



文章栏目: Anammox<sup>+</sup>生物脱氮工艺与应用

DOI 10.12030/j.cjee.202211057 中图分类号 X52 文献标识码 A

薛莹, 王芬, 闫钊. 外加 AHLs 对厌氧氨氧化颗粒污泥 UASB 启动的影响[J]. 环境工程学报, 2023, 17(4): 1092-1101. [XUE Ying, WANG Fen, YAN Zhao. Effect of AHLs addition on start-up of anammox granular sludge-based UASB reactor[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(4): 1092-1101.]

## 外加 AHLs 对厌氧氨氧化颗粒污泥 UASB 启动的影响

薛莹<sup>1</sup>, 王芬<sup>1,✉</sup>, 闫钊<sup>2</sup>

1. 天津大学环境科学与工程学院, 天津 300350; 2. 安阳欣润山环保科技有限公司, 安阳 455007

**摘要** 厌氧氨氧化 (anammox) 颗粒污泥反应器的启动是其工程化应用的重要前提。选用升流式厌氧污泥床反应器 (UASB), 投加外源信号分子 N-酰基高丝氨酸内酯 (AHLs), 探究其对 anammox 污泥颗粒化过程的影响, 以此考察 anammox 颗粒污泥工艺启动方式。结果表明, 联合投加 N-DL-己酰基高丝氨酸内酯 (C6-HSL) 和 N-DL-辛酰基高丝氨酸内酯 (C8-HSL) 信号分子组 (R1) 和甲醇对照组 (R2) 中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 的去除率分别为 87.09%、89.13%、76.83% 和 82.37%、84.39%、69.49%。R1 和 R2 中粒径 >0.45 mm 的污泥占比为 50.67% 和 35.05%, R1 中污泥颗粒化程度高于 R2。胞外聚合物 (EPS) 质量浓度 (以每克可挥发性悬浮物) 分别为 138.31、116.95  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。Anammox 功能基因 *hzo*、*hzsB* 基因拷贝数呈增长趋势, 且 R1 高于 R2。Anammox 菌属 *Candidatus Brocadia* 的相对丰度分别为 30.30%、8.90%。这表明联合投加 C6-HSL 和 C8-HSL 后可促进 EPS 分泌及其他信号分子的内源释放, 进而刺激了 anammox 菌的富集, 加快了 anammox 污泥的颗粒化进程。本研究可为 anammox 颗粒污泥工艺的快速启动提供参考。

**关键词** 厌氧氨氧化; 颗粒污泥; 信号分子; C6-HSL; C8-HSL

作为新型脱氮工艺, anammox 因其无需外加碳源和曝气、负荷高等优点而受到广泛关注<sup>[1-2]</sup>。颗粒污泥沉降性能好、生物活性高、抗冲击负荷强。但 anammox 菌的生长容易受到温度、pH、底物浓度等外界环境因素干扰, 从而导致 anammox 工艺启动难度较大。Anammox 颗粒污泥反应器的快速启动是其工程化应用的重要前提。

群体感应 (quorum sensing, QS) 是指微生物自发合成并释放信号分子, 浓度达阈值后被细胞感知并调控相关基因的表达<sup>[3]</sup>, 如生物膜的形成、毒力因子的表达、生物发光<sup>[4]</sup>等。Anammox 菌代谢过程中合成并分泌 AHLs 信号分子, 通过调控相关功能基因的表达、胞外聚合物 (extracellular polymeric substance, EPS) 合成等生理行为, 最终影响微生物聚集体形成, 即 AHLs 介导 QS 以调控 EPS 含量和组成, 从而诱导 anammox 体系中的污泥颗粒化<sup>[5]</sup>。

LIU 等<sup>[6]</sup>发现 anammox 菌释放的信号分子中 C6-HSL 和 C8-HSL 浓度最高。C6-HSL 可改善颗粒的活性, C8-HSL 对颗粒的稳定性和沉降性起着关键作用<sup>[7]</sup>。ZHANG<sup>[8]</sup>通过在 UASB 反应器中添加  $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  C6-HSL, 使得 anammox 颗粒污泥的活性提高了 16%, 达到了  $1.08\ \text{kg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (以每天每

收稿日期: 2022-11-10; 录用日期: 2023-03-21

基金项目: 天津市科技计划项目 (19ZXSZSN00080)

第一作者: 薛莹 (1999—), 女, 硕士研究生, [3275477189@qq.com](mailto:3275477189@qq.com); ✉通信作者: 王芬 (1979—), 女, 博士, 副教授, [wangfen@tju.edu.cn](mailto:wangfen@tju.edu.cn)

千克悬浮物消耗N的质量计)。HAN等<sup>[9]</sup>发现C8-HSL在总氮容积负荷为 $1.68\text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ 的条件下,促进了紧密结合型EPS的蛋白质(protein, PN)分泌,提高了污泥的沉降性。张向晖等<sup>[10]</sup>向升流式厌氧污泥床(upflow anaerobic sludge blanket, UASB)反应器中分别添加C6-HSL和C8-HSL,发现质量浓度为 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的AHLs会抑制anammox菌群生长,但能提高其脱氮性能,并显著促进hzs A的表达。目前,较多研究集中在C6-HSL或C8-HSL单独投加对anammox工艺脱氮性能等方面的影响。但在实际体系中,C6-HSL和C8-HSL同时存在,因此,本研究选择联合投加C6-HSL和C8-HSL以探究其对anammox颗粒污泥工艺启动的影响。

本研究在UASB反应器中接种污水厂剩余污泥和anammox污泥以启动anammox颗粒污泥系统,再联合投加外源信号分子C6-HSL和C8-HSL,通过定期检测并分析进出水氮的质量浓度、沉降指标、EPS质量浓度、污泥粒径、功能基因相对丰度、AHLs质量浓度等以探究外加AHLs对anammox污泥颗粒化过程的作用及其对anammox菌活性和富集的影响,以期为anammox颗粒污泥工艺的启动提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验装置

本实验系统主要由UASB反应器、蠕动泵、水浴加热装置、进水箱、集水箱等组成(图1)。UASB反应器主体为有机玻璃材质,内径9 cm,高径比15:1,体积10 L,有效体积8.6 L。从下至上每24 cm设置一个取样口。整套装置气密性良好,三相分离器与反应器顶盖为一体。反应器外有水浴层,水浴控制在 $(35\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。利用蠕动泵进水和内循环控制上升流速在 $6\text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

### 1.2 接种污泥

本实验的接种污泥为污水厂剩余污泥和anammox污泥的混合污泥,两者质量比为2:1。剩余污泥取自天津市津南污水处理厂,anammox污泥取自 $1\text{ m}^3$ 的厌氧序批式反应器(anaerobic sequencing batch reactor, ASBR)。接种后混合液污泥浓度(MLSS)为 $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,混合液挥发性悬浮固体浓度(MLVSS)为 $1.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,MLVSS/MLSS为0.53。

### 1.3 模拟废水

实验所用模拟废水采用自来水人工配置,氨氮( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )和亚硝氮( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )分别来源于硫酸铵( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )和亚硝酸钠( $\text{NaNO}_2$ )。 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 质量浓度之比为1.3,按需进行配制。矿物成分为碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ ) $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) $0.027\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、氯化钙( $\text{CaCl}_2$ ) $0.18\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、七水合硫酸镁( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此外,加入微量元素I、II溶液<sup>[11]</sup>,体积浓度为 $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ,用高纯氮气吹扫配水至少10 min,以除去溶解氧,并用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸(HCl)调节pH至7.5~8.0。

### 1.4 UASB反应器的启动

UASB反应器共运行92 d,分为4个阶段。氨氮去除率增长至稳定后即可进入下一阶段。从第13天开始,向反应器R1投加 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的C6-HSL和 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的C8-HSL,向反应器R2投加 $0.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甲醇做对照<sup>[12]</sup>。不同阶段的时间、进水TN、水力停留时间(HRT)如表1所示。反应

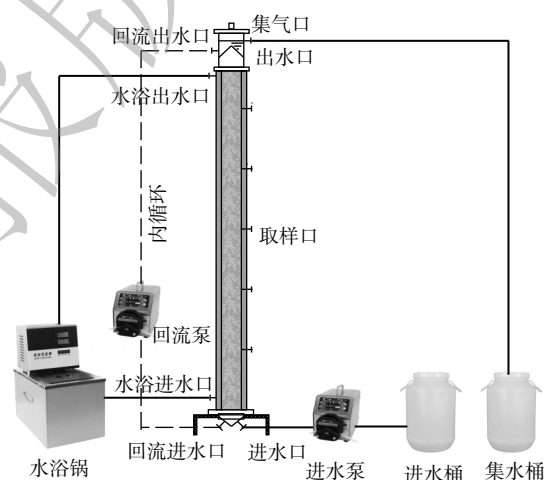


图1 Anammox UASB反应系统装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of anammox UASB system

器 R1 和 R2 运行工况相同。

### 1.5 分析项目及测试方法

1) 常规项目及测试方法。每天取 1 次出水水样, 经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 放入 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。按《水和废水监测分析方法》<sup>[13]</sup> 中的分析方法测定水质指标: 采用纳氏试剂-紫外分光光度比色法测定氨氮质量浓度; 采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法测定亚硝氮质量浓度; 采用紫外分光光度法测定硝氮质量浓度; 采用重量法测定 MLSS; 采用马弗炉燃烧-重量法测定 MLVSS。污泥体积指数 ( $\text{SVI}_5$ ) 根据污泥的 MLSS 和污泥沉降比 ( $\text{SV}_5$ ) 计算得出。

$$\text{SVI}_5 = \text{SV}_5 / \text{MLSS} \quad (1)$$

2) 污泥粒径。颗粒污泥粒径采用湿氏筛分法测定。取 50 mL 泥水混合物, 依次通过孔径为 2.00、0.90、0.45、0.15 mm 的不锈钢网筛, 利用 MLSS 的测定方法分别测定不同粒径范围的质量, 并计算其所占的百分比<sup>[11]</sup>。

3) EPS 提取及测定。对污泥中 EPS 进行提取, 提取后的 EPS 进行 PN、多糖 (polysaccharide, PS) 的测定<sup>[14]</sup>。PN 采用 Lowry 法试剂盒测定, 以牛血清蛋白为标准物质, 于 550 nm 波长下用紫外分光光度计进行测定, 根据样品的吸光度和标准曲线计算 PN 浓度。PS 采用苯酚-浓硫酸法测定, 以葡萄糖为标准物质, 在 490 nm 波长处测定吸光度, 根据样品的吸光度和标准曲线计算 PS 浓度。

4) 群体感应物质的测试。在各阶段末期进行泥相的群体感应物质的测试, 对泥相进行预处理。预处理步骤为: 取一定量污泥在 -80  $^{\circ}\text{C}$  下冷冻干燥 24 h。称一定量干污泥于 50 mL 离心管中, 每次加入 10 mL 乙酸乙酯, 振荡 20 min, 离心, 取上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜 (重复 3 次), 加入 1 mL 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  HCl, 分装至 500 mL 试剂瓶中, 进行固相萃取, 浓缩至 1 mL, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后用超高效液相色谱质谱联用 (UPLC-MS) 测定其浓度<sup>[6]</sup>。

5) 污泥 DNA 提取。为探究微生物群落的变化, 在不同阶段末取污泥样品提取 DNA。将冻存的样品在室温下化冻后, 于转速 3 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10~20 min 后, 弃去上清液作为提取 DNA 的基质样品, 采用 E.Z.N.A. Soil DNA Kit 试剂盒 (Omega, Norcross, GA, USA) 提取污泥总 DNA。将所得 DNA 提取物 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存。

6) 实时定量 PCR (qPCR) 反应。提取的 DNA 样品为待测样品, 通过 qPCR 测定 16S rRNA 基因与功能基因的相对丰度, 用荧光染料 SYBR-Green II 检测 qPCR。qPCR 程序在 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 2 min 后开始, 然后进行 40 个循环, 每个循环包括变性 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 退火温度 60 s 和 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s。不同基因的引物和退火温度见表 2。该反应在型号为 BIO-RAD MJ Mini<sup>TM</sup> 的机器上运行, 联机以 CFX Manager Software 进行实时数据采集与分析。

7) 高通量测序。提取完的 DNA 样品为待测样品, 以 16S V4 区引物 (515F 和 806R) 经过 PCR 扩增, 产物纯化, 文库制备及库检后进行 HiSeq 上机测序。通过对 Reads 拼接过滤、OTUs (Operational Taxonomic Units) 聚类进行物种注释及丰度分析, 揭示样品物种构成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脱氮性能分析

在阶段 I, 进水 TN 为 165 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 。由图 2 可知, R1 中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率逐渐增加, R2 由于反应器故障, 在第 4 天  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  出水质量浓度突然增加, 之后  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率逐渐增加。在阶段 I, R1 的 TN 去除率高于 R2, 对 R1 和 R2 的 TN 去除率进行独立样本 T 分析, 得出 R1 有显著的脱氮优势 ( $p < 0.05$ )。

从阶段 II 开始 R1 投加 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  C6-HSL 和 0.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  C8-HSL, R2 投加等量的甲醇, 进水 TN 为 232 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  (实际反应器周期初始质量浓度 165 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ )。随着反应器的持续运行, 脱氮性能逐

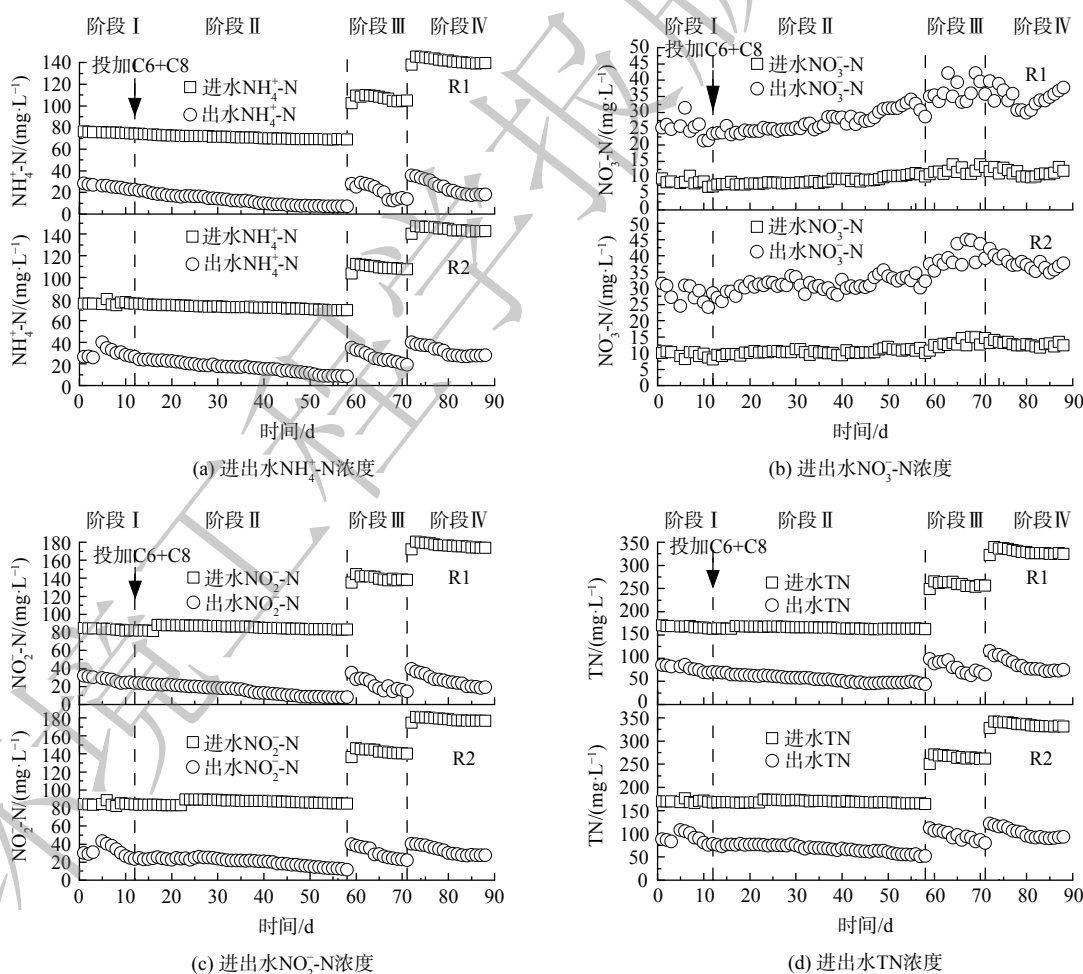
表 1 UASB 反应器不同阶段的运行工况

Table 1 Operating conditions of UASB reactor at different stages of startup period

阶段	时间/d	进水 TN/(mg $\cdot\text{L}^{-1}$ )	HRT/h
I	12	165	24
II	44	165	24
III	18	270	24
IV	18	350	24

表 2 qPCR 扩增引物序列及其条件  
Table 2 qPCR amplification primer sequence and conditions

目的基因	引物	引物序列	退火温度/℃	碱基数目	参考文献
anammox 16S	A438f	GTCRGGAGTTADGAAATG	58	250	[15]
	A648r	ACCAGAAGTTCCTACTCTC			
hzsB	hzsB364f	TGYGCVAGYTGCAAYTAYGARAG	54	301	[16]
	hzsB640r	CTGAAHGGACTYCCBGTRAAAYTC			
nirS	nirS-cd3aF	GTSAACGTSAAAGGARACSGG	59	478	[17]
	nirS-R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA			
hzo	hzoclF1	TGTGCATGGTCAATTGAAAG	55	473	[18]
	hzoclR1	CAACCTCTTCWGCAGGTGCATG			
ccsB	ccsB1189f	AYAATCCWGCYGTWMWVGTGDA	57	451	[16]
	ccsB1589r	GCWARRTRTRTCDKKATACCA			



注：R1为投加外源信号分子组；R2为甲醇对照组。

图 2 进出水中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、TN 的变化

Fig. 2 Variations of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、TN concentrations in the influent and effluent

渐增强, R1、R2 中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率显著增加 ( $p < 0.05$ )。在阶段 II 末, R1 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率分别达到 89.88%、90.50% 和 73.15%,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  生成量为  $18.48 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; R2 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率分别达到 87.75%、86.33% 和 68.22%,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  生成量为  $22.07 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。图 3 表明, 该过程中 R1、R2 的化学计量数  $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  均值分别为 1.18、1.16,  $\Delta\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  均值分别为 0.31、0.38。投加信号分子后,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  的去除量以及  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的生成量均高于理论值。这可能是由于当反应器出水 DO 为 1.04~1.56 时, 硝化细菌利用 DO 和基质发生硝化作用, 消耗了部分  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , 从而生成  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ [12]。

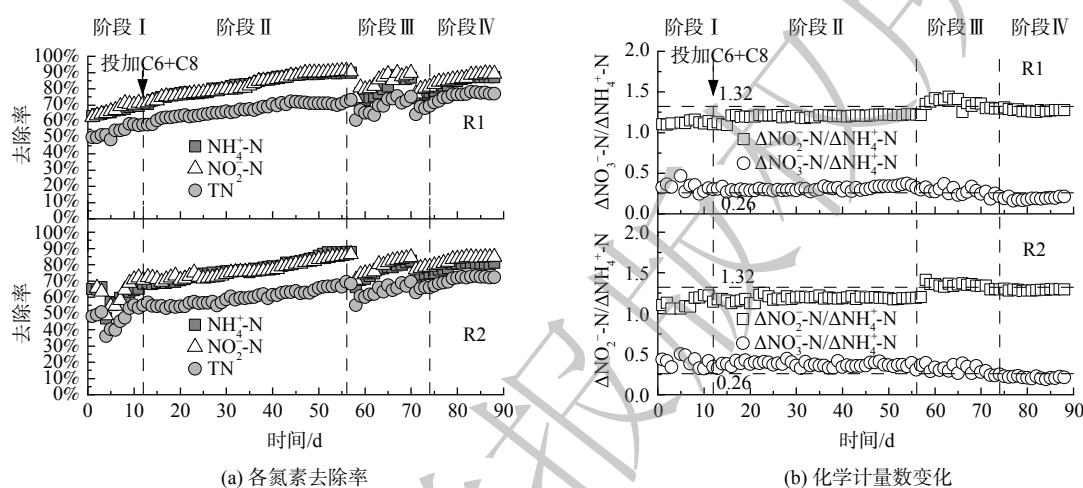


图 3  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN 去除率变化及  $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\Delta\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  的变化

Fig. 3 Variations of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN removal rates and variations of  $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  and  $\Delta\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$

在阶段 III, 提升进水 TN 至  $270 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在该阶段初期, 反应器脱氮性能下降, 随着反应器的持续运行, 脱氮性能逐渐恢复。R1、R2 中化学计量数  $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  和 TN 去除率逐渐增加。在阶段 III 末, R1 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率分别达到 86.86%、89.55% 和 75.07%,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的生成量为  $22.47 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; R2 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率分别达到 82.37%、84.39% 和 69.49%,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的生成量为  $24.62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该过程中 R1 的化学计量数  $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  均值为 1.37, 高于理论值 (1.32),  $\Delta\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  均值为 0.29, 高于理论值 (0.26); R2 的化学计量数  $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  均值为 1.36,  $\Delta\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  均值为 0.32。由此可见, 投加信号分子更有利于体系脱氮主反应向 anammox 方向发展。R1 的 TN 去除率可达到 70% 以上, 提高进水 TN 之后, 在 13 d 内可恢复, 而 R2 的 TN 去除率仍在 70% 以下, 这说明投加 C6-HSL 和 C8-HSL 有利于体系脱氮性能的恢复。

在阶段 IV, 继续提升进水 TN 至  $350 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , R1、R2 中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率显著增加 ( $p < 0.05$ )。在阶段 IV 末, R1 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率分别达到 87.09%、89.13% 和 76.83%,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的生成量为  $25.68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; R2 的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  和 TN 去除率分别达到 81.07%、84.70% 和 72.18%,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的生成量为  $24.68 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该过程中 R1 和 R2 的化学计量数  $\Delta\text{NO}_2^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  均值分别为 1.28、1.29,  $\Delta\text{NO}_3^-\text{-N}/\Delta\text{NH}_4^+\text{-N}$  均值分别为 0.20、0.22, 均低于理论值。这可能是系统存在少量的硝化菌和反硝化菌降解  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  和  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  造成的。在投加 C6-HSL 和 C8-HSL 期间, R1 中  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN 去除率均高于 R2, 故联合投加 C6-HSL 和 C8-HSL 有助于提高启动期氮的去除率。

## 2.2 污泥沉降性能与粒径分布

在每个阶段末取一定量污泥检测其沉降性能和粒径分布。R1 和 R2 的污泥质量浓度在  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  以下, R1 和 R2 的 MLSS 均呈先下降后上升的趋势。呈下降的原因是启动期初期污泥没有形成稳定

的颗粒，在上升流速形成的选择压力下，絮状污泥随出水流失。R1的 $SVI_5$ 从96.70降至44.10，R2的 $SVI_5$ 从104.90降至56.65。R1中污泥的 $SVI_5$ 低于R2，说明R1污泥的沉降性能更优<sup>[19]</sup>。这表明联合投加C6-HSL和C8-HSL有助于污泥沉降性能的改善( $p < 0.05$ )，且对污泥浓度有显著促进作用( $p < 0.005$ )。

一般来说，把颗粒粒径大于0.2 mm的污泥称为颗粒污泥<sup>[20]</sup>。颗粒污泥占比达到55%时，可认为颗粒污泥系统启动成功<sup>[21]</sup>。图4表明，在阶段Ⅱ末，R1中粒径 $> 0.15$  mm的污泥达到57.44%，这说明R1在第56天完成了anammox颗粒污泥系统启动。在启动期末，R2中粒径 $> 0.15$  mm的污泥所占比例仅为53.37%，这说明R2尚未完成anammox颗粒污泥系统启动。

粒径为0.45~0.90 mm时污泥脱氮效果及物理、生化性能最佳<sup>[22]</sup>。R1中粒径在0.45~0.90 mm的污泥占比从4.93%增至17.05%，增加了13.88%，而R2中粒径在0.45~0.90 mm的污泥占比从7.67%增至15.42%，增加了8.45%。随着各阶段进水基质浓度的提高，大颗粒污泥占比有所增加。这可能是由EPS的分泌及微生物群落结构变化而引起的。TANG<sup>[23]</sup>研究了外源添加信号分子对anammox颗粒污泥的影响，发现外源添加 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的C6-HSL、C8-HSL使污泥的中位直径分别增加了8%、24%，从而促进了anammox污泥的颗粒化进程。该结果与本研究结果一致。R1中颗粒污泥的比例明显大于R2，故联合投加C6-HSL和C8-HSL可促进颗粒污泥的比例增加，从而加快了anammox污泥颗粒化进程。

### 2.3 EPS分析

本实验中EPS成分主要以PN为主，外源投加C6-HSL和C8-HSL可促进污泥EPS的分泌，特别是PN分泌，增加细胞表面的相对疏水性，可促进微生物的聚集生长。表3表明，随着进水TN逐渐增加，R1和R2的EPS质量浓度均逐渐增加。文献<sup>[24]</sup>指出EPS质量浓度的增加有利于anammox菌细胞间的互相粘附聚集及细胞交流进而促进颗粒污泥的形成，这与粒径分布的变化情况一致。PN为疏水性物质，PN/PS的提高可增强污泥的相对疏水性，从而触发污泥颗粒化的进程<sup>[25]</sup>，使得微生物细胞更易于从水相中脱离出来并互相聚集<sup>[26]</sup>。

### 2.4 泥相AHLs分析

在每个阶段末取样检测AHLs的质量分数，启动期检测到4种AHLs信号分子，分别是C6-HSL、C8-HSL、C14-HSL、3-oxo-C14-HSL。图5表明，AHLs信号质量分数呈升高的趋势。R1中的C6-HSL在阶段Ⅰ末质量分数为 $248.90 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。而在从阶段Ⅱ至阶段Ⅳ，C6-HSL质量分数分别为1071.50、984.80、952.40  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ，虽稍有下降，但均比阶段Ⅰ增加近4倍，R1中的C8-HSL质量分数在阶段Ⅰ至阶段Ⅳ呈升高趋势。这说明通过联合投加C6-HSL和C8-HSL使水相中AHLs质量分数的增加达到QS系统的阈值，激活相关基因如编码AHLs合成酶<sup>[27]</sup>的基因LuxI的表达，进而释放出更多的AHLs。R2中C6-HSL质量分数在阶段Ⅰ至阶段Ⅳ分别为184.00、286.81、292.20、

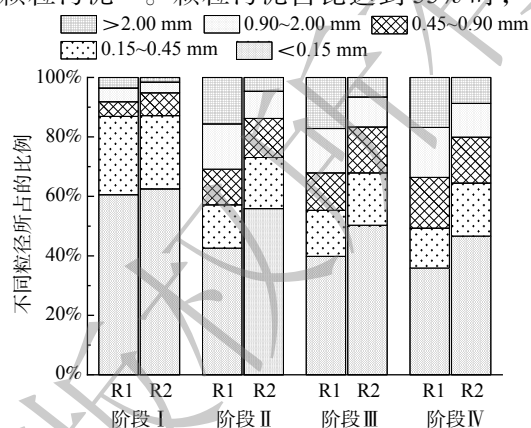


图4 不同阶段R1与R2中不同粒径污泥所占比例变化  
Fig. 4 Proportion of sludge with different particle sizes in R1 and R2 changes at different stages

表3 不同阶段R1和R2的EPS质量浓度、PN/PS  
Table 3 EPS concentration, PN/PS of R1 and R2 at different stages

阶段	EPS/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )		PN/PS	
	R1	R2	R1	R2
阶段Ⅰ	79.78	80.97	2.62	2.77
阶段Ⅱ	129.12	104.05	2.14	2.02
阶段Ⅲ	163.99	146.39	2.26	2.09
阶段Ⅳ	184.74	179.68	2.64	2.34

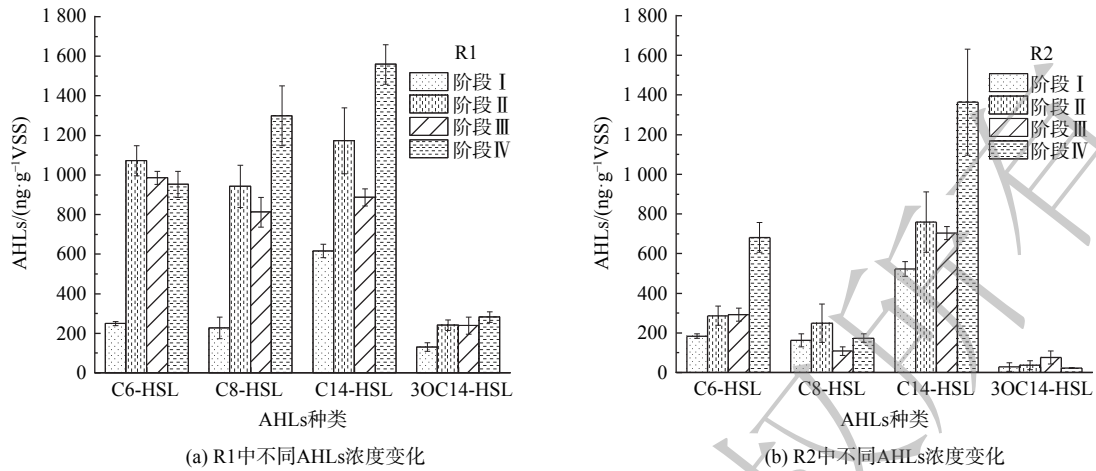


图 5 不同阶段 R1 与 R2 泥相中不同 AHLs 的质量分数变化

Fig. 5 Concentration changes of different AHLs in R1(a) and R2(b) sludge phases in different stages

681.80 ng·g<sup>-1</sup>, 其增加归因于内源 C6-HSL 合成并扩散到细胞外; R2 中的 C8-HSL 质量分数始终保持在较低水平。AHLs 从不同的方面影响 anammox 反应, 如 C6-HSL 和 C8-HSL 会影响 anammox 反应的电子传输载体并促进 EPS 的分泌<sup>[23]</sup>。

C14-HSL 和 3-oxo-C14-HSL 在 R1 和 R2 中均呈升高趋势, 且 R1 中的质量分数高于 R2, 这说明外源投加的 C6-HSL 和 C8-HSL 可诱导其他信号分子在颗粒中持续内源性释放。

### 2.5 16S rRNA 基因与功能基因分析

在不同的阶段末期取适量污泥提取 DNA 为待测样品进行 qPCR 反应, 由标准曲线得各样品的 16S rRNA、*hzo*、*hzsB*、*ccsB*、*nirS* 基因拷贝数, 如图 6 所示。16S rRNA 基因的拷贝数均在 10<sup>6</sup> copies·g<sup>-1</sup> 数量级内, 且 R1 中的基因拷贝数均高于 R2。这表明 R1 中有更高的菌群丰度, 更有利于脱氮性能的提高。投加信号分子后 R1 中 *hzo*、*nirS* 的基因拷贝数显著增加 ( $p < 0.05$ ), *hzsB* 的基因拷贝数变化趋势不明显; R2 中 *hzo*、*hzsB*、*nirS* 的基因拷贝数逐渐增加, 但明显低于 R1。R1 和

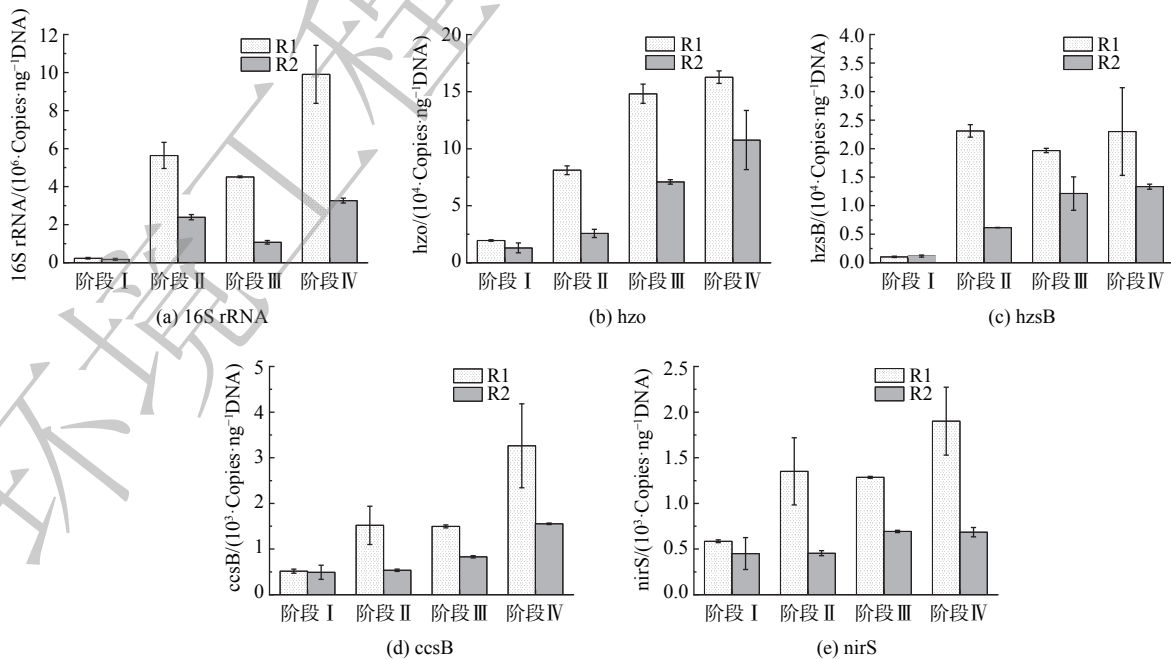


图 6 不同阶段 R1 与 R2 泥相的基因拷贝数变化

Fig. 6 Variations of copy number of genes in sludge phase of R1 and R2 at different stages

R2 中的 *ccsB* 基因拷贝数均随着进水浓度的增加呈现逐渐增加的趋势，且 R1 高于 R2。这说明联合投加 C6-HSL 和 C8-HSL 可促进 anammox 功能基因相对丰度的增加。

## 2.6 微生物群落分析

1) 门水平微生物物种。在不同阶段末取适量污泥提取 DNA 为待测样品进行高通量测序，结果如图 7 所示。在门水平上，浮霉菌门 (*Planctomycetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 是主要的菌群。Anammox 菌属于浮霉菌门，R1 和 R2 中浮霉菌门相对丰度均呈上升趋势，阶段 I 至阶段 III 的变化不明显，阶段 IV，R1 和 R2 中的浮霉菌门分别为 36.01% 和 19.11%，较阶段 I 分别增加了 17.30% 和 5.28%，但 R1 中的浮霉菌门相对丰度高于 R2。这说明逐步提高进水基质浓度和外源联合投加 C6-HSL 和 C8-HSL 均有利于 Anammox 菌的富集和生长。其他门类的细菌在系统中呈现下降的趋势，变形菌门在 R1 和 R2 中分别从 36.25%、31.56% 降至 26.50%、28.76%；拟杆菌门在 R1 和 R2 中分别从 11.75%、10.58% 降至 6.66%、5.61%。这可能是由于外源投加的信号分子促进作用，以及利于 anammox 菌生长的环境条件使得 anammox 菌具有更好的竞争优势。

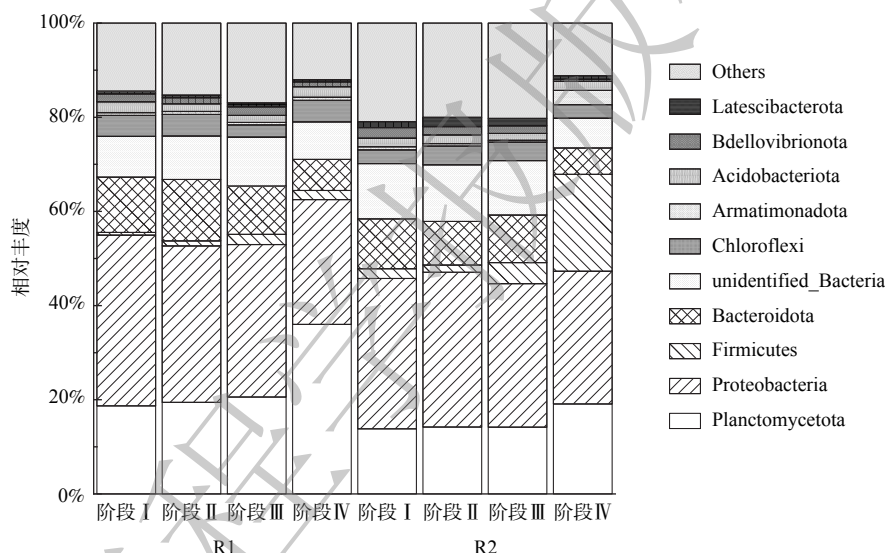


图 7 不同阶段 R1 与 R2 中门水平的微生物群落变化

Fig. 7 Variations of microbial communities at gate level in R1 and R2 at different stages

2) 属水平微生物物种。Anammox 菌属主要以 *Candidatus Brocadia* 为主，如图 8 所示，*Candidatus Brocadia* 在 R1 中的相对丰度先降低后增加，在阶段 I 至阶段 IV 的相对丰度分别为 14.80%、9.75%、10.11% 和 30.30%。阶段 II 至阶段 IV，随着进水 TN 的增加，R1 和 R2 中 *Candidatus Brocadia* 的丰度逐渐增加，该菌属逐渐富集。VAN DER STAR<sup>[28]</sup> 发现高浓度含氮废水更适合 *Candidatus Brocadia* 生存，这与本研究的结果一致。*Candidatus Jettenia* 是 anammox 菌属，在 R1 和 R2 中的相对丰度先增加后降低，这可能是因为在阶段 II、III 中 C6-HSL 和 C8-HSL 质量分数增加有利于 *Candidatus Jettenia* 的富集；阶段 IV，*Candidatus Brocadia* 的丰度高，占据生长优势，而 *Candidatus Jettenia* 的竞争能力较弱，故丰度有所下降。

R1 和 R2 中具有反硝化作用的菌群为反硝化菌 (*Denitratisoma*)、陶厄氏菌属 (*Thauera*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)，总丰度分别从 25.86%、11.90% 降至 12.19%、9.08%。R1 和 R2 中具有硝化作用的菌群为亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)，总丰度分别从 2.42%、2.28% 降至 1.56%、1.27%。这说明体系的主反应向着 anammox 方向进行。



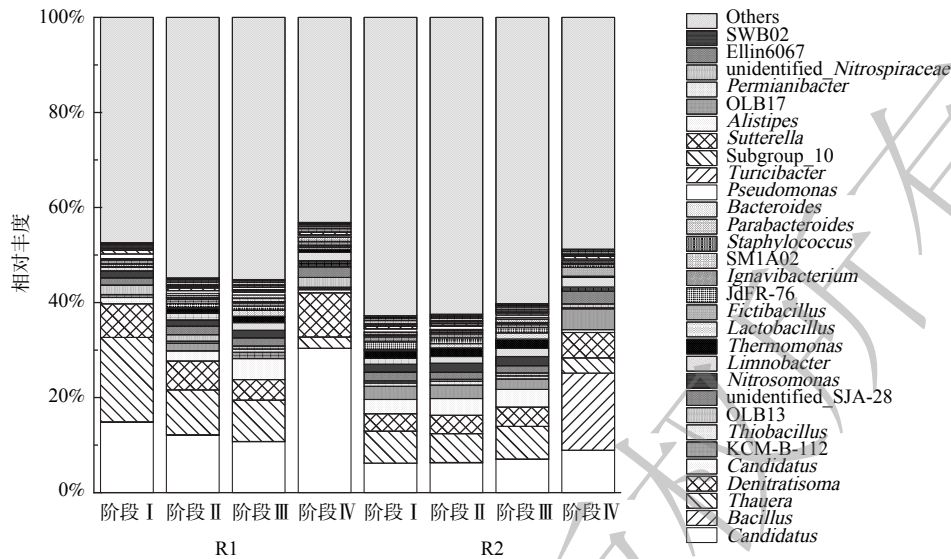


图8 不同阶段R1与R2中属水平的微生物群落变化

Fig. 8 Variations of microbial communities in R1 and R2 at the genus level at different stages

### 3 结论

C6-HSL 和 C8-HSL 的联合投加提高了氮的去除率。联合投加 C6-HSL 和 C8-HSL 促进污泥分泌 EPS, 诱导其他信号分子的内源释放, 进一步促进污泥之间形成聚集体及颗粒化过程, 增大了颗粒污泥占比, 加快了 anammox 污泥的颗粒化进程。R1 中 16S rRNA、*hzo*、*hzsB*、*ccsB*、*nirS* 基因拷贝数均增加且 *Candidatus Brocadia* 菌属的丰度明显高于 R2。投加 C6-HSL 和 C8-HSL 有利于功能基因相对丰度的提高及 anammox 菌属的生长和富集。

### 参考文献

- [1] MADEIRA C L, ARAÚJO J C D. Inhibition of anammox activity by municipal and industrial wastewater pollutants: A review[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 799(10): 149449.
- [2] CAO Y S, VAN LOOSDRECHT M C M, DAIGGER G T. Mainstream partial nitrification-anammox in municipal wastewater treatment: Status, bottlenecks, and further studies[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(4): 1365-1383.
- [3] FENG Z L, GU M Q, SUN Y P, et al. Potential microbial functions and quorum sensing systems in partial nitrification and anammox processes[J]. *Water Environment Research*, 2021, 93(9): 1562-1575.
- [4] PAPPENFORTH K, BASSLER B L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 576-588.
- [5] HU H, HE J, LIU J, et al. Role of N-acyl-homoserine lactone (AHL) based quorum sensing on biofilm formation on packing media in wastewater treatment process[J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(14): 11128-11139.
- [6] LIU L J, JI M, WANG F, et al. N-acyl-l-homoserine lactones release and microbial community changes in response to operation temperature in an anammox biofilm reactor[J]. *Chemosphere*, 2020, 262: 127602.
- [7] 刘长远, 韩蕊, 衣隆强等. 群体感应信号分子AHLs强化厌氧氨氧化过程综述[J/OL]. 环境工程: 1-11[2023-04-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2097.X.20221219.1615.002.html>.
- [8] ZHANG J, LI J, ZHAO B H, et al. Long-term effects of N-acyl-homoserine lactone-based quorum sensing on the characteristics of ANAMMOX granules in high-loaded reactors[J]. *Chemosphere*, 2019, 218: 632-642.
- [9] HAN H, LI J, ZHANG J, et al. Enhancing the treatment performance of partial denitrification/Anammox process at high nitrogen load: Effects of immobilized strain HFQ8<sub>CN</sub> on the sludge characteristics[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125870.
- [10] 张向晖, 彭永臻, 贾方旭, 等. 外源自诱导物对厌氧氨氧化的影响[J]. *中国环境科学*, 2018, 38(5): 1727-1733.
- [11] 王彩允. 低氨氮浓度厌氧氨氧化工艺强化及颗粒污泥菌群特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- [12] LIU L J, XU S H, WANG F, et al. Effect of exogenous N-acyl-homoserine lactones on the anammox process at 15 °C: Nitrogen removal performance, gene expression and metagenomics analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2021, b,341: 125760.
- [13] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [14] 操沈彬. 基于短程反硝化的厌氧氨氧化脱氮工艺与菌群特性[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- [15] HUMBERT S, ZOPFI J, TARNAWSKI S E. Abundance of anammox bacteria in different wetland soils[J]. *Environment Microbiology Reports*, 2012, 4(5): 484-490.

- [16] SCHMID M C, HOOPER A B, KLOTZ M G, et al. Environmental detection of octahaem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium - oxidizing bacteria[J]. *Environment Microbiology*, 2008, 10(11): 3140-3149.
- [17] THROBACK I, ENWALL K A, HALLIN S. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 49(3): 401-417.
- [18] ZHOU Z, CHEN J, MENG H, et al. New PCR primers targeting hydrazine synthase and cytochrome c biogenesis proteins in anammox bacteria[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2017, 101(3): 1-21.
- [19] 李海玲, 李冬, 张杰, 等. 调控温度和沉降时间实现 ANAMMOX 颗粒快速启动及其稳定运行[J]. *环境科学*, 2019, 40(2): 837-844.
- [20] KREUK M D, KISHIDA N, LOOSDRECHT M V. Aerobic granular sludge—state of the art[J]. *Water Science & Technology*, 2007, 55(8): 75-81.
- [21] 范骏洋, 张善林, 邹海晴, 等. 乳品废水厌氧反应器快速启动及颗粒污泥形成[J]. *工业水处理*, 2020, 40(11): 66-69.
- [22] ZHU G B, WANG Y S, 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.
- [23] TANG X, GUO Y Z, CHEN S S, et al. Metabolomics uncovers the regulatory pathway of acyl-homoserine lactones based quorum sensing in anammox consortia[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(4): 2206-2216.
- [24] HOU X L, LIU S T, ZHANG Z T. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge[J]. *Water Research*, 2015, 75: 51-62.
- [25] LIU Y Q, LIU Y, TAY J H. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(2): 143-148.
- [26] SHENG G P, YU H Q, LI X Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882-894.
- [27] WATERS C M, LU W Y, RABINOWITZ J D, et al. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic Di-GMT levels and repression of *vpsT*[J]. *Journal Of Bacteriology*, 2008, 190(7): 2527-2536.
- [28] VAN DER STAR W R L, MICLEA A I, VAN DONGEN U G J M, et al. The membrane bioreactor: A novel tool to grow anammox bacteria as free cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(2): 286-294.

(责任编辑: 靳炜)

## Effect of AHLs addition on start-up of anammox granular sludge-based UASB reactor

XUE Ying<sup>1</sup>, WANG Fen<sup>1,\*</sup>, YAN Zhao<sup>2</sup>

1. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Anyang Xinrunshan Environmental Protection Technology Co., Ltd., Anyang 455007, China

\*Corresponding author, E-mail: wangfen@tju.edu.cn

**Abstract** The start-up of an anaerobic ammonia oxidation (anammox) granular sludge reactor is an important challenge for its engineering application. In this study, the exogenous signal molecule N-acyl homoserine lactone (AHLs) was added to UASB reactor to explore its influence on the granulation process of anammox sludge and provide a basis for the start-up of anammox granular sludge process. It was found that the removal rates of  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ,  $\text{NO}_2^--\text{N}$  and TN in signal molecule group (R1) added with N-DL-hexanoyl homoserine lactone (C6-HSL) and N-DL-octanoyl homoserine lactone (C8-HSL) together were 87.09%, 89.13% and 76.83% respectively, and in methanol control group (R2) were 82.37%, 84.39% and 69.49%. The sludge with particle size > 0.45 mm in R1 accounted for 50.67%, and that in R2 accounted for 35.05%. The granulation degree of sludge in R1 was higher than that in R2. The extracellular polymeric substances (EPS) concentrations of R1 and R2 were 138.31  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}$  and 116.95  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{VSS}$ , respectively. The copy numbers of functional genes *hzo* and *hzsB* of anammox showed an increasing trend, and R1 was higher than R2. The relative abundance of anammox genus *Candidatus Brocadia* was 30.30% and 8.90% respectively. Therefore, the addition of C6-HSL and C8-HSL can promote the accumulation of anammox bacteria and accelerate the granulation process of anammox sludge by promoting the secretion of EPS and the endogenous release of other signal molecules.

**Keywords** anaerobic ammonia oxidation; granular sludge; signal molecule; C6-HSL; C8-HSL