

文章编号: 1000-5641(2018)06-0022-10

异养硝化-好氧反硝化细菌的筛选 及其脱氮性能研究

张婷月^{1,2}, 丁钰^{1,2}, 黄民生^{1,2}

(1. 华东师范大学 生态与环境科学学院, 上海 200241;

2. 华东师范大学 上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室, 上海 200241)

摘要: 为寻求高效水体脱氮手段, 从龙泓涧梯级塘底泥中筛选出以 *Pseudomonas* 菌属为主、具有异养硝化-好氧反硝化功能菌群, 将其命名为 LHJ-1. 异养硝化和好氧反硝化性能研究结果表明, 菌群 LHJ-1 具有明显的异养硝化功能, 对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TOC 利用率分别达 99.90% 和 56.69%, 且表现出较高的反硝化能力, 对 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的转化率分别为 92.46% 和 89.67%. 由不同环境因素(碳氮比、碳源、pH 值和溶解氧)影响实验可知, 多种环境因子均对菌群 LHJ-1 脱氮效果具有较大影响, 因此在实际应用中需考察不同环境因子, 以找出最佳生长条件, 获得最大脱氮效率. 异养硝化-好氧反硝化菌群 LHJ-1 的筛选在水体脱氮除碳中具有广阔的应用前景.

关键词: 异养硝化; 好氧反硝化; 混合菌; 脱氮性能

中图分类号: X522 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2018.06.003

Screening of heterotrophic nitrification-aerobic denitrifying bacteria and its nitrogen removal characteristics

ZHANG Ting-yue^{1,2}, DING Yu^{1,2}, HUANG Min-sheng^{1,2}

(1. School of Ecological and Environmental Sciences, East China Normal University,
Shanghai 200241, China;

2. Shanghai Key Laboratory for Urban Ecological Processes and Eco-Restoration,
East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract: In order to find a high-efficiency denitrification method, a *Pseudomonas* genus-based strain was selected from the sediment of Cascade Pond in Longhong Ravine. The strain had heterotrophic nitrification and aerobic denitrification capability and was named LHJ-1. The results showed that the bacterial consortium LHJ-1 had clear heterotrophic nitrification capability; the utilization rates of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and TOC were 99.90% and 56.69%,

收稿日期: 2018-06-08

基金项目: 国家重大科技专项(2014ZX07101102, 2017ZX07207001); 上海市普陀区高层次人才科研创新项目(2014-A-18); 地理信息科学教育部重点实验室开放研究基金(KLGIS2016A03)

第一作者: 张婷月, 女, 硕士研究生, 研究方向为水环境治理与修复. E-mail: 1391994089@qq.com.

通信作者: 黄民生, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为水环境治理与修复.

E-mail: mshuang@des.ecnu.edu.cn.

respectively. Concurrently, it demonstrated good denitrification ability, with conversion rates of NO_3^- -N and NO_2^- -N at 92.46% and 89.67%, respectively. Experiments evaluating environmental effects showed that various factors (e.g., C/N ratio, carbon source, pH, and DO concentration) could have a significant influence on the denitrification effect. Accordingly, different environmental factors should be investigated in practical applications to determine the optimum growth conditions for the best nitrogen removal efficiency. The screening of heterotrophic nitrification and aerobic denitrifying bacteria consortium LHH-1 has broad application prospects for both denitrification and decarbonization of water.

Keywords: heterotrophic nitrification; aerobic denitrification; mixed bacterial community; denitrification characteristics

0 引言

近年来水生态环境问题日益严重, 水中氮素污染状况不断恶化, 氮素超标已成为水体富营养化的一个重要原因. 因此去除水中氮素已经成为水污染防治领域的一个热点问题^[1]. 生物脱氮以无污染、高效率的优点被认为是脱除水中氮素的有效手段^[2]. 传统的生物脱氮分为硝化过程和反硝化过程^[3-5]. 自养硝化细菌将水中 NH_4^+ -N 在好氧条件下氧化为 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N, 反硝化细菌在缺氧的环境下还原 NO_3^- -N 成氮气, 从而脱除水中氮元素. 由于反应条件和作用机理不同, 硝化和反硝化过程需分开进行, 导致工艺流程耗时较长. 因此科学家希望能够突破传统生物脱氮技术限制, 发掘新型脱氮方法^[6-7]. 1984 年, Robertson 等人发现了一种能以 NO_3^- -N 和氧气同时作为电子受体的兼养微生物 *Thiosphaera Pantotropha*, 并将此过程命名为好氧反硝化^[8]. 这一发现突破了传统生物脱氮理论, 此后陆续有学者对好氧反硝化领域展开研究. 目前报道出的好氧反硝化菌属有产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)^[9]、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[2,10]、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)^[11] 和红球杆菌属 (*Rhodococcus*)^[12] 等. 综合分析好氧反硝化作用机理的不同观点, 总结起来可以从微环境和生物学角度进行析分^[13-14]. 前者认为在微生物絮体内, 由于氧传递导致絮体内产生溶解氧浓度梯度, 在外部环境中与空气接触良好的好氧反硝化菌进行硝化作用, 在絮体内部存在厌氧的微环境, 由厌氧菌进行反硝化作用^[15]. 后者认为好氧反硝化过程中的协同呼吸, 使得氧和 NO_3^- -N 可同时作为电子受体^[8]. 此外, 在好氧条件下, 膜内硝酸盐还原酶几乎不起作用, 而周质硝酸还原酶能够在高浓度溶解氧条件下表达, 参与完成反硝化过程. 较传统的生物脱氮而言, 好氧反硝化菌能够同时进行硝化和反硝化, 缩短工艺流程, 且具有较好的耐高溶解氧性能, 能够利用原水中的碳源完成自身代谢活动, 生长速率快.

本实验从龙泓涧梯级塘底泥中富集出具有异养硝化-好氧反硝化功能的细菌菌群, 讨论了其异养硝化及好氧反硝化生理生化特征, 并研究了不同因素(碳源、碳氮比、pH 值和溶解氧)对其脱氮效能的影响, 以期在实际工程应用提供技术借鉴.

1 材料与方 法

1.1 样品采集

龙泓涧梯级塘位于杭州西湖西南面, 采用彼得森抓泥斗采集底部沉积物, 随后迅速冷藏运回实验室.

1.2 培养基

富集驯化培养基^[16]: $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$ 0.405 1 g/L; KNO_3 1 g/L; NH_4Cl 1 g/L; KH_2PO_4 0.007

g/L; K_2HPO_4 0.027 g/L; MgSO_4 0.005 g/L; 微量元素溶液 2 mL/L, 调节 pH 值在 7.0~7.5.

微量元素溶液组成: EDTA 100 mg/L; ZnSO_4 4.4 mg/L; CaCl_2 11 mg/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.2 mg/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.2 mg/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3.2 mg/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.2 mg/L.

初筛固体培养基: $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$ 0.405 g/L; KNO_3 1 g/L; NH_4Cl 1 g/L; KH_2PO_4 0.007 g/L; K_2HPO_4 0.027 g/L; MgSO_4 0.005 g/L; 微量元素溶液 2 mL/L, 调节 pH 值在 7.0~7.5, 琼脂粉 20 g. 微量元素组成同富集驯化培养基.

复筛固体培养基: $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$ 0.405 g/L; KNO_3 1 g/L; KH_2PO_4 0.007 g/L; K_2HPO_4 0.027 g/L; MgSO_4 0.005 g/L; 微量元素溶液 2 mL/L, 调节 pH 值在 7.0~7.5, 琼脂粉 20 g. 微量元素组成同富集驯化培养基.

DTM 液体培养基: $\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_4$ 0.405 g/L; KNO_3 1 g/L; KH_2PO_4 0.007 g/L; K_2HPO_4 0.027 g/L; MgSO_4 0.005 g/L; 微量元素溶液 2 mL/L, 调节 pH 值在 7.0~7.5. 微量元素组成同富集驯化培养基.

1.3 好氧反硝化菌的筛选

根据郭琳等^[16]和 Zhu 等^[17]的筛选方法, 取样品 10 mL 和灭菌水 90 mL 于 250 mL 锥形瓶中, 加灭菌玻璃珠震荡混匀, 取以上 10 mL 混合液加入 100 mL 灭菌富集驯化培养液, 放入 30°C、120 r/min 摇床(型号为 HPY-91), 每 5 天 更换一次新鲜培养基(10 mL 原液+90 mL 灭菌培养基). 15 d 后取样液 10 mL, 加入 90 mL 灭菌水混匀, 形成混合菌液. 采用倍比稀释法稀释成 10^{-1} 到 10^{-7} 梯度的菌悬液, 再用灭菌接种环蘸取菌液在初筛固体培养基上进行划线, 倒置培养皿于 30 °C 恒温培养箱(型号为 LRH-150F), 每天观察菌落形态. 比较挑取生长良好的菌落于复筛固体培养基进行划线分离纯化, 倒置培养皿于 30 °C 恒温培养箱, 每天观察菌落形态, 直至得到特征一致的菌落. 而后挑取同一平板上长势良好、不同位置的菌落接种于 100 mL 的 DTM 培养基中, 放置在 30 °C、120 r/min 摇床中, 54 h 后测其总氮(TN)去除效率, 选取 TN 去除率在 70% 以上的菌进行进一步研究.

1.4 菌群鉴定

DNA 提取方法参照 AXYGEN 公司 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒, 采用细菌普通引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')/806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对特定区域扩增, 扩增条件参照文献 [22]. 扩增产物采用 Illumina 技术进行高通量测序, 采用 Qiime 软件进行数据处理和多样性分析, 由上海美吉生物检测公司完成.

1.5 异养硝化和好氧反硝化性能测定

将筛选出脱氮效率 70% 以上的菌群 LHJ-1 接种至装有 300 mL 灭菌培养基的 500 mL 锥形瓶中, 放置摇床中, 每 6 小时取样监测 TN、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N、总有机碳(TOC)、 OD_{600} 指标, 通过比较 54 h 内菌群生长, 碳源和氮源利用情况, 分析 LHJ-1 在不同条件下的硝化和反硝化性能.

1.6 不同环境因子影响实验

实验选取碳氮比(C/N)、碳源、初始 pH 值和溶解氧(DO) 4 个因素探究环境因子对菌群生长的影响. C/N 为 4、8、12、16 和 20; 碳源为乙酸钠、丁二酸钠、柠檬酸钠和葡萄糖; 初始 pH 值为 3、5、7、9 和 11; 本实验通过改变摇床转速实现不同的溶解氧梯度, 设置转速 60、90、120 和 150 r/min. 以 DTM 液体培养基为基础, 根据不同因素的不同水平设置单一变量, 考察菌群 30 °C 下第 30 小时的 TN、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N 和 OD_{600} 的变化, 对

不同碳源的利用情况.

1.7 实验指标分析方法

菌群生长状况 OD_{600} 采用 UV-7504 单光束紫外-可见分光光度计(下同)测定; TN 浓度采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定(GB11894-89); NH_4^+-N 浓度采用纳氏试剂分光光度法测定; $NO_3^- -N$ 浓度采用紫外分光光度法测定; $NO_2^- -N$ 浓度采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定(GB7493-87); TOC 浓度采用总有机碳分析仪(型号为 TOC-L CPN CN200)测量.

2 结果与讨论

2.1 菌群鉴定

细菌生物多样性检测是基于对 16S rDNA 功能基因等特定区域片段 PCR 产物进行高通量测序, 来探究物种的群落组成和进化关系. 高通量测序结果表明(如图 1 所示), LHJ-1 为混合菌群, 在属水平上主要由 *Pseudomonas*(74.34%)、*Cupriavidus*(2.79%)、*Acidovorax*(10.44%)、*Acinetobacter*(11.09%) 和 *Pseudoduganella*(1.16%) 构成, 其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)占比最大, 成为优势菌. 假单胞菌属是典型的好氧反硝化菌^[18], 这表明经过长时间的富集和驯化, 菌群 LHJ-1 已成为由好氧反硝化菌主导的功能群落.

不同菌属的细菌混合生长, 物种多样性丰富, 提高了系统的稳定性, 菌种之间的协同共生作用, 在实际应用中具有更好的环境适应性, 更有利于水中氮素和有机物的脱除.

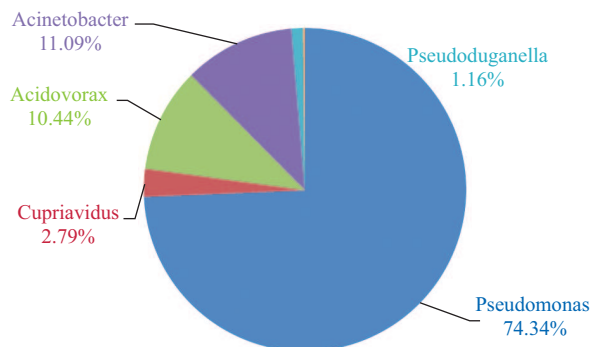


图1 菌群 LHJ-1 属水平群落丰度组成

Fig. 1 Abundance of bacterial consortium LHJ-1 community at the Genus level

2.2 菌群 LHJ-1 的异养硝化特性

异养菌较自养菌而言, 可利用环境中的有机碳源维持自身生长, 生长速率快, 细胞产量高^[19], 同时达到降解有机物的目的. 本文为了考察 LHJ-1 的异养硝化性能, 将其接种至以 NH_4Cl 为唯一氮源、丁二酸钠为碳源的培养基中, 结果如图 2 所示.

0~6 h 内细菌处于适应期, 生长较为缓慢. 6~18 h 细菌处于对数增长阶段, 细菌量迅速增加, OD_{600} 值从 0.008 增长至 0.112. 与此同时, 碳源浓度也迅速下降, 从 113.175 mg/L 下降至 30.353 mg/L, 平均降解速率为 4.601 mg/(L·h), 降解率为 73.18%. 由此可见, 细菌利用了大量外部碳源来供自身生长, 具有明显的异养功能. NH_4^+-N 浓度在 0~6 h 内迅速下降, 从最初 3.081 mg/L 降至 0.003 mg/L, 去除率达 99.90%, 而后趋于稳定. 细菌生长与 NH_4^+-N 的去除存在一个滞后过程, 可能是由于菌体先吸收氮源和碳源后需要一个利用转化过程, 此现象与康鹏亮研究^[20]一致. TN 的去除主要集中在细菌的对数生长阶段, 从 0 h 到 18 h, TN 去除率达 83.04%, 最大去除率在第 30 小时, 达到 93.58%. 随后细菌生长进入衰亡期, TOC 和 TN

浓度都有所回升,最后趋于稳定.这可能是由于碳源消耗殆尽,当碳源不足时,不足以提供充足的能量供菌生长,细菌通过自溶获取能量,造成细胞内有机碳和有机氮的释放.苏兵等人研究发现以 NH_4Cl 为氮源时认为菌体自溶会导致 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度上升^[21],而本实验中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度在第 6 小时后一直保持较低水平,至衰亡期才有些许升高而后又迅速降低.安强等人粗提了菌株 NR 的氨单加氧酶(AMO)和羟胺氧化酶(HAO),从酶学角度证明了菌株 NR 的硝化性能^[22].检测报告表明,菌群 LHJ-1 中存在 AMO 和 HAO,推测由于 HAO 具有良好的酶活性, LHJ-1 具有良好的硝化性能. $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度一直较低,整个过程中基本无 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 积累,此现象与黄廷林等人的研究结果^[23]一致. $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 在体系中呈现出先缓慢上升后下降的趋势,最高积累量达 1.181 mg/L,第 36 小时后开始下降,稳定在 0.500 mg/L 左右.由此也能看出菌群 LHJ-1 可以在好氧条件下进行反硝化,具有好氧反硝化功能.田凤蓉等人在研究菌株 LH-N7 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除时有类似发现^[24],体系中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 不断积累,随着反应时间延长积累量下降.硝化过程中产生的酸度,随着好氧反硝化作用的发生,产生的碱度补偿部分酸度^[25],酸对反硝化作用抑制减弱,可能是导致 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度先升高再降低的原因.另外,王国英等人认为原因可能是由于在反应初期, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 充足,异养硝化作用强于好氧反硝化作用,后期 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度降低,好氧反硝化作用强于异养硝化作用^[26].

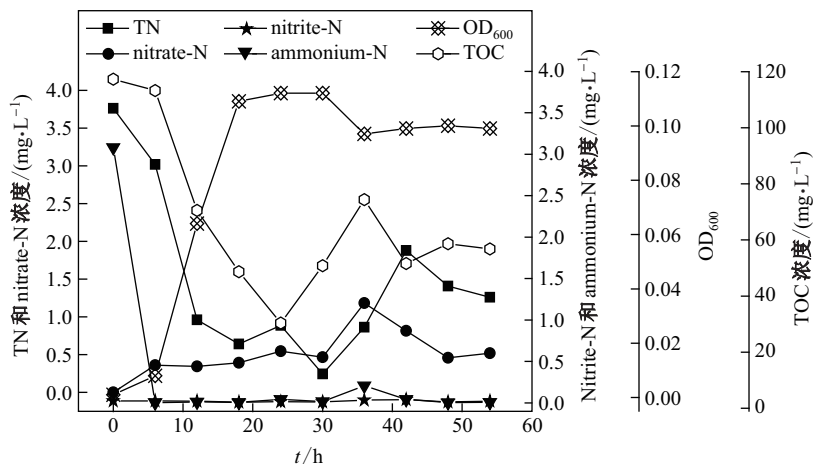


图2 菌群 LHJ-1 异养硝化特性

Fig. 2 Heterotrophic nitrification characteristics of bacterial consortium LHJ-1

2.3 菌群 LHJ-1 的好氧反硝化特性

本次实验分别以 KNO_3 和 NaNO_2 为唯一氮源,以丁二酸钠为碳源, C/N 为 16, 接种对数生长期(OD_{600} 值为 0.091)菌液 2 mL, 探究菌群 LHJ-1 的好氧反硝化特性.

在以 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为唯一氮源的情况下,观察 54 h 内细菌脱氮特性,如图 3(a)所示.可知,细菌的生长与 TOC 的降解趋势和 TN 的去除具有一致性,与异养硝化过程情况相同.6 h 到 18 h 细菌处于对数生长期, TOC 由 113.100 mg/L 降解至 49.080 mg/L, 降解率为 56.60%. 第 30 小时, TOC 降解效率达到最大,为 67.12%. TN 浓度在 18 h 内迅速下降到 1.408 mg/L, 平均去除速率为 0.275 mg/(L·h), TN 去除率达到 76.73%. TOC 和 TN 浓度在细菌内源呼吸期都有所上升,与异养硝化阶段类似. $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 在 0~6 h 去除最快,去除率达 81.57%, 平均去除速率 0.817 mg/(L·h). TOC 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的减少说明菌群 LHJ-1 具有较好的好氧反硝化能力^[27]. 30°C 时, LHJ-1 最大 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 去除效率达 92.46%, 高于已报道的菌株 *Ochrobactrum* sp.

tbtd^[28]的最大 NO_3^- -N去除效率(76.96%),说明LHJ-1菌群较*Ochrobactrum* sp. tbtd菌株具有更强的反硝化性能. 在 NO_3^- -N快速去除的同时, NO_2^- -N出现少量积累,最高积累量出现在第6小时为0.890 mg/L,随即又下降,保持在0.200 mg/L左右的水平. 康鹏亮等人认为反硝化初期 NO_2^- -N的短暂积累可能是由于反硝化初期 NO_3^- -N去除率较高造成 NO_2^- -N的大量积累,随着 NO_3^- -N去除达到平衡, NO_2^- -N的去除效率提高^[20]. 这与本实验现象一致.

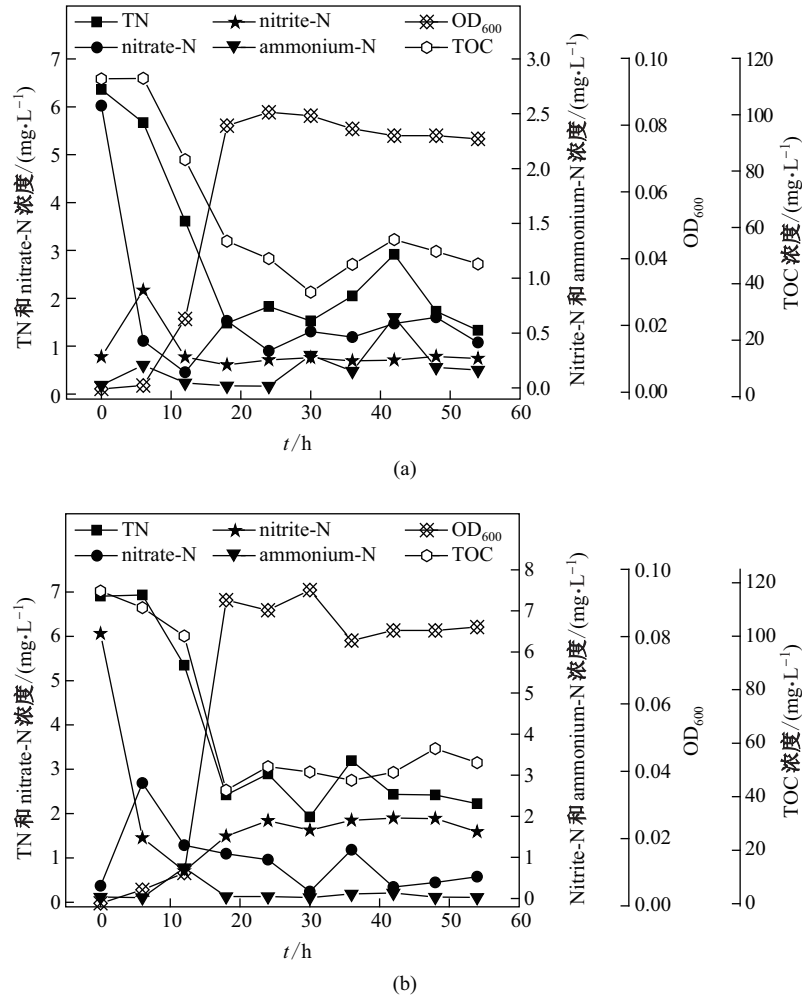


图3 以 NO_3^- -N (a) 和 NO_2^- -N (b) 为氮源时菌群 LHJ-1 好氧反硝化特性

Fig. 3 Aerobic denitrification characteristics of bacterial consortium LHJ-1 with NO_3^- -N(a) and NO_2^- -N (b) as the nitrogen sources

图 3(b)所示是以 NaNO_2 为唯一氮源, 54 h 内 LHJ-1 表现出的好氧反硝化性能. 由图可知, 细菌依然是在 18 h 内处于对数生长期, 这与异养硝化特性、以 NO_3^- -N 为氮源时表现一致. 氮源和碳源作为细菌生长的重要营养物质, 变化情况与细菌生长呈现同步趋势. 反硝化作用初始, NO_2^- -N 以 0.829 mg/(L·h) 的速率下降, 对应去除率达 77.16%, 此时细菌并没有立即迅速繁殖, 这也与异养特性一致. 细菌对 NO_2^- -N 的最大利用率达 89.67%, 对 TN 的最大去除率达 72.11%, 实验末期, NO_2^- -N 和 TN 的浓度有所回升, 分别维持在 1.900 mg/L 和 2.500 mg/L. 实验期间, NO_3^- -N 有明显积累量, 6 h 最大积累量达 2.690 mg/L, 36 h 积累量达 1.182

mg/L. 出现此现象的原因可能是由于 NO_2^- -N 初始浓度过高, 高浓度的 NO_2^- -N 抑制了硝酸盐还原酶的活性, 导致 NO_3^- -N 去除效果差. 随着 NO_2^- -N 浓度逐渐下降, 抑制作用减弱, 积累的 NO_3^- -N 量逐渐减少. 整个过程中无 NH_4^+ -N 积累.

综上所述, 菌群 LHJ-1 能够利用 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 为氮源进行好氧反硝化, 这与 *P. stutzeri* YZN-001^[10] 和 *P. tolaassi* Y-11^[25] 表现相同. LHJ-1 对 NO_3^- -N 最大利用率 92.46% 大于对 NO_2^- -N 的利用率 89.67%, 最大 TN 去除率分别为 79.07% 和 72.11%.

2.4 不同环境因子对菌群 LHJ-1 的脱氮影响

2.4.1 不同 C/N 对菌群 LHJ-1 的脱氮影响

碳和氮作为细菌生长过程的基本营养物质, 其配比不同直接影响着异养硝化好氧反硝化细菌的脱氮效率. C/N 过高, 会导致资源能源浪费且降低反硝化速率; C/N 过低, 能源不足, 也会抑制菌的生长^[19]. 因此, 寻找合适 C/N 是提高好氧反硝化菌脱氮能力且节约资源的重要环节. 如图 4 所示, 当 C/N 从 4 上升至 20 时, TN 和 NO_3^- -N 去除率同步先升高后降低, C/N 为 4 时 TN 和 NO_3^- -N 去除率均达最低值, 分别为 28.30% 和 24.11%, NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 积累达最高值, 均超出 1.000 mg/L; 当 C/N 达到 16 时去除率达最高值, 分别为 75.95% 和 78.30%. OD_{600} 在 5 个 C/N 梯度下基本一致, 说明不同 C/N 对菌体生长状态影响不明显, 但过低 C/N 会造成碳源成为限制因素, 导致提供的电子流少而慢, 从而降低了反硝化速率, 影响了氮素的去除. 从实验可知, LHJ-1 适宜的 C/N 为 16. 对于特定菌株, 应根据其新陈代谢特征和面临的环境因素选择合适的 C/N^[29].

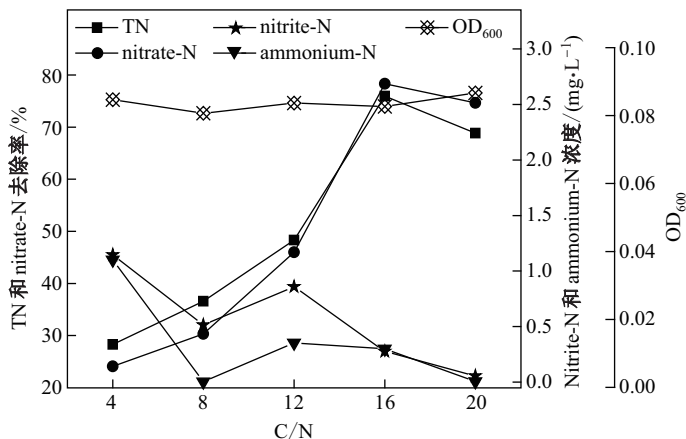


图4 不同 C/N 下菌群 LHJ-1 脱氮特性

Fig. 4 Nitrogen removal characteristics of bacterial consortium LHJ-1 with different C/N ratios

2.4.2 碳源种类对菌群 LHJ-1 的脱氮影响

不同碳源具有不同的氧化还原电位^[23], 是细菌好氧反硝化过程中的电子供体和能源物质, 影响着硝酸盐还原酶的活性^[27], 进而会影响细菌的脱氮效果. 如图 5 所示. 菌群对 4 种碳源的利用率从高到低排序依次为乙酸钠(57.32%)、丁二酸钠(56.43%)、柠檬酸钠(46.16%)和葡萄糖(34.94%). 4 种碳源下 OD_{600} 均显著增多, 由高到低排序为葡萄糖(0.122)、柠檬酸钠(0.111)、丁二酸钠(0.087)和乙酸钠(0.078). 从图上可知, 菌体生长情况与 TN 去除具有一致性, 菌体密度越大, 对 TN 的去除率就越大. 葡萄糖组 TN 和 NO_3^- -N 去除率均最高, 分别为 93.92% 和 92.73%, 柠檬酸钠组、丁二酸钠组和乙酸钠组的 TN 去除率分别为

81.96%、68.85%和59.24%,与之对应的 NO_3^- -N去除率为83.76%、74.66%和77.04%。以上数据表明,不同碳源会导致菌群对 NO_3^- -N的去除能力产生差异,这可能与它们的氧化还原电位有关^[30]。

颜薇芝等人认为不动杆菌属YN3更易利用有机酸,当碳源是葡萄糖时,菌体基本不增长^[31]。本实验中相较于有机酸,当碳源为葡萄糖时,菌群生长最好,这与YN3表现不同。蔡茜等人筛选出的蒙氏假单胞菌H97在以上4种碳源中生长,对葡萄糖和TN去除率均最低,TN去除率仅为46.42%;LHJ-1与H97相反,其对葡萄糖利用率最低,对TN去除率却最大^[32]。本实验中, NH_4^+ -N积累量很少,均小于0.050 mg/L, NO_2^- -N积累量也较少,乙酸钠组的 NO_2^- -N积累量最大达0.227 mg/L,丁二酸钠、柠檬酸钠和葡萄糖组均少于0.060 mg/L。以上说明菌群LHJ-1能够利用上述碳源生长,具有好氧反硝化能力。

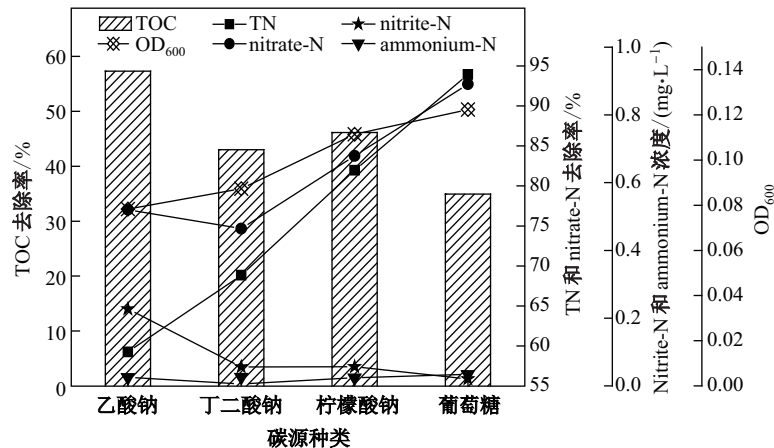


图5 不同碳源下菌群LHJ-1脱氮特性

Fig. 5 Nitrogen removal characteristics of bacterial consortium LHJ-1 with different carbon sources

2.4.3 不同pH值对菌群LHJ-1的脱氮影响

微生物生长过程中pH值是重要的影响因素之一。pH值过高或过低会降低微生物的酶活性,改变微生物细胞膜电位,从而影响微生物的代谢活动和营养吸收。过低的pH值会导致核酸和微生物表面蛋白的水解变质,抑制微生物的生长代谢^[31]。如图6所示,溶液为强酸性(pH=3)和强碱性(pH=11)时,OD₆₀₀值仅为0.001和0.002,细菌生长几乎被完全抑制。同时TN和 NO_3^- -N去除率极低, NH_4^+ -N和 NO_2^- -N积累量极少,脱氮作用受到严重限制。说明细菌LHJ-1在强酸或强碱环境中不宜生存,反硝化活性极低。当pH值为5、7、9时,细菌生长活跃,OD₆₀₀高于0.080,反硝化活性较高,TN去除率均高于75%,分别为79.61%、75.95%和78.56%, NO_3^- -N去除率有所升高,分别为86.03%、78.32%和96.91%。在pH值为9时虽然能够获得更好的 NO_3^- -N去除率,但是 NH_4^+ -N积累量大达1.399 mg/L。已报道的研究表明,大部分的好氧反硝化菌都能在中性或偏碱性条件生长^[25],本研究中菌群LHJ-1在偏酸、中性和偏碱条件下均有较强的脱氮能力,预示其应用范围更为广泛。

2.4.4 不同DO浓度对菌群LHJ-1的脱氮影响

摇床转速与DO浓度之间存在正相关的线性关系,DO浓度也是影响微生物好氧反硝化代谢的重要因素之一,决定了 NO_2^- -N的去除效率^[33]。由图7可看出,当转速提升, NO_3^- -N

去除率基本相同, 均在 70% 以上, 90 r/min 时稍低为 74.78%。菌体密度 OD_{600} 和 TN 去除具有一致性。60、90 和 120 r/min 时 OD_{600} 较高, 分别为 0.088、0.097 和 0.083, 对应 TN 去除率为 76.40%、78.34% 和 75.95%。150 r/min 时 OD_{600} 较小, 仅为 0.022, TN 去除率也较少为 51.41%, 而 NO_3^- -N 去除率却为 77.55%。造成此现象的原因可能是细菌能够利用 NO_3^- -N 进行自身生长, 但由于转速高, 导致细菌与摇瓶碰撞, 细胞破裂, 内部氮转移至溶液中, 因此导致了 TN 去除率下降, OD_{600} 也较小。在 60 r/min 时 NH_4^+ -N 积累量最大为 0.749 mg/L, 硝化作用发生缓慢。90 r/min 和 150 r/min 时 NO_2^- -N 积累量明显较高, 分别为 0.942 mg/L 和 1.678 mg/L。已报道的研究表明, 低溶解氧水平抑制了 NO_2^- -N 向 NO_3^- -N 的转化^[34], 较高的

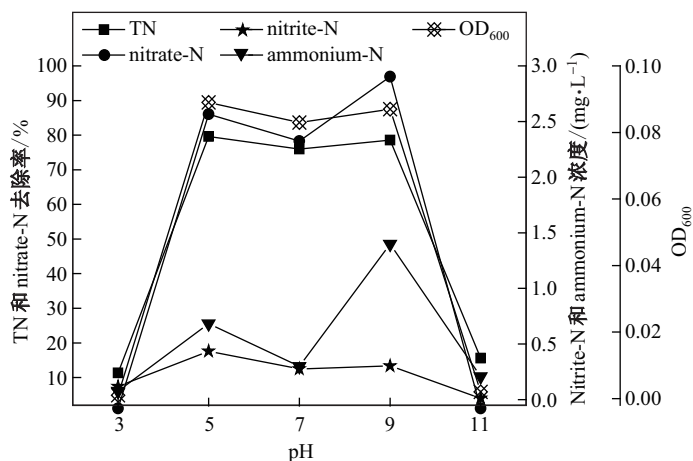


图 6 不同 pH 值下菌群 LHJ-1 脱氮特性

Fig. 6 Nitrogen removal characteristics of bacterial consortium LHJ-1 with different pH values

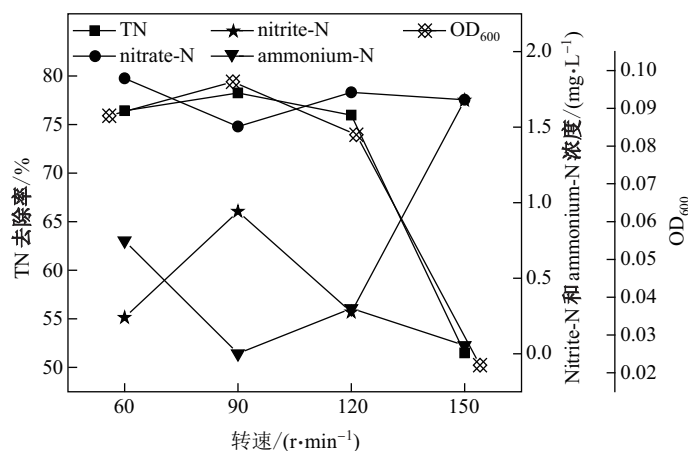


图 7 不同 DO 浓度下菌群 LHJ-1 脱氮特性

Fig. 7 Nitrogen removal characteristics of bacterial consortium LHJ-1 with different dissolved oxygen concentrations

溶解氧水平又会抑制亚硝酸盐还原酶活性^[35], 这与本研究结果相吻合, 因此合适的溶解氧水平是微生物提高反硝化速率同时减少 NO_2^- -N 积累的关键因素之一。

3 结 论

从龙泓涧梯级塘底泥中筛选出具有异养硝化-好氧反硝化功能的菌群 LHI-1, 主要包含 *Pseudomonas*、*Cupriavidus*、*Acidovorax*、*Acinetobacter* 和 *Pseudoduganella*, 其中 *Pseudomonas* 占比最大。异养硝化特性探究结果表明, 菌群 LHI-1 对 NH_4^+ -N 和 TN 的最大去除率分别为 99.90% 和 93.58%, 具有较强的异养硝化功能。好氧反硝化性能研究中, 菌群 LHI-1 对 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的最大去除率分别为 92.46% 和 89.67%, 具有明显的好氧反硝化性能。研究还进一步证实, 多种环境因子对菌群 LHI-1 的脱氮效率影响显著。环境因子影响实验表明, 菌群 LHI-1 发挥异养硝化-好氧反硝化功能的最佳 C/N 为 16, 最佳碳源为葡萄糖, 最佳 pH 值范围为 5~9, 最佳通氧转速为 60~120 r/min, 在对应的培养条件下, 菌群 LHI-1 达到了较高的脱氮效率。

该菌拟用于处理生活污水的厌氧/好氧(A/O)工艺中。生活污水中 COD 通常在 300~400 mg/L, 较高的在 500 mg/L 左右, NH_4^+ -N 浓度在 30 mg/L 左右。由上述结果可知, 当 C/N 为 16 时 TN 去除效果最高, 而实际应用中原水很难达到较高的 C/N, 这可能导致碳源不足, 从而降低处理效果。因此在后续的实验中需加强对 LHI-1 的驯化, 使其能够适应较低的 C/N 条件, 并取得较好的脱氮效果。

[参 考 文 献]

- [1] 杨垒. 高效异养硝化细菌的脱氮特性及其处理高氨氮废水研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2016.
- [2] 刘天琪. 异养硝化-好氧反硝化菌 ADN-42 的脱氮特性[D]. 辽宁 大连: 大连理工大学, 2014.
- [3] FU Z M, YANG F L, AN Y Y, et al. Simultaneous nitrification and denitrification coupled with phosphorus removal in an modified anoxic/oxic-membrane bioreactor (A/O-MBR)[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 43(2): 191-196.
- [4] JI Z Y, CHEN Y G. Using sludge fermentation liquid to improve wastewater short-cut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(23): 8957-8963.
- [5] CHOI K, ZHANG S, SONG J H, et al. Aerobic denitrification by a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying (HN-AD) culture enriched activated sludge[J]. KSCE Journal of Civil Engineering, 2017, 21(6): 2113-2118.
- [6] QIAO S, LIU X J, ZHOU J T. Research progress of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification in biological denitrification[J]. Journal of Safety & Environment, 2014, 14(2): 128-135.
- [7] 黄廷林, 赵金亚, 张海涵. 一株异养硝化-好氧反硝化菌 JY78 的筛选及其脱氮特性研究[J]. 安全与环境学报, 2016, 16(4): 325-331.
- [8] ROBERTSON L A, KUENEN J G. Aerobic denitrification: A controversy revived[J]. Archives of Microbiology, 1984, 139(4): 351-354.
- [9] 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.
- [10] ZHANG J B, WU P X, HAO B, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(21): 9866-9869.
- [11] ZHANG Q L, LIU Y, AI G M, et al. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7[J]. Bioresource Technology, 2012, 108: 35-44.
- [12] CHEN P Z, LI J, LI Q X, et al. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24[J]. Bioresource Technology, 2012, 116: 266-270.
- [13] 王永刚, 王旭, 张俊娥, 等. 好氧反硝化细菌研究及应用进展[J]. 工业水处理, 2017(2): 12-17.
- [14] 马放, 王弘宇, 周丹丹. 好氧反硝化生物脱氮机理分析及研究进展[J]. 工业用水与废水, 2005, 36(2): 4.
- [15] 高廷耀, 周增炎. 生物脱氮工艺中的同步硝化反硝化现象[J]. 给水排水, 1998(12): 6-9.

(下转第 87 页)

- [29] 魏佳虹, 孙宝盛, 赵双红, 等. pH 对 SBR 处理效果及活性污泥微生物群落结构的影响 [J]. 环境工程学报, 2017, 11(3): 1953-1958.
- [30] 应启峰, 肖昌松, 纪树兰, 等. 直链烷基苯磺酸盐(LAS)的生物降解性 [J]. 微生物学通报, 2002, 29(5): 85-89.
- [31] 张军臣, 胡晓东, 石云峰, BCO+BAF工艺深度处理洗涤剂废水 [J]. 环境工程学报, 2015, 9(5): 2331-2336.
- [32] 官景渠, 李济生. 表面活性剂在环境中的生物降解 [J]. 环境科学, 1994(2): 81-85.
- [33] 郭伟, 李培军. 阴离子表面活性剂(LAS)环境行为与环境效应 [J]. 安全与环境学报, 2004, 4(6): 37-42.
- [34] 张学佳, 纪巍, 康志军, 等. 十二烷基苯磺酸钠(LAS)在环境水体中的自然降解 [J]. 黑龙江大学工程学报, 2008, 35(2): 75-80.
- [35] SCOTT M J, JONES M N. The biodegradation of surfactants in the environment [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1508(1): 235-251.
- [36] 秦勇. 表面活性剂好氧初级生物降解研究 [D]. 太原: 太原理工大学化学学院, 2006.

(责任编辑: 张 晶)

(上接第31页)

- [16] 郭琳. 水源水库中好氧反硝化菌的筛选及脱氮性能研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2015.
- [17] ZHU L, DING W, FENG L J, et al. Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem[J]. Bioresource Technology, 2012, 108: 1-7.
- [18] 杨霄. 分层型水库水体细菌群落演变机制与扬水曝气强化作用研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2016.
- [19] 梁贤. 一株异养硝化细菌 YL 的筛选及其脱氮特性研究[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2015.
- [20] 康鹏亮, 张海涵, 黄廷林, 等. 湖库沉积物好氧反硝化菌群脱氮特性及种群结构[J]. 环境科学, 2018(5): 2431-2437.
- [21] 苏兵. 一株海洋异养硝化—好氧反硝化菌的分离鉴定、脱氮特性及应用[D]. 福建 厦门: 集美大学, 2014.
- [22] 安强, 赵彬, 何义亮. 异养硝化菌 *Alcaligenes faecalis* strain NR 的硝化性能及其酶活性[J]. 上海交通大学学报, 2012, 46(5): 774-779.
- [23] 黄廷林, 张丽娜, 张海涵, 等. 一株贫营养异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及脱氮特性[J]. 生态环境学报, 2015(1): 113-120.
- [24] 田凤蓉, 张彬彬, 杨志林, 等. 高效脱氮除臭异养硝化菌的筛选鉴定及脱氮性能研究[J]. 环境工程, 2014(5): 64-68.
- [25] HE T X, LI Z L, SUN Q, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion[J]. Bioresource Technology, 2016, 200: 493-499.
- [26] 王国英, 崔杰, 岳秀萍, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌脱氮同时降解苯酚特性[J]. 中国环境科学, 2015, 35(9): 2644-2649.
- [27] 潘玉瑾, 刘芳, 孟爽, 等. 好氧反硝化菌 *P.chengduensis* ZPQ2 的筛选及其反硝化条件优化[J]. 环境工程, 2016(1): 41-46.
- [28] 林娜, 郭楚玲, 柯林, 等. 富营养化池塘中好氧反硝化菌的分布及脱氮研究[J]. 中国科技论文在线, 2010(5): 369-372.
- [29] YINGCHIH C, MINGSHIUM C. Determination of optimal COD/nitrate ratio for biological denitrification[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 51(1): 43-49.
- [30] LI C, YANG J, WANG X, et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24[J]. Bioresource Technology, 2015, 182: 18-25.
- [31] 颜薇芝, 张汉强, 余从田, 等. 1株异养硝化好氧反硝化不动杆菌的分离及脱氮性能[J]. 环境工程学报, 2017(7): 4419-4428.
- [32] 蔡茜, 何腾霞, 冶青, 等. 耐冷嗜碱蒙氏假单胞菌 H97 的鉴定及其好氧反硝化特性[J]. 环境科学, 2018(7): 1-15.
- [33] YANG L, REN Y X, LIANG X, et al. Nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier *Acinetobacter junii* YB and its potential application for the treatment of high-strength nitrogenous wastewater[J]. Bioresource Technology, 2015, 193: 227-233.
- [34] 马放, 王弘宇, 刘锋刚. 溶解氧和有机碳源对同步硝化好氧反硝化脱氮的影响[C]//全国环境微生物学学术研讨会. 第八次全国环境微生物学学术研讨会论文集, 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [35] 孙移鹿, 张雪宁, 李昂. 基于溶解氧调控缓解好氧反硝化过程亚硝酸盐积累的研究[C]//全国环境微生物学学术研讨会. 第十七次全国环境微生物学学术研讨会论文集, 北京: 化学工业出版社, 2014.

(责任编辑: 张 晶)