

传统生物脱氮反硝化过程的生化机理及动力学*

王淑莹** 孙洪伟 杨庆 彭永臻

(北京工业大学北京市水质科学与水环境恢复工程重点实验室 北京 100022)

摘要 传统生物脱氮是指以硝酸盐为电子受体的一系列生物还原反应过程, 该过程是在硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶和一氧化二氮还原酶的作用下完成的. 反硝化的生化机理及动力学是生物脱氮技术的理论基础. 为促进反硝化生物脱氮技术的进一步发展, 理解反硝化一系列复杂的生化反应过程及其电子传递、能量转化模式是十分必要而有意义的. 本文通过对反硝化生化反应过程相关机理的论述, 系统归纳了一个涉及多种酶及多种中间产物并伴随着电子(能量)传递的复杂反硝化生化反应过程, 详细总结分析了反硝化过程电子通过电子传递链从电子供体(NADH)传递到终端电子受体的传递模式, 以及借助于Peter提出的化学渗透假说建立的能量产生方式. 同时建议采用积分法和微分法来确定反硝化动力学参数 v_{\max, NO_3} , μ_{Dmax} , $K_{\text{S}, \text{NO}_3}$. 图1 参27

关键词 反硝化; 生化机理; 动力学; 电子传递

CLC X703.1

Biochemical Reaction Mechanism and Kinetics of Denitrification*

WANG Shuying**, SUN Hongwei, YANG Qing & PENG Yongzhen

(Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

Abstract Conventional biological denitrification includes a series of biological reduction processes with nitrate as electron acceptor, by the catalysis of corresponding nitrate reductase (NaR), nitrite reductase (NiR), nitric oxide reductase (NoR) and nitrous oxide reductase (N₂OR). The biochemical reaction mechanism and kinetics of denitrification are the theoretical foundation of biological nitrogen removal. In order to promote further development of biological nitrogen removal, it is necessary and significant to understand the complex biochemical reaction mechanisms of biological denitrification and its electron flow and energy production pathway. This paper, through the discussion of the complex mechanisms, puts forward the complex biochemical reaction process of biological denitrification, including many enzymes and various intermediate products, and involving electron flow (energy production), analyzes the electron transfer model in which electron transfers from NADH to terminal electron acceptor, and the type of energy production based on the chemiosmotic hypothesis established by Peter, and also proposes to adapt integral and differential methods to solve the kinetics constant values v_{\max, NO_3} , μ_{Dmax} , $K_{\text{S}, \text{NO}_3}$. Fig 1, Ref 27

Keywords denitrification; biochemical mechanism; kinetics; electron flow

CLC X703.1

反硝化过程是伴随电子传递而发生硝酸盐呼吸的生化反应过程^[1]. 从物质转化角度看, 硝酸盐通过异化硝酸盐还原作用将硝酸盐还原为一氧化氮、一氧化二氮和氮气. 从电子传递模式角度分析, 反硝化菌利用硝酸盐和亚硝酸盐中的+V价和+III价N作为电子受体, -II价O作为受氢体生成H₂O和OH⁻碱度, 从能量转化模式角度看, 有机物作为微生物生长的碳源、电子供体, 并提供能量. Sharma等^[2](1977)提出了反硝化的生化反应过程. Ye RW等^[3](1994), Loosdrecht等^[4](1998)从微生物角度对该生化反应过程进行了完善. Feleke等^[5]、Killingstad等^[6]和Rijn等^[7]众多学者对其进行了应用. Madigan等^[8](1997)对反硝化过程的电子传递模式进行了研究. 我国学者郑平^[9]也报道了反硝化过程的电子传递模式.

但目前系统论述反硝化过程的物质转化途径、电子传递模式、能量产生方式及相应酶特性的文献资料较少. 对于反硝化动力学常数, 目前普遍采用的是Henze和Grady (1987)推荐IAWPRC ASM模式I中的免误数值^[10]. 由于文献报道反硝化动力学参数范围较大, 结论也不尽相同. 因此, 在具体的试验过程中, 如何确定试验条件下的反硝化动力学参数显得尤为重要. 本文基于反硝化的物质转化途径、电子传递模式及能量产生方式三方面, 详述反硝化的生化反应机理, 同时给出确定反硝化动力学参数的方法, 从而为生物脱氮生化反应系统合理化、科学化的设计和运行奠定基础.

1 反硝化的生化机理

反硝化作用也称硝酸盐呼吸. 反硝化菌是硝酸盐呼吸的载体, 离开了反硝化菌, 硝酸盐呼吸也将不复存在^[9]. 反硝化菌在种类学上没有专门的类群. 很多细菌都被证明具有反硝化能力. 闫志英等^[11]对反硝化菌的类型及特性进行了详细的报道. Chun Chin Wang等^[12]在ABS废水处理厂中分

收稿日期: 2007-08-13 接受日期: 2008-04-19

*国家“十一五”科技支撑计划重点项目(No. 2006BAC19B03) Supported by the Key Technology R & D Program for the 11th Five-year Plan of China (No. 2006BAC19B03)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wsy@bjut.edu.cn)

离出降解己内酰胺的反硝化菌. Oskar Modina等^[13]发现了以甲烷为碳源的反硝化菌. 在细菌界, 反硝化菌属主要是Proteobacter门细菌和非Proteobacter门细菌, Proteobacter门下的 α -Proteobacteria纲、 β -Proteobacteria纲、 γ -Proteobacteria纲和 ϵ -Proteobacteria纲内都含有大量的反硝化菌. 近年来, 国外学者在反硝化的生化机理等方面进行了深入研究, 尤其是在反硝化菌的电子传递及能量产生模式等方面.

1.1 反硝化的物质转化途径

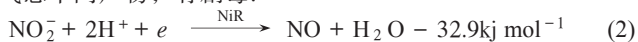
反硝化过程是一个涉及多种酶和多种中间产物并伴随着电子传递和能量产生的复杂生化反应过程. 大量研究表明, 反硝化是涉及4种酶(硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶、一氧化二氮还原酶)的四步生化还原反应.

首先, 硝酸盐在硝酸盐还原酶(Nitrate reductase, NaR)的作用下, 被还原成亚硝酸盐.



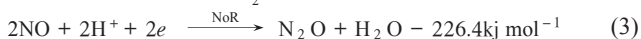
该反应中, 需要两个外源电子将硝酸盐中 N^{5+} 还原为亚硝酸盐中 N^{3+} , 同时脱下的一个 O^{2-} 与细胞质中水分解产生的 2H^+ 结合生成 H_2O . 反应放出 82.9 kJ mol^{-1} 的能量. NaR在革兰氏阴性菌中似乎是周质酶, 是膜结合蛋白, 他们的合成受 O_2 的限制, 只有在无氧的条件下才能合成. Kirstein等^[14]的研究表明, 反硝化菌细胞内存在两种硝酸盐还原酶, 即位于细胞膜内侧的膜内硝酸盐还原酶和位于细胞膜外侧的膜外硝酸盐还原酶. 两种硝酸盐还原酶在生理功能、催化活性中心等方面具有较大差异性, 但他们的亚单位中均含有钼(Mo)原子, Cyt b 或Cyt c .

第二步, 亚硝酸盐在亚硝酸盐还原酶(Nitrite reductase, NiR)的作用下被还原成NO, NO是反硝化过程中的第一个气态中间产物, 有毒害.



该反应需要一个电子将亚硝酸盐中 N^{3+} 还原成 N^{2+} , 同样需要 2H^+ 与 O^{2-} 结合生成 H_2O . NiR存在于细胞膜外细胞周质中, 似乎是周质酶^[15]. 有含 c 和 d_1 两种细胞色素的Cyt cd_1 型和含Cu催化中心的Cu型两种类型, 相对分子质量(M_r)为 120×10^3 和 36×10^3 . NiR的 M_r 为 63×10^3 , 适宜pH值为6.1^[16].

第三步, 在一氧化氮还原酶(NO oxidoreductase, NoR)的作用下, NO被还原成 N_2O .



该反应需要 $2e$ 和 2H^+ 将NO还原成 N_2O 和 H_2O . Walter^[17]等的研究表明, NoR位于细胞膜上, 是一种与膜结合的细胞色素 bc 复合物. 由两个 M_r 分别为 53×10^3 和 16.5×10^3 亚单位组成. 这两个亚单位分别与Cyt b 和Cyt c 结合, 同时该酶含有非血红素铁.

第四步, 在一氧化二氮还原酶(N_2O reductase, $\text{N}_2\text{O}R$)的作用下, N_2O 被还原成 N_2 .



该反应所需的 $2e$ 用于 N_2O (+I价N)到 N_2 (0价N)的还原, 生成了自然界中氮的最稳定形式—氮气. Patrick Wu等^[18]的研究表明, $\text{N}_2\text{O}R$ 为细胞周质酶, 是 M_r 为 67×10^3 的含有两个Cu活性中心同型二聚体. 反应放出 261.8 kJ mol^{-1} 的能量, 是

反硝化生化反应中放能最多的.

从以上生化反应看出, 在反硝化过程中, 共放出约 604 kJ mol^{-1} 的能量, 这些能量即使全部转化为ATP, 约可产生 11.5 mol ATP , 属于低级能源. 同时每步生化反应均涉及电子和质子的传递及能量的转化, 因此, 了解反硝化过程的电子传递和能量转化是十分必要的.

1.2 反硝化过程的电子传递模式

在反硝化物质转换途径的基础上, 结合其生化反应过程及电子传递模式图1, 详述反硝化的电子传递过程. 从生化反应式可以看出, 1 mol 硝酸盐还原为氮气需要7个电子和8个质子.

对于异养型的反硝化菌, 电子通过电子传递链^[8](由与细胞膜紧密结合的电子载体NADH, FP, FeS, CoQ, Cyt b , Cyt bc_1 复合物, Cyt c 等辅酶组成的电子传递系统)传递给终端电子受体硝酸盐. 要理解反硝化菌的电子传递, 首先清楚以下3方面内容: (1) 反硝化菌细胞膜内电子载体的还原电动势大小顺序如下^[19]: NAD^+/NADH (-0.32 V) < FP (-0.30 V) < FeS (-0.18 V) < Cyt $b_{ox/red}$ ($+0.030\text{ V}$) < Cyt bc_1 ($+0.032\text{ V}$) < CoQ/CoQH $_2$ ($+0.100\text{ V}$) < Cyt $c_{ox/red}$ ($+0.254\text{ V}$) < $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ($+0.433\text{ V}$). (2) 细胞色素和FeS在电子传递链中仅传递电子, 当电子通过两者时, 质子被泵出至膜外. CoQ(辅酶Q)即携带电子又携带质子^[20]. (3) NaR是从CoQ中获得电子的, 而NiR、NoR和 $\text{N}_2\text{O}R$ 均从Cyt c 中获得电子^[21-22].

结合图1描述反硝化菌的电子传递过程. 电子传递链的直接电子供体NADH随着NADH把 $2e$ 和 2H^+ 传递给FP, FP仅把 $2e$ 传递给FeS蛋白, 同时把 2H^+ 分泌出去. 在接受到FeS传递给 $2e$ 的同时, CoQ从细胞质中吸收两个来自水分解的质子. 从此位置开始, 电子传递将分两路进行. 其一是CoQ将两个电子传递给NaR中的Cyt b 使 NO_3^- 还原, 同时也向膜外排出两个质子. 其二是CoQ一次传递一个电子给Cyt bc_1 复合物, 而Cyt bc_1 复合物的重要功能就是把电子从CoQ传递给Cyt c , 然后, 电子以Cyt c 为节点, 首先传递给 $1e$ 给NiR内的Cyt cd_1 , 由于Cyt cd_1 一般只能催化转移一个电子的还原反应. 所以它从Cyt c 接受一个电子, 使 NO_2^- 还原成NO. 其次, Cyt c 把 $2e$ 给NoR内的Cyt bc . 最后, $\text{N}_2\text{O}R$ 内的Cu活性中心接受Cyt c 提供的 $2e$, 将电子传递给 $\text{N}_2\text{O}R$ 的另一个Cu活性部位, 使 N_2O 还原成 N_2 . 至此完成反硝化的电子传递. 在这里需要指出^[23]: 在电子传递过程中, Cyt bc_1 复合物和CoQ可形成CoQ- bc_1 位点的CoQ循环. 还原后的CoQ(CoQH $_2$)提供一个电子给Cyt bc_1 复合物, 同时排出一个质子使CoQH $_2$ 变成CoQ的半醌形式(CoQH), 每两个CoQH分子进入Cyt bc_1 复合物, 其中一个被Cyt bc_1 复合物中的Cyt b 吸收一个质子后还原成CoQH $_2$, 另一个被氧化成CoQ. 在电子传递链中, 通过这种机制循环, 电子可以自CoQ和Cyt bc_1 复合物之间进行穿梭, 每一个分子CoQH $_2$ 氧化成CoQH, 就有一个电子传递给Cyt c 和一个质子被排至膜外, 相应地增加了跨膜质子被排出的数量.

1.3 反硝化过程的能量转化

反硝化菌维持正常生理活动及合成新细胞所需的能量主要来源于生物体内的能量载体ATP^[24]. 反硝化过程能量产生

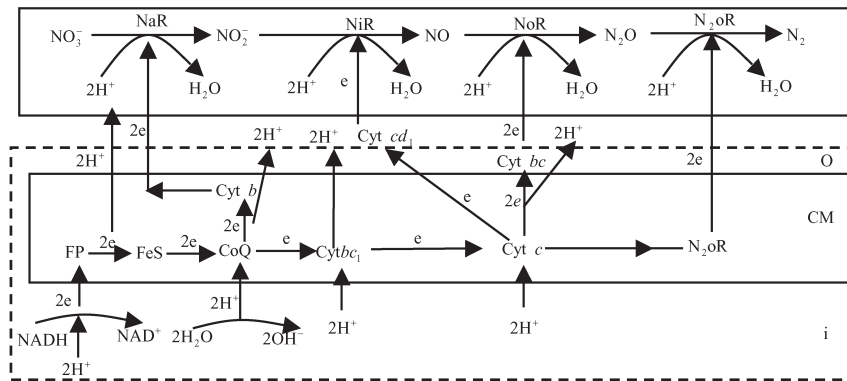


图1 反硝化的生化反应过程及电子传递模式

Fig. 1 Biochemical reaction of denitrification and electron flow pathway

CM: 细胞质膜; O: 细胞膜外部; i: 细胞膜内部; NaR: 硝酸盐还原酶; NiR: 亚硝酸盐还原酶; NoR: 一氧化氮还原酶; N_2oR : 一氧化二氮还原酶; Cyt-细胞色素; NAD: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸; FP-黄素蛋白; FeS: 铁硫蛋白; CoQ: 辅酶Q
 CM: Cytoplasmic membrane; O: Out of membrane; I: Internal of membrane; NaR: Nitrate reductase; NiR: Nitrite reductase; NoR: Nitric oxide reductase; N_2oR : Nitrous oxide reductase; Cyt: Cytochrome; NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide; FP: Flavoproteins; FeS: Iron-sulfur proteins; CoQ: Coenzyme Q

的机制遵循英国生物化学家Peter Mitchel提出的化学渗透假说^[25], 并伴随着质子动力的产生. 由于硝酸盐的还原电势(+0.42 V)低于 O_2 的还原电势(+0.82 V), 所以在传递单位电子合成ATP的数量上, 以硝酸盐为最终电子受体的低于以氧为最终电子最终的, 这也是反硝化菌的生长比率低于在硝化菌的生长比率的原因.

2 反硝化动力学

近年来, 国外学者对反硝化动力学的研究经历了一个循序渐进的过程, 在最初单一基质Monod方程^[26]的基础上, Barker等^[27]对反硝化动力学进行了充分的研究. 进行反硝化反应动力学研究的目的在于: (1) 确定硝酸盐利用速率与基质浓度之间的函数关系; (2) 确定反硝化菌增殖速率与基质浓度之间的函数关系; (3) 确定动力学参数 v_{max, NO_3^-} , $\mu_{D, max}$ 和 K_{S, NO_3^-} ; (4) 确定动力学参数与反应条件的关系.

2.1 反硝化菌的比增殖速率

反硝化生物反应过程中, 反硝化菌比增殖速率与硝酸盐浓度的关系可用Monod方程来表示, 同时根据反硝化菌比增殖速率的物理意义, 可得:

$$\mu_D = \frac{1}{X} \left(\frac{dx}{dt} \right)_r = \mu_{D, max} \frac{S}{K_{S, NO_3^-} + S} \quad (5)$$

式中, μ_D —反硝化菌比生长速率(d^{-1}); $\mu_{D, max}$ —反硝化菌最大比增殖速率(d^{-1}); X —生物体浓度($mg\ L^{-1}$); S —硝酸盐浓度($mg\ L^{-1}$); K_{S, NO_3^-} —半速率常数($mg\ L^{-1}$).

2.1.1 反硝化菌的净比增殖速率 考虑到反硝化菌的内源代谢作用, 其净增殖速率应为比增殖速率与自身分解速率之差.

$$u_{net} = \mu_D - K_d \quad (6)$$

式中, u_{net} —反硝化菌的净比增殖速率(d^{-1}), K_d —内源代谢系数(d^{-1}), 其他符号定义同前.

反硝化菌的污泥龄与净比增殖速率成反比, 即

$$\theta_c = \frac{1}{u_{net}} = \frac{1}{\mu_D - K_d} \quad (7)$$

式中, θ_c —污泥龄(d), 其他符号定义同前. 需要指出的是, 为维持活性污泥菌群中反硝化菌的数量, 最小污泥龄应不小于反硝化菌的净比增殖速率的倒数, 即

$$\theta_{cmin} \geq \frac{1}{u_{net}} = \frac{1}{\mu_D - K_d} \quad (8)$$

美国环保局推荐的反硝化过程中反硝化菌的内源代谢系数 K_d 为 $0.04\ d^{-1}$ ^[2].

2.1.2 反硝化菌增殖动力学参数 $\mu_{D, max}$, K_{S, NO_3^-} 的确定 对实际生物处理系统中的反硝化反应, 其动力学参数应通过试验确定. 在参考活性污泥动力学参数的确定方法和相关资料的基础上, 笔者建议采用积分法和微分法来求解特定生化反应条件下的反硝化菌增殖的动力学参数.

(A) 积分法

如果动力学实验中测定了微生物浓度 x 与时间 t 的关系, 可以采用积分—一元回归图解法. 就是将动力学方程进行积分求得积分式, 再将其线性化, 然后把试验数据带入坐标系内作图, 进行线性回归, 据此求取动力学参数. 具体步骤如下:

(a) 反硝化菌的增殖速率表示为:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{D, max} \frac{SX}{K_{S, NO_3^-} + S}$$

(b) 将上式两边分别对 x 、 t 积分得积分式并取倒数:

$$\frac{t}{\ln x - x_0} = \frac{K_{S, NO_3^-}}{\mu_{D, max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{D, max}} \quad (9)$$

(c) 作图求取参数值

可将式(9)按直线方程 $y=ax+b$ 考虑, 以 $\frac{1}{S}$ 为横坐标, 以 $\frac{t}{\ln x - x_0}$ 为纵坐标作图. 在试验过程中, 测定不同时刻混合液的硝酸盐浓度及污泥浓度, 将测得的数值带入相应的横、纵坐标, 得多组数据, 然后在坐标系内作图, 按一元线性回归的方法进行归纳整理, 所得直线的斜率为 $\frac{K_{S, NO_3^-}}{\mu_{D, max}}$, 横坐标轴上的截距为 $-\frac{1}{K_{S, NO_3^-}}$, 纵坐标轴上的截距 $\frac{1}{\mu_{D, max}}$, 通过这些数据联立求取动力学参数值.

(B) 微分法

微分法是根据不同的试验条件下测得的反应速率, 直接由速率方程计算参数值. 在动力学试验中, 如果测定一定时间范围内反硝化菌浓度, 计算出相应的比增殖速率, 然后采用微分法来确定动力学参数. 具体步骤如下:

(a) 首先测定、计算一定时间范围内的微生物浓度, 然

后采用公式(10)来确定微生物的比增殖速率.

$$\mu_{Dt} = \frac{1}{\bar{x}} \frac{\Delta x}{\Delta t} \quad (10)$$

式中, μ_{Dt} —测定时间段内微生物的比增殖速率[g(新细胞) g⁻¹(细胞) d⁻¹]; \bar{x} —测定时间段内微生物的平均浓度(mg VSS L⁻¹); Δx —测定时间段内微生物浓度的变化量(mg VSS L⁻¹).

(b) 将反硝化菌的比增殖速率表示为:

$$\mu_D = \mu_{D, \max} \frac{S}{K_{S, NO_3^-} + S}$$

两边取倒数得:

$$\frac{1}{\mu_D} = \frac{K_{S, NO_3^-}}{\mu_{D, \max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{D, \max}} \quad (11)$$

(c) 将(11)式以1/S~1/ μ_D 作图, 通过在横、纵坐标轴上的截距, 联立方程确定动力学参数.

2.2 硝酸盐的利用速率

硝酸盐利用速率按物理意义考虑, 可用下式表示:

$$v_{NO_3^-} = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (12)$$

式中, $v_{NO_3^-}$ —硝酸盐的比利用速率[mg(NO₃⁻) mg(VSS)⁻¹ d⁻¹], 其他符号定义同前.

硝酸盐的比利用速率与反硝化菌的比增殖速率通过反硝化菌的产率系数相关联, 见下式

$$Y_D = -\frac{dX}{dt} / \frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_D}{v_{NO_3^-}} \quad (13)$$

式中, Y_D —反硝化菌的产率系数[mg(VSS) mg(NO₃⁻)⁻¹]; 美国环保局提出反硝化过程中反硝化菌的产率系数 Y_D 为0.6~1.2^[2], 其他符号定义同前.

将(12)式变形, 并与(6)式组合可得:

$$v_{NO_3^-} = -\frac{\mu_D}{Y_D} = -\mu_{D, \max} \frac{S}{K_{S, NO_3^-} + S} \times \frac{1}{Y_D} = -\frac{\mu_{D, \max}}{Y_D} \frac{S}{K_{S, NO_3^-} + S} \quad (14)$$

令 $v_{D, \max} = \frac{\mu_{D, \max}}{Y_D}$, 则式(14)可改写成如下形式:

$$v_{NO_3^-} = -v_{\max, NO_3^-} \frac{S}{K_{S, NO_3^-} + S} \quad (15)$$

式中, v_{\max, NO_3^-} —硝酸盐的最大比利用速率.

2.2.1 硝酸盐利用速率方程的修正 反硝化菌比例的修正: 在生物处理系统中, 利用前置缺氧反应器接受废水进水, 而在后置的好氧反应器进行硝化反应. 由于反硝化异养菌在缺氧段和好氧段均可生长, 并分别还原硝酸盐和氧气, 但其中有一部分既能利用硝酸盐又能利用氧气作为电子受体, 所以必须考虑在缺氧段只有一部分生物体具有活性这一事实, 因此应将硝酸盐利用速率表达式进行修正.

$$v_{NO_3^-} = -v_{\max, NO_3^-} \frac{\eta S}{K_{S, NO_3^-} + S} \quad (16)$$

式中, η —生物体中反硝化菌的比例.

在处理生活污水的前置缺氧脱氮反应器中发现^[2]: η 介于0.2~0.8之间, 影响 η 的因素包括污泥的性状、系统SRT和随硝酸盐一起所去除的进水BOD的百分率. 对于后置缺氧悬浮生长或附着生长工艺, 在以缺氧为主导的条件下, 并用一种有选择性的单一基质培养生物体, 在这种情况下由于微生物主要有反硝化菌组成, η 并不是必需的.

溶解氧浓度的修正: 溶解氧可通过抑制硝酸盐还原酶来抑制硝酸盐的还原, 在液体主流中当DO浓度很低(<0.2 mg/L)时, 活性污泥絮体上的反硝化过程仍可进行. 当DO高

于0.2 mg L⁻¹时, 会抑制假单胞菌属的反硝化作用, 所以硝酸盐和DO对硝酸盐对生物动力学的可用公式(17)乘以两个修正因子并以饱和形式表示如下:

$$v_{NO_3^-} = v_{\max, NO_3^-} \frac{S}{K_{S, NO_3^-} + S} \left(\frac{NO_3^-}{K_{S, NO_3^-} + NO_3^-} \right) \left(\frac{K'_0}{K'_0 + DO} \right) \quad (17)$$

式中, K'_0 —DO对硝酸盐还原过程的抑制系数, 是系统的特征系数, 建议值为0.1~0.2 mg L⁻¹; K_{S, NO_3^-} —硝酸盐限制反应的半速率常数, 建议值为0.1 mg L⁻¹^[28]; 其他符号定义同前.

2.2.2 硝酸盐利用动力学参数 v_{\max, NO_3^-} 、 K_{S, NO_3^-} 的确定 对于硝酸盐利用动力学参数 v_{\max, NO_3^-} 、 K_{S, NO_3^-} 的确定, 同样采用积分法和微分法.

(A) 积分法

如果动力学实验中所测得的数据是硝酸盐浓度S与时间t的关系时, 笔者建议采用积分一元回归图解法. 具体步骤如下:

(a) 将(11)式和(13)式联立, 硝酸盐利用速率表示为:

$$-\frac{dS}{dt} = v_{\max, NO_3^-} \frac{SX}{K_{S, NO_3^-} + S}$$

(b) 积分并整理得:

$$\ln \frac{S_0}{S_t} = \frac{v_{\max, NO_3^-}}{K_{S, NO_3^-}} \frac{t}{(S_0 - S_t)} - \frac{1}{K_{S, NO_3^-}} \quad (18)$$

式中: S_0 —在t=0时刻硝酸盐浓度(mg L⁻¹); S_t —在t时刻硝酸盐浓度(mg L⁻¹); 其他符号定义同前.

(c) 作图求取参数值

同样, 可将式(18)按直线方程 $y=ax+b$ 考虑, 以 $\frac{Xt}{S_0 - S_t}$ 为横坐标, 以 $\frac{\ln \frac{S_0}{S_t}}{(N_0 - N_t)}$ 为纵坐标. 在试验过程中, 测定不同时刻混合液的硝酸盐浓度值、污泥浓度值, 将测得的数值带入相应的横、纵坐标项, 可以得到多组数据, 坐标系内作图, 然后按一元线性回归的方法进行归纳整理. 所得直线的斜率为 $\frac{v_{\max, NO_3^-}}{K_{S, NO_3^-}}$, 在横坐标轴上的截距 $\frac{1}{v_{\max, NO_3^-}}$, 纵坐标轴上的截距为 $-\frac{1}{K_{S, NO_3^-}}$, 通过这些数据求取动力学参数.

(B) 微分法

在动力学试验中, 测定一定时间范围内硝酸盐浓度, 计算出相应的比利用速率, 就可以采用微分法来确定动力学参数. 具体步骤如下:

(a) 首先测定计算一定时间范围内硝酸盐浓度, 直接采用下式来确定硝酸盐的比利用速率.

$$v_{NO_3^-, t} = \frac{1}{\bar{x}} \frac{\Delta S}{\Delta t} \quad (19)$$

式中, $v_{NO_3^-, t}$ —测定时间段内硝酸盐比利用速率[mg(NO₃⁻) mg(VSS)⁻¹ d⁻¹]; \bar{x} —测定时间段内微生物的平均浓度[mg(VSS) L⁻¹]; ΔS —测定时间段内硝酸盐浓度的变化量(mg L⁻¹);

(b) 硝酸盐的比利用速率表示为:

$$v_{NO_3^-, t} = v_{\max, NO_3^-} \frac{S}{K_{S, NO_3^-} + S}$$

两边取倒数得:

$$\frac{1}{v_{NO_3^-, t}} = \frac{K_{S, NO_3^-}}{v_{\max, NO_3^-}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max, NO_3^-}} \quad (20)$$

(c) 将(20)式以1/S~1/ $v_{NO_3^-, t}$ 作图, 通过横、纵坐标上的截距, 联立方程求解, 可确定动力学参数.

采用上述的试验方法进行动力学系数的测定, 评定实

实际条件的反硝化动力学参数值.在试验过程中实测的动力学常数与文献参考值可能会有一定的偏差,都属于正常的试验现象.很多学者的研究已证明了这一点.

3 结语

反硝化是一个涉及4种酶即硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶和一氧化二氮还原酶的四步复杂生化还原反应.在生化反应过程中,电子通过电子传递链由直接电子供体NADH传递给终端电子受体 NO_3^- ,使 NO_3^- 还原成 N_2 .在电子传递的过程中,伴随质子从膜内向膜外的迁移,形成了质子动力,促进ATP的合成.但由于硝酸盐电子受体比 O_2 电子受体具有较低的正还原电势,所以反硝化反应过程中有效自由能变化比较小,故合成较少数量的ATP.在一定的条件下,反硝化菌增殖速率和硝酸盐利用速率可用米-门方程和Monod方程来描述.在确定反硝化菌污泥龄时,要采用反硝化菌的净比增殖速率.对于硝酸盐利用速率要考虑溶解氧浓度对其的影响.如前置反硝化,还要对生物体中反硝化菌的比例进行修正,以获得符合实际实验条件下的动力学参数.

通过对反硝化生化机理、电子传递模式及动力学研究,有助于人们对反硝化反应的深入理解,从而创造出反硝化反应的适宜条件,以此促进生物脱氮理论、技术的进一步发展,为实现可持续污水生物脱氮技术奠定基础.

References

- Eddy M. Wastewater Engineering Treatment and Reuse. 4th ed. Beijing: Qingshua University Press, 2003
- Sharma B, Ahlert RC. Nitrification and nitrogen removal. *Water Res*, 1977, **11** (10): 897-925
- Ye RW, Avriil BA, Tiedje JM. Denitrification: Production and consumption of nitric oxide. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** (4): 1053-1058
- Loosdrecht MC, Jetten SM. Microbiological conversion in nitrogen removal. *Water Sci Technol*, 1998, **38**: 1-8
- Feleke Z, Sakakibara Y. A bio-electrochemical reactor coupled with adsorber for the removal of nitrate and inhibitory pesticide. *Water Res*, 2002, **36**: 3092-3102
- Killingstad MW, Widdowson MA, Smith RL. Modelingenhanced *in situ* denitrification in groundwater. *Environ Eng*, 2002, **128** (6): 491-504
- Rijn JV, Tal Y, Schreier HJ. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacul Eng*, 2006, **34**: 364-376
- Madigan MT, Martinko M, Parker J. Brock Biology of Microorganisms. Beijing: Scientific Publisher, 1997
- 郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术. 北京: 科学出版社, 2004
- Henze M, Grady CPL. Activated Sludge Model No1, IAWPRC Scientific and Technical Report, No 1. IAWPRC, London, 1987
- Yan ZY (闫志英), Liao YZ (廖银章), Li XD (李旭东), Liu XL (刘晓凤), Yuan YX (袁月祥), Song L (宋丽). Progress in research of biological removal of nitrogen. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2006, **12** (2): 292-296
- Wang CC, Lee CM. Isolation of the ϵ -caprolactam denitrifying bacteria from wastewater treatment system manufactured with acrylonitrile-butadiene-styrene resin. *J Hazardous Mat*, 2007, **145**: 136-141
- Modina O, Fukushib K, Yamamoto K. Denitrification with methane as external carbon source. *Water Res*, 2007, **41** (12): 2726-2738
- Kirstein K, Bock E. Close genetic relation and characterization of the periplasmic reductase from *Thiosphaerchia coli* nitrate reductase. *Arch Microbiol*, 1993, **160**: 447-453
- Jong OK, John U, Rick WY. Diversity of oxygen and N-oxide regulation of nitrite reductases in denitrifying bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **156** (1): 55-60
- Qiu XY, Hurt RA, Wu LY, Chen CH, Tiedje JM, Zhou JZ. Detection and quantification of copper-denitrifying bacteria by quantitative competitive PCR. *J Microbiol Methods*, 2004, **59** (2): 199-210
- Walter G, Zumft, Peter MH. Kroneck respiratory transformation of nitrous oxide (N_2O) to dinitrogen by bacteria and archaea. *Adv Microb Physiol*, 2006, **52**: 107-227
- Wunsch P, Körner H, Neese F, Van R J, Kroneck P M, Zumft W G. NosX function connects to nitrous oxide (N_2O) reduction by affecting the Cu_z center of NosZ and its activity *in vivo*. *FEBS Lett*, 2005, **579** (21): 4605-4609
- Grady CPL, Daigger GT, Lim HC. Biological Wastewater Treatment. 2nd ed. Beijing: Chemical Industrial Press, 2003. 258-300
- Joliot P, Joliot A. Electrogenic events associated with electron and proton transfers within the cytochrome b6/f complex. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2001, **1503** (3): 369-376
- Reimann J, Flock U, Lepp H. A pathway for protons in nitric oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochim et Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2007, **1767** (5): 362-373
- Menyhárd DK, Keserü GM. Binding mode analysis of the NADH cofactor in nitric oxide reductase: A theoretical study. *J Mol Graphics & Modelling*, 2006, **25** (3): 363-372
- Zumft WG, Kroneck PMH. Respiratory transformation of nitrous oxide (N_2O) to dinitrogen by bacteria and archaea. *Adv Microb Physiol*, 2006, **52**: 107-227
- Seviour RJ, Blackall LL. The microbiology of activated sludge. Australia: Kluwer Academic Publishers, 1999. 287-288
- Mitchel P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transport by a chemiosmotic type of membrane possible function of chains of catalysts. *Nature*, 1961, **191**: 144-148
- Monod. The growth of bacteria cultures. *Annu Rev Microbiol*, 1949, **3**: 371-394
- Bark PS, Dold PL. General model for biological nutrient removal in activated sludge system: Model presentation. *Water Environ Res*, 1997, **68** (5): 969-984