



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202108077

中图分类号 X703.1

文献标识码 A

刘步蟾, 罗剑飞, 黄燊曦, 等. 重金属和抗生素胁迫对亚硝酸盐氧化菌及硝化菌群活性的影响[J]. 环境工程学报, 2021, 15(11): 3686-3695.

LIU Buchan, LUO Jianfei, HUANG Shenxi, et al. Effects of heavy metal and antibiotic stresses on the activity of nitrite-oxidizing bacteria and nitrifying bacteria flora[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(11): 3686-3695.

重金属和抗生素胁迫对亚硝酸盐氧化菌及硝化菌群活性的影响

刘步蟾, 罗剑飞, 黄燊曦, 尹昊, 孙秋云, 林炜铁✉

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

第一作者: 刘步蟾(1995—), 男, 硕士研究生。研究方向: 环境微生物学。E-mail: 2057536169@qq.com

✉通信作者: 林炜铁(1964—), 男, 博士, 教授。研究方向: 环境微生物等。E-mail: lfwtlin@scut.edu.cn

摘要 重金属和抗生素广泛存在工业废水、养殖水体中, 对硝化细菌活性有不同程度的影响。为研究重金属和抗生素胁迫对亚硝酸盐氧化菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)及硝化菌群活性的影响, 采集珠江水样富集硝化菌群并分离纯化NOB, 研究了不同浓度重金属离子(Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cr^{6+})和抗生素(卡那霉素、氨苄青霉素、链霉素、盐酸四环素)对NOB亚硝酸盐氧化活性的影响, 揭示了不同重金属和抗生素胁迫对NOB及硝化菌群富集物活性的影响。结果表明: 第15代富集培养的硝化菌群中*Nitrosomonas*丰度由0.11%升高至10.04%, *Nitrobacter*丰度由0.014%上升到2.104%; 经鉴定, 分离纯化的NOB菌株与*Nitrobacter winogradskyi*相似性为99.58%; NOB的亚硝酸盐氧化活性随重金属离子、抗生素浓度升高而下降; 在初始NOB量相等情况下, 与NOB组相比, 硝化菌群富集物实验组在重金属或抗生素胁迫下, 亚硝酸盐氧化速率更快, 稳定性更高, 对重金属和抗生素的抗逆性更强, 对于处理含氮废水的实际应用潜力更大。该研究结果可为NOB的研究和在工业、养殖业水体净化的开发应用提供参考。

关键词 亚硝酸盐氧化细菌; 硝化菌群; 重金属; 抗生素

亚硝酸盐氧化菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)在生物硝化反应中驱动 $\text{NO}_2\text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的过程, 对于工业、养殖业水体净化修复至关重要。NOB严格好氧, 是一类以 CO_2 为唯一碳源、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 为能源的自养细菌, 生长代时普遍在10 h以上^[1], 生长率低, 对环境因素极为敏感, 这些特点限制了NOB菌株的分离纯化和机理研究^[2]。随着工农业废水中重金属和抗生素累积的问题日益突出, 过高的重金属、抗生素影响微生物群落结构和代谢功能, 进而影响生态系统的净化修复特别是硝化细菌生物脱氮能力, 故有必要对其进行进一步探讨。

由于NOB分离和纯培养较为困难, 目前其菌种资源并不多, 国内外研究多集中于以硝化活性污泥为材料的资源开发及其种群生态分布的研究上, 且大多为基于氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)的研究。王勤^[3]的研究表明, 在生物脱氮系统中, 应控制重金属 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 的质量浓度分别不高于0.5、30、0.5、5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; TIAN等^[4]的研究表明, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的链霉素可

收稿日期: 2021-08-13; 录用日期: 2021-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41977034)

以完全抑制生物膜废水处理系统中的硝化反应; KATIPOGLU 等^[5]的研究表明, 对活性污泥系统连续供给 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸四环素, 硝化细菌活性丧失, NOB 在系统中相对丰度降低了 10 倍。在实际应用上, NOB 菌株世代时间长、数量少、对环境敏感, 导致硝化效果欠佳, 对比探究 NOB 和硝化菌群在环境胁迫下的活性变化对废水脱氮应用有一定理论意义, 而基于不同重金属、抗生素胁迫下比较 NOB 和硝化菌群脱 $\text{NO}_2\text{-N}$ 效果的研究尚未见报道。

本研究采集珠江水样富集硝化菌群, 并分离纯化一株 NOB, 考察了不同浓度重金属离子和抗生素对菌株亚硝酸盐氧化能力的影响, 探究了菌株在环境胁迫下的一般规律, 再对比 NOB 和硝化菌群富集物(初始 NOB 数量相等情况下)在不同种重金属和抗生素胁迫下的亚硝酸盐氧化活性的变化, 以期为 NOB 的研究及其在工业、养殖业水体净化的实际应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂和仪器

所用化学试剂均为分析纯; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (DP209, 北京天根生化科技有限公司); 零背景 pTOPO-TA 克隆载体试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司); TransStart® Tip Green qPCR SuperMix(AQ142-11, 北京全式金生物技术公司)。富集硝化菌群的水样取自珠江穗石码头。

紫外-可见光分光光度计 (UV-2800A, 上海尤尼柯仪器有限公司); 立式压力蒸汽灭菌锅 (GI80DP, 美国致微仪器有限公司); 振荡培养箱 (ZQLY-180G, 上海知楚仪器有限公司); pH 测量仪 (HQ40d, 美国 Hach 公司); 超微量紫外可见光分光光度计 (Nano Drop 1000, 美国 Thermo Fisher 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500, 美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 培养基

NOB 液体培养基: $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$, $0.485 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$, $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。以上成分高压蒸汽灭菌冷却后, 加入过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜除菌的 NaHCO_3 、 NaNO_2 、微量元素母液, 使其在培养基中的含量最终分别为 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、体积分数 1% 。在 NOB 液体培养基中加入质量分数为 1.6% 的琼脂。硝化菌群富集培养基: NOB 液体培养基中 NaNO_2 替换为等浓度 NH_4Cl 。微量元素母液^[6]: 10 mL 浓 HCl , $2.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.062 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$, $0.017 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.036 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.070 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZnCl}_2$, $0.190 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.024 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 。

1.3 实验方法

1) 硝化菌群的富集和 NOB 的分离纯化。将 10 mL 珠江穗石码头水样接入装有 90 mL 富集培养基的锥形瓶中, 在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养, 每隔 2 d 取样检测 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的含量, 初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 被 AOB 氧化为 $\text{NO}_2\text{-N}$, 接着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 被 NOB 氧化为 $\text{NO}_3\text{-N}$, 完成硝化过程。当硝化率达 90% 以上时, 以 10% 体积比接种到新鲜富集培养基继续培养, 以此获得稳定硝化菌群富集物, 提取富集物 DNA 送至金唯智生物公司高通量测序。将富集液稀释涂布于 NOB 固体培养基平板上, 在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱倒置培养 28 d 以上, 挑取 NOB 单菌落至液体培养基进一步纯化, 通过光学显微镜、扫描电镜观察 NOB 形态。

2) NOB 的鉴定。以 NOB 菌液作为模板, 用细菌 16S rDNA 通用引物^[7]27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR。PCR 反应体系 ($25 \mu\text{L}$): $2 \mu\text{L}$ NOB 菌液, 27F 和 1492R($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $0.5 \mu\text{L}$, $12.5 \mu\text{L}$ $2 \times$ Master Mix, $9.5 \mu\text{L}$ ddH₂O。PCR 反应条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min ; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 90 s , 35 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min 。使用胶回收试剂盒回收纯化 16S rDNA, 采用零背景 pTOPO-TA 克隆载体试剂盒进行 T-A 克隆, 经菌落 PCR 检测出阳性转化子并送至金唯智生物科技有限公司测序。将 16S rDNA 完整序列通过 BLAST 与 Genebank 数据库比对后, 选择相似度较高的序列, 用 MEGA 7.0 软件采用邻接法构建系统进化树并分析同源性。

3) 重金属、抗生素对 NOB 亚硝酸盐氧化活性的影响。将 NOB 种子液以 10% 体积比接种至液体培养基中(初始 $\text{NO}_2\text{-N}$ 为 $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)，添加不同重金属、抗生素设置单一变量，在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下振荡培养，每 12 h 取样检测 $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量。通过参考文献^[3-5,8]及预实验设定重金属实验组质量浓度梯度为 Cu^{2+} (0、1、5、10、20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、 Zn^{2+} (0、1、2、3、5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、 Cd^{2+} (0、1、5、10、20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、 Mn^{2+} (0、5、20、50、70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、 Cr^{6+} (0、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)；抗生素实验组质量浓度梯度为卡那霉素(0、1、5、10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、氨苄青霉素(0、1、2、3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、链霉素(0、1、3、5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、盐酸四环素(0、10、20、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

4) 重金属、抗生素胁迫对 NOB 及硝化菌群活性的影响。通过绝对定量 qPCR 检测 NOB 种子液和硝化菌群富集物中 NOB 的绝对数量(以 *nxrA* 基因拷贝数计)：*nxrA* 引物^[9]F1370F1(5'-CAGACCG ACGTGTGCGAAAG-3')和 F2843F2(5'-TCCACAAGGAACGGAAGGTC-3')。使用 *nxrA* 的胶回收产物作为标准品。采用改良 CTAB 法提取 DNA^[10]。绝对定量 qPCR 体系与程序参考 TransStart® Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒(全式金，北京)说明书。

选择一组合适的重金属离子、抗生素质量浓度(显著影响 NOB 氧化活性但不完全抑制活性，NOB 完全耗完底物时间为无添加组的 1.5 倍以上)，比较 NOB 初始接种量相等情况下 NOB 和硝化菌群富集物对重金属、抗生素单一因素胁迫的亚硝酸盐氧化响应。其中重金属组： $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 、 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 、 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 、 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$ 、 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cr}^{6+}$ ；抗生素组： $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素、 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素、 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素、 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸四环素。NOB 和硝化菌群富集物种子液接种量依据 qPCR 结果设定(见表 1)，使 NOB 和硝化菌群实验组中初始 NOB 数量相等；摇床条件设为 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，每 12 h 取样检测 $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量。

1.4 分析方法

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 采用靛酚蓝法测定^[11]； $\text{NO}_2\text{-N}$ 采用 N-(1-萘基)-乙二铵光度法测定^[11]； $\text{NO}_3\text{-N}$ 采用离子色谱法测定^[12]；pH 通过 pH 计(HQ40d，美国 Hach 公司)测量；NOB *nxrA* 质量浓度通过超微量紫外可见分光光度计(Nano Drop 1000，美国)测定，标准品拷贝数按照式(1)计算；NOB *nxrA* 基因绝对拷贝数量使用实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7500，美国)和 7500 Software v2.3 检测分析。

$$N = \frac{c}{660 \times 10^9 \cdot L} \times 6.02 \times 10^{23} \quad (1)$$

式中： c 为 NOB *nxrA* 质量浓度， $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ； L 为 *nxrA* 片段长度，320 bp。

2 结果与讨论

2.1 环境样与硝化菌群富集物高通量分析

在属水平统计珠江水环境样、富集物群落组成情况如图 1 所示。在富集培养过程中，AOB、NOB 以及 *Pseudomonas* 逐渐成为优势菌群。在 15 代硝化菌群富集培养中，*Pseudomonas* 由环境样 0.88% 增长到第 15 代的 72.18%，成为富集物的主要优势菌种之一；*Nitrosomonas* 丰度由 0.11% 升高至 10.04%；*Nitrobacter* 的丰度由 0.014% 上升到 2.10%；环境样中 *Nitrospira*、*Candidatus Nitrotoga*、*Nitrospina* 等属的 NOB 在第 15 代富集物中检测不到。有研究表明，*Nitrobacter* 的亚硝酸盐半饱和常数 (K_{m,NO_2}) 为 $40\sim 1380 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，*Nitrospira* 的亚硝酸盐半饱和常数为 $9\sim 27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，*Nitrospira* 具有更高 $\text{NO}_2\text{-N}$ 亲和力，生长速率低，适合在低浓度 $\text{NO}_2\text{-N}$ 下缓慢生长^[13-14]；*Nitrososphaera* 与 *Nitrosomonas* 同样具有这种关系。这解释了 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的选择压力下 *Nitrosomonas*

表 1 种子液 qPCR 结果及接种体积

种子液	<i>nxrA</i> 拷贝数/(拷贝 $\cdot\text{mL}^{-1}$)	接种量/%
NOB	$7.54 \times 10^6 \pm 5.82 \times 10^5$	2.000
硝化菌群富集物	$2.49 \times 10^6 \pm 4.16 \times 10^4$	6.056

和 *Nitrobacter* 分别成为优势 AOB、NOB 且丰度升高的现象。

2.2 NOB 的形态及分子生物学鉴定

NOB 的菌落形态和细胞形态如图 2 所示。培养 30 d, 长出来 NOB 菌落呈针尖大小, 色泽淡黄, 平实不透明, 边缘及表面光滑, 直径 0.2~0.3 mm, 直径随培养时间的延长而增大(图 2(a)和图 2(b)); 培养 45 d, 直径约 0.5 mm。结晶紫染色结果显示: NOB 为分散排列、无芽孢、两端钝圆的短杆状细菌, 细胞大小为 0.5~1.0 μm (图 2(c))。扫描电镜成像显示: NOB 呈杆状, 细胞表面完整、光滑(图 2(d))。

菌株 NOB1 的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库通过 BLAST 检索对比, 结果表明, NOB1 与 *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 模式菌株相似度最高, 达到 99.58%。基于 16S rDNA 序列构建系统发育树, 如图 3 所示, NOB1 与 *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 同源性最高, 且与各 *Nitrobacter* 处于同一聚类。

2.3 重金属、抗生素对 NOB 亚硝酸盐氧化活性的影响

1) 重金属对 NOB 亚硝酸盐氧化活性的影响。不同浓度的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cr^{6+} 对 NOB 亚硝酸盐氧化活性的影响情况如图 4 所示。可以看出, 在 5 种重金属组中, 亚硝酸盐氧化活性随重金属浓度的变化规律基本一致, 均随重金属离子浓度升高而其活性抑制作用增强。以 Cu^{2+} 组为例, Cu^{2+} 添加量为 $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时亚硝酸盐氧化速率最快, 在第 3 天基本消耗完底物, 脱 $\text{NO}_2\text{-N}$ 率达到 97.58%; 在 Cu^{2+} 添加量为 1、5、 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, 分别在第 4.5、6.5、8 天基本消耗完初始添加的 $\text{NO}_2\text{-N}$, 表明 NOB 亚硝酸盐氧化速率随 Cu^{2+} 浓度升高而降低;

Cu^{2+} 质量浓度为 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的亚硝酸盐氧化速率介于 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组之间, 其原因是 Cu^{2+} 添加量较高(根据 $K_{\text{sp}}(\text{Cu}(\text{OH})_2)=2.2\times 10^{-20}$ 计算出 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 开始沉淀 pH 为 5.92), 形成可见的 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀, 毒害性随之减小, 同样的现象亦存在于 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Zn^{2+} 实验组。从 5 种重金属离子对 NOB 亚硝酸盐氧化速率的影响来看, 对 NOB 亚硝酸盐氧化活性抑制作用为 $\text{Cr}^{6+}>\text{Zn}^{2+}>\text{Cu}^{2+}>\text{Cd}^{2+}>\text{Mn}^{2+}$ 。重金属对微生物的损害主要体现为破坏细胞膜、抑制生物大分子合成^[15]。有学者研究^[16-18]表明, 当添加 $\text{Cu}^{2+}\geq 30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Cd}^{2+}\geq 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Cr}^{6+}\geq 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对硝化脱氮过程有显著影响, 这些研究是以硝化活性污泥作为材料, 活性污泥可能通过沉淀、吸附或吸收重金属而降低毒性, 相比于单一菌株, 活性污泥可能对重金属胁迫有更好的抗性^[19], 所以这些研究中的结果略高

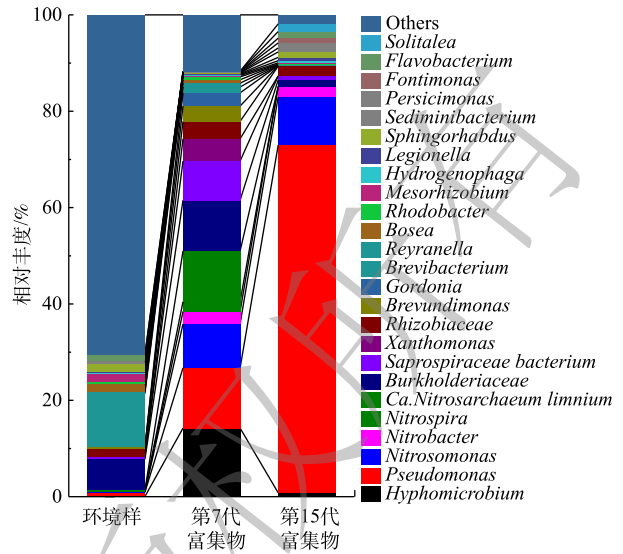


图 1 环境样和硝化菌群富集物的细菌群落丰度变化
Fig. 1 Bacterial abundance changes of environmental sample and nitrifying bacteria enrichment

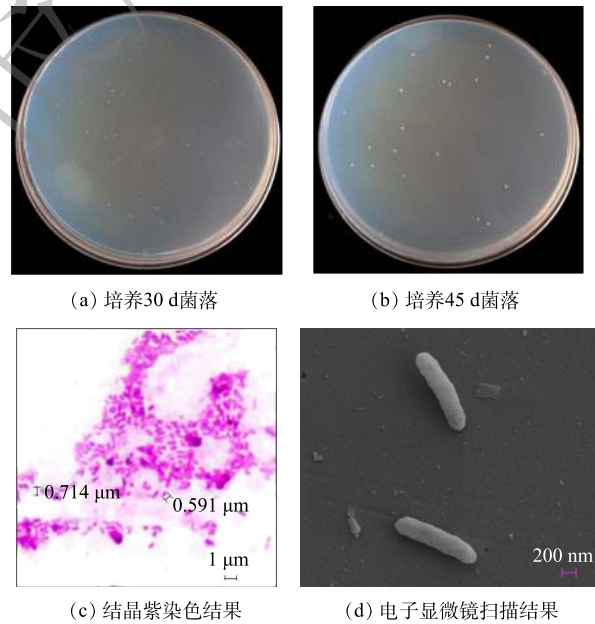


图 2 NOB 的菌落形态和细胞形态

Fig. 2 Colony and cell morphologies of NOB

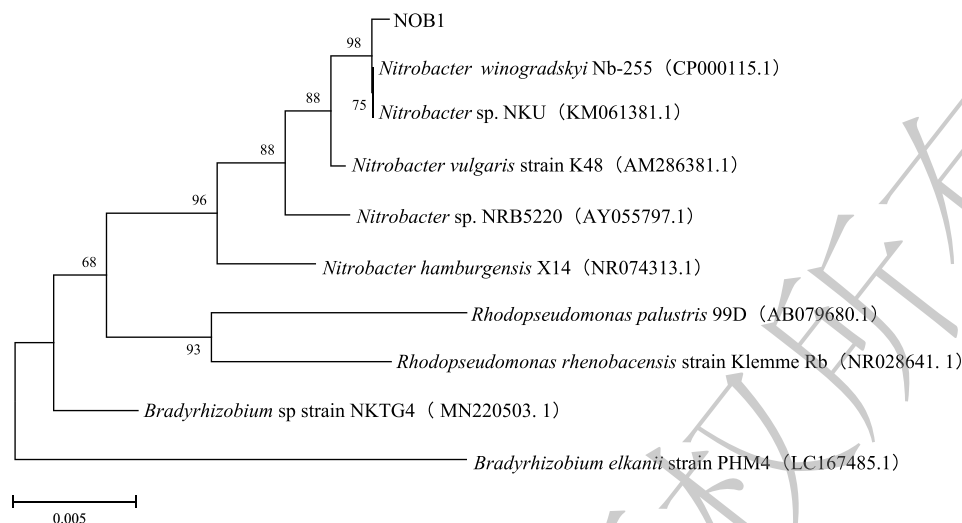


图 3 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

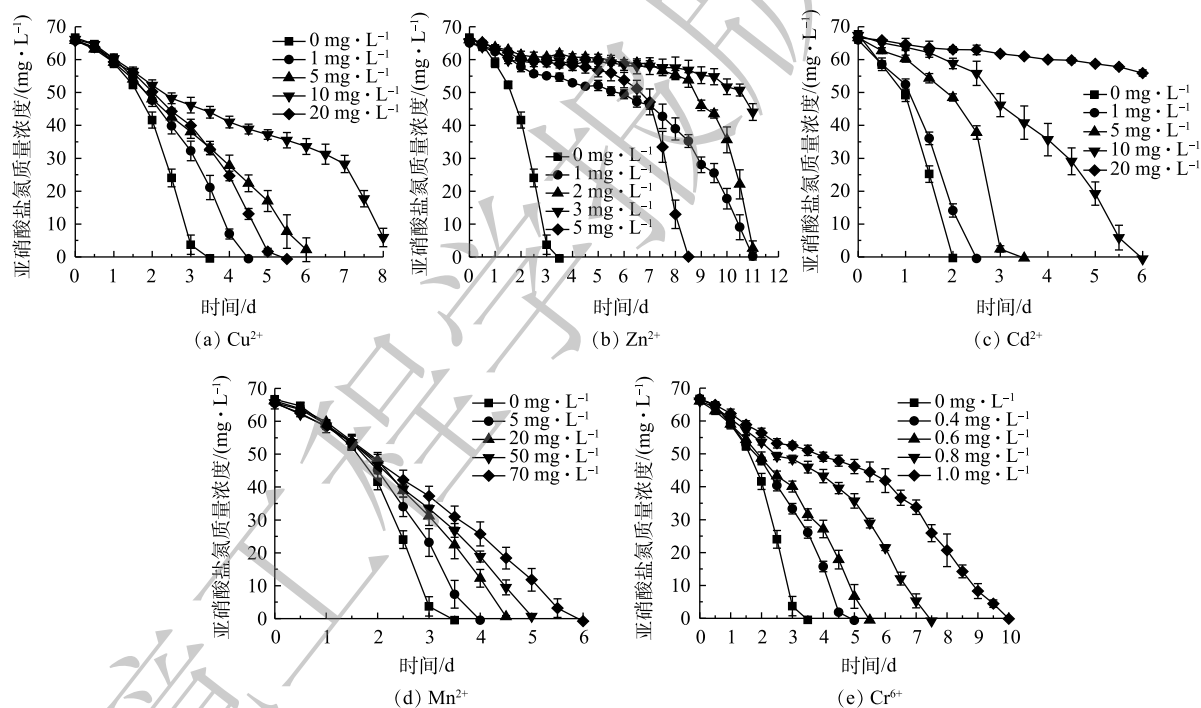


图 4 重金属对 NOB 亚硝酸盐氧化活性的影响

Fig. 4 Effects of heavy metals on nitrite oxidation activity of NOB

于本研究中的单一 NOB 菌株。

2) 抗生素对 NOB 亚硝酸盐氧化活性的影响。不同浓度卡那霉素、氨苄青霉素、链霉素、盐酸四环素对 NOB 亚硝酸盐氧化活性的影响如图 5 所示。可以看出, 除盐酸四环素外, 其他 3 种抗生素对 NOB 亚硝酸盐氧化活性起到显著的抑制作用。空白对照组在第 2.5 天氧化完 $\text{NO}_2\text{-N}$; 卡那霉素或氨苄青霉素 $\geq 1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, NOB 在培养前期表现较弱的亚硝酸盐氧化活性, 随着培养时间的延长, NOB 受抗生素毒害作用加深, 活性逐渐殆尽; NOB 对盐酸四环素的耐受性较强, 添加盐酸四环素 $\leq 10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 NOB 亚硝酸盐氧化活性几乎不受影响, 盐酸四环素为 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 NOB 活性略有降低, 在高达 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 盐酸四环素才对 NOB 表现出较明显的抑制效果, 但脱 $\text{NO}_2\text{-N}$ 率仍能

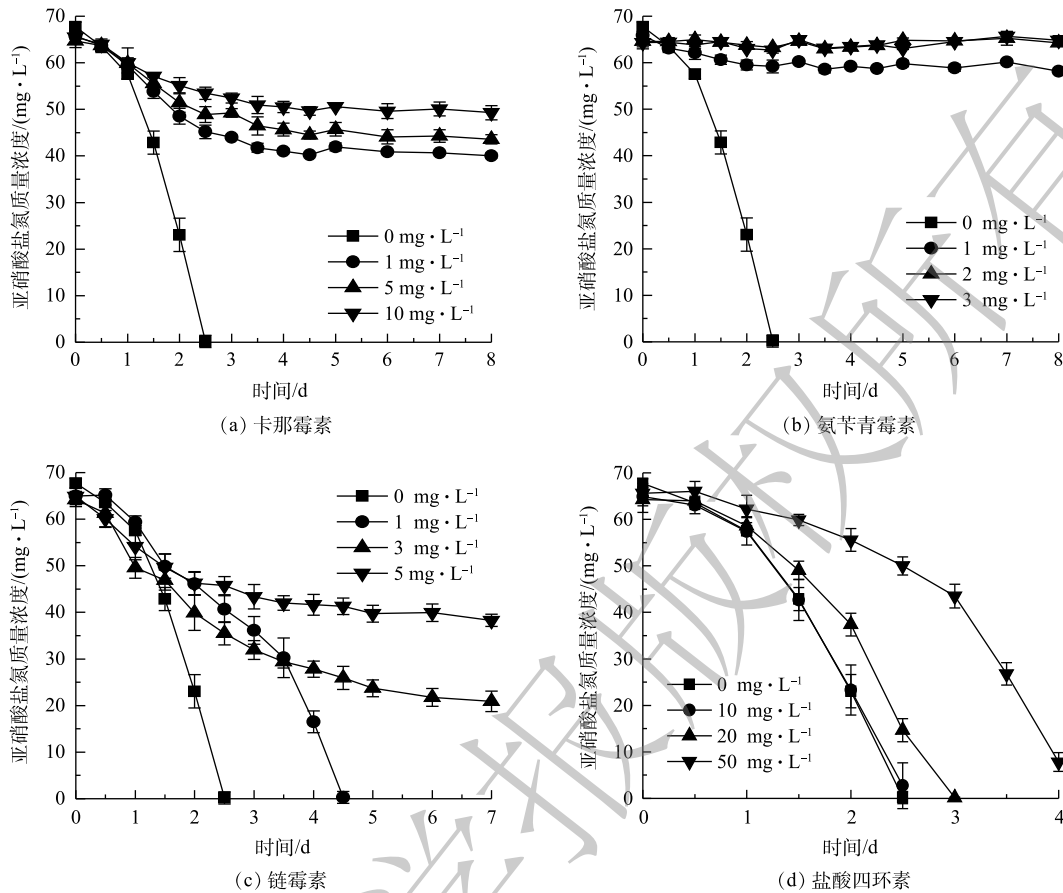


图 5 抗生素对 NOB 亚硝酸盐氧化活性的影响

Fig. 5 Effects of antibiotics on nitrite oxidation activity of NOB

在第 4 天达到 90.02%。以质量浓度 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 抗生素的脱 $\text{NO}_2\text{-N}$ 率为依据判断 4 种抗生素对 NOB 亚硝酸盐氧化速率的影响，对 NOB 亚硝酸盐氧化活性抑制作用强弱顺序为氨苄青霉素 > 卡那霉素 > 链霉素 > 盐酸四环素。

2.4 重金属和抗生素胁迫对 NOB 及硝化菌群活性的影响

1) NOB 和硝化菌群绝对定量。NOB 和硝化菌群富集物中 *nxrA* 绝对定量结果见表 1，可以看出 NOB 纯培养种子液中 NOB 的绝对拷贝数要高于硝化菌群富集物的，前者数量约为后者的 3 倍。为使两者初始接种 NOB 量相等，NOB 种子液和硝化菌群种子液的接种量分别为 2.000% 和 6.056%。

2) 重金属胁迫对 NOB 及硝化菌群活性的影响。重金属胁迫对 NOB 及硝化菌群活性的影响结果如图 6 所示。可以看出，在重金属离子胁迫作用下，硝化菌群富集物的亚硝酸盐氧化速率均高于 NOB 组。以 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 组为例，NOB 对照和实验组分别于第 3.5 和 5 天氧化完底物，硝化菌群对照和实验组的亚硝酸盐氧化速率更快，在第 2 天的脱 $\text{NO}_2\text{-N}$ 率分别达到 100% 和 90.08%。同时，值得注意的是，硝化菌群对照组和实验组的亚硝酸盐氧化速率几乎一致，而 NOB 对照组和实验组的亚硝酸盐氧化速率差异显著。这表明 NOB 组在 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 胁迫作用下活性受到显著影响，而硝化菌群组则几乎不受到 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 的抑制作用。同样的现象发生也在 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 和 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$ 实验组。由此可见，在初始 NOB 数量相等情况下，NOB 纯培养物在铜、锌、镉、锰、铬等重金属胁迫下的抗逆性和稳定性略显不足，而硝化菌群富集物亚硝酸盐氧化活性和稳定性更高，抗重金属胁迫能力更强，实际应用潜力更大。硝化菌群富集物中除了 NOB、AOB，还有丰富的微生物群落，其中 *Pseudomonas*、*Rhizobiaceae*、*Burkholderiaceae* 等占比较大，分别达到 72.18%、2.04%、

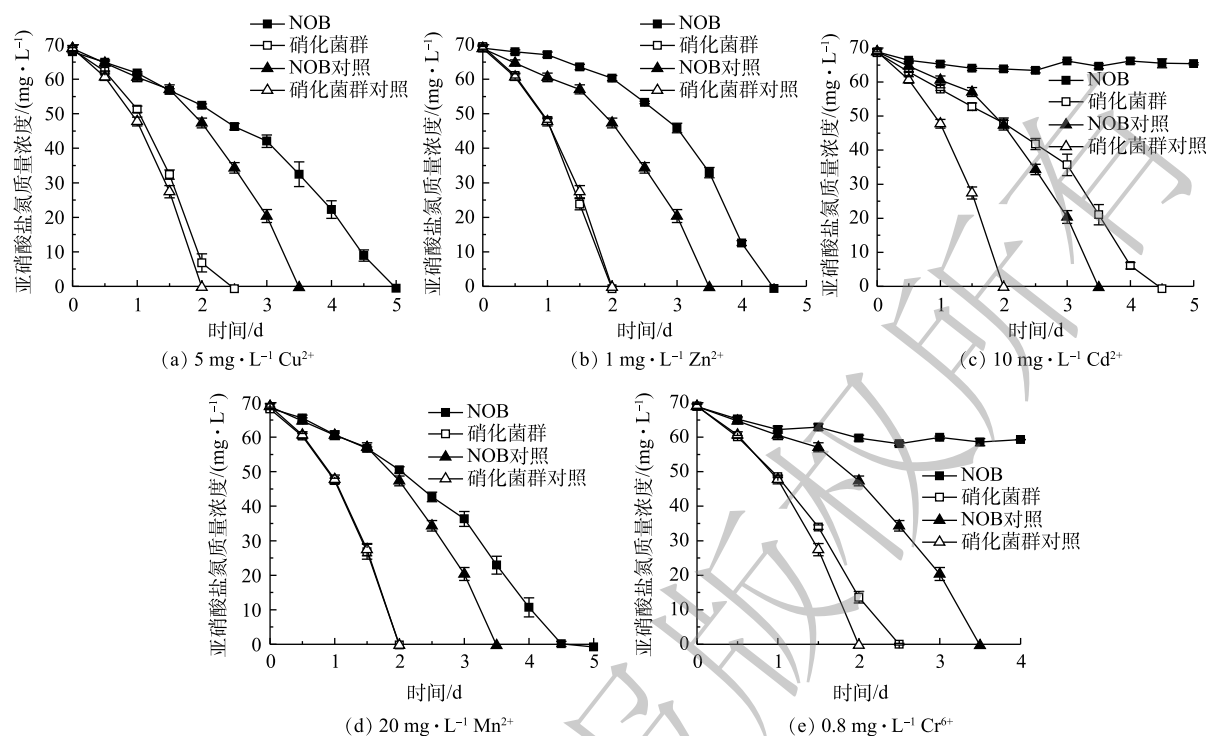


图6 重金属胁迫对NOB和硝化菌群活性的影响

Fig. 6 Effects of heavy metals stress on the activity of NOB and nitrifying bacteria flora

1.39%。有研究^[20-22]表明,这些微生物有较强分泌胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)能力。EPS上的羧基、羟基、磷酸基等阴离子基团是吸附 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 等重金属离子的主要位点^[23-24]。此外,有的微生物还有离子通道、重金属外排、氧化还原等复杂的胞内解毒机制,如 Cr^{6+} 可以竞争 SO_4^{2-} 转运蛋白结合位点,细菌相关蛋白表达水平升高从而解毒^[25]。这些研究结论与本研究观察到的硝化菌群富集物稳定性更高、亚硝酸盐氧化速率更快等现象一致。

3) 抗生素胁迫对NOB及硝化菌群活性的影响。4种抗生素胁迫对NOB及硝化菌群活性的影响结果如图7所示。对比NOB与硝化菌群富集物组可以看出,在不同抗生素胁迫下,后者的亚硝酸盐氧化速率均高于前者。以 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素组为例,在无添加卡那霉素的情况下,NOB和硝化菌群分别在第5、3.5天消耗完底物。NOB对抗生素敏感,在 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素胁迫下,NOB和硝化菌群组的亚硝酸盐氧化活性均受到显著抑制作用,培养前期氧化速率较缓慢,随着培养时间的延长受毒害作用加深,亚硝酸盐氧化活性逐步降低,第6天NOB和硝化菌群组的脱 $\text{NO}_2\text{-N}$ 率分别为24.60%和77.18%,在抗生素的抑制作用下,硝化菌群的亚硝酸盐氧化能力仍高于NOB。在硝化系统中,微生物主要通过外排泵、核糖体保护机制、以及破坏活性位点等方式抵抗抗生素;ZHANG等^[26]的研究表明,*Pseudomonas*、*Flavobacterium*和*Nocardiopsis*的菌群数量与抗生素抗性基因呈正相关。本研究的高通量测序结果(图1)表明,*Pseudomonas*和*Flavobacterium*在富集物菌群中占比为73.55%。这可能是硝化菌群富集物在抗生素胁迫下亚硝酸盐氧化活性、稳定性以及抗逆性都比NOB单一菌株更高的原因之一,说明硝化菌群在应对抗生素污染的环境问题具有更大的潜力。

同时,值得注意的是,在 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸四环素条件下,不管是NOB还是硝化菌群富集物,实验组都比对照组先消耗完底物,即 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸四环素在实验中在一定程度上促进亚硝酸盐氧化而非抑制作用,表明适量浓度的四环素可能对NOB的富集有帮助。宋超^[27]在NOB的活性受到

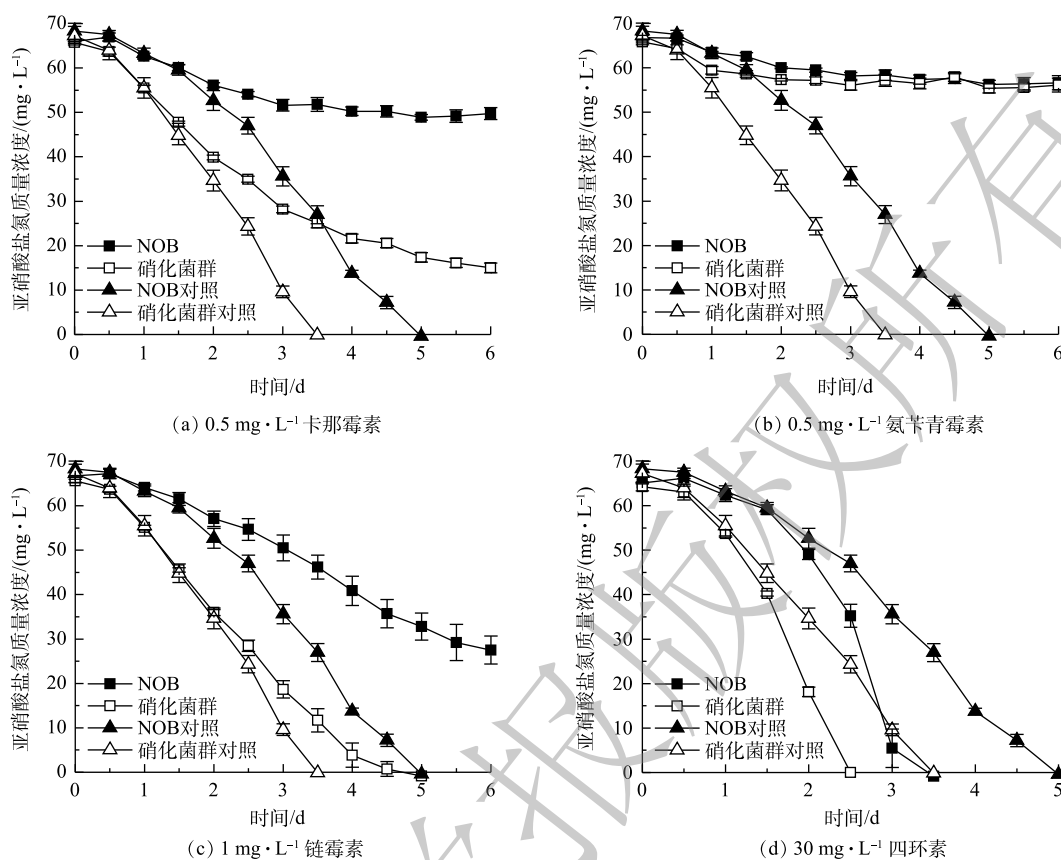


图 7 抗生素胁迫对 NOB 及硝化菌群活性的影响

Fig. 7 Effects of antibiotic stress on the activity of NOB and nitrifying bacteria flora

四环素抑制的结论基础上进一步研究发现，在硝化污泥中加入较高浓度的四环素，NOB 的数量比四环素浓度较低的组更多，硝化性能更好。其可能原因是：四环素刺激 EPS 的分泌，与 EPS 的—OH、C—O—C、C=O 和 C—N 等官能团作用，诱导硝化污泥形成结构紧密的聚合物，对部分优势菌种起到保护作用^[28-29]；四环素被 EPS 吸附并通过微生物缓慢降解而减弱毒性效应^[30]；且四环素本身易变质失效。

3 结论

1) 以珠江穗石码头水样富集硝化菌群并分离纯化一株 NOB 菌株，NOB 的亚硝酸盐氧化活性随重金属离子 (Cu²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺、Mn²⁺、Cr⁶⁺)、抗生素 (卡那霉素、氨苄青霉素、链霉素、盐酸四环素) 浓度升高而受到抑制效应增强。

2) 在初始 NOB 相等情况下，与 NOB 纯培养物相比，硝化菌群富集物在重金属或抗生素胁迫下的亚硝酸盐氧化速率更快，稳定性更高，对重金属和抗生素的抗逆性更强，对于处理含氮废水有更好的应用潜力。

参考文献

- [1] BOYABAT N, ÖZER A, BAYRAKÇEKEN S, et al. Comparison of oxidation kinetics of nitrite-oxidizing bacteria: Nitrite availability as a key factor in niche differentiation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(2): 745-753.
- [2] MEIKLEJOHN J. The Isolation of *Nitrosomonas europaea* in pure culture[J]. *Journal of General Microbiology*, 1950, 4(2): 185-191.
- [3] 王勤. 重金属对生物脱氮的毒性效应研究[D]. 广州: 广州大学, 2009.
- [4] TIAN Z, PALOMO A, ZHANG H, et al. Minimum influent

- concentrations of oxytetracycline, streptomycin and spiramycin in selecting antibiotic resistance in biofilm type wastewater treatment systems[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 720: 137531.
- [5] KATIPOGLU-YAZAN T, MERLIN C, PONS M N, et al. Chronic impact of tetracycline on nitrification kinetics and the activity of enriched nitrifying microbial culture[J]. *Water Research*, 2015, 72(1): 227-238.
- [6] WIDDEL F, BAK F. *Gram-negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria* [M]. New York: Springer, 1992.
- [7] BAKER G C, SMITH J J, COWAN D A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55(3): 541-555.
- [8] 王秀衡, 任南琪, 王爱杰, 等. 铁锰离子对硝化反应的影响效应研究[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2003, 35(1): 122-125.
- [9] SOPHIE W, FRANCK P, XAVIER L R, et al. Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of *Nitrobacter*-like *nxrA* sequences in soil[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(2): 261-271.
- [10] GRIFFITHS R I, WHITELEY A S, O'DONNELL A G, et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5488-5488.
- [11] 中华人民共和国环境保护部, 中国国家标准化管理委员会. 土壤. 氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的测定. 氯化钾溶液提取-分光光度法: HJ 634-2012[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- [12] 中华人民共和国环境保护部, 中国国家标准化管理委员会. 水质. 无机阴离子的测定. 离子色谱法: HJ/T 84-2001[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- [13] LAWSON C, LÜCKER S. Complete ammonia oxidation: An important control on nitrification in engineered ecosystems?[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 50: 158-165.
- [14] BERGMANN D J, HOOPER A B, KLOTZ M G. Structure and sequence conservation of *hao* cluster genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria: Evidence for their evolutionary history[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5371-5382.
- [15] 王文超, 杨立中, 谭周亮. 重金属对废水生物硝化过程影响研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2013, 36(S2): 157-161.
- [16] 张宏扬. Cu(II)对生物硝化过程和硝化菌群结构的影响机理研究[D]. 天津: 天津大学, 2013.
- [17] 张杉. 重金属镉对SBR系统水处理效果及微生物群落影响研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2017.
- [18] 杜振峰. Cr(VI)对生物硝化过程和硝化菌群结构的影响机理研究[D]. 天津: 天津大学, 2013.
- [19] LIU Y, LAM M C, FANG H H. Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge[J]. *Water Science & Technology*, 2001, 43(6): 59-66.
- [20] CHUG R, MATHUR S, KOTHARI S L, et al. Maximizing EPS production from *Pseudomonas aeruginosa* and its application in Cr and Ni sequestration[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2021, 26: 100972.
- [21] KUMAR M S, SWARNALAKSHMI K, ANNAPURNA K. *Rhizobium Biology and Biotechnology*[M]. Cham: Springer, 2017: 257-292.
- [22] SUN B, HAN P, TAO R, et al. *Advances in Applied Biotechnology*[M]. Cham: Springer, 2015: 295-303.
- [23] XING W, FANG L, CAI P, et al. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(5): 1369-1374.
- [24] RAJESH A, KUMAR N. Biosorption of cadmium using a novel bacterium isolated from an electronic industry effluent[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 235: 176-185.
- [25] HENNE K L, TURSE J E, NICORA C D, et al. Global proteomic analysis of the chromate response in *Arthrobacter* sp. strain FB24[J]. *Journal of Proteome Research*, 2009, 8(4): 1704.
- [26] ZHANG J, CHEN M, SUI Q, et al. Impacts of addition of natural zeolite or a nitrification inhibitor on antibiotic resistance genes during sludge composting[J]. *Water Research*, 2016, 91(15): 339-349.
- [27] 宋超. 四环素强化生物去除及其在自然水体中迁移转化规律的研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [28] 韩月, 李凯, 王志康, 等. SBR中纳米氧化锌和四环素复合投加系统对污泥胞外聚合物的影响[J]. *环境工程学报*, 2019, 13(7): 1623-1633.
- [29] 张微. 四环素与胞外聚合物的相互作用及其对污泥耐药性的影响[D]. 上海: 东华大学, 2014.
- [30] 石义静. 硝化颗粒污泥的培养及其与四环素相互作用研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.

(责任编辑: 曲娜)

Effects of heavy metal and antibiotic stresses on the activity of nitrite-oxidizing bacteria and nitrifying bacteria flora

LIU Buchan, LUO Jianfei, HUANG Shenxi, YIN Hao, SUN Qiuyun, LIN Weitie*

School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

*Corresponding author, E-mail: lfwtlm@scut.edu.cn

Abstract Heavy metals and antibiotics are widely distributed in industrial wastewater and aquaculture water, which have varying degrees of impact on the activity of nitrifying bacteria. In order to study the effects of heavy metals and antibiotics on the nitrite oxidation of nitrite-oxidizing bacteria (NOB) and nitrifying bacteria flora, water sample of the Pearl River was collected to enrich and cultivate nitrifying bacteria flora and isolate NOB, then the effects of different concentrations of heavy metal ions (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{6+}) and antibiotics (kanamycin, ampicillin, streptomycin and tetracycline hydrochloride) on the nitrite oxidation activity of NOB were studied to reveal the effects of heavy metals and antibiotics stresses on the activities of nitrifying bacteria flora and NOB. The results showed that the abundance of *Nitrosomonas* in the nitrifying bacteria flora after the 15th times enrichment increased from 0.11% to 10.04%, and the abundance of *Nitrobacter* increased from 0.014% to 2.104%. The isolated and purified NOB was closely related to *Nitrobacter winogradskyi*, showing a similarity of 99.58%. The nitrite oxidation activity of NOB decreased with the increase of the concentration of heavy metal ions and antibiotics; in comparison with NOB, the nitrifying bacteria flora under the stress of heavy metals and antibiotics had a higher nitrite oxidation rate, more stable and stronger stress resistance to heavy metals and antibiotics, which indicates it has a greater potential on the practical application in nitrogenous wastewater treatment. The results provide a theoretical reference for the research of NOB and its development and application in industry and aquaculture water purification.

Keywords nitrite-oxidizing bacteria; nitrifying bacteria flora; heavy metal; antibiotic