



论文

一株硫酸盐型厌氧氨氧化菌的分离和鉴定

蔡靖, 蒋坚祥, 郑平*

浙江大学环境工程系, 杭州 310029

*通讯作者, E-mail: pzheng@zju.edu.cn

收稿日期: 2009-06-23; 接受日期: 2009-09-13

摘要 以硫酸盐为电子受体、氨为电子供体的反应称为硫酸盐型厌氧氨氧化, 这是一个新的生物反应. 迄今为止, 虽已证明硫酸盐型厌氧氨氧化的存在, 但并未获得进行该反应的微生物. 本课题组从长期稳定运行的厌氧脱氮除硫反应器污泥中, 分离获得了一株硫酸盐型厌氧氨氧化菌. 形态观察、生理试验和 16S rDNA 序列比对表明, 该菌株可归入 *Bacillus benzoovorans*. 以 Biolog 板检测发现, 该菌株可利用多种碳源, 基质多样性明显. 其最适代谢 pH 为 8.5, 最适代谢温度为 30 °C. 研究证明, 该菌株可在无氧条件下, 同时去除氨氮和硫酸盐, 具有硫酸盐型厌氧氨氧化活性. 这一发现为硫酸盐型厌氧氨氧化的确认提供了生物学证据, 为新型生物脱氮除硫工艺的研发打下了基础, 为微生物学增加了新的内容, 为地球氮素和硫素循环提供了新的认识.

关键词
芽孢杆菌
氨氮
硫酸盐
分离鉴定

1 引言

硫酸盐型厌氧氨氧化是一个以氨为电子供体, 以硫酸盐为电子受体的生物反应, 其反应产物为氮气和单质硫 ($\text{SO}_4^{2-} + 2\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{S}^0 + \text{N}_2 + 4\text{H}_2\text{O}$). 2001 年, Fdz-Polanco 等人^[1]在以颗粒活性炭厌氧流化床反应器处理酒糟废水时, 首次发现氨氮与硫酸盐可在该反应器内同时减少; 物料衡算表明, 部分氨氮和硫酸盐被转化成氮气和单质硫. 近年来, 硫酸盐型厌氧氨氧化现象得到了其他研究者的不断证实^[2~6].

氮素和硫素是生物必需营养元素, 任何生物的生存、延续和发展都离不开这两种元素^[7, 8]. 在地球上, 海洋面积占 71%, 它是地球生物化学循环最大的源和汇. 海洋与大气之间的氮通量和硫通量分别为 140 Tg/a^[9]和 15~33 Tg/a^[10]. 氨和硫酸盐普遍存在于海水及其沉积物中, 浓度分别为 100 μM ^[11]和 20 mM^[12], 具备进行硫酸盐型厌氧氨氧化反应的基本条件. 据报道, 亚硝酸盐型厌氧氨氧化(以氨作为电子供体, 以亚硝酸盐作为电子受体, 反应产物为氮气的

生物反应)对海洋氮损失的贡献率高达 30%~50%^[13]. 由于海洋中硫酸盐的含量远远高于亚硝酸盐, 从反应条件上看, 硫酸盐型厌氧氨氧化的作用将大于亚硝酸盐型厌氧氨氧化. 此外, 硫酸盐型厌氧氨氧化打通了氮素和硫素循环, 搞清硫酸盐型厌氧氨氧化有助于深入认识地球氮素和硫素循环.

在许多工业废水(如制药、食品、化工废水等)中, 氨和硫酸盐同时存在. 以硫酸盐型厌氧氨氧化为依据, 可以研发新的废水生物脱氮除硫技术. 由于无需外源电子受体, 这类新工艺可望显著降低废水处理成本.

硫酸盐型厌氧氨氧化是一个全新的生物反应, 分离获得硫酸盐型厌氧氨氧化微生物, 可以增加人们的菌种资源, 搞清硫酸盐型厌氧氨氧化的微生物机理, 可以丰富微生物学内容.

迄今为止, 虽然硫酸盐型厌氧氨氧化的存在得到了认同, 但进行该反应的微生物并未得到分离. 尽管文献报道的硫酸盐型厌氧氨氧化作用均发现于有机环境, 但从理论上讲, 它是一个自养型生物反应. 为此, 本课题组从长期稳定运行的厌氧脱氮除硫反

反应器污泥中, 分离获得了一株硫酸盐型厌氧氨氧化菌, 进行了该菌株的分类鉴定, 并试验了该菌株的自养硫酸盐型厌氧氨氧化活性。

2 材料与方法

2.1 菌株和培养基

分离菌株所用的活性污泥样品取自本实验室长期运行的脱氮除硫反应器^[4]。

液体无机培养基: 每升含 K_2SO_4 0.163 g, Na_2SO_3 0.118 g, NH_4Cl 0.229 g, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 1.066 g, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.533 g, KCl 0.37 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.16 g, $CaCl_2$ 0.08 g, $KHCO_3$ 1.25 g, 酸性和碱性微量元素液各 1 mL。

酸性微量元素液组成: 每升含 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.491 g, H_3BO_3 0.062 g, $ZnCl_2$ 0.068 g, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.017 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.099 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.119 g, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.024 g, HCl 4.18 mL。碱性微量元素液组成: $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ 0.033 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.024 g, $NaOH$ 0.4 g。

固体培养基: 每升含琼脂 20 g, 其余同液体无机培养基。

培养基采用加压蒸汽灭菌(121 °C, 30 min)。

2.2 分离培养方法

取反应器中的活性污泥样品, 采用系列稀释及平板划线法分离目标菌株。培养物置于厌氧培养罐中, 30 °C 恒温培养。根据菌落形态的一致性和菌体细胞的一致性, 判断菌株的纯化状况, 选取生长快、活性强的菌株进行分类鉴定和功能试验。

2.3 菌株鉴定

2.3.1 细胞形态观察

磷钨酸负染后, 用透射电镜观察。

2.3.2 细胞结构观察

超薄切片后, 用 JEM-1200EX 透射电镜观察。

2.3.3 菌株碳源利用情况

采用 Biolog 细菌自动鉴定仪检测。在 Biolog 96 孔平板上, 除对照孔外, 将合适浓度的菌悬液接种于各微孔并培养 16 h 后, 读数鉴定^[14]。

2.3.4 菌株 16S r DNA 序列测定和系统发育树构建

采用基因组 DNA 提取试剂盒(上海申能博彩)提取被鉴菌株的基因组 DNA, 并以细菌的通用引物 11F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1387R (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3') 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系(50 μ L): DNA 模板(1.0 μ mol) 2 μ L, dNTP 混合物(终浓度 100 μ mol)1 μ L, DNA 聚合酶 0.5 μ L, 正反引物各 1 μ L, 缓冲液 5 μ L, 水 39.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。纯化 PCR 产物, 测序。测序委托大连宝生物工程技术有限公司进行。将测得的 16S r DNA 序列后将结果输入 NCBI Gene Bank 数据库 (National Center for Biotechnology Information, NCBI), 进行 BLASTN 比对。利用 MEGA4.1 软件中基于 Kimura 2-parameter 模型的邻接法来建立系统发育树, 并用 bootstrap 法(replication 值为 1000)进行检验^[15]。

2.4 菌株功能确认

菌株功能试验在 65 mL 血清瓶中进行。离心收集培养好的菌株, 并制成菌悬液, 将其转接到液体培养基中。每个试验瓶中加入 2 mL 菌悬液, 总反应体积为 50 mL, pH 8.5。培养前用无氧氮气置换瓶内空气, 使其处于无氧状态。整个试验置于 30 °C 恒温条件下进行, 每隔 24 h 测定氨氮和硫酸盐的减少量, 以及亚硝酸盐和硝酸盐的产生量, 以此来判断菌株的脱氮除硫能力。

2.5 最适生长条件实验

以氨氮和硫酸盐的去除效率为标准判断菌株最适代谢条件。采用单因素实验法, 通过观察不同 pH 下氨氮和硫酸盐的去除效率, 确定该菌种的最适 pH 条件, 培养基原始 pH 分别设定为 6.5、7.5、8.5、9.5、10.5。通过观察不同温度下氨氮和硫酸盐的去除效率, 确定该菌种的最适温度条件, 培养温度分别设定为 15 °C、25 °C、30 °C、35 °C、45 °C、55 °C。

2.6 分析方法

氨氮(NH_4^+-N): 苯酚-次氯酸盐分光光度法^[16]; 硫酸盐($SO_4^{2-}-S$): 铬酸钡分光光度法^[16]; 硝氮(NO_3^--N): 紫外分光光度法^[16]; 亚硝氮(NO_2^--N): N -(1-萘基)-乙二胺光度法^[16]。

3 结果与分析

3.1 分离菌株及其形态特征

经过反复分离和纯化, 获得一个脱氮除硫菌株, 命名为菌株 ASR. 30 °C 恒温培养 3 d, 培养基上长出菌落. 该菌革兰氏染色阴性; 菌体大小 (0.7~1.0) $\mu\text{m} \times (2.4 \sim 3.5) \mu\text{m}$, 具有偏极生鞭毛(图 1); 菌体细胞杆状; 细胞壁表面光滑, 内有芽孢, 呈卵圆形. 菌落浅黄色, 圆形, 大小 0.5~1 mm, 表面湿润、光滑.

3.2 菌株碳源利用情况

将菌株 ASR 接种到 95 种碳源的 Biolog GN 板微孔中, 培养 16 h 后, 观察碳源利用情况表明, 该菌株

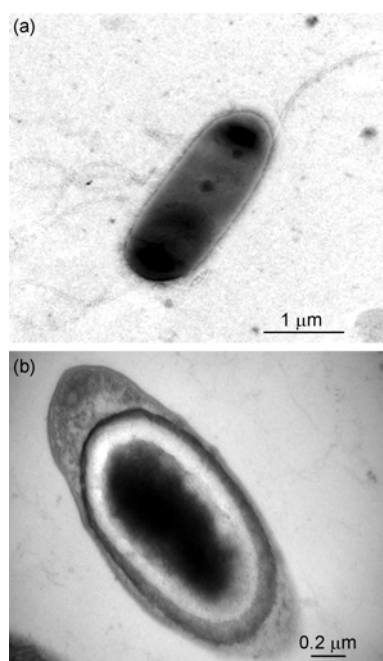


图 1 菌株透射电镜照片

能够利用醋酸、琥珀酸、柠檬酸、顺乌头酸、 α -D-葡萄糖、D,L-乳酸、吐温 40、吐温 80、D-甘露醇、丙酮酸甲酯、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖酸、D-葡萄糖醛酸、 β -羟酸、 γ -羟丁酸、衣康酸、酮戊二酸、丙二酸、奎尼酸、葡萄糖二酸、溴丁二酸、D-丙氨酸、L-丙氨酸、左旋天冬酰胺、L-天门冬氨酸、L-谷氨酸、L-组氨酸、L-脯氨酸、L-焦酸、L-丝氨酸、D,L-肉碱、 γ -氨基丁酸、尿刊酸和腐胺, 具有丰富的基质多样性.

3.3 菌株 16S r-DNA 序列及其系统发育分析

通过 PCR 扩增, 所得的菌株 16S rDNA 产物为 1334bp. 将菌株 16S rDNA 序列输入 Gene Bank 数据库, 进行 BLASTN 比对, 结果显示, 菌株 ASR 与芽孢菌属和寡养单胞菌属的细菌具有高度的 16S rDNA 序列相似性, 其中与 *Bacillus koreensis*, *Streptomyces clavuligerus* 的序列相似性高达 99%, 与 *Bacillus benzoovorans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus longiquaesitum*, *Bacillus nealsonii*, *Bacillus pichinotyi* 的序列相似性达到 96%. 菌株 ASR 与这些菌株之间的系统发育树如图 2 所示. 由系统发育树可以看出, 菌株 ASR 与 *Bacillus benzoovorans* 菌株的进化距离最为接近.

3.4 菌株脱氮除硫活性

将菌株 ASR 接种到含有氨氮和硫酸盐的液体培养基中, 分别在 24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h 测定氨氮和硫酸盐的减少量以及亚硝酸盐和硝酸盐的产生量, 结果见图 3. 经过 120 h 培养后, 氨氮转化率最高达 44.4%, 硫酸盐转化率最高达 40.0%; 亚硝酸盐和硝酸盐产生量几乎为零, 但血清瓶底部出现淡黄色颗粒物. 采用 origin 软件以一级反应动力学方程

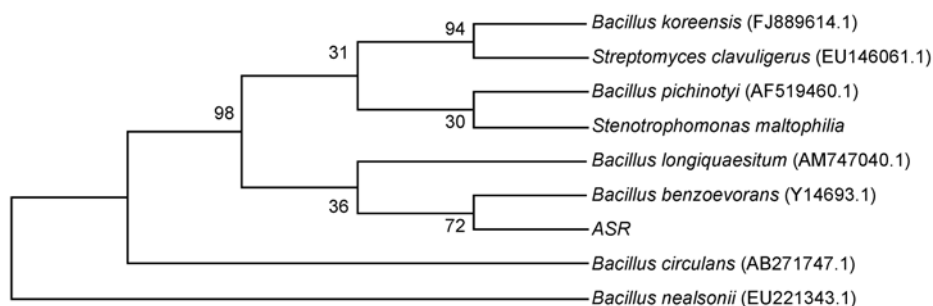
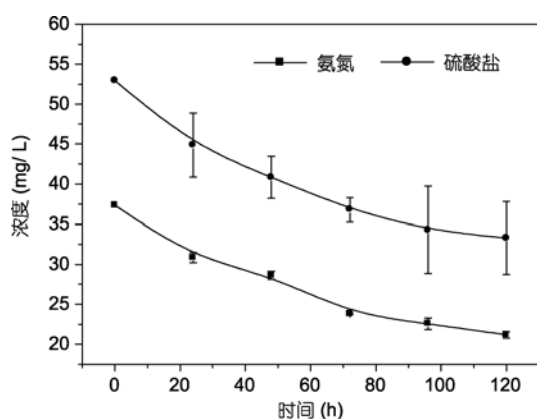
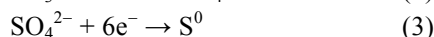
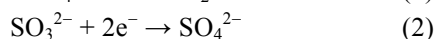
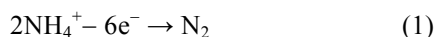


图 2 菌株 ASR 与不同菌株之间的系统发育树. 括号内为相应菌株在 GeneBank 中的基因序列登录号

图3 菌株对 NH_4^+ 和 SO_4^{2-} 的转化情况

对实验数据进行拟合可知, 菌株 ASR 的氨氮转化速率为 $0.168 \text{ mg NH}_4^+\text{-N}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ($R^2=0.9802$), 硫酸盐转化速率为 $0.191 \text{ mg SO}_4^{2-}\text{-S}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ($R^2=0.9525$). 转化的氨氮和硫酸盐摩尔比为 2.01, 符合 Folz-Polanco 等人^[1]提出的化学反应计量关系.

根据电子守恒原理, 有:



经计算, 氨氮转化过程中共失去电子数量为: 3.47 mmol/L , 硫酸盐转化过程中共得到电子数量为: 3.69 mmol/L , 失去电子数量与得到电子数量之比为 0.94, 两者电子得失数量大体相当. 这表明, 菌株 ASR 具有同步将氨氮转化为氮气, 硫酸盐转化为单质硫的能力.

3.5 菌株最适代谢条件

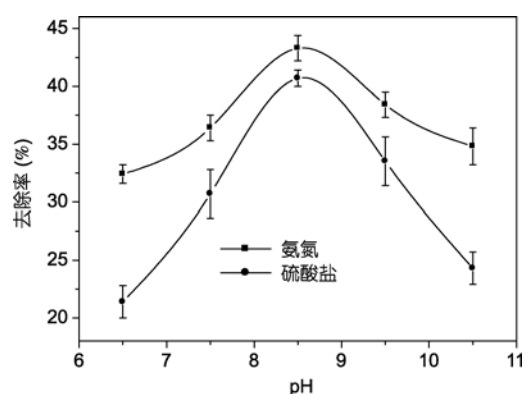
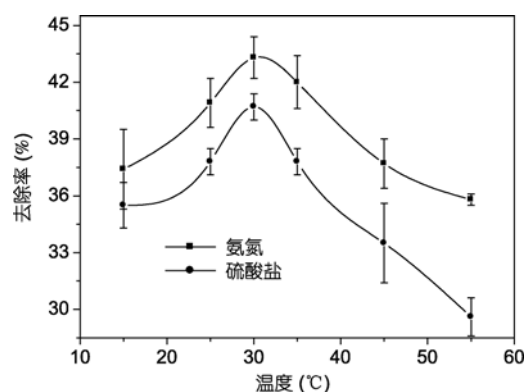
在不同 pH 下测定了菌株的氨氮和硫酸盐转化率 (5 d), 结果见图 4. 由图可知, 随着 pH 升高, 菌株的氨氮和硫酸盐转化率变化趋势相似, 先升高后下降, pH 为 8.5 时达到最高.

在不同温度下测定了菌株的氨氮和硫酸盐转化率 (5 d), 结果见图 5. 由图可知, 随着温度升高, 菌株的氨氮和硫酸盐转化率变化趋势也较相似, 先升高后下降, 温度为 30°C 时达到最高.

4 讨论

4.1 菌株的归属

菌株形态是菌种鉴定的重要依据^[17]. 从透射电

图4 不同 pH 下菌株对 NH_4^+ 和 SO_4^{2-} 的去除率 (5 d)图5 不同温度下菌株对 NH_4^+ 和 SO_4^{2-} 的去除率 (5 d)

镜照片看, 该菌株能产生芽孢, 可归入产芽孢细菌. 其细胞形态呈杆状, 能在兼性厌氧条件下生长, 按照《常见细菌系统鉴定手册》^[18]中产芽孢细菌检索表, 可归入双芽孢杆菌属、盐芽孢杆菌属、硫氮素芽孢杆菌属、脂环酸芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、短芽孢杆菌属、硫芽孢杆菌属或芽孢杆菌属. 随着分子生物学手段的发展, 16S rDNA 序列成为菌种鉴定的另一重要依据. 目前国际上公认和普遍采用的伯杰分类系统, 也采用 16S rDNA 序列作为分类依据^[19]. 根据 16S rDNA 序列的 BLASTN 比对结果, 可将该菌株进一步归入芽孢杆菌属. 从菌株之间的系统发育树看, 菌株 ASR 与 *Bacillus benzoovorans* 最为接近.

综合菌株的形态学特征、生理学特征和系统发育分析, 可将菌株 ASR 归入 *Bacillus benzoovorans*.

4.2 菌株的特殊功能

菌株从稳态运行的脱氮除硫反应器污泥中分离获得, 所用的分离培养基是无机盐培养基, 以碳酸盐

为碳源,以氨氮为能源和氮源,以硫酸盐为电子受体.这表明该菌株能在无机环境中,以氨氮和硫酸盐作为基质进行生长代谢. Liu 等人^[5]通过分子生物学手段发现,浮霉菌门中 *Candidatus Anammoxoglobus sulfate* 可能具有同时转化氨氮和硫酸盐的能力.迄今为止,尚无芽孢杆菌具有硫酸盐型厌氧氨氧化方面的研究报告.

根据《伯杰细菌鉴定手册》^[20],芽孢杆菌属菌株的特性为:严格好氧或兼性厌氧;有机化能营养,利用多种底物进行呼吸代谢,发酵代谢或兼营呼吸和发酵代谢. Nakada 等人从 *Bacillus* sp. BN53-1 中分离到硫化氢氧化酶,它可将硫化氢氧化为单质硫^[21]. Riet 等人^[22]和 Chikwem 等人^[23]则相继从芽孢杆菌属菌株中分离到硝酸盐还原酶^[22, 23]. 这些结果表明芽孢杆菌属菌株具有代谢多样性,也为其参与硫酸盐型厌氧氨氧化反应提供了解释.但在本研究中,芽孢杆菌

生长于无机条件下,同时具有脱氮除硫功能,尚属首次发现,值得深入研究.

5 结论

(1)从长期运行的厌氧脱氮除硫反应器污泥中分离获得菌株 ASR,经形态学观察、生理学试验和 16S rDNA 序列比对,将其归入芽孢杆菌属,分类上该菌株与 *Bacillus benzoovorans* 最为接近.

(2)试验证明,菌株 ASR 具有硫酸盐型厌氧氨氧化能力,能够在无氧条件下,以硫酸盐为电子受体氧化氨.这是一个新的发现,为硫酸盐型厌氧氨氧化的确认提供了微生物学证据.

(3)菌株 ASR 的最适生长 pH 和温度分别为 8.5 和 30 °C,可兼性厌氧生长,能利用多种碳源,基质多样性明显.

致谢 此工作得到国家自然科学基金项目(批准号: 30770039)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA06Z332)资助,特此致谢.

参考文献

- 1 Fdz-Polanco F, Fdz-Polanco M, Fernandez N, Urueña MA, Garcia PA, Villaverde S. New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Res*, 2001, 35(4): 1111—1114
- 2 董凌霄, 吕永涛, 韩勤有, 王志盈. 硫酸盐还原对氨氧化的影响及其抑制特性研究. 西安建筑科技大学学报(自然科学版), 2006, 38(3): 425—428
- 3 Zhao QL, Li W, You SJ. Simultaneous removal of ammonium-nitrogen and sulphate from wastewaters with an anaerobic attached-growth bioreactor. *Water Sci Technol*, 2006, 54(8): 27—35
- 4 张蕾, 郑平, 何玉辉, 金仁村. 硫酸盐型厌氧氨氧化性能的研究. 中国科学 B 辑: 化学, 2008, 38(12): 1113—1119
- 5 Liu ST, Yang FL, Gong Z, Meng FF, Chen HH, Xue Y, Furukawa K. Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal. *Bioresour Technol*, 2008, 99(15): 6817—6825
- 6 Yang ZQ, Zhou SQ, Sun YB. Start-up of simultaneous removal of ammonium and sulfate from an anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in an anaerobic up-flow bioreactor. *J Hazard Mater*, doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.067
- 7 郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术. 北京: 科学出版社, 2004. 1—3
- 8 缪应祺. 废水生物脱硫机理及技术. 北京: 化学工业出版社, 2004. 1—5
- 9 Gruber N, Galloway JN. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 2009, 451: 293—296
- 10 Malin G. New pieces for the marine sulfur cycle Jigsaw. *Science*, 2006, 314(5799): 607—608
- 11 Kuypers MMM, Sliemers AO, Lavik G, Schmid M, Jørgensen BB, Kuenen JG, Sinninghe Damsté JS, Strous M, Jetten MSM. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the black sea. *Nature*, 2003, 422: 608—611
- 12 Habicht KS, Gade M, Thamdrup B, Berg P, Canfield DE. Calibration of sulfate levels in the Archean Ocean. *Science*, 2002, 298(5602): 2372—2374
- 13 [0]Devol AH. Nitrogen cycle: solution to a marine mystery. *Nature*, 2003, 422: 575—576
- 14 姚槐应, 黄昌勇. 土壤微生物生态学及其实验技术. 北京: 科学出版社, 2006. 166—169
- 15 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596—1599
- 16 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法(第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 258—284

- 17 R.E.布坎南, N.E.吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册(第八版). 北京: 科学出版社, 1984. 7—9
- 18 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 43—65
- 19 陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学. 北京: 化学工业出版社, 2007. 5
- 20 Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Baltimore: The Williams and Wickins Company, 1994. 559
- 21 Nakada Y, Ohta Y. Purification and properties of hydrogen sulfide oxidase from *Bacillus* sp. BN53-1. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87(4): 452—455
- 22 Riet J, Wientjes FB, Doorn J, Planta RJ. Purification and characterization of the respiratory nitrate reductase of *Bacillus licheniformis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 1979, 576(2): 347—360
- 23 Chikwem JO, Downey RJ. Purification and characterization of the respiratory nitrate reductase of *Bacillus stearothermophilus*. *Anal Biochem*, 1982, 126(1): 74—80

Isolation and identification of bacteria responsible for simultaneous anaerobic ammonium and sulfate removal

CAI Jing, JIANG JianXiang & ZHENG Ping

Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract: Sulfate-dependent anaerobic ammonium oxidation is a novel biological reaction, in which ammonium is oxidized with sulfate as the electron acceptor under anoxic conditions. Ammonium and sulfate are cosmopolitan chemical species which are an integral part of the global nitrogen and sulfur cycles. A detailed exploration of sulfate-dependent anaerobic ammonium oxidation is quite practical. In this work, a bacterial strain named ASR has been isolated from an anaerobic ammonia and sulfate removing reactor working under steady-state. On the basis of electron microscopy, physiological tests and 16S rDNA phylogenetic sequence analysis, the strain ASR is found to be related to *Bacillus benzoovorans*. According to the biological carbon source utilization test, the strain ASR could use many carbon sources. Its optimum pH value and temperature were 8.5 and 30 °C, respectively. The test proves that the strain ASR is able to use sulfate to oxidize ammonia anaerobically. The maximum ammonia and sulfate removal rates were 44.4% and 40.0%, respectively. The present study provided biological evidence for the confirmation and development of sulfate-dependent anaerobic ammonium oxidation and brought new insights into the global nitrogen and sulfur cycles.

Keywords: bacillus, ammonia, sulfate, isolation and identification