

单级自养脱氮系统亚硝化菌株的分离、鉴定及定性

郭劲松, 秦宇, 方芳*, 杨国红

(重庆大学三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400045)

摘要:【目的】研究单级自养脱氮系统中亚硝化菌株的培养及代谢特征,为系统运行操控提出理论指导。【方法】从单级自养脱氮系统活性污泥中采集微生物样品,经过4次富集和分离过程,最终获得一株亚硝化能力较强的菌株N1,通过显微镜观察及16S rDNA序列分析鉴定该菌株,研究摇瓶装量、pH、温度及底物浓度对其代谢过程的影响。【结果】该菌株与*Nitrosomonas* sp. NL7 (AY958677)、*Nitrosomonas* AS1 (EF016119)、*Nitrosomonas* sp. Is32 (AJ621027)相似性分别为97%、96%和96%,对氧气需求量存在较严格要求,pH及温度对其氨氧化活性具有明显的影响,最适条件分别为pH 8.0和30℃,在氨氮浓度80~800 mg/L较宽的底物浓度范围内具有活性,当氨氮浓度高达800 mg/L时,其氨氧化活性没有受到明显的抑制。【结论】该N1菌株为亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas* sp.),与已有报道的其它亚硝化菌相比,N1对氨氮有较强降解能力及较广的浓度适应范围。

关键词: 单级自养脱氮; 亚硝化菌; 分离纯化; 特性

中图分类号: X712 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1088-07

近年来,水体氮磷污染问题日趋严重。各种脱氮新工艺的开发成为环境科学与工程领域的研究热点之一。其中生物脱氮工艺因其经济、有效、易操作等特点,倍受学者青睐。单级自养脱氮工艺是诸多新型生物脱氮工艺中的一种,该工艺在一个反应器中完成氨氮至 N_2 的全部转化过程,且该过程全部由同一微生物体系内的自养菌完成,在处理高氨氮、低C/N比废水方面所具有的简易、高效、低耗等优点是其它生物脱氮工艺无可比拟的。由于自养脱氮现象发现较晚,目前关于单级自养脱氮的工艺技术仍处于研发阶段,其脱氮反应机理的诸多研究成果尚未形成共识。学术界有一种观点认为,该工艺主要由亚硝化菌及厌氧氨氧化菌协同完成脱氮过程^[1~3],实现脱氮的关键是要将 NH_4^+ 氧化过程控制在 NO_2^- ,避免 NO_3^- 的积累,为后续的厌氧氨氧化提供条件。因此,亚硝化菌在单级自养脱氮系统中起到尤为重要的作用。

本研究从单级自养脱氮反应器中分离纯化得到一株具有较高氨氧化活性的菌株N1,通过对其进行分子生物学鉴定和相关特性研究,拟掌握其培养及代谢特征,为系统进一步驯化和筛选优势功能菌提出运行操控指导,为该工艺开拓实际工程应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 污泥样品:活性污泥样品取自单级自养脱氮反应器^[4]。该反应器接种污泥采自重庆市渝北区城南污水处理厂曝气池中的好氧污泥和唐家桥污水处理厂浓缩池中污泥。接种污泥在温度为30℃、pH为8.0左右的条件下,加入人工配制氨氮废水进行逐步培养和驯化。人工配制氨氮废水中,不含有机碳, NH_4HCO_3 浓度为100~300mg/L,以N:P比为10:1的比例加

基金项目: 国家自然科学基金(50608071); 高等学校博士学科点专项科研基金(20050611010); 污染控制与资源化研究国家重点实验室开放项目(PCRRF06001)

*通讯作者。Fax: +86-23-65127370; E-mail: xiduo@tom.com

作者简介: 郭劲松(1963-), 男, 四川射洪人, 教授, 博士, 主要从事水污染控制的理论与技术研究。E-mail: Guo0768@cqu.edu.cn

收稿日期: 2008-03-13; 修回日期: 2008-04-24

入磷酸盐缓冲溶液,另外加入 Fe、Mg 等微量元素,以 NaHCO_3 调节溶液 pH 值。本研究中取污泥样品时,系统已完成启动过程,处于稳定运行状态,氨氮转化率及总氮去除率分别达到 90% 及 80% 左右^[5]。

1.1.2 主要试剂和仪器 :PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成, Taq 酶、PCR buffer、 Mg_2^+ 及 dNTPs 由天根生化科技有限公司提供。其它试剂均为国产分析纯。OLGMPUS 荧光显微镜及成像系统, BIO-RAD MyCycler PCR 扩增仪, BIO-RAD Versa Doc 电泳成像系统, Sension2 型便携式 pH/ISE 测量仪。

1.2 菌株的分离与纯化

亚硝化菌分离培养基及富集培养基组分详见文献[6]。取单级自养脱氮反应器中活性污泥 5 mL 于 500 mL 三角瓶中,内装 100 mL 亚硝化菌富集培养基,于温度 30 °C 转速 150 r/min 摇瓶培养,每两天加 3 mL 浓度为 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行富集,同时制备一瓶不接种活性污泥的空白对照。采用格里斯试剂的显色反应在白瓷板上检验 NO_2^- 是否生成,确定富集细菌是否具有氨氧化功能,进行取舍。培养 10 d 后取富集上清液 1 mL 涂布于硅胶平板,于 30 °C 的培养箱中培养至菌落出现。无菌条件下挑取单菌落重新接于亚硝化菌分离培养基内,于同样的温度与转速培养。经多次重复分离得到具有亚硝化能力较强的菌株。

1.3 菌株的鉴定

将纯化菌株进行革兰氏染色,用光学显微镜观察细胞形态、大小及其运动,检测该菌株对碳源、氮源的利用及生长因子的需求情况,参照文献[7]对分离的菌株进行初步分类鉴定。

将分离得到的菌株按 Regan 等^[8]的方法提取细菌 DNA。根据形态学观察及文献^[8,9]公布的序列,确定亚硝化菌的 16S rDNA 扩增引物对为: AmoA-1F 及 AmoA-2R,按文献[9]PCR 反应条件扩增出 16S rDNA,检测回收后送往上海生工生物工程技术有限公司测序。测序结果在 NCBI 上应用 BLAST 程序与数据库中已有细菌 16S rDNA 序列进行同源性比较分析。

1.4 特性分析

氨氮:纳氏试剂比色法^[10];亚硝酸盐:N-1-奈基-乙二胺比色法^[10]。

细菌计数:最大可能数量法^[11];菌体细胞量:干重法^[11]。

数据处理:① 测定多个时刻摇瓶中上清液的基质浓度;② 绘制基质浓度变化曲线;③ 根据基质浓度

变化曲线求出最大斜率,即基质的最大去除速率 V_{\max} ;

④ 将 V_{\max} 除以摇瓶中菌体浓度即得基质的最大比反应速率 v_{\max} 。

2 结果和分析

2.1 菌株的鉴定

经 4 次富集和分离,最终获得 1 株亚硝化能力较强的菌株 N1,如图 1 所示。菌落呈白色小圆点状,直径 1 mm 左右,不透明,边缘不光滑,且不易挑取。革兰氏阴性,细胞为球状,单生或对生,无荚膜,严格好氧,在肉汁培养基上不能生长,从氨氧化为亚硝酸盐的过程中获得能量。

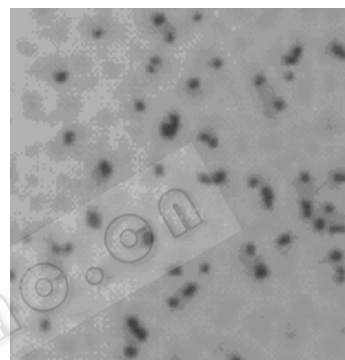


图 1 显微镜下的 N1 菌株(400 倍)

Fig. 1 Electron micrograph of N1 ($\times 400$).

根据菌株革兰氏染色及特性分析结果,提取菌液 DNA 并选择氨氧化菌特有引物对菌株进行 PCR 扩增。试验结果显示,N1 的 16S rDNA 长 520 bp,在 NCBI 数据库中注册序列号为 EU647556,将此序列与 GenBank 数据库中序列进行比对,得到了该菌株的匹配序列。该菌株与 *Nitrosomonas* sp. NL7 (AY958677)、*Nitrosomonas* AS1 (EF016119)、*Nitrosomonas* sp. Is32 (AJ621027) 相似性分别为 97%、96% 和 96%,结合培养及生理生化特征,将 N1 鉴定为亚硝化球菌属,命名为 *Nitrosomonas* sp. N1。

2.2 环境条件对 N1 菌株活性的影响

2.2.1 摇瓶装量:250 mL 三角瓶中分别装入体积为 10、20、50、100、150、200 mL 的培养基,其中氮源 NH_4^+ -N 浓度均为 160 mg/L,分别接种分离纯化后液体培养基中的 N1 菌株 1 mL (细菌数 4.5×10^5 个/mL,菌体细胞量 0.8 mg/mL),在 30 °C 条件下 150 r/min 摇床培养。试验结果如图 2 所示。

试验结果表明,摇瓶装量分别为 10、20 以及

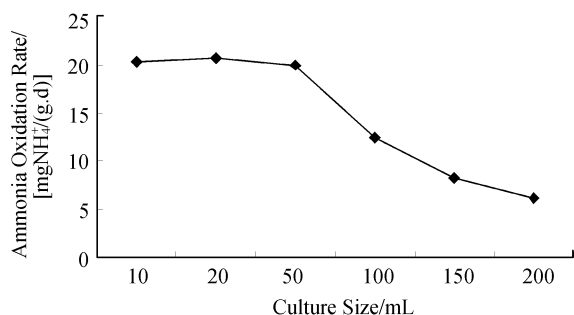


图2 瓶装量试验结果

Fig. 2 Effect of culture size on ammonia oxidation rate of N1.

50 mL 时 N1 菌株的氨氧化速率差别不大, 均在 20 mgNH₄⁺/(g 菌体·d) 左右, 但随着培养基体积的进一步增加, 氨氧化速率逐步下降, 100 mL 及 150 mL 摇瓶装量条件的氨氧化速率分别为 12.42 mgNH₄⁺/(g 菌体·d) 和 8.28 mgNH₄⁺/(g 菌体·d), 200 mL 时低至 6.21 mgNH₄⁺/(g 菌体·d), 仅为 50 mL 条件下的 30%。由于摇瓶装量与液体培养基的富氧速率成正比关系, 所以该试验说明菌株 N1 在氧气充足的条件下氨氧化活性较强, 对氧气需求量有较严格的要求。

在自养脱氮系统中, 亚硝化菌完成将氨氮转化成亚硝态氮的第一步工作, 而最终实现氮的去除还需要厌氧氨氧化菌协同作用^[1-3]。厌氧氨氧化菌属典型的厌氧自养菌, 对氧极其敏感。有文献报道, 当溶解氧 (DO) 大于 0.03 mg/L 时, 其活性就将受到抑制^[12]。从本试验及其它关于亚硝化菌的生理生化特性报道中均证明该类菌种属典型好氧菌, 为了较好地实现自养脱氮系统的氨氮去除就必须协调好亚硝化菌及厌氧氨氧化菌在 DO 上的矛盾。因此, 从试验结果上分析, 自养脱氮系统应采用相应的生物膜反应器或者颗粒污泥作为载体, 一方面为亚硝化菌代谢提供足够的溶解氧, 另一方面为厌氧氨氧化菌创造一个较好的厌氧环境。

2.2.2 pH 值: 对于废水生物处理过程, pH 值是另外一个非常重要的环境条件。本试验将 1 mL N1 菌株接种到起始 pH 值分别为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的培养基中, 培养条件同摇瓶装量试验。结果如图 3 所示, N1 菌株在 pH8.0 时氨氧化速率最高, 小于 8.0 的弱酸性范围内, 氨氧化速率随 pH 的升高而升高, 从 pH6.5 时的 10.35 mg NH₄⁺/(g 菌体·d) 上升到 pH8.0 时的 20.00 mg NH₄⁺/(g 菌体·d), 且在该区域内 pH 范围变化 0.5, 氨氧化速率将上升 3~4 mgNH₄⁺/(g 菌体·d) 左右。在大于 8.0 的弱碱区域中, 氨氧化速率随 pH

的升高而降低, 说明该菌株对 pH 很敏感, 较小的 pH 波动将引起较大的氨氧化速率变化。关于自养脱氮及厌氧氨氧化的其它相关研究中, 均有报道在 pH8.0 左右时脱氮效果最佳^[13, 14], 本试验结果从亚硝化菌的微生物学角度证实了这一观点, 该系统的最佳控制 pH 值为 8.0 左右。

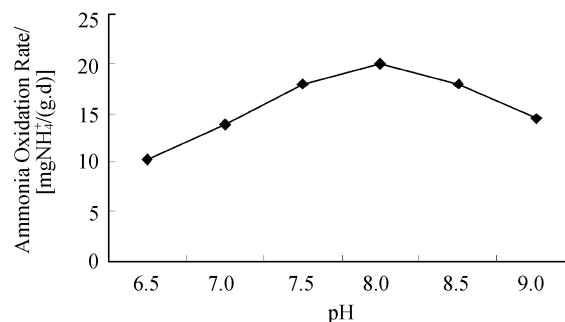


图3 pH 值试验结果

Fig. 3 Effect of pH on ammonia oxidation rate of N1.

关于 pH 对亚硝化菌活性的影响机制, 目前主要有两种观点。有学者认为细菌所处环境中的 pH 会直接影响细菌的电解质平衡, 从而影响其活性; 也有学者认为 pH 本身并不会直接影响亚硝化菌的活性, 但 pH 将会决定水溶液中作为亚硝化菌代谢基质——游离氨 FA 的浓度^[15]。pH 较高时, 在同样的总氨氮浓度下游离氨将较高, 而 pH 较低时则相反。即 pH 对亚硝化菌活性的影响是通过水溶液中游离氨的浓度而发挥作用的。试验进一步考察了不同 pH 下 N1 菌株的氨氧化速率及相应的游离氨浓度。游离氨浓度按式 (1) 计算^[16], 式中 t 为反应温度 (°C), 本试验中该值为 30。试验结果如表 1 所示。

表 1 不同 pH 下对应的游离氨浓度及氨氧化速率
Table 1 Concentration of FA and ammonia oxidation rate under different pH value

pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
FA mg/L	0.45	1.27	3.86	11.07	29.46	52.73
Ammonia oxidation rate mgNH ₄ ⁺ /(g·d)	10.35	13.80	17.93	20.00	17.93	14.49

$$NH_3(mg/L) = \frac{17}{14} \times (NH_4^+ - N) \times 10^{pH} \times \left[\frac{EXP \frac{6344}{273+t} + 10^{pH}}{1} \right]^{-1} \quad (1)$$

从表 1 可以看出, 在 pH 小于 8.0 的范围内, 游离氨浓度与氨氧化速率成正相关关系, 随游离氨浓度的升高氨氧化速率也逐渐升高, 但在 pH 大于 8.0 范围内, 氨氧化速率随游离氨浓度的升高而降低。

目前部分学者研究了 FA 对亚硝化菌产生抑制作用的临界值^[17-19],指出当 FA 浓度高于某个范围时亚硝化菌的代谢将明显降低。由计算值可知,本研究在氨氮浓度 160 mg/L、温度 30、pH<8 范围内,游离氨浓度低(0.45~11.07 mg/L),不足以对亚硝化菌代谢产生抑制作用,游离氨浓度与氨氧化速率成一定正比例关系,可认为此时 pH 对菌株的影响主要由 pH 对水溶液中游离氨浓度的影响所造成。而在 pH>8 时,FA 浓度较高,超过了目前所有关于 FA 对亚硝化菌产生抑制作用的临界值(10 mg/L),因此,该范围内 pH 对氨氧化活性的影响是复合的,除了游离氨的影响外 pH 本身也会对细菌的氨氧化速率具有较大影响。Groeneweg 等^[13]在试验中也得到类似结论。

2.2.3 温度:生物反应过程具有一个最适温度,只有在最适温度附近,细菌才会表现出良好的反应活性,从而增进反应器的运行效果。本试验在 250 mL 三角瓶中接种 1 mL N1 菌株,内装 20 mL 培养基,并将接种后的培养基置于不同温度下 150 r/min 摇床培养。结果表明,温度从 20 上升到 30,氨氧化速率逐渐提高,由 11.73 mg NH₄⁺/(g 菌体·d)上升到 23.45 mg NH₄⁺/(g 菌体·d),但随着温度继续升高,氨氧化速率又开始下降。由此说明,该亚硝化菌株在 30 条件下活性最大,低于 25 或高于 35 条件下,氨氧化速率都有明显的下降(图 4 所示)。

表 2 不同温度下 N1 菌株氨氧化速率实测值与理论值比较

Table 2 Comparison of testing and computational ammonia oxidation rates under different temperatures

T/	20	22	25	28	30	32	35	38
Testing rate mg NH ₄ ⁺ /(g·d)	11.73	14.49	20.00	21.38	23.45	22.76	20.69	17.93
Computational rate mg NH ₄ ⁺ /(g·d)		14.25	19.00	25.18	30.28	36.33	47.54	61.88

修正的 Arrhenius 方程式在描述细菌最大生长速率与温度之间的关系时,不同细菌有不同的适用范围。本研究中,通过计算值与实测值的比较可知,在一定温度范围内(20~28)该菌株的氨氧化速率与温度之间的关系近似可以用式(2)来描述,而对于较高温(大于 30)误差则较大,需对该式进一步修正。

亚硝化过程是一个酶催化反应,在此过程中直接起作用的酶是氨单加氧酶(ammonium monooxygenase, AMO)。按照酶抑制理论,只有在较低温度范围内,其反应速率才会随温度升高而加快,超过某一温度后,即酶被加热到生理允许温度以上,酶的反应速率反而随温度升高而下降,因为温度虽然可以加快

从图 4 可以看出,该细菌氨氧化速率随温度变化趋势与硝化反应一致^[14]。有研究表明,在一定温度范围(5~40)内,硝化细菌最大生长速率与温度之间的关系可用修正的 Arrhenius 方程式来表示^[20]。而在废水生物处理中,基质的去除速率与微生物的增长速率可用简单的正比关系来描述^[21],因此,利用修正的 Arrhenius 方程式(式 2)计算了温度对 N1 菌株氨氧化速率的影响。结果见表 2。

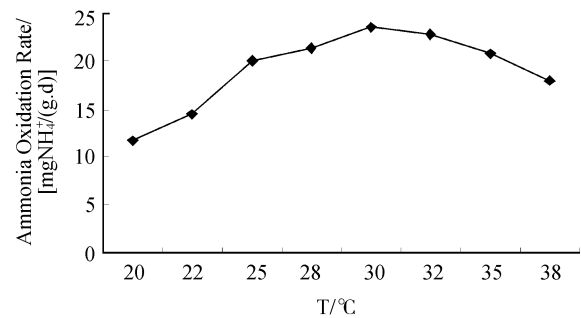


图 4 温度试验结果

Fig. 4 Effect of temperature on ammonia oxidation of N1.

$$v_t = v_{20} \exp\left[-\frac{Ea(20-t)}{293R(273+t)}\right] \quad (2)$$

式中, v_t 为温度 t () 时的氨氧化速率; v_{20} 为 20 时实测氨氧化速率; Ea 为氨氧化反应活化能, 约为 70 kJ/mol^[22]; $R = 8.314 \times 10^{-3}$ KJ/(mol·K)。

催化反应速率,但同时也加快了酶的热失活速率。本研究中 N1 菌株,最佳酶活性温度即 30~32,与文献^[19]中报道的 40 稍有差异。亚硝化菌世代周期较长,有多篇文献报道在以氨氮为唯一能源培养 *Nitrosomonas* 时,并没有测到细胞数量的增加^[23-25]。本研究中,经长期富集培养后 N1 菌株浓度也不是很高(4.5×10^5 个/mL),可以认为该菌株在高温区(大于 30)最大生长速率与温度之间的关系不能简单用修正的 Arrhenius 方程式来描述,该原因可能造成了与相关文献的差异。此外,该菌株取自单级自养脱氮反应器,该系统从接种到驯化成功已经稳定运行 2 年时间,在长期运行过程中,系统温度始终控制在 30 左右,所以可以认为该菌株在反应器内经历了一个长期

的驯化过程,已经适应了 30℃ 左右的控制条件,因此在较高温度范围内(大于 30℃)生理代谢能力并不会随温度升高而加强,反而受到抑制。

2.3 N1 菌株对氨氮浓度适应性

很多物质在低浓度时用作基质,但在高浓度时则成为抑制剂,抑制细菌的生长并干扰细菌的代谢^[26], $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 在亚硝化菌的代谢过程中也是如此,通过游离氨浓度直接影响其代谢活性^[17]。本研究分别配制不同 NH_4^+ 浓度的培养基,接种 N1 菌株,以研究该菌株的氨氧化能力及底物浓度对其活性的影响。同期制作一组未接种菌株的空白对照。接种当日及以后定期取样分别检测氨氮、亚硝酸根等含量。试验结果见图 5。

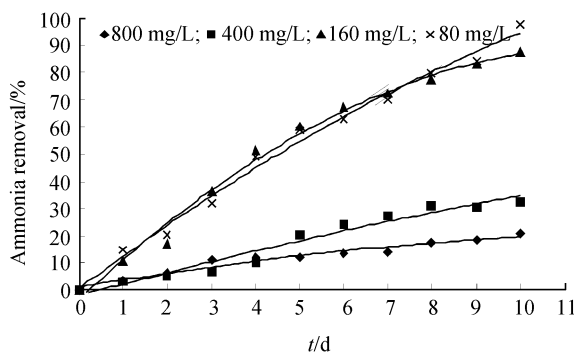


图 5 不同氨氮浓度下氨氮去除率

Fig. 5 Ammonia removal under different ammonia concentrations.

从图中可以看出, N1 具有较宽的底物浓度适应范围,在 80~800 mg/L NH_4^+ 浓度中该菌株均具较强活性,其氧化能力主要表现在接种后前 10 d 左右,而后氨氮的转化率随培养时间变化不大。在低浓度区,氨氮转化率很高,底物浓度 80 mg/L 时该菌株可以将氨氮几乎全部转化;160 mg/L 时,10 天后转化率也可达 88%;400 mg/L 及 800 mg/L 底物氨氮浓度的转化率分别为 31% 和 21%。不同氨氮浓度下 N1 菌

株氨氧化速率如表 3 所示。从表中可以看出,虽然各浓度范围下 N1 的氨氮转换化率稍有不同,但其氨氧化速率相差不大,尤其是 80~400 mg/L 之间。由于接种细菌数量相同而底物浓度大幅度增加,所以在高浓度范围内与低浓度相比氨氮的去除率相对较小,氨氧化速率在 800 mg/L 时,稍有下降,但差别并不明显(表 3)。试验结果说明,高浓度范围下 N1 氧化活性没有受到明显抑制。在整个试验过程中,空白样品中的氨氮浓度没有变化,也没有亚硝态氮生成,所以可以认为氨氮的转化完全由 N1 菌株完成。

表 3 N1 菌株在不同氨氮浓度下对应的氨氧化速率
Table 3 Ammonia oxidation rates under different ammonia concentrations

$\text{NH}_4^+\text{-N}/(\text{mg/L})$	80	160	400	800
Ammonia oxidation rate / $[\text{mg NH}_4^+(\text{g}\cdot\text{d})]$	15.37	15.55	16.25	12.79

3 讨论和结论

亚硝化菌在自然界氮循环过程中发挥着重要作用,尤其在生物脱氮系统中,无论何种工艺均离不开该类细菌完成氨氮的第一步转化。为了开发高效生物脱氮新技术并研究其机理,部分学者曾对亚硝化污泥进行了相关研究,但近年来少有关于分离纯化后的亚硝化菌的特性分析,该细菌在新型自养脱氮工艺中的应用更少有报道。由上述试验结果可以看出,从本研究中从单级自养脱氮反应器里分离纯化得到的亚硝化菌 N1 菌株具有很高的氨氧化活性,表 4 为本研究与其他研究者试验结果的比较。本研究中的 N1 菌株与文献^[27]中的 *Nitrosomonas eutropha* 相比,略低于其氨氧化速率,原因在于 Niranjana 等^[27]选择了该菌株的最佳生长反应条件下完成氨氧化速率测试试验,且最后富集得到的亚硝化菌浓度较高,而本试验研究的

表 4 不同研究中的氨氧化速率比较

Table 4 Comparison of different studies on ammonia oxidation rates

Kinds of Nitroso-bacteria (sludge)	Ammonia oxidation rate	Reference	
Nitroso-bacteria	Strain N1	10.35~23.45 $\text{mgNH}_4^+\text{-N}/(\text{g}\cdot\text{d})$	This study
	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	26.65 $\text{mgNH}_4^+\text{-N}/(\text{g}\cdot\text{d})$	[27]
	Strain N1	8.28~18.76 $\text{mgNH}_4^+\text{-N}/(\text{L}\cdot\text{d})$	This study
	4 strains isolated from wastewater treatment plant	3.85~5.29 $\text{mgNH}_4^+\text{-N}/(\text{L}\cdot\text{d})$	[28]
Nitroso-sludge	Nitroso-sludge of CSTR reactor	3.01 $\text{kgNH}_4^+\text{-N}/(\text{kgVSS}\cdot\text{d})$	[29]
	6 weeks' enrichment cultivate of Nitroso-sludge	0.04 $\text{kgNH}_4^+\text{-N}/(\text{kgSS}\cdot\text{d})$	[30]
	Active sludge from wastewater treatment plant	0.05 $\text{kgNH}_4^+\text{-N}/(\text{kgVSS}\cdot\text{d})$	[31]

为该菌株在不同生长控制条件下的氨氧化速率。本研究结果与文献[28]数据相比明显较高,且文献[27]中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度范围只讨论了在40~50 mg/L的低浓度情况,本研究中N1菌株耐受底物浓度范围广,在80~800 mg/L较宽的浓度范围内均有活性,底物浓度高至800 mg/L时,其氨氧化活性没有受到明显的抑制,这在以前相关文献中也尚未见报道。因此,可以认为N1菌株对氨氮有较强降解能力。

目前单级自养脱氮工艺因其在生物处理废水方面的诸多优势得到了国内外越来越多学者的重视,但由于机理研究的不明晰,使得该工艺一直处于黑箱阶段,研究者多通过系统运行参数与反应器进出水水质比较的宏观方法来掌握该工艺的控制条件,相关研究停留在实验室研究阶段,而不能应用于水质多变的实际废水处理中。本研究取样时,系统从构建到稳定运行已有近两年时间,相关微生物群落结构研究结果显示,该反应器内活性污泥微生物组成与接种污泥相比,已发生了很大变化,较长的驯化时间使得系统内微生物组成单一。然而,虽然该系统具有较高的运行效能,但抗冲击负荷能力不强,反应器在氨氮浓度160 mg/L条件下有较高运行效能。

本研究中的亚硝化细菌采自单级自养脱氮反应器中活性污泥,通过分离纯化得到多株具有氨氧化活性菌株,其中N1不仅具有较高的氨氧化活性,且对高氨氮含量污水有较强耐受能力。通过对N1菌株的培养及代谢特性研究,可以掌握其最佳代谢条件,为系统进一步驯化污泥、筛选优势功能菌提供相关理论依据。此外,若将该菌株继续扩大培养并完成相关基因功能菌的研究,必定会为单级自养脱氮系统的运行操控提供微观方面的理论指导,为系统的实际应用奠定基础。

致谢 本研究得到了重庆大学基因工程研究中心殷幼平、夏玉先、王中康等老师指导,在此对各位老师和同学表示衷心感谢!

参 考 文 献

- [1] Third KA, Sliemers AO. The CANON System (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under Ammonium Limitation: Interaction and Competition between Three Groups of Bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 24(4): 558-596.
- [2] Kuai L, Verstraete W. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Applied & Environmental Microbiology*, 1998, 64: 4500-4506.
- [3] Sliemers AO, Derworth N, Campos Gomez JL, et al. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Wat Res*, 2002, 36: 2475-2482.
- [4] 方芳, 郭劲松, 秦宇, 等. 单级自养脱氮生物膜 SBR 工艺的启动研究. *中国给水排水(China Water & Wastewater)*. 2006, 22(1): 58-61.
- [5] 方芳, 杨国红, 郭劲松, 等. DO 和曝停比对单级自养脱氮工艺影响试验研究. *环境科学(Environmental Science)*. 2007, 28(9): 1975-1980.
- [6] 黄俊丽, 肖丽, 王贵学, 等. 全程自养脱氮体系中的微生物区系分析. *微生物学通报(Microbiology)*. 2005, 35(6): 78-82.
- [7] Buchanan RE, Gibbens NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册编译组译. 第八版. 北京: 科学出版社. 1984. 626-631.
- [8] Regan JB, Harrington GW, Noguera DR. Ammonia and nitrite oxidizing bacterial communities in a pilot scale chloraminated drinking water distribution system. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 73-82.
- [9] 陈玲, 明镇寰. 硝化池中氨氧化细菌 amoA 基因的检测及其多样性研究. *浙江大学学报(理学版)(Journal of Zhejiang University(Science Edition))*. 2004, 31(5): 565-569.
- [10] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002, 276-279.
- [11] 余毓馨, 吴国庆, 孟宪庭. 环境工程微生物检验手册. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
- [12] Strous M, van Gerven K, Kuenen JG, et al. Effects of AEROBIC and microaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997, 63: 2446-2448.
- [13] Groeneweg J, Sellner B, Tappe W. Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at NH_3 concentration near K_m : effect of pH and temperature. *Water Research*, 1994, 28(12): 2561-2566.
- [14] Antoniou P, Hamilton J, Koopman B, et al. Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Wat Res*, 1990, 24(1): 97-101.
- [15] Jayamohan S, Ohgaki S, Hanaki K. Effect of Do on kinetics of nitrification. *Water supply*. 1998, 6: 141-150
- [16] Taichi Y, Keita T, Toichiro K, et al. Novel Partial Nitritation Treatment for Anaerobic Digestion Liquor of Swine Wastewater Using Swim-Bed Technology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102(6): 479-503.
- [17] Anthonisen AC, Lochr RC, Prakasam TBS, et al. Inhibition of nitrification of ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Fed*, 1976, 48(5): 835-852.
- [18] Christian F, Marc B, Philipp H, et al. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. *Journal of Technology*, 2002, 99: 295-306.
- [19] Abeling U, Seyfried CF. Anaerobic-aerobic treatment of

- high-strength ammonia wastewater-nitrogen removal via nitrite. *Water Science and Technology*, 1992, 26(5-6): 1007–1015.
- [20] Hao XD, Joseph J, Mark CM. Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification ANAMMOX biofilm process. *Wat Res*, 2002, 36: 4839–4849.
- [21] 顾夏声. 废水生物处理数学模式. (第二版). 北京: 清华大学出版社, 1993, 61–64.
- [22] Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM. Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65(7): 3248–3250
- [23] Wang JH, Baltzis BC, Lewandowski GA. Fundamental denitrification kinetic study with *Pseudomonas denitrifications*. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 47: 26–41.
- [24] Bock E, Schmidt I, Stuvén R, et al. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch Microbiol.* 1995. 163: 16–20.
- [25] Schmidt I, Bock E. Anaerobic ammonium oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch Microbiol.* 1997, 167: 106–111.
- [26] Edwards VH. The influence of high substrate concentration on microbial kinetics. *Biotechnol Bioeng*, 1970, 12: 679–712.
- [27] Niranjana Kumar Shrestha, Shigeru Hadano, Toshiaki Kamachi, et al. Dinitrogen production from ammonia by *Nitrosomonas europaea*. *Applied Catalysis A: General*, 2002, 237(1-2): 33–39.
- [28] 沈珈琦, 方苹, 范伟平. 亚硝化菌株的筛选及其初步鉴定. 生物加工过程(*Chinese Journal of Bioprocess Engineering*). 2004, 2(1): 30–34.
- [29] 左剑恶, 杨洋, 蒙爱红. 高氨氮浓度下的亚硝化过程及其影响因素研究. 环境污染与防治(*Environmental Pollution & Control*), 2003, 25(6): 332–335.
- [30] 李谷, 黄正, 范玮, 等. 硝化细菌富集方法的研究. 淡水渔业(*Freshwater Fisheries*). 2000, 30(9): 36–38
- [31] 陈金声, 史家梁, 徐亚同. 硝化速率测定和硝化细菌计数考察脱氮效果的应用. 上海环境科学(*Shanghai Environmental Science*), 1996, 3(3): 18–20.

Isolation, identification and characterization of nitroso-bacteria in one-step completely nitrogen removal process

Jinsong Guo, Yu Qin, Fang Fang*, Guohong Yang

(Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

Abstract: [Objective] To study the characteristics of the Nitroso-bacteria in one-step completely autotrophic nitrogen removal process. [Methods] We took samples from activated sludge of the one-step completely autotrophic nitrogen removal reactor. Through four times of enrichments and isolations, one Nitroso-bacteria named N1 was obtained. We identified this strain by microscope and 16S rDNA analysis and studied the effect of pH, temperature as well as ammonium concentration on the metabolism of N1. [Results] Of the N1 nucleotides, 97%, 96% and 96% were identical with the conserved fragment of *Nitrosomonas* sp. NL7 (AY958677), *Nitrosomonas* AS1 (EF016119) and *Nitrosomonas* sp. Is32 (AJ621027) respectively. The optimal temperature and pH of N1 were 8.0 and 30 and sufficient dissolved oxygen was demanded. In addition, no restraint effect was turned up in the ammonium concentration of 80–800 mg/L. [Conclusion] N1 was identified as *Nitrosomonas* sp. Compared with the relative references, this strain was ammonium-tolerant.

Keywords: one-step completely autotrophic nitrogen removal; Nitroso-bacteria; isolation; characterization

Supported by the Natural Science Foundation of China (50608071), the Doctorate Program Foundation of Educational Ministry of China (20050611010) and the Opening Project of the State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse (PCRRF06001)

*Corresponding author. Fax: +86-23-65127370; E-mail: xiduo@tom.com

Received: 13 March 2008/ Revised: 24 April 2008