

文章编号: 1009-038X(2002)05-0515-04

好氧同时硝化—反硝化脱氮微生物的混合培养

堵国成, 耿金菊, 陈坚

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 筛选和分离得到的多株脱氮微生物, 能在完全好氧条件下将氨氮转化为 NO_2^- , 随即在好氧反硝化菌的作用下还原为 N_2 排放, 整个生物脱氮过程历时较短, 30 h 内对 200 mg/L 的氨氮去除率达 99%, 而且无中间产物 NO_2^- 的积累. 混合脱氮微生物菌群生长的适宜 pH 范围为 7~10, 探索实现混合脱氮微生物菌群高密度培养的 pH: 发酵前期补酸控制 $\text{pH} \leq 8$, 发酵中后期不控制 pH 值, 可缩短菌体的生长周期, 提高菌体的氨氮降解速率, 细胞质量浓度达 3.9 g/L , 比自然 pH 条件下提高了 62.5%.

关键词: 脱氮微生物 硝化—反硝化 好氧脱氮 混合培养

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

Mixed Culture of Denitrifying Bacteria for Aerobic Simultaneous Nitrification-Denitrification

DU Guo-cheng, GENG Jin-ju, CHEN Jian

(Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: NH_4^+ was converted to NO_2^- under aerobic conditions by the screened bacteria, the intermediate NO_2^- was then reduced to N_2 by aerobic denitrifying bacteria, and no NO_2^- was accumulated. 200 mg/L of NH_4^+ can be removed within 30 h with a removal rate of 99%. The appropriate pH for the growth of mixed bacteria was 7~10. pH control policy for the high density mixed culture in 5 L fermentor was proposed. By controlling pH value lower than 8 in the early stage and without pH controlling afterwards, cell growth period was shortened and NH_4^+ removal rate could be improved, dry cell weight reached 3.9 g/L , increased 62.5% higher than that under natural pH conditions.

Key words: denitrifying bacteria; nitrification-denitrification; aerobic denitrifying; mixed culture

传统的生物脱氮途径被认为硝化反应只发生在好氧条件下, 而反硝化反应只能在厌氧或缺氧条件下进行. 由于对环境条件的要求不同, 这两个过程不能同时发生, 而只能序列式进行. 然而, 生物脱

氮技术新的发展却突破了传统理论的认识, 尤其是 20 世纪 80 年代好氧反硝化菌的重要发现, 使得有关好氧硝化—反硝化生物脱氮的研究日趋活跃. 目前已知的好氧反硝化菌有 *Pseudomonas spp.*, *Al-*

收稿日期 2002-05-02; 修订日期 2002-06-26.

作者简介: 堵国成(1965-), 男, 江苏常州人, 工学博士, 副教授.

万方数据

caligenus faecalis 和 *Thiosphaera pantotropha* 等^[1-3],这些微生物均可在好氧条件下将亚硝酸根离子(NO_2^-)或硝酸根离子(NO_3^-)还原为氮气(N_2).这样,生物硝化反应与反硝化反应就可同一容器中同时进行,与传统的序列表生物脱氮工艺相比,具有其独特的优越性:(1)硝化反应的产物可直接成为反硝化反应的底物,避免了培养过程 NO_2^- 和 NO_3^- 的积累对硝化反应的抑制,加速了硝化—反硝化反应的进程;(2)无需酸碱中和,反硝化反应释放出的 OH^- 可部分补偿硝化反应所消耗的碱,能使系统中的pH值相对稳定;(3)硝化反应和反硝化反应可在相同的条件和系统下进行,可简化操作的难度,大大降低投资费用和运行成本.因此,新型好氧反硝化微生物的筛选和好氧同时硝化—反硝化生物脱氮技术已成了生物脱氮领域新的研究热点和发展趋势.

pH值是影响混合脱氮微生物菌群分布和硝化—反硝化反应速率的关键所在.由于硝化微生物在硝化过程中产生酸,而反硝化微生物进行反硝化作用时则产生碱,且硝化微生物和反硝化微生物的最适生长pH值不同,因此必须平衡好培养过程的pH值才能实现混合菌群的协调生长,共同维持较高的氮氮降解速率.本实验中将硝化菌群和反硝化菌群混合培养,在5L的发酵罐中采取不同的pH控制方式进行培养,获得了混合菌群高密度培养的最适pH控制方式,在最适pH条件下,采取分批补料的方式进一步提高了菌体的浓度.

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

菌种 好氧脱氮微生物菌群(*Aerobic denitrifying Bacteria*),从土壤和水中分离得到.发酵培养基(g/L): NaHCO_3 1.75, CH_3COONa 0.854, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, NaCl 1.0, FeSO_4 0.4, K_2HPO_4 1.0, MgSO_4 0.25. NaNO_2 和 NaNO_3 量根据需要添加.

1.2 培养方法

种子培养:从新鲜斜面上挑取一环菌,接种至装有50 mL种子培养基的500 mL的锥形瓶中培养,培养温度为30℃,200 r/min摇床培养.

发酵培养 5 L容积发酵罐(韩国KF-5 L台式发酵罐)装液3 L,接种体积分数为10%,发酵过程控制温度30℃,搅拌转速为400 r/min,通气量为1 L/(L·min),培养过程中的pH值按需要控制.

1.3 分析方法

氨氮测定 纳氏分光光度法^[4].细胞量的测定:取5 mL发酵液以11 000 r/min离心10 min,弃去上清液,用0.1 mol/L的HCl溶液洗涤菌体,105℃干燥至恒重后称重,计算出细胞干重(DCW).亚硝酸盐测定:对硝基苯胺-N,N-二甲基苯胺光度法^[5]和离子色谱法.硝酸盐测定:酚二磺酸光度法^[4]和离子色谱法.

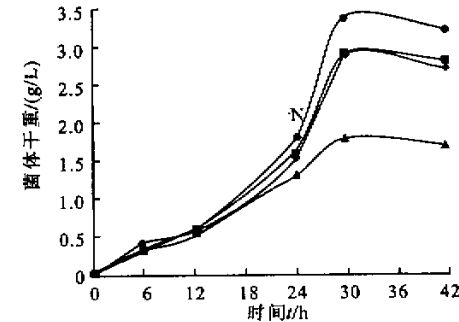
2 结果与讨论

2.1 好氧条件下的生物脱氮过程

本实验均在好氧条件下进行,同时检测了氨态氮(NH_4^+-N)、亚硝态氮(NO_2^--N)和硝态氮(NO_3^--N)的变化情况. NO_2^--N 或 NO_3^--N 应是硝化反应的直接产物,但在 NH_4^+-N 被降解的同时,整个生物脱氮过程均检测不到 NO_2^--N 和 NO_3^--N 的产生,表明硝化反应和反硝化反应在同一系统内同时进行.硝化反应产物直接被反硝化菌利用,由于反硝化菌是异养菌,生长繁殖快,因此反硝化过程进行较快,故硝化产物不积累.

2.2 好氧条件下亚硝酸盐和硝酸盐的降解过程

NO_2^- 和 NO_3^- 是生物脱氮的硝化产物,同时也是反硝化菌生长所必需的氮源,虽然它们在好氧生物脱氮过程中不积累,难以了解其在硝化—反硝化反应中的存在状况,但可以通过外加一定的亚硝酸盐和硝酸盐,将其直接作为反硝化微生物的底物,考察它们在生物脱氮过程中的变化,进而更好地了解生物脱氮过程.实验在添加铵盐的同时,在培养基中添加了适量的亚硝酸盐和硝酸盐,从它们的变化过程及氮元素的平衡推测好氧反硝化的机理.分别添加一定量的 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 进行混合微生物培养时,其菌体生长、 NH_4^+-N 去除率(r)、 NO_2^--N 降解曲线和 NO_3^--N 降解曲线如图1(a,b,c和d)所示.



(a)菌体生长

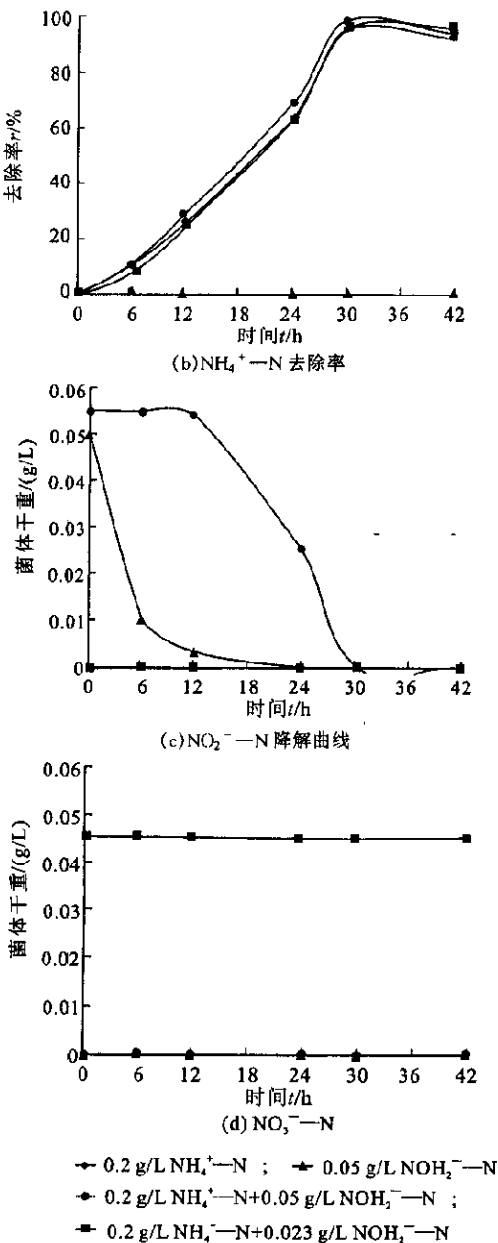


图 1 培养基中添加一定量的 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 时各参数的变化

Fig.1 Parameter changes with the addition of NH_4^+ 、 NO_2^- and NO_3^-

由图 1(d)可知,混合微生物不能利用培养基中的 NO_3^- 作电子受体,外加的 NO_3^- 不能被降解,故混合微生物中不存在降解 NO_3^- 的反硝化菌;同时也证明了在 NH_4^+-N 降解过程中, NO_3^- 不是该生物脱氮过程的中间产物.研究中的生物脱氮不经过图 2(a)所示的全程硝化反硝化生物脱氮途径,同时发现一定量硝酸盐的存在对菌体生长和氨氮降解无影响.

由图 1(c)可知,当微生物仅以 NO_2^- 作氮源时, NO_2^- 能在短时间内被降解,微生物培养 12 h 后 NO_2^- 可从 0.05 g/L 降低为 0.003 g/L,其最大细胞干重(主要为反硝化菌)达 1.7 g/L,表明混合菌群中的反硝化菌能直接利用 NO_2^- 作电子受体,进行反硝化脱氮反应^[6].当培养基中同时添加 NO_2^- 和 NH_4^+ 时, NH_4^+-N 降解不受干扰,但 NO_2^- 的降解速率下降,尽管如此混合菌群在 30 h 内对 NO_2^- 的去除率仍可达 100%.由此可以判断该生物脱氮 NO_2^--N 是该生物脱氮过程的硝化产物,也是反硝化反应的直接电子受体,而且已有的资料也证实,好氧反硝化菌的直接作用底物是亚硝酸氮而非硝酸氮^[7].

由于反硝化菌群仅能利用 NO_2^- 作电子受体进行反硝化脱氮,而 NH_4^+-N 被降解的同时,没有 NO_2^--N 的积累及 NO_3^--N 的产生,整个生物脱氮过程比一般的好氧硝化—厌氧反硝化历时要短得多.因此根据 NH_4^+ 、 NO_2^- 和 NO_3^- 在生物脱氮过程中的变化情况,判断该脱氮微生物菌群有好氧硝化菌群(亚硝化菌)和好氧反硝化菌群组成,它们所经历的生物脱氮过程为好氧短程同时硝化—反硝化(Aerobic shortcut simultaneous nitrification—denitrification)过程,即在好氧条件下亚硝化微生物将 NH_4^+-N 转化为 NO_2^--N ,随即由反硝化微生物直接进行反硝化反应,将 NO_2^--N 还原为 N_2 释放.其过程简图如图 2 所示:

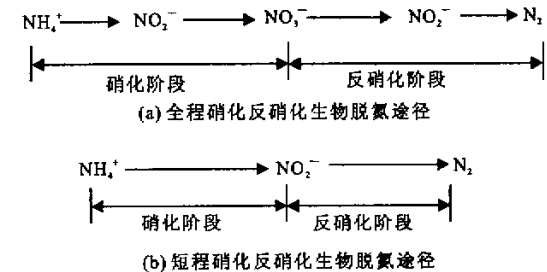


图 2 生物脱氮流程简图

Fig.2 Sketch of bio-denitrification process

好氧短程同时硝化反硝化生物脱氮过程,除了具备好氧同时生物脱氮过程的一系列优点外,与全程硝化反硝化相比,其还具备了短程硝化反硝化所特有的一些优点^[8]:(1)硝化阶段可减少 25% 左右体积分数的需氧量,降低了能耗;(2)反硝化阶段可减少质量分数 40% 左右的有机碳源,降低了运行费用;(3)反应时间短;(4)具备较高的反硝化速率, NO_2^- 的反硝化速率通常比 NO_3^- 高 63% 左右.所以其生物脱氮过程比一般硝化—反硝化反应进程

较快.这一新型的脱氮微生物组成的生物脱氮途径为简化现有的生物脱氮工艺和设施提供了一个崭新的思路,对其进一步的研究开发具有重要的现实意义.

2.3 5 L 容积发酵罐中 pH 的控制

本实验在 5 L 容积机械搅拌发酵罐上分别控制 pH=7(反硝化反应的适宜 pH 值),pH=8(硝化反应的适宜 pH 值),pH≤7 和 pH≤8 及自然 pH 条件进行发酵.由图 3(a 和 b)可见,尽管混合微生物的初始生长 pH 范围较宽,但控制不同的 pH 条件进行培养时,其菌体生长速率和氨氮降解速率却有显著的差异.

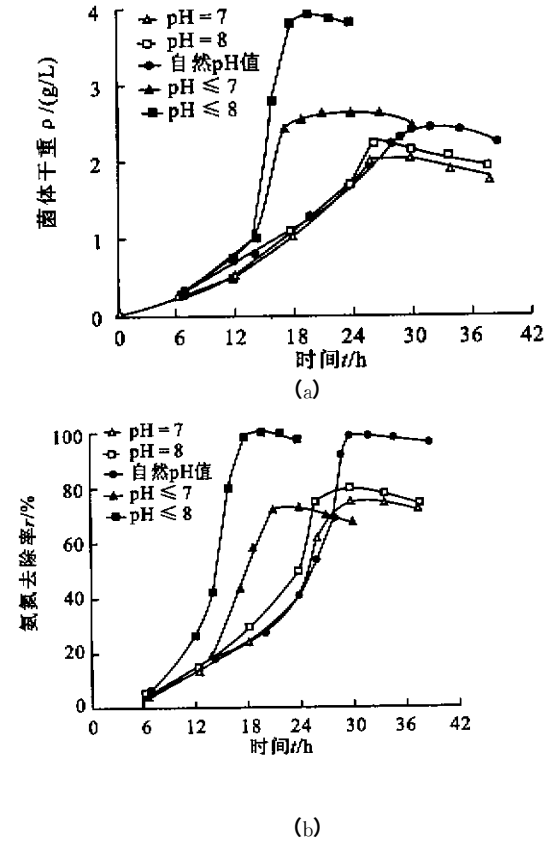


图 3 5 L 容积发酵罐不同 pH 控制下菌体生长和氨氮变化曲线
Fig.3 Time courses of DCW and the removal rate of ammonia-nitrogen under different pH conditions in 5 L fermentor

比较图 3(a)和图 3(b)可发现,氨氮降解过程和菌体生长过程是同步进行的,因此,控制不同 pH 值对菌体生长的影响和对氨氮降解的影响是一致的.在自然 pH 条件下,发酵前期 pH 有一上升过程(图

4).采取补加酸控制 pH 不超过 8,可使混合菌群的发酵周期缩短,菌体生长对数期缩短至 20 h,比自然 pH 条件下提前了 10 h.菌量达 3.9 g/L,比自然条件下提高了 62.5%,增幅较大.前期补酸使 pH≤7 时,菌体生长和氨氮降解效果不好,说明脱氮混合菌群培养过程中前期 pH 的控制很重要,必须使 pH 保持在硝化菌最适 pH 范围内使硝化菌充分生长,因硝化菌群生长速率较慢,硝化过程是整个生物脱氮过程的控制步骤.当硝化—反硝化偶联系统正常运转后,pH 的变化成为混合菌群互相协调生长的外观表征,此时若继续补碱将 pH 恒定在 7 或者 8,外加的碱会干扰混合菌群的生长代谢和菌群的协调作用.因此,在实验中采取控制前期 pH≤8 的策略,可显著提高菌体的生长性能和氨氮降解性能.

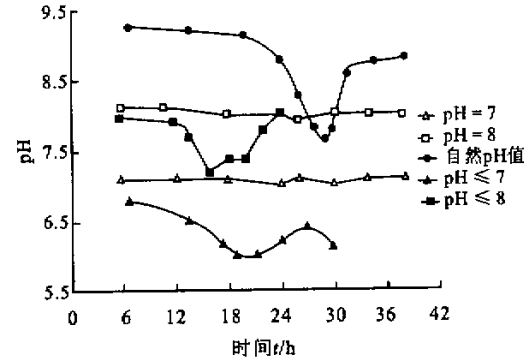


图 4 5 L 容积发酵罐中 pH 随时间变化曲线
Fig.4 Time course of pH changes in 5 L fermentor

3 结 论

该脱氮微生物菌群由好氧硝化菌群(亚硝化菌)和好氧反硝化菌群组成,它们所经历的生物脱氮过程为好氧短程同时硝化反硝化过程,即在好氧条件下亚硝化微生物将 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 转化为 $\text{NO}_2^- - \text{N}$,随即由反硝化微生物直接进行反硝化反应,将 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 还原为 N_2 释放.

采用发酵前期补酸控制 pH≤8,发酵中后期不控制 pH 值,可缩短菌体的生长周期,提高菌体的氨氮降解速率,细胞质量浓度达 3.9 g/L,比自然 pH 条件下提高了 62.5%.

参考文献:

[1] ROBERTSON L A, VAN NIEL E W J, TORREMANS R A M. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha* [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1988, 54 (1): 2812–2818.

2.4 SBA 法测定 Glu 定标值校正的验证

由表 6 可知,SBA 法测定脱盐液中 Glu 定标值校正为 125,稀释倍数为 200,对 SBA 定标值进行验证.

由表 7 看出,SBA 法测定脱盐液中 Glu,定标值为 125 时,添加谷氨酸量的回收率为 100%,由此说明 SBA 校正后的定标值是准确的,其他待测样品校正后的定标值经验证也是准确的.

表 7 SBA 法测定脱盐液中 Glu 定标值校正后的验证
Tab.7 The test of calibrating value after emendation in the determination of Glu from the desalting liquor using SBA method

No.	SBA 读数/ u_1	添加谷氨酸量/ ($\mu\text{g/L}$)	SBA 读数/ u_2	回收率/ %
1	72.0	39.3	111.4	100.3
2	66.8	49.1	116.0	100.0

另外作如下验证实验 :用 SBA 测定麸酸和味精,定标 100 时和旋光法基本一致,因为麸酸和味精都是以固体形式存在的, NH^{4+} 几乎不存在,这也说明了铵根离子对 SBA 仪中的谷氨酸氧化酶膜有抑制作用.

3 结 论

用 SBA 生物传感议测定清洁生产^[4] 各工段的样品时,因受 NH^{4+} 的影响,其定标都要进行相应的调整 除发酵液回收率在 91% 左右外,其他样品回收率基本上都在 80% ~ 83% 左右,理论上将 SBA 定标校正为 120 ~ 125,就能较准确地测量样品中 L-谷氨酸的含量. 因此,味精清洁生产工艺中各样品定标建议为 :发酵液定标 108 ~ 110,等电母液和絮清液、四效浓缩液、脱盐液、脱色液定标均为 120 ~ 125.

参考文献：

[1] 于信令. 味精工业手册[M]. 北京 中国轻工业出版社,1995. 570 – 587.
[2] 毛忠贵. 生物工业下游技术[M]. 北京 中国轻工业出版社,1999. 427.
[3] SMITH T J, MATHIAS L J. New methacrylate derivatives based on pyroglutamic acid[J]. *Polymer Preprints*, 2000, 41 (2) : 1254 – 1255.
[4] 毛忠贵. 味精清洁生产技术——谷氨酸提取的闭路循环新技术[A]. 全国发酵行业环境保护和综合利用技术交流会文集 [C]. 北京 中国发酵工业协会, 2001. 79 – 83.

(责任编辑 杨 萌)

(上接第 518 页)

[2] OTTE S, SCHALK J, KUENEN J G. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis* [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 1999, 51 (2) : 255 – 261.
[3] GUPTA A B. *Thiosphaera pantotropha* : A sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 1997, 21 (8) : 589 – 595.
[4] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法(第三版) [M]. 北京 : 中国环境科学出版社, 1989.
[5] 金尚满, 程英明, 车喜善等. 对硝基苯胺—N,N—二甲苯胺光度法测定痕量亚硝酸盐. *环境化学* [J], 1992, 11 (3) : 75 – 77.
[6] YOO H, AHN K H, LEE H J, *et al.* Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor[J]. *Water Research*, 1999, 33 (1) : 145 – 154.
[7] MULLER E B, STOUTHAMER A H, VAN VERSEVELD H W. Simultaneous NH_3 oxidation and N_2 production at reduced O_2 tensions by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium[J]. *Biodegradation*, 1995, 6 (4) : 339 – 349.
[8] JETTEN M S M. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system [J]. *Water Science Technology*, 1997, 35 (9) : 171 – 180.

(责任编辑 杨 萌)