

金属离子对粪产碱杆菌 C16 的脱氮和亚硝酸盐积累的影响

王瑶 刘玉香* 安华 张浩

(太原理工大学 环境科学与工程学院 山西 太原 030024)

摘要:【目的】研究不同金属离子对异养氨氧化细菌 C16 的生长和脱氮性能影响, 探讨适于 C16 生长和脱氮的金属离子及其浓度。【方法】实验选用 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 5 种金属离子, 对 C16 的生长、脱氮性能、亚硝酸盐氮积累以及相关酶活性进行研究。【结果】 Mg^{2+} 明显促进 C16 的生长和 NH_4^+ -N 氧化速率; 较高浓度 Mn^{2+} 使得 C16 无法生长; 原培养基中缺少 Fe^{2+} 会抑制 C16 的生长和 NH_4^+ -N 氧化速率; 在原培养基中加入 0.1 mmol/L 的 Cu^{2+} 对 C16 的生长和脱氮具有一定的促进作用, Cu^{2+} 使得培养基中基本无 NO_2^- -N 和 NH_2OH 的积累; 不同浓度的 Zn^{2+} 对 C16 的生长和氨氮去除有抑制作用。酶活实验结果显示, 0.1 mmol/L Mg^{2+} 促进了羟胺氧化还原酶(HAO)的活性; 0.1 mmol/L Cu^{2+} 促进了硝酸盐还原酶(Nar)和亚硝酸盐还原酶(Nir)的活性。【结论】 Mg^{2+} 是 C16 生长和脱氮过程中的一种重要金属离子; 加入 Cu^{2+} 可避免过量亚硝酸盐积累。

关键词: 异养氨氧化, 金属离子, 羟胺氧化还原酶, 硝酸盐还原酶, 亚硝酸盐还原酶

Influence of metal ions on nitrogen removal and NO_2^- -N accumulation by *Alcaligenes faecalis* C16

WANG Yao LIU Yu-Xiang* AN Hua ZHANG Hao

(College of Environmental Science and Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan, Shanxi 030024, China)

Abstract: [Objective] The influence of different metal ions on the growth and nitrogen removal ability were studied to identify the suitable metal ions and their concentrations for strain C16. [Methods] Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} ions were selected to study their influence on the growth, nitrogen removal ability, NO_2^- -N accumulation and activity of relative enzymes of strain C16. [Results] Mg^{2+} significantly promoted the growth and NH_4^+ -N oxidation rate of strain C16; C16 could not grow in higher concentrations of Mn^{2+} ; lacking of Fe^{2+} in original medium inhibited the growth and NH_4^+ -N oxidation rate of C16; adding 0.1 mmol/L Cu^{2+} in the original culture medium could stimulate the growth and nitrogen removal rate of strain C16, meanwhile NO_2^- -N and NH_2OH were only present in trace amounts; the existing of Zn^{2+} of different concentrations inhibited the growth and NH_4^+ -N oxidation rate of C16. A further enzyme testing results showed that, 0.1 mmol/L Mg^{2+} promoted the activity of hydroxylamine oxidase (HAO); 0.1 mmol/L Cu^{2+}

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51078252); 山西省国际合作计划项目(No. 2010081018); 山西省自然科学基金项目(No. 2010011016-1)

*通讯作者: ✉: yuxiangliu2002@126.com

收稿日期: 2014-02-09; 接受日期: 2014-03-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-10

promoted nitrate reductase (Nar) and nitrite reductase (Nir) activity. **[Conclusion]** Mg^{2+} was necessary for the growth and nitrogen removal of strain C16. The addition of Cu^{2+} could avoid excessive accumulation of nitrite.

Keywords: Heterotrophic ammonia oxidizing bacteria, Metal ions, Nitrate reductase, Nitrite reductase, Hydroxylamine oxidase

传统的废水处理过程中氨氮去除包括好氧条件下的硝化作用和厌氧条件下的反硝化作用。然而,这种传统的氨氮去除过程中存在反应装置庞大、对高负荷有机物浓度敏感等许多难以克服的问题^[1-5]。近年来在废水处理过程中,异养微生物的脱氮作用受到了越来越多的关注^[6-7],异养脱氮是异养微生物同时异养硝化和好氧反硝化作用的结果^[8-10]。

在生物法处理废水的过程中,微量的金属离子是微生物生命活动所需的营养物质,是酶的活化剂或活性基,对酶的活性有一定的促进作用。但当环境中的金属离子缺乏、过多或比例失调时,会影响酶的活性,从而影响微生物的生长代谢作用^[11-13]。异养氨氧化菌在代谢底物时,有着与自养氨氧化菌相似的酶系统,即先由氨单加氧酶(AMO)将铵/氨氧化为羟胺,然后由羟胺氧化还原酶(HAO)催化进一步氧化得到亚硝酸。AMO 和 HAO 是好氧氨氧化菌代谢过程中的关键酶^[10,14]。在反硝化过程中,存在于细胞周质中的硝酸盐还原酶(Nar)是在好氧条件下将硝酸盐转变成亚硝酸盐的关键酶^[15-17]。从反硝化细菌 *Thiosphaera pantotropha* LMD 中分离出的两种类型的亚硝酸盐还原酶(Nir)都可在好氧条件下催化亚硝酸盐发生还原反应^[18]。在异养硝化过程中,各种酶所需的金属离子是不同的,例如:AMO 的活性位点被认为含有 Cu^{2+} ,少量 Cu^{2+} 的加入可以明显的刺激 NH_3 的氧化^[19-20]。而在对细菌 *T. pantotropha* LMD 的研究中发现, Mg^{2+} 是 AMO 所需的一种重要金属离子^[21]。非血红素 Fe 的羟胺氧化还原酶在异养氨氧化菌中广泛分布,这些酶的羟胺氧化还原活性可明显被 Fe^{2+} 激活^[10,22-23]。在氮氧化物还原酶中,检测到了 Fe^{2+} 的存在^[24]。

Alcaligenes faecalis C16 是本实验室从焦化废水活性污泥中筛选到的一株高效去除氨氮并显著积累亚硝酸盐氮的异养氨、氧化细菌^[5,25]。之前的实验主要是对 C16 的最佳碳源、氮源、C/N 和 pH 等条件做了研究,本实验则研究 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 5 种金属离子对异养硝化细菌 C16 的生长、脱氮性能、亚硝酸盐氮积累以及酶活性的影响,探讨适于 C16 生长和脱氮的金属离子及其浓度,从而使 *A. faecalis* C16 在生物废水处理过程中有更好的应用。

1 材料与方法

1.1 微生物

A. faecalis C16 保存在 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 甘油封存的培养基中。

1.2 培养基

基础培养基(g/L):柠檬酸钠 4.902, $(NH_4)_2SO_4$ 0.472, K_2HPO_4 0.200, NaCl 0.120。用 25% 的 NaOH 溶液调节到培养基 pH 7.0。

原培养基(g/L):柠檬酸钠 4.902, $(NH_4)_2SO_4$ 0.472, K_2HPO_4 0.200, NaCl 0.120, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.050, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.010, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.010。用 25% 的 NaOH 溶液调节到培养基 pH 7.0。

1.3 金属离子对 C16 硝化性能的影响

1.3.1 金属离子种类对 C16 硝化性能的影响: 为了研究 C16 在不同的无机金属离子培养基中的生长和 NH_4^+ -N 去除效果,将 0.4 mol/L 的 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 无菌母液,取 0.1 mL 分别加入到高压蒸汽灭菌后的基础培养基中,将基础培养基作为对照。每 100 mL 培养基中接入 1 mL 处于对数期的 C16 细菌悬浮液(其菌液吸光值为 0.745 ± 0.028)。在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 摇床中培养。每 24 h 取样测定其菌液密度(OD_{600} 值)和

NH_4^+ -N 值。

1.3.2 不同浓度 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 对 C16 硝化性能的影响：原培养基中的 3 种金属离子(Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+})浓度依次为 0、0.1、1.0、3.0 mmol/L，其他两种金属离子浓度不变，以原培养基作为对照，研究 C16 的生长和 NH_4^+ -N 去除效果。高压蒸汽灭菌后，每 100 mL 的培养基中接入 1 mL 处于对数期的 C16 细菌悬浮液(其菌液吸光值为 0.745 ± 0.028)。30 °C、120 r/min 摇床培养。每 24 h 取样测定其菌液密度(OD_{600} 值)、 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 和 NH_2OH -N 值。

1.3.3 不同浓度 Cu^{2+} 对 C16 硝化性能的影响：在原培养基中分别加入 0.1、0.5、1.0 mmol/L 的 Cu^{2+} ，以原培养基作为对照，研究 Cu^{2+} 对 C16 生长和脱氮性能的影响。30 °C、120 r/min 摇床培养。每 24 h 取样测定其菌液密度(OD_{600} 值)、 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 和 NH_2OH -N 值。

1.3.4 不同浓度 Zn^{2+} 对 C16 硝化性能的影响：在原培养基中分别加入 0.1、1.0、3.0 mmol/L 的 Zn^{2+} 。以原培养基作为对照，研究 Zn^{2+} 对 C16 生长和脱氮性能的影响。30 °C、120 r/min 摇床培养。每 24 h 取样测定其菌液密度(OD_{600} 值)、 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 和 NH_2OH -N 值。在以上方法中所有高压蒸汽灭菌培养基都是基础培养基，所有金属离子母液都是过滤除菌。

1.4 不同无机金属离子对 HAO、Nar 和 Nir 活性的影响

在酶体系中分别加入 0.1 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 分别测定 HAO、Nar 和 Nir 活性，研究不同金属离子的加入对 HAO、Nar 和 Nir 活性的影响。以原培养基作为对照。

1.5 测定方法

菌液密度用可见分光光度计在波长 600 nm 测吸光度；氨氮：纳氏试剂光度法；亚硝酸盐氮：N-(1-萘基)-乙二胺光度法^[26]；羟胺：8-羟基喹啉光度法^[27]。

酶活测定方法：从培养 24 h 的培养基中取出

200 mL 菌液进行预处理，8 000 r/min 离心 10 min 后倒掉上清液，用 pH 7.4、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗 2-3 次，使菌液悬浮。用超声波破碎 5 mL 细菌悬浮液(20 min, 37 W, 超声波处理 3 s 停顿 7 s, 冰浴)。破碎后离心(15 000 r/min, 20 min, 4 °C)，得到 5 mL 上清液用于测定 HAO、Nir 和 Nar 的活性。HAO 的测定体系是：0.050 mol/L Tris-HCl (pH 7.4)，0.001 mol/L 铁氰化钾，0.004 mol/L EDTA，800 μL 酶液，加入 0.002 mol/L 羟胺反应开始，在 400 nm 处测其吸光度。根据反应混合物中羟胺的减少量测定 HAO 的活性。Nar 的测定体系是：10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)，0.2 mmol/L NADH，800 μL 酶液，加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 硝酸钠反应开始。根据反应混合物中硝酸钠的减少量测定 Nar 的活性。Nir 的测定体系是：10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)，0.2 mmol/L NADH，800 μL 酶液，加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 亚硝酸钠反应开始。根据反应混合物中亚硝酸钠的减少量测定 Nir 的活性。Nar 和 Nir 均在 340 nm 处测其吸光度。

蛋白浓度的测定用 Bradford Reagent Kit (北京索莱宝科技有限公司)。每分钟催化 1 μmol 底物所需的酶量定义为一个酶活单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 金属离子种类对 C16 脱氮性能的影响

浓度为 0.4 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 5 种金属离子对 C16 的生长和脱氮性能影响如图 1A, B 所示。与对照组相比，基础培养基中加入 Mg^{2+} 明显促进 C16 的生长和 NH_4^+ -N 氧化速率。基础培养基中加入 Fe^{2+} 对 C16 的生长基本没有影响，但促进了 NH_4^+ -N 氧化速率。而 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的加入却明显抑制了 C16 的生长，并且 NH_4^+ -N 氧化速率也较低。基础培养基中加入 Mn^{2+} 时，C16 未见生长。由此可知， Mg^{2+} 对 C16 的生长和脱氮有重要作用，它可能是 C16 脱氮途径中的一种重要金属离子。

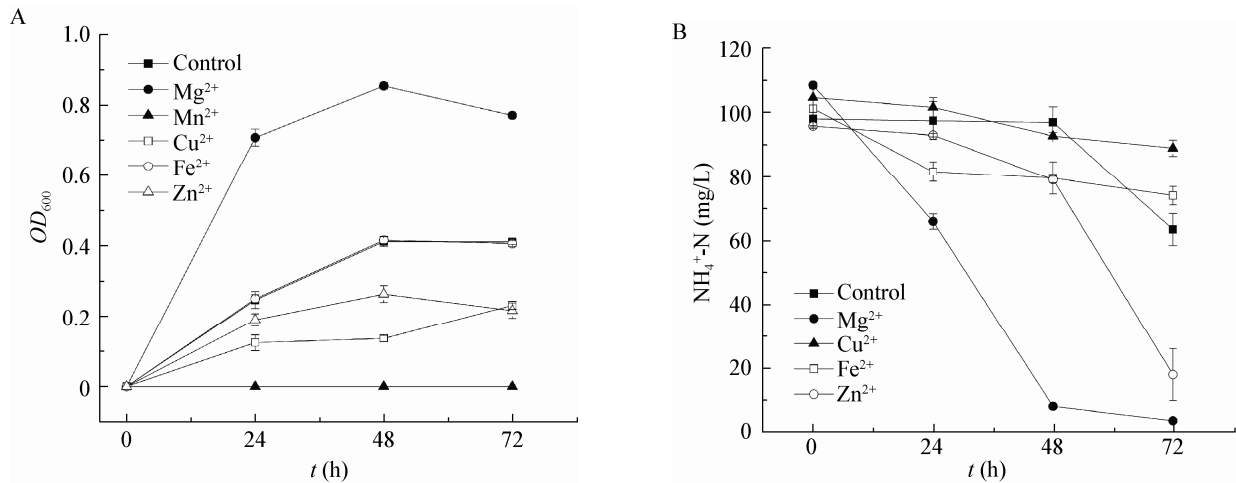


图 1 5 种金属离子对菌株 C16 生长和脱氮性能的影响

Figure 1 Effect of five kinds of metal ions on the growth and nitrogen removal by strain C16

注: 误差线采用 2 次测定结果平均值±标准偏差形式表达。

Note: Error bars using $\bar{x} \pm s$ of two replicates.

结果表明不同金属离子对 C16 的生长和脱氮具有不同作用。这些金属离子的加入可能在一定程度上影响了 C16 脱氮过程中相关酶的活性。Robertson 等^[21]对异养硝化细菌 *T. pantotropha* LMD 的研究结果显示, Mg²⁺是 AMO 所需的一种重要金属离子。Zhao B.等^[3]的研究发现, Mg²⁺明显促进了异养硝化细菌 *Providencia rettgeri* YL 的生长和氨氮去除速率, Mn²⁺和 Zn²⁺对 YL 的生长和氨氮去除速率也有促进作用, 这与对 C16 的作用不同。

2.2 不同浓度 Mg²⁺、Mn²⁺和 Fe²⁺对 C16 硝化性能的影响

2.2.1 不同浓度的 Mg²⁺对 C16 硝化性能的研究:

如图 2A、B 所示, 当原培养基中没有 Mg²⁺时, C16 的生长和 NH₄⁺-N 去除速率较其他浓度组变慢, NH₄⁺-N 在 72 h 才基本去除完全; 0 mmol/L Mg²⁺浓度组的 NH₂OH 累积量远远高于其他浓度组, 在 24 h NH₂OH 浓度达到了 30.212±2.396 mg/L, 然后开始逐渐减少(图 2C); NO₂⁻-N 的积累量与原培养基相比无明显差异(图 2D)。由此推测出 Mg²⁺可能影响了 HAO 的活性, 继而影响了羟胺的氧化速率, 使羟胺大量积累。如图 2 所示, 不同浓度 Mg²⁺对 C16 的生长和 NH₄⁺-N 氧化都有一定的促进作用。

因此, Mg²⁺是 C16 生长和脱氮过程中的一种重要金属离子, 这与上述实验得出的结论是一致的。Zhao B.等^[3]和 Kim 等^[28]的研究显示, Mg²⁺也明显促进了异养硝化细菌 *P. rettgeri* YL 和 *Bacillus* strains PK15 的生长和氨氮去除速率。

2.2.2 不同浓度的 Mn²⁺对 C16 硝化性能的研究:

当 Mn²⁺浓度为 1.0、3.0 mmol/L 时, C16 未见生长。在 0 和 0.1 mmol/L 浓度组中, C16 的生长、NH₄⁺-N 氧化以及 NO₂⁻-N 和 NH₂OH 的积累与原培养基基本相同, 如图 3 所示。由此可知, 较高浓度的 Mn²⁺对 C16 的生长和氨氮去除有抑制作用。

2.2.3 不同浓度 Fe²⁺对 C16 硝化性能的研究:

如图 4A、B 所示, 当原培养基中没有 Fe²⁺时, 在 24 h, C16 的生长速度和 NH₄⁺-N 氧化速率都低于其他浓度组; 在 NH₄⁺-N 氧化过程中, NO₂⁻-N 和 NH₂OH 的积累量明显低于其他浓度组, 如图 4C、D 所示。在 24 h, 随着 Fe²⁺浓度的增大, Fe²⁺明显促进了 C16 的生长和 NH₄⁺-N 氧化速率。48 h 后, 较高浓度的 Fe²⁺使得 NH₂OH 的氧化速率较其他浓度组下降, 这可能是由于较高浓度 Fe²⁺使 NH₂OH 氧化成 NO₂⁻-N 的过程受到抑制, 如图 4C、D 所示。由此可知, 当原培养基中没有 Fe²⁺, 而有 Mg²⁺

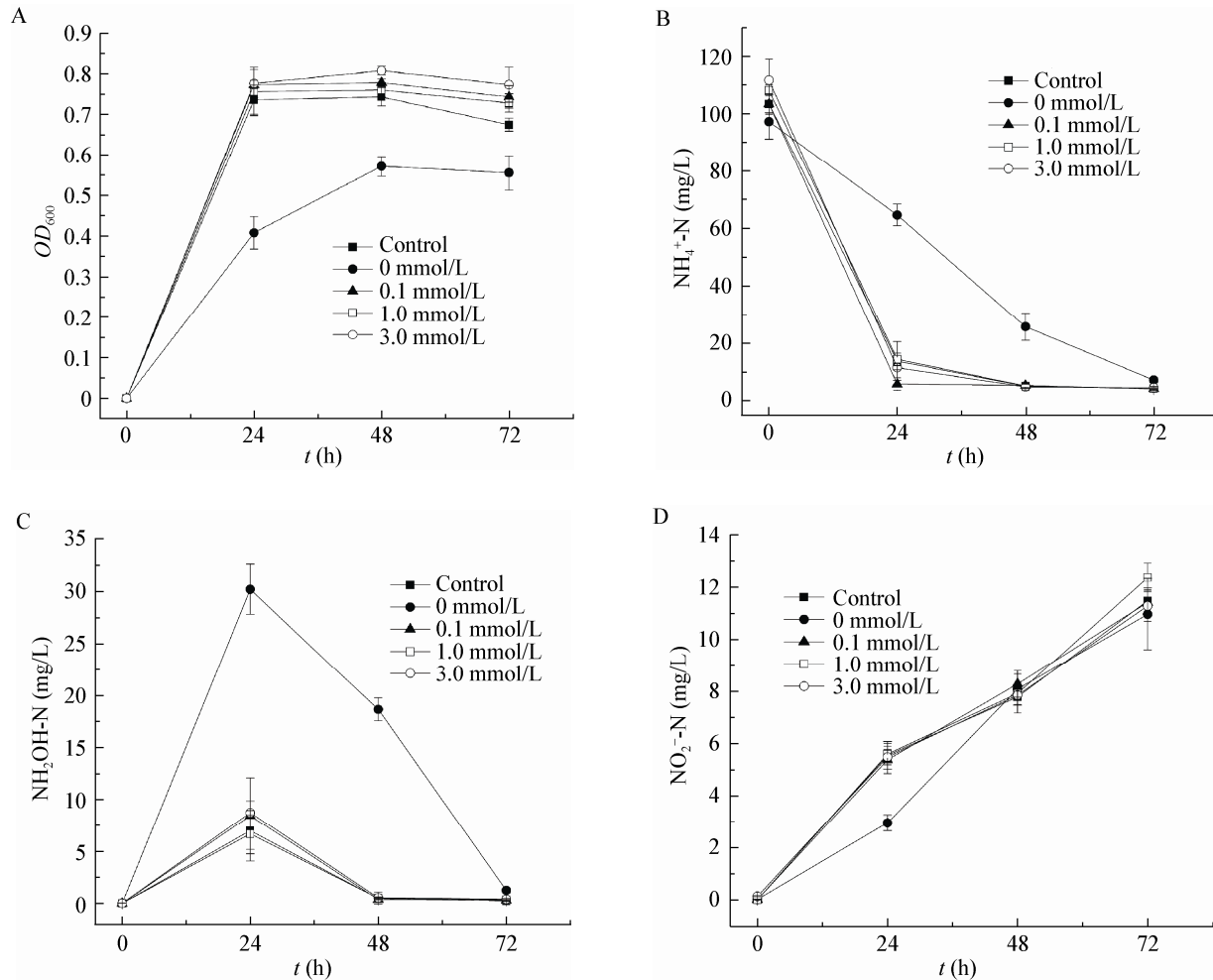


图2 不同浓度 Mg^{2+} 对菌株 C16 硝化性能的影响

Figure 2 Effect of different concentrations of Mg^{2+} on nitrification performance by strain C16

注：误差线采用 2 次测定结果平均值±标准偏差形式表达。

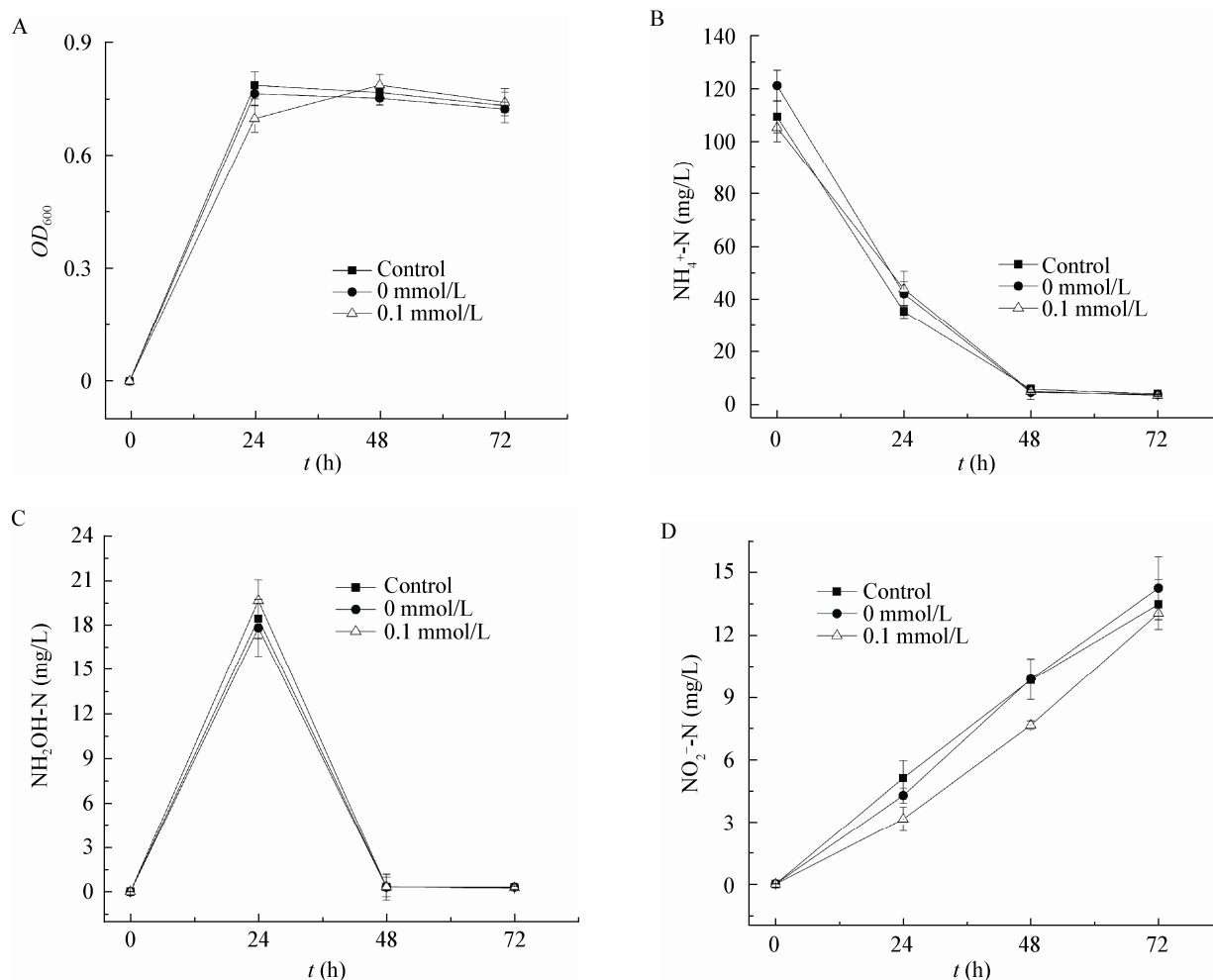
Note: Error bars using $\bar{x} \pm s$ of two replicates.

和 Mn^{2+} 存在时，对 C16 的生长和氨氮去除有抑制作用，由于不同金属离子之间存在协同作用^[29]， Fe^{2+} 与 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 共同存在时，对 C16 的生长和氨氮的去除是有利的。

2.3 Cu^{2+} 对 C16 硝化性能的影响

在原培养基的基础上，分别加入不同浓度的 Cu^{2+} ，以原培养基作为对照，研究 Cu^{2+} 对 C16 生长和脱氮性能的影响(图 5)。在图 5A 中，原培养基中 Cu^{2+} 加入与否，对 C16 的生长基本没有影响。在图 5B 中，0、0.1、0.5、1.0 mmol/L Cu^{2+} 在 24 h

的 NH_4^+ -N 去除率分别为：75.570%±3.727%、88.020%±2.323%、74.610%±3.318%、60.960%±2.791%。0.1 mmol/L Cu^{2+} 对 NH_4^+ -N 的去除有一定的促进作用，而 1.0 mmol/L Cu^{2+} 对 NH_4^+ -N 的去除有一定的抑制作用。一定浓度范围内的金属离子对酶活性有一定的促进作用，但当环境中的金属离子浓度超过这个范围时，会抑制酶的活性，从而抑制微生物的生长代谢作用^[11,30]。在图 5C 中，24 h 时对照组中的 NH_2OH 累积量明显高于其他浓度组。在图 5D 中，不同浓度 Cu^{2+} 使得培养基中基本无

图3 不同浓度 Mn^{2+} 对菌株 C16 硝化性能的影响Figure 3 Effect of different concentrations of Mn^{2+} on nitrification performance by strain C16

注: 误差线采用 2 次测定结果平均值 \pm 标准偏差形式表达。

Note: Error bars using $\bar{x}\pm s$ of two replicates.

NO_2^- -N 的积累, 这可能是由于 Cu^{2+} 的加入促进了 Nir 的活性, 使得 C16 的 NO_2^- -N 还原速率加快。于大禹等^[31]研究发现, 0.1 mmol/L 的 Cu^{2+} 对异养硝化细菌 H1 氨氮氧化过程也有显著促进作用。 Cu^{2+} 也可以促进异养硝化细菌 *Nitrosomonas europaea* 的生长和氨氮去除速率^[29]。

在原培养基中加入一定浓度的 Cu^{2+} 对 C16 脱氮作用产生了影响, 0.1 mmol/L 的 Cu^{2+} 对 C16 的生长和 NH_4^+ -N 氧化有一定的促进作用。在不同种类金属离子对 C16 生长和脱氮影响实验中, 培养基中只有 Cu^{2+} 存在时, 明显抑制了 C16 的生长并

且脱氮效果也很差, 如图 1 所示。由于不同金属离子之间存在协同作用^[29], 因此 Cu^{2+} 与其他金属离子共同存在时, 对 C16 的生长和脱氮过程才有促进作用。此外, 不同浓度 Cu^{2+} 的加入使得培养基中 NH_2OH 的累积量明显减少, 而且也没有 NO_2^- -N 的积累。由于过量亚硝酸盐的积累对水生态系统会带来环境和健康问题^[15,32], 因此, 可考虑在原培养基中加入 0.1 mmol/L 的 Cu^{2+} , 以促进 C16 的生长和脱氮效率以及避免过量亚硝酸盐的积累。由此可知, 异养硝化细菌硝化产物的积累是可以通过改变环境条件而去除的。

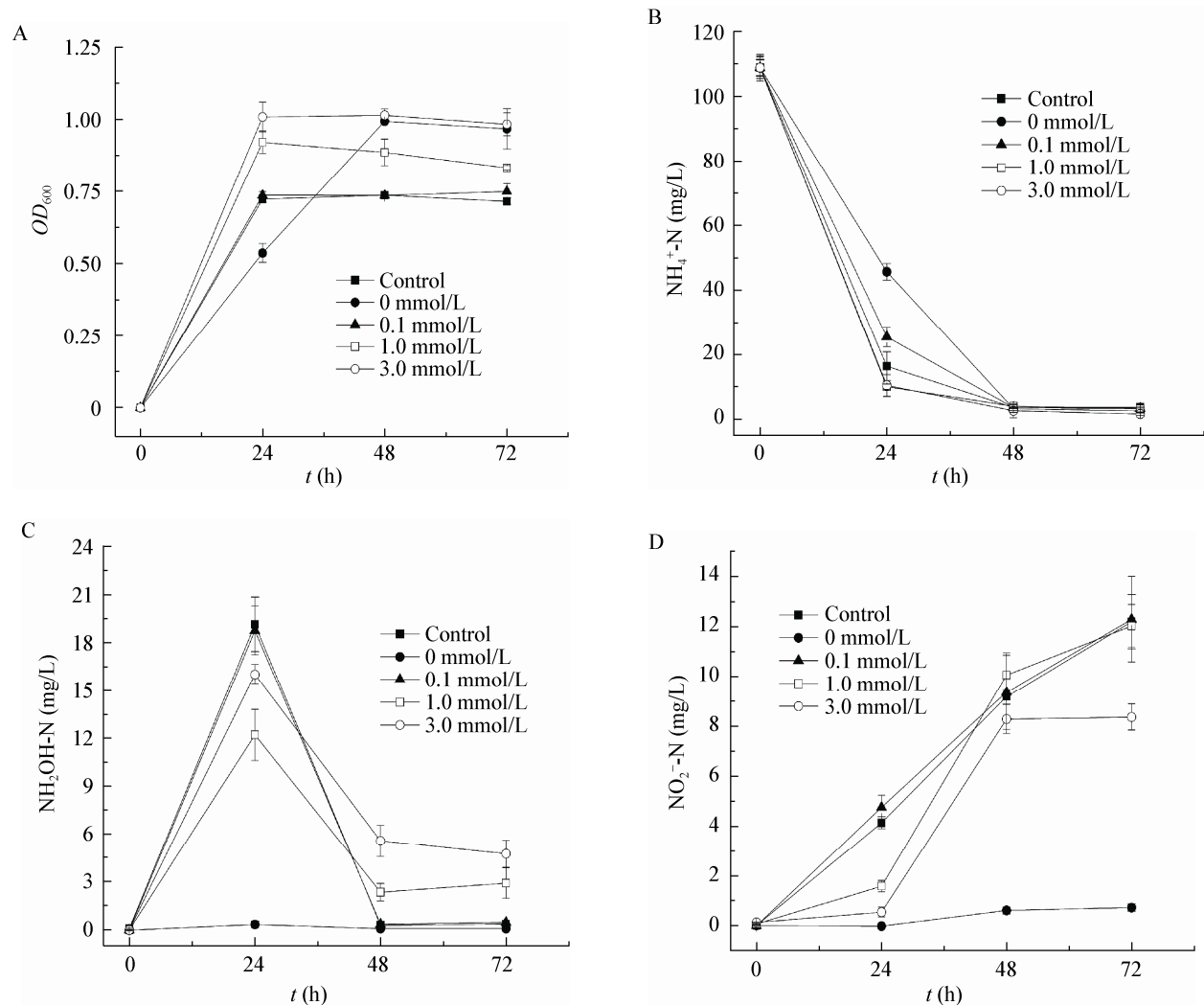


图4 不同浓度 Fe²⁺对菌株 C16 硝化性能的影响

Figure 4 Effect of different concentrations of Fe²⁺ on nitrification performance by strain C16

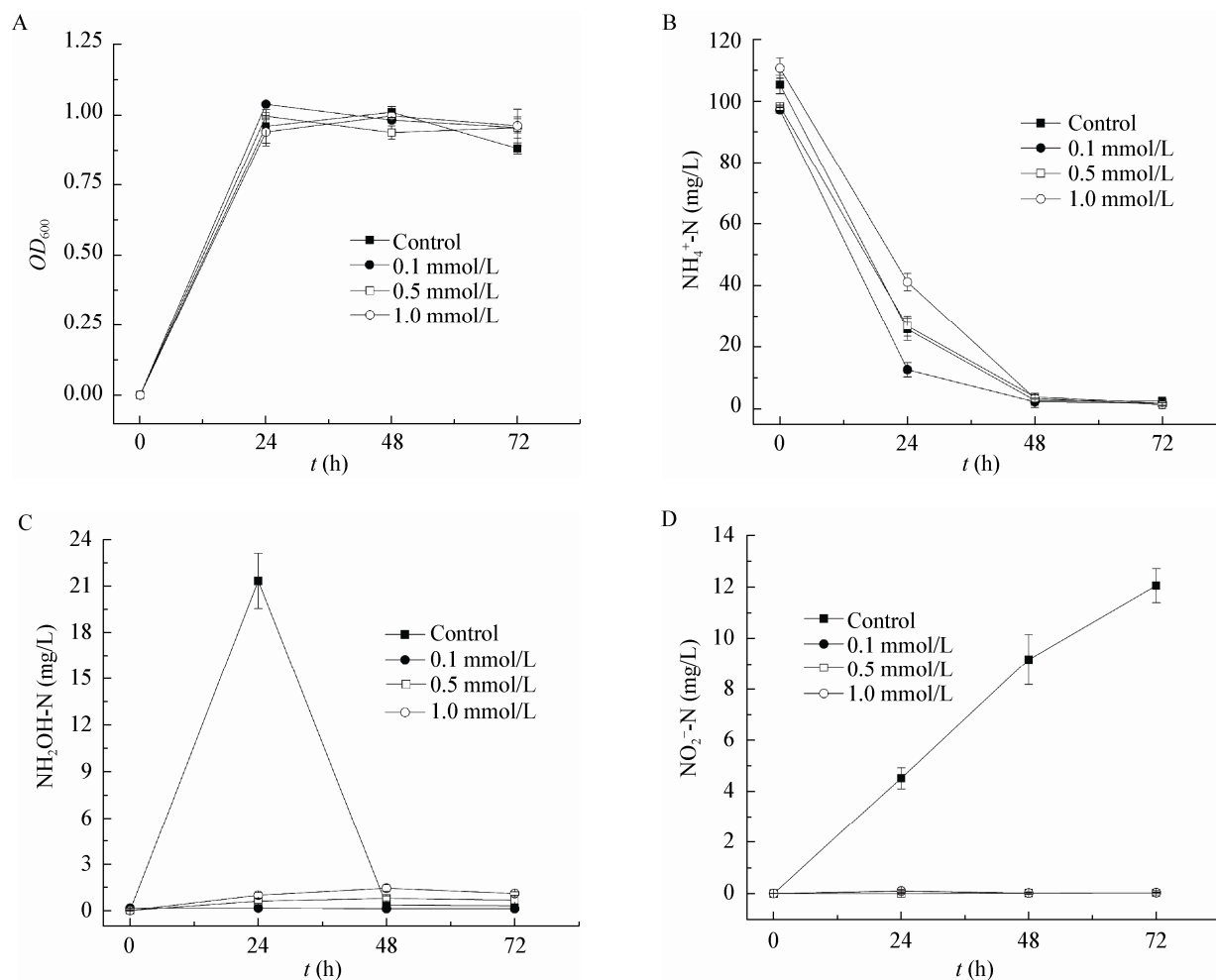
注：误差线采用 2 次测定结果平均值±标准偏差形式表达。

Note: Error bars using $\bar{x} \pm s$ of two replicates.

2.4 Zn²⁺对 C16 硝化性能的影响

在原培养基的基础上，分别加入不同浓度的 Zn²⁺，以原培养基作为对照，研究 Zn²⁺对 C16 生长和脱氮性能的影响。如图 6 所示。在 24 h 时，随着 Zn²⁺浓度的增加，C16 的生长受到抑制(图 6A)；0、0.1、1.0、3.0 mmol/L Zn²⁺在 24 h 的 NH₄⁺-N 去除率分别为：46.280%±3.701%、42.290%±3.958%、34.550%±1.585%和 25.640%±1.857% (图 6B)，NH₂OH 的积累量分别为 25.234±1.889、14.248±2.148、

12.960±1.496 和 5.836±1.028 mg/L (图 6C)；不同浓度组中 NO₂⁻-N 的积累与原培养基基本相同(图 6D)。由此可知，Zn²⁺对 C16 的生长和氨氮去除是不利的。而在金属离子种类对 C16 脱氮影响实验中，Zn²⁺也明显地抑制了 C16 的生长和氨氮氧化速率，如图 1 所示。Kim 等^[28]的研究结果显示，Zn²⁺对 PK15 的生长和氨氮去除速率没有任何影响。因此，在酶活实验中，可以不用考虑 Zn²⁺对 C16 的影响。

图5 不同浓度 Cu²⁺对菌株 C16 硝化性能的影响Figure 5 Effect of different concentrations of Cu²⁺ on nitrification performance by strain C16

注: 误差线采用 2 次测定结果平均值±标准偏差形式表达。

Note: Error bars using $\bar{x} \pm s$ of two replicates.

2.5 不同金属离子对酶活性的影响

0.1 mmol/L 金属离子对 HAO、Nar 和 Nir 3 种酶活性的影响,如表 1 所示。在这 4 种金属离子中, Cu²⁺对 HAO 活性有一定的抑制作用,但明显促进了 Nir 和 Nar 的活性。Mg²⁺明显促进了 HAO 的活性,但对 Nar 和 Nir 的作用不明显。Mn²⁺和 Fe²⁺对这 3 种酶的作用都不明显。

在表 1 中,0.1 mmol/L Cu²⁺明显增强了 Nar 和 Nir 的活性,根据好氧反硝化途径 NO₃⁻→NO₂⁻→

N₂^[3], NO₃⁻在 Nar 的作用下还原成 NO₂⁻, NO₂⁻又在 Nir 的作用下发生还原反应。Nar 和 Nir 活性的增大使得反应向右进行的速率加快,从而使培养基中 NO₂⁻-N 的积累量减少,也可能使 NH₂OH 的氧化速率加快。这可以很好地解释在图 5C、D 中, Cu²⁺的加入使得培养基中无 NO₂⁻-N 积累和 NH₂OH 明显减少的现象。0.1 mmol/L Mg²⁺明显促进了 HAO 的活性,在图 2B 中,0.1 mmol/L Mg²⁺也明显促进了氨氮氧化速率。

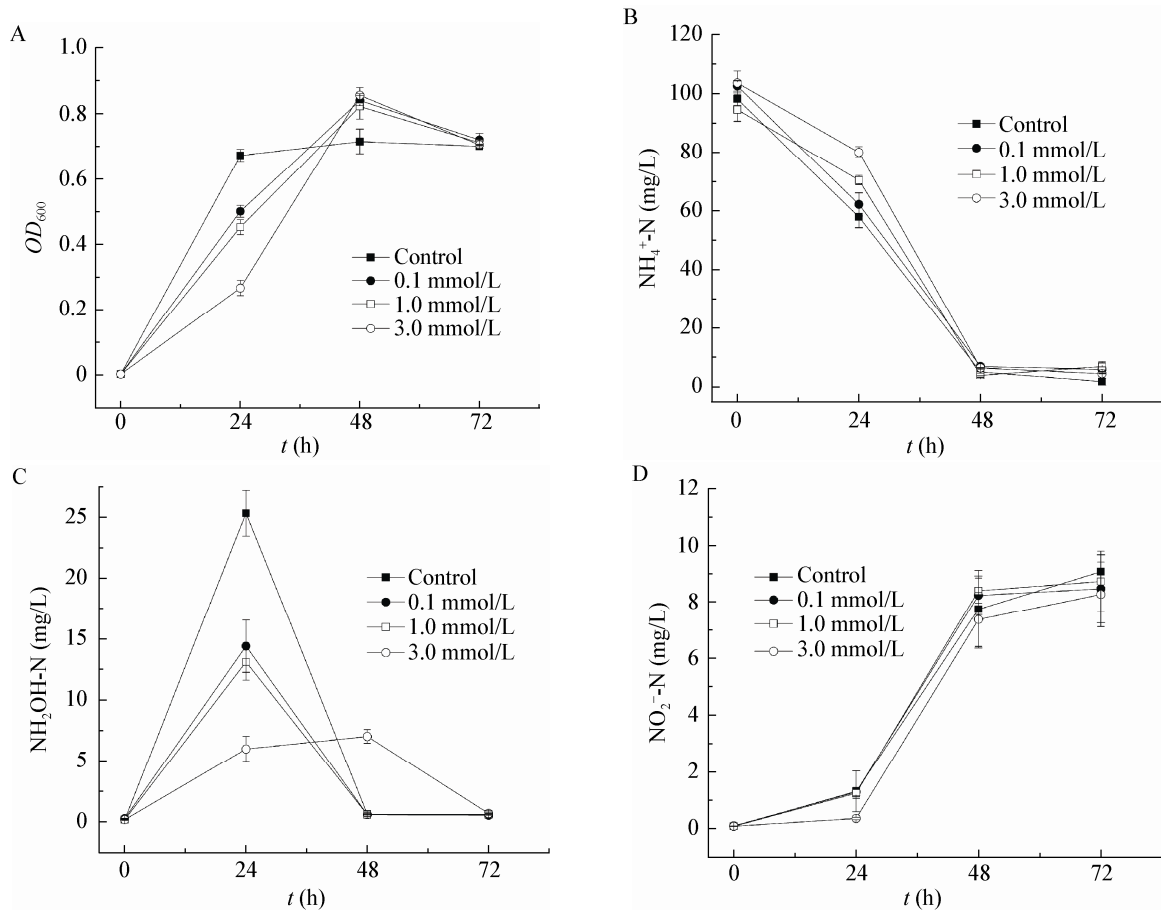


图6 不同浓度 Zn²⁺对菌株 C16 硝化性能的影响

Figure 6 Effect of different concentrations of Zn²⁺ on nitrification performance by strain C16

注：误差线采用 2 次测定结果平均值±标准偏差形式表达。

Note: Error bars using $\bar{x} \pm s$ of two replicates.

表 1 不同金属离子对 HAO、Nar 和 Nir 活性的影响
Table 1 Effect of different metal ions on HAO, Nar and Nir activities

金属离子 Metal ions	亚硝酸盐还原酶 Nir (U/mg protein)	活性 Activity (%)	硝酸盐还原酶 Nar (U/mg protein)	活性 Activity (%)	羟胺氧化还原酶 HAO (U/mg protein)	活性 Activity (%)
Control	0.007 77	100	0.008 20	100	0.009 46	100
Mg ²⁺	0.008 53	110	0.009 37	114	0.011 69	124
Mn ²⁺	0.009 24	119	0.009 61	117	0.010 29	109
Cu ²⁺	0.010 62	137	0.011 01	134	0.007 94	84
Fe ²⁺	0.008 52	110	0.007 75	95	0.009 79	103

3 结论

Mg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺和 Zn²⁺ 5 种金属离子分别对异养硝化细菌 C16 的生长、脱氮性能、亚硝酸盐氮积累以及酶活性产生了不同影响。Mg²⁺是 C16 生长和脱氮过程中的一种重要金属离

子；较高浓度 Mn²⁺使得 C16 无法生长；原培养基中缺少 Fe²⁺会抑制 C16 的生长和 NH₄⁺-N 氧化速率；Cu²⁺加入可避免过量亚硝酸盐积累。不同浓度的 Zn²⁺对 C16 的生长和氨氮去除有抑制作用。在酶活实验中 0.1 mmol/L Mg²⁺促进了 HAO 的活性 0.1 mmol/L

Cu²⁺明显地促进了反硝化酶 Nar 和 Nir 的活性。

参 考 文 献

- [1] Joo HS, 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.
- [2] Lv YK, Wang X, Liu BK, et al. Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying strain W1[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2012, 20(5): 995-1002.
- [3] Zhao B, He YL, Huang J, et al. Heterotrophic nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, 37(6): 609-616.
- [4] 刘玉香, 王瑶, 李屹, 等. 复合异养脱氮菌群脱氮性能研究[J]. 太原理工大学学报, 2012, 43(4): 421-424.
- [5] 吕永康, 殷家红, 刘玉香, 等. 一株异养硝化菌的分离鉴定及其最佳亚硝化条件[J]. 化工学报, 2011, 5(62): 1421-1427.
- [6] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Water Research, 2006, 40(16): 3029-3036.
- [7] Su JJ, Yeh KS, Tseng PW. A strain of *Pseudomonas* sp. isolated from piggery wastewater treatment systems with heterotrophic nitrification capability in Taiwan[J]. Current Microbiology, 2006, 53(1): 77-81.
- [8] Robertson LA, Van Niel EDWJ, Torremans RAM, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(11): 2812-2818.
- [9] Zhao B, He YL, Hughes J, et al. Heterotrophic nitrogen removal by a newly isolated *Acinetobacter calcoaceticus* HNR[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(14): 5194-5200.
- [10] 何霞, 吕剑, 何义亮, 等. 异养硝化机理的研究进展[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 844-847.
- [11] 汪小明, 严子春, 施锦. 金属离子对活性污泥法处理效能的影响[J]. 石油化工应用, 2008, 27(2): 1-3.
- [12] 孟雪征, 赖震宏, 龙腾锐. 金属离子对好氧活性污泥活性的影响[J]. 安全与环境学报, 2004, 4(6): 43-45.
- [13] 杨峰晓, 唐赟. 金属离子对嗜热菌 BF80 生长及苯酚降解的影响研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 876-881.
- [14] Hooper AB, Vannelli T, Bergmann DJ, et al. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1997, 71: 59-67.
- [15] Celen E, Kilic MA. Isolation and characterization of aerobic denitrifiers from agricultural soil[J]. Turkish Journal of Biology, 2004, 28(1): 9-14.
- [16] Bell LC, Richardson DJ, Ferguson SJ. Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*: The periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification[J]. FEBS Letters, 1990, 265(1): 85-87.
- [17] Bedzyk L, Wang T, Rick WY. The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(9): 2802-2806.
- [18] Moir JWB, Baratta D, Richardson DJ, et al. The purification of a cd1-type nitrite reductase from, and the absence of a copper-type nitrite reductase from, the aerobic denitrifier *Thiosphaera pantotropha*; the role of pseudoazurin as an electron donor[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 212(2): 377-385.
- [19] 王一明, 彭光浩. 异养硝化微生物的分子生物学研究进展[J]. 土壤, 2003, 35(5): 378-386.
- [20] Ensign SA, Hyman MR, Arp DJ. *In vitro* activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(7): 1971-1980.
- [21] Robertson LA, Kuenen JG. *Heterotrophic nitrification in Thiosphaera pantotropha*: oxygen uptake and enzyme studies[J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134(4): 857-863.
- [22] 宋琴, 许雷. 异养硝化作用酶学研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(5): 60-62.
- [23] Moir J, Wehrfritz JM, Spiro S, et al. The biochemical characterization of a novel non-haem-iron hydroxylamine oxidase from *Paracoccus denitrificans* GB17[J]. Biochemical Journal, 1996, 319(3): 823.
- [24] Palmer T. Understanding Enzymes[M]. London: Prentice Hall, 1995: 128-154.
- [25] Liu YX, Li Y, Lv YK. Isolation and characterization of a heterotrophic nitrifier from coke plant wastewater[J]. Water Science and Technology, 2012, 65(11): 2084-2090.
- [26] 国家环保总局水和废水检测分析方法编委会. 水和废水分析监测方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 211.
- [27] Frear D, Burrell R. Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants[J]. Analytical Chemistry, 1955, 27(10): 1664-1665.
- [28] Kim JK, Park KJ, Cho KS, et al. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(17): 1897-1906.
- [29] 寇明旭, 刘全阳. 金属离子对活性污泥微生物影响研究进展[J]. 山西建筑, 2007, 33(5): 176-177.
- [30] Loveless J, Painter H. The influence of metal ion concentrations and pH value on the growth of a *Nitrosomonas* strain isolated from activated sludge[J]. Journal of General Microbiology, 1968, 52(1): 1-14.
- [31] 于大禹, 张琳颖, 高波. 异养硝化-好氧反硝化菌异养硝化性能的影响因素[J]. 化工进展, 2012, 31(12): 2797-2800.
- [32] Croen LA, Todoroff K, Shaw GM. Maternal exposure to nitrate from drinking water and diet and risk for neural tube defects[J]. American Journal of Epidemiology, 2001, 153(4): 325-331.