



Pseudomonas oryzae EN-F4 菌株的脱氮特征及羟胺对其脱氮过程的促进作用

谢尧旭, 张漫漫, 何腾霞*, 卢海凤, 陈亚

贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室,
贵州 贵阳 550025

谢尧旭, 张漫漫, 何腾霞, 卢海凤, 陈亚. *Pseudomonas oryzae* EN-F4 菌株的脱氮特征及羟胺对其脱氮过程的促进作用[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 3858-3875.

XIE Yaoxu, ZHANG Manman, HE Tengxia, LU Haifeng, CHEN Ya. Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas oryzae* EN-F4 with/without the supplementation of hydroxylamine[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 3858-3875.

摘要: 【目的】异养硝化-好氧反硝化(heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, HN-AD)微生物在生物脱氮中具有重要作用, 而能同时去除废水中多种无机氮尤其是羟胺的 HN-AD 微生物报道较少。本研究从菜地中分离筛选出一株能同时去除羟胺和亚硝酸盐的 HN-AD 菌株 EN-F4, 探究其脱氮特征以及羟胺对其脱氮过程的影响, 为提高废水处理效率奠定基础。【方法】通过形态学和 16S rRNA 基因测序对该菌株进行鉴定, 并利用批量试验研究该菌株的脱氮特征, 结合氮平衡、酶活性和特异性酶抑制剂探索菌株的 HN-AD 机理, 最后通过添加羟胺研究其对不同氮源转化的影响。【结果】菌株 EN-F4 经鉴定为栖稻假单胞菌(*Pseudomonas oryzae*), 该菌株在 25 °C 条件下对铵盐、羟胺、亚硝酸盐和硝酸盐的去除效率分别为 99.27%、99.13%、87.01% 和 85.20%, 对应的最大去除速率分别为 8.27、1.85、5.10 和 5.31 mg/(L·h)。更突出的是, 外加羟胺后不会抑制该菌的反硝化能力, 反而促进了亚硝酸盐和总氮的去除, 其最大去除速率分别提升至 7.80 mg/(L·h) 和 7.51 mg/(L·h)。结合酶活性的成功检测、氮平衡和 HN-AD 特异性酶抑制剂分析证实了菌株具有优异的 HN-AD 能力。【结论】菌株 *Pseudomonas oryzae* EN-F4 可以在 25 °C 条件下高效地进行 HN-AD 去除废水中的多种无机氮, 且羟胺能显著促进亚硝酸盐和总氮的去除。

资助项目: 国家自然科学基金(42007223, 42167019); 贵州省科技计划(黔科合基础-ZK[2021]一般 233); 贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2021]086); 贵州大学培育项目(贵大培育[2019]50 号); 大学生“SRT 计划”(贵大 SRT 字[2022]443 号)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42007223, 42167019), the Guizhou Science and Technology Program (ZK [2021] General 233), the Growth Project of Young Scientific and Technological Talents in General Colleges and Universities in Guizhou (KY [2021] 086), the Cultivation Project of Guizhou University ([2019] No. 50), and the “SRT Plan” Project for College Students ([2022] 443 of Guizhou University).

*Corresponding author. E-mail: txhe@gzu.edu.cn

Received: 2023-02-21; Accepted: 2023-05-18; Published online: 2023-05-29

关键词: *Pseudomonas oryzae*; 异养硝化-好氧反硝化; 酶活; 抑制剂; 氮平衡

Nitrogen removal characteristics of *Pseudomonas oryzae* EN-F4 with/without the supplementation of hydroxylamine

XIE Yaoxu, ZHANG Manman, HE Tengxia*, LU Haifeng, CHEN Ya

Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), College of Life Sciences/Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: [Objective] The microorganisms with the function of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification (HN-AD) play a key role in the biological removal of nitrogen, while little is known about the HN-AD microorganisms capable of simultaneous removing multiple inorganic nitrogen sources, especially hydroxylamine, from wastewater. In this study, a HN-AD strain EN-F4 capable of simultaneous removing hydroxylamine and nitrite was isolated from a vegetable field. We explored its nitrogen removal characteristics and the effects of hydroxylamine on the nitrogen conversion process, aiming to lay a foundation for improving the efficiency of wastewater treatment. [Methods] The strain EN-F4 was identified based on morphological characteristics and 16S rRNA gene sequence. Batch experiments were carried out to determine the nitrogen conversion characteristics of the strain EN-F4. The nitrogen balance, enzyme activity, and specific enzyme inhibitor tests were conducted to decipher the HN-AD mechanism of the strain EN-F4. Finally, the effects of hydroxylamine addition on the conversion of different nitrogen sources were explored. [Results] The isolate EN-F4 was identified as *Pseudomonas oryzae*. The strain cultured at 25 °C showed the ammonium, hydroxylamine, nitrite, and nitrate removal efficiencies of 99.27%, 99.13%, 87.01%, and 85.20% and the maximum nitrogen removal rates of 8.27, 1.85, 5.10, and 5.31 mg/(L·h), respectively. The addition of hydroxylamine did not inhibit the denitrifying ability of the strain EN-F4, while it promoted the removal of nitrite and total nitrogen by the strain, with the maximum removal rates reaching 7.80 and 7.51 mg/(L·h), respectively. The enzyme activity, nitrogen balance, and specific enzyme inhibitors confirmed the strong HN-AD capability of the strain. [Conclusion] *Pseudomonas oryzae* EN-F4 could efficiently remove inorganic nitrogen sources from wastewater by HN-AD at 25 °C, and hydroxylamine could significantly promote the removal of nitrite and total nitrogen.

Keywords: *Pseudomonas oryzae*; heterotrophic nitrification-aerobic denitrification (HN-AD); enzyme activity; inhibitors; nitrogen balance

氮作为植物生长的必需养分之一,是一种不可或缺的化学元素。近年来,人们为了使农作物增产大量施用氮肥,但作物不能完全吸收利用全部的氮,导致过剩的氮积累在土壤中,经微生物作用被转化为无机氮随雨水流入地表水和地下水中,继而导致水质恶化并危害人类健康^[1]。氮污染废水中主要污染物包括铵、羟胺、硝酸盐和亚硝酸盐。据报道,铵态氮对水生生态系统具有较强的破坏性^[2];羟胺不仅对植物有害,还会抑制微生物的生长,进而降低微生物的脱氮效率^[3-5];亚硝酸盐和硝酸盐对人类健康具有较大的危害,过量的亚硝酸盐和硝酸盐会阻断正常的氧气运输,诱导高铁血红蛋白血症^[6-7],还可能会导致甲状腺肿大、癌症以及生殖和发育毒性等疾病^[8-11]。因此,高效去除污水中的含氮污染物成为了近年来的热点研究,在污水脱氮方法中,微生物脱氮技术因其简单高效、成本低廉且无二次污染等优点深受广大研究人员的青睐,俨然成为了含氮污水治理中有效方式之一。

随着研究的深入,异养硝化-好氧反硝化(heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, HN-AD)微生物的发现进一步提高了废水脱氮效率。目前已被分离出的大部分 HN-AD 微生物如不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[12]、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[13]、红球菌属(*Rhodococcus*)^[14]和假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[5]等均能在好氧条件下去除废水中的无机氮。然而,这些微生物在脱氮过程中普遍存在无机氮去除速率低下、亚硝酸盐大量积累、羟胺不能去除、多种氮源去除受限,以及有毒物质羟胺或亚硝酸盐抑制脱氮效率等现象。例如,在优化条件下,菌株 *Pseudomonas* sp. DM02 在 12 h 内仅去除 10 mg/L 的铵^[15];菌株 *P. stutzeri* C3 在好氧反硝化过程中有大量亚硝酸盐累积^[16];菌株 *P. mendocina* X49、*P. stutzeri* GEP-01 和 *Zobellella taiwanensis* DN-7 均不能去

除羟胺^[17-19];菌株 *Alcaligenes faecalis* No.4 和 *A. faecalis* NR 不能去除硝态氮和亚硝态氮^[20-21];菌株 *P. stutzeri* T13 在 HN-AD 过程中,累积的亚硝酸盐会显著降低总氮的去除效率等^[22]。因此,分离筛选出一株不受各种氮形式及浓度限制并且能够高效去除一种或多种氮源的 HN-AD 菌株是非常迫切的。

本研究利用羟胺和亚硝酸盐为混合氮源从菜地中分离筛选出一株 HN-AD 菌株 EN-F4,并通过形态学观察、16S rRNA 基因测序分析及系统发育树的构建对该菌株进行鉴定;采用不同的无机氮(铵、羟胺、亚硝酸盐和硝酸盐)为唯一氮源,探究菌株 EN-F4 的异养硝化和好氧反硝化能力;通过中间产物检测、氮平衡分析、相关酶活性以及酶抑制剂测定来探索菌株 EN-F4 的脱氮特征。本研究结果对提高废水处理效率具有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

样品采于中国贵州省锦屏县菜地。

1.1.2 培养基^[5]

Luria-Bertani (LB)液体培养基(g/L): 10.0 氯化钠, 10.0 胰蛋白胨, 5.0 酵母浸粉, pH 值 7.2。该培养基用于活化及培养细菌。

富集培养基(g/L): 0.098 6 NaNO₂, 0.049 6 HONH₃Cl, 0.014 CaCl₂, 0.04 MgSO₄, 3.5 K₂HPO₄, 1.5 KH₂PO₄, 0.009 Fe₂(SO₄)₃, 1.836 C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, pH 值 7.2。该培养基用于分离细菌。

溴麝香草酚蓝(BTB)固体培养基(g/L)^[23]: 1 KH₂PO₄, 0.236 (NH₄)₂SO₄, 0.488 MgSO₄, 0.094 CaCl₂, 0.592 FeSO₄·7H₂O, 2.45 C₆H₅Na₃O₇, 18 agar, BTB (1.5%乙醇)试剂 1 mL, pH 值 7.0。

该培养基用于菌株 EN-F4 的形态鉴定。

硝化培养基(g/L): 0.099 2 HONH₃Cl 或 0.236 (NH₄)₂SO₄ 或混合的 0.236 (NH₄)₂SO₄ 和 0.049 6 HONH₃Cl, 3.5 K₂HPO₄, 0.04 MgSO₄, 0.009 Fe₂(SO₄)₃, 0.014 CaCl₂, 1.5 KH₂PO₄, 1.225/3.064/3.676 C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, pH 值 7.2。该培养基用于评估菌株的异养硝化能力。

反硝化培养基(g/L): 0.361 KNO₃ 或 0.246 NaNO₂ 或混合的 0.361 KNO₃ 和 0.246 NaNO₂, 3.5 K₂HPO₄, 0.009 Fe₂(SO₄)₃, 1.5 KH₂PO₄, 0.04 MgSO₄, 0.014 CaCl₂, 3.064/3.064/6.127 C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, pH 值 7.2。该培养基用于评估菌株的好氧反硝化能力。

羟胺的影响培养基(g/L): 0.049 6 HONH₃Cl, 0.236 (NH₄)₂SO₄ 或 0.361 KNO₃ 或 0.246 NaNO₂, 0.014 CaCl₂, 0.009 Fe₂(SO₄)₃, 3.5 K₂HPO₄, 1.5 KH₂PO₄, 0.04 MgSO₄, 3.676 C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, pH 值 7.2, 该培养基用于评估羟胺对其他无机氮的影响。

以上所有培养基均在 0.11×10³ Pa、121 °C 条件下灭菌 30 min, 冷却后备用。

1.2 菌株分离筛选与鉴定

在 250 mL 锥形瓶中加入 100 mL 含有羟胺和亚硝酸盐的灭菌培养基, 从采集的湿土样中取约 1 g 样品至富集培养基中培养 3 d (25 °C、150 r/min)。取富集培养后的培养基置于新鲜培养基中继续培养, 培养条件不变, 此操作重复 3 次。取 5 μL 细菌悬浮液涂布在 LB 和 BTB 固体培养基平板上, 在 25 °C 条件下培养 3 d, 选择其中能使 BTB 培养基变蓝的菌落, 用重复平板划线法对菌落进行纯化分离。从分离出的菌株中挑选出羟胺(NH₂OH)和亚硝酸盐(NO₂⁻-N)去除效率最高的菌株作为 HN-AD 候选菌株, 并将其保存在 30%甘油溶液(-20 °C)中。分别使用扫描电子显微镜(SU8100, 日立)和光学显微镜(Olympus

BX53-DIC, 东京)来观察候选细菌的革兰氏染色和形态。再用细菌 DNA 提取试剂盒(Magen)从候选菌株中提取总 DNA, 采用 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R^[24]进行聚合酶链式反应(PCR)扩增(CFXConnect&T100)。PCR (25 μL)反应体系参照 Zhang 等^[5]的报告。PCR 产物经凝胶电泳后, 由上海生工生物技术有限公司进行测序, 获得 16S rRNA 的全长基因序列, 并将其提交至 GenBank 获得登录号, 通过 BLAST 同源性检索与其他序列进行比较, 采用软件 MEGA 6.0 中 Clustal X 程序进行多重序列比对分析, 通过 neighbor-joining 方法构建进化树, 对候选菌株进行分析鉴定。

1.3 对菌株脱氮能力的评估

将菌株 EN-F4 接种到 LB 液体培养基中, 在 25 °C、150 r/min 摇床活化 24 h^[3]; 在 6 500 r/min 条件下离心 5 min (25 °C), 再用 20 mL 灭菌纯水洗涤细菌 3 次, 分别接种于 100 mL 硝化和反硝化培养基中。在去除铵盐、硝酸盐和亚硝酸盐培养基中, 菌株 EN-F4 的初始接种量控制在 0.2 (细胞光密度, OD₆₀₀)左右, 在去除羟胺培养基中, 其 OD₆₀₀ 控制在 0.5 左右。随后振荡培养接种后的培养基, 每隔 6 h 从含有不同氮源的培养基中采集培养液, 测定 pH、OD₆₀₀ 和铵(NH₄⁺-N)、羟胺(NH₂OH)、硝酸盐(NO₃⁻-N)、亚硝酸盐(NO₂⁻-N)和总氮(TN)浓度。选用 pH 计(DDS-307A)测定样本 pH 值。用分光光度计(Metash UV-6000)测定 OD₆₀₀ 和各种无机氮浓度。分别采用靛酚蓝紫外分光光度法、8-羟基喹啉紫外分光光度法、紫外分光光度法、N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法和碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定铵盐、羟胺、硝酸盐和亚硝酸盐和总氮浓度^[25]。氮的去除效率和速率分别用公式: $E_f = (R_1 - R_2) / R_1$, $E_{f1} = (R_1 - R_2) / h$ 计算^[26], 其中 E_f 、 E_{f1} 、 R_1 、 R_2 和 h 分别表示无机氮的去除效率、氮的去除速

率、初始氮浓度、最终氮浓度和培养时间^[27]。所有试验重复 3 次。

1.4 羟胺对其他无机氮转化的影响分析

将浓度为 10 mg/L 的羟胺分别加入到含铵、硝酸盐和亚硝酸盐的培养基中,培养方法和测定方法与 1.3 一致。所有试验重复 3 次。

1.5 氮平衡

运用 2.2 的接种方法,将菌种分别接种于 4 种分别以铵、羟胺、硝酸盐和亚硝酸盐为单一氮源的硝化和反硝化培养基中,在每个测试的初始(0 h)和结束时收集合成废水中的细菌悬浮液,每次取出约 6 mL 的细菌悬液,并以 6 500 r/min 离心 5 min。测定初始培养时间的 TN 浓度(标记为 Initial TN1)和无机氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 NH_2OH 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$)浓度。使用 300 W 的功率以及间隔/超声时间都为 3 s 的 JY92-IIN 超声(Scientz-IID, JY92-IIN, 宁波新芝生物科技股份有限公司)处理将每种细菌悬液的另外 6 mL 等分试样超声处理 15 min,以破坏细胞并释放细胞内氮,再使用 0.22 mm 的过滤器过滤离心后的上清液,然后测定初始培养时间的 TN (标记为 Final TN1)和无机氮浓度。分别用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 HONH_3Cl 、 KNO_3 或 NaNO_2 作为单一氮源培养样品 12、30、12 和 12 h,然后对每个样品执行上述程序,以确定最终无机氮、Initial TN2、Final TN2 和无机氮含量,无机氮 Final ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 NH_2OH 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$)的氮平衡计算参照 He 等^[28]的研究。

1.6 酶活性

将菌株 EN-F4 分别转接至含铵、羟胺、硝酸盐和亚硝酸盐培养基中培养 5、10 和 8 和 15 h 后,在 6 500 r/min、25 °C 条件下离心 5 min 后获得细菌上清液。通过 BCA 细菌蛋白质提取试剂盒(Solarbio)检测总蛋白浓度。关键硝化酶氨单加氧酶(AMO)活性被送至贵州为莱科技有限责

任公司进行检测。使用亚硝酸盐还原酶活性测定试剂盒(COMIN)检测亚硝酸盐还原酶 NIR 活性。为了测定羟胺氧化还原酶(HAO)活性,使用亚硝酸盐还原酶试剂盒中的提取液及破碎条件将菌株 EN-F4 细胞裂解。配制 HAO 的反应体系(20 mL)包含 EDTA (0.04 mmol/L)^[29]、酶提取物、 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (0.01 mol/L)、Tris-HCl (10 mmol/L)和 HONH_3Cl (15 mg/L)。在 25 °C 条件下培养反应 15 min 后,通过检测羟胺的减少量来评估 HAO 活性。NR 的反应体系(20 mL)包含硝酸盐 (20 mg/L)、酶提取物、Tris-HCl (10 mmol/L)和 NADH (0.2 mmol/L)。用硝酸盐的减少量来评估 NR 的酶活性。

酶活力单位(U)的定义为在特定条件下,每分钟转化 1 μmol 底物所需的酶量,酶的比活性(U/mg)的计算方式是每毫克蛋白质所含的酶活力单位数。对照组不含酶提取物。

1.7 HN-AD 相关酶抑制剂评估

为了进一步探究菌株 EN-F4 的关键酶活性,使用特异性硝化抑制剂二乙基二硫代氨基甲酸 DDC (0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L)和 1-辛炔 OCT (0、4.0、8.0、12.0 和 16.0 mmol/L)探究其对 AMO 的抑制效果;使用 Na_2WO_4 (0、0.85、1.70、2.55 和 3.40 mmol/L)和原花青素(0、0.042、0.084、0.126 和 0.168 mmol/L)做硝酸盐还原酶 NR 的抑制剂,探究其抑制效果;使用 DDC (0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L)做亚硝酸盐还原酶 NIR 的抑制剂,探究其抑制效果。对照组中不添加抑制剂。铵、硝酸盐和亚硝酸盐的初始浓度固定在 50 mg/L,接种方式与 1.2 相同,通过各无机氮的去除情况以评估抑制剂对菌株关键酶活性的抑制效果^[26]。

1.8 统计处理和图形制作

使用 Excel 和 SPSS Statistics 软件进行数据统计分析。MEGA 7.0 和 Origin2021 制作相关图

形。本研究的所有结果均表示为平均值±标准差。

2 结果与讨论

2.1 菌株 EN-F4 的鉴定

经过初步筛选,从土壤样品中分离出数十株菌株,其中菌株 EN-F4 表现出能同时且高效去除羟胺(NH_2OH)和亚硝酸盐(NO_2^- -N)的脱氮能力,将该菌株纯化并作为候选菌株。经观察菌株的形态发现,菌株 EN-F4 的菌落呈黄色、圆形、中间凸起、边缘规则、表面光滑湿润且在 BTB 和 LB 培养基上不透明。经革兰氏染色发现菌株 EN-F4 为阴性,无鞭毛。将测序获得的 16S rRNA 的核苷酸序列提交至 GenBank 中获得菌株 EN-F4 的登录号: OP891013。通过 BLAST 的同源性检索表明菌株 EN-F4 与 *Pseudomonas oryzae* 的相似度高达 99%。基于菌株 EN-F4 和其他相关菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树,进一步说明了细菌 EN-F4 与 *P. oryzae* OR204 菌株密切相关。以上结果说明,菌株 EN-F4 为 *P. oryzae* EN-F4。此前,已有许多研究证明假单胞菌属中许多菌株具有 HN-AD 能力,如 *P. taiwanensis* EN-F2^[5]、*P. tolaasii* Y-11^[27]、*P. stutzeri* YG-24^[30] 和 *P. aeruginosa* P-1^[24]等,据了解,*P. oryzae* 在羟胺存在下的氮去除研究未见报道。

2.2 异养硝化能力评价

在有氧条件下,以铵态氮为单一氮源研究菌株 EN-F4 的异养硝化特征,每间隔 6 h 对菌株 EN-F4 的细胞生长、中间代谢产物、铵和总氮的含量进行检测,结果如图 1A 所示。菌株 EN-F4 接种到培养基后直接进入对数生长期,培养 6 h 后, OD_{600} 从 0.21 增至 0.96。随着细菌的生长, 53.40 mg/L 的初始铵态氮被去除了 92.89%, 最大去除速率高达 8.27 mg/(L·h), 显著高于菌株 *T. pantotropha* [5 mg/(L·h)]^[31]、*Rhizobium* sp.

WS7 [3.18 mg/(L·h)]^[32]、*Pseudomonas* sp. ADN-42 [1.38 mg/(L·h)]^[33] 和 *Rhodococcus* sp. CPZ24 [3.1 mg/(L·h)]^[14]。培养 12 h 后,铵几乎被完全去除(99.27%),值得注意的是,铵可能在 6–12 h 之间已经被完全去除,12 h 检测到的铵态氮可能是细菌死亡分解后释放到培养基中的铵^[30],且 12 h 后铵浓度会随着培养时间逐渐升高。随着铵态氮的去除,总氮浓度(53.49 mg/L)显著降低至 5.35 mg/L,去除率和速率分别高达 90.00%和 7.80 mg/(L·h),总氮的去除速率均高于上述已报道的生物脱氮菌,表明了菌株 EN-F4 能高效地将大部分铵态氮转化为气态氮。在铵态氮去除的过程中,未检测到羟胺的积累,只在培养 6 h 时检测到 0.10 mg/L 的亚硝酸盐以及 4.49 mg/L 的硝酸盐,随后被消耗,亚硝酸盐与 *Pseudomonas taiwanensis* EN-F2 菌株的变化趋势类似^[5]。说明菌株 EN-F4 在进行硝化的同时也能执行反硝化作用去除硝酸盐和亚硝酸盐^[34],因此没有中间产物的积累。由于反硝化产碱,pH 值从 7.19 升至 9.03。以上所有结果表明,菌株 EN-F4 能高效进行以铵态氮为单一氮源的异养硝化且无中间代谢产物的积累。

羟胺是硝化过程的中间产物,在含氮废水中普遍存在。研究表明,羟胺的存在会抑制反硝化细菌的繁殖^[4],过量的羟胺会抑制脱氮过程,甚至导致反硝化细菌死亡^[20,35-36],故目前报道的大部分微生物均不能在羟胺存在的情况下生长繁殖并将其去除。为了验证菌株 EN-F4 是否具有去除羟胺的能力,本研究以盐酸羟胺为唯一氮源进一步探索菌株的异养硝化能力。结果如图 1B 所示,把菌株 EN-F4 接种至含羟胺培养基 30 h 后, OD_{600} 从 0.45 上升至 0.61, pH 值从 7.17 上升至 8.00。随着菌株的生长,羟胺浓度(22.94 mg/L)也显著降低至 0.20 mg/L,去除率和最大去除率分别是 99.13%和 1.85 mg/(L·h),羟胺的最大

去除速率远高于 *Glutamicibacter arilaitensis* EM-H8 [0.21 mg/(L·h)]^[37]、*Pseudomonas putida* Y-9 [0.028 mg/(L·h)]^[38]和 *Photobacterium* sp. NNA4 [0.7 mmol/(L·h)]^[39], 这种现象打破了羟胺存在下微生物不能生长并将其去除的局限性。总氮的去除率为 22.09%, 最大去除速率为 2.31 mg/(L·h), 均高于上述菌株。在去除羟胺的过程中, 亚硝酸盐积累在 18 h 达到峰值(15.91 mg/L), 30 h 降至 2.43 mg/L。这种现象与 *Photobacterium* sp. NNA4^[39]和 *A. faecalis* No.4^[20]的情况相反, 两者均能去除羟胺但未见菌株的生长以及亚硝酸盐的累积。此外, 硝酸盐的积累也从 4.78 mg/L 降至 0.75 mg/L, 这进一步说明了菌株在执行硝化作用的同时可以进行反硝化作用去除硝酸盐和亚硝酸盐^[5]。试验证明了菌株 EN-F4 能在有羟胺存在的废水中进行生长繁殖并能将其去除, 更重要的是, 没有过多的无机氮积累, 进一步证明了菌株 EN-F4 具有较强的异养硝化作用。

2.3 菌株 EN-F4 的好氧反硝化能力

使用硝酸盐为唯一氮源来检测菌株 EN-F4 的好氧反硝化能力, 菌株培养 12 h 后, OD_{600} 从 0.15 迅速增至 0.63 并保持稳定。硝酸盐浓

度(54.17 mg/L)迅速下降(图 2A), 最终维持在 7–9 mg/L 之间。经 30 h 的培养, 硝酸盐的去除率为 85.20%, 最大去除速率是 5.10 mg/(L·h)。尽管菌株 EN-F4 不能完全去除硝酸盐, 但是去除速率远高于 *O. anthropic* LJ81 [4.16 mg/(L·h)]^[40]、*Vibrio diabolus* SF16 [2.83 mg/(L·h)]^[41]和 *Rhizobium* sp. WS7 [3.51 mg/(L·h)]^[32]。随着菌株的生长和硝酸盐的去除, 总氮从 58.84 mg/L 降至 19.53 mg/L, 去除率为 66.81%, 最大去除速率为 4.34 mg/(L·h), 显著高于菌株 *Acinetobacter tandoii* MZ-5 [1.06 mg/(L·h)]^[3]和 *Streptomyces mediolani* EM-B2 [1.60 mg/(L·h)]^[25]。此外, 由于菌株脱氮过程产碱, pH 值从 7.19 上升至 9.00。在硝酸盐还原的过程中可以检测到亚硝酸盐, 且在接种 6 h 时达到峰值 5.37 mg/L, 在接种 30 h 时降至 2.16 mg/L, 这与 *Paracoccus denitrificans* ISTOD1^[42]反硝化过程无亚硝酸盐积累的情况相反。同时在硝酸盐还原过程中, 也可检测到 5.61 mg/L 的铵态氮, 这可能是由一些细胞死亡分解释放铵氮或者将硝酸盐异化还原为铵所致^[27,30,33]。综上所述, 菌株 EN-F4 能以硝酸盐为氮源进行反硝化作用, 但是其反硝化作用弱于硝化作用。

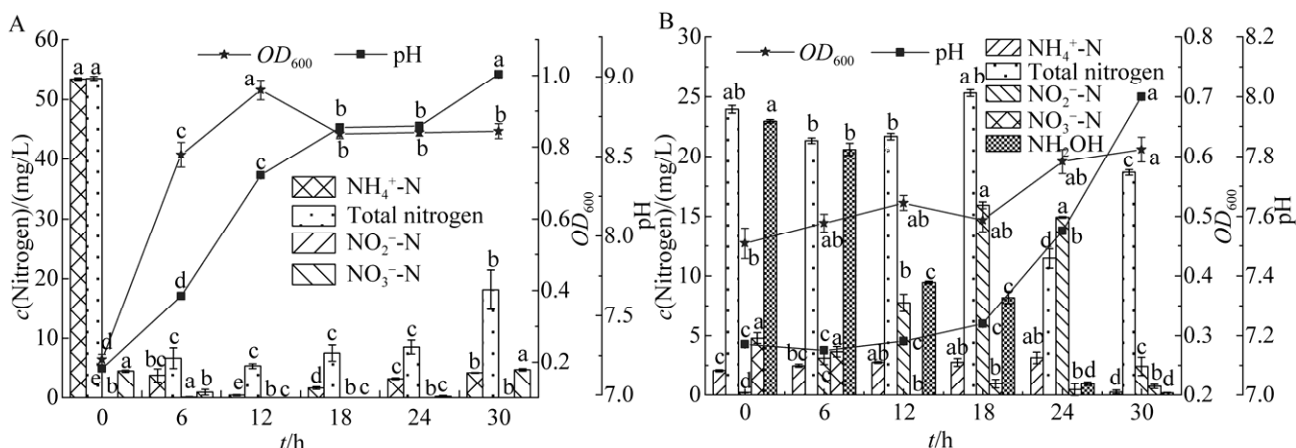


图 1 菌株 EN-F4 去除铵态氮(A)和羟胺(B)的异养硝化特性

Figure 1 The heterotrophic nitrification characteristics of ammonium (A) and hydroxylamine (B) of strain EN-F4. Values are means \pm SD (error bars) for three replicates. Different lowercase letters indicate significant difference between treatments at $P < 0.05$.

类似地, 在有氧条件下, 将菌株 EN-F4 接种到含单一亚硝酸盐的培养基中, 进一步研究菌株的反硝化能力(图 2B)。菌株接种 12 h 后, 细胞生长从对数期进入稳定期, 菌株的 OD_{600} 从 0.13 增长至 0.65, 亚硝酸盐浓度(54.75 mg/L)迅速下降, 然后维持在 7.55 mg/L 左右。培养结束时, 亚硝酸盐及总氮去除率分别为 87.01% 和 69.25%, 最大去除速率分别为 5.31 和 5.06 mg/(L·h), 菌株 EN-F4 对亚硝酸盐的最大去除速率远高于 *Photobacterium* sp. NNA4 [4.5 mg/(L·h)]^[39]、*Pseudomonas taiwanensis* EN-F2 [4.55 mg/(L·h)]^[5]、*Rhizobium* sp. WS7 [2.16 mg/(L·h)]^[32] 和 *Exiguobacterium mexicanum* SND-01 [2.30 mg/(L·h)]^[43]。在亚硝酸盐去除过程中没有检测到硝酸盐及羟胺的积累, 这与 *P. taiwanensis* J488 的反硝化结果一致^[26]。故推测大部分的亚硝酸盐被转化为气态氮。在培养 30 h 后, 铵态氮浓度逐渐累积至 5.71 mg/L, 这可能是由于死细胞分解产生的^[26]。以上结果进一步证明了菌株 EN-F4 能高效地执行好氧反硝化作用。

综上所述, 菌株 EN-F4 分别以亚硝酸盐和硝

酸盐为单一氮源的好氧反硝化能力接近, 去除效率和速率分别为 85.20%、87.01% 和 5.31 mg/(L·h)、5.10 mg/(L·h), 但低于分别以铵(99.27%)和羟胺为氮源(99.13%)的去除效率。因此, 菌株 EN-F4 能高效执行异养硝化好氧反硝化作用去除无机氮, 且异养硝化能力强于好养反硝化能力。

2.4 羟胺对其他无机氮转化的影响

据报道, 羟胺的毒性会降低细菌活性^[36]。为了研究羟胺对菌株 EN-F4 脱氮过程的影响, 将 10 mg/L 的羟胺分别添加到含 50 mg/L 的铵、硝酸盐和亚硝酸盐培养基中, 碳源保持不变, 每间隔 6 h 对菌株生长、无机氮含量和中间代谢产物进行检测。

为了研究羟胺对硝化过程的影响, 将 10 mg/L 的羟胺添加到含铵培养基中(图 3A)。菌株接种培养 30 h 后, OD_{600} 从 0.52 显著升高至 1.30, 与羟胺和铵作为单一氮源时相比, OD_{600} 分别增加了 0.69 和 0.46, 这一现象类似于之前的报道中羟胺可以增加氨氧化细菌丰度的结论^[44], pH 值也从 7.19 增至 9.01。随着菌株的生长, 羟胺和铵态氮分别被去除了 89.67% 和 92.60%, 最大

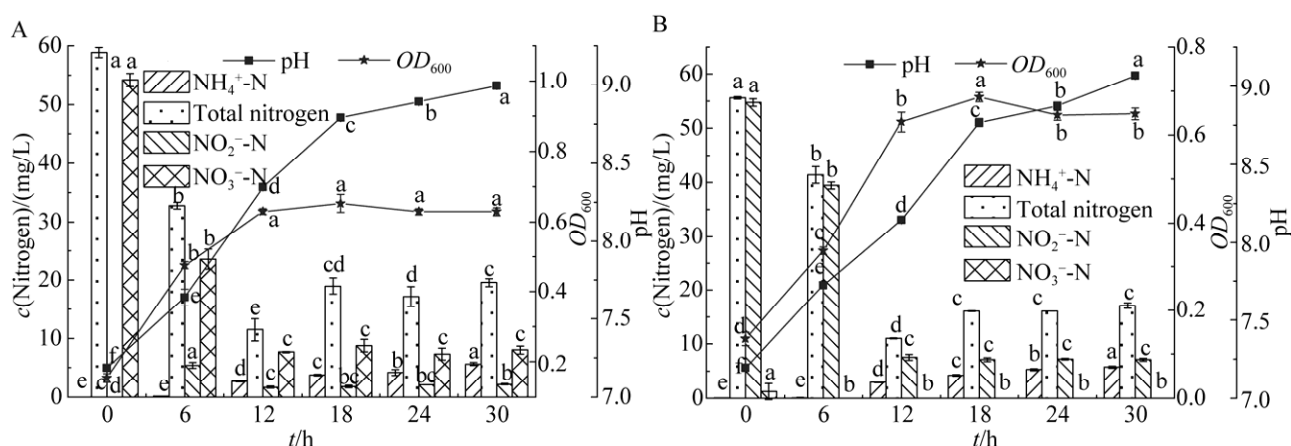


图 2 菌株 EN-F4 去除硝态氮(A)和亚硝态氮(B)的好氧反硝化特性

Figure 2 The aerobic denitrification characteristics of nitrate (A) and nitrite (B) of strain EN-F4. Values are means \pm SD (error bars) for three replicates. Different lowercase letters indicate significant difference between treatments at $P<0.05$.

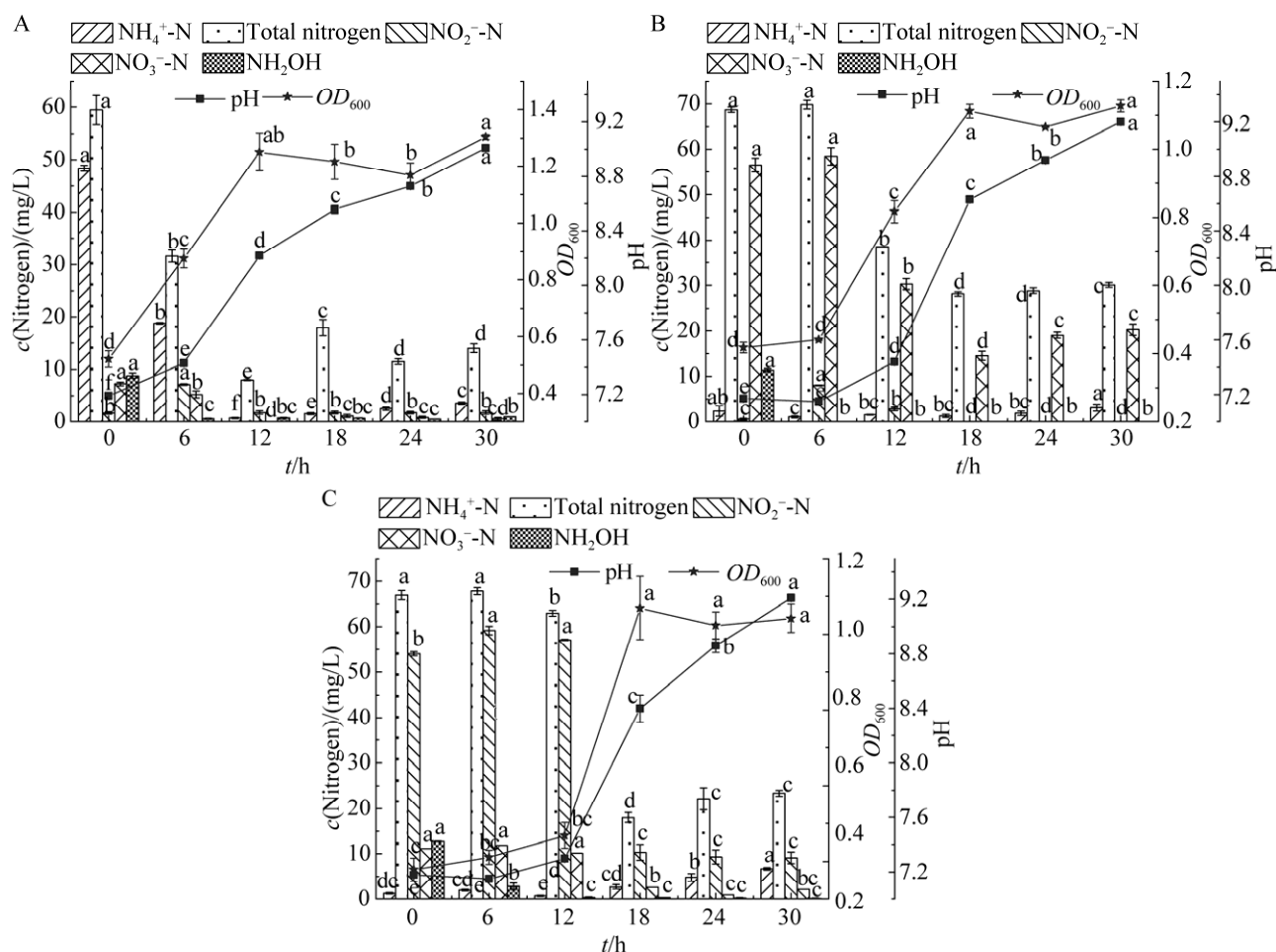


图3 羟胺对铵态氮(A)、硝态氮(B)和亚硝态氮(C)转化的影响

Figure 3 The effects of hydroxylamine on the conversion of ammonium (A), nitrate (B) and nitrite (C). Values are means \pm SD (error bars) for three replicates. Different lowercase letters indicate significant difference between treatments at $P < 0.05$.

去除速率分别为 1.38 和 4.94 mg/(L·h)，远低于以铵[100%和 8.27 mg/(L·h)]和羟胺[100%和 1.85 mg/(L·h)]为单一氮源时的去除效率和最大去除速率，表明羟胺和铵态氮存在相互抑制，这种现象不同于 Zhang 等^[5]报道的羟胺不影响铵态氮去除的结论。尽管如此，羟胺的最大去除速率 [1.38 mg/(L·h)] 仍然高于菌株 *Pseudomonas putida* Y-9 [0.028 mg/(L·h)]^[38]、*P. taiwanensis* J488 [0.28 mg/(L·h)]^[26] 和 *Photobacterium* sp. NNA4 [0.7 mmol/(L·h)]^[39]。随着菌株的生长和无机氮的去除，总氮浓度从

59.50 mg/L 下降至 13.99 mg/(L·h)，去除效率和最大去除速率分别为 76.49%和 4.65 mg/(L·h)，低于以铵态氮为唯一氮源时的总氮去除效率 (90.00%)，原因可能是在混合氮源中，羟胺和铵态氮更多地转化为亚硝酸盐和硝酸盐。在培养 6 h 时，亚硝酸盐浓度出现峰值 7.14 mg/L，然后从 12 h 至培养结束时保持在 1.72 mg/L 左右，此外，还检测到低浓度(0.52 mg/L)的硝酸盐，这一现象与菌株 *Enterobacter cloacae* CF-S27 的报道中表述的即使在羟胺存在下硝酸盐和亚硝酸盐也不会累积的结论相反^[45]。

以羟胺和硝酸盐作为混合氮源,探究羟胺对反硝化过程的影响(图 3B)。结果表明,菌株 EN-F4 的细胞在 0–6 h 内处于延滞期,6–12 h 进入对数生长期, OD_{600} 从 0.42 增至 1.11 后进入稳定期,培养至 30 h 时, OD_{600} 升至 1.13, pH 值从 7.17 上升至 9.20。培养至 6 h 时,11.38 mg/L 的羟胺被完全去除,最大去除速率为 1.90 mg/(L·h),类似于单一羟胺为氮源时的速率[1.85 mg/(L·h)],表明硝酸盐的存在不影响羟胺的去除。菌株培养 30 h 后,硝酸盐浓度从 56.52 降至 20.27 mg/L,去除效率为 64.13%,在 0–6 h 之间出现最大去除速率 4.69 mg/(L·h),低于以硝酸盐为单一氮源时的 5.10 mg/(L·h),表明羟胺的存在会抑制硝酸盐的去除,这与 Zhang 等^[35]报道的在反硝化过程中加入低于 35 mg/L 的羟胺会提高反硝化率的现象相反。由于菌株 EN-F4 能将 100% 的羟胺和 64.13% 的硝酸盐去除,初始浓度为 68.66 mg/L 的总氮也降至 30.12 mg/L,去除效率和最大去除速率分别为 56.14% 和 5.22 mg/(L·h),总氮的去除效率显著高于羟胺为单一氮源时的 22.09%,但略低于硝酸盐作单一氮源时的 66.81%,去除速率则高于两者[羟胺为 2.31 mg/(L·h),硝酸盐为 4.34 mg/(L·h)]。在羟胺和硝酸盐去除期间,亚硝酸盐在菌株 EN-F4 培养至 6 h 时达到最大值(8.04 mg/L)而在 30 h 后被完全消耗。此外,还检测到 3.05 mg/L 的铵盐产生。以上结果表明,羟胺的加入会抑制硝酸盐和总氮的去除。

以羟胺和亚硝酸盐为混合氮源,进一步探索羟胺对反硝化过程的影响。结果如图 3C 所示,羟胺在接种后的 12 h 内被迅速去除,浓度从 12.71 mg/L 下降至 0.29 mg/L,在 30 h 时剩余 0.09 mg/L,被去除了 99.29%,在 0–6 h 之间出现最大去除速率 1.64 mg/(L·h),略低于羟胺为单一氮源时的速率[1.85 mg/(L·h)],表明亚硝酸盐的存在对羟胺的影响不大。当羟胺基本被完全去

除,亚硝酸盐开始还原,这表明在羟胺和亚硝酸盐混合氮源体系中,先进行硝化作用后再进行反硝化作用。初始浓度为 54.04 mg/L 的亚硝酸盐下降至 9.15 mg/L,去除效率和最大去除速率分别为 83.07% 和 7.80 mg/(L·h),远高于单一亚硝酸盐去除系统的最大去除速率[5.31 mg/(L·h)]。添加羟胺后,亚硝酸盐的去除速率被显著提高了 2.49 mg/(L·h)。菌株 EN-F4 在该混合氮源中具有较长时间的延滞期(0–12 h),12 h 后才进入对数生长期, OD_{600} 最大值为 1.04,均高于单一羟胺(0.61)和亚硝酸盐(0.65),pH 值也从 7.18 上升至 9.21。在此期间,可以检测到 6.74 mg/L 的铵盐和 2.19 mg/L 的硝酸盐。与此同时,总氮被去除了 65.24% (从 66.94 mg/L 下降至 23.27 mg/L),最大去除速率为 7.51 mg/(L·h),加入羟胺后,总氮的速率被提高了 2.45 mg/(L·h)。综上所述,羟胺加入亚硝酸盐培养基后可以促进细胞的生长以及亚硝酸盐和总氮的去除,这与之前报道中羟胺的存在会抑制细菌的繁殖和降低亚硝酸盐的去除率结论相悖^[4,35]。

2.5 氮平衡分析

在好氧条件下菌株 EN-F4 在不同氮源下的氮平衡分析结果如表 1 所示。菌株 EN-F4 分别利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 、 NaNO_2 和 KNO_3 为唯一氮源培养 12、30、12 和 12 h。以铵态氮为单一氮源时,初始总氮浓度为 (51.24 ± 1.00) mg/L,经过 12 h 培养, (11.28 ± 1.16) mg/L 的初始总氮被转化为积累的胞内氮, (4.38 ± 0.04) mg/L 转化为有机氮,氮损失高达 69.44%,远高于菌株 *Exiguobacterium mexicanum* SND-01 (40.3%)^[43]、*Bacillus thuringiensis* WXN-23 (4.9%)^[29] 和 *Agrobacterium* sp. LAD9 (50%)^[46]。铵态氮去除期间,在 12 h 时没有检测到羟胺、亚硝酸盐和硝酸盐的存在,表明菌株 EN-F4 主要将铵态氮转化为气态氮,根据菌株 EN-F4 异养硝化过程中

表 1 菌株 EN-F4 的氮平衡分析

Table 1 The nitrogen balance analysis of strain EN-F4

Substance	Initial TN (mg/L)	Final N (mg/L)					Intracellular-N (mg/L)	N lose (%)
		NH ₄ ⁺ -N	NH ₂ OH	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	Organic-N		
NH ₄ ⁺ -N	51.24±1.00	0	0	0	0	4.38±0.04	11.28±1.16	69.44±0.32
NH ₂ OH	27.79±0.76	1.54±0.04	2.81±0.19	13.77±0.09	0.74±0.01	3.83±0.62	0.70±0.12	15.83±0.73
NO ₃ ⁻ -N	58.97±0.52	1.40±0.12	0	2.19±0.10	16.03±0.65	1.00±0.84	3.43±0.41	59.22±0.02
NO ₂ ⁻ -N	56.12±0.44	3.20±0.03	0	7.71±0.41	0	3.59±0.91	3.10±0.63	68.84±0.52

的中间产物分析, 6 h 时有亚硝酸盐和硝酸盐的产生, 故推测该菌株以铵为唯一氮源进行的异养硝化途径可能为 NH₄⁺-N→NO₂⁻-N→NO₃⁻-N→气态氮和生物量氮。以羟胺为唯一氮源, 探究菌株去除羟胺的途径。羟胺的初始总氮浓度为 (27.79±0.76) mg/L。培养 30 h 后, 羟胺仍剩余 (2.81±0.19) mg/L, 总氮损失率仅为 15.83%, 低于菌株 *Glutamicibacter arilaitensis* EM-H8 (26.86%)^[37], 但高于菌株 *Alcaligenes faecalis* NR (9.9%)^[21]。菌株仍能大部分羟胺去除。由氮平衡结果可知, 羟胺主要被转化为 (13.77±0.09) mg/L 的亚硝酸盐, 仅有 (0.74±0.01) mg/L 的硝酸盐、(3.83±0.62) mg/L 的有机氮和细胞破碎后释放的 (1.54±0.04) mg/L 的铵态氮。根据羟胺去除的中间代谢产物的积累以及氮平衡的验证, 可推测胺氧化的途径为 NH₂OH→NO₂⁻-N→NO₃⁻-N→NO₂⁻-N→气态氮和生物量氮。

以硝态氮为唯一氮源, 探究菌株 EN-F4 的反硝化途径。硝酸盐的初始总氮浓度为 (58.97±0.52) mg/L, 培养 12 h 后, 总氮损失率为 59.22%, 远高于菌株 *Rhizobium* sp. WS7 (18.53%)^[32]。菌株不能将硝酸盐完全去除, 仍能检测到 (16.03±0.65) mg/L 的硝酸盐。此外, 可检测到 (2.19±0.10) mg/L 的亚硝态氮和 (1.40±0.12) mg/L 的铵态氮积累, 未检测到羟胺的积累。有机氮含量为 (1.00±0.84) mg/L, 积累的胞内氮含量为 (3.43±0.41) mg/L。根据硝态氮还原过程中的中

间产物和氮平衡分析推测, 硝态氮的还原途径可能为: NO₃⁻-N→NO₂⁻-N→气态氮和生物量氮; 以亚硝酸盐为氮源进一步探索菌株的反硝化途径。初始总氮为 (56.12±0.44) mg/L 的亚硝酸盐经 12 h 的培养后, 剩余 (7.71±0.41) mg/L 的亚硝酸盐, 68.84% 的初始总氮被转化为气态氮, 表明亚硝酸盐主要被转化为气态氮。在亚硝酸盐还原过程中, 检测到有 (3.20±0.03) mg/L 的铵态氮、(3.59±0.91) mg/L 的有机氮和 (3.10±0.63) mg/L 的胞内氮累积, 而没有羟胺和硝态氮的产生, 根据亚硝态氮还原过程中的中间产物和氮平衡分析推测, 以亚硝酸盐为唯一氮源的反硝化途径可能为 NO₂⁻-N→气态氮和生物量氮。

2.6 酶活性

细菌进行 HN-AD 过程依赖于相关酶的催化, 关键硝化酶氨单加氧酶 (AMO) 和羟胺氧化还原酶 (HAO) 分别负责铵和羟胺的氧化, 硝酸盐还原酶 (NR) 和亚硝酸盐还原酶 (NIR) 分别催化硝酸盐和亚硝酸盐的还原^[47-49]。为了验证菌株 EN-F4 的 HN-AD 能力, 对 AMO、HAO、NR 和 NIR 的酶活性进行了检测 (表 2)。试验结果表明, 这 4 种关键酶均在菌株 EN-F4 中表达并被成功检测。在有氧条件下, 与酶 HAO、NR 和 NIR 相比, AMO 表现出最高的比活性 0.88 U/mg 蛋白, 远高于菌株 *P. taiwanensis* J488 (0.65 U/mg 蛋白)^[26]、*Pseudomonas putida* Y-9 (0.598 U/mg 蛋白)^[38] 和 *Bacillus thuringiensis* WXN-23 (0.11 U/mg

表 2 菌株 EN-F4 的特异酶活性

Table 2 Specific enzyme activity of strain EN-F4

Enzymes	Specific activity (U/mg protein)
Ammonia monooxygenase (AMO)	0.88±0.01
Hydroxylamine oxidoreductase (HAO)	0.24±0.01
Nitrate reductase (NR)	0.18±0.00
Nitrite reductase (NIR)	0.02±0.01

蛋白)^[29], AMO 的高比活性也证实了图 1A 中菌株 EN-F4 仅培养 12 h 就能去除 100%的铵态氮, 最大去除速率为 8.27 mg/(L·h)的高效异养硝化能力。HAO 在菌株 EN-F4 中的比活性为 0.24 U/mg 蛋白, 远高于 *Bacillus thuringiensis* WXN-23 (0.026 U/mg 蛋白)^[29]、*P. taiwanensis* J488 (0.049 U/mg 蛋白)^[26]和 *Glutamicibacter arilaitensis* EM-H8 (0.065 U/mg 蛋白)^[37], HAO 较高的比活性也证实了图 1B 中菌株 EN-F4 可以快速高效地去除羟胺的能力。NR 的比活性为 0.18 U/mg 蛋白, 低于 *Pseudomonas taiwanensis* EN-F2 (0.42 U/mg 蛋白)^[5], 但它显著高于 *Pseudomonas putida* Y-9 (0.001 8 U/mg 蛋白)^[38]和 *P. taiwanensis* J488 (0.091 U/mg 蛋白)^[26]。菌株 EN-F4 中 NR 的比活性低于 AMO 和 HAO, 也证实了菌株 EN-F4 的好氧反硝化能力弱于异养硝化能力。在全部酶中, NIR 的比酶活性(0.02 U/mg 蛋白)最低, 虽显著低于 *P. taiwanensis* J488 (0.102 U/mg 蛋白)^[26], 但它高于 *Pseudomonas putida* Y-9 (0.005 6 U/mg 蛋白)^[38], NIR 的酶活性显著低于其他 3 种酶, 这可能是因为 NIR 的检测条件并未进行优化, 导致检测效果不好。NR 和 NIR 的酶活性较低于 AMO 和 HAO, 这也证实了菌株 EN-F4 对硝酸盐(85.20%)和亚硝酸盐(87.01%)的去除效率低于对铵(92.08%)和羟胺(99.13%)的去除效率。菌株 EN-F4 中的这 4 种关键酶均表达说明该菌具有执行 HN-AD 过程的能力。

2.7 抑制剂

在异养硝化过程中, 一般选用二乙基二硫代氨基甲酸脂(DDC)和 1-辛炔(OCT)作为硝化酶抑制剂。据报道, DDC 可以螯合 AMO 酶活性位点的铜离子, 从而阻断铵态氮氧化功能, 进而达到抑制效果^[26,50-51]。OCT 可通过与 AMO 共价结合达到抑制硝化作用的效果^[52]。本研究使用 DDC 和 OCT 这 2 种硝化抑制剂来进一步了解菌株 EN-F4 的铵转化过程。当加入不同浓度的 DDC (0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L)后, 结果如图 4A 所示, 浓度为 0 mmol/L 时, 铵的去除率为 100%, 但在加入 0.5 mmol/L DDC 后, 铵的去除效率显著降至 7.49%, 且相应的 OD_{600} 的值从 0.69 降至 0.38, pH 值从 8.24 降至 7.25, 表明低浓度的 DDC 已经可以显著抑制菌株 EN-F4 的 AMO 活性。随着 DDC 浓度的增加, DDC 对铵态氮的抑制效果也逐渐增强。铵态氮的去除率从 100%持续下降至 0.68%, 相应的 OD_{600} 值从 0.69 持续下降至 0.34。以上结果表明 DDC 抑制剂对菌株 EN-F4 的 AMO 酶活性具有显著的抑制作用, 也说明 AMO 酶催化铵态氮的去除。另外, 使用不同浓度的 OCT (0、4.0、8.0、12.0 和 16.0 mmol/L)对菌株 EN-F4 的 AMO 酶活性作进一步研究。结果如图 4B 所示, OCT 抑制剂浓度为 0 mmol/L 时, 铵态氮的去除率可达 100%。当加入 4.0 mmol/L 的 OCT 时, 铵态氮的去除率从 100%显著降低至 7.49%, OD_{600} 从 1.13 显著降至 0.077, pH 值从 8.26 显著降至 7.20, 低浓度的 OCT 对菌株

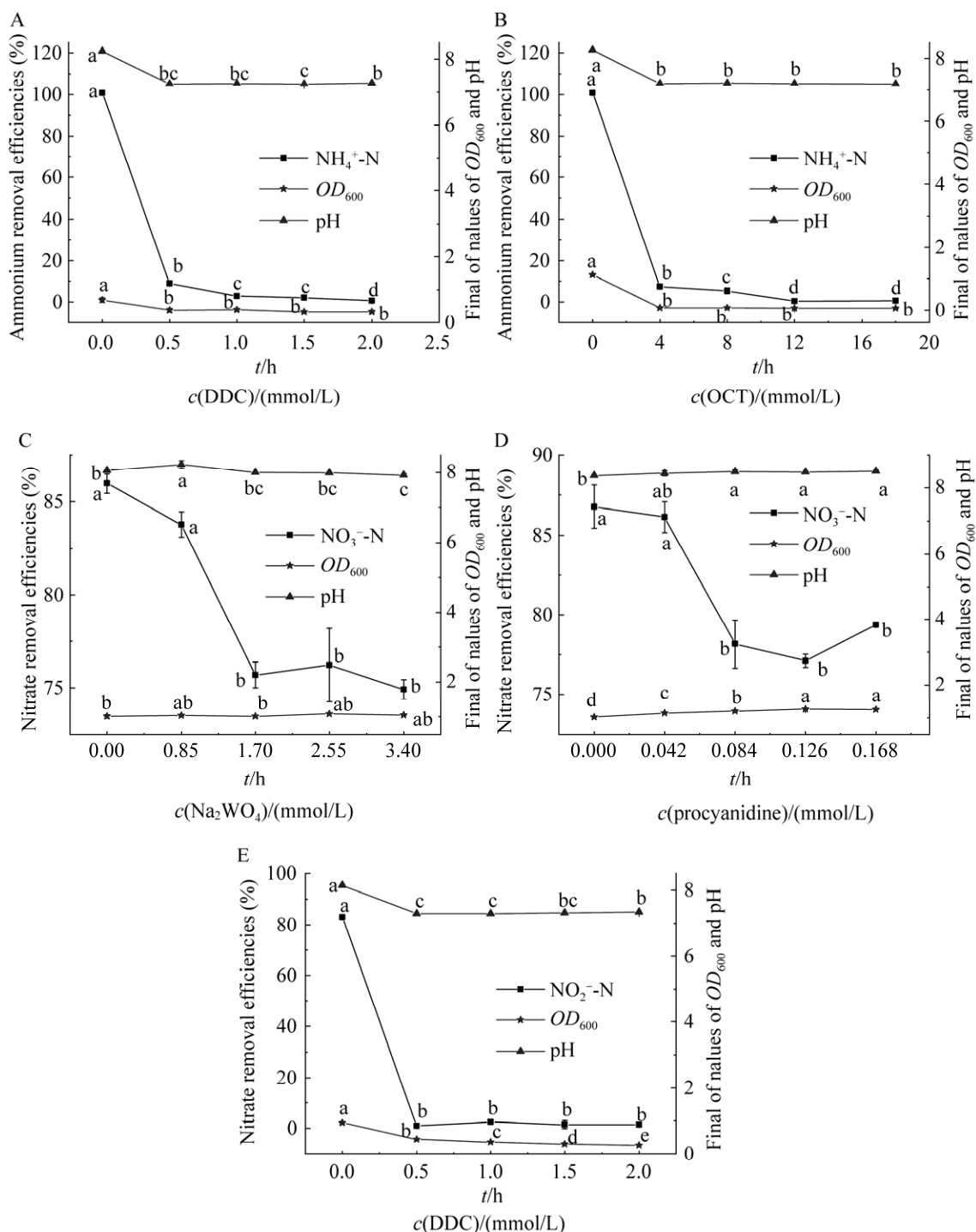


图 4 DDC (A)和 OCT (B)对铵态氮去除有显著影响. Na_2WO_4 (C)和原花青素(D)对硝态氮去除无显著影响. DDC (E)对亚硝态氮的去除有显著影响

Figure 4 DDC (A) and OCT (B) exhibited significant effect on ammonium removal. Na_2WO_4 (C) and procyanidine (D) exhibited no significant effect on nitrate nitrogen removal. DDC (E) exhibited significant effect on nitrite nitrogen removal. Values are means \pm SD (error bars) for three replicates. Different lowercase letters indicate significant difference between treatments at $P<0.05$.

EN-F4 已有显著的抑制效果, 且 OCT 对菌株 EN-F4 的抑制效果随浓度的增加而逐渐增强, OCT 浓度高达 16 mmol/L 时铵态氮的去除率最终降至 0.53%。综上所述, AMO 的酶活性能被 DDC 和 OCT 显著抑制, 也说明了 AMO 酶催化铵态氮的去除。

硝酸盐还原的关键酶是 NR^[53-54], 类似地, 选用反硝化抑制剂 Na₂WO₄ 和 procyanidins (原花青素) 对 NR 的作用进行探索^[53]。据报道, 原花青素可通过膜干扰改变膜促构象特异性抑制膜结合的 NR^[55], 而 Na₂WO₄ 可在代谢过程中替代 NR 辅酶因子进而起到抑制作用。选用不同浓度的 Na₂WO₄ (0、0.85、1.70、2.55 和 3.40 mmol/L) 加入到含硝酸盐的反硝化培养基中, 结果如图 4C 所示, 菌株 EN-F4 的 NR 酶活性逐渐受到抑制, 硝态氮的去除率从 85.96% 下降至 74.92%, OD₆₀₀ 在 1.05 左右保持稳定, 并未显著下降, pH 值随 Na₂WO₄ 浓度变化, 在 0.85 mmol/L 的 Na₂WO₄ 浓度下, pH 从 8.05 上升至 8.22, 最后随浓度增加逐渐下降至 7.92。结果表明, Na₂WO₄ 只能部分抑制菌株 NR 的酶活性。这一结果与菌株 *Alcaligenes* sp. TB 被 1.7 mmol/L Na₂WO₄ 完全抑制硝酸盐还原的结果不一致^[53], 表明菌株 EN-F4 比产碱菌属对 Na₂WO₄ 表现出更高的耐受性。另外, 用不同浓度的原花青素 (0、0.042、0.084、0.126 和 0.168 mmol/L) 作抑制剂, 进一步探究菌株 EN-F4 的 NR 酶活性。结果如图 4D 所示, 随着原花青素浓度的逐渐增加, 硝态氮的去除率从 86.76% 逐渐下降至 79.36%, OD₆₀₀ 呈上升趋势 (1.05 上升至 1.26), pH 值也从 8.37 上升至 8.50。试验表明, 原花青素只能部分抑制 NR 的酶活性^[55]。以上结果表明, Na₂WO₄ 和原花青素对 NR 的抑制效果不显著, 说明菌株 EN-F4 的 NR 酶不同于以往报道的 NR 酶, 具体机制有待进一步研究。

NIR 是亚硝酸盐还原的关键酶, 包括含血红素的细胞色素 cd1 和含铜的酶, 分别由 nirS 和 nirK 编码^[56-57]。DDC 可作 NIR 抑制剂, 抑制机理是通过螯合含铜 NIR 活性中心的铜离子来抑制以亚硝酸盐为氮源的反硝化作用^[49]。为了探究菌株 EN-F4 的亚硝酸盐还原酶是否受 DDC 的抑制作用, 选用不同浓度梯度的 DDC (0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mmol/L) 添加到反硝化系统中, 结果如图 4E 所示, 在 0 mmol/L DDC 浓度作用下, 亚硝态氮的去除率为 82.96%。在加入 0.5 mmol/L 的 DDC 时, 亚硝态氮的去除率显著下降至 0.92%, OD₆₀₀ 从 0.94 降至 0.44, pH 值从 8.14 降至 7.29。随着 DDC 浓度的增加, 亚硝态氮的去除率最终降至 1.47%, OD₆₀₀ 持续下降至 0.27, pH 值在 7.30 左右保持稳定。试验结果说明, 菌株 EN-F4 的 NIR 是由 nirK 编码的含铜的酶, 能被 DDC 显著抑制反硝化能力和细胞的生长, 这与 DDC 可以显著抑制反硝化过程中由 nirK 编码的 NIR 活性的结果相同^[50]。这一结果有力地支持了菌株 EN-F4 中存在 NIR, 且是由 nirK 编码的含铜亚硝酸盐还原酶。

综上所述, 硝化抑制剂 DDC 和 OCT 基本上能完全抑制 AMO 的作用, 进而抑制铵态氮的去除, Na₂WO₄ 和原花青素抑制剂对 NR 酶的抑制效果不显著, 推测硝态氮的去除并不局限于传统的反硝化途径。而 DDC 抑制剂可显著抑制 NIR 酶活性, 进而抑制亚硝酸盐的去除。

3 讨论与结论

从菜地中分离并纯化出一株能高效去除多种氮源的菌株 EN-F4, 经过形态学观察和 16S rRNA 基因测序分析, 鉴定该菌株为栖稻假单胞菌 (*P. oryzae*)。在 25 °C 好氧条件下, 菌株 *P. oryzae* EN-F4 能高效地进行异养硝化和好氧反硝化作用去除铵、羟胺、硝酸盐和亚硝

酸盐, 去除效率分别为 92.09%、99.13%、85.20% 和 87.10%。添加 10 mg/L 的羟胺后可显著促进亚硝酸盐和总氮的去除, 最大去除速率分别被提高至 7.80 和 7.51 mg/(L·h)。关键酶 AMO、HAO、NR 和 NIR 分别为 0.88、0.24、0.18 和 0.02 U/mg 蛋白, 且 AMO 酶活性能被特异性抑制剂 DDC 和 OCT 显著抑制, NR 酶活性能被 Na₂WO₄ 和原花青素部分抑制, NIR 酶活性能被 DDC 显著抑制。结合中间代谢产物检测、酶活力和氮平衡分析, 推测菌株 EN-F4 的硝化途径可能是 NH₄⁺-N→NO₂⁻-N→NO₃⁻-N→气态氮/生物量氮和 NH₂OH→NO₂⁻-N→NO₃⁻-N→NO₂⁻-N→气态氮/生物量氮, 这 2 个硝化过程可能同时存在于菌株 EN-F4 中。推测菌株 EN-F4 的反硝化途径可能是 NO₃⁻-N→NO₂⁻-N→气态氮/生物量氮以及 NO₂⁻-N→气态氮/生物量氮。所有结果表明, 菌株 EN-F4 是一种较好的净化氮污染废水候选菌株。

参考文献

- [1] MASSARELLI C, LOSACCO D, TUMOLO M, CAMPANALE C, URICCHIO VF. Protection of water resources from agriculture pollution: an integrated methodological approach for the nitrates directive 91-676-EEC implementation[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(24): 13323.
- [2] LI DL, XU XB, LI Z, WANG T, WANG C. Detection methods of ammonia nitrogen in water: a review[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 127: 115890.
- [3] OUYANG L, WANG KJ, LIU XY, WONG MH, HU ZL, CHEN HR, YANG XW, LI SF. A study on the nitrogen removal efficacy of bacterium *Acinetobacter tandoii* MZ-5 from a contaminated river of Shenzhen, Guangdong Province, China[J]. Bioresource Technology, 2020, 315: 123888.
- [4] 邢崇阳, 范禹辰, 陈璇, 郭劲松, 申渝, 晏鹏, 方芳, 陈猷鹏. 羟胺对厌氧氨氧化污泥群落的影响[J]. 环境科学, 2020, 41(7): 3365-3372.
- [5] YAN P, FANG F, CHEN YP. Effect of hydroxylamine on community of anammox sludge[J]. Environmental Science, 2020, 41(7): 3365-3372 (in Chinese).
- [6] ZHANG MM, HE TX, CHEN MP, WU QF. Ammonium and hydroxylamine can be preferentially removed during simultaneous nitrification and denitrification by *Pseudomonas taiwanensis* EN-F₂[J]. Bioresource Technology, 2022, 350: 126912.
- [7] TITOV VY, PETRENKO YM. Proposed mechanism of nitrite-induced methemoglobinemia[J]. Biochemistry (Moscow), 2005, 70(4): 473-483.
- [8] KNOBELOCH L, SALNA B, HOGAN A, POSTLE J, ANDERSON H. Blue babies and nitrate-contaminated well water[J]. Environmental Health Perspectives, 2000, 108(7): 675-678.
- [9] HE TX, XIE DT, LI ZL, NI JP, SUN Q. Ammonium stimulates nitrate reduction during simultaneous nitrification and denitrification process by *Arthrobacter arilaitensis* Y-10[J]. Bioresource Technology, 2017, 239: 66-73.
- [10] van MAANEN JM, van DIJK A, MULDER K, DE BAETS MH, MENHEERE PC, van der HEIDE D, MERTENS PL, KLEINJANS JC. Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid[J]. Toxicology Letters, 1994, 72(1/2/3): 365-374.
- [11] SUHOGUSOFF AV, HIRATA R, ARAVENA R, ROBERTSON WD, FERRARI LCKM, STIMSON J, BLOWES DW. Dynamics of nitrate degradation along an alternative latrine improved by a sawdust permeable reactive barrier (PRB) installed in an irregular settlement in the municipality of São Paulo (Brazil)[J]. Ecological Engineering, 2019, 138: 310-322.
- [12] FAN AM, STEINBERG VE. Health implications of nitrate and nitrite in drinking water: an update on methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 1996, 23(1): 35-43.
- [13] HUANG XF, LI WG, ZHANG DY, QIN W. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature[J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 44-50.
- [14] ZHANG QL, LIU Y, AI GM, MIAO LL, ZHENG HY, LIU ZP. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7[J]. Bioresource Technology, 2012, 108: 35-44.

- [14] CHEN PZ, LI J, LI QX, WANG YC, LI SP, REN TZ, WANG LG. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24[J]. Bioresource Technology, 2012, 116: 266-270.
- [15] DENG M, ZHAO XL, SENBATI Y, SONG K, HE XG. Nitrogen removal by heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas* sp. DM02: removal performance, mechanism and immobilized application for real aquaculture wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2021, 322: 124555.
- [16] JI B, YANG K, WANG HY, ZHOU J, ZHANG HN. Aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* C3 incapable of heterotrophic nitrification[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(2): 407-409.
- [17] LEI Y, WANG YQ, LIU HJ, XI CW, SONG LY. A novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Zobellella taiwanensis* DN-7, can remove high-strength ammonium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(9): 4219-4229.
- [18] XIE FX, THIRI M, WANG H. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel isolated *Pseudomonas mendocina* X49[J]. Bioresource Technology, 2021, 319: 124198.
- [19] GAO JQ, ZHU TD, LIU C, ZHANG JS, GAO JL, ZHANG JL, CAI M, LI YH. Ammonium removal characteristics of heterotrophic nitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* GEP-01 with potential for treatment of ammonium-rich wastewater[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2020, 43(6): 959-969.
- [20] JOO H-S, HIRAI M, SHODA M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2): 184-191.
- [21] ZHAO B, AN Q, HE YL, GUO JS. N₂O and N₂ production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR[J]. Bioresource Technology, 2012, 116: 379-385.
- [22] SUN YL, LI A, ZHANG XN, MA F. Regulation of dissolved oxygen from accumulated nitrite during the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of *Pseudomonas stutzeri* T13[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(7): 3243-3248.
- [23] HE TX, YE Q, SUN Q, CAI X, NI JP, LI ZL, XIE DT. Removal of nitrate in simulated water at low temperature by a novel psychrotrophic and aerobic bacterium, *Pseudomonas taiwanensis* strain J[J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 4984087.
- [24] WEI R, HUI C, ZHANG YP, JIANG H, ZHAO YH, DU LN. Nitrogen removal characteristics and predicted conversion pathways of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* P-1[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(6): 7503-7514.
- [25] HE TX, WU QF, DING CY, CHEN MP, ZHANG MM. Hydroxylamine and nitrite are removed effectively by *Streptomyces mediolani* strain EM-B2[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 224: 112693.
- [26] HE TX, XIE DT, NI JP, LI Z, LI ZL. Nitrous oxide produced directly from ammonium, nitrate and nitrite during nitrification and denitrification[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 388: 122114.
- [27] HE TX, LI ZL, SUN Q, XU Y, YE Q. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion[J]. Bioresource Technology, 2016, 200: 493-499.
- [28] HE TX, ZHANG MM, CHEN MP, WU QF, YANG L, YANG L. *Klebsiella oxytoca* (EN-B2): a novel type of simultaneous nitrification and denitrification strain for excellent total nitrogen removal during multiple nitrogen pollution wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2023, 367: 128236.
- [29] XU N, LIAO M, LIANG YQ, GUO JW, ZHANG YH, XIE XM, FAN QY, ZHU YQ. Biological nitrogen removal capability and pathways analysis of a novel low C/N ratio heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium (*Bacillus thuringiensis* strain WXN-23)[J]. Environmental Research, 2021, 195: 110797.
- [30] LI CN, YANG JS, WANG X, WANG ET, LI BZ, HE RX, YUAN HL. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24[J]. Bioresource Technology, 2015, 182: 18-25.
- [31] ROBERTSON LA, van NIEL EW, TORREMANS RA, KUENEN JG. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropa*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(11): 2812-2818.

- [32] WEI BH, LUO X, MA WK, LÜ PY. Biological nitrogen removal and metabolic characteristics of a novel cold-resistant heterotrophic nitrification and aerobic denitrification *Rhizobium* sp. WS7[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 362: 127756.
- [33] JIN RF, LIU TQ, LIU GF, ZHOU JT, HUANG JY, WANG AJ. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the marine origin bacterium *Pseudomonas* sp. ADN-42[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(4): 2000-2011.
- [34] ZHU L, DING W, FENG LJ, KONG Y, XU J, XU XY. Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 108: 1-7.
- [35] ZHAO JK, ZHAO JQ, XIE ST, LEI SH. The role of hydroxylamine in promoting conversion from complete nitrification to partial nitrification: no toxicity inhibition and its characteristics[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 319: 124230.
- [36] ZHANG XX, XIA YK, WANG CC, LI JJ, WU P, MA LP, WANG YG, WANG Y, DA FH, LIU WR, XU LZ. Enhancement of nitrite production via addition of hydroxylamine to partial denitrification (PD) biomass: functional genes dynamics and enzymatic activities[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 318: 124274.
- [37] LIU YX, HU TT, SONG YJ, CHEN HP, LV YK. Heterotrophic nitrogen removal by *Acinetobacter* sp. Y1 isolated from coke plant wastewater[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 120(5): 549-554.
- [38] HUANG XJ, XU Y, HE TX, JIA HJ, FENG M, XIANG SD, WANG ST, NI JP, XIE DT, LI ZL. Ammonium transformed into nitrous oxide via nitric oxide by *Pseudomonas putida* Y-9 under aerobic conditions without hydroxylamine as intermediate[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 277: 87-93.
- [39] LIU Y, AI GM, WU MR, LI SS, MIAO LL, LIU ZP. *Photobacterium* sp. NNA4, an efficient hydroxylamine-transforming heterotrophic nitrifier/aerobic denitrifier[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(1): 64-71.
- [40] LEI X, JIA YT, CHEN YC, HU YY. Simultaneous nitrification and denitrification without nitrite accumulation by a novel isolated *Ochrobactrum anthropic* LJ81[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 272: 442-450.
- [41] DUAN JM, FANG HD, SU B, CHEN JF, LIN JM. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 421-428.
- [42] MEDHI K, SINGHAL A, CHAUHAN DK, THAKUR IS. Investigating the nitrification and denitrification kinetics under aerobic and anaerobic conditions by *Paracoccus denitrificans* ISTOD1[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 242: 334-343.
- [43] CHENG HY, XU AA, KUMAR AWASTHI M, KONG DD, CHEN JS, WANG YF, XU P. Aerobic denitrification performance and nitrate removal pathway analysis of a novel fungus *Fusarium solani* RADF-77[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 295: 122250.
- [44] YU Y, LI MX, DAI X, MENG FH, QI XJ, HOU JQ, YE MY, XI BD. In situ mature leachate treatment with hydroxylamine addition in the Aerobic-Anaerobic Recirculation Landfill[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 696: 134084.
- [45] PADHI SK, TRIPATHY S, MOHANTY S, MAITI NK. Aerobic and heterotrophic nitrogen removal by *Enterobacter cloacae* CF-S27 with efficient utilization of hydroxylamine[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 232: 285-296.
- [46] CHEN Q, NI JR. Ammonium removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(5): 619-623.
- [47] SHAFIEE RT, SNOW JT, ZHANG Q, RICKABY REM. Iron requirements and uptake strategies of the globally abundant marine ammonia-oxidising archaeon, *Nitrosopumilus maritimus* SCM1[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(9): 2295-2305.
- [48] WANG Z, JIANG YH, AWASTHI MK, WANG J, YANG XG, AMJAD A, WANG Q, LAHORI AH, ZHANG ZQ. Nitrate removal by combined heterotrophic and autotrophic denitrification processes: impact of coexistent ions[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 838-845.
- [49] ETTWIG KF, BUTLER MK, Le PASLIER D, PELLETIER E, MANGENOT S, KUYPERS MMM, SCHREIBER F, DUTILH BE, ZEDELJUS J, de BEER D, GLOERICH J, WESSELS HJCT, van ALLEN T, LUESKEN F, WU ML, van de PAS-SCHOONEN KT, den CAMP HJMO, JANSSEN-MEGENS EM, FRANCOIS KJ, STUNNENBERG H, et al.

- Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 543-548.
- [50] KIM SW, MIYAHARA M, FUSHINOBU S, WAKAGI T, SHOUN H. Nitrous oxide emission from nitrifying activated sludge dependent on denitrification by ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 3958-3963.
- [51] BÉDARD C, KNOWLES R. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH_4 , NH_4^+ , and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers[J]. *Microbiological Reviews*, 1989, 53(1): 68-84.
- [52] MEN YJ, ACHERMANN S, HELBLING DE, JOHNSON DR, FENNER K. Relative contribution of ammonia oxidizing bacteria and other members of nitrifying activated sludge communities to micropollutant biotransformation[J]. *Water Research*, 2017, 109: 217-226.
- [53] CHEN J, GU SY, HAO HH, CHEN JM. Characteristics and metabolic pathway of *Alcaligenes* sp. TB for simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(22): 9787-9794.
- [54] KUYPERS MMM, MARCHANT HK, KARTAL B. The microbial nitrogen-cycling network[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(5): 263-276.
- [55] BARDON C, POLY F, PIOLA F, PANCTON M, COMTE G, MEIFFREN G, EL ZAHAR HAICHAR F. Mechanism of biological denitrification inhibition: procyanidins induce an allosteric transition of the membrane-bound nitrate reductase through membrane alteration[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(5): fiw034.
- [56] GRAF DRH, JONES CM, HALLIN S. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N_2O emissions[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114118.
- [57] WITTORF L, JONES CM, BONILLA-ROSSO G, HALLIN S. Expression of *nirK* and *nirS* genes in two strains of *Pseudomonas stutzeri* harbouring both types of NO-forming nitrite reductases[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(6): 343-347.