

生物脱氮微生物学及研究进展

赵 丹^{1,2}, 任南琪¹, 马 放¹, 沈耀良², 李 勇²

(1. 哈尔滨工业大学 环境生物技术中心, 黑龙江 哈尔滨 150090 ; 2. 苏州科技学院 环保系, 江苏 苏州 215011)

摘 要: 生物脱氮是含氮废水处理的常用方法之一. 除传统的硝化-反硝化过程外, 还存在着多种微生物参与的转化机制及相关的未知领域. 在传统生物脱氮过程机理上, 结合废水处理运行中的新发现, 就亚硝酸盐型硝化、异氧硝化-好氧反硝化、自养细菌反硝化、厌氧氨氧化等进行了报道.

关键词: 生物脱氮; 硝化作用; 反硝化作用; 厌氧氨氧化

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6780(2002)05-0060-06

Microbiology and research progress in biological nitrogen removal

ZHAO Dan^{1,2}, REN Nan-qi¹, MA Fang², SHEN Yao-liang², LI Yong²

(1. Research Center of Environmental Biotechnology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. Environmental Protection Department, Suzhou Institute of Science and Technology, Suzhou 215011, China)

Abstract: Biological nitrogen removal is a common method used for treatment of nitrogenous wastewater, but for traditional nitrification and denitrification, there are many confused blanks about the complicated reactions and conversions as well as the unknown related field charged by microorganisms. On the basis of the introduction about the traditional nitrification and denitrification, combined with the new discoveries about biological nitrogen removal in real operation, the research progresses such as the actions of nitrite-type nitrification, heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, autotrophic denitrification as well as anaerobic ammonium oxidation were reported in this paper.

Key words: biological nitrogen removal(BNR); nitrification; denitrification; anaerobic ammonium oxidation

水体富营养化是我国当今水环境面临的重大问题, 解决的根本方法是通过制定和实施排放标准, 对污染源进行脱氮除磷处理, 实现氮、磷的达标排放.

现阶段含氮废水的主要处理方法有生物处理法、吹脱法、气提法、离子交换法、折点加氯法等^[1], 其中生物脱氮的方式适用范围最广、投资及运转成本最低、操作简单、无二次污染, 废水达标排放可靠性强, 因此成为脱氮的最佳处理方式.

传统的生物脱氮主要包括氨化作用、硝化作用、反硝化作用, 但是随着对脱氮工艺运行及其微生物学研究的深入, 许多新的现象被发现. 本文拟从传统生物脱氮原理入手, 就新近发现的现象加以介绍和分析.

1 传统生物脱氮原理

1.1 氨化作用

通过微生物胞外蛋白酶的水解作用使含氮有机物转化为氨基酸, 之后进入内脱氨基产生氨的过程称为氨化作用(ammonification), 此过程可在好氧或厌氧条件下进行^[2]. 好氧条件下参与脱氨基的微生物主要有枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、荧光假单胞菌等, 厌氧条件下的微生物主要有腐败梭菌、兼性大肠杆菌、酵母菌、变形杆菌等. 尿素在尿酶的作用下水解为碳酸胺, 之后分解为氨和二氧化碳. 参与此过程的微生物主要有尿芽孢八叠球菌等含有尿酶的微生物.

1.2 硝化作用

化能无机自养菌将氨氧化为硝酸盐的过程称为硝化作用(nitrification). 早在 1877 年, 施来

收稿日期: 2001-12-20

基金项目: 江苏省环境科学与工程重点实验室资助项目(ZD2001003)

作者简介: 赵 丹(1972-), 女, 哈尔滨工业大学博士生.

兴^[3]等人就通过实验证明了这一生物学过程的存在. 1890年维诺格拉斯基^[3]利用含铵盐的无机硅胶培养基首次对硝化细菌进行了研究, 证明硝化过程包括两个连续而又独立的阶段: 氨氧化为亚硝酸盐过程、亚硝酸盐氧化为硝酸盐的过程, 参与两过程的微生物同属于硝化杆菌亚群^[3].

1.2.1 氨氧化为亚硝酸的过程

氨氧化细菌首先在氨单加氧酶(AMO)的作用下将氨氮氧化为NH₂OH和H₂O, 此过程中的2个外源电子来自于后续的羟胺氧化, 通过Cyt_c和CoQ由HAO传递给AMO. NH₂OH氧化为NO₂⁻是由羟胺氧化还原酶(HAO)进行的. AMO是一种膜整合蛋白, 而HAO存在于周质中(见图1). 参与此过程的微生物特性见表1^[3], 反应过程为

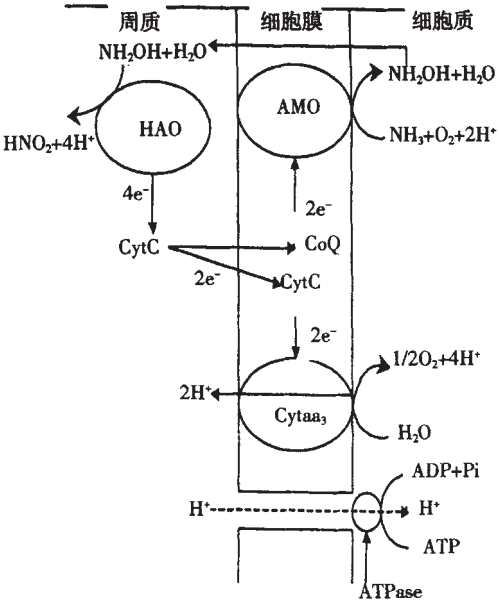
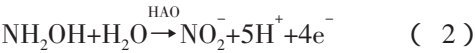


图1 氨氧化的电子传递示意图

Fig.1 Electron transfer sketch map of ammonia oxidation

表1 氨氧化菌的特性

Table 1 Characteristic of ammonia oxidation bacteria

代表种	细胞形态	鞭 毛	膜内褶结构	细胞大小/μ m
<i>Nitrosococcus</i>	球状至椭圆球状	丛毛	呈泡囊分布于四周或堆积中央	(1.5~1.8)× (1.7~2.5)
<i>Nitrosolobus</i>	多形态叶片状	周生	使细胞分隔	(1.0~1.5)× (1.0~2.5)
<i>Nitrosomonas</i>	直杆状	极生至偏极生	呈泡囊分布与四周	(0.7~1.5)× (1.0~2.4)
<i>Nitrospira</i>	紧密螺旋状	周生	细胞膜内陷	(3.0~0.8)× (1.0~8.0)
<i>Nitrovibrio</i>	细长弯曲杆状	极生至偏极生	细胞膜内陷	(3.0~0.4)× (1.0~3.0)

1.2.2 亚硝酸氧化为硝酸的过程

亚硝酸氧化菌将NO₂⁻氧化为NO₃⁻, 产生ATP和NADH, 并通过卡尔文循环固定CO₂. 原子示踪实验证明亚硝酸盐好氧氧化过程中, 产物硝酸盐中的氧原子来自于水. 亚硝酸氧化酶(NOR)位于细胞的呼吸颗粒上, 与膜紧密结合, 因为能量的需要, 参与此过程的细胞色素不是C型, 而是a型, 整个体系称为“亚硝酸氧化酶”, 整个反应至今未检出任何中间产物, 是一步完成的(见图2), 参与此

过程的微生物特性见表2^[3].

以上介绍的利用无机物的化能自养代谢过程, 各反应的还原电势都比较高: $E(\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+) = 340 \text{ mV}$ 及 $E(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-) = 430 \text{ mV}$, 因此欲使无机基质的氧化和NAD的还原相耦联, 必须提供一定的能量, 而细菌的氧化磷酸化效率很低, NAD还原过程产生1分子NADH需消耗3分子ATP, 然而实际情况是氧化1分子亚硝酸盐只产生1分子的ATP, 因此为获得合成细胞所需的还原力, 必须消耗大量

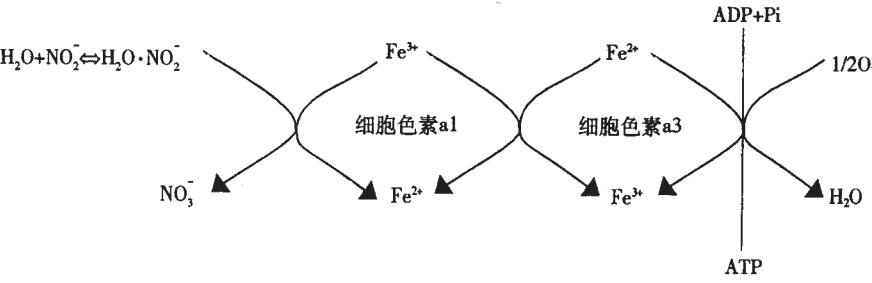


图2 亚硝酸氧化过程的电子传递示意图

Fig. 2 Electron transfer sketch map of nitrite oxidation

ATP ,这就是硝化细菌生长慢、世代时间长、细胞产率^[4]。率低的原因。

表2 亚硝酸氧化菌的特性
Table 2 Characteristic of nitrite oxidation bacteria

代表种	细胞形态	鞭 毛	膜内褶结构	细胞大小/ μm	利用有机质能力
<i>Nitrobacter</i>	梨状或多态杆状	极生至侧生	呈扁平泡囊分布于一侧	(0.5~0.8) $\times$ (1.0~2.0)	可异养生长
<i>Nitrococcus</i>	球状	极生	呈微管随机分布	1.5	无
<i>Nitrospina</i>	细长杆状	未观察到	无	(3~0.4) $\times$ (1.7~6.6)	无
<i>Nitrospira</i>	疏松螺旋状	未观察到	细胞膜内陷	(0.3~0.4) $\times$ (0.8~1.0)	可混合营养生长

1.3 硝酸盐还原和反硝化作用

同化型硝酸盐还原过程是微生物以硝态氮为氮源 ,将硝酸盐转化为氨氮 ,并合成构成蛋白质的氨基酸等生物大分子的过程 ,代表性的属为气单胞菌属、芽孢杆菌属、欧文氏菌属、肠杆菌属、微球菌属、分枝杆菌属、葡萄球菌属、弧菌属中的一些种。异化型硝酸盐还原过程即为通常意义上的将氮氧化物 (NO_3^- 、 NO_2^-) 还原为气态氮氧化物 (NO 、 N_2O) 或进一步还原为 N_2 的反硝化过程^[9] ,典型微生物为芽孢杆菌属、生丝微菌属、假单胞菌属、莫拉氏菌属、螺菌属和硫杆菌属的一些种 ,其中的酶系主要为硝酸还原酶(NaR) 亚硝酸还原酶(NiR) 氧化氮还原酶(NOR) 氧化亚氮还原酶(N_2OR) 同化型和异化型硝酸盐还原过程的比较情况见图3。

2.1 亚硝酸盐型硝化

亚硝酸盐型硝化即是利用参与硝化过程的两种类型细菌(氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌)性质的不同 ,将硝化过程控制在亚硝酸盐阶段。常用的工艺有 SHARON^[6](single reactor for high activity ammonia removal over nitrite) 和 OLAND^[7](oxygen limited autotrophic nitrification denitrification) ,分别由荷兰 Delft 技术大学和比利时 Gent 大学开发。实现亚硝酸盐型硝化的方法可分为以下几种：

(1) 改变 pH 抑制亚硝酸盐氧化的方法^[8]。研究表明^[9]当 pH 为 7.4~8.3 时 ,亚硝酸盐的积累率高达 90% 以上。

(2) 利用两种细菌生长速率的不同实现亚硝酸盐型硝化。在温度 $<15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $>30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时(考虑微生物反应速率 ,一般利用 $>30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 情况) ,氨氧化菌的生长速率高于亚硝酸氧化菌 ,此时通过控制较短的污泥龄 ,将世代时间较长的亚硝酸氧化菌 “ 洗出 ”^[10]。

(3) 利用亚硝酸氧化菌的氧亲和力比氨氧化菌低的特点 ,通过在絮体内部创建缺氧条件或通过在好氧与缺氧之间的快速循环 ,选择性的限制亚硝酸氧化菌的生长^[11]。

(4) 利用氨氧化菌和亚硝酸氧化菌对进水游离氨浓度和氨氮负荷的耐受力差异 ,当游离氨浓度 $>0.6\text{ mg/L}$ 时就可以抑制亚硝酸氧化菌 ,而游离氨浓度 $>40\text{ mg/L}$ 时才会抑制氨氧化菌活性。同样进水较高的氨氮负荷也会形成亚硝酸盐的积累。

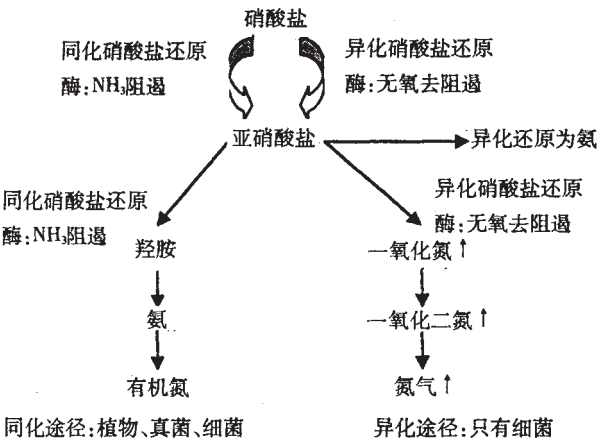


图3 硝酸盐同化和异化过程的比较

Fig.3 Comparison of nitrate assimilation and catabolism

生物脱氮过程研究新进展

根据对实际运行系统的观察及微生物文献的报道 ,一些学者提出了在其研究的处理过程中“ 非传统 ”的氮的消亡现象。但由于废水处理实际过程中很难得到正确的生物量平衡 ,因此这些主张很难得到证明。本文综述了以上的文献 ,并对“ 非传统 ”的氮的转化的条件进行了评述。

亚硝酸盐型硝化具有减少处理设施的占地面积 ,节省投资 ;减少硝化过程的产酸量即碱量投加 ;节省 O_2 的供给 ,降低动力消耗 ;节省碳源 ;尤其适用于原水含氮量较高的情况 ,可以减轻游离氨对微生物反应速度的抑制 ,保证处理效率等优点。

2.2 异养硝化-好氧反硝化

特殊的异养硝化-好氧反硝化现象是指将硝化作用中产生的硝态氮产物反硝化还原为氮的过

程^[12],通常是指在有氧气存在下或在曝气池中,由于氧气向絮体或生物膜中的扩散受限制,或没有很好的混合,导致厌氧反硝化的发生。一般絮体的尺寸在0.15 mm或生物膜超过0.1 mm的范围已经足够允许在传统的活性污泥处理系统中形成实际上的反硝化。另外在氧气受限的活性污泥系统中,微生物细胞可以通过同时呼吸氧气和硝酸盐获得较高的生长速率。此时因为污泥絮体中存在部分的厌氧情况,正常的反硝化还是可以发生,因而很难区分这两个过程。这一技术发现为利用单一细

菌、单个反应器在低氧浓度下处理高C/N比(>10)的废水提供了生物学基础。

2.3 自养反硝化菌的反硝化

自养反硝化菌的反硝化是以还原性的无机物(硫化物、 H_2)为电子供体,以氧化态氮为电子受体进行的反硝化过程。典型的微生物为硫细菌中的脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)和氢细菌中的脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)等,其反应过程如式(3)(4),示意图见图4。

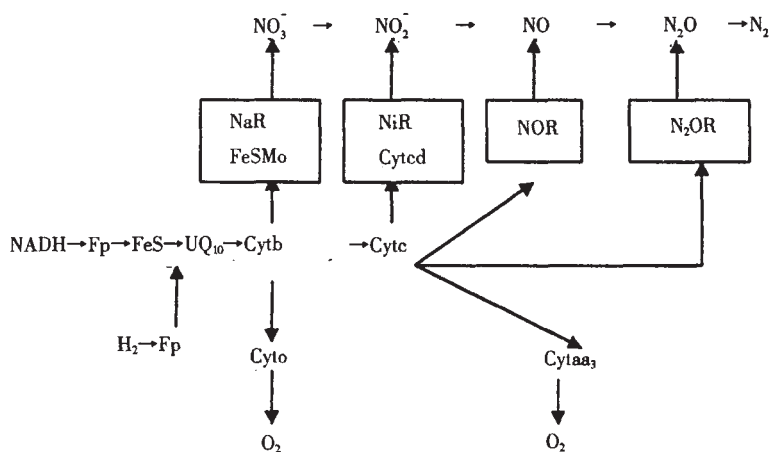
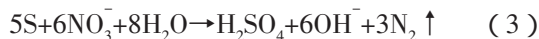


图4 脱氮副球菌反硝化过程的电子转移示意图

Fig.4 Electron transfer sketch map of denitrification of *Paracoccus denitrificans*

2.4 自养硝化菌的反硝化

早在1972年就有报道^[13]在微藻类条件下,自养硝化菌还原亚硝酸盐为 N_2O 的量是羟胺氧化为亚硝酸盐量的2倍。1995年,Muller等^[14]发现在非常低的氧压力下,如DO压力在0.3 kPa时,系统的最大氨氧化率可达58%。1997年Hippen^[15]等报道了自养微生物在好氧情况下的反硝化,称之为好氧反氨化(aerobic de-ammonification),此过程的可能途径见图5。这些自养硝化菌转化速率在数量级上比传统的硝化-反硝化速率低很多,可以看作是在特殊条件下发生的一类副反应。

2.5 氨的厌氧氧化(ANAMMOX)

ANAMMOX是anaerobic ammonium oxidation的缩写形式。理论上氨氮还可以作为反硝化过程中的电子供体而被氧化。这一反应的自由能与反硝化过程的自由能是相等的(式(5))^[16]。最近的研究表明,自然界中存在着至少两种不同的氨的厌氧氧化,一种情况如2.4中所述的低氧分压情况,另外一种专性厌氧氨氧化过程是最近在中试处理产

甲烷反应器出水的厌氧反硝化流化床系统中发现的^[17]。 ^{15}N 的示踪实验展示出如图6所示的反应过程。此系统以 NO_2^- 作为电子受体,其最大的氨氧化速率为 $55 \text{ nmol NH}_4^+ / (\text{min} \cdot \text{mg 蛋白质})$,尽管此速率比亚硝化杆菌快25倍,但其生长速率仅为0.003倍/h(倍增时间为11 d)。表3给出了在不同微生物的序批培养中氨氮、联氨、羟胺的厌氧转化速率。

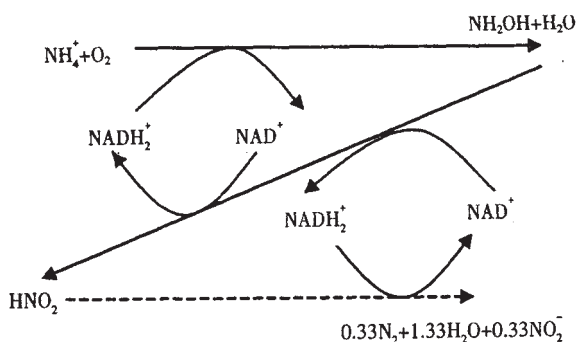


图5 好氧氨氧化的可能途径

Fig.5 Potential approach of aerobic de-ammonification

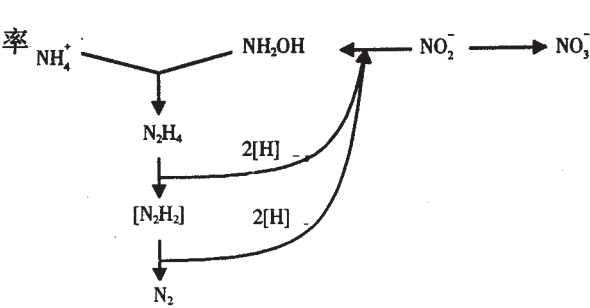
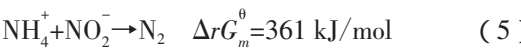


图6 厌氧氨氧化的可能途径

Fig. 6 Potential approach of anaerobic ammonium oxidation



ANAMMOX富集培养的微生物是一类、不发光的椭圆形细菌,电镜下显示出不寻常的无规则形态,并显示出古细菌,如太古或分支非常深的细菌(*Thermotoga*和*Aquifex*等)的一些特性,有待于进一步进行研究和鉴定. ANAMMOX细菌与一般的好氧氨氧化菌中的羟胺氧化酶在16SRNA数据库中无任何同源情况,表4列举了此两种HAO酶的一些特征比较.

表3 不同微生物的序批培养中氨氮、联氨、羟胺的厌氧转化速率 nmol/min·mg蛋白质

Table 3 Transfer rate of NH_4^+ 、 N_2H_4 、 NH_2OH during anaerobic batch culture of microbe

微生物	测试物质	NO_2^- 转化率	羟胺/氨氮/联氨转化率	产物	参考文献
<i>N.europaea</i>	$\text{NH}_2\text{OH} + \text{NO}_2^-$	2	3	N_2O	[18]
<i>N.europaea</i>	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^-$	2	3	N_2O	[18]
<i>N.europaea</i>	$\text{H}_2 + \text{NO}_2^-$	7	—	N_2O 、 N_2	[19]
<i>N.europaea</i>	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^-$	<1	<1	N_2O	[19]
<i>N.europaea</i>	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^-$	0.9	1.1	NO 、 N_2O	[20]
ANAMMOX	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^-$	12	9	N_2	[21]
ANAMMOX	NH_2OH	n/a	12	N_2	[22]
ANAMMOX	$\text{N}_2\text{H}_4 + \text{NO}_2^-$	13	11	NH_4^+ 、 N_2	[22]
ANAMMOX	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^-$	68	55	N_2	[21]

表4 ANAMMOX与好氧氨氧化菌中的HAO性质的比较 ²²⁾

Table 4 The comparison of the characteristic of HAO in anaerobic and aerobic ammonium oxidation

指 标	ANAMMOX中HAO	好氧氨氧化菌中HAO
分子量/kDa	150	125~175
亚单位/kDa	60~95	63
组成	a2-a3	a2-a3
410/280比率	4.5	3.3
原血红素	(22±4)/150	24/a3
活性中心	P ₄₆₈	P ₄₆₃
$V_{\text{max}}/\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	21	—
$K_m/\mu\text{M}$	26	8
最佳pH	8	8
等电点pI	5.5	5.3
N-末端	blocked	DISTV

3 结论

氮的转化过程对于废水处理过程非常重要. 由于存在着许多可能的转化过程以及在实际条件下分析反应的复杂性,还有许多地方是相矛盾的. 本文对文献中可能的微生物氮转化过程进行了综

述,并且讨论了与废水处理过程相关的转化作用. 所叙述的好氧反硝化和自养硝化菌的反硝化反应速率太慢,因此这一转化过程在实际中作用不大. 异养硝化过程只有在废水具有较高的COD/N时才可行. 氨氮厌氧氧化只有在具有较长的污泥停留时间或生物膜的自养系统中才发生,由于可以

利用氨氮作为反硝化细菌的电子供体,此工艺在脱氮过程中不需有机物。厌氧氨氧化与亚硝酸盐型硝化相联合实现的脱氮过程需要更少量的氧气和有机物 $4.6 \rightarrow 1.9 \text{ kgO}_2/\text{kgN}$ 、 $2.6 \text{ kgBOD}/\text{kgN} \rightarrow 0$, 并且污泥产量从 $1 \text{ kgVSS}/\text{kgN}$ 下降为 $0.08 \text{ kgVSS}/\text{kgN}$, 还可以使废水中的BOD完全转化为甲烷气体。这一过程在处理高 NH_3 含量废水中有着广阔的应用前景^[23]。

参 考 文 献:

- [1] 唐受印,戴友芝. 水处理工程师手册[M]. 北京:化学工业出版社,2000.
- [2] 沈同,王镜岩. 生物化学(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
- [3] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H. A Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th edition)[M]. Williams and Wilkins, 1994.
- [4] 郑世民. 自养微生物[M]. 北京:科学出版社,1983.
- [5] 闵航,陈美慈,赵宇华,等. 厌氧微生物学[M]. 北京:浙江大学出版社,1993.
- [6] HELLINGA C, SCHELLEN A A J C, MULDER J W, *et al.* The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium rich wastewater[J]. Wat.Sci.Tech, 1998, 37(9):135-142.
- [7] KUAL L P, VERSTRAETE W. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification denitrification system[J]. Appl.Environ.Microbiol, 1998, 64:4500-4506.
- [8] ABELING U, SEYFRIED C F. Anaerobic-aerobic treatment of high strength ammonium wastewater nitrogen. removal via nitrite[J]. Wat.Sci.Tech, 1992, 26(5-6):1007-1015.
- [9] 徐冬梅,聂梅生,金承基. 亚硝酸盐型硝化实验研究[J]. 给水排水,1999, 25(7):37-39.
- [10] RANDALL C W, BUTH D. Nitrite build up in activated sludge resulting from temperature effects[J]. J.Wat.Poll. Contr.Fed, 1984, 56:1039-1044.
- [11] LAANBROEK H J, GERARD S S. Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradsky* grown in mixed continuous cultures[J]. Arch.Microbiol, 1993, 159:453-459.
- [12] ROBERTSON L A, DALSGAARD T, REVSBECH N P, *et al.* Confirmation of 'aerobic denitrification' in batch cultures using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry[J]. FEMS Microb.Eco, 1995, 18:113-120.
- [13] RITCHIE G A F, NICHOLAS D J D. Identification of the sources of nitrogen oxide produced by oxydative and reductive processes in *N.europaea*[J]. Biochem.J, 1972, 126:1181-1191.
- [14] MULLER E B. Simultaneous NH_3 oxidation and N_2 production at reduced O_2 tension by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium[J]. Biodegradation, 1995, 6:339-349.
- [15] HIPPEL A, ROSENWINKEI K H, BAUMGARTEN G, *et al.* Aerobic de-ammonification: a new experience in the treatment of wastewaters [J]. Wat.Sci.Tech., 1997, 35(10):111-120.
- [16] BRODA E. Two kinds of lithotrophs missing in nature[J]. Microbiol, 1997, 17:491-493.
- [17] MULDER A, VAN DE GRAAF A A, ROBERTSON L A, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1995, 16:177-183.
- [18] DE BRUIJN P, VAN DE GRAAF, JETTEN A A, J, *et al.* Growth of on hydroxylamine [J]. FEMS Microbiol.Lett, 1995, 125:179-184.
- [19] BOCK E, SCHMIDT I, STUVEN R, *et al.* Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor[J]. Arch.Microbiol, 1995, 163:16-20.
- [20] SCHMIDT I, BOCK, E. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by[J]. Arch.Microbiol N.europaea, 1997, 167:106-111.
- [21] Van de Graaf, A A, de bruijn, P, ROBERTSON, *et al.* Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor [J]. Microbiology, 1996, 142:2187-2196.
- [22] VAN DE GRAAF A A, DE BRUIJN, ROBERTSON P, *et al.* Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ^{15}N studies in a fluidized bed reactor [J]. Microbiology, 1997, 143:2415-2421.
- [23] DILWORTH M J, EADY R R. Hydrazine is a product of dinitrogen reduction by the vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum* [J]. Biochem.J, 1991, 277:465-468.