

# 异养硝化-好氧反硝化菌群 YQS 脱氮及聚集特性研究

杨欣雨, 刘玉香\*

(太原理工大学环境科学与工程学院, 山西 太原 030001)

**摘要:**从自然环境中分离得到一个兼具异养硝化-好氧反硝化(HN-AD)性能和聚集性能的菌群 YQS, 鉴定其优势属为 *Rhizobium*, *Azoarcus* 和 *Hydrogenophaga*。综合分析了菌群 YQS 的脱氮性能、影响异养硝化性能的因素、聚集性能和胞外聚合物(EPS)的分泌情况。结果表明, 菌群 YQS 对氨氮、硝态氮和亚硝态氮的去除率分别为 97.33%、89.55% 和 85.94%; 碳源为柠檬酸钠, C/N 为 12、温度为 30°C、转速为 130 r/min 是菌群 YQS 进行异养硝化的最佳条件; 菌群 YQS 的良好聚集性能与其分泌的 EPS 有关, 聚集指数可达 53.72%。菌群 YQS 的分离为实现污水生物高效脱氮和功能微生物富集提供了新的生物资源。

**关键词:** 异养硝化-好氧反硝化; 根瘤菌; 脱氮; 聚集; 胞外聚合物

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2024)S2-0234-07

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2024.S2.042

## Study on nitrogen removal and aggregation characteristics of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacteria YQS

YANG Xin-yu, LIU Yu-xiang\*

(College of Environmental Science and Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030001, China)

**Abstract:** A bacterial group YQS with both heterotrophic nitrification-aerobic denitrification (HN-AD) and aggregation properties was isolated from the natural environment, and its dominant genera were identified as *Rhizobium*, *Azoarcus* and *Hydrogenophaga*. The nitrogen removal performance, factors affecting heterotrophic nitrification performance, aggregation performance and extracellular polymer (EPS) secretion of YQS were analyzed comprehensively. The results showed that the removal rates of ammonia nitrogen, nitrate nitrogen and nitrite nitrogen by YQS were 97.33%, 89.55% and 85.94%, respectively. The optimal conditions for heterotrophic nitrification were sodium citrate as carbon source, C/N of 12, temperature of 30°C and rotation speed of 130 r/min. The good aggregation performance of YQS was related to the secretion of EPS, and the aggregation index reached 53.72%. The isolation of YQS provides a new biological resource for efficient nitrogen removal and functional microbial enrichment in wastewater.

**Key words:** HN-AD; *Rhizobium*; nitrogen removal; aggregation; EPS

随着工农业生产的发展和人们生活水平的提高, 导致大量的含氮废水排出, 对水生生态系统平衡和人类健康产生了严重影响<sup>[1-2]</sup>, 因此, 污水脱氮迫在眉睫。与物理、化学脱氮工艺相比, 生物脱氮工艺因其高效、节能、低成本、无二次污染等特点, 具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。其中, 异养硝化-好氧反硝化微生物的出现, 打破了传统生物脱氮的壁垒, 使硝化和反硝化可以同时在一个空间中进行, 具有生长速度快、脱氮效率高、成本低廉等优点<sup>[3-4]</sup>。

目前, 从土壤和废水处理系统中已经分离得到了一些具有异养硝化-好氧反硝化功能的微生物, 其主要集中在不动杆菌属(*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*), 一些罕见属的异养硝化-好氧反硝化(HN-AD)菌很少被报

道和涉及<sup>[5-6]</sup>。而且大部分 HN-AD 菌的研究局限在单菌种, 而混合菌种对实际环境的适应能力更强<sup>[6-8]</sup>。因此, 尝试从不同环境中筛选高效的罕见属混合 HN-AD 菌群具有重要意义。

此外, HN-AD 细菌很容易随水流失, 这限制了实验室筛选得到的功能微生物的实际应用<sup>[9]</sup>。功能微生物的聚集是培养微生物应用于废水处理的前提, 可以为实际应用中污泥絮体和生物膜的形成提供理论依据<sup>[10]</sup>。目前, 仅有少数关于有聚集性能的 HN-AD 细菌的研究, 而且主要集中在对脱氮性能的研究, 有关聚集性能的研究很少, 如菌株 *Klebsiella pneumoniae* CF-S9<sup>[11]</sup>。微生物聚集现象主要与生长过程中胞外聚合物(EPS)的产生有关<sup>[12]</sup>。但是, 对于 HN-AD 菌的聚集现象与 EPS 的相关性、脱氮过

收稿日期: 2024-03-26; 修回日期: 2024-07-15

基金项目: 山西省基础研究计划(202103021224106)

作者简介: 杨欣雨(1998-), 女, 硕士生, 研究方向为水污染控制及资源化利用, 1344672130@qq.com; 刘玉香(1969-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为污染物资源化利用与新型生物处理技术的研发, 通讯联系人, yuxiangliu2002@126.com。

程中所产 EPS 的组成和含量等尚未明确。因此,兼具高效 HN-AD 脱氮特性和聚集特性的混合菌群的筛选和相关研究很有必要。

笔者以从河岸边污泥中筛选得到的兼具高效异养硝化性能和聚集性能的菌群 YQS 为研究对象,对其脱氮特性和聚集特性进行考察。通过对 EPS 的组成和含量测定分析其聚集现象的成因。同时,采用单因素实验确定其进行异养硝化脱氮的最佳条件。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 样品来源

本研究所用样品来源于夏季某河岸边污泥。

#### 1.1.2 培养基

富集培养基(1 L): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4.05 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.16 g、NaCl 0.12 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,调节 pH 为 7.0。

异养硝化培养基(1 L): $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  4.05 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.47 g、NaCl 0.12 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,调节 pH 为 7.0。

好氧反硝化培养基是基于异养硝化培养基,将其中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  替换为含氮量相等的 $\text{KNO}_3$  和 $\text{NaNO}_2$  得到的。

所有培养基使用前在 0.11 MPa、121℃ 下高压蒸汽灭菌 20 min。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 菌群的筛选和鉴定

将采集得到的泥样按 5% 接入到装有 150 mL 无菌富集培养基的 250 mL 锥形瓶中。在 30℃、120 r/min 条件下恒温培养 24 h,之后以 2% 的比例转接至新鲜的富集培养基中,重复转接至少 3 次,保证每次在新鲜培养基中均可以生长至培养基中液体变浑浊,以达到功能菌群成为优势菌群的目的。培养一段时间后,检测培养基中氨氮和总氮的含量,若氮含量发生明显下降,则视为筛选成功。将筛选得到的菌群委托上海生工生物工程股份有限公司进行 16S rDNA 高通量测序鉴定分析,并将其用于后续实验中。

#### 1.2.2 菌群的脱氮特性研究

将筛选得到的菌群在异养硝化培养基中培养至对数期,然后按 2% 分别接种至新鲜的异养硝化和

以硝氮或亚硝氮为唯一氮源的好氧反硝化培养基中。将接种后的培养基置于 30℃、120 r/min 条件下振荡培养,实验设 3 组平行,定时取样,以 8 000 r/min 离心 6 min 后取其上清液,测定其中  $OD_{600}$ 、氨氮( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ )、硝氮( $\text{NO}_3^--\text{N}$ )、亚硝氮( $\text{NO}_2^--\text{N}$ )、总氮(TN)、化学需氧量(COD)的质量浓度。

#### 1.2.3 菌群的聚集特性研究

将处于对数期的菌群按 2% 接种至装有 150 mL 无菌异养硝化培养基的 250 mL 锥形瓶中,振荡培养 48 h。期间定时取样测定其聚集指数和相对疏水性指数用来表征其聚集性能。同时,采用低温加热法对采集到的样品中的 EPS 进行提取。具体方法参考文献[13]。提取得到的 EPS 分为松散结合型 EPS(LB-EPS)和紧密结合型 EPS(TB-EPS)。对提取得到的 EPS 的组成和含量进行测定。

#### 1.2.4 菌群异养硝化脱氮条件优化

为了研究碳源(乙酸钠、柠檬酸钠、琥珀酸钠、淀粉、葡萄糖)、C/N(4、8、12、16、20、24)、温度(10、20、30、40℃)、转速(0、80、130、180、230 r/min)和氨氮初始质量浓度(15、50、100、300、500、1 000 mg/L)对菌群 YQS 脱氮效果的影响,以异养硝化培养基为基础,各培养条件下仅改变单一影响因子,其余条件固定不变,分别为  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  质量浓度 100 mg/L、温度为 30℃、pH=7.0、C/N=10 以及转速 130 r/min。将处于对数生长期的菌液以 2% 的接种量接种至装有 150 mL 无菌培养基的 250 mL 锥形瓶中,振荡培养 48 h。定时取样测定其  $OD_{600}$ 。培养结束时,取样测定培养基中  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 、TN 质量浓度,实验设置 3 组平行样。

#### 1.2.5 测定方法

利用分光光度计测量 600 nm 处的吸光度来表征细菌生长( $OD_{600}$ )。 $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 、 $\text{NO}_3^--\text{N}$ 、 $\text{NO}_2^--\text{N}$ 、TN 和 COD 分别采用纳氏试剂分光光度法、水杨酸-浓硫酸分光光度法、N-(1-萘基)-乙二胺光度法、碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法和快速消解分光光度法进行测定。聚集指数和疏水性指数测定参考文献[14]。利用荧光分光光度计和 FT-IR 测定样品中 EPS 的三维荧光光谱和红外光谱。采用福林酚法和硫酸-萘酮法测定蛋白质和多糖。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌群的筛选和鉴定

对富集得到的菌群进行初步脱氮性能测试发现,其中一个菌群在异养硝化培养基中具有良好的

生长和脱氮情况。同时,在培养过程中发现,菌群会发生如图 1(a)中所示的团聚现象。具体表现为,随着培养时间的延长,培养基中的菌液先是变黏稠,而后菌体团聚成结构松散的基团,最后团聚体结构变紧密。此时,培养基中液体变澄清,团聚体沉降在锥形瓶底部。鉴于该菌群优异的脱氮性能和特殊的生长状况,确定将其作为接下来的研究对象,并命名为菌群 YQS。

为了进一步了解菌群 YQS 的物种组成,采用高通量测序获得样品中门水平和属水平的微生物组成和相对丰度,如图 1(b)、图 1(c)所示。在菌群 YQS 中,变形菌门(*Proteobacteria*)占绝对优势,相对丰度为 94.22%。研究表明<sup>[15]</sup>,变形菌门是污水处理系统中常见的一类微生物,主要用于硝化反硝化脱氮过程。其次,菌群 YQS 中还有少量的拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)。在属水平上,根瘤菌属(*Rhizobium*)、固氮弧菌属(*Azoarcus*)、氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*)三者占绝对优势,共占菌群的 91.4%。其中,根瘤菌属所占占比最高,为 40.71%。根瘤菌是参与氮循环的典型土壤固氮微生物,因其容易产生 EPS 而闻名,而 EPS 是聚集现象出现的主要原因<sup>[12]</sup>。因此,菌群 YQS 产生的聚集现象主要与其中根瘤菌所产的胞外聚合物相关。目前,已经鉴定出几种具有异养硝化-好氧反硝化功能的根瘤菌<sup>[7,16]</sup>。其次,在菌群 YQS 中占优势的是固氮弧菌属(*Azoarcus*)和氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*),相对丰度分别为 27.35%和 23.35%。其中,固氮弧菌属(*Azoarcus*)被报道可以参与好氧反

硝化过程,氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*)是典型的好氧反硝化菌<sup>[17-18]</sup>。本研究中所得到的菌群是自然筛选得到的,对环境变化的适应能力优于人为复配的混合菌群,具有一定的实际污水脱氮处理的潜力。

### 2.2 菌群的脱氮特性研究

以  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  作为唯一氮源,考察菌群的异养硝化脱氮特性,菌群 YQS 的生长及  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  转化过程如图 2(a)所示。从图 2(a)中可以看出,菌群在异养硝化培养基中生长的对数期是 6 h。在培养 24 h 之后,菌群 YQS 的生长进入了稳定期,在这之后,  $\text{OD}_{600}$  的值不稳定,是由于菌体开始出现絮凝和团聚现象。在前 24 h,随着菌群的生长,氨氮的质量浓度急剧下降,相应地,平均氨氮去除速率为 3.51  $\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ,说明氨氮的去除与菌体生长密切相关。在整个培养期,氨氮最终仅剩余 2.47  $\text{mg}/\text{L}$ ,实现了 97.33% 的去除。该值高于蒋慧慧等<sup>[19]</sup>筛选出来的 JN01 对氨氮的去除率(87.29%),远高于张泽锴等<sup>[20]</sup>筛选得到的 ZH-2。而且整个过程中没有亚硝氮的积累,有少量硝氮积累。此外,在培养结束时,培养基中 TN 的去除率达到 96.88%。结果均证明了菌群 YQS 具有良好的异养硝化能力。

分别以  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  作为培养基中的唯一氮源,考察菌群在好氧条件下的反硝化能力,结果如图 2(b)和图 2(c)所示。在以  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  为唯一氮源的培养基中,前 6 h  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  质量浓度急剧下降,这一过程伴随着  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  质量浓度的快速上升;在 6 h 之后, $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的质量浓度一直高于  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ,TN 的变

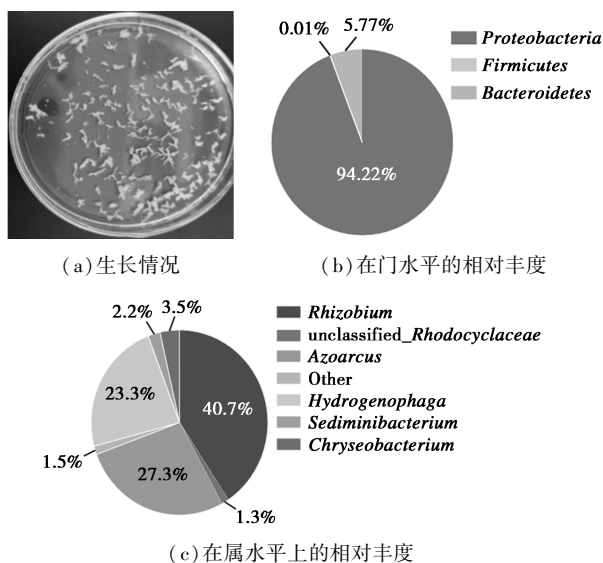
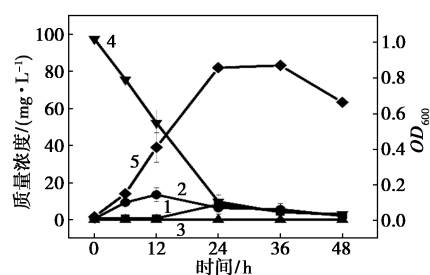
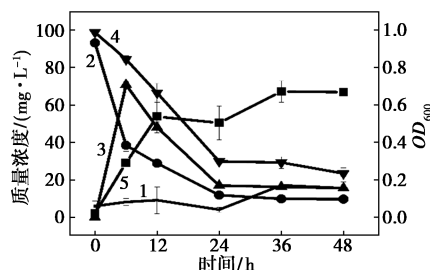


图 1 菌群 YQS 的生长情况及在门水平和属水平上的相对丰度



(a) 在以  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  为唯一氮源的培养基中



(b) 在以  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  为唯一氮源的培养基中

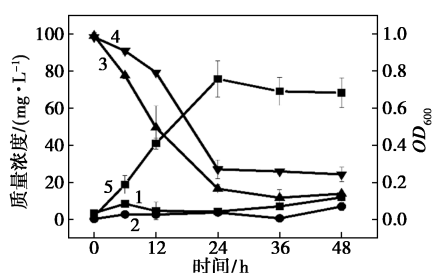
(c) 在以  $\text{NO}_2\text{-N}$  为唯一氮源的培养基中1— $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ; 2— $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ; 3— $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ; 4—TN; 5— $\text{OD}_{600}$ 

图2 菌群 YQS 的脱氮特性研究

化趋势与  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的变化趋势接近。在以  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  为唯一氮源的培养基中,类似于  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的情况,83.27%的亚硝氮在 24 h 内被去除。在整个培养过程中几乎没有检测到除亚硝态氮外的含氮化合物。菌群 YQS 对  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的去除率远超刘雨晴等<sup>[21]</sup>筛选出来的 L3。此外,COD 和 TN 也可以被有效去除,这些结果均表明菌群 YQS 可以进行好氧反硝化。

不同氮源的培养基中氮的去除率如表 1 所示。从表 1 中可以看出,在以氨氮为唯一氮源的培养基中,可以实现最大的氮去除率(97.33%)。然而,硝酸盐(89.55%)和亚硝酸盐(85.94%)都有少量剩余。同时,以氨氮为氮源的培养基中,COD 和 TN 的去除效果比在硝酸盐/亚硝酸盐为唯一氮源的培养基好。这是由于  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  更容易被细胞吸收,参与生物大分子的合成,部分的氨氮通过微生物的同化作用去除<sup>[22]</sup>。结果表明,菌群 YQS 可以利用不同的氮源实现生长和污染物的去除,具有异养硝化和好氧反硝化的能力。

表1 不同氮源培养基中氮和有机物的去除率

培养基氮源类型	TN 去除率/%	COD 去除率/%
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	96.88	92.93
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	76.20	86.22
$\text{NO}_2^-\text{-N}$	75.25	83.25

### 2.3 菌群异养硝化性能影响因素研究

碳源、C/N、初始氨氮浓度、温度、转速对菌群 YQS 异养硝化性能和最大生长量的影响如表 2~表 6 所示。在反硝化过程中,碳源是良好电子供体用来还原氮<sup>[23]</sup>。从表 2 中可以看出,与淀粉、葡萄糖相比,当其他 3 种碳源分别作为唯一碳源时,菌群 YQS 具有良好的生长情况和异养硝化性能。这是因为微生物更倾向于利用结构简单、分子质量小的

有机物<sup>[24]</sup>。最终,在各培养基中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除率分别为 92.68%(柠檬酸钠)>91.79%(丁二酸钠)>75.26%(乙酸钠)。这一结果与 Li 等<sup>[25]</sup>研究得到的柠檬酸钠和丁二酸钠分别是菌株 YG-24 脱氮的一级、二级高效碳源相一致。值得关注的是,在含乙酸钠的培养基中,菌群 YQS 的聚集现象不明显。以柠檬酸钠为碳源的培养基中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 的去除率均最高。出现这种差异的原因与其氧化还原电位有关,柠檬酸钠被氧化的程度更大<sup>[25]</sup>。因此,综合考虑菌群的生长情况和脱氮效率,选择柠檬酸钠作为菌群 YQS 异养硝化的最佳碳源。

表2 碳源类型对菌群 YQS 的影响

碳源类型	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率/%	TN 去除率/%	$\text{OD}_{600}$ 峰值
柠檬酸钠	92.68	87.23	1.02
乙酸钠	75.26	66.42	0.98
丁二酸钠	91.79	83.88	0.83
淀粉	21.88	15.08	0.24
葡萄糖	35.95	27.91	0.43

适量的碳源供给在保证了解氮效率的同时还可以节约成本。从表 3 中可以看出,在 C/N 为 4~24 的范围内,研究了菌群 YQS 生长和异养硝化所需的最佳 C/N。在培养过程中发现,高 C/N(20、24)会延长  $\text{OD}_{600}$  达到峰值的时间,但生长量并没有明显提升。C/N 为 24 时,菌群 YQS 的絮凝情况较差。在 C/N 处于 4~12 时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除率随着 C/N 的增大而提高。特别是 C/N 为 8 时,菌群 YQS 仍然可以去除 87.40%的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 74.13%的 TN。这一数值已经超过了菌株 *Pseudomonas* sp. G16 和 *Bacillus aryabhattai*. JN01 在 C/N 为 10 时对  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除率<sup>[19]</sup>。结果表明,菌群 YQS 可以在较少碳源供给的情况下生长和脱氮,可以实现对碳源的高效利用。综上所述,选用 C/N 为 12 作为菌群 YQS 异养硝化的最佳 C/N,既保证了良好的异养硝化性能,又节约了碳源投加的成本。

表3 C/N 对菌群 YQS 的影响

C/N	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率/%	TN 去除率/%	$\text{OD}_{600}$ 峰值
4	49.23	42.86	0.690
8	87.40	74.13	1.010
12	96.37	87.07	1.500
16	95.52	92.67	1.305
20	95.21	86.33	1.290
24	94.85	82.47	1.410

从表 4 中可以看出,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  质量浓度从 15 mg/L 提升到 300 mg/L 时, 随着培养基中物质供给逐渐丰富, 菌群 YQS 的最大生长量也随之提高。在 100 mg/L 以下质量浓度的氨氮负荷下, 菌群 YQS 对  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 的去除率均在 90% 以上, 且随着质量浓度的升高, 脱氮效率逐渐下降。菌群 YQS 在不同氨氮质量浓度下的异养硝化性能与菌株 ZN1 接近, 对于 300 mg/L 左右的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除率 (75.19%) 优于 *Sporidiobolus pararoseus* Y1 和 *Pseudomonas stutzeri* YG-24<sup>[2,25-26]</sup>。当氨氮质量浓度达到 500 mg/L 以上时, 菌群 YQS 的生长和脱氮情况较差。菌群 YQS 在低质量浓度氨氮条件下良好的脱氮特性是由于菌群来源于自然界中, 而不是由活性污泥中筛选得到的。因此, 菌群 YQS 适用于污水厂生物脱氮处理的后续步骤。

表 4 初始氨氮质量浓度对菌群 YQS 的影响

初始氨氮质量浓度/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率/%	TN 去除率/ %	$OD_{600}$ 峰值
15	94.64	93.35	0.16
50	93.70	91.03	0.52
100	92.89	91.03	0.96
300	75.19	62.65	1.19
500	35.52	23.71	0.33
1000	23.85	23.40	0.27

除了培养基组分 (碳源类型、C/N、初始氨氮质量浓度等), 外部环境因素也会对微生物异养硝化性能产生影响<sup>[27]</sup>。从表 5 中可以看出, 在 30℃ 时菌群的异养硝化性能最好, 氨氮的去除率为 30℃ > 40℃ > 20℃ > 10℃。这是因为温度影响酶活性和传质过程。在 10℃ 的条件下, 菌群 YQS 几乎不生长, 也不脱氮。不同于振荡培养下形成的絮体, 静置条件下菌体会在培养基液面上方形成一层白膜。随着菌群的生长, 膜变厚且结构更紧实。这是由于振荡培养下絮体受到了较大的水流剪切力作用<sup>[28]</sup>。从表 6 中可以看出, 在 130 r/min 条件下, 菌群的脱氮效率达到最大。菌群 YQS 与菌株 N26 异养硝化性能的最适转速接近, 比菌株 WUST-7 对 DO 的需求少<sup>[28-29]</sup>。高转速有利于菌群的生长, 但脱氮效率不会得到提升。综合考虑, 温度为 30℃ 和转速为 130 r/min 是菌群 YQS 脱氮的最佳条件。

表 5 温度对菌群 YQS 的影响

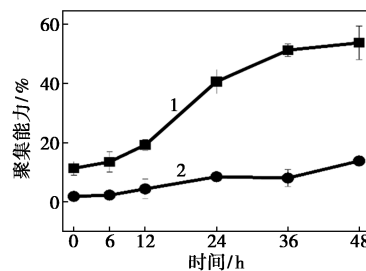
温度/℃	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率/%	TN 去除率/%	$OD_{600}$ 峰值
10	16.51	16.07	0.13
20	90.19	85.26	0.68
30	96.17	95.52	0.86
40	91.62	91.79	0.83

表 6 转速对菌群 YQS 的影响

转速/( $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率/%	TN 去除率/%	$OD_{600}$ 峰值
0	59.69	55.85	0.461
80	94.39	85.78	0.960
130	97.51	96.88	0.880
180	91.92	86.23	0.980
230	89.60	86.42	1.030

## 2.4 菌群聚集性能研究

随着脱氮反应的进行, 可以观察到菌体的聚集现象。细菌的聚集能力对于生物膜和絮体的形成非常重要。因此, 采用聚集指数和相对疏水性指数考察菌群的聚集能力, 结果如图 3 所示。从图 3 中可以看出, 随着脱氮反应的进行, 菌群 YQS 细胞之间的聚集能力逐渐增强, 并在 36 h 后基本趋于稳定, 其最大自聚集能力约为 53.72%。菌群 YQS 的聚集能力与同类型的菌株 A2 和 LJ-1 相似<sup>[14,30]</sup>。菌株的疏水性随时间变化关系与菌株自聚集能力的变化趋势基本相同, 在 48 h 时, 菌群 YQS 的相对疏水性达到最大 13.78%。



1—聚集指数; 2—疏水性指数

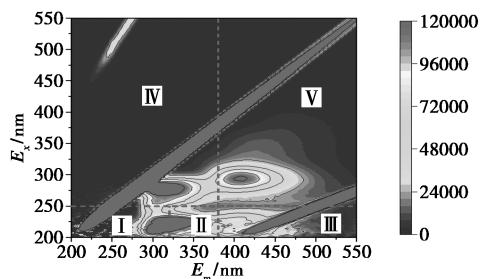
图 3 菌群 YQS 的聚集性能

## 2.5 菌群分泌 EPS 的表征

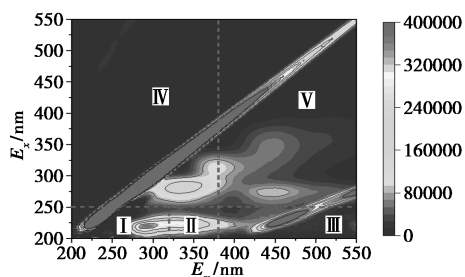
EPS 由双层结构组成: 外层为 LB-EPS, 内层为 TB-EPS<sup>[31]</sup>。利用 3D-EEM 和 FT-IR 对不同培养时期提取的 LB-EPS 和 TB-EPS 的组成和官能团进行分析, 如图 4 所示。采用区域积分法对荧光图谱进行识别, 从图 4(a)、图 4(b) 中可以看出, 区域 I 和 II 为芳香蛋白 I 和 II, 区域 III 为黄腐酸类似物, 区

域IV为可溶性微生物副产物,区域V为腐植酸类似物<sup>[32]</sup>。在每个时期中,TB-EPS和LB-EPS组成成分相似,均为类酪氨酸芳香蛋白、可溶性微生物副产物和腐殖酸。这一组成与Yang等<sup>[33]</sup>的研究结果相似,但是*Acinetobacter* sp.FYF8所产EPS的荧光图谱中没有出现腐殖酸的荧光峰<sup>[34]</sup>。不同区域TB-EPS的荧光峰强度均大于LB-EPS,表明TB-EPS是细胞外基质中的主要成分。从图4(c)中可以看出,LB-EPS和TB-EPS的峰位置基本相同。菌群YQS所产EPS在 $3445\text{ cm}^{-1}$ 处的主峰是糖类O—H伸缩振动,与絮凝菌株*Paenibacillus etgii* B69和菌株A3的多糖峰相似<sup>[30,35-36]</sup>。所测得的其他峰分别位于 $1036$ 、 $2936$ 、 $1461\text{ cm}^{-1}$ 和 $1631\text{ cm}^{-1}$ 处。位于 $1036\text{ cm}^{-1}$ 的峰为糖类C—OH伸缩振动。 $1631\text{ cm}^{-1}$ 对应的蛋白质酰胺I区的C=O伸缩振动代表疏水性官能团<sup>[37]</sup>。结果表明,菌群分泌EPS的主要成分是蛋白质和多糖。

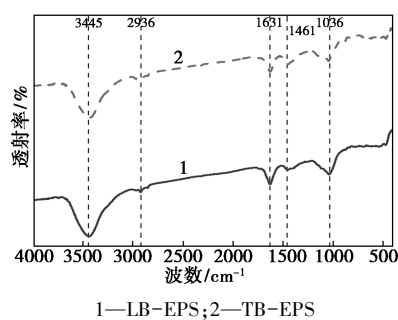
为了进一步了解菌群YQS分泌EPS的组成,单独测定了脱氮过程中TB-EPS中蛋白质和多糖的质量浓度,并将二者之和作为TB-EPS的总质量浓度,结果如图4(d)所示。随着培养过程的进行,PS和PN的质量浓度均呈现先升高后降低的趋势,但PN质量浓度始终高于PS。这与以往的纯培养微生物中PS质量浓度高的观点不同<sup>[38]</sup>。在24 h时,TB-EPS的总质量浓度高达 $109.37\text{ mg/L}$ 。这是因为对数期微生物生长代谢旺盛。在24 h之后,虽然EPS的质量浓度有所下降,但仍能保持良好的聚集性能,这与PN/PS值上升有关。有研究表明,聚集性能主要与EPS中蛋白质的质量浓度相关<sup>[39]</sup>。



(a) LB-EPS 的三维荧光光谱

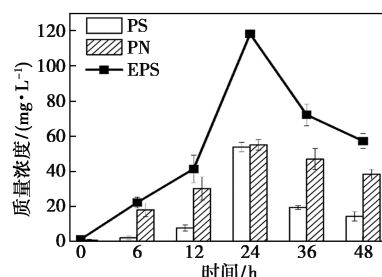


(b) TB-EPS 的三维荧光光谱



1—LB-EPS; 2—TB-EPS

(c) EPS 的红外光谱



(d) 培养周期内 EPS 的产量变化

图4 菌群分泌EPS的表征

### 3 结论

从自然环境中筛选得到了一个兼具异养硝化-好氧反硝化性能和聚集性能的菌群YQS。经鉴定,菌群YQS的优势属为根瘤菌属(*Rhizobium*)、固氮弧菌属(*Azoarcus*)、氢噬胞菌属(*Hydrogenophaga*)。菌群YQS对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的去除率分别为97.33%、89.55%和85.94%。该菌群异养硝化的最佳条件为:碳源为柠檬酸钠、C/N为12、温度为 $30^\circ\text{C}$ 、转速为 $130\text{ r/min}$ ,能够耐受 $300\text{ mg/L}$ 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 负荷。菌群YQS具有良好的聚集能力,其EPS的主要成分是蛋白质和多糖。其中,蛋白质的占比最多,还含有少量的腐殖酸。该菌群的发现为污水处理中高效脱氮和功能微生物的富集提供了一种新的解决思路。

### 参考文献

- [1] Sun Z, Lv Y, Liu Y, et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. S1 [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 220: 142-150.
- [2] Zhang N, Chen H, Lyu Y, et al. Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2019, 94(4): 1165-1175.
- [3] Wu S, Lv N, Zhou Y, et al. Simultaneous nitrogen removal via heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Lysinibacillus fusiformis* B301 [J]. *Water Environment Research*, 2023, 95

- (3):e10850.
- [4] Kang X, Zhao X, Song X, *et al.* Nitrogen removal by a novel strain *Priestia aryabhatai* KX-3 from East Antarctica under alkaline pH and low-temperature conditions [J]. *Process Biochemistry*, 2023, 130:674–684.
- [5] 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.
- [6] 黄诗玮, 田云, 马述, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌氮代谢特性研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2023, 40(1):91–97.
- [7] Qiao Z, Sun R, Wu Y, *et al.* Characteristics and metabolic pathway of the bacteria for heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in aquatic ecosystems [J]. *Environmental Research*, 2020, 191:110069.
- [8] 雍佳君, 成小英. 蠡河底泥中反硝化复合菌群富集及菌群结构研究 [J]. *环境科学*, 2015, 36(6):2232–2238.
- [9] Shi Y, Hu Y, Liang D, *et al.* Enhanced denitrification of sewage via bio-microcapsules embedding heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria *Acinetobacter pittii* SY9 and corn cob [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 358:127260.
- [10] Yang L, Cui S, Ren Y X, *et al.* Nitrogen removal and aggregation characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* YL and its application capacity for ammonium-rich wastewater treatment [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 43:102260.
- [11] Padhi S K, Tripathy S, Sen R, *et al.* Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 78:67–73.
- [12] Wei Z, Huang S, Zhang Y, *et al.* Characterization of extracellular polymeric substances produced during nitrate removal by a thermophilic bacterium *Chelatococcus daeguensis* TAD1 in batch cultures [J]. *RSC Advances*, 2017, 7(70):44265–44271.
- [13] 徐小惠, 魏德洲, 张兰河. 胞外聚合物的提取及其吸附性能 [J]. *东北大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(10):1467–1474.
- [14] 洪培, 李静, 倪林幸子, 等. 好氧反硝化菌 LJ-1 的脱氮及自聚集性研究 [J]. *环境科学与技术*, 2022, 45(12):1–8.
- [15] Saha S, Gupta R, Sethi S, *et al.* Enhancing the efficiency of nitrogen removing bacterial population to a wide range of C:N ratio (1.5:1 to 14:1) for simultaneous C&N removal [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2022, 16(8):101.
- [16] Wei B, Luo X, Ma W, *et al.* Biological nitrogen removal and metabolic characteristics of a novel cold-resistant heterotrophic nitrification and aerobic denitrification *Rhizobium* sp. WS7 [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 362:127756.
- [17] Gao S, Zhou Q, Zhang Z, *et al.* Enhanced nutrients removal from eutrophic water by aerobic denitrifiers assisting floating plants [J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2023, 32(3):2601–2609.
- [18] Yin Y, Li Y. Study on the feasibility of enhancing the biodegradation of aniline wastewater by polyvinyl alcohol-sodium alginate gel pellets embedded activated sludge [J]. *Environmental Engineering Science*, 2022, 39(5):431–440.
- [19] 蒋慧慧, 王强, 付维来, 等. 一株异养硝化-好氧反硝化细菌的筛选及氮转化特性研究 [J]. *生物技术通报*, 2023, 39(12):250–260.
- [20] 张泽锟, 闫勇, 郭静, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌株的分离、鉴定及其氨氮降解过程初探 [J]. *中国酿造*, 2022, 41(8):83–88.
- [21] 刘雨晴, 张耀月, 詹夏沁, 等. 一株异养硝化-好氧反硝化菌株 L3 的筛选鉴定及其脱氮特性 [J]. *水处理技术*, 2023, 49(12):94–100.
- [22] 刘妍, 袁林江, 陈希, 等. 一株异养硝化-好氧反硝化-积累磷的细菌 *Klebsiella pneumoniae* A15 的筛出及其特性研究 [J]. *中国环境科学*, 2024, 44(4):2286–2296.
- [23] Lan S, Lai Y, Wang L, *et al.* Treatment of nitrate-nitrogen-containing wastewater via aerobic denitrifying bacteria using different carbon sources [J]. *BioResources*, 2022, 17(2):1972–1987.
- [24] Chen J, Zheng J, Li Y, *et al.* Characteristics of a novel thermophilic heterotrophic bacterium, *Anoxybacillus contaminans* HA, for nitrification-aerobic denitrification [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(24):10695–10702.
- [25] 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.
- [26] Zeng J, Liao S, Qiu M, *et al.* Effects of carbon sources on the removal of ammonium, nitrite and nitrate nitrogen by the red yeast *Sporidiobolus pararoseus* Y1 [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 312:123593.
- [27] Chen Q, Ni J. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(5):619–623.
- [28] 胡杰, 颜家保, 霍晓琼, 等. 低 C/N 比异养硝化-好氧反硝化菌筛选及硝化特性 [J]. *化工进展*, 2019, 38(3):1567–1572.
- [29] 夏远航, 杨小丽, 李海华, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 *Acinetobacter johnsonii* sp. N26 的脱氮性能及代谢途径 [J]. *微生物学通报*, 2023, 50(4):1374–1395.
- [30] 洪培. 湖泊表层沉积物好氧反硝化菌株的脱氮、聚集特性及其在 SBBR 中强化除氮的应用研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2020.
- [31] Shi Y H, Huang J H, Zeng G M, *et al.* Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview [J]. *Chemosphere*, 2017, 180:396–411.
- [32] Zhang L, Wang Z, Su J, *et al.* Mechanisms of ammonia, calcium and heavy metal removal from nutrient-poor water by *Acinetobacter calcoaceticus* strain HM12 [J]. *Journal of Environmental Management*, 2024, 351:119912.
- [33] Yang W, Xu L, Wang Z, *et al.* Synchronous removal of ammonia nitrogen, phosphate, and calcium by heterotrophic nitrifying strain *Pseudomonas* sp. Y1 based on microbial induced calcium precipitation [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363:127996.

空间牢固结合较密实屏蔽体,大大减少了热辐射,降低导热系数,达到隔热和保温效果,除此之外表面还有球状纳米颗粒,能够均匀分散于水泥颗粒中,填充于更细微的孔隙中,形成致密非渗透结构,可以显著提升整个水泥石的力学性能。

### 3 现场试验

渤海辽东湾海域某油田前期热采井作业情况显示,水泥机体在高温作用下水泥石孔隙增大,水泥石强度衰退,密封失效。旅大油田为首个海上特超稠油规模热采工程,对于热采井及深井勘探有着重大意义。旅大某区块地质特征为粉砂质板岩夹绢云母板岩,孔隙率大,且热采过程热损失大,使稠油流动性降低,降低采油效率。为了降低热采固井水泥浆的热传导,要求对水泥浆配方进行改进。在热采井固井水泥浆配方中加入了2%纳米亲水气凝胶HYA-1,显著提高了水泥石的抗压强度,降低水泥石的渗透率,显著降低了水泥浆的导热系数,据测井解释成果,全井段水泥胶结以优为主(94.15%),相对幅值小于15%,固井质量优秀,满足后续热采测试要求。

### 4 结论

采用正辛烷溶剂对二氧化硅气凝胶进行改性研制的气凝胶具有高强和低导热性能的纳米亲水气凝胶HYA-1材料,粒径为20~50 nm,分散性好。该气凝胶加入到水泥浆具有良好的流变性和稠化性能。在水泥浆中加入2%亲水气凝胶HYA-1,水泥石养护7 d抗压强度达到55 MPa,抗折强度提高了1.09倍,渗透率降低97%,导热系数降低了91%,具有良好的力学性能。在海上旅大热采井固井现场作业时,在热采井固井水泥浆配方中加入2%纳米亲水气凝胶HYA-1,显著提高了水泥石的抗压强度,

降低水泥石的渗透率,增加水泥石的致密性,显著降低了水泥浆的导热系数,固井质量优秀。HYA-1的成功应用对渤海辽东湾海域的热采有着重大的研究意义。

### 参考文献

- [1] 张水,李国忠,姜葱葱,等.粉煤灰在水泥发泡轻质保温材料中的应用研究[J].粉煤灰,2011,(6):3-5.
- [2] 刘慧卿,东晓虎.稠油热复合开发提高采收率技术现状与趋势[J].石油科技通报,2022,7(2):174-184.
- [3] 李钊.地热资源评价方法的探讨[J].城市地质,2014,(9):25-29.
- [4] 杨维丽.稠油热采注汽管线及井口保温技术研究及应用[J].南方能源观察,2023,(4):1-2.
- [5] 柴丽娟,李珠,刘元珍,等.玻化微珠发泡保温板水泥发泡试验研究[J].混凝土,2015(8):153-155,160.
- [6] 徐可军,王新征,何育荣,等.稠油热采井中泡沫水泥浆的固井技术[J].石油钻采工艺,2002,24(6):30-31.
- [7] 郭晓煜,张光磊,赵霄云,等.气凝胶在建筑节能领域的应用形式与效果[J].硅酸盐通报,2015,34(2):444-449,455.
- [8] 冯凯.河北雄县地热井耐腐蚀保温水泥浆体系研究与应用[D].青岛:中国石油大学(华东),2020.
- [9] 王永洪,候金三,李璞,等.一种适用于长封固段固井用的大温差低导热水泥浆:CN202011196209.1[P].2020-12-18.
- [10] 王非,陈晓红,胡子君,等.疏水SiO<sub>2</sub>气凝胶的制备及表征[J].硅酸盐通报,2008,27(6):1235-1239.
- [11] 张志华,倪星元,沈军,等.SiO<sub>2</sub>气凝胶表面特性对其吸附性能的影响[J].材料导报,2005,19(7):115-117.
- [12] 倪星元,张志华,黄耀东,等.纳米多孔SiO<sub>2</sub>气凝胶的常压制备及应用[C].第五届中国功能材料及其应用技术学术会议.北京:2004.
- [13] 王晓亮,许明标,杨晓榕,等.纳米溶胶在水泥浆中的应用[J].油田化学,2021,38(3):412-416.
- [14] 戴勤友.新型粘土气凝胶对水泥砂浆性能的影响[J].硅酸盐通报,2020,39(9):3014-3022.
- [15] 张磊,周长灵,徐鸿照,等.一种亲水型气凝胶的制备方法:CN202111490536.2[P].2022-08-02.
- [16] Talebi Z, Soltani P, Habibi N, et al. Silica aerogel/polyester blankets for efficient sound absorption in buildings[J]. Construction and Building Materials, 2019, 220(9): 76-89. ■
- [17] Li D, Liang X, Wu C. Characteristics of nitrogen removal and extracellular polymeric substances of a novel salt-tolerant denitrifying bacterium, *Pseudomonas* sp. DN-23 [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 335.
- [18] Zheng Z, Li W, Huang X, et al. Effect of trace elements and optimization of their composition for the nitrification of a heterotrophic nitrifying bacterium, *Acinetobacter harbinensis* HITLi7T, at low temperature [J]. Annals of Microbiology, 2017, 67(11): 715-725.
- [19] Zhang Y, Li J, Pang Y, et al. Systematic investigation of simultaneous copper biosorption and nitrogen removal from wastewater by an aerobic denitrifying bacterium of auto-aggregation [J]. Environmental Research, 2023, 235: 116602. ■

(上接第240页)

- [34] Fan Y, Su J, Zheng Z, et al. Denitrification performance and mechanism of a novel isolated *Acinetobacter* sp. FYF8 in oligotrophic ecosystem [J]. Bioresource Technology, 2021, 320: 124280.
- [35] Chen G, Huang J, Tian X, et al. Response of extracellular polymeric substances to high load shock in an aerobic granular sludge reactor performing simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification [J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2023, 235(1): 41.
- [36] Li O, Lu C, Liu A, et al. Optimization and characterization of polysaccharide-based biofloculant produced by B69 and its application in wastewater treatment [J]. Bioresource Technology, 2013, 134: 87-93.