



## 过表达亚硝酸盐还原酶的重组大肠杆菌辅助污水短程硝化

辛玉峰\*, 曲晓华\*

曲阜师范大学生命科学学院, 山东 曲阜 273165

**摘要:** 【目的】为了体现并突出亚硝酸盐还原酶在污水脱氮以及短程硝化中的重要性, 对过表达亚硝酸盐还原酶的大肠杆菌进行了污水脱氮的研究。【方法】通过转化带有亚硝酸盐还原酶基因的重组质粒, 将亚硝酸盐还原酶在大肠杆菌中过表达, 通过分析重组大肠杆菌的产物研究了该酶的表达及还原亚硝酸盐的情况, 通过将该重组菌与已报道的硝化-反硝化细菌或生活污水进行混合培养, 研究重组菌用于辅助氨氮去除的短程硝化能力。【结果】重组大肠杆菌能正确表达亚硝酸盐还原酶,  $OD_{600}=2.0$  的菌悬液在 2 h 内还原约 1 mmol/L 的亚硝酸盐, 并产生几乎等量的一氧化氮; 重组大肠杆菌与 *Acinetobacter* sp. YF14 菌株等比例混合时, 12 h 能够提高氨氮脱氮效率约(36.0±7.4)%, 且在 4 h 时, 最大亚硝酸盐的积累量减少 37%; 重组大肠杆菌( $OD_{600}=1.0$ ) 12 h 内能够提高污水厂活性污泥的脱氮效率约(31.0±5.7)%, 且未检测到亚硝酸盐和硝酸盐的积累; 溶氧水平对于亚硝酸盐还原酶重组菌辅助脱氮具有明显的影响, 中等溶氧量[(6.4±0.7) mg/L]时脱氮效果最好。【结论】过表达亚硝酸盐还原酶的大肠杆菌可以提高污水脱氮的短程硝化能力。

**关键词:** 亚硝酸盐还原酶, 大肠杆菌, 重组, 短程硝化, 污水, 污泥, 脱氮

自工业革命以来, 大量含氮化合物的产生和排放使环境中氮含量严重超标, 由此带来的水体富营养化等是水环境污染中最突出的问题。水体富营养化会对鱼类造成毒害作用以及使藻类大量增殖, 并大量消耗水中的溶解氧等<sup>[1-2]</sup>。目前, 含氮化合物主要是通过生物法处理, 相比化学法处理, 生物法具有费用低、不产生二次污染等优势<sup>[2-3]</sup>。传统的氨氮生物处理主要是通过好氧硝化和厌氧反

硝化相偶联的方法, 氨氮经过亚硝化细菌和硝化细菌依次氧化为亚硝酸盐和硝酸盐, 再经过反硝化细菌将硝酸盐还原为亚硝酸盐, 进而还原为氮气, 从而达到从环境中去除氨氮的目的<sup>[2]</sup>。约 20 年前产生的短程硝化方法, 则与传统的硝化-反硝化方法不同, 其特点是不经过或尽量少地经过硝酸盐阶段, 使反应体系控制在亚硝酸盐阶段时即被还原为氮气<sup>[4-6]</sup>。短程硝化比传统的硝化-反硝化节

基金项目: 山东省自然科学基金青年基金(ZR2012CQ011); 曲阜师范大学校级基金资助(XJ201108)

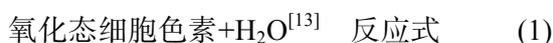
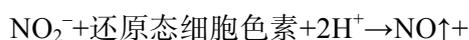
\*通信作者。Tel: +86-537-4458576; E-mail: 辛玉峰, xinyufeng520@163.com; 曲晓华, sduxyf@126.com

收稿日期: 2017-02-16; 修回日期: 2017-04-23; 网络出版日期: 2017-04-27

约大量能源, 并防止污泥膨胀, 提高脱氮效率等。目前, 实现短程硝化的方法主要是通过控制部分理化条件, 例如温度<sup>[7]</sup>、pH<sup>[6,8]</sup>、游离氨<sup>[8]</sup>以及溶解氧<sup>[9]</sup>等, 其不足之处是有些条件不易控制, 如温度和 pH 等, 一旦进水性质确定后则往往不容易改动, 并且容易产生大的动力消耗和二次污染等问题。

分析传统及短程硝化过程可以发现<sup>[10-11]</sup>, 在传统的过程中, 硝化作用负责从氨氮向硝态氮转化, 经过亚硝酸盐产生硝酸盐, 反硝化过程是先将硝酸盐还原为亚硝酸盐, 再还原为一系列的还原产物直至氮气; 而典型的短程硝化, 则通过控制各种条件使反应体系尽量不经过硝酸盐, 直接由亚硝酸盐还原产生氮气。在由传统的硝化-反硝化向短程硝化转变过程中, 亚硝酸盐的转化方向至关重要, 如果氧化为硝酸盐则是传统的硝化-反硝化过程, 而迅速还原为一氧化氮(NO)进而还原为 N<sub>2</sub> 则属于短程硝化过程, 因此, 实现短程硝化的关键在于控制亚硝酸盐的去向。

亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, NIR)是反硝化过程中将亚硝酸盐转化为气态氮(NO)的酶(EC 1.7.1.2)。大部分亚硝酸盐还原酶都催化相同的反应(反应式 1), 在细菌和古细菌中均广泛分布<sup>[12]</sup>。



通过分子生物学方法过表达 NIR, 使亚硝酸盐向气态 NO 的转化多于向硝态氮的转化, 从而使脱氮体系向短程硝化的方向进行, 达到污水脱氮短程硝化的目的。目前, 尚少见通过改造菌株控制短程硝化的报道。本文利用大肠杆菌对 NIR 进行了过表达, 并检测了重组菌的亚硝酸盐还原酶的活性, 并将重组菌与已经报道的异养硝化-反

硝化菌 *Acinetobacter* sp. YF14<sup>[14]</sup> 或待处理污水进行混合, 检测了重组菌在污水脱氮中的作用, 本文还初步研究了溶氧对于重组菌辅助脱氮的影响, 希望可以为通过生物法控制短程硝化提供基础的理论支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种、药品及培养基

菌株 *E.coli* BL21(DE3) 在 LB 培养基中 37 °C 培养, *Acinetobacter* sp. YF14 菌株使用的 LB 培养基, 基本培养基等参考文献[14]。使用药品均购自 Sigma Aldrich 公司, 为分析纯。含氨氮配水为 pH 7.0 的 100 mmol/L HEPES 缓冲液溶解的氯化铵(1.0–1.5 mmol/L)。生活污水和活性污泥取自曲阜市污水处理厂。

### 1.2 重组菌株构建

利用试剂盒(OMEGA, USA)提取 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 的基因组, 采用 Phusion 高保真聚合酶(Life technology, USA), 利用 PCR 的方法获得目的基因 *PaNir*。基因 *PaNir* 的扩增引物为: F1: 5'-CACACAGGAAACAGCTATGCCATTTGGCAAG-3'; R1: 5'-TTCCATTCGCCATTTCATCAGTACACGTCGTGC-3', 其中下划线部分为与质粒载体相连接时的同源臂序列。质粒载体 pBBR1MCS2 的线性化通过 PCR 获得, 引物为 F2: 5'-TGAATGGCGAATGGAAATTGTAAG-3'; R2: 5'-AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC-3'。将目的基因与线性化的质粒通过 In-fusion 的方法进行连接, 并转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中, 获得目的重组菌株 BL21 (PaNIR)。同时直接将质粒 pBBR1MCS2 转化进入 BL21(DE3), 获得对照菌株 BL21(C), 该菌株只含

有一个空白质粒。

### 1.3 重组菌株的氨氮化合物代谢的全细胞分析

利用 LB 培养基将重组菌株培养过夜, 按照 1% 的接种量扩大培养 100 mL, 当生长到  $OD_{600}$  为 0.6 左右, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 在 30 °C 下继续培养 4 h, 离心(5000 r/min, 5 min)收集菌体, 利用 pH 7.0 的 100 mmol/L HEPES 缓冲液洗涤菌体 2 次, 并用相同缓冲液悬浮菌体至  $OD_{600}$  为 2.0, 将该菌悬液分装至反应器中, 加入一定浓度的氯化氨, 在一定时间取样, 离心(13000 r/min, 2 min)去菌体, 检测上清中的氮化合物。

### 1.4 混合培养菌群的脱氨氮效果实验

为评估重组菌株辅助污水脱氮短程硝化作用, 分别采用 2 种处理方式: (1) 利用已经报道的异养硝化-反硝化菌 *Acinetobacter* sp. YF14<sup>[14]</sup>为试验菌株, 加入不同比例的重组菌株; (2) 根据之前报道的方法略作改动<sup>[14]</sup>, 取曲阜市污水处理厂进水管经初步预处理的生活污水作为试验水样, 另取曝气池活性污泥, 按照水样:污泥体积比为 100:25 的比例进行配比成试验组, 加入  $OD_{600}=1.0$  的重组菌 BL21(PaNIR), 以不加重组菌的样品或用 BL21(C) 代替重组菌的样品为对照组。以上 2 种处理方式的反应均在 100 mL 三角瓶中进行, 反应体系为 25 mL, 在 25 °C、100 r/min 摇床振荡培养, 并在不同时间检测各种氮化合物含量。除不用 IPTG 诱导外, 菌株 YF14 的收集方式均与重组菌相同(见 1.3)。

溶氧对于重组菌株辅助脱氮作用的影响: 在 100-mL 三角瓶中放置 25 mL 的  $OD_{600}=2.0$  的菌株 YF14 中或污水厂污泥(氨氮含量为 1.5 mmol/L 左右), 添加  $OD_{600}=2.0$  经 IPTG 诱导后的重组大肠杆菌 BL21(PaNIR), 用氮气吹 5 min 以去除氧气, 于 25 °C 振荡培养, 通过不同转速(50、100、

200 r/min)来控制溶氧量(实际 DO 值分别为  $4.5\pm 0.6$ 、 $6.4\pm 0.7$ 、 $7.8\pm 0.9$  mg/L), 振荡培养 2 h 后, 取样检测氨氮量( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ), 计算消耗氨氮的百分比。

### 1.5 水质分析方法

氨氮采用靛酚蓝分光光度法; 亚硝酸盐采用重氮化偶合分光光度法; 硝酸盐采用紫外分光光度计法<sup>[14]</sup>; NO 的检测利用将生成的 NO 通入水中, 使其自发氧化形成  $\text{NO}_2^-$  后, 采用 Griess 试剂 (Sigma, USA)检测  $OD_{540}$ , 计算出  $\text{NO}_2^-$  的浓度, 再根据 NO 与  $\text{NO}_2^-$  为 1:1 的比例计算 NO 的浓度。溶氧(DO)利用奥立龙 RDO 探头(Thermo Scientific, USA)进行检测。

### 1.6 生物统计及生物信息学

统计及计算使用 GraphPad Prism 5.0 软件。序列比对利用 NCBI 数据库中的 BlastP 程序 ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome))。PCR 获得基因的测序由上海生工生物公司完成。

## 2 结果和分析

### 2.1 亚硝酸盐还原酶基因在大肠杆菌中的表达

在大肠杆菌 BL21(DE3)的基因组中, 利用 *Pseudomonas aeruginosa* 的亚硝酸盐还原酶的氨基酸序列(PaNIR: NP\_249210.1)进行广泛比对, 没有发现相似的序列, 说明大肠杆菌自身不含有与 *P. aeruginosa* 类似的 NIR 酶。将 PaNIR 的编码基因利用 PCR 扩增, 产物电泳检测正确, 测序结果显示没有突变(结果未展示)。将该条带与线性化质粒 pBBR1MCS2 相连后, 转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达, 利用活性检测方法验证该酶能在 BL21(DE3)中正常表达(图 1)。

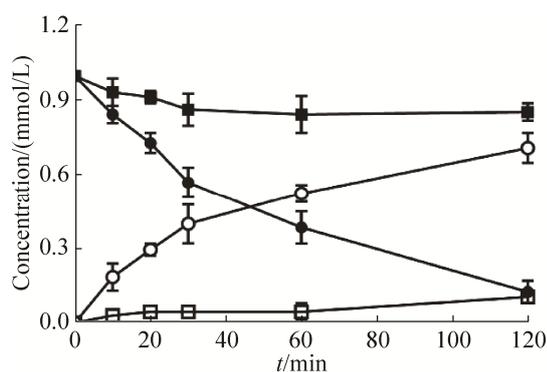


图 1. 重组大肠杆菌还原亚硝酸盐为一氧化氮

Figure 1. Recombinant *E. coli* reduce nitrite to NO. (□): NO concentration of BL21(C); (○): NO concentration of BL21(PaNIR); (■): Nitrite concentration of BL21(C); (●): Nitrite concentration of BL21(PaNIR). Data represent the average of three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

## 2.2 重组大肠杆菌能迅速氧化亚硝酸盐为 NO

将重组的大肠杆菌 BL21(PaNIR)进行培养并诱导后, 收集并重悬菌体为  $OD_{600}=2.0$ , 加入不同浓度的亚硝酸盐进行培养。结果显示(图 1), 该菌能在 30 min 内将 50%以上的亚硝酸盐转化为 NO, 2 h 以后能将约 1 mmol/L 的亚硝酸盐彻底转化, 生成的 NO  $[0.64\pm 0.70 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})]$ 与消耗的亚硝酸盐  $[0.72\pm 0.10 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})]$ 几乎等量。对照菌 BL21(C)只有少量的亚硝酸盐消耗和 NO 生成, 可能来源于大肠杆菌自身具有的亚硝酸盐还原活性<sup>[15]</sup>。

综上所述, 重组大肠杆菌 BL21(PaNIR)能够表达有功能的亚硝酸盐还原酶。

## 2.3 重组大肠杆菌辅助菌株 YF14 实现短程硝化

菌株 YF14 是一株异养硝化-反硝化菌株<sup>[14]</sup>, 为了验证构建的重组菌 BL21(PaNIR)是否能够促进菌株 YF14 的氮去除效率, 以  $OD_{600}$  值为 2.0 的菌株 YF14 为基础, 添加不同比例的 BL21(PaNIR)

[以 BL21(C)作为对照菌], 研究复合菌群的氮去除及短程硝化能力。短程硝化能力的评估是根据在反应过程中检测到的亚硝酸盐量和脱氨氮效率比较的, 亚硝酸盐积累越少而脱氨氮效率越高, 说明其短程硝化能力越强。

结果显示, 重组菌 BL21(PaNIR)可以辅助菌株 YF14 进行更快的生物脱氮(图 2-a, b, c), 且随着加入的重组菌越多, 辅助脱氮效果越明显, 以 12 h 的数据为例, 添加  $OD_{600}$  为 1.0 (图 2-a)、2.0 (图 2-b)和 4.0 (图 2-c)的重组菌比仅含有菌株 YF14 的氨氮去除率分别提高了  $(24.0\pm 3.5)\%$ ,  $(36.0\pm 7.4)\%$ 和  $(42.0\pm 8.3)\%$ 。此外, 只添加对照菌 BL21(C)后, 对于菌株 YF14 也具有一定的辅助效果(图 2-a, b, c), 这说明大肠杆菌自身也具有还原亚硝酸盐氮的功能, 与前人报道结果类似<sup>[15]</sup>。经过计算, 去除掉对照菌 BL21(C)自身的影响后, 重组菌 BL21(PaNIR)产生的辅助脱氮效率中由 NIR 过表达产生的部分就比较有限, 添加  $OD_{600}$  为 1.0、2.0 和 4.0 的重组菌, 这部分氨氮去除效率仅分别提高了 11.9%、22.3%和 28.8%, 提高效率有限的原因可能是由于菌株 YF14 代谢氨氮产生的亚硝酸盐释放较少<sup>[14]</sup>。

另外, 在脱氮的过程中积累的亚硝酸盐明显减少(图 2-d, e, f), 以 4 h 数据为例, 添加  $OD_{600}$  为 1.0 (图 2-d), 2.0 (图 2-e)和 4.0 (图 2-f)的重组菌 BL21(PaNIR)时, 最大亚硝酸盐积累量相比只有菌株 YF14 时分别减少了 18.5%、37.0%和 56.9%, 这进一步说明重组菌与异养硝化-反硝化菌 YF14 组合后, 能够帮助减少在脱氮过程中积累的亚硝酸盐, 从而提高脱氨氮和短程硝化能力。硝酸盐积累量的变化趋势与亚硝酸盐类似(图 2-g, h, i), 添加了重组菌后, 硝酸盐的积累变少, 但幅度小于亚硝酸盐, 这可能有两个原因: (1) 表达亚硝酸

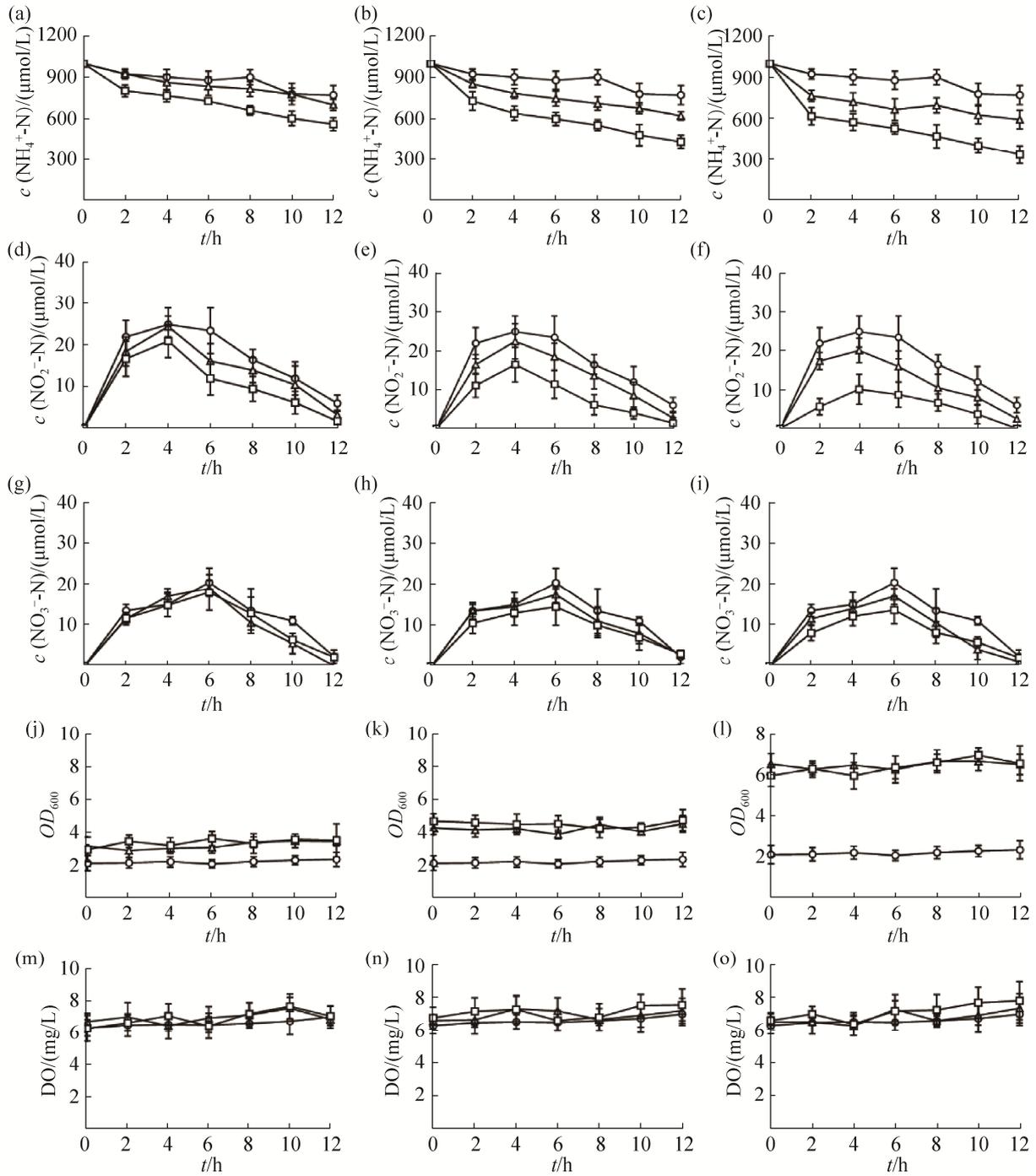


图 2. 重组大肠杆菌辅助菌株 YF14 去除氨氮

Figure 2. Recombinant *E. coli* contribute to the denitrification of the YF14. The figures (a), (d), (g), (j) and (m) showed the several changes of the mixture of  $OD_{600}$  of 1.0 BL21(C) or BL21(PaNIR) and  $OD_{600}$  of 2.0 YF14; The figures (b), (e), (h), (k) and (n) showed the mixture of  $OD_{600}$  of 2.0 BL21(C) or BL21(PaNIR) and  $OD_{600}$  of 2.0 YF14; And the figures (c), (f), (I), (l) and (o) showed the mixture of  $OD_{600}$  of 4.0 BL21(C) or BL21(PaNIR) and  $OD_{600}$  of 2.0 YF14; ○: YF14 alone; △: YF14 and BL21(C); □: YF14 and BL21(PaNIR). Error bars represents the standard deviations.

盐还原酶的重组菌消耗了部分亚硝酸盐, 根据传统的硝化-反硝化过程, 作为底物的亚硝酸盐的消耗会使硝酸盐的产量降低; (2) 亚硝酸盐的消耗也促进了硝酸盐经过反硝化形成亚硝酸盐的速度, 这进一步消耗了体系中的硝酸盐。

同时检测了在培养过程中体系  $OD_{600}$  值的变化情况(图 2-j, k, l), 从结果可以看出, 在检测的 12 h 过程中, 体系的  $OD_{600}$  并没有发生大的变化, 这可能是在培养过程中未添加必要的碳源导致的, 也可能与菌种的生长速度相关<sup>[14]</sup>, 这同时也说明, 在脱氮过程中, 由于菌种自身生物量增加而消耗的氮量所占比例不大。溶氧量 DO 在反应过程中没有明显的变化(图 2-m, n, o), 基本保持在稳定供氧状态, 未出现大幅度消耗氧气情况, 说明供氧量能够满足该反应需求。

## 2.4 重组大肠杆菌辅助污水处理实现短程硝化

为验证重组菌 BL21(PaNIR)是否能促进实际污水的脱氮微生物进行短程硝化, 将重组菌与活性污泥厂硝化池中活性污泥相混合, 活性污泥含有大量的微生物种群, 本身具有一定的脱氮效果, 重组菌加入后可能促进其中亚硝酸盐快速还原为  $NO$ , 并促进脱氮。

从结果来看(图 3-A), 与对照相比, 重组大肠杆菌 BL21(PaNIR)能显著提高污水中氨氮的去除效果。以 12 h 为例, 重组菌相比污水原污泥的脱氮效率提高了(31.0±5.7)%, 添加对照的菌 BL21(C)与只有污泥的效果相差不大, 这说明重组菌 BL21(PaNIR)表达的亚硝酸盐还原酶发挥了作用。

在本实验中, 未检测到亚硝酸盐和硝酸盐的积累(结果未展示), 因此无法定量说明 NIR 的作用程度。与图 2 实验相似的是, 反应体系的 DO 值也基本未发生变化, 说明供氧满足体系要求(图 3-B)。

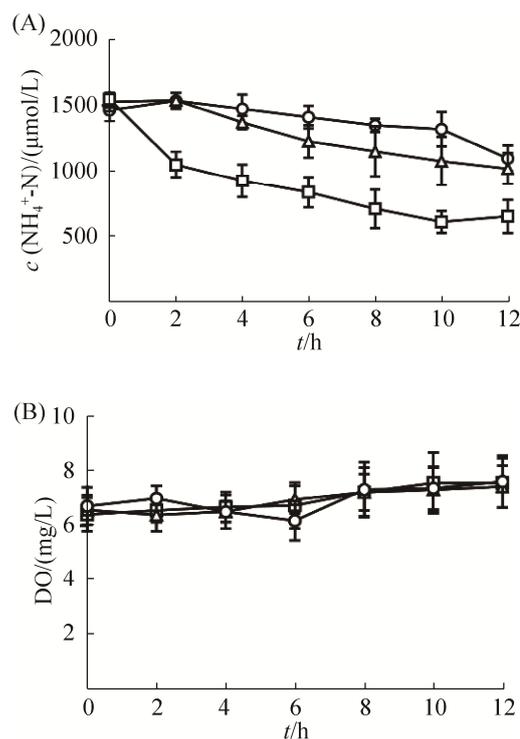


图 3. 重组大肠杆菌辅助污泥去除氨氮

Figure 3. Recombinant *E. coli* contribute to the denitrification of sludge. The amino nitrogen (A) and dissolved oxygen (B) were showed.  $\circ$ : Sludge alone;  $\Delta$ : Sludge and BL21(C);  $\square$ : Sludge and BL21(PaNIR). Error bars represents the standard deviations.

## 2.5 溶氧对重组菌功能的影响

短程硝化过程中影响的重要因素是氧气的供应, 本研究以  $OD_{600}=2.0$  的重组大肠杆菌为例, 研究了重组菌 BL21(PaNIR)辅助污水脱氮体系中氧气供应的影响。从结果来看(图 4), 无论是重组菌与菌株 YF14 相混合(图 4-A), 还是与生活污水相混合(图 4-B), 均获得了较为一致的结果, 即氧气供应量的变化明显影响重组菌的辅助效果, 并且溶氧为  $6.4\pm 0.7$   $mg/L$  时, 氨氮的脱除效果最好, 2 h 内氨氮的去除率分别是 19%和 28%左右。过高的溶氧( $7.8\pm 0.9$   $mg/L$ )并没有进一步提高氨氮的脱除效果。

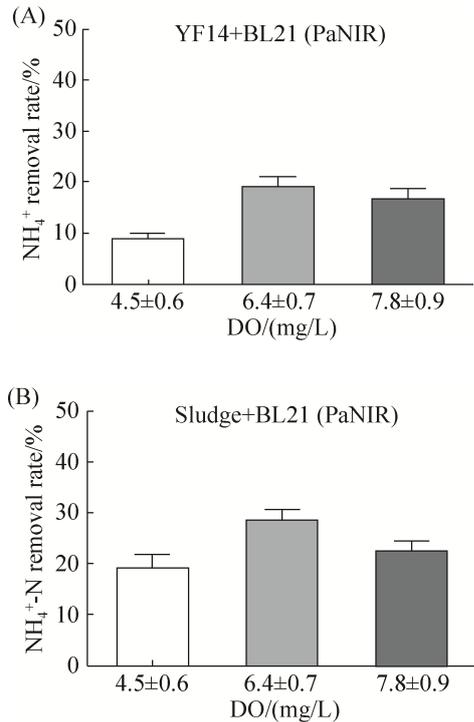


图 4. 氧气供应对于重组大肠杆菌功能的影响  
Figure 4. Effect of oxygen supply for the function of recombinant *E. coli*. The amino nitrogen removal rate (%) were showed in the mixture of YF14 and BL21(PaNIR) (A) or sludge and BL21(PaNIR) (B). Error bars represents the standard deviations.

### 3 讨论

短程硝化比传统硝化过程约节约 25% 的能量, 并且能降低污泥产量<sup>[16]</sup>。传统控制短程硝化的方法是通过理化手段, 例如通过控制 pH、温度、溶解氧等, 但一些理化指标难以实际控制, 马勇等指出在实际水处理过程中, 实际可控的理化因素只有溶解氧, 其他如 pH、温度等均由于进水条件以及实际应用等难以实现<sup>[16]</sup>。利用生物控制法实现污水的短程硝化, 是结合生物学和污水处理的发展而出现的交叉应用, 目前通过分离异养硝化-反硝化细菌<sup>[17-20]</sup>、厌氧氨氧化细菌<sup>[21-22]</sup>和短程反硝化相结合<sup>[23]</sup>等, 均是通过生物控制法实现短

程硝化的具体应用。

通过细菌过表达亚硝酸盐还原酶从而帮助脱氮体系更快地进入短程硝化, 从原理上和本文结果来看是可行的。首先, 重组大肠杆菌能够降低菌株 YF14 在脱氮过程中积累的亚硝酸盐和硝酸盐, 提高其脱氮效率(图 2); 其次, 重组大肠杆菌可以与污水污泥一起发挥作用, 加快其脱氮效率(图 3-A); 最后, 重组大肠杆菌能够消耗体系中的亚硝酸盐(图 1), 使其产生 NO, NO 作为小分子可以自由进出生物体内, 从而进入下一步的脱氮反应, 最终生成 N<sub>2</sub>。

本研究中提出的短程硝化与传统的短程硝化不同, 传统短程硝化一般是指通过理化手段等控制硝化菌的生长, 并提高亚硝化菌的生长速率从而提高体系中的亚硝酸盐量, 其标志是有稳定且较高的亚硝态氮的积累<sup>[9]</sup>; 而本研究中的短程硝化则是指通过生物法将体系中产生的亚硝态氮迅速转化为 NO, 从而使亚硝态氮尽量少地进入硝态氮阶段, 促进体系更快地进入反硝化脱氮过程。因此, 两者目的相同, 但在实现短程硝化的途径和方法上有本质上的区别。

另外, 尽管重组大肠杆菌能够提高菌株 YF14 或生活污水的脱氮效率, 但从实际促进效率上来看并不大, 推测可能有几个原因: 首先, 脱氮体系(无论是菌株 YF14 还是活性污泥)所释放到体外的亚硝酸盐的量很关键, 因为亚硝酸盐是重组大肠杆菌的底物, 直接关系到它还原的效率, 从结果来看(图 2, 图 3), 这个量可能不大(菌株 YF14 检测到的亚硝酸盐积累较少, 而生活污水处理污水时检测不到亚硝酸盐), 因此需要认真评估在体系中所释放的亚硝酸盐的量; 其次, 重组菌还原亚硝酸盐的效率不高, 从实验结果来看, 加入了重组大肠杆菌后对于菌株 YF14 产生的亚硝酸盐

去除率提高不大, 这可能是提高脱氮效率不高的一个原因; 最后, 重组菌与原土著菌之间的协同作用没有经过优化, 由于过表达了亚硝酸盐还原酶, 使得体系中原有的亚硝酸盐消耗过快, 而产生 NO 的速率过快, 这打破了原有的菌群平衡, 菌群的其他功能并没有及时跟上这种变化, 使下游产物积累而反馈抑制了整个体系, 导致脱氮效率促进不大。

利用重组大肠杆菌表达亚硝酸盐还原酶基因, 从而将亚硝态氮迅速转化为 NO, 使体系进行短程硝化, 只是一次利用分子生物学方法改进脱氮工艺的尝试, 其本身存在着不足之处。首先, 生物法处理污水的通病是添加的外来菌株是否能与土著菌株协同作用<sup>[24]</sup>, 既能保证添加菌种的正常生长和功能的发挥, 又不至于过度生长导致膨胀而使土著菌株体系消失, 这需要对于外来和土著菌株的基础研究都非常清楚, 因此, 仔细研究含氮污染中起关键作用的微生物的基础生理生化、遗传及代谢等对于更好地利用它们非常重要; 其次, 该体系仍然需要生物诱导, 即需要添加 IPTG 诱导 NIR 的表达, 这样既增加了生产成本, 亦不符合大型生产的要求, 因此研究有效的组成型表达的细菌协助污水的短程硝化, 以及从环境中进一步筛选所需要的高效菌株十分重要; 最后, 本研究使用批次培养的方式, 这与其他文献用 SBR 反应器不同, 批次培养在氧气的供应上不如 SBR 反应器准确, 根据以前的报道, 污水的脱氮过程中溶氧越低越有利于短程硝化<sup>[16]</sup>, 本研究利用超过一般硝化菌的氧饱和常数<sup>[5]</sup>的溶氧浓度(图 2, 图 3), 研究重组菌辅助污水的脱氮效果, 这可能会带来一定的误差, 因此, 改进供氧方式研究重组菌的作用十分必要。

由此, 笔者认为将来的研究可从以下 3 点入

手: (1) 加强环境微生物的基础理论研究, 重点研究污水处理过程中的微生物, 特别针对于含氮污水中的微生物的生理生化及遗传代谢特性; (2) 加强分子生物学与污水脱氮处理的结合研究, 利用分子生物学手段, 改造一些关键的微生物或酶, 使体系向着污水短程脱氮的方向进行。例如: 在起到关键作用的微生物菌群内部加强亚硝酸盐还原酶的作用, 并减弱硝酸盐氧化酶的作用; (3) 加强污水脱氮机理的进一步研究, 包括其中的微生物及其酶学作用、脱氮原理及化学计量学原理等。

## 参考文献

- [1] Hao XD, Zhang ZJ. Nitrogen pollution of water and its control. *Environmental Pollution & Control*, 1990, 12(4): 25–27, 47. (in Chinese)  
郝晓地, 张自杰. 水体氮污染及其防治对策. *环境污染与防治*, 1990, 12(4): 25–27, 47.
- [2] Li XY, Xu F. Progress of biological treatment technology of micro-polluted water with low concentration of ammonia-nitrogen. *Pollution Control Technology*, 2012, 25(4): 31–34. (in Chinese)  
李学尧, 徐富. 微污染水体中低浓度氨氮的生物处理技术进展. *污染防治技术*, 2012, 25(4): 31–34.
- [3] Wang H, Li HB. Study and development of biotechnology of ammonia removal in wastewater. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2008, 36(5): 97–100, 103. (in Chinese)  
王洪, 李海波. 氨氮废水生物处理工艺及研究进展. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 36(5): 97–100, 103.
- [4] Yuan LJ, Peng DC, Wang ZY. Biological nitrogen removal by shortcut nitrification-denitrification. *China Water & Wastewater*, 2000, 16(2): 29–31. (in Chinese)  
袁林江, 彭党聪, 王志盈. 短程硝化-反硝化生物脱氮. *中国给水排水*, 2000, 16(2): 29–31.
- [5] Zhu GB, Peng YZ, Guo JH. Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2008, 40(10): 1552–1557. (in Chinese)  
祝贵兵, 彭永臻, 郭建华. 短程硝化反硝化生物脱氮技术. *哈尔滨工业大学学报*, 2008, 40(10): 1552–1557.
- [6] Liu CX, Hu HY, Peng DC, Wang ZY, Qian Y. Short-cut

- nitrification and denitrification for treatment of high ammonia content wastewater from coking plant. *China Water & Wastewater*, 2003, 19(8): 11–14. (in Chinese)
- 刘超翔, 胡洪营, 彭党聪, 王志盈, 钱易. 短程硝化反硝化工艺处理焦化高氨废水. *中国给水排水*, 2003, 19(8): 11–14.
- [7] Shang HL, Peng YZ, Zhang JR, Wang SY. The effect of temperature on short-cut nitrification and denitrification. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(3): 516–520. (in Chinese)
- 尚会来, 彭永臻, 张静蓉, 王淑莹. 温度对短程硝化反硝化的影响. *环境科学学报*, 2009, 29(3): 516–520.
- [8] Zhi XH, Wang HW, Ding F, Peng YZ, Ma LM. The study of shortcut nitrification-denitrification at normal temperature. *Research of Environmental Sciences*, 2006, 19(1): 26–29. (in Chinese)
- 支霞辉, 王红武, 丁峰, 彭永臻, 马鲁铭. 常温条件下短程硝化反硝化生物脱氮研究. *环境科学研究*, 2006, 19(1): 26–29.
- [9] Ma Y, Li J, Wu XL, Peng YZ. A/O pilot-scale nitrogen removal process treating domestic wastewater III. The study of nitrification process control. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(5): 716–721. (in Chinese)
- 马勇, 李军, 吴学蕾, 彭永臻. A/O 生物脱氮工艺处理生活污水中试(三)短程硝化过程控制的研究. *环境科学学报*, 2006, 26(5): 716–721.
- [10] Li JY, Lin WT, Luo JF, Tian GL. Community structure of microbes involved in nitrification and denitrification in typical shrimp-farming water. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(4): 478–488. (in Chinese)
- 李敬源, 林炜铁, 罗剑飞, 田国梁. 典型对虾养殖水体中参与硝化与反硝化过程的微生物群落结构. *微生物学报*, 2012, 52(4): 478–488.
- [11] He X, Lv J, He YL, Zhao B, Li CJ. Study progress on the mechanism of heterotrophic nitrification. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(5): 844–847. (in Chinese)
- 何霞, 吕剑, 何义亮, 赵彬, 李春杰. 异养硝化机理的研究进展. *微生物学报*, 2006, 46(5): 844–847.
- [12] Xin YF, Zhao TY, Qu XH. Distribution, structure and sequence alignment, and metagenomics analysis of two nitrite reductases with NO forming. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(3): 597–608. (in Chinese)
- 辛玉峰, 赵天颖, 曲晓华. 两类产 NO 的亚硝酸盐还原酶的分布, 结构与序列比较及宏基因组分析. *微生物学报*, 2017, 57(3): 597–608.
- [13] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997, 61(4): 533–616.
- [14] Xin YF, Qu XH, Yuan MD, Jing YD. Isolation and identification of a heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying *Acinetobacter* sp. YF14 and its denitrification activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(12): 1646–1654. (in Chinese)
- 辛玉峰, 曲晓华, 袁梦冬, 荆延德. 一株异养硝化-反硝化不动杆菌的分离鉴定及脱氮活性. *微生物学报*, 2011, 51(12): 1646–1654.
- [15] Tiso M, Schechter AN. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119712.
- [16] Ma Y, Wang SY, Zeng W, Peng YZ, Zhou L. A/O pilot-scale nitrogen removal process treating domestic wastewater I. The study of short-cut nitrification and denitrification. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2006, 26(5): 703–709. (in Chinese)
- 马勇, 王淑莹, 曾薇, 彭永臻, 周利. A/O 生物脱氮工艺处理生活污水中试(一)短程硝化反硝化的研究. *环境科学学报*, 2006, 26(5): 703–709.
- [17] Qu Y, Zhang PY, Yu DS, Guo SS, Yang RX. Bioaugmentation for shortcut nitrification in SBR treating for sewage containing sea water by nitrification-aerobic denitrification bacteria. *Environmental Science*, 2010, 31(10): 2376–2384. (in Chinese)
- 曲洋, 张培玉, 于德爽, 郭沙沙, 杨瑞霞. 异养硝化/好氧反硝化菌生物强化含海水污水的 SBR 短程硝化系统初探. *环境科学*, 2010, 31(10): 2376–2384.
- [18] Pan D, Huang QY, Chen WL. Screening and identification of two heterotrophic nitrifying bacteria and characterization of their capacity for nitrogen removal. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(10): 1382–1389. (in Chinese)
- 潘丹, 黄巧云, 陈雯莉. 两株异养硝化细菌的分离鉴定及其脱氮特性. *微生物学报*, 2011, 51(10): 1382–1389.
- [19] Sun XM, Li QF, Zhang Y, Liu HD, Zhao J, Qu KM. Phylogenetic analysis and nitrogen removal characteristics of a heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacteria strain from marine environment. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(6): 687–695. (in Chinese)
- 孙雪梅, 李秋芬, 张艳, 刘淮德, 赵俊, 曲克明. 一株海水异养硝化-好氧反硝化菌系统发育及脱氮特性. *微生物学报*, 2012, 52(6): 687–695.
- [20] Zhang GY, Chen MC, Han RY, Min H. Isolation, identification and phylogenetic analysis of a heterotrophic nitrifier. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2): 156–161. (in Chinese)
- 张光亚, 陈美慈, 韩如昉, 闵航. 一株异养硝化细菌的分离及系统发育分析. *微生物学报*, 2003, 43(2): 156–161.
- [21] Hong YG, Li M, Gu JD. Bacterial anaerobic ammonia

- oxidation (Anammox) in the marine nitrogen cycle—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(3): 281–286. (in Chinese)  
洪义国, 李猛, 顾继东. 海洋氮循环中细菌的厌氧氨氧化. *微生物学报*, 2009, 49(3): 281–286.
- [22] Zhao YG, Zheng P. Composition, structure and function of anammoxosome—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 8–18. (in Chinese)  
赵弋戈, 郑平. 厌氧氨氧化体的组成、结构与功能. *微生物学报*, 2016, 56(1): 8–18.
- [23] Wang H, Pei WZ, Li XD, Hao C, Zeng KM. Removing nitrogen from low-C/N-piggery-wastewater using shortcut nitrification/denitrification-ANAMMOX. *Environmental Science*, 2009, 30(3): 815–821. (in Chinese)  
王欢, 裴伟征, 李旭东, 郝纯, 曾抗美. 低碳氮比猪场废水短程硝化反硝化-厌氧氨氧化脱氮. *环境科学*, 2009, 30(3): 815–821.
- [24] Yang YN, Yang DH. Review on mechanism and application status of bioaugmentation technique in wastewater treatment. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(1): 230–233. (in Chinese)  
杨懿宁, 杨殿海. 生物强化技术在污水处理中的作用机理及应用现状. *安徽农业科学*, 2015, 43(1): 230–233.

## Shortcut nitrification of sludge by recombinant *Escherichia coli* overexpressing nitrite reductase

Yufeng Xin<sup>\*</sup>, Xiaohua Qu<sup>\*</sup>

College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273165, Shandong Province, China

**Abstract: [Objective]** To highlight the significance of nitrite reductase in wastewater denitrification and shortcut nitrification, we studied wastewater denitrification by *Escherichia coli* expressing nitrite reductase. **[Methods]** Nitrite reductase was overexpressed by transformed a recombinant plasmid with *nir* gene in *E. coli*. Expression of nitrite reductase and metabolism of nitrite were studied by detecting the products in the whole cell of recombinant *E. coli*. To evaluate the function of recombinant *E. coli* used for shortcut nitrification, we measured the denitrification efficiency of the mixture consisting of the recombinant *E. coli* and YF14 that was a nitrifying and denitrifying bacterium. **[Results]** The recombinant *E. coli* could express nitrite reductase, reduced about 1 mmol/L nitrite within 2 hours and produced almost equal amounts of nitric oxide ( $OD_{600}=2.0$  bacterial suspension). When the recombinant *E. coli* and YF14 were mixed in equal proportions, the ammonia nitrogen removal efficiency increased by about  $(36.0\pm 7.4)\%$  within 12 hours, and the maximum accumulated amount of nitrite decreased by about 37%. Recombinant *E. coli* ( $OD_{600}=1.0$ ) significantly improved the ammonia nitrogen removal efficiency of activated sludge by about  $(31.0\pm 5.7)\%$  within 12 hours, and no nitrite and nitrate were detected. Oxygen supply affected ammonia nitrogen removal with optimal DO of  $(6.4\pm 0.7)$  mg/L. **[Conclusion]** Recombinant *E. coli* with nitrite reductase can contribute to the shortcut nitrification capacity of wastewater.

**Keywords:** nitrite reductase, *E. coli*, recombinant, shortcut nitrification, sewage, sludge, denitrification

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2012CQ011) and by the College Fund of Qufu Normal University (XJ201108)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-537-4458576; E-mail: Yufeng Xin, xinyufeng520@163.com; Xiaohua Qu, sduxuyf@126.com

Received: 16 February 2017; Revised: 23 April 2017; Published online: 27 April 2017