

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (12):1608–1618; 4 December 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150133

一个氨氧化菌群的筛选及除氮特性

杨小龙¹, 刘莉华², 吴秉奇¹, 刘淑杰^{1*}, 陈福明¹

¹深圳清华大学研究院, 深圳环境微生物资源开发与应用工程实验室, 广东 深圳 518057

²深圳大学, 广东省滨海土木工程耐久性重点实验室, 广东 深圳 518060

摘要:【目的】筛选耐受低 C/N 比、高氨氮环境的高效氨氧化菌群, 为开发新型氨氮去除菌剂奠定基础。【方法】采用多点取样、低 C/N 比、高浓度氨氮废水强行驯化、驯化液连续梯度稀释等步骤, 筛选具有高效去除铵氮能力的氨氧化菌群, 并考察不同 C/N 比、摇床转速和铵氮浓度下目的菌群去除铵氮的特性; 分离培养目的菌群中的优势菌株, 经形态学观察、生理生化特性测定和 16S rRNA 序列分析对菌株进行鉴定。【结果】筛选到了 3 个具有较强去除铵氮能力的氨氧化菌群, 其中以 JQ8 活性最好, 对初始 $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 17.86 mmol/L、C/N 比为 4 的合成废水处理 6 d 后, $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 去除率达到 97.01%; 在 $\text{C/N} \geq 4$ 、 $\text{NH}_4^+ -\text{N} \leq 28.57$ mmol/L 环境下, 菌群 JQ8 对溶液中 $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 的 6 d 去除率均可达 95%, 净除氮率接近 80%。实验室模拟好氧活性污泥处理系统处理线路板工业废水, 用菌群 JQ8 对系统强化处理 7 d 后 $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 和 TN 去除率分别达到 87.8% 和 67.9%。分析菌群 JQ8 组成发现, *Deftuvibacter* sp.、*Paracoccus* sp. 和 *Aquamicrobium* sp. 细菌为其主要优势菌株。【结论】从垃圾渗滤液中筛选到一个具有较强铵氮去除能力的氨氧化菌群 JQ8, 可耐受较低 C/N 比和高氨氮环境, 在强化污水处理系统对工业废水氨氮处理中, 表现出良好的效果。

关键词: 氨氧化菌群, 筛选, 除氮特性, 菌株鉴定

中图分类号: X172 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 12-1608-11

据 2013 年《中国环境统计年报》显示, 全国废水排放量 695.4 亿 t, 其中氨氮作为第二个主要污染物, 其排放量就达 245.7 万 t^[1]。由于经济迅速发展, 产业结构变化和人们生活用水量增大, 废水出现了低 C/N 比、高氨氮、含 PAHs 等有毒物质的多种类水质, 给生物脱氮技术带来了许多困难^[2-3]。因此近年来, 一些低 C/N 比、高氨氮污水处理技术逐渐成为研究热点。氨氧化菌 (ammonium oxidizing bacteria, AOB) 是废水生物处理系统实现氨氮去除的主体, 是将氨氮转化为亚硝态氮完成硝化作用限速步骤的承担着, 在

生物脱氮中起关键作用^[4]。目前, 国内外主要针对于不同污水处理系统中氨氧化菌群结构和多样性的生态学研究, 及常规条件下氨氧化细菌的分离、筛选、作用机理及固定化进行研究^[5-8]。研究显示, 在废水处理中功能性菌群比单菌具有更强的稳定性和耐冲击能力, 菌群所含微生物为全谱的微生物组合, 具有更高的分解力和更宽的降解谱系, 能够突破传统离子抑制浓度的限制^[9-11]。如台湾的 H. S. B. (高效菌群) 在 Cl^- 为 30 g/L 的高浓度条件下, 菌群仍可有效去除废水中的有机物和氨氮^[12]。因此, 经长期富集驯化的自然菌群具有更优、更稳定的功能活性。本研究从

基金项目: 深圳市科技研发资金 (KJYY20130905154610633)

* 通信作者。Tel: +86-755-26712692; Fax: +86-755-26559956; E-mail: liusj@tsinghua-sz.org

作者简介: 杨小龙 (1987-), 男 (汉), 甘肃天水人, 助理研究员, 微生物学。E-mail: yx1327813040@163.com

收稿日期: 2015-03-25; 修回日期: 2015-06-17

菌群思路出发, 筛选可耐受低 C/N 比、高氨氮环境中的高效氨氧化菌群, 并考察菌群的除氮特性和对实际氨氮废水的降解能力, 为开发新型的氨氮去除菌剂奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.2 培养基: 富集培养基 (g/L): 丁二酸钠 1.0 (COD 1000 mg/L)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 (15.15 mmol/L $\text{NH}_4^+ -\text{N}$)、 KH_2PO_4 0.2、 CaCO_3 2.0、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2、 MnSO_4 0.02、微量元素^[13] 1 mL、蒸馏水 1 L, pH6.0; 121 °C 湿热灭菌 30 min, 冷却后加入 75 g/L NaHCO_3 溶液 (2 mL/100 mL)。 $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 测试培养基 (g/L): 使用富集培养基, 但用 0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 代替 2.0 g/L CaCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和丁二酸钠浓度均变为 2.0 g/L。分离培养基: 富集培养基中加入 1.5% 的琼脂粉, 为防止水分蒸发, 避免平板干裂, 倒置于盛有少量水的干燥器中培养。合成废水培养基 (g/L): 葡萄糖 1.0 (COD 1000 mg/L)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.18 ($\text{NH}_4^+ -\text{N} = 17.86$ mmol/L)、蛋白胨 0.1、 NaHCO_3 0.6、 KH_2PO_4 0.15 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01、微量元素 1 mL、蒸馏水 1 L, pH7.5–7.8。净除氮率测定, 参见文献 [14]。

1.2 氨氧化菌群的筛选

1.2.1 氨氧化菌群的富集驯化: 取样品 10.0 g 或 10.0 mL 接入装有玻璃珠和 100 mL 蒸馏水的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、180 r/min 恒温振荡 30 min, 使样品充分打散, 污泥颗粒或菌胶团中的活菌释放出来, 制成样品悬液。以 10% 体积比, 取悬液接入 100 mL 富集培养基中, 30 °C、180 r/min 恒温振荡培养,

1.1.1 样品来源: 共采集了 9 个来自不同环境的样品, 1#、2# 分别来源于深圳市危险废物处理站 MBR 污水处理系统一级池和二级池活性污泥, 3#、4# 分别来源于深圳市光明泽浩工业园 RPIR 污水处理系统一级池和二级池活性污泥, 5# 来源于城市生活污水, 6#、7# 分别来源于市售某品牌氨氮和总氮去除菌剂, 8# 来源于城市垃圾渗滤液, 9# 来源于线路板工业废水。所采集样品的水质参数见表 1。

表 1. 样品水质参数

Table 1. Water quality data of collective samples

Item / (mg/L)	Number of samples								
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#
COD	680.9	1185.4	156.8	86.2	128.3	—	—	2891.7	237.3
$\text{NH}_4^+ -\text{N}$	166.2	180.9	79.4	29.8	33.9	—	—	309.5	86.9
$\text{NO}_3^- -\text{N}$	47.6	38.5	6.3	26.7	2.6	—	—	17.1	23.6
TN	239.3	241.2	97.5	109.6	57.9	—	—	367.5	116.3
pH	7.94	8.01	7.96	7.83	7.16	—	—	6.40	8.05

Dimensionless form of pH value.

每隔 7 d 以 10% 接种量转接到新鲜的富集培养基中, 以此来不断淘汰其他杂菌, 连续富集、驯化 3 个月。在富集过程中, 定期用氨试剂、格利斯试剂和二苯胺试剂检验亚硝酸盐和硝酸盐生成情况。格利斯试剂遇到 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 生成红色物质, 二苯胺试剂遇 $\text{NO}_3^- -\text{N}$ 生成蓝色物质, 且颜色的深浅与其含量的大小成正比。

1.2.2 氨氧化菌群的筛选: 取 3 个月后的富集液 5 mL、8000 r/min 离心, 收集菌体, 菌体用无菌水充分洗涤 3 次后, 接入 30.3 mmol/L $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 测试培养基中, 30 °C、180 r/min 恒温振荡培养, 每个样品设置 3 组平行。分别在 2、4、6、8、10 d 时, 取样离心后测定上清液中 $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 含量。以 $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 去除效率, 筛选活性较好的菌群, 进行下一步实验。

1.3 筛选菌群的活化

筛选得到的菌群, 采用富集培养基 30 °C、160 r/min 恒温振荡培养 5 d, 所得培养液用于后续实验。

1.4 菌群对合成氨氮废水的处理

以 5% (体积比) 的接种量, 取上步筛选获得的菌群活化培养液离心, 所得菌体经无菌水洗涤后分别接入人工配制的合成氨氮废水中, 30 °C、160 r/min 恒温振荡培养, 每组设置 3 个平行, 每隔一定时间取样测定上清液中 $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 含量。

1.5 菌群 JQ8 的除氮特性分析

以 5% 的接种量,取菌群 JQ8 活化培养液离心,所得菌体经无菌水洗涤后接入 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 测试培养基中,30 ℃、160 r/min 恒温振荡培养 6 d,分别研究菌群在不同初始 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度和不同 C/N 比条件下对 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的去除能力,每组设置 3 个平行样。同样,保持初始 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度和 C/N 比不变,30 ℃、不同转速振荡培养 6 d,研究菌群在不同摇床转速下的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 去除能力。

1.6 菌群 JQ8 对工业废水氨氮的处理

以深圳市光明泽浩工业园 RPIR 污水处理系统进水为处理对象,采用 20 L 水桶作为反应容器,利用气泵连接鱼缸曝气头插入桶底进行曝气(DO 约为 3.8 mg/L),每桶装入新鲜的线路板废水原水 18 L。试验共设置泥对照组、泥 + 菌组、无泥对照组、无泥 + 菌组 4 组,每组设置 3 个平行样。原水水质如下:COD 273 mg/L、 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 78.6 mg/L、TP 3.7 mg/L、TN 85.5 mg/L、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 0.82 mg/L、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 4.5 mg/L、pH8.15。

加菌组的混合液污泥浓度(MLSS)为 3.1 g/L,污泥来源于活性污泥处理系统排泥池。菌的接种量为 50 mL/18 L(接种后菌浓度为 1.63×10^6 CFU/mL),接种后置于实验室常温、连续曝气培养 9 d,每隔一定时间取样测定上清液中 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 、TN 含量和溶液 pH。重复试验 3 次,根据结果判定菌群对线路板氨氮废水处理的效能。

1.7 分析方法

COD 的测定采用快速消解分光光度法, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的测定采用纳氏试剂比色法, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的测定采用紫外分光光度法, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 的测定采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法,TP 的测定采用钼酸铵分光光度法,菌浓度的测定平板计数法,TN 和菌体细胞中的氮含量的测定采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法^[15-16]。

1.8 菌群 JQ8 中优势菌株的分离鉴定

1.8.1 菌群 JQ8 中优势菌株的分离纯化:取菌群 JQ8 活化培养液,梯度稀释后,将 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 浓度稀释液涂布于分离培养基琼脂平板上,每个稀释度做 3 个平行。30 ℃ 恒温培养 5-7 d,直到培养基上出现相互重叠的单菌落时停止培养,挑选不同形态的菌

落,反复转接划线纯化,直至得到纯的单菌落。

1.8.2 分离菌株的形态学及生理生化特征分析:菌株在分离培养基琼脂平板上 30 ℃ 培养 5 d,观察生长情况并镜检,生理生化鉴定参见文献[17-18]。

1.8.3 分离菌株的 16S rRNA 序列测定及同源性分析:采用 TIANamp Bacteria DNA Kit 试剂盒抽提分离菌株的基因组 DNA,采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,确定为目的片段后作为 DNA 模板进行 16S rRNA 序列扩增。PCR 反应引物采用 16S rRNA 通用引物(27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492r: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'); PCR 扩增程序为 95 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 7 min。采用琼脂糖电泳分析 PCR 产物的浓度和质量;PCR 产物经克隆后送往上海生物工程技术有限公司进行测序,所得 16S rRNA 序列经 BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行序列同源性比较,通过 MEGA 5.0 软件进行多重序列比对分析,并以 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,进化树分枝稳定性用 Bootstrap 分析,重复 1000 次。

2 结果和分析

2.1 氨氧化菌群的筛选

对来自污水处理系统活性污泥、工业废水、城市生活污水和垃圾渗滤液等不同环境的 9 个样品,以 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 作为唯一氮源,通过不断转接、淘汰其他菌,富集具有 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 去除能力的菌群。培养基中加入一定浓度的丁二酸钠和碳酸氢钠,是为了同时富集异养和自养氨氧化菌群。经过 3 个多月的富集、驯化、筛选,发现有菌群 JQ1、JQ5 和 JQ8 对 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的去除效率较好、较稳定,对 C/N 为 4.7、30.3 mmol/L 的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 处理 6 d 后,去除率均超过 90%,其中 JQ8 更达到 95.7%;但发现不接菌对照在第 8 天时 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 去除率达到 21.9%,且随时间的延长去除率不断升高(见表 2、图 1),推测可能是由于培养液中 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 浓度过高,在比较大的摇床转速下发生了氮吹脱作用。同时,检测发现除 JQ6 和 JQ9 外的 7 个菌群在富集过程中均有亚硝酸态氮和硝酸态氮的积累,说明它们均发生了氨氧化作用。

表 2. 氨氧化菌群的筛选
Table 2. Screening of AOB flora

t/d	Control	The remaining amount of NH ₄ ⁺ -N/(mmol/L)								
		JQ1	JQ2	JQ3	JQ4	JQ5	JQ6	JQ7	JQ8	JQ9
0	30.23	30.23	30.34	30.23	30.11	30.38	30.18	30.41	30.30	30.20
2	27.68	23.69	20.67	22.26	23.19	20.70	25.24	22.97	19.22	24.04
4	25.83	18.70	18.49	18.64	18.51	18.46	19.16	18.29	10.46	18.91
6	24.66	2.90	9.39	9.47	9.77	3.01	9.86	10.01	1.31	10.17
8	23.60	0.69	8.34	3.33	7.32	4.89	8.94	10.40	-	11.05
10	22.73	-	10.06	-	8.12	4.15	10.09	10.23	-	8.44

- : not detected.

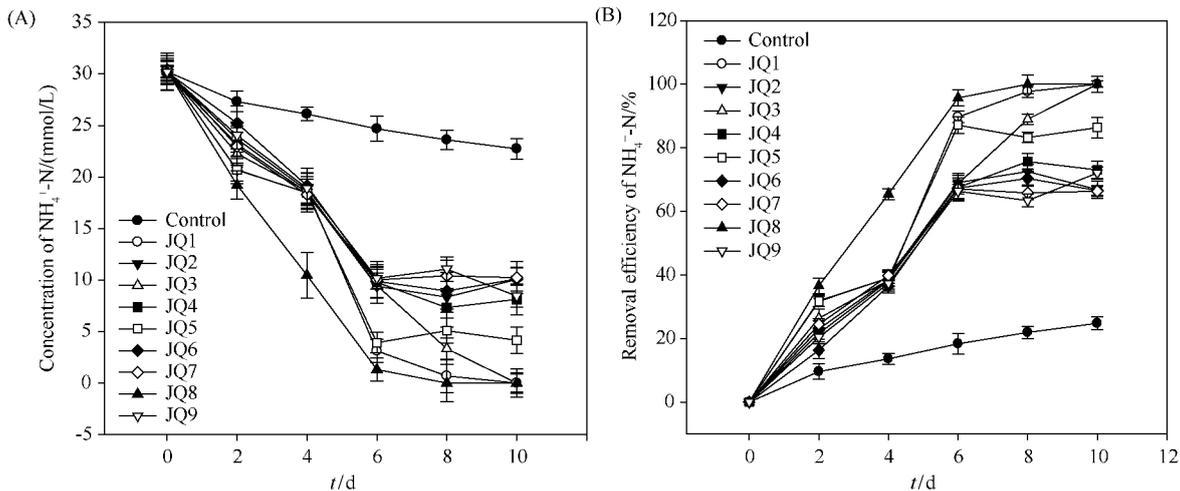


图 1. 氨氧化菌群对 NH₄⁺-N 的去除能力

Figure 1. Removal activity of AOB flora to NH₄⁺-N. A and B are change of NH₄⁺-N concentration and removal efficiency, respectively.

2.2 菌群对合成氨氮废水的处理效果

为了进一步验证,以初始 NH₄⁺-N 浓度为 17.86 mmol/L 的人工合成废水为对象,将培养时的摇床转速改为 160 r/min,考察了 JQ1、JQ3、JQ5 和 JQ8 四种菌群对 NH₄⁺-N 的去除能力。从图 2 可见,4 种菌群均对合成废水 NH₄⁺-N 表现出较好的去除能力,在 8 d 内可将 NH₄⁺-N 由初始浓度降至 2.14 mmol/L 以下;其中 JQ8 对 NH₄⁺-N 的去除速度较快、最为稳定,第 6 天废水 NH₄⁺-N 去除量就达到 17.36 mmol/L,去除率达到 97.01%。而不接菌的对照,在第 6 天和第 8 天时废水 NH₄⁺-N 含量仍为 (17.79 ± 0.10) mmol/L,最大下降量仅 0.2 mmol/L。因此,可以排除因培养液中 NH₄⁺-N 浓度过高,而在较高转速下产生的 NH₄⁺-N 被吹脱去除。综合考虑,选择 JQ8 作为考察菌群,进行下一步研究。

2.3 菌群 JQ8 的除氮特性

2.3.1 不同初始 NH₄⁺-N 浓度对菌群 JQ8 去除氨

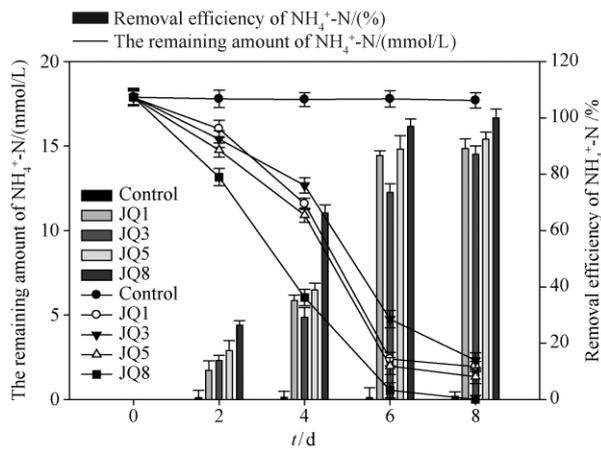


图 2. 氨氧化菌群对合成氨氮废水的净化能力

Figure 2. The purification ability of AOB flora on synthetic ammonium wastewater.

氮效率的影响:以 NH₄⁺-N 作为唯一氮源,保持测试培养液中 C/N 比为 5 不变,改变培养液的初始 NH₄⁺-N 浓度,30 °C、160 r/min 振荡培养 6 d,考察了

初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度对菌群 JQ8 去除 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 能力的影响,并分析不同 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度下菌群细胞中的氮和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的积累情况。

从图 3 可以看出,在 C/N 比不变的情况下, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度从 3.57 - 28.57 mmol/L 变化时,培养液中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 残留量小于 1.07 mmol/L, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率保持在 95% 左右,净除氮率逐渐升高,在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为 28.57 mmol/L 时达到最大 79.38%,这是由于培养液菌体细胞氮含量和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 积累量不与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的增量成线性关系导致。当初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度由 35.71 mmol/L 逐渐升高时,菌群对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除率和净出氮率开始下降,到 71.43 mmol/L 时培养液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的残留量达到 26.24 mmol/L, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率仅为 63.25%,净除氮率为 53.34%。由于 C/N 比不变,在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度升高的同时,菌群生长量逐渐增大,菌体细胞中氮含量和转化 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 积累的 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 量也开始增加,最大时分别达到 2.83、1.14 和 3.11 mmol/L。

因此,菌群 JQ8 具有较强的高氨氮耐受能力。在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度 ≤ 28.57 mmol/L 环境下,JQ8 可高效对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 进行去除,去除率可达到 95%;而当 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度 ≥ 35.71 mmol/L 时,对菌群 JQ8 去除氨氮有一定影响,氨氮去除率随 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度增加而不断下降。

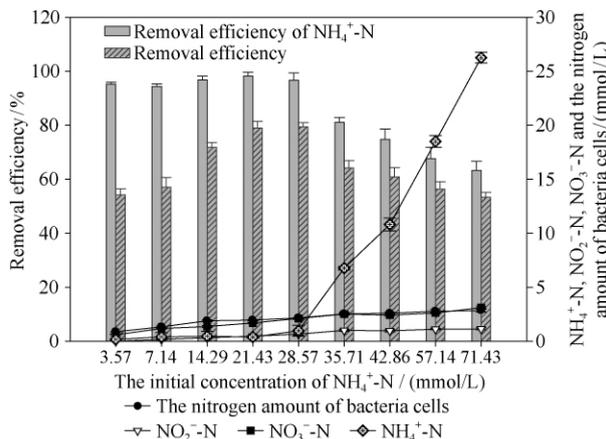


图 3. 初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度对氨氧化菌群 JQ8 去除氨氮效率的影响

Figure 3. Influence of initial ammonia nitrogen concentration on removal efficiency of AOB flora JQ8 to $\text{NH}_4^+\text{-N}$.

2.3.2 不同 C/N 比对菌群 JQ8 去除氨氮效率的影响:设置初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为 30.3 mmol/L,调整培养液中丁二酸含量,改变测试培养液的 C/N 比,30 °C、160 r/min 振荡培养 6 d,研究了菌群 JQ8 在不同 C/N 比条件下的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除能力。

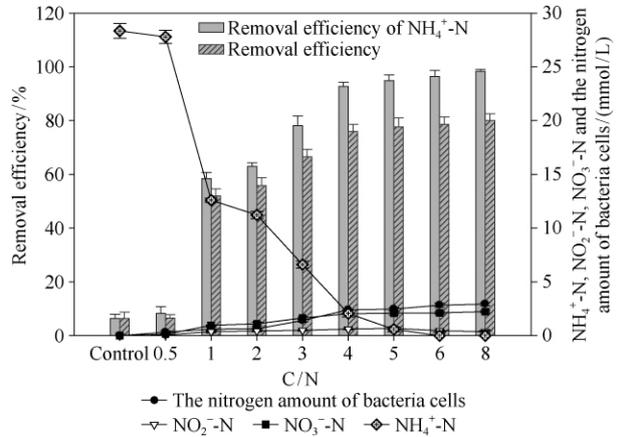


图 4. C/N 比对氨氧化菌群 JQ8 去除氨氮效率的影响

Figure 4. Influence of C/N on removal efficiency of AOB flora JQ8 to $\text{NH}_4^+\text{-N}$.

由图 4 可知,当 C/N = 0.5 时,菌群 JQ8 在培养液中几乎不生长,对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除率比不接菌对照仅高出 1.81%,对氨氮基本没有去除;当 C/N ≥ 1 时,随着 C/N 比不断增大,菌群在培养液中的生长量开始增大,对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除率不断升高, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的积累量开始增加。当 C/N 比上升到 4 时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率升至 94.87%,净除氮率达到 76.01%,其中有 2.4 mmol/L 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 用于菌体生长消耗,积累的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 达到 2.04 mmol/L;当 C/N 比升高到 5,并不断增加时,培养液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 几乎被完全去除, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率超过 95%,净除氮率接近 80%。通过以上研究表明,菌群 JQ8 具有一定的低 C/N 比耐受能力,在 C/N 为 1 时菌群 JQ8 对氨氮的去除率仍可达 58.6%;但 C/N 比越大菌群 JQ8 去除氨氮的效率越高。

2.3.3 不同摇床转速对菌群 JQ8 去除氨氮效率的影响:保持 C/N 比为 5、初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为 30.3 mmol/L 不变,研究了不同摇床转速培养条件下菌群 JQ8 对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除能力。由图 5 可见,培养 6 d 后,在厌氧和静置条件下,菌群几乎不生长,对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除作用较小;随着摇床转速不断增大,接菌处理的试验组和不接菌对照组 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率

均不断升高。在溶解氧水平由 120 r/min 变化到 160 r/min 时, 试验组 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 去除率和净除氮率递增明显, 160 r/min 时分别达到 89.25% 和 75.24%; 而对照组 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 去除率的递增量较小, 仅增加到 5.73%; 当超过 160 r/min 后, 虽然试验组 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 去除率和净除氮率均有提升, 但对照组 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 去除率增速更显著, 在 200 r/min 时去除率达到 34.32%, 说明溶解氧水平越高, 高浓度氨氮发生的氮吹脱作用越加明显。因此, 菌群 JQ8 在好氧培养条件下对氨氮具有较好的去除效率, 但对好氧条件并不苛刻。

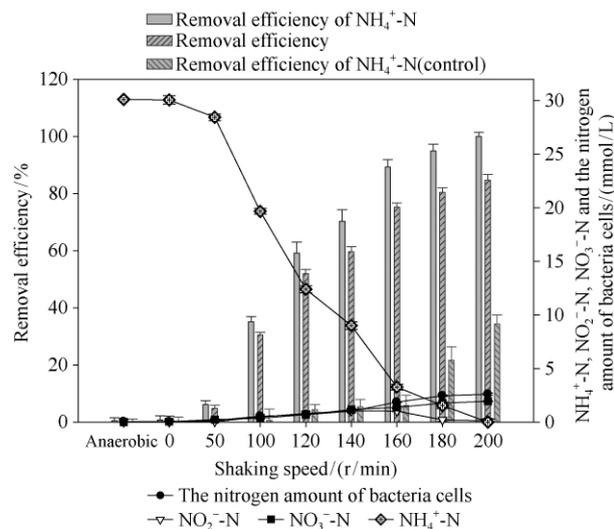


图 5. 摇床转速对氨氧化菌群 JQ8 去除氨氮效率的影响
Figure 5. Influence of shaking speed on removal efficiency of AOB flora JQ8 to $\text{NH}_4^+ - \text{N}$.

2.4 菌群 JQ8 对工业废水氨氮处理效果

从图 6 可以看出, 相比对照, 菌群对初始 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度为 5.61 mmol/L、C/N 为 3.5 的线路板工业废水中氨氮具有良好的去除效果, 但加泥的实验组效果优于未加泥实验组。加泥组处理 7 d 后, 废水中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、TN 含量分别下降至 0.68 mmol/L 和 1.96 mmol/L, 去除率分别达到了 87.8% 和 67.9%, 同时出现了少量的 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 积累; 在第 9 天时, 废水中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 再未检出, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量分别达到 0.27 mmol/L 和 0.86 mmol/L。而未加泥组, 菌群对废水中氨氮的去除速度缓慢, 去除率也较低, 在处理 7 d 后废水中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、TN 去除率分别为 63.2% 和 39.1%, 9 d 后废水中氨氮含量不再下降。相同接种量, 加泥组与未加泥组氨氮去除效

率截然不同, 分析原因可能是氨氧化菌群偏附着性生长, 污泥为菌群生长提供有利的生长载体, 使得菌群对线路板废水的耐毒性增强, 菌群得以迅速生长繁殖。

2.5 菌群 JQ8 中优势菌株的分离鉴定

经纯化后, 从中挑选出 3 株不同菌落和细胞形态特征的菌株, 依次命名为 JQ8-1、JQ8-2 和 JQ8-9。3 株菌在分离培养基琼脂平板上 30 °C 培养 5 d 后的菌落形态特征及生理生化特性如下。菌株 JQ8-1, 菌落白色、表面干燥、边缘不整齐, 直径 1.8 - 2.4 mm, 细胞短杆状, 革兰氏染色阴性, 硝酸盐还原阴性, 不产 H_2S 、不发酵葡萄糖。菌株 JQ8-2, 菌落圆形、橙色、表面湿润、边缘整齐, 直径 2.5 - 3.2 mm, 兼性厌氧生长, 细胞短杆状, 革兰氏染色阴性, VP 阴性, 硝酸盐还原阳性, 产 H_2S , 发酵葡萄糖。菌株 JQ8-9, 菌落黄绿色、表面干燥、边缘不整齐, 直径 1.5 - 2.1 mm, 细胞短杆状, 革兰氏染色阴性, VP 阴性, 硝酸盐还原阳性, 产 H_2S , 发酵葡萄糖。

对提取的菌株基因组 DNA 采用 16S rRNA 通用引物进行扩增, 得到了约 1500 bp 大小的扩增片段。扩增产物送往上海生工生物进行测序后, 序列结果在 NCBI 上经 BLAST 分析, 构建系统发育树 (图 7), 结合生理生化特征确定了 3 株菌的分类地位。

从图 7 可以看出, 菌株 JQ8-1 与废水杆菌属 (*Deffluvibacter* sp.) 和水微菌属 (*Aquamicrobium* sp.) 的几种细菌均位于进化树的同一类群, 与菌株 *Deffluvibacter* sp. QDZ-C、*Deffluvibacter lusatiensis* strain UAM8 和 *Aquamicrobium lusatiense* strain ADC-22 的相似度均达到了 97%; 菌株 JQ8-2 与副球菌属 (*Paracoccus* sp.) 的细菌的模式株均位于进化树的同一类群, 与菌株 *Paracoccus versutus* strain GW1、*Paracoccus* sp. P1A、*Paracoccus thiophilus* strain AS001 的相似度均为 99%; 菌株 JQ8-9 与水微菌属 (*Aquamicrobium* sp.) 细菌位于进化树的同一分支, 且与菌株 *Aquamicrobium* sp. H14 的相似度为 99%。结合菌株的形态学特征和生理生化特性, 最后确认 JQ8-1 为 *Deffluvibacter* sp. 细菌、JQ8-2 为 *Paracoccus* sp. 细菌、JQ8-9 为 *Aquamicrobium* sp. 细菌, 3 株菌在 GenBank 中的 Accession No. 分别为 KP751407、KP751408、KP751409。

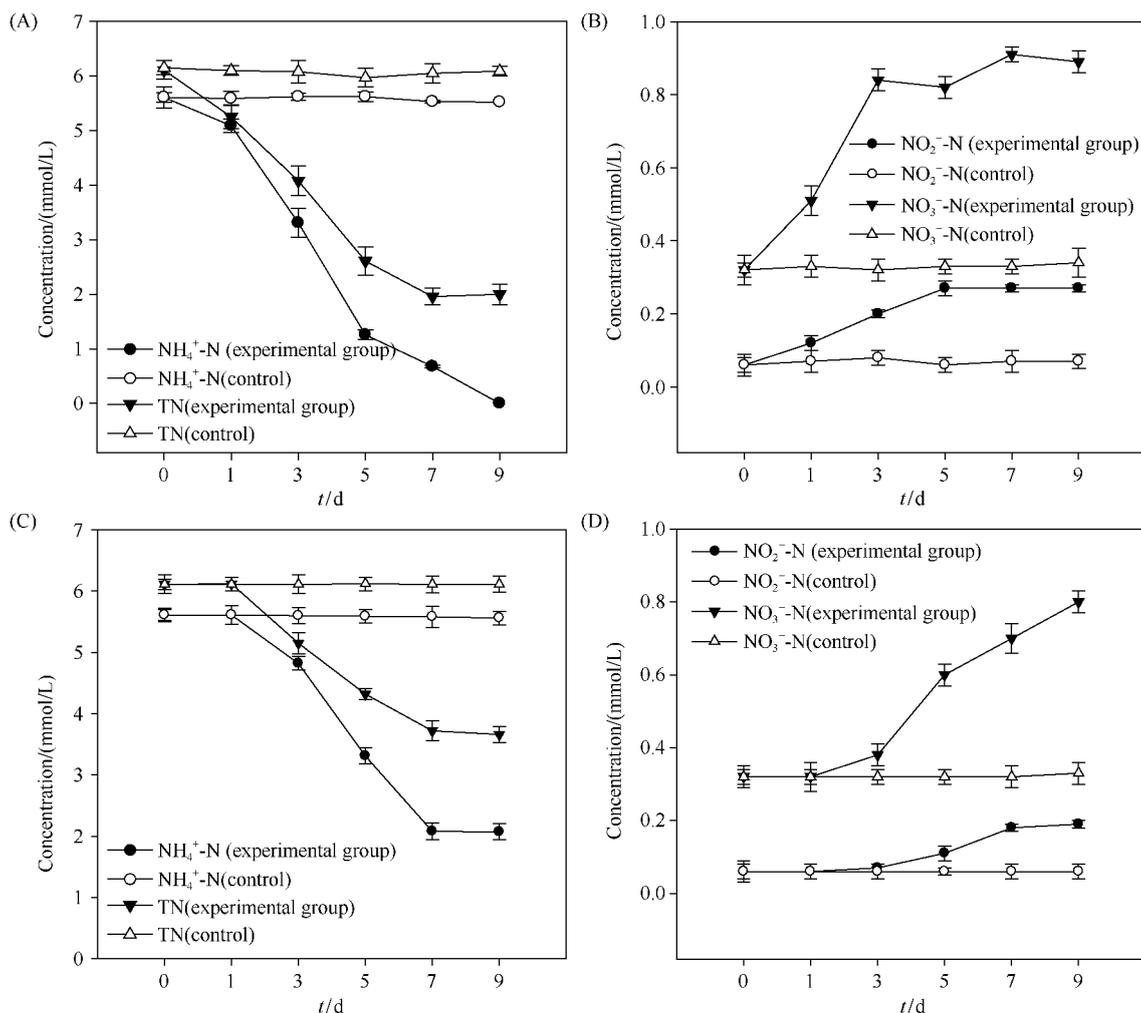


图 6. 氨氧化菌群 JQ8 对线路板废水氨氮去除效果

Figure 6. The removalability of AOB flora JQ8 to $\text{NH}_4^+\text{-N}$ on brandboard wastewater. A and B are mud wastewater group, C and D are wastewater group.

3 讨论

自 19 世纪发现 AOB 以来,多数学者致力于分离筛选 AOB 菌株的研究,但由于 AOB 生长周期长,且对氧浓度、水质组成和温度等因素敏感,很难筛选得到纯的菌株^[4]。随着人们对氨氧化菌群结构和多样性研究的不断深入,发现以菌群形式实现氨氧化,提升污水处理系统的氨氮脱除效率是一个很好的途径。曲洋等利用 4 种菌构成的异养硝化/好氧反硝化菌群强化 SBR 反应器对含海水污水氨氮进行处理,强化后系统 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率和亚硝化率比原系统高出 6.85% 和 14.47%^[19]。但人工分

离培养的菌株在自然界中仅占到存在菌株总量的 1% 左右,未分离的菌株与分离菌株间可能存在着协同关系^[20],人工构建菌群在实际应用中要大打折扣。如司文攻等分别用异养硝化菌单菌株构建的 N4 + N5 + N6 复合菌和筛选单菌时的富集驯化菌液处理初始氨氮浓度为 18.7 mmol/L 的人工废水,48 h 后氨氮去除率分别为 88.2% 和 96.9%,后者比前者高出 14.7%^[21]。

目前,国内外对氨氧化菌群的筛选研究仅有为数不多的报道。何晓红等报道的氨氧化菌群 AHAA-4,在连续式好氧硝化混合器 (CSTR) 中氨氧化负荷最高可达 97.57 mmol/L,是目前国内研究最为突出的^[22]。与 AHAA-4 相比,保持 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除

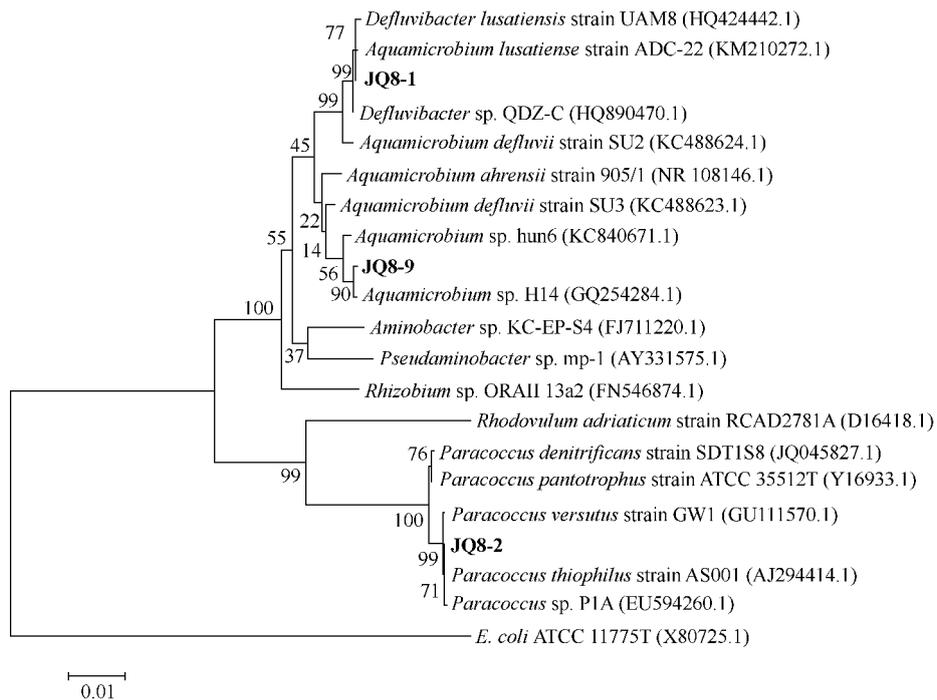


图 7. 基于 16S rRNA 的菌株系统发育树

Figure 7. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence.

率在 95% 以上, JQ8 最高耐受氨氮浓度达 35.71 mmol/L, 可达到 AHAA-4 在 CSTR 中的启动初期水平, 但 JQ8 在低 C/N 比耐受性上表现更佳。李焕等富集的氨氧化菌群在氨氮初始浓度小于 14.29 mmol/L 时, 7 d $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 去除率达到 85%, 但当氨氮浓度升高到 30.3 mmol/L 时去除率不到 40%^[23]; 徐璐等从污水处理厂 SBR 池活性污泥中筛选的氨氧化菌群, 对初始氨氮浓度为 5 mmol/L 的氨氧化培养基, 4 d $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 去除率可达到 81.4%^[24]。JQ8 菌群与李焕、徐璐等筛选的氨氧化菌群相比, 在高浓度氨氮耐受能力和去除率上更优。

污水处理生化系统中, 水质的 C/N 比对氨氮去除有直接影响。当 C/N 比小于 5 或更低时, 系统内营养物质失衡, 异养硝化菌和反硝化菌的生长会受到营养供应限制, 细胞量严重不足, 造成氨氮去除效率下降。菌群 JQ8 具有较强的 C/N 比耐受性, C/N 比为 3 时 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 去除率仍可达 80%。已发现的绝大多数的异养硝化菌, 需要通过外加碳源, 在 C/N 比 ≥ 8 时才能对氨氮显现出良好的去除效果^[25], 这势必增加了污水处理成本。目前达到与 JQ8 有相同 C/N 比耐受能力的菌株的报道还较少。通过模拟

好氧污水处理系统, 处理实际的低 C/N 比线路板工业废水, 7 d 后 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 TN 去除率分别可达到 87.8% 和 67.9%, 效果显著, 表现出很强的实际应用性。菌群 JQ8 为好氧氨氧化菌, 但对氧浓度水平要求不高。结合活性生物填料及固定化微生物技术, 将菌群 JQ8 用于序批式间歇活性污泥法 (SBR)、膜生物反应器 (MBR)、氧化沟等常用污水好氧处理工艺强化氨氮处理, 具有广阔应用前景。

从菌群 JQ8 中分离培养得到的 3 株优势菌 JQ8-1、JQ8-2 和 JQ8-3, 经菌落形态特征和生理生化鉴定及 16S rRNA 序列分析, 确定分别为 *Defluviobacter* sp. 细菌、*Paracoccus* sp. 细菌和 *Aquamicrobium* sp. 细菌。该 3 个属内菌株, 肖继波、潘丹、刘杰等在污水处理中均有分离^[26-28]。在菌群的氨氧化特性考察中, 发现溶液中虽有一定量的亚硝酸盐和硝酸盐氮的积累。但处理前后溶液的氮含量并不守恒, 因此推测菌群 JQ8 中不仅包含自养/异养氨氧化菌, 可能还有异养硝化菌和反硝化菌, 其对氨氮的去除主要以 N_2 、 N_2O 等气态形式氮除去。氨氧化菌胞内存在一种特有酶——氨单加氧酶, 组成酶的其中一个 *amoA* 亚基可以编码氨氧化过程中涉及的蛋白酶, 是该酶

的活性位点,可催化铵氧化成羟胺^[29],为氨氧化菌提供能量。通过对氨单加氧酶 *amoA* 基因序列分析,可以反映出环境中氨氧化菌的种类、数量和活性。因此,通过扩增 *amoA* 基因,可利用 Real-Time PCR、PCR-DGGE 等技术,对菌群 JQ8 完成氨氧化的机理及菌群在废水中的迁移变化作进一步研究。

参考文献

- [1] 环境保护部. 2013 年环境统计年报(废水). 北京: 环境保护部, 2013.
- [2] 马秀兰. SBR 法生物强化处理低温低 C/N 比污水的研究. 吉林大学博士学位论文, 2010.
- [3] Xing XH, Jun BH, Yanagida M, Tanji Y, Unno H. Effect of C/N values on microbial simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous substances in wastewater by single continuous-flow fluidized-bed bioreactor containing porous carrier particles. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, 5 (1): 29-37.
- [4] Kowalchuk GA, Stephen JR. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55: 485-529.
- [5] Qiao S, Liu XJ, Zhou JT. Research progress of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification in biological denitrification. *Journal of Safety and Environment*, 2014, 14 (2): 128-135. (in Chinese)
乔森, 刘雪洁, 周集体. 异养硝化-好氧反硝化在生物脱氮方面的研究进展. *安全与环境学报*, 2014, 14 (2): 128-135.
- [6] Zimmo OR, Van der Steen NP, Gijzen HJ. Comparison of ammonia volatilisation rates in algae and duckweed-based waste stabilisation ponds treating domestic wastewater. *Water Research*, 2003, 37 (19): 4587-4594.
- [7] Zhang B, Sun BS, Liu HN, Huang CF, Ji M. Analysis and succession of ammonia-oxidizing bacterial community structure in membrane bioreactor. *Journal of Tianjin University*, 2009, 42 (1): 65-71. (in Chinese)
张斌, 孙宝盛, 刘慧娜, 黄翠芳, 季民. 膜生物反应器中氨氧化菌群落结构的演替与分析. *天津大学学报*, 2009, 42 (1): 65-71.
- [8] Bodelier PLE, Roslev P, Henckel T, Frenzel P. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature*, 2000, 403 (6768): 421-424.
- [9] Tano-Debrah K, Fukuyama S, Otonari N, Taniguchi F, Ogura M. An inoculum for the aerobic treatment of wastewater with high concentrations of fats and oils. *Bioresource Technology*, 1999, 69 (2): 133-139.
- [10] Ding AZ, Zhang ZZ, Fu JM, Cheng LR. Biological control of leachate from municipal landfills. *Chemosphere*, 2001, 44 (1): 1-8.
- [11] 罗国维, 林世光, 彭金海. 工业废水处理技术研究及应用. 广州: 华南理工大学出版社, 1992.
- [12] Jiang YB. Characteristics of high solution bacteria technique and its application to Hi-Concentration wastewater treatment. *Water Resources Protection*, 2001, (2): 23-24, 34. (in Chinese)
江耀斌. H. S. B. 技术的特点及其在高难度废水处理中的应用. *水资源保护*, 2001, (2): 23-24, 34.
- [13] Belser LW, Schmidt EL. Diversity in the ammonia-oxidizing nitrifier population of a soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 36 (4): 584-588.
- [14] Yang XL, Li WM, Chen Y, Cao YS. Identification and denitrification of an aerobic bacterium. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (8): 1062-1070. (in Chinese)
杨小龙, 李文明, 陈燕, 曹郁生. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其除氮特性. *微生物学报*, 2011, 51 (8): 1062-1070.
- [15] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [16] 朱旭芬. 现代微生物学实验技术. 杭州: 浙江大学出版社, 2011.
- [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.
- [18] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984.
- [19] Qu Y, Zhang PY, Yu DS, Guo SS, Yang RX. Bioaugmentation for shortcut nitrification in SBR treating for sewage containing sea water by nitrification-aerobic denitrification bacteria. *Environmental Science*, 2010, 31 (10): 2376-2384. (in Chinese)
曲洋, 张培玉, 于德爽, 郭沙沙, 杨瑞霞. 异养硝化/好氧反硝化菌生物强化含海水污水的 SBR 短程硝化系统初探. *环境科学*, 2010, 31 (10): 2376-2384.
- [20] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995, 59 (1): 143-169.

- [21] Si WG, Lv ZG, Xu C. Isolation of heterotrophic nitrifiers which can tolerate high concentration of ammonia-nitrogen and the optimization of their nitrogen removal efficiency in wastewater. *Environmental Science*, 2011, 32 (11): 3448-3454. (in Chinese)
司文攻, 吕志刚, 许超. 耐受高浓度氨氮异养硝化菌的筛选及其脱氮条件优化. 环境科学, 2011, 32 (11): 3448-3454.
- [22] He XH, Yang N, Tao Y, Li DP, Li W, Ding Y. Shortcut nitrification of high ammonia concentration wastewater and ammonia-oxidizing bacterial community. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19 (2): 313-317. (in Chinese)
何晓红, 杨暖, 陶勇, 李大平, 李伟, 丁勇. 高浓度氨氮废水短程硝化及氨氧化菌群分析. 应用与环境生物学报, 2013, 19 (2): 313-317.
- [23] Li H, Wang QH, Sun XH, Wang XM, Qiu TL. Domestication and enrichment of high concentration of ammonia oxidation bacteria and its dynamic change analysis. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6 (5): 1548-1552. (in Chinese)
李焱, 汪群慧, 孙晓红, 王旭明, 仇天雷. 高效氨氧化菌群富集、驯化及其动态变化规律分析. 环境工程学报, 2012, 6 (5): 1548-1552.
- [24] Xu L, Liu DF, Gao F, Zhang GW, Yu J, Liu J, Wei YS. Screening of ammonia-oxidizing bacteria and optimization of fermentation conditions. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8 (7): 3063-3068. (in Chinese)
徐璐, 刘东方, 高芳, 张国威, 于洁, 刘杰, 魏岩松. 氨氧化菌群的筛选及发酵条件的优化. 环境工程学报, 2014, 8 (7): 3063-3068.
- [25] Liu ZP, Liu SJ. Advances in the molecular biology of nitrifying microorganisms. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2004, 10 (4): 521-525. (in Chinese)
刘志培, 刘双江. 硝化作用微生物的分子生物学研究进展. 应用与环境生物学报, 2004, 10 (4): 521-525.
- [26] Xiao JB, Jiang HX, Chu SW. Isolation and identification of aerobic denitrifying bacterium *Deffluwibacter lusatiensis* strain DN7 and its heterotrophic nitrification ability. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23 (7): 1979-1984. (in Chinese)
肖继波, 江惠霞, 褚淑祎. 好氧反硝化菌 *Deffluwibacter lusatiensis* str. DN7 的分离鉴定和异养硝化性能. 应用生态学报, 2012, 23 (7): 1979-1984.
- [27] Pan D, Huang QY, Chen WL. Screening and identification of two heterotrophic nitrifying bacteria and characterization of their capacity for nitrogen removal. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (10): 1382-1389. (in Chinese)
潘丹, 黄巧云, 陈雯莉. 两株异养硝化细菌的分离鉴定及其脱氮特性. 微生物学报, 2011, 51 (10): 1382-1389.
- [28] 刘杰. 生物膜反应器用于污水脱氮除磷的研究. 浙江大学硕士学位论文, 2011.
- [29] Stephen JR, Chang YJ, Macnaughton SJ, Kowalchuk GA, Leung KT, Flemming CA, White DC. Effect of toxic metals on indigenous soil β -subgroup proteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (1): 95-101.

Screening and ammoxidation characteristics of an ammonium oxidizing bacteria group

Xiaolong Yang¹, Lihua Liu², Bingqi Wu¹, Shujie Liu^{1*}, Fuming Chen¹

¹Shenzhen Environmental Microbiology Resources Development and Application Engineering Laboratory, Research Institute of Tsinghua University in Shenzhen, Shenzhen 518057, Guangdong Province, China

²Guangdong Provincial Key Laboratory of Durability for Marine Civil Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] This study aimed to screen high-performance ammonia oxidizing bacteria (AOB) resistant to a high concentration of ammonia-nitrogen and low C/N ratio, for the development of novel AOB agents. [Methods] Multi-point sampling, compulsory domestication, gradient dilution of domestication liquid were conducted to screen AOB with efficient and stable ammonia-nitrogen removing ability, and effects of different factors on its ammoxidation ability including C/N ratio, shaking speed and ammonia-nitrogen concentration were studied. Dominant strains were screened and identified by morphological observation, physiological and biochemical properties test and 16S rRNA sequence analysis.

[Results] Three efficient AOB were obtained, among them a micro-flora named JQ8 showed the highest activity. The ammonia-nitrogen removal rate reached 95.07% in a simulated wastewater with 17.86 mmol/L of initial ammonia-nitrogen at C/N 4 treated by JQ8 for 6 days. Moreover, its ammonia nitrogen removal rate kept above 95% and net nitrogen removing rate nearly 80% in the solution with a C/N ratio above 4 and an NH_4^+ -N concentration below 28.57 mmol/L. The circuit board industry wastewater was treated using the laboratory-simulated aerobic active sludge disposal system. The removal rate of NH_4^+ -N and total nitrogen reached 87.8% and 67.6% respectively after 7 days' treatment using JQ8. *Deffluibacter* sp., *Paracoccus* sp. and *Aquamicrobium* sp. were identified as the dominant strains after the composition analysis of JQ8. [Conclusion] An ammonia oxidizing bacteria consortium JQ8 screened from the landfill leachate showed a strong ammonium-nitrogen removal and endurance ability under low C/N ratio and high ammonia-nitrogen concentration, thus is probably applicable to intensify the ammonia-nitrogen removal treatment of industrial wastewater with sewage disposal system.

Keywords: ammonium oxidizing bacteria, screening, removal ammonium characteristics, strain identification

(本文责编:李磊)

Supported by the Science and Technology Research Foundation of Shenzhen city (KJYY20130905154610633)

* Corresponding author. Tel: +86-755-26712692; Fax: +86-755-26559956; E-mail: liusj@tsinghua-sz.org

Received: 25 March 2015/Revised: 17 June 2015