

## 一株高效异养硝化菌的选育、鉴定及其硝化条件

曾庆梅, 司文攻, 李志强, 靳靖, 吴聪, 魏春燕, 黄博英

(合肥工业大学, 农产品生物化工教育部工程研究中心, 合肥 230009)

**摘要:**【目的】针对现阶段异养硝化菌硝化速率较低的问题, 选育更高效的异养硝化菌, 进而鉴定该菌株的种属, 了解其硝化特性和硝化条件。【方法】分别从污水处理厂活性污泥、化肥厂土壤以及农田土壤中取样, 以柠檬酸钠为碳源,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源, 采用污泥驯化、驯化过程中驯化液连续梯度稀释、平板划线分离及颜色指示剂快速硝化效果检测等步骤, 筛得一株高效的异养硝化菌。经生理生化和 16S rDNA 序列的系统发育分析鉴定其种属; 将该菌接入人工氨氮废水, 定时检测水中含氮化合物的变化, 了解其硝化特性; 通过改变培养基碳源、溶氧量、C/N 比、温度和 pH 考察其硝化条件。【结果】获得的高效异养硝化菌为革兰氏阴性杆菌, 不利用葡萄糖发酵, 氧化酶、接触酶阳性, 不产吡啶, 能由有机酸盐产碱; 其与产碱菌属菌株 *Alcaligenes* sp. ES-SDK-3 的 16S rDNA 同源性高达 99.7%。用该菌株处理初始氨氮浓度为 182.30 mg/L 的废水, 30 h 后氨氮去除率为 99.8%, 指数期平均氨氮去除速率为 9.61 mg-N/L/h, 其在硝化过程中几乎没有亚硝酸盐氮和硝酸盐氮产生; 最佳碳源为柠檬酸钠; 高的溶氧量和高的 C/N 比有利于其降解氨氮, 当 C/N 比为 12 时即可达到较好的效果; 该菌株在温度为 30℃-35℃, pH 为 5.0-9.0 范围内均能较彻底地降解氨氮。【结论】该菌株为产碱菌属, 命名为 *Alcaligenes* sp. HN-S; 其在硝化速率与处理的氨氮浓度方面均高于目前国内外筛出的大多数异养硝化菌; 通过考察其硝化条件, 为其走向实际污水脱氮工艺提供了依据。

**关键词:** 异养硝化菌; 分离; 鉴定; 硝化作用

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 06-0803-08

脱氮一直以来都是污水治理的重要课题, 而生物脱氮又被认为是目前废水脱氮中最经济有效的方法之一<sup>[1]</sup>。在废水生物脱氮过程中, 氨氮的去除率是一个重要指标, 而氨氮的转化依赖于硝化微生物的作用。长期以来, 人们都认为在污水处理系统中执行硝化功能的是一群自养型微生物<sup>[2]</sup>, 因此现阶段污水脱氮工艺中的硝化作用单元完全是按自养硝化菌的生理特性来设计的<sup>[3]</sup>。然而在实践中人们发现自养硝化菌在脱氮工艺中存在许多缺陷, 如 (1) 自养硝化菌在有大量有机物存在条件下, 对氧气和营养物的竞争不如好氧异养菌, 从而导致其难

以在系统中成为优势菌; (2) 自养硝化菌增值速度慢, 特别是在低温冬季, 难以维持较高的生物浓度。因此造成系统总水力停留时间较长, 提高了基建投资和运行费用<sup>[4]</sup>。所以近年来异养硝化菌的选育成为热点, 并取得了一些阶段性成果。

自 1949 年 Quastel 和 Scholefield<sup>[5]</sup> 首次以丙酮酸脲作为选择性培养基筛选得到产  $\text{NO}_2^-$  的异养硝化菌株以来, 人们发现异养硝化现象广泛存在于不同的环境中<sup>[6-11]</sup>。异养硝化菌应用的关键是其硝化能力, Kim 等<sup>[12]</sup> 筛得 24 株具异养硝化功能的蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), 在最佳培养条件下, 对

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30871739, 30571304); 安徽省教育厅重点科研项目 (KJ2007A099)

**作者简介:** 曾庆梅 (1962-), 男, 江西吉水人, 教授, 博士, 主要从事环境生物治理与生物发酵研究。Fax: +86-55-12901862; E-mail: swg\_0207@yahoo.com.cn; zengqingmei-1@163.com

**收稿日期:** 2009-11-09; **修回日期:** 2010-02-06

100 mg/L 的氨氮去除率达 90% 以上; Su 等<sup>[13]</sup> 从猪舍污水中筛得一株为产碱假单胞菌 (*Pseudomonas alcaligenes* AS-1) 的异养硝化菌, 58 h 内能降解掉  $2.5 \pm 0.2$  mmol/L 的  $\text{NH}_4^+$ ; Joo 等<sup>[14]</sup> 筛得一株为粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis* No. 4) 的异养硝化菌, 在高的  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度 (约 1200 mg-N/L) 下, 达到其最大  $\text{NH}_4^+$ -N 去除速率为 28.9 mg-N/L/h, 显示出优异的异养硝化能力。国内方面也有研究者筛出了一些异养硝化菌<sup>[15-19]</sup>, 其中硝化效果较好的有孔庆鑫等<sup>[18]</sup> 筛得的一株为不动杆菌 (*Acinetobacter* sp. YY-5) 的异养硝化菌, 其处理起始氨氮浓度为 95.23 mg/L 的废水, 3 d 后降解率达 98.6%; 陈赵芳等<sup>[19]</sup> 筛得的一株名为 YY4 的异养硝化菌, 处理起始氨氮浓度为 104.12 mg/L 的废水时, 12 h 的降解率为 95%, 最大硝化速率为 7.42 mg-N/L/h, 速度相对较高。

综合目前的研究成果, 可以发现异养硝化菌比自养硝化菌有许多优势<sup>Δ</sup>, 但也存在异养硝化菌在单位生物量的氨氧化速率较自养硝化菌慢的问题<sup>[19]</sup>。此外, 目前筛出的大多数异养硝化菌在处理高浓度氨氮废水 ( $\text{NH}_4^+$ -N 浓度大于 100 mg/L) 时, 往往有较高浓度的氨氮残留。本文报道一株高效异养硝化菌的筛选与鉴定, 并对其硝化性能及影响因素进行了考察。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源:** 取自合肥市内多家污水处理厂活性污泥、化肥厂内土壤及市郊农田土壤。

**1.1.2 培养基:** ① 驯化培养基: 柠檬酸三钠 5.0 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0 g,  $\text{NaCl}$  0.5 g, 微量元素溶液<sup>[20]</sup> (剔除了 EDTA) 1 mL, 蒸馏水 999 mL; 固体培养基按 1.6% 的浓度另加入纯化琼脂粉; ② 异养硝化培养基: 柠檬酸三钠 9.0 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.7 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3.0 g, 其余组分同驯化培养基; ③ 自养硝化培养基按脚注文献<sup>ΔΔ</sup> 配制。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 溴化乙锭购自 Sigma 公司; UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒来自上海生工生物工程技术服务有限公司; PCR MasteMix 来自天根生化科技(北

京)有限公司; 其它试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司。电泳仪、凝胶成像系统 (BIO-RAD U. S. A), VITEK2 系统 (生物梅里埃公司 U. S. A), PCR 仪 (杭州博日科技有限公司), 紫外可见分光光度仪 (UV-1600 型, 北京瑞利分析仪器公司), 紫外透射分析仪 (上海精科实业有限公司), 生化培养箱 (HSP-2500 型, 上海精宏实验设备有限公司), 冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司), 扫描电镜系统 (JSM-6490LV 型, 日本电子公司)。

### 1.2 高效异养硝化菌株的分离纯化

**1.2.1 异养硝化菌的驯化、富集:** 将不同来源的土样充分混匀, 取 1 g 该混合土样于盛有 200 mL 驯化培养基的 500 mL 锥形瓶中, 恒温回旋培养。温度设为 30℃, 转速 200 r/min。驯化以 3 d 为一周期。每一周期结束将瓶中培养液静置沉淀片刻, 然后取出部分菌液置于另一干净锥形瓶中, 加新鲜驯化培养基补足至 200 mL, 继续驯化。取出的菌液按驯化周期渐次从 50 mL 递减至 10 mL, 补充的培养基也相应由开始的 150 mL 加至驯化末期的 190 mL。驯化期间定期用氨试剂<sup>ΔΔ</sup> 检测氨氮去除情况。当驯化菌液在滴加氨试剂后呈无色时, 则表示驯化过程完成。

**1.2.2 异养硝化菌的纯化、分离:** 按林燕等人<sup>[15]</sup> 的方法进行。

**1.2.3 液体培养基考察各菌株的硝化能力:** 经分离纯化, 共得到 69 株菌。将它们分别接入异养硝化培养基, 摇床培养。3 d 后分别用氨试剂、格里斯试剂、二苯胺—硫酸试剂<sup>ΔΔΔ</sup> 检测各菌培养基中氨氮残留、亚硝酸盐氮和硝酸盐氮生成情况。用这种方法选出 6 株脱氨氮较彻底且产亚硝酸盐氮和硝酸盐氮较少的菌株。再将这 6 株菌的培养基取出适量经离心, 用分光光度法定量检测各菌液中氨氮残留量, 选出一株使氨氮残留量最少的菌株。

### 1.3 菌株的形态与生理生化鉴定

**1.3.1 形态学鉴定:** 对筛得菌株进行革兰氏染色, 在光学显微镜下观察其形态, 并对菌株做扫描电镜观察<sup>[21]</sup>。

**1.3.2 生理生化鉴定:** 依据《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[22]</sup> 进行。

**1.3.3 VITEK 微生物分析仪鉴定:** 由安徽出入境检验检疫局鉴定。

Δ 曾庆梅, 司文攻, 李志强. 高效异养硝化菌的筛选. 中国环境科学学会 2009 年学术年会优秀论文集, 2009.

ΔΔ 合肥工业大学生物与食品工程学院生物工程系. 微生物实验指导书. 2004.

ΔΔΔ 合肥工业大学生物与食品工程学院生物工程系. 微生物实验指导书. 2004.

## 1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增、测序及系统发育分析

**1.4.1 细菌基因组 DNA 的提取:**取指数生长期细菌,  $9168 \times g$  下离心 1 min 彻底弃尽培养基, 用 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取细菌基因组 DNA, 提取完毕用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 DNA 质量。

**1.4.2 16S rDNA 的 PCR 扩增与测序:**将细菌基因组作为模板, 扩增引物为一对通用引物。正向引物 BSF8/20: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 BSR1541/20: P<sub>2</sub>: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系 (50  $\mu$ L) 为: 引物 BSF8/20 和 BSR1541/20 各 1  $\mu$ L; 模板 DNA 1  $\mu$ L;  $2 \times Taq$  PCR MasteMix 25  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。PCR 程序如下: 1. 95 $^{\circ}$ C 5 min; 2. 95 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 3. 第二步循环 29 次; 4. 72 $^{\circ}$ C 7 min; 5. 4 $^{\circ}$ C 放置。扩增完毕用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段 DNA, 并由天根生化科技(北京)有限公司完成测序。

**1.4.3 系统发育分析:**经测序获得 16S rDNA 长度为 1475 bp。利用该序列按《生物信息学应用技术》<sup>[23]</sup>所述方法构建系统发育树, 进行系统发育分析。

## 1.5 硝化特性研究

实验用容器为 500 mL 锥形瓶, 培养基装量为 200 mL。接入菌株后 30 $^{\circ}$ C、转速 200 r/min 摇床培养。

**1.5.1 生长曲线及培养过程中培养液 pH 的测定:**定时检测异养硝化培养基的  $OD_{600}$  和 pH。

**1.5.2 脱氮速率特征曲线测定:**定时检测异养硝化培养基中氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮浓度, 计算其硝化速率。

**1.5.3 菌株在自养硝化培养基中的代谢情况考察:**将菌株接入自养硝化培养基培养 10 d, 定时检测培养基  $OD_{600}$  和培养前后氨氮浓度的变化。

## 1.6 硝化条件考察

实验容器为 500 mL 锥形瓶, 每瓶装培养基 200 mL。

**1.6.1 碳源种类对菌株降解氨氮效果的影响:**将异养硝化培养基的碳源分别改为甲酸钠、乙酸钠、丙酮酸钠、琥珀酸钠、苹果酸、柠檬酸钠、酒石酸钾钠、葡萄糖、蔗糖, 其余成份不变。每种碳源实验时均维持 C/N = 11.7, 培养条件均为 30 $^{\circ}$ C、转速 200 r/min 摇床培养。培养 10 d, 检测培养前后氨

氮浓度的变化。

**1.6.2 溶氧量对菌株降解氨氮效果的影响:**将菌株接入异养硝化培养基, 通过改变摇床转速来改变培养基中的溶氧量。转速分别设为 0 r/min、50 r/min、100 r/min、150 r/min、200 r/min、250 r/min, 并用溶氧仪测出各转速下的溶氧量。定时检测不同转速下培养基中氨氮浓度的变化。

**1.6.3 C/N 比对菌株降解氨氮效果的影响:**改变异养硝化培养基中碳源柠檬酸钠的量, 使 C/N 比分别为 3、6、9、12、15、18, 将菌株分别接入, 30 $^{\circ}$ C、转速 200 r/min 摇床培养。定时检测培养基中氨氮浓度的变化。

**1.6.4 温度对菌株降解氨氮效果的影响:**将菌株接入异养硝化培养基, 分别于 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C 下培养, 摇床转速为 200 r/min。定时检测培养基中氨氮浓度的变化, 重复 3 次。

**1.6.5 pH 值对菌株降解氨氮效果的影响:**用 HCl 和 NaOH 溶液将异养硝化培养基 pH 分别调为 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0, 接入菌株, 30 $^{\circ}$ C、转速 200 r/min 摇床培养。定时检测培养基中氨氮浓度的变化, 重复 3 次。

## 1.7 分析方法<sup>[24]</sup>

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 采用纳氏试剂光度法; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 采用酚二磺酸光度法。

## 2 结果

### 2.1 菌株的分离纯化

将适量污水处理厂活性污泥、化肥厂内土壤和市郊农田土壤充分混合, 取 1.0 g 该混合土样驯化。经约 4 个月驯化和 5-6 轮划线分离, 获得能在异养硝化固体培养基上生长的菌株 69 株。将这些菌株分别接入异养硝化液体培养基, 培养后经指示剂和分光光度法检测, 获得一株高效的异养硝化菌, 命名为 HN-S。

### 2.2 菌株 HN-S 的形态与生理生化鉴定

**2.2.1 形态学鉴定:**HN-S 在固体培养基上培养 2 d 后形成菌落为灰褐色、圆形、不透明, 有特殊气味。革兰氏染色阴性。细胞呈杆状, 大小为 0.45  $\mu$ m - 0.5  $\mu$ m  $\times$  1.0  $\mu$ m - 2.0  $\mu$ m, 扫描电镜图片如图 1 (A)、(B) 所示。

**2.2.2 生理生化鉴定:**HN-S 不利用葡萄糖发酵, 氧化酶、接触酶阳性, 不产吡啶, 能由有机酸盐产碱。依据《常见细菌系统鉴定手册》初步判定为产碱菌

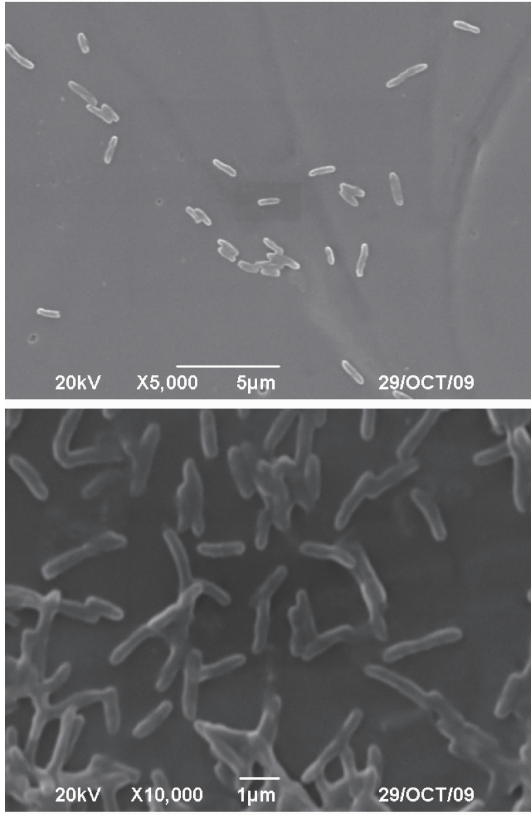


图1 菌株 HN-S 扫描电镜照片 (A) (5000 ×) 和扫描电镜照片 (B) (10000 ×)

Fig.1 SEM of strain HN-S (A) (5000 ×) and (B) (10000 ×).

属 (*Alcaligenes* sp.)。

**2.2.3 VITEK 全自动细菌鉴定系统鉴定:** HN-S 经 VITEK2 全自动细菌鉴定系统鉴定为粪产碱菌粪亚种 (*Alcaligenes faecalis* ssp. *faecalis*) (可能性 99%)。

## 2.3 系统发育分析

测序后,得到长度为 1475 bp 的菌株 HN-S 的 16S rDNA 序列。该序列提交 GenBank 后登录号 (Accession Number) 为 GU166294。经 BLAST 同源性检索,发现它与产碱菌属菌株 *Alcaligenes* sp. ES-SDK-3 的 16S rDNA 序列同源性高达 99.7%。将其与一些异养硝化菌、少量自养硝化菌以及部分 16S rDNA 同源性相近的菌的 16S rDNA 序列进行系统发育分析,得到系统进化发育树的结构如图 2 所示。由图可知,本文筛出的异养硝化菌 HN-S 在系统发育树上与 *Alcaligenes* sp. ES-SDK-3 位于同一发育地位。

## 2.4 菌株 HN-S 的硝化特性

**2.4.1 生长曲线及培养过程中 pH 的变化:** 菌株在异养硝化培养基中培养时生长曲线及 pH 的变化如图 3 所示。由图可知,菌株在大约 12h 后进入指数

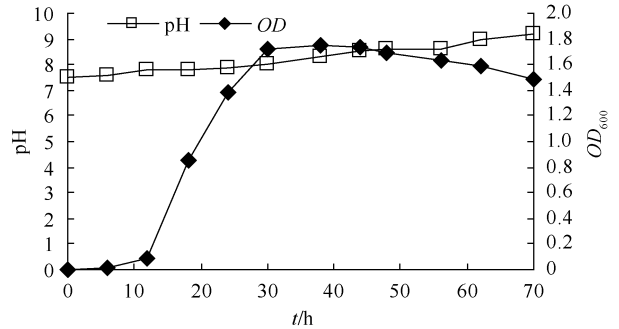


图3 菌株 HN-S 的生长曲线及培养过程中 pH 的变化

Fig.3 Growth curve of strain HN-S and the changes of pH during cultivation.

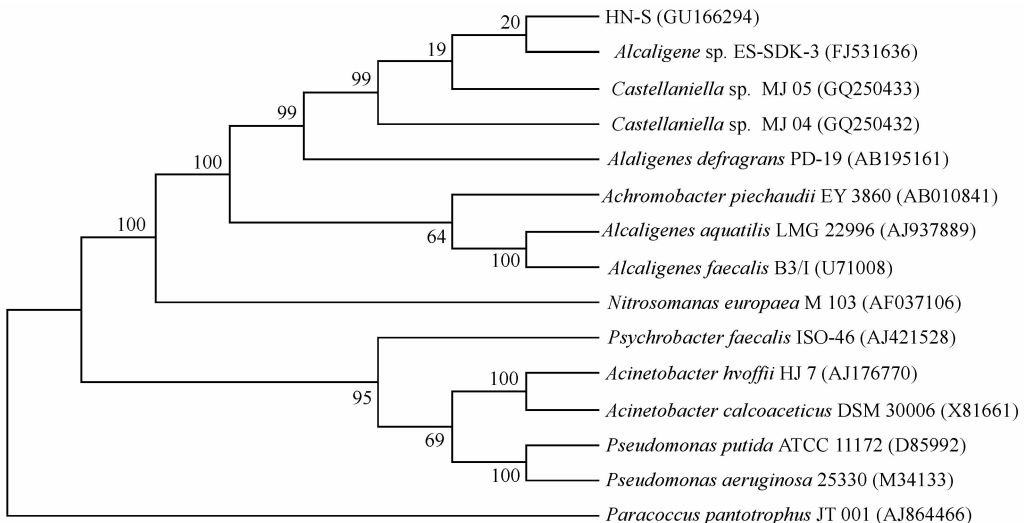


图2 基于菌株 HN-S 和其它相关菌株的 16S rDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.2 Unrooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain HN-S and sequences of validly described bacteria associated. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

生长期,30 h后进入稳定期。培养过程中 pH 由 7.5 缓慢上升至 9.2,符合产碱菌属的特征,且培养液呈弱碱性也有利于硝化作用。这一点与自养硝化菌在培养过程中产酸<sup>[25]</sup>刚好相反。

**2.4.2 降解氨氮速率特征曲线:**菌株在异养硝化培养基中培养时脱氮速率特征曲线如图 4 所示。由图可以看出,前 12 h 菌株处于氨氮降解的延滞期,12 h 后氨氮浓度迅速下降。12 h 时氨氮浓度为 173.32 mg/L,30 h 时已降为 0.43 mg/L,18 h 的平均降解速率为 9.61 mg-N/L/h,结合生长曲线,表明氨氮降解主要发生在其指数期。在 30 h 内的氨氮降解率为 99.8%,且在降解氨氮过程中一直没有检测到亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的积累。

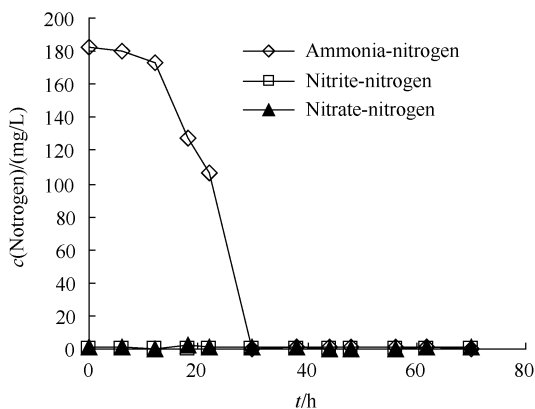


图 4 菌株 HN-S 的脱氮速率特征曲线

Fig. 4 Curve of ammonia removal and nitrite and nitrate accumulation of strain HN-S.

**2.4.3 菌株在自养硝化培养基中的代谢情况:**菌株 HN-S 在自养硝化培养基中培养 10 d 期间  $OD_{600}$  一直在 0.03 以下,培养基基本澄清,培养前后培养基中氨氮浓度由 1022.73 mg/L 变为 945.55 mg/L,基本无变化,少量的变化可能是氨氮挥发所致。

一些化合物如乙炔、硫脲等<sup>[26]</sup>可以抑制自养硝化菌的生长而对异养硝化菌无影响,由此可以将二者区分开来。本文直接将菌株 HN-S 接入自养硝化培养基,证明其无自养硝化能力,是一株专性异养硝化菌。

## 2.5 菌株 HN-S 硝化脱氮条件研究

**2.5.1 碳源对脱氮效果的影响:**将菌株 HN-S 接入不同碳源的异养硝化培养基,所得结果如图 5 所示。由图可知,最佳碳源为柠檬酸钠,菌株接入后,10 d 内使氨氮由 169.32 mg/L 降为 0.48 mg/L,降解率为 99.7%;其次为琥珀酸钠和乙酸钠,氨氮降解率分别为 97.2% 和 93.6%。

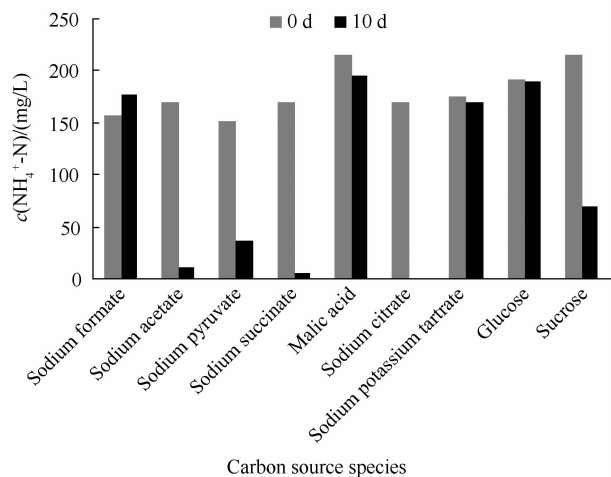


图 5 不同碳源对 HN-S 脱氮效果的影响

Fig. 5 Effect of carbon source on the denitrifying ability of strain HN-S.

**2.5.2 溶氧量对脱氮效果的影响:**实验中通过改变摇床转速来改变培养基中的溶氧量,结果如图 6 所示。由图可知,摇床转速越高,培养基中溶氧量越高,其值由静止时的 0.2 mg/L 上升至 250 r/min 时的 4.2 mg/L,而溶氧量越高越有利于菌株 HN-S 的硝化脱氮。

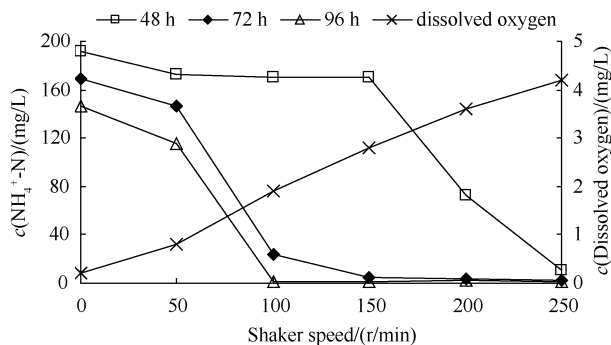


图 6 不同溶氧量对 HN-S 脱氮效果的影响

Fig. 6 Effect of the level of dissolved oxygen on the denitrifying ability of strain HN-S.

**2.5.3 C/N 比对脱氮效果的影响:**将菌株 HN-S 接入 C/N 比不同的异养硝化培养基,培养后所得结果如图 7 所示,在一定范围内,提高 C/N 比有利于提高菌株的硝化脱氮能力。当 C/N 比为 12 时硝化效果已比较理想。当 C/N 比为 15 或 18 时,120 h 时氨氮降解率均达 100%,两条曲线近乎重合,再提高 C/N 比没有意义。

**2.5.4 温度对脱氮效果的影响:**将菌株 HN-S 以不同温度培养,其降解氨氮的效果如表 1 所示。由表可知,菌株在 30℃ - 35℃ 时培养硝化脱氮效果最好,在其它温度下,虽然也有一定的脱氮能力,但强度下降。

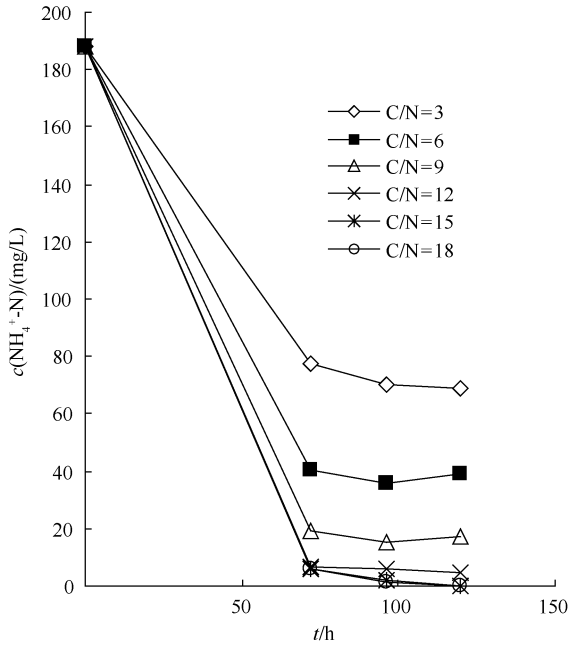


图7 不同 C/N 对 HN-S 脱氮效果的影响

Fig. 7 Effect of different C/N ratio on denitrifying ability of strain HN-S.

表1 不同温度对 HN-S 脱氮效果的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 1 Effect of temperature on denitrifying ability of strain HN-S

$T/^\circ\text{C}$	$c(\text{NH}_4^+ - \text{N}) / (\text{mg/L})$		
	0 h	24 h	48 h
20	188.31 $\pm$ 3.22	45.16 $\pm$ 3.48	25.99 $\pm$ 3.62
25	183.13 $\pm$ 4.23	18.81 $\pm$ 1.36	9.81 $\pm$ 2.22
30	188.19 $\pm$ 5.56	11.20 $\pm$ 2.92	1.07 $\pm$ 0.35
35	180.78 $\pm$ 3.42	7.88 $\pm$ 1.96	0.89 $\pm$ 0.18
40	185.63 $\pm$ 5.52	40.23 $\pm$ 3.57	40.23 $\pm$ 4.13

**2.5.5 pH 对脱氮效果的影响:**将菌株 HN-S 接入不同 pH 的异养硝化培养基,其硝化脱氮效果如表 2 所示。由表可知,菌株对 pH 有较宽的适应范围,在 pH 值为 5-9 时均能达到较好的脱氮效果。此外在表中还可以看到在 pH 为 5.0 和 7.0 时,培养 72 h 后反比培养 24 h 时的氨氮残留量要大一些。其原因一方面是在酸性环境中培养后期菌株已无活性,而培养时间越长,培养基中水分蒸发越多,导致溶液中氨氮浓缩所致。实验测得在该培养条件下,3 d 后培养基中水分蒸发率约为 3% - 4%。在 pH 为 3.0 时,菌株不能生长,随着培养时间的延长,培养基中氨氮浓度也在不断升高,就是因为这一点。另一方面可能是长时间的培养导致细胞自溶,使胞内氨氮溶出所致。在 pH 为 9.0 和 11.0 时,72 h 内菌株有持续的脱氮能力,说明在碱性环境中菌株能较长时间保持活力,这可能与菌株较能适应偏碱性环境的特性有关。在弱碱性环境中脱氮效果最好,若

碱性过强则会抑制菌株脱氮活性。

表2 不同 pH 对 HN-S 脱氮效果的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

pH value	$c(\text{NH}_4^+ - \text{N}) / (\text{mg/L})$		
	0 h	24 h	72 h
3.0	186.33 $\pm$ 3.58	189.52 $\pm$ 2.32	200.57 $\pm$ 7.56
5.0	186.33 $\pm$ 3.58	2.93 $\pm$ 0.31	3.64 $\pm$ 0.71
7.0	186.33 $\pm$ 3.58	3.07 $\pm$ 0.52	3.66 $\pm$ 0.63
9.0	186.33 $\pm$ 3.58	2.07 $\pm$ 0.00	1.79 $\pm$ 0.00
11.0	186.33 $\pm$ 3.58	62.94 $\pm$ 4.12	21.15 $\pm$ 0.21

### 3 讨论

已被筛选出来的异养硝化菌主要分布在如下几个属或种:泛养硫球菌 (*Thiosphaera pantotropha*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、节杆菌属 (*Arthrobacter* sp.)、芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)<sup>[1]</sup> 及粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*)<sup>[27]</sup> 等,此外还有短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus* sp.)<sup>[15]</sup>、不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)<sup>[18]</sup> 等。本文筛出的异养硝化菌 HN-S 在系统发育树上与产碱菌属菌株 *Alcaligenes* sp. ES-SDK-3 位于同一发育地位,结合其形态学和生理生化特征,可基本确定其为 *Alcaligenes* sp., 命名为 *Alcaligenes* sp. HN-S。

*Alcaligenes* sp. HN-S 在氨氮浓度为 182.30 mg/L 的情况下,在指数期降解氨氮的平均速率为 9.61 mg-N/L/h,降解速率高于 *Alcaligenes faecalis* OKK17 菌的 6.5 mg-N/L/h、*Thiosphaera pantotropha* 菌的 5 mg-N/L/h<sup>[14]</sup> 以及陈赵芳等<sup>[19]</sup> 筛出的 YY4 菌的 7.42 mg-N/L/h。处理的氨氮浓度也更高(历次实验的氨氮浓度均在 180.0 mg/L 以上),氨氮降解率历次实验在 2-3 d 内均能达到 99% 以上。同时在降解氨氮过程中一直没有检测到亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的积累,这一点与孔庆鑫等<sup>[18]</sup> 的 *Acinetobacter* sp. YY-5 菌类似。 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  均是水体中的污染物,在水体中三者还能相互转化。传统硝化菌仅是转变了水体中氮的存在形式,往往还需要反硝化菌协同作用才能真正达到脱氮的目的。*Alcaligenes* sp. HN-S 未将水体中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  转变为  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ , 根据氮的转化途径资料<sup>[28]</sup>,其极可能是将氨氮转变为气体直接脱除,这增加了其应用推广价值。

有一点需要作出说明的是在碳源种类对菌株降解氨氮效果的影响的实验中,实验周期设为 10 d 是因为 HN-S 是由柠檬酸钠为碳源驯化所得,在用其它物质作碳源时菌株可能需要一个适应过程,若培养时间过短就不能真正反映其利用该碳源的脱氮效

果。所有的碳源实验都在培养 10 d 后检测,但不表示对各碳源而言要达到如图 5 中所示脱氮效果均需要 10 d。

*Alcaligenes* sp. HN-S 的硝化速率比大多数已报道的异养硝化菌<sup>[12-19]</sup>高,但低于 Joo 等<sup>[14]</sup>报道的粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis* No. 4)的最大硝化速率 28.9 mg-N/L/h。一方面,*Alcaligenes* sp. HN-S 的最大硝化速率阶段集中在 22-30 h,8 h 内将氨氮由 106.39 mg/L 降至 0.43 mg/L,这样得出其最大硝化速率为 13.25 mg-N/L/h;另一方面,本实验使用的最高氨氮浓度约为 190 mg/L,这并非其极限氨氮负荷,所以测得的硝化速率也并非极限速率。而 *Alcaligenes faecalis* No. 4 是在高的氨氮负荷(约 1200 mg-N/L)下才能达到该硝化速率,若将氨氮负荷降为约 400 mg-N/L 和 100 mg-N/L,则其最大硝化速率分别降为 13.6 mg-N/L/h 和 4.7 mg-N/L/h<sup>[14]</sup>。后续实验将增加起始氨氮浓度,考察 HN-S 的最大氨氮负荷和极限硝化速率,并着重研究 *Alcaligenes* sp. HN-S 的脱氮途径和机理,为其走向生产实践提供依据。

根据上述实验结果,得出三点结论如下:

(1)通过活性污泥强行驯化、驯化过程中驯化液连续梯度稀释、平板划线分离、颜色指示剂快速检测等步骤,筛出一株高效的异养硝化菌。经鉴定其属 *Alcaligenes*,命名为 *Alcaligenes* sp. HN-S。

(2)*Alcaligenes* sp. HN-S 为专性异养硝化菌,无自养硝化能力。其在氨氮浓度为 182.30 mg/L 的情况下,在指数期降解氨氮的平均速率为 9.61 mg-N/L/h,期间最大速率为 13.25 mg-N/L/h,高于目前所筛得的大多数异养硝化菌株。且在降解氨氮的过程中无亚硝酸盐氮和硝酸盐氮的积累,显示出良好的应用推广前景。

(3)实验中对其硝化脱氮效果影响较大的几个因素,包括碳源种类、溶氧量、C/N 比、温度和 pH 进行了考察。发现高的溶氧量和 C/N 比有利于其硝化脱氮;其对碳源种类也有较严格的选择性,对柠檬酸钠、琥珀酸钠和乙酸钠利用较好;在温度为 30℃-35℃ 时脱氮效果良好;对 pH 的适应范围较宽,pH 值在 5-9 时均能取得理想的脱氮效果。

## 参考文献

[1] 张光亚,陈美慈,韩如暘,闵航. 一株异养硝化菌的分离及系统发育分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2003, 43(2): 156-161.  
[2] 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 and Control*), 2003, 25(1): 283-285.

[3] 付玉华,李艳全. 沈阳市郊区蔬菜污染调查. 农业环境保护 (*Agro-Environmental Protection*), 1999, 18(1): 36-37.  
[4] 马放,王弘宇,周丹丹. 好氧反硝化生物脱氮机理分析及其研究进展. 工业用水与废水 (*Industrial Water & Wastewater*), 2005, 36(2): 11-14.  
[5] Quastel JH, Scholefield PG. Influence of organic nitrogen compounds on nitrifications in soil. *Nature* (London), 1949, 164: 1068-1072.  
[6] Schimel JP, Firestone MK. Identification of heterotrophic nitrification in a Sierran forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48(4): 802-806.  
[7] Killham K. Nitrification in coniferous forest soils. *Plant and soil*, 1990, 128:31-44.  
[8] Adams JA. Identification of heterotrophic nitrification in strongly acid larch humus. *Soil Biology and Biochemistry*, 1986, 18(3): 339-342.  
[9] Duggin JA, Voigt GK, Bormann FH. Autotrophic and heterotrophic nitrification in response to clear-cutting northern hardwood forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 1991, 23(8): 779-787.  
[10] 杜睿. 内蒙古典型草原土壤 N<sub>2</sub>O 产生的机理探讨. 中国环境科学 (*China Environmental Science*), 2000, 20(5): 387-391.  
[11] Robertson LA, Kuenen JG, Kleijntjens R. Aerobic denitrification and heterotrophic nitrification by *Thiosphaera pantotropha*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1985, 51(4): 445.  
[12] Kim JK, Park KJ, Cho KS, Nam SW, Park TJ, Bajpai R. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*, 2005, 96: 1897-1906.  
[13] Su JJ, Yeh KS, Tseng PW. A Strain of *Pseudomonas* sp. Isolated from Piggery Wastewater Treatment Systems with Heterotrophic Nitrification Capability in Taiwan. *Current Microbiology*, 2006, 53: 77-81.  
[14] 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.  
[15] 林燕,孔海南,何义亮,严立,李春杰. 异养硝化菌的分离及其硝化特性实验研究. 环境科学 (*Environmental Science*), 2006, 27(2): 324-328.  
[16] 苏俊峰,马放,魏利,李维国,魏利,高珊珊. 异养硝化菌处理氨氮废水及微生物群落结构分析. 北京工业大学学报 (*Journal of Beijing University of Technology*), 2007, 33(12): 1300-1304.  
[17] 胡宝兰,郑平,武小鹰,尹亮. 一株氨氧化链霉菌的分类鉴定及其氨氧化特性的研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(3): 321-324.  
[18] 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.

- [19] 陈赵芳, 尹立红, 浦跃朴, 李先宁, 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.
- [20] 苏俊峰, 王维华, 马放, 高珊珊, 魏利, 魏利, 王晨. 好氧反硝化菌的筛选鉴定及处理硝酸盐废水的研究. *环境科学 (Environmental Science)*, 2007, 28(10): 2332-2335.
- [21] 郭素枝. 扫描电镜技术及其应用. 第一版. 厦门: 厦门大学出版社, 2006: 129.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学技术出版社, 2001: 180-181.
- [23] 王禄山, 高培基. 生物信息学应用技术. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2008: 48-128.
- [24] 国家环保局. 水与废水监测分析方法. 第三版. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [25] 叶剑锋. 废水生物脱氮处理新技术. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2006: 26-27.
- [26] Pollard PC. A quantitative measure of nitrifying bacterial growth. *Water Research*, 2006, 40: 1569-1576.
- [27] Blagodatsky SA, Kesik M, Papen H, Butterbach-Bahl K. Production of NO and N<sub>2</sub>O by the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis parafaecalis* under varying conditions of oxygen saturation. *Geomicrobiology Journal*, 2006, 23(3-4): 165-176.
- [28] Wrage N, Velthof GL, Beusichem ML van, Oenema O. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33: 1723-1732.

## Isolation, identification and characterization of a high-efficient heterotrophic nitrifier

Qingmei Zeng<sup>\*</sup>, Wengong Si, Zhiqiang Li, Jing Jin, Cong Wu, Chunyan Wei, Boying Huang

(Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** [Objective] In order to improve the rate of the heterotrophic nitrification, we screened and identified a high-efficient heterotrophic nitrifier, as well as studied its nitrification characteristics and nitrification conditions. [Methods] We obtained activated sludge samples from sewage and chemical fertilizer factories and farmland. We then utilized sodium citrate and ammonium chloride as carbon and nitrogen source. We used methods including domestication, gradient dilution of domestication liquid, isolation from streaking plate and color indicator as rapid nitrification detection. Finally a high-efficient heterotrophic nitrifier was obtained. We identified this strain according to its physiological, biochemical properties and the sequence analysis of 16S rDNA. After inoculating the strain into artificial ammonia-nitrogen wastewater, changes of nitrogen compounds were measured in order to understand the nitrification characteristics. Nitrification condition was also optimized by changing the carbon source, dissolved oxygen, C/N ratio, temperature and pH of the medium. [Results] The heterotrophic nitrifier was a gram-negative bacilli. It neither fermented glucose, nor produced indole. Oxidase and catalase tests were positive. It could produce alkali if organic salt was provided. The strain shared 99.7% sequence identity of its 16S rDNA with ES-SDK-3 of *Alcaligenes* sp. In the artificial wastewater with 182.30 mg/L ammonia nitrogen as initial concentration, the removal efficiency by the strain was 99.8% after 30h cultivation. The average nitrogen removal rate was 9.61 mg-N/L/h in its exponential phase. It produced almost no NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N in the entire nitrification process. The optimal carbon source is sodium citrate. Higher dissolved oxygen and C/N ratio favor its nitrification. When temperature is ranged from 30°C to 35°C and pH is ranged from 5.0 to 9.0, it can completely remove ammonia nitrogen. [Conclusions] The strain was identified as *Alcaligenes* genus, and named as *Alcaligenes* sp. HN-S. Our research confirmed that the *Alcaligenes* sp. HN-S had significant advantages over heterotrophic nitrifiers that were screened previously with aspect of ammonia nitrogen removal rate. The research of its nitrification condition definitely provided necessary theory support for a new biology process to remove nitrogen with high efficiency.

**Keywords:** heterotrophic nitrifier; isolation; identification; nitrification

(本文责编:王晋芳)