

## 研究报告

## 硝化细菌群的富集及其去除城镇寡营养河道中氨氮污染的应用

应之悦<sup>1</sup>, 翁国永<sup>2,3</sup>, 陈建军<sup>4</sup>, 许楹<sup>\*1</sup>, 周宁一<sup>1</sup>

1 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

2 浙江省城市供水水质监测网台州监测站, 浙江 台州 318020

3 浙江黄岩自来水公司, 浙江 台州 318020

4 台州职业技术学院, 浙江 台州 318000

应之悦, 翁国永, 陈建军, 许楹, 周宁一. 硝化细菌群的富集及其去除城镇寡营养河道中氨氮污染的应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 14-24

Ying Zhiyue, Weng Guoyong, Chen Jianjun, Xu Ying, Zhou Ningyi. Enrichment of nitrifying bacteria and their application in removing ammonia nitrogen pollution in an urban oligotrophic river[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 14-24

**摘要:**【背景】随着工农业的发展, 污水排放导致的氨氮超标逐渐成为水体污染的重要因素, 脱氮已成为人们研究的重点。目前脱氮方法主要集中于硝化细菌的硝化作用, 其将氨氮转化为硝酸盐氮, 从而减少水体中氨氮的污染。由于工业废水和农业污水中的有机物含量较高, 而且异养硝化细菌具有生长较快等优势, 因此对异养菌的研究多于自养菌。然而现有的异养硝化细菌对有机物含量低的自然河道氨氮的去除率不够理想, 尤其是富集来自寡营养河道的菌群对其原位环境中氨氮的去除研究尚未见报道。【目的】富集自然河道中具有硝化功能的菌群并验证其生长情况, 检测其菌群结构。研究菌群在人工模拟污水中对氨氮的去除情况, 并研究其在自然河道中对氨氮的去除情况。【方法】从自然河道中使用氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌的无机盐培养基进行氨氧化菌群和亚硝酸盐氧化菌群的富集, 对富集得到的菌群进行 16S rRNA 基因测序并分析其菌群结构。采用显微计数法检测菌群的生长情况。模拟自然环境, 在桶内置入人工污水, 并投入氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1, 于室温下曝气, 检测 2 种菌群共同作用对氨氮的去除情况。将 2 种菌群同时投入河道水中, 通过对河道水取样, 观察 2 种菌群共同作用下水质及氨氮的变化情况。【结果】富集得到氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1, 获得 2 个菌群的菌群结构: 在氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 中均为变形菌门(*Proteobacteria*)的细菌相对丰度最高, 分别占 99.28%和 99.64%; 在菌群 AOB1 中相对丰度较高的属是 *Aeromonas* (73.00%)和 *Delftia* (9.17%), 在菌群 NOB1 中相对丰度较高的属是

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901200)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901200)

\*Corresponding author: E-mail: ying.xu@sjtu.edu.cn

Received: 2021-08-06; Accepted: 2021-08-23; Published online: 2021-09-22

*Aeromonas* (36.66%)和 *Pseudomonas* (30.82%)。两个菌群均生长良好, 以 5%接种量进行转接时, 菌群 AOB1 和 NOB1 分别于 2–3 d 生物量达到最大(分别为  $5.23 \times 10^{10}$  个/L 和  $3.63 \times 10^{10}$  个/L)。菌群处理寡营养(葡萄糖浓度 0.04 g/L)的人工生活污水 1 周后对氨氮的去除率为 95.26%, 而且无亚硝酸盐氮的积累。取自然河道水于桶内, 向其中投放菌群 AOB1 和 NOB1, 于实验室内曝气(曝气量 5 L/min), 10 d 后氨氮的去除率为 94.04%, 无亚硝酸盐氮的积累。将菌群投入浙江省台州市某河道 700 m 区域内, 在有少量排污的情况下, 16 d 氨氮的去除率为 49.19%, 氨氮的去除率较好。【结论】本研究富集了来自寡营养河道中具有硝化功能的 2 个菌群, 其共同作用可以去除实验室模拟污染水体和寡营养河道中的氨氮。本研究储备了微生物资源, 证明了利用微生物消除城镇寡营养河道氨氮污染的可行性, 对实现国家“美丽乡村”的建设目标具有潜在的示范价值。

**关键词:** 氨氮; 硝化细菌群; 脱氮

## Enrichment of nitrifying bacteria and their application in removing ammonia nitrogen pollution in an urban oligotrophic river

YING Zhiyue<sup>1</sup>, WENG Guoyong<sup>2,3</sup>, CHEN Jianjun<sup>4</sup>, XU Ying<sup>\*1</sup>, ZHOU Ningyi<sup>1</sup>

1 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 Taizhou Monitoring Station of Urban Water Quality Monitoring Network of Zhejiang Province, Taizhou 318020, Zhejiang, China

3 Zhejiang Huangyan District Water Supply Company, Taizhou 318020, Zhejiang, China

4 Taizhou Vocational and Technical College, Taizhou 318000, Zhejiang, China

**Abstract:** [Background] With the development of industry and agriculture, excessive ammonia nitrogen caused by sewage discharge has gradually become an important issue in water pollution, and ammonia nitrogen removal has become one of research hotspots. In previous studies, it has been reported that nitrifying bacteria were able to convert ammonia nitrogen to nitrate nitrogen, resulting in the reduction of ammonia nitrogen concentration in water. Thus the ammonia nitrogen elimination in polluted water by biological methods mainly depended on nitrifying bacteria. Currently there are more studies on heterotrophic nitrifying bacteria than autotrophic ones. However, the removal efficiency of the existing heterotrophic nitrifying bacteria for ammonia nitrogen in oligotrophic rivers is not ideal. In particular, the bioremediation in situ by nitrifying consortia from oligotrophic rivers has virtually not been reported. [Objective] We aim to enrich and characterize nitrifying consortia from oligotrophic rivers, and explore the potential of the ammonia nitrogen elimination in an oligotrophic river by *in situ* isolated consortia. [Methods] The mineral media for ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria are used to isolate ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing bacterial consortia from rivers. The microbial diversities of two consortia were identified according to sequences of V3–V4 region of 16S rRNA genes. The microscopic counting method was used to detect the growth of the consortia. Two consortia were inoculated into the artificial sewage together with aerating at room temperature, and the depletion of ammonia nitrogen was detected. Two consortia were together introduced into the

oligotrophic river *in situ*, and the depletion of ammonia nitrogen was also detected. **[Results]** In this experiment, an ammonia-oxidizing bacterial consortium and a nitrite-oxidizing bacterial consortium were enriched and designated AOB1 and NOB1, respectively. In AOB1 and NOB1, 99.28% and 99.64% strains belong to *Proteobacteria*, respectively. Furthermore, the relatively dominant genera in AOB1 are *Aeromonas* (73.00%) and *Delftia* (9.17%). The relatively dominant species in NOB1 are *Aeromonas* (36.66%) and *Pseudomonas* (30.82%). After 2–3 d incubation in the mineral media, the biomasses of AOB1 and NOB1 reached to  $5.23 \times 10^{10}$  cells/L and  $3.63 \times 10^{10}$  cells/L, respectively. When AOB1 and NOB1 were introduced into artificial sewage with low organic matter (glucose concentration being 0.04 g/L), the depletion of ammonia nitrogen was 95.26% after 7 d, without accumulation of nitrite nitrogen. When AOB1 and NOB1 were introduced into water from an oligotrophic river (Taizhou city, Zhejiang province) with aerating (aeration rate being 5 L/min) in the lab, and the depletion of ammonia nitrogen was 94.04% after 10 d. AOB1 and NOB1 were also together introduced into a 700-meter water area of the above river, and sewage was still discharged continuously into this river during the testing period. After 16 d, 49.19% ammonia nitrogen in the above water area were removed. **[Conclusion]** This study has enriched an ammonia-oxidizing bacterial consortium and a nitrite-oxidizing bacterial consortium from oligotrophic rivers, which can together remove ammonia nitrogen in artificial sewage and oligotrophic river water. This study provides microbial resources and a feasibility of using microbes to eliminate ammonia nitrogen pollution in urban oligotrophic rivers. It also has a potential application in implementing the desired goal of “The Beautiful Countryside”.

**Keywords:** ammonia nitrogen; nitrifying bacterial consortium; ammonia nitrogen elimination

浙江省的水域面积为 0.59 万 km<sup>2</sup>, 占地域面积的 5.66%。为建设美丽浙江, 浙江省政府启动了“五水共治”碧水行动。浙江省台州市境内水网较为发达且降水量较大, 雨水管网无法及时排放, 导致地面污染带入河道, 引起河流的污染。同时, 生活污水和工业废水的不规范排放加重了水质污染, 严重影响了城市形象。根据台州市生态环境局最新的生态环境状况公报和地表水环境质量状况报告显示, 台州市全市地表水总体水质属轻度污染, 主要污染指标为氨氮、总磷和化学需氧量 (chemical oxygen demand, COD)。当大量的氮、磷、钾等元素长时间缓慢地排放入水体中, 会引起藻类和水生生物的生长, 从而使有机物的生成速度大于消耗速度, 最终导致有机物的积累<sup>[1]</sup>, 引起水体的富营养化。水体的富营养化是水污染的普遍现

象, 氨氮浓度的降低是治理水体富营养化时的重要指标之一<sup>[2]</sup>。目前对氨氮的去除方法有物理法、化学法和生物法。采用生物法去除污水中的氨氮具有操作较为简单、成本低且不易造成污染等优点, 因此在水产品养殖和污水处理中被广泛应用<sup>[3-4]</sup>。采用微生物对原位环境进行修复具有环境的适应性较好、降低生物入侵的风险等优势, 并且操作简单、处理成本较低。

对氨氮的去除主要是通过硝化细菌的硝化作用完成。硝化细菌广泛分布于自然环境中, 在河流、淡水湖、咸水湖、海洋、土壤中都广泛分布。硝化细菌可以分为氨氧化细菌和亚硝酸盐氧化细菌。在硝化细菌去除氨氮的过程中, 氨氧化细菌首先将氨氮转化为亚硝酸盐氮, 亚硝酸盐氧化细菌将亚硝酸盐氮转化为硝酸盐氮<sup>[5]</sup>。硝化细菌可以分为自养型和异养型, 目前

已经发现的硝化细菌大多为自养硝化细菌, 自养菌的硝化能力极强, 硝化反应活性比异养菌高  $10^3$ – $10^4$  倍<sup>[6]</sup>。在目前的研究中, 由于自养菌生长较缓慢且对环境较敏感, 而异养菌生长代谢速度快, 因此对硝化细菌研究较多的是异养硝化细菌的研究。在大多数实际被污染的河水环境中, 有机物含量较少, 河水有机物浓度无法使大多数异养菌生长, 也不能有效降低氨氮浓度。单一细菌去除氨氮的效果往往不如菌群, 因为在菌群中一种微生物的代谢产物可能是另一种微生物的生长基质, 因此在工业中使用较多的是菌群。在处理水体污染时, 使用的方法多为购买来自外国的菌剂以降低氨氮的浓度, 市场价格较高<sup>[7]</sup>。目前已有不少关于硝化细菌应用于水产养殖的报道, 对于污水的研究大多数都只是在实验室水平, 应用在大规模自然水体中的报道较少。

本研究富集了来自寡营养河道的硝化细菌群, 分析菌群的结构并研究其生长情况, 分析菌群对实验室人工模拟污染水质和自然环境原位河道水质的影响, 以期利用生物法去除寡营养水体中氨氮污染物提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 培养基及河道水

氨氧化细菌液体培养基(g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.00, NaCl 0.30,  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.03,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03,  $\text{NaHCO}_3$  1.60。调节 pH 值为 7.2。

亚硝酸盐氧化细菌液体培养基(g/L):  $\text{NaNO}_2$  1.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03,  $\text{MnSO}_4$  0.01,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.75, 无水  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.00,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.25。调节 pH 值为 7.5。

固体培养基: 向液体培养基内加入 18.00 g/L 琼脂粉。

液体和固体培养基均于  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

人工污水 I:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.750 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.210 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025 g/L, 柠檬酸三钠 1.810 g/L, 加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  调整氨氮浓度, 用蒸馏水定容。

人工污水 II:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.750 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.210 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025 g/L, 葡萄糖 0.040 g/L, 加入  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  调整氨氮浓度, 用蒸馏水定容。

自然水体: COD 含量 25.00–30.00 mg/L, 氨氮浓度为 5.50 mg/L, 总氮浓度 10.45 mg/L。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

$\text{NaNO}_2$ , 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 其他化学试剂, 国药集团化学试剂有限公司; FastDNA™ Spin Kit for Soil DNA 提取试剂盒, MP Biomedicals 公司。酶标仪, Gene 公司; 超纯水仪, Millipore 公司; 显微镜, Leica 公司; 板框压滤机, 浙江诺盾过滤机械有限公司。

#### 1.1.3 分析检测项目

氨氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )检测依照《水和废水监测分析方法》中的纳氏试剂分光光度法<sup>[8]</sup>; 亚硝酸盐氮( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )检测依照《水和废水监测分析方法》中的 N-(1-萘基)-二乙胺光度法<sup>[8]</sup>。

### 1.2 样品来源与细菌的富集

分别从浙江省台州市路桥区某河道和上海交通大学闵行校区某河道采集水样, 使用氨氧化细菌培养基和亚硝酸盐氧化细菌培养基从采集的河道水样中分别富集氨氧化菌群和亚硝酸盐氧化菌群。将 50 mL 水样分别加入 100 mL 液体氨氧化细菌培养基和亚硝酸盐氧化细菌培养基中, 于 30 °C、180 r/min 富集 5 d 后, 得到氨氧化菌群和亚硝酸盐氧化菌群原始培养液, 用以进一步扩大。将菌群原始培养液分别以 10% 接种量转接入新的相应液体培养基中。以相同的培养条件重复 2 次富集培养, 获得去除氨氮

的氨氧化菌群(命名为 AOB1)和去除亚硝酸盐氮的亚硝酸盐氧化菌群(命名为 NOB1)。用甘油管于 $-80^{\circ}\text{C}$  分别保藏菌群 AOB1 和 NOB1。

### 1.3 菌群的生长

取保藏的氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1, 以 0.2%的接种量分别接种于氨氧化细菌液体培养基和亚硝酸盐氧化细菌液体培养基中。于  $30^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 2 d 后, 以 5%接种量转接于相应的液体培养基中, 于相同条件下培养。每 24 h 取 0.1 mL 菌液, 使用显微计数法进行计数。XB-K-25 血球计数板设置有 2 个计数室。计数室高度为 0.1 mm、面积为  $1\text{ mm}^2$ , 即计数室体积为  $0.1\text{ mm}^3$ 。每个计数室内有 25 个中号方格。向血球计数板的计数室内加样, 记录计数室中央区域的右上、右下、左上、左下和中央 5 个中号方格中细菌数目, 分别记为  $N_1$ 、 $N_2$ 、 $N_3$ 、 $N_4$  和  $N_5$ 。设置 3 个重复。 $N$  (个/L)的计算公式为:

$$N=(N_1+N_2+N_3+N_4+N_5)/5\times 25\times 10\,000\times 1\,000。$$

### 1.4 人工污水生物脱氮实验

取氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 菌剂(菌的浓度达到  $10^{10}$  个/L), 分别以 2%的接种量将其放置于 3 L 人工污水 I 中(菌的终浓度约为  $4\times 10^8$  个/L), 对照组内未投放微生物。向人工污水 I 中添加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  调节氨氮的浓度至 100 mg/L。将人工污水 I 置于桶内, 模拟自然环境, 于室温下曝气, 曝气量为 5 L/min。分别于 20、24、36、48 h 取样, 测定在较高浓度氨氮(100 mg/L)和较高浓度有机物(柠檬酸三钠 1.81 g/L, 其理论 COD 浓度为 841.90 mg/L)人工污水 I 中氨氮的去除情况及亚硝酸盐氮浓度变化。

由于在自然水体中 COD 含量为 25.00–30.00 mg/L, 因此根据此浓度向 3 L 人工污水 II 中添加葡萄糖 0.04 g/L (理论 COD 浓度为 42.70 mg/L), 使其浓度

略高于自然河道, 并且降低氨氮浓度, 调整为 25 mg/L。取氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 菌剂, 分别以 2%的接种量放置于 3 L 人工污水 II 中。每隔 24 h 取样测定低浓度氨氮和低浓度有机物人工污水 II 中氨氮的去除情况及亚硝酸盐氮浓度变化。

### 1.5 自然河道水生物脱氮实验

取浙江省台州市某河道内的 10 L 水于桶内, 取氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 菌剂, 菌剂中菌的浓度达到  $10^{10}$  个/L, 分别以 2%接种量投入 10 L 河道水中, 对照组内未投放微生物。模拟自然环境, 于室温下连续曝气, 曝气量为 5 L/min, 观察菌群对水质的影响。

氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 菌剂(菌的浓度达到  $10^{10}$  个/L)各  $3.5\times 10^3$  L 混匀, 然后使用板框压滤机过滤, 收集菌体。过滤后的混合菌体分散(共计 14 个投放点)投入浙江省台州市路桥区某河道下游 700 m 区域内的河道水中(河道水体积约为  $1\times 10^7$  L)。在河道内固定曝气装置, 连续曝气(曝气量约为 5 L/min)。于 7 d 和 16 d 分别取适当水样检测其中的氨氮、总氮浓度变化。样品送至专业水质检测机构检测。

### 1.6 氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 的微生物多样性分析

取保藏的菌液以 0.2%接种于 10 mL 相应培养液中, 于  $30^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 3 d 后, 以 1%接种量转接至相应培养基中培养 2 d。取培养液, 使用 FastDNA™ Spin Kit for Soil DNA 提取微生物的总 DNA, 具体操作步骤按产品说明书进行。提取的 DNA 样品送至上海派森诺生物科技股份有限公司, 使用 Illumina NovaSeq 平台对 16S rRNA 基因的 V3–V4 区进行双端测序, 并进行微生物多样性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 功能菌群的生长

通过富集得到氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1。

由于硝化细菌群的生长量较少, 无法通过  $OD_{600}$  确定其菌群的生长情况, 因此采用显微计数法检测其生长。将富集的 2 种功能菌群分别接种于相应的液体培养基中, 每 24 h 取样, 对菌群计数以检测其生长情况, 菌群的生长情况如图 1 所示。

由图 1 可知, 氨氧化菌群 AOB1 接入的初始细菌数为  $1.84 \times 10^{10}$  个/L, 菌量迅速增加, 在 2 d 左右达到最大, 为  $5.23 \times 10^{10}$  个/L; 亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 接入的初始细菌数为  $1.21 \times 10^{10}$  个/L, 在第 3 天达到  $3.63 \times 10^{10}$  个/L。生长实验的后期(3–8 d), 虽然菌悬液中细胞数量变化不大, 但是存在明显的菌体细胞的附壁现象, 这是由于硝化细菌易于在物体表面附着进而形成生物膜。通过该生长曲线可以适当掌握混合菌群的生长规律, 选择合适的生长时间收集菌体, 便于后续脱氮实验。

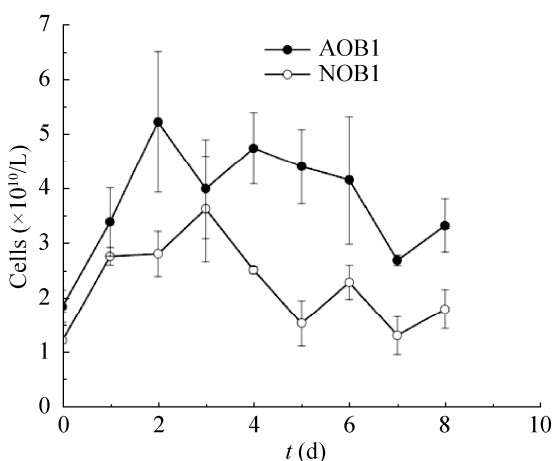


图 1 氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 的生长图

Figure 1 Growth of ammonia-oxidizing consortium AOB1 and nitrite-oxidizing consortium NOB1.

### 2.2 菌群 AOB1 和菌群 NOB1 共同作用去除人工污水中的氨氮

将菌群 AOB1 和菌群 NOB1 菌剂投放人工污水中并于室温下曝气, 模拟自然环境, 探究其对污水的处理效果。检测人工污水内氨氮和亚硝酸盐氮浓度的变化。氨氮初始浓度约为 100 mg/L 时, 结果如图 2A 所示, 经过 36 h 的处理后处理组和对照组的人工污水 I 的氨氮去除率分别为 71.55% 和 52.44%, 处理组的氨氮浓度下降更快且氨氮浓度更低。如图 2B 所示, 亚硝酸盐氮浓度先上升后下降, 处理完成后水体中无亚硝酸盐氮的积累。

由于人工污水 I 未灭菌, 蒸馏水中存在一定的微生物, 而且人工污水 I 中有机物的浓度较高, 推测在曝气过程中对照组的桶内存在明显的硝化细菌富集生长现象, 导致其氨氮浓度有所下降, 但是投放了菌群 AOB1 和 NOB1 的人工污水 I 中氨氮下降程度明显大于对照组。表明菌群 AOB1 和 NOB1 共同作用具有去除氨氮的效果, 亚硝酸盐氮浓度先上升后下降, 并且处理完成后无亚硝酸盐氮的积累。

由于浙江省台州市路桥区某河道水的 COD 含量仅为 25.00–30.00 mg/L, 氨氮浓度为 5.50 mg/L 左右, 因此使用 0.04 g/L 的葡萄糖代替柠檬酸三钠, 0.04 g/L 葡萄糖的理论 COD 浓度为 42.70 mg/L。降低人工污水的 COD 含量, 并且调整氨氮初始浓度为 25 mg/L 左右, 检测人工污水 II 内氨氮和亚硝酸盐氮的浓度变化。如图 2C 所示, 处理组和对照组的氨氮 1 周后的去除率分别为 95.26% 和 17.87%, 浓度分别下降至 1.14 mg/L 和 18.25 mg/L。在降低人工污水中的 COD 含量后, 来自环境中的细菌未对实验产生较多影响, 而且亚硝酸盐氮浓度先上升后下降, 处理完成后未产生积累, 如图 2D 所示。说明氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 共同作用时

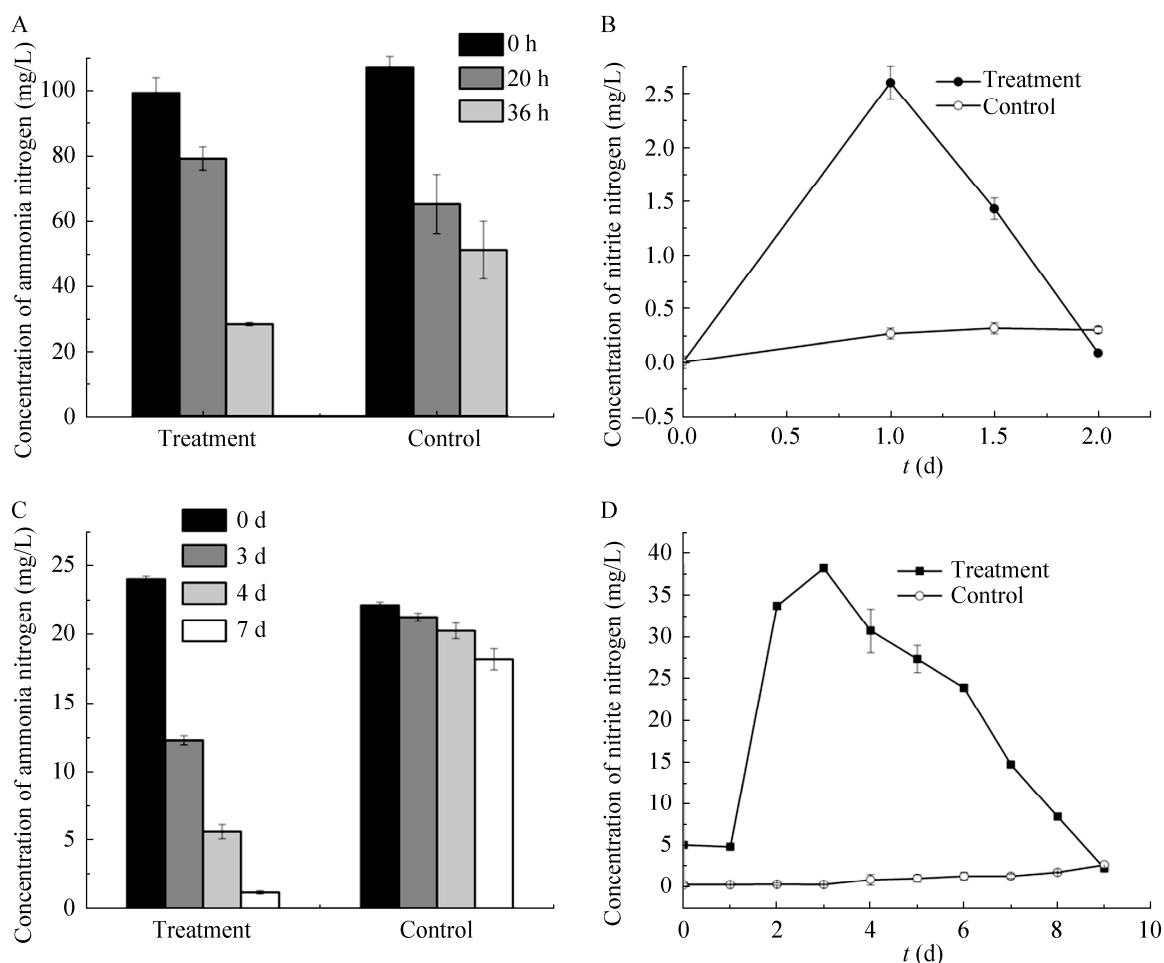


图 2 氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 共同作用处理人工污水脱氮实验 A: 人工污水 I 脱氮实验氨氮浓度变化; B: 人工污水 I 脱氮实验亚硝酸盐氮浓度变化; C: 人工污水 II 脱氮实验氨氮浓度变化; D: 人工污水 II 脱氮实验亚硝酸盐氮浓度变化

Figure 2 Removal of ammonia nitrogen and nitrite nitrogen in artificial sewage by ammonia-oxidizing consortium AOB1 and nitrite-oxidizing consortium NOB1. A: Removal of ammonia nitrogen in artificial sewage I; B: Concentration change of nitrite nitrogen in artificial sewage I; C: Removal of ammonia nitrogen in artificial sewage II; D: Concentration change of nitrite nitrogen in artificial sewage II.

可以有效降低人工污水中的氨氮浓度, 并且最终不积累亚硝酸盐氮, 这为其在自然环境中的应用提供了参考。

### 2.3 菌群 AOB1 和菌群 NOB1 共同作用消除自然河道水中的氨氮

取 10 L 来自浙江省台州市路桥区某河道水于桶内, 将菌群 AOB1 和菌群 NOB1 菌剂投放其中, 对照组内未投放微生物; 于室温下连续曝气,

观察河道水生物增强处理前后的变化。实验组和对照组氨氮的 10 d 去除率分别为 94.04% 和 26.88%, 实验组最终无亚硝酸盐氮的积累, 而对照组亚硝酸盐氮浓度上升了 277.42%。因此菌群 AOB1 和 NOB1 有利于改善河道水的水质。

将菌群 AOB1 和菌群 NOB1 菌剂共同投放于浙江省台州市路桥区某河道 700 m 区域内, 在河道内进行曝气。该河道有少量连续排污, 其

COD 含量为 25.00–30.00 mg/L, 氨氮浓度为 5.50 mg/L, 分别于河道的上、中、下游设置采样点。于 7 d 和 16 d 分别采样, 以河道不同检测点作为重复。检测生物增强处理 7 d 和 16 d 的氨氮浓度和总氮浓度。结果如图 3 所示, 在有连续排污的情况下, 氨氮的浓度持续下降。河道中氨氮的 16 d 去除率为 49.19%, 氨氮浓度降为 2.82 mg/L; 总氮浓度也有所下降, 从 10.45 mg/L 下降至 7.72 mg/L, 去除率为 26.12%。

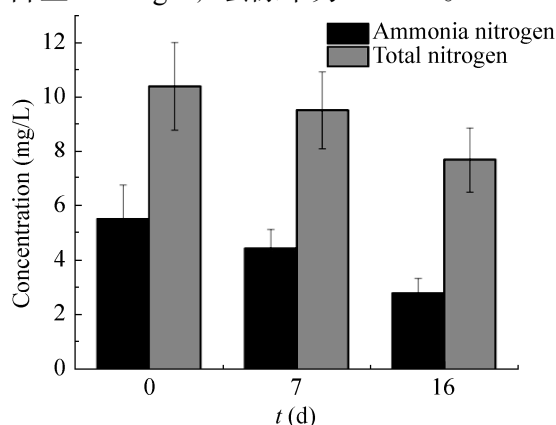


图 3 台州市路桥区河水中氨氮浓度和总氮浓度变化  
Figure 3 Changes of ammonia nitrogen and total nitrogen concentrations in river in Luqiao district, Taizhou city.

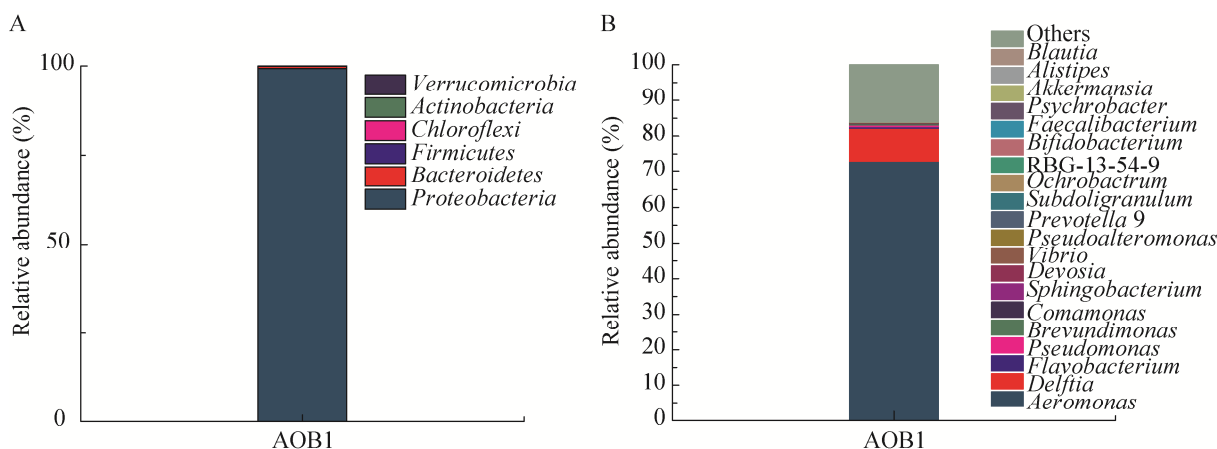


图 4 氨氧化菌群 AOB1 物种组成和丰度分析 A: 在门的分类水平上菌群 AOB1 的物种分布柱状图; B: 在属的分类水平上菌群 AOB1 的物种分布柱状图

Figure 4 Bacteria composition and relative abundance of ammonia-oxidizing consortium AOB1. A: Bacteria composition and relative abundance at phylum level of AOB1; B: Bacteria composition and relative abundance at genus level of AOB1.

菌群 AOB1 和菌群 NOB1 来自自然环境, 二者的共同作用可以改善自然环境, 同时其对环境的影响较少。这为通过生物增强法去除水体中的氨氮污染提供了潜在的可行性。

## 2.4 菌群 AOB1 和菌群 NOB1 的种群结构

采用 Illumina NovaSeq 对 16S rRNA 基因的 V3–V4 区进行高通量测序 (登录号为 PRJNA751173), 分析氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 的种群结构, 图 4 和图 5 中展示了丰度较高的物种, 其他丰度低的物种合并到 Others 中。

氨氧化菌群 AOB1 的种群如图 4 所示, 在门的分类水平上, 由 6 个门组成, 其中 99.28% 属于变形菌门 (*Proteobacteria*), 其次是拟杆菌门 (*Bacteroidetes*, 0.58%) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*, 0.09%)。在属的分类水平上, 由 30 余属组成, 其中相对丰度较高的属是 *Aeromonas* (73.00%)、*Delftia* (9.17%)、*Flavobacterium* (0.46%) 和 *Pseudomonas* (0.43%), 还有 16.04% 的物种无详细注释信息。



亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 的种群如图 5 所示, 在门的分类水平上(图 5A), 由 6 个门组成, 其中 99.64% 隶属于变形菌门(*Proteobacteria*), 其次是厚壁菌门(*Firmicutes*, 0.28%)和放线菌门(*Actinobacteria*, 0.03%)。在属的分类水平上(图 5B), 由 30 余属组成, 其中相对丰度较高的属是 *Aeromonas* (36.66%)、*Pseudomonas* (30.82%)、*Hydrogenophaga* (5.84%)、*Thauera* (1.25%)和 *Alishewanella* (1.13%), 还有 21.34% 的物种无详细注释信息。

### 3 讨论与结论

在废水处理的过程中, 生物脱氮是研究热点, 但是在实际应用中很难实现高效去除氨氮并达到理想的脱氮要求。本研究尝试从寡营养的自然河道中富集出具有高脱氮能力的氨氧化菌群 AOB1 和亚硝酸盐氧化菌群 NOB1, 验证其功能后共同投入到原位环境中, 有效地降低了河道中的氨氮含量并净化了水质。本研究储备了微生物资源, 证明了利用微生物消除城镇

寡营养河道氨氮污染的可行性。对实现国家“美丽乡村”的建设目标、响应浙江省“五水共治”碧水行动、消除江南水系丰沛的河道港汊的污染、改善人们居住环境具有潜在的参考价值。

市面上销售的硝化细菌菌剂种类较多, 国产的硝化菌剂效果一般, 进口产品效果较好但是价格较高。由于不同环境的水体存在差异, 市售的菌剂都是按固定细菌类别配制而成, 将其运用到不同水体中的处理效果也存在很大差异。菌剂中某些功能菌可能在某些水体中无法生长甚至死亡, 从而无法保持较好的氨氮去除效果, 在一定程度上增加了经济成本。

目前, 在实验室水平, 祁自忠等使用自养富集的方法获得虾塘底泥的土著硝化菌群, 其中 *Amphiplicatus* (14.71%)、*Gracilimonas* (13.31%)、*Truepera* (12.10%)、*Tistlia* (9.74%)、*Nitrosomonas* (7.88%)、*Nitrospina* (4.55%)等属相对丰度较高, 其中包括自养菌和异养菌; 但该菌群需与解淀粉芽孢杆菌固定化后共同作用, 通过解淀粉芽孢杆菌去除 COD; 硝化菌群与解

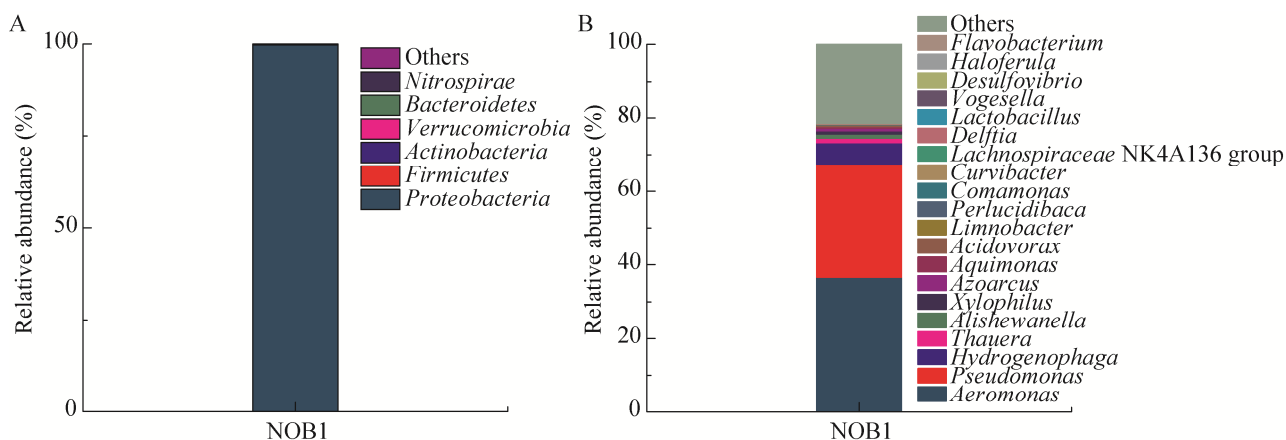


图 5 亚硝酸盐氧化菌群 NOB1 物种组成和丰度分析 A: 在门的分类水平上菌群 NOB1 的物种分布柱状图; B: 在属的分类水平上菌群 NOB1 的物种分布柱状图

Figure 5 Bacteria composition and relative abundance of nitrite-oxidizing consortium NOB1. A: Bacteria composition and relative abundance at phylum level of NOB1; B: Bacteria composition and relative abundance at genus level of NOB1.

淀粉芽孢杆菌共同作用时, 48 h 后对高 COD 浓度的模拟养殖污水中氨氮的去除率为 99.03%<sup>[9]</sup>。然而通过自养富集方法获得的硝化细菌群单独应用于污染水体修复的研究鲜有报道。对于异养菌修复污染水体的研究, 大多数学者利用单菌或者几株菌构建的简单菌群修复污染水体, 也有部分学者研究复合菌群对模拟污水中氨氮的去除情况。例如刘玉佳等从河道底泥中筛选异养硝化-好氧反硝化菌群、异养硝化菌群、好氧反硝化菌群并分析其菌群结构, 功能菌的相对丰度分别是 54.72%、46.26%和 91.57%; 三者构成的复合菌群对模拟河水的氨氮去除率为 89.98%, 其模拟河道水的 COD 浓度为 35 mg/L<sup>[10]</sup>。Yao 等从污水处理厂的活性污泥中筛选异养硝化-好氧反硝化菌群, 研究了其在低温情况下对模拟污水中氨氮的去除情况: 该菌群在 12 h 内对氨氮的去除率约为 37.50%, 但自养硝化受到明显抑制; 在菌群中, *Pseudomonas* 起主要的脱氮功能, 而菌群微生物多样性在富集过程中显著降低<sup>[11]</sup>。本研究从自然河道环境中富集出的 2 种菌群 AOB1 和 NOB1 与已报道的硝化细菌群结构有明显差异, 在未添加外源物质的情况下, 2 种菌群共同作用 36 h 后高有机物含量的人工污水(初始氨氮浓度 100 mg/L)氨氮的去除率为 71.55%, 7 d 后寡营养的人工污水(初始氨氮浓度为 25 mg/L 左右)氨氮去除率为 95.26%。

目前, 在自然环境原位水平, 马玉在低污染的河流岸边搭建人工湿地系统, 通过长时间检测发现氨氮的去除率随时间推移而上升; 其中各个湿地系统中优势菌株各不相同, *Pseudomonas*、*Microbacteriaceae* 在不同的季节中均为优势菌株; 其表面流湿地、潜流湿地和垂直流湿地对氨氮的去除率分别于夏季(71.24%)、冬季(61.63%)、春季(62.63%)达到最高<sup>[12]</sup>。该研究并未进行菌群的筛选, 而且湿地

系统需长时间后达到较高的氨氮去除率。对于此类寡营养低污染水体, 更多学者则筛选了贫营养的异养硝化-好氧反硝化菌并研究其在水体中的脱氮功能<sup>[13-14]</sup>。对于复合菌群在自然环境中修复水体的应用研究, 目前较多学者将其应用于处理污染较严重的黑臭水体。吴霞等采用多种菌株按比例配制而成的复合菌群与微生物促进剂共同处理某污染程度较严重的河道, 初始阶段对污染物的去除效果较差, 于第 10 天再次投加菌剂, 第 18-20 天后氨氮的去除率稳定在 30%左右<sup>[15]</sup>。该处理方法时间跨度较长且需多次投加。本研究富集得到的 2 种菌群可在河道中共同作用。河道的初始氨氮浓度为 5.50 mg/L, 在河道有连续排污的情况下经过 16 d 的处理后氨氮浓度下降 49.19%, 河道的水质有明显的改善, 有效降低了氨氮浓度, 并且降低了河道中总氮的浓度。

本研究富集了来自河道自然环境中具有硝化功能的 2 个菌群, 其共同作用可以去除实验室模拟污染水体和寡营养河道中的氨氮。值得注意的是, 我们在实验室水平利用 2 个菌群处理原位寡营养河水时, 空白对照组也存在氨氮浓度的少量下降, 这可能是水体中含有少量的土著硝化细菌作用的结果, 但样品组中通过生物增强的方法加入 AOB1 和 NOB1 菌群加快了氨氮的消除和水质的改善。因此, 投入的生物增强菌剂与原位土著菌群如何进一步共同作用、监测原位生物多样性的变化将是我们今后研究的一部分内容; 同时, 针对严重污染的水体筛选更加优质的降解菌群以丰富菌种资源也将是我们的研究目标。

## REFERENCES

- [1] Withers PJA, Neal C, Jarvie HP, Doody DG. Agriculture and eutrophication: where do we go from here? [J]. Sustainability, 2014, 6(9): 5853-5875

- [2] Hao XY, Chang C, Janzen HH, Hill BR, Ormann T. Potential nitrogen enrichment of soil and surface water by atmospheric ammonia sorption in intensive livestock production areas[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2005, 110(3/4): 185-194
- [3] 罗胜南, 尚润东, 靳永胜. 我国微生物法去除氨氮研究进展[J]. *生物技术进展*, 2017, 7(2): 155-160  
Luo SN, Shang RD, Jin YS. Progress on microbiological removal of ammonia nitrogen in China[J]. *Current Biotechnology*, 2017, 7(2): 155-160 (in Chinese)
- [4] Yao JC, Mei Y, Xia GH, Lu Y, Xu DM, Sun NB, Wang JD, Chen J. Process optimization of electrochemical oxidation of ammonia to nitrogen for actual dyeing wastewater treatment[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 16(16): 2931
- [5] Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263-276
- [6] Geraats SGM, Hooijmans CM, Van Niel EWJ, Robertson LA, Heijnen JJ, Luyben KCAM, Kuenen JG. The use of a metabolically structured model in the study of growth, nitrification, and denitrification by *Thiosphaera pantotropha*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 36(9): 921-930
- [7] 赵彭年, 杨德玉, 王加友, 丁一凡, 安鹏, 王远. 一株亚硝化细菌的分离鉴定及其发酵工艺优化[J]. *生物技术进展*, 2019, 9(1): 69-77  
Zhao PN, Yang DY, Wang JY, Ding YF, An P, Wang Y. Isolation and identification of a nitrite bacterium and its optimization of fermentation process[J]. *Current Biotechnology*, 2019, 9(1): 69-77 (in Chinese)
- [8] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版, 增补版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002  
State Environmental Protection Administration. *Monitoring Method of Water and Waste Water*[M]. 4th Edition, Supplementary Edition). Beijing: China Environmental Science Press, 2002
- [9] 祁自忠, 杨匡, 程成, 刘子夏, 韩茵. 固定化硝化菌群联合芽孢杆菌处理对虾养殖废水[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(9): 1922-1939  
Qi ZZ, Yang K, Cheng C, Liu ZX, Han Y. Treatment of shrimp wastewater by combination of immobilized nitrifying bacterial consortia and selected *Bacillus* population[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(9): 1922-1939 (in Chinese)
- [10] 刘玉佳, 李茹莹. 河道底泥中异养硝化-好氧反硝化菌群富集培养及其脱氮性能[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(9): 2911-2918  
Liu YJ, Li RY. Enrichment and nitrogen removal characteristic of heterotrophic nitrification-aerobic denitrifiers from river sediment[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(9): 2911-2918 (in Chinese)
- [11] Yao S, Ni JR, Chen Q, Borthwick AGL. Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 127: 151-157
- [12] 马玉. 组合人工湿地系统处理校园景观水效果研究[D]. 徐州: 中国矿业大学硕士学位论文, 2020  
Ma Y. Study on the effect of combined constructed wetland system to treat campus landscape water[D]. Xuzhou: Master's Thesis of China University of Mining and Technology, 2020 (in Chinese)
- [13] Su JF, Zhang K, Huang TL, Wen G, Guo L, Yang SF. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low nutrient conditions by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. SYF26[J]. *Microbiology*, 2015, 161(4): 829-837
- [14] 黄廷林, 白士远, 张海涵, 周石磊, 何秀秀. 一株贫营养异养硝化-好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮特性[J]. *环境工程学报*, 2015, 9(12): 5665-5671  
Huang TL, Bai SY, Zhang HH, Zhou SL, He XX. Identification and denitrification characteristics of an oligotrophic heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(12): 5665-5671 (in Chinese)
- [15] 吴霞, 谢悦波. 直接投菌法在城市重污染河流治理中的应用研究[J]. *环境工程学报*, 2014, 8(8): 3331-3336  
Wu X, Xie YB. Application of directly adding microbial agent to improve water quality of heavily polluted urban river[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2014, 8(8): 3331-3336 (in Chinese)