

地下水硝酸盐去除中反硝化微生物的研究进展*

李发东¹ 张妍^{1,2} 李静¹

(1. 中国科学院地理科学与资源研究所 中国科学院生态系统网络观测与模拟重点实验室 北京 100101;

2. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 地下水硝酸盐污染已经成为一个全球问题,由于饮用高硝酸盐含量的地下水会增加高铁血红蛋白症和癌症风险,地下水硝酸盐污染受到越来越多的关注。反硝化脱氮是地下水硝酸盐脱氮的主要途径之一。本文就参与地下水硝酸盐去除的反硝化微生物种类、反硝化机理、碳源类型以及地下水污染中微生物作用的国内外研究现状进行了较全面系统的评述。在此基础上,提出了该类研究中存在的不足,包括实验室研究较多但野外研究较少,野外原位应用中对特定微生物特性方面研究缺乏,碳源利用率低和硝酸盐去除速度慢,去除过程中有效微生物的代谢途径仍不清楚等问题。针对这些问题,本文认为以后的研究应该进一步开发野外原位应用中反硝化微生物资源,并借助先进的分子方法和功能基因鉴定此类特殊微生物的种类、功能及其生态学行为,选择最佳碳源,完整深入地理解地下水硝酸盐去除中微生物的代谢过程,识别反硝化过程中氮的来源与去向,为寻找提高处理效率的方法提供理论依据,真正将理论和实践结合起来。

关键词 地下水 硝酸盐 反硝化 微生物 碳源类型

中图分类号: X523 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2013)01-0110-09

Research review of denitrifying microorganisms of groundwater to nitrate denitrification

LI Fa-Dong¹, ZHANG Yan^{1,2}, LI Jing¹

(1. Key Laboratory of Ecosystem Network Observation and Modeling, Chinese Academy of Sciences; Institute of Geographic Sciences and Natural Resources Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract There has been an increasing global trend in nitrate contamination of groundwater, and especially in China. This has raised concern for increased nitrate-caused methemoglobinemia and cancer. Available technical data and experience have indicated that denitrification was a more acceptable method for nitrate removal than reverse osmosis and ion exchange. This paper systematically reviewed the denitrifying micro-organisms, denitrification mechanisms, carbon sources, and laboratory/field-scale nitrate removal processes for effective denitrification of groundwater. Key problems with previous studies were also pointed out. As the reviewed showed that there were more related laboratory research than field research, information on the characteristics of specific micro-organisms involved in on-site nitrate removal from groundwater was limited. In addition, the utilization ratio of carbon sources was low and nitrate removal rate from groundwater was also slow. Despite the above issues, metabolic pathways of effective denitrifying micro-organisms used in nitrate removal from groundwater were still unclear. Hence the proposed relevant suggestions included: 1) In situ exploitation of denitrifying micro-organisms. Identification of the specific functions and ecological behaviors of micro-organisms via advanced molecular methods and function gene analyses. 2) Selection of the best sources of carbon and metabolic processes of microorganisms during nitrate removal from groundwater. 3) Clarification of the denitrification processes of nitrogen transformation in groundwater. All the above suggestions provided the basis of the theory of nitrite removal from groundwater, making both the theory and practice more reliable combination.

Key words Groundwater, Nitrate, Denitrification, Micro-organism, Carbon sources

(Received Jul. 27, 2012; accepted Sep. 2, 2012)

* 中国科学院“百人计划”项目与国家自然科学基金项目(41271047)资助

李发东(1972—),男,博士,研究员,博士生导师,主要研究方向为生态水文与水环境。E-mail: lifadong@igsnr.ac.cn

收稿日期: 2012-07-27 接受日期: 2012-09-02

长期使用高硝酸盐含量的饮用水, 可导致婴儿血红蛋白增高, 也可能引起成年人与此相关的癌病发生^[1]。目前, 硝酸盐含量超标已成为许多国家和地区地下水污染的一种主要形式^[2]。例如, 英国近一百万人口的饮用水源中硝酸盐浓度超过欧盟组织规定的最大允许浓度 $[11.3 \text{ mg(N)}\cdot\text{L}^{-1}]$ ^[3]。加拿大农村井水中有 14% 硝酸盐浓度超标^[4]。美国一些地区地下水硝酸盐含量也可高达 $500\sim 700 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[5]。巴基斯坦 26% 井水硝酸盐含量超过世界卫生组织规定的最大允许水平 ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)^[6]。中国浅层地下水约有 50% 地区遭到一定程度的硝酸盐污染, 地下水水质呈下降趋势^[7]。据报道, 北京地区浅层地下水中硝酸盐含量大于 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的地区超过研究面积的 30% 以上^[8]。黄河三角洲地区地下水中硝酸盐的浓度高达 $101 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[9]。

鉴于地下水硝酸盐污染的现状及其严重危害, 如何有效降低甚至去除地下水硝酸盐受到越来越多的关注, 尤其是生物反硝化脱氮技术因其高效低耗的特点被广为研究^[10-11], 在反硝化脱氮过程中微生物起着至关重要的作用^[12], 反硝化微生物可降低污染地下水中的含氮污染物浓度^[13], 削减因硝酸盐或亚硝酸盐的积累对生物的毒害作用, 减少富营养化的发生机率, 对于水质保护有重要意义^[14]。近年来, 国内外学者已经对地下水硝酸盐污染的现状^[15-17]和生物脱氮技术进展^[18-19]作了系统总结。然而, 对反硝化微生物在地下水硝酸盐脱氮过程中的研究鲜有全面总结。本文综述了反硝化微生物在地下水硝酸盐脱氮中的研究进展, 以期对认识和掌握地下水硝酸盐污染防护及治理, 改善居民饮用水质量提供参考。

1 反硝化微生物的种类

能够还原硝酸盐或亚硝酸盐, 产生 N_2O 或 N_2 的微生物, 称为反硝化微生物。反硝化微生物以反硝化细菌为主。据报道已分离的具有反硝化功能的细菌包括 50 多个属、130 多个种, 自然界最普遍的有产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、假单胞菌属(*Pseudomonaceae*)、科奈瑟菌科(*Neisseriaceae*)、硝化细菌科(*Nitro bacteriaceae*)^[20]、红螺菌科(*Rhodospirillaceae*)和芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)等。除反硝化细菌外, 某些真菌和放线菌也具有反硝化作用, 如镰刀菌(*Fusarium*)、酵母菌(*Saccharomyces*)^[21]和链霉菌属(*Streptomyces*)^[22]等。地下水硝酸盐去除过程中, 反硝化菌通常需要一些有机或无机物质作为能源。根据生长碳源不同, 将反硝化细菌分为异养反硝化菌和自养反硝化菌。

多数反硝化细菌属于异养反硝化菌。异养反硝化菌根据其生长特性可分为厌氧、好氧与自养反硝化菌。在好氧、厌氧或缺氧条件下, 它们通过不同的呼吸途径利用有机碳源进行反硝化作用。厌氧反

硝化细菌利用硝酸盐中的氧进行呼吸, 氧化分解有机物, 将硝态氮还原为 N_2 或 NO_2 。其中, 属假单胞菌属(*Pseudomonas*)的种类最多, 如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)、门多萨假单胞菌(*P. mendocina*)、绿针假单胞菌(*P. chlororanhis*)和致金假单胞菌(*P. aureofaeiens*)。好氧反硝化菌是利用好氧反硝化酶的作用, 在有氧条件下进行反硝化作用的一类异养菌。近年来研究颇多, 好氧反硝化菌分布广泛, 可适应多种生境, 多为好氧或兼性好氧。具有好氧反硝化功能的菌株主要分属副球菌属(*Paracoccus*)、假单胞菌属、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)等^[23]。表 1 列举了目前在水体中发现的一些好氧反硝化菌种类。好氧反硝化菌和厌氧反硝化菌在地下水硝酸盐去除应用中有些差异: (1) 反应产物不同, 好氧反硝化菌反硝化的主要产物是 N_2O , 而厌氧反硝化菌的反硝化主要产物是 N_2 ; (2) 好氧反硝化菌能在好氧条件下进行反硝化, 使其与硝化能够同时进行, 而厌氧反硝化菌只能在厌氧条件下发生反硝化; (3) 好氧反硝化菌比厌氧反硝化菌的反硝化速率慢; (4) 电子最终受体不同, 好氧反硝化菌可以 NO_3^- 或 O_2 作为电子受体, 而好氧反硝化菌不能以 O_2 作为电子受体。

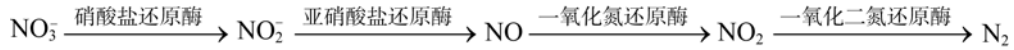
表 1 反硝化微生物中的好氧反硝化菌及其来源
Table 1 Aerobic denitrifiers and their sources of denitrifying microorganisms

种类 Type	菌株名称 Microorganism name	来源 Source	参考文献 Reference
副球菌属 <i>Paracoccus</i>	<i>P. denitrificans</i>	废水 Waste water	[24]
	<i>Paracoccus</i> sp. KS2	废水 Waste water	[25]
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	地下水 Groundwater	[26]
	<i>P. nautical</i>	废水 Waste water	[26]
	<i>P. stutzeri</i> TR2	废水 Waste water	[27]
	<i>P. carboxydohydrogena</i>	污水池 Sewage tank	[28]
产碱杆菌属 <i>Alcaligenes</i>	<i>A. faecalis</i>	废水 Waste water	[24]
	<i>A. faecalis</i> No. 4	下水道 Drainage	[29]
	<i>A. faecalis</i> sp. STC1	污水 Waste water	[30]
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> W2	鱼塘水 Fishpond water	[31]

自养反硝化菌是能够利用一些无机物(如 CO_2 或 HCO_3^-)在氧化过程中释放出来的能量将硝酸盐还原进行反硝化作用的细菌^[32], 如脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)、反硝化硫微螺菌(*Thiomicrospira denitrificans*)、亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、布兰汉氏菌属(*Branhamella catarrhalis*)、奈氏球菌属(*Gemmis oceanospirillum*)等^[33]。

在地下水硝酸盐去除应用中自养反硝化菌较异养菌具有三大优势: 一是自养反硝化菌的反硝化速

率是异养反硝化的 2 倍^[34]；二是自养反硝化菌在地下水硝酸盐去除过程中只产生极少量的污泥，可使污泥的处理量降低到最低^[35]；最重要的是自养反硝化不需要投加有机物作为碳源^[36]，大大降低污水处理的成本。然而，目前对自养反硝化菌的研究较少，未来应该加强这方面研究。



催化这 4 步反应的酶分别是硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶、一氧化氮还原酶和一氧化二氮还原酶，它们相对应的编码基因分别是 *nar*、*nir*、*nor* 和 *nos*，这些基因被用来作为研究反硝化微生物种群组成的靶序列。这 4 种酶的类型结构都已经被鉴定(表 2)。其中亚硝酸盐还原酶基因 *nirK* 和 *nirS* 催化反硝化过程中最关键的一步反应——由亚硝酸盐转化为氧化氮，是反硝化微生物最为重要的功能基因。有些反硝化微生物只具有硝酸盐还原酶，故只能将 NO_3^- 还原至 NO_2^- ，如无色杆菌属(*Photobacterium*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、琼脂杆菌属(*Agarobacterium*)和芽孢杆菌属等；而其他类群由于具有反硝化中的全部酶系，因此能将 NO_3^- 还原成 N_2 ，如微球菌属、丙酸杆菌属、螺菌属等^[38]。由于 *nosZ* 编码的一氧化二氮还原酶能催化还原 N_2O 的同时生成 N_2 ，而 N_2O 是一种重要的温室气体，因此利用反硝化微生物去除地下水硝酸盐途径中的特殊酶(*nos*)和产物(N_2O)来解读温室气体也应得到广泛研究。

3 反硝化过程中的碳源类型

当环境中存在分子态氧时，反硝化微生物利用分子态氧作为最终电子受体氧化分解有机物。在无分子态氧存在时，则利用硝酸盐和亚硝酸盐作为电子受体，以有机物作为碳源及电子供体提供能量^[40,44]。地下水中反硝化作用通常发生在厌氧或兼性厌氧并含足够溶解有机碳(dissolved organic carbon, DOC)的水环境中。因此，必须提供合适的碳源以增加微生物的数量和提高微生物活性。当地下水中的硝酸盐氮流经反硝化墙时，反硝化菌就会利用碳源作为电子供体，硝酸盐作为最终电子受体被去除。一般当生物需氧量/凯氏氮(BOD_5/TKN) $>3\sim 5$ h，则认为碳源充足，否则需要再加碳源。碳源来自外投有机碳源、水体本身含有的有机碳源以及微生物本身分解提供的有机质。但由于天然地下水有机碳的含量有限，要达到大量和高效的去除目的，就必须向地下水中添加有机碳^[45]。一直以来，寻找合适的有机碳源是生物脱氮的研究热点。研究较多的液体碳

2 反硝化微生物去除地下水硝酸盐的作用机理

反硝化微生物在一系列酶的催化作用下将硝酸盐氮或亚硝酸盐氮还原成 N_2O 或 N_2 的过程，称为反硝化作用^[37]。

反硝化过程由 4 步反应组成：

源有甲醇^[46]、乙醇^[47]、乙酸^[48]和葡萄糖^[49]等。甲醇和乙醇相对于葡萄糖可增加反硝化活性，但甲醇有毒，所以乙醇是最好的液体碳源^[50]。虽然这些液体碳源在地下水生物脱氮领域取得了很好的效果，但液体碳源的使用会带来较高的运行成本且未完全反应的碳源也可能造成地下水的二次污染^[46]，这在一定程度上增加了工艺难度。固体碳源既能根据微生物的需求提供碳源，还能作为生物附着载体，提高反硝化菌的密度和活性。这些固体碳源包括人工合成的高聚物[聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)和聚 ϵ -己内酯(poly ϵ -caprolactone, PCL)等]^[13,51]、生物体内合成的高聚物聚羟基烷酸(poly-hydroxy-alkanoates, PHAs)^[52]和一些纤维素物质(棉花、报纸和秸秆等)^[53-57]。沈志红等^[58]选取麦秸、锯末、乙醇作为碳源，比较了这 3 种物质单独或两两组合作为碳源的情况下，生物反硝化去除模拟地下水中硝酸盐的效果。发现添加 0.5%的乙醇对以锯末为碳源的反应体系比单独添加锯末或乙醇反应体系的硝酸盐去除具有显著促进作用。另外，玉米秸秆加上豆油比单独的玉米秸秆作为碳源，地下水中硝酸盐去除效果更显著^[59]。因此，未来研究还应该着力于对多种不同比例的碳源混合提高反硝化微生物活性的研究，以及深入了解环境条件(如 pH 以及盐分浓度等因素)对微生物利用碳源效果的影响。

在已有研究中，由于木材制品(如锯屑和木片)具有成本低、渗透性强、高碳氮比(不同木材的碳氮比范围为 30 : 1~300 : 1^[60])和坚固^[61]等优点，一般作为野外原位试验的碳源；而室内试验主要使用纤维素和乙醇等作为反硝化反应系统中的碳源。截止到目前，除木材制品外的绝大部分碳源只应用于室内试验研究，并未在原位治理中应用。今后应该加强碳源在野外原位试验中的应用研究，探寻在原位治理硝酸盐污染的最佳碳源。

4 反硝化速率的测定

反硝化能力通常用反硝化速率来衡量^[18-19]。反硝化速率的测定方法主要包括：(1)乙炔(C_2H_2)抑制法。该方法通过添加 C_2H_2 抑制 N_2O 进一步还原为

表 2 反硝化过程中酶的名称、类型、表达条件、结构和编码基因以及研究实例
Table 2 The name, type, expression, configuration and coding genes and study cases of denitrifying enzymes

名称 Name	类型 Type	表达条件 Expression condition	酶结构和编码基因 Configuration and coding gene	研究实例 Case study
硝酸还原酶 Nitrate reductase	周质硝酸还原酶 Periplasmic nitrate reductase	好氧和厌氧 Aerobic and anaerobic condition	由 <i>napA</i> 和 <i>napB</i> 两个亚基组成。 <i>NapA</i> 由 <i>napA</i> 基因编码, <i>napB</i> 是二血红素细胞色素 C ₅₅₂ 。 Configuration is composed by two subunits (<i>napA</i> and <i>napB</i>). Coding gene of <i>NapA</i> is <i>napA</i> while that of <i>napB</i> is C ₅₅₂ .	富养罗尔斯通氏菌(<i>Palstonia eutropha</i>)、红杆菌属(<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)和流感嗜血杆菌(<i>Haemophilus influenzae</i>)编码周质硝酸还原酶的基因先后被鉴定 ^[39] 。 Coding genes of the periplasmic nitrate reductase for <i>P. eutropha</i> , <i>R. sphaeroides</i> and <i>H. influenzae</i> were identified ^[39] .
	膜结合硝酸还原酶 A membrane-bound nitrate reductase	厌氧 Anaerobic condition	由 α 、 β 和 γ 3 个亚基组成。 α 亚基由 <i>narG</i> 编码, β 亚基由 <i>narH</i> 编码, γ 亚基由 <i>narI</i> 编码。 Configuration is composed by α , β and γ subunits, whose coding gene is <i>narG</i> , <i>narH</i> and <i>narI</i> , respectively.	目前已经在铜绿假单胞菌(<i>P. aeruginosa</i>)、脱氮副球菌(<i>Paracoccus denitricans</i>)、施氏假单胞菌(<i>P. stutzeri</i>)、荧光假单胞菌(<i>P. fluorescens</i>)和大肠杆菌(<i>E. coli</i>)等方面进行了研究 ^[40] 。 There are many studied related membrane-bound nitrate reductase for <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. denitricans</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. fluorescens</i> and <i>E. coli</i> ^[40] .
亚硝酸还原酶 Nitrite reductase	血红素亚硝酸还原酶 Heme nitrate reductase	有氧或无氧 Aerobic or anaerobic condition	由 <i>nirS</i> 基因编码。 Coding gene is <i>nirS</i> .	Moir 等 ^[41] 报道 <i>T. pantotropha</i> 细胞中均含有一种亚硝酸还原酶, 并鉴定为细胞色素 <i>cd1</i> 型。 Moir et al. ^[41] reported that cells of <i>T. pantotropha</i> contained nitrite reductase which was identified as Cytochrome <i>cd1</i> .
	铜型亚硝酸还原酶 Copper nitrite reductase	有氧或无氧 Aerobic or anaerobic condition	由 <i>nirK</i> 基因编码。 Coding gene is <i>nirK</i> .	Tocheva 等 ^[42] 研究了含铜型亚硝酸还原酶的晶体结构, 发现 N 原子和 O 原子与辅助因子等的侧向配位结合模式与该酶的催化机理密切相关。 According to studying crystal texture of copper nitrite reductase, Tocheva et al. ^[42] found that lateral coordination combined pattern of N, O and Cu was closely related to catalytic mechanism of copper nitrite reductase.
一氧化氮还原酶 Nitric oxide reductase	—	有氧或无氧 Aerobic or anaerobic condition	由 <i>norB</i> 和 <i>norC</i> 两个亚基组成。 Configuration is composed by <i>norB</i> and <i>norC</i> subunits.	目前已经在 <i>P. stutzeri</i> 和 <i>P. denitrifications</i> 等细菌中分离提纯, 其部分特征已被确定 ^[40] 。 Nitric oxide reductase was purified from <i>P. stutzeri</i> and <i>P. denitrifications</i> . Some of its characteristic has been determined ^[40] .
一氧化二氮还原酶 Dinitrogen oxide reductase	—	低氧或缺氧 Aerobic or anaerobic condition	该酶的每个亚基都包含 6 个 Cu 原子, 排列成 2 个不同类型的活性中心, 一个是双核电子传递位点 Cu _A , 另一个是四核催化位点 Cu _Z 。 Every subunit includes six copper atoms which arrange two different active centers. One is dual-core electron transfer site (Cu _A); the other is four nuclear catalytic site (Cu _Z).	在有氧条件下, <i>T. pantotropha</i> 中的一氧化二氮还原酶能将 NO 和 N ₂ O 两种气体同时还原, 但这两种气体相互抑制 ^[43] 。 In aerobic conditions, dinitrogen oxide reductase of <i>T. pantotropha</i> could reduce deoxidize NO and N ₂ O. However, the two gases are mutual inhibition.

N₂, 然后测定 N₂O 的累积量来计算反硝化速率^[62]。这种方法的特点是简便、灵敏、成本低, 目前已在测定土壤、沉积物、水体中反硝化速率得到很好的应用。但是在 NO₃⁻浓度低的情况下, C₂H₂ 对将 N₂O 还原为 N₂ 的抑制作用不完全, 且硫化物的存在会削弱 C₂H₂ 的抑制作用; 而 C₂H₂ 抑制法计算出来的反硝化速率也忽视了耦合硝化/反硝化作用, 因此反硝化速率的计算结果会偏低。C₂H₂ 抑制法可以原位动态监测作物生育期内农田土壤反硝化速率, 为提高肥料利用效率服务。张玉铭等^[63]应用乙炔抑制原状土柱培育法测定了 4 种施肥处理的玉米地氮素反硝化损失速率, 表明土壤氮素的反硝化损失量为 0.67~3.85 kg·hm⁻², 氮肥的反硝化损失率为 0.5%~1.5%。Kim 等^[64]应用此方法测定了日本广岛湾沉积物的反硝化速率季节变化。Barnes 等^[65]采用 C₂H₂ 抑制法发现英国亨伯河口总反硝化速率在 1.2~10

mmol·m⁻²·d⁻¹。(2)N₂ 产量测定法。此法的优点是测定的反硝化速率中包括了耦合硝化/反硝化作用, 其缺点是反硝化作用产生的 N₂ 量很少, 这会对反硝化速率的测定产生很大干扰^[66]。(3)¹⁵N 同位素示踪法。¹⁵N 同位素能够同时测定硝化作用、NO₃⁻异化还原为 NH₄⁺ 的作用、N 矿化及来自水体和沉积物的反硝化作用, 但是这种方法必须满足 4 个条件: 加入的 ¹⁵NO₃⁻ 必须与水体及沉积物中 ¹⁴NO₃⁻ 混合均匀; 加入的 ¹⁵NO₃⁻ 不能改变实际反硝化速率; 加入同位素的量可以忽略; ¹⁴NO₃⁻ 和 ¹⁵NO₃⁻ 扩散速率相同。如果实际情况和这 4 个条件不相符, 测定的反硝化速率会存在偏差。¹⁵N 同位素示踪技术是高效的分析技术^[67]。(4)膜直接进样技术。此技术可以区分不同的反硝化途径, 即通过膜接口装置将溶解性气体转化为气体形态, 直接进入质谱在线测定水样中 N₂, 利用测定出的 N₂ 同位素产物与同位素配对法计算出耦

合和非耦合的反硝化速率, 具有测定速度快、所需样品量少、测定灵敏度和精度高的特点^[68], 但测试费用昂贵。陈能汪等^[69]结合膜进样质谱分析和 $N_2:Ar$ 法初步探明九龙江河口区的夏季反硝化作用。(5)N 质量平衡法。该法是测定反硝化速率的传统方法, 根据氮的输入和输出量之比估算反硝化率, 但是在实际情况中很难取得准确的氮输入量和输出量, 因此该方法估算的结果可信度较差。(6) NO_3^- 消耗量测定法。该法通过建立地下水中 NO_3^- -N 变化和反硝化作用之间的关系, 推算反硝化速率。McMahon 等^[70]研究反硝化作用动力学特征发现, 反硝化速率与 NO_3^- -N 浓度有关, 遵循一级动力学特征。自然环境下 NO_3^- -N 浓度范围在 $2.0\sim 25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的反硝化速率变化范围为 $0.01\sim 3.1\text{ mg(N)}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ^[71]。通过测定因工厂排污引起氮污染的地下水 NO_3^- -N 浓度的减少, 确定反硝化速率为 $7.1\times 10^{-3}\text{ mg(N)}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ^[72]。另外, 测定反硝化速率的方法还包括 ^{15}N - NO_3^- 稀释法、孔隙水剖面的成岩模式法和微电极法等。

在以上测定方法中, 目前最常用的是 C_2H_2 抑制法和 ^{15}N 同位素示踪技术。用 C_2H_2 抑制法测定反硝化速率操作简单、便捷、成本低, 可以进行大批量样品的同时测定, 目前对于反硝化速率和反硝化酶活性的测定, 普遍采用的都是 C_2H_2 抑制法。 ^{15}N 同位素示踪技术最好用在氮素含量较高的生态系统中。同一条件下, 对比和结合这两种主要的反硝化

速率测定方法还有待进一步研究。

5 国内外最新研究进展

国内外关于水中硝酸盐的去除已有很多研究, 室内试验和野外原位试验都取得了显著的去硝效果(表 3)。从表 3 可以看出已有的研究中存在室内研究较多和野外原位研究偏少的问题。室内研究和野外原位监测都表明, 应用微生物反硝化作用去除地下水中硝酸盐污染的去硝率高达 90%以上。为便于比较脱氮速率, 将文献中反硝化速率的单位统一为 $\text{g(N)}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ 。以往研究中, 特别需要指出的是 Isaka 等^[73]以聚乙二醇(PEG)为碳源评估了反硝化细菌的脱氮性能, 发现最大反硝化速率高达 $5\ 100\text{ g(N)}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, 约为其他研究中反硝化速率的 20~1 000 倍。其可能原因是反硝化速率大小与硝酸盐浓度、温度^[40,74]和碳源类型^[75]有关。由于地下水中也含有有机氮和 NH_4^+ , 在反硝化反应系统中不能去除, 因此对于未来实际应用中, 在进入反硝化反应系统之前需要有机氮和 NH_4^+ 的硝化前处理系统的设计。

地下水污染地区的地质条件对修复效果有着较大的影响, 因此有必要对该地区地质和水文条件进行详细了解。另外, 需要对在反硝化脱氮过程中微生物的多样性和动力学进一步关注。脱氮过程中产生的终产物之一 N_2O 是破坏臭氧层且具有强烈温室效应的气体, 因此, 充分了解反硝化微生物的特性,

表 3 反硝化微生物在地下水硝酸盐污染中的研究
Table 3 Studies on denitrifying microorganisms in groundwater nitrate pollution

	反硝化微生物种类 Type of denitrifying microorganisms	碳源 Carbon source	反硝化速率 Denitrification rate [$\text{g(N)}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$]	去除率 Removal rate (%)	文献 Reference
室内 试验 Laboratory-scale experiment	生丝微菌属 <i>Hyphomicrobium</i>	聚乙二醇 PEG	5 100	92	[73]
	—	甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	6.96	100	[76]
	—	芦竹 <i>Arundo donax</i>	4.23	87~100	
	芽孢杆菌 <i>Bacillus sp.</i>	乙醇 Ethanol	—	99.9	[77]
	脱氮硫杆菌 <i>Thiobacillus denitrificans</i>	—	143.13	100	[33]
野外原位试验 Field-scale experiment	厌氧污泥中筛选的反硝化细菌 Denitrifying bacteria collected from anaerobic sludge	纤维素 Cellulose	—	99	[56]
	产吡啶金黄杆菌、巴利阿里假单胞菌、产碱 杆菌属、绿针假单胞菌、铜绿假单胞菌、 代尔夫特食酸菌、抗坏血酸克吕沃尔菌 <i>Chryseobacterium indologenes</i> , <i>P. balearica</i> , <i>P.</i> <i>alcaligenes</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Delftia acidovorans</i> , <i>Kluyvera ascorbata</i>	海藻 Gracilaria verrucosa	180~270	79~98	[78]
	紫色杆菌或假单胞菌 <i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Pseudomonas</i>	可溶性淀粉 Soluble starch	460	99.5	[79]
	—	木屑 Sawdust	1.4	—	[80]
	—	木屑 Sawdust	32	91	[81]
	—	软木、硬木 Cork wood, hardwood	3.0~4.9 3.3~4.4	—	[82]
	—	玉米棒子、木片 Maize cob, chip	15.0~21.8 3.0~4.9	—	[83]

建立反硝化微生物的种群结构与其功能特性之间的联系, 不仅对于地下水硝酸盐的去除具有一定指导意义, 而且对于保护人类生存环境也具有重要意义。地下水硝酸盐脱氮处理系统中微生物的群落组成非常复杂, 大量反硝化微生物目前还不为人类所了解, 如何发现和鉴定系统中存在的反硝化微生物、确定其优势菌群、确定真正起作用的功能反硝化, 可以借助先进的分子方法^[84]和功能基因(如硝酸盐还原酶基因 *napA* 和 *narG*, 亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 和 *nirK*, 一氧化氮还原酶基因 *nosZ* 等)^[85]完整深入地了解脱氮机理, 识别反硝化过程中氮的来源与去向, 为实践提供理论指导。另外, 反硝化微生物应用于原位地下水硝酸盐去除中, 菌群之间的关系是竞争还是互利, 环境因素(如温度、溶氧、酸碱性等)对菌群功能的影响如何还未清楚地了解。

6 小结与研究展望

应用微生物的反硝化作用这种简便廉价的方法治理地下水硝酸盐污染已取得显著成效。然而, 已有研究中存在的问题与不足如下: (1)大量的反硝化微生物研究集中在实验室研究中, 而野外原位去除地下水硝酸盐研究中并没有鉴定反硝化微生物的特性; (2)地下水硝酸盐去除中反硝化微生物对碳源的利用率较低, 硝酸盐的去除速度慢; (3)许多有效微生物的代谢途径仍不清楚, 某些菌在去除地下水中硝酸盐的同时, 有可能会产生中间代谢物 N_2O , 导致二次污染的风险; (4)反硝化微生物应用于原位地下水硝酸盐去除中, 菌群之间的关系是竞争还是互利, 环境因素(如温度、溶氧、酸碱性等)对菌群功能的影响如何; 还没有清楚地了解。

未来的研究应该主要集中在: (1)野外原位应用中反硝化微生物资源仍需要进一步开发, 鉴定此类特殊微生物的种类、功能及其生态学行为, 为寻找提高处理效率的方法提供理论依据, 真正将理论和实践结合起来; (2)最佳碳源的选择及不同比例的碳源混合; (3)借助先进的分子方法和功能基因(如硝酸盐还原酶基因 *napA* 和 *narG*, 亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 和 *nirK*, 一氧化氮还原酶基因 *nosZ* 等)完整深入地了解地下水硝酸盐去除中微生物的代谢过程, 识别反硝化过程中氮的来源与去向, 为实践提供理论指导; (4)加强反硝化微生物菌群之间的关系, 以及环境因素对其产生的影响等方面的研究。

参考文献

- [1] Forman D, Al-Dabbagh S, Doll R. Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain[J]. *Nature*, 1985, 313(6004): 620-625
- [2] Gurdak J J, Qi S L. Vulnerability of recently recharged groundwater in principle aquifers of the United States to nitrate contamination[J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(11): 6004-6012
- [3] Hiscock K M, Llord J W, Lerner D N, et al. An engineering solution to the nitrate problem of a borehole at Swaffham, Norfolk, U.K.[J]. *Journal of Hydrology*, 1989, 107(1/4): 267-281
- [4] Goss M J, Barry D A J, Rudolph D L. Contamination in Ontario farmstead domestic wells and its association with agriculture: 1. Results from drinking water wells[J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 1998, 32(3/4): 267-293
- [5] Costa J L, Massone H, Martínez D, et al. Nitrate contamination of a rural aquifer and accumulation in the unsaturated zone[J]. *Agricultural Water Management*, 2002, 57(1): 33-47
- [6] Khan M S, Ahmad S R, ur Rahman Z, et al. Estimation and distribution of nitrate contamination in groundwater of Wah Town, its causes and management[J]. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2012, 11(4): 332-335
- [7] 冯锦霞, 朱建军, 陈立, 等. 我国地下水硝酸盐污染防治及评估预测方法[J]. *地下水*, 2006, 28(4): 58-62
Feng J X, Zhu J J, Chen L, et al. Nitrate contamination of groundwater and its control and evaluation forecast methods[J]. *Ground Water*, 2006, 28(4): 58-62
- [8] 邹胜章, 张金炳, 李洁, 等. 北京西南城近郊浅层地下水盐污染特征及机理分析[J]. *水文地质工程地质*, 2002, 29(1): 5-9
Zou S Z, Zhang J B, Li J, et al. Analysis of shallow groundwater salt pollution feature and mechanism in the southwest suburb of Beijing City[J]. *Hydrogeology and Engineering Geology*, 2002, 29(1): 5-9
- [9] Chen J Y, Makoto T, Liu G Q, et al. Nitrate pollution of groundwater in the Yellow River delta, China[J]. *Hydrogeology Journal*, 2007, 15(8): 1605-1614
- [10] Wupuer T, Shi C, Wupuer B, et al. Study on treatment of nitrate polluted farmland groundwater by a newly isolated aerobic denitrifying bacterium[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2011, 48(5): 918-922
- [11] Long L M, Schipper L A, Bruesewitz D A. Long-term nitrate removal in a denitrification wall[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2011, 140(3/4): 514-520
- [12] Wang Y P, Wiatrowski H A, John R, et al. Impact of mercury on denitrification and denitrifying microbial communities in nitrate enrichments of subsurface sediments[J]. *Biodegradation*, 2012, doi: 10.1007/s10532-012-9555-8
- [13] Wu W Z, Yang F F, Yang L H. Biological denitrification with a novel biodegradable polymer as carbon source and biofilm carrier[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 136-140
- [14] Burgin A J, Hamilton S K. Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways[J]. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2007, 5(2): 89-96
- [15] 罗泽娇, 靳孟贵. 地下水三氮污染的研究进展[J]. *水文地*

- 质工程地质, 2002, 29(4): 66-69
- Luo Z J, Jin M G. Research progress of ammonia, nitrite and nitrate pollution in groundwater[J]. Hydrogeology and Engineering Geology, 2002, 29(4): 66-69
- [16] Wakida F T, Lerner D N. Non-agricultural sources of groundwater nitrate: A review and case study[J]. Water Research, 2005, 39(1): 3-16
- [17] Burden R J. Nitrate contamination of New Zealand aquifers: A review[J]. New Zealand Journal of Science, 1982, 25(3): 205-220
- [18] Rivett M O, Buss S R, Morgan P, et al. Nitrate attenuation in groundwater: A review of biogeochemical controlling processes[J]. Water Research, 2008, 42(16): 4215-4232
- [19] 闫志英, 廖银章, 李旭东, 等. 新型废水生物脱氮的微生物学研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(2): 292-296
- Yan Z Y, Liao Y Z, Li X D, et al. Progress in research of biological removal of nitrogen[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2006, 12(2): 292-296
- [20] Xia S Q, Li J X, Wang R C, et al. Tracking composition and dynamics of nitrification and denitrification microbial community in a biofilm reactor by PCR-DGGE and combining FISH with flow cytometry[J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 49(3): 370-378
- [21] Shoun H, Kim D H, Uchiyama H, et al. Denitrification by fungi[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 94(3): 277-281
- [22] Shoun H, Kano M, Baba I, et al. Denitrification by actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(17): 4413-4415
- [23] 丁炜, 朱亮, 徐京, 等. 好氧反硝化菌及其在生物处理与修复中的应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(6): 923-929
- Ding W, Zhu L, Xu J, et al. Progress of researches on aerobic denitrifiers and their application in bioremediation[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2011, 17(6): 923-929
- [24] Robertson L A, Kuenen J G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium[J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129(9): 2847-2855
- [25] Patureau D, Zumstein E, Delgenes J P, et al. Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems[J]. Microbial Ecology, 2000, 39(2): 145-152
- [26] Ridgway H F, Safarik J, Phipps D, et al. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(11): 3565-3575
- [27] Broocks A, Bandelow B, Pekrun G, et al. Comparison of aerobic exercise, clomipramine, and placebo in the treatment of panic disorder[J]. American Journal of Psychiatry, 1998, 155(5): 603-609
- [28] Meyer O, Lalucat J, Schlegel H G. *Pseudomonas carbodihydrogena* (Sanjévia and Zavarzin) comb. nov., a monotrichous, nonbudding, strictly aerobic, carbon monoxide-utilizing hydrogen bacterium previously assigned to *Seliberia* [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1980, 30(1): 189-195
- [29] Joo H S, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2): 184-191
- [30] Ozeki S, Baba I, Takaya N, et al. A novel C1-using denitrifier *alcaligenes* sp. STC1 and its genes for copper-containing nitrite reductase and azurin[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2001, 65(5): 1206-1210
- [31] 于爱茸, 李尤, 俞吉安. 一株耐氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 77-81
- Yu A R, Li Y, Yi J A. Denitrification of a newly isolated bacillus strain W2 and its application in aquaculture[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(3): 77-81
- [32] Biswas S, Bose P. Zero-valent iron-assisted autotrophic denitrification[J]. Journal of Environmental Engineering, 2005, 131(8): 1212-1220
- [33] 牛建敏, 李睿华. 不同环境中脱氮硫杆菌的分离, 培养及其去除硝酸盐的研究[J]. 环境工程, 2009, 27(S1): 226-229
- Niu J M, Li R H. Isolation and culture of thiobacillus denitrificans derived from different environments and their capacities of removing nitrate[J]. Environmental Engineering, 2009, 27(S1): 226-229
- [34] Vidal S, Rocha C, Galvão H. A comparison of organic and inorganic carbon controls over biological denitrification in aquaria[J]. Chemosphere, 2002, 48(4): 445-451
- [35] Van Rijn J, Tal Y, Schreier H J. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications[J]. Aquacultural Engineering, 2006, 34(3): 364-376
- [36] Sliemers A O, Derwort N, Campos-Gomez J L, et al. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor[J]. Water Research, 2002, 36(10): 2475-2482
- [37] Philippot L. Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2002, 1577(3): 355-376
- [38] Payne W J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms[J]. Bacteriological Reviews, 1973, 37(4): 409-452
- [39] 李平, 张山, 刘德立. 细菌好氧反硝化研究进展[J]. 微生物学通报, 2005, 25(1): 60-64
- Li P, Zhang S, Liu D L. Study progress of bacterial aerobic denitrification[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(1): 60-64
- [40] 辛明秀, 赵颖, 周军, 等. 反硝化细菌在污水脱氮中的作用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 773-776
- Xin M X, Zhao Y, Zhou J, et al. The application of denitrifying bacteria in demitrication of wastewater[J]. Journal of Microbiology, 2007, 34(4): 773-776
- [41] Moir J W B, Baratta D, Richardson D J, et al. The purification of a *cd1*-type nitrite reductase from, and the absence of a copper-type nitrite reductase from, the aerobic denitrifier *Thiosphaera pantotropha*; the role of pseudoazurin as an electron

- donor[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 212(2): 377–385
- [42] Tocheva E I, Rosell F I, Mauk A G, et al. Side-on copper-nitrosyl coordination by nitrite reductase[J]. *Science*, 2004, 304(5672): 867–870
- [43] Heikkilä M P, Honisch U, Wunsch P, et al. Role of the tat transport system in nitrous oxide reductase translocation and cytochrome *cd 1* biosynthesis in *Pseudomonas stutzeri*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(5): 1663–1671
- [44] Kim S, Jung H, Kim K S, et al. Treatment of high nitrate-containing wastewaters by sequential heterotrophic and autotrophic denitrification[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2004, 130(12): 1475–1480
- [45] 曹文平, 张后虎, 汪银梅. 以纤维素物质为反硝化碳源和载体去除水中硝酸盐[J]. *工业水处理*, 2012, 32(2): 5–9
Cao W P, Zhang H H, Wang Y M. Removal of nitrate from water with cellulosic substances as carbon source and bio-carrier[J]. *Industrial Water Treatment*, 2012, 32(2): 5–9
- [46] Ergas S J, Rheinheimer D E. Drinking water denitrification using a membrane bioreactor[J]. *Water Research*, 2004, 38(14/15): 3225–3232
- [47] Aslan S, Turkman A. Nitrate and pesticides removal from contaminated water using biodenitrification reactor[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(4): 882–886
- [48] Li H J, Chen Y G, Gu G W. The effect of propionic to acetic acid ratio on anaerobic-aerobic (low dissolved oxygen) biological phosphorus and nitrogen removal[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(10): 4400–4407
- [49] Calderer M, Gibert O, Martí V, et al. Denitrification in presence of acetate and glucose for bioremediation of nitrate-contaminated groundwater[J]. *Environmental Technology*, 2010, 31(7): 799–814
- [50] Gómez M A, González-López J, Hontoria-García E. Influence of carbon source on nitrate removal of contaminated groundwater in a denitrifying submerged filter[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2000, 80(1/3): 69–80
- [51] Xu Y, Qiu T L, Han M L, et al. Heterotrophic denitrification of nitrate-contaminated water using different solid carbon sources[J]. *Procedia Environmental Sciences*, 2011, 10: 72–77
- [52] Wang X M, Wang J L. Denitrification of nitrate-contaminated groundwater using biodegradable snack ware as carbon source under low-temperature condition[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2012, 9(1): 113–118
- [53] Saliling W J B, Westerman P W, Losordo T M. Wood chips and wheat straw as alternative biofilter media for denitrification reactors treating aquaculture and other wastewaters with high nitrate concentrations[J]. *Aquacultural Engineering*, 2007, 37(3): 222–233
- [54] 邵留, 徐祖信, 金伟, 等. 以稻草为碳源和生物膜载体去除水中的硝酸盐[J]. *环境科学*, 2009, 30(5): 1414–1419
Shao L, Xu Z X, Jin W, et al. Nitrate removal from wastewater using rice straw as carbon source and biofilm carrier[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(5): 1414–1419
- [55] Israel S, Engelbrecht P, Tredoux G, et al. In situ batch denitrification of nitrate-rich groundwater using sawdust as a carbon source—arydale, South Africa[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2009, 204(1/4): 177–194
- [56] Wang Q H, Feng C P, Zhao Y X, et al. Denitrification of nitrate contaminated groundwater with a fiber-based biofilm reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(7): 2223–2227
- [57] Volokita M, Belkin S, Abeliovich A, et al. Biological denitrification of drinking water using newspaper[J]. *Water Research*, 1996, 30(4): 965–971
- [58] 沈志红, 张增强, 王豫琪, 等. 生物反硝化去除地下水中硝酸盐的混合碳源研究[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(6): 1263–1269
Shen Z H, Zhang Z Q, Wang Y Q, et al. Biological denitrification for nitrate removal from groundwater using mixed carbon sources[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(6): 1263–1269
- [59] Greenan C M, Moorman T B, Kaspar T C, et al. Comparing carbon substrates for denitrification of subsurface drainage water[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2006, 35(3): 824–829
- [60] Gibert O, Pomierny S, Rowe I, et al. Selection of organic substrates as potential reactive materials for use in a denitrification permeable reactive barrier (PRB)[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(16): 7587–7596
- [61] Robertson W D, Ptacek C J, Brown S J. Rates of nitrate and perchlorate removal in a 5-year-old wood particle reactor treating agricultural drainage[J]. *Ground Water Monitoring and Remediation*, 2009, 29(2): 87–94
- [62] Felber R, Conen F, Flechard C R, et al. The acetylene inhibition technique to determine total denitrification ($N_2 + N_2O$) losses from soil samples: potentials and limitations[J]. *Biogeosciences Discussions*, 2012, 9(3): 2851–2882
- [63] 张玉铭, 董文旭, 曾江海, 等. 玉米地土壤反硝化速率与 N_2O 排放通量的动态变化[J]. *中国生态农业学报*, 2001, 9(4): 70–72
Zhang Y M, Dong W X, Zeng J H, et al. Dynamic of denitrification rate and N_2O flux in maize field[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2001, 9(4): 70–72
- [64] Kim D H, Matsuda O, Yamamoto T. Nitrification, denitrification and nitrate reduction rates in the sediment of Hiroshima Bay, Japan[J]. *Journal of Oceanography*, 1997, 53(4): 317–324
- [65] Barnes J, Owens N J P. Denitrification and nitrous oxide concentrations in the Humber estuary, UK, and adjacent coastal zones[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, 37(3/7): 247–260
- [66] Tesoriero A J, Liebscher H, Cox S E. Mechanism and rate of denitrification in an agricultural watershed: Electron and mass balance along groundwater flow paths[J]. *Water Resources Research*, 2000, 36(6): 1545–1559
- [67] Tobias C R, Macko S A, Anderson I C, et al. Tracking the fate of a high concentration groundwater nitrate plume through a fringing marsh: A combined groundwater tracer and in situ

- isotope enrichment study[J]. *Limnology and Oceanography*, 2001, 46(8): 1977–1989
- [68] McCarthy M J, Gardner W S. An application of membrane inlet mass spectrometry to measure denitrification in a recirculating mariculture system[J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1/4): 341–355
- [69] 陈能汪, 吴杰忠, 洪华生. 九龙江河口区夏季反硝化作用初探[J]. *环境科学*, 2011, 32(11): 3229–3234
Chen N W, Wu J Z, Hong H S. Preliminary results concerning summer-time denitrification in the Jiulong River estuary[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2011, 32(11): 3229–3234
- [70] McMahan P B, Böhlke J K, Bruce B W. Denitrification in marine shales in northeastern Colorado[J]. *Water Resources Research*, 1999, 35(5): 1629–1642
- [71] Korom S F. Natural denitrification in the saturated zone: A review[J]. *Water Resources Research*, 1992, 28(6): 1657–1668
- [72] DeSimone L A, Howes B L. Denitrification and nitrogen transport in a coastal aquifer receiving wastewater discharge[J]. *Environmental Science and Technology*, 1996, 30(4): 1152–1162
- [73] Isaka K, Kimura Y, Osaka T, et al. High-rate denitrification using polyethylene glycol gel carriers entrapping heterotrophic denitrifying bacteria[J]. *Water Research*, 2012, 46(16): 4941–4948
- [74] Schipper L A, Cameron S C, Warneke S. Nitrate removal from three different effluents using large-scale denitrification beds[J]. *Ecological Engineering*, 2010, 36(11): 1552–1557
- [75] Gálvez J M, Gómez M A, Hontoria E, et al. Influence of hydraulic loading and air flowrate on urban wastewater nitrogen removal with a submerged fixed-film reactor[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2003, 101(2): 219–229
- [76] Ovez B, Ozgen S, Yuksel M. Biological denitrification in drinking water using *Glycyrrhiza glabra* and *Arunda donax* as the carbon source[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7): 1539–1544
- [77] 张小玲, 梁运祥. 一株反硝化细菌的筛选及其反硝化特性的研究[J]. *淡水渔业*, 2006, 36(5): 28–32
Zhang X L, Liang Y X. Screening of a strain denitrobacteria and its denitrification characteristic[J]. *Freshwater Fisheries*, 2006, 36(5): 28–32
- [78] Ovez B, Mergaert J, Saglam M. Biological denitrification in drinking water treatment using the seaweed *Gracilaria verrucosa* as carbon source and biofilm carrier[J]. *Water Environment Research*, 2006, 78(4): 430–434
- [79] Kim Y S, Nakano K, Lee T J, et al. On-site nitrate removal of groundwater by an immobilized psychrophilic denitrifier using soluble starch as a carbon source[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(3): 303–308
- [80] Schipper L A, Barkle G F, Vojvodic-Vukovic M. Maximum rates of nitrate removal in a denitrification wall[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34(4): 1270–1276
- [81] Robertson W D, Blowes D W, Ptacek C J, et al. Long-term performance of in situ reactive barriers for nitrate remediation[J]. *Ground Water*, 2000, 38(5): 689–695
- [82] Cameron S G, Schipper L A. Nitrate removal and hydraulic performance of organic carbon for use in denitrification beds[J]. *Ecological Engineering*, 2010, 36(11): 1588–1595
- [83] Cameron S G. Manipulation of carbon media, temperature and hydraulic efficiency to increase nitrate removal rate in denitrification beds[D]. Waikato: University of Waikato, 2011
- [84] Hoshino T, Terahara T, Tsuneda S, et al. Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(5): 1165–1175
- [85] Braker G, Zhou J Z, Wu L Y, et al. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2096–2104