

好氧反硝化细菌的筛选及反硝化效率测定

李永勇, 罗泽娇, 毛维美, 刘存富 (中国地质大学(武汉)环境学院, 湖北武汉430074)

摘要 从土壤中分离得到21株能以硝酸盐为唯一氮源提供的细菌, 其中, 能进行反硝化生成亚硝酸盐氮的细菌共12株, 从中选择效果较好的2株作为研究对象, 分别标记为DM8和DM13。研究其生长曲线、最适生长pH值范围, 得到DM8最适生长的pH值范围是6.0~8.0, DM13最适生长的pH值范围是6.0~7.5。测定反硝化过程中硝酸盐氮和亚硝酸盐氮的浓度变化, DM8和DM13在培养48h后, 硝酸盐氮的去除率分别为33%和97%。

关键词 好氧反硝化细菌; 筛选; 反硝化效率

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)06-02191-03

Aerobic Denitrifiers Isolated and Denitrification Efficiency Measuring

LI Yongyong et al (School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract 21 strains that can consume nitrate as only source of nitrogen were isolated from the soil, among which 12 strains can convert nitrate into nitrite. The best two strains, which were marked as DM8 and DM13, were chosen for further study. The growth curve, the optimum pH value range and the concentrations of the nitrate and nitrite in the denitrification process were obtained for both of the two strains. The optimum pH value range for DM8 was 6-8 whereas 6.0~7.5 was the optimum pH range for DM13. In case of denitrification process, after 48 h the nitrate elimination rate was found as 33% and 97% for DM8 and DM13 strains respectively.

Key words Aerobic denitrifiers; Screening; Denitrification efficiency

农用氮肥, 是引起地下水硝酸盐污染的一个主要原因。硝酸盐氮可以转化成亚硝胺, 而亚硝胺是三大致癌物之一。我国的食管癌高发区(如河北磁县, 河南安阳、林县), 其癌症发病率与饮用水、土壤和食物中 NO_3^- 等氮污染物呈正相关关系^[1-2]。目前, 我国地下水的硝酸盐氮污染加重, 地下水硝酸盐污染问题正日益受到国内外研究者的关注^[3-4]。以我国河北省为例, 1991年2月~1993年7月间的地下水监测结果表明, 邯郸市地下水硝酸盐氮含量为79.71 ng/L, 唐山市32.00 ng/L, 秦皇岛37.30 ng/L, 分别超过我国《生活饮用水水质卫生规范》中规定的4.6、1.6和1.9倍^[5]。我国滇池流域地下水硝酸盐属于III类标准(2.00~20.00 ng/L)的仅为30%, IV类(20.00~30.00 ng/L)为20%, V类(30.00 ng/L)为50%, 地下水硝酸盐合格率仅为30%^[6]。

随着地下水中氮污染的日益严重, 地下水脱氮已成为一个重要的研究课题, 而生物脱氮则是一种有效而又经济的方法。传统认为, 能进行反硝化的细菌, 大都是兼性厌氧的, 细菌的反硝化作用是在无氧条件下发生的。在有氧条件下, 阻止了反硝化细菌以硝酸盐或亚硝酸盐作为最终的电子受体; 只有在无氧的条件下, 才能诱导出反硝化所需的硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶。但近年来, 国内外许多研究已充分证明了好氧反硝化细菌的存在^[7]。笔者从土壤中筛选出能在好氧条件下进行反硝化的细菌, 研究其生长条件及其反硝化效率, 为好氧反硝化脱氮的工程利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 培养基^[8] 土壤中好氧条件下能耐受硝态氮的细菌筛选培养基(SM), 其配方为丁二酸钠2.84 g/L、 NaNO_3 0.67 g/L、 KH_2PO_4 1.36 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.24 g/L、酵母粉1.00 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.19 g/L, 1 L培养基加入1 ml 微量元素溶液, pH值调至7.2。

鉴别筛选得到的细菌是否具有反硝化能力的鉴别培养基

基金项目 国家自然科学基金青年基金资助项目(40402020); 武汉市晨光计划(20045006071-20)。

作者简介 李永勇(1982-), 男, 山西太原人, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物。

收稿日期 2007-10-12

基(BTB), 其配方为L-天门冬酰胺酸1.00 g/L、 KNO_3 1.00 g/L、 KH_2PO_4 1.00 g/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00 g/L, 1 L培养基加入1 ml 溴百里酚兰(BTB)储备液(1%的BTB乙醇溶液), 琼脂20.00 g/L, pH值调至7.0~7.3。

反硝化培养基(DM)用于驯化菌种, 并作为测试细菌反硝化能力的液体培养基, DM培养基中仅以 NO_3^- 为唯一氮源来源, 避免其他氮源对结果造成影响, 其配方为丁二酸钠4.72 g/L、 NaNO_3 0.67 g/L、 KH_2PO_4 1.50 g/L、 Na_2HPO_4 0.42 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00 g/L, 1 L培养基加入2 ml 微量元素溶液, pH值调至7.2。配制固体培养基时加入20.00 g/L琼脂粉。

微量元素溶液配方为 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4.00 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 g/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7.00 g/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.20 g/L、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.40 g/L和 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.00 g/L。

1.2 测试方法 NO_3^- -N的测定采用离子选择电极法, 该方法操作简单、快捷, 不受浊度、色度干扰, 其他共存离子对其干扰小, 还具有较高的灵敏度、准确度和精度, 测量范围为0.10~1 000.00 ng/L。

NO_2^- -N的测定采用-萘胺光度法, 在pH值为2.0~2.5时, 水中亚硝酸盐与对磺基苯磺酸生成重氮盐, 与盐酸-萘胺发生偶联后生成红色偶氮染料, 其色度与亚硝酸盐含量成正比, 波长520 nm条件下测量吸光度, 测量范围是0.10~0.60 ng/L。

1.3 实验方法

1.3.1 好氧反硝化细菌的初筛与复筛实验。该实验在Takaya等^[8-9]筛选方法的基础上进行了改进, 实验分4步进行: 富集培养, 取适量稻谷壳、生活污水或土壤作为样品, 加入盛有100 ml SM培养基的500 ml锥形瓶中, 在温度30和摇床速率120 r/min培养3 d, 将5 ml培养物接种到新鲜的SM培养基中, 以相同的条件进行培养。如此重复3次。筛选培养, 培养物在BTB培养基(BTB培养基中加入丁二酸钠8.50 g/L)上划线培养, 30 培养1~3 d。如果样品为土壤样品, 可以直接在DM培养基中富集培养, 或经过0.9%的

NaCl 溶液浸泡,直接在 BTB 培养基上划线培养。复筛培养,挑取使 BTB 培养基呈现蓝色的菌落进行复筛。将初筛得到的菌株在 DM 培养基上划线分离 3 次,确保培养物为纯培养物。初步鉴别细菌的反硝化能力,将得到的纯培养物接种到盛有 2 ml DM 培养液的大试管中,以棉塞封口,培养 24 h 后,向试管中滴加 1~2 滴对磺基苯磺酸和 - 萘胺的混合溶液,选择可以使溶液颜色变红的菌种作为筛选得到的好氧反硝化细菌。

筛选方法改进的方面:首先,主要注意到了好氧条件,增大了培养瓶并且减少了培养液的量,保证了培养液中溶解氧的量;其次,去除培养基中的氨盐和蛋白质成分,以硝酸盐氮为唯一的氮源提供,提高了筛选出自养型好氧反硝化细菌的可能;另外,增加了对细菌好氧反硝化能力的初步鉴定环节,避免出现后续无用的实验工作,提高了筛选效率。

1.3.2 分批培养条件下的生长曲线测定。新配制的 DM 培养液,经过细菌过滤器除菌后,其光密度在 540 nm 处为 0.000 Abs(以去离子水作为参照)。当有细菌在 DM 培养基中生长时,溶液呈乳白色、半透明状(DM8 的生长使培养液呈现绿色),其吸光度与培养液中细菌的浓度成正比。

在容积为 1 000 ml 的锥形瓶中,加入 DM 培养液 100 ml,移取 1 ml 处于对数生长期的菌悬液(菌悬液在波长为 540 nm 处的 OD 值为 1.0)于培养液,在温度 30 和摇床速率 120 r/min 培养,培养 12 h 后每隔 4 h 取 1 次样,在波长 540 nm 处用 722S 型可见分光光度计测其光密度值。

用细菌活菌数测定的方法,作出光密度值与细菌数量的对应关系,计算出细菌生长的世代周期。

1.3.3 pH 值对细菌生长的影响。配制不同 pH 梯度的 DM 培养液,各取 10 ml 分装到容积 250 ml 的培养瓶中,用微量移液枪移取在对数生长期的菌悬液 250 μ l(在波长 540 nm 处的 OD 值为 1.0),温度 30,摇床速率 120 r/min 的条件下培养 20 h,以 DM 培养液(或去离子水)作为空白,在波长 540 nm 处测定菌悬液的光密度值。pH 值用 PHS-12 型 pH 计测定。

1.3.4 温度对细菌生长的影响。250 ml 的培养瓶中,各装入 DM 培养液 10 ml,接种对数生长期的菌悬液 250 μ l,分别置于不同的温度(15 的室温、30 和 45)条件下培养,24 h 后测定其光密度值。

1.3.5 好氧反硝化效率测定。用容积 1 000 ml 的锥形瓶作为培养瓶,加入 50 ml DM 培养液,接种对数生长期的菌悬液 250 μ l(在波长 540 nm 处的 OD 值为 1.0),在温度 30 和摇床速率 120 r/min 培养,隔 24 h 取样,测定培养液中 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的变化。以不加入细菌的培养液作为空白对照。

上述各实验菌在无菌条件下进行,所有实验均设置 3 个平行,取平均值进行分析。

2 结果与分析

2.1 细菌筛选结果 在 BTB 培养基上初筛得到 30 株细菌,进一步筛选,能在 DM 培养基上生长(以硝酸钠为唯一氮源)的菌株共 21 株,反应后能生成 NO_2^- -N 的 12 株,通过初步测定,选择硝酸盐去除率较高的 2 株作为研究对象,编号为 DM8 和 DM13。

实验分离得到的好氧反硝化细菌 DM8 和 DM13 可使

BTB 培养基变成蓝色,因为在反硝化过程中, NO_3^- 的还原会使培养基 pH 值升高,BTB 呈现蓝色反应。两株细菌都可在以硝酸盐氮为唯一氮源提供的条件下生长,为以后的氮测试排除了干扰。筛选过程中,向培养液中滴加 1~2 滴对磺基苯磺酸和 - 萘胺的混合溶液,溶液颜色变红,有亚硝酸盐产生,实现了反硝化过程的第一步,证明这 2 株细菌在有氧条件下具有反硝化能力。

根据生理生化实验,初步鉴定 DM8 为铜绿假单胞菌属,DM13 待进一步确定。

2.2 生长曲线的绘制 细菌的生长可以使澄清的培养液逐渐变得浑浊,菌悬液中细菌的数量与其吸光度成正比,因此,测定其不同生长时期的光密度值,可以得到细菌的生长曲线。细菌接种到均匀介质的液体培养基后,细菌生长曲线表现出 4 个不同的生长时期:迟缓期、对数生长期、稳定生长期、衰亡期。由图 1 可以看出,DM8 的对数生长期出现在 12 h 后,从 30 h 开始进入稳定生长期。DM13 在接种 20 h 后进入对数生长期,36 h 后进入稳定生长期,稳定生长期较短。

经计算,DM8 和 DM13 的世代周期分别是 2.35、3.40 h。

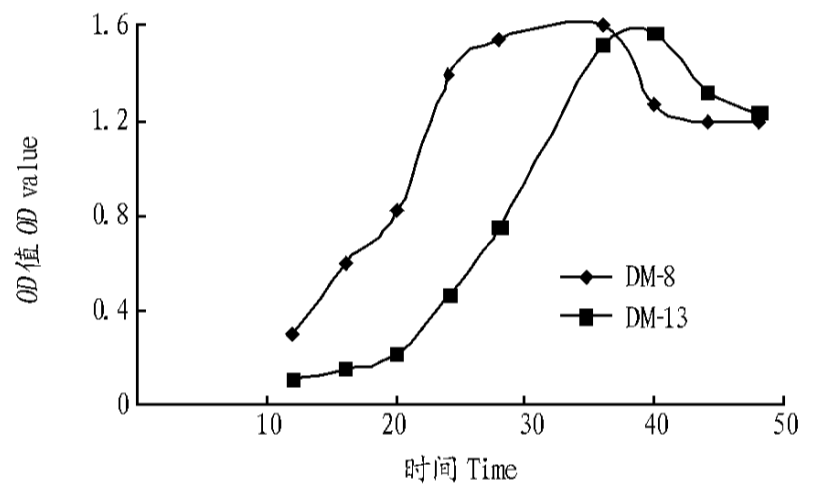


图1 DM8 和 DM13 的生长曲线

Fig.1 Growth curve of DM8 and DM13

2.3 细菌生长最适 pH 值和最适温度 细菌生长有一个最适生长的 pH 值范围。通过实验得出,DM8 最适生长的 pH 值是 6.0~8.0,DM13 最适生长的 pH 值是 6.0~7.5,如图 2。

在其他条件相同的情况下,细菌随着温度条件而不同。培养 24 h 后,DM8 和 DM13 在温度 30 的条件下,OD 值最大,生长状况最佳。

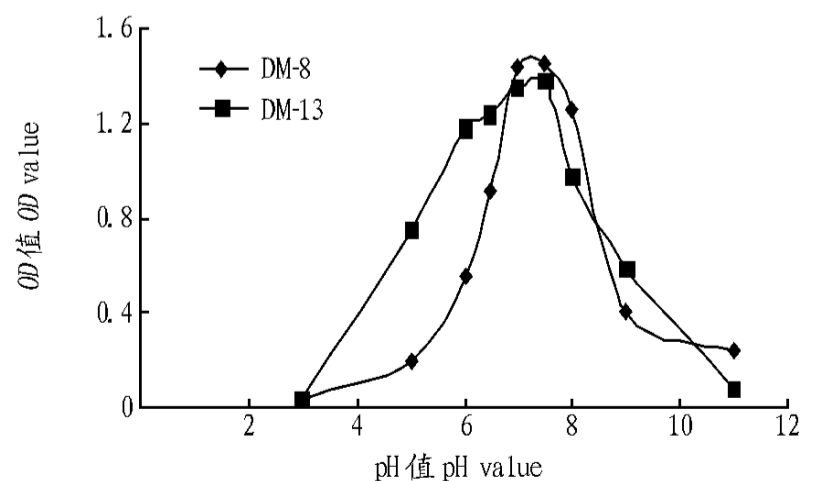


图2 pH 值对 DM8 和 DM13 生长的影响

Fig.2 Influence of pH value to growth of DM8 and DM13

2.4 反硝化效率 新鲜配制的 DM 培养液, NO_3^- -N 浓度为 100.00 mg/L, NO_2^- -N 的浓度为 0。接种细菌后,随着细菌的生长, NO_3^- -N 的浓度降低, NO_2^- -N 的浓度升高。由图 3 和 4 可以看出,培养 48 h 后,DM8 和 DM13 培养液中的 NO_3^- -N

和 NO_2^- -N 浓度不再有明显的变化。DM8 的 NO_3^- -N 由 100.00 mg/L 降为 66.65 mg/L , NO_3^- -N 的去除率为 33% ;DM13 的 NO_3^- -N 由 100.00 mg/L 降为 3.08 mg/L , NO_3^- -N 的去除率为 97% 。DM13 对 NO_3^- -N 去除效果优于DM8。2 株细菌在反硝化过程中都有 NO_2^- -N 产生,证明这两种细菌可以进行反硝化。第3 天后 NO_3^- -N 的含量又开始上升,可能是细菌的死亡裂解释放出了菌体内的部分氮所致。

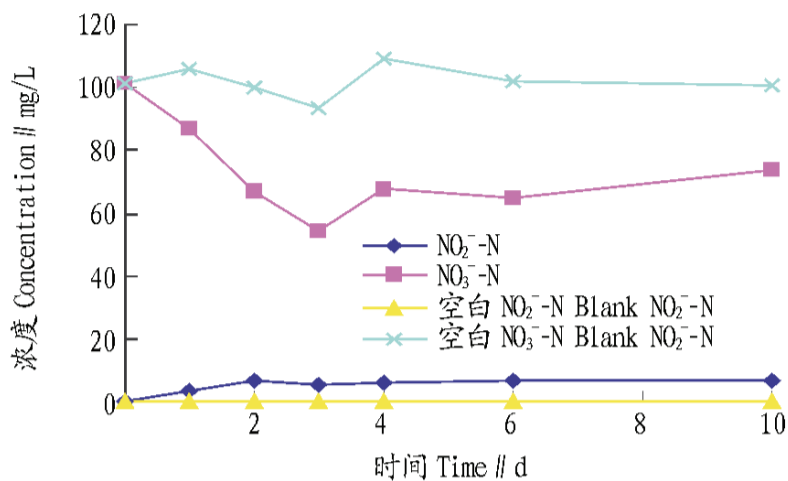


图3 DM8 反硝化效果

Fig.3 Denitrification efficiency of DM8

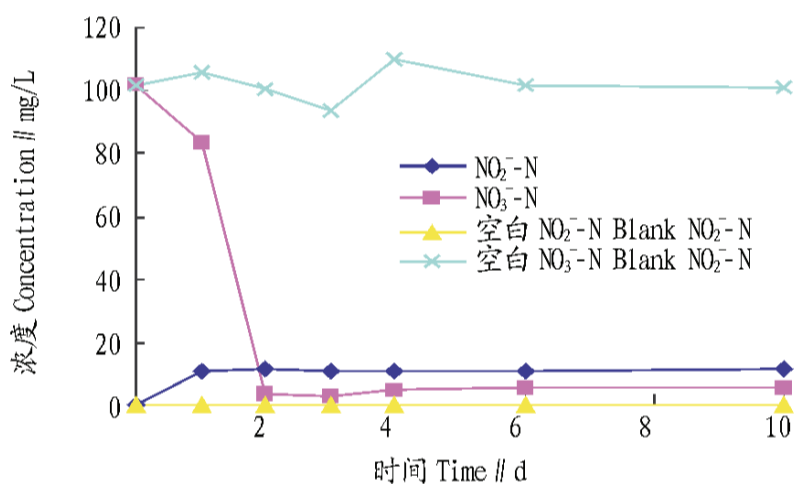


图4 DM13 反硝化效果

Fig.4 Denitrification efficiency of DM13

3 结论

实验筛选得到的DM8 和DM13,即使在有氧的条件下,

(上接第2186 页)

3 结论

该酶降解壳聚糖的最适pH 值为4.5 左右,在pH 值5~9 范围内具有很好的稳定性;最适温度 60°C ,且在 60°C 以下具有很好的稳定性。金属离子 N^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 能明显激活该酶的活力,而 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+} 强烈抑制酶活。该酶对脱乙酰度为 73% ~ 82% 的壳聚糖显示了较高的活性,而对脱乙酰度为 64% 和 90% 壳聚糖的水解活力较低。

参考文献

- [1] 蒋挺大. 甲壳素 M. 北京: 化学工业出版社,2003.
- [2] KIMS K, RAJAPAKSE N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review[J]. Carbohydr Res, 2005, 62: 357-368.
- [3] PANTALEONE D, YALPAN M, SCOLLAR M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis[J]. Carbohydr Res, 1992, 237: 325-332.
- [4] YALPAN M, PANTALEONE M. An examination of the unusual susceptibility of a nimgycars to enzymatic hydrolysis[J]. Carbohydr Res, 1994, 256: 159-175.

也能通过反硝化作用有效降低培养液中硝酸盐的浓度,打破了反硝化作用只能在无氧或兼性厌氧的条件下才能发生的传统理论。DM8 和DM13 都可以硝酸盐为唯一氮源来源,排除了其他形态的氮对研究的干扰,便于研究反硝化过程中各种形态氮的转化。笔者也初步研究并得到这2 种细菌的生长曲线、最适生长温度和最适pH 值范围,为进一步研究好氧反硝化细菌及其在工程方面的应用奠定了理论基础。DM13 的 NO_3^- -N 去除率较DM8 高,48 h 内可使氮的去除率达到 97% 。

目前国内外地下水生物脱氮技术大多建立在无氧、缺氧的反硝化机理之上,但地下水不是一个完全厌氧环境^[10],溶解氧为 $2.62\sim 3.70 \text{ mg/L}$ 。地下水好氧生物脱氮技术,由于好氧反硝化细菌的培养条件较易得到,生长速率及脱氮效率也较高,将会有更加广泛的研究和应用前景。

参考文献

- [1] 杨琰,刘存富,蔡鹤生,等. 水环境硝酸盐氮污染研究新方法—— ^{15}N 和 ^{18}O 相关法[J]. 地球科学——中国地质大学学报,2003,28(2): 219-224.
- [2] 张秀兰,李绍森. 磁县食管癌防治区饮用水情况的调查与研究[J]. 中国肿瘤,1996,5(11): 12-12.
- [3] 吕忠贵,杨圆. 浅析氮磷化肥的使用利用及对农业生态环境的污染[J]. 农业环境与发展,1997,14(3): 30-34.
- [4] 陈建耀,王亚,张洪波,等. 地下水硝酸盐污染研究综述[J]. 地理科学进展,2006,25(1): 34-44.
- [5] 李文体. 河北省地下水水质调查评价方法及成果简介[J]. 河北水利水电技术,1994(3): 10-13.
- [6] 高阳俊,张乃明. 滇池流域地下水硝酸盐污染现状分析[J]. 云南地理环境研究,2003,15(4): 39-42.
- [7] 丁爱中,傅家谟,盛国英. 好氧生物反硝化反应的实验证据[J]. 科学通报,2000,45(3): 2779-2782.
- [8] TAKAYA N, MARIA ANTONINA B C S, YASUSHI S, et al. Aerobic denitrification bacteria that produce low levels of nitrous oxide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3152-3157.
- [9] 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[J]. 微生物学杂志,2005,25(3): 77-81.
- [10] 胡国强,许胜先. 工业冷却水中除锰、除铁的试验研究[J]. 给水排水,1999,25(6): 41-44.

- [5] FUJ Y, WU S M, CHANG C T, et al. Characterization of three chitosanase isozymes isolated from a commercial crude porcine pepsin preparation[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(4): 1042-1048.
- [6] HUNG T, CHANG Y, SUNG H, et al. Purification and characterization of hydrolyase with chitinase and chitosanase activity from commercial stembronia[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 4666-4673.
- [7] IIU J, XIA W. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulose[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 30(1): 82-87.
- [8] KITTUR F S, KUMAR A, LALITHA R G, et al. Chitosanase activity of a pectinase isozyme of Aspergillus niger: A non-specific activity[J]. Carbohydr Polym, 2003, 53: 191-196.
- [9] IMOTO T, YAGSHTA K. A simple activity measurement of lysozyme[J]. Agri Biol Chem, 1971, 35(7): 1054-1156.
- [10] II J, DU Y, YANG J, et al. Preparation and characterization of low molecular weight chitosan and chito-digomers by a commercial enzyme[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2002, 31: 111-117.
- [11] 陈鲁生,周武,姜云生. 壳聚糖粘均分子量的测定[J]. 化学通报,1996(4): 57-58.