

基于电子分配的化能自养细菌培养策略

何晓敏, 林炜铁, 罗剑飞*

华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州

何晓敏, 林炜铁, 罗剑飞. 基于电子分配的化能自养细菌培养策略[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 698-714.

HE Xiaomin, LIN Weitie, LUO Jianfei. Culture strategy of chemoautotrophic bacteria based on electron distribution[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 698-714.

摘要:【目的】针对化能自养细菌培养困难的问题, 本研究基于电子分配理论分析它们难培养的原因, 并基于纯培养探究电子分配策略对提高化能自养细菌生物量的可行性。【方法】从维持细胞内 pH 平衡和最适能量代谢的角度, 计算得出硫氧化细菌盐硫小杆菌(*Halothiobacillus*) DCM-3、亚硝酸盐氧化细菌硝化杆菌(*Nitrobacter*) N1 及氨氧化细菌亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas*) SCUT-1 氧化相应底物产生的电子最终分配给 O₂ 与 CO₂ 的最优比例, 并以相应菌株为对象, 分别设置不同的 O₂ 与 HCO₃⁻ (CO₂) 摩尔量比例以形成不同的电子分配比例进行纯培养验证, 用离子色谱仪和紫外分光光度计检测底物和产物浓度, 用稀释涂布法测定细胞密度。【结果】DCM-3、N1 和 SCUT-1 菌株的最优分配比例分别为 0.733:0.267、0.867:0.133 和 0.6:0.4。若基于最优电子分配比例的条件, DCM-3、N1 和 SCUT-1 菌株分别可合成 3.967 ATP/S₂O₃²⁻、0.433 ATP/NO₂⁻ 和 1.35 ATP/NH₃。根据计算结果, 其难培养的原因主要为单位底物提供的能量合成的 ATP 数量少, 且要求适当控制低氧气浓度及补充适量的无机碳。纯培养验证中, DCM-3 菌株在最优比例下的生物量为 6.5×10⁷ CFU/mL, 是不控制比例的对照组的 2.2 倍。N1 菌株在最优比例下的生物量为 7×10⁶ CFU/mL, 与对照组无显著差异, 但最优比例的 HCO₃⁻ 浓度(0.4 mmol/L)明显低于对照组(2.5 mmol/L), 该菌株表现出倾向于较高氧气但对 CO₂ 需求低的生长特性, 与计算得到的最优比例相符。SCUT-1 菌株在控制 O₂ 和 CO₂ 量的实验组中的单位 NH₄⁺ 浓度生物量积累达 1.3×10⁶ CFU/(mL·(mmol/L)) 以上, 比充足 O₂ 和 CO₂ 量条件的高 25%–40%。【结论】基于电子分配的化能自养细菌培养策略, 通过限制 O₂ 和 CO₂ 摩尔量并形成一定比例从而限制电子分配的培养条件, 有助于提高同一底物条件下的生物量积累, 为化能自养细菌的培养提供一定的策略参考。

关键词: 化能自养细菌; 电子分配; 能量代谢; 纯培养

资助项目: 国家自然科学基金(91951118, 41977034)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (91951118, 41977034).

*Corresponding author. E-mail: ljfj2002@scut.edu.cn

Received: 2024-08-28; Accepted: 2024-11-06; Published online: 2024-11-19

Culture strategy of chemoautotrophic bacteria based on electron distribution

HE Xiaomin, LIN Weitie, LUO Jianfei*

School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: [Objective] In view of the difficulty in the culture of chemoautotrophic bacteria, this study analyzed the reasons for the difficulty based on the theory of electron distribution and explored the feasibility of using the electron distribution strategy for increasing the biomass of chemoautotrophic bacteria based on pure culture. [Methods] From the perspective of maintaining intracellular pH balance and optimal energy metabolism, we calculated the optimal distribution ratios of electrons produced by the sulfur-oxidizing bacterial strain *Halothiobacillus* sp. DCM-3, nitrite-oxidizing bacterial strain *Nitrobacter* sp. N1, and ammonia-oxidizing bacterial strain *Nitrosomonas* sp. SCUT-1 to O₂ and CO₂ by oxidizing corresponding substrates. Furthermore, different molar ratios of O₂ to HCO₃⁻ (CO₂) were set respectively to form different electron distribution ratios for pure culture verification of the strains. Substrate and product concentrations were measured by ion chromatography and ultraviolet spectrophotometry, and cell density was measured by the dilution coating method. [Results] The optimal electron distribution ratios of strains DCM-3, N1, and SCUT-1 were 0.733:0.267, 0.867:0.133, and 0.6:0.4, respectively. Based on the optimal electron distribution ratios, strains DCM-3, N1, and SCUT-1 could synthesize 3.967 ATP/S₂O₃²⁻, 0.433 ATP/NO₂⁻, and 1.35 ATP/NH₃, respectively. According to the calculation results, the main reasons for the difficulty in culture were the small amount of ATP synthesized with the energy provided by per unit substrate and the need to control a low oxygen concentration and supplement an appropriate amount of inorganic carbon. The results of pure culture verification showed that the biomass of DCM-3 under the optimal ratio was 6.5×10⁷ CFU/mL, which was 2.2 times that of the control group. The biomass of N1 under the optimal ratio was 7×10⁶ CFU/mL, which was not significantly different from that of the control group. However, the HCO₃⁻ concentration (0.4 mmol/L) of the optimal ratio of strain N1 was significantly lower than that (2.5 mmol/L) of the control group, which meant that the strain showed a growth characteristic of tending to higher oxygen concentration but lower CO₂ demand, which was consistent with the calculated optimal ratio. The biomass accumulation per unit NH₄⁺ concentration of SCUT-1 strain in the group with controlled O₂ and CO₂ was more than 1.3×10⁶ CFU/(mL·(mmol/L)), which was 25%–40% higher than that obtained under sufficient O₂ and CO₂. [Conclusion] The culture strategy of chemoautotrophic bacteria based on electron distribution restricts the culture conditions of electron distribution by limiting the molar amounts and forming a certain ratio of O₂ and CO₂, which helps to improve the biomass accumulation under the same substrate condition and provides certain strategic reference for the culture of chemoautotrophic bacteria.

Keywords: chemoautotrophic bacteria; electron distribution; energy metabolism; pure culture

化能自养细菌固定 CO_2 进行自养生长, 它们催化的硫氧化、氨氧化、亚硝酸盐氧化等反应在废水处理中发挥了关键的作用^[1-3]。然而, 化能自养细菌的生长缓慢、生物量较低, 对环境变化高度敏感, 导致其培养难度较大。Nowka 等^[4]培养普通硝化杆菌(*Nitrobacter vulgaris*)、维氏硝化杆菌(*Nitrobacter winogradskyi*)、莫斯科硝化螺菌(*Nitrospira moscoviensis*)等亚硝酸盐氧化细菌(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)的研究中, 得出它们的生长代时为 13–44 h。化能自养硫氧化细菌(sulfur-oxidizing bacteria, SOB), 盐硫小杆菌属(*Halothiobacillus* sp.) LS2, 在 20% 氧浓度下以 1 mmol/L 硫代硫酸盐为底物时, 最大生物量仅为 1.4×10^7 细胞/mL^[5]。Wu 等^[6]对分离得到的氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)菌株进行培养, 在 1.5 mmol/L 底物浓度下, 其最大生物量仅能达到 10^6 细胞/mL。另外, 化能自养细菌对环境变化有高敏感性, 如底物浓度、光照、温度、pH 值、氧气、金属离子等^[7-8]。Wu 等^[6]的研究中, 培养基顶空氧气浓度对 5 株 *Nitrosomonas* 的生长有显著影响。Zhang 等研究发现, 化能自养细菌释放的小分子有机碳(如氨基酸、有机酸)会通过抑制卡尔文循环的关键酶核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)基因的转录效率来抑制细菌的 CO_2 固定, 异养细菌可帮助消耗这些有机物解除抑制^[9]。化能自养细菌对环境变化的高敏感性、对异养细菌解除环境因子毒害的依赖性, 极大地加强了培养的难度。关于化能自养细菌的培养策略仍需进一步研究。

有氧条件下, 化能自养细菌氧化底物产生的电子进入呼吸链后, 一部分沿正向传递给终端氧化酶还原 O_2 同时形成跨膜质子梯度(proton motive force, PMF), 由 ATP 合成酶利用 PMF 合

成 ATP; 另一部分电子沿逆向传递给复合体 I 合成 NADH 等还原力同时消耗 PMF, 还原力最终主要用于固定 CO_2 。可认为, 化能自养细菌氧化底物产生的电子进入呼吸链用于 ATP 和还原力的合成, 最终按一定比例分配给 O_2 和 CO_2 。从维持细胞内 pH 平衡和最适能量代谢(合成 ATP 和还原力的比例与固碳途径所需的一致)的角度, 可计算出该比例理论值。若忽略细胞内物质代谢对 pH 的影响, 理论上 $\Delta H^+_{\text{out}} = \Delta H^+_{\text{in}}$, 在电子分配给 O_2 和 CO_2 的过程中, 若比例发生变化(如固碳效率降低而底物氧化速率不变时, 绝大部分电子传递给 O_2 , 细胞缺乏对 ATP 和还原力的需求), 将导致 $\Delta H^+_{\text{out}} > \Delta H^+_{\text{in}}$, 引起细胞内 pH 变化, 进而影响细胞生长代谢。因此, 为了维持高效的底物氧化速率和固碳速率, 理论上底物氧化生成的电子必须按一定比例分配给 O_2 和 CO_2 。

本研究针对化能自养细菌培养困难的问题, 从维持细胞内 pH 平衡和最适能量代谢的角度, 即 $\Delta H^+ = \Delta H^+_{\text{out}}$ (电子经复合体传递给 O_2 , 质子泵出细胞) - ΔH^+_{in} (质子泵入细胞用于合成 ATP 和还原力) = 0, 以及合成的 ATP 和还原力都用于固定 CO_2 , 从而计算得出 SOB 菌株 *Halothiobacillus* sp. DCM-3、NOB 菌株硝化杆菌属 (*Nitrobacter* sp.) N1 以及 AOB 菌株 *Nitrosomonas* sp. SCUT-1 氧化相应底物产生的电子, 最终分配给 O_2 与 CO_2 的最优比例, 根据最优电子分配比例理论上分析其难培养的原因。根据计算结果提出基于电子分配的化能自养细菌培养策略, 以相应菌株为对象, 分别设置不同的 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 摩尔量比例以形成不同的电子分配比例进行纯培养验证, 探讨最优电子分配比例策略对提高化能自养细菌生物量积累的可行性, 为化能自养细菌的培养提供一定的指导。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和培养基

1.1.1 硫氧化细菌

化能自养硫氧化菌株 *Halothiobacillus* sp. DCM-3 由本课题组分离获得。

液体培养基(g/L): MgCl₂ 0.12, CaCl₂·2H₂O 0.01, NaCl 1.00, Widdel 微量元素液^[10] 1 mL/L, 121 °C 灭菌 20 min 后, 加入 Na₂S₂O₃·5H₂O 0.248, NH₄Cl 0.027, FeCl₂·4H₂O 0.008, 磷酸缓冲液 10 mmol/L, NaHCO₃ 的添加量设置与最优电子分配比例的计算结果及底物氧化产生的电子量有关, 试剂使用 0.22 μm 孔径的聚醚砜滤膜(天津市津腾实验设备有限公司)进行过滤除菌, 培养基 pH 6.75–7.05。

固体培养基(g/L): K₂HPO₄ 0.40, MgSO₄·7H₂O 0.12, NH₄Cl 0.10, KNO₃ 0.40, 琼脂 15.00, 121 °C 灭菌 20 min 后, 加入 Na₂S₂O₃·5H₂O 2.48, NaHCO₃ 0.20, FeSO₄·7H₂O 0.02, 试剂进行过滤除菌, 培养基 pH 6.5–6.8。

1.1.2 亚硝酸盐氧化细菌

亚硝酸盐氧化菌株 *Nitrobacter* sp. N1 由本课题组^[11]于珠江穗石码头水样分离获得, 该菌株与 *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 相似度最高(99.58%)。

液体培养基(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.25, CaCl₂·2H₂O 0.01, NaCl 1.00, Widdel 微量元素液^[10] 1 mL/L, 121 °C 灭菌 20 min 后, 加入 NaNO₂ 0.35, 磷酸缓冲液 20 mmol/L, 设定量的 NaHCO₃, 试剂进行过滤除菌, 培养基 pH 6.9–7.0。

固体培养基(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.25, CaCl₂·2H₂O 0.01, NaCl 1.00, K₂HPO₄ 0.30, Widdel 微量元素液^[10] 1 mL/L, 琼脂 15.00, 121 °C 灭菌 20 min 后, 加入 NaNO₂ 0.69, NaHCO₃ 0.20, 试剂进行过滤除菌, 培养基 pH 6.6–6.9。

1.1.3 氨氧化细菌

氨氧化菌株 *Nitrosomonas* sp. SCUT-1 由本课题组^[6]于生活废水分离获得, 该菌株与菌种 *Nitrosomonas ureae* 相似度最高(95.54%)。

液体培养基(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.05, CaCl₂·2H₂O 0.02, NaCl 0.50, 121 °C 灭菌 20 min 后, 加入 NH₄Cl 0.053 5, 磷酸缓冲液 6 mmol/L, 微量元素^[10] 1 mL/L, 设定量的 NaHCO₃, 试剂进行过滤除菌, 培养基 pH 7.50–7.65。

固体培养基(g/L): MgSO₄·7H₂O 0.05, NaCl 0.50, KH₂PO₄ 0.10, CaCO₃ 5.00, 琼脂 15.00, 121 °C 灭菌 20 min 后, 加入 NH₄Cl 0.535, NaHCO₃ 0.42, 微量元素^[10] 2 mL/L, 试剂进行过滤除菌, 培养基 pH 7.9–8.0。AOB 固体培养基采用血清瓶密封平板^[6], 以 125 mL 血清瓶为容器, 并使用丁腈胶塞与铝盖构建密闭环境, 使用 Parafilm™ 封口膜包裹血清瓶口。

1.2 主要试剂和仪器

五水硫代硫酸钠、盐酸萘乙二胺, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 氯化铵、碳酸氢钠、水杨酸钠、亚硝基铁氰化钠二水化合物、二氯异氰尿酸钠, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 亚硝酸钠、磺胺, 天津市大茂化学试剂厂; 氨基磺酸, 上海凌峰化学试剂有限公司; 高氯酸, 成都市科隆化学品有限公司。

振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 气相色谱仪, 浙江福立分析仪器股份有限公司; 离子色谱仪, 赛默飞世尔科技公司; 紫外分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.3 液体培养基顶空条件的制备及顶空氧气量的测定

液体培养基顶空条件的制备: 每个 125 mL 血清瓶分装 50 mL 液体培养基, 顶空体积为 70 mL。血清瓶用丁腈胶塞和铝盖密封后沸水浴 20 min, 利用循环水式真空泵抽真空 7 min, 充

入 0.15 MPa 氩气 1 min, 之后抽真空 4 min 充入 Ar 1 min 循环 4 次, 最后充入 0.12–0.13 MPa Ar 2 min。顶空添加各实验条件所需的氧气量。

对装有 50 mL 液体的 125 mL 血清瓶完成顶空去除空气的操作后, 加入一定量的氧气并高温湿热灭菌, 液体溶氧使用氧电极测定, 该预实验结果表明, 当不额外添加氧气时顶空氧气的量与液体溶氧相近, 添加氧气后, 液体溶氧占比随着顶空氧气添加量的提高而减小, 占比减小至约 5%(表 1)。因此液体培养基的氧含量可以顶空氧气的量表征。

液体培养基顶空氧气的量采用气相色谱仪测定, 使用 ECD 检测器和 Porapak-Q 柱, Ar 作载气, 进样口、ECD 检测器和柱温度分别为 100、300、70 °C, 载气流速为 30 mL/min, 进样体积为 1 mL。标准曲线为氧气体积分数与峰面积的线性关系。氧气体积分数与氧气摩尔量的换算如公式(1)所示。

$$N=v \times 0.07 / 24.5 \quad (1)$$

式中, N 为氧气的量(mol), v 为氧气体积分数, 0.07 指顶空体积为 0.07 L, 24.5 为 25 °C 下的气体摩尔常数(L/mol)。

1.4 培养液中底物和产物含量的检测

$S_2O_3^{2-}$ 和 SO_4^{2-} 含量的检测使用离子色谱仪, Dionex IonPac AS19 IC 柱, 淋洗液为 18 mmol/L KOH, 流速为 1 mL/min, 抑制器电流为 45 mA,

柱温 30 °C, 背景电导 4–6 μ S/cm, 进样量 25 μ L。

NO_2^- 含量的检测: 参照国标(HJ 634—2012), 选用盐酸萘乙二胺显色法进行检测^[12]。

NO_3^- 含量的检测参照 Cawse 的方法进行^[13]。将 100 μ L 培养液与 100 μ L 质量分数为 2% 的氨基磺酸溶液充分混匀, 并于室温条件下反应 2 min, 再加入 800 μ L 体积分数为 5% 的高氯酸溶液, 混合均匀后于 203 nm 处读取吸光值。

NH_4^+ 含量的检测参照 Hood-Nowotny 等的方法进行^[14]。显色液 A: 8.5 g 水杨酸钠、0.6 g 氢氧化钠、0.063 9 g 亚硝基铁氰化钠二水化合物溶于 50 mL 去离子水中; 显色液 B: 0.2 g 二氯异氰尿酸钠溶于 50 mL 去离子水中。将 100 μ L 培养液与 100 μ L 显色液 A、100 μ L 显色液 B 以及 1.7 mL 水充分混合, 室温条件下反应 30 min 后, 于 660 nm 处读取吸光值。

1.5 最优电子分配比例的计算方法

最优电子分配比例计算根据 CO_2 固定中 ATP 和还原力的比例, 以及维持细胞内 pH 平衡的原则, 计算时只考虑与底物氧化、 CO_2 固定途径及呼吸链相关的胞内质子浓度变化, 忽略胞内其他代谢途径导致的质子浓度变化, 且只涉及相应细菌的某一主要底物及电子受体为 O_2 的计算。在计算相应菌株的最优分配比例时, 需对该菌株的基因组进行分析, 明确其主要底物的代谢途径、固碳途径及呼吸链组分, 从而确

表1 液体顶空氧气含量与液体溶氧的测定

Table 1 Measurement of oxygen content in liquid headspace and dissolved oxygen

Oxygen addition (mL)	Oxygen volume fraction in headspace (%)	Molar quantity of oxygen in headspace ($\times 10^{-4}$ mol)	Dissolved oxygen in liquid (mg/L)	Molar quantity of oxygen in liquid ($\times 10^{-4}$ mol)	Total molar quantity of oxygen ($\times 10^{-4}$ mol)
0.00	0.092	0.027	1.040	0.016	0.043
0.86	1.067	0.314	1.205	0.019	0.333
1.72	2.470	0.726	1.710	0.027	0.753
2.62	3.509	1.031	1.903	0.030	1.061
5.00	7.223	2.123	3.110	0.049	2.172

定电子去向、ATP 和还原力的来源等。维持胞内 pH 平衡是指胞内增加的质子数等于胞内减少的质子数。假设胞内增加质子为“-”，减少质子为“+”，则胞内 $\Delta H^+ = \Delta H^+_{out} + \Delta H^+_{胞内消耗} - \Delta H^+_{胞内产生} - \Delta H^+_{in} = 0$ 。

细菌的电子传递链是分支型的，底物被氧化产生的电子可直接传递给细胞色素 c 或醌 (ubiquinone, Q)，而不一定从复合物 I 开始按顺序传递。其中，电子传递链的复合体 I、复合体 III、复合体 IV 及复合体 V (ATP 合成酶) 的催化活性都与 PMF 耦合。细菌中的典型复合体 I (NDH-I 酶) 催化 NADH 和 Q 之间的电子传递，每个电子的传递驱动 2 个质子的跨膜转移，与线粒体复合体 I 密切相关，该质子泵是完全可逆的，因此该酶也可以催化 QH_2 还原 NAD^+ 产生 NADH，并消耗 PMF^[15-16]。原核生物的复合体 III 催化 QH_2 和细胞色素 c 之间的电子传递，每传递 2 电子会将胞质的 $2H^+$ 转移到质膜外，且质膜上 QH_2 氧化也会释放 $2H^+$ 到膜外，则真正涉及胞内质子变化的是从胞质转运的 $2H^+$ ，因此设复合体 III 的 H^+/e^- 比为 1^[17]。不同细菌含有的复合体 IV 类型不同，不同培养条件下也可能表达不同类型的复合体 IV，其中典型的细胞色素 aa_3 终端氧化酶传递 $1e^-$ 给 O_2 跨膜转运 $1H^+$ ，并消耗胞内 $1H^+$ 形成 H_2O ^[18]。此处假设复合体 IV 的 H^+/e^- 比为 1，且有氧条件下消耗胞内 $1H^+$ 形成 H_2O 。复合体 V (ATP 合成酶) 消耗 PMF 合成 ATP，细菌中主要的 ATP 合成酶是 F_0F_1 -ATP 合成酶。大肠杆菌的 F_0F_1 -ATP 合成酶结构中，胞质侧的 F_1 部分起催化作用且有 3 个催化位点；质子跨膜的途径位于 F_0 部分，转运的质子数与 c 亚基数量有关，而 c 亚基的数量随物种而不同，截至目前已报道的细菌 ATP 合成酶的 c 亚基数量为 9-15 个，一个包含 n 个 c 亚基的转子环每转移 n 个质子产生 3 个 ATP^[19-20]。然而，

目前硫氧化细菌和硝化细菌的 ATP 合成酶具体结构尚未被报道，此处假设其 ATP 合成酶的 c 亚基数量为 12，则合成 1 分子 ATP 需跨膜转运 $4H^+$ 。根据底物氧化产生的电子进入呼吸链的位置，假设需 x 电子沿传递链正向传递给氧气， y 电子沿传递链逆向传递，合成还原力，最终传递给 CO_2 ，该过程合成的 ATP 与还原力正好符合 CO_2 固定途径中的相应比例。由于还原 1 分子 O_2 需要 $4e^-$ ，则氧化 1 分子底物需要 $x/4$ 分子 O_2 。所需 CO_2 的量与具体固碳途径中 CO_2 的化学计量数相关。

1.6 化能自养菌株纯培养验证最优分配比例

1.6.1 实验种子液的制备

从固体培养基上挑取菌落到 50 mL 液体培养基 (顶空为空气，添加 0.20 g/L $NaHCO_3$) 中，在 30 °C、150 r/min 的条件下摇床培养，SOB 和 NOB 菌株在底物消耗 80% 以上后以 2% 接种量传代，AOB 菌株在底物消耗 50% 以上后以 4% 接种量传代。

将上述的 SOB 和 NOB 传代培养物以 3% 接种量，接种至 2 瓶顶空为空气的 150 mL 液体培养基中，AOB 传代培养物以 6% 接种量接种至 6 瓶顶空为空气的 50 mL 液体培养基中。在 30 °C、150 r/min 的条件下摇床培养，当 SOB 和 NOB 培养液的底物消耗 80% 以上、AOB 培养液的底物消耗 50% 以上，用孔径 0.22 μm 的聚醚砜滤膜抽滤收集菌体，再用 150 mL 无底物和 HCO_3^- 的空白培养基重悬膜上的菌体，再次用新的滤膜抽滤收集菌体，最终加入约 25 mL 空白培养基重悬菌体并取出滤膜，作为实验种子液。

1.6.2 菌株在不同 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 摩尔量比例下的纯培养

假设由于物理化学平衡，顶空加入的 O_2 随

着液体溶氧的消耗而不断溶于液体中，加入的 HCO_3^- 随着 CO_2 的减少而不断转化为 CO_2 直至耗完。将种子液以 1% 接种量接种至不同 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 摩尔量比例的实验组及不控制比例的对照组培养基(顶空为空气，添加 0.20 g/L NaHCO_3)中，各组设 2 个生物平行。接种后使用 Parafilm™ 封口膜包裹血清瓶口，30 °C、150 r/min 摇床培养。后续定时取样检测各瓶培养液的底物和产物浓度，各组其中一个生物平行使用稀释涂布法监测细菌的细胞密度。待培养物生长到对数末期时，各组的 2 个生物平行都进行细胞密度测定直至衰退期。各组的生物量积累为各组 2 个生物学重复在稳定期的生物量平均值。

1.7 数据统计分析

利用 Origin 2019 软件进行统计分析，各组生物量积累使用方差分析，当 $P < 0.05$ 时，认为存在显著差异。

2 结果与分析

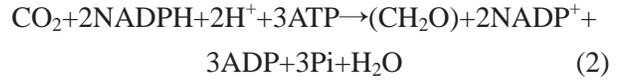
2.1 最优电子分配比例的计算

2.1.1 硫氧化细菌 *Halothiobacillus* sp. DCM-3 的最优分配比例计算

对 *Halothiobacillus* sp. DCM-3 的基因组序列分析发现，其可通过周质中的硫氧化酶(Sox)系统将 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 氧化为 SO_4^{2-} ，完整的 Sox 系统由 SoxXA、SoxYZ、SoxB、Sox(CD)₂4 部分组成，其中 SoxXA 含有 c 型血红素^[21-23]。该菌株氧化 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 产生的电子由细胞色素 c (cyt c) 传递进入呼吸链，其氧化 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 产生电子的主要传递路径见图 S1 [图 S1、图 S2 和图 S3 数据已提交国家微生物科学数据中心 (<http://nmdc.cn>)，编号为 NMDCX0001727]。

另外，对该菌株的基因组分析表明，其呼吸链由典型的复合体组成，其 CO_2 固定途径为卡尔文循环，起始酶为 I 型 RuBisCO，另外还

有编码羧酶体结构的基因。卡尔文循环的总反应式如式(2)所示。



式中， (CH_2O) 为糖的简式，可得固定 1 分子 CO_2 形成 1 分子 (CH_2O) ，需要 3 分子 ATP 和 2 分子 NADPH^[24]。细菌通常以 NADPH 为还原力固定 CO_2 ，而在真核细胞线粒体和一些细菌中广泛存在着一种膜结合的转氢酶(transhydrogenase, TH)，消耗 PMF 催化 NAD(H) 与 NADP(H) 之间转氢——1 分子 NADH 形成 1 分子 NADPH 并转运 1H^+ 进入胞内^[25]。本次计算假设细菌用于固碳的 NADPH 来源于消耗 PMF 的转氢酶催化 NADH 转氢，计算如式(3)所示。

$$\left\{ \begin{array}{l} x(\text{O}_2 \text{为电子受体}) + y(\text{CO}_2 \text{为电子受体}) = 8 \\ \text{胞内} \Delta H^+ = \Delta H^+_{\text{out}} + \Delta H^+_{\text{胞内消耗}} - \Delta H^+_{\text{in}} = \\ x(\text{复合体IV, 泵出} 1\text{H}^+/\text{e}^-) + x(0.5\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \\ \text{H}_2\text{O}) + 0.5y(\text{NAD}^+ + 2\text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADH}) + \\ 0.5y(\text{固定CO}_2 \text{需要消耗的H}^+) - y(\text{复合体III,} \\ \text{泵入} 1\text{H}^+/\text{e}^-) - 2y(\text{复合体I, 泵入} 2\text{H}^+/\text{e}^-) - \\ 0.5y(\text{NADP}^+ + \text{NADH} + \text{H}^+_{\text{out}} \rightarrow \text{NADPH} + \\ \text{NAD}^+ + \text{H}^+_{\text{in}}) - 0.75y(\text{ATP/NADPH} = 3/2) \times \\ 4(\text{复合体V, 泵入} 4\text{H}^+/\text{ATP}) = 2x - 5.5y = 0 \end{array} \right. \quad (3)$$

计算得出 1 mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 氧化产生的 8 mol e^- 需有 88/15 mol e^- 传递给 O_2 ，32/15 mol e^- 逆向传递形成还原力最终传递给 CO_2 ，即最优电子分配比例为 0.733: 0.267。根据计算结果，*Halothiobacillus* sp. DCM-3 氧化 1 mmol/L $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 需 1.467 mmol/L O_2 (即 3.59%) 和 0.533 mmol/L CO_2 (即 1.31%)。若基于最优电子分配比例的条件，由于 DCM-3 在周质侧氧化 1 分子 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 产生 10H^+ ，则 8e^- 按比例传递给 O_2 ，可产生 3.967 ATP/ $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 。

2.1.2 亚硝酸盐氧化细菌 *Nitrobacter* sp. N1 的最优分配比例计算

NOB 利用亚硝酸盐氧化还原酶 (nitrite oxidoreductase, NXR) 将 NO_2^- 氧化为 NO_3^- 。NXR 结合在细胞质膜上, 可能由 NxrA (α)、NxrB (β) 和 NxrC (γ) 3 个亚基组成, 含底物结合位点的 NxrA 亚基位于 *Nitrobacter* 的胞质侧^[26]。NxrC 是一个双血红素的细胞色素 c, 可能作为终端氧化酶的电子供体^[27]。

对 *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 的基因组序列分析^[28]表明, 该菌株的 *nxA*、*nxB* 与细胞色素 c 及 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 转运体 *narK* 在同一基因簇上, 推测 NO_2^- 氧化产生的电子经细胞色素 c 介导进入呼吸链。其呼吸链由典型的复合体组成, 其 CO_2 固定途径为卡尔文循环, 起始酶为 I 型 RuBisCO, 另外还有编码羧酶体结构的基因与 RuBisCO 基因相邻。该菌株氧化 NO_2^- 产生电子的主要传递路径如附图 S2 所示。计算假设细菌用于固碳的 NADPH 由转氢酶催化产生。计算列式如公式(4)所示。

$$\left\{ \begin{array}{l} x(\text{O}_2 \text{ 为电子受体}) + y(\text{CO}_2 \text{ 为电子受体}) = 2 \\ \text{胞内 } \Delta H^+ = \Delta H^+_{\text{out}} + \Delta H^+_{\text{胞内消耗}} - \Delta H^+_{\text{胞内产生}} \\ \Delta H^+_{\text{in}} = x(\text{复合体IV, 泵出 } 1\text{H}^+/\text{e}^-) + x(0.5\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}) + 0.5y(\text{NAD}^+ + 2\text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADH}) + 0.5y(\text{固定CO}_2 \text{ 需要消耗的H}^+) - \\ 2(\text{胞质侧NXR氧化NO}_2^- \text{产生的H}^+) - \\ y(\text{复合体III, 泵入 } 1\text{H}^+/\text{e}^-) - 2y(\text{复合体I, 泵入 } 2\text{H}^+/\text{e}^-) - 0.5y(\text{NADP}^+ + \text{NADH} + \text{H}^+_{\text{out}} \rightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}^+ + \text{H}^+_{\text{in}}) - 0.75y(\text{ATP/NADPH} = 3/2) \times 4(\text{复合体V, 泵入 } 4\text{H}^+/\text{ATP}) = -2 + 2x - 5.5y = 0 \end{array} \right. \quad (4)$$

计算得出 1 mol NO_2^- 氧化产生的 2 mol e^- 需有 26/15 mol e^- 传递给 O_2 , 4/15 mol e^- 逆向传递形成还原力最终传递给 CO_2 , 即最优电子分配比例为 0.867:0.133。根据计算结果, *Nitrobacter* sp.

N1 氧化 1 mmol/L NO_2^- 需 0.433 mmol/L O_2 (即 1.06%) 和 0.067 mmol/L CO_2 (即 0.164%)。若基于最优电子分配比例的条件, 1 分子 NO_2^- 产生 2 e^- 按比例传递给 O_2 , 可产生 0.433 ATP/ NO_2^- 。

2.1.3 氨氧化细菌 *Nitrosomonas* sp. SCUT-1 的最优分配比例计算

AOB 利用膜结合的氨单加氧酶 (ammonia monooxygenase, AMO) 将周质中的 NH_3 氧化为羟胺, 再由周质中的羟胺氧化还原酶 (hydroxylamine oxidoreductase, HAO) 将羟胺氧化为 NO, 但氧化 NO 形成 NO_2^- 的酶尚未明确^[29-30]。AMO 将氨氧化为羟胺的过程需要 2 e^- , 羟胺氧化为 NO_2^- 产生 4 e^- , 其中 HAO 氧化羟胺产生的 3 e^- 经过 *cyt c*₅₅₄ 传递给膜上的 *cyt c*_{m552}, 假设 NO 氧化产生的 1 e^- 也传递给 *cyt c*_{m552}, 而 *cyt c*_{m552} 有醌还原酶活性, 则羟胺氧化产生的 4 e^- 通过 *cyt c*_{m552} 传递给 Q, 并假设其中 2 e^- 由 QH_2 回补给 AMO 反应^[31-32]。对 *Nitrosomonas* sp. SCUT-1 的基因组并结合 *Nitrosomonas europaea* 的基因组^[33] 分析表明, 其 CO_2 固定途径为卡尔文循环, 存在典型的呼吸链复合体 I、II、III、IV、V, 以及依赖 PMF 的膜结合转氢酶。*Nitrosomonas* sp. SCUT-1 将氨氧化为 NO_2^- 过程中的主要电子传递路径见图 S3, 计算列式如公式(5)所示。

$$\left\{ \begin{array}{l} x(\text{O}_2 \text{ 为电子受体}) + y(\text{CO}_2 \text{ 为电子受体}) = 2 \\ \text{胞内 } \Delta H^+ = \Delta H^+_{\text{out}} + \Delta H^+_{\text{胞内消耗}} - \Delta H^+_{\text{胞内产生}} \\ \Delta H^+_{\text{in}} = x(\text{复合体III, 泵出 } 1\text{H}^+/\text{e}^-) + x(\text{复合体IV, 泵出 } 1\text{H}^+/\text{e}^-) + x(0.5\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}) + \\ 0.5y(\text{NAD}^+ + 2\text{e}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADH}) + 0.5y(\text{固定CO}_2 \text{ 需要消耗的H}^+) - 2y(\text{复合体I, 泵入 } 2\text{H}^+/\text{e}^-) - 0.5y(\text{NADP}^+ + \text{NADH} + \text{H}^+_{\text{out}} \rightarrow \text{NADPH} + \text{NAD}^+ + \text{H}^+_{\text{in}}) - 0.75y(\text{ATP/NADPH} = 3/2) \times 4(\text{复合体V, 泵入 } 4\text{H}^+/\text{ATP}) = 3x - 4.5y = 0 \end{array} \right. \quad (5)$$

假设固碳途径所需的 NADPH 由转氢酶催化产生, 1 分子 NH_3 氧化产生的 4e^- 最终有 2e^- 通过 Q 进入呼吸链。计算得出, 进入呼吸链的 2 mol e^- 需有 1.2 mol e^- 传递给 O_2 , 0.8 mol e^- 逆向传递形成还原力最终传递给 CO_2 , 即最优电子分配比例为 0.6:0.4。根据计算结果, *Nitrosomonas* sp. SCUT-1 氧化 1 mmol/L NH_3 需 0.3 mmol/L O_2 (即 0.735%) 和 0.2 mmol/L CO_2 (即 0.49%)。若基于最优电子分配比例的条件, 由于 SCUT-1 在周质侧氧化 1 分子 NH_3 产生 3H^+ , 则进入呼吸链的 2e^- 按比例传递给 O_2 可产生 1.35 ATP/ NH_3 。

2.2 化能自养菌株纯培养验证最优分配比例

2.2.1 硫氧化细菌 *Halothiobacillus* sp. DCM-3 的纯培养验证

在 50 mL 液体培养基中, 添加的 $1\text{ mmol/L S}_2\text{O}_3^{2-}$ 被氧化后产生的电子量为 $4\times 10^{-4}\text{ mol}$, 由于还原 O_2 和 CO_2 分别需 4 个电子, 则所需 O_2 和 CO_2 的总量为 $1\times 10^{-4}\text{ mol}$ 。根据最优比例计算结果, 设置不同 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 摩尔量比例分组, 以及实际的 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 摩尔量比例如表 2 所示, 表 2 中平均氧气摩尔量的数据以平均值 \pm 误差的形式呈现, 为各组测得的 2 个生物平行的氧气摩尔量平均值。其中比例④

(0.75:0.25) 与 *Halothiobacillus* sp. DCM-3 的最优比例计算结果相近。

在培养过程中, 随着 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 氧化产生 SO_4^{2-} , 各组培养液的 pH 均出现小幅度下降, 但都保持在 6.0 以上。如图 1 所示, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 与产生的 SO_4^{2-} 的化学计量数大概呈 1:2 的关系, 且底物消耗及产物产生的速率表现为与氧气的量呈正相关。各组生长到达稳定期的时间与底物耗完的时间邻近, 但生物量积累与氧气的量不呈正相关。对各组的生物量积累进行方差分析, ⑤的生物量积累显著低于不控制比例的空白对照 (Control), ①与空白对照不存在显著差异, ②③④显著高于空白对照, 表明在相同底物条件下, 适当控制 O_2 和 HCO_3^- (CO_2) 的摩尔量比例有利于提高该菌株的生物量积累。其中, 最优比例④的生物量积累显著高于②③, 达到 $6.5\times 10^7\text{ CFU/mL}$, 是对照组的 2.2 倍, 表明在相同底物条件下, 通过控制 O_2 和 HCO_3^- (CO_2) 的摩尔量比例形成相应的最优电子分配比例, 确实有助于得到该硫氧化菌株的最优生物量积累。

2.2.2 亚硝酸盐氧化细菌 *Nitrobacter* sp. N1 的纯培养验证

在 50 mL 液体培养基中, 添加的 5 mmol/L NO_2^- 被氧化后产生的电子量为 $5\times 10^{-4}\text{ mol}$, 所需

表2 DCM-3菌株培养实验的分组及各组的实际 O_2 与 HCO_3^- (CO_2)的摩尔量比例

Table 2 The groups of DCM-3 strain culture experiment and the actual molar ratio of O_2 to HCO_3^- (CO_2) in each group

Groups	Oxygen addition (mL)	Average oxygen volume fraction (%)	Average molar quantity of oxygen ($\times 10^{-4}\text{ mol}$)	Molar quantity of bicarbonate ($\times 10^{-4}\text{ mol}$)	Actual molar ratio of oxygen to bicarbonate
① (0.15:0.85)	0.36	0.658	0.202 ± 0.002	0.85	0.192:0.808
② (0.35:0.65)	0.84	1.291	0.395 ± 0.019	0.65	0.378:0.622
③ (0.55:0.45)	1.31	1.732	0.530 ± 0.020	0.45	0.541:0.459
④ (0.75:0.25)	1.92	2.553	0.782 ± 0.021	0.25	0.758:0.242
⑤ (0.95:0.05)	2.60	3.171	0.971 ± 0.035	0.05	0.951:0.049

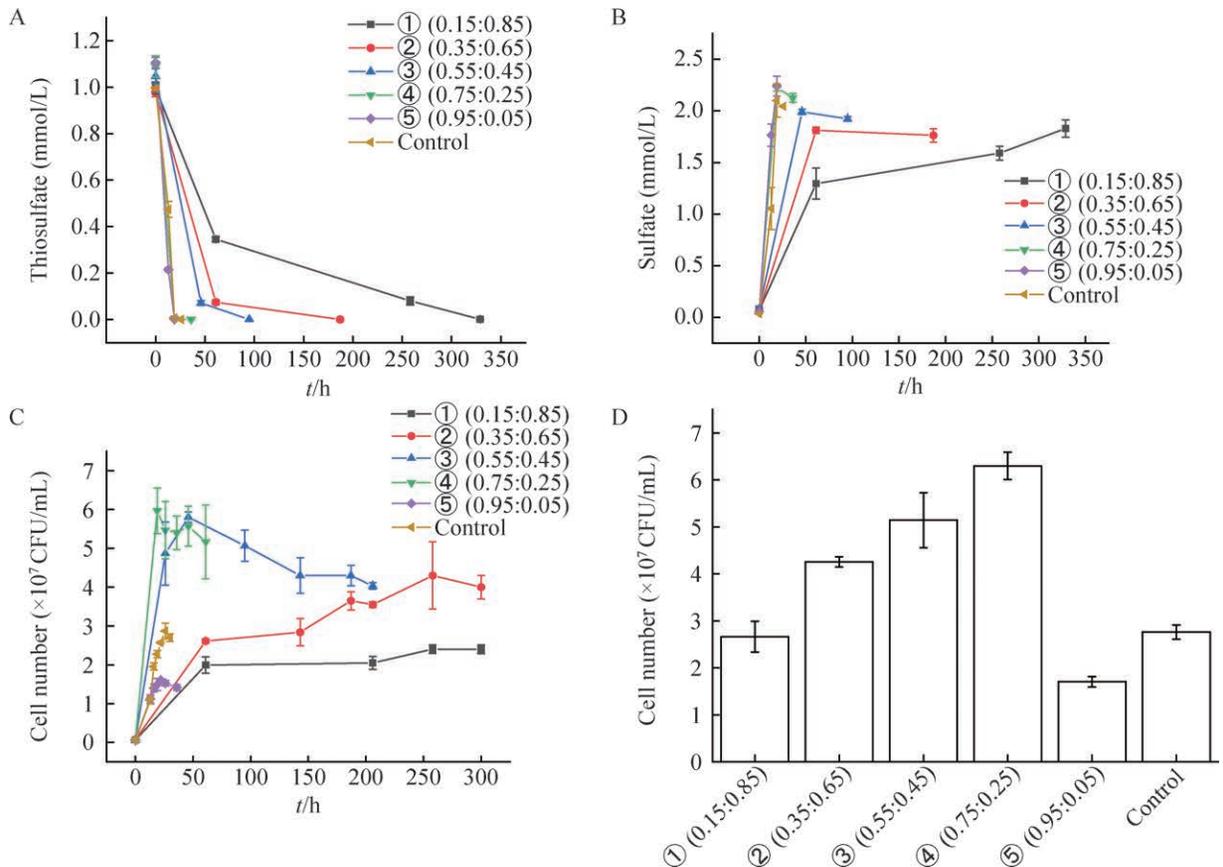


图1 DCM-3菌株纯培养的 $S_2O_3^{2-}$ 和 SO_4^{2-} 浓度变化、生物量变化和生物量积累。A: 硫代硫酸盐; B: 硫酸盐; C: 生物量变化; D: 生物量积累。

Figure 1 Changes of thiosulfate and sulfate concentrations, biomass change and biomass accumulation in pure culture of DCM-3 strain. A: Thiosulfate; B: Sulfate; C: Biomass change; D: Biomass accumulation.

O_2 和 CO_2 的总量为 1.25×10^{-4} mol。根据最优比例计算结果设置的不同 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 摩尔量比例分组, 以及实际的 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 摩尔量比例如表 3 所示, 表 3 中平均氧气摩尔量的数据以平均值 \pm 误差的形式呈现, 为各组测得

的 2 个生物平行的氧气摩尔量平均值。其中比例③(0.85:0.15)与 *Nitrobacter* sp. N1 的最优比例计算结果相近。培养实验的初始 pH 都接近中性, 为 6.9–7.0。

如图 2 所示, 在培养过程中, 各组底物消

表3 N1菌株培养实验的分组及各组的实际 O_2 与 HCO_3^- (CO_2)的摩尔量比例

Table 3 The groups of N1 strain culture experiment and the actual molar ratio of O_2 to HCO_3^- (CO_2) in each group

Groups	Oxygen addition (mL)	Average oxygen volume fraction (%)	Average molar quantity of oxygen ($\times 10^{-4}$ mol)	Molar quantity of bicarbonate ($\times 10^{-4}$ mol)	Actual molar ratio of oxygen to bicarbonate
① (0.25:0.75)	0.74	1.143	0.327 \pm 0.041	0.95	0.256:0.744
② (0.55:0.45)	1.72	2.832	0.809 \pm 0.012	0.55	0.595:0.405
③ (0.85:0.15)	2.57	4.031	1.152 \pm 0.013	0.20	0.852:0.148

耗及产物产生的速率表现为与氧气的量呈正相关。当氧气的量高于最优分配比例所需的量时(即③和对照组),生长的稳定期与底物消耗完的时间相邻,在底物耗完后的48 h内进入衰亡期。当氧气的量低于最优分配比例所需的量时(即①②),生物量最大的稳定期与底物消耗完的时间不相关,稳定期在底物消耗速率下降时出现,且在底物消耗完之前已出现衰亡期。推测该 *Nitrobacter* 菌株在 5 mmol/L NO_2^- 条件下生长时,若长期处于低于最优比例氧含量的环境中,生长增殖受一定的抑制,表明在该底物条件下其对氧的依赖性较高。对各组的生物量积累进

行方差分析,①②③组之间的生物量积累存在显著差异,①②的生物量积累显著低于③和对照组,表明在该底物条件下,高于最优比例的氧含量有利于其生物量的积累。相比之下,③与对照组的生物量积累不存在显著差异,能达到 7×10^6 CFU/mL,其中③培养基的 HCO_3^- 浓度为 0.4 mmol/L,显著低于对照组的 2.5 mmol/L HCO_3^- 浓度,但仍能达到与对照组相近的生物量,表明该菌株对 CO_2 的需求量较低。在 5 mmol/L NO_2^- 条件下,该 *Nitrobacter* 菌株表现出倾向于较高氧气但对 CO_2 需求低的生长特性,与计算得到的最优分配比例相符。

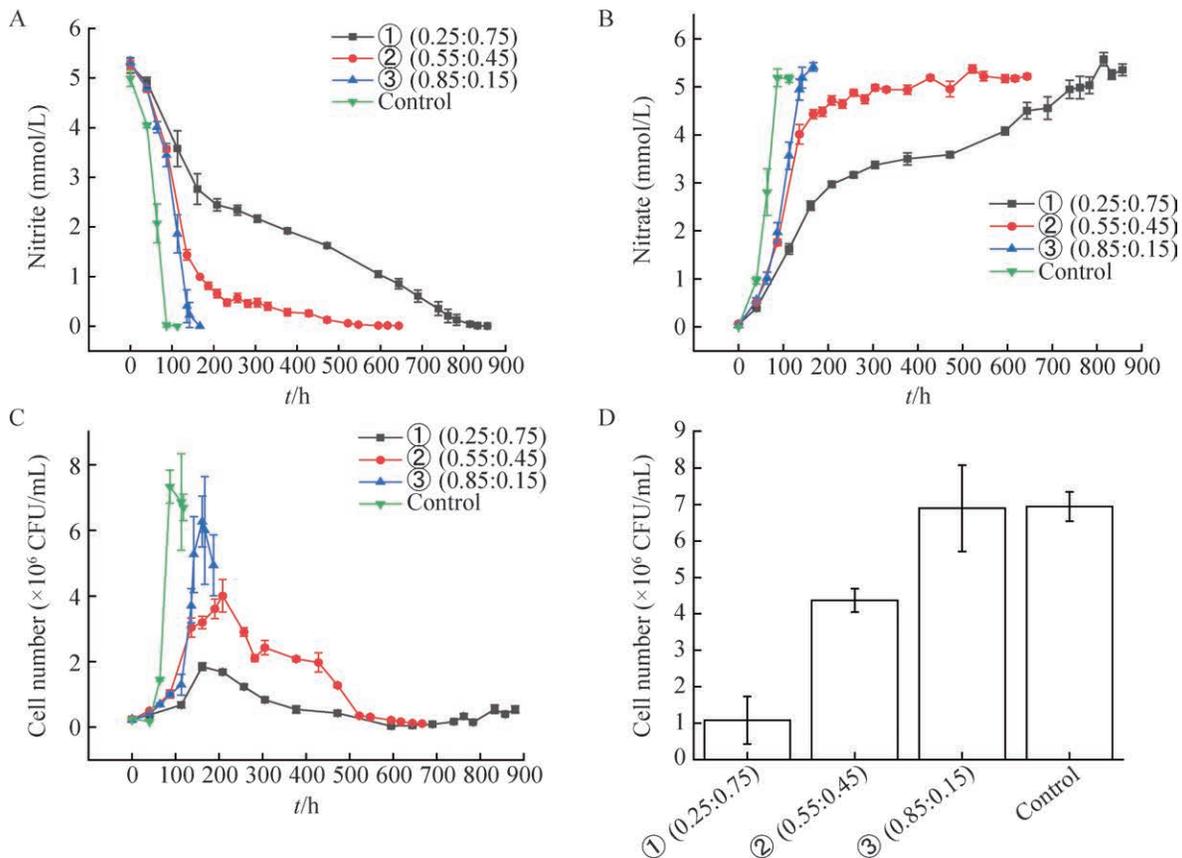


图2 N1菌株纯培养的 NO_2^- 和 NO_3^- 浓度变化、生物量变化和生物量积累。A: 亚硝酸盐; B: 硝酸盐; C: 生物量变化; D: 生物量积累。

Figure 2 Changes of nitrite and nitrate concentrations, biomass change and biomass accumulation in pure culture of N1 strain. A: Nitrite; B: Nitrate; C: Biomass change; D: Biomass accumulation.

2.2.3 氨氧化细菌 *Nitrosomonas* sp. SCUT-1 的纯培养验证

在 50 mL 液体培养基中, 所添加的 1 mmol/L NH_4^+ 被氧化后进入呼吸链的电子量为 1×10^{-4} mol, 所需 O_2 和 CO_2 的总量为 0.25×10^{-4} mol。根据最优比例计算结果设置的不同 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 摩尔量比例分组, 以及实际的 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 摩尔量比例如表 4 所示, 表中平均氧气摩尔量的数据以平均值 \pm 误差的形式呈现, 为各组测得的 2 个生物平行的氧气摩尔量平均值。其中比例②(0.55:0.45)与 *Nitrosomonas* sp. SCUT-1 的最优比例计算结果相近。

如图 3 所示, 在培养过程中, 实验组培养液的 pH 在 7.0–7.5 之间, 而对照组 pH 上升到 8.0, 可能是导致对照组氨氧化和细胞增殖停止的主要原因, 则对照组的生长量被显著低估。实验组均在 600 h 后消耗完底物, 但在培养前期消耗不同浓度底物后进入稳定期并快速进入衰亡期, 为了更严谨地比较, 利用单位 NH_4^+ 浓度生物量积累来校正。在该底物条件下, 比例③有最高生物量积累, 达 6.5×10^5 CFU/mL, 比例①有最优的单位 NH_4^+ 浓度生物量积累, 达 1.5×10^6 CFU/(mL·(mmol/L))。方差分析表明, ①②③的单位 NH_4^+ 浓度生物量积累之间不存在显著差异, 均达到 1.3×10^6 CFU/(mL·(mmol/L)) 以上。在 $P < 0.1$ 下可认为实验组的单位 NH_4^+ 浓度生物量积累都显著高于对照组。由于本研究

的对照组生物量被显著低估, 则与 Wu 等^[6]研究中同一菌株在 O_2 和 HCO_3^- 充足条件下的单位 NH_4^+ 浓度生物量积累 [1.07×10^6 CFU/(mL·(mmol/L))] 相比, 本研究实验组的单位 NH_4^+ 浓度生物量积累高 25%–40%。该结果表明, 控制 O_2 和 CO_2 的摩尔量比例有助于提高该 AOB 菌株对底物氨的利用效率, 从而提高单位 NH_4^+ 浓度的生物量积累, 与最优电子分配比例的计算原则部分相符。然而, 当 O_2 和 CO_2 的量都较低时, 可能不利于该菌株固碳的正常进行, 只能维持细胞的代谢, 导致后期的细胞增殖终止。

3 讨论与结论

化能自养细菌在废水处理中起重要作用, 但其生长缓慢、生物量较低、对环境变化高度敏感, 导致培养难度较大。有氧条件下, 化能自养细菌氧化底物产生的电子进入呼吸链用于 ATP 和还原力的合成, 最终按一定比例分配给 O_2 和 CO_2 。本研究针对化能自养细菌培养困难的问题, 从维持细胞内 pH 平衡和最适能量代谢的角度, 计算得出了 SOB 菌株 *Halothiobacillus* sp. DCM-3、NOB 菌株 *Nitrobacter* sp. N1 以及 AOB 菌株 *Nitrosomonas* sp. SCUT-1 氧化相应底物产生的电子最终分配给 O_2 与 CO_2 的最优比例。根据计算结果, 以上化能自养细菌氧化 1 mmol/L 的底物时, 对 O_2 的需求低于空气的氧气浓度(21%), 而所需 CO_2 浓度高于空气的 CO_2

表4 SCUT-1菌株培养实验的分组及各组的实际 O_2 与 HCO_3^- (CO_2)的摩尔量比例

Table 4 The groups of SCUT-1 strain culture experiment and the actual molar ratio of O_2 to HCO_3^- (CO_2) in each group

Groups	Oxygen addition (mL)	Average oxygen volume fraction (%)	Average molar quantity of oxygen ($\times 10^{-4}$ mol)	Molar quantity of bicarbonate ($\times 10^{-4}$ mol)	Actual molar ratio of oxygen to bicarbonate
① (0.25:0.75)	0.00	0.125	0.036 \pm 0.001	0.19	0.158:0.842
② (0.55:0.45)	0.16	0.499	0.143 \pm 0.026	0.11	0.565:0.435
③ (0.85:0.15)	0.35	0.674	0.193 \pm 0.018	0.04	0.828:0.172

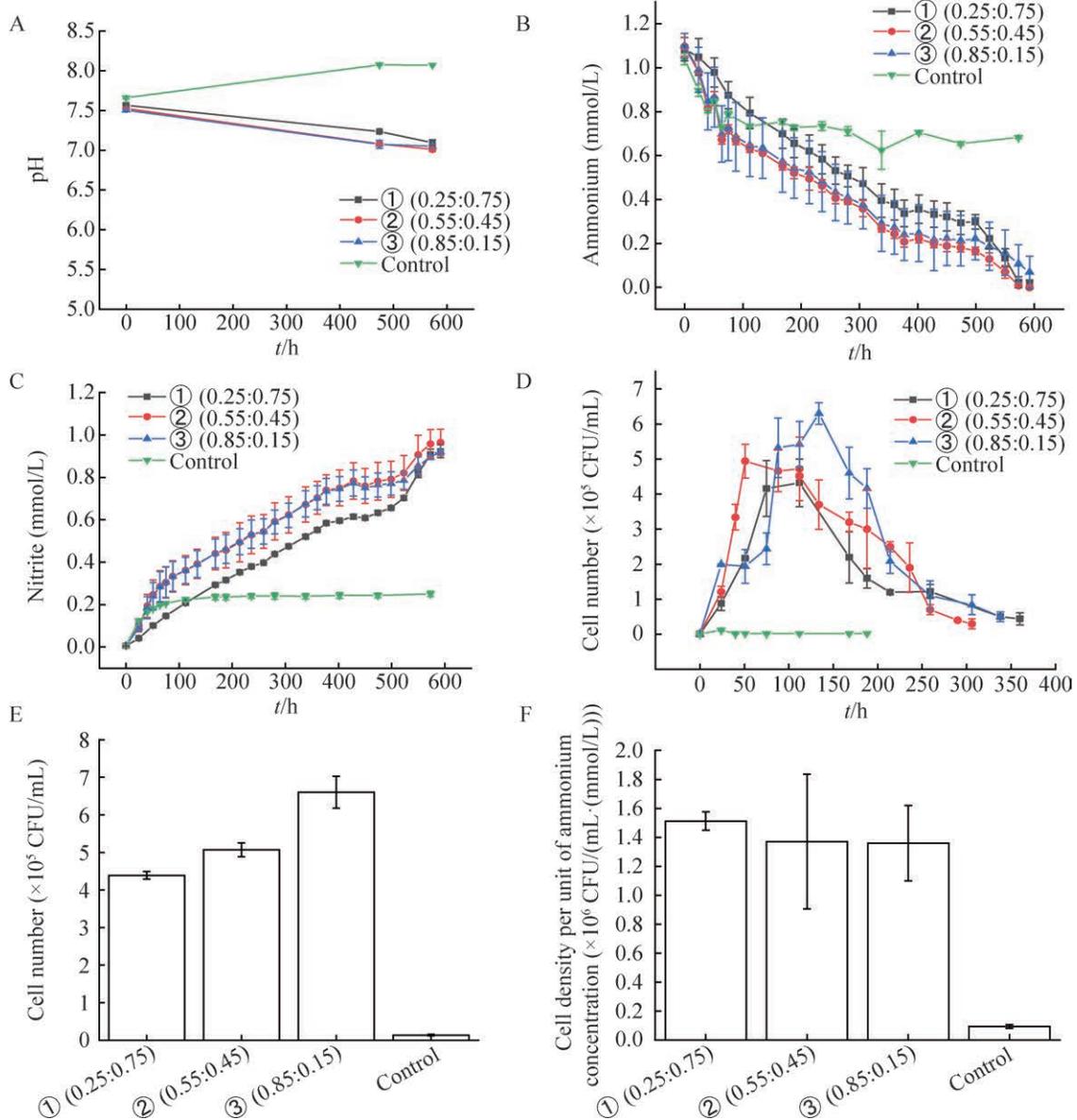


图3 SCUT-1菌株纯培养的pH、NH₄⁺和NO₂⁻浓度变化、生物量变化、生物量积累和单位NH₄⁺浓度生物量积累。 A: pH; B: 铵盐; C: 亚硝酸盐; D: 生物量变化; E: 生物量积累; F: 单位NH₄⁺浓度生物量积累。

Figure 3 Changes of pH, ammonium and nitrite concentrations, biomass change, biomass accumulation and biomass accumulation per unit NH₄⁺ concentration in pure culture of SCUT-1 strain. A: pH; B: Ammonium; C: Nitrite; D: Biomass change; E: Biomass accumulation; F: Biomass accumulation per unit NH₄⁺ concentration.

浓度(0.04%), 因此其难培养的可能原因之一是培养过程中需适当控制低氧气浓度及补充适量的无机碳。另外, 即使是基于最优电子分配比例的条件, 以上化能自养细菌的能量合成效率

仍低于异养细菌。异养细菌氧化 1 分子葡萄糖经过糖酵解和 TCA 循环形成 CO₂, 即可产生 4 分子 ATP、10 分子 NADH、2 分子 FADH₂, 最终可形成 26 ATP/葡萄糖(假设 1 分子 NADH

氧化形成 2 分子 ATP, 1 分子 FADH_2 氧化形成 1 分子 ATP)。相较于异养细菌, 化能自养细菌的单位底物浓度能量合成效率较低, 且底物氧化产生的电子还需用于合成还原力, 因此单位底物浓度积累的生物量比较低。

经计算, NOB 另一类群 *Nitrospira* 的最优电子分配比例约为 0.6:0.4, 氨氧化古菌的最优电子分配比例为 0.586:0.414 (或 0.524:0.476), 计算过程在附图[数据已提交国家微生物科学数据中心 (<http://nmdc.cn>), 编号: NMDCX0001727]。中。以上计算结果有助于解释化能自养硝化微生物在低氧浓度下的表现。Hink 等^[34]的研究表明, 在相同底物浓度下, AOA 可能表现出比 AOB 略高的氧气亲和力, 与 AOA 和 AOB 的最优比例计算结果相符。根据计算结果, AOB 和 *Nitrospira* 对氧的需求均低于 *Nitrobacter*, 而 AOB 与 *Nitrospira* 的相近。Sliemers 等^[35]的研究表明, 在 AOB 与 NOB 共培养过程中, 当溶氧浓度维持在 $2.3 \mu\text{mol/L}$ (0.005 6%) 时, AOB、*Nitrospira* 和 *Nitrobacter* 分别约占真细菌细胞群的 65%、15% 和 3%, AOB 和 *Nitrospira* 体现出比 *Nitrobacter* 更高的氧亲和力。相比之下, 在 Law 等^[36]的研究中, 与共存的 AOB 相比, *Nitrospira* 对 O_2 的亲和力更高。由此可得, 在同一混合样品中, 低氧浓度下 AOB 和 *Nitrospira* 都有可能成为优势菌, 即两者对氧的亲和力相近, 与计算结果吻合。

本研究根据最优分配比例的计算结果提出了基于电子分配的化能自养细菌培养策略, 设置 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 的摩尔量比例, 以形成相应的电子分配比例。其中, 以 $1 \text{ mmol/L S}_2\text{O}_3^{2-}$ 为底物时, *Halothiobacillus* sp. DCM-3 的最优分配比例确实有助于得到该菌株的最优生物量积累。SOB 菌株 *Halothiobacillus* sp. LS2 以 1 mmol/L 硫代硫酸盐为底物时, 在 20% 氧浓度

下的最大生物量为 $1.4 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$, 在 5% 氧浓度下的最大生物量为 $1.7 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$, 表明适当控制低 O_2 摩尔量有助于提高该 SOB 菌株的生物量积累(是 20% 氧浓度的 1.2 倍), 与本研究的计算结果部分相符^[5]。本研究中, DCM-3 菌株在最优比例组的生物量积累是对照组的 2.2 倍, 表明限制 O_2 和 CO_2 摩尔量并形成最优比例, 对于提高该 SOB 菌株的生物量积累更有效。

以 5 mmol/L NO_2^- 为底物培养 *Nitrobacter* sp. N1, 当氧气的量低于最优分配比例所需的量时, 该菌株在底物未耗完且消耗速率下降的时候进入稳定期, 生物量积累显著低于氧含量较高的情况, 可能与长期处于低氧环境有关。在高瑶远等^[37]的研究中, 用低溶氧条件驯化硝化活性污泥后, 其中未检测到 *Nitrobacter*。推测长期低于最优比例氧含量的环境对 *Nitrobacter* 的生长活性有抑制作用。①②实验组的生物量积累较低, 也可能与缺氧条件下固定的 CO_2 不同程度地形成 PHB 储存在胞内, 用于生长的固碳量降低有关^[38]。然而, 在该底物浓度下, 生长活性正常的 *Nitrobacter* 对 CO_2 的需求较低。Vadivelu 等^[39]的研究中, 存在或不存在 CO_2 不会影响 *Nitrobacter* 富集培养物对 NO_2^- 的亲合常数 K_s , 即不影响能量代谢效率, 与本研究的结果相符。因此在 5 mmol/L 底物浓度下, *Nitrobacter* 倾向于较高氧气但对 CO_2 需求低的生存要求与计算得到的最优分配比例相符, 在该底物浓度下, 给予限制的 O_2 和 CO_2 摩尔量, 并形成最优比例, 可达到和充足 O_2 与 HCO_3^- (CO_2) 条件下相近的生物量积累。

以 1 mmol/L NH_4^+ 为底物培养 *Nitrosomonas* sp. SCUT-1, 实验组中该菌株在培养前期就进入稳定期, 但与 Wu 等^[6]研究中同一菌株的生物量积累($1.6 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$)相比, 本研究的生物量积

累约为其培养结果的 37%，可能受到碳限制的影响。Mellbye 等^[40]的研究发现，在碳限制时，*Nitrosomonas europaea* 的 RuBisCO 表达显著上调，而细胞密度下降至碳充足时的 37%–66%，与本研究中实验组的生长速率高但生物量积累降低的现象相符。另外，在 *Nitrosomonas ureae* 的基因组中缺乏编码羧酶体的基因，固碳途径的起始酶为胞质的 I 型 RuBisCO，对 CO₂ 的浓度要求提高^[41–42]。氧浓度低 CO₂ 浓度高的①组有较优的单位 NH₄⁺浓度生物量积累。与 Wu 等^[6]研究中同一菌株在 O₂ 和 HCO₃⁻充足条件下的单位 NH₄⁺浓度生物量积累相比，本研究实验组的单位 NH₄⁺浓度生物量积累高出 25%–40%。这可能是通过限制 O₂ 和 CO₂ 摩尔量比例限制了 RuBisCO 的加氧酶活性，以及限制了氨氧化产生电子的分配去向，从而提高了实验组的固碳效率。对该 AOB 菌株最优电子分配比例的计算高估了缺乏羧酶体情况下 RuBisCO 的固碳效率，低估了碳限制对 AOB 的复杂影响。给予的 CO₂ 浓度偏低，导致生物量积累低于适宜条件下的表现。然而，实验组的单位 NH₄⁺浓度生物量积累显著高于对照组，表明控制 O₂ 和 CO₂ 的摩尔量并形成一定比例，有助于提高该 AOB 菌株对底物 NH₄⁺的利用效率，从而提高单位 NH₄⁺浓度的生物量积累，与最优电子分配比例的计算原则部分相符。

本研究结果表明，基于电子分配的化能自养细菌培养策略，通过限制 O₂ 和 CO₂ 摩尔量，并形成一定比例，从而限制电子分配的培养条件，有助于提高同一底物条件下的生物量积累，为化能自养细菌的培养提供一定的策略参考。在 ATCC 保藏中心，用于培养 *Halothiobacillus* 的培养基 ATCC Medium 290: S-6 medium for *Thiobacilli*、用于培养 *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 的培养基 ATCC Medium 480:

Nitrobacter medium 203、用于培养 *Nitrosomonas* 的培养基 ATCC Medium 2265: *Nitrosomonas europaea* medium，均未写明一定底物条件下所需的 O₂ 和 CO₂ 摩尔量。相比之下，在 Wu 等^[6]的研究中，低于 21% O₂ 更有利于 5 株 *Nitrosomonas* 的生长，表明好氧的化能自养细菌并不一定最适合在 21% O₂ 下生长。在设计培养条件时，除了参考现有可查阅的培养条件，还应根据酶的底物亲和力给予适当浓度的电子供体，并根据其氧化产生的电子量给予相应摩尔量及一定比例的 O₂ 和 CO₂，使电子合理分配，提高固碳效率和细胞得率。本研究的培养策略有助于对化能自养细菌的培养条件进行精细的优化，使底物氧化产生的有限电子能够更充分地被用于细胞的生长增殖。然而，该策略在其他化能自养细菌培养中的适用性及设置 O₂ 和 CO₂ 比例的量值限制有待进一步探究。

作者贡献声明

何晓敏：研究设计、数据收集和处理、论文撰写；林炜铁：研究构思、论文修改；罗剑飞：研究构思、论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] LIN S, MACKAY HR, HAO TW, GUO G, van LOOSDRECHT MCM, CHEN GH. Biological sulfur oxidation in wastewater treatment: a review of emerging opportunities[J]. *Water Research*, 2018, 143: 399-415.
- [2] YE JJ, LIU JY, YE M, MA X, LI YY. Towards advanced nitrogen removal and optimal energy recovery from leachate: a critical review of anammox-based processes[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2020, 50(6): 612-653.
- [3] WINKLER MK, STRAKA L. New directions in biological nitrogen removal and recovery from wastewater[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019,

- 57: 50-55.
- [4] NOWKA B, DAIMS H, SPIECK E. Comparison of oxidation kinetics of nitrite-oxidizing bacteria: nitrite availability as a key factor in niche differentiation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(2): 745-753.
- [5] 曲珊珊, 严洪珊, 林炜铁, 罗剑飞. 化能自养硫氧化细菌 *Halothiobacillus* sp. LS2 介导的以乙炔为电子受体的硫氧化反应[J]. *微生物学报*, 2021, 61(6): 1488-1495.
- QU SS, YAN HS, LIN WT, LUO JF. Anaerobic sulfur oxidation with acetylene as electron acceptor mediated by chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium *Halothiobacillus* sp. LS2[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(6): 1488-1495 (in Chinese).
- [6] WU JJ, ZHAN MJ, YUAN LL, ZHU YY, LIN WT, LUO JF. Sealing solid agar in serum bottles for rapid isolation and long-term preservation of chemoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Water Research*, 2024, 260: 121916.
- [7] STEIN LY. Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 49: 9-15.
- [8] LIU BC, LIN WT, HUANG SX, SUN QY, YIN H, LUO JF. Removal of Mg^{2+} inhibition benefited the growth and isolation of ammonia-oxidizing bacteria: an inspiration from bacterial interaction[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 838: 155923.
- [9] ZHANG SW, FU XH, HAN YL, WEI LW, LIU MN, WANG YN, WANG L. Main components of free organic carbon generated by obligate chemoautotrophic bacteria that inhibit their CO_2 fixation[J]. *iScience*, 2022, 25(12): 105553.
- [10] BALOWS A, TRÜPER HG, DWORKIN M, HARDER W, SCHLEIFER KH. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications[M]. New York, NY: Springer, 1992: 3352-3378.
- [11] 刘步蟾. 硝化细菌的分离纯化、环境响应及在废水处理中的应用[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2021.
- LIU BC. Isolation, purification, environmental response and application of nitrifying bacteria in wastewater treatment[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [12] 中华人民共和国环境保护部. 土壤 氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的测定 氯化钾溶液提取-分光光度法: HJ 634—2012[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. Soil-Determination of ammonium, nitrite and nitrate by extraction with potassium chloride solution-spectrophotometric methods: HJ 634—2012[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2012 (in Chinese).
- [13] CAWSE PA. The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry[J]. *Analyst*, 1967, 92(1094): 311-315.
- [14] HOOD-NOWOTNY R, UMANA NHN, INSELBACHER E, OSWALD-LACHOUANI P, WANKE W. Alternative methods for measuring inorganic, organic, and total dissolved nitrogen in soil[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2010, 74(3): 1018-1027.
- [15] KAILA VRI, WIKSTRÖM M. Architecture of bacterial respiratory chains[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(5): 319-330.
- [16] LAMBERT AJ, BRAND MD. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane[J]. *The Biochemical Journal*, 2004, 382(Pt 2): 511-517.
- [17] MITCHELL P. Possible molecular mechanisms of the proton motive function of cytochrome systems[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1976, 62(2): 327-367.
- [18] WIKSTROM MK. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria[J]. *Nature*, 1977, 266(5599): 271-273.
- [19] WEBER J, SENIOR AE. ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase[J]. *FEBS Letters*, 2003, 545(1): 61-70.
- [20] KÜHLBRANDT W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2019, 88: 515-549.
- [21] FRIEDRICH CG, BARDISCHEWSKY F, ROTHER D, QUENTMEIER A, FISCHER J. Prokaryotic sulfur oxidation[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(3): 253-259.
- [22] GHOSH W, DAM B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(6): 999-1043.
- [23] REIJERSE EJ, SOMMERHALTER M, HELLWIG P, QUENTMEIER A, ROTHER D, LAURICH C, BOTHE E, LUBITZ W, FRIEDRICH CG. The unusual redox centers of SoxXA, a novel c-type heme-enzyme essential for chemotrophic sulfur-oxidation of *Paracoccus pantotrophus*[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(26): 7804-7810.
- [24] SHARKEY TD. Discovery of the canonical Calvin-Benson cycle[J]. *Photosynthesis Research*, 2019, 140(2): 235-252.
- [25] SPAANS SK, WEUSTHUIS RA, van der OOST J, KENGEN SWM. NADPH-generating systems in bacteria and Archaea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 742.
- [26] DAIMS H, LÜCKER S, WAGNER M. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(9): 699-712.
- [27] SIMON J, KLOTZ MG. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2013, 1827(2): 114-135.
- [28] STARKENBURG SR, CHAIN PSG, SAYAVEDRA-SOTO LA, HAUSER L, LAND ML, LARIMER FW, MALFATTI SA, KLOTZ MG, BOTTOMLEY PJ, ARP DJ, HICKEY WJ. Genome sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 2050-2063.
- [29] CARANTO JD, LANCASTER KM. Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America, 2017, 114(31): 8217-8222.
- [30] LANCASTER KM, CARANTO JD, MAJER SH, SMITH MA. Alternative bioenergy: updates to and challenges in nitrification metalloenzymology[J]. *Joule*, 2018, 2(3): 421-441.
- [31] GONZÁLEZ-CABALEIRO R, CURTIS TP, OFİTERU ID. Bioenergetics analysis of ammonia-oxidizing bacteria and the estimation of their maximum growth yield[J]. *Water Research*, 2019, 154: 238-245.
- [32] KIM HJ, ZATSMAN A, UPADHYAY AK, WHITTAKER M, BERGMANN D, HENDRICH MP, HOOPER AB. Membrane tetraheme cytochrome c_{m552} of the ammonia-oxidizing *Nitrosomonas europaea*: a ubiquinone reductase[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(25): 6539-6551.
- [33] CHAIN P, LAMERDIN J, LARIMER F, REGALA W, LAO V, LAND M, HAUSER L, HOOPER A, KLOTZ M, NORTON J, SAYAVEDRA-SOTO L, ARCIERO D, HOMMES N, WHITTAKER M, ARP D. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(9): 2759-2773.
- [34] HINK L, LYCUS P, GUBRY-RANGIN C, FROSTEGÅRD Å, NICOL GW, PROSSER JI, BAKKEN LR. Kinetics of NH_3 -oxidation, NO -turnover, N_2O -production and electron flow during oxygen depletion in model bacterial and archaeal ammonia oxidisers[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(12): 4882-4896.
- [35] SLIEKERS AO, HAAIJER SCM, STAFSNES MH, KUENEN JG, JETTEN MSM. Competition and coexistence of aerobic ammonium- and nitrite-oxidizing bacteria at low oxygen concentrations[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(6): 808-817.
- [36] LAW Y, MATYSIK A, CHEN XM, SWA THI S, NGOC NGUYEN TQ, QIU GL, NATARAJAN G, WILLIAMS RBH, NI BJ, SEVIOUR TW, WUERTZ S. High dissolved oxygen selection against *Nitrospira* sublineage I in full-scale activated sludge[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(14): 8157-8166.
- [37] 高瑶远, 彭永臻, 包鹏, 郭思宇, 王淑莹. 低溶解氧环境下全程硝化活性污泥的特性[J]. *中国环境科学*, 2017, 37(5): 1769-1774.
- GAO YY, PENG YZ, BAO P, GUO SY, WANG SY. The characteristic of activated sludge in nitrifying low-DO reactor[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(5): 1769-1774 (in Chinese).
- [38] FREITAG A, RUDERT M, BOCK E. Growth of *Nitrobacter* by dissimilatoric nitrate reduction[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1987, 48(1/2): 105-109.
- [39] VADIVELU VM, YUAN ZG, FUX C, KELLER J. Stoichiometric and kinetic characterisation of *Nitrobacter* in mixed culture by decoupling the growth and energy generation processes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(6): 1176-1188.
- [40] MELLBYE BL, GIGUERE A, CHAPLEN F, BOTTOMLEY PJ, SAYAVEDRA-SOTO LA. Steady-state growth under inorganic carbon limitation conditions increases energy consumption for maintenance and enhances nitrous oxide production in *Nitrosomonas europaea*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(11): 3310-3318.
- [41] 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.
- [42] YOSHIZAWA Y, TOYODA K, ARAI H, ISHII M, IGARASHI Y. CO_2 -responsive expression and gene organization of three ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase enzymes and carboxysomes in *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(17): 5685-5691.