

厌氧氨氧化菌代谢有机物研究

高大文, 侯国凤, 陶 彧, 任南琪

(哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨 gaodw@hit.edu.cn)

摘 要: 以厌氧氨氧化菌(ANAMMOX 菌)为基础开发的工艺被认为是最为简捷的生物脱氮过程. 由于绝大多数废水中含有有机物, 有必要研究有机物对 ANAMMOX 菌产生的影响. 在 ANAMMOX 反应器内, 大量有机物的引入会抑制 ANAMMOX 菌的活性, 但是这种抑制作用往往是可逆的. 此外在所有已被发现的 5 个 ANAMMOX 菌属中, 有 4 个属能不同程度地代谢小分子有机物(如甲酸、乙酸、丙酸等). 综述了国内外在有机物对 ANAMMOX 菌及其工艺的影响研究领域所取得的成果, 分析近 5 年对 ANAMMOX 菌代谢有机物的研究, 从而为高氮低碳废水处理新途径提供新思路.

关键词: 厌氧氨氧化菌; 有机物; 抑制; 代谢

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2012)02-0089-05

Review of the studies on metabolizing organic matter by ANAMMOX bacteria

GAO Da-wen, HOU Guo-feng, TAO Yu, REN Nan-qin

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China, gaodw@hit.edu.cn)

Abstract: ANAMMOX bacteria is a kind of microorganisms that are related to the order Planctomycetales, able to autotrophically one-to-one combine ammonium and nitrite into dinitrogen gas. Based on ANAMMOX bacteria, ANAMMOX process is believed to be a shortcut pathway for biological nitrogen removal. Since most wastewater contains organic matter, it is of importance to understand the specific impact of organic matter on ANAMMOX bacteria. In an ANAMMOX reactor, large amount of organic matter could inhibit ANAMMOX activity, while such inhibitory is reversible. To date, among the five discovered ANAMMOX genera, four are demonstrated to be able to oxidize short chain organic matter, such as formate, acetate and propionate. This paper reviews the state-of-art of impact of organic matter on ANAMMOX bacteria, especially focuses on the catabolism of organic matter by ANAMMOX bacteria and the perspective application of such technology on the treatment of high nitrogen-carbon ratio wastewater.

Key words: ANAMMOX bacteria; organic matter; inhibitory; catabolism

厌氧氨氧化(ANAMMOX)是指一类微生物在厌氧条件下以亚硝酸盐为电子受体氧化铵盐,最终产生氮气的生物过程,该现象于1995年在荷兰被发现并命名^[1]. ANAMMOX 相比传统脱氮工艺具有能耗低、污泥产量少、节省外加碳源等显著优势. 一般认为 ANAMMOX 菌是自养细菌,以二氧

化碳或碳酸盐作为碳源,以铵盐作为电子供体,以亚硝酸盐/硝酸盐作为电子受体. ANAMMOX 菌生长缓慢(倍增时间 11 d)^[2],细胞产率极低,对周围环境敏感,因而富集培养极为困难,至今未获得 ANAMMOX 菌的纯菌株^[3]. 2005 年,有学者发现 ANAMMOX 菌 *Kuenenia stuttgartiensis* 等能够以丙酸盐等有机物作为电子供体,并在代谢有机物的过程中为细胞提供能量和碳源,从而暗示 ANAMMOX 菌可能具备异养特性. 但是该代谢过程中的某些特殊机理和途径(例如异养型厌氧氨氧化等)尚未被确证.

收稿日期: 2010-08-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21177033); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20092302110059).

作者简介: 高大文(1967—),男,教授,博士生导师;

任南琪(1959—),男,博士生导师,中国工程院院士.

目前全球已有至少 13 个以 ANAMMOX 工艺为主的污水处理实际工程项目,并广泛分布在欧洲一些国家(如荷兰、瑞士)和日本^[4].在污水处理领域,几乎所有的实际废水中均不同程度含有有机物,因此,研究不同有机物对 ANAMMOX 菌的影响对该工艺广泛应用于脱氮领域具有重要意义.

1 有机物对 ANAMMOX 的影响

自从厌氧氨氧化现象被发现后,很多学者从不同角度研究了 ANAMMOX 菌对不同有机物的耐受性和利用情况.包括不同有机负荷对 ANAMMOX 反应器的影响,不同种类有机物(甲醇、乙醇、葡萄糖、甲酸、醋酸和丙酸等)对 ANAMMOX 菌的影响,以及某种特定有机物(如丙酸)被 ANAMMOX 菌利用的情况等.

1.1 有机物引发 ANAMMOX 系统内各脱氮菌种间的竞争

实际的 ANAMMOX 反应器都是混菌系统,其脱氮功能也主要是硝化细菌、ANAMMOX 菌和反硝化菌共同作用的结果.例如,CANON 工艺(Completely autotrophic ammonium removal over nitrite,通过亚硝酸途径的完全自养生物脱氮)就是由亚硝化细菌和 ANAMMOX 菌共同完成的将氨氮转化为氮气的一种脱氮技术^[5].Toh 等^[6]在用 ANAMMOX 工艺处理焦化废水的研究中证实了反硝化菌的存在.胡勇等有^[7]发现在有机碳源(葡萄糖)存在的 ANAMMOX 反应器中,ANAMMOX 菌和反硝化菌可同时存在,适宜的 COD 与 NH_4^+-N 比值范围为 0~1.57.

少量有机物的引入对 ANAMMOX 菌的活性影响不大;但是大量有机物的加入将加剧反硝化菌与 ANAMMOX 菌之间的竞争,而反硝化过程因消耗 H^+ 引起微环境 pH 值升高^[8],也可能超出适合 ANAMMOX 菌生长的最佳 pH 范围,致使 ANAMMOX 菌的活性降低,从而导致 ANAMMOX 系统的脱氮效果降低.吕永涛等^[9]采用厌氧生物转盘的 ANAMMOX 反应器研究了不同有机物质量浓度对 ANAMMOX 菌活性及其脱氮性能的影响,连续试验的结果表明当 COD 为 50 mg/L 时,反硝化菌和 ANAMMOX 菌共同行使脱氮功能,总氮去除率高达 96.59%;当 COD 为 100 mg/L 时,氨氮的平均去除率只有 74.46%,ANAMMOX 作用被削弱.郑平等^[10]发现以酵母膏为有机碳源的 ANAMMOX 反应器的脱氮性能与容积总氮负荷有关,容积总氮负荷低于 $0.43 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,有机物对 ANAMMOX 反应器运行性能的影响较小.

由于种间竞争引起的 ANAMMOX 活性降低往往是可逆的.例如,周少奇等^[11]以实际生活污水作有机碳和无机碳源,认为有机碳的存在将会降低 ANAMMOX 菌的活性,质量浓度越高其抑制作用越强,但短时间内该抑制作用是可逆的.郑平等^[10]也发现停止添加有机物(酵母膏)并降低容积总氮负荷,可在短期内消除对 ANAMMOX 菌的抑制影响.

1.2 有机物对 ANAMMOX 菌的抑制作用

研究发现一些有机物对 ANAMOX 菌具有强烈的抑制作用,不同有机物的抑制强度不同,同种有机物对不同生存环境下的 ANAMMOX 菌的抑制强度也不同.

譬如对于甲醇,Guven 等^[12]报道称 0.5 mmol/L 的浓度就能使体系中 ANAMMOX 活性完全丧失;Jensen 等^[13]在对海底沉积物中 ANAMMOX 菌进行研究时发现 3.3 mmol/L 浓度仍使 ANAMMOX 系统具有 2% 活性;而在 Isaka 等^[14]的研究中,3.3 mmol/L 的甲醇对应的相对活性为 51%.这说明不同环境下的 ANAMMOX 菌对甲醇的敏感度不一样.究其抑制原理,可能是 ANAMMOX 菌细胞内的羟胺氧化还原酶把甲醇转变成甲醛,而甲醛通过对肽链的不可逆交叉耦合作用使 ANAMMOX 菌细胞内的某些关键酶失活^[12].

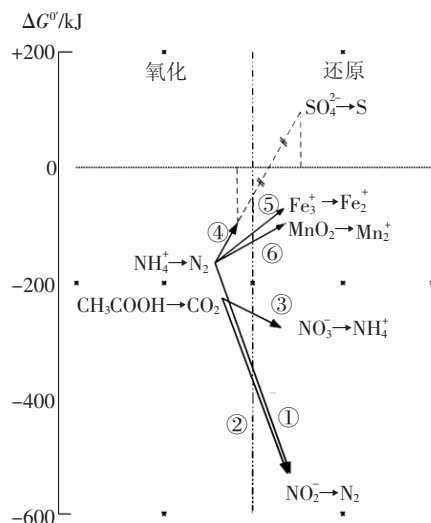
另外,Guven 等^[12]研究还表明 2 mmol/L 的乙醇对 ANAMMOX 的活性抑制率为 70%,而 Isaka 等^[14]的研究中,3.3 mmol/L 浓度的抑制率为 90%(抑制率指当有抑制剂存在时 ANAMMOX 菌的活性与无抑制剂时活性的比值).这不仅说明了不同环境下对 ANAMMOX 活性的抑制率不同,也说明 ANAMMOX 活性受甲醇的抑制作用比乙醇更敏感.Jensen 等^[13]还研究了乙炔对 ANAMMOX 菌活性的影响,当乙炔浓度为 0.022 mmol/L 时即可达到完全抑制.

2 ANAMMOX 菌代谢有机物

2.1 热力学分析

最初的研究认为,ANAMMOX 菌是专性能无机自养型细菌(chemolithoautotroph)^[15],它只能利用亚硝酸盐/硝酸盐为电子受体,以铵盐为电子供体,以无机碳为碳源.自养型的 ANAMMOX 菌缓慢的生长速率和极低的细胞产率在一定程度上限制了 ANAMMOX 工艺的广泛应用.随着对 ANAMMOX 菌研究的不断深入,发现 ANAMMOX 菌的代谢途径具有多样性,它能以有机物(如甲酸、乙酸、丙酸)为电子供体^[12,16],以硫酸盐为电子受

体^[17],甚至还能在以甲酸为电子供体还原高价态的 Fe 和 Mn^[18].从吉布斯自由能角度分析上述新颖的 ANAMMOX 菌代谢途径都是热力学可行的(图1).而实际上最初厌氧氨氧化现象的提出也正是基于热力学分析的结果^[3].

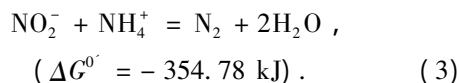
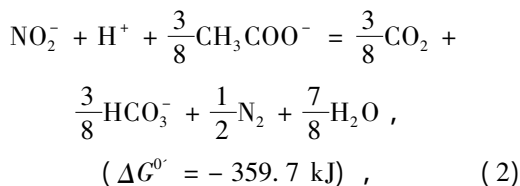
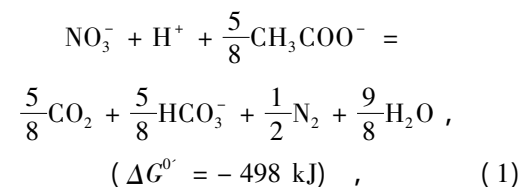


反应①是标准ANAMMOX过程,反应②~⑥为已经被实验验证存在的ANAMMOX途径.箭头长度表示该反应的吉布斯自由能的相对值.计算结果所参考的数据来源于文献[19].

pH=7.0 25℃ 1标准大气压.

图1 ANAMMOX菌细胞内氧化还原反应的自由能

基于热力学,厌氧氨氧化反应的自由能与采用乙酸作为电子供体将 NO_2^- 转化为氮气的反硝化反应自由能基本相当,并且低于将 NO_3^- 转化为 N_2 的反硝化反应自由能,反应式如下:



如果ANAMMOX菌能利用有机物,在理论上其增殖速度和细胞产率可能大大提高.于是一些学者对此进行了探究,发现某些ANAMMOX菌能够代谢一些小分子有机物.

2.2 代谢有机物产能

Guyen等^[12]最先发现某些有机物的确可以被ANAMMOX菌所利用,并被氧化为 CO_2 .他们发现虽然醇类物质(如甲醇、乙醇)会抑制厌氧氨

氧化过程,但是葡萄糖、甲酸盐和丙胺酸对其活性却没有影响,而乙酸盐和丙酸盐不仅不影响ANAMMOX菌的生存,还能够被其利用,特别是对丙酸盐的利用效率更高(每分钟每毫克细胞蛋白质可以代谢0.8 nmol丙酸盐).研究还发现,ANAMMOX菌利用丙酸盐时,必须以亚硝酸盐或硝酸盐为电子受体,且这一过程不受铵盐存在的影响.Kartal等^[20-21]发现了2种氧化丙酸盐和乙酸盐的ANAMMOX菌,并将其分别命名为*Anammoxoglobus propionicus*和*Brocadia fulgida*.目前已知能够代谢小分子有机物的ANAMMOX菌种分布于已知的5个属中的4个属,代谢有机物的速率如表1所示.

表1 不同种ANAMMOX菌对不同有机酸氧化速率^[21]

菌种	mmol · g ⁻¹ · min ⁻¹			
	<i>Brocadia anammoxidans</i>	<i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	<i>Anammoxoglobus propionicus</i>	<i>Brocadia fulgida</i>
甲酸	6.5 ± 0.6	5.8 ± 0.6	6.7 ± 0.6	7.6 ± 0.6
乙酸	0.57 ± 0.05	0.31 ± 0.03	0.79 ± 0.07	0.95 ± 0.04
丙酸	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.64 ± 0.05	0.310 ± 0.007

研究^[12]表明,ANAMMOX菌代谢丙酸盐的过程可能有两种途径:一种途径与反硝化过程类似,即以有机物作电子供体还原亚硝酸盐/硝酸盐为氮气;另外还可能有一种新的代谢途径——异化硝酸盐/亚硝酸盐还原为氨(即DNRA过程,ANAMMOX菌以硝酸盐/亚硝酸盐为电子受体,以有机物为电子供体,产物为铵盐和 CO_2 ,如图2).Kartal等^[12]认为ANAMMOX菌*Kuenenia stuttgartiensis*具有将DNRA和ANAMMOX协同作用的能力,即将铵盐(DNRA产物)和亚硝酸盐(原料/中间体)通过传统ANAMMOX途径转化为氮气.

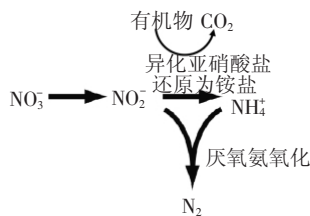


图2 厌氧氨氧化新途径(DNRA)示意图

2.3 同化作用

既然ANAMMOX菌能够代谢有机物,另一个关键问题是被代谢的有机物中C的最终去向,即ANAMMOX菌仅仅是在氧化有机物为 CO_2 的过程中摄取能量,还是将一部分有机碳合成为自身细胞物质.

Guyen 等^[12]利用含放射性¹⁴C 的丙酸盐和液体闪烁计数法检测到至少 50% 的丙酸盐被转化为 CO₂ 被 ANAMMOX 菌自身吸收的丙酸盐却不到 10% ,但由于当时实验条件所限 ,并非所有的放射性¹⁴C 都能追踪归宿 ,因此 ,推测有更多的丙酸盐被 ANAMMOX 菌同化吸收. 2006 年 ,Strous 等^[22]在 ANAMMOX 菌 *Kuenenia stuttgartiensis* 的基因组里发现了 4 个表达脂肪酸生物合成的基因片段 ,其中有 2 个片段明显包含已知的脂肪酸生物合成基因和 S - 腺苷甲硫氨酸(促进) 酶基因的同簇结合体. Rattray 等^[16]通过¹³C 标记的乙酸(CH₃-¹³COOH) 示踪实验 ,证明了 ANAMMOX 菌 *Brocadia fulgida* 能够通过乙酰辅酶 A 途径代谢乙酸进而合成阶梯烷脂质(Ladderane Lipid) 用于合成厌氧氨氧化体膜.

虽然基因组学研究结果和碳同位素标记实验都显示异养 ANAMMOX 可能存在 ,但是目前国内研究还不能完全确定 ANAMMOX 菌细胞中有机酸被同化的具体途径. 也有研究表明 ,ANAMMOX 菌 *Brocadia fulgida* 在利用有机物时经历一个极为低效的途径: 首先氧化乙酸盐为 CO₂ 获取能量 ,进而以 CO₂ 作为碳源合成细胞物质 ,而不是直接合成代谢有机物^[21].

此外 ,在微生物分类学中 根据不同能量来源可将微生物分为光能型(photo -) ,化能型(chemo -) 和放射性衰变能型(radio -) ;根据不同电子供体来源可将微生物分为无机型(- litho -) 和有机型(- organo -) ;根据不同碳的来源可将微生物分为自养型(- autotroph) 和异养型(- heterotroph) ^[23] . 那么对于能够同时以 NH₄⁺ 和有机物为电子供体 ,以无机碳和有机碳为碳源的 ANAMMOX 菌而言 ,至今并不清楚它们究竟是属于化能无机异养菌(chemolithoheterotroph) 还是化能无机自养与化能有机异养兼而行之的兼性细菌(mixotroph) . 笔者认为这一问题将成为该领域未来研究的重点之一.

3 ANAMMOX 工艺在高氮有机废水处理领域的应用前景

在污水生物处理系统中 ,相比传统生物脱氮技术 ,利用厌氧氨氧化所开发的工艺可以节省 90% 的运行费用和 50% 的空间体积 ,同时减少 N₂O 的产生和污泥的排放^[24] . 如果与其他工艺相结合 ,ANAMMOX 将是一个比较理想的生物脱氮方法. 到目前为止 ,很多学者利用实验室规模反应器通过接种不同的种泥成功富集了 ANAMMOX

菌 ,并对其特性进行多方面的研究^[25-28] . 据了解 ,目前全世界至少有 13 座正在运行的 ANAMMOX 系统 ,负责处理制革厂、半导体制造厂等产生的各种不同类型的含氮废水 ,但是由于 ANAMMOX 菌具有世代时间长、细胞产率低和对环境条件(如温度、溶解氧) 非常敏感、富集培养困难等缺点 ,而且有关 ANAMMOX 菌对有机物的代谢特性目前还处于探究阶段 ,因此 ,欲使 ANAMMOX 工艺在世界范围内广泛应用 ,还需要深入研究.

此外 ,由于大多数实际废水中含有机物 ,目前利用厌氧氨氧化工艺处理含氮含碳废水时普遍先去有机物 ,再进入厌氧氨氧化阶段 ,而有机物的去除往往采用好氧曝气的方法 ,这一方面会增加整个工艺的运行成本 ,另一方面剩余的溶解氧对后续 ANAMMOX 工艺也存在一定的负面影响. 众所周知 ,乙酸和丙酸都是厌氧污水处理中常见的短链脂肪酸^[29] ,如果某些 ANAMMOX 菌种被确定具有异养特性 ,则可以直接利用这些异养 ANAMMOX 菌实现高氮低碳废水的直接处理. 同时 ,由于大多数异养菌的生长速率比自养菌快 ,以异养 ANAMMOX 菌为主体的 ANAMMOX 反应器的启动时间则可能被大大缩短. 因此 ,深入研究以铵盐和有机物为电子供体、并以有机物为碳源的异养 ANAMMOX 菌的代谢机理和应用条件 ,将为高氮低碳废水的治理开辟新的研究方向.

参考文献:

- [1] MULDER A , GRAAF van de A A , ROBERTSON L A , et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor [J]. FEMS Microbiology Ecology , 1995 , 16(3) : 177 - 183.
- [2] STROUS M , HEIJNEN J J , KUENEN J G , et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology , 1998 , 50(5) : 589 - 596.
- [3] KUENEN J G. Anammox bacteria: from discovery to application [J]. Nature Reviews Microbiology , 2008 , 6(4) : 320 - 326.
- [4] SCHMID M C , MAAS B , DAPENA A , et al. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology , 2005 , 71(4) : 1677 - 1684.
- [5] THIRD K A , SLIEKERS A O , KUENEN J G , et al. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria [J]. Systematic and Applied Microbiology , 2001 , 24:

- 588 – 596.
- [6] TOH S K , ASHBOLT N J. Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2002 , 59(2/3) : 344 – 352.
- [7] 胡勇有, 梁辉强, 朱静平, 等. 有机碳源环境下的厌氧氨氧化批式实验 [J]. *华南理工大学学报: 自然科学版* , 2007 , 35(6) : 710 – 715.
- [8] 周少奇. 厌氧氨氧化与反硝化协同作用化学计量学分析 [J]. *华南理工大学学报: 自然科学版* , 2006 , 34(5) : 1 – 4.
- [9] 吕永涛, 陈祯, 吴红亚. 有机物浓度对厌氧氨氧化脱氮性能影响试验研究 [J]. *环境工程学报* , 2009 , 3(7) : 1189 – 1192.
- [10] 郑平, 吴明生, 金仁村. 有机物对 ANAMMOX 反应器运行性能的影响 [J]. *环境科学学报* , 2006 , 26(7) : 1087 – 1093.
- [11] 李捷, 张杰, 周少奇. TOC 与 IC 对厌氧氨氧化反应的影响研究 [J]. *给水排水* , 2008 , 34(11) : 157 – 160.
- [12] GUVEN D , DAPENA A , KARTAL B , *et al.* Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium – oxidizing bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2005 , 71(2) : 1066 – 1071.
- [13] JENSEN M M , THAMDRUP B , DALSGAARD T. Effects of specific inhibitors on anammox and denitrification in marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73(10) : 3151 – 3158.
- [14] ISAKA K , SUWA Y , KIMURA Y , *et al.* Anaerobic ammonium oxidation (anammox) irreversibly inhibited by methanol [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2008 , 81(2) : 379 – 385.
- [15] STROUS M , GERVEN E V , ZHENG P , *et al.* Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process in different reactor configurations [J]. *Water Research* , 1997 , 31(8) : 1955 – 1962.
- [16] RATTRAY J E , GEENEVAASEN J A J , VAN NIFTRIK L A , *et al.* Carbon isotope-labelling experiments indicate that ladderane lipids of anammox bacteria are synthesized by a previously undescribed , novel pathway [J]. *FEMS Microbiology Letters* , 2009 , 292(1) : 115 – 122.
- [17] 张蕾, 郑平, 何玉辉, 等. 硫酸盐型厌氧氨氧化性能的研究 [J]. *中国科学 B 辑* , 2008 , 38(12) : 1113 – 1119.
- [18] STROUS M , PELLETIER E , MANGENOT S , *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome [J]. *Nature* , 2006 , 440(7085) : 790 – 794.
- [19] RITTMANN B E , MCCARTY P L. *Environmental biotechnology: principles and applications* [M]. New York: McGraw Hill , 2001.
- [20] KARTAL B , RATTRAY J , VAN NIFTRIK L A , *et al.* Candidatus " Anammoxoglobus propionicus " a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. *Systematic and Applied Microbiology* , 2007 , 30(1) : 39 – 49.
- [21] KARTAL B , NIFTRIK van L A , RATTRAY J , *et al.* Candidatus Brocadia fulgida: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium [J]. *FEMS Microbiology Ecology* , 2008 , 63(1) : 46 – 55.
- [22] STROUS M , PELLETIER E , MANGENOT S , *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome [J]. *Nature* , 2006 , 440(6) : 790 – 796.
- [23] KARL D M. Microbial oceanography: paradigms , processes and promise [J]. *Nature* , 2007 , 5(10) : 759 – 769.
- [24] PILCHER H. Microbiology: pipe dreams [J]. *Nature* , 2005 , 437(7063) : 1227 – 1228.
- [25] TSUHIMA I , OGASAWARA Y , KINDAICHI T , *et al.* Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors [J]. *Water Research* , 2007 , 41(8) : 1623 – 1634.
- [26] STAR van der W R L , ABMA W R , BLOMMERS D , *et al.* Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam [J]. *Water Research* , 2007 , 41(18) : 4149 – 4163.
- [27] NAKAJIMA J , SAKKA M , KIMURA T , *et al.* Enrichment of anammox bacteria from marine environment for the construction of a bioremediation reactor [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2008 , 77(5) : 1159 – 1166.
- [28] CHAMCHOI N , NITISORAVUT S. Anammox enrichment from different conventional sludges [J]. *Chemosphere* , 2007 , 66(11) : 2225 – 2232.
- [29] 任南琪, 赵丹, 陈晓蕾, 等. 厌氧生物处理丙酸产生和积累的原因及控制对策 [J]. *中国科学 B 辑* , 2002 , 32(1) : 83 – 89.

(编辑 刘 彤)