

# 一株分离自畜禽养殖废水的异养硝化细菌及其脱氮特性分析

陈猛<sup>1,2</sup>, 李安章<sup>1</sup>, 杨敏志<sup>1,2</sup>, 张明霞<sup>1,2</sup>, 周莲<sup>1,2</sup>, 朱红惠<sup>1</sup>

(1. 广东省科学院广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物菌种保藏中心, 广东广州 510070) (2. 广东博沃特生物科技有限公司, 广东肇庆 526040)

**摘要:** 为了从高氨氮养殖废水中发掘高效脱氮菌株资源, 本研究采用富集培养的方法, 从猪粪水自然曝气池污水中分离得到 1 株有较高脱氮效率异养硝化菌 ZF1-1; 经形态学分析、16S rRNA 基因序列比对和系统发育树构建, 鉴定其为 *Bacillus siamensis* ZF1-1。脱氮特性研究表明, 在以硫酸铵为唯一氮源的人工废水培养基中, 菌株 ZF1-1 在接种量 1%、30 ℃、180 r/min 培养 72 h 的条件下, 对氨氮的转化率为 77.55%, 总氮脱除率为 21.00%, 且不积累中间产物硝酸盐和亚硝酸盐。菌株 ZF1-1 转化氨氮最适碳源是甘露醇, 最适碳氮比为 20。相同培养条件和培养时间下, 初始氨氮浓度增加, 则氨氮脱除率降低; 初始氨氮浓度为 100 mg/L 时, 氨氮转化效果最好, 转化率达 93.46%。 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  能显著提高菌株 ZF1-1 的氨氮脱除率, 分别达到 98.66%、93.48%、86.47%。将菌株 ZF1-1 应用于高氨氮浓度 (1277.41 mg/L) 的猪粪废水脱氮; 结果显示, 菌株 ZF1-1 处理效果较好, 使猪粪废水氨氮和总氮浓度分别降低 37.50% 和 22.22%。因此, 菌株 ZF1-1 在畜禽养殖高氨氮污染废水脱氮领域具有良好的应用价值。

**关键词:** 脱氮; 硝化作用; 氨氧化; 异养硝化; 芽孢杆菌; 分离鉴定

文章编号: 1673-9078(2020)10-50-58

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.10.0309

## Analysis of a Heterotrophic Nitrification Bacteria Isolated from Livestock and Poultry Wastewater and its Nitrogen Removal Characteristics

CHEN Meng<sup>1,2</sup>, LI An-zhang<sup>1</sup>, YANG Min-zhi<sup>1,2</sup>, ZHANG Ming-xia<sup>1,2</sup>, ZHOU Lian<sup>1,2</sup>, ZHU Hong-hui<sup>1</sup>

(1. Guangdong Microbial Culture Collection Center (GDMCC), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, China)

(2. Guangdong Bowoote Biological Technology Co., Ltd., Zhaoqing 526040, China)

**Abstract:** In order to excavate high-efficiency nitrogen-removing strains from high ammonia nitrogen breeding wastewater, a heterotrophic nitrifying strain ZF1-1 with high denitrification efficiency was isolated from the natural aeration tank sewage of pig manure-water using enrichment culture method. Based on morphological analysis, 16S rRNA gene sequence alignment and phylogenetic tree construction, strain ZF1-1 was identified as *Bacillus siamensis*. The denitrification characteristics of ZF1-1 showed that, in an artificial wastewater culture medium using ammonium sulfate as the only nitrogen source, the strain had a conversion rate of 77.55% to ammonia nitrogen, a total nitrogen removal rate of 21% and no nitrate and nitrite (intermediate products) accumulation when the inoculum amount was 1% at 30 ℃, 180 r/min for

引文格式:

陈猛, 李安章, 杨敏志, 等. 一株分离自畜禽养殖废水的异养硝化细菌及其脱氮特性分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 50-58

CHEN Meng, LI An-zhang, YANG Min-zhi, et al. Analysis of a heterotrophic nitrification bacteria isolated from livestock and poultry wastewater and its nitrogen removal characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 50-58

收稿日期: 2020-04-06

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2019B020215001); 广东省科技计划项目 (2019B030316009); 肇庆市科技计划项目 (2019G010); 广州市科技计划项目珠江科技新星专题 (201806010065, 201906010022); 广东省自然科学基金项目 (2018A030313476)

作者简介: 陈猛(1991-), 男, 硕士, 研究实习生, 研究方向: 养殖废水生物治理与修复

通讯作者: 朱红惠(1970-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 微生物资源发掘与创新利用

72 h. The optimum carbon source for nitrifying ammonia nitrogen of strain ZF1-1 is mannitol, and the optimum carbon-nitrogen ratio is 20. Increasing initial concentration of ammonia nitrogen resulted in decreasing of ammonia nitrogen conversion rate under the same experimental conditions and incubation time. The highest conversion rate of ammonia nitrogen is 93.46% when the initial ammonia nitrogen concentration reaches 100 mg/L.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  can significantly improve the conversion rate of ammonia nitrogen for 98.66%, 93.48% and 86.47% respectively. Subsequently strain ZF1-1 was applied to remove nitrogen (1277.41 mg/L) from pig manure-water with high ammonia nitrogen concentration. The results reveal that strain ZF1-1 exhibit a satisfactory treatment effect, can reduce the ammonia nitrogen and total nitrogen concentrations to 37.50% and 22.22% respectively in the wastewater. Therefore, the strain ZF1-1 has good application potential for nitrogen removal in high ammonia nitrogen polluted wastewater from livestock and poultry breeding.

**Key words:** nitrogen removal; denitrification; ammonoxidation; heterotrophic nitrifying; *Bacillus*; isolation and identification

随着我国工农业快速发展,氨氮排放量越来越大。据统计,2015年我国氨氮排放总量达到了229.9万t,其中农业源排放72.1万t,远超过工业源排放的21.7万吨。排放的氨氮最终通过地表径流等途径输入到河流、湖泊和海洋中,引起湖泊富营养化、无机氮污染、水生生物死亡,扰乱了正常的生态系统平衡,对生态环境造成严重危害<sup>[1,2]</sup>。去除水体中的氮对防治富营养化意义重大,而生物脱氮技术具有低成本、高效率、易操作、无二次污染等优点,极具发展潜力,成为近年研究热点<sup>[3-5]</sup>。

氨氮的生物净化主要依赖于微生物硝化作用。传统氮循环理论认为,硝化作用主要是由自养型硝化细菌完成的<sup>[6]</sup>。但自养型硝化细菌分离培养困难,生长速率慢、耗时长,而且对高浓度氨氮和有机物敏感,因此在实际的污水处理应用中受到了较大限制<sup>[7,8]</sup>。与自养型硝化细菌相比,异养型硝化细菌生长速率更快,细胞产量更高,需要的溶解氧浓度更低,对高浓度氨氮的耐受性强,耐酸性也更强,容易在污水处理系统中保持优势,可以克服自养型硝化细菌的弱点<sup>[9,10]</sup>。目前报道较多的异养硝化菌主要有:假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)<sup>[11,12]</sup>、无色杆菌(*Achromobacter* sp.)<sup>[13]</sup>、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)<sup>[14]</sup>、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)<sup>[15]</sup>等。但是目前异养硝化菌研究多集中在溶氧、pH等条件对脱氮效果的影响以及脱氮工艺参数控制和优化等;从高氨氮浓度的养殖废水中发掘脱氮菌株资源的报道较少,对其脱氮特性缺乏系统研究(例如养殖废水含有较高浓度的无机离子,但是其对异养硝化菌株脱氮的影响少有报道),这些问题限制了异养硝化菌株在高氨氮养殖废水处理中的应用。

本研究从含有高浓度氨氮的自然曝气猪粪水中分离得到一株具有高效脱氮能力的异养硝化菌株ZF1-1,对其进行分子鉴定及生理生化分析,系统研究了菌株脱氮特性,并将其应用于畜禽养殖废水脱氮,旨在为高氨氮养殖废水的生物脱氮处理提供脱氮性能优越、环境适应性强的异养硝化菌株资源和技术支撑,

具有重要的理论价值和现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品与培养基

#### 1.1.1 样品来源

样品为水泡粪固液分离后的水泡粪水;采集自广东省汕尾市金瑞丰生态农业有限公司养猪场水泡粪粪池。

#### 1.1.2 培养基

##### 1.1.2.1 富集培养基

$\text{NH}_4\text{Cl}$  0.4 g,  $\text{NaNO}_2$  0.25 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.4 g, 蒸馏水定容至1000 mL, pH 7.2, 121 °C, 20 min, 高压湿热灭菌。

##### 1.1.2.2 氨氮人工废水培养基( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 培养基)

丁二酸钠 2.5 g, 二水合柠檬酸钠 2.5 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.66 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, pH 7.4, 蒸馏水定容至1000 mL, 121 °C, 20 min, 高压湿热灭菌。添加过滤除菌的复合碳源 1% (V/V), 复合维生素 0.2% (V/V), 复合微量元素 0.2% (V/V)。复合碳源: D-葡萄糖 6.9 g, D-果糖 6.9 g, D-乳糖 6.9 g, 醋酸钠 9.5 g, 90%乳酸 6.4 mL, 甘露醇 7 g, 无水乙醇 7 mL, 甘油 6.3 mL, 苯甲酸钠 4.8 g, 水杨酸 4.6 g, 溶于500 mL水中, 调至pH 7.4, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。复合维生素液: 生物素/Vh 10 mg, 叶酸/Vb9 100 mg, 吡哆醇/Vb6 100 mg, 硫胺素/Vb1 200 mg, 烟酸 200 mg, 泛酸钙 100 mg, VB12 2 mg, 核黄素/Vb2 20 mg, 硫辛酸 20 mg, EDTA-Na 400 mg, 调pH至7.5, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌。微量元素混合液:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.4 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.24 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4 g, KI 0.2 g,  $\text{CaCl}_2$  5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.1 g, EDTA-Na 10 g, 溶于1000 mL蒸馏水, 调pH至7.4, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。配制对应的固体培养基时, 添加琼脂至15 g/L。

### 1.1.2.3 营养肉汤琼脂 (Nutrient Agar, NA 培养基)

蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g, 溶于 1000 mL 蒸馏水, 调 pH 至 7.3, 添加 15 g/L 的琼脂, 121 °C 灭菌 20 min。

## 1.2 仪器与测定方法

### 1.2.1 实验仪器

高压蒸汽灭菌锅 HVE-50 (Hirayama, Japan)、洁净工作台 SW-CJ-2FD, 苏州苏净安泰; 超纯水机 RM-220, 湖州先河; 梯度 PCR 仪 GSX1, Eppendorf Germany; 电泳仪, 北京六一; PHS-3C 型 pH 计, 上海雷磁; 小型高速冷冻离心机 5424, Eppendorf Germany; 超低温冰箱 MDF-682, Panasonic Japan; 生化培养箱 LRH-250, 上海浦东荣丰; 紫外/可见分光光度计 Ultrospec 6300 pro, GE Healthcare UK; 凝胶成像系统, BIO-RAD USA; 光学显微镜 DM6, Leica Germany。

### 1.2.2 测定方法

氨氮 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) 浓度测定采用纳氏试剂分光光度法 (HJ 535-2009); 亚硝态氮 ( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) 浓度测定采用 4-氨基苯磺酰胺分光光度法 (GB 7493-1987); 硝态氮 ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) 浓度测定采用紫外分光光度法 (HJ/T 346-2007); 总氮 (TN) 浓度测定采用碱性过硫酸钾消解-紫外分光光度法 (HJ636-2012)。

## 1.3 富集培养及菌株分离

取 10 mL 粪水样品, 置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 90 mL 无菌富集培养基, 于 30 °C, 180 r/min 摇床中富集培养 24 h; 转接, 重复富集一次。将富集液进行梯度稀释 ( $10^{-4}$ ~ $10^{-7}$ ) 涂布于  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  固体培养基上, 30 °C 培养箱中培养至出现明显的单菌落。挑取单菌落, 经多次划线纯化后, 接入 NA 液体培养基中, 30 °C, 180 r/min, 培养至对数生长期, 转移至冻存管中, 加甘油至终浓度 25% (V/V), -80 °C 保存备用。

## 1.4 菌种鉴定

### 1.4.1 形态学鉴定

将分离获得的菌株涂布于 NA 平板上, 30 °C 培养 24 h 后, 观察其菌落特征; 挑取单菌落, 对菌株进行革兰氏染色, 显微镜下观察其细胞形态。

### 1.4.2 16S rRNA 基因分子鉴定

采用 CTAB 法<sup>[16]</sup>提取菌株基因组 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTACCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-

TACG ACTT AACCCCAATCGC-3') 进行 PCR 扩增。扩增体系及程序参见文献<sup>[17]</sup>。扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。将测序结果提交 GenBank 和 EzBioCloud 进行比对分析, 并选取同属内近缘种的 16S rRNA 基因序列, 以同科菌株 *Aeribacillus pallidus* KCTC3564<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因 (CP017703) 为外参, 采用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

## 1.5 菌株 ZF1-1 的脱氮特性研究

### 1.5.1 菌株 ZF1-1 对氨氮的脱除效果验证

接种菌株 ZF1-1 至  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  液体培养基中 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度为 100 mg/L), 30 °C, 180 r/min 恒温振荡培养。根据菌株 ZF1-1 在该培养基中的生长速率, 分别在培养 0、12、24、36、48、72 和 96 h 后取样。一部分样品用于检测  $\text{OD}_{600}$  值; 一部分用于测总氮浓度; 第三部分培养液离心取上清, 定量检测上清液中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度。

### 1.5.2 不同碳源对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

分别以葡萄糖、蔗糖、乙酸钠、甘露醇、柠檬酸钠、丁二酸钠为唯一碳源配制  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  液体培养基 (不添加复合碳源),  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度 140 mg/L。计算不同碳源的添加量使得碳氮比固定为 10。115 °C, 灭菌 15 min 后, 将菌株 ZF1-1 的菌悬液分别按 1% 的接种量接入培养基中, 每种培养基 3 个重复, 30 °C、180 r/min 恒温摇床振荡培养 48 h 后, 测定氨氮的残留浓度, 并换算成氨氮脱除率。

### 1.5.3 不同碳氮比对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

以葡萄糖为唯一碳源配制  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  液体培养基 (不添加复合碳源),  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度 140 mg/L。加入适量的葡萄糖调节碳氮比为 2.5、5、10、15、20、25 和 30。115 °C, 灭菌 15 min 后, 将菌株 ZF1-1 的菌悬液按 1% 的接种量接入培养基中, 每种培养基 3 个重复, 30 °C、180 r/min 恒温摇床振荡培养 48 h 后, 测定氨氮的残留浓度, 并换算成氨氮脱除率。

### 1.5.4 初始氨氮浓度对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

采用 1.1.1 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  培养基, 其中以葡萄糖为唯一碳源替换复合碳源。调节葡萄糖和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  添加量, 固定碳氮比为 10, 设置氨氮浓度梯度为: 100、200、400、600、800 和 1000 mg/L, 每个处理 3 重复, 30 °C、180 r/min 接种培养 48 h, 后取样检测  $\text{OD}_{600}$  值、氨氮、硝态氮和亚硝态氮浓度。

### 1.5.5 不同无机盐离子对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

基础培养基:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.382 g (氨氮浓度 100 mg/L), 甘露醇 5.06 g (碳氮比 20),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  4.78 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.24 g,  $\text{NaCl}$  4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.3。对照组不加无机盐离子, 处理组分别加 10 mg/L 的  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$ ; 每组 3 个重复。30 °C、180 r/min 接种培养 48 h, 后取样检测  $\text{OD}_{600}$  值、氨氮、硝态氮和亚硝态氮浓度。

### 1.6 菌株 ZF1-1 在高氨氮养殖废水脱氮中的应用

供试样品为水泡粪粪水, 采集自汕尾市金瑞丰生态农业有限公司养猪场。经检测, 粪水样品中氨氮含量为 1277.41 mg/L, 总氮 1615.30 mg/L。

将粪水样品用葡萄糖调节碳氮比为 10, 115 °C, 高压湿热灭菌 15 min, 按 1% 接种量接入菌株 ZF1-1 悬液; 对照组接入等体积无菌水, 每个处理 3 个重复。30 °C, 180 r/min, 培养 48 h 后检测氨氮和总氮浓度。

### 1.7 数据处理

定量测定菌株 ZF1-1 在  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  培养基、脱氮特性研究培养基和猪粪废水中的脱氮效果时, 每个处理设 3 个重复, 并使用 Excel 计算标准偏差, 方差分析采用 SPSS20.0 软件分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株分离鉴定

#### 2.1.1 形态学观察

本研究以氨氮为唯一氮源对粪水中的微生物进行富集和分离筛选, 得到一株疑似脱氮菌 ZF1-1。在 NA 平板上, 菌株 ZF1-1 菌落为白色、不透明、表面皱褶, 边缘翘起, 中间内陷, 革兰氏染色结果阳性, 有鞭毛。

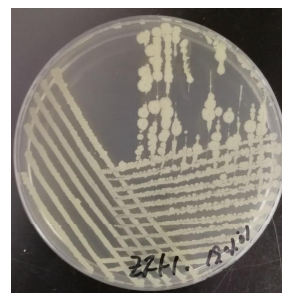


图1 菌株 ZF1-1 的菌落形态

Fig.1 The colonial morphology of strain ZF1-1

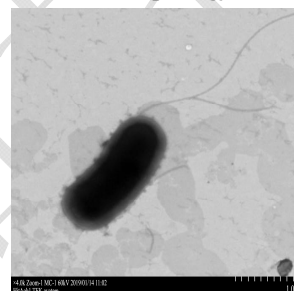


图2 菌株 ZF1-1 的透射电镜图片

Fig.2 Transmission electron microscopy of strain ZF1-1

#### 2.1.2 16S rRNA 基因鉴定

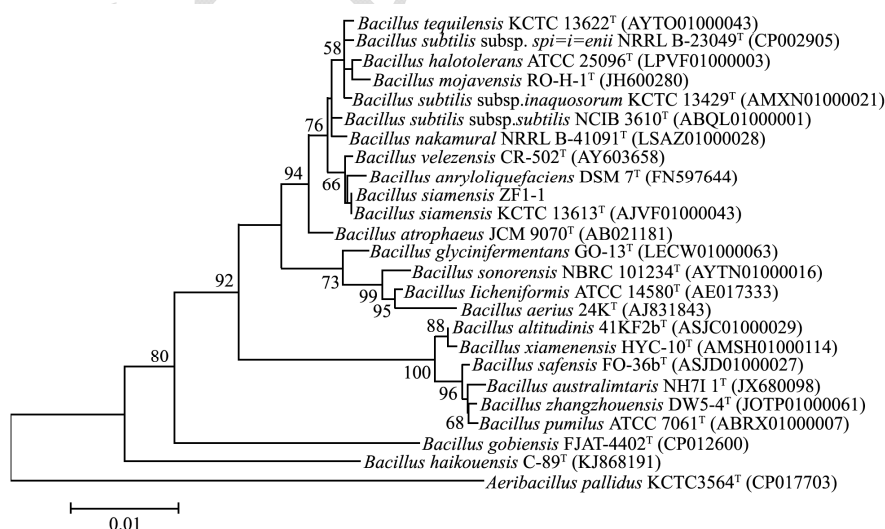


图3 基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

注: 以 Kimura-2 参数模型计算遗传距离, 以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 建树。bootstrap 自展 1000 次检验进化树拓扑结构置信区间。



使用通用引物 27F/1492R 扩增菌株 ZF1-1 的 16S rRNA 基因并测序。扩增片段长度为 1427 bp。将该序列在 GenBank 和 EzBioCloud 数据库中进行分析、比对,选取同属内近缘种的 16S rRNA 基因序列,采用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。如图 3 所示,菌株 ZF1-1 与 *Bacillus siamensis* 聚在一个分支上。再结合 *B. siamensis* 菌落表面皱褶,边缘翘起,中间内陷<sup>[18]</sup>等特征,与本研究菌株 ZF1-1 菌落形态一致,因此将菌株 ZF1-1 初步鉴定为暹罗芽孢杆菌。

## 2.2 菌株 ZF1-1 的脱氮特性研究

### 2.2.1 菌株 ZF1-1 对氨氮的脱除效果

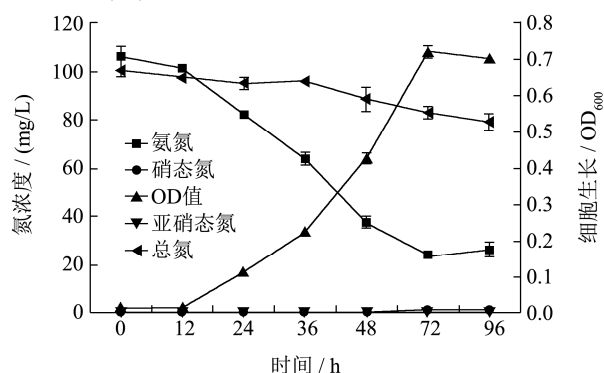


图4 菌株 ZF1-1 生长趋势与氨氮脱除曲线

Fig.4 Growth trend and ammonia removal curve of strain ZF1-1

虽然菌株 ZF1-1 是从  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  为唯一氮源的培养基中富集、分离得到的,但对其氨氮脱除能力和特性尚不清楚,需要进一步验证。如图 4 所示,接种菌株 ZF1-1 后,随着时间的推移,培养物  $\text{OD}_{600}$  值不断提高,至 72 h 左右进入稳定期, $\text{OD}_{600}$  值最高为 0.76 左右;培养过程中,氨氮浓度不断下降,从开始的 105.95 mg/L,到 24 h 后下降至 23.82 mg/L;总氮从 100.12 mg/L 下降到 79.11 mg/L。在此过程中,未检测到亚硝态氮产生,有极少量的硝态氮产生。目前普遍认为  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的异养硝化途径主要分为 2 种、第 1 种是  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  经 AMO 氧化为  $\text{NH}_2\text{OH}$ ,再经 HAO 氧化为  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  或  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ <sup>[19]</sup>,期间有  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  或  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  生成;第 2 种是  $\text{NH}_2\text{OH}$  直接转化为  $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2$ <sup>[14]</sup>,没有  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  或  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  产生。肖继波等<sup>[20]</sup>发现 *Deffluibacter lusatiensis* DN7 在去除  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的过程中积累了大量的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ,符合第一种异养硝化途径;牟东阳等<sup>[21]</sup>对菌株 *Pseudomonas* sp.DK1 的研究发现  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除过程中几乎检测不到  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  或  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ,认为菌株 DK1 的异养硝化途径属于第 2 种。本文在对菌株 ZF1-1 的影响因素研究过程中发现菌株在培养后期才有极少量的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  产生,始终没有  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的生成,可以认为其

在  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的异养硝化遵循了第 2 种途径;但也有通过第一种途径又偶联反硝化的可能性,当反硝化速率快于硝化,则也会表现出不积累硝态氮和亚硝态氮的特性。

### 2.2.2 不同碳源对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

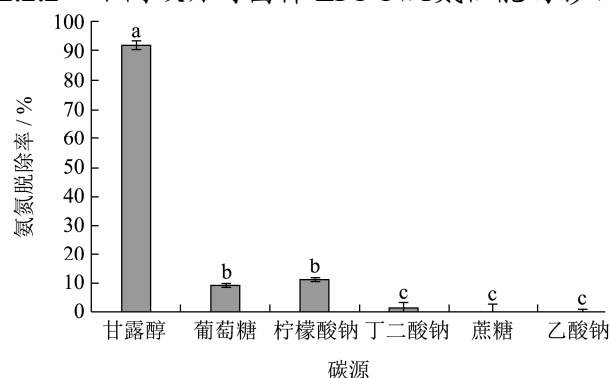


图5 不同碳源对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

Fig.5 Effects of different carbon sources on denitrifying performance of strain ZF1-1

注:图中具有不同小写字母者表示有显著性差异(Duncan法,  $p < 0.05$ )。

研究表明,碳源种类影响着细菌的硝化反应速度和脱氮效率,对于不同菌株,其脱氮的最佳碳源也可能不同<sup>[22]</sup>。图 5 表明,不同的碳源对菌株 ZF1-1 的脱氮性能具有重要的影响。以甘露醇为碳源时,氨氮脱除率最高,达到了 91.85%。其次是葡萄糖和柠檬酸钠,但氨氮脱除率明显受限,只有 10.00%左右;当碳源是蔗糖、丁二酸钠或乙酸钠时,菌株 ZF1-1 生长也受限,菌体未出现明显生长,氨氮脱除率接近零。这与郝明辉等研究结果不同,他们的研究表明假黄单胞菌 C2 (*Pseudoxanthomonas* sp.) 以丁二酸钠为唯一碳源时的效果最好,达到 84.47%<sup>[23]</sup>。据报道,碳源的化学结构和分子量对氨氮脱除率的影响很大,细菌偏爱利用偏爱利用乙酸钠、丁二酸钠等化学结构简单、分子量小的碳源<sup>[24]</sup>。但本研究结果显示,菌株 ZF1-1 以甘露醇为碳源时生长最好、氨氮脱除率最高,而以分子量较小、化学结构简单的乙酸钠和丁二酸钠为碳源时氨氮脱除率很低,说明不同细菌脱氮时对碳源的偏好性存在差异。

### 2.2.3 不同碳氮比对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

碳源的调控不仅包括碳源种类的选择,还包括碳源的供给量<sup>[25]</sup>。如图 6 所示,本研究中不同的碳氮比对菌株 ZF1-1 的脱氮性能影响非常显著。随着碳氮比从 2.5 增大到 20,菌株 ZF1-1 对氨氮的转化效率迅速增加。在碳氮比为 20 时,氨氮脱除率达到 82.36%。此后,碳氮比继续增大至 25 和 30 时,氨氮脱除率相对稳定,在小

范围内上下浮动。这与李忠徽等<sup>[26]</sup>研究结果类似。他们分离得到了一株异养硝化巨大芽胞杆菌P5-2; 研究表明, 当碳氮比为15时, 菌株P5-2的氨氮去除率最高, 为94.16%; 随着碳氮比的升高, 菌株P5-2对氨氮的转化呈现出略微下降的趋势; 可能是因为此时菌体生长所需的能量充足, 碳源成为非限制性因素。实际应用过程中, 较低的碳氮比能减少碳源添加量, 节约成本, 有更高的实用价值, 所以菌株ZF1-1在脱氮应用实践中的最佳碳氮比为20。

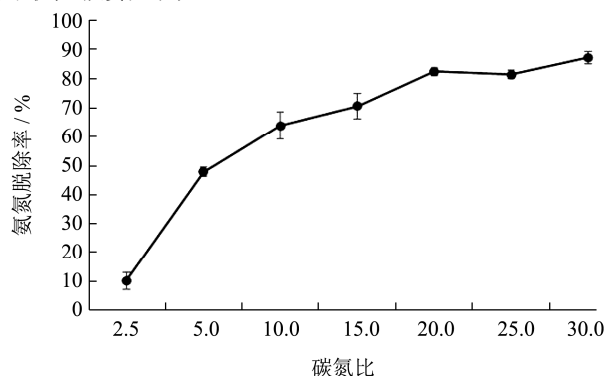


图6 碳氮比对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

Fig.6 Effect of carbon-nitrogen ratio on the denitrifying performance of strain ZF1-1

## 2.2.4 初始氨氮浓度对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

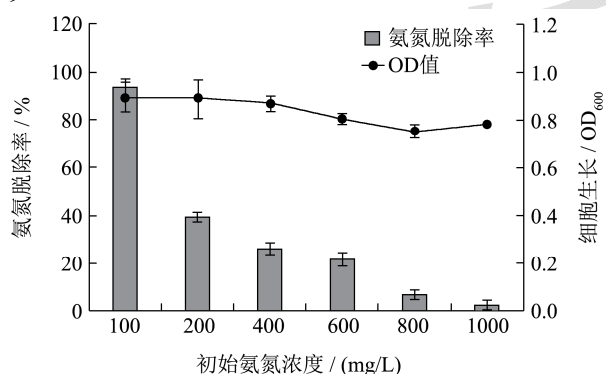


图7 初始氨氮浓度对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

Fig.7 Effect of initial ammonia nitrogen concentration on the denitrifying performance of strain ZF1-1

初始氨氮浓度可能会对菌株的脱氮能力产生影响, 浓度过高可能会对脱氮菌的硝化过程有较大程度的抑制作用。如图7所示, 本研究中不同的初始氨氮浓度对菌株 ZF1-1 的氨氮脱除率影响显著。随着初始氨氮浓度增加, 氨氮转化效率迅速下降; 而菌株生长受影响较小, OD<sub>600</sub> 值小幅度降低。初始氨氮浓度为100 mg/L 时, 氨氮脱除率最大为93.46%, OD<sub>600</sub> 值达到0.9; 而当氨氮初始浓度为200 mg/L 时, 氨氮脱除率迅速降低到39%, OD<sub>600</sub> 值并未明显降低(0.89)。但从氨氮转化速率来看, 菌株 ZF1-1 在初始氨氮浓度

为400~600 mg/L 时氨氮脱除速率最高, 为2.2~2.6 mg/(L·h)。与本研究结果类似, Liu 等<sup>[27]</sup>筛选得到的 *Alcaligenes faecalis* C16 在初始氨氮浓度为100 mg/L 时转化率为94.1%, 而在800 mg/L 时转化率只有52.8%。熊英等<sup>[28]</sup>从垃圾渗滤液中分离了一株亚硝化单胞菌 *Nitrosomonas eutropha* CZ-4; 研究表明, 菌株 CZ-4 能够有效去除初始氨浓度为0.66~603 mg/L 的地表水或污水中的氨氮, 且不同初始浓度下氨氮去除速率差异明显, 在初始氨浓度为600 mg/L 时达到最大脱除速率。

## 2.2.5 无机离子对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

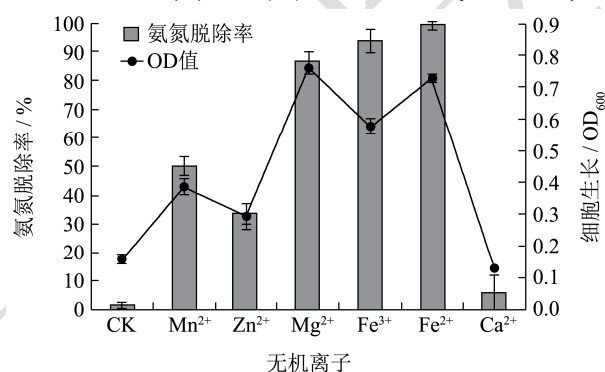


图8 无机离子对菌株 ZF1-1 脱氮性能的影响

Fig.8 Effect of inorganic ions on the denitrifying performance of strain ZF1-1

无机离子(如 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>等)能够参与调节细胞内外渗透压、pH 或氧化还原电位, 可以作为辅酶或激活酶发挥活性, 对微生物的生长代谢至关重要<sup>[29]</sup>。如图8所示, 无机离子对菌株 ZF1-1 的脱氮效率和生长均有显著影响。Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>处理组显示出最高的氨氮脱除效率, 分别为98.66%、93.48%和86.47%。其次是 Mn<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>处理组, 氨氮脱除效率分别为50.05%和33.38%。Ca<sup>2+</sup>处理组氨氮效率最差, 仅为1.29%。菌株生长趋势与氨氮脱除效率趋势整体相近。但是 Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>处理组 OD<sub>600</sub> 值出现反常, 结果偏低, 主要是由于这两个处理组的菌体出现了凝结成块的现象, 测 OD<sub>600</sub> 前用无菌石英砂充分涡旋, 但仍有少量小团块未打碎, 导致 OD<sub>600</sub> 测量值偏低。张兰河等<sup>[30]</sup>对于一个 SBR 工艺脱氮系统的研究发现, 投加 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>有助于提高 SBR 工艺的有机物降解能力和脱氮能力, 且 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>摩尔比的降低促进了有机物和总氮的去除。王于靖等<sup>[31]</sup>发现 Fe<sup>2+</sup>能促进 SBR 污水处理系统脱氮; 在进水 Fe<sup>2+</sup>质量浓度为2 mg/L、碳氮比由6.67降至2.22时, Fe<sup>2+</sup>的存在可提高 SBR 污水处理系统脱氮效果, 使氨氮去除率接近100%, 总氮去除率最高可达到90.69%, 较未添加 Fe<sup>2+</sup>时分别提高了30.09%和40.59%。这些都与本研究的结果类似。

## 2.3 菌株 ZF1-1 在养殖废水脱氮中的应用

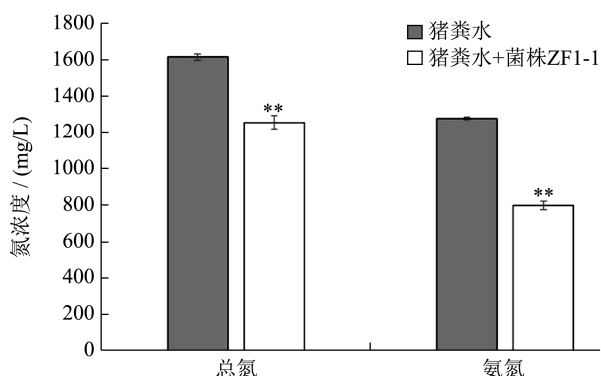


图9 菌株 ZF1-1 在含高浓度氨氮的猪粪水中的脱氮效果

Fig.9 Application of strain ZF1-1 in swine fecal sewage with high concentration of ammoniacal nitrogen

注：图中具“\*\*”表示有极显著性差异 ( $p < 0.01$ )。

猪粪水的生物脱氮是一大难题。因为其氨氮浓度较高，往往对脱氮菌的反硝化过程有很大程度的抑制作用。异养硝化细菌独特的底物利用和生长特性使其在强化处理复合型高氨氮废水方面具有潜在的应用价值。Joo 等利用单一异养硝化菌株 *Alcaligenes faecalis* No.4 处理养猪废水，强化系统的脱氮除碳效果较传统脱氮工艺显著提高<sup>[32]</sup>。本研究将筛选得到的菌株 ZF1-1 应用于含高浓度氨氮的猪粪水（氨氮含量 1277.41 mg/L）。结果表明（图 9），接菌处理 48 h 后，试验组氨氮和总氮浓度均显著降低 ( $p < 0.001$ , t-test)，其中总氮浓度降低 22.22%，氨氮浓度降幅超 37.50%。说明异养硝化菌株 ZF1-1 在高浓度氨氮废水处理领域具有良好的实际应用潜力。

## 3 结论

3.1 从自然曝气猪粪水中筛得一株有较好脱氮性能的菌株 ZF1-1。经形态学、16S rRNA 基因序列分析和系统发育分析，将其鉴定为暹罗芽孢杆菌 (*Bacillus siamensis*)。

3.2 在  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  液体培养基中，以初始浓度为 100 mg/L 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  为唯一氮源，接菌培养 72 h 后，菌株 ZF1-1 对氨氮脱除率为 83.3%，且不积累  $\text{NO}_3^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^+\text{-N}$ 。

3.3 碳源种类和碳氮比是影响菌株 ZF1-1 脱氮性能的重要因素。在 30 °C、pH 7.4 条件下，菌株 ZF1-1 硝化作用最适碳源是甘露醇，最适碳氮比为 20。

3.4 初始氨氮浓度从 100 mg/L 增加到 1000 mg/L 过程中，氨氮脱除效率逐步降低。初始氨氮浓度为 100 mg/L 时，氨氮脱除率为 93.46%。

3.5 无机离子对菌株 ZF1-1 的脱氮效率和生长均有显

著影响， $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  存在时，可显著提高菌株 ZF1-1 的氨氮脱除效率，分别达到 98.66%、93.48% 和 86.47%。

3.6 菌株 ZF1-1 在养殖废水中的应用试验表明，菌株 ZF1-1 对氨氮浓度较高的猪粪水有较好的脱氮效果，使其总氮和氨氮分别下降了 22.22% 和 37.50%。

## 参考文献

- [1] 庞朵,彭自然,何文辉,等.异养高效硝化细菌的筛选鉴定与固定化最优化[J].基因组学与应用生物学,2018,37(6):2430-2437  
PANG Duo, PENG Zi-ran, HE Wen-hui, et al. Screening, identification and immobilized optimization of heterotrophic nitrifying bacteria [J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(6): 2430-2437
- [2] 张家顺,吕娜,田长城,等.一株高效脱氮菌株的分离鉴定及应用潜力分析[J].中国水产科学,2017,24(4):757-765  
ZHANG Jia-shun, LYU Na, TIAN Chang-cheng, et al. Screening and identification of an efficient nitrogen-degrading strain and application of a potential analysis [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 757-765
- [3] Enrico C, Manuela P, Claudio R, et al. Physiological and phylogenetic characterization of *Rhodotorula diobovata* DSB006, a nitrophilous yeast [J]. Biology, 2018, 7(3): 39
- [4] Barman P, Bandyopadhyay P, Kati A, et al. Characterization and strain improvement of aerobic denitrifying eps producing bacterium *Bacillus cereus* PB88 for shrimp water quality management [J]. Waste and Biomass Valorization, 2018, 9(8): 1319-1330
- [5] Kearns P J, Mckim A N B, Hoyt H, et al. Nutrient enrichment alters salt marsh fungal communities and promotes putative fungal denitrifiers [J]. Microbial Ecology, 2019, 77: 358-369
- [6] 康鹏亮,陈胜男,黄廷林,等.好/厌氧条件下反硝化细菌脱氮特性与功能基因[J].环境科学,2018,39(8):326-333  
KANG Peng-liang, CHEN Sheng-nan, HUANG Ting-lin, et al. Denitrification characteristics and functional genes of denitrifying bacteria under aerobic or anaerobic conditions [J]. Environmental Science, 2018, 39(8): 326-333
- [7] Kathiravan V, Krishnani K K. *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp.: nitrifying aerobic denitrifiers have a plasmid encoding for denitrifying functional genes [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(4): 1187-1198
- [8] GAO Fang-zhou, LIAO Shao-an, LIU Shan-shan, et al. The combination use of *Candida tropicalis* HH8 and *Pseudomonas*

- stutzeri* LZX301 on nitrogen removal, biofloc formation and microbial communities in aquaculture [J]. Aquaculture, 2019, 500: 50-56
- [9] Islam A, CHEN De-li, White R E. Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(4): 972-975
- [10] 何霞,吕剑,何义亮,等.异养硝化机理的研究进展[J].微生物学报,2006,46(5):844-847
- HE Xia, LYU Jian, HE Yi-liang, et al. Study progress on the mechanism of heterotrophic nitrification [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 844-847
- [11] 王永红,李安章,张明霞,等.分离自养殖水体的异养硝化-好氧反硝化菌及其脱氮作用研究[J].现代食品科技,2019,35(7): 36-46,81
- WANG Yong-hong, LI An-zhang, ZHANG Ming-xia et al. Isolation of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria from aquaculture water and study of their denitrification [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(7): 36-46, 81
- [12] Wittorf L, Jones C M, Bonilla-Rosso G, et al. Expression of *nirK* and *nirS* genes in two strains of *Pseudomonas stutzeri* harbouring both types of NO-forming nitrite reductases [J]. Research in Microbiology, 2018, 169(6): 343-347
- [13] Vandamme P A, Peeters C, Inganäs E, et al. Taxonomic dissection of *Achromobacter denitrificans* Coenye et al. 2003 and proposal of *Achromobacter agilis* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter pestifer* sp. nov., nom. rev., *Achromobacter kerstersii* sp. nov. and *Achromobacter delevi* sp. Nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(9): 3708-3717
- [14] ZHAO Bin, AN Qiang, HE Yi-liang, et al. N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub> production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR [J]. Bioresource Technology, 2012, 116: 379-85
- [15] Prangya R J, Rout P, Bhunia R, et al. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal [J]. Bioresource Technology, 2017, 244(1): 484-495
- [16] 冯广达,陈美标,羊宋贞,等.用于PCR扩增的细菌DNA提取方法比较[J].华南农业大学学报,2013,34(3):439-442
- FENG Guang-da, CHEN Mei-biao, YANG Song-zhen, et al. A comparative study on bacteria DNA extraction methods used for PCR amplification [J]. Journal of South China Agricultural University, 2013, 4(3): 39-442
- [17] 刘勇,李辉,李金霞,等.特异PCR方法对枯草芽孢杆菌群的鉴定区分[J].饲料工业,2010,31(4):52-54
- LIU yong, LI hui, LI jin-xia, et al. Identification of *Bacillus subtilis* population by specific PCR method [J]. Feed Industry, 2010, 31(4): 52-54
- [18] 盛建海,韩涛,王骥腾,等.源自生物絮团产絮凝剂的异养硝化-好氧反硝化菌xt1的鉴定及其脱氮特性[J].海洋与湖沼, 2018,49(2):375-383
- SHENG Jian-hai, HAN Tao, WANG Ji-teng, et al. Identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain xt1 with flocculation ability isolated from biofloc [J]. Oceanologia ET Limnologia Sinica, 2018, 49(2): 375-383
- [19] ZHANG Qing-ling, LIU Ying, AI Guo-min, et al. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7 [J]. Bioresource Technology, 2012, 108: 35-44
- [20] 肖继波,江惠霞,褚淑祎.不同氮源下好氧反硝化菌 *Deftuvibacter lusatiensis* str.DN7的脱氮特性[J].生态学报, 2012,32(20):6463-6470
- XIAO Ji-bo, JIANG Hui-xia, CHU Shu-yi. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium *Deftuvibacter lusatiensis* str.DN7 using different sources of nitrogen [J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(20): 6463-6470
- [21] 牟东阳,靳鹏飞,彭永臻,等.1株异养硝化-好氧反硝化细菌 DK1的分离鉴定及其脱氮特性[J].环境科学,2017,38(11): 319-329
- MU Dong-yang, JIN Peng-fei, PENG Yong-zhen, et al. Identification and nitrogen removal characteristics of the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterial strain DK1 [J]. Environmental Science, 2017, 38(11): 319-329
- [22] 李卫芬,傅罗琴,邓斌,等.1株好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究[J].环境科学,2011,32(8):2403-2408
- LI Wei-fen, FU Luo-qin, DENG Bin, et al. Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier [J]. Environmental Science, 2011, 32(8): 2403-2408
- [23] 郝明辉,于鲁冀,李廷梅,等.一株异养硝化菌的筛选及生长特性研究[J].生物技术通报,2016,32(4):168-174
- HAO Ming-hui, YU Lu-ji, LI Ting-mei, et al. Screening and growth characteristics of a heterotrophic nitrification bacterium [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(4): 168-174
- [24] 陈玲,白洁,赵阳国,等.分离于河口区芦苇湿地1株好氧反硝化菌的鉴定及其反硝化特性[J].微生物学报,2016,56(8): 1314-1325

- CHEN Ling, BAI Jie, ZHAO Yang-guo, et al. Identification and denitrification characteristics of an aerobic denitrifier in estuary phragmites wetland [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(8): 1314-1325
- [25] 田雪雪,程玉立,张圆圆,等.一株异养硝化-好氧反硝化功能菌的分离鉴定及其脱氮特性[J].环境工程学报,2017,11(2): 1269-1275
- TIAN Xue-xue, CHENG Yu-li, ZHANG Yuan-yuan, et al. Isolation, identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(2): 1269-1275
- [26] 李忠徽,王淼,衣萌萌,等.一株异养硝化巨大芽胞杆菌的分离鉴定及其脱氮性能研究[J].农业生物技术学报,2019,27(8): 1331-1340
- LI Zhong-hui, WANG Miao, YI Meng-meng, et al. Isolation, identification and denitrification performance of a heterotrophic nitrifying bacillus megaterium [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(8): 1331-1340
- [27] LIU Yu-xiang, WANG Yao, LI Yi, et al. Nitrogen removal characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* C16 [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2015, 23(5): 827-834
- [28] 熊英,向斯,程凯.一株高适应性*Nitrosomonas eutropha* CZ-4的脱氮特性[J].中国环境科学,2019,39(8):3365-3372
- XIONG Ying, XIANG Si, CHENG Kai. Nitrogen removal characteristics of a highly adaptable *Nitrosomonas eutropha* CZ-4 [J]. China Environmental Science, 2019, 39(8): 3365-3372
- [29] 林国庆,初慧,朱恒华,等.离子类型对石油污染含水层中微生物去除苯的影响[J].地质学报,2019,93(s1):266-272
- LIN Guo-qing, CHU Hui, ZHU Heng-hua, et al. Effect of ion types on the removal of benzene by microorganisms in petroleum- contaminated aquifer [J]. Acta Geologica Sinica, 2019, 93(s1): 266-272
- [30] 张兰河,赵倩男,郑晶,等. $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 共存对SBR工艺生物脱氮和微生物群落结构的影响[J].环境科学学报,2019,39(10): 3256-3264
- ZHANG Lan-he, ZHAO Qian-nan, ZHENG Jing, et al. Effect of the coexistence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on the biological denitrification and microbial community structure [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, 39(10): 3256-3264
- [31] 王于靖,黄显怀.外加 $\text{Fe}^{2+}$ 对低碳氮比污水生物脱氮影响研究[J].工业用水与废水,2019,50(2):15-18
- WANG Yu-jing, HUANG Xian-huai. Effect of additional  $\text{Fe}^{2+}$  on biological denitrification from sewage with low carbon-nitrogen ratio [J]. Industrial Water and Wastewater, 2019, 50(2): 15-18
- [32] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. Water Research, 2006, 40(16): 3029-3036

(上接第 323 页)

- [33] 肖芳,黄勤挽,范润勇,等.HPLC法同时测定杜仲3个药用部位中8种成分[J].中成药,2016,38(8):1782-1786
- XIAO Fang, HUANG Qin-lian, FAN Run-yong, et al. Simultaneous determination of 8 components in 3 medicinal parts of *Eucommia ulmoides* by HPLC [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 38(8): 1782-1786
- [34] 张欣,张春风,祁东利,等.HPLC同时测定杜仲叶中7种成分的含量[J].中国药科大学学报,2012,43(5):435-437
- ZHANG Xin, ZHANG Chun-feng, QI Dong-li, et al. Simultaneous determination of seven compounds in *Eucommiae folium* by HPLC [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2012, 43(5): 435-437
- [35] 许兰波,张峰,丁艳霞,等.HPLC法同时测定杜仲叶中6个黄酮类成分的含量[J].药物分析杂志,2014,34(8):1422-1425
- XU Lan-bo, ZHANG Feng, DING Yan-xia, et al. Simultaneous determination of six flavonoids in leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv. by HPLC [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 34(8): 1422-1425
- [36] 袁建国,杜江丽,周爱存,等.双波长 HPLC 同时测定氮沉降处理下杜仲皮和叶中的 5 种成分[J].浙江农林大学学报,2015,32(1):60-66
- AI Jian-guo, DU Jiang-li, ZHOU Ai-cun, et al. Simultaneous determination of five components in bark and leaf of *Eucommia ulmoides* under nitrogen deposition by dual wavelength HPLC [J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2015, 32(1): 60-66