

汪 诺,刀 禹,覃星雨,等.一株耐高氨氮异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及降解动力学分析 [J]. 中国环境科学, 2025,45(1):500-507.
Wang N, Dao Y, Qin X Y, et al. Isolation and degradation kinetic analysis of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain tolerant to high-strength ammonium [J]. China Environmental Science, 2025,45(1):500-507.

一株耐高氨氮异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及降解动力学分析

汪 诺,刀 禹,覃星雨,孙德智,刘新颖* (北京林业大学环境科学与工程学院,北京市水体污染源控制技术重点实验室,北京 100083)

摘要: 从处理含高碳、氮浓度废水的反应器中筛选出一株耐高氨氮的异养硝化-好氧反硝化菌 WN1,通过菌落形态以及 16S rDNA 分析鉴定为谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*. 对该菌在初始氨氮浓度分别为 500,1000,1500,2000,2500,3000mg/L 的生长及代谢特性进行研究. 结果表明,菌株 WN1 在氨氮浓度高达 3000mg/L,对应游离氨浓度为 590.2mg/L 时仍能较好生长(48h, $OD_{600}=3.264$). 随着初始氨氮浓度由 500 提升至 3000mg/L, 菌株 WN1 的最大氨氮转化速率 R_m 由 15.93 增加至 43.29mg/(L·h). 同时,反应过程中氨氮和 COD 的平均转化速率分别为 7.06~9.36mg/(L·h)和 95.63~199.13mg/(L·h). 进一步,采用 Haldane 模型拟合不同初始氨氮浓度下菌株的生长及基质降解特性($R^2=0.99$),菌株 WN1 的最大比生长速率、最大氨氮比降解速率和最大 COD 比降解速率分别为 $0.36h^{-1}$ 、 $6.45gN/(gDCW \cdot d)$ 、 $122.85gCOD/(gDCW \cdot d)$. 菌株 WN1 的氨氮抑制常数 K_i 为 3749.49mg/L,比其它自养或异养的氨氧化菌对高浓度氨氮具有更强的抗抑制能力,结果表明,菌株 WN1 在处理高浓度含氮有机废水中具有很好的应用前景.

关键词: 异养硝化-好氧反硝化; 动力学; 高氨氮; 游离氨; 比降解速率

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2025)01-0500-08

Isolation and degradation kinetic analysis of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification strain tolerant to high-strength ammonium. WANG Nuo, DAO Yu, QIN Xing-yu, SUN De-zhi, LIU Xin-ying* (Beijing Key Laboratory of Water Pollution Source Control Technology, College of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China). *China Environmental Science*, 2025,45(1): 500~507

Abstract: A heterotrophic nitrification and aerobic denitrification (HNAD) strain WN1 with significant tolerance against high ammonium concentrations was isolated from a reactor treating high-strength ammonium organic wastewater. Based on colony morphology and 16S rDNA analysis, it was identified as *Corynebacterium glutamicum*. The growth and metabolic characteristics of WN1 were studied under different initial ammonium concentrations of 500, 1000, 1500, 2000, 2500 and 3000mg/L, respectively. The results showed that strain WN1 could still grow well (48h, $OD_{600}=3.264$) at an initial ammonium concentration of 3000mg/L, corresponding to a free ammonia concentration of 590.2mg/L. As initial ammonium concentrations increased from 500 to 3000mg/L, the maximum ammonium conversion rate (R_m) of strain WN1 increased from 15.93 to 43.29mg/(L·h). Additionally, the average conversion rates of ammonium and COD were 7.06~9.36mg/(L·h) and 95.63~199.13mg/(L·h), respectively. Furthermore, the Haldane model was used to characterize the growth and substrate degradation properties of strain WN1 under different initial ammonium concentrations ($R^2 = 0.99$). Strain WN1 had a maximum specific growth rate of $u_{max} = 0.36h^{-1}$, a maximum specific ammonium degradation rate of $r_{max} = 6.45gN/(gDCW \cdot d)$, and a maximum specific COD degradation rate of $r_{max} = 122.85gCOD/(gDCW \cdot d)$. The ammonium inhibition constant K_i of strain WN1 was 3749.49mg/L, indicating greater resistance to high ammonium concentrations compared with other autotrophic or heterotrophic ammonium-oxidizing bacteria. The results suggest that strain WN1 is promising for treating high-strength ammonium organic wastewater.

Key words: HNAD; kinetics; high-strength ammonium; free ammonia; specific degradation rate

含氮有机废水如养殖废水、污泥脱水液和垃圾渗沥液等^[1]在经过厌氧消化处理后含有高浓度的氨氮(>1000mg/L),需要得到妥善处理.厌氧处理阶段的甲烷化和氨化过程会产生碱度导致 pH 值不断升高(>8.0),碱性条件下氨氮从离子态水解转化为分子态($NH_4^+ + OH^- \rightarrow NH_3 + H_2O$),厌氧出水中的游离氨(FA)浓度常常高达上百 mg/L.相比于高成本且易产生二

次污染的物化处理技术,生物脱氮技术具有经济、绿色的优点^[2].然而,FA 的生物毒害性较强^[3],会影响传统生物氨氧化过程(如自养硝化和厌氧氨氧化).研究

收稿日期: 2024-06-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(52300075);国家自然科学基金项目(642201053)

* 责任作者, 讲师, Liuxinying@bjfu.edu.cn

发现当 FA 浓度为 20~50mg/L 时,绝大多数自养细菌的生长和氨氧化性能受到抑制^[4-5],从而造成传统生物脱氮过程不稳定和处理效果差等问题,成为了高氨氮废水生物脱氮处理的瓶颈。

Robertson 等^[6]首次从脱硫脱硝废水处理系统中分离得到了一株兼有异养硝化和好氧反硝化功能(HNAD)的菌株 *Paracoccus pantotrophus*。近年来,越来越多的 HNAD 菌被分离出来,分布在 *Alcaligenes*^[7]、*Pseudomonas*^[8]、*Acinetobacter*^[9]等不同菌属。HNAD 菌具有世代周期短,生理活性高和环境适应力强等特性,其脱氮同时能够降解转化废水中的有机物,在处理含氮有机废水中具有很好的应用前景^[10]。HNAD 菌在耐受较高浓度氨氮方面展现出良好潜力^[11-12],然而,目前关于 HNAD 菌的筛选和脱氮特性研究所用的氨氮浓度仍然有限,通常小于 2000mg/L 且主要为离子态氨氮,高浓度氨氮尤其是高 FA 下对 HNAD 菌生长代谢的影响应得到关注。

本文从处理含高碳、氮浓度废水的反应器中筛选出一株对高浓度氨氮(FA 浓度也高)具有较好耐受和脱除能力的 HNAD 菌 WN1,研究菌株在不同初始氨氮浓度下的生长和代谢特性,并通过动力学模型进行拟合,以期为 HNAD 菌在处理高浓度含氮有机废水中的应用提供理论支持。

1 材料与方 法

1.1 培养基

对常规异养硝化培养基^[13]改进后用于本实验,其配方为(1L):NH₄Cl 3.821g,CH₃COONa 12.82g, K₂HPO₄ 0.25g,新维氏盐溶液 10mL,NB 微量元素 10mL,维他命溶液 10mL。其中新维氏盐溶液配方为(1L):KCl 20.0g, MgSO₄·7H₂O 12.5g, CaCl₂·2H₂O 2.0g;NB 微量元素配方为(1L):FeSO₄·7H₂O 0.3g, CuCl₂·2H₂O 0.03g, ZnSO₄·7H₂O 0.2g, MnCl₂·4H₂O 0.1g, CoCl₂·6H₂O 0.17g, NiSO₄·6H₂O 0.11g。通过改变加入 NH₄Cl 的质量调整培养基初始氨氮浓度,并相应改变加入 CH₃COONa 量固定 C/N 为 10。培养基在使用前用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调节初始 pH 为 8.4±0.1,121℃ 高压蒸汽灭菌 30min。固体平板培养基需加入 1.5%~2%的琼脂粉。

1.2 实验方法

1.2.1 异养硝化-好氧反硝化菌株的筛选 实验室长期运行的 SBR 反应器(5.0L)对含高碳、氮浓度的垃圾焚烧厂渗沥液厌氧出水(COD 4000~6000mg/L、NH₄⁺-N 1400~1600mg/L)具有较好的处理效果^[14],COD 去除率>95%,总氮去除率>99%。从反应器中取出 2.0mL 活性污泥并涡旋振荡混匀,采用梯度稀释法稀释样品后,取 0.1mL 的 10⁻⁴、10⁻⁵和 10⁻⁶ 稀释液分别涂布于初始氨氮浓度为 1000mg/L 的 HNAD 固体培养基,pH 值为 8.4±0.1,对应 FA 浓度为 210.4~302.8mg/L。于 30℃ 恒温培养箱培养至长出菌落(3d),选取成长茁壮且不同形态的单菌落进行编号并挑取至 HNAD 液体培养基,于 30℃、150r/min 条件下培养 2d。分别测定 12h、24h、36h 和 48h 培养基中氨氮浓度与 COD 浓度,选出其中氨氮和 COD 转化率高且经过几代分离纯化后效果稳定的菌株。

1.2.2 菌株鉴定 采用 DNA 提取试剂盒(QIAGEN)提取菌株 DNA,对 16S rDNA 进行 PCR 采用引物 27F(5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')/1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系为(50μL):DNA 模板 1μL,Taq DNA 聚合酶(PCR Master Mix)46 μL,前后引物各 1.5μL。PCR 反应条件为:98℃ 预变性 2min,98℃ 变性 10s,54℃ 退火 15s,72℃ 延伸 30s,30 个循环,72℃ 延伸 10min。将获得的 PCR 产物交由中美泰和生物技术有限公司(北京)进行测序,测序结果提交 GenBank 获得序列号。使用 NCBI 网站的 BLAST 在线程序将结果序列与 Genbank 中已有菌株序列进行比对,选择同源性高的菌株序列下载,将测序结果在 NCBI 里进行 Blast 分析,利用 MEGA11.0 软件将筛选菌株与其他已报道的典型 HNAD 菌进行比对,并采用近邻结合法(Neighbour-joining)构建该菌株的系统发育树。

1.2.3 不同初始氨氮浓度条件下菌株脱氮性能研究 向密闭小瓶(250mL)装入 HNAD 培养基(50mL),上方连通空气气袋(2L)提供菌株所需氧气,并每隔 4h 向气袋中补充纯氧。设置 HNAD 培养基(pH 值约 8.4)初始氨氮浓度分别为 500,1000,1500,2000,2500,3000mg/L。将长至对数生长期的菌液于 8000r/min 离心收集菌体,用 PBS 溶液洗涤 3 次

后重悬于无菌水中作为接种液,固定接种液 OD₆₀₀ 值约为 0.6,并接种(2%)至上述培养基,同时设置不加接种液的空白对照组.在 30°C,150r/min 恒温摇床中进行培养,定时取样测定氨氮、硝氮、亚硝氮、COD 浓度以及菌悬液 OD₆₀₀ 值.取样同时抽取气袋中气体(100mL),通入吸收液(0.005mol/L 稀硫酸,50mL)后测定氨氮浓度,并通过公式(1)计算物理逸散的氨氮量.

$$\rho = A \times \frac{C_{\text{吸}} \times V_{\text{吸}}}{V_{\text{培}}} \quad (1)$$

式中: ρ 为逸散的氨氮(mg/L); A 为顶空总体积与抽取气体量的比(22); $C_{\text{吸}}$ 为吸收液氨氮(mg/L); $V_{\text{吸}}$ 为吸收液体积(50mL); $V_{\text{培}}$ 为培养基体积(50mL).

1.2.4 细胞浓度与 OD₆₀₀ 的标准曲线 以去离子水做空白,通过分光光度计(600nm)测定一系列不同生长状态的菌悬液吸光度(OD₆₀₀),通过干燥法测定对应菌株细胞浓度(mg/L),即细胞干重(DCW),将细胞干重同 OD₆₀₀ 建立标准曲线,所得方程为: $Y = 571.19X - 57.05 (R^2 = 0.99)$.

1.2.5 菌株比生长速率、基质比降解速率、产率系数计算

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t - t_0} \quad (2)$$

式中: μ 为菌株的比生长速率(h⁻¹); X 为 t 时刻时菌株的细胞浓度(mg/L); X_0 为 t_0 时刻细胞浓度(mg/L); t_0 为菌株培养任一阶段的初始时刻(h); t 为菌株培养任一阶段的结束时刻(h).

$$q = -24 \times \frac{\left[\frac{S_0 - S}{t_0 - t} \right]}{X_0} \quad (3)$$

式中: q 为比降解速率(g/(gDCW·d)); S_0 为初始时刻 t_0 氨氮浓度(mg/L); S 为 t 时刻氨氮浓度(mg/L); X_0 为 t_0 时刻菌株的细胞浓度(mg/L).

$$Y = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (4)$$

式中: Y 为产率系数(g/(DCW·gN)); X_0 为初始时刻细胞浓度(mg/L); X 为结束时刻细胞浓度(mg/L); S_0 为初始时刻氨氮浓度(mg/L); S 为结束时氨氮浓度(mg/L).

1.3 Compertz 降解动力学模型

菌株 WN1 的氨氮转化过程可以采用修饰过的 Compertz 模型^[15]进行拟合,见公式(5):

$$S = S_0 \left\{ 1 - \exp \left[- \exp \left(\frac{eR_m}{S_0} (t_0 - t) + 1 \right) \right] \right\} \quad (5)$$

式中: S_0 为初始时刻氨氮浓度(mg/L); S 为 t 时刻氨氮浓度(mg/L); R_m 为最大转化速率(mg/(L·h)); t_0 为迟滞时间(h); t 为反应时间(h); e 为常数.

1.4 Haldane 抑制动力学模型

当氨氮浓度过高对硝化菌的活性产生抑制时,氨氮浓度对其降解过程的影响可以用 Haldane 模型拟合^[16],见公式(6):

$$r = \frac{r_{\text{max}} S_0}{K_s + S_0 + \left(\frac{S_0^2}{K_i} \right)} \quad (6)$$

式中: S_0 为底物浓度(mg/L); r 为底物的比降解速率[g/(gDCW·d)]; r_{max} 为微生物未被抑制时的最大比降解速率[g/(gDCW·d)]; K_s 为饱和常数(mg/L); K_i 为抑制常数(mg/L).

1.5 分析项目与方法

pH 值通过 pH 测定仪(雷磁)测定;COD 采用重铬酸钾法测定;氨氮采用纳氏试剂法测定,并通过公式(7)计算 FA 浓度.

$$\rho = \frac{17}{14} \times \frac{\text{NH}_4^+ - \text{N} \times 10^{\text{pH}}}{\exp \left[\frac{6334}{273 + t} \right] + 10^{\text{pH}}} \quad (7)$$

式中: ρ 为 FA 浓度(mg/L); $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 为以 N 计的氨氮浓度(mg/L); t 为温度(°C).

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选与鉴定

从长期运行的处理含高碳、氮浓度废水的反应器中取样,在含高浓度 FA(210.4~302.8mg/L)的 HNAD 固体培养基上初步筛选得到 6 株菌株,在经过 HNAD 液体培养基复筛得到 1 株脱氮除碳效果较好的菌株,命名为 WN1.菌株 WN1 在 HNAD 固体培养基上菌落具有以下特征:呈黄色,圆形隆起,边缘整齐,表面湿润、光滑.

菌株 WN1 的 16S rDNA 基因片段的 PCR 扩增产物长度约为 1400bp,获得序列号为 PQ127018.通过 NCBI 数据库的 Blast 同源性分析,显示该菌株序列与 *Corynebacterium glutamicum strain ATCC 13032* 相似性为 100%,结合形态学特征后鉴定菌株 WN1 为谷氨酸棒状杆菌 *C. glutamicum*,系统发育树如图 1(b)所示.

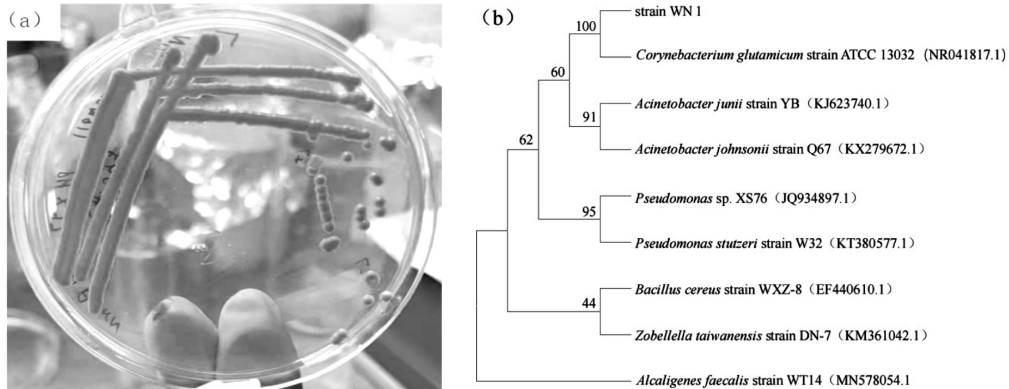


图1 菌株 WN1 的菌落形态和系统发育树

Fig.1 Colony morphology and phylogenetic tree of strain WN1

2.2 不同初始氨氮浓度对菌株生长与基质降解的影响

在 30℃、pH 值为 8.4 反应条件下,不同初始氨氮浓度(500~3000mg/L)对应的 FA 浓度分别为 97.0, 188.9,284.6,412.5,470.3 和 590.2mg/L,菌株 WN1 的生长与基质降解情况如图 2 所示.动力学拟合结果显示(表 1),初始氨氮浓度由 500mg/L 提高到 3000mg/L, t_0 从 3.44 增加为 34.30h,说明随着初始氨氮浓度升高,菌株 WN1 的适应期不断增加.菌株 WN1 在初始氨氮为 3000mg/L 下仍可以较好的生长,48h 的 OD_{600} 为 3.264.已有研究表明,大多数 HNAD 菌如 *Alcaligenes faecalis* TF-1^[12]、*Pseudomonas* L3^[17]等能够较好地耐受高浓度氨氮(500~1000mg/L)并进行生长,但氨氮浓度过高时 HNAD 菌的生长也会受到抑制甚至停止,可能是此时高浓度 FA 干扰了跨膜质子浓度梯度进而影响了合成代谢的能量生成^[18].王秀杰等^[19]研究表明 *Acinetobacter* sp. JQ1004 能够在 0~2000mg/L 氨氮条件下生长,但在初始氨氮浓度为 2500mg/L 时,对应 FA 为 86.7mg/L,菌株生长被完全抑制.菌株 WN1 在经过一定适应期后,即使在 FA 浓度高达 590.2mg/L 时仍能够较好生长,且 48h 后各组均有较高的生物量($OD_{600}>3.0$).进一步,计算了不同初始氨氮浓度下菌株 WN1 的最大比生长速率(表 2).菌株 WN1 最大比生长速率随着氨氮浓度的增加有所下降,初始氨氮浓度 1500mg/L 时其最大比生长速率仍有 $0.310h^{-1}$,大于已报道的 *Acinetobacter* sp. JQ1004 ($0.308h^{-1}$)^[19]、*Alcaligenes faecalis* No.4($0.2h^{-1}$)^[7]等 HNAD 菌.上述结果表明菌株 WN1 可以耐受高浓度氨氮(FA 浓度也高)进行生长,对毒物有较好的抗抑

制能力,相比其它 HNAD 菌对高氨氮环境的耐受性更强.

表 1 不同初始氨氮浓度下菌株 WN1 的氨氮降解动力学参数
Table 1 Kinetic parameters for ammonium degradation of strain WN1 under different initial ammonium concentrations

起始浓度(mg/L)	R_m (mg/(L·h))	t_0 (h)	R^2
500	15.93	3.44	0.96
1000	30.26	5.99	0.98
1500	28.29	16.86	0.97
2000	41.24	21.40	0.98
2500	45.85	31.85	0.99
3000	43.29	34.30	0.96

本实验中各组用初始氨氮浓度(500~3000mg/L)均保证了菌株充足底物利用,虽然菌株 WN1 的表观氨氮转化率随初始氨氮浓度的升高有所降低,但初始氨氮为 1000mg/L 时其氨氮转化率(48h)达到 44.6%,相比其它 HNAD 菌如 *Bacillus methylotrophicus* strain L7^[20](1121mg/L,36.5%)、*Raoultella* sp. sari01^[21](1000mg/L,37.6%)等在处理高浓度氨氮(>1000mg/L)时的转化率较高.研究表明,FA 浓度过高时,可能会对底物降解相关功能酶产生毒害作用^[22-23],从而抑制菌的代谢活性.然而,从动力学拟合结果可知(表 1),随着初始氨氮浓度由 500 提升至 3000mg/L,菌株 WN1 的最大氨氮转化速率 R_m 由 15.93 逐渐增加至 43.29mg/(L·h),与 *Pseudomonas putida* YH^[13]、*Acinetobacter junii* NP1^[24]等 HNAD 菌的 R_m 随氨氮浓度升高而增加的结果类似,说明菌株 WN1 对较宽的氨氮浓度范围均有良好的响应.计算后得出菌株 WN1 反应过程的平均氨氮转化速率为 7.06~9.36mg/(L·h),均高于处理

高浓度氨氮(>1000mg/L)时的 *Pseudomonas* L3^[17] (1000mg/L,5.46mg/(L·h))、*Alcaligenes faecalis* C16^[25] (1200mg/L,5.26mg/(L·h))、*Pseudomonas. aeruginosa* U1^[11](1500mg/L,6.38mg/(L·h))等 HNAD 菌.以上结果说明菌株 WN1 不仅能够耐受高浓度氨氮,而且在高氨氮负荷下具有较强的脱氮能力.此外,在氨氮降解过程中,均未检测到硝氮和亚硝氮的浓度变化.分

析原因可能是亚硝氮和硝氮作为中间产物在代谢过程中被迅速转化且没有产生积累,以致于检测不到;或者是该菌像个别已报道的 HNAD 菌一样具有能将氨氮直接转化为气态氮的脱氮路径^[26],并未转化为亚硝氮或硝氮等中间产物.上述特点使得该菌具有较佳的脱氮效能,在应用于高氨氮废水处理时可以减少工艺流程并降低处理成本.

表 2 不同初始氨氮浓度下菌株 WN1 的比生长速率与基质比降解速率

Table 2 Specific cell growth rate and substrate degradation rate of strain WN1 under different initial ammonium concentrations

初始氨氮浓度 (mg/L)	FA 浓度(mg/L)	开始			结束			$q_{\text{氨氮max}}$ (gN/(gDCW·d))	q_{CODmax} (gCOD/(g DCW·d))	μ_{max} (h ⁻¹)	Y(gDCW/gN)		
		t_0 时刻	氨氮浓度 S_0 (mg/L)	COD 浓度 M_0 (mg/L)	细胞浓度 X_0 (mg/L)	t 时刻	氨氮浓度 S (mg/L)					COD 浓度 M (mg/L)	细胞浓度 X (mg/L)
500	97.0	6	451	4815	130.35	12	377	2985	919.69	2.255	56.155	0.326	10.739
1000	188.9	6	966	9665	140.34	12	863	7505	910.55	2.943	61.566	0.312	7.460
1500	284.6	6	1480	14625	120.93	12	1381	12978	778.03	3.275	54.477	0.310	6.637
2000	412.5	6	2095	19385	102.00	12	2010	18080	586.11	3.333	51.176	0.291	5.695
2500	470.3	7	2526	23855	133.68	12	2408	22558	560.98	3.142	46.573	0.287	4.883
3000	590.2	7	3084	29070	107.15	12	2992	28135	407.90	3.087	41.885	0.267	4.365

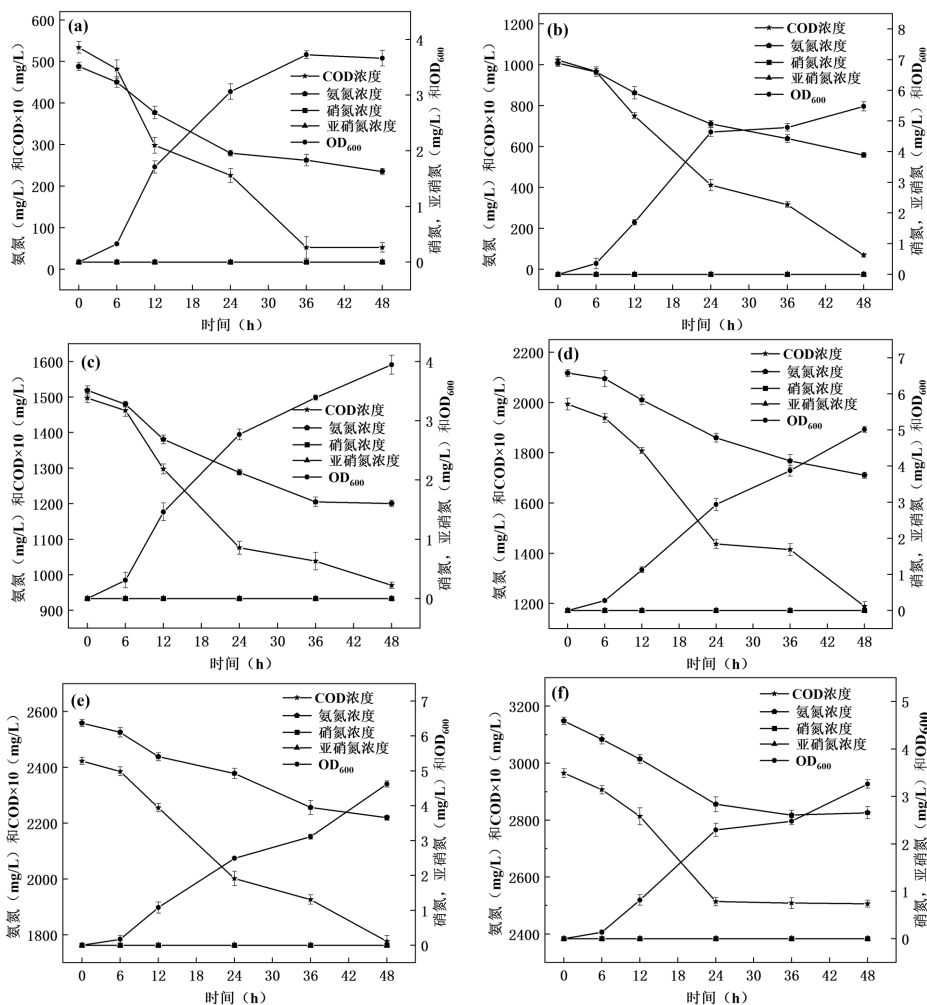


图 2 不同初始氨氮浓度下菌株 WN1 的生长与基质降解特性

Fig.2 The growth and substrate degradation properties of strain WN1 under different initial ammonium concentrations

相比于自养硝化菌,HNAD 菌能耐受较高氨氮浓度,而多数关于 HNAD 菌的筛选和降解特性的研究只关注离子态氨氮浓度而忽视了 FA 浓度.Wang 等^[27]研究发现,HNAD 菌 *Serratia marcescens* W5 在低氨氮浓度(100mg/L)时 pH 值变化(7.0~10.0)对其氨氮降解没有明显影响;而在高氨氮浓度(300~500mg/L)时,pH 值为 10.0 时的氨氮转化速率比 pH 值为 7.0 时显著降低,推断是由于 FA 浓度过高所致,因此 FA 对 HNAD 菌的影响应该得到关注.本研究采用了高浓度 FA 环境(210.4~302.8mg/L)筛选出菌株 WN1;在菌株培养过程中,虽然随着氨氮的降解 FA 浓度有所下降,但过程中较高的 pH 值(>8.0)使得 FA 仍维持在一定的浓度,48h 后各组的 FA 浓度分别为 55.2,82.4,166.8,228.2,278.3, 369.4mg/L.上述进一步说明了菌株 WN1 能够耐受高浓度氨氮(FA 浓度也高)并对氨氮进行有效转化,在处理高浓度氨氮(FA 浓度也高)废水中具有很大的应用潜力.

同时,菌株 WN1 的生长代谢过程中,COD 浓度变化与氨氮浓度的变化一致(图 2).随着菌株生长体系中的 COD 浓度不断降低,反应过程的 COD 平均转化速率为 95.63~199.13mg/(L·h).由此可知,该菌对有机物同样具有较好的降解能力,在处理高浓度含 N 有机废水时可以实现较好地同步脱氮除碳.

实际工程中,在对高浓度含氮有机废水如畜禽养殖废水、污泥脱水液和垃圾渗沥液等处理时,通常采用减少进水或增加回流的方法降低原水中氨氮及 FA 浓度,并设置较长的水力停留时间,以满足废水处理要求.这不仅降低了处理效率,而且大幅增加了工艺处理成本.而菌株 WN1 所具的优良特性,使其在通过生物强化等手段进行工程应用后能降低工艺复杂度,实现对上述含氮有机废水的低耗高效处理并提升处理效果,具有极佳的应用前景.

2.3 不同初始氨氮浓度条件下菌株的生长及基质降解动力学特性分析

本文进一步采用 Haldane 模型,拟合不同氨氮浓度对菌株生长及基质降解特性的影响,得到动力学参数及相关系数(R^2)如表 3 所示.

由图 3 可知,在不同的初始氨氮浓度条件下,菌株的比生长速率随氨氮浓度的增加呈现逐渐降低的趋势.上文实验结果也发现,随着氨氮浓度升高,菌株的适应期 t_0 增加且最大比生长速率 u_{\max} 下降,可见

高浓度氨氮对菌株的生长产生了一定的抑制.采用 Haldane 模型很好地拟合了上述生长规律($R^2=0.99$),最大比生长速率时对应的氨氮浓度可以通过以下公式计算得出:

$$S_{\max} = \sqrt{K_s K_i} = \sqrt{23.02 \times 9754.776} = 474 \text{mg/L}$$

表 3 Haldane 动力学模型参数的拟合值

Table 3 Estimated parameters from the Haldane kinetics model

Haldane 模型	r_{\max}	$K_s(\text{mg/L})$	$K_i(\text{mg/L})$	R^2
比生长速率	0.36	23.02	9754.77	0.99
氨氮比降解速率	6.45	880.40	3749.49	0.99
COD 比降解速率	122.85	439.88	1677.95	0.99

由此可知,氨氮浓度为 474mg/L(FA 浓度为 93mg/L)时,菌株达到最大比生长速率 0.36h^{-1} ,当氨氮浓度超过该浓度时会对菌株的生长产生抑制.

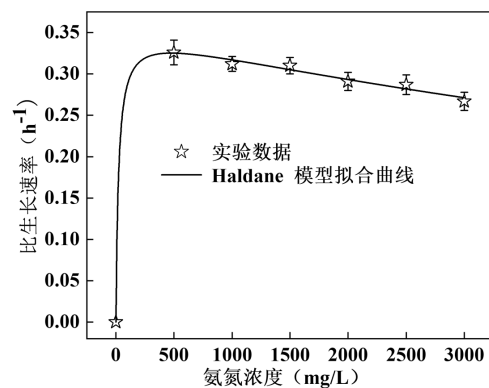


图 3 不同初始氨氮浓度菌株 WN1 生长的抑制动力学模型
Fig.3 The inhibition kinetic model for the growth of strain WN1 under different initial ammonium concentrations

由图 4 可知,随着氨氮浓度的升高,菌株对氨氮的比降解速率呈现先上升后下降的趋势.菌株 WN1 对氨氮的最大比降解速率为 $6.45\text{gN}/(\text{gDCW}\cdot\text{d})$,此时对应的氨氮浓度可以通过以下公式计算得出:

$$S_{\max} = \sqrt{K_s K_i} = \sqrt{880.40 \times 3749.49} = 1816 \text{mg/L}$$

当氨氮浓度超过 1816mg/L 时,会对氨氮的降解产生抑制.在 Haldane 模型中,抑制常数 K_i 越大,表明菌株的抗抑制能力越强.菌株 WN1 的 K_i 值为 3749.49mg/L ,远大于自养氨氧化菌(K_i 为 59mg/L)和厌氧氨氧化菌(K_i 为 67.23mg/L)^[28],且约为已报道的 HNAD 菌 *Acinetobactor* sp. JQ1004(K_i 为 1445.31mg/L)^[19] 的 2.6 倍.高氨氮浓度时,更多的 FA 分子通过自

由扩散穿过细胞膜,会破坏细胞内外质子和钾离子的浓度平衡从而使细胞失活.上述结果表明菌株 WN1 对高氨氮具有更强的抗抑制能力,原因可能是该菌为革兰氏阳性菌,细胞壁较厚,FA 不易渗入细胞内对细胞活性产生抑制.

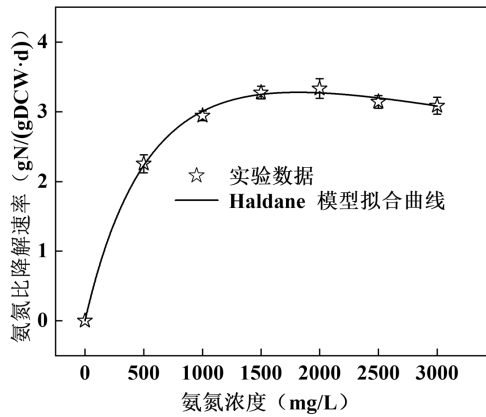


图4 初始氨氮浓度菌株 WN1 降解氨氮的抑制动力学模型
Fig.4 The inhibition kinetic model for ammonium degradation by strain WN1 under different initial ammonium concentrations

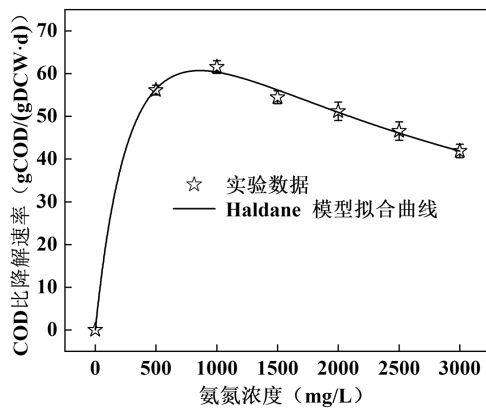


图5 初始氨氮浓度菌株 WN1 降解 COD 的抑制动力学模型
Fig.5 The inhibition kinetic model for COD degradation by strain WN1 under different initial ammonium concentrations

随着氨氮浓度的升高,菌株对 COD 的比降解速率也呈现先上升后下降的趋势.菌株 WN1 对 COD 的最大比降解速率为 122.85gCOD/(gDCW·d),此时对应的氨氮浓度可以通过以下公式计算得出:

$$S_{\max} = \sqrt{K_s K_i} = \sqrt{439.88 \times 1677.95} = 859 \text{ mg/L}$$

当氨氮浓度超过 859mg/L 时,会对 COD 的降解产生抑制.随着氨氮浓度的升高,菌株对 COD 降解会先于氨氮降解受到抑制,COD 降解过程对高浓度氨氮更敏感,说明菌株的碳代谢路径如 TCA 循环等受

到了 FA 更多的抑制影响.

3 结论

3.1 从处理含高碳、氮浓度废水的反应器中筛选出一株异养硝化-好氧反硝化菌 WN1,鉴定为谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*.

3.2 菌株 WN1 在氨氮浓度高达 3000mg/L,对应 FA 浓度为 590.2mg/L 时仍能较好生长.在 T 为 30°C、pH 值为 8.4,随初始氨氮浓度由 500 升至 3000mg/L,最大氨氮转化速率 R_m 由 15.93 增至 43.29mg/(L·h).

3.3 菌株 WN1 在氨氮降解过程中,没有亚硝氮或硝氮的积累.反应过程的平均氨氮和 COD 转化速率分别为 7.06~9.36mg/(L·h)和 95.63~199.13mg/(L·h).

3.4 Haldane 模型较好地拟合了不同初始氨氮浓度下菌株 WN1 的生长及基质降解特性($R^2=0.99$),菌株 WN1 的最大比生长速率、最大氨氮比降解速率和最大 COD 比降解速率分别为 0.36h^{-1} 、6.45gN/(gDCW·d)和 122.85gCOD/(gDCW·d).菌株 WN1 的氨氮抑制常数 K_i 为 3749.49mg/L.

参考文献:

- [1] 吴 岩.短程硝化反硝化处理高浓氨氮废水效果及机理研究 [D].北京:北京建筑大学,2020.
Wu Y. Study on the effect and mechanism of wastewater treatment with high concentration of ammonia nitrogen by partial nitrification [D]. Beijing: Beijing University of Civil Engineering and Architecture, 2020.
- [2] 刘 妍,袁林江,陈 希,等.一株异养硝化-好氧反硝化-积累磷的细菌 *Klebsiella pneumoniae* A15 的筛出及其特性研究 [J]. 中国环境科学, 2024, 44(4):2286-2296.
Liu Y, Yan L J, Chen X, et al. Sieving and characterization of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying-phosphorus-accumulating bacterial strain, *Klebsiella pneumoniae* A15 [J]. China Environmental Science, 2024,44(4):2286-2296
- [3] Park S, Chung J, Rittmann B E, et al. Nitrite accumulation from simultaneous free-ammonia and free-nitrous-acid inhibition and oxygen limitation in a continuous-flow biofilm reactor [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015,112(1):43-52.
- [4] Liu Y, Ngo H H, Guo W, et al. The roles of free ammonia (FA) in biological wastewater treatment processes: A review [J]. Environment International, 2019,123:10-19.
- [5] Yao Q, Peng D, Wang B, et al. Effect of free ammonium and free nitrous acid on the activity, aggregate morphology and extracellular polymeric substance distribution of ammonium oxidizing bacteria in partial nitrification [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2017,124(3):319-326.
- [6] Robertson L A, Kuenen J G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium [J].

- Journal of General Microbiology, 1983,129(9):2847-2855.
- [7] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4 [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2):184-191.
- [8] 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 [J]. 中国环境科学, 2013,33(7):1309-1315.
Wu J J, Wang Z Y, Xu P Y. Isolation and identification of an efficiently heterotrophic nitrifier, and its removal characterization of ammonia nitrogen [J]. China Environmental Science, 2013,33(7):1309-1315.
- [9] Ren Y X, Yang L, Liang X. The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB [J]. Bioresource Technology, 2014,171:1-9.
- [10] 李艳丽,杨 垒,张志昊,等.好氧反硝化细菌 *Burkholderia* sp. ZH8 的脱氮特性与生物强化作用 [J]. 中国环境科学, 2024,44(8):4282-4291.
Li Y L, Yang L, Zhang Z H, et al. Nitrogen removal characteristics and bioenhancement effects of aerobic denitrifying bacteria *Burkholderia* sp. ZH8 [J]. China Environmental Science, 2024,44(8):4282-4291.
- [11] 高雅娟,靳静晨,高 洁,等.耐高浓度氨氮的异养硝化好氧反硝化菌株 U1 的鉴定及其脱氮特性 [J]. 微生物学通报, 2022,49(7):2442-2456.
Gao Y J, Jin J C, Gao J, et al. Identification and denitrification characteristics of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification strain U1 resistant to high concentrations of ammonia nitrogen [J]. Microbiology China, 2022,49(7):2442-2456.
- [12] 崔明雷.垃圾渗滤液中粪产碱杆菌 TF-1 的筛选优化及脱氮机理研究 [D]. 重庆:重庆理工大学, 2022.
Cui M L. Optimization and nitrogen removal mechanism of *Alcaligenes faecalis* TF-1 Screened from landfill leachate [D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2022.
- [13] 汪旭晖,杨 垒,任勇翔,等.异养硝化细菌 *Pseudomonas putida* YH 的脱氮特性及降解动力学 [J]. 环境科学, 2019,40(4):1892-1899.
Wang X H, Yang L, Ren Y X, et al. Nitrogen removal by heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas putida* YH and its kinetic characteristics [J]. Environmental Science, 2019,40(4):1892-1899.
- [14] 刘新颖.垃圾焚烧渗滤液厌氧出水短程硝化反硝化的脱氮研究 [D]. 北京:北京林业大学, 2022.
Liu X Y. Nitrogen removal by partial nitrification and denitrification process for anaerobically treated leachate from municipal solid waste incineration plant [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2022.
- [15] 王秀杰,王维奇,李 军,等.异养硝化菌 *Acinetobacter* sp. 的分离鉴定及其脱氮特性 [J]. 中国环境科学, 2017,37(11):4241-4250.
Wang X J, Wang W Q, Li J, et al. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifier, *Acinetobacter* sp., and its characteristics of nitrogen removal [J]. China Environmental Science, 2017,37(11):4241-4250.
- [16] 孙洪伟,于 雪,高宇学,等.游离氨(FA)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.
- [17] 李 哲,吕 剑,张宇轩,等.具有异养硝化-好氧反硝化功能的水产养殖生物絮团菌的分离鉴定及其性能研究 [J]. 河海大学学报(自然科学版), 2021,49(2):127-133.
Li Z, Lv J, Zhang Y X, et al. Separation, identification and performance of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria from bioflocs in aquacultural system [J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences), 2021,49(2):127-133.
- [18] Ferreira T B, Carrondo M J T, Alves P M. Effect of ammonia production on intracellular pH: Consequent effect on adenovirus vector production [J]. Journal of Biotechnology, 2007,129(3):433-438.
- [19] 王秀杰,王维奇,李 军,等.氨氮对异养硝化菌 *Acinetobacter* sp. 活性影响及动力学特性分析 [J]. 中国环境科学, 2018,38(3):943-949.
Wang X J, Wang W Q, Li J, et al. Inhibition of initial ammonia and free ammonia nitrogen on *Acinetobacter* sp. and their biokinetics [J]. China Environmental Science, 2018,38(3):943-949.
- [20] 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.
- [21] 颜薇芝,郝 健,孙俊松,等.拉乌尔菌 sari01 的分离及其异养硝化好氧反硝化特性 [J]. 环境科学, 2016,37(7):2673-2680.
Yan W Z, Hao J, Sun J S, et al. Isolation of *Raoultella* sp. sari01 and Its Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Characteristics [J]. Environmental Science, 2016,37(7):2673-2680.
- [22] Decrey L, Kazama S, Kohn T. Ammonia as an in situ sanitizer: Influence of virus genome type on inactivation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016,82(16):4909-4920.
- [23] Müller T, Walter B, Wirtz A, et al. Ammonium toxicity in bacteria [J]. Current Microbiology, 2006,52(5):400-406.
- [24] 杨 垒,陈 宁,任勇翔,等.异养硝化细菌 *Acinetobacter junii* NP1 的同步脱氮除磷特性及动力学分析 [J]. 环境科学, 2019,40(8):3713-3721.
Yang L, Chen N, Ren Y X, et al. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal and kinetics by the heterotrophic nitrifying bacterium *Acinetobacter junii* NP1 [J]. Environmental Science, 2019, 40(8):3713-3721.
- [25] Liu Y X, Wang Y, Li Y, et al. Nitrogen removal characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* C16 [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2015,23(5):827-834.
- [26] Wu M R, Hou T T, Liu Y, et al. Novel *Alcaligenes ammonioxydans* sp. nov. from wastewater treatment sludge oxidizes ammonia to N₂ with a previously unknown pathway [J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(11):6965-6980.
- [27] Wang T, Dang Q F, Liu C S, et al. Heterotrophic nitrogen removal by a newly-isolated alkalitolerant microorganism, *Serratia marcescens* W5 [J]. Bioresource Technology, 2016,211:618-627.
- [28] 李 芸,李 军,蔡 辉,等.晚期垃圾渗滤液厌氧氨氧化脱氮及其抑制动力学 [J]. 中国环境科学, 2016,36(5):1409-1416.
Li Y, Li J, Cai H, et al. Nitrogen removal and inhibition kinetics of ANAMMOX reactor fed with the mature landfill leachate [J]. China Environmental Science, 2016,36(5):1409-1416.

作者简介: 汪 诺(2000-),女,安徽安庆人,北京林业大学硕士研究生,主要从事生物脱氮及废水处理研究.2332613271@qq.com.