黄凯文,张 欣,周雨晨,等.磺胺间甲氧嘧啶胁迫下硫自养反硝化菌群的响应机制 [J]. 中国环境科学, 2025,45(9):5227-5235.
Huang K W, Zhang X, Zhou Y C, et al. Response mechanisms of sulfur autotrophic denitrifying microbial communities under the stress of sulfamethoxazole [J]. China Environmental science, 2025,45(9):5227-5235.

磺胺间甲氧嘧啶胁迫下硫自养反硝化菌群的响应机制

黄凯文[1],张 欣[1],周雨晨[1],周一杰[1],王 硕[1,2*],李 激[1,2] (1.江南大学 环境与生态学院,江苏省厌氧生物技术重点实验室,江苏 无锡 214122；2.江苏省高校水处理技术与材料协同创新中心,江苏 苏州 215009)

摘要：采用硫填料床反应器,以工业废弃物白泥作为碱度源,逐步提升磺胺间甲氧嘧啶(SMM)浓度,探究硫自养反硝化(SADN)菌群在 SMM 胁迫下的微观响应机制.结果表明,SADN 菌群能够利用白泥提供的碱度进行高效脱氮,在低浓度 SMM 胁迫下系统保持稳定, *Thiobacillus* 菌群得到富集,硝态氮(NO_3^--N)及 SMM 去除率达 99%以上.在高浓度 SMM 冲击下,系统中 *Thiobacillus* 菌群丰度降低,脱氮性能有所波动.但系统中优势菌群通过增加 C6-HSL 分泌,调控谷氨酸(Glu)和脯氨酸(Pro)等疏水性氨基酸合成,促进胞外聚合物(EPS)中紧密结合型蛋白(TB-PN)的合成,维持蛋白质二级结构紧密,从而促进污泥絮体团聚.在此调控下,系统脱氮性能恢复,SMM 去除率维持在 60%以上.此外,在高浓度 SMM 胁迫下,*unclassified_f__Rhodocyclaceae* 借助凋亡的自养菌群及 EPS 分泌的碳源协同 *Ferritrophicum*、*Thiobacillus* 等 SADN 菌群进行高效脱氮.

关键词：硫自养反硝化；磺胺间甲氧嘧啶；胞外聚合物；酰化高丝氨酸内酯；微观响应
中图分类号：X703 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)09-5227-09

Response mechanisms of sulfur autotrophic denitrifying microbial communities under the stress of sulfamethoxazole. HUANG Kai-wen[1], ZHANG Xin[1], ZHOU Yu-chen[1], ZHOU Yi-jie[1], WANG Shuo[1,2*], LI Ji[1,2] (1.Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, School of Environment and Ecology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China；2.Jiangsu College Water Treatment Technology and Material Collaborative Innovation Center, Suzhou 215009, China). *China Environmental science*, 2025,45(9)：5227~5235

Abstract：A sulfur packed-bed reactor was employed, with lime mud-an industrial by-product, serving as an alkalinity source. The concentration of Sulfamethoxazole (SMM) was gradually increased to investigate the microscopic response mechanisms of sulfur autotrophic denitrifying (SADN) microbial communities under SMM stress. The results indicated that the SADN microbial communities could utilize the alkalinity provided by lime mud to achieve efficient nitrogen removal. Under low-concentration SMM stress, the system remained stable, *Thiobacillus* was enriched with removal efficiencies of nitrate (NO_3^--N) and SMM exceeding 99%. Under the impact of high-concentration SMM, the abundance of *Thiobacillus* in the system decreased, and the nitrogen removal performance fluctuated. However, the dominant bacteria in the system regulated the synthesis of hydrophobic amino acids glutamic acid (Glu) and proline (Pro) by increasing the secretion of C6-HSL, promoted the synthesis of tightly bound protein (TB-PN) in extracellular polymer (EPS), maintained the tight secondary structure of the protein, and thus promoted the aggregation of floc sludge. Under this regulation, the denitrification performance was recovered, and the SMM removal rate reached 60%. Additionally, under high-concentration SMM stress, *unclassified_f__Rhodocyclaceae* utilized the carbon sources secreted by apoptotic autotrophic bacteria and EPS to synergize with *Ferritrophicum* and *Thiobacillus* for efficient nitrogen removal.

Key words：sulfur autotrophic denitrification；sulfamethoxazole；extracellular polymeric substances；acyl-homoserine lactones；microscopic response

磺胺间甲氧嘧啶(SMM)是一种常见的磺胺类抗生素,由于其价格低廉且具有广谱抗菌活性,因此广泛用于畜禽养殖产业中以增强畜禽抗病能力.而 SMM 通常不能被畜禽完全吸收,它们会随着畜禽的粪便和尿液流入水体中[1].目前,通常采用多级 A/O 工艺[2]、SBR 工艺[3]等对畜禽养殖废水进行处理,而这些传统的活性污泥技术对于 SMM 没有很好的去除效果.同时,由于畜禽养殖废水高化学需氧量(COD)和高总氮(TN)等特点,导致其出水仍有较高硝态氮(NO_3^--N)残留.因此,需要对其尾水中残留的 NO_3^--N 以及 SMM 进行深度处理.

经 A/O 和 SBR 工艺处理后的畜禽养殖废水二级出水碳氮比较低,采用异养反硝化技术还需投加大量碳源,会显著增加工艺的碳排放.硫自养反硝化

收稿日期：2025-02-23
基金项目：国家重点研发计划项目(2023YFC3207601);江苏省生态环境监测科研基金资助项目(24A13);无锡市科技创新创业资金资助项目(M20241005)
* 责任作者, 副研究员, shuowang@jiangnan.edu.cn

技术(SADN)无需有机碳源作为底物,对处理低碳氮比出水较为适宜.同时,已有研究表明 SADN 工艺对抗生素具有一定的去除效果.张亮等[4]研究发现在 SADN 系统中自养菌群能够通过共代谢途径同步降解 SMX 和 NO_3^--N,SMX 去除率为 3.7±1.4μg/(g SS·d),同时证实该过程以生物降解为主导机制.苏燕等[5]等研究指出,在进水诺氟沙星(NOR)浓度为 0.5mg/L 时, SADN 系统对 NOR 的去除率达 80.7%且以生物降解为主.因此,将 SADN 运用于畜禽养殖废水的深度脱氮具有较好的应用前景.然而,针对 SADN 处理含抗生素类废水的研究大多集中在抗生素的生物降解上,对于 SADN 系统中硫自养反硝化菌群在抗生素胁迫下微生物响应机制的研究还相对较少,这在很大程度上限制了 SADN 技术在抗生素去除领域的应用.

此外,在 SADN 系统中,每还原 1g NO_3^--N 会消耗 3.91g 碱度[6](以 $CaCO_3$ 计).在以往的试验和工程中,最常用的碱度源为碳酸氢钠[7].但对于低碱度的废水,需要大量的碳酸氢钠来维持自养反硝化过程,这也会增大药剂成本的投入,同时也间接提高了碳排放.而我国造纸行业通常采用碱法制浆,该过程中会产生大量的碱回收白泥,其主要成分为碳酸钙(80%),同时含有碳酸钠、氢氧化钠等残碱[8](8%),具备代替碳酸氢钠成为 SADN 进水碱度源的潜力.

基于此,本研究采用白泥作为碱度源,同时选取典型磺胺类抗生素 SMM 作为目标污染物,旨在探究硫自养反硝化工艺碱度替换的可行性以及 SMM 胁迫下 SADN 菌群的响应机制,为拓宽 SADN 工艺的应用范围提供技术支持.

1 材料与方法

1.1 实验装置

实验装置如图 1 所示,实验装置为柱状反应器,反应器内径为 54cm,高 60cm,有效容积为 1.1L.在距离反应器底部 5cm 处设置进水缓冲区,并在该区域上部安装布水器均匀布水.实验中采用市场中购买的工业级硫磺(S^0)作为硫填料,其为半球形,平均粒径为 0.5~1cm,填充高度为 32cm.反应器设有脱氧层、脱氮层,采用底部进水顶部出水的方式在室温下连续流运行 60d,共分 5 个阶段运行阶段(表 1).

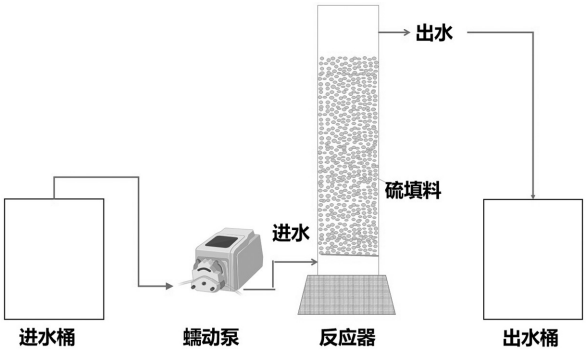


图 1 实验装置

Fig.1 Diagram of experimental device

1.2 接种污泥及进水水质

反应器接种污泥取自无锡某市政污水处理厂缺氧池活性污泥.实验过程中反应器进水采用人工配水,以硝酸钾为氮源,磷酸氢二甲为磷源,同时加入 0.5mL/L 的微量元素.G1 阶段采用碳酸氢钠作为碱度源,在 G2 阶段以白泥作为碱度源,在 G3 阶段加入 SMM,并在 G4 和 G5 阶段逐步提升其浓度,具体进水水质如表 1 所示.

表 1 各阶段进水水质

Table 1 Influent water quality at each stage

试验阶段	起始时间 (d)	空床停留时间 (h)	进水硝态氮浓度 (mg/L)	碱度投加 (g/L)	进水磺胺间甲氧嘧啶浓度 (mg/L)
G1	1~18	5	20	0.5g/L 碳酸氢钠	0
G2	19~29	5~3	20	1.2g/L 白泥	0
G3	29~34	3	20		0.25
G4	35~40	3	20		0.5
G5	41~60	3	20		1

1.3 分析方法

水质测定方法均参照《水与废水监测分析方法》.利用紫外分光光度计(DR6000)测定 NO_3^--N 和亚硝态氮(NO_2^--N),利用离子色谱仪(ICS-5000)测定硫酸根离子(SO_4^{2-}).利用高效液相色谱仪(LC-20ADXR)测定 SMM,其流动相 A(0.1%甲酸)和流动相 B(乙腈)比例为 75:25,流速、测定波长、进样体积、柱温分别为 1.0mL/min、270nm、40uL 和 30℃.

1.4 胞外聚合物和信号分子特征分析

量取 10mL 泥水混合物提取各阶段胞外聚合物(EPS),在 3220g,4℃条件下离心 10min 后撇去上清液,用缓冲液冲洗污泥两次.在 5000g,4℃条件下离心

15min.将上清液过 0.22μm 水系滤膜,获得 SMP−EPS.利用缓冲液将污泥稀释至原体积(10ml),置于 80℃水浴中加热 5min,冷却后在 13000g,4℃条件下离心 15min,将上清液过 0.22μm 水系滤膜,获得 LB−EPS.在污泥中加入 250mg/g VSS $Na_2S·9H_2O$,利用缓冲液稀释至原体积,于 4℃摇床中震荡 1h,加入 170mg/g VSS NH_4F 再震荡 1h.在 13000g,4℃条件下离心 15min,将上清液过 0.22μm 水系滤膜,获得 Ionic TB−EPS.在污泥中加入 140mg/g VSS $C_{12}H_{25}SO_4Na$,用缓冲液稀释至原体积,于 4℃摇床中震荡 45min,在 13000g,4℃条件下离心 15min,将上清液过 0.22μm 水系滤膜,获得 hydrophobic TB−EPS.利用采用 lowry 法对 EPS 中的 PN 含量进行测定,采用硫酸−蒽酮法测定 PS 含量[9].取 1ml TB−EPS 进行水解后,利用高效液相色谱仪(Agilent1260)对 EPS 中各类氨基酸含量进行测定.将 10ml 污泥样品进行冷冻干燥,采用傅里叶红外光谱仪(Thermo Nicolet nexus 470)对冻干污泥 EPS 官能团变化进行测定,并利用 Peakfit4.2 软件对其蛋白质二级结构进行计算.量取 50ml 泥水混合物,提取污泥酰化高丝氨酸内酯类(Acyl−homoserine lactones,AHLs)信号分子,采用超高效液相色谱−串联质谱(UPLC−MS/MS)技术对 AHLs 进行含量测定.

1.5　高通量测序分析

在每一阶段结束后,取出适量硫填料至于 100ml 烧杯中,并加入适量超纯水进行超声搅拌,收集脱落的生物膜于离心管后在 10000g 转速下离心 5min,撇去上清液,仅保留底部的沉积物,置于−80℃冰箱.待全部实验结束后,将样品送往上海美吉生物科技有限公司进行高通量测序.所有获得的原始序列数据集已上传到 NCBI(SRA),登录号为: SRP570156.

2　结果与讨论

2.1　硫自养反硝化系统污染物去除效能

2.1.1　脱氮性能　硫自养反硝化系统在实验室规模填料床反应器中稳定运行 60d,其脱氮性能如图 2 所示.在 G1 阶段,SADN 系统能够稳定去除 20mg/L NO_3^-−N,在第 1~7d 时出水中有约 1mg/L 的 NO_2^-−N 检出,但经过 7d 的适应后,出水中无 NO_2^-−N 检出,表明此时 SADN 系统较为稳定且反硝化完全.在此基础上,在 G2 阶段运用白泥作为碱度源,同时调整空床停留时间(EBCT)为 3h.面对骤增的氮负荷,系统脱氮性能出现恶化,有 2~9mg/L 的 NO_3^-−N 积累.但 SADN 菌群能够迅速适应氮负荷的增长,在 5d 过后,系统脱氮性能恢复正常.成功替换碱度源后,在进水中加入 0.25mg/L SMM,并逐渐提升其浓度至 1mg/L 以探究 SADN 菌群在 SMM 胁迫下的微观响应机制.在 0.25mg/L 及 0.5mg/L 的低浓度 SMM 胁迫下,SADN 系统较为稳定.而在 1mg/L 的高浓度 SMM 胁迫下,系统脱氮性能受到较大冲击,NO_3^-−N 去除率在 10%~50%波动,同时伴随有 4mg/L 以上的 NO_2^-−N 积累.经过 14d 的适应后,SADN 菌群逐步对高浓度 SMM 产生耐药性,出水水质与 G3 和 G4 阶段相同,表明此时系统已进入稳态.

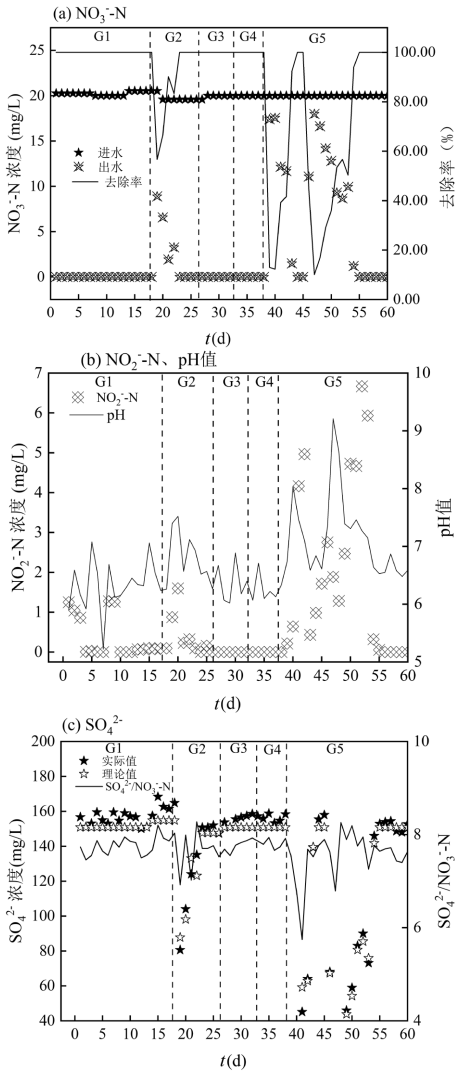


图 2　SADN 各阶段脱氮性能

Fig.2　Nitrogen removal performance at each stage of SADN

硫自养反硝化过程会消耗碱度,使得出水 pH

值下降.在 G2 阶段采用白泥作为碱度源后,系统脱氮性能未受影响.同时,在 G2~G5 阶段出水平均 pH 值维持在 6.5 以上,处于 SADN 菌群最适 pH 值范围,表明在 SADN 系统中白泥可代替碳酸氢铵作为碱度源.此外,对脱氮过程中实际产生的硫酸根离子(SO_4^{2-})进行测定,并计算 NO_3^--N 去除量与 SO_4^{2-}产生量,其平均值为 7.6,符合 SADN 系统理论计算值[10],表明在整个试验过程中系统硫代谢功能未受影响.

2.1.2 磺胺间甲氧嘧啶去除效能 为探究 SADN 系统对于 SMM 的去除效果,对 G3-G5 阶段进出水 SMM 浓度进行测定,结果如图 3 所示.在 G3 和 G4 的低浓度 SMM 胁迫下,出水中均无 SMM 检出,SMM 被 SADN 菌群完全降解.在 G5 阶段,进一步提升 SMM 浓度至 1mg/L,出水中约有 0.45mg/L SMM 残留,去除率下降至 55%.在此期间,系统脱氮性能也有所恶化,NO_3^--N 及 NO_2^--N 积累较为明显.在 SADN 菌群适应高浓度 SMM 胁迫后,SMM 去除率增至 60%以上,脱氮性能也恢复至 G3 和 G4 水平,推测在 SADN 系统中,SMM 与 NO_3^--N 存在共代谢去除过程[11].

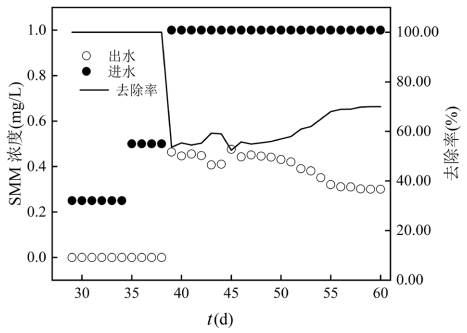


图 3 SADN 各阶段 SMM 去除效能

Fig.3 SADN removal efficiency of SMM at each stage

触发的自我保护机制,即通过分泌更多的 EPS 来抵增加的氮负荷[13].而在 SMM 的长期胁迫下,污泥絮体遭到一定程度的破坏,EPS 总量有所下降.

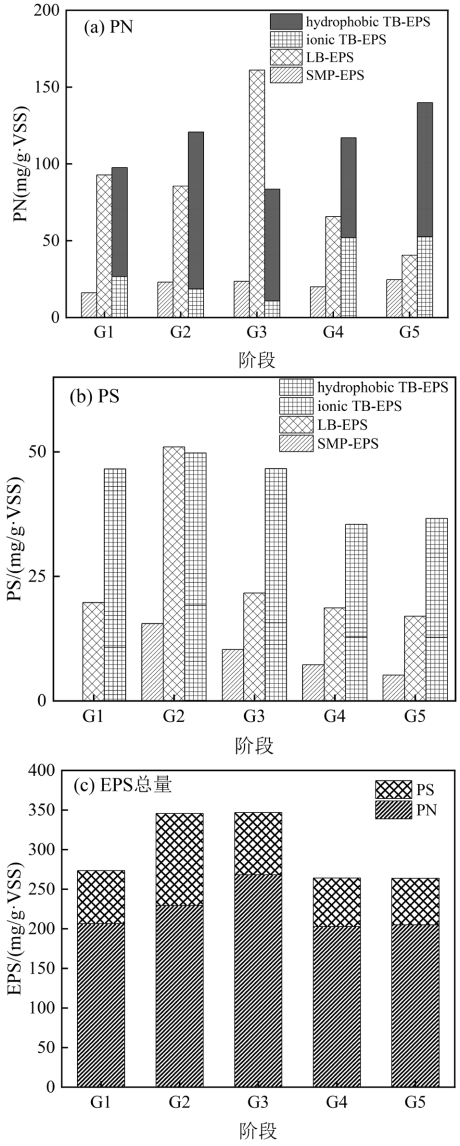


图 4 各阶段 EPS 中 PN, PS 和总量

Fig.4 PN, PS and total in EPS at each stage

2.2 硫自养反硝化系统 EPS 特性分析

2.2.1 EPS 组分及含量变化 EPS 作为微生物的保护层,其主要由蛋白(PN)和多糖(PS)组成,可在抵御抗生素冲击、保持污泥絮体稳定以及改善脱氮性能方面发挥重要作用[12].因此,通过测定 EPS 中 PN 及 PS 含量可以探究 SMM 对硫自养反硝化污泥絮体结构的影响.如图 4(c)所示,在增加氮负荷后,G2 阶段 EPS 总量增长较为明显,由 273.56mg/g VSS 增至 345.72mg/g VSS,这是微生物面对环境因素改变而

为进一步探究 SMM 胁迫下污泥 EPS 的特性变化,将 EPS 分为溶解型 EPS(SMP-EPS)、松散型 EPS(LB-EPS)以及紧密型 EPS(TB-EPS),其中又将 TB-EPS 细分为离子型 TB-EPS(ionic TB-EPS)以及疏水型 TB-EPS(hydrophobic TB-EPS).如图 4(a)所示,SMP 层 PN 含量变化较小,而 LB 层则对于环境变化较为敏感.在 G3 阶段加入 SMM 后,LB-PN 含量由 51.00mg/g VSS 激增至 161.16mg/g VSS.由于 LB-EPS 中含有大量的结合水,因此 LB-PN 含量增加会

导致污泥絮体密度变低,孔隙率增加[14],表明在SMM的冲击下,污泥絮体结构趋于松散.但在G4和G5阶段,LB-PN含量明显减少,而ionic TB-PN的含量有较为明显的增加,由10.80mg/g VSS增至52.53mg/g VSS.Ionic TB层含有足够的阳离子结合位点,存在的羟基基团可以通过离子桥接作用促进污泥聚集[9].LB-PN的减少及ionic TB-PN的增加,表明SADN菌群逐渐适应SMM的胁迫,功能菌群通过离子桥接形式使污泥结构恢复紧密.此外,hydrophobic TB-PN在G3~G5阶段一直保持较高的水平,其可通过C-H长链疏水基的疏水作用促进污泥絮体的聚集[9],是在SMM胁迫下SADN系统维持污泥结构稳定的重要因素之一.

图4(b)显示了不同阶段EPS中PS的变化,在G1~G2阶段,PS总量由66.87mg/g VSS增至116.30mg/g VSS.PS具有较长的碳链和活跃的支链,可形成网络结构作为骨架维持污泥结构稳定[15],其含量在G2阶段骤增,表明SADN菌群通过增加PS分泌来维持结构稳定,抵御高氮负荷冲击.同时,PS具有粘附微生物和抵抗有毒物质的作用,SMM在接触细胞膜前须先穿过PS层,微生物周围的粘性PS可以防止有毒物质直接接触细胞[16].在G3~G5阶段,各层EPS中PS含量均有所下降,表明SMM会抑制微生物分泌胞外PS,从而加剧SMM的毒性,这也是在G5阶段水质有所波动的原因之一.

2.2.2　EPS中氨基酸特征分析　氨基酸是蛋白质的基本单位,不同的氨基酸构成可反应污泥的稳定性,图5显示了不同阶段EPS中氨基酸的含量及占比变化.在各个阶段中,氨基酸的总量波动较小,表明提升氮负荷以及SMM浓度不会抑制氨基酸的分泌.甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)等八种疏水性氨基酸的占比在G1、G3和G5阶段分别为34.51%、31.88%及36.68%.疏水性氨基酸在蛋白质内部可以通过其疏水作用维持蛋白质的三级结构,增强污泥微生物间的黏附力,同时可以维持生物膜结构的稳定[17].八种疏水性氨基酸占比在SMM胁迫下呈现先下降后上升的趋势,表明SMM在一定程度上会破坏污泥结构的稳定,但在菌群适应SMM胁迫后,SADN系统污泥结构再次恢复紧密.

天冬氨酸(Asp)有助于免疫蛋白及抗体的产生[18],Asp在各阶段均处于较高水平是SADN系统能够抵御高SMM胁迫的重要原因之一.谷氨酸(Glu)和酪氨酸(Tyr)均为氮代谢的重要氨基酸[19],在SMM的胁迫下,Glu含量减少而Tyr含量呈增加趋势,表明面对SMM的胁迫,微生物优先通过强化Tyr的稳定代谢维持SADN系统脱氮性能.此外,脯氨酸(Pro)具有调控线粒体电子传递复合物的功能[20],其占比一直较为稳定,有助于提高电子转移效率,促进SADN系统达到强化脱氮和SMM去除的作用.

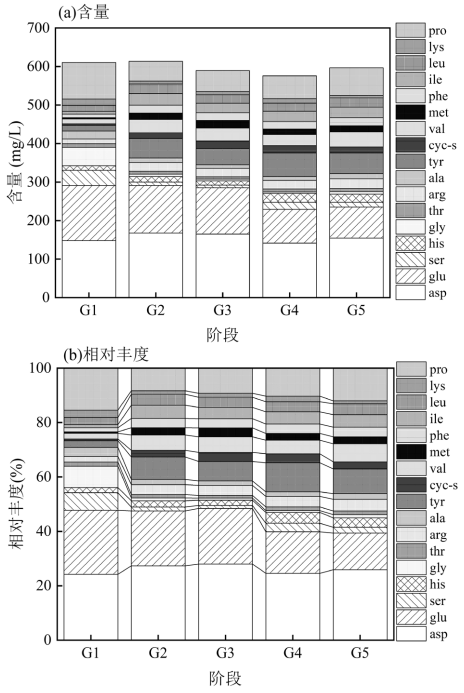


图5　EPS中氨基酸含量和相对丰度变化

Fig.5　Changes of amino acid content and relative abundance in EPS

2.2.3　蛋白质二级结构解析　利用傅里叶红外光谱对投加SMM前后五个阶段的污泥进行表征,并利用Peakfit对能够准确灵敏反应蛋白质构象及变化的酰胺Ⅰ带(1700-1600cm^{-1})进行蛋白质二级结构定量分析,各种酰胺Ⅰ带的蛋白质二级结构划分为聚合链(1625~1610cm^{-1})、β-折叠(1640~1630cm^{-1})、无规则卷积(1645~1640cm^{-1})、α-螺旋(1657~1648cm^{-1})、β-转角(1666~1659cm^{-1})、反向β-折叠(1695~1680cm^{-1})6种结构.

如表2所示,α-螺旋具有一定的刚性,被认为是决定污泥絮凝功能的关键结构[21].同时α-螺旋/(β-折叠 + 无规则卷曲)的比值通常被用于分析疏水基团的结构[22],比值越高表示蛋白结构越致密.在

G1−G5 阶段,α−螺旋/(β−折叠 + 无规则卷曲)的比值分别为 0.62、0.62、0.55、0.55 及 0.62,表明在 SMM 胁迫的初期,蛋白结构遭到一定的破坏,而在微生物具有对 SMM 的耐受性能后,SADN 污泥蛋白结构恢复并促进功能菌群紧密结合.此外,各阶段样品中 β−转角/聚合链的比值分别为 1.12、1.10、1.37、1.14、1.18,该数值可表示系统内免疫蛋白的含量,从而反应其调节细菌的代谢能力[23].在初期面对 SMM 的胁迫,蛋白结构遭到一定的破坏后,微生物倾向于构建球体蛋白来抵御 SMM 的冲击.

表 2 不同阶段污泥蛋白质二级结构变化

Table 2 Changes of secondary structure of sludge protein at different stages

阶段	聚合链%	β−折叠%	无规则卷曲%	α−螺旋%	β−转角%	反向 β−折叠%
G1	16.01	22.14	14.65	22.65	17.93	6.62
G2	16.04	22.22	14.66	22.95	17.65	6.47
G3	16.48	20.92	13.90	19.32	22.59	6.80
G4	18.85	20.85	13.78	18.93	21.46	6.13
G5	15.46	22.21	14.23	22.75	18.20	7.16

2.3 硫自养反硝化系统群体感应变化

酰化高丝氨酸内酯类(Acyl−homoserine lactones, AHLs)化合物是革兰氏阴性菌群体感应系统中最重要的一类信号分子,其可调控许多生理特性的表达[24].微生物可通过分泌和释放 AHLs 达到调控 EPS 分泌,促进污泥絮体聚集等功能.因此,对硫自养反硝化污泥中 AHLs 含量进行测定,结果如图 6 所示.C6−HSL 是 SADN 系统中含量最高的信号分子,其主要通过调控 PN 的分泌来促进生物膜的形成以及加速污泥絮体聚集[25].在 G3 阶段加入 SMM 后,C6−HSL 的含量由 128.34ng/L 上升至 184.56ng/L,随着 SMM 浓度的提升,其含量最终稳定在 179.24ng/L.这是因为在 G3 初始阶段,SMM 抑制了微生物分泌疏水性氨基酸,从而使疏水蛋白结构遭到破坏,污泥结构趋于松散.此时,微生物倾向于分泌更多 C6−HSL 来调控 EPS 中 PN 的合成,促进污泥絮体团聚,从而达到抵御 SMM 胁迫的目的.C4−HSL 具有较高的亲水性,可以促进亲水 PS 的分泌.其含量随着 SMM 浓度的增加而减少,表明 SMM 会抑制 C4−HSL 的分泌,从而减少胞外 PS 含量,加剧 SMM 毒性. 3OC6−HLS 能够增强污泥粘附生长能力,抵御不利环境影响[26];3OC8−HLS 可以促进 ATP 的合成进而增强微生物活性,提高污染物去除效率[27].它们的含量较为稳定,是系统能够维持较高脱氮性能的重要因素.

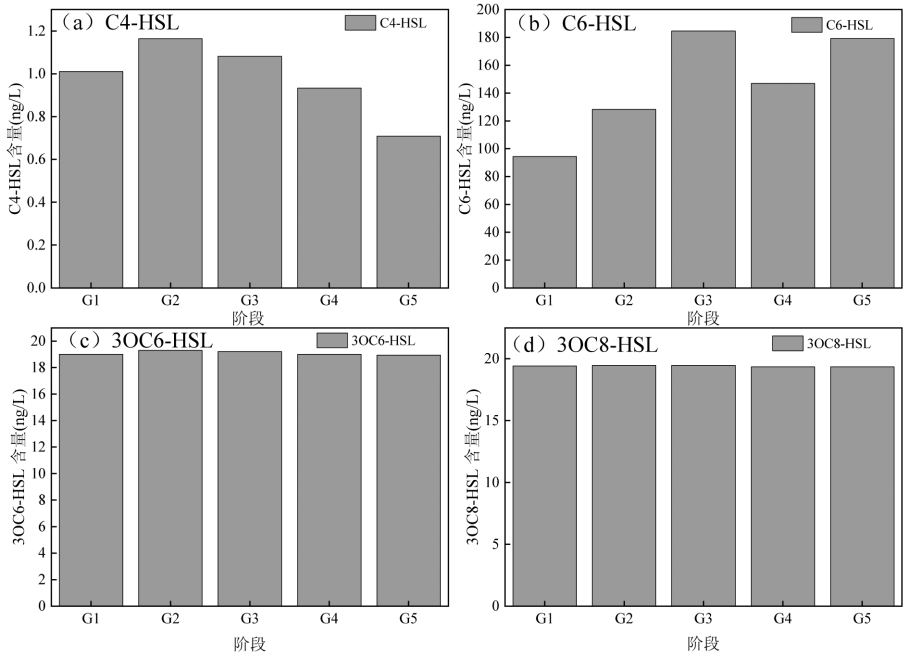


图 6 各阶段 AHLs 含量变化

Fig.6 AHLs content changes in each stage

2.4 微生物菌群变化

2.4.1 微生物多样性分析

采用高通量测序技术

对各阶段污泥样品进行微生物多样性及微生物群落结构分析,其结果如表 3 所示,其中 G0 为接种污泥.在 G2 阶段采用白泥作为碱度源并提升氮负荷的过程中,微生物的多样性和丰富度均显著下降,表明大量菌群由于不适应高氮负荷的冲击而凋亡.在 G3 和 G4 阶段系统中微生物多样性及丰富度无明显变化,而在 G5 阶段它们均显著下降.图 7 显示了各阶段 SADN 系统中微生物群落的差异,其中 G5 阶段微生物与其他各阶段有较大差异,表明在高浓度 SMM 胁迫下,系统中出现了新的优势脱氮菌群.

表 3　微生物 Alpha 多样性及丰富度指数表

Table 3　Alpha diversity index of the systems

组别	Ace	Chao	Shannon	Simpson
G0	1234.36	1195.127	5.16	0.02
G1	1454.13	1407.783	5.18	0.02
G2	952.63	920.6194	3.75	0.08
G3	939.15	909.2571	3.84	0.07
G4	940.19	915.6419	4.50	0.03
G5	490.29	465.0337	3.22	0.09

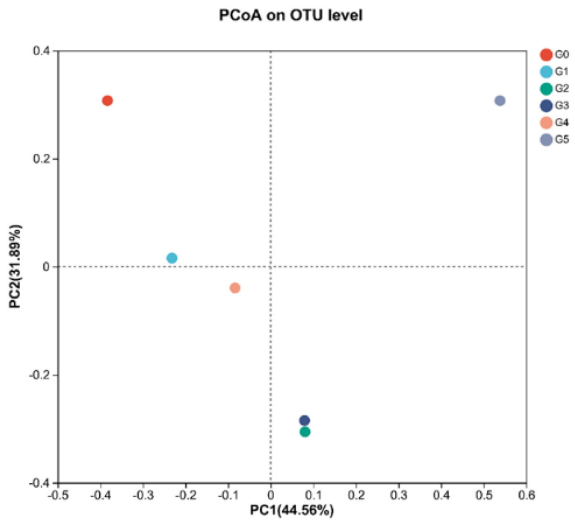


图 7　不同阶段微生物 PCoA 分析

Fig.7　Microbial PCoA analysis at different stages

2.4.2　属水平群落分析　图 8 显示了不同阶段属水平微生物的变化,其中 G0 为接种污泥.在 G1 及 G2 阶段, *Thiobacillus*、*Sulfurimonas* 等典型硫自养反硝化菌群的得到富集,并且在 G2 阶段二者总占比约 50%,表明在 SADN 菌群能够适应较高的氮负荷,并且能够适应白泥提供的碱度源进行高效脱氮.在 G3 阶段,面对 0.25mg/L 的 SMM 胁迫,系统中菌群变化较小,*Thermomonas* 菌群丰度由 5.85%增加至 9.40%,表明 *Thermomonas* 对于环境变化和抗生素胁迫具有较好的适应性[28].而随着 SMM 浓度的提升,*Thiobacillus*、*Sulfurimonas* 等 SADN 菌群丰度骤减,其总占比由 46.08%降至 19.86%,这是由于 SMM 可通过影响核酸合成,从而抑制菌群的生长[29].*Ferritrophicum* 凭借对磺胺类抗生素较高耐受性[30],其丰度在 G5 阶段增至 10.50%,成为丰度较高的 SADN 菌群.同时,在 G5 阶段,SADN 系统中出现了新的优势菌群 *unclassified_f__Rhodocyclaceae*,其相对丰度增至 31.40%.*unclassified_f__Rhodocyclaceae* 能够在厌氧条件下利用自养反硝化菌群的 EPS 代谢产物及凋亡的自养反硝化菌群为有机碳源进行内源反硝化[31],它与 *Ferritrophicum*、*Thiobacillus* 等 SADN 菌群在高浓度 SMM 胁迫下协同脱氮,共同维持了 SADN 系统稳定的脱氮性能.

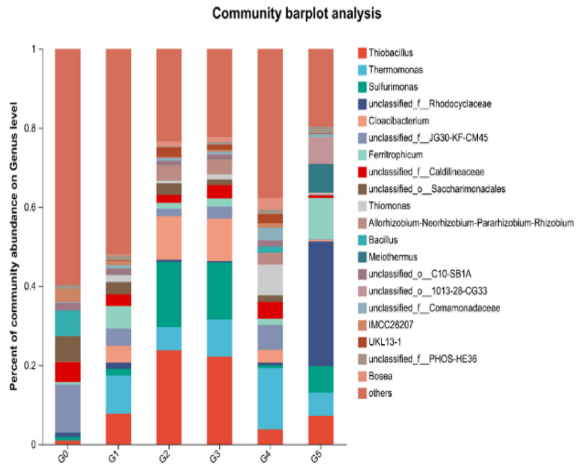


图 8　不同阶段属水平微生物群落变化

Fig.8　Microbial community changes at genus level at different stages

2.4.3　属水平微生物与 EPS 相关性分析　为进一步解析在 SMM 胁迫下 SADN 菌群的微观响应机制,对 G3−G5 阶段 EPS 含量与属水平微生物群落丰度进行 Spearman 相关性分析,结果如图 9 所示.*Thiobacillus* 和 *Sulfurimonas* 作为 SADN 菌群,二者功能相似,与 PN 均呈显著正相关(P<0.05).同时,*Ferritrophicum* 与 SMP−PN 及 hydrophobic TB−EPS 均呈显著正相关(P<0.05).在 SMM 胁迫下,这些高丰度 SADN 菌群通过正向调控 EPS 中 PN 的合成通路,增强蛋白质疏水基团的表面特性,进而促进污泥絮

体的生物絮凝作用,有效维持污泥微结构稳定性,提升系统对 SMM 胁迫的抗逆性.*Unclassified_f__Rhodocyclaceae* 与各层 PS 均呈显著负相关(P<0.05),其可能会抑制 EPS 中 PS 的合成.在高浓度 SMM 胁迫下,其相对增加使得系统中 PS 分泌受阻,加深了 SMM 的毒性,这可能是系统出水 NO_3^--N 存在波动的原因.但 *Thiobacillus* 等 SADN 菌群对 EPS 的正反馈调节有效补偿了 *Unclassified_f__Rhodocyclaceae* 对 PS 合成的抑制作用,通过动态调节 EPS 各组分含量,最终实现系统稳态运行.

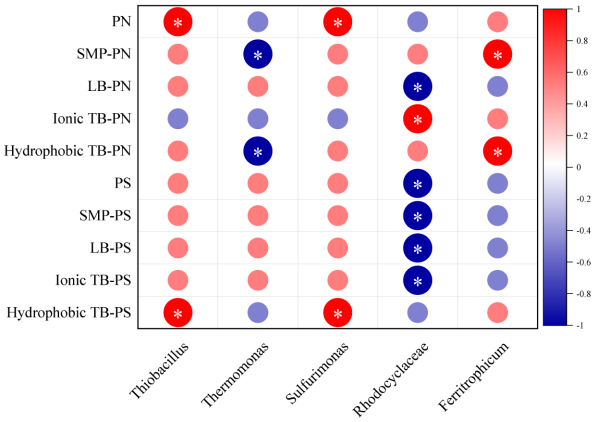


图 9 属水平微生物与 EPS 相关性图

Fig.9 Correlation between generic level microorganisms and EPS

3 结论

3.1 SADN 菌群可利用白泥作为碱度源进行高效脱氮,同时其具有较强的抗冲击能力和适应性,面对高浓度 SMM 的冲击,系统能够逐步恢复稳态,最终 NO_3^--N 去除率为 100%,SMM 去除率为 60%.

3.2 在提升氮负荷的过程中,SADN 菌群通过 EPS 中 PS 含量来维持系统稳定.而在面对 SMM 胁迫时则通过提升 TB-PN 含量,发挥其离子桥接及疏水作用来维持污泥结构稳定.

3.3 SADN 菌群通过上调 EPS 中疏水性氨基酸的分泌,维持蛋白质二级结构稳定,从而促进污泥絮体团聚,抵御高浓度 SMM 胁迫.

3.4 C6-HSL 是系统中最主要的信号分子,其主要作用是调控 EPS 中 TB-PN 的分泌,从而使系统适应不同的环境变化.

3.5 在高浓度 SMM 胁迫下,*unclassified_f__Rhodocyclaceae* 以凋亡的自养菌群及 EPS 分泌物为碳源进行内源反硝化,协同 *Ferritrophicum*、*Thiobacillus* 等 SADN 菌群进行高效脱氮.

参考文献:

[1] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. Environmental Science & Technology, 2015,49(11):6772-6782.

[2] Vanotti M B, Ro K S, Szogi A A, et al. High-rate solid-liquid separation coupled with nitrogen and phosphorus treatment of swine manure: Effect on water quality [J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2018,2.

[3] Riaño B, García-González M C. On-farm treatment of swine manure based on solid-liquid separation and biological nitrification-denitrification of the liquid fraction [J]. Journal of Environmental Management, 2014,132:87-93.

[4] Zhang L, Sun F, Wu D, et al. Biological conversion of sulfamethoxazole in an autotrophic denitrification system [J]. Water Research, 2020,185:116156.

[5] Su Y, Qian J, Wang J, et al. Unraveling the mechanism of norfloxacin removal and fate of antibiotics resistance genes (ARGs) in the sulfur-mediated autotrophic denitrification via metagenomic and metatranscriptomic analyses [J]. Science of the Total Environment, 2024,922.

[6] Liu L H, Koenig A. Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: Batch experiments [J]. Process Biochemistry, 2002, 37(8):885-893.

[7] Pan H, Cui M H, Zhang C, et al. Alkalinity regulation in a sulfur autotrophic denitrifying filter substantially reduced total dissolved solids and sulfate in effluent [J]. Bioresource Technology, 2022,348.

[8] 贺 盛,黎祖光,李俞锡,等.碱回收白泥建材资源化利用的研究进展[J]. 中国造纸, 2022,41(7):103-108.
He S, Li Z G, Li Y X, et al. Research progress on the resource utilization of alkali recovered white mud building materials [J]. China Paper, 2022,41(7):103-108.

[9] An Q, Chen Y H, Tang M, et al. The mechanism of extracellular polymeric substances in the formation of activated sludge flocs [J]. Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2023,663.

[10] 李 舵.硫-锰复合反硝化系统构建及协同脱氮机制研究 [D]. 保定: 河北大学, 2024:10-12.
Li D. Construction of sulfur-manganese composite denitrification system and research on synergistic nitrogen removal mechanism [D]. Baoding: Hebei University, 2024:10-12.

[11] Wang B Z, Li H Y, Liu T, et al. Enhanced removal of cephalexin and sulfadiazine in nitrifying membrane-aerated biofilm reactors [J]. Chemosphere, 2021,263.

[12] Wang X B, Chen T T, Gao C Y, et al. Use of extracellular polymeric substances as natural redox mediators to enhance denitrification performance by accelerating electron transfer and carbon source metabolism [J]. Bioresource Technology, 2022,345.

[13] Wang Z Y, Chu Y H, Chang H X, et al. Advanced insights on removal of antibiotics by microalgae−bacteria consortia: A state−of−the−art review and emerging prospects [J]. Chemosphere, 2022,307.

[14] Li X Y, Yang S F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge [J]. Water Research, 2007,41(5):1022−1030.

[15] Hou X L, Liu S T, Zhang Z T. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge [J]. Water Research, 2015,75:51−62.

[16] Mao Y H, Song A X, Wang Z M, et al. Protection of bifidobacterial cells against antibiotics by a high molecular weight exopolysaccharide of a medicinal fungus Cs−HK1through physical interactions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018,119:312−319.

[17] Zhang B, Lens P N L, Shi W X, et al. The attachment potential and N−acyl−homoserine lactone−based quorum sensing in aerobic granular sludge and algal−bacterial granular sludge [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018,102(12):5343−5353.

[18] Tang X, Guo Y Z, Wu S S, et al. Metabolomics uncovers the regulatory pathway of acyl−homoserine lactones based quorum sensing in anammox consortia [J]. Environmental Science & Technology, 2018,52(4):2206−2216.

[19] 陈　宁,刘　崇,李玉光,等.硝化颗粒污泥胞外聚合物及信号分子功能分析 [J]. 中国环境科学, 2023,43(9):4666−4675.
Chen N, Liu C, Li Y G, et al. Functional analysis of extracellular polymers and signal molecules in Nitrified granular Sludge [J]. China Environmental Science, 2023,43(9):4666−4675.

[20] Hayat S, Hayat Q, Alyemeni M N, et al. Role of proline under changing environments: a review [J]. Plant Signaling & Behavior, 2012,7(11):1456−1466.

[21] Yang F, Qu J W, Huang X X, et al. Phosphorus deficiency leads to the loosening of activated sludge: The role of exopolysaccharides in aggregation [J]. Chemosphere, 2022,290.

[22] Yan L L, Zhang M Y, Liu Y, et al. Enhanced nitrogen removal in an aerobic granular sequencing batch reactor under low DO concentration: Role of extracellular polymeric substances and microbial community structure [J]. Bioresource Technology, 2019,289.

[23] Chen F M, Li X, Gu C W, et al. Selectivity control of nitrite and nitrate with the reaction of S⁰ and achieved nitrite accumulation in the sulfur autotrophic denitrification process [J]. Bioresource Technology, 2018,266:211−219.

[24] Hu H Z, He J G, Liu J, et al. Biofilm activity and sludge characteristics affected by exogenous N−acyl homoserine lactones in biofilm reactors [J]. Bioresource Technology, 2016,211:339−347.

[25] 许炜怡,黄凯文,刘　崇,等.高氮负荷下硫自养反硝化菌群的胞外聚合物和信号分子特征 [J]. 中国环境科学, 2024,44(8):4314−4325.
Xu W Y, Huang K W, Liu C, et al. Characteristics of extracellular polymers and signaling molecules of sulfur autotrophic denitrifying bacterial communities under high nitrogen loading [J]. China Environmental Science, 2024,44(8):4314−4325.

[26] Gamage A M, Shui G H, Wenk M R, et al. N−Octanoylhomoserine lactone signalling mediated by the BpsI−BpsR quorum sensing system plays a major role in biofilm formation of Burkholderia pseudomallei [J]. Microbiology−Sgm, 2011,157:1176−1186.

[27] Tan C H, Koh K S, Xie C, et al. The role of quorum sensing signalling in EPS production and the assembly of a sludge community into aerobic granules [J]. ISME Journal, 2014,8(6):1186−1197.

[28] 高珊珊,解冰瀚,耿明月,等.粉态硫自养反硝化膜生物反应器(p−SMBR)的优化调控:水力停留时间和膜通量的影响 [J]. 环境工程学报, 2024,18(6):1604−1613.
Gao S S, Xie B H, Geng M Y, et al. Optimal regulation of powdered sulfur autotrophic denitrification membrane bioreactor (p−SMBR): The influence of hydraulic retention time and membrane flux [J]. Journal of Environmental Engineering, 2024,18(6):1604−1613.

[29] Dong S, Yan X, Li W, et al. Macroscopic Zn−doped α−Fe_2O_3/graphene aerogel mediated persulfate activation for heterogeneous catalytic degradation of sulfamonomethoxine wastewater [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2022,108:254−262.

[30] Wang R, Zhang X, Yang S, et al. Enhanced nitrogen removal driven by S/Fe2+ cycle in a novel hybrid constructed wetland [J]. Journal of Cleaner Production, 2023,426:139113.

[31] Zhou H, Xu G. Biofilm characteristics, microbial community structure and function of an up−flow anaerobic filter−biological aerated filter (UAF−BAF) driven by COD/N ratio [J]. Science of the Total Environment, 2020,708:134422.

作者简介：黄凯文(1999−),男,东苏苏州人,硕士研究生,主要研究方向废水处理工程.发表论文 2 篇.6221402077@stu.jiangnan.edu.cn.