

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180102001

http://www.yykxjz.cn/

王越, 成钰, 李秋芬, 张艳. 不同氮源和环境因子对花津滩芽孢杆菌 SLWX2 脱氮性能的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 133-140

Wang Y, Cheng Y, Li QF, Zhang Y. Effects of different nitrogen sources and environmental factors on the nitrogen removal performance of *Bacillus hwajinpoensis* SLWX₂. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 133-140

不同氮源和环境因子对花津滩芽孢杆菌 SLWX₂ 脱氮性能的影响*

王越^{1,2} 成钰^{1,2} 李秋芬^{2①} 张艳²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展
重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 花津滩芽孢杆菌(*Bacillus hwajinpoensis*) SLWX₂ 是1株从海水养殖环境分离的可高效去除水体中氨氮(NH₄⁺-N)、亚硝酸氮(NO₂⁻-N)和硝酸氮(NO₃⁻-N)的菌株。本实验在添加葡萄糖条件下, 研究 NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 作为唯一氮源和环境因子(温度、pH、C/N 和盐度)对该菌株生长和脱氮性能的影响。结果显示, 菌株对这3种形态氮的去除与其生长保持一致, 主要发生在对数生长期; 当 NH₄⁺-N 作为唯一氮源时, 生长和脱氮均没有延迟期, NH₄⁺-N 在去除过程中, 没有 NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 的积累; 当 NO₂⁻-N 作为唯一氮源时, 生长和脱氮均有较长延迟期, 在 NO₂⁻-N 消除过程中, 没有 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 的积累; 当 NO₃⁻-N 作为唯一氮源时, 生长和脱氮也有较长延迟期, 在 NO₃⁻-N 消除过程中, 基本检测不到 NH₄⁺-N, NO₂⁻-N 呈先上升后下降趋势。环境因子影响研究表明, 环境因子对该菌株的生长和脱氮性能影响基本一致, 在 pH 为 6~8.5、温度为 28~40℃、C/N 为 5~25、NaCl 为 0~30 g/L 条件下, 菌株展现了良好的生长特性和脱氮性能。其中, 最佳条件中, 温度为 30℃, C/N 为 25, pH 为 8.0, 盐度为 25。该菌株可高效去除 NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N, 对环境条件适应范围较广, 在工业和养殖废水脱氮中具有较大的应用潜力。

关键词 花津滩芽孢杆菌; 生物脱氮; 唯一氮源; 环境因素; 去除率

中图分类号 Q938 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)01-0133-08

城镇生活污水、工业废水、农业肥料污染等带来的环境中过多的 N 会对水生生物产生危害(姜爱霞, 2000)。生物脱氮技术因可以弥补物理化学法的缺点, 成本低、效率高、操作简单且不会对环境造成二次污染(梁刘艳等, 2001)而受到重视。传统生物脱氮技术

具有硝化菌与反硝化菌对环境的要求不同、硝化菌生长缓慢且反硝化过程消耗有机氮源导致反应速率减缓等缺点(程海华等, 2016)。随着生物脱氮理论与技术的发展, 越来越多的异养硝化-好氧反硝化菌(Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification,

* 中国水产科学研究院基本科研业务费(2017HY-ZD0502; 2017HY-ZD1003)、国家自然科学基金项目(31170113)和海洋公益性行业科研专项(201305043)共同资助 [This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2017HY-ZD0502; 2017HY-ZD1003), the National Natural Science Foundation Program (31170113), and National Marine Public Welfare Research Project (201305043)]. 王越, E-mail: sdzchwangyue3637@163.com

① 通讯作者: 李秋芬, 研究员, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-01-02, 收修改稿日期: 2018-01-26

HN-AD)被发现和研究,这类菌株在生物脱氮过程中具有同时去除C和N、硝化与反硝化同时进行、无二次污染、节约反应系统面积与成本等独特优势(Ren *et al.*, 2014; 孙雪梅等, 2012; 乔森等, 2014; 苏婉昀等, 2013)。因而, HN-AD 的研究逐步成为生物脱氮研究领域的一大热点。目前, 我国对这类菌株的研究尚处于起步阶段, 主要集中于菌株筛选和脱氮特性研究(刘晶晶等, 2008; Wang *et al.*, 2009; 黄钧等, 2009; Yao *et al.*, 2013), 对其脱氮条件和机理的报道较少。本实验室从刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖环境中分离得到1株HN-AD菌, 经鉴定为花津滩芽孢杆菌(*Bacillus hwajinpoensis*), 命名为SLWX₂(成钰等, 2016)。Chen等(2011)、Kaçar等(2013)和Phelan等(2013)也分别在海胆(*Echinoidea*)、爱琴海东部海岸和海绵(*Phylum porifera*)中检测到花津滩芽孢杆菌, 但并未见对其脱氮性能的研究报道。环境因素对微生物脱氮性能的发挥具有重要意义, 目前, 已有许多研究表明, 不同氮源、pH、溶解氧、温度对不同脱氮生物的脱氮效率有明显影响(刘国玉等, 2003; 刘芳, 2014)。本实验室已研究了SLWX₂在多种氮源同时存在情况下的脱氮特性及其对不同浓度无机氮的耐受范围(成钰等, 2016)。本研究报道不同氮源和不同环境因子对该菌株生长及脱氮效果的影响, 探究其最佳脱氮条件, 以期菌株SLWX₂在生物脱氮工程中的使用提供理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

本实验室由刺参养殖环境中分离得到1株花津滩芽孢杆菌, 命名为SLWX₂。

1.2 培养基

NH₄⁺-N培养基: MgSO₄·7H₂O 0.06 g, NaH₂PO₄ 0.12 g, K₂HPO₄ 0.3 g, NaCl 18 g, CaCO₃ 0.6 g, FeSO₄ 0.06 g, (NH₄)₂SO₄ 0.141 g, 葡萄糖 0.75 g, 蒸馏水 600 ml, 121℃灭菌 20 min。

NO₂⁻-N培养基: MgSO₄·7H₂O 0.06 g, NaH₂PO₄ 0.12 g, K₂HPO₄ 0.3 g, NaCl 18 g, CaCO₃ 0.6 g, FeSO₄ 0.06 g, NaNO₂ 1.48 g, 葡萄糖 0.75 g, 蒸馏水 600 ml, 121℃灭菌 20 min。

NO₃⁻-N培养基: MgSO₄·7H₂O 0.06 g, NaH₂PO₄ 0.12 g, K₂HPO₄ 0.3 g, NaCl 18 g, CaCO₃ 0.6 g, FeSO₄ 0.06 g, KNO₃ 0.22 g, 葡萄糖 0.75 g, 蒸馏水 600 ml, 121℃灭菌 20 min。

培养基中的葡萄糖过滤灭菌后, 按比例加入到已灭菌的其他成分中。上述药品均为分析纯, 采购自国药集团。

1.3 不同氮源对菌株脱氮特性的影响

将活化后处于对数生长期的SLWX₂菌液, 接入分别以(NH₄)₂SO₄、NaNO₂和KNO₃为唯一氮源的培养基, 使菌液终浓度在(1.8~1.9)×10⁶ CFU/ml范围内, 每种3个平行, 于28℃、150 r/min震荡培养42 h。每6 h取样检测OD₆₀₀值及NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N和总氮(TN)的浓度。

1.4 不同环境因素对菌株生长和脱氮的影响

将对数生长期的SLWX₂菌液接种在NH₄⁺-N培养基内, 保证菌液终浓度在(1.8~1.9)×10⁶ CFU/ml范围内, 每组3个平行。培养基根据硝化培养基进行调整, NH₄⁺-N初始浓度约为50 mg/L, 在实验条件中, 温度为28℃、盐度为30、pH为7、C/N为10的基础上, 控制单因素变量, 各实验组单因素设定如下:

(1) 温度: 20℃、25℃、28℃、30℃、35℃、40℃、50℃;

(2) pH: 5、6、7、8、8.5、9;

(3) C/N: 1、5、10、15、20、30、40;

(4) 盐度: 0、5、10、20、25、30、50、80

150 r/min震荡培养24 h后, 取样测OD₆₀₀值, 离心, 取上清液, 测NH₄⁺-N值。

1.5 无机氮和总氮的测定方法

参照《海洋监测规范》(GB 17378.4-2007), NH₄⁺-N的测定采用次溴酸盐氧化法; NO₂⁻-N的测定采用盐酸萘乙二胺分光光度法; NO₃⁻-N的测定采用铈-镉还原法。TN测定采用总有机碳(Total organic carbon, TOC)分析仪(TOC-VCPH, TNM-1), 按照仪器使用说明书进行操作。

2 结果

2.1 不同氮源对菌株脱氮特性的影响

2.1.1 硫酸铵为唯一氮源时菌株的脱氮特性 在(NH₄)₂SO₄为唯一氮源的NH₄⁺-N培养基(添加葡萄糖)中连续培养菌株SLWX₂ 42 h。开始培养的24 h中, 菌体生长迅速, OD₆₀₀值达到0.45, 无明显延迟期, NH₄⁺-N和TN质量浓度由初始的54.28、54.63 mg/L分别降低至36.00、38.52 mg/L; 培养30 h后, 菌体OD₆₀₀值增长为0.83, NH₄⁺-N和TN质量浓度迅速下降, 去除率分别为82.50%和78.30%; 之后菌体增殖

稍缓慢,培养 36 h 后, NH₄⁺-N 和 TN 基本被去除完全, 去除率分别达 96.4%和 93.7% (图 1)。综上可知, NH₄⁺-N 和 TN 的去除主要发生在 SLWX₂ 菌株的对数增长期(0~30 h), 表明以 NH₄⁺-N 为唯一氮源时, 菌株 SLWX₂ 可快速生长和脱氮, 几乎没有延迟期, 30 h 内, 可去除 80%以上的 NO₄⁺-N, 在菌株 SLWX₂ 的生长过程中, 未检测到 NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N。

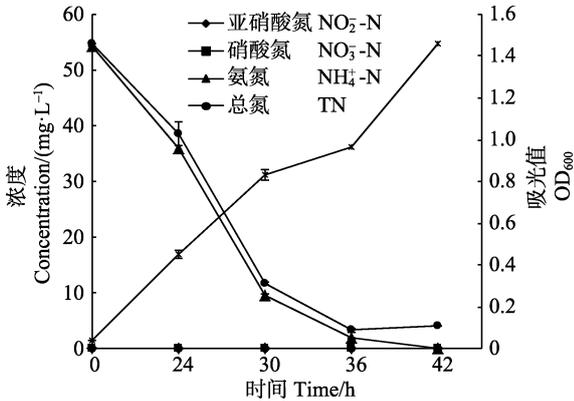


图 1 氨氮培养基中各指标的动态变化
Fig.1 Dynamic changes of each index in the ammonia culture medium

2.1.2 亚硝酸钠为唯一氮源时菌株的脱氮特性

在 NaNO₂ 为唯一氮源的培养基(添加葡萄糖)中, 连续培养 SLWX₂ 菌株 42 h。开始培养的 30 h 内, 菌体生长缓慢, NO₂⁻-N 和 TN 质量浓度下降幅度不明显, 即菌株 SLWX₂ 对 NO₂⁻-N 的适应期较长; 培养至 30 h 时, SLWX₂ 菌株进入对数生长期, NO₂⁻-N 和 TN 质量浓度开始有明显的下降; 培养 42 h 后, OD₆₀₀ 值达 1.38, NO₂⁻-N 和 TN 去除率分别为 99.9%和 92.5%(图 2)。综上可知, NO₂⁻-N 和 TN 的快速去除发生在 30~42 h 的对数生长期, 即在 NaNO₂ 为唯一氮源时, 菌株 SLWX₂ 的生长和脱氮会延迟, 去除 NO₂⁻-N 主要在 24 h 以后, 但对 NaNO₂ 的去除很彻底。

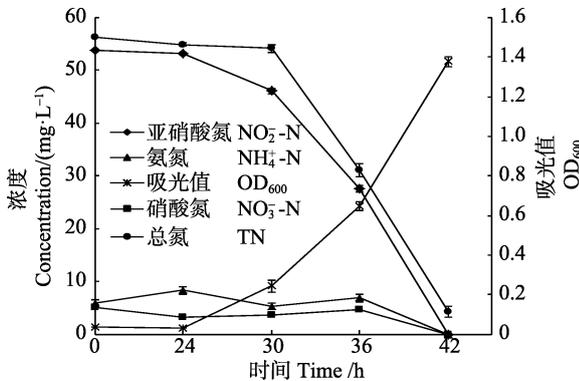


图 2 亚硝酸盐氮培养基中各指标的动态变化
Fig.2 Dynamic changes of each index in the nitrite nitrogen medium

在 SLWX₂ 菌株的生长过程中, NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 的质量浓度基于初始值小幅度波动, 没有明显积累, 表明 NO₂⁻-N 去除过程中, 不产生 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N。

2.1.3 硝酸钾为唯一氮源时菌株的脱氮特性

在 KNO₃ 为唯一氮源的培养基(添加葡萄糖)中, 连续培养 SLWX₂ 菌株 48 h, 开始培养的 30 h 内, 菌体生长缓慢, NO₂⁻-N 和 TN 质量浓度基本无变化, 即菌株 SLWX₂ 对 KNO₃ 具有较长适应期; 培养至 30 h 时, SLWX₂ 菌株进入增殖迅速的对数生长期, NO₃⁻-N 和 TN 质量浓度呈直线下降, 出现 NO₂⁻-N 的积累; 培养 42 h 时, OD₆₀₀ 值达 0.98, NO₃⁻-N 和 TN 去除率分别为 65.0%和 46.6%, NO₂⁻-N 为 14.69 mg/L, 为最大累积量; 随后的 6 h 中, NO₃⁻-N 和 TN 持续下降, NO₂⁻-N 开始降低, 到 48 h 时, NO₃⁻-N 和 TN 去除率分别达 78.1%和 75.7%, NO₂⁻-N 质量浓度也降至 0.051 mg/L(图 3)。综上可知, NO₃⁻-N 和 TN 的大量去除发生在菌株 SLWX₂ 的对数生长后期, 即培养 30 h 之后。说明菌株 SLWX₂ 以 NO₃⁻-N 为唯一氮源是, 脱氮会发生延迟, 主要发生在对数增长期的中后期, 且脱氮效率较 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 稍低。

在菌株 SLWX₂ 整个脱氮过程中, 检测到 NaNO₂ 质量浓度呈先上升后下降趋势, 有少量前期积累, 但检测不到 NH₄⁺-N, 说明 NO₃⁻-N 去除过程中产生 NO₂⁻-N, 但不产生 NH₄⁺-N。

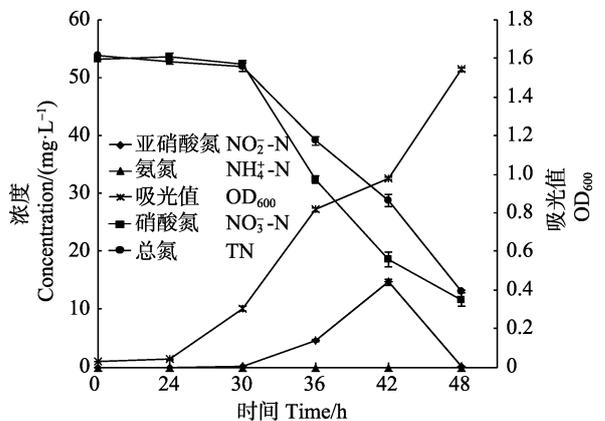


图 3 硝酸盐氮培养基中各指标的动态变化
Fig.3 Dynamic changes of each index in the nitrate nitrogen medium

2.2 不同环境因素对菌株生长和脱氮的影响

2.2.1 温度对菌株 SLWX₂ 生长和氨氮去除的影响

温度对菌株 SLWX₂ 的生长和脱氮能力影响较大。在 20℃ 条件下, 菌体生长缓慢, 浓度保持在很低的水平, 且对 NH₄⁺-N 的去除效果不明显; 在 25℃、28℃ 条件下, 菌株 SLWX₂ 菌体浓度和 NH₄⁺-N 去除率较

20℃时有所增加。在 30~40℃的培养范围内, 菌体均生长良好, 且能高效脱氮, 对应 OD₆₀₀ 值分别为 1.200、0.931 和 0.764, NH₄⁺-N 去除率分别达 99.8%、99.4% 和 84.7%。但在 50℃培养条件下, 菌体停止生长, OD₆₀₀ 值仅为 0.0191(图 4)。综上可见, 菌株 SLWX₂ 生长的适宜温度为 28~40℃, 并能实现较高的 NH₄⁺-N 去除率, 其中, 最适菌体生长及脱氮温度为 30℃。

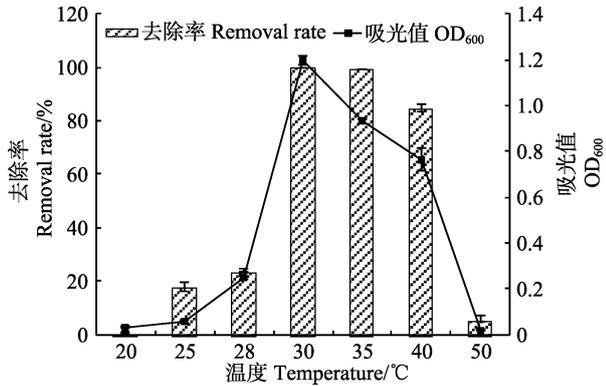


图 4 不同温度对菌株 SLWX₂ 生长和脱氮的影响
Fig.4 Effect of temperature on the growth and nitrogen removal of SLWX₂

2.2.2 pH 对菌株 SLWX₂ 生长和氨氮去除的影响

菌株 SLWX₂ 在不同的 pH 条件下, 培养 24 h 后测得的生长和 NH₄⁺-N 去除情况见图 5。从图 5 可以看出, 菌株 SLWX₂ 能在 pH 为 6~8.5 范围内, 较好生长且维持较高的 NH₄⁺-N 去除率, 相应 OD₆₀₀ 值为 0.249、0.261、0.464 和 0.364, 去除率分别为 49.9%、49.8%、59.6% 和 55.8%。太偏酸性(pH 为 5)或碱性(pH 为 9)的条件均不利于菌体生长和 NH₄⁺-N 的去除, 菌体 OD₆₀₀ 值仅为 0.0124 和 0.131, NH₄⁺-N 去除率低至 25.3% 和 23.2%(图 5)。综上可见, 弱酸、中性和弱碱(pH 为 6~8.5)条件下, 菌株 SLWX₂ 均能生长, 其对 pH 具有较宽的适应范围, 中性偏碱的条件更利于其生长及脱氮, 最适 pH 为 8.0。

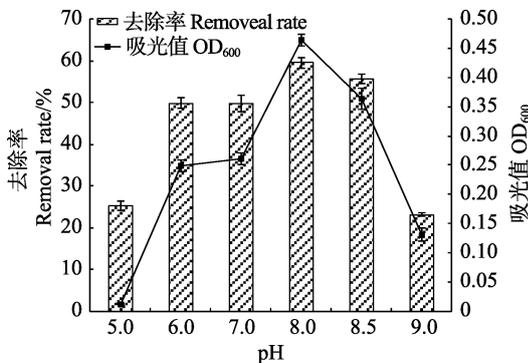


图 5 不同 pH 对菌株 SLWX₂ 生长和脱氮的影响
Fig.5 Effect of pH on the growth and nitrogen removal of SLWX₂

2.2.3 C/N 对菌株 SLWX₂ 生长和氨氮去除的影响

菌株 SLWX₂ 在 C/N 为 1 时, OD₆₀₀ 值仅为 0.129, 生长缓慢, 且 NH₄⁺-N 去除率仅为 8.7%。随着 C/N 的增大至 25 时, 菌体生长速度与 NH₄⁺-N 去除率逐渐提高。C/N 为 5~25 时, 菌体生长 OD₆₀₀ 值分别为 0.235、0.248、0.264、0.291 和 0.463, 对应的 NH₄⁺-N 去除率分别达 16.0%、18.2%、23.1%、36.9% 和 45.7%。C/N 为 20~25 时, 菌体生长与 NH₄⁺-N 去除效果最佳, 但在 C/N 继续增大时, 菌体生长受到限制, OD₆₀₀ 值明显下降, 对应的 NH₄⁺-N 去除率也降至 10.0% 和 4.3% (图 6)。综上可见, 菌株 SLWX₂ 生长及脱氮的最适 C/N 为 25。

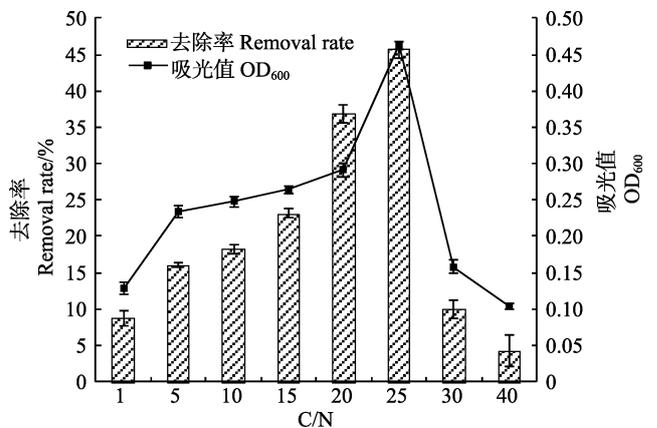


图 6 不同 C/N 对菌株 SLWX₂ 生长和脱氮的影响
Fig.6 Effect of C/N on the growth and nitrogen removal of SLWX₂

2.2.4 盐度对菌株 SLWX₂ 生长和氨氮去除率的影响

从图 7 可以看出, 菌株 SLWX₂ 在 NaCl 为 0~25 g/L 培养条件下, 具有良好的生长和脱氮性能, OD₆₀₀ 值分别为 0.830、0.926、0.979、1.01 和 1.08, NH₄⁺-N 去除率均在 90% 以上, 分别达 99.4%、99.8%、96.2%、97.0% 和 100%。菌体生长随着 NaCl 浓度的

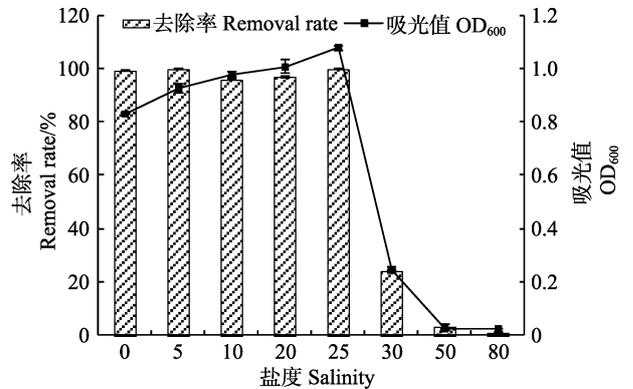


图 7 不同盐度对菌株 SLWX₂ 生长和脱氮的影响
Fig.7 Effect of salinity on the growth and nitrogen removal of SLWX₂

增加而受到限制, 在 NaCl 为 30 g/L 时, NH₄⁺-N 去除率降至 24.0%(图 7)。综上所述, 盐度对菌株 SLWX₂ 的生长和 NH₄⁺-N 去除有较大影响, 淡水至低盐度有利于菌体的生长和脱氮, 生长及脱氮的最适盐度为 25, 盐度高于 30 则不利。

3 讨论

3.1 不同氮源对菌株脱氮性能的影响

生物脱氮可以发生在菌体生长的任何一个时期, 因菌种而异。张光亚等(2003)研究表明, 硝化作用主要发生在老龄细胞; 辛玉峰等(2011)和黄廷林等(2015)分离得到的菌株不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) YF14 和皮特不动杆菌(*Acinetobacter pittii*) A14, 其硝化和反硝化均发生在菌体生长的稳定期; 郭强等(2015)研究表明, 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的硝化过程发生在对数期和稳定期。本研究发现, 菌株 SLWX₂ 脱氮主要发生在菌体对数生长期, 与王弘宇等(2009)、刘天琪等(2015)的结论一致。不同氮源条件下, 菌株 SLWX₂ 进入对数增长期的时间不同, NH₄⁺-N 为氮源时, 几乎没有延迟期, 0~30 h 为对数增长期, 而 NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 分别为氮源时, 延迟期较长(0~30 h), 30~48 h 才为对数增长期, 与已报道的好氧反硝化比异养硝化更快进入对数增长期(蒋静艳等, 2009)这一结论不同, 可能是因为 2 个相关酶系的激活顺序不同, 或者 NaNO₂ 在溶液产生游离亚硝酸(FNA), 对菌株生长和代谢产生抑制作用(Zeng *et al*, 2008), 又或者是菌株对 NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 的耐受性较差。

NO₂⁻-N 为氮源时, 反应体系中没有 NH₄⁺-N 和 NO₃⁻-N 的积累, 与菌株劳氏茨污水杆菌(*Deffluviobacter lusatiensis*) DN7 (肖继波等, 2012)和假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) qy37(张培玉等, 2010)在 NO₂⁻-N 去除过程中, NO₃⁻-N 明显积累不同, 但类似于菌株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) YL(梁贤等, 2015)的 NO₂⁻-N 去除特性, 说明菌株 SLWX₂ 可能利用 NaNO₂ 还原酶(Nir)将 NO₂⁻-N 直接转变为 N 的气态产物而脱离系统。NO₃⁻-N 为唯一氮源时, NO₂⁻-N 在 30 h 开始积累, 42 h 达到最大值, 为 14.69 mg/L, 48 h 被去除至 0.05 mg/L, 表明菌株 SLWX₂ 可能先利用 KNO₃ 还原酶, 将 NO₃⁻-N 还原为 NO₂⁻-N, 再诱导产生 Nir, 进而将 NO₂⁻-N 还原为气态 N 溢出系统, 与陈茂霞等(2013)的结论相一致。菌株利用 NO₂⁻-N 进行反硝化作用, NO₂⁻-N 去除率在 42 h 时达 99.9%, 但 NO₃⁻-N 去除过程中, NO₃⁻-N 去除率在 48 h 时为 78.1%, 说明该菌株对 NO₂⁻-N 的利用率高于 NO₃⁻-N, 这与马放等(2005)

分离出更易利用 NO₂⁻-N 的菌株裂解亚氯酸假单胞菌(*Pseudomonas chloritidismutans*) X31 结果相同。

3.2 环境因子对菌株生长和脱氮性能的影响

芽孢杆菌在微生物处理含 N 废水中有巨大的研究和应用价值, 而 1 株有应用价值的脱氮菌株, 也需要有较为宽泛的环境适应性(李秋芬等, 2013)。本研究探究不同环境因素(温度、pH、C/N、盐度)对菌株 SLWX₂ 的生长和脱氮能力的影响, 发现不同的温度、pH、C/N 和盐度对该菌株的生长和脱氮均有明显的影响, 但该菌株对环境的适应范围较宽, 在温度为 28~40℃、pH 为 6~8.5、C/N 为 5~25、盐度为 5~30 的范围内, 均能较好地生长, 并维持较高的脱氮能力, 而且菌体生长越好, 脱氮效果越好, 说明菌体生长和脱氮基本是同步进行的, 这与王娟等(2010)的研究结果一致。

多数报道的芽孢杆菌生长和脱氮性能研究均在 30℃ 条件下进行, 蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) WZX-8 的最大 NH₄⁺-N 去除率发生在 30℃ 培养下(廖小红等, 2009), 气单胞菌(*Aeromonas* sp.) HN-02 的最佳 NH₄⁺-N 去除温度也为 30℃(陈茂霞等, 2013), 这与本研究的菌株 SLWX₂ 的最适生长和脱氮温度相同。研究还发现, 菌株 SLWX₂ 在 40℃ 条件下, 仍能良好生长和脱氮, NH₄⁺-N 去除率达 84.7%, 与其他这类菌株(梁贤等, 2015; 陈茂霞等, 2013; 李秋芬等, 2013)相比, 具有耐高温的优势。温度为 20℃ 以下和 50℃ 以上时, 菌体基本不生长, 脱氮效果不佳, 这是因为低温使得酶活性受到抑制, 而高温条件下, 酶易失活, 从而影响脱氮效果。

环境中 pH 与微生物的生命活动密切相关, 是影响微生物活性的重要指标之一。苏俊峰等(2012)研究表明, 环境中 H⁺ 浓度不能超过微生物酶的适应范围, 否则影响酶活性, 影响微生物对营养物质的吸收。菌株 SLWX₂ 的最适脱氮 pH 范围为 6~8.5, 与陈茂霞等(2013)研究的 pH 为 6~9 相似。而海水养殖水体的 pH 一般是中性或偏碱性, 所以该菌株可以在实际养殖废水处理中应用。

异养菌通常需要有有机物作为氮源和能源, 有机碳不足时, 不利于菌体生长, 相应的生理功能也会降低, 因此, HN-AD 菌对 C/N 的要求较高(鲜思淑等, 2016)。本研究通过固定 N 添加量和调整葡萄糖的质量浓度控制 C/N 时发现, 在 C/N 为 5~25 范围内, NH₄⁺-N 去除率随 C/N 增加而增大, 但 C/N 高于 30 时, NH₄⁺-N 去除率开始下降, 这种先上升后下降的趋势与孙庆花等(2016)、李秋芬等(2013)研究结果相似。因为氮源远高于菌体的生长所需量时, 氮源成为非限制因素

(王弘宇等, 2007), 过多的氮源会嵌入酶结构导致酶活性降低, 硝化能力也随之下降(宋宇杰等, 2013)。不同菌株的最佳脱氮 C/N 并不相同, 菌株 X₃ 的最佳 C/N 为 5 时(李秋芬等, 2013), 雷氏普威登斯菌(*Providencia rettgeri*) YL(席星林等, 2014)的最佳脱氮效果发生在 C/N 为 10 时, 假单胞菌 XS76(吴建江等, 2013)去除 NH₄⁺-N 的最适 C/N 为 15, 本研究的菌株 SLWX₂ 对氮源的要求较高, 最佳 C/N 为 25, 但实际含 N 废水中的 C/N 较低, 若增加氮源便导致脱氮成本增加, 因此, 还需要针对低 C/N, 对该菌进行驯化, 以提高脱氮效率。

微生物可以通过渗透压调节自身新陈代谢, 因而对盐度有一定的适应能力(张彦灼等, 2015), 但盐度过高, 会引起渗透压升高而抑制代谢活动, 降低微生物活性, 严重时可导致细胞脱水发生质壁分离, 甚至死亡(鲜思淑等, 2016)。多数芽孢杆菌的脱氮特性研究都是在低盐条件下进行的, 而本研究的菌株 SLWX₂ 是从海水中分离得到, 具有较好的耐盐性, NaCl 为 2.5% 时, 菌株生长和脱氮效果最佳, NH₄⁺-N 去除率达 100%, NaCl 为 3% 时, 菌体仍能生长, 也有一定的脱氮效果。值得关注的是该菌株在 NaCl 为 0 条件下仍生长良好, NH₄⁺-N 去除率达 90% 以上, 这与同样分离于海水的菌株 X31 (马放等, 2005) 在无盐条件下不能生长的特性相比, 有明显优势。综上所述, 该菌株在淡水或低盐度含 N 废水处理中有较大的应用价值, 也可以通过驯化提高其耐盐性, 应用于海水养殖废水的脱氮。

以上研究表明, 该菌株对无机氮和 TN 的脱除效率均较高, 且对环境因子的适应性也较宽, 因此, 具有较大的应用潜力, 后续将加强该菌在海水养殖污水处理中的实际验证。

参 考 文 献

- Chen MX, Wang H, Zhou HZ, *et al.* Screening and characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain HN-02. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19(4): 688–693 [陈茂霞, 王欢, 周后珍, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 HN-02 的筛选及其特性. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(4): 688–693]
- Chen YG, Zhang YQ, He JW, *et al.* *Bacillus hemisentroti* sp. nov. a moderate halophile isolated from a sea urchin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(12): 2950–2955
- Cheng HH, Zhu JX, Qu KM, *et al.* Effect of different organic carbon sources and C/N on the bio-filter purification. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 127–134 [程海华, 朱建新, 曲克明, 等. 不同有机碳源及 C/N 对生物滤池净化效果的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 127–134]
- Cheng Y, Li QF, Fei YT, *et al.* Screening and nitrogen removing characteristics of heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria SLWX₂ from sea water. *Environmental Science*, 2016, 37(7): 2681–2688 [成钰, 李秋芬, 费聿涛, 等. 海水异养硝化-好氧反硝化芽孢杆菌 SLWX₂ 的筛选及脱氮特性. *环境科学*, 2016, 37(7): 2681–2688]
- Gu Q, Yang YL, Chen HP. Study on characteristic of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a strain of *Bacillus licheniformis*. *Environmental Science and Technology*, 2015, 38(7): 38–42 [郭强, 杨云龙, 陈宏平. 一株地衣芽孢杆菌的异养硝化-好氧反硝化特性研究. *环境科学与技术*, 2015, 38(7): 38–42]
- Huang J, Yang H, Mu LP, *et al.* Characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification strain DN1.2. *Chinese High Technology Letters*, 2009, 19(2): 213–218 [黄钧, 杨航, 牟丽婷, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌株 DN1.2 的脱氮特性研究. *高技术通讯*, 2009, 19(2): 213–218]
- Huang TL, Zhang LN, Zhang HH, *et al.* Screening and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain. *Ecology and Environment Sciences*, 2015, 24(1): 113–120 [黄廷林, 张丽娜, 张海涵, 等. 一株贫营养异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及脱氮特性. *生态环境学报*, 2015, 24(1): 113–120]
- Jiang AX. Study of the mechanism and countermeasures of the nitrogen pollution in water environment. *China Population, Resources and Environment*, 2000(2): 77–78 [姜爱霞. 水环境氮污染的机理和防治对策. *中国人口·资源与环境*, 2000(2): 77–78]
- Jiang JY, Hu ZH, Huang Y. Isolation of heterotrophic nitrifiers/aerobic denitrifiers and their roles in N₂O production for different incubations. *Environmental Science*, 2009, 30(7): 2105–2111 [蒋静艳, 胡正华, 黄耀. 异养硝化/好氧反硝化菌的分离鉴定及其在不同培养条件下产 N₂O 研究. *环境科学*, 2009, 30(7): 2105–2111]
- Kaçar A, Koçyiğit A. Characterization of heavy metal and antibiotic resistant bacteria isolated from aliaga ship dismantling zone, eastern Aegean Sea, Turkey. *International Journal of Environmental Research*, 2013, 7(4): 895–902
- Li QF, Sun XM, Zhang Y, *et al.* Environmental adaptability of heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria strain X3. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 120–125 [李秋芬, 孙雪梅, 张艳, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌株 X3 的环境适应性. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 120–125]
- Liang LY, Wang P. Study on method of nitrogen removal from waste water. *Journal of Beijing Institute of Light Industry*, 2001, 19(1): 29–35 [梁刘艳, 汪苹. 废水脱氮处理方法研究. *北京轻工业学院学报*, 2001, 19(1): 29–35]
- Liang X, Ren YX, Yang L, *et al.* Characteristics of nitrogen removal by a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium YL. *Environmental Science*, 2015, 36(5): 1749–1755 [梁贤, 任勇翔, 杨垒, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 YL 的脱氮特性. *环境科学*, 2015, 36(5): 1749–1755]
- Liao XH, Wang P, Diao HF, *et al.* Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification ability of *Bacillus cereus* WXZ-8. *Environmental Pollution and Control*, 2009, 31(7): 17–20 [廖小红, 汪苹, 刁惠芳, 等. 蜡状芽孢杆菌 WXZ-8 的异养硝化/好氧反硝化性能研究. *环境污染与防治*, 2009, 31(7): 17–20]

- Liu F. Study on enrichment and denitrification conditions of heterotrophic nitrifiers and aerobic denitrifiers. Master's Thesis of Northeastern University, 2014 [刘芳. 异养硝化菌和好氧反硝化菌富集及脱氮条件研究. 东北大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Liu GY, Zhao YL. Study on the ways of biological denitrification of waste water. Sci-Tech Information Development and Economy, 2003, 13(4): 80–82 [刘国玉, 赵月龙. 污水生物脱氮方法研究. 图书情报导刊, 2003, 13(4): 80–82]
- Liu JJ, Wang P, Wang H. Study on denitrification characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrifier. Research of Environmental Sciences, 2008, 21(3): 121–125 [刘晶晶, 汪苹, 王欢. 一株异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮性能研究. 环境科学研究, 2008, 21(3): 121–125]
- Liu TQ, Jin RF, Zhou JT, *et al.* Nitrogen-removal characteristic of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacterium ADN-42. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(2): 989–996 [刘天琪, 金若菲, 周集体, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 ADN-42 的脱氮特性. 环境工程学报, 2015, 9(2): 989–996]
- Ma F, Wang HY, Zhou DD, *et al.* Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas chloritidismutans* strain X31. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2005, 33 (7): 42–46 [马放, 王弘宇, 周丹丹, 等. 好氧反硝化菌株 X31 的反硝化特性. 华南理工大学学报(自然科学版), 2005, 33 (7): 42–46]
- Phelan RW, O'Halloran JA, Kennedy J, *et al.* Diversity and bioactive potential of endospore-forming bacteria cultured from the marine sponge *Haliclona simulans*. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(1): 65–78
- Qiao S, Liu XJ, Zhou JT. Research progress of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification in biological denitrification. Journal of Safety and Environment, 2014, 14(2): 128–135 [乔森, 刘雪洁, 周集体. 异养硝化-好氧反硝化在生物脱氮方面的研究进展. 安全与环境学报, 2014, 14(2): 128–135]
- Ren YX, Yang L, Liang X. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB. Bioresource Technology, 2014, 171: 1–9
- Song YJ, Li Y, Liu YX, *et al.* Effect of carbon and nitrogen sources on nitrogen removal by a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain Y1. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(9): 2491–2497 [宋宇杰, 李屹, 刘玉香, 等. 碳源和氮源对异养硝化好氧反硝化菌株 Y1 脱氮性能的影响. 环境科学学报, 2013, 33(9): 2491–2497]
- Su JF, Huang WB, Ma F, *et al.* Heterotrophic nitrification bacteria dispose the wastewater of NH₄-N and influence factor. Ecology and Environmental Sciences, 2012, 21, (9): 1599–1603 [苏俊峰, 黄文斌, 马放, 等. 异养硝化细菌处理氨氮废水及影响因素研究. 生态环境学报, 2012(9): 1599–1603]
- Su WY, Gao JF, Zhao HM. Research progress in heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria. Industrial Water Treatment, 2013, 33(12): 1–5 [苏婉昀, 高俊发, 赵红梅. 异养硝化-好氧反硝化菌的研究进展. 工业水处理, 2013, 33(12): 1–5]
- Sun QH, Yu DS, Zhang PY, *et al.* Identification and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain isolated from marine environment. Chinese Journal of Environmental Science, 2016, 37(2): 648–654 [孙庆花, 于德爽, 张培玉, 等. 1 株海洋异养硝化-好氧反硝化菌的分离鉴定及脱氮特性. 环境科学, 2016, 37(2): 648–654]
- Sun XM, Li QF, Zhang Y, *et al.* Phylogenetic analysis and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria strain from marine environment. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(6): 687–695 [孙雪梅, 李秋芬, 张艳, 等. 一株海水异养硝化-好氧反硝化菌系统发育及脱氮特性. 微生物学报, 2012, 52(6): 687–695]
- Wang HY, Ma F, Su JF, *et al.* Influence of carbon source and C/N ratio on nitrogen removal of aerobic denitrifier. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(6): 968–972 [王弘宇, 马放, 苏俊峰, 等. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响. 环境科学学报, 2007, 27(6): 968–972]
- Wang HY, Ma F, Yang K, *et al.* Ammonia removal by two strains of heterotrophic nitrifying bacteria. China Environmental Science, 2009, 29(1): 47–52 [王弘宇, 马放, 杨开, 等. 两株异养硝化细菌的氨氮去除特性. 中国环境科学, 2009, 29(1): 47–52]
- Wang J, Dai XL, Song ZF, *et al.* Isolation and identification and identification of ammonifying bacterium and characteristics of degrading NH₃-N. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(6): 1198–1201 [王娟, 戴习林, 宋增福, 等. 一株氨化细菌的分离、鉴定及氨氮降解能力的初步分析. 水生生物学报, 2010, 34(6): 1198–1201]
- Wu JJ, Wang ZY, Xu PY. Isolation and identification of an efficiently heterotrophic nitrifier, and its removal characterization of ammonia nitrogen. China Environmental Science, 2013, 33(7): 1309–1315 [吴建江, 王兆阳, 许培雅. 一株高效异养硝化菌的分离、鉴定及其氨氮去除特性. 中国环境科学, 2013, 33(7): 1309–1315]
- Xi XL, Pan YJ. The denitrification performance study of heterotrophic nitrifying bacteria *Providencia rettgeri* strain YL based on environmental factors. Environmental Engineering, 2014(s1): 144–147 [席星林, 潘玉洁. 基于环境因子的异养硝化菌 *Providencia rettgeri* strain YL 脱氮性能研究. 环境工程, 2014(s1): 144–147]
- Xian SS, Chen MX, Xiong R, *et al.* Research advances of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification under different factors. Technology of Water Treatment, 2016(1): 1–6 [鲜思淑, 陈茂霞, 熊蓉, 等. 异养硝化-好氧反硝化影响因素研究进展. 水处理技术, 2016(1): 1–6]
- Xiao JB, Jiang HX, Chu SY. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium *Deffluvibacter lusatiensis* str. DN7 using different sources of nitrogen. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(20): 6463–6470 [肖继波, 江惠霞, 褚淑祎. 不同氮源下好氧反硝化菌 *Deffluvibacter lusatiensis* str. DN7 的脱氮特性. 生态学报, 2012, 32(20): 6463–6470]
- Xin YF, Qu XH, Yuan MD, *et al.* Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Acinetobacter* sp. YF14 and its denitrification activity. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(12): 1646–1654 [辛玉峰, 曲晓华, 袁梦冬, 等. 一株异养硝化-反硝化不动杆菌的分离鉴定及脱氮活性. 微生物学报, 2011, 51(12): 1646–1654]

- Yao S, Ni JR, Chen Q, *et al.* Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *Bioresource Technology*, 2013, 127: 151–157
- Zhang GY, Chen MC, Han RY, *et al.* Isolation, identification and phylogenetic analysis of a heterotrophic nitrifier. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2): 156–161 [张光亚, 陈美慈, 韩如吻, 等. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析. *微生物学报*, 2003, 43(2): 156–161]
- Zhang PY, Qu Y, Yu DS, *et al.* Comparison of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification system by strain qy37 and its accelerating removal characteristic of $\text{NH}_4^+\text{-N}$. *Environmental Science*, 2010, 31(8): 1819–1826 [张培玉, 曲洋, 于德爽, 等. 菌株 qy37 的异养硝化/好氧反硝化机制比较及氨氮加速降解特性研究. *环境科学*, 2010, 31(8): 1819–1826]
- Zeng QW, Liang YX, Ge XY. Screening of denitrobacteria and preliminary study about its denitrification properties. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2008, 27 (5): 616–620
- Zhang YZ, Li J, Chen GH, *et al.* Effects of NaCl concentration on partial nitrification and denitrification by aerobic granular sludge. *Research of Environmental Sciences*, 2015, 28(5): 823–830 [张彦灼, 李军, 陈光辉, 等. NaCl 对好氧颗粒污泥短程硝化反硝化的影响. *环境科学研究*, 2015, 28(5): 823–830]

(编辑 陈严)

Effects of Different Nitrogen Sources and Environmental Factors on the Nitrogen Removal Performance of *Bacillus hwajinpoensis* SLWX₂

WANG Yue^{1,2}, CHENG Yu^{1,2}, LI Qiufen^{2①}, ZHANG Yan²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract *Bacillus hwajinpoensis* SLWX₂ is a bacterium strain isolated from maricultural environments that can effectively remove $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ from water. In this study, the effects of different nitrogen sources ($\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, and $\text{NO}_3^-\text{-N}$) and environmental factors (temperature, pH, C/N, and salinity) on growth and nitrogen removal were studied. The results showed that the growth of *Bacillus hwajinpoensis* SLWX₂ was consistent with the removal of the three forms of inorganic nitrogen, which occurred mainly in the logarithmic growth phase. There was no delay in growth of the bacterial cells and $\text{NH}_4^+\text{-N}$ removal, and no $\text{NO}_2^-\text{-N}$ nor $\text{NO}_3^-\text{-N}$ was produced when $\text{NH}_4^+\text{-N}$ was used as the sole nitrogen source. Further, there was no accumulation of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ when $\text{NO}_2^-\text{-N}$ was used as the sole nitrogen source, but there was a long delay in growth and $\text{NO}_2^-\text{-N}$ removal. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ was not detected, but $\text{NO}_2^-\text{-N}$ first accumulated and then decreased when $\text{NO}_3^-\text{-N}$ was used as the sole nitrogen source. The experimental results showed that the effects of the environmental factors on the growth of SLWX₂ correlated with its ammonium removal function. The strain showed good growth and ammonium removal performance under the conditions of weak acids, neutral, and weak bases (pH 6~8.5), temperature 28~40 °C, C/N 5~25, and NaCl 0~30 g/L. The optimal conditions for SLWX₂ were temperature of 30 °C, C/N 25, pH 8.0, and salinity 25. The strain SLWX₂ showed high efficiency in removing $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ in water, and it has a wide adaptation range to environmental conditions, which suggests its huge potential in bio-removal of nitrogen in waste water from industries and aquaculture.

Key words *Bacillus hwajinpoensis*; Bio-removal of nitrogen; Sole nitrogen source; Environmental factors; Removal rate

① Corresponding author: LI Qiufen, E-mail: liqf@ysfri.ac.cn