

刘金苓, 钟玉鸣, 谢志儒, 等. 2009 厌氧氨氧化微生物在有机碳源条件下的代谢特性 [J]. 环境科学学报, 29(10): 2041–2047
Liu J L, Zhong Y M, Xie Z R, *et al*. 2009 Metabolism of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria with organic carbon addition [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(10): 2041–2047

厌氧氨氧化微生物在有机碳源条件下的代谢特性

刘金苓^{1,3}, 钟玉鸣¹, 谢志儒^{1,2}, 贾晓珊^{1,*}, 徐昕荣⁴

- 1 中山大学环境科学与工程学院, 广州 510275
- 2 中国航空工业规划设计研究院, 北京 100011
- 3 广州市环境保护科学研究院, 广州 510620
- 4 华南理工大学分析测试中心, 广州 510640

收稿日期: 2009-01-28 修回日期: 2009-04-23 录用日期: 2009-07-30

摘要: 通过多系列血清瓶实验并结合吉布斯自由能量分析探讨了厌氧氨氧化微生物在有机碳源条件下的代谢特性. 实验结果表明: 在葡萄糖作为有机碳源的条件下, 低浓度的葡萄糖 (0.5 mmol L^{-1}) 能够促进厌氧氨氧化反应的速率, 高浓度的葡萄糖 ($\geq 1\text{ mmol L}^{-1}$) 抑制了厌氧氨氧化活性; 厌氧氨氧化微生物不仅具有厌氧氨氧化的代谢特性, 还具有反硝化和硫酸盐还原的代谢能力. 吉布斯自由能量分析表明: 在低浓度葡萄糖条件下, 尽管最初厌氧氨氧化途径具有优势, 但随后与反硝化途径展开竞争并处于劣势; 在高浓度葡萄糖条件下, 与厌氧氨氧化途径相比, 反硝化途径完全占据优势; 硫酸盐还原途径与厌氧氨氧化和反硝化途径相比不具有能量优势, 只能发生在这两个途径之后.
关键词: 厌氧氨氧化; 硫酸盐还原; 反硝化; 代谢

文章编号: 0253-2468(2009)10-2041-07 中图分类号: X171 文献标识码: A

Metabolism of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria with organic carbon addition

LIU Jinling^{1,3}, ZHONG Yuming¹, XIE Zhiru^{1,2}, JIA Xiaoshan^{1,*}, XU Xinrong⁴

- 1 School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275
- 2 China Aeronautical Project and Design Institute, Beijing 100011
- 3 Guangzhou Research Institute of Environmental Protection, Guangzhou 510620
- 4 Analytical and Testing Center, South China University of Technology, Guangzhou 510640

Received 28 January 2009; **received in revised form** 23 April 2009; **accepted** 30 July 2009

Abstract The metabolism of anammox bacteria with an organic carbon source was studied by conducting a series of experiments in serum bottles and calculating the Gibbs free energy of each oxidation process. The results showed that anammox activity was enhanced with 0.5 mmol L^{-1} glucose addition and inhibited when glucose was more than 1 mmol L^{-1} . In this experiment, anammox bacteria not only oxidised ammonium to nitrite but reduced nitrite and sulphate. Gibbs free energy analysis indicated that ① when glucose was low, anammox was prior to denitrification initially, but later, denitrification dominated and nitrite was oxidized. ② when glucose was high, denitrification was always prior to anammox. As sulphate reduction had no advantage in free energy, it occurred after denitrification and anammox.
Keywords anaerobic ammonium oxidation; sulphate reduction; denitrification; metabolism

1 引言 (Introduction)

厌氧氨氧化是指在厌氧或者缺氧条件下, 厌氧氨氧化微生物以 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 为电子受体, 氧化 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 为氮气的生物过程 (Mulder *et al*, 1995; Van de Graaf *et al*, 1995; 郑平等, 1998). 厌氧氨氧化与传

统硝化-反硝化脱氮相比, 具有脱氮效率高、能耗低、二次污染小等优点, 在废水的生物脱氮工艺中具有广泛的应用前景 (Grmmen *et al*, 2002; Kartal *et al*, 2004).

目前, 尽管国内外已有厌氧氨氧化工艺的应用性报道, 但是完全意义上的应用于废水生物脱氮还

存在废水中复杂成分,特别是有机物对厌氧氨氧化微生物的干扰问题.自从G ven等(2005)发现在丙酸盐存在时,厌氧氨氧化微生物能分解丙酸盐为 CO_2 进行反硝化脱氮这一非厌氧氨氧化的代谢途径以来,国内外学者对有机碳源条件下厌氧氨氧化反应持有相反的两种观点.一种认为有机碳源条件下,反硝化菌等异养菌和厌氧氨氧化菌共存并形成基质竞争,有机物浓度高时,异养菌大量繁殖,厌氧氨氧化菌不再表现活性(Wang et al., 2005; 康晶等, 2005; 杨洋等, 2006; 朱静平等, 2006; Chanchoi et al., 2007).另外一种观点认为,有机碳源条件下,厌氧氨氧化微生物仍然占据重要生态位,和反硝化菌竞争并优先利用有机碳源,代谢途径表现多样化. Kartal等(2007)发现了 *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* 可以竞争过其他厌氧氨氧化菌和异养反硝化菌,能在 NO_2^- 、 NH_4^+ 和 NO_3^- 存在的条件下将丙酸氧化.这两种相反的观点不但显示着问题的复杂性,同时也揭示出进行更深一步研究的必要性.

因此,本研究以经过长期连续培养的厌氧氨氧化微生物 A2 (Accession No. AM056027) 为研究对象,在有机碳源(以葡萄糖为代表)条件下进行一系列标准血清瓶实验,整合实验结果并结合吉布斯自由能进行分析,以期了解厌氧氨氧化微生物在有机碳源条件下的代谢特性,为厌氧氨氧化工艺的应用提供理论依据.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 供试厌氧氨氧化微生物

采用完全混合连续流反应器(CSTR)启动培养厌氧氨氧化微生物,经过2年后,其 NH_4^+-N 的降解活性为 $2160 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (以VSS计), NH_4^+-N 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的去除量与 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的生成量比为1.00:1.26:0.24.反应器内微生物形态单一,采用分子生物学手段测定16S rDNA基因序列,命名为A2 (Accession No. AM056027),系统发育分析表明该菌属于 *Planctomycetales* 的一个分支(徐昕荣等, 2006).

2.2 基本的血清瓶实验操作方法

本研究采用改进的微生物血清瓶方法(Jia et al., 1996, 1999).首先在充满氩气的无菌厌氧箱内对灭菌后的血清瓶(200 mL)用丁基橡胶塞塞住并加铝盖用封口钳密封待用;其次用医用注射器从

完全混合连续流反应器(CSTR)中取出60 mL厌氧氨氧化培养物,在厌氧条件下经过 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、10 min的离心后移去上清液,用除氧的 KHCO_3 缓冲液($\text{pH} = 8.0$)清洗3遍;然后加入60 mL根据不同实验目的配制的培养液(基础无机盐溶液+目标成分)使厌氧氨氧化培养物处于悬浮状态.悬浮后的60 mL混合液再用医用注射器注入前述待用血清瓶内,并用黑布包裹后置入恒温摇床中在 35°C 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下进行实验.

基础无机盐溶液为 KHCO_3 0.50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.34 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 0.027 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CaCl_2 0.136 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NaNO_2 0.365 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.33 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、微量元素 I 溶液(EDTA- FeSO_4 溶液,其中,EDTA和 FeSO_4 质量浓度均为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 mL $\cdot \text{L}^{-1}$ 、微量元素 II 溶液(Linping et al., 1998) 1 mL $\cdot \text{L}^{-1}$.

2.3 有机碳源条件下的厌氧氨氧化微生物活性实验

活性实验采用基本的血清瓶实验方法.设置5个有机碳源初始条件,即在无机盐溶液的基础上,添加葡萄糖使其在血清瓶中浓度分别为0.05、1.0、2.0和4.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.每个初始条件均安排3个重复并设置CK为不接种厌氧氨氧化菌的对照组.所有血清瓶的初始 NH_4^+-N 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度均为 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, SO_4^{2-} 浓度为 $337 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, KHCO_3 浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值为8.0.接种VSS为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.4 抑制剂对厌氧氨氧化活性的影响实验

实验同样采用如上基本的血清瓶实验方法,共设置2个系列实验.第1系列为青霉素对厌氧氨氧化活性的影响实验,分为a和b两个实验.实验a在无机盐基础上,添加青霉素浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理并与不添加青霉素处理进行对比;实验b在无机盐溶液添加 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的基础上,添加青霉素浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理与并不添加青霉素处理进行对比.第2系列为钼酸铵对厌氧氨氧化活性的影响实验,同样分为a和b两个实验.实验a在无机盐基础上,添加钼酸铵浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理与不添加钼酸铵处理进行对比;实验b在无机盐溶液添加葡萄糖浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的基础上,添加钼酸铵浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理与不添加钼酸铵处理进行对比.

2.5 硫酸盐还原细菌的检测实验

针对长期培养所得的厌氧氨氧化菌(A2),在特制的硫酸盐培养液中厌氧培养2周后,加紫外灭菌

的硫酸亚铁铵 0.5 g L^{-1} , 观察有否黑色沉淀, 如有黑色沉淀, 证明有硫酸盐还原作用的产生。

硫酸盐还原细菌培养采用改进的 Postgate B 培养基, 成分为: 乳酸钠 3.50 g L^{-1} 、 NH_4Cl 1.00 g L^{-1} 、 K_2HPO_4 0.50 g L^{-1} 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g L^{-1} 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g L^{-1} 、 Na_2SO_4 1.50 g L^{-1} , 其中, SO_4^{2-} 浓度为 1014 mg L^{-1} , pH 为 7.0

2.6 常规测试分析方法

常规分析测定项目包括 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 、 NO_3^--N 、TN、 SO_4^{2-} 、pH、SS、VSS, 所有项目采用标准方法 (国家环保总局, 2002) 进行。其中, NH_4^+-N 采用水杨酸-次氯酸盐光度法; NO_2^--N 、 NO_3^--N 和 SO_4^{2-} 的测定采用离子色谱法; TN 的测定采用紫外法; SS、VSS 的测定采用重量法; 葡萄糖的测定采用蒽酮法 (Reineke *et al.*, 1984)。

3 结果 (Results)

3.1 有机碳源条件下厌氧氨氧化微生物的代谢特征

3.1.1 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 和 NO_3^--N 的变化 不同浓度有机碳源 (葡萄糖) 条件下厌氧氨氧化活性的变化情况如图 1 所示。由图 1 可知, 随着添加葡萄糖浓度的增大, NO_2^--N 的去除速度加快, 对应的 NH_4^+-N 去除率和 NO_3^--N 生成量则减少。反应进行 240 h 时, 0.05 、 1.0 、 2.0 和 4.0 mmol L^{-1} 葡萄糖条件下的 NO_2^--N 去除率均为 100.0%; NH_4^+-N 去除率分别达到 87.3%、70.1%、29.9%、22.8% 和 13.2%; TN 的去除率也分别达到 77.1%、80.9%、61.6%、59.3% 和 54.7%。在 144 h 内, 0.5 mmol L^{-1} 葡萄糖条件下的 NO_2^--N 和 NH_4^+-N 的去除率均高于不添加葡萄糖的处理, 如反应进行到

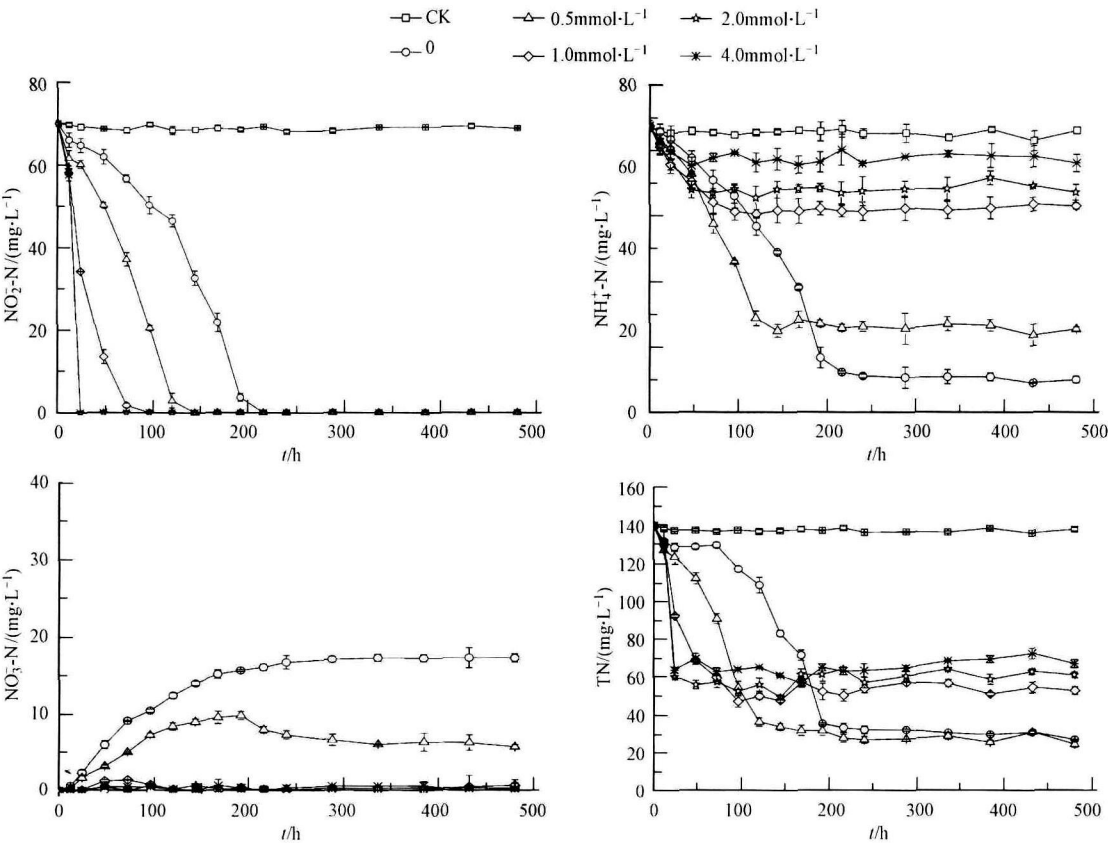


图 1 葡萄糖对厌氧氨氧化活性的影响
Fig 1 Effects of glucose on anammox activity

144 h 时, 0.5 mmol L^{-1} 葡萄糖条件下的 NO_2^--N 和 NH_4^+-N 去除率比不添加葡萄糖的处理分别高出 26.5% 和 47.6%, 说明少量葡萄糖的添加促进了 NO_2^--N 和 NH_4^+-N 的去除。

3.1.2 硫酸盐浓度的变化 图 2 描述了不同浓度葡萄糖条件下 SO_4^{2-} 浓度的变化。由图 2 可知, 0.05 、 1.0 、 2.0 和 4.0 mmol L^{-1} 葡萄糖条件下的 SO_4^{2-} 浓度出现下降的时间分别是 432、432、240、168

和 72 h, 当反应进行到 480 h 时, 不同浓度葡萄糖条件下 SO_4^{2-} 的去除率分别为 3.5%、3.5%、32.4%、72.1% 和 99.2%。取出悬浮菌液加入硫酸亚铁铵, 1.0、2.0 和 4.0 mmol L⁻¹ 葡萄糖处理均出现黑色沉淀, 0 和 0.5 mmol L⁻¹ 葡萄糖处理未出现黑色沉淀。这表明一定浓度葡萄糖条件下会发生 SO_4^{2-} 的还原现象, 随着葡萄糖浓度的增加, SO_4^{2-} 还原速率逐渐增大。

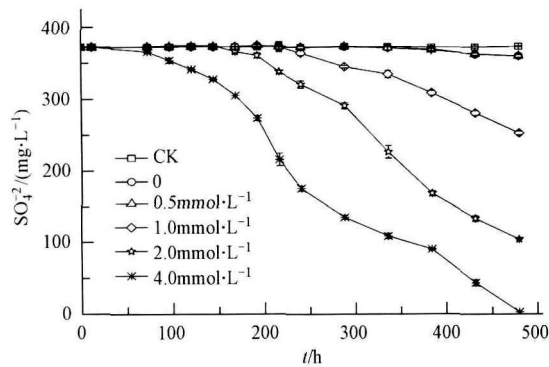


图 2 不同葡萄糖条件下 SO_4^{2-} 的变化情况
Fig. 2 Effects of glucose on sulfate reduction

3.1.3 葡萄糖浓度的变化 葡萄糖浓度的变化如图 3 所示。由图 3 可知, 反应 48 h 内, 不同浓度葡萄糖条件下反应体系内葡萄糖浓度快速下降, 0.5、1.0、2.0 和 4.0 mmol L⁻¹ 体系葡萄糖分别下降了 79.1%、93.5%、93.2% 和 95.1%。

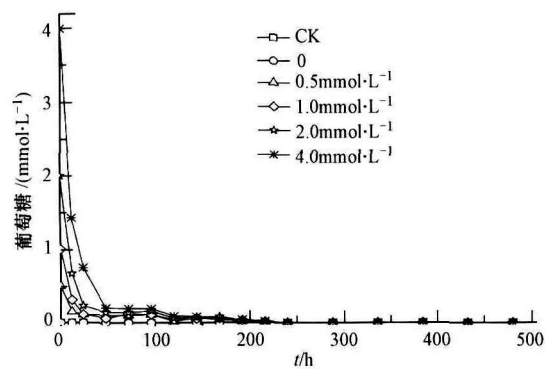


图 3 葡萄糖的变化情况

Fig. 3 Degradation of glucose by ANAMMOX enrichment cultures

3.1.4 pH 值的变化 不同浓度葡萄糖条件下反应体系内 pH 值的变化如图 4 所示。由图 4 可知, 0 和 0.5 mmol L⁻¹ 体系中的 pH 值随反应进行稍微升高, pH 值由反应初始的 8.00 分别缓慢升高至 8.08 和 8.17; 1.0 mmol L⁻¹ 体系中的 pH 值上升较快, 72 h 时 pH 值达到 8.29。随着反应进行, pH 上升平缓。

480 h 时 pH 达到 8.42。2.0 和 4.0 mmol L⁻¹ 体系的 pH 值波动较大, 在 24 h 时, pH 值降到最低, 分别为 7.69 和 7.24。随后 pH 值快速上升, 在 480 h 时, pH 值分别达到 8.21 和 7.94。

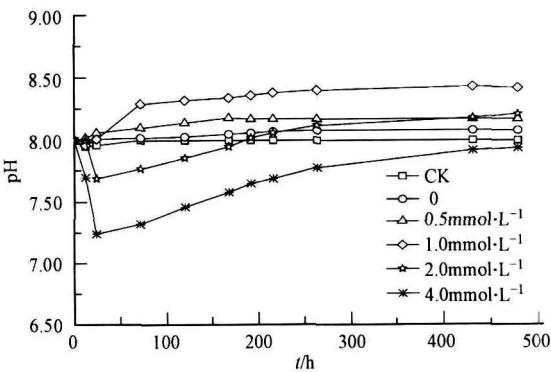


图 4 葡萄糖对 pH 值的影响
Fig. 4 Effects of glucose on pH

3.2 抑制剂对葡萄糖条件下厌氧氨氧化代谢的影响

3.2.1 青霉素的影响 有关青霉素对厌氧氨氧化微生物的活性和反硝化反应的影响见图 5。由图 5 a 可知, 在无机盐溶液基础上, 添加青霉素处理和不

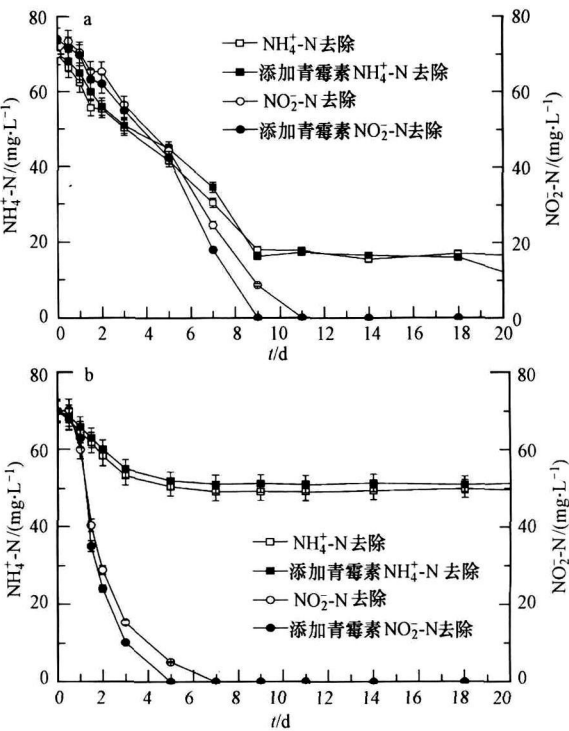


图 5 青霉素对厌氧氨氧化和反硝化反应的影响 (a 无机盐溶液, b 无机盐溶液 + 1 mmol L⁻¹ 葡萄糖)

Fig. 5 Effects of penicillin G on the anammox reaction and denitrification (a inorganic salt solution, b inorganic salt solution with 1 mmol L⁻¹ glucose added)

添加青霉素处理的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的去除率没有显著性差异, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度的下降趋势相同, 均在第 11 d 达到了最大去除率 75.3% 和 74.6%, 在第 11 d 时, 两个处理对 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的去除率均达到 100%, 显示青霉素对厌氧氨氧化活性没有影响. 由图 5b 可知, 在 1 mmol L^{-1} 葡萄糖条件下, 添加青霉素处理和不添青霉素处理 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的降解去除几乎完全相同, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 去除率在第 7 d 达到 100%, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的去除率分别为 26.9% 和 29.8%. 这同样表明即使在葡萄糖条件下, 青霉素的添加对厌氧氨氧化微生物的活性和反硝化反应没有影响.

3.2.2 钼酸盐的影响 有关钼酸盐对厌氧氨氧化活性和硫酸盐还原反应的影响结果见图 6. 从图 6 可以看出, 在无机盐溶液条件下, 2 mmol L^{-1} 钼酸盐的添加对厌氧氨氧化活性没有显著影响, 和青霉素的添加趋势一致, 不再赘述. 在有机碳源 (2 mmol L^{-1} 葡萄糖) 条件下, 添加钼酸盐处理和不添加钼酸盐处理的硫酸盐均都在第 7 d 开始显著下降, 降解趋势几乎相同. 这同样表明即使在葡萄糖条件下, 钼酸盐的添加对厌氧氨氧化微生物的活性和硫酸盐还原反应没有影响. 硫酸盐还原菌的检测实验表明, 即使用硫酸盐还原菌培养液强化培养 15 d, 也未发现硫酸盐还原现象.

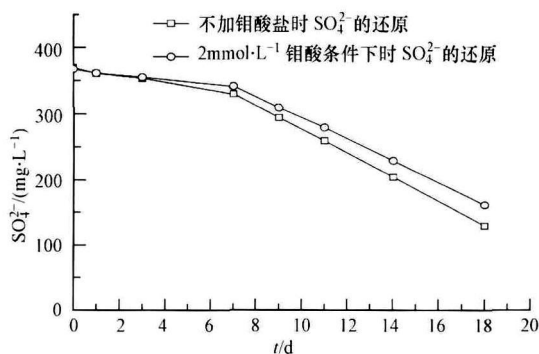


图 6 钼酸盐对 2 mmol L^{-1} 葡萄糖条件下硫酸盐还原的影响

Fig. 6 Effects of MoO_4^{2-} on sulfate reduction in the presence of 2 mmol L^{-1} glucose

4 讨论 (Discussion)

4.1 有机碳源对厌氧氨氧化活性的影响

G ven 等 (2005) 的研究表明, 低浓度葡萄糖 (1 mmol L^{-1}) 对厌氧氨氧化活性没有影响, 高浓度葡萄糖 ($> 2 \text{ mmol L}^{-1}$) 能够抑制厌氧氨氧化活性. 本研究中, 当葡萄糖的添加量为 0.5 mmol L^{-1} 时, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 的降解速率均高于不添加葡萄糖

的处理; 当葡萄糖浓度大于 1 mmol L^{-1} 时, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 快速降解完全, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 只有少量去除. 这说明低浓度的葡萄糖 (0.5 mmol L^{-1}) 能够促进厌氧氨氧化活性, 高浓度葡萄糖 ($\geq 1 \text{ mmol L}^{-1}$) 则抑制了厌氧氨氧化活性. 本研究结果不但补充完善了 G ven 等 (2005) 有关低葡萄糖条件下的结论, 同时进一步揭示出有机碳源对厌氧氨氧化活性影响的复杂性.

4.2 厌氧氨氧化微生物的反硝化代谢特性

随着添加葡萄糖浓度的提高, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 快速下降, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 只有少量去除, 表现出传统反硝化反应特征. 青霉素能够抑制细菌细胞壁的合成, 从而抑制细菌的繁殖, 传统的反硝化细菌对青霉素敏感失活, 而厌氧氨氧化微生物对青霉素不敏感 (Jetten *et al.*, 1999). 本研究通过添加青霉素实验证实了反硝化反应不是由反硝化菌造成的, 而是由厌氧氨氧化微生物主导的反应, 是厌氧氨氧化微生物另外一种代谢途径. G ven 等 (2005) 用丙酸盐对厌氧氨氧化培养物进行长达 150 d 的培养, 发现厌氧氨氧化菌能够优先氧化丙酸盐生成 CO_2 , 还原 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 或 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 为 N_2 , 通过 FISH 验证反应器内厌氧氨氧化菌一直保持 80% 左右, 而反硝化菌只占 2%, 从而阐明了厌氧氨氧化菌的反硝化代谢途径. Kartal 等 (2007) 研究报道了能够优于反硝化菌利用丙酸盐进行反硝化代谢的厌氧氨氧化菌, 并命名为 *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"*. 本研究结果表明, 即使在更复杂有机碳源葡萄糖条件下, 厌氧氨氧化菌也能够改变其代谢途径表现出反硝化代谢特性.

4.3 厌氧氨氧化微生物的硫酸盐还原代谢特性

高浓度葡萄糖条件下, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 首先快速降解完全, 然后 SO_4^{2-} 浓度出现下降, 并伴随着 S^{2-} 的产生, 表现出典型硫酸盐还原反应的特征. 本研究中厌氧氨氧化培养物通过硫酸盐还原菌典型培养基培养 15 d 后, 检测未发现有传统硫酸盐还原菌的存在; 另外, 钼酸盐在 $0.6 \sim 1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ 时, 对传统硫酸盐还原菌抑制作用就很明显. 本研究添加高浓度钼酸盐 (2 mmol L^{-1}) 的活性试验中同样发生着这种硫酸盐还原反应的结果, 进一步验证了硫酸盐的还原不是传统硫酸盐还原菌的作用, 而是厌氧氨氧化微生物的另一种代谢途径. Li 等 (2008) 研究发现, 厌氧氨氧化菌能以硫酸盐为电子受体, 氧化氨氮, 达到同时去除氨氮和硫酸盐的目的. 尽管 Li 等的研究结果是在无机碳源添加条件下的发现, 和本

研究的实验条件相差比较大,但这些结果还是能够进一步揭示出厌氧氨氧化微生物是一种具有多代谢途径的特殊菌种.

4.4 厌氧氨氧化微生物多代谢途径的能量分析

前述实验结果及相关讨论显示出厌氧氨氧化微生物除了本身的氨氧化代谢途径之外,还具有反硝化和硫酸盐还原的代谢特性.众所周知,一种具有多代谢途径的微生物通常会选择对自己最有利的代谢途径,此时通过不同代谢途径所能获取的能量大小往往是一个重要的判断标准.本研究以不同反应的标准吉布斯自由能量的变化为基础,引入实际条件下的能量分析,试图从能量选择方面解释厌氧氨氧化微生物选择不同代谢途径的机制.

4.4.1 厌氧氨氧化反应和反硝化反应的基质竞争

在厌氧氨氧化微生物选择氨氧化或者反硝化代谢途径时,将面临两反应的共同基质 NO_2^- -N 的竞争问题.如果不考虑细胞合成,厌氧氨氧化反应为式(1)所示(Brodg 1977);假设葡萄糖完全分解生成 CO_2 ,反硝化反应则为式(2);假设葡萄糖不完全分解,生成乙酸和 CO_2 ,反硝化反应为式(3).

$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- = \text{N}_2(\text{g}) + 2\text{H}_2\text{O}$, $\Delta G^{0'} = -357.79 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (以 NO_2^- 计,下同) (1)

$1/8\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{NO}_2^- + \text{H}^+ = 1/2\text{N}_2(\text{g}) + 3/4\text{CO}_2(\text{g}) + 5/4\text{H}_2\text{O}$, $\Delta G^{0'} = -400.52 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (2)

$5/24\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{NO}_2^- + \text{H}^+ = 1/2\text{N}_2(\text{g}) + 3/4\text{CO}_2(\text{g}) + 1/4\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + 5/4\text{H}_2\text{O}$, $\Delta G^{0'} = -416.46 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (3)

根据化学反应热力学(Thauer *et al.*, 1977), $\Delta G^{0'}$ 是 $\text{pH} = 7$ 条件下的标准自由能变化,只有 $\Delta G^{0'} < 0$ 时,反应才能够自发进行.理论上讲,由于 $\Delta G^{0'}$ 取值为式(1) > 式(2) > 式(3),所以,在 pH 为 7 的标准条件下,反硝化反应优先于厌氧氨氧化反应进行.

$\Delta G'$ 是根据实际基质浓度和产物浓度计算而得的反应自由能变化,描述了真实反应进行的状态.以厌氧氨氧化反应式(1)为例,其真实反应的自由能变化计算如式(4)所示.

$\Delta G' = \Delta G^{0'} + 2.303R \times T \times \lg(p_{\text{N}_2} / 0.99 \times 10^{-5} [\text{NH}_4^+]^{-1} [\text{NO}_2^-]^{-1})$ (4)

式中, R 是气体常数,取值为 $8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$; T 为绝对温度(K); $[\text{NH}_4^+]$ 、 $[\text{NO}_2^-]$ 分别为 NH_4^+ 、 NO_2^- 浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); p 为血清瓶内氮气压 (Pa).

以添加 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖为例,厌氧氨氧化和反硝化反应对基质竞争的能量分析

结果如图 7 所示.在添加 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖处理中(图 7a),由图 4 中 pH 值变化可知,少量葡萄糖可以完全分解,反硝化以反应(2)为主.在厌氧氨氧化和反硝化(2)的反应初始阶段,即 NO_2^- 为 $0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $\Delta G'$ (厌氧氨氧化) < $\Delta G'$ (反硝化),厌氧氨氧化优先于反硝化开始进行;随着反应进行, $\Delta G'$ (厌氧氨氧化) 稍高于 $\Delta G'$ (反硝化),反硝化和厌氧氨氧化同时进行;随后以反硝化反应为主要反应.厌氧氨氧化和反硝化反应的消长变化也许和系统中 pH 的变化紧密关联. A2 微生物的厌氧氨氧化活性最适 pH 值为 7~8 (徐昕荣等, 2006), $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖处理 pH 值逐渐升至 8.29 不利于厌氧氨氧化反应的进行,很可能是一个重要的原因.

在添加 $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖处理中(图 7b),同样由图 4 中 pH 值快速下降可知,葡萄糖不完全分解,反硝化以反应(3)为主.此时在 NO_2^- 降解的整个过程中, $\Delta G'$ (厌氧氨氧化) > $\Delta G'$ (反硝化),厌氧氨氧化反应完全竞争不过反硝化反应,所以,高浓度葡萄糖处理条件下以反硝化反应为主.

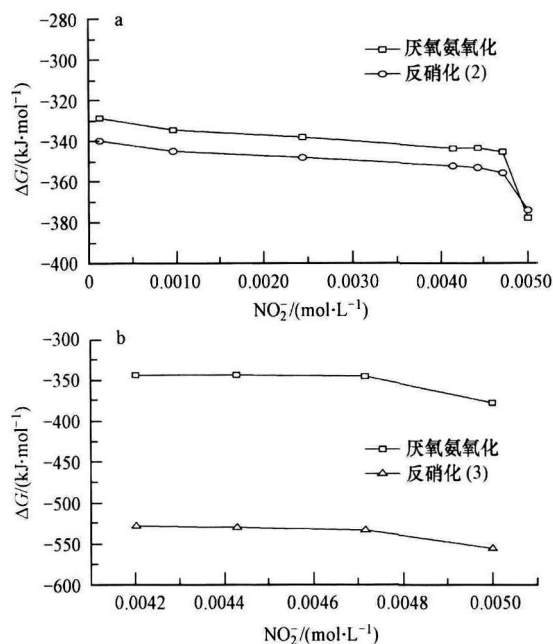
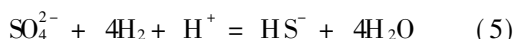


图 7 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖条件下厌氧氨氧化和反硝化自由能变化 (a $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, b $4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 7 Gibbs free energy of anammox and denitrification with $(1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ glucose (a) and } 4.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ glucose (b)})$

4.4.2 硫酸盐还原与厌氧氨氧化及反硝化反应的电子竞争 由于本实验条件所限无法进行真实反应的自由能量分析,但还是可以进行一些初步的能

量分析. 传统的硫酸盐还原反应主要为式 (5) 和式 (6) 两类. 同时, 计算得到式 (1) 和式 (2) 的 $\Delta G^{0'}$ 分别为 $-119.26 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $-133.51 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 而式 (5) 和式 (6) 的 $\Delta G^{0'}$ 远远高于式 (1) 和式 (2), 所以, 硫酸盐还原反应理论上应该在厌氧氨氧化和反硝化反应进行完毕后才进行, 和实际监测结果相符.



$\Delta G^{0'} = -18.96 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (以转移 1 mol 电子计算, 下同)



$$\Delta G^{0'} = -5.90 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

5 结论 (Conclusions)

1) 低浓度葡萄糖 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够促进厌氧氨氧化反应速率, 高浓度葡萄糖 ($\geq 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 则抑制了厌氧氨氧化活性.

2) 在有机碳源条件下, 经过连续长期培养的厌氧氨氧化微生物 A2 不仅具有厌氧氨氧化代谢特性, 还具有反硝化和硫酸盐还原代谢特性.

3) 实验结果结合吉布斯自由能分析表明, 低浓度葡萄糖 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 条件下, 厌氧氨氧化和反硝化同时存在, 厌氧氨氧化优先进行; 高浓度葡萄糖 ($\geq 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 条件下, 反硝化为主要反应. 硫酸盐还原发生在厌氧氨氧化和反硝化之后.

责任作者简介: 贾晓珊 (1962—), 男, 教授, 博士生导师.
Tel: 020-39332733, E-mail: eesjx@mail.sysu.edu.cn

参考文献 (References):

- Broda E. 1977. Two kinds of lithotrophs missing in nature [J]. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17: 491—493
- Chanchoi N, Nisoravut S, Schmitt J E. 2007. Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) and denitrification [J]. *Bioresour. Technol.* 99: 3331—3336
- Grimm R, Verstraete W. 2002. Environmental biotechnology: The ongoing quest [J]. *J. Biotechnol.* 98(1): 113—123
- 国家环境保护局《水和废水监测分析方法》编委会. 2002. 水和废水监测分析方法 (第4版) [M]. 北京: 中国环境科学出版社: 268—279
- State Environmental Protection Administration of China. 2002. The Methods of Water and Waste Water Monitoring (4th Edition) [M]. Beijing: China Environmental Science Press: 268—279 (in Chinese)
- G ven D, Dapena A, Kartal B, et al. 2007. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol.* 71: 1066—1071
- Jetten M S M, Strous M, van de Pas-Schoonen K T, et al. 1999. The anaerobic oxidation of ammonium [J]. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 421—437

- Jia X S, Fang H H P. 1999. Methanogenic characteristics of formate utilizing sludge [J]. *Journal of Environmental Engineering, American Society of Civil Engineers (ASCE)*, 125 (7): 596—601
- Jia X S, Furumai H, Fang H H P. 1996. Extracellular polymers of hydrogen utilizing methanogenic and sulfate reducing sludges [J]. *Wat. Res.* 30: 1439—1444
- 康晶, 王建龙. 2005. EGSB反应器中厌氧颗粒污泥的脱氮特性研究 [J]. *环境科学学报*, 25(2): 208—213
- Kang J, Wang J L. 2005. The characteristics of anaerobic ammonium oxidation by granular sludge from EGSB reactor [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* 25(2): 208—213 (in Chinese)
- Kartal B, Niftrik L, van Sliker O, et al. 2004. Application, ecology, physiology and biodiversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria [J]. *Review in Environ. Sci. Biotechnol.* 3: 255—264
- Kartal B, Rattray J, van Niftrik L A, et al. 2007. *Candidatus "Anammoxoglobus propinquus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 39—49
- Liu P, Wilby V. 1998. Ammonium removal by the oxygen limited autotrophic nitrification-denitrification system [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11): 4500—4506
- Liu S T, Yang F L, Gong Z, et al. 2008. Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal [J]. *Bioresour. Technol.* 99: 6817—6825
- Mukler A, van de Graaf A A, Robertson L A, et al. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor [J]. *FEMS Microbiol. Ecology*, 16: 177—183
- Reineke W, Knackmuss H J. 1984. Evaluation of cleaning strategies for removal of biofilms from reverse osmosis membranes [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2: 395—402
- Thauer R K, Jungermann K, Decker K. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria [J]. *American Society for Microbiology*, 41: 100—180
- Van de Graaf A A, Mukler A de Bruijn P, Jetten M S M, et al. 1995. Anaerobic oxidation of ammonia is a biologically mediated process [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4): 1246—1251
- Wang J L, Kang J. 2005. The characteristics of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) by granular sludge from an EGSB reactor [J]. *Process Biochemistry*, 40: 1973—1978
- 徐昕荣, 贾晓珊, 陈杰峨. 2006. 一种未见报道过的厌氧氨氧化微生物的鉴定及其活性分析 [J]. *环境科学学报*, 26(6): 912—918
- Xu X R, Jia X S, Chen J E. 2006. Identification and substrate degradation of a novel type of anammox bacterium [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 26(6): 912—918 (in Chinese)
- 杨洋, 左剑恶, 沈平, 等. 2006. 温度、pH 值和有机物对厌氧氨氧化污泥活性的影响 [J]. *环境科学*, 27(4): 691—695
- Yang Y, Zuo J E, Shen P, et al. 2006. Influence of Temperature, pH Value and Organic Substance on Activity of ANAMMOX Sludge [J]. *Environmental Science*, 27(4): 691—695 (in Chinese)
- 郑平, 胡宝兰, 徐向阳, 等. 1998. 厌氧氨氧化受体的研究 [J]. *应用与环境生物学报*, 4(1): 74—76
- Zheng P, Hu B L, Xu X Y, et al. 1998. Study on electron acceptor of mixed microbial culture for anaerobic ammonia oxidation [J]. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* 4(1): 74—76 (in Chinese)
- 朱静平, 胡勇有, 闰佳. 2006. 有机碳源条件下厌氧氨氧化 ASBR 反应器中的主要反应 [J]. *环境科学*, 27(7): 1353—1357
- Zhu J P, Hu Y Y, Yan J. 2006. Main reactions in anaerobic ammonium oxidation reactor under organic carbon condition [J]. *Environmental Science*, 27(7): 1353—1357 (in Chinese)