

研究报告

## *Acinetobacter* sp. Y1 的氨氮去除性能及其关键酶活性

刘泽英<sup>1</sup> 吕永康<sup>1\*</sup> 刘玉香<sup>2</sup> 范晓军<sup>3</sup> 孙明星<sup>3</sup>

(1. 太原理工大学 煤科学与技术教育部和山西省重点实验室 山西 太原 030024)

(2. 太原理工大学环境科学与工程学院 山西 太原 030024)

(3. 太原理工大学化学化工学院 山西 太原 030024)

**摘要:**【目的】研究 *Acinetobacter* sp. Y1 的氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)去除性能及其关键酶的提取与酶活性。【方法】以柠檬酸钠为碳源, 硫酸铵为氮源, 研究菌株 Y1 的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 去除性能; 采用正交实验优化超声波破碎法提取粗酶的条件, SDS-PAGE 分析比较渗透压休克法和超声波破碎法获得的粗酶; 检测关键酶——羟胺氧化还原酶(HAO)、亚硝酸盐还原酶(NIR)、硝酸盐还原酶(NAR)的酶活性。【结果】24 h 内菌株 Y1 的菌密度(*OD*<sub>600</sub>)可达 1.280, 对 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、总氮(TN)和 COD 的降解率分别达到 98%、94%和 92%, 硝化过程中羟胺、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮不积累, 反硝化产生 N<sub>2</sub>; 超声波破碎法提取粗酶的最佳工作条件为: 破碎功率 50 W, 工作与间歇时间分别为 4 s 和 7 s, *OD*<sub>600</sub> 为 1.250, 总工作时间 20 min, 关键酶 HAO、NIR 和 NAR 的比活力分别为 0.011、0.002 和 0.018 U/mg; 渗透压休克法得到的 HAO 比活力是 0.067 U/mg。【结论】*Acinetobacter* sp. Y1 能同时高效去除 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、TN 和 COD。优化超声波破碎法提取粗酶的条件, 检测到 HAO、NIR 和 NAR 的酶活性, 且渗透压休克法比超声波破碎法更适合用来提取 HAO。

**关键词:** 异养硝化, 氨氮, 羟胺氧化还原酶, 亚硝酸盐还原酶, 硝酸盐还原酶

## Ammonia nitrogen removal characteristic and its key enzymes activity of *Acinetobacter* sp. Y1

LIU Ze-Ying<sup>1</sup> LYU Yong-Kang<sup>1\*</sup> LIU Yu-Xiang<sup>2</sup> FAN Xiao-Jun<sup>3</sup> SUN Ming-Xing<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Coal Science and Technology of Shanxi Province and Ministry of Education, Taiyuan University of Technology, Taiyuan, Shanxi 030024, China)

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

(3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan, Shanxi 030024, China)

**Abstract:** [Objective] To study the ammonia nitrogen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) removal characteristic, extraction and activity of its key enzymes in *Acinetobacter* sp. Y1. [Methods] Sodium citrate and ammonium

**Foundation item:** Science and Technology Development of Shanxi Province (No. 20140321013-04); The Program for International Cooperation Projects of Shanxi Province (No. 2013081020)

\*Corresponding author: Fax: 86-351-6010386; E-mail: yongkanglv@163.com

Received: October 15, 2015; Accepted: December 15, 2015; Published online (www.cnki.net): January 04, 2016  
基金项目: 山西省科技攻关项目(No. 20140321013-04); 山西省国际合作计划项目(No. 2013081020)

\*通讯作者: Fax: 86-351-6010386; E-mail: yongkanglv@163.com

收稿日期: 2015-10-15; 接受日期: 2015-12-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-04

sulfate were used as the sole carbon and nitrogen sources respectively to investigate  $\text{NH}_4^+$ -N removal characteristic of strain Y1. The ultrasonic conditions were optimized using orthogonal experiment, and the crude enzyme obtained from ultrasonic crushing method and osmotic shock method were compared by SDS-PAGE, then the activity of key enzymes—hydroxylamine oxidoreductase (HAO), nitrite reductase (NIR) and nitrate reductase (NAR) were measured. **[Results]** Bacteria density ( $OD_{600}$ ) was 1.280, and  $\text{NH}_4^+$ -N, total nitrogen (TN), COD removal rate can reach up to 98%, 94% and 92% respectively of strain Y1 in 24 h. Hydroxylamine, nitrite nitrogen and nitrate nitrogen in nitrification process were detected without accumulation, and  $\text{N}_2$  was produced in the process of denitrification. The optimal ultrasonic conditions were: ultrasonic power 50 W, work/interval time 4/7 s,  $OD_{600}$ =1.250 and total working time 20 min, and the corresponding specific activities of HAO, NIR and NAR were 0.011, 0.002, 0.018 U/mg, respectively. Specific activity of HAO obtained by osmotic shock method was 0.067 U/mg. **[Conclusion]**  $\text{NH}_4^+$ -N, TN and COD were removed simultaneously with high efficiency by strain Y1. HAO, NIR and NAR activities were detected after optimizing the ultrasonic conditions. And it was better to use osmotic shock method for HAO extraction than ultrasonic crushing method.

**Keywords:** Heterotrophic nitrification, Ammonia nitrogen, Hydroxylamine oxidoreductase, Nitrite reductase, Nitrate reductase

氮是造成环境污染和水质富营养化的重要污染物,控制含氮污水的排放越来越受到人们的重视<sup>[1]</sup>。异养硝化细菌在利用有机碳源进行生长的同时将含氮化合物硝化生成羟胺、亚硝酸盐、硝酸盐等产物,多数还能同时进行好氧反硝化作用,直接将硝化产物转化为含氮气体,具有经济、高效、易操作等优点<sup>[2-3]</sup>,成为目前最有前景的脱氮方法。

已经发现的异养硝化细菌种类繁多,例如 *Paracoccus versutus* LYM<sup>[4]</sup>、*Alcaligenes faecalis* NR<sup>[5]</sup>、*Klebsiella pneumoniae* CF-S9<sup>[6]</sup>、*Pseudomonas stutzeri* YZN-001<sup>[7]</sup>和 *Bacillus methylotrophicus* L7<sup>[8]</sup>等。但是,异养硝化细菌基质范围广泛,硝化和反硝化性能差异明显,氨氮( $\text{NH}_4^+$ -N)去除机理较为复杂<sup>[5]</sup>。一种路径是  $\text{NH}_4^+$ -N 在氨单加氧酶作用下被氧化为羟胺,然后由羟胺氧化还原酶(HAO)氧化为亚硝酸盐氮( $\text{NO}_2^-$ -N),而后  $\text{NO}_2^-$ -N 在亚硝酸盐还原酶(NIR)、硝酸盐还原酶(NAR)等的催化作用下还原为含氮气体<sup>[9-11]</sup>;另一种路径是通过羟胺直接将  $\text{NH}_4^+$ -N 氧化为含氮气体<sup>[4,12]</sup>。因此,HAO、NIR、NAR 是  $\text{NH}_4^+$ -N 去除过程中的 3 个关键酶,且两种路径之间的根本区别是 HAO 催化的羟胺转化途径不同,所以,在异养硝化细菌代谢过程中,HAO 占

据核心地位<sup>[13-14]</sup>。HAO 是周质蛋白,可以通过渗透压休克法释放。但由于超声波破碎法在实验室应用的普遍性,国内外学者对 HAO 提取主要采用超声波破碎法<sup>[5-6]</sup>。目前,异养硝化细菌的相关研究多数还是集中在菌株的筛选和生物学特性上,从酶学角度研究其  $\text{NH}_4^+$ -N 去除性能的报道较少, $\text{NH}_4^+$ -N 去除相关的关键酶的提取和酶活性研究也鲜有报道。

*Acinetobacter* sp. Y1 是从太原焦化污水处理厂活性污泥中筛选到的一株异养硝化菌,在中国普通微生物菌种保藏中心保藏登记号为 CGMCC6563。本文研究了菌株 Y1 的  $\text{NH}_4^+$ -N 去除性能,采用正交实验优化超声波破碎法提取粗酶的条件,SDS-PAGE 分析比较渗透压休克法和超声波破碎法获得的粗酶,检测关键酶 HAO、NIR、NAR 的酶活性,为从酶学角度深入了解异养硝化细菌的  $\text{NH}_4^+$ -N 去除性能提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

菌株 *Acinetobacter* sp. Y1 与甘油混合,冷冻保存在  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 。

硝化培养基(g/L):柠檬酸钠 4.902,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.472, NaCl 0.12,  $K_2HPO_4$  0.20,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  0.01,  $FeSO_4$  0.01, pH 7.0, C/N 14, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

## 1.2 方法

**1.2.1 氨氮去除性能:** 将 1 mL 处于对数生长期的菌株 Y1 接种到装有 100 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中。30 °C、120 r/min 摇床培养, 定时取样, 测定相应的菌密度( $OD_{600}$ )、 $NH_4^+$ -N、羟胺、 $NO_2^-$ -N、硝酸盐氮( $NO_3^-$ -N)、总氮(TN)和 COD 值。结果取 3 个重复实验平均值。

**1.2.2 气体检测:** 将 1 mL 处于对数生长期的菌株 Y1 接种到装有 100 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中。没有接种菌株 Y1 的一组作为对照。0.6 MPa 下连续充纯氧 5–6 min 后, 用橡胶塞将锥形瓶口封住, 再用封口胶将瓶口密封好。30 °C、120 r/min 摇床培养, 每隔 6 h 取样, 培养至 48 h。用气相色谱(SP-2100, Beifen-Ruili China)测定  $N_2$  含量。

**1.2.3 超声波破碎:** 将 1 mL 处于对数生长期的菌株 Y1 接种到装有 100 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 30 °C、120 r/min 摇床培养 16 h。将菌液 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清收集菌体。用 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液洗 3 次, 重悬菌体于离心管中, 用超声波细胞粉碎机破碎, 工作条件按单因素和正交试验表进行。超声波破碎后, 将破碎液 4 °C、14 000 r/min 离心 20 min, 上清即为粗酶液。用考马斯亮蓝法测定粗酶液在 595 nm 下的吸光度, 以此表征细胞破碎的效果。结果取 3 个重复实验平均值。

**1.2.4 渗透压休克法:** 将培养好的菌液 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清收集菌体。用去离子水洗 3 次, 重悬菌体于含 0.5 mol/L 蔗糖和 1.3 mmol/L EDTA 二钠盐的 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH 8.0)中, 室温下轻轻振荡 15 min 后 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清; 将菌体重悬于 Tris-HCl 缓冲液(20 mmol/L, pH 8.0), 室温下轻轻振荡 15 min, 4 °C、14 000 r/min 离心 20 min

取上清。

**1.2.5 HAO、NIR、NAR 酶活性测试:** HAO 测定的体系包括 0.050 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 0.001 mmol/L  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 0.004 mmol/L EDTA, 酶液, 加入羟胺开始反应, 30 °C 孵育 15 min, 根据反应体系中羟胺的减少量测定 HAO 的活性<sup>[15]</sup>。NIR、NAR 酶测定体系包括 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4), 0.200 mmol/L NADH, 酶液, 分别加入亚硝酸钠、硝酸钠开始反应, 30 °C 孵育 15 min, 根据反应前后亚硝酸钠、硝酸钠的减少量分别测定 NIR、NAR 的活性<sup>[16]</sup>。

蛋白浓度的测定用 Bradford Protein Assay Kit (Sangon, China)。一个酶活单位(U)定义为每分钟催化 1  $\mu$ mol 反应物所需的酶量。酶比活力(U/mg)定义为每毫克蛋白所具有的酶活力单位。

**1.2.6 分析方法:** 菌密度( $OD_{600}$ )采用可见分光光度计测定; 氨氮采用纳氏试剂光度法; 羟胺用 8-羟基喹啉光度法; 亚硝酸盐氮采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法; 硝氮采用酚二磺酸光度法; 总氮采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法; COD 采用消解比色法; 粗酶溶出量采用考马斯亮蓝染色法;  $N_2$  由气相色谱测定<sup>[17-18]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的氨氮去除性能

如图 1 所示, 菌株 Y1 生长的迟缓期较短, 4 h 后进入对数生长期, 4–12 h 时生长速度最快, 最大生长速率( $\mu_{max}$ )达到  $0.11 h^{-1}$ , 24 h 时基本进入稳定期,  $OD_{600}$  可达 1.280。12 h 时, 97%的  $NH_4^+$ -N 被去除, 相应的硝化速率达到  $7.83 mg/(L \cdot h)$ , 24 h 时,  $NH_4^+$ -N 降解率达到 98%以上。*Acinetobacter* sp. HA2<sup>[19]</sup>、*Klebsiella pneumoniae* CF-S9<sup>[6]</sup>、*Rhodococcus* sp. CPZ24<sup>[20]</sup>的硝化速率分别为 3.03、4.3、3.4  $mg/(L \cdot h)$ , 均低于菌株 Y1 的降解速率。定性实验检测到  $NH_4^+$ -N 去除过程中有  $N_2$  产生, 36 h 时达到稳定值, 约为 53.74%。硝化过程中, 培养基中羟胺、 $NO_2^-$ -N、 $NO_3^-$ -N 都没有积累, 可能是

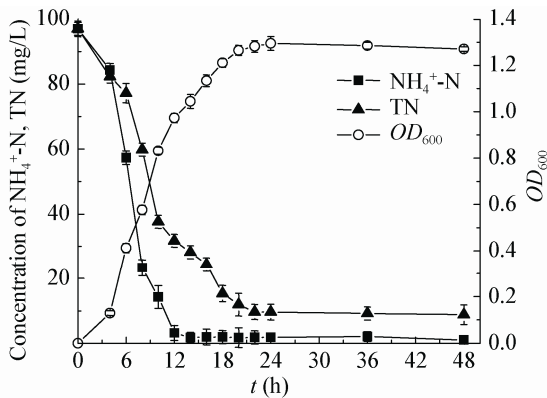


图1 菌株 Y1 的生长、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 去除性能  
Figure 1 The growth,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  and TN removal characteristics of strain Y1

$\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除过程中没有生成这 3 种中间代谢物,也可能是生成后在 HAO、NIR 和 NAR 的催化作用下迅速进入下一步转化。

如图 1、2 所示,在菌株 Y1 的作用下,TN、COD 快速降低,24 h 时,TN、COD 的降解率分别达到 94%、92%。证明菌株 Y1 不仅具有良好的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN 去除性能,也能高效分解有机物,可以充分地利用有机碳源生长并合成生命体,具有异养微生物的特性。相比之下,*Bacillus* sp. LY 和 *Brevibacillus* sp. LY 对 TN 的降解率分别为 69.12% 和 35.16%,对 COD 的降解率分别为 71.7% 和 52.16%<sup>[21]</sup>,远低于菌株 Y1 的性能。

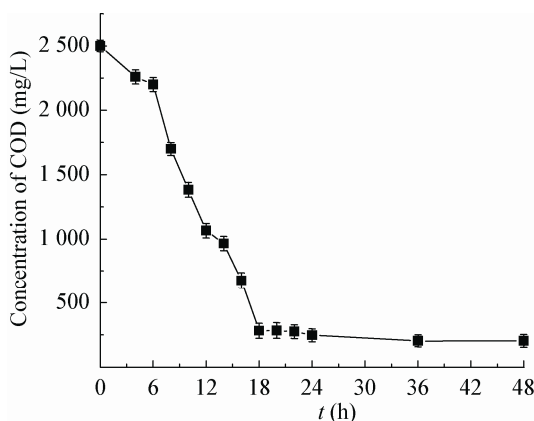


图2 菌株 Y1 的 COD 去除性能  
Figure 2 The COD removal characteristic of strain Y1

## 2.2 关键酶的提取

2.2.1 超声波破碎法提取粗酶条件优化: 为了研究 HAO、NIR 和 NAR 的酶活性,需要进行关键酶的提取。超声波破碎法提取粗酶在实验室规模应用普遍,但由于超声对细菌有热效应、空化效应、机械效应,应首先考察影响粗酶溶出量的因素(主要有破碎功率、工作与间歇时间、 $\text{OD}_{600}$ 、总工作时间),并采用正交实验进行优化,确定超声波破碎的最佳工作条件。

图 3 反映了超声波破碎功率、工作与间歇时间、 $\text{OD}_{600}$ 、总工作时间对  $A_{595}$  的影响。 $A_{595}$  随着超声波破碎功率呈现先增加后减少的趋势,50 W 时, $A_{595}$  达到最大值,进一步提高功率, $A_{595}$  随之减小(图 3A)。这是由于超声波功率增大,细胞壁的网状结构容易被破碎为较小的碎片,但功率过大时,溶出蛋白易断裂<sup>[22]</sup>。根据经验及参考文献<sup>[22]</sup>,固定超声的间歇时间为 7 s,工作时间为 4 s 时,空化效应产生的气泡能有足够时间爆炸, $A_{595}$  达到最大,工作时间超过 4 s 后,产生的热量不能及时扩散会导致蛋白质变性(图 3B)。 $\text{OD}_{600}$  增加,总的蛋白含量增大,但  $\text{OD}_{600}$  超过 1.250 后,菌液粘度相对升高,菌体接触空化气泡的机会减少,导致破碎效率降低,粗酶溶出量随之减少(图 3C)。同时,延长破碎时间,细菌破碎更完全,粗酶溶出量增加(图 3D),总工作时间超过 20 min,热效应增强,空化效应也会产生高温高压,导致部分蛋白变性<sup>[23]</sup>。

采用  $L_9(3^4)$  正交实验,结合单因素实验结果,对粗酶提取条件进行优化。各因素所选参数如表 1 所示,正交实验结果如表 2 所示。由正交实验  $R$  值分析可知,各因素对粗酶溶出量影响的重要程度依次为  $C>D>A>B$ ,即菌液密度对粗酶溶出量影响最大,然后是总工作时间、超声波破碎功率,工作与间歇时间影响最小。由  $T$  值分析可知,最佳参数组合为  $C_2D_2A_2B_2$ ,即菌液密度 1.250,总工作时间 20 min,超声波破碎功率 50 W,工作与间歇时间分别为 4 s 和 7 s。

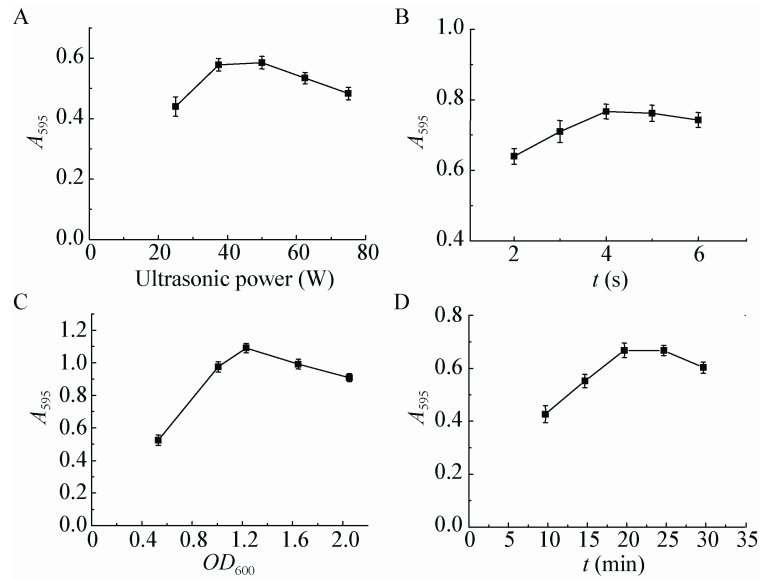


图3 粗酶溶出量与超声波破碎功率(A)、工作与间歇时间(B)、OD<sub>600</sub> (C)、总工作时间(D)的关系

Figure 3 Relationship between A<sub>595</sub> and ultrasonic power (A), work/interval time (B), OD<sub>600</sub> (C), total work time (D)

注:A:工作与间歇时间分别为4s和7s, OD<sub>600</sub>=1.250,总工作时间20min; B:超声波破碎功率50W,间歇时间7s, OD<sub>600</sub>=1.250,总工作时间20min; C:超声波破碎功率50W,工作与间歇时间分别为4s和7s,总工作时间20min; D:超声波破碎功率50W,工作与间歇时间分别为4s和7s, OD<sub>600</sub>=1.250.

Note: A: Work/Interval time 4/7 s, OD<sub>600</sub>=1.250, total work time 20 min; B: Ultrasonic power 50 W, interval time 7 s, OD<sub>600</sub>=1.250, total work time 20 min; C: Ultrasonic power 50 W, work/interval time 4/7 s, total work time 20 min; D: Ultrasonic power 50 W, work/interval time 4/7 s, OD<sub>600</sub>=1.250.

表1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors			
	A 功率 Ultrasonic power (W)	B 工作与间歇时间 Work/Interval time (s)	C 菌液密度 OD <sub>600</sub>	D 总工作时间 Total work time (min)
	1	37	3/7	1.027
2	50	4/7	1.250	20
3	62	5/7	1.665	25

表2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验结果

Table 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal result

实验 Tests	A 功率 Ultrasonic power (W)	B 工作与间歇时间 Work/Interval time (s)	C 菌液密度 OD <sub>600</sub>	D 总工作时间 Total work time (min)	A <sub>595</sub>
1	1	1	1	1	0.346
2	1	2	2	2	0.869
3	1	3	3	3	0.688
4	2	1	2	3	0.922
5	2	2	3	1	0.665
6	2	3	1	2	0.597
7	3	1	3	2	0.801
8	3	2	1	3	0.567
9	3	3	2	1	0.703
T <sub>1</sub>	1.903	2.069	1.510	1.714	
T <sub>2</sub>	2.184	2.101	2.494	2.267	
T <sub>3</sub>	2.071	1.988	2.154	2.177	
R	0.281	0.113	0.984	0.553	

**2.2.2 渗透压休克法与超声波破碎法提取粗酶的 SDS-PAGE 分析比较:** HAO 是周质蛋白, 可以通过渗透压休克法释放。但由于超声波破碎法在实验室应用的普遍性, 国内外学者对 HAO 提取主要采用超声波破碎法<sup>[5-6,24]</sup>。将超声波破碎法和渗透压休克法获得 HAO 进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 4 所示, 超声波破碎法得到的粗酶液蛋白条带较多、含量高, 渗透压休克法得到的粗酶液蛋白条带少、含量也较低。原因是超声波破碎会使细胞壁、细胞膜破裂, 细胞内容物完全释放, 而渗透压休克法是使细菌的质壁分离, 细菌外膜破裂, 释放周质蛋白。基于这些优点, 渗透压休克法提取周质蛋白得到了更多学者的关注<sup>[14,25-27]</sup>。但要确定渗透压休克法是否比超声波破碎法更适合提取周质蛋白 HAO, 仍需通过酶活实验确定。

### 2.3 HAO、NIR、NAR 酶活性测试

根据正交实验得出的最佳工作条件对菌株 Y1 进行超声波破碎获得粗酶液, 检测关键酶 HAO、NIR 和 NAR 酶活性, 结果如表 3 所示。菌株 Y1 的

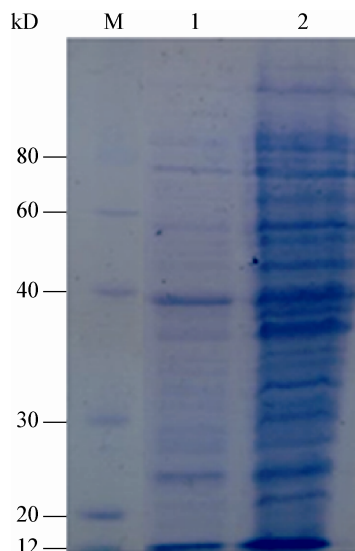


图 4 HAO 两种不同提取方法的 SDS-PAGE 分析  
Figure 4 SDS-PAGE analysis of two different extraction methods

注: M: 蛋白 Marker; 1: 渗透压休克法; 2: 超声波破碎法。  
Note: M: Protein marker; 1: Osmotic shock method; 2: Ultrasonic crushing method.

表 3 3 种酶的酶活力和比活力  
Table 3 Enzyme activities and specific activities of three enzymes

酶 Enzyme	酶活 Enzyme activity (U/mL)	比活力 Specific activity (U/mg)
HAO <sup>1</sup>	0.212	0.067
HAO <sup>2</sup>	0.033	0.011
NIR	0.006	0.002
NAR	0.054	0.018

注: HAO<sup>1</sup>: 渗透压休克法得到的 HAO; HAO<sup>2</sup>: 超声波破碎法得到的 HAO。

Note: HAO<sup>1</sup>: HAO obtained from osmotic shock method; HAO<sup>2</sup>: HAO obtained from ultrasonic crushing method.

HAO 酶活力为 0.033 U/mL, 比活力为 0.011 U/mg。本实验与其他文献中报道的 HAO 比活力具有相当的可比性, *Alcaligenes faecalis* NR<sup>[5]</sup>、*Acinetobacter calcoaceticus* HNR<sup>[24]</sup>、*Klebsiella pneumoniae* CF-S9<sup>[6]</sup> 的 HAO 酶比活力与菌株 Y1 为一个数量级, 分别为 0.016、0.051 和 0.011 U/mg。而 *Agrobacterium* sp. LAD9、*Achromobacter* sp. GAD3、*Comamonas* sp. GAD4 的 HAO 相对酶活力仅为  $0.94 \times 10^{-4}$ 、 $0.31 \times 10^{-4}$  和  $0.178 \times 10^{-3}$  U/mg<sup>[28]</sup>。渗透压休克法得到的 HAO 酶活力为 0.212 U/mL, 比活力为 0.067 U/mg, 均高于超声波破碎法得到的 HAO。因此渗透压休克法比超声波破碎法得到的粗酶液中 HAO 酶含量高, 杂蛋白含量低, 更有利于 HAO 的提取和进一步的分离纯化。

NIR、NAR 的酶活力和比活力分别为 0.006、0.054 U/mL 和 0.002、0.018 U/mg。*Klebsiella pneumoniae* CF-S9<sup>[6]</sup> 的 NIR、NAR 比活力分别为 0.018、0.007 U/mg。*Providencia rettgeri* YL<sup>[14]</sup> 的 NIR、NAR 比活力分别为 0.041、0.031 U/mg。

酶活性测试结果显示, 在  $\text{NH}_4^+$ -N 去除过程中, HAO、NIR、NAR 都有一定的表达。即  $\text{NH}_4^+$ -N 去除过程中的代谢产物(羟胺、 $\text{NO}_2^-$ -N、 $\text{NO}_3^-$ -N)在 HAO、NIR、NAR 的催化作用下得到进一步转化。HAO 酶活性较高, 但  $\text{NO}_2^-$ -N 在培养基中没有积累, 可能是有一部分羟胺在 HAO 作用下直接还原

为  $N_2$ <sup>[4]</sup>。

### 3 结论

(1) *Acinetobacter* sp. Y1 在柠檬酸钠为碳源、硫酸铵为氮源条件下生长 24 h,  $OD_{600}$  可达 1.280, 对氨氮、总氮、COD 的降解率分别高达 98%、94%、92%, 硝化过程羟胺、 $NO_2^-$ -N、 $NO_3^-$ -N 不积累, 反硝化产生  $N_2$ 。

(2) 超声波破碎法对 HAO、NIR、NAR 进行粗酶提取的最佳工作条件为:  $OD_{600}=1.250$ , 总工作时间 20 min, 破碎功率 50 W, 工作与间歇时间分别为 4 s 和 7 s。

(3) 超声波破碎法得到的 HAO、NIR、NAR 的比活力分别为 0.011、0.002、0.018 U/mg。渗透压休克法得到的 HAO 比活力为 0.067 U/mg, 更适合用来提取 HAO。

### 参考文献

- [1] Yang Q, Li XM, Zeng GM, et al. Study progress on mechanism for simultaneous nitrification and denitrification[J]. Microbiology China, 2003, 30(4): 88-91 (in Chinese)  
杨麒, 李小明, 曾光明, 等. 同步硝化反硝化机理的研究进展[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 88-91
- [2] Joo HS, Hirai M, Shoda M. Pigery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No.4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. Water Research, 2006, 40(16): 3029-3036
- [3] Marazioti C, Kornaros M, Lyberatos G. Kinetic modeling of a mixed culture of *Pseudomonas denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic operating conditions[J]. Water Research, 2003, 37(6): 1239-1251
- [4] Shi Z, Zhang Y, Zhou JT, et al. Biological removal of nitrate and ammonium under aerobic atmosphere by *Paracoccus versutus* LYM[J]. Bioresource Technology, 2013, 148: 144-148
- [5] Zhao B, An Q, He YL, et al.  $N_2O$  and  $N_2$  production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR[J]. Bioresource Technology, 2012, 116: 379-385
- [6] Padhi SK, Tripathy S, Sen R, et al. Characterisation of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Klebsiella pneumoniae* CF-S9 strain for bioremediation of wastewater[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 78: 67-73
- [7] Zhang JB, Wu PX, Hao B, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(21): 9866-9869
- [8] Zhang QL, Liu Y, Ai GM, et al. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7[J]. Bioresource Technology, 2012, 108: 35-44
- [9] Kim JK, Park KJ, Cho KS, et al. Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(17): 1897-1906
- [10] Khardenavis AA, Kapley A, Purohit HJ. Simultaneous nitrification and denitrification by diverse *Diaphorobacter* sp.[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(2): 403-409
- [11] Wan CL, Yang X, Lee DJ, et al. Aerobic denitrification by novel isolated strain using  $NO_2^-$ -N as nitrogen source[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(15): 7244-7248
- [12] 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
- [13] Wehrfritz JM, 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 Letters, 1993, 335(2): 246-250
- [14] Chen Q, Ma T, Wang T. Separation and purification of hydroxylamine oxidase from *Agrobacterium tumefaciens* LAD9[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(7): 69-73 (in Chinese)  
陈倩, 马涛, 王婷. 异养硝化好氧反硝化菌株 *Agrobacterium tumefaciens* LAD9 羟胺氧化酶分离纯化[J]. 生物技术通报, 2014(7): 69-73
- [15] Wang Y, Liu YX, An H, et al. Influence of metal ions on nitrogen removal and  $NO_2^-$ -N accumulation by *Alcaligenes faecalis* C16[J]. Microbiology China, 2014, 41(11): 2254-2263 (in Chinese)  
王瑶, 刘玉香, 安华, 等. 金属离子对粪产碱杆菌 C16 的脱氮和亚硝酸盐积累的影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2254-2263
- [16] Zhao B, He YL, Huang J, et al. Heterotrophic nitrogen removal by *Providencia rettgeri* strain YL[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(6): 609-616
- [17] Frear DS, Burrell RC. Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants[J]. Analytical Chemistry, 1955, 27(10): 1664-1665
- [18] State Environmental Protection Administration, Editorial Board of Water and Exhausted Water Monitoring Analysis Method. Water and Exhausted Water Monitoring Analysis Method[M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 211-285 (in Chinese)  
国家环境保护总局, 水和废水检测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 211-285
- [19] Yao S, Ni JR, Ma T, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2[J]. Bioresource Technology, 2013, 139: 80-86
- [20] Chen PZ, Li J, Li QX, et al. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24[J]. Bioresource Technology, 2012, 116: 266-270
- [21] Lin Y, Kong HN, He YL, et al. Isolation and characterization of heterotrophic nitrifying bacteria[J]. Environmental Science, 2006, 27(2): 324-328 (in Chinese)  
林燕, 孔海南, 何义亮, 等. 异养硝化细菌的分离及其硝化特性实验研究[J]. 环境科学, 2006, 27(2): 324-328
- [22] An Q, Zhao B, He YL. Heterotrophic nitrification capability and its enzyme activity of *Alcaligenes faecalis* strain NR[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Natural Edition), 2012, 46(5): 774-779 (in Chinese)  
安强, 赵彬, 何义亮. 异养硝化菌 *Alcaligenes faecalis* strain NR 的硝化性能及其酶活性[J]. 上海交通大学学报: 自然版, 2012, 46(5): 774-779
- [23] Shi RL, Wang LP, Liu YP. Conditions of ultrasonic wave disruption for recombination *E. coli* of alginate lyase[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010(21): 98-101, 104 (in Chinese)

- 石荣莲, 汪立平, 刘玉佩. 重组褐藻胶裂解酶基因工程菌超声波破碎条件研究[J]. 湖南农业科学, 2010(21): 98-101,104
- [24] 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
- [25] Chen Z, Jia HY, Yan QJ, et al. Optimization of fermentation conditions of recombinant  $\beta$ -xylosidase extracellularly expressed in *E. coli*[J]. Microbiology China, 2013, 40(2): 212-219 (in Chinese)
- 陈洲, 贾会勇, 闫巧娟, 等. 重组大肠杆菌高效分泌表达  $\beta$ -木糖苷酶发酵条件的优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(2): 212-219
- [26] Malik A, Jenzsch M, Lübbert A, et al. Periplasmic production of native human proinsulin as a fusion to *E. coli* ecotin[J]. Protein Expression and Purification, 2007, 55(1): 100-111
- [27] Ramanan RN, Tan JS, Mohamed MS, et al. Optimization of osmotic shock process variables for enhancement of the release of periplasmic interferon- $\alpha$ 2b from *Escherichia coli* using response surface method[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(2): 196-202
- [28] Chen Q, Ni JR. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by novel isolated bacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(9): 1305-1310

(上接 p.1930)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

### 4 特别说明

#### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

#### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

#### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/swsxtbcn>