

## 两株异养硝化细菌的分离鉴定及其脱氮特性

潘丹, 黄巧云, 陈雯莉\*

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要:**【目的】利用异养硝化培养基,从华中农业大学实验猪场污水中筛选得到2株具有较高脱氮效率的细菌。【方法】通过形态学特征及16S rDNA序列的系统发育分析,对分离菌株进行了鉴定。且对菌株P2和P9降解氨氮的相关特性也作了研究。此外,将菌株单独或混合接种于猪场污水,检测其处理实际污水的脱氮效果。【结果】初步判断菌株P2为副球菌属(*Paracoccus* sp.),P9为申氏杆菌属(*Shinella* sp.)。2株细菌能在有机物存在下进行异养硝化作用,经24h培养,菌株P2和P9对氨氮的去除率可达80%左右,同时未发现亚硝酸盐、硝酸盐积累;但菌株P2,P9不能以 $\text{NO}_3^-$ 或 $\text{NO}_2^-$ 为唯一氮源发生好氧反硝化作用。菌株P2和P9异养硝化的最适碳源为丁二酸钠,最适C/N比为9,且脱氮过程中pH值从6.8到8.9一直呈上升趋势。菌株对小分子碳源具有较强的依赖性,在加入小分子碳源的情况下,其对污水具有较强的脱氮能力,且这两个菌株混合施用较单独作用氨氮去除效果更好。【结论】菌株P2和P9脱氮能力较强,其在污水处理行业具有重要的应用前景。

**关键词:** 生物脱氮, 异养硝化, 猪场污水, 氨氮

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2011)10-1382-08

氮素污染物是造成水体污染和富营养化的主要原因之一,因此水体中氮素的去除对于清洁水体具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。废水的生物脱氮是目前水处理领域中研究的热点问题,其中关于异养硝化菌脱氮作用的研究,是对传统硝化-反硝化理论的丰富与发展<sup>[3-4]</sup>。近来的研究表明,脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)<sup>[5]</sup>、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)<sup>[6-7]</sup>、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)<sup>[8]</sup>、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)<sup>[9]</sup>、节杆菌(*Arthrobacter* sp.)<sup>[10-11]</sup>和红球菌(*Rhodococcus* sp.)<sup>[12]</sup>等异养微生物也能进行硝化作用。与传统的自养硝化菌相比,异养硝化菌具

有生长速率快、要求溶解氧浓度低、能忍受更酸性环境的优点<sup>[13-15]</sup>。其总体氧化氨氮的速率并不比自养菌慢<sup>[10]</sup>,异养硝化作用的重要性正日益受到关注。本文从华中农业大学实验猪场污水中分离出两株异养硝化细菌,通过异养硝化作用脱除氨氮,脱氮过程中基本没有亚硝酸盐、硝酸盐的生成;同时,进一步分析了脱氮过程中菌株的生长情况,pH值的变化趋势,最佳C/N(质量比),对不同碳源的利用程度等,以深入了解菌株的脱氮特性;并应用分离菌株处理实际猪场污水,对其脱氮效果进行了评价,为今后脱氮菌株的实际应用及理论研究奠定了基础。

基金项目:国家自然科学基金(40825002,41071180);国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07104-003)

\* 通信作者。Tel: +86-27-87282730; Fax: +86-27-87280670; E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 潘丹(1985-),女,湖北人,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail: pandan126@163.com

收稿日期: 2011-04-08; 修回日期: 2011-05-31

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 污水来源: 取自华中农业大学实验猪场污水排放口。

1.1.2 培养基: (1) 异养硝化培养基:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 g; 琥珀酸钠 2.17 g; 维氏盐溶液<sup>[16]</sup>, 50 mL; 加水溶解, 补充蒸馏水至 1 L, pH7.0 (若需固体培养基, 加 2% 琼脂)。(2) 亚硝酸盐培养基: 将异养硝化培养基的氮源换成  $\text{KNO}_2$ , 其它同异养硝化培养基。(3) 硝酸盐培养基: 将异养硝化培养基的氮源换成  $\text{KNO}_3$ , 其它同异养硝化培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器: 碳源、氮源、其它试剂等为分析纯试剂, 购自上海国药集团化学试剂有限公司; DNA 提取试剂、PCR 试剂购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 电泳仪、凝胶成像系统 (BIO-RAD U. S. A); 普通 PCR 仪 (Biometra, 德国); 7200 可见分光光度计 (UNICO, 上海); UV-2802H 紫外分光光度计 (UNICO, 上海)。

### 1.2 异养硝化菌的筛选

1.2.1 初筛: 在 250 mL 的锥形瓶中加入 100 mL 液体异养硝化培养基, 取猪场污水 5 mL 接种到锥形瓶中, 在 28℃, 180 r/min 的恒温空气摇床上培养 3 d, 取 5 mL 上清液接种至新鲜培养基中培养。连续取样转接 3 次, 选取氨氮浓度降低最多的样品划线接种在异养硝化固体培养基表面, 28℃ 培养 2 d, 挑取单菌落, 作为初筛菌。

1.2.2 复筛: 将初筛菌接种于新鲜液体培养基中, 28℃, 180 r/min 摇床培养 2 d, 进行复筛。将氨氮降低最明显的菌落划线接种在异养硝化固体培养基表面, 挑取单菌落纯化 2 次, 最后经复筛得到 2 个菌株, 编号分别为 P2, P9。

### 1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态学鉴定: 观察单菌落形态, 并将菌体进行革兰氏染色观察。

1.3.2 16S rDNA 同源性比较: 采用常规细菌总 DNA 提取法, 分别提取 P2 和 P9 基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板扩增 16S rDNA, 扩增采用的引物是 1 对通用引物<sup>[17]</sup>。正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。引物由上海生工

生物工程有限公司合成。PCR 采用 50  $\mu\text{L}$  反应体系, 程序如下: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 40 s, 72℃ 2 min, 循环 35 次; 72℃ 15 min。测序由上海生工生物工程有限公司完成, 测序结果提交 GenBank, 并进行 BLAST 分析。

### 1.4 菌株 P2 和 P9 的脱氮氮曲线及生长趋势测定

将菌株以 5% 的接种量分别接种于装有 100 mL 液体异养硝化培养基的 250 mL 三角瓶中, 28℃, 180 r/min 恒温摇床培养, 每隔 2-4 h 取样, 检测培养液中氨氮、亚硝酸盐、硝酸盐的含量及菌体细胞密度 ( $OD_{600}$ ), 得到菌株 P2, P9 的脱氮氮曲线和细菌浓度随时间变化的趋势图。

1.5 菌株 P2, P9 分别以  $\text{NO}_3^-$  和  $\text{NO}_2^-$  为唯一氮源的代谢情况

1.5.1  $\text{NO}_3^-$  为唯一氮源的代谢情况: 将菌株以 5% 的接种量分别接种于以  $\text{KNO}_3$  为唯一氮源的 100 mL 硝酸盐培养基中, 28℃, 180 r/min 恒温摇床培养, 定时取样检测培养液中硝酸盐的含量。

1.5.2  $\text{NO}_2^-$  为唯一氮源的代谢情况: 将菌株以 5% 的接种量分别接种于以  $\text{KNO}_2$  为唯一氮源的 100 mL 亚硝酸盐培养基中, 28℃, 180 r/min 恒温摇床培养, 定时取样检测培养液中亚硝酸盐的含量。

### 1.6 菌株 P2, P9 脱氮过程中 pH 值的变化情况

将已活化培养的纯菌液以 5% 的接种量分别接种于 100 mL 异养硝化培养基中, 28℃, 180 r/min 摇床恒温培养, 定时取样检测培养液的 pH 值。

### 1.7 菌株 P2, P9 对不同碳源的利用情况

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g, 维氏盐溶液 50 mL, 分别加入以下 3 种物质: 蔗糖, 琥珀酸钠, 葡萄糖, 使各培养基的最终含碳量为 1.0 g, 加水溶解后混匀补充蒸馏水至 1 L。分别将菌株 P2 和 P9 以 5% 的接种量接种于含不同碳源的培养基中, 28℃, 180 r/min 恒温摇床中培养, 定时取样检测氨氮浓度。

1.8 不同的 C/N 比对菌株 P2 和 P9 脱氮效果的影响

调整异养硝化培养基的碳源浓度, 使得各培养基的碳氮质量比 (C/N) 分别为 0.6, 3, 6, 9, 12。分别将菌株 P2 和 P9 以 5% 的接种量接种于不同碳氮质量比的培养基中, 28℃, 180 r/min 恒温摇床中培养, 定时取样检测氨氮浓度。

### 1.9 菌株 P2 和 P9 对实际污水的脱氮效果

分别取 100 mL 猪场污水于 250 mL 锥形瓶内, 测

得初始氨氮浓度约为 170 - 180 mg/L, 将菌株 P2 和 P9 的种子液以 5% 接种, 28℃, 180 r/min 恒温摇床中培养, 定时取样检测氨氮浓度。

### 1.10 菌株 P2 和 P9 单独与混合条件下对实际污水的脱氮效果

分别取 100 mL 猪场污水于 250 mL 锥形瓶内, 测得初始氨氮浓度约为 460 mg/L, 加丁二酸钠, 高压蒸汽灭菌后以 5% 的接种量分别接种菌株 P2 和 P9, 28℃, 180 r/min 恒温摇床中培养, 定时取样检测污水中氨氮浓度, 研究菌株单独与混合条件下对实际污水的脱氮效果 (CK 为未灭菌、未加菌且未加碳源的实验对照组)。

### 1.11 分析方法

取样品于 Eppendorf 管中, 高速离心 (10000 r/min, 10 min), 取上清液, 按实验要求选择性测定硝酸盐、亚硝酸盐、氨氮、 $OD_{600}$  等。

**1.11.1 硝酸盐测定:** 酚二磺酸紫外分光光度法<sup>[18]</sup>。

**1.11.2 亚硝酸盐测定:** N-(1-萘基)-乙二胺光度法<sup>[18]</sup>。

**1.11.3 氨氮的测定:** 纳氏试剂光度法<sup>[18]</sup>。

**1.11.4 菌体生长量:** 吸光度法, 测  $OD_{600}$ 。

**1.11.5 pH 值:** 用 pH 计测定。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌株的鉴定

**2.1.1 形态学鉴定:** 通过分离筛选得到 2 株异养硝化细菌, 分别命名为 P2 和 P9。P2 菌体呈球状, 革兰氏染色阴性; 单菌落呈乳白色, 圆形, 边缘整齐, 表面光滑, 粘稠, 直径大小约为 3 - 4 mm。P9 菌体呈短杆状, 革兰氏染色阴性; 单菌落呈乳白色, 圆形, 边缘整齐, 表面干燥, 直径大小约为 1 mm。其革兰氏染色结果见图 1。

**2.1.2 16S rDNA 的同源性比较:** 2 个分离菌株经 PCR 扩增、16S rDNA 测序, 将所测菌株的序列通过 BLAST 检索与 GenBank 中的核酸序列进行同源性比对。结果显示, 菌株 P2 的 16S rDNA 基因序列, 该序列在 GenBank 登录号为 JF772176, 与多株 *Paracoccus* sp. 16S rDNA 的相似性达 99%。菌株 P9 的 16S rDNA 基因序列, 该序列在 GenBank 登录号为 JF772177, 与多株 *Shinella* sp. 的相似性水平也达

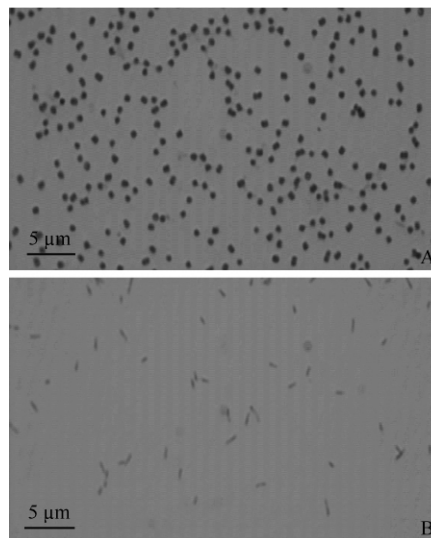


图 1 菌株 P2 (A) 和 P9 (B) 的革兰氏染色形态 (1000 ×)

Fig. 1 Micrograph of strain P2 (A) and P9 (B) with Gram stain (1000 ×).

99%。结合菌株的形态学特征与革兰氏染色结果, 可基本确定分离菌株 P2 为副球菌属 (*Paracoccus* sp.), P9 为申氏杆菌属 (*Shinella* sp.)。

### 2.2 菌株 P2 和 P9 的脱氮氮曲线及生长趋势测定

接种菌株 P2, P9 于异养硝化培养基中, 定时取样检测培养液中氨氮、亚硝酸盐、硝酸盐的含量变化及菌株 P2, P9 在培养条件下的生长情况 (测  $OD_{600}$ )。结果显示 (图 2), 菌株 P2 在 0 - 2 h 处于氨氮降解的延滞期, 2 h 后氨氮浓度迅速下降, 14 h 降解率达 70%, 14 h 后氨氮降解已趋于饱和, 同时未发现亚硝酸盐和硝酸盐的积累。而菌株 P9 在 0 - 4 h 处于氨氮降解的延滞期, 4 h 后氨氮浓度开始较快下降, 32 h 降解率达 80%, 同时亦未发现亚硝酸盐和硝酸盐的积累。比较二者知, 菌株 P2 降解氨氮起步迅速, 14 h 对氨氮的降解即趋于饱和; 菌株 P9 降解稍慢, 但经 32 h 后对氨氮的降解率更高。而二者在降解氨氮的过程中一直没有检测到亚硝酸盐和硝酸盐的积累, 这一点与孔庆鑫等<sup>[16]</sup>的 *Acinetobacter* sp. YY-5 菌类似。

同时, 由图 2 可见, 菌株 P2 在 2 h 后进入对数生长期, 12 h 后进入稳定生长期, 22 h 后生长趋于衰退。菌株 P9 在 0 - 4 h 处于生长的延滞期, 4 h 后进入对数生长期, 但是同菌株 P2 相比, 生长缓慢许多, 24 h 后进入稳定生长期。由图知, 菌株 P2 生长快, 菌体密度高, 而菌株 P9 生长慢, 菌体量也较菌株 P2 少很多。

且菌株的生长情况与其脱氮氮情况是相关的,生长较快的菌株 P2,其脱氮氮的速度也较快,生长稍慢的菌

株 P9,其脱氮氮的速度也相应稍慢,两菌株都是在菌株生长的对数期实现对氮氮的脱除。

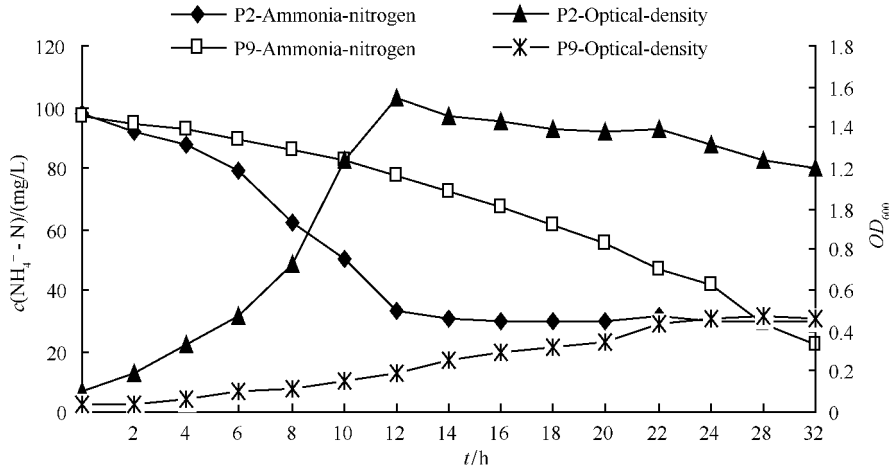


图2 菌株 P2 和 P9 脱氮氮曲线及生长趋势图

Fig.2 Curves of ammonia removal and growth trend of strains P2 and P9.

2.3 菌株 P2 和 P9 分别以 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 为唯一氮源的代谢情况

菌株 P2, P9 均不具有好氧反硝化功能,完全不能利用硝酸盐或亚硝酸盐,在整个实验周期中硝酸盐及亚硝酸盐含量几乎不变,没有任何被降解的趋势。故菌株 P2, P9 均不能以硝酸盐或亚硝酸盐为唯一氮源进行反硝化作用。

2.4 菌株 P2 和 P9 脱氮过程中 pH 值的变化情况

菌株 P2, P9 在异养硝化培养基中脱氮的同时其 pH 值变化情况,结果显示(图 3),菌株 P2 和 P9 在整个脱氮过程中培养基的 pH 值一直处于上升趋势,约由 6.8 上升至 8.9,最后趋于稳定。在 4-36h 其变化较快, pH 值迅速上升, 36 h 时二者 pH 值均达到 8.6 以上,此后缓慢上升至 pH 值稳定。整体来看,菌株 P2, P9 的 pH 值变化情况基本一致。这两菌株表现出来的在脱氮过程中 pH 值一直升高的情况,与传统的自养硝化菌不同,而与已报道菌株 *Arthrobacter B<sub>D</sub>* 在以葡萄糖为 C 源,蛋白胨或醋酸胺为 N 源的基质上培养时,最初基质的 pH 为 3-7,但培养后 pH 会普遍升到 8.0-9.5<sup>[10]</sup> 较为相似。一般而言,自养硝化菌在脱氮过程中产酸,使 pH 值降低。而曝气状况下高 pH 值本身就有利于氮氮的脱除,上述结果表明菌株 P2, P9 是异养硝化菌株并有很好的脱氮性能。

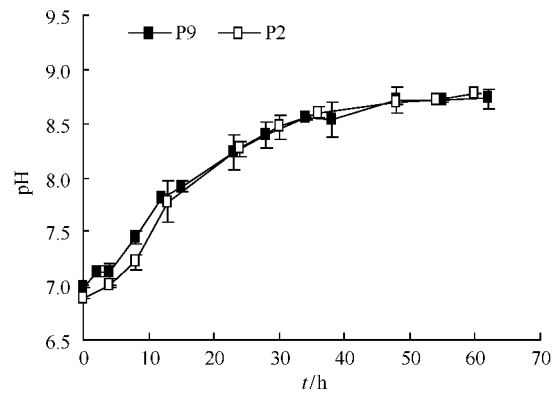


图3 菌株 P2 和 P9 脱氮氮过程中培养液 pH 值的变化

Fig.3 Fluctuation of pH values of culture medium during ammonia removal by strains P2 and P9.

2.5 菌株 P2 和 P9 对不同碳源的利用情况

碳源的主要作用是构成微生物细胞的碳骨架和供给微生物生长繁殖所需要的能量,不同的碳源在代谢中的地位不同,菌株对其利用率也有所不同。由于碳源不仅影响着异养硝化菌的生长,也影响着它的硝化活性<sup>[19]</sup>,因此,碳源的类型对异养硝化活性起着相当关键的作用。如菌株 *Alcaligenes faecalis* No. 4 只能利用有机酸进行硝化反应<sup>[20]</sup>。菌株 *Alcaligenes faecalis* 只有在醋酸钠或者乙醇作碳源的情况下,才能充分去除硝酸<sup>[21]</sup>。故我们检测了菌株 P2 和 P9 对几种不同碳源的利用情况,以选择菌株高氮氮脱除能力下的相对最合适碳源,实验结果如图 4 所示。

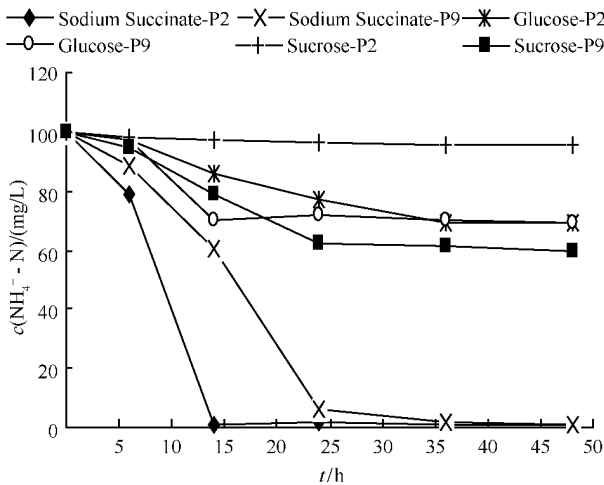


图4 不同碳源对菌株 P2 和 P9 脱氨氮能力的影响  
 Fig. 4 Comparison among ammonia removal ability of strains P2 and P9 with different carbon sources.

由图4可以看出,菌株 P2 和 P9 对3种不同碳源的利用程度差异非常显著。在碳源绝对充足的情况下,丁二酸钠作为碳源时,菌株 P2 ,P9 脱氮效果最好,基本上24 h就能实现对氨氮的脱除,尤其是菌株 P2 ,接种14 h后即可将约为103 mg/L的氨氮降解完全;葡萄糖和蔗糖分别作碳源时,两菌株均能生长,但异养硝化能力不强,氨氮降解率最高不足40% ,达不到理想效果。故菌株 P2 和 P9 利用丁二酸钠作小分子碳源时异养硝化能力最好,为以后利用它们对猪场实际污水的脱氮处理奠定了基础。

2.6 不同的 C/N 比对菌株 P2 和 P9 脱氮效果的影响

异养硝化菌由于是异养菌,在脱氮的同时要消耗有机物,所以高的 C/N 比,往往对脱氮有利。Kim 等<sup>[2]</sup> 将多株具异养硝化功能的芽孢杆菌在不同条件下混合培养,发现在 C/N 为 8 时,混合菌株对氨氮的去除率要明显高于 C/N 为 4 时的氨氮去除率。一般而言,异养硝化菌能够处理污水的 C/N 范围为 2 - 10<sup>[3, 22]</sup>。

培养条件下,菌株 P2 的最佳 C/N 比实验结果如图 5 所示,结果表明,菌株 P2 的异养硝化能力随着 C/N 比的增加而提高。由于菌株 P9 同菌株 P2 的最佳碳氮比趋势完全一致,只是同等条件下菌株 P2 较菌株 P9 利用碳源的速度更快,脱氨氮速度更快,与前面分析的这 2 株菌株的生长特性相吻合,故这里不再呈现菌株 P9 的最佳 C/N 比实验图。对于这 2 株菌株,当 C/N 比为 0.6 的时候,氨氮去除率

较低;随着 C/N 比的增加,菌株对氨氮的去除率迅速升高;当 C/N 比大于 6 的时候,去除率的增加随着 C/N 比的提高增幅变小;当 C/N 比为 9 - 12 时,菌株 P2 和 P9 对氨氮的去除率 24h 内均可达到 100%。故取 C/N 比为 9 即可满足菌株 P2 和 P9 在异养硝化过程中对碳源的需求,最佳 C/N 比值为 9。一般来说,太高的 C/N 比会导致出水 COD 过高,水质变差,故在实际处理过程中要注意选择合适的 C/N 比。

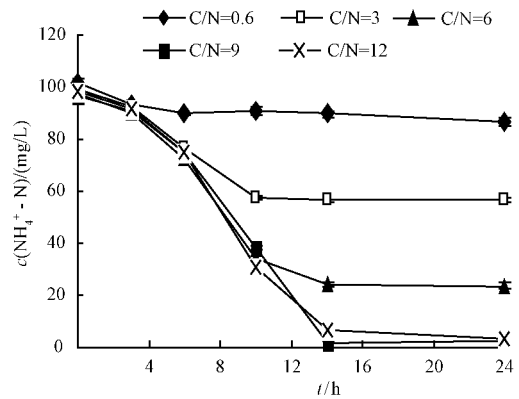


图5 C/N 比对菌株 P2 氨氮降解能力的影响  
 Fig. 5 Effect of different C/N ratio on ammonia removal ability of strain P2.

2.7 菌株 P2 和 P9 对实际污水的脱氮效果

前面的实验表明,菌株 P2 和 P9 对实验室人工配水中氨氮的降解效果较好,但在真正的污水中是否仍具有活性及其对污水的耐受程度将直接关系到其应用前景。为此,我们对菌株在实际猪场污水中降解氨氮的能力进行了检验。如图 6 所示,实际猪场污水中初始氨氮浓度约为170 - 180 mg/L时,在充足的小分子可利用碳源丁二酸钠存在时,菌株 P2 , P9 在24 h内即可迅速降解氨氮。其中,菌株 P2 降解速率更快,24 h内可完全实现对氨氮的脱除,菌株 P9 接种后经48 h也可完成对氨氮的全部降解。而对照实验,即没有加小分子可利用碳源丁二酸钠,只接种了菌悬液的情况下,氨氮降解缓慢,且降解量少。这可能与实际污水中没有足够可供菌株有效利用的小分子碳源有关。菌株只能利用污水中本身存在的少量小分子碳源,却难以实现对污水中可能存在的复杂大分子有机物等的利用,故氨氮降解率很低。

实验表明,菌株 P2 ,P9 均具有较强的小分子碳源依赖性,只有在外加丁二酸钠的污水中才能够较

好的生长,较快地脱除氨氮。这势必会增加污水处理的成本,但同时也提供了一种对其进行精确调控的手段,可通过人为调节小分子碳源加入量来达到人为控制菌株生长的目的。同时,也可以通过加入某些小分子碳源产生菌作为伴生菌的方法解决菌株 P2, P9 所需碳源的问题。总体而言,在外加丁二酸钠的情况下,异养硝化菌株 P2, P9 具有较强的耐受力,在实际猪场污水水样中能较好地生长,并具有很强的异养硝化能力,可实现对氨氮的快速有效脱除。其对实际污水的异养硝化能力不亚于已报道异养硝化菌株 *Acinetobacter sp.* YY4<sup>[23]</sup>,均需补加小分子碳源丁二酸钠,且后者还要添加维氏盐溶液。

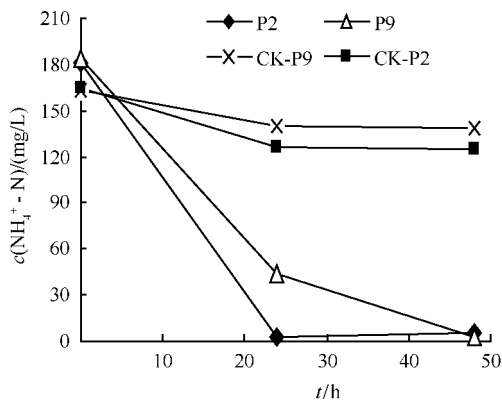


图6 菌株 P2 和 P9 降解猪场污水中氨氮能力的检测

Fig. 6 Evaluation on ammonia removal ability of strains P2 and P9 in piggery wastewater.

### 2.8 菌株 P2 和 P9 单独与混合条件下对实际污水的脱氮效果

取猪场污水,测得初始氨氮浓度约为 460 mg/L,加丁二酸钠,高压蒸汽灭菌后以 5% 的接种量分别接种菌株 P2, P9,菌株单独与混合作用的脱氮效果如图 7 所示(CK 为未灭菌、未加菌且未加碳源的实验对照组)。从图 7 可以看出,在较高氨氮浓度的实际猪场污水中,将菌株 P2 与菌株 P9 以 1:1 混合接种,其脱氨氮效果明显好于菌株 P2 或 P9 单独作用。小分子碳源丁二酸钠存在时,各实验组在菌株接种后 2 d 内,能迅速降解污水中较高浓度的氨氮,3-6 d 降解速度渐缓。6 d 后,菌株 P2, P9 分别单独作用的脱氨氮水平相当,氨氮去除率均约为 60%,而混菌组氨氮去除率可达 70%,较单菌株作用提高约 10 个百分点。此外,实验结果显示,未做任何处理的对照组,其氨氮去除率低,经 9 d 的作用

时间,脱氮率仍停留在 35% 左右,效果远不及加菌组。综上所述,将菌株 P2 与 P9 混合,接种于同一体系中互利共生,联合作用,可在一定程度上提高脱氮效果,异养硝化能力强于菌株单独作用。迄今为止,此类异养硝化菌株的混菌研究在国内外尚鲜有报道。

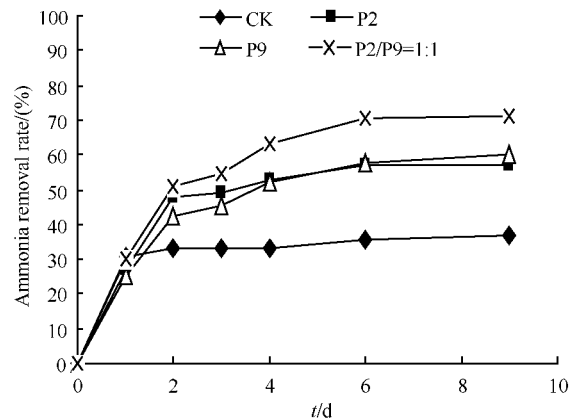


图7 菌株 P2 和 P9 单独与混合作用下对猪场污水中氨氮降解能力的对比

Fig. 7 Comparison of ammonia removal ability of strains P2 and P9 individually or mixed in piggery wastewater.

## 3 结论

通过我们的实验研究,得出以下几点结论。

(1) 利用富集培养及平板划线法从猪场污水中分离到 2 株具有较强异养硝化功能的菌株 P2, P9。在液体异养硝化培养基中,它们在 24 h 内即可将氨氮浓度从 106 mg/L 降低到 20 mg/L 左右,氨氮去除率达到 80% 以上。相比菌株 P9,菌株 P2 的异养硝化速率更高,降解氨氮更迅速,14 h 对氨氮的降解即趋于饱和,而要达到与菌株 P2 相同的氨氮脱除率,菌株 P9 需要 28 h,且二者在脱氮过程中均无亚硝酸盐或硝酸盐的积累。此外,氮源实验表明,菌株 P2, P9 均无好氧反硝化能力,不能降解硝酸盐或亚硝酸盐。

(2) 通过常规细菌形态学观察及 16S rDNA 系统发育分析,对菌株 P2 和 P9 进行了鉴定,初步鉴定菌株 P2 为念球菌属 (*Paracoccus sp.*), P9 为申氏杆菌属 (*Shinella sp.*)。

(3) 研究了菌株 P2 和 P9 在培养条件下的生长情况、降解氨氮的相关条件及特性。发现它们在异养硝化过程中的最适碳源均为丁二酸钠,最适 C/N

比均为 9, 脱氮过程中 pH 值变化情况也基本一致, 都是从 6.8 上升到 8.9 等。

(4) 将菌株 P2、P9 单独或混合接种于实际猪场污水中, 检验了其对污水的脱氮效果。发现菌株 P2 和 P9 对小分子碳源具有较强的依赖性, 在加入小分子碳源时, 对实际污水均有较强的异养硝化能力。在充足的丁二酸钠存在时, 菌株 P2 能在 24h 内将污水中约 180 mg/L 的氨氮降解完全, P9 所需时间则稍长。而混菌实验表明, 将菌株 P2、P9 按 1:1 混合接种, 作用 6 d 后, 其对猪场污水中含量约为 460 mg/L 较高浓度的氨氮, 降解率可达到 70%, 较之单菌株作用提高了约 10 个百分点。

综上所述, 本研究所筛选菌株能在污水处理中表现出较好的异养硝化作用, 同国内外已报道的异养硝化能力比较优异的异养硝化菌株脱氮能力不相上下<sup>[2, 16, 23]</sup>, 丰富与发展了国内外在利用异养硝化菌株进行废水生物脱氮方面的研究。今后的工作重点主要包括以下两点: (1) 将分子生物学技术与微生物技术相结合, 深入研究异养硝化的硝化机理, 从而补充完善生物脱氮机理; (2) 结合实际对菌株脱氮条件的优化进一步研究, 完善以异养硝化菌为主体的各种脱氮工艺技术, 指导异养硝化菌在工程上的应用。

## 参考文献

- [1] Xia S, Li J, Wang R. Nitrogen removal performance and microbial community structure dynamics response to carbon nitrogen ratio in a compact suspended carrier biofilm reactor. *Ecological Engineering*, 2008, 32 (3): 256-262.
- [2] Kim JK, Park KJ, Cho KS, Nam SW, Park TJ, Bajpai R. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 2005, 96 (17): 1897-1906.
- [3] 温东辉, 唐孝炎. 异养硝化及其在污水脱氮中的作用. *环境污染与防治 (Environmental Pollution & Control)* 2003 25(5): 283-285.
- [4] 林燕, 孔海南, 何义亮, 严立, 李春杰. 异养硝化细菌的分离及其硝化特性实验研究. *环境科学 (Chinese Journal of Environmental Science)*, 2006, 27 (2): 324-328.
- [5] Moir JWB, Crossman LC, Spiro S, Richardson DJ. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Letters*, 1996, 387(1): 71-74.
- [6] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Water Research*, 2006, 40(16): 3029-3036.
- [7] 王成林, 周巧红, 王亚芬, 梁威, 吴振斌. 一株异养硝化细菌的分离鉴定及其亚硝化作用研究. *农业环境科学学报 (Journal of Agro-Environment Science)* 2008, 27 (3): 1146-1150.
- [8] Daum M, Zimmer W, Papen H, Kloos K, Nawrath K, Bothe H. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Current Microbiology*, 1998, 37(4): 281-288.
- [9] Lin Y, Kong HN, He YL, Kuai L, Inamori Y. Simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor and isolation of heterotrophic nitrifying bacteria. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 2004, 40(3): 105-114.
- [10] Brierley EDR, Wood M. Heterotrophic nitrification in an acid forest soil: isolation and characterization of a nitrifying bacterium. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(10): 1403-1409.
- [11] Ho KL, Chung YC, Lin YH, Tseng CP. Biofiltration of trimethylamine, dimethylamine, and methylamine by immobilized *Paracoccus* sp. CP2 and *Arthrobacter* sp. CP1. *Chemosphere*, 2008, 72(2): 250-256.
- [12] 张光亚, 陈美慈, 韩如暘, 闽航. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* 2003 43(2): 156-161.
- [13] Stephenson T, Judd S, Jefferson B, Brindle K. Membrane bioreactors for wastewater treatment. London: IWA Publishing, 2000.
- [14] Islam A, Chen D, White RE. Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39(4): 972-975.
- [15] Burton J, Chen C, Xu Z, Ghadiri H. Gross nitrogen transformations in adjacent native and plantation forests of subtropical Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(2): 426-433.
- [16] 孔庆鑫. 一株新型脱氮微生物的分离鉴定及其脱氮机制. 军事医学科学院, 硕士学位论文, 2004.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 409-412.
- [18] 国家环保局. 水和废水监测分析方法. 第三版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.

- [19] Mevel G, Prieur D. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46 (5): 465-473.
- [20] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100 (2): 184-191.
- [21] Otani Y, Hasegawa K, Hanaki K. Comparison of aerobic denitrifying activity among three cultural species with various carbon sources. *Water Science and Technology*, 2004, 50 (8): 15-22.
- [22] Gupta AB, Gupta SK. Simultaneous carbon and nitrogen removal from high strength domestic wastewater in an aerobic RBC biofilm. *Water Research*, 2001, 35 (7): 1714-1722.
- [23] 陈赵芳, 尹立红, 浦跃朴, 季先宁, 谢祥峰. 一株异养硝化菌的筛选及其脱氮条件. 东南大学学报 (*Journal of Southeast University*) 2007, 37 (3): 486-490.

## Screening and identification of two heterotrophic nitrifying bacteria and characterization of their capacity for nitrogen removal

Dan Pan, Qiaoyun Huang, Wenli Chen\*

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** [Objective] Two heterotrophic nitrifying bacteria, P2 and P9 isolated from piggery wastewater, were studied for their capacity of nitrification and nitrogen removal. [Methods] Physiological characteristics and phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences of strains P2 and P9 were analyzed. The ammonia removal characteristics of strains P2 and P9 were investigated. Furthermore, nitrogen removal ability of strains P2 and P9 individually or mixed were evaluated in the treatment of actual piggery wastewater. [Results] Strains P2 and P9 were identified as *Paracoccus* sp. and *Shinella* sp., respectively. Heterotrophic nitrification could occur by the strains when they utilized organics. After cultivation of 24 h, the ammonia removal rates by the strains were up to 80% approximately; meanwhile, there was almost no nitrite and nitrate accumulation. However, aerobic denitrification could not occur by the strains when  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$  was provided as the sole nitrogen source, respectively. For heterotrophic nitrification, with strains P2 and P9, the optimal carbon source was sodium succinate, and the optimal C/N ratio was 9. Besides, the pH values rose from 6.8 to 8.9 in the whole ammonia removal process. The growth and nitrogen removal ability of the two strains depended much on the quantity of small molecule carbon source, and the nitrogen removal capability of strains P2 or P9 in wastewater with small molecule carbon source was improved evidently. The effect was strengthened especially when the two strains were mixed together. [Conclusion] Nitrogen removal ability of strains P2 and P9 was relatively strong, and they may exhibit broad application prospects in wastewater treatment.

**Keywords:** biological nitrogen removal, heterotrophic nitrification, piggery wastewater, ammonia

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40825002; 41071180) and by the National Water Pollution Control and Management Technology Special Program of China (2009ZX07104-003)

\* Corresponding author. Tel: +86-27-87282730; Fax: +86-27-87280670; E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

Received: 8 April 2011/Revised: 31 May 2011