

一株嗜盐反硝化菌 *Halomonas alkaliphile* L8 的脱氮及其产四氢嘧啶研究

卢静¹, 武丽娜¹, 田凤蓉², 王开春², 杨杰³, 祖航天², 吕明生³, 王淑军³

(1. 山西大学 生命科学学院, 山西 太原 030006;

2. 中蓝连海设计研究院有限公司, 江苏 连云港 222004;

3. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏 连云港 225005)

摘要: 石油、医药、海水养殖等产业所产生的废水具有高盐高氮的特点。从连云港市赣榆区盐场沉积土壤中分离得到一株耐盐反硝化细菌 L8, 经鉴定该菌株为革兰氏阴性菌, 盐单胞菌属(*Halomonas alkaliphila*)。L8 菌株最适生长温度为 37 °C, pH=8.0, NaCl 质量浓度 0.06 g/mL, 具有嗜盐性。L8 菌在初始 250 mg/L 硝态氮质量浓度下反应 72 h, 对硝酸盐氮的去除率达 78% 以上。L8 菌株具有产四氢嘧啶能力, 产量达 0.54 mg/mL (培养 84 h)。L8 是一株耐盐反硝化菌株, 在高盐污水处理与工业化生产四氢嘧啶领域具有广阔的应用前景。

关键词: 耐盐; 反硝化; 四氢嘧啶; 高盐含氮水处理

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 0253-2395(2024)06-1326-11

Study on the Denitrification Performance and Tetrahydropyrimidine Production of *Halomonas Alkaliphile* L8

LU Jing¹, WU Li'na¹, TIAN Fengrong², WANG Kaichun², YANG Jie³, ZU Hangtian²,

LÜ Mingsheng³, WANG Shujun³

(1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Zhonglan Lianhai Design and Research Institute Co., Ltd., Lianyungang 222004, China;

3. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 225005, China)

Abstract: The wastewater produced by petroleum, pharmaceutical, mariculture and other industries has the characteristics of high salt and high nitrogen. A salt tolerant denitrifying bacterium L8 was isolated from the soil of Ganyu Salt Company in Lianyungang. The strain was identified as *Halomonas alkaliphila* and a gram-negative bacterium. The optimum growth temperature of L8 was 37 °C, pH = 8.0 and salinity at 0.06 g/mL. The results showed that the removal rate of nitrate nitrogen by L8 was above 78% when the initial mass concentration of nitrate nitrogen was 250 mg/L for 72 h. The L8 strain had the ability to produce tetrahydropyrimidine, and the yield was 0.54 mg/mL (84 hours of culture). The L8 is a salt tolerant denitrifying strain, which has broad application prospects in the field of high salt wastewater treatment and industrial production of tetrahydropyrimidine.

Key words: salt tolerance; denitrification; tetrahydropyrimidine; treatment of high salt and nitrogen water

收稿日期: 2023-12-12; 接受日期: 2024-06-14

基金项目: 国家自然科学基金 (32201964)

作者简介: 卢静 (1990-), 女, 山西忻州人, 博士, 副教授, 研究方向为生物技术。E-mail: jinglu@sxu.edu.cn

* 通信作者: 王淑军 (WANG Shujun), E-mail: sjwang@jou.edu.cn

引文格式: 卢静, 武丽娜, 田凤蓉, 等. 一株嗜盐反硝化菌 *Halomonas alkaliphile* L8 的脱氮及其产四氢嘧啶研究 [J]. 山西大学学报 (自然科学版), 2024, 47(6): 1326-1336. DOI: 10.13451/j.sxu.ns.2024109

0 引言

近年来,随着经济的高速发展,人民生活水平质量的日益提高,保护自然环境已成为共识,环境污染、资源浪费、生态破坏等受到高度关注。石化、纺织、化肥、造纸等行业会产生大量的含氮废水,高浓度的氮源污染物被释放到水体中会导致水体富营养化,影响水质和生态,继而给人类的生活和生产带来严重的影响^[1]。氮素作为污水中重要的污染因子,是相关行业发展制约因素之一,其中高浓度氨氮废水造成的污染是环境污染中难以解决的问题之一。如何经济、高效处理含氮废水是环境工程领域的重点研究内容。

传统处理污水的方法有吹脱法、生物膜法、离子交换法、电化学法等,这些方法处理废水成本高额且效率低,不适用于高浓度、成分复杂的污水^[2]。生物脱氮法是指多种微生物经过氨化、硝化、反硝化等的联合作用,将污水中的有机氮及氨氮转化为氮气的过程,具有成本低、操作简单,稳定高效,无二次污染等优势,已经成为污水脱氮技术的主导^[3-4]。反硝化细菌能将硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)还原为气态氮,是生物脱氮系统中的主要功能菌株^[5]。研究表明,由于环境条件的波动等原因,出水中的氨氮较易达标,但存在硝态氮进一步转化为气态氮效果较差的问题,导致出水中总氮的浓度不稳定^[5-8]。此外,一些特殊的工艺要求(如食品工业),产生的废水通常盐度较高,影响污水处理效果^[9]。因此,耐盐反硝化微生物的筛选对于高盐废水脱氮处理具有重要意义。

盐度对污水脱氮系统具有显著影响,在某些高盐环境下,这些菌株的生长与繁殖受到渗透压的影响,自身脱氮能力受到抑制,不能有效解决高盐水体污染的问题^[10]。张兰河等发现,高盐会严重影响厌氧/缺氧/好氧工艺污染物去除效率,当盐度达到 40 g/L 时,微生物多样性减少,脱氮效果变差^[11]。刘琳在低温条件下从污水处理站的活性污泥中筛选得到三株耐低温、异氧硝化的菌株,将其混合培养制成菌剂,最高可对氨氮的去除率达 96%,但 NaCl 质量浓度为 0.03 g/mL 时,脱氮率降至 50%^[12]。微生物在高盐环境中会合成渗透压补偿溶质

(如四氢嘧啶),提高其在高温、高盐、干燥、辐射等环境中的抗逆性^[13]。四氢嘧啶是一种环状氨基酸衍生物,在工业化生产领域有着广泛的应用,如在制剂方面,可做微生物保存的保护剂、酶的稳定剂等;在医药学领域,四氢嘧啶可用于制造抗氧化药物,具有美容、抗氧化、延缓皮肤衰老的功能,同时有治疗阿尔兹海默症的功效,在疾病治疗上具有开发潜力^[14]。通过细菌生产四氢嘧啶是一种高效可行的生产方法,姚倩倩等利用了中度嗜盐菌 W2 高渗合成、低渗释放的特性,在 NaCl 质量浓度为 0.1 g/mL 时,其四氢嘧啶产率达 161 mg/g^[15]。

目前国内缺乏具有耐盐性的反硝化细菌菌株,所以本研究从旨在连云港市赣榆区盐场中筛选分离鉴定出能够耐盐、具有脱氮能力的菌株,对解决高盐污水处理有着现实意义,且其产生的副产物四氢嘧啶也可用于工业化应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

连云港市赣榆盐场采集沉积的土壤用于筛选分离嗜盐脱氮菌株。

1.1.2 试验设备

电子天平(赛多利科学仪器有限公司);全自动高压灭菌锅(上海华线医用核子仪器);恒温摇床和离心机(Eppendorf公司);Agilent1200型高效液相色谱仪(Agilent公司);全波长酶标仪(Thermo公司);SWCJ2F超净双人工作台(苏州净化设备厂);PCR扩增仪(Bio-Rad公司);多参数水质分析仪(北京连华科技有限公司)。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基

酵母粉 5 g/L,蛋白胨 10 g/L,甘油 250 mg/L、氯化钠质量浓度 0.1 g/mL、葡萄糖 250 mg/L、甲醇 50 mg/L。

1.2.2 筛选培养基

苯酚 10 g/L、磷酸氢二钾 35 g/L、磷酸二氢钾 10 g/L、硫酸铵 25 g/L、氯化铵 25 g/L、尿素 25 g/L、 NaNO_3 25 g/L、 MgSO_4 10 g/L、 CaCl_2 10 g/L、NaCl 50 g/L。

1.2.3 Luria-Bertani(LB)培养基

酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 质量浓度 0.03 g/mL。

1.2.4 脱氮培养基

硝化培养基: 硫酸铵 0.24 g/L, 乙酸钠 0.2 g/L, 磷酸氢二钾 1.0 g/L, 硫酸镁 0.3 g/L, 硫酸铁 0.03 g/L, 氯化钠质量浓度 0.03 g/mL, pH=8.0。

反硝化培养基: 硝酸钾 0.4 g/L, 乙酸钠 1.28 g/L, 磷酸氢二钾 1.0 g/L, 硫酸镁 0.3 g/L, 硫酸铁 0.03 g/L, 氯化钠质量浓度 0.03 g/mL, pH=7.0。此培养基 C/N 为 1:20, 按此比例可配置不同初始氮浓度的反硝化培养基。

1.2.5 盐浓度筛选培养基

配制氯化钠质量浓度为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20 g/mL 的 LB 培养基作为盐浓度筛选培养基。

1.2.6 pH 筛选培养基

选择不同的缓冲液配置不同 pH 的 LB 培养基作为 pH 筛选培养基 (pH 5.0~11.0, MES 系统: 5.0、5.5、6.0; PTPES 系统: 6.5、7.0; HEPES 系统: 7.5、8.0; NaOH-甘氨酸系统: 9.0、10.0、11.0), 以上培养基缓冲溶液终浓度均为 10 mmol/L, NaCl 质量浓度为 0.03 g/mL, 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L。用 NaOH 调节 pH 为 9.0、10.0 和 11.0。

1.2.7 产四氢嘧啶培养基

葡萄糖 10.0 g/L, 酵母粉 3.0 g/L, 氯化钠质量浓度选择合适的量, 硫酸镁 2.0 g/L, 磷酸氢二钾 0.55 g/L, 硫酸亚铁 0.005 g/L, 柠檬酸钠 3.0 g/L, 氯化钙 0.2 g/L。

1.3 菌株的分离与鉴定

1.3.1 菌株的分离筛选

在富集培养基中加入 3 g 采集的土壤样品, 120 r/min、30 °C 培养 48 h, 培养液明显浑浊, 镜检菌群种类丰富, 将培养液进行稀释涂布于筛选培养基上, 经过分离纯化得到 L8 菌株。

1.3.2 菌株的鉴定

(1) 菌种活化

将分离的菌种划到筛选培养基平板上进行三区划线, 将平板放入 30 °C 恒温培养箱培养 1 d~2 d, 每 12 h 观察平板上菌落的生长情况, 将生长好的平板再转接至斜面, 放入冰箱 4 °C 保存。

(2) 菌株形态特征观察

光学显微镜观察: 利用革兰氏染色观察细菌基本形态及阴阳性。

电子显微镜观察: 结合文献[16]中不同处理方法对细菌的影响, 设计了具体的扫描电镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 操作方法, 操作方法如下:

① 取 1 mL 对数期菌液, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。

② 用蒸馏水清洗菌体 3 次, 再用磷酸缓冲液清洗 1 次, 15 000 r/min 离心 5 min, 最后一次清洗弃上清后晾干 30 min。

③ 将沉淀物加 1 mL 纯水制成悬浮液, 立即吸取 10 μL, 滴加至盖玻片上 (如稀释, 用纯水稀释至不同倍数, 总体系 10 μL), 抹匀, 静置蒸发, 干燥后在酒精灯火焰上快速过 3 次。

④ 加入体积分数 0.1% 戊二醛溶液固定 1 h。

⑤ 加入体积分数 0.5% 戊二醛溶液置换固定 2 h。

⑥ 加入体积分数 2.5% 戊二醛溶液 4 °C 固定 12 h。(上述所有戊二醛溶液用磷酸缓冲液稀释)

(3) 生理生化鉴定

采用细菌微量生化反应管进行检测, 将菌液接种到 22 种生理生化试剂反应管、四种培养基和氧化酶试纸中, 37 °C 培养 24 h 后观察并记录结果。

(4) 菌株的 16S rDNA 序列分析

用 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA, 使用 16S rRNA 通用引物 (27F 和 1492R) 进行 PCR 扩增, PCR 产物交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 测序结果用于系统进化树的构建。引物序列信息为: 27F: 5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTG TTACGACTT-3'。

1.4 菌株生长特性研究

1.4.1 种子液的制备

将斜面保存的 L8 菌株划线分离, 接种单菌落于 LB 培养基, 120 r/min、30 °C 培养 24 h, 获得种子液。

1.4.2 菌株生长曲线

以1%的转接量将种子液接入不同盐度的LB液体培养基,120 r/min、30 °C培养,每4 h检测菌液OD₆₀₀的数值。

1.4.3 pH对菌株生长影响

为探究pH对L8菌株生长的影响,选取不同缓冲体系(pH 5.0~11.0, MES系统:5.0、5.5、6.0;PTPES系统:6.5、7.0;HEPES系统:7.5、8.0;NaOH-甘氨酸系统:9.0、10.0、11.0),以1%的转接量将种子液接种于LB液体培养基中,120 r/min、30 °C培养20 h,检测菌液OD₆₀₀的数值。

1.4.4 温度对菌株生长影响

为探究温度对L8菌株生长的影响,选取20、25、30、35、37、40、45 °C这七个温度梯度。以1%的转接量将种子液接种于LB液体培养基中,120 r/min培养20 h,检测菌液OD₆₀₀的数值。

1.4.5 盐度对菌株生长影响

为探究NaCl质量浓度对L8菌株生长影响,选取0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20 g/mL共11个质量浓度梯度。以1%的转接量将种子液接种于不同盐浓度的LB培养液中,120 r/min、30 °C培养20 h,检测菌液OD₆₀₀的数值。

1.5 菌株脱氮能力的测定

1.5.1 菌株硝化能力的测定

先将L8菌株于适宜条件下培养20 h制成一级种子液,再以10%的接种量接种到LB培养基中培养20 h制成二级种子液,将二级种子液以20%的接种量接种硝化培养基,37 °C、120 r/min培养,氨氮含量用水杨酸-次氯盐光度法检测^[17]。

1.5.2 菌株反硝化能力的测定

按照1.5.1的方法制备L8菌株的二级种子液,将二级种子液以20%的接种量接种反硝化培养基中,37 °C、120 r/min培养,硝基氮含量用酚二磺酸光度法检测,亚硝基氮含量用(1-萘基)-乙二胺光度法检测^[18]。

1.5.3 碳氮比对菌株反硝化能力影响

按照1.5.1的方法制备L8菌株的二级种子液,将二级种子液以20%的接种量接种至碳氮比为10:1与20:1的反硝化培养基中,在37 °C、

120 r/min摇床中培养,探究碳氮比对L8菌株脱氮能力的影响。

1.5.4 初始氮浓度对菌株反硝化能力的影响

按照1.5.1的方法制备L8菌株的二级种子液,将二级种子液以20%的接种量接种至不同初始氮浓度的反硝化培养基中(50 mg/L~250 mg/L,梯度50 mg/L),在37 °C、120 r/min摇床中培养,探究初始氮浓度对L8菌株脱氮能力的影响。

1.6 菌株产渗透压补偿溶质(四氢嘧啶)的测定

1.6.1 诱导培养基诱导四氢嘧啶产生

将细菌接入其诱导培养基,在35 °C、120 r/min摇床中培养84 h。

1.6.2 产物提纯

用改良乙醇抽提法抽提胞内四氢嘧啶^[14],高盐诱导胞内产生四氢嘧啶后,离心收集菌体,将菌体洗涤2次(等渗NaCl溶液),10 000 r/min离心5 min;加入体积分数80%乙醇溶液(70 °C)5 mL,剧烈涡旋30 min,10 000 r/min离心15 min;重复抽提2次得到上清液;用0.45 μm水相滤膜过滤以除去菌体碎片,收集的滤液在40 °C下进行干燥;加入5 mL超纯水溶解结晶物,12 000 r/min离心10 min,收集上清。

1.6.3 产物检测

四氢嘧啶含量测定采用高效液相色谱法^[19],使用Agilent 1200型高效液相色谱仪和Agilent SB C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)、流动相比率为水:乙腈=10:90,流速为1.0 mL/min,柱温为30 °C、检测波长为204 nm、进样量为2 μL,保留时间为25 min。

1.7 数据分析

实验设3个重复($n=3$)。去除率计算公式:

$$\eta = 100 \times (A_1 - A_2) / A_1$$

式中 η 为NO₂⁻-N、NO₃⁻-N和NH₄⁺-N的去除率;A₁、A₂分别为对照组和实验组NH₄⁺-N、NO₂⁻-N和NO₃⁻-N的质量浓度(单位mg/L)。

用GraphPad Prism 8.0软件处理获得的数据,数据用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

2 结果与分析

2.1 菌株L8的形态特征及生理生化鉴定

将来自连云港市赣榆盐场采集沉积的土壤

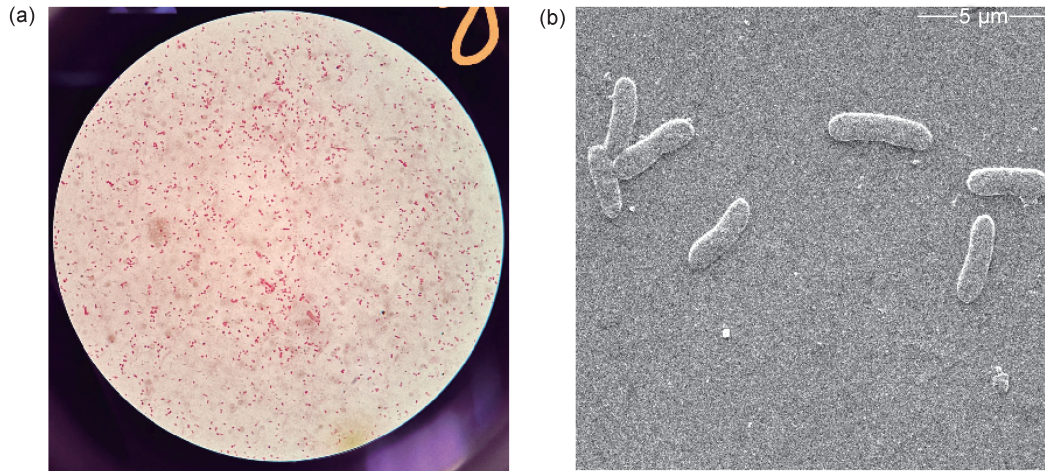


图1 菌株L8形态特征观察

(a) 光学显微镜下菌株个体形态(油镜,放大倍数为1 000×); (b) 扫描电镜下菌株个体形态。

Fig. 1 Observation of morphological characteristics of strain L8

(a) Individual morphology of L8 under optical microscope; (b) Individual morphology of L8 under scanning electron microscope.

表1 菌株L8的生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identification of strain L8

项目	结果	项目	结果	项目	结果
葡萄糖	+	氧化酶	+	硝酸盐(还原)	+
蔗糖	+	淀粉水解	-	亚硝酸盐(产气)	+
甘露糖	+	苯丙氨酸脱氨酶	-	明胶	+
麦芽糖	+	甘露醇	+	DNA	-
乳糖	-	七叶苷	+	尿素	-

“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应。

进行富集培养、稀释涂布之后,在筛选培养基上共分离得到15株形态不同的菌株,经鉴定均为盐单胞菌,采用亚硝酸盐氮快速测试纸进行了脱氮能力的初测,通过对比比色卡发现15株都有反硝化能力,且菌株L8反硝化能力最强,因而后续选择菌株L8进行后续研究。如图1(a)所示,菌株L8的革兰氏染色结果为红色,说明其为革兰氏阴性菌;其在扫描电镜下形态的如图1(b)所示,菌株L8呈棒状和杆状。菌株L8的生理生化分析结果如表1所示,其中蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、甘露醇、氧化酶、七叶苷、硝酸盐(还原)、亚硝酸盐(产气)以及明胶反应呈均阳性;而乳糖、淀粉水解、苯丙氨酸脱氨酶、尿素、DNA反应则呈现阴性。

2.2 菌株L8的16S rDNA基因序列分析

如图2(a)所示,菌株L8的16S rDNA PCR扩增产物大小约为1 400 bp,将测序的结果通过 <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/> 与已知模

式菌进行同源比对并绘制系统发育树[图2(b)],结果表明菌株L8与已知种 *Halomonas alkaliphila* 相似性为99.70%。菌株L8属于盐单胞菌属,该菌可在盐湖、海底等高盐环境中存活^[20],可用于高盐污水的处理和降解环境中的苯酚^[21]。此外,*Halomonas alkaliphila*能够在天然环境中合成多种化合物,如金属钡纳米颗粒^[22]、低聚半乳糖^[23],也常用作于产四氢嘧啶^[24]、胞外多糖^[25]、果聚糖^[26]的发酵菌株。

2.3 菌株L8的生长特性研究

2.3.1 菌株在不同盐度下的生长曲线的测定

菌株L8接种于不同盐度的LB液体培养基中,检测其生长情况,结果图3所示。在NaCl质量浓度为0.03 g/mL~0.10 g/mL时生长几乎不受影响,当OD₆₀₀值达到1.35时生长曲线趋于平稳;在0.15 g/mL的NaCl质量浓度条件下菌株仍可生长,但生长速度和生物量略有降低,OD₆₀₀值最高达到1.25左右。表明该菌耐盐性能较好,在高盐条件下依旧能够正常生长繁殖,与孙文妮等^[27]研究的嗜盐反硝化菌YL5-2特性很相近,YL5-2在NaCl质量浓度0.10 g/mL~0.20 g/mL条件下生长较好且脱氮率达95%以上,说明可利用该菌株的耐盐特性处理高盐污水,在未来污水高效处理有着广泛的前景。

2.3.2 pH对L8菌株生长的影响

由图4可知,在这四个缓冲体系中,L8菌在

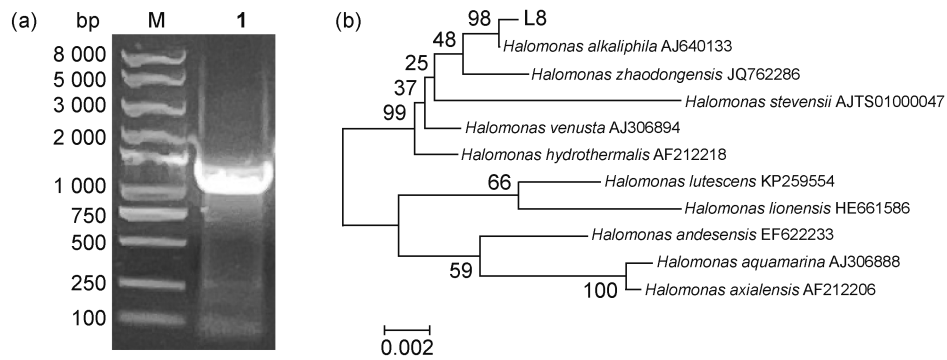


图2 菌株L8分子生物学鉴定

(a) 16S rDNA PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图, M为DNA标记, 1为菌株L8的16S rDNA PCR的扩增产物; (b) 基于16S rDNA基因序列的系统发育树。

Fig. 2 Molecular biological identification of strain L8

(a) Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA PCR product, M is the DNA marker, 1 is the 16S rDNA PCR amplification product of strain L8; (b) Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence.

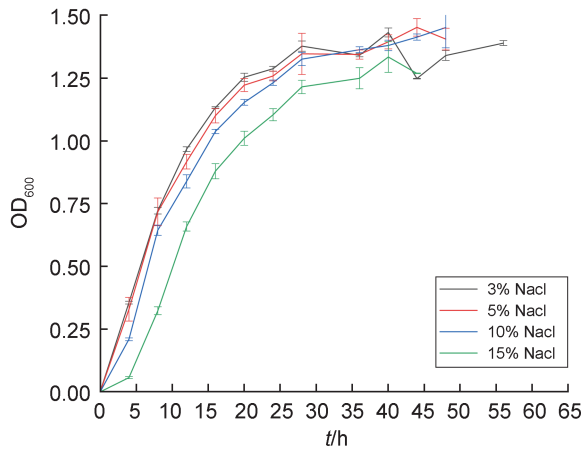


图3 菌株L8在不同盐度下的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of *Halomonas alkaliphila* L8 under different salinities

pH 6~10 的区间范围内生长良好, 其中 OD_{600} 在 pH=8 处达到最大, 说明该菌生长的最适 pH 为 8; 该生长曲线在 pH 5~18 呈上升趋势, 在 pH 8~11 呈下降趋势, 表明 L8 菌适宜在弱酸、中性、弱碱的条件下培养, 这与黄廷林等和 Zhang 等^[28-29] 的好氧反硝化细菌在中性及在弱碱环境中生长较好的观点相一致; 在 pH 10~11 处下降幅度明显, 表明 L8 菌强碱条件下生长受到抑制, 没有耐碱的特性。综上, 菌株 L8 在 pH 5~10 条件下都生长良好, 其最适 pH 为 8。

2.3.3 温度对L8菌株生长的影响

由图 5 可知, 曲线在温度 20 °C~37 °C 的范围内呈上升趋势, 37 °C~45 °C 的范围内呈下降趋势, 在 37 °C 处 OD_{600} 的值达到最大, 表明菌株

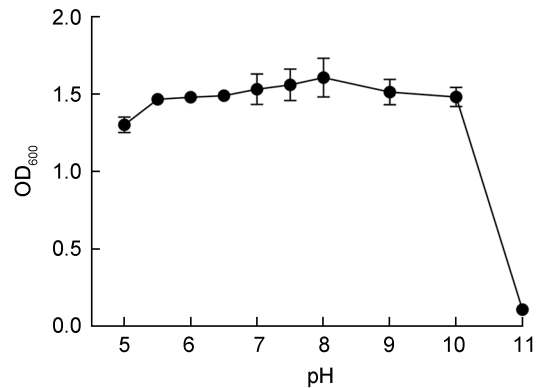


图4 pH对菌株L8生长的影响

Fig. 4 Effect of pH on the growth of strain L8

L8 的最适生长温度为 37 °C; 在温度 20 °C 和 45 °C 的条件下菌株的 OD_{600} 较低, 较低的温度或较高的温度都会抑制酶的活性, 从而影响菌株正常的生长代谢。

2.3.4 盐度对L8菌株生长的影响

由图 6 可知, 在 NaCl 质量浓度 0~0.06 g/mL 范围内, 菌株 L8 的 OD_{600} 随着盐度的升高而升高, 且在 0.06 g/mL 处达到最大值, 因此最适 NaCl 质量浓度为 0.06 g/mL 左右。在 NaCl 质量浓度 0.06~0.20 g/mL, L8 菌的生长速度随着 NaCl 质量浓度的升高呈现逐渐下降的趋势, 推测原因是较高的渗透压会影响细胞膜的通透性, 进而影响其正常的生长代谢, 在高渗的环境下使得细胞容易脱水死亡, 但其 OD_{600} 在 0.12 g/mL 的 NaCl 质量浓度下仍能够保持较高的数值, 表明其有耐盐特性, 可在较高的 NaCl 质量浓度下生长。

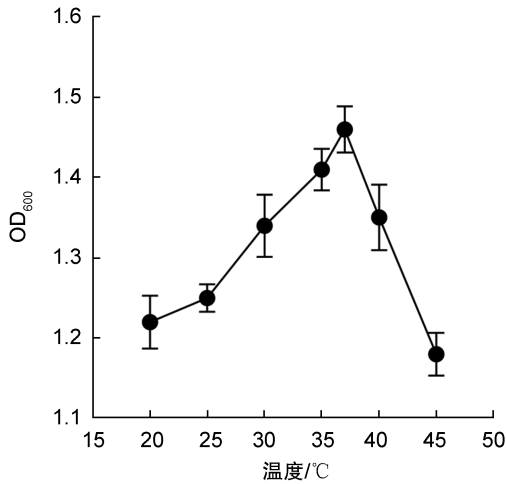


图5 温度对菌株L8的影响

Fig. 5 Effect of temperature on strain L8

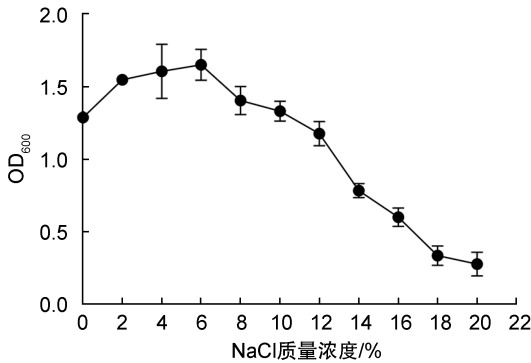


图6 NaCl质量浓度对菌株L8生长的影响

Fig. 6 Effect of salinity on the growth of strain L8

2.4 菌株L8的脱氮能力测定

2.4.1 菌株脱氮能力测定

在初始氨氮质量浓度为 50 mg/L 的情况下, 48 h 和 72 h 之后反应液中的氨氮的含量基

本没有变化(分别为 60.62 和 59.28 mg/L), 说明 L8 菌株没有硝化能力。而 L8 菌株具有较强的反硝化能力, 在初始硝氮质量浓度为 50 mg/L 的情况下, 如表 2 所示, 其对硝酸盐态氮的去除率随着时间增加在 60 h 处脱氮率达 75.64%, 说明 L8 菌株能够利用反硝化培养基中的硝态氮作为氮源, 将硝态氮转化为亚硝态氮; 48 h~60 h 亚硝态氮基本维持不变, 推测 L8 菌株无法将亚硝酸盐彻底还原成为氮气。

2.4.2 初始碳氮比对菌株反硝化能力的影响

当碳氮比 10:1 时, 24 h 时硝酸盐氮质量浓度由初始 20.13 mg/L 降至 17.17 mg/L, 降解率 14.7%, 亚硝酸盐氮为 1.45 mg/L; 48 h 时硝酸盐氮含量降至 14.06 mg/L, 降解率 30.15%, 亚硝酸盐氮为 1.74 mg/L。当碳氮比 20:1 时, 48 h 时硝酸盐氮由初始 50.39 mg/L 降至 12.43 mg/L, 硝酸盐降解率 75%, 随着时间的增长, 在 48 h~72 h 中硝酸盐降解率基本保持不变, 分析原因是菌液达到饱和状态, 生存空间减小, 其自身活性受到抑制。当碳氮比较高时(20:1), 体系中会存在较高浓度的亚硝酸盐, 且随着时间变化亚硝酸盐含量稳定维持在 33.0 mg/L 左右; 降低碳氮比之后, L8 菌株的最终反应液中的硝酸盐氮大部分去除。

通过与碳氮比 10:1 反硝化的试验进行对比, 碳氮 20:1 的效果明显要好(表 3), 这与朱云等^[30]的好氧反硝化细菌最适碳氮比的研究相似, 其碳氮比为 5:1 时, 硝酸盐氮的去除率

表2 菌株L8反硝化能力的测定

Table 2 Denitrification capacity of strain L8

项目	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
$c(\text{NO}_3\text{-N})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	50.00 ± 0.25	40.36 ± 0.32	27.25 ± 0.42	20.46 ± 0.18	12.43 ± 0.22	12.24 ± 0.08
$c(\text{NO}_2\text{-N})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	0	17.60 ± 0.85	26.1 ± 1.24	32.3 ± 1.58	37.8 ± 0.48	35.1 ± 0.70
$\text{NO}_3\text{-N}$ 去除率/%	0	19.68 ± 0.32	45.77 ± 0.42	58.79 ± 0.18	75.26 ± 0.22	75.64 ± 0.08
$\text{NO}_2\text{-N}$ 富集/%	0	35.02 ± 0.85	51.94 ± 1.24	64.29 ± 1.58	75.22 ± 0.48	69.80 ± 0.70

注:“ $\text{NO}_3\text{-N}$ ”表示硝态氮,“ $\text{NO}_2\text{-N}$ ”表示亚硝态氮。实验设3个重复($n=3$),实验数据用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

表3 碳氮比 10:1 和 20:1 时菌株L8的反硝化测定结果

Table 3 Denitrification test results of strain at carbon nitrogen ratios of 10:1 and 20:1

碳氮比	硝酸盐氮质量浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$				亚硝酸盐氮质量浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
10:1	20.13 ± 0.19	17.17 ± 0.43	14.06 ± 0.41	/	0	/	1.74 ± 0.33	/
20:1	50.39 ± 0.38	/	12.43 ± 0.21	12.86 ± 0.17	0	/	32.8 ± 0.52	32.9 ± 0.27

注:“/”表示未检测。实验设3个重复($n=3$),实验数据用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

表4 初始硝态氮质量浓度对菌株L8反硝化能力的影响

Table 4 Effect of initial nitrate mass concentration on denitrification capacity of L8

时间	物质浓度(mg·L ⁻¹)	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L	250 mg/L
12 h	c(NO ₃ -N)	40.36±0.22	86.42±0.58	138.24±1.03	176.36±0.57	234.26±1.89
	c(NO ₂ -N)	17.60±0.56	29.40±0.36	30.60±0.88	34.20±0.80	27.60±1.56
24 h	c(NO ₃ -N)	27.25±0.79	70.62±0.45	138.24±0.93	176.36±0.46	206.32±1.08
	c(NO ₂ -N)	26.10±0.53	32.10±0.78	35.10±1.64	38.40±0.96	28.00±0.72
36 h	c(NO ₃ -N)	20.46±1.78	56.83±1.26	92.28±1.88	118.44±1.28	178.44±3.24
	c(NO ₂ -N)	32.30±2.24	41.70±0.89	45.90±2.64	49.50±1.87	41.10±0.65
48 h	c(NO ₃ -N)	12.43±1.36	47.42±1.85	70.22±2.98	93.78±1.96	132.56±2.28
	c(NO ₂ -N)	37.80±1.56	40.50±2.58	42.60±3.80	45.30±1.05	37.80±0.69
60 h	c(NO ₃ -N)	12.24±1.74	32.65±3.24	56.70±2.41	78.54±2.44	78.40±1.46
	c(NO ₂ -N)	35.10±1.45	44.10±1.62	47.40±1.70	51.60±2.16	37.20±0.60
72 h	c(NO ₃ -N)	11.89±2.16	22.46±2.38	33.87±2.15	43.52±1.50	53.75±2.53
	c(NO ₂ -N)	39.30±2.33	46.50±2.77	49.20±3.20	59.40±1.63	41.40±1.20
72 h NO ₃ ⁻ N 去除率/%		76.72±1.02	77.49±1.39	78.29±1.75	78.42±1.20	78.86±1.72

注:“NO₃⁻N”表示硝态氮,“NO₂⁻N”表示亚硝态氮。实验设3个重复(n=3),实验数据用平均值±标准误(Mean±SE)表示。

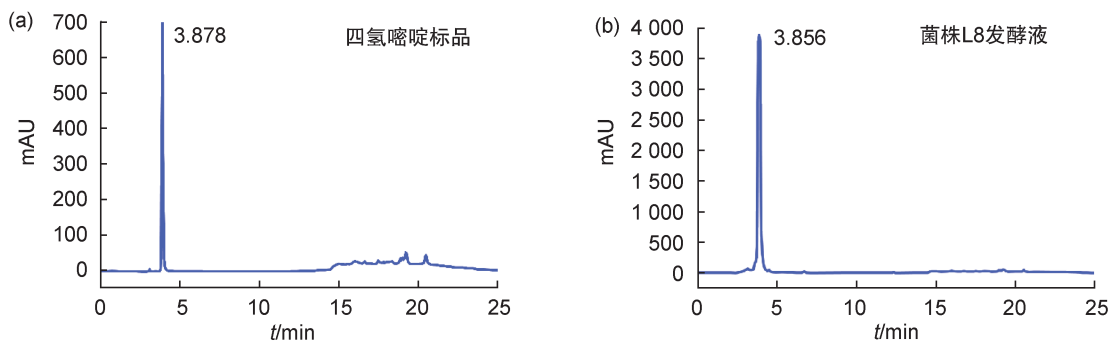


图7 菌株L8产四氢嘧啶液相图谱

Fig. 7 HPLC results of ectoine production by strain L8

最低,碳氮比为15:1时去除率达到最大,在15:1~20:1区间基本保持不变,这两者表明培养基的碳氮比对细菌的脱氮能力有着较大的影响。

2.4.3 初始硝态氮浓度对菌株反硝化能力的影响

选取50、100、150、200、250 mg/L的初始硝态氮质量浓度,使其在37℃、120 r/min的摇床下反应72 h,每12 h取一次样,探究初始硝态氮质量浓度对菌株反硝化能力的影响,结果如表4所示。由表3可知,在50 mg/L的初始硝态氮质量浓度下反应72 h,L8菌株对硝态氮的去除率达76.72%,随着初始硝态氮浓度的逐渐升高,L8菌株的脱氮率也随之升高,在250 mg/L处其脱氮率达到78.86%,说明较高的硝态氮浓度能够提高菌株的活性。

2.5 菌株L8产四氢嘧啶能力的研究

微生物在高盐环境下会产生四氢嘧啶来平

衡渗透压,因为本菌株耐盐范围测定表明菌株可在0.15 g/mL NaCl下生长,所以选取0.15 g/mL NaCl溶液条件来诱导胞内产生四氢嘧啶。采用高效液相色谱法检测四氢嘧啶标准样品以及L8菌株的胞内四氢嘧啶产量,结果如图7所示。四氢嘧啶标准样品在3.878 min时出现吸收峰(图7(a)),标准曲线 $y = 864.9x + 27867$ ($R^2 = 0.9936$);L8菌株发酵液在3.856 min时出现吸收峰(图7(b)),根据标准曲线求得四氢嘧啶产量为0.545 mg/mL,具有良好的产四氢嘧啶能力。洪煜等^[14]从吉兰泰盐湖土壤中筛选得到2株性能较好的嗜盐产四氢嘧啶菌株,NaCl质量浓度的高低影响着菌株产四氢嘧啶的能力,JG5菌株在0.10 g/mL NaCl下产四氢嘧啶可达0.08 mg/mL,另外一株JG9在NaCl质量浓度为0.05 g/mL时产四氢嘧啶达0.10 mg/mL,对比看出L8是一株具有高产四氢

嘧啶的优势菌株。四氢嘧啶是一类渗透压补偿溶质,对受外界刺激的蛋白质、核酸、酶、生物膜具有保护作用,可作为一种良好的生物保护剂^[10]。因此,将这种既能处理高盐废水,又能产四氢嘧啶的优良菌株用于工业化生产,具有潜在的经济价值。

3 结论

(1) L8 菌株是从连云港市赣榆区盐场沉积土壤中分离提取得出一株耐盐反硝化细菌。经生理生化鉴定、16S rDNA 鉴定其为盐单胞菌属 *Halomonas alkaliphila*, 该菌株为革兰氏阴性菌,具有降解淀粉的能力。

(2) L8 菌株的最适生长条件为:温度 37 °C、pH 为 8.0、NaCl 质量浓度为 0.06 g/mL,具有嗜盐性,在 0.15 g/mL NaCl 的高盐环境中生长良好。

(3) L8 菌株的反硝化能力较强。在碳氮比 20:1 条件下对硝酸盐降解率达到 75.33%;在初始硝态氮质量浓度为 250 mg/L 的条件下,对硝酸盐的降解率达 78.86%,是一株具有脱氮能力的优势菌株,可用于处理高盐含氮废水。

(4) L8 菌株产四氢嘧啶能力较强,在 NaCl 质量浓度 0.15 g/mL 条件下产四氢嘧啶 0.545 2 g/mL,将其应用于化妆品方面有着保湿、抗辐射的作用,可以有效减轻皮肤老化,美白效果明显。

参考文献:

- [1] ZHANG W, CHU H Q, YANG L B, *et al.* Technologies for Pollutant Removal and Resource Recovery from Blackwater: a Review[J]. *Front Environ Sci Eng*, 2023, **17**(7): 83. DOI: 10.1007/s11783-023-1683-3.
- [2] 李天育, 陈钰琦, 张静, 等. 含氮废水的处理方法研究[J]. *广东化工*, 2020, **47**(24): 82-83. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1865.2020.24.037.
LI T Y, CHEN Y Q, ZHANG J, *et al.* Research on the Treatment of Ammonia-nitrogen Wastewater[J]. *Guangdong Chem Ind*, 2020, **47**(24): 82-83. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1865.2020.24.037.
- [3] FANG K, GONG H, HE W Y, *et al.* Recovering Ammonia from Municipal Wastewater by Flow-electrode Capacitive Deionization[J]. *Chem Eng J*, 2018, **348**: 301-309. DOI: 10.1016/j.cej.2018.04.128.
- [4] 王琳, 牟春霞, 王丽. 高氨氮含量废水的处理方法及研究现状[J]. *水处理技术*, 2021, **47**(5): 1-5. DOI: 10.16796/j.cnki.1000-3770.2021.05.001.
WANG L, MU C X, WANG L. Treatment Methods and Research Status of High Ammonia-nitrogen Content Wastewater[J]. *Technol Water Treat*, 2021, **47**(5): 1-5. DOI: 10.16796/j.cnki.1000-3770.2021.05.001.
- [5] KONG D D, LI W B, DENG Y L, *et al.* Denitrification-potential Evaluation and Nitrate-removal-pathway Analysis of Aerobic Denitrifier Strain *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* RAD-2[J]. *Water*, 2018, **10**(10): 1298. DOI: 10.3390/w10101298.
- [6] 谭盼. A²O+MBR 在西安市某污水厂工程设计中的应用[J]. *山西建筑*, 2018, **44**(23): 126-128. DOI: 10.13719/j.cnki.cn14-1279/tu.2018.23.066.
TAN P. Application of A²O Combined MBR in Engineering Design of Wastewater Treatment Plant in Xi'an[J]. *Shanxi Archit*, 2018, **44**(23): 126-128. DOI: 10.13719/j.cnki.cn14-1279/tu.2018.23.066.
- [7] 张海明, 尚林峰, 侯明韬. 广东某新建 A²O-MRB 市政污水调实例[J]. *广东化工*, 2018, **45**(18): 150-151. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1865.2018.18.071.
ZHANG H M, SHANG L F, HOU M T. Engineering Application of a A²O-MBR Case for Municipal Sewage Treatment in Guangzhou[J]. *Guangdong Chem Ind*, 2018, **45**(18): 150-151. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1865.2018.18.071.
- [8] 刘立国, 王艳, 朱保成, 等. A/O+MBR 工艺处理高氨氮煤化工污水工程实例[J]. *工业水处理*, 2017, **37**(3): 101-103.
LIU L G, WANG Y, ZHU B C, *et al.* Engineering Example of A/O+MBR Process for the Treatment of High Ammonia-nitrogen Coal Chemical Wastewater[J]. *Ind Water Treat*, 2017, **37**(3): 101-103.
- [9] 姚娜, 张磊, 田凤蓉, 等. 耐盐反硝化细菌的筛选鉴定及生长促进剂对其反硝化性能的影响研究[J]. *化学与生物工程*, 2024, **41**(2): 48-53.
YAO N, ZHANG L, TIAN F R, *et al.* Screening and Identification of Salt-resistant Denitrifying Bacterium and Effect of Growth Promoters on Its Denitrification Performance[J]. *Chem Bioeng*, 2024, **41**(2): 48-53.
- [10] 王冠凤, 石艳丽, 钱晓路, 等. 四氢嘧啶高产菌株的筛选及发酵条件的优化[J]. *食品与药品*, 2019, **21**(1): 49-56. DOI: 10.3969/j.issn.1672-979X.2019.01.012.
WANG G F, SHI Y L, QIAN X L, *et al.* Screening of Ectoine High-productive Strain and Optimization of Fermentation Condition[J]. *Food Drug*, 2019, **21**(1): 49-56. DOI: 10.3969/j.issn.1672-979X.2019.01.012.

- [11] 张兰河, 田蕊, 陈子成, 等. NaCl 盐度对 A²O 工艺去除废水污染物和系统微生物的影响[J]. 农业工程学报, 2018, **34**(10): 231-237. DOI: 10.11975/j.issn.1002-6819.2018.10.029.
ZHANG L H, TIAN R, CHEN Z C, *et al.* Effects of NaCl Salinity on Wastewater Pollutants Removal and Microorganism in A²O Technology Process[J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2018, **34**(10): 231-237. DOI: 10.11975/j.issn.1002-6819.2018.10.029.
- [12] 刘琳. 低温异养硝化细菌的筛选及其固定化研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2020. DOI: 10.26939/d.cnki.gbhgu.2020.001389. LIU L. Screening and Immobilization of Heterotrophic Nitrifying Bacteria at Low Temperature[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2020.
- [13] 张田田, 李永臻, 沈国平, 等. 高盐盐湖可分离嗜盐耐盐菌的种群多样性及四氢嘧啶产量评价[J]. 生物技术通报, 2022, **38**(1): 168-178. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0201.
ZHANG T T, LI Y Z, SHEN G P, *et al.* Population Diversity of Isolated Halophilic and Halotolerant Bacteria from Hypersaline Salt Lakes and Evaluation of Ectoine Production[J]. *Biotechnol Bull*, 2022, **38**(1): 168-178. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0201.
- [14] 洪煜, 高波, 严冬, 等. 吉兰泰盐湖土壤嗜盐菌的分离及其产四氢嘧啶的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, **47**(6): 115-123. DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.06.015.
HONG Y, GAO B, YAN D, *et al.* Isolation and Ectoine-producing Characteristics of Halophiles from Soil of Jilantai Saline Lake[J]. *J Northwest A F Univ Nat Sci Ed*, 2019, **47**(6): 115-123. DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.06.015.
- [15] 姚倩倩, 顾向阳. 中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. W2 的分离和鉴定及其高产四氢嘧啶特性研究[J]. 南京农业大学学报, 2017, **40**(1): 109-115. DOI: 10.7685/jnau.201604003.
YAO Q Q, GU X Y. Isolation, Identification and the High Ectoine-producing Characteristics of a Moderately Halophilic Bacterium *Halomonas* Sp. W2[J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2017, **40**(1): 109-115. DOI: 10.7685/jnau.201604003.
- [16] 孙镇平, 李佳, 刘洪红, 等. 不同处理技术对环境扫描电镜下细菌原始形态的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2013, **1**: 41-43. DOI: 10.16872/j.cnki.1671-4652.2013.01.010.
SUN Z P, LI J, LIU H H, *et al.* The Impact of Different Processing Techniques on the Original Form of Environmental Scanning Electron Microscope Bacteria[J]. *Journal Of Yangzhou University (Agricultural And Life Science Edition)*, 2013, **1**: 41-43. DOI: 10.16872/j.cnki.1671-4652.2013.01.010.
- [17] 郑鸿煜. 纯碱工业废水中氨氮测定方法的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
ZHENG H Y. Study on Determination Method of Ammonia Nitrogen in Soda Ash Industrial Wastewater[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2020.
- [18] WANG Q H, YU L J, LIU Y, *et al.* Methods for the Detection and Determination of Nitrite and Nitrate: a Review[J]. *Talanta*, 2017, **165**: 709-720. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.12.044.
- [19] 翁南海, 张磊, 卢静, 等. 一株耐盐反硝化细菌的筛选鉴定及其在高盐废水脱氮中的应用[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版), 2023, **32**(3): 31-37.
WENG N H, ZHANG L, LU J, *et al.* Screening and Identification of a Salt-tolerant Denitrifying Bacterium and Its Application in the Treatment of High-salinity Nitrogen-containing Wastewater[J]. *J Jiangsu Ocean Univ Nat Sci Ed*, 2023, **32**(3): 31-37.
- [20] 陈江楠, 陈潇宁, 刘心怡, 等. 基于工程化盐单胞菌的下一代工业生物技术[J]. 合成生物学, 2020, **1**(5): 516-527.
CHEN J N, CHEN X N, LIU X Y, *et al.* Engineering *Halomonas* SPP. for Next Generation Industrial Biotechnology(NGIB)[J]. *Synth Biol J*, 2020, **1**(5): 516-527.
- [21] 母显杰, 丁舒心, 赵娜娜, 等. 盐单胞菌 H17 降解苯酚的响应面法优化及动力学[J]. 环境污染与防治, 2020, **42**(4): 449-453. DOI: 10.15985/j.cnki.1001-3865.2020.04.011.
MU X J, DING S X, ZHAO N N, *et al.* Optimization of Response Surface Methodology and Kinetics of Phenol Degradation by *Halomonas* Sp. H17[J]. *Environ Pollut Contr*, 2020, **42**(4): 449-453. DOI: 10.15985/j.cnki.1001-3865.2020.04.011.
- [22] 汪文静, 丁诗婷, 张玲, 等. 盐单胞菌合成纳米钯催化污染物的还原[J]. 安徽农业大学学报, 2020, **47**(4): 559-564. DOI: 10.13610/j.cnki.1672-352x.20200907.019.
WANG W J, DING S T, ZHANG L, *et al.* Biosynthesis of Nano-palladium by *Halomonas salina* JX-1 for Catalytic Reduction of Pollutants[J]. *J Anhui Agric Univ*, 2020, **47**(4): 559-564. DOI: 10.13610/j.cnki.1672-352x.20200907.019.
- [23] 朱五二, 缪明永, 顾正华, 等. 盐单胞菌 S62 β -半乳糖苷酶合成低聚半乳糖的研究[J]. 生物加工过程, 2019, **17**(2): 131-137. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3678.2019.02.003.
ZHU W E, MIAO M Y, GU Z H, *et al.* Synthesis of Galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Halomonas* Sp. S62[J]. *Chin J Bioprocess Eng*, 2019, **17**(2):

- 131-137. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3678.2019.02.003.
- [24] ZHAO Q, LI S N, LV P W, *et al.* High Ectoine Production by an Engineered *Halomonas hydrothermalis* Y2 in a Reduced Salinity Medium[J]. *Microb Cell Fact*, 2019, **18**(1): 184. DOI: 10.1186/s12934-019-1230-x.
- [25] JOULAK I, FINORE I, NICOLAUS B, *et al.* Evaluation of the Production of Exopolysaccharides by Newly Isolated *Halomonas* Strains from Tunisian Hypersaline Environments[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **138**: 658-666. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.128.
- [26] TOHME S, HACIOSMANOĞLU G G, EROĞLU M S, *et al.* Halomonas Smyrnensis as a Cell Factory for Co-production of PHB and Levan[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, **118**(Pt A): 1238-1246. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.197.
- [27] 孙文妮, 田凤蓉, 王开春, 等. 一株嗜盐反硝化弧菌的耐盐能力和降解能力研究[J]. *工业用水与废水*, 2020, **51**(3): 24-29. DOI: 10.3969/j.issn.1009-2455.2020.03.006.
- SUN W N, TIAN F R, WANG K C, *et al.* Salt Tolerance and Degradation Ability of a Halophilic Denitrifying Vibrio Strain[J]. *Ind Water Wastewater*, 2020, **51**(3): 24-29. DOI: 10.3969/j.issn.1009-2455.2020.03.006.
- [28] 黄廷林, 苏俊峰, 李倩. 好氧反硝化菌株的筛选培养及其反硝化性能研究[J]. *西安建筑科技大学学报(自然科学版)*, 2009, **41**(5): 704-707. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7930.2009.05.020.
- HUANG T L, SU J F, LI Q. Isolation, Identification and Denitrifying Characteristics of Aerobic Denitrifying Bacteria[J]. *J Xi'an Univ Archit Technol Nat Sci Ed*, 2009, **41**(5): 704-707. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7930.2009.05.020.
- [29] ZHANG M, HUANG S B. Identification and Denitrification Characteristics of a Thermophilic Aerobic Denitrifier[J]. *Huan Jing Ke Xue*, 2011, **32**(1): 259-265.
- [30] 朱云, 龚望宝, 谢骏, 等. 好氧反硝化细菌的鉴定及其脱氮特性研究[J]. *水生生物学报*, 2020, **44**(4): 895-903. DOI: 10.7541/2020.106.
- ZHU Y, GONG W B, XIE J, *et al.* Identification and Denitrification Characteristics of the Aerobic Denitrifying Bacteria *Pseudomonas Furukawaii* Zs1[J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2020, **44**(4): 895-903. DOI: 10.7541/2020.106.