

有机碳对氨氧化细菌及氨氧化古菌的影响

胡 燕¹, 许轶菁²

(1. 无锡市梁溪区住房和城乡建设局, 江苏 无锡 214000;
2. 无锡市河道堤闸管理处, 江苏 无锡 214000)

摘要: 氮是水生态系统初级生产力的限制性生源要素, 也是造成黑臭水体的重要污染物。微生物是氮循环的驱动泵, 硝化作用及反硝化是微生物的特有过程, 也是氮素生物地球化学循环以及氮素去除过程中最为关键的步骤。通过分析体系中氮转化、氨氧化古菌(AOA)及氨氧化细菌(AOB)数量和活性对不同有机碳的响应发现, 有机碳的添加增大了氨氧化古菌在氨氧化菌群中的比例, 而氨氧化细菌比氨氧化古菌对铵根离子的降低更为敏感体系的潜在硝化速率与氨氧化细菌的氨单加氧酶基因拷贝数具有正向相关性。本研究结果对如何通过促进水体自身氮转化活性而快速削减水体中氨氮提供了指导。

关键词: 氨氮; 有机碳; 氨氧化细菌; 氨氧化古菌; 潜在硝化能力

中图分类号: X703

文献标识码: B

文章编号: 1007-7839 (2019) 01-0052-04

Effects of organic carbon on ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea

HU Yan¹, XU Yijing²

(1. *Liangxi District Housing and Urban-Rural Development Bureau of Wuxi City, Wuxi 214000, Jiangsu;*
2. *River and Dike Gate Management Office of Wuxi City, Wuxi 214000, Jiangsu*)

Abstract: Nitrogen is a limiting factor of primary productivity in aquatic ecosystem, and also an important pollutant causing black and odorous water. Microorganism is the driving pump of nitrogen cycle. Nitrification and denitrification are the unique processes of microorganism, and also the most critical steps in nitrogen biogeochemical cycle and nitrogen removal process. By analyzing the response of nitrogen transformation, the quantity and activity of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) to different organic carbon, it was found that the addition of organic carbon increased the proportion of ammonia-oxidizing archaea in ammonia-oxidizing bacteria, and that ammonia-oxidizing bacteria were more sensitive to the reduction of ammonium ion than ammonia-oxidizing archaea. The potential nitrification rate of the system is positively correlated with the ammonia monooxygenase gene copy number of the ammonia-oxidizing bacteria. The results provided guidance on how to rapidly reduce ammonia nitrogen in water by promoting the nitrogen conversion activity of water body.

Key words: ammonia nitrogen; organic carbon; ammonia-oxidizing bacteria; ammonia-oxidizing archaea; potential nitrification capacity

收稿日期: 2018-08-10

作者简介: 胡燕(1968—), 女, 硕士, 主要从事河道管理、整治工作。

1 概述

水体中氨氮浓度的升高不仅会造成水体富营养化,更会影响到水生态系统健康,并导致黑臭水体的形成。黑臭水体普遍存在着氨氮浓度过高的问题,因此在治理中如何有效降低氨氮浓度并维持是重点。氨氧化菌广泛存在于水体和底泥中,并在氨氧化过程中发挥着重要的作用^[1]。

在水体生态修复过程中,水生植物根际是微生物集中和活跃的区域。由于植物的存在而形成的根际微生态环境,对于只能由细菌完成的硝化和反硝化过程具有重要作用。水生植物根系释放的氧气以及分泌的有机碳对微生物活动有显著影响^[2],而这些作用对氨氧化菌数量及活性的影响还不清楚。

2 材料与方法

2.1 模拟生态系统的建立

用圆形鱼缸承装 1.5 L 底泥,上覆水 2 ~ 3 cm,保鲜膜覆盖,25 °C 暗培养。选择添加不同的有机碳作为单一变量,选用葡萄糖,谷氨酸,乙酸钠设计实验。设计 4 个组,分别为:无外加有机碳源,和分别添加 20 mg/L 的葡萄糖、谷氨酸和乙酸钠。预培养 1 d 后开始处理。在处理开始后 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d 取样,测定氮素指标并对氨氧化古菌(AOA)及氨氧化细菌(AOB)的氨单加氧酶(*amoA*)基因进行定量 PCR (qPCR) 分析。

2.2 理化指标测试

NH_4^+-N 、 NO_3^--N 和 NO_2^--N 均参考《水和废水监测分析方法》进行测定。

2.3 硝化能力(PNR)的测定

在 50 ml 离心管中加入 5.0 g 新鲜底泥,加入 20 ml 磷酸盐缓冲液(PBS),再加入 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。悬浮物在黑暗的培养箱中培养 24 h, 25 °C。之后亚硝酸盐用 5 ml, 2 M KCl 提取,即加入 5 ml, 2 M KCl, 离心,后加入硫胺类药剂,与萘乙烯联胺在 540 nm 处测量吸光度,测定亚硝态氮的含量。

2.4 氨氧化菌的定量 PCR 分析

用 Mo Bio 土壤总 DNA 提取试剂盒, Premix ExTaq, 氨氧化古菌的氨单加氧酶(AOA-*amoA*)基因用引物 Arch-*amoA*F 和 Arch-*amoA*R 扩增,氨氧化细菌的氨单加氧酶(AOB-*amoA*)基因用引物 *amoA*-1F 和 *amoA*-2R 进行扩增^[3]。

3 结果与分析

3.1 不同形态氮的动态变化

对各试验组的氨态氮变化进行分析,结果见图 1。所有处理中铵态氮浓度大体上呈现降低的趋势,这与氨氧化微生物具有密切关系。但铵态氮并不是持续降低的,这可能与一些异养菌对体系中有机的分解有关,异养微生物通过矿化作用使有机氮转化为铵根离子,造成铵根离子浓度的上升。试验结束时对照组,葡萄糖组, L- 谷氨酸组以及乙酸钠组的最终铵态氮下降率分别为 55.6%, 93.9%, 61.6%, 74.0%, 各处理组的铵态氮下降率高于对照组,而其中添加葡萄糖时铵态氮的转化率最大,说明葡萄糖这类易利用碳源可以在一定程度上促进氨氮的转化。

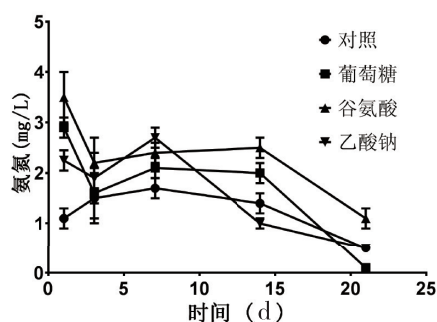


图 1 铵态氮变化图

对实验各组的亚硝态氮变化进行分析,结果见图 2。亚硝态氮都有升高的趋势,到 21 d 时,对照组,葡萄糖组,谷氨酸组和乙酸钠组的亚硝酸盐浓度分别达到了 0.0458, 0.0482, 0.0295 和 0.0382 mg/L。但对照组与葡萄糖组,谷氨酸组以及乙酸钠组的亚硝态氮浓度并不存在显著性差异。亚硝态氮主要为硝化、反硝化的产物,其含量可以在一定程度上反映水体中微生物的活跃程度,亚硝态氮含量

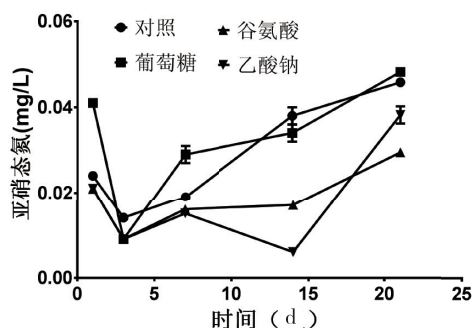


图 2 亚硝态氮变化图

的增加也表明体系中氨氧化菌的活性逐渐增强。

对实验各组的硝态氮变化进行分析,结果见图3。对照组和葡萄糖组中硝态氮浓度出现了升高的趋势,而谷氨酸组和乙酸钠组中硝态氮浓度却有所下降,但下降幅度并不大。硝态氮浓度的升高是硝化作用的结果,而硝态氮浓度的下降则说明谷氨酸组和乙酸钠组中发生了反硝化作用,但这种下降仅开始于谷氨酸组的第14 d后和乙酸钠组的第7 d后,且下降幅度并不大,谷氨酸组和乙酸钠组的硝态氮水平分别从第14 d,第7 d起降低了44.8%和30.6%。乙酸钠组和谷氨酸组的硝态氮浓度在后期有所下降,这说明体系中发生了反硝化作用。不同有机碳源对反硝化菌的影响并不相同,而乙酸是富集反硝化除磷菌的有效碳源^[4],从而促进氮的转化过程。

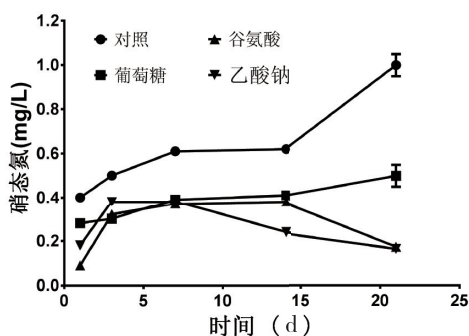


图3 硝态氮变化图

3.2 潜在硝化能力(PNR)的变化

实验各组中PNR的变化趋势如图4所示。潜在硝化能力均出现了先降低再升高最后又降低的变化情况。21 d时,PNR显著降低,对照组,葡萄糖组,谷氨酸组以及乙酸钠组的PNR数值分别为0.0231、0.0127、0.0023、0.0155 $\mu\text{g/g/d}$ 。这与硝化产物的积累以及氨氮的降低有关,氨氮是氨氧化菌的能量物质,实验后期的低氨氮对氨氧化菌活性产生一定的影响,进而对体系的潜在硝化速率造成影响。但在实际水体中,一直存在着与外界水体的交换,所以在短时间内不会出现因氨氮浓度降低所导致的硝化能力下降的问题。但从图4可以看出,乙酸钠相比其他处理组能更好地促进硝化能力的提升,这可能与乙酸钠能够促进反硝化作用,减少硝化产物,从而促进了硝化反应的进行。

3.3 氨氧化古菌(AOA)及氨氧化细菌(AOB)的丰度变化

实验各组中氨氧化古菌(AOA)的丰度变化

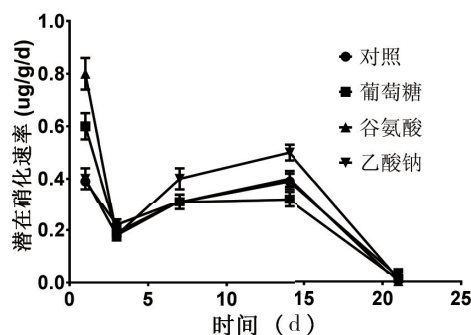


图4 潜在硝化能力变化图

如图5所示。随着时间的推移,各组中氨氧化古菌的 *amoA* 基因拷贝数都有增加的趋势,但均高于 10^5 copies/g。同一时间点时,各处理组的拷贝数大多大于对照组,但这种增加并不显著。

在进行处理1周后,对照组,葡萄糖组,谷氨酸组以及乙酸钠组的氨氧化古菌的 *amoA* 基因拷贝数分别是各组处理后1 d的 AOA-*amoA* 基因拷贝数的1.9倍,3.4倍,1.6倍,2.6倍。而到了21 d时,对照组,葡萄糖组,谷氨酸组以及乙酸钠组的 AOA-*amoA* 基因拷贝数都达到了 10^6 以上,分别是各组处理后1 d的 AOA-*amoA* 基因拷贝数的3.0倍,13.3倍,3.4倍,8.8倍。其中,葡萄糖组 AOA-*amoA* 基因拷贝数增加得最多,对照组增加得最少。各组体系间隙水中铵态氮的浓度到21 d时都下降了50%以上,但从 AOA-*amoA* 基因拷贝数的变化情况来看,氨氧化古菌的丰度并没有受到铵态氮下降的影响。

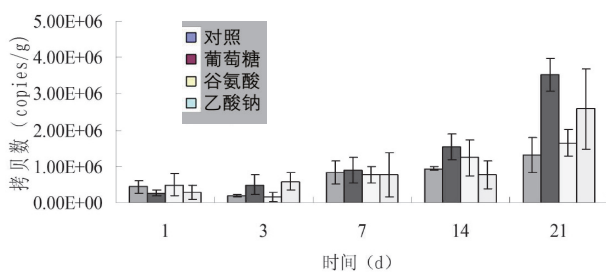


图5 氨氧化古菌的 *amoA* 基因拷贝数变化

实验各组中氨氧化细菌(AOB)的丰度变化如图6所示。前7 d AOB-*amoA* 基因拷贝数都有所增加,到第7 d时,对照组,葡萄糖组,谷氨酸组以及乙酸钠组的 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数分别是各组处理后1天的 AOB-*amoA* 基因拷贝数的5.9倍,2.5倍,2.1倍,2.4倍,且对照组 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数大于其他处理组的 AOB-*amoA*

基因拷贝数。

第 14 d 时, 各组 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数都出现了明显的下降, 对照组和葡萄糖组甚至在第 21 d 时降到了 10^2 左右, AOB 的这种变化应与体系中铵根离子的降低有关, 对比 AOA 及 AOB 的变化, 说明相比于 AOA, AOB 对铵根离子的变化更为敏感。同时发现 AOB 的变化与 PNR 的变化具有一致性, 这说明 AOB 的丰度与体系的潜在硝化速率具有正向相关性。

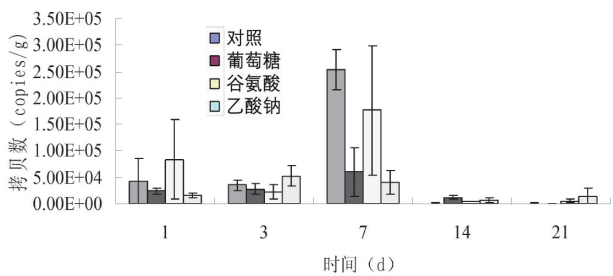


图 6 氨氧化细菌的 *amoA* 基因拷贝数变化

AOB 的 *amoA* 基因拷贝数比 AOA 的低 1 ~ 2 个数量级。每个 AOB 和 AOA 细胞中分别有 2.5 和 1 个 *amoA* 基因拷贝^[3], 以此计算得到 AOA/AOB 的细胞数比率。从表 1 中可以看出, 各组各时间点 AOA 的细胞数总是多于 AOB 的细胞数, 从十几倍到几千倍, 这也说明了 AOA 种群数量在氨氧化菌群中的绝对优势。

表 1 氨氧化古菌 / 氨氧化细菌丰度比率表

	对照	葡萄糖	谷氨酸	乙酸钠
1	25.6	27.4	14.6	44.2
3	13.4	45.5	17.4	27.9
7	8.4	37.5	10.9	48.0
14	2347.8	320.0	619.7	269.5
21	5807.6	16842.3	841.5	494.5

注: C- 对照组 G- 葡萄糖组 L-L- 谷氨酸组 NA- 乙酸钠组

添加有机碳的实验组中 AOA 的比率大于对照组中 AOA 的比率, 尤其是葡萄糖组和乙酸钠组中这种现象更明显。这说明有机碳的添加增大了 AOA 在氨氧化菌群中的比例, 使其在该体系中

的氨氧化菌群落中占据主导地位。AOA 在植物根际环境中占据主导地位^[5], 而其中的原因可能是 AOA 比 AOB 能更好地适应根际环境中的微氧状态, 也有可能是植物根系分泌物对 AOA 的促进作用更为显著。而有机碳即是植物根系分泌的重要物质之一。

各组 PNR 数值的变化与 AOB-*amoA* 基因拷贝数变化的一致性, 说明 AOB 的种群数量与体系的潜在硝化速率具有正向相关性。但从数据来看, 并没有发现 AOA 对潜在硝化速率的显著性贡献。这种相关性的缺乏, 可能是因为微生物群落中 AOA 是不活跃的, 或者说的不稳定的组成, 而较高的氨氧化速率主要依赖于非常活跃的 AOB。也有可能是因为 AOA 具有选择性的能源来源, 因此在硝化作用中并不活跃。因为高氨氮而造成的黑臭水体的修复过程中, 在氨氮浓度仍较高时, 应当以促进 AOB 的生物量及活性为主, 以保证氨氮的快速转化和去除, 而当氨氮降低至一定浓度时, 进行水生植物的大力修复, 以构建稳定高活性的氮转化生态体系, 保证水质的长效维持。

参考文献:

[1] Nicol G.W., Schleper C.Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle?[J] . Trends in Microbiology, 2006, 14 (5) :207-212 .

[2] Karjalainen H., Stefansdottir G., Tuominen L. et al.Do submersed plants enhance microbial activity in sediment? [J] . Aquatic Botany, 2001, 69 (1) :1-13 .

[3] Leininger S., Urich T., Schloter M. et al.Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils.[J] . Nature, 2006, 442: 806-809 .

[4] 吉芳英, 杨勇光, 万小军等 . 碳源种类对反硝化除磷系统运行状态的影响 [J] . 中国给水排水, 2010, 26 (15) : 5-9.

[5] Martina H., Aaron M. S., and Andreas S. Archaea Dominate the Ammonia-Oxidizing Community in the Rhizosphere of the Freshwater Macrophyte Littorella uniflora[J] . Appl. Environ. Microbiol, 2008, 74 (10) : 3279-3283 .