好氧反硝化芽孢杆菌 JD-014 的分离鉴定及脱氮性能

杨 婷[1,2]，辛 瑜[1,2]，时 祎[1,2]，张 梁[*1,2]，石孔泉[3]，张丽娜[3]
(1. 江南大学 粮食发酵工艺技术国家工程实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；3. 江苏大有生物科技发展有限公司，江苏 无锡 214122)

摘要：为了更好地实现以绿色环保的方式处理食品工业废水中的氮素污染物，从某河道水体中分离筛选出了 1 株具有好氧反硝化功能的芽孢杆菌 JD-014。通过对该菌株在脱氮过程中气态氮(N_2)的产生、氮平衡估算以及酶活测定证实了菌株 JD-014 的好氧反硝化途径，并对影响其脱氮性能的环境因素进行了研究。结果表明：以 50 mg/L NO_3^--N 为唯一氮源时，菌株 JD-014 对 NO_3^--N 的去除速率为 0.56 mg/(L·h)。在脱氮过程中，该菌株可将 NO_3^--N 部分转化为 N_2 并伴随有相关功能酶活的检出；当碳源为丁二酸钠和柠檬酸钠、碳氮比(C/N)为 10~25、温度为 37 ℃、转速为 150~200 r/min、盐度为 1%以下时，该菌株脱氮性能最佳。此外，菌株 JD-014 还具有较好的亚硝酸盐耐受性，在 NO_2^--N 质量浓度为 10~200 mg/L 时，脱氮率可保持在 46.62%~99.92%。本研究表明，好氧反硝化芽孢杆菌 JD-014 在实际食品加工废水的氮素污染生物处理方面具有很大的应用潜力。

关键词：好氧反硝化；食品废水；芽孢杆菌；脱氮；环境因素
中图分类号：Q 939.9　**文章编号**：1673-1689(2022)01-0068-09　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.01.009

Isolation, Identification and Nitrogen Removal Characteristics of Aerobic Denitrifying *Bacillus* Strain JD-014

YANG Ting[1,2]，*XIN Yu*[1,2]，*SHI Yi*[1,2]，*ZHANG Liang*[*1,2]，*SHI Kongquan*[3]，*ZHANG Lina*[3]
(1. National Engineering Laboratory for Cereal fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Dayou Biotechnology Co., Ltd., Wuxi 214122, China)

Abstract: A strain of *Bacillus subtilis* JD-014 with aerobic denitrification function was isolated and screened out from a river course in this study to treat and remove the nitrogen pollutants in food industrial wastewater in a green and environmentally friendly way. The aerobic denitrification pathway within this strain was verified by the gaseous nitrogen production, the nitrogen balance calculation and the functional enzymatic activity measurement during the nitrogen removal process. The effect of different environmental factors on its nitrogen removal performance was investigated as

收稿日期：2021-03-30
基金项目：国家重点研发计划项目(2018YFA0900300)；江苏省科技计划项目(BE2018055)。
作者简介：杨 婷(1991—)，女，博士研究生，主要从事环境微生物研究。E-mail：lalating2009@163.com
* **通信作者**：张 梁(1978—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事活性物质生物制造、环境生物修复、发酵工程等研究。E-mail：zhangl@jiangnan.edu.cn

well. The results showed that the nitrogen removal rate of JD-014 was 0.56 mg/（L·h）when sodium nitrate （50 mg/L) was used as the sole nitrogen source. The strain was found to partly transfer the NO_3^--N into N_2 accompanied by the detection of related functional enzyme activity. The optimal conditions for JD-014 to achieve the best nitrogen removal performance were carbon source of sodium succinate or sodium citrate, C/N ratio of 10 to 25, temperature of 37 ℃, shaking speed of 150 to 200 r/min, and salinity of less than 1%. Moreover, JD-014 had great nitrite tolerance, and the nitrogen removal efficacy could be kept within 46.62%~99.92% when the concentration of NO_2^--N was 10~200 mg/L. These results suggested that the aerobic denitrifying *B. subtilis* JD-014 had great potential in the biological treatment of nitrogen pollution in food processing wastewater.

Keywords: aerobic denitrification, food wastewater, *Bacillus strain*, nitrogen removal, environmental factors

近年来，随着食品行业的迅猛发展，食品加工废水的生成量日益增多，尤其是对于腌制类制品和肉制品等的加工过程，更是产生了大量含高浓度氮的有机废水[1-2]。这些不经彻底处理的废水排放会额外增加水体中氮素污染物的积累，不仅导致水体的富营养化，影响水生生物正常的生理机能，还会进一步威胁到人类的健康安全[3-5]。因此，如何有效降低食品工业废水中氮素污染已成为食品工业发展的当务之急[6]。生物脱氮技术目前已被证实是处理氮素污染最经济高效且绿色环保的方法，并已得到广泛的应用[7-8]。其中，好氧反硝化菌的发现打破了传统反硝化只能在严格厌氧条件下进行的限制，好氧反硝化菌可以直接在有氧条件下将氮污染物转化为无害的气态氮，在有效去除氮素污染中表现出了更强的优势和潜力[9-10]。

目前，越来越多的好氧反硝化菌从不同的环境中分离筛选出来，如假单胞菌属（*Pseudomonas* sp.）[11]、产碱杆菌属（*Alcaligenes* sp.）[4]、不动杆菌属（*Acinetobacter* sp.）[12]、芽孢杆菌属（*Bacillus* sp.）[13]等。相较于大多数革兰氏阴性反硝化菌株，反硝化芽孢杆菌是典型的革兰氏阳性菌，具有抗逆性强、可适环境多样、代谢过程中能产生大量胞外酶和维生素等优势。同时，由于大多数芽孢杆菌属于非致病菌，其生物安全性能可靠，在食品工业废水处理领域的氮素去除方面具有更大的应用价值[13-15]。但对于芽孢杆菌相关的好氧反硝化特性以及脱氮代谢机理还未得到明确解析。

基于此，作者从江苏省无锡市某河道中分离筛选出一株具有好氧反硝化功能的菌株，经鉴定为 *Bacillus subtilis*，对该菌株在好氧条件下的反硝化特性和脱氮途径进行了验证，同时探究了不同环境因素对该菌株脱氮性能的影响，以期为反硝化芽孢杆菌在食品加工的废水脱氮处理方面提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 样品取自江苏省无锡市某河道的水体及活性污泥中。

1.1.2 培养基

1）富集培养基（LB 培养基，g/L）：NaCl 10.0，蛋白胨 10.0，酵母浸粉 5.0。

2）初筛培养基（BTB 培养基，g/L）：$NaNO_3$ 0.84，丁二酸钠 8.5，KH_2PO_4 1.0，$FeSO_4·7H_2O$ 0.59，$MgSO_4·7H_2O$ 1.0，$CaCl_2$ 0.09，1 g/dL 溴百里酚蓝 1 mL。

3）反硝化培养基（DM 培养基，g/L）：$NaNO_3$ 0.84，丁二酸钠 8.5，Na_2HPO_4 4.0，KH_2PO_4 1.5，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2；微量元素溶液 2 mL。其中，微量元素溶液（g/L）：EDTA 50.0，$ZnSO_4·7H_2O$ 3.92，$MnCl_2·4H_2O$ 5.06，$FeSO_4·7H_2O$ 5.0，$CoCl_2·6H_2O$ 1.61，$CaCl_2$ 5.5，$(NH_4)_6Mo_7O_2·4H_2O$ 1.1，$CuSO_4·5H_2O$ 1.57。研究菌株的耐亚硝酸盐特性时，将 $NaNO_3$ 替换为 $NaNO_2$ 作为唯一氮源。

另加入 2 g/dL 的琼脂至 LB 培养基和 BTB 培养基中形成固体 LB 培养基和 BTB 培养基。所有培养基在 121 ℃下高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 好氧反硝化菌株的分离与筛选 分别取 2 mL 水体样品或 2 g 污泥样品加入到98 mL 灭菌后的新鲜 LB 培养基中，于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 24 h 后转接 2 mL 菌液至新的 LB 培养基中富集

培养,重复 3 次。将富集后的菌液按梯度稀释法稀释成 1×10^{-1}~1×10^{-9} 倍,取 100 μL 菌液涂布于固体 LB 培养基平板上培养。挑取不同形态的单菌落进行多次划线纯化,并将纯化后的菌株点样于 BTB 固体培养基中,置于 30 ℃的生化培养箱培养 72 h。根据 BTB 培养基颜色的变化情况初步筛选出具有反硝化能力的菌株。然后,将初筛得到的菌株接种到反硝化培养基 DM 培养基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养 72 h 后测定 NO_3^--N 的质量浓度,选取脱氮率最高的菌株作为目标菌株。

1.2.2 好氧反硝化菌株的鉴定 将目标菌株在 LB 培养基中活化后,利用 Biospin 细菌 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,以此为模板,采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1492R(5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:2×Taq PCR Master Mix 50 μL,DNA 模板 1 μL,上下游引物各 1 μL,灭菌后的 ddH_2O 定容至 100 μL。PCR 扩增条件:95 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1.5 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。扩增后的产物通过 1.5 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测正确后送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序,并将测序结果提交 GenBank 数据库。通过 BLAST 比对分析后,选取其他同源性较高的序列,利用 Neighbor-Joining 法在 MEGA 5.2 软件构建系统发育树。

1.2.3 好氧反硝化菌株脱氮过程中氮平衡估算 为了进一步阐明目标菌株的脱氮途径,采用血清瓶密封培养的方式,通过充入混合气 O_2 和 He(体积比约为 21:79)排除瓶内的空气,在 37 ℃、200 r/min 的条件下培养 120 h 后采集血清瓶内顶空的气体,对目标菌株脱氮过程中的 O_2 和 N_2 进行测定。以未接种菌液的血清瓶样品作为空白对照,同时测定脱氮前后相关氮素物质的质量,对其氮平衡进行估算。

1.2.4 目标菌株好氧反硝化酶活测定 收集在 DM 培养基中培养至对数中期的目标菌株菌体,洗涤 3 次并利用超声破碎法进行细胞破碎,离心后对其上清液进行硝酸盐还原酶(Nap)和亚硝酸盐还原酶(Nir)酶活的测定。测定方法参考文献[13]。

1.2.5 好氧反硝化菌株的脱氮性能影响因素研究 将 LB 培养基中培养至对数期的菌液接种于以 NO_3^--N 为唯一氮源的 DM 培养基中,使其初始 OD_{600} 保持在 0.1。通过改变培养基中的碳源、C/N、温度、转速及盐度,研究不同环境因素对菌株好氧反硝化性能的影响。其中,碳源种类分别为葡萄糖、蔗糖、甘油、丁二酸钠和柠檬酸钠;C/N 分别为 5、10、15、20、25;温度设置为 20、25、30、37 ℃;转速依次设置为 50、100、150、200、250 r/min;盐度设置分别添加 NaCl 的质量分数为 1%、3%、5%、10%。控制单一变量,其余基本条件分别为:温度为 37 ℃,转速为 200 r/min,C/N 为 10,碳源为丁二酸钠,氮源为 $NaNO_3$。摇床培养 72 h 后,考察目标菌株的生长状态以及 NO_3^--N 质量浓度的变化。

1.2.6 好氧反硝化菌株耐亚硝酸盐的特性研究 在以 NO_2^--N 为唯一氮源的 DM 培养基中,保持 C/N 为 10 不变,通过改变 $NaNO_2$ 的添加量从而调整培养基中初始 NO_2^--N 质量浓度分别为 10、50、100、150、200、300 mg/L,在 37 ℃、200 r/min 条件下培养,每 24 h 取样,考察目标菌株的生长状态以及 NO_2^--N 质量浓度的变化。

1.2.7 测定方法 定期取样 5 mL,室温下于 12 000 r/min 离心 10 min,然后取其上清液进行理化指标的测定。菌体生物量(OD_{600})采用分光光度法。氮化合物指标的测定参照文献[16],其中 NO_3^--N 采用紫外分光光度法测定,NO_2^--N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测定,NH_4^+-N 采用纳氏试剂分光光度法测定,TN(总氮)采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定,胞内氮根据离心前后菌液 TN 的差值计算,N_2 和 O_2 采用配有 TCD 检测器的气相色谱仪测定。

1.2.8 数据分析 采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析,组间比较采用 Duncan's 检验法,$P<0.05$ 代表统计学意义上差异显著。

2 结果与分析

2.1 菌株 JD-014 的分离鉴定

从富集培养及分离纯化后的好氧反硝化初筛菌株中,通过对反硝化性能的评估,复筛得到 1 株对硝态氮降解能力最强的菌株,将其命名为 JD-014。通过对 16S rDNA 基因测序分析,菌株 JD-014 序列全长为 1 538 bp,将 16S rDNA 基因序列提交至 GenBank 数据库,登录号为 MK124647。将该序列与数据库中已有细菌的 16S rDNA 序列 BLAST 比对分析后,发现菌株 JD-014 与 *Bacillus subtilis* 的相似度高达 99%以上,初步确定该菌株为枯草芽孢

杆菌(*Bacillus subtilis*)。以 Neighbor–Joining 法构建　　的系统发育树如图 1 所示。

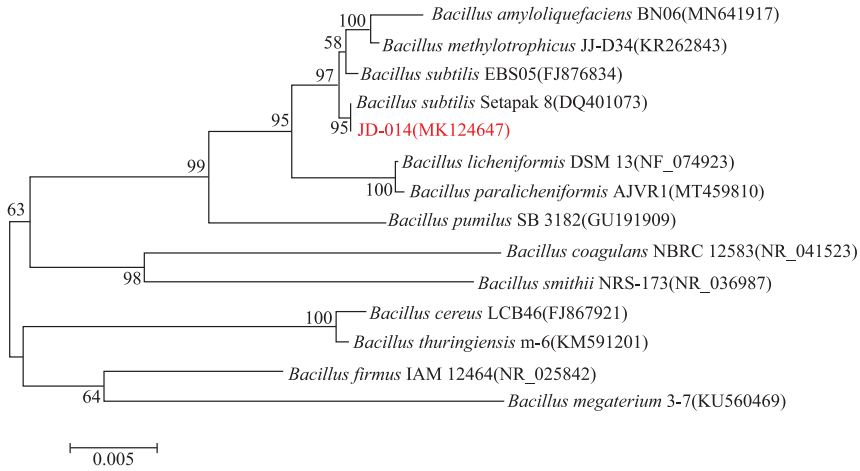


图 1　菌株 JD–014 基于 16S rRNA 基因的系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic tree constructed from 16S rRNA gene sequences of strain JD–014

2.2　菌株 JD–014 的好氧反硝化性能

如图 2 所示，在以 50 mg/L NO_3^-–N 为唯一氮源的 DM 培养基中，菌株 JD–014 生长良好，24 h 后进入对数生长期，在 48 h 时菌体生长达到最大，最高 OD_{600} 为 1.24。随着菌株 JD–014 的不断生长，NO_3^-–N 呈现出减少的趋势，72 h 后 NO_3^-–N 质量浓度降为 12.32 mg/L，去除率达到 76.57%，去除速率为 0.56 mg/(L·h)，与目前有关报道具有好氧反硝化性能的 *Bacillus* sp.相比，菌株 JD–014 的去除速率低于菌株 *B. cereus* GS–5(2.69 mg/(L·h))[17]，但却高于菌株 *B. subtilis* BRAZ2B (0.53 mg/(L·h))[18]、*Bacillus* sp. LY(0.35 mg/(L·h))[19]以及 *B. cereus* X7 (0.32 mg/(L·h))[20]。这表明本实验中获得的芽孢杆菌 JD–014 具有较强的氮素去除能力。此外，培养后期由于菌体的生长进入衰亡期，导致 NH_4^+–N 的质量浓度有所升高。

2.3　菌株 JD–014 的好氧反硝化途径初步验证

将菌株 JD–014 在血清瓶密封培养 120 h，发现血清瓶顶空能够检测到一定量的 N_2 产生，并且瓶中 O_2 的体积分数由最初的 20.7%消耗至 8.8%。通过氮

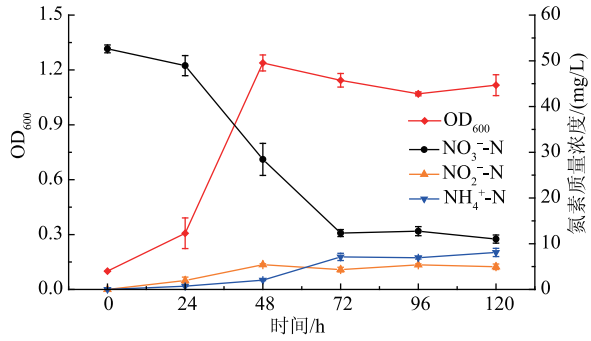


图 2　菌株 JD–014 的生长及脱氮特性

Fig. 2　Growth and nitrogen removal characteristic of strain JD–014

平衡比较，菌株 JD–014 脱氮前后的氮素变化发现(见表 1)。当 NO_3^-–N 为唯一氮源时，菌株 JD–014 能将 18.27%的初始氮源转变为胞内氮，而 25.77%的初始氮源则以气态氮(N_2)产物的形式逸出。此外，在摇瓶条件下的细胞破碎上清液中也检测到了硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的酶活，其比酶活分别为(4.25±0.75)、(2.61±0.59) mU/mg。由此可见，菌株 JD–014 能够通过好氧反硝化途径进行氮素的去除。

表 1　菌株 JD–014 氮平衡计算

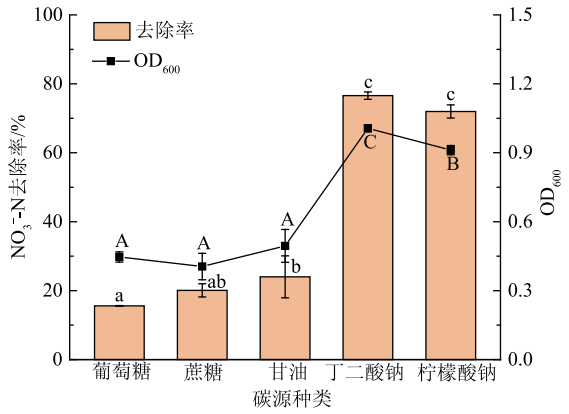
Table 1　Nitrogen balance of strain JD–014

培养时间/h	质量/mg				
	NO_3^-–N	NO_2^-–N	NH_4^+–N	胞内氮	N_2
0	5.20±0.02	—	—	—	—
120	0.76±0.19	0.41±0.09	1.40±0.17	0.95±0.07	1.34±0.22

2.4 不同环境因素对菌株 JD-014 好氧反硝化性能的影响

2.4.1 碳源对菌株 JD-014 好氧反硝化性能的影响

在反硝化进程中,碳源通常作为异养细菌的能量来源和电子供体[21]。如图 3 所示,不同种类的碳源对菌株 JD-014 的生长和 NO_3^--N 的去除率存在着显著影响。在分别以丁二酸钠、柠檬酸钠为唯一碳源时,菌株 JD-014 生长良好,并在好氧条件下可保持较好的脱氮能力;在 72 h 时,菌株 JD-014 对 NO_3^--N 的去除率分别达到 76.59%和 71.99%。而当碳源为葡萄糖、蔗糖和甘油时,菌株 JD-014 的生长状态和脱氮性能远远差于以丁二酸钠和柠檬酸钠为碳源时的情况,并且差异显著(P<0.05),以上述 3 类为碳源时,菌株 JD-014 对NO_3^--N 的去除率都仅为 20%左右。这可能是由于丁二酸钠和柠檬酸钠能够直接参与细胞TCA 循环,从而更易被菌株高效利用,而葡萄糖和蔗糖等大分子有机物要先水解成小分子的有机酸后才能被微生物利用[4,21]。本实验结果也与菌株 *Holomonas* sp. Y8[22]以及 *Pseudomonas* sp. HG7[23]在利用有机酸作为碳源时脱氮率更高的结果相一致。



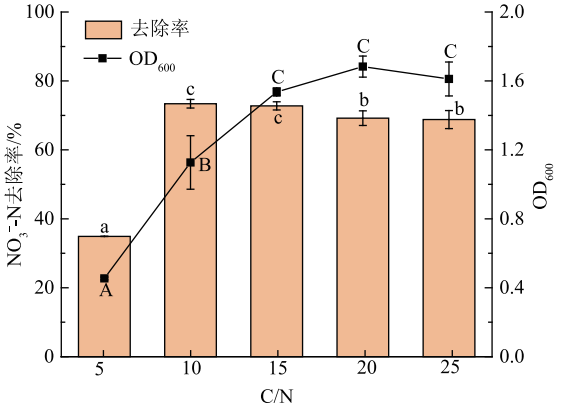
不同字母代表差异显著,P<0.05。

图 3 碳源对菌株 JD-014 生长及脱氮性能的影响

Fig. 3 Effect of carbon sources on growth and nitrogen removal characteristic of strain JD-014

2.4.2 C/N 对菌株 JD-014 好氧反硝化性能的影响

C/N 是影响反硝化进程的关键因素之一,C/N 较小时,由于碳源的不足导致提供的电子数缺乏,从而抑制菌株的生长,使得脱氮效率有所降低[24]。如图 4 所示,当 C/N 为 5 时,由于提供的碳源不足导致菌株 JD-014 生长缓慢,OD_{600} 仅为 0.45,对 NO_3^--N 的去除率也较低,为 34.90%;当 C/N 增加至 10 时,菌株 JD-014 的生长及对 NO_3^--N 的去除均明显提高,NO_3^--N 的去除率为 73.40%;当 C/N 继续增加至 15、20 和 25 后,菌株 JD-014 的生长无明显差异(P>0.05),对 NO_3^--N 的去除率分别为 72.76%、69.20%、68.79%。这与菌株 *Cupriavidus* sp. S1[25]随着 C/N 从 4 增加到 12,NO_3^--N 的去除率不断增加,C/N 继续升高到 28 时,脱氮率基本不变的研究结论相似;而高于菌株 *Klebsiella quasipneumoniae* HY3-2[26]好氧反硝化在最佳 C/N 为 2 时的去除率。此外,在作者所在团队之前的研究中发现,当固定 C/N 为 10,改变碳源质量浓度分别为 100、500、1 000、2 000、3 000 mg/L 时,菌株 JD-014 的生长速率会随着碳源质量浓度的增加而不断升高,而对 NO_3^--N 的去除率可以保持在 50.07%~94.06%[13]。



不同字母代表差异显著,P<0.05。

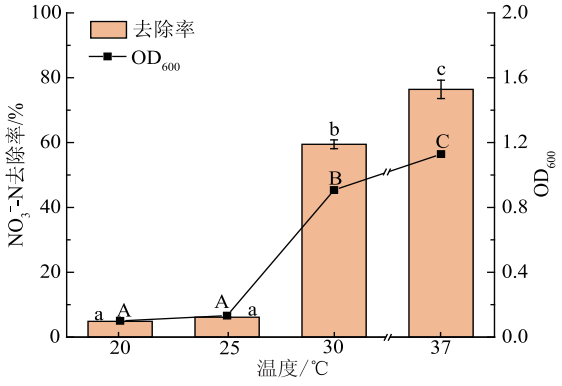
图 4 C/N 对菌株 JD-014 生长及脱氮性能的影响

Fig. 4 Effect of C/N ratio on growth and nitrogen removal characteristic of strain JD-014

2.4.3 温度对菌株 JD-014 好氧反硝化性能的影响

温度对菌株的生长和脱氮性能也会产生影响。温度过高或过低,都会影响细胞内相关功能酶的活性,从而抑制菌体的生长,不利于好氧反硝化的进行。如图 5 所示,温度对菌株 JD-014 的生长和脱氮性能存在显著性差异(P<0.05)。在培养温度为 20~25 ℃时,菌株 JD-014 基本不生长,也基本无法降解 NO_3^--N。由此表明菌株 JD-014 不能耐受低温环境,在低温条件下脱氮性能明显受到抑制。当温度超过 30 ℃时,菌株 JD-014 能够正常生长,同时发挥好氧反硝化作用。在温度分别为 30 ℃和 37 ℃条件下,菌株 JD-014 的菌体生物量 OD_{600} 分别为 0.91 和 1.13,

对NO_3^--N 的去除率分别达到 59.47%和 76.41%。由此可见,在培养温度为 37 ℃左右时更有利于菌株 JD-014 好氧反硝化的进行,这与目前报道的大多数好氧反硝化菌的最适脱氮温度为 30~37 ℃相一致[27]。此外,也有一些反硝化菌在极端环境下脱氮效果明显,如菌株 *Pseudomonas tolaasii* Y-11[28]在 15 ℃条件下对 NO_3^--N 的去除率达到 93.5%,*Chelatococcus daeguensis* TAD1 [29] 具有高温脱氮的潜力,50 ℃下 NO_3^--N 的去除率仍在 99%以上。



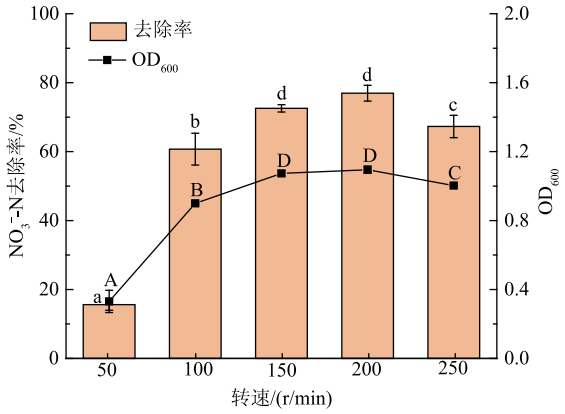
不同字母代表差异显著,P<0.05。

图 5 温度对菌株 JD-014 生长及脱氮性能的影响

Fig. 5 Effect of temperature on growth and nitrogen removal characteristic of strain JD-014

2.4.4 溶氧对菌株 JD-014 好氧反硝化性能的影响

一般来说,溶氧对大多数反硝化菌株的影响都有一个阈值范围。一定范围内,随着溶氧浓度的提高,菌株的生长代谢活跃旺盛,胞内有关反硝化酶系的表达有所提高,导致脱氮性能增加。而当溶氧超过阈值后,对氮素的去除率反而降低[26,30]。本实验中通过调整摇床的转速来改变溶氧的质量浓度,在转速 50、100、150、200、250 r/min 的条件下,对应的溶氧质量浓度分别为 2.3、3.9、5.0、6.3、6.7 mg/L。如图 6 所示,随着转速的不断提高,菌株 JD-014 对 NO_3^--N 的去除率呈现出先上升后降低的趋势。转速为 50 r/min 时,溶氧较低,导致菌株 JD-014 生长缓慢,OD_{600} 为 0.33,对应的 NO_3^--N 的去除率也较低,仅为 15.61%;转速为 100~200 r/min 时,菌体生物量增加,OD_{600} 为 0.90~1.10,NO_3^--N 的去除率提高到 60.72%~76.96%,进一步说明菌株 JD-014 是在好氧条件下进行脱氮过程;当转速继续增加到 250 r/min 时,NO_3^--N 的去除率显著降低 (P<0.05),为 67.30%。由此可见,菌株 JD-014 发挥好氧反硝化功能较适宜的转速在 150~200 r/min,对应的溶氧质量浓度范围为 5.0~6.3 mg/L。



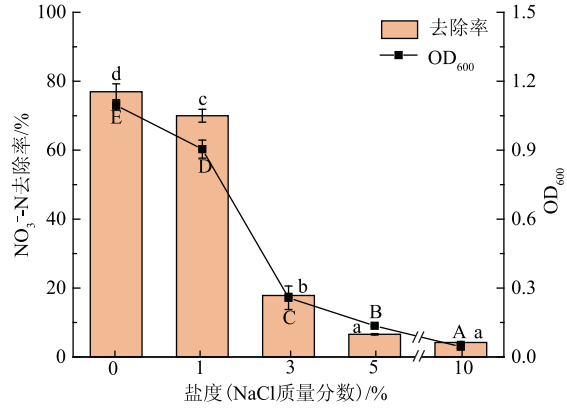
不同字母代表差异显著,P<0.05。

图 6 转速对菌株 JD-014 生长及脱氮性能的影响

Fig. 6 Effect of speed on growth and nitrogen removal characteristic of strain JD-014

2.4.5 盐度对菌株 JD-014 好氧反硝化性能的影响

盐度是好氧反硝化过程进行的一个限制性环境因素。如图 7 所示,与不含盐度的培养条件相比,当盐度为 1%时,菌株 JD-014 能正常生长和进行相应的好氧反硝化过程,72 h 培养后菌体 OD_{600} 为 0.90,NO_3^--N 的去除率达到 69.99%;当盐度逐步提高到 3%时,菌株 JD-014 的生长明显受到抑制(P<0.05),OD_{600} 仅为 0.26,NO_3^--N 的去除率也大幅度降低,为 17.83%;当盐度进一步提高到 5%和 10%时,菌株 JD-014 由于无法适应高盐浓度的环境,导致菌体几乎不生长,NO_3^--N 的去除率分别为 6.58%和 4.21%。由此可见,菌株 JD-014 在 1%的盐度下脱氮



不同字母代表差异显著,P<0.05。

图 7 盐度对菌株 JD-014 生长及脱氮性能的影响

Fig. 7 Effect of salinity on growth and nitrogen removal characteristic of strain JD-014

能力不受影响，但是菌株 JD-014 具有一定的耐盐潜力，后期可考虑对其进行高盐浓度下的驯化或通过分子手段改造菌株体内的耐盐基因，拓宽菌株 JD-014 在含盐食品废水脱氮方面的应用范围。

2.5 菌株 JD-014 耐亚硝酸盐的特性研究

高质量浓度的亚硝酸盐对微生物有强烈的毒害作用，一般而言，当 NO_2^--N 的质量浓度高于 20 mg/L 时会抑制反硝化相关酶的活性[31-32]。如图 8(a)所示，在以不同质量浓度 NO_2^--N 为唯一氮源的好氧反硝化体系中，当 NO_2^--N 质量浓度在 10~150 mg/L 时，菌株 JD-014 的菌体生物量随着 NO_2^--N 质量浓度的增加而升高，对应的 OD_{600} 最大值分别为 0.41、0.72、1.58 和 1.98；当 NO_2^--N 质量浓度进一步提高到 200 mg/L 和 300 mg/L 时，菌株 JD-014 的生长受到一定程度的抑制。菌株 JD-014 对 NO_2^--N 的脱除效果是随着 NO_2^--N 质量浓度的增加而依次降低。如图 8(b)所示，当 NO_2^--N 质量浓度为 10 mg/L 时，对 NO_2^--N 的去除率可以高达 99.92%；而当 NO_2^--N 质量浓度增加到 50、100、150、200、300 mg/L 时，NO_2^--N 的去除率分别降低为 79.68%、64.19%、58.82%、46.62%和 35.02%。文献报道，菌株 *Bacillus* sp. YX-6[32]是一株具有耐 NO_2^--N 毒性的好氧反硝化芽孢杆菌，在 20 mg/L 的 NO_2^--N 质量浓度下脱氮率几乎为 100%；随着 NO_2^--N 质量浓度的增加，*Bacillus* sp. YX-6 对 NO_2^--N 的去除率逐渐下降，当其质量浓度提高到 100 mg/L 时，脱氮率仅为 20%。而本研究筛选的同属芽孢杆菌 JD-014 则能适应于更大范围 NO_2^--N 质量浓度，在 50~200 mg/L 该菌株均能发挥较好的好氧反硝化作用，其脱氮率在 45%~80%。由此可见，菌株 JD-014 在处理高质量浓度亚硝酸盐食品废水中具有巨大的潜在应用价值。

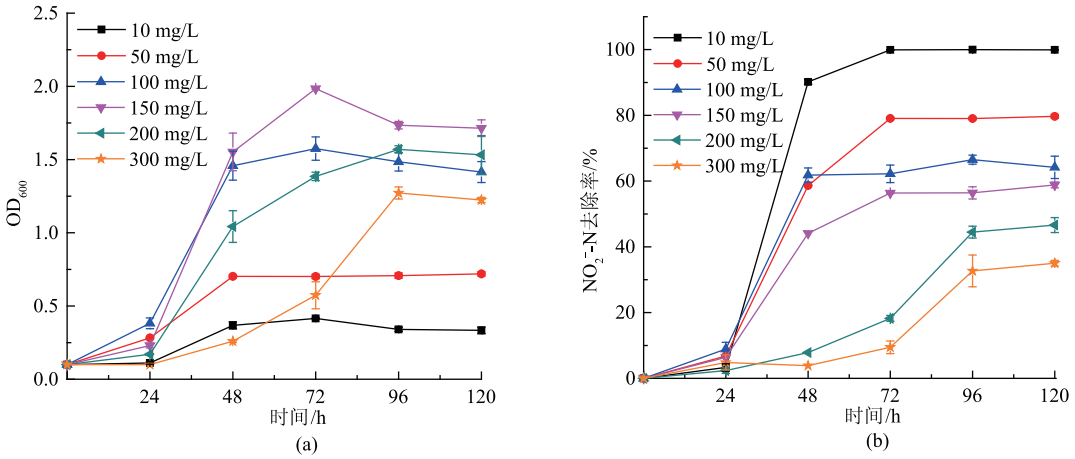


图 8 菌株 JD-014 在不同质量浓度 NO_2^--N 下的生长及脱氮特性

Fig. 8 Growth and nitrogen removal characteristic of strain JD-014 under different concentration of NO_2^--N

综上，本研究中所筛选的食品安全型微生物 *Bacillus subtilis* JD-014 由于其自身具有的独特优势以及所具备的高效好氧反硝化脱氮性能，使其可以广泛适用于多种食品行业加工废水的氮素污染生物处理，如肉制品加工废水（通常含有高质量浓度总氮 50~841 mg/L）、啤酒加工废水（总氮质量浓度 25~450 mg/L）、乳制品加工废水（总氮质量浓度 300~400 mg/L）、腌制品加工废水（总氮质量浓度 100~1 000 mg/L）、马铃薯加工废水（总氮质量浓度约 620 mg/L）、豆制品加工废水（总氮质量浓度约 267.1 mg/L）等[2,33-35]。此外，针对一些高质量浓度亚硝酸盐的食品废水，菌株 JD-014 具有对高质量浓度亚硝酸盐良好的耐受性，在这类高氮废水处理中更占优势，从而能更好地促进水体健康持续发展。

3 结 语

本研究从江苏省无锡市某河道水体中筛选出 1 株具有好氧反硝化性能的菌株 JD-014，经 16S rDNA 序列比对及系统发育分析，初步鉴定为枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）。在以 50 mg/L NO_3^--N 为唯一氮源时，NO_3^--N 去除速率为 0.56 mg/(L·h)。通过气态氮的产生、氮平衡估算以及酶活测定等方面分析，证实了菌株 JD-014 可以通过好氧反硝化途径进行氮素去除。此外，对不同环境因素分析中

发现,菌株 JD-014 在丁二酸钠和柠檬酸钠为碳源、C/N 为 10~25、温度为 37 ℃、转速为 150~200 r/min、盐度为 1%以下时具备最佳的好氧反硝化性能。此外,菌株 JD-014 还具有较好的亚硝酸盐耐受性,在 NO_2^--N 质量浓度高达 200 mg/L 时脱氮率仍可达到 46.62%。作者为进一步深入研究芽孢杆菌的好氧反硝化提供了重要理论依据,同时也为食品工业废水中氮素的污染去除提供了优良的候选菌株。

参考文献:

[1] 邓永飞,刘涛,吴海铨,等. 食品工业废水处理技术研究进展[J]. 工业水处理,2021,41(10):1-11.
[2] 张智,周健. 食品工业高盐高氮磷有机废水处理技术发展趋势[J]. 给水排水,2012,48(9):1.
[3] HE Z,FENG Y,ZHANG S,et al. Oxygenic denitrification for nitrogen removal with less greenhouse gas emissions:microbiology and potential applications[J]. **Science of the Total Environment**,2018,621:453-464.
[4] CHEN J,GU S,HAO H,et al. Characteristics and metabolic pathway of *Alcaligenes* sp. TB for simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. **Applied Microbiolgy and Biotechnology**,2016,100(22):9787-9794.
[5] REZVANI F,SARRAFZADEH M H,EBRAHIMI S,et al. Nitrate removal from drinking water with a focus on biological methods:a review[J]. **Environmental Science and Pollution Research**,2019,26(16):1-18.
[6] 李文甫,杜柳冰,刘思莹,等. 一株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮性能研究[J]. 生物技术通报,2019,35(9):202-209.
[7] PADHI S K,TRIPATHY S,SEN R,et al. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater[J]. **International Biodeterioration & Biodegradation**,2013,78:67-73.
[8] HUANG F,PAN L,LYU N,et al. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2017,124(5):564-571.
[9] FENG L,YANG J,MA F,et al. Characterisation of *Pseudomonas stutzeri* T13 for aerobic denitrification:stoichiometry and reaction kinetics[J]. **Science of the Total Environment**,2020,717:1-9.
[10] QIAO Z,SUN R,WU Y,et al. Characteristics and metabolic pathway of the bacteria for heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in aquatic ecosystems[J]. **Environmental Research**,2020,191:1-10.
[11] ZHAO B,CHENG D Y,TAN P,et al. Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal[J]. **Bioresource Technology**,2018,250:564-573.
[12] YANG J R,WANG Y,CHEN H,et al. Ammonium removal characteristics of an acid-resistant bacterium *Acinetobacter* sp. JR1 from pharmaceutical wastewater capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. **Bioresource Technology**,2019,274:56-64.
[13] YANG T,XIN Y,ZHANG L,et al. Characterization on the aerobic denitrification process of *Bacillus* strains[J]. **Biomass and Bioenergy**,2020,140:1-11.
[14] GAO J,GAO D,LIU H,et al. Biopotentiality of high efficient aerobic denitrifier *Bacillus megaterium* S379 for intensive aquaculture water quality management[J]. **Journal of Environmental Management**,2018,222:104-111.
[15] ZIAEI-NEJAD S,REZAEI M H,TAKAMI G A,et al. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity,survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. **Aquaculture**,2006,252(2/3/4):516-524.
[16] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京:中国环境科学出版社,2002.
[17] ROUT P R,BHUNIA P,DASH R R. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification,aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal[J]. **Bioresource Technology**,2017,244(1):484-495.
[18] HUSSAIN S A,PRASHER S O,CHENIER M,et al. Removal of nitrate-N by antibiotic exposed bacterial isolates from constructed wetlands[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2011,27(9):2061-2069.
[19] ZHAO B,HE Y L,ZHANG X F. Nitrogen removal capability through simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Bacillus* sp. LY[J]. **Environmental Technology**,2010,31(4):409-416.
[20] YAO R L,QIU L N,ZHANG W W,et al. Isolation and characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification

bacterium,*Bacillus cereus* X7 at high salinity[J]. **Advanced Materials Research**,2013,864:111-114.

[21] LIU Y,HU T,SONG Y,et al. Heterotrophic nitrogen removal by *Acinetobacter* sp. Y1 isolated from coke plant wastewater[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2015,120(5):549-554.

[22] 郭超,尹辉,范奎,等. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及脱氮特性研究[J]. 安全与环境工程,2020,27(4):41-47.

[23] 李雪,刘思彤,陈倩. 一株好氧反硝化菌的鉴定及脱氮特性研究[J]. 北京大学学报(自然科学版),2018,54(6):1276-1282.

[24] 陈玲,白洁,赵阳国,等. 分离于河口区芦苇湿地 1 株好氧反硝化菌的鉴定及其反硝化特性[J]. 微生物学报,2016,56(8):1314-1325.

[25] SUN Z,LYU Y,LIU Y,et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. S1[J]. **Bioresource Technology**,2016,220:142-150.

[26] 杨静丹,祝铭韩,刘琳,等. 异养硝化 - 好氧反硝化菌 HY3-2 的分离及脱氮特性[J]. 中国环境科学,2020,40(1):294-304.

[27] 王秀杰,王维奇,张阳,等. 不同环境条件下 *Pseudomonas* sp.脱氮特性及功能基因表达差异研究[J]. 中国环境科学,2019,39(10):4377-4386.

[28] HE T,LI Z,SUN Q,et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion[J]. **Bioresource Technology**,2016,200:493-499.

[29] LI H,PAN M,ZHOU S,et al. Characterization of nitrous oxide emissions from a thermophilic denitrifying bacterium *Chelatococcus daeguensis* TAD1 in an aerated sequencing batch reactor[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2016,112(1):233-240.

[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.

[31] CAMARGO J A,ALONSO A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems:a global assessment[J]. **Environment International**,2006,32(6):831-849.

[32] SONG Z F,AN J,FU G H,et al. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds[J]. **Aquaculture**,2011,319(1/2):188-193.

[33] 朱杰. 肉类加工废水生物处理过程中氨氮转化规律及脱氮最佳运行工况研究[D]. 成都:西南交通大学,2004.

[34] LI S,ZHAO S,YAN S,et al. Food processing wastewater purification by microalgae cultivation associated with high value-added compounds production:a review[J]. **Chinese Journal of Chemical Engineering**,2019,27(12):2845-2856 .

[35] IOANNOU L A,PUMA G L,KASSINOS F D. Treatment of winery wastewater by physicochemical,biological and advanced processes:a review[J]. **Journal of Hazardous Materials**,2015,286:343-368.

科　技　信　息

欧盟授权第二种可用作人类食品成分的昆虫

2021 年 11 月 12 日，欧盟委员会网站消息，依据欧洲食品安全局科学评估结论，欧盟委员会于当日授权并允许昆虫——飞蝗,用作人类食品成分或零食在欧盟上市销售。因昆虫高脂、高蛋白,富含维生素、纤维素和矿物质,被欧盟从农场到餐桌战略认可并作为人类食品中蛋白质的重要替代来源。

去年 7 月,欧盟委员会第一次授权允许昆虫——黄粉虫在欧盟投放市场,此次飞蝗授权,是欧盟授权作为食品投放市场的第二种昆虫。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟授权第二种可用作人类食品成分的昆虫[EB/OL]. (2021-11-17).http://news.foodmate.net/2021/11/612263.html