

一株高适应性 *Nitrosomonas eutropha* CZ-4 的脱氮特性

熊英¹, 向斯^{1,2}, 程凯^{1*} (1.湖北工业大学资源与环境工程学院, 河湖生态修复与藻类利用湖北省重点实验室, 湖北武汉 430068; 2.武汉微盛科创环境生物科技有限公司, 湖北武汉 430068)

摘要: 从垃圾渗滤液中分离得到了一株亚硝化单胞菌 *Nitrosomonas eutropha* CZ-4, 其 16S rDNA 序列与 *N. eutropha* C91 的相似性达 99%。研究了 pH 值、温度、游离亚硝酸浓度、盐度等对其生长的影响, 并测试了其在垃圾渗滤液、黑臭水和富营养化湖水中的脱氮效果。结果表明, 该菌的最适生长 pH 值为 7.3~8.7, 最适生长温度为 30.9℃, 游离亚硝酸和盐度对该菌的半数抑制浓度分别约为 0.11mg/L 与 2%。在最佳发酵条件下, 该菌的最大氨氮去除速率为 58mg/(L·h), 最短倍增时间为 8.2h; 在不同类型的污水/地表水(初始氨氮浓度为 0.66~603mg/L)中, 该菌的最大氨氮去除速率为 11.4mg/(L·h), 最短倍增时间为 10.9h, 最低残余氨氮浓度为 0.11mg/L。

关键词: 自养氨氧化菌; 垃圾渗滤液; 亚硝化单胞菌; 氨氮去除速率; 倍增时间

中图分类号: X172, X703.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2019)08-3365-08

Nitrogen removal characteristics of a highly adaptable *Nitrosomonas eutropha* CZ-4. XIONG Ying¹, XIANG Si^{1,2}, CHENG Kai^{1*} (1.Hubei Key Laboratory of Ecological Restoration for River-Lakes and Algal Utilization for College of Resources and Environmental Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China; 2.Wuhan Micro-Glory Environmental Technology Innovation Co.Ltd, Wuhan 430068, China). *China Environmental Science*, 2019,39(8): 3365~3372

Abstract: A *Nitrosomonas* strain was isolated from the landfill leachate. It was named as *Nitrosomonas eutropha* CZ-4 for its 16S rDNA sequence was highly similar to *N. eutropha* C91 at an identity of 99%. This work studied the influences of pH, temperature, free nitrous acid concentration and salinity on the growth of *N. eutropha* CZ-4, as well as its NH₃-N removal abilities in landfill leachate, black odor water and eutrophic lake water. The results showed that the optimum growth pH of the strain was 7.3~8.7, the optimum growth temperature was 30.9℃, and the IC₅₀ of free nitrous acid and salinity was about 0.11mg/L and 2% (in terms of NaCl), respectively. Under the optimal fermentation condition, the maximum NH₃-N removal rate reached 58mg/(L·h), and the shortest doubling time was 8.2h. In different types of sewage/surface water (their initial ammonia concentration ranged from 0.66mg/L to 603mg/L), the NH₃-N removal rate was up to 11.4mg/(L·h), the doubling time was as short as 10.9h, and the residual NH₃-N concentration was down to 0.11mg/L.

Key words: autotrophic ammonia oxidizing bacteria; landfill leachate; *Nitrosomonas*; ammonia nitrogen removal rate; doubling time

氨氮是造成水体富营养化和黑臭的重要原因。生物硝化脱氮^[1]是主流的脱氮方式, 包括氨氧化和亚硝氮氧化两步^[2], 而氨氧化(将氨氮氧化为亚硝氮)正是硝化的限速步骤^[3-4]。污水处理系统中的氨氧化主要由自养氨氧化细菌(AOB)完成。AOB 包括亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)等 5 个属^[3], 而亚硝化单胞菌属在污水和富营养化地表水中分布最广、数量最多^[5], 对氨氧化的贡献最大^[6-7]。

亚硝化单胞菌以氨为唯一能源, 以 CO₂ 为碳源, 对环境条件极度敏感^[3,8], 易受温度、pH 值、盐度、游离氨(FA)和游离亚硝酸(FNA)浓度等多种因素的影响^[9-10]。如不适的温度^[11]和低 pH 值导致的高 FNA 浓度均会抑制氨氧化^[12], 而高盐度则会通过增大细胞渗透压影响氧和底物的传递, 使氨氧化速率下

降^[13]。目前, 虽有适应上述单一因素的亚硝化单胞菌的报道, 但单株亚硝化单胞菌对多种因素均具有较高适应性的案例尚未见报道。

不同的亚硝化单胞菌对 FA 的亲和力差异较大^[14], 如 *Nitrosomonas ureae* 和 *Nitrosomonas oligotropha* 等对 FA 的亲和力较高, 适合在低 FA 环境中生长, 而在高 FA 环境中则有较长的延迟期^[15]; 而 *Nitrosomonas europaea* 等对 FA 的亲和力较低, 适合在高 FA 环境中生长, 但在低 FA 条件下的竞争力较差^[16-17]。迄今为止, 关于单株亚硝化单胞菌在不同 FA 浓度条件下均具有较高亲和力的研究也鲜见报道。

收稿日期: 2019-01-04

基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX07602002)

* 责任作者, 教授, chengkaicn@163.com

本文分离筛选得到一株 AOB,通过研究 pH 值、温度、FNA 浓度、盐度等对其生长的影响,发现该菌在不同 FA 浓度下均能有效生长(脱氮),且能够耐受较高浓度的 FNA 和盐度,并适应较宽的温度和 pH 值范围,对于深入研究其适应机理并开发其应用价值具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 培养基

向液体基础培养基^[18]中加入适量 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH=7.8^[19],固体培养基中的琼脂粉含量为 1.8%.

1.2 分离纯化

将湖南郴州某垃圾渗滤液处理厂的活性污泥离心(4℃,6500r/min,15min)后,用灭菌生理盐水洗涤 3 次去除亚硝氮,按 1%的体积比接种于基础培养基中,27℃,200r/min 振荡培养,5d 后用格里斯试剂检测亚硝氮的积累情况.将亚硝氮阳性样品涂布平板,27℃培养 5d 后挑取单菌落接种于基础培养基中,27℃,200r/min 振荡培养 5~7d,对亚硝氮阳性样品进行 3 轮平板划线纯化.纯化后的样品经结晶紫染色^[20]后油镜镜检.

1.3 16S rDNA 测序和系统发育树构建

采用通用引物 27F 和 1492R^[21]扩增 16S rDNA 片段,PCR 反应体系:taq 酶(15U/μL)0.1μL;缓冲液 2μL;dNTP 混合液(2.5mmol/L)1.6μL;模 4μL;上下游引物各 0.15μL;超纯水 12μL.反应条件:94℃预变性 4min;94℃变性 25s,58℃退火 20s,72℃延伸 30s,25 个循环;72℃最终延伸 5min.PCR 产物经上海生工测序,再经 Blastn 比对,并通过 MEGA5.0 的邻接法构建系统发育树.

1.4 发酵条件的优化与验证

1.4.1 接种液的制备 将菌种保藏液离心(4℃,6500r/min,15min)洗涤 3 次后,取 1mL 接种到 100mL 基础培养基中,27℃,200r/min 振荡培养至亚硝氮积累速率达到约 100mg/(L·d)时(需 3~5d)作为接种液.

1.4.2 盐度和 FNA 浓度对氨氮去除效果的影响 (1)盐度的影响向 100mL 盐度(以 NaCl 计)分别为 0.2%、0.5%、1%、2%、4%和 6%的基础培养基中加入 1mL 接种液,27℃,200r/min 振荡培养 5d,间隔取样测定氨氮浓度.(2)FNA 浓度的影响 向 100mL 亚硝氮浓度分

别为 0,500,1000,2000 和 4000mg/L 的基础培养基(初始 pH 值均为 7.8,其 FNA 浓度分别为 0,0.06,0.11,0.23 和 0.46mg/L)中加入 1mL 接种液,27℃,200r/min 振荡培养 5d,间隔取样测定氨氮浓度.

1.4.3 初始 pH 值和温度对氨氮去除率(NRR)的影响 (1)初始 pH 值的影响 向 100mL 初始 pH 值分别为 7.3、8.0 和 8.7 的基础培养基中加入 1mL 接种液(设 3 平行),30℃,200r/min 振荡培养 3d 后测定氨氮浓度.(2)温度的影响 向 100mL 初始 pH 值为 8.0 的基础培养基中加入 1mL 接种液(设 3 平行),分别于 26,30 和 34℃,200r/min 振荡培养 3d 后测定氨氮浓度.(3)温度和初始 pH 值的联合作用 采用响应面法,利用 Design-Expert 软件设计 2 因素 5 水平 3 平行的试验分组,pH 值范围 7.5~8.5,温度范围 27~33℃.向 100mL 基础培养基中加入 1mL 接种液,于 200r/min 振荡培养 3d 后,测定氨氮浓度,并绘制响应曲面.

1.4.4 补料发酵 向 20L 发酵罐中装入 10L 基础培养基,并接种 500mL 接种液.试验组(根据 1.4.3 的结果)发酵条件为:温度 30.9℃,pH=8.2;对照组发酵条件为:温度 27℃,pH=7.8.两组均采用 1mol/L 碳酸氢钠自动控制 pH 值.发酵期间,当氨氮浓度降至约 300mg/L 时,补充氯化铵溶液使其达到 500mg/L.

1.5 对不同类型污水的脱氮测试

1.5.1 菌剂的制备方法 将补料发酵的产物离心(4℃,6500r/min,15min)洗涤 3 次去除亚硝酸盐作为菌剂.

1.5.2 垃圾渗滤液中的脱氮测试 向 100mL 垃圾渗滤液中接种 1mL 菌剂,对照组不接种,31℃,200r/min 振荡培养,48h 后测氨氮与亚硝氮浓度.

1.5.3 在富营养化湖泊水中的脱氮测试 向 100mL 三种湖水(汤逊湖、南湖和野芷湖)中分别接种 1mL 菌剂,对照组不接种,31℃,200r/min 振荡培养,12h 后测氨氮浓度.

1.5.4 在黑臭河水中的脱氮测试 向 100mL 黑臭水(巡司河水)中接种 0.1mL 菌剂(较低的接种剂量能够明显延长培养时间,从而有充足的时间进行多次测量以得到较准确的最短倍增时间),对照组不接种,31℃,200r/min 振荡培养,每隔 12h 测氨氮浓度.

上述实验组与对照组均设 3 平行.

1.6 测试与计算方法

分别采用纳氏试剂法和 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定氨氮和亚硝氮^[22];根据氨氮去除速率的变幅^[19]计算倍增时间(h)^[23];采用 Anthonisen 等^[24]的方法计算 FA 浓度(mg/L)和 FNA 浓度(mg/L)。

1.7 统计方法

采用 Origin 作图;采用 SPSS 进行正态性检验和方差分析(多重比较采用 LSD 法);采用 Design-Export 软件的二阶模型进行响应面试验的方差分析与回归分析。

2 结果与讨论

2.1 细菌的形态和系统发育

分离纯化得到一株 AOB,该菌呈短杆状($0.66\sim 0.86\times(1.52\sim 1.75)\mu\text{m}$ (见图 1),具有明显的运动性,符合 *Nitrosomonas eutropha* 的特征^[3].且其 16S rDNA 序列(Genbank 序列号为 MH999419^[25])与已知的亚硝化单胞菌的相似度为 97%~99%,其系统发育树(图 2)显示该菌与 *N. eutropha* C91 的遗传距离最近(相似

度为 99%),考虑到该菌分离于郴州垃圾渗滤液,故将其命名为 *N. eutropha* CZ-4。

与同属的其它亚硝化单胞菌相比,*N. eutropha* 在高氨氮环境中占比最高^[12],常分布于污水处理厂等高氨环境中^[3,26-27],如 Schmidt 等^[25]从牛粪中分离到了 *N. eutropha* N904.而 CZ-4 菌也来源于垃圾渗滤液(其氨氮浓度高达 500~1000mg/L),与同样来源于污水处理厂的 *N. eutropha* C91^[6]的相似度高达 99%。

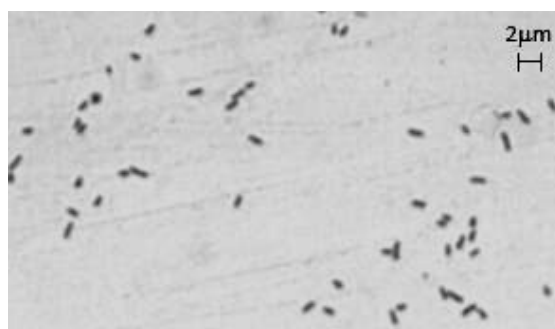


图 1 *N. eutropha* CZ-4 的光学显微照片

Fig.1 OM observation of strain *N. eutropha* CZ-4

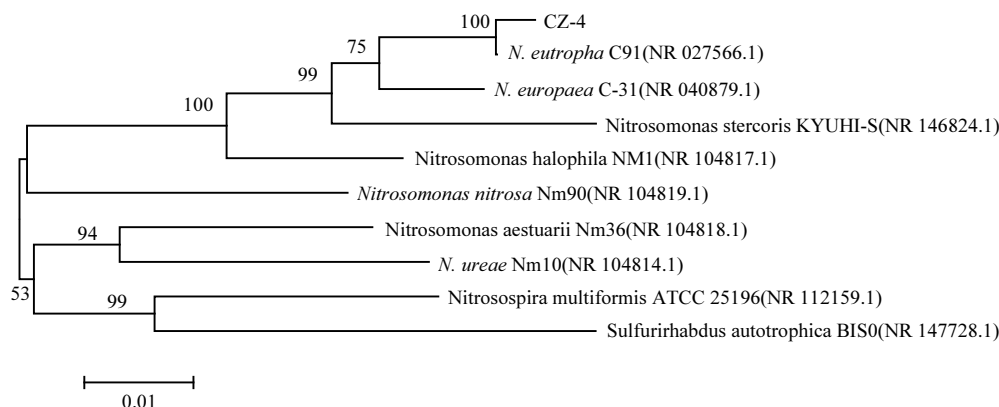


图 2 *N. eutropha* CZ-4 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *N. eutropha* CZ-4

2.2 环境因素对 CZ-4 菌的影响

2.2.1 盐度和 FNA 浓度对 CZ-4 菌的抑制效应
由图 3a 可见,盐度能够显著影响氨氮去除效果($P<0.05$):培养 5d 时,盐度 2%条件下的 NRR 为 52%,而盐度 0.2%时的 NRR 为 94%,说明 CZ-4 的半数抑制盐度约为 2%,明显高于已知的亚硝化单胞菌(见表 1).盐度是影响 AOB 生长的重要因素,高盐度使细胞渗透压增大,进而干扰底物和氧的传递并影响氨氧化速率^[13],而微生物的耐盐能力则可能与蛋白质中的酸性氨基酸的含量有关^[28-29].从应用上看,由于 AOB 的发酵过程中需要补碱(维持 pH 值稳定),盐度

会随之增加,较高的耐盐能力将有利于该菌的补料发酵生产及在高盐废水中的应用。

FNA 既是氨氧化的产物,也会对 AOB 产生毒性^[24,27],因此 FNA 浓度也是 AOB 的重要影响因素^[38].由图 3b 可见,FNA 浓度能显著影响氨氮去除效果($P<0.05$):培养 5d 时,0.11mg/L FNA 组的 NRR 为 56%,而空白组的 NRR 则为 94%,说明 FNA 对该菌的半数抑制浓度大于 0.11mg/L;此外,0.23mg/L FNA 组仍能够有效去除氨氮,说明该菌对 FNA 的最大耐受浓度应高于 0.23mg/L,与 *N. mobilis* Ms1^[33]类似,高于 *N. europaea* 19718^[23,31-32]、

Nitrosomonas sp. AL212^[35-36]和 *N. eutropha* C91^[3,31]等多数亚硝化单胞菌,仅明显低于 *N. stercoris* KYUHI-S^[37].迄今为止,FNA 对 AOB 影响机制的研究尚不充分^[39],仅 Stein 等^[31-32]发现 FNA 对 3 种 AOB 的影响机制各不相同,包括了特异性抑制氨

单加氧酶(AMO),抑制 AMO 基因或一氧化氮还原酶基因的转录等.从应用的角度,较高的 FNA 耐受能力不但有利于该菌的补料发酵生产,而且有利于将该菌应用于短程硝化-反硝化等以亚硝氮为关键中间产物的脱氮工艺^[40].

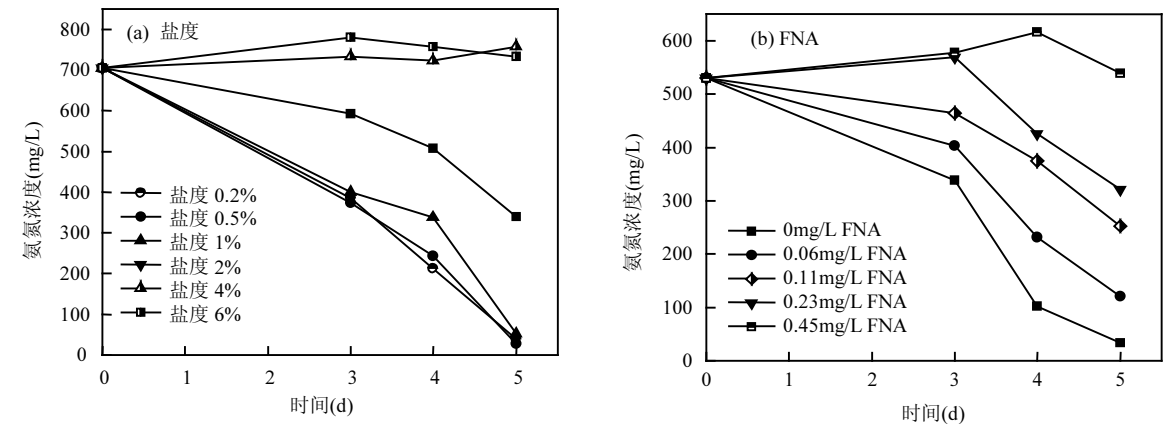


图 3 盐度和 FNA 浓度对脱氮效果的影响
Fig.3 Effect of salinity and FNA concentration on NH₃-N removal ability

表 1 不同亚硝化单胞菌对若干环境因子的适应性
Table 1 Adaptability of different *Nitrosomonas* strains to several environmental factors

菌种	最适 pH 值	最适 FA 浓度(mg/L)	最适温度(℃)	抑制盐度(NaCl%)	最大 FNA 耐受浓度(mg/L)	分离来源
CZ-4(本研究)	8.17(7.3 ^a ~8.7 ^a)	10.4~196.6	30.9	2 ^b	>0.23	垃圾渗滤液
<i>N. europaea</i> 19718 ^[3,23,30-32]	7.8~8.2	5.9~18.1	25~29	2.3 ^c	≤0.03	废水
<i>Nitrosomonas mobilis</i> Ms1 ^[33]	8.0~9.0	2.2~14.4	27	1.46 ^b	≤0.30	活性污泥
<i>Nitrosomonas</i> sp.JPCCT2 ^[34]	7.5~8.0	4.2~16.7	28	1.8 ^b	n.d.	活性污泥
<i>N. eutropha</i> C91 ^[3,31]	7.5~8.0	4.2~12.7	30	n.d.	≤0.03	市政污水
<i>Nitrosomonas</i> sp.AL212 ^[35-36]	7.2	0.5	25	n.d.	≤0.04	活性污泥
<i>N. stercoris</i> KYUHI-S ^[37]	7.0~9.0	3.6~234.1	25	3.5 ^b	≤2.11	牛粪堆肥

注:^a不低于最适pH值条件下的NRR的80%;^b半数抑制盐度;^c最大耐受盐度,n.d.为未检出.

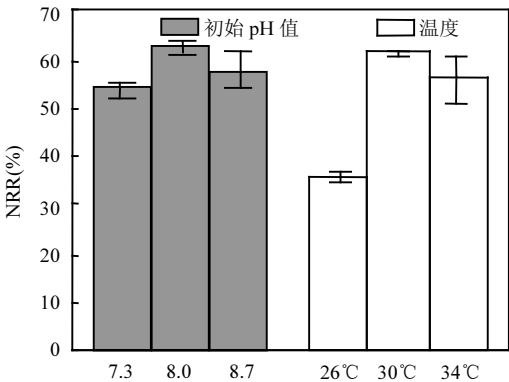


图 4 初始 pH 值和温度对 NRR 的影响
Fig.4 Effect of initial pH and temperature on NRR

2.2.2 温度和 pH 值对 CZ-4 菌的影响 由图 4 可见,尽管 30 和 34℃的 NRR 均显著高于 26℃的 NRR ($P<0.05$),但该菌在 26℃的 NRR 仍达到了最大 NRR

的 58%.类似的,尽管初始 pH=8.0 的 NRR 显著高于 pH=7.3 的 NRR($P<0.05$),但 pH=8.7 的 NRR 也能达到最大 NRR 的 91%,说明适宜 CZ-4 菌生长的 pH 值范围至少为 pH=7.3~8.7.

根据响应面试验的结果,温度和初始 pH 对 NRR 影响的回归方程为:

$$\text{NRR} = -2356.90 + 333.99 \times B + 68.65 \times A + 0.22 \times A \times B - 20.87 \times B^2 - 1.14 \times A^2 \quad (1)$$

式中: A 为温度,℃; B 为初始 pH 值.求解后的最佳培养条件为:温度 30.9℃($P<0.05$),初始 pH 值为 8.17 ($P<0.05$),温度与初始 pH 值之间无交互作用($P>0.05$).图 5 是该回归方程的三维立体响应曲面,显示温度的响应面弯曲度比初始 pH 值更大,说明温度对氨氮去除率的影响较大.

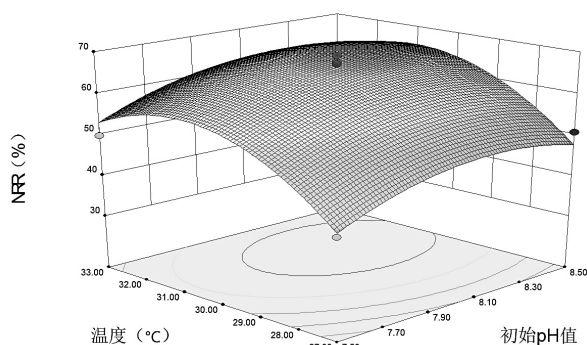


图5 温度和初始 pH 值的联合作用对 NRR 的影响

Fig.5 The combined influence of temperature and initial pH on NRR

根据响应面试验的结果,优化了补料发酵的温度和 pH 值,结果表明(图 6):尽管优化前后的平均氨氮去除速率(分别为 21.85 和 18.65mg/(L·h))和最大氨氮去除速率(分别为 48.45 和 57.59mg/(L·h))的变化均不大,但达到最大氨氮去除速率的时间从 239.5h 大幅度缩短至 79.5h,而最短倍增时间也由 48.5h 减少至 8.2h.说明优化后的温度和 pH 值条件能够明显加速 CZ-4 菌的生长,从而大幅缩短发酵周期。

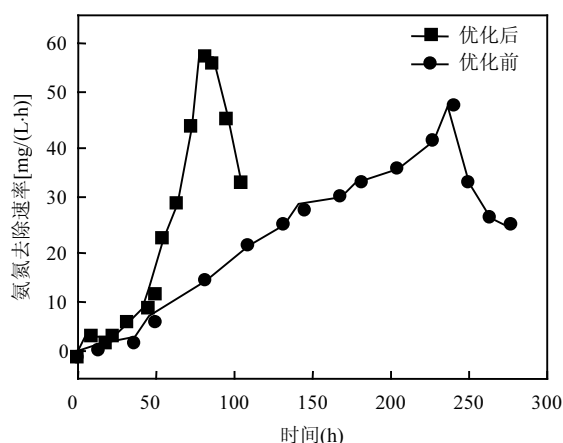


图6 补料发酵过程中氨氮去除速率的变化曲线

Fig.6 Change of $\text{NH}_3\text{-N}$ removal rate during fed-batch fermentation

温度是影响 AOB 活性的重要因素^[41],多数 AOB 的脱氨活性在 10~30 °C 之间随升温而增加^[42-43],但 CZ-4 菌的最适生长温度为 30.9 °C,明显高于其它亚硝化单胞菌(表 1),将有利于降低该菌在发酵生产时的降温难度.此外,该菌在 26~34 °C 时均保持较高的脱氨活性,也有利于在不同季节和不同温度的污水中应用该菌。

氨氮是 AOB 的能量与氮源,但只有 FA 才能透过细胞膜而被 AOB 所利用^[2],故必须提供足够的 FA 才能支撑氨氧化.但是 FA 本身具有毒性^[38],过高浓度的 FA 也可能直接抑制 AOB 的生长^[44].FA 的两面性使得不同类型的 AOB 具有不同的最适 FA 浓度(范围).而 pH 值则能够通过改变 $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ 的电离平衡^[12]而影响 FA 浓度,进而影响 AOB 的生长和代谢:多数 AOB 的最适 pH 值范围是 7~8.5^[27],且氨氧化速率随着 pH 值的下降而减小^[45].表 1 比较了多株亚硝化单胞菌株的最适 FA 浓度范围,其中,多数菌的最适 FA 范围比较狭窄,如 *Nitrosomonas* sp. AL212^[35-36] 的最适 FA 为 0.5mg/L,而 *N. europaea* 19718^[30] 的最适 FA 范围也仅为 5.9~18.1mg/L.而 CZ-4 菌在 pH=7.3~8.7 的范围内均具有较高的氨氧化活性,对应的 FA 浓度范围为 10.4~196.6mg/L,说明该菌对 FA 的亲和能力较强但又对高浓度的 FA 不甚敏感.目前,仅发现 *N. stercoris* KYUHI-S^[37] 具有与 CZ-4 菌类似的较宽 FA 适应范围,但二者的 16S rDNA 序列的差异较大(图 1,二者 Blastn 的相似度也仅为 96%).从应用上看,较宽的最适 FA 范围不但有利于将 CZ-4 菌用于处理不同 FA 浓度的污水,而且有利于降低发酵生产时的 pH 值控制难度。

2.3 对不同类型污水的脱氨效果

菌剂对垃圾渗滤液的脱氨效果明显(图 7):实验组的氨氮浓度显著低于对照组($P<0.05$),亚硝氮浓度则显著高于对照组($P<0.05$);实验组的氨氮平均去除速率达到 11.4mg/(L·h),类似的,同期的亚硝氮的平均积累速率也达到了 11.5mg/(L·h),说明脱氨的主要方式为氨氧化(将氨氮氧化为亚硝氮)。

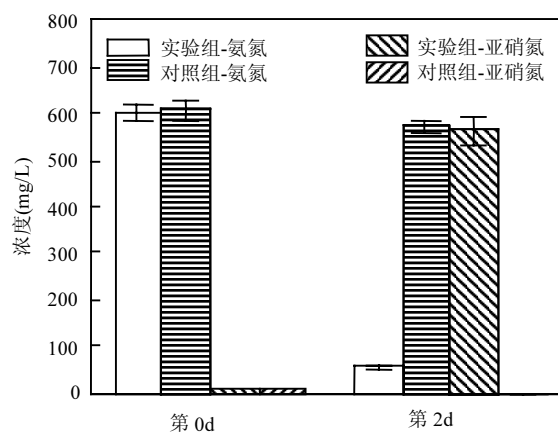


图7 垃圾渗滤液中的氨氧化效果

Fig.7 Ammonia oxidation effect in landfill leachate

接种 12h 后,菌剂对 3 个不同来源的富营养化湖水也有显著的脱氨效果(图 8a, $P<0.05$):野芷湖水的氨氮浓度从地表水 III 类标准提高至地表水 I 类标准(残余氨氮浓度仅为 0.11mg/L),汤逊湖水和南湖水的氨氮浓度也从地表水劣 V 类标准提高至地表水 II 类标准.类似的,在黑臭水中,按 0.1%剂量投加的菌剂也能够有效脱氨(图 8b, $P<0.05$),特别是氨氮去除速率会持续增加:从 12~24h 时的 0.09mg/(L·h),逐步增加至 48~60h 时的 0.45mg/(L·h).

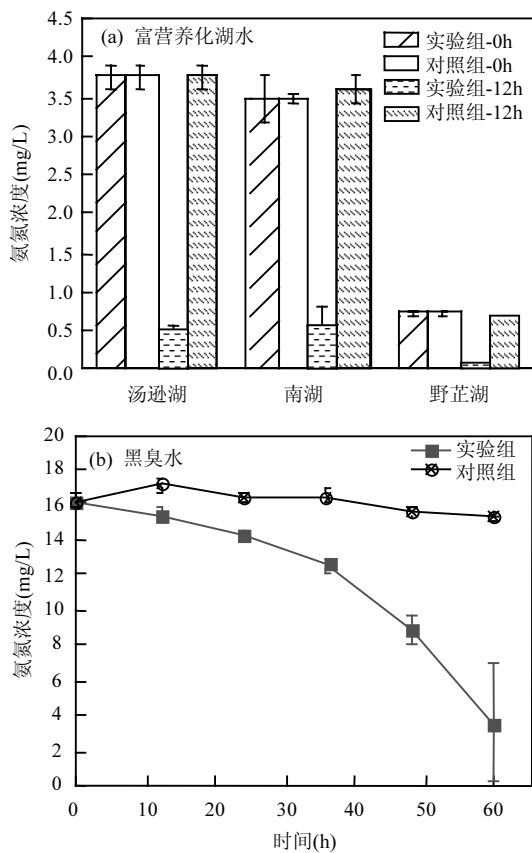


图 8 在富营养化湖水和黑臭水中的脱氨效果
Fig.8 Ammonia removal effect in eutrophic lake water and black odor water

根据亚硝化单胞菌的底物亲和力和生长速率的不同,可分为r策略者和k策略者^[5,46].其中,r策略者的底物亲和力低,生长快,如*N.eutropha*、*N.europaea*和*N.halophile*等^[14];k策略者的底物亲和力高,但生长慢,如*N.oligotropha*和*N.urea*等^[15].鲜见单株亚硝化单胞菌在不同氨氮浓度培养基或污水中均具有较高脱氨活性的报道.由于缺少将纯种亚硝化单胞菌应用于污水的报道,表 2 比较了前人将亚硝化单胞菌接种至不同初始氨氮浓度的培养基中的平均氨氮去除速率,结

果表明 CZ-4 菌不但在高氨氮培养基和高氨垃圾渗滤液中具有最高的氨氮去除速率,而且在中低浓度氨氮的地表水中也具有较高的氨氮去除速率,如该菌仅以 0.1%的接种比处理初始氨氮浓度仅为 15.88mg/L 的黑臭河水时的氨氮去除速率,与*N.mobilis* Ms1^[33]和*N.stercoris* KYUHI-S^[37]等菌在按 5%~10%比例接种于初始氨氮浓度为 100~532mg/L 的培养基中的速率相当(表 2),甚至明显高于*Nitrosomonas* sp. THD-1^[47]在氨氮浓度为 58mg/L 的培养基中的情况.而 CZ-4 菌对中低浓度氨氮具有较高亲和力的原因则可能与 AMO 有关:在基因组层面上,尽管多数 AOB 仅具有单拷贝的 AMO 基因,但少数 AOB 却具有多拷贝的 AMO 基因^[15],特别是与 CZ-4 菌遗传关系最接近的*N.eutropha* C91 也具有 2 个拷贝的 AMO 基因^[48],而较多的拷贝数有利于增强 AOB 的低氨适应性^[15,49];在表达调控的层面上,也有证据表明,AMO 的数量也会随着 FA 浓度的降低而升高^[50],从而增强 AOB 的低氨适应性.

表 2 不同亚硝化单胞菌脱氨效果的比较
Table 2 Comparison of NH₃-N removal ability of different *Nitrosomonas* strains

菌种	测试基质	接种量 (%)	初始氨氮浓度 (mg/L)	平均氨氮去除速率 [mg/(L·h)]	最短倍增时间 (h)
CZ-4(本研究)	垃圾渗滤液	1	600	11.40	n.d.
	巡司河水(黑臭水)	0.1	15.88	0.67	10.9
	南湖水(富营养化湖水)	1	3.26	0.24	n.d.
	合成培养基	5	415.92	18.65	8.2
<i>N.europaea</i> 19718 ^[31,53]	合成培养基	10	140	10.61	12.8
<i>N.mobilis</i> Ms1 ^[33]	合成培养基	5	100	0.67	10
<i>N.eutropha</i> CM-NRO14 ^[54]	合成培养基	n.d.	180	1.72	19.6
<i>Nitrosomonas</i> sp. THD-1 ^[47]	合成培养基	1	58	0.36	18.4
<i>N.stercoris</i> KYUHI-S ^[37]	合成培养基	10	532	0.68	24
<i>N.eutropha</i> C91 ^[31]	合成培养基	10	140	11.29	20.6
<i>N.europaea</i> ^[51]	合成培养基	3.75	100	n.d.	40.8
<i>N.europaea</i> ^[52]	合成培养基	1	100	n.d.	8.0

最短倍增时间是指示微生物生长的重要指标,已知的亚硝化单胞菌的最短倍增时间均不低于 8.0h^[51-52],而 CZ-4 菌在培养基中的最短倍增时间低

至 8.2h,明显低于与 CZ-4 菌遗传关系最接近的 *N. eutropha* C91^[31] 的最短倍增时间(表 2)。特别是,CZ-4 菌在黑臭水中的最短倍增时间也仅为 10.9h,甚至低于多数亚硝化单胞菌在合成培养基中的最短倍增时间(表 2)。综上所述,CZ-4 菌既对氨氮具有较高的亲和力,又具有较快的生长速度,兼具 r 策略和 k 策略的优点,说明该菌具有重要的应用价值。

3 结论

3.1 从垃圾渗滤液中分离了一株 *N. eutropha* CZ-4,其 16S rDNA 序列与 *N. eutropha* C91 的相似度为 99%。

3.2 CZ-4 菌的最适生长温度为 30.9℃,最适生长 pH 值为 7.3~8.7;其半数抑制盐度约为 2%,半数抑制 FNA 浓度约为 0.11mg/L。发酵条件优化后,最大氨氮去除速率为 57.59mg/(L·h),最短倍增时间为 8.2h。

3.3 CZ-4 菌能够有效去除初始氨浓度为 0.66~603mg/L 的地表水或污水中的氨氮,对垃圾渗滤液的最大氨氮去除速率为 11.4mg/(L·h),在黑臭水中的最短倍增时间为 10.9h。

参考文献:

- [1] Eighmy T T, Bishop P L. Distribution and role of bacterial nitrifying populations in nitrogen removal in aquatic treatment systems [J]. Water Research, 1989,23(8):947-955.
- [2] Guo J, Peng Y, Wang S, et al. Pathways and organisms involved in ammonia oxidation and nitrous oxide emission [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2013,43(21):2213-2296.
- [3] Koops H P, Purkhold U, Pommerening-Röser A, et al. The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria [J]. Prokaryotes, 2006, 5:778-811.
- [4] Kowalchuk G A, Stephen J R. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology [J]. Annual Review of Microbiology, 2001,55:485-529.
- [5] Koops H P, Andreas P R. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001,37(1):1-9.
- [6] Watson S W, Mandel M. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid composition of 27 strains of nitrifying bacterial [J]. Journal of Bacteriology, 1971,107(2):563-569.
- [7] Koops H P, Harms H. Deoxyribonucleic acid homologies among 96 strains of ammonia-oxidizing bacteria [J]. Archives of Microbiology, 1985,141(3):214-218.
- [8] Papp B, Torok T, Sandor E, et al. High cell density cultivation of the chemolithoautotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea* [J]. Folia Microbiologica (Praha), 2016,61(3):191-198.
- [9] Fiencke C, Spieck E, Bock E. Nitrifying bacteria [M]. Springer Netherlands, 2005:255-276.
- [10] 张宇坤,王淑莹,董怡君,等.游离氨和游离亚硝酸对亚硝态氮氧化菌活性的影响 [J]. 中国环境科学, 2014,34(5):1242-1247.
- [11] Zhang Y K, Wang S Y, Dong Y J, et al. Effect of FA and FNA on activity of nitrite-oxidizing bacteria [J]. China Environmental Science, 2014,34(5):1242-1247.
- [12] Groeneweg J, Sellner B, Tappe W. Ammonia oxidation in nitrosomonas at NH₃ concentrations near K_m: Effects of pH and temperature [J]. Water Research, 1994,28(12):2561-2566.
- [13] Claros J, Jimenez E, Aguado D, et al. Effect of pH and HNO₂ concentration on the activity of ammonia-oxidizing bacteria in a partial nitrification reactor [J]. Water Science & Technology, 2013, 67(11):2587-2594.
- [14] 张宇坤,王淑莹,董怡君,等.NaCl 盐度对氨氧化细菌活性的影响及动力学特性 [J]. 中国环境科学, 2015,35(2):465-470.
- [15] Zhang Y K, Wang S Y, Dong Y J, et al. Effect of NaCl salinity on activity of ammonia-oxidizing bacteria and kinetic characterization [J]. China Environmental Science, 2015,35(2):465-470.
- [16] Suwa Y, Imamura Y, Suzuki T, et al. Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to (NH₄)₂SO₄ in activated sludges [J]. Water Research, 1994,28(7):1523-1532.
- [17] Bollmann A, Laanbroek H J. Continuous culture enrichments of ammonia-oxidizing bacteria at low ammonium concentrations [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001,37(3):211-221.
- [18] Verhagen F J, Laanbroek H J. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991,57(11):3255-3263.
- [19] Verhagen F J M, Hageman P E J, Woldendorp J W, et al. Competition for ammonium between nitrifying bacteria and plant roots in soil in pots: effects of grazing by flagellates and fertilization [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994,26(1):89-96.
- [20] Oshiki M, Takagi R, Hatamoto M, et al. High-cell-density cultivation of *Nitrosomonas europaea* in a membrane bioreactor for performing protein purification and characterization studies [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2017,62(6):330-333.
- [21] Bollmann A, French E, Laanbroek H J. Isolation, cultivation, and characterization of ammonia-oxidizing bacteria and archaea adapted to low ammonium concentrations [J]. Methods in Enzymology, 2011,486:55-88.
- [22] 范秀容,李广武,沈 萍.微生物学实验 [M]. 2 版.北京:高等教育出版社, 1989:51-53.
- [23] Fan X R, Li G W, Shen P. Microbiology experiment [M]. 2nd Ed. Beijing: Higher Education Press, 1989:51-53.
- [24] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. [J]. Journal of Bacteriology, 1991,173(2):697-703.
- [25] 国家环境保护总局.水和废水监测分析方法 [M]. 4 版.北京:中国环境科学出版社, 2002:271-281.
- [26] State Environmental Protection Administration. Water and wastewater monitoring and analysis method [M]. 4th Ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002:271-281.
- [27] Belser L W, Schmidt E L. Growth and oxidation kinetics of three genera of ammonia oxidizing nitrifiers [J]. FEMS Microbiology Letters, 2010,7(3):213-216.
- [28] Anthonisen A C, Loehr R C, Prakasam T B et al. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid [J]. Water Pollution Control Federation, 1976,48(5):835-852.
- [29] Xiong Y, Cheng K. *Nitrosomonas eutropha* strain CZ-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, GenBank: MH999419.1 [EB/OL].

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH999419.1/>, 2019-4-10/2019-4-13.
- [26] Schmidt I, Bock E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha* [J]. Archives of Microbiology, 1997,167(2/3):106-111.
- [27] Jiménez E, Giménez J B, Seco A, et al. Effect of pH, substrate and free nitrous acid concentrations on ammonium oxidation rate [J]. Bioresource Technology, 2012,124(11):478-484.
- [28] Paul S, Bag S K, Das S, et al. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes [J]. Genome biology, 2008,9(4):R70.
- [29] Soppa J. From genomes to function: haloarchaea as model organisms [J]. Microbiology, 2006,152(3):585-590.
- [30] Koops H P, Bottcher B, Moller, et al. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp.nov., *Nitrosomonas ureae* sp.nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp.nov., *Nitrosomonas marina* sp.nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp.nov., *Nitrosomonas eutropha* sp.nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp.nov. and *Nitrosomonas halophila* sp.nov.[J]. Journal of General Microbiology, 1991,137:1689-1699.
- [31] Cua L S, Stein L Y. Effects of nitrite on ammonia-oxidizing activity and gene regulation in three ammonia-oxidizing bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters, 2011,319(2):169-175.
- [32] Stein L Y, Arp D J. Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998,64(10):4098-4102.
- [33] Thandar S M, Ushiki N, Fujitani H, et al. Ecophysiology and comparative genomics of *Nitrosomonas mobilis* Msl isolated from autotrophic nitrifying granules of wastewater treatment bioreactor [J]. Frontiers in Microbiology, 2016,7:1869.
- [34] Itoh Y, Sakagami K, Uchino Y, et al. Isolation and characterization of a thermotolerant ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. JPCCT2 from a thermal power station [J]. Microbes and Environments, 2013,28(4):432-435.
- [35] Limpiyakorn T, Kurisu F, Sakamoto Y, et al. Effects of ammonium and nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in laboratory-scale continuous-flow reactors [J]. FEMS microbiology ecology, 2007,60(3):501-512.
- [36] Yuichi S, Norton J M, Bollmann A, et al. Genome sequence of *Nitrosomonas* sp. strain AL212, an ammonia-oxidizing bacterium sensitive to high levels of ammonia [J]. Journal of Bacteriology, 2011,193(18):5047-5048.
- [37] Nakagawa T, Takahashi R. *Nitrosomonas stercoris* sp.nov., a chemolithoautotrophic ammonia-oxidizing bacterium tolerant of high ammonium isolated from composted cattle manure [J]. Microbes and Environments, 2015,30(3):221-227.
- [38] Park S, Bae W. Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid [J]. Process Biochemistry, 2009,44(6):631-640.
- [39] Tan N C G, Kampschreur M J, Wanders W, et al. Physiological and phylogenetic study of an ammonium-oxidizing culture at high nitrite concentrations [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008,31(2):114-125.
- [40] Loosdrecht M C M. The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater [J]. Water Science and Technology, 2001,44(1):153-160.
- [41] Chen M, Chen Y, Dong S, et al. Mixed nitrifying bacteria culture under different temperature dropping strategies: Nitrification performance, activity, and community [J]. Chemosphere, 2018,195:800-809.
- [42] Lee S, Cho K, Lim J, et al. Acclimation and activity of ammonia-oxidizing bacteria with respect to variations in zinc concentration, temperature, and microbial population [J]. Bioresource Technology, 2011,102(5):4196-4203.
- [43] Zeng J, Zhao D, Yu Z, et al. Temperature responses of ammonia-oxidizing prokaryotes in freshwater sediment microcosms [J]. PLOS ONE, 2014,9(6):1-8.
- [44] 孙洪伟,于雪,高宇学,等.游离氨对氨氧化菌(AOB)活性抑制动力学试验 [J]. 环境科学, 2018,39(9):4294-4301.
- Sun H W, Yu X, Gao Y X, et al. Inhibitory kinetics of free ammonia (FA) on ammonia-oxidizing bacteria (AOB) [J]. Environmental Science, 2018,39(9):4294-4301.
- [45] Fumasoli A, Morgenroth E, Udert K M. Modeling the low pH limit of *Nitrosomonas eutropha* in high-strength nitrogen wastewaters [J]. Water Research, 2015,83:161-170.
- [46] Serralta S, Joaquín, Gatti., et al. Enrichment of AOB and NOB population by applying a BABE Reactor in an activated sludge pilot plant [J]. Water Environment Research, 2015,87(4):369-377.
- [47] 楚江,王一农,章文军,等.亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas* sp.)THD-1分离鉴定及高密度培养 [J]. 生物学杂志, 2012,29(5):81-84.
- Chu J, Wang Y N, Zhang W J, et al. Isolating and high-density culturing of *Nitrosomonas* sp. THD-1 [J]. Journal of Biology, 2012, 29(5):81-84.
- [48] Stein L Y, Arp D J, Berube P M, et al. Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutropha* C91: Implications for niche adaptation [J]. Environmental Microbiology, 2008,9(12):2993-3007.
- [49] Hommes N G. Mutagenesis and expression of amo, which codes for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* [J]. Journal of Bacteriology, 1998,180(13):3353-3359.
- [50] Bock E, Wagner M. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source [J]. Prokaryotes, 2013,64:83-118.
- [51] Keen G A, Prosser J I. Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria [J]. Archives of Microbiology, 1987,147(1):73-79.
- [52] Skinner F A, Walker N. Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture [J]. Archives of Microbiology, 1961,38(4):339-349.
- [53] Cruvillier N, Poughon L, Creuly C, et al. Growth modelling of *Nitrosomonas europaea* ATCC(R) 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC(R) 25391: A new online indicator of the partial nitrification [J]. Bioresource Technology, 2016,220:369-377.
- [54] 杨浩锋,谢柳,周俊利,等.一株氨氧化细菌的分离鉴定及其氨氧化特性 [J]. 基因组学与应用生物学, 2013,32(4):453-458.
- Yang H F, Xie L, Zhou J L, et al. Isolation, identification and characteristics of an ammonia oxidizing bacterium [J]. Genomics and Applied Biology, 2013,32(4):453-458.

作者简介: 熊英(1994-),女,湖北孝感人,硕士研究生,主要研究方向为氨氧化微生物技术.发表论文1篇.