

光电子作用下土壤微生物粪产碱杆菌反硝化性能研究

余萍, 李艳, 鲁安怀, 曾翠平, 王鑫, 丁竑瑞

(造山带与地壳演化教育部重点实验室, 北京大学地球与空间科学学院, 北京 100871)

摘要: 本文在对普通培养条件下异养微生物粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*, *A. faecalis*)反硝化特征研究的基础上, 运用电化学方法于一定电势下(-0.15 V、-0.06 V、+0.06 V vs. NHE)模拟半导体矿物导带光电子能量, 探讨不同能量的光电子对 *A. faecalis* 反硝化特性及细胞生长代谢的影响。实验显示, 在普通培养条件下, *A. faecalis* 在有氧和无氧环境中均不能还原 NO_3^- , 但还原 NO_2^- 效果明显。在模拟光电子实验体系中, *A. faecalis* 可在不同电势(-0.15 V、-0.06 V、+0.06 V)的阴极石墨电极表面附着并形成具有反硝化活性的菌膜; 其中, 外加电势为-0.15 V 的实验组菌膜量最多, 其 NO_3^- 去除率也最高, 10 天达到 52%; -0.06 V 体系略低, NO_3^- 去除率为 30.5%, +0.06 V 体系菌膜量最少, 其 NO_3^- 去除效果也最差, 仅为 10.6%。而在不添加微生物的电化学体系中, 3 个外加电势下的 NO_3^- 浓度均未发生明显变化。本实验研究结果证明了一定能量的半导体矿物光电子可影响土壤异养微生物 *A. faecalis* 的生长代谢及反硝化行为。

关键词: 半导体矿物; 粪产碱杆菌; 反硝化; 光电子

中图分类号: P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2013)06-0761-06

The denitrifying capability of soil microbe-*Alcaligenes faecalis* conducted by photoelectrons

YU Ping, LI Yan, LU An-huai, ZENG Cui-ping, WANG Xin and DING Hong-ruì

(Key Laboratory of Orogenic Belts and Crustal Evolution, School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: On the basis of studying the denitrifying capability of batch cultured *Alcaligenes faecalis* (*A. faecalis*), the electrochemical method was applied by poisoning different cathode potentials (-0.15 V, -0.06 V, +0.06 V vs. NHE) to simulate the energy of photoelectrons from conduction bands of semiconducting minerals. Based on the results obtained, the authors studied the influence of exogenous electrons with different energy levels on the growth and denitrification capability of *A. faecalis* in the electrochemical system. The result showed that in the case of batch culture, *A. faecalis* could reduce nitrite significantly under aerobic or anaerobic conditions, rather than reducing nitrate. In simulated photoelectron systems, the formation of cathodic biofilms with denitrification activity on the graphite electrode was observed at all three cathode potentials (-0.15 V, -0.06 V, +0.06 V vs. NHE). Quantitatively, the bacteria was obviously colonized on the cathode poised at -0.15 V, the removal rate of nitrate by *A. faecalis* was simultaneously the highest (52% after 10 d), compared with 30.5% reduction rate of NO_3^- in the -0.06 V system. Much fewer bacteria were attached sparsely to the

收稿日期: 2013-04-22; 修订日期: 2013-08-13

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(41230103); 国家自然科学基金面上项目(41272003)

作者简介: 余萍(1988-), 女, 硕士, 材料及环境矿物学专业, E-mail: ypcandy1988@163.com; 通讯作者: 鲁安怀, E-mail: ahl@pku.edu.cn

electrode surface when the poised potential was at +0.06 V, resulting in the lowest removal rate of 10.6%. In the sterile systems (three cathode potentials without bacteria), the concentration of NO_3^- only decreased a little. The results of this study indicate that photoelectrons with different energies from semiconducting minerals influence the metabolism and denitrification capability of heterotrophic microbe-*A. faecalis*.

Key words: semiconducting minerals; *A. faecalis*; denitrification; photoelectron

天然土壤中普遍含有铁、锰氧化物半导体矿物,如赤铁矿(Fe_2O_3)、针铁矿(FeOOH)、软锰矿(MnO_2)等(鲁安怀,2003),其导带电势多集中在 $-1.01 \sim -0.28$ V(vs. NHE, normal hydrogen electrode)之间(Xu and Schoonen, 2000)。已有研究证实,在日光的激发下,天然半导体矿物如金红石和闪锌矿可产生光生电子-空穴对(鲁安怀等,2004;李艳,2008),导带电子或价带空穴可参与环境中物质的氧化还原反应(李艳等,2006;鲁安怀,2007;Li et al., 2008)。数亿年来,土壤体系中所含有的丰富的微生物种已衍生出多种营养类型和能量利用方式,不断地从周围环境中获取电子能量以维持自身的新陈代谢(Nannipieri et al., 2003)。

现有研究发现,天然半导体矿物闪锌矿和金红石的日光光生电子可显著促进化能自养型微生物嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, 简称 *A. ferrooxidans*)的生长,分别使 *A. ferrooxidans* 的生长量增加到无光电子对照组的 1.90 倍和 1.69 倍(吕明等,2008;王鑫等,2009);半导体矿物 CdS 光催化产生的光电子能够作用于从异养产碱杆菌 *Alcaligenes eutrophus* 菌体中提取的 NAD 辅酶,使其还原为 NADH(Shumilin et al., 1992)。土壤半导体矿物日光光生电子作为土壤微生物的外源电子来源之一,理应对土壤微生物的生长代谢行为产生一定的影响。

由于土壤体系中含有丰富的有机质成分,以有机质为能量和碳素来源的异养微生物种类和数量与化能自养微生物相比更加庞大。因此,本文在前人研究基础上,选择土壤中广泛分布的兼性厌氧异养微生物粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*, *A. faecalis*)作为研究对象,在研究纯培养条件下 *A. faecalis* 反硝化行为的基础上,运用电化学方法于不同电势下,模拟与微生物相接触的半导体矿物导带光电子能量,探讨不同能量的光电子对 *A. faecalis* 生长代谢及反硝化行为的影响。

1 实验材料及方法

1.1 实验材料

粪产碱杆菌(*A. faecalis*, ATCC 8750)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。实验所用化学试剂均为分析纯。

1.2 微生物培养

微生物培养基成分: K_2HPO_4 9.28 g/L, KH_2PO_4 1.81 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 661 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 24.2 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.6 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.99 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 51.5 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L, 柠檬酸三钠 1.18 g/L, 用 1 N 硫酸调整 pH 值至 7.0(Anderson et al., 1993)。接种 1%(体积比)的粪产碱杆菌并置于 30°C 恒温摇床中以 150 r/m 振荡活化培养。2 天后将处于对数生长期的细菌接种于体系中进行实验。

1.3 实验过程

1.3.1 纯培养实验

溶解氧浓度(DO 值)是影响微生物反硝化途径的重要因素,故微生物纯培养实验分别在有氧和无氧情况下设置有菌实验组和无菌对照组,并在培养体系中添加 NO_3^- 或 NO_2^- ,以考察不同培养情况下微生物对 NO_3^- 或 NO_2^- 的反硝化效果。其中, NO_3^- 体系中 NO_3^- 的初始浓度为 5 mM, NO_2^- 体系中 NO_2^- 的初始浓度为 1 mM。接种 5%(体积比)已活化的 *A. faecalis*, 用 1 N 硫酸调整 pH=7.0,每隔一定时间测定体系中 NO_3^- 及 NO_2^- 的浓度和微生物的 OD600 值。有氧实验在 LRH-150 生化培养箱中(上海齐欣科学仪器公司)进行,无氧实验在厌氧操作箱(855AC, PAS-LABS)中进行。

1.3.2 电化学实验

实验采用双室电化学装置在有氧条件下进行,装置由透明玻璃制成,分为阴极室和阳极室,装置用

704 硅胶密封。其中,阴极室为培养基及活化后的 *A. faecalis* 菌液,并添加 5 mM NO_3^- 为反硝化反应的电子受体,阳极电解液为 0.9% 的生理盐水。两室以质子交换膜(PEM, DuPont, USA)相隔。实验前将质子膜分别置于 0.3% H_2O_2 和 1 N H_2SO_4 煮沸 1 h 后,浸泡于去离子水中洗净。工作电极和对电极均为光滑石墨板电极(2.5 cm × 10 cm, 上海弘枫石墨科技中心),阴极参比电极为 232 型饱和甘汞电极。用 1000 A 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)固定阴极电势(-0.15 V / -0.06 V / +0.06 V vs. NHE)实验体系运行时间为两周。实验同时设置无菌和断路对照组。实验每隔一段时间从阴极室取样测定 NO_3^- 和 NO_2^- 的浓度、pH 值、溶解氧浓度以及微生物 OD600 值,实验全程记录电流-时间曲线。实验结束后取阴极电极样品进行石墨板表面细菌的扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM) (FEI Quanta 200FEG)观察,并测定电极表面总蛋白量。

1.4 测试方法

1.4.1 NO_3^- 和 NO_2^- 的测定方法

在紫外光谱区, NO_3^- 有强烈的吸收,根据 Lambert-Beer 定律,可知其吸收值与硝酸根的浓度成正比,在波长 210~220 nm 处,可测定其吸光度。水中溶解的有机物,在 210 nm 及 275 nm 处均有吸收,而 NO_3^- 在 275 nm 处没有吸收,从而可通过测定 275 nm 的吸光度对其吸光度进行校正(中华人民共和国环境保护行业标准:HJ/T 346-2007)。具体方法如下:取 0.5 mL 待测样于 25 mL 比色管中,加入 1 mL 1 N 盐酸溶液,摇匀。加入 3 mL 氨基磺酸铵溶液(50 g/L),用蒸馏水稀释至刻度,摇匀。用 1 cm 石英比色皿,以不添加 NO_3^- 的空白试剂作参比,使用紫外分光光度计于波长 210 nm 处,测定吸光度 A210,调整波长至 275 nm 处,仍以空白试剂作参比,测定吸光度 A275,通过 A210-A275 得出最终的吸光值。

在酸性溶液中, NO_2^- 能与对氨基苯磺酰胺起重氮化作用,再与 α -萘胺起偶氮反应,生成紫红色偶氮染料。故 NO_2^- 测定方法如下:吸取 25.0 μL 水样于 25 mL 比色管中,加 1 mL 对氨基苯磺酸- α -萘胺混合溶液,摇匀,放置 10 min。在紫外分光光度计上于波长 520 nm 处,用 1 cm 石英比色皿,以不添加 NO_2^- 的空白试剂作参比,测量吸光度(中华人民共和国国家标准:GB/T 5009.33-1996)。

1.4.2 SEM 制样方法

将 0.2 M 的 Na_2HPO_4 和 0.2 M 的 NaH_2PO_4 以 61:39 的体积比配制 0.2 M 的 PBS(磷酸盐缓冲液),调整 pH=7.0。取 50 mL PBS 加入 1 g 多聚甲醛于 60℃ 水浴 1 h 溶解,冷却后加入 25% 戊二醛水溶液 10 mL,加水至 100 mL,配制 2.5% 的戊二醛固定液。取阴极石墨电极样品,经 PBS 溶液清洗 2~3 次后置于 2.5% 戊二醛中固定(4℃ 过夜),取固定后的样品依次于 25%(20~30 min)、50%(20~30 min)、75%(20~30 min)、95%(30~60 min)、100%(60 min) 的乙醇溶液中梯度脱水(其中 75% 乙醇浓度较敏感,脱水时间要适宜),随后将样品置于乙酸异戊脂中处理以置换乙醇用于最后的临界点干燥(K850)。处理完的样品喷金后待观察。

1.4.3 电极表面蛋白测试方法

首先称取 10 mg 考马斯亮蓝 G-250,加入 95% 乙醇 5 mL 和 85% 磷酸 12 mL,定容至 100 mL,配制考马斯亮蓝 G-250 染料试剂(100 mg/L)。随后将阴极电极(2.3 cm²/58 cm²)置于 0.2 M NaOH 中沸水浴 10 min,得到电极表面微生物蛋白液。取待测蛋白液用 0.9% 生理盐水按一定比例稀释至 0.8 mL,加入 0.2 mL G-250(100 mg/L)于比色管中混合摇匀。使用紫外分光光度计于峰位 595 nm 和 450 nm 处,以生理盐水作参比,测定吸光度。通过 A595/A450 得出最终的吸光值。

1.4.4 其他化学分析方法

pH 值由 Mettler Toledo FE20 型 pH 计测定;硝酸根及亚硝酸根的浓度、菌浓度、蛋白量由 Unico UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计测定;光电子模拟、电流-时间曲线监测均使用 CHI1000A 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)。

2 结果与讨论

2.1 普通培养条件下 *A. faecalis* 的生长及其反硝化效率

在有氧和无氧普通培养条件下,通过观察 NO_3^- 和 NO_2^- 体系中的 OD 值变化可知,有氧环境中 *A. faecalis* 的浓度均显著增长而无氧环境下微生物则只有微弱增长趋势,说明溶解氧(DO)在一定程度上促进了 *A. faecalis* 的生长代谢。进一步分析 NO_3^- 和 NO_2^- 浓度变化曲线得出, NO_3^- 体系中(图 1a)的 NO_3^- 浓度基本无变化,始终在 250~270 mg/L 之间

波动,说明普通培养条件下的 *A. faecalis* 无法还原 NO_3^- 而 NO_2^- 体系中(图 1b)的 NO_2^- 浓度降低明显,2 d 后浓度由 56 mg/L 降为零,其中,有氧条件下 NO_2^- 浓度明显下降,由初始的 56 mg/L 到 48 h 降为零,N 的去除效率为 0.34 mg/L·h,而无氧条件下的 NO_2^- 还原效率略低于有氧条件下,至 72 h 方去除完全,N 的去除效率为 0.23 mg/L·h。且实验过程中无 NO_3^- 检出。说明普通培养条件下的 *A.*

faecalis 可有效还原 NO_2^- 为低价态的氮氧化物或氮气,其在有少量溶解氧的情况下对 NO_2^- 的反硝化效率更高。前人研究表明,氧气虽然不会抑制细胞内亚硝酸根还原酶的活性,但会抑制亚硝酸根还原酶的生成(Sandra *et al.*, 1996)。因此,虽然有氧条件下微生物生长情况明显优于无氧条件,但是有氧条件下 NO_2^- 还原能力却仅略优于无氧条件。

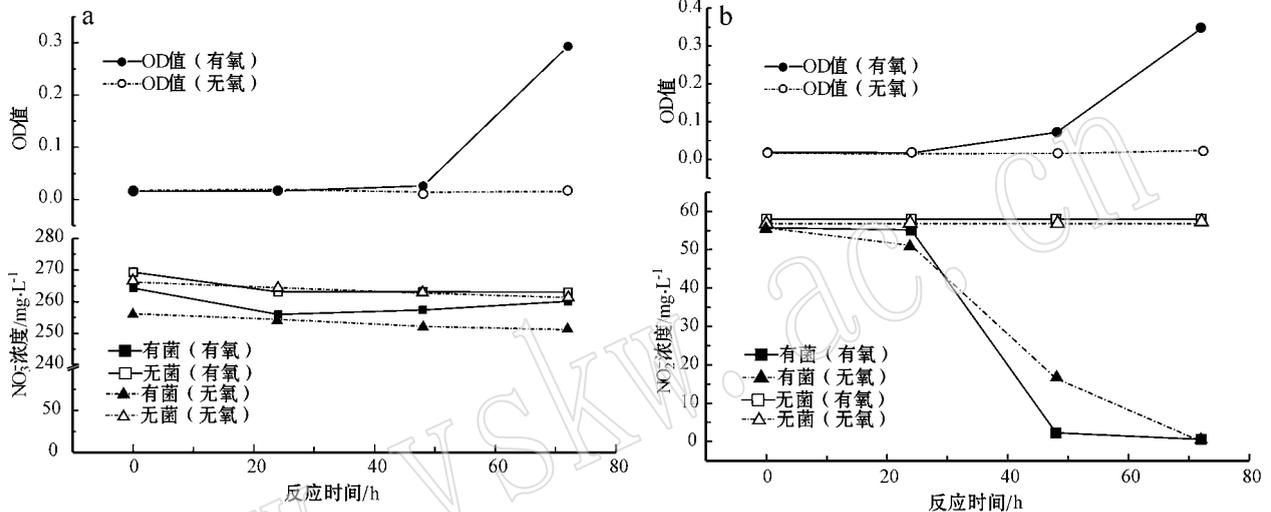


图 1 NO_3^- 体系(a)和 NO_2^- 体系(b)中离子浓度和 OD 值的变化曲线

Fig. 1 Variation curve of NO_3^- , NO_2^- concentration and OD in the system that contained NO_3^- (a) and NO_2^- (b)

2.2 不同阴极电势下 *A. faecalis* 在电极表面的生长及形态特征

根据土壤半导体矿物的导带电势,设置 3 组不同的阴极电势(-0.15 V/-0.06 V/+0.06 V vs. NHE)模拟不同能量的导带光生电子,在电化学实验装置中对 *A. faecalis* 进行培养。两周后发现,*A. faecalis* 可在具不同电势的电极表面发生不同程度的附着(图 2)。3 组电势下的菌体形态均为短杆状,长度约为 0.7~1 μm 。而断路体系中的电极表面基本无菌体附着,仅极少量菌体在粗糙的石墨电极表面零散分布。定量蛋白测试结果显示,*A. faecalis* 在电势为 -0.15 V 和 -0.06 V 的电极表面附着量较大,分别为 19.93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 和 16.55 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,而在 +0.06 V 的电极表面附着量较小,为 7.89 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。以上结果表明,光生电子可促进 *A. faecalis* 在固体表面的附着生长,其生长量与光生电子的能量相关,光生电子越负,其生长情况越好。

2.3 不同阴极电势下 *A. faecalis* 的反硝化特性

在双室体系 NO_3^- 中(DO=4.26 mg/L),当微生物附着于电极表面形成具有生物活性的菌膜(图 2)并同时外加电极电势(-0.15 V、-0.06 V、+0.06 V)以提供不同能量的模拟光电子后,体系中 NO_3^- 浓度在 4~6 天出现了不同程度的下降(图 3a)。与菌膜生长状况相同,*A. faecalis* 菌膜在 -0.15 V 和 -0.06 V 的电极电势体系中还原 NO_3^- 的效果更好。当体系运行 10 天后,-0.15 V 实验组的 NO_3^- 去除率最高,达到了 52%;-0.06 V 体系去除率略低,为 30.5%;+0.06 V 体系去除率为 10.6%(图 3b)。在仅提供外源电子的无菌对照体系中, NO_3^- 浓度也略有降低,但其去除率远远低于同电势下有菌体系,3 组电势下的去除率分别为 13.9%、17.2% 和 5.1%。断路体系中 NO_3^- 浓度基本无变化,始终在 250 mg/L 左右波动(图 3b)。 NO_3^- 还原效果与 *A. faecalis* 在电极表面的附着情况基本一致。由于

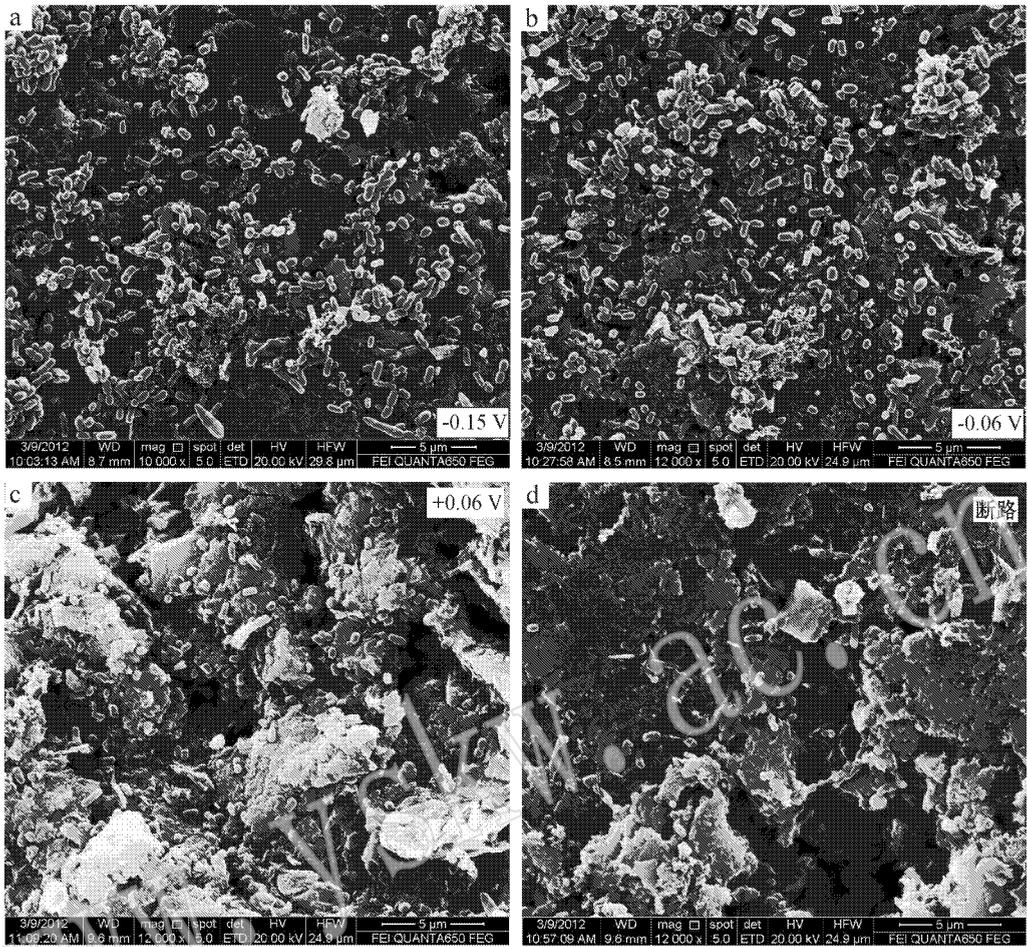


图 2 两周后不同电势下固体电极表面 SEM 图像

Fig. 2 SEM images of cathode surface under poised potentials after 2 weeks

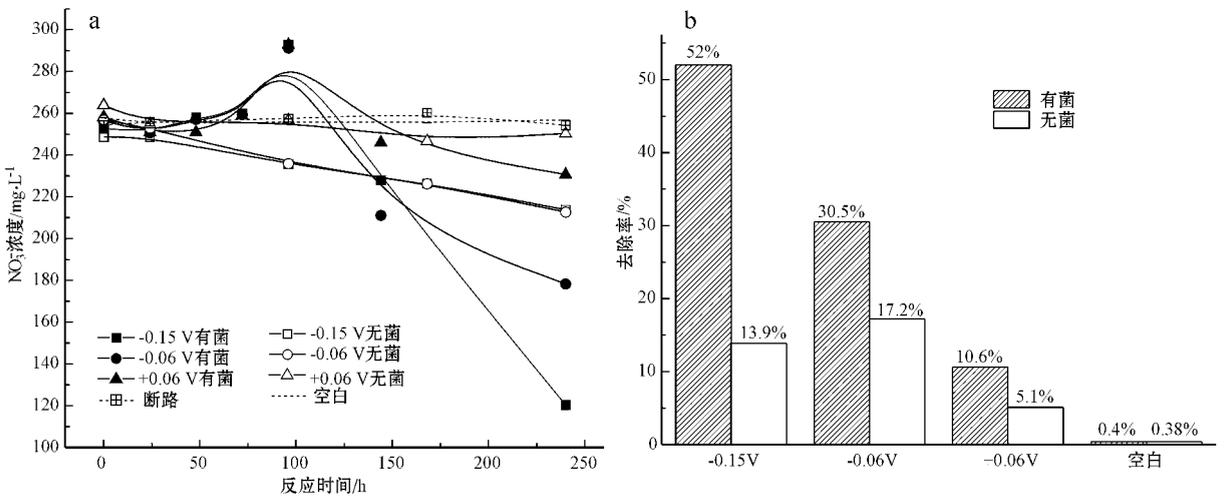


图 3 固定电极电势条件下 NO₃⁻ 浓度变化图 (a) 和 10 天后 NO₃⁻ 去除率 (b)

Fig. 3 Variation curve of NO₃⁻ concentration at poised-potentials (a) and removal rate of NO₃⁻ after 10 d (b)

A. faecalis 纯培养条件下就具有较强的还原 NO_2^- 的能力(图 1b), 体系中产生的 NO_2^- 很快被 *A. faecalis* 还原为其他氮氧化物进而转变为 N_2 , 所以 NO_2^- 的变化趋势相对比较微弱, 其浓度一直保持在较低的状态, 在 0.68 mg/L 左右波动(图中未给出)。以上结果说明, 外源光电子可影响微生物对 NO_3^- 的还原效率, 一定范围内的光电子能量可促进微生物的反硝化过程。

3 结论

在仅有 *A. faecalis* 和仅提供外源电子的体系中, NO_3^- 均无法被单一的微生物过程或电化学过程还原。然而, 当 *A. faecalis* 附着于阴极表面形成具有生物活性的菌膜, 并同时恒定电势(-0.15 V、-0.06 V、+0.06 V)以模拟半导体矿物光催化产生的不同能量的光电子后, 体系中的 NO_3^- 浓度出现了明显的下降, -0.15 V 体系中 NO_3^- 的去除率达到了 52%, -0.06 V 体系次之, 对应 SEM 和蛋白测试结果也显示, 在此电势下, *A. faecalis* 在石墨电极上的附着较好, 而 +0.06 V 体系的反硝化效果及菌体与电极界面的化学变化均比较微弱。综上所述, 半导体矿物光电子能够一定程度上促进非光合微生物 *A. faecalis* 在固体表面附着生长并影响其新陈代谢, 增强其还原 NO_3^- 的能力, 并且一定范围内电势越低, 其反硝化能力越强。

References

- Anderson I C, Poth A and Homstead J. 1993. A comparison of NO and N_2O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*[J]. *App. Environ. Microbiol.*, 59(11): 3 525.
- Li Y, Lu A, Wang C, *et al.* 2008. Characterization of natural sphalerite as a novel visible light-driven photocatalyst [J]. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 92(8): 953~959.
- Li Yan. 2008. Visible light-driven photocatalysis of natural sphalerite and the producing mechanisms[D]. Peking University(in Chinese).
- Li Yan, Lu Anhuai and Wang Changqiu. 2006. An experimental study on photocatalytic reduction of methyl orange by natural sphalerite under visible light irradiation[J]. *Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry*, 28(4): 304~308(in Chinese with English abstract).
- Lu Anhuai. 2003. Mineralogical photocatalysis in natural self-purification of inorganic minerals[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 24(4): 323~331(in Chinese with English abstract).
- Lu Anhuai. 2007. Mechanisms of environmental response to biomineralization[J]. *Geological Journal of China Universities*, 13(4): 613~620(in Chinese with English abstract).
- Lu Anhuai, Guo Yanjun, Liu Juan, *et al.* 2004. Photocatalytic effect of nature and modified V-bearing rutile[J]. *Chinese Science Bulletin*, 49(21): 2 350~2 353(in Chinese with English abstract).
- Lü Ming, Lu Anhuai, Hao Ruixia, *et al.* 2008. The utilization of photoinduced electrons from natural rutile by Fe bacteria[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 27(3): 211~220(in Chinese with English abstract).
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, *et al.* 2003. Microbial diversity and soil functions[J]. *European Journal of Soil Science*, 54: 655~670.
- Sandra Otte, Nicole G G and Lesley A R. 1996. Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions[J]. *Environmental Microbiology*, 62(7): 2 421~2 426.
- Shumilin I A, Nikandrov V V, Popov V O, *et al.* 1992. Photogeneration of NADH under coupled action of CdS semiconductor and hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* without exogenous mediators [J]. *Federation of European Biochemical Societies*, 306(2, 3): 125~128.
- Wang Xin, Li Yan, Lu Anhuai, *et al.* 2009. Experimental researches on the pathway of the chemoautotroph microbes utilizing solar energy[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 28(6): 527~534(in Chinese with English abstract).
- Xu Y an d Schoonen M A A. 2000. The absolute energy positions of conduction and valence bands of selected semiconducting minerals [J]. *American Mineralogist*, 85: 543~556.

附中文参考文献

- 李艳. 2008. 天然闪锌矿可见光催化作用及其形成机制研究[D]. 北京大学.
- 李艳, 鲁安怀, 王长秋. 2006. 天然闪锌矿可见光催化还原甲基橙的实验研究[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 28(4): 304~308.
- 鲁安怀. 2003. 无机界矿物天然自净化功能之矿物催化作用[J]. *岩石矿物学杂志*, 22(4): 323~331.
- 鲁安怀. 2007. 生命活动中矿化作用的环境响应机制研究[J]. *高校地质学报*, 13(4): 613~620.
- 鲁安怀, 郭延军, 刘娟, 等. 2004. 天然含钒金红石: 一种用于降解卤代有机物的光催化剂[J]. *科学通报*, 49(21): 2 350~2 353.
- 吕明, 鲁安怀, 郝瑞霞, 等. 2008. 铁细菌利用天然金红石光生电子能量研究[J]. *岩石矿物学杂志*, 27(3): 212~220.
- 王鑫, 李艳, 鲁安怀, 等. 2009. 化能自养型微生物利用太阳能途径的实验研究[J]. *岩石矿物学杂志*, 28(6): 527~534.