

# 不同碳源对反硝化细菌生长的影响

李建<sup>1</sup>, 潘康成<sup>2</sup>

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 四川农业大学, 四川雅安 625014)

[收稿日期] 2011-11-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2012) 06-0011-03 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 细菌的生长速度和碳源有非常密切的关系, 研究不同碳源对反硝化细菌生长的影响, 以找到适合用于扩大培养菌种的最佳碳源。分别采用葡萄糖、酒石酸钾钠、蔗糖、乙酸和乙醇 5 种碳源作为唯一碳源, 接种反硝化细菌进行对比实验, 采用活菌数来反映不同碳源对反硝化细菌生长的影响。结果显示, 葡萄糖促进反硝化细菌生长的作用明显优于其余 4 种碳源。对反硝化细菌进行扩大培养, 葡萄糖的效果是比较好的。

**[关键词]** 反硝化细菌; 碳源; 生长

## Effect on the Growth of Denitrifying Bacteria from Different Carbon Sources

LI Jian<sup>1</sup>, PAN Kang-cheng<sup>2</sup>

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014, China)

**Abstract:** The growth of bacteria was relative to carbon sources intimately. The experiment was designed to find the best carbon source in enlarging denitrifying bacteria by research into effect on the growth of denitrifying bacteria from different carbon sources. The 5 carbon sources including glucose, potassium sodium tartrate, cane sugar, acetic acid and ethanol were used as the only carbon source respectively taking denitrifying bacteria into liquid culture media in the contrast test. Live bacteria number was used to estimate effect on the growth of denitrifying bacteria from different carbon sources. The results made it clear that glucose could promote the growth of denitrifying bacteria more remarkably than the others. The results indicated that glucose was better than the others in enlarging denitrifying bacteria.

**Key words:** denitrifying bacteria; carbon sources; growth

人工反硝化细菌能有效去除硝酸盐<sup>[1]</sup>, 充足的碳源对固定化细菌的反硝化作用是必要的<sup>[2]</sup>, 碳源是影响脱氮的主要因素之一<sup>[3]</sup>。环境中碳源不能满足需要时, 就必须投入其他碳源, 以保证反硝化脱氮作用继续进行<sup>[4]</sup>。碳源一直是异养反硝化作用的研究重点<sup>[5]</sup>, 甲醇、乙酸等有机物可作为反硝化过程所需的外加碳源<sup>[6-8]</sup>。为寻找高效、经济的外加碳源, 探索反硝化细菌的发酵工艺, 本实验对葡萄糖、酒石酸钾钠、蔗糖、乙酸、乙醇等碳源对反硝化细菌生长的影响进行研究。

### 1 材料与方法

1.1 菌种 反硝化细菌 XF03 株(兼性厌氧)由四川农业大学动物医学院发酵工程实验室提供。

1.2 仪器 PYX-DHS 隔水式电热恒温培养箱、奥林巴斯光学显微镜、电子天平。

1.3 试剂 酒石酸钾钠、葡萄糖、蔗糖、乙醇、冰乙酸、KNO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、蒸馏水、液体石蜡、NaOH、NaCl。

#### 1.4 培养基

1.4.1 基础培养基 KNO<sub>3</sub> 2.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.41 g<sup>[9]</sup>, 酒石酸钾钠 20 g, 蒸馏水

作者简介: 李建, 实习研究员, 从事需氧菌类生物制品检测工作。E-mail: lijian@ivdc.gov.cn

1000 mL, pH 7.2, 115 °C 灭菌备用, 用于种子液培养; 在液体培养基中加 0.7% (W/V) 琼脂粉, 制成琼脂平板培养基, 用于活菌计数。

1.4.2 不同碳源培养基的制备 制备 5 种不同碳源培养基。以基础培养基中的碳、氮源浓度及 C/N 为参比, 其他物质不变, 计算出其他碳源添加量(表 1), 配制完毕, 灭菌保存备用。

表 1 5 种液体培养基中碳源添加量

|      | 酒石酸钾钠/<br>(g·L <sup>-1</sup> ) | 葡萄糖/<br>(g·L <sup>-1</sup> ) | 蔗糖/<br>(g·L <sup>-1</sup> ) | 乙醇<br>(95%) | 冰乙酸       |
|------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------|-----------|
| 添加量  | 20                             | 11.4                         | 10.9                        | 11.5 mL/L   | 10.9 mL/L |
| C 浓度 | 4.57                           | 4.56                         | 4.59                        | 4.56 g/L    | 4.58 g/L  |
| N 浓度 | 0.277                          | 0.277                        | 0.277                       | 0.277 g/L   | 0.277 g/L |

1.5 接种培养 取 XF03 株斜面菌种接种基础液体培养基, 用灭菌的液体石蜡覆盖其表层, 置于烛

缸中 35 °C 恒温培养 4 d 后, 进行活菌计数。然后取 1 mL 种子液分别接种 9 mL 上述 5 种不同的液体培养基, 用灭菌的液体石蜡覆盖其表层, 置于 35 °C 培养箱中, 培养 2、4、6 d 后进行活菌计数。

1.6 活菌计数 采用平板计数法, 进行活菌计数。取 1 mL 培养液加入 9 mL 基础液体培养基进行 10 倍系列稀释, 选择适当稀释度的菌液滴基础培养基琼脂平皿 3 个, 0.1 mL/个, 使菌液均匀散开, 置于烛缸中 35 °C 培养 4 d 后计数菌落, 计算活菌数。

1.7 数据统计 对活菌计数结果进行 *t* 检验。

## 2 结果与分析

2.1 5 种不同碳源对反硝化细菌生长的影响 5 种液体培养基培养的反硝化细菌活菌数如表 2 所示。

表 2 5 种液体培养基培养的反硝化细菌 XF03 株活菌数

| 菌液    |               | 培养时间              |                   |                   |                   | CFU/mL |
|-------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
|       |               | 0 d               | 2 d               | 4 d               | 6 d               |        |
| 葡萄糖   | 平均值 $\bar{x}$ | $7.0 \times 10^6$ | $1.2 \times 10^8$ | $9.4 \times 10^8$ | $1.5 \times 10^9$ |        |
|       | 标准差 <i>s</i>  | $4.9 \times 10^6$ | $7.8 \times 10^7$ | $2.3 \times 10^8$ | $8.2 \times 10^7$ |        |
| 酒石酸钾钠 | 平均值 $\bar{x}$ | $7.0 \times 10^6$ | $1.1 \times 10^8$ | $2.3 \times 10^8$ | $2.8 \times 10^8$ |        |
|       | 标准差 <i>s</i>  | $4.9 \times 10^6$ | $3.4 \times 10^7$ | $5.6 \times 10^7$ | $1.1 \times 10^8$ |        |
| 蔗糖    | 平均值 $\bar{x}$ | $7.0 \times 10^6$ | $3.3 \times 10^7$ | $5.7 \times 10^7$ | $1.2 \times 10^8$ |        |
|       | 标准差 <i>s</i>  | $4.9 \times 10^6$ | $5.8 \times 10^7$ | $3.5 \times 10^7$ | $6.6 \times 10^7$ |        |
| 乙酸    | 平均值 $\bar{x}$ | $7.0 \times 10^6$ | $1.3 \times 10^7$ | $2.7 \times 10^7$ | $9.2 \times 10^7$ |        |
|       | 标准差 <i>s</i>  | $4.9 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^7$ | $1.4 \times 10^7$ | $4.5 \times 10^7$ |        |
| 乙醇    | 平均值 $\bar{x}$ | $7.0 \times 10^6$ | $2.8 \times 10^7$ | $3.8 \times 10^7$ | $6.1 \times 10^7$ |        |
|       | 标准差 <i>s</i>  | $4.9 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^7$ | $5.8 \times 10^6$ | $3.7 \times 10^7$ |        |

注: “葡萄糖”、“酒石酸钾钠”、“蔗糖”、“乙酸”、“乙醇”分别代表以上物质作为唯一碳源的液体培养基培养的菌液。

## 2.2 结果分析

2.2.1 培养时间对细菌增殖的影响 含葡萄糖的菌液中, 活菌数在 0、2、4、6 d 的比值为 1:1.6:133.7:215.5。含酒石酸钾钠的菌液中, 活菌数在 0、2、4、6 d 的比值为 1:15.4:33.1:40。含蔗糖的菌液中, 活菌数在 0、2、4、6 d 的比值为 1:4.8:8.1:16.4。含乙酸的菌液中, 活菌数在 0、2、4、6 d 的比值为 1:1.9:3.8:13.1。含乙醇的菌液中, 活菌数在 0、2、4、6 d 的比值为 1:4.1:5.5:8.7。0~6 d 细菌生长速度顺序为: 葡萄糖>酒石酸钾钠>蔗糖>乙醇(或乙酸)(此处以碳源代表含此碳源的菌液, 下同)。在 5 种液体培养基中, 细菌在 0~4 d 培养时间越长, 活菌数越高, 活菌减少最早可能发生于 4 d 后, 因此在相同条件下进行菌种增殖, 培养时间不宜少于 4 d。

2.2.2 不同碳源对细菌生长的影响 接种后 2 d, 活菌数顺序为: 葡萄糖>酒石酸钾钠>蔗糖>乙醇>乙酸, 其比值为 4.1:3.8:1.2:1:0.5。对有关数据进行 *t* 检验表明, 葡萄糖与乙醇、葡萄糖与乙酸、酒石酸钾钠与乙醇、酒石酸钾钠与乙酸活菌数差异显著; 其余的菌液活菌数彼此之间差异不显著。如果增殖培养 2 d, 添加葡萄糖或酒石酸钾钠效果较好。

接种后 4 d, 活菌数顺序为: 葡萄糖>酒石酸钾钠>蔗糖>乙醇>乙酸, 其比值为 24.3:6.0:1.5:1:0.7。对有关数据进行 *t* 检验表明, 葡萄糖与乙酸、葡萄糖与酒石酸钾钠、葡萄糖与蔗糖、葡萄糖与乙醇、酒石酸钾钠与乙醇、酒石酸钾钠与乙酸活菌数差异极显著; 酒石酸钾钠与蔗糖活菌数差异显著; 其余的菌液活菌数彼此差异不显著。如果增殖

培养 4 d, 添加葡萄糖效果最好, 添加酒石酸钾钠效果稍差一些。

接种后 6 d, 活菌数顺序为: 葡萄糖 > 酒石酸钾钠 > 蔗糖 > 乙酸 > 乙醇, 其比值为 24.4 : 4.6 : 1.9 : 1.5 : 1。对有关数据进行 *t* 检验表明, 葡萄糖与乙酸、葡萄糖与酒石酸钾钠、葡萄糖与蔗糖、葡萄糖与乙醇活菌数差异极显著; 酒石酸钾钠与乙醇活菌数差异显著; 其余的菌液细菌浓度彼此差异不显著。如果增殖培养 6 d, 添加葡萄糖效果较好。

综上所述, 在 35 ℃、pH 7.2、C/N = 19 的条件下, 葡萄糖作为碳源对反硝化细菌 XF03 株生长的促进作用明显优于其余 4 种碳源。

### 3 讨论和结论

本实验研究表明相对于酒石酸钾钠、蔗糖、乙醇和乙酸, 在 C 浓度相同的情况下, 葡萄糖作为唯一碳源更有利于反硝化细菌 XF03 株的增殖, 能获得较多的活菌。

反硝化实质上是氮的还原<sup>[10]</sup>, 可以碳源作为电子供体<sup>[11]</sup>。电子供体为单一碳源有机物时,  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  的降解速率受  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度和碳源有机物浓度的双重影响<sup>[12]</sup>。反硝化细菌利用不同碳源, 通过不同的呼吸途径, 产生的能量不同, 细胞的产率也不同<sup>[13]</sup>。有机物质转化成细胞的百分率越大, 对其需求量越小<sup>[14]</sup>。反硝化细菌的细胞产率与碳源性质间的关系非常密切<sup>[15]</sup>。

需氧反硝化细菌可在有氧的条件下进行反硝化, 菌种扩大培养相对容易。厌氧反硝化细菌可在厌氧的条件下进行反硝化, 反硝化的效率较高, 一般为自养型, 可在无外源有机物的情况下完成增殖。兼性厌氧菌对溶解  $\text{O}_2$  的浓度没有严格要求, 适用范围更广, 能在偏酸性环境中生长, 适于治理大面积水体 N 污染。

利用葡萄糖、酒石酸钾钠、蔗糖、乙酸和乙醇分别作为唯一碳源对比研究其对反硝化细菌增殖的影响, 以找到适用于反硝化细菌增殖的最佳碳源。反硝化细菌 XF03 株以葡萄糖作为碳源进行菌种扩大培养和生物脱氮, 具有较高的性价比和在生产中运用的现实性。

本实验通过活菌计数结果来反映不同碳源对

反硝化细菌生长的影响, 在细菌进入衰退期之前, 菌液中的活菌数可有效地反映细菌的生长状况, 活菌数越多, 表明碳源越易被分解利用, 细菌生长越迅速, 碳源对该菌株增殖的促进作用越好, 而且在实际应用中活菌数也是评价细菌生长状况及其应用价值的一个重要指标。反硝化细菌 XF03 株作为兼性厌氧菌, 比较适合用于  $\text{NO}_3^-$  污染的富营养化水体的生物脱氮。

### 参考文献:

- [1] 姜桂华, 徐凌云. 包气带人工微生物反硝化除氮实验研究[J]. 长春地质学院学报, 1997, 27(4): 423-439.
- [2] 谭佑铭, 罗启芳. 固定化反硝化菌去除水中硝酸盐氮的研究[J]. 环境与健康杂志, 2001, 18(6): 373.
- [3] 谭佑铭, 罗启芳, 王琳, 等. 固定化反硝化菌对富营养化水体脱氮的试验研究[J]. 中国卫生工程学, 2003, 2(2): 65.
- [4] 姜桂华. 碳源对人工微生物脱氮的影响研究[J]. 水资源保护, 2001, 1: 29.
- [5] 谭佑铭, 罗启芳. 不同碳源对固定化反硝化菌脱氮的影响[J]. 卫生研究, 2003, 3(22): 95.
- [6] 谭佑铭, 罗启芳. 上流式厌氧污泥床去除饮用水中硝酸盐氮的研究[J]. 卫生研究, 2002, 31(1): 19-21.
- [7] Louis A S, Maja V V. Five years of nitrate removal, denitrification and carbon dynamics in a denitrification wall[J]. Wat Res, 2001, 35(14): 3473-3477.
- [8] Sara H, Mikael P. Metabolic properties of denitrifying bacteria adapting to methanol and ethanol in activated sludge[J]. Wat Res, 1998, 32(1): 13-18.
- [9] 李树刚, 马光庭. 生物脱氮菌种筛选及条件选择的研究[J]. 广西大学学报(自然科学版), 2003, 28(2): 173.
- [10] Bruce E Rittmann, Perry L McCarty. Environmental Biotechnology[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004.
- [11] 伦世仪. 环境生物工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [12] 周少奇. 环境生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [13] 王毓仁. 提高废水生物反硝化效果的理论和实践[J]. 石油化工环境保护, 1995, 2: 1-7.
- [14] 格雷斯利. 废水生物处理理论与应用[M]. 李献文, 译. 北京: 中国建筑工业出版社, 1989.
- [15] 王丽丽, 赵林, 谭欣, 等. 不同碳源及其碳氮比对反硝化过程的影响[J]. 环境保护科学, 2004, 1: 15.