



NH₂OH 与 NO₂⁻对 anammox 体系中 N₂O 排放的影响

杨余涤非, 沈雁文✉

上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240

摘要 厌氧氨氧化 (anammox) 为新型生物脱氮工艺, 面临 N₂O 温室气体排放问题。羟胺 (NH₂OH) 与亚硝酸盐 (NO₂⁻) 是影响 anammox 体系 N₂O 排放的重要环境因子。基于批次实验, 考察了不同质量浓度 NH₂OH 和 NO₂⁻ 对 anammox 体系中 N₂O 释放的影响。结果表明, 在 [NO₂⁻] 为 100~300 mg·L⁻¹ 条件下, N₂O 排放量随 NH₂OH 质量浓度递增; 而当 [NO₂⁻] 增至 300~500 mg·L⁻¹, 投加高质量浓度 NH₂OH (30、50 mg·L⁻¹) 能抑制 N₂O 的产生。微生物群落多样性分析表明, 低 [NO₂⁻] 的环境中, NH₂OH 会增加体系中异养菌的相对丰度, 并抑制 anammox 菌的生长; 而在高 [NO₂⁻] 的环境中, 高质量浓度的 NH₂OH 可促进 anammox 菌与共存异养细菌的生长。功能基因分析表明, N₂O 的排放量受到硝化、反硝化及硝酸盐异化还原产铵 (DNRA) 代谢途径调控, 并与 *norB*、*nrfA* 基因丰度呈显著正相关 ($P < 0.05$)。因此, anammox 体系 N₂O 产量受到 NO₂⁻ 与 NH₂OH 综合作用的影响, 当进水 [NO₂⁻] 较高时可通过投加适量 NH₂OH 降低 N₂O 排放量, 而当进水 NO₂⁻ 不足时可通过抑制 NH₂OH 的累积量以减少 N₂O 的生成。该研究结果可为 anammox 工艺的低碳运行提供参考。

关键词 厌氧氨氧化; N₂O; 羟胺; NO₂⁻; 微生物群落结构; 功能基因

厌氧氨氧化 (anammox) 是新型的生物脱氮技术, 相较传统的硝化-反硝化生物脱氮工艺具有无需依赖外部碳源、能耗低、排泥量小等优势。然而, 由于该工艺体系中厌氧氨氧化菌通常与反硝化菌共存, anammox 过程中的 N₂O 排放问题不容忽视^[1-2]。作为非碳型温室气体, N₂O 在 100 年时间尺度的全球增温潜势是 CO₂ 的 273 倍^[3]。因此, 由此产生的温室效应对评估 anammox 工艺的降碳潜力影响巨大。传统硝化-反硝化工艺的 N₂O 排放因子 (即消耗每单位氮素所产生的 N₂O 量) 为 0.01%~3.3%, 而 anammox 工艺的 N₂O 排放因子可达 1.2%~12%, 且受到多种环境因子的影响, 包括进水亚硝酸盐 (NO₂⁻) 的浓度、中间产物羟胺 (NH₂OH) 积累与消耗速率, 以及微生物群落演替^[4-6]。LAWSON 等^[1] 发现 anammox 菌与其颗粒中的反硝化菌相互依赖, 虽然 anammox 过程本身不涉及 N₂O 的产生, 但考虑到体系中与 anammox 菌共存的反硝化菌同步反硝化途径的作用, 会导致 anammox 体系排放 N₂O^[7]。因此, 有必要研究不同工艺条件下 anammox 体系的 N₂O 排放变化规律及其调控机制。

NO₂⁻ 和 NH₂OH 对 anammox 工艺有不同的影响。NO₂⁻ 对于 anammox 是一种抑制剂, 其对于 anammox 的抑制作用随环境条件 (pH、温度等) 的变化而不同, 最低抑制阈值一般不低于 100~300 mg·L⁻¹; NO₂⁻ 的 IC₅₀ 范围为 150~600 mg·L⁻¹^[8]。而 NH₂OH 对 anammox 体系有抑制作用, 当 [NH₂OH] 为 40~80 mg·L⁻¹ 时 anammox 受到抑制, 通过 PCR 实验测定其阈值为 70 mg·L⁻¹, 超过阈值时菌体将失去活性^[9]。少量的 NH₂OH 不会抑制氨氧化菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 与 anammox, 还可恢复 anammox 菌的活性, [NH₂OH] 为 5 mg·L⁻¹ 时即可选择性抑制 NOB, 并促进硝化反应启动^[10]。

NH₂OH 氧化与 NO₂⁻ 还原也是产生 N₂O 的重要代谢途径, 涉及功能微生物主要是氨氧化菌 (AOB) 以及反硝化菌^[11]。NH₂OH 氧化途径可通过生物或非生物过程实现, 但一些研究表明 NH₂OH 的非生物途径产生

收稿日期: 2023-09-02; 录用日期: 2023-11-14

基金项目: 上海市自然科学基金项目 (21ZR1432300)

第一作者: 杨余涤非 (1999—), 女, 硕士研究生, yangyudifei@sjtu.edu.cn; ✉通信作者: 沈雁文 (1985—), 女, 博士, 副教授, yanwenshen@sjtu.edu.cn

的 N_2O 可忽略不计^[5]。在生物途径中, AOB 菌可通过羟胺氧化还原酶 (*hao*) 氧化 NH_2OH 并分解, NO 是这个过程的中间体; 另外, NH_2OH 还可通过 *cytochrome P460* 氧化成 N_2O , 并与 NO 络合物相互作用^[12-13]。而 NO_2^- 还原途径中, AOB 菌在此途径下以氨、氢、丙酮酸盐作为电子供体还原 NO_2^- , 特别是在缺氧条件或 NO_2^- 累积的条件下^[14]。 NH_2OH 氧化及 NO_2^- 还原是脱氮系统中 N_2O 的主要来源, 且这 2 种方式可同时发生^[15-17]。虽然许多研究致力于区分 NH_2OH 氧化、 NO_2^- 还原对 N_2O 的贡献, 但结论大都表明两者难以区分, 脱氮体系中 N_2O 的产生被认为是这些途径的单一或协同作用^[18]。因此, 在 anammox 体系中, NH_2OH 和 NO_2^- 对 anammox 系统中 N_2O 的产生机制仍不明确。对此, 虽然有研究表明当 $[\text{NO}_2^-]$ 为 $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 体系中 N_2O 随 NH_2OH 增加, 但对不同 $[\text{NO}_2^-]$ 条件下的研究仍有所欠缺^[6, 19]。

基于此, 本研究以 anammox 体系作为研究对象, 设定不同 $[\text{NO}_2^-]$ 条件以考察 NH_2OH 对 N_2O 产量的影响, 探究体系脱氮效率与功能菌群结构的变化, 从而优化 NH_2OH 与 NO_2^- 的投加策略, 为 anammox 体系的低碳运行提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验装置和运行条件

本实验使用 anammox 颗粒污泥作为菌种, 该颗粒污泥在实验室规模的 UASB 反应器中连续运行一年, 其厌氧氨氧化活性 (specific anammox activity, SAA) 为 $(79\pm 4.08)\text{mg}\cdot(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}$ 。实验所用 UASB 反应器的工作体积为 1 L, 运行温度控制在 $(35\pm 1)^\circ\text{C}$, 并用遮光布包裹反应区。蠕动泵将模拟废水连续泵入反应器底部, 反应器上部的溢流堰出水, 菌体产气则从反应器顶部的气室收集排出。除了分析取样外, 反应器不额外排泥。模拟废水中的成分主要为 NH_4^+ 、 NO_2^- 、无机盐溶液及微量元素, 其中 NH_4^+ 、 NO_2^- 分别以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_2 的形式添加, 具体配方参考文献 [20]。

1.2 批次实验设计

批次实验采用血清瓶作为容器, 其总体积为 250 mL, 有效体积为 180 mL。在每升无菌水加入 100 mL 无机盐溶液和 0.15 mL 微量元素 I 和 II, 初始 COD 设定为 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。批次实验中的组分与母反应器的模拟废水一致, 即微量元素 I 中含有 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $9.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 微量元素 II 含有 $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $0.014 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ H_3BO_4 , $0.99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $0.21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ^[20]。在实验前, 为去除泥浆中残存的 NH_4^+ 与 NO_2^- , 用无机盐溶液对颗粒污泥样品进行清洗 (3 次以上)。将 anammox 菌分别暴露于 $[\text{NO}_2^-]$ 为 100、300、500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下, 继而向实验组中添加不同浓度 NH_2OH (0、10、30、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。 NH_2OH 的生成和消耗速度都很快, 故本研究采用性质较为稳定的盐酸羟胺 ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 进行批次实验 (表 1)。另外, 用 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 HCl 和 NaOH 将用每各血清瓶内的 pH 调至约 7.5。然后, 用 N_2 吹扫血清瓶顶空气体以及液相 (15min 及以上) 以去除 O_2 , 并及时密封。所有批次实验均在恒温振动培养箱中进行, 转速与温度控制在 $120 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 35°C 。用注射器定时取样 (4°C 保存), 结束后测定瓶内污泥的浓度 (SS 和 VSS) 和水样氮素质量浓度, 每组实验均重复 3 次。

1.3 分析方法

$[\text{NH}_4^+]$ 、 $[\text{NO}_2^-]$ 、 $[\text{NO}_3^-]$ 、COD 分别使用纳氏试剂分光光度法、N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法和紫外分光光度法、重铬酸钾法测定。SS、VSS 使用焚烧称重法 (国家环保局, 2002) 测定, 比厌氧氨氧化活性 (SAA) 定义为每天每克挥发性悬浮物 (VSS) 的基质消耗速率^[21]。亚硝氮及氨氮的去除率分别定义为 NRE (nitrite removal efficiency)、

表 1 不同实验组 $\text{NO}_2^-/\text{NH}_2\text{OH}$ 的初始质量浓度
Table 1 Initial $\text{NO}_2^-/\text{NH}_2\text{OH}$ concentration in different experimental groups

组别	$[\text{NO}_2^-]/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$[\text{NH}_2\text{OH}]/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
A0	100	0
A1	100	10
A2	100	30
A3	100	50
B0	300	0
B1	300	10
B2	300	30
B3	300	50
C0	500	0
C1	500	10
C2	500	30
C3	500	50

ARE(ammonium removal efficiency); 总氮的去除率则定义为 TNRE(total nitrogen removal efficiency)。通过气袋收集 N_2O , 并用配备微池电子捕获检测器 (μ -ECD) 的 Agilent 6890N 气相色谱测定其排放量。

在实验结束时, 采集约 5 mL 污泥, 保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中。选取 3 组中的对照组, 以及实验组中 N_2O 排放量最小和最大的组共 9 个样本进行 Illumina MiSeq 测序分析 (Majorbio Company, 中国上海)。利用通用引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16s rRNA 基因的 V3~V4 区扩增并测序。采用主成分分析法 (principal component analysis, PCA) 分析比较不同分组样品间群落的 β 多样性差异, 并用相似性分析 (ANOSIM) 进行差异检验。通过 PICRUST2 功能预测结果与 KEGG 数据库对比, 得到 KO(KEGG Orthology) 功能的丰度预测, 从而得出功能基因丰度。

2 结果与讨论

2.1 NH_2OH 与 NO_2^- 对 anammox 体系 N_2O 排放的影响

如图 1~3 所示, 当 anammox 菌分别暴露于 $[NO_2^-]$ 为 100、300、500 $mg\cdot L^{-1}$ 的体系中, 添加不同浓度的 NH_2OH (0、10、30、50 $mg\cdot L^{-1}$)。在反应结束时 (65 h), 各组中 (除 A0 外) NO_2^- 均有残留, 这说明添加 NH_2OH 后 NO_2^- 在体系内累积, 而 NH_4^+ 的残留量均较低, 同时体系中的 NO_3^- 也逐渐积累。另外, anammox 体系中 N_2O 的产量随时间波动, 但大致先增加后下降, 各组 N_2O 分别在 6~25 h 达到最高峰。

为探究 NH_2OH 与 NO_2^- 对 anammox 体系的综合影响, 在不同 $[NO_2^-]$ 下分别添加质量浓度为 0、10、30、50 $mg\cdot L^{-1}$ NH_2OH 。有趣的是, 不同 $[NO_2^-]$ 下 A、B、C 三组对 NH_2OH 的反应不一致。图 4(b) 表明, 对比不同 $[NH_2OH]$ 下的脱氮效率, 发现 anammox 体系中 NRE、TNRE、SAA 的总体趋势均为下降, 而 A、C 两组中 A3、C3 的脱氮效率略有恢复, 这说明 NH_2OH 对于 anammox 体系的抑制作用可能是可逆的。各组的 ARE 值始终保持在较高水平, 在 A 组中的变化趋势与 NRE 一致, 始终高于 75%, 在 B、C 两组中则始终高于 98%; 说明当 NO_2^- 浓度为 100 $mg\cdot L^{-1}$ 时, ARE 会受 NH_2OH 浓度影响; 但当 NO_2^- 浓度提高到 300 和 500 $mg\cdot L^{-1}$ 时, NH_2OH 对 ARE 没有明显影响, 并且始终保持在较高水平。大量研究证明 NH_2OH

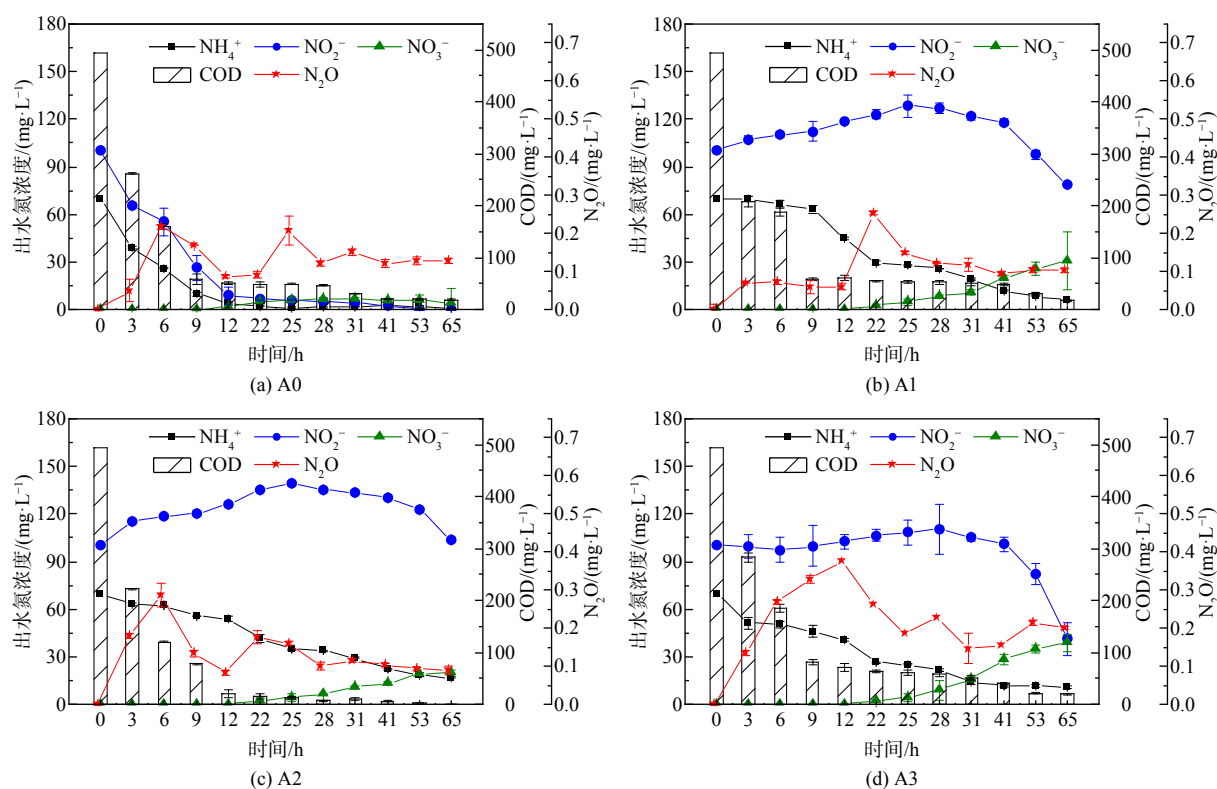


图1 $[NO_2^-]$ 为 100 $mg\cdot L^{-1}$ 时 A 组体系中氮素、COD 与 N_2O 的变化

Fig. 1 Nitrogen, COD and N_2O in a)A0, b)A1, c)A2 and d)A3 when $NO_2^- = 100\text{ }mg\cdot L^{-1}$

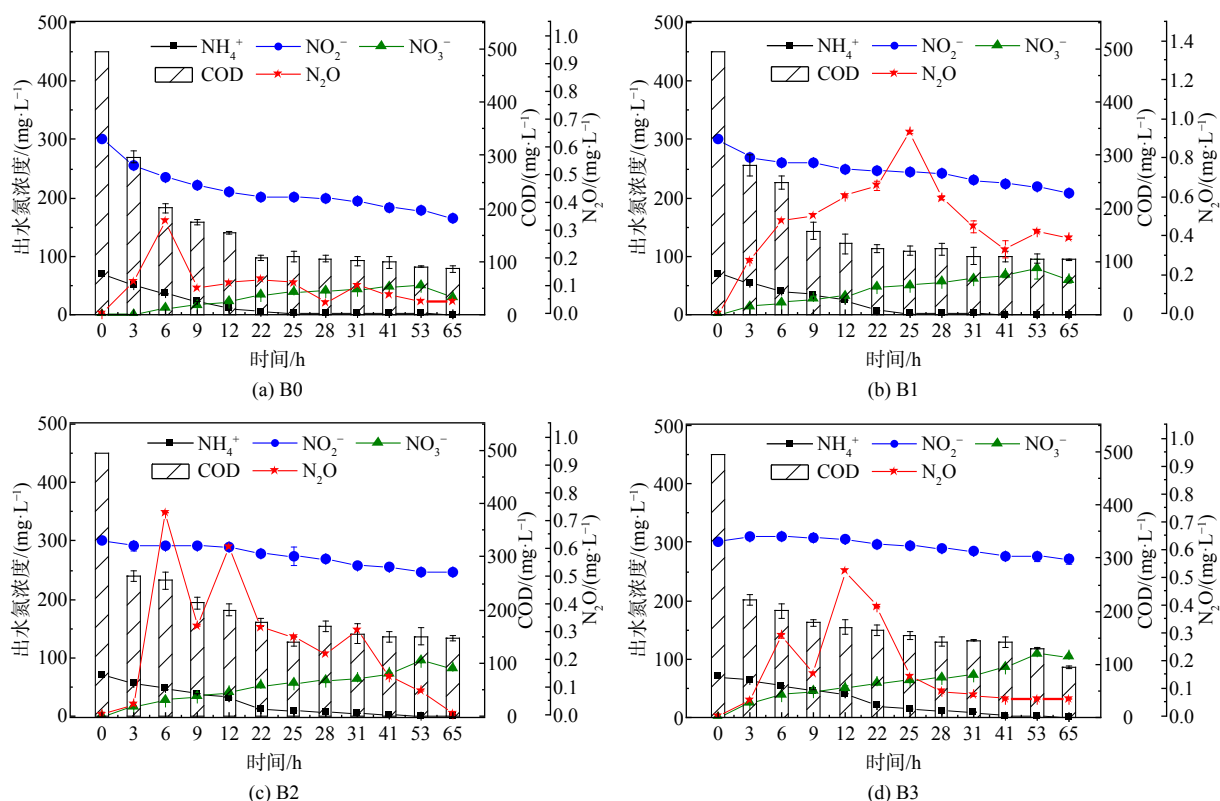


图 2 $[\text{NO}_2^-]$ 为 $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 B 组体系中氮素、COD 与 N_2O 的变化

Fig. 2 Nitrogen, COD and N_2O in a)B0, b)B1, c)B2 and d)B3 when $\text{NO}_2^-=300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

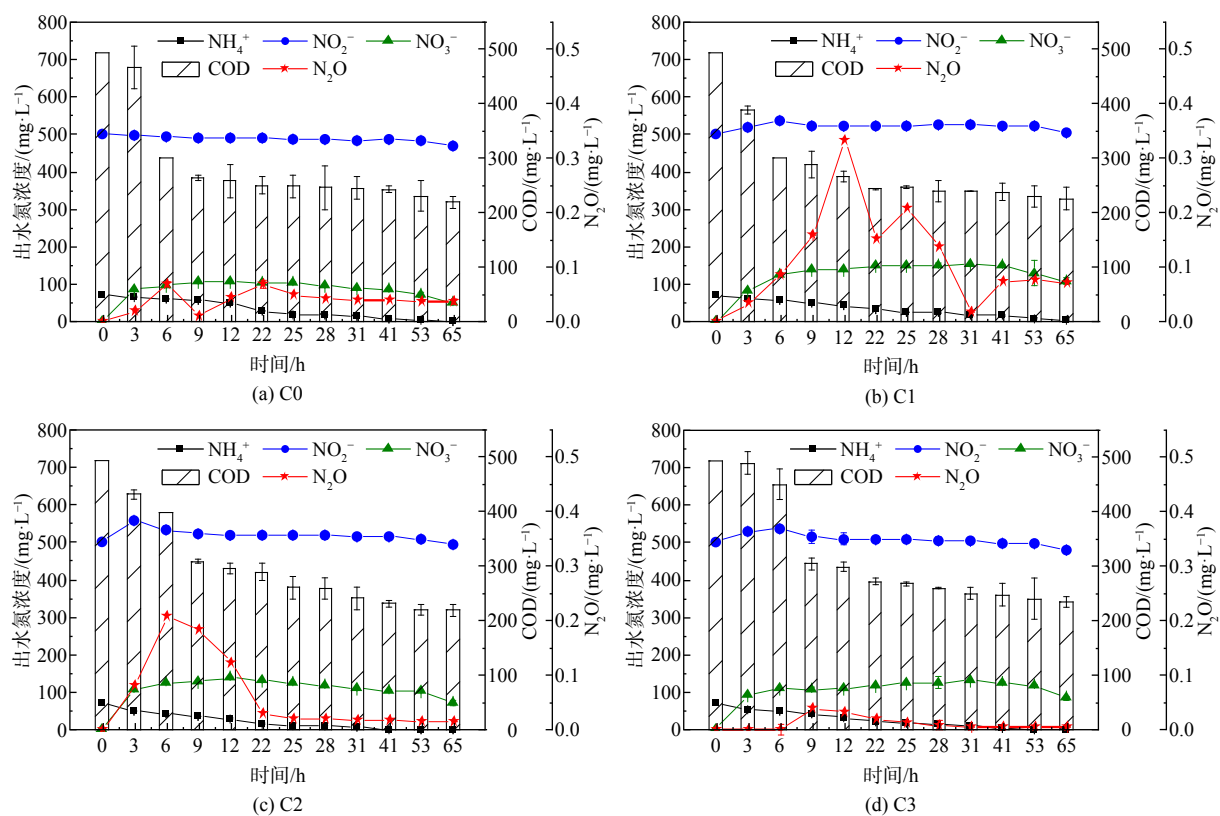


图 3 $[\text{NO}_2^-]$ 为 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 C 组体系中氮素、COD 与 N_2O 的变化

Fig. 3 Nitrogen, COD and N_2O in a)C0, b)C1, c)C2 and d)C3 when $\text{NO}_2^-=500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

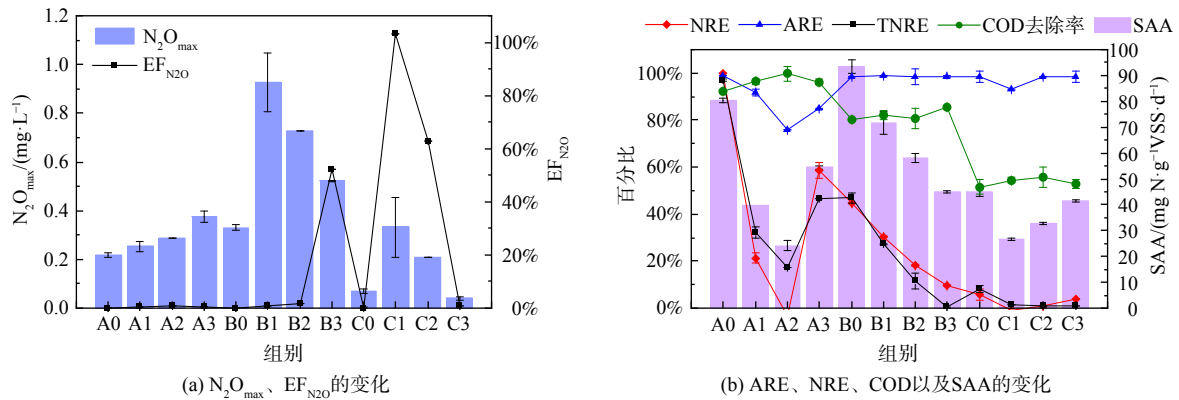


图 4 各实验体系中 N_2O_{max} 、 EF_{N_2O} 、ARE、NRE、COD 及 SAA 的变化

Fig. 4 a) N_2O_{max} 、 EF_{N_2O} , b) ARE, NRE, COD and SAA in each experimental group

对于 NOB 有抑制作用, 而对于 AOB 有促进作用, 从而有利于 anammox 体系中 NH_4^+ 的消耗及 NO_2^- 的积累^[9-10, 22-23]。如图 4(a) 所示, 在 A 组中, N_2O_{max} 随 $[NH_2OH]$ 递增, 而 B、C 两组均为先增加后下降, B、C 两组中 N_2O_{max} 最高的是 B1 和 C1 组, 且 $B1 > C1$ 。因此, 在 $[NO_2^-]$ 为 $100 \sim 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, anammox 体系中微生物可能倾向于通过 NH_2OH 氧化途径生产 N_2O ; 而 $[NO_2^-]$ 为 $300 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, anammox 体系中加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_2OH 会刺激 N_2O 的产生, 而进一步提高 $[NH_2OH]$ (30 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能抑制 N_2O 增长^[15]。 EF_{N_2O} (去除每单位氮素所排放的 N_2O) 与 N_2O_{max} 的变化趋势不一致, A、C 两组中的 EF_{N_2O} 值均为先增加后下降, 而 B 组则随 $[NH_2OH]$ 增加而递增; 3 组实验中 EF_{N_2O} 的最高值主要集中在 $[NH_2OH]$ 较高 (即 A2、B3、C1 组) 时, 且 $C1 > B3 > A2$ 。值得注意的是, 对比各实验组的脱氮效率与 N_2O 排放量, 发现 TNRE、NRE 及 SAA 的变化趋势与 EF_{N_2O} 呈反比, 但与其直接产量 (N_2O_{max}) 没有明显相关性, 这说明 anammox 体系脱氮效果越好, N_2O 的单位产量 (EF_{N_2O}) 越低。以上分析表明, anammox 体系的脱氮效率及 N_2O 产量是 NO_2^- 与 NH_2OH 综合作用的结果。本研究针对 anammox 体系中 N_2O 的减排提出了 NH_2OH 与 NO_2^- 的投加策略, 但在实际污水处理工程中, 如何进一步提高 anammox 菌的富集度及有效控制 NO_2^- 的去除率 (NRE) 仍是一个挑战, 需通过连续流 anammox 反应器长期运行以寻求最佳平衡点。

2.2 NH_2OH 与 NO_2^- 对 anammox 体系微生物群落及功能基因的影响

1) 微生物群落分析。选取各组中 N_2O_{max} 与 EF_{N_2O} 最高及最低的组别进行 16s rRNA 分析。细菌群落的丰富度和多样性如表 2 所示, 其中 ACE 和 Chao 指数越大, 表明物种丰富度越多, 而 Shannon 指数越大和 Simpson 指数越小, 表明群落的多样性越高^[24]。在实验结束时, A、C 两组的群落丰富度 ACE、Chao 指数随 $[NH_2OH]$ 增长而增加, Shannon 指数则随之增大, 说明其群落丰富度与多样性均增加。B 组中的 ACE 与 Chao 指数随 $[NH_2OH]$ 先减少后增加, 而 Shannon 指数增加, Simpson 指数减少, 说明其群落丰富度先减后增, 而多样性则持续增加。因此, NH_2OH 有提高 anammox 体系的群落丰富度和多样性的潜力, 但在不同 $[NO_2^-]$ 下有不同效果。

微生物门水平的主成分分析 (PCA) 结果如图 5 (a) 所示, 成分因子 1 (PC1) 与成分因子 2 (PC2) 对数据点差异性贡献率分别为 62.92% 和 16.96%。从象限分布来看, A、B、C 三组之间的群落结构差异比组内样本间的差异更大, 说明 NO_2^- 与 NH_2OH 的质量浓度变化对 anammox 菌落都有影响, 但 NO_2^- 的影响更大。如图 5 (b) 所

表 2 微生物群落的丰富度和多样性

Table 2 Richness and diversity of microbial communities

组别	群落丰富度指数		群落多样性指数	
	ACE	Chao	Shannon	Simpson
A0	868.9	919.3	4.140	0.053
A2	882.4	889.2	4.260	0.045
A3	903.4	923.3	4.401	0.037
B0	889.3	911.2	3.904	0.085
B1	803.4	814.2	3.937	0.058
B3	843.4	831.1	3.961	0.055
C0	929.3	976.2	4.366	0.035
C1	942.1	942.1	4.487	0.033
C3	956.4	961.0	4.376	0.036

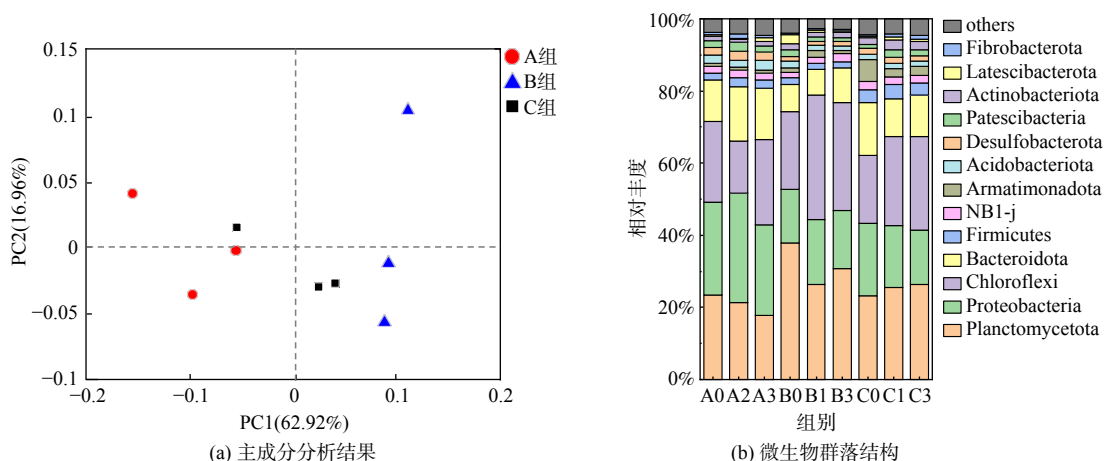


图 5 微生物门水平上的主成分分析 (PCA) 结果与群落组成

Fig. 5 a) Principal component analysis (PCA) plots and b) Microbial community composition at phylum level

示, 在门水平上 (相对丰度 $>0.1\%$) 各反应器的优势菌均为 Planctomycetes、Chloroflexi、Proteobacteria。Proteobacteria 和 Chloroflexi 经常被发现与 Planctomycetes 共生, Planctomycetes 和 Proteobacteria 含有许多与脱氮相关的细菌, 对 anammox 系统有重大贡献^[25]。对比不同 $[\text{NH}_2\text{OH}]$ 下 anammox 菌门水平的变化, 发现当 $[\text{NO}_2^-]$ 较低时 ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 三组菌群中 Planctomycetes 的相对浓度逐渐降低; 当 $[\text{NO}_2^-]$ 提高 ($300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 时, B1 与 B3 组的 Planctomycetes 相比 B0 组降低 27.58%、16.97%; 当 $[\text{NO}_2^-]$ 提高到 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 三组中 Planctomycetes 的相对浓度逐渐提高。在 A 组中, Bacteroidetes、Proteobacteria 和 Chloroflexi 的相对丰度之和逐渐增加, 分别为 59.70%、59.74%、62.94%; B 组中先增加后下降, 分别为 43.94%、59.69%、55.76%, 而 C 组中三者的相对丰度之和相近, 分别为 53.46%、52.35%、52.33%。Planctomycetes 主要负责 anammox 过程, 在缺乏 NO_2^- 时, anammox 反应会减弱; 而 anammox 颗粒污泥中 Bacteroidetes、Proteobacteria 和 Chloroflexi 等门均为异养菌, 能以微生物源有机物 (如胞外多聚物、溶解性微生物产物和细胞凋亡产物) 为能源, 并能进行反硝化作用, 故具有释放 N_2O 的潜能^[24, 26]。

微生物属水平结构的 PCA 结果如图 6 (a) 所示, 成分因子 1 (PC1) 与成分因子 2 (PC2) 对数据点差异性贡献率分别为 41.79% 和 18.7%。从象限分布来看, A、B、C 三组的组间差异较为显著, 而组内样本差异较小, 说明 $[\text{NO}_2^-]$ 对 anammox 菌体的影响较大。如图 6 (b) 所示, 在属水平上 (相对丰度 $>0.05\%$) *Candidatus Kuenenia* (13.11%~24.51%) 和 *Candidatus Brocadia* (0.084%~4.03%) 被鉴定为 anammox 功能菌。其中, *Candidatus Kuenenia* 是系统中始终占优势的 anammox 菌属。当不添加 NH_2OH 时, $[\text{NO}_2^-]$ 为 100、300、 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3 个实验组 (A0、B0、C0) 中, *Candidatus Kuenenia* 的相对丰度逐渐降低, B0、C0 组相比

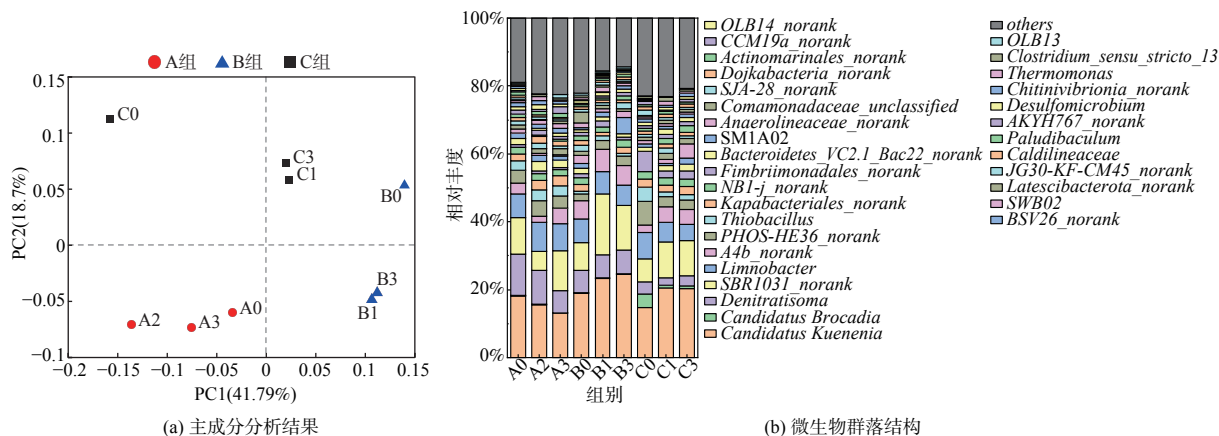


图 6 微生物属水平上的 PCA 与群落组成

Fig. 6 Principal component analysis (PCA) plots and Microbial community composition at genus level

A0组分别降低了16.53%、18.80%，说明anammox菌的生长受到 NO_2^- 的不利影响。另外，C0组中*Candidatus Brocadia*的浓度是A0、B0组的22.71、17.59倍，说明anammox菌能够应对高 $[\text{NO}_2^-]$ ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的抑制，而且*Candidatus Brocadia*对于 NO_2^- 的适应性比*Candidatus Kuenenia*更强。对比不同 $[\text{NO}_2^-]$ 下 NH_2OH 对anammox体系的影响，发现添加 NH_2OH 能缓解高质量浓度 NO_2^- ($500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的毒性，从而促进*Candidatus Kuenenia*的生长，但在 $[\text{NO}_2^-]$ 较低时 ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 反而会产生抑制作用。此外，*Denitratisoma*、*SBR1031*、*Limnobacter*以及*A4b_norank*也是优势菌属。异养菌*SBR1031* (9.28%~17.91%)与*A4b_norank* (2.04%~7.32%)与 N_2O 之间存在显著相关性 ($P<0.05$)。A2、A3组中*SBR1031*的相对丰度比A0组增加了5.69%、9.47%，而B组中B1、B3组是B0组的2.73倍、2.00倍，C1、C3组较C0组高56.36%、35.54%；*A4b_norank*在各组中的变化趋势与*SBR1031*相同。值得注意的是，上述相对丰度的变化与 $\text{N}_2\text{O}_{\text{max}}$ 的变化趋势(见图4(a))一致。*SBR1031*和*A4b_norank*都属于*Chloroflexi*门，其中*SBR1031*属于*Anaerolineae*科，在体系其代谢功能与 NH_4^+ 相关，可清除细胞碎片和细胞外蛋白，促进anammox污泥颗粒化，但*SBR1031*其他的特殊功能还不清楚；*A4b_norank*则属于*Anaerolineae*纲，此类菌带有亚硝酸盐还原酶基因(*nir*)，能够将 NO_2^- 转化为 NO ^[27-28]，其作为异养菌在anammox体系中广泛存在，有利于维持厌氧微环境并维持脱氮系统的稳定，anammox中几乎所有的异养菌都具有部分反硝化的能力，将 NO_3^- 转化为 NO_2^- ，从而与NOB细菌一同完成亚硝酸盐循环，也因此具有释放 N_2O 的潜能^[1,29]。本研究发现当 $[\text{NO}_2^-]$ 较低时 ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)， NH_2OH 会增加体系中异养菌的相对丰度，降低anammox菌的丰度，从而促进体系内 N_2O 的释放；在 $[\text{NO}_2^-]$ 较高时 ($300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)，添加 NH_2OH 有利于anammox菌和异养菌的生长，而且anammox是NO的消耗者，能将NO与 NH_4^+ 偶联，也可通过NO还原来保存能量和生长，从而降低体系内 N_2O 的释放量，故 $\text{N}_2\text{O}_{\text{max}}$ (图4(a))随 $[\text{NH}_2\text{OH}]$ 增大而回落^[30-31]。另外，体系中存在的*Denitratisoma* (57.62%±2.96%)、*Limnobacter* (60.24%±1.22%)都是反硝化菌，属于*Proteobacteria*门。*Denitratisoma*具有盐还原基因(nitrite reductase, *nir*)，使得anammox体系具有积累 N_2O 的可能性，而*Limnobacter*则具有降解 N_2O 的潜力，因此，anammox体系中的 N_2O 积累也可能是反硝化菌综合作用的结果。综上所述，anammox体系的脱氮效率与 N_2O 排放是 NO_2^- 和 NH_2OH 共同作用的结果，当 $[\text{NO}_2^-]$ 较高时可提高 NH_2OH 的投加量，在刺激anammox生长同时控制 N_2O 的产量，而 $[\text{NO}_2^-]$ 较低时不投加 NH_2OH 可能是更好的选择。

2) 功能基因分析。在生物脱氮过程中， N_2O 主要来源于 NH_2OH 氧化或硝化反硝化途径。如图7所示， NH_4^+ 通过氨单加氧酶(*amo*)的作用被分子氧氧化为 NH_2OH ，之后 NH_2OH 在羟胺氧化还原酶(*hao*)的作用下以分子氧作为电子受体被氧化为 NO_2^- 。此时， N_2O 主要产生于 NH_2OH 的不完全氧化。亚硝酸盐还原酶(*nirK*)和一氧化氮还原酶(*norB*)都是与AOB菌相关的酶，*NirK*将 NO_2^- 还原为NO，*norB*再将NO还原为 N_2O 。反硝化过程的中间产物主要包括 NO_2^- 、NO、 N_2O ，分别由硝酸盐还原酶(*nar*)，亚硝酸盐还原酶(*nir*)，一氧化氮还原酶(*nor*)及氧化亚氮还原酶(*nos*)催化产生^[2,15,17,30,32-34]。

如图7所示，硝化途径中当 $[\text{NO}_2^-]$ 较低时(A组)，A2、A3组中的丰度是A0组的1.44倍、2.56倍，此时 NH_2OH 将促进*amoA*的生长；而当 $[\text{NO}_2^-]$ 增大(B、C组中)时，其中B1组中的丰度相比B0、B3组增长50.93%、75.27%，C1组中的丰度是C0、C3组的2.35倍、1.69倍，B1、C1(即 $[\text{NH}_2\text{OH}]$ 为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时)*amoA*的丰度最高，这与 $\text{N}_2\text{O}_{\text{max}}$ 的变化趋势(图4(a))相同，而*hao*的变化则与*amoA*相反。有研究表明，*amoA*(氨单加氧酶)基因存在于AOA当中，可将 NH_4^+ 氧化成 NH_2OH ，AOB相比异养反硝化菌而言具有更强的 NO_2^- 还原能力， N_2O 是其最终产物；*Hao*(羟胺氧化还原酶)作为anammox系统中常见的基因，也参与NO的氧化还原，进一步验证了 NH_2OH 代谢对于anammox中 N_2O 释放的影响^[35]。在反硝化途径中，*norB*与*nosZ*的变化趋势相似，而且*norB*的丰度与 N_2O 排放量呈现显著正相关(图8)，可见此体系中反硝化途径对 N_2O 有较强的促进作用。当 $[\text{NO}_2^-]$ 较低 ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 时，*norB*与*nosZ*的丰度都随 $[\text{NH}_2\text{OH}]$ 而上升，其中A2、A3组中*norB*的丰度相比A0组增长41.54%和68.76%，*nosZ*则分别增加39.56%、138.36%。但当 $[\text{NO}_2^-]$ 较高 (300 、 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的B、C两组中，B3中*norB*的丰度相较B0、B1组减少26.29%、60.29%，*nosZ*的丰度则分别减少23.75%、48.74%；在C组中，C3组中*norB*的丰度相较C1组减少39.97%，*nosZ*的丰度则减少34.27%。可见当 $[\text{NO}_2^-]$ 较高时，高浓度 ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) NH_2OH 下*norB*与*nosZ*的丰度均降低，由此减少anammox体系中 N_2O 的排放。有研究表明，在氮代谢途径中，反硝化基因

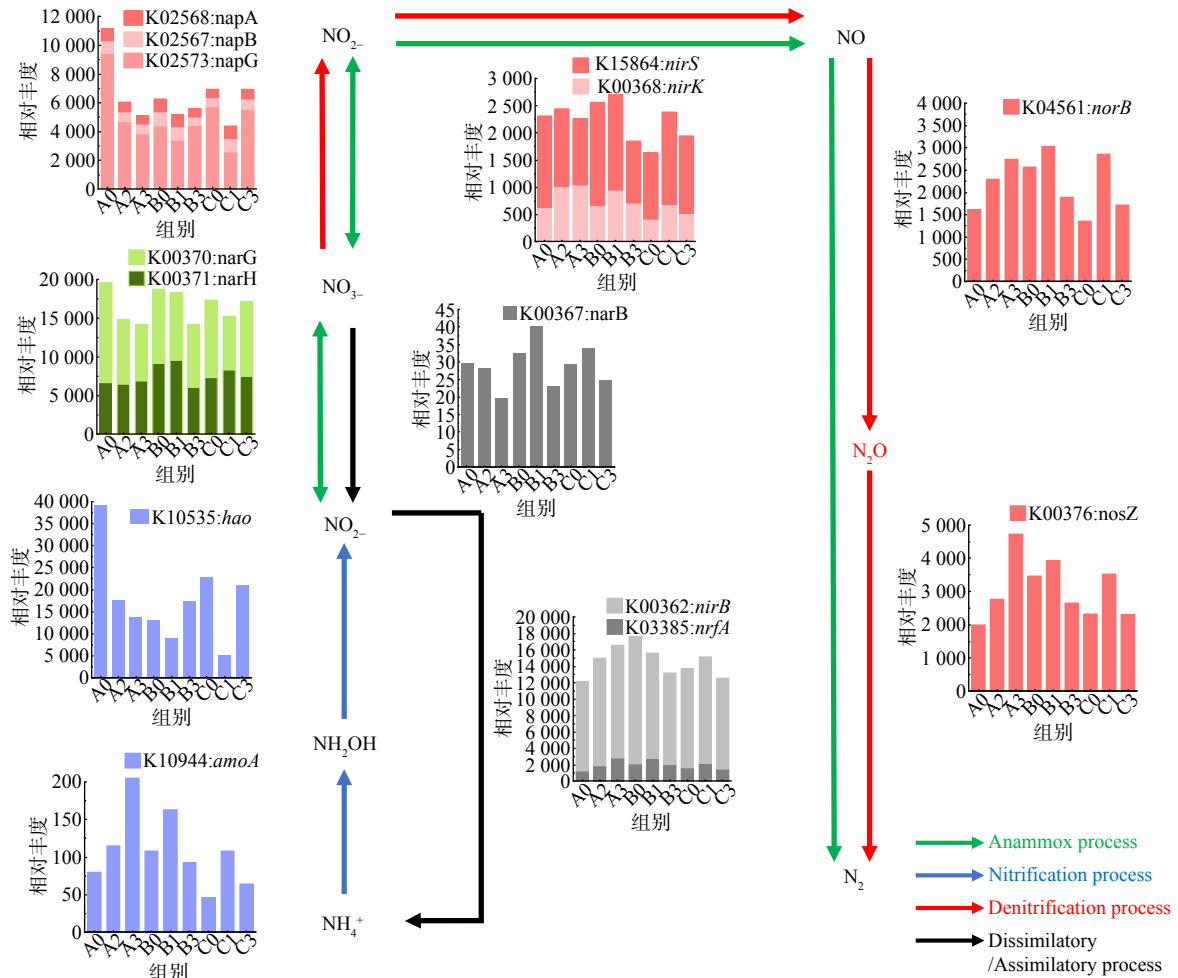
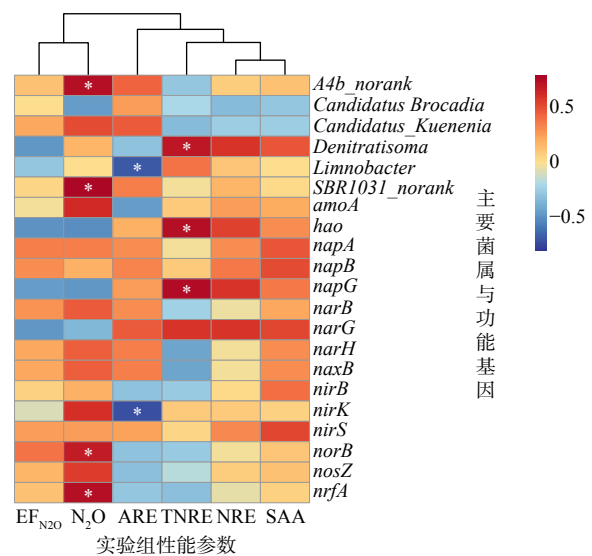


图 7 氮代谢关键功能基因的变化

Fig. 7 Key functional genes in nitrogen metabolism

norB 和 *nosZ* 是与 N_2O 代谢直接相关的基因, *norB* 的作用在于将 NO 还原成 N_2O , 而 *nosZ* 是现今唯一被发现的 N_2O 还原酶, 能将 N_2O 转化成 N_2 , *norB* 与 *nosZ* 来源于 *Bacteroidetes*、*Chloroflexi*、*Planctomycetes* 及 *Proteobacteria*, 其中 *Proteobacteria* 的贡献最大。一系列研究表明, 其丰度与 N_2O 释放量呈正相关^[31, 36]。除此以外, 本实验还发现反硝化途径中各组的 *nirK* 的变化趋势与 $\text{N}_2\text{O}_{\text{max}}$ 趋同 (将图 7 与图 4(a) 对比), 而 *nirS* 变化趋势与 A0、B0、C0 三组 (变量仅为 NO_2^-) 的 $\text{N}_2\text{O}_{\text{max}}$ 相同。大多数 *nirS* 来源于 *Proteobacteria*, 是一种同时含有 c 和 d1 型血红素的亚硝酸盐还原酶, *nirK* 则是一种含铜的亚硝酸盐还原酶^[37]。有研究证明, 一些硝化细菌含有 *nirK* 和 *nirS* 基因, 可在厌氧条件下通过反硝化释放 N_2O , 而 *nirS* 的相对丰度与反硝化过程中的 N_2O 相关^[11, 35]。因此, 猜测 anammox 体系能通过 *nirS* 和 *nirK* 形成 NO , 进而增加体系中的 N_2O , *nirK* 在 NH_2OH 氧化与 NO_2^- 还原途径中均可能存



注: 颜色梯度表示Spearman的等级相关系数, 范围从红色(正相关)到蓝色(负相关); 星号表示统计学上有显著性差异: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) 和 $p < 0.001$ (***)。

图 8 实验组性能参数与优势菌属、功能基因的相关性

Fig. 8 Correlation between performance parameters, dominant bacteria and functional genes

在, 而 nirS 在 NO_2^- 还原途径中担任更重要的作用。值得注意的是, 不同 $[\text{NO}_2^-]$ 下 nrfA (亚硝酸还原酶) 与 N_2O 排放量也呈现显著正相关 (图 8), 这说明 DNRA 途径也参与 N_2O 代谢。完全的 DNRA 反应 (NO_2^- 完全转化为 NH_4^+) 不会产生 N_2O , 但 anammox 体系中 NO_2^- 的大量积累会导致不完全的 DNRA 反应, N_2O 也由此产生, 如何避免这种不完全的 DNRA 仍需进一步研究^[38]。

3 结论

1) 在 anammox 体系中, NO_2^- 和 NH_2OH 都不利于 anammox 体系的脱氮效率, N_2O 产量则是 NO_2^- 与 NH_2OH 综合作用的结果。当 $[\text{NO}_2^-]$ 为 $100\sim 300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, NH_2OH 不利于 N_2O 的减排; 当 $[\text{NO}_2^-]$ 增至 $300、500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 质量浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_2OH 会刺激 N_2O , 而 $[\text{NH}_2\text{OH}]$ 为 $30、50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 则能抑制 N_2O 。2) 异养菌 *SBR1031* 与 *A4b_norank* 与 N_2O 排放量之间存在显著相关性 ($P<0.05$)。 NO_2^- 为 $100\sim 300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, NH_2OH 促进异养菌的生长, 并抑制 *Candidatus Kuenenia*; 在 NO_2^- 增至 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}、500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, NH_2OH 有利于 *Candidatus Kuenenia* 和异养菌的生长。3) N_2O 的释放量与硝化途径 (amoA、hao)、反硝化途径 (nirS、nirK、norB、nosZ) 以及 DNRA 途径 (nrfA) 有关, 并与功能基因 norB、nrfA 呈显著正相关 ($P<0.05$)。

参考文献

- [1] 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.
- [2] LU X, PEREIRA D S, AL-HAZMI H E, et al. Model-based evaluation of N_2O production pathways in the anammox-enriched granular sludge cultivated in a sequencing batch reactor[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(5): 2800-2809.
- [3] IPCC. Climate Change 2021: The Physical Science Basis[R]. Cambridge: Cambridge University Press, 2021.
- [4] LACKNER S, GILBERT E M, VLAEMINCK S E, et al. Full-scale partial nitrification/anammox experiences-An application survey[J]. *Water Research*, 2014, 55: 292-303.
- [5] LAW Y, LANT P, YUAN Z. The confounding effect of nitrite on N_2O production by an enriched ammonia-oxidizing culture[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(13): 7186-94.
- [6] TERADA A, SUGAWARA S, HOJO K, et al. Hybrid nitrous oxide production from a partial nitrifying bioreactor: Hydroxylamine interactions with nitrite[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(5): 2748-2756.
- [7] 郝晓地, 杨振理, 于文波, 等. 污水处理过程 N_2O 排放: 过程机制与控制策略[J]. *环境科学*, 2023, 44(2): 1163-1173.
- [8] LIN L M, STEVEN P, RATTIER M, et al. Individual and combined effect of salinity and nitrite on freshwater Anammox bacteria (FAB)[J]. *Water Research*, 2020, 169: 114931.
- [9] 邢崇阳, 范禹辰, 陈璇等. 羟胺对厌氧氨氧化污泥群落的影响[J]. *环境科学*, 2020, 41(7): 3365-3372.
- [10] LI J, ZHANG Q, LI X, et al. Rapid start-up and stable maintenance of domestic wastewater nitrification through short-term hydroxylamine addition[J]. *Bioresour Technol*, 2019, 278: 468-472.
- [11] WUNDERLIN P, MOHN J, JOSS A, et al. Mechanisms of N_2O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions[J]. *Water Research*, 2012, 46(4): 1027-37.
- [12] LAW Y, NI B, LANT P, et al. N_2O production rate of an enriched ammonia-oxidising bacteria culture exponentially correlates to its ammonia oxidation rate[J]. *Water Research*, 2012, 46(10): 3409-19.
- [13] EMILIE N P, COURTENS H D C, SIEGFRIED E V, ROBIN J, et al. Nitric oxide preferentially inhibits nitrite oxidizing communities with high affinity for nitrite[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 193.
- [14] WRAGEA N, VELTHOF G L, BEUSICHEM M L, et al. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(2001): 1723-1732.
- [15] ALI M, RATHNAYAKE R M, ZHANG L, et al. Source identification of nitrous oxide emission pathways from a single-stage nitrification-anammox granular reactor[J]. *Water Research*, 2016, 102: 147-157.
- [16] IRISA T, HIRA D, FURUKAWA K, et al. Reduction of nitric oxide catalyzed by hydroxylamine oxidoreductase from an anammox bacterium[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(6): 616-21.
- [17] MA C, JENSEN M, SMETS B F, et al. Pathways and controls of N_2O production in nitrification-anammox biomass[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(16): 8981-8991.
- [18] XIAO P, AI S, ZHOU J, et al. N_2O profiles in the enhanced CANON process via long-term N_2H_4 addition: Minimized N_2O production and the influence of exogenous N_2H_4 on N_2O sources[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(30): 37188-37198.
- [19] ZHAO J, ZHAO J Q, YANG W, et al. Mechanisms of NO and N_2O production by enriched nitrifying sludge in a sequencing batch reactor: Effects of hydroxylamine[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 316: 115237.
- [20] XU J, WU X, ZHU N, et al. Anammox process dosed with biochars for enhanced nitrogen removal: Role of surface functional groups[J]. *Science of the Total Environment*, 2020J 748: 141367.
- [21] WANG Y, MA X, ZHOU S, et al. Expression of the nirS, hzsA, and hdh Genes in Response to Nitrite Shock and Recovery in *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(13): 6940-7.
- [22] ZHAO J, ZHAO J Q, XIE S, et al. The role of hydroxylamine in promoting conversion from complete nitrification to partial nitrification: NO toxicity inhibition and its characteristics[J]. *Bioresour Technol*, 2021, 319: 124230.
- [23] XU G, XU X, YANG F, et al. Partial nitrification adjusted by hydroxylamine in aerobic granules under high DO and ambient temperature and subsequent

- Anammox for low C/N wastewater treatment[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 213: 338-345.
- [24] XU J, WU X, ZHU N, et al. Roles of MnO_2 on performance, sludge characteristics and microbial community in anammox system[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 848-856.
- [25] ZHAO Y P, LIU S F, JIANG B, et al. Genome-centered metagenomics analysis reveals the symbiotic organisms possessing ability to cross-feed with anammox bacteria in anammox consortia[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(19): 11285-11296.
- [26] ZHANG X J, ZHOU Y X, ZHENG T F, et al. Toxic effects of CuO , ZnO and TiO_2 nanoparticles in environmental concentration on the nitrogen removal, microbial activity and community of Anammox process[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 332: 42-48.
- [27] JIANG H, WANG Z, REN S, et al. Culturing sludge fermentation liquid-driven partial denitrification in two-stage Anammox process to realize advanced nitrogen removal from mature landfill leachate[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 415: 125568.
- [28] JIANG M, JI S, WU R, et al. Exploiting refractory organic matter for advanced nitrogen removal from mature landfill leachate via anammox in an expanded granular sludge bed reactor[J]. *Bioresour Technol*, 2023, 371: 128594.
- [29] LI J, LIU Q, GU Y, et al. The response of anaerobic ammonium oxidation process to bisphenol-A: Linking reactor performance to microbial community and functional gene[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 838: 156030.
- [30] HU Z, WESSELS H J, ALEN T V, et al. Nitric oxide-dependent anaerobic ammonium oxidation[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1244.
- [31] KARTAL B, TAN N C, BIEZEN V D, et al. Effect of nitric oxide on anammox bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(18): 6304-6.
- [32] OKABE S, OSHIKI M, TAKAHASHI Y, et al. N_2O emission from a partial nitrification-anammox process and identification of a key biological process of N_2O emission from anammox granules[J]. *Water Research*, 2011, 45(19): 6461-70.
- [33] YANG Q, CUI B, ZHOU Y, et al. Impact of gas-water ratios on N_2O emissions in biological aerated filters and analysis of N_2O emissions pathways[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 723: 137984.
- [34] SUENAGA T, OTA T, OBA K, et al. Combination of ^{15}N Tracer and Microbial Analyses Discloses N_2O Sink Potential of the Anammox Community[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(13): 9231-9242.
- [35] XIONG J, MA S, HE X, et al. Nitrogen transformation and dynamic changes in related functional genes during functional-membrane covered aerobic composting[J]. *Bioresour Technol*, 2021, 332: 125087.
- [36] LI S, WANG S, JI G. Influences of carbon sources on N_2O production during denitrification in freshwaters: Activity, isotopes and functional microbes[J]. *Water Research*, 2022, 226: 119315.
- [37] WANG H, FAN Y, ZHOU M, et al. Function of Fe(III) -minerals in the enhancement of anammox performance exploiting integrated network and metagenomics analyses[J]. *Water Research*, 2022, 210: 117998.
- [38] QUICK A M, REEDER W J, FARRELL T B, et al. Nitrous oxide from streams and rivers: A review of primary biogeochemical pathways and environmental variables[J]. *Earth-Science Reviews*, 2019, 191: 224-262.

(责任编辑: 靳炜)

Effect of NH_2OH and NO_2^- on N_2O emission of anammox system

YANG Yudifei, SHEN Yanwen*

School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

*Corresponding author, E-mail: yanwenshen@sjtu.edu.cn

Abstract As a new biological nitrogen removal technology, anaerobic ammonium oxidation (anammox) is faced with N_2O emissions, a greenhouse gas with high global warming potential. Hydroxylamine (NH_2OH) and nitrite (NO_2^-) are key environmental factors affecting N_2O emissions in the anammox system. Based on batch experiments, the effects of NH_2OH and NO_2^- concentrations on N_2O release in anammox process were investigated. The results showed that at low NO_2^- concentration ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), the N_2O emission increased with NH_2OH concentration. However, at high NO_2^- concentration ($300,500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), adding high concentrations of NH_2OH ($30, 50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) could reduce N_2O production. Microbial community analysis showed that at low NO_2^- concentration, adding NH_2OH increased the relative abundance of heterotrophic bacteria while inhibited the growth of anammox bacteria. At high NO_2^- concentration, high doses of NH_2OH promoted the growth of anammox bacteria and coexisting heterotrophic bacteria. Functional gene analysis showed that N_2O emissions were regulated by nitrification, denitrification, and dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) pathways and were positively correlated with the abundance of *norB* and *nrfA* genes ($P < 0.05$). Therefore, the N_2O production in the anammox system is influenced by the combined effects of NO_2^- and NH_2OH . When treating influent with high NO_2^- concentration, supplying an appropriate amount of NH_2OH can reduce N_2O emissions. On the other hand, in the case of insufficient nitrite, reducing NH_2OH accumulation may mitigate N_2O formation. This study provides a reference for operating the anammox process in a low-carbon-emission manner.

Keywords anammox; N_2O ; hydroxylamine; NO_2^- ; microbial community; functional genes