

## 摘 要

生物脱氮以其高效、环境友好、经济等优势被视为最具发展前景的污水脱氮技术。与自养微生物相比，好氧反硝化微生物的世代周期短，生长速度快，脱氮效率高，在强化污水生物脱氮中表现出良好的应用前景。然而，大部分好氧反硝化微生物研究侧重实际脱氮效果，如何提高其运行稳定性，降低应用成本，仍需开展大量系统、深入的研究工作。基于此，本研究以课题组已有保藏菌株为研究对象，通过探究其处理模拟生活污水与膜生物反应器（MBR）出水的脱氮效果，获得好氧反硝化脱氮微生物制剂的复配配方，通过优化所得微生物制剂的混合发酵工艺条件，提高菌体浓度进而降低制备成本，进一步地，将所得好氧反硝化脱氮微生物制剂投加至缺氧/好氧-膜生物反应器（A/O-MBR）的好氧池，研究其强化生物脱氮的效果及反应器中微生物群落演替，针对好氧反硝化关键微生物菌株，结合氮平衡分析和关键脱氮酶酶活的变化，初步解析其脱氮途径，以期丰富好氧反硝化微生物脱氮的相关知识，为好氧反硝化脱氮微生物制剂的研制及应用提供技术支撑，具有较为重要的学术意义和实践价值。主要研究内容和结果如下：

（1）好氧反硝化菌株的脱氮效果研究。好氧反硝化菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 的氮去除能力受碳氮比（C/N 比）的限制。在 C/N 比较低的体系中，菌株生长速度较为缓慢，且无法进行氮素的去除。而在碳源充足的体系内，菌株不仅可以进行正常的新陈代谢并且可有效脱氮。六株好氧反硝化菌株彼此间无竞争拮抗作用，可组成微生物制剂进行后续试验。

（2）好氧反硝化脱氮微生物制剂的混合发酵条件优化。通过摇床试验，优化了发酵培养基的组分和工艺条件，其中氮源为 2.3 g/L 的碳酸氢铵，碳源为 20 g/L 的葡萄糖，金属离子为 0.1 g/L 的  $\text{Fe}^{3+}$ ，初始 pH 为 7.5，培养温度为 40℃，装液量为 100 mL。3 L 发酵罐试验结果表明，在第 9 h、24 h 和 48 h 分别进行补料，可获得的最大  $\text{OD}_{600}$  为 4.13，显著优于未补料的对照组(2.31)，且第 96 h 时发酵液的活菌数最高，为 390 亿 CFU/mL，此时细胞干重与细胞得率分别为 12.73 g/L 与 0.29 g/g。

（3）好氧反硝化微生物制剂强化模拟生活污水脱氮的效果。投加好氧反硝化微生物制剂的实验组总氮（TN）去除率为 60.34%，比对照组提高了 17.55%，且出水 TN 浓度为  $12.75 \pm 2.72$  mg/L，符合我国《城镇污水处理厂污染物排放标准》（GB 18918-2002）一级 A 标准。结合微生物群落分析可知，好氧反硝化脱氮微生物制剂的投加不仅可以改善微生物群落结构，增加其丰富度和多样性，同时也有助于推动群落中优势菌属的富集，从而强化 A/O-MBR 体系的脱氮性能。

（4）好氧反硝化菌株 B301 的生理生化及脱氮途径初探。菌株 B301 可以通过异养硝化-好氧反硝化（HD-AD）同步去除污水中的氮，且无亚硝态氮（ $\text{NO}_2^-$ -N）的积累。温度为 30℃、碳源为柠檬酸钠和 C/N 比为 15 的条件下，该菌株的脱氮效果最佳。好氧条件下，分别以氨氮（ $\text{NH}_4^+$ -N）、硝态氮（ $\text{NO}_3^-$ -N）和  $\text{NO}_2^-$ -N 为唯一氮源时，该菌株的最大脱氮速率分别为  $2.11 \text{ mg NH}_4^+-\text{N}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 、 $1.62 \text{ mg NO}_3^- -\text{N}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 和  $1.41 \text{ mg NO}_2^- -\text{N}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ，具有良好的异养硝化和好氧反硝化能力。菌株 B301 可以有效利用混合氮源，

并优先利用  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 。氮平衡分析结果表明，83.25%的初始氮转化为气态氮，3.36%转化为胞内氮。通过分析 HN-AD 过程的关键酶，认为菌株 B301 通过 HN-AD 实现同步硝化反硝化（SND）的途径为  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$ 。菌株 B301 展现出优秀的氮去除能力，在处理含氮污水中具有巨大的潜力。

**关键词：**好氧反硝化；生物脱氮；微生物制剂；生活污水

## Abstract

Biological denitrification is regarded as the most promising technology for wastewater denitrification due to its advantages of high efficiency, environmental friendliness, and economy. Compared to autotrophs, aerobic denitrifying bacteria have a short generation cycle, fast growth rate, and high denitrification efficiency, showing good prospects for application in enhanced biological nitrogen removal from wastewater. However, most aerobic denitrifying bacteria studies focus on the actual denitrification effect. There is still a need for systematic and in-depth research on improving their operational stability and reducing application costs. Based on this, this study was conducted to evaluate the effect of nitrogen removal from simulated domestic wastewater and MBR effluent by using the strains stored by the group, to obtain a formulation of aerobic denitrification inoculum and to optimize the mixed fermentation process conditions of the resulting inoculum to increase the concentration of the bacteria and thus reduce the preparation cost. Further, the resulting aerobic denitrification inoculum was injected into the aerobic tank of the A/O-MBR to study the effect of enhanced biological nitrogen removal and the microbial community succession in the reactor. The preliminary analysis of the denitrification pathways of the essential aerobic denitrifying bacteria, combined with nitrogen balance analysis and changes in the enzymatic activity of key denitrification enzymes, is intended to enrich the knowledge of aerobic denitrifying bacteria nitrogen removal and provide technological support for the development and application of aerobic denitrification inoculum, which is of great academic significance and practical value. The main research contents and results are as follows:

(1) Evaluation of the denitrification effect for aerobic denitrifying bacteria. The nitrogen removal capacity of aerobic denitrifying strains B301, B308, B601, P6, X01, and Y11 were limited by C/N. In systems with a relatively low C/N, strains could grow slower and not perform nitrogen degradation. Strains could carry out normal metabolism and effective nitrogen removal in a suitable carbon source system. The six aerobic denitrifying strains had no competitive antagonism with each other and could be combined into the aerobic denitrification inoculum for subsequent tests.

(2) Optimization of mixed fermentation conditions for aerobic denitrification inoculum. The components and process conditions of the fermentation medium were optimized by shaking bed tests, in which the nitrogen source was 2.3 g/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , the carbon source was 20 g/L glucose, the metal ion was 0.1 g/L  $\text{Fe}^{3+}$ , the fermentation pH was 7.5, the incubation temperature was 40°C, and the loading volume was 100 mL. The 3 L fermenter experiment results showed that the maximum  $\text{OD}_{600}$  obtained was 4.13 at 9 h, 24 h, and 48 h, which was significantly better than the control group without replenishment (2.31), and the highest viable count of 39 billion CFU/mL at 96 h. The fermentation broth's dry weight and cell yield were 12.73 g/L and 0.29 g/g, respectively.

(3) Study on aerobic denitrification inoculum enhanced nitrogen removal in domestic wastewater. The total nitrogen (TN) removal rate of the experimental group with the aerobic denitrification inoculum was 60.34%, 17.55% higher than that of the control group, and the

effluent TN concentration was  $12.75 \pm 2.72$  mg/L, in line with China's Standard for the Discharge of Pollutants from Urban Wastewater Treatment Plants (GB 18918-2002). With the combination of microbial community analysis, it was clear that the addition of aerobic denitrification inoculum not only improved the microbial community structure, increasing its abundance and diversity, but also helped to promote the enrichment of dominant genera in the community, thus enhancing the nitrogen removal performance of the A/O-MBR system.

(4) Preliminary investigation on the physiological, biochemical, and denitrification pathways of aerobic denitrifying bacteria strain B301. The results show that strain B301 removed nitrogen via heterotrophic nitrification and aerobic denitrification (HN-AD) without nitrite accumulation. It exhibited the optimal nitrogen removal efficiency under  $30^{\circ}\text{C}$ , citrate as the carbon source and C/N ratio of 15. The maximal rates of ammonium, nitrate and nitrite achieved  $2.11 \text{ mgNH}_4^+ \text{-N}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ,  $1.62 \text{ mgNO}_3^- \text{-N}/(\text{L}\cdot\text{h})$  and  $1.41 \text{ mgNO}_2^- \text{-N}/(\text{L}\cdot\text{h})$ , respectively, when ammonium, nitrate and nitrite were employed as the only nitrogen source under aerobic conditions. Ammonium nitrogen was preferentially consumed via HN-AD in the coexistence of three nitrogen species. Nitrogen balance analysis suggested that 83.25% of ammonium was converted to gaseous nitrogen. The HD-AD pathway catalyzed by strain B301 followed  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$  supported by the results of key denitrifying enzymatic activities. This strain exhibited excellent nitrogen removal ability and had great potential in disposing of nitrogenous wastewater.

**Keywords:** Aerobic denitrification; Biological nitrogen removal; Microbial agent; Domestic sewage

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 生物脱氮技术研究进展.....	1
1.1.1 氮素污染现状.....	1
1.1.2 传统生物脱氮技术.....	1
1.1.3 新型生物脱氮技术.....	1
1.2 好氧反硝化脱氮技术研究进展 .....	2
1.2.1 好氧反硝化微生物的筛选与分类.....	2
1.2.2 好氧反硝化的影响因素.....	3
1.2.3 异养硝化-好氧反硝化的脱氮途径研究进展 .....	4
1.3 好氧反硝化生物强化脱氮技术研究进展 .....	5
1.3.1 生物强化脱氮技术研究进展.....	5
1.3.2 好氧反硝化生物强化脱氮技术在污水处理中的应用现状 .....	5
1.3.3 好氧反硝化脱氮微生物制剂研究进展 .....	6
1.4 研究目的和意义.....	6
1.5 主要研究内容.....	7
第二章 好氧反硝化菌株的脱氮效果研究 .....	8
2.1 引言.....	8
2.2 材料与方法.....	8
2.2.1 好氧反硝化菌株的性质.....	8
2.2.2 试验材料.....	9
2.2.3 好氧反硝化菌株的脱氮效果评价.....	9
2.2.4 分析测试项目与方法.....	10
2.3 结果与分析.....	10
2.3.1 菌株的生长曲线.....	10
2.3.2 氨氮的去除特性.....	10
2.3.3 硝态氮浓度的变化.....	11
2.3.4 亚硝态氮浓度的变化.....	12
2.3.5 COD 的去除效果 .....	13
2.3.6 总氮的去除效果.....	14
2.3.7 菌株的生长稳定性.....	15
2.3.8 好氧反硝化脱氮微生物制剂配方的确定 .....	16
2.4 本章小结.....	17
第三章 好氧反硝化脱氮微生物制剂的混合发酵条件优化 .....	18
3.1 引言.....	18

3.2 材料与amp;方法.....	18
3.2.1 培养基.....	18
3.2.2 试验方法.....	18
3.2.3 分析测试项目与方法.....	19
3.3 结果与分析.....	19
3.3.1 发酵培养基组分的优化.....	19
3.3.2 发酵培养条件的优化.....	22
3.3.3 摇瓶正交试验优化及验证.....	24
3.3.4 发酵罐分批补料优化.....	24
3.4 本章小结.....	26
第四章 好氧反硝化微生物制剂强化模拟生活污水脱氮的效果 .....	27
4.1 引言.....	27
4.2 材料与amp;方法.....	27
4.2.1 试验装置.....	27
4.2.2 运行条件及方法.....	28
4.2.3 分析测试项目与方法.....	29
4.3 结果与分析.....	29
4.3.1 总氮浓度的变化情况.....	29
4.3.2 氨氮的去除效果.....	30
4.3.3 总磷的去除效果.....	30
4.3.4 COD 的去除效果 .....	31
4.3.5 硝态氮与亚硝态氮浓度的变化情况.....	32
4.3.6 同步硝化反硝化效果.....	32
4.3.7 污泥浓度的变化情况.....	33
4.3.8 微生物群落分析.....	33
4.4 本章小结.....	36
第五章 好氧反硝化菌株 B301 的生理生化及脱氮途径分析 .....	37
5.1 引言.....	37
5.2 材料与amp;方法.....	37
5.2.1 试验菌株.....	37
5.2.2 培养基.....	37
5.2.3 试验方法.....	38
5.2.4 分析测试项目与方法.....	39
5.3 结果与分析.....	40
5.3.1 关键菌株的挑选.....	40
5.3.2 关键菌株影响因素的优化.....	40
5.3.3 关键菌株的脱氮性能.....	41
5.3.4 关键菌株的氮平衡分析.....	45

5.3.5 关键菌株脱氮关键酶的活性.....	45
5.3.6 关键菌株的脱氮机理分析.....	47
5.4 本章小结.....	47
第六章 结论与展望 .....	49
6.1 结论.....	49
6.2 展望.....	50
参考文献.....	51

## 第一章 绪 论

氮是导致水体污染的重要污染物之一，可引起水体富营养化，破坏水生生态系统的结构和功能<sup>[1, 2]</sup>。随着城市化进程的加快和污水排放要求的提高，生活污水高效处理技术的研发受到多方关注，对新型脱氮技术的需求也愈加迫切<sup>[3, 4]</sup>。

### 1.1 生物脱氮技术研究进展

#### 1.1.1 氮素污染现状

水资源是人类赖以生存的物质基础，也是社会经济发展的关键所在。随着我国国民经济的快速发展，人民生活水平日益提升，生活污水的排放量急剧增加，由此导致的氮素污染不容乐观。《2021 年中国生态环境统计年报》<sup>[5]</sup>数据显示，我国 2021 年氨氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )总排放量为 86.8 万吨，其中，生活源污水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  排放量占 66.9%，高达 58.0 万吨；总氮(TN)的总排放量为 316.7 万吨，生活源污水的 TN 排放量占比 43.6%，为 138.0 万吨。氮素污染物的持续排放已远超环境的自净能力<sup>[6]</sup>，污染形势十分严峻。为此，我国《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918-2002)一级 A 标准明确指出，TN 的排放限值为 15 mg/L， $\text{NH}_4^+\text{-N}$  为 5 mg/L。部分地区出台了更为严格的地方标准，例如昆明市地方标准《城镇污水处理厂主要水污染物排放限值》(DB5301/T43-2020)的一级 A 排放标准中，要求出水 TN 低至 5 mg/L， $\text{NH}_4^+\text{-N}$  低至 1 mg/L。

近年来，我国的污水处理能力不断提升，至 2021 年，全国纳入排放源统计调查的污水处理厂已达 12586 家，污水处理厂设计处理能力达 29729.7 万吨/日，年处理生活污水量达 762.5 亿吨<sup>[5]</sup>。然而，为应对日益严格的水污染物排放标准及日益严峻的氮素污染形势，进一步提高现有污水处理设施的技术水平，亟须研发低成本、安全高效且可操作性强的新型脱氮技术。

#### 1.1.2 传统生物脱氮技术

生活污水脱氮技术从机理上大致分为物化脱氮和生物脱氮。其中，生物脱氮以其高效、环境友好、经济等优点，被视为最具发展前景的生活污水脱氮技术<sup>[7, 8]</sup>。生物脱氮技术是指利用微生物将污水中的氮素转化为氮气( $\text{N}_2$ )的技术，主要包括传统生物脱氮技术和新型生物脱氮技术。

传统生物脱氮技术由硝化和反硝化两个相对独立的阶段组成，如图 1-1 所示。首先， $\text{NH}_4^+\text{-N}$  被氨氧化细菌(AOB)转化为亚硝态氮( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )，并在亚硝酸盐氧化细菌(NO<sub>B</sub>)的作用下进一步转化为硝态氮( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )；然后，在反硝化细菌的作用下， $\text{NO}_3^-\text{-N}$  最终被还原为  $\text{N}_2$ <sup>[9, 10]</sup>。其中，AOB 和 NO<sub>B</sub> 均为自养好氧细菌，而反硝化菌是异养厌氧细菌<sup>[11]</sup>。由于不同脱氮菌群的生理机制之间的差异，硝化和反硝化过程在空间和时间上无法统一<sup>[12]</sup>，必须在两个单独的系统内独立进行。此外，与异养细菌相比，自养硝化菌生长较慢且对环境条件要求苛刻<sup>[13]</sup>。因此，传统的生物脱氮技术工艺流程冗长烦琐，同时基建投资费用及运行成本也较高<sup>[14, 15]</sup>。

#### 1.1.3 新型生物脱氮技术



相关学者对生物脱氮技术进行了不断研究与探索, 逐渐开发出一些新型高效的生物脱氮技术, 譬如厌氧氨氧化脱氮技术 (Anaerobic Ammonia Oxidation, ANAMMOX)、自养反硝化技术 (Autotrophic Denitrification) 和好氧反硝化脱氮技术 (Aerobic Denitrification)。与传统生物脱氮技术相比, 新型生物脱氮技术的优势主要体现在运行成本和能耗上 (表 1-1), 特别是好氧反硝化技术, 凭借好氧反硝化微生物生长迅速且菌群适应性强等优势, 在污水生物处理方面表现出巨大的应用潜力。

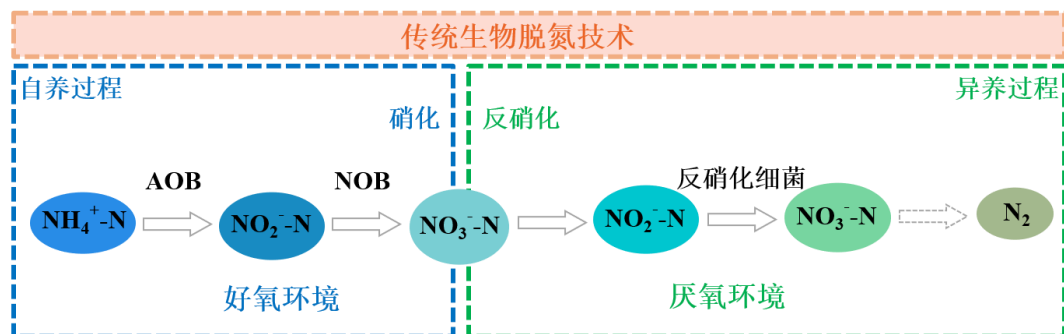


图 1-1 传统生物脱氮进程

Fig. 1-1 Traditional biological nitrogen removal process

表 1-1 不同生物脱氮技术的特点

Table 1-1 Characteristics of different biological nitrogen removal techniques

脱氮技术	厌氧氨氧化	自养反硝化	好氧反硝化
原理	厌氧: $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$	好氧: $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ 缺氧: $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$	好氧: $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2$
优势	无需额外补充碳源 污泥产量低等	运行成本低廉 二次污染风险较小等	硝化与反硝化可在同一反应器中进行; 菌株生长迅速; 运行成本低廉; 受环境影响小等
劣势	菌株生长缓慢 运行成本高 对环境要求严苛等	自养菌世代周期长 增值速率慢等	脱氮过程中可能会伴随温室气体产生 ( $\text{N}_2\text{O}$ 与 $\text{NO}$ ) 等

## 1.2 好氧反硝化脱氮技术研究进展

### 1.2.1 好氧反硝化微生物的筛选与分类

自从第一株好氧反硝化菌株 *Thiosphaera pantotropha* 在反硝化脱硫脱氮装置中成功分离出来后<sup>[16]</sup>, 越来越多的学者在水产养殖池塘、盐湖沉积物和污水处理厂等不同的环境样本中发现了好氧反硝化微生物的存在, 均具有较优的反硝化速率 (表 1-2)。大多数好氧反硝化微生物分布在变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 以及放线菌门 (*Actinobacteriota*)<sup>[17-19]</sup>。除了细菌外, 研究人员还从地表沉积物中分离出具有好氧反硝化性能的真菌 (酵母菌<sup>[20, 21]</sup>)。

表 1-2 2020~2022 年分离出的部分好氧反硝化微生物

Table 1-2 Some aerobic denitrifiers isolated within 2020-2022

门	种属	来源	反硝化速率	年份
细菌	<i>Bacillus subtilis</i> JD-014	水产养殖池塘	0.80 mg $\text{NO}_3^-$ -N/(L·h)	2021 <sup>[22]</sup>
	<i>Rhizobium pusense</i> WS7*	污水处理厂	3.51 mg $\text{NO}_3^-$ -N/(L·h)	2022 <sup>[23]</sup>

门	种属	来源	反硝化速率	年份
真菌	<i>Exiguobacterium mexicanum</i> SND-01*	盐湖沉积物	3.63 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(L·h)	2021 <sup>[24]</sup>
	<i>Acinetobacter</i> sp. ND7*	污水处理厂	2.77 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(L·h)	2020 <sup>[25]</sup>
	<i>Sporidiobolus pararoseus</i> Y1*	海产养殖水	4.81 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(L·h)	2020 <sup>[20]</sup>
	<i>Penicillium tropicum</i> IS0293*	地表水	4.86 mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N/(L·h)	2020 <sup>[26]</sup>

注：带\*的微生物还具备异养硝化的特性。

## 1.2.2 好氧反硝化的影响因素

### (1) 温度

温度是影响大多数好氧反硝化微生物脱氮性能的主要环境因素之一。目前发现的大部分好氧反硝化微生物都是常温菌，最适的温度为 25~37°C<sup>[27]</sup>。温度过高或者过低都会影响菌株细胞内的功能酶活性<sup>[28]</sup>，进而影响到好氧反硝化进程。但是也有一些好氧反硝化菌株在低温或者高温环境下具有较优的氮去除效果<sup>[29-31]</sup>。譬如，从养猪场废水中分离出来的 *Acinetobacter* sp. TAC-1<sup>[32]</sup>，在 5°C 对 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的去除率能到达 94.6%；高温工业废水中筛选出的菌株 *Chelatococcus daeguensis* TAD1 在 50°C 下可有效去除含氮污染物，最佳 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 去除率可达到 96.1%。这些耐寒或耐热型好氧反硝化菌株的发现，一方面对低温环境下的水质达标排放具有重要意义；另一方面也为一些温度保持在 45°C 以上的实际工业废水（如钢铁生产废水、肥料废水、烟道气吸收液）无害化处理处置提供一种新的思路。

### (2) 碳源和碳氮比

目前发现的绝大多数好氧反硝化微生物均为异养微生物，即需要利用有机碳来维持细胞生长和电子传递。研究中常见的碳源有乙酸盐、丁酸盐、葡萄糖、柠檬酸盐和蔗糖等。不同种属的好氧反硝化微生物所需的碳源也有所不同。*Serratia marcescens* CL1502<sup>[33]</sup> 在以葡萄糖为碳源时氮去除效能最优，其 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 去除率可达到 96.9%；而对于 *Acinetobacter* sp. T1<sup>[34]</sup>、*Marinobacter* sp. F6<sup>[35]</sup> 和 *Pseudomonas stutzeri* T1<sup>[36]</sup> 等菌株来说，相较于糖类等大分子有机物，它们更偏爱乙酸盐和柠檬酸盐等分子量小、结构简单的碳源，氮去除率均能达到 40% 以上。在实际处理过程中，研究人员发现报纸<sup>[37]</sup>、玉米芯<sup>[38]</sup> 以及花园垃圾<sup>[39]</sup> 等生活废弃物均可用于好氧反硝化微生物的脱氮过程，这极大程度上缓减了垃圾处理处置的压力，更加具备经济价值。除此之外，木屑、小麦秸秆以及芦苇等天然物质<sup>[40]</sup> 也可以固态碳源的形式作为反硝化过程的碳源。

碳氮比（C/N 比）也是影响好氧反硝化微生物脱氮性能的重要因素之一，其是衡量电子供体与电子受体比例的指标。只有在合适的 C/N 比下，脱氮效率才能达到最优值。过低的 C/N 比抑制菌体的生长，过高则会影响酶系的表达<sup>[19]</sup>。大多数好氧反硝化微生物最适的 C/N 比在 8~10 之间。但也有部分好氧反硝化菌株在低 C/N 比条件下展现出较优的脱氮性能，譬如 *Acinetobacter* sp. Y16<sup>[30]</sup> 在 C/N 比为 2 时 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的去除率可达 66%。

### (3) 其他因素

影响好氧反硝化微生物脱氮性能的环境因素还包括 pH、盐度和金属离子等。过酸

过碱的环境均会抑制好氧反硝化微生物的生长,而影响脱氮性能<sup>[11]</sup>。大部分好氧反硝化微生物较为适宜的 pH 处于中性或弱碱性 (pH=7~8)。盐度过高会引起高渗透压,导致细胞脱水,影响细胞与外界环境之间化学物质的交换,进而影响微生物的新陈代谢,甚至导致细胞解体 and 酶活性丧失<sup>[41]</sup>。在高盐水环境中存在一些具有优异的好氧反硝化性能的微生物<sup>[24]</sup>。与之相类似,过量的金属离子(如  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cr}^{6+}$ ) 也会提高抑制酶活性,从而影响脱氮性能。不过微量的金属元素对微生物来说是有益的,譬如投加适量废铁屑至反应器中可促进好氧反硝化菌的活性及丰度<sup>[42]</sup>。

### 1.2.3 异养硝化-好氧反硝化的脱氮途径研究进展

随着研究的不断深入,发现大部分好氧反硝化微生物还具有异养硝化的特性<sup>[43]</sup>(详见表 1-2),并将此类好氧反硝化微生物命名为异养硝化-好氧反硝化微生物(Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification, HN-AD)。作为好氧反硝化微生物,HN-AD 微生物能够利用各种碳源将不同的含氮化合物(如  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ) 通过同化作用转化为胞内氮,或者是通过异化作用转化为  $\text{N}_2$ <sup>[44]</sup>。

在完整的异养硝化-好氧反硝化体系中,氮代谢过程中可能涉及的酶<sup>[42]</sup>有氨单加氧酶(Ammonia Monooxygenase, AMO)、羟胺氧化酶(Hydroxylamine Oxidoreductase, HAO)、亚硝酸氧化酶(Nitrite Oxidoreductase, NIO)、硝酸还原酶(Nitrate Reductase, NAR)、亚硝酸还原酶(Nitrite Reductase, NIR)、一氧化氮还原酶(Nitric Oxide Reductase, NOR)和一氧化二氮还原酶(Nitrous Oxide Reductase,  $\text{N}_2\text{OR}$ )。微生物的硝化反硝化过程和好氧呼吸同时依赖电子传递呼吸链(ETC)的进行,ETC 系统包括 4 个关键要素<sup>[45]</sup>,分别是 NADH 脱氢酶(复合体 I)、醌池、 $\text{bc}_1$  复合体(复合体 III)以及细胞色素 c(图 1-2)。

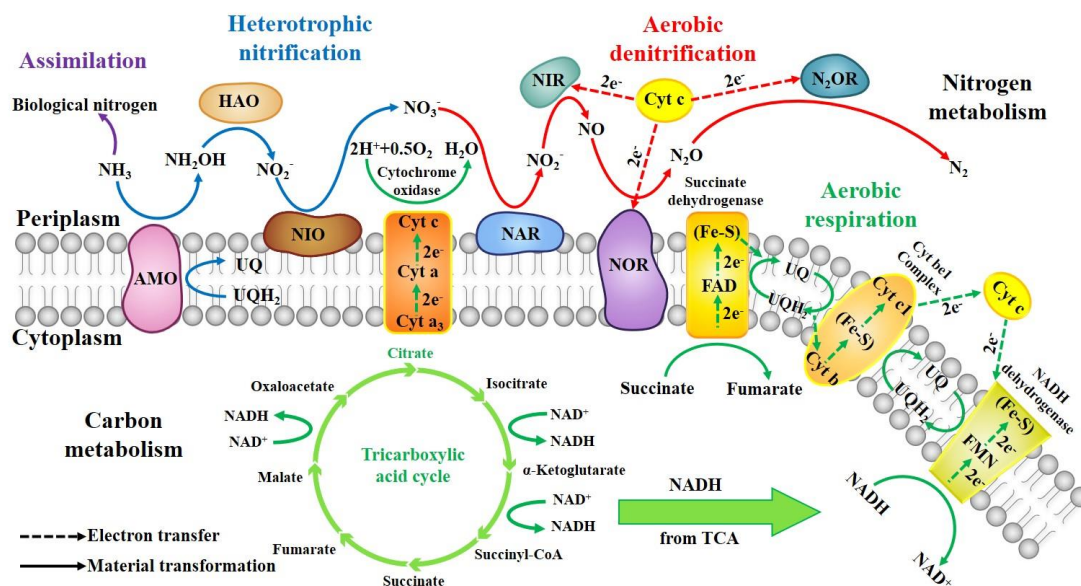
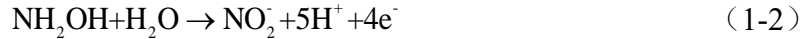
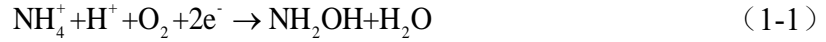


图 1-2 异养硝化-好氧反硝化过程中的碳代谢与氮代谢<sup>[45]</sup>

Fig. 1-2 Carbon and nitrogen metabolism in heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process<sup>[45]</sup>

不同微生物的氮代谢相关酶基因的表达存在较大差异,导致不同的 HN-AD 微生物的氮代谢途径也各异。研究表明,HN-AD 微生物主要存在两种异化转换的途径<sup>[46]</sup>,一种途径是  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  先被氧化成  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  或者是  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , 最后被还原为  $\text{N}_2$ <sup>[47]</sup>(途径 I); 另一种途径是  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  氧化产生的羟胺直接被氧化成  $\text{N}_2$ <sup>[48]</sup>(途径 II)。目前,大多数 HN-

AD 菌遵循的是第一种脱氮途径，相关的化学反应如式 1-1 至 1-7 所示。



然而，在好氧反硝化的过程中，由于  $\text{NO}_3^-$ -N 的快速转化<sup>[49]</sup>，不可避免出现部分  $\text{NO}_2^-$ -N 积累的现象。 $\text{NO}_2^-$ -N 的积累会导致高浓度的氮残留<sup>[32, 50]</sup>，降低 TN 去除率，甚至有可能危害水生生物的生存。因此，迫切需要挖掘可有效处理多种含氮化合物且不积累  $\text{NO}_2^-$ -N 的 HN-AD 菌。

### 1.3 好氧反硝化生物强化脱氮技术研究进展

#### 1.3.1 生物强化脱氮技术研究进展

生物强化技术由于成本低、无二次污染及适用范围广<sup>[51]</sup>等优点，在污水处理厂提标改造中有明显的技术经济优势，因而受到国内外学者的广泛关注。在污水处理系统中加入具有特定功能的微生物，可以提高目标污染物的去除效率和增强系统运行的稳定性，从而达到净化污水的目的<sup>[52]</sup>。

常见的生物强化技术主要有直接投加法、吸附投菌法和固定化投菌法<sup>[53]</sup>，后两者均是先将目标微生物吸附或固定在各类载体上（例如沸石、海藻酸钠和聚乙烯醇），后进行投加。相较而言，直接投加法的操作更为简单便利且成本低廉。然而，将微生物制剂直接投置于反应器中普遍存在有效微生物流失的问题，为此，重复多次进行投加并逐次递减投加量直至投加结束<sup>[53]</sup>是目前直接投加法中较优的应用方式。

#### 1.3.2 好氧反硝化生物强化脱氮技术在污水处理中的应用现状

由于生长速度快，与土著微生物共生长能力强，好氧反硝化微生物被广泛应用于生物强化脱氮技术领域<sup>[54, 55]</sup>。许多学者已进行了关于好氧反硝化生物强化脱氮技术的研究，证明能够有效提高污水脱氮效果。当  $\text{NO}_3^-$ -N 负荷为 140 mg/L 时，好氧反硝化菌 *Pseudomonas* sp. GL19 可完全去除  $\text{NO}_3^-$ -N，且无  $\text{NO}_2^-$ -N 积累，TN 平均去除率可达 96.5%<sup>[56]</sup>。从水库中获得的好氧反硝化细菌 *Pseudomonas stutzeri* ZF31 可强化低温环境的脱氮效果，10℃时 TN 去除率可达到 60.08%<sup>[57]</sup>。好氧反硝化菌株 *Pseudomonas stutzeri* ADP-19 能强化序批式反应器(SBR)处理厌氧发酵出水，在好氧条件下可同时去除 96.5% 的  $\text{NH}_4^+$ -N 和 73.3% 的磷酸根<sup>[58]</sup>。好氧反硝化菌 *Acinetobacter junii* YB 按 20% (v/v) 的投加量接种至 SBR 中处理高  $\text{NH}_4^+$ -N 废水，与空白对照相比， $\text{NH}_4^+$ -N 去除率从 93.75% 升高到 99.71%，TN 去除率则从 75.89% 提高到 94.29%<sup>[59]</sup>。在膜生物反应器 (MBR) 系统中接种好氧反硝化菌株 *Acinetobacter* sp. TSH1，第 91 d 时，出水  $\text{NH}_4^+$ -N 浓度降低至

20 mg/L 以下,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率稳定在 82.6%~87.2%, 并且出水  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度逐渐降低, 稳定在 7.9 mg/L~17.2 mg/L<sup>[60]</sup>。在移动床生物膜反应器 (MBBR) 中投加好氧反硝化菌株 *Acinetobacter* sp. TAC-1 处理养猪场废水, 结果表明,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 的去除速率分别从 16.53 mg/(L·h) 和 16.15 mg/(L·h) 增加至 24.58 mg/(L·h) 和 24.45 mg/(L·h)<sup>[61]</sup>。

### 1.3.3 好氧反硝化脱氮微生物制剂研究进展

与单一菌株相比, 多种脱氮功能微生物的共同作用往往可以达到更为理想的脱氮效果<sup>[62]</sup>。通过投加复合微生物制剂提高系统稳定性和脱氮处理效果的办法, 已经引起国内外学者广泛的关注<sup>[63, 64]</sup>。两株好氧反硝化菌株 (*Delftia* sp. YH01 和 *Acidovorax* sp. YH02) 以等比混合的方式制成微生物制剂 ( $\text{OD}_{600}=2.0$ ), 按进水量的 30% 投加至 SBR 内, 可以将  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TN 和 COD 去除率分别提高 12.1%、9.2% 和 9.4%<sup>[65]</sup>。好氧反硝化微生物制剂被投加至生物陶粒反应器中, 用于强化处理高浓度含  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  废水, 系统稳定运行后  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  平均去除率可达 93% 以上, COD 的平均去除率稳定在 98%<sup>[66]</sup>。将三株从垃圾渗滤液中分离得到的好氧反硝化菌株 *Achromobacter xylosoxidans* GAD4、*Comonas testosteroni* GAD3 和 *Agrobacterium tumefaciens* LAD9, 按 1:1:1 的比例混合制备成微生物制剂, 接种至 SBR 中进行生物强化城市污水的脱氮研究, 结果表明, 投加微生物制剂能显著增加 SBR 系统的 TN 去除率 (80.5%)<sup>[67]</sup>。

因无二次污染及好氧反硝化菌株生长迅速等特点, 将好氧反硝化生物强化脱氮技术应用用于污水处理, 具有良好的推广应用前景。然而, 大部分好氧反硝化微生物制剂的配方较为单一, 是两株或三株菌的简单混合, 且大多侧重其实际脱氮效果研究, 如何提高好氧反硝化微生物制剂的运行稳定性, 降低应用成本, 提高可操作性, 仍需开展大量系统、深入的研究工作。

## 1.4 研究目的和意义

生物脱氮以其高效、环境友好、经济等优势被视为最具发展前景的污水脱氮技术。由于不同脱氮菌群的脱氮机制存在差异, 传统生物脱氮技术需要经过硝化和反硝化两个相对独立的过程, 而硝化阶段的自养微生物生长较为缓慢且对环境条件要求苛刻, 导致传统脱氮工艺启动时间普遍过长, 前期投资费用过高, 后期也不利于进行提标改造。近年来, 关于好氧反硝化生物强化脱氮技术的研究受到学者的广泛关注, 与自养微生物相比, 好氧反硝化微生物的世代周期短, 生长速度快, 脱氮效率高, 将其投加至污染水体中, 可强化体系的脱氮性能, 在实际工程化应用中具有切实的可行性。

基于此, 本研究首先考察了六株好氧反硝化菌处理模拟生活污水及实验室运行的 MBR 出水的脱氮效果, 获得好氧反硝化脱氮微生物制剂的复配配方; 接着, 通过优化配方菌株混合发酵的工艺条件, 获得好氧反硝化微生物制剂的最佳发酵条件; 在此基础上, 将所得好氧反硝化脱氮微生物制剂投加至 A/O-MBR 的好氧池, 研究其强化生物脱氮的效果及反应器中微生物群落演替; 最后, 针对好氧反硝化关键微生物菌株, 结合氮平衡分析和关键脱氮酶酶活的变化, 初步解析其脱氮途径。研究结果不仅可丰富好氧反硝化微生物菌株脱氮的相关知识, 为好氧反硝化微生物制剂的研制及应用提供技术支撑, 还可作为实际污水处理厂提标改造提供新思路, 降低改造和运行成本, 具有较为重要的学术意

义和实践价值。

## 1.5 主要研究内容

本研究拟采用的技术路线如图 1-3 所示，主要研究内容如下：

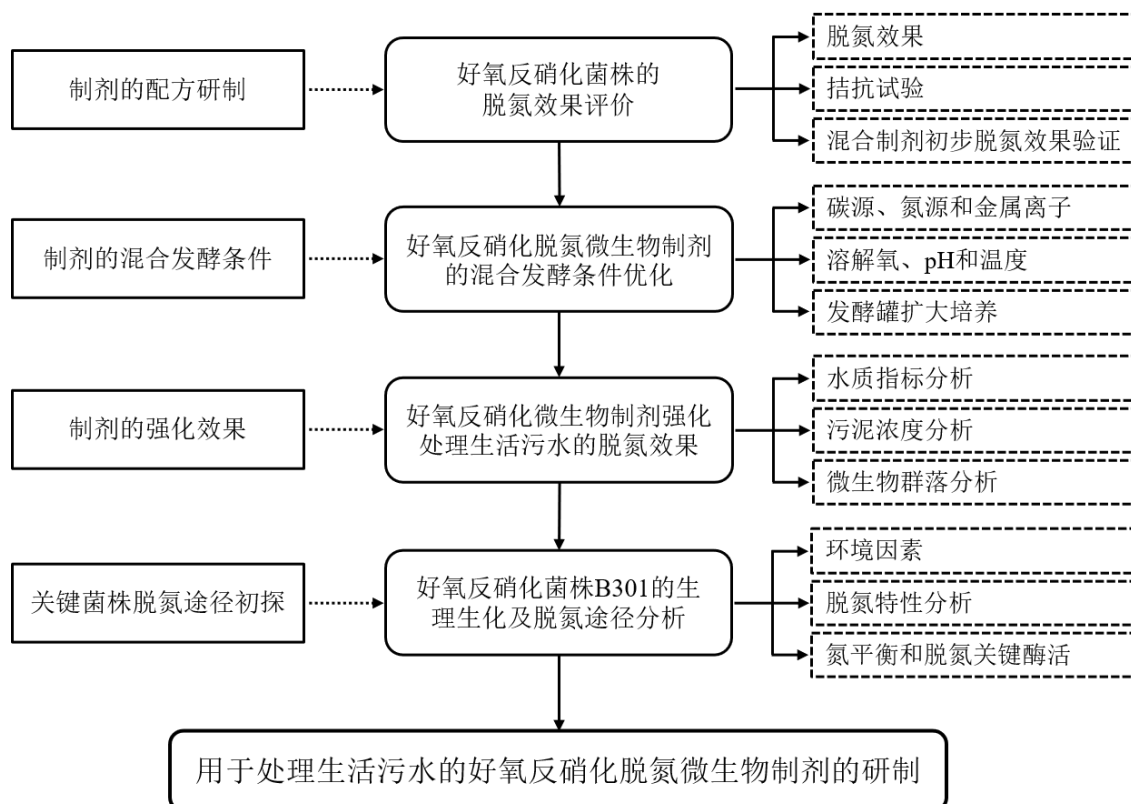


图 1-3 技术路线图

Fig. 1-3 Technology roadmap

(1) 好氧反硝化菌株的脱氮效果研究。以模拟生活污水及实验室运行的 MBR 出水为处理对象，研究实验室现有菌株的好氧反硝化效果，包括  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN、COD 和细胞密度 ( $\text{OD}_{600}$ )，获得好氧反硝化脱氮微生物制剂的复配配方。

(2) 好氧反硝化脱氮微生物制剂混合发酵的工艺条件优化。优化配方菌株混合发酵的工艺条件，包括碳源、氮源和金属离子等营养条件，以及溶解氧、pH 和温度等环境条件对菌体浓度的影响，获得好氧反硝化脱氮微生物制剂的最佳发酵条件。

(3) 好氧反硝化脱氮微生物制剂强化生物脱氮的应用效果。在上述研究基础上，以模拟生活污水为处理对象，将上述微生物制剂投加于 A/O-MBR 的好氧池（生物膜池）内，研究其强化脱氮的效果，研究反应器中微生物组成的演替。

(4) 关键菌株的生理生化及好氧反硝化脱氮途径初探。在上述研究基础上，选取关键菌株，观察其对  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的降解效果，通过氮平衡分析和脱氮关键酶活的测定，初步解析其脱氮途径。

## 第二章 好氧反硝化菌株的脱氮效果研究

### 2.1 引言

好氧反硝化脱氮技术的关键是好氧反硝化微生物。这类微生物的生长速度快，与土著微生物共生长能力强<sup>[54,55]</sup>，可同时降解氨氮（ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ）、硝态氮（ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ）和溶解性有机物。碳氮比（C/N 比）是影响好氧反硝化微生物脱氮性能的重要因素之一<sup>[28]</sup>。不同的好氧反硝化微生物适宜的 C/N 比也有所不同。已有研究表明<sup>[68]</sup>，较高的 C/N 比更有利于好氧反硝化微生物的脱氮过程；而在较低的 C/N 比下，好氧反硝化微生物通常表现出较差的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除能力和反硝化能力。譬如 *Acinetobacter junii* YB<sup>[69]</sup>，当 C/N 比从 2 增加至 15 时，其  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除速率从 4.04 增加至 10.09  $\text{mg NH}_4^+\text{-N}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。大多数好氧反硝化微生物适宜的 C/N 比在 8~10 之间。

本章以模拟生活污水及实验室运行的膜生物反应器（MBR）出水为处理对象，研究实验室现有六株好氧反硝化菌株的脱氮效果，包括  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  和总氮（TN）等的去除效果，获得好氧反硝化脱氮微生物制剂的复配菌株配方。在此基础上，通过拮抗试验及微生物制剂的脱氮效果初探，判定好氧反硝化脱氮微生物制剂的可行性，为后续研究奠定基础。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 好氧反硝化菌株的性质

好氧反硝化菌株 B301（形赖氨酸芽孢杆菌）、B308（蕈状芽孢杆菌）、B601（枯草芽孢杆菌）、P6（阿氏芽孢杆菌）、X01（普沙根瘤菌）和 Y11（空气芽孢杆菌），均为实验室保藏菌株且具有好氧反硝化能力，上述微生物菌株的基本特性见表 2-1。

表 2-1 好氧反硝化微生物特性

Table 2-1 Characteristics of aerobic denitrifying bacteria

菌株	种属	菌株特性
B301	形赖氨酸芽孢杆菌属	形赖氨酸芽孢杆菌具有异养硝化-好氧反硝化能力 <sup>[70]</sup> ，能促进作物生长 <sup>[71]</sup> ，在植物病害防治 <sup>[72]</sup> 上具有极大的应用价值。
B308	蕈状芽孢杆菌属	蕈状芽孢杆菌具有较强的溶磷能力以及吡啶乙酸活性，还具有固氮、分泌蛋白酶和纤维素酶等多种能力 <sup>[73]</sup> 。
B601	枯草芽孢杆菌属	枯草芽孢杆菌具有异养硝化-好氧反硝化和溶磷能力 <sup>[22]</sup> ，可有效促进微生物群落的相互作用 <sup>[74]</sup> 。
P6	阿氏芽孢杆菌属	阿氏芽孢杆菌具有较强的溶磷 <sup>[75]</sup> 和固氮能力，可提高微生物群落的丰富度，有利于植物的生长 <sup>[76]</sup> 。
X01	普沙根瘤菌属	普沙根瘤菌具有异养硝化和好氧反硝化特性 <sup>[23]</sup> ，还具有一定的解磷、溶磷 <sup>[77]</sup> 和固氮 <sup>[78]</sup> 能力。
Y11	空气芽孢杆菌属	空气芽孢杆菌具有一定的固氮能力 <sup>[79]</sup> ，在极端环境（如高盐）下会产生大量的胞外聚合物（EPS）保护细胞 <sup>[80]</sup> 。



### 2.2.2 试验材料

试验所用的化学试剂均为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司（上海）。

### 2.2.3 好氧反硝化菌株的脱氮效果评价

#### (1) 菌株的活化

取出保藏在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱相应菌株的冷冻管，放无菌台内室温解冻后，整管（约 0.9 mL）接种于装有 50 mL 已灭菌的 Luria Bertani 培养基（LB）中（表 2-2）。摇瓶瓶口用纱布、橡皮筋包裹后，置于摇床振荡培养（ $30^{\circ}\text{C}$ ，160 r/min），获得各菌株的种子发酵液。

表 2-2 培养基的配方

Table 2-2 Media components

培养基的配方	胰蛋白胍 (g/L)	酵母提取物 (g/L)	NaCl (g/L)	琼脂 (g/L)
LB	10	5	10	-
固态 LB	10	5	10	20

#### (2) 湿菌泥的制备

通过测定各菌株发酵液的活菌数，收集 10 亿 CFU/100 mL 时的发酵液，在 5000 r/min 离心 15 min 及无菌水洗涤 3 次后，获得各菌株的湿菌泥，备用。

#### (3) 好氧反硝化菌株的脱氮效果研究

以模拟生活污水和实验室 MBR 出水（见表 2-3）为处理对象，在装液量为 100 mL 的 250 mL 锥形瓶内分别投加(2)中的湿菌泥，置于摇床连续培养 24 h ( $30^{\circ}\text{C}$ ，40 r/min)。每隔 3 h 取样一次，测定不同体系内的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、化学需氧量（COD）、TN 和细胞密度（ $\text{OD}_{600}$ ），研究各菌株处理模拟生活污水和 MBR 出水的脱氮效果。

表 2-3 模拟生活污水和 MBR 出水的组成

Table 2-3 Components of domestic wastewater and MBR effluent

名称	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg/L)	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg/L)	COD (mg/L)	TN (mg/L)
模拟生活污水 I	$28.58 \pm 0.41$	-	$319.35 \pm 0.00$	$35.3 \pm 0.88$
模拟生活污水 II	$30.34 \pm 0.41$	-	$447.10 \pm 0.00$	$36.12 \pm 0.07$
MBR 出水 I	$0.92 \pm 0.05$	$14.53 \pm 0.11$	$47.9 \pm 7.53$	$17.89 \pm 0.34$
MBR 出水 II	$1.05 \pm 0.06$	$26.21 \pm 0.54$	$53.23 \pm 0.00$	$28.47 \pm 0.61$

注：此试验分为两批次进行，其中菌株 B301、B308、B601 和 P6 为第 I 批次，菌株 X01 和 Y11 为第 II 批次。模拟生活污水 I 和模拟生活污水 II 根据同一配方配制；MBR 出水 I 和 MBR 出水 II 为实验室稳定运行的 MBR 出水。模拟生活污水配方见表 2-4。

#### (4) 好氧反硝化脱氮微生物制剂处理模拟生活污水的脱氮效果

将各菌株的发酵液按照 1: 1: 1: 1: 1 的比例混合，获得好氧反硝化脱氮微生物制剂。以模拟生活污水为处理对象，投加好氧反硝化制剂的湿菌泥（接种量为 10 亿 CFU/100 mL），置于摇床培养 24 h ( $30^{\circ}\text{C}$ ，40 r/min)。每隔 12 h 取样一次，测定锥形瓶内的 TN 浓度，初步观察其脱氮效果。



表 2-4 模拟生活污水配方

Table 2-4 The composition of domestic wastewater

名称	浓度 (mg/L)	名称	浓度 (mg/L)	名称	浓度 (mg/L)
葡萄糖	230.0	蛋白胨	60.0	无水乙酸钠	40.0
牛肉膏	20.0	NaHCO <sub>3</sub>	198.0	KaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12.0
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	170.0	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.4	无水 CaCl <sub>2</sub>	1.2
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0				

## 2.2.4 分析测试项目与方法

所有水样测定前均先离心 (4°C, 15 min, 5000 r/min), 收集的上清液用于 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、COD 和 TN 的测定。上述理化指标均采用国家标准方法测定<sup>[81]</sup>。活菌数采用平板计数法 (GB 4789.2-2016) 测定。通过分光光度计 (岛津 UV-1800, 日本) 在 600 nm 波长下测定发酵液的 OD<sub>600</sub>。

## 2.3 结果与分析

### 2.3.1 菌株的生长曲线

通过绘制菌株的生长曲线, 确定各菌株的对数生长期, 从而确定最适的培养时间。图 2-1 为各菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 的生长曲线。

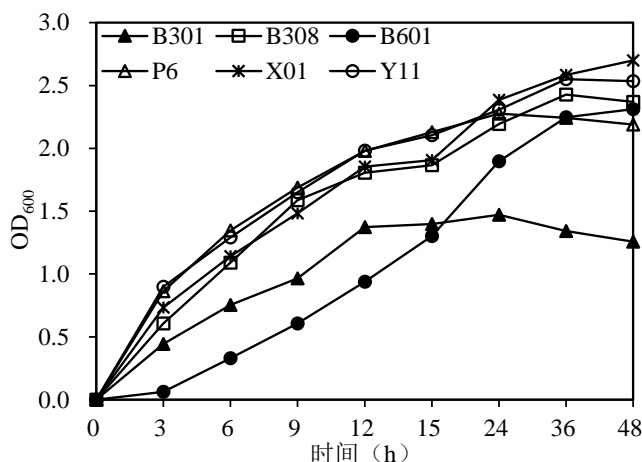


图 2-1 菌株生长曲线

Fig. 2-1 Growth curve of strains

菌株 B301、B308、P6、X01 和 Y11 生长较为迅速, 第 3 h 时均已进入对数生长期。而菌株 B601 的适应期较长, 前 3 h 生长缓慢, 但在 12 h 后, 发酵液在 600 nm 处的吸光值呈直线上升趋势。第 24 h 时, 菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 均处于对数生长期, 且发酵液的 OD<sub>600</sub> 维持在较高水平, 此时各菌株发酵液的 OD<sub>600</sub> 分别为 1.47、2.19、1.90、2.28、2.39 和 2.31。因此, 确定各菌株的适宜发酵培养时间为 24 h, 并用作第三章发酵条件优化过程的终止时间。

### 2.3.2 氨氮的去除特性

六株好氧反硝化菌株对模拟生活污水中的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 去除效果如图 2-2a 所示。菌株

B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 均能有效将  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  转化成其他形式的氮， $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率依次为 19.8%、17.2%、21.2%、21.7%、21.47%和 19.15%。反应初期，菌株 B301、B308、B601 和 P6 处于适应阶段，生长较为缓慢， $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除效果不明显，12 h 后， $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度才出现明显的下降。菌株 X01 和 Y11 在反应初期均出现  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度升高的现象，这可能是因为在高 C/N 比、低溶解氧 (DO) 的体系内，具有固氮性能微生物可将氮气 ( $\text{N}_2$ ) 转化为  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ <sup>[82]</sup>；12 h 后，与其他菌株的现象相似， $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度也出现明显的下降。这与以往的研究结果相似<sup>[83, 84]</sup>，由于转速较低 (40 r/min 时，DO 为 0.96~1.42 mg/L)，缺乏充足的 DO，六株好氧反硝化菌株硝化作用不完全，导致  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度有部分残留。

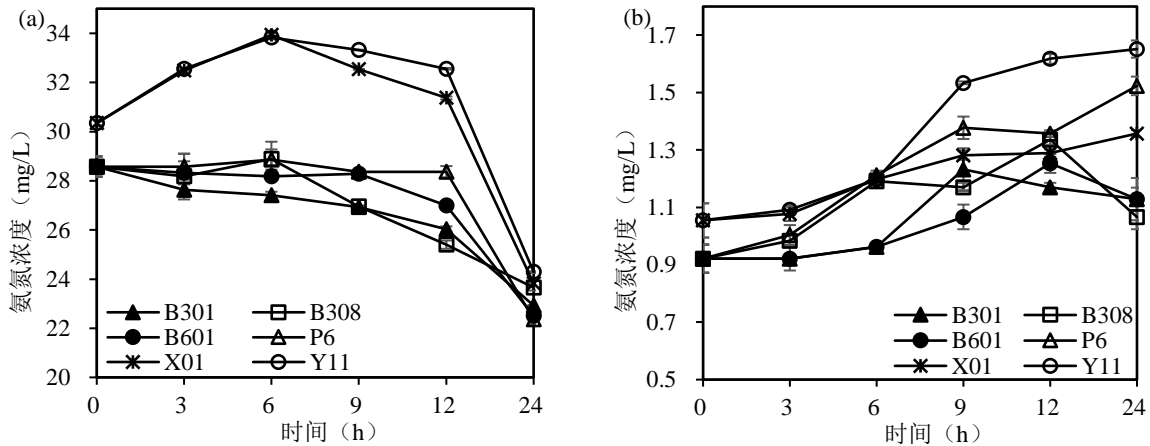


图 2-2  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度随时间的变化 (a: 模拟生活污水; b: MBR 出水)

Fig. 2-2 Variation in  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  concentration (a: domestic wastewater; b: MBR effluent)

六株好氧反硝化菌株对 MBR 出水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除效果如图 2-2b 所示。接种菌株 B301、B308 和 B601 的 MBR 出水体系  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度先升高后降低，而接种菌株 P6、X01 和 Y11 的 MBR 出水体系  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度整体呈现出上升趋势。在 24 h 时，体系内  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度均高于初始值。这可能是因为在养分含量较低的环境中，破碎的菌体细胞会释放  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ <sup>[11]</sup>，从而产生  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度升高的现象。与图 2-2a 相比，MBR 出水体系的 C/N 比较低，好氧反硝化菌株由于缺乏充足的碳源，生长受到显著的抑制，无法进行正常的脱氮过程。

### 2.3.3 硝态氮浓度的变化

六株好氧反硝化菌株对模拟生活污水中的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  去除效果如图 2-3a 所示。模拟生活污水体系内的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度都呈现出先升高后降低的趋势。在 24 h 时，菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 的  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度都略高于 0，含量分别为 0.15 mg/L、0.06 mg/L、0.03 mg/L、0.78 mg/L、1.74 mg/L 和 1.93 mg/L。目前人们所认可的好氧反硝化脱氮途径主要有两种<sup>[46]</sup>：在  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  经氨单加氧酶 (AMO) 氧化为羟氨 ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) 后，有两条不同的氧化途径，一种是氧化为  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ；另一种是  $\text{NH}_2\text{OH}$  直接转化为  $\text{N}_2$ 。结合好氧反硝化菌株在模拟生活污水中  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的试验结果，认为前者的可能性较大。

六株好氧反硝化菌株对 MBR 出水中的  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效果如图 2-3 的 b 和 c 所示。在 24h 时, 接种 B301、B308、B601、P6 和 Y11 的 MBR 出水体系  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度都呈现出轻微上升的趋势, 但上升幅度不大, 而菌株 X01 出现小幅度下降, 降低至 25.83 mg/L。好氧反硝化菌株在 MBR 出水体系内  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度无显著变化, 这表明菌株在低 C/N 比环境下无法利用  $\text{NO}_3^-$ -N 进行反硝化过程。

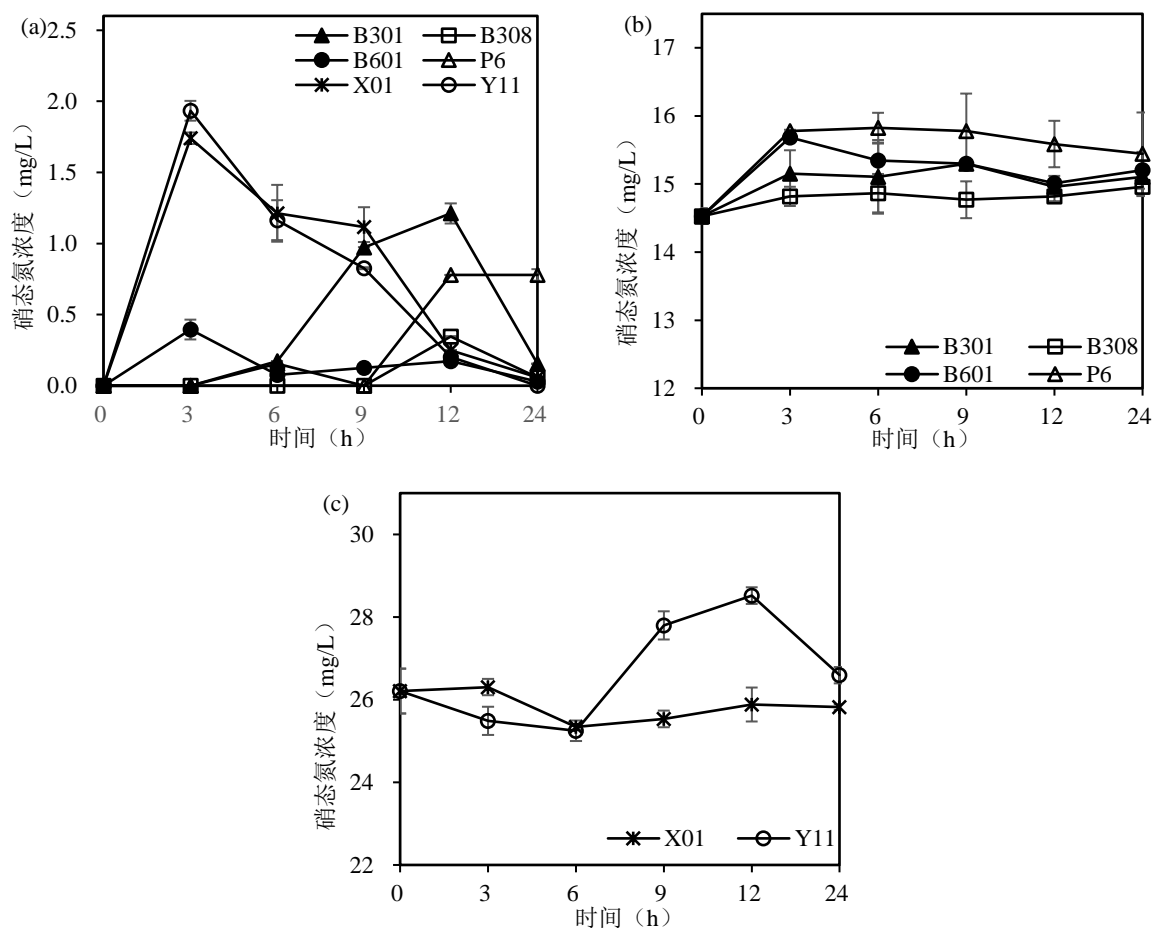


图 2-3  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度随时间的变化 (a: 模拟生活污水; b: MBR 出水 I; c: MBR 出水 II)

Fig. 2-3 Variation in  $\text{NO}_3^-$ -N concentration

(a: domestic wastewater; b: MBR effluent I; c: MBR effluent II)

### 2.3.4 亚硝态氮浓度的变化

六株好氧反硝化菌株对模拟生活污水中的  $\text{NO}_2^-$ -N 去除效果如表 2-5 所示。模拟生活污水体系  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度均较低, 这说明在脱氮过程中, 大部分  $\text{NO}_3^-$ -N 可能直接转化为  $\text{N}_2$ , 期间无明显的  $\text{NO}_2^-$ -N 积累。以往的研究中也出现类似的结果<sup>[85]</sup>, 由于菌株具有较高的反硝化性能, 可以将硝化产生的中间产物立即利用转化, 所以检测不到  $\text{NO}_2^-$ -N 的存在<sup>[86]</sup>。

六株好氧反硝化菌株对 MBR 出水中的  $\text{NO}_2^-$ -N 去除效果如表 2-6 所示。MBR 出水体系内的  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度均较低。由于缺乏碳源, 好氧反硝化菌株无法进行正常的新陈代谢, 在 MBR 出水体系内难以生存, 无法有效利用  $\text{NO}_3^-$ -N 并将其转化为  $\text{NO}_2^-$ -N, 因而 MBR 出水体系内  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度保持在较低水平。

表 2-5 模拟生活污水中  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度随时间的变化Table 2-5 Variation in  $\text{NO}_2^-$ -N concentration with time in domestic wastewater

菌株名称	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
B301	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B308	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B601	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
X01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Y11	0.00	0.00	0.00	0.08	0.03	0.00

表 2-6 MBR 出水中  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度随时间的变化Table 2-6 Variation in  $\text{NO}_2^-$ -N concentration with time in MBR effluent

菌株名称	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
B301	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B308	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B601	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
X01	0.00	0.00	0.00	0.28	0.30	0.27
Y11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

### 2.3.5 COD 的去除效果

六株好氧反硝化菌株对模拟生活污水中 COD 的去除效果如图 2-4a 所示。在模拟生活污水体系内，COD 浓度的变化与  $\text{NH}_4^+$ -N 的降解趋势相一致。在 0~3 h 内菌株 B301、B308、B601、X01 和 Y11 均处于适应期，COD 去除率较低，随着好氧反硝化菌株进入到对数生长期后，COD 去除率显著提高。COD 去除主要发生在菌株的对数生长期，其它好氧反硝化菌株也出现相似的结果，譬如 *Klebsiella* sp. y6<sup>[87]</sup>。COD 浓度的逐步降低，表明模拟生活污水体系内 COD 被正常分解，菌种新陈代谢正常。反应结束时，好氧反硝化菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 对模拟生活污水体系的 COD 去除率分别为 88.3%、90.0%、86.7%、86.7%、85.7% 和 84.5%。

六株好氧反硝化菌株对 MBR 出水中 COD 的去除效果如图 2-4b 所示。在 MBR 出水体系内，COD 浓度都呈现出下降的趋势。最终，菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 对 MBR 出水体系的 COD 去除率分别为 38.9%、50.0%、66.7%、88.9%、70.0% 和 60.0%。COD 浓度的逐步降低，说明 MBR 出水中的 COD 被正常分解，表明在低 C/N 比的环境下，六株好氧反硝化菌株也可以有效利用碳源进行新陈代谢。结合各氮态浓度的变化，说明好氧反硝化菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 均能在低 C/N 比的体系内生存，但由于缺乏充足的碳源，反硝化过程受到显著的抑制，无法进一步降解  $\text{NO}_3^-$ -N。

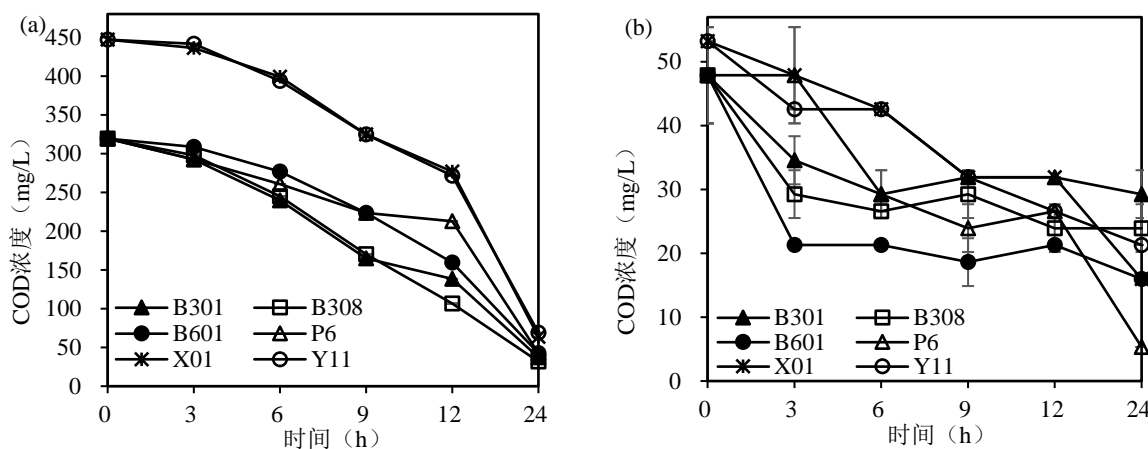


图 2-4 COD 浓度随时间的变化 (a: 模拟生活污水; b: MBR 出水)

Fig. 2-4 Variation in COD concentration (a: domestic wastewater; b: MBR effluent)

### 2.3.6 总氮的去除效果

六株好氧反硝化菌株在模拟生活污水中 TN 去除效果如图 2-5a 所示。接种菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 的模拟生活污水体系 TN 浓度均呈现下降趋势，这与  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 COD 变化趋势一致。反应结束时，体系内 TN 浓度分别为 27.80 mg/L、24.82 mg/L、20.97 mg/L、26.31 mg/L、26.79 mg/L 和 29.53 mg/L，相应的 TN 去除率分别为 21.25%、29.69%、40.59%、25.47%、25.83% 和 18.24%。其中，菌株 B601 的 TN 去除效果最优。

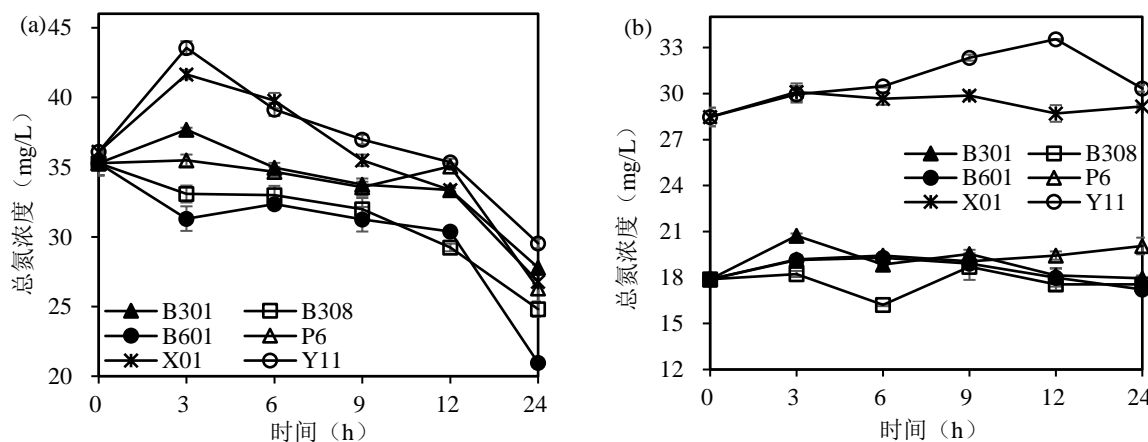


图 2-5 TN 浓度随时间的变化 (a: 模拟生活污水; b: MBR 出水)

Fig. 2-5 Variation in TN concentration (a: domestic wastewater; b: MBR effluent)

目前普遍认同好氧反硝化菌的异养硝化途径主要有两种：第一种是  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  经 AMO 氧化为  $\text{NH}_2\text{OH}$ ，后通过羟胺氧化酶 (HAO) 氧化为  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ <sup>[88]</sup>，期间有  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  或  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  产生；第二种是  $\text{NH}_2\text{OH}$  直接转化为  $\text{N}_2$ <sup>[89]</sup>，没有  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  或  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  生成。在模拟生活污水体系内， $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 COD 同时被去除，这是异养硝化异于自养硝化最显著的特征，同时在氮去除过程中还伴随着  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的产生和分解。由此可知，六株好氧反硝化菌株具有一定的异养硝化-好氧反硝化特性，在好氧条件下可有效降解  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ，初步认为均是遵循第一种途径。与其他文献中 TN 去除率相比<sup>[90]</sup>，模拟生活污水体系 TN 去除率较低，这主要是因为缺乏充足的 DO (0.96~1.42 mg/L)，导致硝化作用不完全，

大部分  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  得不到降解, 造成体系内 TN 浓度偏高。这与 *Halomonas* sp. B01<sup>[91]</sup> 的脱氮效果相似, 其在低转速的环境下 TN 去除率只有 41.50%, 但随着转速的提高, 其 TN 去除率也升高至 96.00%。

六株好氧反硝化菌株对 MBR 出水中的 TN 去除效果如图 2-5b 所示。与图 2-5a 不同的是, 在 MBR 出水体系内, TN 浓度变化趋势不显著。结合图 2-4b 的试验结果, 表明六株好氧反硝化菌株在低 C/N 比的环境中可以生存, 但由于碳源的匮乏, 无法有效降解  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , 导致各菌株脱氮效果微弱。

### 2.3.7 菌株的生长稳定性

在 600 nm 波长下, 通过分光光度计测定发酵液的吸光值, 测得的吸光值与发酵液中吸光物质的浓度成正比。因此, 通过测得的  $\text{OD}_{600}$  可以反映出发酵液的菌体浓度, 从而观察菌株生长的稳定性。菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 在模拟生活污水中的生长稳定性如表 2-7 所示。由分析可知, 在 0~3 h 内菌株 B301、B308、B601、X01 和 Y11 均处于适应期, 生长较为缓慢。3~9 h, 菌株 B301、B308 和 B601 处于对数增长期, 总细菌数迅速增加, 在 9 h 后菌株达到稳定。菌株 X01 和 Y11 在 3~12 h 内处于对数增长期, 总细菌数迅速增加, 在 12 h 后菌株达到稳定。而菌株 P6 生长最快, 在 0~3 h 内已结束适应期进入到对数增长阶段, 并在 6 h 后达到稳定。菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 最大的  $\text{OD}_{600}$  分别为 0.08、0.10、0.09、0.17、0.03 和 0.04。

表 2-7 模拟生活污水中菌株的生长稳定性

Table 2-7 Strains growth performance in domestic wastewater

菌株名称	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
B301	0.00	0.02	0.07	0.08	0.06	0.04
B308	0.00	0.04	0.09	0.10	0.10	0.02
B601	0.00	0.01	0.05	0.08	0.09	0.05
P6	0.00	0.13	0.15	0.17	0.13	0.13
X01	0.00	0.02	0.03	0.03	0.03	0.01
Y11	0.00	0.01	0.03	0.03	0.04	0.03

菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 在 MBR 出水中的生长稳定性如表 2-8 所示。3 h 后, 接种菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 的 MBR 出水体系内均出现生长停滞和细胞消亡的现象, 各菌株最大的  $\text{OD}_{600}$  分别为 0.01、0.02、0.01、0.02、0.03 和 0.03, 显著低于表 2-7 的结果。表明六株好氧反硝化菌在低 C/N 比环境中, 由于缺乏充足的养分, 无法进行正常的新陈代谢活动, 生长受到显著抑制。

表 2-8 MBR 出水中菌株的生长稳定性

Table 2-8 Strain growth performance in MBR effluent

菌株名称	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
B301	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

菌株名称	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
B308	0.00	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01
B601	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
P6	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
X01	0.00	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02
Y11	0.00	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02

### 2.3.8 好氧反硝化脱氮微生物制剂配方的确定

上述试验结果可知, 尽管在 MBR 出水体系 (低 C/N 比) 内, 六株好氧反硝化菌株也可利用碳源, 但由于缺乏充足的碳源, 菌株的生长缓慢甚至停滞, 脱氮效果较差, 但六株好氧反硝化菌株在模拟生活污水体系中均展现出较优的脱氮性能和生长稳定性。因此, 该好氧反硝化微生物制剂的配方为菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11, 可有效处理模拟生活污水。

为保证好氧反硝化菌株的混合使用效果, 研究了菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 的拮抗反应情况, 如图 2-6 所示。拮抗试验发现, 菌株两两划线交叉处均没有出现停止生长的现象, 且在交叉点出现后的生长情况也并未减弱, 说明各菌株之间均无竞争拮抗作用, 可组成好氧反硝化脱氮微生物制剂进行后续试验研究。

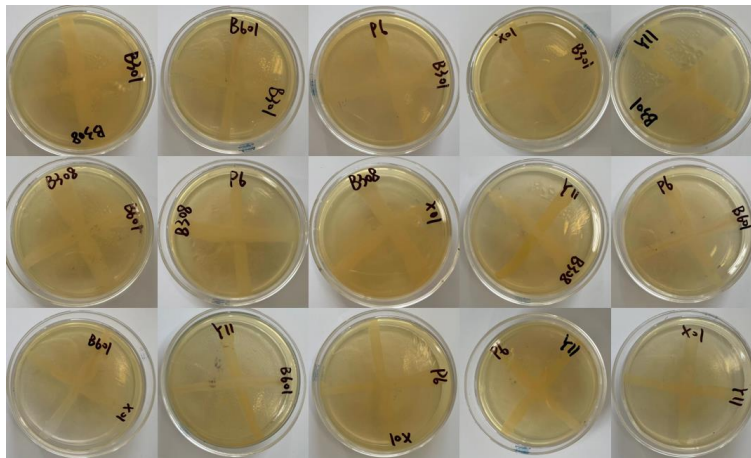


图 2-6 菌株间的拮抗试验

Fig. 2-6 Antagonism experiment of strains

为初步观察好氧反硝化脱氮微生物制剂对模拟生活污水的去除效果, 研究了其对模拟生活污水中 TN 的去除效果, 如表 2-9 所示。经过 24 h 的摇床培养, 微生物制剂可有效去除 12.15% 的 TN。尽管与单菌株的 TN 去除能力有一定的差距, 但实际生活污水体系复杂多变, 与单菌株相比, 混合微生物制剂更具有稳定性与实用性<sup>[63, 64]</sup>。

表 2-9 TN 去除率随时间的变化情况

Table 2-9 Variation in TN removal rate with time

时间 (h)	0	12	24
TN 去除率 (%)	0.00	1.50	12.15

## 2.4 本章小结

(1) 好氧反硝化菌株在不同体系内的脱氮效果显示, 菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11 的氮去除能力受 C/N 比的限制。在 C/N 比不足的体系中, 菌株均可以生长, 但生长速度缓慢且对氮素的去除效果不明显。在模拟生活污水体系内, 温度控制为 30℃, 摇床转速为 40 r/min 时, 菌株 B601 的脱氮能力最强, TN 去除率可达 40.59 %。

(2) 好氧反硝化脱氮微生物制剂的复配菌株包括菌株 B301、B308、B601、P6、X01 和 Y11。通过绘制各菌株的生长曲线, 确定各菌株的适宜发酵培养时间为 24 h。拮抗试验结果显示, 六株好氧反硝化菌株彼此间无竞争拮抗作用, 可组成微生物制剂进行后续试验。等比混合制备的好氧反硝化脱氮微生物制剂可有效处理模拟生活污水, 经过 24 h 的摇床培养, 微生物制剂可有效去除 12.15% 的 TN。



## 第三章 好氧反硝化脱氮微生物制剂的混合发酵条件优化

### 3.1 引言

低成本、高产量的发酵工艺是实现微生物制剂产业化应用的关键。发酵工艺一般采用补料、膜过滤、细胞固定化等方式来减少代谢废物对菌株生长的抑制从而提高菌体浓度,但这些方法往往存在操作复杂、成本较高的问题<sup>[92]</sup>。相较而言,通过优化培养基组分和发酵工艺条件来提高菌体浓度是最为经济有效的方式。其中,培养基主要由碳源、氮源以及无机盐离子组成,发酵工艺条件包括初始 pH 值、温度和溶解氧(DO)等。

与纯种发酵相比,混合发酵可节约生产成本且能提高生产效率。然而,由于混合发酵选用的外界因素(如营养、pH、温度和装液量),对制剂内的菌株来说可能不是最适因素,故存在各菌株生长速率不等的问题。但考虑到其在实际生产过程中的简便和高效,因此,本研究选用混合发酵作为发酵的主要方式。以往的研究表明,在 3 L 发酵罐内进行混合发酵,发酵液的最高活菌数可达 221 亿 CFU/mL<sup>[93]</sup>。

本研究为获得好氧反硝化脱氮微生物制剂的最优发酵工艺,首先通过摇瓶培养对其发酵培养基的组分和工艺条件进行优化,包括碳源、氮源、金属离子、初始 pH、温度和 DO。然后,通过正交试验优化发酵工艺条件。最后,采用 3 L 发酵罐进一步强化其发酵效果,可为微生物制剂的制备提供有益参考。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 培养基

本研究使用的基础培养基有两种,即种子培养基和基础发酵培养基,其组成如表 3-1 所示。使用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 溶液将上述培养基的初始 pH 调节至  $7.00 \pm 0.20$ 。

表 3-1 培养基的配方

Table 3-1 Media components

培养基的成分及浓度 (g/L)	胰蛋白胨	NaCl	酵母提取物
种子培养基	10.0	10.0	5.0
基础发酵培养基	5.0	5.0	2.5

#### 3.2.2 试验方法

(1) 菌株的活化及好氧反硝化微生物制剂的制备方法同第 2.2.3 节。

(2) 发酵培养基组分的优化

选择 5 种氮源(大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酵母粉、碳酸氢铵、硫酸铵)、5 种碳源(蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉、柠檬酸)和 5 种金属离子( $K^+$ (氯化钾)、 $Ca^{2+}$ (氯化钙)、 $Mg^{2+}$ (硫酸镁)、 $Fe^{3+}$ (硫酸铁)、 $Mn^{2+}$ (硫酸锰)),在基础发酵培养基的基础上,以发酵液中的细胞密度( $OD_{600}$ )为评价指标,进行上述发酵培养基组分的单因素优化试验。

其余因素控制如下：初始 pH 设定为 7.00，装液量为 100 mL（100 mL/250 mL），接种量为 1%（v/v， $OD_{600}=1.0$ ），在 30°C 和 160 r/min 下培养 24 h。

在上述试验基础上，考察不同质量浓度的氮源（2.3、3.5、4.7、5.8 和 7.0 g/L）、碳源（5、10、15、20、25 和 30 g/L）和金属离子（0.05、0.10、0.20 和 0.30 g/L）对发酵液中  $OD_{600}$  的影响，得出各组分的最适浓度。其他条件同上。

### （3）发酵培养条件的优化

在上述最佳培养基组分的条件下，研究初始 pH（6.0、7.0、8.0 和 9.0）、温度（20°C、30°C、35°C、40°C 和 50°C）及装液量（40、60、80、100 和 120 mL）对发酵液中  $OD_{600}$  的影响，确定各影响因素的最适范围。

### （4）正交试验

在上述单因素试验优化的基础上，选择三个关键影响因素及水平进行正交试验，根据试验结果的极差分析，获得好氧反硝化微生物制剂的最佳发酵条件。

### （5）发酵罐分批补料试验

在上述最佳发酵条件下，以  $OD_{600}$ 、细胞干重和细胞得率为评判指标，研究 3 L 发酵罐（保兴 BIOTECH-3JG-3JG-9000D，上海）分批补料策略。当残余碳源浓度小于初始浓度的 50% 时，进行补料操作，将发酵罐内的碳源浓度恢复至初始浓度，并继续培养，直至  $OD_{600}$ 、细胞干重和细胞得率不再发生变化。发酵结束时，测定并记录发酵液中最终的  $OD_{600}$ 、活菌数、细胞干重和细胞得率。

## 3.2.3 分析测试项目与方法

将 30 mL 发酵液在 12 000 r/min 下离心 15 min，丢弃上清液，用无菌水冲洗两次，烘干至恒重，用天平称其重量并计算细胞干重，单位为  $g/L$ <sup>[94]</sup>（在原方法的基础上进行了调整，将文献中 5 mL 样品设置为 30 mL 样品，其余不变动）。残糖浓度采用 3, 5-二硝基水杨酸（DNS）比色法<sup>[95]</sup>测定，单位为  $g/L$ 。细胞得率通过细胞与碳源消耗的质量之比计算，单位为  $g/g$ 。使用 pH 计（奥豪斯 ST3100，美国）测定培养基的 pH，其余测试方法同第 2.2.4 节。

## 3.3 结果与分析

### 3.3.1 发酵培养基组分的优化

#### （1）氮源种类及浓度的优化

氮是组成蛋白质和核酸的主要元素<sup>[96]</sup>。本研究选择廉价易得的大豆蛋白胨、胰蛋白胨、酵母粉、碳酸氢铵和硫酸铵作为氮源，进行氮源的筛选，结果如图 3-1 所示。与不外加氮源的对照组（1.92）相比，选择大豆蛋白胨、胰蛋白胨和硫酸铵作为氮源的培养基  $OD_{600}$  较低，均为 1.88。而选择酵母粉和碳酸氢铵作为氮源的培养基  $OD_{600}$  要高于对照组，分别为 1.93 和 2.09。其中，添加碳酸氢铵的培养基  $OD_{600}$  最高。在后续试验中，选择碳酸氢铵作为氮源。

在上述试验结果的基础上，对发酵培养基的氮源（碳酸氢铵）浓度进行优化，备选

的碳酸氢铵浓度有 2.3、3.5、4.7、5.8 和 7.0 g/L，优化结果如图 3-2 所示。随着氮源浓度的升高，OD<sub>600</sub> 先增大后减小，分别为 1.99、1.97、1.89、1.73 和 1.26。氮源浓度为 2.3 g/L 时，OD<sub>600</sub> 最高，故设定培养基内碳酸氢铵浓度为 2.3 g/L。

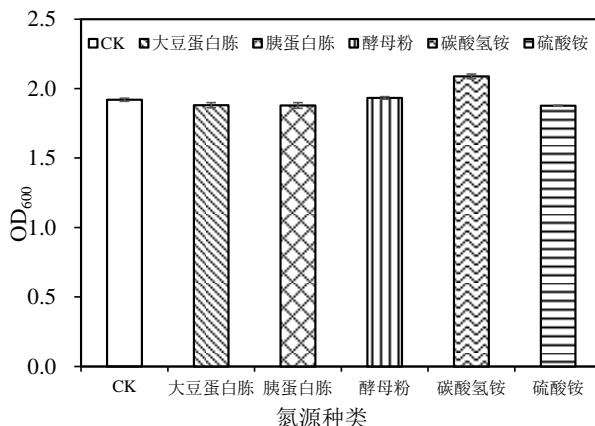


图 3-1 氮源种类对好氧反硝化微生物制剂菌体浓度的影响

Fig. 3-1 Effect of nitrogen source species on cell concentration for aerobic denitrification inoculum

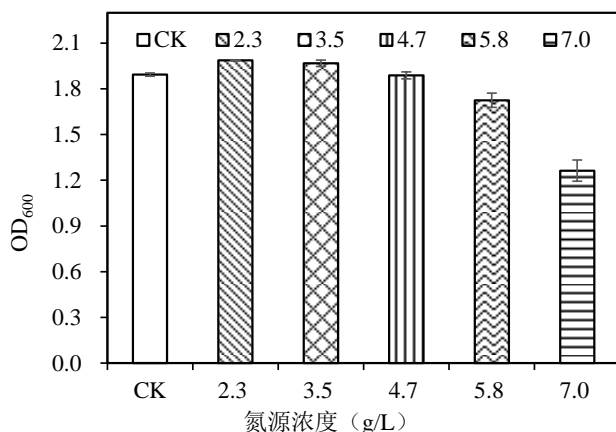


图 3-2 氮源浓度对好氧反硝化微生物制剂菌体浓度的影响

Fig. 3-2 Effect of nitrogen source concentration on cell concentration for aerobic denitrification inoculum

## (2) 碳源种类及浓度的优化

碳源作为细胞合成的骨架和能量来源，在细胞生长过程中起着重要的作用<sup>[97]</sup>。本研究选择五种廉价易得的试剂进行最佳碳源的筛选，此五种试剂依次为蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉和柠檬酸，结果如图 3-3 所示。与不外加碳源的对照组（1.89）相比，选择蔗糖、淀粉和柠檬酸作为碳源的培养基 OD<sub>600</sub> 较低，分别为 1.62、1.76 和 1.47。而选择葡萄糖和麦芽糖作为碳源的培养基 OD<sub>600</sub> 要高于对照组，分别为 2.15 和 2.08。其中，添加葡萄糖的培养基 OD<sub>600</sub> 最高。鉴于上述试验结果，选择葡萄糖作为碳源。

在上述试验结果的基础上，对发酵培养基的碳源（葡萄糖）浓度进行优化，备选葡萄糖浓度有 5、10、15、20、25 和 30 g/L，优化结果如图 3-4 所示。随着碳源浓度的升高，OD<sub>600</sub> 先增大后减小，分别为 2.01、2.08、2.14、2.35、2.19 和 1.99，均大于对照组（1.89）。其中，当添加 20 g/L 葡萄糖时，发酵液的 OD<sub>600</sub> 最高。因此，发酵培养基内葡萄糖浓度设定为 20 g/L。

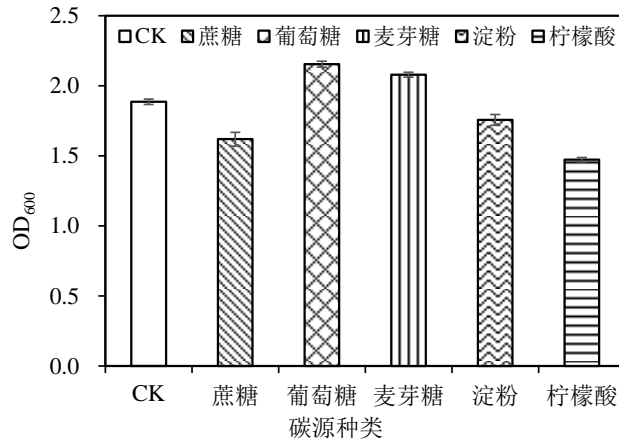


图 3-3 碳源种类对好氧反硝化微生物制剂菌体浓度的影响

Fig. 3-3 Effect of carbon source species on cell concentration for aerobic denitrification inoculum

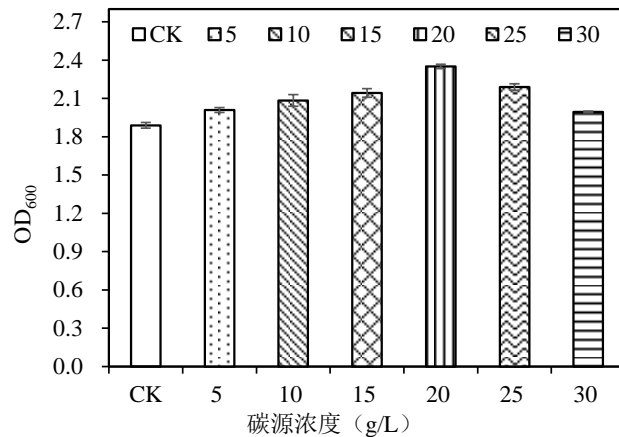


图 3-4 碳源浓度对好氧反硝化微生物制剂菌体浓度的影响

Fig. 3-4 Effect of carbon source concentration on cell concentration for aerobic denitrification inoculum

### (3) 金属离子种类及浓度的优化

在微生物生长代谢过程中，需要一些金属离子参与其生理反应<sup>[98]</sup>，来促进其生长，譬如钾、钙、镁、铁和锰等。本试验探究了五种金属离子（ $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 和  $Mn^{2+}$ ）对微生物制剂混合发酵过程的影响，结果如图 3-5 所示。试验结果表明，分别添加  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 和  $Mn^{2+}$ 的培养基 OD<sub>600</sub> 分别为 2.09、2.10、2.13、2.28 和 2.07，均高于未添加金属离子的对照组（1.93）。其中，添加  $Fe^{3+}$ 的发酵培养基 OD<sub>600</sub> 最高。这可能是因为铁元素是细胞内电子传递过程中一种必不可少的电子载体<sup>[99]</sup>，会影响酶的合成，进而影响到微生物的新陈代谢过程。基于上述试验结果，在后续试验中，选择  $Fe^{3+}$ 作为发酵培养基内的金属离子。

在上述试验结果的基础上，对发酵培养基的金属离子（ $Fe^{3+}$ ）浓度进行优化，备选的  $Fe^{3+}$ 浓度有 0.05、0.10、0.20 和 0.30 g/L，优化结果如图 3-6 所示。随着金属离子浓度的升高，OD<sub>600</sub> 先增大后减小，其值分别为 2.23、2.37、2.09 和 1.79。除了  $Fe^{3+}$ 浓度为 0.30 g/L 外，其余培养基的 OD<sub>600</sub> 均高于对照组（1.91）。由此可知，适量的  $Fe^{3+}$ 可以促进发酵培养基内菌体的生长，OD<sub>600</sub> 的升高，但  $Fe^{3+}$ 浓度一旦过高，会对菌体的生长产

生抑制作用。在  $\text{Fe}^{3+}$  为 0.10 g/L 时最高，为 2.37。因此，在后续试验中，将发酵培养基内  $\text{Fe}^{3+}$  浓度设置为 0.10 g/L。

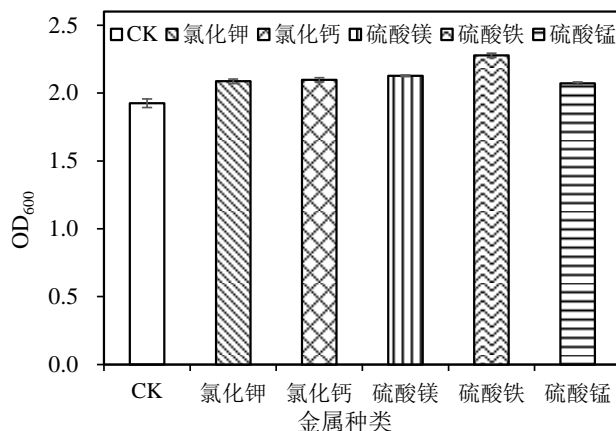


图 3-5 金属离子种类对好氧反硝化微生物制剂菌体浓度的影响

Fig. 3-5 Effect of metal ion species on cell concentration for aerobic denitrification inoculum

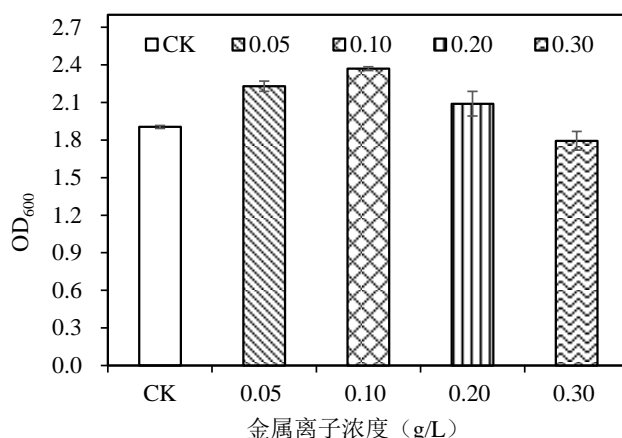


图 3-6 金属离子浓度对好氧反硝化微生物制剂菌体浓度的影响

Fig. 3-6 Effect of metal ion concentration on cell concentration for aerobic denitrification inoculum

综上所述，发酵培养基最佳的氮源是 2.3 g/L 的碳酸氢铵，最佳的碳源是 20 g/L 的葡萄糖，最佳的金属离子是 0.1 g/L 的  $\text{Fe}^{3+}$ 。

### 3.3.2 发酵培养条件的优化

为了进一步节约微生物制剂的生产成本，提高其生产效率，对微生物制剂的发酵工艺条件（初始 pH 值、温度和 DO）进行优化，以  $\text{OD}_{600}$  为评判指标，确定各影响因素的最佳范围，结果如图 3-7 所示。

初始 pH 是影响菌体浓度的重要因素之一，其可以通过改变细胞膜的流动性、解离代谢底物和产物等途径影响菌体的生长和蛋白的分泌<sup>[100]</sup>。有研究表明，在发酵过程中，适宜的初始 pH 有利于提高发酵过程中微生物的酶活性<sup>[101]</sup>。本研究设置的初始 pH 分别为 6.0、7.0、8.0 和 9.0，优化结果如图 3-7a 所示。随着初始 pH 的增加， $\text{OD}_{600}$  呈现先上升后下降的趋势。当初始 pH 分别在 6.0、7.0、8.0 和 9.0 时，发酵液中的  $\text{OD}_{600}$  依次为 2.25、2.32、2.15 和 2.11。当初始 pH 为 7.0 时，发酵液中的  $\text{OD}_{600}$  最高。由此可知，本

研究制备的微生物制剂适宜在中性条件下生长，在后续试验中，将初始 pH 的范围设置为 7.0 左右。

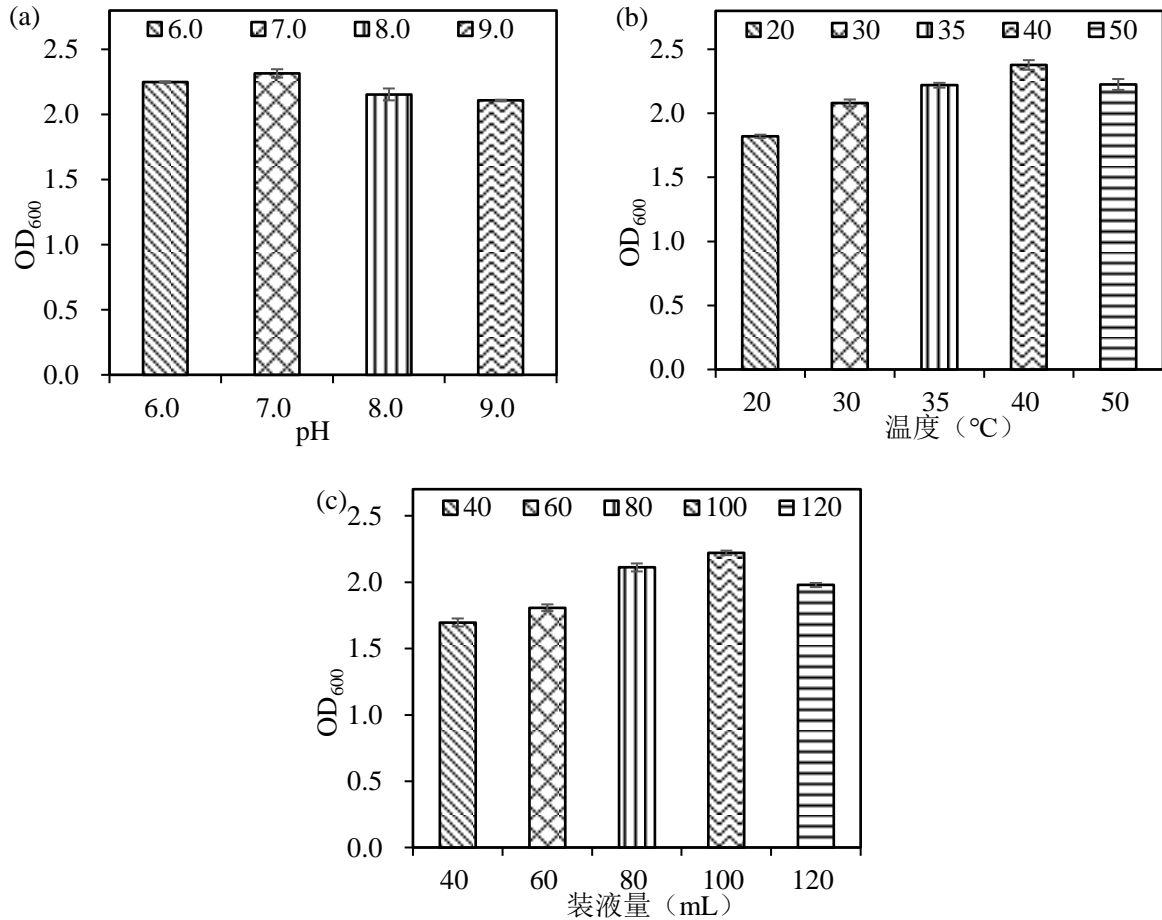


图 3-7 发酵条件对细胞生长的影响 (a: pH; b: 温度; c: 装液量)

Fig. 3-7 Effects of fermentation conditions on cell growth

(a: pH; b: Temperature; c: Liquid loading)

温度会通过影响酶活性来影响微生物的生长<sup>[102]</sup>。低温环境会抑制微生物的酶活性，而高温则可能会使酶失活。本研究设置 5 种不同的温度（20°C、30°C、35°C、40°C 和 50°C），观察在不同的温度下微生物制剂菌体浓度的变化情况，结果如图 3-7b 所示。随着温度从 20°C 升高至 50°C，发酵液内 OD<sub>600</sub> 先增大后减小，其数值依次为 1.82、2.08、2.22、2.38 和 2.23。在 40°C 时，OD<sub>600</sub> 最高。鉴于上述试验结果，将混合发酵培养的温度范围设置在 40°C 左右。

DO 是菌体浓度的重要因素之一，过低的 DO 值会限制细胞生长和代谢产物的合成，而 DO 值过高则会对细胞生长和代谢产物的合成产生不利影响<sup>[103]</sup>，因此，有必要对微生物制剂发酵过程中的 DO 值进行优化。在同一摇床培养的过程中，主要通过装液量的多少来控制 DO 浓度。本研究设置了 5 种装液量，依次为 40、60、80、100 和 120 mL，优化结果如图 3-7c 所示。由图可知，随着装液量的增加（即 DO 浓度的降低），OD<sub>600</sub> 先增大后减小，分别为 1.70、1.81、2.11、2.22 和 1.98。在装液量为 100 mL 时 OD<sub>600</sub> 最高，为 2.22。因此，后续试验中，将混合发酵过程中的装液量范围控制在 100 mL 左右。

### 3.3.3 摇瓶正交试验优化及验证

由单因素优化试验可知，最佳的初始 pH 为 7.0，最佳的温度为 40°C，最佳的装液量为 100 mL。利用正交试验，以上述最佳参数为中心，设置了 3 个水平，进一步优化微生物制剂的发酵工艺条件，具体的发酵工艺参数如表 3-2 所示，试验方案设计及结果如表 3-3 所示，正交试验的极差分析结果如表 3-4 所示。

表 3-2 正交试验的参数

Table 3-2 Parameters of the orthogonal test

编号	A (初始 pH)	B (温度)	C (装液量)
1	6.5	35	80
2	7.0	40	100
3	7.5	45	120

表 3-3 正交试验的设计及结果

Table 3-3 Orthogonal design and results

试验号	A	B	C	OD <sub>600</sub>
1	1	1	1	2.24
2	1	2	2	2.32
3	1	3	3	2.19
4	2	1	2	2.38
5	2	2	3	2.17
6	2	3	1	2.32
7	3	1	3	2.19
8	3	2	1	2.42
9	3	3	2	2.36

表 3-4 极差分析

Table 3-4 Range analysis

指标	因素	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k <sub>3</sub>	R	优化组合
OD <sub>600</sub>	A	6.75	6.87	6.97	0.22	A <sub>3</sub>
	B	6.81	6.91	6.87	0.10	B <sub>2</sub>
	C	6.98	7.06	6.55	0.51	C <sub>2</sub>

由上述试验结果可知，三个因素对菌体浓度的影响主次顺序依次为：装液量>初始 pH>温度，由均值 k 得出最优组合是 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>，即初始 pH 为 7.5，培养温度为 40°C，装液量为 100 mL。

### 3.3.4 发酵罐分批补料优化

分批补料发酵能使营养物质在某个阶段维持在适宜的浓度范围内，既可保证发酵过程中底物的供给，又可以有效减缓某些代谢产物对菌体所产生的阻遏或抑制效应，因此

更有利于菌体生长<sup>[104]</sup>。在前期摇床培养优化的基础上，以 OD<sub>600</sub>、细胞干重、细胞得率和活菌数为评判指标，探究在 3 L 发酵罐内通过分批补料后好氧反硝化脱氮微生物制剂的发酵效果，结果如图 3-8 和图 3-9 所示。

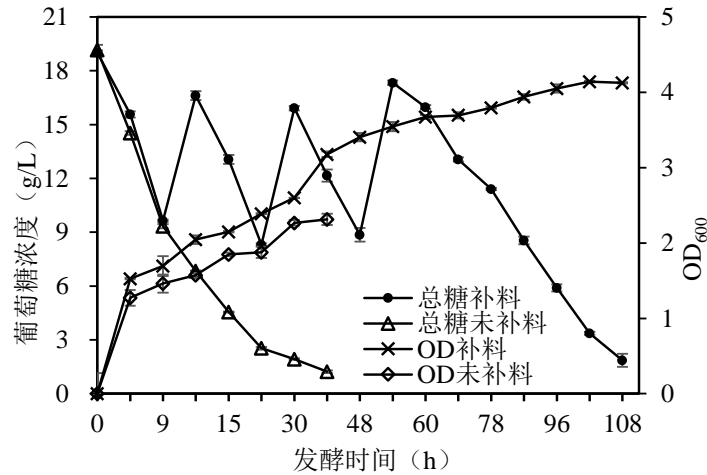


图 3-8 分批补料发酵的菌体浓度及碳源消耗

Fig. 3-8 Cell concentration and carbon source consumption in batch feeding fermentation

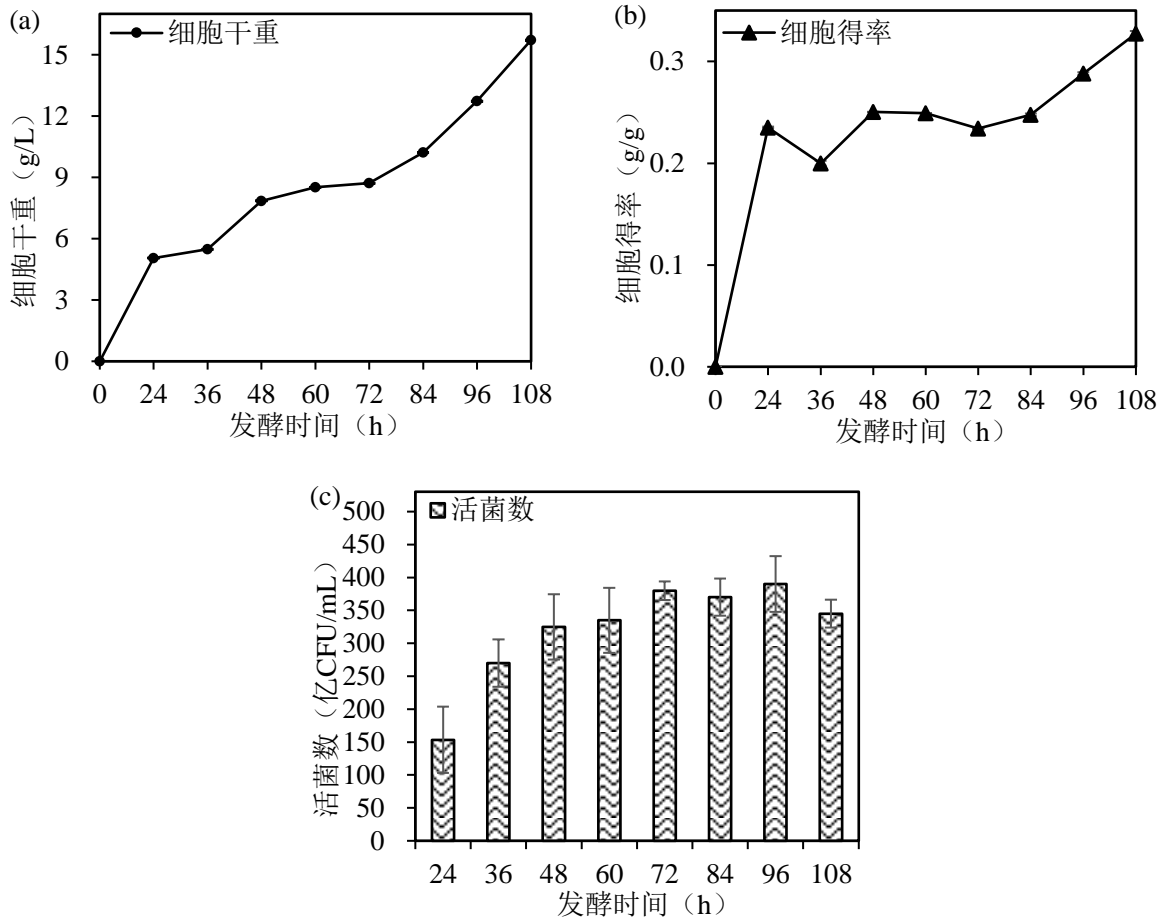


图 3-9 补料对细胞干重、细胞得率和活菌数的影响 (a: 细胞干重; b: 细胞得率; c: 活菌数)

Fig. 3-9 Effects of batch feeding on viable cell dry weight, cell viability and viable count

(a: Cell dry weight; b: Cell viability; c: Viable count)



在发酵过程中，每隔 3 h 进行取样，一直持续 5 d，期间通过测定发酵罐内的葡萄糖浓度来确定补料的时间点。随着菌体浓度的不断升高，发酵罐内的葡萄糖浓度随之降低，这说明微生物在充分利用葡萄糖来促进自身的生长繁殖。在第 9 h 时，发酵罐内的葡萄糖浓度降低至 9.65 g/L，因此，在第 9 h 时，使用 100 g/L 的葡萄糖溶液对发酵罐进行碳源的补料，将发酵罐内的葡萄糖浓度提升至 20.58 g/L。补充碳源后，微生物可以继续利用营养物质进行生长繁殖。在第 24 h 和第 48 h 时，发酵罐内的葡萄糖浓度降低至 10.00 g/L 以下，因此在第 24 h 和第 48 h 时进行补料。在第 24 h 时，进行第二次补料，菌体浓度再次呈现快速增长趋势，而在第 48 h 时完成第三次补料，发酵罐内的 OD<sub>600</sub> 还在升高，但其增长的幅度较为平缓。最终，在第 108 h 时，分批补料的发酵液达到最大的 OD<sub>600</sub>，为 4.13，要显著优于未补料试验组（2.31）。

在分批补料发酵的试验中，72~96 h 时发酵液的活菌数都维持在较高的水平，说明此时发酵罐内的菌体浓度较高且菌株较为活跃。96 h 时，发酵液的活菌数最高，为 390 亿 CFU/mL，此时，发酵液的细胞干重与细胞得率分别为 12.73 g/L 与 0.29 g/g。但此时的细胞干重与细胞得率均不是最大值。在 108 h 时，发酵罐内的细胞干重与细胞得率要高于 96 h，这说明在 108 h 时，发酵罐内可能存在一定数量的死细胞。

### 3.4 本章小结

(1) 通过摇瓶培养，优化了好氧反硝化脱氮微生物制剂发酵培养基的氮源、碳源以及金属离子。结果表明，发酵培养基最佳的氮源是 2.3 g/L 的碳酸氢铵；最佳的碳源是 20 g/L 的葡萄糖；最佳的金属离子是 0.1 g/L 的 Fe<sup>3+</sup>。在获得最佳发酵培养基组分后，通过单因素和正交试验，对微生物制剂的发酵工艺条件（初始 pH、温度以及装液量）进行优化。最佳发酵工艺条件如下：初始 pH 为 7.5，培养温度为 40°C，装液量为 100 mL。

(2) 基于上述试验结果，在 3 L 发酵罐上进行分批补料的技术研究，以进一步提高菌体浓度。在第 9 h、24 h 和 48 h 分别进行补料，结果表明，经过分批补料后发酵液的最大 OD<sub>600</sub>（4.13）要显著高于未补料试验组（2.31），且第 96 h 时发酵液的活菌数最高，为 390 亿 CFU/mL，此时的细胞干重与细胞得率分别为 12.73 g/L 与 0.29 g/g。

## 第四章 好氧反硝化微生物制剂强化模拟生活污水脱氮的效果

### 4.1 引言

由于生长速度快、与土著微生物共生长能力强且无二次污染<sup>[54,55]</sup>，好氧反硝化微生物制剂被广泛应用于生物强化脱氮技术领域。低温好氧反硝化菌群可强化反应器的脱氮效果，出水总氮（TN）去除率提高 24.56%<sup>[105]</sup>。在中试设备中投加好氧反硝化菌群，出水氨氮（ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ）和 TN 去除率分别提高 23.18%和 3.71%<sup>[106]</sup>。

缺氧/好氧-膜生物反应器（A/O-MBR）是将传统的 A/O 活性污泥法和 MBR 膜分离技术相结合的新型污水处理工艺<sup>[107]</sup>。研究表明<sup>[108]</sup>，生活污水可以通过 A/O-MBR 反应器系统进行有效处理，稳定运行后化学需氧量（COD）、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 的去除率分别为 91.14%、94.89%和 55.82%，但其出水 TN 浓度（16.47 mg/L）仍高于我国一级 A 标准规定的 15 mg/L 限值，尚需进一步处理。

前述研究结果表明，本研究制备的好氧反硝化脱氮微生物制剂可有效处理生活污水。但与 A/O-MBR 工艺结合，处理生活污水的脱氮效果如何，是否可实现生活污水达标排放，尚有待进一步研究。为此，本章将微生物制剂投加至 A/O-MBR 的好氧池内，进行为期 71 d 的连续运行。通过各氮态浓度的变化，考察微生物制剂强化生活污水的脱氮效果以及对同步硝化反硝化（SND）进程的影响。利用高通量测序技术分析好氧池内菌群的丰度和多样性，探究菌群结构的变化与工艺运行效果之间的联系，揭示微生物制剂的生物强化机制，为该好氧反硝化微生物制剂的实际应用提供有益参考。

### 4.2 材料与方法

#### 4.2.1 试验装置

A/O-MBR 装置及工艺流程如图 4-1 所示，有效容积为 7.92 L。

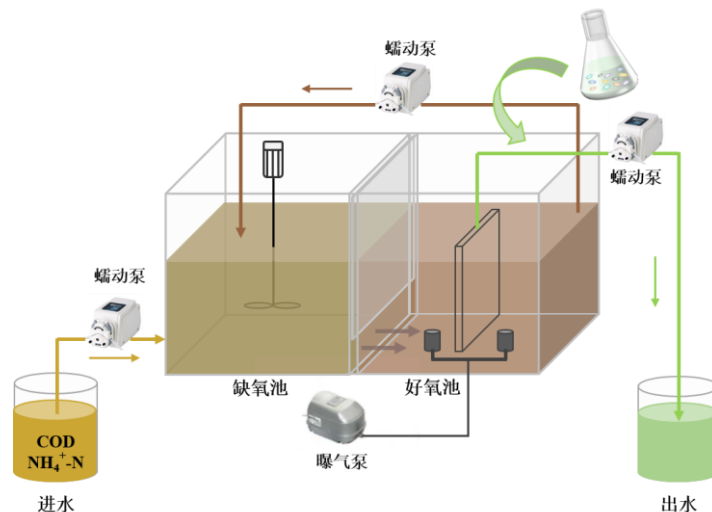


图 4-1 A/O-MBR 装置示意图

Fig. 4-1 Schematic diagram of the A/O-MBR

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/727141002040006045>