

## 研究报告

## 好氧反硝化细菌 SY-D-22 的分离、优化及脱氮机理

张宇红\*, 刘香宇, 董先博, 许家琪, 徐子凌

沈阳化工大学环境与安全工程学院, 辽宁 沈阳 110142

张宇红, 刘香宇, 董先博, 许家琪, 徐子凌. 好氧反硝化细菌 SY-D-22 的分离、优化及脱氮机理[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1815-1825.

ZHANG Yuhong, LIU Xiangyu, DONG Xianbo, XU Jiaqi, XU Ziling. Aerobic denitrifying bacterium SY-D-22: isolation, optimization of denitrification conditions, and characterization of denitrification mechanism[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1815-1825.

**摘要:**【背景】在处理含硝酸盐氮的废水中, 常见微生物不能同时高效去除硝酸盐氮和总氮, 导致处理废水时往往使用多种微生物复合菌剂或者使用复杂的工艺。【目的】高效、安全地去除水中的硝酸盐氮和总氮。【方法】富集筛选出一株新型高效好氧反硝化细菌, 对其进行 16S rRNA 基因鉴定。利用响应面法对其影响脱氮因素进行优化并探索其最佳脱氮条件。研究其对含硝酸盐氮废水的反硝化能力及脱氮特性。【结果】从活性污泥中筛选获得一株新型高效好氧反硝化细菌 SY-D-22, 经鉴定为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)。响应面法优化其最佳反硝化条件为: pH 8.18, C/N 为 13.39, 温度 31.43 °C, 摇床转速 130 r/min。当以最佳碳源柠檬酸钠为唯一碳源时, 对于 100 mg/L 浓度的  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率可达 100%, 同时对于总氮(total nitrogen, TN)的去除率为 95.34%, 具有高效脱氮能力。【结论】从活性污泥中筛选出一株新型好氧反硝化细菌 *Staphylococcus* SY-D-22, 通过响应面法条件优化, 菌株的硝酸盐氮去除率达到 100.00%, 总氮去除率达到 95.34%, 具有去除硝酸盐氮和亚硝酸盐氮能力。

**关键词:** 反硝化脱氮; 响应面法; 好氧反硝化; 同步硝化反硝化; 总氮; 条件优化

资助项目: 辽宁省教育厅面上项目(LJKZ0471); 大学生创新训练计划(X202110149097)

This work was supported by the Liaoning Provincial Department of Education (LJKZ0471) and the Innovative Training Program for College Students (X202110149097).

\*Corresponding author. E-mail: zhangyhhit@163.com

Received: 2022-05-10; Accepted: 2022-09-20; Published online: 2023-01-05

# Aerobic denitrifying bacterium SY-D-22: isolation, optimization of denitrification conditions, and characterization of denitrification mechanism

ZHANG Yuhong<sup>\*</sup>, LIU Xiangyu, DONG Xianbo, XU Jiaqi, XU Ziling

College of Environmental and Safety Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, Liaoning, China

**Abstract:** [Background] In the treatment of wastewater containing nitrate, common microorganisms cannot efficiently remove nitrate while having a high removal rate for total nitrogen, which results in the use of multiple bacteria or complex processes. [Objective] To efficiently and safely remove nitrate nitrogen and total nitrogen from water. [Methods] An efficient aerobic denitrifying bacterium was isolated from activated sludge and sequenced for the 16S rRNA gene. The response surface methodology was employed to optimize the factors affecting nitrogen removal. Further, the denitrification capacity and characteristics of the strain for nitrate-containing wastewater were studied. [Results] An efficient aerobic denitrifying bacterium SY-D-22 was isolated from activated sludge and identified as *Staphylococcus*. The best denitrification efficiency of the strain was achieved under pH 8.18, C/N ratio of 13.39, 31.43 °C, and 130 r/min. With sodium citrate as the sole carbon source, strain SY-D-22 rapidly removed nitrogen under aerobic conditions, demonstrating the nitrate nitrogen (100 mg/L) removal rate up to 100% and the total nitrogen removal rate of 95.34%. [Conclusion] *Staphylococcus* SY-D-22 was isolated from the activated sludge. After the denitrification conditions were optimized by response surface methodology, the removal rates of the strain for nitrate nitrogen and total nitrogen was up to 100.00% and 95.34%, respectively. This strain is capable of removing nitrate nitrogen and nitrite nitrogen.

**Keywords:** denitrification; response surface methodology; aerobic denitrification; simultaneous nitrification and denitrification; total nitrogen; condition optimization

硝酸盐氮(nitrogen nitrate,  $\text{NO}_3^-$ -N)是自然水体中的重要污染物<sup>[1]</sup>。高浓度的  $\text{NO}_3^-$ -N 会与其他含氮的有机化合物反应生成亚硝胺(nitrosamine)和亚硝基酰胺(nitrosoamide), 导致基因突变、畸形甚至诱发癌症<sup>[2]</sup>。含有硝酸盐氮废水的处理已成为亟待解决的问题。生物脱氮可以使硝酸盐氮经由  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  过程而去除, 每个过程由不同的酶进行催化, 并且伴随着能量守恒<sup>[3]</sup>。生物反硝化可以通过自养或异养方式实现。异养反硝化在

水处理设施中更有优势, 因为其显示出更高的效率。传统的生物脱氮认为硝化与反硝化过程对于氧气的需求不同, 需要分开在不同反应器内进行, 这增加了实际运行成本。1984 年, 好氧反硝化细菌首次被发现并报道<sup>[4-5]</sup>。区别于传统的反硝化脱氮理论, 好氧反硝化细菌可以在好氧条件下进行反硝化反应。自此以后, 越来越多的好氧反硝化细菌被发现并报道, 如李文甫等<sup>[6]</sup>从水产研究养殖池中分离得到一株假单胞菌属(*Pseudomonas*)的新型高效脱氮菌; 李誉琦等<sup>[7]</sup>

分离得到一株耐高温耐高浓度亚硝酸盐氮的反硝化细菌等。好氧反硝化体系的发现和完善使得整个氨化、硝化和反硝化脱氮过程足以在同一氧气条件下进行。弥补了传统反硝化脱氮需要将整个脱氮过程中的氨化、硝化和反硝化放在不同的反应器当中进行的缺点,对于新型脱氮工艺的开发提供了理论基础和研究方向。然而目前所报道的好氧反硝化脱氮菌株依然具有去除速率慢、对于总氮的降解效果不理想等缺点<sup>[8]</sup>。

本试验从污水处理厂的活性污泥中分离得到一株好氧反硝化细菌,利用响应面法对其最佳脱氮条件进行优化,确定其最佳碳源,并分析其反硝化特性,以期为该菌株在水处理中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

富集培养基、好氧反硝化液体培养基和活化培养基按照参考文献[9]配制。

好氧反硝化固体培养基(g/L):在富集培养基中加入 1.0 mL 以 10 g/L 溶解于酒精的溴麝香草酚蓝(bromothymol blue, BTB)和 20.0 琼脂,无氨水溶解并调节 pH 值为 7.0–7.3。

### 1.2 主要试剂和仪器

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、*Taq* Plus DNA 聚合酶、10×PCR buffer (含  $Mg^{2+}$ )、dNTPs (10 mmol/L), 生工生物工程(上海)股份有限公司。

PCR 仪, ABI 公司;凝胶成像仪,上海复日科技有限公司;冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;电泳仪,北京六一仪器厂;紫外分光光度计,岛津公司;精密电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

### 1.3 检测方法

$OD_{600}$  测定方法为分光光度法;硝酸盐氮

( $NO_3^-$ -N) 浓度测定方法为紫外分光光度法(HJ/T346—2007)<sup>[10]</sup>;亚硝酸盐氮( $NO_2^-$ -N)浓度测定方法为分光光度法(GB7493—87)<sup>[11]</sup>;总氮(TN)浓度测定方法为碱性过硫酸钾法(HJ636—2012)<sup>[12]</sup>。

### 1.4 好氧反硝化菌的富集分离和筛选

在 100 mL 富集培养基中添加 10 g 活性污泥, 30 °C、130 r/min 条件下培养 3 d, 移取 10% 培养液转接至新的富集培养基中, 共转接 3 次。吸取富集后的菌悬液, 使用灭菌水进行  $10^{-1}$ – $10^{-6}$  梯度稀释, 涂布在 BTB 固体培养基上, 30 °C 恒温培养 3 d, 挑取菌落进行分离纯化, 得到单菌株。培养种子液( $OD_{600} \geq 0.5$ )后按照 2% 接种量加入 100 mL 好氧反硝化液体培养基中, 30 °C、130 r/min 好氧振荡, 48 h 后检测培养基前后的  $NO_3^-$ -N 的浓度变化, 对其中去除效率最好的菌株进行后续研究。

### 1.5 好氧反硝化细菌的鉴定

#### 1.5.1 形态及生理生化鉴定

将筛选得到的菌株接种至固体 LB 培养基 30 °C 培养 3 d 后进行形态学观察。对菌株进行革兰氏染色镜检。生理生化试验参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>。

#### 1.5.2 菌株的 16S rRNA 基因鉴定和系统发育树构建

将筛选到的菌株接种至活化培养基培养 48 h 后, 利用细菌 DNA 提取试剂盒提取离心 (8 000 r/min 离心 10 min) 收集的菌体的 DNA。利用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACCTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25  $\mu$ L): 正、反向引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 10×PCR buffer (with  $MgCl_2$ ) 2.5  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, *Taq* Plus DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s,

72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。将 PCR 扩增产物送至金唯智公司进行测序, 所得序列登录 NCBI 进行 BLAST, 选取相关序列进行系统发育树构建。

### 1.6 好氧反硝化细菌的条件优化

好氧反硝化菌的好氧反硝化过程受环境因素影响, 这些环境因素在实际生物脱氮过程中变化较多且相互影响, 通过试验确定这些环境因素对菌株 SY-D-22 生长和脱氮效率的影响, 为菌株 SY-D-22 之后的实际应用提供理论依据。区别于单因素试验, 响应面法(response surface methodology, RSM)将统计与数学结合, 可以分析重要变量对响应值的交互影响<sup>[14-15]</sup>。以 C/N、pH、温度和摇床转速(溶解氧浓度)为自变量(表 1), 以  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率为响应值, 根据 Design-Expert 的 Box-Behnken 系统软件设计 29 组实验。实验结果利用 Design-Expert 软件进行分析。

### 1.7 好氧反硝化细菌的碳源优化

为分析各碳源对分离得到的菌株生长及反硝化能力的影响, 分别以蔗糖、丁二酸钠, 乙酸钠、葡萄糖和柠檬酸钠为唯一碳源, 以 2% 的接种比例接种菌株至好氧反硝化液体培养基中, 其余条件为 1.5 中获得的最佳条件, 培养 36 h, 每 6 h 检测其  $OD_{600}$  和硝酸盐氮浓度并计算硝酸盐氮去除率, 比较各个碳源的优缺点, 找出最佳碳源。

表 1 Box-Behnken 实验设计

Table 1 Box-Behnken design of experiments

Independent variable	C/N	pH	Temperature (°C)	Shake speed (r/min)
Horizontal	-1	5	4	20
encoding	0	10	7	30
	1	15	10	40
				60
				120
				180

### 1.8 好氧反硝化细菌的反硝化特性

以 1.6 中得到的最佳碳源为唯一碳源, 以  $\text{KNO}_3$  为唯一氮源, 其他培养条件为 1.5 中获得的最佳条件, 以 2% 的比例接种并培养 48 h, 每隔 3 h 取样检测菌株 SY-D-22 的  $OD_{600}$  值, 30 °C、8 000 r/min 离心样品 10 min 并稀释 500 倍后检测其  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度、 $\text{NO}_2^-$ -N 浓度和 TN 浓度, 以对其好氧反硝化特性进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 好氧反硝化细菌的富集分离筛选结果

经过富集、分离提纯得到 40 株单菌株, 选取其中长势较好的 7 株进行进一步筛选。初步筛选出一株好氧反硝化菌株 DJ22 (表 2), 对于硝酸盐氮去除率可达 90.67%。

### 2.2 好氧反硝化细菌的鉴定结果

将菌株 DJ22 命名为 SY-D-22, 并对其进一步分析。菌落外观呈浅粉色圆形, 边缘整齐。革兰氏染色结果为阳性球菌。生理生化试验结果见表 3。经过鉴定, 菌株 SY-D-22 属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*), 相似度为 99.70%。利用 MEGA 软件构建系统发育树, 如图 1 所示。将菌株 SY-D-22 的 16S rRNA 基因序列上传 GenBank, 登录号为 NMDCN000RC0。

### 2.3 好氧反硝化细菌的条件优化结果

菌株的生长代谢受环境因素的影响较大。

表 2 菌株对于硝酸盐去除率的初步筛选

Table 2 Preliminary screening of nitrate degradation rate of bacterial strains

Strain	$\text{NO}_3^-$ -N degradation rate (%)
DJ3	29.52±8.72
DJ4	48.47±6.99
DJ8	36.19±8.24
DJ16	67.39±6.11
DJ22	90.67±2.31
DJ27	78.67±6.11
DJ32	40.48±5.45

表 3 生理生化试验结果

Table 3 Results of physiological and biochemical experiments

Item	Result
Indole test	—
Gelatin liquefaction	—
Methyl red test	+
Aerobic test	+
Catalase test	+
Acid production test of glucose	+
42 °C growth	+
Citrate utilization	+
Nitrate reductase	+

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

对于好氧反硝化脱氮的条件优化, 一般采用单因素试验来进行。然而单因素试验具有许多限制, 无法确定各个因素对菌株的影响是否具有交互作用。利用响应面法对菌株的最佳脱氮条件进行优化<sup>[16]</sup>, 可以将各个自变量的交互作用直观地表达出来, 为之后菌株的实践应用提供更加直观准确的理论依据。对响应面试验结果(表 4)进行二次多项式分析, 结果如表 5 所示;  $F$  值(7.65)和  $P$  值 0.000 3 表示模型显著。相关系数  $R^2$  为 0.884 4 表明模型预测值很接近真实值。

从表 5 可以看出, pH ( $P=0.000\ 4$ )、C/N ( $P=0.007\ 9$ )和摇床转速( $P=0.002\ 4$ )对硝酸盐去

除率的影响极其显著。与其他变量相比,  $F$  值最高的 pH 起重要作用, 为 21.74。这是因为 pH 会影响好氧反硝化相关酶的活性, 甚至会影响好氧反硝化脱氮的最终产物。RSM 模型结果显示(图 2), 在 pH 8.18 时, 硝酸盐去除率最高, 这是由于弱碱性环境有利于硝酸盐还原酶的活性, 可以提高反硝化脱氮的效率, 这与李彦芹等<sup>[17]</sup>的研究结果一致; SY-D-22 好氧反硝化脱氮的最佳摇床转速范围为 120–150 r/min, 说明菌株 SY-D-22 在进行反硝化反应时需要高浓度的溶解氧供给。溶解氧浓度过低会造成缺氧环境, 导致丝状菌的过度繁殖, 从而影响反硝化细菌的生长发育和脱氮效率, 这与朱云等<sup>[18]</sup>研究结果一致。

反硝化过程需要大量电子供体, 这些电子供体通常由外部的有机碳源、内部碳源等提供<sup>[19]</sup>, 因此 C/N 是影响反硝化过程的重要因素。根据 RSM 模型显示的结果(图 3): C/N 在从 7.0 到 15.0 变化时, 菌株 SY-D-22 的硝酸盐氮去除率先增加后减小, 这是因为碳源浓度过高或者过低都会对菌株的反硝化能力产生抑制, 这与王亚娥等<sup>[20]</sup>研究结果一致; 温度在 20–40 °C 变化过程中, 菌株 SY-D-22 对硝酸盐氮的去除率呈现先增大后减小的趋势, 说明好氧反硝化关键酶对

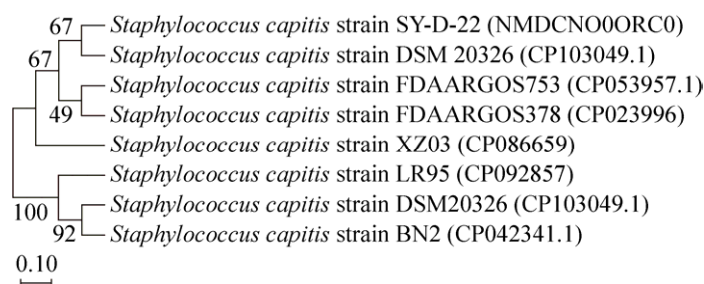


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建菌株 SY-D-22 的系统发育树 节点处的数字代表树的自举值; 括号内的数字为 GenBank 登录号; 标尺: 0.10 序列差异度

Figure 1 Constructed a phylogenetic tree of SY-D-22 based on 16S rRNA gene sequence. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap; The number in the parentheses are the GenBank accession number; Bar: 0.10 sequence divergence.

表 4 响应面法试验数据

Table 4 Response surface methodology test data

No.	pH ( $X_1$ )	C/N ratio ( $X_2$ )	Temperature ( $X_3$ , °C)	Shaker speed ( $X_4$ , r/min)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N degradation rate (%)
1	7	10	30	120	92.53
2	7	15	30	60	95.67
3	10	10	40	120	45.48
4	7	10	30	120	89.40
5	4	10	30	180	26.66
6	10	10	30	60	6.27
7	10	5	30	120	56.46
8	4	10	40	120	31.37
9	7	10	20	60	4.71
10	7	15	20	120	28.23
11	7	10	30	120	94.10
12	10	10	30	180	100.00
13	4	10	30	60	7.84
14	7	15	40	120	65.87
15	7	5	40	120	39.21
16	7	5	30	60	40.78
17	4	10	20	120	9.41
18	7	5	20	120	31.37
19	4	5	30	120	14.12
20	7	15	30	180	98.81
21	7	10	40	180	50.19
22	10	10	20	120	62.74
23	7	10	40	60	54.89
24	7	10	20	180	78.42
25	4	15	30	120	23.53
26	7	5	30	180	58.03
27	10	15	30	120	97.24
28	7	10	30	120	90.97
29	7	10	30	120	95.67

于温度的变化具有一定敏感性。有研究表明, 好氧反硝化细菌进行高效好氧反硝化脱氮的最适温度通常为 30–37 °C<sup>[21-23]</sup>。在 RSM 模型预测的最佳条件下, 硝酸盐去除率达到 100%, 此时 pH 值为 8.18, C/N 为 13.39, 温度为 31.43 °C, 摇床转速为 130 r/min。

## 2.4 好氧反硝化细菌的碳源优化结果

好氧反硝化微生物通常为异养型细菌, 需要外加碳源维持自身生长和反硝化脱氮。因此, 碳源的种类对于微生物生长和代谢有很大影响<sup>[24]</sup>, 当使用相对分子量较小、化学结

构相对简单且易去除的有机物作为碳源时, 对于水体氮素污染物的去除具有促进作用<sup>[25]</sup>, 同时可以加快反硝化细菌的反硝化进程。由图 4 可知, 柠檬酸钠作为碳源时, 菌株 SY-D-22 的硝酸盐氮去除率最高, 达到 100%, 去除速率也最快, 为 8.49 mg/(L·h); 其次为蔗糖, 对于硝酸盐氮去除率为 91.75%; 以葡萄糖、丁二酸钠和乙酸钠为唯一碳源时, 硝酸盐氮的去除率分别为 72.93%、88.51%和 56.13%。可见, 菌株 SY-D-22 的最佳碳源为柠檬酸钠, 这与赵洋等<sup>[26]</sup>以柠檬酸钠、琥珀酸钠、醋酸钠和草酸钠

为碳源进行脱氮性能测定的结果一致。

## 2.5 好氧反硝化细菌的反硝化性能测定结果

在以 100 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N 为底物浓度的情况下, 如图 5 所示, 在 27–36 h, 菌株的  $\text{OD}_{600}$  显

著增加, 从 0.108 增加到 1.116, 此时菌株处于生长对数期, 此时菌株 SY-D-22 生长速率迅速增加。这也印证了菌株在指数生长期的快速生长, 同时大量吸收环境中的  $\text{NO}_3^-$ -N, 对硝酸

表 5 二次多项式方差分析表

Table 5 Quadratic polynomial analysis of variance table

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value
Model	26 760.58	14	1 911.47	7.65	0.000 3**
$X_1$	5 429.81	1	5 429.81	21.74	0.000 4**
$X_2$	2 390.80	1	2 390.80	9.57	0.007 9*
$X_3$	433.56	1	433.56	1.74	0.208 8
$X_4$	3 398.65	1	3 398.65	13.61	0.002 4*
$X_1X_2$	246.02	1	246.02	0.984 9	0.337 8
$X_1X_3$	384.55	1	384.55	1.54	0.235 1
$X_1X_4$	1 402.88	1	1 402.88	5.62	0.032 7*
$X_2X_3$	222.01	1	222.01	0.888 8	0.361 8
$X_2X_4$	49.77	1	49.77	0.199 3	0.662 2
$X_3X_4$	1 537.03	1	1 537.03	6.15	0.026 4*
$X_1^2$	7 105.73	1	7 105.73	28.45	0.000 1**
$X_2^2$	945.43	1	945.43	3.78	0.072 1
$X_3^2$	6 034.68	1	6 034.68	24.16	0.000 2**
$X_4^2$	1 549.16	1	1 549.16	6.20	0.025 9*
Residual	3 497.17	14	249.80		
Lack of fit	3 472.61	10	347.26	56.57	0.000 7**
Pure error	24.55	4	6.14		
Cor total	30 257.74	28			
$R^2$	0.884 4				
Predicted $R^2$	0.768 8				

\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

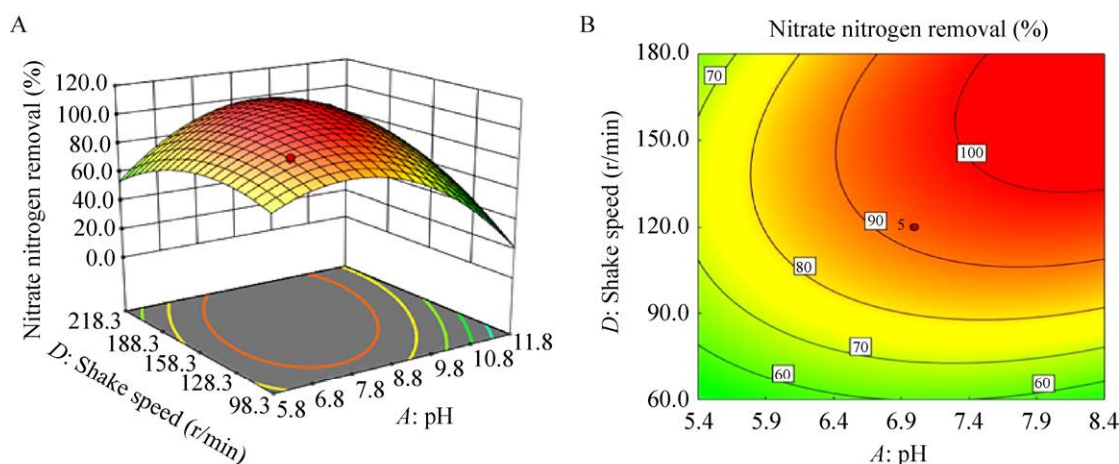


图 2 pH ( $X_1$ )和摇床转速( $X_4$ )的 3D 响应面图(A)和等值线图(B)

Figure 2 3D response surface (A) and contour (B) of pH ( $X_1$ ) and shaker speed ( $X_4$ ).



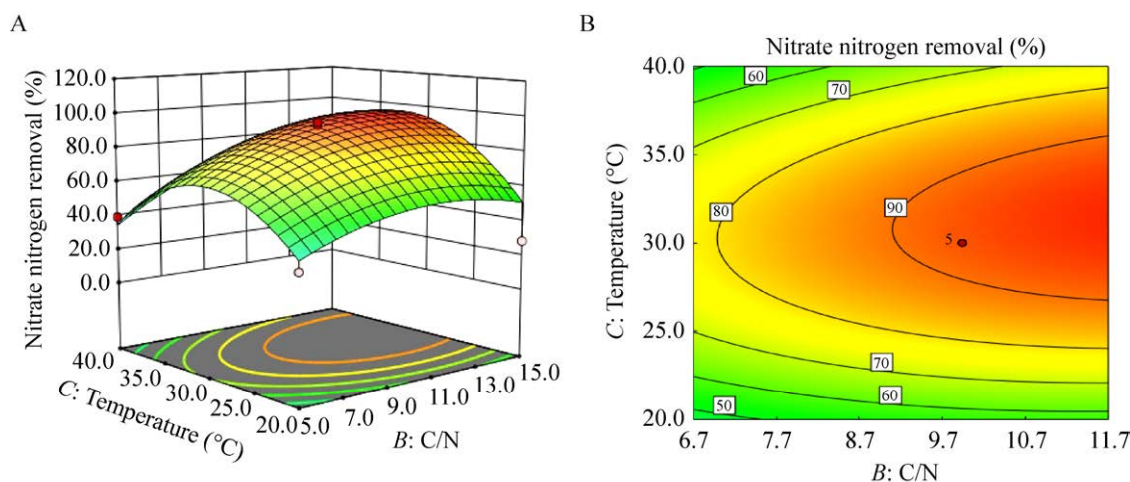


图3 C/N ( $X_2$ )和温度( $X_3$ )的3D响应面图(A)和等值线图(B)

Figure 3 3D response surface (A) and contour (B) of C/N ( $X_2$ ) ratio and temperature ( $X_3$ ).

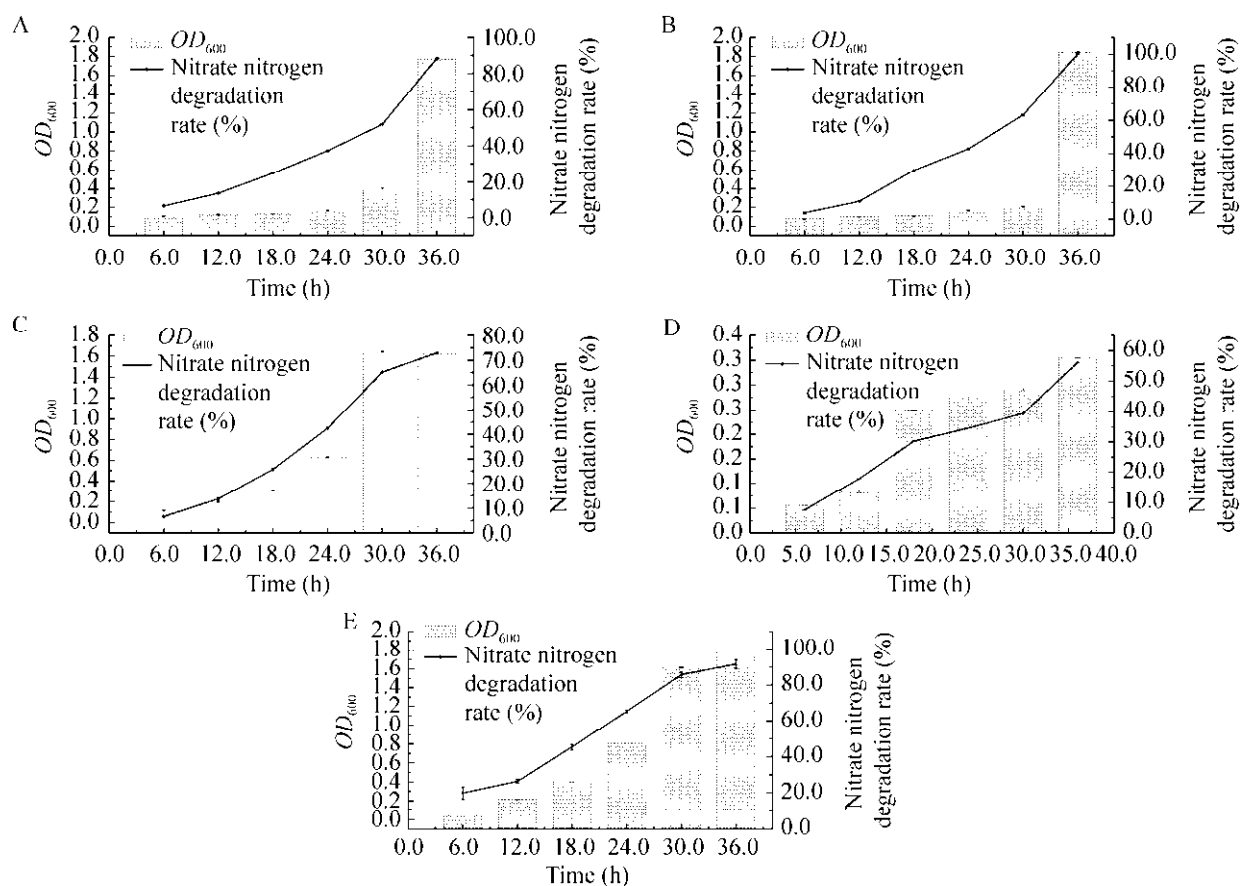


图4 不同碳源下菌株 SY-D-22 的生长及硝酸盐氮去除率随时间变化结果 A: 丁二酸钠. B: 柠檬酸钠. C: 葡萄糖. D: 乙酸钠. E: 蔗糖

Figure 4 Growth and nitrate nitrogen removal rate of strain SY-D-22 under different carbon sources with time. A: Sodium succinate. B: Sodium citrate. C: Glucose. D: Sodium acetate. E: Sucrose.



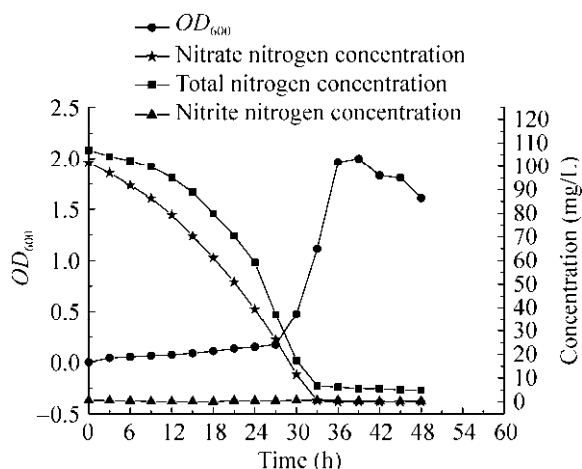


图 5 菌株 SY-D-22 的  $OD_{600}$  值、硝酸盐氮和总氮浓度随时间变化情况

Figure 5  $OD_{600}$  value, nitrate nitrogen and total nitrogen concentration of SY-D-22 over time.

盐氮的去除速率也最快, 为  $3.35 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ; 培养 30 h 后菌体生长变缓, 在 30–36 h 生长处于稳定期; 培养 39 h 后, 菌体密度呈现减小趋势, 进入衰亡期。试验中的细菌指数期生长特征、指数期细菌吸收环境中的营养元素情况, 与经典的细菌生长理论相符合。在 0–30 h,  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度迅速下降, 从  $101.60 \text{ mg/L}$  降至  $11.54 \text{ mg/L}$ ,  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率为 88.65%, 去除速率为  $3.00 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ; TN 的浓度从  $106.98 \text{ mg/L}$  降至  $17.49 \text{ mg/L}$ , TN 去除率为 83.65%, 去除速率为  $2.98 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ; 培养至 48 h 时,  $\text{NO}_3^-$ -N 去除率达到 100.00%, 去除速率为  $1.46 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ , 较之前报道的一株好氧反硝化地衣芽孢杆菌的  $1.02 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$  的降解速率<sup>[27]</sup>更快; TN 的去除率达到 95.34%, 去除速率为  $0.69 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。整个实验过程中亚硝酸盐氮质量浓度为  $0.1\text{--}0.7 \text{ mg/L}$ , 整个过程中无亚硝酸盐氮的积累。结果表明, 菌株 SY-D-22 具有生长速度快、高效脱氮的特点。在生长过程中, 在 36 h 左右达到生长稳定期,  $OD_{600}$  值达到 1.96。菌株 SY-D-22 具有很高的总氮同步去除率, 总氮在 0–33 h 内变化规律

和硝酸盐氮相似, 之后基本趋于稳定, 最终总氮去除率为 95.34%。在此之前报道的好氧反硝化细菌的总氮去除率普遍较低, 如此前分离的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)对硝酸盐氮的去除率为 94.60%, 对总氮的去除率仅为 64.00%<sup>[28]</sup>; 一株垃圾渗滤液分离出的好氧反硝化菌硝酸盐氮的去除率为 93.41%, 对总氮的去除率仅为 86.33%<sup>[29]</sup>; 含水介层中分离出的门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)对硝酸盐氮的去除率为 95.55%, 对总氮的去除率仅为 65.42%<sup>[30]</sup>等, 对于同步去除硝酸盐氮和总氮的能力均弱于菌株 SY-D-22。

### 3 结论

本研究从活性污泥中分离筛选出一株新型具有高效好氧反硝化能力的菌株 *Staphylococcus* SY-D-22, 采用响应面法对菌株的环境影响因素进行优化, 得出最优的好氧反硝化脱氮培养条件为: pH 值为 8.18, C/N 为 13.39, 温度为  $31.43^\circ\text{C}$ , 摇床转速为 130 r/min。在此条件下, 模拟响应值  $\text{NO}_3^-$ -N 的去除率将达到 100%。柠檬酸钠为菌株反硝化脱氮的最佳外接碳源。反硝化性能测定结果表明该菌株具有高效好氧反硝化能力, 对于  $100 \text{ mg/L}$  左右的硝酸盐氮去除率可达 100%, 总氮去除率可达 95.34%。

### REFERENCES

- [1] CHEN JY, TANG CY, SAKURA Y, YU JJ, FUKUSHIMA Y. Nitrate pollution from agriculture in different hydrogeological zones of the regional groundwater flow system in the North China Plain[J]. Hydrogeology Journal, 2005, 13(3): 481-492.
- [2] BAHRI MA, CALVO L, GILARRANZ MA, RODRIGUEZ JJ, EPRON F. Activated carbon supported metal catalysts for reduction of nitrate in water with high selectivity towards  $\text{N}_2$ [J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2013, 138/139: 141-148.
- [3] JI B, WANG HY, YANG K. Nitrate and COD removal

- in an upflow biofilter under an aerobic atmosphere[J]. Bioresource Technology, 2014, 158: 156-160.
- [4] ROBERTSON LA, van NIEL EW, TORREMANS RA, KUENEN JG. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(11): 2812-2818.
- [5] ROBERTSON LA, KUENEN JG. Aerobic denitrification: a controversy revived[J]. Archives of Microbiology, 1984, 139(4): 351-354.
- [6] 李文甫, 杜柳冰, 刘思莹, 翁美遂, 舒璇, 陈琼华. 一株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及脱氮性能研究[J]. 生物技术通报, 2019, 35(9): 202-209.  
LI WF, DU LB, LIU SY, WENG MS, SHU H, CHEN QH. Isolation and identification of an efficient aerobic denitrifying bacterium[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(9): 202-209 (in Chinese).
- [7] 李誉琦, 马佩钰, 刘涵, 王灵芝, 高仁玲, 李慧娟. 一株耐高温亚硝酸盐型反硝化细菌的鉴定及脱氮特性[J]. 生物技术通报, 2019, 35(9): 194-201.  
LI YQ, MA PY, LIU H, WANG LZ, GAO RL, LI HJ. Identification and denitrification characters of a high-temperature-resistant nitrite-denitrifying bacterium[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(9): 194-201 (in Chinese).
- [8] 闫苗苗, 张海涵, 钊珍芳, 李苏霖, 黄廷林, 杨尚业. 生物脱氮技术中好氧反硝化细菌的代谢及应用研究进展[J]. 环境科学研究, 2020, 33(3): 668-676.  
YAN MM, ZHANG HH, ZHAO ZF, LI SL, HUANG TL, YANG SY. Research progress of metabolism and application of aerobic denitrifying bacteria in biological denitrification technology[J]. Research of Environmental Sciences, 2020, 33(3): 668-676 (in Chinese).
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 294-348.  
DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 294-348 (in Chinese).
- [10] 国家环保总局. 水质-硝酸盐氮的测定-紫外分光光度法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007: 1-16.  
State Environmental Protection Administration. Water Quality-Determination of Nitrate Nitrogen-Ultraviolet Spectrophotometry[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2007: 1-16 (in Chinese).
- [11] 国家环保总局. 水质-亚硝酸盐氮的测定-分光光度法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1987: 149-153.  
State Environmental Protection Administration. Water Quality-Determination of Nitrogen (Nitrate)-Spectrophotometric Method[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1987: 149-153 (in Chinese).
- [12] 王有志. 水质分析技术[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2018: 133-148.  
WANG YZ. Water Quality Analysis Technology[M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2018: 133-148 (in Chinese).
- [13] BEZERRA MA, SANTELLI RE, OLIVEIRA EP, VILLAR LS, ESCALEIRA LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. Talanta, 2008, 76(5): 965-977.
- [14] 张淑楠, 王心义, 夏大平. 初始 pH 值对微生物反硝化的影响[J]. 环境工程, 2015, 33(S1): 67-71.  
ZHANG SN, WANG XY, XIA DP. Effects of initial pH on denitrification of microorganism[J]. Environmental Engineering, 2015, 33(S1): 67-71 (in Chinese).
- [15] MIRMASOOMI SR, MEHDIPOUR GHAZI M, GALEDARI M. Photocatalytic degradation of diazinon under visible light using  $\text{TiO}_2/\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanocomposite synthesized by ultrasonic-assisted impregnation method[J]. Separation and Purification Technology, 2017, 175: 418-427.
- [16] 杜丛, 崔崇威, 邓凤霞, 李昂, 马放. 基于响应面法对一株好氧反硝化菌脱氮效能优化[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 874-882.  
DU C, CUI CW, DENG FX, LI A, MA F. Identification of a highly efficient aerobic denitrifier and denitrification optimization using response surface method[J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 874-882 (in Chinese).
- [17] 李彦芹, 李春青, 管鹏悦, 田旭, 肖英男, 王晓改, 康现江. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及脱氮条件研究[J]. 环境科学与技术, 2015, 38(7): 33-37.  
LI YQ, LI CQ, GUAN PY, TIAN X, XIAO YN, WANG XG, KANG XJ. Isolation and identification of an aerobic denitrifier and its denitrification conditions[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 38(7): 33-37 (in Chinese).
- [18] 朱云, 龚望宝, 谢骏, 王广军, 余德光, 李志斐, 张凯, 田晶晶. 好氧反硝化细菌的鉴定及其脱氮特性研究[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 895-903.  
ZHU Y, GONG WB, XIE J, WANG GJ, YU DG, LI ZF, ZHANG K, TIAN JJ. Identification and denitrification characteristics of the aerobic denitrifying bacteria *Pseudomonas furukawii* ZS1[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(4): 895-903 (in Chinese).
- [19] 付昆明, 张晓航, 刘凡奇, 仇付国, 曹秀芹. 葡萄糖碳源条件下 C/N 对反硝化和  $\text{N}_2\text{O}$  释放性能的影响[J]. 环

- 境工程学报, 2021, 15(4): 1279-1288.
- FU KM, ZHANG XH, LIU FQ, QIU FG, CAO XQ. Effect of C/N on denitrification and  $N_2O$  release with glucose as the carbon source[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(4): 1279-1288 (in Chinese).
- [20] 王亚娥, 陈泳帆, 赵炜, 权海荣. 生物海绵铁体系好氧反硝化菌株筛选及其脱氮影响因素分析[J]. 环境工程, 2019, 37(5): 76-81.
- WANG YE, CHEN YF, ZHAO W, QUAN HR. Screening of aerobic denitrifying bacteria and influencing factors of nitrogen removal in biological sponge iron system[J]. Environmental Engineering, 2019, 37(5): 76-81 (in Chinese).
- [21] KIM M, JEONG SY, YOON SJ, CHO SJ, KIM YH, KIM MJ, RYU EY, LEE SJ. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(5): 498-502.
- [22] REN YX, 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.
- [23] JOO HS, 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.
- [24] ELEFSINIOTIS P, WAREHAM DG, SMITH MO. Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 114(3): 289-297.
- [25] 李微, 高明杰, 曾飞, 刘静, 孙慧智, 李大争. 温度和碳源对短程反硝化除磷效果的影响[J]. 水处理技术, 2020, 46(8): 55-59.
- LI W, GAO MJ, ZENG F, LIU J, SUN HZ, LI DZ. Effect of temperature and carbon source on phosphorus removal by short-cut denitrification[J]. Technology of Water Treatment, 2020, 46(8): 55-59 (in Chinese).
- [26] 赵洋, 孙慧明, 林浩澎, 罗娉婷, 朱雅婷, 陈琼华, 舒琥. 一株安全高效的好氧反硝化菌 *Pseudomonas stutzeri* DZ11 的生物安全性及脱氮性能研究[J]. 生物技术通报, 2022, 38(10): 226-234.
- ZHAO Y, SUN HM, LIN HP, LUO PT, ZHU YT, CHEN QH, SHU H. Biosafety and nitrogen removal performance of a safe and efficient aerobic denitrifying *Pseudomonas stutzeri* DZ11[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(10): 226-234 (in Chinese).
- [27] 赵坤, 田相利, 董双林, 蒋雯雯, 李海东. 一株异养硝化-好氧反硝化地衣芽孢杆菌的脱氮特性及机制研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2020, 50(8): 43-52.
- ZHAO K, TIAN XL, DONG SL, JIANG WW, LI HD. Nitrogen removal characteristic and mechanism of heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying *Bacillus licheniformis*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2020, 50(8): 43-52 (in Chinese).
- [28] 郭少鹏, 江兴龙, 王泽旭, 魏金生. 高效硝化与反硝化功能菌株的分离筛选及其性能研究[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(6): 1520-1529.
- GUO SP, JIANG XL, WANG ZX, WEI JS. Isolation and screening of high-efficiency nitrification and denitrification functional strains and effect evaluation[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(6): 1520-1529 (in Chinese).
- [29] 李思琦, 杨静丹, 刘琳, 刘二佳, 王晓慧. 好氧反硝化菌 *Achromobacter* sp. L16 的脱氮特性[J]. 生物技术通报, 2020, 36(6): 93-101.
- LI SQ, YANG JD, LIU L, LIU EJ, WANG XH. Denitrification characteristics of aerobic denitrifying bacteria *Achromobacter* sp. L16[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(6): 93-101 (in Chinese).
- [30] 朱晓明, 赵东华, 阮晓红. 一株分离于含水层介质的好氧反硝化菌脱氮性能研究[J]. 环境污染与防治, 2020, 42(3): 275-279, 286.
- ZHU XM, ZHAO DH, RUAN XH. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium isolated from aquifer porous media[J]. Environmental Pollution and Control, 2020, 42(3): 275-279, 286 (in Chinese).