

耐受高浓度氨氮异养硝化菌的筛选及其脱氮条件优化

司文攻^{1,2}, 吕志刚^{1,2}, 许超^{1,2}

(1. 江苏江达生态科技有限公司, 无锡 214061; 2. 江苏省河海湖泊生态修复与资源化工程技术研究中心, 无锡 214061)

摘要:研究了异养硝化菌对高浓度氨氮的耐受能力和去除能力. 采用多点取样、高浓度氨氮废水强行驯化、驯化液连续梯度稀释、颜色指示剂快速硝化效果检测、平板划线分离等步骤, 筛选能耐受高浓度氨氮废水的异养硝化菌株, 以各菌株 16S rDNA 序列的系统发育分析来鉴定其种属, 考察了菌株的脱氮特性, 并通过提高 C/N 比和优化菌株配伍的方式对其脱氮能力进行了优化. 结果共筛出 8 株高效的异养硝化菌株, 并将其命名为 N1 ~ N8. 系统发育分析表明 8 株菌分属丛毛单胞菌属 (*Comamonas* sp.)、红球菌属 (*Rhodococcus* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)、副球菌属 (*Paracoccus* sp.), 其对起始氨氮浓度为 $256.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N = 5.5 的人工废水, 72 h 后氨氮去除率约在 65% ~ 80% 之间, 其中最高为 N4 的 80.2%. 若将上述废水的 C/N 比提高至 8.0, 则各菌株的氨氮去除率相应提高至约 80% ~ 90%. 部分菌株配伍后脱氨氮效果优于任一单菌株, 其中 N4 + N5 + N6 对起始浓度为 $261.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氨氮、在 C/N = 5.5 的条件下, 48 h 去除率为 88.2%. 将 N4 + N5 + N6 组合驯化菌液, 则能将该氨氮去除率提高至 99.8%; 在将起始氨氮浓度提高至 $446.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N 比降为 3.2 后, 52 h 后氨氮去除率亦可达 99.9%, 且最终几乎无亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的积累, 总氮去除率为 66.5%, 菌株同化的氮仅占损失氨氮的 33%. 可见驯化菌液中一些未能分离的菌株对分离出的菌株的脱氨氮效果有显著的协同作用.

关键词:高浓度氨氮; 异养硝化菌; 分离; 硝化作用; 优化

中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)11-3448-07

Isolation of Heterotrophic Nitrifiers Which Can Tolerate High Concentration of Ammonia-nitrogen and the Optimization of Their Nitrogen Removal Efficiency in Wastewater

SI Wen-gong^{1,2}, LÜ Zhi-gang^{1,2}, XU Chao^{1,2}

(1. Jiangsu Jiangda Ecological Science and Technology Co., Ltd., Wuxi 214061, China; 2. River, Lake and Sea Ecological Restoration and Resources Engineering and Technology Research Institution, Wuxi 214061, China)

Abstract: The removal capabilities and tolerance of high concentration of ammonia-nitrogen of heterotrophic nitrifiers were studied. Methods included multi-point sampling, domestication, gradient dilution of domestication liquid, color indicator as rapid nitrification detection and isolation from streaking plate were conducted to screen heterotrophic nitrifiers. The strains were identified according to the sequence analysis of 16S rDNA. After inoculating the strains into ammonia-nitrogen wastewater, changes of nitrogen compounds were measured in order to understand their denitrification characteristics. The denitrification efficiency was optimized by improving the C/N ratio, changing the compatibility of the strains and mixing the compatible strains with the domesticated bacterial suspension. Finally 8 high-efficiency heterotrophic nitrifiers were obtained, and named as N1-N8 respectively. Phylogenetic analysis showed that 8 strains belonged to *Comamonas* genus, *Rhodococcus* genus, *Pseudomonas* genus, *Arthrobacter* genus and *Paracoccus* genus, respectively. When the initial concentration of ammonia nitrogen was $256.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the C/N was 5.5 of the artificial wastewater, the removal rates of ammonia nitrogen by the strains were about 65% - 80%, and the strain N4 was the best. When the C/N ratio of the wastewater increased to 8.0, the ammonia nitrogen removal rates of the strains correspondingly increased to about 80% - 90%. As the strains compatibility, the denitrification rate of N4 + N5 + N6 was 88.2% in the artificial wastewater with initial ammonia nitrogen concentration was $261.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and initial C/N ratio was 5.5, which was higher than that of any single strain. The ammonia nitrogen removal rate could reach to 99.8% when N4 + N5 + N6 were combined with the domesticated bacterial suspension. In the artificial wastewater, when the initial ammonia nitrogen increased to $446.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the C/N ratio decreased to 3.2, the ammonia nitrogen removal rate of the mixed strains which composed of N4 + N5 + N6 and domesticated bacterial suspension was 99.9%. There was almost no nitrite and nitrate nitrogen accumulated in eventually, and the total nitrogen removal rate was 66.5%. The nitrogen which was assimilated by the strains was only 33% of the lost ammonia nitrogen. It shows that the strains which could not be isolated in the domesticated bacterial suspension had significant synergies effects on ammonia nitrogen removal of the isolating strains.

Key words: high concentration of ammonia nitrogen; heterotrophic nitrifier; isolation; nitrification; optimization

硝化是污水脱氮处理过程中的一个重要环节^[1], 传统认为执行硝化功能的是一群自养型微生物^[2]. 然而在实践中人们发现自养硝化菌在脱氮工艺中存在的缺陷较多^[3], 与此同时发现异养硝化现

象广泛存在于不同的环境中^[4-8], 一些异养硝化菌

收稿日期: 2011-01-12; 修订日期: 2011-06-07

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (BE2009601, BE2010636)

作者简介: 司文攻 (1983 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物污水脱氮处理, E-mail: SWG_0207@yahoo.com.cn

也被分离筛选出来,包括恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[9]、脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)^[10]、粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)^[11]等。

异养硝化菌的脱氮能力决定着其应用推广前景,所以高效菌株的选育成为关键。在这方面目前国内外的研究取得了一些阶段性成果,如 Kim 等^[12]筛出的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、Su 等^[13]筛出的产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes* AS-1)、Joo 等^[14]筛出的粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis* No. 4)、孔庆鑫^[15]筛出的不动杆菌(*Acinetobacter* sp. YY-5)、曾庆梅等^[16]筛出的产碱菌(*Alcaligenes* sp. HN-S)、张培玉等^[17]筛出的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、廖小红等^[18]筛出的蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus* XWZ-8)、陈咄圳等^[19]筛出的嗜吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinivorans*)等,脱氮效果相对较好。研究表明,一些异养硝化菌同时也是好氧反硝化菌^[20],意味着硝化反硝化可以在同一反应器中完成,这一点也是自养硝化菌无法比拟的优势。但目前筛出的绝大多数异养硝化菌耐受的氨氮浓度还不够高^[1],对菌株处理氨氮浓度超过 200 mg·L⁻¹ 的废水的研究还很少。此外异养硝化菌在脱氮的过程中往往需要加入大量的有机碳源(C/N 比需在 10 左右才能达到理想的脱氮效果),提高了污水处理成本。

本研究的目标是在筛选高效异养硝化菌的基础上,通过优化菌株组合、配伍的方式,研制复合脱氮菌剂,提高其对高浓度氨氮(>200 mg·L⁻¹)的耐受能力和脱除能力,降低有机碳源的投入量,节省脱氮成本。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株筛自土壤。土样来源包括无锡市内多家污水处理厂活性污泥、化肥厂土壤、江苏江达生态科技有限公司有机堆肥等处。

1.2 培养基

各培养基组份参考文献^[16]配制。碳源为柠檬酸钠,氮源为 NH₄Cl,实验中根据需要调整其浓度。

1.3 高效异养硝化菌的驯化及分离纯化

将不同来源的土样充分混匀,取 1 g 该混合土样,以氨氮浓度为 260 mg·L⁻¹、C/N = 5.5 的培养基驯化菌株。驯化过程如下:将土样置于含 200 mL 该培养基的 500 mL 锥形瓶中,30℃、转速 200 r·min⁻¹ 摇床培养。驯化以 3 d 为一个周期,每一周期结束后取 10 mL 驯化菌液于另一 500 mL 锥形瓶中,再加入

190 mL 新鲜培养基继续驯化。定期以氨试剂^[21]检测氨氮去除情况,以格利斯试剂和二苯胺-硫酸试剂^[21]检测亚硝酸盐氮和硝酸盐氮积累情况。当培养基中氨氮去除较彻底,且亚硝酸盐氮和硝酸盐氮积累较少时,认为驯化过程完成。将该最终的驯化菌液妥善保存,除从中筛出纯菌株外,在下述实验中还将其作为一种菌剂用以脱氨氮。

取完成驯化的菌液梯度稀释、涂布平板,以常规平板划线分离方法分离纯化菌株。经初筛、复筛及异养硝化效果定量检测等步骤,获得 8 株高效的异养硝化菌株,将其命名为 N1 ~ N8。其中 N4 在该培养条件下脱氨氮效果最佳。

1.4 单菌株的硝化特性考察

按 0.1% 的接种量将 N4 接种于 200 mL 氨氮起始浓度约为 260 mg·L⁻¹、C/N = 5.5 液体培养基中,30℃、180 r·min⁻¹ 摇床培养。实验中通过定时检测培养基的 D_{600} 得到菌株的生长曲线;通过定时检测培养基中氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、总氮浓度的变化了解菌株的脱氮特征。

1.5 菌株的系统发育分析

菌株 N1 ~ N8 基因组 DNA 的提取、16S rDNA 的 PCR 扩增与测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。将这些序列通过 NCBI 网站上的 BLAST 程序与 GenBank 中的核酸数据库进行相似性分析,然后用 NCBI 的 Entrez 系统检索并下载部分与待测序列相似性较大的序列及一些常见的异养硝化菌和少量自养硝化菌的 16S rDNA 序列,将这些序列用 Clustalx 程序进行多重序列比对,形成一个多重序列匹配列阵,然后用 MEGA5 程序包中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化发育树。

1.6 菌株的脱氮效果优化

实验用容器为 500 mL 锥形瓶,培养基装液量为 200 mL。

1.6.1 C/N 比优化实验

在起始氨氮浓度均约为 260 mg·L⁻¹ 的情况下,分别在 C/N 比为 5.5 和 8.0 时考察菌株 N1 ~ N8 的脱氨氮效果。各菌株的接种量均为 0.1%,培养时间为 48 h,检测培养前后氨氮浓度的变化。

1.6.2 菌株配伍脱氨氮实验

将 8 株菌三三配伍,组合方式为 N1 + N2 + N3、N2 + N3 + N4、N3 + N4 + N5、N4 + N5 + N6、N5 + N6 + N7、N6 + N7 + N8、N2 + N4 + N7,其中的 N2、N4、N7 为脱氮效果最优的 3 株菌,单独作为一组合。每一组合各菌株等量接种,扩大培养后按 0.1% 的总

接种量接入起始氨氮浓度约为 $260 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{C}/\text{N} = 5.5$ 的培养基中,培养 48 h 后检测氨氮浓度的变化.

1.6.3 最佳配伍菌株组合与原始驯化菌液协同作用对脱氨氮效果的影响

将上述实验获得的最佳脱氨氮效果配伍菌株扩大培养,取 10 mL 培养 24 h 的菌液与等量原始驯化菌液混合,再取该混合菌液按 0.1% 的接种量分别接入起始氨氮浓度约为 $260 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{C}/\text{N} = 5.5$ 和起始氨氮浓度约为 $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{C}/\text{N} = 3.2$ 的培养基中,定时检测氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、总氮、总无机氮浓度的变化,并与相同接种量的原始驯化菌液的脱氮效果进行比较.

1.7 分析方法^[22]

$\text{NH}_4^+ - \text{N}$: 纳氏试剂光度法; $\text{NO}_2^- - \text{N}$: N -(1-萘基)-乙二胺光度法; $\text{NO}_3^- - \text{N}$: 酚二磺酸光度法; TN (总氮)、 TIN (总无机氮): 过硫酸钾氧化-紫外分光光度法.

检测 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 TIN 时,均用经离心后的细菌培养液的上清液;检测 TN 时则用细菌悬浊液,其中包括无机氮和有机氮.

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离纯化

经约 2 个月的污泥强行驯化和 5~6 轮划线分离,获得能在异养硝化固体培养基上生长的菌株共 31 株,经接入液体培养基中培养、检测,其中 8 株脱氨氮效果最好,且效果稳定,将其命名为 N1~N8. 各菌接入培养基培养 72 h 后脱氮效果如图 1 所示.

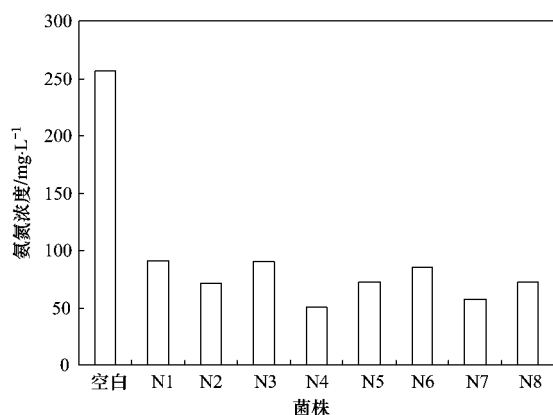


图 1 培养基中接入不同菌株后的氨氮残留量

Fig. 1 Residual ammonia-nitrogen of the medium after inoculating different strains

由图 1 可知,在起始氨氮浓度为 $256.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{C}/\text{N} = 5.5$ 的条件下,经 72 h 培养后,各菌株的氨氮去除率约在 65%~80% 之间.表明这些菌

株能耐受较高浓度的氨氮,但硝化脱氮并不彻底,氨氮残留量依然较大.其中脱氨氮效果最好的是 N4 菌,其氨氮去除率为 80.2%. 以下将对 N4 作进一步的研究.

2.2 菌株 N4 的硝化特性

菌株在异养硝化培养基中培养时的生长曲线及脱氮特征曲线如图 2 所示.

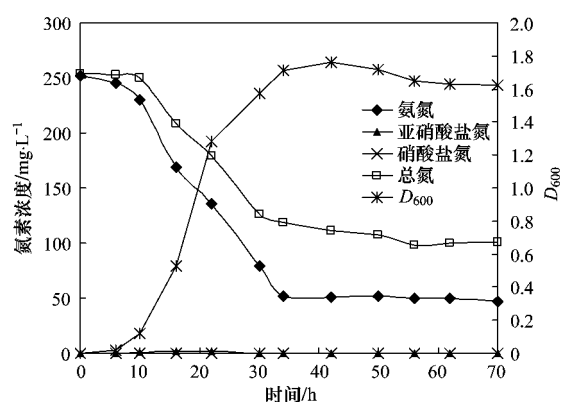


图 2 菌株 N4 的脱氮特征曲线及生长曲线

Fig. 2 Characteristics of denitrification during the growth of strain N4

由图 2 可知,菌株在大约 10 h 后进入指数生长期,34 h 后进入稳定期.氨氮的去除主要发生在指数期,34 h 时氨氮降至 $51.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其后由于碳源的匮乏,氨氮没有进一步的去除,最终氨氮去除率稳定在 80% 左右.整个异养硝化期间几乎没有亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的积累.在指数中期亚硝酸盐氮略有积累,但随即降解.根据水体中生物脱氮氮素转化途径^[23],氨氮在微生物的作用下转化为三类含氮化合物:氧化成亚硝酸盐、硝酸盐、羟胺等;被微生物同化为自身生长代谢所需的有机态氮,即生物态氮,其主要以有机胺、氨基酸等形式存在于胞内;还有一部分是以含氮气体(包括氮氧化物和氮气)的形式逸出至外界环境中.因此氨氮只有转化为气态氮才能从水体中完全脱除.

在硝化作用过程中,产生的羟胺为一中间产物,其残留量往往极少,因此实验中没有单独检测.一些硝化细菌常会将氨氮最终氧化为亚硝酸盐氮和硝酸盐氮,但 N4 在整个脱氮过程中几乎没有检测到这 2 种形式的氮,说明 N4 兼具反硝化功能,能同步硝化反硝化,所以最终培养液中的总氮 (TN) 即为生物态氮和残余氨氮之和.由图 2 可知,总氮最终残留浓度为 $128.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,去除率为 49.5%.由图 2 还可计算出在去除的氨氮中,被转化为气体脱除的约占 61%,被同化的生物态氮占 39%,同化的氮显著少于被氧化脱除的氮.

2.3 各菌株的系统发育分析

测序得到菌株 N1 ~ N8 的 16S rDNA 序列长度在 1 191 ~ 1 397 bp 之间. 经 BLAST 同源性检索, 分别发现 N1 与 *Comamonas aquatica*、N2 与 *Rhodococcus* sp.、BX2、N3 与 *Pseudomonas* sp. AFB-9、N4 和 N7 与 *Pseudomonas* sp. SMCC B0310、N5 与 *Pseudomonas mendocina* NaF-B-1、N6 与 *Arthrobacter* sp. CW1、N8 与 *Paracoccus* sp. ZGL1 的相似性均在 99% 以上. 将这 8 株菌与一些异养硝化菌及一些自养硝化菌进行系统发育分析, 得到系统进化发育树的结构如图 3 所示. 根据待检细菌在系统发育树上

的位置, 可初步判定 N1 属丛毛单胞菌属 (*Comamonas* sp.), N2 属红球菌属 (*Rhodococcus* sp.), N3、N4、N5、N7 属假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), N6 属节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.), N8 属副球菌属 (*Paracoccus* sp.).

已被正式描述硝化细菌(包括自养和异养型)分为 3 类^[24]: 一类属 *Nitrosomonas* 属, 一类属 *Alcaligenes* 属, 第三类属 *Rhodococcus* 属、*Arthrobacter* 属、*Bacillus* 属、*Nitrobacter* 属和 *Pseudomonas* 属. 本研究筛选出的 8 株菌大多在这些菌属内, 只有 N1 为 *Comamonas* 属, 因此 N1 可能是 1 株新型的异养硝化菌.

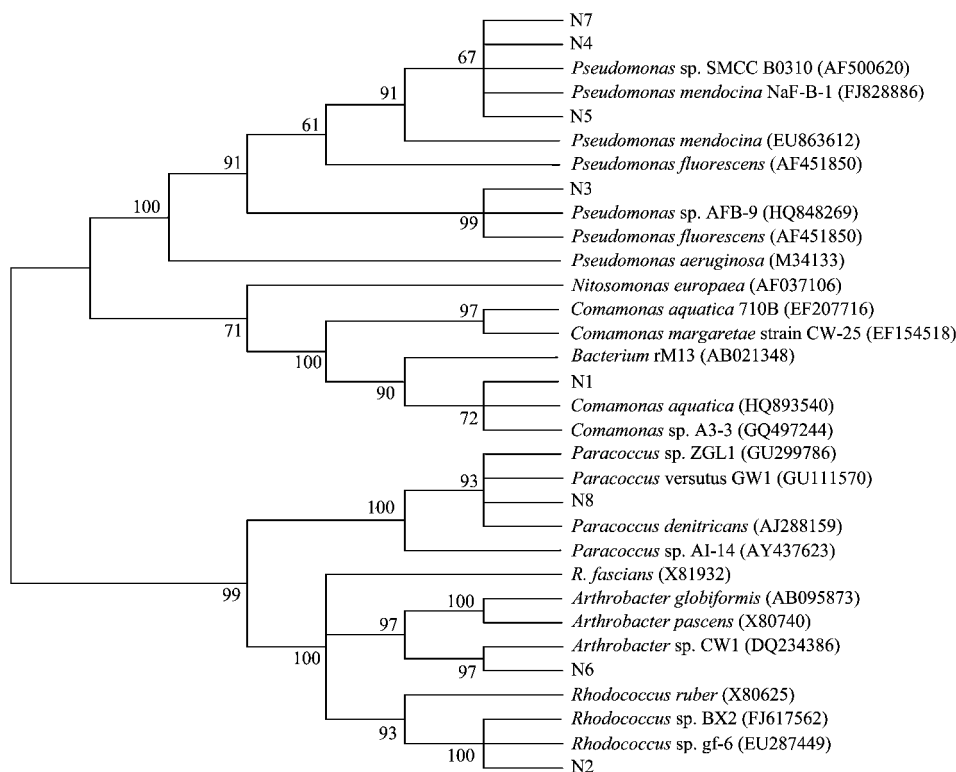


图 3 基于菌株 N1 ~ N8 和其它相关菌株的 16S rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig. 3 Unrooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strains N1-N8 and sequences of validly described bacteria associated

2.4 C/N 比实验

在起始氨氮浓度不变的情况下 (约 $260 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 将菌株 N1 ~ N8 接入 C/N 比分别为 5.5 和 8.0 的异养硝化培养基中, 其结果如图 4 所示.

由图 4 可知, 提高 C/N 比后, 各菌株的脱氨氮能力均有不同程度的提高, 其中 N1、N2、N3 提高幅度显著. 当 C/N 比为 8.0 时, 各菌株的氨氮去除率约为 80% ~ 90%, 其中最高为 N2 的 91.4%.

影响异养硝化菌株的硝化能力的因素有很多, 如温度、pH、碳源种类、C/N 比、溶氧量等^[16]. 在实际应用中, C/N 比是一个较易调节的因素, 所以本实验只

对 C/N 比进行了考察. 各菌株在 C/N 比为 8.0 时, 氨氮仍有一定量的残留. 有研究表明^[15, 16, 25], C/N 比要达到 10 以上才能达到较彻底的脱氨氮效果, 本研究筛选出的菌株可能也要达到该 C/N 比才能将起始约 $260 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氨氮彻底去除, 但提高 C/N 比无疑会增加脱氮成本, 因此需要进一步寻求在低 C/N 比的条件下提高菌株的脱氨氮效率.

2.5 菌株配伍对脱氨氮效果的影响

微生物与微生物之间存在着多种复杂的相互关系, 如互生、共生、拮抗等^[26], 表明多种微生物共同培养可能会加强或减弱其在某方面的作用, 笔者前

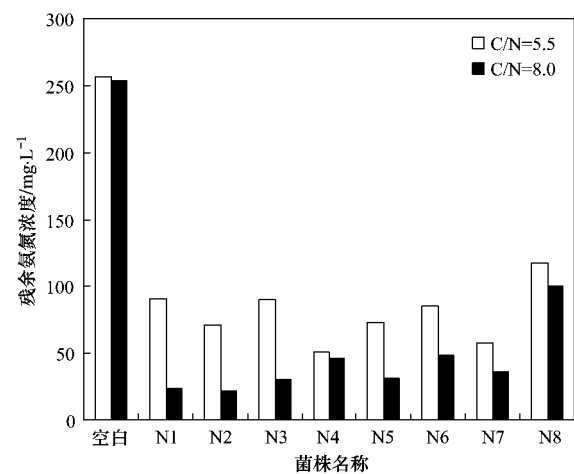


图 4 不同 C/N 比对菌株 N1~N8 脱氮效果的影响
Fig. 4 Effect of different C/N ratios on denitrifying ability of strains N1-N8

期实验中也发现最终的驯化菌液的脱氮效果往往比单菌株的好,因此本研究将不同菌株配伍,进行脱氮考察,所得结果如图 5 所示.

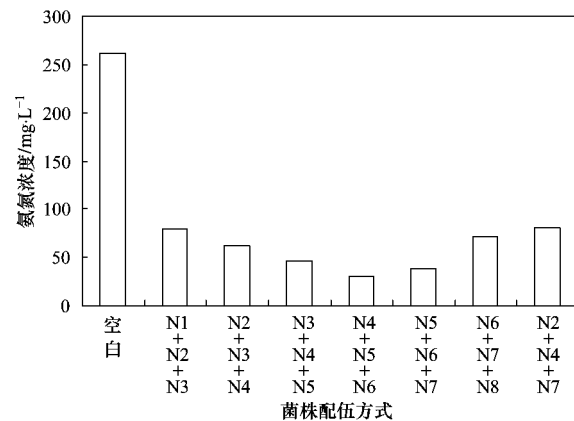


图 5 不同菌株配伍对脱氮效果的影响
Fig. 5 Effect of different strains compatibility proposals on denitrifying ability

由图 5 可知,7 种配伍方式的菌株对起始 $261.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氨氮 48 h 后的去除率约为 69% ~

88%. 其中组合 N4 + N5 + N6 的效果最好,氨氮去除率为 88.2%,高于任一单菌株的氨氮去除率,说明一些菌株之间存在协同作用. 组合 N2 + N4 + N7 氨氮去除率为 69.2%,效果比 N2、N4 或 N7 单独作用时要差. 可见将单独脱氮效果最好的菌株组合并不一定能取得最佳的效果.

尹明锐等^[27]构建了一个由 2 株性能良好的异养硝化-好氧反硝化菌组成的复合菌群 F1,其脱氮能力较单菌株有较大幅度提高, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率最高为 96.06%. 比较而言,F1 菌群的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率较 N4 + N5 + N6 菌群高,但 F1 菌群处理的废水起始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度较低,为 $85 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 下文将进一步寻求提高复合菌群在高氨氮浓度下的脱氮率.

2.6 组合菌株 N4 + N5 + N6 与原始驯化菌液协同作用的脱氮效果

因人工能够分离培养的菌株往往仅占自然界存在菌株总量的 1% 左右^[28],这些未能分离的菌株与分离的菌株之间也可能存在着协同的关系. 曲洋等^[29]将 4 株扩大培养的高效异养硝化-好氧反硝化菌加入 SBR 短程硝化系统中,牟丽婷等^[30]将由 2 株异养硝化菌构成的微生物脱氮菌剂加入开放脱氮反应器中,均发现菌剂的加入能提高反应器的脱氮效率. 实验将配伍菌株 N4 + N5 + N6 与驯化菌液混合共同接入异养硝化培养基,以通过优势脱氮菌株来强化驯化菌液的脱氮效果,所得结果如表 1 所示.

由表 1 可知,在 $\text{C/N} = 5.5$ 的条件下,驯化菌液对 $261.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氨氮,经 48 h 后去除率达 96.9%,比任一单菌株和配伍菌株的脱氨氮效率均要高. 说明驯化菌液中有许多菌未能分离出来,这些菌株对氨氮的去除发挥着重要作用. 而在将驯化菌液与配伍菌株混合后,氨氮去除率提高至 99.8%,几乎完全去除,氨氮残余为 $0.48 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,出水水质优于国家Ⅲ类标准,可见加入脱氨氮效果优异的配伍菌株对驯化菌液的脱氨氮效果有强化作用.

表 1 驯化菌液中加配伍菌株与否对脱氮效果的影响 ($\bar{X} \pm s, n = 3$) / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

含氮化合物种类	驯化菌液			驯化菌液 + 配伍菌株		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	261.8 ± 3.12	101.5 ± 2.17	8.7 ± 1.02	259.2 ± 2.33	78.3 ± 1.14	0.48 ± 0.12
$\text{NO}_2^-\text{-N}$	0.82 ± 0.002	1.07 ± 0.003	0.01 ± 0.002	0.63 ± 0.001	1.27 ± 0.003	0.04 ± 0.001
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	0.52 ± 0.017	0.08 ± 0.004	0.08 ± 0.005	0.69 ± 0.028	0.12 ± 0.009	0.03 ± 0.002
TIN	269.2 ± 2.98	105.6 ± 1.73	10.1 ± 2.03	267.2 ± 3.82	83.8 ± 2.18	1.1 ± 0.25
TN	268.5 ± 3.57	207.60 ± 4.68	131.8 ± 2.36	265.5 ± 4.02	189.3 ± 2.33	116.3 ± 1.18

在 2 种脱氮方式过程中,几乎都没有亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的产生,总无机氮也几乎与氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮之和相等,证明损失的氨氮除一部分被同化为生物质氮外,其余转变为气体逸出.由表 1 可计算出,在 2 种脱氮方式中,脱除的氨氮分别约有 53% 和 57% 转化为气体,有 47% 和 43% 被菌株同化.总氮去除率在 48 h 后分别为 50.9% 和 56.2%,损失的总氮即转化为气体的氮.

2.7 配伍菌株组合原始驯化菌液对高浓度氨氮的去除效果

将培养基氨氮浓度提高至约 $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,相应 C/N 比降至 3.2,按 0.1% 的接种量接入上述混合菌液,脱氨氮效果如图 6 所示.

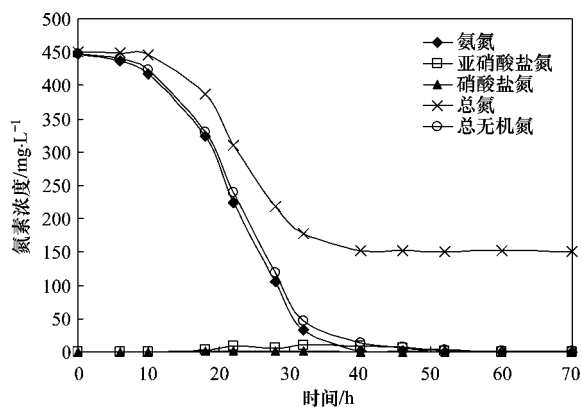


图 6 混合菌株对高浓度氨氮的脱氮效果

Fig. 6 Denitrifying ability of mixing strains in wastewater with high concentration of ammonia-nitrogen

由图 6 可知,前 10 h 氨氮降解较缓慢,10 h 后氨氮浓度开始快速下降,52 h 时氨氮浓度已由起始的 $446.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降至 $0.61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,去除率达 99.9%.结合图 2,可知混合菌株的降解氨氮曲线与单菌株 N4 相似,氨氮的快速去除也大致发生在各菌株的指数生长期.期间亚硝酸盐氮有一定的积累,最高积累量为 $10.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,但在 60 h 时已被完全降解;硝酸盐氮的积累一直不显著;总氮的去除比氨氮稍滞后,总体上随着氨氮的去除而减少,最终去除率为 66.5%,比在起始氨氮浓度为 $260 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有大幅提高.总无机氮的去除曲线几乎与氨氮去除曲线重合,结合硝酸盐氮和亚硝酸盐氮积累曲线,可知培养液中无机氮几乎全部由氨氮、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮组成,无其他形式的无机氮.因此脱除的氨氮除一部分被菌株同化外,其余均被转化为含氮气体从培养液中逸出.最终同化的氮约占脱除的氮

氮的 33%,逸出的气态氮约占 67%,说明随着氨氮浓度的增加,菌株生物量并没有相应大量提高.综上可知脱除的氨氮大部分被转变为含氮气体逸出.

Joo 等^[31]用筛得的异养硝化菌 *Alcaligenes faecalis* No.4 和其突变株 L1 处理高氨氮浓度($1200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的人工废水,其 TN 去除率分别为 48% 和 16%,其中 L1 能将该浓度的氨氮近 100% 去除,但同化的氮占脱除氨氮的 82.9%.比较而言,菌株 N4 和 L1 处理的氨氮浓度虽更高,但同化的氮也较本文的菌剂更高,且 Joo 等所用 C/N 比更高,约为 8.3.此外,实验的 $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨氮并非该菌剂能耐受的极限氨氮浓度,后续实验将进一步提高起始氨氮浓度,考察其脱氮特征.

在将氨氮浓度瞬间提高约 70% (由约 $260 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高至 $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的条件下,混合菌株能够快速适应且脱氮效果优异,表明混合菌株耐环境冲击能力较强.其原因可能是体系中菌种较多、菌群结构较复杂的缘故.因此该混合菌液适合制成微生物生态制剂^[32].

3 结论

(1)通过活性污泥强行驯化、颜色指示剂快速脱氮效果检测等步骤,共筛出 8 株、名为 N1 ~ N8 的能耐受高浓度氨氮的异养硝化菌株.它们对起始氨氮浓度约为 $260 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N = 5.5 的人工废水,48 h 后氨氮去除率在 65% ~ 80% 之间,其中 N4 脱氨氮效果最好,其脱氨氮作用主要发生在指数生长期,期间无亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的积累,有同步硝化反硝化功能.

(2)基于各菌株的 16S rDNA 序列的系统发育分析表明,8 株菌分属从毛单胞菌属、红球菌属、假单胞菌属、节杆菌属和副球菌属,其中属丛毛单胞菌属的 N1 可能是 1 株新型异养硝化菌.

(3)提高培养基 C/N 比能提高所筛选出的菌株的脱氨氮效率:在将 C/N 比由 5.5 提高至 8.0 后,8 株菌的氨氮去除率由约 65% ~ 80% 提高至 80% ~ 90%;将一些菌株配伍也有利于提高脱氨氮效率:菌株 N4、N5、N6 配伍后,对起始 $261.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氨氮 48 h 后的去除率为 88.2%,高于任一单菌株.

(4)用最佳配伍菌株组合原驯化菌液,其脱氨氮效果有大幅的提升.在 C/N = 5.5 的条件下,培养 48 h 后该混合菌液能将起始 $259.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氨氮降至 $0.48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;在将氨氮浓度进一步提高至 $446.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、C/N 比降为 3.2 后,52 h 后该混合

菌液依然能将其降为 $0.61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氨氮去除率为 99.9%。脱除的氨氮除一部分被菌株同化外, 大部分被转变为含氮气体。该混合菌不论是耐受的氨氮浓度, 还是氨氮去除率, 均大幅高于目前国内外筛出的绝大多数异养硝化菌株^[12-19, 24, 25, 33, 34]。

参考文献:

- [1] 刘志培, 刘双江. 硝化作用微生物的分子生物学研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2004, **10**(4): 521-525.
- [2] 温东辉, 唐孝炎. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用[J]. 环境污染与防治, 2003, **25**(1): 283-285.
- [3] 马放, 王弘宇, 周丹丹. 好氧反硝化生物脱氮机理分析及其研究进展[J]. 工业用水与废水, 2005, **36**(2): 11-14.
- [4] Schimel J P, Firestone M K. Identification of heterotrophic nitrification in a Sierran forest soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, **48**(4): 802-806.
- [5] Killham K. Nitrification in coniferous forest Soils [J]. Plant and Soil, 1990, **128**(0): 31-44.
- [6] Adams J A. Identification of heterotrophic nitrification in strongly acid larch humus [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1986, **18**(3): 339-342.
- [7] Duggin J A, Voigt G K, Bormanna F H. Autotrophic and heterotrophic nitrification in response to clear-cutting northern hardwood forest [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1991, **23**(8): 779-787.
- [8] Robertson L A, Kuenen J G, Kleijntjens R. Aerobic denitrification and heterotrophic nitrification by *Thiosphaera pantotropha* [J]. Antonio van Leeuwenhoek, 1985, **51**(4): 445.
- [9] Daum M, Zimmer W, Papen H, et al. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida* [J]. Current Microbiology, 1998, **37**(4): 281-288.
- [10] Moir J W, Crossman L C, Spiro S, et al. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans* [J]. FEBS Lett, 1996, **387**: 71-74.
- [11] Anderson I C, Poth M, Homstead J, et al. A comparison of NO and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(11): 3525-3533.
- [12] Kim J K, Park K J, Cho K S, et al. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains [J]. Bioresource Technology, 2005, **96**(17): 1897-1906.
- [13] Su J J, Yeh K S, Tseng P W. A strain of *Pseudomonas* sp. isolated from piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan [J]. Current Microbiology, 2006, **53**: 77-81.
- [14] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, **100**(2): 184-191.
- [15] 孔庆鑫. 一株新型脱氮微生物的分离鉴定及其脱氮机制[D]. 天津: 军事医学科学院, 2004.
- [16] 曾庆梅, 司文攻, 李志强, 等. 一株高效异养硝化菌的选育、鉴定及其脱氮条件[J]. 微生物学报, 2010, **50**(6): 803-810.
- [17] 张培玉, 曲洋, 于德爽, 等. 菌株 qy37 的异养硝化/好氧反硝化机制比较及氨氮加速降解特性研究[J]. 环境科学, 2010, **31**(8): 1819-1826.
- [18] 廖小红, 汪苹, 刁惠芳, 等. 蜡状芽孢杆菌 WXZ-8 的异养硝化/好氧反硝化性能研究[J]. 环境污染与防治, 2009, **31**(7): 17-24.
- [19] 陈咄圳, 王立刚, 王迎春, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及脱氮性能的实验研究[J]. 环境科学, 2009, **30**(12): 3614-3618.
- [20] Robertson L A, Van Niel Ed W J, Torremans R A M, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **54**(11): 2812-2818.
- [21] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 224.
- [22] 国家环境保护局. 水与废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [23] Wrage N, Velthof G L, Van Beusichem M L, et al. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, **33**(12-13): 1723-1732.
- [24] 赵诣. 三株异养硝化细菌的分离、特征及其对水产养殖废水的脱氮作用[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [25] 陈赵芳, 尹立红, 浦跃朴, 等. 一株异养硝化菌的筛选及其脱氮条件[J]. 东南大学学报, 2007, **37**(3): 486-490.
- [26] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 259-261.
- [27] 尹明锐, 汪苹, 刘健楠, 等. 复合脱氮菌群的构建及其脱氮特性研究[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2010, **28**(3): 55-59.
- [28] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiological Reviews, 1995, **59**(1): 143-169.
- [29] 曲洋, 张培玉, 于德爽, 等. 异养硝化/好氧反硝化菌生物强化含海水污水的 SBR 短程硝化系统初探[J]. 环境科学, 2010, **31**(10): 2376-2384.
- [30] 牟丽婷, 黄钧, 苟莎. 异养硝化微生物菌剂及其好氧颗粒污泥的脱氮试验[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15**(3): 356-360.
- [31] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Improvement in ammonium removal efficiency in wastewater treatment by mixed culture of *Alcaligenes faecalis* No. 4 and L1 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, **103**(1): 66-73.
- [32] 张小玲. 反硝化菌 DNF409 水体脱氮规律研究及其 *narG* 基因的中断[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [33] 杨宗政, 王鑫, 庞金钊, 等. 异养硝化菌的分离及其强化活性污泥脱氮效果[J]. 中国给水排水, 2006, **22**(21): 67-70.
- [34] 林燕, 孔海南, 何义亮, 等. 膜生物反应器异养硝化菌的分离及硝化特性[J]. 中国环境科学, 2005, **25**(4): 394-398.