

# 全程自养脱氮反应系统的微生物区系分析\*

黄俊丽 肖 丽 王贵学\*\* 郭劲松

(重庆大学生物工程学院 重庆 400044)

**摘要:** 在建立全程自养脱氮反应器的基础上, 以活性污泥为对照, 分析了脱氮反应器内真菌、细菌和放线菌的数量、种类(类群)、种(株系)数和优势种(株系或类群), 及硝化菌和亚硝化菌的数量变化。研究结果表明, 与活性污泥相比, 全程自养脱氮反应器内微生物数量、种类和区系组成发生很大变化。自养脱氮反应器内亚硝化菌数量显著增加, 说明亚硝化菌的积累是全程自养脱氮系统的一个显著特点。

**关键词:** 全程自养脱氮, 微生物, 区系, 硝化菌, 亚硝化菌

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0078-05

## Analysis of Microbial Flora in Full Autotrophic Ammonium Removal System\*

HUANG Jun-Li XIAO Li WANG Gui-Xue\*\* GUO Jin-Song

(College of Biological Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044)

**Abstract:** The microbial flora of fungi, bacterial and actinomycetes in full autotrophic ammonium removal reactor and activated sludge was analyzed, and the amount of nitrite-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing bacteria was also compared. The result showed that the population, species, species number and dominates of microorganisms in full autotrophic ammonium removal reactor were different from that in activated sludge. In full autotrophic ammonium removal reactor, the amount of ammonia-oxidizing bacteria was increased remarkably which indicated that the accumulation of ammonia-oxidizing bacteria was a remarkable feature of full autotrophic ammonium removal system.

**Key words:** Full autotrophic ammonium removal, Microorganisms, Flora, Nitrite-oxidizing bacteria, Ammonia-oxidizing bacteria

水体富营养化是我国当今水环境面临的重大问题, 如何经济有效地去除水中的氮, 是解决水体安全重要课题。目前最有效、应用最广泛的脱氮方法是生物脱氮工艺, 其中比较成熟的是传统硝化—反硝化工艺。Mulder 等在研究生物反硝化时发现  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_2^-$  同时消失的现象后, 开发了一种新的处理工艺, 即厌氧氨氧化<sup>[1]</sup>。其基本原理是含氮有机物首先在异养微生物的作用下分解成高浓度  $\text{NH}_4^+$ , 部分  $\text{NH}_4^+$  在亚硝酸菌作用下氧化为  $\text{NO}_2^-$ , 然后厌氧氨氧化菌在无氧条件下以  $\text{CO}_3^{2-}$  作为碳源, 以  $\text{NO}_2^-$  为电子受体, 以没有反应完的  $\text{NH}_4^+$  作为电子供体, 将  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_2^-$  共同转化为  $\text{N}_2$ 。Hippen 等人在对垃圾渗滤水处理厂进行氮平衡的研究时, 也发现了这种特殊的生物脱氮现象—自养脱氮<sup>[2,3]</sup>。Helmer 等实验证明, 反应只进行到亚硝化阶段, 最终产物为氮气<sup>[4]</sup>。

全程自养脱氮反应系统是一个组成复杂的微生态系统, 主要的微生物种类除真菌、细菌和放线菌外, 还包括原生动物及少量的后生动物等<sup>[5]</sup>。脱氮过程不但受硝化菌和

\* 国家科技攻关计划小城镇科技发展重大项目 (No. 2003BA808A17-02-04)

\*\* 通讯作者 Tel: 023-65120497, E-mail: wanggx@cqu.edu.cn

收稿日期: 2005-02-21, 修回日期: 2005-04-09

亚硝化菌数量和种类的影响,还易受环境条件及其它微生物数量和种类的限制,因此,稳定的微生物群落结构的形成,也是影响废水处理过程中的关键因素之一。本课题组在与重庆大学城环学院合作初步建立全程自养脱氮反应器的基础上,分析了全程自养脱氮反应系统中微生物的组成及分布状况,这将为阐明全程自养脱氮机理奠定理论基础,为进一步优化全程自养脱氮反应器的设计和运行提供必要的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

活性污泥取自重庆城南污泥厂。将污泥静置,沉降,倾去部分上清液,在温度为 30℃、pH 为 8.0 左右的条件下,加入合成氨氮废水进行逐步培养和驯化,建立全程自养脱氮反应器。合成氨氮废水中,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  为 100 ~ 300 mg/L,以 N:P 比为 10:1 的比例加入磷酸盐缓冲溶液,另外加入 Fe、Mg 等微量元素,以  $\text{NaHCO}_3$  调节溶液 pH 值。稳定运行时系统的 C/N 比为 0.85,氨氮和总氮去除率分别达 70% 和 43% 左右。

### 1.2 微生物(真菌、细菌和放线菌)的分离及数量分析

采用梯度稀释分离法进行微生物的分离<sup>[6]</sup>。取少量活性污泥和脱氮反应器中样品,在旋涡振荡器上振荡充分混匀,然后进行梯度稀释。真菌、放线菌和细菌分别采用  $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-7}$  的稀释梯度,分别采用马丁氏培养基、改良高氏一号培养基和牛肉膏蛋白胨培养基进行分离培养<sup>[6]</sup>。每培养皿加入 1 mL 稀释液和 9 mL 培养基,稀释分离后分别在 26℃、28℃ 和 30℃ 培养 6 d、8 d 和 10 d,然后记数观察。每处理每重复 3 种微生物各 3 皿,求平均数。分离的 3 种微生物及时进行转管保存做进一步的鉴定。

采用烘干法测定活性污泥和脱氮反应液的土壤干重<sup>[6]</sup>。取活性污泥和脱氮反应器中泥水混合物各 30 mL 至小烧杯中烘干称重,然后将小烧杯洗净烘干后称其净重,求得 30 mL 泥水混合物的土壤干重,最后算出 1 mL 泥水混合物的土壤干重。采用 CFU 法计算每克干土中微生物的数量<sup>[6]</sup>。

微生物数量(cfu/g 干土) = (平均每皿菌落数/1 mL 土壤干重)  $\times 10^3$  ( $10^5$  或  $10^7$ )。

### 1.3 微生物鉴定及区系分析方法

将 3 大类群的微生物稀释分离后,根据真菌的培养性状和形态特征进行真菌种类鉴定<sup>[7,8]</sup>;根据细菌的培养性状、革兰氏染色和鞭毛染色及其它理化性质进行细菌优势群的鉴定<sup>[9,10]</sup>;根据培养性状和形态特征进行放线菌优势类群的鉴定<sup>[11]</sup>。根据各种微生物在培养皿上出现的平均频率,将微生物分为 3 类:出现频率在 5% 以下,为稀有种(类群),记为 (+);出现频率在 5% ~ 20% 之间,为常见种(类群),记为 (++) ;出现频率在 20% 以上,为优势种(类群),记为 (+++)。

### 1.4 硝化菌和亚硝化菌的计数

同样采取梯度稀释分离法分离硝化菌和亚硝化菌。硝化菌和亚硝化菌的分离分别采用  $10^{-2}$  和  $10^{-3}$  的稀释梯度,采用 CFU 法计算每克干土中硝化菌和亚硝化菌的数量。硝化菌和亚硝化菌分离培养基成分如下:硝化菌分离培养基 NaCl 2.7 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.4 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 g,  $\text{NaNO}_2$  2.5 g,  $\text{NaHCO}_3$  16.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.66 g,  $\text{H}_2\text{O}$  定容至 1,000 mL, (溶液最终调至 pH 7.0)。

亚硝化细菌分离培养基  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, NaCl 2.0 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g,  $\text{CaCO}_3$  5.0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  定容至 1,000 mL, (溶液最终调至 pH 7.2)。

2 结果与分析

2.1 微生物数量分析

采用稀释分离法分别测定了全程自养脱氮反应器和活性污泥中真菌、细菌和放线菌的数量 (表 1)。结果表明,脱氮反应器中真菌数量明显高于活性污泥,而细菌和放线菌的数量稍低,但差异不显著。由于活性污泥中的微生物菌群经过培养驯化后,

因为系统内缺乏有机碳源而生长缓慢,因此数量减少,这种变化的实质是特定微生物的自然选择,是微生物在厌氧条件下竞相利用有机物的竞争。但真菌作为一种异氧菌,经过培养后驯化数量却显著增加,这还有待于进一步的深入研究。

表 1 微生物数量分析

处理	真菌 (cfu/g 干土)	细菌 (cfu/g 干土)	放线菌 (cfu/g 干土)
自养脱氮反应器	$3.8 \times 10^{6**}$	$4.0 \times 10^9$	$2.3 \times 10^7$
活性污泥	$2.8 \times 10^5$	$4.4 \times 10^9$	$5.4 \times 10^7$

\*表示差异显著 ( $P \leq 0.05$ ),\*\*表示差异极显著 ( $P \leq 0.01$ )

2.2 硝化菌和亚硝化菌数量分析

硝化菌和亚硝化菌是脱氮系统中非常重要的两大类微生物,在传统的硝化—反硝化系统中,亚硝酸细菌数量在  $10^2 \sim 10^5$  之间,硝酸细菌数量在  $10^5 \sim 10^6$  之间,二者的数量直接反映系统的脱氮效率 (表 2)。从表 2 可以看出,活性污泥中,亚硝化菌数量只有硝化菌数量的 1/6,而在自养脱氮反应器中,亚硝化菌数量显著增加,而硝化菌数量略有下降,两种菌的数量比例为 41.5。据分析,在没有任何限制的条件下,硝化菌的生长速度远大于亚硝化菌,因此,在普通活性污泥中  $\text{NO}_2^-$  的积累受到限制。在自养脱氮反应体系中,通过控制体系的温度、pH 值和水力停留时间可以淘汰掉部分硝化菌,使亚硝化菌占绝对优势。上述结果表明,自养脱氮反应器中富集的自养型细菌可以适应高浓度的亚硝酸盐,因此存活的亚硝化菌数量明显增加。

2.3 微生物区系及优势种 (类群) 分析

2.3.1 真菌种 (株系) 数和优势种 (株系) 分析: 分别对自养脱氮反应器和活性污泥中的真菌种 (株系) 数和优势种 (株系) 进行了分析 (表 3)。与活性污泥相比,自养脱氮反应器的真菌种 (株系) 数和优势种 (株系) 发生了很大变化。在活性污泥中分离到 10 种真菌,其优势种主要是白地霉和哈次木霉;而在自养脱氮反应器中分离到 14 种真菌,其优势种 (种系) 主要是镰刀菌属、葡萄霉属和膝葡萄属。

表 2 硝化菌和亚硝化菌数量分析

处理	硝化菌 (cfu/g 干土)	亚硝化菌 (cfu/g 干土)	亚硝化菌/硝化菌
自养脱氮反应器	$1.3 \times 10^5$	$5.4 \times 10^6$	41.5
活性污泥	$2.2 \times 10^5$	$3.5 \times 10^4$	0.16

表 3 真菌组成及区系分析

真菌种类 (属/种)	自养脱氮反应器	活性污泥
黄曲霉 ( <i>Aspergillus flavus</i> )	+	
灰绿曲霉 ( <i>Aspergillus glaucus</i> )	+	+
黑曲霉 ( <i>Aspergillus niger</i> )	+	+
短梗霉属 ( <i>Aureobasidium</i> sp.)	+	++

续表 3

簇座属 ( <i>Botryoderma</i> sp.)		+
葡孢霉属 ( <i>Botryosporium</i> sp.)	+++	
镰刀菌属 ( <i>Fusarium</i> sp.)	+++	
白地霉 ( <i>Geotrichum albidum</i> )	+	+++
粘帚霉属 ( <i>Gliocladium</i> sp.)	+	
膝葡萄属 ( <i>Gonatobotrys</i> sp.)	+++	
丛梗孢属 ( <i>Monilia</i> sp.)	++	+
毛霉属 ( <i>Mucor</i> sp.)		+
膝斑菌属 ( <i>Myrothecium</i> sp.)		++
覃青霉 ( <i>Penicillium paxilli</i> )	+	
黑根霉 ( <i>Rhizopus nigricans</i> )		+
哈次木霉 ( <i>Trichoderma hamatum</i> )	++	+++
沃德霉属 ( <i>Wardomyces</i> sp.)	+	
待鉴定 (种)	1	
合计 (属/种)	14	10

2.3.2 细菌菌株 (株系) 数和优势种 (种类) 分析: 自养脱氮反应器和活性污泥中的细菌种 (株系) 数和优势种 (株系) 也有差别 (表 4)。从自养脱氮反应器中分离到 7 种细菌, 优势种 (株系) 主要是荧光假单胞菌和巨大芽孢杆菌; 从活性污泥中分离到 9 种细菌, 优势种 (种类) 主要是黄杆菌和荧光假单胞菌。

表 4 细菌组成及区系分析

细菌种类 (属/种)	自养脱氮反应器	活性污泥
巨大芽孢杆菌 ( <i>Bacillus megaterium</i> )	+++	+
短小芽孢杆菌 ( <i>Bacillus pumilus</i> )		+
蜡质芽孢杆菌 ( <i>Bacillus cerus</i> )		+
芽孢杆菌 ( <i>Bacillus</i> sp.)	+	
棒状杆菌 ( <i>Corynebacterium</i> sp.)	+	
荧光假单胞菌 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	+++	++
假单胞菌 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	+	+
黄杆菌 ( <i>Flavobacterium</i> sp.)	++	+++
链球菌 ( <i>Streptococcus</i> sp.)		+
双球菌 ( <i>Diplococcus</i> sp.)		+
节杆菌 ( <i>Arthrobacter</i> sp.)	+	+
合计 (属/种)	7	9

2.3.3 放线菌株系数和优势类群分析: 分离出的放线菌 95% 以上为链霉菌属, 依据培养特性 (即基内菌丝的颜色和孢子丝的着生和颜色) 将形状相同的菌株归成类群, 列于表 5。从表 5 可以看出, 自养脱氮反应器和活性污泥中放线菌主要类群有白孢类群、黄色类群、粉红孢类群、烬灰类群、灰褐类群及吸水类群。在自养脱氮反应器中, 优势类群主要是白孢类群。而在活性污泥中, 放线菌优势类群主要是粉红孢类群。以上结果表明, 与活性污泥相比, 自养脱氮反应器中放线菌的株系数和主要类群都发生了很大变化。从以上微生物区系及优势种 (类群) 的分析可知, 生物脱氮系统只是一个污泥系统, 各种菌群同时存在, 相互竞争, 当环境条件发生改变, 适应环境条件变化的菌群就成为优势菌群, 起着主导作用。

表 5 放线菌组成及区系分析

类群	自养脱氮反应器		活性污泥	
	株系数	所占比例	株系数	所占比例
白袍类群 (Albosporus)	6	+++	1	+
粉红袍类群 (Roseosporus)	2	+	8	+++
黄色类群 (Flavus)	2	++	3	+
烬灰类群 (Cinargriseus)	1	+	1	+
灰褐类群 (Griseofusus)	1	+	2	+
吸水类群 (Hygroscopicus)			1	+
合计	12		16	

3 讨论

目前比较成熟的脱氮工艺为传统硝化一反硝化工艺，而新的全程自养脱氮工艺对低 C/N 比、高浓度含氮废水具有高效脱氮作用，并且脱氮能耗仅为传统硝化一反硝化脱氮的 1/3，因此具有重要的理论和实践价值。

全程自养脱氮包括两步：第一步是将部分氨氮氧化为亚硝酸盐，第二步是厌氧氨氧化，因此亚硝酸盐的积累是全程自养脱氮反应过程的关键步骤。本研究的结果表明，在全程自养脱氮反应器中，亚硝化菌占绝对优势，反应只进行到亚硝化阶段。贾呈玉等 (2003) 的研究也表明，亚硝氮的加入，加快了氨氮和总氮的转化率，而硝酸盐的影响比较小<sup>[12]</sup>。有研究表明，C/N 比较大时，碳源充足，反硝化反应进行得比较完全，但会导致出水 COD 偏高；相反，C/N 比较小时，碳源不足，反硝化反应进行得不完全，因此 C/N 比取 0.95 ~ 1.0 最佳<sup>[13]</sup>。在本研究中，C/N 比为 0.85，因此，在此基础上对系统进行改进，提高 C/N 比，可以提高系统的脱氮效率。

在该反应过程中，始终未加有机碳，因此全程自养脱氮反应主要是通过自养菌来进行的。全程自养脱氮的全过程由自养菌在同一个反应器中完成，其机理尚不清楚。本研究通过分析全程自养脱氮的微生物区系，从微生物学角度探讨生物脱氮的机理，将有助于采取合理措施提高生物脱氮的效率。

参 考 文 献

[1] Mulder A, Van de Graaf A A, Robertson L A, *et al.* FEMS Microbial Ecol, 1995, 16: 177 ~ 183.  
[2] Hippen A, Baumgarten G, Rosenwinkel K H, *et al.* Wat Sci Tech, 1998, 38 (8~9): 241 ~ 248.  
[3] Hippen A, Scholten E, Helmer C, *et al.* New Advances in Biological Nitrogen and Phosphorus Removal for Municipal or Industrial Wastewaters, 1998, 10: 12 ~ 14.  
[4] Helmer C, Kunst S. Wat Sci Tech, 1999, 39 (7): 13 ~ 21.  
[5] Hasse D. Polymeric Basic Aluminum Silicate-sulfate EPO, 1990. 372, 715A1.  
[6] 中国科学院南京土壤微生物研究所. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985.  
[7] 中国科学院南京土壤微生物研究所. 常用与常见真菌. 北京: 科学出版社, 1973.  
[8] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.  
[9] 中国科学院微生物研究所. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.  
[10] 卢振祖. 细菌分类学. 武汉: 武汉大学出版社, 1994.  
[11] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社, 1992.  
[12] 贾呈玉, 李道棠, 杨 虹. 上海环境科学, 2003, 22 (1): 32 ~ 35.  
[13] 刘吉明, 杨云龙. 山西建筑, 2004, 30 (8): 67 ~ 68.