



耐热脱氮菌株的分离鉴定及性能研究

严新杰^{1,2,3}, 马彦蓉^{1,2,3}, 刘沁雅^{1,2,3}, 章旭^{1,2,3}, 郭平均⁴, 厉巍^{1,2,3*}, 刘勇弟^{1,2,3}

1 华东理工大学资源与环境工程学院, 工业废水无害化与资源化国家工程研究中心, 上海 200237

2 华东理工大学资源与环境工程学院, 国家环境保护化工过程环境风险评价与控制重点实验室, 上海 200237

3 上海污染控制与生态安全研究院, 上海 200092

4 上海华谊(集团)公司, 上海 201108

严新杰, 马彦蓉, 刘沁雅, 章旭, 郭平均, 厉巍, 刘勇弟. 耐热脱氮菌株的分离鉴定及性能研究. 微生物学报, 2022, 62(9): 3518–3528.

Yan Xinjie, Ma Yanrong, Liu Qinya, Zhang Xu, Guo Pingjun, Li Wei, Liu Yongdi. Isolation, identification and characterization of two mesophilic strains for nitrogen removal. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3518–3528.

摘要:【目的】为了解决高温的煤化工废水生物脱氮效率不高的技术难题。【方法】本研究从上海某能化集团有限公司的煤化工废水处理系统的活性污泥中筛选得到一株耐热氨氧化细菌 A1 和一株耐热反硝化细菌 D1。【结果】通过形态学观察、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析, 菌株 A1 初步鉴定为 *Aquamicrobium ahrensii*, 菌株 D1 初步鉴定为 *Pseudomonas stutzeri*。采用单因子优化实验研究发现, 菌株 A1 和 D1 的最适生长温度分别高达 42 °C 和 40 °C。在模拟实际废水处理的初始 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度 100 mg/L 和 42 °C 的条件下, 构建了由菌株 A1 和 D1 (W/W, 20%/10%) 组成的共培养物, 探究该共培养物在不同 pH 和 C/N 对短程硝化反硝化脱氮及 N_2O 的释放效应。结果表明, 该共培养物在 42 °C、pH 9.0–10.0 和初始 C/N 为 2:1 时, 处理模拟废水的氮素去除率达 >99.0%, 最大 N_2O 得率高达 51.3%。【结论】本研究的结果可为高温煤化工废水的生物处理提供技术支撑及菌种储备, 同时也为高温污水处理过程中 N_2O 的释放规律提供理论参考。

关键词: 煤化工废水; 耐热氨氧化菌; 耐热反硝化菌; 分离鉴定; 脱氮

基金项目: 国家自然科学基金(52170076); 上海市青年科技启明星计划(20QC1400500)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (52170076) and by the Shanghai Rising-Star Program (20QC1400500)

*Corresponding author. E-mail: wei_li@ecust.edu.cn

Received: 17 January 2022; Revised: 15 March 2022; Published online: 27 May 2022

Isolation, identification and characterization of two mesophilic strains for nitrogen removal

YAN Xinjie^{1,2,3}, MA Yanrong^{1,2,3}, LIU Qinya^{1,2,3}, ZHANG Xu^{1,2,3}, GUO Pingjun⁴,
LI Wei^{1,2,3*}, LIU Yongdi^{1,2,3}

1 National Engineering Research Center for Innocuous and Resourceful Industrial Wastewater, School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2 State Key Laboratory for Environmental Risk Assessment and Control of Environmental Chemical Processes, School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

3 Shanghai Institute of Pollution Control and Ecological Security, Shanghai 200092, China

4 Shanghai Huayi (Group) Company, Shanghai 201108, China

Abstract: [Objective] To address the low efficiency of biological nitrogen removal from high-temperature coal chemical wastewater. [Methods] In this study, a mesophilic ammonia-oxidizing bacterial strain A1 and a mesophilic denitrifying bacterial strain D1 were isolated from the activated sludge of the coal chemical wastewater treatment system of an energy and chemical group Co. Ltd. in Shanghai. [Results] Based on the morphological, physiological, and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence, strain A1 was preliminarily identified as *Aquamicrobium ahrensii* and strain D1 as *Pseudomonas stutzeri*. The single factor experiments showed that the optimal growth temperatures of strains A1 and D1 were as high as 42 °C and 40 °C, respectively. Then, we simulated the wastewater treatment at the initial NH_4^+ -N concentration of 100 mg/L and 42 °C, and established a co-culture composed of strains A1 and D1 (W/W, 20%/10%) to explore the effects of the co-culture on shortcut nitrification and denitrification and N_2O release at different pH and C/N ratios. At 42 °C, pH 9.0–10.0, and initial C/N ratio of 2:1, the co-culture showed a nitrogen removal rate above 99.0% and the maximum N_2O yield of 51.3%. [Conclusion] This study can provide technological support and strain resources for the biological treatment of high-temperature coal chemical wastewater, and help to reveal the law of N_2O release in the treatment of high-temperature wastewater.

Keywords: wastewater of coal chemical industry; mesophilic ammonia-oxidizing bacteria; mesophilic denitrifying bacteria; isolation and identification; nitrogen removal

现代煤化工是指煤炭通过清洁加工转化为燃料和化学品的过程, 在过程中所产生的废水即为煤化工废水^[1]。由于煤化工工艺的炉型特点及反应温度特性, 使得废水的温度通常较高 (>37 °C), 最高可达 45 °C^[2]。同时, 这股废水的 C/N 比 < 4, 属于典型的低 C/N 比废水^[1]。目前, 大多数煤化工污水处理厂都设有生化处理系统, 普通的氨氧化菌及反硝化菌适宜的生长温度为 25–35 °C, 在高温的煤化工废水条件下不能正常生长, 从而导致在实际运行过程中无

法达到理想的脱氮效果^[3]。生态环境部发布的《现代煤化工建设项目环境准入条件(试行)》表明, 氨氮(NH_4^+ -N)是煤化工废水处理中出水较难达标的污染物, 对生态环境的危害较大^[4–5]。因此, 煤化工废水高温条件下的生物脱氮有效技术亟待开发。

煤化工废水通过常规的氨氧化菌和反硝化细菌进行生物法处理, 实际上游往往安装冷却设备或控温设备对废水先进行降温, 但这无疑会大大增加企业的运行成本^[6]。为了减少高温

废水冷却处理环节,降低设备投资,直接筛选耐热脱氮细菌用于处理高温的煤化工废水已有零星报道,如Gao等^[7]报道菌株 *Bacillus megaterium* S379 在 25–40 °C 温度范围对 320 mg/L 亚硝酸盐氮 (NO_2^- -N) 的去除率均在 70%以上,而在温度 45 °C 条件下去除率仅为 57.93%。如张苗等^[8]通过高温筛选,在温度 50 °C 条件下,好氧反硝化细菌(*Chelatococcus* sp. TAD1) 24 h 内将培养液中的 NO_2^- -N 由初始的 113.58 mg/L 降低到 85.31 mg/L,而脱氮率仅为 24.89%。但对于筛选耐热脱氮细菌的报道脱氮效果并不佳^[9],因此亟需筛选耐热脱氮细菌来克服高温这一制约因素。

与此同时,在废水生物脱氮的过程中不可避免地会释放出污水处理副产物氧化亚氮 (N_2O)^[10]。 N_2O 是一种潜在的温室气体,其温室效应是二氧化碳(CO_2)的 310 倍,甲烷(CH_4)的 4–21 倍,能够破坏臭氧层,形成酸雨^[10]。Kampschreur 等认为在实验室规模研究中,废水中含有的氮负荷高达 0–90%以 N_2O 的形式释放,而在实际规模研究中,约 0–14.6%比例的氮以 N_2O 的形式释放^[11], N_2O 释放使得氮素污染物从水环境到大气环境污染形态转移,这无疑降低了废水处理的可持续性。并且 N_2O 也是生物反硝化脱氮过程中的重要中间产物^[10],因此在碳中和大背景下,研究高温条件污水生物脱氮反硝化过程中 N_2O 的释放规律为高温生物脱氮应用于工程提供实践基础^[12–13]。

本研究以分离筛选自煤化工废水处理系统中的耐热氨氧化细菌和耐热反硝化细菌为对象,考察温度对其脱氮性能及 N_2O 释放规律的影响,同时探究了耐热脱氮菌株构建共培养物的短程硝化反硝化脱氮及 N_2O 释放的影响,为高温的煤化工氨氮废水的生物处理提供技术支撑及菌种储备,同时也为高温污水处理过程中

N_2O 的释放规律提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1) 上海某能化集团有限公司污水处理厂生化处理系统,其系统包括预处理和生化处理单元两部分。预处理单元主要作用是调节水质水量,生化处理单元为一体化 AO 处理装置。本研究筛选样品取自一体化 AO 处理装置的活性污泥,模拟废水按照一体化 AO 处理装置中的进水水质进行配置。

(2) 氨氧化菌富集培养基(g/L)^[14–17]: NH_4Cl 0.104; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.010; NaCl 0.580; KH_2PO_4 0.050; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.100; NaHCO_3 2.500; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.100; FeCl_3 0.280; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.021; MnSO_4 2.200; CuSO_4 0.016; H_3BO_3 0.500; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.046; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.500。氨氧化菌固体培养基:在该富集培养基中加入 20.000 g/L 的琼脂。以上培养基将调节 pH 至 7.8。

(3) 反硝化菌富集培养基(g/L)^[14–17]: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.137; KH_2PO_4 0.020; CaCl_2 0.010; CH_3COONa 0.257; NaCl 2.850; NaNO_2 0.247; H_3BO_3 0.150; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.540; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.020; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.120; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.120。反硝化菌固体培养基:在该富集培养基中分别加入 20.000 g/L 的琼脂和 1.000 mL/L 的 1% 的 BTB^[15]。以上培养基将调节 pH 至 6.8。

(4) 模拟废水(g/L)^[14]: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.237; KH_2PO_4 0.094; CaCl_2 0.010; CH_3COONa 0.257; NaCl 2.850; NH_4Cl 0.4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.556; NaCl 0.580。

以上培养基均在 121 °C、 1.1×10^4 Pa 条件下灭菌 30 min,冷却备用^[14]。

1.2 耐热菌株的筛选、分离和鉴定

取活性污泥样品在氨氧化菌固体培养基和反硝化菌固体培养基采用稀释涂布法于 42 °C、120 r/min 培养。待菌落长出后,用接种环挑取单菌落利用连续划线分离法获得耐热纯化菌株^[16-18]。分别将分离的纯化菌株接种至装有氨氧化菌富集培养基和反硝化菌富集培养基的试管中,于 42 °C、120 r/min 培养^[14]。培养 6-7 d 后,从装有氨氧化菌培养基的试管中取 0.1 mL 菌液放置于陶瓷板,滴加格里斯试剂,若菌液变成红色,初步鉴定该菌株为氨氧化细菌并标号。培养 2-3 d 后,从装有反硝化菌培养基的试管中取菌液按照 2%的比例接种到另一装有新鲜反硝化菌培养基的厌氧密闭血清瓶中,于 42 °C、120 r/min 培养 10 h,若血清瓶顶空检测出 N₂O 积累,初步鉴定该菌株为反硝化细菌并标号。以上操作均在无菌环境中,菌株冻存于 -80 °C 的 40%甘油中。

取 -80 °C 冻存菌株,冰浴解冻,参照文献预处理后采用 ZEISS Gemini SEM 500 场发射扫描电子显微镜观察菌体形态^[19-21]。以菌株 A1 和 D1 的 DNA 为模板,分别采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')进行 PCR 扩增^[14]。扩增采用 50.0 μL 体系,包括 1.0 μL 基因组 DNA (20 ng/μL), 5.0 μL 10×Buffer, 1.0 μL Taq 聚合物 (5 μg/μL), 1.0 μL dNTPs (10 mmol/L), 上下游引物各 1.5 μL (10 μmol/L) 和 39.0 μL 无菌水。循环条件包括 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环^[14]。PCR 产物用 AxyPrep DNA Gel 凝胶回收试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City) 纯化回收^[14]。纯化后的扩增子送派森诺(上海,中国)进行 DNA 测序。将 16S rRNA 基因序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源性比较,以

neighbor-joining 法构建系统发育树^[22]。

1.3 脱氮菌株 A1 和 D1 的最适脱氮温度分析

将活化的 A1 和 D1 菌液以 20% 和 10% 比例分别接入装有 50 mL 的氨氧化菌液体培养基的锥形瓶和 10 mL 的反硝化菌液体培养基的密闭血清瓶(预先除氧无菌处理)中,分别以不接入菌种的培养基作为空白对照组。其中锥形瓶中的 NH₄⁺-N 初始浓度为 100 mg/L,血清瓶中的 NO₂⁻-N 初始浓度为 180 mg/L,研究不同温度 (25、30、35、40、42、45 °C) 条件下对菌株 A1 和 D1 脱氮能力的影响。以上处理均在 120 r/min 的摇床中培养,每隔一段时间取样分析 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 和顶空 N₂O 的浓度。

1.4 基于耐热菌株构建的共培养物短程硝化反硝化脱氮及 N₂O 释放性能研究

将活化的菌液 A1 和 D1 (W/W, 20%/10%) 接入装有 50 mL 模拟废水的锥形瓶中,以不接入菌种的培养基作为空白对照组,锥形瓶中 NH₄⁺-N 初始浓度为 100 mg/L,分别研究不同 pH 值 (6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0) 和不同 C/N 值 (1:1、2:1、3:1 和 4:1) 条件下对由菌液 A1 和 D1 构建的共培养物短程硝化反硝化脱氮及 N₂O 释放效应。以上处理在 42 °C、120 r/min 的摇床中培养,每隔 24 h 取样分析 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 的浓度,反应 7-8 d 后,将液体转移至密闭血清瓶(预先除氧无菌处理)中,在 42 °C、120 r/min 的摇床中振荡培养,每隔 4 h 取样分析 NO₂⁻-N 和顶空 N₂O 的浓度。

1.5 分析方法

硝态氮采用紫外分光光度法、氨氮采用苯酚-次氯酸盐法、亚硝酸盐氮采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法、蛋白质采用快速 Lowry 法^[23]、体系内 N₂O 浓度采用气相色谱法^[14],通过道尔顿分压定律(公式 1)和亨利定律(公式 2)计算得出^[10]。

$$C_g = \frac{V}{22.4} \times 28 \times 1000 \quad (1)$$

$$C_0 = C_g \left(K_0 RT + \frac{V_g}{V_l} \right) \quad (2)$$

式中, V 为顶空中 N_2O 的体积分数; C_g 为气液平衡后气相中的 N_2O 浓度(mg/L); C_0 为液相中的 N_2O 浓度(mg/L); K_0 为 N_2O 的亨利常数 mol/(L·atm); R 为气体状态常数(L·atm)/(mol·K); T 为绝对温度(K); V_g 和 V_l 分别为顶空平衡器内气相和液相的体积(mL)。

2 结果与分析

2.1 菌株 A1 和 D1 的形态学特征

菌株 A1 和 D1 的菌落和菌株形态特征如图 1 所示, 菌株 A1 菌落较小, 直径约为 0.2–0.5 mm; 早期菌落透明, 成熟后期变为乳白色; 菌落凸起成圆形, 表面光滑, 边缘不整齐。通过电镜观察, 菌体 A1 形态呈杆状, 两端钝圆, 胞质内膜内陷, 菌体大小为 (1.0–1.1) μm × (0.4–0.5) μm ,

在常规氨氧化细菌的细胞大小范围之内^[23]。菌株 D1 的菌落较小, 直径约为 1.0–2.0 mm; 早期菌落透明, 后期变成乳白色; 菌落凸起形成圆形, 表面光滑, 边缘较整齐。通过电镜观察, 菌株 D1 菌体清晰, 形态呈直杆状, 两端钝圆, 大小为 (0.3–0.4) μm × (1.1–1.2) μm , 菌株 D1 与已报道的 *Pseudomonas stutzeri* 的尺寸、形态基本相近^[9]。

2.2 菌株 A1 和 D1 的 16S rRNA 基因序列分析

菌株 A1 和 D1 的 16S rRNA 基因全长分别为 1 375 bp 和 1 429 bp, 将 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库作 BLAST 比对, 并根据比对的结果构建系统发育树。菌株 A1 归于 *Aquamicrobium* 属, 与 *Aquamicrobium ahrensii* strain G210 (GenBank: JX188232.1) 的亲缘关系最近(图 2)。截至目前, 已鉴定到的 AOB 有 5 个属, 分别为 *Nitrosomonas*、*Nitrosospira*、*Nitrosovibrio*、*Nitrosolobus* 和 *Nitrosococcus*, 均

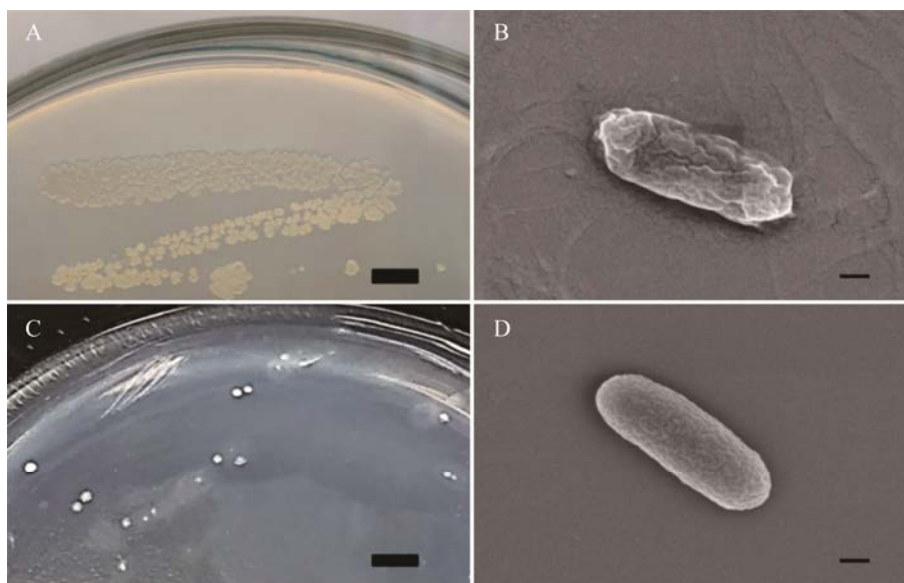


图 1 菌株 A1 和 D1 菌落和菌株形态照片

Figure 1 Photographs of the strain A1 and D1 colony and strain morphology. A: flat chart, scale=2 mm; B: scanning electron microscopy, scale=0.2 μm ; C: flat chart, scale=10 mm; D: scanning electron microscopy, scale=0.5 μm .

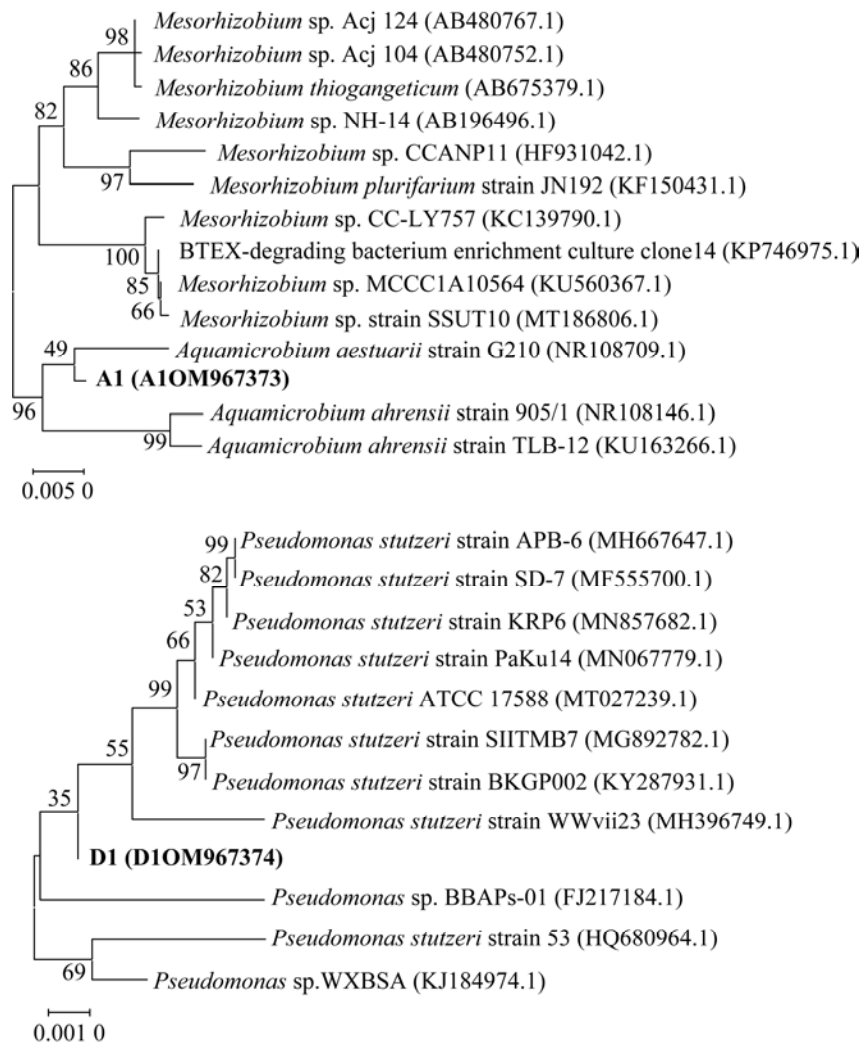


图 2 菌株 A1 和 D1 系统发育树

Figure 2 Strains A1 and D1 phylogenetic trees. Bar 0.005 0 and 0.001 0 at the bottom is the sequence divergence. The numbers of GenBank were shown in parentheses.

属于变形菌纲^[24-25], 因此, 菌株 A1 不属于常规的氨氧化细菌。菌株 D1 归于 *Pseudomonas* 属, 与 *Pseudomonas stutzeri* strain WWvii23 (GenBank: MH396749.1)的亲缘关系最近, 且 *Pseudomonas stutzeri* 属于典型的反硝化菌^[26-27] (图 2)。因此, 结合形态学、16S rRNA 基因序列分析以及系统进化树试验结果, 可确定菌株 A1 和 D1 分别为 *Aquamicrobium* 属和 *Pseudomonas* 属。

2.3 温度对脱氮菌株 A1 和 D1 的影响

为了考察温度对菌株 A1 和 D1 脱氮特性的

影响, 试验了 24 h 内在不同温度分别为 25、30、35、40、42 °C 的条件下菌株 A1 和 D1 的氮素去除情况。结果如图 3 所示, 菌株 A1 在温度 25-45 °C 区间, 其 NH₄⁺-N 转化速率随温度的升高呈先增大后减小。当温度为 42 °C 时, 菌株 A1 的 NH₄⁺-N 转化速率最大, 为 1.18 mg N/(g protein·h), NH₄⁺-N 去除率高达 59.4%; 温度为 25 °C 时, NH₄⁺-N 去除率骤降至 2.30%, 说明菌株 A1 的最适生长温度为 42 °C。菌株 D1 在温度 25-42 °C 区间, 其 NO₂⁻-N

还原速率随温度的升高呈先增大后减小。当温度为 40 °C 时, 菌株 D1 的 NO_2^- -N 还原速率最大, 为 12.16 mg N/(g protein·h), 亚硝氮还原率超过 99%, 说明菌株 D1 的最适生长温度为 40 °C。据文献报道, *Halomonas sacchaevitans* DN20 在温度 30 °C 条件下, 其反硝化还原速率为 2.82 mg N/(g protein·h), 随着温度升高至 45 °C, 其反硝化还原速率大大降低^[28], 本实验得到的菌株 D1 与 *Halomonas sacchaevitans* DN20 相比, 具有更强的反硝化能力。

如图 4 所示, 在温度 25–42 °C 区间, 菌株 D1 亚硝酸盐型反硝化过程均释放出了不太理想的 N_2O , 其中当温度为 40 °C 时, 菌株 D1 的 N_2O 得率最高, 达到 74.01%。Wang 等发现不论温度升高还是降低, N_2O 的释放量一直处于上升的趋势^[29]。Reino 等通过配制模拟废水研究了不同温度对生物脱氮过程中 N_2O 释放的影响, 发现了 N_2O 产生速率与温度呈正比^[30]。综上所述, 菌株 D1 在高温环境下能够实现反硝化脱氮, 但同时也会释放出大量 N_2O 。

2.4 不同 C/N 条件下的耐热菌株 A1 和 D1 共培养物的性能测试

为了明确 C/N 对该共培养物短程硝化反硝化脱氮及 N_2O 释放效应的影响, 在 C/N 分别为 1:1、2:1、3:1 和 4:1 条件下监测了 196 h 内的氮素去除情况。结果如图 5 所示, 在模拟废水氨氮浓度为 100mg/L, pH 9.0, 温度为 42 °C 条件下, 在氨氧化阶段, 随着初始 C/N 的增加, NH_4^+ -N 转化率及 NO_2^- -N 积累量几乎不受 C/N 的影响; 而在反硝化阶段, 随着初始 C/N 的增加, NO_2^- -N 还原率明显提升, 且最高的 N_2O 得率也随之升高。当初始 C/N=1:1 时, NO_2^- -N 仅还原 70.4%, 最高的 N_2O 得率为 42.0%。当初始 C/N=2:1、3:1 和 4:1 时, NO_2^- -N 去除率均 > 99.0%, 最高 N_2O 的得率分别为 45.6%、51.0% 和 52.3%。当环境条件成为限制性因素时, 4 步反硝化还原酶活性可产生不同响应, Pan 等研究发现氧化亚氮还原酶(Nos)竞争电子能力较弱, 当碳源受限造成的不彻底反硝化也是引起 N_2O 积累的重要影响因素之一。低 C/N 条件

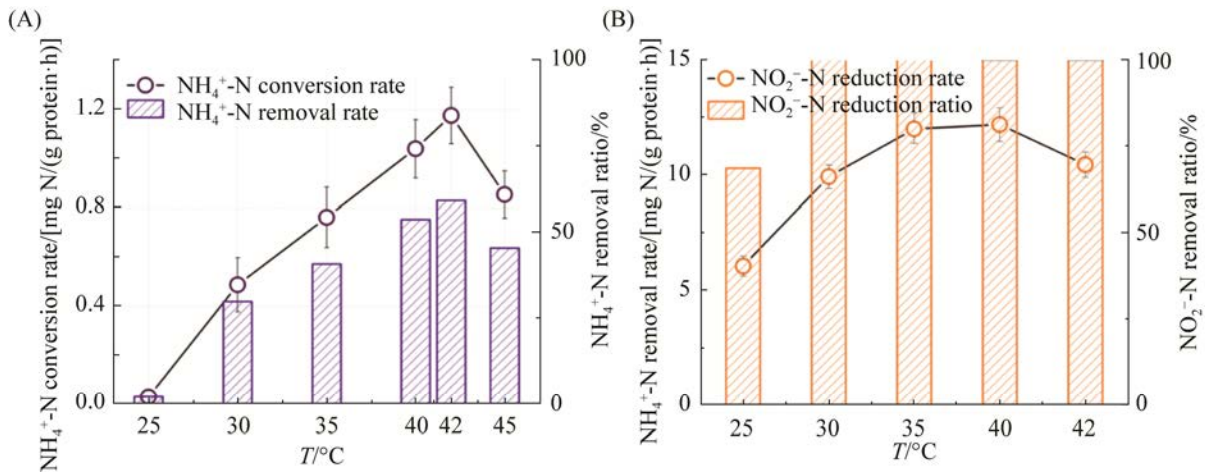


图 3 温度对菌株 A1 和 D1 脱氮特性的影响

Figure 3 Effect of temperature on nitrogen removal characteristics of the strain A1 and D1. A: ammonia nitrogen conversion rate of the strain A1; B: nitrite nitrogen reduction rate of the strain D1. Values represents means±SD. Three biological repeats were performed.

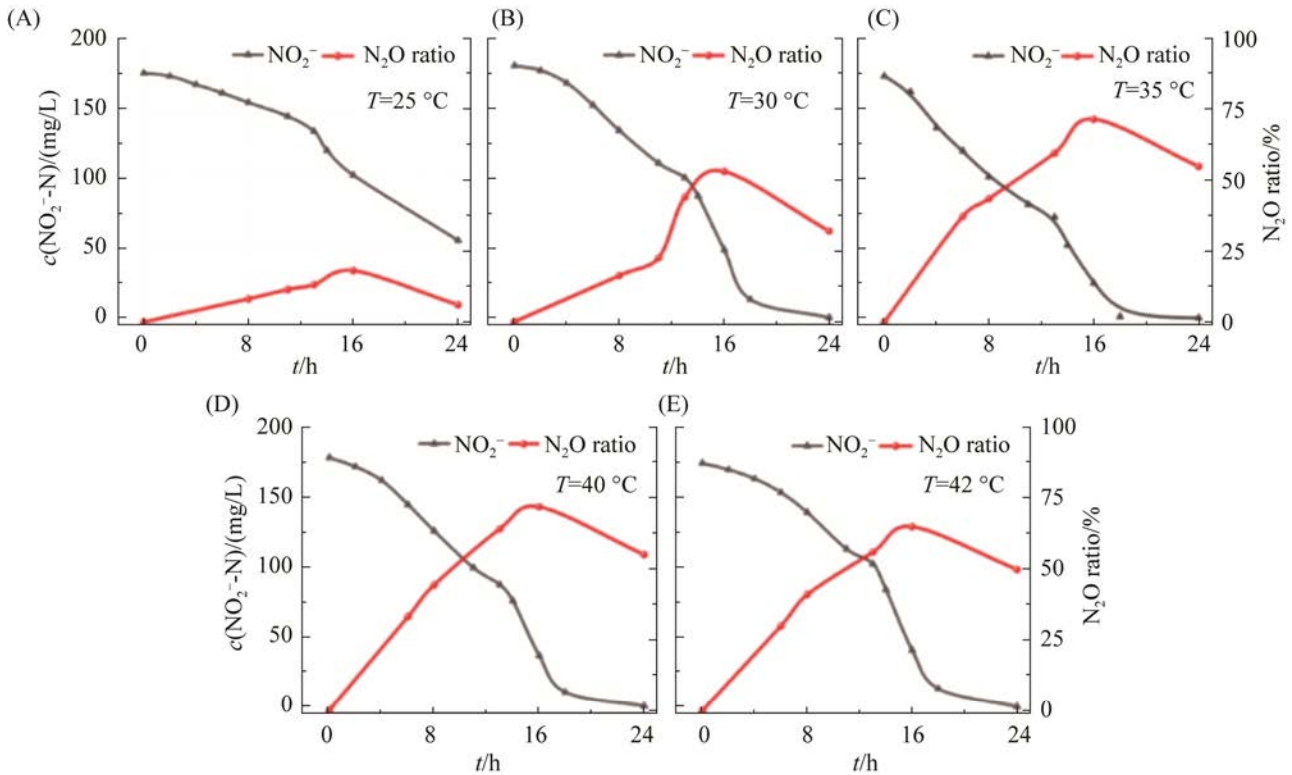


图 4 不同温度条件下菌株 D1 的亚硝酸盐氮还原情况及 N₂O 得率

Figure 4 Nitrite reduction and N₂O yield rate of the strain D1 at different temperatures. A: T=25 °C; B: T=30 °C; C: T=35 °C; D: T=40 °C; E: T=42 °C.

下, Nos 会利用细胞内碳源进行反硝化, 触发电子竞争时, Nos 往往得不到足够电子, 导致 N₂O 的释放^[31]。基于以上的结果, 当 C/N 为 2:1 时, 该共培养物能实现高效的氮素去除并减少了 N₂O 的释放。与此同时, C/N=2:1 相较于 C/N=3:1 和 4:1 降低了外加碳源的成本。综上所述, 由菌株 A1 和 D1 构建的共培养物最佳 C/N 为 2:1。

2.5 不同 pH 条件下的耐热菌株 A1 和 D1 共培养物的性能测试

为了明确 pH 对该共培养物短程硝化反硝化脱氮及 N₂O 释放效应的影响, 在 pH 分别为 6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 条件下监测了 220 h 内的氮素去除情况。结果如图 6 所示, 在模拟废水氨氮浓度为 100 mg/L, 初始 C/N=4:1, 温度为 42 °C 条件下, 在氨氧化阶段, 当 pH 分别为 6.0 和 7.0 时, 经过 192 h 反应, 氨氮分别仅

转化了 43.8% 和 74.7%, 且 NO₂⁻-N 积累浓度较低。当 pH 分别为 8.0、9.0 和 10.0 时, 经过 192 h 的处理, NH₄⁺-N 去除率均 >99%, 其中当 pH 为 9.0 时, NO₂⁻-N 积累量最高, 高达 52.6 mg/L。在反硝化阶段, 当 pH 为 6.0 时, NO₂⁻-N 被快速还原, 且 N₂O 释放量低于检测限; 当 pH 分别为 7.0、8.0、9.0 和 10.0 时, NO₂⁻-N 经 20 h 反应后, 其还原率均 >99%, 最高的 N₂O 得率分别为 53.6%、58.3%、53.0% 和 40.5%。基于以上的结果, 当 pH 范围为 9.0–10.0 时, 该共培养物能实现高效的氮素去除并减少了 N₂O 的释放。与此同时, 由于亚硝酸盐氧化菌 (NOB) 生存的最适 pH 范围为 6.0–7.5, 为了抑制 NOB 的活性, 提高下游反硝化细菌对 NO₂⁻-N 的利用率^[32–33]。因此, 由氨氧化细菌菌株 A1 和反硝化细菌菌株 D1 构建的混合菌群的最佳 pH 范围为 9.0–10.0。

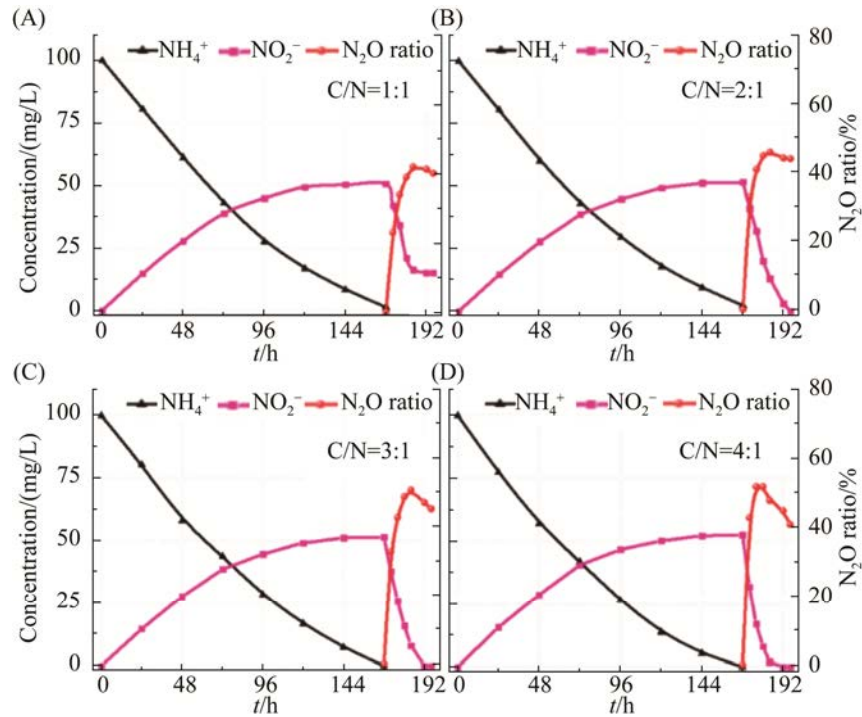


图 5 不同 C/N 条件下短程硝化反硝化脱氮及 N_2O 释放效应

Figure 5 Effects of shortcut nitrification-denitrification on nitrogen removal and N_2O release under different C/N ratios. A: C/N=1:1; B: C/N=2:1; C: C/N=3:1; D: C/N=4:1.

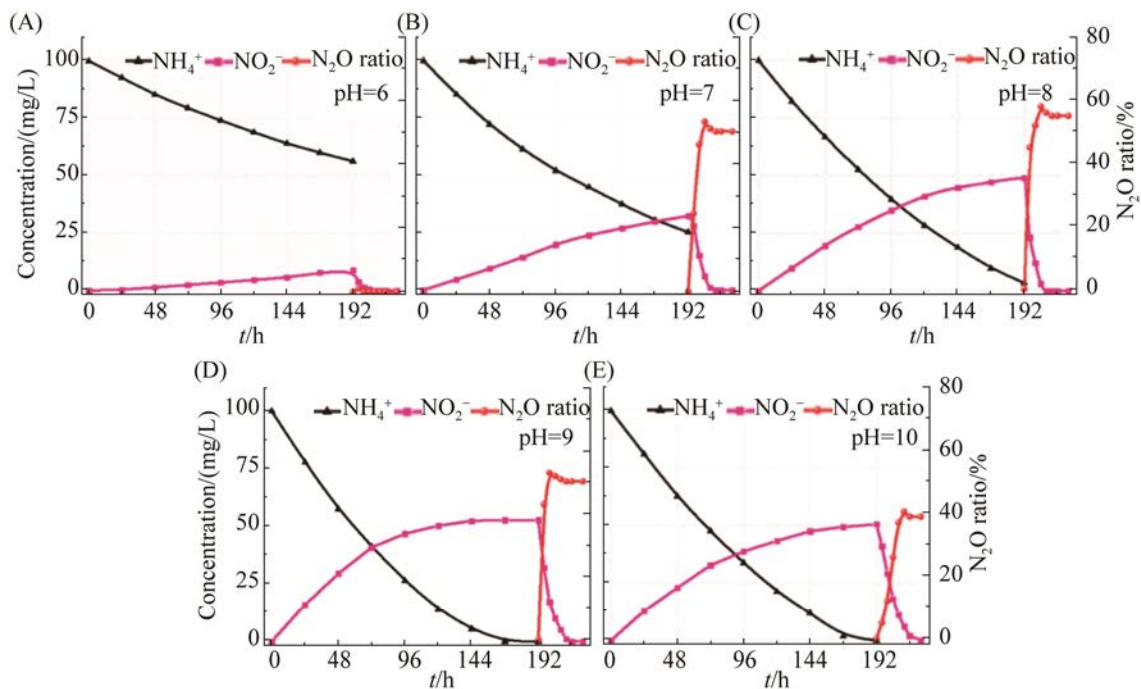


图 6 不同 pH 条件下短程硝化反硝化脱氮及 N_2O 释放效应

Figure 6 Effects of shortcut nitrification-denitrification on nitrogen removal and N_2O release under different pH conditions. A: pH=6; B: pH=7; C: pH=8; D: pH=9; E: pH=10.

3 结论

(1) 本文从煤化工废水处理系统的活性污泥中筛选得到 1 株耐热氨氧化细菌 A1 和 1 株耐热反硝化细菌 D1, 菌株 A1 鉴定为 *Aquamicrobium ahrensii*, 菌株 D1 鉴定为 *Pseudomonas stutzeri*。

(2) 耐热菌株 A1 和 D1 均具有较强的脱氮能力, 其最适生长温度分别为 42 °C 和 40 °C。

(3) 由耐热菌株 A1 和 D1 构建的共培养物在 42 °C 高温条件下, 处理 NH₄⁺-N 浓度为 100 mg/L 模拟废水的最佳 pH 为 9.0–10.0, 最佳 C/N 为 2:1, 氮素去除率达 >99.0%, 最大 N₂O 得率高达 51.3%。

(4) 菌株 A1 和 D1 能在 42 °C 的高温条件下生存和脱氮, 说明其具有一定的耐热特性, 对环境温度适应范围较广, 可为高温的煤化工氨氮废水的生物处理提供技术支撑及菌种储备, 同时也为高温污水处理过程中 N₂O 的释放规律提供理论参考。

参考文献

- [1] 孙双印. 煤化工行业发展趋势及问题分析. 河南化工, 2016, 33(4): 11–13.
Sun SY. Development trend and problem analysis of coal chemical industry. *Henan Chemical Industry*, 2016, 33(4): 11–13. (in Chinese)
- [2] 《煤化工建设项目环境准入条件(试行)》解读. 煤炭加工与综合利用, 2016(2): 1–3.
Interpretation of environmental access conditions for coal chemical construction projects (trial). *Coal Processing & Comprehensive Utilization*, 2016(2): 1–3. (in Chinese)
- [3] 郑平, 胡宝兰, 徐向阳. 新型生物脱氮理论与技术. 北京: 科学出版社, 2004.
- [4] 郑辉. 生态环境部正式发布《2018 中国生态环境状况公报》. 水处理技术, 2019, 45(6): 105.
Zheng H. The ministry of ecological environment officially issued the 《2018 China ecological environment bulletin》. *Technology of Water Treatment*, 2019, 45(6): 105. (in Chinese)
- [5] Guo L. Ecology. Doing battle with the green monster of Taihu Lake. *Science*, 2007, 317(5842): 1166.
- [6] Zhao Q, Han HJ, Xu CY, Zhuang HF, Fang F, Zhang LH. Effect of powdered activated carbon technology on short-cut nitrogen removal for coal gasification wastewater. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 179–185.
- [7] Gao JQ, Gao D, Liu H, Cai J, Zhang JQ, Qi ZL. Biopotentiality of high efficient aerobic denitrifier *Bacillus megaterium* S379 for intensive aquaculture water quality management. *Journal of Environmental Management*, 2018, 222: 104–111.
- [8] 张苗, 黄少斌. 高温好氧反硝化菌的分离鉴定及其反硝化性能研究. 环境科学, 2011, 32(1): 259–265.
Zhang M, Huang SB. Identification and Denitrification Characteristics of a Thermophilic Aerobic Denitrifier. *Environmental Science*, 2011, 32(01): 259–265. (in Chinese)
- [9] 李誉琦, 马佩钰, 刘涵, 王灵芝, 高仁玲, 李慧娟. 一株耐高温亚硝酸盐型反硝化细菌的鉴定及脱氮特性. 生物技术通报, 2019, 35(9): 194–201.
Li YQ, Ma PY, Liu H, Wang LZ, Gao RL, Li HJ. Identification and denitrification characters of a high-temperature-resistant nitrite-denitrifying bacterium. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(9): 194–201. (in Chinese)
- [10] Zhuge YY, Shen XY, Liu YD, Shapleigh J, Li W. Application of acidic conditions and inert-gas sparging to achieve high-efficiency nitrous oxide recovery during nitrite denitrification. *Water Research*, 2020, 182: 116001.
- [11] Kampschreur MJ, Temmink H, Kleerebezem R, Jetten MSM, Van Loosdrecht MCM. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research*, 2009, 43(17): 4093–4103.
- [12] Zhuang JL, Zhou YY, Liu YD, Li W. Flocs are the main source of nitrous oxide in a high-rate anammox granular sludge reactor: insights from metagenomics and fed-batch experiments. *Water Research*, 2020, 186: 116321.
- [13] Li W, Zhuang JL, Zhou YY, Meng FG, Da Kang, Zheng P, Shapleigh JP, Liu YD. Metagenomics reveals microbial community differences lead to differential nitrate production in anammox reactors with differing nitrogen loading rates. *Water Research*, 2020, 169: 115279.
- [14] 马彦蓉. 耐热脱氮菌株的分离鉴定及性能研究. 华东理工大学硕士学位论文, 2021.

- [15] Takaya N, Catalan-Sakairi MAB, Sakaguchi Y, Kato I, Zhou ZM, Shoun H. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3152–3157.
- [16] 汤默然, 李茹莹. 异养硝化-好氧反硝化菌株的分离筛选及复配菌剂对河水的净化效果. *环境科学学报*, 2021, 41(7): 2657–2663.
Tang MR, Li RY. Isolation of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains and purification of river water by mixed cultures. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 41(7): 2657–2663. (in Chinese)
- [17] 冯亮. 好氧反硝化菌 *Pseudomonas stutzeri* T13 的脱氮特性及机制研究. 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2021.
- [18] 王秀杰, 王维奇, 李军, 李芸, 张彦灼, 孙艺齐, 王思宇, 卞伟. 异养硝化菌 *Acinetobacter* sp. 的分离鉴定及其脱氮特性. *中国环境科学*, 2017, 37(11): 4241–4250.
Wang XJ, Wang WQ, Li J, Li Y, Zhang YZ, Sun YQ, Wang SY, Bian W. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifier, *Acinetobacter* sp., and its characteristics of nitrogen removal. *China Environmental Science*, 2017, 37(11): 4241–4250. (in Chinese)
- [19] 黄雪娇, 杨冲, 倪九派, 李振轮. 1 株高效去除氨氮的红假单胞菌的分离鉴定及特性. *环境科学*, 2016, 37(6): 2276–2283.
Huang XJ, Yang C, Ni JP, Li ZL. Isolation, identification and characteristics of a *Rhodopseudomonas* with high ammonia-nitrogen removal efficiency. *Environmental Science*, 2016, 37(6): 2276–2283. (in Chinese)
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [21] 布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [22] 蔡茜, 何腾霞, 冶青, 李振轮. 耐冷嗜碱蒙氏假单胞菌 H97 的鉴定及其好氧反硝化特性. *环境科学*, 2018, 39(7): 3314–3320.
Cai X, He TX, Ye Q, Li ZL. Identification and characterization of a hypothermic alkaliphilic aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas monteilii* strain H97. *Environmental Science*, 2018, 39(7): 3314–3320. (in Chinese)
- [23] 国家环境保护总局《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: 中国环境出版社, 2002.
- [24] Wang JP, Li LZ, Liu YD, Li W. A review of partial nitrification in biological nitrogen removal processes: from development to application. *Biodegradation*, 2021, 32(3): 229–249.
- [25] 董莲华, 杨金水, 袁红莉. 氨氧化细菌的分子生态学研究进展. *应用生态学报*, 2008, 19(6): 1381–1388.
Dong LH, Yang JS, Yuan HL. Research advances in molecular ecology of ammonia oxidizing bacteria. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(6): 1381–1388. (in Chinese)
- [26] Wang JP, Liu YD, Li W. Model-based assessment of nitrification using formic acid as a selective inhibitor. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 276: 124290.
- [27] Wang JP, Liu YD, Meng FG, Li W. The short- and long-term effects of formic acid on rapid nitritation start-up. *Environment International*, 2020, 135: 105350.
- [28] 蒋欣燃. 厌氧反硝化细菌的分离鉴定及其对水产养殖废水脱氮作用的初步研究. 大连海洋大学硕士学位论文, 2017.
- [29] Wang XJ, Ye CS, Zhang ZJ, Guo Y, Yang RL, Chen SH. Effects of temperature shock on N_2O emissions from denitrifying activated sludge and associated active bacteria. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 605–611.
- [30] Reino C, Van Loosdrecht MCM, Carrera J, Pérez J. Effect of temperature on N_2O emissions from a highly enriched nitrifying granular sludge performing partial nitritation of a low-strength wastewater. *Chemosphere*, 2017, 185: 336–343.
- [31] Pan YT, Ni BJ, Lu HJ, Chandran K, Richardson D, Yuan ZG. Evaluating two concepts for the modelling of intermediates accumulation during biological denitrification in wastewater treatment. *Water Research*, 2015, 71: 21–31.
- [32] Wang JP, Liu YD, Meng FG, Li W. The short- and long-term effects of formic acid on rapid nitritation start-up. *Environment International*, 2020, 135: 105350.
- [33] Li W, Cai ZY, Duo ZJ, Lu YF, Gao KX, Abbas G, Zhang M, Zheng P. Heterotrophic ammonia and nitrate bio-removal over nitrite (hanbon): performance and microflora. *Chemosphere*, 2017, 182: 532–538.