

好氧反硝化细菌的筛选鉴定及处理硝酸盐废水的研究

苏俊峰^{1,2}, 王继华³, 马放^{1*}, 高珊珊¹, 魏利¹, 王晨¹

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 2. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055; 3. 哈尔滨师范大学生命与环境科学学院, 哈尔滨 150080)

摘要:采用污泥驯化手段富集好氧反硝化细菌, 将得到的驯化污泥分离纯化, 共得到 5 株好氧反硝化细菌. f1、f2、f3、f5 和 f7 的 TN 去除率为 90.4%、91.2%、94.6%、95.6% 和 97%, 表现出较好地去除总氮的能力. 经过生理生化鉴定和 16S rDNA 测序, 建立了系统发育树, 可基本确定分离的菌株 f1、f3 和 f5 为 *Pseudomonas* sp., 分离菌 f2 和 f4 为 *Paracoccus* sp.. 采用筛选的 5 株好氧反硝化细菌建立连续流反应器. 在反应器进入稳定运行阶段时, 可以观察到系统对于硝酸盐的去除率稳定在 98.16% 左右. 表现出较好的硝酸盐去除效果, 出水亚硝酸盐含量一直维持在较低的水平, 其最大值不超过 3.56 mg/L. COD 的平均去除率为 87.24%, 基本实现了同一反应器中有机物和硝酸盐的共同去除.

关键词:好养反硝化细菌; 硝氮废水; 好养反硝化

中图分类号: X172; X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)10-2332-04

Isolation and Identification of Aerobic Denitrifiers and Dispose the Wastewater of NO_3^- -N

SU Jun-feng^{1,2}, WANG Ji-hua³, MA Fang¹, GAO Shan-shan¹, WEI Li¹, WANG Chen¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 3. Department of Biology and Environment, Harbin Normal University, Harbin 150080, China)

Abstract: After domesticating activated sludge to enriched aerobic denitrifiers, 5 aerobic denitrifiers were isolated from it. The removal rates of TN were 90.4%, 91.2%, 94.6%, 95.6% and 97% by f1, f2, f3, f5 and f7, respectively. According to the physiological biochemical index, five strains of aerobic denitrifiers were generally identified as *Pseudomonas* sp., *Paracoccus* sp., respectively. The establishment of continuous flow reactor surveyed various indices. And the efficiency of nitrate nitrogen removal can reach up to 98.16%, when the reactor works smoothly. The nitrite concentration of effluent was at a low level and the maximum value was no more than 3.56 mg/L. At the same time, the efficiency of COD removal was 87.24%, which demonstrates the coinstantaneous removing of both organic and nitrate nitrogen.

Key words: aerobic denitrifiers; nitrate wastewater; aerobic denitrification

脱氮是近年来废水处理研究中的重要课题, 而生物脱氮又被认为是目前废水脱氮中经济有效的方法之一^[1]. 一般认为硝化作用只发生在好氧条件下, 而反硝化只能在厌氧或缺氧的条件下进行. 20 世纪 80 年代科学家发现了好氧反硝化菌, 在许多实际运行的好氧硝化池中也常常发现有 30% 的总氮损失^[2]. 国内外的不少研究和报道^[3~5]已能充分证明, 反硝化可发生在有氧条件下, 使得有关好氧硝化-反硝化生物脱氮的研究日趋活跃.

目前已知的好氧硝化-反硝化菌有: 粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*)^[6]、假单胞 (*Pseudomonas*)^[7~9]、克雷伯菌属 (*Klebsiella*)^[7]、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*)^[10]、红球菌属 (*Rhodococcus*)^[11]、动胶菌属 (*Zoogloea*)^[7] 和泛养硫球菌 [*Thiosphaera pantotropha*], 现更名为脱氮副球菌 (*Paracoccus denitrificans*)^[12]. 它们能同时利用氧和硝酸作为电

子受体以获得高生长率. 与传统的生物脱氮工艺相比, 好氧反硝化菌的出现可以使生物脱氮在同一反应器中完成, 实现真正意义上的同步硝化反硝化过程. 关于利用好氧反硝化菌实现的生物脱氮的报道较少. Gupta 等^[13]用含有 *Thiosphaera pantotropha* 的生物转盘处理不同浓度的生活污水. Kshirsagar 等^[14]利用 2 个操作条件完全相同的氧化沟来处理模拟肥料的工业废水.

本研究从太平污水处理厂的曝气池和生物陶粒作为载体的好氧反硝化反应器中取得样品, 经过驯化、富集、分离、纯化、先初步筛选, 再复筛, 得到 5 株

收稿日期: 2006-11-22; 修订日期: 2007-01-15

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目 (50521140075); 黑龙江省青年科学技术专项资金项目 (QC05C05); 黑龙江省环境生物技术重点实验室开放课题项目 (ZD200501)

作者简介: 苏俊峰 (1977~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物技术. E-mail: sjf1977518@sina.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: mafang@hit.edu.cn

高效的好氧反硝化细菌,利用 5 株好氧反硝化细菌建立连续流反应器处理硝酸盐废水.

1 材料与方法

1.1 培养基

FM^[14]培养基(g/L):牛肉膏 1.0;蛋白胨 5.0;KNO₃ 1.0.

自制的好氧反硝化培养基(SG,g/L):Na₂HPO₄·7H₂O 5.0;KH₂PO₄ 1.0;MgSO₄·7H₂O 0.1;琥珀酸钠 5.5;KNO₃ 2.0;NaNO₂ 0.5;微量元素溶液 2 mL;pH 7~7.5.

微量元素溶液(g/L):EDTA 50.0;ZnSO₄ 2.2;CaCl₂ 5.5;MnCl₂·4H₂O 5.06;FeSO₄·7H₂O 5.0;(NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O 1.1;CuSO₄·5H₂O 1.57;CoCl₂·6H₂O 1.61;pH=7.0.

1.2 试验装置

试验装置采用的是 1 个直径为 180 mm,有效容积为 3 L 的圆柱形玻璃容器,反应器内的活性污泥来自 SBR 法处理高浓度氨氮废水工艺;反应器间歇曝气培养,具体操作模式为:进水→曝气→搅拌→沉降(0.3 h)→排水(0.15 h).初始曝气时间为 12 h,每 3 d 将曝气时间增加 1~2h,搅拌时间相应减少.

表 1 试验模拟用水水质

Table 1 Water quality of the synthetic wastewater					
水质指标	COD	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	TN	pH
浓度/mg·L ⁻¹	149.57~356.71	46.50~103.86	0.07~8.47	54.38~114.46	6.8~7.5

试验装置如图 1 所示,反应器由有机玻璃加工而成,容积为 12 L,沿反应器自上而下设 5 个取样口,顶部设三相分离器.采用鼓风曝气、电动搅拌机搅拌,转子流量计调节曝气量以控制反应器中溶解氧浓度,用溶解氧仪和 pH 计分别在线测定各反应阶段的 DO 和 pH 值.将筛选的好养反硝化细菌扩大

运行 28 d 后污泥呈浅灰色絮状,污泥状态良好,至此认为污泥驯化结束^[15].

1.3 好氧反硝化细菌筛选

从反应器内取 10 mL 新鲜污泥至装有 90 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中,然后将三角瓶放入空气振荡器中,把污泥充分摇匀打碎.打碎后的污泥经倍比稀释,采用混均平板法和涂布平板法分离,在好氧反硝化培养基(SG)经 3 次划线分离后得到 42 株细菌.将上述分离纯化后得到的纯分离物斜面用灭菌后的 SG 培养液洗到装有 100 mL SG 培养液的三角瓶中,并在每个三角瓶内加入几粒灭菌的玻璃珠(尽量减小厌氧微环境对是试验结果的影响),用 9 层纱布包好瓶口,放入空气振荡培养器,具体参数如下:温度 30℃,转速 140 r/min,培养时间 40 h.取培养前后的菌液采用日本岛津公司生产的 TOC-VCPN-TNM-1 型仪器测定 TN 浓度,考察其对 TN 的去除率.

1.4 连续流反应器的人工配水方法

试验用废水采用人工配水,由 KNO₃、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、MgSO₄·7H₂O、MnSO₄、NaAC 和微量元素按一定比例配制.其水质如表 1 所示.

1.5 连续流反应器的建立

培养,接种少量的新鲜活性污泥,空曝气 3 d 形成活性污泥后进行运行.水温为 20~25℃.

1.6 水质分析方法

实验采用的水质分析方法具体见表 2.

表 2 常规指标的检测项目与方法

Table 2 Main analytical items and analytical methods	
待测指标	测定方法
NO ₂ ⁻ -N	乙二胺光度法
NO ₃ ⁻ -N	麝香草酚分光光度法
NH ₄ ⁺ -N	纳氏试剂分光光度法
TN-N	碱性过硫酸钾紫外分光光度法
COD	快速测定法

1.7 细菌总 DNA 的提取

取 500 μL PBS 悬浮菌体,12 000 r·min⁻¹,10 min,将上清液移入到 1 个新离心管中,加入 300 μL DNA 提取液涡旋振荡混匀后放于 37℃ 水浴锅中保温 30 min,每隔 5 min 将离心管上下颠倒几次,使反应完全.加 80 μL 10% SDS,65℃ 水浴 1 h,期间将离

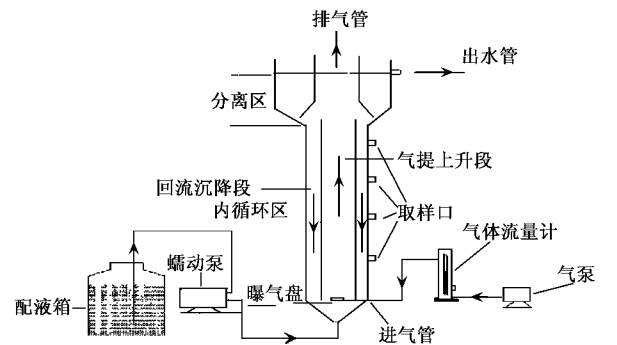


图 1 反应器装置

Fig.1 Sketch of continuous flow reactor

心管上下颠倒几次, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min, 将上清移至另一 1.5 mL 离心管中. 加 30 μL NaAC 冰浴 10 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 将上清液移入到 1 个新离心管中, 加 400 μL 氯仿/异戊醇(24:1)上下颠倒混匀. 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 加入 400 μL 氯仿, 颠倒几下混匀, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 用 200 μL 的移液器将上清液转移到 1 个新的离心管内. 如蛋白较多重复以上 2 个步骤. 加入 0.6 倍体积异丙醇, 上下颠倒混匀. 样品放置在 -20°C 冰箱内, 1 h 或过夜进行沉淀. 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心样品 20 min, 倒掉上清液. 室温晾至样品 6~8 h 使其干燥. 用 20 μL TE 悬浮样品.

1.8 16S rDNA 测序及同源性比较

委托大连宝生物工程公司进行测序, 16S rDNA 将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行同源性比较. 根据测序结果, 利用 NCBI 提供的 Blastn 工具和 Cluastx、PhyloDraw 等相关软件在 GenBank 数据库中找到了同源序列^[16], 并建立了系统发育树.

2 结果与讨论

2.1 好氧反硝化菌的筛选

从太平污水处理厂的曝气池和生物陶粒作为载体的好氧反硝化反应器中取得活性污泥样品, 采用 SBR 反应器对活性污泥样品进行 1 个月的驯化, 在污泥驯化后, 从装置中共分离纯化得到 42 株细菌, 其中 TN 去除率在 90% 以上的菌株有 5 株. 分别为 f1、f2、f3、f5 和 f7, 其对总氮的去除率为 90.4%、91.2%、94.6%、95.6% 和 97%, 表现出较好地去除总氮的能力. 一般认为, 生物同化作用利用的氮不会超过 TN 的 30%, 所以可以基本认为这 5 株细菌在好氧条件下具有反硝化作用.

2.2 菌株鉴定

采用 16S rRNA 基因的通用引物 BSF8/20 和 BSR1451/20^[9] 扩增菌株基因组 DNA, 取 3 μL 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测. 产物回收后, 克隆进 T-载体(宝生物), 采用 M13 正反向通用引物进行测序. 将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行同源性比较. 经 16S rDNA 测序及同源性比较, 分离菌 f1、f3 和 f5 与多株 *Pseudomonas* sp. 的相似性水平达 99%, 分离菌 f2 和 f4 与多株 *Paracoccus* sp. 的相似性水平达 99%, 结合菌株的形态学和生理学特性, 可基本确定分离的菌株 f1、f3 和 f5 为 *Pseudomona* sp., 分离菌 f2 和 f4 为 *Paracoccus*

sp., 系统发育树的结构如图 2 所示.

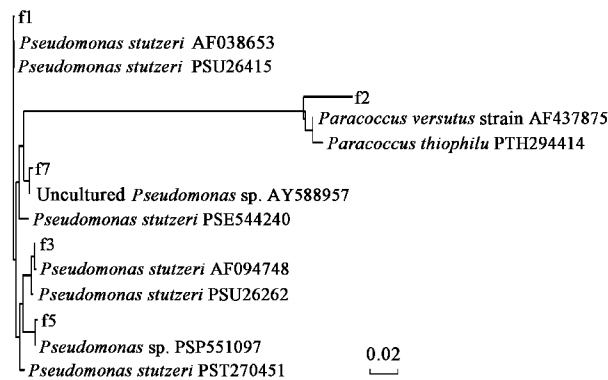


图 2 5 株细菌同相近序列采用 N J 法构建的系统进化树
Fig.2 Phylogenic tree of 5 sample and similar sequences in GenBank, constructed by neighbor-joining method

2.3 连续流反应器运行效果分析

试验期间连续流反应器对硝态氮的去除效果如图 3 所示. 从图 3 中可以看出, 在前 10 d 的时间内, 硝酸盐的去除率波动较大, 在第 11~20 d, 进水硝酸盐浓度趋于稳定, 平均进水硝酸盐浓度为 96.92 mg/L, 硝酸盐去除率逐步升高, 在第 21~30 d 平均出水硝酸盐浓度为 1.78 mg/L, 硝酸盐的平均去除率为 98.16%. 而在整个试验阶段出水亚硝酸盐含量一直保持在较低水平, 其最高值不超过 3.56 mg/L, 平均为 1.35 mg/L. 从图 4 亦可以看出, TN 去除率在前 10 d 的时间内亦呈现无规律的变化; 在第 11~20 d, TN 去除率渐趋于稳定, 并呈现缓慢上升的趋势. 在第 21~30 d 时, 出水 TN 的平均浓度为 2.37 mg/L, 其间最小出水 TN 浓度达到 1.09 mg/L, TN 的平均去除率为 96.71%, 由此可知, 进水硝酸盐氮基本上被转变成了气态氮.

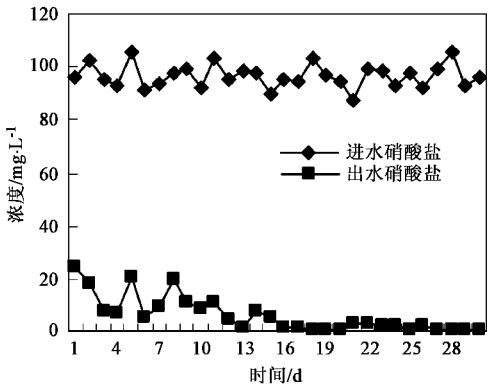


图 3 进出水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度的变化

Fig.3 Variation of $\text{NO}_3^- - \text{N}$ in the effluent of continuous flow reactor

从图 5 可以看出, 在前 15 d COD 的去除率波动

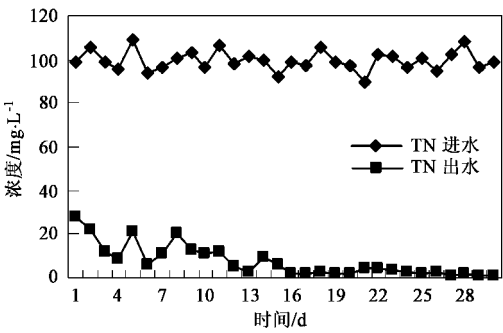


图 4 进出水 TN 浓度的变化

Fig.4 Variation of TN in the effluent of continuous flow reactor

较大,在第 15 d 后 COD 的去除率趋于稳定,16 ~ 30 d 的 COD 去除率为 87.24% .说明连续流反应器对 COD 有一定的去除,基本实现了有机物质的去除和反硝化反应在同一反应器中同时发生,并且系统对硝酸盐和 COD 都有较好的去除率.

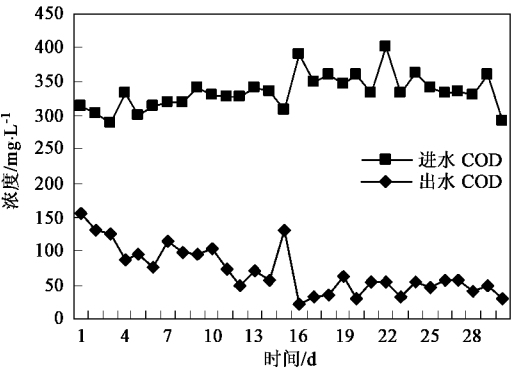


图 5 进出水 COD 浓度的变化

Fig.5 Variation of COD in the effluent of continuous flow reactor

3 结论

(1)采用 SBR 反应器对活性污泥样品进行 1 个月的驯化,从装置中共分离纯化得到 5 株高效好养反硝化细菌,分别为 f1、f2、f3、f5 和 f7,其对总氮的去除率为 90.4%、91.2%、94.6%、95.6% 和 97%,表现出较好地去除总氮的能力.

(2)经 16S rDNA 测序及同源性比较,分离菌 f1、f3 和 f5 与多株 *Pseudomona* sp. 的相似性水平达 99%,分离菌 f2 和 f4 与多株 *Paracoccus* sp. 的相似性水平达 99%. 结合菌株的形态学和生理学特性,可基本确定分离的菌株 f1、f3 和 f5 为 *Paracoccus* sp., 分离菌 f2 和 f4 为 *Paracoccus* sp..

(3)在第 21 ~ 30 d 硝酸盐的平均去除率为 98.16%. 而在整个试验阶段出水亚硝酸盐含量一直

保持在较低水平,其最高值不超过 3.56 mg/L. 在第 21 ~ 30 d 时, TN 的平均去除率为 96.71%, 由此可知,进水硝酸盐氮基本上被转变成了气态氮. 16 ~ 30 d COD 去除率为 87.24%, 说明连续流反应器对 COD 有一定的去除,基本实现了有机物质的去除和反硝化反应在同一反应器中同时发生.

参考文献:

[1] 张光亚,方柏山,闵航,等. 好氧同时硝化反硝化菌的分离鉴定及系统发育分析[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2): 226 ~ 228.

[2] Patureau D, Zumstein E, Delgenes J P, et al. Aerobic denitrification isolation from diverse natural and managed ecosystems[J]. Microb Ecol, 2000, 39: 145 ~ 152.

[3] Ding A Z, Fu J M, Sheng G Y. Evidence of aerobic denitrification [J]. Chin Scie Bull, 2000, 45(3): 2779 ~ 2782.

[4] Xie S G, Zhang X J, Wang Z S. Integrated study on biochemical mechanism in biofilter system[J]. Acta Sci Circumst, 2002, 22(5): 557 ~ 561.

[5] Robertson L A, Kuenen J G. Aerobic denitrification: a controversy revived[J]. Arch Microbiol, 1984, 13(9): 351 ~ 354.

[6] Ottens S, Seckalk J, Kuenen J G. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51(2): 255 ~ 261.

[7] Takaya N, Maria Antonina B C S, Yasushi S, et al. Aerobic denitrification bacteria that produce low levels of nitrous oxide[J]. Appl Envir Microbio, 2003, 69(6): 3152 ~ 3157.

[8] 龙雯,陈存社,汪萍,等. 一株好氧反硝化细菌的分离与鉴定 [J]. 中国酿造, 2006, 8: 28 ~ 30.

[9] 马放,周丹丹,王宏宇,等. 一株好氧反硝化细菌生理生态特征的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2006, 38(4): 575 ~ 577.

[10] Pai S L, Chong N M, Chen C H. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bio-agents in waste water treatment[J]. Bioresource Technology, 1999, 68(2): 179 ~ 185.

[11] 张光亚,方柏山,闵航. 一株好氧反硝化菌的特征及系统进化分析[J]. 华侨大学学报, 2004, 25: 75 ~ 78.

[12] Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1 [J]. Bio Technol Lett, 1997, 11 (19): 1157 ~ 1159.

[13] Gupta A B, Gupta S K. Simultaneous carbon and nitrogen removal in a mixed culture aerobic RBC biofilm [J]. Wat Res, 1999, 33(2): 555 ~ 561.

[14] Kshirsagar M, Gupta A B, Gupta S K. Aerobic denitrification studies on activated sludge mixed with *Thiosphaera pantotropha* [J]. Environ Technol, 1994, 16(1): 35 ~ 43.

[15] 周丹丹,马放,王弘宇,等. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 837 ~ 839.

[16] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(11): 3389 ~ 3402.