

# 菌株 qy37 的异养硝化/好氧反硝化机制比较及氨氮加速降解特性研究

张培玉, 曲洋, 于德爽, 郭沙沙, 杨瑞霞

(青岛大学环境科学与工程系, 青岛 266071)

**摘要:**筛选出 1 株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 qy37, 通过形态观察、生理生化试验和 16S rDNA 序列分析, 确定其为假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。研究了异养硝化-好氧反硝化菌 qy37 的脱氮特性。在以  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源的异养硝化系统内, 该菌 32 h 内使  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  由 138.52 mg/L 降至 7.88 mg/L, COD 由 2408.39 mg/L 降至 1177.49 mg/L,  $\text{NH}_2\text{OH}$  最大积累量为 9.42 mg/L,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  最大积累量仅为 0.02 mg/L, 推测该菌将  $\text{NH}_2\text{OH}$  直接转化为  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$  从系统中脱除。在以  $\text{NaNO}_2$  为氮源的好氧反硝化系统内, 该菌 24 h 内使  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  由 109.25 mg/L 降至 2.59 mg/L,  $\text{NH}_2\text{OH}$  最大积累量为 3.28 mg/L。好氧反硝化系统与异养硝化系统相比菌体生长量高, TN 去除率低, COD 消耗量低,  $\text{NH}_2\text{OH}$  积累量低, 并且检测到  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的积累。认为好氧反硝化在菌体生长和能量利用方面比异养硝化更有效率。在异养硝化-好氧反硝化混合系统内, 16 h  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除速率比异养硝化系统提高了 37.31%。混合系统的  $\text{NH}_2\text{OH}$  积累量低于异养硝化系统和好氧反硝化系统, 但  $\text{N}_2\text{O}$  产出量高于二者。

**关键词:**异养硝化; 好氧反硝化; 脱氮; 污水处理; 混合系统; 羟胺

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)08-1819-08

## Comparison of Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification System by Strain qy37 and Its Accelerating Removal Characteristic of $\text{NH}_4^+\text{-N}$

ZHANG Pei-yu, QU Yang, YU De-shuang, GUO Sha-sha, YANG Rui-xia

(Department of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** The characterization in nitrogen removal of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria (qy37) was studied. A strain coded as qy37 which had simultaneous heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying ability was screened. In the light of its morphological and physiological characters as well as their sequence analysis of the 16S rDNA, strain qy37 was identified as *Pseudomonas* sp.. In heterotrophic nitrifying system utilized ammonium chloride as nitrogen source, the concentration of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  reduced from 138.52 mg/L to 7.88 mg/L and COD reduced from 2408.39 to 1177.49 mg/L by strain qy37 in 32 hours, the maximum accumulation of  $\text{NH}_2\text{OH}$  and  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  were 9.42 mg/L and 0.02 mg/L respectively, it was speculated that  $\text{NH}_2\text{OH}$  was transformed to  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  directly by strain qy37. In aerobic denitrifying system utilized sodium nitrite as nitrogen source, the concentration of  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  reduced from 109.25 mg/L to 2.59 mg/L by strain qy37 in 24 hours, and the maximum accumulation of  $\text{NH}_2\text{OH}$  was 3.28 mg/L. Compared with heterotrophic nitrifying system, aerobic denitrifying system had a higher bacterial growth whereas the lower removal rate of TN and COD, as well as the accumulation of  $\text{NH}_2\text{OH}$ .  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  was also detected in aerobic denitrifying system. It is considered that the upgrowth of bacterium and utilization of energy in aerobic denitrifying system were more efficient than that in heterotrophic nitrifying system. In heterotrophic nitrification-aerobic denitrification system, the removal rate of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  improved 37.31% in 16 hours than that in heterotrophic nitrifying system, the accumulation of  $\text{NH}_2\text{OH}$  was less but  $\text{N}_2\text{O}$  was higher than that in both heterotrophic nitrifying system and aerobic denitrifying system.

**Key words:** heterotrophic nitrification; aerobic denitrification; nitrogen removal; sewage disposal; heterotrophic nitrification-aerobic denitrification system; hydroxylamine

异养硝化与好氧反硝化是目前生物脱氮的研究热点。异养硝化是指微生物在利用有机底物的同时将氨氮转化为羟胺、亚硝酸盐和硝酸盐的过程<sup>[1]</sup>。由于异养硝化菌可以在降解氨氮的同时消耗污水中的有机污染物, 而且比自养硝化菌世代周期短、生长速率快、可耐受较低溶解氧, 所以在污水脱氮处理中的应用前景较好<sup>[2,3]</sup>。好氧反硝化是指微生物可以同时利用氧和硝酸盐或亚硝酸盐为电子受体进行的呼吸作用<sup>[4]</sup>, 这推翻了传统的反硝化作用只能在厌

氧条件下进行的观点, 好氧反硝化使得同步脱氮体系的构建成为可能<sup>[5,6]</sup>。

目前越来越多的文献报道异养硝化菌同时也具有好氧反硝化功能<sup>[7-9]</sup>, 但是大多数文献都是将异养硝化和好氧反硝化作为单独的系统分开研究, 关

收稿日期: 2009-10-15; 修订日期: 2010-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50678085, 50878107); 青岛大学优秀研究生学位论文培育项目 (YSPY2009014)

作者简介: 张培玉 (1963~), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为环境生物技术, E-mail: envbio@163.com

于二者比较的文献鲜见报道,涉及异养硝化和好氧反硝化混合系统的研究就更难见到.本试验从活性污泥中筛选出1株具有异养硝化和好氧反硝化功能的耐盐菌,对该菌的异养硝化和好氧反硝化脱氮特性进行了研究,并比较了两者氮素转化及降解产物的差异性,最后对异养硝化-好氧反硝化混合系统的脱氮特性进行了探讨,旨在为异养硝化-好氧反硝化菌在污水处理工程中的实际应用提供理论支持.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

从稳定运行的处理高浓度氨氮含盐废水的MBR和A/O反应器中选取污泥,通过菌体对数生长期转接以及逐渐增加培养基中海水比例的方式富集驯化,最后从系统中筛选出1株对氨氮和总氮降解性能较好的耐盐异养硝化菌,编号为qy37.

### 1.2 培养基

异养硝化培养基(g/L): $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  8.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5;  $\text{CH}_3\text{COONa}$  3.1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1; 海盐(海水经煎晒而成的天然盐)30; pH 7.0~7.3; 微量元素:2 mL.

好氧反硝化培养基(g/L):  $\text{NaNO}_2$  0.5;  $\text{CH}_3\text{COONa}$  2.4; pH 7.0~7.3; 其他成分同异养硝化培养基.

微量元素溶液(g/L):  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  63.7;  $\text{ZnSO}_4$  2.2;  $\text{CaCl}_2$  5.5;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  5.06;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.0;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.1;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.57;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1.61; pH = 7.0.

### 1.3 形态和生理生化试验

菌株的形态和生理生化试验根据文献[10,11]进行.

### 1.4 16S rDNA 测序和同源性比较

(1)用离心柱型DNA提取试剂盒提取DNA

用于16S rDNA的PCR反应引物为一对通用引物.正向引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物1492R:5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'.引物由上海生工生物工程有限公司合成.

PCR反应体系(50  $\mu\text{L}$ ):10  $\times$  buffer(含 $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , dNTP 4  $\mu\text{L}$ ,正向和反向引物各1  $\mu\text{L}$ ,模板1  $\mu\text{L}$ ,*Taq*聚合酶缓冲液1  $\mu\text{L}$ ,重蒸水37  $\mu\text{L}$ .PCR程序如下:①94 $^\circ\text{C}$ 预变性5 min;②94 $^\circ\text{C}$  30 s,55 $^\circ\text{C}$  30 s,72 $^\circ\text{C}$  2 min,循环30次;③72 $^\circ\text{C}$  15 min;④4 $^\circ\text{C}$ 放置.测序由上海生工生物工程有限公司完成.

(2)系统发育分析

将测序结果用BLAST软件与GenBank中已登录的16S rDNA序列进行同源性比较,通过CLUSTAL X和BIOEDIT等软件进行多重序列比对分析,并以Neighbor-Joining法构建系统发育树.

### 1.5 菌株异养硝化以及好氧反硝化性能测试

取处于对数生长期的菌液按2%的接种量接种于装有200 mL异养硝化培养基或好氧反硝化培养基的500 mL三角瓶中(九层纱布封口),30 $^\circ\text{C}$ ,120 r/min摇床振荡培养(培养期间通过称重法补充三角瓶中的水分),定时取样测定培养液中各指标的含量变化.

### 1.6 异养硝化、好氧反硝化以及混合系统产 $\text{N}_2\text{O}$ 试验

异养硝化与好氧反硝化培养基如前所述.混合系统: $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 g/L,  $\text{NaNO}_2$  0.5 g/L,其他成分与异养硝化培养基相同.取处于对数生长期的菌液10 mL接种于装有200 mL培养基的500 mL锥形瓶内,将导入高纯氧的气管放入培养基液面下曝气3 min(驱逐空气中氮气并保证纯氧环境),用丁基橡胶塞盖紧瓶口,再用封口胶封口.30 $^\circ\text{C}$ ,120 r/min摇床培养,定时取气体样品测定 $\text{N}_2\text{O}$ 含量(采用无菌注射器取样).

### 1.7 分析方法

$\text{NH}_4^+-\text{N}$ :钠氏试剂分光光度法; $\text{NO}_2^--\text{N}$ :N-(1-萘基)乙二胺光度法; $\text{NO}_3^--\text{N}$ :麝香草酚分光光度法;COD:重铬酸钾法(为了避免高氯离子的干扰,采用硝酸银掩蔽法);羟胺:偶联反应光度法<sup>[12]</sup>;总氮:过硫酸钾氧化紫外分光光度法;菌体生长量:吸光度法,7200型UNIC可见分光光度计于600 nm处测量吸光度值;pH值:6010型pH计测定; $\text{N}_2\text{O}$ :Agilent 6890N气相色谱仪,所用色谱柱为HP-Plot分子筛柱(30 m  $\times$  0.53 mm  $\times$  25  $\mu\text{m}$ ),色谱条件:进样口温度110 $^\circ\text{C}$ ,炉温180 $^\circ\text{C}$ ,ECD检测器温度为300 $^\circ\text{C}$ .所有样品均测定3次,取平均值.

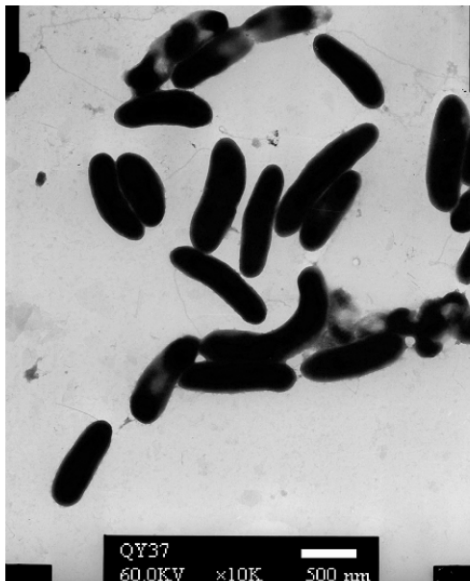
## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株 qy37 的形态学特征

菌株qy37为革兰氏阴性杆菌,大小为0.5  $\mu\text{m}$   $\times$  1.8  $\mu\text{m}$ ,菌体顶端有鞭毛,无芽孢.形成的菌落成鸭黄色,形状不规则,边缘呈卷曲状,隆起呈脐凹状,菌落表面干燥,不易挑取,不透明.菌株qy37的电镜照片见图1.

### 2.2 菌株 qy37 的生理生化特性

菌株qy37的生理生化特性鉴定结果为:严格好

图 1 菌株 qy37 的形态特征 ( $\times 10\ 000$ )Fig.1 Electronic microscope photograph of strain qy37 ( $\times 10\ 000$ )

氧接触酶、 $H_2O_2$ 酶、硝酸盐还原、亚硝酸盐还原、明胶液化、淀粉水解为阳性;甲基红试验、V-P 试验、产吲哚、油脂水解、纤维素水解、产氨试验为阴性;石蕊牛乳实验为还原退色;利用蔗糖、葡萄糖产酸;不能利用乳糖、甘露醇、半乳糖产酸. 该菌最适的生长盐度为 0% ~ 4% , >10% 基本不生长.

### 2.3 16S rDNA 序列和系统发育分析

获得分离菌株 qy37 部分长度的 16S rDNA 序列 (1 382 bp), 菌株的 GenBank 序列登录号为 FJ897172.1, 将所测得菌株的序列通过 BLAST 检索与 GenBank 中的核酸序列进行同源性比对, 利用 BIOEDIT 和 MEGA 等软件, 以 Neighbor-Joining 法绘制 16S rDNA 系统发育树, 结果见图 2. 从进化树上可以看出, 菌株 qy37 与多株 *Pseudomonas* sp. 16S rDNA 的相似性达到 99%, 结合菌株的形态学和

生理生化特性, 可基本确定菌株 qy37 属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*).

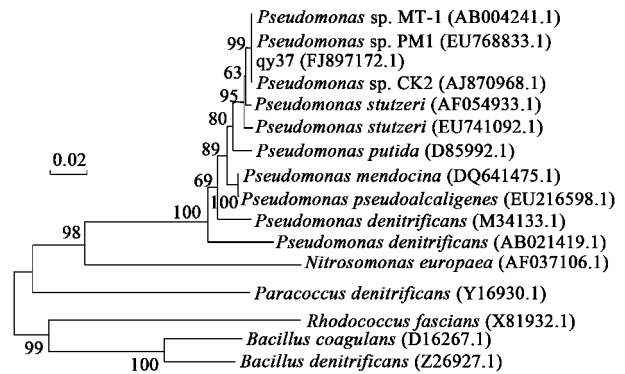


图 2 基于 16S rDNA 序列同源性构建的菌株 qy37 和亲缘性相近的其他细菌的系统发育树

Fig.2 Unrooted phylogenetic trees based on the 16S rDNA sequences of strain qy37 and related bacteria

### 2.4 菌株 qy37 的异养硝化作用

从图 3 可以看出, 在以  $NH_4Cl$  为唯一氮源的异养硝化系统内, 反应的前 32 h, 系统内的  $NH_4^+ - N$  由 138.52 mg/L 降至 7.88 mg/L, 菌体生长吸光度升高到最大值 2.033, 说明菌体的对数生长期与  $NH_4^+ - N$  的快速去除期是一致的, 这与张光亚等<sup>[13]</sup>所报道的关于硝化作用是在老龄细胞中的结论并不一样, 而与王宏宇等<sup>[14]</sup>、Su 等<sup>[15]</sup>的结论相似. 造成这种差异性的原因可能是所研究的菌种氨氮代谢机制不同, 目前报道的异养硝化菌的氨单加氧酶 (ammonia monooxygenase, AMO) 和羟胺氧化酶 (hydroxylamine oxidase, HAO) 的序列相似性也并不完全相同<sup>[16]</sup>, 具体原因还需进一步研究.

在氨氮氧化的同时, 系统内 COD 在 32 h 内由 2 408.39 mg/L 降至 1 177.49 mg/L, 氨氮和 COD 的同时去除是异养硝化区别于自养硝化的最明显的特

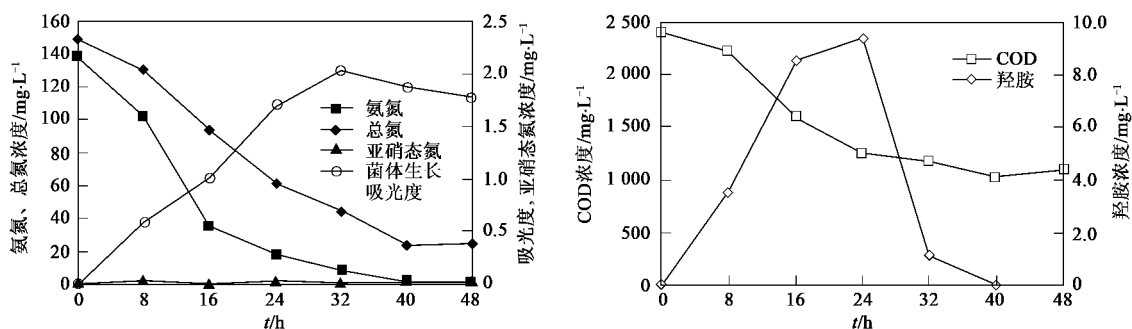


图 3 菌株 qy37 的异养硝化系统

Fig.3 Heterotrophic nitrifying system of strain qy37

征. 异养硝化菌在氧化  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  的过程中, 并没有像自养硝化菌一样将氧化  $\text{NH}_2\text{OH}$  后所生成的电子传递给辅酶 Q 供 AMO 的还原, 而是传递给了用于反硝化的细胞色素 c550, 所以 AMO 的还原必须通过外加有机碳源的氧化来实现<sup>[17]</sup>. 异养硝化菌在氧化氨氮时必须要靠有机碳源来提供还原力, 这对于其应用于实际的污水处理工程有重要的意义, 异养硝化菌对有机碳源的需求性可以克服传统硝化池不耐有机负荷冲击的缺陷, 并且为提高同步脱氮系统的氨氮去除率提供了可能性.

系统内 TN 在 40 h 内由 149.08 mg/L 降至 24.38 mg/L. 由于 TN 在测定时包含了菌体同化作用所利用的氮源, 所以 TN 去除率可基本上认为是菌体同化作用从系统中所去除的氮的总量. 由较高的 TN 去除率可以推断系统内发生了较为显著的好氧同步脱氮现象. 菌株 qy37 在整个培养期间没有检测到  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  的生成,  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  的最大积累量仅为 0.02 mg/L, 这与菌株 *Paracoccus pantotrophus* ATCC 35512<sup>[18]</sup> 对  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  的氧化过程较为相似. 检测不到  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  的原因是异养硝化和好氧反硝化的结合点在亚硝酸盐水平,  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  并不作为菌株 qy37 脱氮的中间产物. 而亚硝态氮积累量几乎为零的原因是  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  被氧化为  $\text{NH}_2\text{OH}$  后, 菌体并不选择从  $\text{NH}_2\text{OH}$  依次转化为  $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、 $\text{NO}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$  的脱氮路径, 而是由  $\text{NH}_2\text{OH}$  直接转化为  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$  从系统中脱除, 所以没有中间产物  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  的积累, 这与 Richardson 等<sup>[19]</sup> 报道的异养硝化脱氮模型相符. 造成这种现象的原因可能是菌体在长期对外界特殊环境 (例如高盐环境) 进行调整和适应的过程中, 逐渐形成的优先选择氮素转化过程中最便捷的代谢方式 (从  $\text{NH}_2\text{OH}$  转化为  $\text{N}_2\text{O}$  的第二条路径中仅有中间产物 NOH 的生成, 但是其可以被迅速地转化为

$\text{N}_2\text{O}$ <sup>[20]</sup>).

与  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  极低的积累量不同,  $\text{NH}_2\text{OH}$  在系统反应的前 8 h 内就积累了 3.56 mg/L, 在 24 h 后达到其最大值 9.42 mg/L, 由此说明  $\text{NH}_2\text{OH}$  是  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  氧化的中间产物, 其含量随着  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  的快速氧化而不断地升高. 从 24 ~ 40 h 之间  $\text{NH}_2\text{OH}$  的浓度快速降低, 这正好符合系统反应后期氨氮基本不再降解而 TN 仍迅速下降的现象. 当异养硝化反应系统中  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  和  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  的浓度过低或无法检出时, 对于  $\text{NH}_2\text{OH}$  的观测是探明系统内氮素转化的有效途径之一.

## 2.5 菌株 qy37 的好氧反硝化作用

由图 4 可以看出, 在以  $\text{NaNO}_2$  为唯一氮源的好氧反硝化系统内,  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  的浓度在 24 h 内由 109.25 mg/L 降至 2.59 mg/L, 在 32 h 时降到最低点 0.36 mg/L, 去除率为 99.67%. 在  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  去除的同时, 菌体生长吸光度也在 24 h 内升高到最大值 2.651, 说明好氧反硝化作用主要发生在菌体对数生长期细胞繁殖和生命活动最为旺盛的时期.  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  在溶液中会产生游离亚硝酸 (FNA), FNA 有较强的生物毒性, 常对微生物的生长代谢产生抑制作用. 好氧反硝化系统的初始 pH 值为 7.0 ~ 7.3, 根据公式<sup>[21]</sup> 计算得出此时的 FNA 为 0.013 ~ 0.006 mg/L, 这已经达到了抑制菌体生命活动的浓度<sup>[22]</sup>. 而菌株 qy37 比目前已报道的亚硝酸型反硝化菌<sup>[23-25]</sup> 具有更快的  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  去除速率, 并没有因为较高的  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  浓度而对其生命活动产生明显的影响, 说明菌株 qy37 在控制出水  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  含量方面有一定的应用价值.

在菌株 qy37 对  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  的代谢途径中, 主要发生同化性亚硝酸盐还原作用和异化性亚硝酸盐还原作用. 当系统中没有氨氮作为细胞合成代谢所需的底物时, 菌株 qy37 可以利用同化性亚硝酸盐还原作

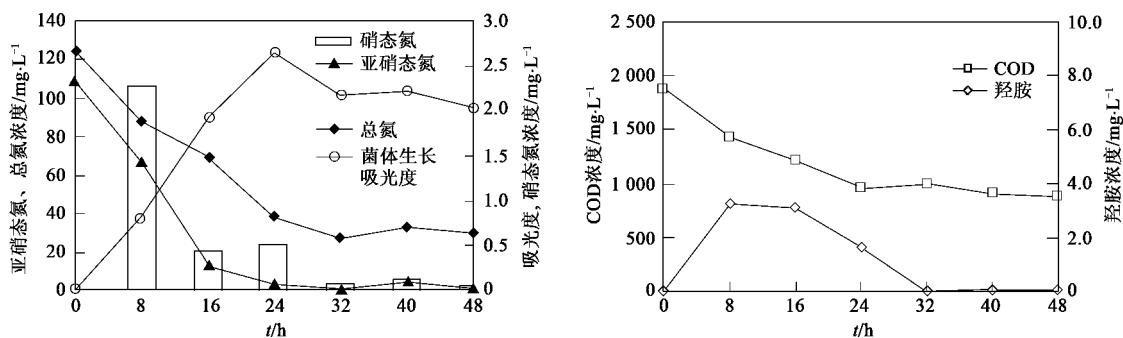


图 4 菌株 qy37 的好氧反硝化系统

Fig. 4 Aerobic denitrifying system of strain qy37

用,将 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 逆向生成 $\text{NH}_2\text{OH}$ 再转化为氨氮供菌体利用.系统内 $\text{NH}_2\text{OH}$ 在8 h时上升至最高点3.28 mg/L,随后一直维持在较高水平,直到16 h后才开始逐渐降低,而这段时间正是菌体合成自身细胞物质用于生长繁殖的最旺盛时期,由此可知羟胺的浓度可以作为同化性亚硝酸盐还原作用强弱的标志.而异化性亚硝酸盐还原作用的强弱是与TN去除率相对应的,系统内TN在32 h内降低了77.96%,说明菌株qy37以亚硝酸盐为底物时同样具有较强的脱氮能力,可以在有氧环境下发生较为彻底的好氧反硝化作用.

## 2.6 菌株 qy37 的异养硝化作用与好氧反硝化作用比较

研究证明,以亚硝态氮为底物时进行的好氧反硝化作用与以氨氮为底物时进行的异养硝化作用在菌体数量、COD降解量以及 $\text{NH}_2\text{OH}$ 产生量等方面有明显的不同.

(1)好氧反硝化时,菌株qy37的生长吸光度在24 h内就达到最高值2.651,而异养硝化时的菌体生长吸光度到32 h时才达到2.033,好氧反硝化时菌体可以更快地进入对数生长期,并且细胞数量也要比异养硝化时多,蒋静艳等<sup>[26]</sup>也发现了类似的现象.这种差异性的现象可能是由异养硝化和好氧反硝化对氮素不同的代谢机制引起的:在异养硝化时,菌体内AMO的还原需要消耗有机碳源提供的大量还原力,而菌体新陈代谢和生长繁殖也需要碳源代谢产生的ATP作为能源,这样二者就构成了对有机碳源需求的矛盾和竞争;在好氧反硝化时,菌体能够发生协同呼吸从而克服细胞色素c和细胞色素aa3之间电子传输链中的瓶颈现象<sup>[27]</sup>,亚硝酸盐可以和氧气同时作为呼吸作用的最终电子受体并产生生命活动所需的能量,所以亚硝酸盐的消耗是与有机碳源的消耗相偶联的,二者并不存在矛盾和竞争关系.换言之,异养硝化是一种耗能的反应过程,而好氧反硝化是一种产能的反应过程,所以好氧反硝化在菌体生长和能量利用方面比异养硝化更有效率.在TN去除率上也反映了上述推论,在本试验中,好氧反硝化在32 h的TN去除率为77.96%,居然比异养硝化的TN去除率低5.69%,这也说明了好氧反硝化时菌体利用了更多的氮源用于自身细胞的合成.

(2)在32 h内,好氧反硝化COD浓度降低了899.19 mg/L,异养硝化COD浓度降低了1230.90 mg/L,异养硝化比好氧反硝化消耗了更多的有机碳源(异养硝化与好氧反硝化试验时所用的C/N都约

为7/1).有机碳源消耗的差异性也反映了异养硝化与好氧反硝化对于碳源代谢的不同关系:异养硝化时由于AMO的还原要和菌体生长繁殖竞争有机碳源,所以比单纯利用碳源产生能量的好氧反硝化消耗更多的有机底物.

(3)好氧反硝化时 $\text{NH}_2\text{OH}$ 在8 h内达到最大积累量3.28 mg/L,随后便不断降低.异养硝化时 $\text{NH}_2\text{OH}$ 在8 h内达到3.56 mg/L,在24 h后达到最大积累量9.42 mg/L.好氧反硝化产生的 $\text{NH}_2\text{OH}$ 是同化亚硝酸盐还原作用的结果,它的积累意味着菌体细胞物质的大量合成以及生长发育速度的加快;而异养硝化产生的 $\text{NH}_2\text{OH}$ 是硝化反应的中间产物,它的积累说明了 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 被氧化的速率大于 $\text{NH}_2\text{OH}$ 被氧化的速率.

(4)菌株qy37的亚硝态好氧反硝化与异养硝化的另一个不同之处在于其有硝态氮的积累,在8 h内 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 积累量达到最大值2.28 mg/L,这可能是反应刚开始时亚硝酸盐的大量积累诱导了亚硝酸氧化酶,将 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ .随着亚硝酸盐去除率的增加,随后的24 h内 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 逐渐降解.

## 2.7 菌株 qy37 的异养硝化-好氧反硝化混合系统

在异养硝化培养基内投加亚硝酸钠,构成异养硝化-好氧反硝化混合体系,系统内各氮素及菌体生长量变化如图5所示.

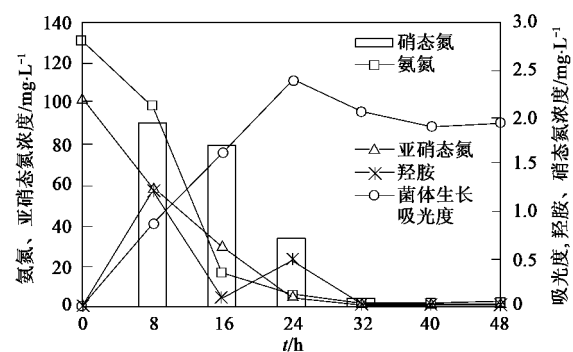


图5 菌株 qy37 的异养硝化-好氧反硝化混合系统

Fig. 5 Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification system of strain qy37

按照Robertson等<sup>[28]</sup>提出的异养硝化-好氧反硝化工作模型,当系统内同时存在氨氮和亚硝态氮时,菌体优先选择进行反硝化.也有其他研究<sup>[29]</sup>表明亚硝酸盐或硝酸盐的加入会对异养硝化产生抑制作用.但是本研究结果却与此相反,由图5可以看出,亚硝酸盐的加入非但没有抑制异养硝化作用,反而加速了氨氮的降解.在16 h时混合系统的 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$

已降至 17.14 mg/L,由图 5 中线性关系得出在前 16 h 混合系统的  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  去除速率比异养硝化系统的  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  去除速率提高了 37.31%。混合系统内好氧反硝化的速率并没有受到异养硝化作用的影响,  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  降解率维持原水平。左薇<sup>[30]</sup>在研究 1 株假单胞菌时,以硝酸盐为好氧反硝化系统的氮源,得到了与本试验类似的结论。

混合系统菌体生长吸光度在 24 h 达到最大值 2.391,略低于好氧反硝化系统,高于异养硝化系统的菌体数量。系统中同样检测到了  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  的存在,8 h 达到最大积累量 1.94 mg/L,随后逐渐降低,与好氧反硝化系统相比变化不大。混合系统与异养硝化系统相比明显不同的是  $\text{NH}_2\text{OH}$  的变化趋势,  $\text{NH}_2\text{OH}$  出现反复升高又降低的现象。  $\text{NH}_2\text{OH}$  的最大积累量为 1.23 mg/L,远低于异养硝化系统,甚至比发生同化性亚硝酸盐还原作用的好氧反硝化系统的  $\text{NH}_2\text{OH}$  最大积累量都低。而且在异养硝化系统内,羟胺迅速增加的时期正是  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  的快速降解期,而混合系统内  $\text{NH}_2\text{OH}$  虽然在前 8 h 内积累,但是在随后  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  降解最迅速的 8 h 内  $\text{NH}_2\text{OH}$  的浓度却迅速降低,当氨氮开始减速降解时  $\text{NH}_2\text{OH}$  的浓度又有小部分回升。

为了进一步探寻菌株 qy37 的氨氮加速降解途径,需要研究异养硝化及好氧反硝化过程中的气态产物 NO 和  $\text{N}_2\text{O}$ 。由于 NOR(nitric oxide reductase)对 NO 的高度亲和性<sup>[31]</sup>,对 NO 的产出研究难度较大,所以选择  $\text{N}_2\text{O}$  为系统气态产物的研究对象。试验中检测了封闭环境内异养硝化系统、好氧反硝化系统及混合系统的  $\text{N}_2\text{O}$  溢出量(因为 DO 等环境因子与之前试验的差异性,封闭环境试验中并没有检测系统中其他氮素的浓度变化)。从图 6 中可以看出,好氧反硝化系统的  $\text{N}_2\text{O}$  溢出浓度始终高于异养硝化

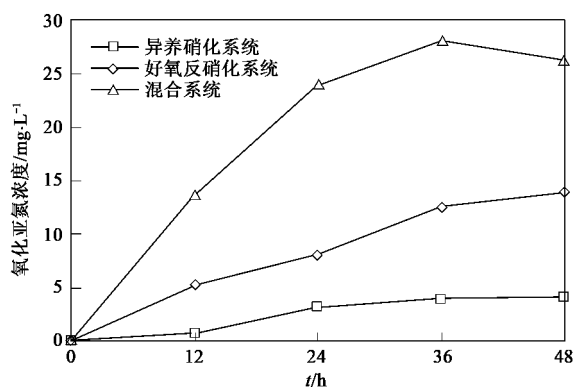


图 6 3 种不同系统  $\text{N}_2\text{O}$  溢出浓度

Fig. 6  $\text{N}_2\text{O}$  production of three different systems

系统,而加入亚硝酸盐的混合系统与自养硝化系统以及好氧反硝化系统相比  $\text{N}_2\text{O}$  的溢出速度要快得多,36 h 时  $\text{N}_2\text{O}$  浓度是异养硝化系统的 6.93 倍,是好氧反硝化系统的 2.23 倍。从中间产物  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{NH}_2\text{OH}$  的变化趋势推断混合系统氨氮加速降解的原因如下。

(1) 亚硝酸盐的加入诱导菌体产生了大量的 NIR(nitrite reductase)。当混合系统内加入亚硝酸盐时,  $\text{NH}_2\text{OH}$  的积累量较异养硝化系统明显偏低,并且在氨氮降解最迅速的 8~16 h 内,  $\text{NH}_2\text{OH}$  还出现了降低的趋势,说明羟胺被氧化的速度已经超越了氨氮氧化为羟胺的速度,而此时的气态产物  $\text{N}_2\text{O}$  的浓度又迅速增加,很有可能是因为混合系统内亚硝酸盐的投加诱导了菌体 NIR 大量的生成(已有研究报导 NIR 为诱导酶<sup>[32]</sup>),  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  可以被迅速降解,所以  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  可以经由  $\text{NH}_2\text{OH}$ 、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 、NO、 $\text{N}_2\text{O}$  的路径从系统中脱除。16~24 h  $\text{NH}_2\text{OH}$  的浓度稍有回升,可能是因为在氨氮降解末期用于异养硝化的 NIR 数量或是活性受到了用于好氧反硝化的 NIR 的竞争抑制,当投加的亚硝酸盐基本降解完后  $\text{NH}_2\text{OH}$  的浓度才又开始降低。

(2) 亚硝酸盐的加入可以加快 HAO 中双核活性位点  $\text{Fe}^{2+} \text{-Fe}^{2+}$  与  $\text{Fe}^{3+} \text{-Fe}^{3+}$  之间的转换速度。根据 Moir 等<sup>[20]</sup>对于异养硝化菌体内羟胺氧化的研究,  $\text{NH}_2\text{OH}$  可以与 HAO 上活性位点的双核中心  $\text{Fe}^{3+} \text{-Fe}^{3+}$  反应生成 NOH 和  $\text{Fe}^{2+} \text{-Fe}^{2+}$ ,然后  $\text{Fe}^{2+} \text{-Fe}^{2+}$  给出电子供细胞色素 C550 还原,同时两分子 NOH 生成  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{H}_2\text{O}$ 。根据混合系统中羟胺的减少以及  $\text{N}_2\text{O}$  的增多,推测亚硝酸盐对于以 2 个  $\text{Fe}^{3+}$  为双核中心的 HAO 的活性有一定的强化作用。

对本实验室保存的其他异养硝化-好氧反硝化菌(盐单胞菌 GYL<sup>[33]</sup>)也做了混合系统的脱氮研究,氨氮加速降解的现象并不明显,推测这是假单胞菌特有的性质。试验中同样发现了过高的  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  浓度(160 mg/L)会抑制氨氮的降解速率,所以关于  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  相对于  $\text{NH}_4^+ \text{-N}$  的投加比例以及  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  最大投加量方面还需进一步试验确定。同时关于混合系统氨氮加速降解的机制也不是非常明确,需要更深层次的研究。

$\text{NO}_2^- \text{-N}$  的加入可以提高异养硝化菌氨氮降解速率的特性,使得异养硝化菌在强化短程硝化反硝化系统性能上有较大的应用潜力。在短程脱氮系统内投入异养硝化菌,系统内积累的  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  不仅可以加快氨氮的降解速度,缩短硝化反应的时间,而且由于

菌种的好氧反硝化能力,可以在硝化段完成对部分  $\text{NO}_2^-$ -N 的降解,从而降低硝化段完成时亚硝态氮的最大积累量,缩短反硝化的时间,提高系统的运行效率和处理能力。

### 3 结论

(1) 从活性污泥中筛选出 1 株耐盐异养硝化-好氧反硝化菌 qy37, 经形态观察、生理生化实验以及 16S rDNA 序列分析, 确定该菌属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。

(2) 在异养硝化系统内, 菌株 qy37 使  $\text{NH}_4^+$ -N 由 138.52 mg/L 降至 7.88 mg/L, COD 由 2408.39 mg/L 降至 1177.49 mg/L。没有检测出  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N 的最大积累量仅为 0.02 mg/L, 推测该菌具有特殊的氨氮代谢模式。

(3) 在好氧反硝化系统内, 菌株 qy37 在 24 h 内使  $\text{NO}_2^-$ -N 由 109.25 mg/L 降至 2.59 mg/L,  $\text{NH}_2\text{OH}$  最大积累量为 3.28 mg/L。

(4) 好氧反硝化作用在菌体生长量、COD 消耗量、 $\text{NH}_2\text{OH}$  积累量以及  $\text{NO}_3^-$ -N 产生量上都与异养硝化作用有较大的差异。认为好氧反硝化在菌体生长和能量利用方面比异养硝化更有效率。

(5) 发现异养硝化-好氧反硝化混合系统  $\text{NH}_4^+$ -N 去除速率比异养硝化系统的  $\text{NH}_4^+$ -N 去除速率快,  $\text{NH}_2\text{OH}$  积累量低于异养硝化和好氧反硝化系统, 而  $\text{N}_2\text{O}$  产生量却高于二者。

致谢: 本研究部分实验内容在国家海洋局第一海洋研究所完成, 在此感谢林学政研究员和徐国英同学的倾力相助。

#### 参考文献:

- [1] Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, et al. New concepts of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater [J]. FEMS Microbiol Rev, 2003, 27: 481-492.
- [2] Islam A, Chen D, White R E. Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils [J]. Soil Biol Biochem, 2007, 39(4): 972-975.
- [3] Burton J, Chen C, Xu Z, et al. Gross nitrogen transformations in adjacent native and plantation forests of subtropical Australia [J]. Soil Biol Biochem, 2007, 39(2): 426-433.
- [4] Katarzyna B, Irena W B. Carbon source in aerobic denitrification [J]. Biochem Eng J, 2007, 36: 116-122.
- [5] Morita M, Uemoto H, Watanabe A. Nitrogen-removal bioreactor capable of simultaneous nitrification and denitrification for application to industrial wastewater treatment [J]. Biochem Eng J, 2008, 41: 59-66.
- [6] Mia K, Seong Y J, Su J Y, et al. Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios [J]. J Biosci Bioeng, 2008, 106(5): 498-502.
- [7] Joo H S, Hirai M, Shodal M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4 [J]. J Biosci Bioeng, 2005, 100(2): 184-191.
- [8] Lin Y, Kong H N, He Y L, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor and isolation of heterotrophic nitrifying bacteria [J]. Jpn J Water Treat Biol, 2004, 40(3): 105-114.
- [9] Kim J K, Park K J, Cho K S, et al. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains [J]. Bioresource Technol, 2005, 3(29): 1897-1906.
- [10] 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. 78-159.
- [11] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984. 137-422.
- [12] 王术皓, 杜凌云, 张爱梅, 等. 利用偶联反应光度法测定羟胺体系的研究及其在应用 [J]. 分析科学学报, 2008, 16(4): 307-309.
- [13] 张光亚, 陈美慈, 闵航, 等. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析 [J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 156-161.
- [14] 王宏宇, 马放, 杨开, 等. 两株异养硝化细菌的氨氮去除特性 [J]. 中国环境科学, 2009, 29(1): 47-52.
- [15] Su J J, Yeh K S, Tseng P W. A strain of *Pseudomonas* sp. isolated from piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan [J]. Curr Microbiol, 2006, 53: 77-81.
- [16] Wehrfritz J M, Carter J P. Hydroxylamine oxidation in heterotrophic nitrate-reducing soil bacteria and purification of a hydroxylamine-cytochrome oxidoreductase from a *Pseudomonas* species [J]. Arch Microbiol, 1997, 166: 421-424.
- [17] Wehrfritz J M, Reilly A, Spiro S, et al. Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropa*, identification of electron acceptors that couple heterotrophic nitrification to aerobic denitrification [J]. FEBS Lett, 1993, 335(2): 246-250.
- [18] Robertson L A, Torremans R A, Rob A M, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropa* [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(11): 2812-2818.
- [19] Richardson D J, Wehrfritz J M, Keech A, et al. The diversity of redox proteins involved in bacterial heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. Biochem Soc T, 1998, 26(3): 401-408.
- [20] Moir J W B, Wehrfritz J M. The biochemical characterization of novel non-haem-iron hydroxylamine oxidase from *Paracoccus denitrificans* GB17 [J]. Biochem J, 1996, 319: 823-827.
- [21] 叶剑锋. 废水脱氮处理新技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006. 50-51.
- [22] Vadivelu V M, Keller J, Yuan Z G. Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic

- processes of an enriched *Nitrosomonas* culture [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **95**(5): 830-839.
- [23] 张云霞,周集体,袁守志. 高效亚硝酸型反硝化菌生长特性及脱氮研究[J]. *大连理工大学学报*, 2009, **49**(2): 180-185.
- [24] Castro M, Braker G, Farias L, *et al.* Communities of *nir* Stype denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific [J]. *Environ Microb*, 2005, **7**(9): 1298-1306.
- [25] 张小玲,张卫东,张玲,等. 好氧反硝化菌的选育及其初步应用[J]. *微生物学通报*, 2008, **35**(10): 1556-1561.
- [26] 蒋静艳,胡正华,黄耀. 异养硝化/好氧反硝化菌的分离鉴定及其在不同培养条件下产  $N_2O$  研究[J]. *环境科学*, 2009, **30**(7): 2105-2111.
- [27] 王宏宇,马放,苏俊峰,等. 好氧反硝化菌株的鉴定及其反硝化特性研究[J]. *环境科学*, 2007, **28**(7): 1548-1552.
- [28] Robertson L A, Cornelisse R, De V P, *et al.* Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1989, **56**(4): 289-299.
- [29] Robertson L A, Cornelisse R, Zeng R, *et al.* The effect of thiosulphate and other inhibitors of autotrophic nitrification on heterotrophic nitrifiers [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1989, **56**(4): 301-309.
- [30] 左薇. 一株好氧反硝化菌的筛选鉴定及其脱氮特性分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2006.
- [31] Fujiwara T, Fukumori Y. Cytochrome cb-type nitric oxide reductase with cytochrome c oxidase activity from *Paracoccus denitrificans* ATCC 35512 [J]. *J Bacteriol*, 1996, **178**(7): 1866-1871.
- [32] Moir J W, Baratta D, Richardson D J, *et al.* The Purification of a cd1 type nitrite reductase from the aerobic denitrifier *Thiophaea pantotropha* [J]. *Eur J Biochem*, 2003, **212**: 377-385.
- [33] 张培玉,郭艳丽,于德爽,等. 一株轻度嗜盐反硝化细菌的分离鉴定和反硝化特性初探[J]. *微生物学通报*, 2009, **36**(4): 581-586.