

硼对厌氧氨氧化反应器启动过程及菌群结构的影响

苏一魁, 吴桂荣, 荣宏伟, 黄晓遇, 谭炳琰, 储昭瑞
(广州大学 土木工程学院, 广东 广州 510006)

摘要: 第二类自诱导物型群体感应是细菌本身能够分泌一种信号分子(AI-2)并感应其浓度,进而调节特定基因表达及控制菌群行为的现象,比如生物膜的形成。硼是 AI-2 的重要组成部分,因而通过在厌氧氨氧化反应器启动过程中投加一定量硼酸(0.24 mmol/L),探讨硼对厌氧氨氧化反应器启动及菌群结构的影响。以城市污水处理厂的活性污泥作为反应器接种污泥,并控制 pH 值和温度分别在 7.5~7.7、(34±1)℃,经过 154 d 运行,总氮去除负荷达到 1.77 kgN/(m³·d),总氮去除率在 88.3% 左右,高于其他文献报道的相同反应器的总氮去除负荷。Illumina MiSeq 高通量测序结果显示,经过 154 d 的运行,反应器中的优势菌群为浮霉菌门(26.60%)、变形菌门(23.41%)、绿弯菌门(29.81%),其中优势厌氧氨氧化菌为 *Candidatus Jettenia*,占 21.07%。

关键词: 硼酸; 群体感应; 厌氧氨氧化; 高通量测序; UASB

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2019)13-0006-05

Effect of Boron on Start-up Process and Microbial Community in Anaerobic Ammonium Oxidation Reactor

SU Yi-kui, WU Gui-rong, RONG Hong-wei, HUANG Xiao-yu,
TAN Bing-yan, CHU Zhao-rui

(School of Civil Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Autoinducer-2 (AI-2) mediated quorum sensing is a system that the bacteria can secrete a signal molecule and detect its concentration to regulate specific gene expression and coordinate bacterial behaviors such as biofilm formation. Boron (B) is an important component of AI-2. A certain amount of H₃BO₃ (0.24 mmol/L) was added to anaerobic ammonium oxidation (Anammox) reactor during the start-up process to investigate the effect of boron on the start-up and microbial community structure. The reactor was inoculated with activated sludge from municipal wastewater treatment plant, and the pH value and temperature were controlled at 7.5~7.7 and (34±1)℃, respectively. After 154 days' operation, the total nitrogen removal load of the reactor reached 1.77 kgN/(m³·d), and the total nitrogen removal efficiency reached 88.3%. Illumina MiSeq high-throughput sequencing results showed that after 154 days of operation, dominant bacteria in Anammox reactor were *Planctomycetes* (26.60%), *Proteobacteria* (23.41%) and *Chloroflexi* (29.81%). The dominant Anammox bacteria was *Candidatus Jettenia* accounting for 21.07%.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51778155); 广东省教育厅青年创新人才项目(2016KQNCX121); 广州市教育局市属高校科研项目(1201630169)

通信作者: 荣宏伟 E-mail: rhwcw@139.com

Key words: H_3BO_3 ; quorum sensing; Anammox; high-throughput sequencing; UASB

随着工农业的发展和人们生活水平的提高,水资源短缺和水体污染的问题日益突出,其中氮素是主要的污染物之一。传统的硝化反硝化脱氮工艺处理率低,能耗高,不符合目前的可持续发展理念^[1],而厌氧氨氧化菌的发现为生物脱氮技术注入了新的活力。但厌氧氨氧化菌的生长速度慢,世代周期长达11 d,严重影响了其在城市污水处理中的应用^[2-3]。因此,研发一种有效的快速启动方法对于厌氧氨氧化在城市污水处理中的应用至关重要。

群体感应(QS)是菌群细胞间相互沟通、协调行为和功能的一种现象,常见的信号分子有酰化高丝氨酸内酯、寡肽以及第二类自诱导物(AI-2),其中AI-2型群体感应系统被认为是细菌间交流的语言^[4-5]。最近报道显示,硼是AI-2的重要组分。因此,笔者探讨了硼对厌氧氨氧化反应器启动过程及菌群结构的影响,旨在为厌氧氨氧化反应器的快速启动提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 试验装置

试验采用如图1所示的UASB反应器,其由有机玻璃制成,下圆柱部分内径为100 mm,有效高度为800 mm,有效容积为4 L,通过水浴套筒维持反应器内部温度为 $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

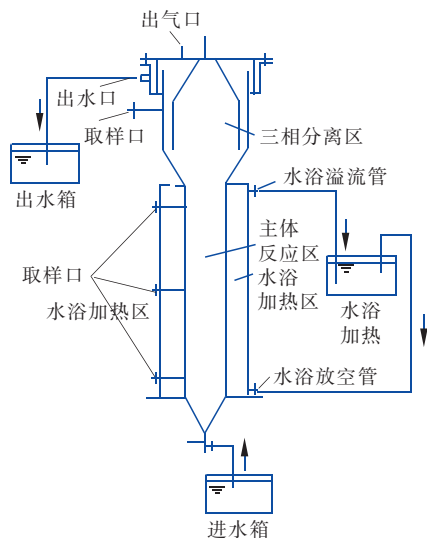


图1 UASB试验装置

Fig.1 Schematic diagram of UASB

1.2 接种污泥和进水

接种污泥取自广州市沥滘污水处理厂二沉池,

呈黄褐色,沉降性能良好,MLSS为34.22 g/L,污泥的接种量为2 L,为反应器有效容积的50%。反应器进水采用人工配水,控制pH值在7.5~7.7。主要成分包括: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为200 mg/L, CaCl_2 为300 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为6 mg/L, H_3BO_3 为15 mg/L, NaHCO_3 为300 mg/L,微量元素为1 mL/L, NH_4Cl 和 NaNO_2 按照实际情况配制。微量元素组成:EDTA为15.0 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为0.43 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 为0.24 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 为0.99 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 为0.25 g/L, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 为0.22 g/L, $\text{NaSeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 为0.21 g/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 为0.19 g/L, $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 为0.05 g/L。

1.3 分析方法

$\text{NH}_4^+ - \text{N}$:纳氏试剂光度法; $\text{NO}_2^- - \text{N}$:N-(1-萘基)-乙二胺光度法; $\text{NO}_3^- - \text{N}$:麝香草酚分光光度法;pH值:HQ40d型便携式pH仪。

1.4 污泥样品和DNA提取

分别取刚接种的污泥样品和运行154 d的反应器污泥样品进行DNA的提取,为了避免取样的误差,同一时间从反应器的不同位置取出适量的污泥,混合均匀后于 -80°C 下保存备用。DNA的提取采用PowerSoil DNA提取试剂盒。提取后的DNA产物采用Q3000紫外分光光度计测定DNA的浓度和质量,并采用1%的琼脂糖进行凝胶电泳以检测DNA的完整性。提取的DNA样品于 -80°C 下储存。

1.5 高通量测序及数据分析

为了解析反应器启动过程中微生物群落结构,采用16S rRNA基因靶向测序。测序平台选择目前广泛应用的高通量测序平台——MiSeq paired-end,测序工作委托上海美吉生物公司完成。16S rRNA基因靶向测序数据分析主要包括分类学分析、 α 多样性分析以及 β 多样性分析,分析平台采用Qiime平台^[6]。

2 结果与讨论

2.1 厌氧氨氧化反应器运行效果

为了避免亚硝酸盐的抑制作用,采用低浓度、低负荷启动方式驯化培养Anammox菌。主要分为7个阶段:①1~35 d,进水氨氮和亚硝酸盐氮浓度为50 mg/L,HRT为24 h;②36~51 d,进水氨氮和亚硝酸盐氮浓度为100 mg/L,HRT为24 h;③52~54 d,

进水氨氮和亚硝酸盐氮浓度为 150 mg/L, HRT 为 24 h; ④55 ~ 72 d, 进水的氨氮和亚硝酸盐氮浓度为 200 mg/L, HRT 为 24 h; ⑤73 ~ 84 d, 进水氨氮和亚硝酸盐氮浓度为 200 mg/L, HRT 为 12 h; ⑥85 ~ 130 d, 进水氨氮和亚硝酸盐氮浓度为 250 mg/L, HRT 为 12 h; ⑦131 ~ 154 d, 进水氨氮和亚硝酸盐氮浓度为 250 mg/L, HRT 为 6 h。结果见图 2 ~ 4。

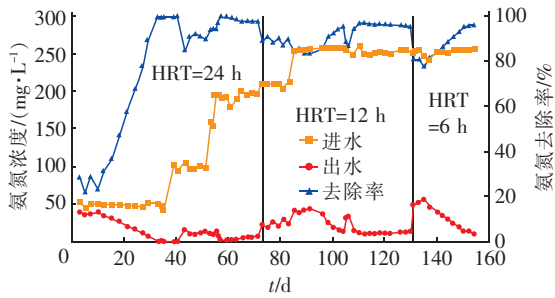


图2 进、出水氨氮浓度变化

Fig. 2 Variation of influent and effluent $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ during the operation

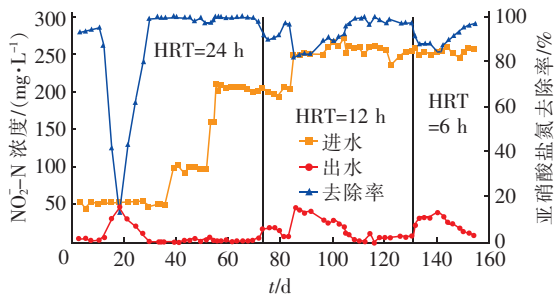


图3 进、出水亚硝酸盐氮浓度变化

Fig. 3 Variation of influent and effluent $\text{NO}_2^- - \text{N}$ during the operation

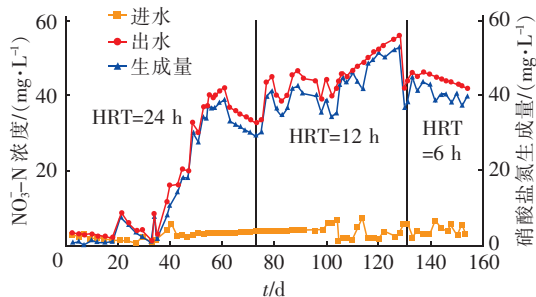


图4 进、出水硝酸盐氮浓度变化

Fig. 4 Variation of influent and effluent $\text{NO}_3^- - \text{N}$ during the operation

从图 2 ~ 4 可知 UASB 反应器的启动过程经历了 3 个阶段, 即污泥适应阶段 (1 ~ 20 d)、活性表现阶段 (21 ~ 29 d)、活性提高阶段 (30 ~ 154 d)。在污

泥适应阶段, 由于接种污泥存在着许多异养菌, 能够以菌体死亡后释放的有机物作为有机碳源进行反硝化作用。在该阶段出水 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度几乎为零, 氨氮的降解量很低。随着有机物的不断减少, 亚硝酸盐氮的去除率不断降低, 在第 20 天时降至最低, 这表明反硝化阶段结束, 开始进入活性表现阶段, 即 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 被同步降解, 并伴有 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的生成。进水中的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 在第 29 天时已基本降解为零。接着, 反应器进入活性提高阶段。在该阶段, 通过不断提高进水氮负荷和缩短 HRT 来促进厌氧氨氧化菌的生长, 至第 154 天进水总氮负荷为 $2.0 \text{ kgN}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 总氮去除率达到了 88.3%, 略高于厌氧氨氧化工艺去除率的理论最大值 (88%), 标志着厌氧氨氧化启动成功。

在 118 d 时, 进水总氮负荷为 $1.0 \text{ kgN}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 总氮去除率达到了 87.0%, 即总氮去除负荷为 $0.87 \text{ kgN}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 在第 154 天时更是高达 $1.77 \text{ kgN}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$, 明显高于张海芹^[7]、孟凡能^[8]、Tran^[9]等在相近时间段的总氮去除负荷。这说明在反应器中加入硼酸有利于缩短厌氧氨氧化的启动时间, 可能是由于硼酸是 AI-2 的重要组分, 硼酸的加入加强了厌氧氨氧化菌的群体感应触动机制。

2.2 反应器内群落结构多样性分析

通过 16S rRNA 基因靶向测序对反应器启动过程中微生物多样性的变化进行了分析。在初始及第 154 天获得有效序列数分别为 43 228 和 44 848 条。在相似水平为 97% 下, 测序样品的稀释性曲线如图 5 所示, 当两个样品的序列数大于 25 000 条时, 操作分类单元 (OTU) 数增速趋于平缓, 说明本次测序能够真实反映样品中微生物的群落结构信息。

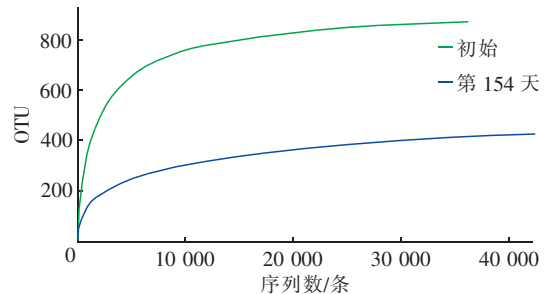


图5 样品的稀释曲线

Fig. 5 Rarefaction curves of microbial communities in UASB

两个样品的 α 多样性可以采用一系列统计学分析指数去估计。两个样品的测序深度 (Coverage)

分别为 99.8%、99.7%, 说明本次测序量能够涵盖样品中的微生物群落结构信息。微生物种群丰富度可以通过 Chao1 和 ACE 指数来反映。随着反应器的启动, Chao1 和 ACE 指数值分别由 900、881 下降至 491、485, 表明在启动过程中微生物种群的丰富度逐渐降低, 这主要是由于一些不能适应的微生物被淘汰及死亡造成的。Shannon 指数和 Simpson 指数是常见的微生物多样性指数, 可以综合反映微生物种群的丰富度和均匀度。在反应器启动过程中, Shannon 指数逐渐减小 (由 5.76 降至 3.85), 而 Simpson 指数逐渐增大 (由 0.007 提高至 0.06), 均表明反应器内微生物种群多样性越来越低。分析原因主要有二个: 一是微生物种群丰富度降低, 即反应器内微生物种群种类减少; 二是微生物种群均匀度降低, 也就是随着反应器的启动, 厌氧氨氧化菌的丰度不断升高, 而其他非功能微生物的丰度逐渐降低。

2.3 反应器内菌群组成

图 6 显示了在分类水平为门的条件下反应器启动初期和启动完成后微生物群落结构变化。可以看出, 接种污泥 (Day0) 中微生物群落结构比较丰富, 主要有: 变形菌门 *Proteobacteria* (30.48%)、绿弯菌门 *Chloroflexi* (23.88%)、拟杆菌门 *Bacteroidetes* (14.98%)、放线菌门 *Actinobacteria* (8.49%)。随着反应器的运行, 反应器内微生物群落结构发生了显著的变化, 优势菌群转变为: 浮霉菌门 *Planctomycetes* (26.60%)、变形菌门 *Proteobacteria* (23.41%)、绿弯菌门 *Chloroflexi* (29.81%)。其中, 浮霉菌门是目前报道具有厌氧氨氧化功能细菌的一个分支^[10]。变形菌门的存在说明反应器还存在一定的反硝化作用, 这也是反应器的去除率高于理论值的原因, 这些反硝化菌能够以胞外聚合物和菌体死亡释放的有机物作为碳源进行反硝化。

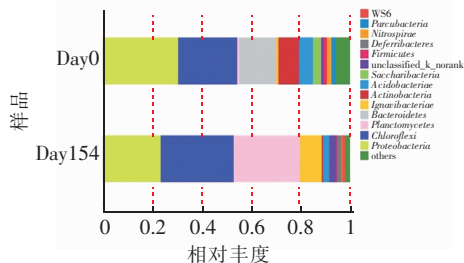


图 6 分类水平为门时反应器内微生物群落结构变化

Fig. 6 Variation of microbial community structure at level of phylum in UASB during the start-up period

在分类水平为目的条件下, 启动初期和启动完成后反应器内微生物群落结构的演替规律如图 7 所示。可以看出, 接种污泥中有超过 40% 的序列不能够被鉴别出来, 在鉴别出的序列中, 菌群分布较广, 且丰度较均匀, 这是因为接种污泥取自实际污水处理厂, 进水基质的多样性决定了菌群的多样性。随着反应器的运行, *Anaerolineales* 和 *Brocadiales* 的相对丰度增加显著, 分别从 4.63% 和零增加至 22.51% 和 23.23%。*Brocadiales* 属于浮霉菌门, 具有厌氧氨氧化功能^[10]。*Anaerolineales* 属于绿弯菌门, 是一种丝状菌, 对生物膜和颗粒污泥的形成起到重要作用。

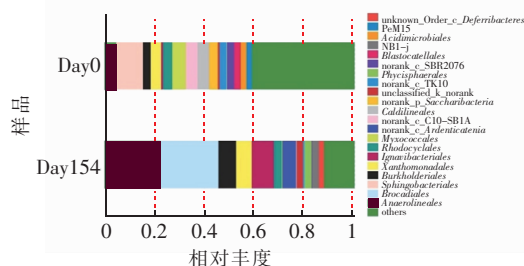


图 7 分类水平为目的时反应器内微生物群落结构变化

Fig. 7 Variation of microbial community structure at level of order in UASB during the start-up period

在分类水平为属的条件下, 启动初期和启动完成后反应器内微生物群落结构的演替规律如图 8 所示。可以看出, 大部分序列在分类水平为属时不能够被鉴别出来, 结合前述分析发现, 这些未鉴别序列主要来自于绿弯菌门。

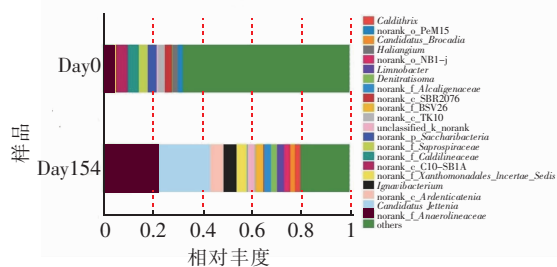


图 8 分类水平为属时反应器内微生物群落结构变化

Fig. 8 Variation of microbial community structure at level of genus in UASB during the start-up period

在启动初期接种污泥中的厌氧氨氧化菌污泥量为零。随着反应器的进行菌群发生了变化, *Candidatus Jettenia* 和 *norank_f_Anaerolineaceae* 得到了富集, 在启动完成后其相对丰度分别从零和 4.44% 增加到 21.07% 和 22.51%, 成为了 UASB 反应器的主要菌群。*Candidatus Jettenia* 和 *Brocadia* 是

已报道的常见厌氧氨氧化菌^[10],在启动完成后的相对丰度分别为21.07%和2.16%。

3 结论

① 以城市污水处理厂的二沉池污泥为种泥,在启动的过程中,加入信号分子 AI-2 的重要成分——硼(0.24 mmol/L),有效缩短了 Anammox 反应器的启动时间,至第154天时总氮去除负荷为1.77 kgN/(m³·d),高于其他文献报道的相同反应器的总氮去除负荷。推测可能是由于硼酸的加入,加强了厌氧氨氧化菌群体感应的触动机制,从而缩短了厌氧氨氧化的启动时间。

② 通过高通量测序分析可知,厌氧氨氧化反应器启动完成后的优势菌群为:浮霉菌门(26.60%)、变形菌门(23.41%)、绿弯菌门(29.81%)。其中浮霉菌门中的 *Candidatus Jettenia* (21.07%) 在启动完成后成为了优势菌群之一,是优势厌氧氨氧化菌群。绿弯菌门中的 *Anaerolinea* (22.51%) 对生物膜和颗粒污泥的形成起到重要作用。变形菌门(23.41%)的存在表明反应器中还存在一定的反硝化作用。

参考文献:

- [1] Vlaeminck S E, De Clippeleir H, Verstraete W. Microbial resource management of one-stage partial nitrification/anammox[J]. Microb Biotechnol, 2012, 5(3): 433 - 448.
- [2] Puyol D, Carvajal-Arroyo J M, Garcia B, et al. Kinetic characterization of *Brocadia* spp.-dominated anammox cultures[J]. Bioresour Technol, 2013, 139: 94 - 100.
- [3] Oshiki M, Shimokawa M, Fujii N, et al. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium ' *Candidatus Brocadia sinica* ' [J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 6): 1706 - 1713.
- [4] Sigrid C J, Keersmaecker D, Sonck K, et al. Let LuxS speak up in AI-2 signaling[J]. Trends Microbiol, 2006, 14(3): 114 - 119.
- [5] 黄妙琴, 郭峰, 柯才焕. 近岸海洋细菌的群体感应与生物膜形成关系[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2010, 11(6): 863 - 870.
Huang Miaoqin, Guo Feng, Ke Caihuan. Quorum sensing signal molecule and biofilm formation capacity in marine coastal bacteria [J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2010, 11(6): 863 - 870 (in Chinese).
- [6] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335 - 336.
- [7] 张海芹, 陈重军, 王建芳, 等. 厌氧氨氧化启动过程及特性研究进展[J]. 化工进展, 2014, 33(8): 2180 - 2186.
Zhang Haiqin, Chen Chongjun, Wang Jianfang, et al. Progress in start-up and related characteristics of anaerobic ammonium oxidation processes: A review [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2014, 33(8): 2180 - 2186 (in Chinese).
- [8] 孟凡能, 张树军, 吕鑑, 等. 混合污泥接种的厌氧氨氧化处理污泥脱水液的启动[J]. 中国环境科学, 2009, 29(3): 318 - 324.
Meng Fanneng, Zhang Shujun, Lü Jian, et al. The start-up of dealing with reject by ANAMMOX inoculated with mixed sludge [J]. Chinese Environmental Science, 2009, 29(3): 318 - 324 (in Chinese).
- [9] Tran H T, Park Y J, Cho M K, et al. Anaerobic ammonium oxidation process in an upflow anaerobic sludge blanket reactor with granular sludge selected from an anaerobic digester [J]. Biotechnology Bioengineering, 2006, 11(3): 199 - 204.
- [10] 郑平, 张蕾. 厌氧氨氧化菌的特性与分类[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2009, 35(5): 473 - 481.
Zheng Ping, Zhang Lei. Characterization and classification of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria [J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Science, 2009, 35(5): 473 - 481 (in Chinese).



作者简介: 苏一魁(1995 -), 男, 广西柳州人, 硕士研究生, 研究方向为污水处理技术。

E-mail: 136107612@qq.com

收稿日期: 2018 - 10 - 10