

厌氧氨氧化菌特性及其在生物脱氮中的应用*

祖波¹ 张代钧^{1,2**} 白玉华¹

(重庆大学环境科学系 重庆 400030)¹

(重庆大学西南资源开发及环境灾害控制工程教育部重点实验室 重庆 400030)²

摘要: 在无分子氧环境中, 同时存在 NH_4^+ 和 NO_2^- 时, NH_4^+ 作为反硝化的无机电子供体, NO_2^- 作为电子受体, 生成氮气, 这一过程称为厌氧氨氧化。目前已经发现了 3 种厌氧氨氧化菌 (*Brocadia anammoxidans*, *Kuenenia stuttgartiensis*, *Scalindua sorokinii*); 对厌氧氨氧化菌的细胞色素、营养物质、抑制物、结构特征和生化反应机理的研究表明, 厌氧氨氧化菌具有多种代谢能力。基于部分硝化至亚硝酸盐, 然后与氨一起厌氧氨氧化, 以及厌氧氨氧化菌与好氧氨氧化菌或甲烷菌的协同耦合作用, 提出了几种生物脱氮的新工艺 (ANAMMOX、SHARON-ANAMMOX、CANON 和甲烷化与厌氧氨氧化耦合工艺)。

关键词: 厌氧氨氧化菌, ANAMMOX, CANON, SHARON-ANAMMOX

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0149-05

The Character and Application of Anammox Bateria in Wastewater Biotreatment*

ZU Bo¹ ZHANG Dai-Jun^{1,2**} BAI Yu-Hua¹

(Department of Environmental Science, Chongqing University, Chongqing 400030)¹

(Key Laboratory for the Exploitation of Southwestern Resource & the Environmental Disaster Control Engineering, Ministry of Education, Chongqing 400030)²

Abstract: Anaerobic ammonium oxidation is a new process in which ammonium is oxidized with nitrite as the electron acceptor under anoxic conditions, producing dinitrogen gas. Three anammox bacteria (*Brocadia anammoxidans*, *Kuenenia stuttgartiensis*, *Scalindua sorokinii*) have been found recently. The investigation on cytochrome spectra, nutrition, inhibitors, cell structures and biochemistry reaction mechanisms in anammox bacteria indicated that anammox bacteria had the potential of diverse metabolic types. Several novel microbial nitrogen removal processes have been developed (ANAMMOX process, SHARON-ANAMMOX process, CANON process and integration of methanogenesis with anaerobic ammonium oxidation).

Key words: Anammox bacteria, ANAMMOX, CANON, SHARON-ANAMMOX

1977 年 Broda 指出, 化能自养细菌能以 NO_3^- 、 CO_2 和 NO_2^- 作为氧化剂把 NH_4^+ 氧化为 N_2 。推测自然界可能存在以 NO_2^- 为电子受体的厌氧氨氧化反应^[1]。后来有研究发现氨氧化菌 *Nitrosomonas europaea* 和 *Nitrosomonas eutropha* 能同时硝化与反硝化, 利用 NH_4^+ 还原 NO_2^- 或 NO_3^- , 或者在缺氧条件下利用 NH_4^+ 作为电子供体, 把 NH_4^+ 转化为 N_2 。在利用 NO_2^- 为电子受体时, 其厌氧氨氧化的最大速率 (以单位蛋白质计) 约为 $2\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。然而在反硝化的小试实验中发现了一种特殊自养菌的优势微生物群体, 它以 NO_2^- 为电子受体, 最大比氨氧化速率 (以单位蛋白质计) 为 $55\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

* 国家自然科学基金资助 (No. 50378094)

教育部优秀青年教师基金项目 (No. 教人司 [2003] 355 号)

** 通讯作者 Tel/Fax: 86-023-65105875, E-mail: dzhang@cqu.edu.cn

收稿日期: 2005-05-09, 修回日期: 2005-07-11

此反应比 *Nitrosomonas* 快 25 倍, 把这种细菌称为厌氧氨氧化菌^[2]。

在无分子氧环境中, 同时存在 NH_4^+ 和 NO_2^- 时, NH_4^+ 作为反硝化的无机电子供体, NO_2^- 作为电子受体, 生成氮气, 这一过程称为厌氧氨氧化。近年来, 在厌氧氨氧化菌生理生化特性的理论研究领域和废水生物脱氮的应用研究领域都有了许多新的发现, 这对于全面认识厌氧氨氧化菌的性质、开发新的废水脱氮技术都具有重要意义。

1 厌氧氨氧化菌的微生物学特性

1.1 厌氧氨氧化菌的菌种

1.1.1 *Candidatus "Brocadia anammoxidans"*: Strous 等研究了 SBR 反应器中厌氧氨氧化污泥 (优势菌为 *B. anammoxidans*) 的生理学参数。富集培养得到的细菌 70% 以上是一种优势自养菌。经过 pH 7.4、20 mmol/L 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲剂和 2.5% 的戊二醛混合液处理后, 在电子显微镜下表现出不规则的微生物特性。采用改进的 Percoll 密度梯度离心分离法分离得到了非常纯的细胞悬浮物, 在每 200 ~ 800 个细菌中含有不到 1 个杂细菌。这些纯化的厌氧氨氧化菌活性很高, 从中提取的 DNA 通过 PCR 扩增确认。16S rRNA 的分析表明 *B. anammoxidans* 是厌氧氨氧化工艺的功能微生物, 确认了厌氧氨氧化菌是 *Planctomycetales* 序列中自养菌的一个新成员, 被命名为 *Candidatus "B. anammoxidans"*^[3]。此菌种适宜的 pH 值和温度范围分别为 6.7 ~ 8.3, 20°C ~ 43°C。最佳条件: pH 8.0, 温度 40°C^[2]。对 NH_4^+ 和 NO_2^- 的亲合力常数低于 0.1 mg N/L, 生物量细胞产率 (以单位氨计) 为 (0.066 ± 0.001) mol/mol, 最大比氨消耗速率 (以单位蛋白质计) 为 (45 ± 5) nmol/(min · mg), 倍增时间为 11 d^[2]。

1.1.2 *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"*: *Candidatus "K. stuttgartiensis"* 菌是从德国和瑞士几个污水处理厂的生物膜反应器中发现的。Egli 等的研究表明, *K. stuttgartiensis* 与 *B. anammoxidans* 的作用方式类似, 电镜显示其细菌结构也类似。但它对磷酸盐有更高耐受性 (20 mmol/L), 对亚硝酸盐耐受性则为 13 mmol/L, 在细胞密度更低的情况下有活性。最大的厌氧氨氧化活性 (以单位蛋白质计) 为 26.5 nmol/(mg · min), 比 *B. anammoxidans* 低。pH 范围是 6.5 ~ 9.0, 最佳为 8.0。最佳温度为 37°C, 在 45°C 时观察不到厌氧氨氧化活性, 并且发现温度降至 37°C 时厌氧氨氧化活性不会恢复。在 11°C 时的活性约为 37°C 的 24%, 可见它适宜生存于中温偏碱性环境^[4]。

1.1.3 *Candidatus "Scalindua sorokinii"*: 最近在黑海发现的 *Candidatus "Scalindua sorokinii"*。它又分为两种厌氧氨氧化菌种 *Candidatus "Scalindua brodae"* 和 *Candidatus "Scalindua wagneri"*^[5], 其生理特性研究较少。

1.2 厌氧氨氧化菌的细胞结构及色素 厌氧氨氧化菌是革兰氏阴性光损性球状化能自养菌, 直径不到 1 μm ^[3]。具有蛋白质的 S 层, 细胞壁上存在漏斗状结构, 无肽聚糖, 厌氧氨氧化菌有一个单一双分子层 (膜) 即厌氧氨氧化体 (anammoxosome)。厌氧氨氧化菌的细胞质因此被 anammoxosome 分为 3 个部分: (A) 外部区域 (细胞壁 (cell wall), 细胞质膜 (cytoplasmic membrane), PP 质 (periplasm), 细胞内质膜 (intracytoplasmic membrane))。(B) 核糖质 (riboplasm)。(C) 厌氧氨氧化体膜 (anammoxosome membrane), 厌氧氨氧化体 (anammoxosome), 类核 (nucleoid)^[6], 见图 1。在富集培养期间, 厌氧氨氧化菌污泥颜色从棕色变为深红。对厌氧氨氧化菌细胞和细胞提取物的可见光谱分析发现 c 型细胞色素的吸收信号明显增加。77K 的细胞光谱分析表明

没有 a 型、b 型和 d₁ 型的细胞色素。在厌氧氨氧化活性增加期间, 468 nm 处的吸收信号逐渐增加并达到最高值, 用 CO 处理后就消失^[2]。

1.3 厌氧氨氧化菌的营养 厌氧氨氧化菌培养基含 NH₄⁺ (5 ~ 30mmol/L)、NO₂⁻ (5 ~ 35mmol/L)、重碳酸盐 (10mmol/L)、矿物质及微量元素^[2]。

Dapena-Mora 等研究了气提式反应器 (gas lift reactor) 和 SBR 中厌氧氨氧化过程的稳定性, 其培养基的组成为: (NH₄)₂SO₄ 0.132 ~ 4.240 g, NaNO₂ 0.069 ~ 5.420 g, NaNO₃ 0.425 g, KHCO₃ 1.25 g, NaH₂PO₄ 0.05 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, FeSO₄ 0.00625 g, EDTA 0.00625 g, 微量元素溶液: 1.25mL, 用蒸馏水定容至 1L^[7]。磷酸盐浓度应低于 0.5 mmol/L^[3], 加入甲烷不抑制氨和亚硝酸盐的转化, 在长期的试验中发现甲烷不被厌氧氨氧化菌转化。在短期试验中, 反应器中加入 H₂后, 明显的刺激了厌氧氨氧化。但 H₂不能取代氨作为电子供体。短时间的批试验中投加不同有机底物 (丙酮酸盐、甲醇、乙醇、丙氨酸、葡萄糖、酪蛋白氨基酸) 会严重抑制厌氧氨氧化菌的活性, 因此底物的范围被局限为: NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、胍和羟胺^[2]。

1.4 抑制物 Strous 等发现 NO₂⁻ 浓度超过 98 mg/L 时抑制厌氧氨氧化活性^[2], 当亚硝酸盐浓度超过 5 mmol/L 时, 若持续时间较长 (12 h), 厌氧氨氧化活性将完全消失, 但加入微量 (50 μmol/L) 羟胺或胍, 则可以恢复活性。超过 2 mmol/L 的磷酸盐浓度将会造成厌氧氨氧化活性的丧失。O₂对厌氧氨氧化是可逆抑制。γ 射线照射或 121℃ 下消毒污泥, 或在接种期内没有接种菌种将不会发生厌氧氨氧化反应; 在接种期投加不同的抑制剂 (2, 4-二硝基酚、碳酸基氧间氯苯胺、HgCl₂) 时, 完全抑制氨的氧化和硝酸盐的还原, 乙炔对厌氧氨氧化也有很强的抑制作用^[2]。

2 厌氧氨氧化菌的生化反应机理

2.1 梯式烷脂质 (Ladderane lipids) 厌氧氨氧化菌脂质含有酯连接和醚连接的混合脂肪酸, 并发现了独特的膜脂结构: 环状系统 X (图 2-II), 环状系统 Y (图 2-I) 和 2 种不同的环状系统 (X + Y) 见图 2-III。环状系统 X 和 Y 的所有环被 cis-环连接, 导致了象楼梯式的结构, 因此定义为 Ladderane lipids^[6]。有研究表明在 *Candidatus "B. anammoxidan"* 中, Ladderane X 和 Ladderane Y 占总脂的 34%。目前这种梯式烷膜脂只在厌氧氨氧化菌中发现^[6]。

2.2 厌氧氨氧化的可能反应机理 Van de Graaf 用¹⁵N 作为示踪元素, 研究了厌氧条件下的氨氧化, 提出了浮霉状菌纲细菌在厌氧条件下以亚硝酸盐为电子受体的氨氧化代谢途径^[8]。假设 N₂H₄ 转化为氮气的过程是为了给 NO₂⁻ 还原为 NH₂OH 的反应提供等量的电子。得到两种可能的机理。其一: 一个由

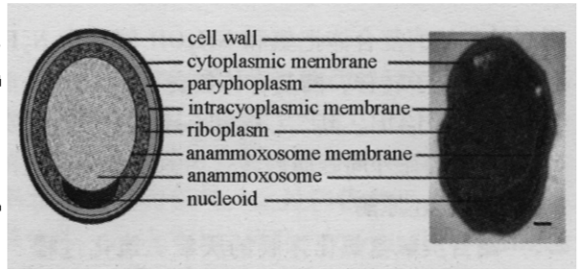


图 1 浮霉状菌纲细菌的电镜观察

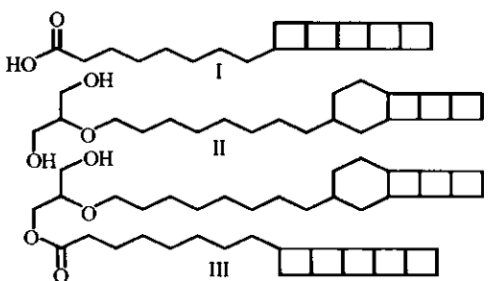
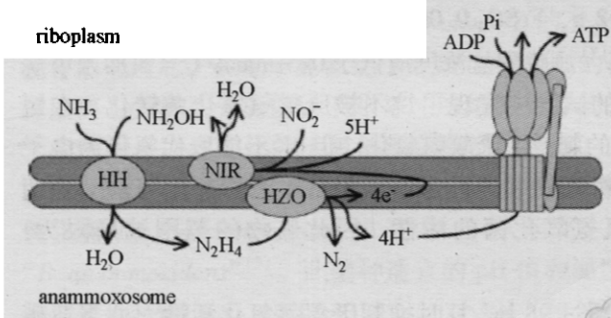


图 2 3 种梯式烷脂的结构特征

周围是膜的酶复合体把氨和 NH_2OH 转化为 N_2H_4 , N_2H_4 则在外周胞质内氧化为氮气。利用内部电子转移, 酶复合体负责 N_2H_4 氧化, 而在这种酶复合体的细胞质位置上 NO_2^- 被还原为 NH_2OH 。其二: 氨和 NH_2OH 在细胞质内被一种周围是膜的酶复合体转化为 N_2H_4 。 N_2H_4 在外周胞质内转化为氮气, 它产生的电子通过电子传输链传递给细胞质内的亚硝酸盐还原酶^[8]。

2.3 结合厌氧氨氧化体膜的厌氧氨氧化过程 厌氧氨氧化反应的关键酶之一是位于 anammoxosome 的胼氧化酶 (HZO)^[6], 提出了生化模型 (图 3): NH_4^+ 和羟胺 (NH_2OH) 被胼水解酶 (HH) 结合为胼。胼又被胼氧化酶 (HZO) 氧化, HZO 与 HAO (*N. europaea*) 有些相似^[2]。氧化发生在 anammoxosome 的里面, 形成 N_2 、4 个质子和 4 个电子。这 4 个电子和从来自 Riboplasm 中的 5 个质子一起被亚硝酸还原酶 (NIR) 还



原亚硝酸盐至羟胺^[6]。在这个模型中, 通过消耗在 Riboplasm 中的质子和在 anammoxosome 里面产生的质子, 厌氧氨氧化反应建立了一个质子梯度。这就导致了电化学质子梯度直接从 anammoxosome 到 Riboplasm。这种梯度含有化学势能 (ΔpH) 和电子势能 ($\Delta\psi$)。 ΔpH 和 $\Delta\psi$ 都有一种让质子从 anammoxo-

some 的里面到外面的一种力 (质子驱动力 Δp)。在厌氧氨氧化体膜的三磷酸腺苷酶 (ATPase) 的催化作用下合成三磷酸腺苷 (ATP)。质子通过 ATPase 形成的质子孔回到 Riboplasm 中, 厌氧氨氧化体膜的 ATPase 位于 Riboplasm 中球状的、亲水的 ATP 合成区和厌氧氨氧化体膜中非亲水的质子迁移区上, 合成的 ATP 在 Riboplasm 中被释放^[6]。

3 厌氧氨氧化菌的应用

3.1 厌氧氨氧化工艺 Mulder 等在厌氧流化床中发现了厌氧氨氧化。后来, van de Graaf 等和 Bock 等发现了以亚硝酸盐为电子受体的厌氧氨氧化过程^[9]。郑平等研究了厌氧氨氧化菌混培物的动力学特性^[10]。Fux Christian 等进行中试试验研究, 首先在连续搅拌反应器中完成亚硝化, 58%的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转化为 NO_2^- ; 在 SBR 中完成厌氧氨氧化, 除 N 速率为 $2.4 \text{ kg N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 除 N 达 90%; Sliemers 等在 gas lift reactor 中发现除 N 速率达 $8.9 \text{ kg N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 这个除 N 速率是实验室所获得的除 N 速率的 20 倍^[9]。Dapena-Mora 等研究中发现在 gas lift reactor 中 N 负荷率为 $2.0 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$, 最大比厌氧氨氧化活性 (MSAA) 为 $0.9 \text{ g}/(\text{g} \cdot \text{d})$ 。在 SBR 中 N 负荷率为 $0.75 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$, MSAA 为 $0.4 \text{ g}/(\text{g} \cdot \text{d})$, 除 NO_2^- 达 99%^[7]。

3.2 SHARON-ANAMMOX 联合工艺 Jetten 等^[11]利用 SHARON-ANAMMOX 联合工艺对污泥消化出水进行了研究。SHARON 反应器总氮负荷为 $0.8 \text{ kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 转化 53%的总氮 (39% NO_2^- , 14% NO_3^-), 用 SHARON 反应器的出水作为厌氧氨氧化流化床反应器的进水, 在限制 NO_2^- 的厌氧氨氧化反应器中 NO_2^- 全部被除去。试验中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除率达 83%^[12]。Van Dongen 等应用 SHARON-ANAMMOX 联合工艺在工厂中长时间

稳定运行^[9]。

3.3 CANON (completely autotrophic nitrogen removal over nitrite) 工艺 Dijkman 和 Strous 描述了一个新的生物脱氮工艺 CANON, 在限氧条件下 (<0.5% 空气饱和度) 得到了好氧和厌氧氨氧化菌的混培物, NH_4^+ 被需氧氨氧化菌 (*Nitrosomonas* 和 *Nitrososira*) 氧化为亚硝酸盐, 然后被厌氧氨氧化菌转化为氮气, 此过程依赖于 2 种 (*Nitrosomonas* 需氧菌和 *Planctomycete* 厌氧氨氧化菌) 自养微生物菌群的协同作用^[9]。CANON 在 2 种不同的反应器 (SBR 和恒化器) 中进行, 容积负荷 $0.1 (\text{kg N}) / (\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 除氮达 92%。Sliekers 等发现在限氧条件以及好氧氨氧化菌和厌氧氨氧化菌都有合适的负荷率时, SBR 反应器中除 N 负荷率达 $0.3 (\text{kg N}) / (\text{m}^3 \cdot \text{d})$, NH_4^+ 主要转化为 N_2 (85%), 其余的转化为硝酸盐 (15%)^[9]。Sliekers 等^[13]用 gas lift reactor, 除 N 负荷率达 $1.5 (\text{kg N}) / (\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 这个速率是以前实验室获得的速率的 20 倍。Hao 等^[14]开发了在生物膜反应器中混合硝化 (亚硝化 + 硝化)、厌氧氨氧化的数学模型, 基于此模型, 评价了 CANON 过程的温度, 流速。

3.4 甲烷化与厌氧氨氧化耦合 Jetten 等通过污泥消化产甲烷除去 COD, N 部分氧化至 NO_2^- , 然后以 NH_4^+ 为电子供体反硝化, 实现了甲烷化和厌氧氨氧化^[11]。ZHANG 运用 EGSB 反应器技术 COD 的去除率 97%、 NO_2^- 去除率 100%, 容积负荷达 $6.56 \text{ gCOD} / (\text{L} \cdot \text{d})$ 和 $0.9 \text{ gN} / (\text{L} \cdot \text{d})$, 实现了甲烷化、反硝化与厌氧氨氧化的耦合^[15]。

4 结语

厌氧氨氧化菌实现了氮氮的短程转化, 缩短了氮素的转化过程, 对能耗和碳的依赖更少, 具有极大的优越性。对其生理生化特性的研究为开发更节约能源、更符合可持续发展要求的废水脱氮技术提供了生物学和微生物学基础。厌氧氨氧化菌与甲烷菌、好氧氨氧化菌的协同耦合作用又为新型的脱氮工艺提供了可能性。然而由于其生长速率慢, 比增长率低, 因此高效富集培养厌氧氨氧化菌, 解决其菌体增殖和持留问题, 扩增菌体以便有效应用于污水处理厂中是今后一段时间的重要研究课题。

参考文献

- [1] Broda E. Z Allg Microbiologie, 1977, 17: 491 ~ 493.
- [2] Jetten M S M, Strous M, Van de Pas-Schoonen K T, et al. FEMS Microbiol Rev, 1999, 22: 421 ~ 437.
- [3] Strous M, Kuenen J G, Jetten M S M. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (7): 3248 ~ 3250.
- [4] Egli K, Fanger U, Alvarez P J J, et al. Arch Microbiol, 2001, 175: 198 ~ 207.
- [5] Schmid M C, Walsh K, Webb R, et al. Syst Appl Microbiol, 2003, 26: 529 ~ 538.
- [6] Van Niftrik L A, Fuerst J A, Sinninghe Damste J S, et al. FEMS Microbiology Letters, 2004, 233: 7 ~ 13.
- [7] Dapena-Mora A, Campos J L, Mosquera-Corral A, et al. J Biotechnol, 2004, 110: 159 ~ 170.
- [8] Van de Graaf A A, De Bruijn P, Robertson LA, et al. Microbiology, 1997, 143 (7): 2415 ~ 2421.
- [9] Khin T, Annachatre A P. Biotechnology Advances, 2004, 22: 519 ~ 532.
- [10] 郑平, 胡宝兰. 生物工程学报, 2001, 17 (2): 193 ~ 198.
- [11] Jetten M S M, Horn S J, van Loosdrecht M C M. Water Sci Technol, 1997, 35: 171 ~ 180.
- [12] 冯叶成, 王建龙, 钱易. 微生物学通报, 2001, 28 (4): 88 ~ 91.
- [13] Sliekers A O, Third K A, Abma W, et al. FEMS Microbiol Lett, 2003, 218: 339 ~ 344.
- [14] Hao X, Heijnen J J, Van Loosdrecht M C M, et al. Water Research, 2002, 36: 4839 ~ 4849.
- [15] Dai-Jun Z. J of Environ Sci, 2003, 15 (3): 423 ~ 432.