

## 基于响应面法对一株好氧反硝化菌脱氮效能优化

杜丛 崔崇威 邓凤霞 李昂 马放\*

(哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150090)

**摘要:**【目的】水体富营养化是当今我国水环境面临的重大水域环境问题,氮素超标排放是主要的引发因素之一。好氧反硝化菌构建同步硝化反硝化工艺比传统脱氮工艺优势更大。获得高效的好氧反硝化菌株并通过生长因子优化使脱氮效率达到最高。【方法】经过序批式生物反应器(Sequencing batch reactor, SBR)的定向驯化,筛选获得高效好氧反硝化菌株,采用响应面法优化好氧反硝化过程影响总氮去除效率的关键因子(碳氮、溶解氧、pH、温度)。【结果】从运行稳定的SBR反应器中定向筛选高效好氧反硝化菌株 *Pseudomonas* T13,采用响应面法对碳氮比、pH和溶解氧关键因子综合优化获得在18 h内最高硝酸盐去除率95%,总氮去除率90%。该菌株的高效反硝化效果的适宜温度范围为25-30 °C;最适pH为中性偏碱;适宜的COD/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N为4:1以上;最佳溶解氧浓度在2.5 mg/L。【结论】从长期稳定运行的SBR反应器中筛选获得一株高效好氧反硝化菌 *Pseudomonas* T13,硝酸盐还原酶比例占脱氮酶基因的30%以上,通过运行条件优化获得硝氮去除率达到90%以上,对强化废水脱氮工艺具有良好应用价值。

**关键词:** 好氧反硝化, 脱氮, 响应面, 功能基因, 生长因子

## Identification of a highly efficient aerobic denitrifier and denitrification optimization using response surface method

DU Cong CUI Chong-Wei DENG Feng-Xia LI Ang MA Fang\*

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150090, China)

**Abstract:** [Objective] The eutrophication of water body is one of pressing water environmental problems in China today. It is mainly caused by over-discharge of wastewater with high nitrogen. Aerobic denitrification bacteria are promising on simultaneous nitrification and denitrification process, presenting high advantages than conventional denitrification process. A high efficient aerobic denitrification strain was isolated and its nitrogen removal efficiency was optimized. [Methods] The aerobic denitrification strain was obtained in a SBR reactor, and response surface method was used to improve key factors influencing denitrification and total nitrogen removal efficiency. [Results] High efficiency aerobic denitrification strain of *Pseudomonas* T13 was selected from a SBR reactor. Based on response surface method, the highest nitrate removal rate was 95%, total nitrogen removal rate of

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51178139)

\*通讯作者: Tel: 86-451-86282107; 信箱: mafang@hit.edu.cn

收稿日期: 2014-11-27; 接受日期: 2015-01-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-03

90% within 18 h, which were obtained by optimizing key factors of ratio of carbon and nitrogen, dissolved oxygen, pH, and temperature. The suitable temperature ranged from 25 °C to 30 °C. The optimal pH is neutral and the suitable COD/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N was over 4:1. The DO was around 2.5 mg/L. *Pseudomonas* T13 can use nitrate and nitrite as electron acceptor for nitrate respiration with 90% removal rate. **[Conclusion]** An aerobic strain with high efficient denitrification was identified as *Pseudomonas* T13 from a long-term running SBR reactor. Over 30% nitrate reductase were detected out of all denitrification enzyme genes from the strain. It is presenting a great potential on nitrate removal (>90%) to strengthen nitrogen removal process in wastewater treatment.

**Keywords:** Aerobic denitrification, Nitrogen removal, Response surface, Functional genes, Growth factor

氮污染是造成水体富营养化的主要原因之一, 导致溶解氧下降致使水生生物大量死亡, 破坏生态平衡。传统的生物脱氮处理过程中, 首先在好氧条件下氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)通过亚硝化细菌的作用氧化为亚硝酸盐氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N), 而后由硝化细菌进一步氧化为硝酸盐氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N), 然后在缺氧条件下亚硝酸盐氮或硝酸盐氮通过反硝化菌(脱氮菌)还原为氮气(N<sub>2</sub>)而从废水中逸出<sup>[1-3]</sup>。长期以来, 反硝化一直被认为是一个严格的厌氧过程<sup>[4]</sup>, 因为有氧存在时反硝化细菌作为兼性菌会优先利用溶解氧呼吸, 甚至在溶解氧 DO 浓度低于 0.1 mg/L 时也是如此, 使得电子流向氧, 从而导致不能利用硝酸盐和亚硝酸盐作为最终电子受体实现反硝化过程。同时在反硝化作用过程中, O<sub>2</sub> 也被认为可抑制反硝化还原酶<sup>[5]</sup>。但是对脱氮副球菌(*Paracoccus denitrifications*)的研究发现, 在有氧条件下其生长速率比完全厌氧下对硝酸盐的转化率更高, 随后证实了好氧反硝化细菌和好氧反硝化酶系的存在<sup>[6]</sup>, 硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶、一氧化二氮还原酶催化完成好氧反硝化菌的反硝化作用过程<sup>[7]</sup>。与传统的生物脱氮工艺相比, 好氧反硝化菌可以使生物脱氮在同一反应器中完成, 实现真正意义上的同步硝化/反硝化。

好氧反硝化菌是在实验室中从长期运行的反硝化和除硫工艺出水中首次分离获得, 包括 *Thiosphaera pantotropha*、*Pseudomonas* sp. 和 *Alcaligenes faecalis* 等, 之后更多的好氧反硝化菌从土壤、底泥、活性污泥中获得, 包括 *Pseudomonas*

*nautical*、*Thauera mechernichensis*、*Alcaligenes*、*Microvirgula aerodenitrificans* 等。有些好氧反硝化菌同时也是异养硝化菌, 能直接把氨转化为最终气态产物逸出, 这也使得在同一反应器内同时完成硝化反硝化成为可能。Gupta 等<sup>[8]</sup>用含有 *Thiosphaera pantotropha* 的生物转盘处理不同浓度的生活污水时, 在有有机负荷和氨氮负荷分别为 6.9–20.7 g COD/(m<sup>2</sup>·d)和 0.69–2.09 g N/(m<sup>2</sup>·d)的情况下, COD 和氨氮去除速率高达 5.8–14.1 g COD/(m<sup>2</sup>·d)和 0.41–1.10 g N/(m<sup>2</sup>·d), 同时总氮去除率达 20%–68%。Kshirsagar 等<sup>[9]</sup>利用两个操作条件完全相同的氧化沟来处理模拟肥料工业废水, 其中一个氧化沟内投加 *Thiosphaera pantotropha*, 另一个没有投加的氧化沟为对照系统。当进水 TKN 为 790 mg/L 时, 含有 *Thiosphaera pantotropha* 的氧化沟系统对 TKN 去除(硝化效果)和 TN 去除(反硝化效果)分别比对照系统高出 10%和 20%, 这说明了 *Thiosphaera pantotropha* 在异养硝化和好氧反硝化方面的重要作用。

好氧反硝化中, 其反应速率限制参数主要包括 DO、C/N 比、温度和 pH 值等。好氧反硝化细菌对溶解氧的适应浓度范围很大, 最近的研究在 3–18 mg/L 范围内对一株 *Pseudomonas stutzeri* 的硝酸盐还原酶基因分析表明, DO 浓度增高菌株的 *napA* 和 *nirS* 两种基因明显表达<sup>[10]</sup>。Huang 等<sup>[11]</sup>在利用 *Citrobacter diversus* 进行研究时指出 C/N 与 DO 浓度是好氧反硝化的关键因素, 好氧反硝化所需 C/N 比缺氧反硝化所需的 C/N 要高, 最佳好氧反硝化活性在 C/N 为 4–5 时获得; 细菌生长速度和反

硝化速率最合适 DO 浓度为 2–6 mg/L。李丛娜等利用序批式生物反应器(Sequencing batch reactor, SBR)进行脱氮研究时发现,在溶解氧浓度高达 8 mg/L, C/N 为 7.9, MLSS 较低的情况下,经过 5 h 曝气,总氮去除率可达到 45.3%,总氮去除率随进水 C/N 的提高而增加<sup>[12]</sup>。另外,碳负荷和氮负荷越高,其反硝化效果也越好。研究发现,在某一最佳的范围内提高有机碳浓度能够明显增加好氧反硝化菌的反硝化速率<sup>[13]</sup>。用含有 *Thiosphaera pantotropha* 的生物转盘处理不同浓度的生活污水时,研究发现在一定浓度范围内氨氮硝化速率会随有机负荷增加呈线性增加规律,在 COD 负荷率为 15 g N/(m<sup>2</sup>·d) 和氨氮负荷率为 1.5 g N/(m<sup>2</sup>·d) 时所获得的线性增长速率为 1 g N/(m<sup>2</sup>·d)<sup>[8]</sup>。

关于利用好氧反硝化菌实现的生物脱氮的报道还不多见。一个重要原因是由于好氧反硝化菌在环境中数量较少,不易形成优势种群,直接筛选难度较大。马放等<sup>[14]</sup>采用 SBR 反应器,通过间歇曝气和连续曝气方式对活性污泥体系中好氧反硝化菌的选择和富集效果作了比较。两种方式均能起到富集好氧反硝化菌群的作用,并且开发出相应的实验装置<sup>[15]</sup>。好氧反硝化细菌的脱氮效能受关键因子 C/N 比、温度、pH 和溶解氧的相互影响,为了能够达到综合优化的目的,试验采用响应面法对关键因子进行优化获得目标菌株的最佳反硝化性能。响应面法是一种能够对多元因子综合优化并确定最优响应值的统计学方法,与传统方法(如正交试验)相比,响应面法能够考虑到试验随机误差,将复杂的未知函数关系在小区域内用简单的一次或二次多项式模型来拟合,计算比较简便<sup>[16]</sup>。本研究通过菌株脱氮效能优化结果,为后续该菌株的实际脱氮工艺构建提供有力的高效运行指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

DM 培养基(g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7.9, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, 丁二酸钠 4.7,

KNO<sub>3</sub> 1.5, 微量元素溶液 1 mL。微量元素溶液(g/L): EDTA 50.00, ZnSO<sub>4</sub> 2.20, CaCl<sub>2</sub> 5.50, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 5.06, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.00, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.10, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.57, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.61, pH 7.0。

FM 培养基(g/L): 牛肉膏 1.0, 蛋白胨 5.0, KNO<sub>3</sub> 1.0, 调节 pH 至 7.2–7.4。

### 1.2 好氧反硝化 SBR 反应器及运行方法

**1.2.1 反应器构型:** 实验采用的是有效容积为 3 L 的序批式生物反应器(图 1)。反应器内装有溶解氧仪、pH 在线监测仪、ORP 测定仪、温度计、液位计、搅拌器等,运行过程由时间自动控制系统进行控制。通过间歇曝气和连续曝气相结合的方式对活性污泥体系中好氧反硝化细菌进行选择 and 富集。

**1.2.2 好氧反硝化功能驯化条件:** 驯化初段以 FM 培养液培养以增加系统微生物含量,随后以 DM 培养液培养,并逐渐增加曝气时间以富集好氧反硝化菌。SBR 反应器中经过一个月的富集培养,待硝酸盐去除率趋于稳定(去除率>90%),此时污泥呈灰黄色,易沉降,污泥浓度达到 3 000 mg/L 以上,表明好氧反硝化污泥活性较好。

**1.2.3 SBR:** 反应器运行通过间歇曝气和连续曝气相结合的方式对活性污泥体系中好氧反硝化细菌进行选择 and 富集,调节反应温度在 22±2 °C,气体流量计控制气量维持 DO 值。间歇曝气(1–23 d)反应

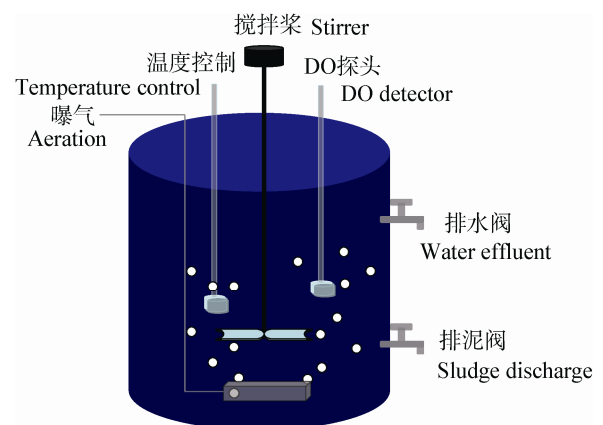


图 1 SBR 反应器装置

Figure 1 The sequencing batch reactor

器每一周期运行 24 h, 其流程为进水(1.5 L)→曝气/搅拌→搅拌→沉降(0.5 h)→排水(0.1 h, 1.5 L)。随着反应器的运行, 曝气时间由第 1 天的 4 h 逐渐增加到第 23 天的 23.4 h。第 24–30 天采取连续曝气富集, 运行方式同间歇曝气, 定期检测进水/出水的  $\text{NO}_3^-$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N、TN 和 COD。

### 1.3 好氧反硝化菌的分离筛选

**1.3.1 菌种分离纯化:** 用梯度稀释混合平板法和平板划线法分离纯化好氧反硝化菌。稀释混合平板法取 1 mL 该梯度菌悬液加入已灭菌的平皿中, 分别倒入 50 °C 左右未凝培养基混匀, 待培养基凝固后倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养。培养 2–3 d 后, 挑选出一个合适的梯度。挑取菌落形态清晰、形态不同的单菌落, 三区划线, 重复几次直至菌落特征一致, 无异常菌落出现, 挑取单一菌落接种到斜面培养基上培养保存备用, 所有操作都是在超净工作台无菌操作。

**1.3.2 菌种筛选:** 将得到的菌体通过肉汤培养基扩大培养以后, 分装到离心管中, 在 8 000 r/min 条件下离心 15 min, 弃去上清液, 然后向离心管中加入灭过菌的磷酸缓冲溶液, 搅匀离心管底部沉淀的菌体, 再次离心, 如此洗涤菌体 3 次, 以去除菌体表面吸附的培养基, 将得到的菌体用无机盐培养基配成菌悬液, 以 10% (体积比) 的接种量接种到无机盐培养液中, 在 30 °C、130 r/min 摇床中培养, 每隔一段时间取样, 离心取上清, 测量培养前后溶液中 TN、 $\text{NO}_3^-$ -N 浓度的变化确定实验所需的高效菌种。

### 1.4 好氧反硝化菌培养优化

采用响应面法对影响好氧反硝化效率的关键影响因子(C/N 比、溶解氧、温度、pH)进行优化。对于物理因子温度和 pH 的优化范围分别为 15–40 °C 和 6.0–8.0, 溶解氧优化范围设定为 1.8–3.3 mg/L, 通过回归拟合、显著性和方差分析, 预测最佳条件, 中心组合设计(Central composite design, CCD)采用 Statease 公司生产的软件 Design-Expert 8.0 进行实验设计以及数据分析, 中心组合设计实验因子水平条件优化见表 1。

表 1 环境因子中心组合设计实验因子水平  
Table 1 Central composite design experimental factor level of environmental factors

Factors	Level (-)	Level (+)
Temperature (°C)	20	35
pH	6.0	8.0
DO (mg/L)	1	4

在物理因子优化基础上, 对碳源和氮源进行反硝化效率的进一步优化, 碳源以 COD 计算, 氮源以硝酸盐氮计算, 组合设计因子变化范围根据筛选菌株的驯化条件设置, 如表 2 所示。

### 1.5 好氧反硝化菌功能鉴定

**1.5.1 16S rRNA 基因序列测定:** 将菌株接入 DM 液体培养基培养 24 h, 采用上海华舜 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。采用细菌保守序列 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增。引物序列为: BSF8/20: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; BSR1541/20: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。

PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ )<sup>[17]</sup>: 10×PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 引物 BSF8/20 和 BSR1541/20 各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 (10 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 去离子水 35.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 56 °C 40 s, 72 °C 2 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min。

PCR 产物测序由大连宝生物生物工程有限责任公司完成, 以 Seq Forward、Seq Reverse、Seq Internal 为引物对上述产物进行 DNA 双向测序。

**1.5.2 硝酸盐还原酶测定:** 硝酸盐还原酶(NAP)是好氧反硝化细菌反硝化作用的关键酶, 是由 2 个亚单位(NAP A 和 NAP B)组成的二聚体; 其中 NAP A 是由周质硝酸盐还原酶亚基基因(*napA*)编码。采用

表 2 碳源、氮源中心组合设计实验因子水平  
Table 2 Central composite design experimental factor level of carbon and nitrogen

Factors	Level (-)	Level (+)
A 碳源 COD (mg/L)	400	800
B 氮源 $\text{NO}_3^-$ -N (mg/L)	100	200

上海华舜 DNA 提取试剂盒(W6511)提取基因组 DNA 后,以 *napA* 基因保守区的一部分序列为引物,进行 PCR 扩增,可以对细菌是否具有好氧反硝化潜能进行鉴定<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SBR 反应器运行和好氧反硝化菌驯化

驯化初始,以 FM 培养液作为 SBR 反应器进水,在驯化过程中逐渐增加 DM 培养液的含量。富集结束时(第 30 天),出现 TN 明显降低(物理吹脱和同化作用会引起微量减少)、硝酸盐大量去除(少量被菌体利用合成自身氮源)及亚硝氮微量积累的现象,证明确实有好氧反硝化发生,并且反应进行的比较彻底。从反应器功能菌群富集培养并通过平板分离获得 22 株具有好氧反硝化功能的目标菌株(表 3)。综合总氮去除和硝酸盐去除率,22 株菌中获得一株较好的好氧反硝化菌 T13。

菌株 T13 对硝酸盐的去除效果最好,在 18 h 内硝氮去除率为 97.75%,对总氮的去除率达到 89.74%,同时微生物的生长情况较好。菌株最大生长速率为  $0.3079 \text{ h}^{-1}$ ,生长代时为 2.25 h。

### 2.2 16S rRNA 基因序列鉴定

进一步对 T13 的 16S rRNA 基因测序,其 16S rRNA 基因的序列长度为 1 420 bp,结果用 BLAST 软件与 GenBank 中的序列进行同源性比较。结果表明,菌株 T13 与已报道的 *Pseudomonas* sp. 序列相似性为 99%,推断该菌为 *Pseudomonas*。将已报道好氧反硝化菌 *Pseudomonas* sp.、*Paracoccus pantotrophus*、*P. denitrificans*、*Alcaligenes faecalis*、*Alcaligenes* sp.、*Microvirgula aerodenitrificans*、*Thauera selenatis*、*Thauera mechernichensis*、*Pseudomonas denitrificans* 序列下载,以 *E. coli* 为参考序列,应用 MEGA 4.0 软件 N-J 法构建系统发育树,确定其进化地位,结果如图 2 所示。

假单胞菌属中已经报道的具有脱氮功能的菌株通常都在厌氧条件下进行反硝化作用,但是在一定溶解氧存在时也对反硝化产生积极作用,对溶解

表 3 SBR 反应中获得的 22 株目标菌对 TN 和  $\text{NO}_3^-$  的去除率

Table 3 The removal rate of TN and  $\text{NO}_3^-$  by 22 strains from SBR

菌株 Strain No.	总氮去除率 TN removal (%)	硝氮去除率 $\text{NO}_3^-$ -N removal (%)	生长吸光度 Optical density
T1	20	23	0.18
T2	16	17	0.21
T3	8	11	0.16
T4	48	54	0.52
T5	40	45	0.50
T6	15	14	0.30
T7	22	20	0.28
T8	15	10	0.27
T9	49	58	0.47
T10	37	60	0.51
T11	63	75	0.60
T12	68	64	0.62
T13	84	91	0.65
T14	25	29	0.38
T15	68	83	0.58
T16	60	68	0.54
T17	38	40	0.40
T18	20	18	0.20
T19	45	52	0.30
T20	26	36	0.28
T21	22	33	0.44
T22	16	20	0.21

氧的耐受程度也不尽相同,如 *Pseudomonas aeruginosa* 的  $\text{DO} < 1.3 \text{ mg/L}$ <sup>[19]</sup>,而 *Pseudomonas putida* AD-21 在 DO 高达 5–6 mg/L 时仍可以进行反硝化<sup>[20]</sup>。利用氰化钾(KCN)选择培养基筛选得到的 *Pseudomonas* sp. Y2-1-1 菌株的溶解氧浓度高达 9.0 mg/L 的培养基中 5 d 内硝酸盐氮的去除率达到 47%,其基因序列分析发现存在与好氧反硝化相关的周质硝酸盐还原酶(NAR)的亚基 *napA* 基因<sup>[21]</sup>。*Pseudomonas stutzeri* T13 对硝酸盐还原酶检测发现大量脱氮相关的基因,其中检测到的硝酸盐还原酶比例占脱氮酶基因的 30%以上<sup>[22]</sup>,这为 T13 的好氧反硝化功能优化提供重要支持。

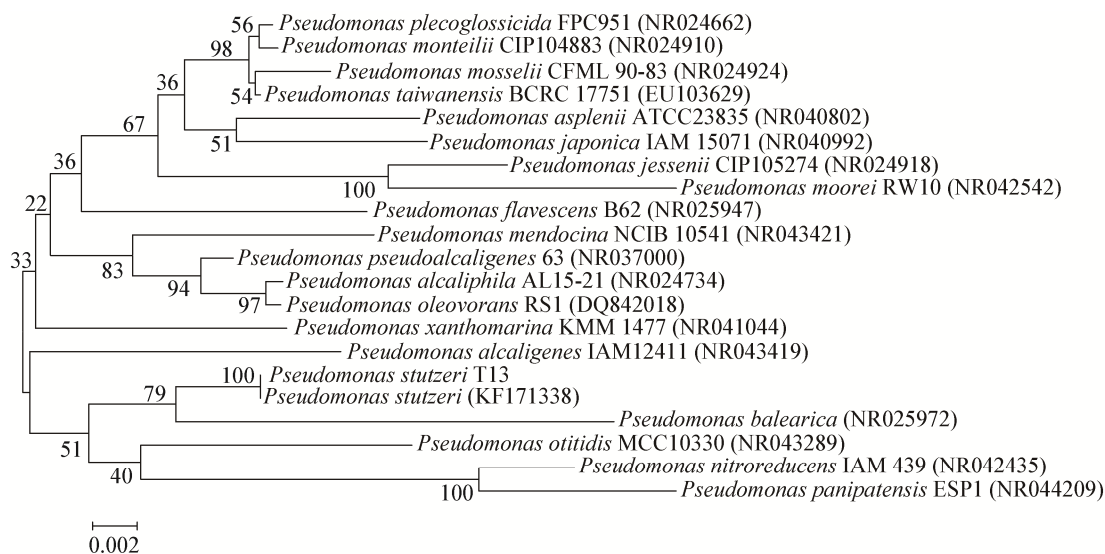


图2 菌株 T13 和其他已报道好氧反硝化菌构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic trees of strain T13 and related bacteria with N-J

注: 结点处的数字代表树的自举值, 小括弧内的数字为序列在 GenBank 中的注册号。标尺, 0.2% 序列差异度。

Note: The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap and in the parentheses are the GenBank accession numbers of gene sequences. Bar, 0.2% sequence divergence.

### 2.3 基于响应面法的好氧反硝化条件优化

好氧反硝化菌的代谢特性受温度、pH、溶解氧等关键环境因子影响, 这些环境因素在实际废水处理过程中变化较多而且相互影响, 通过实验确定这些生态因素对菌株 T13 生长和脱氮效能的影响, 为菌株 T13 应用于实际废水处理提供参考数据的意义重大。在微生物生长适宜的中温范围(15–40 °C), 随着温度的升高有利于脱氮率逐渐增大。在 15 °C 的低温条件下, T13 仍具有一定的脱氮能力, 硝氮去除率为 45.8%。温度升高, 细胞内的化学反应和酶反应加快, 生长比较迅速, 代谢活力增强, 整个过程中菌株的生长趋势和反硝化效能趋势一致。

在温度为 20–35 °C 范围内, 菌株 T13 生长情况较好; 在温度为 30 °C 时, 生长和反硝化效能最好, 硝氮去除率可达到 95%。根据响应面法结果预测该菌株在低温(15 °C)时中性条件脱氮效能可以达到 40%以上, 但是实际实验值更低, 仅达到 30%左右(表 4)。在 20 °C 时, T13 的脱氮效能在中性及偏碱条件下可以达到 60%以上, 酸性条件(pH 6.0)会使脱氮效能降低到 50%左右。

表 4 关键环境因子响应面法优化结果

Table 4 Optimization of key environmental factors based on response surface method

Design	A Temperature (°C)	B pH	C DO (mg/L)	Removal (%)	
				Experiment	Predicted
1	35.0	6.00	4.0	63.20	62.33
2	20.0	8.00	4.0	54.02	47.72
3	27.5	7.00	0.0	70.03	76.50
4	27.5	7.00	2.5	96.91	97.69
5	27.5	7.00	2.5	97.97	97.69
6	20.0	6.00	4.0	62.34	53.65
7	27.5	5.00	2.5	27.87	30.67
8	15.0	7.00	2.5	32.71	43.09
9	20.0	6.00	1.0	52.37	51.47
10	27.5	7.00	2.5	97.20	97.69
11	35.0	8.00	1.0	79.61	76.50
12	27.5	8.68	2.5	43.17	55.60
13	35.0	8.00	4.0	82.45	71.55
14	27.5	7.00	2.5	98.22	97.69
15	20.0	8.00	1.0	60.01	49.08
16	27.5	7.00	2.5	98.45	97.69
17	27.5	7.00	2.5	99.98	97.69
18	35.0	6.00	1.0	69.22	63.73
19	40.0	7.00	2.5	66.85	73.17
20	27.5	7.00	5.0	63.94	74.19



由于过高的  $H^+$  浓度会在好氧反硝化过程产生  $HNO_2$ , 从而抑制硝酸还原酶活性。因此当 pH 小于 5.0 时, 生长及反硝化效能都急剧下降; pH 为 4.0 时硝化效能和菌株生长效果均为最差; pH 7.0 时, 菌株 T13 生长最好, 硝氮去除率最高可达 86.78%; 该菌最适 pH 为中性偏碱。在菌株单因子关键条件优化的基础上, 采用响应面法对三种关键环境因子温度(15–40 °C)、pH (6.0–8.0)和溶解氧(1–4 mg/L)综合优化(图 3), 该菌株的最高硝酸盐去除率 97.75%, 总氮去除率 89.74%。高效反硝化效果的最佳温度为 25–30 °C; 最适 pH 为 7.0; 最佳溶解氧浓度在 2.5 mg/L。响应面法优化结果的方差分析  $P$ -value 为 0.000 4。

外加不同碳源对 *Pseudomonas* T13 生长及硝氮去除结果表明, 以丁二酸钠、葡萄糖两种外加碳源作为菌株 T13 唯一碳源可以大大提高菌株 T13 的生长速度。实验中以人工配水模拟废水的碳源(丁二酸钠)浓度变化范围为 400–900 mg/L, 硝酸盐氮( $KNO_3$ )的浓度范围为 100–250 mg/L。通过响应面法优化碳氮比对菌株 *Pseudomonas* T13 的最佳好氧反硝化效果发现, 通过调控碳源浓度改变不同碳氮比, 菌株 T13 的硝氮去除率随碳氮比的增加而增大, 随着碳氮比降低, 反硝化作用也降低(图 4)。当 C/N 比达到 4:1 时好氧反硝化过程的硝酸盐氮去除率达到 85%以上, 研究碳氮变化范围内 C/N 比提高到 8:1 是硝酸盐去除率最高达到 95% (表 5)。响应面法优化结果的方差分析  $P$ -value<0.000 1。本实验室前期研究中发现的好氧反硝化菌株 X31 以乙酸盐作为碳源时菌株的反硝化速率要稍高于丁二酸盐作为碳源, 当 C/N 大于 5 时, 脱氮率能达到 90%以上<sup>[23]</sup>。而近期在养殖水体中筛选获得的 *Pseudomonas* GC5, 以乙醇为碳源时碳氮比需要在 15:1 时达到最佳脱氮效能<sup>[24]</sup>。因此, 本研究获得的脱氮菌株 T13 对较低碳氮比的需求在未来工艺实际应用中具有一定优势。

C/N 是在呼吸过程中获得高效反硝化效率的主要控制参数<sup>[20,25]</sup>, 由于好氧反硝化关键酶——周质

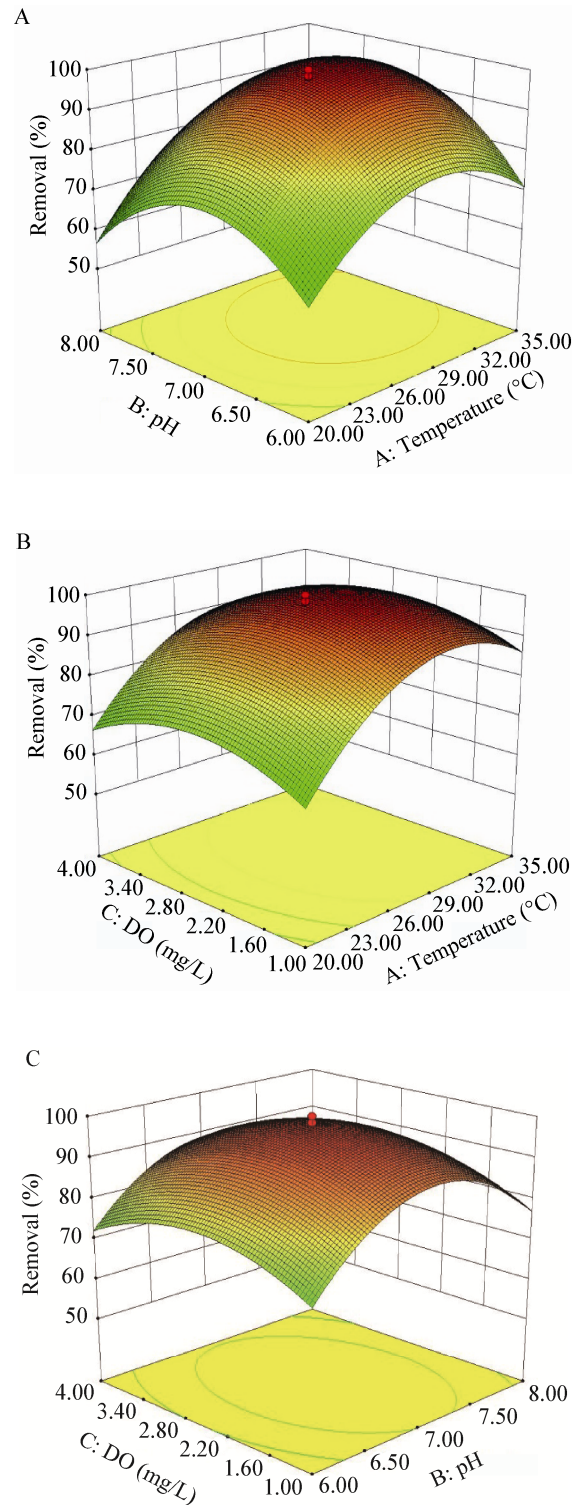


图 3 基于响应面法优化关键环境因子(温度、pH、溶解氧)对好氧反硝化效能  
Figure 3 Optimization of temperature, pH, DO on aerobic denitrification by response surface methodology

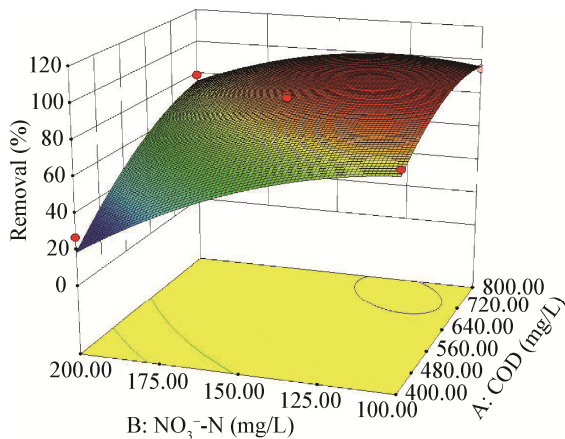


图4 基于响应面法优化碳源、氮源对好氧反硝化效能  
Figure 4 Optimization of carbon and nitrogen on aerobic denitrification by response surface methodology

表5 碳源、氮源响应面法优化结果

Table 5 Optimization of carbon and nitrogen based on response surface method

Design	碳源 COD (mg/L)	氮源 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg/L)	Removal (%)	
			Experiment	Predicted
1	800.00	200.00	79.27	70.52
2	600.00	150.00	83.19	86.02
3	600.00	79.29	92.89	91.24
4	600.00	150.00	89.16	86.02
5	600.00	150.00	91.96	86.02
6	600.00	150.00	90.31	86.02
7	800.00	100.00	95.18	93.84
8	317.16	150.00	35.17	40.34
9	400.00	100.00	80.18	75.52
10	600.00	150.00	90.15	86.02
11	400.00	200.00	27.23	16.20
12	882.84	150.00	95.97	91.71
13	600.00	220.71	30.26	32.81

硝酸盐还原酶的表达更多地受消耗碳源的影响,碳源消耗越大,酶活性越高。在高碳氮比和限制性呼吸的环境下,可激活反硝化相关基因表达,进行好氧反硝化反应。在其他不同好氧反硝化菌的研究中发现,溶解氧含量对氮素去除效率影响会同时影响对碳氮比的需求,较低的溶解氧能够降低好氧反硝化过程对C/N比的需求<sup>[10]</sup>,通常DO的浓度可以降低到2.0–6.0 mg/L。尽管*Pseudomonas*属的好氧反

硝化菌能够对更高的溶解氧(>10.0 mg/L)进行适应<sup>[11]</sup>,然而过高的提高溶解氧(>5.0 mg/L)水平需要更高的碳源浓度以达到>50%的总氮去除率<sup>[12]</sup>。本研究获得的*Pseudomonas* T13的适宜工作溶解氧浓度为2.5 mg/L左右,比其他报道的溶解氧需求量更低,而较低的溶解氧含量条件下的好氧反硝化过程对有机碳源的需求更少,这对于硝酸盐含量较高的污水快速转化十分有利。

### 3 结论

通过长期运行的SBR好氧反硝化工艺,获得一株高效的好氧反硝化菌*Pseudomonas* T13,采用响应面法对该菌株的关键影响因子碳氮比、pH和溶解氧进行综合优化,该菌株的高效反硝化效果的适宜温度范围为25–30℃;最适pH为中性偏碱;适宜的COD/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N为4:1以上;最佳溶解氧浓度在2.5 mg/L。优化条件下在18 h后达到最高硝酸盐去除率95%,总氮去除率90%。研究表明在高碳氮比和限制性呼吸的环境下,反硝化相关基因表达能够激活表达实现高效的好氧反硝化反应。

### 参考文献

- [1] Demoulin G, Rudiger A, Goronszy MC. Cyclic activated sludge technology-recent operating experience with a 90000 p.e. plant in Germany[J]. Water Science Technology, 2001, 43(3): 331-337
- [2] Seghers K. Technical report: brewery wastewater treatment with UNITANK[R]. Belgium: Keppel Integrated Engineering Group, 2000
- [3] Wu W, Timpany P, Dawson D. Simulation and application of a novel modified SBR for biological removal[J]. Water Science Technology, 2001, 43(3): 215-222
- [4] Ke GH. Study on the kinetics of aerobic denitrification[J]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Technology and Business University, 2006 (in Chinese)  
柯国华. 好氧反硝化动力学研究[J]. 北京: 北京工商大学硕士学位论文, 2006
- [5] Frette L, Gejlsbjerg B, Westermann P. Aerobic denitrifiers isolated from an alternating active sludge system[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 24: 363-370
- [6] Robertson LA, Kuenen JG. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultative autotrophic sulphur bacterium[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1983, 129: 2847-2855
- [7] Zheng P, Xu XY, Hu BL. Novel Theory and Biotechnology for Nitrogen Removal[M]. Beijing: Science Press, 2004 (in Chinese)  
郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术[M]. 北京:



- 科学出版社, 2004
- [8] Gupta AB, Gupta SK. Simultaneous carbon and nitrogen removal in a mixed culture aerobic RBC biofilm[J]. Water Research, 1999, 33(2): 555-561
- [9] Kshirsagar M, Gupta AB, Gupta SK. Aerobic denitrification studies on activated sludge mixed with *Thiosphaera pantotropha*[J]. Environmental Technology, 1994, 16(1): 35-43
- [10] Ji B, Wang H, Yang K. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O<sub>2</sub> concentrations[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(4): 719-722
- [11] Huang HK, Tseng SK. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2001, 55: 90-94
- [12] Li CN, Lü XW, Inamori Y. Study on nitrogen removal by simultaneous nitrification and denitrification[J]. Water & Wastewater Engineering, 2001, 27(1): 22-24 (in Chinese)  
李丛娜, 吕锡武, 稻森悠平. 同步硝化反硝化脱氮研究[J]. 给水排水, 2001, 27(1): 22-24
- [13] Zhi W, Ji G. Quantitative response relationships between nitrogen transformation rates and nitrogen functional genes in a tidal flow constructed wetland under C/N ratio constraints[J]. Water Research, 2014, 64: 32-41
- [14] Ma F, Wang HY, Zhou DD. Selection and enrichment of aerobic denitrifier in activated sludge system[J]. Journal of Hunan University of Science & Technology (Natural Science Edition), 2005, 20(2): 80-83 (in Chinese)  
马放, 王弘宇, 周丹丹. 活性污泥体系中好氧反硝化菌的选择与富集[J]. 湖南科技大学学报: 自然科学版, 2005, 20(2): 80-83
- [15] Zhou DD, Ma F, Wang HY, et al. Study on screening method of aerobic denitrifier[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 837-839 (in Chinese)  
周丹丹, 马放, 王弘宇, 等. 关于好氧反硝化菌筛选方法的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 837-839
- [16] Wang YF, Wang CG. The application of response surface methodology[J]. Journal of the CUN (Natural Science Edition), 2005, 14(3): 236-240 (in Chinese)  
王永菲, 王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2005, 14(3): 236-240
- [17] Wang AJ, Kan HJ, Yu ZG, et al. Optimal conditions and validation of single-strand conformation polymorphism technology for the analysis of microbial communities in activated sludge[J]. Microbiology China, 2008, 35(7): 1164-1169 (in Chinese)  
王爱杰, 阚洪晶, 于振国, 等. SSCP 技术分析活性污泥微生物群落结构的条件优化及检验[J]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1164-1169
- [18] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs[J]. Genome Research, 2008, 18(5): 821-829
- [19] Chen F, Xia Q, Ju L. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence[J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69(11): 6715-6722
- [20] Kim M, Jeong SY, Yoon SJ, et al. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios[J]. Journal of Bioscience Bioengineering, 2008, 106(5): 498-502
- [21] Kong QX, Li JW, Wang XW, et al. A new screening method for aerobic denitrification bacteria and isolation of a novel strain[J]. Journal of Applied and Environmental Biology, 2005, 2: 222-225 (in Chinese)  
孔庆鑫, 李君文, 王新为, 等. 一种新的好氧反硝化菌筛选方法的建立及新菌株的发现[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 2: 222-225
- [22] Li A, Gai Z, Cui D, et al. Genome sequence of a highly efficient aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* T13[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(20): 5720
- [23] Wang HY, Ma F, Su JF, et al. Influence of carbon source and C/N ratio on nitrogen removal of aerobic denitrifier[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(6): 968-972 (in Chinese)  
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[J]. 环境科学学报, 2007, 6: 968-972
- [24] Zhou L, Tang JW, Wang X, et al. Screening and identification of aerobic denitrifiers and the optimization of denitrification conditions[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2011, 23(5): 942-947 (in Chinese)  
周莉, 汤江武, 王新, 等. 好氧反硝化细菌的筛选鉴定及其反硝化反应条件优化[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(5): 942-947
- [25] Yang G, Hao X, Li C, et al. Effects of greenhouse intensive cultivation and organic amendments on greenhouse gas emission according to a soil incubation study[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2015, 61(1): 89-103