

厌氧氨氧化反应器运行过程微生物群落演替分析

朱 彤, 贾若坦, 梁启煜, 谢元华

(东北大学 机械工程及自动化学院, 辽宁 沈阳 110819)

摘 要: 为探究厌氧氨氧化(ANAMMOX)过程中微生物群落结构的演化,采用高通量测序技术对ANAMMOX反应器中微生物群落结构进行分析.结果表明:反应器运行61 d后氮去除负荷达到 $1.04 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$,总氮去除率达75%以上.反应器中微生物多样性较为丰富,存在变形菌门、绿曲挠菌门、绿菌门、浮霉菌门等微生物.从启动到稳定过程中微生物群落结构趋于稳定.其中和脱氮相关的变形菌门和浮霉菌门合计占比达40%以上. ANAMMOX菌所在的浮霉菌门比例随运行时间延长而逐渐增加,是反应器脱氮效能提高的主要原因.反应器内占据优势地位的ANAMMOX菌主要为 *Candidatus Kuenenia* 属,占比14%左右,同时还有少量 *Candidatus Brocadia* 属.

关 键 词: 厌氧氨氧化;高通量测序;群落特征;氮去除;微生物

中图分类号: X 703

文献标志码: A

文章编号: 1005-3026(2018)05-0693-06

Evolution Analysis of Microbial Community During the Running Process in an ANAMMOX Reactor

ZHU Tong, JIA Ruo-tan, LIANG Qi-yu, XIE Yuan-hua

(School of Mechanical Engineering & Automation, Northeastern University, Shenyang 110819, China.

Corresponding author: ZHU Tong, professor, E-mail: tongzhu@mail.neu.edu.cn)

Abstract: In order to provide theoretical support for the optimization of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) technology, high-throughput sequencing technology was used to study the microbial community structure and its evolution in an ANAMMOX reactor. The results showed that the reactor achieved nitrogen removal rate up to $1.04 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ after 61 days. The total nitrogen removal rate was above 75%. The microbial diversity in the reactor was very abundant, including *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Chlorobi*, *Planctomycetes*, etc. The microbial community structure tended to be stable with the running process of the reactor. The proportion of *Proteobacteria* and *Planctomycete*, associated with denitrification, totally achieved over 40%. The proportion of ANAMMOX bacteria belonging to *Planctomycete* increased gradually with reactor operation, which was the main reason for denitrification efficiency improvement. The ANAMMOX bacteria *Candidatus Kuenenia* category dominated in reactor about 14%. A small number of *Candidatus Brocadia* genus also existed in the reactor.

Key words: ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation); high-throughput sequencing; community characteristics; denitrification; microbe

厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, ANAMMOX)技术在废水脱氮领域相较于传统脱氮技术具有明显优势.但ANAMMOX菌对环境因素的变化敏感^[1]且倍增时间长、生长缓慢,限制了ANAMMOX反应器的快速启动^[2].目前对ANAMMOX过程的微生物生态学机制研究还不

完善.因此,实现ANAMMOX反应器的快速启动并明确ANAMMOX反应器内部不同位置的微生物种群结构变化与差异,对ANAMMOX技术的规模化应用有重要意义.

研究表明,在反应器内添加填料可以减少ANAMMOX污泥的流失,加速ANAMMOX菌的

富集,缩短反应器启动时间,已经成功应用于 ANAMMOX 反应器的填料有无纺布、海绵、生物质炭等^[3].但目前对填料上污泥微生物结构变化的研究较少,菌群变化的影响因素仍不甚明了.

微生物群落结构研究的方法有很多种,包括生化指标分析、荧光原位杂交、16SrRNA 文库构建和 PCR-DGGE 等方法.这些传统的分子生物学方法效率比较低下,不能有效、系统地反映群落的丰度和多样性.高通量测序技术作为新型微生物种群鉴定技术,能更全面深入地了解微生物种群结构,在环境微生物鉴定领域应用广泛.陈重军等^[4]基于高通量测序对 ABR ANAMMOX 反应器各隔室细菌群落分析表明,各隔室群落存在较大差异,种属也不尽相同.

针对本研究所启动的 ANAMMOX 反应器,利用高通量测序技术分析其不同功能菌的组成占比和功能,并对填料不同位置功能菌属的结构演替进行研究,探讨反应器功能菌群结构变化与其宏观污染物去除效能之间的联系,为 ANAMMOX 反应器高效稳定运行提供借鉴和理论依据.

1 实验材料和方法

1.1 实验装置

实验装置见图 1,反应器材质为有机玻璃,圆柱部分直径 234 mm,高 750 mm,有效容积 30 L.反应器内环状填料架上缠绕亲水性帘式纤维填料,有效填充率为 $7.49\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.水温通过加热器(SX-265,广东金利佳机电有限公司)自动控制,pH 值通过在线监测装置(SIN-PH160,杭州联测自动化技术有限公司)监测并联动控制补液泵进行酸碱调节液的投加.进水由蠕动泵控制连续进水.

1.2 实验材料

接种污泥为实验室培养的混合污泥,含有部分 ANAMMOX 细菌,接种后反应器内混合液悬浮固体质量浓度(mixed liquid suspended solids, MLSS)为 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.实验原水为人工配水,其中, NH_4^+-N , NO_2^--N 分别由 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_2 按需配置(NH_4^+-N 与 NO_2^--N 物质的量之比为 1:1,具体负荷见 2.1 节), KH_2PO_4 $54\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $9\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,矿物质元素浓缩液 $2\text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$,微量元素浓缩液 $1\text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$.由 NaHCO_3 按需配置提供无机碳,避免采用有机碳源引起杂菌生长,对 ANAMMOX 产生抑制.矿物质元素浓缩液组成为 CaCl_2 $0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, KCl

$0.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, MgSO_4 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;微量元素浓缩液组成为(质量浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.24, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25, H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.99, $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.22, $\text{NiCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.19, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.43.

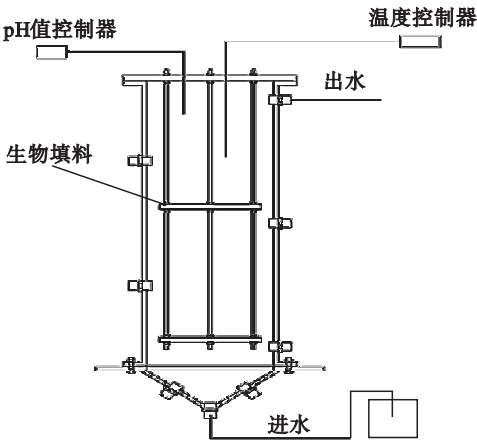


图 1 上升流式厌氧氨氧化反应器
Fig. 1 Up-flow ANAMMOX reactor

1.3 实验控制参数

pH 值控制在 7.50 ± 0.1 (通过 0.1 mol/L 的 HCl 调节),温度控制在 $34\text{ }^\circ\text{C}$,初始 HRT 设定为 24 h,进水充分曝氮气除氧(溶解氧控制在 0.1 mg/L 以下),反应器遮光.

1.4 实验方法

水质指标测定:氨氮采用纳式分光光度法;亚硝氮采用盐酸萘乙二胺分光光度法;硝氮采用紫外分光光度法.在反应器开始启动到稳定运行的过程中采集不同时间段的污泥样品,监测反应器运行过程中的微生物群落变化.反应器运行期间共取 4 组样品,分别是 1 号样品(ANAMMOX 反应器种泥),2 号样品(运行 30 d 时填料下部污泥),3 号样品(运行 90 d 时填料下部污泥),4 号样品(运行 90 d 时填料上部污泥).在所选的取样时间点,反应器脱氮能力稳定,污泥样品能够代表这一阶段反应器内的微生物群落结构状态.污泥样品从反应器取出后,在 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,样品送往上海美吉生物医药科技有限公司进行测序分析.

获得实验样品后,基因组 DNA 用 PowerSoil DNA 提取试剂盒(MOBIO 公司生产)抽提,再用 1% 琼脂糖凝胶电泳对获得的基因组 DNA 进行检测. DNA 抽提之后,进行 PCR 扩增.所用扩增引物包括 338F($\text{ACTCCTACGGGAGGCAGCAG}$) 和 806R($\text{GGACTACHVGGGTWTCTAAT}$). 用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增所得产物,使用

AXYGEN 公司的 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物, Tris_HCl 洗脱; 2% 琼脂糖电泳检测. 在电泳初步定量结果基础上, 将 PCR 产物用 Promega 公司的 QuantiFluor™ - ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量, 之后针对不同样本的测序量要求, 进行相应比例的混合.

2 结果与讨论

2.1 反应器运行状态

ANAMMOX 反应器启动历时 30 d, 负荷提升后稳定运行 40 d, 处理效果如图 2 所示. 反应器运行 0 到 30 d, 进水 TN 质量浓度从 100 mg/L 逐渐上升到 600 mg/L, 进水总氮负荷从 $0.1 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 提高到 $0.6 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, 总氮去除率稳定保持在 80% 左右. 之后保持进水浓度不变, 逐渐缩短停留时间, 第 61 d, 停留时间从 24 h 逐渐缩短至 12 h, 总氮负荷提高到 $1.3 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, 去除负荷达到 $1.04 \text{ kg} \cdot \text{N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. 反应器在此负荷下持续

运行, 总氮去除率始终保持在 75% 以上. 说明本研究所用 ANAMMOX 反应器在短时间内获得了较高的氮去除负荷, 快速启动成功.

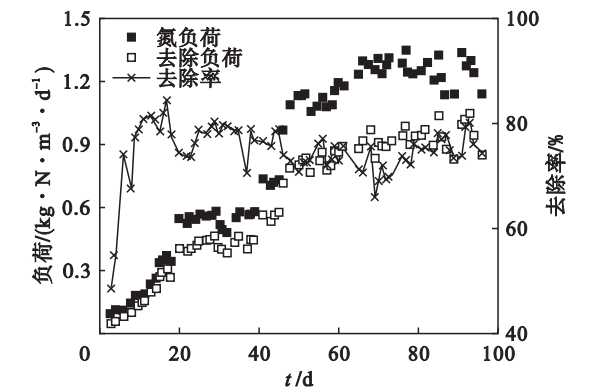


图 2 反应器运行状态
Fig. 2 Running state of reactor

2.2 菌群丰度和多样性分析

通过高通量测序得到待测样品的微生物种群分布中 Alpha 多样性相关的各项指标见表 1.

表 1 污泥样品的 Alpha 多样性
Table 1 Alpha diversity of different activated sludge samples

样品序号	读数	OTU 数	Ace	Chao	Shannon	Simpson	Coverage
1	34 094	318	368	388	3. 39	0. 083 8	0. 998 181
2	38 785	366	399	407	3. 51	0. 0742	0. 998 659
3	41 611	375	401	408	3. 66	0. 064 9	0. 998 919
4	30 018	284	347	343	3. 46	0. 064 2	0. 997 901

Coverage 指数反映本次测序结果是否代表了样本中微生物的真实情况, 其数值高低反映了样本中序列被测出的概率. 本实验的待测样品的 Coverage 值均大于 99. 7%, 能够确保测序结果代表样品中的微生物组成. Ace, Chao 指数表征微生物种群丰度, 可以对群落中 OTU 数进行估计, 数值越大表示物种总数越多. 从表 1 可知, 反应器填料下部样本 1 号、2 号、3 号的 Ace 和 Chao 指数先增大再逐渐平稳, 反映出反应器启动初期生物多样性和群落复杂程度逐渐增加, 在稳定运行后, 生物多样性与群落分布逐渐稳定, 4 号的两个指数均低于其他样本, 说明填料上部微生物群落相对纯净. Shannon 和 Simpson 指数可以反映出功能菌属的多样性. Simpson 指数越高, 表明群落多样性越低, 而 Shannon 指数正相反. Shannon 指数也呈现先增大再平稳最后减小的变化趋势. 而 Simpson 指数的变化与 Shannon 指数相反. 但两者反映出的生物多样性和群落变化结果与 Ace 和 Chao 指数的结果完全相同.

2.3 运行期间微生物群落变化

2.3.1 微生物群落在门分类层面上的比对

图 3 是 ANAMMOX 反应器种泥、运行第 30 d 污泥、运行第 90 d 污泥的微生物群落组成. 3 个样品共检测到 9 个菌门, 其中共同拥有并占有较大比例的是绿菌门 (Chlorobi), 变形菌门 (Proteobacteria), 绿曲挠菌门 (Chloroflexi), 拟杆菌门 (Bacteroidetes), 浮霉菌门 (Planctomycetes). 其中和脱氮相关的有浮霉菌门和变形菌门, 占总菌门比例的 40% 左右, 见表 2.

反应器从开始启动到实现较高负荷下稳定运行, 变形菌门始终是污泥中最主要微生物种群. 在第 0 d 和第 30 d 时占比基本没有变化, 稳定在 34% 左右, 虽然在第 90 d 时下降到 27%, 但仍高于其他微生物种群. 这与其他研究人员所得 ANAMMOX 反应器功能菌群分布类似. Bae 等^[5]发现在启动成功的反应器中变形菌门占 42%, 高于浮霉菌门的 20%. 陈重军等^[4]在 ABR ANAMMOX 反应器中发现各格室变形菌门均为

最主要的菌种,在脱氮菌中占有最重要的地位. ANAMMOX 菌所在的浮霉菌门所占比例随运行时间的增加有了明显提高,从 5.4% 左右提高到 14.8%,增幅达到 9.4%. 说明反应器内的 ANAMMOX 菌大量繁殖,本实验对 ANAMMOX 菌富集取得了非常显著的效果.

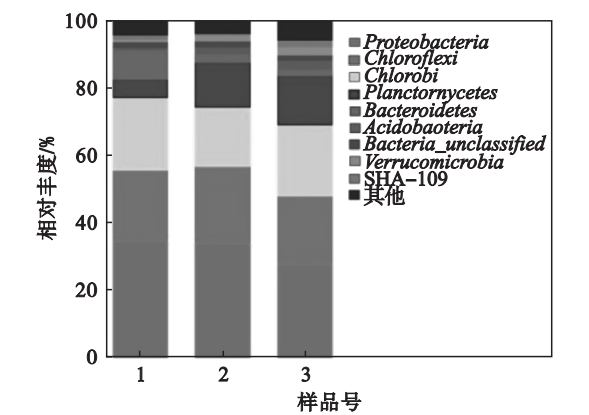


图 3 ANAMMOX 反应器不同时期微生物群落门水平分类

Fig. 3 Composition of microbial community structure in different period of ANAMMOX reactor at a phylum level

表 2 反应器主要功能细菌群落构成占比 (门水平)				
Table 2 Relative percentage of the denitrifying bacterial in the ANAMMOX reactor	%			
菌门	1	2	3	4
变形菌门	34.742 5	34.242 8	27.943 2	26.444 1
浮霉菌门	5.476 7	13.521 9	14.867 7	27.743 4
合计	40.219 2	47.764 7	42.810 9	54.187 5

而其他非脱氮细菌,如绿曲挠菌门、绿菌门、拟杆菌门等也常在 ANAMMOX 反应器中被检测到. 但它们在 ANAMMOX 反应中起何种作用还有待进一步研究.

对比第 30 d 和第 90 d 污泥样品中浮霉菌门所占比例的变化发现(见表 2). 从 30 d 到 90 d,浮霉菌门所占比例仅有 1.3% 的增长,相比于第 0 d 到第 30 d 时 8.1% 的增长速度,增速明显放缓. 推测可能是由于污泥样品均取自填料下部,而填料下部周围堆积了许多未附着在填料上的污泥,使得其附近水流流动不畅,造成细菌间物质交换效率低下,从而使细菌繁殖减缓. 为了验证这种推测,对反应器填料上部 and 下部污泥的微生物群落结构进行对比,如图 4 所示. 填料上部污泥中检测到的细菌种类与下部基本相同,但各菌种间的比例明显不同. 与下部污泥相比,上部污泥中绿菌门所占比例大幅减少仅剩 5.4% 左右. 而与脱氮相关的浮霉菌门和变形菌门所占比例大幅增加,占

比超过 50%,且增加主要是由 ANAMMOX 菌所在的浮霉菌门比例上升引起. 上部污泥中浮霉菌门占比达到 27.7%,远高于下部污泥的 14.8%. 分析原因是由于填料下部周围物质交换效率低下,限制了浮霉菌门的繁殖,虽然上部开始污泥挂膜量不如下部,但由于物质交互充分,细菌繁殖速度很快,ANAMMOX 菌所在的浮霉菌门反而获得了更好的富集效果. 这也说明保证反应器内微生物与周边环境充分的物质交换对 ANAMMOX 菌的快速富集有非常重要的作用.

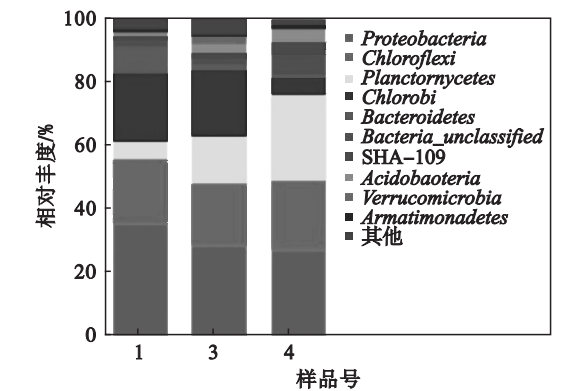


图 4 ANAMMOX 反应器不同位置微生物群落门水平分类

Fig. 4 Composition of microbial community structure in different position of reactor at a phylum level

对所有样品的群落结构相似度进行比较,得到相似度树状图,见图 5. 样品间相似程度越高则在树状图中位置越靠近. 反应器稳定运行阶段的两个污泥样品(样品 2 和 3)在树状图中位置最接近,相似程度最高. 它们与反应器启动时的污泥(样品 1)已经存在一定程度的差异. 说明反应器从启动到稳定运行,内部群落结构不断变化,反应器稳定后菌群结构也趋于稳定. 而反应器上部污泥(样品 4)与其他几个样品间差异性明显,说明即使在同一反应器内,填料不同位置物质交换的微小差异也会对微生物群落的构成产生影响.

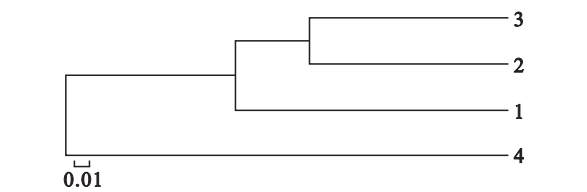


图 5 不同样本间相似度树状图

Fig. 5 Tree of similarity among different samples

2.3.2 微生物群落在属分类层面上的比对

门分类学水平相对较高,包含物种数量较多. 而属分类学水平的分析更加精细,为了进一步阐明反应器运行过程中微生物群落的演化,从属的

层面上对反应器内微生物群落结构进行分析。

选择在系统中占有较大比例且是反应器脱氮功能的主要来源的浮霉菌门进行分析。浮霉菌门生物学分类如表 3 所示^[6]。

图 6 是第 90 d 时所取污泥样品的浮霉菌门群落组成。其中的 *Candidatus Kuenenia* 属和 *Candidatus Brocadia* 属是具有厌氧氨氧化功能的菌属。*Candidatus Kuenenia* 属发现于德国斯图加特污水处理厂,以 CO₂ 为唯一碳源,将 NO₂⁻—N 氧化成 NO₃⁻—N 获得能量^[7]。而 *Candidatus Brocadia* 属是第一个获得富集鉴定的 ANAMMOX 菌种^[8]。本研究的 ANAMMOX 反应

器中 *Candidatus Kuenenia* 属是占据优势的 ANAMMOX 细菌。在上部和下部污泥的浮霉菌门中分别占比 74% 和 44%。研究表明在不同的生存环境中,ANAMMOX 菌的群落结构存在差异,在某一稳定的生长环境中,通常只有一个种属的 ANAMMOX 菌占据优势^[9]。这与本实验的结果也相吻合。

在上部污泥中出现了下部污泥所没有的 *Candidatus Brocadia* 属,且 SM1A02 属的细菌所占比例大幅提高。其原因可能是反应器不同位置物质交换效率的差异引起的。

表 3 浮霉菌门生物学分类

Table 3 Taxonomy of phylum Planctomycetes

门	纲	目	科	属
	<i>Phycisphaerae</i>	<i>Phycisphaerales</i>	<i>Phycisphaeraceae</i>	
		<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	<i>Brocadiaceales</i>	<i>Brocadiaceae</i>	<i>Candidatus Scalindua</i> <i>Candidatus Kuenenia</i> <i>Candidatus Brocadia</i> <i>Candidatus Anammoxoglobus</i> <i>Candidatus Jettenia</i>

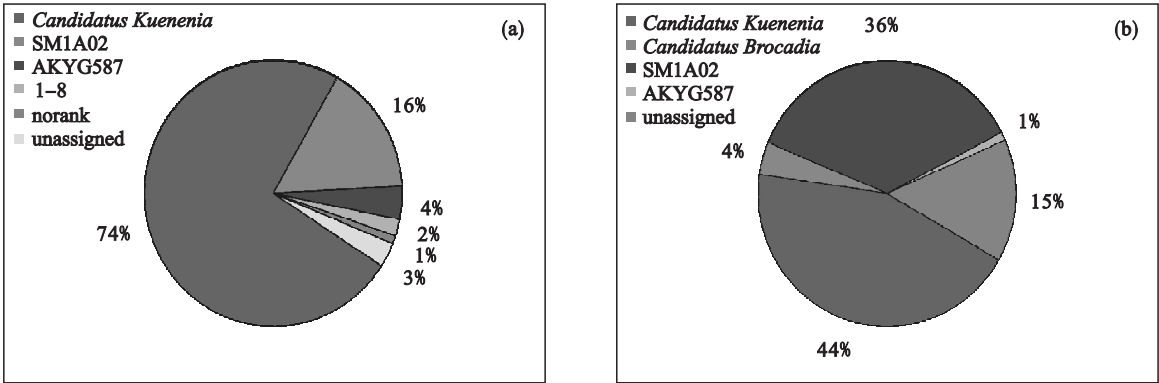


图 6 反应器浮霉菌门的组成占比 (属水平)

Fig. 6 Constituent proportion of the *Planctomycetes* bacterial communities in the reactor at a genus level

(a)—填料下部污泥; (b)—填料上部污泥。

除浮霉菌门外,反应器中还存在许多变形菌门。绿曲挠菌门,绿菌门的细菌与 ANAMMOX 菌共存。这些细菌当中有些具有亚硝化功能,如亚硝化单细胞菌属 (*Nitrosomonas*),有些具有反硝化作用,像 *Denitratisoma* 属,变形菌门中的某些细菌还具有丝状菌的功能,能够构建网状结构利于 ANAMMOX 菌的富集生长^[10]。另外反硝化菌和丝状菌的存在也有助于分解水中的有机质,为 ANAMMOX 菌的生长创造有利条件。

3 结 论

- 1) 研究所用 ANAMMOX 反应器在 61 d 内就获得总氮负荷 1.3 kg·N·m⁻³·d⁻¹,氮去除负荷 1.04 kg·N·m⁻³·d⁻¹的处理能力,并在此负荷下持续稳定运行 30 d 以上,总氮去除率始终保持在 75% 以上。
- 2) 高通量测序分析结果表明ANAMMOX反

应器启动到稳定过程中微生物群落结构趋于稳定. 其中变形菌门和浮霉菌门合计占比达到 40% 以上. ANAMMOX 菌所在的浮霉菌门比例随运行时间延长而逐渐增加, 是反应器脱氮效能提高的主要原因. 反应器内占据优势地位的 ANAMMOX 菌主要是 *Candidatus Kuenenia* 属, 占比达到 14% 左右, 同时也有少量 *Candidatus Brocadia* 属的 ANAMMOX 菌.

3) 同一反应器内填料不同位置的微生物群落结构存在较大差异, 反应器脱氮效能的稳定依赖于功能菌种群的稳定. 反应器内不同位置物质交换效率的差异导致了微生物群落结构的差异. 微生物物质交换越充分, ANAMMOX 菌富集速度越快.

参考文献:

[1] Strous M, Kuenen J G, Jetten M, et al. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation [J]. *Applied & Environment Microbiology*, 1999, 65 (7) : 3248 – 3250.

[2] Star W R L V D, 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.

[3] 张海芹, 陈重军, 王建芳, 等. 厌氧氨氧化启动过程及特性研究进展 [J]. *化工进展*, 2014, 33 (8) : 2180 – 2186.

(Zhang Hai-qin, Chen Chong-jun, Wang Jian-fang, et al. Start-up and related characteristics of anaerobic ammonia oxidation processes: a review [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2014, 33 (8) : 2180 – 2186.)

[4] 陈重军, 张海芹, 汪瑶琪, 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.

(Chen Chong-jun, Zhang Hai-qin, Wang Yao-qi, et al. Characteristics of microbial community in each compartment of ABR ANAMMOX reactor based on high-throughput sequencing [J]. *Environmental Science*, 2016, 37 (7) : 2652 – 2658.)

[5] Bae H, Chung Y C, Jung J Y. Microbial community structure and occurrence of diverse autotrophic ammonium oxidizing microorganisms in the ANAMMOX process [J]. *Water Science & Technology*, 2010, 61 (11) : 2723 – 2732.

[6] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an ANAMMOX bacterium from a community genome [J]. *Nature*, 2006, 440 (7085) : 790 – 794.

[7] Schmid M, Twachtmann U, Klein M, et al. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation [J]. *Systematic & Applied Microbiology*, 2000, 23 (1) : 93 – 106.

[8] Kuenen J G. Extraordinary anaerobic ammonium-oxidizing bacteria [J]. *ASM News*, 2001, 67 (9) : 456 – 463.

[9] Vossenberg J V D, 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.

[10] Li J, Hu B, Zheng P, et al. Filamentous granular sludge bulking in a laboratory scale UASB reactor [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (9) : 3431 – 3434.