张宗磊,赵 骥,陈啸洋,等.中温下短程反硝化-厌氧氨氧化生物膜工艺脱氮特性研究 [J]. 中国环境科学, 2025,45(9):4955-4964.
Zhang Z L, Zhao J, Chen X Y, et al. Characteristics of nitrogen removal by partial denitrification-anammox biofilm process (PDA-Bf) at mesophilic temperature [J]. China Environmental Science, 2025,45(9):4955-4964.

中温下短程反硝化-厌氧氨氧化生物膜工艺脱氮特性研究

张宗磊,赵 骥*,陈啸洋,邱艳玲,冯 娟,于德爽,王晓霞 (青岛大学环境与地理科学学院,山东 青岛 266071)

摘要：采用短程反硝化-厌氧氨氧化生物膜系统(PDA-Bf)处理模拟城市生活污水,重点探究其在中温条件(34℃)下的脱氮性能.经过 317d 的运行,结果表明,在进水碳氮比(C/N)为 2.1 的条件下,系统出水总氮(TN)浓度降低至 10.94mg/L,平均 TN 去除率达到 82.6%,且厌氧氨氧化途径在 TN 去除中的贡献占比随运行时间显著增加.研究发现,反硝化菌属 *Thauera* 和厌氧氨氧化菌属 *Candidatus* Brocadia 在生物膜中的丰度随运行时间显著提高,*Thauera* 从第 250d 0.37%增至第 305d 的 4.11%,*Ca.* Brocadia 从 0.27%的升至到 3.51%,二者协同效果良好.生物膜外层中编码硝酸盐还原的 *narG*(55152hits)、*narH*(35866hits)和 *narI*(16506hits)基因丰度较高,表明该区域适合反硝化菌生长,为厌氧氨氧化反应(Anammox)提供亚硝酸盐;与外层相比,生物膜内层中与 Anammox 相关的 *hdh*(1174hits)基因丰度较高,且亚硝酸盐还原基因 *nirK*(13400hits)和 *nirS*(3954hits)丰度较低,维持了较高的亚硝酸盐浓度,为厌氧氨氧化菌(AnAOB)创造了适宜环境.这种微生物群落的分层结构表明,生物膜外层和内层分别适合 *Thauera* 和 *Ca. Brocadia* 的生长,共同促进了系统的高效脱氮性能.

关键词：短程反硝化；厌氧氨氧化；生物膜；生物脱氮；微生物；宏基因组
中图分类号：X703 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)09-4955-10

Characteristics of nitrogen removal by partial denitrification-anammox biofilm process (PDA-Bf) at mesophilic temperature.

ZHANG Zong-lei, ZHAO Ji*, CHEN Xiao-yang, QIU Yan-ling, FENG Juan, YU De-shuang, WANG Xiao-xia (Department of College of Environmental and Geographical Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, China). *China Environmental Science*, 2025,45(9)：4955~4964

Abstract: This study employed a partial denitrification-Anammox biofilm system (PDA-Bf) to treat simulated municipal wastewater, with a focus on exploring its nitrogen removal performance under mesophilic conditions (34℃). After 317 days of operation, the results indicated that under an influent carbon-to-nitrogen ratio (C/N) of 2.1, the total nitrogen (TN) concentration in the effluent was reduced to 10.94mg/L, with an average TN removal rate of 82.6%. Moreover, the contribution of the Anammox pathway to TN removal significantly increased over time. The study found that the abundances of the denitrifying genus *Thauera* and the anammox genus *Candidatus* Brocadia in the biofilm significantly increased with operation time. *Thauera* increased from 0.37% on day 250 to 4.11% on day 305, and *Ca.* Brocadia rose from 0.27% to 3.51%. The two genera worked well in synergy. The outer layer of the biofilm had a high abundance of genes encoding nitrate reduction, such as *narG* (55152hits), *narH* (35866hits), and *narI* (16506hits), indicating that this area was suitable for the growth of denitrifying bacteria and provided nitrite for the Anammox reaction. In contrast, the inner layer of the biofilm had a higher abundance of the Anammox-related *hdh* gene (1174hits), and lower abundances of nitrite reduction genes *nirK* (13400hits) and *nirS* (3954hits), maintaining a higher nitrite concentration and creating a suitable environment for Anammox bacteria (AnAOB). This stratified microbial community structure suggests that the outer and inner layers of the biofilm are respectively suitable for the growth of *Thauera* and *Ca.* Brocadia, jointly promoting the efficient nitrogen removal performance of the system.

Key words: partial denitrification; anammox; biofilm; biological nitrogen removal; microorganisms; metagenomics

厌氧氨氧化(Anammox)作为一种新兴的生物处理技术,近年来在废水处理领域逐渐受到关注,其具有实现高效且可持续的氮去除潜力[1].厌氧氨氧化细菌(AnAOB)能在无氧条件下,以亚硝酸盐(NO_2^--N)为电子受体,将氨氮(NH_4^+-N)直接转化为氮气(N_2),且无需依赖溶解氧(DO)和外加有机碳源[2-3].然而,在实际应用中,稳定生成 NO_2^--N 是一个关键挑战.短程硝化(NH_4^+-N→NO_2^--N)在低氨氮浓度和低温操作条件下难以有效调控,而短程反硝化(PD)则能够更稳定地提供 NO_2^--N,同时减少温室气体一氧化

收稿日期：2025-02-08
基金项目：国家自然科学基金项目(42477138,52070106);山东省自然科学基金项目(ZR2023QE134);山东省高等学校青创团队引育计划(城镇污水高效治理与资源化利用研究团队)
* 责任作者, 副教授, zhaoji@qdu.edu.cn

二氮(N_2O)的生成[4-5].此外,通过外部碳源将 Anammox 过程中产生的硝酸盐(NO_3^--N)转化为 NO_2^--N,可进一步提升系统效率[6].将 PD 与 Anammox 耦合应用于城市污水处理时,在异养反硝化菌和自养厌氧氨氧化菌的协同作用下,短程反硝化-厌氧氨氧化(PDA)工艺能够同步去除氨氮和硝氮,并降低化学需氧量(COD)[7-8].

温度是制约 Anammox 技术应用的关键因素之一,因其在污水处理厂中难以实现人工精准控制[9].以往研究表明,高温条件有利于厌氧氨氧化细菌的生长,这使得该技术在低温地区的广泛应用面临挑战.然而,国内已有研究显示,我国西北某市政污水处理厂的缺氧移动床生物膜反应器(MBBR)在 10.7~25.2℃的中低温条件下成功实现了 PD 驱动的 Anammox 过程,表现出稳定的氮去除能力[10].国外相关研究也表明,在 10~20℃的温度区间内,PDA 工艺能够保持较高的氮去除效率[11].相比之下,中高温条件下的 PDA 研究更关注提高反应速率和稳定性,尤其是在高温环境下增强细菌的活性.因此,探究温度变化对 PDA 系统的影响具有重要的研究价值.

PDA 工艺在实验室和中试规模的研究中已展现出显著脱氮优势[6].当前研究多集中于 20~25℃的室温区间或 10~15℃的低温环境[12],针对 30℃以上中高温条件的系统研究明显不足.虽然短程反硝化-厌氧氨氧化一体化生物膜工艺(PDA-Bf)在低温(<20℃)条件下的稳定性已被证实[12],但基于北温带地区(如我国华北平原)全年水温监测数据,25~35℃中高温段实际覆盖全年时长的 70%以上[13],其中夏季主导水温可达(34±2)℃.为完善该工艺在实际水温条件下的运行理论,本文在 34℃恒温条件下运行 PDA-Bf 反应器,重点探究:反硝化与 Anammox 对脱氮的贡献动态;功能基因(*narG*、*hdh*、*hzs*)的丰度变化规律;微生物群落(如 *Candidatus* Brocadia 与 *Thauera*)的结构响应特征.通过宏基因组学解析了中高温环境特异的氮代谢途径重组现象,为提升污水处理厂在中高温情况下的脱氮效能提供了基于实际工况的运行参数优化方案.

1 材料与方法

1.1 反应器及操作条件

实验采用工作容积为 6L,有效容积为 5L 的序批式(SBR)反应器,配备机械搅拌装置进行充分混合,外壁设置进水口、出水口与取样口.反应器顶部加盖以确保溶解氧(DO)浓度低于 0.1mg/L 以保持反应器内部缺氧状态.为了利于 Anammox 富集采用封闭遮光运行模式,并配备加热棒以维持反应器内温度在 34℃左右.

反应器共运行 317d,每天运行 2 个周期,每个运行周期包括:进水(5min)、缺氧反应(360min)、沉淀(120min)、出水(5min)、静置(230min).在每个周期反应器进水量与出水量都为 3L,体积交换比(Volumetric Exchange Ratio,VER)为 1.试验进行期间不进行曝气.根据反应器运行情况,可将整个运行过程分为两个阶段,为恢复阶段(第 1~66d)和稳定阶段(第 67~316d).

1.2 废水组成和接种生物膜

本试验过程中用水均为人工合成废水模拟城市污水,试验过程中根据需要随时调节合成废水成分与浓度.进水 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 维持分别在 60mg/L 和 70mg/L.废水成分包括 NH_4Cl、$CaCl_2$、KH_2PO_4 和微量元素溶液Ⅰ、Ⅱ.详细微量元素浓度见表 1.配制 COD 溶液作为有机碳源,与进水桶分开投加,保证初始浓度在 150mg/L 左右.

采用运行 1 年多的短程反硝化-厌氧氨氧化生物膜系统,载体为边长 2cm 的立方体聚氨酯填料,总体积为 1L,具有一定的脱氮性能.

表 1 微量元素配方

Table 1 The composition of the trace element solutions

类别	化合物	浓度(g/L)
微量元素Ⅰ	$FeSO_4·7H_2O$	5
	EDTA	5
微量元素Ⅱ	$MnCl_2·4H_2O$	0.99
	$CuSO_4·5H_2O$	0.25
	$ZnSO_4·7H_2O$	0.43
	$NiCl_2·6H_2O$	0.19
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}·4H_2O$	0.16
	$CoCl_2·6H_2O$	0.24
	$Na_2SeO_3·5H_2O$	0.16
	H_3BO_3	0.01
	$FeSO_4·7H_2O$	1
	EDTA	15

1.3 计算

利用公式(1),(2)计算 Anammox 和反硝化对总氮(TN)去除的贡献百分比[14]:

$$\text{Anammox}(\%)=(1+1.32-0.26)\times\frac{[NH_4^+-N_i]-[NH_4^+-N_e]}{TN_i-TN_e}\times100\% \quad (1)$$

$$\text{Denitrification}(\%)=100\%-\text{Anammox}(\%) \quad (2)$$

利用公式(3),(4)计算总氮去除率 TNremoval efficiency,氨氮去除率 Ammonia removal efficiency (ARE)(%):

$$\text{TN removal efficiency}(\%)=\frac{TN_i-TN_e}{TN_i}\times100\% \quad (3)$$

$$\text{ARE}(\%)=\frac{NH_4^+-N_i-NH_4^+-N_e}{NH_4^+-N_i}\times100\% \quad (4)$$

利用公式(5)计算总氮容积负荷 NTR(%)[15]:

$$\text{NTR}(\%)=\frac{NO_2^--N_e+1.32\cdot(NH_4^+-N_i-NH_4^+-N_e)}{NO_3^--N_i+0.26\cdot(NH_4^+-N_i-NH_4^+-N_e)-NO_3^--N_e} \quad (5)$$

式中:NH_4^+-N_i 和 NH_4^+-N_e 分别表示进水氨氮浓度和出水氨氮浓度,mg/L;TN_i 和 TN_e 分别表示进水 TN 浓度和出水 TN 浓度,mg/L;NO_3^--N_i 和 NO_3^--N_e 分别表示进水硝氮浓度和出水硝氮浓度,mg/L;NO_2^--N_e 表示出水亚硝浓度,mg/L.

1.4　分析方法

化学分析前,采集的样品均经 0.45μm 滤纸过滤.NH_4^+-N、NO_2^--N 和 NO_3^--N 采用紫外分光光度计(UV-5200)分析,按照标准方法(APHA,2012)进行测定.其中,NH_4^+-N 按照"4500-NH3F.酚盐 Method"的方法进行分析;NO_2^--N 的测定采用"4500-NO_2-B.比色法";NO_3^--N 按照"4500-NO_3-B.紫外分光光度法筛选法"进行分析.COD 采用(联华科技.中国 5B3A 股份有限公司)快速分析仪,按照"5200-COD.封闭回流比色测定法"进行分析.

1.5　微生物分析

本试验采用的 16SrRNA 高通量测序技术分别对实验第 250d 与 310d 系统内微生物群落进行测序,以分析微生物群落结构与数量变化情况.微生物样品从不同时期随机选择的填料上获取.各样品 DNA 的提取参照前期研究的方法.用 338F/806R 引物扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区.纯化后的扩增子在上海美吉生物医药科技有限公司 Illumina Mi Seq PE300 平台(美国 Illumina 公司)上进行[16].

宏基因组测序被用于揭示硝酸盐还原途径以及功能细菌与反硝化相关基因之间的关系.生物膜样品采集自反应器中的载体,在第 310d 对载体进行环状切割,将其分为核心区域与四周区域(图 1).宏基因组测序委托由上海美吉生物科技公司进行,具体测定流程如下:DNA 的提取使用 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit(Omega Bio-tek,美国)试剂盒进行,完成基因组 DNA 抽提后,利用 TBS-380 检测 DNA 浓度;将 DNA 片段化,筛选约 400bp 的片段,用于构建 PE 文库;使用 Illumina NovaSeq 测序平台进行宏基因组测序,原始数据已提交至 NCBI(序列号:PRJNA1256655).

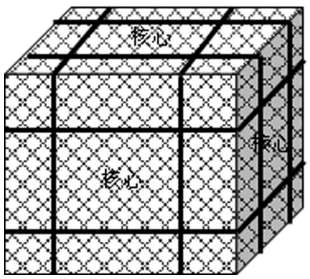


图 1　填料切割分布情况

Fig.1　Filler cutting distribution

2　结果与讨论

2.1　中温条件下 PDA-Bf 反应器的长期脱氮性能

PDA-Bf 系统在中温条件下长期运行 317d.反应器 C/N 维持在 2.1 左右,进水 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 浓度为 60mg/L、70mg/L,COD 在反应器初始浓度为 150mg/L.NLR 维持在 0.15±0.02kg/(m^3·d).图 1 显示的是系统氨氮去除情况,图 2 显示的是系统硝氮和亚硝去除情况,图 3 是系统氮去除贡献与 TN 去除情况.

在恢复阶段(第 1~66d),出水 NO_3^--N 浓度保持在 6~10mg/L,NO_3^--N 去除率维持在 85.5%,同时 NTR 缓慢上升,在第 66d 升高至 48.2%,这表明 PDA-Bf 系统仍具有足够的 PD 活性将 NO_3^--N 转化为 NO_2^--N.期间,出水 NO_3^--N 浓度稳定维持在一个较低的水平.在该阶段进水 NH_4^+-N 浓度比较稳定的情况下,出水 NH_4^+-N 浓度波动较大,维持在 20~30mg/L;但在总体看来,氨氮去除率是缓慢提升的,在第 66d 氨氮去除率达到 59.7%.此外,TN 去除率在恢复阶段波动也较为剧烈,其趋势是逐渐上升,在第 66d 到达 75.1%,出水 TN 为 33.18mg/L,说明脱氮效

果在逐渐提高.在第 66d,Anammox 途径在 TN 去除贡献中占比达到 64.7%,这表明 Anammox 与 PD 这两种脱氮途径相互配合,PD 过程为 Anammox 提供了所需的 NO_2^--N,而 Anammox 进一步促进了氮素的转化和去除.这种协同作用不仅提高了脱氮效率,降低了运行成本,还增强了系统的稳定性和抗冲击性[17].

在稳定阶段(第 67~317d),出水 NO_3^--N 浓度逐渐降低,在第 317d 出水 NO_3^--N 浓度降低至 4.77mg/L,平均 NO_3^--N 去除率为 89.4%.在此阶段,NTR 呈现出稳步上升趋势,在第 317d 到达 83.9%,期间 NTR 平均值为 68.0%,与恢复阶段(NTR 平均值为 39.2%)相比有巨大提升,表明 PD 性能越来越强.这一现象说明在长期运行过程中,系统通过微生物群落的适应和优化,逐步提高了 PD 效率,使得亚硝酸盐的积累和转化能力显著增强[18].出水 NH_4^+-N 浓度从 23.3mg/L(第 67d)持续降低到 5.88mg/L(第 317d),平均 NH_4^+-N 去除率为 81.4%,原因在于随着反应器的运行 AnAOB 慢慢适应中温条件的环境.出水 TN 浓度也逐渐降低,从第 67d 的 30.2mg/L,降低至第 317d 的 11.7mg/L,期间 TN 去除率最高达到 91.5%,与恢复阶段相比较,脱氮性能进一步提高.在稳定阶段,Anammox 途径在 TN 去除中所做贡献在试验前期提升明显,后期维持在一个比较稳定的水平,在整个稳定阶段平均 Anammox 途径在 TN 去除中贡献占比为 81.5%,PD 工艺产生的 NO_2^--N 绝大部分被 Anammox 工艺消耗,进一步说明了 PD 和 Anammox 之间的协同作用机制[19].

2.2 不同典型周期 PD 和 Anammox 协同作用下的脱氮性能

为了进一步探究 PDA-Bf 反应器的脱氮性能,对比分析了第 110d,第 249d 和第 310d 3 个典型周期内 NH_4^+-N、NO_3^--N、NO_2^--N 和 COD 在缺氧段的变化规律(经过多次试验发现,在沉淀阶段,由于搅拌停止,反应器内的微生物几乎不发生生化反应,图 5).

在长期保持中温、进水浓度几乎不变的条件下,第 110d 和第 249d 以及第 310d,反应器反应一个周期分别消耗了 56.09mg/L、58.23mg/L 和 61.39mg/L 的 NO_3^--N.并且在 3 个典型周期中,当反应 60min 时其 NO_2^--N 浓度分别为 14.6mg/L、19.8mg/L 与 23.1mg/L,并且在第 310d 的典型周期中,当反应 90min 时 NO_2^--N 浓达到了度 26.9mg/L.这表明在这 3 个典型周期中,生成 NO_2^--N 的速率与最大浓度都有明显提升.说明在长期保持中温条件的情况下,反应器内的反硝化菌可以维持良好的 PD 性能,为 Anammox 提供足够的 NO_2^--N[20].

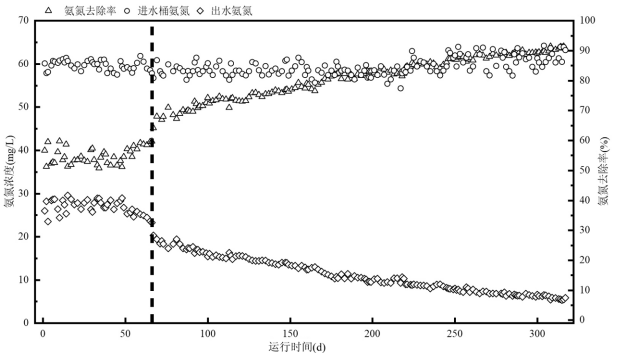


图 2 系统氨氮去除情况

Fig.2 System ammonia-nitrogen removal

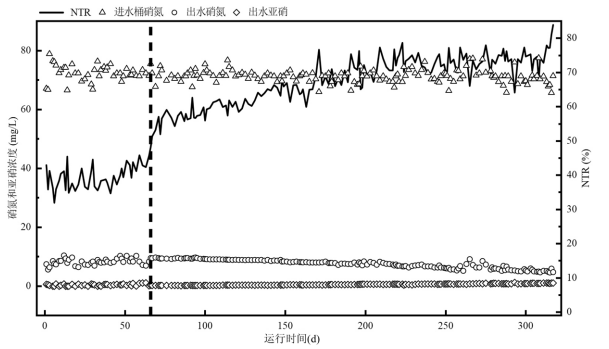


图 3 系统硝氮和亚硝去除情况

Fig.3 System nitrate and nitrite removal

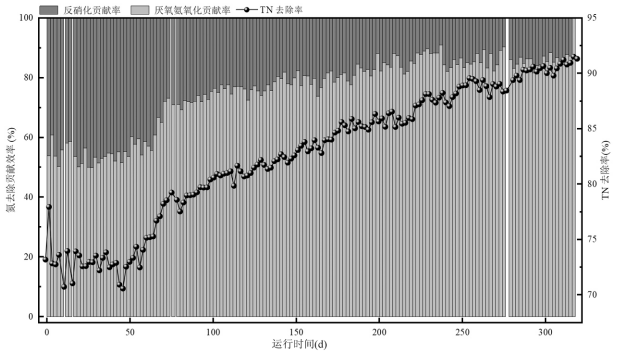


图 4 系统氮去除贡献与 TN 去除情况

Fig.4 System nitrogen removal contribution and TN removal

与之对应的是,在第 110d 和第 249d 以及第 310d,反应器内 NH_4^+-N 浓度分别消耗了 38.77、41.61、44.0mg/L,NH_4^+-N 去除率分别为 69.7%、84.1%以及 88.1%.Anammox 性能的逐渐提高与 PD 段稳定提供足

够的 NO_2^--N 密切相关.在这三个不同的典型周期里,TN 的去除率分别为 78.2%、87.3%和 90.7%,说明在中温条件下,PD 和 Anammox 之间可以保持良好的协同作用.此外,Anammox 对脱氮的贡献率分别为 84.3%、86.1%和 85.3%.这说明当 Anammox 在一个可以稳定提供 NO_2^--N 的环境时,Anammox 性能比较稳定,可以将 PD 生成的 NO_2^--N 全部用于 Anammox 反应,并且 Anammox 活性可以随着 NO_2^--N 的增多而变强,消耗更多的 NH_4^+-N[21].

2.3　稳定中温条件下微生物群落变化分析

2.3.1　细菌群落多样性和丰富度的变化　为了进一步研究在中温条件下 PDA-Bf 反应器中的脱氮性能,对细菌群落进行了高通量测序分析.对第 250d、第 305d 采集的生物载体上的样品进行分析.2 个样品的覆盖率均大于 0.99,表明测序深度的结果可以代表整个细菌群落(表 2).

表 2　污泥样本微生物群落丰富度与多样性

Table 2　The richness and diversity of microbial communities in sludge samples

时间(d)	Ace	Chao	Shannon	Simpson	Coverage
250	924.829	914.422	4.656	0.023	0.999
305	958.204	947.066	4.872	0.020	0.999

Ace 指数和 Chao 指数反映了反应器的物种丰富度.Ace 指数在载体上由第 250d 的 924.829 上升至第 305d 的 958.204,Chao 指数在生物载体上由 914.422 上升至 947.066.这表明长期中温条件的运行使生物载体群落丰富度变得更高,这说明中温条件有利于微生物群落的增殖.Shannon 和 Simpson 指数代表了反应器内物种的多样性.Shannon 指数在载体上由第 250d 的 4.656 略微上升至第 305d 的 4.872,Simpson 指数在生物载体上由 0.023 略微下降至 0.020.这说明在中温条件运行的 PDA-Bf 反应器中的生物载体上的微生物种群有一个较为稳定的繁殖环境,不易受到外界的干扰,保持群落的多样性稳定.

2.3.2　功能微生物群落在中温条件下的变化　在两个样品中,絮体中的微生物群落在门水平上没有显著变化(图 6).生物载体上的优势菌门分别是绿弯菌门(Chloroflexi)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、酸杆菌门(Acidobacteriota)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)、MBNT15 和浮游菌门(Planctomycetota),其中 Chloroflexi 由第 250d 的 22.3%的相对丰度下降到第 305d 的 18.2%, Proteobacteria 从 20.2%上升到 29.2%, MBNT15 从 6.71%下降到 2.45%,Planctomycetota 从 4.46%上升至 7.59%Bacteroidota、Acidobacteriota 和 Verrucomicrobiota 的相对丰度比较稳定,变化较小.

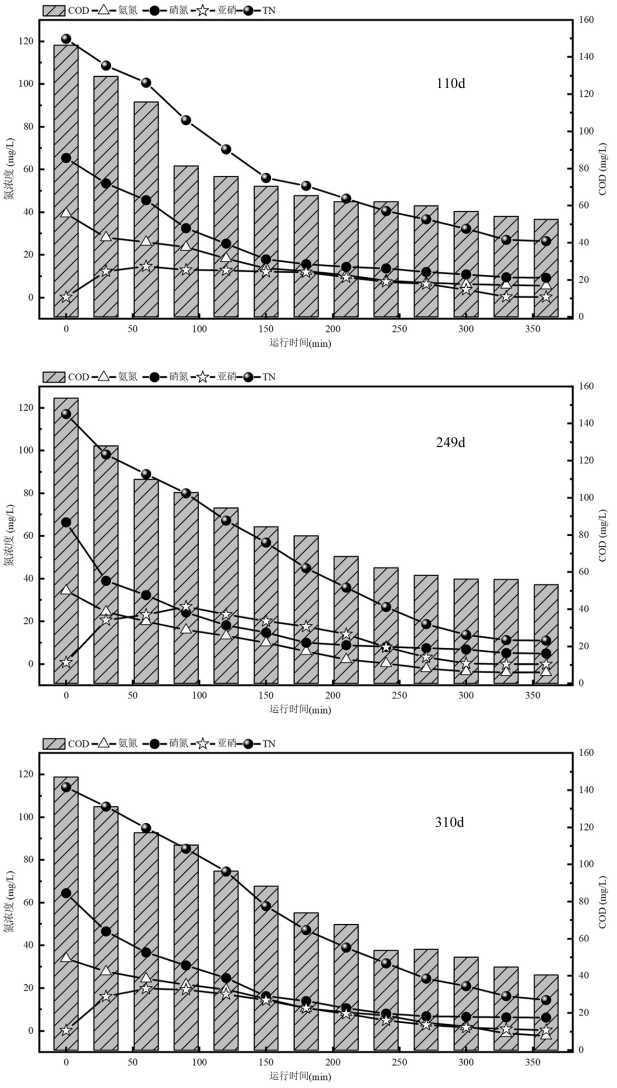


图 5　第 110, 249, 310d 系统全周期情况

Fig.5　Variations of nutrients (NH_4^+-N, NO_2^--N, NO_3^--N, and COD) in 3 typical cycles

反应器后期 PD 与 Anammox 的协同作用良好,与 Proteobacteria 和 Planctomycetota 密切相关. Proteobacteria 是由反硝化细菌组成,通常被报道为污水处理系统中的优势菌门,其相对丰度的增加表明了菌群反硝化能力的加强,而所有的 AnAOB 都属于 Planctomycetota,其相对丰度的增加表明了菌群

的 Anammox 能力加强[22].

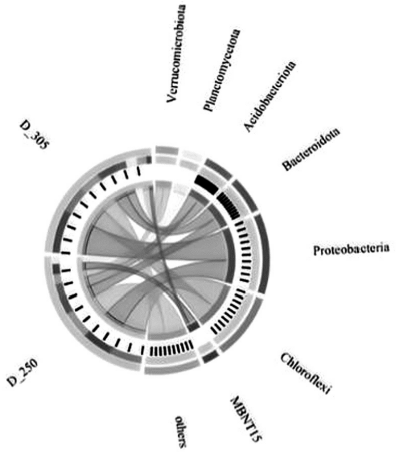


图 6 门水平的微生物分类组成

Fig.6 Microbial taxonomic compositions at phylum level

在众多微生物属中(图 7),固氮螺旋菌属(*Azospira*)作为传统的反硝化菌属备受关注[23].它在生物膜上占比较多,在 D_250 样本中的相对丰度为 2.81%,在 D_305 样本中的相对丰度为 2.93%,表明其在生物膜的反硝化过程中扮演重要角色. *Denitratisoma*、*Ignavibacterium*、陶厄氏菌(*Thauera*)和 *Candidatus* Competibacter 同样是反应器生物膜上相对丰度较高的菌属.其中,*Denitratisoma* 在 D_250 样本中的相对丰度为 1.76%,在 D_305 样本中升至 3.02%;*Ignavibacterium* 在 D_250 样本中的相对丰度为 2.04%,在 D_305 样本中为 2.64%;*Thauera* 在 D_250 样本中的相对丰度较低,仅为 0.38%,但在 D_305 样本中显著增加至 4.11%;*Ca.* Competibacter 在 D_250 样本中的相对丰度为 1.143%,在 D_305 样本中为 1.38%.在 Anammox 方面,仅发现了 *Candidatus* Brocadia 这一常见的 AnAOB 菌属[22].它在 D_250 样本中的相对丰度较低,为 0.27%,而在 D_305 样本中相对丰度大幅提升至 3.51%,说明其在中温条件长期运行的 PDA−Bf 反应器中稳定增长发挥良好的脱氮作用.此外,像 *norank f A4b* 在 D_250 样本中的相对丰度为 9.32%,在 D_305 样本中为 5.23%,是相对丰度较高的微生物属之一;norank f Saprospiraceae 在 D_250 样本中的相对丰度为 2.93%,在 D_305 样本中为 3.97%.这些数据反映出不同微生物属在两个样本中的分布和丰度变化,为研究生物膜微生物群落结构和功能提供了详细的信息[24].

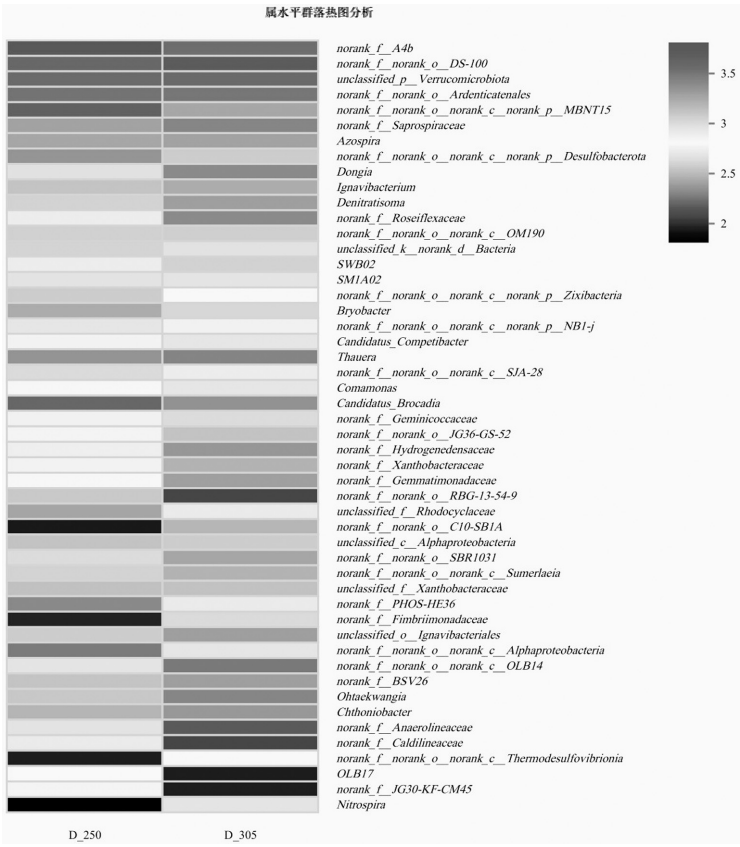


图 7 属水平的微生物分类组成

Fig.7 Microbial taxonomic compositions at the genus level

对两个实验样本中的反硝化、Anammox 优势菌属进行差异性对比分析(图 8).

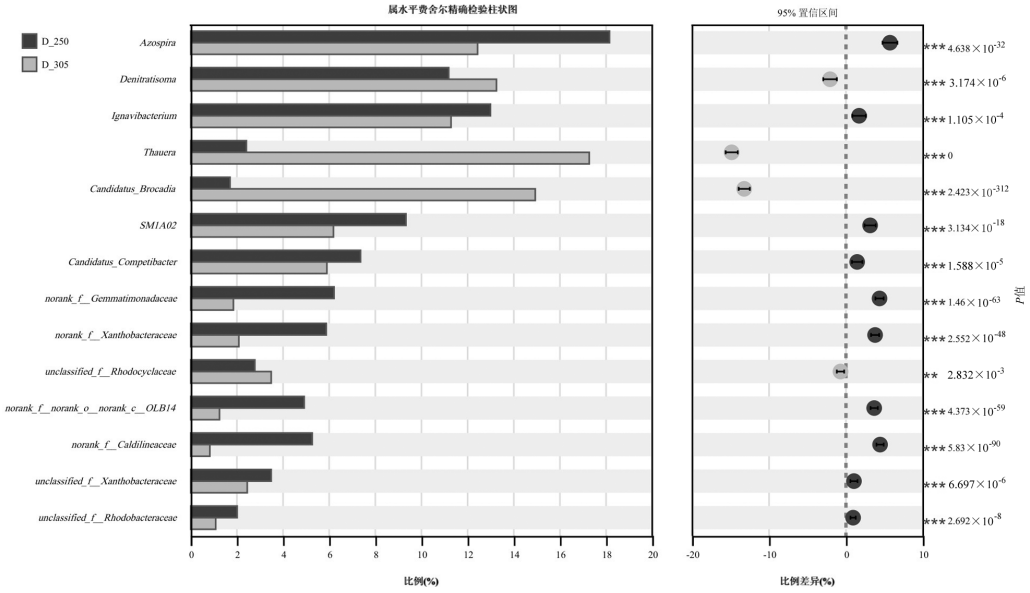


图 8　属水平功能菌差异性分析

Fig.8　Analysis of differential functional bacteria at the genus level

Thauera 从第 250d0.37%的相对丰度成长到第 305d 的 4.11%.*Thauera* 是一种典型的反硝化菌,广泛存在于各类污水生物处理工艺[25].*Thauera* 相对丰度的增加,说明其在适应中温条件下的反应器环境[26],反应器的反硝化效果增强,通过对比分析 3 个典型周期的反硝化效果,可以看出反硝化速率的逐渐提升.其他反硝化优势菌属 A*zospira*、*Denitratisoma*、*Ignavibacterium*、*Ca.* Competibacter 在中温条件下 PDA-Bf 反应器中比较稳定,保持着比较稳定的反硝化效果.*Ca.* Brocadia 是一种活跃在生物膜中的厌氧氨氧化菌属,具有较好的自养脱氮能力[27],随着实验的进行,观察到 *Ca.* Brocadia 从 0.27%的相对丰度增加到 3.51%,为反应器提供了良好的脱氮环境.*Thauera* 的增长为 Anammox 提供了充足的亚硝酸盐,使 *Ca.* Brocadia 获得了良好的生存条件,进而其相对丰度逐渐增加,两者具有较好的协同作用.相对应的是,后期反硝化和 Anammox 之间的良好的协同能力来起到脱氮作用[6],使中温条件下 PDA-Bf 反应器脱氮效果逐渐变强.

2.4　生物膜内、外层微生物和基因组分析

2.4.1　生物膜内、外层微生物空间分布　为了从微生物角度了解生物膜内、外层功能菌的富集情况,对载体进行环状切割,将其分为核心区域与四周区域(图 1).通过宏基因组分析鉴定了生物膜内、外层属水平的细菌群落(图 9).宏基因组分析显示,在生物膜外层 *Thauera* 的拷贝数为 12677996,是外层最多的菌属,相对丰度为 11.1%而在生物膜内层,其拷贝数为 491242,相对丰度为 1.05%.*Thauera* 在 PD 中发挥着重要作用.生物膜外层的 *Thauera* 数量显著高于内层,表明其更倾向于吸附于填料表面以快速获取碳源[28],而碳源向填料内部的传递存在一定滞后性,因此外层吸附的 *Thauera* 数量更多.有利于反应器中亚硝酸盐的快速积累,PD 的持续发生.

无论是在填料内部还是表面,*Ca.* Brocadia 被鉴定为拷贝数最多的 AnAOB 菌属,对 Anammox 反应有重要作用.*Ca.* Brocadia 在填料表面拷贝数为 1070412,相对丰度为 0.94%,在填料内部拷贝数为 914194,相对丰度为 1.95%.*Ca.* Brocadia 在填料内部的相对丰度高于填料表面,说明环境相对稳定,受到扰动较小的填料内部更适合 *Ca.* Brocadia 的生存,在与其他菌群竞争时更易取得优势[29].在整个生物膜上 *Thauera* 为 *Ca.* Brocadia 提供足够的亚硝酸盐进行 Anammox 反应,这种相互配合可以更快更好地完成生物脱氮.

2.4.2　生物膜内外层氮代谢功能基因分析　为了探究生物膜内、外层的氮代谢途径,通过宏基因组测序分析确定了必需的反硝化基因和 Anammox 基因(图 10).在生物膜外层,编码硝酸盐还原的基因有

(*napG* 55152hits,*napH* 35866hits,*napI* 16506hits, *napA* 15922hits,*napB* 4732hits,*napC* 9596hits,*narB* 3204hits),它们负责亚硝酸盐的生成.编码 Cu-containing 亚硝酸还原酶(*nirK* 25318hits)和 Cytochromecd1 亚硝酸还原酶(*nirS* 24046hits)的基因对亚硝酸盐呼吸至关重要.相对较高的 *nirK* 和 *nirS* 丰度会促进亚硝酸盐进一步消耗.检测到编码一氧化氮还原酶(*norB* 30332hits,*norC* 6654hits)和一氧化二氮还原酶(*nosZ* 28114hits)的基因[30].这有助于避免中间产品(NO 和 N_2O)的积累.检测到与 Anammox 反应有关的的基因(*hdh* 610hits),促进了 PD 与 Anammox 的反应.

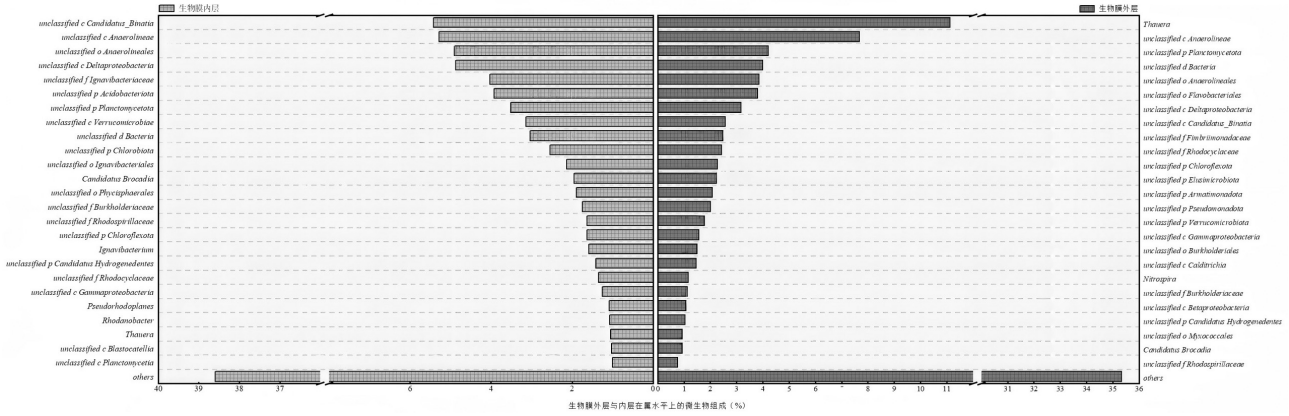


图 9 生物膜外层与内层在属水平上的微生物组成

Fig.9 Microbial composition at the genus level of the outer and inner layers of biofilm

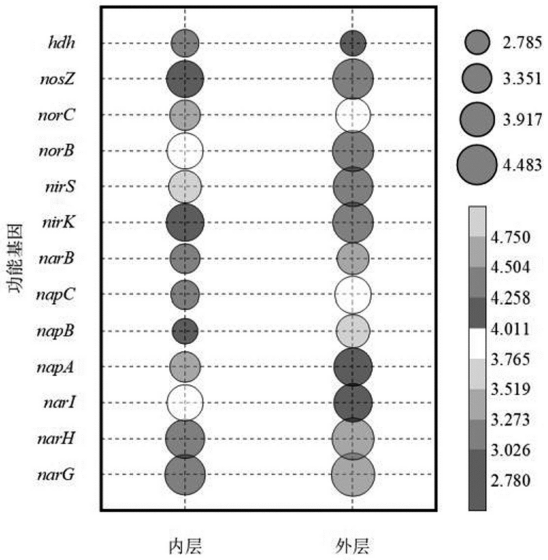


图 10 生物膜外层与内层功能基因对比

Fig.10 Comparison of functional genes in the outer and inner layers of biofilm

在生物膜内层,编码硝酸盐还原的基因有(*napG* 26700hits, *napH* 19550hits, *napI* 9706hits, *napA* 2252hits, *napB* 674hits, *napC* 1312hits, *narB* 1698hits),与生物膜外层编码硝酸盐还原的基因丰度相比有所减少,说明了在中温条件的 PDA-Bf 反应器中含有硝酸盐还原基因的菌属主要存在于生物膜外层进行硝酸盐的还原[31].同时,编码 Cu-containing 亚硝酸还原酶(*nirK* 13400hits)和 Cytochromecd1 亚硝酸还原酶(*nirS* 3954hits)的基因在生物膜内、外层丰度差别较大,外层基因的丰度分别是内层的 1.9 和 6.1 倍.这说明在生物膜内层更容易保留从硝酸盐还原的亚硝酸盐,维持较多的亚硝酸盐,更有利于 Anammox 反应的发生.检测到编码一氧化氮还原酶(*norB* 10014hits,*norC* 2220hits)和一氧化二氮还原酶(*nosZ* 11340hits)的基因,生物膜内层少于外层的丰度,可以减少中间产物的积累.在生物膜内层检测到与 Anammox 反应有关的的基因(*hdh*1174hits),相较于外层的丰度较多.内层亚硝酸盐含量较高,且编码亚硝酸还原基因的菌属较少,这种环境更有利于 AnAOB 的生存,因此聚集了更多的 AnAOB[32].生物膜内层相较于外层能够更高效地进行 PDA 反应,这得益于内层菌属所受环境扰动较小,从而能够更稳定地附着并进行反应.

2.4.3 生物膜内外层氮代谢基因与功能细菌分析

为了更好地了解 PD 与 Anammox 之间的协同脱氮机理,分析了系统中与氮代谢相关功能菌中的功能基因的丰度的差异(图 11).主要的反硝化细菌 *Thauera* 主要存在于生物膜外表面,其中可以将 NO_3^--N 还原为 NO_2^--N 的 *narG*、*narH*、*narI* 和 *napC* 基因含量分别为 5350hits、6324hits、1352hits 和

4856hits,可以将 NO_2^--N 还原为 NO 的 *nirK* 和 *nirS* 基因含量总量低于 *narG*、*narH*、*narI* 和 *napC*,分别为 2134hits 和 9128hits.而在生物膜内层与 NO_3^--N 还原为 NO_2^--N 的基因含量远远低于生物膜外层,这在基因水平上证明反应器中可以在生物膜外层实现稳定的 PD 效果[33].其中,作为优势 AnAOB 菌属,*Ca.* Brocadia 中 *hdh* 基因通过调节氢化酶的活性,帮助 Anammox 细菌在缺氧或厌氧环境中更有效地利用

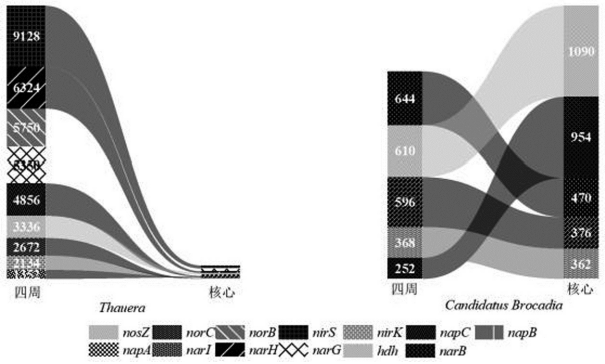


图 11　生物膜外层与内层氮代谢基因在 Thauera 与 *Ca.* Brocadia 中的分布

Fig.11　Distribution of nitrogen metabolism genes in the outer and inner layers of biofilm in Thauera and *Ca.* Brocadia

氢气,提高氮的去除效率.*hdh* 基因在 Anammox 过程中的作用与细菌的能量代谢、电子传递以及氢气利用密切相关[34].尽管目前研究尚未完全阐明 *hdh* 基因在这一过程中的具体机制,但其通过增强电子传递和提供额外能量来源,已表现出提高 Anammox 细菌代谢效率的作用[35].在样本中,*hdh* 的丰度在生物膜外层与内层有较为明显的差异.在生物膜内层 *hdh* 基因的丰度达到 1090hits,而在生物膜外层只有 610hits.这从基因水平进一步说明,系统中的 Anammox 主要在生物膜内层反应.此外,在 *Ca.* Brocadia 中含有和 NO_3^--N 还原相关的基因 *narG*、*narH* 和 *narB*,这说明在某些特定情况下,*Ca.* Brocadia 可以进行 NO_3^--N 还原,为 Anammox 提供 NO_2^--N[36].综上,在生物膜系统中,可以实现稳定的 PD 与 Anammox 反应,促进系统的高效脱氮.

3　结论

3.1　在 34℃中温条件下,PDA-Bf 反应器稳定运行 317d,进水 C/N 维持在为 2.1 左右,出水 TN 浓度降至 10.94mg/L,平均 TN 去除率达 82.6%,且 Anammox 贡献占比增加,表现出良好的脱氮性能.

3.2　在 317d 实验周期内,反硝化菌属 *Thauera* 和厌氧氨氧化菌属 *Ca.* Brocadia 的相对丰度显著增加,表明 PD 与 Anammox 的协同作用在微生物层面得到增强.

3.3　功能基因分析显示,生物膜外层硝酸盐还原基因(*narG*、*narH*、*narI*)丰度高,为 Anammox 提供 NO_2^--N;内层亚硝酸盐还原基因(*nirK*、*nirS*)丰度低,维持高 NO_2^--N 浓度,且厌氧氨氧化关键基因(*hdh*)丰度高于外层,更利于 AnAOB 生长代谢.

3.4　生物膜结构中,*Thauera* 的硝酸盐还原基因(*narG*、*narH*、*narI*)在外层丰度高,主要负责 PD 过程;*Ca.* Brocadia 的厌氧氨氧化基因(*hdh*)在内层丰度高,这种分层布局提高了 PDA-Bf 工艺的脱氮效率.

参考文献:

[1] Van De Graaf A A, Mulder A, De Bruijn P, et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995,61(4):1246-1251.

[2] Kartal B, Maalcke W J, De Almeida N M, et al. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation [J]. Nature, 2011,479(7371):127-130.

[3] 唐喜芳,王雅歌,张　毅,等.厌氧氨氧化脱氮组合新工艺的研究进展,存在问题和展望 [J]. 中国水科学前沿, 2024,2(1):4-15.
Tang X F, Wang Y G, Zhang Y, et al. RongResearch progress,problems and future prospects of a new combined anaerobic ammonia oxidation and nitrogen removal process [J]. Frontiers of Chinese Water Sciences, 2024,2(1):4-15.

[4] 王淑莹,张静蓉,尚会来,等.生物膜同步硝化反硝化脱氮过程中 N_2O 的产生量及机理分析 [J]. 北京工业大学学报, 2011,37(9):1400-1406.
Wang S Y,Zhang J R,Shang H L, et al. The N_2O production and mechanism analysis of simultaneous nitrifcation and denitrification in biofilm reactor [J]. Journal of Beijing University of Technology, 2011,37(9):1400-1406.

[5] 周　晨,潘玉婷,刘　敏,等.反硝化过程中氧化亚氮释放机理研究进展 [J]. 化工进展, 2017,36(8):3074-3084.
Zhou C, Pan Y T, Liu M, et al. Advance of mechanism on N_2O emissions from biological denitrification [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2017,36(8):3074-3084.

[6] Fu J, Hou Z, Zhao H, et al. Enhanced nitrogen removal from low strength anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) permeate using complete nitrification and partial denitrification-anammox processes [J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2024,18(12):155.

[7] Fan Y, Zhang M, Li B, et al. Nitrogen degradation performance and microbial dynamic analysis for the efficient combination of partial denitrification and anammox (PD/a) process [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2024,12(2):112002.

[8] Tiku D K, Kumar A, Sawhney S, et al. Effectiveness of treatment

technologies for wastewater pollution generated by Indian pulp mills [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2007,132(1-3):453-466.

[9] Godzieba M, Florczyk M, Kowal P, et al. Impact of low temperature on bacterial community dynamics and process efficiency in anaerobic ammonia removal: A network analysis of metagenomic data [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2024,12(6):114661.

[10] Laureni M, Falas P, Robin O, et al. Mainstream partial nitritation and anammox: Long-term process stability and effluent quality at low temperatures [J]. Water Research, 2016,101:628-639.

[11] Zhao Q, Peng Y, Li J, et al. Pilot-scale implementation of mainstream anammox for municipal wastewater treatment against cold temperature [J]. Nature Communications, 2024,15(1):10314.

[12] Zhang T, Cao J, Zhang Y, et al. Achieving efficient nitrite accumulation in glycerol-driven partial denitrification system: Insights of influencing factors, shift of microbial community and metabolic function [J]. Bioresource Technology, 2020,315:123844.

[13] 陈俊江,张星星,王超超,等.新型短程反硝化耦合厌氧氨氧化工艺研究进展 [J]. 环境科学与技术, 2021,44(4):54-63.
Cheng J J, Zhang X X, Wang C C, et al. Research advances of novel partial denitrification coupled with anammox [J]. Environmental Science and Ecotechnology, 2021,44(4):54-63.

[14] Yu L, Zhang Q, Li R, et al. Extracellular polymeric substances trigger microbial immigration from partial denitrification (PD) to anammox biofilms in a long-term operated PD/anammox process in low-strength wastewater [J]. Water Research, 2023,229:119382.

[15] Xu D, Du R, Gao S, et al. Selective genes expression and metabolites transformation drive a robust nitrite accumulation during nitrate reduction under alternating feast-famine condition [J]. Water Research, 2024,255:121520.

[16] Desantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006,72(7): 5069-5072.

[17] Du R, Peng Y, Cao S, et al. Advanced nitrogen removal from wastewater by combining anammox with partial denitrification [J]. Bioresource Technology, 2015,179:497-504.

[18] 王秋颖,于德爽,赵 骥,等.Pd-dpr 系统处理城市污水与高硝酸盐废水实现稳定亚硝酸盐积累和磷去除的特性 [J]. 环境科学, 2020, 41(3):1384-1392.
Wang Q Y, Yu D S, Zhao J, et al. Stable nitrite accumulation and phosphorus removal from high-nitrate and municipal wastewaters in a combined process of partial denitrification and denitrifying phosphorus removal (PD-DPR) [J]. Environmental Science, 2020, 41(3):1384-1392.

[19] 李健伟,彭永臻,张 亮.主流城市污水部分厌氧氨氧化技术的研究与工程化应用 [J]. 给水排水, 2020,56(S2):5-9,16.
Li J W, Pen Y Z, Zhang L. Research and engineering application for mainstream municipal wastewater treatment with partial Anammox [J]. Water Supply and Drainage, 2020,56(S2):5-9,16.

[20] Wang G, Zhang D, Xu Y, et al. Comparing two start up strategies and the effect of temperature fluctuations on the performance of mainstream anammox reactors [J]. Chemosphere, 2018,209:632-639.

[21] Wang S, Zhang K, Miao Y, et al. The enhancement of anammox by graphene-based and iron-based nanomaterials in performance and mechanisms [J]. npj Clean Water, 2024,7(1):100.

[22] Witkabel P, Abendoth C. A systematic literature review of microbial anammox consortia in UASB/ EGSB-reactors [J]. Chemosphere, 2024,367:143630.

[23] Wu F, Zeng Z, Zhang W, et al. Functional bacteria and their genes encoding for key enzymes in hydrogen-driven autotrophic denitrification with sulfate loading [J]. Journal of Cleaner Production, 2024,440:140901.

[24] Ye L, Zhou Y, Tang L, et al. Analysis of the partial nitrification/ anammox performance and microbial structure of low C/N wastewater by A2/O process [J]. Water, 2023,15(12):2300.

[25] 杨 华,黄 钧,赵永贵,等.陶厄氏菌 Thauera sp. strain TN9 的鉴定及特性 [J]. 应用与环境生物学报, 2013,19(2):318-323.
Yang H, Huang J, Zhao Y G, et al. Identification and characteristics of Thauera sp. strain TN9 [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2013,19(2):318-323.

[26] Patel R J, Nerurkar A S. Thauera sp. for efficient nitrate removal in continuous denitrifying moving bed biofilm reactor [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2024,47(3):429-442.

[27] 毛 艳,郎锋祥,张 洁,等.红壤地下水厌氧氨氧化菌分布特征及环境响应 [J]. 微生物学报, 2024,64(6):1735-1746.
Mao Y, Lang F X, Zhang J, et al. Distribution characteristics and environmental responses of anammox bacteria in groundwater of red soil areas [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024,64(6):1735-1746.

[28] Ren T, Chi Y, Wang Y, et al. Diversified metabolism makes novel thauera strain highly competitive in low carbon wastewater treatment [J]. Water Research, 2021,206:117742.

[29] Kallistova A, Nikolaev Y, Grachev V, et al. New insight into the interspecies shift of anammox bacteria ca. “brocadia” and ca. “jettenia” in reactors fed with formate and folate [J]. Frontiers in Microbiology, 2022,12:802201.

[30] Zhang X, Huang C, Sui W, et al. Irons differently modulate bacterial guilds for leading to varied efficiencies in simultaneous nitrification and denitrification (SND) within four aerobic bioreactors [J]. Chemosphere, 2024,358:142216.

[31] Zhang T, Liu W, Liu G, et al. Metabolic characteristics and the cross-feeding of bacillus and ca. Brocadia in an integrated partial denitrification-anammox reactor driven by glycerol [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2024,12(1):111859.

[32] Wang H, Fan Y, Zhou M, et al. Metagenomics insight into the long-term effect of ferrous ions on the mainstream anammox system [J]. Environmental Research, 2023,238:117243.

[33] Zhang X, Miao Y, Yu D, et al. Culturing partial denitrification biofilm in side stream incubator with ordinary activated sludge as inoculum: One step closer to mainstream Anammox upgrade [J]. Bioresource Technology, 2022,347:126679.

[34] Zhen J, Wang Z, El-Baz A, et al. Immobilized exogenous electron shuttle-mediated anaerobic ammonia oxidation (anammox) process: Performance and mechanism [J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 495:153415.

[35] Zhang X, Al-Dhabi N A, Zhang X, et al. Activation of denitrification potential within anammox consortia to exceed nitrogen removal thresholds via fe-mn functionalized biochar: Enhanced interspecies electron transfer and metabolite cross-feeding [J]. Chemical Engineering Journal, 2024,497:154707.

[36] Okabe S, Shafdar A A, Kobayashi K, et al. Glycogen metabolism of the anammox bacterium “candidatus brocadia sinica”.[J]. The ISME journal, 2021,15(5):1287-1301.

作者简介：张宗磊(1999-),男,山东东营人,硕士研究生,主要研究方向为城市污水处理.zzl345345@163.com.