

◆特邀栏目◆

一株脱氮毕赤酵母 Y-4 的分离鉴定及其氨氮降解性能*

雷可^{1,2}, 池越^{1,2}, 毛俊儒^{1,2}, 陆兵^{1,2}, 潘世优^{1,2}, 黎贞崇³, 韦宇拓^{1,2**}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西微生物与酶工程技术研究中心, 广西南宁 530004; 3. 广西科学院, 广西南宁 530007)

摘要:当前水体氨氮污染严重, 环境治理迫在眉睫, 筛选高效安全的脱氮菌株可为废水脱氮提供更多选择。本研究从沼气发酵污泥中分离筛选能降解氨氮的菌株, 使用 18S rDNA 序列分析, 对筛选出的优良菌株进行种类鉴定; 同时采用单因素试验和正交试验, 探究菌株最佳脱氮条件[培养温度、初始 pH 值、盐浓度、碳氮比(C/N)]及其硝化、反硝化能力。结果表明, 分离筛选得到 1 株具有较强脱氮能力的野生型毕赤酵母(*Pichia* sp.) 菌株 Y-4。在试验优化后, 得到菌株 Y-4 的最适脱氮条件: 培养温度 25 °C, 初始 pH 值 8.0、盐浓度(氯化钠浓度) 30 g/L、C/N 为 30。在培养 24 h 后菌株 Y-4 对亚硝酸氮(NO_2^- -N)的降解率为 80.50%, 在培养 48 h 后菌株 Y-4 对氨氮(NH_4^+ -N)的降解率达 99.92%, 且在 24 h 内菌株 Y-4 的异养硝化和好氧反硝化的速率分别达到 6.25 和 6.71 mg/(L·h), 表明毕赤酵母菌株 Y-4 对废水氮污染处理以及生物修复具有一定的应用价值与潜力。

关键词:毕赤酵母; 生物脱氮; 异养硝化; 好氧反硝化; 条件优化

中图分类号: Q89 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2023)05-0188-09

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20240417.019

当今工业、农业、生活废水以及垃圾渗滤液等的大量排放大大增加水生生态系统中的活性氮含量, 不仅导致水体富营养化, 危害人类健康, 也加大了污染治理难度, 造成严峻的生态压力和生物多样性丧失^[1,2]。离子交换和吸附等物理处理方法对有机污染物具有很高的保留率^[3], 而化学方法工作量大、操作繁琐、价格昂贵, 并且需要二次处理^[4]。与一般的

物理、化学方法脱氮处理相比, 生物法脱氮因其高效、环保和低成本而最具前景。目前已有许多脱氮菌株在工业废水、淡水栖息地、盐碱湖、海洋沉积物和海水养殖水以及活性污泥中被发现。细菌中主要有亚硝酸菌属(*Nitrosomonas*)、硝酸菌属(*Nitrobacter*)等自养型细菌^[5], 还有假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[6]、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)^[7]、不动杆菌属(*Acinetobact-*

收稿日期: 2023-05-03

修回日期: 2023-06-05

* 国家自然科学基金面上项目(52270121)资助。

【第一作者简介】

雷可(1999—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事生物技术研究, E-mail: 1741245572@qq.com。

【**通信作者简介】

韦宇拓(1971—), 男, 教授, 主要从事生物技术研究, E-mail: weiyutuo@gxu.edu.cn。

【引用本文】

雷可, 池越, 毛俊儒, 等. 一株脱氮毕赤酵母 Y-4 的分离鉴定及其氨氮降解性能[J]. 广西科学, 2024, 31(1): 188-196.

LEI K, CHI Y, MAO J R, et al. Isolation and Identification of a Denitrifying *Pichia* sp. Y-4 and Its Ammonia Nitrogen Degradation Performance [J]. Guangxi Sciences, 2024, 31(1): 188-196.

er)^[8]、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[9]等异养型细菌,这些异养型细菌的氨氮降解率为 66.0%—93.6%^[10]。虽然有研究证明真菌可以脱氮^[11],但是关于真菌生物脱氮的研究并不多,已报道的有青霉属(*Penicillium*)、曲霉菌属(*Aspergillus*)真菌^[12]和酵母^[13]。例如,一株青霉菌 EC3 从活性污泥中被分离鉴定,48 h 后其氨氮降解率达 97.7%^[14];腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)RADF-77 在好氧条件下以葡萄糖和茶渣为碳源时对硝酸盐的平均去除率分别为 4.43 mg/(L·h)和 4.50 mg/(L·d)^[15];一株新型酵母 *Barrettozyma californica* K1 以蔗糖为最佳碳源在 140 mg/L 的氮浓度下培养 48 h,其对氨氮的最大去除效率为 99.11%^[13];孢汉逊氏酵母(*Hanseniaspora uvarum*)KPL108 在好氧条件下对硝酸盐的去除率为 99%,总有机碳去除率为 93%^[16]。目前,生物脱氮法的研究大多集中在细菌方面,对真菌特别是酵母的研究甚少。与细菌相比,酵母更具有优势,除脱氮外,它还具有降解多种有机基质和抵抗极端条件的潜力^[17],并且酵母的适应性强,可以吸附抱团从而更好地沉淀,利于回收且不易损失^[18]。因此有必要拓宽真菌在废水脱氮中的利用途径,并通过探究不同环境条件因素的影响优化酵母的脱氮条件,从而提高其氨氮降解效率,弥补细菌脱氮的不足。本研究从实验室沼气发酵污泥中筛选能降解氨氮的菌株,使用 18S rDNA 序列分析,对筛选出的优良菌株进行种类鉴定,并采用单因素试验和正交试验优化其脱氮条件,以使其达到更高效的脱氮效果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 污 泥 样 品

污泥样品取自本实验室沼气发酵污泥。

1.1.2 主 要 酶 和 试 剂

LA Taqase 购自 TaKaRa 公司,苯酚、酒石酸钠(国药集团化学试剂有限公司),EDTA [生工生物工程(上海)股份有限公司],亚硝基铁氰化钠、对氨基苯磺酸、盐酸萘乙二胺(成都西亚化工股份有限公司)等均为分析纯。

1.1.3 仪 器 与 设 备

PB-10 台式 pH 计(Sartorius 公司),ZQZY-HB 恒温摇床(上海知楚仪器有限公司),LRH-250 生化培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司),CR22G III 高速冷冻离心机[日立(中国)有限公司],ELX800 多功

能酶标仪(BioTek 公司),Biometra GmbH PCR 仪(广西百谷生物科技有限公司),DYY-8C 核酸电泳仪(北京六一生物科技有限公司),Tanon 1600 凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

1.1.4 培 养 基

LB 培养基^[19]。筛选培养基:葡萄糖 2 g/L、氯化铵 3.82 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、七水合硫酸镁 0.05 g/L、氯化钾 1 g/L、氯化钙 0.05 g/L、pH 值 7.0。SOC 培养基^[20]。酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂(YPD)培养基^[21]。异养硝化培养基:葡萄糖 2 g/L、氯化铵 0.764 3 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、七水合硫酸镁 0.05 g/L、氯化钾 1 g/L、氯化钙 0.05 g/L。反硝化培养基:将异养硝化培养基中的氯化铵换成 0.985 7 g/L 的亚硝酸钠即可。固体培养基则需加入 1.5%(W/V)的琼脂。按倍数调整培养基中氯化铵和亚硝酸钠的含量以达到实验所需的氨氮(NH₄⁺-N)浓度和亚硝酸氮(NO₂⁻-N)浓度。

1.2 方 法

1.2.1 菌 株 的 筛 选 与 分 离

富集:10 g 污泥样品加入装有 100 mL 去离子水的无菌锥形瓶中,200 r/min、30 °C 摇床培养 30 min 后静置 15 min。取 1 mL 污泥菌悬液于 100 mL LB 培养基中,200 r/min、30 °C 摇床培养 24 h。

初筛、驯化:取上述富集的菌液,按 1%(V/V)的接种量接种到 NH₄⁺-N 浓度为 200 mg/L 的筛选培养基中,200 r/min、30 °C 摇床培养 48 h。逐次增大筛选培养基的 NH₄⁺-N 浓度,由 200、400、600、800 mg/L 直至 1 000 mg/L,多次重复接种,进行菌株驯化。将驯化后得到的菌液梯度稀释涂布于固体筛选培养基上,30 °C 恒温培养 48 h。选取单菌落重新划线于 LB 平板上,重复划线 3 次,得到分离纯化的单菌落。

复筛:将分离纯化的单菌接种到 YPD 培养基中,200 r/min、30 °C 摇床培养 12—24 h 后,按 1%(V/V)的接种量转接到 100 mL 筛选培养基中,200 r/min、30 °C 摇床培养 48 h。离心取上清液检测残余 NH₄⁺-N 浓度,选择氨氮降解率较高的菌株进行后续试验。

1.2.2 菌 株 18S rDNA 基 因 的 测 序 鉴 定

提取所得菌株的总 DNA,用通用引物 18S1(5'-CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGCCTGAGAAACGGCTACC-3')和 18S2(5'-CCAAAATC-CCTTAACGTGAGTTTTCCTCGTTGAAGAGC

G-3')进行18S rDNA的PCR扩增。反应体系(50 μL):模板DNA 1 μL , 18S1和18S2各1 μL , dNTP mixture 4 μL , LA Taqase 0.5 μL , 10 \times LA Taqase Buffer 5 μL , 灭菌 H_2O 37.5 μL 。PCR反应程序: 94 $^\circ\text{C}$ 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 57 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 2 min, 30个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 10 min; 4 $^\circ\text{C}$ 保存。将PCR扩增产物送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序, 在NCBI网站上进行同源性比对(BLAST软件), 并用MEGA 6.0软件构建系统发育树。

1.2.3 单因素试验

将筛选所得菌株接种到YPD培养基中活化, OD_{595} 达到1.0(对数生长期)时, 按1%的接种量接种到 NH_4^+ -N浓度为200 mg/L的异养硝化培养基中, 改变单一变量, 包括培养温度(16、23、30、37、44 $^\circ\text{C}$)、初始pH值(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)、盐浓度(氯化钠浓度, 0、5、10、20、30、40、60 g/L)、碳氮比(C/N, 5、10、20、30、40、50), 200 r/min培养48 h后, 测定不同条件变化下菌液的 OD_{595} 以及上清液中的 NH_4^+ -N浓度。

1.2.4 正交试验优化

基于单因素试验结果, 采用软件Minitab 17 (Minitab Inc., State College, USA)设计四因素三水平的正交试验。按照表1设计的正交试验方案, 将菌株接种到 NH_4^+ -N浓度为200 mg/L的异养硝化培养基中, 在不同因素条件下培养48 h, 测定不同因素条件下菌液的 OD_{595} 以及上清液中的 NH_4^+ -N浓度。

表1 正交试验设计

Table 1 Orthogonal experimental design

水平 Level	因素 Factor			
	A (Culture temperature)/ $^\circ\text{C}$	B (Initial pH value)	C (Carbon nitrogen ratio, C/N)	D (Salt concentration)/(g/L)
1	25	7.5	20	20
2	30	8.0	30	30
3	35	8.5	40	40

1.2.5 菌株的氨氮浓度耐受性

将 OD_{595} 达到1.0(对数生长期)的菌株接种到耐受培养基(NH_4^+ -N浓度为100、200、300、500、700、1000 mg/L)中。根据正交试验优化结果, 在菌株的最优氨氮降解条件下培养, 培养过程中每间隔12 h

检测菌体 OD_{595} 和培养液上清液的 NH_4^+ -N浓度。

1.2.6 菌株的反硝化降解特性

将对数生长期的菌株接种到200 mg/L的亚硝酸钠培养基中, 最适温度(25 $^\circ\text{C}$)、200 r/min摇床培养5 d。每间隔12 h测定培养基中菌体 OD_{595} 和培养液上清液中的 NO_2^- -N浓度。

1.2.7 测定方法

利用靛酚蓝分光光度法^[22]进行 NH_4^+ -N浓度的测定, 制作氨氮标准曲线, 根据标准曲线公式 $y = 0.594x + 0.002$ ($R^2 = 0.998$) 计算上清液中的 NH_4^+ -N浓度。

采用N-(1-萘基)-乙二胺光度法^[23]进行测定, 制作亚硝酸氮标准曲线, 根据标准曲线公式 $y = 0.40988x - 0.0001$ ($R^2 = 0.9979$) 计算上清液中的亚硝酸钠和 NO_2^- -N浓度。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选、分离和鉴定

本实验经过筛选得到的菌株命名为Y-4。提取菌株Y-4基因组并扩增其18S rDNA序列, 经18S rDNA基因测序, 同源性比对(BLAST软件)后用MEGA 6.0软件构建系统发育树, 如图1所示。系统发育树结果表明菌株Y-4与杰丁毕赤酵母(*Pichia jadinii*)的亲缘关系最近, 同时根据其菌落形态特征, 将菌株Y-4鉴定为毕赤酵母(*Pichia* sp.), 其具有兼性厌氧、化能异养、无致病性等特征。

2.2 单因素试验结果分析

2.2.1 不同培养温度对菌株Y-4生长和脱氮的影响

由图2可知, 比较在不同培养温度下菌株Y-4的生长情况与氨氮降解率, 菌株Y-4的最适生长温度为23 $^\circ\text{C}$, 最佳脱氮温度为30 $^\circ\text{C}$, 氨氮降解率在达到最高值(88.9%)后便随着温度的升高而下降。在较低温度(≤ 23 $^\circ\text{C}$)和较高温度(> 40 $^\circ\text{C}$)下, 菌株Y-4的菌体浓度和氨氮降解率都处于较低的水平; 30—37 $^\circ\text{C}$ 的温度较适合菌株Y-4的生长和脱氮, 此温度范围下菌株Y-4的氨氮降解率可维持在70%以上。在30 $^\circ\text{C}$ 时, 菌株Y-4的生长未受到明显抑制, 且拥有最高的氨氮降解率, 因此菌株Y-4的最适氨氮降解温度为30 $^\circ\text{C}$ 左右。

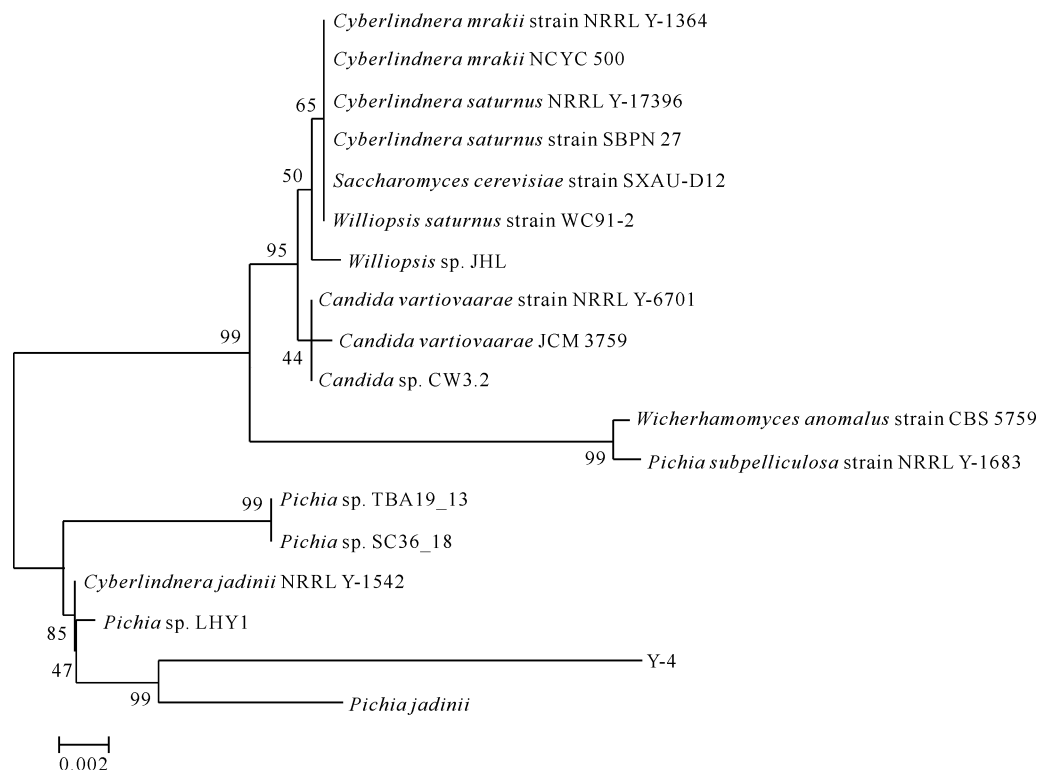


图 1 菌株 Y-4 系统发生树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain Y-4

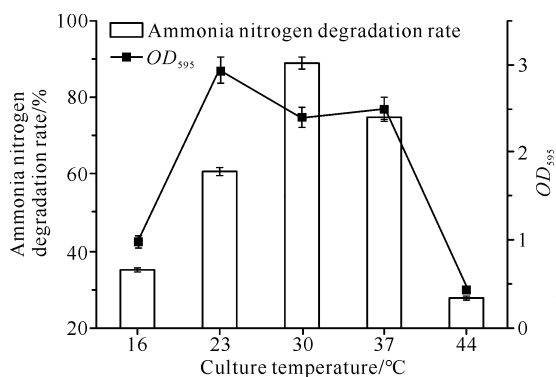


图 2 不同培养温度对菌株 Y-4 生长和脱氮的影响

Fig. 2 Effects of different culture temperatures on the growth and nitrogen removal of strain Y-4

2.2.2 不同初始 pH 值对菌株 Y-4 生长和脱氮的影响

图 3 表明菌株 Y-4 生长的最适初始 pH 值为 6.0; 脱氮最佳初始 pH 值为 8.0, 氨氮降解率达到 84.96%。比较菌株 Y-4 的生长情况与氨氮降解率, 发现在初始 pH 值为 5.5—8.5 时菌株 Y-4 的生长和脱氮能力较为稳定, 可在偏酸性的环境中生长, 氨氮降解率保持在 60% 以上; pH 值一旦超过 8.5 则不利于菌株 Y-4 的生长和脱氮, 严重影响其异养硝化效率。可见, 菌株 Y-4 在 pH 偏中性的弱碱环境下的除

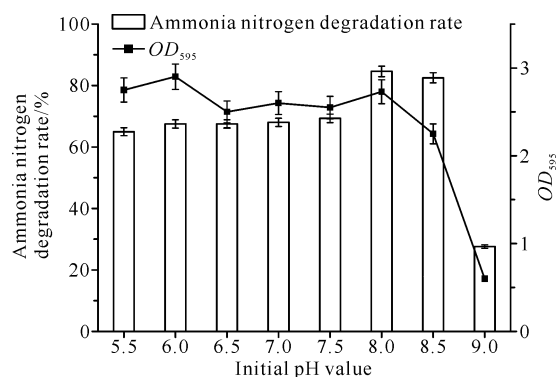


图 3 不同初始 pH 值对菌株 Y-4 生长和脱氮的影响

Fig. 3 Effect of different initial pH value on the growth and nitrogen removal of strain Y-4

氮效果最佳。

2.2.3 不同盐浓度对菌株 Y-4 生长和脱氮的影响

图 4 表明菌株 Y-4 最适生长盐浓度和最佳脱氮盐浓度均为 30 g/L, 菌体 OD₅₉₅ 达到 3.5, 氨氮降解率可达到 99.88%, NH₄⁺-N 几乎完全去除。菌株 Y-4 的 OD₅₉₅ 与氨氮降解率变化趋势一致, 菌体 OD₅₉₅ 降低或升高, 脱氮效率同时降低或升高。盐浓度 > 40 g/L 的环境对菌株 Y-4 的生长和异养硝化过程存在较大的抑制作用。可见, 菌株 Y-4 具有较高的盐耐受性, 适用于较高盐浓度的废水脱氮。

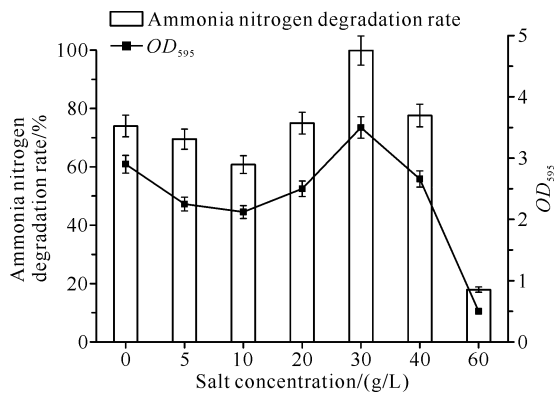


图4 不同盐浓度对菌株 Y-4 生长和脱氮的影响

Fig. 4 Effects of different salt concentration on the growth and nitrogen removal of strain Y-4

2.2.4 不同 C/N 对菌株 Y-4 生长和脱氮的影响

以葡萄糖为碳源,通过增加培养基中的葡萄糖含量,测定不同 C/N 下菌株 Y-4 的脱氮情况。如图 5 所示,菌株 Y-4 的最适生长 C/N 和最佳脱氮 C/N 均为 30,氨氮降解率最大可达 95.61%,对 NH_4^+-N 的去除较为完全,之后便呈现出下降的趋势,菌株 Y-4 整体上脱氮率维持在 50% 以上。当 $\text{C/N} > 30$ 时,随着 C/N 的升高,菌株 Y-4 的生长以及脱氮效率开始受到影响,这可能是由于在以葡萄糖为碳源的培养基中,高浓度的葡萄糖导致环境渗透压升高,从而进一步影响菌株 Y-4 的生长以及脱氮。

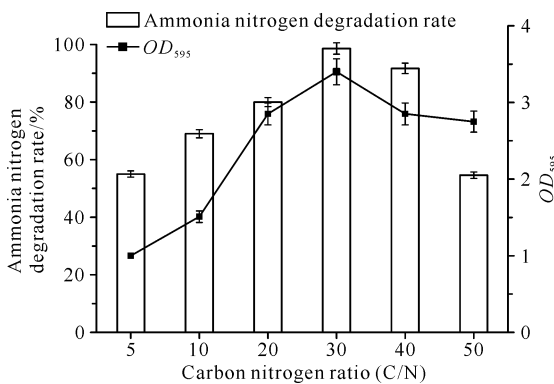


图5 不同 C/N 对菌株 Y-4 生长和脱氮的影响

Fig. 5 Effects of different C/N on the growth and nitrogen removal of strain Y-4

2.3 菌株 Y-4 氨氮降解条件的正交实验优化

表 2 为菌株 Y-4 氨氮降解条件的四因素三水平正交实验优化结果。从表 2 可知,决定菌株 Y-4 脱氮效率的影响因素的主次顺序为初始 pH 值 > 盐浓度 > C/N > 培养温度,菌株 Y-4 的最佳组合为初始 pH 值 8.0、盐浓度 30 g/L、C/N = 30、培养温度 25 °C,该菌株能在 48 h 内将 200 mg/L 的氨氮几乎降解完全,氨氮降解率提升至 99.92%,达到优化效果。

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal experimental results

试验编号 Test number	A	B	C	D	氨氮降解率/% Ammonia nitrogen degradation rate/%
1	1	1	1	1	87.33
2	1	2	2	2	99.92
3	1	3	3	3	44.12
4	2	1	2	3	64.08
5	2	2	3	1	89.84
6	2	3	1	2	70.74
7	3	1	3	2	59.52
8	3	2	1	3	68.26
9	3	3	2	1	60.92
K_1	77.123	70.310	75.443	79.363	
K_2	74.887	86.007	74.973	76.727	
K_3	62.900	58.593	64.493	58.820	
R	2.240	27.414	10.950	20.543	

2.4 不同初始氨氮浓度对菌株 Y-4 生长和异养硝化的影响

如图 6 所示,在不同初始 NH_4^+-N 浓度(100、200、300、500、700、1 000 mg/L)条件下培养 132 h 后,菌株 Y-4 的氨氮降解率分别为 100.0%、94.9%、60.0%、36.4%、28.6%、19.1%,且菌体 OD_{595} 均超过 3.0 (图 7),表明菌株 Y-4 最高可耐受 1 000 mg/L 的 NH_4^+-N 浓度,可用于高氨氮浓度废水的脱氮。如图 6 所示,在不同初始 NH_4^+-N 浓度(100、200、300、500、700、1 000 mg/L)条件下分别对菌株 Y-4 培养不同时间,结果表明在 0—24 h 内,菌株 Y-4 对不同初始浓度的氨氮的平均降解速率分别为 4.16、4.70、4.79、5.08、6.25、5.00 $\text{mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$,其中,初始 NH_4^+-N 浓度为 700 mg/L 时菌株 Y-4 的平均降解速率达最高。结合图 7 进行分析,随着 NH_4^+-N 浓度的升高以及时间的延长,24 h 后菌株 Y-4 的生长趋势并未出现明显的抑制情况,氨氮降解量维持在一定的水平,36 h 后由于营养物质的不断消耗,降解速率和脱氮效率逐渐降低,菌株 Y-4 硝化作用不明显,残余氨氮量基本不变。

2.5 菌株 Y-4 的好氧反硝化降解能力

如图 8 所示,初始亚硝酸盐浓度为 200 mg/L,好氧反硝化 24 h 时,菌株 Y-4 的菌体 OD_{595} 达 2.0 以

上,亚硝酸氮降解率为 80.50%。0—24 h 菌株 Y-4 的平均亚硝酸氮降解速率为 6.71 mg/(L·h),12—24 h 期间的平均亚硝酸氮降解速率达最大,达 7.81 mg/(L·h),因此菌株 Y-4 的反硝化作用集中在对数生长期阶段,到 60 h 时亚硝酸氮降解率接近 100%。相比异养硝化作用的氨氮降解速率,菌株 Y-4 好氧反硝化作用的亚硝酸氮的降解速率更快。

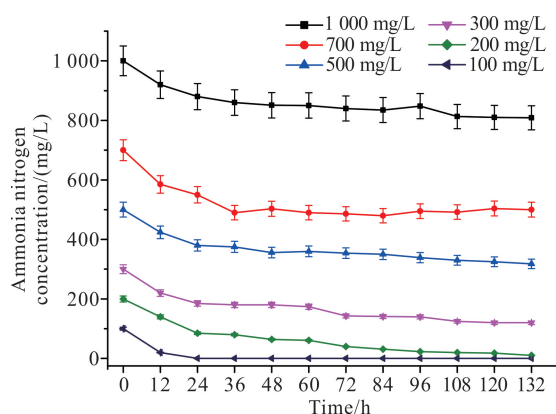


图 6 初始氨氮浓度对菌株 Y-4 异养硝化的影响

Fig. 6 Effect of initial ammonia nitrogen concentration on heterotrophic nitrification of strain Y-4

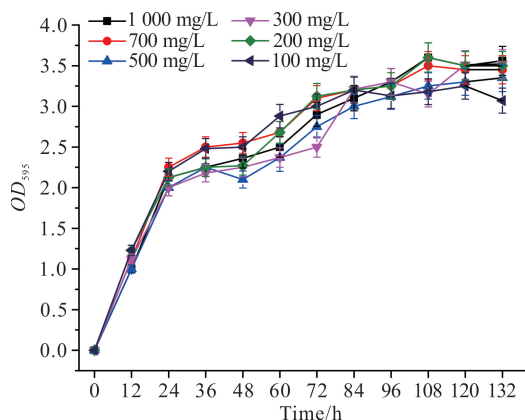


图 7 初始氨氮浓度对菌株 Y-4 生长的影响

Fig. 7 Effect of initial ammonia nitrogen concentration on the growth of strain Y-4

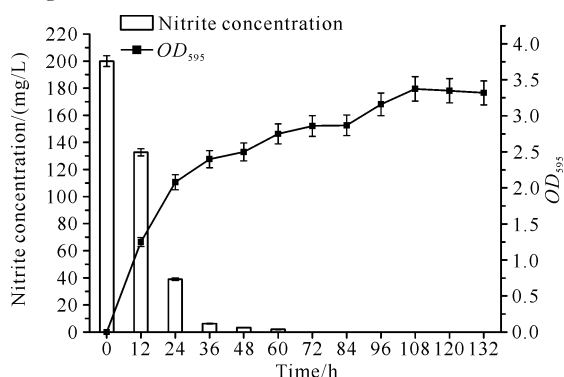


图 8 菌株 Y-4 在亚硝酸盐中的好氧反硝化作用

Fig. 8 Aerobic denitrification of strain Y-4 in nitrite

3 讨论

本研究发现筛选得到的毕赤酵母菌株 Y-4 可以进行异养硝化和好氧反硝化,并探究了培养温度、初始 pH 值、盐浓度、C/N 对 Y-4 的脱氮能力的影响。这些因素从不同方面影响微生物细胞膜的流动性、通透性、营养物质的存在形式以及代谢产物的产生等,是微生物废水脱氮的重要因素^[24]。

温度是影响菌株活性的重要环境因素之一,其变化直接影响微生物的酶活和生长速度,因此只有在最佳的温度条件下,好氧脱氮细菌才能拥有最佳的脱氮性能^[25]。菌株 Y-4 生长和脱氮的最佳温度为 23—37 °C,与大部分的好氧反硝化菌的最佳温度范围相似^[26]。当温度为 15—20 °C 时,菌株 Y-4 的氨氮降解率仍有 30%—60%,并且在 45 °C 时仍能降解氨氮,可见该菌株的温度适应范围较宽,有利于菌株在环境中竞争与存活。大多数的异养硝化菌在温度低于 15 °C 和高于 45 °C 时脱氮性能都受到严重抑制^[27-29],本研究中不同温度对菌株 Y-4 的影响与该研究结果一致。

pH 值不但会影响细胞内的酶的活性,而且还会影响溶液中营养物质或抑制物质的浓度,从而直接或间接影响好氧硝化或者反硝化菌株的活性^[30]。研究表明,污泥氨氧化的最适 pH 值为 7.5—8.3^[31],本研究筛选得到的毕赤酵母菌株 Y-4 在 pH 值为 5.5—8.5 时其氨氮降解率仍达到 60% 以上,这是因为在酶催化下异养硝化过程会产生酸,所以适宜的温度和偏中性的弱碱环境有利于硝化反应的正向发生,提高脱氮速率,而 Y-4 在 pH 值为 8.0 时的脱氮性能最优,这与谭俊杰等^[32]和邵勇等^[33]的研究结果一致。

盐浓度直接影响细胞渗透压和通透性,是物质交换的限制条件。当废水中的盐浓度大于 1% (W/V) 时,即可被认为是高盐废水,在此条件下生物脱氮效率低下^[34]。适宜的盐浓度不会引起细胞质壁分离、脱水,以及细菌的生长缓慢或死亡,反之,过高的盐浓度则会致使其氨氮降解能力减弱^[35]。本研究筛选得到的毕赤酵母菌株 Y-4 可耐受 60 g/L 的盐浓度,在 30 g/L 盐浓度下的脱氮效果最优,因此可应用于高盐浓度的氨氮废水处理。

研究表明,菌株在脱氮过程中,不同的 C/N 会影响菌株生长,因此探究最佳 C/N 有利于提高菌株的脱氮效率^[36]。碳源是菌株生长过程中的主要限制因素,在硝化或反硝化过程中起电子供体的作用,同时

参与细胞物质的合成,有机碳源质量浓度越高,脱氮速率就越快^[37]。多数异养硝化细菌以柠檬酸盐^[38-40]或者琥珀酸钠^[41,42]为最佳碳源,最适 C/N 为 10—20^[43,44]。本研究通过改变葡萄糖的浓度来改变 C/N,结果表明在 C/N 为 30—40 时,菌株 Y-4 脱氮效果最优,而多数异氧硝化反硝化菌的最适 C/N 为 10—20^[34],与细菌相比,菌株 Y-4 的适宜 C/N 较高,这表明菌株 Y-4 可以应用于高碳废水处理;在 C/N 为 5—20 时,菌株 Y-4 的氨氮降解率仍有 50%—80%,可见菌株 Y-4 具有良好的生存能力,能够在低营养的环境中生存,具有较大的竞争优势。

一般认为反硝化的发生仅限于细菌(原核生物),但也有研究证明许多真菌(真核生物)表现出不同的反硝化活性。前人研究表明,真菌反硝化系统由含铜亚硝酸盐还原酶(NirK)和细胞色素 P450 一氧化氮(NO)还原酶(Nor),即 P450nor 组成,将亚硝酸盐还原为 N₂O^[45,46]。本研究中,菌株 Y-4 在初始亚硝酸盐浓度为 200 mg/L、好氧反硝化 24 h 后,亚硝酸氮降解率为 80.50%,到 60 h 时亚硝酸氮降解率可接近 100%。

此外,与细菌相较之下,真菌产生的降解酶来源丰富并且能够承受恶劣条件,特别是波动的污染物负荷^[47]。菌株 Y-4 具有耐高 NH₄⁺-N 浓度、高盐浓度和高 C/N 的特点,可用于榨菜等食品加工厂废水、海水养殖业废水等的处理。同时,菌株 Y-4 为毕赤酵母,既可以治理污水还可以利用其生产单细胞蛋白产生收益^[48],在降低治理成本的同时也可以带来经济收益,这也为微生物废水脱氮提供了一些新的选择与思路。

4 结论

毕赤酵母菌株 Y-4 通过异养硝化以及好氧反硝化作用具有一定的脱氮性能。在以氯化铵和亚硝酸钠作为唯一氮源时,Y-4 对 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 的最高降解率分别达到 99.92% 和 80.50%,24 h 内降解速率最大分别为 6.25 和 6.71 mg/(L·h),且可耐受 1 000 mg/L 的 NH₄⁺-N 浓度,在废水氮污染处理以及生物修复方面具有一定的应用潜力。

参考文献

[1] 李一依,赵勇娇,刘芳,等. 马赛菌属 *Massilia neuiana* 异养硝化-好氧反硝化脱氮特征实验[J]. 环境工程, 2020,38(10):103-107.

[2] 杜全能,朱文娟,兰时乐. 一株异养硝化-好氧反硝化皱褶念珠菌(*Diutina rugosa*)的分离及脱氮特性[J]. 生物技术通报,2020,36(1):60-65.

[3] GUPTA V K, ALI I, SALEH T A, et al. Chemical treatment technologies for waste-water recycling: an overview [J]. RSC Advances, 2012, 2(16): 6380-6388.

[4] CRUZ H, LAW Y Y, GUEST J S, et al. Mainstream ammonium recovery to advance sustainable urban wastewater management [J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(19): 11066-11079.

[5] 马英,钱鲁闽,王永胜,等. 硝化细菌分子生态学研究进展[J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 872-879.

[6] XIE F X, THIRI M, WANG H. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel isolated *Pseudomonas mendocina* X49 [J]. Bioresource Technology, 2021, 319: 124198.

[7] 陈均利,彭英湘,罗沛,等. 异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮特性及其对猪场废水处理的研究[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(3): 295-299, 303.

[8] CHEN S N, LI S L, HUANG T L, et al. Nitrate reduction by *Paracoccus thiophilus* strain LSL 251 under aerobic condition: performance and intracellular central carbon flux pathways [J]. Bioresource Technology, 2020, 308: 123301.

[9] HUANG F, PAN L Q, LV 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.

[10] XI H P, ZHOU X T, ARSLAN M, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification process: promising but a long way to go in the wastewater treatment [J]. Science of the Total Environment, 2022, 805: 150212.

[11] 邹平,李传宽,徐志强,等. 一株反硝化真菌的分离鉴定及其对生物塔脱氮效率的影响[J]. 湖南大学学报(自然科学版), 2017, 44(6): 142-150.

[12] 杨晓华. 一株异养硝化好氧反硝化真菌的筛选及特性研究[D]. 太原:太原理工大学, 2012.

[13] FANG J K, LIAO S A, ZHANG S S, et al. Characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification yeast, *Barnettozyma californica* K1 [J]. Bioresource Technology, 2021, 339: 125665.

[14] 赵中艳. 一株青霉菌异养硝化和好氧反硝化特性的研究[J]. 水资源保护, 2008, 24(2): 73-75.

[15] CHENG H Y, XU A A, AWASTHI M K, et al. Aerobic denitrification performance and nitrate removal

- pathway analysis of a novel fungus *Fusarium solani* RADF-77 [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 295: 122250.
- [16] ZHANG H H, ZHAO Z F, KANG P L, et al. Biological nitrogen removal and metabolic characteristics of a novel aerobic denitrifying fungus *Hanseniaspora uvarum* strain KPL108 [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 267: 569-577.
- [17] GIOVANELLA P, VIEIRA G A L, RAMOS OTERO I V, et al. Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 382: 121024.
- [18] 李平, 张山, 郑永良, 等. 反硝化真菌-细菌优化组合及其脱氮能力研究[J]. *环境科学与技术*, 2006(3): 9-10, 45, 115.
- [19] 樊笑, 胡子涵, 刘国, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌的分离及脱氮特性[J]. *环境科学与技术*, 2022, 45(11): 1-9.
- [20] 李清扬. CRISPR 系统对大肠杆菌 I 类整合子的敲除、抑制及基因重组工具的开发[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [21] 张利华. 热带假丝酵母生产萜类天然产物的系统代谢工程[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [22] 吴宁安, 王瑞瑞, 刘金利, 等. 靛酚蓝分光光度法测定高浓度氨氮的低吸光度反常分析[J]. *中国有色冶金*, 2022, 51(6): 54-59, 102.
- [23] 国家环境保护总局, 《水和废水监测分析方法》编委会. 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.
- [24] 胡丹, 何富强, 杜全能, 等. 1 株异养硝化-好氧反硝化神户肠杆菌的鉴定及脱氮特性[J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(10): 70-74.
- [25] 安健, 宋增福, 杨先乐, 等. 好氧反硝化细菌 YX-6 特性及鉴定分析[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(3): 561-569.
- [26] 魏巍, 黄廷林, 苏俊峰, 等. 1 株贫营养好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. *生态环境学报*, 2010, 19(9): 2166-2171.
- [27] ZHANG J B, WU P X, HAO B, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001 [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(21): 9866-9869.
- [28] 魏渤惠, 罗晓, 吕鹏翼, 等. 高效异养硝化-好氧反硝化菌 *Glutamicibacter* sp. WS1 低温下对多种氮源的脱氮特性及氮代谢机制[J]. *环境科学*, 2023, 44(9): 5006-5016.
- [29] 胡锦涛, 肖春桥, 邓祥意, 等. 稀土浸矿场地土壤异养硝化-好氧反硝化菌株 K3 的分离及脱氮研究[J]. *稀土*, 2021, 42(5): 1-12.
- [30] 杨洋, 左剑恶, 沈平, 等. 温度、pH 值和有机物对厌氧氨氧化污泥活性的影响[J]. *环境科学*, 2006, 27(4): 691-695.
- [31] 李兵, 林炜铁. 1 株好氧反硝化芽孢杆菌的脱氮特性研究[J]. *水生态学杂志*, 2009, 2(3): 48-52.
- [32] 谭俊杰, 李立君, 李雪洁, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌株 GNR 选育及对猪场废水脱氮实验[J]. *环境工程*, 2021, 39(2): 21-26.
- [33] 邵勇, 邓敬轩, 任洪艳, 等. 一株 *Agrobacterium* sp. 异养硝化菌的分离鉴定及其氨氧化性能[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(2): 325-331.
- [34] GUO Y, ZHOU X M, LI Y G, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Halomonas campisalis* [J]. *Biotechnology Letters*, 2013, 35(12): 2045-2049.
- [35] 陈应运. 铁基修饰菌丝球构建耐盐好氧颗粒污泥及抗逆特性研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2021.
- [36] FABBRICINO M, PETTA L. Drinking water denitrification in membrane bioreactor/membrane contactor systems [J]. *Desalination*, 2007, 210(1/3): 163-174.
- [37] ROBERTSON L A, KUENEN J G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium [J]. *Journal of General Microbiology*, 1983, 129(9): 2847-2855.
- [38] 刘淳, 李永红, 刘颖颖, 等. 1 株高效异养硝化细菌的分离鉴定及硝化特性[J]. *环境科学与技术*, 2019, 42(3): 152-157.
- [39] 刘丽珂. 异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及其脱氮性能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [40] 顾鑫. 碳氮比对 *Acinetobacter junii* ZHG-1 异养硝化好氧反硝化性能的影响机制研究[D]. 西安: 长安大学, 2022.
- [41] 汪旭晖, 杨垒, 任勇翔, 等. 异养硝化细菌 *Pseudomonas putida* YH 的脱氮特性及降解动力学[J]. *环境科学*, 2019, 40(4): 1892-1899.
- [42] 张宇红, 董先博, 刘香宇, 等. 新型异养硝化-好氧反硝化菌 *Paracoccus* sp. QD-19 的分离及脱氮特性研究[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(3): 301-310.
- [43] 胡丹. 一株异养硝化-好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮特性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- [44] 陈均利, 张苗苗, 张树楠, 等. *Alcaligenes faecalis* WT14 的异养硝化-好氧反硝化特性及对高氨废水处理潜力[J]. *环境工程*, 2021, 39(2): 27-32, 40.
- [45] DESLOOVER J, VLAEMINCK S E, CLAUWAERT P, et al. Strategies to mitigate N₂O emissions from biological nitrogen removal systems [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 474-482.

- [46] SHOUN H, FUSHINOBU S, JIANG L, et al. Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2012, 367(1593): 1186-1194.
- [47] ESPINOSA-ORTIZ E J, RENE E R, PAKSHIRAJAN K, et al. Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: applications and perspectives [J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 283: 553-571.
- [48] 骆杨庆, 吴增林, 李升福, 等. 响应面法优化玉米浸液蛋白提取工艺及单细胞蛋白发酵的研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 231-237.

Isolation and Identification of a Denitrifying *Pichia* sp. Y-4 and Its Ammonia Nitrogen Degradation Performance

LEI Ke^{1,2}, CHI Yue^{1,2}, MAO Junru^{1,2}, LU Bing^{1,2}, PAN Shiyu^{1,2}, LI Zhenchong³, WEI Yutuo^{1,2* * *}

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. Guangxi Microorganism and Enzyme Research Center of Engineering Technology, Nanning, Guangxi, 530004, China; 3. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

Abstract: At present, ammonia nitrogen pollution in water resources is severe, and environmental governance is urgent. Screening efficient and safe denitrification strains can provide more choices for wastewater denitrification. Strains capable of degrading ammonia nitrogen were isolated and screened from biogas fermentation sludge in this study. The selected excellent strains were identified by 18S rDNA sequence analysis. At the same time, single factor and orthogonal experiments were used to explore the optimal nitrogen removal conditions [culture temperature, initial pH value, salt concentration, carbon-nitrogen ratio (C/N)] and the nitrification and denitrification capacity of the strain. The results showed that a wild-type strain of *Pichia* sp. Y-4 with strong denitrification ability was isolated and screened. After experimental optimization, the optimal denitrification conditions for strain Y-4 are temperature 25 °C, initial pH value 8.0, salt concentration (NaCl concentration) 30 g/L, and carbon-nitrogen ratio 30. After 24 h of culture, the degradation rate of nitrite nitrogen (NO_2^- -N) by strain Y-4 was 80.50%, and the degradation rate of ammonia nitrogen (NH_4^+ -N) by strain Y-4 was 99.92% after 48 h of culture. The heterotrophic nitrification and aerobic denitrification rates of strain Y-4 within 24 h reached 6.25 mg/(L·h) and 6.71 mg/(L·h), respectively, indicating that *Pichia* sp. Y-4 has certain application value and potential for wastewater nitrogen pollution treatment and bioremediation.

Key words: *Pichia* sp.; biological nitrogen removal; heterotrophic nitrification; aerobic denitrification; condition optimization

责任编辑: 梁 晓



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>