

## 一株反硝化真菌的分离鉴定及其对生物塔脱氮效率的影响\*

邹平<sup>†</sup>, 李传宽, 徐志强, 陈心仪, 孙珮石, 毕晓伊, 吴志浩

(云南大学 生态学与环境学院, 云南 昆明 650091)

**摘要:**国内外对细菌的作用及作用机制研究较多,而对真菌的作用及机制研究较少。为了提高 $\text{NO}$ 、 $\text{NO}_x$ 的脱除效率,本文对脱氮塔生物膜中的反硝化真菌进行了分离、纯化及鉴定,通过摇瓶实验研究了反硝化真菌对 $\text{NO}_3^-$ 的作用特征,最后在脱氮塔中投加了分离的反硝化真菌纯菌株扩大培养液,研究了其对 $\text{NO}_x$ 脱除效率的影响,还对脱氮塔内真菌的群落结构进行了高通量测序分析。实验结果表明:经过真菌形态特征和脱氮( $\text{NO}_3^-$ )特性研究及ITS序列测定分析,将3LNB菌株鉴定为镰刀菌的腐皮镰刀菌 *Fusarium solani*。高通量测序分析结果证明了脱氮塔内确实存在镰刀菌属的腐皮镰刀菌 *Fusarium solani*。在 $\text{NO}_3^-$ -N浓度高达10.01 g/L的条件下,实验共10 d,细菌反硝化组反硝化率为5.6%,其脱除效率为0.56 g/L;真菌3LNB菌株的反硝化率能达到15.1%,其脱除效率为1.51 g/L。实验室实验证明3LNB菌株对 $\text{NO}_3^-$ 具有较强的反硝化能力。将3LNB纯菌株扩大培养液400 mL(4%)投加到脱氮塔中, $\text{NO}$ 、 $\text{NO}_x$ 的平均脱除率分别提高了5.12%、5.36%。脱氮塔净化实验证明3LNB培养液能强化微生物对 $\text{NO}$ 、 $\text{NO}_x$ 的脱除效能,这可能主要与腐皮镰刀菌等真菌细胞存在细胞色素P450nor有关。

**关键词:**脱氮塔;燃煤烟气;真菌;腐皮镰刀菌;反硝化作用

**中图分类号:**X511

**文献标志码:**A

## Isolation and Identification of a Fungi with Denitrification and Its Influence on Nitrogen Removal Efficiency of Biological Tower

ZOU Ping<sup>†</sup>, LI Chuankuan, XU Zhiqiang, CHEN Xinyi, SUN Peishi, BI Xiaoyi, WU Zhihao

(College of Ecology and Environment, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** At home and abroad, many studies of bacterial technology to remove  $\text{NO}$  and  $\text{NO}_x$  have been performed. However, the effect and mechanism of fungal were poorly studied. To improve the removal efficiency of  $\text{NO}$  and  $\text{NO}_x$ , the fungi isolated and identified from the biofilm of denitrifying tower through shaking flasks experiment was studied on its nitrogen removal characteristics to nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Expanding culture was put into the denitrify tower to study its effect on the  $\text{NO}$  and  $\text{NO}_x$  removal efficiency. The fungal community structure through high-throughput sequencing analysis was monitored. The results showed that the strain 3LNB through morphological, nitrogen ( $\text{NO}_3^-$ ) removal characteristics research, and ITS sequence analysis was identified as *Fusarium solani*. For up to 10.01 g/L of  $\text{NO}_3^-$ -N, the denitrifying rate of

\* 收稿日期:2016-10-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(51168046,51278447), National Natural Science Foundation of China (51168046,51278447); 云南省自然科学基金资助项目(2015FB111), Natural Science Foundation of Yunnan Province(2015FB111)

作者简介:邹平(1964—),女,重庆人,云南大学副研究员,博士

<sup>†</sup> 通讯联系人, E-mail:851517048@qq.com

bacteria control group was 5.6% with nitrogen removal efficiency of 0.56 g/L, but the denitrifying rate of strain 3LNB was 15.1% with nitrogen removal efficiency of 1.51 g/L for 10 days, which proved that the strain 3LNB had strong denitrification function. The nitrogen removal rate of NO and NO<sub>x</sub> was increased by 5.12% and 5.36% on average, respectively, after the expanding culture 400 mL (4%) of pure strain 3LNB was put into denitrifying tower, which proved that the strain 3LNB culture can improve removal rate of NO and NO<sub>x</sub> in denitrifying tower. This may be mainly related to the presence of cytochrome P450nor in fungi such as *Fusarium solani*.

**Key words:** denitrification tower; coal-fired flue gas; fungi; fusarium solani; denitrification

工业烟气排放的 SO<sub>2</sub> 和 NO<sub>x</sub> 是环境中污染十分严重的气体,是形成酸雨、雾霾的主要原因<sup>[1-3]</sup>.微生物净化燃煤烟气较物理化学法显示出独有的优势,效率高、工艺设备简单、能耗和运行费用低、二次污染少<sup>[4]</sup>.从已有的研究成果可知,生物法对燃煤烟气中 NO<sub>x</sub> 的净化处理主要是基于硝化菌的硝化作用和反硝化菌的反硝化作用来实现的<sup>[5]</sup>.

反硝化作用定义为在有机物(电子供体和营养物)存在条件下,通过微生物反应将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(接受电子)或 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(接受电子)还原为 N<sub>2</sub>O 或 N<sub>2</sub> 的过程.即 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>→NO<sub>2</sub><sup>-</sup>→NO→N<sub>2</sub>O→N<sub>2</sub>,是大气氮循环中的一部分.

反硝化细菌的种类很多,研究也较早<sup>[6]</sup>.反硝化作用一度被认为只存在于细菌中,但 1992 年 Shoun 等发现真菌中也存在反硝化作用<sup>[7]</sup>.据研究发现真菌与细菌的反硝化作用各有其特点.细菌反硝化的特点是对溶解氧控制要求严格.而真菌反硝化的特点则是(1)可在微厌氧或有氧条件下进行<sup>[8]</sup>.(2)真菌反硝化系统缺乏氧化亚氮还原酶(Nos),不能将 N<sub>2</sub>O 还原为 N<sub>2</sub>,最终产物为 N<sub>2</sub>O,而细菌具有 N<sub>2</sub>O 还原酶(Nos).真菌可通过与细菌的协同反硝化作用产生 N<sub>2</sub>,即 N<sub>2</sub> 或 N<sub>2</sub>O 是由胺和亚胺氮源中的氮元素与亚硝态氮中的氮素结合产生的<sup>[9]</sup>.(3)虽有部分真菌(如尖孢镰刀菌和赤霉菌等)可将 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 或 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原为 N<sub>2</sub>O,但大部分反硝化真菌只能将 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 还原,这表明 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 可作为更有效的底物而被反硝化真菌利用<sup>[7]</sup>.(4)真菌含有一类特殊的细胞色素 P450,细胞色素 P450 具有一氧化氮还原酶的功能,能还原 NO 生成 N<sub>2</sub>O 是真菌最独特的一步,也是较经济的一步,真菌细胞色素 P450nor 催化 NO 还原的速度约为细菌 NO 还原酶的 5 倍,在真菌的反硝化作用中起着非常重要的作用<sup>[10]</sup>.

目前生物法对烟气的 NO<sub>x</sub> 尤其是 NO 的脱除效率还较低<sup>[11-12]</sup>,国内外也没有生物法烟气同时脱

硫脱氮工艺的真菌群落结构及其功能作用的研究报道.为了提高生物法对 NO<sub>x</sub> 尤其是 NO 的脱除效率,本文对脱氮塔生物膜中的真菌群落结构进行了高通量分析,对具有反硝化作用的真菌进行了分离纯化及鉴定,随后研究了真菌对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的反硝化作用特征,最后在脱氮塔中添加所分离真菌纯菌株的扩大培养液研究了其对 NO,NO<sub>x</sub> 脱除效率的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

真菌菌种来源:从脱氮塔中无菌操作取出长有丰富生物膜的陶粒若干,在灭菌烧杯中加适量无菌营养液振荡使生物膜脱落并摇匀,制成悬液待分离真菌使用.

反硝化真菌分离纯化培养基为查氏固体培养基,其组分:蔗糖 30 g,NaNO<sub>3</sub> 3.0 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g,KCl 0.5 g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g,H<sub>2</sub>O 溶解、定容到 1000 mL,琼脂 20 g.利用传统平板法进行真菌的分离纯化;利用摇床进行真菌的液体好氧扩大培养.蔗糖既为真菌营养物,也是反硝化电子供体.

### 1.2 烟气处理装置

实验室动态法配制混合气体的温度控制在 28~30℃,与部分实际工业产生的烟气基本一样.生物净化装置由玻璃管加工制作而成,生物膜填料层用内径 Φ95 mm 的玻璃管制成,填料层总高 1.0 m,分为两层,层间距约为 0.1 m.生物膜填料塔采用气液逆流操作,SO<sub>2</sub> 和 NO<sub>x</sub> 烟气采用动态法配制,即通过 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 溶液与 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液及 NaNO<sub>2</sub> 溶液与 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 FeSO<sub>4</sub> 的混合溶液发生化学反应制取 SO<sub>2</sub> 和 NO<sub>x</sub>,之后与空气混合.填料侧壁设置有三个气体取样口,采用型号 KM950 烟气分析仪对烟气进行测定.进气口初始浓度 NO 控制在 1500×10<sup>-6</sup>

左右,  $\text{NO}_2$  初始浓度控制在  $500 \times 10^{-6}$  左右,  $\text{SO}_2$  初始浓度为  $1\ 000 \times 10^{-6}$  左右. 填料采用类球形直径为 1.0~2.5 cm 的轻质陶粒, 气体流量计每小时进气  $0.4\ \text{m}^3/\text{h}$ , 循环液总体积 10 L, 流速大小为 6~8 L/h, 每隔 10 d 更换循环液 2 L, 脱氮塔 pH 控制在 7.5~8.5 (饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液调节), 实验装置流程见图 1.

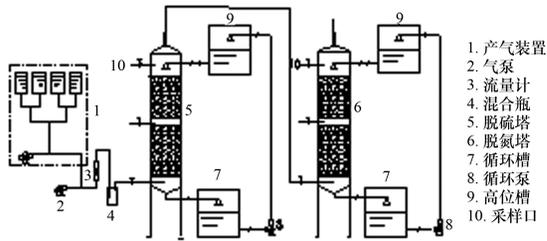


图 1 生物法烟气同时脱硫脱氮实验装置图

Fig.1 Double towers system of simultaneous biological removal of  $\text{SO}_2$  and  $\text{NO}_x$

### 1.3 分析方法

麝香草酚分光光度法<sup>[13]</sup>测定培养基中的硝酸盐含量. 格里斯 (Griess) 试剂比色法<sup>[14]</sup>测定培养基中的亚硝酸盐含量.

为避免细菌和真菌对培养液 N 分析结果的影响, 在紫外分光光度法比色前, 对分析培养液样品高速离心 ( $13\ 000\ \text{r}/\text{min}$ ) 10 min 后, 取上清液进行分析测定. 因抗生素分子含 N, 故每组实验设计了加入相应抗生素但未加入对应微生物的空白对照组, 其它成分均与对应实验组相同, 在比色时作为空白对照.

### 1.4 真菌的研究方法

#### 1.4.1 真菌的形态学研究方法

平板法分离纯化真菌, 观察平板中菌落形态, 使用生物显微镜、电镜观察真菌个体及局部形态.

#### 1.4.2 反硝化脱氮特征实验

研究反硝化作用的培养基组分: 蔗糖 3.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{KCl}$  0.05 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 g,  $\text{H}_2\text{O}$  溶解、定容到 100 mL. 前期通过预实验, 培养基硝酸钠加入量为 6.07 g, 相当于  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  10.01 g/L. 实验时使用细菌抗生素 6 g/L 可溶性的头孢菌素<sup>[15]</sup>, 以抑制细菌的生长. 真菌抗生素使用 2 g/L 的氟康唑氯化钠溶液<sup>[16]</sup>, 以抑制真菌的生长. 抗生素根据实验时间的长短实时补充. 反硝化脱氮特征实验已经多次重复, 实验结果有重现性.

选取 4 支 250 mL 锥形瓶, 每瓶培养基总体积为 100 mL, 按下列顺序编号实验.

1# 真菌反硝化组: 研究分离培养的真菌是否具有反硝化作用. 灭菌培养基中加入 1 mL 真菌培养悬液, 6 g/L 的头孢菌素 1 mL;

2# 真菌与细菌反硝化组: 研究分离培养真菌与生物膜悬液对  $\text{NO}_3^-$  是否具有反硝化协同作用. 灭菌培养基中加入 1 mL 的真菌培养悬液, 并加 1 mL 脱氮塔的生物膜悬液;

3# 细菌反硝化组: 灭菌培养基中加入 1 mL 脱氮塔中的生物膜悬液, 并加 2 g/L 真菌抗生素氟康唑氯化钠溶液 1 mL, 作为细菌反硝化组;

4# 空白对照组: 灭菌培养基中加入 6 g/L 的头孢菌素 1 mL, 加入真菌抗生素氟康唑氯化钠溶液 1 mL. 实验分组编号情况如表 1 所示.

表 1 实验分组编号

Tab.1 Group numbering in the experiments

编号	氮柱 悬液	真菌 3LNb	细菌 抗生素	硝酸盐	真菌 抗生素	备注
1		✓	✓	✓		真菌反 硝化组
2	✓	✓		✓		真菌与细菌 反硝化组
3	✓			✓	✓	细菌反 硝化组
4			✓	✓	✓	空白对照组

注: ✓ 表示添加, 无✓ 则不添加.

实验共 10 d, 各实验组每天取一次共 10 次样品测定  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  量, 最后一天测定培养基中  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  量. 分析各实验组氮素的分布情况.

### 1.5 真菌菌株的分子生物学鉴定

将密封好的纯菌株平板寄往上海生工生物工程股份有限公司进行鉴定. 真菌组的 DNA 提取采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒 SK8259 (上海生工生物工程股份有限公司). 以纯化后的真菌总 DNA 为模板, 用真菌通用引物 TCCGTAGGT-GAACCTGCGG 进行 PCR 扩增, 扩增片段为 ITS1, 其长度在 600 bp 左右. PCR 扩增程序为:  $94\ ^\circ\text{C}$  预变性 4 min;  $94\ ^\circ\text{C}$  变性 45 s,  $55\ ^\circ\text{C}$  退火 45 s,  $72\ ^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环, 最后于  $72\ ^\circ\text{C}$  延伸修复 10 min,  $4\ ^\circ\text{C}$  保存. 反应完成后, 经 1% 琼脂糖电泳, 检测扩增片段的大小和特异性. 将菌株测得的 ITS1 序列在 NCBI 上 blast 进行对比, 采用邻接法进行进化关系分析和系统树的构建.

### 1.6 高通量分析脱氮塔中真菌群落结构

将脱氮塔内的陶粒取出, 通过一系列的无菌操作, 得到大量的微生物, 然后将冷藏有微生物的离

心管寄往上海生工生物工程股份有限公司进行高通量测序分析真菌的群落结构。

序列数据处理:将多条序列按其序列间的距离对它们进行聚类,后根据序列之间的相似性作为域值分成操作分类单元(OTU),通常域值的序列相似性定为 0.97,操作分类单元被认为可能属于属;域值的序列相似性定为 0.99 被认为可能属于种。

OTU 聚类采用的软件为 uclust。

对处理后序列进行物种分类,采用的软件为 RDP classifier,RDP classifier 是基于 Bergey's taxonomy,Bergey's taxonomy 分为 6 层,它们依次为域(domain)、门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)。同时,基于 OTU 聚类的结果,获取每一个 OTU 聚类的代表性序列,分别是长度最长序列(length)、丰度最大的序列(abundance)和所有的序列(ALL)形成三份结果,并进行各类 RDP 分析。

### 1.7 真菌对脱氮塔脱氮效率的影响研究

实验室温度 28~30 °C,每天测定脱氮塔 NO, NO<sub>2</sub> 的脱除率 3 次(早中晚各一次),取平均值,共 7 d.作为真菌添加前的实验对照.同时将分离纯化的 3LNB 菌株用查氏液体培养基进行扩大培养,培养液体积共 400 mL,培养 3 d 左右真菌生长旺盛时,向脱氮塔内添加此真菌培养液,控制与对照组相同的环境条件(温度、pH,空气流量、循环液流速等),然后再次每天测定脱氮塔 NO,NO<sub>2</sub> 的脱除率,测定方法与对照组一致,共 7 d.同时观察真菌 3LNB 在脱氮塔内的生长情况,记录实验数据,并与添加前数据进行对比分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 形态学鉴定

真菌 3LNB 在查氏培养基平板上生长迅速.在 30 °C 恒温培养箱中,48 h 后长出菌落,菌落平展,白色,无气味,呈细长绒毛状.用显微镜观察可以看到菌丝透明,有隔,分支;小分生孢子有 1~2 个分隔,呈纺锤形至卵圆形;大分生孢子,有 3~5 个分隔,呈梭形至月牙形,末端较钝;厚垣孢子长于菌丝尖端,呈圆形.菌株的显微镜图片和电镜图片如图 2~3 所示。

### 2.2 反硝化脱氮特性研究结果

从图 4 可知:在 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 浓度高达 10.01 g/L 的条件下,实验共 10 d,细菌反硝化组反硝化率为 5.

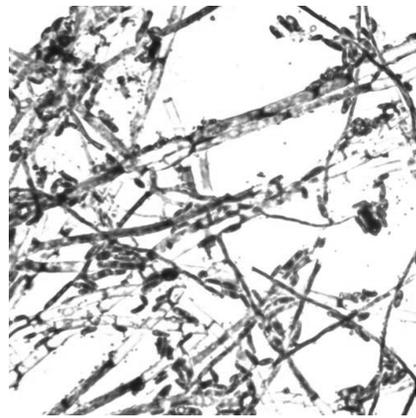


图 2 真菌 3LNB 显微镜图片(放大 400 倍)  
Fig.2 Microscope image of 3LNB  
(Magnified 400 times)

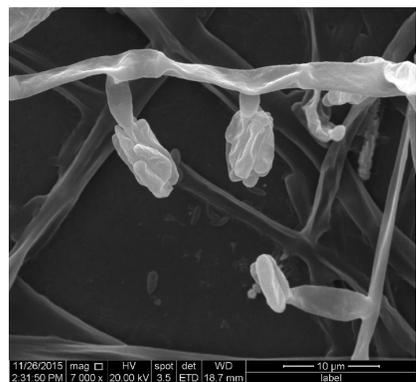


图 3 真菌 3LNB 电镜图片  
Fig.3 SEM image of 3LNB strain

6%,其脱除效率为 0.56 g/L;真菌 3LNB 菌株的反硝化率为 15.1%,其脱除效率 1.51 g/L;真菌与细菌反硝化组 9.4%,其脱除效率 0.94 g/L。

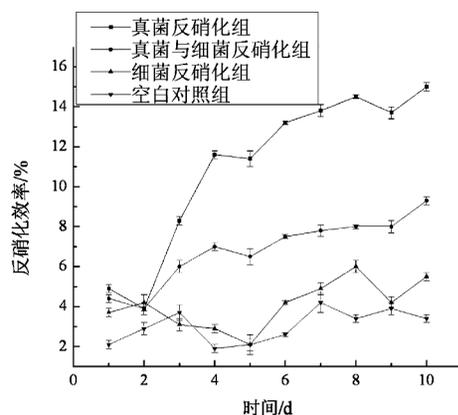


图 4 各实验组反硝化率变化曲线  
Fig.4 The nitrification rate in experimental groups

本实验对各实验组反应液第 10 d 的亚硝酸根 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 进行了定量测定,其结果如图 5 所示。

从图 5 可知:NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 离子既是反硝化的目标物

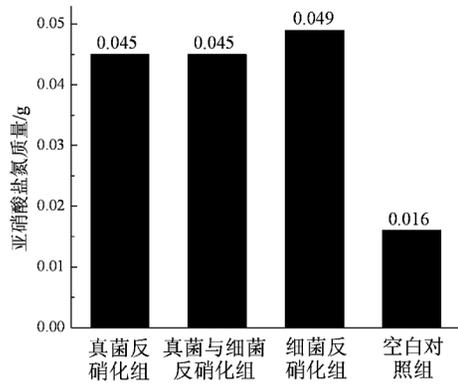


图 5 第 10 天各实验组反应液中亚硝酸盐氮的质量

Fig.5 Quality of the denitrate nitrogen in experimental groups reaction liquid on 10th day

同时也是中间产物,各实验组反应液中均有很少量的亚硝酸根  $\text{NO}_2^-$  离子存在,但其中真菌反硝化组与真菌与细菌反硝化组有更低含量的  $\text{NO}_2^-$  离子,这可能与大部分反硝化真菌只能将  $\text{NO}_2^-$  还原,这表明  $\text{NO}_2^-$  可作为更有效的底物而被反硝化真菌利用<sup>[7]</sup>.空白对照组有极少量的  $\text{NO}_2^-$  离子,这与其被微生物污染有关.

表 2 为各实验组反应液第 10 d 氮素分布情况.从表 2 和图 5 可知,反应液中初始投加  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  的浓度为 10.01 g/L,浓度较高,目的是结合燃煤工厂实际需要.燃煤烟气中含有大量的  $\text{NO}_x, \text{SO}_2$ , 重金属、碳氢化合物等. $\text{NO}_x, \text{SO}_2$  等在细菌作用下会转变成  $\text{NO}_2^-, \text{NO}_3^-, \text{SO}_4^{2-}$ .这些离子与重金属离子会逐渐在循环液中积累从而达到较高的浓度,脱氮塔在运转中虽然有开路工序(即定期从脱氮塔中放出定量循环液,以减少循环液中含盐量及微生物代谢产物),但由于燃煤烟气量太大,循环液中始终存在较高离子浓度.经检测,循环液中离子浓度常常在 4.0%~9.0% 左右.所以本实验培养基设计的离子浓度为 6.0% 左右.

经另外纯菌株分离实验可知,在实验室脱氮塔中还分离纯化出了嗜盐细菌:如盐单胞菌等.这提示脱氮塔在长期运行中循环液的较高盐浓度对细菌等微生物形成了选择性压力.

空白对照组没有接种真菌与细菌,空白实验组的氮素质量守恒.

细菌反硝化组反硝化反应程度较真菌 3LNB 小得多.细菌反硝化组的菌种虽然取自生物膜悬液,但反应初在其反应液中添加了适量的真菌抑制剂,真菌不能生长,其内主要是细菌在发挥作用.细菌反硝化组存在大量能发挥反硝化作用的细菌,但其反硝

化作用强度不如真菌 3LNB.

表 2 各实验组反应液第 10 d 氮素分布情况

Tab.2 Nitrogen existing in the experimental groups reaction liquid on 10th day

类别	真菌反硝化组 / (100ml)	真菌与细菌反硝化组 / (100ml)	细菌反硝化组 / (100ml)	空白对照组 / (100ml)
初始投加	1.001	1.001	1.001	1.001
$\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{g}$	0.850	0.907	0.945	0.966
$\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{g}$ 减少量	0.151	0.094	0.056	0.029
$\text{NO}_2^- - \text{N}/\text{g}$	0.045	0.045	0.049	0.029
总挥发 $\text{N}/\text{g}(\text{N}_2 - \text{N}/\text{g} + \text{N}_2\text{O} - \text{N}/\text{g})$	0.106	0.049	0.007	0
反硝化率 % = ( $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 减少量 / $\text{g} \div$ 初始投加 $\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{g}$ ) $\times 100\%$	15.1	9.4	5.6	2.9
10 天脱氮效率 $\text{g}/\text{L}$ (以 $\text{NO}_3^-$ 减少量计算)	1.51	0.94	0.56	0.29

真菌反硝化组的真菌 3LNB 反硝化反应程度最高,10 d 较细菌反硝化组的反硝化率高 9.5%,脱除效率高 0.95 g/L,其反硝化能力较细菌强 2.7 倍.

真菌与细菌反硝化组中的微生物既有真菌 3LNB,也有生物膜悬液,实验测得其反硝化率 10 d 为 9.4%,反硝化脱除效率为 0.94 g/L,其反硝化脱氮效率较细菌反硝化组高 1.68 倍,但却是单独真菌 3LNB 菌株反硝化脱氮效率的 0.62 倍,较低.

在李平<sup>[17]</sup>的反硝化真菌-细菌优化组合及其脱氮能力研究论文中,总  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  为 10 mmol(0.14 g/L)环境下,镰刀菌属在 30 h 内能脱除少量的  $\text{NO}_3^-$ ,培养一周后能脱除约 70%(0.098 g/L),并且几乎没有  $\text{NO}_2^-$  的积累.在几乎没有  $\text{NO}_2^-$  的积累这一点上,与本论文的实验结果一致.真菌反硝化组与李平实验  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  脱除效率对比分析如表 3 所示.

表 3  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  7 d 脱除效率对比分析

Tab.3 Removal rate of nitrate nitrogen comparison on 7th day

	李平实验 7 d	真菌反硝化组 7 d
初始 $\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{g}$	0.140	1.001
脱除 $\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{g}$ 效率	0.098	0.139

从表 3 可知,在 7 d 实验时间内,真菌反硝化组

对  $\text{NO}_3^-$ -N 脱除效率为 0.139 g/L, 较李平实验 0.098 g/L 高 1.42 倍. 通过比较说明 3LNB 菌株对  $\text{NO}_3^-$  具有较强的反硝化作用.

真菌与细菌反硝化组仅从  $\text{NO}_3^-$ -N 含量减少的分析数据看, 其反硝化作用程度似乎较真菌 3LNB 株弱, 但该组微生物还含有硝化细菌, 其复杂的微生物系统对  $\text{NO}_2^-$ -N 的含量分析可能具有一定的增加作用, 此增加作用会导致对真菌与细菌反硝化组脱氮作用的低估. 由于上述实验是以  $\text{NO}_3^-$  作为反硝化对象, 其与脱氮塔中的硝化对象  $\text{NO}_x$  有差异, 所以本论文下一步实验即将真菌 3LNB 菌株扩大培养后投加到脱氮塔中, 研究真菌 3LNB 对脱氮塔的反硝化效率影响情况.

### 2.3 分子生物学鉴定

3LNB 菌株 PCR 扩增的 ITS1 序列长度为 518bp.

Blast 结果如图 6 所示: 菌株 3LNB 的 ITS1 序列在系统发育树上与 *Fusarium solani* KR708647.1 腐皮镰刀菌聚为一簇, 通过 NCBI 序列比对, ITS1 序列相似度为 100%. 结合生理生化研究, 菌落特征, 个体形态的生物显微镜和电镜观察, 将菌株 3LNB 鉴定为腐皮镰刀菌 *Fusarium solani*, 隶属镰刀菌属, 瘤座孢科, 从梗孢目, 丝孢菌纲, 半知菌亚门, 真菌界.

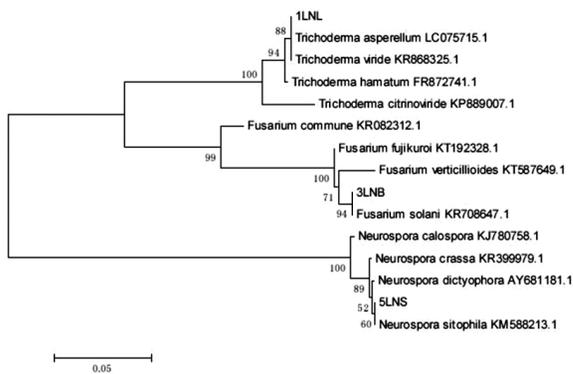


图 6 基于 ITS1 序列的真菌 3LNB 菌株的系统发育树  
Fig.6 Phylogenetic analysis and related species based on 3LNB ITS1 sequence

### 2.4 脱氮塔中真菌群落结构高通量测序分析

通过高通量测序分析, 在门(phylum)水平上样本主要 rank reads 数目以及真菌种群相对丰度, 由高到低排序: 担子菌门(Basidiomycota) reads25916, 59.35% > 子囊菌门(Ascomycota) reads10795, 24.72% > 未分类真菌(Unclassified fungi) reads4316, 9.88% > 接合菌门(Zygomycota) reads1666, 3.82%

> 壶菌门(Chytridiomycota) reads303, 0.69%. 门水平热图如图 7 所示.

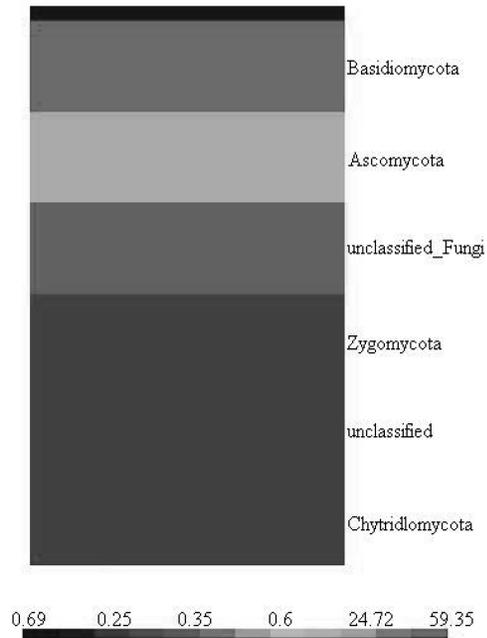


图 7 门水平热图

Fig.7 Heat map of phylum

从图 7 高通量分析结果可知脱氮塔中担子菌门、子囊菌门真菌相对丰度较高. 1992 年 Shoun 等<sup>[7]</sup>就发现, 子囊菌门和担子菌门的真菌存在反硝化活性. 但两门的真菌在本研究的培养条件下未能分离到纯菌株. 尽管如此, 它们的反硝化作用在脱氮塔应是客观存在的.

半知菌亚门在高通量测序分析门水平上未检测到, 其相对丰度未知, 但属(genus)水平上却检测出真菌 3LNB 菌株所隶镰刀菌属(*Fusarium*)的相对丰度: reads317, 占 0.73%. 其它曲霉属(*Aspergillus*) reads149, 占 0.34%, 青霉属(*Penicillium*) reads125, 占 0.29%; 赤霉菌属(*Gibberella*) reads58, 占 0.13%. 属水平热图如图 8 所示.

在种(species)水平上, 腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*) reads17, 占 0.04%. 种水平热图如图 9 所示.

1972 年 Bollag 和 Tung<sup>[18]</sup>在含氧低的培养基中发现土壤真菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)还原  $\text{NO}_2^-$  并释放  $\text{N}_2\text{O}$ . Shoun 等<sup>[7]</sup>也发现严格好氧的尖孢镰刀菌等多种真菌能进行反硝化作用. 许多真核微生物也能在低氧或厌氧条件下利用复杂的 ATP 产能系统进行反硝化作用, 如镰刀菌属(*Fusarium*)、木霉属(*Trichoderma*)、柱孢属(*Cylin-*



图 8 属水平热图

Fig.8 Heat map of genus



图 9 种水平热图

Fig.9 Heat map of species

drocarpon)、毛壳属(*Chaetonium*)、水稻恶苗病属(*Giberella*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)及其他半知菌类、丝状真菌、酵母菌等.真菌反硝化需要少量的  $O_2$  供应,有氧呼吸产生 ATP 和反硝化过程同时在线粒体中进行<sup>[19]</sup>.

本论文通过免培养的高通量测序,发现属水平、种水平分析结果均证明了脱氮塔中镰刀菌属腐

皮镰刀菌 *Fusarium solani* 的存在.脱氮塔真菌群落结构中还有曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)等种群.利用传统微生物平板分离技术又从脱氮塔生物膜中分离出镰刀菌属的腐皮镰刀菌,通过实验又证明了该腐皮镰刀菌能发挥较强的反硝化作用.因此本论文的实验结果与 Bollag 和 Tung, Shoun 的发现实现了相互印证.但利用镰刀菌属真菌影响烟气净化中氮氧化物脱除效率的研究却未见报道.

### 2.5 对脱氮塔脱氮效率的影响研究

通过前述实验室研究发现真菌 3LNB 菌株对  $NO_3^-$  具有较强的反硝化能力.为了研究其对脱氮塔  $NO_x$  尤其是  $NO$  脱除效率的影响,本论文扩大培养了真菌 3LNB,将扩大培养液添加至脱氮塔中,并对添加前后的脱氮效率进行了监测比较.扩大培养液导入 48 h 后即可看见脱氮塔内的大量白色的腐皮镰刀菌,如图 10 所示.



图 10 脱氮塔中的腐皮镰刀菌(白色部分)

Fig.10 *Fusarium solani* in denitrifying tower (white part)

3LNB 菌株扩大培养液加入脱氮塔前后  $NO$ ,  $NO_x$  的脱除效率曲线如图 11~图 12 所示.从图 11~图 12 可知,腐皮镰刀菌 3LNB 菌株培养液加入后, $NO$ , $NO_x$  的脱除效率分别平均提高了 5.12%, 5.36%.

利用 t 检验法<sup>[20]</sup>,检验添加前后两组  $NO$ , $NO_x$  脱除率平均数的差异是否显著:

$t_{NO} = 11.907 > t_{0.01} = 3.055, P_{NO} < 0.01$ , 差异显著;

$t_{NO_x} = 10.939 > t_{0.01} = 3.055, P_{NO_x} < 0.01$ , 差异显著.

t 检验结果表明,腐皮镰刀菌真菌扩大培养液加入脱氮塔后, $NO$ , $NO_x$  的平均脱除效率得到了显著提高.说明腐皮镰刀菌在与生物膜共同存在的条

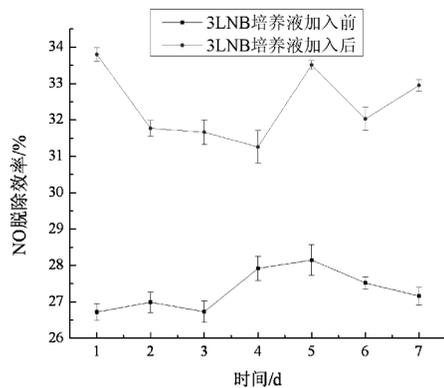


图 11 3LNB 培养液添加前后 NO 脱除率曲线  
Fig.11 Removal rate of NO before and after  
3LNB culture adding

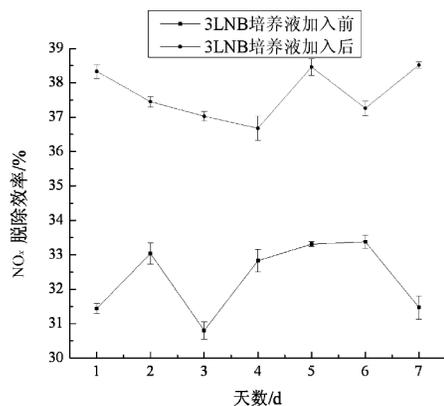


图 12 3LNB 培养液添加前后 NO<sub>x</sub> 脱除率曲线  
Fig.12 Removal rate of NO<sub>x</sub> before and after  
3LNB culture adding

件下能显著提高 NO, NO<sub>x</sub> 的脱氮效率。

这可能主要与腐皮镰刀菌等真菌细胞存在细胞色素 P450nor 有关。1993 年, Nakahara 等<sup>[10]</sup>发现在真菌的反硝化作用中, 一种细胞色素 P-450 起着一氧化氮还原酶(NOR)的作用, 被称为细胞色素 P450nor(nitric oxide reductase)。它能以 NADH 为直接的电子供体, 将 NO 还原成 N<sub>2</sub>O。可能的催化机制: 细胞色素 P450nor 首先与 NO 形成复合物, 随后细胞色素 P450nor 中的 Fe<sup>3+</sup> 被 NADH 还原成 Fe<sup>2+</sup>, 并将电子转移给 NO 生成 NO<sup>-</sup>, 最后两分子 NO<sup>-</sup> 生成 N<sub>2</sub>O 和 H<sub>2</sub>O<sup>[10]</sup>。真菌细胞色素 P450nor 催化 NO 还原的速度约为 300 umol/(min · kg), 是细菌 NO 还原酶的 5 倍<sup>[21-24]</sup>。其次与真菌发挥反硝化作用时对氧气的适应能力比细菌强等有关<sup>[7]</sup>。

而在实验室中腐皮镰刀菌与生物膜悬液协同作用时, 其对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的反硝化效率却低于腐皮镰刀菌纯菌株, 这可能提示微生物对 NO, NO<sub>x</sub> 的脱除机制与其对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的脱除机制存在差异。

目前, 关于腐皮镰刀菌本身就有反硝化作用, 其扩大培养后与生物膜共同作用能显著提高烟气脱氮(NO, NO<sub>x</sub>) 效率的研究很少。作为微生物的重要成员, 真菌对于微生物净化烟气中 NO, NO<sub>x</sub> 的异养反硝化作用应得到充分重视, 应研究发掘更多具有反硝化脱除 NO, NO<sub>x</sub> 的真菌菌种。真菌细胞色素 P450nor 可直接将部分 NO 还原为 N<sub>2</sub>O, 对这个更加经济的反硝化脱除 NO 途径应进行全面系统的深入研究, 这对于提高 NO, NO<sub>x</sub> 的脱除效率, 推动微生物净化烟气 NO, NO<sub>x</sub> 技术的工业化进程具有非常重要的意义。

### 3 结 论

1) 从脱氮塔中分离纯化的真菌 3LNB 菌株, 经形态观察、脱氮特性研究、ITS 序列分析, 通过 NCBI 序列比对, 鉴定真菌 3LNB 菌株为镰刀菌属的腐皮镰刀菌 *Fusarium solani*。

2) 高通量测序分析脱氮塔真菌群落结构发现, 在属水平上镰刀菌属(*Fusarium*) 的相对丰度为 0.73%; 在种水平上腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*) 的相对丰度为 0.04%, 充分证明了脱氮塔中镰刀菌属的腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*) 的存在。

3) 腐皮镰刀菌 3LNB 具有较强的反硝化脱氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 作用, 是一株异养反硝化真菌。

4) 扩大培养后的腐皮镰刀菌 3LNB 扩大培养液与生物膜微生物共同作用, 能显著提高脱氮塔对烟气中 NO, NO<sub>x</sub> 的脱除效率, NO, NO<sub>x</sub> 脱除效率分别提高 5.12%, 5.36%。这可能主要与真菌细胞存在细胞色素 P450nor 有关, 它具有较强的一氧化氮还原酶的性质。

### 参考文献

- [1] 赵毅, 王涵, 王添颖, 等. 吸附烟气中 NO<sub>x</sub> 的吸附剂研究进展[J]. 中国电力, 2015, 48(10): 157-160.  
ZHAO Yi, WANG Han, WANG Tianhao, et al. Study on adsorbents for NO<sub>x</sub> adsorption from flue gas[J]. Electric Power, 2015, 48(10): 157-160. (In Chinese)
- [2] 苏亚欣, 毛玉茹. 燃煤氮氧化物排放控制技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 6-13.  
SU Yaxin, MAO Yuru. Technologies for NO<sub>x</sub> emission control [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 6-13. (In Chinese)
- [3] 李惠琴. 浅谈雾霾与 PM2.5[J]. 环境研究与监测, 2016, 29(2): 73-76  
LI Huiqin. Preliminary analysis on haze and PM2.5[J]. Environmental Research and Monitoring, 2016, 29(2): 73-76. (In

- Chinese)
- [4] 邹平,陈金全,孙珮石,等.微生物法净化烟气中NO的机理[J].煤炭学报,2013,38(A02):460-465.  
ZOU Ping, CHEN Jinquan, SUN Peishi, *et al.* Research on the microbial purification mechanism of NO in the coal-fired flue gas[J]. Journal of China Coal Society, 2013, 38(A02): 460-465. (In Chinese)
- [5] MANCONI I, CARUCCI A, LENS P, *et al.* Simultaneous biological removal of sulphide and nitrate by autotrophic denitrification in an activated sludge system[J]. Water Science and Technology, 2006, 53(12): 91-99.
- [6] 李平,张山,刘德立.细菌好氧反硝化研究进展[J].微生物学杂志,2005,25(1):60-64.  
LI Ping, ZHANG Shan, LIU Deli. Research progress on aerobic denitrification of bacteria[J]. Journal Microbiol., 2005, 25(1): 60-64. (In Chinese)
- [7] SHOUN H, KIM D H, UCHIYAMA H, *et al.* Denitrification by fungi[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 94(3): 277-281.
- [8] KOBAYASHI M, MATSUO Y, TAKIMOTO A, *et al.* Denitrification a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(27): 16263-16267.
- [9] BAGGS E M. Soil microbial sources of nitrous oxide: Recent advances in knowledge, emerging challenges and future direction[J]. Current Opinion in Environmental Sustainability, 2011, 3(5): 321-327.
- [10] NAKAHARA K, TANIMOTO T, HATANO K, *et al.* Cytochrome P-450 55A1 (P-450dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(11): 8350-8355.
- [11] 姜阅,孙珮石,邹平,等.生物强化法提高生物塔烟气同时脱硫脱氮性能的实验研究[J].云南大学学报:自然科学版,2016,38(1):133-140.  
JIANG Yue, SUN Peishi, ZOU Ping, *et al.* Experimental research on the purification of biofilm-packing tower by bioaugmentation technique on removal of SO<sub>2</sub> and NO<sub>x</sub> simultaneously from flue gas[J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences, 2016, 38(1): 133-140. (In Chinese)
- [12] 毛永杨,王海玉,孙珮石.生物法同时脱除高温烟气中SO<sub>2</sub>和NO<sub>x</sub>的实验研究[J].云南大学学报:自然科学版,2012,34(2):227-231.  
MAO Yongyang, WANG Haiyu, SUN Peishi, *et al.* Study on biological simultaneous removal of SO<sub>2</sub> and NO<sub>x</sub> from high temperature flue gas by biological trickling filter[J]. Journal of Yunnan University: Natural Sciences, 2012, 34(2): 227-231. (In Chinese)
- [13] 纪晓娜,刘晶,左妍,等.RP-HPLC和麝香草酚法检测硝酸盐氮的比较[J].长春工程学院学报:自然科学版,2014,15(1):1-4.  
JI Xiaona, LIU Jing, ZUO Yan, *et al.* Comparison on nitrate by detections of RP-HPLC and thymol UV-Vis spectrophotometry[J]. Journal of Changchun Institute of Technology: Natural Science Edition, 2014, 15(1): 1-4. (In Chinese)
- [14] 柳玲,高晓庆,苗振华,等.离子色谱法与分光光度法测定水中亚硝酸盐含量的对比[J].中国给水排水,2016,32(2):93-96.  
LIU Ling, GAO Xiaoqing, MIAO Zhenhua, *et al.* Comparison between ion-chromatography and spectrophotometry for determining nitrite in water[J]. China Water & Wastewater, 2016, 32(2): 93-96. (In Chinese)
- [15] 周新丽,贺丹丹,王有才.对头孢菌素类抗生素的特点及临床应用方法的探讨[J].当代医药论丛,2015,13(13):150-151.
- [16] 刘郴州,林丽丹,温碧霞,等.氟康唑预防早产儿侵袭性真菌感染的效果[J].中华实用儿科临床杂志,2014,29(22):1751-1753.  
LIU Chenzhou, LIN Lidan, WEN Bixia, *et al.* Preventive effect of Fluconazole prophylaxis on invasive fungous infections of premature infants[J]. Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2014, 29(22): 1751-1753. (In Chinese)
- [17] 李平,张山,郑永良,等.反硝化真菌-细菌优化组合及其脱氮能力研究[J].环境科学与技术,2006,29(3):9-10.  
LI Ping, ZHANG Shan, ZHENG Yongliang, *et al.* Denitrification by screened and mix-cultured fungi and bacteria[J]. Environmental Science and Technology, 2006, 29(3): 9-10. (In Chinese)
- [18] BALLAG J M, TUNG G. Nitrous oxide released by soil fungi[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1972, 4(3): 271-276.
- [19] TAKAYA N, SHOUN H. Nitric oxide reduction, the last step in denitrification by *Fusarium oxysporum*, is obligatorily mediated by cytochrome P450nor[J]. Molecular and General Genetics, 2000, 263(2): 342-348.
- [20] 贵州农学院.生物统计附试验设计[M].北京:农业出版社,1980:51-60  
Guizhou Agricultural College. Biostatistics and experimental design[M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1980: 51-60. (In Chinese)
- [21] SHOUN H. Denitrification and anaerobic energy producing mechanisms by fungi[J]. Protein, Nucleic Acid and Enzyme, 2006, 51(5): 419-429.
- [22] ZUMFT W G. Cell biology and molecular basis of denitrification [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(4): 533-616.
- [23] 朱咏华,吴康,郑芒,等.根瘤农杆菌介导的丝状真菌筒青霉遗传转化的研究[J].湖南大学学报:自然科学版,2010,37(10):72-76.  
ZHU Yonghua, WU Kang, ZHENG Mang, *et al.* Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the *Penicillium simplicissimum* H5[J]. Journal of Hunan University: Natural Sciences, 2010, 37(10): 72-76. (In Chinese)
- [24] 刘云国,冯宝莹,樊霆,等.真菌吸附重金属离子的研究[J].湖南大学学报:自然科学版,2008,35(1):71-74.  
LIU Yunguo, FENG Baoying, FAN Ting, *et al.* Study on the biosorption of heavy metals by Fungi[J]. Journal of Hunan University: Natural Sciences, 2008, 35(1): 71-74. (In Chinese)