

## 乙酸驱动条件下粪产碱杆菌 Y5 的碳氮共脱除特性

潘国平<sup>1,2</sup> 钟玉鸣<sup>2,3</sup> 马连营<sup>2,3</sup> 许玫英<sup>2,3\*</sup>

(1. 江西农业大学 生物科学与工程学院 江西 南昌 330045)

(2. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)

(3. 省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东 广州 510070)

**摘要:**【目的】研究微生物的碳氮共脱除特性及其关键影响因素。【方法】以乙酸为唯一碳源分离获得的碳氮共脱除菌株 Y5 为模式菌株,分析菌株 Y5 的 16S rRNA 基因序列、碳源和氮源去除动力学,以及碳源种类、碳氮比(C/N)、溶解氧浓度(DO)、温度和 pH 等影响效果。【结果】菌株 Y5 归属于粪产碱杆菌。与葡萄糖及多种有机酸相比,菌株 Y5 在以乙酸为唯一碳源条件下具有较高的 TOC 和  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除速率。在好氧条件下,当起始 TOC 浓度为 1 000 mg/L,氨氮浓度为 110 mg/L 时,菌株 Y5 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TOC 和总氮(TN)去除率分别达 99.54%、92.95% 和 86.55%,最大  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TOC 和 TN 去除速率分别为 903.58、505.81 和 406.03 mg/(L·d)。【结论】粪产碱杆菌 Y5 在以乙酸为唯一碳源条件下具有较强的碳氮共脱除能力,其最佳反应条件为: C/N=10, pH 7.0–8.0, 溶氧>6.20 mg/L, 反应温度为 30 °C。

**关键词:** 异养氨氧化, 碳氮共脱除, 粪产碱杆菌 Y5

## Simultaneous carbon and nitrogen removal of *Alcaligenes faecalis* Y5

PAN Guo-Ping<sup>1,2</sup> ZHONG Yu-Ming<sup>2,3</sup> MA Lian-Ying<sup>2,3</sup> XU Mei-Ying<sup>2,3\*</sup>

(1. College of Bioscience and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(3. State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

**Abstract:** [Objective] Understanding the characteristics of simultaneous carbon and nitrogen removal under different conditions. [Methods] We took strain Y5, which was isolated in the medium with sodium acetate as the sole carbon source and capable of removing carbon and nitrogen simultaneously, as the model microorganism in this study. The 16S rRNA gene sequence of strain Y5 was analyzed. The carbon and nitrogen removal dynamics of strain Y5, as well as the influencing factors such as carbon source, ratio of carbon to nitrogen (C/N), dissolved oxygen concentration (DO), temperature, and pH were investigated. [Results] Strain Y5 belonged to *Alcaligenes faecalis*.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170470, 51308133); 广东省中国科学院全面战略合作项目(No. 2012B09110 0257); 广东省自然科学基金项目(No. S2012010008133); 广东省科技攻关项目(No. 2012A061100009, 2012B030800011); 广东省科学院青年科学研究基金项目(No. qnj201307)

\*通讯作者: Tel: 86-20-87684471; ✉: xumy@gdim.cn

收稿日期: 2014-02-02; 接受日期: 2014-03-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-10

Compared with glucose and other organic acids, strain Y5 showed higher total organic carbon (TOC) and  $\text{NH}_4^+$ -N removal rates in the medium with sodium acetate as the sole carbon source. When the initial TOC and  $\text{NH}_4^+$ -N were 1 000 mg/L and 110 mg/L, the  $\text{NH}_4^+$ -N, TOC and TN removal rates were 99.54%, 92.95% and 86.55% after 48 hours aerobic incubation, respectively. **[Conclusion]** *Alcaligenes faecalis* Y5 had efficient carbon and nitrogen simultaneous removal ability when taking sodium acetate as the sole carbon source and its optimal conditions were C/N=10, pH 7.0–8.0, DO>6.20 mg/L, 30 °C.

**Keywords:** Heterotrophic ammoxidation, Simultaneous carbon and nitrogen removal, *Alcaligenes faecalis* Y5

随着经济的快速发展,自然水体所承受的外来污染压力越来越大。据不完全统计,每年有  $4.9 \times 10^{12}$  mol 的氮素和数量更为庞大的有机物进入水体中,造成严重的碳、氮共存型污染<sup>[1]</sup>。传统理论认为:水体中氮的去除需要经历氨氧化、硝化与反硝化等过程才能完成。氨氧化和硝化两个过程分别由两类化能自养微生物完成,有机物的干扰很可能阻断该氮循环反应通路<sup>[2]</sup>,从而抑制水环境的脱氮效率<sup>[3]</sup>。因此,碳氮共存型的污染不可避免地对传统氨氧化微生物群落形成压力,严重抑制自养型氨氧化反应的进行,影响氮素生物地球化学循环。

最近的研究表明,自然环境中存在一大类可以在利用有机碳源的同时进行氨氧化的微生物群体。在适宜的条件下,该类微生物可完成氨氧化、硝化与反硝化的一系列反应,从而实现同步碳氮共脱除,在富营养化水体的碳氮循环中发挥独特的作用<sup>[4-5]</sup>。目前已发现的这类微生物主要包括:假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、鞣丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*)、氧化木糖无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)等<sup>[6]</sup>。这些微生物具有降解多种有机物的能力,可利用的碳源包括:葡萄糖、柠檬酸、琥珀酸、丙酮酸、乙酸等常见碳源,甚至包括多种有毒难降解有机物,如苯酚、苯胺、菲、苯乙醇、腈等。前者往往经过有机酸代谢、三羧酸循环进入生物体内,而后的降解机理更为复杂<sup>[7-8]</sup>。

乙酸盐是废水中常见的有机污染物,研究自然界中以乙酸为驱动力的同步脱氮过程具有重要的

实际应用价值,同时还可为进一步研究其它碳源驱动条件下的同步脱碳脱氮特点提供参考。本文研究了以乙酸为唯一碳源分离获得的一株与粪产碱杆菌具有较高相似性的菌株 Y5 的碳氮共脱除特性及其相关影响因素,确定了该菌株的碳氮共脱除动力学特性及其最佳反应条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基组成

牛肉蛋白胨培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 5, NaCl 5, pH 7.0–7.4。固体培养基添加琼脂粉 20 g/L。

异养氨氧化培养基(g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.432,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.100,  $\text{CaCl}_2$  0.040, NaCl 0.040,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  4.980,  $\text{NaHCO}_3$  0.200,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.010, KCl 0.040,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.082。固体培养基添加琼脂粉 20 g/L。

本实验所用试剂均选自广州试剂厂。配制好的培养基在全自动高压灭菌锅中  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

### 1.2 乙酸驱动型碳氮共脱除微生物的分离和富集培养

菌株分离和富集培养:采用梯度稀释法将河涌底泥样品涂布于牛肉蛋白胨培养基平板上,在 30 °C 培养箱中培养 24–48 h 后从平板上挑取不同形态的单菌落,分别接种至 100 mL 牛肉蛋白胨液体培养基中,在 30 °C、160 r/min 摇床培养 12–24 h 至培养液明显浑浊( $OD_{600} > 0.5$ )后分别吸取 2 mL 菌液至离心管中,在 6 000 r/min 条件下离心收集菌体,再重悬于生理盐水洗涤一次,后再在相同条件下离心收集菌体。

碳氮共脱除功能菌株的确定:按 1%接种量将培养了 24 h 的菌液转接至 100 mL 异养氨氧化培养基中,在 30 °C、120–140 r/min 条件下摇床培养 5 d,期间每隔 24 h 取样,分别测定上清液中氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮和 pH 等指标的变化。将氨氮去除率超过 70%以上的菌株收集保存。

### 1.3 微生物鉴定

微生物形态学观察:将已纯化的菌株接种于牛肉蛋白胨固体培养基上培养 3 d 后观察菌落形态。细菌样品经磷钨酸负染色后通过透视电子显微镜(日立 H-7650)观察细胞形态与菌体大小。

菌株 16S rRNA 基因扩增和序列测定:将菌种接种于牛肉蛋白胨培养基中,在 30 °C、160 r/min 条件下悬浮培养 20–24 h,吸取 1 mL 菌液于 1.5 mL 无菌离心管中,8 000 r/min 常温离心 1 min,去上清,用 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物)提取总 DNA。PCR 扩增采用 16S rRNA 基因的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和 1492R (5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3'),PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,反应条件如下:94 °C 5 min;94 °C 45 s,56 °C 45 s,72 °C 90 s,循环 30 次;72 °C 10 min。PCR 产物的纯化与测序均由华大基因公司完成。测序结果在 NCBI 上进行比对分析,采用 MEGA 5.0 法构建系统发育树。

### 1.4 异养氨氧化活性测定实验

接种纯化菌株至装有 100 mL 异养氨氧化培养基的 250 mL 锥形瓶中,初始培养液浓度调整为 0.02 左右(以  $OD_{600}$  计)。在 30 °C、160 r/min 恒温摇床培养,分别在 0、2、4、6、8、12、16、20、24、36、48、60、72、96 h 取样,6 000 r/min 离心后,分别测定上清液中氨氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮、总氮和乙酸盐浓度,以及 pH、DO、ORP 和电导率等指标。所有实验均设有 3 个平行,并作空白对照(下同)。

### 1.5 碳氮共脱除活性影响实验

研究碳源类型对微生物碳氮共脱除活性影响时,将异养氨氧化培养基中的乙酸钠分别替换成甲酸钠 0.8 g/L,丙酸钠 0.8 g/L,柠檬酸钠 1.4 g/L,

丁二酸钠 0.8 g/L,草酸钠 0.8 g/L,乳酸钠 1.0 g/L 和葡萄糖 5.0 g/L,在 30 °C、160 r/min 恒温摇床培养。研究碳氮比对微生物生长和碳氮共脱除活性影响时,调整异养氨氧化培养基中  $NH_4Cl$  的添加量,使初始碳氮比分别为 40/1、20/1、10/1、7.5/1 和 5/1,在 30 °C、160 r/min 恒温条件下培养。研究溶解氧对微生物生长和碳氮共脱除活性的影响时,分别改变摇床转速为 0、60、120、200 r/min 以及厌氧组,厌氧组培养基在接种前放入厌氧培养箱中吹氮气至溶解性氧低于检测仪器的下限。研究 pH 对微生物生长和碳氮共脱除活性的影响时,用 0.2 mol/L NaOH 或 HCl 溶液调节液体培养基初始 pH 值分别为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0。研究温度对微生物生长和碳氮共脱除活性的影响时,将摇瓶分别置于 10、20、30、37 °C 条件下培养。以上实验定时取样,检测菌体  $OD_{600}$  及培养液中残余的氨氮和 TOC 浓度。

### 1.6 分析方法

细菌生长以  $\lambda$  600 nm 处的浊度  $OD_{600}$  表示,采用美国 Ultrospec 6300 pro 分光光度计测定。生长曲线则是由全自动生长分析仪(Growth Curves Bioscreen C)测定。

氨氮浓度测定:水杨酸-次氯酸盐光度法(GB7481-87);硝酸盐氮:紫外分光光度法;亚硝酸盐氮:N-(1-萘基)-乙二胺光度法(GB7493-87);美国 Ultrospec 6300 pro 分光光度计测定吸光度<sup>[9]</sup>;蛋白含量测定:考马斯亮蓝法<sup>[10]</sup>。pH、DO(溶解性氧)、ORP(氧化还原电位)、电导率的测定:便携式多功能水质分析仪测定(WTW-3041,德国);乙酸盐:采用安捷伦 1260 高效液相色谱仪测定,色谱条件为:流动相为 5%甲醇与 95%磷酸缓冲溶液(pH 2),流速 1 mL/min,无梯度洗脱,紫外 220 nm 检测,自动进样;总有机碳(TOC)、总氮(TN)的测定:采用 TOC 分析仪(Liqui TOC II)分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 Y5 的分离与初步鉴定

通过对目标微生物的富集培养,在牛肉蛋白胨培养基平板中分离得到 7 个菌株,其中两株在进一

步富集培养中具有氨氮去除能力。通过第二阶段氨氧化能力与生长的测定,确定菌株 Y5 的氨氧化活性最高。革兰氏染色结果显示菌株 Y5 为革兰氏阴性菌。在牛肉蛋白胨培养基平板上,30 °C 培养 48 h 后,菌落形态为圆形,菌落直径约为 3–6 mm,表面湿润,橙黄色,边缘平整。透视电镜观察细胞的形态为短杆状或球状,有 2–5 条鞭毛,单一菌体排列,部分首尾相连接成长链状(图 1)。菌株 Y5 的 16S rRNA 基因序列长约 1 440 bp (NCBI 登录号为 KF925435.1),与粪产碱杆菌 IAM12369 (NR\_043445.1)的相似性最高(99%)。系统发育分析结果进一步表明(图 2)菌株 Y5 归属于粪产碱杆菌

(*Alcaligenes faecalis*)。

## 2.2 菌株 Y5 的碳氮共脱除特性

通过序批实验研究乙酸驱动型菌株 Y5 碳氮共脱除过程的反应特征。如图 3 所示,在 160 r/min、30 °C 条件下,经过 41 h 的培养, $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度从初始的 93.62 mg/L 降低到 1.97 mg/L,去除速率为 2.23 mg/(L·h),去除率为 97.90%。同时乙酸钠的消耗曲线与  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除曲线类似,从初始的 2 453.87 mg/L (TOC 测定值约为 895.28 mg/L)到 41 h 的 172.77 mg/L (TOC 测定值约为 82.21 mg/L),乙酸钠消耗速率达到 55.63 mg/(L·h),消耗率为 92.95% (TOC 去除率为 90.81%)。即使在较高的有机碳负

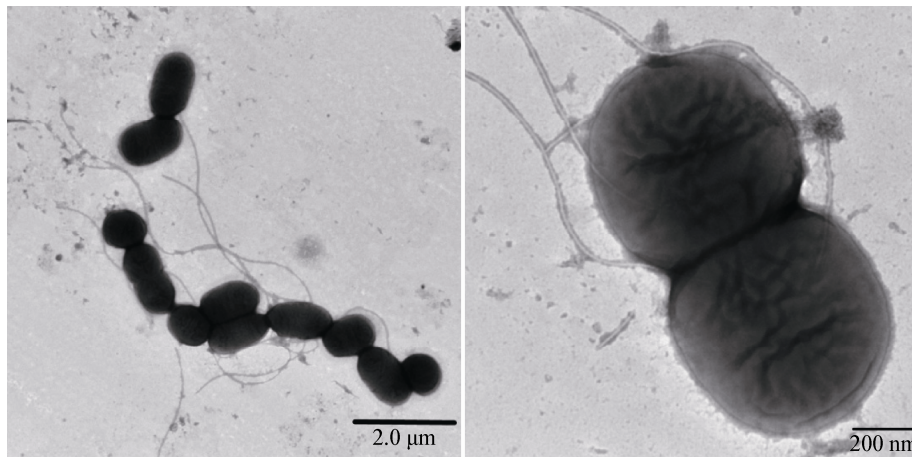


图 1 菌株 Y5 透视电镜图片

Figure 1 Transmission electron microscope of strain Y5

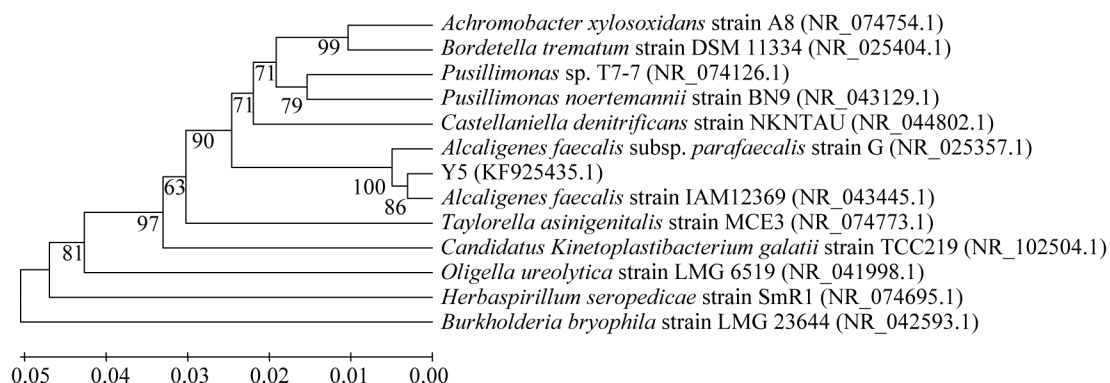


图 2 菌株 Y5 的系统发育树

Figure 2 Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic position of strain Y5 and representatives of some other related taxa

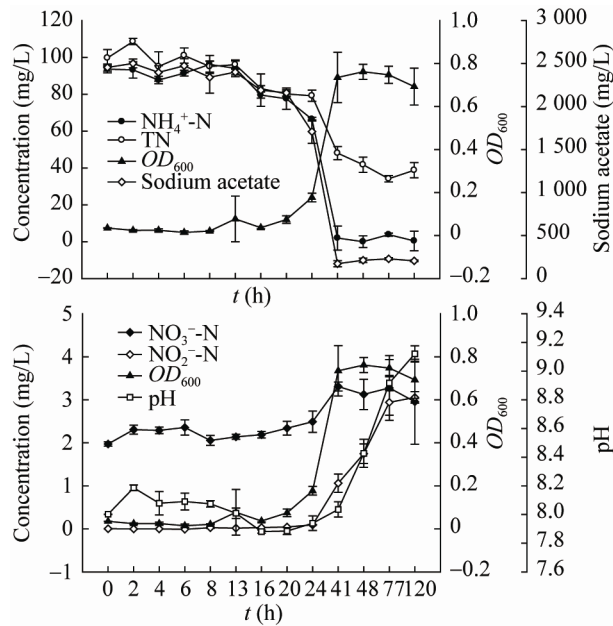


图3 实验体系中菌株 Y5 的生长及碳氮化合物变化曲线  
Figure 3 The cell growth and the changes of carbon and nitrogen compounds in experimental system of strain Y5

载(TOC>1 000 mg/L)条件下,依然有超过 90 mg/(L·d)的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 431.94 mg/(L·d)的 TOC 被去除。TN 从初始浓度 99.67 mg/L 到终浓度 34.15 mg/L,去除率为 65.73%。实验后期,亚硝氮和硝氮产生积累,分别为 3.05 mg/L 和 3.2 mg/L,均在乙酸钠与  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  消耗殆尽时开始出现。反应过程显示氨氧化过程与乙酸消耗过程密切相关。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  转化为硝酸盐后,可能通过反硝化过程转化为氮气,使 TN 降低。

对培养体系中蛋白质含量的测定结果表明,在  $OD_{600}$  达到 0.8–0.9 时,培养体系中细胞蛋白含量增加约为 16.7–17.4 mg/L。菌体在此过程生长,部分氮源进入微生物体内。通过计算反应体系中氮含量的摩尔量,推测除去被微生物通过同化代谢途径进入自身的细胞体系中之外,剩余的氮可能通过反硝化过程以气态氮的形式逸出。此外,反应过程中培养体系中 pH 在前半段表现为稍微下降,显现氨氧化与硝化的特征,后半段则从 7.2 持续升高,并在 120 h 后达到最高值 9.1,与反硝化特征相符。推测菌株 Y5 通过先硝化后反硝化的连续反应过程

进行脱氮。从实验测定的 ORP 与电导率在稳定期大幅下降也可推测存在反硝化反应产生气态氮逸出现象。该结果与其它文献报道相似<sup>[11]</sup>。由于在生长周期内,菌株 Y5 在 40–120 h 后进入了平稳期,各项指标变化不大,故将 48 h 生长周期作为后期实验的反应周期。

## 2.3 影响菌株 Y5 碳氮共脱除活性的因素

### 2.3.1 碳源种类对菌株 Y5 碳氮共脱除活性的影响:

分析比较了常见的糖类(葡萄糖)和有机酸(乙酸钠、甲酸钠、丙酸钠、柠檬酸钠、丁二酸钠、草酸钠、乳酸钠)作为碳源对菌株 Y5 碳氮共脱除特性的影响。在 30 °C、120 r/min 条件下培养 48 h 后,分析比较培养体系中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TOC 和 TN 的变化,以  $OD_{600}$  表征微生物的生长量,结果如图 4 所示。菌株 Y5 能利用乙酸钠、丙酸钠、柠檬酸钠等有机酸生长,其中乙酸钠组中菌株 Y5 的生长率最高, $OD_{600}$  较初始值(0.02)增加了 0.89,其次为柠檬酸钠组,增加了 0.56,丙酸钠组和乳酸钠组则分别增加了 0.53 和 0.51。而添加葡萄糖为碳源的培养基中,菌株 Y5 的生长迟缓,48 h 后  $OD_{600}$  为  $0.010\pm 0.006$ ,低于初始接种值。这些结果与文献报道粪产碱杆菌不能利用葡萄糖的结果相符合<sup>[12]</sup>。

在各实验组中,乙酸钠组的 TOC 去除速率也是最高的,达到  $15.61\pm 0.89$  mg/(L·h)。柠檬酸钠组、

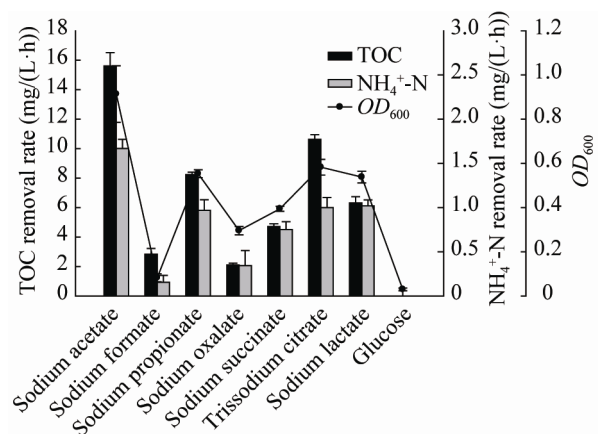


图4 不同碳源条件下菌株 Y5 的碳氮脱除速率  
Figure 4 The removal rates of carbon and nitrogen by strain Y5 with different carbon sources



丙酸钠组和乳酸钠组的 TOC 去除速率则分别为  $10.63 \pm 0.30$ 、 $8.23 \pm 0.16$  和  $6.31 \pm 0.42$  mg/(L·h)。与此同时,乙酸钠组的  $\text{NH}_4^+$ -N 去除效果也表现为最佳,其  $\text{NH}_4^+$ -N 去除速率为  $1.66 \pm 0.10$  mg/(L·h)。随后分别为乳酸钠组  $1.01 \pm 0.06$  mg/(L·h),柠檬酸钠组  $0.99 \pm 0.11$  mg/(L·h)和丙酸钠组  $0.96 \pm 0.11$  mg/(L·h)。综合以上分析,乙酸钠被确定为菌株 Y5 碳氮共脱除反应的最佳碳源,用于后续实验。

在实际污水处理中,尤其在有机物浓度较高的条件下,乙酸等有机酸广泛存在,为菌株 Y5 这一类有机酸驱动的异养氨氧化微生物提供有利的反应条件,实现处理系统中碳氮污染物的共脱除。

**2.3.2 碳氮比对菌株 Y5 碳氮共脱除活性的影响:**以乙酸钠为碳源、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源调整反应体系中的 C/N 比分别为 40、20、10、7.5 和 5,初始菌液  $OD_{600}$  值为 0.02,在  $30^\circ\text{C}$ 、120 r/min 条件下培养 48 h,分析比较反应体系中  $\text{NH}_4^+$ -N、TOC、TN,以及  $OD_{600}$  的变化,确定菌株 Y5 碳氮共脱除的最佳 C/N。结果如图 5 所示,各组的  $\text{NH}_4^+$ -N、TOC 和 TN 去除率较高的组别是 C/N 为 10、7.5 和 5,  $\text{NH}_4^+$ -N 的去除速率分别为  $1.72 \pm 0.08$ 、 $1.66 \pm 0.42$  和  $1.68 \pm 0.18$  mg/(L·h), TOC 的去除率分别达到  $89.06\% \pm 1.43\%$ 、 $90.17\% \pm 1.75\%$  和  $89.79\% \pm 1.65\%$ , TN 去除率分别为  $62.59\% \pm 9.86\%$ 、 $86.55\% \pm 2.09\%$  和  $79.26\% \pm 10.91\%$ 。在这几个 C/N 组别中,菌体生物量增加也较为明显。这些结果表明,较低 C/N 比有利于菌株 Y5 的碳氮共脱除。综合考虑反应体系中  $\text{NH}_4^+$ -N、TOC 和 TN 的去除速率,确定 C/N=10

为较佳反应条件。

**2.3.3 溶解氧浓度对菌株 Y5 碳氮共脱除活性的影响:**本部分实验将菌株 Y5 接种于富集培养基体系中,初始菌液  $OD_{600}$  为 0.02。有氧组在  $30^\circ\text{C}$ ,分别使用 0、60、120、200 r/min 转速条件下培养,另有一组先在厌氧工作站内除去体系中的溶解氧,并密封瓶口,再在  $30^\circ\text{C}$  摇床(转速为 160 r/min)培养,分别取样测定  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度与生物量。实验结果表明,在转速为 0 的情况下,溶氧浓度为 5.25 mg/L,其  $\text{NH}_4^+$ -N 去除率在 60 h 时接近 50%。当转速提升至 60 r/min 后,  $\text{NH}_4^+$ -N 去除率提高至 90%。当转速超过 120 r/min 时,溶氧浓度超过 7.0 mg/L,40 h 后  $\text{NH}_4^+$ -N 去除率达到 100%。而在厌氧培养条件下,菌株 Y5 的生长几乎停止,  $\text{NH}_4^+$ -N 无法去除(表 1 和图 6)。可见,在一定范围内,溶氧对菌株 Y5 的生长和  $\text{NH}_4^+$ -N 去除起促进作用。溶解氧不足时,菌株 Y5 的生长率与氨氧化速率均受抑制。

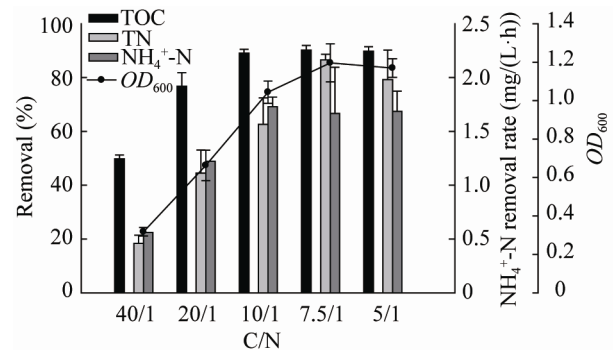


图 5 不同 C/N 条件下培养体系中  $\text{NH}_4^+$ -N、TN 和 TOC 的去除率及菌株 Y5 的生长情况

Figure 5 The removal rates of  $\text{NH}_4^+$ -N, TN and TOC and the growth of strain Y5 under different C/N conditions

表 1 不同溶解氧浓度对菌株 Y5 的生长和氨氧化能力的影响

Table 1 The effects of dissolved oxygen concentration on the growth and ammonium removal ability of strain Y5

| 转速<br>Shake speed (r/min) | 溶解氧<br>DO       | 生长<br>Growth ( $OD_{600}$ ) | $\text{NH}_4^+$ -N 终浓度<br>Final $\text{NH}_4^+$ -N (mg/L) |
|---------------------------|-----------------|-----------------------------|---|
| 160 (Anaerobic)           | <0.10           | $0.037 \pm 0.002$           | $104.646 \pm 3.084$                                       |
| 0                         | $5.25 \pm 0.10$ | $0.141 \pm 0.003$           | $66.594 \pm 1.306$  |
| 60                        | $6.20 \pm 0.20$ | $0.319 \pm 0.007$           | $36.378 \pm 1.628$  |
| 120                       | $7.45 \pm 0.15$ | $0.467 \pm 0.029$           | $0.170 \pm 0.812$   |
| 200                       | $7.50 \pm 0.20$ | $0.432 \pm 0.038$           | $0.631 \pm 1.312$   |

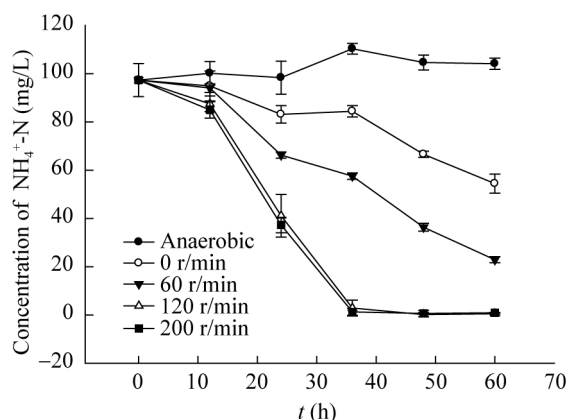


图 6 不同溶解氧浓度条件下  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度变化曲线  
Figure 6 Changes of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  concentration under different dissolved oxygen concentration conditions

**2.3.4 温度对菌株 Y5 碳氮共脱除活性的影响:** 分别在 10、20、30 和 37 °C、120 r/min 条件下分析比较菌株 Y5 的碳氮去除效率。图 7 结果显示, 随着温度升高, 菌株 Y5 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率逐步升高, 经过 48 h 的培养,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率由 10 °C 的  $6.57\% \pm 1.35\%$  提升至 30 °C 的  $99.40\% \pm 1.74\%$ 。TN 去除情况与  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  相似, 在 30 °C 达到最高 ( $42.37\% \pm 3.09\%$ )。当温度由 30 °C 提高到 37 °C 后, 活性明显受到抑制,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率下降为  $26.28\% \pm 5.47\%$ , TN 去除率为零。TOC 去除率的变化也表现为相同的趋势, 在 30 °C 去除率达到  $86.48\% \pm 1.27\%$ , 而在 10 °C 和 37 °C 分别为  $7.09\% \pm 5.36\%$  和  $10.55\% \pm 1.69\%$ 。菌体生长量表现也一致, 在 30 °C 时反应体系的  $OD_{600}$  最高, 达到  $0.85 \pm 0.04$ 。结果表明: 菌株 Y5 碳氮共脱除的最适温度为 30 °C。这可能是菌株 Y5 参与氨氧化和脱氮的酶活性与温度有关<sup>[12-13]</sup>。

**2.3.5 pH 对菌株 Y5 碳氮共脱除活性的影响:** 在氨氧化过程中, pH 是影响氨的形态和微生物生长的重要环境因子。调节培养体系的起始 pH 分别为 6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0, 在 30 °C、120 r/min 条件下培养 48 h 后取样测定体系中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN 与 TOC 的变化, 分析 pH 对菌株 Y5 碳氮共脱除活性的影响。图 8 结果显示, 培养体系的 pH 对菌株 Y5 的碳氮脱除活性和生长均有明显影响。在

pH 7.0–10.0 条件下菌株 Y5 具有较高的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 去除效率,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率均超过 90.00%, TN 去除率也达 50.55%–66.74%。表明菌株 Y5 这一类以乙酸盐驱动的氨氧化微生物的脱氮反应适合在中性或微碱性环境中进行, 酸性条件 (pH 5.0–6.0) 不利于脱氮的进行。此外, 在 pH 7.0–10.0 范围内, TOC 去除率均处于较高水平, 达 75.03%–90.05%, 其中 pH 7.0–9.0 的 TOC 去除率为 80.89%–90.05%。在 pH 7.0–10.0 范围内, 初始 pH 在碱性范围对 Y5 的生长差异影响并不明显, 而在 pH 低于 7.0 的酸性环境则对菌株 Y5 的生长有极大影响。其他文献的报道也显示粪产碱杆菌在 pH 为 7.0–8.0 的条件下具有较强的异养硝化能力<sup>[14-15]</sup>。

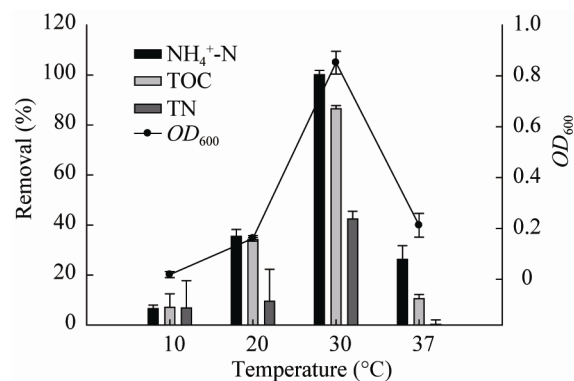


图 7 温度对菌株 Y5 碳氮共脱除特性的影响  
Figure 7 The effects of temperature on the simultaneous carbon and nitrogen removal by strain Y5

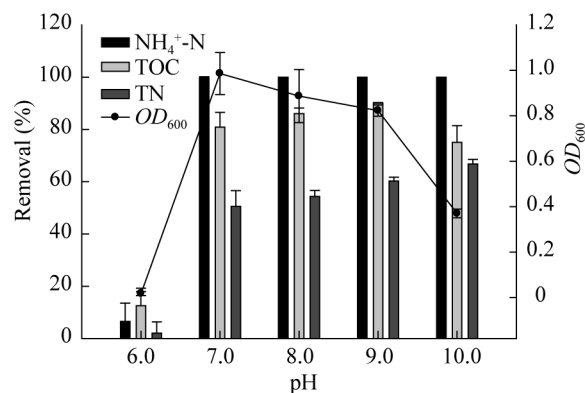


图 8 pH 对菌株 Y5 碳氮共脱除特性的影响  
Figure 8 The effects of pH on the simultaneous carbon and nitrogen removal by strain Y5

### 3 结论

粪产碱杆菌 Y5 可利用多种有机酸进行碳氮共脱除,其中乙酸钠是最佳碳源,其最佳反应条件为: 30 °C、C/N=10、pH 7.0-8.0、溶氧>6.20 mg/L。在起始 TOC 浓度为 900 mg/L 和  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度为 93 mg/L 的条件下,反应 48 h 后 TOC 和  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除率均超过 90%,其最大  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TOC 去除速率分别为 53.52 mg/(L·d)和 321.72 mg/(L·d)。即使在 TOC 高达 1 000 mg/L 的条件下仍保持高效的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  [90 mg/(L·d)]和 TOC [431.94 mg/(L·d)]去除率,明显高于文献报道的假单胞菌 ZW2 (67.48%)和粪产碱杆菌 ZW5 (78.21%)的 COD 去除率<sup>[16]</sup>。菌株 Y5 的 TN 去除率达 60%-86%,最高去除速率可达 406.03 mg/(L·d),远高于 Joo 等所报道的粪产碱杆菌 No. 4 的 TN 去除率(40%-50%)<sup>[3]</sup>和王弘宇等所报道的粪产碱杆菌 ZW5 的 TN 去除率(48.52%)<sup>[16]</sup>。

### 参考文献

- [1] Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle[J]. *Science*, 2010, 330(6001): 192-196.
- [2] 刘志培, 贾省芬, 俞志明, 等. 新型异养氨氧化菌的分离鉴定及氨氧化特性[J]. *环境污染与防治*, 2005, 27(5): 337-339.
- [3] 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.
- [4] Chen Q, Ni JR. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(9): 1305-1310.
- [5] Zhang JB, Wu PX, Hao B, et al. Heterotrophic nitrification

- and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(21): 9866-9869.
- [6] Castignetti D, Hollocher TC. Heterotrophic nitrification among denitrifiers[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 47(4): 620-623.
  - [7] 丁炜, 朱亮, 徐京, 等. 好氧反硝化菌及其在生物处理与修复中的应用研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 17(6): 923-929.
  - [8] Anderson IC, Poth M, Homstead J, et al. A comparison of NO and N<sub>2</sub>O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(11): 3525-3533.
  - [9] 国家环境保护局. 水与废水监测分析方法[M]. 第4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 266-268.
  - [10] 余瑞元, 陈丽蓉, 陈雅蕙, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 第2版. 北京: 北京大学出版社, 2011: 240-242.
  - [11] Velusamy K, Krishnani KK. Heterotrophic nitrifying and oxygen tolerant denitrifying bacteria from greenwater system of coastal aquaculture[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(6): 1978-1992.
  - [12] Kiyohara H, Nagao K, Kouno K, et al. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* Afk2[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(2): 458-461.
  - [13] Kim DJ, Lee DI, Keller J. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH[J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(3): 459-468.
  - [14] Mevel G, Prieur D. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2000, 46(5): 465-473.
  - [15] Papen H, Vonberg R, Hinkel I, et al. Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N<sub>2</sub>O, and NO production in exponentially growing cultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(8): 2068-2072.
  - [16] 王弘宇, 马放, 杨开, 等. 两株异养硝化细菌的氨氮去除特性[J]. *中国环境科学*, 2009, 29(1): 47-52.