

研究报告



氨氮对 3 种吸附态亚硝化单胞菌的抑制动力学

蔡雨衡¹ 向斯^{1,2} 程凯^{*1}

1 湖北工业大学资源与环境工程学院 河湖生态修复与藻类利用湖北省重点实验室 湖北 武汉 430068

2 武汉微盛科创环境科技有限公司 湖北 武汉 430068

摘要:【背景】氨氮浓度会明显影响亚硝化单胞菌的活性,但氨氮浓度对吸附态亚硝化单胞菌菌种的抑制动力学尚缺乏研究。【目的】研究氨氮浓度对 3 种吸附态亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas eutropha* CZ-4、*Nitrosomonas halophila* C-19 和 *Nitrosomonas europaea* SH-3)的影响。【方法】以碳酸钙作为吸附基质,设定氨氮浓度为 25–1 000 mg/L,测定 3 种亚硝化单胞菌(*N. eutropha* CZ-4、*N. halophila* C-19 和 *N. europaea* SH-3)的亚硝氮积累速率与最大比生长速率,并通过 Edwars2 模型建立氨氧化的抑制动力学方程。【结果】*N. halophila* C-19 在初始氨氮浓度为 50–100 mg/L 时的亚硝氮积累最快,*N. europaea* SH-3 的亚硝氮积累则在初始氨氮浓度为 50–200 mg/L 时最快,而 *N. eutropha* CZ-4 则适于在初始氨氮浓度为 50–400 mg/L 时积累亚硝氮;*N. eutropha* CZ-4 的最大比生长速率出现在初始氨氮浓度为 50–400 mg/L 时,明显高于 *N. halophila* C-19 (25–100 mg/L),而 *N. europaea* SH-3 的生长速度在初始氨氮浓度为 50–800 mg/L 区间内无显著差异;*N. europaea* SH-3 的 K_1 (922.76 mg/L)显著高于 *N. eutropha* CZ-4 (597.88 mg/L),而 CZ-4 的 K_1 又显著高于 *N. halophila* C-19 (186.24 mg/L),*N. europaea* SH-3 的 K_m (72.06 mg/L)显著高于 *N. halophila* C-19 (23.23 mg/L)。【结论】3 种吸附态亚硝化单胞菌的生长和氨氧化对氨氮浓度变化的响应存在明显差异,对于认识不同亚硝化单胞菌在不同氨氮浓度污水中的功能并开发相应的工程技术具有重要意义。

关键词: 亚硝化单胞菌, 游离氨, 氨氧化活性

The $\text{NH}_3\text{-N}$ inhibition kinetics of 3 *Nitrosomonas* at adhesive statusCAI Yuheng¹ XIANG Si^{1,2} CHENG Kai^{*1}

1 Hubei Provincial Key Laboratory of Ecological Restoration for River-Lakes and Algal Utilization, College of Resources and Environmental Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China

2 Wuhan Micro-Glory Environmental Technology Innovation Company Limited, Wuhan, Hubei 430068, China

Abstract: [Background] The activity of *Nitrosomonas* was significantly influenced by $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration, but the inhibition kinetics of $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration of the adhesive *Nitrosomonas* were still unknown. [Objective] The influence of $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration on 3 strains of adhesive *Nitrosomonas* (*Nitrosomonas eutropha* CZ-4, *Nitrosomonas halophila* C-19 and *Nitrosomonas europaea* SH-3).

Foundation items: Major National Science and Technology Projects of China (2017ZX07602002); Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Hubei Province (201810500085)

***Corresponding author:** Tel: 86-27-59750635; E-mail: chengkaicn@163.com

Received: 21-01-2021; **Accepted:** 14-04-2021; **Published online:** 06-05-2021

基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX07602002); 湖北省大学生创新创业训练计划(201810500085)

***通信作者:** Tel: 027-59750635; E-mail: chengkaicn@163.com

收稿日期: 2021-01-21; **接受日期:** 2021-04-14; **网络首发日期:** 2021-05-06

[Methods] Three strains of Nitrosomonas (*N. eutropha* CZ-4, *N. halophila* C-19 and *N. europaea* SH-3) were cultured under different initial $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations (ranged from 25–1 000 $\text{NH}_3\text{-N}$ mg/L) with calcium carbonate as the adsorption matrix. The accumulation rate of $\text{NO}_2^- \text{-N}$ and the specific growth rate were measured, the inhibition kinetic equations of ammonia oxidation were also established by Edwars2 model. **[Results]** The accumulation of $\text{NO}_2^- \text{-N}$ of *N. halophila* C-19 was fastest when the initial $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration was 50–100 mg/L, while the $\text{NO}_2^- \text{-N}$ accumulation rate was maximum when the initial $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration was 50–200 mg/L for *N. europaea* SH-3 and 50–400 mg/L for *N. eutropha* CZ-4, respectively. The maximum specific growth rate of *N. eutropha* CZ-4 occurred at the initial $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration of 50–400 mg/L, which was much higher than *N. halophila* C-19 (25–100 mg/L). There was no significant difference in growth rates for *N. europaea* SH-3 when the initial $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration ranged from 50 mg/L to 800 mg/L. The K_1 of *N. europaea* SH-3 (922.76 mg/L) was significantly higher than *N. eutropha* CZ-4 (597.88 mg/L), and also the K_1 of *N. eutropha* CZ-4 was significantly higher than *N. halophila* C-19 (186.24 mg/L). Moreover, the K_m (72.06 mg/L) of *N. europaea* SH-3 was significantly higher than *N. halophila* C-19 (23.23 mg/L). **[Conclusion]** The three strains of adhesive Nitrosomonas showed great differences both in ammonia oxidation activity and growth. The results may not only help to understand the functions of different Nitrosomonas in wastewaters with different $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations, but also contribute to develop corresponding engineering technologies.

Keywords: Nitrosomonas, free ammonia, ammonia oxidation activity

在众多污水脱氮方法中,生物法脱氮是一种经济、有效和前景广阔的方法,已被大量使用。硝化是生物脱氮过程中的必需步骤,特别是亚硝氮的大量积累是短程硝化反硝化、厌氧氨氧化等新型工艺实施的前提条件,对于降低能耗、减少碳源消耗、提高反应速率和降低剩余污泥产量等均具有重要意义,因此成为研究热点^[1]。

在绝大多数污水处理系统中,亚硝氮积累主要是通过氨氧化细菌(Ammonia Oxidizing Bacteria, AOB)实现的^[2]。AOB 是自养微生物,生长缓慢^[2],受诸多环境因子的限制,如温度、pH、溶解氧、游离氨(Free Ammonia, FA)等均可影响 AOB 的氨氧化活性^[3],并使之成为硝化过程,乃至整个脱氮过程的限速步骤^[2]。其中,FA 的影响是较为特殊的,FA 既是 AOB 氨氧化的直接底物^[4-5],也会对 AOB 产生毒害效应^[6]。也就是说,适当浓度的 FA 能够促进 AOB 的活性,而高浓度的 FA 则会抑制 AOB 的活性。于德爽等^[7]发现当 FA 浓度为 0.92–1.25 mg/L 时即可实现稳定的短程硝化反硝化;Vadivelu 等^[4]和季丽丽等^[8]发现 3.4–16.0 mg/L 之间的 FA 对 AOB 的代谢均无抑制作用;吴莉娜等^[9]甚至发现高达

40–70 mg/L 的 FA 也能够实现稳定的短程硝化,而 Hellings 等^[10]则发现 70 mg/L 的 FA 浓度会明显抑制 AOB 的活性。显然,不同污水处理系统对 FA 的耐受能力不同,但由于这些研究多以活性污泥^[2,7-11]或含有多种 AOB 的富集产物^[4]为研究对象,少数针对单种 AOB 的研究也仅局限于 *Nitrosomonas europaea* 等极个别种类,而缺乏针对不同 AOB 菌种的 FA 抑制动力学的比较,因此很难用各 AOB 菌种的生理特点来解释适宜 FA 浓度的巨大差异性。此外,这些研究多以氨氧化活性为研究对象,缺乏对 AOB 生长性能的研究。然而 AOB 的生长不仅是其在污水处理系统中发挥脱氮功能的前提(在既定的工艺条件下, AOB 需要达到一定的数量才能实现有效脱氮),而且当环境条件发生变化时, AOB 的生长与氨氧化活性的变化也可能不同步^[3,12]。

N. europaea、*N. eutropha* 和 *N. halophila* 的系统进化关系非常亲密(三者同属于亚硝化单胞菌属中的 *N. europaea*/Nitrosococcus mobilis 谱系)^[13],但是三者的生态分布仍存在差异:*N. europaea* 和 *N. eutropha* 常见于污水处理系统等高氨水中,而 *N. halophila* 则既常见于污水处理系统,也能够分布于

高盐和高 pH 值等低浓度氨氮废水中^[3]。上述生态分布的差异性,预示着这 3 种亚硝化单胞菌对高氨的敏感性很可能不同。

此外,亚硝化单胞菌能够以游离态或吸附态存在。在实际污水处理系统中,由于活性污泥/生物膜的存在,菌种主要以吸附态存在。但是目前实验室内针对纯种亚硝化单胞菌的研究绝大多数都是以游离态为研究对象,而吸附态与游离态的亚硝化单胞菌在氨氧化活性、生长速度、环境耐受性等方面^[12,14-15]均存在明显差异,因此,深入研究吸附态亚硝化单胞菌的生理特征将更贴近实际应用。

综上所述,FA 对吸附态亚硝化单胞菌菌种的抑制动力学尚缺乏研究,特别是对不同菌种的氨氧化活性和生长速度的非同步影响尚未可知。本文以从我国本土分离得到的 *N. eutropha* CZ-4 (分离于湖南省)、*N. halophila* C-19 (分离于陕西省)和 *N. europaea* SH-3 (分离于湖北省)为材料,研究了 FA 对 3 种吸附态亚硝化单胞菌氨氧化活性的抑制规律,以期对开发基于本土菌种的氨氧化增效菌剂具有指导价值。

1 材料与方法

1.1 培养基及主要试剂和仪器

参考文献[16-18]的方法配制培养基,以 NH_4Cl 为氨氮来源,再加入 5.0 g/L 的碳酸钙作为吸附基质^[12],并添加 HEPES (BioFroxx 公司)缓冲溶液使终浓度为 25 mmol/L (能够有效缓冲约 40 mg/L 的亚硝氮积累量),并使用 1 mol/L 的氢氧化钠调节培养基 pH 至 7.8^[19]。培养基经 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后备用。 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的检测采用 721E 型分光光度计(上海光谱公司)。

1.2 接种液的制备

N. eutropha CZ-4^[20]、*N. halophila* C-19 和 *N. europaea* SH-3^[21]均为本实验室前期分离得到,其中 *N. eutropha* CZ-4 为纯菌株,*N. halophila* C-19 和 *N. europaea* SH-3 均为只含有单一 AOB 的富集培养物。接种液的制备方法为:将 15 mL 菌液分别加入

300 mL 氨氮浓度为 150 mg/L 的基础培养基中,在 32 °C (CZ-4 和 SH-3)或 35 °C (C-19)和 160 r/min 振荡的环境中进行菌种培养,每隔 12 h 取样 1 mL 液体测定其亚硝氮浓度,当亚硝氮积累速度达到约 5–10 mg/(L·h) 时的菌液作为接种菌液。

1.3 氨氧化活性测定与生长的计算

将氨氮含量为 1 000 mg/L 的基础培养基和不含氨氮的基础培养基进行混合,使氨氮浓度梯度分别设计为 25 (25)、50 (48)、100 (93)、200 (190)、400 (391)、600 (589)、800 (806)和 1 000 (953) mg/L (括号中为实测值),调节 pH 至 7.8,并加入 25 mmol/L 的 HEPES 缓冲液。向 100 mL 培养基中接种 3 mL 接种液,分别置于 3 种菌的最适生长温度(其中,CZ-4 和 SH-3 为 32 °C、C-19 为 35 °C)和 160 r/min 条件下振荡培养,每 12 h 取样 1 mL 测定亚硝氮浓度和氨氮浓度。

由于本研究对象为吸附态亚硝化单胞菌(实测吸附态亚硝化单胞菌对氨氧化的贡献率超过 95%,即游离态亚硝化单胞菌对氨氧化的贡献率低于 5%),因此不宜采用细胞计数法对吸附态亚硝化单胞菌进行计数,也难以用细胞密度、 OD_{600} 等常规指标来测定生长曲线。由于亚硝化单胞菌的数量与其积累 $\text{NO}_2\text{-N}$ 的速度成正比关系^[19,22],并且采用富集培养物也能检测 AOB 的生长与代谢性能^[23-24],因此本研究在 HEPES 的缓冲能力范围内(即亚硝氮浓度不超过 40 mg/L 时),根据亚硝氮积累速度计算比生长速率 μ (h^{-1})= $(\ln V_n - \ln V_{n-1})/\Delta t$ ^[19]。其中 V_n 为亚硝氮积累速度[mg/(L·h)],其计算方法为 $V_n = (D_t - D_{t-1})/\Delta t$,其中, D_t 为第 t 次测量的亚硝氮积累量, Δt 为 2 次测量时间间隔的时间。最后,再根据各组的最大比生长速率 μ_{\max} 计算最短代时 T (h), $T = \ln 2/\mu_{\max}$ ^[18]。

1.4 抑制动力学分析

采用亚硝氮浓度不超过 40 mg/L 时(pH 稳定)的亚硝氮积累速度及其对应的氨氮浓度,比较了 Haldane、Aiba、Luong、Edwards1 和 Edwards2 等

5 个数学模型^[25], 并最终选择了 Edwares2 模型通过 Excel 进行规划求解($P < 0.05$, r^2 值最大)。为便于直观分析, 将实测的亚硝氮积累速度转化为相对亚硝氮积累速率, 转换方法为: 将 3 种菌在培养 48 h 时的最大亚硝氮积累速度[C-19 为 $2.92 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$, SH-3 为 $0.80 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$, CZ-4 为 $0.73 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$]定义为 100%。

1.5 测量与统计

上述试验均设 3 个平行。 $\text{NH}_3\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 分别采用纳氏试剂分光光度法^[26]与 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法进行测定^[26]; 作图软件使用 Origin 2018, 数据处理中误差量均用标准误(Standard Error, SE)表示; 数据分析软件使用 SPSS 24。对实验数据进行方差分析和最小显著性差异(Least Significant Difference, LSD)多重比较, 对于部分不服从正态分布或方差非齐性的数据, 则对其进行取对数或平方的转化后进行数据分析。

2 结果与分析

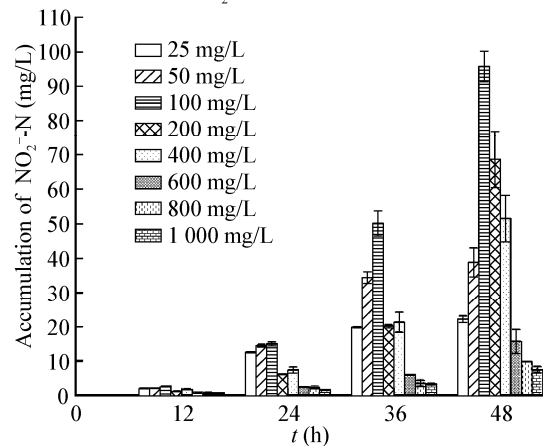
2.1 亚硝氮积累量的变化

由图 1 可见, 3 种菌的亚硝氮积累量存在明显差异: 当初始氨氮浓度为 50–100 mg/L 时, C-19 的亚硝氮积累最多; 当初始氨氮浓度为 50–400 mg/L 时, CZ-4 的亚硝氮积累最多; 而 SH-3 的亚硝氮积累量则在初始氨氮浓度为 50–200 mg/L 时最大。此外, 3 种菌的延迟期总体上均随初始氨氮浓度的提高而延长, 以 C-19 的延长效应最为明显(延迟期从 0 h 逐步增加到 36 h)。上述结果说明初始氨氮浓度对 3 种菌氨氧化活性的影响不同。

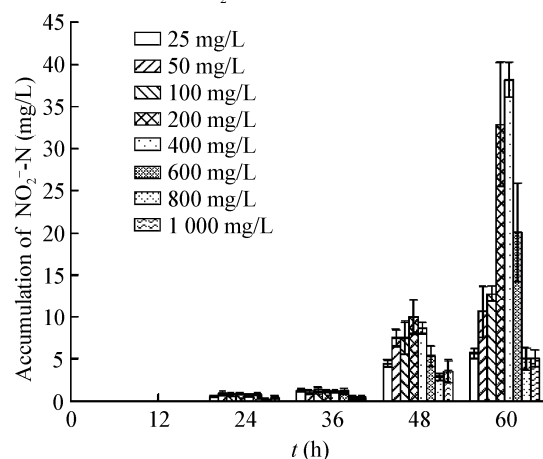
2.2 生长性能

由图 2 可见, CZ-4 的最大比生长速率显著高于 C-19 和 SH-3 ($P < 0.05$), 而且 3 种菌的最大比生长速率均受初始氨氮浓度的显著影响($P < 0.05$): C-19 的最大比生长速率在初始氨氮浓度为 25–100 mg/L 时最高; SH-3 的最大比生长速率则在初始氨氮浓度 50–800 mg/L 时无明显差异; 而 CZ-4 在初始氨氮浓度为 50–400 mg/L 时始终维持高速生长。上述结果

A Accumulation of $\text{NO}_2^-\text{-N}$ in C-19 under different initial $\text{NH}_3\text{-N}$



B Accumulation of $\text{NO}_2^-\text{-N}$ in CZ-4 under different initial $\text{NH}_3\text{-N}$



C Accumulation of $\text{NO}_2^-\text{-N}$ in SH-3 under different initial $\text{NH}_3\text{-N}$

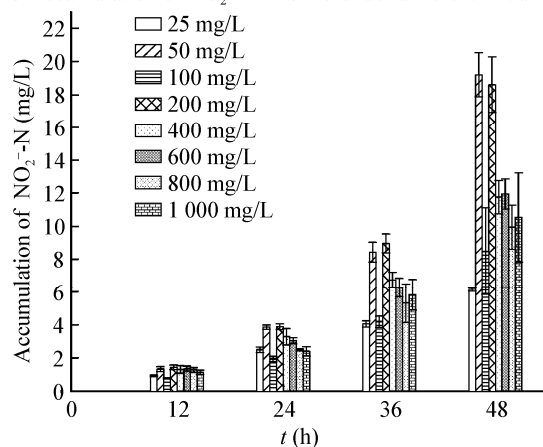


图 1 菌株 C-19 (A)、CZ-4 (B) 和 SH-3 (C) 在不同初始氨氮浓度条件下的亚硝氮积累情况

Figure 1 The accumulation of $\text{NO}_2^-\text{-N}$ when strain C-19 (A), CZ-4 (B) and SH-3 (C) were cultured at different initial $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations

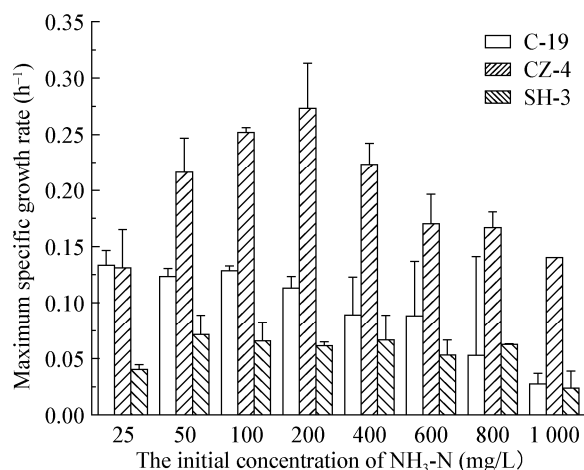


图2 最大比生长速率

Figure 2 Maximum specific growth rate

不但说明初始氨氮浓度对3种菌生长的影响不同,而且也说明初始氨氮浓度对氨氧化活性和生长速度的影响不同步,如SH-3生长的最适初始氨氮浓度为50–800 mg/L,但其氨氧化活性的最适氨氮浓度则仅为50–200 mg/L。

2.3 氨氧化的抑制动力学

由图3可见,Edwards2模型能够较好地拟合CZ-4、C-19和SH-3的亚硝氮积累速率(r^2 分别为1.00、1.00和0.89, $P < 0.05$)。其中,最适于SH-3积累亚硝氮的初始氨氮浓度超过了200 mg/L,明显高于另两种菌,C-19和CZ-4的最适初始氨氮浓度分

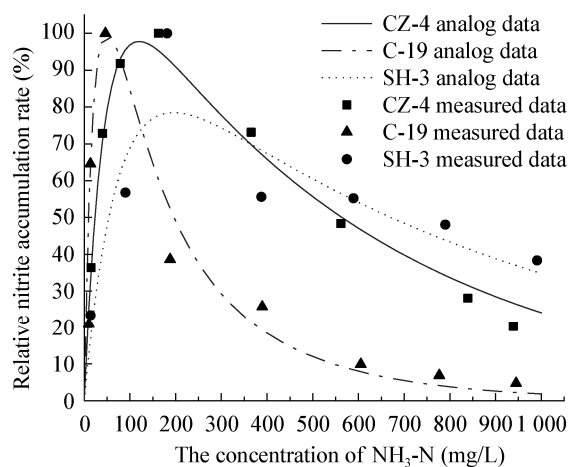


图3 抑制动力学模型

Figure 3 Models of inhibition kinetics

别约为50 mg/L和120 mg/L;当超过了最适亚硝氮积累的初始氨氮浓度后,C-19的亚硝氮积累速率会快速下降,而另两种菌的下降则较为平缓。

K_i 是抑制常数,代表最大氨氧化能力被抑制一半时的氨氮浓度,此数值越高则代表对高氨的耐受力越强。根据图4可知,3种菌的 K_i 均存在显著差异($P < 0.05$):SH-3最高,CZ-4次之,C-19最低。 K_m 是亲和力常数,代表达到最大氨氧化能力一半时的氨氮浓度,此数值越低则代表菌种对低氨的亲和力越高。由图4可知,C-19的 K_m 显著低于SH-3($P < 0.05$),但C-19和CZ-4的 K_m 无显著差异($P > 0.05$)。上述结果说明氨氮浓度对3种菌氨氧化抑制动力学的影响有明显差异:CZ-4的低氨亲和力和高氨耐受力均较强;SH-3的低氨亲和力较弱,但高氨耐受力最强;C-19的低氨亲和力很强,但高氨耐受力非常弱。

3 讨论

本研究中,*N. halophila* C-19、*N. eutropha* CZ-4和*N. europaea* SH-3在含碳酸钙培养基中的最大比生长速率分别为0.13、0.27和0.07 h⁻¹,相应的代时分别为5.33、2.57和9.9 h。通常在不使用碳酸钙的分批培养中,亚硝化单胞菌的最大比生长速率均不超过0.1 h⁻¹(即最短代时为6.93 h)^[27],如*N. eutropha*^[28]和*N. europaea*^[29]在无碳酸钙培养基中

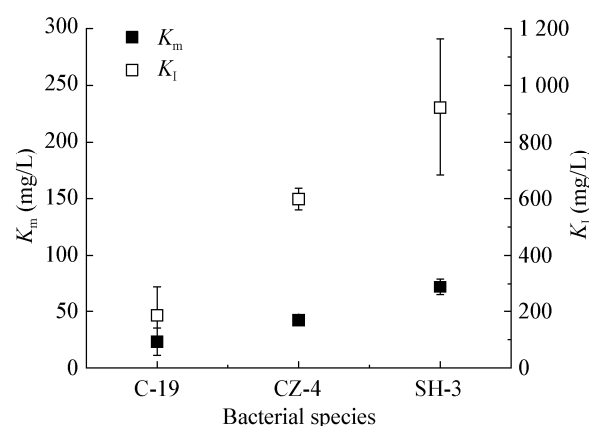


图4 动力学参数

Figure 4 Kinetics parameters

的最大比生长速率分别为 0.075 h^{-1} 和 0.054 h^{-1} , 本研究中关于 SH-3 的结果与此类似。这说明碳酸钙不能促进 *N. europaea* 的生长^[11]; 但本研究中 C-19 和 CZ-4 的生长速度均突破了此限制。在以往的研究中, 尽管缺乏碳酸钙促进亚硝化单胞菌生长的直接证据, 但碳酸钙确实能促进亚硝化单胞菌的吸附^[11], 而某些吸附态亚硝化单胞菌的比生长速率甚至可以达到游离态的 2.4 倍^[30]。

K_m 和 K_i 常用于衡量 AOB 对其生存环境中底物浓度的适应性, 其中 K_m 为亲和力常数, 其数值越低则 AOB 对底物的亲和力越高(即适应较低的底物浓度), 而 K_i 为抑制常数, 其数值越高则 AOB 对底物(毒性)的耐受力越高(即适应较高的底物浓度)^[12]。考虑到不同地表水/污水中的 FA 浓度差异很大, 而且 FA 既是 AOB 的直接底物^[3-4], 也会在高浓度时产生毒性^[5], 因此推测不同 AOB 对 FA 的 K_m/K_i 差异是驱动不同类型地表水/污水中 AOB 群落结构差异的重要原因^[31]。此外, 由于 FA 在总氨中的比例会随温度和 pH 而剧烈变化, 因此以 FA 来计量 K_m 和 K_i 将更具可比性。根据公式^[32] $FA = \frac{17}{14} \times \frac{NH_3-N(mg/L) \times 10^{pH}}{e^{\left(\frac{6334}{273} + C\right)} + 10^{pH}}$ 对图 5 进行换算后, 得到以 FA 计的 K_m 和 K_i (表 1)。由表 1 可见, 3 种菌的 K_m 分布区间换算为 0.91–5.31 mg/L FA, 均低于 FA 对 AOB 产生抑制效应的下限浓度(10–150 mg/L)^[19]。然而 3 种菌 K_i 的分布区间换算为 6.70–77.99 mg/L

FA, 以 SH-3 的 K_i 最高, 而 C-19 的 K_i 则最低, 说明 SH-3、CZ-4 和 C-19 的氨氧化活性对高氨的耐受能力依次减弱。这与 3 种菌的生态分布特征是吻合的: *N. europaea* 常见于污水处理系统中^[33], 因此对高氨的适应性较好; *N. eutropha* 由于具有其他亚硝化单胞菌所不具有的环境耐受性基因^[34], 因此常见于重污染水^[35-36], 而这些重污染水往往伴随有较高浓度的氨氮; *N. halophila* 不但能够分布于污水中, 也在高盐和高 pH 值的地表水中广泛存在(这类地表水的氨氮浓度并不高)^[36-37]。

此外, 在本研究中 *N. halophila* C-19、*N. eutropha* CZ-4 和 *N. europaea* SH-3 的最大氨氧化速率(以 NO_2^- -N 积累速率计, 见表 1)依次降低, 其分布区间为 15.36–79.68 mg/(L·d)。此结果与张挺等^[38]研究的氨氧化细菌 CM-NR014 相似[70 mg/(L·d)], 高于楚江等^[39]研究的 *Nitrosomonas* sp. THD-1 [8.64 mg/(L·d)], 但明显低于姚仁达等^[40]研究的氨氧化菌富集产物[296.4 mg/(L·d)]。造成这些差异的原因, 既有可能是菌种自身的特性不同, 也有可能是源于试验方法的差异(如不同的初始接种量、培养条件、培养时长和测量周期的耦合作用)所致。

N. europaea 是亚硝化单胞菌研究的模式生物, 其 K_m 变化范围为 0.29–0.95 mg/L FA^[41-45]。相比之下, 本研究中 SH-3 的 K_m (4.35–5.31 mg/L FA)则明显偏高, 而造成这一现象的原因很可能是源于本文研究的是吸附态 *N. europaea*。有研究表明, 尽管碳酸钙并不影响 *N. europaea* 的生长^[12], 但包括

表 1 FA 浓度对 3 株亚硝化单胞菌生长与氨氧化活性的影响

Table 1 The influences of FA concentration on the growth and ammonia oxidation activity of three strains of *Nitrosomonas*

Strains	Growth performance (measured results)		Ammonia oxidation activity (calculated by models)			Maximum NO_2^- -N accumulation rate (mg/(L·d))
	Optimal initial FA concentration for growth (mg/L FA)	Maximum specific growth rate (h^{-1})	Optimal FA concentration for ammonia oxidation activity (mg/L FA)	K_m (mg/L FA)	K_i (mg/L FA)	
C-19	2.02–8.01	0.13	4.05	0.91–2.85	6.70–23.51	70.08 ^a
SH-3	3.35–53.63	0.07	13.41	4.35–5.31	45.73–77.99	19.20 ^a
CZ-4	3.35–26.81	0.27	8.04	2.54–3.12	37.55–42.61	36.45 ^b

注: ^a: 以培养至 48 h 的结果计; ^b: 以培养至 60 h 的结果计

Note: ^a: Based on the result at 48 h; ^b: Based on the result at 60 h

N. europaea^[37]在内的吸附态亚硝化单胞菌比游离态具有更强的氨氧化能力^[12],而 K_m 的计算正是基于氨氧化能力(即亚硝氮积累速率)^[21]。有别于较多针对 K_m 的研究,对 K_I 的研究则少得多。本文中,SH-3的 K_I (45.73–77.99 mg/L FA)与Burrell等^[41]所测定的 K_I (超过71.22 mg/L FA)相当,明显高于文献[46–49]测得的*N. europaea*最适FA浓度的上限范围(12.27–42.32 mg/L FA)。造成此差异的原因既可能是因为不同菌株的特性不同,也可能是由于吸附态*N. europaea*具有更高的氨氮耐受性,也可能是由于本实验使用的是只含有单一AOB富集培养物造成。

通常,*N. eutropha*的最适FA浓度变化范围为4.2–196.6 mg/L FA^[19,50–51]。相比之下,本研究中CZ-4的 K_m (2.54–3.12 mg/L FA)则明显偏低,说明CZ-4比其他*N. eutropha*具有更强的氨亲和力,而且CZ-4的比生长速率也非常高,这与熊英等观察到CZ-4兼具r策略和k策略优点的结果,即在低氨环境中具有较快的生长速度吻合^[20]。在实验中CZ-4展现出了较长的延滞期,说明其在转接后对新培养条件的适应期较长,但获得适应后该菌即可快速生长,即较高的比生长速率,见图2。也就是说,CZ-4在较长的延滞期后表现出了较广的氨氮适宜范围。

国内外针对*N. halophila*的研究均非常有限,Jeanningros等^[52]、Oishi等^[53]和Fujita等^[54]发现该菌的最适FA浓度范围多小于2.5 mg/L FA,C-19的 K_m 的变幅(0.91–2.85 mg/L FA)与此基本吻合。关于氨对*N. halophila*抑制性的研究较少见,而Sorokin等发现当初始氨氮浓度低于4 mmol时,*N. halophila* ANs5的生长几乎无延迟期,而高氨时生长则明显延迟^[37],这与本文观察到的C-19的延迟期随初始氨氮浓度升高而明显延长的现象吻合,说明高氨会明显抑制*N. halophila*的生长。

本研究不但有利于解释亚硝化单胞菌在不同类型水体/污水中的分布,而且有利于在生物增效(Bioaugmentation)工程中选用针对性强的本土菌

种,并有利于开发适合的AOB发酵工艺(如发酵培养基中的最适FA浓度)。

4 结论

(1) 氨氮对C-19、SH-3和CZ-4这3种菌的抑制动力学效应各不相同:SH-3、CZ-4和C-19的 K_I 依次降低,而SH-3的 K_m 显著高于C-19。

(2) C-19适用于低氨污水,SH-3适用于高氨污水,而CZ-4则具有较广的氨氮适宜范围,而且生长极其迅速。

REFERENCES

- [1] Zhou SQ, Zhou JL. The advances in investigation of new technologies on biological nitrogen removal[J]. Techniques and Equipment for Environpollcont, 2000(6): 11-19 (in Chinese)
周少奇,周吉林. 生物脱氮新技术研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000(6): 11-19
- [2] Sun HW, You YJ, Zhao HN, Guo Y, Yu HY, Li H, Ma J. Inhibitory effect of free ammonia on the activity of nitrifying bacteria and recoverability[J]. China Environmental Science, 2015, 35(1): 95-100 (in Chinese)
孙洪伟,尤永军,赵华南,郭英,于海燕,李晗,马娟. 游离氨对硝化菌活性的抑制及可逆性影响[J]. 中国环境科学, 2015, 35(1): 95-100
- [3] Soliman M, Eldyasti A. Ammonia-oxidizing bacteria (AOB): opportunities and applications: a review[J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2018, 17(2): 285-321
- [4] Vadivelu VM, Keller J, Yuan ZG. Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 95(5): 830-839
- [5] Sun HW, Peng YZ, Wang SY, Ma J. Achieving nitrification at low temperatures using free ammonia inhibition on *Nitrobacter* and real-time control in an SBR treating landfill leachate[J]. Journal of Environmental Sciences, 2015, 30: 157-163
- [6] Park S, Bae W. Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(6): 631-640
- [7] Yu DS, Yin JL, Wang XX, Li NN. Study on stability of shortcut nitrification by controlling DO and FA[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2011, 5(12): 2677-2680 (in Chinese)
于德爽,殷金兰,王晓霞,李宁宁. 控制DO及FA条件下

- 短程硝化过程系统稳定性研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(12): 2677-2680
- [8] Ji LL, Yang ZH, Xu ZY, Li XJ, Tang ZG, Deng JH. Achieve single-stage autotrophic biological nitrogen removal process by controlling the concentration of free ammonia[J]. Environmental Science, 2011, 32(1): 199-205 (in Chinese)
季丽丽, 杨朝晖, 徐峥勇, 李小江, 唐志刚, 邓久华. 控制游离氨实现单级自养生物脱氮的研究[J]. 环境科学, 2011, 32(1): 199-205
- [9] Wu LN, Peng YZ, Wang SY, Zhang SJ. Effect of free ammonia on the short-cut nitrification of the municipal landfill leachate[J]. Environmental Science, 2008, 29(12): 3428-3432 (in Chinese)
吴莉娜, 彭永臻, 王淑莹, 张树军. 游离氨对城市生活垃圾渗滤液短程硝化的影响[J]. 环境科学, 2008, 29(12): 3428-3432
- [10] Hellings C, Schellen AAJC, Mulder JW, Van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. The Sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water[J]. Water Science and Technology, 1998, 37(9): 135-142
- [11] Wanyan DQ, Yuan Y, Li X, Bi Z. A new model for the treatment of low ammonia nitrogen wastewater by CANON process[J]. Environmental Science, 2017, 38(3): 1122-1129 (in Chinese)
完颜德卿, 袁怡, 李祥, 毕贞. 一种 CANON 工艺处理低氨氮废水的新模式[J]. 环境科学, 2017, 38(3): 1122-1129
- [12] Diab S, Shilo M. Effect of adhesion to particles on the survival and activity of *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp.[J]. Archives of Microbiology, 1988, 150(4): 387-393
- [13] Pommerening-Röser A, Rath G, Koops HP. Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1996, 19(3): 344-351
- [14] Yang H, Hu YL. Nitrifying bacteria culture in entrapment immobilization[J]. Environmental Science, 2018, 39(6): 2763-2769 (in Chinese)
杨宏, 胡银龙. 硝化细菌的培养及包埋固定化中试[J]. 环境科学, 2018, 39(6): 2763-2769
- [15] Li AJ, Hou BL, Li MX. Cell adhesion, ammonia removal and granulation of autotrophic nitrifying sludge facilitated by N-acyl-homoserine lactones[J]. Bioresource Technology, 2015, 196: 550-558
- [16] Oshiki M, Takagi R, Hatamoto M, Yamaguchi T, Araki N. High-cell-density cultivation of *Nitrosomonas europaea* in a membrane bioreactor for performing protein purification and characterization studies[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2017, 62(6): 330-333
- [17] Koops HP, Pommerening-Röser A. The Lithoautotrophic Ammonia-oxidizing Bacteria[A]//Bergey's Manual[®] of Systematic Bacteriology[M]. Boston, MA: Springer US, 2005: 141-147
- [18] Papp B, Török T, Sándor E, Fekete E, Flippin M, Karaffa L. High cell density cultivation of the chemolithoautotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*[J]. Folia Microbiologica, 2016, 61(3): 191-198
- [19] Bollmann A, French E, Laanbroek HJ. Isolation, cultivation, and characterization of ammonia-oxidizing bacteria and archaea adapted to low ammonium concentrations[J]. Methods in Enzymology, 2011, 486: 55-88
- [20] Xiong Y, Xiang S, Cheng K. Nitrogen removal characteristics of a highly adaptable *Nitrosomonas eutropha* CZ-4[J]. China Environmental Science, 2019, 39(8): 3365-3372 (in Chinese)
熊英, 向斯, 程凯. 一株高适应性 *Nitrosomonas eutropha* CZ-4 的脱氮特性[J]. 中国环境科学, 2019, 39(8): 3365-3372
- [21] Gao HJ, Xiang S, Cheng K. Isolation of an AOB enrichment culture suitable for low ammonia sewages and its ammonia oxidation characteristics[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 43(1): 150-157 (in Chinese)
高慧娟, 向斯, 程凯. 适用于低氨污水的高效氨氧化菌的分离筛选及其氨氧化特性[J]. 环境科学与技术, 2020, 43(1): 150-157
- [22] Engel MS, Alexander M. Growth and autotrophic metabolism of *Nitrosomonas europaea*[J]. Journal of Bacteriology, 1958, 76(2): 217-222
- [23] Wu J, He CD, Van Loosdrecht MCM, Pérez J. Selection of ammonium oxidizing bacteria (AOB) over nitrite oxidizing bacteria (NOB) based on conversion rates[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 304: 953-961
- [24] Sepehri A, Sarrafzadeh MH. Activity enhancement of ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge process: metabolite reduction and CO₂ mitigation intensification process[J]. Applied Water Science, 2019, 9(5): 1-12
- [25] Luong JH. Generalization of monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1987, 29(2): 242-248
- [26] State Environmental Protection Administration, Editorial Board of *Methods for Monitoring and Analysis of Water and Waste Water*. Water and Wastewater Monitoring and Analysis Method[M]. Beijing: China Environment Science Press, 2002: 271-281 (in Chinese)
国家环境保护总局, 《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 271-281
- [27] Thandar SM, Ushiki N, Fujitani H, Sekiguchi Y, Tsuneda S. Ecophysiology and comparative genomics of *Nitrosomonas mobilis* Ms1 isolated from autotrophic nitrifying granules of wastewater treatment bioreactor[J]. Frontiers in

- Microbiology, 2016, 7: 1869
- [28] Cruvellier N, Poughon L, Creuly C, Dussap CG, Lasseur C. Growth modelling of *Nitrosomonas europaea* ATCC® 19718 and *Nitrobacter winogradskyi* ATCC® 25391: a new online indicator of the partial nitrification[J]. Bioresource Technology, 2016, 220: 369-377
- [29] Cua LS, Stein LY. Effects of nitrite on ammonia-oxidizing activity and gene regulation in three ammonia-oxidizing bacteria[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 319(2): 169-175
- [30] Powell SJ, Prosser JI. Inhibition of biofilm populations of *Nitrosomonas europaea*[J]. Microbial Ecology, 1992, 24(1): 43-50
- [31] Cébron A, Berthe T, Garnier J. Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary (France)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7091-7100
- [32] Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TB, Srinath EG. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid[J]. Journal - Water Pollution Control Federation, 1976, 48(5): 835-852
- [33] Hao YJ, Wu SW, Wu WX, Chen YX. Research progress on the microbial ecology of aerobic ammonia-oxidizing bacteria[J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(4): 1573-1582 (in Chinese)
郝永俊, 吴松维, 吴伟祥, 陈英旭. 好氧氨氧化菌的种群生态学研究进展[J]. 生态学报, 2007, 27(4): 1573-1582
- [34] Stein LY, Arp DJ, Berube PM, Chain PSG, Hauser L, Jetten MSM, Klotz MG, Larimer FW, Norton JM, Op Den Camp HJM, et al. Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(12): 2993-3007
- [35] Koops HP, Bottcher B, Moller UC, Pommerening-Roser A, Stehr G. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov.[J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137(7): 1689-1699
- [36] Nakagawa T, Takahashi R. *Nitrosomonas stercoris* sp. nov., a chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacterium tolerant of high ammonium isolated from composted cattle manure[J]. Microbes and Environments, 2015, 30(3): 221-227
- [37] Sorokin D, Tourova T, Schmid MC, Wagner M, Koops HP, Kuenen GJ, Jetten M. Isolation and properties of obligately chemolithoautotrophic and extremely alkali-tolerant ammonia-oxidizing bacteria from Mongolian soda lakes[J]. Archives of Microbiology, 2001, 176(3): 170-177
- [38] Zhang T, Zhou JL, Xie L. Study on the amplification culture of an high efficiency ammonia oxidizing bacteria[J]. Environmental Science and Technology, 2013, 26(2): 1-4 (in Chinese)
张挺, 周俊利, 谢柳. 一种高效氨氧化细菌扩大培养方法的研究[J]. 环境科技, 2013, 26(2): 1-4
- [39] Chu J, Wang YN, Zhang WJ, Zhang DM. Isolating and high-density culturing of *Nitrosomonas* sp. THD-1[J]. Journal of Biology, 2012, 29(5): 81-84 (in Chinese)
楚江, 王一农, 章文军, 张德民. 亚硝化单胞菌 (*Nitrosomonas* sp.) THD-1 分离鉴定及高密度培养[J]. 生物学杂志, 2012, 29(5): 81-84
- [40] Yao RD, Yuan Q, Wang KJ. Analysis on the effect of ammonia-oxidizing bacteria enrichment and its influence factors under the substrate continuous feeding in a sequencing batch reactor[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(4): 925-934 (in Chinese)
姚仁达, 苑泉, 王凯军. 底物流加-间歇运行方式下氨氧化细菌富集培养的效果及影响因素分析[J]. 环境工程学报, 2020, 14(4): 925-934
- [41] Burrell PC, Phalen CM, Hovanec TA. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(12): 5791-5800
- [42] Groeneweg J, Sellner B, Tappe W. Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at NH_3 concentrations near K_m : effects of pH and temperature[J]. Water Research, 1994, 28(12): 2561-2566
- [43] Suzuki I, Dular U, Kwok SC. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts[J]. Journal of Bacteriology, 1974, 120(1): 556-558
- [44] Drozd JW. Energy coupling and respiration in *Nitrosomonas europaea*[J]. Archives of Microbiology, 1976, 110(2/3): 257-262
- [45] Schmidt I, Steenbakkers PJM, Op Den Camp HJM, Schmidt K, Jetten MSM. Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(9): 2781-2788
- [46] Kurisu F, Kurisu F, Sakamoto Y, Yagi O. Effects of ammonium and nitrite on communities and populations of ammonia-oxidizing bacteria in laboratory-scale continuous-flow reactors[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 60(3): 501-512
- [47] Stein LY, Arp DJ. Loss of ammonia monooxygenase activity in *Nitrosomonas europaea* upon exposure to nitrite[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 4098-4102

- [48] Hunik JH, Meijer HJG, Tramper J. Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at extreme substrate, product and salt concentrations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 37(6): 802-807
- [49] Ahn JH, Yu R, Chandran K. Distinctive microbial ecology and biokinetics of autotrophic ammonia and nitrite oxidation in a partial nitrification bioreactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 100(6): 1078-1087
- [50] Zhang XJ, Li D, Liang YH, He YP, Zhang YL, Fan D, Zhang J. Effect of ammonia concentration on the performance and microbial characteristics of CANON process[J]. China Environmental Science, 2014, 34(7): 1715-1721 (in Chinese)
张肖静, 李冬, 梁瑜海, 何永平, 张玉龙, 范丹, 张杰. 氨氮浓度对 CANON 工艺性能及微生物特性的影响[J]. 中国环境科学, 2014, 34(7): 1715-1721
- [51] Yang JC, Zhang L, Daisuke H, Takahiro S, Ma YG, Li ZG, Furukawa K. High rate partial nitrification treatment of reject wastewater[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(4): 436-440
- [52] Jeanningros Y, Vlaeminck SE, Kaldate A, Verstraete W, Graveleau L. Fast start-up of a pilot-scale deammonification sequencing batch reactor from an activated sludge inoculum[J]. Water Science and Technology, 2010, 61(6): 1393-1400
- [53] Oishi R, Tada CK, Asano R, Yamamoto N, Suyama Y, Nakai Y. Growth of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in cattle manure compost under various temperatures and ammonia concentrations[J]. Microbial Ecology, 2012, 63(4): 787-793
- [54] Fujita M, Tsuji K, Akashi A. Temporal variation in maximum cell-specific nitrification rate[J]. Water Science and Technology, 2010, 61(8): 2069-2073