



主持人: 葛成军

不同氮负荷下 ANAMMOX 运行效能及菌群动态变化

郭梦霞^{1#}, 符祥壮¹, 周欣玮¹, 徐文^{1*}, 王德欣¹, 余明², 柏晓²

(1. 海南大学生态与环境学院, 海南 海口 570228 中国; 2. 海南天鸿市政设计股份有限公司, 海南 海口 570208 中国)

摘要: 采用聚氨酯海绵填料作为厌氧氨氧化菌的生物膜载体, 富集厌氧氨氧化菌, 探究不同进水氮负荷条件下生物膜系统的脱氮性能及微生物群落变化。结果表明: 随着进水氮负荷的上升, 总氮去除率不断提高, 稳定期总氮去除率高达 85.79%, 出水氮负荷为 $0.26 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, 总氮去除达到国家一级标准; 同时通过扫描电镜观察到聚氨酯海绵载体上形成了“菜花状”的生物膜, 随后通过测序结果表明系统中的厌氧氨氧化菌由 *Candidatus_Brocadia* 未明确分类地位的菌属组成, 稳定期占比高达 29.80%, 最后, 总结了在高负荷条件下厌氧氨氧化体系的极佳效能得益于厌氧氨氧化菌属与其他菌属之间的共同协作, 即硝态氮反硝化形成的亚硝态氮将作为原料供给厌氧氨氧化的代谢, 为今后厌氧氨氧化菌群相关代谢研究及工程实际应用提供综合指导。

关键词: 厌氧氨氧化菌; 生物膜; 聚氨酯海绵; 菌群特征; HRT

中图分类号: X522 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2025)04-0616-11

郭梦霞, 符祥壮, 周欣玮, 等. 不同氮负荷下 ANAMMOX 运行效能及菌群动态变化 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(4): 616-626. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240053

随着社会发展, 大量的含氮废水被排放在环境中, 致使水体富营养化从而对生态环境造成极大的危害^[1]。厌氧氨氧化是一种新型的脱氮技术, 是厌氧氨氧化菌以 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 作为电子受体, 在缺氧条件下氧化 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 生成氮气(N_2)和少量的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ ^[2-3]。与传统的硝化-反硝化工艺相比, 厌氧氨氧化工艺具有降低能耗, 减少污泥产生, 脱氮率高等优点^[4]。然而, 厌氧氨氧化细菌(anaerobic ammonia oxidising bacteria, AnAOB)生长缓慢, 菌体易流失^[5], 同时对环境条件非常敏感, 如溶解氧(DO)^[6]、温度^[7]、底物质量浓度^[8]、pH^[9]、水力停留时间(hydraulic retention time, HRT)^[10]等环境因素都会直接影响厌氧氨氧化菌的活性, 进而导致工艺性能下降等问题。

投加载体是截留 AnAOB、提高厌氧氨氧化脱氮性能的有效方法之一^[11]。载体可以为微生物的生长和增殖提供良好的生存环境, 降低剪切力的风险^[12], 为 AnAOB 提供厌氧环境, 且有助于

富集优势菌群^[13-14]。安雪迪等^[15]利用聚氨酯海绵填料富集厌氧氨氧化生物膜, 经过 120 d 的运行后, 容积氮去除负荷从 0.08 提升至 $3.39 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, 系统表现出良好的适应性和氮去除率。水力停留时间(HRT)是厌氧氨氧化工艺中的一个重要参数^[16], 会影响反应器的运行效能及微生物群落的构建。在大多数典型的厌氧氨氧化工艺系统中, HRT 均为 16~24 h, 但是较长的 HRT 会阻碍进水氮负荷(Influent nitrogen loading rate, NLR)的提升^[17]。同时, HRT 还会直接影响微生物生存的环境和脱氮效率, Karasuta 等^[18]的研究表明 HRT 的降低使得 NLR 增加, 从而影响脱氮效率。Li 等^[19]研究显示在氮负荷为 $3.6 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 、水力停留时间为 2 h 的条件下, 膜生物反应器的脱氮效率最高, 根据测序结果表明这主要得益于菌群之间的相互协作。厌氧氨氧化系统中微生物群落的相互作用也是影响代谢活性的关键问题。代谢交换和交叉喂养在

收稿日期: 2024-03-26

修回日期: 2024-04-01

基金项目: 海口市重点科技计划项目(RZ2300005613); 国家自然科学基金(52100038)

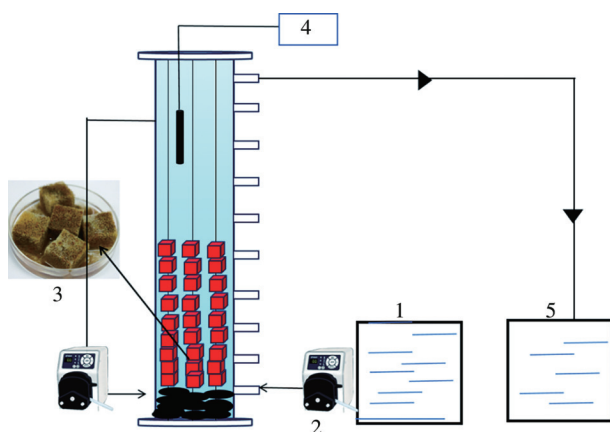
*第一作者: 郭梦霞(1999—), 女, 海南大学生态与环境学院 2021 级硕士研究生。E-mail: 1250842608@qq.com

*通信作者: 徐文(1966—), 男, 副教授, 硕导。研究方向: 生态环境修复技术、环境工程技术, E-mail: 454004953@qq.com

微生物群落中无处不在,但是目前针对 NLR 提升对厌氧氨氧化工艺的运行的整体效能及微生物群落中功能微生物的生理、生态特征之间的平衡很少被报道。因此,了解厌氧氨氧化细菌与其他细菌的交叉喂养机制也很重要。笔者选取了聚氨酯海绵作为生物膜载体,旨在研究以下几个方面:(1)阐明 NLR 的提高在长期运行过程中对反应器运行效能的影响;(2)讨论在 NLR 变化下生物膜的形态变化;(3)根据微生物多样性变化分析菌群的动态演化。

1 材料及方法

1.1 试验装置 反应器结构如图 1 所示,反应器为改进 UASB 反应器,直径 8.5 cm,高 90 cm,有效容积 5.10 L,底部用鹅卵石铺垫防止菌种掉落形成死区对厌氧氨氧化微生物群落造成影响,外接回流装置加速生物膜的形成,填料为聚氨酯海绵,由于其为轻质填料易漂浮,故使用铁丝串联后投入反应器中,填充率为 30%,反应器内装有加热器控制温度为 $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$,反应器外壁使用锡箔纸进行包裹避免光源的干扰。



1.进水箱;2.蠕动泵;3.聚氨酯海绵填料;4.加热器;5.出水箱。

1. Feed tank; 2. Peristaltic pump; 3. Polyurethane sponge filler; 4. Heater; 5. Outlet tank.

图 1 反应器装置

Fig. 1 Reactor setup

1.2 进水水质和接种污泥 试验用水的合成废水分别含有 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$,由 NH_4Cl 和 NaNO_2 提供并按 1 : 1.32 进行配制;矿质元素为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 KH_2PO_4 ($36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 CaCl_2 ($2.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);微量元素 I : EDTA ($5\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($5\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);微量元素 II : EDTA

($15\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($990 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($430 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($190 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($210 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、 H_3BO_4 ($14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);pH 由 NaHCO_3 调节至 7.5 ± 0.4 ;模拟城市生活污水,进水流量为 $6 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。合成废水在使用前持续通入 N_2 约 30 min,以确保系统中溶解氧质量浓度低于 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。接种污泥为实验室驯化良好的厌氧氨氧化颗粒污泥,厌氧氨氧化细菌主要包含 *Candidatus_Kuenenia*、*Candidatus_Jettenia* 及 *Candidatus_Brocadia* 3 种。

1.3 生物填料 试验所需的填料为聚氨酯海绵,如图 2 所示,由于其多孔性、高比表面积和潜在的阳离子交换能力,具有高效的生物质截留能力和基质吸附能力,可以延长厌氧氨氧化菌的停留时间,使厌氧氨氧化污泥能够形成生物膜。这些生物膜具有更稳定的结构,可以进一步提高厌氧氨氧化菌在反应器中的停留时间。

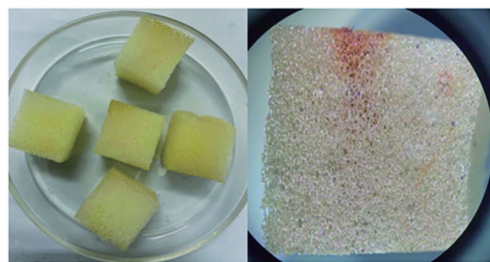


图 2 聚氨酯海绵填料

Fig. 2 Polyurethane sponge filler

1.4 运行条件 系统总运行时间为 150 d:反应器启动阶段,HRT 设定为 8 h,设置进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度为 20 和 $26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;第 50 天开始,进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度保持不变,改变 HRT。

试验阶段分为启动阶段,与水力负荷增加段。保持进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度不变,通过调缩短 HRT 逐渐增加氮负荷率(NLR)。以氮负荷增加段与水利负荷增加段的氮损为分析视角,可客观反映厌氧氨氧化体系的抗负荷水平与稳定性特征,其详细的操作条件示于表 1 中。

1.5 分析项目及方法 在长期的试验运行中,每 2 d 采集 1 次水样,然后根据国家标准方法,测定水质指标。分析前,通过 $0.45 \mu\text{m}$ 注射过滤器过滤样品。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 采用纳氏试剂分光光度法、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 使用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 采取苯酚二磺酸分光光度法。总氮为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$

表 1 反应器的运行条件

Tab. 1 Operating conditions for the reactor

运行时间 Time/d	进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	进水 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ / ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	HRT/h	进水NLR/ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$)
1 ~ 50	20 ± 3.21	25.98 ± 3.02	8	0.15 ± 0.01
51 ~ 100	20 ± 5.02	28.72 ± 2.76	6	0.20 ± 0.07
101 ~ 150	20 ± 3.11	28.37 ± 4.25	4	0.31 ± 0.02

和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 之和,数据分析和绘图由 Origin 完成。

1.5.1 生物膜形态分析 扫描电镜样品制备一般步骤如下:用磷酸盐缓冲液冲洗填料表面;加入戊二醛放入冰箱中固定;使用不同质量浓度的乙醇和乙酸异戊酯等比例混合进行脱水、置换和干燥;最后,采用离子溅射镀膜机对样品进行金属镀膜,并采用扫描电镜对不同阶段的生物膜和生物载体进行形态学表征。污泥样品通过奥特光学显微镜 SZ650 进行观察并进行拍照。

1.5.2 微生物分析 在各阶段运行稳定后的第 1 天(种泥当天、50 d、100 d、150 d)将载体放在烧杯中用超声波清洗机使载体上的生物膜脱落并采集,以分析微生物群落结构。使用细菌 16 s rRNA V3 ~ V4 区的引物 338 F(CTCTCTACGGGAGGCAG CAG)和引物 806 R(GGAC ACTACHVGGGTWCTT AAT)在聚合酶链反应(PCR)中扩增 DNA^[20]。之后在上海美吉生物医药科技有限公司的 Illumina Miseq 2000 平台上进行 Illumina 测序。将测序获得的原始数据序列进行质控和过滤,区分样本后进行分类操作单元(OTU)聚类分析和物种分类学分析。基于分类学信息,在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。

2 结果与分析

2.1 厌氧氨氧化生物膜系统的氮去除性能 反应器运行过程中的氮质量浓度变化见图 3。该试验可以分为 3 个不同的阶段。在初始阶段(1 ~ 50 d),平均的进水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 分别为 23.10 和 25.98 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此外, HRT 维持在 8.00 h。第 1 周出水的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 去除率较低。运行 50 d 后,出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度平均为 5.54 和 2.68 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。平均出水 TN 质量浓度为 10.44 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 低于 GB 18918—2002 中的一级标准(15.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。出水 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 质量浓度呈上升趋势,最终平均值为 2.22 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 此时 $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的平均值为

1.34 高于理论值 1.32, $\Delta\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的平均值为 0.13 低于理论值 0.26。

在第 2 阶段(51 ~ 100 d), 将 HRT 调整为 6.00 h。此时氮负荷率(NLR)从 0.16 $\text{kg}\cdot\text{N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ 至 0.21 $\text{kg}\cdot\text{N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, 随着 HRT 的降低, 第 1 周出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度分别为 4.81 和 2.17 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, TN 去除率为 79.29%。随着生物膜的发育,反硝化作用逐渐减弱,厌氧氨氧化作用增强^[19], TN 去除率在第 62 天提升至 84.50%, 随后平均出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 质量浓度分别为 1.08 和 0.63 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这一阶段平均出水 TN 质量浓度为 8.10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此阶段厌氧氨氧化菌活性上升,但是 $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的平均值为 1.28, 低于理论值 1.32。

在第 3 阶段(101 ~ 150 d)将 HRT 从 6.00 h 下降至 4.00 h, HRT 的改变使得氮负荷继续提升,这一阶段 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的去除率一直在 90.00% 以上,并未受到 HRT 的冲击, TN 去除率也高达 85.79%, 反应器即使在较低的 HRT 条件下反应器依旧保持良好的脱氮效能。 $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\Delta\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的比值分别为 1.30 和 0.27, 均接近理论值, 整体运行平稳, 此时反应器厌氧氨氧化反应占主导地位^[21]。

2.2 厌氧氨氧化生物膜形态变化 为了更深入地了解厌氧氨氧化生物膜的微观结构, 采用立体显微镜和扫描电镜对各个阶段结束后采集的污泥样品进行了观察。图 4 表示不同阶段生物载体和生物膜的形态特征的变化。整个运行过程中, 用立体显微镜观察到聚氨酯海绵载体上生物膜颜色经历了从白色(0 d)到略带红色(50 d)的逐渐变化, 然后逐渐加深红色, 最后变成典型的红色(150 d)(图 4-b)。AnAOB 的颜色通常为红色, 已显示其来源于细胞色素 C^[22], 且显色度与 AnAOB 的量和活性息息相关^[23]。同时还观察到载体的多空结构有利于厌氧氨氧化菌体的截留, 随着反应器的运行, 可以观察到载体上布满了红色生物膜, 在运行期间内, 污泥形态逐渐从接种时的微小絮体转变为团聚的生物膜, 附着在生物填料表面的污泥结构逐渐变得致密(图 4-a)。

2.3 微生物群落分析

2.3.1 微生物多样性分析 在每个阶段结束之后收集(0、50、100 和 150 d)生物膜样品, 分别标记为种

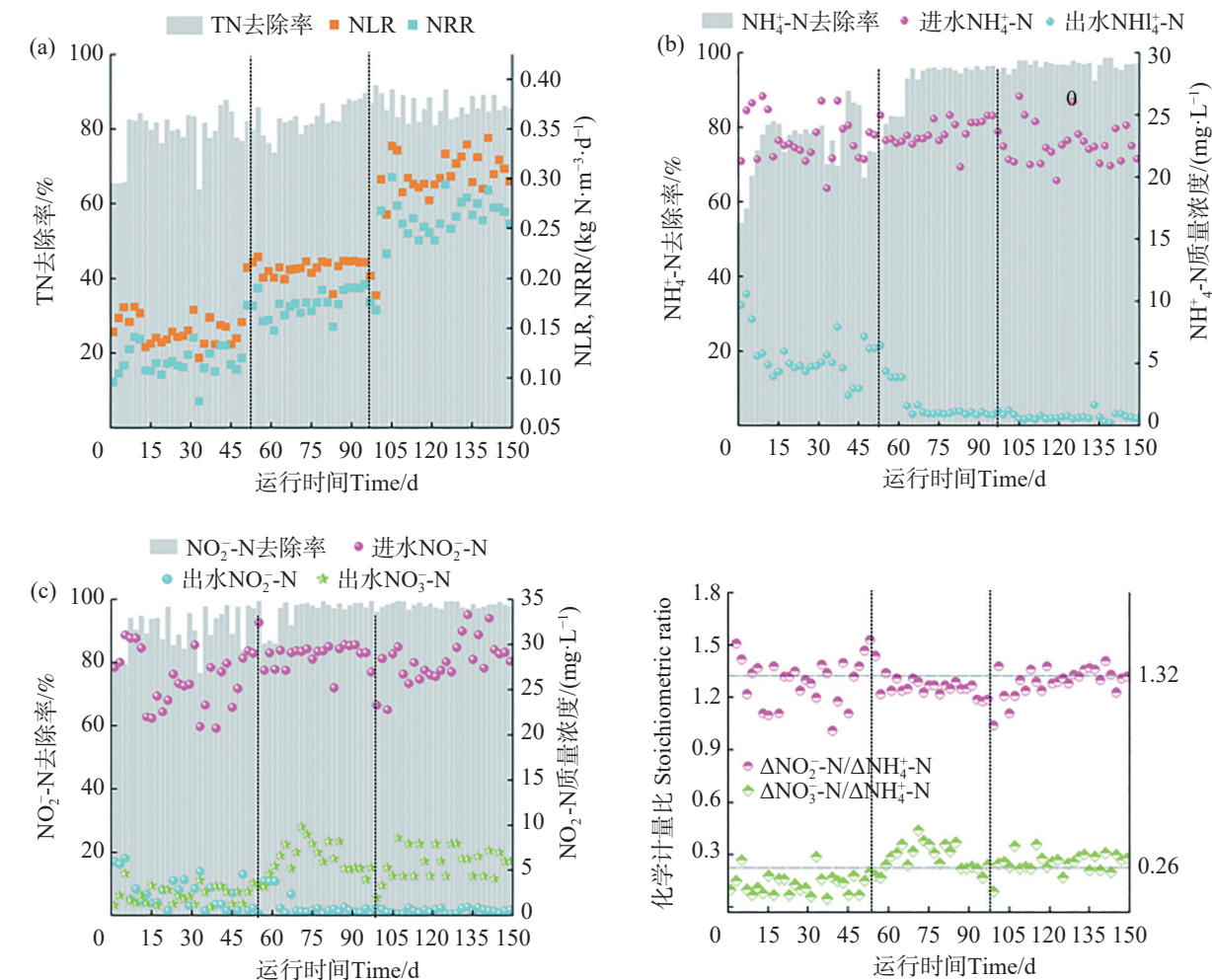
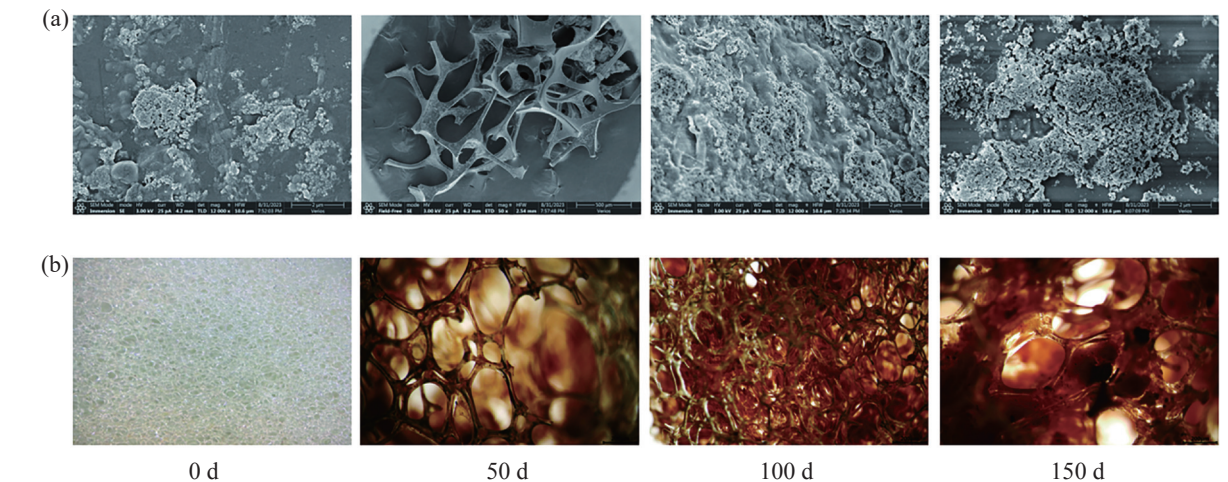


图 3 反应器脱氮性能及化学计量比

Fig. 3 Nitrogen removal performance and stoichiometric ratio of the reactor



a.在扫描电镜下观察厌氧氨氧化生物膜的微观结构。b.在立体显微镜下观察成熟厌氧氨氧化生物膜的外观。

a.Observation of the microstructure of anammox biofilm under scanning electron microscope; b.Observation of the morphology of mature anammox biofilm under SEM.

图 4 反应器生物膜形态变化

Fig. 4 Morphological changes of the reactor biofilm

泥当天、50 d、100 d 和 150 d 用于 16 s rRNA 基因测序。Alpha 多样性是指一个特定区域或者生态系统内的多样性,常用的度量指标有 Chao1、Shannon、Simpson 等反映富集培养过程微生物群落多样性

特征。4 个样本的覆盖率均大于 0.99,说明测序深度可以代表整个细菌群落(表 2),根据 Alpha 多样性指数结果可知,生物膜的 OTU 数随着反应器的运行逐渐增加。在整个反应过程中,Shannon, Simpson 用于描述微生物群落的多样性,随着

NLR 的变化,微生物多样性在第 1 和第 2 阶段大多逐渐上升,在第 3 阶段下降,ACE、Chao1 指数用来表征微生物群落丰度的变化则一直下降。韦恩图进一步揭示了 4 个样品中共有的 OTU 数为 488,这表明在每个样品中存在明显的差异(图 5)。

表 2 反应器微生物多样性指数

Tab. 2 Microbial diversity index of the reactor

样本 Sampling	总序列条数 Total sequences	抽平序列数 Rarefaction	OTUs	多样性指数 Diversity index				
				Shannon	Simpson	ACE	Chao1	coverage
0 d	70 736	50 922	782	3.761	0.106	827.419	808.235	0.998
50 d	51 705		762	4.245	0.048	824.841	802.552	0.998
100 d	53 649		620	4.166	0.049	804.580	787.116	0.998
150 d	50 922		774	3.906	0.062	699.762	680.921	0.998

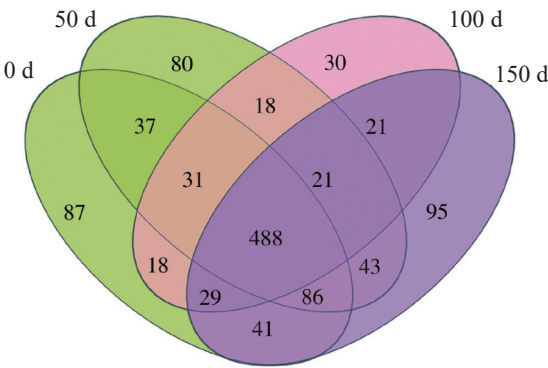


图 5 微生物群落韦恩图

Fig. 5 Venn diagram of microbial communities

2.3.2 门分类水平上菌群结构分析 细菌群落在门水平上的相对丰度如图 6 所示。反应器中的微生物可分为 10 类,其他未分类细菌归为“other”。结果显示,各个样品的主要们包括变形菌门 (Proteobacteria 29.35%~ 36.97%),绿弯菌门 (Chloroflexi 12.53%~ 25.92%)、浮霉菌门 (Planctomycetota 11.81%~ 30.37%)、拟杆菌门

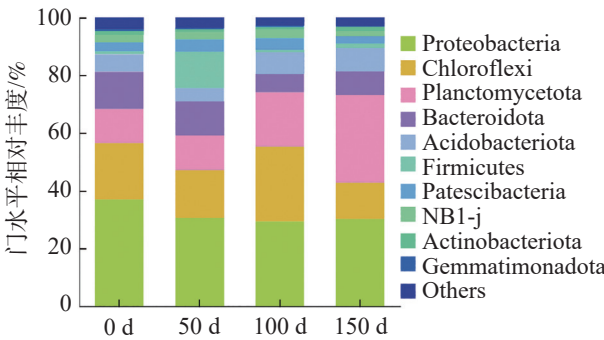
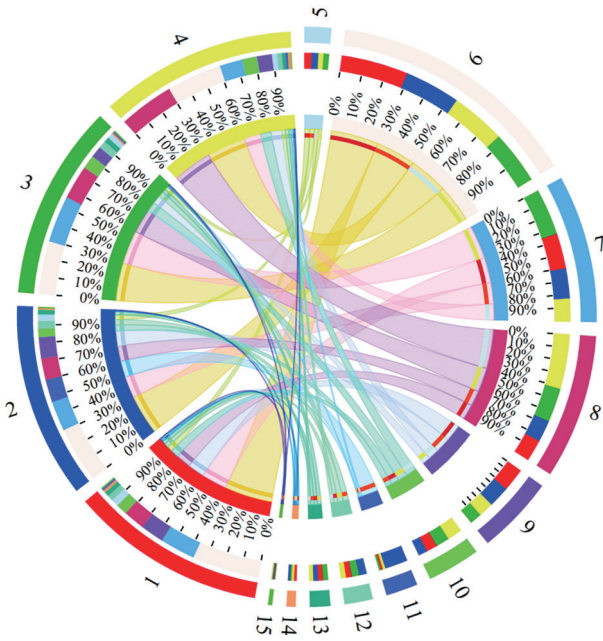


图 6 微生物群落门水平分布

Fig. 6 Distribution of microbial community at the phylum level

(Bacteroidota 6.26%~ 12.90%)、酸杆菌门 (Acidobacteriota 4.65%~ 8.22%)和厚壁菌门 (Firmicutes 0.81%~ 12.61%)。Proteobacteria 中含有许多异养反硝化菌和硝化菌,这些硝化菌和反硝化菌经常出现在厌氧氨氧化系统中,通过消耗溶解氧为 AnAOB 提供严格的厌氧环境^[24],如图 7



1. 种泥当天 (0 d); 2. 50 d; 3. 100 d; 4. 150 d; 5. 其他; 6. 变形菌门; 7. 绿弯菌门; 8. 浮霉菌门; 9. 拟杆菌门; 10. 酸杆菌门; 11. 厚壁菌门; 12. 骸骨细菌门; 13. NB1-j; 14. 放线菌门; 15. 芽单胞菌门。

1. 0 d; 2. 50 d; 3. 100 d; 4. 150 d; 5. others; 6. Proteobacteria; 7. Chloroflexi; 8. Planctomycetota; 9. Bacteroidota; 10. Acidobacteriota; 11. Firmicutes; 12. Patescibacteria; 13. NB1-j; 14. Actinobacteriota; 15. Gemmatimonadota.

图 7 样品与物种关系(门水平)

Fig. 7 Sample-species relationships (phylum level)

所示,在不同的氮负荷条件下 Proteobacteria 一直处于下降趋势,最终下降至 30.23%,在最后一个阶段达到最高值 30.37%。

2.3.3 属水平微生物群落分析 在属的水平上(图 8),根据其生态功能分为厌氧氨氧化菌、反硝化菌和硝化菌 3 大类。厌氧氨氧化菌主要包括 4 类 *Candidatus_Brocadia*、*Candidatus_Annamoxoglobus*、*Candidatus_Jettenia* 和 *Candidatus_Kuenenia*。随着 NLR 上升, *Candidatus_Brocadia* 含量一直占据主导地位,在稳定期(100 ~ 150 d)达到 29.80%。

反硝化菌如 *Denitratisoma* 和 *Dokdonella* 可以利用细胞代谢或微生物死亡的有机质进行硝酸盐和亚硝酸的还原^[25],随着 HRT 的下降丰度降为 12.28% 和 0.37%。*SBR1031* 一直处于上升趋

势,稳定期占 14.05%,并且先前的研究表明 *SBR1031* 的代谢功能与氨氮有关^[26]。*SBR1031* 在不含有机碳化合物的 AnAOB 反应器中被广泛检测到,并且可以使用胞外聚合物(Extracellular polymers, EPS)作为碳源,与细胞聚集密切相关,随着 HRT 的上升, AnAOB 分泌 EPS 供 *SBR1031* 使用,同时产生的 NO_3^- -N 被反硝化菌利用发生部分反硝化作用生成 NO_2^- -N 被 AnAOB 利用,菌群之间发生底物的交换进行交叉喂养达到协同脱氮的效果;除此之外系统中的反硝化菌,如 *OLB13*、*A4b*、*SJA-15*,在微生物群落中表现出明显的优势。*OLB13*、和 *A4b* 属于 *Chloroflexi*,可以清除细胞碎片和细胞外蛋白,从而促进细菌聚集^[27]。值得注意的是,在 4 个样品中也检测到了少量的

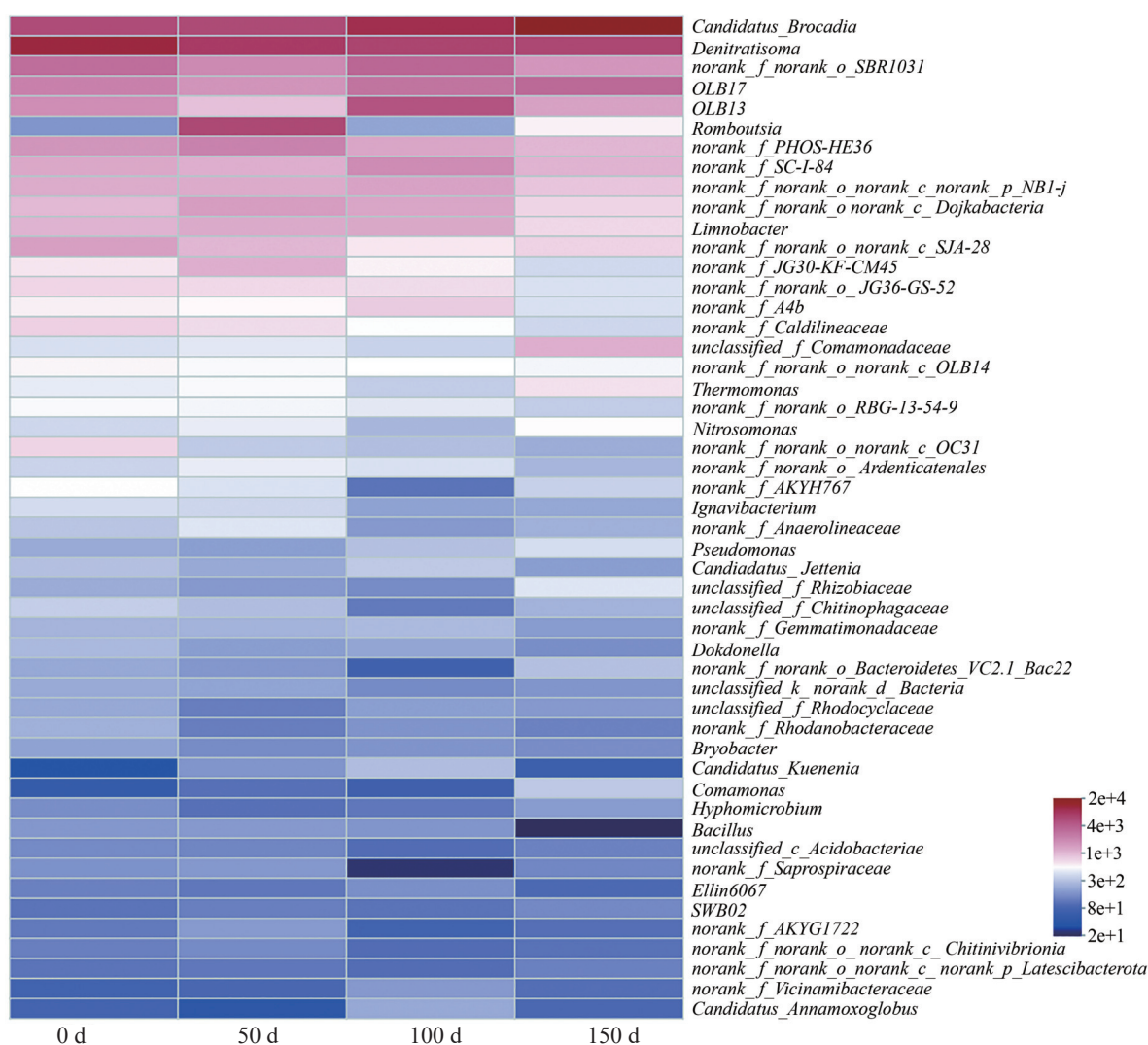


图 8 微生物群落属水平热图分析

Fig. 8 Heatmap analysis of microbial communities at the genus level

Nitrosomonas 在种泥中的丰度为 0.07%, 在稳定期为 0.05%。

2.3.4 16s rRNA 微生物群落的功能 16s rRNA 高通量测序结果可以用来预测微生物群落的功能。PICRUST2 功能预测用来预测环境样本中微生物群落的功能信息, 通过功能组成和丰度

变化了解环境变化过程中一些潜在的微生物功能特征^[28], 得到 COG 功能丰度图如下(图 9)。生物膜中丰度较高的功能分别是能源的产生和转化功能、氨基酸转运和代谢功能、翻译、核糖体结构和生物生成功能、细胞壁/膜/胞膜的生物生成功能, 以及复制重组和修复功能。

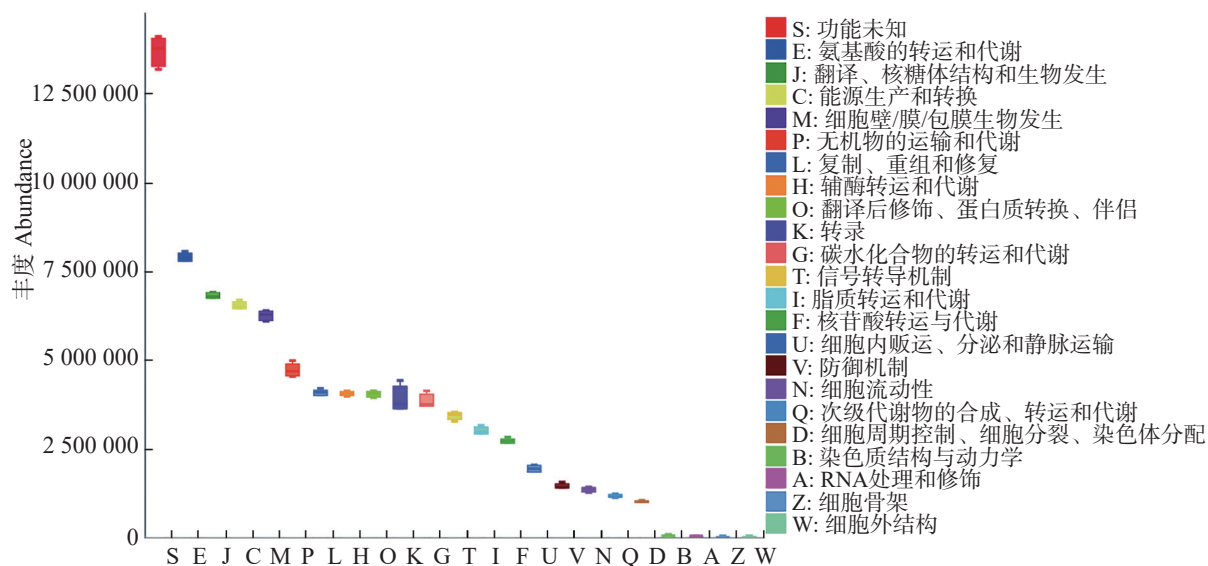


图 9 微生物群落功能的 COG 功能丰度变化

Fig. 9 Changes in COG functional abundance for microbial community functions

3 讨论

本研究利用聚氨酯海绵填料作为厌氧氨氧化菌的生物膜载体, 富集厌氧氨氧化菌, 通过设置不同进水氮负荷观察生物膜系统的脱氮性能及微生物群落变化, 结果表明: 随着进水氮负荷的上升, 总氮去除率不断提高, 稳定期总氮去除率高达 85.79%, 这可能是系统中存在许多异养菌, 环境的改变导致微生物自溶释放有机氮, 反硝化菌可以利用其他菌种自溶释放的有机物发生反硝化反应^[29], $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 在微生物繁殖过程中会被消耗掉, 而进水中的溶解氧也会氧化部分 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 。因此, $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$ 低于厌氧氨氧化的理论比值^[30], 这与高逸凡等^[31] 研究结果相反, 厌氧氨氧化菌活性在第三阶段最高, 生物膜发育成熟, AnAOB 与系统中异养菌共存达到一个平稳的状态, 为证明猜想后续对微生物群落进行分析。有研究结果^[32] 表明, 随着 HRT 的降低, 促使微生物分泌更多的胞外聚合物 (extracellular polymers, EPS) 来抵御外界环境条件的变化。除了生物膜表面颜色的变化之外, 生物膜结构的稀疏性也有相应的变化。

测序结果表明: 生物膜含有许多不同形式的微生物区系, 如球菌、杆菌和少数丝状细菌^[33], 但球菌最多。球菌可能为 AnAOB, 杆菌可能为反硝化菌, 这与 Wang 等^[34] 的结果一致。此外, 丝状细菌可以为球形 AnAOB 聚集提供骨架^[35], 在第 50 天后, 生物膜中的微生物呈现出具有不规则菜花状形状的压实结构, 表明是厌氧氨氧化菌群逐渐被所分泌 EPS 包裹^[36]。一般而言, 厌氧氨氧化生物膜的紧凑压实状态使其更能较好地黏附于载体内外表面, 进而提升厌氧氨氧化体系的稳定性与脱氮性能。因此, 生物载体诱导生物膜形成的潜在机制可能是由于载体表面较粗糙, 有利于厌氧氨氧化细菌的沉积, 最终在水力与底物负荷冲刷下, 逐渐淘洗并增加优势菌群的初始黏附。总而言之, 载体的空间结构可以为厌氧氨氧化菌的生长提供足够的空间, 实现生物膜外-内侧菌群演替与代谢耦合的“生态位”布局。

微生物多样性指数 ACE、Chao1 用来表征微生物群落丰度的变化, 随着 NLR 的改变一直下降这与闫冰等^[37] 研究结果一致, 随着厌氧氨氧化生物膜在载体上定殖, 环境的改变致使不适应厌氧

氨氧化系统环境的物种逐渐被淘汰, 最终 AnAOB 逐渐占据优势, 同时生态位相同的物种也会出现竞争, 抑制或者淘汰其他竞争微生物, 使生物膜中形成以 AnAOB 为主的微生物群落, 从而导致群落结构越来越单一。

环境中的溶解氧有限, 随着 HRT 的改变, 系统中的微生物也发生一定变化, 较高的流速造成底物不足与 AnAOB 产生竞争, 因此限制了变形菌门的增殖, Planctomycetota 中包含厌氧氨氧化菌属, 随着氮负荷的变化呈现上升趋势, 浮游菌门相对丰度的变化在一定程度上可以反映系统中功能微生物的演替。Chloroflexi 通常被发现是颗粒污泥或生物膜反应器中的优势门, 其可用作厌氧氨氧化絮凝物的骨架并与 AnAOB 结合以附着于生物载体其丝状结构可能在造粒中起到骨架的作用^[38], 与 AnAOB 形成共生关系这也解释了生物反应器中形成致密生物膜结构的原因。作为异养细菌, 它们可以消耗反应系统中的有机物质^[39]。在整个试验过程中, Chloroflexi 丰度始终处于较高水平, 占 12.53% ~ 25.92%。Firmicutes 已被报道为有助于反应器系统中碳消耗的碳水化合物发酵细菌^[40], 在第一阶段丰度最高, 达到 12.61%, 这些都与在脱氮过程中获得的更高的总氮去除率相匹配, 也证明了这些培养物对系统的适应性和普遍性, 当反应器 HRT 发生变化后以较高的 NLR 运行时, 这些菌群也很活跃^[41]。

在高负荷阶段, *Candidatus_Brocadia* 含量一直占据主导地位, 在稳定期 (100 ~ 150 d) 达到 29.80%, Zhang 等^[42] 研究表明在具有强剪切力洗涤的情况下检测到厌氧氨氧化菌从 *Candidatus_Jettenia* 到 *Candidatus_Brocadia* 的种群进化。较强的剪切力、较短的水力停留时间和较高的 NLR 可以使 *Candidatus_Brocadia* 优于其他 AnAOB。NLR 达到 $0.31 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, AnAOB 与异养细菌的共生关系缓解基质短缺对 AnAOB 的抑制。研究表明, 反硝化细菌与 AnAOB 的交叉互养机制对厌氧氨氧化共生体的生态演化与脱氮协同过程存在促进效应。AnAOB 具有产生乙酸盐、甲酸盐、糖原等的潜力, 以喂养其共生体, 如 *Denitratisoma* 和 OLB13 可以利用 *Candidatus_Brocadia* 产生的有机物将 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 还原为 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 供 AnAOB 使用, 从而增加厌氧氨氧化系统的 NRR 和容积氮

去除负荷 (Nitrogen removal rate, NRE), 此外, *SRB1031* 作为生物膜骨架构建的贡献者可将厌氧氨氧化菌稳定固定于生物载体上。以上研究证实, 厌氧氨氧化生物膜系统良性运转及相应抗胁迫能力有赖于多功能性菌群的协同互助, 即反硝化菌和厌氧氨氧化菌通过共生/竞争效应共同塑造稳定的群落结构。因此, 厌氧氨氧化菌、厌氧微生物和反硝化菌的共存确保了厌氧氨氧化生物膜反应器在基质胁迫下的高脱氮效率和稳定性^[43]。

微生物生长发育过程存在细胞分裂、凋亡及信息交换, 本研究中丰度较高的几种功能均与微生物的代谢有关, 生物膜形成过程中伴随着菌群的死亡凋谢会产生有机物, 有机物被反硝化菌利用发生反硝化反应, 同时伴随着能量的转化, 较高的 HRT 促使 AnAOB 分泌更多的 EPS, 被丝状菌利用, EPS 产生及消耗过程涉及能量转换、氨基酸转运及转录等, 说明在系统中, AnAOB 和反硝化菌、丝状菌之间存在交叉喂养, 利用不同的底物进行协作, 使其在较高的 NLR 下也能保持较高的运行效能。这与前面微生物群落多样性结果一致。细胞壁和细胞膜生物合成功能占比为 7.63%, 该功能有利于合成细胞膜促进微生物的附着及生长, *Chloroflexi* 作为定殖的先锋物种, 为 AnAOB 提供骨架, 最终形成以厌氧氨氧化菌为核心的生物膜, 以促进厌氧氨氧化反应高效、稳定地运行。

4 结 论

从不同水力停留时间的氮损研究视角下证实, 反应器经过长期运行, 稳定后 TN 去除率可达到 85.79%, $\Delta \text{NO}_2^- \text{-N} / \Delta \text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 $\Delta \text{NO}_3^- \text{-N} / \Delta \text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的比值分别为 1.30 和 0.27, 均接近理论值, 有利于体系提升抗击负荷能力为优化厌氧氨氧化工艺参数提供依据。

经由镜检与 SEM 发现, 在不同工况下生物膜由松散向紧实化演变, 预示着生物膜由外侧至内侧形成菌群形态演化与功能代谢耦连的“生态位”分布, 对于厌氧氨氧化生物膜工艺的中试放大具有实际的内涵。

经由微生物种群的分析表明, *Candidatus_Brocadia* 为填料生物膜中的主要功能菌, 在填料上占比为 29.8%, 厌氧氨氧化体系的极佳效能得益于厌氧氨氧化菌属与其他菌属之间的共同协作, 即

硝态氮反硝化形成的亚硝态氮将作为原料供给厌氧氨氧化的代谢。以上试验结果探明了运行参数对滤池菌群演替的影响规律及作用机制,为厌氧氨氧化反应在实际应用中运行提供思路。

参考文献:

- [1] HUANG D Q, FU J J, LI Z Y, et al. Inhibition of wastewater pollutants on the anammox process: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 803: 150009.
- [2] CHEN H, HU H Y, CHEN Q Q, et al. Successful start-up of the anammox process: influence of the seeding strategy on performance and granule properties[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 594 – 602.
- [3] CHEN X Y, LIU L J, BI Y M, et al. A review of anammox metabolic response to environmental factors: characteristics and mechanisms[J]. *Environmental Research*, 2023, 223: 115464.
- [4] MA B, PENG Y Z, ZHANG S J, et al. Performance of anammox UASB reactor treating low strength wastewater under moderate and low temperatures[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 129: 606 – 611.
- [5] VAN DER STAR 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.
- [6] LEI Z, WANG L X, WANG J, et al. Partial-nitrification of low-strength anaerobic effluent: a moderate-high dissolved oxygen concentration facilitates ammonia-oxidizing bacteria disinhibition and nitrite-oxidizing bacteria suppression[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 770: 145337.
- [7] KOUBA V, HŮRKOVÁ K, NAVRÁTILOVÁ K, et al. Effect of temperature on the compositions of ladderane lipids in globally surveyed anammox populations[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 830: 154715.
- [8] 陈重军, 张敏, 喻徐良, 等. 基质浓度对 ABR 厌氧氨氧化反硝化脱氮除碳效能影响及动力学特征[J]. *环境科学学报*, 2018, 38(9): 3552 – 3560.
- [9] VAN KESSEL M A H J, STULTIENS K, POL A, et al. Simultaneous anaerobic and aerobic ammonia and methane oxidation under oxygen limitation conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(13): e0004321.
- [10] LU Y F, DING Z B, GAO K X, et al. The effect of hydraulic retention time on ammonia and nitrate bio-removal over nitrite process[J]. *Environmental Technology*, 2020, 41(10): 1275 – 1283.
- [11] WANG P C, LU B, CHAI X L. Rapid start-up and long-term stable operation of the anammox reactor based on biofilm process: status, challenges, and perspectives[J]. *Chemosphere*, 2023, 336: 139166.
- [12] YUAN Q, JIA Z, ROOTS P, et al. A strategy for fast anammox biofilm formation under mainstream conditions[J]. *Chemosphere*, 2023, 318: 137955.
- [13] LI R L, ZHU L J, YANG K, et al. Impact of urbanization on antibiotic resistome in different microplastics: evidence from a large-scale whole river analysis[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(13): 8760 – 8770.
- [14] LIU X M, SHENG G P, LUO H W, et al. Contribution of extracellular polymeric substances (EPS) to the sludge aggregation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(11): 4355 – 4360.
- [15] 安雪迪, 彭永臻, 李自强, 等. 有机物冲击对颗粒污泥/填料厌氧氨氧化反应器的影响[J]. *中国给水排水*, 2018, 34(15): 17 – 23.
- [16] 李亚峰, 于佳辉, 张文文, 等. 影响 UASB 厌氧氨氧化反应器脱氮性能的因素研究[J]. *沈阳建筑大学学报(自然科学版)*, 2018, 34(1): 176 – 182.
- [17] ZHOU S, ZHANG Z, SUN Z L, et al. Responses of simultaneous anammox and denitrification (SAD) process to nitrogen loading variation: start-up, performance, sludge morphology and microbial community dynamics[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 795: 148911.
- [18] KARASUTA C, WANG X J, ZHENG X W, et al. Effect of hydraulic retention time on effluent pH in anammox bioreactors: characteristics of effluent pH and pH as an indicator of reactor performance[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 280: 111716.
- [19] LI H, CAI T, GAO Y J, et al. Long-term performance, microbial evolution and spatial microstructural characteristics of anammox granules in an upflow blanket filter (UBF) treating high-strength nitrogen wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 367: 128206.
- [20] ZHANG J H, ZHANG Q, LI X Y, et al. Rapid start-up of partial nitrification and simultaneously phosphorus removal (PNSPR) granular sludge reactor treating low-strength domestic sewage[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 660 – 666.
- [21] 罗景文, 杨津津, 李绍康, 等. 填料对 ANAMMOX 污泥活性恢复的影响及菌群特征[J]. *环境科学*, 2022, 43(1): 424 – 431.
- [22] MA H Y, ZHANG Y L, XUE Y, et al. Relationship of heme c, nitrogen loading capacity and temperature in anammox reactor[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 659: 568 – 577.
- [23] DING S, ZHENG P, LU H F, et al. Ecological characteristics of anaerobic ammonia oxidizing bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(5): 1841 – 1849.
- [24] TIAN X, SCHOPF A, AMARAL-STEWART B, et al. Anammox attachment and biofilm development on surface-modified carriers with planktonic and biofilm-

- based inoculation[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 317: 124030.
- [25] SU B S, LIU Q, LIANG H L, et al. Simultaneous partial nitrification, anammox, and denitrification in an upflow microaerobic membrane bioreactor treating middle concentration of ammonia nitrogen wastewater with low COD/TN ratio[J]. *Chemosphere*, 2022, 295: 133832.
- [26] WANG W Q, LI D, LI S, et al. Characteristics and formation mechanism of hollow anammox granular sludge in low-strength ammonia sewage treatment[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 421: 127766.
- [27] WAN K, YU Y, HU J G, et al. Recovery of anammox process performance after substrate inhibition: reactor performance, sludge morphology, and microbial community[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 357: 127351.
- [28] 余道道, 孙敬起, 霍唐燃, 等. 沸石载体恢复受饥饿影响厌氧氨氧化菌的性能研究[J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2021, 57(3): 507–516.
- [29] YU Y C, GAO D W, TAO Y. Anammox start-up in sequencing batch biofilm reactors using different inoculating sludge[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(13): 6057–6064.
- [30] 王特, 田凯, 李杰. 厌氧氨氧化菌富集过程影响因素的研究现状[J]. *石油化工应用*, 2022, 41(4): 6–11.
- [31] 高逸凡, 邹婷, 刘霄霄, 等. 水力停留时间对厌氧氨氧化工艺的影响[J]. *山东化工*, 2022, 51(11): 25–27.
- [32] LI B J, WANG Y, WANG W H, et al. High-rate nitrogen removal in a continuous biofilter anammox reactor for treating low-concentration nitrogen wastewater at moderate temperature[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 337: 125496.
- [33] SU H, ZHANG D C, ANTWI P, et al. Adaptation, restoration and collapse of anammox process to La(III) stress: performance, microbial community, metabolic function and network analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 325: 124731.
- [34] WANG T, ZHANG H M, YANG F L, et al. Start-up of the Anammox process from the conventional activated sludge in a membrane bioreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(9): 2501–2506.
- [35] FENG K, LOU Y, LI Y T, et al. Conductive carrier promotes synchronous biofilm formation and granulation of anammox bacteria[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 447: 130754.
- [36] 黄嘉豪, 刘桂文, 朱杰, 等. 改性生物填料载体强化厌氧氨氧化反应器脱氮研究[J]. *生物加工过程*, 2022, 20(1): 41–49.
- [37] 闫冰, 夏嵩, 桂双林, 等. 厌氧氨氧化菌富集培养过程微生物群落结构及多样性[J]. *环境科学*, 2020, 41(12): 5535–5543.
- [38] WANG H, CHEN H, LIU S Y, et al. Inhibition and recovery of UASB-Anammox process: performance characteristics and microbial community dynamics in response to substrate concentration and dissolved oxygen exposure[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2023, 51: 103472.
- [39] LAWSON C E, WU S, BHATTACHARJEE A S, et al. Metabolic network analysis reveals microbial community interactions in anammox granules[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15416.
- [40] BONASSA G, VENTURIN B, BOLSAN A C, et al. Performance and microbial features of anammox in a single-phase reactor under progressive nitrogen loading rates for wastewater treatment plants[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(1): 107028.
- [41] WANG H, WANG J J, ZHOU M D, et al. A versatile control strategy based on organic carbon flow analysis for effective treatment of incineration leachate using an anammox-based process[J]. *Water Research*, 2022, 215: 118261.
- [42] ZHANG A Y, WANG S, YANG M M, et al. Influence of NaCl salinity on the aggregation performance of anammox granules[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 39: 101687.
- [43] 王晓瞳, 杨宏, 苏杨, 等. 生物滤池快速启动 ANAMMOX 运行策略及菌群特征[J]. *环境科学*, 2020, 41(7): 3345–3355.

Operational efficacy of ANAMMOX under different nitrogen loads and dynamic changes of the microbial communities

GUO Mengxia^{1#}, FU Xiangzhuang¹, ZHOU Xinwei¹, XU Wen^{1*}, WANG Dexin¹, YU Ming², BAI Xiao²

(1. School of Ecology and Environment, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

2. Hainan Tianhong Municipal Design Co., Ltd, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Polyurethane sponge was used as a biofilm carrier for the enrichment of anaerobic ammonia oxidizing bacteria (AnAOB) to investigate the denitrification performance and microbial community changes of the biofilm system under different nitrogen loads of influent water. The results showed that the total nitrogen removal rate increased with the nitrogen load of influent water. The total nitrogen removal rate was as high as 85.79% in the stabilization period, the nitrogen load in effluent was $0.26 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, and the total nitrogen removal reached the national standard. Meanwhile, the formation of cauliflower-shaped biofilm on the polyurethane sponge carrier was observed by using the scanning electron microscopy, and the sequencing of the biofilm samples showed that the biofilm system had been used to enrich the anaerobic ammonia oxidizing bacteria (AnAOB). Subsequently, the sequencing showed that the functional microorganisms in the system were *Candidatus brocadia*, which accounted for 29.80% of the total number of microorganisms in the stable period. Finally, the changes of cross-feeding interactions between the genera of anaerobic ammonia oxidizing bacteria and other genera of microbiota under high load conditions were summarized, which will provide a comprehensive guideline for the future metabolism research and practical application of the anaerobic ammonia oxidizing bacterial flora in the engineering.

Keywords: ANAMMOX; biofilm; polyurethane sponge; flora characterization; HRT

(责任编辑: 钟云芳)