

闫冰, 聂含冰, 付嘉琦, 等. 长期运行厌氧氨氧化系统沿程不同形态污泥微生物群落结构及功能解析 [J]. 中国环境科学, 2025,45(2):1052-1062.

Yan B, Nie H B, Fu J Q, et al. Deciphering the Microbial Community Structure and Function of Sludge with Different Morphologies along the ANAMMOX Reactor under Long-term Operation [J]. China Environmental Science, 2025,45(2):1052-1062.

长期运行厌氧氨氧化系统沿程不同形态污泥微生物群落结构及功能解析

闫冰^{1,2,3}, 聂含冰^{1,2,3}, 付嘉琦^{1,2,3}, 韩佩^{1,3}, 易其臻^{1,3}, 桂双林^{1,2,3}, 夏嵩^{1,2,3*} (1.江西省科学院能源研究所, 江西南昌 330096; 2.温室气体核算与碳减排江西省重点实验室, 江西南昌 330096; 3.江西省碳中和研究中心, 江西南昌 330096)

摘要: 为深入理解厌氧氨氧化系统沿程微生物群落特征, 考察了长期运行的升流式厌氧污泥床(UASB)厌氧氨氧化系统沿程方向上不同形态污泥微生物群落多样性、结构、物种网络及功能特征。结果表明, 厌氧氨氧化系统沿程方向上不同形态污泥 AnAOB 基因丰度存在显著差异($P<0.05$), 底部颗粒污泥(KL)中 AnAOB 基因丰度为 2.12×10^{10} copies/g VSS, 显著高于系统沿程其它形态污泥($P<0.05$); 沿程方向上不同形态污泥微生物多样性存在显著差异($P<0.05$), 但未呈现出明显的变化规律。不同形态污泥优势菌门(相对丰度 $>1\%$)为绿弯菌门(Chloroflexi)、浮霉菌门(Planctomycetota)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、酸杆菌门(Acidobacteriota)和放线菌门(Actinobacteriota), 相对丰度排名前 10 的菌属为 *norank_f_norank_o_SBR1031*、*Candidatus_Kuenenia*、*norank_f_Anaerolineaceae*、*Nitrosomonas*、*Limnobacter*、*norank_f_PHOS-HE36*、*Denitratisoma*、*Denitratisoma* 和 *OLB13norank_f_A4b*, 相对丰度在不同样品间存在显著差异($P<0.05$); 沿程方向不同形态污泥微生物群落结构间存在显著差异($P=0.001$)。网络分析发现, 不同形态污泥微生物网络结构和拓扑性质存在差异, 其中沉淀池内絮状泥(CD)、出水管内生物膜(XK)的平均度和中心紧密度高于沿程其他样品, 微生物群落间具有更紧密的关联性。PICRUSt2 分析发现, 与代谢相关的通路功能基因丰度明显大于其他功能基因丰度, 并且沿程不同形态污泥间代谢功能基因丰度存在显著差异($P<0.05$), 氮素代谢功能基因 *hao* 相对丰度远高于 *norB*, 同时 *narG* 基因丰度是 *nirS* 丰度的 20.8~733.9 倍, 系统内部分亚硝化和部分反硝化功能活跃。厌氧氨氧化系统沿程方向上不同形态污泥微生物群落存在明显的异质性特征, 但未呈现出明显的规律性。

关键词: 厌氧氨氧化; 污泥形态; 微生物群落; 共生网络; PICRUSt2 软件

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2025)02-1052-11

Deciphering the microbial community structure and function of sludge with different morphologies along the ANAMMOX reactor under long-term operation. YAN Bing^{1,2,3}, NIE Han-bing^{1,2,3}, FU Jia-qi^{1,2,3}, HAN Pei^{1,3}, YI Qi-zhen^{1,3}, GUI Shuang-lin^{1,2,3}, XIA Song^{1,2,3*} (1. Institute of Energy Research, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China; 2. Key Laboratory of Greenhouse Gas Accounting and Carbon Reduction of Jiangxi Province, Nanchang 330096, China; 3. Jiangxi Carbon Neutralization Research Center, Nanchang 330096, China). *China Environmental Science*, 2025,45(2): 1052~1062

Abstract: To understand the characteristics of microbial communities along the anaerobic ammonia oxidation (ANAMMOX) system, this study explored the diversity, structure, species network, and functional features of microbial communities in sludge with different morphologies along the flow direction in a long-term operated up-flow anaerobic sludge bed (UASB) ANAMMOX system. The results showed significant differences ($P<0.05$) in the abundance of AnAOB genes in sludge with different morphologies along the anaerobic ammonia oxidation system. The abundance of AnAOB genes in the bottom granular sludge (KL) was 2.12×10^{10} copies/g VSS, which was significantly higher ($P<0.05$) than that in sludge with other morphologies along the system. There were significant differences ($P<0.05$) in the microbial diversity of sludge with different morphologies along the system, but no obvious change patterns were observed. The dominant bacterial phyla (relative abundance $>1\%$) in sludge with different morphologies were Chloroflexi, Planctomycota, Proteobacteria, Bacteroidota, Acidobacteriota, and Actinobacteriota. The top 10 genera in terms of relative abundance were *norank_f_norank_o_SBR1031*, *Candidatus_Kuenenia*, *norank_f_Anaerolineaceae*, *Nitrosomonas*, *Limnobacteriota*, *norank_f_PHOS-HE36*, *Denitratisoma*, *Denitratisoma*, and *OLB13norank_f_A4b*. There were significant differences ($P<0.05$) in relative abundance among different samples. There were significant differences ($P=0.001$) in the microbial community structure of sludge with different morphology along the process. Network analysis found differences in the structure and topological properties of microbial networks among different morphologies of sludge. Specifically, the average degree and center

收稿日期: 2024-07-01

基金项目: 江西省重点研发计划“揭榜挂帅”项目(2022BBG71016); 江西省科学院省级财政项目-杰出青年人才培养计划(2023YSBG50010, 2022YSBG500006); 江西省科学院省级包干制项目(2022YJC2009, 2022YSBG21010)

* 责任作者, 研究员, xiasong@jxas.ac.cn

tightness of flocculent sludge in sedimentation tank (CD) and biofilm in the effluent pipe (XK) were higher than those in other samples along the system, indicating a closer correlation among microbial communities. PICRUSt2 analysis revealed that the abundance of functional genes related to metabolic pathways was significantly higher than that of other functional genes. Additionally, there were significant differences ($P < 0.05$) in metabolic functional genes abundance among different morphologies of sludge along the process. The relative abundance of nitrogen metabolism functional gene *hao* was much higher than that of *norB*, while the abundance of the *narG* gene was 20.8 to 733.9 times that of *nirS*, indicating activeness of partial nitrification and partial denitrification functions within the system. The anaerobic ammonia oxidation system exhibits significant heterogeneity in the microbial communities of sludge with different morphologies along the process, but no distinct regularity is observed.

Key words: anaerobic ammonium oxidation; sludge morphology; microbial community; co-occurrence network; PICRUSt2

以厌氧氨氧化(ANAMMOX)为基础的生物脱氮技术,无需外加有机碳源、曝气需求低、剩余污泥量少且脱氮效率高,相较于传统硝化-反硝化脱氮技术具有经济高效及环境友好等优点,是未来污水生物脱氮技术研究的重要方向^[1],具有广阔的应用前景^[2-3].厌氧氨氧化系统内的微生物群落,是系统稳定运行及高效脱氮的重要保障.虽然运行条件、方式和水质参数存在差异,但厌氧氨氧化系统内优势菌群组成具有高度的相似性,主要为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、装甲菌门(Armatimonadetes)和放线菌门(Actinobacteria)^[4-6].这些微生物组成了厌氧氨氧化系统内的核心群落,其中,功能菌群与伴生菌群在底物和代谢上的相互作用(竞争、互利共生等)决定了系统的脱氮效率.因此,深刻认识厌氧氨氧化系统内核心菌群及其相互作用关系,是掌握厌氧氨氧化工艺稳定高效运行的微生物学机制的基础.

对厌氧氨氧化系统启动过程微生物群落研究发现,优势菌群组成无显著变化,但厌氧氨氧化菌相对丰度随启动过程逐渐升高^[7-9].在温度与负荷变化的条件下,厌氧氨氧化系统启动过程中微生物群落丰度呈现出不同的变化特征^[9].实际工程 PN/A 系统不同填料载体生物膜富集效果存在差异,其微生物群落互作关系也不同^[10-11].同时,在部分硝化-厌氧氨氧化-反硝化耦合系统中功能菌群及其相互作用关系与脱氮性能关系密切^[12-14].但已有研究主要集中于厌氧氨氧化系统启动、运行过程中微生物群落的演替特征及其与系统脱氮效率的关系,忽视了系统内沿程环境的空间异质性,及ANAMMOX功能微生物之间及其与伴生菌群的相互影响和代谢机制.研究发现反应器沿程氮素、pH值、DO和MLSS发生明显变化^[15],且厌氧氨氧化脱氮效率也随之变

化^[16].也就是说,反应器沿程存在环境的空间异质性特征,即沿程的基质浓度、pH值和水利条件等都呈现显著差异,这将引起微生物群落结构及其微生物间的相互作用关系改变,然而,已有研究主要将反应器内微生物群落视为一个整体,对厌氧氨氧化系统沿程微生物群落结构及其功能特征仍不清楚.以系统沿程视角探究反应器微生物群落的空间异质性特征,对理解氮素转化空间变化过程的机理具有重要意义.

本文基于长期稳定运行的厌氧氨氧化系统,对沿程不同形态污泥微生物群落结构及功能特征进行系统分析,以期掌握长期稳定运行厌氧氨氧化系统中微生物群落的空间特征及相互作用关系,为厌氧氨氧化工程应用提供基础.

1 材料与方法

1.1 反应器与接种污泥

实验装置为课题组前期进行厌氧氨氧化系统启动的 UASB 反应器^[17].该 UASB 的有效容积为 6.3L,试验过程控制反应器温度稳定在(32±1)°C,通过蠕动泵从底部进水口连续泵入,出水经上部出水口溢流流出.反应器接种污泥为好氧池的污泥和实验室厌氧氨氧化污泥,以体积比 2:1 混合接种,接种泥的 MLSS 为 18.03g/L,MLVSS 为 10.18g/L,VSS/SS 为 56.46%.

1.2 实验用水

实验用水为人工合成的模拟废水,其中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 分别由 NH_4Cl 和 NaNO_2 按需配置,其它组分包括: NaHCO_3 500mg/L、 KH_2PO_4 25mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300mg/L、 CaCl_2 120mg/L 以及微量元素浓缩液 I、II 各 1ml/L,微量元素浓缩液参照文献 [18] 配制.

1.3 反应器运行条件与样品采集

UASB 经过 90d 运行成功启动,氮容积负荷(NLR)为 $0.54\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$,氮去除负荷为(NRR) $0.46\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$,总氮去除率为 86.03%。当前,反应器已经稳定运行超过 750d,氮容积负荷(NLR)为 $1.67\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$,氮去除负荷为(NRR) $1.48\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$,总氮去除率为 88.54%。

整个运行过程中,我们观察发现反应器沿程方向出现污泥形态产生空间异质性,为了深入了解反应器沿程不同形态污泥的微生物群落结构及功能特征,分别采集了反应器底部颗粒污泥(KL)、填料内污泥(TF)、三相分离器内絮状泥(SF)、出水管内生物膜(XK)和沉淀池内絮状泥(CD),污泥样品如图 1。采样过程进行 3 次重复采样,共采集 15 个样品。采集的污泥样品经离心后,于 -80°C 冰箱保存待用。

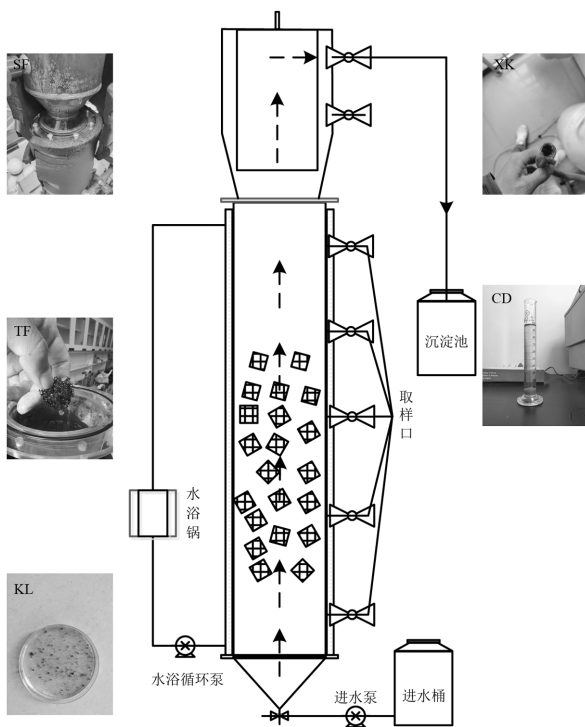


图 1 厌氧氨氧化系统沿程不同形态污泥

Fig.1 Sludge with different morphologies along the anaerobic ammonia oxidation system

1.4 DNA 提取、定量 PCR 与高通量测序

污泥总 DNA 利用 FastDNA® SPIN Kit for soil(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, U.S)试剂盒进行提取,具体提取步骤按操作说明完成。得到的总 DNA 样品,经过琼脂糖凝胶电泳进行定性检测,并利用 SMA4000 超微量分光光度计(Merinton, USA)对

其浓度、纯度进行测定后,放置于 -80°C 冰箱中保存待用。

实时荧光定量 PCR 相关引物见表 1,反应体系为: $0.8\mu\text{L}$ 的上、下游引物, $2\mu\text{L}$ 的 DNA 模板, $0.4\mu\text{L}$ LROX II, $2\mu\text{L}$ dNTP, $10\mu\text{L}$ SYBR Premix Ex Taq II, $6\mu\text{L}$ 的灭菌超纯水。根据已知浓度的质粒 DNA,按 10 倍梯度稀释绘制标准曲线。每份样品做 3 个平行,采用平均值法计算最后测定的厌氧氨氧化菌基因拷贝数,扩增效率和可决系数 R^2 分别大于 95%和 0.98。

本研究采用通用引物 515F 和 806R(表 1)对 16S rRNA 基因 V4 区进行 PCR 扩增($25\mu\text{L}$ 反应体系)。PCR 扩增产物经检测、纯化及定量分析后,构建 MiSeq 文库,利用 Miseq PE300 测序平台(Illumina Inc, San Diego, CA, USA)进行高通量测序。

表 1 相关引物序列

Table 1 List of the primers sequences

目标菌种	引物	序列(5' 3')	文献
总细菌	515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	[19]
	806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	
AnAOB	Amx368F	TTCGCAATGCCGAAAGG	[20]
	Amx820R	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	

1.5 数据处理与统计分析

本研究基于 QIIME 2 2020.2^[21]完成高通量测序数据的生物信息学分析。使用 q2-demux 插件对原始序列数据进行拆分并进行质量过滤,然后使用 DADA2^[22]进行去噪;用 mafft^[23](q2-alignment)对所有扩增序列变体(ASV)进行比对,并用 fasttree2^[24](q2-phylogeny)构建系统发育树;将样品序列抽平后使用 q2-diversity 计算 α 多样性指数[香农(Shannon)多样性指数、Observed OTUs(Sobs)、辛普森(Simpson)多样性指数和 Chao1 指数]和 β 多样性指数(Bray-Curtis dissimilarity);使用 q2-feature-classifier 比对 Greengenes 13_8 99%OTU 参考序列对 ASV 进行分类。

QIIME 2 导出特征表为 biom 格式文件,利用 PICRUST2 软件进行 16S rRNA 基因数据功能预测,参考 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库,得到 KO(KEGG Orthology)功能的丰度预测表及 KEGG 代谢途径(KEGG pathway)丰

度表。

基于厌氧氨氧化系统沿程样品中相对丰度前 100 的物种,构建微生物物种网络;利用 Cytoscape (3.7.1)软件中 CoNet 插件进行微生物群落网络关系分析;选取 5 种相关计算方法(Spearman 相关性, Pearson 相关性,Kullback-Leibler dissimilarity, Bray-Curtis dissimilarity 和 mutual information),并用 Brown 方法对物种方法的 P 值进行整合,保留显著相关($P<0.05$)的数据进行后续分析,之后选取 Benjamini-Hochberg 方法进行多重检验获得网络相关性;将网络相关性数据导入 Gephi 软件(0.9.2),利用 Frucherman Reingold 算法进行布局,实现网络图可视化;利用 Cytoscape 软件中 Network Analyzer 插件进行网络拓扑性质分析。

不同分组间差异检验采用两两 Student-t 检验;采用基于 Bray-Curtis 距离的非度量多维尺度(nonmetric multidimensional scaling,NMDS)分析,比较不同分组样品间群落 β 多样性差异,并用相似性分析(ANOSIM)进行差异检验;统计分析及做图均基于 R(3.5.1)不同程序包实现。

2 结果与讨论

2.1 厌氧氨氧化系统沿程 AnAOB 基因定量分析

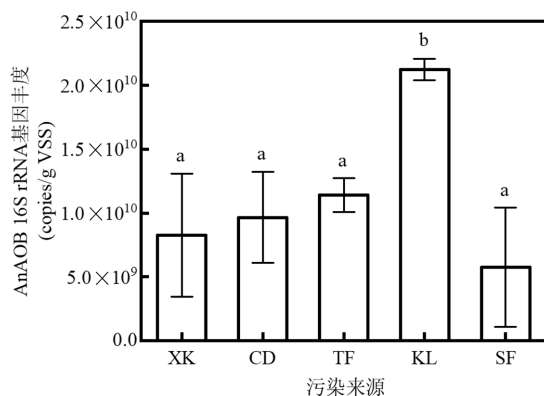


图2 厌氧氨氧化系统沿程不同形态污泥厌氧氨氧化菌丰度
Fig.2 Abundance of AnAOB in sludge with different morphologies along the anaerobic ammonia oxidation system
不同字母表示差异显著($P<0.05$)

利用 qPCR 手段对厌氧氨氧化系统沿程不同形态污泥 AnAOB 丰度进行定量检测(图 2),结果表明,沿程方向上,不同形态污泥中 AnAOB 基因丰度表现

为 $KL>TF>CD>XK>SF$,说明系统沿程方向上厌氧氨氧化菌丰度存在逐渐降低的趋势。有研究发现,反应器沿程方向上氮素浓度逐渐降低^[25],且厌氧氨氧化反应器沿程方向厌氧氨氧化脱氮贡献率也呈下降趋势^[16]。然而,值得注意的是虽然 AnAOB 丰度在 TF、SF、CD 和 XK 中无显著差异,但 SF 中 AnAOB 丰度低于 CD 和 XK。进一步分析发现,反应器底部颗粒污泥 AnAOB 基因丰度为 2.12×10^{10} copies/g VSS,显著高于系统沿程其它形态污泥($P<0.05$)。一方面,可能是因为反应器底部基质浓度相对较高,易于厌氧氨氧化菌富集;另一方面,可能是因为颗粒污泥厌氧氨氧化菌相对丰度较高(一般大于 50%)^[26-27]。

2.2 厌氧氨氧化系统沿程微生物群落多样性

微生物群落多样性对系统稳定至关重要,本研究选取 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao 指数、Sobs 指数表征群落多样性。厌氧氨氧化反应器沿程方向微生物群落多样性指数变化如图 3 所示,TF 的多样性显著低于其他样品($P<0.05$),其他样品间多样性无显著差异($P>0.05$),并且沿程方向上多样性没有明显的变化规律。与本研究不同的是,有研究认为反应器沿程方向(自下而上)基质浓度逐渐降低,因此,长期运行后,反应器下层微生物群落中厌氧氨氧化菌逐渐占据主导地位成为优势种群,而某些稀有种遭到淘汰,致使下层的微生物物种种类相对上层较为单一,进而导致微生物多样性也呈现沿程方向上逐渐升高的趋势^[16,28]。

2.3 厌氧氨氧化系统沿程微生物群落结构特征

厌氧氨氧化系统沿程微生物群落门、属水平组成如图 4(a)、(b)所示,由此可知,微生物群落优势菌门(相对丰度>1%)并未在沿程呈现出明显差异,主要为绿弯菌门(Chloroflexi)、浮霉菌门(Planctomycetota)、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、酸杆菌门(Acidobacteriota)和放线菌门(Actinobacteriota),这与以往研究中存在的核心微生物群落组成类似^[5,7,28]。其中,绿弯菌门的相对丰度最高,在所有样品中都超过 25%,并且 TF 中绿弯菌门相对丰度高达 48.52%显著高于其他污泥($P<0.05$)(表 2)。有研究发现,绿弯菌门在降解衰亡菌体及颗粒污泥载体方面具有重要作用^[29-30],同时一些丝状菌也隶属于绿弯菌门,它们在污泥的支撑结构中发挥重要作用^[30]。放线菌门相对丰

度在 CD 中显著高于其他样品($P < 0.05$), 酸杆菌门相对丰度则在 SF 中最高. 值得注意的是, 浮霉菌门和拟杆菌门相对丰度在沿程各样品中未呈现出显

著差异($P > 0.05$). 浮霉菌门是厌氧氨氧化菌所在的菌门, 而拟杆菌门中某些菌属被认为具有硝化、反硝化功能^[31-33].

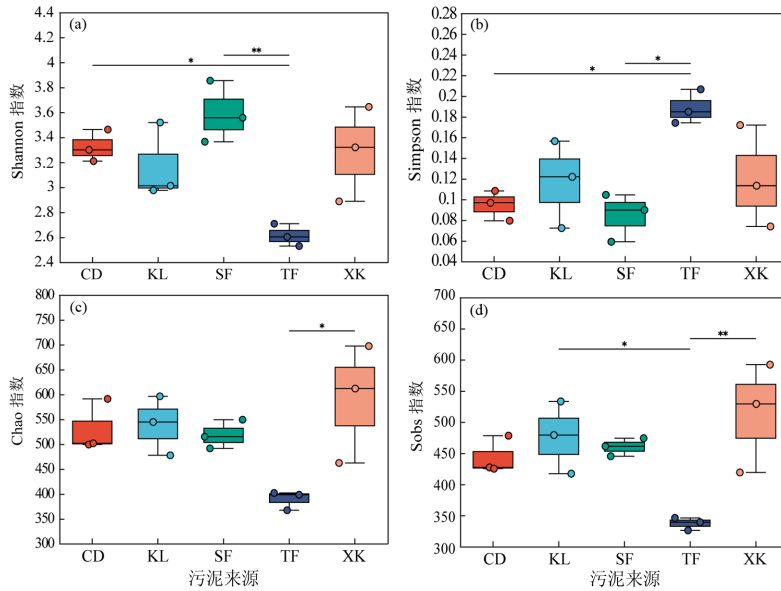


图3 厌氧氨氧化系统沿程微生物群落 alpha 多样性指数

Fig.3 Alpha diversity index of microbial community along the anaerobic ammonia oxidation system

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

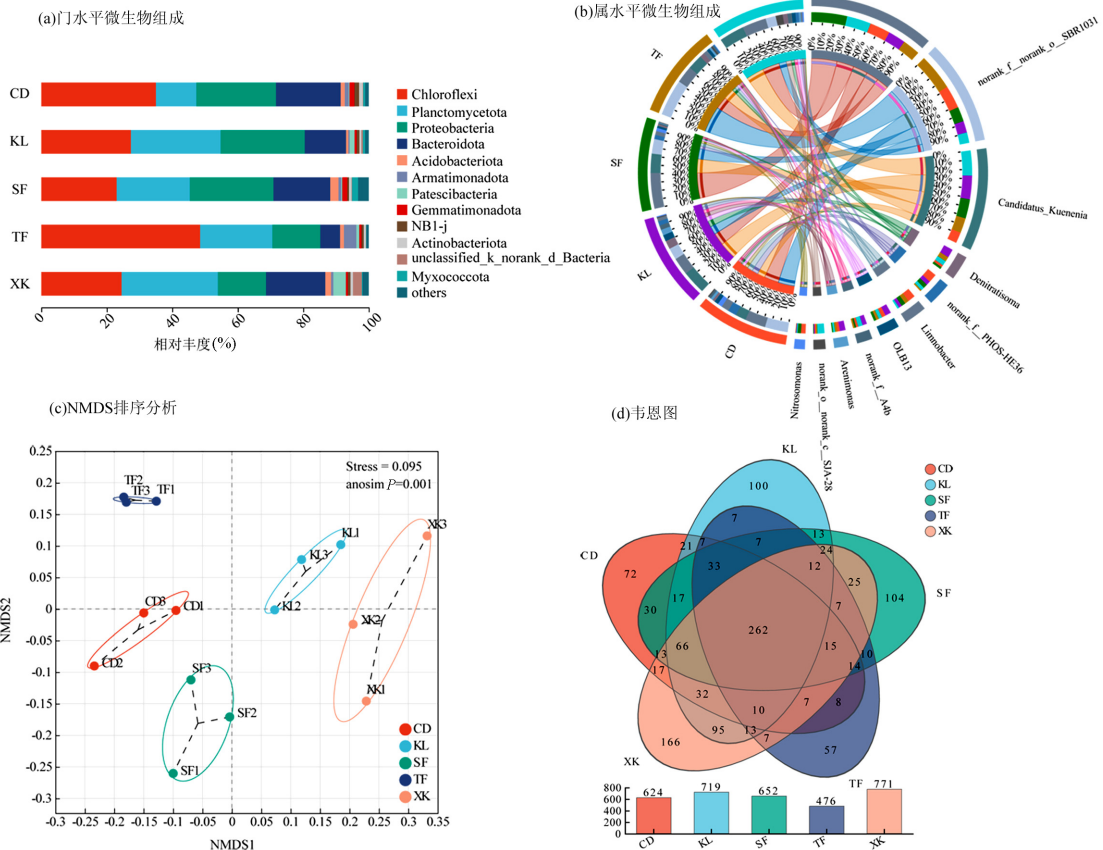


图4 厌氧氨氧化系统沿程微生物群落结构

Fig.4 Microbial community structure along the anaerobic ammonia oxidation system

表 2 不同形态污泥优势菌门相对丰度差异特征

Table 2 Differences in relative abundance of dominant phyla in sludge with different morphologies

样品	绿湾菌门	浮霉菌门	变形菌门	拟杆菌门	放线菌门	酸杆菌门
CD	0.350±0.068 ^a	0.123±0.036 ^a	0.243±0.043 ^a	0.197±0.054 ^a	0.011±0.001 ^a	0.012±0.002 ^a
XK	0.246±0.057 ^b	0.294±0.105 ^a	0.147±0.025 ^b	0.181±0.119 ^a	0.008±0.003 ^b	0.017±0.010 ^{ab}
SF	0.230±0.031 ^b	0.223±0.043 ^a	0.256±0.058 ^{ac}	0.173±0.010 ^a	0.008±0.001 ^b	0.025±0.008 ^b
TF	0.485±0.029 ^c	0.220±0.032 ^a	0.146±0.020 ^b	0.061±0.009 ^a	0.006±0.001 ^b	0.012±0.003 ^a
KL	0.274±0.050 ^{ab}	0.274±0.089 ^a	0.257±0.060 ^a	0.126±0.044 ^a	0.006±0.003 ^b	0.007±0.002 ^a

注:数据为平均值±标准偏差,同一列不同字母表示差异显著($P<0.05$), $n=3$,下同。

沿程方向上,不同形态污泥优势菌门在纲水平的组成特征如图 5 所示.结果表明,尽管不同样品间纲水平丰度存在明显差异,但组成具有高度一致性.绿湾菌门下主要的纲水平组成主要为 Anaerolineae 和 Chloroflexia,浮霉菌门下主要的纲水平组成为 Brocadiae.然而,变形菌门的纲水平组成为在沿程不同形态污泥样品中不同,SF 和 TF 中纲水平组成为 Gammaproteobacteria 和 Alphaproteobacteria,而 CD、KL 和 XK 中纲水平组除了上述 2 个纲外,还有丰度较低的其他变形菌纲,拟杆菌门中纲水平组成及丰度在沿程不同形态污泥样品中存在差异.

属水平上,沿程不同形态污泥的厌氧氨氧化菌都为 *Candidatus_Kuenenia*,其被认为对基质具有较强的亲和力^[34].沿程方向上不同形态污泥 *Candidatus_Kuenenia* 相对丰度分别为 0.272 ± 0.089 、 0.173 ± 0.024 、 0.221 ± 0.044 、 0.287 ± 0.106 和 0.122 ± 0.036 ,KL 和 XK 中 *Candidatus_Kuenenia* 的相对丰度显著高于 CD($P<0.05$)(表 3),这与定量 PCR 结果一致.*Limnobacter* 是厌氧氨氧化菌重要的伴生菌,具有抵御外部环境的影响作用^[35],KL 和 XK 中其相对丰度较低,而 CD 中其相对丰度显著高于其他形态污泥($P<0.05$),可能是相对于颗粒污泥和下水口生物膜,

沉淀池絮状泥受外部环境的影响更大,环境选择促使 *Limnobacter* 丰度更高.*Nitrosomonas* 是主要的氨氧化菌,沿程方向上 CD 中其相对丰度显著高于其他形态污泥($P<0.05$),KL 和 TF 则显著低于其他形态污泥,这可能与能获得氧气接触量有关.具有反硝化功能的 *Denitratisoma* 在沿程方向不同形态污泥间呈现出显著差异($P<0.05$),推测可能是获得内碳源量不同导致.本研究中丰度最高的菌属 *norank_f_norank_o_SBR1031* 被认为是厌氧消化的核心微生物种群^[36],是厌氧氨氧化系统重要的伴生菌,对污泥结构稳定及系统内菌群细胞分泌的有机物降解方面发挥重要作用^[37],其在沿程方向不同形态污泥间呈现出显著差异($P<0.05$).

基于 Bray-Curtis 距离对厌氧氨氧化系统沿程微生物群落数据进行非度量多维尺度(nonmetric multidimensional scaling,NMDS)排序分析(图 4(c)),结果表明,NMDS 排序压力值(stress)小于 0.1,表明分析结果具有很好的解释意义.沿程方向上不同形态污泥呈现出明显的空间分异特征,说明不同样品的微生物群落组间差异大于组内差异.进一步进行群落相似性分析(anosim)发现,沿程方向不同形态污泥微生物群落结构间存在显著差异($P=0.001$),说明微生物群落结构在厌氧氨氧化系统沿程方向上发生显著变化.

表 3 不同形态污泥排名前 10 的属相对丰度差异特征

Table 3 Differences in the relative abundance of the top 10 genera in sludge with different morphologies

样品	<i>norank_f_norank_o_SBR1031</i>	<i>Candidatus_Kuenenia</i>	<i>norank_f_Anaerolineaceae</i>	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Limnobacter</i>	<i>norank_f_PHOS-HE36</i>	<i>Denitratisoma</i>	<i>Arenimonas</i>	<i>OLB13</i>	<i>norank_f_A4b</i>
CD	0.264±0.036a	0.122±0.036a	0.002±0.001a	0.054±0.010a	0.087±0.017a	0.099±0.034a	0.028±0.002a	0.028±0.008a	0.045±0.022a	0.026±0.007ab
KL	0.135±0.007bd	0.272±0.089b	0.002±0.002a	0.008±0.003bc	0.038±0.012bc	0.049±0.024b	0.099±0.026b	0.067±0.019b	0.070±0.044a	0.052±0.016a
SF	0.168±0.030b	0.221±0.044ab	0.002±0.0002a	0.036±0.002d	0.046±0.006b	0.048±0.015b	0.021±0.001a	0.008±0.002a	0.023±0.005a	0.016±0.004b
TF	0.420±0.025c	0.173±0.024ab	0.005±0.0005b	0.001±0.0001b	0.048±0.008b	0.013±0.002b	0.055±0.007c	0.025±0.002a	0.032±0.005a	0.015±0.001ab
XK	0.117±0.026d	0.287±0.106b	0.002±0.0006a	0.012±0.007c	0.018±0.007c	0.038±0.034b	0.054±0.013c	0.024±0.015a	0.040±0.028a	0.051±0.024ab

利用韦恩(Venn)图分析了厌氧氨氧化反应器沿程不同形态污泥微生物群落物种差异特征,不同样品微生物群落共有和特有物种(ASV)如图 4(d)所示.沿程不同形态污泥共有 ASV 262 个,其中 KL、SF、TF、XK 和 CD 分别有 100、104、57、166 和 72 个特有 ASV.共有种数量明显高于各样品特有种数量,

说明虽然沿程方向上基质浓度差异导致可能存在大量稀有种(相对丰度<0.1%),但核心种仍保持一致,这与前述物种组成分析结果相互印证.值得关注的是,KL 和 XK 拥有 95 个共有 ASV,说明它们可能在群落组成及结构上存在一定的相似性.

2.4 微生物网络分析

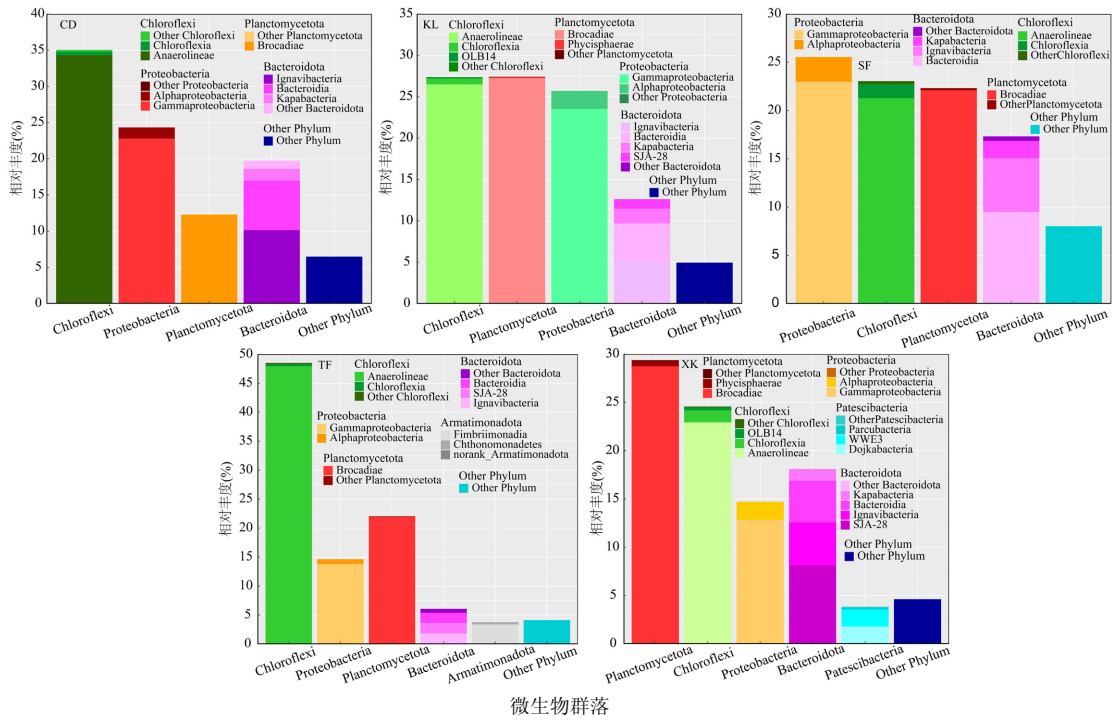


图 5 不同形态污泥的微生物群落纲水平组成

Fig.5 The microbial community composition of class in sludge with different morphologies

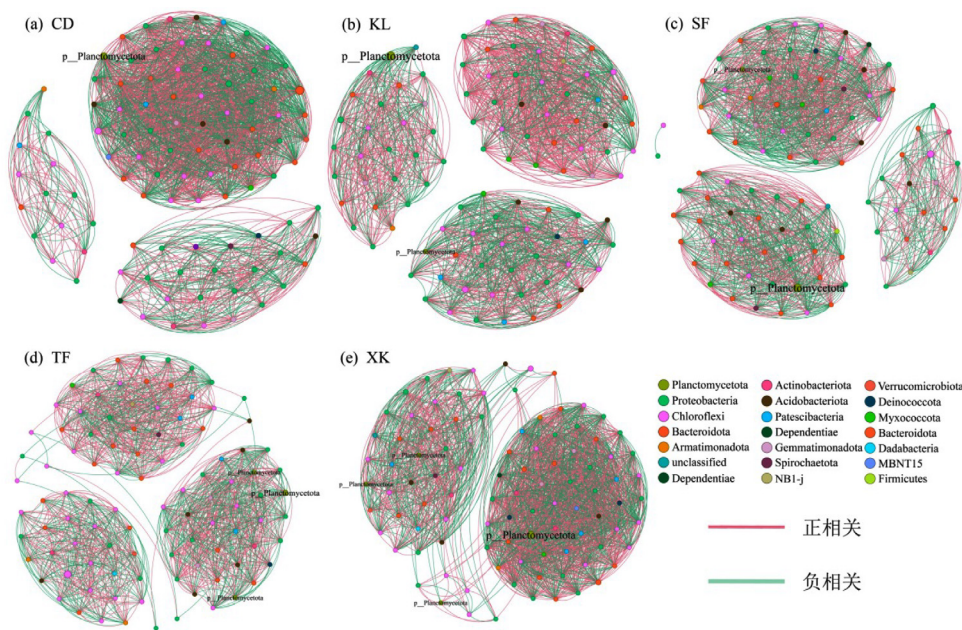


图 6 厌氧氨氧化系统沿程不同形态污泥微生物网络

Fig.6 Microbiome networks of sludge with different morphologies along the anaerobic ammonia oxidation system

微生物群落共现网络是深入理解物种间的相互作用关系的有效途径^[38].沿程方向上不同形态污泥微生物群落相互作用关系网络如图 6,图中每个节点代表一个物种,节点间的连线称为边,代表物种间的相互作用关系,沿程不同形态污泥(除 XK 外)微生物网络都呈现出存在 3 个相互作用关系紧密的子网络,说明有每个样品都包含 3 个微生物类群,且不同类群间无明显互作关系.CD 共获得 98 个物种节点,2058 个边(其中正相关边 1214 个,负相关边 844 个);KL 共获得 100 个物种节点,1653 个边(其中正相关边 1223 个,负相关边 630 个);SF 共获得 98 个物种节点,1606 个边(其中正相关边 834 个,负相关边 772 个);TF 共获得 100 个物种节点,1387 个边(其中正相关边 782 个,负相关边 605 个);XK 共获得 99 个物种节点,2091 个边(其中正相关边 1136 个,负相关边 955 个)(表 4).结合微生物网络图和网络拓扑性质,笔者发现,CD、XK 的平均度和中心紧密度高于沿程其他样品,说明微生物间关联性更强.尽管沿程方向上不同形态污泥微生物网络结构和拓扑性质存在差异,但浮霉菌门是所有微生物网络的主要节点,说明与厌氧氨氧化相关的微生物类群相互作用关系紧密,是厌氧氨氧化系统沿程不同形态污泥的核心微生物类群.

表 4 微生物网络的拓扑学指数

Table 4 Topological indices of microbial networks

项目	CD	KL	SF	TF	XK
节点数	98	100	98	100	99
边数	2058	1653	1606	1387	2091
聚类系数	0.50	0.50	0.49	0.50	0.50
网络密度	0.216	0.167	0.169	0.140	0.216
平均度	21.000	16.530	16.388	13.870	21.121
正相关边数	1214	1023	834	782	1136
负相关边数	844	630	772	605	955
网络直径	1	1	1	1	1
平均路径长度	1	1	1	1	1
平均聚类系数	0.5	0.5	0.49	0.5	0.5
中心紧密度	0.433	0.334	0.338	0.280	0.431

2.5 PICRUSt2 功能预测分析

基于 PICRUSt2 功能预测结果显示(图 7),沿程方向上不同形态污泥样品涉及的 KEGG 路径包括:有机系统(Organismal Systems)、代谢(Metabolism)、人类疾病(Human Diseases)、遗传信息处理(Genetic Information Processing)、环境信息处理(Environmental

Information Processing) 和 细胞 过程 (Cellular Processes),与已有的关于厌氧氨氧化系统研究结果一致^[17].预测到的与代谢相关的通路功能基因丰度明显大于其它功能丰度,并且沿程不同形态污泥间代谢功能丰度存在显著差异($P < 0.05$),其他一级功能层预测基因丰度在沿程不同形态污泥间均无显著差异($P > 0.05$),说明与代谢相关的通路是系统的主要功能.笔者推测,在厌氧氨氧化沿程方向上,氮素的转化及微生物群落的相互作用主要通过代谢路径完成,如自养菌(主要是 AnAOB)可以分泌胞外多聚物(蛋白和多肽)供异养菌代谢得到自身所需的氨基酸或自养菌直接分泌氨基酸给异养菌^[39],同时异养菌也可以为自养菌提供次生代谢物钼酸盐辅因子和叶酸,以利于其活性和生长^[40].

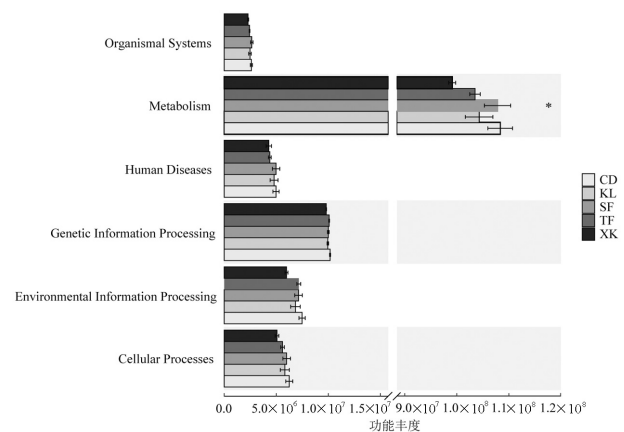


图 7 不同样品 PICRUSt2 预测功能丰度变化(一级功能层)

Fig. 7 Changes in PICRUSt2-based predicted function for different samples (hierarchy level 1)

进一步对功能预测基因二级功能层分析发现,所有样品共发现 45 个子功能(图 8).沿程方向上不同形态污泥中,XK 二级功能层基因丰度相对较低,SF 和 CD 则表现出二级功能层基因丰度相对较高,可能是沿程方向上基质和环境条件存在差异,导致微生物群落功能特征发生变化.能量代谢途径丰度在 CD 和 XK 中较低,而在 KL、TF 和 SF 中相对较高,氮素转化过程中涉及能量代谢,说明氮素转化功能菌在 KL、TF 和 SF 更活跃.碳水化合物代谢途径丰度在 XK 和 KL 中较低,在 CD、TF 和 SF 中较高,说明异养菌功能在 CD、TF 和 SF 较强.

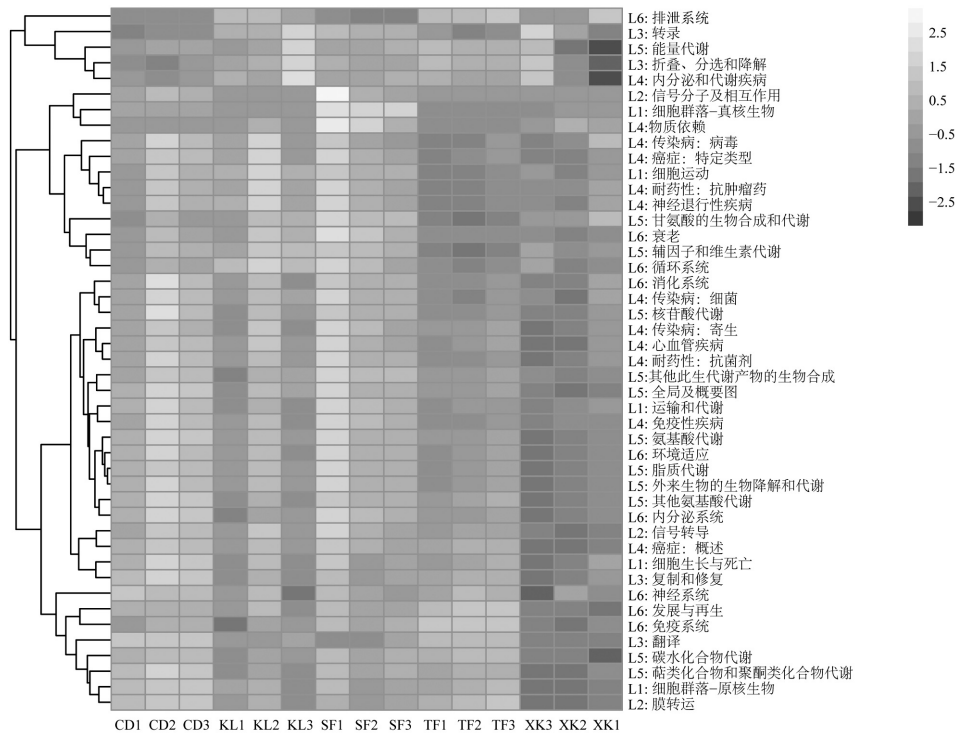


图 8 不同样品 PICRUSt2 功能预测热图(二级功能层)

Fig.8 Heatmap of PICRUSt2-based predicted function for different samples (hierarchy level 2)

L1~L6 表示一级功能层:L1 表示细胞过程,L2 表示环境信息处理,L3 表示遗传信息处理,L4 表示人类疾病,L5 表示代谢,L6 表示有机系统

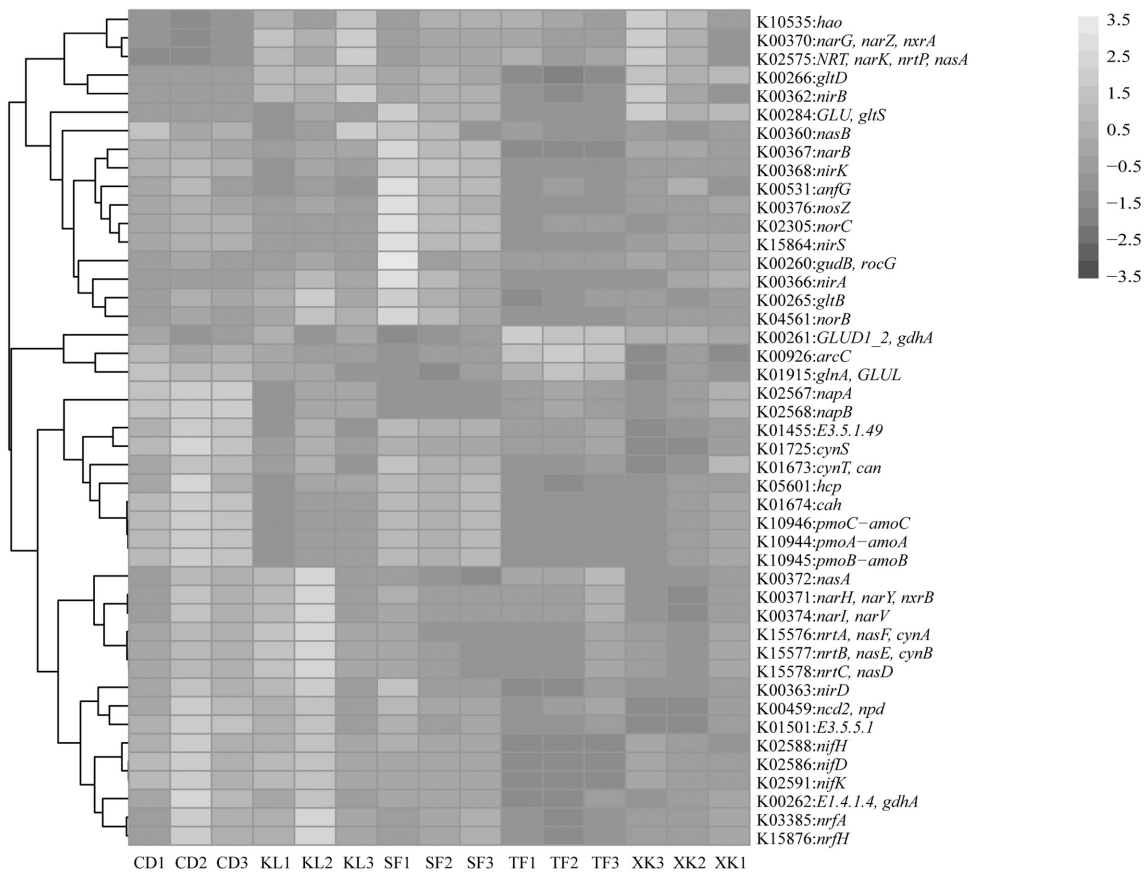


图 9 氮代谢相关 KO 基因拷贝数热图

Fig.9 Heatmap of nitrogen metabolism-related KO based on predicted gene copy

通过比对 PICRUST2 功能预测中直系同源分类 (KO)表与 KEGG 数据库中氮代谢相关的 65 个直系同源基因(KEGG orthology),得到沿程不同形态污泥样品中与氮代谢相关的功能酶基因 45 个(图 9)。涉及的氮素转化过程主要包括硝化过程,其功能基因包括氨单加氧酶功能基因 *pmoA-amoA*、*pmoB-amoB* 和 *pmoC-amoC*,羟胺脱氢酶功能基因 *hao*,羟胺还原酶功能基因 *hcp*,亚硝酸盐氧化还原酶的编码基因 *norB* 作为主要的功能基因;反硝化过程,其功能基因包括硝酸盐还原酶功能基因 *narG*、*napA*,亚硝酸盐还原酶功能基因 *nirS*、*nirK*,NO 还原酶功能基因 *norB*、*norC* 以及 N_2O 还原酶功能基因 *nosZ*;异化硝酸盐还原,其功能基因包括 *narI*、*napA*、*napB*、*nirB*、*nirD*、*nrfA* 和 *nrfH*;同化硝酸盐还原,其功能基因包括 *nasA*、*nasB*。氨氧化过程的功能基因 *pmoA-amoA*、*pmoB-amoB*、*pmoC-amoC* 丰度在 CD 和 SF 较高,分别是 KL、TF 和 XK 的 6.8、52.9 和 4.2 倍,*hao/hcp* 在 KL、TF、SF、CD、XK 分别为 97.6、123.5、49.6、26.6 和 114.5,说明 *hao* 起主要作用,而 *hao/norB* 则分别为 16.5、37.1、11.3、11.8 和 30.9,表明部分亚硝化在系统内较为活跃。反硝化过程中 *narG* 基因丰度是 *nirS* 丰度的 20.8~733.9 倍,是 *nirK* 丰度的 2.6~39.6 倍,是 *norC* 丰度的 12.4~99.1 倍,是 *nosZ* 的 4~43.7 倍,说明硝酸盐还原能力远远大于亚硝酸还原、NO 还原和 N_2O 还原的能力,反硝化过程利用内碳源实现了部分反硝化。沿程方向上不同样品间反硝化功能基因的丰度也存在明显差异,KL 和 TF 中 *narG/nirS* 分别为 108.9 和 733.9,而 CD 和 SF 中 *narG/nirS* 分别为 20.8 和 13.3,说明部分反硝化能力在 TF 和 KL 中远远大于 CD 和 SF。

3 结论

3.1 厌氧氨氧化系统沿程方向上不同形态污泥 AnAOB 基因丰度呈逐渐降低趋势,且 KL 中 AnAOB 基因丰度显著高于系统沿程其他形态污泥($P<0.05$)。沿程方向上 TF 的多样性显著低于其他样品($P<0.05$),但不同形态污泥微生物多样性没有明显的变化规律。

3.2 沿程不同形态污泥的核心微生物群落组成一致,但相对丰度在不同样品间存在显著差异($P<0.05$);微生物群落结构在不同形态污泥间呈现明显的空

间分异特征,且差异显著($P=0.001$)。

3.3 沿程方向上不同形态污泥微生物网络结构和拓扑性质存在差异,但浮霉菌门是所有微生物网络的主要节点。

3.4 沿程方向上不同形态污泥微生物群落中与代谢相关的通路存在显著差异($P<0.05$),且氮素和碳水化合物代谢能力明显不同;不同形态氮素在沿程方向上的转化能力差异明显。

参考文献:

- [1] Wu P, Chen J J, Garlapati V K, et al. Novel insights into Anammox-based processes: A critical review [J]. Chemical Engineering Journal, 2022,444:136534.
- [2] 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.
- [3] Tomaszewski M, Cema G, Ziemińska-Buczyńska A. Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis [J]. Chemosphere, 2017,182:203–214.
- [4] 李泽兵,刘常敬,赵白航,等.多基质时厌氧氨氧化菌、异养反硝化污泥活性及抑制特征 [J]. 中国环境科学, 2013,33(4):648–654. Li Z B, Liu C J, Zhao B H, et al. Activity and inhibition characteristics of anammox and heterotrophic denitrifier bacteria in a multi-substrate system [J]. China Environmental Science, 2013,33(4):648–654.
- [5] 姜滢,郭萌萌,谢军祥,等.不同培养条件厌氧氨氧化颗粒污泥性质及微生物群落结构差异 [J]. 环境科学, 2020,41(5):2358–2366. Jiang Y, Guo M L, Xie J X, et al. Characteristics of ANAMMOX granular sludge and differences in microbial community structure under different culture conditions [J]. Environmental Science, 2020, 41(5):2358–2366.
- [6] 王晗,李瀚翔,陈猷鹏,等.盐度条件下 ANAMMOX-EGSB 反应器颗粒污泥微生物群落 [J]. 环境科学, 2019,40(4):1906–1913. Wang H, Li H X, Chen Y P, et al. Microbial community of granular sludge in an ANAMMOX-EGSB reactor under saline conditions [J]. Environmental Science, 2019,40(4):1906–1913.
- [7] 闫冰,夏嵩,桂双林,等.厌氧氨氧化菌富集培养过程微生物群落结构及多样性 [J]. 环境科学, 2020,41(12):5535–5543. Yan B, Xia S, Gui S L, et al. Microbial community structure and diversity during the enrichment of anaerobic ammonium oxidation bacteria [J]. Environmental Science, 2020,41(12):5535–5543.
- [8] 李亚男,姚丽,隋倩雯,等.厌氧氨氧化细菌富集培养过程微生物结构与功能解析 [J]. 环境科学学报, 2021,41(1):92–101. Li Y N, Yao L, Sui Q W, et al. Evolution of microbial structures and functions during the enrichment of anammox bacteria [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2021,41(1):92–101.
- [9] 马雨晴,王博,李笑迪.温度与负荷对 Anammox 菌自富集启动的 PDA 的影响 [J]. 中国环境科学, 2024,44(3):1307–1313. Ma Y Q, Wang B, Li X D. Effect of temperature and load variation of pda system initiated by anammox bacteria self-enrichment [J]. China Environmental Science, 2024,44(3):1307–1313.
- [10] 赵星程,贾方旭,刘晨雨,等.实际规模 PN/A 工艺载体挂膜性能与微生物群落 [J]. 化工进展, 2024.https://doi.org/10.16085/j.issn.1000-6613.2023-1310. Zhao X C, Jia F X, Liu C Y, et al. Biofilm immobilization effects and microbial communities of the carriers in real scale PN/A process [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2024.https://doi.org/

- 10.16085/j.issn.1000-6613.2023-1310.
- [11] Ma Y, Wang B, Li X, et al. Enrichment of anammox biomass during mainstream wastewater treatment driven by achievement of partial denitrification through the addition of bio-carriers [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2024,137:181-194.
- [12] Zhou F, Xiao W Z, Zhou K Y, et al. Performance characteristics and community analysis of a single-stage partial nitrification, anammox and denitrification (SPANADA) integrated process for treating low C/N ratio wastewater [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022,433(P1):134452.
- [13] Depeng W, Kailong H, Xiwei H, et al. Varied interspecies interactions between anammox and denitrifying bacteria enhanced nitrogen removal in a single-stage simultaneous anammox and denitrification system [J]. *Science of the Total Environment*, 2021,813:152519.
- [14] 常尧枫,郭萌蕾,谢军祥,等.厌氧氨氧化脱氮除碳功能菌群结构及代谢途径 [J]. *中国环境科学*, 2022,42(3):1138-1145.
Chang Y F, Guo M L, Xie J X, et al. The structure and metabolic pathway of functional bacteria for nitrogen and carbon removal in Anammox [J]. *China Environmental Science*, 2022,42(3):1138-1145.
- [15] 鲍林林,陈婉秋,申今生,等.折流板生物膜反应器快速启动厌氧氨氧化 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2016,48(2):114-118.
Bao L L, Chen W Q, Shen J S, et al. Study on the fast startup of the anammox process by baffled biofilm reactor [J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2016,48(2):114-118.
- [16] 秦 榕,宋佳宇,齐碧薇,等.厌氧氨氧化反应器菌群动态演替分析 [J]. *环境科学与技术*, 2020,43(S1):23-28.
Qin R, Song J Y, Qi B W, et al. Dynamic succession analysis of bacteria in anaerobic ammonia oxidation reactor for refining wastewater treatment [J]. *Environmental Science and Technology*, 2020,43(S1):23-28.
- [17] 闫 冰,付嘉琦,夏 嵩,等.厌氧氨氧化启动过程细菌群落多样性及 PICRUSt2 功能预测分析 [J]. *环境科学*, 2021,42(8):3875-3885.
Yan B, Fu J Q, Xia S, et al. Diversity and PICRUSt2-based predicted functional analysis of bacterial communities during the start-up of ANAMMOX [J]. *Environmental Science*, 2021,42(8):3875-3885.
- [18] Van D G A A, De Bruijn P, Robertson L A, et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor [J]. *Microbiology*, 1996,142(8):2187-2196.
- [19] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011,108(S11):4516-4522.
- [20] Schmid M C, Maas B, Dapena A, et al. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005,71(4):1677-1684.
- [21] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 [J]. *Nature Biotechnology*, 2019,37(8):852-857.
- [22] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data [J]. *Nature Methods*, 2016,13(7):581-583.
- [23] Katoh K, Misawa K, Kuma K, et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002,30(14):3059-3066.
- [24] Price M N, Dehal P S, Arkin A P. FastTree 2—Approximately maximum-likelihood trees for large alignments [J]. *Plos One*, 2010, 5(3):e9490.
- [25] 梁子阳,彭嘉敏,张泳纯,等.低进水浓度 CASS 工艺沿程污染物去除特征及微生物群落变化 [J]. *环境工程学报*, 2023,17(10):3219-3230.
Liang Z Y, Peng J M, Zhang Y C, et al. Pollutant removal characteristics and microbial community changes along the CASS process with low concentration influent [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2023,17(10):3219-3230.
- [26] Feng Y, Zhao Y, Guo Y, et al. Microbial transcript and metabolome analysis uncover discrepant metabolic pathways in autotrophic and mixotrophic anammox consortia [J]. *Water Research*, 2018,128:402-411.
- [27] Lawson C, Wu S, Bhattacharjee A S, et al. Metabolic network analysis reveals microbial community interactions in anammox granules [J]. *Nature Communications*, 2017,8(1):15416.
- [28] 曹 雁,王桐屿,秦玉洁,等.厌氧氨氧化反应器脱氮性能及细菌群落多样性分析 [J]. *环境科学*, 2017,38(4):1544-1550.
Cao Y, Wang T Y, Qin Y J, et al. Nitrogen removal characteristics and diversity of microbial community in ANAMMOX reactor [J]. *Environmental Science*, 2017,38(4):1544-1550.
- [29] Kandaichi T, Yuri S, Ozaki N, et al. Ecophysiological role and function of uncultured Chloroflexi in an anammox reactor [J]. *Water Science and Technology*, 2012,66(12):2556-2561.
- [30] Björnsson L, Hugenholtz P, Tyson G W, et al. Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal [J]. *Microbiology*, 2002, 148(8):2309-2318.
- [31] Zeng T, Li D, Liao W, et al. Nitrogen removal and functional bacteria distribution of ANAMMOX at ambient temperature [J]. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 2016,6(4):476-483.
- [32] Lu H, Chandran K, Stensel D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment [J]. *Water Research*, 2014,64:237-254.
- [33] Cas S B, Du R, Baikun L, et al. High-throughput profiling of microbial community structures in an ANAMMOX-UASB reactor treating high-strength wastewater [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016,100(14):6457-6467.
- [34] Zhang L, Narita Y, Gao L, et al. Microbial competition among anammox bacteria in nitrite-limited bioreactors [J]. *Water Research*, 2017,125:249-258.
- [35] Wang C, Liu S T, Xu X C, et al. Achieving mainstream nitrogen removal through simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification process in an integrated fixed film activated sludge reactor [J]. *Chemosphere*, 2018,203:457-466.
- [36] Xia Y, Wang Y, Wang Y, et al. Cellular adhesiveness and cellulolytic capacity in Anaerolineae revealed by omics-based genome interpretation [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016,9(1):111.
- [37] Xiang T, Gao D. Comparing two hydrazine addition strategies to stabilize mainstream deammonification: Performance and microbial community analysis [J]. *Bioresource Technology*, 2019,289:121710.
- [38] Ma B, Wang H Z, Dsouza M, et al. Geographic patterns of co-occurrence network topological features for soil microbiota at continental scale in eastern China [J]. *The ISME Journal*, 2016,10(8): 1891-1901.
- [39] Liu Y, Sun J, Peng L, et al. Assessment of heterotrophic growth supported by soluble microbial products in anammox biofilm using multidimensional modeling [J]. *Scientific Reports*, 2016,6(1):27576.
- [40] Zhao Y, Liu S, 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 and Technology*, 2018,52(19):11285-11296.

作者简介: 闫冰(1986-),男,黑龙江绥化人,副研究员,博士,主要从事污水生物脱氮及环境微生物学研究.发表论文 40 余篇.yanbing@jxas.ac.cn;yanbing718@126.com.