

# 厌氧氨氧化启动过程 Anammox 菌富集规律和差异分析

陈重军<sup>1,2</sup>, 朱为静<sup>1</sup>, 黄孝肖<sup>1</sup>, 吴伟祥<sup>1,3</sup>

1 浙江大学环境与资源学院, 浙江 杭州 310058

2 苏州科技学院环境科学与工程学院, 江苏 苏州 215009

3 农业部面源污染控制重点开放实验室, 浙江 杭州 310058

陈重军, 朱为静, 黄孝肖, 等. 厌氧氨氧化启动过程 Anammox 菌富集规律和差异分析. 生物工程学报, 2014, 30(6): 891-900.

Chen CJ, Zhu WJ, Huang XX, et al. Enrichment regulation of anammox bacteria in the anammox start-up process. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 891-900.

**摘要:** 为明确厌氧氨氧化反应器启动过程中 Anammox 菌的富集规律, 采用荧光原位杂交 (FISH) 和实时荧光定量 PCR (q-PCR) 分析技术, 对未添加填料、添加多面空心球以及添加竹炭的 3 个 UASB 反应器厌氧氨氧化启动过程中 Anammox 菌的增长规律进行分析。研究表明, Anammox 菌的相对数量和绝对数量均随着启动时间呈逐渐递增趋势, 在稳定运行阶段的第 123 天, 无填料、多面空心球和竹炭反应器中 Anammox 菌分别占总细菌的 23.3%、32.6%和 43.7%, 单位 VSS 污泥中 Anammox 菌 16S rRNA 基因拷贝数分别为 $(25.64 \pm 2.76) \times 10^7$ 、 $(47.12 \pm 2.76) \times 10^7$ 和 $(577.99 \pm 27.25) \times 10^7$  拷贝数  $g^{-1}$  VSS。竹炭反应器中 Anammox 菌最大生长率和最短倍增时间分别为  $0.064 d^{-1}$  和 10.8 d, 最大生长率分别是无填料和多面空心球反应器的 1.78 倍和 1.88 倍。因此, 填料添加特别是竹炭的添加可极大地促进 Anammox 菌的选择性生长和繁殖。FISH 和 q-PCR 分析技术均适用于 Anammox 菌的富集规律研究, 但因其检测目标存在差异, 造成两者表征结果有所不同。

**关键词:** 填料, 厌氧氨氧化, 厌氧氨氧化菌, 荧光原位杂交, 实时荧光定量 PCR

**Received:** November 6, 2013; **Accepted:** December 16, 2013

**Supported by:** China National Critical Project for Science and Technology on Water Pollution Prevention and Control (No. 2014ZX07101-12), Natural Science Funds of Suzhou University of Science and Technology (No. XKQ201303), Science and Technology Project of Jiangsu Construction Department (No. 2013ZD35).

**Corresponding author:** Weixiang Wu. Tel/Fax: +86-571-88982020; E-mail: weixiang@zju.edu.cn

国家水体污染控制与治理科技重大专项 (No. 2014ZX07101-12), 苏州科技学院科研基金项目 (No. XKQ201303), 江苏省建设系统科技项目 (No. 2013ZD35) 资助。

# Enrichment regulation of anammox bacteria in the anammox start-up process

Chongjun Chen<sup>1,2</sup>, Weijing Zhu<sup>1</sup>, Xiaoxiao Huang<sup>1</sup>, and Weixiang Wu<sup>1,3</sup>

1 College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

2 School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, Jiangsu, China

3 Ministry of Agriculture Key Laboratory of Non-point Source Pollution Control, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

**Abstract:** To study the enrichment regulation of anammox bacteria during the whole start-up process of anammox reaction, two reactors with addition of carries of Spherical Plastic (SP) and Bamboo Charcoal (BC) and one without carrier (CK) were used to start anammox reaction. Then FISH and q-PCR analyses for the growth of all anammox bacteria were conducted during the operational process. The results indicate that the number of anammox bacteria in all reactors increased with time during the whole start-up process, which was consistent with the removal rate of ammonium and nitrite. On day 123 of stable phase, the percent of anammox cells in the sludge of CK, SP and BC accounted for 23.3%, 32.6% and 43.7%, respectively. The number of anammox bacteria 16S rRNA gene copies was  $(25.64 \pm 2.76) \times 10^7$ ,  $(47.12 \pm 2.76) \times 10^7$  and  $(577.99 \pm 27.25) \times 10^7$  copies  $g^{-1}$  VSS in the sludge of CK, SP and BC, respectively. Carrier addition could dramatically increase enrichment of anammox bacteria. BC addition significantly increased the anammox bacteria number in the UASB reactor which resulted in the acceleration of the anammox start-up process. In addition, the max specific growth rate and the minimum doubling time were  $0.064 d^{-1}$  and 10.8 d in BC reactor. The max specific growth rate of anammox bacteria in BC reactor was 1.78 times and 1.88 times greater than that in CK and SP reactor, respectively. Therefore, the FISH and q-PCR analyses were suitable for determining the enrichment regulation of anammox bacteria during the start-up time, while a bit of differences in results existed between the two analytical methods due to the difference in analysis targets.

**Keywords:** carrier, anaerobic ammonium oxidation, anammox bacteria, fluorescence in situ hybridization (FISH), quantitative PCR (q-PCR)

厌氧氨氧化 (Anaerobic ammonium oxidation, Anammox) 结合亚硝化反应, 相对于传统的硝化/反硝化过程, 可降低约 50% 的曝气量和 100% 的有机碳源, 在废水脱氮过程中应用优势明显<sup>[1-2]</sup>。但 Anammox 菌生长慢 (最大比生长率仅  $0.0027 h^{-1}$ )、倍增时间长 (10–12 d), 导致厌氧氨氧化反应器启动耗时长, 一般都超过 120 d, 世界上第一个现场规模的厌氧氨氧化反应器启动时间长达 3.5 年<sup>[3]</sup>, 该缺陷是限制厌氧氨氧化处理工艺大规模应用的最主要因素<sup>[4]</sup>。因此, 厌氧氨氧化启动过程的研究一直是学者研究的热点, 以求寻找适宜 Anammox 菌快速增

长的环境。近年来, 研究认为减少厌氧氨氧化反应器污泥流失或延长污泥停留时间是实现厌氧氨氧化快速启动的重要途径之一<sup>[5]</sup>, 而添加填料是有效减少 Anammox 菌流失的方法, 使 Anammox 菌附着于填料表面, 促进 Anammox 菌的富集, 所用填料包括无纺布<sup>[6-7]</sup>、聚乙二醇凝胶<sup>[8-9]</sup>、聚乙烯醇凝珠<sup>[10]</sup>、海绵<sup>[11-12]</sup>等。然而, 大部分研究仅专注于填料添加对污泥流失率的影响, 以及启动成功后微生物群落结构差异等<sup>[13]</sup>, 对反应器启动过程中 Anammox 菌的富集趋势和规律, 以及填料添加是否会对 Anammox 菌选择性生长繁殖方面还未有深入研究。

荧光原位杂交 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 是将结合了荧光分子的探针杂交于对应的靶染色体或染色质的位置, 从而检测特异性 DNA 序列的技术; 而实时荧光定量 PCR (Quantitation PCR, q-PCR) 分析技术, 在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析获取原始模板拷贝数的方法。采用特定的引物, FISH 和 q-PCR 技术可以明确 Anammox 菌的分布比例与绝对数量, 已经初步应用于 Anammox 菌的分析和检测<sup>[14]</sup>, 而在启动过程 Anammox 菌的富集趋势方面的研究还较少。本文拟采用 FISH 和 q-PCR 分析, 定性并定量研究 UASB 反应器启动厌氧氨氧化过程中 Anammox 菌的富集规律和变化趋势, 以期为 Anammox 的快速启动提供理论和技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 反应装置

启动装置采用 UASB 反应器, 有机玻璃制成, 反应器上部直径 20 cm, 下部直径 10 cm, 高度 1 m, 高径比 10 : 1, 有效容积 10.8 L, 反应器上部设置三相分离器用于气液固的高效分离, 气孔用水封以保证反应器内部严格缺氧, 进水采用蠕动泵控制。反应器外部设置厚度为 1 cm 的保温层, 内加循环水, 维持反应温度为  $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , 反应器用黑色塑料纸包扎避光。

### 1.2 启动运行

采用 3 个相同的 UASB 反应器启动厌氧氨氧化, 反应器均接种某城市污水处理厂二沉池和某啤酒厂厌氧消化池混合污泥 (体积比 1 : 1), 污泥添加量 64.8%, 其中 1 号反应器未添加填料

(无填料反应器, CK); 2 号反应器添加多面空心球填料 (直径 25 mm, 比表面积  $460 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$ , 多面空心球反应器, SP); 3 号反应器添加低温竹炭 (直径 3–5 mm, 比表面积  $2.5 \times 10^8 \text{ m}^2\text{m}^{-3}$ , 竹炭反应器, BC) 两种填料有效容积均为 400 mL, 占反应器有效容积的 3.7%。进水氨氮和亚硝态氮浓度均为 40 mg/L, 采用连续流方式, 水力停留时间为 48 h。

在整个启动过程中, 第 0、44、70、106 和 123 天取各反应器中污泥或生物膜样品, 无填料反应器污泥经过多点采样混合作为该时段样品, 多面空心球和竹炭反应器分别采取各自填料表面的生物膜, 混匀后作为该时段样品, 其中第 0 天为接种污泥。样品及时放置于  $-70 ^\circ\text{C}$  保存。

### 1.3 FISH 分析方法

采用 Amx368 (5'-CCT TTC GGG CAT TGC GAA-3'-CY3) 探针 (由宝生物工程 (大连) 有限公司合成), 分析 Anammox 菌的分布特征<sup>[15]</sup>。CY3 荧光染料受激发后发出肉眼可见的红光, 因此 FISH 图像红色代表所有 Anammox 菌; 而全细菌的检测采用 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色, DAPI 是一种可以穿透细胞膜的荧光染料, 呈蓝色, 双重染色后可在显微镜的同一视野下观察全细菌的丰度, 因此 FISH 图像蓝色代表总细菌。通过 FISH 图像不同颜色之间的差异, 采用 Matlab 软件统计分析 Anammox 菌占总细菌的比例, 以阐明 Anammox 菌在启动过程中的富集规律<sup>[16]</sup>。

### 1.4 q-PCR 分析

q-PCR 分析采用 Amx694F (5'-GGGGAGA GTGGA ACTTCGG-3') 和 Amx960R (5'-GCTCC ACCGCTTGTGCGAGC-3') 引物对<sup>[14]</sup>, 分别对

污泥 (或生物膜) 样品的 Anammox 菌基因拷贝数进行分析。利用 SYBR-Green 法进行荧光定量扩增, 仪器为 iQ<sup>TM</sup>5 多重实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, USA), 所用试剂为 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex-Taq<sup>TM</sup> Kit (TaKaRa), 质粒的提取采用常规质粒抽提试剂盒 Plasmid Mini Kit (OMEGA)。样品反应体系与标准曲线 PCR 体系相同, 根据抽提质粒计算目的基因拷贝数, 10 倍系列稀释 ( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$ ) 用作模板, 制作标准曲线, 根据标准曲线计算出未知样品基因的表达量。

q-PCR 具体反应控制过程如下: 95.0 °C 预变性 1 min; 95.0 °C 变性 10 s, 59.3 °C 退火 15 s (收集荧光信号), 72 °C 延伸 15 s, 39 个循环; 在 72–95 °C 之间制备熔解曲线确定基因特异性, 每升高 0.5 °C 保持 5 s。

### 1.5 Anammox 菌倍增时间和生长率

对 Anammox 菌倍增时间和生长率的评估, 是明晰 Anammox 菌在不同填料反应器中生长状况和趋势的主要指标。Anammox 菌倍增时间和生长率计算主要依据式 (1) 和式 (2)<sup>[17]</sup>:

$$t_d = \frac{\ln(2)(t-t_0)}{\ln \frac{C}{C_0}} \quad (1)$$

$$\ln C = \ln C_0 + \mu(t-t_0) \quad (2)$$

其中,  $t-t_0$ : 时间段;  $C$ : Anammox 菌浓度, 拷贝数  $\text{mL}^{-1}$ ;  $C_0$ : Anammox 菌初始浓度, 拷贝数  $\text{mL}^{-1}$ ;  $\mu$ : 生长率 ( $\text{d}^{-1}$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 水质分析

经过 4 个多月的运行, 3 个反应器均能成功启动厌氧氨氧化反应, 稳定运行阶段对氨氮和亚硝态氮的去除率在 98% 以上, 无填料、多面

空心球和竹炭反应器启动时间分别为 117 d、97 d 和 85 d, 启动过程可明显分为 4 个阶段<sup>[18]</sup>, 即: 1) Anammox 菌活性迟滞阶段: 出水氨氮浓度高于进水, 亚硝态氮没有降低趋势, 该阶段 Anammox 菌基本未表现出活性, 且污泥中含有的氨氮得以释放, 造成出水氨氮高于进水, 3 个反应器分别耗时 18 d、21 d 和 30 d。2) Anammox 菌活性表现阶段: 出水氨氮低于进水并逐步降低, 亚硝态氮有所降低, 该阶段 Anammox 菌缓慢表现出一定的活性, 3 个反应器分别耗时 54 d、40 d 和 25 d。3) Anammox 菌活性提高阶段: 出水氨氮与亚硝态同步并快速下降, 该阶段 Anammox 菌表现出较强的活性, 且活性快速增强, 3 个反应器分别耗时 25 d、16 d 和 10 d。4) Anammox 菌活性稳定阶段: 氨氮和亚硝态氮同步去除, 且两者出水浓度均稳定且低于 1 mg/L, 该阶段 Anammox 菌活性较强, 对底物去除效能基本稳定, 稳定运行时间设定为 20 d<sup>[19]</sup>。

填料添加有助于促进厌氧氨氧化反应器的快速启动, 相对于无填料, 竹炭反应器缩短启动时间 32 d, 而多面空心球反应器缩短 20 d, 竹炭添加对厌氧氨氧化快速启动非常有效, 极大地缩短了启动时间。

### 2.2 表观现象分析

采用 UASB 反应器启动厌氧氨氧化反应, 启动过程中, 污泥颜色从暗黑色 (因厌氧消化污泥呈现深黑色) 变为淡黄色, 然后逐渐变为棕红色, 且红颜色逐渐加深, 因厌氧氨氧化污泥含有丰富的细胞色素 C 而呈现红色 (图 1)<sup>[20]</sup>。其中无填料反应器富集污泥主要在底部, 说明厌氧氨氧化污泥沉降性能较好; 多面空心球反应器主要附着于多面空心球填料表面, 形成的生物膜致密、均匀; 竹炭反应器污泥部分随竹炭



图 1 反应器启动过程污泥颜色变化情况 (从左到右依次是空白、多面空心球和竹炭反应器)  
Fig. 1 Changes in appearance UASB reactor during the whole start-up experiment (from left to right CK, SP and BC reactor, respectively).

悬浮于反应器上部,部分随竹炭沉于反应器底部。相比多面空心球反应器,竹炭表面的生物膜不太均匀,但竹炭填料表面附着生物膜量大,几乎覆盖了整个表面。膜生物量大亦可能是造成厌氧氨氧化快速启动的重要原因。

### 2.3 FISH 技术结果分析

对 3 个反应器启动过程污泥 (或生物膜) 样品进行 FISH 分析,获得的图像见图 2。从 FISH 图像可以看出,在反应器启动成功后,样品中含有大量的 Anammox 菌 (呈现红色),分布不规则,一般以团聚体形式存在<sup>[21]</sup>。利用 Matlab 软件对不同时间 FISH 图像进行分析,根据不同颜色的像素数量进行定量计算 Anammox 菌相对于总细菌的比例,结果见图 3。FISH 分析结果表明,无填料、多面空心球和竹炭反应器中,启动阶段 Anammox 菌的相对数量随着时间呈逐渐递增趋势,变化趋势与氨氮、亚硝态氮的去除规律基本相符。

3 个反应器启动过程中 Anammox 菌增长趋势相类似,但也有所差异。第 0-70 天左右,是

无填料反应器 Anammox 菌活性迟滞和表现阶段,Anammox 菌占总细菌的比例从 5.7%缓慢上升至 15.8%,而在 70 d 之后,Anammox 菌活性得到提高,进入活性提高阶段,但其占总细菌的比例只有较少上升,从 15.8%上升至 17.3%,可能是 Anammox 菌快速增长,但总细菌的基数较大,导致 Anammox 菌比例上升缓慢。进入稳定阶段后,Anammox 菌占总细菌比例由 17.3%迅速上升至 23.3%,该过程中 Anammox 菌逐渐成熟,其他细菌因为底物的特异性和限制性大量死亡,造成 Anammox 菌的相对比例快速增加。多面空心球反应器 Anammox 菌的集聚情况与无填料反应器有所差异,Anammox 菌聚集体较小,但分布较广。在整个富集过程中,多面空心球反应器生物膜中 Anammox 菌占总细菌的比例缓慢上升,从 5.7%升至 32.6%,在 Anammox 菌活性迟滞阶段上升速率较小,而在 Anammox 菌活性稳定阶段,相对比例上升速率较大,该变化趋势跟无填料反应器较为一致。

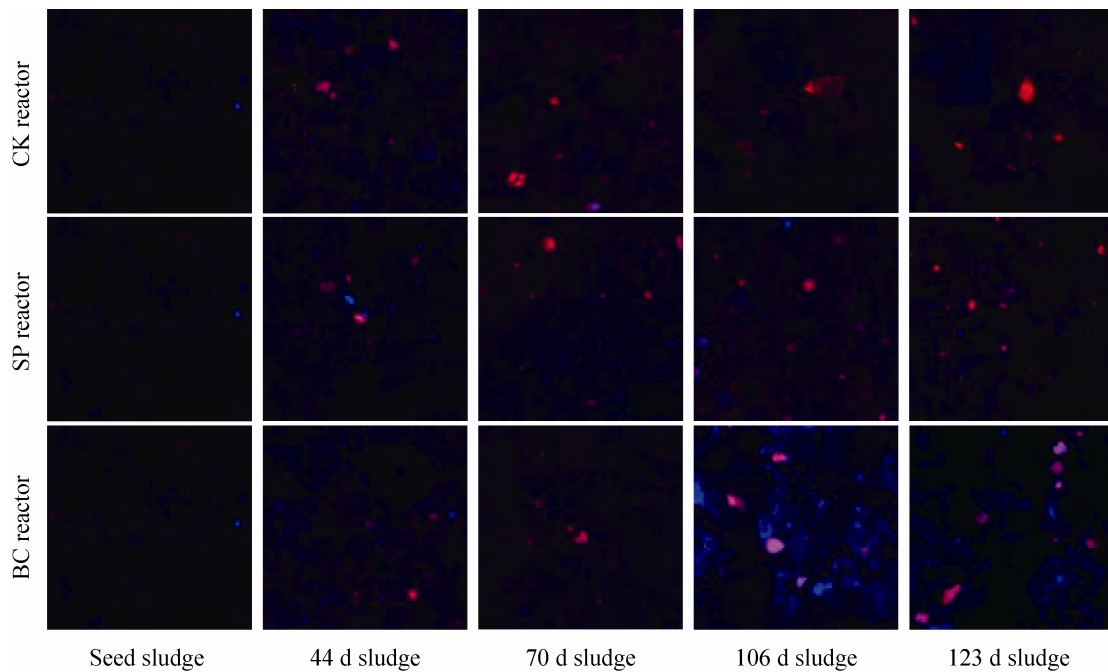


图 2 Anammox 菌在 UASB 反应器中的富集情况 (红色代表 Anammox 菌, 蓝色代表 DAPI)

Fig. 2 Enrichment of anammox bacteria during the entire start-up process in CK reactor by applying FISH technology (Red referred to anammox bacteria; Blue referred to DAPI).

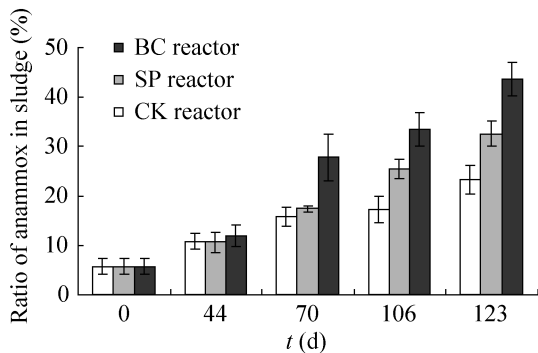


图 3 FISH 分析启动过程中 Anammox 菌占总细菌的比例

Fig. 3 FISH analysis of biomass from reactors seeded with anaerobic digester with Amx0368 probe.

竹炭反应器启动时间 85 d, 明显少于其他两个反应器。从 FISH 分析图像看, Anammox 菌的上升趋势与前两个反应器一致。竹炭反应器中 Anammox 菌占总细菌的比例明显高于其

他两个反应器, 在初始启动时相对比例为 5.7%, 在启动成功后第 123 天时, 相对比例达到 43.7%, 高于无填料反应器的 23.3% 和多面空心球反应器的 32.6%, 且富集趋势最为特殊。Anammox 菌活性迟滞阶段 相对比例缓慢上升, 与其他反应器一致, 但在 Anammox 菌活性表现阶段、提高阶段和稳定阶段, Anammox 菌快速上升, 上升速率高于其他两个反应器。在稳定培养阶段, Anammox 菌在 3 个反应器中的变化趋势相类似, 均有较快的上升。

总的来说, 本文中获取的富集产物 Anammox 菌所占比例较低。López 等富集培养 Anammox 菌, 经过 1 年多的富集和运行后, Anammox 菌所占比例达到  $(85.0 \pm 1.8)\%$ , 可能是高负荷长期运行造成富集效果较高<sup>[22]</sup>。Wang

等采用 MBR 和 SBR 反应器启动厌氧氨氧化, 启动 65 d 和 101 d 后, Anammox 菌分别占 61.4% 和 76.9%, 认为底物浓度差异是造成两个反应器差异的主要原因<sup>[23]</sup>。而朱月琪等采用较低氮负荷, 进水氨氮约 15 mg/L, 亚硝态氮 15–20 mg/L, 在 ABR 反应器内启动厌氧氨氧化, 经过 4 个月的驯化, 四格室的 Anammox 菌占总生物量的百分比分别为 7.6%、6.0%、18.1% 和 26.4%, 均处在较低水平, 说明 Anammox 菌的富集比率与氮素负荷密切相关<sup>[24]</sup>。

## 2.4 q-PCR 技术结果分析

由表 1 可知, 无填料、多面空心球和竹炭反应器污泥 (或生物膜) Anammox 菌的 16S rRNA 基因拷贝数增长趋势跟 FISH 技术分析结果基本一致。在厌氧氨氧化富集启动过程中, 单位 VSS 污泥 (或生物膜) 中 Anammox 菌 16S rRNA 基因拷贝数随着富集时间的增加而逐步递增。在第 123 天启动成功的污泥中, 无填料、多面空心球和竹炭反应器单位 VSS 污泥中 Anammox 菌 16S rRNA 基因拷贝数分别为  $(25.64 \pm 2.76) \times 10^7$ 、 $(47.12 \pm 2.76) \times 10^7$  和  $(577.99 \pm 27.25) \times 10^7 \text{ g}^{-1} \text{ VSS}$ , 竹炭反应器分别是无填料和多面空心球的 22.5 倍和 12.3 倍。从 Anammox 菌的基因拷贝数来看, 竹炭添加有利于反应器中 Anammox 菌的富

集, 可能是造成反应器快速启动的主要因素。

从 q-PCR 分析结果, 并通过计算式 (1) 和式 (2), 计算得到表 2 的结果。竹炭反应器平均生长率和平均倍增时间分别为  $0.048 \text{ d}^{-1}$  和 14.5 d, 而无填料反应器和多面空心球反应器分别为  $0.022 \text{ d}^{-1}$  和 30.9 d,  $0.027 \text{ d}^{-1}$  和 25.3 d。竹炭反应器 Anammox 菌的平均生长率是无填料和多面空心球反应器的 2.18 倍和 1.78 倍。而竹炭反应器 Anammox 菌最大生长率和最短倍增时间分别为  $0.064 \text{ d}^{-1}$  和 10.8 d, 而无填料反应器和多面空心球反应器分别为  $0.036 \text{ d}^{-1}$  和 19.5 d,  $0.034 \text{ d}^{-1}$  和 20.3 d。竹炭反应器 Anammox 菌的最大生长率是无填料和多面空心球反应器的 1.78 倍和 1.88 倍, 最短倍增时间仅为无填料和多面空心球反应器的 55% 和 53%。竹炭反应器内部 Anammox 菌较高的生长率造成倍增时间较短, 从而促进了 UASB 反应器厌氧氨氧化的快速启动。

竹炭添加促进 Anammox 菌的生长和繁殖, 反应器 Anammox 菌最大生长率为  $0.064 \text{ d}^{-1}$ , 比本文中无填料反应器 ( $0.036 \text{ d}^{-1}$ )、多面空心球反应器 ( $0.034 \text{ d}^{-1}$ ) 和 Hao 等报道的  $0.029 \text{ d}^{-1}$ <sup>[21,25]</sup> 都高, 跟 Strous 等采用 SBR 反应器富集 Anammox 菌所报道的  $0.065 \text{ d}^{-1}$ <sup>[26]</sup> 基本一致, 但低于 Isaka 采用生物滤池富集 Anammox 菌所报

表 1 三个反应器启动过程中厌氧氨氧化污泥 16S rRNA 基因拷贝数

Table 1 The number of 16S rRNA gene copies of anammox sludge in the three reactors

Anammox sludge	16S rRNA copies in anammox sludge ( $\text{g}^{-1} \text{ VSS}$ )		
	CK reactor	SP reactor	BC reactor
Seed sludge	$(1.63 \pm 0.23) \times 10^7$	$(1.63 \pm 0.23) \times 10^7$	$(1.63 \pm 0.23) \times 10^7$
44 d sludge	$(6.23 \pm 1.32) \times 10^7$	$(7.32 \pm 1.32) \times 10^7$	$(24.07 \pm 2.77) \times 10^7$
70 d sludge	$(7.65 \pm 2.05) \times 10^7$	$(7.79 \pm 2.05) \times 10^7$	$(26.41 \pm 0.86) \times 10^7$
106 d sludge	$(14.00 \pm 0.33) \times 10^7$	—	$(265.11 \pm 39.62) \times 10^7$
123 d sludge	$(25.64 \pm 2.76) \times 10^7$	$(47.12 \pm 2.76) \times 10^7$	$(577.99 \pm 27.25) \times 10^7$

表 2 三个反应器启动过程中 Anammox 菌的生长率和倍增时间

Table 2 Specific growth rate and doubling time of anammox bacteria during the entire process in the three reactors

Reactors	CK reactor	SP reactor	BC reactor
Average specific growth rate ( $d^{-1}$ )	0.022	0.027	0.048
Average doubling time (d)	30.9	25.3	14.5
Max specific growth rate ( $d^{-1}$ )	0.036	0.034	0.064
Min doubling time (d)	19.5	20.3	10.8

道的  $0.38 d^{-1}$ <sup>[27]</sup>和 Noophan 等在 SBR 厌氧氨氧化反应器中发现的  $0.15 d^{-1}$ <sup>[28]</sup>。而竹炭反应器 Anammox 菌最短倍增时间为 10.8 d, 与目前学术界普遍接受的 Anammox 菌倍增时间(11 d)基本一致<sup>[22]</sup>。

## 2.5 FISH 和 q-PCR 分析结果差异分析

从图 2 和表 1 结果可知, FISH 和 q-PCR 分析都能表征厌氧氨氧化反应器 Anammox 菌的增长趋势, 分析结果存在共同点, 无填料、多面空心球和竹炭反应器中 Anammox 菌的相对比例和绝对量的变化趋势基本一致, 随着富集时间的增加呈现缓慢增长趋势, 且两者结果均是竹炭反应器>多面空心球反应器>无填料反应器, 推测这也是造成竹炭反应器启动耗时短的主要原因。但从 q-PCR 结果来看, 竹炭反应器的富集程度远比 FISH 结果要高, 在稳定阶段, 竹炭反应器单位 VSS 污泥中 Anammox 菌 16S rRNA 基因拷贝数分别是无填料和多面空心球反应器的 5.63 倍和 10.34 倍, 而 FISH 结果 Anammox 菌占总细菌的比例, 竹炭反应器分别是无填料和多面空心球反应器的 1.88 倍和 1.34 倍。

但是, FISH 和 q-PCR 分析结果亦存在很大的不同, 这主要是分析技术本身检测目标的差异造成的。FISH 分析技术采用荧光染色方法确定目标菌, 而染色主要针对团聚体存在的目标

菌, 但大部分 Anammox 菌不以团聚体形式存在, 而是以单独个体独立存在, 这就导致 FISH 分析技术虽然能确定有效的 Anammox 菌并初步阐明 Anammox 菌占总细菌的比例, 但不能决定其绝对数量, 对 Anammox 菌的绝对数量特别是游离态的 Anammox 菌很难准确分析。因此, q-PCR 技术被引入该领域, 且被认为是能准确考究厌氧氨氧化启动过程中功能型微生物变化趋势的有效手段<sup>[3]</sup>。q-PCR 分析技术是在 PCR 快速扩增过程中, 通过捕捉信号即时测定特异性产物的量, 并据此推断目的基因的初始量, 因此该技术能准确捕捉扩增放大后的 Anammox 菌信号, 覆盖所有能够响应的 Anammox 菌, 涵盖以团聚体及游离态存在的 Anammox 菌, 比 FISH 分析技术更加灵敏和准确<sup>[29]</sup>。填料的添加在一定程度上改变反应器内 Anammox 菌的形态和聚集方式, 这也是造成启动过程中 FISH 分析和 q-PCR 分析结果存在差异的主要成因。

因此, FISH 和 q-PCR 分析都能表征厌氧氨氧化反应器 Anammox 菌的增长趋势, 但在表征准确度上 FISH 低于 q-PCR 分析, 但目前针对 Anammox 菌的探针、引物等的设计还有待进一步发展和完善, 相信随着人们对 Anammox 菌生理特性的日趋明晰, 对厌氧氨氧化启动过程中 Anammox 菌富集规律的探寻也会更加成熟。



### 3 结论

荧光原位杂交 (FISH) 和实时荧光定量 PCR (q-PCR) 分析技术表明, Anammox 菌相对数量和绝对数量均随着启动时间呈逐渐递增趋势, 变化趋势与底物的去除规律基本相符。在稳定运行阶段的第 123 天, 无填料、多面空心球和竹炭反应器中 Anammox 菌分别占总细菌的 23.3%、32.6%和 43.7%, 单位 VSS 污泥中 Anammox 菌 16S rRNA 基因拷贝数分别为  $(25.64 \pm 2.76) \times 10^7$ 、 $(47.12 \pm 2.76) \times 10^7$  和  $(577.99 \pm 27.25) \times 10^7$  拷贝数  $g^{-1}$  VSS, Anammox 菌最大生长率为  $0.064 d^{-1}$ , 最短倍增时间为 10.8 d。填料添加特别是竹炭的添加可极大地促进 Anammox 菌的选择性生长和繁殖, 促成 Anammox 菌生长率高和倍增时间短, 加速厌氧氨氧化 UASB 反应器的快速启动。FISH 和 q-PCR 分析技术均适用于 Anammox 菌的富集规律的研究, 但因其检测目标存在差异, 造成两者表征结果有所不同, 在准确度上 FISH 低于 q-PCR 分析。

### REFERENCES

- [1] Volcke EIP, Van Hulle SWH, Donckels BMR, et al. Coupling the SHARON process with Anammox: model-based scenario analysis with focus on operating costs. *Water Sci Technol*, 2005, 52(4): 107–115.
- [2] Yu YC, Gao DW, Tao Y, et al. Start-up of anammox in a sequencing biofilm reactor (SBBR). *China Environ Sci*, 2012, 32(5): 843–849 (in Chinese).  
于英翠, 高大文, 陶彧, 等. 利用序批式生物膜反应器启动厌氧氨氧化研究. *中国环境科学*, 2012, 32(5): 843–849.
- [3] van der Star WRL, Abma WR, Blommers D, et al. Start-up of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res*, 2007, 41(18): 4149–4163.
- [4] Ding S, Zheng P, Tang CJ, et al. Characteristics of anaerobic sludges in Anammox-EGSB bioreactors started with different inocula. *Chin J Biotech*, 2011, 27(4): 629–636 (in Chinese).  
丁爽, 郑平, 唐崇俭, 等. 三种接种物启动 Anammox-EGSB 反应器的性能. *生物工程学报*, 2011, 27(4): 629–636.
- [5] Gaul T, Maerker S, Kunst S. Start-up of moving bed biofilm reactors for deammonification: the role of hydraulic retention time, alkalinity and oxygen supply. *Water Sci Technol*, 2005, 52(7): 127–133.
- [6] Fujii T, Sugino H, Rouse JD, et al. Characterization of the microbial community in an anaerobic ammonium-oxidizing biofilm cultured on a nonwoven biomass carrier. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94(5): 412–418.
- [7] Wang Y, Huang Y, Yuan Y, et al. Performance of anammox bio-film reactor utilizing non-woven fabric carriers. *Chin J Environ Eng*, 2009, 3(6): 1015–1018 (in Chinese).  
王勇, 黄勇, 袁怡, 等. 厌氧氨氧化无纺滤布生物膜反应器的运行. *环境工程学报*, 2009, 3(6): 1015–1018.
- [8] Isaka K, Date Y, Sumino T, et al. Ammonium removal performance of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76: 1457–1465.
- [9] Date Y, Isaka K, Sumino T, et al. Microbial community of anammox bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier. *Water Sci Technol*, 2008, 58(5): 1121–1128.
- [10] Rouse J, Fujii T, Sugino H, et al. PVA-gel beads as a biomass carrier for anaerobic oxidation of ammonium in a packed-bed reactor. *Proc Heleco*, 2005, 5: 1–9.
- [11] Lü J, Zhang L, Kenji F, et al. Sponge as carrier and applying it for anammox in an up-flow column reactor. *J Beijing Univ Technol*, 2009, 35(12): 1670–1674 (in Chinese).  
吕鑑, 张莉, Kenji Furukawa, 等. 海绵作填料在上流式厌氧固定床反应器中厌氧氨氧化. *北京工业大学学报*, 2009, 35(12): 1670–1674.

- [12] Zhang L, Yang JC, Ma YG, et al. Treatment capability of an up-flow anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier. *J Biosci Bioeng*, 2010, 110(1): 72–78.
- [13] Kuenen JG. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Review Microbiol*, 2008, 6: 320–326.
- [14] Ni BJ, Hu BL, Fang F, et al. Microbial and physicochemical characteristics of compact anaerobic ammonium-oxidizing granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(8): 2652–2656.
- [15] Dong ZQ, Sun TH. A potential new process for improving nitrogen removal in constructed wetlands-Promoting coexistence of partial-nitrification and ANAMMOX. *Ecol Eng*, 2007, 31(2): 69–78.
- [16] Lopez-Vazquez CM, Song YI, Hooijmans CM, et al. Short-term temperature effects on the anaerobic metabolism of glycogen accumulating organisms. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97(3): 483–495.
- [17] Park H, Rosenthal A, Jezek R, et al. Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial ecology of anaerobic ammonia oxidation (anammox) bioreactor communities. *Water Res*, 2010, 44(17): 5005–5013.
- [18] Chen CJ, Huang XX, Lei CX, et al. Improving anammox start-up with bamboo charcoal. *Chemosphere*, 2012, 89(10): 1224–1229.
- [19] Zhang SH, Zheng P. Studies on start-up technique of anammox bioreactor. *China Environ Sci*, 2004, 24(4): 496–500 (in Chinese).  
张少辉, 郑平. 厌氧氨氧化反应器启动方法的研究. *中国环境科学*, 2004, 24(4): 496–500.
- [20] Molinuevo B, Garcia MC, Karakashev D, et al. Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: effect of organic matter content on process performance. *Biores Technol*, 2009, 100: 2171–2175.
- [21] Qing YJ, Zhou SQ. Research progress on anaerobic ammonium-oxidation bacteria. *Chin J Ecol*, 2007, 26(11): 1867–1872 (in Chinese).  
秦玉洁, 周少奇. 厌氧氨氧化菌的研究进展. *生态学杂志*, 2007, 26(11): 1867–1872.
- [22] López H, Puig S, Ganigue R, et al. Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, 83(3): 233–241.
- [23] Wang T, Zhang H, Gao D, et al. Comparison between MBR and SBR on Anammox start-up process from the conventional activated sludge. *Bioresour Technol*, 2012, 122: 78–82.
- [24] Zhu YQ, Zhang LJ, Zeng GQ, et al. Study on anammox of low concentration of ammonia nitrogen wastewater in ABR. *Chin J Environ Eng*, 2010, 6(4): 1224–1230 (in Chinese).  
朱月琪, 张丽娟, 曾国驱, 等. 低浓度氨氮废水在 ABR 中的厌氧氨氧化研究. *环境工程学报*, 2010, 6(4): 1224–1230.
- [25] Hao XD, Heijnen JJ, van Loosdrecht MCM. Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 77(3): 266–277.
- [26] Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50: 589–596.
- [27] Isaka K, Date Y, Sumino T, et al. Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(1): 47–52.
- [28] Noophan P, Sripiboon S, Damrongsri M, et al. Anaerobic ammonium oxidation by *Nitrosomonas* spp. and anammox bacteria in a sequencing batch reactor. *J Environ Manag*, 2009, 90(2): 967–972.
- [29] Ni SQ, Gao BY, Wang CC, et al. Fast start-up, performance and microbial community in a pilot-scale anammox reactor seeded with exotic mature granules. *Bioresour Technol*, 2011, 102(3): 2448–2454.

(本文责编 郝丽芳)