

# 沸石载体恢复受饥饿影响厌氧氨氧化菌的性能研究

余道道<sup>1</sup> 孙敬起<sup>2</sup> 霍唐燃<sup>2</sup> 赵云鹏<sup>2</sup> 刘思彤<sup>1,2,†</sup>

1. 北京大学深圳研究生院环境与能源学院, 深圳 518055; 2. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871; † 通信作者, E-mail: liusitong@pku.edu.cn

**摘要** 利用沸石良好的吸氨能力和微生物载体功能, 将受饥饿影响的厌氧氨氧化菌在含沸石的反应器内进行活性恢复, 研究沸石对长期饥饿影响下厌氧氨氧化菌恢复过程中菌群活性及结构的影响。结果表明, 经过82天的运行, 沸石反应器和对照反应器(无沸石添加)内厌氧氨氧化菌均获得恢复。沸石反应器的脱氮效率从第59天开始与对照反应器拉开差距, 运行第82天时, 沸石反应器中氮去除负荷(NRR)为177.8 mgN/(L·d), 显著大于对照反应器(154.3 mgN/(L·d))。利用16S rRNA高通量测序方法, 对反应器内菌群的微生物组成与功能进行分析, 发现投加沸石载体使得恢复后的厌氧氨氧化菌 *Candidatus Brocadia* 的丰度更高, 可以更好地促进受饥饿抑制的厌氧氨氧化菌的恢复。

**关键词** 厌氧氨氧化菌; 沸石; 细菌恢复; 群落结构

## Effect of Zeolite on Recovery of Anammox Bacteria Affected by Starvation

YU Daodao<sup>1</sup>, SUN Jingqi<sup>2</sup>, HUO Tangran<sup>2</sup>, ZHAO Yunpeng<sup>2</sup>, LIU Sitong<sup>1,2,†</sup>

1. Department of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055; 2. Department of Environmental Science & Engineering, Peking University, Beijing 100871; † Corresponding author, E-mail: liusitong@pku.edu.cn

**Abstract** Zeolite has good ammonium absorption capacity and microbial carrier function. Anammox bacteria affected by starvation were activated in a reactor containing zeolite to study the effect of zeolite on the activity and structure of anammox bacteria after long-term starvation. The results showed that anammox bacteria recovered in the zeolite reactor and the control reactor (without zeolite addition) after 82 days of operation. The nitrogen removal efficiency of zeolite reactor began to lag behind that of the control reactor on the 59th day. On the 82nd day of operation, the nitrogen removal load (NRR) of zeolite reactor was 177.8 mgN/(L·d), significantly higher than that of the control reactor (154.3 mgN/(L·d)). At the same time, 16S rRNA high-throughput sequencing method was used to analyze the microbial composition and function of the microbial community in the reactor. It was found that adding zeolite carrier could increase the abundance of anammox bacteria *Candidatus brocadia* after recovery, and could better promote the recovery of anammox bacteria inhibited by hunger.

**Key words** anammox bacteria; zeolite; bacterial recovery; community structure

厌氧氨氧化是在厌氧条件下, 以氨为电子供体, 亚硝酸盐为电子受体, 将氨氧化成氮气的生物过程。与传统的生物脱氮方法相比, 厌氧氨氧化具有氮去除负荷高、污泥产量低以及无需外加碳源等优点<sup>[1]</sup>, 受到学者们的普遍关注。然而, 由于厌氧氨氧化菌生长速度极慢, 倍增时间长, 因此其培养过程极其缓慢<sup>[2-3]</sup>。更重要的是, 在反应器长期运行之后, 如果种泥保存不当, 使污泥处于饥饿状态, 活

性会受到更大的影响。因此, 研究长期受饥饿影响厌氧氨氧化菌的有效恢复策略具有重要的意义。

目前, 恢复受饥饿影响厌氧氨氧化菌活性的措施主要有改变进水负荷、投加中间产物  $N_2H_4$  以及添加陶粒或彗星状纤维材料等载体。候晓帮等<sup>[4]</sup>采用4种方式(正常负荷、降低负荷、投加  $N_2H_4$  和投加  $NH_2OH$ )复活厌氧氨氧化菌, 发现降低负荷或投加  $N_2H_4$  是快速恢复厌氧氨氧化菌活性的有效方

法。杨开亮等<sup>[5]</sup>采用以彗星状纤维材料为载体(特点是利用中间的小珠将纤维固定起来,两端呈放射状)的序批式反应器(sequencing batch reactor, SBR),对停止运行 100 天的反应器中厌氧氨氧化菌进行恢复培养。结果表明,生物膜的形成可增强厌氧氨氧化菌的活性,缩短恢复周期,恢复后厌氧氨氧化菌的脱氮性能良好。但是,这些方法都存在不足之处:外源添加药品增加成本,且  $N_2H_4$  有剧毒、极不稳定;采用陶粒或彗星状纤维材料等载体存在成本高、恢复过程漫长等问题。因此,本研究拟用一种高效吸附  $NH_4^+-N$ 、经济成本低且环境友好的材料——沸石,通过底物吸附耦合生物降解的模式,对受饥饿影响的厌氧氨氧化菌进行恢复。

沸石是分布在自然界中的硅酸盐矿物,内部具有丰富的多孔结构,孔体积可达自身体积的一半,比表面积高达  $400\sim 1000\text{ m}^2/\text{g}$ ,能提供多个吸附活性位点<sup>[6]</sup>。沸石具有良好的离子吸附性及交换性,尤其对  $NH_4^+-N$  的吸附性能良好<sup>[7]</sup>。Miladinovic 等<sup>[8]</sup>发现表面有生物膜的沸石比普通沸石脱氮效果好,沸石生物膜上的硝化作用可以协同沸石的离子交换作用共同去除  $NH_4^+-N$ 。Qiu 等<sup>[9]</sup>分别以陶瓷、沸石和碳酸盐为填料,研究 3 种曝气生物滤池(biological aerated filter, BAF)的性能,发现沸石 BAF 和碳酸盐 BAF 的  $NH_4^+-N$  去除效率比陶瓷颗粒 BAF 高,且抗冲击能力更好。Yapsakli 等<sup>[10]</sup>利用沸石吸附和生物降解相结合的方法去除废水中  $NH_4^+-N$ ,原理是将微生物的代谢作用与沸石的  $NH_4^+-N$  吸附作用耦合,通过沸石吸附与解吸附  $NH_4^+-N$  离子的功能,为厌氧氨氧化反应提供  $NO_2^- -N$  与  $NH_4^+-N$  之比相对稳定的进水,促进废水中  $NH_4^+-N$  的去除。现有研究多以沸石为载体来促进废水中  $NH_4^+-N$  的去除,鲜有研究利用沸石促进受饥饿影响厌氧氨氧化菌的恢复。我们通过比较在反应器内加入和不加沸石两种情况下长期受饥饿影响厌氧氨氧化菌的活性恢复情况,利用 16S rRNA 高通量测序,探究恢复过程中菌群变化规律,为沸石用于恢复受饥饿影响厌氧氨氧化菌的研究和应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验装置

实验装置由进水系统、曝气系统、反应器主体、出水系统、水浴循环系统以及自控系统组成,反应器有效容积为 5 L。通过时间控制器控制反应

器的进水、搅拌、沉降与出水阶段的时间。两个反应器顶部均有硅胶垫圈,以此隔绝氧气。在反应器底部放置转子,并通过控制磁力搅拌器进行搅拌。为了保证厌氧氨氧化菌所需的恒温条件,反应器外层设有温度控制在  $37\pm 0.5^\circ\text{C}$  的水浴夹层。其中一个反应器为不加沸石的对照,另一个反应器底部放入一个自制三层沸石架(图 1)。沸石架由 3 只定制不锈钢架焊接而成,单只架外圈直径为 11 cm,高 5 cm。将每只不锈钢架网面的中间掏空,从而使搅拌过程中厌氧氨氧化菌与沸石充分接触。网面被掏空的部分呈圆形,内圈直径为 4 cm,沸石架高约 18 cm,沸石反应器内的沸石添加量约为  $100\text{ g/L}$ 。整个沸石反应器装置如图 2 所示。

### 1.2 实验废水和接种污泥

反应器进水采用人工模拟废水,其物质组成如表 1 所示。进水前,用  $N_2/CO_2$  (95%/5%)对人工模拟废水进行曝气,除去水中的溶解氧,并将进水 pH 控制在 6.8~7.2。

反应器接种的是放置在室温中试反应器内、在  $NH_4^+-N$  和  $NO_2^- -N$  浓度接近  $0\text{ mg/L}$  的污水中饥饿长达 88 天的厌氧氨氧化污泥。接种后,各反应器内混合液挥发性悬浮固体(mixed liquor volatile suspended solid, MLVSS)的浓度均为  $4500\text{ mg/L}$ 。

### 1.3 反应器运行和水质检测方法

对照反应器和沸石反应器共运行 82 天,第 1~10 天为启动阶段,第 11~30 天为负荷提升阶段,第 31~82 天为稳定运行阶段。反应器启动初期,两个反应器进水的  $NH_4^+-N$  和  $NO_2^- -N$  浓度均保持在  $50\pm 5\text{ mg/L}$ 。在负荷提升阶段结束以前,当连续 3 个水力停留时间(hydraulic retention time, HRT)反应器出



图 1 装满沸石的沸石架  
Fig. 1 Zeolite shelves filled with zeolite

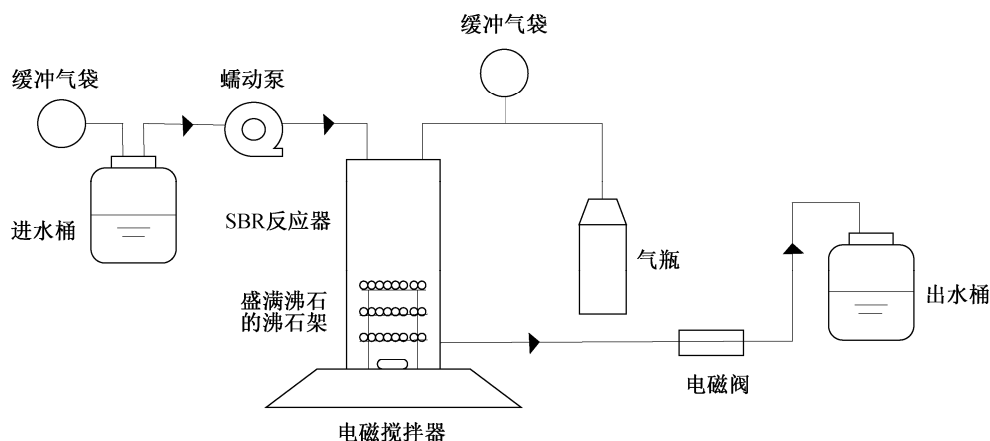


图 2 沸石反应器装置示意图  
Fig. 2 Schematic diagram of zeolite reactor

表 1 合成废水的组成  
Table 1 Composition of synthetic wastewater

主要成分	浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	微量元素	浓度/(g·L <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>2</sub>	0.246~0.986	Na <sub>2</sub> EDTA	15.000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.236~0.943	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.430
NaHCO <sub>3</sub>	0.500	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.283
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.025	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.845
Na <sub>2</sub> EDTA	0.006	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.250
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.010	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.190
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.010	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.014
MgSO <sub>4</sub>	0.100	—	—

表 2 对照反应器及沸石反应器污泥样品编号  
Table 2 Sample numbers of contrast reactor and zeolite reactor

污泥	天数				
	1	15	45	60	82
对照反应器悬浮态污泥	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1
沸石反应器悬浮态污泥	A_2	B_2	C_2	D_2	E_2
沸石反应器附着态污泥	—	B_3	C_3	D_3	E_3

说明：“—”表示反应器运行的第 1 天，无附着态污泥。

水中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 浓度都稳定在 5 mg/L 以下时，通过提高进水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 浓度的方式来提升反应器进水氮负荷。当进水的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 浓度提高至 200 mg/L 左右时，即负荷提升阶段结束后，不再继续提高进水中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 的浓度，改为通过缩短 HRT 的方式来加大反应器进水的氮负荷。在稳定运行阶段末期，两个反应器的 HRT 均由最初的 24 小时缩短至 8 小时。

每天取两个反应器的进出水进行水质检测分析。在反应器运行的 3 个阶段，分别取两个反应器内悬浮态污泥样品以及沸石反应器内沸石表面附着态污泥样品，用于分析胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)和微生物的组成结构，样品采集时间和编号如表 2 所示。

使用梅特勒 FE20 型 pH 计测定 pH 值，使用雷磁 JPB-607A 型便携式溶解氧仪测定溶解氧。氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)、亚硝酸盐氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)、硝酸盐氮(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-

N)、总氮(total nitrogen, TN)和 MLVSS 等指标均按照国家标准方法<sup>[11]</sup>测定。

#### 1.4 EPS 提取及测定

EPS 是特定环境条件下细菌代谢分泌的、包裹在细胞壁外的高分子聚合物，主要由蛋白质(protein, PN)和多糖(polysaccharide, PS)构成<sup>[12]</sup>。EPS 是颗粒污泥快速形成与维持稳定的关键因素之一<sup>[13]</sup>，厌氧氨氧化污泥中的 EPS 含量越大，污泥颗粒稳定性越强。本研究采用热提取法<sup>[14]</sup>提取 EPS。取 0.5 mL 厌氧氨氧化污泥，静置 20 分钟后去除上清液。用 0.05%NaCl 溶液将样品定容至 10 mL，将混合液放入 60°C 水浴中加热 30 分钟。在 10000 rpm 的转速下将混合液离心 15 分钟，吸取上清液，并用 0.45 μm 滤膜过滤，即可得到 EPS 提取液。采用快速 Lowry 法蛋白质试剂盒测定 EPS 中 PN 含量，采用蒽酮硫酸比色法测定 EPS 中 PS 含量<sup>[15]</sup>。采用标准重量法测定可挥发性悬浮固体浓度(volatile suspended solids, VSS)<sup>[11]</sup>，利用公式：(测得 PN/PS 浓度×提取液体积)/VSS，将 PN 与 PS 含量相加，即得最终 EPS

浓度, EPS 中 PN 和 PS 以每克 VSS 中的蛋白和多糖含量计算。

在整个 82 天的运行周期中, 采集并测定第 1 天、第 15 天、第 30 天、第 45 和第 82 天共 5 个时间点的污泥样本。由于测定 EPS 需至少 3 个平行样, 每个平行样取 0.5 mL 菌样, 而起始阶段沸石反应器内采集到的附着态污泥过少(低于 1.5 mL), 故只测定对照反应器内悬浮样及沸石反应器内悬浮污泥的 EPS 含量。

### 1.5 DNA 提取、聚合酶链式扩增反应(PCR) 及 Illumina 测序

采用试剂盒法提取污泥中的 DNA, 所用的试剂盒为 FastDNA® SPIN Kit for Soil 土壤 DNA 快速提取试剂盒, 采用琼脂糖凝胶电泳对 DNA 提取情况进行检验。提取出的 DNA 样品置于 -20°C 冰箱内冷冻保存。利用细菌通用引物 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) 和 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT)<sup>[16]</sup> 对合格的 DNA 样品进行 16S rRNA 基因在 V3~V4 可变区的高通量测序 (Illumina Miseq 2000, 上海美吉生物医药科技有限公司)。测序深度指数为 Coverage, 每个样品测 40000~70000 条序列, 样品覆盖度均在 99.8% 以上。通过 Miseq 测序得到的双端测序 reads, 按照重叠关系进行拼接, 将测序获得的原始序列数据进行质控过滤, 得到高质量序列, 然后进行操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 的聚类分析, 并通过 RDP classifier 贝叶斯算法, 在 97% 的相似水平上对 OTU 进行物种分类学注释 (80% 置信度)。基于 OTU 数据, 进行物种分类学分析, 分析样品的多样性和菌群结构。通过每个 OTU 对应的 greengene id, 获得 OTU 对应的 clusters of orthologous groups of proteins (COG) 家族信息和 KEGG orthology (KO) 信息, 并计算各 COG 的丰度和 KO 丰度。根据 COG 数据库的信息, 可以从 Egg NOG 数据库中解析得到各个 COG 的描述信息和功能信息, 从而得到 COG 功能丰度谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应器的脱氮性能

两个反应器进出水的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度变化见图 3(a) 和 (b), TN 去除率及氮去除负荷 (nitrogen removal rate, NRR) 变化见图 3(c) 和 (d)。在反应器的启动阶段, 两个反应器进水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度均为  $50 \pm 5$  mg/L, HRT 设置为 24 小时。

两个反应器出水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度均呈下降趋势。启动阶段末期 (第 9 天), 对照反应器的出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  降至 11.9 mg/L, 沸石反应器的出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  降至 10.2 mg/L; 两反应器的出水  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  均降至 0 mg/L。对照反应器和沸石反应器的 NRR 分别为 18.6 mgN/(L·d) 和 18.12 mgN/(L·d), 无明显差别。在负荷提升阶段 (第 11~30 天), 厌氧氨氧化菌的脱氮活性迅速提升, TN 去除率呈直线增长, NRR 的增长速率也比启动阶段有一定程度的提高。由图 3(c) 可以看出, 在负荷提升阶段, 两个反应器的 TN 去除率曲线基本上重合。第 11~15 天, TN 去除率由 75% 上升至 84%, 第 16~30 天, TN 去除率稳定在  $80\% \pm 3\%$ 。两个反应器的 NRR 从第 11 天的 26.5 mgN/(L·d) 增加到第 30 天的 73 mgN/(L·d)。

在稳定运行阶段 (第 31~82 天), 厌氧氨氧化菌的脱氮活性开始稳定, 此时沸石反应器的稳定性及脱氮性能开始高于对照反应器。特别是当 HRT 由 12 小时缩短为 8 小时 (第 59 天), 两反应器的 TN 去除率均呈断崖式下降, 对照反应器下降 42.3%, 沸石反应器下降 39.1%。两反应器的 NRR 下降幅度不大, 对照反应器下降 25.64 mgN/(L·d), 沸石反应器仅下降 17.08 mgN/(L·d)。由此看出, 在反应器内部受到较大冲击时 (突然缩减 HRT 等), 沸石反应器具有更好的稳定性。TN 去除率的显著下降可能是由于过早地缩短 HRT, 使进水中 TN 超出反应器的 TN 去除负荷, 导致在出水时, 反应器内还有大量  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  未去除, 厌氧氨氧化菌被过高的  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度抑制, 使得 TN 去除效率大幅度下滑。

由图 3(c) 和 (d) 可以看出, 在稳定运行阶段的后期 (第 59~82 天), 沸石反应器的 NRR 和 TN 去除率开始高于对照反应器, 并逐渐与对照反应器拉开差距。沸石反应器的 TN 去除率由第 58 天的 47.6% 增加到第 82 天的 64.1%, 增幅为 16.5%; 对照反应器的 TN 去除率在这 25 天里由 43.9% 增至 55.2%, 增幅 11.4%; 两反应器 TN 去除率增幅相差 5.1%。沸石反应器的 NRR 在这 25 天里由 139.3 mgN/(L·d) 增至 177.8 mgN/(L·d), 增幅为 38.5 mgN/(L·d); 对照反应器的 NRR 在这 25 天里由 129.1 mgN/(L·d) 增至 154.3 mgN/(L·d), 增幅为 25.2 mgN/(L·d)。沸石反应器的 NRR 增幅比对照反应器提高 52.78%, 说明在反应器受到较大冲击后, 与对照反应器相比, 沸石反应器可以更高效地恢复反应器的整体脱氮效率。在整个 82 天的运行周期中, 沸石反应器与对照

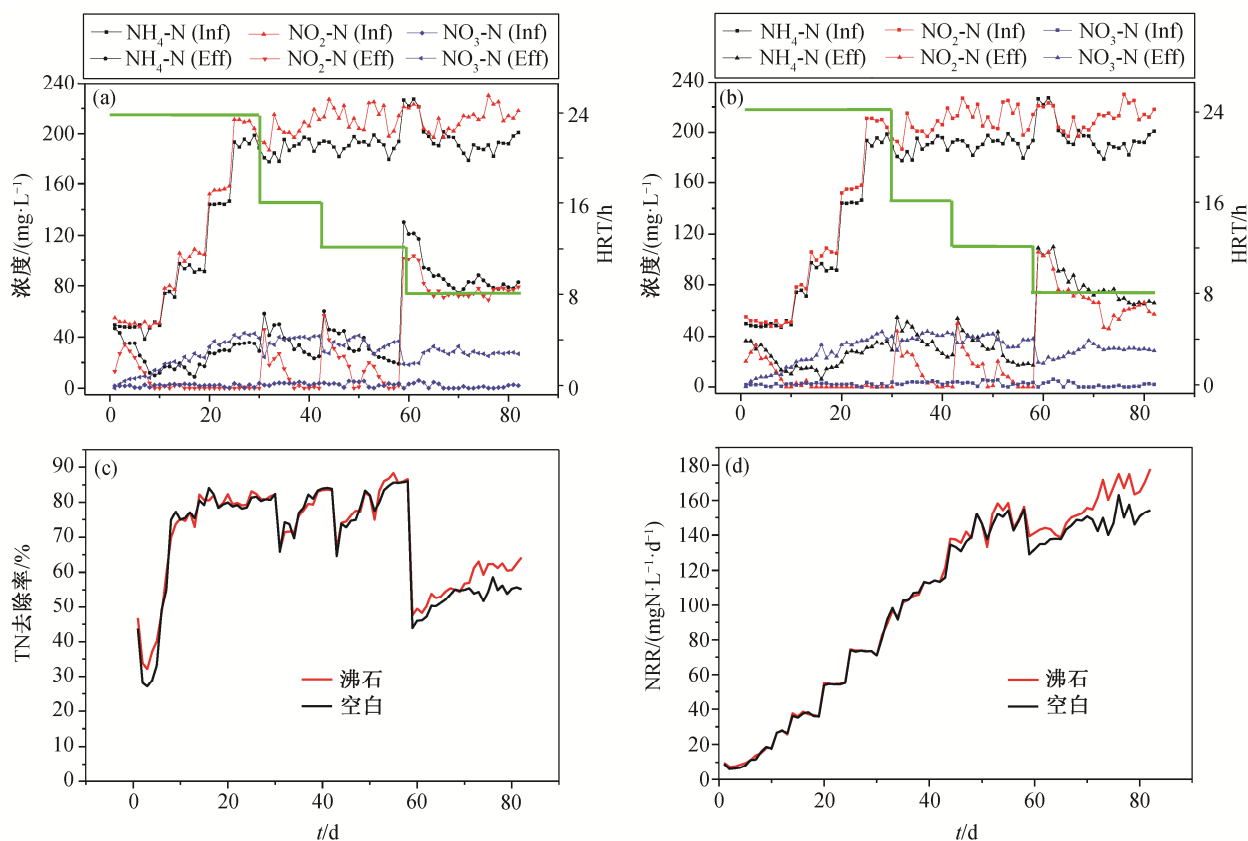


图3 对照反应器(a)和沸石反应器(b)进出水中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度变化、反应器总氮(TN)去除率变化(c)以及氮去除负荷(NRR)变化(d)

Fig. 3 Variations of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  and  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  removal efficiencies in contrast reactor (a) and zeolite reactor (b), changes of TN removal rate (c) and reactor nitrogen removal rate (NRR) (d) in the reactor

反应器的NRR经t检验得到 $p=0.6353(>0.05)$ ,说明两个反应器的整体脱氮效率无明显差异。但是,在反应器运行的最后24天,即当HRT缩短为8小时的阶段,两个反应器NRR值经t检验得出 $p=0.0007(<0.01)$ ,即具有显著的差异性。这说明在稳定运行后期,沸石反应器的总体脱氮效率显著高于对照反应器。综上所述,添加沸石可以提高反应器的整体脱氮效率,并增强反应器内部系统的稳定性。

## 2.2 反应器运行过程中EPS多糖和蛋白浓度变化分析

由图4可知,两反应器内悬浮污泥EPS含量总体上随时间增加而升高。前3次采样(第15天、第30天和第45天)的两反应器内悬浮态污泥EPS含量经t检验得 $p=0.5152(>0.05)$ ,无显著性差异。并且,前3次采样的沸石反应器内悬浮态污泥EPS含量均小于对照反应器,可能是由于前期过多的菌泥在沸

石表面形成过厚的生物膜,影响内层厌氧氨氧化菌的恢复<sup>[17]</sup>,同时沸石会截留部分细菌,使其无法与反应器内的基质充分反应。但是,到稳定运行后期(第82天),沸石反应器内悬浮菌样EPS含量(103.2 mg/gVSS)首次超越对照反应器(97.1 mg/gVSS)。陈方敏等<sup>[18]</sup>发现,高活性的厌氧氨氧化细菌EPS浓度范围为100.1~105.6 mg/gVSS,本研究与之相近。综上所述,虽然在第15天、第30天和第45天,对照组反应器内悬浮态污泥EPS含量高于沸石反应器,但两者差异并不显著。经过长时间(82天)的运行,沸石反应器内悬浮态污泥EPS浓度高于对照反应器。结合TN去除率来看,在反应器运行的前58天内,两反应器的TN去除曲线几乎重合,TN总体去除率并无明显的差异( $p=0.8201>0.05$ )。沸石反应器在悬浮污泥EPS含量低于对照反应器的情况下,还保持与对照反应器几乎一样的脱氮效率,这也说明添加沸石载体后,沸石吸附 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,使得反应器的脱氮更加高效和稳定。

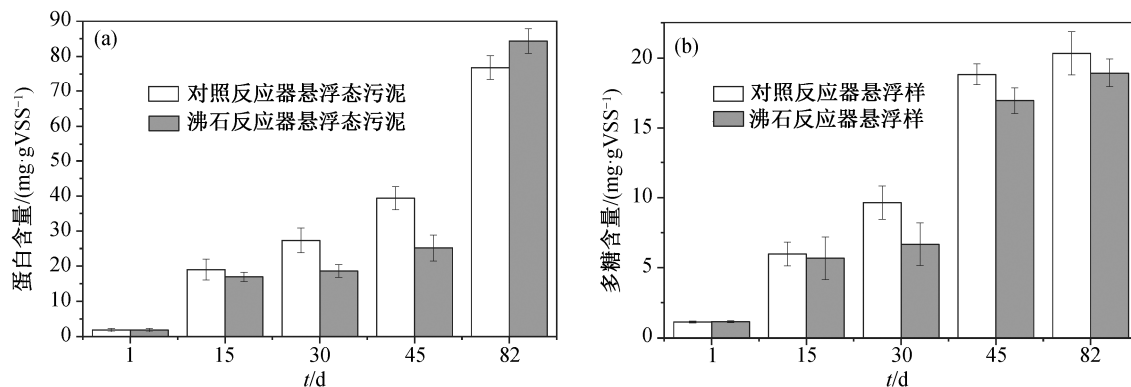


图 4 反应器内悬浮污泥的蛋白浓度(a)和多糖浓度(b)  
 Fig. 4 Protein concentration (a) and polysaccharide concentration (b) of suspended sludge in the reactor

### 2.3 反应器内微生物群落结构分析

为了进一步探究沸石吸氨对反应器内菌群组成的影响, 将对照反应器和沸石反应器内悬浮污泥及沸石反应器内沸石表面附着态污泥进行 16S rRNA 基因高通量测序。首先对采集样本的细菌测序结果进行主成分分析(principal component analysis, PCA), 探究不同时期两个反应器内微生物群落结构的相似性与差异性。PCA 分析可以对数据进行简化, 去除干扰元素, 降维后在二维坐标图中表征出样本间的相似性。样本组成越相似, 则在 PCA 图中的距离越近, 出现样品数据点聚集的现象。

如图 5 所示, 选取的样品共聚为 4 类。反应器运行启动阶段, 即第一次采样的采样点 B\_1, B\_2 和 B\_3 聚为一类, 说明在该阶段, 沸石反应器内污泥的微生物群落结构没有发生大的改变。随着反应器的运行, 从负荷提升期开始, 沸石反应器内污泥的群落结构发生显著的改变——沸石反应器悬浮样 C\_2 和沸石反应器附着样 C\_3 开始与对照反应器悬浮样 C\_1 拉大距离。但是, C\_2 与 C\_3 的距离仍然接近, 说明此时沸石反应器内悬浮态污泥与附着态污泥的群落结构相似。到稳定运行期, 沸石反应器内悬浮样(D\_2 和 E\_2)、沸石反应器内附着样(D\_3 和 E\_3)以及对照反应器悬浮样(D\_1 和 E\_1)各自形成 3 个距离较远的团簇, 说明在稳定运行期, 对照反应器悬浮样与沸石反应器悬浮样的群落结构差异继续变大, 而沸石反应器内部悬浮态污泥与附着态污泥的群落结构也开始出现差异。上述结果表明, 沸石的加入对反应器内污泥微生物群落结构的演替有显著的影响。

### 2.4 菌群分类及丰度变化情况

由图 6 和 7 可知, 对照反应器内悬浮污泥中厌氧氨氧化菌属主要是 *Candidatus Brocadia*, 其次是 *Desnitritisoma*。随着反应器的运行, *Candidatus Brocadia* 在对照反应器内悬浮污泥中的丰度占比为 B\_1 6.9%, C\_1 29%, D\_1 30% 和 E\_1 34%, 呈增加的趋势, 且在负荷提升期(第 15~45 天)的幅度较大, 为 22.1%。在稳定运行期(第 45~82 天), 增幅较小, 仅为 5%。沸石反应器内悬浮菌样中厌氧氨氧化菌属主要是 *Candidatus Brocadia*, 其初始占比为 0.29%。随着反应器的运行, *Candidatus Brocadia* 在沸石反应器内悬浮菌样中的丰度占比为 B\_2 4.9%, C\_2 20%, D\_2 33% 和 E\_2 41%, 呈增加的趋势。与对照反应器不同的是, 沸石反应器内悬浮态菌在稳定运行时期, *Candidatus Brocadia* 菌属丰度占比的增幅(21%)较大。其中, 在第 60 天及第 90 天取得的污泥样品中, 沸石反应器内悬浮菌样中 *Candidatus Brocadia* 菌属的相对丰度均超过对照反应器, 两反应器内 *Candidatus Brocadia* 属丰度占比差距由 3% (第 60 天) 拉大到 7% (第 90 天)。上述结果说明沸石的加入可以提升反应器内悬浮污泥中厌氧氨氧化菌的相对丰度和增长速率。

*Candidatus Brocadia* 属在沸石反应器内附着态污泥中的丰度占比为 B\_2 12%, C\_2 36%, D\_2 34% 和 E\_2 35%。附着态污泥内 *Candidatus Brocadia* 菌属含量在负荷提升期(第 15 天)及稳定运行期前期(第 45 天)均比同时期对照反应器内悬浮态污泥高。但是, 在稳定运行期的中、后期(第 45, 60 和 90 天), 附着态污泥内 *Candidatus Brocadia* 属的丰度占比变化不大, 维持在 35%±1%。可能是因为沸石表面附

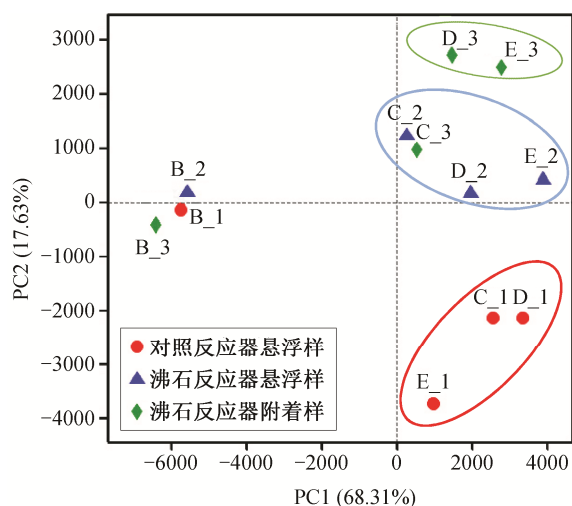


图 5 主成分分析

Fig. 5 Principal component analysis

着污泥内厌氧氨氧化菌的相对丰度在这段时间一直处于较高水平, 到达“瓶颈”。在反应器运行前期(第 1~45 天), 附着态污泥内 *Candidatus Brocadia* 属的丰度占比增长比悬浮态污泥快的原因可能是沸石良

好的吸附  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  能力以及沸石对厌氧氨氧化菌提供的载体功能。在反应器运行期间, 沸石反应器内的沸石表面形成一层厌氧氨氧化生物膜, 通过沸石自身吸附及解吸  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的能力, 在生物膜微环境内进行稳定的厌氧氨氧化反应, 从而能够更好地促进受饥饿抑制厌氧氨氧化菌的恢复。

*Denitratisoma* 属是一种兼性厌氧反硝化菌属, 可在微氧条件下利用系统内  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  或  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  进行反硝化反应<sup>[19]</sup>。从图 6 和 7 可以看出, 在厌氧氨氧化菌恢复过程中, *Denitratisoma* 属的丰度呈逐步上升的趋势。以对照反应器为例, *Denitratisoma* 属在悬浮态污泥中的丰度占比为 B\_1 5.8%, C\_1 33%, D\_1 34% 和 E\_1 38%, 丰度占比从第 2 次采样(第 15 天)的 5.8% 升至第 5 次采样(第 45 天)的 38%, 增幅达 27.2%, 与 *Candidatus Brocadia* 属在对照反应器悬浮态污泥中丰度占比的变化情况(第 45 天比第 15 天提高 22.1%)类似, 两者均呈逐步递增趋势。这说明在受饥饿影响厌氧氨氧化菌的恢复过程中, *Denitratisoma* 与 *Candidatus Brocadia* 属于协同共生

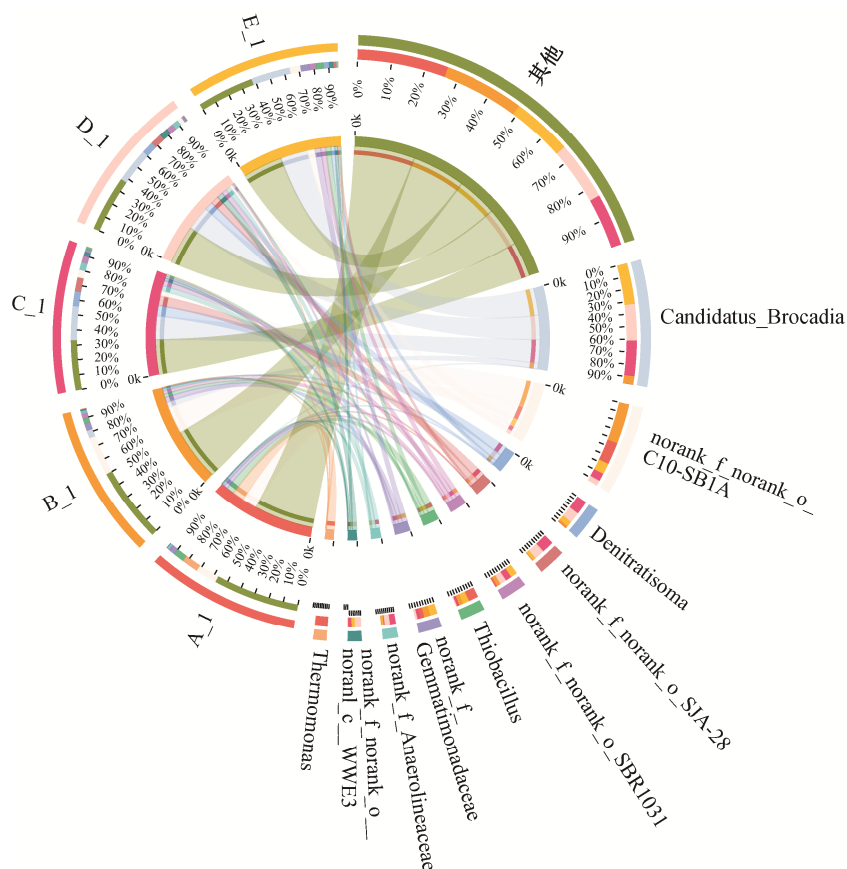


图 6 对照反应器内悬浮态污泥样品在属水平上的物种分类及丰度占比

Fig. 6 Species classification and abundance of suspended sludge samples in contrast reactor

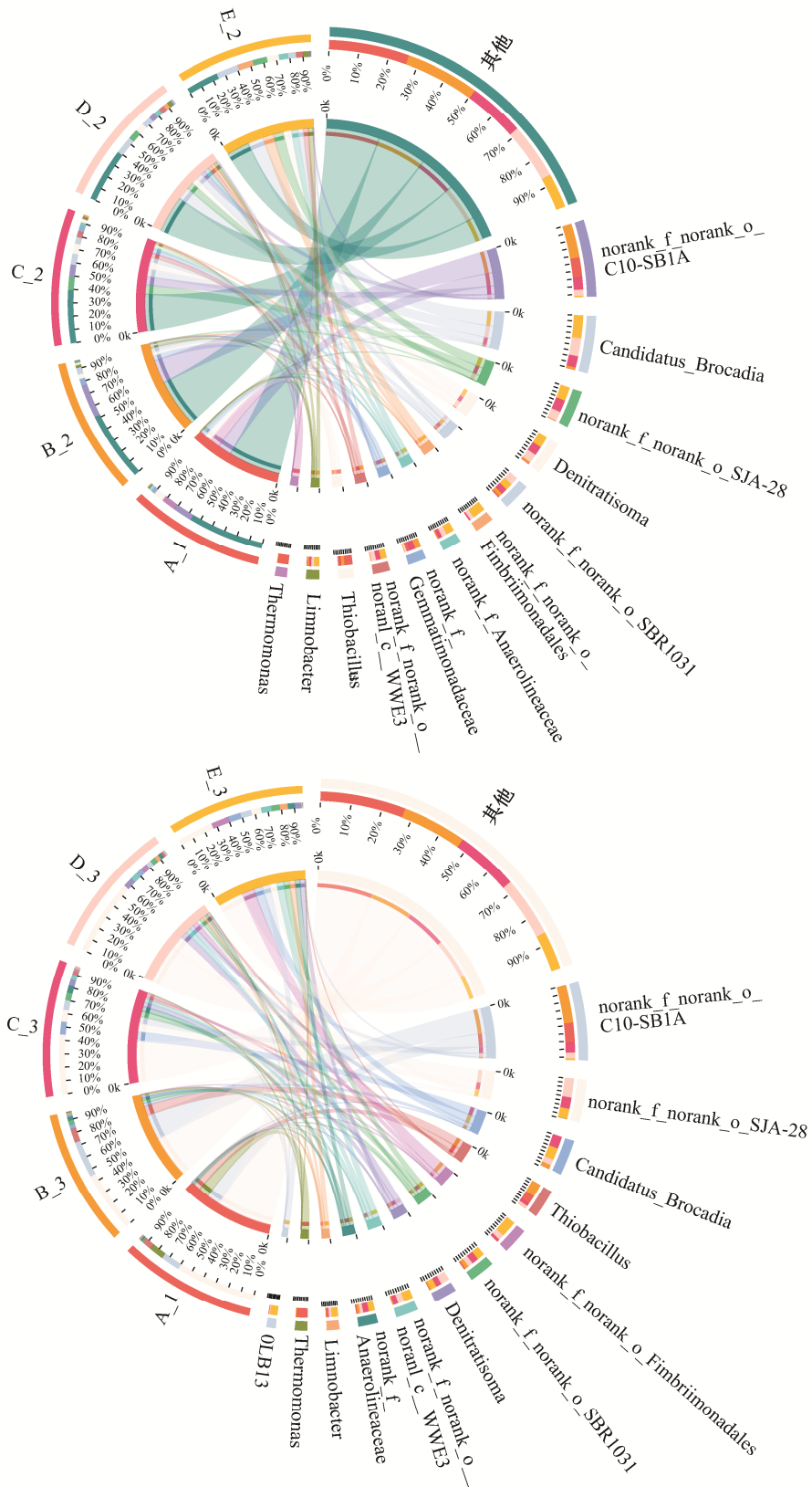


图 7 沸石反应器内悬浮态污泥样品(a)和附着态污泥样品(b)在属水平上的物种分类及丰度占比  
 Fig. 7 Species classification and abundance of suspended sludge samples (a) and attached sludge samples (b) in zeolite reactor

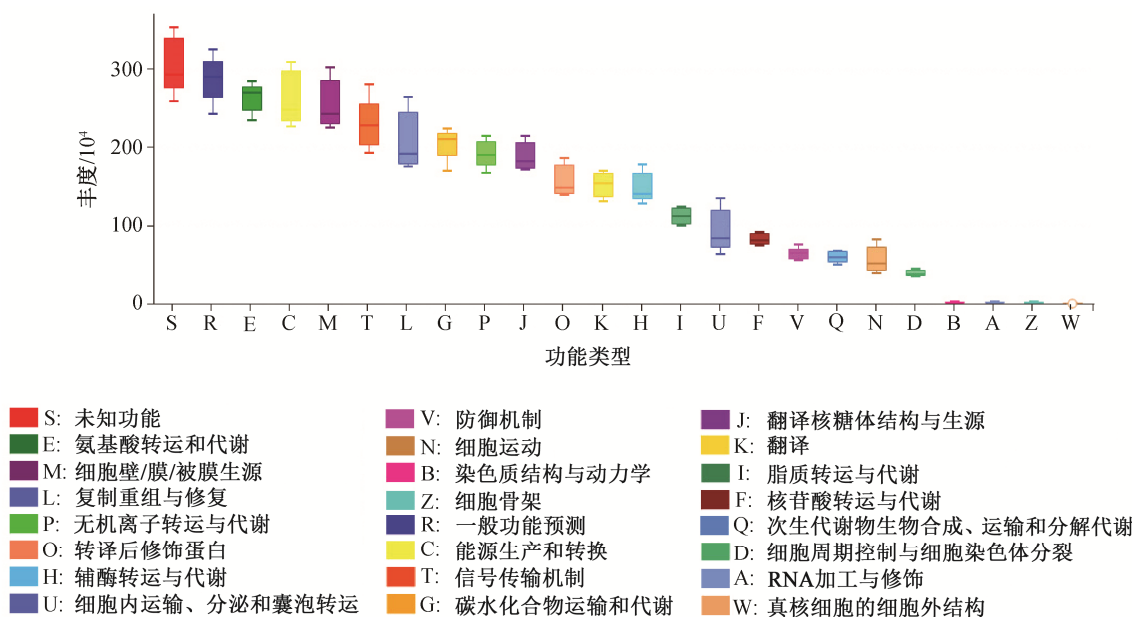


图8 微生物群落功能的 COG 功能丰度变化

Fig. 8 Change of COG function abundance of microbial community

关系。在沸石反应器内, *Denitratisoma* 属在悬浮态污泥中的丰度占比为 B\_2 6.3%, C\_2 31%, D\_2 37%和 E\_2 36%, 在附着态污泥中丰度占比为 B\_2 6.9%, C\_2 32%, D\_2 39%和 E\_2 36%。沸石反应器内悬浮态与附着态污泥中 *Desnitratisoma* 属的丰度占比几乎相同, 且沸石反应器内污泥中 *Desnitratisoma* 属的丰度占比与对照反应器内污泥差别不大, 说明沸石对反应器内 *Desnitratisoma* 属的丰度影响甚微。

## 2.5 功能预测分析

16s rDNA 高通量测序结果可以用来预测微生物群落的功能。采用 PICRUSt1 功能预测法, 对 4 个采样时间点(第 15 天、第 45 天、第 60 天和第 82 天), 两个反应器内不同形态污泥中的微生物群落功能进行 COG 功能预测, 得到 COG 功能丰度箱(图 8)。可以看出, 3 种污泥中丰度较高的 COG 功能基因分别为细胞壁和细胞膜生物合成功能、能量产生和转化功能、氨基酸转运和代谢功能以及信号转换功能。其中, 丰度排第一位和第二位的功能分别是氨基酸转运和代谢以及能量的产生和转化, 说明反应器中微生物的活性较高, 生长速率较快, 微生物增加量大。丰度排第三位的是细胞壁和细胞膜生物合成功能, 该功能有利于微生物的附着态生长, 说明厌氧氨氧化菌容易附着在沸石载体表面, 通过沸石的吸氨能力及载体功能, 促进厌氧氨氧化反应高效、稳定地运行。结合污泥中物种分类及丰度占比

可以发现, 沸石表面附着污泥内厌氧氨氧化菌的丰度比其他两种污泥更快地达到峰值(35%)。

进一步地, 通过对两个反应器内 3 种不同污泥状态的 4 个采样时间点(第 15 天、第 45 天、第 60 天和第 82 天)的 COG 功能基因丰度之间进行 t 检验, 寻找  $p < 0.05$  的 COG 功能分类, 结果如图 9 所示。两种对照反应器悬浮样以及沸石反应器悬浮样和附着样均存在显著性差异的 COG 功能分类: 信号传导通路、细胞防御机理。对于沸石表面附着的污泥, 向反应器内加入沸石可能会增加污泥内细胞的防御

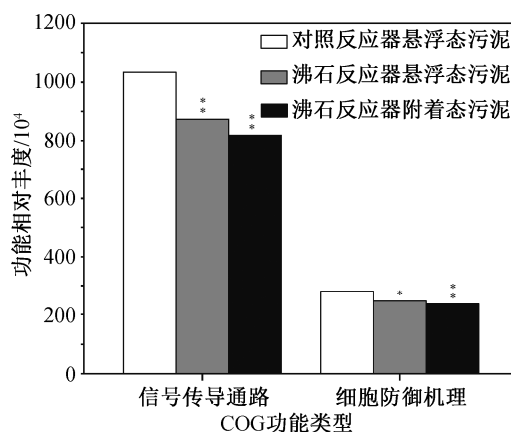


图9 两反应器内污泥的两种不同 COG 功能丰度及显著性差异

Fig. 9 Significance of two different COG function abundances of sludge in two reactors

代谢, 增强细菌自身的排异及适应功能。对于悬浮态细菌, 向反应器内加入沸石可能会加强细菌之间的通信。沸石反应器内悬浮污泥 *Candidatus Brocadia* 属的丰度比对照反应器高 7%, 说明沸石的加入可使细菌之间信号传导更加密切, 从而促进细菌功能的恢复。

### 3 结论

本文通过研究投加沸石载体对受饥饿影响厌氧氨氧化菌恢复过程的影响, 得到如下主要结论。

1) 投加沸石载体可使反应器内厌氧氨氧化反应更加稳定和高效,  $\text{NH}_4^+$ -N 吸附和微生物降解同时发生。2) 投加沸石载体可使恢复后的厌氧氨氧化菌(*Candidatus Brocadia*)的丰度更高, 更好地促进受饥饿抑制厌氧氨氧化菌的长期恢复。3) 沸石为载体, 运行生物膜-活性污泥复合系统反应器, 通过底物吸附+生物降解耦合手段, 在沸石表面的微环境中达到长期高效稳定的  $\text{NH}_4^+$ -N 底物供给, 可以更好地促进厌氧氨氧化反应进行。

### 参考文献

- [1] Jetten M S, Wagner M, Fuerst J, et al. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation “anammox” process. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, 12 (3): 283–288
- [2] Zhang L, Narita Y, Gao L, et al. Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited. *Water Research*, 2017, 11(6): 296–303
- [3] Tang C J, Zheng P, Chai L Y, et al. Characterization and quantification of anammox start-up in UASB reactors seeded with conventional activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 82 (8): 141–148
- [4] 侯晓帮, 操家顺, 周可为. 厌氧氨氧化抑制试验及复活策略研究. *中国给水排水*, 2017, 33(23): 55–60
- [5] 杨开亮, 占志强, 王莹, 等. 厌氧氨氧化菌活性的快速恢复及运行. *上海海事大学学报*, 2017, 38(4): 84–87
- [6] Ban Z, Dave G. Laboratory Studies on Recovery of N and P from Human Urine through Struvite Crystallisation and Zeolite Adsorption. *Environmental Technology*, 2004, 25(1): 111–121
- [7] Inglezakis V J. The concept of “capacity” in zeolite ion-exchange systems. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2005, 281(1): 68–79
- [8] Miladinovic N, Weatherley L R. Intensification of ammonia removal in a combined ion-exchange and nitrification column. *Chemical Engineering Journal*, 2008, 135(1): 15–24
- [9] Qiu L P, Zhang S B, Wang G W, et al. Performances and nitrification properties of biological aerated filters with zeolite, ceramic particle and carbonate media. *Bioresour Technol*, 2010, 101(19): 7245–7251
- [10] Yapsakli K, Aktan C K, Mertoglu B. Anammox-zeolite system acting as buffer to achieve stable effluent nitrogen values. *Biodegradation*, 2017, 28(1): 69–79
- [11] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
- [12] Sheng G P, Yu H Q, Li X Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882–894
- [13] 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. *Bioresource Technology*, 2016, 220: 641–646
- [14] Abzac P, Bordas F, Joussein E, et al. Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(1): 412–418
- [15] Shu D, He Y, Yue H, et al. Metagenomic and quantitative insights into microbial communities and functional genes of nitrogen and iron cycling in twelve wastewater treatment systems. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 290: 21–30
- [16] Gaudy A F. Colorimetric determination of protein and carbohydrate. *Water Wastes*, 1962, 7: 17–22
- [17] Ali M, Oshiki M, Rathnayake L, et al. Rapid and successful start-up of anammox process by immobilizing the minimal quantity of biomass in PVA-SA gel beads. *Water Research*, 2015, 79: 147–157
- [18] 陈方敏, 顾澄伟, 胡羽婷, 等. 厌氧氨氧化污泥恢复过程中的颗粒特性. *环境科学*, 2018, 39(12): 5605–5611
- [19] Fahrbach M, Kuever J, Meinke R, et al. *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17beta-oestradiol-degrading, denitrifying betaproteobacterium. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(7): 1547–1552