

人工湿地高效好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性研究

王莹^{1,2}, 周巧红¹, 梁威¹, 徐栋¹, 蔡林林^{1,2}, 陶敏^{1,2}, 吴振斌¹

(1.中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2.中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:从增氧型复合垂直流人工湿地中采集样品,利用间歇曝气法富集好氧反硝化菌,并进行分离纯化,共得到10株好氧反硝化菌。其中编号为B13的菌株在初始硝态氮含量为 $277.23\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、碳氮比为5的条件下,24 h的硝态氮去除率达92.80%,亚硝态氮积累只有 $12.57\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,脱氮速率达到 $20.58\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。16S rDNA序列分析表明,该菌与*Pseudomonas stutzeri* 同源性达100%。选用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计实验,通过测定对硝态氮去除能力和亚硝态氮的积累量,研究碳源、碳氮比(C/N)、pH以及溶解氧含量(DO)4种不同因素对B13号菌株好氧反硝化性能的影响。结果表明,该菌株对硝态氮的去除率最大可达99.88%,几乎没有亚硝态氮积累。对硝态氮去除率影响最大的因素为碳氮比,其次为pH,溶解氧含量和碳源。对应的最优条件是碳源为葡萄糖,碳氮比为10,pH为9,溶解氧含量为 $1.84\sim 3.57\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词:人工湿地;好氧反硝化细菌;反硝化活性;系统发育分析

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)06-1193-06

Isolation and Identification of a High-efficiency Aerobic Denitrifier and Its Denitrifying Characteristic in Constructed Wetland

WANG Ying^{1,2}, ZHOU Qiao-hong¹, LIANG Wei¹, XU Dong¹, CAI Lin-lin^{1,2}, TAO Min^{1,2}, WU Zhen-bin¹

(1.State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2.Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The identification of a Aerobic denitrifier and its practicability for aerobic wastewater treatment in Integrated Vertical-flow Constructed Wetland (IVCW) were studied in this paper. Samples were collected from an aerated IVCW. After enrichment by intermittent aeration, isolation and purification in turn, 10 strains of aerobic denitrifiers were obtained and their denitrifying capability were studied in batch culture under aerobic condition. Results showed that the most efficient strain was B13. With initial nitrate concentration of $277.23\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, C/N(carbon/nitrogen) ratio of 5 and an incubation time of 24 h, nitrate removal rate reached 92.80% and nitrite accumulation was in a low concentration of $12.57\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The maximum removal rate of nitrate was $20.58\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Phylogenetic analysis based on partial 16s rDNA showed that stain B13 had 100% sequence similarity with *Pseudomonas stutzeri*. An orthogonal experiment by four factors with three levels $L_9(3^4)$ was designed to explore the best aerobic denitrification condition for strain B13. The four factors were carbon source, C/N ratio, pH value and dissolved oxygen. Further, results showed that the highest nitrate removal rate was up to 99.88% almost without nitrite accumulation. Thus, strain B13 might be a good candidate for aerobic wastewater treatment. The most important factor on nitrate removal was C/N ratio, followed by pH value, dissolved oxygen and carbon source. The optimized condition for nitrogen removal was C/N ratio of 10, pH of 9 and dissolved oxygen concentration between $1.84\sim 3.57\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ with glucose as the carbon source.

Keywords: constructed wetland; aerobic denitrifying bacteria; denitrification activity; phylogenetic analysis

收稿日期:2009-12-10

基金项目:国家自然科学基金(50808172,20877093,50909091);国家“十一五”水专项(2009ZX07209-004-4);中国科学院知识创新工程青年人才领域前沿项目(Y05E04)

作者简介:王莹(1985—),女,江西抚州人,硕士,主要研究方向为环境生物技术。

责任作者:吴振斌 E-mail:wuzb@ihb.ac.cn

好氧反硝化菌(aerobic denitrifier)是利用好氧反硝化酶的作用,在有氧条件下进行反硝化作用的一类反硝化菌^[1]。对于好氧反硝化的研究始于20世纪80年代,Robertson和Kuene第1次从除硫和反硝化处理系统中分离出好氧反硝化菌 *Paracoccus pantotrophus*, *Pseudomonas* sp 和 *Alcaligenes faecalis*^[2]。此后人们在各种不同的环境下诸如土壤、沟渠、池塘、沉积物和活性污泥等分离出了好氧反硝化菌^[3-6]。

好氧反硝化细菌广泛存在于自然界中,人工湿地是否存在好氧反硝化细菌是一个值得探讨的问题。研究表明,人工湿地(Constructed Wetland)对各形态氮都具有一定的去除效果^[7-9],其对氮的去除机制包括基质的吸附、过滤、沉淀以及氮的挥发、植物的吸收和湿地中微生物硝化与反硝化作用的去除。微生物的硝化与反硝化作用在氮的去除中有重要作用,这些微生物中可能就包括好氧反硝化细菌。

人工湿地水生植物的根系常形成一个网络状的结构,并在植物根系附近形成好氧、缺氧和厌氧的不同环境,这种小生境为好氧反硝化细菌的存在提供了可能^[9]。本实验室研发的增氧型复合垂直流人工湿地(Aeration Integrated Vertical Flow Constructed Wetland, Aeration IVCW, 专利号:200820192850.6)在下行池底部安装曝气装置,为好氧反硝化菌提供更为优质的生存环境。

本研究尝试从增氧型复合垂直流人工湿地分离出高效好氧反硝化菌,根据16S rDNA序列分析确定该菌的分类学和系统发育地位,选用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 对所选菌株进行正交试验设计,研究碳源、碳氮比、溶解氧以及pH 4种不同因素对该菌株好氧反硝化性能的影响。选择这4个因素的依据是:①碳源在细胞的生长以及氮的去除过程中是必不可少的,碳源的种类及浓度在反硝化过程中都是关键的参数^[10],因此为所选菌株选择一个合适碳源和C/N是有必要的;②在好氧反硝化菌中,反硝化作用可能以电子受体的角色与有氧呼吸形成辅助或竞争关系^[11],DO是重要的生态指标;③参与好氧反硝化过程的各种还原酶的活性有可能受pH的影响,所以应当对反应的pH加以探讨,以求达到最佳的脱氮效果。对反硝化特性的研究旨在为好氧反硝化菌的工程应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 增氧型复合垂直流人工湿地结构

增氧型复合垂直流人工湿地在IVCW下行池底

部的排空管内平行埋有3根曝气管,以软管与空气压缩机连接,曝气量采用气体流量计计量,系统进水为居民小区生活污水,采用间歇式进水,水力负荷为 $0.2 \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$,水力停留时间为24 h。空气压缩机采用间歇停曝方式,运行/停止时间比为8 h:16 h,平均气体流量为 $0.25 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ 。参考付贵萍等^[12]构建湿地的布水系统,其基本结构如图1所示。

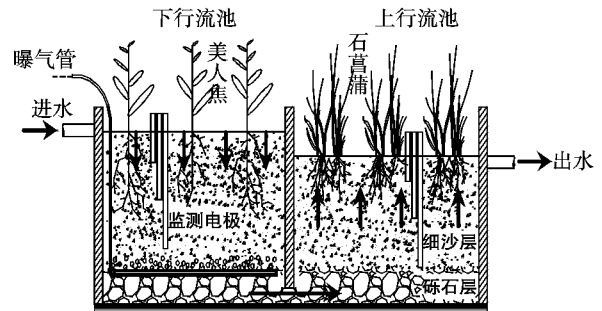


图1 增氧型复合垂直流人工湿地示意图

Figure 1 Sketch of aeration IVCW

1.2 培养基

1.2.1 液体培养基(LB)

KNO_3 2 g, K_2HPO_4 1 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.2 g, 柠檬酸钠 5 g, 微量盐溶液 2 mL; 蒸馏水 1 000 mL^[13]。

1.2.2 溴百里酚蓝(BTB)选择性培养基

琼脂 20 g, KNO_3 1 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, 琥珀酸钠 8.5 g, BTB(1%溶于酒精)1 mL; 蒸馏水 1 000 mL, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节 pH7.0~7.3^[14]。

1.3 好氧反硝化细菌的筛选

1.3.1 采样与富集

样品从增氧型复合垂直流人工湿地小试装置采集,利用间歇曝气法进行富集,间歇时间为12 h。试验装置见图2。将装置置于30℃温箱培养,每5 d转接1次,富集时间1个月。

1.3.2 初筛与复筛

采用涂布法将菌悬液均匀涂布于BTB选择性培养基,30℃温箱培养3 d后,选取变蓝的菌落或晕圈作为初筛菌,再将初筛的菌株接种于液体培养基,30℃、 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养5 d,进行复筛。

1.4 菌株好氧反硝化活性的测定

硝酸盐测定:GB 7480—87 酚二磺酸紫外分光光度法;亚硝态氮测定:GB 7493—87 N-(1-萘基)-乙二胺光度法。

1.5 DO及pH测定

DO测定:用ORION 5-STAR (Thermo Electron

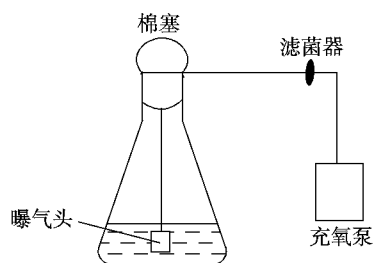


图 2 好氧反硝化细菌富集装置

Figure 2 Sketch of the enrichment set for aerobic denitrifiers

Corporation)进行在线测定。pH 测定:用 DELTA 320 pH 计(Mettler Toledo)进行测定。

1.6 菌株的鉴定

将菌种接种于 LB 中,30 ℃温箱培养 5 d,取 1 mL 菌悬液利用杭州爱思进生物技术有限公司 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒提取模板。PCR 反应的引物为通用引物,正向引物为 P1:5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3',P2:5'-GGTACCTTGTAC GACTT-3'。PCR 反应体系(50 μ L),反应条件如下:①94 ℃预变性 5 min;②94 ℃变性 40 s,56 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 2 min;③第 2 步循环 30 次;④72 ℃延伸 10 min。PCR 产物的纯化与测序由北京天一辉远生物科技有限公司完成,测序结果提交 GenBank 进行 blast 比对。

1.7 优化好氧反硝化性能条件的方法

试验选取四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交表设计实验(因素水平表见表 1)。实际实验中不同 DO 值通过设计不同的转速来实现,转速的 3 个水平分别为 0、60、120 $r \cdot \min^{-1}$,对应的 DO 值为 0.75~1.33 $mg \cdot L^{-1}$ 、1.84~3.57 $mg \cdot L^{-1}$ 和 5.39~6.74 $mg \cdot L^{-1}$ 。

表 1 $L_9(3^4)$ 因素水平表
Table 1 Orthogonal experiment table of $L_9(3^4)$

因素	水平 I (1)	水平 II (2)	水平 III (3)
碳源(因素 A)	葡萄糖	琥珀酸钠	柠檬酸钠
碳氮比(因素 B)	1	5	10
pH(因素 C)	5	7	9
DO(因素 D)/ $mg \cdot L^{-1}$	0.75~1.33	1.84~3.57	5.39~6.74

1.8 数据处理与分析

采用 OriginPro 7.5 作为绘图工具,利用 SPSS 13.0 统计分析软件对正交试验所得实验数据进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 好氧反硝化菌的筛选

经过间歇曝气富集、初筛、复筛以及分离纯化,得

到 10 株菌,分别命名为 B5、B9、B13、B18、B19、B28、B29、B36、B37、B38。将获得的菌株接种于 LB 中,30 ℃、120 $r \cdot \min^{-1}$ 摇床培养 5 d,测定硝态氮去除率,亚硝态氮积累量,所得结果如图 3 所示。从图中可以发现,选取的菌株都具有很高的硝态氮去除率,除 B36 和 B38 外,菌株对硝态氮去除率均在 95%以上。但亚硝态氮的积累量具有差异,最小的只有 0.32 $mg \cdot L^{-1}$,最高可达 56.19 $mg \cdot L^{-1}$ 。通过比较选取硝态氮去除率最高(99.39%)且亚硝态氮积累量最少(0.36 $mg \cdot L^{-1}$)的菌株 B13 进行下一步试验。

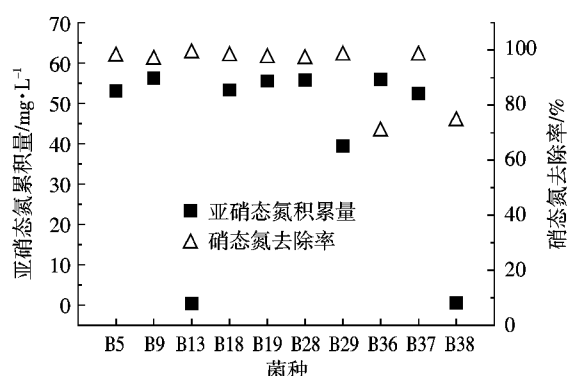


图 3 筛选菌株培养 5 d 后硝态氮去除率及亚硝态氮积累量比较
Figure 3 Comparison of nitrate removal and nitrite accumulation by different screened strains on the fifth day

2.2 菌株 B13 降解硝酸盐效果测定

将 B13 接种于 LB 中,30 ℃、120 $r \cdot \min^{-1}$ 摇床培养 5 d,第 1 个 24 h 每隔 4 h 测定 1 次硝态氮与亚硝态氮含量,此后每隔 24 h 测定 1 次,结果如图 4 所示。

由图 4 可以看出,B13 在 0~8 h 硝态氮降解速率缓慢,菌种接种到新鲜培养基后,细菌并不立即生长繁殖,而要经过一段时间的调整 and 适应,以合成多种酶,并完善体内的酶系统和细胞的其他成分,这段时间称为迟缓期^[5]。该菌主要反应时间在 0~24 h,脱氮速率在 16 h 时达到最大为 20.58 $mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$,24 h 的硝态氮去除率达 92.80%,亚硝态氮积累只有 12.57 $mg \cdot L^{-1}$,24 h 后降解速率明显减缓。虽然 B13 的迟缓期较长,但 8 h 后硝态氮降解速率迅速增加,16 h 降解速率到达最大。较快的反应速率与高效的去除效果,对其以后作为工程菌,应用于环境治理有着积极的意义。

2.3 16s rDNA 同源性比较

应用引物 P1、P2 分别对分离的 B13 的 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物琼脂糖凝胶电泳,1 671bp 出现特异性条带为 16S rDNA 片段扩增条带。对其进行测序,将该 16S rDNA 序列提交 GenBank,结果(图 5)

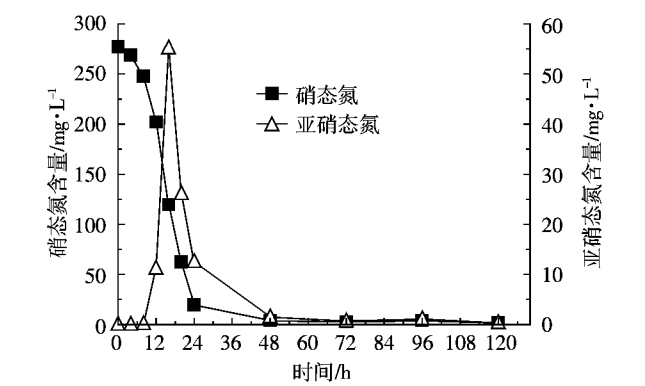


图4 菌株 B13 降解硝态氮及亚硝态氮积累时间曲线
Figure 4 Curves of nitrate removal and nitrite accumulation of strain B13

表明,B13(unknown strain)与 *Pseudomonas stutzeri* 相似度很高,同源性达 100%,可以初步认为 B13 为施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)的一种。

2.4 菌株 B13 好氧反硝化性能条件分析

按表 1 所示条件进行正交试验,30 ℃培养 24 h,

测定其硝态氮去除率,亚硝态氮积累量,重复试验 3 次,所得结果如表 2 所示。

3 个单位组经分析无显著性差异,以单位组 I 为例,由表 2 可以得出:(1)只考虑碳源(因素 A)对硝态氮去除率的影响。硝态氮去除率分别为葡萄糖:40.11%、99.80%、98.96%;琥珀酸钠:36.96%、99.68%、86.08%;柠檬酸钠:52.45%、55.17%、99.41%。可以看出葡萄糖是 3 种中最佳的碳源选择。(2)C/N(因素 B)对硝态氮去除率的影响非常明显。C/N 为 1 时菌株 B13 对硝态氮去除率均小于 53%;C/N 为 5 时,有 1 组小于 56%;C/N 为 10 时,菌株 B13 对硝态氮去除率均大于 98%,将数据进行方差分析, $P=0.033<0.05$,有显著性差异。可以看出随着 C/N 的增加,菌株对硝态氮去除率也提高了,C/N 最佳为 10。(3)pH(因素 C)、DO(因素 D)对硝态氮去除率的影响,对数据进行分析发现 3 个水平的显著性水平差异不明显,选择硝态氮去除率均值较大的作为最佳值,分别为 pH=9,DO

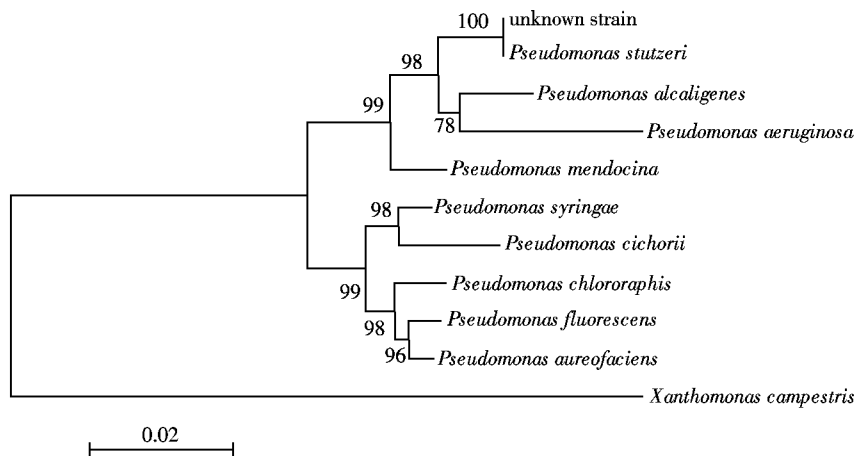


图5 B13 16S rDNA 进化树
Figure 5 Phylogenetic tree of strain B13 based on 16S rDNA sequences homology

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果分析
Table 2 The analysis on $L_9(3^4)$ orthogonal experiment results

试验号	因素				硝态氮去除率/%			亚硝态氮积累量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		
	A(1)	B(2)	C(3)	D(4)	单位组 I	单位组 II	单位组 III	单位组 I	单位组 II	单位组 III
1	1	1	1	1	40.11	35.48	34.39	0.10	0.08	0.11
2	1	2	2	2	99.80	99.76	99.80	0.50	0.26	0.29
3	1	3	3	3	98.96	99.03	98.90	1.23	1.06	1.19
4	2	1	2	3	36.96	35.25	37.01	1.68	1.67	1.49
5	2	2	3	1	99.68	99.70	99.88	0.29	0.26	0.24
6	2	3	1	2	86.08	86.08	86.17	0.10	0.10	0.09
7	3	1	3	2	52.45	50.12	51.26	26.49	25.38	25.32
8	3	2	1	3	55.17	53.02	49.54	0.08	0.08	0.08
9	3	3	2	1	99.41	99.62	99.71	0.25	0.23	0.25

为 $1.84\sim 3.57\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。9 组实验中有 4 组硝态氮去除率达到 98% 以上, 6 组亚硝态氮积累量在 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下, 可见该菌株的环境适应性良好。这一特点可使其具有良好的应用前景。

将表 2 所得结果用 SPSS 软件进行方差分析, 所得结果如表 3、表 4 所示。

由表 3 可以明显看出, 以硝态氮去除率为指标, 各因素影响的顺序为 $\text{C/N}>\text{pH}>\text{DO}>\text{碳源}$ 。由表 4 进行分析, 可以得出以亚硝态氮的积累量为指标各因素的影响顺序为 $\text{C/N}>\text{pH}>\text{DO}>\text{碳源}$, 与表 3 所得结果相同, 对应的最优条件为: 碳源为葡萄糖, $\text{C/N}=10$, $\text{pH}=9$, 溶解氧含量为 $1.84\sim 3.57\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。据正交试验所得结果可以分析出 C/N 是菌株反硝化性能的最主要影响因素, 同时可以说明 B13 对溶解氧的耐受性很强, 其反硝化性能对溶解氧的敏感度远远小于对 C/N 的敏感度, 这使得菌株的工程应用的难度大大降低。在

表 3 方差分析表(以硝态氮去除率为指标)

Table 3 Tests of between-subjects effects(nitrate removal rate)

Source	Type III sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected model	19 597.401 ^a	8	2 449.675	1 120.000	0.000
Intercept	145 688.811	1	145 688.811	66 609.445	0.000
碳源	516.607	2	258.303	118.097	0.000
碳氮比	14 361.703	2	7 180.852	3 283.111	0.000
pH	3 141.516	2	1 570.758	718.156	0.000
DO	1 577.575	2	788.788	360.637	0.000
Error	39.370	18	2.187		
Total	165 325.582	27			
Corrected total	19 636.771	26			

注: a. R squared=0.998 (Adjusted R squared=0.997)。

表 4 方差分析表(以亚硝态氮积累量为指标)

Table 4 Tests of between-subjects effects(nitrite removal rate)

Source	Type III sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected model	1 705.971 ^a	8	213.246	4 019.507	0.000
Intercept	292.527	1	292.527	5 513.881	0.000
碳源	392.467	2	196.233	3 698.829	0.000
碳氮比	463.018	2	231.509	4 363.747	0.000
pH	449.587	2	224.794	4 237.165	0.000
DO	400.898	2	200.449	3 778.288	0.000
Error	0.955	18	0.053		
Total	1 999.453	27			
Corrected total	1 706.925	26			

注: a. R squared=0.999 (Adjusted R squared=0.999)。

增氧型复合垂直流人工湿地中, 表层的溶解氧的范围为 $2.5\sim 3.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 基本符合菌株所要求的条件, 如果将菌株固定化添加到系统中, 可以大幅度提高系统对氮的处理能力。

3 讨论

试验首次从人工湿地中分离出好氧反硝化菌, 说明人工湿地中确实存在好氧反硝化作用。好氧反硝化菌是一类好氧或兼性好氧, 以有机碳作为能源的异养硝化菌。虽然广泛存在于自然界中, 但很难成为优势菌。试验分离出 10 株好氧反硝化细菌, 表明在增氧型复合垂直流人工湿地中, 利用间歇曝气, 使得好氧反硝化细菌转化为优势菌的可能性大大提高了。

经 16S rDNA 同源性比较, 初步认定 B13 为施氏假单胞菌。查阅资料, 发现施氏假单胞菌是已发现的好氧反硝化菌中较为常见的, Naoki 等^[16]在活性污泥中发现 *Pseudomonas stutzeri* TR2, Su 等^[9]在猪圈废水处理系统发现 *Pseudomonas stutzeri* SU2。与其他已发现的好氧反硝化细菌相比, 菌株 B13 是一株非常高效的好氧反硝化细菌, 它的硝态氮去除率为 99.39%, 脱氮速率可达 $20.58\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。已报道^[4,13,17-18]分离出的好氧反硝化菌其脱氮速率大多数在 $4.50\sim 13.67\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, B13 脱氮速率是这些菌的 1.51~4.57 倍, 与朱晓宇等^[19]分离出的两株菌速率相当。

正交试验结果表明, C/N 3 个水平中, 在 C/N 为 10 的时候 B13 脱氮效率最好, 亚硝态氮累积最少。这是因为在高 C/N 的情况下, 氧化还原反应可能比较强, 周质 Nar 的基因调控蛋白(FNR)活性高, 对氧化还原反应敏感, 激活好氧反硝化菌的反硝化相关基因表达^[20]。 C/N 太高不但提高污水处理费用, 也有可能降低好氧反硝化细菌的反硝化能力。王弘宇等^[21]发现在 C/N 高于 10 之后, 好氧反硝化细菌的反硝化能力有下降趋势。碳源浓度过高或者太低, 反硝化效率都会降低。低于最佳碳源浓度时, 反硝化速率增加缓慢, 因为没有足够的能量; 碳源浓度过高时, 反硝化速率也是受到限制的^[22]。试验中菌株 B13 以葡萄糖为碳源时获得较高的脱氮效率, 这可能是因为葡萄糖较其他两种碳源的分子结构更简单, 碳源的化学结构和分子量对反硝化效率的影响是很大的, Her 也认为结构越简单、分子量越小的碳源越有利于反硝化的进行^[23]。

4 结论

(1) 通过间歇曝气富集, BTB 选择性培养基筛选,

分离纯化得到10株好氧反硝化菌。

(2)对所得的10株菌的好氧反硝化性能测定,得到一株好氧反硝化能力强且亚硝态氮积累少的菌株B13, B13在初始硝态氮含量为 $277.23 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, C/N为5的条件下, 24 h的硝态氮去除率达92.80%, 亚硝态氮积累 $12.57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 16 h的脱氮速率达到最大, 为 $20.58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

(3)将B13进行16S rDNA分子生物学鉴定, 初步鉴定其为*Pseudomonas stutzeri*。

(4)通过四因素三水平 $L_9(3^4)$ 正交表实验, 得到B13好氧反硝化的最优条件为: 碳源为葡萄糖, C/N=10, pH=9, DO为 $1.84 \sim 3.57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 最优条件下24 h硝态氮的去除率为99.88%, 几乎没有亚硝态氮累积。菌株反硝化性能对溶解氧的敏感度低, C/N是最主要影响因素, 有利于菌株的工程应用。

参考文献:

- [1] 王薇, 蔡祖聪, 钟文辉, 等. 好氧反硝化菌的研究进展[J]. 应用生态学报, 2007, 18(11): 2618–2625.
WANG W, CAI Z C, ZHONG W H, et al. Research advances in aerobic denitrifiers [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(11): 2618–2625.
- [2] Robertson L A, Kuenen J G. Aerobic denitrification: A controversy revived[J]. *Archives of Microbiology*, 1984, 139: 351–354.
- [3] Robertson L A, van Neil E W J, Torremans R A M. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotroph*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 2812–2818.
- [4] Patureau D, Bernet N, Delgenès J P, et al. Effect of dissolved oxygen and carbon nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54: 535–542.
- [5] Su J J, Liu B Y, Liu C Y. Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotroph* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the active sludge of a piggery wastewater treatment system[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90: 457–462.
- [6] Norihisa O, Nobuhiko N, Toshiaki N K, et al. Characterization of the aerobic denitrification in *Mesorhizobium* sp. strain NH-14 in comparison with that in related rhizobia[J]. *Microbes and Environments*, 2005, 20(4): 208–215.
- [7] Gersberg R M, Elkins B V, Goldman C R. Nitrogen removal in artificial wetland[J]. *Water Res*, 1983, 17: 1009–1014.
- [8] Jennifer A Schaafsma, Andrew H Baldwin, Christopher A Streb. An evaluation of a constructed wetland to treat wastewater from a dairy farm in Maryland[J]. *USA, Ecological Engineering*, 2000, 14: 199–206.
- [9] Jan Vymazal. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 380: 48–65.
- [10] Patureau D, Bernet N, Delgenès J P, et al. Effect of dissolved oxygen and carbon–nitrogen loads on denitrification by an aerobic consortium[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 54: 535–542.
- [11] Chen F, Xia Q, Ju L K. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H fluorescence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6715–6722.
- [12] 付贵萍, 吴振斌, 任明迅, 等. 垂直流人工湿地系统中水流规律的研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21(6): 720–725.
Fu G P, Wu Z B, Ren M X, et al. Studies on the hydraulic pattern of the vertical–flow constructed wetland[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2001, 21(6): 720–725.
- [13] Qin X K, Xin W W, Min J, et al. Development and application of a novel and effective screening method for aerobic denitrifying bacteria[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 260: 150–155.
- [14] Takaya N, Catalan–Sakairi M A B, et al. Aerobic denitrification bacteria that produce low levels of nitrous oxide[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 3152–3157.
- [15] 杨基先, 高珊珊, 马放, 等. 一株好氧反硝化细菌的分离鉴定及反硝化能力[J]. 环境科学学报, 2008, 28(7): 1302–1307.
Yang J X, Gao S S, Ma F, et al. Identification and phylogenetic analysis of an isolated aerobic denitrifier[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(7): 1302–1307.
- [16] Naoki T, Maria A B, Yasushi S, et al. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3152–3157.
- [17] 黄运红, 龙中儿, 许杨. 一株好氧反硝化细菌的筛选及初步鉴定[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 266–268.
HUANG Y H, LONG Z E, XU Y. Screening and primary identification of an aerobic denitrifier[J]. *Food Science*, 2007, 28(8): 266–268.
- [18] Pai S L, Chong N M, Chen C H. Potential applications of aerobic denitrifying bacteria as bioagents in waste water treatment[J]. *Biore–source Technology*, 1999, 68: 179–185.
- [19] 朱晓宇, 王世梅, 梁剑茹, 等. 两株高效好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮效率[J]. 环境科学学报, 2009, 29(1): 111–117.
Zhu X Y, Wang S M, Liang J R, et al. Isolation and identification of two aerobic denitrifiers with high efficiency in the removal of N from simulated wastewater[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(1): 111–117.
- [20] Stouthamer A H, de Boer A P, van Der O J, et al. Emerging principles of inorganic nitrogen metabolism in *Paracoccus* denitrificans and related bacteria[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997, 71: 33–41.
- [21] 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, 27(6): 968–972.
WANG H Y, MA F, SU J F, 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.
- [22] Huang H K, Tseng S K. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 55: 90–94.
- [23] Her J J, Huang J S. Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough[J]. *Bioresource Technology*, 1995, 54: 45–51.

致谢: 张甬元教授、刘保元教授、成水平、贺锋、张丽萍和学科组其他成员在实验过程中给予了指导或帮助, 在此表示感谢。