

# 环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第38卷 第7期

Vol.38 No.7

**2017**

中国科学院生态环境研究中心 主办  
科学出版社 出版



目次

基于船载走航气溶胶质谱技术的海洋气溶胶研究 ..... 颜金培,陈立奇,林奇,赵淑惠,李磊,朱大勇(2629)

利用 MODIS C6 数据分析中国西北地区气溶胶光学厚度时空变化特征 ..... 赵仕伟,高晓清(2637)

秋冬季节华北背景地区 PM<sub>1</sub> 污染特征及来源 ..... 张周祥,张养梅,张小曳,王亚强,沈小静,孙俊英,周怀刚(2647)

杭州市 PM<sub>2.5</sub> 中水溶性离子的污染特征及其消光贡献 ..... 吴丹,蔺少龙,杨焕强,杜荣光,夏俊荣,齐冰,刘刚,李凤英,杨孟,盖鑫磊(2656)

青岛不同强度霾天气溶胶中二次无机离子的生成及粒径分布 ..... 谢丹丹,祁建华,张瑞峰(2667)

西安市重污染与清洁天 PM<sub>2.5</sub> 组分及其活性氧物质对比 ..... 王莹,韩永明,何世恒,张婷,刘随心,曹军骥(2679)

黄山 PM<sub>10</sub> 中二元羧酸类化合物的季节变化特征及其来源 ..... 孟静静,侯战方,张二勋,董杰,刘晓迪,邢继钊,刘加珍(2688)

泉州市大气 PM<sub>2.5</sub> 镧系元素组成特征及来源解析 ..... 张云峰,于瑞莲,胡恭任,孙境蔚,许文质,张棕巍(2698)

西北石化区周围毒害类空气污染物污染特征及健康风险评价 ..... 许亚宣,李小敏,于华通,董林艳,赵玉婷,姚懿函,邹广迅,张新民(2707)

G20 峰会期间宜兴市大气 VOCs 特征及来源分析 ..... 张磷,张祥志,秦玮,茅晶晶,秦艳红,谢卫平,史文科,陈文泰(2718)

四川省 2005~2014 年农业源氨排放清单及分布特征 ..... 冯小琼,陈军辉,姜涛,钱骏,叶宏(2728)

长三角地区典型城市非道路移动机械大气污染物排放清单 ..... 鲁君,黄成,胡馨遥,杨强,井宝莉,夏阳,卢滨,唐伟,楼晟荣,陶士康,李莉(2738)

我国城市饮用水中 N-亚硝基二甲胺的健康风险评估及水质标准制定 ..... 张秋秋,潘申龄,张昱,杨敏,安伟(2747)

地下水污染风险评估中污染源荷载量化方法的对比分析 ..... 赵鹏,何江涛,王曼丽,崔亚丰(2754)

胶州湾表层海水中的正构烷烃及其来源解析 ..... 张倩,宋金明,彭全材,李学刚,袁华茂,李宁,段雨琴,曲宝晓,王启栋(2763)

桂江流域夏季水-气界面 CO<sub>2</sub> 脱气的空间变化及其影响因素 ..... 张陶,李建鸿,蒲俊兵,吴飞红,李丽,袁道先(2773)

都柳江水系沉积物镉等重金属空间分布特征及生态风险 ..... 宁增平,肖青相,蓝小龙,刘意章,肖唐付,赵彦龙,吴世良(2784)

太湖表层水体及沉积物中双酚 A 类似物的分布特征及潜在风险 ..... 陈政宏,郭敏,徐怀洲,刘丹,程杰,李江,张圣虎,石利利(2793)

洱海沉积物水提取态有机氮特征及与其他来源溶解性有机氮的差异 ..... 李文章,张莉,王圣瑞,肖尚斌,钱伟斌,席银,许可宸,史玲珑(2801)

阿哈水库沉积物-水界面磷、铁、硫高分辨率空间分布特征 ..... 孙清清,陈敬安,王敬富,杨海全,计永雷,兰晨,王箫(2810)

北京市水环境中精神活性物质污染特征 ..... 张艳,张婷婷,陈卫平,郭昌胜,花镇东,张远,徐建(2819)

降雨特征及污染物赋存类型对路面径流污染排放的影响 ..... 陈莹,王昭,吴亚刚,赵剑强,杨文娟(2828)

CaO<sub>2</sub> 不同投加方式对黑臭河道底泥内源磷释放抑制作用 ..... 徐焱,李大鹏,韩菲尔,宋小君,李鑫,周婧,黄勇(2836)

坡耕地薄层紫色土-岩石系统中氮磷的迁移特征 ..... 鲜青松,唐翔宇,朱波(2843)

微生物强化组合浮床净化微盐碱水体的效果 ..... 陈友媛,吴亚东,孙萍,吴丹(2850)

氧化镁基生物质炭高效去除水体中磷的特性 ..... 王彬斌,林景东,万顺利,何锋(2859)

Pd/Fe<sup>0</sup> 双金属复合催化纤维降解水中痕量亚硝基二甲胺 ..... 张环,傅敏,魏俊富,王一冰,安慧颖,沈书怡(2868)

针铁矿、磁铁矿和石膏对 2,4-二氯苯酚厌氧降解的影响 ..... 孔殿超,周跃飞,陈天虎,王进,李碧(2875)

污水再生过程中消毒副产物前体物转化规律 ..... 韩慧慧,缪恒峰,张雅晶,陆敏峰,黄振兴,阮文权(2883)

微生物燃料电池改性阳极处理 PTA 废水 ..... 孙靖云,范梦婕,陈英文,祝社民,沈树宝(2893)

水稻秸秆浸泡液对蓝藻和绿藻生长选择性抑制作用 ..... 苏文,陈洁,张胜鹏,孔繁翔(2901)

沼液 SBR 处理出水养殖螺旋藻 ..... 蔡小波,郁强强,刘锐,赵远,陈吕军(2910)

K<sup>+</sup> 强化高盐环境下厌氧氨氧化脱氮效能 ..... 吴国栋,于德爽,李津,周同,王晓静(2917)

包埋氨氧化细菌短程硝化的高效稳定运行 ..... 于濛雨,刘毅,田玉斌,石欢,徐富,杨宏(2925)

ANAMMOX 的快速启动及 EPS 在 ANAMMOX 颗粒污泥中的空间分布 ..... 李惠娟,彭党聪,陈国燕,姚倩,卓杨,王彬斌(2931)

厌氧氨氧化污泥中氨氧化的潜在电子受体 ..... 李祥,林兴,王凡,袁砚,黄勇,袁怡,毕贞,刘忻,杨朋兵(2941)

基于厌氧氨氧化的含氮废气原位处理 ..... 林兴,王凡,袁砚,李祥,黄勇,袁澄伟(2947)

基于污泥资源化利用的粗放型绿色屋顶生长基质的组成 ..... 沈庆然,李田,曹熠,潘舆(2953)

罗红霉素短期冲击对活性污泥中氨氧化微生物丰度和多样性的影响 ..... 高景峰,孙丽欣,樊晓燕,潘凯玲,李定昌(2961)

不同盐度下活性污泥中微生物群落变化规律及其处理模拟染料废水 ..... 周贵忠,许硕,姚倩,银钗(2972)

CO<sub>2</sub>-咸水-砂岩相互作用过程中微生物群落结构动态变化特征 ..... 王博强,李晨阳,卢伟,樊昊,张冬至,汪治,吕聪,沈福东(2978)

油菜/玉米轮作农田土壤呼吸和异养呼吸对秸秆与生物炭还田的响应 ..... 田冬,高明,黄容,吕盛,徐畅(2988)

模拟气候升温对湿地土壤微生物群落及磷素形态的影响 ..... 腾昌运,沈建国,王忠,王行,李鸿毅,张志剑(3000)

秦岭红桦林土壤细菌群落剖面分布特征及其影响因素 ..... 杜璨,许晨阳,王强,张帆,马武功,和文祥,侯琳,耿增超(3010)

微生物对汞矿区农田土壤汞甲基化的影响 ..... 贾钦,朱雪梅,王琪,傅海辉,郝亚琼,何洁,杨子良(3020)

施用海泡石对铅、镉在土壤-水稻系统中迁移与再分配的影响 ..... 方至萍,廖敏,张楠,吕婷,黄小辉(3028)

BS + CTMAB 复配修饰在黄棕壤吸附苯酚上的应用 ..... 刘伟,孟昭福,任爽,李文斌(3036)

1999 年与 2014 年贡嘎山峨眉冷杉枝和叶中常见重金属的生物富集特征对比 ..... 李芬,王训,罗辑,袁巍,喻子恒,商立海(3045)

铅锌尾矿污染区 3 种菊科植物体内重金属的亚细胞分布和化学形态特征 ..... 朱光旭,肖化云,郭庆军,张忠义,杨曦,孔静(3054)

膨润土调质对污泥堆肥的脱毒及重金属钝化和雌酮消除作用 ..... 周莉娜,蔡函臻,李荣华,王美净,赵军超,王权,张增强(3061)

餐厨垃圾与秸秆混合中温和高温厌氧消化对比 ..... 郭香麟,左剑恶,史绪川,王凯军,李静(3070)

我国村镇生活垃圾可燃组分基本特征及其时空差异 ..... 晏卓逸,岳波,高红,李志龙,黄启飞,聂小琴,汪群慧(3078)

甲烷催化还原 NO<sub>x</sub> 中 Co 基/分子筛催化剂的助剂和载体优化 ..... 潘华,建艳飞,陈宁娜,刘红霞,何焯,贺亚飞(3085)

《环境科学》征稿简则(2737) 《环境科学》征订启事(2809) 信息(2867, 2971, 3027)

# ANAMMOX 的快速启动及 EPS 在 ANAMMOX 颗粒污泥中的空间分布

李惠娟<sup>1,2</sup>, 彭党聪<sup>1</sup>, 陈国燕<sup>1</sup>, 姚倩<sup>1</sup>, 卓杨<sup>1</sup>, 王彬斌<sup>3</sup>

(1. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055; 2. 西北水资源与环境生态教育部重点实验室, 西安 710055; 3. 浙江工业大学环境学院, 杭州 310014)

**摘要:** 为探讨厌氧氨氧化反应的快速启动过程及胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)在厌氧氨氧化颗粒污泥中的空间分布, 采用厌氧序批式反应器(anaerobic sequencing batch reactor, ASBR)接种活性污泥成功启动厌氧氨氧化反应. 结果表明稳定运行时,  $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N去除率均达到99%以上, TN去除率为 $89.87\% \pm 0.43\%$ , 总氮(TN)去除负荷达到 $1.7 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ .  $\text{NH}_4^+$ -N与 $\text{NO}_2^-$ -N的消耗量和 $\text{NO}_3^-$ -N生成量之间的比例关系为 $1: (1.32 \pm 0.08): (0.24 \pm 0.03)$ . 反应器运行中, 出水pH和 $\text{NO}_3^-$ -N浓度可作为反应性能的指标, 快速判断反应器运行情况. 蛋白质为厌氧氨氧化颗粒污泥EPS的主要组分, 蛋白质(PN)和多糖(PS)的含量分别为 $(59.61 \pm 5.64) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $(12.21 \pm 2.04) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , PN/PS为 $4.88 \pm 1.39$ .  $\beta$ -D-呋喃葡萄糖和死细胞集中分布在颗粒污泥最外层; 活细胞、蛋白质、脂类、 $\alpha$ -呋喃葡萄糖和 $\alpha$ -甘露糖遍布整个颗粒污泥, 但主要集中在外侧. 蛋白质和脂类构成了厌氧氨氧化颗粒污泥的骨架, 厌氧氨氧化菌分布在蛋白质和脂类中间.

**关键词:** 厌氧氨氧化; 颗粒污泥; 胞外聚合物; 多重荧光染色; 厌氧序批式反应器

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2017)07-2931-10 DOI: 10.13227/j.hjxx.201701037

## Fast Start-up of ANAMMOX and the Spatial Distribution of EPS in ANAMMOX Granules

LI Hui-juan<sup>1,2</sup>, PENG Dang-cong<sup>1</sup>, CHEN Guo-yan<sup>1</sup>, YAO Qian<sup>1</sup>, ZHUO Yang<sup>1</sup>, WANG Bin-bin<sup>3</sup>

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 2. Key Laboratory of Northwest Water Resource, Environment and Ecology, Ministry of Education, Xi'an 710055, China; 3. College of Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

**Abstract:** An anaerobic sequencing batch reactor (ASBR) inoculated with activated sludge was employed to investigate the start-up of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process and the spatial distribution of extracellular polymeric substances (EPS) in ANAMMOX granules. The results showed that the removal rates of  $\text{NH}_4^+$ -N and  $\text{NO}_2^-$ -N reached more than 99%. The removal rate of total nitrogen (TN) was  $89.87\% \pm 0.43\%$  and the TN removal load in the ASBR was  $1.7 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ . The ratios of nitrite consumption and nitrate production to ammonium consumption were  $1.32 \pm 0.08$  and  $0.24 \pm 0.03$ , respectively. Besides, the pH and the effluent nitrate concentration in bulk liquid were considered as two simple indicators for rapid diagnosis of ANAMMOX performance. The proteins (PN) was the main component of EPS in ANAMMOX granular sludge. The PN and polysaccharides (PS) in ANAMMOX granules were  $(59.61 \pm 5.64) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  and  $(12.21 \pm 2.04) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectively, with the ratio of PN/PS reaching approximately  $4.88 \pm 1.39$ .  $\beta$ -D-glucofuranose and dead cells were distributed in the outermost layer of granules, while living cells, PN, lipids,  $\alpha$ -glucosamine and  $\alpha$ -mannose were distributed throughout the granules and mainly concentrated on the outside of granules. PN and lipids constituted the framework of ANAMMOX granules and ANAMMOX bacteria were embedded among the PN and lipids matrix.

**Key words:** anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX); granule sludge; extracellular polymeric substances (EPS); multi-fold fluorescent staining; anaerobic sequencing batch reactor (ASBR)

厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, ANAMMOX)是指在厌氧或缺氧条件下, 厌氧氨氧化菌以亚硝氮为电子受体将氨氮氧化为氮气的过程<sup>[1-3]</sup>. 与传统硝化/反硝化过程相比, 厌氧氨氧化反应可减少100%的曝气能耗、100%的有机碳源、80%~90%的污泥产率<sup>[4,5]</sup>, 因此厌氧氨氧化反应被称为一种高效低耗的生物脱氮技术. 然而厌氧氨氧化菌生长缓慢( $\mu_{\max} = 0.065 \text{ d}^{-1}$ )世代时间长(11

d)<sup>[6]</sup>成为制约厌氧氨氧化工艺广泛应用的主要原因, 因此如何快速启动厌氧氨氧化工艺成为突破其应用的一种有效手段. 其次厌氧氨氧化菌对环境变化十分敏感, 其活性容易受到抑制且恢复周期长, 因此找

收稿日期: 2017-01-05; 修订日期: 2017-02-24

基金项目: 陕西省住房城乡科技开发项目(2015-K65); 浙江省自然科学基金青年基金项目(LQ15E080011)

作者简介: 李惠娟(1986~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为废水的生物处理理论与技术, E-mail: lhj270836125@163.com

到可反映厌氧氨氧化反应性能的简单指标对维持反应器稳定运行十分必要. 研究发现厌氧氨氧化颗粒污泥不仅可以提高污泥的沉降性还有利于提高厌氧氨氧化菌对环境的适应性, 认为培养厌氧氨氧化颗粒污泥是维持厌氧氨氧化菌浓度的手段之一<sup>[7,8]</sup>.

已有很多研究表明胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 在污泥颗粒化及维持颗粒污泥的结构稳定中起到重要作用<sup>[9,10]</sup>. 例如 EPS 中的蛋白质 (PN) 和多糖 (PS) 直接影响细胞表面电性、亲疏水性及生物聚集体的空间结构<sup>[11,12]</sup>. 虽然研究发现厌氧氨氧化菌可分泌较多的 EPS<sup>[13]</sup>, 但目前国内外关于 EPS 的研究主要集中在好氧颗粒污泥领域<sup>[14,15]</sup>, 针对厌氧氨氧化颗粒污泥的 EPS 研究较少. 现有关于厌氧氨氧化菌 EPS 的研究主要集中在 EPS 的组成、含量<sup>[16,17]</sup>, 关于 EPS 在厌氧氨氧化颗粒污泥内的空间分布及其在厌氧氨氧化污泥颗粒化过程中的作用的研究较少. 因此有必要研究 EPS 在厌氧氨氧化污泥颗粒化过程中的作用及其在厌氧氨氧化菌细胞外的分布.

本研究采用厌氧序批式反应器 (anaerobic sequencing batch reactor, ASBR) 成功富集厌氧氨氧化颗粒污泥, 解释了以活性污泥做接种泥时厌氧氨氧化反应器的启动过程, 探讨了表征厌氧氨氧化反应器性能的简单指标. 采用多重荧光染色的方法考察了 EPS 在厌氧氨氧化颗粒污泥内的空间分布, 进一步解释了 EPS 的不同组分在厌氧氨氧化污泥颗粒化中作用, 以期快速判断厌氧氨氧化反应器的运行情况提供理论依据, 并直观地解释了 EPS 对形成厌氧氨氧化颗粒污泥的作用.

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验装置与运行

本实验采用 ASBR 反应器, 反应器工作容积为 5 L. 反应器通过外部加热水槽及温控系统装置控制反应温度为  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . 反应器的进水、反应、沉淀和出水由 PLC 控制自动运行. 启动初期, 水力停留时间 (hydraulic retention time, HRT) 为 36 h, 反应器稳定运行后, HRT 缩短至 18 h. 稳定运行周期为 8 h, 其中进水 360 min; 反应 90 min; 沉淀 15 min; 出水 10 min; 闲置 5 min. 搅拌速度为  $70 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 出水 pH 控制 7.5 ~ 8.0.

### 1.2 实验用水及接种污泥

反应器运行期间采用人工配水, 进水组分见表 1, 微量元素溶液<sup>[18]</sup>组分见表 2. 根据出水 pH 值采

用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 和  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 调节进水 pH. 接种污泥取自实验室稳定运行的 A/A/O 系统的活性污泥.

表 1 实验废水组分

组分	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
$\text{NH}_4^+ - \text{N} (\text{NH}_4\text{Cl})$	0.03 ~ 0.8
$\text{NO}_2^- - \text{N} (\text{NaNO}_2)$	0.04 ~ 1.06
$\text{KHCO}_3$	0.50
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.05
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.18
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10
微量元素溶液 I	1.25 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$
微量元素溶液 II	1.25 $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$

表 2 微量元素组分

名称	组分	浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
微量元素溶液 I	EDTA	5
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.145
	EDTA	15
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.24
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
微量元素溶液 II	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.19
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.014
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.43
	$\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.99
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.22
	$\text{NaSeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.21

## 1.3 分析方法

### 1.3.1 常规指标分析

$\text{NH}_4^+ - \text{N}$  采用纳氏试剂分光光度法;  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  采用 *N*-(1-萘基)-乙二胺分光光度法;  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  采用紫外分光光度法; pH: 雷磁 PHS-3C 型 pH 计; MLSS 和 MLVSS 采用重量法. 此外, 厌氧氨氧化反应器产气量采用湿式气体流量计进行计量.

### 1.3.2 荧光原位杂交 (fluorescent *in situ* hybridization, FISH)

样品预处理: 取反应器活性污泥 2 mL, 离心 ( $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 5 min, 去上清液, 加入  $1 \times \text{PBS}$  缓冲溶液 1 mL 重悬, 重复操作两次后, 加入 1 mL 的 4% 多聚甲醛溶液重悬, 放置  $4^{\circ}\text{C}$  下固定 3 h, 使细胞形态固定. 然后离心, 倾去上清液, 加入  $1 \times \text{PBS}$  缓冲溶液 1 mL 离心 5 min, 洗去多余的多聚甲醛溶液重复操作 3 次. 最后, 分别加入体积比为 1:1 的  $1 \times \text{PBS}$  缓冲溶液和无水乙醇, 摇匀置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存.

脱水和杂交: 取由 4% 多聚甲醛固定后的污泥

样品,均匀涂抹于经酒精清洗过的载玻片上,至少取 3 个平行样,干燥后的样品依次用 50%、80%、95% 的乙醇溶液各浸泡 3 min 对细胞进行脱水,取出后风干。配 2 mL 杂交缓冲液(SDS 10%, Tris-HCl 1 mol·L<sup>-1</sup>, NaCl 5 mol·L<sup>-1</sup>, 去离子甲酰胺, ddH<sub>2</sub>O)。将无菌水配置成的 25 ng·μL<sup>-1</sup>的探针与杂交缓冲液按体积比 1:8 混合成探针使用液,用锡箔纸包好放入 46℃ 中预热 5 min。将剩余的杂交缓冲液遍布在杂交管内折好的吸水纸上,目的是让样品在杂交过程中始终处于杂交缓冲液的潮湿环境中,将固定好样品的载

玻片放入杂交管中,在 46℃ 中放置数分钟。取 9 μL 均匀滴入载玻片上的污泥试样中,然后将载玻片迅速移回杂交管中在 46℃ 中避光杂交 2~3 h。杂交结束后,将载玻片快速放入预热后的淋洗缓冲液(SDS 10%, Tris-HCl 1 mol·L<sup>-1</sup>, NaCl 5 mol·L<sup>-1</sup>, ddH<sub>2</sub>O)中,46℃ 水浴 10 min 后用 4℃ 冰水冲洗样品,于黑暗中自然风干。经过风干的样品封片后使用激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP8)进行观察。

本实验所用探针(表 3):总细菌、厌氧氨氧化菌分别采用 Eub338mix、Amx368。

表 3 荧光原位杂交实验中所用的探针

Table 3 Probes used in FISH

探针名称	RNA 序列(5'-3')	标记细菌种属	文献
Eub338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT		
Eub338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Real bacteria	[19,20]
Eub338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT		
Amx368	CCT TTC GGG CAT TGC GAA	All anammox bacteria	[21]

### 1.3.3 胞外聚合物的提取及测定

EPS 的提取采用阳离子交换树脂法(cation exchange resin, CER)<sup>[22]</sup>。取含有 0.1 g MLVSS 的污泥样品,4℃、5 000 r·min<sup>-1</sup> 转速下离心 10 min 后弃去上清液。将上述离心产生的泥饼用 PBS 缓冲液(含有 2 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 和 1 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 并调节 pH 为 7) 重悬至 30 mL。然后将重悬后的混合液在 4℃、5 000 r·min<sup>-1</sup> 转速下离心 10 min。此过程重复两次,以确保获得干净的污泥。称取 7 g 阳离子交换树脂(Dower Marathon C, Na<sup>+</sup> 型, 20~50 目, 货号 Fluka 91973)于锥形瓶中,加入 30 mL PBS 缓冲液,于磁力搅拌器 800 r·min<sup>-1</sup> 搅拌 1 h,弃去上清液(清洗树脂过程)。随后将上述洗净的污泥用分散机分散 5 min,并用 PBS 缓冲液冲洗至 30 mL,转移到已洗好的树脂中,闭光 800 r·min<sup>-1</sup> 搅拌 4 h 进行提取。提取过程结束后,将混合液 4℃、5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min;将离心产生的上清液再次离心 15 min,4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup>。

蛋白质的测定采用 Lowry 法,以牛血清蛋白作为标准物质,具体步骤参照 Frølund 等<sup>[22]</sup> 的描述进行;多糖的测定采用苯酚-硫酸法,以无水葡萄糖作为标准物质,具体步骤参照 DuBois 等<sup>[23]</sup> 的描述进行。

### 1.3.4 多重荧光染色分析

为了对厌氧氨氧化颗粒污泥中的蛋白质、多糖、脂类及死/活细胞的相对含量和空间分布进行分析,本实验使用不同的荧光染料分别对 EPS 和

死/活细胞进行多重荧光染色。异硫氰酸荧光素(FITC)用于胞外蛋白质的染色;Con A (Tetramethylrhodamine conjugates of Concanavalin A) 用来指示 α-呋喃葡萄糖和 α-甘露糖残基;卡尔科弗卢尔荧光增白剂(Calcofluor white)用来染色 β-D-呋喃葡萄糖基;尼罗红(Nile red)用以指示脂类及疏水基团;使用 SYTO 63 染色颗粒污泥中总细胞;SYTOX blue 用于死细胞的染色。多重荧光染色所用荧光染料的激发波长、发射波长、用量和使用浓度见表 4。其中 FITC 和尼罗红购自美国 Mpbio 公司;Calcofluor white 购自美国 Sigma 公司;Con A、SYTO 63 和 SYTOX blue 购自美国 invitrogen 公司。

根据 Chen 等<sup>[24]</sup> 提出的方法,对厌氧氨氧化颗粒污泥进行多重荧光染色。步骤如下:将适量厌氧氨氧化颗粒污泥用 pH 为 7.2,浓度为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 遍,首先把 100 μL 的 SYTO 63 工作液滴加到样品中染色 30 min,然后在样品中添加 100 μL 碳酸氢钠缓冲液(0.1 mol·L<sup>-1</sup>),使胺基保持非质子化的状态,再将样品用 10 μL 的异硫氰酸荧光素(FITC)溶液染色 1 h,后加入 100 μL 的 ConA 溶液染色 30 min,再在样品中添加 100 μL 的 Calcofluor white 溶液染色 30 min,最后加入 60 μL 尼罗红染色 10 min,每次染色后均要用 pH = 7.2 的 PBS 缓冲溶液清洗 3 遍。染色完毕后,将样品 -4℃ 保存。在观察前在样品中添加 100 μL 的 SYTOX blue 溶液染色 5 min。厌氧氨氧化颗粒污泥经染色后,使用冰冻切片(Leica CM1950)进行切片(厚

表 4 颗粒污泥多重荧光染色所用染料特性  
Table 4 Stains used in the proposed staining scheme

染料名称	所染物质	激发波长/nm	发射波长/nm	用量/ $\mu\text{L}$	使用浓度
FTTC	蛋白质	448	500 ~ 550	10	$10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
Con A	$\alpha$ -呋喃葡萄糖和 $\alpha$ -甘露糖	543	550 ~ 600	100	$0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
Calcofluor white	$\beta$ -D-呋喃葡萄糖	400	410 ~ 480	100	$0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
尼罗红	脂类和疏水基团	514	625 ~ 700	60	$0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
SYTO 63	总细胞	633	650 ~ 700	100	$20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
SYTOX blue	死细胞	458	460 ~ 500	100	$2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

度为  $10 \sim 20 \mu\text{m}$ ),再使用激光扫描共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8) 进行观察。

## 2 结果与讨论

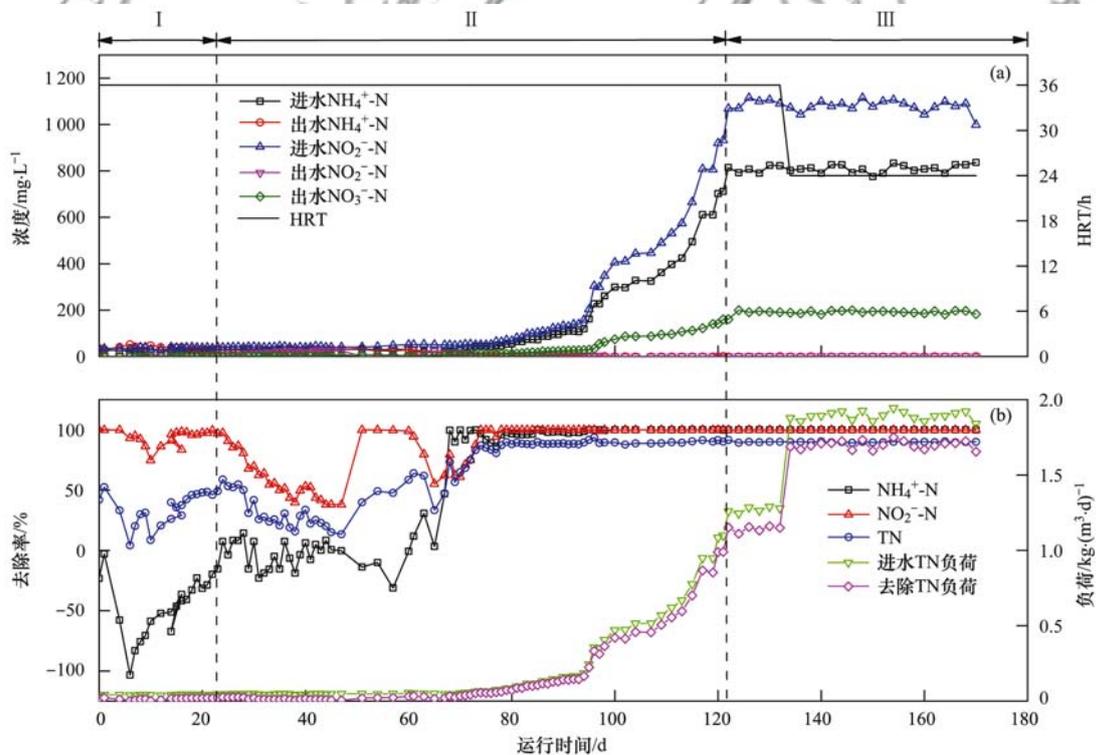
### 2.1 反应器的启动及运行特性

反应器启动后,通过逐步提高进水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度及缩短 HRT 的方式提高反应器的氮负荷。图 1 为启动初期至稳定运行期反应器运行效果图。根据出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度变化可将整个启动过程分为活性停滞期 ( $0 \sim 23 \text{ d}$ )、活性提高期 ( $24 \sim 122 \text{ d}$ ) 和稳定运行期 ( $123 \sim 160 \text{ d}$ ) 这 3 个阶段。

在阶段 I ( $0 \sim 23 \text{ d}$ ),出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度高于进水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度,而出水  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度低于进水  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  浓度,出水  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度基本为零。路青等<sup>[25]</sup> 分别接

种好氧污泥、厌氧颗粒污泥和厌氧消化污泥均成功启动厌氧氨氧化,在启动初期,出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度大于进水,这与本研究结果一致。这是由于污泥接种后微生物所处环境改变,使得接种硝化污泥中的好氧菌因不能适应厌氧环境而发生细胞自溶<sup>[26]</sup>,其次是由于硝化污泥中厌氧氨氧化菌所占份额很小,消耗  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  有限,从而释放出大量的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,导致出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度升高。此外,细菌自溶产生大量的有机物为反硝化菌提供了电子供体和碳源,反硝化成为该阶段的主反应,进水  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  因反硝化作用而得到去除<sup>[26]</sup>。

在阶段 II ( $24 \sim 120 \text{ d}$ ),出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度逐渐降低,在  $24 \sim 66 \text{ d}$  时出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度接近进水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度,随后出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  浓度大幅下降。而出水



(a) 进、出水  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  浓度变化, HRT 变化; (b)  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN 去除率, 进水 TN 负荷及去除 TN 负荷

图 1 厌氧氨氧化反应器运行效果

Fig. 1 Performance of the ANAMMOX reactor

$\text{NO}_2^-$ -N 浓度先升高后下降,这是由于前一阶段中细菌自溶产生的有机物被反硝化菌利用和进水稀释后,使得反硝化菌失去电子供体而活性减弱,导致  $\text{NO}_2^-$ -N 去除率降低,出水  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度升高<sup>[27]</sup>,随着厌氧氨氧化活性的提高, $\text{NO}_2^-$ -N 去除率升高. 在 67 d 时,出水  $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 浓度同时小于进水  $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 浓度,首次出现明显的厌氧氨氧化反应. 随后厌氧氨氧化菌活性逐渐增大,进水浓度快速提升(67 ~ 122 d),此时厌氧氨氧化菌成为优势菌种.

在阶段 III (123 ~ 170 d),反应器厌氧氨氧化菌活性稳定,标志着厌氧氨氧化反应系统启动成功. 通过缩短 HRT,进一步提高反应器的氮负荷,反应负荷最终稳定在  $1.92 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ ,总氮(TN)去除负荷达到  $1.7 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ . 本阶段内, $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 去除率均接近 100%,TN 去除率为  $89.87\% \pm 0.43\%$ .

## 2.2 厌氧氨氧化反应器的性能指标

厌氧氨氧化菌生长缓慢、对外界环境变化极其敏感<sup>[28]</sup>. 因此,厌氧氨氧化菌的活性容易受到抑制,并且恢复周期长. 研究者有必要借助一些简单、高效的性能指标快速判断反应器的运行状况.

### 2.2.1 pH

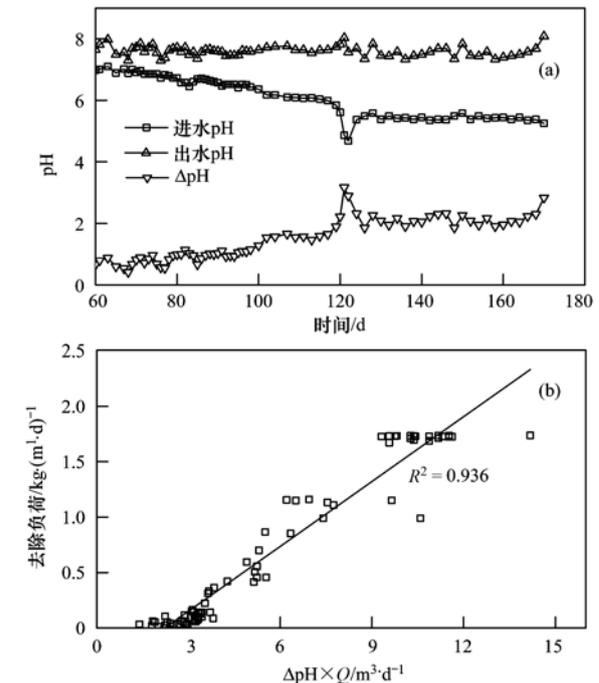
很多研究者指出厌氧氨氧化反应器出水 pH 高于进水 pH<sup>[29-31]</sup>. 如图 2(a)所示,实验过程中发现厌氧氨氧化反应器出水 pH 远高于进水 pH,并且总氮去除负荷与进出水 pH 差值、进水量( $\Delta\text{pH} \times Q$ )之间存在明显的线性相关性( $r^2 = 0.936$ ). 出水 pH 值升高是由于厌氧氨氧化反应过程消耗质子<sup>[29]</sup>. 因此如果进水水质和反应器运行参数不变,可借助出水 pH 值快速判断厌氧氨氧化反应器的运行状况. 如果在进水水质恒定的条件下出水 pH 有很大降低,这就说明反应器运行中出现问

### 2.2.2 $\text{NO}_3^-$ -N 产量

由于厌氧氨氧化菌通过硝酸盐还原酶将  $\text{NO}_2^-$ -N 氧化为  $\text{NO}_3^-$ -N 获得生长所需的能量,因此  $\text{NO}_3^-$ -N 产率也是厌氧氨氧化反应性能的一个重要指标. 实验期间发现出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度与进水 TN 浓度有良好的线性相关性(图 3). 因此如果在进水浓度不变的条件下,出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度出现很大程度的下降,说明反应器运行出现问题,需要及时处

## 2.3 厌氧氨氧化反应化学计量关系

目前,研究者普遍接受的厌氧氨氧化反应化学计量关系如式(1)所示<sup>[32]</sup>. 然而,不同研究者得出



(a) 进、出水 pH 及  $\Delta\text{pH}$  的变化; (b) 去除负荷与  $\Delta\text{pH} \times Q$  的关系

图 2 厌氧氨氧化反应器的性能指标 (pH)

Fig. 2 The pH indicator for start-up performance of the ANAMMOX reactor

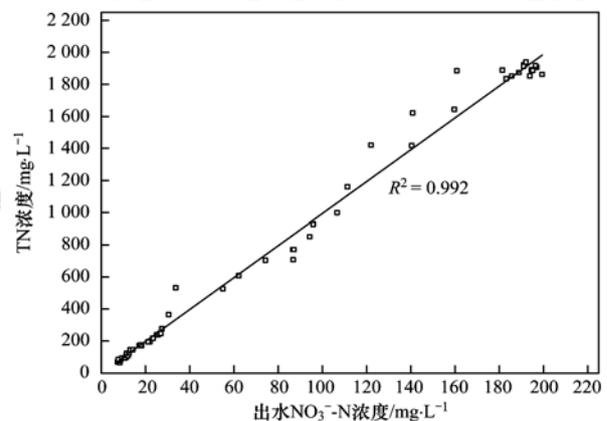
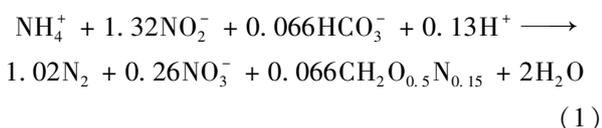


图 3 进水 TN 浓度与出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度的关系

Fig. 3 Relationship between influent TN concentration and effluent  $\text{NO}_3^-$ -N concentration

的结论之间存在较大差异,冯平等<sup>[33]</sup>的研究结果表明,稳定运行阶段三者之间的比值为 1:1.44:0.26,而张海芹等<sup>[34]</sup>采用不同接种污泥启动 ABR 厌氧氨氧化反应器时发现稳定运行后三者的比值分别为 1:1.16:0.21 和 1:1.27:0.36. 除此之外一些研究者发现由于进水基质、运行条件、反应器类型和厌氧氨氧化菌菌种的不同, $\text{NO}_3^-$ -N/ $\text{NH}_4^+$ -N 在 0.5 ~ 4 之间变化<sup>[35,36]</sup>. 本实验中, $\text{NH}_4^+$ -N 与  $\text{NO}_2^-$ -N 的消耗量和  $\text{NO}_3^-$ -N 生成量之间的比例关系为 1:1.32 ±

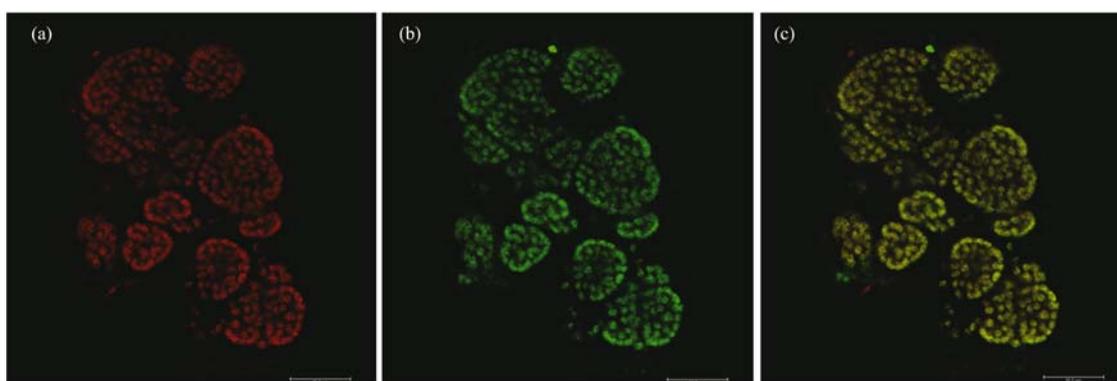
0.08:0.24 ± 0.03.  $\text{NH}_4^+$ -N 与  $\text{NO}_2^-$ -N 消耗量的比值与 Strous 等<sup>[32]</sup>提出的理论值(1.32)一致,而  $\text{NO}_3^-$ -N 生成量与  $\text{NH}_4^+$ -N 消耗量的比值小于 0.26,这可能是由于系统中还存在少量反硝化菌,其利用菌体由于生长过程中死亡或外层组织脱落产生的少量有机物,进行反硝化作用去除一部分  $\text{NO}_3^-$ -N.



## 2.4 厌氧氨氧化菌的检测

实验期间采用 FISH 技术对絮体污泥及颗粒污

泥中厌氧氨氧化菌的百分比进行检测. 图 4 显示的绿色荧光信号 (Amx338) 与红色荧光信号 (EUB338mix) 几乎完全重合,说明此时厌氧氨氧化菌成为反应器中的优势菌,厌氧氨氧化菌占总细菌的  $87.39\% \pm 4.76\%$ . 絮体污泥的 FISH 图片显示厌氧氨氧化菌的荧光信号呈环形,其内部荧光强度较弱,这一结果与 Strous 等<sup>[32]</sup>和 Araujo 等<sup>[37]</sup>的研究结果一致. 这是由于厌氧氨氧化菌细胞内部存在一个被称为厌氧氨氧化体的隔室,而厌氧氨氧化体的主要成分为脂类,厌氧氨氧化体内不含核糖体<sup>[38]</sup>.



(a) 红色 EUB338mix; (b) 绿色 Amx338; (c) a, b 单个图像的叠加

图 4 厌氧氨氧化絮体污泥的 FISH (bar = 10 μm)

Fig. 4 FISH images of ANAMMOXA floc sludge (bar = 10 μm)

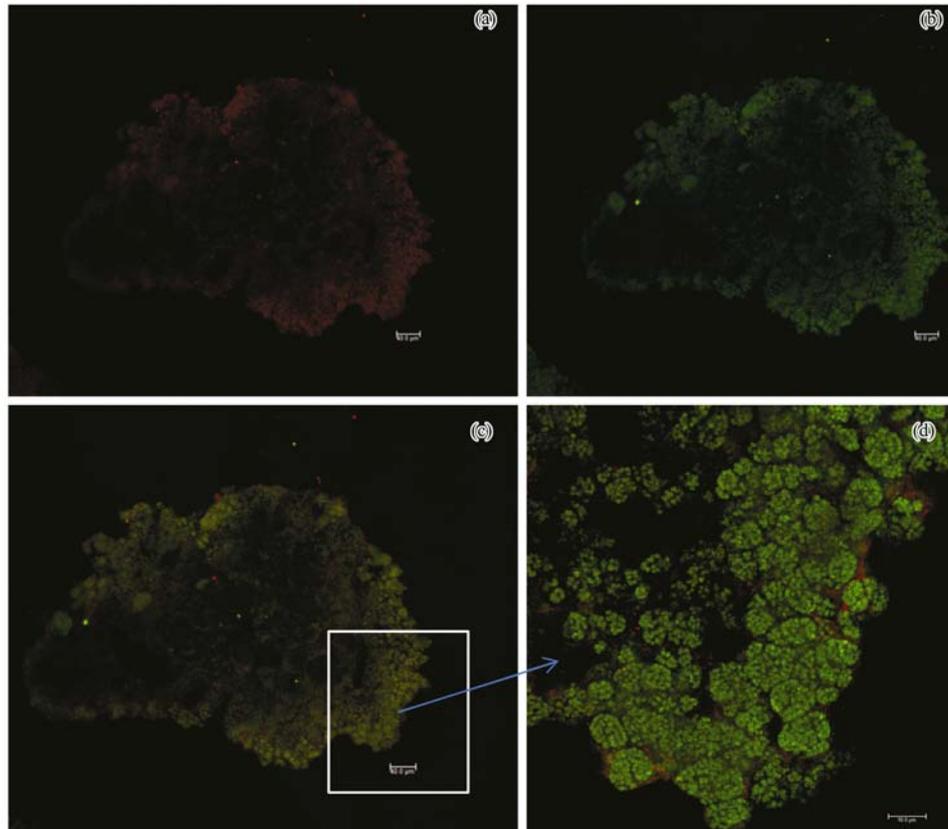
由颗粒污泥的 FISH 图片(图 5)可看出,厌氧氨氧化菌主要集中在颗粒污泥外侧,颗粒污泥内部较少. 颗粒污泥中厌氧氨氧化菌占总细菌的  $90.93\% \pm 6.89\%$ . 这是由于基质受传质阻力影响,颗粒污泥内部基质浓度低,外部基质充足. 由图 4 和 5 可看出厌氧氨氧化菌容易形成生物聚集体,这可能是由于厌氧氨氧化菌可分泌大量 EPS.

## 2.5 厌氧氨氧化颗粒污泥的胞外聚合物的含量及其分布

EPS 的化学成分比较复杂,其组分因来源不同而有所差别. 总体而言,PN 和 PS 是 EPS 的主要成分<sup>[39]</sup>. CER 法提取后,测得其中蛋白质和多糖的含量分别为  $(59.61 \pm 5.64) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  和  $(12.21 \pm 2.04) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , PN/PS 为  $4.88 \pm 1.39$ . 其他关于厌氧氨氧化颗粒污泥 EPS 的研究也发现 PN 是 EPS 的主要组分<sup>[7,8]</sup>. 这可能是由于 EPS 是细胞体与水溶液间的离子传递通道,而离子的转移过程需要转移蛋白参与,因而会有大量蛋白质分泌到胞外参与转移过程<sup>[40]</sup>. 其次是由于 EPS 中的蛋白质容易与金属离

子通过静电作用而键合<sup>[41]</sup>,降低细胞表面的负电性,促进污泥的絮凝作用,同时蛋白质中含有大量疏水基团,其含量的变化会改变微生物的表面性质,从而促进污泥的颗粒化进程. 对比表 5 各类颗粒污泥 EPS 组分及含量可发现,厌氧氨氧化颗粒污泥的 EPS 含量高于其他类型的颗粒污泥,说明厌氧氨氧化菌可分泌较多的 EPS<sup>[13]</sup>. 表 5 所列出的不同接种污泥形成的厌氧氨氧化颗粒污泥 PN/PS 差别较大,而同种接种污泥形成的厌氧氨氧化颗粒污泥 PN/PS 接近,因此推断接种污泥对厌氧氨氧化颗粒污泥 PN/PS 影响较大.

厌氧氨氧化颗粒污泥的多重荧光染色结果也证明了蛋白质是 EPS 的主要组分. 如图 6(c) ~ 6(e) 所示,蛋白质的荧光强度和面积均大于多糖,说明蛋白质的含量高于多糖.  $\beta$ -D-呋喃葡萄糖和死细胞集中分布在颗粒污泥最外层,而活细胞、蛋白质、脂类、 $\alpha$ -呋喃葡萄糖和  $\alpha$ -甘露糖遍布整个颗粒污泥,并主要集中在外侧. McSwain 等<sup>[11]</sup>认为非细胞类蛋白质负责维持颗粒污泥的稳定性,因此可以认为蛋



(a) 红色 EUB338mix; (b) 绿色 Amx338; (c) a, b 单个图像的叠加; (d) 局部放大图; (a) ~ (c) bar = 40  $\mu\text{m}$ , (d) bar = 10  $\mu\text{m}$

图 5 厌氧氨氧化颗粒污泥的 FISH

Fig. 5 FISH images of ANAMMOXA granular sludge

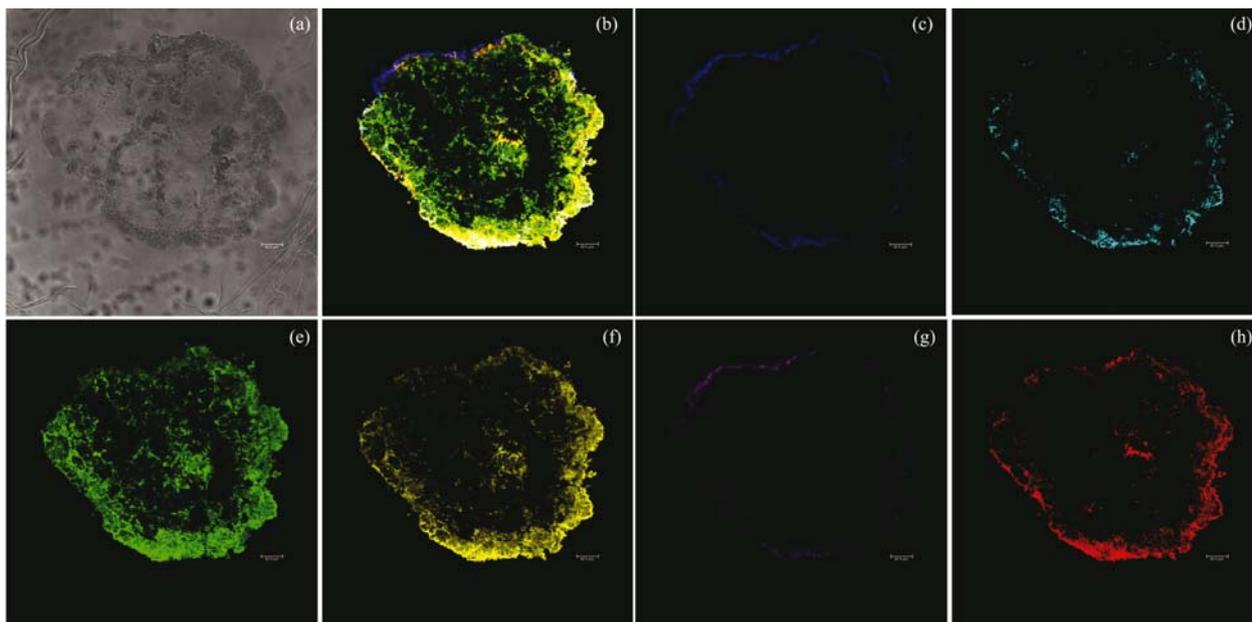
表 5 厌氧氨氧化颗粒污泥及其它种类颗粒污泥 EPS 组分

Table 5 EPS components in anammox granules and other different granules

样品	PN/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	PS/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	PN/PS	EPS/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	HRT/h	丰度/%	接种污泥	文献
厌氧氨氧化颗粒污泥	$59.61 \pm 5.64$	$12.21 \pm 2.04$	4.88	71.82	24	91	活性污泥	本研究
厌氧氨氧化颗粒污泥	$55.6 \pm 3.2$	$70.8 \pm 6.5$	0.8	127.2	22	90	普通活性污泥	[42]
厌氧氨氧化颗粒污泥	$75.3 \pm 9.4$	$36.0 \pm 4.1$	2.1	111.3	36	68	厌氧颗粒污泥	[42]
厌氧氨氧化颗粒污泥	$164.4 \pm 9.3$	$71.8 \pm 2.3$	2.29	236.2	0.16	—	厌氧颗粒污泥	[8]
厌氧氨氧化颗粒污泥	$298.2 \pm 8.7$	$112.1 \pm 2.8$	2.66	140.3	0.1	—	厌氧颗粒污泥	[8]
厌氧氨氧化颗粒污泥	$42.7 \pm 6.5$	$83.2 \pm 7.9$	0.51	125.9	24	—	好氧颗粒污泥	[43]
厌氧氨氧化颗粒污泥	34.9	9.8	3.54	44.7	24	>89	厌氧氨氧化污泥	[44]
厌氧氨氧化颗粒污泥	67.9	25.3	2.7	93.2	72	80	全程自养脱氮污泥	[13]
好氧颗粒污泥	12	26	0.46	38	20.4 ~ 55.2	—	好氧颗粒污泥	[45]
厌氧颗粒污泥	42.7	17.3	2.47	60	—	—	厌氧污泥	[46]
硝化颗粒污泥	$56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	3.11	$74 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2.8	—	硝化污泥	[47]
反硝化颗粒污泥	32	42.3	0.76	74.3	0.83	—	反硝化颗粒污泥	[48]

白质和脂类构成了厌氧氨氧化颗粒污泥的骨架,厌氧氨氧化菌分布在蛋白质和脂类物质中间.多糖主要集中在颗粒污泥外层,可能是由于多糖包含大量的亲水性基团,如羧基,有利于厌氧氨氧化菌获得基质.其次亲水性的 EPS 可阻止气泡的相互黏附,从而避免颗粒污泥上浮现象<sup>[41]</sup>.由图 6(c)所示  $\beta$ -多糖类似壳一样包裹在颗粒污泥最外层,是因为颗粒污泥外部不溶解性的  $\beta$ -多糖可增强颗粒污泥的稳

定性<sup>[49]</sup>.Adav 等<sup>[50]</sup>研究发现分布在颗粒外层的  $\beta$ -多糖对维持颗粒污泥稳定性的贡献大于内部的  $\beta$ -多糖. Tay 等<sup>[51]</sup>发现,碳水化合物可促进细胞间的黏附,进而稳定微生物聚集体的结构.活细胞主要集中在外侧,颗粒污泥内部较少,这一结果与颗粒污泥的 FISH 检测结果一致,推测这可能与厌氧氨氧化颗粒污泥的形成过程有关.厌氧氨氧化菌在颗粒形成过程中以填充的形式进入颗粒内部,但外部基



(a) 明场; (b) c~f 单个图像的叠加; (c) 蓝色 (Calcofluor white)  $\beta$ -D-呋喃葡萄糖; (d) 青色 (Con A)  $\alpha$ -呋喃葡萄糖和  $\alpha$ -甘露糖; (e) 绿色 (FITC) 蛋白质; (f) 黄色 (尼罗红) 脂类; (g) 紫红色 (SYTOX blue) 死细胞; (h) 红色 (SYTO 63) 总细胞

图 6 厌氧氨氧化颗粒污泥的多重荧光染色 (bar = 40  $\mu$ m)

Fig. 6 Multiple fluorescent staining of ANAMMOXA granular sludge (bar = 40  $\mu$ m)

质充足内部基质较少,因此活细胞形成了这种独特的分布.死细胞集中在外侧可能是由于进水没有去除氧气,颗粒污泥外侧的厌氧氨氧化菌因接触氧气失活.

### 3 结论

采用 ASBR 反应器,接种硝化污泥快速启动了厌氧氨氧化反应.反应器稳定运行时, $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 去除率均达到 99% 以上, TN 去除率为  $89.87\% \pm 0.43\%$ ,总氮 (TN) 去除负荷达到  $1.7 \text{ kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ .本实验中厌氧氨氧化反应  $\text{NH}_4^+$ -N、 $\text{NO}_2^-$ -N 与  $\text{NO}_3^-$ -N 三者之间的比值为  $1 : (1.32 \pm 0.08) : (0.24 \pm 0.03)$ .实验过程中发现,进出水 pH 差值、进水量 ( $\Delta \text{pH} \times Q$ ) 与总氮负荷间存在线性相关性,出水  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度同进水 TN 浓度间同样具有良好的线性相关性,因此在运行条件不变的前提下可通过出水 pH 和  $\text{NO}_3^-$ -N 浓度快速判断反应器运行情况. EPS 含量的结果表明蛋白质为厌氧氨氧化颗粒污泥 EPS 的主要组分,蛋白质和多糖的含量分别为  $(59.61 \pm 5.64) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 $(12.21 \pm 2.04) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , PN/PS 为  $4.88 \pm 1.39$ .多重荧光染色的结果表明, $\beta$ -D-呋喃葡萄糖和死细胞集中分布在颗粒污泥最外层;活细胞、蛋白质、脂类、 $\alpha$ -呋喃葡萄糖和  $\alpha$ -甘露糖遍布整个颗粒污泥,并主要集中在外侧.蛋白质和脂类构成了厌氧氨氧化颗粒污泥的骨架,厌氧氨

氧化菌分布在蛋白质和脂类物质中间, $\beta$ -D-呋喃葡萄糖包裹在厌氧氨氧化颗粒污泥最外层,对维持颗粒污泥结构稳定起重要作用.

### 参考文献:

- [1] Bagchi S, Biswas R, Nandy T. Autotrophic ammonia removal processes: ecology to technology [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2012, **42**(13): 1353-1418.
- [2] Kuenen J G. Anammox bacteria: from discovery to application [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, **6**(4): 320-326.
- [3] Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, *et al.* New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, **27**(4): 481-492.
- [4] Terda A, Zhou S, Hosomi M. Presence and detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria and appraisal of anammox process for high-strength nitrogenous wastewater treatment: a review [J]. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 2011, **13**(6): 759-781.
- [5] Henze M, van Loosdrecht M C M, Ekama G A, *et al.* *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design* [M]. London: IWA Publishing, 2008. 139-154.
- [6] López H, Puig S, Ganigué R, *et al.* Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2008, **83**(3): 233-241.
- [7] Chen T T, Zheng P, Shen L D. Growth and metabolism characteristics of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria aggregates [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, **97**(12): 5575-5583.
- [8] Tang C J, Zheng P, Wang C H, *et al.* Performance of high-

- loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge [J]. *Water Research*, 2011, **45**(1): 135-144.
- [9] Forster C F. Anaerobic upflow sludge blanket reactors: aspects of their microbiology and their chemistry [J]. *Journal of Biotechnology*, 1991, **17**(3): 221-231.
- [10] Schmidt J E E, Ahring B K. Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, **42**(2-3): 457-462.
- [11] McSwain B S, Irvine R L, Hausner M, *et al.* Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(2): 1051-1057.
- [12] Liu Y, Tay J H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge [J]. *Water Research*, 2002, **36**(7): 1653-1665.
- [13] Ni S Q, Fessehaie A, Lee P H, *et al.* Interaction of anammox bacteria and inactive methanogenic granules under high nitrogen selective pressure [J]. *Bioresource Technology*, 2010, **101**(18): 6910-6915.
- [14] 张丽丽, 陈效, 陈建孟, 等. 胞外多聚物在好氧颗粒污泥形成中的作用机制[J]. *环境科学*, 2007, **28**(4): 4795-4799. Zhang L L, Chen X, Chen J M, *et al.* Role mechanism of extracellular polymeric substances in the formation of aerobic granular sludge [J]. *Environmental Science*, 2007, **28**(4): 4795-4799.
- [15] 王浩宇, 苏本生, 黄丹, 等. 好氧污泥颗粒化过程中 Zeta 电位与 EPS 的变化特性[J]. *环境科学*, 2012, **33**(5): 1614-1620. Wang H Y, Su B S, Huang D, *et al.* Profiles of Zeta potential and EPS in granulation process of aerobic sludge [J]. *Environmental Science*, 2012, **33**(5): 1614-1620.
- [16] Li Y, Huang Z X, Ruan W Q, *et al.* ANAMMOX performance, granulation, and microbial response under COD disturbance[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2015, **90**(1): 139-148.
- [17] 宋成康, 王亚宜, 韩海成, 等. 温度降低对厌氧氨氧化脱氮效能及污泥胞外聚合物的影响[J]. *中国环境科学*, 2016, **36**(7): 2006-2013. Song C K, Wang Y Y, Han H C, *et al.* Effect of decreasing temperature on the performance and extracellular polymer substance of anaerobic ammonia oxidation sludge [J]. *China Environmental Science*, 2016, **36**(7): 2006-2013.
- [18] van de Graaf A A, de Bruijn P, Robertson L A, *et al.* Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor [J]. *Microbiology*, 1996, **142**(8): 2187-2196.
- [19] Amann R I, Binder B J, Olson R J, *et al.* Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, **56**(6): 1919-1925.
- [20] Daims H, Brühl A, Amann R, *et al.* The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, **22**(3): 434-444.
- [21] Schmid M, Walsh K, Webb R, *et al.* *Candidatus* "Scalindua brodae", sp. nov., *Candidatus* "Scalindua wagneri", sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, **26**(4): 529-538.
- [22] Frølund B, Palmgren R, Keiding K, *et al.* Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin [J]. *Water Research*, 1996, **30**(8): 1749-1758.
- [23] DuBois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, **28**(3): 350-356.
- [24] Chen M Y, Lee D J, Tay J H, *et al.* Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, **75**(2): 467-474.
- [25] 路青, 华兆哲, 李秀芬, 等. MBR 中厌氧氨氧化运行特性及微生物生态结构[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, **29**(4): 581-588. Lu Q, Hua Z Z, Li X F, *et al.* Operation characteristics and microbial community distribution of anammox in a membrane bioreactor [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, **29**(4): 581-588.
- [26] Tang C J, Zheng P, Mahmood Q, *et al.* Start-up and inhibition analysis of the anammox process seeded with anaerobic granular sludge [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, **36**(8): 1093-1100.
- [27] Wang T, Zhang H M, Gao D W, *et al.* Enrichment of anammox bacteria in seed sludges from different wastewater treating processes and start-up of anammox process [J]. *Desalination*, 2011, **271**(1-3): 193-198.
- [28] van der Star W R L, 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.
- [29] Zhang L, Yang J C, Ma Y G, *et al.* Treatment capability of an up-flow anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, **110**(1): 72-78.
- [30] Liu S T, Yang F L, Gong Z, *et al.* Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(15): 6817-6825.
- [31] Li H S, Zhou Q S, Ma W H, *et al.* Fast start-up of ANAMMOX reactor: operational strategy and some characteristics as indicators of reactor performance [J]. *Desalination*, 2012, **286**: 436-441.
- [32] Strous M, Heijnen J J, Kuenen J G, *et al.* The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, **50**(5): 589-596.
- [33] 冯平, 周少奇. 常温下厌氧氨氧化生物膜反应器的启动研究 [J]. *环境科学与技术*, 2010, **33**(6): 19-22, 34. Feng P, Zhou S Q. Experimental study on start-up of UASB-anammox biofilm reactor at ordinary temperature [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, **33**(6): 19-22, 34.
- [34] 张海芹, 王翻翻, 李月寒, 等. 不同接种污泥 ABR 厌氧氨氧化的启动特征 [J]. *环境科学*, 2015, **36**(6): 2216-2221. Zhang H Q, Wang F F, Li Y H, *et al.* Start-up performance of

- ANAMMOX enrichment with different inoculated sludge in anaerobic baffled reactor[J]. *Environmental Science*, 2015, **36**(6): 2216-2221.
- [35] Ahn Y H, Hwang I S, Min K S. ANAMMOX and partial denitrification in anaerobic nitrogen removal from piggery waste [J]. *Water Science & Technology*, 2004, **49**(5-6): 145-153.
- [36] Ahn Y H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review[J]. *Process Biochemistry*, 2006, **41**(8): 1709-1721.
- [37] Araujo J C, Campos A C, Correa M M, *et al.* Anammox bacteria enrichment and characterization from municipal activated sludge [J]. *Water Science & Technology*, 2011, **64**(7): 1428-1434.
- [38] 赵弋戈, 郑平. 厌氧氨氧化体的组成、结构与功能[J]. *微生物学报*, 2016, **56**(1): 8-18.  
Zhao Y G, Zheng P. Composition, structure and function of anammoxosome—a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, **56**(1): 8-18.
- [39] 杨敏, 胡学伟, 宁平, 等. 废水生物处理中胞外聚合物(EPS)的研究进展[J]. *工业水处理*, 2011, **31**(7): 7-12.  
Yang M, Hu X W, Ning P, *et al.* Research progress in extracellular polymeric substances applied to biological wastewater treatment[J]. *Industrial Water Treatment*, 2011, **31**(7): 7-12.
- [40] 王然登, 程战利, 彭永臻, 等. 强化生物除磷系统中胞外聚合物的特性[J]. *中国环境科学*, 2014, **34**(11): 2838-2843.  
Wang R D, Cheng Z L, Peng Y Z, *et al.* Characteristics of EPS taken from an enhanced biological phosphorus removal system [J]. *China Environmental Science*, 2014, **34**(11): 2838-2843.
- [41] Zhu L, Lv M L, Dai X, *et al.* Role and significance of extracellular polymeric substances on the property of aerobic granule[J]. *Bioresource Technology*, 2012, **107**: 46-54.
- [42] Ni S Q, Sun N, Yang H L, *et al.* Distribution of extracellular polymeric substances in anammox granules and their important roles during anammox granulation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, **101**: 126-133.
- [43] Ni B J, Hu B L, Fang F, *et al.* Microbial and physicochemical characteristics of compact anaerobic ammonium-oxidizing granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2010, **76**(8): 2652-2656.
- [44] Li Z L, Xu X C, Shao B, *et al.* Anammox granules formation and performance in a submerged anaerobic membrane bioreactor [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, **254**: 9-16.
- [45] Jemaat Z, Suárez-Ojeda M E, Pérez J, *et al.* Partial nitrification and *o*-cresol removal with aerobic granular biomass in a continuous airlift reactor[J]. *Water Research*, 2014, **48**: 354-362.
- [46] Wu J, Zhou H M, Li H Z, *et al.* Impacts of hydrodynamic shear force on nucleation of flocculent sludge in anaerobic reactor[J]. *Water Research*, 2009, **43**(12): 3029-3036.
- [47] Martínez F, Lema J, Méndez R, *et al.* Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges[J]. *Bioresource Technology*, 2004, **94**(1): 43-48.
- [48] Bhatti Z I, Sumida K, Rouse J D, *et al.* Characterization of denitrifying granular sludge treating soft groundwater in an upflow sludge-blanket reactor [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, **91**(4): 373-377.
- [49] Wang Z W, Liu Y, Tay J H. Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, **69**(4): 469-473.
- [50] Adav S S, Lee D J, Tay J H. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule[J]. *Water Research*, 2008, **42**(6-7): 1644-1650.
- [51] Tay J H, Liu Q S, Liu Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, **33**(3): 222-226.

## CONTENTS

Marine Aerosol Using On-board Aerosol Mass Spectrometry .....	YAN Jin-pei, CHEN Li-qi, LIN Qi, <i>et al.</i> (2629)
Analysis of Spatio-temporal Distribution and Variation Characteristics of Aerosol Optical Depth over the Northwest of China by MODIS C6 Product .....	ZHAO Shi-wei, GAO Xiao-qing (2637)
Sources and Characteristics of Regional Background PM <sub>1</sub> in North China During the Autumn and Winter Polluted Period .....	ZHANG Zhou-xiang, ZHANG Yang-mei, ZHANG Xiao-ye, <i>et al.</i> (2647)
Pollution Characteristics and Light Extinction Contribution of Water-soluble Ions of PM <sub>2.5</sub> in Hangzhou .....	WU Dan, LIN Shao-long, YANG Huan-qiang, <i>et al.</i> (2656)
Formation and Size Distribution of the Secondary Aerosol Inorganic Ions in Different Intensity of Haze in Qingdao, China .....	XIE Dan-dan, QI Jian-hua, ZHANG Rui-feng (2667)
Comparison of Characteristics and Reactive Oxidative Species of PM <sub>2.5</sub> in Xi'an, China During Haze and Clean Days .....	WANG Kun, HAN Yong-ming, Ho Steven Sai Hang, <i>et al.</i> (2679)
Seasonal Variation and Sources of Dicarboxylic Acids and Related Compounds in PM <sub>10</sub> from Mt. Huangshan .....	MENG Jing-jing, HOU Zhan-fang, ZHANG Er-xun, <i>et al.</i> (2688)
Composition Characteristics and Sources Apportionment of Lanthanoid in PM <sub>2.5</sub> of Quanzhou .....	ZHANG Yun-feng, YU Rui-lian, HU Gong-ren, <i>et al.</i> (2698)
Pollution Characteristics and Health Risk Assessment of Hazardous Air Pollutants in the Surroundings of Three Petrochemical Industries in Northwest China .....	XU Ya-xuan, LI Xiao-min, YU Hua-tong, <i>et al.</i> (2707)
VOCs Characteristics and Sources Apportionment in Yixing City During the G20 Summit .....	ZHANG Lin, ZHANG Xiang-zhi, QIN Wei, <i>et al.</i> (2718)
Agricultural Ammonia Emission Inventory and Its Spatial Distribution in Sichuan Province from 2005 to 2014 .....	FENG Xiao-qiong, CHEN Jun-hui, JIANG Tao, <i>et al.</i> (2728)
Air Pollutant Emission Inventory of Non-road Machineries in Typical Cities in Eastern China .....	LU Jun, HUANG Cheng, HU Qing-yao, <i>et al.</i> (2738)
Estimation of Health Risk and Enaction of Safety Standards of <i>N</i> -nitrosodimethylamine (NDMA) in Drinking Waters in China .....	ZHANG Qiu-qiu, PAN Shen-ling, ZHANG Yu, <i>et al.</i> (2747)
Comparison and Analysis of the Quantitative Methods for Pollutant Sources Load in Groundwater Contamination Risk Assessment .....	ZHAO Peng, HE Jiang-tao, WANG Man-li, <i>et al.</i> (2754)
Distribution and Sources of <i>n</i> -alkanes in Surface Seawater of Jiaozhou Bay .....	ZHANG Qian, SONG Jin-ming, PENG Quan-cai, <i>et al.</i> (2763)
Spatial Variations of CO <sub>2</sub> Degassing Across Water-air Interface and Its Impact Factors in Summer in Guijiang River, China .....	ZHANG Tao, LI Jian-hong, PU Jun-bing, <i>et al.</i> (2773)
Spatial Distribution Characteristics and Potential Ecological Risk of Antimony and Selected Heavy Metals in Sediments of Duliujiang River .....	NING Zeng-ping, XIAO Qing-xiang, LAN Xiao-long, <i>et al.</i> (2784)
Distribution Characteristics and Potential Risk of Bisphenol Analogues in Surface Water and Sediments of Lake Taihu .....	CHEN Mei-hong, GUO Min, XU Huai-zhou, <i>et al.</i> (2793)
Characteristics of Water Extractable Organic Nitrogen from Erhai Lake Sediment and Its Differences with Other Sources .....	LI Wen-zhang, ZHANG Li, WANG Sheng-rui, <i>et al.</i> (2801)
High-resolution Distribution Characteristics of Phosphorous, Iron and Sulfur Across the Sediment-Water Interface of Aha Reservoir .....	SUN Qing-qing, CHEN Jing-an, WANG Jing-fu, <i>et al.</i> (2810)
Distribution Characteristics of Drugs of Abuse and Their Metabolites in Aqueous Environment of Beijing, China .....	ZHANG Yan, ZHANG Ting-ting, CHEN Wei-ping, <i>et al.</i> (2819)
Impacts of Rainfall Characteristics and Occurrence of Pollutant on Effluent Characteristics of Road Runoff Pollution .....	CHEN Ying, WANG Zhao, WU Ya-gang, <i>et al.</i> (2828)
Inhibition of Internal Phosphorus Release in the Black-Odor Channel Under Different Adding Methods of CaO <sub>2</sub> .....	XU Yao, LI Da-peng, HAN Fei-er, <i>et al.</i> (2836)
Transport of Nitrogen and Phosphorus from Sloping Farmland with Thin Purple Soil Overlying Rocks .....	XIAN Qing-song, TANG Xiang-yu, ZHU Bo (2843)
Purification of Slightly Salt-alkaline Water Bodies by Microorganism Enhanced Combined Floating Bed .....	CHEN You-yuan, WU Ya-dong, SUN Ping, <i>et al.</i> (2850)
MgO-Biochar for the Adsorption of Phosphate in Water .....	WANG Bin-bin, LIN Jing-dong, WAN Shun-li, <i>et al.</i> (2859)
Degradation of <i>N</i> -nitrosodimethylamine by Palladium/ Iron Bimetallic Composite Catalytic Fiber .....	ZHANG Huan, FU Min, WEI Jun-fu, <i>et al.</i> (2868)
Effects of Goethite, Magnetite and Gypsum on the Anaerobic Degradation of 2,4-Dichlorophenol .....	KONG Dian-chao, ZHOU Yue-fei, CHEN Tian-hu, <i>et al.</i> (2875)
Transformation of Disinfection Byproduct Precursors During the Wastewater Regeneration Processes .....	HAN Hui-hui, MIAO Heng-feng, ZHANG Ya-jing, <i>et al.</i> (2883)
Treatment of PTA Wastewater by Modified Anode Microbial Fuel Cell .....	SUN Jing-yun, FAN Meng-jie, CHEN Ying-wen, <i>et al.</i> (2893)
Selective Inhibition of Rice Straw Extract on Growth of Cyanobacteria and Chlorophyta .....	SU Wen, CHEN Jie, ZHANG Sheng-peng, <i>et al.</i> (2901)
Cultivation of <i>Spirulina platensis</i> in Digested Piggery Wastewater Pretreated by SBR with Operating Conditions Optimization .....	CAI Xiao-bo, YU Qiang-qiang, LIU Rui, <i>et al.</i> (2910)
Nitrogen Removal Performance of ANAMMOX Process with K <sup>+</sup> Addition in Saline Surroundings .....	WU Guo-dong, YU De-shuang, LI Jin, <i>et al.</i> (2917)
Efficient and Stable Operation of Shortcut Nitrification by Entrapping Ammonia Oxidizing Bacteria .....	YU Meng-yu, LIU Yi, TIAN Yu-bin, <i>et al.</i> (2925)
Fast Start-up of ANAMMOX and the Spatial Distribution of EPS in ANAMMOX Granules .....	LI Hui-juan, PENG Dang-cong, CHEN Guo-yan, <i>et al.</i> (2931)
Ammonia Oxidation with Potential Electron Acceptor in ANAMMOX Sludge .....	LI Xiang, LIN Xing, WANG Fan, <i>et al.</i> (2941)
Ammoniac Waste Gas in-situ Treatment Based on ANAMMOX Process .....	LIN Xing, WANG Fan, YUAN Yan, <i>et al.</i> (2947)
Extensive Green Roof Substrate Composition Based on Sludge Recycling .....	SHEN Qing-ran, LI Tian, CAO Yi, <i>et al.</i> (2953)
Short-term Effect of Roxithromycin on Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Activated Sludge .....	GAO Jing-feng, SUN Li-xin, FAN Xiao-yan, <i>et al.</i> (2961)
Influence of Salinity on Microbial Community in Activated Sludge and Its Application in Simulated Dye Wastewater Treatment .....	ZHOU Gui-zhong, XU Shuo, YAO Qian, <i>et al.</i> (2972)
Shift of Microbial Communities During the CO <sub>2</sub> -Brine-Sandstone Interaction Process .....	WANG Bo-qiang, LI Chen-yang, LU Wei, <i>et al.</i> (2978)
Response of Soil Respiration and Heterotrophic Respiration to Returning of Straw and Biochar in Rape-Maize Rotation Systems .....	TIAN Dong, GAO Ming, HUANG Rong, <i>et al.</i> (2988)
Effect of Simulated Climate Warming on Microbial Community and Phosphorus Forms in Wetland Soils .....	TENG Chang-yun, SHEN Jian-guo, WANG Zhong, <i>et al.</i> (3000)
Patterns of Bacterial Community Through Soil Depth Profiles and Its Influencing Factors Under <i>Betula albosinensis</i> Burkill in the Xinjiashan Forest Region of Qinling Mountains .....	DU Can, XU Chen-yang, WANG Qiang, <i>et al.</i> (3010)
Effects of Microbial Activities on Mercury Methylation in Farmland near Mercury Mining Area .....	JIA Qin, ZHU Xue-mei, WANG Qi, <i>et al.</i> (3020)
Effect of Sepiolite Application on the Migration and Redistribution of Pb and Cd in Soil Rice System in Soil with Pb and Cd Combined Contamination .....	FANG Zhi-ping, LIAO Min, ZHANG Nan, <i>et al.</i> (3028)
Application of Amphoteric-Cationic Combined Modification on Phenol Adsorption of Yellow Brown Soil .....	LIU Wei, MENG Zhao-fu, REN Shuang, <i>et al.</i> (3036)
Bioaccumulation of Heavy Metals in Twigs and Leaves of <i>Abies fabri</i> at Mount Gongga in China; A Comparison Study Between 1999 and 2014 .....	LI Fen, WANG Xun, LUO Ji, <i>et al.</i> (3045)
Subcellular Distribution and Chemical Forms of Heavy Metals in Three Types of Compositae Plants from Lead-Zinc Tailings Area .....	ZHU Guang-xu, XIAO Hua-yun, GUO Qing-jun, <i>et al.</i> (3054)
Effects of Bentonite Amendment on Detoxification, Heavy Metal Passivation and Estrone Elimination of Sewage Sludge Compost .....	ZHOU Li-na, CAI Han-zhen, LI Rong-hua, <i>et al.</i> (3061)
Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Co-Digestion of Food Waste and Straw .....	GUO Xiang-lin, ZUO Jian-e, SHI Xu-chuan, <i>et al.</i> (3070)
Basic Features of Combustible Rural Garbage Component and Its Spatial-temporal Difference in China .....	YAN Zhuo-yi, YUE Bo, GAO Hong, <i>et al.</i> (3078)
Optimization of Promoter and Support for Co-based/zeolites Catalysts in Catalytic Reduction of NO <sub>x</sub> by CH <sub>4</sub> .....	PAN Hua, JIAN Yan-fei, CHEN Ning-na, <i>et al.</i> (3085)