



研究报告

光氧环境对紫色硫细菌 YL28 去除无机三态氮的影响

张晓波 周广静 朱笔通 赵春贵* 杨素萍*

华侨大学生物工程与技术系 福建 厦门 361021

摘要:【背景】光和氧是制约光合细菌生长代谢进而影响其除氮效果的重要因素。不产氧光合细菌紫色硫细菌——海洋着色菌(*Marichromatium gracile*) YL28 能以亚硝氮为唯一氮源进行光合生长,对高浓度无机三态氮具有良好去除能力。【目的】阐明 YL28 菌株除氮效率与光氧环境的交互联系,获得其生物除氮的最适光氧条件。【方法】以高浓度无机三态氮共存海水水体为研究体系,在有光/无光条件下考查装样量(表征体系溶氧状态)对 YL28 菌株生物除氮活性的影响,并通过响应面分析法对装样量、光照强度和光周期 3 个主要因素进行优化。【结果】光照且氧浓度较低时(80%装样量),YL28 具有最佳生长和无机三态氮去除能力;装样量在 10%–100%时,菌体生物量(OD_{660})在 0.938–2.719 之间,当氨氮、亚硝氮和硝氮分别为 7.16、5.67 和 4.83 mmol/L 时,其去除率分别在 71.44%–89.09%、99.22%–99.83%和 91.60%–97.33%。黑暗条件下,装样量在 20%–100%时,氨氮、亚硝氮和硝氮去除率分别在 48.07%–64.27%、73.51%–86.42%和 42.57%–46.34%,但菌体生物量(OD_{660} 为 0.615–0.903)明显降低。通过响应面优化,当装样量、光照强度和光周期分别为 80.0% (溶氧量约为 0.32 mg/L)、2 800 lx 和 24L:0D 时,细胞生长和氨氮去除活性达到最佳状态,分别比优化前提高了 21.28%和 14.11%。在实际应用中,选取 72%–89%装样量(溶氧量约为 0.26–0.63 mg/L)、2 240–3 460 lx 光照强度和 21L:3D–24L:0D 光周期,细胞活性可达 95%以上。【结论】80%装样量有助于促进菌体光照生长和除氮;在黑暗有氧和无氧环境下,YL28 菌株也具有较好除氮活性,这为不产氧光合细菌在生物反应器中高效去除无机三态氮的应用提供了有价值的参考数据。

关键词:紫细菌,光,氧,除氮,响应面分析

Foundation items: National Marine Public Industry Research of China (201505026); Natural Science Foundation of Fujian Province (2018J01049); Subsidized Project for Cultivating Postgraduates Innovative Ability in Scientific Research of Huaqiao University

*Corresponding authors: Tel: 86-592-6166178

E-mail: ZHAO Chun-Gui: chungui@hqu.edu.cn; YANG Su-Ping: yangsuping@hqu.edu.cn

Received: 26-11-2018; **Accepted:** 25-01-2019; **Published online:** 25-02-2019

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201505026); 福建省自然科学基金(2018J01049); 华侨大学研究生科研创新能力培育项目

*通信作者: Tel: 0592-6166178

E-mail: 赵春贵: chungui@hqu.edu.cn; 杨素萍: yangsuping@hqu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-26; 接受日期: 2019-01-25; 网络首发日期: 2019-02-25

Effect of light and oxygen on the removal of inorganic nitrogen by *Marichromatium gracile* YL28

ZHANG Xiao-Bo ZHOU Guang-Jing ZHU Bi-Tong ZHAO Chun-Gui*
YANG Su-Ping*

Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021, China

Abstract: [Background] Light and oxygen are important limited factors for cell growth and the inorganic nitrogen removal of anoxygenic phototrophic bacteria (APB). *Marichromatium gracile* YL28, a member of purple sulfur bacteria in APB, can grow with nitrite as the sole nitrogen source and efficiently remove inorganic nitrogen. [Objective] This work aims to explore the relationship between light and/or oxygen and the removal efficiency of inorganic nitrogen by YL28, and acquire the optimal condition of light and oxygen for biological nitrogen removal processes. [Methods] A simulated seawater system with high concentration of co-exist inorganic nitrogen was used to investigate the effect of sample loading quantity (SLQ, it represents dissolved oxygen level) on the inorganic nitrogen removal efficiency by YL28 under the light or dark conditions. The three major factors of SLQ, light intensity and photoperiod were optimized by the response surface analysis. [Results] Under the light condition, the highest removal efficiency of inorganic nitrogen and cell growth were achieved at 80% of SLQ. When SLQ was in the range of 10% to 100%, the range of biomass value (OD_{660}) was from 0.938 to 2.719 and the removal rate of ammonia, nitrite and nitrate reached 71.44%–89.09%, 99.22%–99.83% and 91.60%–97.33% when exposed to 7.16, 5.67, 4.83 mmol/L of ammonia, nitrite, nitrate, respectively. Under the dark condition, when SLQ was in the range of 20% to 100%, the removal rate of ammonia, nitrite and nitrate reached 48.07%–64.27%, 73.51%–86.42% and 42.57%–46.34%, respectively, however, the biomass (OD_{660} , 0.615–0.903) decreased significantly. The response surface analysis showed that the cell growth and ammonia removal efficiency were increased by 21.28% and 14.11% under the 80.0% of SLQ (dissolved oxygen (DO) is approximately 0.32 mg/L), 2 800 lx of light intensity and 24L:0D of photoperiod condition. In practical application, more than 95% of cell activity was achieved under 72% to 89% of SLQ (DO is in the range of 0.26 to 0.63 mg/L), 2 240–3 460 lx of light intensity and 21L:3D–24L:0D of photoperiod conditions. [Conclusion] The 80% of SLQ is of benefit to YL28's phototrophic growth and the inorganic nitrogen removal efficiency; YL28 remains the good nitrogen removal activity under anaerobically and/or aerobically in the dark. This study provides useful information for the removal of inorganic nitride by APB in bioreactor.

Keywords: Purple bacteria, Light, Oxygen, Nitrogen removal, Response surface analysis

随着人类日益增长的食物需要、现代农业及人类城市化活动的加剧^[1], 自然界的氮平衡已经受到严重破坏^[2]。大量的氮化物随着河流进入海洋^[3], 导致水体富营养化以及温室效应气体 N_2O 等增加, 尤其是包括重点增养殖区在内的近海水域养殖水体, 无机氮化物、活性磷酸盐、化学需氧量等含量严重超标, 其中无机氮化物污染物区域多年来一直排在首位^[4-5]。如何及时有效地控制水体中氨氮和亚硝氮等有害物质, 恢复养殖水体的生态平衡, 已成为目前养殖业亟待解决的问题。

微生物不仅是驱动自然界氮循环的重要角色, 而且在生物高效除氮领域的应用也展示出良好前景^[6]。迄今报道了至少 8 种微生物氮代谢途径^[2,7], 如固氮、氨化、氨氧化或硝化、厌氧氨氧化、呼吸性硝酸盐还原(反硝化)、发酵型硝酸盐还原(Dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA)、同化硝酸盐还原、厌氧甲烷反硝化等, 这些氮代谢途径或机制的阐明, 不但对深入理解微生物驱动自然界物质循环和能量循环的机制具有重要意义, 而且依据微生物的这些氮代谢机制

建立了多种不同的生物脱氮工艺, 如硝化反硝化脱氮工艺^[8]、短程硝化反硝化脱氮工艺^[9]以及厌氧氨氧化脱氮工艺^[10]等。目前已研究和应用了各种各样的微生物制剂, 它们在养殖水体氮污染修复和生态恢复等方面发挥了重要作用^[11]。这些微生物主要以芽孢杆菌、硝化细菌、反硝化细菌、乳酸菌、酵母菌、海单胞菌和不产氧光合细菌(习惯称光合细菌)等为主要菌群, 不同微生物对环境的适应性及除氮活性具有明显差异, 它们的生长代谢和除氮过程除了受到污染水体组成复杂性影响外, 也受到水体环境因素如光、氧、pH、温度和氧化还原电位(eH)等严重制约。另外, 也有研究表明, 养殖水体中残留的饵料等有机物的降解主要发生在沉积物-水界面微环境, 在这种微环境中, 物质代谢循环活跃, 硝化/反硝化过程剧烈^[12-13], 导致氧化还原电位(eH)和溶氧(Dissolved oxygen, DO)等降低, 微生物类群变化, 有机物降解不彻底, 使水体中大量积累氨氮、亚硝氮和一些小分子有机物等^[14-16]。因此开发适应于沉积物-水界面的微生物制剂, 将有效降低水体中氨氮和亚硝氮等有害物质的积累程度。

不产氧光合细菌 (Anoxygenic phototrophic bacteria, APB)在水产养殖业上已有广泛的研究和应用^[11,17], 其特点是在光照厌氧条件下利用小分子有机物(酸、醇)和氨生长, 不但为养殖动物提供优质的菌体饵料, 而且大多数 APB 菌株还具有反硝化作用, 因此能有效地去除水体有机物以及氨氮和亚硝态氮等有害物质, 同时也不与水产养殖动物竞争氧气。已报道的 APB 微生物制剂菌种包括 *Rhodobacter sphaeroides* (*Rba. sphaeroides*)、*Rba. capsulata*、*Rhodospseudomonas palustris* (*Rps. palustris*)、*Rubrivivax gelatinosa*、*Phaeospirillum fulvum*等^[11], 其中一些菌株也能够黑暗环境中进行生长代谢, 推测其可满足沉积物-水界面的低光、低氧环境。然而目前使用的 APB 菌株多为淡水种或陆源种, 这些菌株能否应用于海水养殖水体环境还有待进一步考证。本课题组在前期研究中,

从海水潮间带红树林沉积物中分离获得一株能够以亚硝氮为唯一氮源生长的 APB——海洋着色菌 (*Marichromatium gracile*) YL28^[18-19]。该菌株具有高耐盐和耐受 H₂S 能力^[18], 亚硝氮最大去除浓度达 200.0 mg/L, 能同时去除体系中的高浓度无机三态氮, 是迄今报道的亚硝氮去除能力最高的 APB 菌株之一^[20]。进一步研究表明, 氨氮能明显提高该菌株对亚硝氮的适应能力, 小分子有机碳化合物(乙酸、琥珀酸和丙酮酸等)和海藻寡糖可明显提高其去除无机三态氮的能力, 而不利用大分子多糖(如淀粉、环糊精等), 这些大分子与小分子有机碳化合物共存时不影响该菌株的生长和除氮能力^[11,20-21], 同时已完成了该菌株的基因组测定^[22]和代谢途径分析^[23]。

研究表明, 光和氧是制约 APB 生长的重要环境因子, 势必将影响其除氮能力, 但不同的光氧环境对该菌株生长和除氮影响尚不清楚, 尤其是最适生长和除氮的光氧条件以及黑暗低氧环境中的除氮能力。鉴于此, 本文以高浓度无机三态氮共存的模拟海水为研究体系, 在考察了光照/黑暗、装样量以及光周期对该菌株生长和除氮影响的基础上, 通过响应面法优化了生长和氨氮去除的最适光照强度、光周期和装样量, 表明该菌株在光照且厌氧度较高时具有良好的生长和除氮能力, 且在黑暗有氧/无氧条件下, 仍然保持较好氨氮、硝氮和亚硝氮去除能力。本研究为 APB 微生物制剂海水养殖水体修复剂的合理应用提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

Marichromatium gracile YL28 分离自福建泉州洛阳桥红树林潮间带泥水样^[18], 16S rRNA 基因 GenBank 登录号为 JF719917。

1.1.2 培养基和菌种制备

按文献^[11]方法配制培养基。菌种悬液制备: 25 °C、6 000 r/min 离心 10 min 收集光照厌氧培养 4 d 菌悬液的菌体细胞, 用无菌 2% NaCl 溶液洗涤

菌体 3 次, 制备成细胞密度约为 4.8×10^9 CFU/mL 的菌种悬液。

1.2 除氮体系及处理条件

除氮体系: 在无碳源、无氮源培养基中, 添加终浓度为 24.3 mmol/L 乙酸钠为唯一有机碳源, 同时添加无机三态氮, 含量以实测值为准。

装样量设置: 选取规格为 100 mL 透明玻璃蓝盖瓶为培养容器, 设置不同的装样量, 以装满 (140 mL) 容器为 100% 装样量, 静置培养且在培养时旋紧瓶盖。

培养温度为 28 ± 2 °C, 菌种接种量为装样体积的 1.0%, 未特别强调时光照强度为 2 500 lx, 静置处理时间为 5 d, 黑暗处理用黑布包裹培养容器。每组处理 3 个重复, 研究过程中定时取样, 以测定菌体生物量和活细胞光谱, 25 °C、6 000 r/min 离心 10 min 收集上清液用于测定氨氮、亚硝氮和硝氮含量, 离心收集的菌体用于测定光合色素含量。

1.3 生物量、无机三态氮和色素含量的测定

采用比浊法测定菌体生物量, 在光程为 1 cm 的比色杯中, 于分光光度计上测定 660 nm 下的光密度值 (OD_{660}), 或扫描活细胞的吸收光谱。采用次溴酸钠氧化法 (GB12763.4-91)、N-(1-萘基) 乙二胺偶氮分光光度法 (GB/T 11889-1989) 和紫外分光光度法 (HJ/T 346-2007) 分别测定水体中氨氮、亚硝氮和硝氮含量。无机氮含量均以氮素的含量进行计算, 重复测定 3 次。计量单位: mmol/L 或 R (%), R 表示去除率, R (%) = $1 - C_t/C_0 \times 100$, C_t 和 C_0 分别表示无机氮化物测定时刻和初始时刻浓度。光合色素含量测定参照文献 [24] 进行。

1.4 响应面优化设计

研究采用 Design-Expert 8.0 软件进行试验设计, 在最适条件范围内选取装样量、光照强度和光周期进行 3 因素 3 水平优化, 以综合评价光、氧交互作用对菌体生长和氨氮去除效果的影响。测定体系中氨氮、亚硝氮和硝氮的初始浓度分别为 6.74、4.03、4.16 mmol/L。

2 结果与分析

2.1 装样量对 YL28 生长、除氮活性和光合色素合成的影响

一般而言, 溶氧水平依据溶氧量 (Dissolved oxygen, DO) 可分为好氧、缺氧和厌氧 3 种 [25]。为考察 YL28 菌株对溶氧的耐受能力, 研究了不同装样量 (Sample loading quantity, SLQ) 对该菌株生长和除氮能力的影响。DO 测定表明 (图 1A), 光照静置密封体系经 5 d 处理, SLQ 与 DO 呈负相关关系, 随着 SLQ (10%–100%) 升高, 其 DO 由 6.85 mg/L 降低至 0.17 mg/L, 因此采取 SLQ 来表示 DO 水平。菌体生长和除氮活性表明, 随着 SLQ 增加, 菌体生物量 (OD_{660}) 和氨氮去除率逐渐上升, 菌体生物量 (OD_{660}) 和氨氮去除率分别处于 0.938–2.719 和 71.44%–89.09% 之间, 以 80% SLQ 菌体生长和除氮活性最佳, 该菌株对 DO 也具有较好的耐受性, 即使在 10% SLQ (DO 6.85 mg/L) 时, 菌体生物量 (OD_{660}) 可达 0.938, 氨氮去除能力达 71.44%。此外, 对硝氮和亚硝氮的去除率没有明显影响, 去除率分别达 99.22% 和 91.60% 以上, 在好氧 (DO 6.85 mg/L) 环境中, 该菌株硝氮和亚硝氮去除活性很高, 未受到明显抑制。表明 YL28 菌株在光照厌氧 (80% SLQ) 环境中更有利于菌体生长和无机三态氮的去除。在黑暗条件下, 随着装样量的升高 (20%–100%), 菌体生物量 (OD_{660}) 在 0.615–0.903 范围内呈降低的趋势, 氨氮和亚硝氮去除率分别在 48.07%–64.27% 和 73.51%–86.42% 范围内逐渐升高, 硝氮去除率没有明显 ($P > 0.05$) 变化。由此可见, 虽然黑暗环境不是 YL28 菌株生长和除氮的良好环境, 但在黑暗有氧 (20%) 和厌氧 (100%) 的环境中, YL28 菌株都具有较好的脱除无机三态氮的能力, 但生物量更低。

在黑暗条件下, 不同装样量处理的菌体活细胞光谱均未观察到光合色素特征峰, 光合色素合成受到严重抑制, 因此本研究仅测定了在光照条件下不同装样量体系中菌体光合色素合成量的情况, 结果如图 1C 所示。随着 SLQ 的升高 (即体系厌

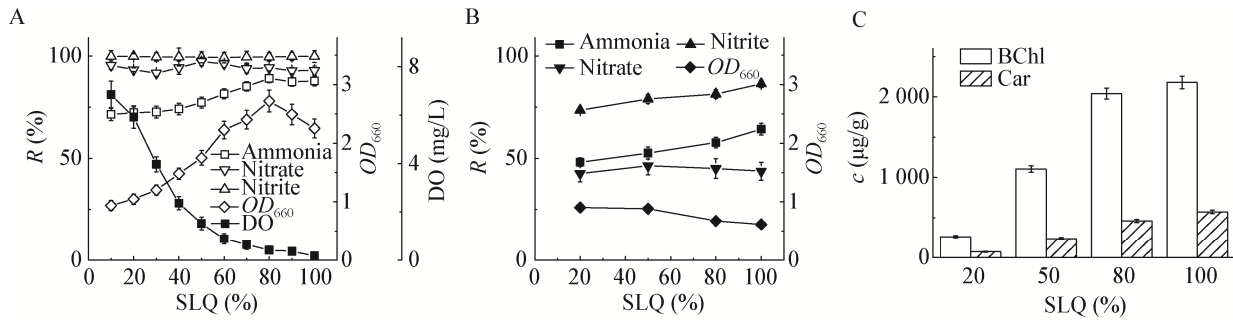


图 1 光照与黑暗条件下, 装样量对 YL28 生长、无机三态氮的去除(A, B)和细菌光合色素合成(C)的影响(5 d)
 Figure 1 Effects of sample loading quantity on the cell growth, inorganic nitrogen removal (A, B) and photopigment contents (C) under the light and dark conditions (5 d)

注: 初始氮浓度(C, mmol/L): 氨氮, 7.16; 亚硝氮, 5.67; 硝氮, 4.83.
 Note: Initial concentration (C, mmol/L): Ammonia, 7.16; Nitrite, 5.67; Nitrate, 4.83.

氧水平升高), 菌体 Car 和 BChl 含量逐渐升高, 当黑暗或装样量较低($\leq 40\%$, 即体系溶氧水平较高)时, 菌体光合色素合成受到抑制, 光合作用生长受到抑制, 菌体主要营化能生长, 但生物量较低; 光照厌氧环境中是光合生长和化能生长的总和, 菌体主要营光合作用生长(图 1A 和 1B)。

2.2 光周期对 YL28 生长和除氮特性的影响

自然光是不连续的, 光照(Light, L)/黑暗(Dark, D)交替必将影响菌体的生长及生物活性。鉴于 80%装样量时菌体生长和除氮活性最高, 进一步考察了在光照条件下 80% SLQ 时, 光周期对菌体生长和无机三态氮总去除率的影响, 结果如

图 2 所示。处理 4 d, 随着光周期光照时间的延长, 菌体生物量(OD_{660})和无机三态氮总去除率逐渐升高, 光周期 12L:12D 时菌体生物量(OD_{660})达到最大值(2.367), 无机三态氮化物总去除率为 80.28%, 进一步提高光周期光照时间, 菌体生物量(OD_{660})不再明显升高, 无机三态氮总去除率继续升高, 24 h 持续光照, 总去除率达到 92.03%; 处理 8 d, 光周期为 0L:24D 和 8L:16D 时, 体系菌体生物量(OD_{660})和无机三态氮总去除率略有升高, 继续延长光周期的光照时间, 菌体生物量和无机三态氮总去除率并没有明显升高 ($P>0.05$)。

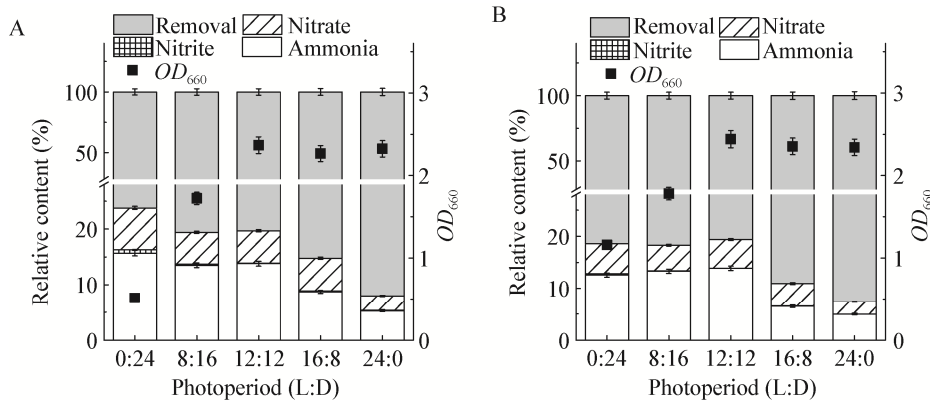


图 2 光周期对 YL28 生长和无机三态氮的去除特性
 Figure 2 Effect of photoperiod on the cell growth and inorganic nitrogen removal in co-exist inorganic nitrogen system

注: A: 4 d; B: 8 d. 初始氮浓度(C, mmol/L): 14.65; 其中氨氮, 6.32; 亚硝氮, 4.47; 硝氮, 3.86.
 Note: A: 4 d; B: 8 d. Initial concentration (C, mmol/L): 14.65, the contents of ammonia, nitrite and nitrate are respectively 6.32, 4.47 and 3.86.

2.3 基于响应面法的光、氧对细胞除氮活性的影响

依据上述研究结果,在光照条件下,不同装样量之间亚硝氮和硝氮去除率无显著差异($P>0.05$),因此只选择生物量(OD_{660})和氨氮去除率($R, \%$)作为检测指标。响应面分析试验因子和水平的设计见表1,测定结果见表2。

2.3.1 方差和置信度分析

通过 Design-Expert 8.0 软件进行二次响应面分析,得到多元二次响应面回归模型(表3)。

表1 响应面分析试验设计

Table 1 Experiment design of response surface analysis

代码 Symbol	因素 Factor	水平 Level		
		-1	0	1
A	装样量 Sample loading quantity (SLQ, %)	60	80	100
B	光照强度 Illuminance (lx)	1 000	2 500	4 000
C	光周期 Photoperiod (L:D)	8:16	16:8	24:0

表2 响应面分析试验数据结果(5 d)

Table 2 The results of response surface analysis (5 d)

分组 Run	A (%)	B (lx)	C (L:D)	生物量 Biomass (OD_{660})		氨氮去除率 Ammonia removal rate ($R, \%$)	
				测定值	预测值	测定值	预测值
				Actual	Predicted	Actual	Predicted
1	1	0	1	2.255	2.234	89.592	89.621
2	0	-1	1	1.945	1.915	83.228	80.648
3	0	0	0	2.499	2.497	86.942	85.870
4	-1	-1	0	1.494	1.402	72.807	71.194
5	0	-1	-1	1.239	1.310	62.311	63.952
6	1	1	0	1.711	1.803	77.524	79.136
7	0	0	0	2.531	2.497	86.519	85.870
8	-1	1	0	1.874	1.823	81.511	78.959
9	0	1	1	2.365	2.294	88.052	86.411
10	0	0	0	2.453	2.497	84.519	85.870
11	1	0	-1	1.761	1.639	78.319	74.126
12	0	0	0	2.545	2.497	85.519	85.870
13	0	1	-1	1.677	1.706	74.220	76.800
14	1	-1	0	1.397	1.448	65.740	68.291
15	0	0	0	2.455	2.497	85.852	85.870
16	-1	0	1	2.101	2.223	84.450	88.643
17	-1	0	-1	1.604	1.625	77.859	77.831

表3 二次响应面回归方程

Table 3 The quadratic response surface regression equation

项目 Items	多项式 Polynomial
生物量 Biomass (OD_{660})	$2.50+0.08A+0.19B+0.35C-0.38A^2-0.5B^2-0.19C^2-0.1A^2C-0.14AB^2$
氨氮去除率 Ammonia removal rate ($R, \%$)	$85.71+4.65B+8.69C-2.96A^2-8.56B^2-4.22A^2C-2.76AB^2$

对回归模型进行方差和置信度分析(表4)。结果表明,生物量和氨氮去除率模型 P 值均小于 0.000 1, 失拟值均大于 0.05, 表明二次响应面回归模型显著, 研究结果与数据模型良好拟合, 生物量和氨氮去除率两种数学模型均可用来预测研究结果。生物量回归模型相关系数 $R^2=0.996$, 氨氮去除率回归模型相关系数 $R^2=0.965$, 表示模型对生物量和氨氮去除率的数据解释量分别为 99.6%和 96.5%, 试验方法可行性水平高。 CV 值表示模型变异系数, CV 值越大, 表示研究可靠性越低。结果显示, 生物量回归模型 $CV=1.92\%$, 氨氮去除率回归模型 $CV=2.30\%$, 表明研究操作可靠性高。模型方程中, 生物量各因素单项、平方项和 A^2C 、 AB^2 , 氨氮去除率 B 、 C 、 A^2 、 B^2 、 A^2C 、 AB^2 六因素的 P 值均小于 0.01, 表明这些因素对其响应具有显著性影响。根据 F 值可判断各因素对生物量、氨氮去除率的影响力, 生物量模型依次为 C (光周期) $>B$ (光照强度) $>A$ (装样量), 氨氮去除率模型依次为 C (光周期) $>B$ (光照强度), 装样量对氨氮去除能力影响不显著($P>0.05$)。

2.3.2 菌体生长和氨氮去除响应面分析及其验证

为更直观地体现各因子交互对生物量和氨氮去除的影响, 进一步对其等高线图、3D 响应面图进行分析, 结果如图3所示。对二次方数学模型进行解析表明, 当 SLQ 为 80.80%、光照强度为 2 838.15 lx、光周期为 24L:0D 时, 菌体生长和氨氮去除率达到理论最佳水平, 预测值分别为 2.680 和 95.0%。

为验证模型可行性, 将所获取的最佳条件进行验证, 结果如表5所示。以 80% SLQ、光照强度 2 800 lx、光周期 24L:0D 为最佳工艺, 进行平行试

表 4 二次方模型方差和置信度分析

Table 4 The variance and confidence analysis of quadratic model

项目 Items	生物量 Biomass (OD_{660})					项目 Items	氨氮去除率 Ammonia removal rate ($R, \%$)				
	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value		平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
Model	3.06	8	0.38	259.67	<0.000 1	Model	944.50	6	157.42	46.12	<0.000 1
A	0.02	1	0.02	16.41	0.004 0	B	173.18	1	173.18	50.74	<0.000 1
B	0.30	1	0.30	204.31	<0.000 1	C	301.86	1	301.86	88.44	<0.000 1
C	0.49	1	0.49	330.50	<0.000 1	A^2	36.89	1	36.89	10.81	0.008 0
A^2	0.60	1	0.60	406.73	<0.000 1	B^2	309.26	1	309.26	90.61	<0.000 1
B^2	1.06	1	1.06	717.76	<0.000 1	A^2C	35.63	1	35.63	10.44	0.009 0
C^2	0.15	1	0.15	102.74	<0.000 1	AB^2	30.55	1	30.55	8.95	0.014 0
A^2C	0.02	1	0.02	13.88	0.006 0	Residual	34.13	10	3.41		
AB^2	0.04	1	0.04	27.63	0.001 0	Lack of fit	30.61	6	5.10	5.80	0.255 0
Residual	0.01	8	0.00			Pure error	3.52	4	0.88		
Lack of fit	0.00	4	0.00	0.63	0.668 0	Cor total	978.63	16			
Pure error	0.01	4	0.00			Standard deviation	1.85				
Cor total	3.07	16				CV (%)	2.30				
Standard deviation	0.04					R^2	0.965				
CV (%)	1.92					Adeq precision	22.51				
R^2	0.996										
Adeq precision	44.17										

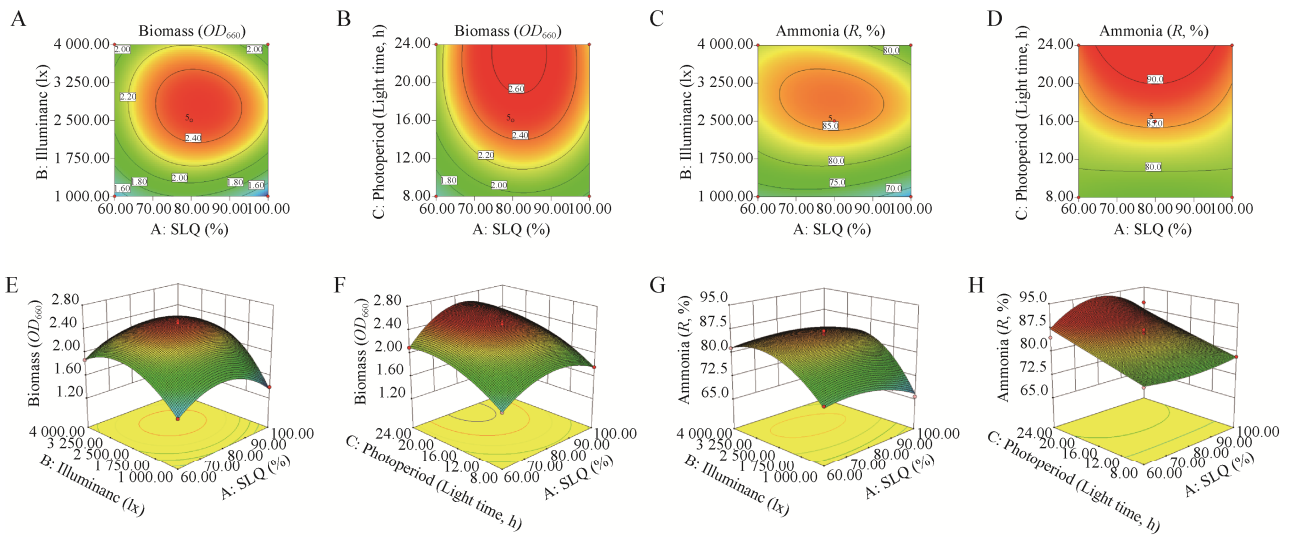


图 3 生物量及氨氮去除率等高线图(A-D)和响应面图(E-H)

Figure 3 The contour plot (A-D) and response surface map (E-H) of biomass and the removal rate of ammonia

注: A 和 E: 装样量与光照强度对菌体生物量(OD_{660})的影响; B 和 F: 装样量与光周期对菌体生物量(OD_{660})的影响; C 和 G: 装样量与光照强度对氨氮去除率的影响; D 和 H: 装样量与光周期对氨氮去除率的影响。

Note: A and E: Effects of SLQ and illuminance on biomass (OD_{660}); B and F: Effects of SLQ and photoperiod (Light time, h) on biomass (OD_{660}); C and G: Effects of SLQ and illuminance on removal rate of ammonia; D and H: Effects of SLQ and photoperiod (Light time, h) on removal rate of ammonia.

表 5 菌体细胞培养条件优化前后细胞活性参数比较
Table 5 Comparison of cell activity between before optimization and after optimization

项目 Items	A (%)	B (lx)	C (L:D)	生物量 Biomass (OD_{660})	氨氮去除率 Ammonia removal rate (R, %)
优化前 Before optimization	100	2500	24:0	2.124	79.68
预测值 Predicted value	80.80	2 838.15	24:0	2.680	95.00
优化后 After optimization	80.00	2 800.00	24:0	2.576	93.79

验, 获得生物量平均值为 2.576 (RSD=0.132, $n=3$), 与理论相差 3.88%, 比对照提高了 21.28%; 氨氮去除率平均值为 93.79% (RSD=2.42, $n=3$), 与理论相差 1.21%, 比对照提高了 14.11%。因此, 基于响应面法所获得的海洋着色菌 YL28 生物除氮过程的光氧参数具有一定的实际应用价值。

2.3.3 期望分析

对上述结果进行期望分析, 并选择最大期望水平的 95% 所对应培养条件区间作为实际应用操作条件(图 4)。结果表明, 理论预测的最佳条件期望值为 0.841, 选择优化后最大期望水平的 95% (0.799) 所对应培养条件区间, 即装样量 72%–89%、光照强度 2 240–3 460 lx, 光周期为 21L:3D–24L:0D 时, 即可达到期望水平的 95% 以上, 菌体生物量和氨氮去除率分别达到 2.55 和

90% 以上。在上述研究中, 黑暗条件下, 80% SLQ 非开放体系菌体生物量(OD_{660})和氨氮去除率分别为 0.635 和 57.65%, 分别达到最大期望水平的 23.69% 和 60.68%, 表明在黑暗条件下, 菌体虽然生长较低, 但依旧可保持较好的氨氮去除特性, 为海洋着色菌 YL28 在生物除氮过程的环境适应性奠定了良好基础。

3 讨论与结论

环境因素(光、氧、pH、盐度和温度等)、营养物质(C、N、P 和生长因子等)和有害物质胁迫等均对微生物生长与代谢有影响。对 APB 而言, 光氧是影响其代谢活性的两个重要因子。已有研究表明: 在光照厌氧环境中, APB 具有良好的生长和去除无机三态氮能力, 例如陈燕红等研究表明, *Rps. palustris* 2-8 在光照厌氧条件下, 当亚硝氮添加量为 2.4 mg/L 时, 其去除率达 95.58%^[26]; 席寅峰等研究表明, 在光强 3 000–5 000 lx 和硝氮添加量 200 mg/L 时, *Rhodospseudomonas* sp. PSB-3 对模拟污染水体处理 96 h, 其硝氮去除率为 20.65%^[27]。在光照好氧环境中, 一些 APB 菌株也具有良好生长能力, 但对溶氧需求不同, 例如岳慧英等研究表明, *Rhodobacter azotoformans* 134K20 在光照好氧条件下的生物量高于黑暗好氧和光照厌氧^[28]。林而舒等研究表明, 当溶氧量为 0.9 mg/L、氨氮初

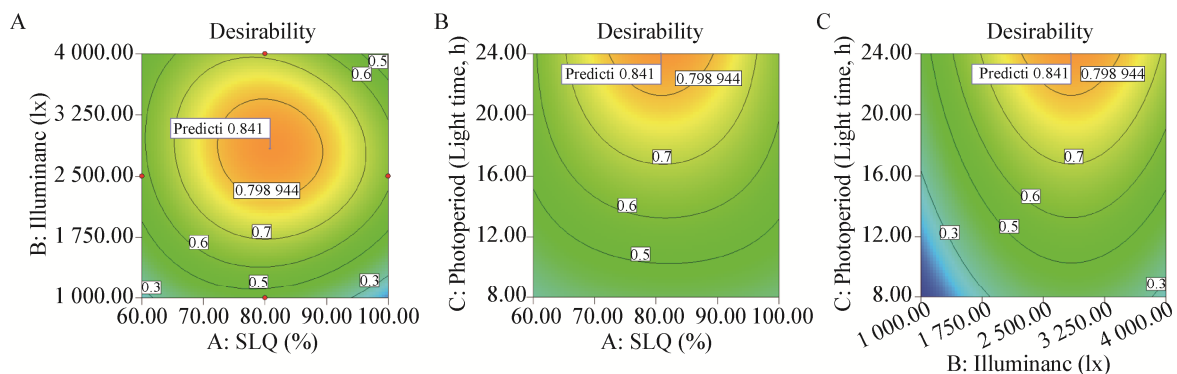


图 4 环境因素对菌体活性等高线期望的影响

Figure 4 Interaction effects of environmental factors on the contour expectation of bacterial activity

注: A: 装样量与光照强度的期望; B: 装样量与光周期的期望; C: 光照强度与光周期的期望。

Note: A: Desirability of SLQ and illuminance; B: Desirability of SLQ and photoperiod (Light time, h); C: Desirability of illuminance and photoperiod (Light time, h).

始浓度为 50 mg/L 时, *Enterobacter asburiae* YT 氨氮去除率达 85%以上^[29]。刘道玉等研究表明, 在 DO 为 3.0–3.5 mg/L 的养殖水体中, 当氨氮、亚硝氮和硝氮含量分别为 2.62、0.35 和 0.59 mg/L 时, *Paracoccus denitrificans* 对其最大去除率分别为 49.23%、42.86%和 67.74%^[30]。本课题组前期研究表明, 紫色硫细菌 YL28 是一株高耐盐和去除高浓度无机三态氮的 APB 菌株^[11,18], 不仅能以亚硝酸盐为唯一氮源进行生长代谢^[19], 最大去除或耐受浓度分别为 200 mg/L 和 500 mg/L 以上^[20], 可同时对亚硝氮和氨氮具有良好去除作用, 是迄今报道的具有高耐盐特性的对亚硝氮去除能力最高的 APB 菌株之一^[18,20]。反硝化作用脱除硝氮和亚硝氮通常是在厌氧环境中进行的, 继 Robertson 等^[31]首次发现好氧反硝化菌后, 其它的好氧反硝化菌不断被报道^[32–35], 但鲜有好氧反硝化 APB 的报道^[36]。本研究表明, 紫色硫细菌 YL28 去除三态无机氮的最适条件是光照厌氧环境, 但在黑暗好氧环境中仍具有良好除氮能力, 当氨氮和亚硝氮初始浓度分别为 7.16 mmol/L 和 5.67 mmol/L 时, 随着 SLQ 的变化, 氨氮和亚硝氮去除率分别在 48.07%–64.27%和 73.51%–86.42%之间。此外, 在光照(2 500 lx)条件下, 当 DO 在 0.17–6.85 mg/L 范围内时, YL28 对硝氮和亚硝氮的高效去除能力不受 DO 的影响, 该菌株具有非常宽泛的 DO 适应范围。硝氮和亚硝氮不是 APB 生长的良好氮源^[19], 在无机三态氮共存体系中, 硝氮和亚硝氮的去除主要通过反硝化过程^[17,25], 因而该 YL28 也可称之为好氧反硝化菌。

综上所述, 本研究以高浓度无机三态氮(氨氮、亚硝氮和硝氮)共存的海水体系为模型, 通过研究光氧对 YL28 生物除氮的影响, 阐明了海洋着色菌 YL28 生物除氮与环境因子光氧的内在联系, 获得生物除氮的最适光氧条件, 相比于优化前, 菌体生物量(OD_{660})提高了 21.28%, 氨氮去除量达到 6.32 mmol/L, 其去除率提高了 14.11%, 且光照厌氧和/或好氧环境中, 亚硝氮和硝氮的去除无明显差异, 由此发现 YL28 菌株具有好氧反硝化作用。

通过期望分析, 反应容器装样量为 72%–89% (DO, 0.26–0.63 mg/L)、光照强度为 2 240–3 460 lx、光周期为 21L:3D–24L:0D 的条件下, 该菌株生长和除氮活性仍可达到最佳活性的 95%以上。

REFERENCES

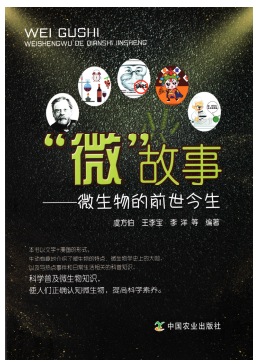
- [1] Gogineni V, Hamann MT. Marine natural product peptides with therapeutic potential: Chemistry, biosynthesis, and pharmacology[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2018, 1862(1): 81–196
- [2] Canfield DE, Glazer AN, Falkowski PG. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle[J]. *Science*, 2010, 330(6601): 192–196
- [3] Duce RA, LaRoche J, Altieri K, et al. Impacts of atmospheric anthropogenic nitrogen on the open ocean[J]. *Science*, 2008, 320(5878): 893–897
- [4] Ni ZF, Wu XG, Li LF, et al. Pollution control and *in situ* bioremediation for lake aquaculture using an ecological dam[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 172: 2256–2265
- [5] Luo S, Wu BL, Xiong XQ, et al. Short-term toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to early life stages of the rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, 35(6): 1422–1427
- [6] Zhou T, Yu DS, Li J, et al. Substrate inhibition and kinetic characteristics of marine anaerobic ammonium oxidizing bacteria treating saline wastewater[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(12): 5162–5168 (in Chinese)
周同, 于德爽, 李津, 等. 海洋厌氧氨氧化菌处理含海水污水的基质抑制及其动力学特性[J]. *环境科学*, 2017, 38(12): 5162–5168
- [7] Thamdrup B. New pathways and processes in the global nitrogen cycle[J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2012, 43(1): 407–428
- [8] Pan YY, Zhou BH, Ma FS, et al. Secondary effluent of dyeing wastewater treatment plant with sulfur autotrophic denitrification[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(7): 4073–4078 (in Chinese)
潘永月, 周北海, 马方曙, 等. 印染废水处理厂二级出水的硫自养反硝化脱氮工艺[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(7): 4073–4078
- [9] Bi CX, Yu DS, Du SM, et al. Nitrite accumulation characteristics of partial denitrification in different sludge sources using sodium acetate as carbon source[J]. *Environmental Science*, 2019, DOI: 10.13227/j.hjcx.201806166 (in Chinese)
毕春雪, 于德爽, 杜世明, 等. 乙酸钠作为碳源不同污泥源短程反硝化过程亚硝酸盐积累特性[J]. *环境科学*, 2019, DOI: 10.13227/j.hjcx.201806166
- [10] Li T, Cao JW, Xie FL, et al. ABR Decarbonization-nitrosation coupled with anammox treat municipal wastewater[J]. *Environmental Science*, 2019. DOI: 10.13227/j.hjcx.201808126 (in Chinese)
李田, 曹家炜, 谢凤莲, 等. ABR 除碳-亚硝化耦合厌氧氨氧化处理城市污水 [J]. *环境科学*, 2019. DOI:

- 10.13227/j.hjcx.201808126
- [11] Zhang XB, Zhu BT, Chan ZH, et al. Effect of organic carbons on the removal of inorganic nitrogen coexisting in marine aquaculture by a marine purple sulfur bacterium, *Marichromatium gracile* YL28[J]. Microbiology China, 2017, 44(5): 1017-1027 (in Chinese)
张晓波, 朱笔通, 产竹华, 等. 有机碳对海洋着色菌 YL28 去除无机三态氮的影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1017-1027
- [12] Gardner WS, McCarthy MJ. Nitrogen dynamics at the sediment-water interface in shallow, sub-tropical Florida Bay: why denitrification efficiency may decrease with increased eutrophication[J]. Biogeochemistry, 2009, 95(2/3): 185-198
- [13] Strauss EA, Richardson WB, Cavanaugh JC, et al. Variability and regulation of denitrification in an Upper Mississippi River backwater[J]. Journal of the North American Benthological Society, 2006, 25(3): 596-606
- [14] Zheng XF, Tang JY, Zhang CF, et al. Bacterial composition, abundance and diversity in fish polyculture and mussel-fish integrated cultured ponds in China[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(7): 3950-3961
- [15] Zheng XF, Tang JY, Ren G, et al. The effect of four microbial products on production performance and water quality in integrated culture of freshwater pearl mussel and fishes[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(9): 4897-4909
- [16] Yang W, Zheng C, Zheng ZM, et al. Nutrient enrichment during shrimp cultivation alters bacterioplankton assemblies and destroys community stability[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 156: 366-374
- [17] Jiang P, Zhao CG, Yang SP. Influences of low-molecular-weight organic carbon and nitrogen sources on growth and inorganic nitrogen removal by *Marichromatium gracile* strain YL28[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(6): 1218-1224 (in Chinese)
蒋鹏, 赵春贵, 杨素萍. 小分子有机碳、氮源对海洋着色菌 (*Marichromatium gracile*) 生长和去除高浓度无机三态氮的影响[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(6): 1218-1224
- [18] Zhao JY, Fu YN, Zhao CG, et al. Identification and characterization of a purple sulfur bacterium from mangrove with rhodopin as predominant carotenoid[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(10): 1318-1325 (in Chinese)
赵江艳, 傅英楠, 赵春贵, 等. 一株高含玫红品的红树林海洋紫色硫细菌分离鉴定及特性[J]. 微生物学报, 2011, 51(10): 1318-1325
- [19] Jiang P, Zhao CG, Jia YQ, et al. Inorganic nitrogen removal by a marine purple sulfur bacterium capable of growth on nitrite as sole nitrogen source[J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 824-831 (in Chinese)
蒋鹏, 赵春贵, 贾雅琼, 等. 以亚硝酸为唯一氮源生长的海洋紫色硫细菌去除无机三态氮[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 824-831
- [20] Jiang P, Zhao CG, Jia YQ, et al. Effects of nitrite on ammonia-nitrogen removal and nitrite-nitrogen as well as photopigment biosynthesis of *Marichromatium gracile* YL28[J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1216-1223 (in Chinese)
蒋鹏, 赵春贵, 贾雅琼, 等. 亚硝酸对海洋着色菌亚硝酸和氨氮去除以及光合色素合成的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1216-1223
- [21] Jiang P, Hong X, Zhao CG, et al. Reciprocal transformation of inorganic nitrogen by resting cells of *Marichromatium gracile* YL28[J]. Journal of Huaqiao University (Natural Science), 2015, 36(2): 185-189 (in Chinese)
蒋鹏, 洪璇, 赵春贵, 等. 海洋着色菌 *Marichromatium gracile* YL28 静息细胞对无机三态氮的相互转化作用[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2015, 36(2): 185-189
- [22] Zhang XB, Zhao CG, Hong X, et al. Genome sequence of *Marichromatium gracile* YL-28, a purple sulfur bacterium with bioremediation potential[J]. Genome Announcements, 2016, 4(3): e00288-16
- [23] Zhu BT, Zhang XB, Zhao CG, et al. Comparative genome analysis of marine purple sulfur bacterium *Marichromatium gracile* YL28 reveals the diverse nitrogen cycle mechanisms and habitat-specific traits[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 17803.
- [24] Zhuo MQ, Zhao CG, Cheng QR, et al. Fingerprinting analysis of photopigments in purple bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(6): 760-768 (in Chinese)
卓民权, 赵春贵, 程茜茹, 等. 紫细菌光合色素指纹图谱的建立与色素分析[J]. 微生物学报, 2012, 52(6): 760-768
- [25] Hong X, Chen ZW, Zhao GC, et al. Nitrogen transformation under different dissolved oxygen levels by the anoxygenic phototrophic bacterium *Marichromatium gracile*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33: 113
- [26] Chen YH, Yang ZH, Yu GH, et al. Influence of illumination, oxygen, pH and salinity on growth and nitrite removal effect of *Rhodospseudomonas palustris* strain 2-8[J]. South China Fisheries Science, 2010, 6(4): 1-5 (in Chinese)
陈燕红, 杨紫红, 喻国辉, 等. 光照、氧气、pH 和盐度对沼泽红假单胞菌 2-8 菌株生长和亚硝酸盐消除的影响[J]. 南方水产, 2010, 6(4): 1-5
- [27] Xi YF, Zhang MJ, Huang XS, et al. Isolation and identification of a photosynthetic bacteria strain and its ability of denitrification[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(27): 14847-14849, 14875 (in Chinese)
席寅峰, 张孟婧, 黄小帅, 等. 1 株光合细菌的分离鉴定及其脱氮能力研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(27): 14847-14849, 14875
- [28] Yue HY, Huang X, Zhao CG, et al. Regulation mechanism of photopigments biosynthesis via light and oxygen in *Rhodobacter azotoformans* 134K20[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(3): 331-336 (in Chinese)
岳慧英, 黄潇, 赵春贵, 等. 不产氧光合细菌光合色素的光氧调控机制[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 331-336
- [29] Lin ES, Tao X, Hu KH, et al. First exploration on the denitrification capability of a strain of enterobacterium and its simultaneous nitrification and denitrification mechanisms[J]. Industrial Water Treatment, 2018, 38(11): 21-26 (in Chinese)
林而舒, 陶欣, 胡开辉, 等. 1 株肠杆菌脱氮性能及其同步硝化反硝化机制初探[J]. 工业水处理, 2018, 38(11): 21-26

- [30] Liu DY, Fan LM, Wang Q, et al. The aerobic denitrification characteristics of paracoccus denitrificans and its nitrogen control for aquaculture water[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2012, 31(11): 2249-2255 (in Chinese)
刘道玉, 范立民, 王琼, 等. 脱氮副球菌的好氧反硝化特性及对养殖水体中氮素的控制[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(11): 2249-2255
- [31] Robertson LA, van Niel EWJ, Torremans RAM, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(11): 2812-2818
- [32] Jin R, Liu T, Liu G, et al. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the marine origin bacterium *Pseudomonas* sp. ADN-42[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 175(4): 2000-2011
- [33] Yao S, Ni JR, Ma T, et al. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2[J]. Bioresource Technology, 2013, 139: 80-86
- [34] Huang XF, Li WG, Zhang DY, et al. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification at low temperature[J]. Bioresource Technology, 2013, 146(10): 44-50
- [35] Zhao B, He YL, Zhang XF. Nitrogen removal capability through simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Bacillus* sp. LY[J]. Environmental Technology, 2010, 31(4): 409-416
- [36] Li GZ, Lai QL, Shao ZZ, et al. Research progress of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria[J]. Biotic Resources, 2018, 40(5): 419-429 (in Chinese)
李贵珍, 赖其良, 邵宗泽, 等. 异养硝化-好氧反硝化细菌的研究进展[J]. 生物资源, 2018, 40(5): 419-429

书 讯

“微”故事——微生物的前世今生



作者: 虞方伯, 王李宝, 李洋等编著
 出版: 中国农业出版社
 责任编辑: 魏兆猛
 I S B N : 978-7-109-24361-3
 定价: 49.8 元
 开本: 16
 装帧: 平装
 页码: 186

《“微”故事——微生物的前世今生》近日已正式出版, 全书分为吾我微生物、微生物学大咖、饮食中的门道、可怖的微生物、微生物与农业、微生物与环境, 以及脑洞大开 7 个篇章, 内含 67 个故事。本书情景结合, 生动有趣、通俗易懂, 即可作为微生物类课程教学辅助书籍, 还可用于科学文化普及。

本书运用风趣幽默的语言、贴近感受和人们生活的事例, 将奇妙的微生物世界展现给读者, 继承传统经典的同时, 与时俱进不失前瞻性, 真正做到了寓教于乐、耳目一新。既有《列文虎克的显微镜》这样的经典知识, 又有《紫色细菌, 第一个被发现的外星生物?》这样的前瞻性进展, 以及与《微生物社交法则——群体感应》相似的秘闻披露。在感慨《制曲酿酒》中先人智慧之余, 不忘《汤飞凡与沙眼衣原体》中汤先生事迹之荣光……

订购方式: (1) 中国农业出版社微店: <https://weidian.com/item.html?itemID=2718623792>
 (2) 全国各大书店均有销售(或扫描下方二维码进行购买)

