

文章编号 1000-5013(2004)01-0075-04

# 一株好氧反硝化菌的特征及系统进化分析

张光亚<sup>①</sup> 方柏山<sup>①</sup> 闵航<sup>②</sup> 陈美慈<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> 华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362011; <sup>②</sup> 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310029)

**摘要** 从土壤中分离出一株好氧反硝化菌, 命名为菌株 HN, 分离菌株呈革兰氏染色阳性, 为球状或杆状, 菌落颜色显橙红色. 该菌株以硝酸钠为氮源时, 进行好氧反硝化作用, 能以乙酰胺为唯一碳源和氮源进行生长. 它的部分长度 16S rDNA 序列分析表明, 分离菌株 HN 与 *Rhodococcus ruber* 的 16S rDNA 序列具有 99% 相似性. 实验采用 PHYLIP 程序对该菌株与报道菌进行系统发育进化分析.

**关键词** 好氧反硝化菌, *Rhodococcus sp.* HN, 16S rDNA 序列, 系统进化分析

中图分类号 Q 933: Q 93-331

文献标识码 A

脱氮是近年来废水处理研究的重要课题, 而生物脱氮又被认为是目前废水脱氮中经济有效的方法之一. 传统生物脱氮工艺将硝化和反硝化作为两个相互独立的阶段, 使二者在时间和空间上分开. 即硝化反应发生在好氧条件下, 反硝化反应则发生在严格的缺氧或厌氧条件下. 近年来, 国内外的不少研究和报道已能充分证明, 反硝化可发生在有氧条件下, 即存在好氧反硝化<sup>[1]</sup>. 在许多实际运行中的好氧硝化池中, 也常常发现有 30% 的总氮损失<sup>[2]</sup>. 这种好氧反硝化过程是由所谓的好氧反硝化菌引起的. 这些好氧反硝化细菌如粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)、泛养硫球菌(*Thiosphaera pantotropha*), 现更名为脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)<sup>[3]</sup>, 能同时利用氧和硝酸作为电子受体以获得高生长率. 利用好氧反硝化菌发展好氧脱氮技术, 具有 3 个优点. (1) 使硝化/反硝化反应在同一个反应器中进行, 可以大大减少占地面积和建设资金. (2) 使用好氧反硝化细菌, 可以减少处理过程中加入调节系统 pH 的化学物质, 降低成本. (3) 在处理过程中, 好氧反硝化菌更容易控制<sup>[3]</sup>. 本文从土壤中经分离和纯化, 得到一株与迄今所报道的好氧反硝化菌均不相同的好氧反硝化菌. 根据其生理生化性状和部分长度的 16S rDNA 序列, 确定了分离菌株的分类学和系统发育地位.

## 1 材料与方法

### 1.1 异养型硝化细菌的分离

1.1.1 培养基组成 2.0 g 乙酰胺, 1.6 g NaOH, 8.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g KCl, 0.5 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.5 mg CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.5 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 mg FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.0 L H<sub>2</sub>O, pH 值为 7.0.

1.1.2 富集分离 取土样于上述培养基中, 经富集并在平板上划线分离. 然后, 分别挑取单菌落于液体培养基中, 检测液体中亚硝酸含量, 选取产亚硝酸较强的一株分离物进一步试验.

### 1.2 碳源和氮源试验

培养基氮源改为质量分数为 0.002 的硫酸铵. 碳源分别为乙酸钠、甲酸钠、苹果酸、葡萄糖、衣康酸、乙酰胺、酵母膏和蛋白胨. 氮源试验时, 碳源改为乙酸钠, 所用氮源是质量分数都为 0.002 的乙酰胺、硫酸铵、硝酸钠、亚硝酸钠、尿素和氨基乙酸. 培养 60 h 后, 测定菌体生长量(试验重复 3 次).

收稿日期 2003-08-26

作者简介 张光亚(1975-), 男, 硕士, 助教, 主要从事生物信息学与分子生态学的研究. E-mail: zhgygh@hqu.edu.cn

基金项目 浙江省自然科学基金资助项目(399214); 华侨大学科研基金资助项目(03HZR7)

### 1.3 分离菌株反硝化活性

以质量分数为 0.002 的硝酸钠为唯一的氮源,以乙酸钠为碳源,培养基煮沸 5 min 后取 20 mL 放入 120 mL 的血清瓶中.菌株活化后接种于该液体培养基中,每隔一定时间测定菌体生长量和亚硝酸量,试验重复 3 次.

### 1.4 好氧反硝化细菌的鉴定

1.4.1 显微摄影 用带拍摄装置的 Olympus BH-2 型光学显微镜拍摄.菌落中的菌体用接种针挑取后涂抹在载玻片上,滴加 1/4 滴蒸馏水,加盖盖玻片,用相差拍摄.

1.4.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序 从平板中直接挑取一环菌体,加到 100  $\mu$ L 的重蒸馏水中,旋涡混匀后,沸水浴 7 min.在离心机( $12\ 000\ r\cdot\min^{-1}$ )上离心 5 min.上清液直接用于 PCR 扩增模板.用于 16S rDNA PCR 反应的引物为一对通用引物,即正向引物为 BSF8/20(5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3'),反向引物为 BSR1541/20(5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3').引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.PCR 反应体系(50 $\mu$ L)为 10 $\times$ 5  $\mu$ L PCR 缓冲液,4  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>(25 m mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>),2  $\mu$ L dNTP,1  $\mu$ L 引物 BSF 8/20 和 BSR 1 541/20,1  $\mu$ L 模板 DNA,0.5  $\mu$ L Taq 酶(10 000 U $\cdot$ mL<sup>-1</sup>),35.5  $\mu$ L 重蒸水.PCR 程序有 5 点.(1) 94  $^{\circ}$ C, 2 min.(2) 94  $^{\circ}$ C, 1 min; 56  $^{\circ}$ C, 1 min; 72  $^{\circ}$ C 2 min.(3) 第 2 步循环 29 次.(4) 72  $^{\circ}$ C, 10 min.(5) 60  $^{\circ}$ C, 10 min.PCR 产物用 QIAGene 公司的 DNA 纯化试剂盒纯化.测序由上海申友生物技术有限责任公司完成,测序用引物为引物 BSF 8/20.

1.4.3 系统发育分析 获得分离菌株部分长度的 16S rDNA 序列(约 602 bp).菌株的 EMBL 序列登录号,如表 1 所示.将所测序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据进行序列联配(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).利用序列比对软件 Clustal X1.8、系统发育分析软件 PHYLIP 3.6、进化树生成软件 Treeview,以构建进化树.用于系统发育树构建的相关菌株,如表 1 所示.

表 1 用于系统发育树构建的分离菌株与相关参比菌株的细菌名称和菌株编号及序列登录号

细菌名称	菌株编号	序列登录号	细菌名称	菌株编号	序列登录号
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	DSM 12141T	AJ005447	<i>Nitrosospira sp</i>	NpAV	Y10127
<i>Paracoccus denitrificans</i>	ATCC 19367	Y16930	<i>Nitrosomonas europaea</i>	M 103	AF037106
<i>Paracoccus versutus</i>	ATCC25364	Y16932	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25330	M34133
<i>Alcaligenes faecalis</i>	B3/I	U71008	<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 11172	D85992
<i>Arthrobacter globiformis</i>	DSM 20124T	X80736	<i>Rhodococcus coprophilus</i>	ATCC29080T	X81928
<i>Arthrobacter ramosus</i>	DSM 20546T	X80742	<i>Rhodococcus sp</i>	HN	AJ459106
<i>Bacillus coagulans</i>	IAM 12463T	D16267	<i>Rhodococcus ruber</i>	DSM 43338T	X80625
<i>Bacillus denitrificans</i>	DSM 466	Z26927	<i>Rhodococcus fascians</i>	ATCC35014T	X81932
<i>Nitrosowibrio tenuis</i>	-	AY123803			

## 2 结果与讨论

### 2.1 分离菌株 16S rDNA 序列测定及鉴定

经富集和分离,获得一株能进行异养型硝化反应的细菌,菌株编号为 HN.分离菌株菌落为橙红色,形态变化顺序为 H R C(Hypha Rod Cocci,菌丝-杆状-球状),革兰氏阳性.分离的菌株经破碎后提取基因组 DNA,以一对通用的真细菌 16S rDNA 的引物(正向引物和反向引物)作 PCR 扩增,得到的产物经纯化后测序.测序后,得到长度为 602 bp 菌株的 16S rDNA 的序列(菌株的 EMBL 序列登录号为 AJ459106).序列联配的结果表明,分离菌株与赤红红球菌(*Rhodococcus ruber*) 16S rDNA 的相似率达 99%.结合菌株的形态学(图 1)和生理学特性(碳源和氮源实验),可基本确定分离的菌株为与赤红红球菌近似的种 *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus sp.* HN 和现已报道的好氧反硝化菌均不相同.

### 2.2 菌株 HN 的反硝化作用

以硝酸钠为唯一的氮源,乙酸钠为碳源.培养基煮沸 5 min 后,取样 20 mL 将其放入 120 mL 的血清瓶中并灭菌.菌株活化后接种于该液体培养基中,菌株在以硝酸为氮源的培养基上生长时,菌体生长曲线及溶液中亚硝酸浓度(C)的变化曲线,如图 2 所示.由图可知,菌体的反硝化主要是在菌体的对数生

长期发生的. 在菌体进入衰亡期后, 溶液中亚硝酸的浓度一直处于很低的浓度水平. 乙酸钠在好氧反硝化过程中起着非常重要的作用. 它不但作为细菌 *Rhodococcus* sp. 生长所需的碳源, 还是菌株进行反硝化过程中能量的来源. 在 C/N 值为 5 时, 反硝化速率达到最大<sup>[4]</sup>. 本实验中 C/N 值约为 2, 可能尚未达到该

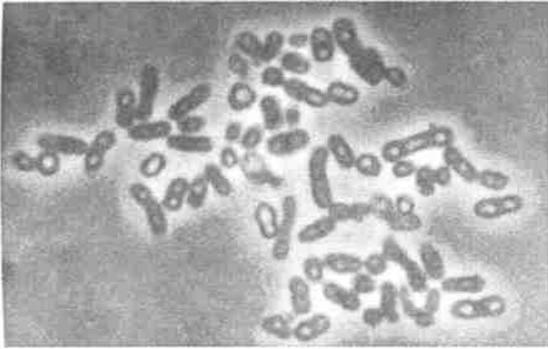


图 1 菌株 HN 的相差照片(1 200 倍)

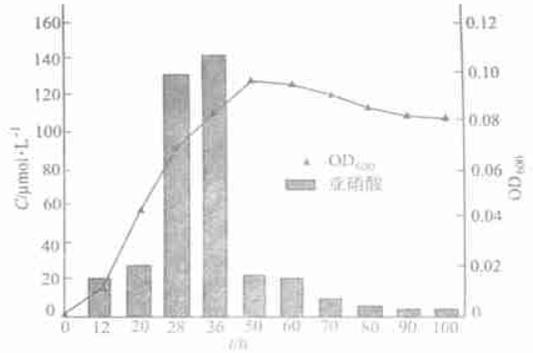


图 2 菌株反硝化作用

菌株最佳 C/N 值, 需要进一步研究菌株的最佳 C/N 值, 以确定此时它的最大反硝化速率.

### 2.3 不同碳源和氮源对分离菌株生长和产亚硝酸的影响

分离物菌株 HN 可在以硫酸铵为氮源, 碳源分别为乙酸钠、甲酸钠、苹果酸、葡萄糖、衣康酸、乙酰胺、琥珀酸、酵母膏和蛋白胨的培养基中生长. 在不同碳源底物中的生长的状况各异, 如表 2 所示. 其在酵母膏中, 生长量最大, 在乙酰胺中产亚硝酸的量最高, 而对甲酸钠和衣康酸则不能利用. 说明该菌株具有相对较广的碳源谱. 菌株 HN 在乙酸钠为碳源, 氮源分别为乙酰胺、硫酸铵、硝酸钠、亚硝酸钠、尿素和氨基乙酸的培养基中的生长各异, 如表 3 所示. 其在乙酰胺中的菌体生长最好, 而在氨基乙酸中产亚硝酸的量最大, 对亚硝酸则不能利用. 这可能是溶液中亚硝酸的浓度较高, 对菌株有毒害作用. 菌株能以乙酰胺为唯一的碳源和氮源进行生长, 与伯杰氏手册上记录的赤红球菌(*Rhodococcus ruber*) 相同<sup>[5]</sup>.

表 2 不同碳源对菌株 HN 生长的影响

碳源	衣康酸	乙酰胺	甲酸钠	乙酸钠	琥珀酸	苹果酸	酵母膏	葡萄糖	蛋白胨
OD <sub>600</sub>	0	0.066	0	0.06	0.03	0.046	0.089	0.032	0.058

表 3 不同氮源对菌株 HN 生长的影响

氮源	乙酰胺	硫酸铵	硝酸钾	亚硝酸钾	尿素	氨基乙酸
OD <sub>600</sub>	0.075	0.058	0.050	0	0.060	0.060

### 2.4 *Rhodococcus* sp. HN 的系统发育分析

将获得的菌株与某些好氧反硝化细菌, 以及一些自养型和异养型硝化细菌进行系统发育分析. 获得的系统进化发育树的结构, 如图 3 所示. 欧洲亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*) 被定义为外群. 可以发

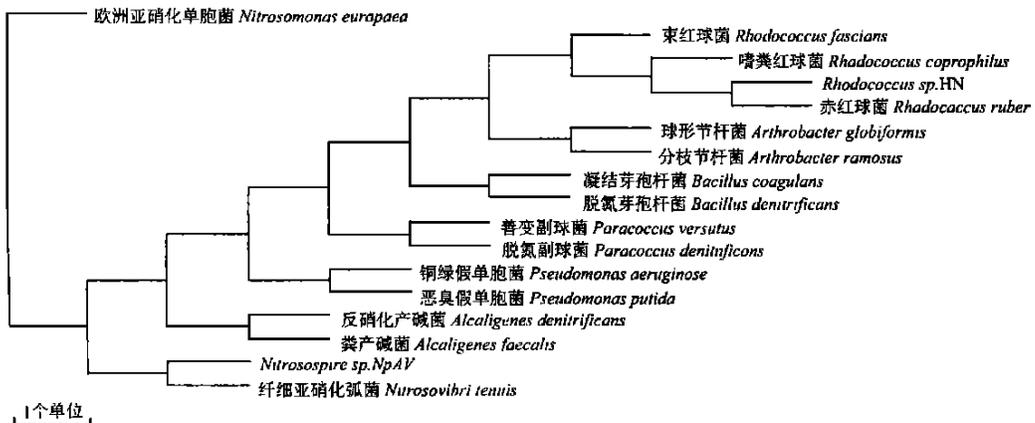


图 3 基于 16S rDNA 序列同源性用最大似然法构建的菌株 HN 和其它相关细菌的系统发育树. 所有的好氧反硝化菌及异养型硝化细菌都归于同一组, *Rhodococcus* sp. 菌株 HN 则接近 *Rhodococcus*

*ruber*. 两者在系统发育地位上几乎相同. 自养硝化细菌纤亚硝化弧菌(*Nitrosovibrio tenuis*)和 *Nitrosospira* sp., 则在另一组.

### 3 结束语

(1) 常见的好氧反硝化微生物, 包括产碱菌属(*Alcaligenes*)、副球菌属(*Paracoccus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)<sup>[6]</sup>. 本文分离的菌株 HN 经鉴定为 *Rhodococcus* sp., 它与目前所报道的好氧反硝化菌均不相同. (2) 菌株 HN 能分别以适当浓度的乙酸钠、苹果酸、葡萄糖、乙酰胺、琥珀酸、酵母膏和蛋白胨为碳源, 以乙酰胺、硫酸铵、硝酸钠、尿素和氨基乙酸为氮源. 它具有较广的碳源和氮源谱, 使得该菌株适应力较强. 它能存在于废水处理的生物反应器中, 有应用于污水好氧反硝化脱氮处理的潜力. 对该菌株进行进一步的研究, 有助于阐明它的生态学意义, 为好氧反硝化工艺的设计提供生物学参数.

### 参 考 文 献

- 1 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): 2 779~ 2 782
- 2 冯叶成, 王建龙, 钱 易. 同时硝化反硝化的实验研究[J]. 上海环境科学, 2002, 21(9): 527~ 529
- 3 Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1[J]. Biotechnology Letters, 1997, 11(19): 1 157~ 1 159
- 4 Huang H K, Tseng S K. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment[J]. Appl. Microbiol Biotechnol. 2001, (55): 90~ 94
- 5 Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. Lippincott: Williams Wilkins 1986. 2 366~ 2 367
- 6 Laurent P, Alain H, Catherine H, et al. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, (34): 121~ 128

## Characteristics and Phylogenetic Analysis of a Strain of Aerobic Denitrifier

Zhang Guangya<sup>①</sup> Fang Baishan<sup>①</sup> Min Hang<sup>②</sup> Chen Meici<sup>②</sup>

(<sup>①</sup> College of Mater. Sci. & Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou, China;

<sup>②</sup> College of Life science, Zhejiang Univ., 310029, Hangzhou, China)

**Abstract** A strain of aerobic denitrifying bacteria was isolated from the soil and named as strain HN. They are bacteria of gram positive, spherical or rod like; they often become orange red colony. They can carry out denitrification when sodium nitrate is taken as nitrogen source; and they can grow with acetamide as unique carbon source and nitrogen source. As indicated by analysing 16S rDNA sequence of partial length, this isolated strain bear similarity to 16S rDNA sequence of *Rhodococcus ruber*. By applying PHYLIP program, phylogenetic analysis was made on strain HN and the relative strains.

**Keywords** aerobic denitrifying bacteria, *Rhodococcus* sp. HN, 16S rDNA sequence, phylogenetic analysis