

低 C/N 摩尔比好氧反硝化菌的 筛选及脱氮特性

胡杰¹, 颜家保^{1*}, 霍晓琼², 吴玲¹, 俞丹青¹, 陈美玲¹, 李超¹

(1. 武汉科技大学化学与化工学院, 煤转化与新型炭材料湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430081;

2. 大长江环境工程技术有限责任公司, 湖南 长沙 410199)

摘要: 从石化废水处理厂活性污泥中分离得到 1 株低 C/N 摩尔比的好氧反硝化菌株 AD-7, 通过形态学观察、生理生化试验及 16S rDNA 测序, 确定其为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。通过单因素实验确定菌株适宜的好氧反硝化培养条件为: 丁二酸钠为碳源、培养温度为 30~35℃、初始 pH 6.0~7.0、摇床转速为 150~200 r/min。在适宜的好氧反硝化培养条件下, 研究了菌株生长情况与反硝化脱氮特性。结果表明, 菌株生长与反硝化脱氮基本同步, 并且在菌株培养 12 h 时, 硝酸盐氮和总氮的去除率分别高达 90.47% 和 86.06%, 未出现亚硝酸盐氮的明显积累。因此, 菌株 AD-7 能够通过完全反硝化实现总氮的有效脱除, 在低 C/N 摩尔比废水脱氮方面具有潜在应用价值。

关键词: 废水; 好氧反硝化; 低 C/N 摩尔比; 脱氮; 假单胞菌

中图分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)05-0128-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2019.05.028

Screening and denitrification characteristics of low C/N ratio aerobic denitrifying bacteria

HU Jie¹, YAN Jia-bao^{1*}, HUO Xiao-qiong², WU Ling¹, YU Dan-qing¹, CHEN Mei-ling¹, LI Chao¹

(1. Hubei Province Key Laboratory of Coal Conversion and New Carbon Materials, School of Chemistry and

Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China;

2. Great Yangtze River Environmental Engineering Technology Co., Ltd., Changsha 410199, China)

Abstract: A low C/N molar ratio aerobic denitrification strain AD-7 is isolated from the activated sludge of petrochemical wastewater treatment plant. It is identified as *Pseudomonas* sp based on the morphological observation, physiological and biochemical test and 16S rDNA gene sequence analysis. Through single factor experiment investigations, the optimum aerobic denitrification culture conditions are settled as follows: sodium succinate is used as carbon source, culture temperature is set at 30~35℃, initial pH is 6.0~7.0 and rotation speed is 150~200 rpm. Under the optimum aerobic denitrification culture conditions, the growth and denitrification characteristics of the strain are studied. Study results show that the growth of the strain keeps basically synchronous with denitrification, the removal rates of nitrate-based nitrogen and total nitrogen can reach 90.47% and 86.06% respectively after 12 hours of cultivation, and there is no significant accumulation of nitrite-based nitrogen during the whole process. Therefore, the strain AD-7 can remove effectively total nitrogen by complete denitrification and has potential application value in denitrification of low C/N ratio wastewater.

Key words: wastewater; aerobic denitrification; low C/N ratio; denitrification; *Pseudomonas* sp

近年来,随着国家对废水中氨氮和总氮排放要求越来越严格,含氮废水处理难度加大,因此如何经济有效地脱氮成为废水处理领域的研究热点^[1]。目前废水脱氮主要采用传统生物工艺,由于硝化和反硝化过程分别需要在好氧和缺氧条件下进行,反应器必须分开,使得处理工艺流程长、基建投资和运行成本较高^[2-3]。随着 Robertson 等首次从废水脱

硫和反硝化系统中分离出好氧反硝化菌 *Thiosphaera pantotropha*^[4], 国内外研究者陆续从环境中分离出多株具有好氧反硝化功能的菌株,包括 *Alcaligenes faecalis*^[1,5-6]、*Pseudomonas* sp.^[7-8]、*Bacillus* sp.^[9]、*Acinetobacter junii*^[10] 等。这些菌株大多还可以进行异养硝化,使得硝化和反硝化作用能够在同一个反应器内进行,可以克服传统处理工艺的诸多弊端。

收稿日期: 2018-09-04; 修回日期: 2019-03-11

基金项目: 湖北省科技创新专项重大项目(2017ACA179)

作者简介: 胡杰(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水处理及环境微生物, 1092785385@qq.com; 颜家保(1964-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为废水生物强化及深度处理, 通讯联系人, 972787445@qq.com。

但是目前分离得到的这些菌株均为异养菌,对碳源的需求量比较大,培养过程中的 C/N 摩尔比通常要在 10 以上^[5,11],否则难以实现废水中氮的有效脱除。而我国化工废水、养殖废水、垃圾渗滤液及部分城市污水的 C/N 摩尔比都较低^[12],为提高脱氮效率,常常需要投加有机碳源来提高废水的 C/N 摩尔比^[13],这样不仅增加了废水处理费用,而且增大了废水处理负荷。因此筛选出低 C/N 摩尔比下能进行好氧反硝化脱氮的菌株具有重要的实际意义。

笔者从石化废水处理厂活性污泥中分离得到 1 株低 C/N 摩尔比(C/N=6)的好氧反硝化菌,并对其进行了种属鉴定及反硝化特性研究,考察了环境因素对好氧反硝化性能的影响,确定菌株生长与反硝化脱氮特性之间的关系,为其应用于低 C/N 摩尔比废水生物脱氮提供理论依据和技术参考。

1 实验材料与仪器

1.1 实验材料

菌源:取自武汉石化炼油废水处理系统生化活性污泥。

LB 培养基:酵母提取物 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 10 g/L、pH 为 7.0~7.2。

好氧反硝化培养基:丁二酸钠 6.136 g/L、Na₂HPO₄·12H₂O 8.0 g/L、KH₂PO₄ 1.5 g/L、KNO₃ 0.75 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、微量元素储备液 2 mL、pH 为 7.0~7.2。

微量元素储备液:MnSO₄·4H₂O 0.10 g/L、ZnSO₄·7H₂O 0.12 g/L、H₃BO₃ 0.07 g/L、Na₂MoO₄·2H₂O 0.04 g/L、CuSO₄·5H₂O 0.02 g/L、CoCl₂·6H₂O 0.04 g/L。

所用培养基均在 121℃ 条件下高压蒸汽灭菌 30 min,向各液体培养基中加入 1.5%~2.0% 琼脂粉即可制成相应固体培养基。

1.2 主要仪器

BBS-SDC 超净工作台,济南鑫贝西生物技术有限公司生产;SPX-250B-Z 生化培养箱,上海博讯实业有限公司生产;HVE-50 高压蒸汽灭菌锅,日本 HIRAYAMA 公司生产;QYC-211 恒温摇床,上海福玛实验设备有限公司生产;UV-2000 紫外-可见分光光度计,美国 UNICO 公司生产;1-14 高速离心机,德国 SIGMA 公司生产;AL104 电子天平,METTLER TOLEDO 生产。

2 实验方法

2.1 菌液驯化和菌株分离

取少量新鲜菌源于 100 mL LB 培养基中活化、富集 2 次后,转接至好氧反硝化培养基中进行多次驯化,同时依次调节培养基中 C/N 摩尔比为 12、10、8、6。将驯化后的菌液通过稀释涂平板和平板划线法分离,得到多株低 C/N 摩尔比好氧反硝化菌株。

2.2 菌株筛选和鉴定

对分离得到的菌株进行低 C/N 摩尔比(C/N=6)好氧反硝化性能测定,挑选其中反硝化性能最优的菌株作为优势菌,依据《常见细菌系统鉴定手册》进行形态学观察及生理生化试验^[14],并通过基因组 DNA 提取、16S rDNA 扩增及测序对其进行种属鉴定。

2.3 培养条件及脱氮特性

将优势菌以体积分数为 3% 的接种量接入 C/N 摩尔比为 6、初始硝酸盐氮质量浓度为 100 mg/L 左右的好氧反硝化培养基中,分别考察碳源种类、培养温度、初始 pH 和摇床转速对反硝化性能的影响,确定最优好氧反硝化培养条件。并在最优培养条件下,定期取样测定培养基中菌体浓度(OD₆₀₀)和亚硝酸盐氮、硝酸盐氮及总氮含量,分析培养基中菌株生长情况和氮的代谢情况及变化规律。

2.4 分析方法

菌体浓度(OD₆₀₀)的测定采用比浊法^[15];亚硝酸盐氮的测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法^[16];硝酸盐氮的测定采用酚二磺酸光度法^[16];总氮的测定采用过硫酸钾氧化紫外分光光度法^[16]。

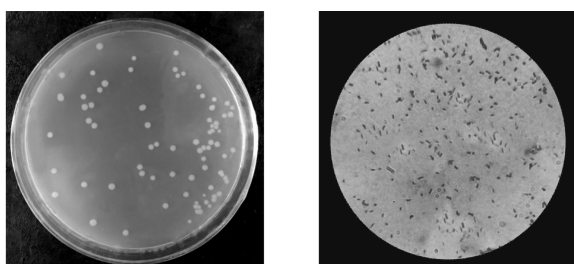
3 实验结果与讨论

3.1 菌种鉴定

3.1.1 形态学观察与生理生化试验

经分离纯化共得到 17 株低 C/N 摩尔比好氧反硝化菌株,挑选其中反硝化性能最好的 1 株(命名为 AD-7)进行菌种鉴定。菌株 AD-7 的菌落形态及革兰氏染色如图 1 所示。由图 1 可以看出,AD-7 的菌落呈圆形,直径大约为 1~2 mm,颜色为乳白色,表面光滑凸起,边缘整齐,菌体呈短杆状,革兰氏染色显阴性。生理生化试验结果如表 1 所示。

依据形态学观察及生理生化试验结果,并结合《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》,初步推断菌株 AD-7 为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。



(a) 菌落形态 (b) 革兰氏染色
图 1 AD-7 菌落形态和革兰氏染色图片

表 1 AD-7 生理生化试验结果

试验名称	试验结果	试验名称	试验结果
糖酵解试验	+	硝酸盐还原试验	+
甲基红试验	+	吲哚试验	-
V-P 试验	-	明胶液化试验	-
淀粉水解试验	+		

注：“+”表示反应呈阳性；“-”表示反应呈阴性。

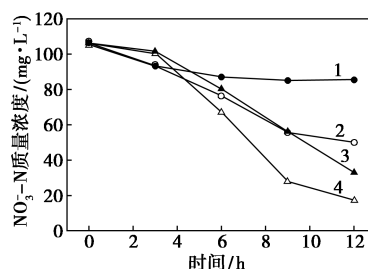
3.1.2 16S rDNA 鉴定

通过基因组 DNA 提取、PCR 扩增、扩增产物纯化及测序得到菌株 AD-7 的 16S rDNA 序列 (1431bp), 将其输入到 GenBank 数据库进行 Blast 比对, 结果发现, 与 WUST 相似度高的主要为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。通过 MEGA7.0 软件计算序列的系统进化距离, 采用 Neighbour-Joining (邻接法) 构建系统发育树, 根据菌株 AD-7 在系统发育树上的位置, 进一步证明其为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。

3.2 好氧反硝化培养条件

3.2.1 碳源种类

碳源的主要作用是微生物的生长代谢提供能量以及作为好氧反硝化过程中的电子供体^[17]。在温度为 30℃、摇床转速为 150 r/min、pH 为 7.0 条件下, 碳源种类对菌株 AD-7 好氧反硝化性能的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出, 菌株 AD-7 在以丁二酸钠为碳源时, 硝酸盐氮的去除率最高, 好氧反硝化速率最快, 12 h 硝酸盐氮去除率达 83.72%, 其次是柠檬酸钠和葡萄糖, 蔗糖作为碳源进行好氧反硝化效果最差, 12 h 硝酸盐氮去除率只有 18.85%。反硝化速率受碳源化学结构和分子质量的影响很大, 丁二酸钠分子结构简单、分子质量小, 可直接以酸的形式被反硝化菌利用, 而糖类必须被分解为有机酸才能被吸收^[18]。因此菌株 AD-7 适宜的好氧反硝化碳源为丁二酸钠。

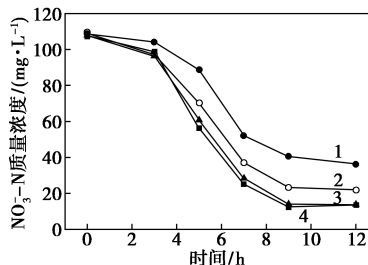


1—蔗糖; 2—葡萄糖; 3—柠檬酸钠; 4—丁二酸钠

图 2 碳源种类对好氧反硝化性能的影响

3.2.2 培养温度

温度主要是通过影响微生物体内酶的活性, 从而影响其生长及降解性能, 温度过高或过低都会使其酶活性降低^[19]。在以丁二酸钠为碳源、摇床转速为 150 r/min、pH 为 7.0 的条件下, 培养温度对菌株 AD-7 好氧反硝化性能的影响如图 3 所示。由图 3 可以看出, 在温度 25~40℃ 范围内, 随着温度的升高, 菌株 AD-7 的好氧反硝化性能先增强后减弱。当温度为 30~35℃ 时, 菌株的好氧反硝化性能最好, 12 h 硝酸盐氮去除率达 87.50%。因此菌株 AD-7 适宜的好氧反硝化培养温度为 30~35℃。

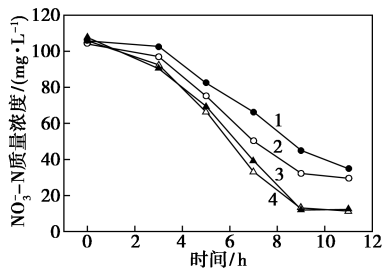


1—25℃; 2—40℃; 3—35℃; 4—30℃

图 3 培养温度对好氧反硝化性能的影响

3.2.3 初始 pH

pH 主要影响微生物细胞膜的通透性及培养基中有机物的离子化程度, 同时也会影响微生物体内酶的活性, 是微生物能否正常生长代谢的一个重要因素。将菌株 AD-7 以 3% 的接种量接入以丁二酸钠为碳源的 4 种不同初始 pH 的好氧反硝化培养基中, 于 30℃、150 r/min 的恒温摇床中培养 12 h, 结果如图 4 所示。由图 4 可以看出, 菌株 AD-7 反硝化的适宜 pH 为弱酸性及中性。在初始 pH 为 6.0 和 7.0 时, 菌株培养 9 h, 硝酸盐氮去除率分别为 88.67% 和 87.63%。主要是因为反硝化过程产碱, 酸性环境有利于反硝化过程的进行, 与武文丽等^[8]的研究结果相一致。因此, 菌株 AD-7 适宜的好氧反硝化初始 pH 为 6.0~7.0。

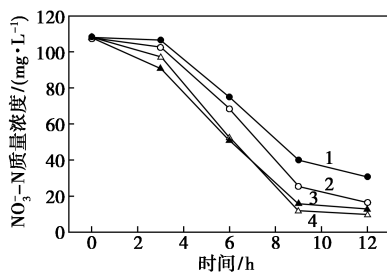


1—pH=9.0;2—pH=8.0;3—pH=6.0;4—pH=7.0

图4 初始 pH 对好氧反硝化性能的影响

3.2.4 摇床转速

Robertson 等^[4]研究发现,在好氧反硝化菌体内存在周质硝酸盐还原酶,可以在有氧的条件下将硝酸盐还原,而培养基中溶解氧浓度与摇床转速密切相关。在以丁二酸钠为碳源、温度为 30℃、pH 为 7.0 的条件下,摇床转速对菌株 AD-7 好氧反硝化性能的影响如图 5 所示。由图 5 可以看出,当摇床转速为 150 r/min 和 200 r/min 时,菌株 AD-7 的好氧反硝化性能最好,12 h 硝酸盐氮的去除率分别为 90.89% 和 88.06%。当摇床转速为 100 r/min 时,由于溶解氧不足,不利于严格好氧的假单胞菌生长。当摇床转速增大到 250 r/min 时,由于水里剪切力过大^[20],从而影响菌株好氧反硝化性能。因此菌株 AD-7 适宜的好氧反硝化摇床转速为 150~200 r/min。



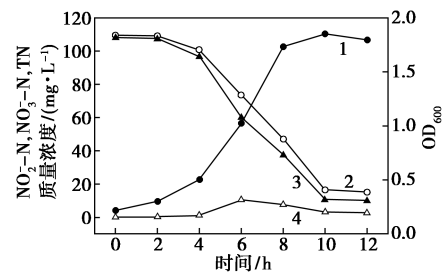
1—100 r/min;2—250 r/min;3—200 r/min;4—150 r/min

图5 摇床转速对好氧反硝化性能的影响

3.3 菌株 AD-7 脱氮特性

为了研究菌株 AD-7 在低 C/N 摩尔比下的生长情况及好氧反硝化脱氮特性,将菌株 AD-7 以 3% 的接种量接入以丁二酸钠为碳源、C/N 摩尔比为 6、pH 为 7.0、初始硝酸盐氮质量浓度为 108.35 mg/L 的好氧反硝化培养基中,于 30℃、150 r/min 的恒温摇床中培养 12 h,定期取样检测培养基中菌体浓度 (OD_{600}) 和亚硝酸盐氮、硝酸盐氮及总氮质量浓度,结果如图 6 所示。由图 6 可以看出,菌株生长情况与硝酸盐氮和总氮的降解情况基本同步。0~4 h 为

菌株生长迟缓期,对应硝酸盐氮和总氮的降解也比较缓慢;4~8 h 和 8~10 h 分别为菌株的对数生长期和稳定期,硝酸盐氮和总氮主要在此阶段进行降解,其降解过程基本符合零级动力学反应,并且会有少量亚硝酸盐氮的积累,在 6 h 达到最大,为 10.62 mg/L;10~12 h 为菌株衰亡期,菌体质量浓度开始降低,硝酸盐氮和总氮基本不再降解。在菌株培养 12 h 时,硝酸盐氮和总氮的去除率分别高达 90.47% 和 86.06%,亚硝酸盐氮的积累量仅为 2.68 mg/L,未出现明显的积累。与 Sun 等^[21]报道的 T13 菌株在好氧反硝化培养过程中存在亚硝酸盐氮的大量积累,使得总氮的去除率只有 18.63% 不相符。这是因为菌株种类不同,进行反硝化代谢氮的过程不一样。因此菌株 AD-7 在以硝酸盐氮为氮源情况下,可以进行完全反硝化,实现总氮的有效脱除。



1— OD_{600} ;2—TN;3— NO_3-N ;4— NO_2-N

图6 菌株生长及脱氮特性

4 结论

(1) 以炼油废水处理厂活性污泥为菌源,通过分离纯化得到 1 株低 C/N 摩尔比好氧反硝化优势菌 AD-7,通过形态学观察、生理生化试验及 16S rDNA 鉴定,确定其为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。

(2) 通过单因素实验,确定菌株 AD-7 的适宜低 C/N 摩尔比好氧反硝化培养条件为:丁二酸钠为碳源、培养温度 30~35℃、培养基初始 pH 为 6.0~7.0、摇床转速为 150~200 r/min。

(3) 在菌株 AD-7 适宜的低 C/N 摩尔比好氧反硝化培养条件下,菌株的生长情况与硝酸盐氮和总氮的降解情况基本同步。菌株培养 12 h 时,硝酸盐氮和总氮的去除率分别高达 90.47% 和 86.06%,亚硝酸盐氮未出现明显的积累。实验结果表明,菌株 AD-7 能够进行完全反硝化,实现总氮的有效脱除。

参考文献

- [1] 张鹏,李宝忠,郭宏山.石化废水脱总氮技术研究[J/OL].现代化工:1-4[2018-09-01].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11>.

- 2172.TQ.20180822.0934.058.html.
- [2] 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 & Bioengineering, 2005, 100(2): 184-191.
- [3] 余森, 丁廷发. 氧化环境工艺中反硝化反应智能模糊控制器的模拟研究[J]. 现代化工, 2018, 38(2): 206-209.
- [4] Robertson L, Van N E, Torremans R, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(11): 2812-2818.
- [5] Zhao B, Tian M, An Q, et al. Characteristics of a heterotrophic nitrogen removal bacterium and its potential application on treatment of ammonium-rich wastewater[J]. Bioresource Technology, 2017, 226: 46-54.
- [6] Liu Y X, Wang Y, Li Y, et al. Nitrogen removal characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* C16[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2015, 23(5): 827-834.
- [7] 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.
- [8] 武文丽, 颜家保, 陈佩, 等. 炼油废水中好氧反硝化菌的筛选及降解特性[J]. 化工进展, 2016, 35(5): 1524-1528.
- [9] Huang F, Pan L Q, Lv N, et al. Characterization of novel *Bacillus* strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2017, 124(5): 564-571.
- [10] Ren Y X, Yang L, Liang X. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB[J]. Bioresource Technology, 2014, 171: 1-9.
- [11] Zhang Y, Shi Z, Chen M X, et al. Evaluation of simultaneous nitrification and denitrification under controlled conditions by an aerobic denitrifier culture[J]. Bioresource Technology, 2015, 175(175C): 602-605.
- [12] 彭永臻, 马斌. 低 C/N 比条件下高效生物脱氮策略分析[J]. 环境科学学报, 2009, 29(2): 225-230.
- [13] 姚鹏程, 袁怡, 龙震宇, 等. 新型单质硫自养生物膜反应器脱氮性能研究[J]. 现代化工, 2018, 38(5): 181-186.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [15] 林海. 环境工程微生物学[M]. 2 版, 北京: 冶金工业出版社, 2008.
- [16] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版, 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [17] 邹艳艳. 基于 Rpf 蛋白分离高效氨氮降解菌及低溶氧生化法处理高氨氮废水技术研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2016.
- [18] Yang L, Ren Y X, Zhao S Q, et al. Isolation and characterization of three heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria from a sequencing batch reactor[J]. Annals of Microbiology, 2015, 66(2): 737-747.
- [19] 陈佩, 颜家保, 武文丽, 等. 邻二甲苯高效降解菌的分离及其降解特性[J]. 化工进展, 2016, 35(2): 565-569.
- [20] 张小燕. 新金分枝杆菌 ZJUVN-08 转化植物甾醇合成雄甾烯二酮的研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2013.
- [21] Sun Y L, Li A, Zhang X N, et al. Regulation of dissolved oxygen from accumulated nitrite during the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(7): 3243-3248. ■

浙江丰利荣获 2018 年度粉体行业最受关注品牌称号

日前, 2018 粉体行业年度奖项评选揭晓, 浙江丰利粉碎设备有限公司荣获“最受关注品牌”称号。这是浙江丰利继 2013 年和 2015 年 HWV 系列旋风磨连续两届上榜、2017 年 CGM1000 超细辊压磨获“最受关注产品”之后, 再度获此行业殊荣。

“粉体行业年度奖”是由中国粉体网联合北京粉体技术协会于 2013 年共同发起, 旨在表彰当年度受用户关注高、业内畅销的产品和行业品牌。它依托于粉体行业大数据资源, 真实反映一年来粉体行业相关产品的活跃度及市场关注度, 旨在推动行业的发展。该项评选活动自 2013 年起已成功举办了三届, 第四届 2018 粉体行业年度奖项评选活动自 2019 年 1 月 2 日上线, 至 2019 年 1 月 31 日截止, 累

计吸引全国 28 个省市近 6 万人次参与投票评选, 本次活动还吸引了德国、美国、加拿大、泰国、日本、澳大利亚、英国等十几个国家的行业人士共同参与。

浙江丰利“超微粉碎设备”品牌于 2002 年首获“浙江名牌产品”称号, 实现了我国粉体设备行业名牌零的突破。17 年来, 凭着过硬的产品质量和高效的节能效果, 热销全国各地, 挺进国际市场, 成为美国、德国、俄罗斯、日本等多家世界 500 强企业在中国采购粉体工程设备定点供应商。目前, 浙江丰利成为我国粉体设备领域规模大、实力强、品种全、新品多的行业龙头企业, 是全国颗粒表征与分检及筛网标委会超微粉碎设备工作组秘书长单位、闻名海内外的成套超微粉体设备和绿色环保装备生产基地。(吴红富)