

在无有机碳源和缺氧条件下自养菌和异养菌脱氨氮作用*

沈珈琦 范伟平** 吴晟旻 王晋宇 李霜

(南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009)

摘要: 在无有机碳源和缺氧条件下, 应用 ^{15}N 示踪考察4株具有氨氧化作用的菌株在膜反应器中的氨氧化产气情况。当溶解氧浓度(DO) $< 0.5\text{mg/L}$ 的缺氧条件下, 自养菌 *Nitrosomonas* sp. 单株培养, 能将6.3%的氨氮转化为氮气, $^{15}\text{N}_2$ 产生量占氨氮消耗量的21.86%。自养菌株与异养菌株混合培养, 可将30.86%的氨氮转化为氮气, $^{15}\text{N}_2$ 产生量占氨氮消耗量的80.38%。在无有机碳的条件下, 自养菌和异养菌的协同代谢作用, 可大大提高缺氧氨氧化产氮气的效率。

关键词: ^{15}N 示踪, 协同代谢, 脱氨氮

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0094-06

Removal of $\text{NH}_3\text{-N}$ by Microbe Without Organic Carbon Source under Oxygen Limited Condition*

SHEN Jia-Qi FAN Wei-Ping** WU Sheng-Min WANG Jin-Yu LI Shuang

(College of Pharmacy and Life Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009)

Abstract: It was investigated by ^{15}N tracer that four strains capable of ammonia oxidation under the condition of limited dissolved oxygen (DO) and without organic carbon source in a sealed bio-membrane reactor. Each strain was cultured at room temperature, a sealed vessel filled with argon and an appropriate quantity of oxygen. When the condition kept DO $< 0.5\text{mg/L}$, 6.3% of $^{15}\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$ could be converted into $^{15}\text{N}_2$ by the single strain of *Nitrosomonas* sp. $^{15}\text{N}_2$ occupied 21.86% of the quantity of consumed $^{15}\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$; whereas 30.86% of $^{15}\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$ could be converted into di-nitrogen gas by mixed autotrophic and heterotrophic strains under the same condition, and $^{15}\text{N}_2$ occupied 80.38% of the quantity of $^{15}\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$ consumed. Cooperative metabolism of autotrophic and heterotrophic strains speeded up the transformation of $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ and production of N_2 under DO $< 0.5\text{mg/L}$ condition without organic carbon source in the membrane reactor.

Key words: ^{15}N tracer, Cooperative metabolism, Removal of $\text{NH}_3\text{-N}$

从微生物代谢基础理论研究出发, 寻求新的生物脱氮技术成为微生物学家和水处理技术人员研究的热点之一。自从1986年Poth报道分离得到一株能够产生氮气的 *Nitrosomonas* sp.^[1]以来, 有关氨氧化产氮气的反应机理报道不断, Van de Graaf等人应用 ^{15}N 示踪技术揭示了厌氧流动床的氨氧化产氮气的反应机理, 提出 NH_2OH 是异养菌厌氧氨氧化代谢中关键的电子受体的假说^[2,3]。Jones比较了自养菌与异养菌厌氧氨氧化产氮气的反应机理^[4], Jetten和Schmidt等人研究发现具有全自养脱氮能力的厌氧菌株 *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*等^[5-7]。近来从分子生物学角度分析微生物酶系在氨氧化过程中作用的研究也有报道^[8]。但至今有关

*江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK2002019)

**通讯作者 Tel: 025-83587339, E-mail: fwpzhu@sohu.com

收稿日期: 2005-04-19, 修回日期: 2005-05-26

缺氧的条件下, 自养菌和异养菌协同催化氨氧化作用机理仍然不清楚^[6]。本文应用¹⁵N示踪技术考察自养菌和异养菌在缺有机碳和缺氧的条件下氧化氨产氮气过程, 分析两类菌协同代谢加速氨氧化的机理, 这对开发氨氧化脱除新工艺有指导意义, 国内还未见有相同报道。

1 材料与方法

1.1 菌株

采用 Skerman's 亚硝化单胞菌培养基^[9]和硅胶平板^[10], 由南京市某污水处理厂序批式曝气活性污泥反应器 (SBR) 中分离得到 4 株菌^[11], 标记为 dN2, dN3, dN11, dN13。采用美国 BIOLOG 自动微生物鉴定系统 (MicroStation) 生理生化性质鉴定结果表明 dN2 可能属 *Nitrosomonas*, dN11 和 dN13 可能属 *Pseudomonas*; 应用 PCR 技术分析, 发现其中 dN2 与已报道的 *Nitrosomonas europaea* 的 16S rDNA 具有 98.9% 的同源性^[12]; dN11 与 *Pseudomonas fluorescens* 具有 99.0% 的同源性; dN13 与 *Pseudomonas fluorescens* 具有 99.38% 的同源性, dN3 显微形貌丝状, 尚未找到同源性较高的相关信息。

1.2 培养基

① *Nitrosomonas* 属的富集培养基: NaCl 0.3g, MgSO₄ · 7H₂O 0.14g, FeSO₄ · 7H₂O 0.03g, (¹⁵NH₄)₂SO₄ (¹⁵N 丰度为 98.37%, 上海化工研究院, ¹⁵N 的丰度 = (¹⁵N 量/总氮量) × 100%) 0.6g, 10mL KH₂PO₄ 溶液 (0.1mol/L), 以上溶于 90 mL 水中, 加蒸馏水稀释至 1,000 mL, 再加 CaCO₃ 10g 和 0.4mL 微量元素溶液 (其中含 Mn 22μg, B 21μg, Cu 17μg, Zn 16μg, Co 14μg)。培养基中约含 ¹⁵NH₄⁺ - ¹⁵N 130mg/L, 培养基于 120°C 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20min。

② 异养菌的富集培养基: 在以上培养基中添加 CH₃COONa (0.20g/L), 其它与①相同。

③ 反硝化培养基: 3 株异养菌株分别好氧培养、离心收集得到菌泥后, 各取 1g 菌泥分别加入 500mL 的装满反硝化培养基的三角瓶中改为严格厌氧培养, 唯一碳源为 CH₃COONa (0.20g/L), 唯一氮源分别为 NaNO₂ (0.30g/L) 和 ¹⁵NH₄NO₃ (¹⁵N 丰度为 98.0%, 上海化工研究院, 0.30g/L), pH7.2, 其它与①相同。

1.3 菌体富集培养

4 株菌由平板接种后, 分别采用上述相应的富集培养基以 SBR 方式, 室温下富集培养 1 个月。每天流加适量的 NaHCO₃ 饱和溶液以保持培养液 pH 在 7.2 左右。培养结束, 菌体浓度约为 10⁶ ~ 10⁸ 个/mL 之间, 将培养液离心, 得到菌泥待用。

1.4 异养菌的反硝化性能考察

将 dN3、dN11 与 dN13 菌株的菌泥采用③号培养基以液体石蜡封住液面, 严格厌氧培养, 考察其分别以 NaNO₂、¹⁵NH₄NO₃ 为氮源培养过程中 NO₂⁻ 含量, 用氩气吹集产生的气体, 定性检测其成分。

1.5 缺氧氨氧化实验

(1) 将弹性纤维膜作为填料放入反应器: 将 4 株菌分别富集培养、离心得到的湿菌泥 3g, 加至含 3L ①号培养基的反应器中培养; 考察混合菌株时, 各取单株湿菌泥 0.75g, 混合后得到的菌泥 3g 加入至含有 3L ①号培养基的反应器中培养。

(2) 单菌株及混合菌株缺氧氨氧化实验时, 用混合气体置换实验系统的气氛, 其成分为 Ar (99.99%); O₂ (99.99%) 体积比为 99: 1, 将反应器中培养液顶出 0.5L 溶液, 控制给气量, 保持每个反应器培养液中 DO < 0.5mg/L 的缺氧状态, 并维持培养液 pH7.2 ~ 7.5 之间。对于 dN2 和混合菌株, 每天取样, 经离心去除水样中菌体, 检测样品液体中 NH₄⁺、NO₂⁻、NO₃⁻ 浓度; 对于 dN3、dN11 和 dN13 菌株, 则每隔 3 d 取样, 作相同的处理和检测。实验结束时分别检测培养液上方气相中 N₂ 的含量以及相应的 ¹⁵N 的丰度。

1.6 检测方法

硝酸盐氮、亚硝酸盐氮和氨氮含量的测定^[13]: 分别取样采用酚二磺酸光度法、N-(1-萘基)-乙二胺光度法和纳氏试剂光度法。用同位素比率质谱仪 (Thermo Finnigan MAT253, 美国热电公司菲尼根质谱分公司) 检测气相 ¹⁵N 的丰度, 应用气相色谱仪 (CX-206, 江南分析仪器厂), 以氢气为载气, 检测系统内由微生物代谢产生的 N₂ 和 N₂O 含量。

2 结果

2.1 异养菌的反硝化性能

将 dN3、dN11 与 dN13 3 株菌分别置于三角瓶中严格厌氧培养, 只加 NaNO₂ 时, 各株菌 2d 差不多可将溶液中 NO₂⁻ 消耗完 (见图 1A); 只加 ¹⁵NH₄NO₃ 时, 各株菌利用 NO₃⁻ 呼吸, 都有一个 NO₂⁻ 累积的过程, 在 16 ~ 32h 左右溶液中 NO₂⁻ 浓度最高, 随后下降 (见图 1B)。后者用氩气吹集得到的气体送样检测, 气相质谱检测结果表明有 N₂ 和 N₂O 产生, 二者 ¹⁵N 的丰度基本相等, 都为 45% 左右。以上结果表明这 3 株菌在厌氧环境下都具有反硝化性能, 能以 NO₂⁻ 或 NO₃⁻ 代替分子氧作为无氧呼吸的最终电子受体。

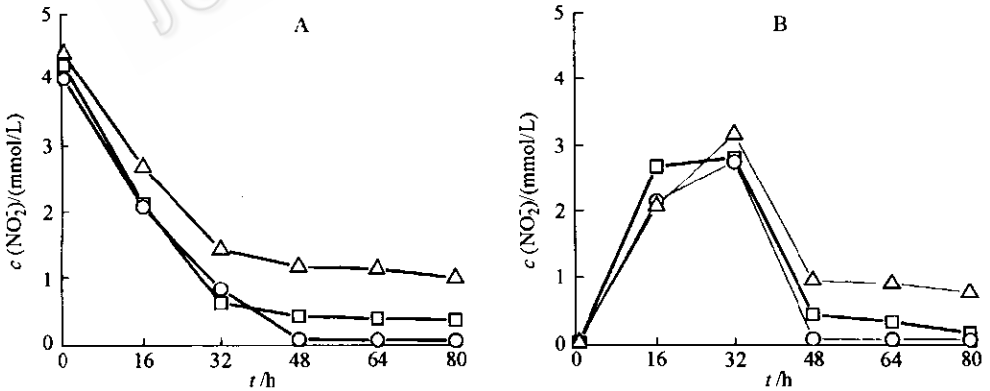


图1 dN3、dN11、dN13 菌株反硝化试验

A 只加 NO₂⁻, B 只加 NO₃⁻

—□— dN3 菌株, —○— dN11 菌株, —△— dN13 菌株

2.2 缺氧条件下单菌和混合菌能源利用对比

单菌株和混合菌株分别在密封反应体系中, DO < 0.5mg/L 的缺氧培养条件下, 只用 (¹⁵NH₄)₂SO₄ 作为能源培养单菌, 氨氧化转化情况如图 2 所示, 混合菌见图 3。单株

菌和混合菌株的氨氧化过程都产生 NO_2^- 的累积, 产生的 NO_3^- 甚少; dN2、dN3、dN11、dN13 和混合菌的氨氧化可使液相总氮含量分别降低 28.81%、11.77%、11.24%、7.67% 和 38.39%。

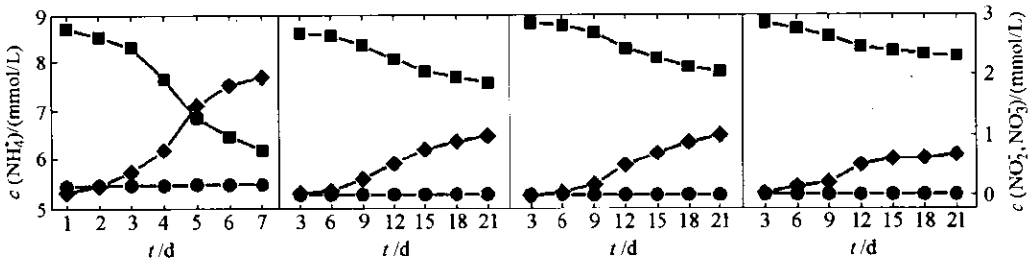


图2 单菌的缺氧氨氧化产生 NO_2^- 和 NO_3^- 量

自左至右分别为 dN2、dN3、dN11、dN13, \blacksquare — NH_4^+ , \blacklozenge — NO_2^- , \bullet — NO_3^-

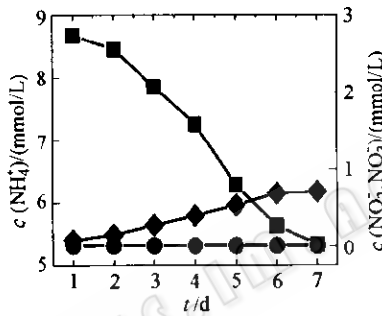


图3 混合菌的缺氧氨氧化产生 NO_2^- 和 NO_3^- 量

\blacksquare — NH_4^+ , \blacklozenge — NO_2^- , \bullet — NO_3^-

2.3 缺氧氨氧化产生气态氮的分析

当反应体系只用 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为能量来源, $\text{DO} < 0.5 \text{mg/L}$ 密闭容器培养条件下, 取样采用气相色谱和质谱仪分析气体的成分, 结果表明: 自养菌 *Nitrosomonas* sp. 密闭容器培养的气样, 经气相色谱检测的结果表明氮气含量为 4.68% (V/V), 质谱仪检测结果表明其中 ^{15}N 的丰度为 64.3%; 同样条件下, 单株异养菌培养的气样基本未检出氮气; 而混合菌培养的气相取样检测结果为: 氮气含量为 20.40% (V/V), 质谱显示 ^{15}N 的丰度达到 72.3%。气相色谱检测结果还表明单株菌和混合菌株产生 N_2O 的量均甚微。 $^{15}\text{N}_2$ — ^{15}N 产生量的计算方法如下:

$$M = M_0 \times V \times A \times B / V_0$$

M —— $^{15}\text{N}_2$ — ^{15}N 产生量 (mg), M_0 ——标准情况下 $1 \text{mol}^{15}\text{N}_2$ — ^{15}N 质量为 30,000mg, V ——反应器液面上方气体体积为 0.5L, A ——气相色谱检测的氮气含量 (%), B —— ^{15}N 的丰度 (%), V_0 ——标准状况下 1mol 气体的体积为 22.4L

对应与图2和图3的数据, 缺氧条件下氨氧化 $^{15}\text{N}_2$ — ^{15}N 产生量及其相关比值见表1。

表1 用①号培养基缺氧条件下氨氧化产气量对比

序号	菌 属	$^{15}\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$	$^{15}\text{N}_2 - ^{15}\text{N}$ 产	$^{15}\text{N}_2 - ^{15}\text{N}$ 产生量	$^{15}\text{N}_2 - ^{15}\text{N}$ 产生量
		消耗量 (mg)	生量 (mg)	占初始 $^{15}\text{NH}_4^+$ — ^{15}N 总量比例 (%)	占 $^{15}\text{NH}_4^+ - ^{15}\text{N}$ 消 耗量比例 (%)
dN2	<i>Nitrosomonas</i>	92.16	20.15	6.30	21.86
dN3	未定	37.66	0	0	0
dN11	<i>Pseudomonas</i>	36.52	0	0	0
dN13	<i>Pseudomonas</i>	24.93	0	0	0
	4 菌株混合	122.86	98.76	30.86	80.38

3 讨论

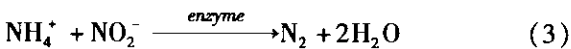
实验结果表明本研究分离得到的3株异养菌,在厌氧条件下,都能利用 NO_2^- 和 NO_3^- 进行无氧呼吸产 N_2 和 N_2O ,当利用 NO_3^- 呼吸时,存在着两阶段氮的还原反应如下:



起始阶段因 NO_3^- 浓度较高,反应(1)速率较快,随着产生的 NO_2^- 浓度增加,反应(1)受到抑制,反应(2)速率迅速增加,消耗 NO_2^- 使两段反应速率达到平衡。因此,3株异养菌利用 NO_3^- 无氧呼吸过程中都存在一个 NO_2^- 累积过程。

本文中的异养菌都是用Skerman's亚硝化单胞菌培养基筛选而得到的,既可利用有机碳作能源,也可在无有机碳存在条件下利用 CO_2 作能源,有氧时可利用 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 呼吸,无氧时可利用 NO_2^- , NO_3^- 呼吸。有文献报道在*Pseudomonas fluorescens*的细胞质空间中存在反硝化酶系^[14];实验考察结果还发现这两株菌在有氧条件下,以乙酸钠为碳源,硝酸钠为唯一氮源的培养过程中,初期有少量氨氮积累的现象(另有文章讨论),总之这两株*Pseudomonas*菌所含酶系非常丰富,根据环境的变化,能相应调节能量代谢途径而生存。

本文筛选的自养菌*Nitrosomonas* sp.可以在缺氧条件下利用 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 作能源利用,将其氧化成 N_2 。在缺氧条件下,以上4菌株共同培养,不供应有机碳源,只供应无机氮源 NH_3 ,氨氧化过程 NO_2^- 累积量少得多,而产 N_2 量较单一*Nitrosomonas* sp.却多得多,此说明*Nitrosomonas* sp.和以上异养菌协同代谢可以增加氨氧化产气的速率:



与文献报道^[15,16]所不同的是,在无有机碳源和缺氧条件下,本实验过程既没有加 CH_3OH ,也没有加 NO_2 。唯一必须条件是膜载体——反应器中弹性纤维膜的存在。

4 结论

由城市污水处理厂筛选得到的1株*Nitrosomonas* sp.,2株*Pseudomonas* sp.,还有1株未定属的异养菌。它们都具有氨氧化性能。应用 ^{15}N 示踪技术考察其在Skerman's亚硝化单胞菌培养基中缺氧氨氧化代谢途径。结果表明:在无有机碳源和缺氧条件下,异养菌和自养菌在挂膜反应器中可以共存和协同代谢脱氨氮,且产氮气较单一*Nitrosomonas* sp.多得多。实验结果对处理缺有机碳高氨氮的废水,开发节能脱氮新工艺的

研究具有重要参考意义。

致谢 本论文气态氮中 ^{15}N 的丰度是由中国科学院南京土壤研究所曹亚澄老师分析, 特表示感谢。

参考文献

- [1] Poth M. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **52** (4): 957~959.
- [2] Van de Graaf A A, Mulder A, De Bruijn P, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (4): 1246~1251.
- [3] Van de Graaf A A, De Bruijn P, Robertson L A, *et al.* *Microbiology*, 1997, **143**: 2415~2421.
- [4] Jones M L, Liehr S K, Classen J J, *et al.* *Advances in Environmental Research*, 2000, **4**: 133~139.
- [5] Jetten M S M, Wagner M, Fuerst J, *et al.* *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, **12**: 283~288.
- [6] Schmidt I, Sliemers Olav, Schmid M, *et al.* *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, **39**: 175~181.
- [7] Schmidt I, Sliemers Olav, Schmid M, *et al.* *FEMS Microbiology Review*, 2003, **27**: 481~492.
- [8] Bothe H, Jost G, Schlöter M, *et al.* *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, **24**: 673~690.
- [9] 中国科学院微生物研究所. 菌种保藏手册. 北京: 科学出版社, 1980. 124~125.
- [10] 郭爱莲, 李振海, 黄淑菊. 西北大学学报《自然科学版》, 1996, **26** (1): 83~86.
- [11] 沈珈琦, 方 莘, 范伟平. 生物加工过程, 2004, **2** (1): 30~34.
- [12] 李 霜, 沈珈琦, 范伟平. 土壤学报, 2005, **42** (16): 1050~1052.
- [13] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1997. 254~281.
- [14] Philippot L, Mirleau P, Mazurier S, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, **1517**: 436~440.
- [15] Schmidt I, Bock E. *Arch Microbiol*, 1997, **167**: 106~111.
- [16] Vidal S, Rocha C, Galvao H. *Chemosphere*, 2002, **48**: 445~451.