

好氧生物反硝化反应的实验证据

丁爱中 傅家谟 盛国英

(中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室; 广东省资源利用与环境
保护重点实验室, 广州 510640. Email: aizhdng@hotmail.com)

摘要 一般认为生物反硝化反应是在严格的厌氧条件下发生的. 实验中发现好氧条件下某些细菌能进行反硝化反应, 并对其反应机理作出了解释.

关键词 硝酸盐污染 反硝化反应 好氧条件 模拟实验

硝酸盐氮(NO_3^- -N)是水中一种颇受关注的污染物, 地表水体和地下水的硝酸盐污染在各国都普遍存在. Volokita 等人^[1]认为农业区过量施用的氮肥、生活废弃物、动物排泄物等是硝酸盐污染的主要原因. 世界卫生组织(WHO, 1984)^[2]和欧洲经济共同体(EEC, 1980)^[3]制定的饮用水硝酸盐氮最大浓度分别为 10 和 11.3 mg/L. 我国饮用水国家标准规定硝酸盐氮浓度小于 20 mg/L.

饮用水中硝酸盐浓度超标严重威胁着身体健康, 地表水体中大量的硝酸盐会导致水体的富营养化. 许多学者都在致力于水体硝酸盐除去方法的研究, 其中反硝化作用是最主要的除去硝酸盐的过程, 即将 NO_3^- 还原为 N_2 的过程, 反应式为^[4]



一般认为, 这个反应是在严格的厌氧条件下发生的^[5-7]. 有部分学者发现它能在好氧条件下进行^[8-11], 但对它的反应机理未给出进一步的解释. 本文根据实验结果, 对好氧条件下硝酸盐的还原反应作出一些解释.

1 材料与方 法

作者从土壤中分离出一种兼性细菌 DN11, 研究其在厌氧条件下的反硝化作用, 但有趣的是, 发现 DN11 能在好氧条件下还原硝酸盐.

(1) 细菌分离培养基. 蒸馏水 1 L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, K_2HPO_4 0.5 g, MgSO_4 0.05 g, CaCl_2 4 mg, 0.005%甲酚红溶液 25 mL, 离子溶液 0.1 mL(含 EDTA 二钠 5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g, 浓硫酸 0.5 mL, 蒸馏水 1 L), 121°C 灭菌 20 min, 用 K_2CO_3 调节培养基 pH 值至 8.2. 土壤样 1 g 用 10 mL 无菌水稀释, 静置沉淀, 取上清液接入平板, 在 25°C 下培养 7 d, 观测到有细菌生成. 逐步纯化, 得到菌株 DN11, 冷藏保存.

(2) 实验方法. 所有实验都是在开放体系(好氧条件, 溶解氧的含量参见表 1 所示)下进行的, 模拟柱由有机玻璃制成, 砂样和土样经 2 mm 筛子筛选, 分层夯实, 填入柱中(参数如表 2 所示), 实验前用 10%(V/V)的盐酸清洗模拟柱, 减少介质背景干扰. 每组实验都通过加与未加 DN11 细菌进行对比. 含氮污水从柱的顶端由马式瓶定水头注入, 底端采样, 菌种由柱顶端随水一起注入. 用标准方法对水样的 NO_3^- -N, NO_2^- -N, NH_4^+ -N, pH 和生物量等进行了分析^[12]. 试验用水的成分如表 3 所示.

表1 实验过程中溶解氧和硝酸态氮的变化^{a)}(单位: mg/L)

S1	DO	4.2	4.0	4.2	4.6	4.2	4.6	3.5	3.4	3.1	3.4	3.0	2.0	2.0
	NO ₃ -N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S2	DO	5.2	5.8	5.5	5.0	4.4	4.0	4.1	4.8	5.9	3.7	4.0	3.5	3.8
	NO ₃ -N	1.4	3.5	9.0	14.0	9.1	11.9	10.0	8.1	7.7	7.4	6.7	8.1	8.4
C1	DO	4.2	4.2	3.8	3.8	3.0	3.0	3.7	3.6	4.2	4.0	4.6	4.8	3.6
	NO ₃ -N	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C2	DO	5.0	4.5	4.4	4.5	4.4	4.0	4.0	5.2	5.6	3.8	5.1	5.2	5.2
	NO ₃ -N	0.1	0.7	3.0	2.5	3.5	3.5	3.5	5.6	9.8	7.9	9.8	10.1	11.2
K1	DO	3.6	2.0	1.8	1.4	0.4	2.7	1.6	1.0	0.8	1.4	2.7	1.6	1.2
	NO ₃ -N	0.1	0.4	2.1	1.1	0.1	0.7	1.4	2.2	2.8	2.1	1.1	0.1	0.1
K2	DO	4.0	4.0	3.3	3.4	3.8	4.1	3.6	4.6	4.5	3.4	4.0	3.0	3.5
	NO ₃ -N	0.1	8.4	13.3	13.3	16.8	15.1	14.0	12.6	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5

a) —未检测到

表2 模拟柱的特征参数

	编号	柱高/cm	横截面积/cm ²	孔隙度	渗透系数/m·d ⁻¹	TOC/mg·L ⁻¹
细砂	S1	40	81.67	0.49	48.0	4.52
	S2	40	81.67	0.45	44.0	4.52
亚砂土	C1	40	63.59	0.42	43.2	6.89
	C2	40	63.59	0.44	40.5	6.89
砂粘土	K1	40	63.59	0.39	4.35	9.17
	K2	40	63.59	0.31	4.70	9.17

表3 供试污水的成分(除注明外, 单位为 mg/L)

成分	含量
电导率/ $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$	2.95×10^3
pH	7.64
Eh/mV	415
溶解氧(DO)	10.2
微生物数目/个·mL ⁻¹	5.0×10^5
总硬度(CaCO ₃ 计)	200.18
NH ₄ ⁺ -N	10.0
NO ₂ -N	0.29
NO ₃ -N	7.0
SO ₄ ²⁻	31.8
Cl	56.53
HCO ₃	60.35
游离CO ₂	10.01
K ⁺	4.3
Na ⁺	21.3
Ca ²⁺	47.35
Mg ²⁺	19.90

2 结果与讨论

如图1(a)~(c)所示, 在好氧条件下, 在不同的介质中NO₃被DN11还原. 在细砂和亚砂土中NO₃被完全还原, 砂质粘土中70%~95%的NO₃被还原, 而未加DN11的对照实验中, NO₃的浓度反而有所增加, 只是在不同的介质中增加的幅度有所不同. 从对照实验的结果可以认

为, 不同介质中 NO_3^- 的除去是由于生物反硝化的结果, 除去效率不同是由于不同介质中有机物质的含量不同, 它对细菌的活动性有一定的影响, 因为所有的模拟实验条件是一致的.

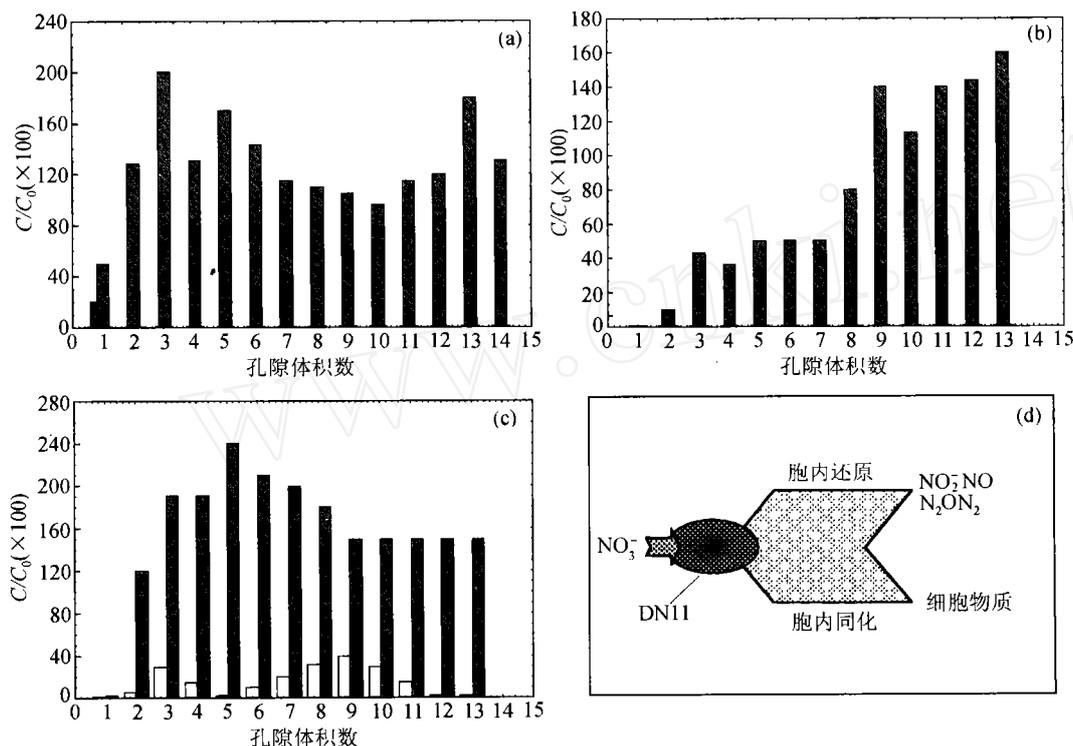


图 1 不同介质中 DN11 对硝酸盐的除去效果及机制

(a) 细砂; (b) 亚砂土; (c) 砂粘土; (d) 硝酸盐除去机制. 图中空白格为加 DN11 菌种, 阴影格为未加 DN11 菌种. (a), (b) 图出水中 NO_3^- -N=0; C——出水中 NO_3^- -N 浓度, C_0 ——初始 NO_3^- -N 浓度

这种现象是如何发生的呢? 作为一种兼性细菌, DN11 利用有机物作为电子给体, 通过细胞合成还原 NO_3^- 或 NO_2^- 为 N_2 , 同时可能产生一些中间产物, 如下列过程:



胞外还原和胞内同化(图 1(d))是除去 NO_3^- 的两种机制^[13], NO_3^- 通过反硝化菌的代谢活动, 可最终还原成有机氮化合物, 成为菌体的组成部分, 这条途径归属为胞内同化; 或最终还原成氮气, 这条途径归属为胞外还原(图 1(d))^[14]. Robertson 等人^[13, 15]认为, 这是此类细菌对 O_2 和 NO_3^- 共呼吸的结果. O_2 对其有两方面的影响: 一是阻碍胞外还原作用, 一是抑制胞内同化作用. 当环境中氧的浓度较高时, DN11 偏向胞内同化硝酸盐, 即在好氧条件下, NO_3^- 的除去是胞内同化的结果, 而胞外还原作用被抑制; 当溶解氧浓度较低时, 胞外还原作用更容易发生, 而胞内同化作用被抑制. 这两种反应机制的发生及转换的氧浓度阈值至今未确定^[16], 需开展进一步的研究.

致谢 本工作为广东省自然科学基金(编号: 990537)和国土资源部环境地质开放研究实验室(K98006)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Volokita M, Belkin S, Abeliovich S, et al. Biological denitrifications of drinking water using newspaper. *Wat Res*, 1996, 30: 965~971
- 2 World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. Geneva, 1984, 11
- 3 EEC Directive of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption 80/778/EEC. of *J Eur Commun*, 1980, 23: 11~29
- 4 Feleke Z, Araki K, Sakakibara Y, et al. Selective reduction of nitrate to nitrogen gas in a bio-electrode reactor. *Wat Res*, 1998, 32: 2728~2734
- 5 Payne W J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol Rev*, 1973, 37: 409~452
- 6 Knowles R. Denitrification. *Microbial Rev*, 1982, 46: 43~70
- 7 Hochstein L I, Tomlinson G A. The enzymes associated with denitrification. *Ann Rev Microbiol*, 1988, 42: 231~261
- 8 Halling-Sorensen B, Hjulær H. Simultaneous nitrification and denitrification with an upflow fixed bed reactor applying clinoptilite as media. *Wat Treat*, 1992, 7: 77~78
- 9 Kokufuta E, Shimohashi M, Nakamura I. Simultaneously occurring nitrification and denitrification under oxygen gradient by polyelectrolyte complex-coimmobilised: *nitrosomonas europaea* and *paracoccus denitrificans* cells. *Biotech Bioeng*, 1988, 31: 382~384
- 10 Masuda S, Watanabe Y, Ishiguro M. Biofilm properties and simultaneous nitrification and denitrification in aerobic rotating biological contactors. *Wat Sci Tech*, 1991, 23: 1355~1363
- 11 Moriyama K, Satok, Harada Y, et al. Simultaneous biological removal of nitrogen and phosphorus using oxic-anaerobic-oxic process. *Wat Sci Tech*, 1990, 22: 61~66
- 12 American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. Washington, D C, 1995. 1~222
- 13 Bonin P, Gilewicz M A. Direct demonstration of "co-respiration" of oxygen and nitrogen oxides by *pseudomonas nititica*: some spectral and kinetic properties of the respiratory components. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 80: 183~188
- 14 秦麟源. 废水生物处理. 上海: 同济大学出版社, 1989. 1~5
- 15 Robertson L A, Kuenen J G. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1990, 57: 139~152
- 16 Kornaros M, Lyberatos G. Kinetics of aerobic growth of a denitrifying bacterium *pseudomonas denitrificans* in the presence of nitrates and/or nitrites. *Wat Res*, 1998, 32: 1912~1922

(1999-08-16 收稿, 2000-01-12 收修改稿)