

董玉玮,张雁秋,涂宝军,等. 亚硝化细菌培养条件的优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):314-316.

亚硝化细菌培养条件的优化

董玉玮^{1,2}, 张雁秋¹, 涂宝军^{1,2}, 孙 玲^{1,2}, 曹文平^{1,2}

(1. 中国矿业大学, 江苏徐州 221116; 2. 徐州工程学院, 江苏徐州 221116)

摘要:以活性污泥中分离出的亚硝化的细菌为研究对象,对亚硝化菌培养条件(培养温度、pH、碳源、氮源、刺激因子)进行优化。结果表明:亚硝化细菌最佳培养温度为 30 ℃,最佳培养基 pH 值为 8.0,外加碳源 Na_2CO_3 最佳浓度为 0.2%, NH_4HCO_3 最佳浓度为 0.2%,刺激因子 LaCl_3 最佳浓度为 0.004%。在此最佳培养条件下,亚硝化细菌生长及亚硝酸盐氮富集能力达到最高,为 185.36 mg/L,脱氮率最高为 92.52%;采用三角瓶半连续式培养的亚硝化细菌脱氮性能优于量筒培养的,而连续式培养较半连续式培养能更有利于亚硝化细菌菌群数量的增长和繁殖。

关键词:亚硝化细菌;培养条件;优化

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0314-03

亚硝化细菌在自然界分布十分普遍,土壤、淡水及海洋中都有亚硝化细菌的存在,能将氨氧化成亚硝酸,属于硝化细菌科两个生理亚群之一^[1],在硝化作用第一步即由铵盐氧化为亚硝酸盐的过程中起作用,同时也是其第一个限速反应^[2-3]。亚硝化细菌与人类的关系十分密切,被广泛应用于食品、生物、医药工业废水净化,城市污水处理,鱼类养殖,农作物土壤改良等方面^[4-5]。亚硝化细菌的生长代谢过程极其缓慢,在适宜的条件下一般需要 24 h 才能完成 1 次分裂周期。在进行固体培养过程中甚至需数月才能长出菌落。亚硝化细菌是严格的专性化异养菌,以铵盐的氧化满足其能量的需要。在纯培养的情况下,培养基中若加入有机物质将会抑制亚硝化细菌的生长,但是自然环境中有机物质对亚硝化细菌的影响不如在纯培养中的大。亚硝化细菌对培养基组成、pH 值和温度等的改变都敏感^[6]。本试验研究碳源、氮源、温度、刺激因子、pH 对亚硝化细菌生长及亚硝酸盐富集能力的影响,对亚硝化细菌培养条件进行优化。

1 材料和方法

1.1 材料

亚硝化细菌从中国矿业大学环境与测绘学院实验室活性污泥中富集分离获得,经鉴定为 *Nitrosomonas* sp.^[7],经不断选育后该菌种亚硝酸盐富集能力较强。

1.2 方法

1.2.1 培养基 亚硝化细菌富集培养基^[8]: 0.4% (NH_4)₂SO₄、0.1% K₂HPO₄、0.05% MgSO₄、0.2% NaCl、0.04% FeSO₄、0.5% CaCO₃混匀溶解。调节 pH 值至 8.0~8.2。亚硝化细菌液体培养基:亚硝化细菌富集培养基稀释 5 倍,即为亚硝化细菌液体培养基,其中 NH_4^+ -N 浓度为

206 mg/L。

1.2.2 亚硝化细菌培养条件优化

1.2.2.1 温度 选取一定量的长势较好的亚硝化细菌,加入 500 mL 亚硝化细菌液体培养基,于 500 mL 摇瓶中,调 pH 值为 8,在 15、25、30、35、40 ℃下,110 r/min 摇床培养。

1.2.2.2 Na_2CO_3 浓度 选取一定量的长势较好的亚硝化细菌,加入 500 mL 亚硝化细菌液体培养基,于 500 mL 摇瓶中,调 pH 值为 8,分别加入 0.1%、0.2%、0.4%、1% Na_2CO_3 ,110 r/min,最适温度下摇床培养。

1.2.2.3 NH_4HCO_3 浓度 选取一定量的长势较好的亚硝化细菌,加入 500 mL 亚硝化细菌液体培养基,于 500 mL 摇瓶中,调 pH 值为 8,分别加入 0.02%、0.1%、0.2%、0.3% NH_4HCO_3 ,110 r/min,最适温度,最适 Na_2CO_3 浓度下摇床培养。

1.2.2.4 刺激因子(氯化镉)浓度 选取一定量的长势较好的亚硝化细菌,加入 500 mL 亚硝化细菌液体培养基,分别加入 0.001%、0.002%、0.004%、0.008%、0.01%、0.02% LaCl_3 ,110 r/min、最适温度、最适 Na_2CO_3 浓度、最适 NH_4HCO_3 浓度下摇床培养。

1.2.2.5 pH 值 选取一定量的长势较好的亚硝化细菌,加入 500 mL 亚硝化细菌液体培养基,于 500 mL 摇瓶中,分别于 pH 6、7、8、9、10 条件下,110 r/min,最适温度,最适 Na_2CO_3 浓度,最适 NH_4HCO_3 浓度,最适 LaCl_3 浓度下摇床培养。

1.2.3 亚硝化细菌培养方式的改进

1.2.3.1 亚硝化细菌的半连续式培养 采用最佳培养基,接种亚硝化细菌 300 mL 菌液分别于 1 L 三角瓶和 1 L 量筒中,不断曝气。30 ℃恒温培养 38~40 d,每 7 d 更换新的培养基,每 2 d 测定其亚硝酸盐氮的含量。

1.2.3.2 亚硝化细菌的连续式培养 取 300 mL 亚硝化细菌菌液,接种于 1 L 三角瓶中,加满亚硝化细菌最佳培养基,30 ℃连续式培养,每 2 d 测定其亚硝酸盐氮的含量。

1.2.4 检测方法^[9] 亚硝态氮含量的测定采用 α -萘胺分光光度法;铵态氮含量的测定采用纳氏试剂分光光度法;硝态氮含量的测定采用酚二磺酸分光光度法。

收稿日期:2013-08-19

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK2011201);徐州工程学院科技计划(编号:XKY2012216)。

作者简介:董玉玮(1980—),男,江苏徐州人,博士,讲师,主要从事环境微生物学研究。E-mail: dongyuwei66@163.com。

通信作者:张雁秋,教授。E-mail: yanqiuzhang66@163.com。

2 结果与分析

2.1 温度对亚硝化细菌培养的影响

分别于 15、25、30、35、40 ℃ 下, 120 r/min 培养亚硝化细菌 18 d。从图 1 可知, 随着培养时间的增加, 不同温度下亚硝态氮含量都是先增加后趋于平缓。温度过低时, 亚硝化细菌的生长代谢缓慢, 随着温度升高, 亚硝化细菌细胞内的生化反应加快, 促进了亚硝态氮的生成。当温度为 30 ℃ 时, 亚硝态氮浓度最高, 为 160.71 mg/L, 即此时亚硝化细菌的脱氮能力最强, 因此亚硝化细菌培养最佳温度为 30 ℃, 这与 Hyungseok 的研究结果^[10]一致。

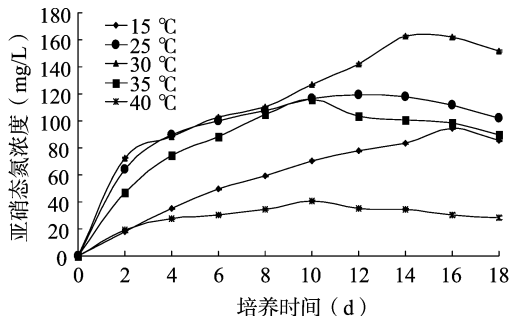


图1 不同温度对亚硝化细菌生长的影响

2.2 pH 值对亚硝化细菌培养的影响

从图 2 可知, 随着培养时间的增加, 不同 pH 值下亚硝态氮含量都是先增加后趋于平缓。亚硝化细菌适宜在偏碱性条件下生长, pH 偏低时, 其活性受到影响, 随着 pH 值的升高, 亚硝化细菌变得活跃。当 pH 值为 8.0 时, 亚硝态氮浓度最高, 为 172.16 mg/L, 即此时亚硝化细菌的脱氮能力最强, 因此亚硝化细菌培养最佳 pH 值为 8.0, 这与廖雪义^[11]等的研究结果一致。

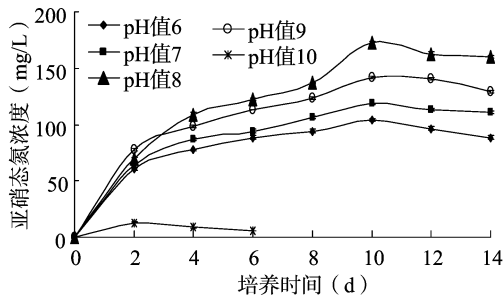


图2 不同pH值对亚硝化细菌生长的影响

2.3 Na_2CO_3 浓度对亚硝化细菌培养的影响

亚硝化细菌以无机碳源为唯一碳源, 因此培养体系中无机碳源的含量会对亚硝化细菌的生长产生影响。自然界中无机碳主要以 CO_2 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 3 种形式存在, 不同形式的无机碳源对亚硝化细菌的生长影响有一定影响, 原来液体培养基以 CaCO_3 为唯一碳源, 由于 CaCO_3 较难溶解, 碳源释放不足, 因此补加易溶解的 Na_2CO_3 以提供更多的碳源供亚硝化细菌生长所需。

从图 3 可知, 随着培养时间的增加, 不同浓度 Na_2CO_3 下亚硝酸盐氮含量都是先增加后趋于平缓。当 Na_2CO_3 浓度为 0.2% 时, 亚硝态氮浓度最高, 为 171.44 mg/L, 即此时亚硝化细菌的脱氮能力最强, 因此亚硝化细菌液体培养基中最佳

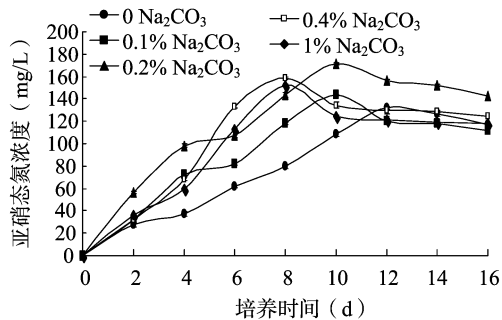


图3 不同浓度 Na_2CO_3 对亚硝化细菌生长的影响

Na_2CO_3 浓度为 0.2%。

2.4 NH_4HCO_3 浓度对亚硝化细菌培养的影响

以 NH_4^+ 为氮源最适合亚硝化细菌的生长, 即硝化作用效率最高。 NH_4HCO_3 不但能提供 NH_4^+ 形式氮源, 且能提供 HCO_3^- 形式碳源, 有利于亚硝化细菌获得更多形式的碳源。

从图 4 可知, 随着培养时间的增加, 不同浓度的 NH_4HCO_3 下亚硝酸盐氮含量都是先增加后趋于平缓。当氮源较少时, 无法满足亚硝化细菌的生长需要, 过多则会对亚硝化细菌有一定的刺激, 硝化作用反而受到抑制。当 NH_4HCO_3 浓度为 0.2% 时, 亚硝态氮浓度最高, 为 179.16 mg/L, 即此时亚硝化细菌的脱氮能力最强, 因此亚硝化细菌最佳 NH_4HCO_3 浓度为 0.2%, 这与杨代金等^[12]的研究结果相近。

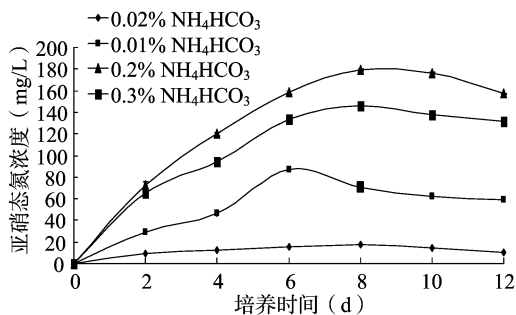


图4 不同浓度 NH_4HCO_3 对亚硝化细菌生长的影响

2.5 刺激因子 LaCl_3 对亚硝化细菌培养的影响

LaCl_3 对亚硝化细菌酶的作用与其浓度有关, 当浓度较低时对酶具有变构激活作用, 而浓度高时对酶具有抑制作用。在一定的 LaCl_3 含量范围内, 亚硝化速率随 LaCl_3 含量的增加而增大。当 LaCl_3 浓度为 0.004% 时, 亚硝态氮浓度最高, 为 183.12 mg/L, 当 LaCl_3 浓度超过 0.004% 时, 反而对亚硝态氮的积累有抑制作用 (图 5)。

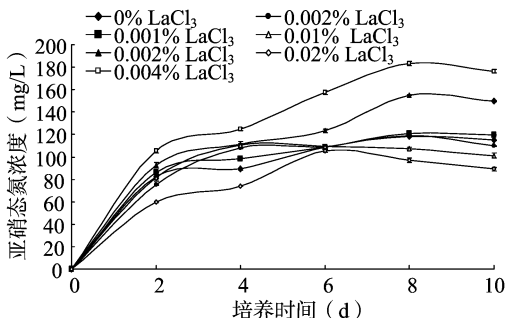


图5 不同浓度 LaCl_3 对亚硝化细菌生长的影响

在加入 0.2% Na_2CO_3 、0.2% NH_4HCO_3 、0.004% LaCl_3 的液体培养基中培养亚硝化细菌, pH 值 8.0, 30 ℃, 110 r/min 培养 10 d, 每 1 d 测定亚硝态氮、铵态氮、硝态氮的含量, 结果见图 6。

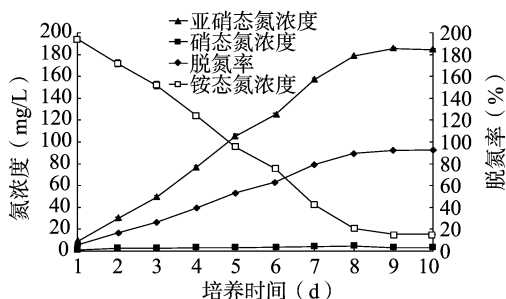


图6 最佳培养条件下亚硝化细菌的脱氮能力

从图 6 可以看出, 在最佳培养条件下, 随着培养时间的增加, 亚硝态氮含量逐渐增加, 最高达 185.36 mg/L, 铵态氮去除率达到 92.52%, 硝态氮含量始终保持在较低水平, 说明经过优化培养后, 该亚硝化细菌的脱氮性能较好。

2.6 培养方式对亚硝化细菌生长的影响

从图 7 可以看出, 在半连续培养中, 随着培养时间的增加, 在三角瓶和量筒中进行半连续培养的亚硝化细菌, 其脱氮性能总体呈增加趋势。在每次更换培养基之前, 亚硝态氮含量逐渐增加。第一次更换培养基前的亚硝态氮最高含量分别为 86.04 mg/L 和 80.11 mg/L, 最后一次更换培养基后, 亚硝态氮的含量最高, 分别达到 174.17 mg/L 和 156.33 mg/L, 分别增加了 50.60% 和 48.75%。同时采用三角瓶培养的亚硝化细菌脱氮性能优于量筒培养的。原因可能是: (1) 三角瓶底部空间较大, 有利于亚硝化细菌生长和营养物质的传递, 量筒底部狭小, 不利于亚硝化细菌大量繁殖, 也不利于营养物质顺利输送; (2) 由于亚硝化细菌对氧气需求较低, 三角瓶自下而上空间逐渐缩小, 阻碍了过多的氧气进入, 从而更有利于亚硝化细菌生长。

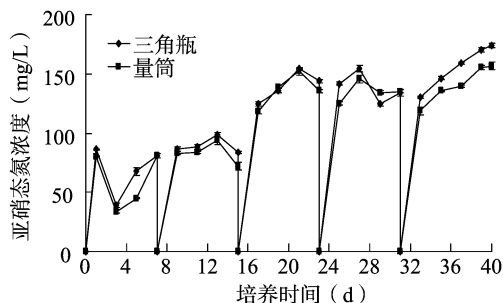


图7 半连续培养对亚硝化细菌活性的影响

从图 8 可知, 经过连续式培养, 亚硝化细菌的亚硝态氮含量总体呈增加的趋势, 最大值达到 202.56 mg/L, 40 d 时亚硝态氮含量为 178.08 mg/L, 略高于半连续培养的亚硝态氮含量 (174.17 mg/L), 但连续式培养较半连续式培养操作更方便, 同时能够较好地有利于亚硝化细菌菌群数量的增长和繁

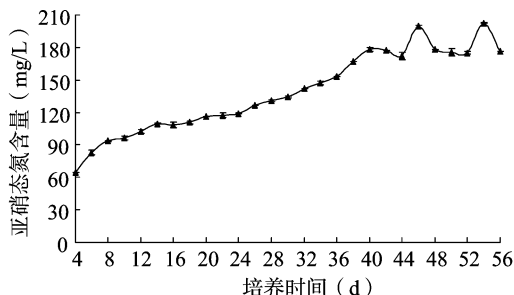


图8 连续式培养对亚硝化细菌活性的影响

殖, 可为今后亚硝化细菌实验室的扩大化培养提供参考。

3 结论

本试验优化后的亚硝化细菌液体培养条件为 0.2% NH_4HCO_3 、0.2% Na_2CO_3 , pH 值 8.0, 温度 30 ℃, 刺激因子 LaCl_3 最佳浓度为 0.004%。在最佳培养条件下, 亚硝化细菌富集亚硝态氮能力最高, 可达 185.36 mg/L, 脱氮率最高为 92.52%。连续式培养较半连续式培养能更有利于亚硝化细菌菌群数量的增长和繁殖, 且更方便。

参考文献:

- [1] Woses C R, Weisburg W G, Paster B J. The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1984, 5(3): 327-336.
- [2] De Boer W, Gunnewiek P J, Veenhuis M, et al. Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(12): 3600-3604.
- [3] Liu Z P, Liu S J. Advances in the molecular biology of nitrifying microorganisms[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2004, 10(4): 521-525.
- [4] Hu J L, Lin X G, Chu H Y. Isolation of soil ammonia-oxidizing bacteria[J]. Soils, 2005, 37(5): 569-571.
- [5] Yu J, Yang M, Qi R, et al. Community structures of ammonia-oxidizing bacteria in different municipal wastewater treatment systems[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2009, 29(3): 521-526.
- [6] Werner D, Newton W E. Nitrogen fixation in agriculture forestry[M]. Netherlands: Springer, 2005: 255-276.
- [8] 陈绍铭, 郑福寿. 水生生物学实验法[M]. 北京: 海洋出版社, 1985: 80-85.
- [9] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 258-280.
- [10] Hyungseok Y. Nitrogen remove from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an intermittently aerated reactor[J]. Wat Res, 1999, 33(1): 146.
- [11] 廖雪义, 马光庭, 蓝荣, 等. 亚硝化作用菌种的分离筛选及条件选择[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(5): 1259-1261.
- [12] 杨代金, 张穗, 王玉军, 等. 一株氨氮降解菌的筛选及其降解特性的初步研究[J]. 山东农业科学, 2009, 3(3): 87-90.