

反硝化细菌在污水脱氮中的作用

辛明秀^{1*} 赵颖² 周军² 高文臣¹

(北京师范大学生命科学学院 北京 100875) (北京城市排水集团有限责任公司 北京 100038)

摘要 反硝化是在反硝化细菌的作用下,以硝酸盐作为最终电子受体而进行的无氧呼吸过程。从污水脱氮的角度论述反硝化在污水脱氮中的作用、污水脱氮的机理、污水脱氮过程中反硝化作用的影响因素等。从反硝化的角度出发,论述了反硝化细菌的类群、反硝化作用的机理、反硝化细菌细胞中参与反硝化过程的关键酶。另外,还论述了近年来发现的有氧反硝化细菌、自养反硝化细菌及反硝化除磷细菌等方面的研究进展。

关键词 反硝化,反硝化细菌,污水脱氮

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0773-04

The Application of Denitrifying Bacteria in Denitrification of Wastewater

XIN Ming-Xiu^{1*}, ZHAO Ying², ZHOU Jun², GAO Wen-Chen¹

(College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875)

(Beijing Drainage Group Co. Ltd (BDG), Beijing 100038)

Abstract Denitrification plays an important role in wastewater treatment systems for the reason that the nitrate or nitrite was reduced, and some gases such as NO, N₂O or N₂ were released. The application of denitrification in wastewater, the mechanism of denitrification, and the effect factors of denitrification were introduced in this paper. The communities of Denitrifying bacteria, and some key enzymes of denitrification were also introduced. The discovery of aerobic denitrifying bacteria, autotrophic denitrifying bacteria, and denitrifying Phosphorus-removing Bacteria were also mentioned in this paper.

Key words Denitrification, Denitrifying bacteria, Denitrification of wastewater

反硝化(Denitrification)是在反硝化细菌的作用下,以硝酸盐作为最终电子受体而进行的无氧呼吸过程,结果使硝酸盐逐渐还原为NO、N₂O,最终变为N₂。反硝化在污水脱氮过程中具有重要意义。污水中的含氮有机物经过异养菌的氨化作用转变为氨氮,再经过硝化细菌的硝化作用将氨氮转变为亚硝酸盐和硝酸盐态氮,最后经过反硝化细菌的反硝化作用将亚硝酸盐和硝酸盐还原为NO、N₂O,并最终变为N₂,从而将含氮物质从污水处理系统中排出。反硝化细菌(Denitrifying bacteria)是一类兼性厌氧微生物,当处于缺氧环境时,反硝化细菌可用硝酸盐、氮化物等作为末端电子受体。有些反硝化细菌还能还原硝酸盐和亚硝酸盐,有些反硝化细菌只能将硝酸盐还原为亚硝酸盐^[1]。

1 反硝化细菌与污水脱氮

当环境中有分子态氧存在时,反硝化细菌氧化分解有机物,利用分子态氧作为最终电子受体。在无分子态氧存在下,反硝化细菌利用硝酸盐和亚硝酸盐作为电子受体,有机物则作为碳源及电子供体提供能量。在污水处理中,当溶解氧(DO)小于或等于0.5mg/L情况下,反硝化细菌利用污水中的有机碳源(污水中的BOD)作为氢供体,以硝酸态盐作为电子受体,将硝酸盐还原为NO、N₂O或N₂,这既可消除污水中的氮,又可恢复环境的pH稳定性,对污水处理系统的正常运行起重要作用。活性污泥系统中10%~90%的细菌具有反硝化能力。系统中缺乏供反硝化细菌利用的碳源物质通常导致反硝化效率降低。当缺乏有机物时,无机物如氢、Na₂S

* 通讯作者 Tel: 010-58805185, E-mail: xinmingxiu@bnu.edu.cn

收稿日期:2006-10-11, 修回日期:2007-03-28

等可作为反硝化反应的电子供体,微生物通过消耗自身的原生质进行内源反硝化,结果导致细胞质的减少,同时生成 NH_3 。因此污水处理系统中应在必要时及时加入一些甲醇等作为反硝化过程的电子供体。

在污水处理系统中反硝化细菌的种类很多,大约有 50 多个属,130 多个种。已经报道的包括无色杆菌属(*Achromobacter*),芽孢杆菌属(*Bacillus*),短杆菌属(*Brevibacterium*),肠杆菌属(*Enterbacter*),乳杆菌属(*Lactobacillus*),微球菌属(*Micrococcus*),假单胞菌属(*Pseudomonas*),螺菌属(*Spirillum*)等。有些种类在厌氧条件下既能进行反硝化,又能分解芳香化合物。如一株固氮弧菌和一株属于螺菌属的细菌能在反硝化条件下分解酚。这类反硝化细菌既可消除污水中的氮同时又消除了含氮的有毒有害污染物。污水处理系统中微生物的群落组成非常复杂,Hoshino 等用分子方法分析反硝化体系中微生物群落的组成成分^[2]。但活性污泥中存在的大量微生物是不可培养微生物,传统的培养方法不能真实反应活性污泥中反硝化细菌的真实情况^[3]。许多研究应用 16S rDNA 序列研究微生物的种群多样性,但反硝化细菌属于系统发育中不相关的种群,不适合用此方法来研究其种群结构,因此有人提出用功能基因来研究^[4]。这些功能基因包括细胞周质空间及细胞膜结合的硝酸盐还原酶基因(*napA* 和 *narG*)、含有细胞色素 *cd1* 和 *Cu* 的亚硝酸盐还原酶(*nirS* 和 *nirK*)基因以及一氧化氮还原酶基因(*nosZ*)等。

2 影响污水脱氮过程中反硝化反应的因素

2.1 有机碳源

一般认为,当污水中的 $\text{BOD}_5/\text{T-N}$ 值 $> 3 \sim 5$ 时,即可认为碳源是充足的,此时不需要补充外加碳源。甲醇作为碳源时反硝化速率高,被分解后的产物为 CO_2 和 H_2O ,但处理费用较高。污水处理系统中碳源的种类不同可导致反硝化细菌的类群及反硝化活性不同。

2.2 pH 值

反硝化过程最适宜的 pH 范围为 6.5 ~ 7.5,不适宜的 pH 值会影响反硝化细菌的生长速率和反硝化酶的活性。当 pH 值低于 6.0 或高于 8.0 时,反应

受到强烈抑制。反硝化反应对 NO_3^- 或 NO_2^- 的消耗有助于 pH 值保持在所需范围内并可补充在硝化过程中消耗的一部分碱度。

2.3 温度

反硝化细菌适宜的生长温度在 $25^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ 之间,低于 15°C 时增殖速率和代谢速率降低,导致反硝化速率降低。实际中反硝化一般控制在 $15^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 。

2.4 溶解氧

当同时存在分子态氧和硝酸盐时,反硝化细菌优先进行有氧呼吸。微生物从有氧呼吸转变为无氧呼吸的关键是合成无氧呼吸的酶,而分子态氧的存在会抑制这类酶的合成及活性。为了保证反硝化过程的顺利进行,必须保持严格的缺氧状态。一般认为,系统中溶解氧保持在 0.5mg/L 以下时反硝化才能正常进行^[5]。

另外,一些其它因素如污水中有毒有害物质、盐度等都会影响反硝化过程的进行,如随着污水中盐度的增加,反硝化活性逐渐降低^[6]。

3 参与反硝化过程的酶

反硝化过程是在一系列酶的催化下将硝酸盐逐渐还原的过程^[7]。在这一过程中硝酸盐代替氧作为电子受体。硝酸盐还原酶催化硝酸盐还原为亚硝酸盐。根据微生物不同,亚硝酸盐(NO_2^-)变为 NO ,或者由 *cd1* 或 *Cu*-亚硝酸盐还原酶催化。 NO 变为 N_2O 由含有细胞色素 *bc* 的 NO 还原酶催化, N_2O 转变为 N_2 由含有 *Cu* 的 N_2O 还原酶催化。到目前为止发现每个细菌中并不含有全部这些还原酶。对硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶了解的相对清楚,对 NO 和 N_2O 还原酶的了解则较少。

3.1 硝酸盐还原酶

在反硝化细菌中发现两种类型的硝酸盐还原酶,一种与细胞膜相连接,另一种位于周质空间。膜结合的硝酸盐还原酶已经在铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*),施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*),荧光假单胞菌(*P. fluorescens*),大肠杆菌(*E. coli*)等进行了研究。膜结合的硝酸盐还原酶含有 3 个亚基,其中的 α 亚基是催化亚基,是这个酶的活性位点。 α 亚基由 *narG* 编码,可溶的 β 亚基由 *narH*

编码,含有4个[4Fe-4S]簇。 γ 亚基,由 *narI* 编码,含有2个b型血红素。膜结合的硝酸盐还原酶形成2个结构域, α 和 β 组成细胞质结构域, γ 亚基组成膜结构域, γ 亚基对于 α 和 β 与细胞膜内侧细胞质的吸附起作用,即通过 γ 亚基与细胞膜相连, γ 亚基接受电子并把电子传递给 β 亚基(通过b-血红素)。

周质空间硝酸盐还原酶由2个亚基组成,NapA和NapB^[8]。前者是大亚基,含有钼辅因子和一个[4Fe-4S]₂,NapB是一个C-型细胞色素,NapC是推测的膜结合的亚基,其功能是作为电子传递体。*nap*基因簇已经在许多反硝化细菌中发现,包括富养罗斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*),脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)等。膜结合的和周质空间硝酸盐还原酶在蛋白质结构、基因组成和生物化学特性都存在许多差异。膜结合的酶能还原氯酸盐,以NADPH作为电子供体,其活性被低浓度的叠氮化合物所抑制。周质空间硝酸盐还原酶不能以NADPH作为电子供体,对低浓度叠氮化合物不敏感。

在可进行有氧反硝化的脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)中两种类型的酶都存在,其中周质空间硝酸盐还原酶在好氧和厌氧条件下都能表达,但在厌氧条件下,大多数硝酸盐还原酶的活性是由膜结合的硝酸盐还原酶所体现,因此推测周质空间硝酸盐还原酶在有氧条件下催化第一步反应。

3.2 亚硝酸盐还原酶

在反硝化细菌的功能基因中研究最多的是亚硝酸盐还原酶基因^[9]。亚硝酸盐还原酶是反硝化途径的关键酶^[10],已作为反硝化细菌的分子标记用于研究其种群结构及多样性。不同反硝化细菌中存在两个独特类型的亚硝酸盐还原酶(NirS和NirK),尽管这两种类型的酶在结构等方面存在差异,但它们执行相同的生理功能。这两个酶分布于分类地位不相关的微生物种群中,也可发现于同一种微生物的不同菌株中。NirS的分布更广,在已经研究过的反硝化细菌中,只有30%的菌株含有NirK。NirS和NirK表现出不同的免疫学和分子量特性。研究反硝化细菌亚硝酸盐还原酶基因*nirK*和*nirS*主要是根据变形菌纲(Proteobacteria)设计探针。SARA HALLIN等根据*nirK*和*nirS*基因设计了两套PCR引物研究污水处理系统反硝化细菌的种群。Xueduan Liu等通过PCR方法用*nir*基因研究

了墨西哥大陆边缘沉积物中反硝化细菌中反硝化基因的分子多样性。燕永亮等对*nir*及相关基因进行了基因结构分析^[11]。这些研究为进一步探索反硝化机制奠定了基础。

4 有氧反硝化细菌

许多微生物能有氧呼吸,同时反硝化。从污水中分离的副球菌属的细菌(*Paracoccus pantotrophus*)是首先被描述的有氧反硝化细菌,硝酸盐或亚硝酸盐还原为N₂可在大气氧存在情况下发生。施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)是另一个报道的有氧反硝化细菌,对氧的耐受力要超过*Paracoccus pantotrophus*。有氧反硝化细菌的许多问题还需深入研究。*Paracoccus pantotrophus*在有氧条件下不表达亚硝酸盐还原酶,所以有氧条件下还原亚硝酸盐的机制还不清楚。大多数反硝化细菌在有氧条件下产生N₂O而不是N₂。Naoki Takaya等研究检测到两株细菌使硝酸盐还原需要氧,也属于有氧反硝化细菌^[12]。由于有氧反硝化细菌在环境中的特殊意义,对其进行研究受到广泛关注^[13]。

5 自养反硝化细菌^[14]

近年来发现一些自养细菌能够利用一些无机物(CO₂,HCO³⁻)在氧化过程中释放出来的能量将硝酸盐还原,进行反硝化作用,这类细菌称为自养反硝化细菌。由于不需要投放有机物作为碳源可节省开支,同时由于只产生极少量的污泥,可使污泥的处理量降低到最低。因此,自养反硝化细菌在污水脱氮中具有重要意义。倍受关注的自养反硝化细菌有脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)和反硝化硫微螺菌(*Thiomicrospira denitrificans*)。

6 反硝化除磷细菌

污水生物除磷是非常经济有效的方法,聚磷菌需要交替的好氧和厌氧条件,在厌氧区释放磷,而在好氧区则在细胞中合成并积累多聚磷酸盐。最近发现一些聚磷菌在好氧或缺氧条件下以硝酸盐作为电子受体而积累磷^[15]。这类细菌被称为反硝化除磷细菌(Denitrifying Phosphorus-removing Bacteria)。反硝化除磷细菌能在聚磷的同时进行硝酸盐的去除,而不需要厌氧和好氧的相互交替。反

硝化除磷细菌的发现可在理论上探讨反硝化细菌和除磷细菌之间的关系,在实际中可探讨污水脱氮除磷的新机制和新工艺。

7 存在问题及展望

7.1 硝化作用与反硝化作用的动态平衡

反硝化是污水脱氮的最后环节,硝化作用和反硝化作用必须处于动态的平衡过程才能保证良好的污水脱氮效果。硝化作用和反硝化作用分别由硝化细菌和反硝化细菌完成,而这两类细菌分别要求不同的环境条件。因此,如何在污水处理的不同区段创造适宜的环境条件,分别满足硝化细菌和反硝化的生长繁殖成为提高污水脱氮效率的关键。

7.2 反硝化细菌的优势种群与季节的变化规律

在污水处理系统中存在许多种类的反硝化细菌,其种群随季节等环境条件的变化而发生。因此发现每个季节污水处理系统中发挥主要作用的优势种群并创造适宜环境是很重要的。我们从2004年开始对污水处理系统中反硝化细菌的数量、种群及不同季节的优势种类进行了初步研究,为深入研究反硝化细菌及在污水脱氮中的作用奠定了基础。

7.3 低温反硝化细菌的研究

在北方地区,除夏季外环境温度都很低,导致反硝化细菌生长繁殖慢,反硝化活性低。我们从北京某污水处理厂取样进行低温反硝化细菌的分离筛选,并通过16S rDNA序列分析方法对所分离的反硝化细菌进行了初步鉴定。发现低温反硝化细菌在污水处理系统中是存在的,所分离的反硝化细菌在实验室条件下,在5℃~10℃具有反硝化的活性(未发表)。

7.4 反硝化细菌基础研究

近年来,虽然发现了不同类型的反硝化细菌,但这些反硝化细菌如何成为反应体系中的优势种群而发挥反硝化作用以及如何根据这些新的反硝化细菌的生物学和生态学特性建立新的脱氮工艺是问题的关键所在。因此,开展反硝化细菌进行反

硝化作用的分子机理、生物学特性和生态学研究,可为使其成为污水处理系统中的优势种群而奠定理论基础。

有氧反硝化细菌、自养反硝化细菌和脱氮除磷细菌的发现丰富了反硝化细菌的研究内容,也增加了对反硝化过程新的认识,同时也为有效控制反硝化活性及污水脱氮开拓了新的途径。通过研究反硝化细菌的生态及生物学特性,改变环境条件,使反硝化细菌充分发挥作用,将对于提高污水脱氮水平发挥重要作用。

参考文献

- [1] Dong Y L, Adela R, Lee M, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2002, **68**(5): 2140 ~ 2147.
- [2] Hoshino T, Terahara T, Tsuneda S, *et al.* J of Appl Microbiol, 2005, **99**: 1165 ~ 1175.
- [3] Binbin Liu, Feng Zhang, Xiaoxi Feng, *et al.* FEMS Microbiol Ecol, 2006, **55**: 274 ~ 286.
- [4] Gesche B, Jizhong Z, Liyoul W, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, **66**: 2096 ~ 2104.
- [5] McKenney D J, Drury C F, Wang S W. Soil Sci Soc AM J, 2001, **65**: 126 ~ 132.
- [6] Yoshie S, Ogawa T, Makino H, *et al.* Letters in Appl Microbiology, 2006, **42**: 277 ~ 283.
- [7] Walter G Zumft. Micro and Mol Biology Review, 1997, **61**(4): 533 ~ 616.
- [8] Laura B, Tao W, Rick W Y E. J of Bacteriology, 1999, **181**(9): 2802 ~ 2806.
- [9] Hubertus J E B, Norman G H, Luis A S-S, *et al.* J of Bacteriology, 2002, **184**(9): 2557 ~ 2560.
- [10] Gesche B, Jizhong Z, Liyoul W, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, **66**(5): 2096 ~ 2104.
- [11] 燕永亮, 杨 剑, 陈立宏, 等. 中国科学 C 辑 生命科学, 2005, **35**(3): 246 ~ 253.
- [12] Naoki T, Maria A B, Catalan S, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2003, **69**: 3152 ~ 3157.
- [13] Qin X K, Xin W W, Min J, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 2006, **260**: 150 ~ 155.
- [14] 任延丽, 靖元孝. 微生物学杂志, 2005, **25**(2): 88 ~ 92.
- [15] Yoram B, Jaap V. Appl Environ Microbiol, 2000, **66**: 1209 ~ 1212.