

关于好氧反硝化菌筛选方法的研究

周丹丹 马 放* 王弘宇 董双石

(哈尔滨工业大学环境科学与工程系 哈尔滨 150090)

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 105 株菌。用测 TN 的方法对所筛菌株进行初筛,得到 25 株对 TN 去除率达到 50% 以上的菌株。用氮元素轨迹跟踪测定法复筛,证实这 25 株菌都可以在好氧条件下进行硝酸盐呼吸,其中 24 株菌的反硝化过程为 $\text{NO}_3^- \text{N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{N} \rightarrow \text{N}_2$, 研究中还发现在反硝化过程中硝酸盐和亚硝酸盐不存在明显竞争被利用的作用。同时还提出了可能实现短程同步硝化反硝化以及在反馈作用的调节下,加快硝化反应速度的观点。

关键词 好氧反硝化细菌, 好氧反硝化, 污泥驯化, 短程同步硝化反硝化

中图分类号 Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209 (2004) 06-0837-03

传统认为,进行的反硝化细菌都是兼性厌氧微生物,因为只有无氧条件下,才能诱导出反硝化作用所需要的硝酸盐还原酶 A 和亚硝酸盐还原酶^[1]。然而,近几年人们不断地发现好氧条件下发生总氮损失。因此,对好氧反硝化的研究逐渐引起研究者的重视。

最早对好氧反硝化菌的研究始于 20 世纪 80 年代。Robertson 和 Kuenen^[2] 在除硫和反硝化处理系统出水中首次分离出好氧反硝化菌泛养副球菌 (*Paracoccus pantotropha*)、假单胞菌属的某一种 (*Pseudomonas* spp.) 和粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*) 等。此后,也有不少学者按照 Robertson 的方法分离一些好氧反硝化菌,例如 Frette 等 (1997)^[3] 从间歇厌氧/好氧污水处理池中分离出 16 株反硝化细菌,它们无论是在好氧条件还是在厌氧条件下都具有反硝化作用。Pai 等 (1999)^[4] 从稻谷沉淀物中分离而得到 3 株好氧反硝化菌,其中 T6 菌株利用无机氮生长繁殖,在有机氮存在情况下也仅利用 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 。另外,目前还发现一些其它细菌也有好氧反硝化作用,如生丝微菌属 (*Hyphomicrobium* X)^[5]。

1 材料和方法

1.1 培养基

FM 培养基^[6],用于好氧反硝化细菌富集培养。DM 培养基^[4],用于好氧反硝化细菌性能测定。

1.2 好氧反硝化细菌筛选的装置

好氧反硝化细菌富集采用的反应器是 4 个内径为 180mm,有效容积为 3L 的烧杯做的反应器 (图 1),分别命名为 1 号、2 号、3 号和 4 号。1 号反应器内的活性污泥来自硫酸盐还原工艺中的硫酸盐还原段 (厌氧) 2 号反应器内的活性污泥来自硫酸盐还原工艺中的反硝化段 (厌氧) 3 号、4 号反应器内的活性污泥来 SBR 法处理高浓度氨氮废水工艺。

1、2、3 号反应器间歇曝气培养,4 号反应器连续曝气培养。

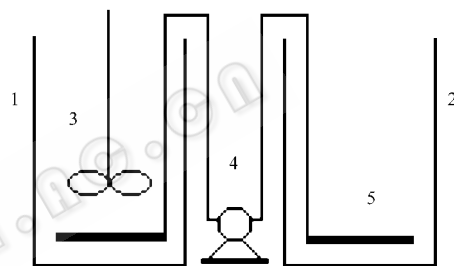


图 1 驯化装置

Fig. 1 Domestication equipment

1. Batch aeration; 2. Sequential aeration; 3. Puddler; 4. Aeration pump; 5. Aeration pipe.

1 号、2 号和 3 号反应器间歇曝气培养,具体操作模式为:进水→曝气→搅拌→沉降 (0.5h)→排水 (0.5h),初始曝气时间为 8h,每 3d 将曝气时间增加 1~2h,搅拌时间相应减少;4 号反应器连续曝气培养,具体操作模式为:进水→曝气 (23h)→沉降 (0.5h)→排水 (0.5h)。驯化初始,以 FM 培养液作为进水,在驯化过程中逐渐增加 DM 培养液的含量。培养液的 COD 在 5000mg/L 左右,总氮 (TN) 在 500mg/L 左右,运行过程中,使溶解氧 (DO) 维持在 5mg/L 左右,温度为室温 (25~30℃)。运行 40d 后,4 个反应器对 COD 的去除率都达到 80% 以上,对 TN 的去除率都达到 70% 以上,在驯化过程中,甚至出现过 TN 的去除率达到 100% 的情况。1 号、2 号和 3 号反应器内的污泥原来为深黑色,散状,40d 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。

1.3 好氧反硝化细菌初筛

从 4 个反应器内分别取 10mL 新鲜污泥至装有 90mL 无菌水、并装有玻璃珠的三角瓶中,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,

* 通讯作者。Tel 86-451-86282107; Fax 86-451-86280107; E-mail: mafang@hit.edu.cn

作者简介 周丹丹 (1980-), 女, 吉林长春人, 硕士研究生, 主要从事生物脱氮技术的研究。E-mail: yatou415@sina.com

收稿日期 2004-04-05, 修回日期 2004-07-09

采用混均平板法和涂布平板法分离,在 DM 培养基经 3 次划线分离后得到 105 株菌。

将上述分离纯化后得到的纯分离物斜面用灭菌后的 DM 培养液洗到装有 100mLDM 培养液的三角瓶中,并在每个三角瓶内加入几粒灭过菌的玻璃珠(尽量减小厌氧微环境对实验结果的影响),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 140r/min,培养时间 40h。取培养后的菌液检测 TN,考察其对 TN 的去除率。经初筛最后得到 50 株反硝化能力较强的菌株,已备后续试验用。

1.4 好氧反硝化细菌复筛

考虑同化作用的影响,不能从 TN 这单一指标就断定初筛后所得到的菌株就具有好氧反硝化能力,所以对所得的 50 株菌进行了复筛。如果实验菌株能以硝酸盐或亚硝酸盐作为电子受体,一定会有 N_2 或 N_2O 生成,本实验主要检测 N_2 。采用分批式反应器,通过检测反应过程中 N_2 的生成量来确定所筛选的菌株是否具有好氧反硝化作用及其反硝化效率。试验装置如图 2 所示。

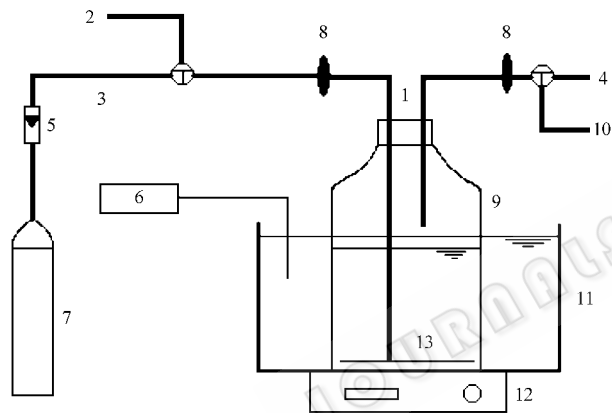


图 2 好氧反硝化细菌复筛试验装置图

Fig.2 Equipment of second screening of aerobic denitrifiers

1. Sample outlet 1; 2. Sample outlet 2; 3. Gas inlet; 4. Gas outlet; 5. Gas flowmeter; 6. Temperature monitor; 7. Oxygen jar; 8. Bacterial filter; 9. Reactor; 10. Barometer; 11. Water bath; 12. Magnetic stirrer; 13. Aeration pipe.

整个反应装置都是密闭的,反应器是由 2000mL 具塞密闭的试剂瓶及管件组成,进出口两端配有孔径为 0.25 μ m 的滤菌器。反应器装入 1000mLDM 培养基后密封,与氧气罐组装,打开进气口和排气口,以 3L/min 的流量通入氧气 3min,赶走反应器和管路内的空气来去除空气中所含的 N_2 对测量结果的干扰,关闭排气口,通入氩气,通过气体压力表的读数确定反应器内压力为正压,停止通入氩气,关闭进气口。同时,打开磁力搅拌器,目的是使培养液均质并与上部氧气充分接触(培养过程中测得 DO 维持在 8~10mg/L)。取样口 1 用于取气体样,监测培养过程中 N_2 生成量,取样口 2 用于取培养液样品,监测培养液中 NO_3^- -N、 NO_2^- -N 和 DO 的变化。

1.5 分析项目和检测

NO_3^- -N 酚二磺酸光度法; NO_2^- -N (1-萘基)-乙二胺

光度法;TN 碱性过硫酸钾法消解紫外分光光度法^[7];COD: CTL-12 型化学需氧量速测仪;TOC、TC、IC: SHIMADZU TOC-V_{CPN} 测定仪;溶解氧(DO): YSI5000 型 DO 测定仪;菌体生长吸光度(A) 吸光度法,用 721 分光光度计在 OD₄₈₀ 处测吸光度值;氮气(N_2): Agilent HP4890D 型气相色谱仪,气相色谱的色谱柱编号为 GS-03-106 型,条件为:载气流量 He 20mL/min;柱前压 0.08Mpa;柱温 60℃;检测器温度 120℃;气化室温度 120℃。

2 结果和分析

2.1 好氧反硝化细菌富集和初筛

在污泥驯化过程中,污泥对 COD 和 TN 的去除率都明显升高,COD 的去除率由初始的 20%~40% 升高到末期的 80%,TN 的去除率由初始的 20%~30% 升高到末期的 70%~80%。

从驯化污泥中共筛选出 105 株分离物中,其中对 TN 去除率在 50% 以上的菌株 25 株(表 1),40%~50% 的菌株 15 株,30%~40% 的菌株 10 株,其余菌株效果不明显。

表 1 从驯化污泥中筛出的对 TN 去除率超过 50% 的菌株					
Table 1 Strains that TN removal rate was over 50%					
Name of strains	TN removal rate/%	Name of strains	TN removal rate/%	Name of strains	TN removal rate/%
X31	82	I9	62	C6	56
Z31	80	C5	60	Z5	56
C3	79	P3	60	X6	54
Z7	74	C1	59	L3	53
X2	74	X1	59	P7	51
C7	71	Z2	59	XT3C	51
XT6	71	Z6	58	P6	51
XT5	65	X5	56	XT3A	50
X32	62				

2.2 好氧反硝化细菌复筛的结果

采用图 2 的装置将初筛所得的对 TN 去除率在 50% 以上的 25 株菌株复筛,证实这 25 株菌都可以在完全好氧的条件下实现反硝化。图 3 为效果较好的 6 株菌的氮元素轨迹跟踪图。从结果来看,这些菌株在液体培养过程都具有以下共同点:反硝化过程或氮气生成过程都发生在对数生长期,在延缓期、稳定期和衰亡期都没有明显的反硝化过程;除 X31 菌株外,其他菌株的反硝化过程都存在明显的 NO_2^- -N 浓度升高的现象,即 NO_3^- -N 先被还原为 NO_2^- -N, NO_2^- -N 又被还原为 N_2 ,X31 菌株反硝化过程中 NO_2^- -N 浓度基本没有发生变化,推断该菌株可直接将 NO_3^- -N 反硝化为 N_2 。

3 结论和建议

(1)采用污泥驯化→细菌分离纯化→初筛(测 TN)→复筛(氮元素轨迹跟踪测定法)的方法筛选好氧反硝化细菌是有效的,该方法可以证实好氧反硝化细菌的存在。由该方法还可以证实好氧反硝化现象存在的非偶然性。

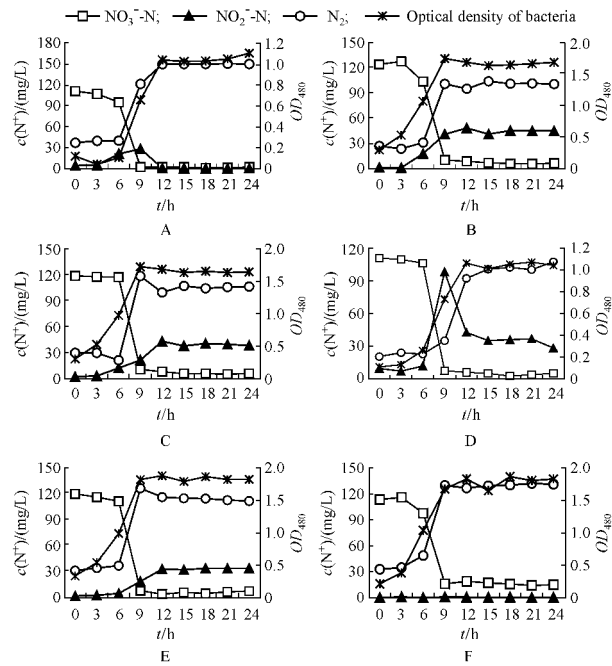


图3 6株菌株氮元素变化

Fig.3 Change of N element of six strains

A Strain C3 ;B Strain Z7 ;C Strain C7 ;D Strain Z31 ;E Strain X2 ;

F Strain X31 .

(2)好氧反硝化作用主要发生在指数生长期,这是因为细菌在这个时期生长速度达到最大,细胞合成所需要的能量和还原力主要在这一阶段被消耗,所以指数生长期是反硝化效率最高的时期。

(3)所得到的 25 株好氧反硝化细菌中,有 24 株在液体培养过程中都存在着明显的 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度升高又降低的过程,其反硝化过程为 $\text{NO}_3^- - \text{N} \rightarrow \text{NO}_2^- - \text{N} \rightarrow \text{N}_2$,仅有 X31 菌株反硝化过程中 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度基本没有发生变化,推断该菌株对

NO_2^- 反硝化效率很高,反硝化过程中没有造成 NO_2^- 的累积。

(4)好氧反硝化细菌并非将全部 NO_3^- 转化为 NO_2^- 后才开始利用 NO_2^- ,可见, NO_3^- 和 NO_2^- 之间不存在激烈的竞争关系。

(5)好氧条件下反硝化作用的实现,将是废水生物脱氮技术的革命,不仅有利于实现同步硝化反硝化(SND),更有可能实现短程同步硝化反硝化,在反馈作用的调控下硝化反应的速度将大大加快。

参 考 文 献

[1] 周德庆.微生物学教程.北京:高等教育出版社,2001,140-141.

[2] Robertson L A, van Neil E W J, Torremans R A M, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotroph*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 11 (54) : 2812-2818.

[3] Frette L, Gejlsbjerg B, Westermann P. Aerobic denitrifiers isolated from an alternating activated sludge system. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997,24 363-370.

[4] Pai S L, Chong N M, Chen C H. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in waste water treatment. *Biore-source Technology*, 1999,68 179-185.

[5] Meiberg J B M, Bruinenbrg P M, Harder W. Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in *Hyphomicrobium X* in the absence and presence of nitrate aerobic denitrification. *J Gen Microbiol*, 1980,120 453-463.

[6] 马放,任南琪,杨基先.污染控制微生物学实验.哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2002 76-77.

[7] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法.第四版.北京:中国环境科学出版社,2002.

Study on Screening Method of Aerobic Denitrifiers

ZHOU Dan-Dan MA Fang* WANG Hong-Yu DONG Shuang-Shi

(Department of Environmental Engineering, Harbin Industry and Technology University, Harbin 150090, China)

Abstract : After domesticating activated sludge to enrich aerobic denitrifier, 105 strains were isolated from it. 25 strains with over 50% of TN removal rate were screened by measuring TN. It was proved that they can produce nitrate respiration under aerobic condition by measuring the concentration of $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ and N_2 . The denitrification process of the 24 strains is $\text{NO}_3^- - \text{N} \rightarrow \text{NO}_2^- - \text{N} \rightarrow \text{N}_2$. Moreover, it was found that there were no obvious competition function between NO_3^- and NO_2^- . It is deduced that aerobic denitrification can help to realize shortened simultaneous nitrification and denitrification and nitrification speed is more rapid via feedback effect.

Key words : Aerobic denitrifier, Aerobic denitrification, Domesticate activated sludge, Shortened simultaneous nitrification and denitrification

* Corresponding author. Tel 86-451-862821071 ; Fax 86-451-86280107 ; E-mail : mafang2002@263.net

Received date : 04-05-2004