

一株具有多途径氮代谢功能的荧光假单胞菌*

王晋宇 范伟平[†] 李霜 沈珈琦

(南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009)

摘要 为研究全自养脱氮过程, 采用斯凯尔曼亚硝化单胞杆菌培养基, 从南京某城市污水处理厂序批式处理系统(SBR)中分离得到一株具有多途径氮代谢功能的荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* dN13。该菌株在有氧条件下, 无有机碳源存在, 能进行氧化 $\text{NH}_3\text{-N}$ 产能代谢生长; 有有机碳源存在且 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的浓度较高时, 它能将 $\text{NO}_2\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3\text{-N}$ 还原为 $\text{NH}_3\text{-N}$ 。在厌氧条件下, 只有乙酸钠作碳源时, 该菌株仍能进行硝酸亚硝酸还原(反硝化)作用。在这个具有多途径氮代谢功能的菌株细胞内, 硝化反硝化过程耦合成为可能。

关键词 荧光假单胞菌; 有氧氨氧化; 硝酸亚硝酸还原; 多途径氮代谢

中图分类号 X172 **文献标识码** A

近年来环境工作者和微生物学家们开发了同时硝化/反硝化(SND)、厌氧氨氧化(ANAMONOX)和全自养脱氮(CANON)等新工艺技术有效处理低碳高氮废水, 而这些生物脱氮新技术的开发, 是基于自然水域中存在具有多途径氮代谢功能的微生物的作用^[1,2]。人们在开发生物脱氮新技术的同时, 努力分离研究那些特殊脱氮功能的菌株。近年来, 不断有文献报道发现具有有氧氨氧化功能和硝酸亚硝酸还原功能的异养菌株, 如脱氮假单胞菌 *Pseudomonas denitrificans*^[3]、节杆菌 *Anthrobacter* sp.^[4]、欧洲亚硝化单胞菌 *Nitrosomonas europaea*^[5]、厌氧脱氮副球菌 *Thiosphaera pantotropha*(现更名为 *Paracoccus denitrifications*)^[6]等。由于异养菌生长速率快, 能快速获得大量菌株, 因此异养氨氧化菌株和具有硝酸亚硝酸还原功能菌株的分离和培育对于低碳高氮废水处理新技术开发研究很有意义。

本研究采用斯凯尔曼亚硝化单胞杆菌培养基, 通过硅胶平板划线分离, 从城市污水处理序批式曝气活性污泥反应器(SBR)中分离得到一株具有多途径氮代谢功能的异养菌株, 命名为 dN13。研究中对其进行了鉴定, 并对其有氧氨氧化及硝酸亚硝酸还原的性能进行了系统的考察, 发现了一些鲜为人知的现象。

1 材料与方法

1.1 菌株 dN13 的鉴定方法

1.1.1 菌株形态及生理生化特征分析 见文献[7]。

1.1.2 菌株 BIOLOG 微生物鉴定及 16S rDNA 相似性分析 采用美国 BIOLOG 自动微生物鉴定系统(MicroStation)对菌株进行系统鉴定。采用华舜基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株基因组 DNA, 根据一对通用引物 BSF8/20:5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 BSR1407/16:5-GACGGCGGTGTGTC-3, 扩增菌株 16S rDNA 序列。引物由上海博亚生物技术公司合成, PCR 反应体系(50 μl)为: 引物各 1 μl , 10 \times PCR 反应缓冲液 5 μl , MgCl_2 4 μl , dNTP 1 μl , Taq 酶 0.5 μl , 基因组 DNA 1 μl , 重蒸水 36.5 μl 。PCR 反应退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, PCR 反应产物经 TaKaRa 胶回收试剂盒处理后连接到 pMD-18T 载体(TaKaRa 公司提供), 送上海博亚生物技术公司测序。

1.2 培养基

1.2.1 斯凯尔曼培养基的基本组成 NaCl 0.3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, MgSO_4 0.07 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, FeSO_4 0.016 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 0.136 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 微量元素溶液 0.4 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ (Mn 22 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, B 21 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Cu 17 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Zn 16 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Co 14 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。

* 江苏省自然科学基金项目(BK2002019)资助

[†] 通讯作者, 范伟平教授, E-mail: fwpzhu@sohu.com; 电话: 025-83587339

作者简介: 王晋宇(1982~), 男, 江苏苏州人, 硕士研究生, 从事生物脱氮技术研究

收稿日期: 2005-10-27; 收到修改稿日期: 2006-01-08

1.2.2 LB 液体培养基 蛋白胨 10 g L^{-1} , 酵母膏 5 g L^{-1} , $\text{NaCl } 10 \text{ g L}^{-1}$ 。

1.3 菌体的富集培养

采用LB 液体培养基对菌株进行大量培养,离心收集菌泥,用少量生理盐水重悬菌液(10^7 个 ml^{-1})。

1.4 dN13 菌株的有氧氨氧化考察

在斯凯尔曼培养基基本组成中,以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源,分别添加 NaHCO_3 、乙酸钠、苹果酸、葡萄糖作为碳源;或以乙酸钠作为碳源,分别添加乙酰胺、尿素、氨基乙酸、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源,碳源和氮源的添加量均为 2 g L^{-1} 。实验过程中将富集培养得到的菌悬液以 5% 接种量接种到各培养基中,培养温度为 28°C ,摇床转速 150 min^{-1} ,每间隔一段时间检测培养基中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、菌株生长量及 pH 值状况,调节培养基 pH 值,使其维持在 7.0 左右。

1.5 dN13 菌株的厌氧硝酸亚硝酸还原实验

在斯凯尔曼培养基基本组成中,分别添加 NaNO_2 (0.3 g L^{-1}) 和 NaNO_3 (0.36 g L^{-1}) 作为唯一氮源,各添加乙酸钠和葡萄糖作为唯一碳源 (2 g L^{-1}),共进行 4 组平行实验。实验过程中将富集培养得到的菌悬液以 5% 接种量接种到各培养基中,以液体石蜡封住液面进行厌氧培养,培养温度为 28°C ,每间隔一段时间检测培养基中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、菌株生长量及 pH 状况,调节培养基 pH 值,使其维持在 7.0 左右。实验后用氩气吹集产生的气体,检测其组成成分。

1.6 dN13 菌株的有氧硝酸亚硝酸还原实验

培养基成分同本文 1.5 节所述。实验过程中将富集培养得到的菌悬液以 5% 接种量接种到各培养基中,培养温度为 28°C ,摇床转速 150 min^{-1} ,每间

隔一段时间检测培养基中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、菌株生长量及 pH 状况,调节培养基 pH 值,使其维持在 7.0 左右。

1.7 检测方法

$\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 分别采用纳氏试剂光度法、N-(1-萘基)-乙二胺光度法、酚二磺酸光度法进行检测^[8]。菌株生长量以波长 660 nm 处的光密度表示,pH 值用 PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂)测定,溶氧浓度(DO)采用 JPB-607 便携式溶氧仪(上海精科雷磁)测定。应用安捷伦 6890 型气相色谱仪检测系统内产生气体的组成,色谱参数:氢火焰离子化检测器;内径 3 mm ,长 2 m 的不锈钢柱,填充国产高分子微球 QX2401 (60-80 目)为固定相。

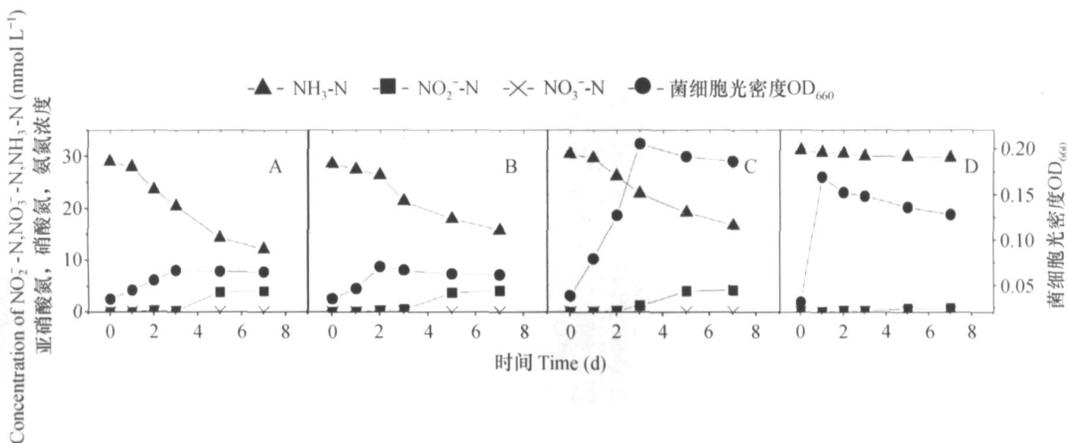
2 结果与讨论

2.1 dN13 菌株的鉴定

dN13 菌株的形态分析和生理生化特征作者已作报道^[7]。采用美国 BIOLOG 自动微生物鉴定系统(MicroStation)鉴定结果表明 dN13 可能属 *Pseudomonas*;16S rDNA 序列分析表明,分离菌株 dN13 与荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 的相似性达 99.38%。以上鉴定结果可基本确定分离的菌株 dN13 属于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。

2.2 荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* dN13 有氧氨氧化作用

有氧环境下(溶氧浓度 $\text{DO} > 7 \text{ mg L}^{-1}$),以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为唯一氮源,考察不同碳源对菌株有氧氨氧化能力的影响。结果如图 1 所示。



A. 碳酸氢钠 NaHCO_3 ; B. 乙酸钠 Sodium acetate; C. 苹果酸 Malic acid; D. 葡萄糖 Glucose

图 1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为唯一氮源,不同碳源的存在对菌株 dN13 有氧氨氧化的影响

Fig. 1 Effect of carbon source on aerobic $\text{NH}_3\text{-N}$ oxidation of strain dN13 using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the sole nitrogen resource

由图 1 可见,不同的碳源条件下,荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* dN13 消耗 $\text{NH}_3\text{-N}$ 产生的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 都有一定的累积,几乎测不出 $\text{NO}_3\text{-N}$ 产生量。碳源明显影响菌株对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 代谢途径。当碳源为无机碳源 CO_3^{2-} 时(图 1A),菌株须利用 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化进行能量代谢,而 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化产能效率低,因此 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化消耗得最多;当葡萄糖作碳源时(图 1D),葡萄糖的有氧代谢产能效率高,菌株转化 $\text{NH}_3\text{-N}$ 仅为满足同化代谢的需要,消耗甚微。当用苹果酸为唯一碳源时(图 1C),菌株产能效率较葡萄糖低,还需要依靠 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化产能,转化成少量的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 。

当用乙酸钠作为唯一碳源时(图 1B),则通过乙醛酸途径产能,效率不高,仍需要部分利用 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化产能,转化成 $\text{NO}_2\text{-N}$ 。可见此菌株能根据碳源的不同、产能效率高而调节有氧能量代谢的途径。菌株在不同碳源中的生物量增长状况为:苹果酸 > 葡萄糖 > 乙酸钠 > NaHCO_3 。因为苹果酸直接提供合成代谢所需要的四碳骨架,利于细胞合成,所以细胞生物量增长量最多。

有氧环境下(溶氧浓度 $\text{DO} > 7 \text{ mgL}^{-1}$),以乙酸钠作为唯一碳源条件,考察不同氮源对菌株转化氮能力的影响。结果如图 2 所示。

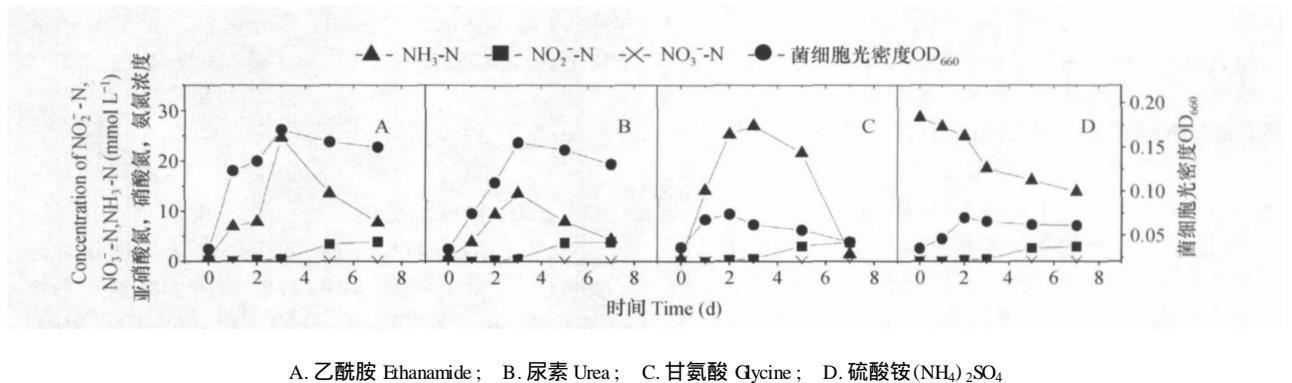


图 2 乙酸钠为唯一碳源,不同氮源的存在对菌株 dN13 有氧氨氧化的影响

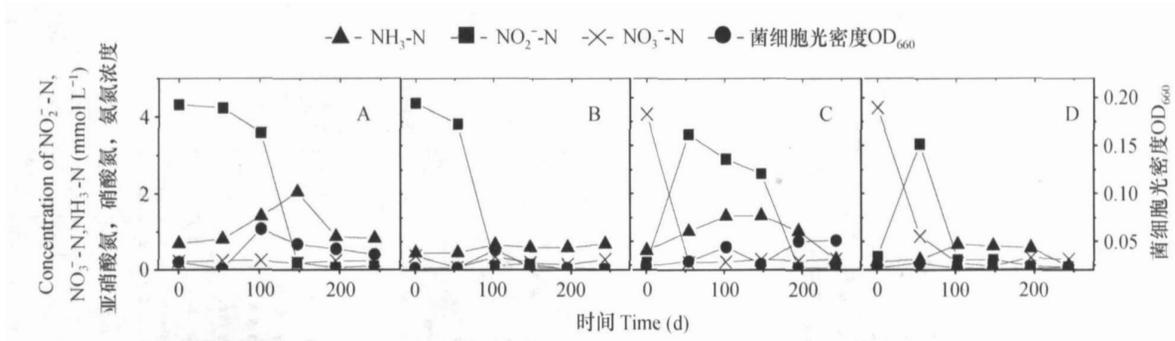
Fig. 2 Effect of nitrogen source on aerobic $\text{NH}_3\text{-N}$ oxidation of strain dN13 using sodium acetate as the sole carbon resource

由图 2A、图 2B、图 2C 可见,当氮源为有机氮源时,菌株首先将有机氮氨化为 $\text{NH}_3\text{-N}$ 再利用;其氨基氧化酶的活力随细胞增殖增大,而同化所需的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 很有限,因此产生一个 $\text{NH}_3\text{-N}$ 累积的过程。随着培养液中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的浓度累积,氨氧化酶将 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化成 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的活力增强,使得溶液中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的浓度累积基本在菌株生长的对数期末达到最高,转而迅速下降。而当 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化产生 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的累积到 4.0 mmolL^{-1} 左右时, $\text{NO}_2\text{-N}$ 的高浓度累积对细胞自身产生了毒害,使得菌株生长转入衰亡期,本实验结果与文献[9]报道基本一致。图 2D 结果表明仅

使用无机氮源的情况类似。图 2 还表明在同样碳源条件下,有机氮源的分子结构中碳骨架数量较大的,菌体的生物量增长较大;可见菌株有氧增殖的生物量增长实质决定于碳源。

2.3 荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* dN13 厌氧硝酸亚硝酸还原作用

分别以乙酸钠和葡萄糖作为碳源,以 NaNO_2 , NaNO_3 作为唯一氮源,pH 保持 7.0,考察菌株在严格厌氧条件 ($\text{DO} = 0 \text{ mgL}^{-1}$) 下的硝酸亚硝酸还原功能,结果如图 3 所示。实验结束后,采用气相色谱检测气体组成成分,结果如表 1 所示。



A. 葡萄糖和亚硝酸钠 Glucose and sodium nitrite; B. 乙酸钠和亚硝酸钠 Sodium acetate and sodium nitrite;
C. 葡萄糖和硝酸钠 Glucose and sodium nitrate; D. 乙酸钠和硝酸钠 Sodium acetate and sodium nitrate

图 3 菌株厌氧硝酸亚硝酸还原作用

Fig. 3 Nitrite and nitrate reduction of strain dN13 under anaerobic condition

表 1 反应体系中气体组成成分

Table 1 Content of gaseous nitrogen produced in reaction system

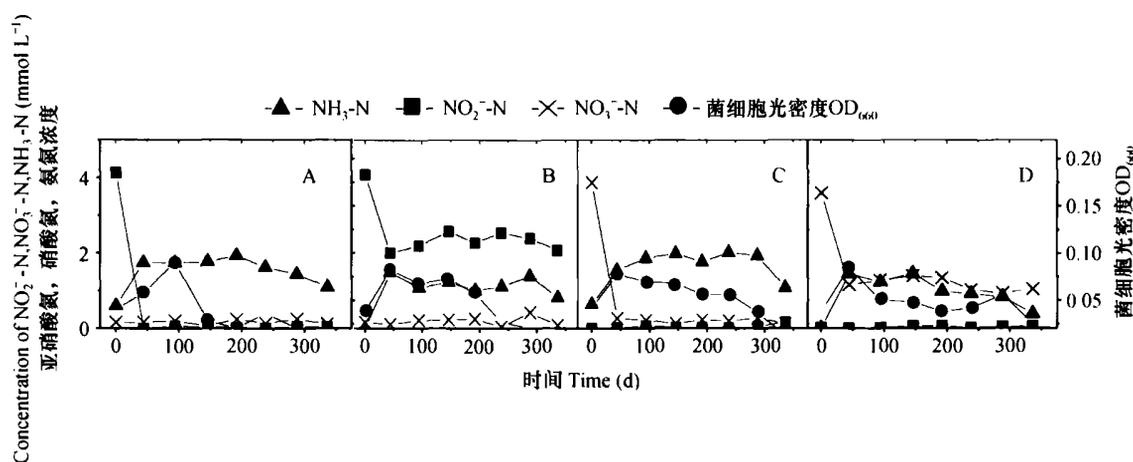
编号 No.	碳源 Carbon source	氮源 Nitrogen source	N ₂ 产生量 Amount of N ₂ produced (mmol L ⁻¹)	N ₂ O 产生量 Amount of N ₂ O produced (mmol L ⁻¹)
A	葡萄糖 Glucose	亚硝酸钠 Sodium nitrite	0.77	0.74
B	乙酸钠 Sodium acetate	亚硝酸钠 Sodium nitrite	0.86	0.71
C	葡萄糖 Glucose	硝酸钠 Sodium nitrate	0.89	0.80
D	乙酸钠 Sodium acetate	硝酸钠 Sodium nitrate	0.86	0.85

由图 3 和表 1 可见,当 NO₂⁻-N 或 NO₃⁻-N 初始浓度为 4.0 mmol L⁻¹ 左右时,此菌株在密闭容器的厌氧条件下有较强的反硝化功能,都能还原产生 N₂ 和 N₂O。其中,用葡萄糖作碳源时(图 3A),有较明显的细胞增殖现象,因糖酵解提供了强还原力烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),NO₂⁻-N 还原过程有个 NH₃-N 累积的过程;以乙酸钠作碳源时(图 3B,图 3D),细胞增殖甚微,NO₂⁻-N 还原过程虽不存在 NH₃-N 累积的过程,但 NO₂⁻-N 还原产气仍很明显。以上现象可以说明此菌株能够进行厌氧硝酸、亚硝酸的同化代谢和反硝化作用。由图 3 还可见,以 NO₂⁻-N 为唯一氮源时(图 3A,图 3B),菌株进入稳定期 NO₂⁻-N 即快速下降。当以 NO₃⁻-N 为唯一氮源时(图 3C,图 3D),

在菌株对数生长期 NO₃⁻-N 迅速还原为 NO₂⁻-N,有一个 NO₂⁻-N 累积过程,如用葡萄糖作碳源(图 3C),还有一个 NH₃-N 累积的过程;4 种情况到了生长稳定期 NO₂⁻-N 都迅速还原消失。本实验结果表明菌株 dN13 在厌氧条件下,不论使用什么碳源,都具有很强的反硝化作用。

2.4 荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* dN13 有氧硝酸亚硝酸还原作用

在有氧状态下(DO > 7 mg L⁻¹),分别以乙酸钠和葡萄糖为唯一碳源,以 NaNO₂、NaNO₃ 为唯一氮源,pH 值保持 7.0 左右,考察菌株在有氧条件下的硝酸亚硝酸还原功能,结果如图 4 所示。



A. 葡萄糖和亚硝酸钠 Glucose and sodium nitrite; B. 乙酸钠和亚硝酸钠 Sodium acetate and sodium nitrite;
C. 葡萄糖和硝酸钠 Glucose and sodium nitrate; D. 乙酸钠和硝酸钠 Sodium acetate and sodium nitrate

图4 菌株有氧硝酸亚硝酸还原作用

Fig. 4 Nitrite and nitrate reduction of strain dN13 under aerobic condition

由图4可知,菌株在有氧状态下当 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ (图4A,图4B)和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ (图4C,图4D)浓度为 4.0 mmol L^{-1} 左右时(相当于图1中菌株dN13生长到达衰亡期时硝态氮的浓度),此时 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 能被菌株迅速还原为 $\text{NH}_3 \text{-N}$ 。其中用葡萄糖作为碳源时(图4A,图4C),有氧糖代谢产生了较多的还原力NADH,使得硝态氮还原过程 $\text{NH}_3 \text{-N}$ 的累积量较以乙酸钠为碳源(图4B,图4D)的大。有氧状态下假单胞菌生长,利用硝态氮作为氮源同化代谢,已有文献报道^[6],但能将硝态氮还原成 $\text{NH}_3 \text{-N}$ 累积,还未见报道。在实验中采用硝态氮作为唯一氮源时,当其浓度高于 4.0 mmol L^{-1} 时,菌株则不能生长。对照图1和图4分析,可以认为有氧条件下,dN13这种将硝态氮还原成 $\text{NH}_3 \text{-N}$ 可能是细胞应急解毒代谢作用,所能承受的 $\text{NO}_2^- \text{-N}$, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的浓度有限。

3 结论

本研究采用斯凯尔曼亚硝化单胞杆菌培养基,从城市污水处理SBR反应器中分离得到一株具有多途径氮代谢功能的荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* dN13,该菌株能够在有氧条件下,根据碳源的不同,产能效率高而调节氮代谢的途径。无有机碳源时能氧化 $\text{NH}_3 \text{-N}$ 产能;有机碳源则利用 $\text{NH}_3 \text{-N}$ 的量大为减少;当 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的浓度不高于 4.0 mmol L^{-1} 时,还能将 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 还原为 $\text{NH}_3 \text{-N}$ 而解毒。菌株dN13在厌氧条件下能够

进行反硝化作用。荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* dN13多途径氮代谢功能使单细胞内氨氧化还原反应的耦合成为可能。这株菌能自养生存,还可以在低碳高氮的环境中快速生长,具有重要的实际应用意义。

参考文献

- [1] Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, et al. New conception of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27: 481 ~ 492
- [2] Khin Than, Annachatre Ajit P. Novel microbial nitrogen removal processes. Biotechnology Advances, 2004, 22: 519 ~ 532
- [3] Lesley A Robertson, Tage Dalgaard, Niels-Peter Revsbech et al. Confirmation of aerobic denitrification in batch cultures, using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry, FEMS Microbiology Ecology, 1995, 18: 113 ~ 120
- [4] Brierley ED R, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil isolation and characterisation of a nitrifying bacterium. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33: 1403 ~ 1409
- [5] Christine Helmer, Sabine Kunst. Simultaneous nitrification denitrification in an aerobic biofilm system. Water Science Technology, 1998, 37(4/5): 183 ~ 187
- [6] Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1. Biotechnology Letters, 1997, 11(19): 1157 ~ 1159
- [7] 沈珈琦,方苹,范伟平.亚硝化菌株的筛选及其初步鉴定.生物加工过程,2004,2(1):30~34. Shen J Q, Fang P, Fan W P. Four strains are isolated and primarily identified for nitrification (In Chinese). Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2004, 2(1):30~34
- [8] 国家环境保护总局主编.水和废水监测分析方法(第四版).北京:中国环境科学出版社,1997.254~281. State Environ-

mental Protection Administration. The Measurement of Determination and Analysis of Water and Wastewater (4th Ed. In Chinese). Beijing: China Environmental Science Press, 1997. 254 ~ 281

[9] 张光亚,陈美慈,韩如堃,等. 一株异养硝化细菌的分离及系

统发育分析. 微生物学报, 2003, 43(2): 156 ~ 161. Zhang G Y, Chen M C, Han R Y, *et al.* Isolation, identification and phylogenetic analysis of a heterotrophic nitrifier (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2): 156 ~ 161

A STRAIN OF *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* WITH MULTIPATHS OF NITROGEN METABOLISM

Wang Jinyu Fan Weiping[†] Li Shuang Shen Jiaqi

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract To study on autotrophic removal of nitrogen from wastewater containing a high concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$, a strain of *Pseudomonas fluorescens* dN13 was isolated, by means of incubation in Skerman's medium for *Nitrosomonas*, from the sequence batch reactor system (SBR) of a wastewater treatment plant in Nanjing. Under aerobic condition, this strain could oxidize $\text{NH}_3\text{-N}$ into $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and grow without organic carbon source; and reduce $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and $\text{NO}_3^- \text{-N}$ into $\text{NH}_3\text{-N}$ with organic carbon source and adequate concentration of $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and $\text{NO}_3^- \text{-N}$, while under anaerobic condition, strain dN13 could still reduce $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and $\text{NO}_3^- \text{-N}$ into $\text{NH}_3\text{-N}$ with sodium acetate as the sole carbon source. In the cells of strain dN13 with such multi-paths of nitrogen metabolism, coupling of nitrification and denitrification is feasible.

Key words *Pseudomonas fluorescens*; Aerobic oxidation of ammonia; Reduction of nitrite and nitrate; Multi-path nitrogen metabolism