

一株氨氮降解菌的筛选鉴定及其降解特性研究

张超¹, 尚润东², 王嘉晖², 欧阳选进², 李晨晨², 张晶², 靳永胜^{2*}

(1.北京市城市管理研究院,北京 100028;2.北京农学院,北京 102206)

摘要 [目的]筛选出能高效降解氨氮或总氮的菌株。[方法]以北京市南宫堆肥厂的垃圾渗滤液为材料,并从中筛选出一株具有高效降解氨氮能力的菌株,通过形态观察、革兰氏染色和 16S rDNA 分子鉴定等方法对其进行种属的鉴定,且对该菌株降解氨氮最适条件进行研究。[结果]通过鉴定发现该菌株属于弗式柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*),命名为弗式柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)H-1,简称 H-1。该菌株在实验室条件下对氨氮的去除最适的 pH 为 7,最适的氨氮浓度为 500 mg/L,最适的 C/N 为 8:1,最适的接种量为 1%,最适的 C 源为红糖:柠檬酸钠(4:1)组合的复合 C 源,在最适的条件下,其对氨氮的降解率为 82.5%。[结论]该菌株对处理含有高浓度氨氮的污水具有潜在的应用价值,为环保工作者开发污水中氨氮的高效处理提供理论依据和技术支持。

关键词 氨氮降解菌;渗滤液;筛选鉴定;降解特性

中图分类号 X 172 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)36-0053-04

Study on Screening and Identification of a Strain of Ammonia-nitrogen-degrading Bacteria and Its Degradation Characteristics

ZHANG Chao¹, SHANG Run-dong², WANG Jia-hui² et al (1.Beijing Institute of Urban Management, Beijing 100028; 2.Beijing Agricultural College, Beijing 102206)

Abstract [Objective] The research aimed to screen for strains that efficiently degrade ammonia or total nitrogen. [Method] Using the landfill leachate of Beijing Nangong Composting Plant as material, a strain with high ability to degrade ammonia nitrogen was selected and was observed by morphological observation, Gram stain and 16S rDNA molecular identification. Identification of species and the optimal conditions for the degradation of ammonia nitrogen in this strain were studied. [Result] The strain was found to belong to *Citrobacter freundii*, and it was named *Citrobacter freundii* H-1, abbreviated as H-1. The optimal pH of the strain for ammonia nitrogen removal under laboratory conditions was 7, the optimum ammonia nitrogen concentration was 500 mg/L, the optimum C:N was 8:1, and the optimum inoculum size was 1%. The most suitable C source was a composite C source of brown sugar; sodium citrate (4:1) combination. Under the optimum conditions, the degradation rate of ammonia nitrogen was 82.5%. [Conclusion] The strain has potential application value for the treatment of sewage containing high concentration of ammonia nitrogen, and provides theoretical basis and technical support for the environmental protection workers to develop high-efficiency treatment of ammonia nitrogen in wastewater.

Key words Ammonia nitrogen degradation; Leachate; Screening and identification; Degradation characteristics

伴随着经济的发展和人们生活水平的提高,垃圾的产量也逐年增高,2015 年垃圾产生量已经达 790.33 万 t^[1]。在多数发展和发展中国家,处理垃圾的主要手段是垃圾填埋^[2],垃圾在填埋的过程中,由于自身发酵产水、雨水冲淋、地表和地下水浸泡等会产生大量的垃圾渗滤液。垃圾渗滤液是一种高浓度的有机废水,具有水质复杂,有机物、氨氮、TN 和 COD 含量高等特点。这些垃圾渗滤液如果不加以处理,不仅会污染地下水源^[3],还会污染周边的环境,进而对人畜造成威胁。

垃圾渗滤液的主要污染物之一氨氮,因为其性质稳定,不易被物理化学的方法彻底去除,因此多采用生化工艺,通过微生物的硝化和反硝化作用,将其去除。近年来,人们陆续筛选出能降解氨氮的微生物,细菌有假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)^[4-5]、粪产碱菌属(*Alcaligenes faecalis*)^[6]、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)^[7-8]、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)^[9-10]、红球菌属(*Rhodococcus* sp.)^[11]、副球菌属(*Paracoccus*)^[12]、苍白杆菌属(*Ochrobactrum* sp.)^[13]、普罗维登斯菌(*Providencia*)^[14]等,真菌有酵母菌属^[15-17]、镰刀菌属^[18-19]、青霉菌属^[19]等。笔者从垃圾渗滤液中分离筛选出了一株具有降解高氨氮能力的菌株,并对其进行了种属的初步鉴定,且对该

菌株降解氨氮最适条件进行了研究,旨在为处理高浓度氨氮废水奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源。该试验筛选出的氨氮降解菌株所用的渗滤液来源于北京市南宫堆肥厂。

1.1.2 培养基。

(1)富集培养基。(NH₄)₂SO₄ 4.72 g, FeSO₄·7H₂O 0.4 g, K₂HPO₄ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.25 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, C₆H₅O₇·Na₃·2H₂O 39.0 g, 微量元素 1 mL, dH₂O 1 000 mL, 调 pH 6.8。

(2)筛选培养基。(NH₄)₂SO₄ 2.36 g, FeSO₄·7H₂O 0.4 g, K₂HPO₄ 1 g, KH₂PO₄ 0.25 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, C₆H₁₂O₆ 10.0 g, 微量元素 1 mL, dH₂O 1 000 mL, 调 pH 6.8。

(3)分离培养基。富集培养基中加入 20%琼脂。

(4)微量元素。EDTA·2Na 5 g, ZnSO₄·7H₂O 3.9 g, CaCl₂·2H₂O 7 g, MnCl₂·4H₂O 5.1 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 1.1 g, CuSO₄·5H₂O 1.6 g, CoCl₂·6H₂O 1.6 g, dH₂O 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化和筛选。取渗滤液 5 mL,加入到灭菌后的 100 mL 富集培养基中,恒温振荡培养(30 ℃, 180 r/min),连续富集 5 d,5 d 后以 1%的比例转接到新的富集培养基中,继续富集 5 d。富集之后,用稀释涂布平板法以 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 3 个梯度分别涂布于分离培养基,30 ℃倒置培

作者简介 张超(1983—),男,北京人,工程师,从事固废处理研究。
* 通讯作者,副教授,博士,硕士生导师,从事环保生物工程研究。

收稿日期 2018-09-06

养。用接种针挑出所有单菌落,以三线法在分离培养基上纯化4~5次,直至纯化出单一菌落,对所纯化出的所有单菌落进行编号,并进行氨氮降解的初步筛选,把氨氮去除效率高的单菌落保存于-80℃超低温冰箱中,备用。

1.2.2 菌株的形态特征及分子鉴定。把超低温冰箱保存的编号为H-1的菌株接种到筛选培养基中培养24h,以其菌液为模版用细菌扩增的通用引物27f和1492r扩增其16s rDNA序列,扩增之后用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,目标条带大小约1500bp,将扩增成功的PCR产物送到北京博迈德基因技术公司测序,测序结果出来之后在NCBI上进行序列比对,并用MEGA 5.0做相似性分析,构建菌株H-1的分子发育树。引物由北京博迈德基因技术公司合成,序列如下:27f 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3',1492R 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'。PCR反应体系为模板(菌液)0.5 μL,PCR mix 10.0 μL,引物各0.5 μL,水13.5 μL;PCR反应条件为94℃、5 min,94℃、30 s,58℃、30 s,72℃、30 s,72℃、10 min,4℃冷却,35个循环。

1.2.3 H-1菌株降解氨氮最适条件研究。研究氨氮初始浓度、可利用C源、C/N比、pH、接种量等条件下H-1菌株对氨氮转化的影响。具体操作如下:用接种环挑取H-1单菌落接种到装有100 mL筛选培养基中,置于28℃、180 r/min摇床中培养,每24 h取菌液检测其氨氮浓度,连续检测5 d,计算氨氮降解率。每一条件均设2个对照,3个平行样,自然pH为6.8。除最适氨氮浓度试验外,其他条件下氨氮初始浓度均为500 mg/L;除pH试验外,其他试验pH均为6.8;除C/N试验外,其他条件下C/N均为8:1;除可利用C源试验和接种量试验外,其他试验C源均为柠檬酸钠。氨氮初始浓度分别设500、750、1000、1250、1500 mg/L;pH分别设5.0、6.0、7.0、8.0、9.0;C/N分别设8:1、9:1、10:1、11:1、12:1;可利用C源试验分别设红糖、柠檬酸钠、葡萄糖、蔗糖、红糖/柠檬酸钠(4:1);接种量(菌液)分别设1%、3%、5%、7%、9%,C源为红糖/柠檬酸钠(4:1)。

氨氮的测定方法:参考国标《水质 氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法》(HJ 535—2009)。氨氮降解率= $[(C_{ck}-C_{样品})/C_{ck}]\times 100\%$,其中,C为氨氮含量(mg/L)。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态特征及分子鉴定

2.1.1 菌株的形态特征。H-1菌株在分离平板上培养24 h可观察到其凸起生长,菌体白色,湿润,边缘平滑无刺,突起生长,正反面颜色相同,继续培养24 h,可观察到菌落表面微泛黄。在显微镜下观察菌体细胞短杆状,革兰氏染色阴性(图1)。

2.1.2 分子鉴定。H-1菌株全长1379 bp,把测序结果在<http://archive-dtd.ncbi.nlm.nih.gov/>网站上进行序列比对,并用MEGA 5.0做相似性分析,构建菌株H-1的分子发育树(图2),发现该菌株与已登记*Citrobacter freundii*(CP016952.1)弗式柠檬酸杆菌序列同源性最高。因而确定该菌株为弗式柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)。将筛选得到的H-1菌株命名为弗式柠

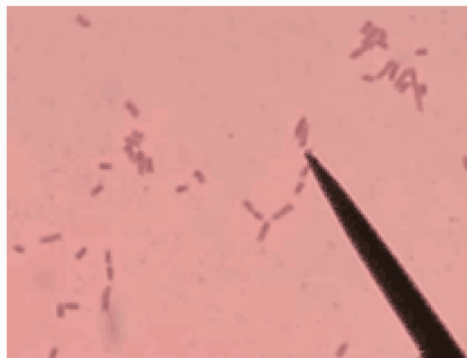


图1 H-1光学显微镜(革兰氏染色)

Fig.1 Optical micrographs of H-1 (Gram stain)

檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)H-1,简称H-1。

2.2 H-1菌株降解氨氮最适条件研究

2.2.1 最适氨氮初始浓度试验。不同的氨氧化菌对氨氮浓度的耐受程度不同,2006年Kim等^[20]和Joo等^[21]的研究均表明,高浓度氨氮会抑制氨氮降解菌及其他细菌的生长,影响氨氧化菌的活性,进而影响微生物对氨氮的去除,因此筛选出具有高效氨氮耐受性的菌株对实际应用具有重要的意义。

由图3可知,硫酸铵作为培养基中唯一的氮源,红糖作为唯一的C源,在氨氮初始浓度分别为500、750、1000、1250、1500 mg/L时,氨氮在第5天时的降解率分别是73.23%、57.17%、51.61%、45.47%和39.51%。表明氨氮初始浓度在500~1500 mg/L时,随着初始氨氮浓度的升高,氨氮降解率虽然不断下降,但其降解速率逐渐增高,说明高浓度的氨氮并未抑制该菌株对氨氮的降解,菌株的这种氨氮去除特性在实际工程应用中具有较强的潜力。

2.2.2 最适C/N试验。C/N是直接影响微生物的生长代谢和产物积累的重要因子之一,Taylor等^[14]研究不同C/N对*Providencia rettgeri* YL生长代谢和氨氮去除的影响发现,C/N为10时,氨氮的去除与C源的消耗达到最佳的平衡状态。因此合适的C/N对微生物的生长代谢及氨氮的去除效率都具有重要意义,该试验在富集和初筛时选用的C/N均为8:1,以此为基础逐渐增加C/N至12:1,以期选出最适的C/N,以优化该菌株对氨氮的降解能力。

从图4可以看出,当碳源为柠檬酸钠,硫酸铵为唯一N源时,氨氮初始浓度为500 mg/L时,C/N在8:1~12:1时H-1菌株对氨氮的降解效率几乎没有影响。推测可能该菌株对C源浓度需求不敏感,或者是C/N梯度设计距离较小,没有把C/N的差距拉开的原因。

2.2.3 最适pH试验。每种微生物都有其自身最适生长的pH,pH过高过低都会影响其生长代谢,进而影响微生物对氨氮的去除能力。由图5可知,当pH分别为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0时,其对氨氮的去除率分别为60.51%、66.6%、74.02%、66.84%、62.28%,该菌在pH为7.0的条件下,其降解率最高,但是当pH仅仅下降至6.5或升高至7.5时,其降解率明显下降,表明该菌株对pH的要求相对比较严格。

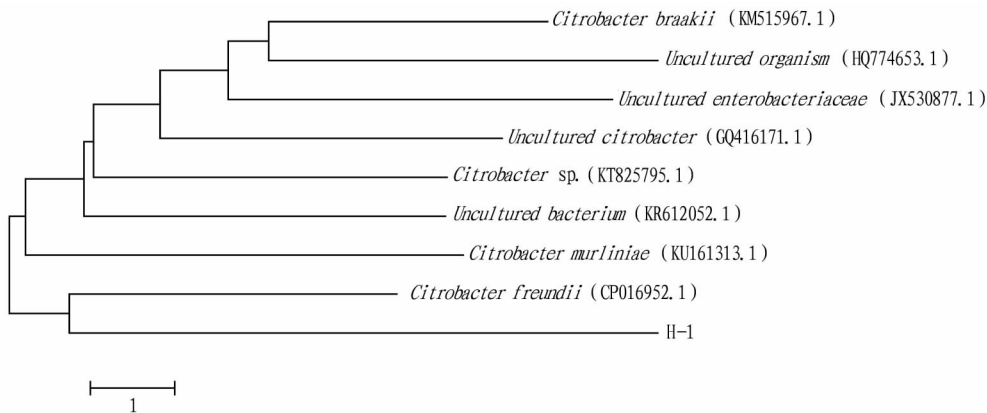


图2 H-1 菌株系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of H-1 strain

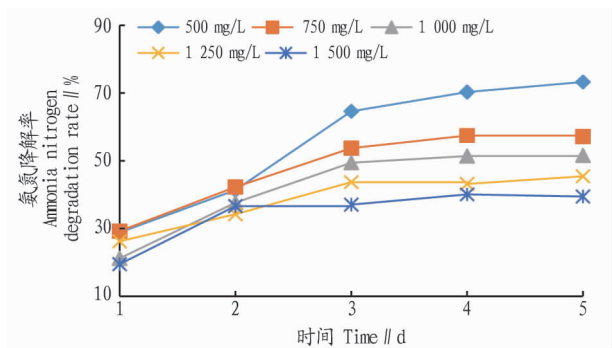


图3 氨氮初始浓度对菌株 H-1 氨氮降解率的影响

Fig.3 Effect of the initial concentration of NH₄⁺-N on ammonia nitrogen degradation rate of strain H-1

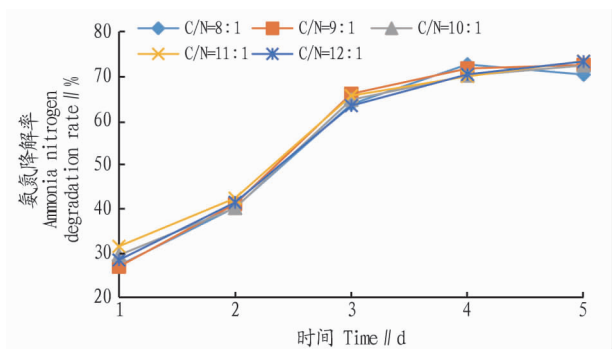


图4 C/N对菌株 H-1 降解率的影响

Fig.4 Effects of C/N on degradation rate of H-1 strain

2.2.4 可利用 C 源试验。微生物生命活动所需的能量及其细胞的碳架都需要碳源。合适的碳源能促进微生物的生长和代谢,进而提高微生物对氨氮降解的能力。从图 6 可以看出,该菌对柠檬酸钠、红糖、蔗糖、葡萄糖作为 C 源均能利用。当 C 源为柠檬酸钠时,其氨氮降解率最高,为 72.94%;其次是红糖,为 65.87%;葡萄糖的利用稍差,其降解率仅 55.95%;但当 C 源为红糖/柠檬酸钠(4:1)组合的复合 C 源时,在其他条件不变的情况下,其氨氮降解率提高至 80.02%。因此,菌株 H-1 对降解氨氮最适的 C 源是红糖/柠檬酸钠(4:1)复合 C 源。

2.2.5 最适接种量试验。接种量决定了菌株的繁殖速度,从

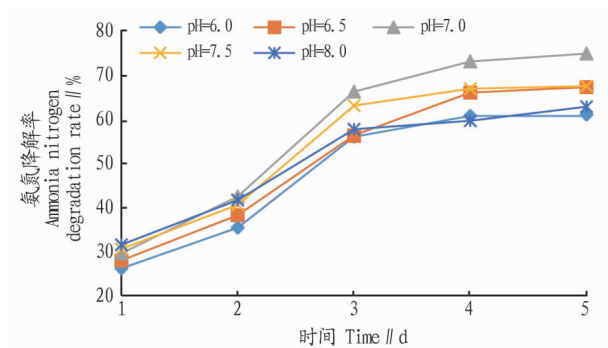


图5 pH对H-1 菌株降解率的影响

Fig.5 Effects of pH on degradation rate of H-1 strain

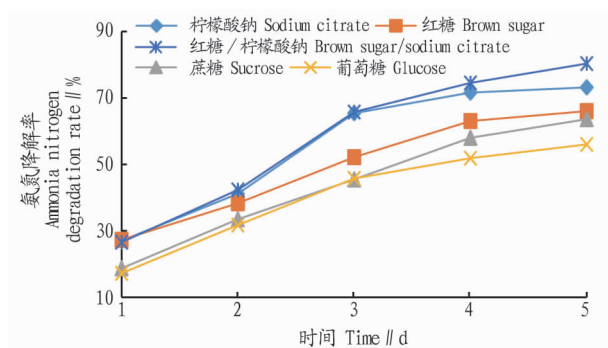


图6 碳源对 H-1 菌株降解率的影响

Fig.6 Effects of carbon sources on degradation rate of H-1 strain

图 7 可以看出,硫酸铵作为培养基中唯一的氮源,柠檬酸钠作为唯一的 C 源时,当初始氨氮浓度不变时,在接种 48 h 内,接种量在 5%~9% 时对氨氮的去除率要稍高于接种量为 1%~3%,但是当 64 h 后检测发现,接种量在 1%~3% 其对氨氮的去除率反而要高于接种量为 5%~9%。因此菌株 H-1 降解氨氮最适的接种量为 1%~3%。

3 结论与讨论

该试验从北京市南宫垃圾堆肥厂垃圾渗滤液中筛选出了一株降解氨氮的菌株,分子鉴定结果表明其属于弗式柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)属。

菌株 H-1 降解氨氮最适条件的研究表明,虽然当氨氮初始浓度为 500 mg/L 时,其降解率最高,达 73.23%,但是当

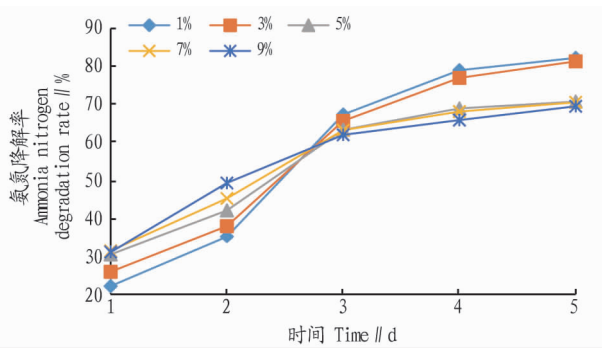


图7 接种量对H-1菌株氨氮降解率的影响

Fig.7 Effects of inoculum amount on degradation rate of H-1 strain

氨氮初始浓度在 500~1 500 mg/L 时,随着初始氨氮浓度的升高,氨氮降解率不断下降,其降解速率逐渐增高,说明高浓度的氨氮并未抑制该菌株对氨氮的降解,这与刘志云等^[15-16]的研究结果类似。刘志云等在研究粉状毕赤酵母 NGH 在不同初始氨氮浓度耐受性试验时表明,当初始浓度分别为 111.19、356.02、645.49、1 233.47 mg/L 时,菌株 NGH 在 24 h 内的氨氮降解率呈现下降趋势,氨氮降解速率却呈现上升趋势;研究克柔假丝酵母 LSA 时也发现,当氨氮初始浓度为 100、300、600、1 200 mg/L 时,菌株 LSA 在接种后 24 h 内的氨氮降解率呈现下降趋势,氨氮降解速率呈现上升趋势。刘志云等认为菌株的这种氨氮去除特性在实际工程应用中具有很大的潜力。当 C/N 在 8:1~12:1 时,菌株 H-1 对氨氮的降解效率几乎没有影响。李明堂等^[9]在研究耐冷约氏不动杆菌 DBP-3 时发现, C/N 从 8 增加至 10 时,氨氮的去除率并没有明显增加,但是当 C/N 从 4 增加至 8 时,菌株 DBP-3 对氨氮的去除率随着 C/N 的增加而明显增加。Kim 等^[20]将多株芽孢杆菌属的细菌在不同条件下进行混合培养,发现其氨氮去除率在 C/N 为 8 时明显高于 C/N 为 4 时。因此菌株 H-1 在 C/N 为 8:1~12:1 时对氨氮的降解效率没有影响,可能是 C/N 为 8:1~12:1 时都达到了氨氮的去除与 C 源的消耗互相平衡的状态,而考虑到实际生产中的成本问题,菌株 H-1 降解氨氮最适的 C/N 选为 8:1。菌株对 pH 要求相对严格,其最适的 pH 为 7.0。在已有的报道中,王涛等^[8]从土壤中分离出一株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) N9,其最适 pH 也为 7.0,而朱伟等^[4]从生活污水污泥中筛选出一株假单胞菌 (*Pseudomonas*) DX3 最适的 pH 为 7.5,喻其林等^[22]从鸡粪好氧堆肥分离出一株氨氧化青霉 (*Penicillium* sp.) M25-22,其最适 pH 为 8.0,这与微生物生存的环境有关,在不同环境中筛选的菌种是有一定差异的。菌株 H-1 降解氨氮最适的 C 源是红糖/柠檬酸钠(4:1)复合 C 源。菌株 H-1

降解氨氮最适的接种量为 1%~3%。在最适的条件下,当初始氨氮浓度为 500 mg/L,其对氨氮的最高降解率为 82.5%。

参考文献

- [1] 王桂琴,张红玉,王典,等.北京市城区生活垃圾组成及特性分析[J].环境工程,2018,36(4):132-136.
- [2] GUERRERO L A, MAAS G J, HOGLAND W, et al. Solid waste management challenges for cities in developing countries[J]. Waste management, 2013, 33(1): 220-232.
- [3] 陈雷.分析城市垃圾处理场对地下水的污染及其处理[J].化工中间体, 2015(10): 105-106.
- [4] 朱伟,李娜.高效氨氮降解菌的筛选·鉴定及降解能力的测定[J].安徽农业科学,2008,36(22):9361-9362,9474.
- [5] ZHANG J B, WU P X, HAO B, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001[J]. Biore-source technology, 2011, 102(21): 9866-9869.
- [6] ZHAO B, AN Q, HE Y L, et al. N_2O and N_2 production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR[J]. Biore-source technology, 2012, 116(4): 379-385.
- [7] ZHANG Q L, LIU Y, AI G M, et al. The characteristics of a novel hetero-trophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotro-phicus* strain L7[J]. Biore-source technology, 2012, 108(3): 35-44.
- [8] 王涛,贾源宾,张宁,等.一株氨态氮降解芽孢杆菌的筛选及降解能力初步研究[J].江苏农业学报,2012,28(4):765-770.
- [9] 李明堂,王玉军,赵淑杰,等.一株约氏不动杆菌对氨氮的低温去除特性研究[J].农业环境科学学报,2013,32(10):2055-2060.
- [10] 信欣,姚力,鲁磊,等.耐高氨氮异养硝化-好氧反硝化菌 TN-14 的鉴定及其脱氮性能[J].环境科学,2014,35(10):3926-3932.
- [11] CHEN P Z, LI J, LI Q X, et al. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24[J]. Biore-source technology, 2012, 116(13): 266-270.
- [12] 刘燕,甘莉,黄哲强,等.脱氮副球菌 YF1 的反硝化特性研究[J].水处理技术,2010,36(10):61-65.
- [13] 黄婧,吴若菁,陈彪,等.畜禽养殖污水中高效氨氮降解菌的筛选、鉴定及生长条件研究[J].环境工程学报,2011,5(8):1779-1784.
- [14] TAYLOR S M, HE Y L, ZHAO B, et al. Heterotrophic ammonium removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Providencia rettgeri* YL[J]. Journal of environmental sciences, 2009, 21(10): 1336-1341.
- [15] 刘志云,刘国华,蔡辉益,等.鸡粪中氨氮降解菌的分离鉴定及除氨适宜条件研究[J].中国农业科学,2016,49(6):1187-1195.
- [16] 刘志云,刘国华,谢庆,等.粉状毕赤酵母 NGH 的氨氮降解特性及除氨效果研究[J].家畜生态学报,2016,37(3):43-49.
- [17] 王震,刘标,陈薇,等.养殖污水中氨氮降解菌的分离、筛选及鉴定[J].江苏农业科学,2013,41(8):377-378.
- [18] 杨晓华.一株异养硝化好氧反硝化真菌的筛选及特性研究[D].太原:太原理工大学,2012.
- [19] 李伟斯.好氧反硝化真菌的筛选及其除氮特性研究[D].青岛:中国石油大学(华东),2013.
- [20] KIM D J, LEE D I, 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]. Biore-source technology, 2006, 97(3): 459-468.
- [21] JOO H S, HIRAI M, SHODA M. Improvement in ammonium removal efficiency in wastewater treatment by mixed culture of *Alcaligenes faecalis* No.4 and L1[J]. J Biosci Bioeng, 2007, 103(1): 66-73.
- [22] 喻其林,陈旭,黄明媛,等.一株异养氨氧化青霉 (*Penicillium* sp.) 特性研究[J].中国农业科学,2010,43(5):986-992.
- [12] 冯仕超,高小红,顾娟,等.基于 CLUE-S 模型的淮河流域土地利用空间分布模拟[J].生态学报,2013,33(3):985-997.
- [13] 傅伯杰,陈利顶.景观生态学原理及应用[M].北京:科学出版社,2001.
- [14] 邓祥征.土地利用转换分析[M].北京:中国大地出版社,2008.
- [15] 邓祥征,林英志,黄河清.土地系统动态模拟方法研究进展[J].生态学杂志,2009,28(10):2123-2129.
- [16] 邓祥征.土地系统动态模拟[M].北京:中国大地出版社,2009.

(上接第 52 页)