

两种不同方式培养硝化细菌的比较研究*

刘松山 陈亮[#] 黄满红 郑宇

(东华大学环境科学与工程学院, 上海 201620)

摘要 在全自养(不投加有机碳源)与保持 COD:N=1.7:1.0(质量比)条件下,研究了硝化细菌的培养生长规律。结果表明,两种培养方式下,硝化率均能达到99%以上,但发展趋势有所不同。全自养时,培养末期亚硝酸盐细菌和硝酸盐细菌个数分别达到了 2.5×10^6 、 4.5×10^4 cfu/mL, COD:N=1.7:1.0 时分别为 2.0×10^6 、 7.5×10^4 cfu/mL,处于同一数量级上。扫描电镜(SEM)观察则表明,两种培养方式下微生物均以杆菌和球菌为主,与硝化细菌的特征相符。然而碳源的单一性会使全自养条件下污泥浓度逐渐减小,而保持一定碳氮比时则使污泥浓度逐渐增加,有助于维持系统的稳定。

关键词 硝化细菌 培养 微生物种群结构 最大可能数

Comparative study of the nitrifying bacteria cultivation in two different ways LIU Songshan, CHEN Liang, HUANG Manhong, ZHENG Yu. (School of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620)

Abstract: The growth rhythm of nitrifying bacteria cultivated in two different ways (one providing no organics, the other maintaining COD:N=1.7:1.0) was comparative studied in this text. As a result, both the nitrifying ratios could reach 99% in the two cultivating ways except that the variation trend was different. The nitrite bacteria and the nitrate bacteria in the end of cultivation reached 2.5×10^6 , 4.5×10^4 cfu/mL if providing no organics in reactor, they were 2.0×10^6 , 7.5×10^4 cfu/mL respectively when kept COD:N of influent at 1.7:1.0, both of them in the same order of magnitude under two cultivating pattern. The SEM showed that the microorganisms were mainly bacillus and coccus, which accord with the features of nitrifying bacteria. However, the solely carbon source decreases the MLSS when no organics provided in reactor, while maintaining a certain of COD:N increases the MLSS and contributes to stabilization of the system.

Keywords: nitrifying bacteria; cultivation; the horde structural of the microbe; the most probable number (MPN)

硝化细菌是促进氮元素转化的一类重要细菌,分为亚硝酸盐细菌和硝酸盐细菌,大多数为自养型。目前,硝化细菌的文献报道主要有污泥中硝化细菌的富集培养^[1-3]、废水中完全自养型硝化细菌的分离培养^[4-5]等。国外亦有有机碳源对硝化细菌影响的报道^[6-8]。在硝化细菌的富集培养中,多数研究了 pH、DO、NH₄⁺-N 负荷、C/N 等影响硝化效率的因素以及硝化细菌个数的变化情况,优化了培养的条件,但缺乏对于水质变化和稳定性的探讨。

在借鉴前人培养硝化细菌的基础上,提出了在固定 C/N 下逐步提高 NH₄⁺-N 负荷进行硝化细菌富集的方法,以期硝化细菌的生长提供适宜的异养菌载体,以满足其黏附生长的特性,并对高 NH₄⁺-N 下全自养硝化细菌培养的稳定性的进行了探讨。

1 实验材料和方法

1.1 污泥接种

接种污泥取自上海松江污水处理厂二沉池回流

污泥。污泥经闷曝、清洗及过滤后,分别取 3 L 污泥和 2 L 水一起加入到容积为 5 L 的两个反应器中。

1.2 实验用水

实验用水为模拟废水。废水基本物质及含量见表 1。除此之外,两反应器均以 (NH₄)₂SO₄ 作为氮源, KH₂PO₄ 作为磷源,并保持 N:P=5:1(质量比,下同)。同时两反应器按 NaHCO₃:N=11.5:1.0^[9] 的比例加入 NaHCO₃ 以调节进水 pH 在 8.0~8.5,后期根据出水 pH 情况酌情调节。2 号反应器按 COD:N=1.7:1.0^[10] 的比例加入 CH₃COONa 作为有机碳源,以期和 1 号反应器进行对比。

1.3 实验装置及流程

两反应器用有机玻璃板制成,尺寸相同,见图 1。反应器运行分为进水、曝气、静置、排水 4 个阶段。每天定时静置 1 h,取样排水后加入新的配水,然后进行曝气。曝气量根据进水 NH₄⁺-N 情况进行调节,保持 DO>2 mg/L。

第一作者:刘松山,男,1989 年生,硕士研究生,研究方向为水污染控制工程。[#] 通讯作者。

* 上海市科委重点项目(No. 09230500200)。

表 1 两反应器配水基本物质
Table 1 Basic substances in influent of the two reactors

物质	NaCl/(g · L ⁻¹)	MgSO ₄ · 7H ₂ O/(g · L ⁻¹)	CaCl ₂ /(g · L ⁻¹)	FeSO ₄ · 7H ₂ O/(g · L ⁻¹)	微量元素 ¹⁾ /(mL · L ⁻¹)
数值	0.5	0.03	0.02	0.01	1

注: ¹⁾具体成分见参考文献[7]。

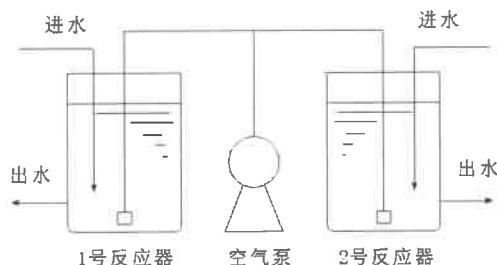


图 1 硝化细菌富集培养装置

Fig. 1 Reactors used for cultivating nitrifying bacteria

注: 1号反应器为全自养硝化细菌富集池; 2号反应器为 COD/N=1.7:1.0 硝化细菌富集池。

为了培养出硝化细菌, 将进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 从 50 mg/L 逐渐提高到 300 mg/L, 每次提高 50 mg/L, 根据出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度决定提高负荷的时间。同时按照相应的比例增加 KH_2PO_4 、 NaHCO_3 、 CH_3COONa 含量。

1.4 分析方法

$\text{NH}_4^+\text{-N}$: 水杨酸分光光度法; $\text{NO}_3^-\text{-N}$: 紫外分光光度计法; $\text{NO}_2^-\text{-N}$: N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法; COD: 微波密封消解法^[11]; DO: 德国 WTW OXI330i 便携式溶解氧仪; MLSS: 重量法。

硝化细菌的计数: 最大可能数 (MPN) 计数法^[12-13]。

取污泥 1 mL, 加入到装有 99 mL pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液的 100 mL 烧杯中, 用超声波发生器超声振荡 1 min, 以充分分散包埋在菌胶团中的细菌, 提高测菌时的出菌率^[14]。

污泥经处理后, 立即用 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液, 依次逐级稀释, 从 10^{-3} 到 10^{-7} 。取 10^{-2} 到 10^{-7} 稀释度的菌液各 1 mL 分别接种于含 5 mL 改良的斯蒂芬逊培养基 A (检测亚硝酸盐细菌) 和改良的斯蒂芬逊培养基 B (检测硝酸盐细菌) 的试管 (分别为亚硝酸盐细菌管、硝酸盐细菌管) 中, 另各选 1 管加入灭菌的蒸馏水作为空白对照, 每种均做 3 个平行样。28 °C 培养 1 个月后进行硝化细菌的计数。

培养 1 个月后, 对于亚硝酸盐细菌管, 各取 5 滴于白瓷板中, 加入格里斯试剂 I 和 II 各 2 滴进行检验, 出现红色为阳性管。对于硝酸盐细菌管, 先用格里斯试剂查看各管的 NO_2^- 转化情况, 然后另取 5 滴菌液, 加 2 滴 (1+1) HCl 和 6~10 滴 10% (质量分

数) 氨基磺酸消除 NO_2^- 的干扰^[15-16], 接着加二苯胺试剂 2 滴进行检验, 出现蓝色为阳性管, 并与格里斯试剂滴定的进行对比。记录各阳性管的数目, 对照 MPN 表换算出 1 mL 菌液中含有的硝化细菌数。

污泥扫描电镜观察: 取一定量的悬浊液, 在 8 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃上清液后, 用 2.5% (质量分数) 戊二醛固定 12 h 以上, 弃上清液, 用蒸馏水洗 3 次, 每次用离心机在 8 000 r/min 离心 10 min, 然后依次用 30% (体积分数, 下同)、50%、70%、85%、95% 的乙醇脱水 1 次, 100% 乙醇脱水 2 次, 每次 15~20 min, 最后经冷冻干燥后扫描^[17]。

2 结果与讨论

2.1 反应器出水水质

实验出水水质如图 2 所示。由图 2 可以看出, 当进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 由 50 mg/L 逐渐提高到 200 mg/L 时, 两反应器出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 均在 50 mg/L 以下。这一阶段 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 大部分转化成了 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, 没有 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的积累。随着 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度进一步提高, 尽管出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 维持在 40 mg/L 以下, 但出水 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 却迅速降低, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 迅速升高。1 号反应器出水 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 在 50 mg/L 左右, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 高达 350~380 mg/L。而 2 号反应器中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量在这一阶段则迅速下降至 10 mg/L 以下, 相应 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 则维持在 200 mg/L 左右并呈下降的趋势。

整个富集培养过程表现出了很好的脱氮效果。低负荷时, 1 号反应器 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率有所波动, 但每阶段后期均达到 99%。然而进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 大于 250 mg/L 时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率逐渐下降, 培养末期在 88% 左右。2 号反应器 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率除个别点外, 其他时期均在 90% 以上, 进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为 300 mg/L 时, 达到了 99% 左右。

在进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 提高到 250 mg/L 时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 并没有完全转化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, 反而 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 急剧升高, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度降低。可能是因为高 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的情况下, 供给的氧气仅够硝化细菌把 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 氧化成 $\text{NO}_2^-\text{-N}$, 而没有彻底地转化成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。

2.2 高 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 水平下反应器性能

在进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为 300 mg/L 时的培养期末, 以

及并不改变原有条件时,对1 d内的氮素转化情况进行了监测,每2 h取一次水样。由测定结果知,在排出前一天的澄清液,加入新模拟废水后,1号反应器中的 NO_2^- -N高达382.6 mg/L,而2号反应器进水后(即0 h) NO_2^- -N则只有0.04 mg/L,周期结束相应值为191.94 mg/L,与图2相符。

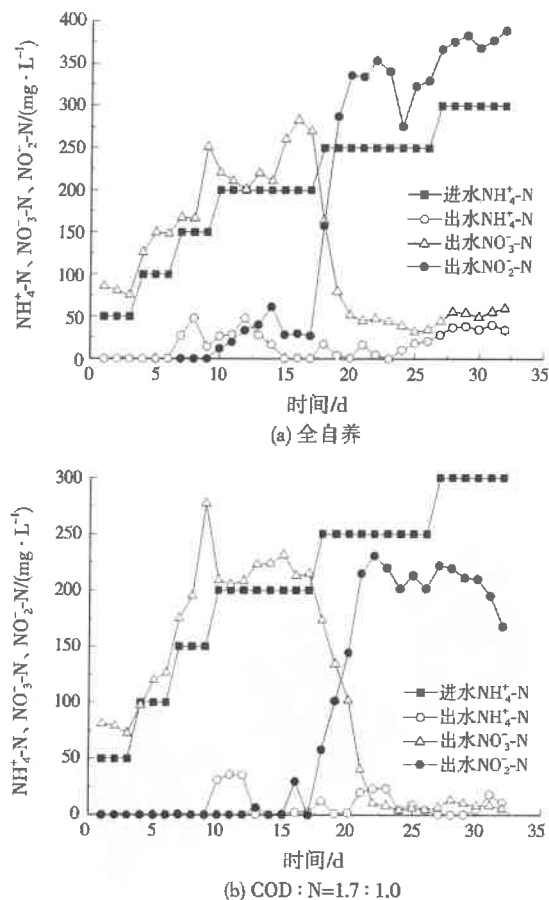


图2 污泥培养过程中每日出水情况
Fig. 2 Concentration of three forms of nitrogen in the effluent during sludge cultivation

扣除周期开始时相应 NO_3^- -N浓度后,得到图3。由图3(a)可以看出,在前18 h,反应器中剩余的 NH_4^+ -N含量呈直线下降,18 h后呈缓慢下降,整个过程中, NO_3^- -N及 NO_2^- -N均逐渐升高,且 NO_2^- -N是 NH_4^+ -N转化的主要形式。在周期末, NO_3^- -N和 NO_2^- -N生成量总和甚至高于 NH_4^+ -N的消耗量。2号反应器也呈现出和1号反应器相同的规律,只是2号反应器周期结束时, NO_3^- -N和 NO_2^- -N生成量总和小于 NH_4^+ -N的消耗量。故认为2号反应器中有反硝化反应的发生。

如图4所示,1 d的监测中,两反应器DO在前16 h一直保持在0.3 mg/L以下,从第16 h开始逐渐上升到4 mg/L左右。pH从8.2左右降低到18 h的6.4左右,使得18 h以后碱度可能成为限制硝

化反应继续进行的因素。所以18 h后两反应器中各种形态氮基本不变化(见图3)。2号反应器中由于添加了有机物,使得反硝化细菌得以生长,促使了反硝化反应的发生,使得 NO_3^- -N和 NO_2^- -N的生成量总和小于 NH_4^+ -N的消耗量。

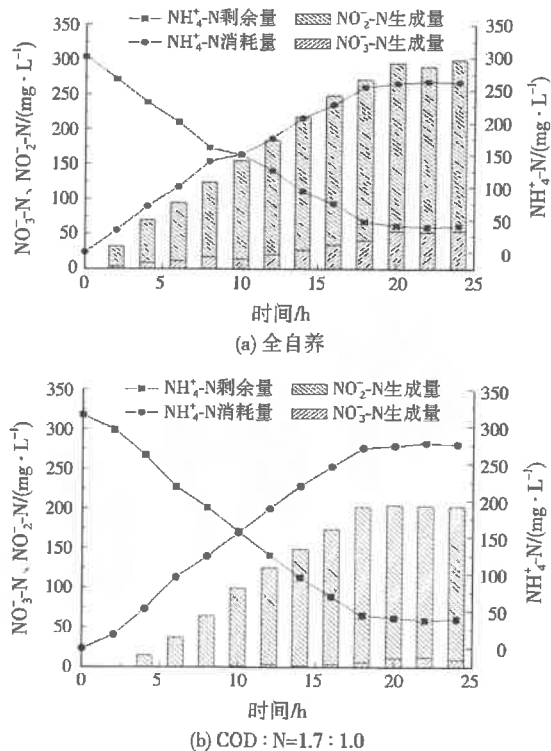


图3 两反应器在进水 NH_4^+ -N为300 mg/L时1 d内的氮素转化情况

Fig. 3 Translation of three forms of nitrogen in a day when the inlet ammonia nitrogen is 300 mg/L

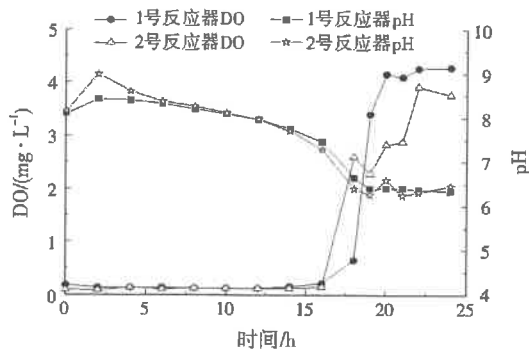


图4 两反应器在1 d水质监测中的DO和pH变化
Fig. 4 Variation of DO and pH of two reactors in a day

对于1号反应器,后期进水 NH_4^+ -N过高可能是图3(a)中 NO_3^- -N和 NO_2^- -N生成量之和高于 NH_4^+ -N消耗量的另一原因。从图5可以看出,在2号反应器中进水COD小于340 mg/L, NH_4^+ -N小于200 mg/L时,1号反应器污泥浓度尽管在减少,即异养细菌在消亡,但出水COD和2号反应器基本保持一致,均处在较低的位置,并且在进水 NH_4^+ -N为

200 mg/L的后期呈逐渐下降的趋势。这说明进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 小于 200 mg/L 时,对 1 号反应器影响不大。但继续提高进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 时,1 号反应器出水 COD 急剧升高至 400 mg/L 以上,推测可能是 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的急剧升高使得一部分额外细菌死亡造成的。1 号反应器出水 TN 相对于进水 TN 也有所升高。2 号反应器尽管在高 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 下也出现出水 COD 的升高,但始终小于进水 COD,且呈现出较快下降的趋势,说明 2 号反应器中微生物受 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度增加的影响不大。

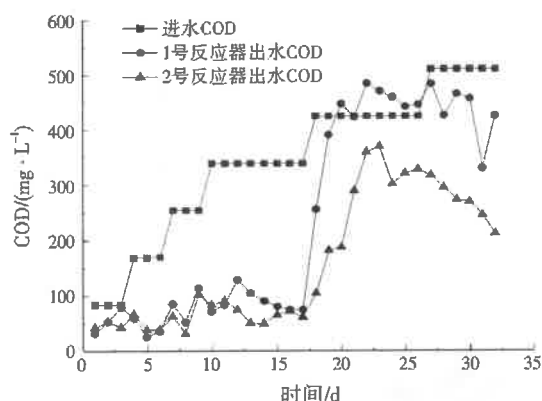


图5 两反应器出水 COD 随时间的变化
Fig. 5 COD of effluent of the two reactors

2.3 污泥浓度及形态

1 号反应器中无有机物的加入,异养菌的生长受到限制,污泥浓度及种类逐渐减少。从图 6 可以看出,1 号反应器中 MLSS 从开始时的 3 378 mg/L 降低到 43 d 时的 2 038 mg/L,尽管硝化污泥的世代周期长,但延长取样间隔时间仍没有发现污泥浓度的升高。而 2 号反应器则由于按 $\text{COD}:\text{N}=1.7:1.0$ 的比例加入了 CH_3COONa ,在富集硝化细菌的同时,也促进了其他异养菌的生长,MLSS 逐渐增大,最初为 3 242 mg/L,第 43 天时提高到了 5 371 mg/L。

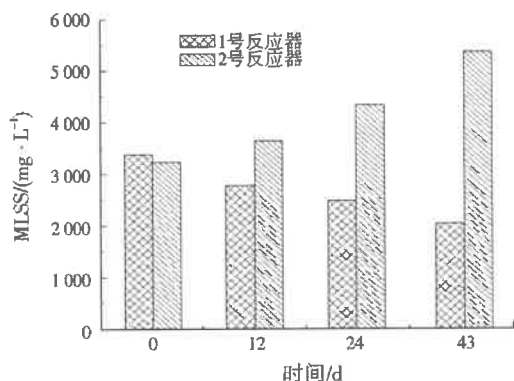
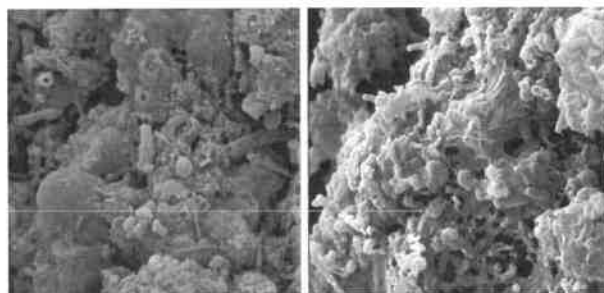


图6 培养过程中两反应器的 MLSS 变化
Fig. 6 Variation of MLSS of the two reactors during cultivation

mg/L。从图 7 可以看出,两池在培养末期,微生物均以杆菌、球菌为主,而硝化细菌也主要为杆菌、球菌、螺旋菌,但 2 号反应器密度比 1 号反应器大。在保持进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为 300 mg/L 时,对第 52 天的出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 进行监测,发现 1 号反应器出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 已经上升至 79.5 mg/L,2 号反应器出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 却只有 0.5 mg/L。说明按 $\text{COD}:\text{N}=1.7:1.0$ 加入有机物有助于保持系统的稳定,在高 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 下仍然能保持较高的硝化效率。



(a) 全自养 (b) $\text{COD}:\text{N}=1.7:1.0$
图7 培养末期两池的微生物形态 SEM 图
Fig. 7 SEM of microbial morphology at the end of the cultivation

2.4 硝化细菌计数

用 MPN 法对培养前后的硝化细菌数进行了计数,结果见表 2。由表 2 可以看出,培养前两反应器的亚硝酸盐细菌数和硝酸盐细菌数分别为 9.0×10^2 、 9.5×10^2 cfu/mL,培养后两反应器的相应数值分别是:1 号反应器为 2.5×10^6 、 4.5×10^4 cfu/mL,分别是培养前的 27.8×10^3 、47.4 倍;2 号反应器为 2.0×10^6 、 7.5×10^4 cfu/mL,分别是培养前的 22.2×10^3 、78.9 倍。杨红艳等^[18]利用间歇培养方式,以曝气池活性污泥作为接种污泥,经过 6 周的培养,硝酸盐细菌从 2.1×10^3 个/mL 增加到 2.2×10^7 个/mL,亚硝酸盐细菌从 4.9×10^4 个/mL 增加到 8.9×10^8 个/mL,分别增加了 4 个数量级。这使得即使在培养后期高 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 下,也实现了很好的硝化效果。

3 结 论

(1) 全自养时,随着进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的提高,硝化率从 99% 逐渐降低到了 88%。 $\text{COD}:\text{N}=1.7:1.0$ 时, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 硝化率除中期略有波动外,其他阶段均在 90% 以上。

(2) 全自养时,MLSS 从 3 378 mg/L 降低到 2 038 mg/L。 $\text{COD}:\text{N}=1.7:1.0$ 时,MLSS 从 3 242 mg/L 上升到 5 371 mg/L。SEM 观察结果表

表2 污泥培养前后硝化细菌计数
Table 2 The count of nitrifying bacteria in sludge

项目		稀释度						细菌数量/(cfu·mL ⁻¹)
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
重复数			3	3	3	3	3	3
亚硝酸盐菌阳性管数	培养前	2	0	0	0	0	0	9.0×10
	1号反应器	3	3	3	3	3	0	2.5×10 ⁶
	2号反应器	3	3	3	3	2	2	2.0×10 ⁶
硝酸盐菌阳性管数	培养前	3	2	0	0	0	0	9.5×10 ²
	1号反应器	3	3	3	1	0	0	4.5×10 ⁴
	2号反应器	3	3	3	3	1	1	7.5×10 ⁴
空白对照			0	0	0	0	0	0

明,两种培养方式下,末期微生物均以杆菌、球菌为主。

(3) 全自养时,培养后亚硝酸盐细菌和硝酸盐细菌个数分别达到了 2.5×10^6 、 4.5×10^4 cfu/mL,分别是培养前的 27.8×10^3 、47.4 倍。COD:N=1.7:1.0 时,反应器中相应值为 2.0×10^6 、 7.5×10^4 cfu/mL,分别是培养前的 22.2×10^3 、78.9 倍。培养后两者亚硝酸盐细菌和硝酸盐细菌处于同一数量级上。

参考文献:

- [1] 李谷,黄正,范玮,等.硝化细菌富集方法的研究[J].淡水渔业,2000,30(9):36-38.
- [2] 楼洪森,杨云龙,方明亮.高效低温硝化细菌培养方法的研究[J].工业水处理,2013,33(2):42-44.
- [3] 屈计宁,金志刚,何群彪,等.高效硝化细菌的富集技术研究[J].同济大学学报:自然科学版,1999(3):351-354.
- [4] 陆洪省,王厚伟.活性污泥中高效硝化细菌的分离与初步鉴定[J].安全与环境工程,2013,20(1):60-62.
- [5] 蒋进元,陈梅娟,赵鑫,等.好氧活性污泥中自养硝化细菌分离方法研究[J].环境工程学报,2010,4(12):2653-2656.
- [6] HU J, LI D, TAO Y, et al. Effect of acetate on nitrite oxidation in mixed-population biofilms[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(6): 580-586.
- [7] LU H, OEHMEN A, VIRDIS B, et al. Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter* phosphates through alternating carbon sources[J]. Water Research, 2006, 40(20): 3838-3848.
- [8] HANAKI K, WANTAWIN C, OHGAKI S. Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor[J]. Water Research, 1990, 24(3): 289-296.
- [9] 张子健,吴伟伟,王建龙.全自养硝化污泥的颗粒化过程研究[J].环境科学,2010,31(1):140-146.
- [10] 金志刚,屈计宁,何群彪.硝化细菌富集技术分析与方法研究[J].上海环境科学,1998,17(8):16-19.
- [11] 江惜卿.微波密封消解法快速测定 COD 技术应用研究[J].环境,2006(S2):28-29.
- [12] 王家玲.环境微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1988.
- [13] 马放.污染控制微生物学实验[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2002.
- [14] 陈金声,史家梁,徐亚同.硝化速率测定和硝化细菌计数考察

脱氮效果的应用[J].上海环境科学,1996,15(3):18-20.

- [15] 陈捷音.水中亚硝化细菌和硝化细菌检测方法的探讨[J].环境监测管理与技术,2007,9(3):49-51.
- [16] 刘冰,侯春芳,付保荣.硝化细菌 MPN-Griess 检测方法的改进[J].现代仪器,2006,12(4):44-45.
- [17] 倪红,熊哲,张珊,等.多孔陶粒固定化微生物效果及扫描电镜观察[J].湖北大学学报:自然科学版,2011,33(2):182-186.
- [18] 杨红艳,龙秀娟,李清华.硝化细菌富集培养及处理富营养化水体应用研究[J].环境保护科学,2007,33(6):50-52.

编辑:陈泽军 (修改稿收到日期:2014-05-06)

(上接第 63 页)

- [6] OGA T, SUTHERSAN S, GANCZARCZYK J J. Some properties of aerobic biofilms[J]. Environ. Technol., 1991, 12(5): 431-440.
- [7] 白永刚.滴滤池—人工湿地技术处理农村生活污水应用研究[D].南京:东南大学,2005.
- [8] 杨敏.有机废水低能耗分散式生物处理技术的研究[D].上海:上海交通大学,2007.
- [9] ECKENFELDER W W. Industrial water pollution control [M]. New York: McGraw-Hill, 1966.
- [10] GROMIEC M J, MALINA J F. Performance of plastic medium in trickling filters[J]. Water Reserch, 1972, 6(11): 1321-1332.
- [11] HOWELL J A, ATKINSON B. Sloughing of microbial film in trickling filters[J]. Water Reserch, 1976, 10(4): 307-315.
- [12] SHENG B H, GANG X, HAI N K. The performance of BAF using natural zeolite as filter media under conditions of low temperature and ammonium shock load[J]. J. Hazard. Mater., 2007, 143(1/2): 291-295.
- [13] 童君,吴志超,张新颖,等.自然通风沸石生物滴滤池脱氮机理[J].环境科学研究,2010,23(11):1436-1440.
- [14] 刘硕,吕缙,黄赞芳. BAF 同步硝化反硝化影响因素研究[C]//2010 年水处理新技术新工艺及给(污)水厂运行管理高级研讨会论文集.北京:冶金工业出版社,2010:123-129.
- [15] 章胜红,陈季华,孙志国.曝气生物滤池废水深度处理同步硝化反硝化机理及影响因素[J].东华大学学报,2007,33(1): 125-129.
- [16] 李方,杨波,田晴,等.滤层高度对升流式曝气生物滤池硝化性能的影响[J].水处理技术,2008,34(10):46-49.
- [17] 朱小彪,徐春华,高宝玉,等.曝气生物滤池生物量和生物活性的实验研究[J].环境科学学报,2007,27(7):1135-1140.

编辑:卜岩枫 (修改稿收到日期:2013-12-18)

