

厌氧氨氧化菌富集培养物对羟胺的转化研究

胡安辉, 郑平*, 陆慧峰, 丁爽, 汪彩华

(浙江大学环境工程系, 杭州 310029)

摘要:【目的】羟胺是厌氧氨氧化的重要中间产物,本研究旨在探明厌氧氨氧化菌对羟胺的转化特性。【方法】采用厌氧氨氧化菌富集培养物,以羟胺和亚硝酸盐为基质进行分批培养试验,检测反应液中基质和产物的消涨情况。【结果】不接种厌氧氨氧化富集培养物时,羟胺和亚硝酸盐具有化学稳定性,彼此不发生化学反应;接种厌氧氨氧化富集培养物后,羟胺和亚硝酸盐发生化学反应;反应过程中有中间产物氨的产生和转化,最大氨氮积累浓度为 0.338 mmol/L;液相中总氮浓度从起始的 4.694 mmol/L 降至结束时的 0.812 mmol/L,转化率为 82.7%。羟胺和亚硝氮浓度均为 2.5 mmol/L 时,羟胺最大比污泥转化速率为 0.535 mmol/(gVSS·h),是厌氧氨氧化反应体系中氨氮最大比污泥转化速率的 1.81 倍。将羟胺浓度提高至 5.0 mmol/L 时,羟胺和亚硝氮转化速率分别提高 26.7% 和 120.7%,最大氨氮积累浓度为 0.795 mmol/L;将亚硝氮浓度提高至 5.0 mmol/L 时,羟胺和亚硝氮转化速率分别提高 6.9% 和 9.0%,最大氨氮积累浓度为 1.810 mmol/L。【结论】厌氧氨氧化富集培养物能够转化羟胺,其对羟胺的转化速率高于对氨的转化速率。羟胺相对过量可显著加快羟胺和亚硝酸盐的转化速率,亚硝酸盐相对过量对羟胺和亚硝氮转化速率影响不大,提高羟胺或亚硝氮浓度均会增大中间产物氨氮的积累。实验现象可用 van de Graaf 模型解释,对于进一步开发厌氧氨氧化工艺具有重要的理论意义。

关键词: 厌氧氨氧化;羟胺转化;比转化速率;分批培养试验

中图分类号: X173 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0485-08

厌氧氨氧化 (ANaerobic AMMonia OXidation, ANAMMOX) 是在厌氧条件下,以氨为电子供体,亚硝酸盐为电子受体,产物为氮气的生物反应^[1]。厌氧氨氧化菌归入浮霉状菌目,已发现 5 个属,10 个种,它们广泛存在于海洋、河流底泥以及废水生物脱氮处理系统中^[2-4]。厌氧氨氧化及其功能菌的发现,对微生物领域脱氮菌的研究、环境工程领域废水生物脱氮技术的开发以及生物地球化学循环中氮素循环的认识,具有重要的理论意义和实用价值。

对于厌氧氨氧化的代谢途径,目前主要有两种模型。基于氮素示踪所建立的代谢模型认为,羟胺

和联氨是厌氧氨氧化的中间产物^[5];而基于基因组学的代谢模型则认为,一氧化氮和联氨是厌氧氨氧化的中间产物^[6]。有关羟胺在厌氧氨氧化中的作用,迄今没有定论。但多位研究者^[7-12]在厌氧氨氧化菌混培物中添加羟胺,检测到了联氨的积累;van de Graaf 等^[13]试验证明低浓度羟胺对厌氧氨氧化有刺激作用;Schalk 和 Shimamura 等^[14-16]从厌氧氨氧化菌中分离到能够转化羟胺的酶,并研究了其特性。因此,羟胺与厌氧氨氧化菌的氮代谢过程有着紧密的关系。弄清厌氧氨氧化菌对羟胺的转化特性,不仅能够理论上进一步弄清厌氧氨氧化菌的氮代谢

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30770039); 国家高科技研究发展计划资助项目 (2006AA06Z332); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y507227)

* 通信作者。Tel: +86-571-86971709; E-mail: pzheng@zju.edu.cn

作者简介: 胡安辉 (1982-), 女, 四川宜宾人, 博士研究生, 研究方向为环境微生物与废物生物处理。E-mail: hu_anhui@126.com

收稿日期: 2009-10-16; **修回日期:** 2009-12-21

途径,而且能够为工程应用中开发厌氧氨氧化潜能提供依据。

本文拟采用分批培养试验,研究厌氧氨氧化菌富集培养物以羟胺为电子供体、亚硝酸盐为电子受体的代谢特性,为阐明厌氧氨氧化的代谢途径提供依据。关于厌氧氨氧化菌富集培养物将羟胺和亚硝酸盐同时转化的研究为国内外首次。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:所有试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。722-S 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)和 UV-2102 PC 型紫外分光光

度计(Unico™), pH 计、PB203-N 和 AL104-IC 天平(METTLER TOLEDO), GZX-9146 MBE 数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司), 马弗炉(上海仪表集团公司制造三部佳敏仪表有限公司)。

1.1.2 培养基:表 1 为本实验所用的培养基组成。培养基 pH 用 NaOH 调节至 7.5-8.0。微量元素组成见文献[1]。

1.2 富集培养物

试验用厌氧氨氧化菌富集培养物取自本课题组高效厌氧氨氧化反应器。厌氧氨氧化富集培养物为红色颗粒污泥,平均粒径 3 mm 左右,经克隆测序分析,该厌氧氨氧化污泥中的优势厌氧氨氧化菌为 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*。

表 1 培养基组成

Table 1 Composition of the medium

Components	Concentration/(g/L)	Components	Concentration/(g/L)
KH ₂ PO ₄	0.015	KHCO ₃	1.25
CaCl ₂	0.00566	Trace element I, II	1 mL respectively
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3	Nitrogen compound	Adding needed

1.3 分批培养试验

用不含基质的无机盐培养基多次清洗厌氧氨氧化污泥,以消除污泥中氨氮、亚硝氮和硝氮对试验的影响。大约 0.09 gVSS 的厌氧氨氧化富集培养物接种于 65 mL 血清瓶中,添加 50 mL 含氮培养基,用氩气吹脱培养基 10 min,去除血清瓶中的氧气,并用丁基橡胶塞密封。血清瓶置于 30 °C、黑暗、摇床上恒温摇动培养,间隔一定时间取上清液测定各含氮化合物浓度。所有培养试验设 3 个重复,以不接种厌氧氨氧化富集物的培养基为对照。

1.4 分析测定方法

氨氮采用水杨酸-次氯酸盐分光光度法;亚硝酸氮采用 N-(1-萘基)乙二胺盐酸盐分光光度法;硝酸氮采用紫外分光光度法;VSS 采用重量法^[17];pH 用 Mettler-Toledo FE20 pH/mV 计。羟胺根据 Frear 和 Burrell 提供的分光光度法测定^[18];联氨根据国标 GB/T15507-1995 中二甲氨基苯甲醛分光光度法测定。

2 结果

2.1 厌氧氨氧化富集培养物对氨的转化特征

氨是厌氧氨氧化的正常电子供体,为了考察所试厌氧氨氧化富集培养物对氨和亚硝酸盐的转化性能,为后续羟胺转化建立参比对象,以氨为基质进行了分批培养试验。根据基质浓度随时间的变化(图

1)可见,在反应初期(0-3 h),氨氮与亚硝氮浓度几乎呈直线下降,氨氮浓度从 2.869 mmol/L 降至 1.295 mmol/L,亚硝氮浓度从 2.937 mmol/L 降至 0.675 mmol/L,总氮浓度从 5.806 mmol/L 降至 1.970 mmol/L;在反应后期(3-6 h),氨氮和亚硝氮转化速度较慢,氨氮、亚硝氮和总氮浓度分别降至 0.819 mmol/L、0.003 mmol/L 和 0.822 mmol/L。从总体上看,亚硝氮转化速度大于氨氮,至 5 h 亚硝氮浓度接近零时,氨氮和总氮浓度不再下降。

用一级反应动力学方程(式 1)对两种基质浓度

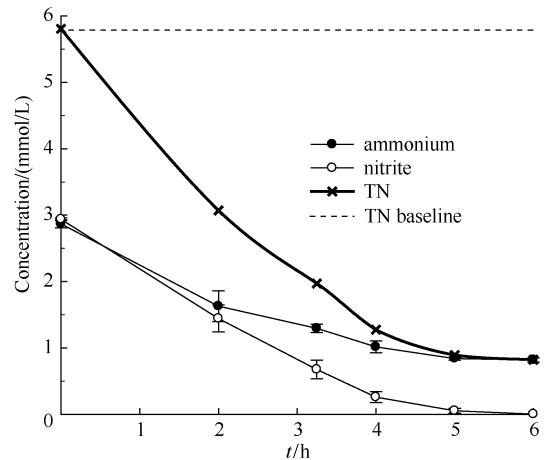


图 1 厌氧氨氧化富集培养物对氨氮和亚硝氮的转化情况

Fig. 1 Conversion of ammonium and nitrite by anammox enrichment.

随时间变化情况进行拟合,拟合所得方程见表2,相关系数为0.98以上。根据拟合方程计算,厌氧氨氧化富集培养物对氨氮与亚硝氮的最大比污泥转化速度分别为0.296 mmol/(gVSS·h)和0.356 mmol/(gVSS·h),处于文献报道值的较高水平(0.115 mmol氨/gVSS/h;1.2 mmol氨/gProtein/h;0.535 mmol总

氮/gVSS/h)^[19-21],消耗的氨氮与亚硝氮之比为1/1.20,接近理论值1/1.32^[22]。

$$C_A = C_0 e^{-k_A t} \quad (1)$$

其中, C_A 为某时刻反应物浓度,单位为 mol/l; C_0 为反应物初始浓度,单位为 mol/l; k_A 为反应速率常数,单位为 h^{-1} 。

表2 厌氧氨氧化富集培养物转化各基质的拟合方程

Table 2 Curve-fit equations for the substrates conversion course in each test

Reaction	Substrate	Curve-fit equations	R
$NH_4^+ \delta + NO_2^-$	NH_4^+	$C = 2.817e^{-0.2412t}$	0.9843
	NO_2^-	$C = 3.0049e^{-0.4815t}$	0.9929
$NH_2OH/NO_2^- = 1/1$	NH_2OH	$C = 2.197e^{-0.4383t}$	0.9946
	NO_2^-	$C = 2.3305e^{-0.1119t}$	0.9859
$NH_2OH/NO_2^- = 1/2$	NH_2OH	$C = 2.2250e^{-0.4077t}$	0.9907
	NO_2^-	$C = 4.6000e^{-0.0545t}$	0.9576
$NH_2OH/NO_2^- = 2/1$	NH_2OH	$C = 4.8220e^{-0.2300t}$	0.9783
	NO_2^-	$C = 2.4720e^{-0.2117t}$	0.9869

2.2 厌氧氨氧化富集培养物对羟胺的转化特征

2.2.1 羟胺的化学转化:羟胺化学性质活泼,为了确定化学反应对羟胺转化的影响,考察了反应体系中羟胺的化学稳定性。在血清瓶中分别加入2.5 mmol/L羟胺和亚硝氮,但不接种厌氧氨氧化富集培养物,测定两种反应物浓度的变化。结果表明(图2),在7.5 h的培养过程中,反应液中的羟胺和亚硝氮浓度分别为 2.190 ± 0.025 mmol和 2.764 ± 0.078 mmol,没有显著变化,也未检测到其他含氮产物。这组结果说明,在所试条件下,羟胺和亚硝酸盐的化学性质稳定,彼此间不发生化学反应。

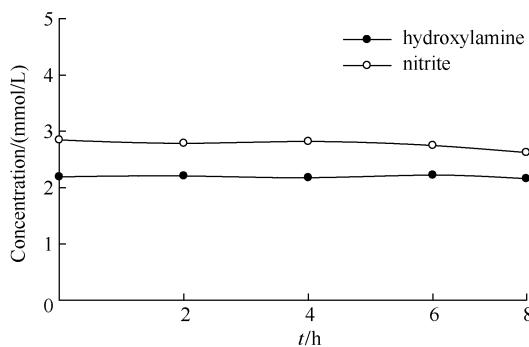


图2 对照组化学反应中羟胺与亚硝酸盐的转化情况

Fig. 2 Conversion of hydroxylamine and nitrite without anammox inocula.

2.2.2 羟胺的生物转化:在羟胺化学稳定性试验的基础上,于血清瓶中分别加入2.5 mmol/L羟胺和亚硝氮,同时接种厌氧氨氧化富集培养物,考察了厌氧氨氧化富集培养物对羟胺和亚硝酸盐的生物转化性能。由图3可知,在7.5 h的培养过程中,随培养时间的延长,亚硝氮浓度呈直线下降,浓度从起始的

2.498 mmol/L降至1.083 mmol/L,平均比污泥转化速率为0.105 mmol/(gVSS·h);羟胺转化可分两段,反应初期(0-2 h),羟胺浓度呈直线下降,浓度从2.197 mmol/L降至0.767 mmol/L,平均比污泥转化速率为0.397 mmol/(gVSS·h);反应后期(2-7.5 h),羟胺转化速度减慢,浓度降至0.072 mmol/L,平均污泥转化速率为0.070 mmol/(gVSS·h)。

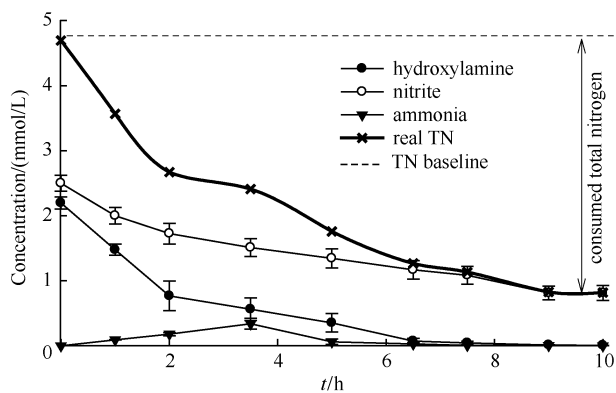


图3 试验组中羟胺和亚硝酸盐的转化情况

Fig. 3 Conversion of hydroxylamine and nitrite with anammox inocula.

在整个培养过程中,除了检测培养液中的羟胺和亚硝氮浓度外,同时检测了氨氮、硝氮和联氨。测定结果表明,培养液中不存在硝氮和联氨;0-3.5 h氨氮浓度逐渐上升到0.338 mmol/L,3.5-7.5 h氨氮浓度下降至检测限以下,积累的最高氨氮浓度与添加的羟胺之比为0.154,与添加的总氮之比为0.072。

在添加厌氧氨氧化富集培养物的试验组中,经过7.5 h的生物转化,羟胺浓度逐渐从2.197 mmol/L降

低到 0 mmol/L, 但亚硝氮浓度残留 0.812 mmol/L。值得注意的是, 培养至 6.5 h 时, 羟胺和氨氮浓度均接近于零, 亚硝氮浓度也基本上保持不变。试验结束时, 液相中的总氮浓度从 4.694 mmol/L 下降至 0.812 mmol/L, 转化率为 82.7%。

用一级反应动力学方程(式 1)对两种基质浓度随时间的变化情况进行拟合, 拟合结果见表 2, 相关系数为 0.98 以上。根据拟合方程计算, 厌氧氨氧化富集培养物对羟胺和亚硝酸盐的最大比污泥转化速度分别为 0.535 mmol/(gVSS·h) 和 0.145 mmol/(gVSS·h)。与以氨为电子供体的对照培养体系相比, 厌氧氨氧化富集培养物对羟胺的比转化速率明显较高, 羟胺比转化速率是氨比转化速率的 1.81 倍; 但亚硝酸盐比转化速率明显较低, 只有对照培养体系的 0.41 倍。消耗的羟氨与亚硝氮之比为(1/0.27), 远高于对照培养体系中消耗的氨氮与亚硝氮之比 1/1.20。

2.3 羟胺和亚硝氮之比对生物转化的影响

2.3.1 对基质转化的影响: 为考察不同羟胺和亚硝氮比值条件下, 厌氧氨氧化富集培养物对羟胺的生

物转化规律, 设计了两组试验。对照组的羟胺和亚硝氮浓度均为 2.5 mmol/L (羟胺和亚硝氮之比为 1:1), 试验组 1 的羟胺和亚硝氮浓度分别为 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L (羟胺和亚硝氮之比为 1:2), 试验组 2 的羟胺和亚硝氮浓度分别为 5 mmol/L 和 2.5 mmol/L (羟胺和亚硝氮之比为 2:1)。

提高亚硝氮比例对基质转化的影响如图 4-A 和 4-B 所示。试验组 1 的羟胺浓度变化特征与对照组一致, 没有显著差异; 0-2 h 羟胺浓度呈直线下降, 转化速率较快, 2-7 h 羟胺浓度继续下降至检测限以下。试验组 1 的亚硝氮浓度变化趋势也与对照组类似, 两条亚硝氮历时曲线几乎平行。对照组和试验组 1 消耗的羟胺和亚硝氮之比分别为 1/0.772 和 1/0.771, 两个比值非常接近。这些结果表明, 在试验组 1 的培养体系中, 亚硝氮相对过量, 羟胺成为厌氧氨氧化的瓶颈因子。

对羟胺和亚硝氮浓度的历时曲线进行一级反应动力学拟合, 方程见表 2。对照组的羟胺最大比污泥转化速率为 0.535 mmol/(gVSS·h), 试验组 1 的羟胺最大比污泥转化速率为 0.572 mmol/(gVSS·h), 羟胺

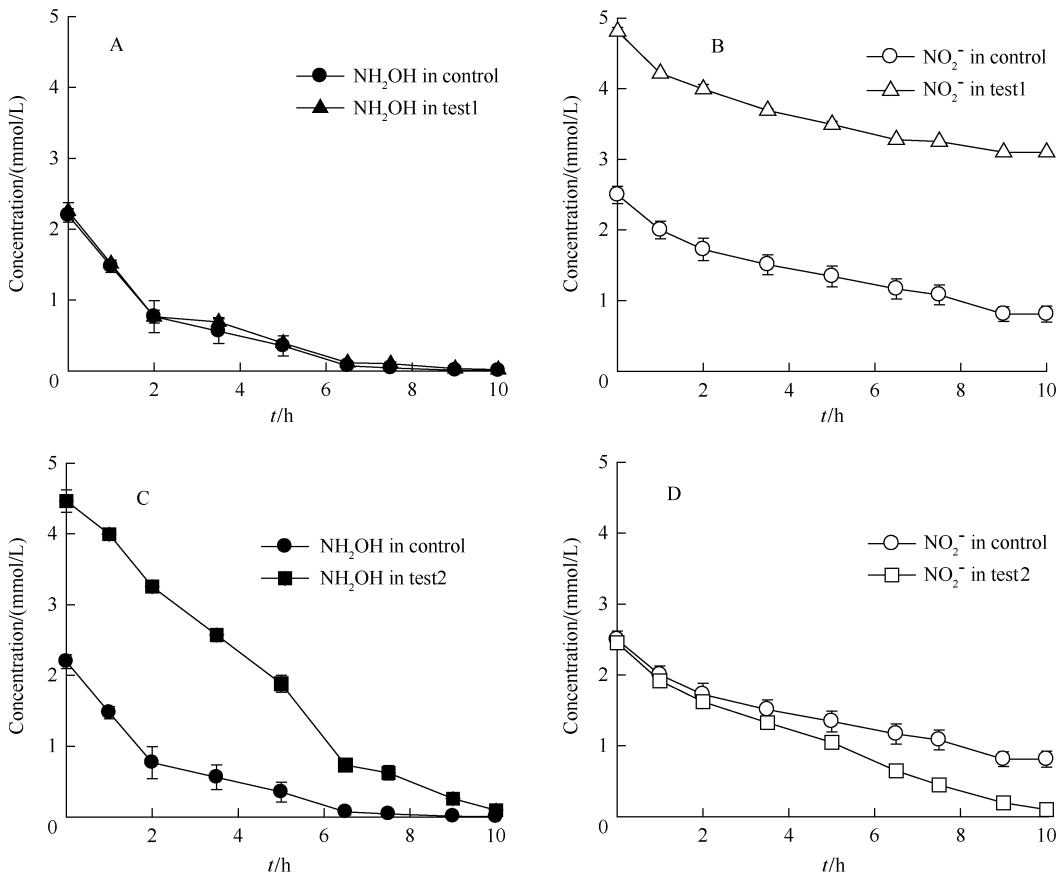


图 4 羟胺和亚硝氮之比对基质转化的影响

Fig. 4 Effects of hydroxylamine to nitrite ratio on substrate conversion.

转化速率提高 6.9%; 对照组的亚硝氮最大比污泥转化速率为 0.145 mmol/(gVSS·h), 试验组 1 的亚硝氮最大比污泥转化速率为 0.158 mmol/(gVSS·h), 亚硝氮转化速率提高 9.0%。这些结果表明, 对照组中设定的羟胺和亚硝氮之比适合于厌氧氨氧化, 提高亚硝氮浓度对厌氧氨氧化影响不大。

提高羟胺相对比例对基质转化的影响如图 4-C 和 4-D 所示。在对照组中, 反应初期(0-2 h)羟胺浓度呈直线下降, 2-6.5 h 转化速度因浓度降低而趋缓, 6.5-10 h 转化速度因浓度近零而停止; 在试验组 2 中, 反应初期(0-2 h)羟胺浓度呈直线下降, 2-6.5 h 羟胺浓度继续快速降低, 6.5-10 h 转化速度因浓度降低而趋缓。在对照组中, 羟胺耗尽, 但有亚硝氮残留, 说明亚硝氮相对富裕。试验组 2 的亚硝氮转化速度显著高于对照组, 试验组 2 的亚硝氮浓度最终降至检测限以下, 说明羟胺相对充裕。对照组和试验组 2 消耗的羟胺和亚硝氮之比分别为 1/0.772 和 1/0.539, 提高羟胺相对比例导致羟胺和亚硝氮的反应计量比增大。

对羟胺和亚硝氮浓度的历时曲线进行一级反应动力学拟合, 方程见表 2。对照组的羟胺最大比污泥转化速率为 0.535 mmol/(gVSS·h), 试验组 2 的羟胺最大比污泥转化速率为 0.678 mmol/(gVSS·h), 羟胺转化速率提高 26.7%; 对照组的亚硝氮最大比污泥转化速率为 0.145 mmol/(gVSS·h), 试验组 2 的亚硝氮最大比污泥转化速率为 0.320 mmol/(gVSS·h), 亚硝氮转化速率提高 120.7%。上述结果表明, 对照组中设定的羟胺和亚硝氮之比偏低, 羟胺成为瓶颈因子, 提高羟胺浓度可显著提高厌氧氨氧化速率。

2.3.2 对中间产物的影响: 在保持羟胺浓度不变, 提高亚硝氮浓度的试验中, 对照组中, 0-3.5 h 培养液中的氨氮浓度升高, 3.5-10 h 培养液中的氨氮浓度降至检测限以下, 积累的最高氨氮浓度为 0.338 mmol/L, 分别相当于初始羟胺浓度的 15.4%、初始亚硝氮浓度的 13.5% 和初始总氮浓度的 7.2%; 试验组 1 中, 0-2 h 培养液中的氨氮浓度急剧升高, 2-3.5 h 培养液中的氨氮浓度急剧下降, 以后缓慢降至检测限以下, 积累的最高氨氮浓度为 1.810 mmol/L (图 5), 分别为初始羟胺浓度的 80.3%、初始亚硝氮浓度的 37.6% 和初始总氮浓度的 25.6%。与对照组相比, 试验组 1 的积累的氨氮峰值升高, 且出峰时间提前。

在保持亚硝氮浓度不变, 羟胺浓度加倍的条件下, 试验组 2 中, 0-5 h 培养液中的氨氮浓度逐渐升高, 5-10 h 培养液中的氨氮浓度缓慢下降, 积累的

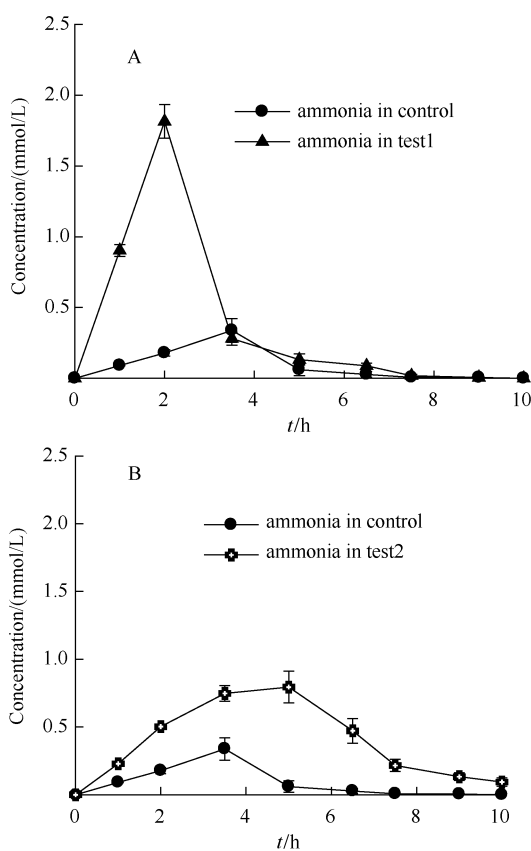


图 5 羟胺和亚硝氮之比对氨积累的影响

Fig. 5 Effects of hydroxylamine to nitrite ratio on ammonia accumulation. In control nitrite and hydroxylamine are both about 2.5 mmol/L; in test1 nitrite goes up to about 5 mmol/L relative to control; in test2 hydroxylamine goes up to about 5 mmol/L relative to control.

最高氨氮浓度为 0.795 mmol/L (图 5), 分别为初始羟胺浓度的 17.8%、初始亚硝氮浓度的 32.4% 和初始总氮浓度的 11.5%。与对照组相比, 试验组 2 的积累的氨氮峰值升高, 但出峰时间滞后, 且峰形相对平缓。

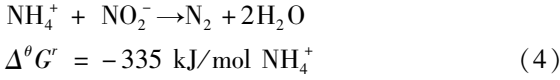
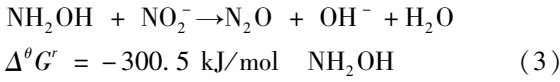
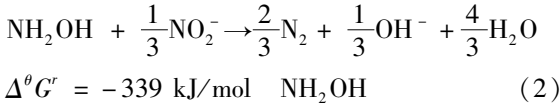
综上所述表明, 不论提高亚硝氮浓度还是提高羟胺浓度, 均会增加中间产物氨氮的积累量; 亚硝氮相对过量导致氨氮出峰时间提前, 羟胺相对过量导致氨氮出峰时间滞后; 亚硝氮相对过量对氨氮积累产生的效应强于羟胺。

3 讨论

3.1 羟胺与亚硝酸的化学稳定性

在羟胺和亚硝酸中, 氮分别为 -1 价和 +3 价, 两者都是化学性质比较活泼的物质, 彼此之间可能发生的化学反应如反应式(2)和(3), 这两个化学反应的标准吉布斯自由能变化均为负数, 说明在标准状态下羟胺和亚硝酸之间的反应可自发进行。但在所试验条件下, 没有观察到羟胺与亚硝酸之间的化

学反应,两者皆有较好的化学稳定性。



3.2 厌氧氨氧化中羟胺的转化反应

根据¹⁵N 示踪研究^[5;13],厌氧氨氧化代谢途径可用图 6 表示。*Candidatus Brocadia anammoxidans* 首先将亚硝酸还原为羟胺,然后将羟胺和氨氮转化成联氨,最后将联氨转化成氮气,所释放的 4 个电子被用于亚硝酸还原为羟胺的反应。从该模型看,羟胺和联氨是厌氧氨氧化的中间产物。

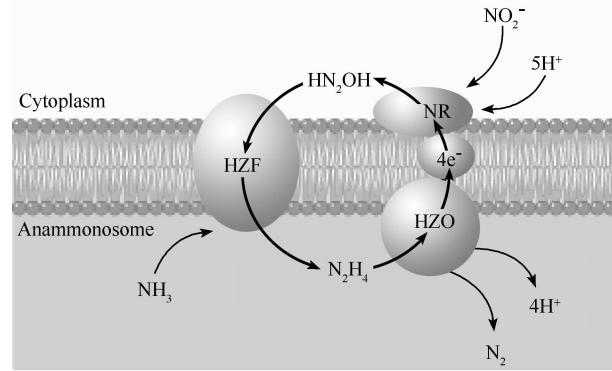


图 6 厌氧氨氧化的代谢途径

Fig. 6 Pathway of anaerobic ammonium oxidation presented by van de Graaf.

van de Star Wouter 等^[14]发现厌氧氨氧化菌能够将羟胺转化为联氨;联氨可进一步转化为氮气和氨。*Escherichia coli* 中的核苷酸还原酶 R2 亚单位也具有催化联氨生成氮气和氨的能力^[24]。

结合 van de Graaf 的厌氧氨氧化模型以及 van de Wouter 的羟胺转化途径^[5;13],作者提出了如图 7 所示的羟胺厌氧氨氧化途径。该途径包括 5 个反应:①亚硝酸还原为羟胺(反应式 5);②羟胺与氨生成联氨(反应式 6);③联氨生成氮气(反应式 7);④羟胺生成联氨(反应式 8);⑤联氨生成氮气和氨(反应式 9)。

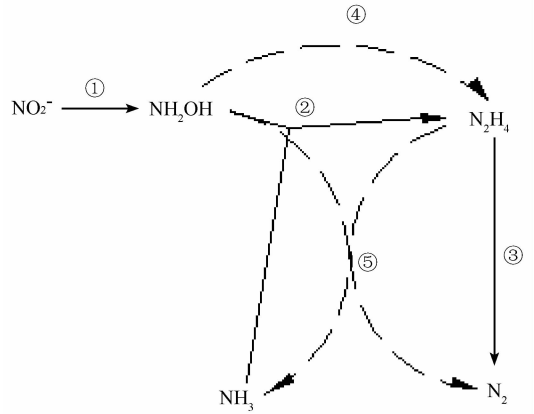
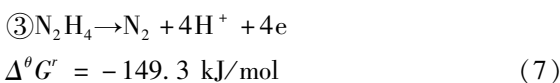
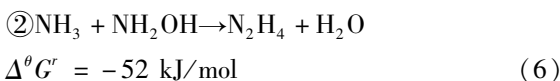
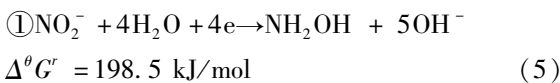
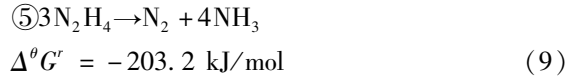
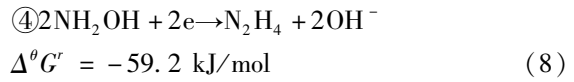


图 7 厌氧氨氧化羟胺转化的可能途径

Fig. 7 Speculative pathway of anammox involving hydroxylamine conversion



在本研究的厌氧氨氧化富集培养物中,以亚硝酸和羟胺为基质,经检测,亚硝酸和羟胺浓度降低,有氨氮的产生和转化,但没有检测到联氨。根据反应过程的电子得失平衡,可得①×1+③×2+④×2,即:3NH₂OH + NO₂⁻→2N₂ + OH⁻ + 4H₂O;由于没有检测到联氨,推测有:②×3+③×2+④×2+⑤,即:7NH₂OH→3N₂ + 4H⁺ + 7H₂O + 4e⁻ + NH₃。

联氨的转化途径可能有两条,即可通过反应式 7 生成氮气并释放电子,所释放的电子用于还原亚硝酸盐;也可通过反应式 9 转化为氨和氮气。据 van de Wouter 报道,在以羟胺为唯一基质时,可检测到联氨积累^[14]。在本研究中没有检测到联氨,可能是添加亚硝酸盐后,亚硝酸盐消耗联氨释放的电子而驱动了联氨转化。

由于羟胺可以转化为联氨(反应式 8),而联氨又能够生成氨(反应式 9),当氨不能及时与羟胺转化为联氨(反应式 6)时就容易产生积累。试验组 2 提高羟胺浓度,可促进反应 8 和 9,导致氨氮积累量大于对照;同时也会促进反应 6 和 7,导致氨氮消耗量增大,因此相对于试验组 1,氨氮峰值较小;但反应 7 产生的电子需要由反应 5 接纳,亚硝酸盐不足会引起氨氮转化受阻,从而造成出峰时间滞后^[14]。试验组 1 提高亚硝酸盐浓度,可促进反应 8 和 9,导致氨氮积累量大于对照,出峰时间提前;同时由于羟胺相对不足,反应 6 和 7 受到影响,致使氨氮积累量大于试验组 2;但是,由于亚硝酸盐充裕,反应 7 释放的电子被反应 5 消耗并产生羟胺,反应 5 产生的羟胺可促进反应 6,致使氨氮快速消失。

4 结论

通过对厌氧氨氧化富集培养物添加羟胺与亚硝氮的培养试验, 考查基质与产物浓度的历时变化特征, 并与传统的以氨为基质的厌氧氨氧化反应进行比较, 得到关于厌氧氨氧化富集培养物同时转化羟胺和亚硝氮的特性的结论如下:

(1) 厌氧氨氧化富集培养物能同时转化羟胺和亚硝氮。羟胺和亚硝氮具有化学稳定性, 彼此间不发生化学反应; 厌氧氨氧化富集培养物可引发羟胺和亚硝酸反应, 使羟胺和亚硝酸盐浓度同时降低; 反应过程中有中间产物氨的产生和转化; 液相中的总氮浓度从起始时的 4.694 mmol/L 降至结束时的 0.812 mmol/L, 转化率为 82.7%。

(2) 厌氧氨氧化富集培养物对羟胺具有较高的转化速度。在同等条件下, 厌氧羟胺氧化的最大比污泥转化速率为 0.535 mmol/(gVSS·h), 是厌氧氨氧化反应体系中氨氮最大比污泥转化速率的 1.81 倍; 羟胺反应体系中的最大总氮比污泥转化速率为 0.680 mmol/(gVSS·h), 略高于氨反应体系中的最大总氮比污泥转化速率。

(3) 以羟胺与亚硝氮之比 1:1 为基础, 提高羟胺浓度能显著加快羟胺和亚硝氮转化速率; 提高亚硝酸盐浓度对羟胺和亚硝氮转化速率影响不大。说明相对于羟胺, 亚硝酸在代谢途径中更具间接性, 这与 van de Graaf AA 模型相吻合。

(4) 羟胺与亚硝氮的适宜比例为 1:1, 提高羟胺或亚硝氮浓度均会增大中间产物氨的积累。保持羟胺浓度不变、提高亚硝氮浓度时, 最大氨氮积累浓度达 1.810 mmol/L; 保持亚硝氮浓度不变、提高羟胺浓度时, 最大氨氮积累浓度降至 0.795 mmol/L; 两种情况下的最大氨氮积累浓度均大于对照的 0.338 mmol/L。

参考文献

- [1] van de Graaf AA, De Bruijn P, Robertson LA, et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology-UK*, 1996, 142:2187-2196.
- [2] Rattray JE, van de Vosseberg J, Hopmans EC, et al. Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria. *Arch Microbiology*, 2008, 190:51-66.
- [3] Quan ZX, Rhee SK, Zuo JE, et al. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (11): 3130-3139.
- [4] Tsushima I, Ogasawara Y, Kindaichi T, et al. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water research*, 2007, 41:1623-1634.
- [5] Kuenen JG, Jetten MSM. Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Asm News*, 2001, 67(9): 456-463.
- [6] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 2006, 440: 790-794.
- [7] Egli K, Fanger U, Alvarez PJ, et al. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology*, 2001, 175: 198-207.
- [8] Kartal B, Rattray J, van Niftrik LA, et al. Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic Applied Microbiology*, 2007, 30: 39-49.
- [9] Kartal B, van NL, Rattray J, et al. Candidatus 'Brocadia fulgida': an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbial Ecology*, 2008, 63: 46-55.
- [10] Schmid M, Walsh K, Webb R, et al. Candidatus "Scalindua brodae", sp. nov., Candidatus "Scalindua wagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic Applied Microbiology*, 2003, 26: 529-538.
- [11] 郑平, 冯孝善. 厌氧氨氧化菌基质转化特性的研究. 浙江农业大学学报 (*Journal of Zhejiang Agricultural University*), 1997, 23(4): 409-413.
- [12] van Dongen LGJ, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. The combined SHARON/Anammox process. London, United Kingdom; IWA Publishing, 2001.
- [13] van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, et al. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of N-15 studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology-UK*, 1997, 143: 2415-2421.
- [14] Schalk J, Devries S, Kuenen JG, et al. A novel hydroxylamine oxidoreductase involved in the Anammox process. *Biochemistry*, 2000, 39: 5405-5412.
- [15] Shimamura M, Nishiyama T, Shinya K, et al. Another multiheme protein, hydroxylamine oxidoreductase, abundantly produced in an anammox bacterium besides the hydrazine-oxidizing enzyme. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105: 243-248.
- [16] Shimamura M, Nishiyama T, Shigetomo H, et al. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 1065-1072.

- [17] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2005.
- [18] Frear DS, Burrell RC. Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants. *Analysis Chemistry*, 1955, 27: 1664-1665.
- [19] Strous M, van Gerven E, Zheng P, et al. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, 1997, 31: 1955-1962.
- [20] Tsushima I, Kindaichi T, Okabe S. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research*, 2007, 41: 785-794.
- [21] 郑平, 胡宝兰. 厌氧氨氧化菌混培物生长及代谢动力学研究. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2001, 17: 193-198.
- [22] Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50: 589-596.
- [23] van der Star WR, van de Graaf MJ, Kartal B, et al. Response of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria to hydroxylamine. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74: 4417-4426.
- [24] Han JY, Swarts JC, Sykes AG. Kinetic studies on the hydrazine and phenylhydrazine reductions of the Escherichia coli R2 subunit of ribonucleotide reductase. *Inorganic Chemistry*, 1996, 35: 4629-4634.

Hydroxylamine conversion by anammox enrichment

Anhui Hu, Ping Zheng*, Huifeng Lu, Shuang Ding, Caihua Wang

(Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: [Objective] Hydroxylamine is an important intermediate product of anammox. This study was focused on the characteristics of hydroxylamine and nitrite conversions by anammox enrichment. [Methods] The changes of nitrogenous substrates and related products with time were measured using batch tests with anammox enrichment as inoculum. [Results] Since hydroxylamine didn't react with nitrite in uninoculated control culture, these two compounds were chemically stable. Both of them decreased with time in anammox enrichment inoculated cultures, in which ammonia as intermediate product would be produced and converted with the maximum concentration being 0.338 mg/L. The total nitrogen concentration decreased from 4.694 mmol/L to 0.812 mmol/L with conversion rate 82.7% in the end. When hydroxylamine and nitrite concentrations were about 2.5 mmol/L respectively, the maximum specific sludge conversion rates of hydroxylamine was 0.535 mmol/(gVSS·h), which was 1.81 times bigger than that of ammonia in ammonia reaction system; the maximum specific sludge rate of total nitrogen was slightly higher than that in ammonia reaction system. When hydroxylamine concentration increased to 5.0 mmol/L, the hydroxylamine and nitrite conversion rates promoted by 26.7% and 120.7% respectively; and the maximum ammonia accumulated was 1.810 mmol/L. When nitrite concentration increased to 5.0 mmol/L, the hydroxylamine and nitrite conversion rates promoted by 6.9% and 9.0% respectively; and the maximum ammonia accumulated was 0.795 mmol/L. [Conclusion] Anammox enrichment was capable of converting hydroxylamine and nitrite simultaneously and had the higher conversion rate of hydroxylamine than ammonia conversion rate. Hydroxylamine and nitrite conversion rates were less affected by increase in nitrite concentration, but more significantly influenced by increase in hydroxylamine. The maximum ammonia concentration accumulated would rise as the result of increasing both hydroxylamine and nitrite. The result of experiment was consistent with pathway model presented by van de Graaf AA.

Keywords: anammox; hydroxylamine conversion; specific conversion rate; batch test

(本文责编:王晋芳)

Supported by the the High-tech Research and Development Program of China (2006AA06Z332), the National Science Foundation of China (30770039) and the Science Foundation of Zhejiang Province (Y507227)

* Corresponding author. Tel: +86-571-86971709; E-mail: pzheng@zju.edu.cn

Received: 16 October 2009/ Revised: 21 December 2009