

## 1 株异养硝化-好氧反硝化神户肠杆菌的鉴定及脱氮特性

胡丹<sup>1,2</sup>, 何富强<sup>1</sup>, 杜全能<sup>3</sup>, 王刚<sup>4</sup>, 兰时乐<sup>1\*</sup> (1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128; 2. 湖南省微生物研究院, 湖南长沙 410009; 3. 广东海大集团股份有限公司海大研究院, 广东广州 511400; 4. 湖南华君农业科技有限公司, 湖南益阳 413000)

**摘要** [目的] 鉴定 1 株异养硝化-好氧反硝化神户肠杆菌, 明确其脱氮特性。[方法] 从养殖池塘底泥中筛选到 1 株异养硝化-好氧反硝化菌 HD-NAH, 经形态学观察、生理生化试验以及 16S rDNA 序列分析, 鉴定为神户肠杆菌 (*Enterobacter kobei*) HD-NAH, 并研究其脱氮特性。[结果] 该菌在以柠檬酸钠为碳源, C/N 为 18, 初始 pH 为 7, 温度为 27 °C, 转速为 190 r/min 时, 24 h 亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)和总氮(TN)降解率分别为 99.98% 和 89.37%, 具有较高的降解效率。菌株在初始 pH 为 7~10, 温度为 27~37 °C, 转速为 130~210 r/min 时, 对 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 TN 的降解率均较高, 表明该菌株的环境适应性较强。在不同氮源条件下, 菌株 HD-NAH 对氮的去除存在差异, 其对 TN 去除率表现为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N+NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, 还存在一定短程异养硝化-好氧反硝化过程。[结论] 菌株 HD-NAH 良好的脱氮特性可为养殖废水除氮提供可选择材料。

**关键词** 神户肠杆菌 HD-NAH; 异养硝化; 好氧反硝化; 脱氮特性

中图分类号 X172 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)10-0070-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.10.018



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Identification of a Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrifying Bacterium and Its Removal Characteristics of Nitrogen

HU Dan<sup>1,2</sup>, HE Fu-qiang<sup>1</sup>, DU Quan-neng<sup>3</sup> et al (1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128; 2. Hunan Institute of Microbiology, Changsha, Hunan 410009; 3. Haida Research Institute of Guangdong Haida Group Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong 511400)

**Abstract** [Objective] To identify a heterotrophic nitrification-aerobic denitrifying bacterium, and clarify its denitrification characteristics. [Method] A heterotrophic nitrification-aerobic denitrifying bacterium was screened from the sludge of aquaculture pond, was named as HD-NAH. The strain was identified as *Enterobacter kobei* by morphological observation, physiological and biochemical tests, and 16S rDNA sequence analysis. The removal characteristics of nitrite nitrogen and total nitrogen by HD-NAH were studied. [Result] The results showed that degradation rate of nitrite nitrogen and total nitrogen by strain HD-NAH were 99.98% and 89.37% respectively, under the conditions of trisodium citrate as the sole carbon source, C/N 18, pH 7, appropriate culture temperature 27 °C and shaking speed 190 r/min. The strain HD-NAH had preferable degradation rate of nitrite nitrogen and total nitrogen under pH 7~10, temperature 27~37 °C, and shaking speed 130~210 r/min, it means that strain HD-NAH has strong environmental adaptability. The degradation rate of nitrite nitrogen and total nitrogen were measured under different nitrogen source, the rate was arranged as: NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N+NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. The strain showed a certain short-range heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process. [Conclusion] It provided an alternative material for the denitrification of aquaculture wastewater basing on good denitrification characteristics of the strain HD-NAH.

**Key words** *Enterobacter kobei* HD-NAH; Heterotrophic nitrification; Aerobic denitrification; Denitrification characteristics

水体氮元素的大量累积会造成水体富营养化和生态失衡等一系列问题, 严重威胁水生生物的生存和健康, 制约我国养殖业的持续发展。在处理水体氮污染过程中, 微生物起着重要作用, 可通过氨化、硝化和反硝化等过程减少水体中的氮含量, 从而达到脱氮目的<sup>[1]</sup>。传统认为微生物的硝化和反硝化是 2 个独立的过程, 直到 1984 年, Robertson 等<sup>[2]</sup>发现一种能进行异养硝化-好氧反硝化的脱氮副球菌 (*Paracocci denitrificans*), 并提出了异养硝化-好氧反硝化的概念。异养硝化-好氧反硝化细菌可在有氧条件下利用有机碳源和有机氮源进行生长, 在降低有机物含量的同时, 利用自发反应去除水体中有毒的氨氮与亚硝酸盐氮, 且除氮率高、除氮速率快, 避免了二次污染, 受到广泛关注<sup>[3-5]</sup>。

异养硝化-好氧反硝化细菌的发现, 为生物脱氮提供了新的研究方向。近年来, 许多研究者从自然界分离了诸多异养硝化-好氧反硝化菌并对其脱氮进行了研究, 包括假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)<sup>[6]</sup>、无色杆菌 (*Achromobacter* sp.)<sup>[7]</sup>、芽

孢杆菌 (*Bacillus* sp.)<sup>[8]</sup>、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)<sup>[9]</sup> 和农杆菌属 (*Agrobacterium* sp.)<sup>[10]</sup> 等细菌及皱褶念珠菌 (*Debaryomyces hansenii*)<sup>[11]</sup> 等真菌。一些细菌在实际水体的应用中取得了良好效果, 如魔鬼弧菌 (*Vibrio diabolus*) SF16 对含盐废水的氨氮和总氮去除率分别达到 97.14% 和 73.92%<sup>[12]</sup>, *Acinetobacter* sp. T1 能够明显提高养猪场废水中的氮去除率<sup>[13]</sup>。因此, 筛选出更多高效除氮的菌种资源, 对于利用微生物进行氮污染环境修复有着重要意义。该研究从淡水养殖池塘底泥中分离到 1 株高效异养硝化-好氧反硝化菌株 HD-NAH, 经形态学观察、生理生化试验并结合 16S rDNA 序列分析, 鉴定为神户肠杆菌, 目前有关该菌用于生物脱氮方面的研究鲜见报道。笔者进一步探讨了该菌株异养硝化-好氧反硝化的影响因素, 以期为该菌株 HD-NAH 应用于淡水养殖废水的除氮处理提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 菌种分离样品。** 采集于湖南省长沙市东湖养殖场池塘底泥, 装于无菌玻璃瓶中, 迅速带回实验室进行富集培养和菌株分离。

**1.1.2 培养基。** 牛肉膏蛋白胨培养基: 牛肉膏 10.0 g/L, 蛋白

**基金项目** 湖南省重点研发项目 (2016NK2103); 湖南创新型省份建设经费资助项目 (2020NK2029)。

**作者简介** 胡丹 (1989—), 女, 湖南桃江人, 助理工程师, 硕士, 从事环境重金属检测研究。\* 通信作者, 副教授, 从事微生物资源利用研究。

**收稿日期** 2021-07-06

胨 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, pH 自然。加入 2% 琼脂, 制成斜面培养基。反硝化培养基: 柠檬酸钠 9.0 g/L, NaNO<sub>2</sub> 0.6 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, 1% 溴麝香草酚蓝 (Bromothymol Blue, BTB) 1.0 mL/L, 琼脂 2%, pH 7.0。基础脱氮培养基: 成分同反硝化培养基, 不添加 1% BTB 和琼脂。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 菌种的富集与初筛。**称取 10 g 池塘底泥于 100 mL 牛肉膏蛋白胨培养基中, 32 °C 170 r/min 摇床中富集培养 72 h 后, 按 10 倍稀释法将富集液稀释至 10<sup>-8</sup>。分别取最后 3 个稀释度的稀释液 0.1 mL 涂布于反硝化固体培养基平板上, 32 °C 恒温培养箱中培养至长出单菌落后, 挑取不同形态的单菌落进行纯化并编号。

**1.2.2 菌种复筛。**将分离纯化的菌种分别接种于牛肉膏蛋白胨培养基中, 32 °C 170 r/min 条件下振荡培养 24 h 后, 离心收集菌体, 使用基础脱氮培养基洗涤菌体 2 次, 等体积基础脱氮培养基悬浮菌体, 按 1% (V/V) 接种量分别接种于基础脱氮培养基中, 32 °C 170 r/min 条件下振荡培养 48 h 后, 测定菌株对亚硝氮 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) 的去除率。

**1.2.3 菌种鉴定。**参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[14]</sup>, 对菌株 HD-NAH 的菌落和菌体形态进行观察并分析菌株的常规生理生化指标。采用 DNA 提取试剂盒 (SK8257, 上海生工生物工程股份有限公司) 提取菌株的基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 16S rDNA 序列。PCR 体系 (25 μL): 10×Buffer (Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, dNTP 1 μL, Taq 酶 0.2 μL, 引物 27F (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG - 3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT - 3') 各 0.5 μL, 模板 0.5 μL, 用无菌 ddH<sub>2</sub>O 定容至 25 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 循环 35 次, 72 °C 延伸 10 min。测序后将 16S rDNA 序列提交至 NCBI, 使用 Blastn 检索比对, 用 MEGA 7.0.26 软件的邻位连接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, bootstrap 自展 1 000 次检验。

**1.2.4 菌株 HD-NAH 脱氮特性研究。**采用单因素试验法, 分别改变基础脱氮培养基的碳源种类 (柠檬酸钠、碳酸钠、丁二酸钠、酒石酸钠和蔗糖)、C/N (2、6、10、14、18、22)、初始 pH (6、7、8、9、10)、温度 (22、27、32、37、42 °C)、摇床转速 (130、150、170、190、210 r/min) 和氮源种类 (121.74 mg/L NH<sub>4</sub>Cl、121.74 mg/L NaNO<sub>3</sub>、121.74 mg/L NaNO<sub>2</sub>、60.87 mg/L NH<sub>4</sub>Cl+60.87 mg/L NaNO<sub>3</sub>、60.87 mg/L NH<sub>4</sub>Cl+60.87 mg/L NaNO<sub>2</sub>), 探讨不同条件下菌株 HD-NAH 的脱氮性能。

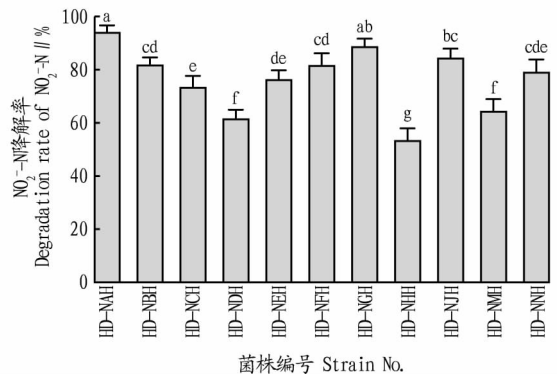
**1.2.5 测定方法。**参照文献 [15] 中的方法测定发酵液上清液中氨氮 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)、亚硝氮 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)、硝态氮 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) 和总氮 (TN) 含量。

**1.2.6 数据处理。**使用 GraphPad Prism 8.0.1 对数据进行处理。采用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行 one-way ANOVA 分析和 Tukey's HSD 检验 (P<0.05)。

## 2 结果与分析

**2.1 菌种的筛选** 从养殖水体底泥中筛选菌种, 通过富集和

平板分离, 共获得 11 株具有反硝化能力的菌株, 分别命名为 HD-NAH、HD-NBH、HD-NCH、HD-NDH、HD-NEH、HD-NFH、HD-NGH、HD-NHH、HD-NJH、HD-NMH、HD-NNH。将分离的 11 株菌株分别接种至牛肉膏蛋白胨培养基, 32 °C 170 r/min 振荡培养 24 h 后, 按 1% (V/V) 的接种量接入基础发酵培养基中, 同样条件下发酵 48 h, 测定发酵液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 含量。从图 1 可见, 分离筛选的 11 株细菌均具有 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的降解能力, 菌株 HD-NAH 对 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的去除率最大, 达到 94.36%。因此, 选择该菌株进行后续研究。



注: 不同柱上不同小写字母表示处理间显著差异 (P<0.05)

Note: Different lowercase letters on different columns indicate significant differences between treatments (P<0.05)

图 1 不同菌株对 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的降解能力

Fig.1 Degradation ability of different bacteria to NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N

## 2.2 菌株 HD-NAH 鉴定

**2.2.1 菌株形态观察。**菌株 HD-NAH 在反硝化培养基上培养 24 h 后的菌落形态为圆形, 较小, 白色, 表面湿润光滑, 边缘整齐, 半透明; 显微镜下细菌形态特征呈短杆状、无芽孢, 周生鞭毛。

**2.2.2 生理生化指标。**菌株 HD-NAH 的半乳糖、V-P 反应、硝酸盐还原、亚硝酸盐还原发酵为阳性; 麦芽糖、MR 反应、水解淀粉、吡啉和纤维素水解发酵为阴性 (表 1)。该菌株的生理生化特征与《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[14]</sup> 中的肠杆菌属基本一致。

表 1 菌株 HD-NAH 生理生化指标

Table 1 Physiological and biochemical indicators of strain HD-NAH

序号 No.	生理生化项目 Physiological and biochemical project	结果 Result
1	半乳糖	+
2	麦芽糖	-
3	MR 反应	-
4	V-P 反应	+
5	水解淀粉	-
6	硝酸盐还原	+
7	亚硝酸盐还原	+
8	吡啉	-
9	纤维素水解	-

注: “+” 为阳性, “-” 为阴性

Note: “+” means positive, “-” means negative

**2.2.3 16S rDNA 序列及系统发育树的构建。**使用通用引物 27F/1492R 对菌株 HD-NAH 的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,在 1 500 bp 处有明显条带(图 2A),长度为 1 475 bp。Blast 比对分析后采用 MEGA 7.0.26 软件对

选取的序列进行系统发育树构建,结果见图 2B。菌株 HD-NAH 与神户肠杆菌 STW0522-51 及 *Enterobacter kobei* strain WCHEK045523 的亲缘关系最近。结合形态学和生理生化试验结果,将菌株 HD-NAH 鉴定为神户肠杆菌。

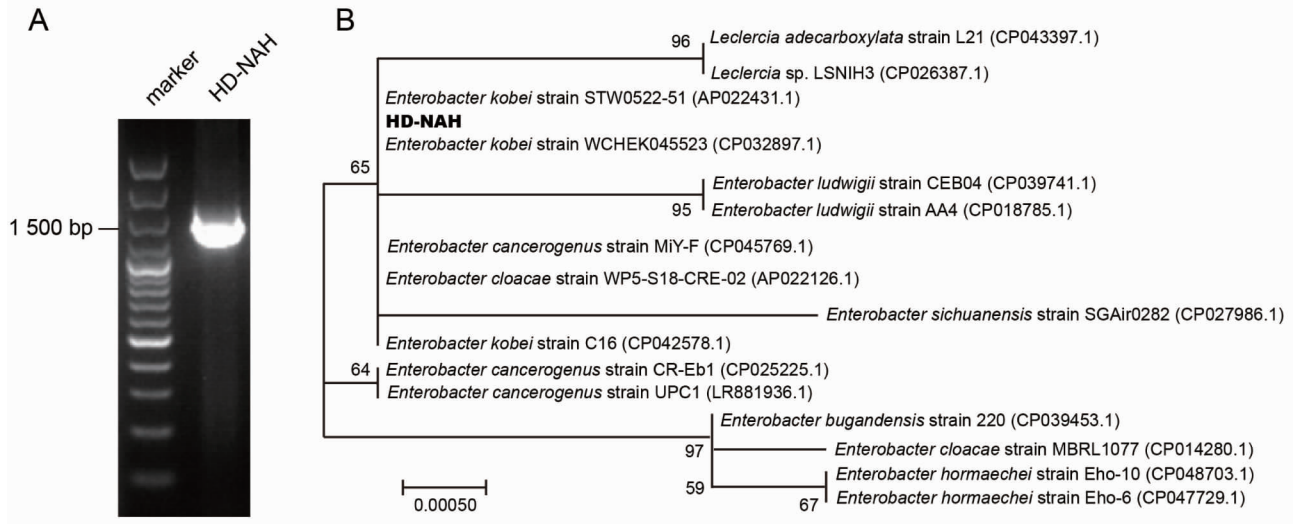


图2 PCR 扩增 HD-NAH 菌株的 16S rDNA (A) 及基于 16S rDNA 序列的系统进化树 (B)

Fig.2 PCR amplification of 16S rDNA of HD-NAH strains (A) and phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences (B)

## 2.3 菌株 HD-NAH 脱氮特性

**2.3.1 碳源对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响。**从图 3 可见,不同碳源对菌株 HD-NAH 的  $\text{NO}_2^-$ -N、TN 降解率存在显著影响( $P < 0.05$ )。以柠檬酸钠为碳源时, $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率最高,分别为 75.21% 和 57.23%。因此,选择柠檬酸钠为碳源进行后续脱氮特性研究。

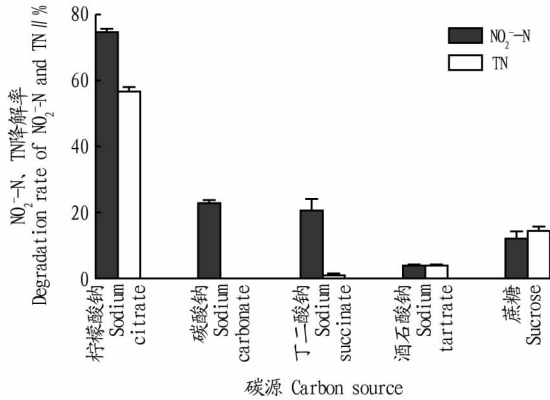


图3 不同碳源对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响

Fig.3 Effects of different carbon sources on the nitrogen removal characteristics of strain HD-NAH

**2.3.2 C/N 对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响。**通过改变培养基中碳源的含量,测定了菌株在 6 种不同 C/N 条件下的脱氮情况。结果表明(图 4),C/N 对菌株脱氮具有显著影响( $P < 0.05$ )。C/N 在 6~18 时, $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率随着 C/N 的升高而增加;在 C/N 为 18 时, $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率均达到最高,分别为 91.56% 和 66.95%;C/N 大于 18 时, $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率均下降。因此,选择 C/N 为 18 进行后续试验。

**2.3.3 初始 pH 对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响。**培养基

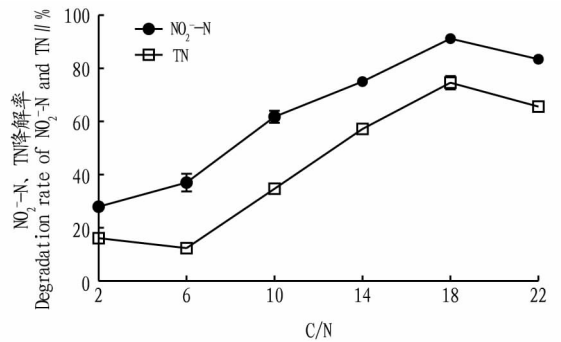


图4 C/N 对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响

Fig.4 Effects of C/N on the denitrification characteristics of strain HD-NAH

pH 主要影响生物的细胞膜电荷量、细胞膜通透性以及营养物质吸收。从图 5 可知,菌株在中性和碱性环境( $\text{pH} \geq 7$ )对  $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率明显高于酸性环境( $\text{pH}$  为 6)。在  $\text{pH}$  为 7~10 时, $\text{NO}_2^-$ -N 的降解率均超过 93.01%。初始  $\text{pH}$  为 7 时, $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率最佳,分别为 95.66% 和 79.43%。但当  $\text{pH}$  高于 9 时, $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率反而下降。以上结果说明菌株 HD-NAH 对中性和碱性环境具有较广的适应性,在  $\text{pH}$  7~10 对氮具有较高的去除率,因此后续选择  $\text{pH}$  为 7 进行试验。

**2.3.4 培养温度对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响。**温度主要影响酶促反应速率、细胞膜的流动性和营养物质的离子化程度,从而影响微生物代谢产物的合成。从图 6 可见,菌株 HD-NAH 具有较广的脱氮温度适应性,在 27~37  $^{\circ}\text{C}$  时,对  $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率无显著差异( $P > 0.05$ ),27  $^{\circ}\text{C}$  为最佳氮去除温度, $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率分别达到 99.95% 和 84.64%。当温度低于 27  $^{\circ}\text{C}$  或高于 37  $^{\circ}\text{C}$  时, $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率下

降。因此,选择培养温度为 27 °C 进行后续试验。

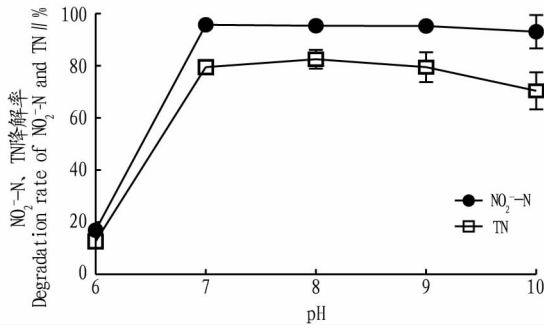


图 5 初始 pH 对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响

Fig.5 Effects of initial pH on the nitrogen removal characteristics of the strain HD-NAH

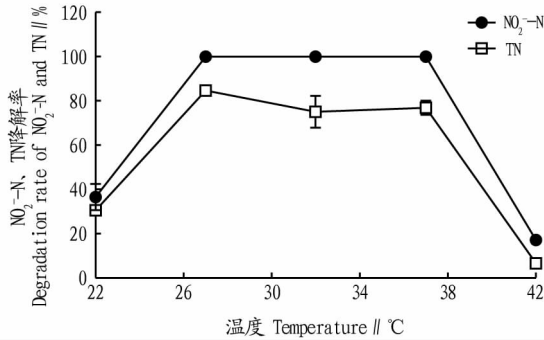


图 6 培养温度对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响

Fig.6 Effects of incubation temperature on the denitrification characteristics of strain HD-NAH

**2.3.5 摇床转速对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响。**摇床转速主要影响培养过程的溶氧量。从图 7 可见,摇床转速在 130~210 r/min 时,菌株对 TN 的降解率无显著影响( $P>0.05$ ),TN 的降解率在 81.75%~89.37%;转速为 150~210 r/min 时,菌株对  $\text{NO}_2^-$ -N 的降解率也无显著影响( $P>0.05$ ), $\text{NO}_2^-$ -N 的降解率均超过 99.90%;当摇床转速为 190 r/min 时, $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率均为最高,分别达 99.98%和 89.37%。

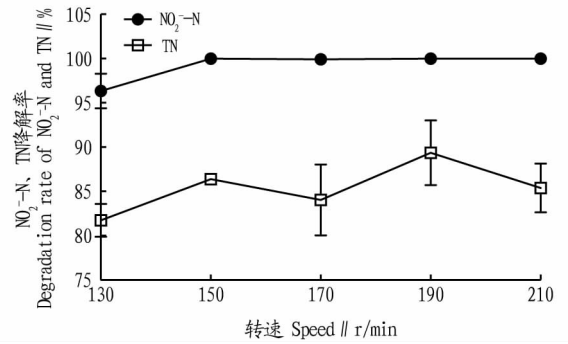


图 7 转速对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响

Fig.7 Effects of rotational speed on the nitrogen removal characteristics of strain HD-NAH

**2.3.6 氮源种类对菌株 HD-NAH 脱氮特性的影响。**由表 2 可知,在以  $\text{NH}_4^+$ -N 为唯一氮源时, $\text{NH}_4^+$ -N 的去除率达到 87.68%,平均降解速率为 4.45 mg/(L·h),TN 去除率为 70.43%,且  $\text{NO}_3^-$ -N 残留浓度仅 2.90 mg/L。以  $\text{NO}_3^-$ -N 为唯一氮源时, $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率为 74.50%,平均除氮速率为 3.78 mg/(L·h),TN 去除率为 69.59%,且  $\text{NO}_2^-$ -N 积累较少,仅 5.23 mg/L。以  $\text{NO}_2^-$ -N 为唯一氮源时, $\text{NO}_2^-$ -N 的去除率为 99.84%,平均除氮速率为 5.06 mg/(L·h),TN 去除率为 91.60%,且  $\text{NO}_2^-$ -N 残留浓度为 1.10 mg/L。以  $\text{NH}_4^+$ -N +  $\text{NO}_3^-$ -N 为混合氮源, $\text{NH}_4^+$ -N 去除率为 83.65%,平均除氮速率为 2.12 mg/(L·h), $\text{NO}_3^-$ -N 去除率为 96.63%,平均除氮速率为 2.45 mg/(L·h),TN 去除率为 88.45%;以  $\text{NH}_4^+$ -N +  $\text{NO}_2^-$ -N 为混合氮源的条件下, $\text{NH}_4^+$ -N 去除率为 83.21%,平均除氮速率为 2.11 mg/(L·h), $\text{NO}_2^-$ -N 去除率为 96.34%,平均除氮速率为 2.44 mg/(L·h),TN 去除率为 89.29%。以上结果表明,单一氮源时,菌株对  $\text{NO}_2^-$ -N 的去除速率和去除率最高,对  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除速率和去除率最低。对 TN 的去除速率和去除率表现为  $\text{NO}_2^-$ -N >  $\text{NH}_4^+$ -N +  $\text{NO}_2^-$ -N >  $\text{NH}_4^+$ -N +  $\text{NO}_3^-$ -N >  $\text{NH}_4^+$ -N >  $\text{NO}_3^-$ -N。

表 2 菌株 HD-NAH 对不同氮源的去除情况

Table 2 Removal of different nitrogen sources by strain HD-NAH

氮源 Nitrogen source	氮残留浓度 Nitrogen residue concentration // mg/L				去除速率 Removal rate // mg/(L·h)				去除率 Removal rate // %			
	$\text{NH}_4^+$ -N	$\text{NO}_3^-$ -N	$\text{NO}_2^-$ -N	TN	$\text{NH}_4^+$ -N	$\text{NO}_3^-$ -N	$\text{NO}_2^-$ -N	TN	$\text{NH}_4^+$ -N	$\text{NO}_3^-$ -N	$\text{NO}_2^-$ -N	TN
$\text{NH}_4^+$ -N	15.00	2.90	15.30	36.00	4.45	—	—	3.57	87.68	—	—	70.43
$\text{NO}_3^-$ -N	1.00	31.05	5.23	37.01	—	3.78	—	3.53	—	74.50	—	69.59
$\text{NO}_2^-$ -N	1.60	5.00	1.10	10.23	—	—	5.06	4.65	—	—	99.84	91.60
$\text{NH}_4^+$ -N + $\text{NO}_3^-$ -N	9.95	2.05	2.33	14.06	2.12	2.45	—	4.49	83.65	96.63	—	88.45
$\text{NH}_4^+$ -N + $\text{NO}_2^-$ -N	10.22	0.90	2.23	13.03	2.11	—	2.44	4.53	83.21	—	96.34	89.29

### 3 讨论

菌株 HD-NAH 以柠檬酸钠为唯一碳源时具有较好的脱氮性能,而以碳酸钠、丁二酸钠、酒石酸钠和蔗糖为碳源时, $\text{NO}_2^-$ -N 和 TN 的降解率均很低,这与 *P.stutzeri* HJ-7 结果一致,该菌以柠檬酸钠为唯一碳源时,30 h 能去除水体中全部

氨氮<sup>[16]</sup>。但与其他研究中的一些菌株有差异,如 *P.stutzeri* YG-24 在以蔗糖为唯一碳源进行反硝化过程中对  $\text{NO}_2^-$ -N 的去除效果最好<sup>[17]</sup>,*P.putida* HJH1 和 *Klebsiella oxytoca* HJH2 以甘油作为唯一碳源时,对  $\text{NO}_2^-$ -N 的降解率最高<sup>[18]</sup>。可见,碳源种类对菌株的脱氮性能影响较大。

在 C/N 低于 6 时,菌株 HD-NAH 对  $\text{NO}_2^-$ -N 的降解率均很低,这是由于过低的碳源难以以为细菌的生存提供足够的能源,导致其生长缓慢;当 C/N 在 6~18 时,菌株除氮率随 C/N 升高而上升,但随 C/N 继续增大除氮率反而下降,这是由于过高的 C/N 会抑制细菌的生长和氮的去除<sup>[19]</sup>,这与 *P. chengduensis* ADM 2-2 C/N 为 5~11、*P. chloritidismutans* ADM 8-1 C/N 为 5~13<sup>[20]</sup> 的除氮趋势一致。可见,C/N 的高低对菌株的除氮性能影响很大。

酸性环境抑制菌株生长,可能是酸性环境会抑制该菌株功能酶活性和细菌代谢活性,这与 *Acinetobacter* sp.GNR 等菌株一致<sup>[21]</sup>。但菌株 HD-NAH 在 pH 为 7~9 时对  $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的去除率分别超过 95.0% 和 79.0%,说明中性和碱性环境有利于该菌株的生长和反硝化作用,即使在 pH 为 10 的强碱性环境下,菌株对  $\text{NO}_2^-$ -N、TN 的降解率也能达到 93.01% 和 70.38%,表明该菌株耐碱能力强。

菌株 HD-NAH 在温度为 27 °C 时的氮降解率最佳,且在 27~37 °C 均能高效去除  $\text{NO}_2^-$ -N、TN,对温度的适应范围较广,这与诸多传统硝化-反硝化微生物的最适温度在 25~37 °C 一致<sup>[22]</sup>。

转速主要影响发酵过程中的溶氧量,溶氧量的高低会影响菌株的生长。该研究菌株 HD-NAH 在 5 个转速条件下除氮率均较高,说明菌株 HD-NAH 能在较广的溶氧量范围进行脱氮,这比一些除氮微生物只能耐受较低的氧浓度有明显优势<sup>[23]</sup>。

氮源种类测试结果表明,菌株 HD-NAH 有较好的异养硝化-好氧反硝化能力,当环境中  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度较高时(以  $\text{NH}_4^+$ -N 为唯一氮源),存在一定  $\text{NO}_2^-$ -N 积累,但  $\text{NO}_3^-$ -N 积累较少,当环境中  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度较低时(以  $\text{NO}_3^-$ -N 或  $\text{NO}_2^-$ -N 为唯一氮源), $\text{NO}_3^-$ -N 具有一定积累,且  $\text{NO}_2^-$ -N 积累较少,这说明该菌在水中  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度较高时,pH 偏碱性,易形成亚硝酸盐硝化,在相反的条件下,则形成硝酸盐硝化的倾向很大,存在一定短程异养硝化-好氧反硝化过程。

#### 4 结论

从养殖池塘底泥样品中筛选到 1 株神户肠杆菌(*Enterobacter kobei*)HD-NAH,该菌具有较高  $\text{NO}_2^-$ -N、TN 降解率。菌株 HD-NAH 去除  $\text{NO}_2^-$ -N 的适宜条件为:碳源为柠檬酸钠,C/N 为 18,初始 pH 为 7,温度为 27 °C,转速为 190 r/min,24 h 内对  $\text{NO}_2^-$ -N、TN 降解率分别为 99.98% 和 89.37%。不同氮源条件下,菌株 HD-NAH 在低  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度中易形成硝酸盐硝化,在高  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度中存在一定短程异养硝化-好氧反硝化过程。该研究将获得的神户肠杆菌用于水体生物脱氮,至于其在含氮废水中的实际应用有待进一步研究。

#### 参考文献

[1] KUYPERS M M M, MARCHANT H K, KARTAL B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. Nature reviews microbiology, 2018, 16(5): 263-276.

- [2] ROBERTSON L A, KUENEN J G. Aerobic denitrification: A controversy revived[J]. Archives of microbiology, 1984, 139(4): 351-354.
- [3] 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.
- [4] CHEN H J, ZHOU W Z, ZHU S N, et al. Biological nitrogen and phosphorus removal by a phosphorus-accumulating bacteria *Acinetobacter* sp. strain C-13 with the ability of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J/OL]. Bioresource technology, 2021, 322[2021-04-15]. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124507.
- [5] TAN X, YANG Y L, LI X, et al. Intensified nitrogen removal by heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria in two pilot-scale tidal flow constructed wetlands: Influence of influent C/N ratios and tidal strategies[J]. Bioresource technology, 2020, 302: 1-9.
- [6] YANG L, WANG X H, CUI S, et al. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5[J/OL]. Bioresource technology, 2019, 285[2021-04-15]. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121360.
- [7] XIA L, LI X M, FAN W H, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge[J/OL]. Bioresource technology, 2020, 301[2021-04-15]. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122749.
- [8] 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.
- [9] PADHI S K, TRIPATHY S, MOHANTY S, et al. Aerobic and heterotrophic nitrogen removal by *Enterobacter cloacae* CF-S27 with efficient utilization of hydroxylamine[J]. Bioresource technology, 2017, 232: 285-296.
- [10] CHEN Q, NI J R. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2012, 113(5): 619-623.
- [11] 杜全能, 朱文娟, 兰时乐. 一株异养硝化-好氧反硝化皱褶念珠菌(*Ditina rugosa*)的分离及脱氮特性[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 60-65.
- [12] DUAN J M, FANG H D, SU B, et al. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater[J]. Bioresource technology, 2015, 179: 421-428.
- [13] CHEN S H, HE S Y, WU C J, et al. Characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium *Acinetobacter* sp. T1 and its application for pig farm wastewater treatment[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2019, 127(2): 201-205.
- [14] 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: 15-18.
- [15] 国家环境保护总局. 《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 1-2.
- [16] 刘淳, 李永红, 刘颖颖, 等. 1 株高效异养硝化细菌的分离鉴定及硝化特性[J]. 环境科学与技术, 2019, 42(3): 152-157.
- [17] LI C E, YANG J S, WANG X, et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24[J]. Bioresource technology, 2015, 182: 18-25.
- [18] 黄妍. 好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮性能的初步研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
- [19] HUANG H K, TSENG S K. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2001, 55(1): 90-94.
- [20] 项文琪, 李孟, 杨江涛, 等. 好氧反硝化菌对高氨氮工业废水脱氮的研究[J]. 武汉理工大学学报, 2016, 38(1): 65-69.
- [21] 谭俊杰, 李立君, 李雪洁, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌株 GNR 选育及对猪场废水脱氮实验[J]. 环境工程, 2021, 39(2): 21-26.
- [22] 陈均利, 彭英湘, 刘锋, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌脱氮特性研究进展[J]. 环境科学与技术, 2020, 43(5): 41-48.
- [23] LUO G Z, LI L, LIU Q, et al. Effect of dissolved oxygen on heterotrophic denitrification using poly (butylene succinate) as the carbon source and biofilm carrier[J]. Bioresource technology, 2014, 171: 152-158.