

# 低温异养硝化-好氧反硝化菌筛选及其脱氮特性

杨 墨<sup>1</sup>, 刘乾亮<sup>2</sup>, 吕东伟<sup>1</sup>, 马 军<sup>1</sup>, 刘惠玲<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨工业大学环境学院 城市水资源与水环境国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150090;

2. 哈尔滨理工大学化学与环境工程学院 黑龙江省绿色化工与技术重点实验室, 黑龙江  
哈尔滨 150040)

**摘 要:** 在冬季的松花江底泥中筛选出4株高效耐低温菌,并对10℃下脱氮效率最高的33号菌进行了表型鉴定和遗传学鉴定。考察了温度、pH值和常用碳源对该菌株在低温下脱氮效果的影响,并对该菌株的低温异养硝化-好氧反硝化性能进行了研究。结果表明:该低温硝化菌株为*Pseudomonas*菌属,命名为*Pseudomonas* sp. M-33。该菌株能在2~35℃下生长并对氨氮进行去除,适宜在中性偏碱的条件下生长,能够在低温下利用柠檬酸钠、醋酸钠、丙三醇和葡萄糖等碳源。该菌株在10℃、24 h内对氨氮的去除率达到90%以上且无亚硝酸盐氮积累。M-33菌株可在好氧状态下对硝酸盐氮和亚硝酸盐氮进行反硝化去除,在硝酸盐氮反硝化过程中会产生一定的亚硝酸盐氮积累并逐渐去除。

**关键词:** 低温; 异养硝化; 好氧反硝化; 脱氮特性; 假单胞菌

**中图分类号:** TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2019)23-0100-05

## Isolation of Cold-resistant Heterotrophic Nitrification – Aerobic Denitrification Strain and Its Nitrogen Removal Performance

YANG Mo<sup>1</sup>, LIU Qian-liang<sup>2</sup>, LÜ Dong-wei<sup>1</sup>, MA Jun<sup>1</sup>, LIU Hui-ling<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, School of Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. Key Laboratory of Green Chemical Engineering and Technology of Heilongjiang Province, College of Chemical and Environmental Engineering, Harbin University of Science and Technology, Harbin 150040, China)

**Abstract:** Four cold-resistant strains were isolated from the sediment of the Songhua River in winter. Phenotype analysis and genetic identification were conducted on No. 33 strain which showed the highest nitrogen removal efficiency under 10℃. Effects of temperature, pH, and carbon sources on the nitrogen removal performance of No. 33 strain were investigated. The performance of heterotrophic nitrification – aerobic denitrification of No. 33 strain at low temperature were studied as well. The results showed that this low temperature nitrifying strain was *Pseudomonas* sp., named *Pseudomonas* sp. M-33. M-33 strain could grow and remove ammonia nitrogen under temperature of 2 – 35℃, and preferred slightly alkaline environment. M-33 could utilize sodium citrate, sodium acetate, glycerol, and glucose as carbon sources at low temperature. During the heterotrophic nitrification process, M-33 removed more

基金项目: 黑龙江省博士后经费资助项目(LBH-Z17059)

通信作者: 马军 E-mail: majun@hit.edu.cn

than 90% of ammonia nitrogen at 10 °C in 24 hours without nitrite accumulation. A certain amount of nitrite was accumulated during the denitrifying of nitrate, which was gradually degraded.

**Key words:** low temperature; heterotrophic nitrification; aerobic denitrification; nitrogen removal performance; *Pseudomonas* sp.

随着人们生活水平的不断提高以及工农业技术的迅猛发展,氮污染的排放量也与日俱增<sup>[1]</sup>。氮污染会导致水体富营养化现象,使得藻类大量繁殖,水生生物因缺氧而死亡。人类饮用了含有过量氮素污染的水后会影响到身体机能,甚至导致癌症<sup>[2]</sup>。因此,我国对污水厂出水中总氮浓度有着严格的标准。污水中氮素的去除方法主要有物理法、化学法和生物法,由于生物脱氮工艺具有设备简单、成本低廉、出水效果好等优点,使其成为了污水厂最广泛使用的脱氮技术。污水的生物脱氮方法繁多,如 MBR 工艺、A/O 工艺等<sup>[3-4]</sup>,其核心主要是利用硝化和反硝化过程将氨氮、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮同化为菌体或转化为含氮气体,以达到除氮目的。由于水质的环境因子和水力条件会对水处理微生物产生极大的影响,因此通过考察影响微生物生长发育的各种因素,对强化实际污水处理工艺效果和工艺调试具有重要的指导意义。

在我国北方区域特别是东北地区,冬季的温度常常在 -30 ~ -20 °C,室外污水温度普遍在 10 °C 左右。低温条件下,微生物的生长和新陈代谢会受到极大抑制<sup>[5]</sup>。对于传统的自养型硝化工艺,低温会显著抑制自养型硝化细菌生长速率和自身酶的活性,降低氨氮的去除效率。异养硝化细菌由于其在极端条件下的良好适应能力和脱氮效能,如低温、强酸、强碱等,近年来备受研究者的关注<sup>[6-7]</sup>。笔者从冬季松花江底泥中筛选出耐低温异养硝化菌,对菌株进行表型和遗传学鉴定,考察了菌株生长过程的影响因素和脱氮效能,并对该低温菌的异养硝化和好氧反硝化能力进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与试剂

#### 1.1.1 试验所用培养基

平板培养基:1 g/L 醋酸钠,1 g/L 氯化铵,0.2 g/L 磷酸氢二钠,18 g/L 琼脂,1 mL/L 微量元素溶液。富集培养基:2 g/L 醋酸钠,1 g/L 氯化铵,0.17 g/L 磷酸氢二钠,0.17 g/L 磷酸二氢钠,2 mL/L 微量元素溶液。筛选和硝化培养基:0.8 g/L 醋酸钠,

0.1 g/L 氯化铵,0.17 g/L 磷酸氢二钠,以及 2 mL/L 微量元素溶液。

#### 1.1.2 菌株的分离和筛选

取 1 g 河道底泥于 50 mL 灭菌磷酸盐缓冲溶液中振荡后离心,将离心后的上清液梯度稀释 10 ~ 10<sup>7</sup> 倍后,分别取 100 μL 上清液涂布于平板培养基上,并于 10 °C 下进行培养,待平板培养基上出现分离且清晰的菌落时,将每个单菌落分别划线接种至平板培养基上。连续划线培养 3 次使菌株纯化并将纯化筛选出的菌株分别接种至筛选培养基中,于 10 °C、150 r/min 下振荡培养,并连续测定溶液中的氨氮浓度,氨氮去除率最大的菌株即为试验所需菌株。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 菌株的鉴定

将筛选出的菌株按照《伯杰氏细菌手册》进行表观形态观察,对其进行革兰氏染色鉴定并采用扫描电镜对菌株的微观形态进行观察。取适量富集培养的菌液,利用试剂盒对其 DNA 进行提取,并进行 16S rDNA 的 PCR 扩增,将产物纯化后对其进行 DNA 测序,并将测序结果通过 NCBI 与其他菌种进行比对以对该菌株进行菌属鉴定。

### 1.2.2 菌株生长和脱氮能力的影响因素

为考察 pH 值对菌株去除氨氮能力的影响,利用 1 mol/L 的盐酸和氢氧化钠溶液调节硝化培养基的初始 pH 值为 5 ~ 10,初始接种量为 OD<sub>600</sub> = 0.2 左右,在 10 °C 下培养 12 h,对初始和结束时上清液的氨氮浓度和菌株浓度(菌株浓度以 OD<sub>600</sub> 计,下同)进行测定。为考察温度对菌株硝化能力的影响,将菌株接种到硝化培养基中,初始接种量为 OD<sub>600</sub> = 0.2 左右,分别在 2 ~ 35 °C 下培养 24 h,对初始和结束时硝化培养基的上清液中氨氮浓度和菌株浓度进行测定。为考察碳源对菌株去除氨氮能力的影响,将菌株接种到模拟污水中,初始接种量为 OD<sub>600</sub> = 0.2 左右,将硝化培养基的碳源分别调整为淀粉、蔗糖、葡萄糖、乙醇、乙二醇,碳氮比为 5,对照组是以碳酸钠作为碳源的硝化培养基,10 °C 下培养 24 h,对初始和结束时上清液的氨氮浓度和菌种浓

度进行测定。

### 1.2.3 耐低温菌株异养硝化-好氧反硝化能力

将筛选出的菌株分别接种至富集培养基中并于 10 ℃ 下富集培养,当菌株的生长浓度达到对数期时,取适量培养基离心并用灭菌后的磷酸盐缓冲液清洗 3 次,再加入灭菌后的磷酸盐缓冲液制备成菌株接种液。将接种液分别加入以氯化铵、硝酸钠和亚硝酸钠为氮源的培养基中,初始氮浓度为 20 mg/L, C/N 值为 5, 于 10 ℃、150 r/min 下培养,初始接种量为  $OD_{600} = 0.2$  左右。对培养基的细菌生长情况,上清液的氨氮、硝酸盐氮和亚硝酸盐氮浓度以及溶液的总氮浓度进行周期测定。

### 1.3 测定方法

氨氮采用纳氏试剂分光光度法进行测定,亚硝酸盐氮采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法进行测定,硝酸盐氮采用盐酸紫外分光光度法进行测定,总氮采用 TOC/TN 分析仪测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的筛选和鉴定

从河道底泥中共筛选分离出 34 株菌,其中在 10 ℃ 下对氨氮的去除率在 85% 以上的有 4 株,对筛选出的 4 株菌进行 16S rDNA 测序并将测序结果与 NCBI 上其他菌株基因序列进行比较,其中 3 株菌为 *Pseudomonas* 菌属、1 株菌为 *Janthinobacterium* 菌属。排列序号为 33 号的一株 *Pseudomonas* 菌属显现出最高的氨氮去除率(>90%)。通过肉眼观察,其菌落呈肉色并且有光泽,菌落直径为 2~3 mm,该菌为革兰氏阴性菌。电镜扫描结果(见图 1)显示,该菌为杆状,大小约为  $1.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$ 。将该菌株的基因测序结果上传至 NCBI,上传的基因编号为 MK332340,该菌株被命名为 *Pseudomonas* sp. M-33。

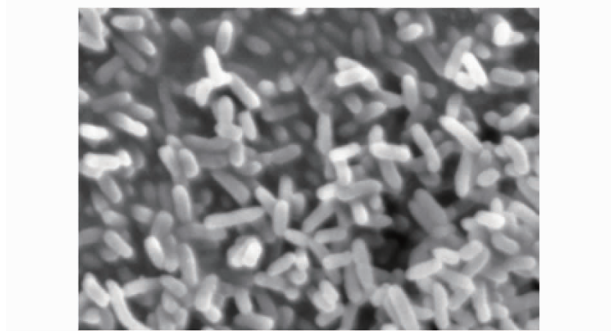


图 1 菌株 M-33 的扫描电镜照片

Fig. 1 Scanning electron microscope photo of strain M-33

### 2.2 pH 值的影响

水体环境的 pH 值是影响细菌异养硝化效率、生长和新陈代谢的重要因素之一。适宜的 pH 值有助于提高细菌的关键性酶表达,提高微生物的氮去除率<sup>[8]</sup>。试验结果表明,10 ℃ 下培养 12 h 后, pH 值为 5 和 10 的培养基中菌株 M-33 的生长速率和氨氮去除率受到了极大抑制(见图 2),这是因为强酸和强碱环境会抑制微生物的新陈代谢和酶表达<sup>[9]</sup>。菌株 M-33 对氨氮的去除率在 pH 值为 8 时达到最高值(78%),且菌株在 pH 值为 7~9 的培养基中均显示出较高的氨氮去除率和生长速率,这是因为在中性偏碱的条件下,溶液中的铵离子大量转化成游离氨,更容易被微生物利用,这个现象与大部分已报道的异养硝化菌的结果类似。

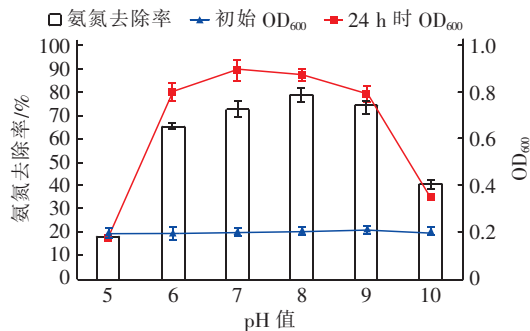


图 2 低温下 pH 值对菌株 M-33 生长和去除氨氮的影响

Fig. 2 Effect of pH on growth of strain M-33 and ammonia nitrogen removal at low temperature

### 2.3 温度的影响

一般情况下,在一定的温度范围内,微生物的生长速率会随着温度的升高而增大。在本试验中,当温度从 2 ℃ 升高至 20 ℃ 时,菌株 M-33 的生长速率以及对氨氮的去除率均明显增长,其中,当温度从 2 ℃ 升高至 10 ℃ 时,氨氮去除率从 43% 迅速上升至 82%;而当温度从 10 ℃ 升高至 25 ℃ 时,氨氮去除率和菌株浓度变化均不明显,氨氮去除率仅上升了 12%;当温度进一步从 30 ℃ 升高至 35 ℃ 时,最终菌株浓度和氨氮去除率均开始下降,说明该菌株属于耐冷菌,25 ℃ 以上的温度反而会抑制其新陈代谢和生长速率。综上,菌株 M-33 是一株耐冷性能较为优异的菌株,在较低的温度下显示出良好的氨氮去除性能。

### 2.4 碳源的影响

碳源是影响硝化过程的重要因素,合适的碳源能够促进细菌的生长,为细菌硝化或反硝化过程提



供能量。在本试验中,柠檬酸钠、醋酸钠等8种常见碳源被分别添加到培养基中以考察碳源种类对菌株M-33生长和氨氮去除性能的影响。结果表明,当采用柠檬酸钠、醋酸钠、丙三醇和葡萄糖作为碳源时,M-33均显示出了相对较高的氨氮去除率和最终的菌株浓度,特别是当葡萄糖作为碳源时,M-33对氨氮的去除率达到了95%以上,超过了醋酸钠作为碳源时的氨氮去除率。当乙醇、甲醇、蔗糖和淀粉为碳源时,M-33对氨氮的去除率低于30%,这说明菌株M-33对小分子醇类和大分子多糖类的碳源利用率有限,导致菌株生长速率变慢,进而导致其硝化效率降低。为了更好地与其他相关研究进行对比,在后续试验中采用醋酸钠作为碳源。

## 2.5 低温异养硝化-好氧反硝化性能

图3显示了菌株M-33异养硝化过程中“三氮”和菌株浓度的变化。可以看出,在试验前5 h,氨氮浓度略微下降,从21.4 mg/L降至19.9 mg/L,OD<sub>600</sub>从0.276上升至0.334,这是因为菌株M-33刚被接入新的培养基中,还处于适应期,菌株的生长和新陈代谢都较为缓慢。5 h后,菌株进入对数生长期,OD<sub>600</sub>从0.33上升至0.76,相应地,氨氮浓度从19.9 mg/L迅速下降至3.38 mg/L。在达到35 h时,氨氮浓度降至最低值(0.88 mg/L),同时菌株浓度略有下降,说明培养基中菌株生长已经进入衰退期。在氨氮去除过程中的第25小时,有微量的亚硝酸盐氮生成,但是随着试验的进行很快被去除掉,说明在硝化过程中同样存在反硝化过程,该菌株属于异养硝化-好氧反硝化菌。

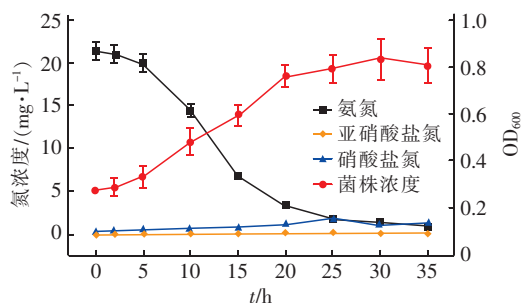


图3 低温下菌株M-33异养硝化过程中“三氮”和菌株浓度的变化

Fig. 3 Changes of nitrogen and strain concentration during heterotrophic nitrification of strain M-33 at low temperature

此外,经过异养硝化过程后,培养基的总氮浓度整体从23.2 mg/L降至11.8 mg/L,而溶液中溶解

态氨氮浓度仅剩余0.88 mg/L,这说明溶液中的氨氮一部分被M-33同化吸收转化为生物氮,另一部分通过M-33的异养硝化与反硝化过程转化为含氮气体逸出,因此使得培养基整体的总氮降低。

图4显示了以亚硝酸盐氮和硝酸盐氮为氮源时M-33菌的好氧反硝化特性(溶解氧浓度约为8 mg/L)。如图4(a)所示,好氧状态下,亚硝酸盐氮在45 h内从初始的19.9 mg/L下降至3.2 mg/L,平均去除速率为0.37 mg/(L·h),M-33菌的浓度(OD<sub>600</sub>)从0.173上升至0.7左右。图4(b)显示了硝酸盐氮的反硝化过程,在45 h内,硝酸盐氮从20.8 mg/L下降至0.9 mg/L,平均去除率为0.44 mg/(L·h),OD<sub>600</sub>从0.135上升至0.8左右。在20 h时,可明显观察到有4.5 mg/L的亚硝酸盐氮积累,并随试验的进行而逐渐去除。

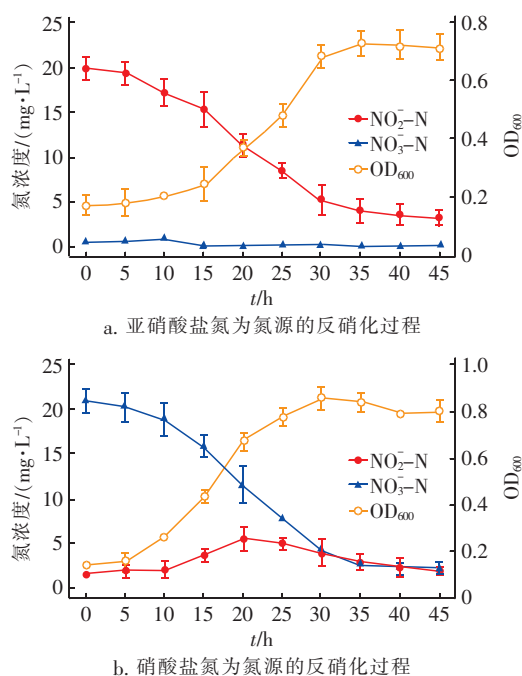


图4 低温下M-33菌株的好氧反硝化性能

Fig. 4 Aerobic denitrification performance of strain M-33 at low temperature

以硝酸盐氮为氮源时,氮去除率和菌株生长浓度高于以亚硝酸盐氮为氮源的反硝化过程,这是因为相对于硝酸盐氮还原酶,亚硝酸盐氮还原酶受氧气的抑制程度更高<sup>[10]</sup>,这导致在相同好氧条件下亚硝酸盐氮去除速率小于硝酸盐氮去除速率,这也是在硝酸盐氮反硝化过程中存在亚硝酸盐氮积累的根本原因。同时,亚硝酸盐氮对微生物有一定毒性,这也是导致亚硝酸盐氮反硝化过程的菌株最终浓度低

于硝酸盐氮反硝化过程的原因之一。

### 3 结论

对松花江底泥中筛选出的4株耐低温菌进行鉴定,并对其中10℃下脱氮效率最高的33号菌进行了表型和遗传学鉴定。M-33菌株经鉴定后属于土壤和水体中大量存在的假单胞菌,对其低温下脱氮性能的研究具有显著的代表性。通过多因素考察发现该菌株适宜在25℃以下生长并对氨氮进行去除,且适宜在中性偏碱性的条件下生长,能够在低温下利用醋酸钠等多种碳源。同时该菌株在好氧条件下可进行反硝化,在相同好氧条件下亚硝酸盐氮反硝化速率小于硝酸盐氮反硝化速率,这也导致硝酸盐氮好氧反硝化过程中有亚硝酸盐氮的积累。

### 参考文献:

- [1] Li C E, Yang J S, Wang X, *et al.* Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 182: 18–25.
- [2] 陈云增, 李天奇, 马建华, 等. 沙颍河流域典型癌症高发区水体硝态氮污染及健康风险[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(5): 1698–1707.  
Chen Yunzeng, Li Tianqi, Ma Jianhua, *et al.* Water nitrate nitrogen pollution and health risk in a typical high cancer incidence area of Shaying River basin[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(5): 1698–1707 (in Chinese).
- [3] 吴海珍, 韦聪, 于哲, 等. 废水好氧生物处理工艺中氧的传质与强化的理论与实践[J]. *化工进展*, 2018, 37(10): 4033–4043.  
Wu Haizhen, Wei Cong, Yu Zhe, *et al.* Oxygen dissolution and gas liquid mass transfer in aerobic biological wastewater treatment: theory and practice[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2018, 37(10): 4033–4043 (in Chinese).
- [4] 王玉华, 汤锦锋, 汪健. 污水厂氧化沟基桩倾斜原因分析及加固处理[J]. *中国给水排水*, 2018, 34(22): 71–76.  
Wang Yuhua, Tang Jinfeng, Wang Jian. Reason analysis and reinforcement treatment of inclined pile in oxidation ditch of WWTP[J]. *China Water & Wastewater*, 2018, 34(22): 71–76 (in Chinese).
- [5] Yao S, Ni J R, Ma T, *et al.* Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2 [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 139: 80–86.
- [6] Zhang S M, Sha C Q, Jiang W, *et al.* Ammonium removal at low temperature by a newly isolated heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas fluorescens* wsw-1001 [J]. *Environ Technol*, 2015, 36(19): 2488–2494.
- [7] 路俊玲, 陈慧萍, 肖琳. 低温反硝化菌——施氏假单胞菌 N3 的筛选及脱氮性能[J]. *环境科学*, 2018, 39(12): 183–188.  
Lu Junling, Chen Huiping, Xiao Lin. Characterization of a newly isolated strain *Pseudomonas* sp. N3 for denitrification at low temperature [J]. *Environmental Science*, 2018, 39(12): 183–188 (in Chinese).
- [8] 张峰峰, 周可, 谢凤行, 等. 一株异养硝化菌 AD-28 氨氮去除特性研究[J]. *水产科学*, 2019, 38(1): 92–97.  
Zhang Fengfeng, Zhou Ke, Xie Fengxing, *et al.* Ammonia nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifier AD-28 [J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(1): 92–97 (in Chinese).
- [9] Yang M, Lu D W, Qin B D, *et al.* Highly efficient nitrogen removal of a coldness-resistant and low nutrient needed bacterium, *Janthinobacterium* sp. M-11 [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 256: 366–373.
- [10] Sun Y L, Li A, Zhang X N, *et al.* Regulation of dissolved oxygen from accumulated nitrite during the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13 [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2015, 99(7): 3243–3248.



作者简介: 杨墨(1988–), 男, 辽宁本溪人, 博士研究生, 主要研究方向为微生物水处理技术。

E-mail: yangmohit@163.com

收稿日期: 2019–04–21