

# 一株高效氨氮降解菌的分离及其 氨氮去除能力分析

刘亚樵, 韩学军, 谭好臣, 陆洪省

(山东科技大学 化学与环境工程学院, 山东 青岛 266590)

**摘要:** 筛选和鉴定高效降解氨氮的细菌, 并应用到污水脱氮处理中。首先从活性污泥中分离筛选出 12 株氨氮降解菌, 选取其中氨氮降解能力最强的菌株(命名为 AN-1)为研究对象, 对该菌株形态、生理生化性质、系统分类学位置、不同影响条件下的氨氮降解能力进行分析。结果表明: 菌株 AN-1 为革兰氏阴性菌, 杆状, 菌落为乳白色, 接触酶和氧化酶反应均为阳性。菌株 AN-1 降解氨氮的最适宜温度为 30 ℃, pH 为 8.0, 氨氮降解率最高达 78%; 该菌株 16S rDNA 序列与 *Shinella zoogloeoides* (GU930756) 相似度最高(95%)。因此, 该氨氮降解菌 AN-1 具有高效降解氨氮的能力, 属于申氏杆菌属(*Shinella*)。

**关键词:** 氨氮降解菌; 申氏杆菌; 活性污泥; 分离

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 1672-3767(2017)02-0070-06

## Isolation of an Ammonia-nitrogen Degrading Bacterium and Its Removal Capability

LIU Yaqiao, HAN Xuejun, TAN Haochen, LU Hongsheng

(College of Chemical and Environmental Engineering, Shandong

University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266590, China)

**Abstract:** The objective of this study is to isolate and identify the bacteria with high ammonia-nitrogen degrading capability degrading and to apply the bacteria to wastewater denitrification treatment. 12 strains of ammonia-nitrogen degrading bacteria were isolated from activated sludge and the bacterium with the highest ammonia-nitrogen degrading capability (strain AN-1) was selected and its morphology, biochemical properties, phylogenetic position and ammonia-nitrogen degrading capability under different conditions were examined. The results indicate that strain AN-1 is a Gram-negative, rhabditiform bacterium, whose colony is milk white, and both its catalase and oxidase are positive. Strain AN-1 has the optimum ammonia-nitrogen degradation effect when the temperature is 30 ℃ and the pH value is 8.0. Its maximum removal rate can reach 78%. The 16S rDNA sequence of strain AN-1 shows the highest similarity of 95% with its closely related bacteria of *Shinella zoogloeoides* (GU930756). It is thus concluded that strain AN-1, with high ammonia-nitrogen degrading capability, is one member of genus *Shinella*.

**Key words:** ammonia-nitrogen degrading bacterium; genus *Shinella*; activated sludge; isolation

氮含量过高是引起水体富营养化的重要因素之一。水体中的有机氮依次经过氨化细菌、亚硝化细菌、硝化细菌、反硝化细菌的作用, 转化为  $\text{NH}_4^+$ -N、亚硝态氮、硝态氮, 再转化为硝态氮、亚硝态氮, 最后以氮气的

收稿日期: 2016-11-02

基金项目: 山东省博士后基金项目(20101008); 山东省博士后创新基金项目(201201008)

作者简介: 刘亚樵(1991—), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事污水处理研究。

陆洪省(1972—), 男, 山东沂水人, 副教授, 博士, 主要从事污水处理以及土壤环境修复研究, 本文通信作者. E-mail: hslu628@163.com

形式从水体中释放出来,这是微生物法控制水体中氮含量过高的主要方式<sup>[1]</sup>。由上述氮代谢过程来看,氨化细菌是氮循环过程中的限速微生物。因此,分离高效氨化细菌对废水有机氮的降低,控制水体富营养化具有重要意义。

对氨化细菌分离筛选的研究<sup>[2-8]</sup>很多,目前已知的氨化细菌有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*)、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、变形杆菌属(*Proteus*)、沙雷菌属(*Serratia*)及微球菌属(*Micrococcus*)<sup>[9-10]</sup>。本研究是从山东某污水厂活性污泥中筛选、分离氨氮降解菌,对其形态、生理生化性质、氨氮降解能力以及分类学位置进行了分析,为污(废)水中高效氨化细菌的分离筛选以及水体富营养化控制提供一定的理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 材料、试剂和仪器

分离氨氮降解菌的活性污泥来自于山东某污水处理厂。

使用的化学试剂:硫酸铵、氯化钠、硫酸亚铁、磷酸氢二钾、硫酸镁、碳酸氢钠、对氨基苯磺酸、 $\alpha$ -萘胺,均为分析纯。

纳氏试剂的配制:称取 60 g 氢氧化钾,溶于约 250 mL 无氨水中,冷却至室温。另外称取 20 g 碘化钾溶于 100 mL 无氨水中,边搅拌边逐步加入二氯化汞结晶粉末(约 10 g),至出现朱红色沉淀不易溶解时,改为滴加饱和二氯化汞溶液,保持搅拌,到出现少量朱红色沉淀不易溶解时,停止滴加饱和二氯化汞溶液。然后把该溶液缓慢注入上述已冷却的氢氧化钾溶液中,边注入边充分搅拌,并用无氨水稀释至 400 mL,然后静置过夜。最后将该溶液的上清液转移至聚乙烯塑料瓶中,常温避光保存。

格里斯试剂配制:对氨基苯磺酸 0.5 g,溶于 150 mL 10%醋酸溶液中,得到溶液 I;称取  $\alpha$ -萘胺 0.1 g,加入 50 mL 去离子水中,煮沸,再缓缓加入 150 mL 10%醋酸溶液,得到溶液 II。溶液 I 和溶液 II 分别保存在棕色瓶中,待用。

### 1.2 培养基组成

氨氮降解菌富集培养基<sup>[11]</sup>组成:( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/L; NaCl, 0.3 g/L; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.03 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.03 g/L; NaHCO<sub>3</sub>, 1.6 g/L; H<sub>2</sub>O, 1 L; pH, 7.2。121℃灭菌 20 min。固体培养基配制时加入琼脂粉(15 g/L),半固体培养基配制时加入琼脂粉(3 g/L)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 氨氮测定

氨氮测定采用纳氏试剂分光光度法(国标法, HJ 535—2009)。测定步骤:首先配制一系列浓度的铵标准使用液各 50 mL,再分别加入 1.0 mL 酒石酸钾钠溶液和 1.5 mL 的纳氏试剂,在 425 nm 处测定吸光度,并绘制标准曲线。吸取适量水样,定容到 50 mL,分别加入酒石酸钾钠溶液(1.0 mL)和纳氏试剂(1.5 mL),在 425 nm 处测定吸光度,根据标准曲线,计算出水样中氨氮浓度。

#### 1.3.2 氨氮降解菌富集及分离

取 10 mL 活性污泥加入到盛有 200 mL 富集培养基的三角瓶中,30℃条件下振荡(160 r/min)培养,每隔 1 d 取培养液,用格里斯试剂检验亚硝酸盐的生成情况,根据红色深浅判断氨氮降解菌的繁殖情况。培养 7 d 后取 10 mL 富集培养液转接到新鲜的 200 mL 富集培养基中,重复上述操作 3 次。

取富集 3 次后的培养液 0.03 mL 划线培养到固体平板培养基上,30℃条件下静置培养 7 d,分别取其中的单菌落重复划线培养 3 次,将纯化得到的 12 个单菌落分别保存到半固体氨氮降解菌富集培养基中,待用。

#### 1.3.3 高效氨氮降解菌的筛选及其生理生化、生长曲线测定

对上述纯化得到的 12 个单菌落分别用富集液体培养基进行培养,每隔 1 d 取培养液用格里斯试剂检验,根据颜色深浅比较不同菌株的氨氮降解能力,选取颜色变化最深的菌株并将该菌株命名为 AN-1,菌株 AN-1 即为氨氮降解能力最强的菌。然后对菌株 AN-1 的生理生化性质进行测定,包括革兰氏染色、接触酶、

氧化酶、V. P 实验、硝酸盐、亚硝酸盐利用等进行测定,操作方法见文献[12]。

生长曲线测定:用液体富集培养基对菌株 AN-1 进行培养,培养基 pH 为 7,培养温度为 30℃,振荡培养(160 r/min),每隔 1 d 测定培养液吸光度( $OD_{560}$ ),作出时间~吸光度曲线。

### 1.3.4 不同条件对氨氮降解能力的影响测定

#### 1) 不同 pH 条件对氨氮降解能力的影响

将菌株 AN-1 接种到液体富集培养基中培养 3 d,分别取富集培养液 5 mL 接种到 pH 分别为 6.0、7.0、8.0 和 9.0 的 195 mL 富集培养基中,30℃ 条件下振荡培养(160 r/min),培养 5 d 后测定培养液中剩余氨氮含量,求出氨氮降解率。

#### 2) 不同温度条件对氨氮降解能力的影响

取 1.3.4(1)中富集培养液 5 mL 接种到 195 mL 富集培养基中,分别在 10、20、30 和 40℃ 条件下振荡(160 r/min)培养 5 d,测定培养液中剩余氨氮含量,求出氨氮降解率。

### 1.3.5 菌株 AN-1 的系统分类位置确定

#### 1) DNA 提取

菌株 AN-1 DNA 的提取采用柱式基因组抽提试剂盒(生工生物工程公司(上海)股份有限公司 UNIQ-10),提取方法按试剂盒说明书。

#### 2) PCR 对菌株 16S rDNA 的扩增

PCR 扩增引物采用细菌 16S rDNA 通用引物<sup>[13]</sup>,引物序列:

正向引物 7F:5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3';

反向引物 1540R:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。

#### 3) PCR 反应体系以及反应条件

PCR 反应体系(25  $\mu$ L):2.5  $\mu$ L 5 $\times$ Buffer(含  $Mg^{2+}$ ),0.5  $\mu$ L 模板 DNA,各 0.5  $\mu$ L 7F(10 uM)和 1540R(10 uM),1  $\mu$ L dNTP(各 2.5 mM),超纯水定容至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件:98℃ 预变性 3 min;98℃ 变性 25 s,55℃ 退火 25 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环,再 72℃ 延伸 10 min,PCR 扩增的序列由上海生工生物工程公司进行测序。

#### 4) 系统树的创建

将测得的 16S rDNA 序列发送到 DDBJ (DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)数据库中的 Blast 中进行比对,利用 CustalX2.1 和 Mega5.0(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件创建系统树,采用的方法为邻接法(Neighbor-Joining)<sup>[14-17]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 菌株的分离和筛选

首先利用格里斯试剂对富集培养液进行初步检测,筛选具有降解氨氮能力的菌株。然后对菌株进行多次驯化培养,最后用线培养法进行分离,共分离培养得到 12 株氨氮降解菌,从中选取氨氮降解能力最强的菌株 AN-1 为代表菌株,用于后面的实验。

### 2.2 生理生化

菌株 AN-1 在固体平板培养基上生长时,其菌落为乳白色圆形,表面湿润光滑,显微镜观察该菌为杆状(图 1)。根据《常见细菌系统鉴定手册》对氨氮降解菌 AN-1 的形态特征、生理生化特征等进行了鉴定,结果如表 1 所示。

### 2.3 菌株 AN-1 生长曲线测定

将菌株 AN-1 在液体培养基中进行振荡培养,每隔 1 d 测定培养液的吸光度( $OD_{560}$ ),作成如图 2 所示的生长曲线。从图 2 可以看出,菌株 AN-1 的停滞期较短,经过 24 h 左右的培养后便进入了对数增长期。在培养到 72 h 时生物量达到最大,在此后的培养过程中,生物量基本保持不变。

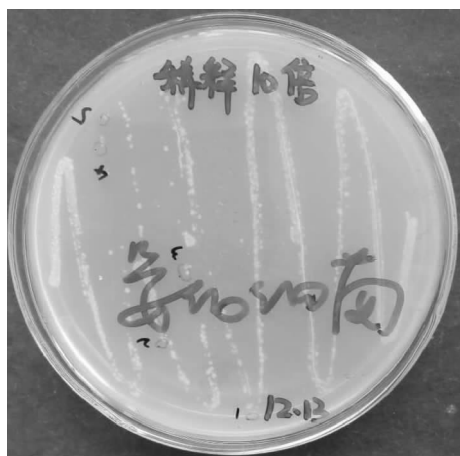


图1 氨氮降解菌株 AN-1 分离、纯化菌落

Fig. 1 Colony isolation and purification of strain AN-1

表1 菌株 AN-1 的生理生化性质

Tab. 1 Physio-chemical properties of strain AN-1

鉴定指标	菌株 AN-1
革兰氏染色(Gram-stain)	—
接触酶(Catalase)	+
氧化酶(Oxidase)	+
乙酰甲基甲醇(V. P.)实验(Voges-Proskauer reaction)	—
硝酸盐还原(Nitrates reduced to nitrites)	—
亚硝酸盐还原(Nitrites reduced to nitrites)	+
葡萄糖(Glucose)	+
淀粉水解(Amylase)	—

注：“+”：阳性或有反应；“—”：阴性或没反应

## 2.4 不同 pH 条件下的氨氮去除率

将菌株 AN-1 分别接种到 pH 为 6.0、7.0、8.0 和 9.0 的培养基中进行振荡培养，培养温度为 30℃，培养到 5 d 时，测定培养液中剩余氨氮含量，分别求出氨氮降解率，作出 pH~氨氮降解率曲线，如图 3 所示。可以看出，菌株 AN-1 在 pH 8.0 左右表现出最高的氨氮降解率，为 78%。pH 为 9.0 的培养基中生长时，菌株 AN-1 的降解率仅有 47%，pH 为 6.0 时的氨氮降解率为 50%。由此可见，菌株 AN-1 的氨氮降解最适 pH 值在 8.0 左右，pH 过高和过低都不利于氨氮降解。

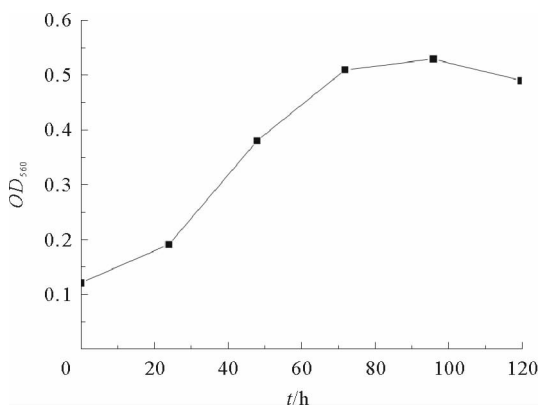


图2 菌株 AN-1 生长曲线

Fig. 2 Growth curve of strain AN-1

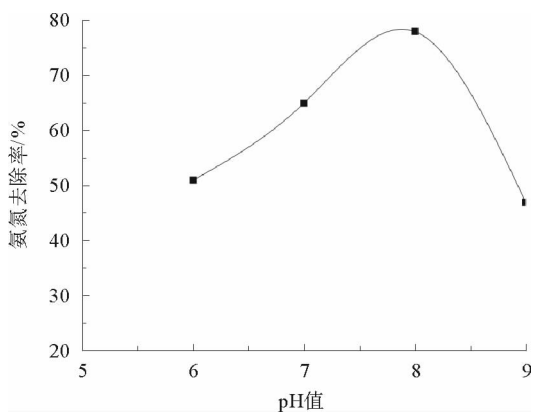


图3 菌株 AN-1 在不同 pH 条件下的氨氮去除率

Fig. 3 NH<sub>4</sub>-N removal rate of strain AN-1 with different pH values

## 2.5 不同温度条件下的氨氮去除率

分别在 10、20、30 和 40℃ 条件对菌株 AN-1 进行振荡(160 r/min)培养 5 d，培养基 pH 均为 8.0，每隔 1 d 测定培养液中氨氮含量，求出氨氮去除率并作不同温度条件下的培养时间~氨氮去除率曲线，如图 4 所示。从图 4 可以看出，菌株 AN-1 在 30℃ 培养时，氨氮去除率最高，达 77%。10℃ 条件下培养，其氨氮去除率仅为 20%，40℃ 培养条件下的氨氮去除率为 25%，稍高于 10℃ 培养条件下的氨氮去除率。可以看出，菌株 AN-1 适宜生长的温度为 30℃ 左右，温度过高或过低，都会降低其氨氮去除率。

## 2.6 氨氮降解菌系统分类位置

经过序列测定,菌株 AN-1 的 16S rRNA 的基因片段为 1398 bp。通过数据库 DDBJ(DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>),获得菌株 AN-1 的登录号为 AB917468。在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据中,选取与菌株 AN-1 16S rRNA 序列同源性较高的基因序列,利用软件 CustalX2.1 和 Mega5.0 创建系统树(图 5)。利用 NCBI 数据库对菌株 AN-1 的 16S rRNA 序列进行同源性分析,结果表明菌株 AN-1 与 *Shinella kummerowiae*(EF070131)相似度最高,为 96%。结合菌株 AN-1 在系统树中的位置,可以判断菌株 AN-1 属于申氏杆菌属,并初步命名为 *Shinella* sp. AN-1(AB917468)。

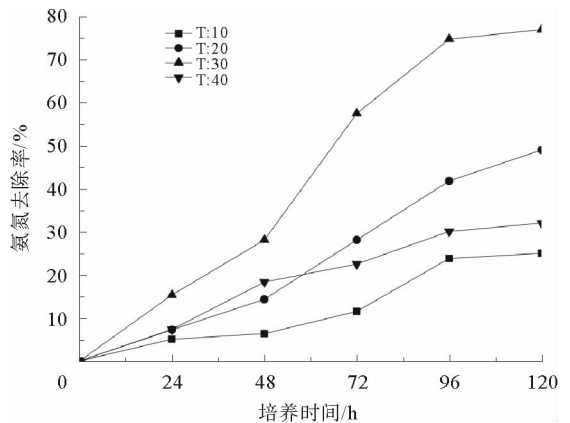


图 4 培养温度对菌株 AN-1 氨氮去除率影响  
Fig. 4 Effect of cultivation temperature on NH<sub>4</sub>-N removal rate of strain AN-1

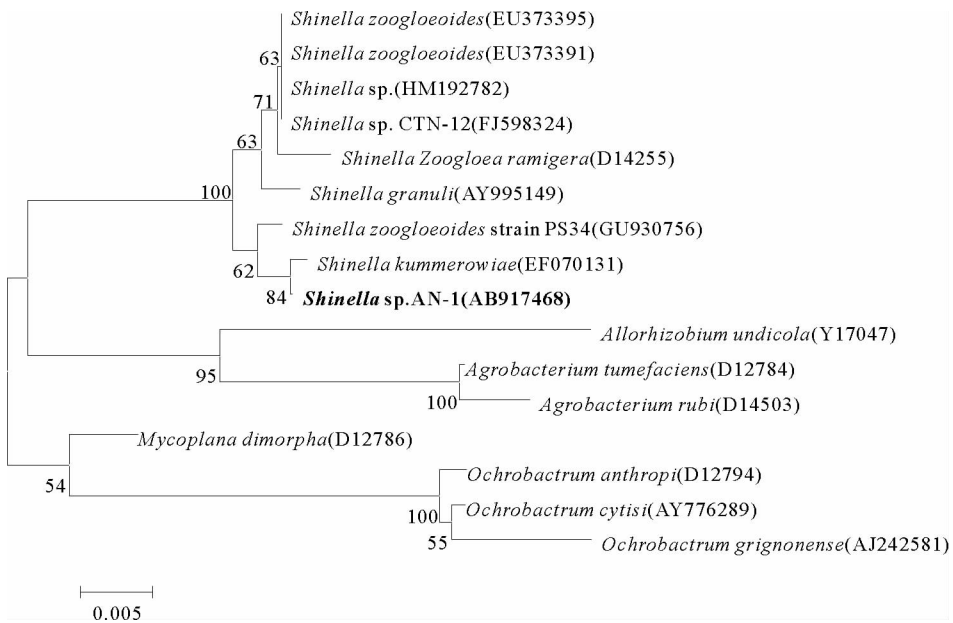


图 5 菌株 AN-1(AB917468)与申氏杆菌属(*Shinella*)中近缘菌株 16S rDNA 序列的无根系统发育树(采用方法为紧邻法)  
Fig. 5 Phylogenetic tree of 16S rDNA gene sequence of strain AN-1 and its closely related strain within the family *Shinella* (Neighbour-adjointing method adopted)

## 3 讨论

本研究筛选得到的申氏杆菌 *Shinella* sp. AN-1(AB917468)具有较强的去除水体中氨氮的能力,氨氮去除率为 78%,为高氨氮废水如养殖废水中去除氨氮提供了新的菌种资源。但要应用到实际的氨氮废水处理中,还需要对具体的环境因素进行分析。另外,如果对菌株 AN-1 进行新菌种鉴定还需要进行 DNA-DNA 杂交,DNA G+C 含量测定、脂肪酸组成分析等工作。

### 参考文献:

[1]张列宇,饶本强,熊琰,等.人工湿地黑臭水体处理系统微生物脱氮机理研究[J].水生生物学报,2010,34(2):256-261.

ZHANG Lieyu,RAO Benqiang,XIONG Ying,et al. The microbial mechanism horizontal constructed wetland used to treated

- black-odor river[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(2): 256-261.
- [2] HEADLEY T R, HUETT D O, DAVISON L. The removal of nutrients from plant nursery runoff in subsurface horizontal-flow wetlands[J]. *Water Science and Technology*, 2001, 44(11/12): 77-84.
- [3] 赵婷婷, 范培成, 姚立荣, 等. 氨化细菌对植物浮岛人工湿地中有机氮强化分解[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(1): 223-226.  
ZHAO Tingting, FAN Peicheng, YAO Lirong, et al. Ammonifying bacteria in plant floating island of constructed wetland for strengthening decomposition of organic nitrogen[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2011, 27(1): 223-226.
- [4] 司马卫平, 何强, 夏安林, 等. 人工湿地处理城市污水效能的影响因素分析[J]. *环境工程学报*, 2008, 2(3): 319-323.  
SIMA Weiping, HE Qiang, XIA Anlin, et al. Analysis on influencing factors of treatment efficiency of municipal wastewater with constructed wetlands [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2008, 2(3): 319-323.
- [5] 李辉, 徐新阳, 李培军, 等. 人工湿地中氨化细菌去除有机氮的效果[J]. *环境工程学报*, 2008, 2(8): 1044-1047.  
LI Hui, XU Xinyang, LI Peijun, et al. Research on ammonibacteria removing organic nitrogen in construction wetland[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2008, 2(8): 1044-1047.
- [6] 刘月敏, 张克强, 张洪生, 等. 廊道式人工湿地处理污水过程中氨氮的去除效果研究[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(5): 208-212.  
LIU Yuemin, ZHANG Keqiang, ZHANG Hongsheng, et al. Removal efficiency of ammonia nitrogen in wastewater by channel constructed wetland[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2008, 24(5): 208-212.
- [7] 刘志云, 刘国华, 蔡辉益, 等. 鸡粪中氨氮降解菌的分离鉴定及除氨适宜条件研究[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(6): 1187-1195.  
LIU Zhiyun, LIU Guohua, CAI Huiyi, et al. Isolation and characterization of ammonia nitrogen-degrading microbe from chicken manure[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(6): 1187-1195.
- [8] 李明堂, 王玉军, 赵淑杰, 等. 一株约氏不动杆菌对氨氮的低温去除特性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2013(10): 2055-2060.  
LI Mingtang, WANG Yujun, ZHAO Shujie, et al. The study of denitrification performance of *Acinetobacter johnsonii* at low temperatures[J]. *Journal of Agriculture Environment Science*, 2013(10): 2055-2060.
- [9] 张庆华, 戴习林, 李怡, 等. 凡纳滨对虾养殖池水中的氨化细菌鉴定及系统发育分[J]. *水产学报*, 2007, 31(5): 692-698.  
ZHANG Qinghua, DAI Xilin, LI Yi, et al. Identification and phylogenesis of ammonifying bacteria from pond water of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(5): 692-698.
- [10] 夏宏生, 蔡明, 向欣. 人工湿地净化作用与微生物相关性研究[J]. *广东水利水电*, 2008(3): 4-8.  
XIA Hongsheng, CAI Ming, XIANG Xin. The study on the relationship between construction wetland and microorganism [J]. *Guangdong Water Conservancy and Hydropower*, 2008(3): 4-8.
- [11] 张玲华, 邝哲师, 张宝玲. 高效硝化细菌的富集培养与分离[J]. *浙江农业学报*, 2002, 14(6): 348-350.  
ZHANG Linghua, KUANG Zheshi, ZHANG Baoling. Research on enrichment and isolation techniques for high-efficient nitrobacteria[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2002, 14(6): 348-350.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] LANE D J. 16S/23S rRNA sequencing[M]//STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, 1991: 115-175.
- [14] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111-120.
- [15] PERSON W R, LIPMAN D J. Improved tools for biological sequence comparison[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988, 85: 2444-2448.
- [16] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method of reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406-425.
- [17] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.