

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2023.22.006

异养硝化好氧反硝化菌的研究进展

吴彦成, 冷俊彤, 张凯, 顾鑫, 朱继涛, 王子婕
(长安大学 建筑工程学院, 陕西 西安 710061)

摘要: 异养硝化好氧反硝化(Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, HNAD)菌因其能同时进行异养硝化和好氧反硝化过程,在单一好氧条件下完成生物脱氮,具有自养硝化微生物(Autotrophic nitrifying organisms, ANOs)和普通异养微生物(Ordinary heterotrophic organisms, OHOs)不具有的优势而备受关注。对HNAD菌的种属分布、脱氮性能的影响因素,与HNAD过程有关的酶、功能基因和脱氮途径进行了综述,并讨论了HNAD菌与ANOs和OHOs脱氮过程的差异,对未来HNAD过程的发展前景进行了展望。

关键词: 生物脱氮; 异养硝化好氧反硝化; 影响因素; 脱氮路径

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2023)22-0037-09

Research Progress of Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacteria

WU Yan-cheng, LENG Jun-tong, ZHANG Kai, GU Xin, ZHU Ji-tao, WANG Zi-jie
(School of Architecture and Engineering, Chang'an University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification (HNAD) bacteria have drawn more and more attention as possessing the advantages that autotrophic nitrifying organisms (ANOs) and ordinary heterotrophic organisms (OHOs) do not have, such as, conducting the nitrification and denitrification processes simultaneously, and fulfilling the biological denitrification process under completely aerobic conditions. The distribution of HNAD bacteria, the factors affecting the denitrification performance, related enzymes and functional genes, and denitrification pathways were summarized. In addition, the differences among the HNAD, ANOs and OHOs bacteria were also discussed. Eventually, the future development of the HNAD was prospected.

Key words: biological nitrogen removal; heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria; influential factor; denitrification pathway

在传统生物脱氮过程中,自养微生物生长缓慢,硝化过程耗时较长,且易受氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)和有机负荷的冲击影响。加之,传统生物脱氮过程需要在时间或空间上完全独立的好氧单元和缺氧单元内进行,工艺占地面积大,流程长。近几十年来,随着生物脱氮理论的发展,越来越多的新型生物脱氮

(BNR)工艺不断涌现,如短程硝化反硝化工艺、同步硝化反硝化(SND)工艺和厌氧氨氧化工艺。SND工艺能够在单个反应器或反应单元中进行硝化反硝化过程,具有占地少、经济性好、管理便捷等优势而广受关注^[1-2],其发生机制可采用微环境理论和生物学理论加以阐释。异养硝化好氧反硝化(HNAD)菌

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2018JQ5143)

能够在完全好氧的条件下同时完成硝化过程和反硝化过程,具备许多自养硝化微生物(Autotrophic nitrifying organisms, ANOs)和普通异养微生物(Ordinary heterotrophic organisms, OHOs)不具有的优点。此外,相比于硝化细菌,HNAD 菌具有生长速率快、对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和有机物冲击负荷耐受性强等优点^[3],近年来受到了广泛的关注。

1 HNAD 菌的种属及分布

HNAD 菌是能够同时进行异养硝化过程(Heterotrophic nitrification, HN)和好氧反硝化过程(Aerobic denitrification, AD)的微生物的统称,其包含很多种属。常见的 HNAD 菌属有 *Halomonas* sp.、

Acinetobacter sp.、*Pseudomonas* sp.、*Paracoccus* sp.、*Bacillus* sp.、*Klebsiella* sp. 等。HNAD 菌在自然界中分布广泛,养猪场废水、活性污泥、水稻土壤、海产养殖场等均有分布。

2 HNAD 菌脱氮性能的影响因素

HNAD 菌的生长受碳源、碳氮比(C/N)、温度、溶解氧、pH 等条件的影响,不同的 HNAD 菌生长所需的最佳条件差异较大,探究不同 HNAD 菌的最适生长条件,有利于系统了解 HNAD 菌。

表 1 中列举了不同菌株单独进行 HN 过程、单独进行 AD 过程和同时进行 HNAD 过程的最佳脱氮条件^[4-17]。

表 1 不同 HNAD 菌的最佳生长条件

Tab.1 Optimum growth conditions for different HNAD bacteria

过程	菌株	碳源	碳氮比	温度/℃	转速/(r·min ⁻¹)	pH
HN	<i>Alcaligenes faecalis</i> SDU20 ^[4]	琥珀酸钠	10	30		8
	<i>Alcaligenes faecalis</i> C16	富马酸	14	30	120	8
	<i>Alcaligenes faecalis</i> OKK17	丙酮酸钠	6	35		7.5
AD	<i>Bacillus</i> sp. JM10		7.4	27.4		7.6
	<i>Marinobacter</i> sp. NNA5 ^[5]	琥珀酸钠和丙酮酸钠	6~8	35	150	7.5
	<i>Pseudomonas balearica</i> RAD-17 ^[6]	葡萄糖和乙酸钠	10	25	200	
	<i>Pseudomonas chloritidismutans</i> K14 ^[7]	丙酮酸钠	10	27	140	7.5
	<i>Pseudomonas plecoglossicui</i> Y-1 ^[8]	葡萄糖	15	15	150	7
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> XL-2 ^[9]		10	30	120	
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ZF31	琥珀酸钠	6.68	27.72	54.15	8.23
	<i>Psychrobacter</i> sp. S1-1	琥珀酸钠	15	20		6.5
HNAD	<i>Alcaligenes faecalis</i> WT14 ^[10]	柠檬酸钠	10.8	20.3	113.5	8.4
	<i>Acinetobacter junii</i> ZHG-1 ^[11]	柠檬酸钠	30	30	150	9
	<i>Acinetobacter junii</i> YB	琥珀酸钠	15	37	200	7.5
	<i>Acinetobacter</i> sp. ND7 ^[12]	柠檬酸钠	8	35	150	
	<i>Bacillus cereus</i> GS-5 ^[13]	乙酸钠	7.5	35	125	8
	<i>Cupriavidus</i> sp. S1 ^[14]	丙酮酸钠	12~28		120	
	<i>Gordonia amicalis</i> UFV4 ^[15]	柠檬酸钠	8	30		7
	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i> F19 ^[16]	乙酸钠	10	30		10
	<i>Providencia rettgeri</i> YL	葡萄糖	10	30	120	7~7.5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> YL	琥珀酸钠	10	30	160	7
	<i>Pseudomonas putii</i> NP5 ^[17]	琥珀酸钠	10	30	160	
	<i>Vibrio diabolus</i> SF16	乙酸钠	10	30	120	7.5~9.5

2.1 碳源

HNAD 菌作为异养菌,以有机物作为碳源和能源。大多数 HNAD 菌生长的最佳碳源是琥珀酸钠、柠檬酸钠和乙酸钠。首先,小分子有机物更容易被微生物吸收^[12];其次,这些物质可以直接进入三羧酸(TCA)循环,可以更加迅速地产生能量^[18]。

葡萄糖、蔗糖等大分子有机物也可以作为

HNAD 菌生长的最佳碳源。杨静丹等^[19]利用高盐环境驯化好氧颗粒污泥,并从中分离出 *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* HY3-2 菌株,其最佳碳源在不同条件下有所不同。进行 HN 过程时,最佳碳源为甘油;进行 AD 过程时,最佳碳源为柠檬酸钠。Wang 等^[20]分离得到的 *Pseudomonas* sp. JQ-H3 以聚己酸内酯(PCL)为唯一碳源进行

HNAD过程,在72 h内对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)的去除率可分别达到95.40%和91.10%。Zhang等^[21]从反硝化反应器中分离出能够以聚3-羟基丁酸-3-羟基戊酸酯为碳源进行HNAD过程的*Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans* SL-205,该菌对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的去除率分别为99.11%、84.13%和95.02%。

2.2 C/N比

通常HNAD菌的生长需要较高的C/N比,介于5~20之间。一般而言,C/N比越高,有机物越充足,HNAD菌去除的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 越多,反硝化效果就越好。然而C/N比过高时,呼吸作用增强,HNAD过程可能会产生较多的有害物质和中间产物如亚硝态氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$),而 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的积累不利于绝大多数HNAD菌的生长,甚至导致其死亡。研究表明,HNAD菌脱氮过程中对C/N比的需求会随着环境条件的变化而改变。Pan等^[22]研究了C/N比对由多种HNAD菌组成的生物群落处理高盐(30 gNaCl/L)废水的影响,发现所需的最佳C/N比为25。Huang等^[23]从松花江分离出的*Acinetobacter* sp. Y16能够在C/N比为2的条件下去除约65%的 $\text{NH}_3\text{-N}$;研究还发现,在C/N比为5时,含有HNAD菌的复杂微生物群落比纯培养菌种具有更高的脱氮效率,这可能是不同HNAD菌之间存在共生和协同作用所致。

2.3 温度

大多数HNAD菌生长的最适温度为25~37℃。Yang等^[17]研究*Pseudomonas putii* NP5时发现,当温度从10℃上升至30℃时, $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除率明显升高(从约15%上升至约95%),当温度从30℃上升至37℃时, $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除率略有下降(降至约90%)。Zheng等^[24]从松花江分离出的*Acinetobacter harbinensis* HITLi7^T能够在2℃下去除 $\text{NH}_3\text{-N}$,最大去除速率为0.076 mg/(L·h)。部分HNAD菌能够在低温环境中生长,原因之一是HNAD菌体内的酶在低温状态下能够保持一定的活性,维持HNAD菌的生长。

2.4 溶解氧(DO)

与传统的缺氧反硝化不同,HNAD的反硝化过程除可利用 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 为电子受体外,还可利用 O_2 作为电子受体。相比于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, O_2 作电子受体时产生的能量更多,更易被微生物利用。但是,过高浓度的DO会导致反硝化酶活性降低,进而降低脱氮效率。例如,保持较低的DO浓度(<3 mg/L)有助于提

高*Pseudomonas* sp. ADN-42的脱氮性能;当摇床速率为50 r/min时,*Pseudomonas stutzeri* YG-24对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除率较低(50.25%),而对 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的去除率较高,分别为90.08%和95.83%。这可能是由于HNAD过程的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化需要比 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原更高的DO浓度。

2.5 pH

在HNAD菌的HN过程中, $\text{NH}_3\text{-N}$ 先被转化为 $\text{NH}_2\text{OH-N}$,然后进一步转化为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$,其中pH逐渐降低;在AD过程中, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 经 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 被转化为氮气(N_2)等其他气态氮,pH呈现逐渐升高趋势。HNAD菌生长的最适pH一般为中性或偏碱性范围。魏冉^[25]研究发现,在pH分别为8.0和9.0的条件下,*Pseudomonas aeruginosa* P-1对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除率分别为99.8%和89.6%,而在pH为7.0的条件下,对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除率仅为66.1%。Yang等^[26]从制药废水中分离出的*Acinetobacter* sp. JR1能够在4.5~10的pH范围内实现 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的有效去除。

2.6 其他因素

除碳源、C/N比、温度、溶解氧、pH外,氮源、盐度和重金属也会影响HNAD菌的脱氮性能。樊琳等^[27]通过模拟自然水生生态系统,探究氮源对HNAD过程氮转化的影响时发现, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的加入会加速 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的利用,而 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的加入会抑制 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的降解, $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的加入则会导致 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 累积。此外,高浓度的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 可能会抑制 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的还原酶活性,导致 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的积累。由于 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 对生物体有毒害作用,而大多数通过 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 途径降解 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的HNAD菌会产生 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的积累,这是影响HNAD菌硝化反硝化过程的重要原因之一。Xie等^[28]从活性污泥中分离出的*Pseudomonas mendocina* X49并不积累 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 。Silva等^[29]在高盐条件下驯化由多种HNAD菌组成的生物群落,结果表明该生物群落能够在高盐环境中生长,并能去除部分 $\text{NH}_3\text{-N}$ 。

微量元素元素对于HNAD菌的生长不可缺少,但金属离子浓度过高则会影响HNAD菌的酶活性,抑制HNAD菌的生长。An等^[30]从污水厂活性污泥中成功分离出*Acinetobacter baumannii* AL-6,该菌在一定浓度Cr(VI)存在(0~10 mg/L)的情况下可去除 $\text{NH}_3\text{-N}$,并将Cr(VI)还原为毒性更低的Cr(III)。

3 HNAD过程相关的酶及基因

参与HN过程的酶包括氨单加氧酶(AMO)、羟胺氧化还原酶(HAO)和亚硝酸盐氧化还原酶(NXR);参与AD过程的酶包括硝酸盐还原酶(NR)、亚硝酸盐还原酶(NIR)、一氧化氮还原酶(Nor)和氧化亚氮还原酶(Nos)。目前针对HNAD菌酶系统的主要研究集中在AMO、HAO、NR和NIR上。

3.1 AMO

AMO是一种铜依赖型的膜结合酶,能够将 NH_3 氧化为 NH_2OH ,其活性介于 $0.0028 \sim 0.1270 \text{ U/mg}$ 蛋白质之间。参与编码AMO的基因有 amoA 、 amoB 与 amoC ,它们共同组成了操纵子 amoCAB ,但是基因 amoAB 可以独立于启动子 amoCAB 表达。AMO由分子质量分别为 38 ku 和 46 ku 的亚基构成,与自养硝化菌 $N. europaea$ 的AMO具有很高的相似性,但二者的结构仍有差异。 1 mmol/L 的乙炔能够抑制 $N. europaea$ 中AMO的活性,却不会抑制 $Paracoccus denitrificans$ 中AMO的活性。Musiani等^[31]利用与AMO相似的微粒甲烷单加氧酶(pMMO)进行同源建模,得到了 $Nitrosomonas europaea$ 中AMO的三个亚基 AmoA 、 AmoB 、 AmoC 及由它们组成的三聚体 AmoABC 的结构模型,确定了 AmoB 和 AmoC 上的铜结合位点。Wang等^[32]在研究对高浓度 $\text{NH}_3\text{-N}$ 具有耐受能力的 $Acinetobacter$ sp. JQ1004时提出,游离氨通过降低 amoA 基因的表达来抑制HN过程与 $Acinetobacter$ sp. JQ1004的生长。Zhao等^[33]在研究重金属对 $Alcaligenes faecalis$ NR的影响时发现, Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 能极大提升AMO的活性,促进 $Alcaligenes faecalis$ NR对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除。

3.2 HAO

HAO能够将 NH_2OH 氧化为 NO_2^- ,其活性为 $0.0110 \sim 0.2400 \text{ U/mg}$ 蛋白质。 C/N 比会影响HAO的活性,He等^[34]将序批式反应器(SBR)中的 C/N 比由 3.5 提高至 9.3 ,测得的HAO活性显著提高(从约 250 U/gMLSS 提高至约 340 U/gMLSS)。Wu等^[35]研究发现, $Alcaligenes$ sp. HO-1能够积累 NH_2OH ,且HO-1中有一种新型HAO能够将 NH_2OH 直接转化为 N_2 。Caranto等^[36]在研究氨氧化菌的 NH_2OH 氧化时提出了一个新模型:HAO将 NH_2OH 氧化为一氧化氮(NO), NO 被 O_2 氧化为 NO_2^- 。 NO 被氧化为 NO_2^- 可能是由一种未知的酶驱动^[37]。目前,在HNAD菌

体内是否存在一种未知的,能够将 NH_2OH 氧化为 NO_2^- 的酶仍有待研究。

3.3 NR

NR是一种钼依赖酶,能够将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,可分为三类:同化硝酸盐还原酶(Nas)、膜结合硝酸盐还原酶(Nar)和细胞周质硝酸盐还原酶(Nap)。Nas能够将部分 NO_3^- 同化,对氮的去除具有重要意义。

Nar由三个亚基组成:一个以双钼磷酸鸟嘌呤二核苷酸(MGD)为辅因子、分子质量为 $112 \sim 140 \text{ ku}$ 的催化亚基 NarG ;一个具有一个 $[3\text{Fe-4S}]$ 和三个 $[4\text{Fe-4S}]$ 中心、分子质量为 $52 \sim 64 \text{ ku}$ 的可溶性亚基 NarH ;另一个是分子质量为 $19 \sim 25 \text{ ku}$ 的血红素醌氧化亚基 NarI 。编码Nar的基因曾被认为只有 narG 、 narH 和 narI 三种基因依次排列,后来在 $Escherichia coli$ 中发现 narI 区域包含两个开放阅读框(ORFs),并将第一个ORF命名为 narJ 。 narJ 对于NAR必不可少,它能够促进 narG 和 narH 复合物的形成,并强化 narG 和 narH 形成的复合物与 narI 的相互作用。

Nap是一种异二聚体酶,包含一个以MGD为辅因子和一个N端 $[4\text{Fe-4S}]$ 中心、分子质量为 90 ku 的催化亚基 NapA ,以及一个从 NapC 接收电子、分子质量为 15 ku 的双血红素细胞色素c(NapB),其活性介于 $0.0095 \sim 0.43 \text{ U/mg}$ 蛋白质之间。研究发现, $Thiosphaera pantotropha$ 同时具有Nap和Nar这两种酶,在缺氧条件下编码Nar的基因表达,而在有氧条件下则编码Nap的基因表达。在厌氧环境中,Nar失活会导致编码Nap的基因过度表达。Nar和Nap的活性与 O_2 的浓度有关, O_2 会抑制 NO_3^- 通过细胞质膜的运输,因此含有Nar的细菌的反硝化过程会被 O_2 抑制。而Nap位于细胞质周质内并不依赖 NO_3^- 的跨膜运输,所以含有Nap的细菌能够在有氧的条件下进行反硝化过程。然而,扩增了10种 $Pseudomonas$ 属和1种 $Moraxella$ 属细菌的 napA 基因并排序后发现,一些表达该基因的菌株在有氧的条件下不能进行反硝化过程,而含有Nap的 $Pseudomonas$ sp. G179在缺氧条件下仍能进行反硝化过程。

3.4 NIR

NIR能够将 NO_2^- 还原为一氧化氮(NO),具有两种类型:含铜亚硝酸盐还原酶(NirK)和细胞色素cd₁亚硝酸盐还原酶(NirS)。NirK包括三种类型,第一

种类型和第二种类型结构相似,由三个亚基类似于等边三角形的边一样相互围绕,每个亚基都含有两个铜位点,一个1型(T1Cu)位点和一个2型(T2Cu)位点,T1Cu位于每个亚基中,T2Cu位于两个相邻的亚基之间,类似于三角形的顶点。第一种类型中的T1Cu使其呈蓝色,第二种类型中的T2Cu使其呈绿色。第三种类型比较少见,是由六个亚基构成的六聚体,每个亚基中包含一个第一类型的T1Cu和第二类型的T2Cu,因此呈蓝绿色。T1Cu将外源电子传递给T2Cu,T2Cu具有催化活性,能与 NO_2^- 结合。NirK由基因nirK编码,nirK的ORF包含1 095个碱基,其中碱基对G(鸟嘌呤)+C(胞嘧啶)占了63%,由nirK编码的氨基酸序列包含364个残基,分子质量为34.4 ku。NirS是一种细胞色素cd₁二聚酶,每个单体上含有两个亚铁血红素基团、血红素c和血红素d₁,电子从细胞色素c₅₅₁通过血红素c进一步转移到血红素d₁,这个过程中 NO_2^- 被还原为NO。Liu等^[38]分离出了具有基因nirK和nirS的*Thermus antranikianii* DSM 12462^T,并发现nirK在O₂受限制和外界条件不断变化时更易表达,而nirS在O₂充足和相对稳定的条件下更易表达。由此可以推测,在HNAD菌反硝化过程中主要表达的是nirS。Zhao等^[9]从好氧反硝化菌*Pseudomonas stutzeri* XL-2中扩增出nirS基因,但未扩增出nirK基因;但是,从好氧反硝化菌*Pseudomonas* sp. yy7中扩增出nirK基因却未扩增出nirS基因。

4 HNAD的脱氮途径

HNAD菌有两种氮代谢途径如图1所示。第一种为 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 途径, NH_3 被依次氧化为 NH_2OH 、 NO_2^- 、 NO_3^- ,然后 NO_3^- 再经过反硝化过程被依次还原为 NO_2^- 、NO、 N_2O 和 N_2 。*Zobellella taiwanensis* DN-7、*Pseudomonas mendocina* TJPU04等以此途径完成HNAD过程。第二种为 NH_2OH 途径, NH_3 被氧化为 NH_2OH 后不经 NO_2^- 、 NO_3^- ,直接被氧化为 N_2O 最终被还原为 N_2 。*Photobacterium* sp. NNA4、*Alcaligenes faecalis* NR等以此途径完成HNAD过程。赵坤等^[39]利用同位素示踪技术从对虾养殖池中分离得到*Bacillus licheniformis* MP15,发现该菌不仅能够将 NH_3 通过 NH_2OH 途径进行代谢,同时也能将 NO_2^- 和 NO_3^- 按 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 途径进行反硝化。 NH_2OH 途径几乎不产生 NO_2^- 和 NO_3^- ,与 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 途径有明显区

别。除上述两种途径外,个别HNAD菌还拥有独特的氮代谢途径。Chen等^[40]向接种*Alcaligenes* sp. TB的培养基中添加硝酸盐还原酶抑制剂后发现仍有 N_2 的产生,认为该菌能够将 NH_3 依次氧化为 NH_2OH 、 NO_2^- ,然后还原为 N_2O ,最终被还原为 N_2 。Wang等^[41]在研究*Thauera* sp. SND5时,认为该菌能够使 $\text{NH}_3\text{-N}$ 通过 NH_2OH 直接被氧化为 N_2 ,即: $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{N}_2$ 。Huang等^[42]未在*Pseudomonas putii* Y-9中检测到AMO,推测该菌能够将 $\text{NH}_3\text{-N}$ 直接转化为 N_2O 而不需要 NH_2OH 作中间体,即: $\text{NH}_3 \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ 。上述特殊途径是否具有普遍性,仍待验证。

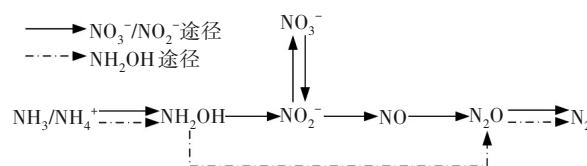


图1 HNAD菌的两种氮代谢途径示意

Fig.1 Schematic diagram of two nitrogen metabolic pathways of HNAD bacteria

5 HNAD菌与ANOs和OHOs的区别

参与传统缺氧生物脱氮过程的菌株包括ANOs和OHOs。ANOs是指一类以CO₂为唯一碳源,以 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_2\text{OH-N}$ 或 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 为氮源和能源进行好氧生长的微生物,包括能将 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的氨氧化古菌(Ammonia oxidizing archaea, AOA)与氨氧化细菌(Ammonia oxidizing bacteria, AOB),以及能将 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的亚硝酸盐氧化菌(Nitrite oxidizing bacteria, NOB)。OHOs是指一类以有机物为碳源,能够利用O₂或 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 或 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 进行生长的一类微生物,包括能将 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原为气态氮的完全反硝化菌;能且只能将 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 还原为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的不完全反硝化菌;能且只能将 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 还原为气态氮的专一亚硝酸盐还原菌和能将 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 还原为气态氮但 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的存在会抑制 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 还原的不完全亚硝酸盐还原菌。目前,虽然发现部分AOB能够进行完全硝化过程($\text{NH}_3\text{-N}$ 完全被氧化为 $\text{NO}_3^-\text{-N}$),但与HNAD菌相比,传统生物脱氮过程需要自养硝化菌和OHOs配合完成,而不能由单一菌种完成整个脱氮过程。这意味着基于HNAD过程的脱氮工艺流程简单,且控制更加容易。从生存条件和反应动力学来看,HNAD菌作为异养菌,具有较高的生长速率和 $\text{NH}_3\text{-N}$ 去除速率。如

Acinetobacter junii ZHG-1 在 11 h 内对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除率可达 97% 左右, $\text{NH}_3\text{-N}$ 去除速率达 $4.48 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$, 相应的 OD_{600} 约为 $1.2^{[11]}$, 而自养硝化菌生长较缓慢, *Nitrosomonas europaea* 进入对数生长期需要 60 h, 约是相同接种量的 HNAD 菌的 10 倍。尽管 OHOs 也是一种异养菌, 生长较快, 但在反硝化菌群中, 完全反硝化菌含量较少, 而不完全反硝化菌和不完全亚硝酸盐还原菌占了整个异养菌的 50% 以上, 这就导致了系统内 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的积累, 相比之下许多 HNAD 菌脱氮过程中没有或有很少的 $\text{NO}_2\text{-N}$ 积累^[11, 43]。同时, HNAD 菌具有调节 pH 的能力, HN 过程导致的碱度降低可通过同时发生的 AD 过程产生的碱度得到补偿。虽然 HNAD 菌在酸性环境中对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除率低于中性偏碱性环境, 但大部分 HNAD 菌仍能在酸性环境中生存, 而 AOB 在偏酸性环境中通常会失活。此外, HNAD 菌适合用于中温和偏高温条件下的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 去除。尽管 AOA 和 AOB 能够分别在低温和高温下去除 $\text{NH}_3\text{-N}$, 但其在低温下的反应速率较低, 致使工艺的脱氮能力有限。此外, 高浓度的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 会抑制自养硝化菌的生长, 而 HNAD 菌对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和有机物的耐受能力则更强。

目前, 传统生物脱氮工艺仍是主流工艺, 基于 HNAD 过程的污水生物脱氮工艺仍未实现。在污水处理系统中, 不同微生物之间的相互作用对出水水质有着极其重要的作用, 如 AOB 和 NOB 的互利共生关系。大部分 NOB 含有能将尿素转化为 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的酶, 而 AOB 则不含有此种酶。在同一污水处理系统中, NOB 能将系统内的尿素转化为能够被 AOB 利用的 $\text{NH}_3\text{-N}$, 而 AOB 将 $\text{NH}_3\text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_2\text{-N}$ 后又供给 NOB 使用^[44]。在这个过程中, 不仅 AOB 和 NOB 氮源的来源问题得以解决, 而且很难发生 AOB 被高浓度 $\text{NO}_2\text{-N}$ 抑制的情况。然而, HNAD 菌由于自身能够利用 $\text{NH}_3\text{-N}$ 进行完全硝化, 这就与 AOB、NOB 形成了一种竞争关系, 不利于 HNAD 菌的生长。同样, OHOs 也会与 HNAD 菌构成一种对底物的竞争关系。C/N 比对 HNAD 菌的影响较大, 有的 HNAD 菌达到最佳脱氮效果时需要的 C/N 比高达 30^[11]。此外, 有研究表明, NH_2OH 的积累不利于 NOB 的生长^[37], 这可能使 NH_2OH 途径或者存在 NH_2OH 积累的 HNAD 菌在竞争中处于优势地位。

部分研究聚集于 HNAD 菌的群体感应 (Quorum sensing, QS), 揭示了 HNAD 菌与其他类型微生物共

生时, 不同种群微生物之间的关系和作用。Wang 等^[45]利用三种酰基高丝氨酸内酯 (N-acyl homoserine lactone, AHL) 分子 (C8-HSL、C6-HSL 和 3-oxo-C10-HSL) 分别处理 *Acinetobacter* sp. JQ1004, 发现这三种低浓度的信号分子都能促进 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除和细胞生长, 并刺激 *amoA* 的表达, 而 50 nmol/L 的信号分子则会抑制 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除。此外, Zhu 等^[46]发现, 不能分泌 AHL 的 *Pseudomonas aeruginosa* 具有更强的脱氮能力, 并且 QS 信号分子倾向于抑制 HNAD 过程而促进自养硝化过程。与之相反的是, Ruan 等^[47]利用姜黄素 (一种 QS 抑制剂) 促进了 SBR 反应器内的 AD 过程, 提高了 SBR 反应器内 $\text{NO}_3\text{-N}$ 的去除率, 并检测到 NAR 和 NIR 的活性明显提高。这说明 QS 信号分子对 HNAD 菌和自养硝化菌的作用较复杂, 仍有待研究。研究表明, QS 信号分子对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的作用机理不同, 绝大多数自养硝化菌是革兰氏阴性菌, 而 HNAD 菌在革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中均有分布。这就使得未来利用淬灭酶或抑制剂调节污水处理系统内的信号分子, 抑制其他微生物的生长, HNAD 菌处于主导地位成为可能。

6 展望

HNAD 过程应用于实际污水生物脱氮工艺需要解决 HNAD 菌与具有不同代谢途径的微生物种群的竞争问题。然而, 目前探讨 HNAD 菌之间、HNAD 菌和 ANOs 以及与 OHOs 之间共生与竞争的研究较少。此外, 脱氮除磷是控制水环境污染的重要手段, 但氮和磷的去除是由不同微生物在不同环境条件下实现, 将 HNAD 过程与除磷耦合, 探究 HNAD 菌同步脱氮除磷的可能性, 也是未来一个重要的研究方向。加之, HNAD 过程的发生机制还未完全掌握, 参与 HNAD 过程酶的结构、功能基因等还未全部明晰。从分子生物学水平开展针对 HNAD 菌的研究, 对于揭示 HNAD 过程的发生机制以及推动 HNAD 过程的应用具有重要指导意义。

7 结论

HNAD 菌在自然界中分布广泛, 绝大多数 HNAD 菌生长在温度为 $25\sim 37^\circ\text{C}$ 、中性至微碱性的有氧环境中。HNAD 菌通常以小分子有机物为碳源, 在高 C/N 比的条件下获得较高的生长速率。氮源、盐度、重金属也会影响 HNAD 菌的生长速率。

参与HNAD过程的酶有AMO、HAO、NAP、NirS等,相应的编码基因分别为*amoCBA*、*hao*、*nap*、*KEFUBC*、*nirS*等,通过测定编码基因的表达也能够确定参与HNAD过程的酶和HNAD菌的氮代谢途径。此外,HNAD菌比传统脱氮菌具有更大的生物脱氮潜力,合理地运用QS系统使HNAD菌在污水处理中占据主导地位可能是未来HNAD菌技术发展的一个方向。

参考文献:

- [1] CUI Y, CUI Y W, HUANG J L. A novel halophilic *Exiguobacterium mexicanum* strain removes nitrogen from saline wastewater via heterotrophic nitrification and aerobic denitrification [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 333: 125189.
- [2] ZHANG Y Y, ZHAO L M, SONG T W, *et al.* Simultaneous nitrification and denitrification in an aerobic biofilm biosystem with loofah sponges as carriers for biodegrading hydrolyzed polyacrylamide-containing wastewater[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(3): 529–540.
- [3] 陈均利,彭英湘,刘锋,等. 异养硝化-好氧反硝化菌脱氮特性研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2020, 43(5): 41–48.
CHEN Junli, PENG Yingxiang, LIU Feng, *et al.* Research advances in denitrification property of the heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 43(5): 41–48 (in Chinese).
- [4] CHEN L F, CHEN L X, PAN D, *et al.* Heterotrophic nitrification and related functional gene expression characteristics of *Alcaligenes faecalis* SDU20 with the potential use in swine wastewater treatment [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(10): 2035–2050.
- [5] LIU Y, AI G M, MIAO L L, *et al.* *Marinobacter* strain NNA5, a newly isolated and highly efficient aerobic denitrifier with zero N₂O emission [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 206: 9–15.
- [6] RUAN Y J, TAHERZADEH M J, KONG D D, *et al.* Nitrogen removal performance and metabolic pathways analysis of a novel aerobic denitrifying halotolerant *Pseudomonas balearica* Strain RAD-17 [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 72.
- [7] HOU P F, SUN X L, FANG Z M, *et al.* Simultaneous removal of phosphorous and nitrogen by ammonium assimilation and aerobic denitrification of novel phosphate-accumulating organism *Pseudomonas chloritidis* K14 [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125621.
- [8] XIANG S D, LI Z L, YE Q, *et al.* Isolation and identification of cold-tolerance aerobic denitrifier *Pseudomonas plecoglossicui* Y-1 [J]. *Desalination and Water Treatment*, 2020, 181: 321–329.
- [9] ZHAO B, CHENG D Y, TAN P, *et al.* Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 564–573.
- [10] CHEN J L, XU J, ZHANG S N, *et al.* Nitrogen removal characteristics of a novel heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria, *Alcaligenes faecalis* strain WT14 [J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 282: 111961.
- [11] GU X, LENG J T, ZHU J T, *et al.* Influence mechanism of C/N ratio on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process [J]. *Bioresource Technology*, 2021: 126116.
- [12] XIA L, LI X M, FAN W H, *et al.* Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 301: 122749.
- [13] ROUT P R, BHUNIA P, USH R R. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244(part 1): 484–495.
- [14] SUN Z Y, LÜ Y K, LIU Y X, *et al.* Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus* sp. S1 [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 220: 142–150.
- [15] SILVA L C F, LIMA H S, MENDES A D O T, *et al.* Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 248: 109294.
- [16] CHEN Y Y, JIN P, CUI Z W, *et al.* Identification and characterization of *Janthinobacterium svalbardensis* F19, a novel low-C/N-tolerant denitrifying bacterium [J].

- Applied Sciences, 2019, 9(9): 1937.
- [17] YANG L, WANG X H, CUI S, *et al.* Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putii* strain NP5 [J]. Bioresource Technology, 2019, 285: 121360.
- [18] ZHANG H H, LI S L, MA B, *et al.* Nitrate removal characteristics and ^{13}C metabolic pathways of aerobic denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans* Z195 [J]. Bioresource Technology, 2020, 307: 123230.
- [19] 杨静丹, 祝铭韩, 刘琳, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌 HY3-2 的分离及脱氮特性[J]. 中国环境科学, 2020, 40(1): 294-304.
- YANG Jingdan, ZHU Minghan, LIU Lin, *et al.* Isolation and denitrification characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium HY3-2 [J]. China Environmental Science, 2020, 40(1): 294-304 (in Chinese).
- [20] WANG X J, WANG W Q, ZHANG Y, *et al.* Simultaneous nitrification and denitrification by a novel isolated *Pseudomonas* sp. JQ-H3 using polycaprolactone as carbon source [J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121506.
- [21] ZHANG S S, SUN X B, FAN Y T, *et al.* Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans* SL-205 using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as the sole carbon source [J]. Bioresource Technology, 2017, 241: 500-507.
- [22] PAN Z L, ZHOU J, LIN Z Y, *et al.* Effects of COD/TN ratio on nitrogen removal efficiency, microbial community for high saline wastewater treatment based on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process [J]. Bioresource Technology, 2020, 301: 122726.
- [23] HUANG F, PAN L Q, HE Z Y, *et al.* Identification, interactions, nitrogen removal pathways and performances of culturable heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria from mariculture water by using cell culture and metagenomics [J]. Science of the Total Environment, 2020, 732: 139268.
- [24] ZHENG Z J, ZHANG D Y, LI W G, *et al.* Substrates removal and growth kinetic characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter harbinensis* HITLi7^T at 2 °C [J]. Bioresource Technology, 2018, 259: 286-293.
- [25] 魏冉. 一株异养硝化-好氧反硝化细菌 *Pseudomonas aeruginosa* P-1 的筛选及脱氮特性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- WEI Ran. Isolation and Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* P-1 for Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [26] YANG J R, WANG Y, CHEN H, *et al.* Ammonium removal characteristics of an acid-resistant bacterium *Acinetobacter* sp. JR1 from pharmaceutical wastewater capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification [J]. Bioresource Technology, 2019, 274: 56-64.
- [27] 樊琳, 产江为, 周波, 等. 不同类型氮组成对异养硝化好氧反硝化体系中氮转化的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2020, 51(5): 833-839.
- FAN Lin, CHAN Jiangwei, ZHOU Bo, *et al.* Effects of different nitrogen composition on nitrogen transformation in heterotrophic nitrification aerobic denitrification system [J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 2020, 51(5): 833-839 (in Chinese).
- [28] XIE F X, THIRI M, WANG H. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel isolated *Pseudomonas mendocina* X49 [J]. Bioresource Technology, 2021, 319: 124198.
- [29] SILVA L C F, LIMA H S, SARTORATTO A, *et al.* Effect of salinity in heterotrophic nitrification/aerobic denitrification performed by acclimated microbiota from oil-produced water biological treatment system [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 130: 1-7.
- [30] AN Q, ZHOU Y, ZHAO B, *et al.* Efficient ammonium removal through heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Acinetobacter baumannii* strain AL-6 in the presence of Cr(VI) [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2020, 130(6): 622-629.
- [31] MUSIANI F, BROLL V, EVANGELISTI E, *et al.* The model structure of the copper-dependent ammonia monooxygenase [J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2020, 25(7): 995-1007.
- [32] WANG X J, WANG W Q, ZHANG Y, *et al.* Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. JQ1004 and evaluation of its inhibitory kinetics by free ammonia [J]. Desalination and Water Treatment, 2019, 147: 316-325.
- [33] ZHAO B, TIAN M, AN Q, *et al.* Characteristics of a

- heterotrophic nitrogen removal bacterium and its potential application on treatment of ammonium-rich wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 226: 46–54.
- [34] HE Z X, YUAN L J, WEI Y N, *et al.* N₂O emission and hydroxylamine oxiuse (HAO) activity in a nitrogen removal process based on activated sludge with three COD/NH₄⁺ ratios [J]. *Water Environment Research*, 2017, 89(5): 387–395.
- [35] WU M R, MIAO L L, LIU Y, *et al.* A novel oxiuse from *Alcaligenes* sp. HO-1 oxidizes hydroxylamine [J]. *BioRxiv-Microbiology*, 2020. DOI:10.1101/2020.08.20.256677.
- [36] CARANTO J D, LANCASTER K M. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(31): 8217–8222.
- [37] SOLER-JOFRA A, PEREZ J, VAN LOOSDRECHT M C M. Hydroxylamine and the nitrogen cycle: a review [J]. *Water Research*, 2021, 190: 116723.
- [38] LIU R R, TIAN Y, ZHOU E M, *et al.* Distinct expression of the two no-forming nitrite reductases in *Thermus antranikianii* DSM 12462^T improved environmental auptability [J]. *Microbial Ecology*, 2020, 80(3): 614–626.
- [39] 赵坤,田相利,董双林,等. 一株异养硝化-好氧反硝化地衣芽孢杆菌的脱氮特性及机制研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(8): 43–52.
ZHAO Kun, TIAN Xiangli, DONG Shuanglin, *et al.* Nitrogen removal characteristic and mechanism of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification *Bacillus licheniformis* [J]. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science Edition)*, 2020, 50(8): 43–52 (in Chinese).
- [40] CHEN J, GU S Y, HAO H H, *et al.* Characteristics and metabolic pathway of *Alcaligenes* sp. TB for simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(22): 9787–9794.
- [41] WANG Q K, HE J Z. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5 [J]. *Water Research*, 2020, 185: 116300.
- [42] HUANG X J, XU Y, HE T X, *et al.* Ammonium transformed into nitrous oxide via nitric oxide by *Pseudomonas putiu* Y-9 under aerobic conditions without hydroxylamine as intermediate [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 277: 87–93.
- [43] WEI R, HUI C, ZHANG Y P, *et al.* 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.
- [44] UIMS H, LUCKER S, WAGNER M. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria [J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(9): 699–712.
- [45] WANG X J, WANG W Q, LI Y, *et al.* Biofilm activity, ammonia removal and cell growth of the heterotrophic nitrifier, *Acinetobacter* sp., facilitated by exogenous N-acetyl-homoserine lactones [J]. *RSC Advances*, 2018, 8(54): 30783–30793.
- [46] ZHU Z Q, YANG Y, FANG A R, *et al.* Quorum sensing systems regulate heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by changing the activity of nitrogen-cycling enzymes [J]. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2020, 2: 100026.
- [47] RUAN X Y, YIN J, CUI X Y, *et al.* Bioaugmentation and quorum sensing disruption as solutions to increase nitrate removal in sequencing batch reactors treating nitrate-rich wastewater [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2020, 98: 179–185.

作者简介:吴彦成(1986–),男,陕西绥德人,工学硕士,工程师,研究方向为给排水系统优化及污水处理。

E-mail:583686680@qq.com

收稿日期:2021-08-20

修回日期:2021-10-31

(编辑:丁彩娟)