



贫营养好氧反硝化菌群的水库原位投菌脱氮特性

周石磊, 黄廷林*, 白士远, 何秀秀

西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 陕西 西安 710055

摘要: 【目的】分析水深和温度对好氧反硝化菌群的影响并探索其脱氮特性, 以为微污染水库水生物脱氮提供依据。【方法】从微污染水源水库表层沉积物中富集、驯化、筛选得到贫营养好氧反硝化混合菌群; 应用好氧反硝化混合菌进行硬质瓶子和软质瓶子水库原位投菌实验分析其脱氮性能。【结果】实验结果表明: 硬质瓶子系统(无水压影响)各个水深下的硝氮完全去除, 软质瓶子(有水压影响)在0.5、5.0 m达到90.66%和100%, 其余水深最大为99.61%、80.55%、67.01%和64.73%; 亚硝氮并没有出现积累; 氨氮由于实验后期菌体的死亡略有上升; 水深0.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 m下的总氮在实验结束时, 硬质瓶子的去除率达到50.11%、61.49%、56.24%、44.50%、36.80%和38.73%, 软质瓶子达到33.47%、60.61%、43.98%、36.28%、27.52%和28.57%; OD_{600} 与pH都出现先升后降的变化, DO在3–8 mg/L。混合菌在11–30 °C表现出很好的脱氮能力, 并随着温度上升而增加; 水压对脱氮有不利影响。【结论】该混合菌温度适应性很强, 静水压对其脱氮过程有抑制作用。

关键词: 贫营养, 好氧反硝化, 混合菌, 原位, 生物脱氮

近年来, 随着氮素的不断涌入, 天然水体的水质污染越来越重^[1-5]。现如今, 众多城市已将湖泊、水库等地表水作为主要供水水源。水源水质微污染控制已成为当前供水领域的研究热点^[6-7], 而控制氮源污染是解决水体微污染问题的重要环节^[8]。生物除氮因其低成本环保的优点成为当前的研究重点^[9]。然而, 传统的生物脱氮^[10]为好氧条件下的硝化, 厌氧、缺氧条件下的反硝化, 脱氮过程因受溶解氧的限制, 因而在天然水体中难以应用。

好氧反硝化菌是在有氧条件下, 利用好氧反硝化酶进行反硝化作用的一类脱氮菌。随着好氧反硝化菌的发现, 因其具有的独特优势^[11-12]: (1) 硝化过程和反硝化过程能在统一体系中进行, (2) 反硝化过程产生的碱能部分中和硝化过程产生的酸, 维持体系pH的稳定, 使其成为近年来脱氮研究的热点。近年来, 好氧反硝化菌的应用主要集中在污废水的脱氮上: Bouchez等^[13]将*M. aerodenitrificans*包埋于藻朊酸盐中, 投加于传统硝化反应器中, 用于市政废水处理, HN-AD脱氮

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAC04B02)

*通信作者。Tel: +86-29-82201038; Fax: +86-29-82202729; E-mail: huangtinglin@xauat.edu.cn

收稿日期: 2015-06-14; 修回日期: 2015-07-31; 网络出版日期: 2015-10-21

率达26.8%；Joo等^[14]使用*Alcaligenes faecalis*处理猪场废水，总氮去除率高于65%。庞长洸等^[15]通过快速富集驯化得到1组低温好氧反硝化菌群，其在10 °C好氧环境下可实现氨氮、总氮和有机物的高效同步去除。有很多报道表明，应用混合菌技术达到去除污染的效果。杨强等^[16]从水环境样品中富集培养的具有亚硝化功能的混合微生物对氨氮有很好的去除效果，于鲁冀等^[17]应用混合菌去除河水氨氮，郭雅妮等^[18]进行的PVA降解混合菌处理模拟废水的试验，刘江红等^[19]用混合菌降解含聚污水的试验研究。表明应用混合菌去除污染方面具有很强的优势。然而，有关贫营养好氧反硝化混合菌的脱氮研究却鲜有报道。

本论文结合本课题组之前的研究^[8,20-26]，从水库沉积物中富集、驯化、筛选得到高效脱氮的好氧反硝化混合菌。通过进行水库原位挂瓶实验考察水深以及温度对于混合菌的脱氮影响，为以后微污染水源水的生物修复提供技术支撑的依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集及实验装置

从山东某水库(34°56'31.41"N, 117°41'95.57"E)，采用彼得森采泥器采集表层0–10 cm沉积物，然后装于灭菌取样瓶子，放置在装有冰袋的泡沫箱内，24 h内运回实验室，待用。实验装置为15 L的硬质塑料瓶(材质不能传递压力不受压力影响)和软质塑料瓶(可传递水体压力受压力影响)，实验过程中向实验系统中装液14 L，余留空间维持溶液中的DO浓度。所装培养基所需水量很大由表层地下水(井水)配制。密封后放置于水库不同深度进行实验，每12 h取样测定DO和pH，并利用便携式充氧泵维持各个瓶内的DO浓度。

1.2 培养基

反硝化液体培养基^[23-26] (g/L): CH₃COONa 0.1; NaNO₃ 0.02; K₂HPO₄·3H₂O 0.02; CaCl₂

0.01; MgCl₂·6H₂O 0.01; 表层地下水1000 mL; pH 7.0–7.5; 121 °C、灭菌30 min。

1.3 好氧反硝化混合菌的富集、驯化和筛选

取一定水库底泥(约200 mL)置于5 L的玻璃瓶子，通过空气泵间歇曝气，控制溶解氧在4–6 mg/L下培养。注入50%配水+50%源水的培养基，进行培养；3 d后更换培养基为75%的配水+25%源水培养；3 d后更换培养基为100%的配水培养3 d；3 d后更换为100%的配水培养3 d；3 d后更换75%配水+25%源水培养；3 d后更换50%配水+50%源水培养；3 d后更换25%配水+75%源水培养。整个驯化富集阶段约为21 d，期间取一定水样投加到配水中进行摇瓶实验测定其脱氮特性，得到10#高效反硝化混合菌。

1.4 水库水体温度分布

通过对水库0.5、5.0、7.5、10.0、12.5和15.0 m水深在0、36、48、60、72、84、96、120、144和168 h的水温进行测定，得到水库水体的温度分布情况。

1.5 水库原位投菌实验

将甘油贮存的混合菌液按照体积比1%接种到装有100 mL反硝化液体培养基的250 mL的锥形瓶中，在30 °C、120 r/min条件下培养24 h，得到活化菌液。按照体积比1%投加活化菌到15 L的硬质瓶子和软质瓶子系统中，放置水库中定时取样测定硝氮、亚硝氮、氨氮、总氮、溶解性总氮来反映混合菌的脱氮特性，测定TOC反映异养除碳特性，测定OD₆₀₀、DO和pH来反映混合菌的生长状况。

1.6 水质分析方法

细菌菌密度采用DR6000 (HACH, 美国) 测定600 nm的吸光度。硝氮、亚硝氮、氨氮和总氮采用分光光度计测定^[27]。具体如下，硝氮采用紫外分光光度法，亚硝氮为N-(1-萘基)-乙二胺光度法，氨氮为纳式试剂分光光度法，总氮和溶解性

总氮为过硫酸钾氧化-紫外分光光度法, TOC采用TOC分析仪(ET1020A, 上海), T和DO由HQ30d (HACH, 美国)测定, pH由HQ11d (HACH, 美国)测定。硝氮、亚硝氮、氨氮、溶解性总氮的水样经0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤进行预处理。

2 结果和分析

2.1 水库温度梯度与原位实验装置

图1-A表示硬质瓶子原位投菌装置示意图, 图1-B表示软质瓶子原位投菌装置示意图, 图1-C表示水库温度分布情况。水库原位混合菌株挂瓶系统, 在0–168 h内的各个挂瓶深度的温度保持稳定。在表层0.5 m的温度为(28.51 \pm 0.45) $^{\circ}\text{C}$; 5.0 m的温度为(27.14 \pm 0.23) $^{\circ}\text{C}$; 7.5 m的温度为(18.32 \pm 0.73) $^{\circ}\text{C}$; 10 m的温度为(13.59 \pm 0.25) $^{\circ}\text{C}$; 12.5 m的温度为(12.15 \pm 0.22) $^{\circ}\text{C}$; 15 m的温度为(11.48 \pm 0.18) $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 水库硬质瓶子原位投菌实验

2.2.1 水库硬质瓶子原位投菌实验的氮素变化情况: 从图2-A和图2-B中可以看到, 硬质瓶子的投

菌实验表明: 随着水深的加深, 水库水体的温度从表层0.5 m的(28.51 \pm 0.45) $^{\circ}\text{C}$; 5.0 m的(27.14 \pm 0.23) $^{\circ}\text{C}$; 7.5 m的(18.32 \pm 0.73) $^{\circ}\text{C}$; 10 m的(13.59 \pm 0.25) $^{\circ}\text{C}$; 12.5 m的(12.15 \pm 0.22) $^{\circ}\text{C}$; 变化到15 m的(11.48 \pm 0.18) $^{\circ}\text{C}$ 。研究表明反硝化过程对温度很敏感, 温度每升高4 $^{\circ}\text{C}$ 、反硝化速率加倍^[28]。从图2可以看到, 随着温度的降低, 硝氮的去除率下降。在0.5 m的硬质瓶子的硝氮最先去, 在60 h表层0.5 m的硝氮去除率达到96.19%; 5.0 m水深在60 h的硝氮去除率达到100%; 7.5 m的硝氮在84 h的去除率达到100%; 10.0 m水深的硬质瓶子在96 h的硝氮去除率达到100%; 12.5和15.0 m水深的硬质瓶子在144 h的硝氮去除率达到100%。该系统的硝氮去除效果优于本课题组之前的研究^[22–23,26,29]。实验结果显示随温度上升, 硝氮去除效果越好。

图2-C中投菌系统的实验结束时的亚硝氮并没有出现积累, 亚硝氮开始上升然后出现降低, 随着水深的增加亚硝氮出现上升的情况逐渐滞后,

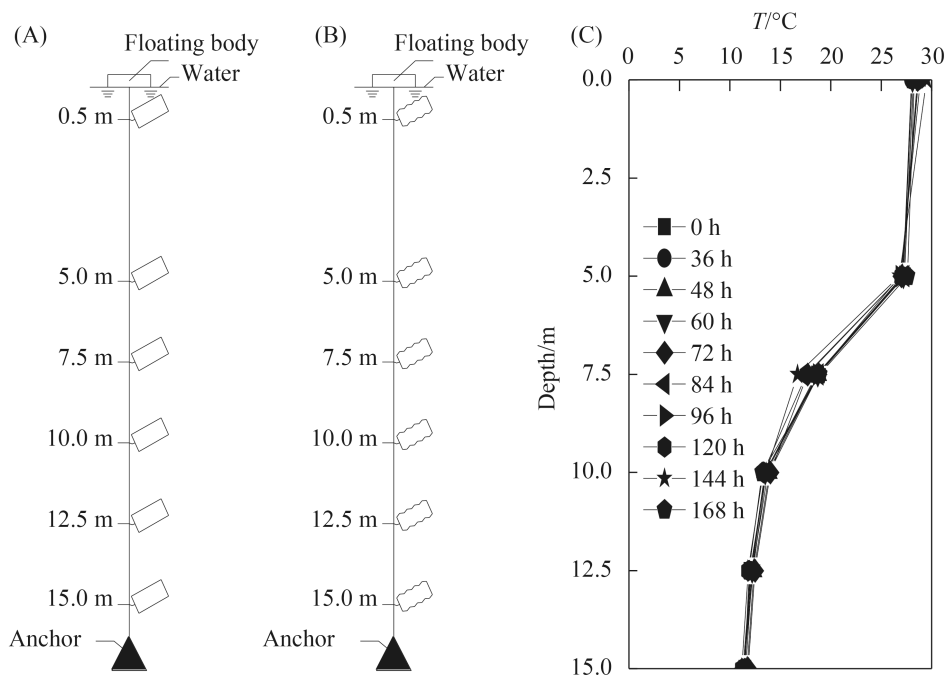


图 1. 原位投菌实验装置和水库温度分布情况

Figure 1. In-situ experimental equipment (A, B) and temperature distribution of the reservoir (C).

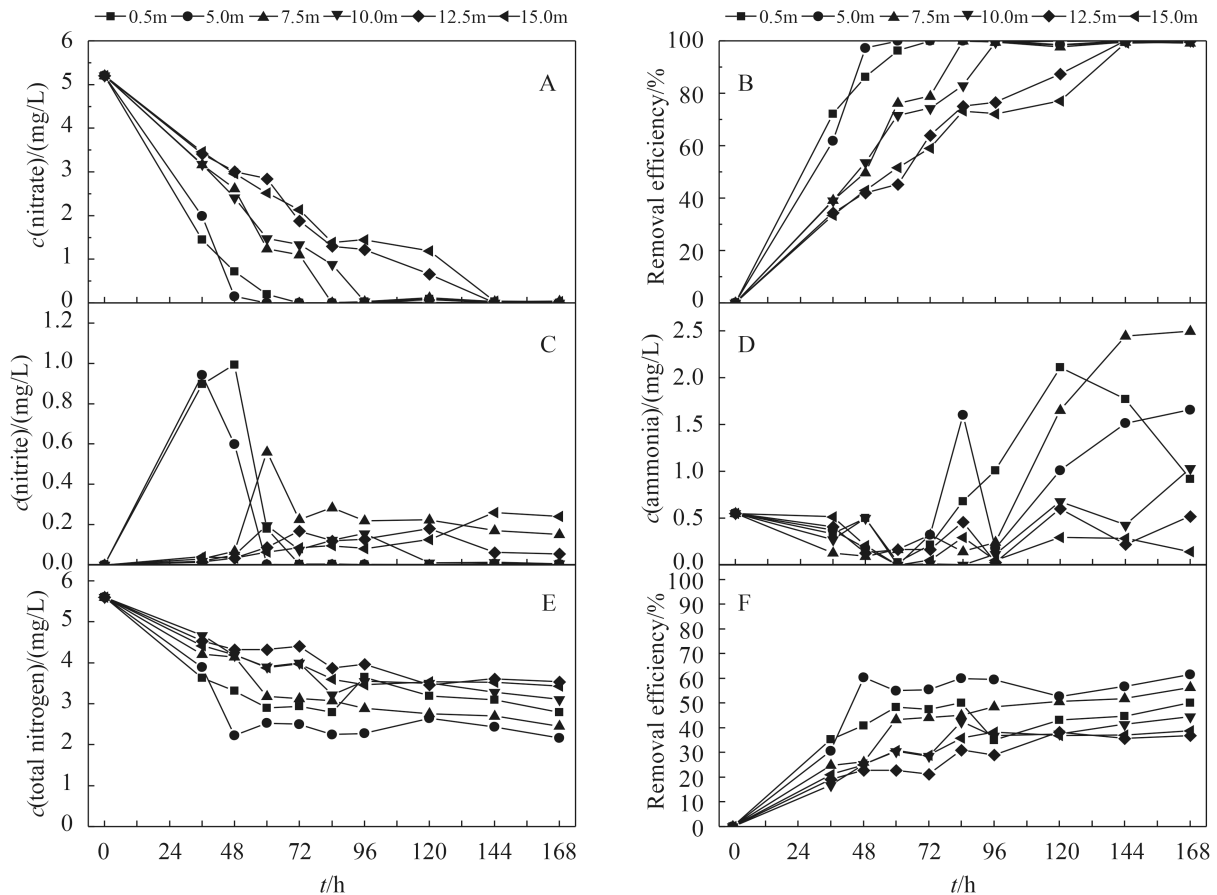


图 2. 水库硬质瓶子原位投菌实验的氮素变化情况

Figure 2. Changes of nitrogen concentrations in hard flask experiment system. A: changes of nitrate concentration; B: removal efficiency of nitrate; C: changes of nitrite concentration; D: changes of ammonia concentration; E: changes of total nitrogen concentration; F: removal efficiency of total nitrogen concentration.

亚硝氮是氮循环过程的中间产物，亚硝氮的变化反映反硝化的进行。表层和中层的菌体生长速度快，在72 h菌体在末期出现死亡，菌液的OD值开始下降，而体系中的氨氮开始上升；其他水深的硬质瓶子体系在96 h后随着OD值的下降，氨氮开始上升。从图2-D中菌密度的变化情况间接说明氨氮上升。从图2-E和图2-F中看到结束时总氮表层0.5 m和5.0 m的去除率最高达到50.11%和61.49%，说明0.5 m和5.0 m硬质瓶子反应器中有50.11%和61.49%的氮素转化为气体形式去除。其他深度的硬质瓶子反应器总氮去除率达到56.25%、44.50%、36.80%和38.73%。随着温度的上升，硝氮和总氮的去除

都有明显的增加，而且软质瓶子投菌系统也有同样的变化。相比于本课题组之前的相关研究，对于温度混合菌有很强的适应性。

2.2.2 水库硬质瓶子原位投菌实验的其他指标变化情况：图3-A和图3-B中看到溶解性总氮表层0.5 m中看到溶解性总氮表层在72 h达到94.40%；5.0 m在72 h达到97.37%；7.5 m在84 h达到94.05%；10.0 m在96 h达到94.40%；12.5 m在144 h达到94.75%；15.0 m在144 h达到89.67%。表层0.5和5.0 m最先达到很高的脱氮效果；C/N从初始的6.25，60 h的C/N表层达到1.61；5.0 m达到2.57；7.5 m达到2.87；10.0 m达到3.49；12.5 m达到

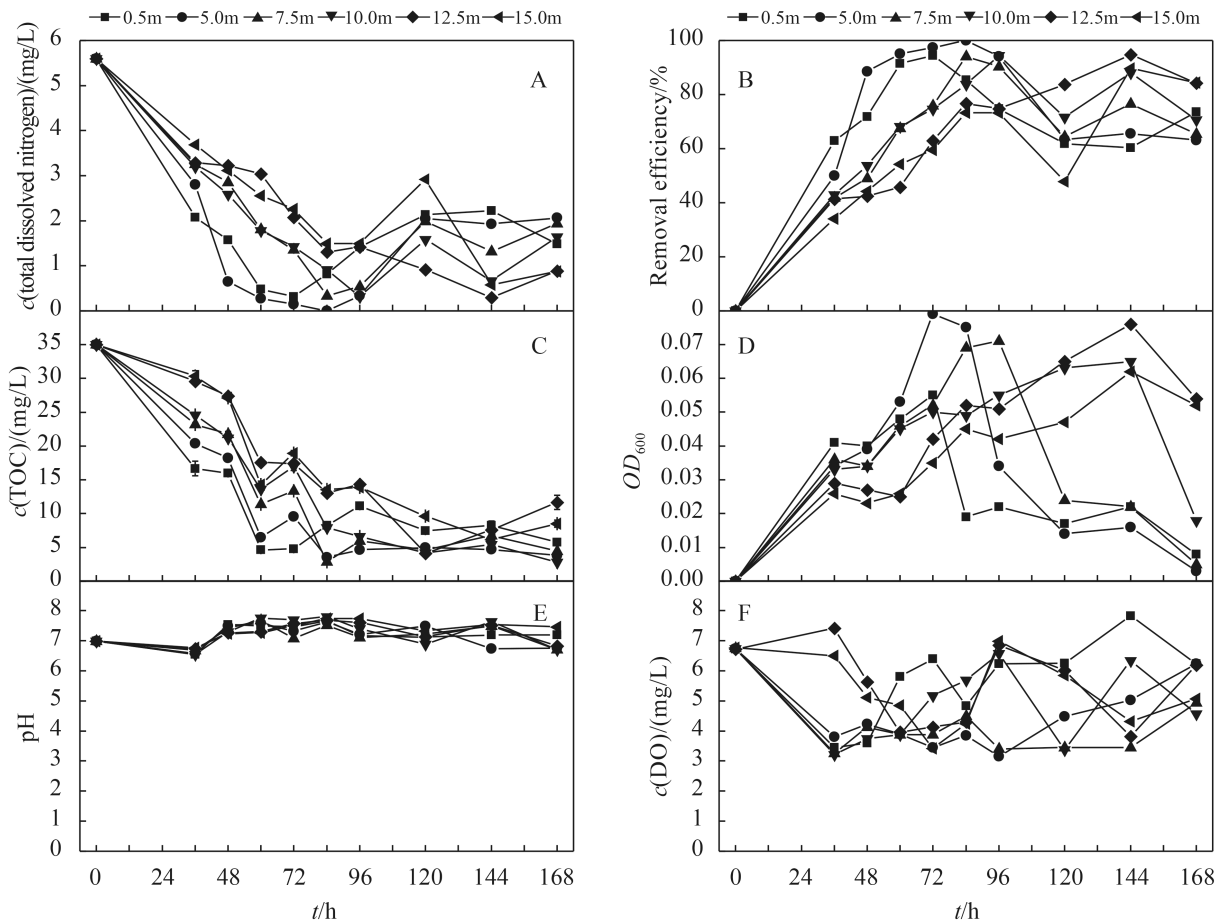


图 3. 水库硬质瓶子原位投菌实验的其他指标变化情况

Figure 3. Changes in total dissolved nitrogen, TOC, OD_{600} , T, DO of hard flask experiment system. A: changes of total nitrogen concentration; B: removal efficiency of total dissolved nitrogen; C: changes of TOC; D: changes of OD_{600} ; E: changes of pH; F: changes of DO concentration.

4.07; 15.0 m达到3.67。由于碳氮比变低,使系统的总氮难以再降。从图3-D中看到在C/N比变低的时候 OD_{600} 开始下降。pH在整个反应过程维持在7-8,不会破坏水体的pH。整个实验的DO在3-8 mg/L内变动。pH随着反应的进行出现上升,反映反硝化的进行,之后达到稳定。

2.3 水库软质瓶子原位投菌实验

2.3.1 水库软质瓶子原位投菌实验的氮素变化情况:

从图4-A和图4-B中可以看到,软质瓶子的投菌实验表明:随着温度的降低,硝氮的去除率下降。在0.5 m的软质瓶子硝氮最先去除,在72 h的时候表层0.5 m的硝氮去除率达到88.18%; 5.0 m

水深在60 h的硝氮去除率达到100%; 7.5 m的在144 h的硝氮去除率达到96.57%; 10.0 m水深的在168 h的硝氮去除率达到80.55%; 12.5 m和15.0 m水深的软质瓶子在168 h的硝氮去除率达到67.01%和64.73%。实验结果显示随温度上升,硝氮去除效果增加。其中5 m水深的硝氮去除效果最好。

图4-C中实验结束时的亚硝氮并没有出现积累,亚硝氮开始上升然后出现降低,随着水深的增加亚硝氮出现上升的滞后性。表层和中层的菌体生长速度快,在72 h菌体在末期出现死亡,菌液的 OD 值开始下降,而体系中的氨氮开始上升。从图4-D中菌密度的变化情况间接说明氨氮上升。

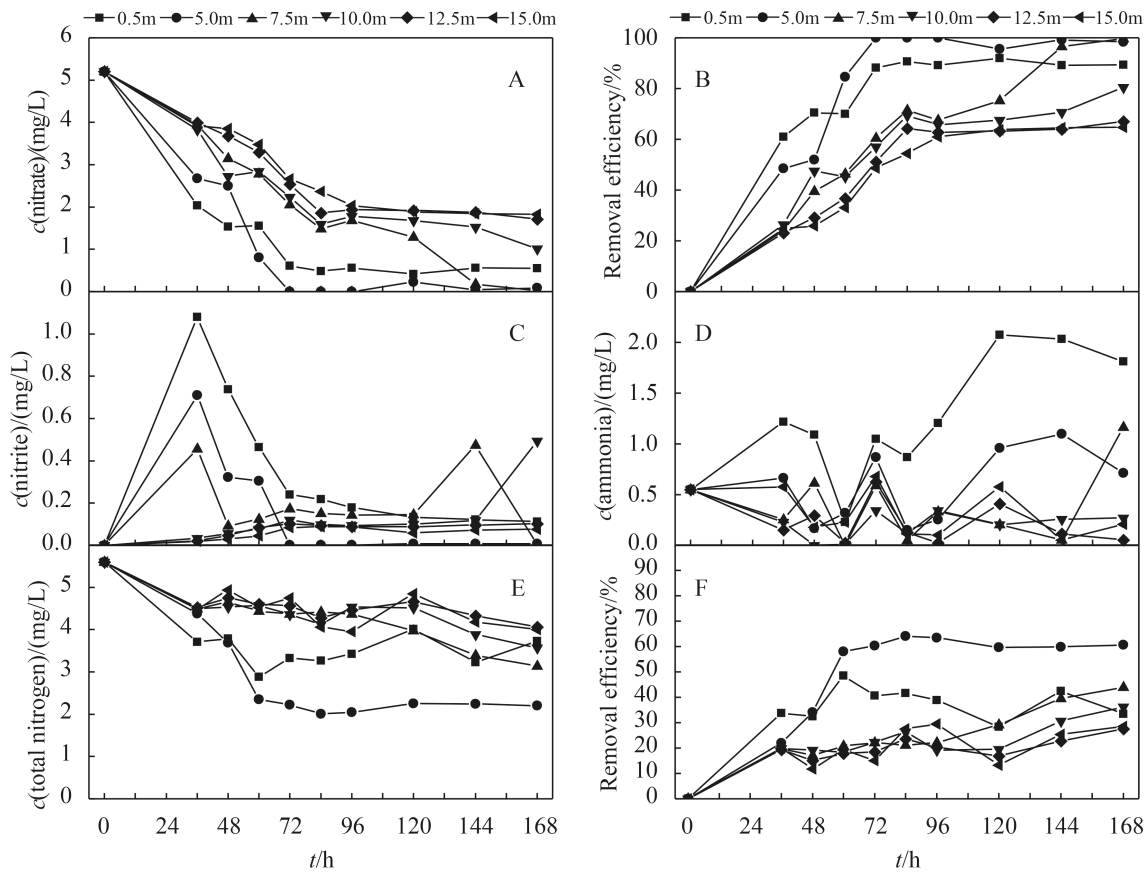


图 4. 水库软质瓶子原位投菌实验的氮素变化情况

Figure 4. Changes of nitrogen concentrations in soft flask experiment system. A: changes of nitrate concentration; B: removal efficiency of nitrate; C: changes of nitrite concentration; D: changes of ammonia concentration; E: changes of total nitrogen concentration; F: removal efficiency of total nitrogen concentration.

从图4-E和图4-F中看到结束时5.0 m的总氮去除率最高, 达到60.61%, 说明在5.0 m软质瓶子反应器中有60.61%的氮素转化为气体形式去除。其他深度的总氮去除率达到33.47%、43.98%、36.28%、27.52%和28.57%。从表1中看到软质瓶子投菌系统在同水深条件下的脱氮效果明显低于硬质瓶子, 说明水深对于好氧反硝化脱氮过程有不利的影响, 水深产生的静水压对反硝化有抑制作用。

2.3.2 水库软质瓶子原位投菌实验的其他指标变化情况: 图5-A和图5-B中看到表层0.5 m的溶解性总氮在72 h达到94.40%; 5.0 m的在84 h达到100%; 7.5 m的在120 h达到87.57%; 10.0 m的在

84 h达到70.94%; 12.5 m的在120 h达到71.46%; 15.0 m的在144 h达到64.99%。表层0.5 m和5.0 m最先达到很高的脱氮效果; C/N从初始的6.25, 168 h结束时的C/N表层达到1.87; 5.0 m达到2.33; 7.5 m达到1.37; 10 m达到1.97; 12.5 m达到3.08; 15.0 m达到3.42。由于碳氮比变低, 使系统的总氮难以再降。从图5-D中看到在C/N比变低的时候 OD_{600} 开始下降。pH在整个反应过程维持在7-8, 不会破坏水体的pH。pH随着反应的进行出现上升, 之后达到稳定。研究表明大多数好氧反硝化菌可耐受3 mg/L以下的溶解氧^[30-32], 部分菌种在高氧分压下仍具有反硝化活性, 可耐受5-

表 1. 硬质瓶子投菌系统与软质瓶子投菌系统情况对比
Table 1. Changes of nitrate, total nitrogen, OD_{600} , pH in hard and soft flask experiment systems

Parameters	0.5 m		5.0 m		7.5 m		10.0 m		12.5 m		15.0 m	
	H*	S*	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S
Nitrate/(mg/L)												
0	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20
72	0.00	0.61	0.00	0.00	1.10	2.05	1.34	2.23	1.87	2.54	2.13	2.67
120	0.09	0.42	0.08	0.23	0.12	1.29	0.01	1.69	0.65	1.91	1.19	1.88
168	0.00	0.56	0.00	0.09	0.04	0.02	0.00	1.01	0.00	1.72	0.03	1.83
Total nitrogen/(mg/L)												
0	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60
72	2.94	3.32	2.50	2.23	3.13	4.36	4.00	4.35	4.41	4.56	3.98	4.75
120	3.19	4.01	2.65	2.25	2.76	3.97	3.50	4.51	3.46	4.66	3.54	4.85
168	2.79	3.73	2.16	2.21	2.45	3.14	3.11	3.57	3.54	4.06	3.43	4.00
OD_{600}												
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0.055	0.062	0.079	0.051	0.052	0.046	0.050	0.043	0.042	0.040	0.035	0.036
120	0.017	0.006	0.014	0.018	0.024	0.047	0.063	0.050	0.065	0.049	0.047	0.050
168	0.008	0.007	0.003	0.003	0.005	0.016	0.018	0.025	0.054	0.038	0.052	0.042
pH												
0	6.98	6.98	6.98	6.98	6.98	6.98	6.98	6.98	6.98	6.98	6.98	6.98
72	7.45	7.37	7.31	7.66	7.08	7.74	7.69	7.69	7.58	7.04	7.50	7.76
120	7.12	6.95	7.48	6.94	7.22	7.83	6.88	7.18	7.14	7.14	7.32	7.33
168	7.19	7.09	6.75	7.12	6.70	6.71	6.71	7.02	6.83	6.97	7.45	7.05

* H, means the hard flask experiment system; S, means the soft flask experiment system.

6 mg/L溶解氧^[33-34]。此混合菌能在DO的3-8 mg/L范围内,表达脱氮能力,更有利于此混合菌在微污染源水中好氧反硝化能力的体现。

3 讨论

由于本研究针对于贫营养水库水体低氮污染的高度净化为目标,从水库底层沉积物中富集、驯化,筛选出好氧反硝化混合菌群。根据1979年,

Kuznetsov等^[35]提出的寡营养细菌的概念,定义为第一次培养时能在含碳1-15 mg/L培养基上生长的寡营养细菌称为专性寡营养细菌(贫营养细菌),可在寡营养和富营养培养基上生长的细菌称为兼性寡营养细菌(兼性贫营养细菌)。本实验同时结合周娜等^[23]的关于贫营养反硝化菌的驯化过程,进行近1个月左右的富集驯化,结束时系统的TOC在8 mg/L左右,满足贫营养菌的定义,完成贫营养混合菌的富集驯化过程。因此本研究筛选

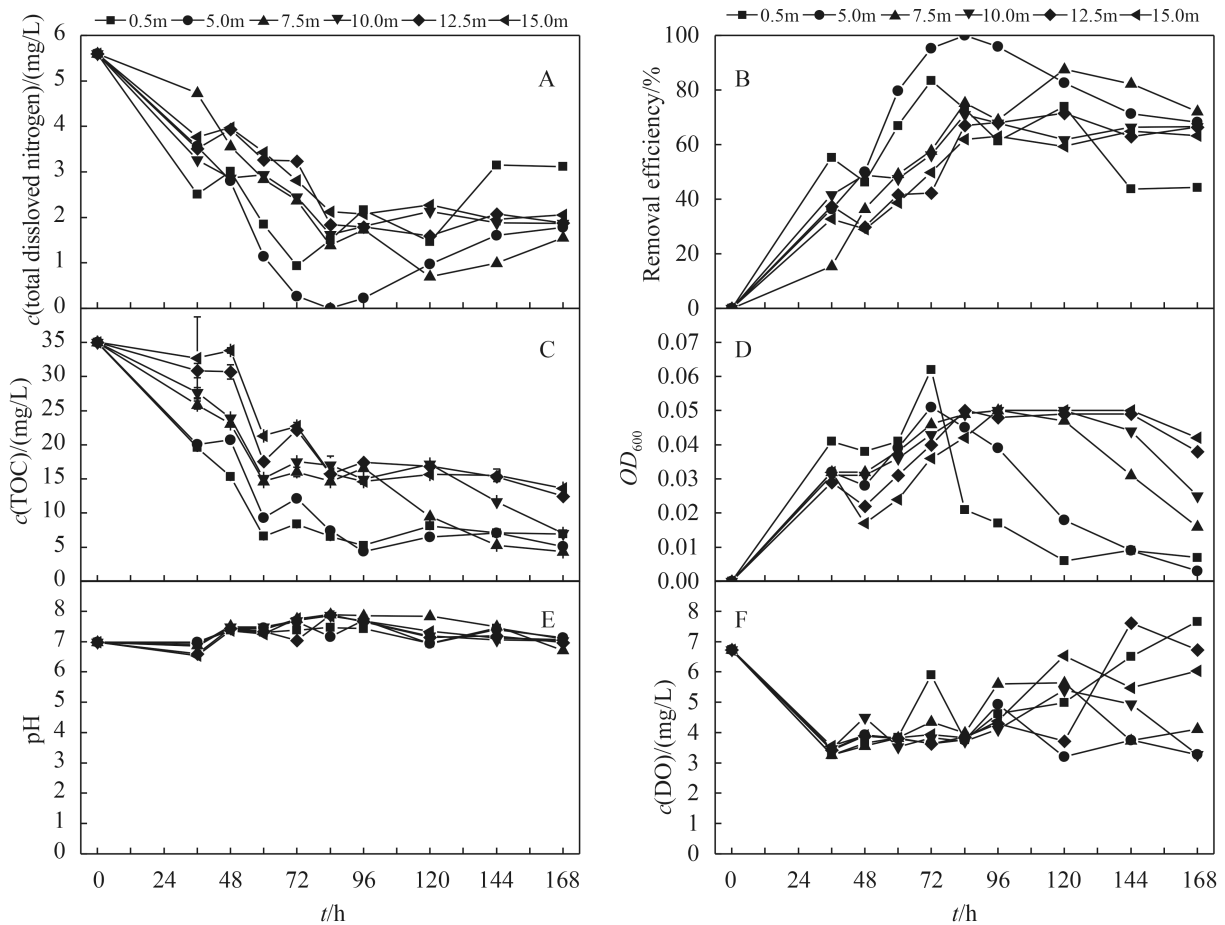


图 5. 水库软质瓶子原位投菌实验的其他指标变化情况

Figure 5. Changes in total dissolved nitrogen, TOC, OD_{600} , T, DO of soft flask experiment system. A: changes of total nitrogen concentration; B: removal efficiency of total dissolved nitrogen; C: changes of TOC; D: changes of OD_{600} ; E: changes of pH; F: changes of DO concentration.

的混合菌为贫营养菌。结合水库水体和上游河流水质情况确定总氮浓度为5–6 mg/L, C/N (TOC/TN) 为6左右。相比于从污废水及养殖废水分离好氧反硝化菌所采用的富集培养基, 本试验的培养基更接近贫营养水库环境。全向春等^[36]的应用贫营养生物膜脱氮的模拟废水COD为100–150 mg/L, 在实验过程中投加反硝化菌系统相比对照的TN有50%左右的去除。杨小龙等^[37]分离的好氧反硝化菌以 KNO_3 为唯一氮源, 实验结束时硝氮从161.61 mg/L降至55.69 mg/L。陈咄圳等^[38]从畜禽养殖废水中筛选分离异养硝化-好氧反硝化菌对初始浓度

为50 mg/L的硝酸盐氮去除率分别达64.27%。杨基先等^[39]分离的好氧反硝化菌株G-3对起始浓度236 mg/L的硝酸盐氮的去除率达到72.91%。相比徐向阳等^[40]在同水平下的培养基(TOC 48 mg/L, 硝氮4 mg/L), 投加好氧反硝化菌*Pseudomonas mendocina* 3–7, 实验结束时硝氮和总氮的去除率达到31.7%和45.0%。相比与本课题组巍巍等^[41]分离的单一菌株PY8在15–20 °C的条件下硝氮去除率为45%–70%左右, 25–30 °C的条件下硝氮去除率达到95%以上; 周娜等^[23]分离的ZN1、ZN2和ZN3在实验结束时的硝酸盐氮去除率达到80%以

上。本文中硬质系统的硝氮达到完全去除。相比之前分离的单一好氧反硝化菌株, 本研究的混合菌更具有脱氮优势。

随着水体温度的增加反硝化效果越好, 从表层0.5 m到底层15.0 m的挂瓶梯度实验得出随着水深的增加, 即水体温度的降低, 各个实验系统的脱氮效果在逐步下降。相比于硬质系统硝氮的完全去除, 软质系统(受水压影响)的硝氮去除率为64.73%–100%。硬质瓶子消除了水库水深带来的水体压力的影响, 不同水深反映的为温度的影响。一般认为, 溶解氧浓度、碳氮比、温度和pH值是反硝化作用的关键限制性因素^[42–43], 但是菌株、反应器以及环境条件的不同使这些因素对于反硝化的影响也不尽相同。静水压作为一种非生物逆境胁迫, 对微生物存在多方面的影响, 如可以是微生物细胞体积、形态、组分发生变化, 使微生物核酸结构、基因表达及其生物学功能发生改变, 这些应对高静水压逆境胁迫的微生物学效应, 已经得到学术界的广泛关注^[44–45]。但是针对大多数水源水库的静水压0.1–1.0 MPa下对微生物的研究却鲜见报道。特别是静水压针对于好氧反硝化菌的影响的研究更少报道。本文面向实际

水体的应用需求, 定性考察水深带来的静水压力对脱氮的影响, 为将来实际应用提供理论支撑。软质瓶子反映的是水深水压和水体温度的双重作用。随着温度的降低和水体压力的上升, 脱氮效率下降。实验结束时, 总氮在实验结束时, 各个水深硬质瓶子的去除率达到50.11%、61.49%、56.24%、44.50%、36.80%和38.73%, 软质瓶子达到33.47%、60.61%、43.98%、36.28%、27.52%和28.57%。表2展示的为实验结束时的各环境因素与脱氮效果的相关性分析情况, 从表2中各因素的相关性分析结果上看出, 硬质瓶子系统的温度及水深(水库静水压)对系统的脱氮相关性为–0.7119和0.8034要明显高于软质瓶子系统的–0.4750和0.6418。从实验结果上看出水体的水压对于好氧反硝化菌的脱氮存在不利的作用, 在10 m以上对于硝氮的去除影响较小。由于水体温度、反应系统的溶解氧、碳氮比以及静水压都会对好氧反硝化的脱氮过程产生影响, 本实验过程中脱氮作用的差异是多因素造成的, 其中静水压的存在有抑制作用。今后将通过更加深入的研究来分析各因素的作用程度。考虑到实际水体的水体压力的影响, 可在以后加强对于好氧反硝化菌体的耐压方面的驯化。

表 2. 硬质瓶子与软质瓶子投菌系统环境变量对脱氮的相关性分析

Table 2. Correlation analysis of environment variables and uncovered nitrogen* in hard and soft flask experiment systems.

System	Parameters	Depth	Temperature	TN-Re*	DO
Hard flask experiment system	Depth				
	Temperature	–0.9377	1		
	TN-Re*	–0.7119	0.8034	1	
	DO	–0.4635	0.5768	0.1720	1
Soft flask experiment system	Depth	1			
	Temperature	–0.9377	1		
	TN-Re*	–0.4750	0.6418	1	
	DO	–0.0641	0.0059	–0.7005	1

* TN-Re means total nitrogen removal efficiency; uncovered nitrogen means gaseous nitrogen.

参考文献

- [1] Cai QH, Hu ZY. Studies on eutrophication problem and control strategy in the Three Gorges Reservoir. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(1): 7–11.
蔡庆华, 胡征宇. 三峡水库富营养化问题与对策研究. 水生生物学报, 2006, 30(1): 7–11.
- [2] Camargo JA, Alonso Á. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, 2006, 32(6): 831–849.
- [3] Duce RA, LaRoche J, Altieri K, Arrigo KR, Baker AR, Capone DG, Cornell S, Dentener F, Galloway J, Ganeshram RS, Geider RJ, Jickells T, Kuypers MM, Langlois R, Liss PS, Liu SM, Middelburg JJ, Moore CM, Nickovic S, Oschlies A, Pedersen T, Prospero J, Schlitzer R, Seitzinger S, Sorensen LL, Uematsu M, Ulloa O, Voss M, Ward B, Zamora L. Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean. *Science*, 2008, 320(5878): 893–897.
- [4] Galloway JN, Townsend AR, Erisman JW, Bekunda M, Cai ZC, Freney JR, Martinelli LA, Seitzinger SP, Sutton MA. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 2008, 320(5878): 889–892.
- [5] Jiang CL, Zhu LQ, Hu XQ, Cheng JY, Xie MH. Reasons and control of eutrophication in new reservoirs// Eutrophication: Causes, Consequences and Control. Netherlands: Springer, 2011: 325–340.
- [6] Wang Z. Research progress in the treatment processes of micro-polluted source water in China. *Industrial Water Treatment*, 2012, 32(10): 1–3, 71. (in Chinese)
王郑. 我国微污染源水处理技术研究进展. 工业水处理, 2012, 32(10): 1–3, 71.
- [7] Ye SF, Wang ZW, Wu ZC. Progress of slightly polluted water resource treatment technology and evaluation on treatment measures. *Technology of Water Treatment*, 2010, 36(6): 22–28, 46. (in Chinese)
叶少帆, 王志伟, 吴志超. 微污染源水处理技术研究进展和对策分析. 水处理技术, 2010, 36(6): 22–28, 46.
- [8] Huang TL, Wang K, Li N, Liu TT. Pilot study on in-situ bacteria inoculation technology for restoration of micro-polluted source water. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(7): 2256–2260. (in Chinese)
黄廷林, 王堃, 李娜, 刘婷婷. 原位投菌技术修复微污染源水的中试研究. 环境工程学报, 2012, 6(7): 2256–2260.
- [9] Zhu GB, Peng YZ, Li BK, Guo JH, Yang Q, Wang SY. Biological removal of nitrogen from wastewater//Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. New York: Springer, 2008: 159–195.
- [10] Kaspar HF. Nitrite reduction to nitrous oxide by propionibacteria: detoxication mechanism. *Archives of Microbiology*, 1982, 133(2): 126–130.
- [11] Ding W, Zhu L, Xu J, Feng LJ, Xu XY. Progress of researches on aerobic denitrifiers and their application in bioremediation. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2011, 17(6): 923–929.
丁炜, 朱亮, 徐京, 冯丽娟, 徐向阳. 好氧反硝化菌及其在生物处理与修复中的应用研究进展. 应用与环境生物学报, 2011, 17(6): 923–929.
- [12] Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, Bock E, Fuerst J, Kuenen JG, Jetten MSM, Strous M. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(4): 481–492.
- [13] Bouchez T, Patureau D, Delgenès JP, Moletta R. Successful bacterial incorporation into activated sludge flocs using alginate. *Bioresource Technology*, 2009, 100(2): 1031–1032.
- [14] 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.
- [15] Pang CL, Chen H, Li A, Ma F. Performance of bioaugmented nitrogen removal by aerobic denitrification consortium for treating the domestic sewage at low temperatures. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2014, 46(12): 45–52. (in Chinese)
庞长泷, 陈翰, 李昂, 马放. 低温好氧反硝化菌群强化生活污水脱氮效能. 哈尔滨工业大学学报, 2014, 46(12): 45–52.
- [16] Yang Q, Yu LJ, Li TM, Wu XN. Enrichment of nitrosobacteria from polluted river and its characteristics of ammonium removal with immobilized cells. *Environmental Science & Technology*, 2014, 37(2): 17–22. (in Chinese)
杨强, 于鲁冀, 李廷梅, 吴小宁. 水中亚硝化功能菌的富集培养及其固定化效果研究. 环境科学与技术, 2014, 37(2): 17–22.
- [17] Yu LJ, Li TM, Yang Q, Wu XN. Immobilization of mixed nitrosation bacteria and influencing factors of NH₃-N removal in river water. *Chinese Journal of Environmental Engineering*,

- 2014, 8(8): 3154–3160. (in Chinese)
- 于鲁冀, 李廷梅, 杨强, 吴小宁. 亚硝化混合菌的固定化及去除河水NH₃-N影响因素. *环境工程学报*, 2014, 8(8): 3154–3160.
- [18] Guo YN, Huang P, Zhou M, Cui SK. Tests on simulated wastewater treatment with the mixed strains of PVA degradation. *Industrial Water Treatment*, 2013, 33(3): 32–35. (in Chinese)
- 郭雅妮, 黄沛, 周明, 崔双科. PVA降解混合菌系处理模拟废水试验. *工业水处理*, 2013, 33(3): 32–35.
- [19] Liu JH, Xu RD, Pan Y, Chen YT, Lu Y. Experimental study of the optimal conditions for degrading HPAM-containing sewage by using the mixed bacteria. *Journal of Safety and Environment*, 2013, 13(3): 14–18. (in Chinese)
- 刘江红, 徐瑞丹, 潘洋, 陈逸桐, 芦艳. 混合菌降解含聚污水的最佳条件试验研究. *安全与环境学报*, 2013, 13(3): 14–18.
- [20] Huang TL, Su JF, Li Q. Isolation, identification and denitrifying characteristics of aerobic denitrifying bacteria. *Journal of Xi'an University of Architecture & Technology (Natural Science Edition)*, 2009, 41(5): 704–707. (in Chinese)
- 黄廷林, 苏俊峰, 李倩. 好氧反硝化菌株的筛选培养及其反硝化性能研究. *西安建筑科技大学学报(自然科学版)*, 2009, 41(5): 704–707.
- [21] Huang TL, Wei W, Su JF, Zhi L, Liu Y. Biological denitrification for micro-polluted source water via in-situ oligotrophic bio-contact oxidation system. *Technology of Water Treatment*, 2010, 36(6): 95–99. (in Chinese)
- 黄廷林, 魏巍, 苏俊峰, 智利, 刘燕. 贫营养原位生物接触氧化法对微污染源水的脱氮试验研究. *水处理技术*, 2010, 36(6): 95–99.
- [22] Huang TL, Wei W, Wang CY, Huang Z, Su JF, Zhi L. Pilot research on micropollutants removal in the raw water by combined process of water-lifting aeration and oligotrophic biofilm. *Journal of Chongqing University*, 2012, 35(1): 125–131, 146. (in Chinese)
- 黄廷林, 魏巍, 王春燕, 黄卓, 苏俊峰, 智利. 扬水曝气-贫营养生物膜组合技术净化微污染原水中试研究. *重庆大学学报*, 2012, 35(1): 125–131, 146.
- [23] Huang TL, Zhou N, Zhang HH, Di SY, Zhou SL, Guo L. Isolation and identification of three oligotrophic aerobic denitrifying bacteria and denitrification characteristics. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(12): 5507–5513. (in Chinese)
- 黄廷林, 周娜, 张海涵, 邸诗雨, 周石磊, 郭琳. 3株贫营养好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化特性. *环境工程学报*, 2014, 8(12): 5507–5513.
- [24] Su JF, Huang WB, Ma F, Huang TL, Gao SS. Heterotrophic nitrification bacteria dispose the wastewater of NH₄-N and influence factor. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21(9): 1599–1603. (in Chinese)
- 苏俊峰, 黄文斌, 马放, 黄廷林, 高珊珊. 异养硝化细菌处理氨氮废水及影响因素研究. *生态环境学报*, 2012, 21(9): 1599–1603.
- [25] Wei W, Huang TL, Li N. Denitrification characteristics of in-situ biological inoculation under conditions of low temperature and poor nutrient. *Water Technology*, 2012, 6(4): 8–12. (in Chinese)
- 魏巍, 黄廷林, 李娜. 低温贫营养原位生物投菌技术脱氮特性研究. *供水技术*, 2012, 6(4): 8–12.
- [26] Wei W, Huang TL, Su JF, Wang CY, Huang Z, Li N. Isolation and identification of an oligotrophic and aerobic denitrification and its denitrification characteristics. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(9): 2166–2171. (in Chinese)
- 魏巍, 黄廷林, 苏俊峰, 王春燕, 黄卓, 李娜. 1株贫营养好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性. *生态环境学报*, 2010, 19(9): 2166–2171.
- [27] 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.
- [28] Zaitsev G, Mettänen T, Langwaldt J. Removal of ammonium and nitrate from cold inorganic mine water by fixed-bed biofilm reactors. *Minerals Engineering*, 2008, 21(1): 10–15.
- [29] Wei W, Huang TL. Isolation and identification of a low temperature and aerobic denitrifier and its denitrification characteristics. *Water Technology*, 2012, 6(6): 12–16. (in Chinese)
- 魏巍, 黄廷林. 低温好氧反硝化菌的分离鉴定及脱氮特性研究. *供水技术*, 2012, 6(6): 12–16.
- [30] Taylor SM, He YL, Zhao B, Huang J. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(10): 1336–1341.
- [31] ud din Ahmad N, Xu HY, Chen LP, Liu ZP, Liu SJ. Enhanced biological nutrient removal by the alliance of a heterotrophic nitrifying strain with a nitrogen removing ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(2): 216–223.
- [32] Yu AR, Li Y, Yu J. Denitrification of a newly isolated *Bacillus*

- strain W2 and its application in aquaculture. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(3): 77–81.
- 于爱草, 李尤, 俞吉安. 一株耐氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性研究. *微生物学杂志*, 2005, 25(3): 77–81.
- [33] Kim M, Jeong SY, Yoon SJ, Cho SJ, Kim YH, Kim MJ, Ryu EY, Lee SJ. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(5): 498–502.
- [34] Zhou Q, Takenaka S, Murakami S, Seesuriyachan P, Kuntiya A, Aoki K. Screening and characterization of bacteria that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously under controlled cultural conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2007, 103(2): 185–191.
- [35] Kuznetsov SI, Dubinina GA, Lapteva NA. Biology of oligotrophic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 1979, 33(1): 377–387.
- [36] Quan XC, Cen Y, Qian Y. Isolation, identification of two aerobic denitrifiers and bioaugmentation for enhancing denitrification of biofilm under oligotrophic conditions. *Environmental Science*, 2013, 34(7): 2862–2868. (in Chinese)
- 全向春, 岑艳, 钱殷. 2株好氧反硝化菌的筛选及其强化贫营养生物膜脱氮效果. *环境科学*, 2013, 34(7): 2862–2868.
- [37] 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.
- [38] Chen PZ, Wang LG, Wang YC, Li J, Ding W, Ren TZ, Li SP. Screening and denitrification characteristics of a Heterotrophic nitrification-aerobic denitrifier bacteria. *Environmental Science*, 2009, 30(12): 3614–3618. (in Chinese)
- 陈咄圳, 王立刚, 王迎春, 李季, 丁伟, 任天志, 李少朋. 异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及脱氮性能的实验研究. *环境科学*, 2009, 30(12): 3614–3618.
- [39] Yang JX, Gao SS, Ma F, Su JF, Wang Q. Identification and phylogenetic analysis of an isolated aerobic denitrifier. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(7): 1302–1307. (in Chinese)
- 杨基先, 高珊珊, 马放, 苏俊峰, 王强. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化能力. *环境科学学报*, 2008, 28(7): 1302–1307.
- [40] Zhu L, Ding W, Feng LJ, Dai X, Xu XY. Characteristics of an aerobic denitrifier that utilizes ammonium and nitrate simultaneously under the oligotrophic niche. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, 19(8): 3185–3191.
- [41] Bernat K, Wojnowska-Baryła I. Carbon source in aerobic denitrification. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 36(2): 116–122.
- [42] Huang HK, Tseng SK. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 55(1): 90–94.
- [43] Aertsen A, Meersman F, Hendrickx MEG, Vogel RF, Michiels CW. Biotechnology under high pressure: applications and implications. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(7): 434–441.
- [44] Bartlett DH. Pressure effects on *in vivo* microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2002, 1595(1/2): 367–381.
- [45] Picard A, Daniel I. Pressure as an environmental parameter for microbial life—a review. *Biophysical Chemistry*, 2013, 183: 30–41.

Nitrogen removal characteristics of mixed aerobic denitrification bacteria under in-situ biological inoculation

Shilei Zhou, Tinglin Huang^{*}, Shiyuan Bai, Xiuxiu He

School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xi'an 710055, Shaanxi Province, China

Abstract: [Objective] We studied the influences of water pressure and temperature on denitrification, and detected its nitrogen removal characteristics for providing evidence to remediate the micro-polluted reservoir source water. [Methods] Mixed oligotrophic aerobic denitrification bacteria was obtained through enrichment, domestication, and screening processes, which was isolated from sediment in the source water reservoir; and the nitrogen removal characteristics was detected by an in-situ biological inoculation experiment (DO at 3–8 mg/L). [Results] Nitrate of the hard flask system (with water pressure influence) was removed completely, however, at 0.5, 5 m water layer, the nitrate removal rate of the soft flask reached 90.66%, 100%, other layers reached 99.61%, 80.55%, 67.01%, 64.73%. No nitrite accumulated. Because of bacteria death, ammonia had a slight increase. At the end of the experiment, in the 0.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 and 15.0 m water layer, the total nitrogen removal rates of hard flask reached 50.11%, 61.49%, 56.24%, 44.50%, 36.80% and 38.73%, however, that of soft system reached 33.47%, 60.61%, 43.98%, 36.28%, 27.52% and 28.57%. OD_{600} and pH first rose and then dropped. The mixed bacteria had prominent nitrogen removal ability between 11 °C and 30 °C. [Conclusion] The mixed bacteria have a strong adaptability to temperature and the water pressure has a disadvantage to the nitrogen removal.

Keywords: oligotrophic, aerobic denitrification, mixed bacteria, in-situ, nitrogen removal

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the the National Science and Technology Pillar Program (2012BAC04B02)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-29-82201038; Fax: +86-29-82202729; E-mail: huangtinglin@xauat.edu.cn

Received: 14 June 2015; Revised: 31 July 2015; Published online: 21 October 2015