

# 城市污水厂活性污泥强化自养反硝化菌研究

常玉梅<sup>1</sup>, 杨琦<sup>1\*</sup>, 郝春博<sup>1</sup>, 尚海涛<sup>1</sup>, 姜体胜<sup>2</sup>

(1. 中国地质大学(北京)水资源与环境学院, 北京 100083; 2. 北京市水文总站, 北京 100089)

**摘要:**采集北京高碑店城市污水厂的反硝化污泥样品,以硫磺作为电子供体进行驯化培养. 测定污泥的增长率来确定污泥活性,分别测定  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{SO}_4^{2-}$  浓度来确定硝酸盐的去除效率和硫酸盐生成速率. 当硝酸盐去除率达到 90% 以上时,提取污泥中微生物总 DNA,构建 16S rRNA 基因片段克隆文库来分析细菌群落结构. 结果表明,污泥的增长率为  $0.177 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ ,污泥中硝酸盐浓度与时间的关系符合一级反应. 污泥中细菌类群主要为 Beta-Proteobacteria、Delta-Proteobacteria、Gamma-Proteobacteria 和 Unclassified bacteria,其中 Beta-Proteobacteria 类细菌占主导地位. 在成熟的反硝化污泥中,自养反硝化菌 *Thiobacillus denitrificans* 占所占比例高达 48.65%. 此外,反应器中还存在 *Denitratisoma* sp.、*Curvibacter* sp.、*Thermomonas* sp.、*Geobacter* sp. 等细菌. 对自养反硝化污泥中细菌多样性的研究有利于优化反应条件,从而提高污泥的硝酸盐去除率.

**关键词:**活性污泥;硝酸盐去除;自养反硝化细菌;克隆文库;系统发育分析

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)04-1210-07

## Experimental Study of Autotrophic Denitrification Bacteria Through Bioaugmentation of Activated Sludge from Municipal Wastewater Plant

CHANG Yu-mei<sup>1</sup>, YANG Qi<sup>1</sup>, HAO Chun-bo<sup>1</sup>, SHANG Hai-tao<sup>1</sup>, Jiang Ti-sheng<sup>2</sup>

(1. School of Water Resources and Environment, China University of Geosciences, Beijing 100083, China; 2. Beijing Hydrologic Center, Beijing 100089, China)

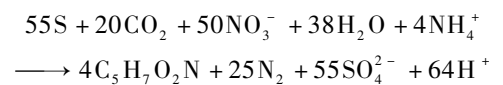
**Abstract:** Activated sludge of municipal wastewater treatment plant was domesticated by sulfur as the electron donor under autotrophic. The sludge activity was determined by measuring growth rate of sludge. The removal efficiency of nitrate and sulfate production efficiency were analyzed by continuously measuring the concentration of  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{SO}_4^{2-}$ . When the removal efficiency of nitrate was more than 90%, 16S rRNA genetic libraries were built up to compare their microbial biodiversity. The growth rate of sludge is  $0.177 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ . The relation between concentration of nitrate and time meets first order reaction kinetics. The bacteria in the sludge affiliated with Beta-Proteobacteria, Delta-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria and Unclassified bacteria. Beta-Proteobacteria is the main phylum in the sludge. Bacteria related to *Thiobacillus denitrificans* from denitrifying bioreactor perform 48.65%. In addition, the bacteria of *Denitratisoma* sp., *Curvibacter* sp., *Thermomonas* sp., *Geobacter* sp. are existed in the sludge. The study of autotrophic denitrifying bacteria diversity is conducive to optimization of reaction conditions and efficient removal of nitrate.

**Key words:** activated sludge; nitrate removal; autotrophic denitrifying bacteria; clone library; phylogenetic analysis

硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ )是工农业和生活污水中普遍存在的污染物,对环境 and 人类健康都有重要影响<sup>[1]</sup>. 水中硝酸盐的去除为氧化还原过程,异养反硝化细菌在硝酸盐转换过程中需要有机碳作为碳源,而当污水中的有机碳源缺乏时,要完成反硝化作用就必须向污水中投放有机化合物,如甲醇或简单有机物等<sup>[2]</sup>,且投加量难以控制. 针对这一问题, Bisogni 等<sup>[3]</sup>在 20 世纪 70 年代提出了采用自养反硝化代替传统反硝化工艺的思路.

自养反硝化细菌主要有利用氢的反硝化细菌<sup>[4]</sup>和利用硫的反硝化细菌. 由于很难收集氢气,所以近年来主要研究方向是利用硫的反硝化过程<sup>[5]</sup>. 某些硫氧化细菌可在缺氧或厌氧条件下利用还原态硫( $\text{S}^{2-}$ 、 $\text{S}^0$ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  等)作为电子供体,通过氧化硫获取能量,同时以硝酸盐为电子受体,将其还原

为氮气,实现自养反硝化过程<sup>[6]</sup>. 以单质硫为例,其典型代谢途径如下式所示<sup>[7]</sup>:



Driscoll 等<sup>[8]</sup>以硫化物和单质硫为电子供体考察了填料床层中的自养反硝化过程,结果表明以不同还原态硫为电子供体均能获得较高的反硝化率. Batchelor 等<sup>[7]</sup>实验研究了硫自养反硝化作为市政废水脱氮工艺的可行性,并发现在各种还原态硫中,

收稿日期:2010-06-28;修订日期:2010-08-30

基金项目:国家自然科学基金项目(40102027,50578151);北京市自然科学基金项目(8052017);北京市产学研项目(51900265005);国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07207-008, 2009ZX07419-002, 2009ZX07207-001)

作者简介:常玉梅(1985~),女,硕士研究生,主要研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail:changyumei-586@163.com

\* 通讯联系人, E-mail:yq@cugb.edu.cn

单质硫作为电子供体时脱氮效果最佳. Sierra-Alvarez 等<sup>[9]</sup>曾经对饮用水处理过程中硫-反硝化作用进行了研究. 刘玲花等<sup>[10]</sup>将自养反硝化细菌运用于硫与石灰石组合工艺去除地下水中硝酸盐, 国内对利用还原态单质硫进行自养反硝化的研究还较少.

基于 16S rRNA/rDNA 的现代分子生物学技术(克隆文库、DGGE、FISH 等)克服了传统技术的弊端,突破了用传统的微生物分离纯化方法调查微生物多样性时,大多微生物无法得到纯培养的限制<sup>[11]</sup>,能够更全面和系统地揭示各种生态环境中前未知的微生物多样性.

本研究中,反硝化污泥中添加硫磺作为电子供体,通过测定样品中  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  浓度来分析硝酸盐去除效率. 当活性污泥去除硝酸盐效率达到 90% 以上,提取微生物总 DNA,构建 16S rRNA 基因片段克隆文库来分析细菌群落结构. 对自养反硝化污泥中细菌多样性的研究有利于优化反应条件,从而高效去除硝酸盐污染.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要仪器

马弗炉(余姚远东数控仪器厂),电热鼓风干燥箱(天津市中环实验电炉有限公司),干燥器,722S 分光光度计,PCR 仪(美国 Bio-rad),PCR 凝胶成像仪(美国 Bio-rad),离心机,恒温水浴锅,高压灭菌锅,电泳槽(北京六一厂),超净工作台,电子天平.

#### 1.1.2 主要试剂

污泥培养液:  $\text{KNO}_3$  60 mg,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 mg,  $\text{NaHCO}_3$  1 000 mg,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mg, 水 1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.2.

STE 缓冲液: 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 2.5 mL, 0.5 mol/L EDTA 0.5 mL, 5 mol/L NaCl 5 mL, 加水至 250 mL.

琼脂糖凝胶回收试剂盒,基因全长扩增、构建克隆文库常用生化试剂.

#### 1.1.3 污泥来源

采集北京市某污水处理厂二次沉淀池中的反硝化污泥,污水处理采用传统活性污泥法的二级处理工艺,一级处理由曝气沉砂池和平流式沉淀池组成,二级处理由曝气池和二次沉淀池组成.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 污泥培养

将自养反硝化污泥放在 500 mL 培养瓶中培养,用导气管连接污泥瓶与史氏发酵管,史氏发酵管用来记录污泥的产气情况,培养瓶底层为颗粒硫磺,为污泥提供元素硫及附着点,中间层为污泥,上层为污泥培养液,放于 30℃ 恒温培养箱中培养,培养液每天更换一次,调节污泥瓶中 pH 为 7.

#### 1.2.2 污泥增长系数的测定

(1)将坩埚和滤纸放在 105 ~ 110℃ 的电热鼓风干燥箱中烘干 2 ~ 3 h 至恒重,在干燥器中冷却 30 min,称量坩埚重  $W_1$  及坩埚与滤纸的重量  $W_2$ .

(2)从污泥瓶中取一定体积( $V$ )的污泥悬浊液,过滤后将污泥及坩埚放入干燥器中烘干 2 ~ 3 h 至恒重,干燥器中冷却 30 min,称重  $W_3$ .

(3)将污泥和坩埚放入马弗炉,在 600℃ 下灼烧 1 ~ 2 h,关闭电源,当温度降至 200℃ 时将坩埚取出,干燥器中冷却后称重  $W_4$ .

(4)按照下列公式计算污泥浓度:

$$\text{VSS}(\text{g/L}) = \frac{(W_3 - W_2) - (W_4 - W_1)}{V}$$

#### 1.2.3 硝酸盐浓度测定

制备硝酸盐标准曲线,参照文献[12]中的酚二磺酸光度法.

从污泥瓶取样口取出一定体积上层液体,过滤. 用移液管量取 50 mL 预处理的水样于蒸发皿中,调节至微碱性(pH 8),置水浴锅上蒸发至干. 加 1 mL 酚二磺酸,用玻璃棒研磨,使试剂与蒸发皿内残渣充分接触,放置片刻,再研磨一次. 放置 10 min,加入约 10 mL 水.

在搅拌下加入 3 ~ 4 mL 氨水,使溶液颜色最深. 将溶液移入 50 mL 比色管中,稀释至标线,混匀. 于波长 410 nm 处,选用玻璃比色皿,以水为参比,测量吸光度.

#### 1.2.4 硫酸盐浓度测定

硫酸盐的测定采用文献[12]中的 EDTA 滴定法. 具体操作步骤为:①取 5 mL 水样于 10 mL 试管中,加 1:1 盐酸 2 滴,10% 氯化钡溶液 5 滴摇匀,观察沉淀情况,确定水样体积为 25 mL,加入钡镁混合液 4 mL;②取经过滤处理的水样 25 mL 移入 250 mL 锥形瓶中,加入 75 mL 蒸馏水,滴加 1:1 的盐酸,刚果红试纸由红色变为蓝色,放置在电炉上加热煮沸 1 ~ 2 min,以除去二氧化碳. 趁热加入 4 mL 钡镁混合液,同时不断搅拌,并加热至沸. 沉淀陈化过夜后滴定. 加入 10 mL 缓冲溶液,少量铬黑 T 指示剂,用 EDTA 标准溶液滴定至溶液由红色变为蓝色,记录

EDTA 标准溶液的用量. 取 100 mL 蒸馏水, 同法做空白校正; ③测定水样的总硬度.

### 1.2.5 系统细菌多样性分析

#### (1) 活性污泥样品预处理

当活性污泥去除硝酸盐效率达到 95% 时, 取污泥加入无菌离心管中, 以 12 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清液; 加入已灭菌的生理盐水洗涤 2 次, 再用 STE 缓冲液洗涤一遍; 用 STE 缓冲液悬浮.

#### (2) 基因组 DNA 的提取

参考 Zhou 等<sup>[13]</sup> 的土壤细菌基因组提取方法.

加入 CTAB (溴化十六烷基三甲胺) 至终浓度为 1%, 加入蛋白酶 K 至终浓度为 10 mg/mL, 混匀, 37℃ 水浴处理 30 min; 加入 20% 的 SDS 至终浓度为 2%, 混匀, 65℃ 水浴 2 h, 每隔 15 ~ 30 min 轻摇一次; 将裂解后的溶液 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液至另一干净的离心管中, 加入等体积的酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1), 轻轻摇匀, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清, 抽提 2 次, 再用氯仿抽提一次; 收集上清液, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 混匀之后 -20℃ 放置 1 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 用 70% 的冰乙醇洗涤沉淀, 离心, 小心弃上清, 自然干燥, 加入 50  $\mu$ L 无菌水溶解 DNA, 保存备用. 抽提的粗制 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测.

#### (3) 16S rDNA 片段扩增

以总 DNA 为模板, 使用细菌 16S rDNA 通用引物 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 和 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). 50  $\mu$ L 的 PCR 反应体系: 5  $\times$  PCR buffer 10  $\mu$ L、25 mmol/L  $MgCl_2$  5  $\mu$ L、10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L、正反引物 20  $\mu$ mol、模板 30 ng、*Taq* DNA 聚合酶 2 U, 适量的双蒸水补足 50  $\mu$ L. PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min  $\rightarrow$  94℃ 变性 30 s  $\rightarrow$  53℃ 退火 30 s  $\rightarrow$  72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 琼脂糖凝胶电泳检测产物.

#### (4) 构建分子克隆文库分析

##### ① 16S rDNA 的回收

扩增产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 在长波紫外灯下对照 Mark, 用干净的手术刀割下 1 500 bp 处的 DNA 琼脂块, 放入 1.5 mL 离心管中. PCR 产物回收采用天根生化胶回收试剂盒纯化, 纯化过程按照试剂盒说明书进行.

##### ② 构建分子克隆文库

按照 pGEM-T Easy Vector system 说明书构建 10  $\mu$ L 连接反应体系, 4℃ 连接过夜.

将连接产物导入大肠杆菌 JM109, 之后涂布 LB (Amp/IPTG/X-Gal) 平板, 37℃ 过夜培养后进行蓝白筛选. 以无菌牙签挑取白色菌落, 重新纯化培养, 以 T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3') 和 SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATACTC-3') 为引物, 以少许菌体为模板, PCR 扩增验证插入片断的大小, 筛选阳性克隆.

#### ③ 16S rDNA 序列测定和系统进化分析

随机挑取 60 个阳性克隆送去测序. 测序工作由北京中科希林生物科技有限公司完成. 用 Dotur 软件对所得序列进行分类, 剔除相同序列, 并做饱和曲线. 将所得序列输入 NCBI 网站, 用 Blast 程序进行比对, 下载同源性较高的序列作为参考, 将所有序列用 BioEdit 中 ClustalW 程序比对后, 用 MEGA 4.0 软件绘制系统发育树.

## 2 结果与讨论

### 2.1 污泥产气情况

连续 7 d 记录污泥瓶中产气情况 (气体体积 V), 并测定污泥瓶中的污泥浓度, 如图 1.

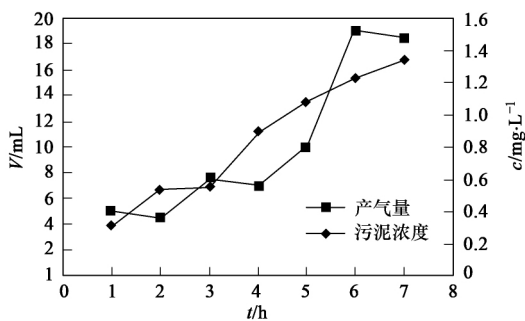


图 1 污泥产气量和浓度变化曲线

Fig. 1 Change curve of daily gas production and sludge concentration

产气速度较快且主要发生在刚加入人工废水的前几个小时. 由图 1 可以看出, 污泥产气呈现增加趋势, 说明污泥处理硝酸盐氮的效率在不断提高.

污泥浓度随着时间的增长而逐渐增大, 将污泥浓度与时间进行线性拟合, 用  $c$  表示污泥浓度 (g/L);  $t$  表示时间 (d). 得到污泥生长拟合直线方程为  $c = 0.177 0t + 0.143 4$  ( $R^2 = 0.972 4$ ), 相关系数在 0.96 以上, 说明  $c-t$  的相关性很好, 得到污泥的增长率为 0.177 g/(L·d).

### 2.2 硝酸盐和硫酸盐浓度测定

初始硝酸盐浓度分别为 10、20、30 mg/L (以下浓度均不包含原培养基中的离子浓度), 随水力

停留时间的不同,测定水中硝酸盐浓度,如图 2.

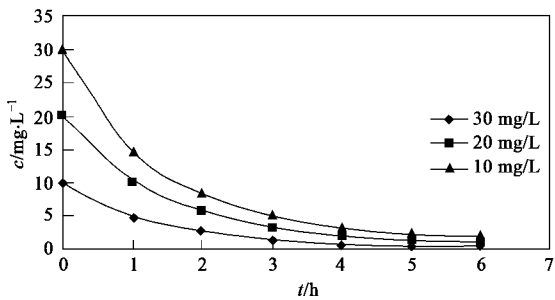


图 2 硝酸盐浓度变化曲线  
Fig.2 Change curve of nitrate concentration

随着时间的增加,硝酸盐的浓度逐渐降低,且硝酸盐降解速度很快,而后逐渐平缓.

为了定量描述硝酸盐氮的降解反应动力学,令  $c_0$  表示硝酸盐氮浓度初始值,  $c_t$  表示时间  $t$  时的硝酸盐浓度,以  $\ln(c_t/c_0)-t$  计算得到硝酸盐(初始浓度 10 mg/L)的降解动力学方程: $c=c_0e^{-0.3122t}$ ,  $R^2=0.9962$ ,一级反应速率常数  $k=0.3113h^{-1}$ ,半衰期  $t=2.23h$ ,符合一级反应动力学.

以初始硝酸盐浓度 10 mg/L 为例,对污泥瓶中的水样进行连续取样,硝酸盐与硫酸盐的关系变化如图 3.

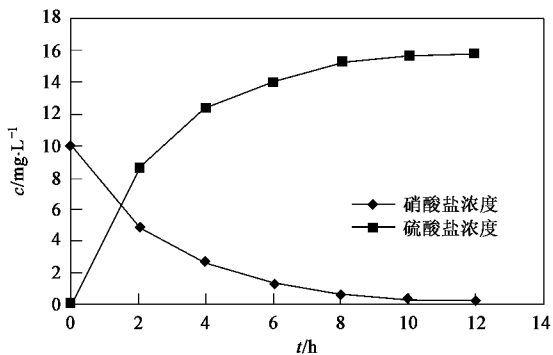


图 3  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  浓度变化曲线  
Fig.3 Concentration change curve of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$

硫酸盐浓度随着反应时间的增长而升高,可以说明自养反硝化污泥将部分单质硫氧化成了  $\text{SO}_4^{2-}$ .

水样中  $\text{NO}_3^-$ -N 去除量与硫酸盐增加量之间的关系见图 4.

两者之间基本上呈线性关系,用最小二乘法回归得直线斜率为 7.39,即每去除 1 mg  $\text{NO}_3^-$ -N,将产生 7.39 mg  $\text{SO}_4^{2-}$ ,参照硫-反硝化的化学计量方程式

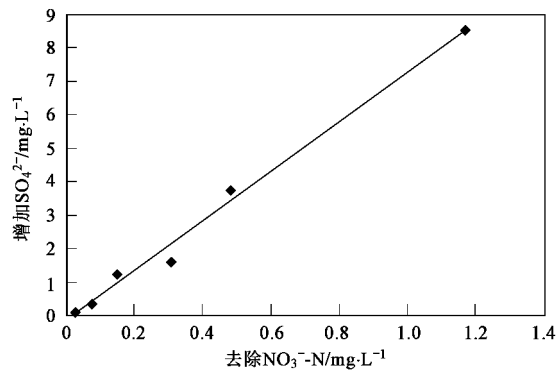


图 4  $\text{NO}_3^-$ -N 去除量与  $\text{SO}_4^{2-}$  生成量关系曲线  
Fig.4 Curve of  $\text{NO}_3^-$ -N removal and  $\text{SO}_4^{2-}$  production

计算出理论值为 7.5 mg,理论值与实验值较接近.

2.3 总 DNA 提取结果

细菌总 DNA 提取结果如图 5 所示,T1、T2 为平行样. 所提 DNA 片段大小约为 23 kb,证明已获得较为完整的基因组 DNA.

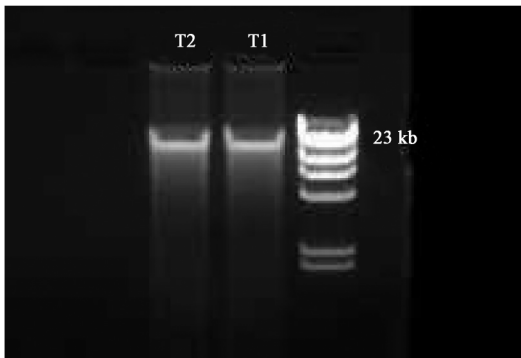


图 5 总 DNA 提取结果  
Fig.5 Extracted genome DNA of bacteria

2.4 16S rDNA 扩增结果

对污泥细菌总 DNA 经 PCR 扩增后,得到 1 500 bp 大小的目的片段,如图 6,CK 为阴性对照.

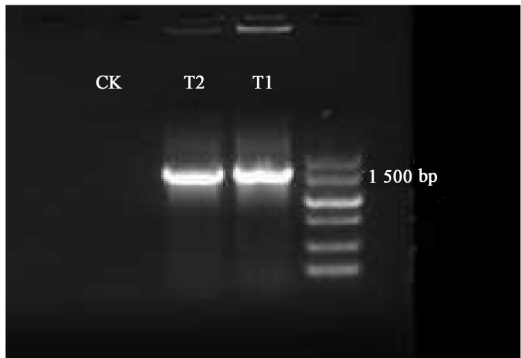


图 6 16S rDNA 全长扩增  
Fig.6 Amplified length of 16S rDNA

2.5 污泥中细菌多样性及系统发育学分析

将每种基因型序列输入 RDP 网站,利用 Classifier 程序确定其系统发育类群. 结果表明,克隆文库中细菌的 16S rDNA 序列分属 4 个细菌类群,分别为 Beta-Proteobacteria ( 59% )、Deta-Proteobacteria ( 11% )、Gamma-Proteobacteria ( 11% ) 和 Unclassified bacteria( 17% ),如图 7.

将每种基因型的序列输入 NCBI 网站,用 BLAST 程序与数据库中已有的序列进行比对分析,主要比对结果如表 1 所示. 从表 1 中可以看出,Proteobacteria( 变形菌门)为样品中的优势种群,其

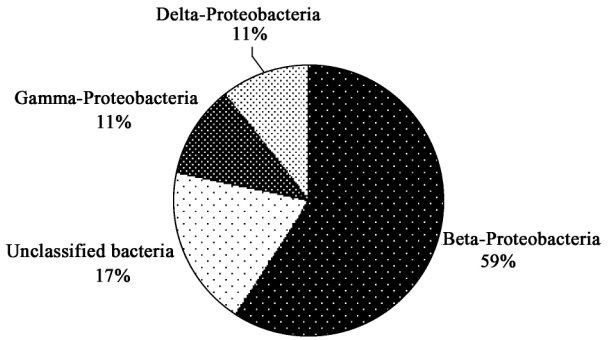


图 7 各类细菌在文库中所占比例  
Fig. 7 Proportion of each phylotype in the clone library

表 1 活性污泥中部分细菌 16S rDNA 序列比对结果

| Table 1 BLAST analysis of 16S rDNA sequences of bacteria in the sludge |        |                       |                                                                                                        |       |
|------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 克隆号                                                                    | 基因频率/% | 系统类群                  | 数据库中最接近种或克隆                                                                                            | 同源性/% |
| T1                                                                     | 48.65  | Beta-Proteobacteria   | Uncultured bacterium clone R1B-7 from denitrifying bioreactor( FJ167444 )                              | 99    |
| T12                                                                    | 13.51  | Unclassified Bacteria | Uncultured Chlorobi group bacterium clone D25_47 in tar-oil contaminated aquifer sediments( EU266920 ) | 97    |
| T13                                                                    | 5.41   | Beta-Proteobacteria   | Uncultured beta proteobacterium SBR1001 from full-scale EBPR sludge ( AF204252 )                       | 96    |
| T14                                                                    | 5.41   | Gamma-Proteobacteria  | Uncultured bacterium clone SR_FBR_E29 in sulfate-reducing fluidized-bed reactor( AY340824 )            | 99    |
| T20                                                                    | 2.70   | Gamma-Proteobacteria  | <i>Thermomonas brevis</i> strain R-13291 ( NR025578 )                                                  | 96    |
| T28                                                                    | 2.70   | Beta-Proteobacteria   | Uncultured bacterium clone G19-79 from soil polluted by heavy metals ( GQ487974 )                      | 95    |
| T3                                                                     | 2.70   | Delta-Proteobacteria  | <i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA in subsurface environments( AE017180 )                             | 99    |
| T32                                                                    | 5.41   | Unclassified Bacteria | Uncultured bacterium clone XJ118 in aerobic activated sludge( EF648160 )                               | 97    |
| T35                                                                    | 2.70   | Gamma-Proteobacteria  | <i>Thermomonas haemolytica</i> ( AF508108 )                                                            | 98    |
| T39                                                                    | 2.70   | Betaproteobacteria    | Uncultured Comamonadaceae bacterium clone 7025P1B11 ( EF562037 )                                       | 99    |

中 Beta-Proteobacteria 占主要地位,为了进一步了解这些微生物的系统发育地位,下载了数据库中同源性最高和较高的序列,构建系统发育树,如图 8. 表 1 中序列已提交 NCBI Genebank,登陆号分别为 HM991628-HM991637.

样品中 Beta-Proteobacteria 类微生物在克隆文库中占 59% ,是文库中第一大类群, $\beta$ -变形菌纲的细菌大多数趋向于在厌氧环境下通过分解有机物来获取营养物质,一些细菌可以利用氢、氨、甲烷和挥发性脂肪酸<sup>[14]</sup>. 有研究表明, $\beta$ -变形细菌纲细菌更易生存于受污染的环境中,在这种环境中所占的比例更大<sup>[15]</sup>. 其中克隆 T1 与 *Thiobacillus* sp. ( 硫杆菌属 ) 的序列相似度为 100% ,且为 *Thiobacillus denitrificans*( 反硝化硫杆菌 ),这类细菌在文库中所占比例高达 48.65% ,是该系统中最丰富的一类细菌. 反硝化硫杆菌是专性自养型,需要氧化无机的还原性硫化物获取能量以固定 CO<sub>2</sub>. 它只能吸收有限量的有机碳. 无氧条件下, *Thiobacillus denitrificans* 在将硫化物氧化的同时,将氮氧化物( 如硝酸盐或亚硝酸盐 ) 还原成 N<sub>2</sub>( 即反

硝化作用或脱氮作用 ).  
克隆 T13 的丰度为 5.41% ,在系统发育树上与与 *Denitratisoma* sp. 聚为一类, *Denitratisoma oestradiolicum* 是红环菌科的一个新属,革兰氏阴性反硝化细菌,是 Fahrbach 等<sup>[16]</sup>从城市污水处理厂的活性污泥中分离得到的,可以 17- $\beta$ -雌二醇( E2 )作为唯一碳源和能源生长,在此过程中 E2 被完全氧化为 CO<sub>2</sub>,亚硝酸盐作为电子受体被还原为 N<sub>2</sub>O. *Curvibacter* sp. 为丛毛单胞菌科的一个属,在克隆文库中只有 1 株代表菌.  
 $\gamma$ -变形杆菌纲是变形杆菌门内最大的一个纲,这些菌在生理上有极大的多样性<sup>[14]</sup>.  $\gamma$ -变形杆菌纲占克隆文库的 11% ,T20、T35 这 2 株菌与 *Thermomonas* sp. ( 热单胞菌属 ) 在同一分支上,热单胞菌属属于 Xanthomonadaceae ( 黄单胞菌科 ),T20 与 *Thermomonas brevis* strain R-13291 有 98% 的序列相似, *Thermomonas brevis* 是从反硝化反应器中分离出来的,DNA 杂交实验表明其属于热单胞菌,但是其表型特征与热单胞菌属的特征存在区别,因此作为一种新种提出,命名为 *Thermomonas brevis*<sup>[17]</sup>; T35

与 *Thermomonas haemolytica* 的相似性为 98% , *T. haemolytica*<sup>[13]</sup> 革兰氏阴性,是从高岭土浆(用于造纸)中分离的,2002 年作为新种提出。

Delta-Proteobacteria(11%) 的细菌可分成 2 个类群:一个群是不是其他生物的细菌,如蛭弧菌和黏细菌;另一个群是在厌氧条件下将硫酸盐和硫还原成硫化物,并能氧化有机养料的细菌,如脱硫弧菌。

克隆文库中 T3 菌株与 *Geobacter sulfurreducens* PCA 的相似性为 99% , *Geobacter* sp. 属于 Desulfuromonales(脱硫单胞菌目)Geobacteraceae(地杆菌科),*G. sulfurreducens*<sup>[18]</sup> 的主要代谢作用为厌氧条件下彻底氧化醋酸盐为 CO<sub>2</sub>,电子受体包括金属离子、单质硫和延胡索酸等,所以推测反应器中存在硫还原反应,硫为电子受体,还原为 H<sub>2</sub>S。

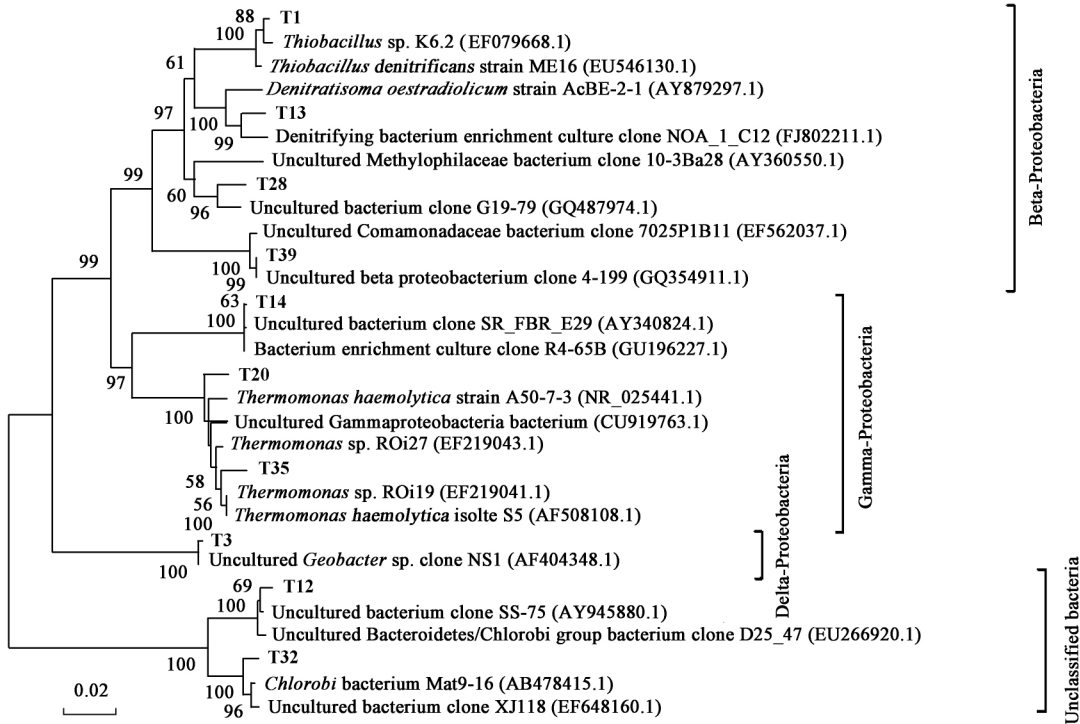


图 8 基于 16S rDNA 序列的细菌系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree of bacteria based on 16S rDNA sequences

3 结论

(1) 硝酸盐氮 12 h 后去除率已达 95% ,通过反应动力学分析,污泥中硝酸盐的浓度与时间的关系符合一级反应动力学。

(2) Beta-Proteobacteria 为污泥样中的主要细菌类群,比例为 59% ,而且样品中存在大量未被认知的细菌(17% ),特异类群的存在与其生态功能密切相关。

(3) 本反应器中 *Thiobacillus denitrificans* 占 48.65% ,在系统中起最主要反硝化作用。污泥中还包括 *Denitratisoma* sp.、*curvibacter* sp.、*Thermomonas* sp.、*Geobacter* sp. 类的细菌,这些细菌在反硝化过程中的研究较少。

参考文献:

[ 1 ] 徐芳香,陆雍森.我国地下水中硝酸盐污染防治及水源保护

[ 2 ] 任延丽,靖元孝.反硝化细菌在污水处理作用中的研究[J].微生物学杂志,2005,25(2):88-92.

[ 3 ] Bisogni J J, Driscoll C T. Denitrification using thiosulfate and sulfide [J]. Journal of the Environmental Engineering Division, 1977, 103(4): 593-604.

[ 4 ] 张彦浩,钟佛华,夏四清.利用氢自养反硝化菌处理硝酸盐污染地下水的研究[J].水处理技术,2009,35(5):75-78.

[ 5 ] Zhang T C, Lampe D G. Sulfur: Limestone autotrophic denitrification processes for treatment of nitrate-contaminated water: Batch experiments [J]. Water Research, 1999, 33(3): 599-608.

[ 6 ] Ricardo B C, Reyes S A, Pieter R, et al. Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 95(6): 1148-1157.

[ 7 ] Batchelor B, Lawrence A W. Autotrophic denitrification using elemental sulfur [J]. Journal of Water Pollution Control Federation, 1978, 50(8): 1986-2001.

[ 8 ] Driscoll C T, Bisogni J J. The use of sulfur and sulfide in

- packedbed reactors for autotrophic denitrification[J]. Journal of the Environmental Engineering Division, 1978, **50**(3): 569-577.
- [9] Sierra-Alvarez R, Beristain-Cardoso R, Salazar R, *et al.* Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment[J]. Water Research, 2007, **41**(6): 1253-1262.
- [10] 刘玲花,王占生,王志石. 硫/石灰石滤柱去除地下水中硝酸盐的研究[J]. 环境工程, 1995, **13**(3): 11-15.
- [11] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1995, **59**(1): 143-169.
- [12] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [13] Zhou J Z, Mary A B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(2): 316-322.
- [14] 陶天申,杨瑞馥,东秀珠. 原核生物系统学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [15] 郝春博,王广才,董健楠,等. 石油污染地下水中细菌多样性研究[J]. 环境科学, 2009, **30**(8): 2464-2472.
- [16] Fahrbach M, Kuever J, Meinke R, *et al.* *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17 $\beta$ -oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, **56**(7): 1547-1552.
- [17] Mergaert J, Cnockaert M C, Swings J. *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly (epsilon-caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, **53**(6), 1961-1966.
- [18] Methe B A, Nelson K E, Eisen J A, *et al.* Genome of Geobacter sulfurreducens: Metal Reduction in Subsurface Environments [J]. Science, 2003. 1967-1969.
- [19] Oh S E, Yoo Y B, Young J C, *et al.* Effect of organics on sulfur-utilizing autotrophic denitrification under mixotrophic conditions [J]. Journal of Biotechnology, 2001, **92**(1): 1-8.
- [20] Brümmer I H M, Felske A, Wagner-Döbler I. Diversity and seasonal variability of  $\beta$ -proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(8): 4463-4473.
- [21] Fernandez N, Sierra-Alvarez R, Amils R, *et al.* Compared microbiology of granular sludge under autotrophic, mixotrophic and heterotrophic denitrification conditions [J]. Water Science and Technology, 2009, **59**(6): 1227-1236.
- [22] 邓旭亮,王爱杰,荣丽丽,等. 硫自养反硝化技术研究现状与发展趋势[J]. 工业水处理, 2008, **28**(3): 13-16.
- [23] Zhang M, Zhang T, Shao M F, *et al.* Autotrophic denitrification in nitrate-induced marine sediment remediation and *Sulfurimonas* denitrificans-like bacteria [J]. Chemosphere, 2009, **76**(5): 677-682.
- [24] Lee H W, Park Y K, Choi E, *et al.* Bacterial community and biological nitrate removal: comparisons of autotrophic and heterotrophic reactors for denitrification with raw sewage [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, **18**(11): 1826-1835.
- [25] 姜体胜,杨琦,尚海涛. 温度和 pH 值对活性污泥法脱氮除磷的影响[J]. 环境工程学报, 2007, **5**(11): 35-37.
- [26] 孙涛,唐顺,杨琦. 自养反硝化菌对硝酸盐氮去除动力学及影响因素研究[J]. 环境工程学报, 2009, **3**(11): 1943-1946.
- [27] 李鹏. 城市污水生物脱氮除磷活性污泥系统微生物多样性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.