



氢自养微生物的驯化及其反硝化特性研究

彭科^{1,2}, 欧阳泽坪^{1,2}, 吴晓燕^{1,2}, 王红帅^{1,2}, 杨柯^{1,2}, 叶坚^{1,2,3*}, 大贯敏彦^{1,4}

- 1 南华大学资源环境与安全工程学院, 湖南 衡阳 421001
- 2 衡阳市土壤污染控制与修复重点实验室, 湖南 衡阳 421001
- 3 湖南省铀尾矿库退役治理技术工程技术研究中心, 湖南 衡阳 421001
- 4 东京工业大学科学技术创成研究院, 日本 东京 152-8550

彭科, 欧阳泽坪, 吴晓燕, 王红帅, 杨柯, 叶坚, 大贯敏彦. 氢自养微生物的驯化及其反硝化特性研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 821-833.

PENG Ke, OUYANG Zeping, WU Xiaoyan, WANG Hongshuai, YANG Ke, YE Jian, OHNUKI Toshihiko. Cultivation of hydrogenotrophic microorganisms and the denitrification characteristics[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 821-833.

摘要: 【目的】本研究筛选出弱酸性环境下利用无机碳源进行高效脱氮的氢自养微生物, 探究不同无机碳源对体系反硝化能力的影响, 以及长期驯化过程中反应器内水质参数、微生物群落结构和脱氮周期变化规律。【方法】氢自养微生物的驯化采用一种成本低廉、气密性优良、可计算氢气利用率的序批式反应器, 通过及时向装置内补充氢气、无机碳源、营养液和硝酸盐对微生物进行连续驯化。【结果】驯化的微生物利用 NaHCO_3 和 CO_2 作为混合无机碳源对硝酸盐的脱氮效果要优于单一使用 NaHCO_3 ; 在环境温度为 $20\text{ }^\circ\text{C}$, pH 为 6.3–7.0, 硝态氮初始投加量为 15 mg-N/L 时, $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 最高反应速率为 $1.374\text{ mg-N/(L}\cdot\text{h)}$, 氢气最高利用率为 43.4%, 脱氮周期为 16 h, 且脱氮过程中无亚硝酸盐积累; 驯化得到的微生物主要为嗜酸菌属(*Acidovorax*), 占比达 84.4%。【结论】利用本研究的装置和驯化方法对土著微生物进行脱氮驯化是可行且高效的, 可筛选出在弱酸性环境下利用无机碳源进行反硝化的氢自养微生物, 为地下水中硝酸盐污染的生物修复提供理论依据, 也为后续进一步研究弱酸性环境下氢自养微生物同时脱氮固铀奠定基础。

关键词: 氢自养反硝化; 碳酸氢钠; 二氧化碳; 硝酸盐; 亚硝酸盐; 微生物群落

资助项目: 湖南省教育厅科学研究项目-优秀青年项目(20B505); 南华大学博士启动经费(190XQD067); 大学生创新创业训练计划(X202210555245)

This work was supported by the Outstanding Youth Program of Scientific Research Foundation of Department of Education of Hunan Province (20B505), the PhD Start-up Funding of University of South China (190XQD067), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (X202210555245).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-734-8282562, E-mail: yejian@usc.edu.cn

Received: 2022-06-29; Accepted: 2022-08-30; Published online: 2022-09-08

Cultivation of hydrogenotrophic microorganisms and the denitrification characteristics

PENG Ke^{1,2}, OUYANG Zeping^{1,2}, WU Xiaoyan^{1,2}, WANG Hongshuai^{1,2}, YANG Ke^{1,2}, YE Jian^{1,2,3*}, OHNUKI Toshihiko^{1,4}

1 School of Resource, Environment and Safety Engineering, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China

2 Hengyang Key Laboratory of Soil Contamination Control and Remediation, Hengyang 421001, Hunan, China

3 Hunan Province Engineering Research Center of Radioactive Control Technology in Uranium Mining and Metallurgy, Hengyang 421001, Hunan, China

4 Laboratory for Advanced Nuclear Energy, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Tokyo 152-8550, Japan

Abstract: [Objective] We screened out hydrogenotrophic microorganisms using inorganic carbon sources for high efficiency in denitrification under weak acidic conditions, to investigate the effects of different inorganic carbon sources on the denitrification capacity of the system, and to explore the variation in water quality parameters, microbial community structure, and denitrification cycle in the reactor during long-term cultivation. [Methods] We developed a sequential batch reactor for continuous cultivation of microorganisms by supplying hydrogen, inorganic carbon source, nutrient solution and nitrate in time, and the apparatus have the advantages of low cost, excellent air tightness, and hydrogen utilization rate calculation. [Results] The cultivated microorganisms showed higher efficiency in denitrifying nitrates with the mixture of NaHCO₃ and CO₂ as inorganic carbon sources than that of NaHCO₃ as solo carbon source. Under the conditions of ambient temperature of 20 °C, pH of 6.3–7.0, and initial nitrate nitrogen dosage of 15 mg-N/L, the highest reaction rate of NO₃⁻-N was 1.374 mg-N/(L·h) and the highest utilization rate of hydrogen was 43.4%. In addition, the denitrification cycle was 16 h, with no nitrite accumulation detected. The cultivated microorganisms were mainly *Acidovorax*, accounting for 84.4%. [Conclusion] It is feasible and efficient to use this apparatus and method to cultivate microorganisms. Hydrogenotrophic microorganisms could be screened for denitrification by inorganic carbon source under weak acidic condition. The findings lay a theoretical basis for the bioremediation of groundwater polluted by nitrate and a foundation for the simultaneous denitrification and uranium fixation of hydrogenotrophic microorganisms in acidic environment in the near future.

Keywords: hydrogenotrophic denitrification; sodium bicarbonate; carbon dioxide; nitrate; nitrite; microbial community

地下水硝酸盐污染是全球关注的焦点。随着工业发展、生活水平提高和农业上污灌及化肥施用,大量点源和面源污染源产生的氮素在灌溉水、雨水及微生物的淋溶作用转化为硝酸

盐,下渗到地下水中,导致河水和地下水硝酸盐污染的风险增加^[1]。Zhang 等^[2]研究表明,我国约 7.83%的样品超过了国家硝酸盐饮用水标准。被硝酸盐所污染的地下水,通过自我修复

至少需要 60 年才能恢复到自然本底值。地下水中硝酸盐污染具有持久性、稳定性和长期环境风险性等特点。饮用受硝酸盐污染的水会影响人们的健康, 可能导致“蓝婴综合征”、甲状腺疾病、糖尿病和胃癌等^[3-4], 甚至会破坏生态系统。因此, 世界卫生组织和我国均规定饮用水中 NO_3^- -N 含量上限为 10 mg/L^[5]。国内外对于废水中硝酸盐污染的修复技术已有较多研究。根据硝酸盐去除的机理, 可将方法分为物理化学法和生物法。传统的物理化学法有吸附法^[6]、离子交换法、反渗透法^[7]、电渗析法^[8]、催化反硝化法和活泼金属还原法^[9-10]等。这些物理化学方法有几个共同特点, 一是需要去除的硝酸盐仅仅是发生了转移或者浓缩, 而非转换成无毒无害的氮气而去除; 二是后续处理成本相对较高, 且较难实际运用于地下水的原位修复。生物法是在厌氧条件下, 具有反硝化能力的微生物在硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、一氧化氮还原酶和一氧化二氮还原酶的接力作用下将硝酸盐最终转化为无毒无害氮气的过程, 具有工艺简单和高效低耗的特点^[11]。根据所利用的碳源不同, 又可以分为异养反硝化法和自养反硝化法。异养反硝化法是向水体中投加有机碳源(乙酸、甲醇和乙醇等)作为异养反硝化菌的营养物质, 倘若有机碳源添加不足, 反硝化过程中亚硝酸盐积累量会增加; 碳源投加过多, 又极易造成二次污染, 而且外部投加有机基质, 会增大处理成本, 也很难使其在地下水中均匀地分布以利微生物利用^[12]。与异养反硝化相比, 本试验采用的氢自养反硝化不仅可以避免外加有机物而引起的二次污染, 其极低的生物量累积还可以减少反应器的堵塞情况, 简化了后续处理过程^[13]。

Kurt 等^[14]在 1987 年首先以氢气作为电子供体在锥形反应器中进行了氢自养反硝化研究。此后, 为了提高脱氮效率和氢气利用率, 越来越多

的研究者对氢自养反硝化系统进行了改造和创新, 经典的反应器有填充床^[15]、流化床、中空纤维反应器^[16]和升流式厌氧污泥床^[17]等。研究者在驯化方法上的选择也大同小异, 王豫琪等^[18]在反应器内添加适量基质、污泥和硝酸盐驯化第 1 代, 取 100 mL 第 1 代菌液接种到 2 倍硝酸盐浓度培养基内驯化第 2 代, 取 100 mL 第 2 代菌液接种到 3 倍硝酸盐浓度培养基内驯化第 3 代, 驯化到第 4 代后得到高效脱氮氢自养微生物。虽然研究者们对这些经典反应器不断进行改进, 但是反应器本身的弊端依旧难以避免, 填充床反应器传输系数相对较低, 易堵塞; 流化床反应器虽然克服了固定床反应器的部分缺点, 但是操作难, 费用高且不适于水力停留时间较长的反应; 中空纤维反应器体型庞大, 难以更换营养液和分离代谢产物; 上流式厌氧污泥床运行工艺较为繁琐, 需要安装三相分离器和布水器等。因此, 探寻一种简单的驯化装置和驯化方法尤为重要。本研究采用的驯化反应器制作和运行成本低廉, 占地面积小, 运行工艺简单且不会堵塞管道, 易于添加营养液和更换微生物代谢产物和废物, 克服某些经典反应器在使用和维护上的困难。整个驯化过程在一个生化培养瓶中进行, 仅需定时补充氢气和添加硝酸盐污染物, 无需接种或转移至其他培养基, 驯化方法相对简单, 且避免了接种过程中的微生物污染问题。

本研究利用自制的序批式反应器(SBR)连续投加 15 mg-N/L 硝酸盐进行了 400 d 的驯化工作, 筛选出在酸性条件下能高效脱氮的氢自养微生物, 探究长期驯化过程中反应器内的水质参数、微生物群落结构和脱氮周期变化规律。

1 材料与方 法

1.1 采样及驯化方法

从湖南衡阳市周边无人干扰区域采集

10份土样(地表以下10 cm的土壤),根据采样地点/时间不同编号分组为A、B、C、1、2、3、4、5、6和7,密封保存在4 °C的冰箱中。分别取20–60 g土样与1 000 mL煮沸冷却水在1 000 mL烧杯中充分混合,充分静置后取固液界面上0–5 cm处约400 mL的泥水混合物为接种菌液。菌液接种于装有1 600 mL营养液的生化培养瓶中,即为供试待驯化液。

从注样口向生化培养瓶中注入6 g NaHCO₃ (0.43 g-C/L)和0.182 1 g NaNO₃,使生化培养瓶内硝态氮的初始浓度为15 mg-N/L。20 °C恒温搅拌培养条件下NO₃⁻降低至2 mg-N/L以下,NO₂⁻降低至0.1 mg-N/L(检测限)以下,完成一个脱氮周期,周期结束后再次添加0.182 1 g NaNO₃驯化。7 d测量一次菌液pH和DO,pH超过9.0后再次投加6 g的NaHCO₃调节pH。每天测量各组的硝态氮和亚硝态氮,计算反硝化速率,探究各微生物组的脱氮周期,结合脱氮过程中是否产生亚硝态氮,筛选出反硝化性能较好的微生物组后,通过向这些微生物组曝CO₂气体改变氢自养反硝化体系内无机碳源结构来调节pH,使驯化环境朝着弱酸性方向进行。

不同无机碳源氢自养反硝化体系的设计如表1所示,NaHCO₃体系R1反硝化达到稳定后,开盖向生化培养瓶内通入CO₂气体曝气3 min,系统CO₂饱和后pH降低至7.3,进入序批反应R2。再次从注样口向生化培养瓶中投加0.182 1 g NaNO₃,20 °C恒温搅拌培养,使反应器内NO₃⁻降低至2 mg-N/L以下,NO₂⁻降低至0.1 mg-N/L以下,完成一个脱氮周期,周期结束后再次添加0.182 1 g NaNO₃驯化。7 d测量一次菌液pH和DO,pH超过8.0后再次通入CO₂气体调节pH至7.3。

R2稳定后,通过离心使微生物和液相分离,再次注入营养液2 000 mL,加入1.4 g

NaHCO₃ (0.1 mg-C/L),CO₂曝气3 min达到饱和后可调节pH至6.3,进入R3。再次从注样口向生化培养瓶中投加0.182 1 g NaNO₃,20 °C恒温搅拌培养。当NO₃⁻降低至2 mg-N/L以下,NO₂⁻降低至0.1 mg-N/L以下,完成一个脱氮周期,周期结束后再次添加0.182 1 g NaNO₃驯化。7 d测量一次菌液pH和DO,pH超过7.0后再次通入CO₂气体调节pH至6.3。

1.2 人工地下水的配制

人工地下水即为本试验使用的营养液,具体化学成分如表2所示。

1.3 实验装置

图1是本实验采用的序批式反应器(SBR)示意图。2 000 mL玻璃量筒5内装入饱和亚硫酸钠溶液(零氧溶液),其目的是防止溶解氧进入1 000 mL倒置塑料量筒4内,可有效储存氢气。倒置塑料量筒4与2 000 mL生化培养瓶9通过塑料管连接,可持续向生化培养瓶9内的供试待驯化液提供电子供体氢气。打开止水夹2后,氢气罐1可通过管件向倒置量筒4内通入氢气

表1 不同无机碳源的氢自养反硝化体系比较

Table 1 Comparison of hydrogenotrophic denitrification systems with different inorganic carbon sources

Run	Inorganic carbon	Electron donor	pH
R1	NaHCO ₃	H ₂	8.3–9.0
R2	NaHCO ₃ +CO ₂	H ₂	7.3–8.0
R3	NaHCO ₃ +CO ₂	H ₂	6.3–7.0

表2 人工地下水的成分表^[19]

Table 2 Composition of artificial groundwater^[19]

Reagents	Concentration (mg/L)
K ₂ HPO ₄	1.76
KH ₂ PO ₄	2.08
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.00
NaCl	0.96
CaCl ₂	1.12
FeSO ₄ ·6H ₂ O	1.29

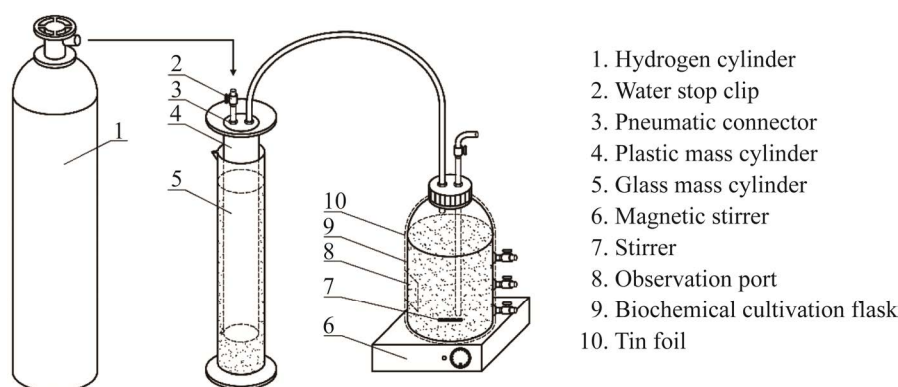


图 1 氢自养反硝化微生物序批式驯化装置

Figure 1 Schematic diagram of hydrogenotrophic denitrification microbial sequencing batch cultivation device.

且不超过倒置量筒 4 最大刻度(1 000 mL), 倒置量筒 4 内氢气量低于 600 mL 时重复上述通气操作, 定期记录倒置量筒 4 的刻度可以测得氢气消耗量进而计算氢气利用率。打开生化培养瓶 9, 伸入气泡石以曝气的方式添加 CO₂。生化培养瓶 9 置于磁力搅拌器上匀速搅拌, 整个实验装置在 20 °C 下运行。与现有的驯化装置与技术相比, 本研究采用的驯化装置制作成本廉价, 气密性较好, 定时读取倒置量筒刻度可计算氢气利用率, 及时补充氢气也可保证微生物有充足的氢气供应, 整个驯化过程仅需定时补充氢气和添加硝酸盐, 驯化方法简单。

1.4 取样和分析方法

测定 NO₃⁻和 NO₂⁻含量前, 用 0.45 μm 过滤器对待测菌液进行过滤。反应器内菌液的 pH 通过便携式 pH 计(ST300, 常州奥豪斯)测定; DO 通过便携式光学溶氧仪(ST400D, 常州奥豪斯)测定; NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 通过紫外可见分光光度计(UV-1800PC, 上海翱艺)分别以紫外分光光度法和 N-1 萘基-乙二胺光度法测定。

1.5 高通量测序及数据分析

1.5.1 DNA 扩增

取 200 mL 驯化后的菌液进行离心, 寄样至

上海委托生工生物工程(上海)股份有限公司, 使用 E.Z.N.A[™] Mag-Bind Soil DNA Kit (OMEGA) 对沉淀物样品内微生物进行 DNA 抽提, 测定浓度后对目标基因组的 16S rDNA V3-V4 区进行 PCR 扩增, 引物采用 341F (CCTACGGGNG GCWGCAG)和 805R (GACTACHVGGGTATCT AATCC), 扩增体系参照 Chen 等^[20], 对沉淀内的细菌进行 Illumina MiSeq 高通量测序。

1.5.2 数据分析

测序得到的 PE reads 根据 overlap 关系进行拼接, 区分样本后对序列质量进行质控和过滤, 去除不符合要求的引物序列、短片段及低质量序列, 得到优质序列。将所得序列根据相似性 (>0.97)划分操作分类单元, 然后分别通过 Uclust 软件、Mothur 软件和 RDPclassifier 软件进行 OTU 聚类分析、α 多样性分析和物种分类学分析。

2 结果与讨论

2.1 氢自养微生物的筛选

不同微生物组脱氮效果如表 3 所示, 其中 2 号微生物组 24 h 硝态氮去除率最高, 达到 97.6%, 周期最短, 且脱氮过程中无亚硝态氮积

表 3 不同微生物组脱氮效果比较

Table 3 Comparison of denitrification effects of different microbial groups

Group	Initial nitrate concentration (mg-N/L)	Nitrate concentration after 24 h (mg-N/L)	Nitrate removal rate after 24 h (%)	Presence of nitrite accumulation	Period length (d)
A	14.82	9.53	35.7	-	9
B	15.99	9.78	38.8	+	7
C	15.48	0.69	95.5	-	1
1	15.82	6.59	58.3	+	3
2	15.41	0.37	97.6	-	1
3	15.70	0.60	96.2	-	1
4	15.26	10.65	30.2	-	6
5	15.96	6.34	60.3	+	4
6	16.37	14.12	13.7	-	15
7	14.69	8.92	39.3	+	5

+: Nitrite accumulation; -: No nitrite accumulation.

累。此外，3号和C号24 h硝态氮去除率也在95%以上，周期仅1 d，脱氮过程也无亚硝态氮积累，在进一步的试验中对这3个样本进行扩培。通过表3可知，微生物脱氮具有普遍性和高效性，具有脱氮能力的微生物广泛存在于不同地区的土壤中^[21]，经过驯化后能迅速将受污染地下水中硝态氮降低至地下水I类标准(2 mg-N/L)。

2.2 不同碳源体系下氢自养微生物脱氮能力比较

图2A显示在序批反应1中，单独利用NaHCO₃作为碳源、H₂作为电子供体时，氢自养微生物的驯化耗时33 d，共7个周期。在第1个周期中，随着硝酸盐浓度的降低，在第10天，体系中的亚硝酸盐积累达到14.3 mg-N/L，但在随后的周期中逐渐减少，最终没有亚硝酸盐积累。在第20天，硝酸盐被降低至目标浓度(2 mg-N/L以下)，而亚硝酸盐仍保持8.65 mg-N/L，硝酸盐浓度的降低和亚硝酸盐浓度的升高有一个明显的拖尾过程，和苏俊峰等^[22]的试验现象一致，也和Sorokin等^[23]通过自养反硝化细菌的全基因测序测得到的结果一致，据此推测氢自养反硝化细菌的生物脱氮途径可能与异养

反硝化细菌相同，NO₃⁻先转化为NO₂⁻再转换为无毒无害的N₂。在最后一个周期中，15 mg-N/L的硝酸盐在3 d内减少，且没有亚硝酸盐积累。由于pH≥9.0后再次向生化培养瓶中添加3 g/L的NaHCO₃，所以体系pH维持在8.3–9.0之间。

批次1结束后，将NaHCO₃和CO₂气体作为混合无机外加碳源的批次2，结果如图2B所示。氢自养微生物在22 d内的6个周期被驯化。在第3天、第16天和第18天分别累积了3.45 mg-N/L、3.75 mg-N/L和3.68 mg-N/L，但在硝酸盐被完全降解后，亚硝酸盐也被完全降解。批次1结束后的批次2中又出现了亚硝酸盐积累以及周期变长的现象可能是因为开盖通CO₂操作对微生物生存环境造成改变所产生的一段适应期。但是，相比于批次1，批次2的体系内亚硝酸盐量积累量少，周期更短，说明CO₂可以使氢自养微生物繁殖得更快。

图2C描述了批次3在12 d内9个周期快速完成驯化，在第3天，硝酸盐降低到2 mg-N/L以下，此过程中没有测得亚硝酸盐。降低pH至弱酸性后的批次3相比于批次1和批次2，周期更短，1 d即可将15 mg-N/L硝酸盐降解，且反应过程中无亚硝酸盐积累。

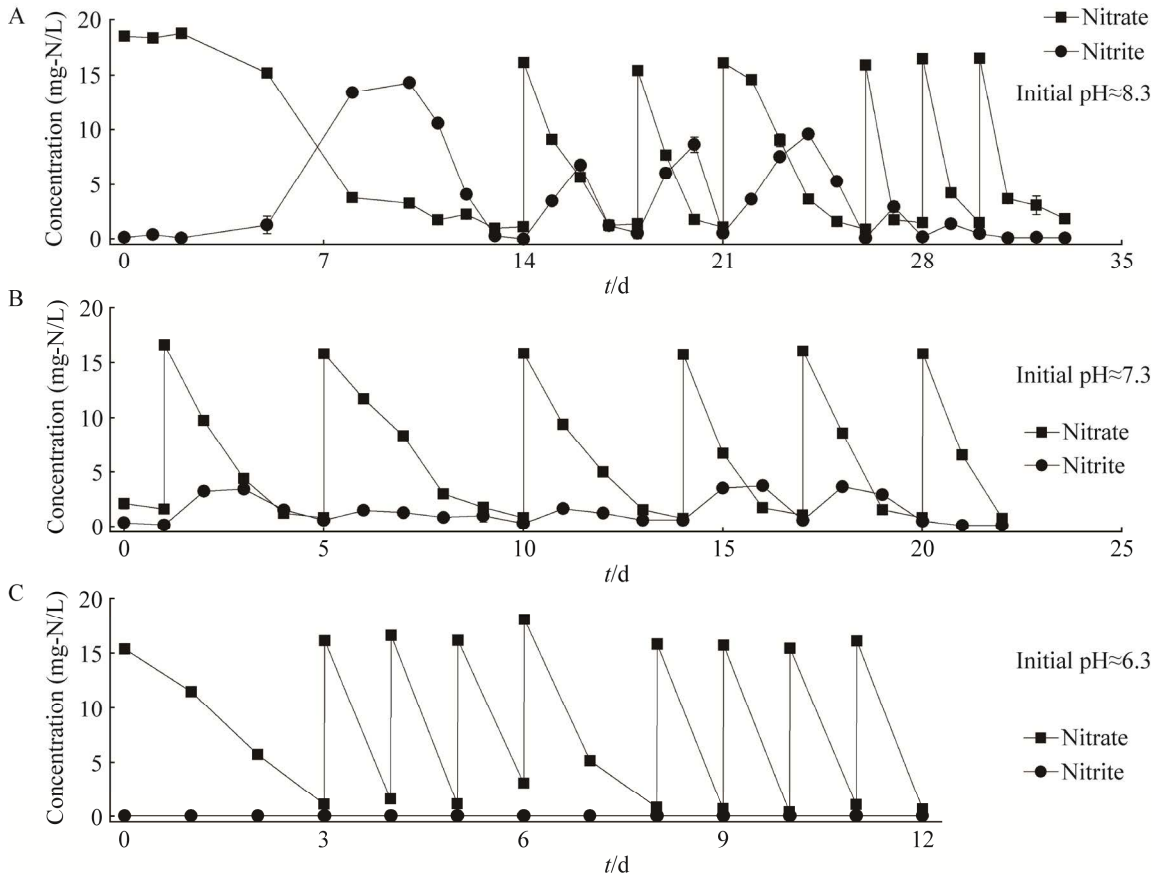


图 2 不同碳源体系下氢自养微生物脱氮能力比较

Figure 2 Comparison of nitrogen removal ability of hydrogenotrophic microorganisms under different carbon source systems. A: NaHCO_3 as carbon source. B: CO_2 and NaHCO_3 as carbon sources. C: CO_2 and NaHCO_3 as carbon sources.

结果表明以 CO_2 和 NaHCO_3 为混合无机碳源调节体系 pH 呈弱酸性是最优条件。以 NaHCO_3 和 CO_2 为混合外加碳源的另外一个优势是可以作为缓冲对调节体系的 pH, 维持体系 pH 相对稳定。

2.3 反应器经典周期内参数变化

本试验 24 h 添加一次硝酸盐, 由图 3A 可得, 在整个反应器的驯化周期内, 添加硝酸盐后的前 8 h 反应速率很快, 此后的 16 h 反应速率不断降低, 推测是因为底物浓度不足, 驯化过后的氢自养微生物 16 h 可将硝酸盐污染物浓度降低至地下水 I 类水标准(2 mg-N/L), 此外,

驯化过程中并无亚硝酸盐积累; 从图 3B 知, 供试待驯化液始终维持在 $\text{DO} \leq 1 \text{ mg/L}$ 的厌氧环境中, 有利于反硝化, pH 在驯化过程中不断升高; 由图 3C 可得, 5 个周期内氢气的最大利用率达 43.4%; 图 3D 显示硝态氮最高反应速率可达 $1.374 \text{ mg-N}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。总的来说, 在一定浓度范围内, 底物浓度越高, 氢气消耗量越多, 氢气利用率越高, 硝态氮的反应速率越快。

2.4 微生物多样性及群落结构分析

2.4.1 微生物多样性分析

本试验共送检 5 个微生物组样品, 其中 4 号和 B 号微生物组样品是驯化过程中送检, 2 号、

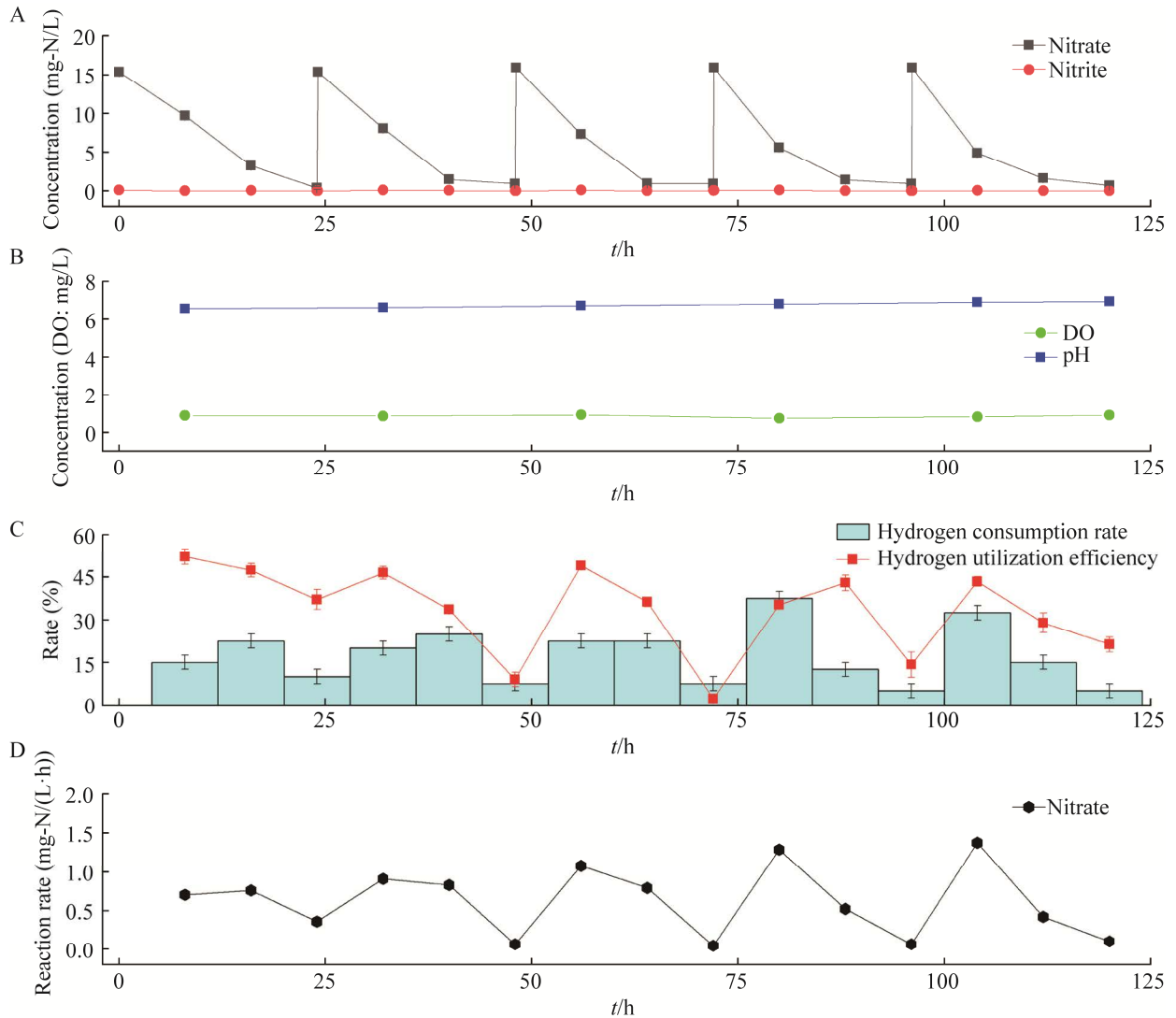


图3 反应器经典周期内参数变化

Figure 3 Parameter variation in the classical cycle of the reactor. A: Changes of NO_3^- -N and NO_2^- -N. B: Changes of pH and DO. C: Changes of H_2 consumption rate (initial quantity of H_2 is 400 mL) and H_2 utilization efficiency. D: Changes of NO_3^- -N reaction rate.

3 号和 C 号微生物组样品是驯化结束后送检，间隔约半年，微生物多样性参数如表 4 所示。通过对比可得，驯化结束后的微生物组 OTU 数、Shannon 指数、Chao 指数和 Ace 指数明显低于驯化过程中的微生物组，而 Simpson 指数大于后者，说明在驯化过程中反应器内物种越来越少，群落的多样性越来越低，也说明本试

验的驯化装置和方法是可行且有效的。其中，脱氮效果最好的 2 号微生物组在去除嵌合体及非特异性扩增序列处理之前的原始序列数为 45 148，处理后的有效序列数为 45 053。将得到有效序列根据相似性(>0.97)划分操作分类单元进行生物信息统计分析，对应的 OTU 数目为 32，Chao 指数和 Ace 指数分别为 32 和 32，

Shannon 指数和 Simpson 指数分别为 0.263 076 和 0.684 238。通过对比各微生物组的多样性指数可得, 2 号微生物组中物种最少, 群落多样性最差。

各微生物组的 OTU Rank-abundance 曲线如图 4A 所示, 驯化过后的微生物组相比于驯化过程中的微生物组, 横轴 OTU Rank 跨度小, 曲线陡峭, 说明驯化过后物种的丰度低, 物种分布非常不均匀, 也进一步说明驯化很成功, 筛

选出了量大的少数几类细菌。各微生物组的 Venn 图和菌属种类统计图分别如图 4B 和图 4C 所示, 各微生物组驯化过程中共有的菌属有 10 种, 且驯化过后的微生物组菌属种类明显低于驯化过程中的微生物组, 其中, 2 号和 C 号的微生物驯化过后仅有 32 种菌属。2 号微生物组的 SEM 图如图 5 所示, 微生物数量繁多且紧密堆积, 其中大部分微生物呈长杆状, 有鞭毛, 表面较为粗糙。

表 4 不同微生物组多样性参数比较

Table 4 Comparison of different microbiome diversity parameters

Simple	Number	OTUs	Shannon	Chao	Ace	Simpson	Coverage
2	32 672	32	0.911 751	32	32	0.684 238	1
3	68 021	37	1.115 919	38	38.501 877	0.458 051	0.999 956
4	54 885	148	1.694 574	149.866 667	150.785 416	0.456 598	0.999 854
B	56 502	150	1.833 718	154.230 769	154.521 036	0.400 083	0.999 763
C	57 968	34	1.197 79	37	36.723 705	0.425 9	0.999 948

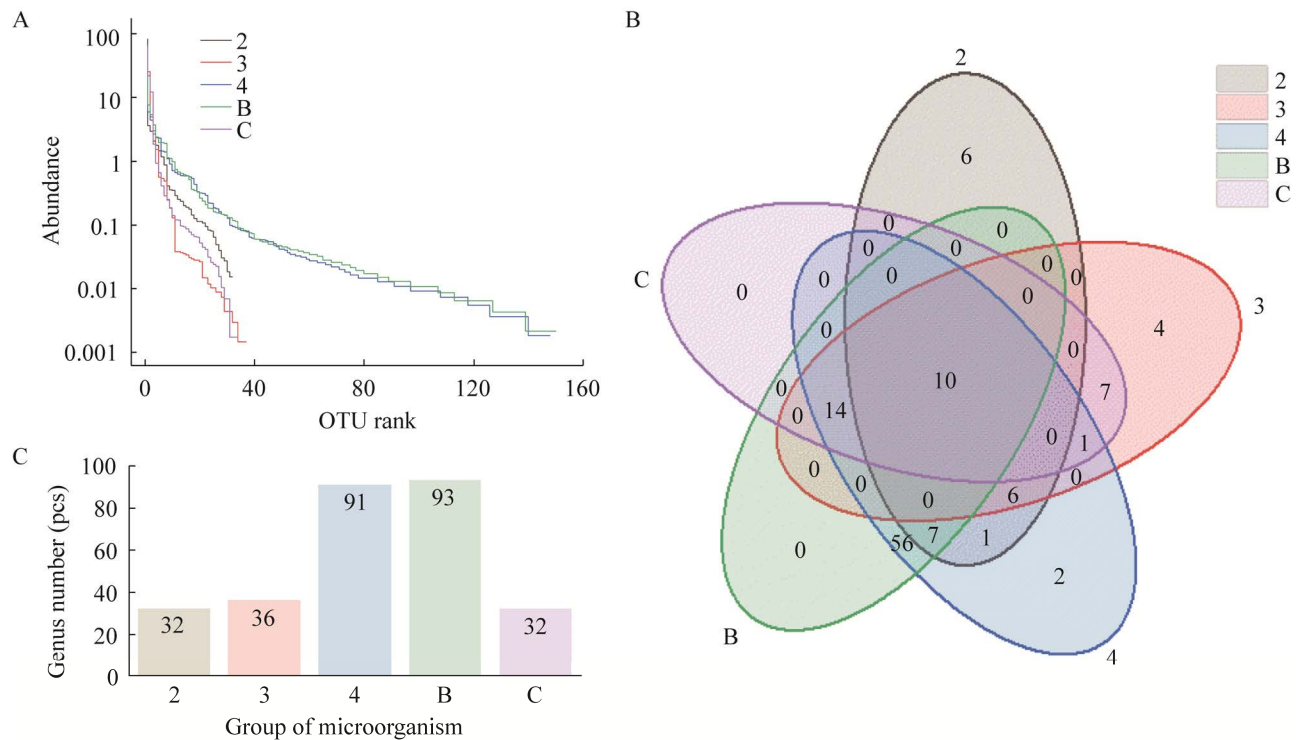


图 4 各微生物组物种组成和多样性分析

Figure 4 Species composition and diversity analysis of each microbiome. A: OTU rank-Abundance curve of each microbiome. B: Venn diagram of each microbiome. C: Statistical chart of genus species in each microbiome.

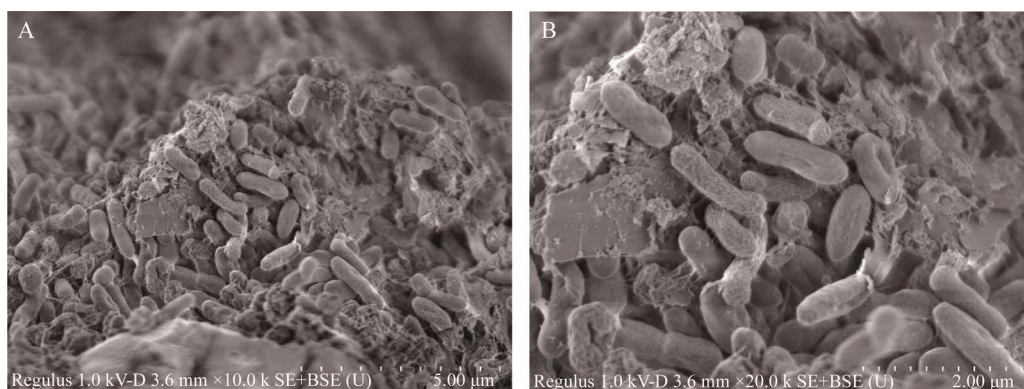


图 5 微生物扫描电镜图(2号)

Figure 5 Scanning electron microscopy (SEM) of microorganism (No. 2). A: $\times 10\,000$ times. B: $\times 20\,000$ times.

2.4.2 微生物群落结构分析

利用 RDP classifier 软件对各微生物组中 OTU 依次进行门、纲、目、科、属分类统计, 解析样品中种群组成, 统计不同分类水平序列数目比例大于 1% 的结果。

从图 6A 所展示的各微生物组“属”水平群落结构图可以看出, 不同地区的土壤微生物经过本试验的驯化方法都得到了以嗜酸菌属 (*Acidovorax*) 为主的具有一定脱氮效果的氢自养微生物。因此, 嗜酸菌属即为本研究驯化出的优势菌属。

这 5 个微生物组中脱氮效果最好的 2 号微生物组在各级水平上的微生物结构图如图 6B 所示, 大部分的细菌集中在变形菌门 (*Proteobacteria*), 它是污水处理厂活性污泥微生物中最重要组成部分, 比例高达 98.5%。变形菌门细菌均为革兰氏阴性菌, 有研究表明变形菌门对废水中的有机物有很好的去除效果^[24]。从“纲”水平群落结果可以看出, 大部分的细菌集中在 β -变形菌纲 (*Betaproteobacteria*), 比例达 86.9%。此外, α -变形菌纲 (*Alphaproteobacteria*) 和 γ -变形菌纲 (*Gammaproteobacteria*) 分别占比 4.24% 和 1.63%。Zhang 等^[25]发现 β -变形菌纲在污水处理系统中起着非常重要的作用, Xia 等^[26]的研究表明,

α -变形菌纲是活性污泥中最主要的变形菌纲。从“目”水平群落结果可以看出, 大部分的细菌集中在伯克氏菌目 (*Burkholderiales*), 比例达 86.9%。此外根瘤菌目 (*Rhizobiales*) 和假单胞菌目 (*Pseudomonadales*) 分别占比 4.24% 和 1.48%。从“科”水平群落结果可以看出, 大部分的细菌集中在丛毛单胞菌科 (*Comamonadaceae*), 比例达 84.4%。此外根瘤菌科 (*Rhizobiaceae*) 和草酸杆菌科 (*Oxalobacteraceae*) 分别占比 2.94% 和 2.43%。从“属”水平群落结果可以看出, 大部分的细菌集中在嗜酸菌属 (*Acidovorax*), 比例达 84.4%。此外丛毛单胞菌属 (*Comamonas*) 占比 1.45%。Peng^[27]的研究表明, 嗜酸菌属中 BoFeN₁ 菌株可以在进行反硝化脱氮的同时通过亚硝酸盐还原酶或非生物反应促进 Fe(II) 和有机物的氧化。

3 结论与展望

(1) NaHCO_3 和 CO_2 作为混合无机碳源对氢自养微生物脱氮的效果要优于单一使用 NaHCO_3 。体系 pH 调整为 6.3–7.0 时效果最佳, 此时氢自养微生物的脱氮周期为 1 d, 且脱氮过程无 NO_2^- -N 积累。在探究最佳无机碳源体系的进一步研究中拟再增加单一使用 CO_2 作为无机碳源的对照体系;

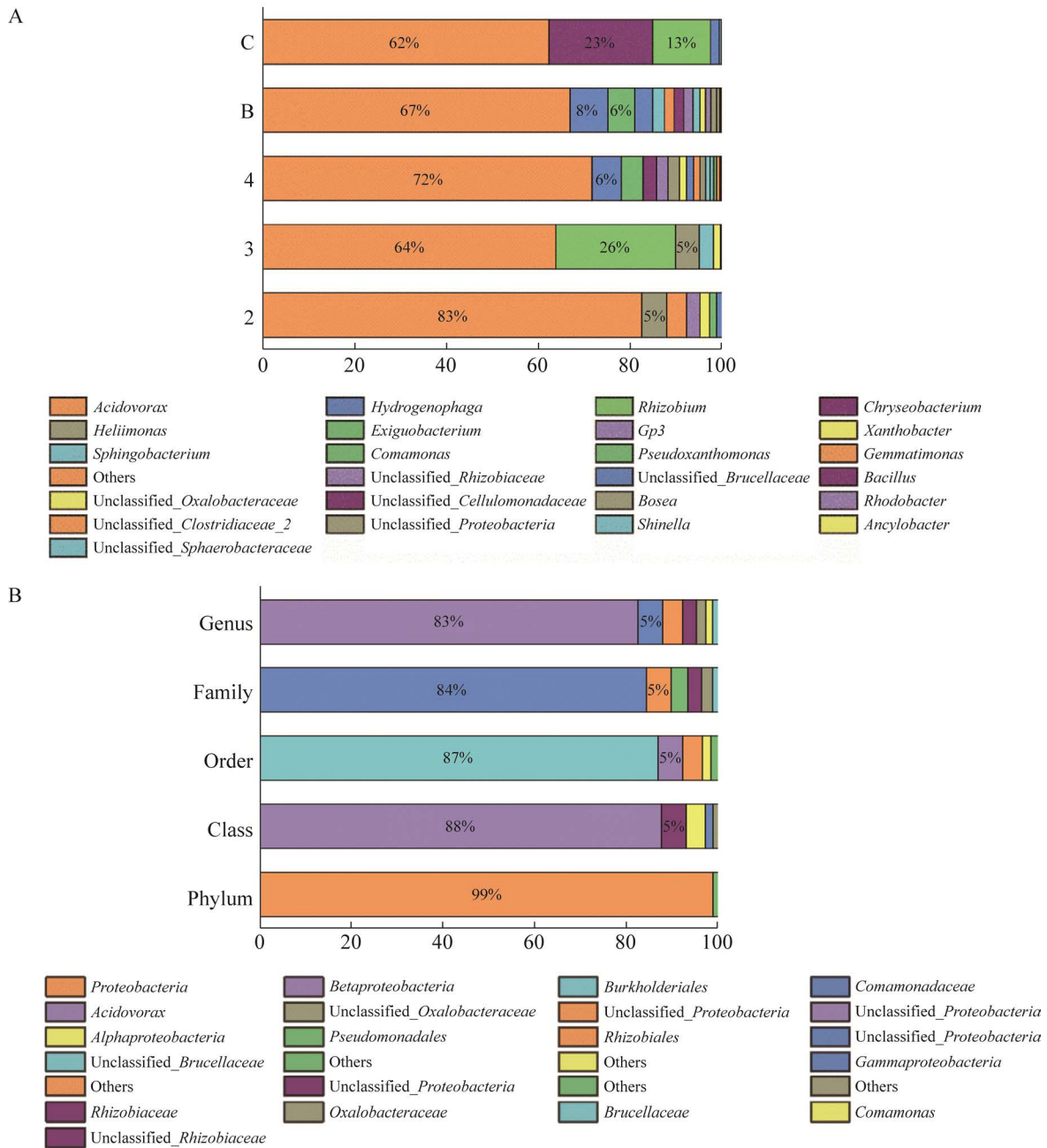


图 6 驯化后微生物群落结构图

Figure 6 Microbial community structure after cultivation. A: Community structure map of each microbiome genus level. B: Community structure map of No. 2 microbiome at the levels of phylum, class, order, family and genus.

(2) 在环境温度为 20 °C，初始投加量为 15 mg-N/L 时，氢自养微生物脱氮速率可达 1.374 mg-N/L，氢气利用率可达 43.4%，16 h 可完成一个脱氮周期，且脱氮过程无亚硝酸盐积

累。本试验表明即使在弱酸性条件下，微生物也具备高效脱氮能力，可为进一步研究酸性环境下微生物同时脱氮固硫奠定实验基础；

(3) 本研究采用的驯化装置和驯化方法是

可行且简单高效的,也说明微生物脱氮具有普遍性和高效性。在“属”水平上,本试验驯化后的优势菌株为嗜酸菌属(*Acidovorax*),可为微生物驯化提供基础数据和理论依据,也可为土壤和地下水微生物脱氮提供微生物学基础。

参考文献

- [1] SANCHEZ DA, SZYNKIEWICZ A, FAIIA AM. Determining sources of nitrate in the semi-arid Rio Grande using nitrogen and oxygen isotopes[J]. *Applied Geochemistry*, 2017, 86: 59-69.
- [2] ZHANG X, ZHANG Y, SHI P, BI ZL, SHAN ZX, REN LJ. The deep challenge of nitrate pollution in river water of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 770: 144674.
- [3] MACILWAIN C. US report raises fears over nitrate levels in water[J]. *Nature*, 1995, 377(6544): 4.
- [4] CYRIELLE B, MATHIEU S, PASCALE L, THIERRY C, VÉRONIQUE V, MAUDE S, VALÉRIE P. Legacy of contaminant N sources to the NO_3^- signature in rivers: a combined isotopic ($\delta^{15}\text{N}-\text{NO}_3^-$, $\delta^{18}\text{O}-\text{NO}_3^-$, $\delta^{11}\text{B}$) and microbiological investigation[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 41703.
- [5] VELUSAMY K, PERIYASAMY S, KUMAR PS, VO DV N, SINDHU J, SNEKA D, SUBHASHINI B. Advanced techniques to remove phosphates and nitrates from waters: a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2021, 19(4): 3165-3180.
- [6] GIZAW A, ZEWGE F, KUMAR A, MEKONNEN A, TESFAYE M. A comprehensive review on nitrate and phosphate removal and recovery from aqueous solutions by adsorption[J]. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, 2021, 70(7): 921-947.
- [7] MCADAM EJ, PAWLETT M, JUDD SJ. Fate and impact of organics in an immersed membrane bioreactor applied to brine denitrification and ion exchange regeneration[J]. *Water Research*, 2010, 44(1): 69-76.
- [8] GU MQ, WANG YN, WAN DJ, SHI YH, HE QC. Electrodialysis ion-exchange membrane bioreactor (EDIMB) to remove nitrate from water: optimization of operating conditions and kinetics analysis[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 839: 156046.
- [9] SUZUKI T, MORIBE M, OYAMA Y, NIINAE M. Mechanism of nitrate reduction by zero-valent iron: Equilibrium and kinetics studies[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 183: 271-277.
- [10] JIANG ZM, LV L, ZHANG WM, DU Q, PAN BC, YANG L, ZHANG QX. Nitrate reduction using nanosized zero-valent iron supported by polystyrene resins: Role of surface functional groups[J]. *Water Research*, 2011, 45(6): 2191-2198.
- [11] 邓文芳, 吴佳鹏, 洪义国, 刘晓晗, 胡耀豪. 真菌反硝化过程及其驱动的 N_2O 产生机制研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(6): 1551-1566.
- [11] DENG WF, WU JP, HONG YG, LIU XH, HU YH. The diversity distribution and N_2O production driven by fungal denitrification in different natural ecosystems[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(6): 1551-1566 (in Chinese).
- [12] dos SANTOS SG, VARESCHE MBA, ZAIAT M, FORESTI E. Comparison of methanol, ethanol, and methane as electron donors for denitrification[J]. *Environmental Engineering Science*, 2004, 21(3): 313-320.
- [13] MOON HS, CHANG SW, NAM K, CHOE J, KIM JY. Effect of reactive media composition and co-contaminants on sulfur-based autotrophic denitrification[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 144(3): 802-807.
- [14] KURT M, DUNN IJ, BOURNE JR. Biological denitrification of drinking water using autotrophic organisms with H_2 in a fluidized-bed biofilm reactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1987, 29(4): 493-501.
- [15] VASILIADOU I, KARANASIOS K, PAVLOU S, VAYENAS D. Experimental and modelling study of drinking water hydrogenotrophic denitrification in packed-bed reactors[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 165(1): 812-824.
- [16] VISVANATHAN C, HUNG N, JEGATHEESAN V. Hydrogenotrophic denitrification of synthetic aquaculture wastewater using membrane bioreactor[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(6): 673-682.
- [17] LIU Q, GAO S, ZHOU Q, XU R, LI ZL, HOU YN, SUN YL, HUANG C. Bio-augmentation of the filler-enhanced denitrifying sulfide removal process in expanded granular sludge bed reactors[J]. *Environmental Research*, 2022, 212: 113253.
- [18] 王豫琪, 张增强, 陈园, 沈志红, 王珍, 何国强. 基于碳酸氢钠为碳源的氢自养反硝化去除地下水中硝酸盐研究[J]. *农业环境科学学报*, 2011(3): 564-572.
- [18] WANG YQ, ZHANG ZQ, CHEN Y, SHEN ZH, WANG

- Z, HE GQ. Nitrate removal from groundwater by hydrogen autotrophic denitrification using bicarbonate as carbon source[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011(3): 564-572 (in Chinese).
- [19] YE J, KIGA A, NAITO K, CONG VO H, SAKAKIBARA Y. Continuous treatments of synthetic groundwater by an *in situ* denitrification and oxidation process with injection of electrolytic hydrogen and oxygen[J]. *Water Supply*, 2015, 15(4): 881-888.
- [20] CHEN Y, TIAN W, SHAO Y, LI YJ, LIN L, ZHANG YJ, HAN H, CHEN ZJ. *Miscanthus* cultivation shapes rhizosphere microbial community structure and function as assessed by Illumina MiSeq sequencing combined with PICRUSt and FUNGUId analyses[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(5): 1157-1171.
- [21] GHAFARI S, HASAN M, AROUA MK. Effect of carbon dioxide and bicarbonate as inorganic carbon sources on growth and adaptation of autohydrogenotrophic denitrifying bacteria[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 162(2): 1507-1513.
- [22] 苏俊峰, 张凯, 黄廷林, 黄文斌, 卢金锁, 郭琳, 杨少斐. 氢自养反硝化细菌 SY6 的反硝化特性研究[J]. *应用基础与工程科学学报*, 2015(3): 493-498.
SU JF, ZHANG K, HUANG TL, HUANG WB, LU JS, GUO L, YANG SF. Characterization of denitrification of a hydrogen autotrophic denitrification bacterium SY6[J]. *Journal of Basic Science and Engineering*, 2015(3): 493-498 (in Chinese).
- [23] SOROKIN DIMITRY Y, TOUROVA TATJANA P, BEZSOUDNOVA EKATHERINA Y, ARJAN P, GERARD M. Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* Gen. nov. sp. nov. - a moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing Gammaproteobacterium from hypersaline lakes[J]. *Archives of Microbiology*, 2007, 187(6): 441-450.
- [24] 窦娜莎, 王琳. 16S rDNA 克隆文库法分析 Biostyr 曝气生物滤池处理城市污水的细菌多样性研究[J]. *环境科学学报*, 2011(10): 2117-2124.
DOU NS, WANG L. Bacteria diversity in a biostyr biological aerated filter of municipal wastewater by 16S rDNA[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011(10): 2117-2124 (in Chinese).
- [25] ZHANG T, SHAO MF, YE L. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(6): 1137-1147.
- [26] XIA S, DUAN L, SONG Y, LI J, PICENO YM, ANDERSEN GL, ALVAREZ-COHEN L, MORENO-ANDRADE I, HUANG CL, HERMANOWICZ SW. Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(19): 7391-7396.
- [27] PENG C, SUNDMAN A, BRYCE C, CATROUILLET C, BORCH T, KAPPLER A. Oxidation of Fe(II)-organic matter complexes in the presence of the mixotrophic nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacterium *Acidovorax* sp. BoFeN₁[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(10): 5753-5763.