

一株青霉菌异养硝化和好氧反硝化特性的研究

赵中艳

(中国辐射防护研究院,山西 太原 030006)

摘要 :从活性污泥中分离出一株青霉菌,培养特性为中温好氧性。初步研究表明 :该菌株可利用多种含碳化合物及含氮化合物作为唯一碳源和氮源,并将含氮化合物转化为亚硝态氮,在好氧条件下,能还原硝酸盐,具有同步硝化和反硝化作用。在实验条件下,以铵盐作为反应底物,培养 24 h 后,溶液中 $\rho(\text{NO}_2^-)$ 为 $0.35 \mu\text{g/mL}$,对硝酸盐有较强的还原能力,24 ~ 72 h 培养后,溶液中的 $\rho(\text{NO}_2^-)$ 为 $3 \sim 5 \mu\text{g/mL}$ 在 $\text{pH} = 5 \sim 11$, 48 h 后对人工合成污水的氨氮去除率可达 90% ~ 97.7%。

关键词 :青霉菌 异养硝化 好氧反硝化

中图分类号 :Q93-3 **文献标识码** :A **文章编号** :1004-6933(2008)02-0073-03

Characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of a penicillium strain

ZHAO Zhong-yan

(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China)

Abstract : A penicillium strain was isolated from activated sludge under moderate temperature aerobic conditions. It was shown that many of the carbonaceous compounds and nitrogenous compounds were utilized as the sole source of C and N for the strain. The strain has the capabilities of simultaneous heterotrophic nitrification and denitrification ; that is, it can turn the nitrogenous compounds into nitrite nitrogen and deoxidize the nitrate under aerobic conditions. In the experiment in which ammonium compounds were the medium, the NO_2^- concentration reached $0.35 \mu\text{g/mL}$ after a 24-hour culture, and the liquid had strong reduction activity on the nitrate. When the solution was cultured for 24 ~ 72 hours, the NO_2^- concentration was $3 \sim 5 \mu\text{g/mL}$. The experimental results also showed that 90-97.7% of the ammonium-nitrogen in the artificial wastewater was removed when the solution was cultured for 48 hours and the pH was 5 ~ 11.

Key words : penicillium ; heterotrophic nitrification ; aerobic denitrification

近年来,国内外大量报道了在污水生物脱氮领域中的异养硝化和好氧反硝化现象,并陆续分离出一些相关菌株^[1-3]。结果表明,多数异养硝化菌同时也是好氧反硝化菌,具有同步硝化反硝化的独特功能。这一发现可能有助于解决传统生物脱氮工艺启动时间长、要求条件苛刻以及硝化与反硝化不能在同一个反应器中进行等缺点。本文研究了已分离出一株青霉菌的某些生物学特征及其异养硝化和好氧反硝化活性,以考察其潜在的推广应用前景。

1 实验材料和方法

1.1 材料及仪器

实验所用的各种试剂均为分析纯级试剂。

主要仪器 生化培养箱,LRH-250-11 型,广东省医疗器械厂生产 ;CTL 型化学需氧量速测仪,承德华通环保仪器厂生产。

1.2 实验方法

1.2.1 富集和分离

取太原市杨家堡污水处理厂活性污泥 10 g 于锥

形瓶中,加入 200 mL 无菌水,置于摇瓶机上振荡 30 min(120 r/min),静置 1 h 后吸取上清液 10 mL 接种于富集培养基,30℃、120 r/min 振荡培养 2~4 d,每 24 h 用格里斯试剂检测培养液中的 NO₂⁻,出现强阳性呈色反应者便可进行菌株的分离培养。

取自 NO₂⁻ 检出阳性的培养液,分别用稀释涂布法和原液直接画线法接种平板,于 30℃ 培养 24~48 h,每平板挑选 10 个菌落再接种于含铵盐的液体培养基中震荡培养,从 NO₂⁻ 阳性培养液中再作纯种分离。从初筛中选出一株青霉菌,作为实验用菌株,命名为 EC-3 菌株。

1.2.2 EC-3 菌株形态和培养特征观察

用玻璃纸透析培养法,于无菌的洁净载物玻片上倾注一薄层分离培养基,贴上一张无菌玻璃纸,于其上接种 EC-3 菌株,置 30℃ 湿盒中培养 24~48 h 后取下玻璃纸贴于载玻片上,染色观察形态 观察 EC-3 菌株在无机盐琼脂培养基和有机营养琼脂培养基及马铃薯培养基上生长特征及液体培养的生长特点;观察不同温度和不同 pH 值条件下菌株培养的生长以及耐盐试验。

1.2.3 EC-3 菌株对各种碳源和氮源的利用

以无机盐液体培养基为基础,分别加入各种碳源和指示剂,同时试管中放一倒置小管收集气体。测定 EC-3 菌株对糖类、醇类和有机酸的利用情况,以发酵过程产酸或产酸产气作为观察指标;对无机氮源与有机氮源的利用与否则以格里斯试剂测定培养液中出现 NO₂⁻ 为特定的判断依据。

1.2.4 EC-3 菌株的某些生化反应试验

分别配制试验 H₂S、吲哚、V.P 及接触酶的培养基,在 30℃ 培养 3~7 d 后测定 H₂S 和吲哚的生成、V.P 反应及接触酶反应。

1.2.5 EC-3 菌株的氨氧化活性试验

培养基以无机盐液体培养基为基础,加入氯化铵 1.0 g,醋酸钠 1.64 g,pH = 7.5。在每个三角锥形瓶分装 500 mL、高压蒸汽灭菌备用。按 v(2%)接入培养 8 h 活化的菌液,30℃ 通气培养 5 d,每隔 24 h 取样,用钠氏试剂光度法测定 ρ(NO₂⁻)。

1.2.6 EC-3 菌株的好氧反硝化活性试验

反硝化的试验底物为硝酸钾,按 w(0.1%)加入无机盐液体培养基中,pH = 7.5,培养条件和测试方法与 1.2.5 相同。

1.2.7 EC-3 菌株对人工合成污水的氨氮去除试验

人工合成污水水质指标为:ρ(COD_{Cr}) = 1300 mg/L,ρ(NH₃-N) = 63.0 mg/L,pH = 3~12,按 v(2%)接入 8 h 培养活化的菌液,通入过滤空气,培养 48 h 后,分别取样测定 NH₃-N 的去除率。

2 结果与讨论

2.1 EC-3 菌株的形态学和培养特征

在光学显微镜下进行形态观察,可见菌丝纵横交错,十分发达,横隔明显,孢子梗和分生孢子呈帚状排列,分生孢子为卵圆形和短链串生,具有青霉的典型形态特征(图 1)。因此,可将 EC-3 菌株初步鉴定为青霉菌属(*Penicillium SP.*)^[4]。EC-3 菌株可在无机或有机培养基上生长,但在有机培养基上的生长较快。在马铃薯蔗糖培养基上生长尤为茂盛,呈毛茸茸的黄褐色菌苔 在缺氧条件下液体培养时,液面上形成一层柔韧而丰厚的菌膜。生长温度为 15~45℃,最适温度为 30~40℃,60℃ 以上为致死温度 可在 pH = 3~12 的条件下生长,但最适 pH 值为 6~9,可耐受 v(7%)高盐(NaCl)的培养条件。以上实验结果表明,EC-3 菌株为中温需氧性,对不同温度和 pH 值有较强的适应能力。

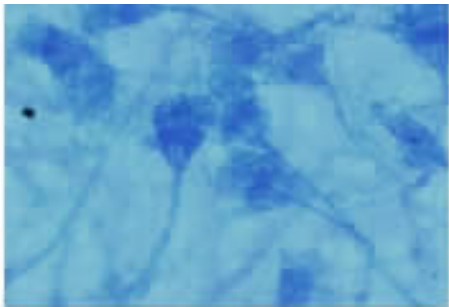


图 1 EC-3 菌株的形态特征

2.2 EC-3 菌株对各种碳源的利用

用于试验的 18 种碳源中有 14 种可以被 EC-3 菌株利用,说明其营养物来源十分广泛,可预示其在污水处理中有广阔的应用前景。具体实验结果见表 1。

表 1 EC-3 菌株对含碳化合物的利用情况

碳化合物	发酵过程		碳化合物	发酵过程	
	产酸(+)	产酸并产气(⊕)		产酸(+)	产酸并产气(⊕)
葡萄糖	+		甘油		⊕
乳糖		⊕	乙醇	+	
麦芽糖		⊕	甲醇	-	-
甘露糖		⊕	异丁醇	-	-
蔗糖	+		草酸铵	+	
木糖		⊕	丙酮酸钠		⊕
淀粉		⊕	酒石酸	-	-
甘露醇		⊕	柠檬酸	-	
山梨醇		⊕	氨基乙酸	+	

注:- 代表不产酸、不产气。

2.3 EC-3 菌株对各种氮源的利用

本项选用 14 种含氮化合物试验 EC-3 菌株的分解利用情况,以生成产物 NO₂⁻ 为特定的检测指标。试验结果表明,14 种含氮化合物均能作为唯一氮源被 EC-3 菌株利用,并转化为亚硝态氮。具体试验结

果见表 2。

表 2 EC-3 菌株对含氮化合物的利用情况

含氮化合物名称	检出 NO ₂ ⁻	含氮化合物名称	检出 NO ₂ ⁻	含氮化合物名称	检出 NO ₂ ⁻
硫酸铵	+	柠檬酸氢二铵	+	蛋白胨	+
氯化铵	+	氨基甲酸乙酯	+	尿 素	+
硫氰酸铵	+	硫酸亚铁铵	+	苯丙氨酸	+
溴化铵	+	磷酸氢钠铵	+	二苯胺	+
乙酰胺	+	乙酸铵	+		

2.4 EC-3 菌株的某些生化反应试验结果

某些细菌可分解含硫氨基酸而生成 H₂S,产生恶臭气味,水体中的 H₂S 积累到一定浓度时,对金属有腐蚀作用。本菌株能利用胱氨酸或半胱氨酸,但没有生成 H₂S 这种有毒产物 吲哚试验反应为阳性、接触酶试验反应为阳性、V.P 试验为阴性反应。

2.5 EC-3 菌株氨氧化活性试验结果

该菌株在培养 10 h 后,用格里斯试剂便可测到培养液中有微量的 NO₂⁻ 出现 培养 24 h 后, $\rho(\text{NO}_2^-)$ 为 0.011 $\mu\text{g/mL}$,随培养时间的延长呈上升趋势。培养至 120 h 后, $\rho(\text{NO}_2^-)$ 为 0.057 $\mu\text{g/mL}$,见图 2。EC-3 菌株还能将有机氮直接转化成亚硝态氮,这是许多异养硝化菌共同具有的独特生理生化功能。某些菌株在氨氧化过程中,仅形成少量的 NO₂⁻ 积累,主要转化成气态氮逸出。培养基的碳源含量对本菌株的氨氧化作用有直接的影响。当质量分数超过 0.5% 以上时,不利于氨氧化进行,在培养基中测不到 NO₂⁻ 存在,但菌株却生长迅速,生物量猛增,胡宝兰等^[5] 也报道了类似的现象,说明培养基的营养主要被用于合成代谢,也是菌株生长所需主要能源的来源。

2.6 EC-3 菌株的好氧反硝化活性试验结果

EC-3 菌株好氧反硝化活性试验结果见图 3 所

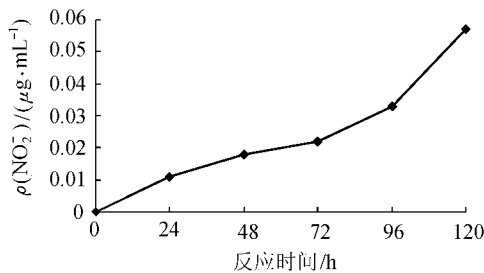


图 2 EC-3 菌株的氨氧化活性试验结果

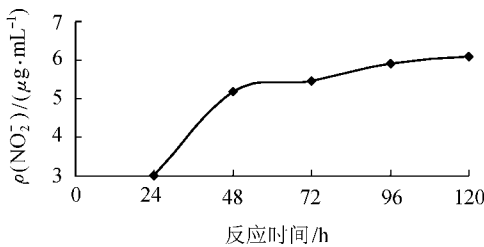


图 3 EC-3 菌株好氧反硝化活性试验结果

示。在培养 5 h 便可用格里斯氏试剂测出微量的 NO₂⁻ 存在 ;24 ~ 48 h 后,溶液中 $\rho(\text{NO}_2^-) = 3 \sim 5 \mu\text{g/mL}$ 96 ~ 120 h 趋于平稳, $\rho(\text{NO}_2^-)$ 为 6 $\mu\text{g/mL}$ 左右。传统生物脱氮理论认为,反硝化作用只能在缺氧情况下产生,有氧存在时,细菌以分子氧而不是以硝酸根的结合态氧为受体,所以反硝化酶系统不能启动。但近年来对好氧反硝化细菌的研究发现,O₂ 和 NO₃⁻ 均可作为电子受体而不影响反硝化细菌的呼吸酶和反硝化酶系统的活力及酶的合成。缺少 O₂ 和 NO₃⁻ 都可能导致细菌生长和反硝化速率的降低^[6],异养硝化和好氧反硝化细菌的发现为生物脱氮技术提供了崭新的思路。

2.7 EC-3 菌株对人工合成污水氨氮的去除

EC-3 菌株对人工合成污水氨氮的去除情况见图 4。pH = 3 ~ 5 时,对氨氮去除率有明显影响,在培养 48 h 后,其去除率分别为 36.8% 和 68.2%,这是与在此 pH 条件下 EC-3 菌株的生长速率较低有直接关系。pH = 5 ~ 11,培养 48 h 后,氨氮的去除率稳定在 90% 以上,最高可达到 97.7%。在这一酸碱度范围内,菌株的生长繁殖没有明显受阻。在 pH = 12 条件下,对菌株生长速率影响较大,氨氮的去除率也随之下降到 60.1%。

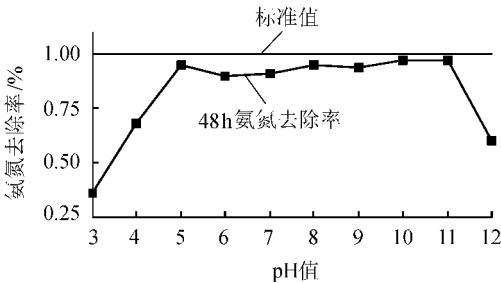


图 4 EC-3 菌株对人工合成废水氨氮去除率的试验结果

参考文献：

[1] VERSTRAETE W, ALEXANDER M. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp [J]. *Bacteriology*, 1972, 110(3) : 955-961.

[2] 温东辉, 唐孝炎. 异氧硝化及其在污水脱氮中的作用 [J]. *环境污染与防治*, 2003, 25(5) : 283-285.

[3] 李平, 张山, 刘德立. 细菌好氧反硝化研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2005, 25(1) : 60-64.

[4] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海 : 上海科学技术出版社, 1979 : 135-127.

[5] 胡宝兰, 郑平, 武小鹰, 等. 一株氨氧化链霉菌的分类鉴定及其氨氧化特性的研究 [J]. *微生物学报*, 2005, 45(3) : 321-324.

[6] ROBERTSON L A, KUENEN J G. Aerobic denitrification : a controversy revived [J]. *Arch Microbiol*, 1984, 139 : 351-354.

(收稿日期 2007-01-20 编辑 高渭文)