分离得到的亚硝酸盐去除菌 AQ-3,在体系中 NO_2^- -N 浓度高于 20 mg/L 时,对亚硝酸盐的去除率就会显著下降。

2.4 单因素试验确定最佳培养条件

2.4.1 温度对 RWX31 菌株好氧反硝化作用的影响

温度对反硝化还原酶活性具有很重要的作用,反硝化还原酶系发挥活性的最佳温度范围是 25℃~35℃,在过低或过高温度时其活性会被抑制^[27]。本研究中,最佳反硝化温度也在此范围内(图 3a)。30℃

表 4 NO_2^- -N 在初始氮源中所占比例对 RWX31 反硝化作用的影响

Table 4 Effect of nitrite proportion on denitrification of strain RWX31

NO_2^- -N 比例 (%)	OD ₆₀₀	NO_2^- -N 浓度 (mg/L)	NO_3^- -N 浓度 (mg/L)	NO_3^- -N 去除率 (%)
0	1.47	0.56	29.23	79.90
20	1.42	28.26	44.84	69.18
40	1.38	21.71	69.17	52.45
60	1.44	28.47	44.44	69.45
80	1.44	34.73	47.15	67.58
100	1.37	21.77	62.03	57.36

培养 24 h 时,菌株可达到 92.7% NO_3^- -N 去除率。温度高于或低于 30℃时其除氮效率均下降。蔡昌凤等^[28]分离到的反硝化菌株 F1 的最佳去除生物 NO_3^- -N 的温度也为 30℃~35℃。

2.4.2 pH 对 RWX31 菌株好氧反硝化作用的影响

反硝化最佳 pH 多为中性或弱碱性,否则环境中过量的氢离子会影响微生物对营养物质的吸收和反硝化酶活力^[29]。由图 3b 可知,RWX31 在弱碱性 pH 7.2 时其反硝化活性最大,可达 90.3%。酸性(pH < 6)或碱性(pH > 7.5)对 RWX31 菌株生长和反硝化均不利。

2.4.3 C/N 对 RWX31 菌株好氧反硝化作用的影响

C/N 是衡量反硝化体系中电子供体与电子受体的比率。当碳源不充足时,电子流过低难以提供足够的能源来维持细胞生长,菌体就只能利用自身细胞物质进行内源呼吸反硝化,相应的反硝化效率会降低;但在较高 C/N 条件时,碳源已非限制性因素,菌体生长和代谢活性稳定,此时增加碳源反硝化效率的增加也极为有限^[30]。图 3c 的结果显示 RWX31 的反硝化效率随着 C/N 的增加而增大,在 C/N 为 10 时候达到最大,此时 NO_3^- -N 去除率可达到 91.2%。此值略高于普通反硝化所需的 C/N,可能是由于 RWX31 菌株需要更多的能量来用于反硝化过程,并且根据 Chiu 等^[31]的研究,对于同一菌株,使用不同碳源时由于其新陈代谢途径和面临的竞争不同,其所需最佳 C/N 也是不同的。Stouthamer 等^[32]还发现,在高 C/N 和限制性呼吸环境下,氧化还原反应强,周质硝酸盐还原酶的基因调控蛋白活性较高,可激活反硝化相关基因的表达,因此他们认为碳源在反硝化过程中可能还起着氧化还原阈值的作用。

2.4.4 DO 对 RWX31 好氧反硝化作用的影响

DO 浓度是好氧反硝化的一个重要因素,研究表明 DO 浓度与摇床转速显著相关^[4,33-34]。本研究中,当摇床转速为 0 和 50 r/min 时(DO 浓度约 3.5~5.8 mg/L), NO_3^- -N 的去除率很低,仅为 63% 和 31.2%。但当转

速增至 100 ~ 250 r/min (DO 浓度 6.5 ~ 7.0 mg/L) 时, NO_3^- -N 去除率有效地提高, 超过 90%。传统理论认为, 氧气的存在会抑制硝酸盐还原酶的活性, 从而抑制反硝化作用。而 Robertson 和 Kuenen^[16]对“好氧反硝化”的说法从 3 个方面做了定义: 字面意义来讲, 在有 O_2 存在的情况下能进行反硝化作用(即共呼吸作用); 从微生物生理的角度来讲, 则 O_2 浓度需足够饱和和细胞电子传递链终端色素氧化酶(因微生物种类而异, 一般为 1% ~ 2% 空气饱和和浓度, 即 DO 浓度约为 0.1 ~ 0.2 mg/L); 而从生态环境的方面来说, 则反硝化过程需发生在 O_2 浓度可被检测到的情况下。根据这 3 个定义, 本文中转速 100 ~ 250 r/min (DO 浓

度 6.5 ~ 7.0 mg/L), 完全属于其所认知的好氧范畴, 可以定义为好氧反硝化。但是本文结果, 摇床转速高于 100 r/min 后其对 RWX31 菌株的反硝化活性影响不大, 可见菌株 RWX31 的好氧反硝化酶和有氧呼吸系统可以同时存在。Patureau 等^[35]指出, 在反硝化还原酶和好氧呼吸系统共存的好氧反硝化菌中, 缺乏 NO_x^- 或 O_2 任意一个均会降低细胞生长速率和反硝化速率。临界理论认为在一定的 DO 范围内, 反硝化率不受其影响, 当 DO 浓度降至某值时, 反硝化酶的活性会显著增加。本研究中 RWX31 的 NO_3^- -N 去除曲线与此理论一致, 其理论 DO 阈值为摇床转速 100 ~ 250 r/min (DO 浓度 6.5 ~ 7.0 mg/L)。

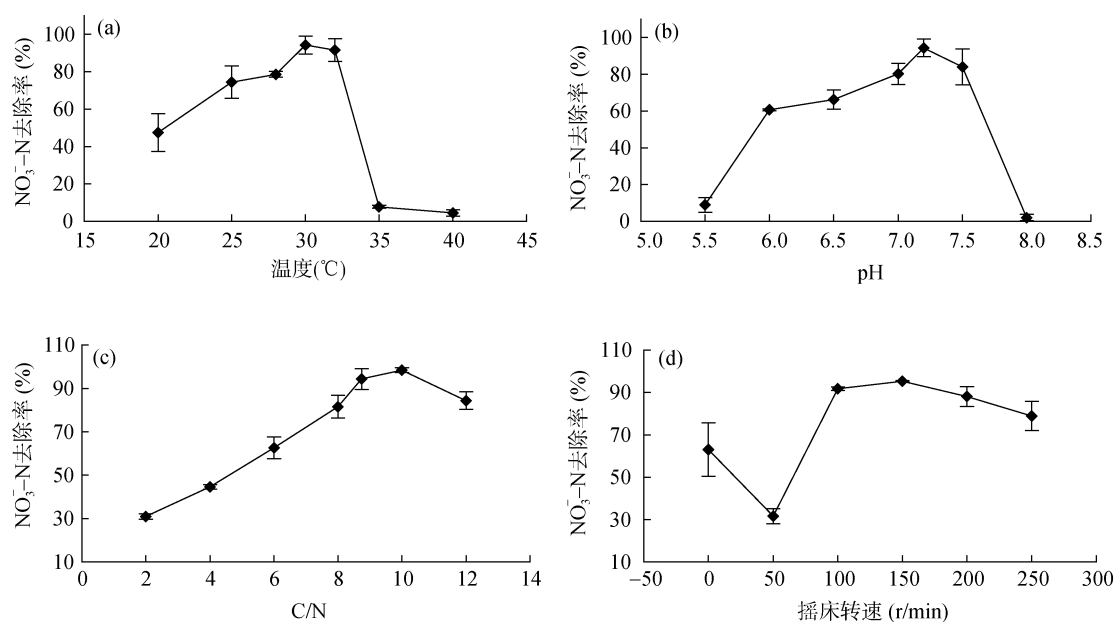


图 3 培养温度、pH、碳氮比和摇床转速对 RWX31 反硝化作用的影响

Fig.3 Effects of temperature, pH, carbon nitrogen ratio and shaking speed on denitrification of strain RWX31

3 结论

本文从不同环境样品中筛选好氧反硝化细菌, 得到一株浮萍根际菌 RWX31, 其在 140 mg/L 的初始 NO_3^- -N 浓度下培养 24 h 对 NO_3^- -N 的去除率可达 82%, 并在好氧条件下可进行反硝化作用产生 N_2O 。通过对根际菌株 RWX31 生长与脱氮条件和特性的研究, 发现 RWX31 的最适培养基条件是以柠檬酸钠为碳源, 接种量为 1%, Mg^{2+} 浓度为 0.05 g/L, 反硝化初始氮源中无 NO_2^- -N。而最适宜培养条件则是温度 28°C ~ 32°C, pH 为 7.0 ~ 7.5, C/N 为 8 ~ 12, DO 浓度约 6.5 ~ 7.0 mg/L。RWX31 在初始 NO_3^- -N 浓度 140 mg/L 时在如上条件培养 24 h 后脱氮率可高于 90%。由此可见, RWX31 是一株高效的好氧反硝化菌株, 具有

优秀的实际应用价值和潜力。

参考文献:

- [1] 闵炬, 陆扣萍, 陆玉芳, 卢伟伟, 周影茹, 孙海军, 邢光熹, 施卫明, 朱兆良. 太湖地区大棚蔬菜地土壤养分与地下水水质调查[J]. 土壤, 2012, 44(2): 213-217
- [2] Borges MT, Sousa A, De Marco P, Matos A, Honigova P, Castro PML. Aerobic and anoxic growth and nitrate removal capacity of a marine denitrifying bacterium isolated from a recirculation aquaculture system[J]. Microbial Ecology, 2008, 55(1): 107-118
- [3] Kim M, Jeong SY, Yoon SJ, Cho SJ, Kim YH, Kim MJ, Ryu EY, Lee SJ. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(5): 498-502
- [4] 郭艳丽, 张培玉, 于德爽, 曲洋, 郭莎莎, 成广勇. 一株轻度嗜盐反硝化菌的分离鉴定及特性[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3): 394-398

- [5] Robertson LA, Kuenen JG. Anaerobic and aerobic denitrification by sulphide-oxidizing bacteria from waste water[J]. Proceedings of the European Symposium on Anaerobic Waste Water Treatment, 1983: 3-12
- [6] Robertson LA, Cornelisse R, Vos P, Hadjioetomo R, Kuenen JG. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1989, 56(4): 289-299
- [7] 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[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(3): 457-462
- [8] Yang XP, Wang SM, Zhang DW, Zhou LX. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 854-862
- [9] 庞德红, 柳知非. 好氧反硝化脱氮机理及处理 NO_x 废气的展望[J]. 污染防治技术, 2010, 23(3): 74-77
- [10] 梁书诚, 赵敏, 卢磊, 赵丽艳. 好氧反硝化菌脱氮特性研究进展[J]. 应用生态学报, 2010, 21(6): 1 581-1 588
- [11] Yamaga F, Washio K, Morikawa M. Sustainable biodegradation of phenol by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from the rhizosphere of duckweed *Lemna aoukikusa*[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(16): 6 470-6 474
- [12] Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2004, 17(1): 6-15
- [13] 周影茹, 袁晓燕, 王俊儒, 包涛芳, 施卫明. 太湖地区高效除氮浮萍品种的筛选及其除氮机理的初步研究[J]. 土壤, 2010, 42(3): 390-397
- [14] 李振高, 万焕楣, 吴留松, 乔凤珍. 水稻根际反硝化细菌生态分布的研究[J]. 土壤学报, 1987, 24(2): 120-126
- [15] Zhou YR, Lu YF, Zhang HL, Shi WM. Aerobic denitrifying characteristics of duckweed rhizosphere bacterium RWX31[J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(3): 211-219
- [16] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: A controversy revived[J]. Archives of Microbiology, 1984, 139(4): 351-354
- [17] 马放, 王弘宇, 周丹丹, 左薇. 好氧反硝化菌株 X31 的反硝化特性[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2005, 33(7): 42-46
- [18] 周立祥, 黄峰源, 王世梅. 好氧反硝化菌的分离及其在土壤氮素转化过程中的作用[J]. 土壤学报, 2006, 43(3): 430-435
- [19] 王慧荣, 韦彦斐, 梅荣武, 孔艳. 一株好氧反硝化菌的分离及特性研究[J]. 环境保护科学, 2012, 38(1): 13-18
- [20] 高喜燕, 刘鹰, 郑海燕, 刘纓, 刘志培. 一株海洋好氧反硝化细菌的鉴定及其好氧反硝化特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(9): 1 164-1 171
- [21] Yang XP, Wang SM, Zhou LX. Effect of carbon source, C/N ratio, nitrate and dissolved oxygen concentration on nitrite and ammonium production from denitrification process by *Pseudomonas stutzeri* D6[J]. Bioresource Technology, 2012, 104: 65-72
- [22] 李兵, 林炜铁. 1 株好氧反硝化芽孢杆菌的脱氮特性研究[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(3): 48-52
- [23] 李俊叶, 王筱兰, 邹峥嵘. 丙烯酸胺降解菌的筛选及优势菌株降解条件优化[J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2012, 36(1): 35-40
- [24] 左薇. 一株好氧反硝化菌的筛选鉴定及其脱氮特性分析(硕士学位论文)[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2006
- [25] 王少坡, 彭永臻, 王淑莹, 张艳萍, 于德爽, 周红星. 不同硝态氮组成下反硝化过程控制参数 pH 变化规律[J]. 高技术通讯, 2005, 15(8): 91-95
- [26] 王会聪, 曹海鹏, 何珊, 杨先乐. 一株养殖水体亚硝酸盐去除菌的鉴定及其去除条件[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 154-161
- [27] Song ZF, An J, Fu G H, Yang XL. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds[J]. Aquaculture, 2011, 319(1/2): 188-193
- [28] 蔡昌凤, 梁磊. 高效好氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性的研究[J]. 环境科学与技术, 2011(1): 41-44
- [29] Thomas KL, Lloyd D, Boddy L. Effects of oxygen, pH and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas* species[J]. FEMS Microbiology Letters, 1994, 118(1/2): 181-186
- [30] 李慧颖, 黄少斌, 范利荣. 一株好氧反硝化菌的反硝化性能研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(8): 9-12
- [31] Chiu YC, Chung MS. Determination of optimal COD/nitrate ratio for biological denitrification[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 51(1): 43-49
- [32] Stouthamer A. Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1992, 61(1): 1-33
- [33] Taylor SM, He Y, Zhao B, Huang J. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying- denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(10): 1 336-1 341
- [34] Zhang QL, Liu Y, Ai GM, Miao LL, Zheng HY, Liu ZP. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methyilotrophicus* strain L7[J]. Bioresource Technology, 2012, (108): 35-44
- [35] Patureau D, Bernet N, Delgenès JP, Moletta R. Effect of dissolved oxygen and carbon-nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 54(4): 535-542

Isolation and Denitrification Conditions of Rhizosphere Aerobic Denitrifying Bacterium RWX31

ZHOU Ying-ru^{1,2}, LU Yu-fang^{1,2}, SHI Wei-ming¹

(1 *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture(Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences)*, Nanjing 210008, China; 2 *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, China)

Abstract: The aim of this study was to screen aerobic denitrifying strain from various environmental sites and to investigate the denitrification conditions for the isolated strain. Enrichment culture technique was used in screening and acclimatization of strain, a rhizosphere aerobic denitrifying bacterium RWX31 was isolated and single-factor experiments were used to investigate the denitrification conditions and characteristics. The nitrate remove efficiency of aerobic denitrifying strain RWX31 was 82% when cultivated in 140 mg/L nitrate for 24 hours, N₂O could be produced aerobically through aerobic denitrification of strain RWX31. The optimum medium was: sodium citrate as carbon source, 1% inoculation volume, 0.05 g/L Mg²⁺ concentration and nitrite proportion of 0 in the initial denitrification nitrogen source. The optimum condition was: temperature 28°C–32°C, pH 7.0–7.5, C/N ratio 8–12 and DO concentration 6.5–7.0 mg/L. The highest nitrate removal efficiency was higher than 90% under the above conditions. Rhizosphere bacterium RWX31 was an efficient aerobic denitrifying strain with higher nitrate removal efficiency than reported previously and has application potential.

Key words: Rhizosphere, Aerobic denitrifying, Nitrate nitrogen removal efficiency, Condition investigation