

吴丽红,李晓惠,杨芳,等. 1 株用于生物强化的高效反硝化菌的筛选鉴定[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):371-373.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.125

1 株用于生物强化的高效反硝化菌的筛选鉴定

吴丽红¹, 李晓惠¹, 杨芳¹, 王丹²

(1. 辽宁科技学院生物医药与化学工程学院, 辽宁本溪 117002; 2. 辽宁大学药学院, 辽宁沈阳 110036)

摘要:从生物脱氮工艺的反硝化段活性污泥中分离到 7 株反硝化菌,考察了其脱氮能力后优选出代表菌株 FH2,该菌在 400 mg/L $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度下,对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的去除率为 100%,且脱氮过程中亚硝酸盐基本无积累,表现出了很强的脱氮能力,可作为生物强化法处理高浓度氨氮废水的菌源。通过对该优势功能菌株进行形态观察、生理生化试验及 16S rDNA 的序列测定和同源性分析,结果表明该菌株为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。该菌反硝化能力强,且具有芽孢微生物的特点,以该菌做为菌源进行生物强化反硝化脱氮研究有很好的应用前景。

关键词:氨氮废水;反硝化脱氮;生物强化;优势反硝菌;筛选鉴定

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0371-03

氮、磷是废水中常见的无机营养物,是引起湖泊富营养化的主要因素。大量含氮废水排入水体不仅引起水体富营养化、造成水体黑臭,而且增加水处理的难度、成本,甚至对人类产生毒害。含氮废水对环境的影响已引起研究人员的重视^[1]。目前,国内外普遍采用物理法、化学法、生物法处理高浓度氨氮废水,这些方法各有优点,同时也都存在不足^[2-4]。生物强化技术是向传统的生物处理系统中引入具有特定功能的微生物,提高有效微生物的浓度,增强其对难降解污染物的降解能力、提高降解速率、改善生物处理效果^[5-6]。投加的微生物可以是原处理体系中存在的,经过驯化、筛选、富集得到的一定数量的微生物,也可以是外源微生物^[7-8]。本试验采用初选-复选-优选技术,从成功启动并稳定运行的厌氧-好氧脱氮生物反应器中分离到 1 株高效功能菌,在考察了其反硝化能力的基础上对该菌株进行了鉴定,旨在为后续的生物强化反硝化脱氮研究提供菌源。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

本研究菌种来源于稳定运行的厌氧-好氧脱氮生物反应器,其主体是厌氧/缺氧-SBR 反应器(实现 COD 去除及反硝化脱氮功能)和好氧 SBR 反应器(实现硝化功能)(图 1)。这 2 个反应器的活性污泥是完全分开的,反应周期均为 8 h,将 2 个反应器运行周期开始时间错开,使厌氧/缺氧-SBR 反应器厌氧期与好氧-SBR 反应器周期同时结束,沉淀上清液相互交换。厌氧/缺氧-SBR 反应器进入缺氧期,好氧-SBR 反应器进入下个周期。2 个反应器的有效容积均为 15 L,活性污泥取自某城市污水处理厂二沉池,用人工合成的废水进行污泥驯化培养。反硝化反应器成功启动后,进水硝酸盐浓度($\text{NO}_3^- - \text{N}$)为 80~240 mg/L,对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的最终去除率接

近 100%。本试验取厌氧/缺氧-SBR 反应器($\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度为 180 mg/L)活性污泥混合液进行反硝化功能菌的筛选。

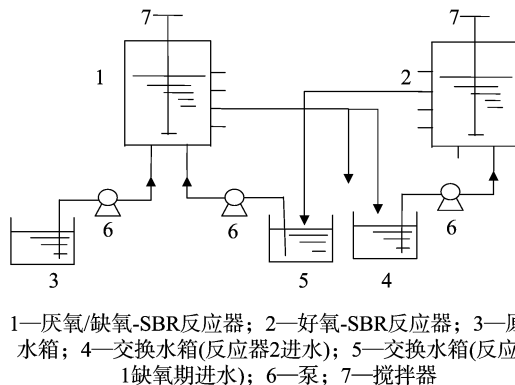


图1 硝化反硝化脱氮试验装置

1.2 方法

采用 COD 快速测定仪测定化学需氧量(COD),采用紫外分光光度法测定硝酸盐含量,采用 $N-(1-萘基)-乙二胺$ 分光光度法测定亚硝酸盐含量,采用玻璃电极法测定 pH 值。

1.3 功能菌的分离、纯化与筛选

1.3.1 分离培养基成分 2.0 g KNO_3 , 5.0 g 葡萄糖, 1 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15~20 g 琼脂, 1 000 mL 蒸馏水 pH 值为 7.2~7.5^[9], 121 °C 下灭菌 20 min。

1.3.2 分离纯化

1.3.2.1 混合细菌平板培养 从反应器内取 10 mL 泥样接入事先已灭菌、内装玻璃珠及 90 mL 无菌水的三角瓶中,在振荡器上振荡 2 h,使细菌呈单细胞状态分散于水中,然后进行倍比稀释。用灭菌吸管分别吸取 $10^{-10} \sim 10^{-4}$ 稀释度的混合菌稀释液 0.1 mL,分别接种到倒有固体培养基的平板上,用无菌玻璃刮刀涂布均匀,再倒 1 层 45 °C 左右的培养基,进行厌氧夹层平板培养。待上层培养基凝固后,倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养至长出单菌落。

1.3.2.2 单菌落分离、纯化培养 分别用无菌接种环对“1.3.2.1”节平板中长出的不同形态特征的单菌落在固体培养基平板上划线分离,倒置于 30 °C 培养箱中恒温培养,反复

收稿日期:2014-02-27

基金项目:辽宁省教育厅科学技术研究项目(编号:L2011225)。

作者简介:吴丽红(1980—),女,辽宁阜新人,硕士,讲师,从事污(废)水生物处理研究。E-mail:wulihong1980@163.com。

几次,直至获得纯菌落为止。以无菌接种环挑取上步平板上长出的单菌落接种到灭菌试管斜面上,30 ℃ 恒温培养至菌落长出,置冰箱保存备用。以上操作均在无菌条件下进行。

1.3.3 菌株筛选 初筛:将分离纯化得到的纯菌株分别接种到装有液体培养基(除不加琼脂外成分同分离培养基)的具胶塞试管内,以保证较好的厌氧/缺氧环境。每株菌重复3管,置于30 ℃ 培养箱中恒温培养15 d。15 d后测定培养液的 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 含量,得到具有反硝化脱氮能力的菌株。复筛:将初筛筛选出的菌株扩大培养后无菌高速冷冻离心分离,等量接种到装有200 mL试验用水的静态试验装置进行摇床培养,每天定时取样,测 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 含量,比较其反硝化能力。由于所筛菌株为后续生物强化辅助技术提供菌源,所以复筛水质应结合反应器实际运行情况,进一步提高硝酸盐浓度,以筛选出反硝化能力强的功能菌。水质除COD、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度不同外,其余与反应器进水一致,水质如下:1 000 mg/L 葡萄糖(COD)、400 mg/L NaNO_3 ($\text{NO}_3^- - \text{N}$)、10 mg/L KH_2PO_4 ($\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$)、10 mg/L CaCl_2 、90 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、30 mg/L NH_4Cl ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$)、2 mL/L 微量元素($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 30 mg/L、KI 180 mg/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 60 mg/L、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60 mg/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 120 mg/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 150 mg/L、EDTA 10 000 mg/L)。pH 值为 7.2 ± 0.2 。

1.3.4 菌株优选 通过复筛结果,优选出1株反硝化脱氮能力最好的菌株进行下一步试验及菌株特性研究。

1.3.5 菌株形态观察及生理生化试验 对优选出的代表菌株进行其单一菌种相关特性研究^[10],具体内容见表1。

1.3.6 16S rDNA 的序列测定和分析 对优选菌株在进行形态观察及生理生化试验的基础上,进行16S rDNA的序列测定,从分子生物学的角度进一步鉴定其属种。细菌基因组DNA提取利用通用引物(正向引物为27F;5' - AGAGTTT-

GATCCTGGCTCAG - 3',反向引物为1391R;5' - GACGGGC - RGTCWGTRCA - 3')扩增菌株的16S rDNA基因,PCR反应体系为20 μL ,反应程序为95 ℃ 3 min,95 ℃ 3 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 10 min。委托生物工程公司对PCR产物进行测序。

2 结果与分析

2.1 反硝化工艺运行情况

以硝酸盐为电子受体的反硝化脱氮工艺运行历时70 d,逐级提高进水负荷过程中出水硝氮、亚硝氮的含量及反硝化效果见图2。在40 mg/L $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 条件下启动反应器,由于活性污泥本身有一定脱氮能力,1 d时少量去除 $\text{NO}_3^- - \text{N}$,前6 d出水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 有逐渐减少趋势, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 没有大量积累,7 d时开始出水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 明显减少,脱氮率达76.65%,反应器启动成功。为了稳定微生物的反硝化效果,没有急于提高进水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度,在40 mg/L $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 条件下,又运行了3 d,反硝化效果进一步提升。在后续提高 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 负荷过程中,提高进水负荷当天,出水变化幅度较大,表明每次提高负荷对活性污泥中的微生物有一定冲击,且微生物数量可能暂时不能满足更高负荷要求。进水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 在60 ~ 220 mg/L浓度范围内,系统对更高一级的进水浓度适应速度较快,基本上3 d时开始出水效果开始好转,4 d、5 d时出水脱氮率超90%,出水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度较低。当进水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 提高到240 mg/L时,对微生物的抑制作用较强,出水波动较大,5 d出水开始好转,在该负荷下一共运行了10 d,最终出水去除率为95.53%。为了探究该装置的进水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 负荷极限,将进水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 提高到260 mg/L后继续运行了9 d,出水脱氮率一直保持在70%左右, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 出水浓度大于60 mg/L, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 大于1.5 mg/L。为了保证出水效果,该反应装置正常的进水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度不应超过240 mg/L。

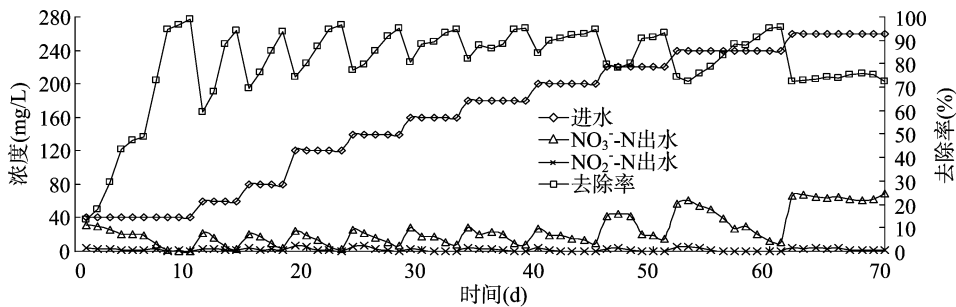


图2 反硝化工艺的启动与运行情况

2.2 分离筛选结果

2.2.1 初筛结果 从反硝化活性污泥中共分离出38株纯菌株,通过菌株初选,筛选出19株具有反硝化效果的功能菌株。

2.2.2 复筛结果 将19株功能菌株等量接种到静态试验装置培养,每日定时取样测定 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 含量,再次比较其反硝化脱氮能力。有7株菌具有良好的目的物去除效果,这7株菌暂时分别命名为F5Y、FC、FZ、FC1、FRB、FH、FH2(图3、图4)。

在电子受体 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度为400 mg/L条件下,培养1 d后,各菌株对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的去除能力有很大差异,效果最突出的是FC1、FH2,硝酸盐去除率分别为87.5%、80%,同时,这2

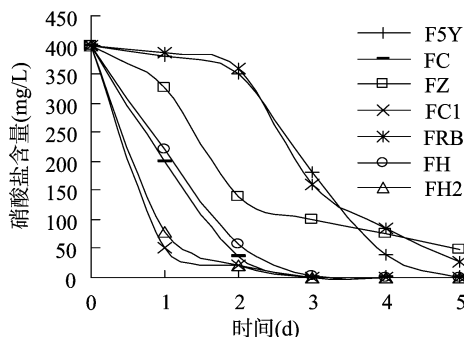


图3 不同菌株优选时硝酸盐含量变化

菌株对亚硝酸盐的积累也很少,硝酸盐很快被代谢掉。3 d 时硝酸盐未被检出,含量为零,亚硝酸盐含量也很低。4 d 时亚硝酸盐全部被代谢。菌株 FC 对硝酸盐的去除效果很好,其间亚硝酸盐的积累现象不明显,但反应周期较前 2 株菌长。由图 3 可知,随着时间的推移,其他菌株也具有硝酸盐还原能力。随着硝酸盐含量的降低,其他几株菌均出现了亚硝酸盐累积(图 4),说明这几株些菌株仅具有将 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 初步还原为 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的能力,无法彻底进行或尚未进行进一步的还原反应,导致不能从反应体系中彻底脱氮。可以看出,菌株 FC1、FH2 几乎可以将初始浓度为 400 mg/L 的 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 全部还原,它们对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的去除建立在将其转化为气态产物基础之上,具有完整的反硝化酶系,表现出较强的脱氮能力。

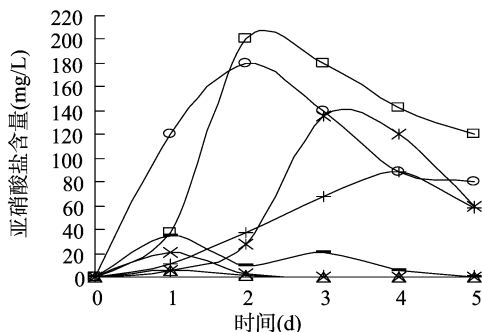


图4 不同菌株优选时亚硝酸盐含量变化

2.2.3 菌株优选结果 综合考虑 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的去除率、去除速率及 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的积累情况,选取菌株 FH2 进行后续研究。该菌对 400 mg/L $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 去除率达 100%,且处理时间短,反应过程中基本没有 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 积累,应用性较好。

2.3 菌株 FH2 形态观察及生理生化试验结果

对优选菌株 FH2 进行形态观察及生理生化试验,结果见表 1。

表 1 菌株 FH2 形态特征及其生理生化试验结果

菌落相关特性		生理生化特性试验	
指标	特性	试验名称	结果
菌体形态	杆状	革兰氏染色	+
菌落形状	不规则	芽孢染色	+
隆起形状	扁平	异染颗粒染色	+
边缘形状	毛玻璃状	鞭毛染色	+
颜色	淡黄	荚膜染色	-
透明程度	扁平	需养性试验	兼性厌氧
黏稠度	毛玻璃状	硝酸盐还原	+
		葡萄糖发酵	+
		触媒试验	+
		V. P. 试验	+

2.4 16S rDNA 的序列测定和分析结果

为了进一步确定菌株 FH2 的决定性属性,在形态观察、生理生化试验基础上,利用分子生物学手段,对其进行 16S rDNA 序列测定分析。将测得的序列采用 Sequencer 软件进行拼接,去掉载体序列及重复序列,得到 16S rRNA 序列。全序列以 BLAST 软件在 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进

行相似性检索,得到与菌株序列最相近的菌株。有以下 6 种菌的同源性达到 99%: *Bacillus cereus* (No. NC_004722.1)、*Acillus thuringiensis* serovar konkukian str. (No. NC_005957.1)、*Acillus anthracis* str. sternechromosome (No. NC_005945.1)、*Bacillus anthracis* str. Ames (No. NC_003997.3)、*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 (No. NC_010184.1)、*Bacillus pseudomycoides* DSM 12442 (No. NC_000745.1)。

通过形态观察、生理生化试验结果及 16S rDNA 的序列测定分析结果综合分析,鉴定菌株 FH2 为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) (GenBank 登录号: NC_004722.1)。

3 结论

本研究从稳定运行的反硝化装置中 ($\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度为 180 mg/L) 通过初筛、复筛,筛选出 7 株反硝化功能菌。根据最终脱氮能力优选出代号为 FH2 的菌株作为代表菌株,在静态试验中该菌在 400 mg/L $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度下最终去除率为 100%,并且对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 代谢速率快,脱氮过程中基本没有亚硝酸盐的积累,体现出了很强的脱氮能力。对菌株 FH2 进行了形态观察及生理生化试验,并辅助分子生物学手段进行了 16S rDNA 的序列测定,结果表明菌株 FH2 为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) (GenBank Accession No. NC_004722.1)。分离到的蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 本身的反硝化能力很强,且具有芽孢的微生物具有很强的抗逆性,在进行生物强化应用过程中可抵抗外界不良环境、适应性强,易存活,所以该菌做为菌源进行生物强化反硝化脱氮处理研究具有很好的应用前景。在后续工作中应进一步研究该优势菌的脱氮特性及影响因子,为生物强化处理高浓度氨氮废水提供菌源。

参考文献:

[1]何 岩,赵由才,周恭明. 高浓度氨氮废水脱氮技术研究进展[J]. 工业水处理,2008,28(1):1-4.

[2]姜 瑞,曾红云,王 强. 氨氮废水处理技术研究进展[J]. 环境科学与管理,2013,38(6):131-134.

[3]崔树军,谷立坤,张建云,等. 高氨氮废水的处理技术及研究应用现状[J]. 中国给水排水,2010,26(14):26-29.

[4]王艳捷,邱忠平,吴 敏,等. “中老龄”垃圾渗滤液重金属和氮的厌氧毒性[J]. 环境工程学报,2008,2(10):1353-1356.

[5]解宏端,马溪平. 生物强化技术提高焦化废水处理效果的研究[J]. 中国给水排水,2007,23(15):90-93.

[6]王建芳,赵庆良,林估侃,等. 生物强化技术及其在废水生物处理中的应用[J]. 环境工程学报,2007,1(9):40-45.

[7]熊贵珊,陈 瑾,叶文衍. 生物强化技术及其在水污染治理中的应用[J]. 环境科学与管理,2013,38(4):82-86.

[8]徐军祥,杨翔华,姚秀清,等. 生物强化技术处理难降解有机污染物的研究进展[J]. 化工环保,2007,27(2):129-134.

[9]周群英,王士芬. 环境工程微生物学[M]. 3 版. 北京:高等教育出版社,2008:444.

[10]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:353-369.