

研究报告

耐高浓度氨氮的异养硝化好氧反硝化菌株 U1 的鉴定及其脱氮特性

高雅娟¹, 靳静晨², 高洁¹, 高宇轩¹, 吴慧娟¹, 张闻天¹, 李晨晨¹, 张国伟¹, 靳永胜^{*1}

1 北京农学院, 北京 102206

2 北京环氧环保科技发展有限公司, 北京 100101

高雅娟, 靳静晨, 高洁, 高宇轩, 吴慧娟, 张闻天, 李晨晨, 张国伟, 靳永胜. 耐高浓度氨氮的异养硝化好氧反硝化菌株 U1 的鉴定及其脱氮特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2442-2456

Gao Yajuan, Jin Jingchen, Gao Jie, Gao Yuxuan, Wu Huijuan, Zhang Wentian, Li Chenchen, Zhang Guowei, Jin Yongsheng. Identification and denitrification characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification strain U1 resistant to high concentrations of ammonia nitrogen[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2442-2456

摘要:【背景】城市垃圾渗滤液是一种成分复杂的有机废水, 含氮量高, 如果未经处理直接排放到环境中会造成严重的环境污染。【目的】筛选可以耐受垃圾渗滤液中高浓度氨氮并高效去除污水中氮素的异养硝化好氧反硝化菌株, 为解决垃圾渗滤液的氮素污染提供功能菌株。【方法】从垃圾渗滤液中筛选分离能耐受高氨氮浓度的菌株, 通过测定各菌株的脱氮能力, 筛选到一株脱氮能力最强的菌株, 命名为 U1, 通过测定 16S rRNA 基因序列和生理生化特性确定该菌株为铜绿假单胞菌。进一步研究了菌株 U1 在不同初始氨氮浓度、碳源、转速、初始 pH、碳氮比等单因素变量下的脱氮能力, 并结合 $L_9(3^4)$ 正交试验研究了菌株 U1 的最佳脱氮条件。【结果】分离出一株铜绿假单胞菌并命名为 U1。该菌株的最优脱氮条件为: 初始氨氮浓度为 1 000 mg/L, 红糖和柠檬酸三钠的混合碳源, pH 6.0, C/N 为 10, 转速为 130 r/min, 菌株 U1 的最大总氮去除率为 64.37%, 最大氨氮去除率为 76.73%。对于总氮和氨氮含量分别是 2 345 mg/L 和 1 473.8 mg/L 的垃圾渗滤液, 菌株 U1 最大总氮去除率为 27.86%, 最大氨氮去除率为 21.32%。【结论】菌株 U1 可以用于处理垃圾渗滤液等高浓度氨氮废水。

关键词: 异养硝化好氧反硝化; 渗滤液; 脱氮; 假单胞菌

基金项目: 北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目(5076516020/018)

Supported by: Research Fund for Academic Degree & Graduate Education of Beijing University of Agriculture (5076516020/018)

*Corresponding author: E-mail: jin6405@126.com

Received: 2021-10-30; Accepted: 2021-12-23; Published online: 2022-02-09

Identification and denitrification characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification strain U1 resistant to high concentrations of ammonia nitrogen

GAO Yajuan¹, JIN Jingchen², GAO Jie¹, GAO Yuxuan¹, WU Huijuan¹, ZHANG Wentian¹, LI Chenchen¹, ZHANG Guowei¹, JIN Yongsheng^{*1}

¹ Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

² Beijing Epoxy Environmental Technology Development Limited Company, Beijing 100101, China

Abstract: [Background] Municipal waste leachate is a kind of complex organic wastewater with high nitrogen content, which can causes serious environmental pollution if discharged directly into the environment. [Objective] To select heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying (HN-AD) strains that can tolerate high concentration of ammonia nitrogen in waste leachate and efficiently remove nitrogen from wastewater, and thereby provide functional strains to address nitrogen pollution in urban wastewater. [Methods] The strains that could tolerate high concentration of ammonia nitrogen were isolated from the waste leachate, and a strain with the strongest denitrification capacity was screened out and named U1. Based on 16S rRNA gene sequencing and physiological and biochemical characteristics, U1 was identified as *Pseudomonas aeruginosa*. Then we further investigated nitrogen removal ability of U1 in the presence of ammonia nitrogen of different initial concentration and different carbon sources, and at different rotation speeds, initial pH, and carbon-to-nitrogen ratios, and explored the optimal nitrogen removal conditions of U1 in combination with L₉(3⁴) orthogonal test. [Results] U1 with strong denitrification ability was isolated and the optimum denitrification conditions for this strain are as follows: ammonia nitrogen at initial concentration of 1 000 mg/L, mixed carbon source of brown sugar+trisodium citrate, pH of 6.0, carbon-to-nitrogen ratio of 10, and rotation speed of 130 r/min. Under the optimum conditions, the maximum total nitrogen removal rate of U1 was 64.37% and the maximum ammonia nitrogen removal rate was 76.73%. For the waste leachate with total nitrogen and ammonia nitrogen amount of 2 345 mg/L and 1 473.8 mg/L, respectively, the maximum removal rate of total nitrogen by U1 was 27.86% and the maximum removal rate of ammonia nitrogen was 21.32%. [Conclusion] U1 can be used to treat wastewater with high-concentration ammonia nitrogen.

Keywords: heterotrophic nitrification and aerobic denitrification; leachate; nitrogen removal; *Pseudomonas* sp.

垃圾渗滤液成分复杂、氨氮含量高、难于处理,是城市垃圾处理中的难题。目前垃圾渗滤液处理主要采取厌氧+好氧的处理方式。垃圾渗滤液处理过程中氮的去除分为3个过程:氨化菌参与的氨化过程、自养硝化菌参与的硝化过程和厌氧反硝化菌参与的反硝化过程。这种

处理方式需要单独使用厌氧和好氧装置,增加了成本和管理难度。与传统生物法脱氮相比,异养硝化好氧反硝化菌具有以下优势:同一容器发生反应,硝化与反硝化同时进行,减少占地面积,成本降低。硝化反应产生的酸与反硝化产生的碱中和,减少了酸碱中和试剂的使用^[1-3]。

因此, 异养硝化好氧反硝化菌是目前污水脱氮的研究热点。

异养硝化好氧反硝化菌株是 Robertson 等^[4]最先发现的, 他们在脱硫脱氮污水处理系统中分离出一株泛养硫球菌(*Thiosphaera pantotropha*), 后更名为脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*), 随后阐明了脱氮副球菌是一类具有同时进行异养硝化好氧反硝化反应的细菌。异养硝化好氧反硝化菌繁殖速度快、抗逆性强、耐高氨氮浓度, 可以在有氧条件下完成氮的去除^[5-6]。氨氮降解是垃圾渗滤液处理最关键的环节, 因此, 筛选高效的脱氮菌株并探究其在处理垃圾渗滤液时的应用效果是脱氮菌研究的重点^[7-8]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 渗滤液来源

渗滤液取自北京市大兴区南宫垃圾菌肥厂。

1.1.2 培养基

富集培养基(g/L)^[9]在添加量上有所改进: 硫酸铵 4.25, 硝酸钾 0.72, 红糖 19.02, 柠檬酸三钠 8.17, 磷酸二氢钾 3.00, 磷酸氢二钾 8.00, 七水硫酸镁 0.20, 微量元素 2.00 mL。

分离培养基: 富集培养基加 20.00 g/L 的琼脂。

溴百里酚蓝(bromothymol blue, BTB)培养基(g/L)^[9]: 硝酸钾 1.00, L-天冬酰胺 1.00, 柠檬酸三钠 8.50, 磷酸二氢钾 1.00, 氯化铁 0.05, 氯化钙 0.20, 七水硫酸镁 1.00, 溴百里酚蓝 0.005, pH 7.0。

氨氮浓度为 750 mg/L 的硝化培养基(g/L)^[10]: 硫酸铵 3.54, 柠檬酸三钠 30.64, 磷酸二氢钾 3.00, 磷酸氢二钾 8.00, 七水硫酸镁 0.20, 微量元素 2.00 mL。

硝酸钾反硝化培养基(g/L)^[11]: 硝酸钾 2.17,

柠檬酸三钠 12.25, 磷酸二氢钾 3.00, 磷酸氢二钾 8.00, 七水硫酸镁 0.20, 微量元素 2.00 mL。

亚硝酸钠反硝化培养基(g/L)^[11]: 亚硝酸钠 1.48, 柠檬酸三钠 12.25, 磷酸二氢钾 3.00, 磷酸氢二钾 8.00, 七水硫酸镁 0.20, 微量元素 2.00 mL。

微量元素(g/L)^[10]: 乙二胺四乙酸二钠 10.00, 七水硫酸锌 3.90, 氯化钙 7.00, 四水氯化锰 5.10, 硫酸亚铁 5.00, 四水合钼酸铵 1.10, 五水硫酸铜 1.60, 氯化钴 1.60。

1.1.3 主要试剂和仪器

化学试剂均为国产分析纯; 细菌通用 PCR 引物、PCR Mix、DNA Marker 和 *Taq* DNA 聚合酶, 北京聚合美生物科技有限公司。紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 纯水仪, 上海和泰仪器有限公司; 离心机, Eppendorf 公司。

1.2 富集、分离和筛选

将从南宫垃圾场取回的垃圾渗滤液按照 1% 接种量加到灭菌后的富集培养基中进行富集培养, 28 °C、130 r/min 恒温摇床培养 5 d, 每间隔 1 d 加 0.1 g 的硫酸铵。然后在超净工作台中进行转瓶培养, 取第 1 次富集好的菌液 1 mL 加入到新的一瓶富集培养基中, 在同样环境下摇床培养 3 d。

取 1 mL 第 2 次富集的菌液采用稀释涂布法进行稀释, 稀释至 10^{-7} , 分别涂布于分离培养基上。于 28 °C 恒温培养箱培养 24–48 h 后, 挑取平板上所有单菌落进行大批量菌株的筛选分离。经过 3–5 次纯化分离得到每株菌的单菌落, 选取脱氮能力最好的 U1 作为目的菌株。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 菌株 U1 的形态特征

使用三线法将分离出的菌株划在分离培养基上, 28 °C 恒温培养, 待该菌株长出单菌落后, 使用革兰氏染色试剂盒对其进行革兰氏染色实验。在显微镜下观察菌株的革兰氏染色结果以

及形态。

1.3.2 生理生化指标特征

参照《常见细菌系统鉴定手册》^[12]对菌株 U1 进行鉴定。

1.3.3 16S rRNA 基因序列分析

扩增菌株 16S rRNA 基因的 PCR 反应体系 (50 μ L): DNA 模板 1 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L, PCR Mix 20 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增和测序所用的引物为细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3')。将测序结果进行序列分析, 在 NCBI 官网上进行 BLAST 比对分析, 使用 MEGA 5.0 构建系统发育树, 完成菌株亲缘关系分析。

1.4 菌株脱氮能力测定

将分离纯化后得到的所有菌株的单菌落分别转移至 100 mL 的富集培养基中, 28 $^{\circ}$ C、130 r/min 恒温摇床培养 36 h。然后以 1%的接种量接种于新的富集培养基中, 同样环境条件下培养 3 d, 测定总氮、氨氮的去除率, 选取脱氮能力最好的菌株作为目的菌株。

1.5 菌株好氧反硝化能力测定

将筛选到的总氮、氨氮去除效果好的菌株活化, 然后以 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 36 h, 分别挑取单菌落以三线法划线于 BTB 固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养, 在 24 h 内观察 BTB 培养基的颜色并拍照记录。

1.6 菌株 U1 的脱氮影响因素研究

1.6.1 单一因素试验

对菌株生长和脱氮影响比较显著的因素为单因素变量, 如不同初始浓度氨氮、碳源、摇床转速、初始 pH、碳氮比等。对菌株 U1 的脱

氮条件进行优化, 所接种的母液均为活化 24 h 的菌液。将菌液以 1%的接种量接种到优化的富集培养基中, 初始氨氮浓度分别为 100、500、1 000、1 500 mg/L; 碳源种类是将富集培养基中的碳源更换为葡萄糖、丁二酸钠、柠檬酸三钠、红糖、混合碳源(红糖和柠檬酸三钠的质量比为 1:4); 摇床转速分别设置为 100、130、160 r/min; 用 1 mol/L HCl 和 NaOH 将培养基的初始 pH 分别调整为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0; C/N 分别为 6、10、20。每隔 24 h 在超净工作台中取样, 然后 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 测定 TN、NH₄⁺-N 浓度。

以 1 000 mg/L 氨氮为初始氮源, 将单因素得到的最佳条件综合到一起, 摇床培养 120 h, 每隔 24 h 在超净工作台中取样, 然后 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 测定 TN、NH₄⁺-N 浓度。

1.6.2 正交试验

以 1 000 mg/L 氨氮为初始氮源, 设计 L₉(3⁴) 正交试验, 4 个因素是碳源、pH、C/N 和摇床转速(表 1)。以 1%接种量将活化好的菌液接入异养硝化培养基中, 以总氮、氨氮去除率作为分析依据, 找到菌株 U1 最优脱氮环境条件。

按照正交试验得到的最优脱氮条件制作培养基, 摇床中培养 120 h, 每隔 24 h 在超净工作台中取样, 然后 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 测定 TN、NH₄⁺-N 浓度。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Level table of orthogonal experimental factors

Level	Factors			
	A Carbon	B pH	C C/N	D Speed (r/min)
1	Trisodium citrate	6.0	6	100
2	Succinic acid sodium	7.0	10	130
3	Brown sugar and trisodium citrate	8.0	20	160

1.7 菌株 U1 在渗滤液中的应用

将活化好的菌液按照 5%、10%、15% 接入未灭菌和灭过菌的渗滤液中, 于 28 °C、200 r/min 培养 120 h, 每隔 24 h 在超净工作台中取样, 然后 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 测定 TN、NH₄⁺-N 浓度。

1.8 分析方法

总氮测定方法^[13]: 碱性过硫酸钾紫外分光光度法。

氨氮测定方法^[14]: 纳氏试剂分光光度法。

2 结果与分析

2.1 菌株 U1 的分离与鉴定

2.1.1 菌体形态特征

琼脂平板上的 U1 菌落为土白色、黏稠状的菌落。菌株 U1 呈直或微弯的杆状, 不呈螺旋状, 一条鞭毛, 大小为(0.5–0.7) μm×(1.5–3.0) μm。菌株 U1 的革兰氏染色结果是阴性, 通过电镜观察菌体形状呈短杆状(图 1)。

2.1.2 生理生化鉴定结果

产生脓青素(绿脓菌素); 可以进行反硝化,

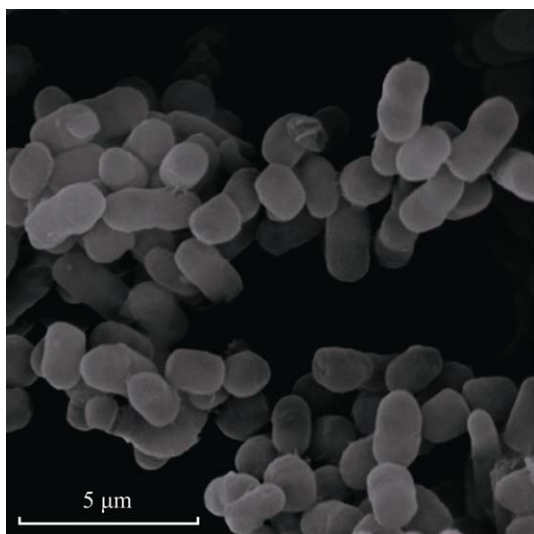


图 1 菌株 U1 的电镜图

Figure 1 Microscopic examination of strain U1.

不能在 4 °C 条件下生长, 不能从蔗糖产生果聚糖, 氧化酶阳性; DNA 的 GC 含量为 67.2 mol%。

以上的生理生化结果表明菌株 U1 符合铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)特征。

2.1.3 分子生物学鉴定与系统发育分析结果

将菌株 U1 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库进行比对, 结果表明, 菌株 U1 (OL356340) 与铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)相似。使用软件 MEGA 5.0 构建系统发育树。从构建的系统发育树上可以看出, 菌株 U1 与铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)亲缘关系最近, 确定菌株 U1 属于假单胞菌属(图 2)。

2.2 不同初始氨氮浓度对菌株 U1 的脱氮影响

从图 3 和图 4 可以看出, 100 mg/L 初始氨氮浓度中的氨氮在 48 h 可以被完全去除, 在 24 h 时, 总氮去除率达到 70%, 之后总氮去除率反而逐渐下降; 500 mg/L 初始氨氮浓度中的氨氮在 48 h 后可以被去除 90% 以上, 总氮去除率在 24–48 h 呈上升状态, 48 h 达到最高即 78.05%, 之后逐渐下降; 当初始氨氮浓度为 1 000 mg/L 和 1 500 mg/L 时, 菌株总氮和氨氮去除趋势接近一致, 都呈现上升状态; 在 120 h 时, 菌株 U1 将 1 000 mg/L 初始氨氮浓度中的总氮去除 65.55%、氨氮去除 86.75%, 将 1 500 mg/L 初始氨氮浓度中的总氮去除 53.97%、氨氮去除 51.06%, 这说明菌株 U1 具有良好的耐受高浓度氨氮能力, 在初始氨氮浓度为 1 500 mg/L 时仍有脱氮能力。Wang 等^[15]研究的香茅醇假单胞菌 WXP-4 可以在 24 h 时使 1 000 mg/L 硝态氮的去除率达到 72.25%, 这说明假单胞菌属对于处理高浓度氮素的污水是有效果的。

2.3 不同碳源对菌株 U1 的脱氮影响

不同碳源对菌株 U1 脱氮的影响如图 5 和图 6 所示。从图 5 和图 6 可以看出, U1 的最适

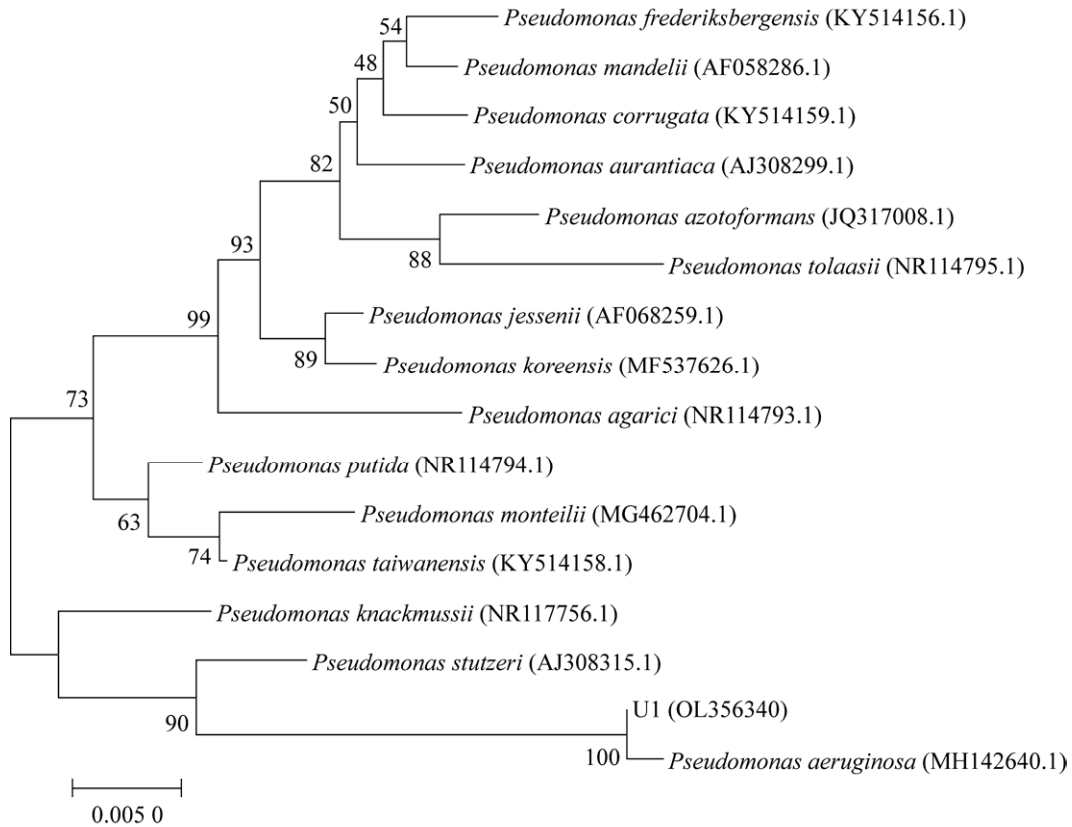


图2 菌株 U1 及其近缘模式菌株 16S rRNA 基因序列系统发育树 括号中的序号表示该菌在 GenBank 数据库中的登录号; 分支点上的数字表示置信度; 标尺代表遗传变异系数

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship between strain U1 and the related species. The serial number in parentheses indicates GenBank accession number; The number at the branch represents the confidence interval; The scale represents the coefficient of genetic variation.

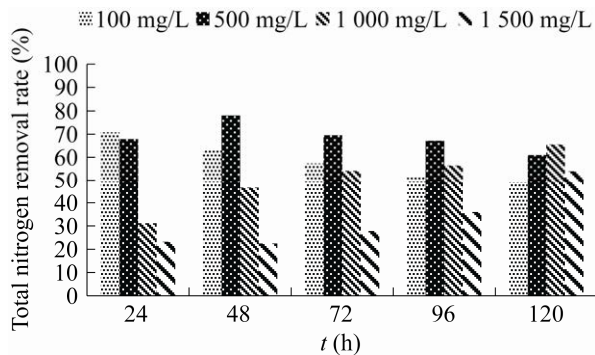


图3 初始氨氮浓度对菌株 U1 总氮去除率的影响
Figure 3 Effect of initial ammonia nitrogen concentration on total nitrogen removal by strain U1.

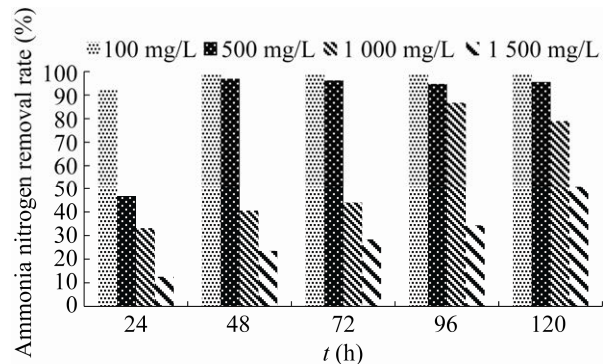


图4 初始氨氮浓度对菌株 U1 氨氮去除率的影响
Figure 4 Effect of initial ammonia nitrogen concentration on ammonia nitrogen removal by strain U1.

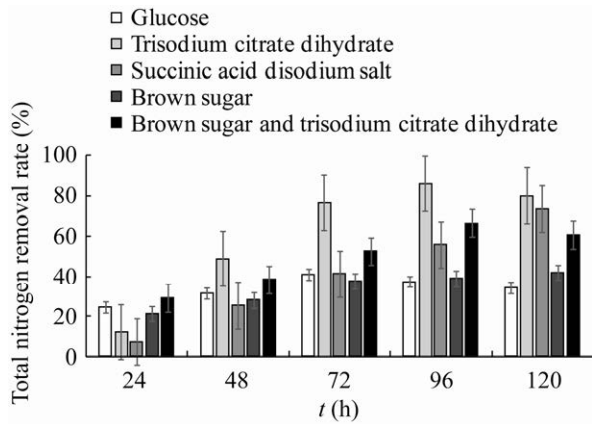


图5 不同碳源对菌株 U1 总氮去除率的影响
Figure 5 Effect of different carbon sources on total nitrogen removal rate by strain U1.

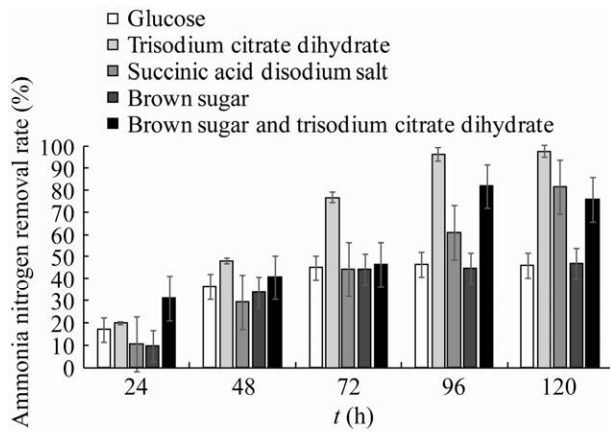


图6 不同碳源对菌株 U1 氨氮去除率的影响
Figure 6 Effect of different carbon sources on ammonia nitrogen removal by strain U1.

碳源是柠檬酸三钠, 96 h 内最大总氮和氨氮去除率分别是 80.32%和 97.50%; 其次是丁二酸钠, 120 h 时总氮和氨氮去除率分别达到 73.76%和 81.78%; 当碳源是柠檬酸三钠时, 96 h 之后的总氮去除率有所下降, 这可能是因为柠檬酸三钠利用率高, 菌株自身的碳源不足, 无法继续供给能量, 菌体自溶导致有机氮的释放引起的。我们的研究与 Silva 等^[16]对假单胞菌 UFV5 的研究发现较为相似, 在以柠檬酸三钠为最适碳源的培养基中 72 h 可以将 139 mg/L 的氨氮去

除, 但 Wei 等^[17]发现铜绿假单胞菌 P-1 的最适碳源却是葡萄糖, 这是因为不同菌株对同种碳源的利用度往往不同, 导致即使在同种碳源下硝化效率也各不相同。

2.4 不同 C/N 对菌株 U1 的脱氮影响

C/N 对于菌株的脱氮影响较大。从图 7 和图 8 可以看出, 菌株 U1 最适的 C/N 为 6, 96 h 内总氮和氨氮的去除率分别达到 45.96%和 67.34%; 在 24–96 h 之间, 所有 C/N 条件下总氮和氨氮去除率均呈上升趋势, C/N 越低, 氨氮去除率越高; 在 96 h 后, C/N 为 15、20 的氨氮去除率趋势线较为平稳, 但仍在上升。这可

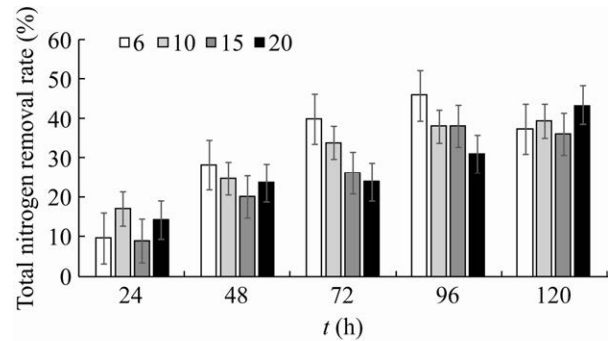


图7 C/N 对菌株 U1 总氮去除率的影响
Figure 7 Effect of C/N on total nitrogen removal by strain U1.

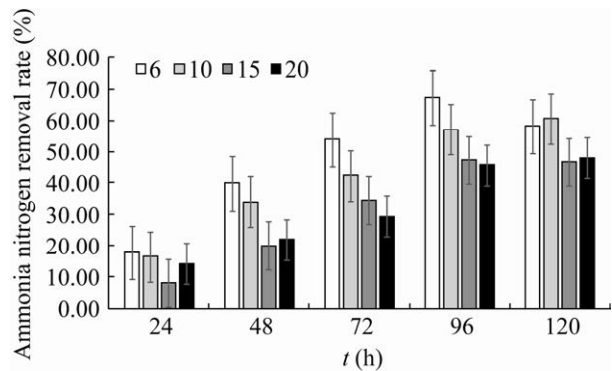


图8 C/N 对菌株 U1 氨氮去除率的影响
Figure 8 Effect of C/N on ammonia nitrogen removal by strain U1.

能是因为碳源太高抑制细菌生长^[18], 进而影响菌株的脱氮作用。这与大多数进行异养硝化好氧反硝化假单胞菌的现象不同, Silva 等^[16]发现假单胞菌 UFV5 培养基中的 C/N 不影响菌株的脱氮效能, 然而张祥^[19]发现施氏假单胞菌 LX 随着 C/N 增加其脱氮能力增强, 而菌株 U1 可以在 C/N 为 6–20 的范围内生长, 进行脱氮作用, 菌株 U1 在实际污水中可以节约成本, 减少碳源的使用。

2.5 不同转速对菌株 U1 的脱氮影响

从图 9 和图 10 可以看出, 不同摇床转速下总氮、氨氮去除率趋势接近一致, 总体上, 转

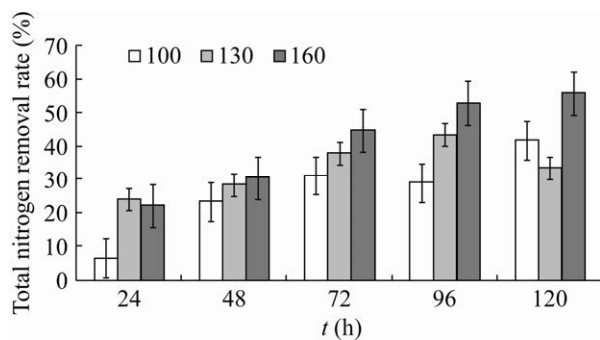


图 9 转速对菌株 U1 总氮去除率的影响

Figure 9 Effect of rotational speed on total nitrogen removal by strain U1.

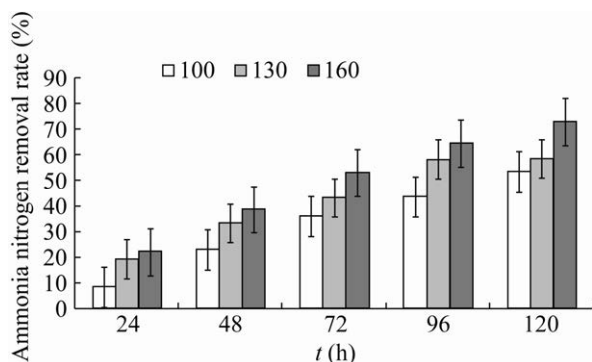


图 10 转速对菌株 U1 氨氮去除率的影响

Figure 10 Effect of rotational speed on ammonia nitrogen removal by strain U1.

速越高, 菌株对总氮、氨氮去除率上升, 这是因为培养基中溶氧好, 菌株生长代谢好, 进而脱氮效果好; 当转速为 160 r/min 时, 总氮和氨氮的最大去除率分别为 55.80% 和 73.01%; 在 96 h 和 120 h 时, 转速为 100 r/min 和 130 r/min 的总氮去除率下降, 这可能是实验过程中存在误差导致的。我们的研究与其他假单胞菌的现象一致, 张祥^[19]发现的施氏假单胞菌 LX 在转速提高到 120 r/min 和 150 r/min 时同样对 TN 有较高的去除率; 白植成^[20]发现的铜绿假单胞菌 B136-33 也是转速越高氮去除率越高; 而 Wei 等^[17]发现的铜绿假单胞菌 P-1 在转速 80–200 r/min 范围内去除氨氮能力无较大区别, 可能由于不同种菌株对溶解氧的利用度往往不同, 导致即使在同样转速下硝化效率也各不相同。

2.6 不同 pH 对菌株 U1 的脱氮影响

在 48–96 h 之间, 不同初始 pH 的总氮去除率呈上升趋势; 在 96 h 后, 总氮去除率虽然仍在上升但较为平缓, 去除效率下降(图 11)。从图 12 中可以看出, 在 24–96 h 之间, 氨氮的去除率呈上升趋势; 在 96 h 后, 氨氮去除率虽然仍在上升但较为平缓, 去除效率下降。实验结果表明 pH 对菌株脱氮的影响较大, 前期的低 pH 值可以稳定菌株在脱氮过程的 pH, 因而具有更好的脱氮效果。该菌株在 pH 6.0–8.0 时都能很好地发挥脱氮作用, 其中, 初始 pH 值为 6.0 时总氮、氨氮去除效果最好, 最大去除率分别是 59.35% 和 70.37%。与其他异养硝化好氧反硝化菌结果一致: Wei 等^[17]发现铜绿假单胞菌 P-1 在初始 pH 7.0–9.0 时氨氮去除率较高; Wang 等^[15]发现的香茅醇假单胞菌 WXP-4 在初始 pH 7.0–15.0 之间脱氮能力都达到了最大值。这种现象也印证了异养硝化好氧反硝化菌可以耐受的 pH 范围比较广的特征。

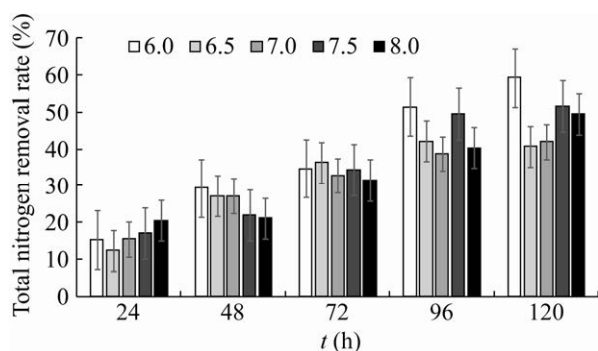


图 11 pH 对菌株 U1 总氮去除率的影响
Figure 11 Effect of pH on total nitrogen removal by strain U1.

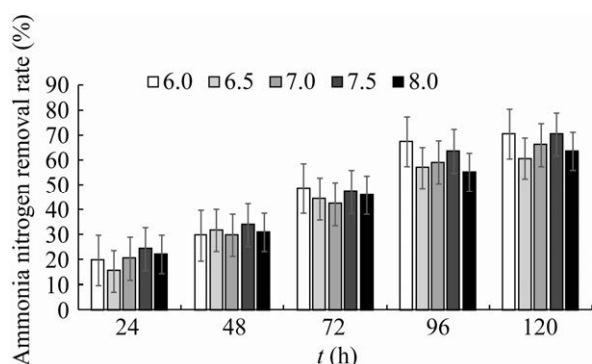


图 12 pH 对菌株 U1 氨氮去除率的影响
Figure 12 Effect of pH on the removal of ammonia nitrogen by strain U1.

2.7 单一因素验证试验结果

在柠檬酸三钠作为碳源、硫酸铵为唯一氮源、初始氨氮浓度为 1 000 mg/L、转速 160 r/min、pH 值为 6.0 和 C/N 为 6 的环境条件下验证菌株 U1 的脱氮性能, 结果如图 13 所示。菌株的总氮去除率在 96 h 内一直上升, 在 96 h 时达到最高值 49.61%; 在 120 h 内, 氨氮去除率一直在上升, 氨氮最高去除率可以达到 57.11%; 在 96 h 后, 菌株总氮去除率开始下降, 氨氮去除率不再变化。这可能与培养基内的 pH 值变化有关, 初始 pH 为 6.0 的情况下, 96 h 时 pH 值就达到了 9.0。当菌株外界 pH 发生变化时, 菌株自身具有一定的调节机制, 但是当 pH 值变化过大, 自身调节机制被破坏, 脱氮率下降^[21]。另一种可能就是碳源利用率好, 培养基碳源不足造成总氮回升^[22]。

2.8 正交试验结果与分析

总氮 $L_9(3^4)$ 正交试验结果如表 2 所示, 采用极差分析法对试验结果进行分析, 在 pH、碳源、C/N 和转速 4 项因素中, pH 的极差值最大为 15.03, 碳源的极差值次之, C/N 的极差最小,

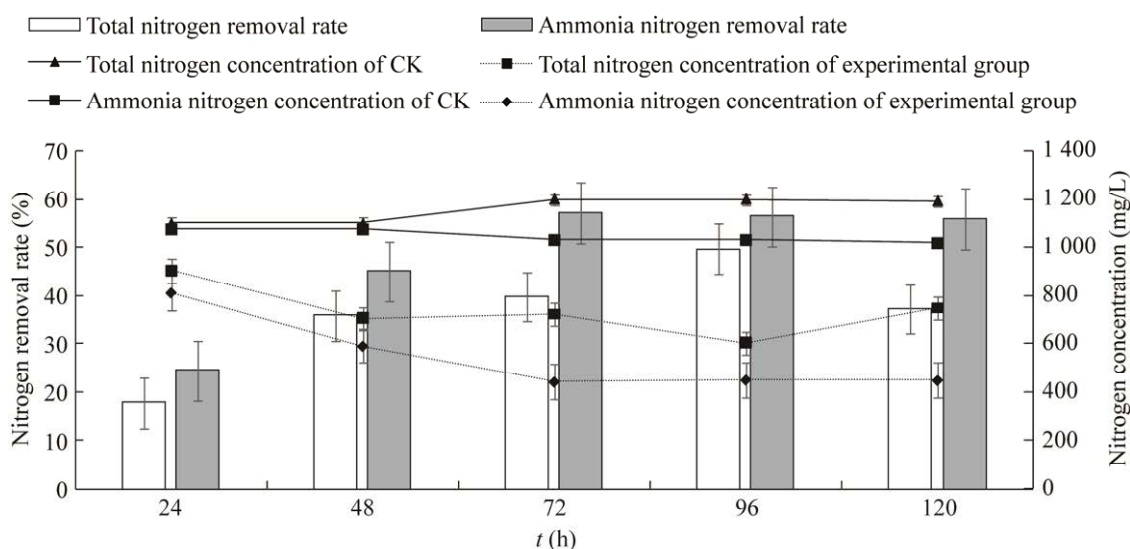


图 13 单一因素验证试验结果
Figure 13 Single factor validation experiment.

表 2 总氮正交试验直观分析表

Table 2 The orthogonal experiment intuitive analysis table of total nitrogen

Item	A Carbon	B pH	C C/N	D Speed	Total nitrogen removal (%)
Experiment 1	1	1	1	1	44.05
Experiment 3	1	3	3	3	28.34
Experiment 4	2	1	2	3	58.49
Experiment 5	2	2	3	1	18.98
Experiment 6	2	3	1	2	46.50
Experiment 7	3	1	3	2	58.10
Experiment 8	3	2	1	3	40.03
Experiment 9	3	3	2	1	40.72
K_1	34.99	53.55	43.53	42.94	
K_2	41.32	38.89	43.93	45.73	
K_3	46.28	38.52	43.50	42.29	
Poor	11.29	15.03	0.43	3.44	

所以对总氮去除率影响从大到小的顺序是: pH>碳源>转速>C/N。然后通过比较均值(K 值)可以得出最佳的试验条件为 $A_3B_1C_2D_2$ 。即菌株 U1 对总氮去除的最优条件为: 红糖和柠檬酸三钠为碳源, pH 值为 6.0, C/N 为 10, 转速为 130 r/min。通过方差分析, 各项因素对总氮去除率的影响不显著。

氨氮 $L_9(3^4)$ 正交试验结果如表 3 所示, 采用极差分析法对试验结果进行分析, 在 pH、碳源、C/N 和转速 4 项因素中, pH 的极差值最大为 16.69, C/N 的极差值次之, 所以对氨氮去除率影响从大到小的顺序为: pH>C/N>碳源>转速。然后通过比较均值(K 值)可以得出最优的试验条件为 $A_3B_1C_2D_2$ 。即菌株 U1 对氨氮去除的最优条件是: 红糖和柠檬酸三钠为碳源, pH 值为 6.0, C/N 为 10, 转速为 130 r/min。通过方差分析, 各项因素对氨氮去除率的影响不显著。

2.9 最优总氮、氨氮条件验证结果

从图 14 可以看出, 在正交试验最优条件下, 菌株 U1 对总氮和氨氮的最大去除率分别

表 3 氨氮正交试验直观分析表

Table 3 The orthogonal experiment intuitive analysis table of ammonia nitrogen

Item	A Carbon	B pH	C C/N	D Speed	Ammonia nitrogen removal (%)
Experiment 1	1	1	1	1	63.54
Experiment 2	1	2	2	2	56.44
Experiment 3	1	3	3	3	42.76
Experiment 4	2	1	2	3	73.30
Experiment 5	2	2	3	1	36.96
Experiment 6	2	3	1	2	57.77
Experiment 7	3	1	3	2	66.09
Experiment 8	3	2	1	3	59.46
Experiment 9	3	3	2	1	59.36
K_1	54.25	67.64	60.26	53.29	
K_2	56.01	50.95	63.03	60.10	
K_3	61.64	53.30	48.60	58.51	
Poor	7.39	16.69	14.43	6.81	

为 64.37% 和 76.73%, 高于表 2 和表 3 中总氮和氨氮的最大去除率, 说明此次正交试验是可靠的。脱氮过程中, pH 稳定, 总氮、氨氮去除率的趋势线一直呈上升状态, 无去除率下降现象, 可以说明在这个环境条件下菌株的能量足够, 能够维持稳定的脱氮效果。

2.10 菌株 U1 对垃圾渗滤液的脱氮效果

实验用渗滤液的总氮和氨氮量分别是 2 345 mg/L 和 1 473.8 mg/L。从图 15 可以看出, 菌株 U1 对渗滤液总氮和氨氮有一定的去除效果。当接种量为 10% 时, 菌株对渗滤液的总氮和氨氮去除效果最好, 最大总氮去除率为 27.86%, 最大氨氮去除率为 21.32%。

10% 和 15% 接种量的总氮去除率趋势线总体上呈上升状态, 并且趋势大致相同, 二者存在差异的原因可能是实验误差造成的。15% 接种量不如 10% 接种量好, 这可能是因为渗滤液中营养物质有限, 菌株无足够的能源来生长代谢。当接种量为 5% 时出现的总氮去除率不稳定

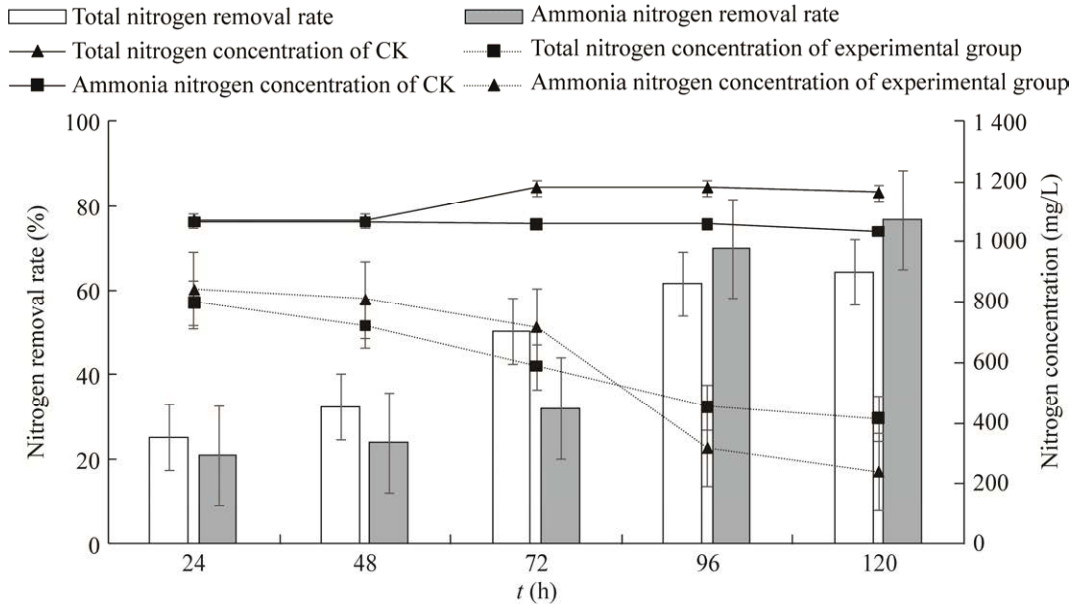


图 14 正交试验验证结果

Figure 14 Orthogonal test validation.

和氨氮去除率先下降后上升的现象，可能的原因是渗滤液中氮浓度高、杂菌较多，菌的生长受到了抑制，随着菌的生长，去除效果也变好^[23]；也有可能是渗滤液中成分复杂，离子与细微悬浮颗粒会影响实验测量结果^[24]。

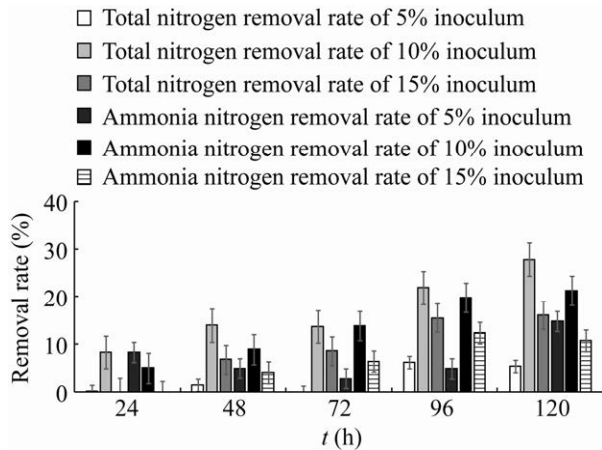


图 15 不同接种量对渗滤液总氮、氨氮去除率的影响

Figure 15 Effect of different inoculum levels on the removal rate of total nitrogen and ammonia nitrogen from leachate.

3 讨论

本实验在研究脱氮影响因素的过程中，菌株 U1 在初始氨氮浓度为 100 mg/L 和 200 mg/L 时，在 48 h 内将氨氮完全去除，之后会出现总氮浓度增加、去除率降低的现象，这可能是因为菌株氮源不足，菌体发生自溶，释放有机氮^[25]。菌株在进行反硝化的过程时 pH 值会增加，导致培养基中的环境 pH 发生变化，如果超出菌株自身的调节能力，菌株的脱氮反应会受到影响^[26]。因此，pH 的控制实验过程和实际应用中十分重要，本实验研究初始 pH 值为 6.0 的情况下，96 h 时检测 pH 值达到了 9.0，所以这也可能是导致总氮去除率降低的原因。渗滤液的成分十分复杂，含盐量高，并且含有大量有毒的重金属元素。本实验中，菌株自身在成分复杂的渗滤液中有一定的脱氮效果，但是去除率并未达到理想效果，有很大可能是因为渗滤液中的有毒有害物质影响了菌株的生长代谢和相应

脱氮酶的活性, 让菌株无法正常地生长并发挥脱氮作用。在渗滤液环境中, 菌株可利用的营养物质太少, 并且还可能与其他微生物存在能源物质的竞争关系, 菌株无法进行大量生长繁殖而发挥脱氮作用。因此, 将菌株应用到渗滤液的处理中时, 应该适宜地加一些碳源或其他营养物质, 让菌株可以正常地进行生长繁殖, 从而发挥脱氮作用^[27]。

目前有许多研究者进行了异养硝化好氧反硝化菌株的异养硝化性能研究, 但是大多只对低浓度氨氮有效, 目前发现的耐高氨氮浓度的菌株大多为假单胞菌, 如李哲等^[28]发现的假单胞菌 L3 可耐受 1 000 mg/L 的氨氮浓度并去除 39.3% 的氨氮, 而本研究发现的铜绿假单胞菌 U1 在 1 000 mg/L 的氨氮浓度下可去除 76.73% 的氨氮。与单一菌株相比, 复合菌株的能力可能会更好一些, 对环境等因素的适应能力更强, 并且可以发生协同脱氮作用。袁建华^[29]利用复合菌剂(盐单胞菌和水生产碱杆菌)在 1 000 mg/L 氨氮浓度下对氨氮和 TN 的去除率分别能达到 82.7% 和 71.5%; 艾铎^[30]利用复合菌 TA-1 (不动杆菌和 unclassified *Brucellaceae*) 在 800 mg/L 氨氮浓度下对氨氮的去除率达到 33.7%, 而初始氨氮浓度约 1 000 mg/L 时氨氮去除率不足 2%, 这比本研究菌株脱氮能力强的原因可能是由于复合菌剂或菌株之间的差异。此外, 异养硝化好氧反硝化菌在实际污水中的应用也存在差异, 本研究发现的铜绿假单胞菌 U1 对总氮和氨氮量分别是 2 345 mg/L 和 1 473.8 mg/L 的渗滤液最大总氮去除率为 27.86%、最大氨氮去除率为 21.32%。李建华等^[31]发现的粪产碱杆菌在直接处理污泥厌氧消化液(初始氨氮浓度 441 mg/L)时, 60 h 内氨氮去除率约为 18%; 陈猛等^[32]发现的枯草芽孢杆菌 ZF2-3 添加到含高浓度氨氮的猪粪水(氨氮质量浓度 475 mg/L)中时总氮去除率为 34.6%、

氨氮去除率为 30.4%; 崔明雷^[33]发现的粪产碱杆菌 TF-1 在氨氮为 947.74 mg/L 的污水中氨氮去除率和总氮去除率分别为 36.69% 和 35.99%。各种脱氮菌在实际污水中的脱氮效果并不理想, 可能是由于渗滤液的成分过于复杂, 对渗滤液有脱氮效果但未达到理想效果, 需要组合渗滤液处理工艺以达到达标排放的目的^[7,34]。与以上实际应用的异养硝化结果相比较, 本研究所获得的菌株在高浓度氨氮废水处理领域具有良好的实际应用潜力。本实验筛选出的菌株 U1 可以与其他脱氮效果好的菌株进行组合, 能更好地完成脱氮反应, 应用到实际污水、臭气处理工程中。

4 结论

本研究从垃圾渗滤液中分离出一株可以耐受高氨氮浓度的异养硝化好氧反硝化菌株 U1, 经形态观察、生理生化特征分析及 16S rRNA 基因序列分析, 该菌株被鉴定为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。该菌株在初始氨氮浓度为 1 000 mg/L 的最优脱氮条件: 混合碳源(红糖和柠檬酸三钠质量比 1:4), pH 值为 6.0, C/N 为 10, 转速为 130 r/min。该菌株可耐受 1 500 mg/L 高浓度氨氮并去除 53.97% 总氮、去除 51.06% 氨氮。在脱氮过程中无大量的硝态氮亚硝态氮累积。该菌株在总氮为 2 345 mg/L 的实际污水中最大去除率达到 27.86%, 可以很好地应用到实际高氨氮污水的脱氮中。

REFERENCES

- [1] 陶美霞, 陈明, 胡兰文, 李凤果, 师艳丽, 杨泉. 生物技术在处理氨氮废水中的研究进展[J]. 现代化工, 2018, 38(12): 24-28
Tao MX, Chen M, Hu LW, Li FG, Shi YL, Yang Q. Research progress of new biotechnology in treatment of ammonia-containing wastewater[J]. Modern Chemical

- Industry, 2018, 38(12): 24-28 (in Chinese)
- [2] Jin RF, Liu TQ, Liu GF, Zhou JT, Huang JY, Wang AJ. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the marine origin bacterium *Pseudomonas* sp. ADN-42[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(4): 2000-2011
- [3] 杨戈威. 同步硝化反硝化污水处理的工艺优化[J]. 当代化工, 2019, 48(3): 495-497, 504
Yang GW. Optimization of wastewater treatment process with simultaneous nitrification and denitrification technology[J]. Contemporary Chemical Industry, 2019, 48(3): 495-497, 504 (in Chinese)
- [4] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a controversy revived[J]. Archives of Microbiology, 1984, 139: 351-354
- [5] 孙琪. 异养硝化-好氧反硝化菌 *Pseudomonas asmenocina* TJP04 的筛选及其脱氮性能研究[D]. 天津: 天津工业大学硕士学位论文, 2019
Sun Q. Screening of the heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas asmenocina* TJP04 and its denitrification performance[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin Polytechnic University, 2019 (in Chinese)
- [6] 张思雨. *Pseudomonas* sp. ZSY 脱氮功能特性研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2018
Zhang SY. Study on nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas* sp. ZSY[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2018 (in Chinese)
- [7] 宋慧贇. 菌株 LV2 在高盐废水中的脱氮性能及其强化应用[D]. 太原: 太原理工大学硕士学位论文, 2021
Song HY. Denitrification performance of strain LV2 in high-salt wastewater and its strengthen the application[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of Technology, 2021 (in Chinese)
- [8] 杨婷. *Bacillus subtilis* JD-014 好氧反硝化脱氮与调控机理研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2021
Yang T. Study on the nitrogen removal characteristic and aerobic denitrification mechanism of *Bacillus subtilis* JD-014[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2021 (in Chinese)
- [9] Gu X, Leng JT, Zhu JT, Zhang K, Zhao JQ, Wu P, Xing QY, Tang KJ, Li XL, Hu B. Influence mechanism of C/N ratio on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process[J]. Bioresource Technology, 2022, 343: 126116
- [10] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2): 184-191
- [11] Wang XJ, Wang WQ, Zhang Y, Sun ZT, Zhang J, Chen GH, Li J. Simultaneous nitrification and denitrification by a novel isolated *Pseudomonas* sp. JQ-H3 using polycaprolactone as carbon source[J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121506
- [12] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
Cai MY, Dong XZ. Handbook for Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [13] 环境保护部. 碱性过硫酸钾紫外分光光度法[S]. 2012
Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China, Water quality-Determination of total nitrogen-Alkalinepotassium persulfate digestion UV spectrophotometric method[S]. 2012
- [14] 环境保护部. 纳氏试剂分光光度法[S]. 2009
Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China, Water quality-Determination of ammonia nitrogen-Nessler's reagent spectrophotometry[S]. 2009
- [15] Wang XP, Duo YK, He JJ, Yao JC, Qian HF, Hrynsphan D, Tatsiana S, Chen J. A newly isolated and rapid denitrifier *Pseudomonas citronellolis* WXP-4: difference in N₂O emissions under aerobic and anaerobic conditions[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(5): 811-820
- [16] Silva LCF, Lima HS, De Oliveira Mendes TA, Sartoratto A, Sousa MP, De Souza RS, De Paula SO, De Oliveira VM, Silva CC. Physicochemical characterization of *Pseudomonas stutzeri* UFV₅ and analysis of its transcriptome under heterotrophic nitrification/aerobic denitrification pathway induction condition[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 2215
- [17] Wei R, Hui C, Zhang YP, Jiang H, Zhao YH, Du LN. Nitrogen removal characteristics and predicted conversion pathways of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* P-1[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(6): 7503-7514
- [18] Ji B, Yang K, Zhu L, Jiang Y, Wang HY, Zhou J, Zhang HN. Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2015, 20(4): 643-651

- [19] 张祥. 铜绿假单胞菌 LX 同步脱氮及还原六价格的研
究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2020
Zhang X. Study on simultaneous nitrogen removal and
Cr(VI) reduction by *Pseudomonas aeruginosa* LX[D].
Guangzhou: Master's Thesis of South China University
of Technology, 2020 (in Chinese)
- [20] 白植成. 铜绿假单胞菌以菌糠为碳源的脱氮性能及
其功能基因克隆表达[D]. 福州: 福建农林大学硕士
学位论文, 2017
Bai ZC. *Pseudomonas aeruginosa* with SMC as carbon
source denitrification performance and function genes
clone and expression[D]. Fuzhou: Master's Thesis of
Fujian Agriculture and Forestry University, 2017 (in
Chinese)
- [21] 吴新年, 郭家磊, 郭倩倩, 王杰. 生活污水生物脱氮
技术影响因素研究[J]. 价值工程, 2020, 39(11): 215-216
Wu XN, Guo JL, Guo QQ, Wang J. Study on
influencing factors of biological nitrogen removal
technology in domestic sewage[J]. Value Engineering,
2020, 39(11): 215-216 (in Chinese)
- [22] 肖伟, 毕永红, 张波, 王栋, 吴红艳. 碳源对藻、菌及
其共培养系统水处理效果的影响[J]. 水生态学杂志,
2021, 42(4): 59-66
Xiao W, Bi YH, Zhang B, Wang D, Wu HY. Effect of
carbon source on nitrogen and phosphorus removal by a
bacterial-algal consortium[J]. Journal of Hydroecology,
2021, 42(4): 59-66 (in Chinese)
- [23] 王晟. 高氨氮垃圾渗滤液物化预处理及后续生物处
理的初步研究[D]. 福建: 福建工程学院硕士学位论文,
2020
Wang S. Physical and chemical separation of high
ammonia nitrogen from landfill leachate and
preliminary study on subsequent biological
treatment[D]. Fujian: Master's Thesis of Fujian
University of Technology, 2020 (in Chinese)
- [24] 袁维芳, 王浩, 汤克敏, 陈娟娟. 垃圾渗滤液处理技
术及工程化发展方向[J]. 环境保护科学, 2020, 46(1):
76-83
Yuan WF, Wang H, Tang KM, Chen JJ. Landfill
leachate treatment techniques and engineering
development direction: a review[J]. Environmental
Protection Science, 2020, 46(1): 76-83 (in Chinese)
- [25] Xu Y, He T, Li ZL, Ye Q, Chen YL, Xie EY, Zhang X.
Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas*
putida Y-9 capable of heterotrophic nitrification and
aerobic denitrification at low temperature[J]. BioMed
Research International, 2017
- [26] Song T, Zhang XL, Li J, Wu XY, Feng HX, Dong WY.
A review of research progress of heterotrophic
nitrification and aerobic denitrification microorganisms
(HNADMs)[J]. Science of the Total Environment, 2021,
801: 149319
- [27] 朱子晗, 李天, 张瑞娜, 欧阳创, 赵由才, 周涛. 老
龄垃圾渗滤液反硝化脱氮的补充碳源应用进展[J].
环境污染与防治, 2021, 43(4): 502-505, 509
Zhu ZH, Li T, Zhang RN, Ouyang C, Zhao YC, Zhou T.
Supplemental carbon sources applications for the
denitrification of mature landfill leachate[J].
Environmental Pollution & Control, 2021, 43(4):
502-505, 509 (in Chinese)
- [28] 李哲, 吕剑, 张宇轩, 武君, 于晓斌, 崔德杰. 具有
异养硝化-好氧反硝化功能的水产养殖生物絮团菌的
分离鉴定及其性能研究[J]. 河海大学学报(自然科学
版), 2021, 49(2): 127-133
Li Z, Lyu J, Zhang YX, Wu J, Yu XB, Cui DJ.
Separation, identification and performance of
heterotrophic nitrification and aerobic denitrification
bacteria from bioflocs in aquacultural system[J].
Journal of Hohai University: Natural Sciences, 2021,
49(2): 127-133 (in Chinese)
- [29] 袁建华. 利用异养硝化-好氧反硝化功能混合菌剂处
理高氨氮垃圾渗滤液的研究[D]. 重庆: 重庆大学硕
士学位论文, 2019
Yuan JH. Removal of high concentration ammonia
nitrogen from landfill leachate by mixed bacteria with
heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[D].
Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University,
2019 (in Chinese)
- [30] 艾铄. 具有全好氧脱氮功能不动杆菌的筛选及其在
高氨氮废水中的应用[D]. 重庆: 重庆理工大学硕士
学位论文, 2020
Ai S. Isolation of *Acinetobacter* with completely
aerobic-denitrification and its application in the
high-strength ammonium nitrogen wastewater
treatment[D]. Chongqing: Master's Thesis of
Chongqing University of Technology, 2020 (in
Chinese)
- [31] 李建华, 刘文静, 高桥润一, 正田诚, 李宁. 异养硝
化-好氧反硝化粪产碱杆菌处理高氨氮污泥厌氧消化
液[J]. 环境工程学报, 2016, 10(4): 1621-1626
Li JH, Liu WJ, Takahashi J, Shoda M, Li N. High
strength ammonium removal in sludge digestate by

- Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(4): 1621-1626 (in Chinese)
- [32] 陈猛, 李安章, 张明霞, 朱红惠. 一株异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及其对养殖废水中氮的去除特性[J]. 农业资源与环境学报, 2020, 37(2): 270-279
Chen M, Li AZ, Zhang MX, Zhu HH. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying strain and its removal characteristics of nitrogen in breeding wastewater[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2020, 37(2): 270-279 (in Chinese)
- [33] 崔明雷. 垃圾渗滤液中粪产碱杆菌 TF-1 的筛选优化及脱氮机理研究[D]. 重庆: 重庆理工大学硕士学位
- 论文, 2021
- Cui ML. Optimization and nitrogen removal mechanism of *Alcaligenes faecalis* TF-1 screened from landfill leachate[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University of Technology, 2021 (in Chinese)
- [34] 陈均利, 彭英湘, 罗沛, 张树楠, 肖润林, 何铁光, 吴金水, 刘锋. 异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮特性及其对猪场废水处理的研究[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(3): 295-299, 303
Chen JL, Peng YX, Luo P, Zhang SN, Xiao RL, He TG, Wu JS, Liu F. Nitrogen removal characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria and its application in swine wastewater treatment[J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(3): 295-299, 303 (in Chinese)