

叶磊, 祝贵兵, 伦中财, 等. 2011. 应用分子生物学与同位素示踪技术研究厌氧氨氧化菌活性及功效 [J]. 环境科学学报, 31(6): 1206-1211

Ye L., Zhu G. B., Lun Z. C., et al. 2011. Determination of activity and contribution of anammox bacteria to N_2 production by molecular biology and isotope analyses [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 31(6): 1206-1211

应用分子生物学与同位素示踪技术研究厌氧氨氧化菌活性及功效

叶磊^{1,3}, 祝贵兵^{1,*}, 伦中财², 王朝旭^{1,3}, 王衫允¹, 冯晓娟¹, 尹澄清¹

1. 中国科学院生态环境研究中心 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

2. 北京京城中水有限责任公司, 北京 100164

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049

收稿日期: 2010-09-12

修回日期: 2010-11-04

录用日期: 2010-11-08

摘要: 厌氧氨氧化是一个新发现的氮循环途径, 与反硝化作用都产生氮气, 但准确衡量厌氧氨氧化活性及功效的相关方法还是个难题. 本研究联合应用分子生物学与同位素示踪技术, 以北京某污水处理厂的活性污泥为实验样品, 研究其中厌氧氨氧化菌的存在、活性和功效. 厌氧氨氧化菌的分子生物学分析是通过 16S rRNA 进行, 选择两步引物分别为 pla46-630r 和 Amx368f-Amx820r 进行巢式 PCR 扩增, 并对 16S rRNA 进行后续基因处理. 同位素示踪技术是通过 ^{15}N 标记, 对反应体系进行 3 种处理: ①仅加 $^{15}NH_4^+$; ②加 $^{15}NH_4^+$ 和 $^{14}NO_3^-$; ③加 $^{14}NH_4^+$ 和 $^{15}NO_3^-$, 模拟实验在 19℃ 的厌氧密闭容器中进行, 3 种处理条件下产物氮气的组成通过气相色谱-同位素比值质谱仪进行分析, 通过数据计算获得厌氧氨氧化和反硝化反应的速率. 16S rRNA 研究结果表明被试活性污泥样品中存在污水处理工艺中常见的厌氧氨氧化菌种类——*Candidatus Brocadia*. 同位素示踪和培养实验的测定结果表明, 被试活性污泥样品的厌氧氨氧化和反硝化反应在 19℃ 的速率分别为 $1.25 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $12.16 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 厌氧氨氧化反应对 N_2 产生量的贡献为 9.32%.

关键词: 厌氧氨氧化; 活性; ^{15}N 同位素; 16S rRNA

文章编号: 0253-2468(2011)06-1206-06

中图分类号: X703.1

文献标识码: A

Determination of activity and contribution of anammox bacteria to N_2 production by molecular biology and isotope analyses

YE Lei^{1,3}, ZHU Guibing^{1,*}, LUN Zhongcai², WANG Chaoxu^{1,3}, WANG Shanyun¹, FENG Xiaojuan¹, YIN Chengqing¹

1. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Quality, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085

2. Beijing Jingcheng Reclaimed Water Co. Ltd., Beijing 100164

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

Received 12 September 2010;

received in revised form 4 November 2010;

accepted 8 November 2010

Abstract: Anaerobic-ammonia oxidation (ANAMMOX) is a newly found pathway in the nitrogen cycle to produce gaseous N_2 . However, there are difficulties in quantitative determination of anammox activity and contribution. In this study, we developed a new way to combine molecular biology and isotope analyses to solve that problem. Activated sludge from a wastewater treatment plant in Beijing was sampled, and anammox activity and its contribution to nitrogen removal were analyzed. Molecular analyses of 16S rRNA using nested PCR amplification were followed with other molecule analyses. Primer pairs of pla46f-630r and Amx368f-Amx820r were used in nested PCR amplification. Isotope analyses were based on ^{15}N labeled ammonium and nitrate. Three treatments (① $^{15}NH_4^+$ only; ② $^{15}NH_4^+$ and $^{14}NO_3^-$; ③ $^{14}NH_4^+$ and $^{15}NO_3^-$) were prepared and experiments were conducted in hermetic anaerobic containers at 19℃. Outcome gaseous N_2 was delivered to a gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer for separation of $^{28}N_2$, $^{29}N_2$ and $^{30}N_2$. Then the rates of anammox and denitrification activities were calculated. The results showed that one kind of anammox bacteria (*Candidatus Brocadia*) existed in the activated sludge; the rates of anammox and denitrification at 19℃ were $1.25 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and $12.16 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ separately. Anammox contributed 9.32% of the total N_2 production. Most of the N_2 production was contributed by denitrification.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 21077119); 国家科技重大专项 (No. 2008ZX07209-006-02, 2008ZX07101-006-08)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21077119), the National Science and Technology Major Project (No. 2008ZX07209-006-02, 2008ZX07101-006-08)

作者简介: 叶磊 (1984—), 男, E-mail: yelei882003@yahoo.com.cn; * **通讯作者 (责任作者),** E-mail: gzbzu@rcees.ac.cn

Biography: YE Lei (1984—), male, E-mail: yelei882003@yahoo.com.cn; * **Corresponding author,** E-mail: gzbzu@rcees.ac.cn

Keywords: anammox; activity; ^{15}N isotopes; 16S rRNA

1 引言(Introduction)

含氮污水的超标排放是引发受纳水体氮污染的重要原因. 采用生物方法是氮脱除的最经济有效的方法. 传统的生物脱氮工艺主要由氨化反应(有机氮→无机氮)、硝化反应(氨态氮→硝态氮) 和反硝化反应(硝态氮→气态氮) 3 部分组成. 但在污水处理厂的实际运行中, 生物脱氮工艺过程复杂, 氨单加氧酶(AMO)、氧化亚氮还原酶(NOS) 等多种酶参与其中, 同时也受到 pH 值、污染物负荷、碱度、碳氮比等多种因素的影响, 气态产物的生成也使得氮平衡很难计算(许世伟, 2008; 祝贵兵, 2008). 厌氧氨氧化是近年来发现的氮循环新途径(唐崇俭, 2010; 祝贵兵, 2010), 其以氨氮和亚硝氮分别作为电子供体和受体, 由自养的厌氧氨氧化菌在厌氧条件下由二者直接生成氮气. 生物脱氮工艺中的厌氧氨氧化是否存在, 活性如何, 以及对脱氮的相对贡献如何, 是相关研究者十分关心的一个问题.

通过分子生物学定性分析方法, 可以检测污水生物脱氮工艺中是否存在厌氧氨氧化菌(范改娜, 2010). 通过对比进水和出水中的氨氮、硝氮和总氮量, 也可以较容易地估算总的脱氮效果. 但是如何对厌氧氨氧化反应的活性及在脱氮工艺中的相对贡献进行量化, 即区分厌氧氨氧化和反硝化脱氮过程, 目前报道很少, 并且还有很多问题有待解决. IPT (isotope pairing technique) 同位素示踪法被广泛地应用于厌氧氨氧化的相关研究(Vandegraaf, 1995; Vandegraaf, 1997). 由于反应机理上存在差异, IPT 同位素示踪法可以将厌氧氨氧化和反硝化反应区分开来, 该思路已在海洋沉积物和水相的厌氧氨氧化研究中得到初步应用(Dalsgaard, 2002; Thamdrup, 2002; Dalsgaard, 2003).

本研究以北京某污水处理厂的活性污泥为被试对象, 以分子生物学分析方法, 对厌氧氨氧化菌的存在及其多样性进行定性分析, 并进一步通过 IPT 同位素示踪法对厌氧氨氧化在生物脱氮工艺中的活性和贡献率进行量化, 以期为生物脱氮工艺的机理研究和过程优化提供方法和理论基础.

2 试验方法(Experimental procedures)

2.1 DNA 提取和聚合酶链式反应(PCR)

称取 0.25 mL 左右的活性污泥样品, 利用 Fast

Soil DNA 提取试剂盒提取(MP Biomedicals, USA) 样品中的总 DNA. 聚合酶链式反应采用巢式 PCR 途径: 第一步使用引物 pla46f(5'-GGATTAGGCATGCAAGTC-3') 和通用引物 630r(5'-CAKAAAGGAGGTGATCC-3') 对浮霉菌属进行 PCR 扩增(Juretschko, 1998; Neef, 1998); 第二步以第一步 PCR 产物作为模板, 使用厌氧氨氧化细菌特异性引物 Amx368f(5'-TTTCGAATGCCCGAAAGG-3') 和 Amx820r(5'-AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC-3') 进行厌氧氨氧化菌 16S rRNA 全长 PCR 扩增(Schmid, 2000).

2.2 克隆、测序和系统发育分析

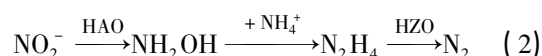
使用 Promega Agarose Gel DNA (Promega, Madison, WI) 纯化试剂盒对 PCR 扩增产物进行切胶纯化, 将 PCR 回收产物与 pGEM-Teasy (Promega, Madison, WI) 载体进行连接后, 转入 JM109 感受态细胞, 最后进行蓝白筛选. 阳性克隆的检验所用引物为 T7、SP6, 挑取阳性克隆子, 用限制性内切酶 *Hha* I 分型, 挑取菌株进行测序(北京 Biomed 生物科技有限公司). 应用 DNASTAR 软件对测序结果进行编辑, 去除载体序列后用 BLAST 在基因库中搜索相似序列. 同时将该序列与已发表的相关细菌的 16S rRNA 序列进行多重序列对齐, 使用 MEGA3.1 软件以邻接法(Neighbor-Joining) 构建进化树. 独立操作单元(OTU) 利用 DOTUR 软件进行划分.

2.3 ^{15}N 同位素的培养和示踪

反硝化反应(denitrification) 是传统硝化-反硝化过程的一部分, 在缺/厌氧条件下进行, 4 个中间过程由硝氮还原酶(NAR)、亚硝氮还原酶(NIR)、一氧化氮还原酶(NO) 和氧化亚氮还原酶(NOS) 分别催化完成. 反应过程如公式(1) 所示:



厌氧氨氧化(anammox) 是不同于传统氮循环的新途径, 是以氨氮和亚硝氮分别作为电子供体和受体, 由自养的厌氧氨氧化菌在厌氧条件下直接生成氮气的过程, 羟胺(hydroxylamine) 和联肼(Hydrazine) 是主要中间产物. 具体反应过程见公式(2):



由反应过程公式可以看出, 在缺氧或厌氧的环境下, 反硝化反应和厌氧氨氧化反应均产生氮气, 但是机理存在差异. 反硝化反应由硝氮经一系列中

间反应产生氮气,氮气的两个氮原子均来自于 NO_3^- . 厌氧氨氧化反应由氨氮和亚硝氮分别作为电子供体和受体产生氮气,氮气分子是由 NH_4^+ 和 NO_3^- 各提供一个氮原子组成的. 当进行 ^{15}N 同位素的示踪时,反硝化反应和厌氧氨氧化反应的差异会通过产生氮气中 $^{28}\text{N}_2$ 、 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的组成得以体现.

采用 Thamdrup 和 Dalsgaard 的海底沉积物厌氧氨氧化实验分析方法 (Dalsgaard, 2002; Thamdrup, 2002) 进行同位素 ^{15}N 的培养和示踪. 将 2.5 mL 左右的活性污泥样品放入 12.6 mL 柱状玻璃瓶 (Labco, UK) 中,同时加入一颗玻璃珠以利于反应时摇匀,然后注满饱和氮气无氧水,使其形成无氧环境,室温下培养 30 h 以去除其中的 NO_3^- . 然后,通过分别注入一定浓度 ^{15}N 丰度为 99.29% 的 NaNO_3 或 ^{15}N 丰度为 98.2% 的 $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 对样品进行 3 种处理: ① 仅加 $^{15}\text{NH}_4^+$; ② 加 $^{15}\text{NH}_4^+$ 和 $^{14}\text{NO}_3^-$; ③ 加 $^{14}\text{NH}_4^+$ 和 $^{15}\text{NO}_3^-$. 在旋转发生器上以 19 °C (原始水温) 反应并按 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h 时间点取样,分别注入 200 μL 7 mol·L $^{-1}$ ZnCl_2 溶液以终止反应. 气体通过气相色谱-同位素比值质谱仪 (Gasbench-MAT253),测得其中 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$ 的浓度.

2.4 分析和计算

处理①、②分别为阴性和阳性对照,处理③为正常反应. 反硝化及厌氧氨氧化速率通过各自氮气产生量对时间的回归获得. 以处理③为例说明计算过程.

厌氧氨氧化反应产生的氮气是由 NH_4^+ 和 NO_3^- 各提供一个氮原子组成. 因此,处理③中厌氧氨氧化反应产生的氮气为 $^{28}\text{N}_2$ 和 $^{29}\text{N}_2$, 二者的量由加入 NO_3^- 中 $^{15}\text{NO}_3^-$ 的比例决定.

$$A_{28} = A_{\text{total}} \times (1 - F_N), A_{29} = A_{\text{total}} \times F_N \quad (3)$$

其中, A_m 表示厌氧氨氧化反应的氮气产生量, F_N 为 NO_3^- 中 ^{15}N 的比例.

反硝化反应产生氮气的两个氮原子均来自于 NO_3^- . 因此,处理③中反硝化反应产生的氮气应该为 $^{28}\text{N}_2$ 、 $^{29}\text{N}_2$ 和 $^{30}\text{N}_2$.

$$D_{28} = D_{\text{total}} \times (1 - F_N)^2,$$

$$D_{29} = D_{\text{total}} \times 2 \times (1 - F_N) \times F_N, D_{30} = D_{\text{total}} \times F_N^2 \quad (4)$$

其中, D_m 为反硝化反应的氮气产生量.

记 P_m 为气相色谱-同位素比值质谱仪测得的氮气总量,结合公式 (3) 和 (4), 且 $D_{30} = P_{30}$ 而得

$$D_{\text{total}} = P_{30} \times F_N^{-2} \quad (5)$$

$$D_{29} = P_{30} \times 2 \times (1 - F_N) \times F_N^{-1} \quad (6)$$

$$A_{29} = P_{29} - D_{29} = P_{29} - P_{30} \times 2 \times (1 - F_N) \times F_N^{-1} \quad (7)$$

$$A_{28} = A_{29} \times F_N^{-1} \times (1 - F_N) \quad (8)$$

叠加公式 (7) 和 (8) 得

$$A_{\text{total}} = F_N^{-1} \times [P_{29} + 2 \times (1 - F_N) \times P_{30}] \quad (9)$$

D_{total} 和 A_{total} 即为各样品中反硝化和厌氧氨氧化反应的氮气产生量.

由于厌氧氨氧化菌为自养细菌,因此在实验过程中未考虑碳源损耗的影响. 另外,同位素分析和计算过程中也忽略了氮元素不同核素在反应中的同位素分馏现象. 同位素分馏是指同位素不同核素之间由于质量差异,一种核素相对于另一种核素更易于通过物理、化学及生物化学作用被转化的现象,主要有热力学平衡分馏、动力学非平衡分馏以及非质量相关分馏等 3 种类型. 本研究中的同位素分馏属于热力学平衡分馏,可将该差异归入系统误差.

3 结果 (Results)

3.1 厌氧氨氧化菌的存在及多样性分析

被试污水处理厂的活性污泥样品,通过 DNA 提取、定性 PCR 扩增、克隆、酶切和测序等过程,获得了 30 个厌氧氨氧化菌的 16S rRNA 基因序列,生物多样性情况如表 1 所示. 以 3% 的差异度作为 OTU 划分标准,30 个厌氧氨氧化菌的 16S rRNA 基因序列隶属于同一个操作分类单元 (OTU); 两个常见的多样性指数: 混乱度估计值为零,香农多样性指数值为 1.

运用 Blast 程序将被试活性污泥样品中的厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中进行相似性比对,选取文献已报道的 8 种厌氧氨氧化菌 (AY254883、AY254882、AY257181、DQ317601、AF375995、AF375994、DQ301513、DQ459989) 为参比,另外选择其它相似的两个序列 (AJ131819、AM285341) 以及生物反应器及自然环境等条件下的典型序列 (HM769653、GQ356075、EU039837) 作参比,建立的系统发育树如图 1 所示. 系统发育树显示,被试活性污泥厌氧氨氧化菌的 16S rRNA 基因序列与 *Candidatus Brocadia* sp. 40 在同一个分支之下,和发现于生物反应器以及氧化沟污泥的厌氧氨氧化序列 (GQ356075\HM769653) 相近.

表 1 被试污水厂活性污泥的厌氧氨氧化菌多样性情况一览
Table 1 Summary of anammox bacterial diversity in the sampled activated sludge

序列数 Number of sequences	操作分类单元数 Number of OTUs	混乱度估计值 Chao1 estimate	香农多样性指数 Shannon index	主导厌氧氨氧化菌 Dominantanammox bacteria
30	1	0	0	Candidatus <i>Brocadia</i>

从活性污泥样品提取的 DNA 中成功完成了厌氧氨氧化菌 16S rRNA 的特异性 PCR 扩增,说明被试污水处理厂的活性污泥中存在厌氧氨氧化菌,但菌种多样性明显单一. 获得的厌氧氨氧化菌 16S rRNA 的基因序列与 Candidatus *Brocadia* sp. 40 的

同源性达到 98%; 系统发育树中该序列与已知厌氧氨氧化菌 Candidatus *Brocadia fulgida* 及 Candidatus *Brocadia anammoxidans* 在同一分支,说明被试活性污泥中的厌氧氨氧化菌属于 Candidatus *Brocadia* 一类.

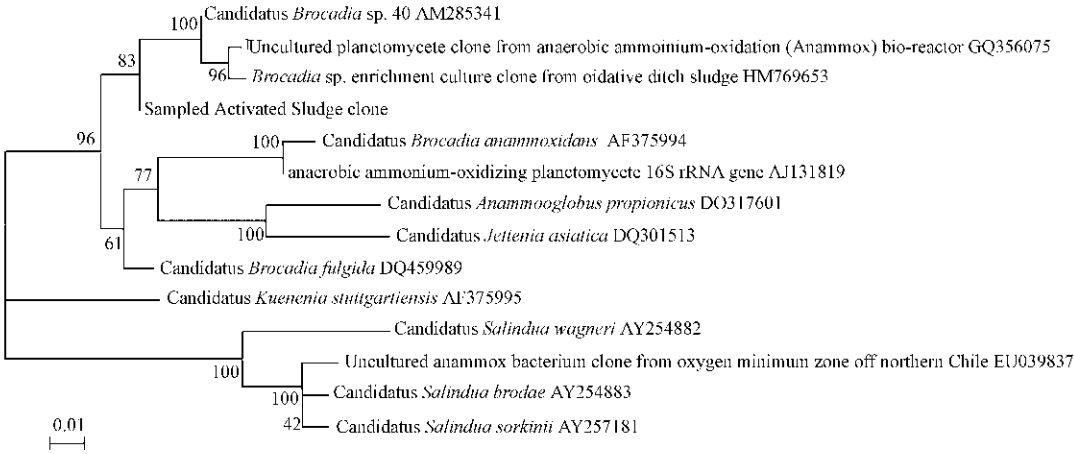


图 1 基于 16S rRNA 基因的厌氧氨氧化菌系统发育树(本文中的参照序列引自 GenBank 数据库,序列名称后的字母加数字代表提交序号,分支节点上的数字表示每 1000 次 bootstrap 分析所支持的次数,小于 50 的未显示. 线段表示 1% 序列差异的分支长度)
Fig. 1 Phylogenetic tree of anaerobic ammonia-oxidizing bacteria targeted on the 16S rRNA gene(all the reference sequences in this paper were obtained from GenBank, and are listed by sequence accession number. The numbers next to the nodes represent the bootstrap values of 1000 replications; the scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides)

3.2 厌氧氨氧化菌的活性及功效

对被试污水处理厂的活性污泥样品,按照 2. 3 节所述¹⁵N 同位素的培养和示踪方法,进行了 3 种形式的培养和处理(只加¹⁵NH₄⁺; ¹⁵NH₄⁺ + ¹⁴NO₃⁻; ¹⁴NH₄⁺ + ¹⁵NO₃⁻),以验证其中是否存在厌氧氨氧化反应,以及测定厌氧氨氧化和反硝化反应的活性. 3 种处理形式所得²⁹N₂和³⁰N₂气体产生量随时间变化的情况如图 3 所示.

只加¹⁵NH₄⁺的活性污泥处理样品,未见任何²⁹N₂和³⁰N₂气体,说明经过之前 30 h 的培养,活性污泥中残存的 NO₃⁻已完全耗尽,不会对后续处理产生影响. 加入¹⁵NH₄⁺ + ¹⁴NO₃⁻的活性污泥处理样品,²⁹N₂随时间延长而增加,说明厌氧氨氧化反应在该处理形式中确实存在且具有一定活性,但³⁰N₂在该

处理形式中未探测到,说明³⁰N₂只由反硝化反应产生. 加入¹⁴NH₄⁺ + ¹⁵NO₃⁻的活性污泥处理样品,²⁹N₂和³⁰N₂均随时间延长而增加,说明了反硝化反应和厌氧氨氧化反应同时存在于该处理形式中.

对于加入¹⁴NH₄⁺ + ¹⁵NO₃⁻的活性污泥处理样品²⁹N₂和³⁰N₂的产气数据,按照 2. 4 节的分析方法,分别计算各时间点下反硝化过程与厌氧氨氧化过程的总氮气产生量. 将两过程的总氮气产生量对时间分别进行回归,得出反硝化过程与厌氧氨氧化过程的速率,分别为 12. 16 nmol·g⁻¹·h⁻¹和 1. 25 nmol·g⁻¹·h⁻¹. 由此可知,在被试污水处理厂的活性污泥中厌氧氨氧化的活性为每 g 活性污泥每 h 转化生成 1. 25 nmol 的氮气,而厌氧氨氧化过程对总氮气产生量的贡献则为 9. 32% .

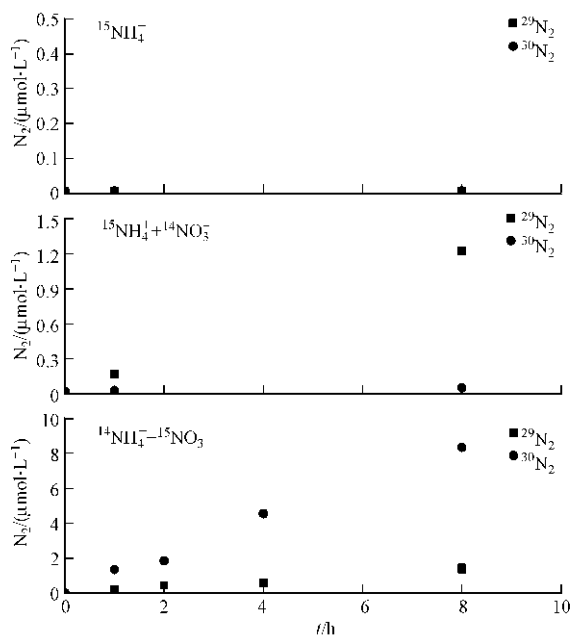


图2 基于 ^{15}N 示踪的被试活性污泥中厌氧氨氧化与反硝化过程图

Fig. 2 Anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in sampled activated sludge amended with ^{15}N labeled on ammonium and nitrate separately

4 讨论 (Discussion)

对被试活性污泥样品的厌氧氨氧化菌的定性分析结果说明了其中确实存在厌氧氨氧化菌。但是,菌种多样性极低,只含有一种厌氧氨氧化菌。在系统发育树中,被试活性污泥的厌氧氨氧化菌 16S rRNA 序列与最初发现于荷兰污水处理厂的厌氧氨氧化菌 *Candidatus Brocadia fulgida* 及 *Candidatus Brocadia anammoxidans* 在同一分支(郑平,2009),说明被试活性污泥中的厌氧氨氧化菌为常见的污水处理厂厌氧氨氧化菌种类。被试活性污泥中厌氧氨氧化菌的低多样性表现也和厌氧氨氧化菌在自然环境中的情况一致(Schmid,2007)。

通过同位素示踪和培养实验,测得被试污水处理厂活性污泥的厌氧氨氧化和反硝化反应的速率分别为 $1.25 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $12.16 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,厌氧氨氧化反应对 N_2 产生量的贡献为 9.32%。厌氧氨氧化活性及其对总 N_2 产生量贡献的相关研究近年来在淡水和海洋的水体和沉积物如 Lake Tanganyika、Golfo Dulce、Greenland Sea、Disko Bay 和 Young Sound 等处已有文献报道,大部分地区的厌氧氨氧化对总 N_2 产生的贡献范围为 2.5% ~ 13%,在深海的极度缺氧区可高达 19% ~ 35% (Dalsgaard,

2003; Schubert,2006; Schmid,2007)。污水处理工艺的相关报道也有出现,在 Erler 的表面流人工湿地的不同位置,厌氧氨氧化对总 N_2 产生的贡献差异很大,范围为 0.1% ~ 32.2% (Erler,2008)。被试污水厂活性污泥中存在厌氧氨氧化反应,但是活性不高,与大部分已发现厌氧氨氧化反应的自然环境相似, N_2 产生量的绝大部分仍由反硝化反应产生。

由于反硝化菌多为异养细菌,需要消耗外在碳源,采用本方法检测得出的反硝化速率存在一定偏差,主要原因是在培养过程中需要消除样品中自带的 $^{14}\text{NO}_3^-$,碳源的损耗会导致反硝化菌的活性会随着时间而逐渐受到抑制,因此得出的反硝化速率要低于实际值。对比于反硝化过程,厌氧氨氧化菌均为自养细菌,样品培养过程中消耗的碳源对厌氧氨氧化反应速率几乎没有影响,测得的厌氧氨氧化速率应该与实际情况相符。

硝化-反硝化反应一直是污水处理厂生物脱氮工艺的主要途径。但是由于温室气体 N_2O 作为副产物的产生,以及反硝化碳源不足、经济效益等方面的考虑,反硝化反应作为生物脱氮工艺主导途径的应用也存在很多难题。随着厌氧氨氧化反应过程的发现,厌氧氨氧化脱氮工艺的研究近年来也蓬勃开展。本文通过联合应用 IPT 同位素示踪和分子生物学技术研究了被试污水处理厂活性污泥中厌氧氨氧化菌的活性及功效,该方法对于评价厌氧氨氧化菌的活性和反应速率,进而为优化厌氧氨氧化生物脱氮工艺具有十分重要的价值。

5 结论 (Conclusions)

1) 16S rRNA 的分子生物学分析探知,被试活性污泥中存在一种常见的污水处理系统厌氧氨氧化菌种——*Candidatus Brocadia*,但生物多样性较低。

2) 通过 IPT 同位素示踪技术测得,被试活性污泥中的厌氧氨氧化和反硝化反应的速率分别为 $1.25 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $12.16 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,厌氧氨氧化反应对 N_2 产生量的贡献为 9.32%。

分子生物学和 IPT 同位素示踪技术的联合应用能够准确地完成厌氧氨氧化菌的存在鉴定和活性测定,但也存在一点不足,即反硝化反应对外在碳源的消耗使得本方法对反硝化速率的测定存在偏差。

致谢:本研究得到了丹麦奥胡斯大学(Aarhus University) Nils Risgaard-Petersen 博士和丹麦国家环境研究所(National

Environmental Research Institute, Silkeborg) Egon Frandsen 的大力支持与帮助,在此表示衷心感谢。

责任作者简介:祝贵兵,男,博士,中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室副研究员。自 1997 年以来一直从事污水生物脱氮、生物硝化反硝化相关课题的研究。从 2006 年开始致力于河流污染控制、湿地氮循环方面研究。公开发表相关论文共 30 余篇,其中以第一作者发表 SCI 收录论文 13 篇;EI 收录论文 20 余篇;出版译著 1 部;申请国家发明专利 4 项。

参考文献 (References):

- Dalsgaard T, Canfield D E, Petersen J, *et al.* 2003. N-2 production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica [J]. *Nature*, 422(6932): 606-608
- Dalsgaard T, Thamdrup B. 2002. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3802-3808
- Erlor D V, Eyre B D, Davison L. 2008. The contribution of anammox and denitrification to sediment N-2 production in a surface flow constructed wetland [J]. *Environmental Science and Technology*, 42(24): 9144-9150
- 范改娜, 祝贵兵, 王雨, 等. 2010. 河流湿地氮循环修复过程中的新型功能微生物 [J]. *环境科学学报*, 30(8): 1558-1563
- Fan G N, Zhu G B, Wang Y, *et al.* 2010. New functional microorganisms in nitrogen cycle restoration of river riparian ecosystems [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 30(8): 1558-1563 (in Chinese)
- Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, *et al.* 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8): 3042-3051
- Neef A, Amann R, Schlesner H, *et al.* 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes [J]. *Microbiology-Uk*, 144: 3257-3266
- Schmid M C, Risgaard-Petersen N, van de Vossenberg J, *et al.* 2007. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity [J]. *Environmental Microbiology*, 9(6): 1476-1484
- Schmid M, Twachtman U, Klein M, *et al.* 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(1): 93-106
- Schubert C J, Durisch-Kaiser E, Wehrli B, *et al.* 2006. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika) [J]. *Environmental Microbiology*, 8(10): 1857-1863
- 唐崇俭, 郑平. 2010. 厌氧氨氧化技术应用的挑战与对策 [J]. *中国给水排水*, 26(4): 19-23
- Tang C J, Zheng P. 2010. Challenges and countermeasures for application of ANAMMOX biotechnology [J]. *China Water and Wastewater*, 26(4): 19-23 (in Chinese)
- Thamdrup B, Dalsgaard T. 2002. Production of N-2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1312-1318
- Vandegraaf A A, Debruijn P, Robertson L A, *et al.* 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of N-15 studies in a fluidized bed reactor [J]. *Microbiology-Uk*, 143: 2415-2421
- Vandegraaf A A, Mulder A, Debruijn P, *et al.* 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4): 1246-1251
- 许世伟, 张建新, 付强. 2008. 城市污水处理厂脱氮除磷调控参数的研究 [J]. *给水排水*, 34(3): 7-11
- Xu S W, Zhang J X, Fu Q. 2008. A study of controlling parameters of nitrogen and phosphorus removal in Municipal wastewater treatment plant [J]. *Water and Wastewater Engineering*, 34(3): 7-11 (in Chinese)
- 郑平, 张蕾. 2009. 厌氧氨氧化菌的特性与分类 [J]. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 35(5): 473-481
- Zheng P, Zhang L. 2009. Characterization and classification of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Science)*, 35(5): 473-481 (in Chinese)
- Zhu G B, Jetten M S M, Kusch P, *et al.* 2010. Potential roles of anaerobic ammonium and methane oxidation in the nitrogen cycle of wetland ecosystems [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4): 1043-1055
- Zhu G B, Peng Y Z, Li B K, *et al.* 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 192: 159-195