

微生物脱氮作用及对中间产物的抑制

万 曦¹, 万国江², 黄荣贵², M. Snozzi³

(1. 中国农业科学院土壤肥料研究所, 北京 100081; 2. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州贵阳 550002; 3. 瑞士联邦环境科学技术研究院 苏黎世 CH-8600)

摘要: 开展了 pH 及好氧-厌氧转换对微生物脱氮作用影响的研究, 结果表明, 在 $\text{pH} \geq 7.5$ 时, 经过 3 次好氧与厌氧条件转换后, 混合微生物的脱氮作用能顺利进行, N_2 产量持续稳定, NO_2^- 、 N_2O 和 NO 产量很少; 在 $\text{pH} = 6.8$ 时, 中间产物 NO_2^- 、 N_2O 等大量出现, 脱氮菌的细胞干重急速下降并被洗出, 脱氮能力受到抑制。

关键词: 混合微生物; 脱氮作用; pH 变化; 好氧与厌氧转换

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2000)02-0227-07

近代人类活动中, 由于农田过量施肥、工业和生活污水排放, 致使大量有机物、氮-磷化合物、异养生物等汇入江河湖海, 导致水体富营养化^[1~5]。为保护水质, 解决水体中营养元素氮过剩问题, 有微生物参与的硝化-反硝化作用的研究越来越受人们重视^[6~11]。

在微生物作用下, 水体中的含氮化合物如尿素、蛋白质等被降解为 NH_4^+ , 部分 NH_4^+ 被细菌同化, 但大部分仍存在于水体。有氧时, 在自养微生物作用下 NH_4^+ 被氧化成 NO_2^- 和 NO_3^- ^[12]; 缺氧时, 脱氮细菌如假单胞菌、无色细菌、芽胞杆菌、微球菌等以 NO_3^- 代替 O_2 作为呼吸链中最终电子受体进行厌氧呼吸, 从而产生一系列脱氮反应^[12]。

微生物的脱氮作用实质上是酶的催化反应过程。环境因素的改变会引起酶的合成受阻或酶的活性降低, 导致有害中间产物积累, 水质急剧恶化, 以致脱氮反应无法顺利进行。同时, NO_2^- 能引起人体高铁血红蛋白血症; N_2O 是“温室气体”之一, 全球大气中 N_2O 浓度正以每年 0.25% 速度递增^[6]。

目前, 有关微生物生长代谢的动力学研究主要集中在终产物和分解产物的抑制及阻遏的调节上, 而综合考虑这些单个机制并开展动态调控实验的报道较少^[6~8]。微生态变化必然影响微生物代谢过程。研究细胞在生长条件瞬间改变时的生理生化特性, 不仅有助于揭示细胞新陈代谢的调节规律, 也利于了解各种生长状态下细胞间大分子的改变。

试验采用恒化连续培养方法, 研究 pH 变化、好氧-厌氧转变等环境因素变化下混合微生物脱氮过程的瞬间动态规律和中间产物的产生及抑制, 以期为了解脱氮细菌的适应能力, 为改善水质提供科学基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

合成培养基: 每升(L) 含: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.16g, KH_2PO_4 1.6g, KNO_3 7.89g, 和

收稿日期: 1999-05-31

基金项目: 国家自然科学基金(39900027); 贵州省科学基金和瑞士联邦自然科学基金和留学回国人员科技活动择优资助。

作者简介: 万曦(1969—), 女, 四川成都人, 助研, 主要从事分子生物学研究。

H₃PO₄、微量元素混合液、EDTA-Na、EDTA-Fe及消沫剂各1 mL;6.5%醋酸钠作为限制性碳源。

恒化器:运作体积3L,稀释率0.03h⁻¹,温度28℃。

H₃PO₄(20%)和NaOH(2mol)用于调节脱氮混合微生物的两个极限pH值:6.8和7.5。

好氧状态:充入氧;厌氧状态:充入氮气。

1.2 测定方法

细胞量:10mL培养液经孔径为0.22μm的滤膜过滤,并于105℃干燥;

醋酸钠,NO₂⁻和NO₃⁻制备:10mL培养液经孔径为0.22μm的滤膜过滤,置于-20℃保藏;

NO₂⁻:50 mL样品与950mL测定液混合,在室温下培养5min,在540nm处测定光密度;

NO₃⁻:离子色谱法测定;

DOC:TOC分析仪测定;

NO₂和N₂:用气相色谱法测定。

1.3 反应过程

所用水体中活性污泥采集后立即运回实验室,接种在混合培养基上,控制25℃,摇床培养24h,然后取出20mL接种到恒化器中分批培养1d,再在有氧条件下连续培养3d。当细菌生长达到稳态后,循环进行转换试验,即分别控制厌氧态和好氧态各24h。

试验在体积为3L的恒化器中进行。用恒定速度输入培养基,混合作用后以同一速度流出反应液。当细菌生长受控于某一营养元素,而其余成分过量时,可以调节细菌的生长速率(μ)。细胞量 x 随时间 t 的变化为^[12]:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x \quad (1)$$

达到稳态时,细胞浓度恒定,此时稀释率(D)等于生长速率(μ):

$$D = \mu \quad (2)$$

这样可通过改变稀释率来选择所需的生长速率。

2 结果与讨论

2.1 pH7.5,好氧与厌氧转换条件下,混合微生物脱氮作用能顺利进行

2.1.1 细胞量与DOC 图1可见,细胞经过稳定的好氧态突然转至厌氧态时,大约需要3小时进行酶的合成、表达和调控,此过程中脱氮能力极小。细胞量(干重)不变,N₂产量停滞并有微量NO₂⁻积累。尔后,脱氮能力逐渐增强,细胞量开始减少。NH₄⁺、NO₃⁻在好氧态时均作为细菌生长的氮源,而转至厌氧态时,NO₃⁻作为电子受体参与能量代谢,供给细胞的总氮量减少,以致细胞量降低。当反应转至好氧态时,细胞量略有上升,经多次转换后趋于稳定。

溶解有机碳(DOC)由最高值(260mg·L⁻¹)下降,与细胞量下降趋势吻合。所测的DOC一部分来源于此阶段碳源(NaCH₂COOH)的积累和死亡的细胞残骸。在以后的好氧、厌氧转化过程中,DOC维持在40mg·L⁻¹左右。从细胞量、DOC变化趋势看出,脱氮反应已顺利进行(图1a)。

2.1.2 N₂与N₂O 厌氧态开始时,经过一段延滞期,N₂量增高至2.0mmol·L⁻¹左右,直到转入好氧态。在以后的厌氧态中,N₂生产稳定于1.1mmol·L⁻¹。由于反应初始时碳源(NaCH₂COOH)浓度高,N₂生产量取决于电子供体的多少,因此N₂浓度达到最高值。随着

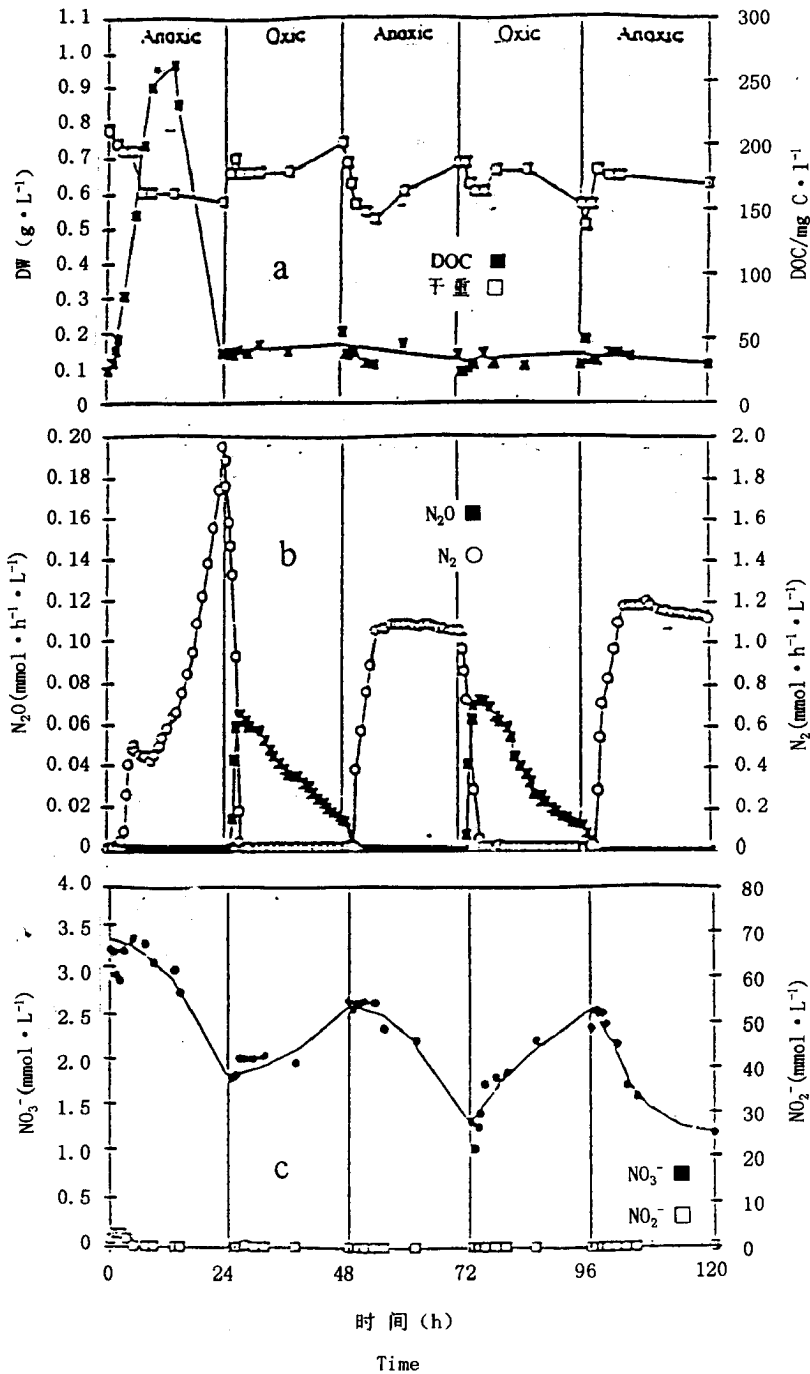


图 1 $\text{pH} \geq 7.5$, 温度 = 30°C , 稀释率 = 0.03h^{-1} 时, 好氧与厌氧转换条件下混合微生物的脱氮作用

Fig. 1 Microbiological denitrification during transitions between oxic and anoxic conditions ($\text{pH} \geq 7.5$, 30°C , dilution rate = 0.03h^{-1})

NaCH_2COOH 的耗损, N_2 的产量下降, 并趋于稳定。好氧态中未测出 N_2 , 却有 N_2O 积累, 说明 O_2 是比 NO_3^- 优先的电子受体。 N_2O 一方面来自于硝化反应, 另一方面由于存在的氧优先抑制 N_2O 还原酶, 导致部分 N_2O 积累 (图 1b)

2.1.3 NO_3^- 与 NO_2^- 厌氧态时, NO_3^- 代替 O_2 作为最终电子受体进行脱氮反应, 含量减少。 NO_2^- 只在初始时有微小积累, 说明即使进行脱氮反应, 一开始仍需要一定时间合成有关还原酶。当反应进入好氧态时, 氧严重抑制 NO_3^- 还原酶, 导致 NO_3^- 浓度立即升高 (图 1c)。然而, 纯化的 NO_3^- 还原酶对氧浓度并不敏感。Susanna^[6] 认为在完整的细胞中, 氧阻止 NO_3^- 通过细胞膜运输到 NO_3^- 还原酶的活性中心— α 、 β

亚基上,从而抑制该还原酶的活性。

好氧态中未观察到 NO_2^- 。因为有氧条件下,纯化的 NO_2^- 还原酶仍很活跃,所以在完整的细胞中 NO_2^- 的还原受抑制是间接的,是与氧化酶(细胞色素氧化酶 aa_3 等)竞争的结果。

2.2 pH = 6.8, 与厌氧转换条件下的脱氮反应

2.2.1 细胞量与 DOC 图 2a 可见,前 2 次好氧厌氧转换时,细胞量在 pH = 6.8 与 pH = 7.5 时变化相似。当第 3 次进入厌氧态时细胞量迅速下降并被洗出。而此时 DOC 达到最高值,说明细胞内的新陈代谢非常低,酶之间的平衡严重失调,脱氮反应停止。

2.2.2 N_2 与 N_2O

当转入厌氧态时, N_2 生产的延迟期逐渐缩短,变化趋势与 pH = 7.5 时相似。 $\text{NaCH}_2\text{-COOH}$ 的积累导

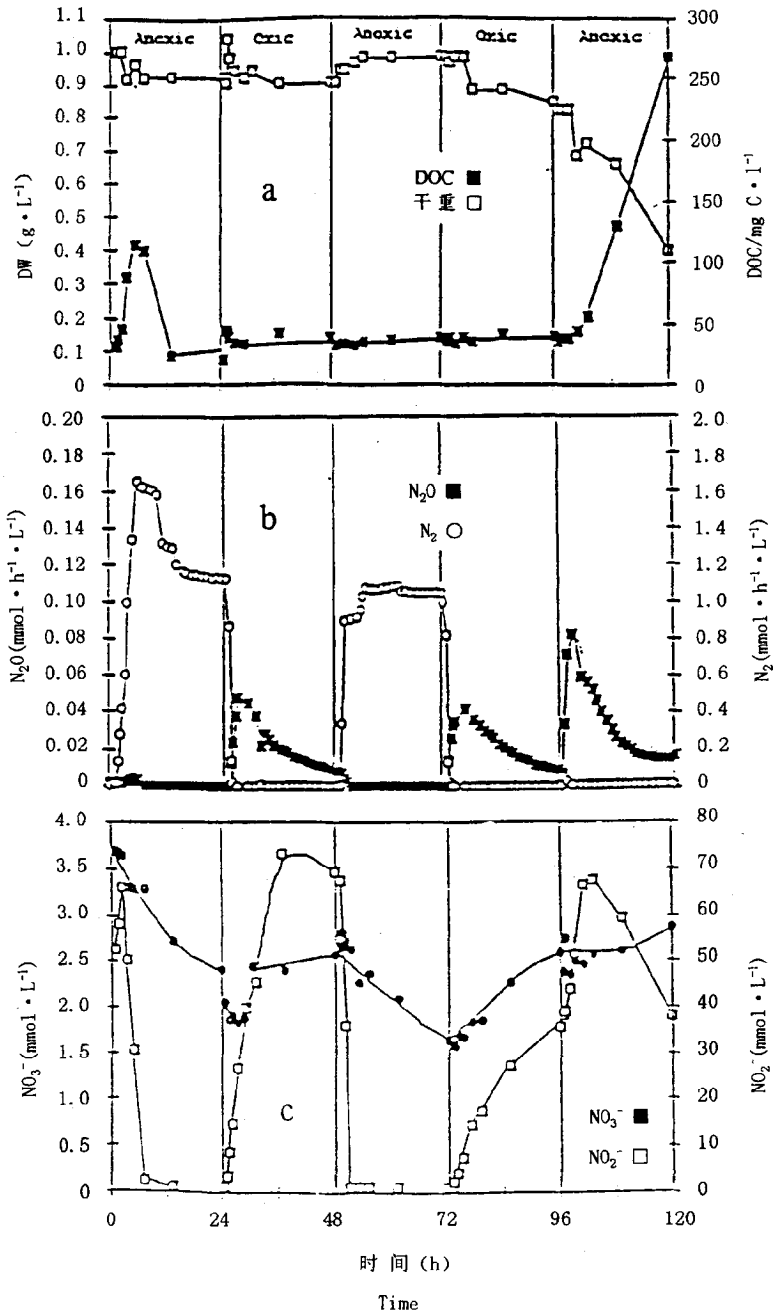


图 2 pH = 6.8, 温度 = 30℃, 稀释率 = 0.03h⁻¹时, 好氧与厌氧转换条件下混合微生物的脱氮作用

Fig.2 Microbiological denitrification during transition between aerobic and anaerobic conditions (pH = 6.8, 30℃, dilution rate = 0.03h⁻¹)

致 N_2 生产量在前半部分达到高峰,并随之下降。同时有少量 N_2O 产生。第 3 次转入厌氧态时 N_2 消失, N_2O 生产达到高峰后,也随之减少。说明 $pH=6.8$ 时脱氮反应已严重受阻。好氧态时,无 N_2 出现,却有少量 N_2O 积累(图 2b)。 N_2O 还原酶是一种位于膜间隙的水溶性酶,极易受外界条件变化的影响,为脱氮酶系中最敏感的酶。由于最适条件是 $pH=8$,所以 $pH=6.8$ 时 N_2O 还原酶活性已被严重抑制。同时, N_2O 的产生与 NO_2^- 数量有关。虽然从 NO_2^- 还原到 N_2O 是一个去毒过程,但 NO_2^- 的积累却抑制 N_2O 还原酶活性,导致 N_2O 增高。有研究表明,即使 N_2O 还原酶处于分离纯化状态,氧也能对它产生抑制作用^[7]。

2.2.3 NO_3^- 与 NO_2^- 图 2c 可见,在第一、二厌氧态时, NO_3^- 下降。尽管有 NO_2^- 产生,脱氮作用仍能进行。然而当转入第三厌氧态时, NO_3^- 含量却增高,表明细菌不再分解 NO_3^- 。虽然从 NO_3^- 还原到 NO_2^- 的过程停止,但由于 NO_2^- 还原酶不能立即还原已产生的大量 NO_2^- ,致使 NO_2^- 产量增高,几小时后又降低,说明此时细胞并未完全丧失脱氮功能。

NO_2^- 还原酶分布于细胞膜的膜间隙,最适条件是 $pH=8$ 。因此 $pH=6.8$ 的条件能部分影响 NO_2^- 还原酶活性,以至影响细菌在厌氧状态下的适应能力。已有研究表明: $NO_2^- = 10\text{mmol/L}$ 时,细胞膜电位可逆性降低; NO_2^- 浓度为 80mmol/L 时,脱氮细菌生长受抑制;而当 $NO_2^- = 100\text{mmol/L}$ 时, NO_2^- 还原酶完全失活^[6]。

在酸性条件下, NO_2^- 易与 H^+ 形成不溶性 HNO_2 。 HNO_2 极易进入细胞膜,通过抑制 ATP 酶降低质子由膜间隙运回到膜内侧的动力,导致 ATP 无法生成。由于缺乏能量,细胞不能进行正常生长代谢,厌氧状态下的还原酶无法合成,致使发生细胞液被洗出现象。

3 小结

1. $pH \geq 7.5$ 时,经多次好氧与厌氧转换后, N_2 能持续稳定产生, NO_2^- 和 N_2O 产量很少,混合微生物具有较强适应性,脱氮反应能顺利进行。

2. $pH=6.8$ 不利于脱氮反应。细胞量急剧下降, N_2O 、 NO_2^- 等中间产物大量积累。由于 N_2O 还原酶(最适 $pH=8$)位于膜间隙,因此是脱氮还原酶系中最敏感的酶。

参 考 文 献

- [1] Wan Xi, Wan Guojiang, Huang Ronggui and Pu Yong. Biogeochemical Mechanism of postdepositional remobilization of Fe & Mn in Lake Aha China[J]. Chinese Geographical Science, 1997, (4): 368~374.
- [2] 万曦,万国江,黄荣贵,普勇.阿哈湖铁、锰沉积后再迁移的生物地球化学机理[J].湖泊科学, 1997, 9(2): 129~134.
- [3] 万国江,徐义芳,李荪蓉,陈振楼.云贵高原若干湖泊水库水化学组分研究[J].环境科学丛刊, 1988, 9(3): 37~51.
- [4] 万国江,白占国,等.碳酸盐岩与环境(卷一)[M].北京:地震出版社, 1995.
- [5] 白占国,吴丰昌,万曦,邹申清,万国江.百花湖季节性水质恶化机理研究[J].重庆环境科学, 1995, 17(3): 10~14.
- [6] Susanna R. The behaviour of the various cytochromes of paracoccus denitrificans during transitions between oxic and anoxic growth conditions[D]. Diss. ETH, 1992.
- [7] Bitzi U *et al.* The biodegradation of mixtures of organic solvents by mixed and monocultures of bacteria[J]. Biotechnology and bioengineering. 1991, 37: 1037~1042.
- [8] Lendenmann U *et al.* Is escherichia coli growing in glucose-limited chemostat culture able to utilize other sugar without lag? [J]. Microbiology, 1995, 141: 71~78.
- [9] Boogerd F *et al.* Electron transport to nitrous oxide in paracoccus denitrificans[J]. FEBS Lett. 1980, 113: 279~284.

- [10] Cox J *et al.* The variable cytochrome content of paracoccus denitrificans grown aerobically under different conditions[J]. FEBS Lett., 1978, 93: 261~265.
- [11] Sinke A J *et al.* Seasonal variation in sulfate reduction and methanogenesis in peaty sediments of eutrophic Lake Loosdrecht, The Netherlands[J]. Biogeochemistry, 1992, 16:43~61.
- [12] 程皆能. 微生物生理学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1987.

Microbiological denitrification and the inhibition of intermediates

WAN Xi¹, WAN Guo-jiang², HUANG Rong-gui², M. Snozzi³

(1. *Inst. of Soils and Fertilizers, CAAS, Beijing 100081*; 2. *State Key Lab. of Envir. Geochem., Inst. of Geochem., CAS, Guiyang 550002*; 3. *Swiss Federal Inst. of Envir. Sci. and Techn. (EAWAG), Zurich CH-8600*)

Abstract: With rapidly industrial and agricultural development, more and more fertilizers, chemicals and heavy ions etc. flow into lakes and rivers without cleaning, which causes lake eutrophication, decreasing quality in drinking water sources. Therefore, denitrification is essential for controlling the amounts of nitrogen. During the process from nitrate to the end products—nitrogen, several intermediates, e.g. nitrite (NO_2^-), nitrous oxid(N_2O) and nitric oxid (NO) may be accumulated which have more toxic influences on environment. In this study, denitrification effect of microorganisms was examined on the changes between oxic and anoxic conditions under varying pH. At pH 7.5, denitrification proceeded well after 3 switches from oxic to anoxic condition and vice versa. Production of N_2 was constant and amounts of NO_2^- , N_2O and NO were little. However, at pH 6.8, the denitrification activity was inhibited and there were a large amounts of intermediates. Dry weight of denitrifying bacteria decreased violently and washed out.

Key words: microorganisms denitrification; pH; transition between oxic and anoxic conditions