

# ANAMMOX 菌的微生物学研究进展\*

赵志宏 李小明\*\* 廖德祥 邓 嫒 李 旭

(湖南大学环境科学与工程院 长沙 410082)

**摘要:** 厌氧氨氧化具有运行成本低、节约能源和资源的特点,是目前最有前途的脱氮途径。厌氧氨氧化是一个生物过程,已确定的细菌有 3 种: *Brocadia*、*Kuenenia* 和 *Scalindua*。综述了其分离和鉴定的方法、生物化学途径、生态生理学特性和分布。

**关键词:** 厌氧氨氧化, 浮霉状菌目, PCR, 厌氧氨氧化体

**中图分类号:** X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0138-05

## The Microbiology Research Progress of ANAMMOX Bacteria\*

ZHAO Zhi-Hong LI Xiao-Ming\*\* LIAO De-Xiang DENG Pin LI Xu

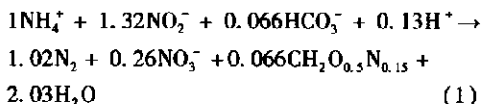
(College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082)

**Abstract:** Anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) is a new process of nitrogen conversion that has prospect most currently. The ANAMMOX process offers great opportunities to remove ammonia from wastewater without the addition of an external carbon source and with considerable less aeration costs in comparison with classical methods. ANAMMOX is a biologically mediated process. Three bacteria are identified responsible for the process as new deep-branching planctomycete; *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*. Described it to separate and the method, biochemistry path, the ecosystem physiology characteristic for authenticate and distribute.

**Key words:** Anaerobic ammonium oxidation, Planctomycetes, Polymerase chain reaction, Anammoxosome

随着经济的迅猛发展,水体中的氮素污染日益严重,已经对环境造成了极大的影响。厌氧氨氧化 (Anaerobic Ammonium Oxidation, 简称 ANAMMOX) 是近几年内发展起来的高效生物脱氮技术,与传统的硝化反硝化脱氮工艺相比,它不需要外加有机碳源进行反硝化,污泥产量少;完全不需要氧气,节省了大量的运行费用;不需要酸碱中和剂,避免二次污染。厌氧氨氧化特别适合处理低 C/N 高氨氮废水,因此它已成为国内外生物脱氮研究的热点问题之一,而实际上对厌氧氨氧化菌微生物学的探讨较少,深入了解和研究厌氧氨氧化菌将有利于其技术应用于实际。

大胆地预言了厌氧氨氧化反应和厌氧氨氧化菌的存在。1995 年, Mulder 等<sup>[3]</sup> 在一个反硝化脱氮流化床反应器中发现了厌氧氨氧化作用,大量的  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_2^-$  同时被去除,从而证实了 Broda 的预言。接着 Van de Graaf 等<sup>[4]</sup> 通过大量的实验研究发现,厌氧氨氧化是一个以氨氮为电子供体,亚硝酸氮为电子受体的自养生物脱氮反应 (反应式 1),羟氨和联氨是其中间产物,厌氧氨氧化菌的微生物学特征成为研究的热点。



## 1 厌氧氨氧化的原理

长期以来,人们认为氨的氧化只在有氧的条件下发生<sup>[1]</sup>。1977 年 Broda<sup>[2]</sup> 从化学热力学出发,

## 2 厌氧氨氧化菌的分离和鉴定

**2.1 厌氧氨氧化菌的分离** 为了从富集培养物中分离厌氧氨氧化菌,先后采用系列稀释分离、平

\*国家自然科学基金项目 (No. 50478054)

国际科技合作重点项目 (No. 2004DFA06200)

长沙市科技计划重点项目 (No. K051132-72)

\*\* 通讯作者 Tel: 0731-8823967, E-mail: xml@hnu.cn

收稿日期: 2006-02-15, 修回日期: 2006-06-14

板划线分离、显微单细胞分离等多种方法,但均以失败告终。反复尝试失败后,终于采用密度梯度离心技术成功的纯化了厌氧氨氧化菌。这种方法的操作如下:首先,用超声波温和的破碎厌氧氨氧化菌富集培养物(生物膜或絮体),将菌群分散成单个菌体(细胞);接着,离心去除残留的聚集体(生物膜或絮体的碎片);最后,将分散的细胞进行 percoll 梯度密度离心。厌氧氨氧化菌沉淀于离心管下层,形成一个深红色的条带。经过优化后采用这种技术获得的细胞悬液可达到很高的纯度,每 200~800 个细胞中只含 1 个污染细胞<sup>[4]</sup>。

## 2.2 厌氧氨氧化菌的鉴定

**2.2.1 形态特征:** Strous 等人从分离细胞浓缩液中检出了厌氧氨氧化活性,并据此判定这种细胞是厌氧氨氧化菌。电镜观察发现,在具有厌氧氨氧化活性的生物膜中,一种形态独特的细胞在数量上占据绝对优势。对这种细胞进行超薄切片观察,可发现细胞内存在分室<sup>[6]</sup>。至今为止,这种由细胞膜围成的分室结构只发现于 planctomycetes (浮霉状菌目)的细胞中。进一步对这种细胞进行复染观察,可发现细胞表面均匀分布着火山口状的结构<sup>[6]</sup>。这种结构也只发现于 planctomycetes 的细胞表面。这些形态特征都指向 planctomycetes,为厌氧氨氧化菌分类地位的最终确定提供了依据。

**2.2.2 现代分子生物学技术鉴定:** 分子生物学技术是研究生态系统中微生物活性等的重要工具。

从细胞悬液中提取 DNA 和 RNA,直接用 PCR 扩增了 16S rDNA,同时也用 16S rDNA 反向转录产生了 crDNA (互补 rDNA),以 RT-PCR 扩增了 16S crDNA。虽然细胞悬液的纯度高达 99% 以上,但只有从 RT-PCR 获得的克隆文库,序列种类相对集中(其中有个序列占 80%)。根据这个优势序列,设计了 18 个特异性寡核苷酸探针,以 Cy3 荧光色素标记后,用于荧光原位杂交试验。在 18 个寡核苷酸探针中,只有 10 个探针能与上述分离的厌氧氨氧化菌细胞结合。这些特异性寡核苷酸探针的获得,为厌氧氨氧化菌的鉴定提供了新的工具。为了确定分离细胞在细菌谱系中的身份,对其 16S rDNA 进行序列(全长 1,453bp,以 *E. coli* 的编号方法,所测序列的位置为 7~1,390)测定。所测的序列与数据库中其它细菌的 16S rDNA 序列进行对比发现,厌氧氨氧化菌属于浮霉细菌(planctomycetes)。与之亲缘关系最近的序列是一个从海洋雪团状聚集体中扩增的 16S rDNA 序列(同源性 80.2%)。与其它浮霉细菌 16S rDNA 序列的同源性为 74%~77%。根据 16S rDNA 谱系分析,目前确定了 3 种厌氧氨氧化菌,即 *Brocadia* 包括 *B. anammoxidans*<sup>[7]</sup> 和 *Brocadia fulgida*<sup>[8]</sup>, *Kuenenia* 包括 *K. stuttgartiensis*<sup>[9]</sup>, *Scalindua* 包括 *S. wagneri*, *S. brodae* 和 *S. sorokinii*<sup>[10,11]</sup>(如图 1 所示)。*Scalindua sorokinii* 是在黑海的缺氧水域中被发现,这首次为厌氧氨氧化菌存在于大自然中提供了直接证据。

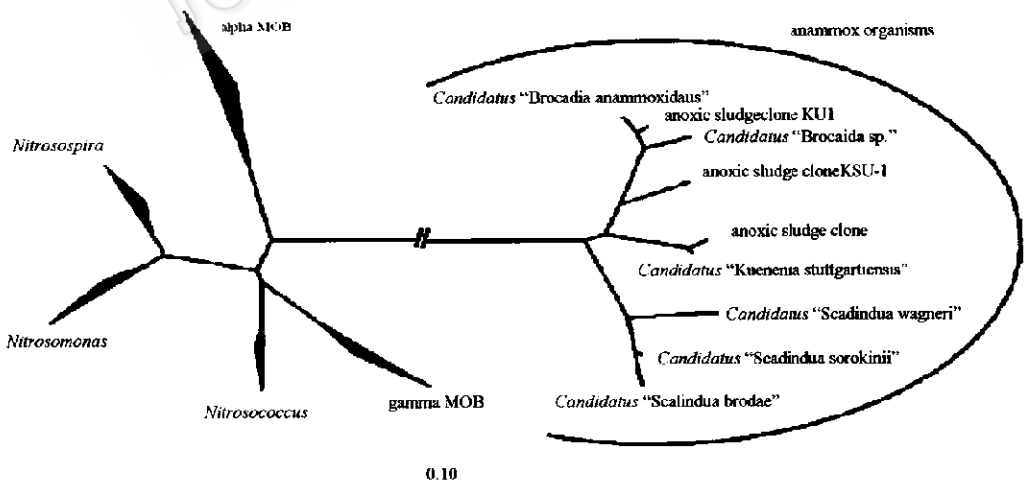


图 1 厌氧氨氧化菌谱系树<sup>[12]</sup>

水平线表示 16S rDNA 基因序列 10% 的差异

### 3 厌氧氨氧化菌的生物化学特性

**3.1 厌氧氨氧化体 (anammoxosome)** 厌氧氨氧化菌的细胞质被单层双分子膜分为三个独立的区域: ①外层区域: paryphoplasm, 外层被细胞壁和细胞膜所包围, 内侧是胞质内膜; ②riboplasm, 包含内核; ③内层自由核糖体区域, 厌氧氨氧化体 (anammoxosome), 被厌氧氨氧化体膜所包围。

厌氧氨氧化反应的一种重要的酶——联胺氧化酶 (HZO), 已被提纯, 证明确实存在于厌氧氨氧化体中<sup>[6]</sup>。这就证明厌氧氨氧化分解代谢确实发生在厌氧氨氧化体内, 厌氧氨氧化体是厌氧氨氧化菌中最为重要的细胞器。厌氧氨氧化体的相对体积很大, 占整个细胞的30%~60%。Jetten等认为厌氧氨氧化体是一个多功能的细胞器, 可能与细胞分裂、DNA复制以及其它生理活动有关。

**3.2 厌氧氨氧化菌的生化反应模型** 氨和羟胺在联胺水解酶 (HH) 的作用下生成联胺。联胺在联胺氧化酶 (HZO) 的作用下氧化。HZO在某些方面与亚硝化单胞菌的羟胺氧化还原酶 (HAO) 有

相似之处。厌氧氨氧化体中的联胺氧化生成氮气, 并生成4个质子和4个电子。4个电子和riboplasm中的5个质子结合起来, 在亚硝酸盐还原酶的作用下, 可能把亚硝酸盐还原成羟胺。在这个模型中, riboplasm层中有效的质子消耗和厌氧氨氧化体中电子的生成, 使得厌氧氨氧化反应形成了质子梯度。这就形成从厌氧氨氧化体到riboplasm层的定向化学质子梯度。这个梯度包括化学电势能——化学质子梯度造成pH值的不同 ( $\Delta pH$ ), 与厌氧氨氧化体比较, riboplasm层趋于碱性; 还包括电能——质子梯度造成电荷差异 ( $\Delta \Psi$ ), 与厌氧氨氧化体比较, riboplasm层趋于阴性。 $\Delta pH$ 和 $\Delta \Psi$ 都对质子有一个驱动力——质子驱动力 ( $\Delta p$ ): 使它从厌氧氨氧化体内进入体外。在 $\Delta p$ 的驱动下, 厌氧氨氧化体膜中的ATP酶催化促进ATP的合成。质子通过ATP酶形成的小孔又进入riboplasm层中。ATP酶中球状的、亲水的那部分在riboplasm层, 不亲水的那端在厌氧氨氧化体膜中。形成的ATP将在riboplasm层中被释放 (如图2所示)。

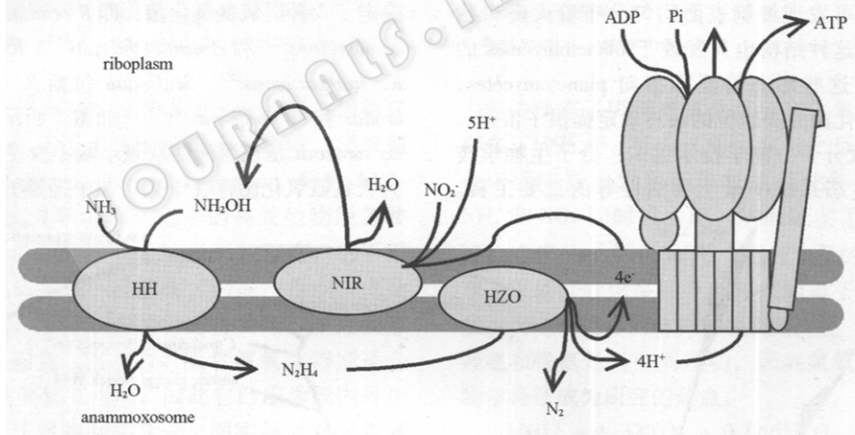


图2 厌氧氨氧化菌的生化反应模型<sup>[13]</sup>

NIR (nitrite-reducing enzyme): 亚硝酸盐还原酶, HH (hydrazine hydrolase): 联胺水解酶, HZO (hydrazine-oxidizing enzyme): 联胺氧化酶

**3.3 特征光谱** 在以无机盐培养基富集厌氧氨氧化菌的过程中, 富集培养物的颜色逐渐从黄棕色转变为深红色, 检测发现, 厌氧氨氧化菌细胞色素c的特征光谱 (540nm~554nm,  $\alpha$ -带明显加强)。但在77k处未检出细胞色素a (600nm~605nm, 末端氧化酶的成分), b (554nm~564nm) 和d<sub>1</sub> (662nm~665nm, cd<sub>1</sub>型亚硝酸盐还原酶的成分) 的特征光

谱。随着富集培养物活性提高, 468nm处的吸收峰逐渐增大。用CO处理富集物后, 这个吸收峰消失, 不能恢复。亚硝化单胞菌在463nm处也存在类似的吸收峰, 一般认为它与羟胺氧还酶中的血红素有关, 常称它为细胞色素P<sub>460</sub><sup>[5]</sup>。通过凝胶作用, 已成功的从*Kuenenia stuttgartiensis*的细胞提取物中纯化得到10kD细胞色素c<sup>[14]</sup>。

#### 4 厌氧氨氧化菌的生态生理学特性

厌氧氨氧化菌是革兰氏阴性细菌,细胞单生或成对,出芽繁殖。它的细胞壁上有凹陷称之为“火山口状的结构”,细胞内部分区。厌氧氨氧化菌的脂质是酯连接和醚连接联合起来的脂肪酸。脂质是分类学的标志,它决定着膜的结构。很清楚地,脂肪膜使离子和代谢物产生浓度梯度。厌氧氨氧化菌具有各种特殊的膜脂质。厌氧氨氧化菌的脂质具有各种不同的种类和派生物。因此,厌氧氨氧化菌有各种独特的膜结构。它们含有一个,两个相同或两个不同的环状系统。厌氧氨氧化菌的膜脂质中还含有丰富的半环状系统。这种脂质占有 *Brocadia anammoxidans* 中所有脂质的34%。这种环状膜脂质的结构在自然界中是比较独特的。而且至今为止这种环状膜脂质的结构也只在厌氧氨氧化菌中才被发现。这种膜脂质结构的功能意义引起了广泛的关注。

在发现的厌氧氨氧化菌中, *B. anammoxidans* 和 *K. stuttgartiensis* 研究得比较多。*B. anammoxidans* 有一层蛋白质的细胞壁,但细胞壁里缺乏肽聚糖,所以对氨基青霉素不敏感。*K. stuttgartiensis* 在很多方面类似于 *B. anammoxidans*。*K. stuttgartiensis* 与 *B. anammoxidans* 细胞结构完全相同,也能由外源羟胺产生联胺。16S rRNA 序列谱系分析确定在黑海的缺氧区域中发现的 *Scalindua sorokinii* 属于厌氧氨氧化菌的一种,与 *K. stuttgartiensis* 的序列相似度为 87.9%,与 *B. anammoxidans* 的序列相似度为 87.6%<sup>[15]</sup>。*Scalindua sorokinii* 有明显的厌氧氨氧化活性和特殊脂质的分布,它被认为有可能是距今为止分布最广泛的厌氧氨氧化菌种。*Scalindua brodae* 和 *Scalindua wagneri* 的 16S rRNA 序列相似度为 93%。

#### 5 厌氧氨氧化在全球氮素循环中的重要作用

在各种生态系统中,厌氧氨氧化菌必须生活在氧气限制的条件下,例如:含氧和缺氧的边界。是不是厌氧氨氧化菌和好氧亚硝化菌能共存于自然界中同一个微生境中呢?在理论上,厌氧氨氧化菌与亚硝化单胞菌能在氧气限制的情况下共存。亚硝化单胞菌把氨离子氧化为亚硝酸盐,并保持较低的氧气浓度,接着厌氧氨氧化菌把有毒的亚

硝酸盐和剩余的氨离子转化为氮气,这就为厌氧氨氧化广泛存在于各种生态系统中提供了理论依据。

厌氧氨氧化细菌首次在荷兰的废水处理系统中被发现,在不添加有机碳源的情况下,去除废水中的氨氮方面有巨大的潜力。在德国、英国、澳大利亚、日本等国的废水处理系统也相继发现了厌氧氨氧化菌。近来研究表明在自然界的海洋生态系统中多次发现了厌氧氨氧化现象。在黑海,运用<sup>15</sup>N 同位素追踪试验和氮素研究已测定出厌氧氨氧化活性,并运用脂质分析和 FISH (fluorescence in situ hybridization) 技术鉴别出新的厌氧氨氧化菌种。据估计,在全球的海底沉积物和缺氧水体中,厌氧氨氧化作用使 1/3 ~ 1/2 的氮得以转化<sup>[16]</sup>。最近在自然界的淡水沉积物中也发现了厌氧氨氧化现象。含氧和缺氧的边界在大自然中比较常见,因此厌氧氨氧化菌的分布非常广泛。由此可见,厌氧氨氧化作用对全球氮素循环有重要的意义。

#### 6 结语

厌氧氨氧化是目前最有前途的脱氮途径,而且它对全球氮素循环有着重要意义。至今为止,厌氧氨氧化菌的微生物学研究已发展到一定的阶段,已经分离和鉴定出厌氧氨氧化菌,提出了可能的生化反应模型,并且通过实验测得厌氧氨氧化菌的主要生理学参数,为把厌氧氨氧化技术应用于实际鉴定了基础,今后的工作主要集中在:(1) 研究厌氧氨氧化菌各部分的功能和结构以及酶的分离:包括在厌氧氨氧化新陈代谢中起到重要作用的亚硝酸盐还原酶、硝酸盐还原酶、羟胺氧化还原酶等<sup>[17]</sup>;(2) 选择合适的工艺条件来培养厌氧氨氧化菌,使生长速率慢的厌氧氨氧化菌应用于实际废水处理中;(3) 研究厌氧氨氧化微生物的生长动力学。

#### 参考文献

- [1] Than K, Annachatre A P. *Biotechnology Advances*, 2004, 22: 519 ~ 532.
- [2] Broda E. *Z Allg Mikrobiol*, 1977, 17: 491 ~ 493.
- [3] Mulder A, Van de Graff A A, Robertson L A, et al. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 16: 177 ~ 184.
- [4] Van de Graaf A A, Mulder A, de Bruijn P. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (4): 1246 ~ 1251.

- [5] 郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术. 北京: 科学出版社, 2004. 98~99.
- [6] Lindsay M R, Webb R I, Strous M, *et al.* Arch Microbiol, 2001, 175 (6): 413~429.
- [7] Strous M, Kuenen J G, Fuerst J A, *et al.* Ant van Leeuwen, 2002, 81: 693~702.
- [8] Kartal M B, van Niftrik L A M P, Sliemers A O, *et al.* Rev Environ Sci Biotechnol, 2004, 3 (3): 255~264.
- [9] Egli K, Franger U, Alvarez P J J, *et al.* Arch Microbiol, 2001, 175: 198~207.
- [10] Kuypers M M M, Sliemers A O, Lavik G, *et al.* Nature, 2003, 422: 608~611.
- [11] Schmid M, Walsh K, Webb R I, *et al.* Syst Appl Microbiol, 2003, 26: 529~538.
- [12] Jettten M S M, Cirpus I, Kartal B, *et al.* Biochemical Society Transactions, 2005, 33 (1): 119~123.
- [13] van Niftrik L A, Fuerst J A, Sinnighe D J S, *et al.* FEMS Microbiology Letters, 2004, 233: 7~13.
- [14] Cirpus I E Y, de Been M, Op den Camp H J M, *et al.* FEMS Microbiol Lett, 2005, 252: 273~278.
- [15] Tal Y, Watts J E M, Schreier H J. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 4: 1816~1821.
- [16] Dalsgaard T, Thamdrup B, Canfield D E. Research in Microbiology, 2005, 156: 457~464.
- [17] Cirpus I E Y, Wim G, Hermansa J H M, *et al.* International Journal of Biological Macromolecules, 2006, 39: 88~94.

## • 征订 •

### 《腐植酸》杂志 2007 年征订启事

《腐植酸》杂志 1979 年创刊, 是中国腐植酸工业协会主办的全国唯一的腐植酸类专业科技期刊, 面向国内外公开发行人。《腐植酸》杂志是《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊、《中国学术期刊(光盘版)》入编期刊; 在“第六届全国石油和化工行业优秀期刊评选活动”中荣获专业技术类优秀期刊。本刊为国际标准大 16 开, 内设 60 页, 主要栏目有: “卷首语”、“专题评述”、“研究论文”、“译文”、“原料与检测”、“协会(专业)标准讨信纸”、“腐植酸文摘”、“腐植酸专利简介”、“‘两会’动态”、“信息传真”、“环保视窗”等。

《腐植酸》杂志集学术性、实用性和专业性于一身, 内容广泛、指导性强、信息量大, 自 1979 年创刊以来, 受到越来越多读者的关注与好评。2007 年, 本刊调整了栏目内容, 增设了新栏目, 以丰富杂志内容、增加行业信息量, 更好地为我国腐植酸事业做好服务工作!

2007 年《腐植酸》杂志征订工作已经全面展开, 热诚欢迎各位新、老读者及时订阅!

本刊为双月刊, 每期定价 15.00 元(含邮费), 全年 6 期, 总计 90.00 元(含邮费)。如需要过刊者, 请直接与编辑部联系。

订阅方式: 请从邮局汇款:

地址: 北京市西城区六铺炕街 1 号《腐植酸》编辑部收

邮编: 100011

电话: 010-82035180

传真: 010-82032432

E-mail: chaia@126.com; humicacid@sohu.com

网址: www.chinaha.org