

一种脱氮复合微生物菌剂的反硝化特性

谢嘉炜^{1,2,3}, 郑展望⁴, 潘碧文⁴, 徐涛⁴, 李秀芬^{*1,2,3}

(1. 江南大学 环境与生态学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省厌氧生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江苏省水处理技术与材料协同创新中心, 江苏 苏州 215009; 4. 浙江双良商达环保有限公司, 浙江 杭州 310000)

摘要: 为了提高污水处理过程中反硝化脱氮的效果, 作者利用实验室已筛选出的反硝化菌株 N1、N9、N10 制备复合脱氮微生物菌剂, 研究了温度、碳氮比(C/N)、碳源类型对复合微生物菌剂的生长和脱氮特性的影响。结果表明, 在 30 °C、C/N 为 10、碳源为可溶性淀粉的条件下, 48 h 后复合脱氮微生物菌剂对硝态氮、总氮和化学需氧量的去除率分别达 92.61%、60.02% 和 58.48%。同时, 在 C/N 比为 2~10 均有脱氮效果, 表明该复合脱氮微生物菌剂在低 C/N 比废水的反硝化脱氮过程中具有一定的应用前景。

关键词: 复合微生物菌剂; 反硝化; 碳氮比

中图分类号: X 172 文章编号: 1673-1689(2024)03-0076-09 DOI: 10.12441/spyswjs.20210621002

Study on Denitrification Characteristics of a Nitrogen Removal Composite Microbial Agent

XIE Jiawei^{1,2,3}, ZHENG Zhanwang⁴, PAN Biwen⁴, XU Tao⁴, LI Xiufen^{*1,2,3}

(1. School of Environment and Ecology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Cooperative Innovation Center of Technology and Material of Water Treatment, Suzhou 215009, China; 4. Zhejiang Shuangliang Sunda Environment Co., Ltd, Hangzhou 310000, China)

Abstract: In order to improve the efficiency of denitrification in wastewater treatment, the denitrifying strains N1, N9 and N10, which have been screened out in the laboratory, were prepared into a composite microbial agent. The influence of different temperatures, carbon-to-nitrogen ratios (C/N), and carbon source types on the growth and denitrification characteristics of the composite microbial agent was investigated, showing significant practical value. The results showed that 92.61% nitrate nitrogen, 60.02% total nitrogen, and 58.48% chemical oxygen demand could be removed by the compound microbial agent under the conditions of 30 °C, C/N ratio of 10, and soluble starch as the carbon source after 48 h. Moreover, the denitrification effect was substantial within the C/N ratio range of 2 to 10, indicating that the composite denitrification microbial agent could have application prospect in the denitrification process of low C/N ratio wastewater.

Key words: composite microbial agent, denitrification, carbon-to-nitrogen ratio

收稿日期: 2021-06-21 修回日期: 2021-11-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC0400707); 江苏省“六大人才高峰”项目(2011-JNHB-004)。

* 通信作者: 李秀芬(1968—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事水处理及回用研究。E-mail: xfli@jiangnan.edu.cn

随着我国国民经济的持续增长和生活水平不断提高,对污水处理的要求也日益严格。已有研究及实践表明,市政污水处理系统出水中的氨氮较易达标,但由于环境条件的波动及碳源缺乏,硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)进一步转化为氮气的反硝化效果普遍较差^[1-3],导致出水中总氮(TN)的浓度不够稳定。系统氮超标易引发受纳水体的富营养化,造成水环境不同程度的污染与破坏^[4-7]。因此,提高市政污水处理系统的反硝化效果进而实现TN的达标排放已引起学者的广泛关注。

添加脱氮微生物菌剂是提高污水处理系统反硝化效果的有效措施之一,具有操作简单、无二次污染、不需要增加处理单元及设施、脱氮效果好等特点^[8]。Yang等从酸性制药废水中分离出了一株耐酸不动杆菌JR1,该菌在pH为4.5~10.0均能有效去除氨,同时在以富马酸为碳源条件下,其TN去除率可达97.9%^[9]。Chen等从猪粪废水中分离出了红球菌CPZ24,处理36h后红球菌CPZ24对硝态

氮的去除率为67%^[10]。Zhang等从水库分离出菌株*Hanseniaspora uvarum* KPL108,该菌株能够实现99%的硝酸盐去除,且无亚硝酸盐积累,大约有92%的硝酸盐转化为气态产物得以去除^[11]。现有研究菌株脱氮效果受到C/N限制,在低C/N污水处理中应用效果不佳。

作者利用实验室自行保藏的3株反硝化菌,复配获得复合脱氮微生物菌剂,研究关键影响因素对其反硝化效果的影响,旨在为提高市政污水处理系统的反硝化研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

制备复合脱氮菌剂的菌株均为作者所在实验室自行保藏的反硝化菌,编号分别为N1、N9和N10,其生理学特性见表1。将N1、N9和N10菌株经LB培养基培养后,按等比例混合制备成复合脱氮微生物菌剂,再对其进行反硝化特性研究。

表1 反硝化菌的菌落特性及革兰氏染色结果

Table 1 Bacterial colony characteristics and gram staining results of denitrifying bacteria

菌株编号	菌落形态	革兰氏染色	菌落直径/mm
N1	乳白色,呈发散状,边缘不规整,表面凸起,湿润,易挑取,短杆状菌	阴性	2
N9	透明色,呈发散状,边缘规整,表面平整,干燥,易挑取,杆状菌	阴性	3
N10	黄色菌落,小点状,边缘规整,表面凸起,湿润,易挑取,杆状菌	阳性	3

1.2 培养基

1.2.1 肉汤培养基 LB培养基。

1.2.2 选择培养基 柠檬酸钠5g, KNO_3 2g, 维氏盐溶液50mL, 蒸馏水定容至1000mL, pH 7.0。使用有机碳源,限制自养菌的生长。

1.2.3 维氏盐溶液 K_2HPO_4 5.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5g, NaCl 2.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, 蒸馏水定容至1000mL, pH 7.0。

1.3 影响因素研究

取上述反硝化菌株N1、N9和N10,分别接种至装有100mL液体LB培养基的摇瓶中,接种体积分数为1%,培养36h时将发酵液等比例混合,获得复合脱氮微生物菌剂。

1.3.1 温度 取上述菌剂混合液接种至装有100mL液体反硝化选择培养基的摇瓶中,接种体积分数为5%,pH为7.0,分别在10、15、20、30、40℃于

40 r/min 振荡培养48h,设置空白及平行实验。结束时测定 OD_{600} 、菌体质量浓度(以干质量百分比计)和TN、硝态氮、化学需氧量(COD)的去除率。

1.3.2 碳氮比(C/N) 取上述菌剂混合液接种至装有100mL液体反硝化选择培养基的摇瓶中,接种体积分数5%,pH 7.0,C/N为2、5、10、20、30,在转速40 r/min的条件下,按上述最佳温度振荡培养48h,设置空白及平行实验。测定结束时,测定发酵液的 OD_{600} 值、菌体浓度以及TN、硝态氮、COD的去除率。

1.3.3 碳源类型 取上述菌剂混合液接种至装有100mL液体反硝化选择培养基的摇瓶中,接种体积分数5%,pH 7.0,碳源类型为葡萄糖、海藻糖、可溶性淀粉、蔗糖和柠檬酸钠,40 r/min条件下,按上述最佳温度及C/N振荡培养,设置空白及平行实验。测定结束时,测定发酵液的 OD_{600} 值、菌体浓度和

TN、硝态氮、COD 的去除率。

1.3.4 硝态氮 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度 取上述菌剂混合液接种至装有 100 mL 液体反硝化选择培养基的摇瓶中,接种体积分数 5%,pH 7.0,在 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度为 5、10、20、30 mg/L,40 r/min 条件下,按上述最佳培养时间、最佳温度及 C/N 比下振荡培养,设置空白及平行实验。测定结束时,测定发酵液的 OD_{600} 值、菌体浓度以及 TN、硝态氮、COD 去除率。

1.3.5 亚硝态氮 ($\text{NO}_2\text{-N}$) 质量浓度 取上述菌剂混合液接种至装有 100 mL 液体实验室反硝化选择培养基的摇瓶中,接种体积分数 5%,pH 7.0,在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度为 1、5、10 mg/L,40 r/min 条件下,按上述最佳培养时间、最佳温度及 C/N 比振荡培养,设置空白及平行实验。结束时测定发酵液的 OD_{600} 值、菌体浓度以及 TN、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、COD 的去除率。

1.3.6 产酶能力 在上述最佳培养条件下,研究反硝化过程中间产物、硝酸还原酶、亚硝酸还原酶的酶活随时间变化关系。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体浓度 取两支无菌离心管,称质量,加入一定体积的摇匀菌液,8 000 r/min 离心,弃去上清液,再次称质量,并测含水率,菌体质量浓度计算见式(1)。

$$\rho = \frac{[(m_2 - m_1) \times (1 - w)]}{V} \quad (1)$$

式中: ρ 为菌体质量浓度,g/L; m_1 为初始无菌离心管质量,mg; m_2 为加入菌液离心并去除上清液后离心管与菌体质量,mg; w 为含水率,%; V 为菌液体积,mL。

1.4.2 氮元素平均去除速率 硝态氮和 TN 平均去除率见式(2)。

$$R = \frac{\rho_1 - \rho_2}{t} \quad (2)$$

式中: R 为硝态氮和 TN 平均去除速率,mg/(L·h); ρ_1 为初始氮元素质量浓度,mg/L; ρ_2 为最终氮元素质量浓度,mg/L。

1.4.3 水质指标 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 质量浓度:纳氏试剂分光光度法(GB7497-87)测定; $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度:紫外分光光度法(HJ/T 346-2007)测定; $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度:萘乙二胺分光光度法(GB17378.4-2007)测定;TN:碱性过硫酸钾消解法(GB11894-89)测定;COD:重铬酸钾滴定法(HJ828-2017)测定。

1.4.4 酶活 硝酸还原酶(NAR)及亚硝酸还原酶(NIR)测定方法见文献[12]。

2 结果与分析

2.1 温度对菌剂生长及脱氮效果的影响

温度是影响反硝化菌生长及脱氮效果的重要因素之一,温度的改变会造成微生物细胞结构的改变从而会影响其生长^[13]。由图 1 可知,温度对复合脱氮微生物菌剂的生长影响较大,随着温度的升高,微生物菌剂生长呈先上升后降低的趋势。当温度为 10~30 °C 时,随着温度的升高,微生物菌剂生长加速, OD_{600} 和菌体质量浓度持续增大。当温度为 10 °C 时,微生物生长活性最低,其 OD_{600} 为 0.36 ± 0.01 ,菌体质量浓度为 (0.11 ± 0.03) g/L;当温度升高至 30 °C 时, OD_{600} 与菌体质量浓度均最大,分别为 (1.07 ± 0.02) g/dL 和 (0.38 ± 0.01) g/L。与 10 °C 相比,分别提高了 1.97 倍和 2.4 倍;当温度超过 30 °C 时,温度的升高对微生物的生长呈抑制作用。因此合适的温度有利于复合脱氮微生物菌剂的生长。

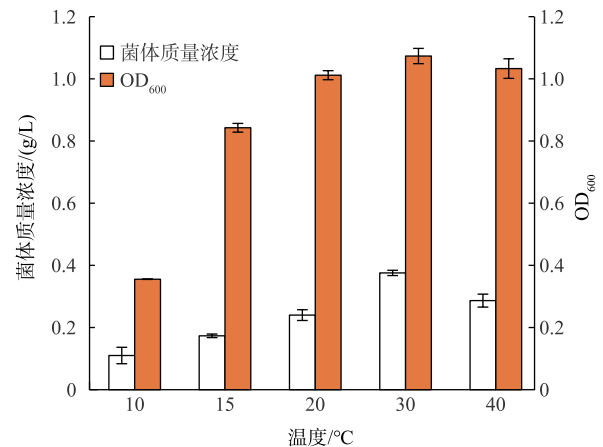


图 1 温度对 OD_{600} 及菌体质量浓度的影响

Fig. 1 Effect of temperature on OD_{600} and thallus concentration

温度对复合脱氮微生物菌剂脱氮效果的影响见图 2。与温度对复合脱氮微生物菌剂生长情况的影响趋势相似,菌剂的脱氮效果与温度也呈先升高后降低的趋势,即 10~30 °C 时随着温度升高,复合脱氮微生物菌剂的脱氮性能逐渐提高。在 10 °C 时, $\text{NO}_3\text{-N}$ 的去除率为 $(11.34 \pm 0.93)\%$,TN 去除率为 $(2.65 \pm 0.57)\%$;当温度升高至 30 °C 时,脱氮效率大大提高,硝态氮的去除率为 $(74.78 \pm 4.13)\%$,TN 的去除率为 $(43.67 \pm 3.05)\%$ 。与 10 °C 相比, $\text{NO}_3\text{-N}$ 和 TN

的去除率分别提高了 6.59 倍和 16.48 倍;当温度高于 30 °C 时,随着温度升高,微生物菌剂脱氮效果下降,这与大多数文献所报道的反硝化菌最适宜的生长温度为 30 °C 相符^[13]。赵彬等研究的 AL-6 以硝酸盐为唯一氮源时硝态氮去除率为 50.2%,TN 去除率为 48.2%^[14];Chen 等研究红球菌 CPZ24 对硝态氮的去除率为 67%^[10]。本研究中微生物菌剂表现出一定的氮类元素去除优势,并且后期可经过其他条件优化进一步提高反硝化效率。此外,随着温度的升高,体系的 COD 去除率先增大后降低,从 10 °C 时的 (19.70±1.97)% 升高至 30 °C 时的 (67.31±2.44)%,提高了 3.42 倍,说明菌剂的脱氮过程需要有机碳源,即有机碳源的存在有助于所得复合脱氮微生物菌剂的生长及脱氮,配方菌株为异养微生物。

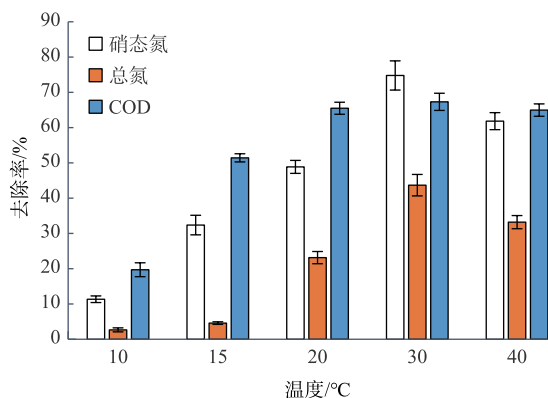


图 2 温度对硝态氮、总氮及 COD 去除率的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the removal rates of NO₃-N, total nitrogen and COD

2.2 C/N 对菌剂生长及脱氮效率的影响

合适的 C/N 是影响反硝化微生物的生长及脱氮效果的因素之一^[15],反应条件中过低的碳源可能导致异养反硝化微生物反硝化效果的下降。图 3 为选择培养基中 C/N 对复合微生物菌剂生长的影响。复合微生物菌剂的生长随着 C/N 的升高呈先升高再降低的趋势。C/N 为 10 时,复合微生物菌剂生长状况最好,OD₆₀₀ 为 1.52±0.01,菌体质量浓度为 (0.92±0.03) g/L。C/N 低于 10 比 C/N 高于 10 对复合微生物菌剂的生长更不利,在 C/N 为 2 时微生物菌剂生长状况最差,但此时仍可以使复合微生物菌剂适度生长,此时 OD₆₀₀ 为 0.796±0.01,菌体质量浓度 (0.29±0.01) g/L,比 C/N 为 10 分别降低了 47.63% 和 68.48%。因此合适的 C/N 有利于复合微生物菌剂的生长,最佳 C/N 为 10,过低的 C/N 由于

碳源的不足不利于复合微生物菌剂的生长,而过高的 C/N 由于 C/N 的失衡也会抑制复合微生物菌剂的生长。

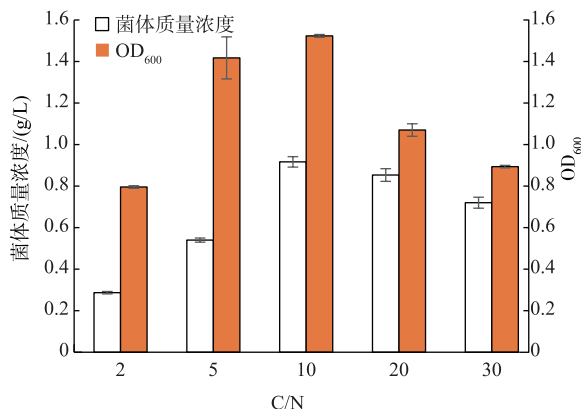


图 3 C/N 对 OD₆₀₀ 值及菌体质量浓度的影响

Fig. 3 Effects of C/N on OD₆₀₀ value and thallus concentration

图 4 为不同 C/N 条件下复合微生物菌剂的脱氮效果。结果显示,脱氮效果随着 C/N 的增加先升高再降低。最佳的脱氮效率在 C/N 为 10,此时硝态氮去除率为 (90.28±0.71)%,TN 去除率为 (50.79±2.08)%。当 C/N 高于 10 时也同样不利于复合微生物菌剂的脱氮效果,在 C/N 为 30 时硝态氮与 TN 去除率显著下降,分别为 (22.67±0.92)% 和 (17.46±2.40)%。复合微生物菌剂中的反硝化菌为异养微生物,C/N 增加在一定程度上表明碳源增加有利于复合微生物菌剂生长。复合微生物菌剂在水体中的脱氮效果与其生长状况有着密切关系,但过高的 C/N 会破坏微生物的生长条件的平衡从而表现出抑制复合微生物菌剂生长的现象。在 C/N 为 2 时,硝态氮 TN 的去除率分别为 (80.61±1.48)% 和 (43.08±1.93)%,比最佳 C/N 为 10 时 TN 去除率分别下降了 10.71% 和 15.18%。在 C/N 为 2 时尽管去除效率下降,但依然有较好的脱氮效率。高峰等研究的 LSD1 在 C/N 为 4 时硝态氮去除率仅为 29%^[16];陈佗等研究的 DF-1 在 C/N 为 2 时氮的去除率仅为 26.9%^[17],因此该复合微生物菌剂在低 C/N 比污水处理中也具有一定的应用前景^[18]。COD 去除率随着 C/N 升高逐渐降低,C/N 由 2 升高到 30 时去除率降低了 69.51%。上述结果表明,复合微生物菌剂生长需要碳源,但其微生物活性特别是脱氮活性不依赖于碳源的供给,通过条件优化,有望进一步提高复合微生物菌剂在低 C/N 条件下的脱氮效果。

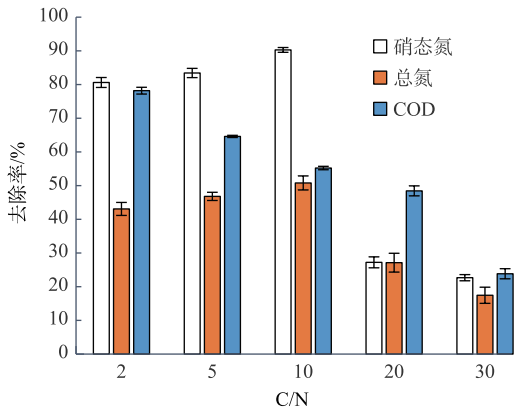


图4 C/N对硝态氮、总氮及COD去除率的影响

Fig. 4 Effects of C/N on removal rates $\text{NO}_3\text{-N}$, TN, and COD

2.3 碳源类型对菌剂生长及脱氮效果的影响

不同的碳源在一定程度上会影响反硝化菌的生长状况及脱氮效果^[19-20],图5是复合微生物菌剂在不同碳源类型中的生长状况。在5种不同碳源的选择培养基中,复合微生物菌剂对海藻糖的利用较差, OD_{600} 为 0.64 ± 0.02 ,菌体质量浓度为 (0.80 ± 0.02) g/L。在柠檬酸钠和可溶性淀粉为碳源时,复合微生物菌剂表现出良好的生长状况,其中在可溶性淀粉为碳源时最为良好,其 OD_{600} 为 1.46 ± 0.04 ,菌体质量浓度为 (1.44 ± 0.02) g/L,比海藻糖为碳源分别提高了1.27倍和0.80倍。

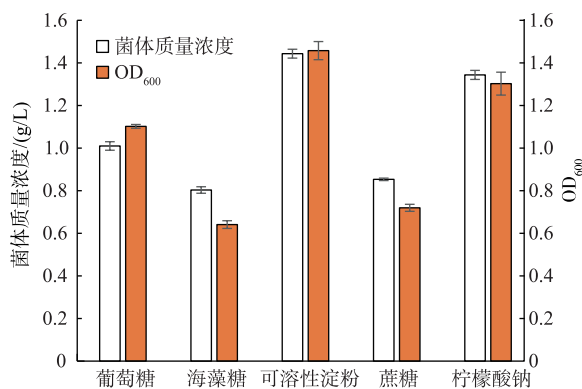


图5 碳源类型对 OD_{600} 值及菌体质量浓度的影响

Fig. 5 Effects of carbon source types on OD_{600} value and thallus concentration

图6是碳源种类对复合微生物菌剂反硝化效率的影响,碳源种类对复合微生物菌剂的影响与对生长状况的影响基本一致。当海藻糖作为碳源时,复合微生物菌剂的脱氮效果最差,此时硝态氮去除率为 $(77.64\pm 0.92)\%$,TN去除率为 $(23.69\pm 1.47)\%$;

可溶性淀粉与柠檬酸钠作为碳源表现出较为良好的脱氮效果,硝态氮去除率分别为 $(92.61\pm 0.48)\%$ 和 $(88.60\pm 0.82)\%$,TN去除率分别为 $(60.02\pm 0.35)\%$ 和 $(52.81\pm 1.12)\%$ 。最佳碳源为可溶性淀粉,硝态氮和TN去除率比葡萄糖为碳源时分别提高了0.19倍和2.74倍,可见碳源种类对于反硝化过程中硝态氮还原影响不明显,但对后续产物的还原有较大影响。在可溶性淀粉为碳源时,硝态氮与TN的平均去除速率为 $5.34 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 和 $3.46 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。Chen等报道的*P. denitrificans*菌株G1硝酸盐和TN的去除率分别为 $(60.57\pm 0.51)\%$ 和 $(36.36\pm 0.34)\%$ ^[21];Deng等报道的SC221-M和BSC24混合后投放至养殖废水中,其脱氮效果为 53.9% ^[22];本研究中复合微生物菌剂脱氮效果均优于以上脱氮微生物,COD去除率随着碳源种类变化幅度不大,因此受碳源种类的影响较小。

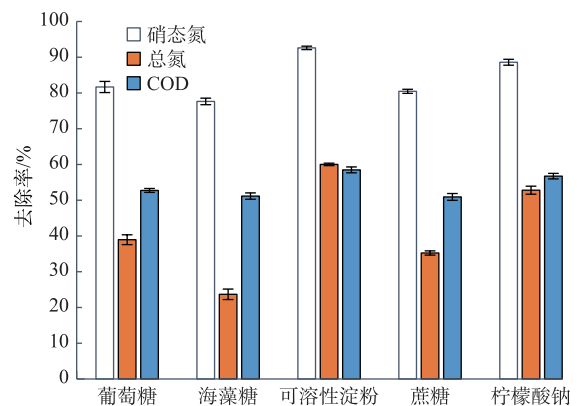


图6 碳源类型对硝态氮、总氮及COD去除率的影响

Fig. 6 Effects of carbon source types on removal rates $\text{NO}_3\text{-N}$, TN, and COD

2.4 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度对菌剂生长及脱氮效果的影响

图7是硝态氮质量浓度对复合微生物菌剂生长的影响,结果表明随着硝态氮质量浓度的升高,复合微生物菌剂的生长状况呈上升趋势。当硝态氮质量浓度为 $5 \text{ mg}/\text{L}$ 时, OD_{600} 为 0.66 ± 0.01 ,菌体质量浓度为 $(0.04\pm 0.00) \text{ mg}/\text{L}$;硝态氮质量浓度为 $40 \text{ mg}/\text{L}$ 时,复合微生物菌剂生长状况最佳, OD_{600} 达到了 0.83 ± 0.01 ,菌体质量浓度为 $(0.11\pm 0.01) \text{ mg}/\text{L}$ 。相较于硝态氮质量浓度为 $5 \text{ mg}/\text{L}$ 时,体系中的 OD_{600} 和菌体质量浓度分别提升了0.27倍和1.68倍。由于该批次实验中的氮质量浓度较低,抑制了复合微生

物菌剂的生长,使得最佳 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度下的 OD_{600} 、菌体质量浓度和脱氮性能均比上述研究结果低,因此硝态氮作为反硝化过程中的电子受体,充足的氮源供给有利于复合微生物菌剂的生长。

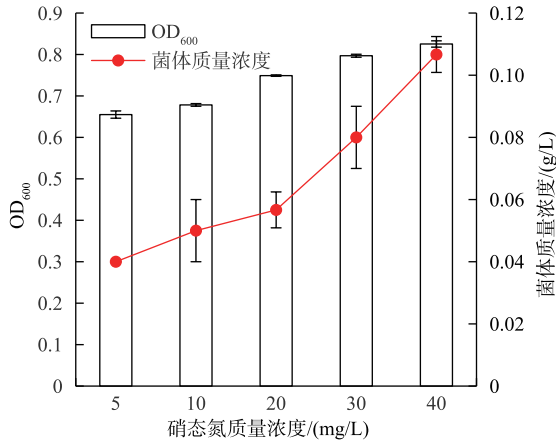


图7 硝态氮质量浓度对 OD_{600} 值及菌体质量浓度的影响
Fig. 7 Effect of $\text{NO}_3\text{-N}$ concentration on OD_{600} value and thallus concentration

硝态氮质量浓度对复合微生物菌剂脱氮效果见图8。硝态氮质量浓度的升高导致硝态氮去除率的下降。硝态氮质量浓度低于10 mg/L时,硝态氮的去除率均为 $(100.00 \pm 0.00)\%$;当硝态氮质量浓度高于10 mg/L时,去除率开始下降,40 mg/L时去除率为 $(83.90 \pm 1.37)\%$ 。过高的硝态氮质量浓度超过了复合微生物菌剂的反硝化上限,因此造成了硝态氮去除率的下降。硝态氮质量浓度的升高有利于TN的去除,硝态氮质量浓度为40 mg/L时,TN的去除率为 $(38.58 \pm 0.77)\%$,比硝态氮质量浓度为5 g/L时的TN去除率 $(16.29 \pm 0.21)\%$ 提高了1.31倍。硝态氮质量浓度对COD的去除效果影响不明显,COD的去除率为55.52%~60.73%。

2.5 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度对菌剂生长及脱氮效率的影响

$\text{NO}_2\text{-N}$ 作为反硝化的底物之一,其质量浓度对复合微生物菌剂的生长及反硝化效果同样存在一定的影响^[23-24],图9为 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度对复合微生物菌剂生长的影响。随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度的升高,复合微生物菌剂的生长呈上升趋势,在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度为1 mg/L时, OD_{600} 为 0.35 ± 0.01 ,菌体质量浓度为 (0.02 ± 0.01) g/L;在 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度为10 mg/L时,复合微生物菌剂生长状况最优, OD_{600} 为 0.64 ± 0.03 ,菌体质量浓度为 (0.04 ± 0.01) g/L,比

$\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度为1 mg/L时分别提高了0.81倍和1.35倍。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 与硝态氮同为反硝化过程中的电子受体, $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度对复合微生物菌剂生长的影响表现出与硝态氮质量浓度相同的趋势,因此提高 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度有利于复合微生物菌剂的影响。

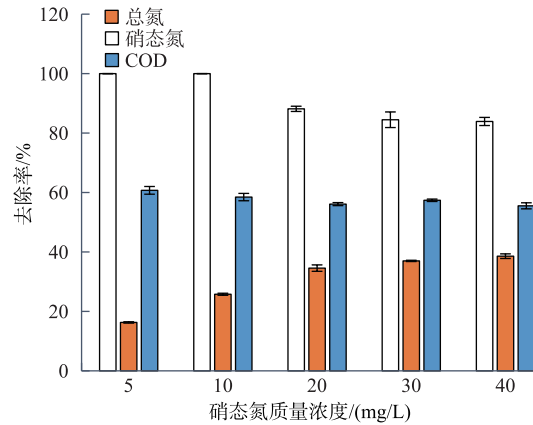


图8 硝态氮质量浓度对硝态氮、总氮及COD去除率的影响
Fig. 8 Effects of $\text{NO}_3\text{-N}$ concentration on the removal rates of $\text{NO}_3\text{-N}$, TN, and COD

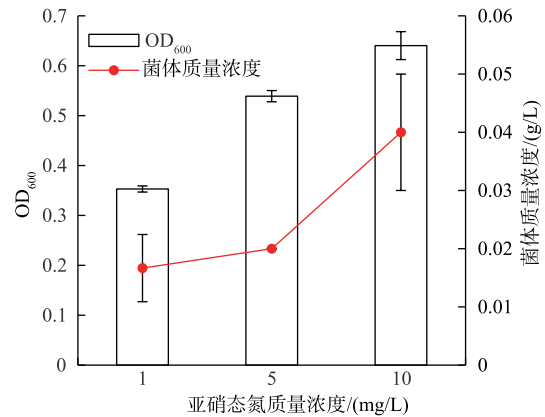


图9 亚硝态氮质量浓度对 OD_{600} 及菌体质量浓度的影响
Fig. 9 Effect of nitrite concentration on OD_{600} value and thallus concentration

图10是亚硝态氮质量浓度对复合微生物菌剂脱氮效果的影响。随着 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度的升高, $\text{NO}_2\text{-N}$ 去除率与TN的去除率均呈上升趋势。当 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度为1 mg/L时, $\text{NO}_2\text{-N}$ 去除率为 $(17.52 \pm 1.39)\%$,TN去除率为 $(11.95 \pm 0.38)\%$;当 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度为10 mg/L时, $\text{NO}_2\text{-N}$ 去除率为 $(55.61 \pm 1.20)\%$,TN去除率为 $(26.52 \pm 0.91)\%$,比1 mg/L的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度时去除率分别提高了2.17倍和1.21倍。COD的去除率由于 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量

浓度的升高,在固定 C/N 时碳源投加量也提高,因此造成了培养基中 COD 升高,从而导致 COD 去除率略微下降。过低的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 质量浓度导致 $\text{NO}_2\text{-N}$ 难以被去除,造成了复合微生物菌剂的脱氮效果降低,因此提高氮源的质量浓度有利于复合微生物菌剂的脱氮效果提升。

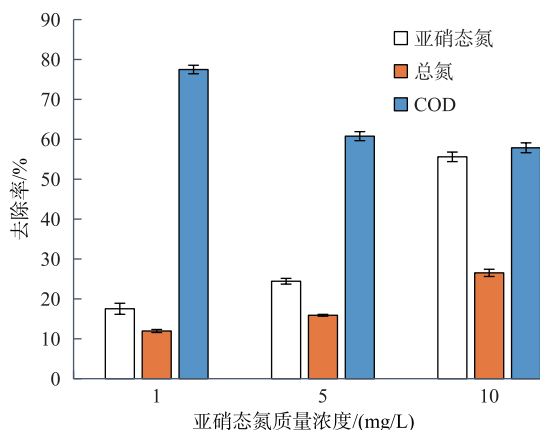


图 10 亚硝态氮质量浓度对亚硝态氮及 COD 去除率的影响
Fig. 10 Effect of $\text{NO}_2\text{-N}$ concentration on the removal rates of $\text{NO}_2\text{-N}$ and COD

2.6 复合脱氮微生物菌剂产反硝化酶的能力

图 11 是复合微生物菌剂在最佳实验条件下反硝化过程中各氮态化合物的质量浓度变化情况。结果表明,48 h 后 $\text{NO}_3\text{-N}$ 质量浓度由 277 mg/L 降至 (18.35 ± 0.95) mg/L。24 h 时体系中 $\text{NO}_2\text{-N}$ 开始积累,出现最大值 (61.95 ± 1.53) mg/L;48 h 积累量为 (31.58 ± 1.01) mg/L。在 40~48 h 氨氮出现一定积累,48 h 氨氮积累量为 (7.36 ± 0.36) mg/L,其原因是微生物进入衰亡期并自溶导致了氨氮的积累^[25]。整个过程 TN 的去除效率为 (166.90 ± 4.89) mg/L。通过氮的物料平衡,79.31%的 $\text{NO}_3\text{-N}$ 通过复合微生物菌剂转化为气态氮。图 12 为复合微生物菌剂的产反硝化酶能力,表明复合微生物菌剂中存在 2 种反硝化酶,硝酸盐还原酶(NAR)和亚硝酸盐还原酶(NIR)均呈现先升高再降低的趋势。NAR 在 24 h 达到最大值 (1.19 ± 0.09) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$,随后开始下降,在 48 h 为 (0.48 ± 0.09) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。NIR 比 NAR 在时间上存在一定的落后性,32 h 达到最大值 (0.57 ± 0.12) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$,随后开始下降,在 48 h 为 (0.27 ± 0.09) $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。NIR 活性在 48 h 内均低于 NAR 活性,也因此解释了上述实验中 TN 去除率低于硝酸盐除率,复合微生物菌剂反硝化过程中

由于硝酸盐反硝化不完全导致中间产物积累。由于 NAR、NIR 这 2 种酶的存在,推测复合微生物菌剂反硝化途径为 $\text{NO}_3\text{-N} \rightarrow \text{NO}_2\text{-N} \rightarrow \text{气体产物}$ ^[26-29]。

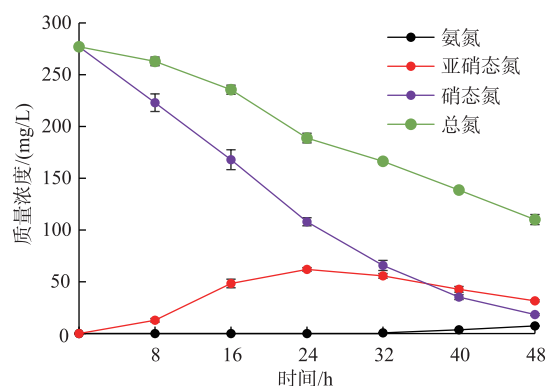


图 11 菌剂产反硝化过程各氮态化合物变化
Fig. 11 Changes of nitrogen compounds during the denitrification process

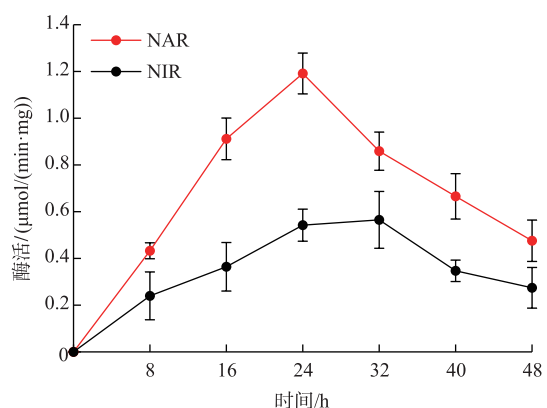


图 12 菌剂产反硝化酶的能力
Fig. 12 Ability of the microbial agents to produce denitrifying enzyme

3 结语

作者所在实验室自行保藏反硝化菌株 N1、N9 和 N10 的最佳培养时间均为 36 h。等比例混合复配后,得到复合脱氮微生物菌剂,该菌剂在 30 °C、C/N 为 10、碳源为可溶性淀粉的条件下,48 h 后硝态氮、TN 和 COD 的去除率分别为 $(92.61\pm 0.48)\%$ 、 $(60.02\pm 0.35)\%$ 和 $(58.48\pm 0.82)\%$ 。此外,该菌剂在 C/N 为 2~10 均有一定的脱氮效果,且在较低质量浓度的硝态氮和亚硝态氮条件下,反硝化效果也较好,表明所得复合脱氮微生物菌剂在低碳氮比、出水水质要求较高的污水处理过程中具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] 谭盼. A²O+MBR 在西安市某污水厂工程设计中的应用[J]. 山西建筑, 2018, 44(23): 126-128.
TAN P. Application of A²O combined MBR in engineering design of wastewater treatment plant in Xi'an[J]. **Shanxi Architecture**, 2018, 44(23): 126-128. (in Chinese)
- [2] 张海明, 尚林峰, 侯明韬. 广东某新建 A²O-MRB 市政污水调试实例[J]. 广东化工, 2018, 45(18): 150-155.
ZHANG H M, SHANG L F, HOU M T. Engineering application of a A²O-MRB case for municipal sewage treatment in Guangzhou[J]. **Guangdong Chemical Industry**, 2018, 45(18): 150-155. (in Chinese)
- [3] 刘立国, 王艳, 朱保成, 等. A/O+MBR 工艺处理高氨氮煤化工污水工程实例[J]. 工业水处理, 2017, 37(3): 101-103.
LIU L G, WANG Y, ZHU B C, et al. Engineering example of A/O+MBR process for the treatment of high ammonia-nitrogen coal chemical wastewater[J]. **Industrial Water Treatment**, 2017, 37(3): 101-103. (in Chinese)
- [4] BECHMANN M E, BERGE D, EGGESTAD H O, et al. Phosphorus transfer from agricultural areas and its impact on the eutrophication of lakes—two long-term integrated studies from Norway[J]. **Journal of Hydrology**, 2005, 304(1/2/3/4): 238-250.
- [5] 温周瑞, 王丛丹, 李文华, 等. 武汉城市湖泊水质及水体富营养化现状评价[J]. 水生态学杂志, 2013, 34(5): 96-100.
WEN Z R, WANG C D, LI W H, et al. Evaluation of water quality and eutrophication of urban lakes in Wuhan[J]. **Journal of Hydroecology**, 2013, 34(5): 96-100. (in Chinese)
- [6] LUO S, WU B L, XIONG X Q, et al. Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to early life stages of the rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2016, 35(6): 1422-1427.
- [7] FURTADO P S, CAMPOS B R, SERRA F P, et al. Effects of nitrate toxicity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared with biofloc technology(BFT)[J]. **Aquaculture International**, 2015, 23(1): 315-327.
- [8] 黄廷林, 周娜, 张海涵, 等. 3 株贫营养好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化特性[J]. 环境工程学报, 2014, 8(12): 5507-5513.
HUANG T L, ZHOU N, ZHANG H H, et al. Isolation and identification of three oligotrophic aerobic denitrifying bacteria and denitrification characteristics[J]. **Chinese Journal of Environmental Engineering**, 2014, 8(12): 5507-5513. (in Chinese)
- [9] YANG J R, WANG Y, CHEN H, et al. Ammonium removal characteristics of an acid-resistant bacterium *Acinetobacter* sp. JR1 from pharmaceutical wastewater capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. **Bioresource Technology**, 2019, 274: 56-64.
- [10] CHEN P Z, LI J, LI Q X, et al. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24[J]. **Bioresource Technology**, 2012, 116: 266-270.
- [11] ZHANG H H, ZHAO Z F, KANG P L, et al. Biological nitrogen removal and metabolic characteristics of a novel aerobic denitrifying fungus *Hanseniaspora uvarum* strain KPL108[J]. **Bioresource Technology**, 2018, 267: 569-577.
- [12] CHEN H, ZHAO X H, CHENG Y Y, et al. Iron robustly stimulates simultaneous nitrification and denitrification under aerobic conditions[J]. **Environmental Science & Technology**, 2018, 52(3): 1404-1412.
- [13] QIN W, LI W G, ZHANG D Y, et al. Ammonium removal of drinking water at low temperature by activated carbon filter biologically enhanced with heterotrophic nitrifying bacteria[J]. **Environmental Science and Pollution Research International**, 2016, 23(5): 4650-4659.
- [14] 赵彬, 安强, 程丹阳, 等. 一株鲍曼不动杆菌及其应用[P]. 中国专利: CN106987547B, 2020-01-03.
- [15] HONG P, SHU Y L, WU X Q, et al. Efficacy of zero nitrous oxide emitting aerobic denitrifying bacterium, *Methylobacterium gregans* DC-1 in nitrate removal with strong auto-aggregation property[J]. **Bioresource Technology**, 2019, 293: 122083.
- [16] 高峰, 蔡凯, 赵振华. 高效反硝化菌株的分离鉴定及功能验证[J]. 广东化工, 2020, 47(10): 33-36.
GAO F, CAI K, ZHAO Z H. Isolation, identification and functional verification of high efficiency denitrification strains[J]. **Guangdong Chemical Industry**, 2020, 47(10): 33-36. (in Chinese)
- [17] 陈佗. 一株异养硝化细菌的筛选鉴定及硝化性能研究[J]. 西部皮革, 2019, 41(8): 156-159.
CHEN T. Screening and identification of a heterotrophic nitrifying bacteria and study on nitrifying performance[J]. **West Leather**, 2019, 41(8): 156-159. (in Chinese)
- [18] ZHANG Q L, LIU Y, AI G M, et al. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7[J]. **Bioresource Technology**, 2012, 108: 35-44.
- [19] 朱云, 龚望宝, 谢骏, 等. 好氧反硝化细菌的鉴定及其脱氮特性研究[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 895-903.

- ZHU Y, GONG W B, XIE J, et al. Identification and denitrification characteristics of the aerobic denitrifying bacteria *Pseudomonas furukawaii* zsl[J]. **Acta Hydrobiologica Sinica**, 2020, 44(4): 895-903. (in Chinese)
- [20] 李紫惠. 异养硝化—好氧反硝化菌 XH02 的脱氮特性及强化脱氮过程中菌群结构变化的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2016.
- [21] CHEN Z, JIANG Y L, CHANG Z Q, et al. Denitrification characteristics and pathways of a facultative anaerobic denitrifying strain, *Pseudomonas denitrificans* G1[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2020, 129(6): 715-722.
- [22] DENG B, FU L Q, ZHANG X P, et al. The denitrification characteristics of *Pseudomonas stutzeri* SC221-M and its application to water quality control in grass carp aquaculture[J]. **PLoS One**, 2014, 9(12): e114886.
- [23] 司圆圆, 陈兴汉, 许开航, 等. 耐盐好氧反硝化细菌 X12 的分离及反硝化特性[J]. 农业工程, 2017, 7(2): 68-71.
SI Y Y, CHEN X H, XU K H, et al. Isolation and denitrification characteristics of salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain X12[J]. **Agricultural Engineering**, 2017, 7(2): 68-71. (in Chinese)
- [24] 曹月坤, 林晓东, 李长波, 等. 反硝化细菌固定化降解亚硝酸盐的研究[J]. 应用化工, 2015, 44(10): 1784-1787.
CAO Y K, LIN X D, LI C B, et al. Research on removal of nitrite by the immobilized denitrifying bacteria[J]. **Applied Chemical Industry**, 2015, 44(10): 1784-1787. (in Chinese)
- [25] 杨垒, 崔坤, 任勇翔, 等. 异养硝化细菌 *Pseudomonas aeruginosa* YL 的脱氮过程及 N₂O 产生特性[J]. 环境科学, 2020, 41(2): 831-838.
YANG L, CUI S, REN Y X, et al. Denitrification process and N₂O production characteristics of heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* YL[J]. **Environmental Science**, 2020, 41(2): 831-838. (in Chinese)
- [26] ZHAO B, CHENG D Y, TAN P, et al. Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal[J]. **Bioresource Technology**, 2018, 250: 564-573.
- [27] 何腾霞, 陈梦苹, 丁晨雨, 等. 微生物脱氮过程中氧化亚氮的释放机理及减释措施[J]. 生物资源, 2021(1): 17-25.
HE T X, CHEN M P, DING C Y, et al. The release mechanism of nitrous oxide during microbial nitrogen removal process and related measures to lower its emission[J]. **Biotic Resources**, 2021(1): 17-25. (in Chinese)
- [28] 王永红, 李安章, 张明霞, 等. 分离自养殖水体的异养硝化—好氧反硝化菌及其脱氮作用研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 36-46.
WANG Y H, LI A Z, ZHANG M X, et al. Isolation of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria from aquaculture water and study of their denitrification efficiency[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2019, 35(7): 36-46. (in Chinese)
- [29] 张馨月, 刘冬梅, 许喜林, 等. LCR 6013 降解亚硝酸盐的途径及其亚硝酸盐还原酶的初步定位[J]. 现代食品科技, 2013, 29(11): 2627-2632.
ZHANG X Y, LIU D M, XU X L, et al. The degradation pathway of nitrite by LCR 6013 and the primary localization of its nitrite reductase[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2013, 29(11): 2627-2632. (in Chinese)