

# 制糖工艺废水处理中好氧反硝化细菌的分离 鉴定及其脱氮特性研究

王 晨<sup>1</sup>,姜述君<sup>1</sup>,董士嘉<sup>2</sup>

(1.黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院,黑龙江 大庆 163000;2.东北农业大学 农学院,黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**为进一步改善制糖污水的治理方法,从制糖废水的活性污泥中分离出一株具有好氧反硝化作用的细菌,研究了不同 pH、温度和 C/N 比对其反硝化速率的影响。结果表明:分离出的菌株为球形菌,革兰氏染色为阳性,菌落颜色为土黄色,结合生理生化等特性,鉴定为海球菌属(*Marinococcus* sp.)。该菌株反硝化反应的最适宜 pH 7.5、温度为 35℃ 左右,反硝化速率可达到 75%;菌株最适 C/N 为 6,其反硝化速率可达到 85%。

**关键词:**好氧反硝化细菌;分离鉴定;脱氮特性

**中图分类号:**X703 **文献标识码:**B **文章编号:**1002-2767(2015)05-0122-03 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.05.0122

任何一种制糖工业,无论是甜菜制糖工业、甘蔗制糖工业、还是淀粉制糖工业,都会产生大量的有机废水<sup>[1-3]</sup>。废水中有机物含量高,酸度大,如果直接排放,不仅对水资源有不利的影 响,而且在浓度超标时会危害到人类的健康,因此对制糖工艺产生的废水治理尤为重要<sup>[4]</sup>。

活性污泥法是一种通过微生物代谢进行治理污水的一种有效的方法,处理效果好,治理成本低,其中的好氧反硝化细菌可以有效去除废水中含有的氮素<sup>[5]</sup>。本试验通过从某淀粉制糖厂污水处理站的活性污泥中分离筛选得到的一株好氧反硝化细菌,并对该细菌进行初步的鉴定和生长条件的优化,为今后进一步研究其去除氮素的机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品 试验样品于 2014 年 1 月取自中粮生化能源(衡水)有限公司污水站。

1.1.2 仪器 离心机、pH 计、紫外分光光度计、恒温震荡摇床、恒温培养箱、显微镜、冰箱、生物洁净工作台、电子天平、灭菌锅

1.1.3 试剂 硝酸盐标准储备液:称取 0.721 8 g 硝酸钾(KNO<sub>3</sub>),105~110℃ 干燥 2 h)。溶于水中,定容至 1 000 mL,加 2 mL 氯仿作保护剂,保

存于棕色试剂瓶中。此溶液 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 含量为 100 mg·L<sup>-1</sup>,保存在 2~5℃,使用期限为 6 个月;1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液,1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液,使用试剂均采用化学纯试剂配制。

### 1.2 方法

1.2.1 培养基配制 BTB 初筛培养基:琼脂 20 g、KNO<sub>3</sub> 1 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g、FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.5 g、CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g、琥珀酸钠 8.5 g、溴百里酚蓝(BTB)(1%乙醇溶液)1 mL,用 1 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 调节 pH 至 7.0~7.3,蒸馏水 1 000 mL,121℃ 灭菌 20 min。LB 液体培养基:KNO<sub>3</sub> 1 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g、FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.05 g、CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g、琥珀酸钠 8.5 g,蒸馏水 1 000 mL,121℃ 灭菌 20 min。DM 反硝化培养基:KNO<sub>3</sub> 0.72 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g、琥珀酸钠 2.8 g,蒸馏水 1 000 mL,121℃ 灭菌 20 min。菌株原液的配制:将菌株接种至 DM 培养基,35℃,培养 12 h,8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心,离心后的菌体用无菌水漂洗两次,然后用无菌水重悬。用光密度法测菌体量为 1.2×10<sup>8</sup>。

1.2.2 好氧反硝化细菌的筛选 ①好氧反硝化菌的富集:采用梯度稀释法将污泥样品稀释至浓度分别为 1、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>,取 0.1 mL 均匀涂布于 BTB 培养基表面,置入恒温培养箱,30℃ 下培养 2~3 d。②好氧反硝化菌的分离纯化:用接种环挑取上述富集培养物中使周围培养基出现蓝色晕圈的单菌落,进行划线分离纯化。接单菌落于 LB 斜面上,于 30℃ 条件下培养 24 h 后,于 4℃ 冰箱中保存。③好氧反硝化菌

收稿日期:2014-12-10

第一作者简介:王晨(1988-),女,黑龙江省哈尔滨市人,在读硕士,从事微生物学研究。E-mail:824674548@qq.com。

通讯作者:姜述君(1968-),博士 教授,从事生物农药、植物逆境生理与分子生物学、植物资源开发利用研究。