

脱氮副球菌硝酸盐/亚硝酸盐还原酶的活性变化及对养殖水体中无机氮素的转化

吴伟^{1,2}, 刘道玉², 瞿建宏¹, 范立民^{1,2}, 王琼²

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081; 2. 南京农业大学渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要:以一株脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)为试验菌株,研究了其在不同溶氧条件下菌体内硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶活性的变化及对水体中无机氮的转化。结果表明,脱氮副球菌是一株好氧细菌,当水体中存在碳源及3种不同形式的无机氮时,水体DO的水平决定了菌体的生长速率及对无机氮的转化利用效率。DO充足,菌体生长速率快,细胞量高,反之则生长缓慢。脱氮副球菌可有效转化不同形式的无机氮,其以同化的方式转化 $\text{NH}_4^+\text{-N}$,而以反硝化方式转化去除 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。反硝化作用的程度取决于细菌体内异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活力。而异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活力受到水体中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的含量以及DO水平的显著影响。从转化速率和效能上来看,水体DO至少应保持在 $3.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上。将活菌数 $\geq 10^9$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的脱氮副球菌按 0.75 、 1.50 、 $2.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的用量加入淡水池塘养殖水体,在38 d试验期内可使养殖水体中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 下降 $39.71\%\sim 49.33\%$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 下降 $50.00\%\sim 64.39\%$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 下降 $44.44\%\sim 60.00\%$,高锰酸盐指数下降 $7.81\%\sim 21.49\%$,对养殖水体中的无机氮素及有机物污染具有较好的控制效果。研究显示,脱氮副球菌的好氧反硝化作用可以为养殖水体有氧条件下的脱氮提供一条新的思路。

关键词:脱氮副球菌;反硝化;硝酸盐还原酶;亚硝酸盐还原酶;养殖水体;无机氮

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)06-1244-09 doi:10.11654/jaes.2013.06.023

The Changes of Nitrate and Nitrite Reductase Activity of *Paracoccus denitrificans* and Its Inorganic Nitrogen Removal for Aquaculture Water

WU Wei^{1,2}, LIU Dao-yu², QU Jian-hong¹, FAN Li-min^{1,2}, WANG Qiong²

(1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Inland Fishery Eco-environment and Resource, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. Fishery College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

Abstract: This paper focused on the activities of nitrate reductase and nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* and its inorganic nitrogen control for aquaculture water under different dissolved oxygen conditions. The results showed that *Paracoccus denitrificans* was an aerobic bacteria, and when carbon sources and three different forms of inorganic nitrogen coexisted in water, the concentration of DO determined the rate of cell growth and the transformation efficiency of inorganic nitrogen. The higher the DO concentration, the faster the growth, the bigger the cells biomass. *Paracoccus denitrificans* had good conversion efficiency for different forms of inorganic nitrogen, it always transformed $\text{NH}_4^+\text{-N}$ via assimilation, while almost transformed all $\text{NO}_3^-\text{-N}$ and $\text{NO}_2^-\text{-N}$ via denitrification. The degree of denitrification depended on the vitality of in vivo dissimilatory nitrate reductase and nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans*. And the vitality of these two enzymes was significantly affected by the concentration of $\text{NO}_3^-\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ and DO. Judging from the aspects of conversion rate and efficiency, the concentration of water DO should be kept at least $3.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. *Paracoccus denitrificans* (viable counts $\geq 10^9\text{ }\cdot\text{mL}^{-1}$) was used to control the nitrogen pollution of aquaculture water, when the concentration of *Paracoccus denitrificans* in aquaculture water reached to $0.75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $2.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the $\text{NH}_4^+\text{-N}$ of aquaculture water decreased by $39.71\%\sim 49.33\%$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ decreased by $50.00\%\sim 64.39\%$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$

收稿日期:2012-11-15

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费(中国水产科学研究院)专项资金项目(2012A0301);现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-49)

作者简介:吴伟(1967—),男,研究员,主要从事污染生态学及环境生物学的研究。E-mail:wuw@ffrc.cn; wuwzh@263.net

decreased by 44.44%~60.00%, COD_{Mn} decreased by 7.81%~21.49% within 38 days. The results indicated that *Paracoccus denitrificans* could effectively control nitrogen and organic pollution of aquaculture water. The details of the aerobic denitrification of *Paracoccus denitrificans* provided a new idea for nitrogen removal of aquaculture water.

Keywords: *Paracoccus denitrificans*; denitrification; nitrate reductase; nitrite reductase; aquaculture water; inorganic nitrogen

养殖水体中的浮游植物不仅是养殖生物的适口饵料,而且是养殖生态平衡的基础。为了构建理想的水体浮游植物群落,养殖前期往往投入大量的无机和有机肥料。在营造合理水色的同时,导致养殖水体中无机氮(NH_4^+-N 、 NO_2^--N 、 NO_3^--N)的过度积累,影响水体生态环境质量。无机氮中的亚硝态氮可以氧化水生动物体内的亚铁血红蛋白(Fe^{2+})生成高铁血红蛋白(Fe^{3+}),使其失去携带氧分子的能力,从而影响水生动物体内氧的运输,使红细胞变性,造成生物死亡^[1-3];硝态氮过量会使水体中的营养平衡失调,水环境质量降低,并且在局部厌氧条件下可转化成亚硝态氮,而氨氮在有氧条件下可通过亚硝化和硝化作用生成亚硝态氮和硝态氮。因此,对于养殖水体而言,为了保证养殖生物的质量与安全,必须将无机氮素特别是亚硝态氮和硝态氮的含量控制在合理的范围内。

水体中硝态氮与亚硝态氮的转化和去除主要是通过微生物的同化吸收和反硝化作用而实现。一般认为反硝化细菌是异养性兼性厌氧细菌,只有在缺氧条件下才以硝酸盐或亚硝酸盐为电子受体,进行反硝化作用。反硝化作用是在硝酸盐或亚硝酸盐还原酶的催化下,将硝酸盐或亚硝酸盐还原并使生物体获得能量的过程。随着研究的深入,Robertson 和 Kuenen^[4]发现了好氧反硝化细菌的存在,即在有氧条件下可进行反硝化作用。近年来,国内外学者已经在好氧反硝化细菌的分离、鉴定、培养和应用等方面进行了一些研究^[5-8],但对好氧反硝化细菌体中硝酸盐/亚硝酸盐还原酶活性的变化以及与溶氧水平、无机氮转化效率之间的相关性研究尚未有报道。

作者从养殖水体环境中分离得到了一株脱氮副球菌,对其在以硝态氮或亚硝态氮为唯一氮源时的好氧反硝化特性进行了研究^[9]。在上述研究的基础上,本文以这株脱氮副球菌为试验菌株,研究了其在3种无机氮共存且溶氧不同的条件下,菌体内亚硝酸盐和硝酸盐还原酶的活性变化,以及对水体中不同形式无机氮的转化效能,初步阐述了其好氧反硝化的可能途径,并将其应用于池塘养殖水体,为生物治理水产养殖水体的氮污染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心环境保护研究室分离鉴定并提供。

1.2 仪器与试剂

胰蛋白胨、酵母浸出汁、葡萄糖、琼脂,北京陆桥技术有限责任公司产品;氯化钠、硝酸钠、亚硝酸钠、N-(1-萘基)-乙二胺盐酸盐、氨基磺酸、碘化钾、碘化汞、酒石酸钾钠、氢氧化钠等均为分析纯,国药集团上海试剂厂产品;细菌异化型硝酸盐还原酶活性定量检测试剂盒、细菌亚硝酸盐还原酶活性定量检测试剂盒、BCA 蛋白质浓度定量试剂盒,GENMED SCIEN-TIFICS INC. U.S.A 产品。

SIGMA 2-16K 低温冷冻离心机, GL-22 MS 高速冷冻离心机, ZHJH-1214 双面气流式无菌工作台, TOMY Autoclave SS-325 型全自动高压灭菌器, SANYO MIR-153 型高低温恒温培养箱, QHZ-98B 全温度光照振荡培养箱, ZHWY 200B 恒温振荡摇床, METTLER AL204 电子分析天平, UV-1200 紫外-可见分光光度计, Nikon 90i 光学显微镜, Multiskan MK3 酶标仪, PHS-3TC 数显 pH 计, YSI 溶氧仪, XW-80A 漩涡混合器等。

1.3 脱氮副球菌对水体中无机混合氮源的转化能力

1.3.1 脱氮副球菌菌液的制备

从试管斜面上取脱氮副球菌菌苔一环,接种到 5 mL 灭菌的基础培养基中,于 30 ℃、100 r·min⁻¹ 摇床上培养 24 h,经 7000 r·min⁻¹ 离心 15 min,弃去上清液,用无菌生理盐水冲洗后再离心,如此重复 3 次。加入 5 mL 无菌生理盐水将菌体稀释成菌悬液备用(OD_{600} 值约等于 1.0,活菌数为 $1 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[10]。

液体基础培养基:胰蛋白胨 10 g·L⁻¹,酵母膏 5 g·L⁻¹,NaCl 10 g·L⁻¹,pH7.0~7.2,121 ℃灭菌 20 min。

1.3.2 无机氮源混合液的配制

考虑到实际的水产养殖水体中, NH_4^+-N 的浓度通常是 NO_3^--N 或 NO_2^--N 的数倍,而 NO_3^--N 和 NO_2^--N

的浓度相对比较接近的事实,故本项研究中设置的无机氮源混合液中 $c(\text{NH}_4^+-\text{N}):c(\text{NO}_3^--\text{N}):c(\text{NO}_2^--\text{N})=5:1:1$ 。为便于了解细菌的转化能力和转化动态,混合液的浓度与实际水体相比扩大了近百倍。配制方法参见 Daum^[11]和赵诣^[12]等方法,并做适当改动,具体配方如下: NH_4Cl 0.229 g, NaNO_3 0.072 8 g, NaNO_2 0.059 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.039 0 g, CaCl_2 0.055 0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.010 0 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.000 024 0 g, K_2HPO_4 13.9 g, KH_2PO_4 5.30 g, 溶于 1 L 蒸馏水中,用 NaOH 或 HCl 调节溶液 pH 值至 7.2~7.5,分装后灭菌,冷却后在无菌条件下加入适量的灭菌葡萄糖母液,使得 C/N 摩尔比达到 15。此混合液 NH_4^+-N 初始浓度约为 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NO_3^--N 初始浓度约为 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NO_2^--N 初始浓度约为 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (试验中以实测值为准)。

1.3.3 无机氮源混合液中溶解氧范围的设定

以 70% 的装液量 (500 mL 三角瓶中加入 350 mL 的无机氮源混合液),于 30°C (细菌适宜生长温度)下通过调节不同转速来分析无机氮源混合液中的溶解氧 (DO) 范围。由文献[9]可知,0、50、100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 这 3 个转速,分别代表了低 DO ($0.85 \sim 1.79 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、中 DO ($3.6 \sim 4.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和高 DO ($6.6 \sim 7.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的水平。

1.3.4 不同 DO 条件下脱氮副球菌对无机氮的转化

将脱氮副球菌菌液按 1% 的比例接种于无机氮源混合液中,在最适的培养温度 (30°C) 与 pH 值 (7.0~7.2) 条件下,于 3 个不同的 DO 水平下培养,经不同时间点取样,分析无机氮源混合液中 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 、 NO_3^--N 浓度变化以及 OD_{600} 值,了解菌体的生长及对不同形式无机氮的转化能力。细菌生长量的测定以波长 600 nm 处的光密度 OD_{600} 表示; NH_4^+-N 、 NO_2^--N 、 NO_3^--N 和总氮 (TN) 的测定分别采用纳氏试剂光度法、N-(1-萘基)-乙二胺光度法、紫外分光光度法,具体参见文献[13]。

1.4 脱氮副球菌转化无机氮过程中硝酸盐/亚硝酸盐还原酶活性的变化

在上述无机氮转化试验中的不同时间点取样,经离心洗涤后制成 500 μL 的菌体悬液 (OD_{600} 约 0.4 以上),采用试剂盒说明书提供的方法对细菌进行裂解,分析细菌的总蛋白浓度、亚硝酸盐和异化型硝酸盐还原酶的活力。亚硝酸盐还原酶的测定以亚硝酸盐为底物,在二乙基二硫代氨基甲酸烯丙基和人工电子供体还原型甲基紫精的参与下,由酶催化产生氨或一氧化氮,同时还还原型甲基紫精转化为氧化型甲基紫精,通过测定氧化型甲基紫精来定量分析亚硝酸盐还原酶

的活性。亚硝酸盐还原酶的活力以 U 表示,单位为 $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,表示每毫克蛋白每分钟转化的 NO_2^- 的量。异化型硝酸盐还原酶的测定是以硝酸盐为底物,在还原型甲基紫精为电子供体的参与下,通过酶的催化而还原为亚硝酸盐,通过测定亚硝酸盐的生成量来定量分析异化型硝酸盐还原酶的活性。异化型硝酸盐还原酶活力以 U 表示,单位为 $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,表示每毫克蛋白每分钟生成的 NO_2^- 的量。酶活的测定时间与水体中无机氮素的测定保持同步,以便分析两者的相关性。

1.5 脱氮副球菌对养殖水体中无机氮素的转化和控制

试验于 2012 年 8 月 2 日至 2012 年 9 月 10 日在江苏盐城地区的某淡水鱼类养殖场的养殖池内进行,共 7 个池塘。每个养殖池的面积为 1.33 hm^2 ,水深为 1.5 m,水温 $29.5 \sim 31.2^\circ\text{C}$ 。设对照池 1 个,试验池 3 个。空白组中不加脱氮副球菌菌液,而 3 个试验组中菌液 (活菌量 $\geq 10^9$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$) 用量分别为 0.75、1.50、2.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ [经毒性试验,脱氮副球菌在 $10\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下对养殖生物无毒性,对养殖生态具有安全性 (另文报道)],每个试验组做 2 个平行。每 15 d 使用一次脱氮副球菌菌液,在每次使用后的 1、7 d 取样测定 DO、 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 NO_2^--N 和高锰酸盐指数的浓度。以了解脱氮副球菌对养殖水体中氮素的控制。试验共进行 38 d,试验期间不换水,并且 7 个塘中鱼类养殖密度和管理水平均严格一致。试验结果使用 SPSS 软件进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表明差异显著, $P < 0.01$ 表明差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 脱氮副球菌对水体中无机混合氮源的转化

不同 DO (高 DO、中 DO 和低 DO) 条件下,脱氮副球菌在转化混合氮源的过程中,混合液中 TN、 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 、 NO_3^--N 浓度以及 OD_{600} 值的变化如图 1~图 3 所示。

由图 1 可知,在高 DO ($6.6 \sim 7.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 条件下,脱氮副球菌在无机氮源混合液中长势良好,细菌经过 7 h 的延迟期后进入对数生长期,44 h 左右进入稳定期,此时的 OD_{600} 值为最高值,可达 1.902。

试验初始时的 TN 为 $91.66 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,分别由 $64.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NH_4^+-N 、 $13.42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NO_3^--N 和 $12.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NO_2^--N 组成,无机氮占 98.93% (剩余 0.98 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TN 为菌体所带入的有机氮)。试验中发现, TN 在前 12 h 基本保持恒定,12 h 后开始快速下降,

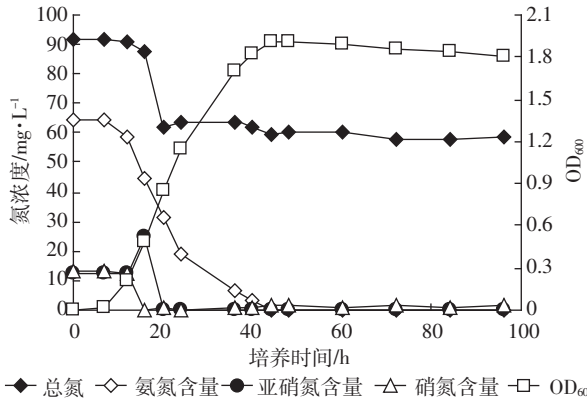


图1 高溶氧($6.6\sim 7.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下,无机氮源混合液中脱氮副球菌的生长及无机氮的含量变化

Figure 1 The growth of *Paracoccus denitrificans* and the changes of inorganic nitrogen contents in mixed inorganic nitrogen source medium under a high dissolved oxygen condition ($6.6\sim 7.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

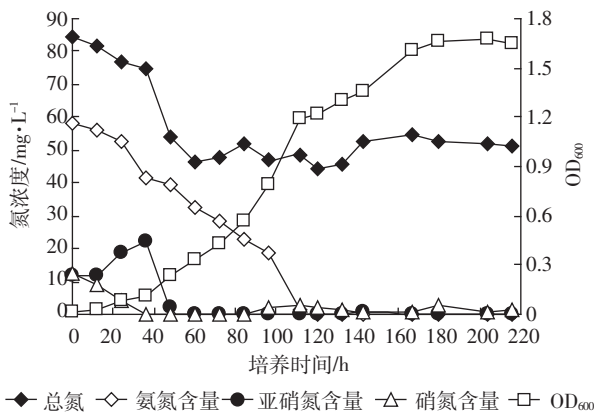


图2 中溶氧($3.6\sim 4.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下,无机氮源混合液中脱氮副球菌的生长及无机氮的含量变化

Figure 2 The growth of *Paracoccus denitrificans* and the changes of inorganic nitrogen contents in mixed inorganic nitrogen source medium under a moderate dissolved oxygen condition ($3.6\sim 4.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

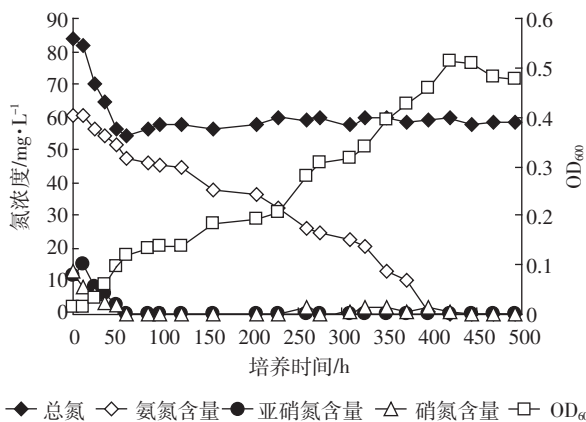


图3 低溶氧($0.85\sim 1.79\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下,无机氮源混合液中脱氮副球菌的生长及无机氮的含量变化

Figure 3 The growth of *Paracoccus denitrificans* and the changes of inorganic nitrogen contents in mixed inorganic nitrogen source medium under a low dissolved oxygen condition ($0.85\sim 1.79\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

20 h 后不再下降,基本保持恒定,试验结束时 TN 浓度为 $58.42\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,与初始时相比降低了 $33.24\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,下降率为 36.27%。因 TN 的测定包含了水中的菌体,故从氮素总量平衡来看,降低的 $33.24\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TN 是从水体中脱除了,唯一的可能是转化成含氮气体从水中逸散,具体的转化途径可从 3 种无机氮的变化分析得出。

初始浓度为 $64.55\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NH_4^+-N 在延迟期结束(7 h)时开始下降,到 12 h 时为 $59.08\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,下降了 $5.47\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,此时 TN 为 $90.88\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,与初始时相比仅下降了 $0.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,而初始浓度分别为 $13.42\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $12.71\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NO_3^--N 和 NO_2^--N 在 12 h 时基本不变,说明此时氮的变化主要是 NH_4^+-N 被菌体吸收转化为菌体的有机氮,氮素未从水体散失。

试验 16 h 时水中 TN 为 $87.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,下降了 $4.41\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; NH_4^+-N 为 $44.84\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,下降了 $19.71\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; NO_3^--N 浓度降为 0, NO_2^--N 浓度积累达到最高值,约 $24.73\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NO_2^--N 的累积几乎是伴随着 NO_3^--N 的降低而同时发生的。在 12 h 时, NO_3^--N 浓度为 $12.19\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NO_2^--N 浓度为 $12.55\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,两者之和为 $24.74\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,而 16 h 时两者之和为 $24.73\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,几乎完全相等。此时菌体细胞内的亚硝酸盐还原酶和异化型硝酸盐还原酶活力的变化与 NO_2^--N 和 NO_3^--N 的含量变化关联密切(详见下文 2.2),说明在无机氮源混合液中 NO_3^--N 转化的第一步可能是被还原为 NO_2^--N ,然后 NO_2^--N 继续通过后续的途径被去除。试验结果显示,此时 NH_4^+-N 的减少量($19.71\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)远大于 TN 的损失量($4.41\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), NH_4^+-N 的减少主要是为了增殖菌体细胞。在试验 20 h 时, TN 为 $62.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NH_4^+-N 为 $31.15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,与初始时相比分别降低了 $29.61\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $33.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,而 NO_3^--N 和 NO_2^--N 均为 0。在这 16 h 至 20 h 的时间段内, 3 种无机氮总量降低了 $58.14\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,而 TN 仅下降了 $29.61\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,表明有 $28.53\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氮素从水中逸散。随后至试验 44 h, NH_4^+-N 不断下降直至为 0,而 TN 却基本保持不变,再一次说明 NH_4^+-N 的下降是转化为菌体细胞的有机氮。整个试验过程中 NH_4^+-N 的转化去除主要在菌体对数生长期。

试验数据表明, TN 浓度最终下降了 $33.24\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,去除率为 36.27%。TN 的下降与 NO_3^--N 和 NO_2^--N 的变化基本同步,而与 NH_4^+-N 的变化不相一致。 NH_4^+-N 在试验后 7 h 即开始下降,直至 44 h 才降为 0,而 TN 的变化集中在 12~20 h 内,在 0~12 h 和 20~44 h 间的

含量变化不显著。12 h 时 TN 浓度为 $90.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 到 20 h 当 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 均被完全除尽时, TN 浓度为 $62.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 下降了 $28.83 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 占最终总 TN 去除量的 86.73%, 这说明 TN 的去除主要发生在 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的转化去除阶段。此阶段 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的去除总量为 $24.74 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结合文献[9]的研究结果, 可认为 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的降低是细菌同化成胞内物质的结果, 而 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 通过反硝化脱除, 几乎贡献了 TN 损失的全部。仅有约 14.19% 的 TN 损失可能由脱氮副球菌对其他物质的转化 (如硝化-反硝化协同作用) 过程贡献。

由图 2 可知, 当 DO 降低至 ($3.6 \sim 4.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 脱氮副球菌的生长速度减慢, 细菌经过 12 h 的延迟期后进入对数生长期, 于 167 h 左右进入稳定期, OD_{600} 值最高值可达 1.677。初始浓度为 $58.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 在延迟期结束时开始下降, 在 112 h 时降为 0, 转化去除率达到了 100%。初始值为 $12.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度在延迟期后期开始下降, 而初始值为 $11.47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度则开始上升, 36 h 时 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度降到 0 (最大去除率为 100%), 与此同时, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度积累达到最高值, 约 $22.39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 之后开始迅速下降, 在 48 h 全部降为 0, 去除率为 100%。与高 DO 时情况类似, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的累积几乎是伴随着 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的降低而同时发生的, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 是 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 去除途径的中间产物。初始浓度为 $84.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TN 在前 36 h 微弱下降, 36 h 后开始快速下降, 60 h 后不再明显下降, 基本保持恒定, 培养结束时 TN 浓度为 $51.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 下降了 $32.73 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 去除率为 38.90%。同样地, 中 DO 条件下 TN 的去除也主要发生在 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的转化去除阶段, 并且当 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 基本除尽时菌体生长量仅有 0.235, 远低于高 DO 时的 0.853, 因此可认为 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的去除主要贡献为 TN 的损失, 而不是促进菌体生长。

由图 3 可知, 当培养液 DO 较低 ($0.85 \sim 1.79 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 脱氮副球菌在混合氮源培养基中的生长变的非常缓慢, 约经过长达 24 h 生长延迟期后进入对数期, 对数期跨度很长, 到 420 h 左右才进入稳定期, OD_{600} 的最高值只达到 0.515。初始值为 $60.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 经过长达 396 h 才降到 0, 转化去除率达到了 100%。初始值为 $12.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度在延迟期即开始下降, 60 h 时降为 0 (最大去除率为 100%, 而初始值为 $11.47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度则从延迟期即开始上升, 12 h 时 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度积累达到最

高值, 约为 $15.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 之后开始下降, 在 60 h 全部降为 0, 去除率为 100%。初始浓度为 $83.87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TN 在延迟期即开始下降, 60 h 后变化不再明显, 基本保持恒定, 培养结束时 TN 浓度为 $54.26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 去除率为 35.30%。

上述结果显示, 脱氮副球菌是一株好氧细菌, 当水体中存在 C 源及 3 种不同形式的无机氮时, 水体 DO 的量决定了菌体的生长速率及对无机氮的转化利用。高 DO 下, 菌体利用 C 源和同化 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的异养生长, 菌体生长速率快, 细胞量高。水体中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的下降早于 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 。由于 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 是通过反硝化被还原, DO 充分条件下, 还原过程中有一定程度的 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 累积, 但最终可完全去除; 中 DO 下菌体生长速率变缓, 细胞量略下降, 水体中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 与 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的下降几乎同步, 表明菌体内利用 C 源、同化 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和利用 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 进行反硝化的二套机制同时启动。反应过程中同样存在 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的累积, 但最终也可完全去除; 而低 DO 下菌体的生长极为缓慢, 细胞量很小, 水体中 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的下降早于 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的变化, 反硝化作用占先导, 反应过程中 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的累积显著低于中高 DO 水平。虽然 3 种 DO 条件下, 脱氮副球菌均可有效转化不同形式的无机氮, 但从转化速率和效能上来看, 水体 DO 至少应保持在 $3.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, 这样的处理才是经济有效的。

2.2 脱氮副球菌转化无机氮过程中硝酸盐/亚硝酸盐还原酶活性的变化

微生物菌体获得能量的基本途径是氧化还原反应, 通过电子供体和受体之间的电子传递释放而来^[14]。微生物在无氧条件下能以 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 为终端电子受体, 在硝酸盐还原酶的存在下进行还原反应而获取能量。硝酸盐还原酶是一种单核含钼的氧化还原酶, 可分为 3 种^[15]: 以硝酸盐为终端电子受体的异化型 (Respiratory dissimilatory)、周质异化型 (Periplasmic diaaamilatory) 和参与硝酸盐同化的同化型 (Assimilatory) 硝酸盐还原酶。异化型硝酸盐还原酶存在于兼性好氧性细菌, 多与膜结构结合, 一般含铁和钼, 以细胞色素为电子供体。同化型硝酸盐还原酶的电子供体为 NADPH, 可被 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 诱导, 但有 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 存在时将会被抑制。而亚硝酸盐还原酶是一类催化 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 为 NH_3 或 NO 的还原反应酶, 参与使 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 氧化有机物质的过程, 包括单电子反应生成 NO 和 6 电子的还原产生 NH_3 。因此本试验条件下与 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 转化有关的主要是细菌的异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶。

为了进一步探明不同 DO 条件下脱氮副球菌对 3 种无机氮源的转化机制,在无机氮转化过程中同步分析了菌体异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活性动态变化,结果如图 4~图 6 所示。

由图 4 可知,在高 DO ($6.6\sim 7.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 条件下,异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶活性均具有先升后降的趋势。由于水体中存在 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N,因此菌体在生长过程中两种酶逐步被诱导,活性逐渐增强。异化型硝酸盐还原酶的活性在 12 h 达到最大值,为 $10.55\text{ nmol NO}_2^-\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,而亚硝酸盐还原酶的活性在 16 h 达到最大值为 $15.93\text{ nmol NO}_2^-\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。伴随 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的降低,两个酶的活性

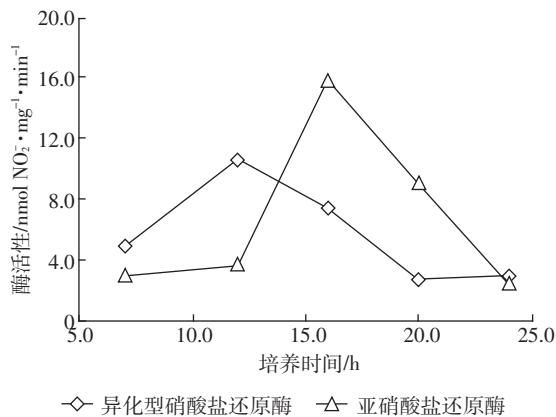


图 4 高溶解氧 ($6.6\sim 7.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 条件下,无机氮混合液中脱氮副球菌的异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶活性变化
Figure 4 The changes of dissimilatory NAR and NIR in the interior of *Paracoccus denitrificans* in mixed inorganic nitrogen medium under a high dissolved oxygen condition ($6.6\sim 7.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

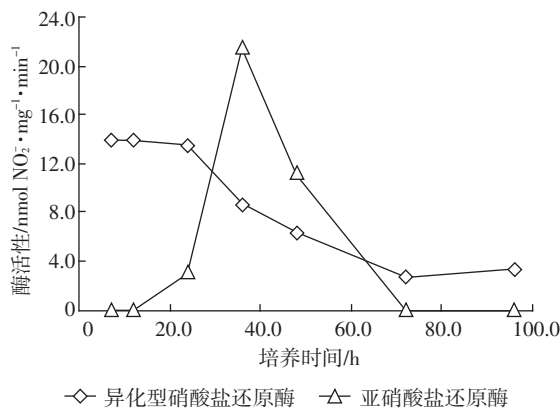


图 5 中溶解氧 ($3.6\sim 4.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 条件下,无机氮混合液中脱氮副球菌的异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶活性变化
Figure 5 The changes of dissimilatory NAR and NIR in the interior of *Paracoccus denitrificans* in mixed inorganic nitrogen medium under a moderate dissolved oxygen condition ($3.6\sim 4.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

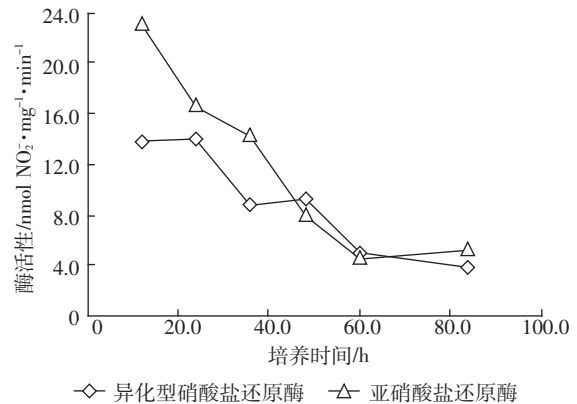


图 6 低溶解氧 ($0.85\sim 1.79\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 条件下,无机氮混合液中脱氮副球菌的异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶活性变化
Figure 6 The changes of dissimilatory NAR and NIR in the interior of *Paracoccus denitrificans* in mixed inorganic nitrogen medium under a low dissolved oxygen condition ($0.85\sim 1.79\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

开始下降。两个酶的活性变化分别与图 1 中 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的变化趋势基本对应,说明高 DO 条件下脱氮副球菌对 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的去除是通过反硝化作用,而且 NO_3^- -N 首先被异化型硝酸盐还原酶还原成 NO_2^- -N,造成水体中短时间内的 NO_2^- -N 累积,然后被亚硝酸盐还原酶继续催化去除。

图 1 和图 4 显示,在高 DO、C 源以及 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 同时存在的情况下, NH_4^+ -N 被脱氮副球菌优先同化吸收合成细胞物质,保持细菌的生长,少部分可能经过硝化-反硝化协同作用转化成气态氮形式排出水体造成 TN 的小部分损失。在 NH_4^+ -N 相对充足的情况下,脱氮副球菌对 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的转化不是同化吸收,而几乎全部是通过好氧反硝化作用去除,造成大部分的 TN 的去除,这可能是因为相比于 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N, NH_4^+ -N 更容易被细菌同化吸收, NH_4^+ -N 的存在会抑制同化型硝酸盐还原作用,以避免不必要的能耗^[16]。在实际养殖水体中, NH_4^+ -N 的浓度往往是 NO_3^- -N 或 NO_2^- -N 的数倍,因此非常有利于脱氮副球菌在养殖水体脱氮中的应用。另外,脱氮副球菌转化的顺序是先 NO_3^- -N 后 NO_2^- -N,这可能是因为 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 同时存在的情况下,细菌会优先利用 NO_3^- -N 进行反硝化作用,相比于 NO_2^- -N,以 NO_3^- -N 为电子受体能够产生更多的能量。

由图 5 可知,中 DO ($3.6\sim 4.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 条件下,异化型硝酸盐还原酶在初始时即被诱导至最大值,此时活性为 $13.86\text{ nmol NO}_2^-\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,维持至 12 h 后开始一直下降。而亚硝酸盐还原酶的活性有一个先升后

降的趋势,伴随水体中 NO_2^- 的累积量而变化,在 36 h 达到最大值为 $21.52 \text{ nmol NO}_2^- \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。两个酶的活性变化分别与图 2 中 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的变化趋势基本对应。与高 DO 条件下相类似,中 DO 条件下脱氮副球菌对 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的去除也是通过反硝化作用,且 NO_3^- -N 首先被异化型硝酸盐还原酶还原成 NO_2^- -N。中 DO 条件下异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活性均高于高 DO 状态,这可能与氧的得电子能力高于 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 有关。DO 水平过高,水中氧充分,所发生的氧化还原反应不需要 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 为电子受体,从而抑制了菌体内异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的诱导,这 2 种酶的活力下降。研究表明 DO 水平是这 2 种酶诱导的影响因素之一,具体的影响机制有待进一步深入研究。

由图 6 可知,在低 DO 试验的初期异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活性都较高,异化型硝酸盐还原酶在 24 h 时活性达到最高为 $14.03 \text{ nmol NO}_2^- \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,亚硝酸盐还原酶的活性在 12 h 达到最大值为 $23.14 \text{ nmol NO}_2^- \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,而之后两个酶均呈逐渐下降的趋势,在 60 h 以后两个酶的活性降到较低值,趋于恒定。整个试验过程中,两个酶的活性变化分别与图 3 中 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的变化趋势基本对应。

综上可知,当水体中存在 C 源及 3 种不同形式的无机氮时,水体中的 NH_4^+ -N 主要是被细菌同化吸收而除去, NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 则是通过反硝化作用而去除。这种反硝化作用的程度取决于细菌体内异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活力,而异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活力受到水体中 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的含量以及 DO 水平的显著影响。

2.3 脱氮副球菌对养殖水体中无机氮素的转化和控制

脱氮副球菌对淡水鱼养殖池塘水体中无机氮素的控制结果见表 1。

由表 1 可知,在试验的 38 d 内,DO 水平维持在 $4.08 \sim 5.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,属中等水平,并且随着试验时间的延长有增长的趋势,试验后期试验组较对照组高,存在显著性差异 ($P < 0.05$)。对照组在试验期间的 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 和高锰酸盐指数含量均有增加,试验 38 d 时与初始相比分别增加了 5.56%、52.38%、38.89% 和 8.19%;而 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氮副球菌试验组,其 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 和高锰酸盐指数含量呈下降趋势,与试验起始时相比,试验 38 d 时分别下降了 39.71%、50.00%、44.44% 和 7.81%; $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氮副球菌试验组 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 和高锰酸盐指数

含量的下降率分别为 47.62%、60.00%、58.33% 和 20.11%,无机氮和高锰酸盐指数的去除率均显著高于 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氮副球菌试验组 ($P < 0.05$);同样, $2.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱氮副球菌试验组 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 含量的下降率分别为 49.33%、64.29%、60.00% 和 21.24%,无机氮和高锰酸盐指数的去除率显著高于 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 试验组,与 $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 试验组差异不显著 ($P > 0.05$)。在 3 个试验组中,脱氮副球菌对 3 种无机氮和高锰酸盐指数均具有良好的去除效果,菌液使用量越高,作用时间越长,去除率越高。但菌量的增加并非是无休止的,试验数据显示, $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 试验组与 $2.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 试验组的作用效果并无显著性差异。考虑到实际水处理的经济有效性,适宜的脱氮副球菌用量以 $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为佳。试验结果同时表明, NO_2^- -N 的下降率均较其他两种无机氮高。这可能与脱氮副球菌具有对 NH_4^+ -N 的异养硝化和好氧反硝化功能有关。由于 NH_4^+ -N 的硝化及 NO_3^- -N 反硝化的同时进行,导致实际水体中 NO_2^- -N 这一中间产物的来源减少。从试验过程和时间上来看,添加活菌制剂 1 d 后转化去除效果不明显,甚至有氮素浓度升高的情况,随着菌体的生长,水质处理效果开始显现,7 d 后脱氮效果开始显著。以后随每次菌液的添加,效果越发明显。但菌液不可以无休止地增加,虽然水体 TN 水平整体上是下降的,但部分氮素可转化为菌体细胞的有机氮,造成有机氮累积。至于菌体有机氮的累积和转化还有待进一步的研究。

从试验中的水质指标来看,试验 1 d 后最先出现下降的是高锰酸盐指数和 NH_4^+ -N,这是细菌异养生长的结果,此时伴随着异养硝化的进行,水体中 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 会有所上升,但 7 d 后由于好氧反硝化的深入, NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 又呈下降趋势。如果适时再加入活菌制剂,可明显促进养殖水体的氮素处理效果。脱氮副球菌的好氧反硝化解决了养殖水体必须有氧和脱氮必须厌氧的这一对矛盾,为养殖水体中氮素污染的防治开辟了一条新途径。

3 结论

(1) 脱氮副球菌是一株好氧细菌,当水体中存在 C 源及 3 种不同形式的无机氮时,水体 DO 的量决定了菌体的生长速率及对无机氮的转化利用效率。DO 充足,菌体生长速率快,细胞量高,反之则生长缓慢。

脱氮副球菌可有效转化不同形式的无机氮,其以同化的方式转化 NH_4^+ -N,而以反硝化方式转化去除

表 1 脱氮副球菌对淡水养殖池塘水体中无机氮素的控制

Table 1 Inorganic nitrogen control in the pond water by *Paracoccus denitrificans*

脱氮副球菌用量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	试验时间/d	水体中的浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$				
		DO	高锰酸盐指数	NH_4^+-N	$\text{NO}_2^- - \text{N}$	$\text{NO}_3^- - \text{N}$
0	0	4.25±0.12	5.25±0.23	0.72±0.08	0.21±0.05	0.18±0.04
	1	4.31±0.15	5.25±0.20	0.75±0.09	0.25±0.05	0.16±0.03
	7	4.21±0.10	5.53±0.19	0.96±0.06	0.32±0.06	0.16±0.04
	16	4.08±0.21	5.84±0.24	0.92±0.08	0.34±0.04	0.18±0.02
	22	4.18±0.16	6.02±0.18	0.78±0.12	0.38±0.06	0.22±0.05
	31	4.35±0.08	5.72±0.12	0.76±0.10	0.28±0.08	0.24±0.03
	37	4.42±0.10	5.68±0.15	0.76±0.10	0.32±0.06	0.25±0.04
0.75	0	4.18±0.15	5.38±0.22	0.68±0.09	0.16±0.04	0.18±0.03
	1	4.22±0.19	5.28±0.18	0.58±0.11	0.18±0.03	0.18±0.03
	7	4.28±0.16	5.25±0.23	0.55±0.12a	0.12±0.05a	0.16±0.02
	16	4.31±0.12	5.35±0.12	0.50±0.08a	0.16±0.02a	0.14±0.02
	22	4.32±0.15	5.23±0.17	0.48±0.12a	0.10±0.01b	0.12±0.01a
	31	4.42±0.13	5.15±0.15a	0.46±0.15a	0.11±0.01b	0.10±0.01a
	37	4.52±0.09	4.96±0.25a	0.41±0.08a	0.08±0.01b	0.10±0.01a
1.50	0	4.22±0.10	5.32±0.15	0.84±0.07	0.15±0.02	0.12±0.02
	1	4.25±0.12	5.25±0.14	0.82±0.06	0.18±0.04	0.15±0.03
	7	4.48±0.09	5.02±0.19a	0.65±0.08a	0.12±0.06a	0.18±0.03
	16	4.45±0.08	5.08±0.24a	0.71±0.11a	0.10±0.01b	0.16±0.02
	22	4.58±0.10a	4.78±0.22b	0.51±0.15a	0.06±0.01b	0.10±0.01a
	31	4.86±0.09a	4.48±0.18b	0.44±0.09a	0.06±0.01b	0.08±0.01b
	37	5.02±0.10a	4.25±0.10b	0.44±0.15a	0.06±0.01b	0.05±0.01b
2.25	0	4.38±0.12	5.18±0.15	0.75±0.08	0.28±0.06	0.25±0.04
	1	4.35±0.18	5.25±0.18	0.78±0.06	0.32±0.02	0.26±0.05
	7	4.52±0.15	4.86±0.25a	0.66±0.08a	0.20±0.05a	0.22±0.03
	16	4.51±0.12	5.02±0.21a	0.62±0.11a	0.18±0.03a	0.18±0.02a
	22	4.66±0.09a	4.82±0.18a	0.51±0.16a	0.10±0.01b	0.16±0.02a
	31	4.96±0.08a	4.51±0.18b	0.41±0.09a	0.10±0.01b	0.12±0.01b
	37	5.10±0.10a	4.08±0.22b	0.38±0.14b	0.10±0.01b	0.10±0.01b

注:表中各组数据以平均值表示,其中 a: $P<0.05$;b: $P<0.01$ 。

$\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 。从转化速率和效能上来看,水体 DO 至少应保持在 $3.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上。

(2)几种不同 DO 条件下,脱氮副球菌对 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的转化去除均是通过反硝化途径进行的。反硝化作用的程度取决于细菌体内异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活力,而异化型硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶的活力受到水体中 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的含量以及 DO 水平的显著影响。

(3)将活菌数 $\geq 10^9$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的脱氮副球菌按 0.75、1.50、2.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的用量加入淡水池塘养殖水体,在 38 d 内可使养殖水体中的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 下降 39.71%~49.33%, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 下降 50.00%~64.39%, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 下降 44.44%~60.00%,高锰酸盐指数下降 7.81%~21.49%,

对养殖水体中的无机氮素及有机物污染具有较好的控制效果。

参考文献:

- [1] 董玉波,戴媛媛.亚硝酸盐氮对水产经济动物毒性影响的研究概况[J].水产养殖,2011,32(4):28-32.
DONG Yu-bo, DAI Yuan-yuan. Research survey of toxic effects of nitrite to aquatic animals[J]. *Journal of Aquaculture*, 2011, 32(4):28-32.
- [2] Sampaio L A, Wasielesky W, Campos Miranda-Filho K. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile mugil platanus[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002 (68): 668-674.
- [3] Das P C, Ayyappan S, Das B K, et al. Nitrite toxicity in Indian major carps: Sublethal effect on selected enzymes in fingerlings of Catla catla, Labeo rohita and Cirrhinus mrigala[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol*

- Pharmacol*, 2004, 138(1):3-10.
- [4] Robertson L A, Kuenen J G. Aerobic denitrification: A controversy revived[J]. *Arch Microbiol*, 1984, 139:351-354.
- [5] 李平, 郑永良, 陈舒丽, 等. 一株好氧反硝化细菌的鉴定及其在废水处理中的应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(5):600-603.
LI Ping, ZHENG Yong-liang, CHEN Shu-li, et al. Identification of an aerobic denitrifying bacterium and its potential application in wastewater treatment[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, 11(5):600-603.
- [6] 张小玲, 张卫东, 张玲, 等. 好氧反硝化菌的选育及其初步应用[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(10):1556-1561.
ZHANG Xiao-ling, ZHANG Wei-dong, ZHANG Ling, et al. Selection of an aerobic denitrifying bacterium and its preliminary application in aquarium water[J]. *Microbiology*, 2008, 35(10):1556-1561.
- [7] Kesser O P, Kiss I, Bihari Z, et al. Biological denitrification in a continuous flow pilot bioreactor containing immobilized *Pseudomonas butanovora* cells[J]. *Bioresource Technology*, 2003, 87:75-80.
- [8] Gupta S K, Mona K. Quantitative estimate of *Thiosphaera pantotroph* from aerobic mixed culture[J]. *Water Research*, 2000, 34(15):3765-3768.
- [9] 刘道玉, 范立民, 王琼, 等. 脱氮副球菌的好氧反硝化特性及对养殖水体中氮素的控制[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(11):2249-2255.
LIU Dao-yu, FAN Li-min, WANG Qiong, et al. The aerobic denitrification characteristics of *Paracoccus denitrificans* and its nitrogen control for aquaculture water[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(11):2249-2255.
- [10] 刘燕, 甘莉, 黄哲强, 等. 脱氮副球菌 YF1 的反硝化特性研究[J]. *水处理技术*, 2010, 10(36):61-65.
LIU Yan, GAN Li, HUANG Zhe-qiang, et al. Study on denitrification characteristics of *Paracoccus* YF1[J]. *Technology of Water Treatment*, 2010, 10(36):61-65.
- [11] Daum M, Zimmer W, Papen H, et al. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*[J]. *Curr Microbiol*, 1998, 37(4):281-288.
- [12] 赵诣. 三株异养硝化细菌的分离、特征及其对水产养殖废水脱氮作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010:31-39.
ZHAO Yi. Isolation and characteristic of three heterotrophic nitrifiers and its application in aquaculture wastewater treatment[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010: 31-39.
- [13] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002:230-290.
EPA. Methods for the monitoring and analysis of water and wastewater [M]. 4th Edition Beijing: Chinese Environmental Science Press, 2002: 230-290.
- [14] Wilson L P, Bouwer E J. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: A review[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, 18:116-130.
- [15] Bell L C, Ferguson S J. Nitric and nitrous oxide reductases are active under aerobic conditions in cells of *Thiosphaera pantotropha*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1991, 273:423-427.
- [16] 史春龙. 富营养化湖泊底泥中反硝化微生物及其反硝化作用的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2003:51-70.
SHI Chun-long. Denitrifiers and their denitrification in eutrophic lake sediment[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003:51-70.