



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202106067

中图分类号 X703.1

文献标识码 A

季军远, 林久淑, 朱晓桐, 等. ANAMMOX-UASB 反应器启动过程中的生物特性[J]. 环境工程学报, 2021, 15(10): 3358-3367.

Ji Junyuan, LIN Jiushu, ZHU Xiaotong, et al. Biological characteristics of ANAMMOX-UASB reactor during startup process[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(10): 3358-3367.

ANAMMOX-UASB 反应器启动过程中的生物特性

季军远^{1,2}, 林久淑^{1,2}, 朱晓桐^{1,3}, 张倩^{1,2}, 樊玉清^{1,2,✉}

1. 中国海洋大学, 海洋环境与生态教育部重点实验室, 青岛 266000

2. 中国海洋大学, 山东省海洋环境地质工程重点实验室, 青岛 266000

3. 南京万德斯环保科技股份有限公司, 南京 211100

第一作者: 季军远 (1980—), 男, 博士, 副教授。研究方向: 废水生物处理, E-mail: tengfei_945@163.com

✉通信作者: 樊玉清 (1973—), 女, 硕士, 高级实验师。研究方向: 废水生物处理技术, E-mail: yuqing@ouc.edu.cn

摘要 以絮状厌氧消化污泥为接种污泥, 经过 250 d 运行后成功启动了 ANAMMOX-UASB 反应器。结果表明: 在启动过程中, 絮体污泥逐渐颗粒化并以不规则状的红色颗粒污泥和褐色絮状污泥为主; 脱氢酶活性由启动前的 $3\ 909.51\ \mu\text{g}\cdot(\text{h}\cdot\text{g})^{-1}$ 最终降至 $72.13\ \mu\text{g}\cdot(\text{h}\cdot\text{g})^{-1}$; EPS 含量在启动过程中先降后升, EPS 组成中主要为 TB-EPS, 占比由 54.4% 升至 75.7%; 启动过程中 LB-EPS 和 TB-EPS 中均以 PN 为主, 且 PN 占比逐步增大, 分别由初始的 88.7% 和 89.5% 增至 99.6% 和 94.7%; 启动过程中 EPS 的结构与组成均发生变化。ANAMMOX-UASB 启动过程中微生物 Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数均先升后降, 启动成功后微生物多样性和丰富度均降低。污泥中微生物的优势菌门为变形菌门 (*Proteobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*)。浮霉菌门中 *Candidatus Anammoximicrobium* 丰度逐渐降低直至消失, 而 *Candidatus Brocadia* 丰度最终增至 12.15%。

关键词 厌氧氨氧化; UASB; 脱氢酶; 胞外聚合物; 微生物群落

厌氧氨氧化工艺氮去除负荷高、无需外加有机碳源、污泥产量低、运行成本低, 但因厌氧氨氧化菌生长速度慢、倍增时间长, 且对环境条件变化较为敏感, 使得厌氧氨氧化工艺启动耗时较长, 这极大地限制了厌氧氨氧化技术的工程应用^[1]。Dokhaven 污水厂的厌氧氨氧化 (anaerobic ammonia oxidation, ANAMMOX) 工艺耗时 3.5 a 成功启动^[2]。因此, 厌氧氨氧化菌 (anaerobic ammonia oxidizing bacteria, AnAOB) 的高效富集、ANAMMOX 工艺的快速启动及稳定运行引起研究者的广泛关注。

ANAMMOX 工艺的快速启动与接种污泥性质、反应器类型密切相关^[3]。不同类型的好氧、厌氧污泥均可用于 ANAMMOX 工艺启动。好氧污泥虽菌群丰富, 但其所含厌氧菌属较少, 启动期会

收稿日期: 2021-06-14; 录用日期: 2021-09-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51978636); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (51408570); 中央高校基本科研业务费专项 (201964005)

相应较长;厌氧反硝化污泥中含有的反硝化菌与 AnAOB 同属厌氧菌,可省去好氧转向厌氧环境时的污泥适应阶段,完成 AnAOB 的富集,可缩短工艺启动市场,但其沉降性能较差,启动过程中易出现污泥流失^[4];而经厌氧消化后的剩余污泥具有良好沉降性能,且来源广泛、易于获取,污泥碳氮比含量低、高氨氮适应性强、厌氧菌含量高且与 AnAOB 的代谢基质相近,较适合作为 ANAMMOX 工艺启动的接种污泥。反应器类型直接影响污泥固体停留时间 (solid retention time, SRT)、水流上升流速等,进而影响 AnAOB 富集、工艺启动速度、工艺运行稳定性等;序批式反应器 (sequencing batch reactor, SBR)、序批式生物膜反应器 (sequencing batch biofilm reactor, SBBR)、膜生物反应器 (membrane bioreactor, MBR)、生物滤池均可成功启动 ANAMMOX 工艺^[5-7]。上流式厌氧污泥床 (upflow anaerobic sludge blanket, UASB) 反应器作为第 2 代厌氧反应器的杰出代表,具有较好的污泥持留能力和基质传质效果,可为 AnAOB 的生长提供良好的环境,其在 ANAMMOX 工艺运行中的优势已逐步显现。WANG 等^[8]将厌氧氨氧化颗粒污泥接种于 UASB 反应器 (22 L),经过 178 d 启动及稳定运行,氮容积负荷 (nitrogen loading rate, NLR) 和氮去除负荷 (nitrogen removal rate, NRR) 可高达 $8.25 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ (以 N 计) 和 $6.93 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ (以 N 计)。

因此,本研究以厌氧消化污泥为接种污泥,以 UASB 反应器为反应装置启动 ANAMMMOX 工艺,研究了 ANAMMOX-UASB 反应器启动过程的生物特性,考察了 ANAMMOX-UASB 启动运行过程中的污泥表观形态、脱氢酶及胞外聚合物的变化,分析了启动过程中胞外聚合物结构、组成的特征,解析了功能菌群动态演替规律,以期探明 ANAMMOX-UASB 启动过程中的生物特性,为厌氧氨氧化工艺的快速启动与工程应用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 实验装置

所采用的实验装置如图 1 所示,UASB 反应器呈圆柱结构,由有机玻璃制成,总容积为 3.5 L,有效容积为 1.4 L,其中反应区内径 6 cm,高度 50 cm。模拟废水由蠕动泵从 UASB 反应器底部连续泵入,从下至上依次经反应区、沉淀区后,最后经出水口排出;产生的气体经顶部排气孔排出。反应区部分采用黑布包裹以避免光照对 AnAOB 产生的不利影响。反应器工作温度为 $(35 \pm 1) \text{ } ^\circ\text{C}$ 。

1.2 接种污泥

实验中所用接种污泥取自青岛市某污水处理厂厌氧消化罐,污泥形态呈黑褐色絮状。混合液悬浮固体质量浓度 (mixed liquid suspended solids, MLSS) 约为 $47.39 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,混合液挥发性悬浮固体质量浓度 (mixed liquor volatile suspended solids, MLVSS) 约为 $22.77 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,MLVSS/MLSS 为 0.48。接种污泥量为 1.2 L。

1.3 实验废水

实验废水采用人工模拟废水, $\text{NH}_4\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2\text{-N}$ 分别由 NH_4Cl 和 NaNO_2 按需配置,其他主要成分为 $27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ 、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 、 $180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。微量元素 I、II 添加量均为 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 。微量元素 I 的组成成分及含量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ EDTA}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、微量元素 II 为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ EDTA}$ 、 $0.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.014 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ 、 $0.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

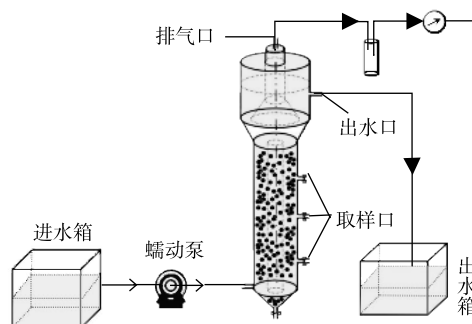


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experimental equipment

废水 pH 为 7.5~7.8。

1.4 分析测定方法

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 采用纳氏试剂分光光度法测定； $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 采用 N-(1-萘基)乙二胺分光光度法测定； $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 采用紫外分光光度法测定；pH 采用玻璃电极法测定；SS 和 VSS 采用重量法^[9]测定。脱氢酶 (dehydrogenase activity, DHA) 的提取与测定采用 TTC 还原法^[10]。胞外聚合物 (extracellular polymeric substance, EPS) 提取与测定参照 WANG 等^[11]的方法分层提取松散型胞外聚合物 (loosely bound EPS, LB-EPS) 与紧密型胞外聚合物 (tightly bound EPS, TB-EPS)。采用硫酸-蒽酮比色法^[12]测定多糖 (polysaccharide, PS) 含量, 采用改进的 Folin-酚试剂法^[13]测定蛋白质 (protein, PN) 的含量。

三维荧光光谱 (three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy, 3D-EEM) 采用荧光光度计 (F-4 600, Hitachi, Japan) 测定样品中 LB-EPS 和 TB-EPS 的三维荧光光谱^[14]。激发波长 (Ex) 和发射波长 (Em) 分别为 200~450 nm 和 240~550 nm, 扫描间隔为 5 nm, 扫描速度采用 $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。用超纯水作为空白样品校正水的拉曼散射。实验数据采用 Origin 绘图分析。

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 及高通量测序: 采用 Power Soil DNA Isolation Kit 按照操作步骤提取样品中 DNA, 使用 1% (质量分数) 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量。采用细菌 16S rRNA 基因 V3+V4 扩增区域, 引物为 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) 和 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC), 对 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增体系及扩增条件按彭广生等^[15]方法进行。PCR 扩增产物使用 OMEGA 胶回收纯化试剂盒纯化后 4°C 保存。样本交由北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行 DNA 提取和测序。利用 Illumina HiSeq 高通量测序技术在 HiSeq 2500 系统进行测序。

2 结果与讨论

ANAMMOX-UASB 反应器启动过程共持续 250 d, 整个过程分为菌体水解期 (阶段 I)、活性迟滞期 (阶段 II)、活性提高期 (阶段 III) 和稳定运行期 (阶段 IV 和阶段 V)^[16]。启动过程运行情况见表 1。

表 1 ANAMMOX-UASB 启动过程中各阶段运行情况
Table 1 Performance of each stage during ANAMMOX-UASB startup process

阶段	运行时间/d	HRT/h	进水 N 质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		出水 N 质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			TN 去除率/%
			$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	
I	1~13	24	50	50	152.36±85.15	1.22±1.16	4.07±1.76	-57.65±84.85
II	14~53	24	50	50	4.68±7.92	7.91±6.31	3.4±1.73	84.19±10.6
III	54~123	24	50~300	50~300	0.17±0.40	0.37±0.42	14.71±18.2	96.6±2.75
IV	124~160	24~12	300	300	1.86±2.62	0.83±0.77	56.21±0.77	90.18±2.49
V	161~250	12~6	300	300	8.55±7.24	3.22±2.02	67.54±6.9	86.78±1.72

2.1 污泥表现形态

ANAMMOX-UASB 反应器接种污泥为絮状黑褐色厌氧消化污泥 (图 2(a))。随着启动运行, 污泥内有机物不断消耗、异养菌逐渐死亡, 导致反应器污泥层高度逐渐下降。第 53 天, 絮状污泥颜色逐渐转变为黄褐色, 且部分区域污泥呈现团聚体状。自第 100 天起, 反应器内出现小颗粒状污泥, 且部分已呈现浅红色 (图 2(b)), 结合此过程反应器脱氮性能可断定厌氧氨氧化反应已明显显现。此时, 反应器内的污泥与郑平等^[17]报导的厌氧氨氧化颗粒污泥形状一致, 说明絮状污泥逐渐颗粒化, 厌氧氨氧化污泥初步形成。颗粒污泥呈现红色是由于厌氧氨氧化菌体内含有丰富的细胞色素 c, 污泥发红程度可以反映厌氧氨氧化菌的富集程度, 可以作为肉眼判断厌氧氨氧化活性的依

据^[18]。随着 ANAMMOX-UASB 反应器继续运行,絮状污泥颗粒化进一步加强,至第 250 天时,反应器内以不规则状的红色颗粒污泥和褐色絮状污泥为主(图 2(c)),此时 NRR 维持在 $2 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ 左右,厌氧氨氧化菌已成功富集。



图 2 ANAMMOX-UASB 启动过程的污泥表观形态

Fig. 2 Sludge apparent morphology during ANAMMOX-UASB startup process

2.2 脱氢酶 (DHA) 活性

脱氢酶主要参与微生物降解有机物的过程^[10],也可以参与某些细胞的合成。一氧化碳脱氢酶是乙酰辅酶 A 途径的关键酶。尽管厌氧氨氧化菌不以有机物为碳源,但仍有脱氢酶活性。ANAMMOX-UASB 反应器启动过程中脱氢酶活性变化,可以反映出厌氧氨氧化工艺启动过程中污泥中异养菌的消长情况,结果见图 3。由图 3 可知,因接种污泥为厌氧消化污泥,其异养微生物丰度较高,脱氢酶活性为 $3909.51 \mu\text{g} \cdot (\text{h} \cdot \text{g})^{-1}$ (以 TF 计)。在第 53 天,污泥的脱氢酶活性降低至 $2788.809 \mu\text{g} \cdot (\text{h} \cdot \text{g})^{-1}$,这主要是由内源有机物量降低,异养微生物逐步衰亡、自溶等造成。随着启动过程的继续(53~250 d),厌氧氨氧化菌丰度逐步增加,异养菌含量进一步降低,脱氢酶活性大幅度降低,最终降至 $72.13 \mu\text{g} \cdot (\text{h} \cdot \text{g})^{-1}$ 。LIN 等^[19]利用厌氧氨氧化污泥作为接种污泥启动厌氧氨氧化工艺时,启动前脱氢酶活性为 $684 \mu\text{g} \cdot (\text{h} \cdot \text{g})^{-1}$,成功启动后脱氢酶活性降为 $252 \mu\text{g} \cdot (\text{h} \cdot \text{g})^{-1}$ 。KIM 等^[20]的研究表明,异养菌脱氢酶参与了有机化合物的同化和异化反应,自养菌的脱氢酶主要参与有机化合物的同化,异养菌的脱氢酶活性远高于自养菌脱氢酶。在厌氧氨氧化工艺启动中,因进水基质无有机物,污泥中异养菌大量裂解死亡,导致脱氢酶活性大幅下降;厌氧氨氧化菌虽然不利用有机物进行分解代谢,但仍以 CO_2 作为无机碳源,通过乙酰辅酶 A 途径合成自身细胞物质,故工艺在成功启动后仍具有一定的脱氢酶活性。

2.3 胞外聚合物 (EPS)

1) EPS 含量。EPS 是厌氧氨氧化污泥的重要组成部分,厌氧氨氧化细菌会嵌入到由细胞和 EPS 组成的聚集体中^[21]。EPS 具有流动性的双层结构,是由松散附着的外层 (LB) 和紧密黏附的内层 (TB) 组成, EPS 的主要成分是蛋白质 (PN) 和多糖 (PS)^[22]。ANAMMOX-UASB 反应器启动过程中

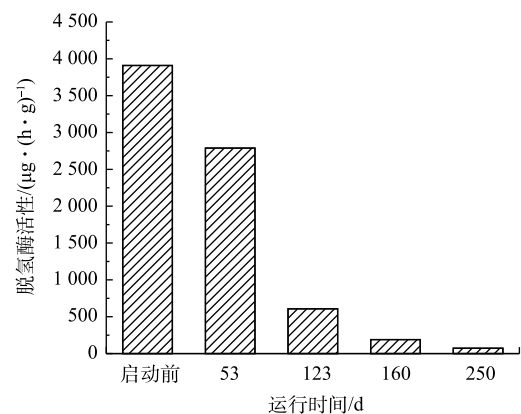


图 3 ANAMMOX-UASB 启动过程中的脱氢酶变化

Fig. 3 Change in DHA activity during ANAMMOX-UASB startup process

EPS 含量及组成见图 4。由图 4 可知,第 0~53 天, EPS 含量快速降低,由初期的 $34.91 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (以 VSS 计)(0 d)下降为 $14.48 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (53 d), PN/PS 由 7.88(0 d)升至 11.58(53 d); EPS 中 TB/LB 由 1.19 变为 1.07。第 53~123 天, EPS 含量略降至 $14.19 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, PN/PS 由 11.58 升至 14.25; EPS 中 TB/LB 为 6.21。第 123~160 天, EPS 含量逐渐上升至 $28.02 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, PN/PS 进一步升至 18.59; EPS 中 TB/LB 为 4.15。第 160~250 天, EPS 含量继续升至 $39.21 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, PN/PS 升至 23.20; EPS 中 TB/LB 变为 3.12。EPS 中 PN 含量变化大, PS 含量变化相对较小,且在启动过程中 PN/PS 持续上升。启动过程中 EPS 均以 TB-EPS 为主; LB-EPS 中 LB-PN/LB 平均值 93.8%, TB-EPS 中 TB-PN/TB 平均值为 93.1%,各分层 EPS 中均以 PN 为主,表明 EPS 中蛋白质在 ANAMMOX-UASB 启动过程中起关键作用,这与 GUO 等^[23]报道的研究结果一致。大量的 PN 产生可能来源于细胞死亡后的释放、细胞的分泌以及 EPS 中含有大量胞外酶所致。PN 是疏水性基团, PS 是亲水性基团, MA 等^[24]的研究表明, EPS 中 PN 的含量与污泥的絮凝和沉降能力成正相关,较高的 PN 含量可以增强微生物聚集体的凝聚性。DONG 等^[25]的研究表明, PN 中带正电荷的氨基可以中和羧基的负电荷,从而加剧污泥的絮凝。CHEN 等^[21]发现, PN/PS 越大,污泥的沉降性能越好。在 ANAMMOX-UASB 启动过程中, PN/PS 由启动前的 7.88 增至 23.20,与絮状污泥逐渐颗粒化及其沉降性能逐渐增强的变化趋势一致。

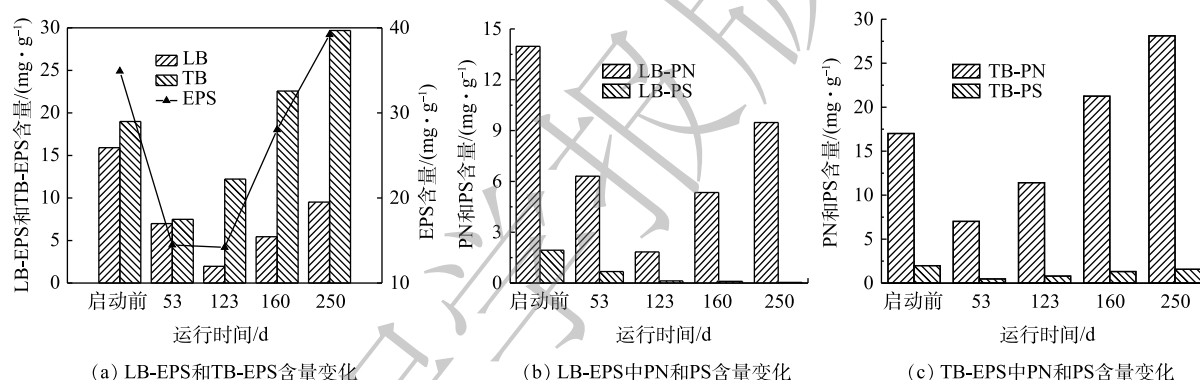


图 4 ANAMMOX-UASB 启动过程中的 EPS 含量及组分变化

Fig. 4 Changes of EPS contents and components during startup process of ANAMMOX-UASB

2) EPS 组分的荧光特性。污泥 EPS 中含有大量荧光特性的物质,可利用三维荧光分光光度法分析 EPS 组成特征。启动过程中第 0、53、123 天的 LB-EPS 和 TB-EPS 三维荧光光谱如图 5 所示。由图 5 可知, ANAMMOX-UASB 在启动过程中共观察到 5 个荧光峰(A~E)。其中,荧光峰 A(220~225 nm/330~340 nm)为芳香族蛋白类物质;荧光峰 B(260~275 nm/335~340 nm)为色氨酸蛋白类物质;荧光峰 C(270~275 nm/300~305 nm)与酪氨酸蛋白类物质有关;荧光峰 D(220 nm/310~320 nm)与简单芳环蛋白类物质有关,荧光峰 E(270 nm/425 nm)为富里酸类物质^[26]。

荧光峰 A、B 在污泥启动过程的 LB-EPS 和 TB-EPS 中均存在,说明在启动过程中的 EPS 均以蛋白质为主;虽然 LB-EPS 和 TB-EPS 所处位置不同,但其组分和结构基本相同。在 LB-EPS 中仅存在荧光峰 A 和 B,无其他荧光峰,且启动过程中 LB-EPS 的结构与组成并未发生较大变化。在第 53 天时 TB-EPS 中,除存在荧光峰 A 和 B,还出现荧光峰 D,说明此阶段有简单芳环蛋白类物质产生;第 123 天时,出现荧光峰 C 和 E,荧光峰 B 消失,说明部分色氨酸蛋白类物质转化为酪氨酸蛋白类物质^[27]。三维荧光结果表明,在 ANAMMOX-UASB 启动过程中污泥 EPS 中的 TB-EPS 的结构和组成均会发生变化。

ANAMMOX-UASB 启动过程中 LB-EPS 和 TB-EPS 中各峰光谱参数见表 2。由表 2 可知,荧光峰会向更长的波长移动(称为红移),或向更短的波长移动(称为蓝移)。在 LB-EPS 中,第 123 天荧

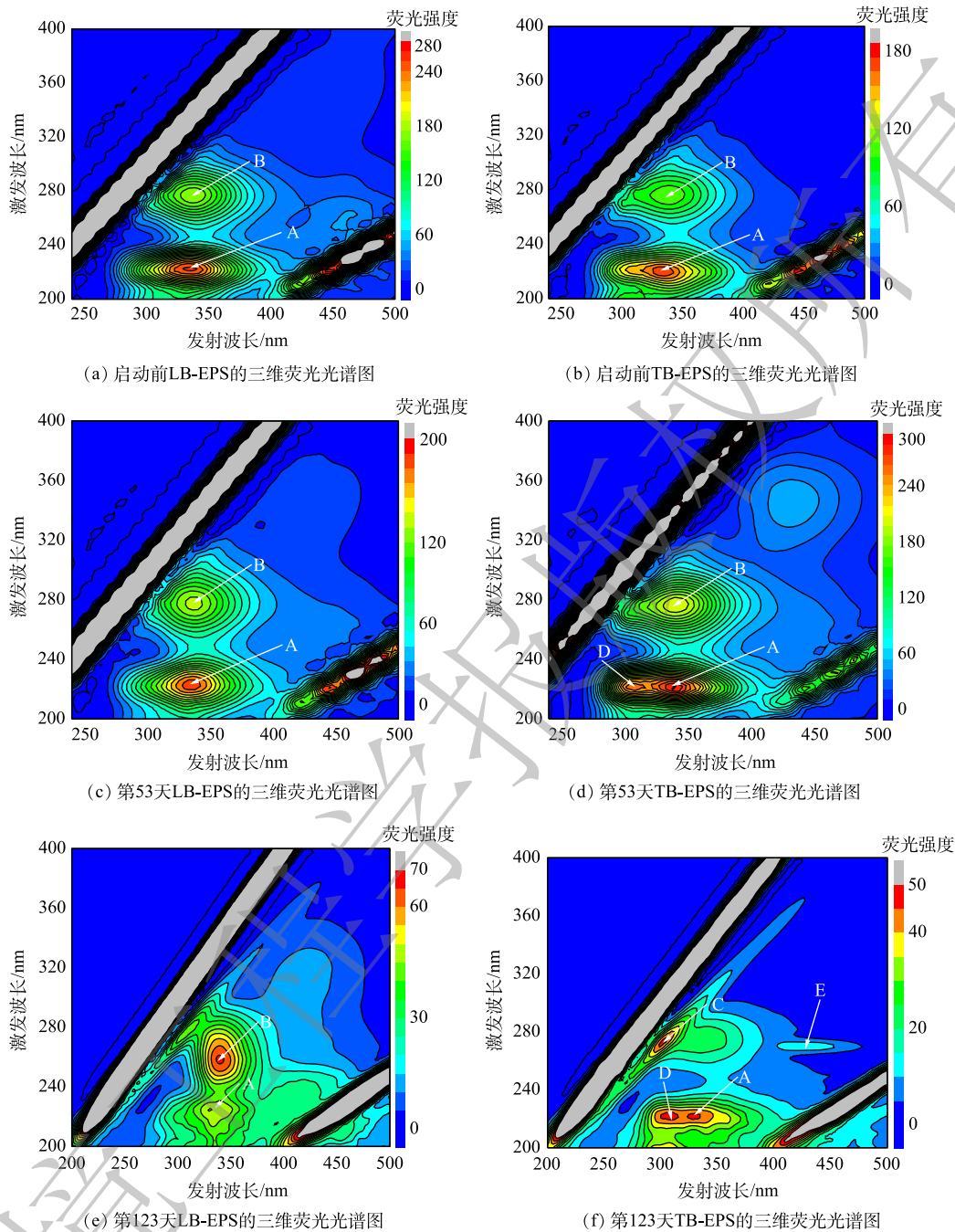


图 5 启动过程中 LB-EPS 和 TB-EPS 的三维荧光光谱

Fig. 5 Three-dimensional fluorescence spectra of LB-EPS and TB-EPS during startup

光峰 A 沿 Ex 方向蓝移 5 nm, 沿 Em 方向红移 5 nm; 荧光峰 B 沿 Ex 方向蓝移 15 nm, 沿 Em 方向红移 5 nm。在 TB-EPS 中, 第 53 天时荧光峰 A 沿 Em 方向红移 10 nm, 但至第 123 天时沿 Em 方向蓝移 10 nm, 与启动前相同; 荧光峰 B 沿 Em 方向红移 5 nm。上述研究结果表明, 波长移动与 EPS 中各成分的结构变化密切相关, 其中波长红移与含羰基取代基、羟基、烷氧基、氨基和羧基含量增加相关联, 而波长蓝移则与芳香酯基减少, 芳香环数下降, 共轭键数的降低和羰基、羟基和氨基的减少直接相关。荧光峰波长及峰强度的变化说明 ANAMMOX-UASB 启动过程中污泥 EPS 中的组分、结构均发生变化。

表2 ANAMMOX-UASB启动过程中LB-EPS和TB-EPS的荧光光谱参数

Table 2 Fluorescence spectral parameters of LB-EPS and TB-EPS during startup process of ANAMMOX-UASB

样品	时间/d	峰A		峰B		峰C		峰D		峰E	
		Ex/Em	强度	Ex/Em	强度	Ex/Em	强度	Ex/Em	强度	Ex/Em	强度
LB	0	225/330	274.5	275/335	175.1	—	—	—	—	—	—
	53	225/330	193.4	275/335	136.2	—	—	—	—	—	—
	123	220/335	51.0	260/340	65.3	—	—	—	—	—	—
TB	0	220/330	176.5	275/335	109.0	—	—	—	—	—	—
	53	220/340	296.4	275/340	210.0	—	—	220/310	260.0	—	—
	123	220/330	47.7	—	—	270/300	48.0	220/310	47.8	270/425	15.3

2.4 微生物群落

1) 微生物多样性和丰富度分析。ANAMMOX-UASB启动过程中的微生物多样性和丰富度如表3所示。由表3可知,所有样品的覆盖率均大于99%。这表明样品数据涵盖的物种充足,微生物群落丰富度和多样性结果具有较高的可靠性和真实性^[28]。ACE和Chao1指数可以表征物种的丰富度,其值越大,所含物种越丰富。Shannon指数常用来评价生物群落组成复杂程度,其值越大,表明群落复杂程度越高^[29]。Simpson指数更倾向于反应群落的均匀性,其值越大,表示优势菌群占总体生物菌群比例越大^[30]。由表3可知,接种污泥的Chao1和ACE指数分别为594.16和583.74,第53天的Chao1和ACE指数分别上升至最大值,为695.08和682.31。这表明此时的群落中所含物种最丰富,结合启动中出水指标可得,此时反硝化菌、氨化菌、厌氧氨氧化菌共存。第250天分别下降到351.00和312.34,表明工艺启动成功后,微生物以自养厌氧氨氧化菌为主,群落丰富度有所下降。接种污泥的Shannon指数为5.19,第53天上升至最大值为6.06,表明此时群落复杂度最大;第250天降低至4.43,其原因是反应器成功启动后,厌氧氨氧化菌的丰度不断升高,其他微生物的丰度逐渐降低,导致微生物群落复杂度有所下降。接种污泥的Simpson指数为0.92,第53天上升至最大值0.96,表明此时反应器内优势菌群所占的比例也最大;第250天下降为0.87,较接种污泥略有降低,表明反应器启动成功后,优势菌群所占的比例有所下降。

2) 微生物门水平物种丰度分析。将微生物在门水平上丰度前10的物种绘制成物种相对丰度柱形累加图(图6)。主要为变形菌门(*Proteobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、*Latescibacteria*菌门、*Cloacimonetes*菌门、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)。其中浮霉菌门

表3 ANAMMOX-UASB启动过程中微生物多样性和丰富度

Table 3 Microbial diversity and abundance during startup process of ANAMMOX-UASB

时间/d	Chao1	ACE	Shannon	Simpson	覆盖率/%
0	594.16	583.74	5.19	0.92	99.5
53	695.08	682.31	6.06	0.96	99.5
123	343.23	328.19	4.78	0.90	99.8
250	351.00	312.34	4.43	0.87	99.7

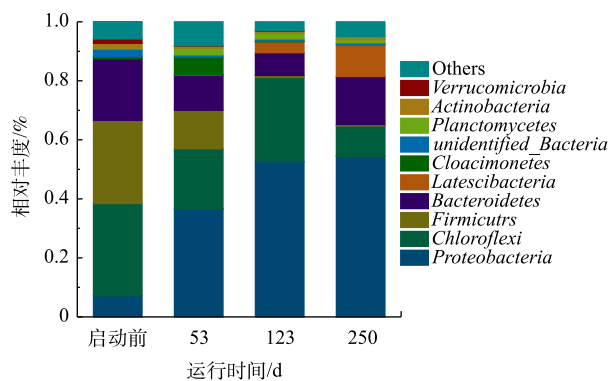


图6 ANAMMOX-UASB启动过程中微生物门水平组成

Fig. 6 Composition of microorganisms at the phylum level during startup process of ANAMMOX-UASB

和变形菌门为脱氮功能菌。变形菌门在各个样品中占最大比例, 在启动过程中丰度逐渐上升, 由 7.22% 上升到 54.40%。曹雁等^[31]利用上流式厌氧过滤床 (upflow blanket filter, UBF) 反应器启动厌氧氨氧化工艺, 启动成功后变形菌门增加了 12%。杨开亮等^[32]利用 SBR 接种活性污泥启动厌氧氨氧化工艺时, 变形菌门在启动过程中丰度逐渐下降。上述研究结果不同, 可能与反应器类型、接种污泥类型、运行参数及环境条件等不同有关。沈耀良等^[33]在厌氧折流板 (anaerobic baffled reactor, ABR) 反应器中发现各隔室中变形菌门为主要菌种, 其在脱氮方面占有重要地位。绿弯菌门是厌氧氨氧化系统中常见的伴生菌门, 接种污泥的丰度为 31.23%, 第 53 天下降为 20.32%, 第 123 天反应器启动成功时丰度上升为 28.52%。CHEN 等^[34]研究发现, 绿弯菌门是兼性厌氧菌, 在厌氧氨氧化污泥中起到支撑和骨架作用, 可作为形成小颗粒污泥的框架粒子, 也可作为颗粒污泥的载体, 从而有利于厌氧氨氧化颗粒污泥的形成。MIAO 等^[35]的研究表明, 厚壁菌门对反硝化有重要作用, 厚壁菌门丰度由 28.27% 下降为 5.55%, 说明 ANAMMOX-UASB 启动过程中异养反硝化菌因环境条件改变大量裂解死亡。浮霉菌门为主要的自养脱氮功能菌群, 厌氧氨氧化菌归属此菌门; 接种污泥浮霉菌门丰度仅为 0.34%, 第 123 天启动成功时其丰度增至 1.89%, 表明反应器内富集了一定量的厌氧氨氧化菌。其他研究者也发现, 厌氧氨氧化工艺启动过程中变形菌门丰度始终高于浮霉菌门丰度。如朱彤等^[36]发现, 在厌氧氨氧化反应器启动成功后, 虽然变形菌门丰度有所下降, 但仍高于浮霉菌门。

3) 微生物属水平物种丰度分析。由于厌氧氨氧化菌属于浮霉菌门, 因此, 对浮霉菌门进行属水平的分析 (图 7)。浮霉菌门有 *unidentified_Phycisphaerae*、*Candidatus_Anammoximicrobium*、*Candidatus_Brocadia*、*Thermogutta*、*Pirellula* 和 *Rhodopirellula*。在已知的 6 种厌氧氨氧化菌属中, 启动过程中存在 2 种厌氧氨氧化菌属, 分别为 *Candidatus_Anammoximicrobium* 和 *Candidatus_Brocadia*。接种污泥中 *Candidatus_Anammoximicrobium* 的丰度为 40.94%, 第 53 天下降到 30.77%, 第 123 天下降为 0。杨瑞丽等^[29]进行厌氧氨氧化工艺启动时, 观察到 *Candidatus_Anammoximicrobium* 丰度随 NLR 增大而逐渐降低, 第 172 天下降到 0, 其可能的原因是 *Candidatus_Anammoximicrobium* 生长速率较慢、亚硝酸盐亲和力较低以及对水质变化的抵抗力较弱。第 123 天, *Candidatus_Brocadia* 是反应器内唯一的厌氧氨氧化菌, 其丰度为 12.15%, 第 250 天, 下降到 11.63%。曹雁等^[31]利用 UBF 反应器培养厌氧氨氧化细菌时, *Candidatus_Brocadia* 的丰度由 0.01% 增加到 1.00%。VAN DER STAR 等^[37]发现 *Candidatus_Brocadia* 适合存在于高含氮浓度废水中。本实验中, 进水氨氮质量浓度由 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 属于高含氮废水, 更适合 *Candidatus_Brocadia* 生长, 故 *Candidatus_Brocadia* 启动过程中可得到有效富集, 成为优势菌属。有研究^[38]表明, 由于生存环境的不同, 厌氧氨氧化菌的群落结构存在差异, 在稳定的生长环境中, 通常只有 1 个属种的厌氧氨氧化菌占优势, 这与本研究结果类似。

3 结论

1) ANAMMOX-UASB 启动过程中絮状污泥逐渐颗粒化, 最终以不规则状的红色颗粒污泥和褐

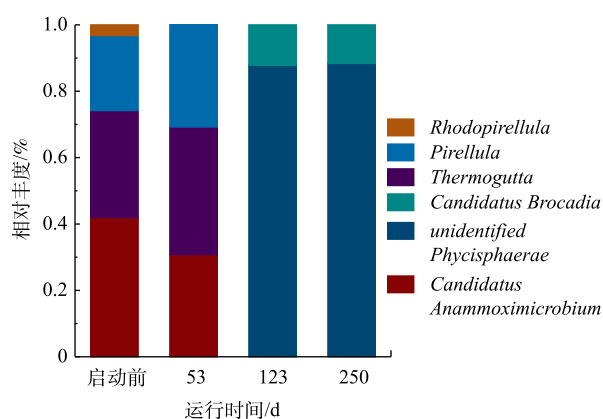


图 7 ANAMMOX-UASB 启动过程中浮霉菌门属水平组成

Fig. 7 Composition of microorganisms of Planctomycetes at the genus level during startup process of ANAMMOX-UASB

色絮状污泥为主。微生物的脱氢酶活性由 $3\,909.51\ \mu\text{g}\cdot(\text{h}\cdot\text{g})^{-1}$ 持续降至 $72.13\ \mu\text{g}\cdot(\text{h}\cdot\text{g})^{-1}$ 。EPS 主要以 TB-EPS 为主, 占比为 75.7%; 且 LB-EPS 和 TB-EPS 中 PN 占比稳步增大, 分别增至 99.6% 和 94.7%, PN 在厌氧氨氧化工艺启动过程中起关键作用。

2) 在 ANAMMOX-UASB 启动过程中, Chao1、ACE、Shannon 和 Simpson 指数均呈现先升后降的趋势, 启动过程中污泥的优势菌门为变形菌门 (*Proteobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、浮霉菌门 (*Planctomycetes*)。浮霉菌门中 *Candidatus Anammoximicrobium* 丰度逐渐降低直至消失, 而 *Candidatus Brocadia* 丰度最终增至 12.15%。

参考文献

- [1] MENG F, SU G, HU Y, et al. Improving nitrogen removal in an ANAMMOX reactor using a permeable reactive biobarrier[J]. *Water Research*, 2014, 58: 82-91.
- [2] ABMA W R, SCHULTZ C E, MULDER J W, et al. Full-scale granular sludge ANAMMOX process[J]. *Water Science and Technology*, 2007, 55(8/9): 27-33.
- [3] 沈耀, 陈重军, 张海芹, 等. 基于高通量测序的ABR厌氧氨氧化反应器各隔室细菌群落特征分析[J]. *环境科学*, 2016, 37(7): 2652-2658.
- [4] 陈文静, 陈圣东, 梁佳茵, 等. Anammox脱氮工艺启动研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2019, 42(11): 130-140.
- [5] 徐师, 张大超, 肖隆文, 等. 厌氧氨氧化反应快速启动方法的研究进展[J]. *环境工程*, 2018, 36(6): 18-21.
- [6] 吕玮, 张立秋, 黄奕亮, 等. 常温低基质下两种厌氧氨氧化反应器启动特性比较[J]. *中国给水排水*, 2019, 35(3): 31-37.
- [7] GAO F, ZHANG H, YANG F, et al. The effects of zero-valent iron (ZVI) and ferrous oxide (Fe_2O_3) on anammox activity and granulation in anaerobic continuously stirred tank reactors (CSTR)[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(11): 1970-1978.
- [8] WANG Y, HU X, JIANG B, et al. Symbiotic relationship analysis of predominant bacteria in a lab-scale anammox UASB bioreactor[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(8): 7615-7626.
- [9] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [10] 朱南文, 闰航, 陈美慈, 等. TTC-脱氢酶测定方法的探讨[J]. *中国沼气*, 1996, 14(2): 3-5.
- [11] WANG Z, GAO M, WANG Z, et al. Effect of salinity on extracellular polymeric substances of activated sludge from an anoxic-aerobic sequencing batch reactor[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(11): 2789-2795.
- [12] HOU J, MIAO L, WANG C, et al. Effect of CuO nanoparticles on the production and composition of extracellular polymeric substances and physicochemical stability of activated sludge flocs[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 176: 65-70.
- [13] FRØLUND B B K. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin[J]. *Water Research*, 1996, 30(10): 1749-1758.
- [14] 杨明明, 刘子涵, 周杨, 等. 厌氧氨氧化颗粒污泥EPS及其对污泥表面特性的影响[J]. *环境科学*, 2019, 40(5): 2341-2348.
- [15] 彭广生, 陆燕青, 曾鸿鹄, 等. 人工湿地 β -六六六去除效果及细菌群落特征分析[J]. *水处理技术*, 2020, 46(8): 34-38.
- [16] 朱晓桐, 于冰洁, 林久淑, 等. ANAMMOX-UASB反应器启动特性[J]. *环境科学与技术*, 2020, 43(12): 143-150.
- [17] 郑平, 许冬冬, 康达, 等. 厌氧氨氧化颗粒污泥研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(8): 1988-1995.
- [18] BORAN K, JAN T K. Anammox biochemistry: A tale of heme c proteins[J]. *Trends in Biochemical Science*, 2016, 41(12): 998-1011.
- [19] LIN Q, KANG D, ZHANG M, et al. The performance of anammox reactor during start-up: Enzymes tell the story[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2019, 121: 247-253.
- [20] KIM S, PARK J, CHO Y, et al. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions[J]. *Bioresour Technol*, 2013, 144: 8-13.
- [21] CHEN H, HU H, CHEN Q, et al. Successful start-up of the anammox process: Influence of the seeding strategy on performance and granule properties[J]. *Bioresour Technol*, 2016, 211: 594-602.
- [22] 杨敏, 胡学伟, 宁平, 等. 废水生物处理中胞外聚合物(EPS)的研究进展[J]. *工业水处理*, 2011, 31(7): 7-12.
- [23] GUO J, WANG S, LIAN J, et al. Rapid start-up of the anammox process: Effects of five different sludge extracellular polymeric substances on the activity of anammox bacteria[J]. *Bioresour Technol*, 2016, 220: 641-646.
- [24] MA B, LI Z, WANG S, et al. Insights into the effect of nickel (Ni(II)) on the performance, microbial enzymatic activity and extracellular polymeric substances of activated sludge[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 251: 81-89.
- [25] DONG J, ZHANG Z, YU Z, et al. Evolution and functional analysis of extracellular polymeric substances during the granulation of aerobic sludge used to treat p-chloroaniline wastewater[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 330: 596-604.
- [26] ZHU L, QI H, LV M, et al. Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using

- FTIR and 3D-EEM technologies[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 124: 455-459.
- [27] 王子超. 盐度和重金属对序批式生物反应器性能及微生物群落结构影响的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [28] 何承兴, 储昭瑞, 谭炳琰, 等. 厌氧氨氧化SBBR启动过程中菌群演替分析[J]. *水处理技术*, 2019, 45(7): 93-96.
- [29] 杨瑞丽, 王晓君, 吴俊斌, 等. 厌氧氨氧化工艺快速启动策略及其微生物特性[J]. *环境工程学报*, 2018, 12(12): 3341-3350.
- [30] 宋壮壮, 吕爽, 刘哲, 等. 厌氧氨氧化耦合反硝化工艺的启动及微生物群落变化特征[J]. *环境科学*, 2019, 40(11): 5057-5065.
- [31] 曹雁, 王桐屿, 秦玉洁, 等. 厌氧氨氧化反应器脱氮性能及细菌群落多样性分析[J]. *环境科学*, 2017, 38(4): 1544-1550.
- [32] 杨开亮, 廖德祥, 王莹, 等. 厌氧氨氧化快速启动及微生物群落演替研究[J]. *水处理技术*, 2020, 46(5): 65-70.
- [33] 沈耀良, 张海芹, 王翻翻, 等. 不同接种污泥ABR厌氧氨氧化的启动特征[J]. *环境科学*, 2015, 36(6): 2216-2221.
- [34] CHEN C, HUANG X, LEI C, et al. Effect of organic matter strength on anammox for modified greenhouse turtle breeding wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 148: 172-179.
- [35] MIAO Y, LIAO R, ZHANG X, et al. Metagenomic insights into Cr(VI) effect on microbial communities and functional genes of an expanded granular sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater[J]. *Water Research*, 2015, 76: 43-52.
- [36] 朱彤, 贾若坦, 梁启煜, 等. 厌氧氨氧化反应器运行过程微生物群落演替分析[J]. *东北大学学报(自然科学版)*, 2018, 39(5): 693-698.
- [37] VAN DER STAR W R L, MICLEA A I, VAN DONGEN U G J M, et al. The membrane bioreactor: A novel tool to grow anammox bacteria as free cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(2): 286-294.
- [38] VAN DE VOSSENBERG J, RATTRAY J E, GEERTS W, et al. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3120-3129.

(责任编辑: 曲娜)

Biological characteristics of ANAMMOX-UASB reactor during startup process

Ji Junyuan^{1,2}, Lin Jiushu^{1,2}, Zhu Xiaotong^{1,3}, Zhang Qian^{1,2}, Fan Yuqing^{1,2,*}

1. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266000, China

2. Shandong Key Laboratory of Marine Environmental Geology Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266000, China

3. Nanjing Wondux Environmental Protection Technology Co. Ltd., Nanjing 211100, China

*Corresponding author, E-mail: yuqing@ouc.edu.cn

Abstract The ANAMMOX-UASB reactor inoculated with flocculent anaerobic digestion sludge was successfully started up after 250 days operation. During the full startup process, floc sludge was gradually granulated, and mainly consists of irregular red granular sludge and brown flocculent sludge. The activity of dehydrogenase decreased from $3\ 909.51\ \mu\text{g}\cdot(\text{h}\cdot\text{g})^{-1}$ to $72.13\ \mu\text{g}\cdot(\text{h}\cdot\text{g})^{-1}$ during the entire startup process. Furthermore, the EPS content declined initially and then increased, and TB-EPS proportion increased from 54.4% to 75.7%, which was the main constituent of EPS. Meanwhile, PN was also the main component in both LB-EPS and TB-EPS, and the proportion of PN increased gradually from 88.7% and 89.5% to 99.6% and 94.7%, respectively. During the startup of ANAMMOX-UASB, both the composition and structure of EPS changed, the indexes of Chao1, ACE, Shannon and Simpson increased firstly and then declined, and the microbial diversity and richness decreased after successful startup. The dominant phyla of microorganisms were *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Planctomycetes*. The abundance of *Candidatus anammoximicrobium* decreased gradually and vanished eventually, while the abundance of *Candidatus brocadia* increased ultimately to 12.15%.

Keywords anammox; UASB; dehydrogenase; extracellular polymeric substance; microbial community