环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心
■ 出版 科学出版社

2020
Vol.41 No.11
第41卷 第11期

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第41卷 第11期
2020年11月15日

目 次

Eco-Environmental Knowledge Web
环 境 科 学
Environmental Science
第41卷第11期 2020年11月
Vol.41, No.11 Nov., 2020

温度和基质浓度对厌氧氨氧化工艺中N_2O释放的影响

王丝可, 于恒, 左剑恶*
(清华大学环境学院, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 污水生物脱氮工艺中通常会释放温室气体N_2O,厌氧氨氧化工艺作为新型生物脱氮工艺,其N_2O的释放规律及机制值得深入研究. 本文利用厌氧氨氧化序批试验,研究了不同温度和基质浓度对厌氧氨氧化工艺中N_2O释放的影响,并探讨了N_2O释放的微生物机制. 结果表明,厌氧氨氧化工艺中进水基质浓度的增加会促进N_2O释放,在35℃条件下,当进水亚硝氮从40 mg·L^{-1}增加至60 mg·L^{-1}和120 mg·L^{-1}时,N_2O最高积累浓度从0.5 mg·L^{-1}增加至1.5 mg·L^{-1}和2.4 mg·L^{-1},分别占总氮去除量的0.85%、1.43%和1.11%. 温度降低对厌氧氨氧化活性抑制作用明显, 15℃下的比厌氧氨氧化活性仅为30℃时的6%. 温度降低导致厌氧氨氧化工艺中N_2O的释放减少,温度降低时反硝化速率的降低是导致N_2O产生速率降低、N_2O积累减少的主要原因. 厌氧氨氧化工艺微生物群落中存在丰富的异养反硝化菌,工艺中N_2O积累主要是反硝化菌产生和消耗N_2O的结果.

关键词:厌氧氨氧化(ANAMMOX); 氧化亚氮(N_2O); 温度; 基质浓度; 微生物群落
中图分类号: X703 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2020)11-5082-07 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.202004267

Effects of Temperature and Substrate Concentration on N_2O Release of ANAMMOX Process

WANG Si-ke, YU Heng, ZUO Jian-e*
(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The greenhouse gas N_2O is released during the biological nitrogen removal process. ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation) is regarded as a promising nitrogen removal process for treating municipal wastewater, and the N_2O emission patterns and mechanisms need further investigation. In this study, batch tests were performed to study the release of N_2O at different temperatures and substrate concentrations, and the microbial mechanisms of N_2O emission were discussed. The results showed that the increase of the influent substrate concentration of the ANAMMOX process promoted the release of N_2O. At 35℃, when the influent nitrite increased from 40 mg·L^{-1} to 60 mg·L^{-1}, 120 mg·L^{-1}, the maximum accumulated concentration of N_2O increased from 0.5 mg·L^{-1} to 1.5 mg·L^{-1} and 2.4 mg·L^{-1}, accounting for 0.85%, 1.43%, and 1.11% of the total nitrogen removal, respectively. Lowering temperature had an obvious inhibitory effect on ANAMMOX activity. The specific ANAMMOX activity at 15℃ was only 6% of that at 30℃. Furthermore, the intracellular ATP concentration was reduced. At 15℃, the intracellular ATP concentration was 4% of that at 30℃. The decrease in temperature led to a decrease in the release of N_2O in the ANAMMOX process. When the temperature decreased, the denitrification rate would decrease, leading to a lower N_2O production rate and lower N_2O accumulation. 16S rRNA amplicon sequencing showed that ANAMMOX bacteria *Candidatus Brocadia* and *Ca. Jettenia* were enriched, accounting for 6.9%-13.8% and 1.4%-2.6% of microbial community, respectively. Abundant heterotrophic bacteria were also found in the microbial community. The accumulation of N_2O in the ANAMMOX process was mainly attributed to denitrifying bacteria producing and consuming N_2O. This study provides support for controlling N_2O emission during the ANAMMOX process for treating municipal wastewater.

Key words: anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX); nitrous oxide (N_2O); temperature; substrate concentration; microbial community

厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, ANAMMOX)是指在厌氧氨氧化菌的作用下,利用亚硝氮作为电子受体,将氨氮氧化,最终产生氮气的过程,该过程无需外加碳源和剩余污泥产量低,是一种迄今为止最具创新的生物脱氮工艺. 截止2014年,全球已有100多座生产性的厌氧氨氧化工艺处理高温高浓度的污泥消化脱水液[1]. 生物脱氮工艺中通常会释放氧化亚氮(N_2O),其为一种强温室气体且具有破坏臭氧层的能力[2]. 至今研究认为厌氧氨氧化菌本身不会产生N_2O,但其微生物群落中不可避免地含有反硝化菌,而导致N_2O释放[2].

厌氧氨氧化工艺处理市政污水可节约能源、降低运行费用,有极大地发展前景. 然而,市政污水的温度受季节的影响波动较大,Poh等[3]的研究发现35℃时反硝化工艺中N_2O的积累高于25℃,而Li等[4]则发现氢自养反硝化工艺仅在15℃积累N_2O,故温度对厌氧氨氧化工艺中N_2O释放的影响规律亟待研究. 此外,在市政污水中氮素浓度波动大,

收稿日期: 2020-04-30; **修订日期**: 2020-05-12
基金项目: 国家自然科学基金项目(21677084)
作者简介: 王丝可(1993~),女,博士研究生,主要研究方向为厌氧氨氧化工艺,E-mail:wsk15@mails.tsinghua.edu.cn
* 通信作者,E-mail:jiane.zuo@mail.tsinghua.edu.cn

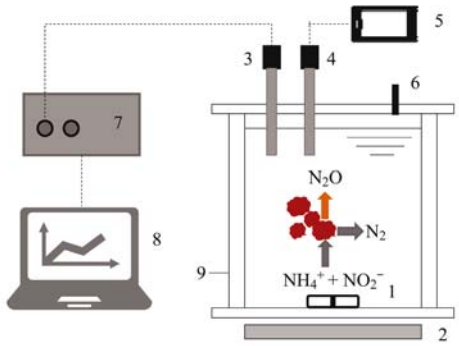
Kampschreur 等[5]的研究发现亚硝氮浓度的增加促进了脱氮工艺中N_2O释放，故基质浓度对厌氧氨氧化工艺中N_2O排放的影响也需要研究.

因此，本文通过序批试验，研究了不同温度和基质浓度下N_2O的释放规律，探讨了N_2O的生成途径，采用高通量测序探究N_2O的微生物机制，以期为控制厌氧氨氧化工艺中N_2O的产生提供支撑.

1　材料与方法

1.1　试验装置及厌氧氨氧化颗粒污泥

本试验用的厌氧氨氧化颗粒污泥来源于在实验室运行 1.5 a 的升流式厌氧氨氧化反应器. 试验装置在带水浴夹层的圆柱形有机玻璃反应器内，反应器的工作体积为 700 mL(图 1)，采用磁力搅拌转子进行混合. 每次试验均接种 100 mL 厌氧氨氧化颗粒污泥于反应器中，试验用水为模拟废水，微量元素的组成见参考文献[6].



1. 磁力搅拌转子；2. 磁力搅拌器；3. N_2O微电极；4. pH 电极；5. WTW 多参数测试仪；6. 进出水口；7. N_2O电极信号放大器；8. 笔记本电脑；9. 水浴夹层

图 1　厌氧氨氧化序批试验反应装置示意

Fig. 1　Schematic reactor of ANAMMOX batch experiment

1.2　序批试验

1.2.1　温度和基质浓度对氧化亚氮产生影响

通过水浴，将反应器温度分别控制在 20、25 和 35℃下，每个温度下共设有 3 个起始基质浓度条件，分别为 NH_4^+-N = NO_2^--N = 40 mg·L^{-1}、NH_4^+-N = NO_2^--N = 60 mg·L^{-1} 和 NH_4^+-N = NO_2^--N = 120 mg·L^{-1}，反应过程中通过滴加 1 mol·L^{-1}盐酸，将 pH 控制在 7.5. 将N_2O微电极(N_2O-R，Unisense，丹麦)的尖端浸没在溶液中，每 30 s 在线记录溶液中N_2O浓度. 每间隔一定时间采集水样进行后续分析.

1.2.2　温度对厌氧氨氧化活性及胞内 ATP 浓度影响

通过水浴，将反应器温度分别控制在 15、20、25 和 30℃下，起始的基质浓度为NH_4^+-N = NO_2^--N = 40 mg·L^{-1}，反应过程中通过滴加 1 mol·L^{-1}盐酸，将 pH 控制在 7.5. 间隔一定时间采集水样进行后续分析. 在反应开始时、反应 2 h 和反应 4 h 时对混合液采样，用于 ATP 检测. 每组试验重复 2 次.

1.3　N_2O在线监测和计算

N_2O微电极的校正参考厂商手册. 以电极浸没在去离子水中所得信号值为零点，逐点加入定量的饱和N_2O溶液，记录电极的信号值，最后根据信号值与N_2O溶液浓度进行线性回归，计算出N_2O电极的标准曲线.

在厌氧氨氧化工艺中，N_2O的产生和消耗同时发生，故溶液中积累的N_2O是N_2O的产生减去N_2O的消耗后的净产生量. 考虑到厌氧氨氧化工艺无曝气，且N_2O在水中溶解度高(温度为 30℃时溶解度为 589 mg·L^{-1})，故计算时假设体系内的N_2O未向大气中释放，几乎全部积累在溶液中. 因此，为计算N_2O净产生速率，采用最小二乘法对一个时间段内N_2O的变化进行直线拟合，得到单位时间内的N_2O平均净产生速率.

1.4　16S rRNA 基因扩增子测序与数据分析

对试验前、中和后期的厌氧氨氧化颗粒污泥采样. 进行 16S rRNA 基因扩增子测序，DNA 提取、PCR 扩增和高通量测序均在上海美吉生物医药科技有限公司(上海，中国)进行，对细菌 16S rRNA 中 V3 ~ V4 高变区进行 PCR 扩增，引物为通用引物 338F/806R. PCR 扩增程序采用两步式反应，重复 3 次. PCR 扩增结束后，采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物质量. 根据 MiSeq Reagent Preparation Guide(Illumina，美国)构建 DNA 文库，在 Illumina MiSeq 测序平台上进行双端测序，读长为 300 bp.

软件 Trimmomatic v0.22 用于移除适配子、剪切原始测序序列(reads)，过滤质量 20 以下的碱基、碱基对数目 50 以下的测序序列；采用 Flash 1.2.11 软件对双端序列进行拼接；采用 Usparse 软件，对拼接后的序列进行可操作分类单元(operational taxonomic units，OTUs)聚类. 基于 Qiime 平台，将 OTUs 序列与 SILVA132 数据库进行比对，从而完成 OTUs 序列分类注释；α 多样性分析采用 Mothur 软件，β 多样性在 Qiime 平台完成. 获得 OTUs 表格后，数据的可视化均在美吉生物云平台完成(www.majorbio.com).

1.5　分析方法

水样经过 0.22 μm 滤膜过滤后对水质指标进行检测. 氨氮、亚硝氮、硝态氮和生物量检测参考国家标准方法[7]. 采用 Nano measurer 软件对颗粒污泥粒径分布进行统计分析. pH 值和溶解氧浓度采用电极在线监测(WTW，德国).

为检测细胞内 ATP，将 1 mL 混合液样品于

15 000 r·min^{-1}离心 5 min 后,去除上清液,样品保存在 -20℃冰箱直至 ATP 检测. 提取胞内 ATP 方法参考文献[8],具体操作如下:将去离子水煮沸后,每个样品各加入 1 mL 沸水和一勺 0.4 mm 玻璃珠,振荡混合 5 min 后,于15 000 r·min^{-1}离心 5 min,保存上清液用于 ATP 检测. ATP 浓度的检测采用 BacTiter-Glo™试剂盒(G8230,Promega,美国),具体操作如下:提前 24 h 将 BacTiter-Glo™ Buffer 在室温下解冻. BacTiter-Glo™ Substrate 恢复室温后,将 BacTiter-Glo™ Buffer 和 BacTiter-Glo™ Substrate 等量混合,避光保存混合试剂. 在 96 孔板中,每孔加入 100 μL 样品和 100 μL 混合试剂, 96 孔板在多功能酶标仪内 30℃ 下混合 5 s 后,读取发光光度(SpectraMax M5, Molecular Devices, 美国),ATP 的浓度用相对荧光单位(relative fluorescence units, RFU)来表示.

2 结果与讨论

2.1 基质浓度对N_2O释放的影响

厌氧氨氧化颗粒污泥经过实验室长期驯化,脱氮效果良好,在 35℃ 不同进水基质浓度下,氮素和N_2O浓度随时间的变化见图 2. 从中可发现,进水基质浓度不同时,氮素和N_2O浓度随时间变化趋势相似. 以 35℃、进水亚硝氮浓度 40 mg·L^{-1}为例,该条件下颗粒污泥的比厌氧氨氧化活性(以 N/VSS 计,下同)为 662 mg·(g·d)$^{-1}$,出水亚硝氮未检出. 厌氧氨氧化反应开始时液相N_2O浓度(以 N 计,下同)为 0.1 mg·L^{-1},随着反应的进行,N_2O浓度逐渐上升,在达到峰值 0.5 mg·L^{-1}后,液相N_2O的浓度逐渐降低,在反应末期N_2O的浓度趋于稳定值 0.1 mg·L^{-1}. 反应周期内,不同时间段的N_2O净产生速率见图 2,N_2O净产生速率在反应开始时达到最大速率 0.012 mg·(L·min)$^{-1}$,随着反应进行逐渐降低; 在反应进行 1 h 后,N_2O净产生速率为负值,代表体系中N_2O的消耗速率大于N_2O的产生速率,N_2O净产生速率最小值为 -0.015 mg·(L·min)$^{-1}$. 35℃ 条件下,随着进水 NO_2^- 浓度从 40 mg·L^{-1}增加至 60 mg·L^{-1}和 120 mg·L^{-1}时,N_2O最高积累浓度从 0.5 mg·L^{-1}增加至 1.5 mg·L^{-1}和 2.4 mg·L^{-1},$N_2O/\Delta TN$ 分别为 0.85%、

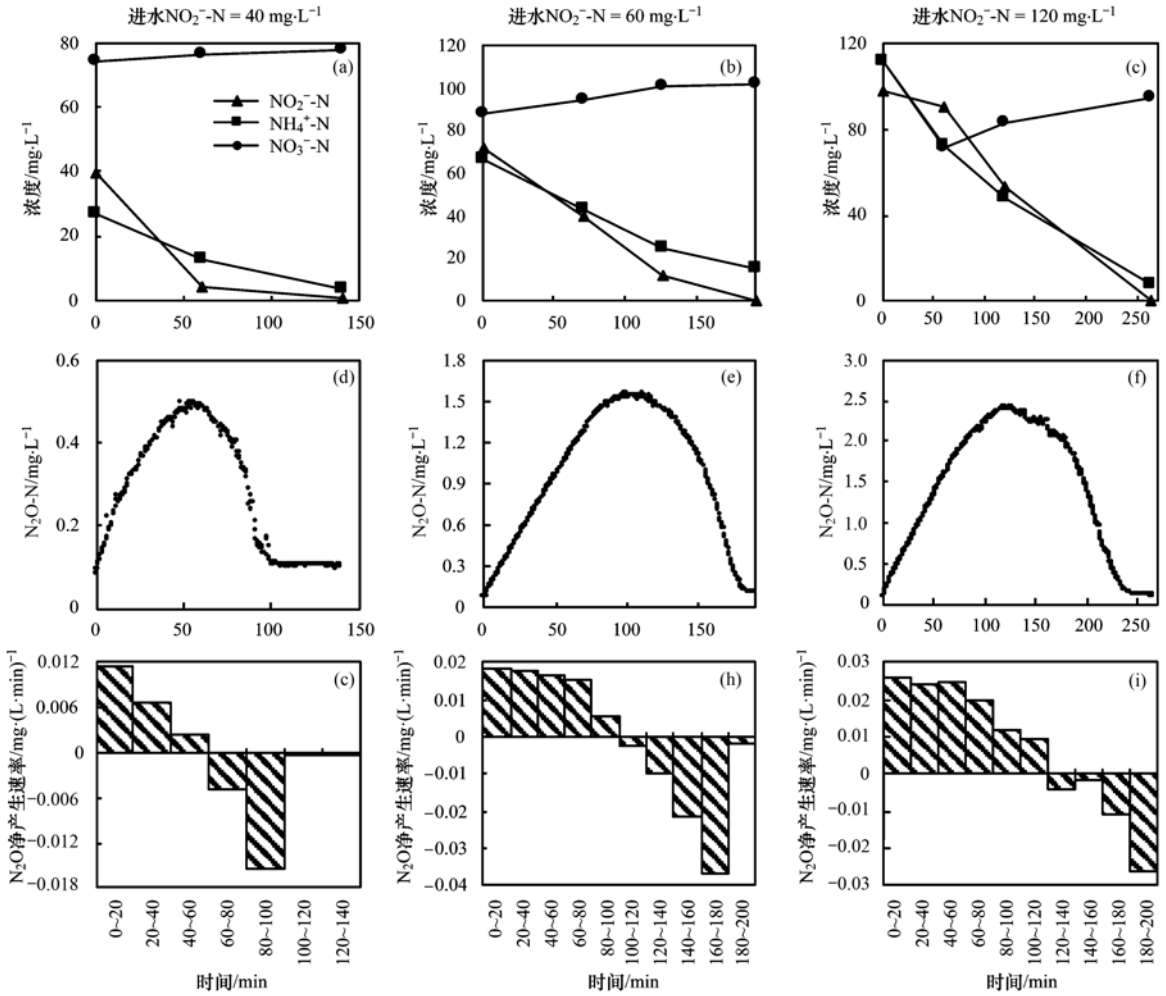


图 2 在 35℃下,不同进水浓度下液相氨氮、亚硝氮、硝氮、N_2O及N_2O净产生速率随时间变化

Fig. 2 At 35℃, NH_4^+, NO_2^-, NO_3^-, N_2O profiles, and net N_2O production rate during varying influent concentrations

1.43%和1.11%，最大N_2O净产生速率相应从0.012 mg·(L·min)$^{-1}$增加至0.018 mg·(L·min)$^{-1}$和0.026 mg·(L·min)$^{-1}$. 在25℃下，N_2O最高积累浓度、N_2O净产生速率和$N_2O/\Delta TN$随着进水浓度增加而增加(表1). 在20℃下，进水NO_2^-浓度从40 mg·L^{-1}增加至60 mg·L^{-1}时，N_2O最高积累浓度从0.4 mg·L^{-1}增加至1.0 mg·L^{-1}，而进水NO_2^-浓度从60 mg·L^{-1}增加至120 mg·L^{-1}时，N_2O最高积累浓度从1.0 mg·L^{-1}降低至0.8 mg·L^{-1}.

本研究中，35℃时最高N_2O积累浓度占进水总氮比率在0.36%~0.75%之间，略高于已有报道的小试厌氧氨氧化反应器的检测值0.1%，与实际规模厌氧氨氧化工艺中N_2O排放接近(表1). 基质浓度显著地影响N_2O释放，首先，基质浓度增加导致N_2O最大积累浓度增加，相关性分析表明N_2O最大积累浓度与ΔTN和ΔNO_2^-呈正相关关系，相关系数(R^2)分别为0.70和0.56，表明总氮去除量为决定N_2O积累的重要因素. 其次，基质浓度增加导致$N_2O/\Delta TN$增加，即工艺中更高比例的去除的氮素会转化为N_2O积累在溶液中，从而增加N_2O的释放. 故在去除总氮的量相同时，控制进水基质浓度能够有效降低厌氧氨氧化工艺中N_2O的释放. 厌氧氨氧化污泥的微生物群落中，厌氧氨氧化菌、好氧氨氧化菌和反硝化菌同时存在，在缺氧的条件下，反硝化的N_2O产生途径，包括好氧氨氧化菌的反硝化和反硝化菌反硝化被认为是主要的N_2O产生途径；考虑到好氧氨氧化菌在厌氧氨氧化微生物群落中丰度较低，故N_2O主要是作为反硝化的中间产物积累. 厌氧氨氧化工艺进水基质主要为氨氮和亚硝氮，氨氮对反硝化途径的N_2O的产生影响较小，而亚硝氮能够显著促进反硝化N_2O的产生[9, 10]，故在进水亚硝氮浓度增加时N_2O产生的增加可能是由于亚硝氮促进反硝化过程中N_2O的积累而导致的. 与本文结果相似，Kampschreur等[11]在生产性的厌氧氨氧化工艺中也观察到NO_2^-浓度的波动导致NO在气相中浓度的波动，当进水流量降低时，NO浓度降低了40%. 虽然在本试验中工艺无曝气，溶液中积累的N_2O能够逐渐地被降解，但厌氧氨氧化工艺常与短程硝化耦合在一个反应器中，厌氧氨氧化颗粒污泥中积累的N_2O会在曝气时被吹脱释放，故单独研究厌氧氨氧化工艺中N_2O的产生，有利于加深对一体式工艺中N_2O释放的理解.

表1　不同温度和进水基质浓度下，厌氧氨氧化工艺中N_2O的释放

Table 1　N_2O emission at different temperatures and different influent concentrations

ANAMMOX工艺类型	温度/℃	进水NO_2^--N/mg·L^{-1}	N_2O最大积累浓度/mg·L^{-1}	N_2O最大净产生速率/mg·(L·min)$^{-1}$	N_2O/TN_{inf}/%	$N_2O/\Delta TN$/%	文献
小试	35	40	0.500	0.011 6	0.36	0.85	本研究
		60	1.563	0.018 5	0.69	1.43	
		120	2.424	0.026 1	0.75	1.11	
	25	40	0.444	0.003 4	0.25	0.59	
		60	0.854	0.003 5	0.34	0.91	
		120	1.584	0.004 9	0.46	1.42	
	20	40	0.380	0.003 3	0.22	0.64	
		60	1.086	0.003 3	0.39	1.01	
		120	0.811	0.002 9	0.28	0.55	
小试	35	100~200	0.35	—	0.1±0.07	0.14±0.09	[12]
生产性	35	500~700	1.26	—	0.6	—	[13]

2.2　温度对厌氧氨氧化活性影响

温度对厌氧氨氧化活性的影响显著，不同温度下，厌氧氨氧化活性和胞内ATP浓度变化见图3. 当反应器温度从30℃降低至25℃和20℃时，比厌氧氨氧化活性从850 mg·(g·d)$^{-1}$降低至768 mg·(g·d)$^{-1}$和539 mg·(g·d)$^{-1}$，出水亚硝氮浓度未检出. 然而温度进一步降低至15℃时，比厌氧氨氧化活性骤然降低至47 mg·(g·d)$^{-1}$，且出水亚硝氮浓度始终在2 mg·L^{-1}上. 对胞内ATP检测发现，30℃条件下，胞内ATP浓度(以VSS计，下同)平均为2.9×10^8 RFU·g^{-1}. 温度降低时，胞内ATP浓度随之降低，当温度为15℃时，胞内ATP浓度平均为1.3×10^7 RFU·g^{-1}，胞内ATP浓度降低至30℃时的4%.

温度降低明显抑制了厌氧氨氧化反应的活性，15℃时的比厌氧氨氧化活性仅为30℃时的6%，且从20℃降低至15℃时，比厌氧氨氧化活性降低更为剧烈. 与本文的结果类似，Lotti等[14]对来自实验室反应器和实际水厂的厌氧氨氧化污泥进行活性的检测，发现温度从30℃降低至15℃时，比厌氧氨氧化活性降低至30℃时的20%. 推测低温下厌氧氨氧化活性降低原因包括反应活化能增加、胞内能量水平降低. 据

报道,温度能改变厌氧氨氧化反应的活化能,Isaka 等[15]的研究发现在 28 ~ 37℃,厌氧氨氧化反应活化能为 33 kJ·mol^{-1};在 22 ~ 28℃时,反应活化能升高至 93 kJ·mol^{-1}. 本文发现低温条件下,胞内 ATP 含量明显降低,ATP 是细胞内的能量货币,温度降低时胞内 ATP 浓度的降低意味着胞内能量存储的降低. Lin 等[16]采用宏蛋白组学研究厌氧氨氧化菌群,发现在 15℃时,厌氧氨氧化活性严重抑制,*Candidatus Kuenenia* 的 NADH 脱氢酶类似蛋白的水平降低,可能导致细胞内能量合成降低. 故低温下厌氧氨氧化菌能量合成受到限制,微生物通过消耗胞内 ATP 来维持代谢活动,从而导致胞内 ATP 水平降低.

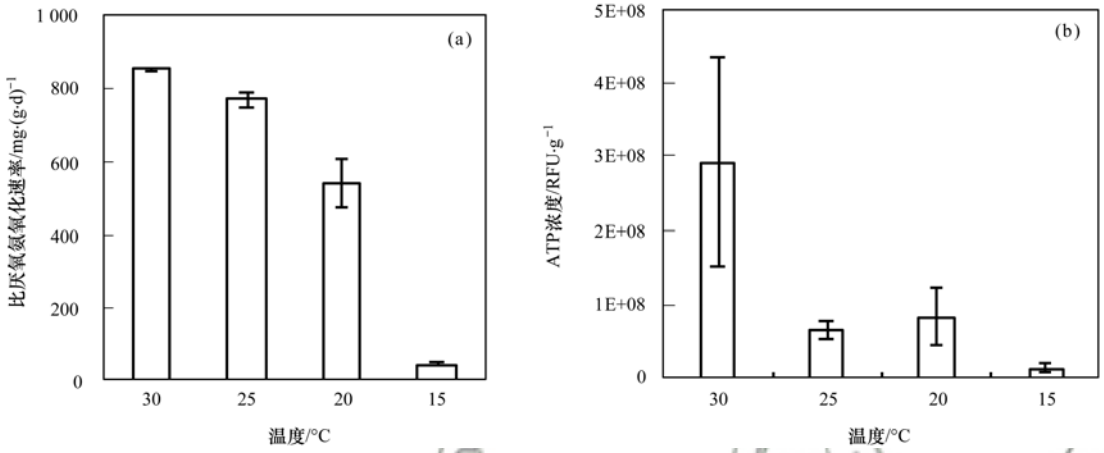


图 3 温度对于厌氧氨氧化活性及细胞内 ATP 含量影响

Fig. 3 ANAMMOX activity and ATP concentration at different temperatures

2.3 温度对N_2O释放影响

温度显著地影响工艺中N_2O的释放(表 1). 结果表明,在进水基质浓度相同时,温度越低,N_2O净产生速率降低、$N_2O/\Delta TN$ 降低. 在进水 NH_4^+ 为 40 mg·L^{-1}条件下,温度从 35℃降低至 25℃和 20℃时,N_2O最大积累浓度从 0.5 mg·L^{-1}降低至 0.4 mg·L^{-1}和 0.38 mg·L^{-1},分别占总氮去除量的 0.85%、0.59% 和 0.64%,相应地最大N_2O净产生速率从 0.011 6 mg·(L·min)$^{-1}$ 降低至 0.003 4 mg·(L·min)$^{-1}$和 0.003 3 mg·(L·min)$^{-1}$. 在进水 NO_2^- 为 60 mg·L^{-1},温度从 35℃降低至 25℃和 20℃时,$N_2O/\Delta TN$ 分别为 1.43%、0.91% 和 1.01%;在进水 NO_2^- 浓度为 120 mg·L^{-1},温度从 35℃降低至 25℃和 20℃时,$N_2O/\Delta TN$ 分别为 1.11%、1.42% 和 0.55%. 相关性分析发现温度与最大N_2O净产生速率呈正相关关系,相关系数(R^2)为 0.74.

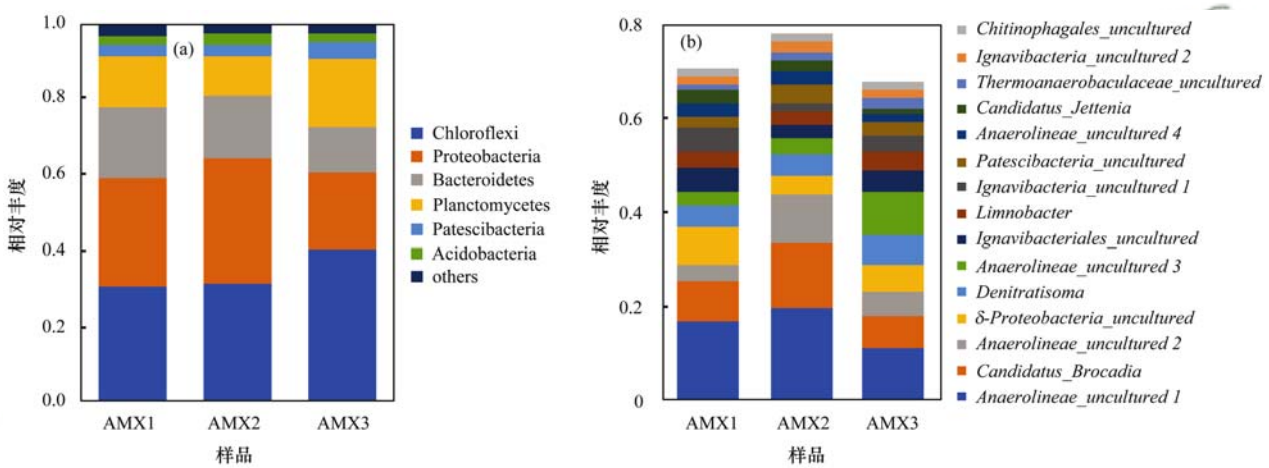
结果表明厌氧氨氧化工艺温度降低导致N_2O净产生速率降低,N_2O释放减少. 厌氧氨氧化工艺中N_2O释放来源于反硝化菌群,许多研究表明温度降低会导致反硝化速率降低[17,18],故推测温度降低时厌氧氨氧化工艺中反硝化菌的反硝化速率降低,从而导致反硝化的N_2O产生减少. 与本结果相似,Hu 等[19]的研究发现厌氧氨氧化工艺在 15℃时N_2O的释放低于 30℃时N_2O的释放. 然而,Wang 等[20]研究反硝化工艺发现运行温度发生变化时,不论温度降低还是升高,N_2O的排放都出现增加,温度的波动导致N_2O释放的增加;同时运行温度越低,NO 还原酶基因和N_2O还原酶基因的转录水平降低. Li 等[4]研究氢自养反硝化污泥发现仅在 15℃时N_2O大量积累,温度更高时(20 ~ 50℃)未发现N_2O积累,推测是由于 15℃时N_2O还原酶活性降低导致. 因此,温度对N_2O释放的影响规律还取决于微生物群落反硝化功能基因丰度、功能基因表达和功能酶的活性.

2.4 微生物群落结构

厌氧氨氧化工艺中N_2O的释放与微生物群落结构有关. 对厌氧氨氧化颗粒污泥进行 16S rRNA 扩增子测序,平均每个样品产生43 803 个测序序列(reads)和18 322 772 个碱基对. 将所有样品序列进行聚类分析,共发现 710 个 OTUs. 对 OTUs 注释后发现,在门水平上,污泥中优势的菌群为 Chloroflexi、Proteobacteria、Bacteroidetes 和 Planctomycetes(图 4),其中,AnAOB 所在的 Planctomycetes 门在厌氧氨氧化污泥样品中的相对丰度为 10.3% ~ 18.0%. 在属水平上,*Anaerolineae_uncultured 1* 为丰度最高的属,其相对丰度为 11.3% ~ 19.5%. 共发现两种优势的厌氧氨氧化菌,*Candidatus Brocadia* 和 *Ca. Jettenia*,其相对丰度分别为 6.9% ~ 13.8% 和 1.4% ~ 2.6%. 此外,*Anaerolineae _ uncultured2*、*δ-Proteobacteria_uncultured* 和 *Denitratisoma* 也是微生物群落中的优势属. 样品 AMX1、AMX2 和 AMX3 分别为检测N_2O释放的序批试验开始时、中间、结束时采集的污泥样品,在 3 个样品之间,微生物群落的组成在属水平和门水平上的差异不显著,表明试验过

程中厌氧氨氧化颗粒污泥的微生物群落结构相似.

厌氧氨氧化工艺中除了自养的厌氧氨氧化菌外,常发现大量的异养菌,例如 Proteobacteria 门、Chloroflexi 门和 Bacteroidetes 门等[21,22]. 这些异养菌能够以胞外多聚物、溶解性微生物产物和细胞凋亡的产物等微生物源有机物为能源,通常具有反硝化功能,是N_2O释放的来源[23,24]. Zhu 等[25]报道厌氧氨氧化工艺中出现N_2O积累,发现仅有 3 个菌种编码有N_2O还原酶基因(nitrous oxide reductase gene, *nosZ*),分别为 Burkholderiaceae、Rhodospirillaceae 和 Rhodobacteraceae,而有更多的菌种具有亚硝酸盐还原酶基因(nitrite reductase, *nir*),例如 Anaerolineaceae、Comamonadaceae、Actinobacteria、*Comamonas* 和 *Denitratisoma* 等,故微生物群落具有N_2O积累的潜能. Lawson 等[23]运用宏转录组学的方法,发现厌氧氨氧化工艺中所有的异养菌基因组都有反硝化基因潜能,同时反硝化基因高度表达,优势菌种 Proteobacteria 和 Anaerolineae 等表达了亚硝酸盐还原酶基因,同时 Ignavibacteriales、Proteobacteria 和 Bacteroidetes 表达了N_2O还原酶基因,共同构成完整的反硝化通路. 与此前研究类似,本文中厌氧氨氧化微生物群落包含了丰富多样的异养菌,发现大量 Anaerolineae 和 *Denitratisoma* 等具有产生N_2O潜能的菌种,为工艺中N_2O释放的来源. 同时也发现了属于 Burkholderiaceae 科的 *Limnobacter* 属和 Ignavibacteriales 等具有N_2O降解潜能的异养菌,能够降解工艺中积累的N_2O. 故厌氧氨氧化工艺中N_2O积累是丰富多样的反硝化菌产生和消耗N_2O的结果.



(a) 门水平上相对丰度的分布; (b) 属水平上相对丰度的分布

图 4　微生物群落结构组成

Fig. 4　Microbial community composition

3　结论

(1)在 25℃ 和 35℃ 时,随着进水 NO_2^- 浓度从 40 mg·L^{-1}增加至 60 mg·L^{-1}和 120 mg·L^{-1},厌氧氨氧化工艺N_2O最大积累浓度升高、N_2O净产生速率增加和$N_2O/\Delta TN$ 增加. N_2O最大积累浓度与 ΔTN 和 ΔNO_2^- 的相关系数(R^2)分别为 0.70 和 0.56,呈正相关关系,表明基质浓度增加会导致更高比例的去除的氮转化为N_2O积累在溶液中.

(2)温度降低抑制了厌氧氨氧化活性, 15℃ 时的比厌氧氨氧化活性仅为 30℃ 时的 6%,胞内 ATP 浓度随之降低. 进水基质浓度相同时,温度从 35℃ 降低至 25℃ 和 20℃,工艺中$N_2O/\Delta TN$ 降低,温度降低导致厌氧氨氧化工艺中N_2O的释放减少和N_2O净产生速率降低.

(3)高通量测序结果表明厌氧氨氧化菌 *Ca. Brocadia* 和 *Ca. Jettenia* 为优势菌属,其相对丰度分别为 6.9%~13.8% 和 1.4%~2.6%. 厌氧氨氧化工艺微生物群落中存在丰富的异养反硝化菌,如 Chloroflexi 门、Proteobacteria 门和 Bacteroidetes 门. 微生物群落结构与工艺中N_2O的释放密切相关,工艺中N_2O的积累主要是反硝化菌产生和消耗N_2O的结果.

参考文献:

[1] Lackner S, Gilbert E M, Vlaeminck S E, *et al*. Full-scale partial nitritation/anammox experiences – An application survey[J]. Water Research, 2014, **55**: 292-303.

[2] Schreiber F, Wunderlin P, Udert K M, *et al*. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: Biological pathways, chemical reactions, and novel technologies[J]. Frontiers in Microbiology, 2012, **3**: 372.

[3] Poh L S, Jiang X, Zhang Z B, *et al*. N_2O accumulation from denitrification under different temperatures [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, **99**(21): 9215-9226.

[4] Li P, Wang Y J, Zuo J E, *et al*. Nitrogen removal and N_2O accumulation during hydrogenotrophic denitrification: Influence of environmental factors and microbial community characteristics [J]. Environmental Science & Technology, 2017, **51**(2): 870-

879.

[5] Kampschreur M J, Temmink H, Kleerebezem R, *et al*. Nitrous oxide emission during wastewater treatment[J]. Water Research, 2009, **43**(17): 4093-4103.

[6] 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.

[7] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[8] Yang N C, Ho W M, Chen Y H, *et al*. A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP[J]. Analytical Biochemistry, 2002, **306**(2): 323-327.

[9] Peng L, Ni B J, Ye L, *et al*. The combined effect of dissolved oxygen and nitrite on N_2O production by ammonia oxidizing bacteria in an enriched nitrifying sludge[J]. Water Research, 2015, **73**(2): 29-36.

[10] Ma C, Jensen M M, Smets B F, *et al*. Pathways and controls of N_2O production in nitritation-anammox biomass [J]. Environmental Science & Technology, 2017, **51**(16): 8981-8991.

[11] Kampschreur M J, Poldermans R, Kleerebezem R, *et al*. Emission of nitrous oxide and nitric oxide from a full-scale single-stage nitritation-anammox reactor [J]. Water Science and Technology, 2009, **60**(12): 3211-3217.

[12] Okabe S, Oshiki M, Takahashi Y, *et al*. N_2O emission from a partial nitrification-anammox process and identification of a key biological process of N_2O emission from anammox granules[J]. Water Research, 2011, **45**(19): 6461-6470.

[13] Kampschreur M J, van der Star W R L, Wielders H A, *et al*. Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during full-scale reject water treatment[J]. Water Research, 2008, **42**(3): 812-826.

[14] Lotti T, Kleerebezem R, van Loosdrecht M C M. Effect of temperature change on anammox activity[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, **112**(1): 98-103.

[15] Isaka K, Date Y, Kimura Y, *et al*. Nitrogen removal performance using anaerobic ammonium oxidation at low temperatures[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, **282**(1): 32-38.

[16] Lin X M, Wang Y Y, Ma X, *et al*. Evidence of differential adaptation to decreased temperature by anammox bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2018, **20**(10): 3514-3528.

[17] 马娟, 彭永臻, 王丽, 等. 温度对反硝化过程的影响以及 pH 值变化规律[J]. 中国环境科学, 2008, **28**(11): 1004-1008.
Ma J, Peng Y J, Wang L, *et al*. Effect of temperature on denitrification and profiles of pH during the process[J]. China Environmental Science, 2008, **28**(11): 1004-1008

[18] Elefsiniotis P, Li D. The effect of temperature and carbon source on denitrification using volatile fatty acids[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, **28**(2): 148-155.

[19] Hu Z Y, Lotti T, de Kreuk M, *et al*. Nitrogen removal by a nitritation-anammox bioreactor at low temperature[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, **79**(8): 2807-2812.

[20] Wang X J, Ye C S, Zhang Z J, *et al*. Effects of temperature shock on N_2O emissions from denitrifying activated sludge and associated active bacteria[J]. Bioresource Technology, 2018, **249**: 605-611.

[21] 黄方玉, 邓良伟, 杨红男, 等. 温度对自养型同步脱氮工艺处理猪场废水厌氧消化液性能及微生物群落的影响[J]. 环境科学, 2019, **40**(5): 2357-2367.
Huang F Y, Deng L W, Yang H N, *et al*. Effect of different temperatures on the performance of autotrophic nitrogen removal and microbial community from swine wastewater [J]. Environmental Science, 2019, **40**(5): 2357-2367.

[22] 宋壮壮, 吕爽, 刘哲, 等. 厌氧氨氧化耦合反硝化工艺的启动及微生物群落变化特征[J]. 环境科学, 2019, **40**(11): 5057-5065.
Song Z Z, Lü S, Liu Z, *et al*. Start-up of simultaneous ANAMMOX and denitrification process and changes in microbial community characteristics[J]. Environmental Science, 2019, **40**(11): 5057-5065.

[23] Lawson C E, Wu S, Bhattacharjee A S, *et al*. Metabolic network analysis reveals microbial community interactions in anammox granules[J]. Nature Communications, 2017, **8**(1): 15416.

[24] Zhao Y P, Liu S F, 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 & Technology, 2018, **52**(19): 11285-11296.

[25] Zhu G B, Wang S Y, Ma B, *et al*. Anammox granular sludge in low-ammonium sewage treatment: Not bigger size driving better performance[J]. Water Research, 2018, **142**: 147-158.

HUANJING KEXUE Vol. 41 No. 11
Environmental Science (monthly) Nov. 15, 2020

CONTENTS