

# 微生物法降解氨氮性能的研究

黄峰<sup>1</sup>, 吕永康<sup>1\*</sup>, 刘玉香<sup>2</sup>, 任瑞鹏<sup>1</sup>

(1. 太原理工大学煤科学与技术教育部和山西省重点实验室, 山西太原 030024;  
2. 太原理工大学环境科学与工程学院, 山西太原 030024)

**摘要:**从焦化废水活性污泥中筛选到1株高效异养硝化菌株 *Alcaligenes sp.* C17。考察了菌株在不同碳氮比(C/N, 指碳与氮的物质的量比)、温度、pH、转速等影响因素下的氨氮降解性能。结果表明, 菌株 C17 在较大的 C/N、温度和 pH 范围内都具有高效的降解氨氮性能, 在处理贫瘠废水与调节废水 pH 方面有着广阔的应用前景。并进一步探究了菌株抵抗高浓度氨氮废水的活性, 以及通过检测该菌株的代谢产物探究了该菌株硝化反硝化性能。

**关键词:**氨氮降解; 影响因素; 产品; 异养硝化; 好氧反硝化

中图分类号: X172

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2016)04-0129-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2016.04.031

## Ammonium removal by microbiological method

HUANG Feng<sup>1</sup>, LV Yong-kang<sup>1\*</sup>, LIU Yu-xiang<sup>2</sup>, REN Rui-peng<sup>1</sup>

(1. Shanxi Key Laboratory of Coal Science and Technology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

**Abstract:** A novel heterotrophic nitrifying bacterium is isolated from activated sludge of a coking wastewater and is identified as *Alcaligenes sp.* C17. The influences of C/N ratio, temperature, pH and shaking speed on the ammonium removal are studied. The results show that the strain exhibits efficient heterotrophic nitrification-aerobic denitrification ability at a broad range of C/N, temperature and pH. It has the capability to be applied in the treatment of oligotrophic source water or adjusting wastewater pH. The activity of C17 to tolerate high ammonium loads is further studied. The metabolic products are also analyzed to investigate the heterotrophic nitrification coupled with aerobic denitrification performance of C17.

**Key words:** ammonium removal; influencing factors; products; heterotrophic nitrification; aerobic denitrification

大量含氮化合物排放到水环境中会引起富营养化, 从而导致水资源的恶化, 严重时甚至威胁到人体的健康<sup>[1]</sup>。因此, 最大限度地减少废水中的含氮污染物成为迫切要解决的问题。考虑到物理法不能把污染物彻底去除, 化学法极易带来二次污染, 兼之二者处理费用较高, 目前多采用生物处理法。传统的生物法是建立在微生物自养需氧硝化和异养厌氧反硝化的基础上, 由于传统工艺耗时、占用空间大等条件的限制, 去除效率较低, 极大地限制了生物脱氮在实际工程中的应用<sup>[2-3]</sup>。为了克服这些条件的束缚, 近年来涌现出一些新的微生物处理方法, 如需氧反硝化、厌氧氨氧化、自氧反硝化、短程反硝化等<sup>[4]</sup>。但最受青睐的方法莫过于异养硝化反硝化<sup>[5-6]</sup>, 一系列关于降解水中含氮污染物的异养需氧型微生物菌株被报道, 如 *Pseudomonas stutzeri*<sup>[7]</sup>, *Alcaligenes faecalis*<sup>[8]</sup> 和 *Acinetobacter*<sup>[9]</sup>, 且都表现出明显不同的硝化反硝化性能。笔者探究了不同实验条件下一株新的微生物菌株 C17 的降氨氮性能, 不

同起始氨氮浓度条件下菌株活性以及不同氮源的情况下对其硝化反硝化产品的探究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 微生物菌株鉴定

异养硝化菌株 C17 是从太原市焦化厂污水处理第 1 曝气池的活性污泥中分离纯化得到, 在大连宝生物工程有限公司进行了 16S rRNA 序列测定。利用软件 MEGA5.1 并采用近邻结合法构建了该菌的系统发生树, 进而为该菌系统命名。用石蜡冷冻法保存在实验室, 使用前富集培养。

#### 1.1.2 培养基

富集培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, pH 7.0~8.0, 蒸馏水为 1 000 mL。

改良异养氨化培养基: CH<sub>3</sub>COCOO<sub>2</sub>Na 4.192 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.472 g, MgSO<sub>4</sub> 0.05 g, MnSO<sub>4</sub> 0.005 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.75 g, pH

收稿日期: 2015-09-08

作者简介: 黄峰(1992-), 男, 硕士生, 主要从事废水处理以及多相催化方面的研究, 1246881458@qq.com; 吕永康(1961-), 男, 博士, 教授, 主要从事废水处理的研究, 硕士生导师, 通讯联系人, yongkanglv@163.com。

7.0~8.0, 蒸馏水 1 000 mL。

亚硝氮培养基: 丙酮酸钠 4.192 g,  $\text{NaNO}_2$  0.493 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.005 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.25 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.75 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~8.0。

硝氮培养基: 丙酮酸钠 4.192 g,  $\text{NaNO}_3$  0.607 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.005 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.25 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.75 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~8.0。

## 1.2 实验方法

取 2 mL 处于对数生长期的菌株悬液接种于 121℃ 灭菌 20 min 的异养氨化培养基中(培养基体积为 100 mL), 所用锥形瓶容量 250 mL, 研究菌株 C17 在不同 C/N(指的是碳与氮的物质的量比, 其值分别为 4、8、12、16、20 和 24)、起始温度(20、25、30、35、40℃ 和 45℃)、pH(2、4、6、8、10 和 12)、转速(30、60、90、120、150 r/min 和 180 r/min)条件下对氨氮去除能力的影响, 在得出适宜的条件(C/N 物质的量比为 16, 起始温度为 30℃, pH 为 8, 转速为 150 r/min)后, 进一步以氨氮降解能力(设定氨氮起始浓度分别为 400、800、1 200、1 600 mg/L)、总氮降解(设定起始氨氮质量浓度为 100、200、300 mg/L)、COD 降解(设定起始氨氮质量浓度为 100、200、300 mg/L)为指标对菌株的活性进行探究, 同时分别取  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaNO}_2$ 、 $\text{NaNO}_3$  作为唯一氮源, 并固定培养基中含氮质量浓度为 100 mg/L, 探究了不同氮源对菌株硝化反硝化产品的影响。

以上实验在取样进行分析时, 样品均经 8 000 r/min、10 min 离心分离之后, 取上清液进行分析。

## 1.3 分析方法

氨氮: 采用纳氏试剂光度法; 亚硝氮: 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法; 硝氮: 采用紫外分光光度法; 羟胺: 采用间接分光光度法; 总氮: 利用 TOC/TN 分析仪;  $\text{OD}_{600}$ : 采用分光光度计法; COD: 利用 COD 测定仪。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微生物菌株鉴定

NCBI Blast 结果显示, 该菌株与产碱杆菌属存在高度相似性, 在部分 16S rRNA 序列分离与测定基础上构建的系统发育树进一步证明了该菌株为产碱菌属, 进而为其命名 *Alcaligenes sp.* C17。菌株在基因库中的 ID: KT265274, 与其有关的系统发育树

如图 1 所示。

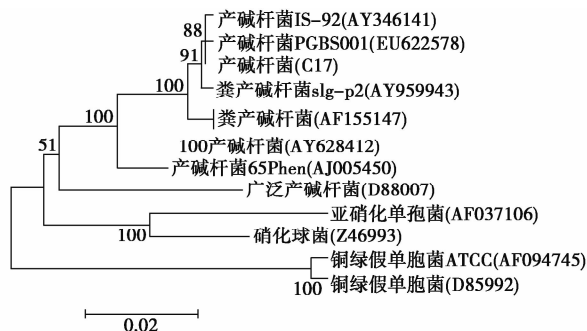


图 1 源于部分 16S rRNA 基因序列分析构建的系统发育树

## 2.2 不同条件下的氨氮降解

### 2.2.1 碳氮比对氨氮去除的影响

碳氮比对氨氮去除的影响如图 2(a) 所示。由图 2(a) 可以看出, 在 C/N 为 4 时, 经 36 h 培养, 氨氮降解率已达 99.37%, 随着 C/N 的增加, 去除率略有升高, 在 C/N 达到 16 时, 经过 36 h 培养, 氨氮的去除率达 99.53%, 高于已报道的菌株 *Bacillus subtilis* A1<sup>[10]</sup>, 此后降解率趋于稳定。原因是起始碳源不足, 没有足够的能量供菌体生长, 相应的除氮效率也会较低。当提供的碳源高于菌体的需求, 菌体的生长和活性处于稳定阶段, 除氮的效率也保持稳定。所以从实验结果可以看出, 在既要保障有充足的碳源, 又避免碳源过剩且保持氨氮高降解率的情况下, 适宜的 C/N 应为 16, 这比已报道的一些异样硝化菌对碳源的需求要高<sup>[11]</sup>。实验结果的另一则信息显示菌株 C17 在 C/N 为 4~24 较广范围内都表现出高效的氨氮降解能力, 说明该菌株在处理水质不稳定或者是贫瘠废水区域时有着广阔的应用前景<sup>[12]</sup>。

### 2.2.2 温度

温度对氨氮去除的影响如图 2(b) 所示。在 20~25℃ 范围内, 氨氮的去除率随着温度的升高而呈现逐渐上升的趋势, 当温度达到 30℃ 左右时, 经过 36 h 的培养, 氨氮的质量浓度已降到 1 mg/L 以下; 当温度达到 40℃ 时, 还保持着较高氨氮去除率(98.69%), 这比已报道的菌株 *Scenedesmus sp.* 适应温度的范围扩大了<sup>[13]</sup>。随着温度的升高, 氨氮去除率急剧下降, 当温度达到 45℃ 时, 经过 36 h 的培养, 氨氮的去除率仅有 8.63%, 由此可以看出, 温度对该菌株降解氨氮能力的显著影响, 也可得出其适宜温度范围为 20~40℃, 与菌株 *Microbacterium sp.* strain SFA13 相比<sup>[14]</sup>, 此菌株不宜在低温条件下降

解氨氮。

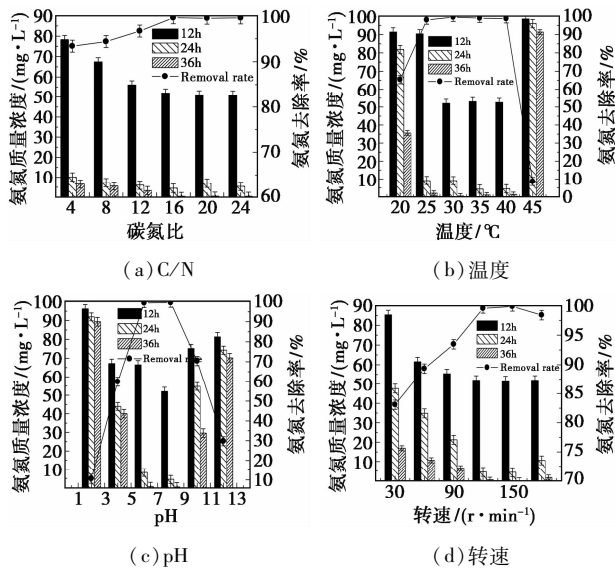


图2 C/N、温度、pH和转速对氨氮去除的影响

### 2.2.3 pH

pH对氨氮去除的影响如图2(c)所示。由图2(c)可以看出,pH对菌株C17降氨氮性能也有较大影响,起始时菌株不能适应酸性环境,生长受到抑制,氨氮转化率很低,随着酸性的降低,菌株的适应能力增强,氨氮去除效率也随着增加。当pH为6时,氨氮已被大量消耗,当pH为8时,经过36h的培养,氨氮去除率达到99.53%。之后随着碱性的增强,氨氮的去除率略有降低,当pH达到10以后,氨氮去除率才急剧下降。说明菌株C17更适宜于生长于稍偏碱的环境,但在较宽pH范围内(pH=4~10)表现出较高的降氨氮能力,与耐酸碱性能差的菌株相比<sup>[15-16]</sup>,更能适应处理复杂的废水系统,可以解决废水调节pH的难题。

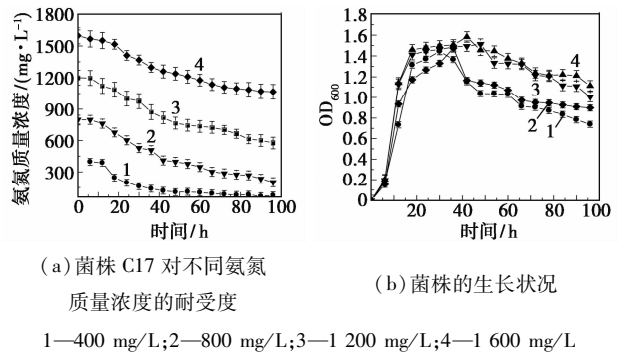
### 2.2.4 转速

转速在氨氮降解过程中起着调节培养基中溶解氧的作用,转速对氨氮去除的影响如图2(d)所示。当转速较低时,氨氮降解率也较低,原因是由于溶解氧较少,随着转速的增加,氨氮的降解率逐渐升高,在转速达到150 r/min以后略有降低,这与已报道过的菌株 *Marinobacter sp.* F6 产生的结果一致<sup>[17]</sup>,由此说明对该菌株适宜的转速是150 r/min。

### 2.3 活性探究

首先测定了菌株C17对不同氨氮质量浓度的耐受能力以及在改良培养基(起始氨氮质量浓度不同)中的生长状况,如图3所示。实验表明菌株C17能适应较大范围的氨氮质量浓度,其对高质量浓度氨氮的抵抗能力远优于菌株 *Acinetobacter*<sup>[9]</sup>,从图3

(a)和图3(b)中可以看出,当氨氮的起始质量浓度高于1600 mg/L时,菌株依然能够生长,氨氮质量浓度仍保持着降低的趋势。为了进一步研究菌株C17的活性,实验测定了该菌株降解总氮(TN)和COD的能力,如图4所示。从图4(a)中可以看出,在起始氨氮质量浓度为100 mg/L时,培养6h后,总氮降解率只有9.97%,但是随着培养时间的增加,总氮的降解率迅速增加;在起始氨氮质量浓度为200 mg/L时,最终得到的总氮的降解率是94.74%,高于李周等<sup>[18]</sup>研究的总氮降解率(约为90%)。从图4(b)中可以看出,在起始氨氮质量浓度分别为100、200 mg/L和300 mg/L时,对应得到最终的COD降解率分别为92.3%、92.8%和91%,优于杨新萍等<sup>[1]</sup>报道过的90%,而李文军<sup>[19]</sup>研究结果仅为68.45%。

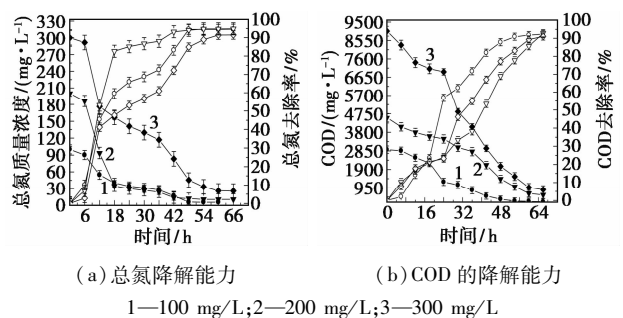


(a) 菌株C17对不同氨氮质量浓度的耐受度

(b) 菌株的生长状况

1—400 mg/L;2—800 mg/L;3—1200 mg/L;4—1600 mg/L

图3 不同起始氨氮质量浓度条件下对菌株浓度耐受度与生长状况的测定



(a) 总氮降解能力

(b) COD的降解能力

1—100 mg/L;2—200 mg/L;3—300 mg/L

图4 不同起始氨氮质量浓度条件下的TN与COD

### 2.4 硝化反硝化产品的研究

无论是硝化还是反硝化过程,氨氮的去除是以产品的形式来展现的。首先用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为唯一氮源来研究菌株C17的代谢产品,结果如图5所示。从图5可以看出,亚硝态氮、羟胺氮以及硝态氮都有积累,但积累量的多少与起始氨氮质量浓度有关,当起始氨氮质量浓度较低时,积累量较少;随着起始氨氮质量浓度的升高,产品的积累量有增加的趋势,羟胺氮与硝态氮的积累表现得尤为明显。由

图 5(b)与图 5(c)可以看出:在氨氮起始质量浓度为 100 mg/L 和 200 mg/L 时,羟胺氮与硝态氮几乎无积累,但当改良培养基中的氨氮起始质量浓度增加到 300 mg/L 时,经过 36 h 的培养,羟胺氮的最大积累量达到了 23.99 mg/L,硝态氮的最大积累量达到 8.13 mg/L,这与以前研究过的菌株 *Alcaligenes sp.* C16 有较大的差别<sup>[20]</sup>。为了进一步研究在硝化产品积累的同时是不是存在反硝化产品的积累,分别采用  $\text{NaNO}_2$  和  $\text{NaNO}_3$  为唯一氮源,结果如图 6 所示。从图 6(a)与图 6(b)中可以看出,当  $\text{NaNO}_2$  作唯一氮源时,在产品中检测到了羟胺氮和硝态氮的存在;当  $\text{NaNO}_3$  作唯一氮源时,产品中检测到了亚硝氮与羟胺氮的存在。结果表明:在硝化产品积累的过程中同时有反硝化产品的积累,这与 Taylor<sup>[21]</sup> 的结论是一致的:菌株在硝化过程中同时伴随着反硝化作用的进行。

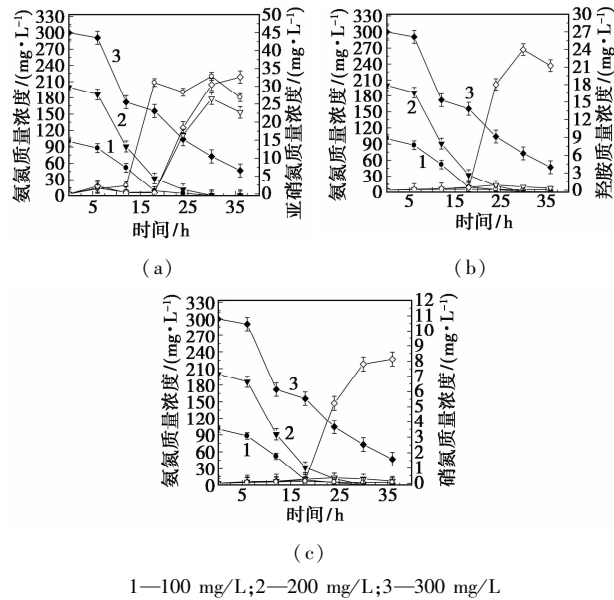


图 5 氨氮作为氮源不同起始浓度条件下的产品

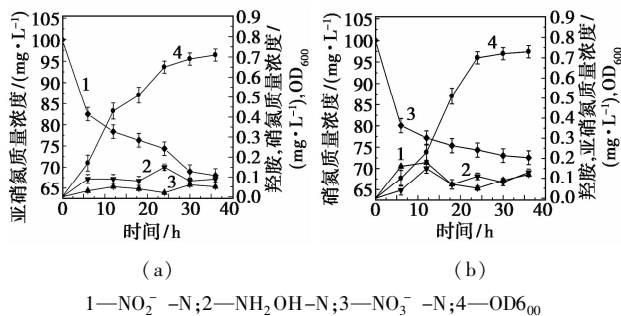


图 6  $\text{NaNO}_2$  与  $\text{NaNO}_3$  分别作为氮源时的产品

### 3 结论

微生物菌株 C17 在 C/N (指碳与氮的物质质量

比)低至 4 时,仍可以保持较高的氨氮去除率 (99.37%);温度在 25 ~ 40℃ 范围内都保持着较高的氨氮去除效率;可以利用的 pH 范围是 4 ~ 10,适宜的 pH 为 8,此时氨氮的去除率可达 99.53%。因为该菌株生长的 C/N、pH 范围广泛,所以应用在降解贫瘠废水中与 pH 不稳定的废水中具有明显的优势。同时该微生物菌株对高氨氮质量浓度的污水有较高的耐受能力。由于该微生物菌株的代谢产品含有一定的硝态或亚硝态物质,有望与能降解亚硝或硝态的微生物菌株组成复合微生物群用以彻底降解废水中的含氮物质。

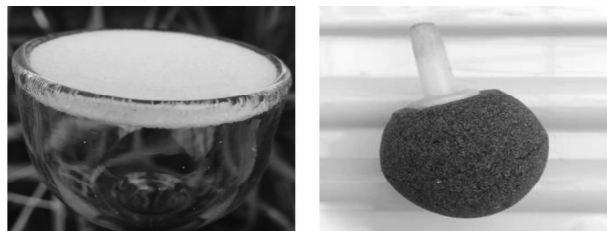
### 参考文献

- [1] Yang X, Wang S, Zhou L. Effect of carbon source, C/N ratio, nitrate and dissolved oxygen concentration on nitrite and ammonium production from denitrification process by *Pseudomonas stutzeri* D6 [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 104: 65 - 72.
- [2] 姜瑞, 曾红云, 王强. 氨氮废水处理技术研究进展 [J]. *环境科学与管理*, 2013, 38 (6): 131 - 134.
- [3] 崔树军, 谷立坤, 张建云, 等. 高氨氮废水的处理技术及研究应用现状 [J]. *中国给水排水*, 2010, 26 (14): 26 - 29.
- [4] Ahn Y H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41 (8): 1709 - 1721.
- [5] Wan C, Yang X, Lee D J, et al. Aerobic denitrification by novel isolated strain using  $\text{NO}_2^-$  as nitrogen source [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (15): 7244 - 7248.
- [6] Wong B T, Lee D J. Denitrifying sulfide removal and carbon methanogenesis in a mesophilic, methanogenic culture [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (12): 6673 - 6679.
- [7] Huang T, Guo L, Zhang H, et al. Nitrogen-removal efficiency of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri* strain ZF31, isolated from a drinking-water reservoir [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 196: 209 - 216.
- [8] Shoda M, Ishikawa Y. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of high-strength ammonium in anaerobically digested sludge by *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 117 (6): 737 - 741.
- [9] Ren Y, 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.
- [10] Yang X, Wang S, Zhang D, et al. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1 [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (2): 854 - 862.
- [11] Liu Y, Li Y, Lv Y. Isolation and characterization of a heterotrophic nitrifier from coke plant wastewater [J]. *Water Science and Technology*, 2012, 65 (11): 2084 - 90.
- [12] Huang X, Li W, Zhang D, et al. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter sp.* Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 44 - 50.

(下转第 134 页)

15 mm,高 32 mm),如图 2 所示。如无特殊说明即采用钛合金微孔曝气头。

采用磷酸靛蓝三磺酸(美国 Acros 公司生产)为臭氧的显色剂,实验用水为超纯水(优普 UPHW 纯水进水型超纯水机)。



(a)砂片曝气头

(b)普通曝气头



(c)钛合金微孔曝气器头

图 2 曝气头种类

### 1.2 试验方法

首先比较了砂片曝气头、普通曝气头和钛合金微孔曝气头(即下文中的微孔曝气头)对臭氧溶解浓度的影响[氧气输出压力为 0.1 MPa,曝气流量为 0.5 L/min,水温为(7 ± 1)℃];然后考察了曝气流量(0.5、1、2 L/min)和水温[(7 ± 1)、(10 ± 1)、(20 ± 1)℃]对臭氧溶解浓度的影响(氧气输出压力为 0.1 MPa);最后研究了氧气瓶输出压力(0.1、0.2、0.3 MPa)对臭氧溶解浓度的影响(曝气流量为

0.5 L/min,水温为(20 ± 1)℃)。

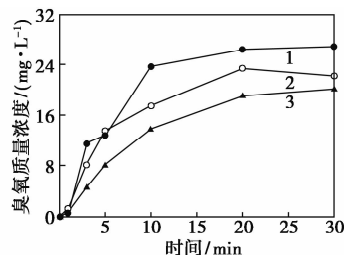
### 1.3 分析方法

臭氧的浓度测定方法为磷酸靛蓝三磺酸测定法<sup>[9]</sup>。气泡尺寸由尼康高速摄像机(AF 200m-Nikkor 24-85 mm f/2.8-40IF)拍摄纪录,在曝气 3 min 气流达到稳定后,选取曝气头正上方区域进行拍照记录。

## 2 实验结果

### 2.1 曝气头的影响

砂片曝气头、普通曝气头和微孔曝气头是目前应用比较广泛的 3 种曝气头。不同曝气头对臭氧质量浓度的影响如图 3 所示。由图 3 可以看出,在同一氧气瓶输出压力下,曝气头种类明显影响臭氧质量浓度的上升速率,在前 10 min,砂片曝气头、普通曝气头和微孔曝气头臭氧水质量浓度上升速率分别为 1.39、2.01、2.37 mg/(L·min)。微孔曝气头制备的臭氧水质量浓度在曝气 10 min 时最先达到平衡,砂片曝气头和普通曝气头制备的臭氧水质量浓度曝气 30 min 之后达到平衡。砂片曝气头、普通曝气头



1—微孔曝气头;2—普通曝气头;3—砂片曝气头

图 3 曝气头种类对臭氧质量浓度的影响

(上接第 132 页)

[13] Ruiz-Martinez A, Serralta J, Seco A, et al. Effect of temperature on ammonium removal in *Scenedesmus sp.* [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 191: 346 - 349.

[14] Zhang D, Li W, Huang X, et al. Removal of ammonium in surface water at low temperature by a newly isolated *Microbacterium sp.* strain SFA13 [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 137: 147 - 152.

[15] Zhang Q, Liu Y, Ai G, et al. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7 [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 108: 35 - 44.

[16] Wahyuni E A. The influence of pH characteristics on the occurrence of coliform bacteria in madura strait [J]. *Procedia Environmental Sciences*, 2015, 23: 130 - 135.

[17] Zheng H, Liu Y, Gao X, et al. Characterization of a marine origin aerobic nitrifying-denitrifying bacterium [J]. *Journal of Bioscience*

and *Bioengineering*, 2012, 114(1): 33 - 37.

[18] Zhou L, Boyd C E. Total ammonia nitrogen removal from aqueous solutions by the natural zeolite, mordenite: A laboratory test and experimental study [J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 252 - 257.

[19] Li W, Wu D, Shi X, et al. Removal of organic matter and ammonia nitrogen in azodicarbonamide wastewater by a combination of power ultrasound radiation and hydrogen peroxide [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2012, 20(4): 754 - 759.

[20] Liu Y, 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.

[21] Taylor S M, He Y, Zhao B, et al. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(10): 1336 - 1341. ■