

厌氧氨氧化颗粒污泥聚集机制研究进展

王伟刚, 王彤, 樊宇菲, 王亚宜*

同济大学环境科学与工程学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092

王伟刚, 王彤, 樊宇菲, 王亚宜. 厌氧氨氧化颗粒污泥聚集机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1927-1940

Wang Weigang, Wang Tong, Fan Yufei, Wang Yayi. Research progress on the aggregation mechanism of anammox granular sludge[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1927-1940

摘要: 厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, anammox)工艺被认为是当前污水生物脱氮领域最经济的处理工艺, 有利于实现污水处理厂的能源自给。厌氧氨氧化菌是该工艺的核心功能微生物。以厌氧氨氧化菌为主导微生物形成的厌氧氨氧化颗粒污泥具有沉速大、污泥持留能力强及对不利环境抵抗能力强等突出优势, 是实现厌氧氨氧化工艺最有前景的污泥形态。本论文围绕厌氧氨氧化颗粒, 介绍了厌氧氨氧化菌的特性、种类及代谢途径, 综述了厌氧氨氧化颗粒污泥的形成假说及与厌氧氨氧化颗粒污泥聚集密切相关的胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)和群体感应研究现状, 并对今后厌氧氨氧化颗粒的研究进行了展望, 以期为后续厌氧氨氧化颗粒的研究及厌氧氨氧化颗粒工艺的优化提供参考。

关键词: 厌氧氨氧化; 颗粒污泥; 生物脱氮; 胞外聚合物; 污水处理

Research progress on the aggregation mechanism of anammox granular sludge

WANG Weigang, WANG Tong, FAN Yufei, WANG Yayi*

State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China

Abstract: Anaerobic ammonium oxidation (anammox) process is the most economical bioprocess for nitrogen removal from wastewater at present, which is conducive to the energy neutral of wastewater treatment plants. Anammox bacteria play a major role in this process. Anammox granular sludge, formed with anammox bacteria, is the most promising sludge form for anammox process, owing to the

基金项目: 国家自然科学基金(51978485, 52100058); 中国博士后科学基金(2021TQ0246, 2021M692422)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (51978485, 52100058); China Postdoctoral Science Foundation (2021TQ0246, 2021M692422)

*Corresponding author: E-mail: yayi.wang@tongji.edu.cn

Received: 2021-09-27; Accepted: 2021-12-08; Published online: 2022-01-20

high settling rate, strong retention capacity, and strong resistance to environmental stresses. Focusing on anammox granules, this paper introduced the characteristics, species, and metabolic pathways of anammox bacteria, and the formation mechanism of anammox granular sludge, and reviewed the extracellular polymeric substance (EPS) and quorum sensing, which are closely related to the aggregation of anammox granular sludge. Moreover, we summarized the future research directions of anammox granules. This review is expected to serve as a reference for the subsequent research on anammox granules and the regulation of anammox process.

Keywords: anaerobic ammonium oxidation; granular sludge; biological nitrogen removal; extracellular polymeric substance; wastewater treatment

厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, anammox)是指在缺氧条件下,以亚硝酸盐(NO_2^-)为电子受体氧化氨氮(NH_4^+)生成氮气的微生物反应过程,其功能菌为化能自养型厌氧氨氧化菌^[1-2]。厌氧氨氧化工艺与传统硝化反硝化脱氮工艺相比反应途径短,具有节约碳源、节省供氧能耗、降低剩余污泥产量和减少温室气体排放等显著低碳特性,是污水处理领域的颠覆性技术,已成为国内外污水生物脱氮领域的研究热点^[3-4]。全球首座实际应用的厌氧氨氧化工艺于2002年在荷兰鹿特丹Dokhaven污水处理厂建成^[5],至今全球已有超过200座厌氧氨氧化工艺的实际工程^[3-6]。

然而,厌氧氨氧化菌倍增时间长、难富集(约2-12 d)^[5,7-9],有效滞留厌氧氨氧化菌是维持反应器稳定运行的关键,而形成厌氧氨氧化颗粒则是攻克该难题的有效途径之一。厌氧氨氧化颗粒除污泥滞留能力强以外,与絮体污泥相比还具有生物密度高、总氮去除负荷高和对不利环境(如重金属、水质波动等)抵抗能力强等突出优势^[10-11],已成为厌氧氨氧化技术应用最具前景的污泥形态。

由于厌氧氨氧化颗粒污泥的显著优势,研究学者对其形成假说及与颗粒污泥形成密切相关的胞外聚合物(extracellular polymeric substance, EPS)特性和群体感应现象等进行了

大量的研究,但目前人们对于厌氧氨氧化颗粒污泥仍缺乏系统的认识。因此本文从厌氧氨氧化颗粒的角度出发,介绍了厌氧氨氧化菌的特性、种类和代谢途径,综述厌氧氨氧化颗粒聚集机制研究的热点问题,以期为厌氧氨氧化颗粒的深入研究和推广应用提供理论依据和技术支持。

1 厌氧氨氧化菌

1.1 特性及种类

厌氧氨氧化菌为不规则球状的革兰氏阴性菌,平均直径介于0.8 μm -1.1 μm 之间,生长速率缓慢,是严格厌氧的化能无机型自养菌。在电子显微镜下观察,厌氧氨氧化菌形态不规则,呈球形或卵形等,细胞外无荚膜,细胞壁表面有火山口状结构,少数有菌毛。由于胞内富含细胞色素C,厌氧氨氧化菌总体呈红色。厌氧氨氧化菌体细胞被分隔为3部分:厌氧氨氧化体、核糖细胞质及外室细胞质;其中,厌氧氨氧化体是厌氧氨氧化菌特有的结构,占细胞体积的50%以上,是厌氧氨氧化反应发生的主要场所^[12-14]。

厌氧氨氧化菌隶属于浮霉菌门^[1]。截至目前,利用现代先进的分子生物学手段,如DNA和RNA提取、荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)等检测报道有7属

23 种厌氧氨氧化菌^[10,15], 分别为以厌氧氨氧化发现地命名的 *Candidatus Brocadia*^[16]、以荷兰代尔夫特理工大学 Kuenen 教授命名的 *Ca. Kuenenia*^[17]、以荷兰奈梅亨大学 Jetten 教授命名的 *Ca. Jettenia*^[18-19]及 *Ca. Scalindua*^[20]、*Ca. Anammoxoglobus*^[21]、*Ca. Anammoximicrobium*^[22]和 *Ca. Brasilis*^[23] (表 1)。除 *Ca. Scalindua* 主要存在于高盐度海洋底泥和低氧区外, 其他 6 个属多存在于污水处理构筑物或实验室反应器等淡水环境中。不同种的厌氧氨氧化菌在生态位上存在着差异, 这些因素影响厌氧氨氧化菌在

生态系统中的地理分布和地球化学意义。

1.2 代谢途径

尽管不同厌氧氨氧化菌属间具有较大的系统发育距离^[40], 但它们具有相似的细胞结构与代谢途径。在厌氧氨氧化菌的代谢活动中, 4 个关键的生物酶发挥着重要的作用, 分别是亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, Nir)、联氨合成酶(hydrazine synthetase, HZS)、联氨脱氢酶(hydrazine dehydrogenase, HDH)和亚硝酸盐氧化还原酶(nitrite oxidoreductase, Nxr)^[41]。如图 1 所示, 厌氧氨氧化菌的 3 步反应为: (1) NO_2^-

表 1 目前已知的厌氧氨氧化菌

Table 1 Currently reported anammox bacterial species

属 Genus	种 Species	来源 Sources	参考文献 References
<i>Ca. Brocadia</i>	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	污水处理厂 Wastewater treatment plant	[1]
	<i>Ca. Brocadia fulgida</i>	污水处理厂 Wastewater treatment plant	[24]
	<i>Ca. Brocadia sinica</i>	脱氮反应器 Nitrogen removal reactor	[25]
	<i>Ca. Brocadia brasiliensis</i>	序批式反应器 Sequencing batch reactor	[26]
	<i>Ca. Brocadia caroliniensis</i>	上流式生物反应器 Up-flow bioreactor	[27]
	<i>Ca. Brocadia sapporoensis</i>	膜生物反应器 Membrane bioreactor	[28]
<i>Ca. Kuenenia</i>	<i>Ca. Kuenen stuttgartiensis</i>	滴滤池 Trickling filter	[29]
<i>Ca. Jettenia</i>	<i>Ca. Jettenia asiatica</i>	生物膜反应器 Biofilm reactor	[19]
	<i>Ca. Jettenia caeni</i>	生物膜反应器 Biofilm reactor	[30]
	<i>Ca. Jettenia moscovienalis</i>	实验室生物反应器 Laboratory bioreactor	[31]
<i>Ca. Scalindua</i>	<i>Ca. Scalindua brodae</i>	填埋场渗滤液处理厂 Landfill leachate treatment plant	[20]
	<i>Ca. Scalindua sorokinii</i>	海洋沉积物 Marine sediments	[32]
	<i>Ca. Scalindua wagneri</i>	填埋场渗滤液处理厂 Landfill leachate treatment plant	[20]
	<i>Ca. Scalindua profunda</i>	海洋沉积物 Marine sediments	[33]
	<i>Ca. Scalindua arabica</i>	海洋沉积物 Marine sediments	[34]
	<i>Ca. Scalindua sinooifed</i>	油藏 Oil reservoirs	[35]
	<i>Ca. Scalindua zhenghei</i>	海洋沉积物 Marine sediments	[36]
	<i>Ca. Scalindua richardsii</i>	海洋沉积物 Marine sediments	[37]
	<i>Ca. Scalindua marina</i>	海洋沉积物 Marine sediments	[38]
	<i>Ca. Anammoxoglobus</i>	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i>	序批式反应器 Sequencing batch reactor
<i>Ca. Anammoxoglobus sulfate</i>		生物转盘 Rotating biological contactor	[39]
<i>Ca. Anammoximicrobium</i>	<i>Ca. Anammoximicrobium moscowii</i>	河流沉积物 River sediment	[22]
<i>Ca. Brasilis</i>	<i>Ca. Brasilis concordiensis</i>	上流式生物反应器 Up-flow bioreactor	[23]

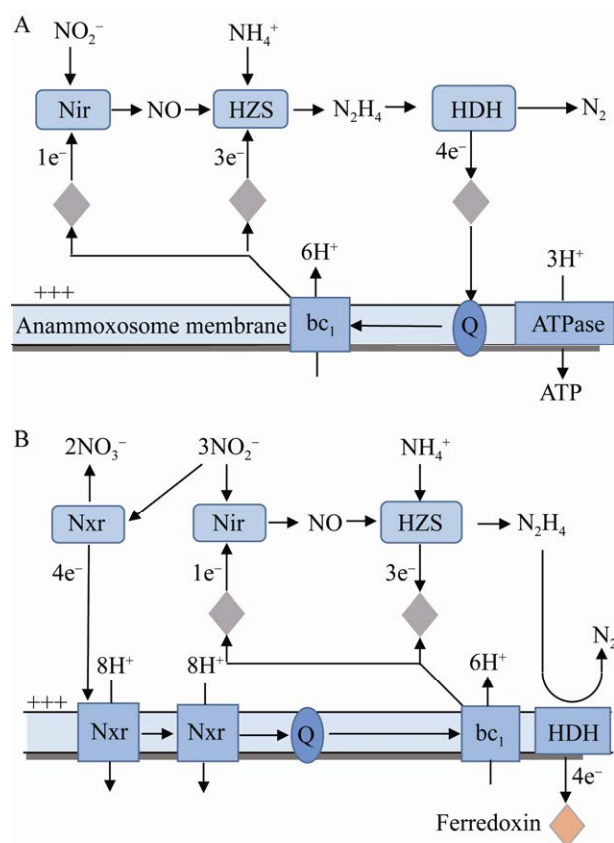


图 1 厌氧氨氧化菌氨氧化代谢途径 A: 以一氧化氮为中间产物的中心分解代谢、电子传递和能量守恒; B: 中心分解代谢与硝酸还原酶结合产生乙酰辅酶 A 途径的高电位电子

Figure 1 Ammonia oxidation metabolic pathway of anammox bacteria. A: Central catabolism with nitric oxide as intermediate, electron transport and energy conservation; B: Combination of central catabolism with nitrate reductase to generate high potential electrons for the acetyl-CoA pathway.

在亚硝酸盐还原酶的作用下还原为 NO, 此过程需要 1 个电子; (2) NO 和 NH_4^+ 在联氨合成酶的作用下生成 N_2H_4 , 此过程需要 3 个电子; (3) N_2H_4 在联氨脱氢酶的作用下分解生成 N_2 , 此过程释放出 4 个电子用于补充上述两步。最后, 一部分 NO_2^- 在亚硝酸盐氧化还原酶的作用下生成 NO_3^- , 所获得的能量用于合成代

谢。合成代谢以 NO_2^- 为电子供体、二氧化碳为碳源, 通过还原性乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 途径进行胞内物质的合成, 同时生成少量的 NO_3^- 。

2 厌氧氨氧化工艺应用现状及挑战

厌氧氨氧化工艺因其自养脱氮的特性, 具有巨大的节能降耗潜力。目前工程应用的厌氧氨氧化工艺主要用来处理污泥消化液^[42]、垃圾渗滤液^[43]、禽畜养殖场废水^[44]及味精废水^[45]等高氨氮废水。厌氧氨氧化颗粒因其沉速大、污泥持留能力强及总氮去除负荷高等突出优势, 是厌氧氨氧化工艺实际工程应用中优先考虑和最常见的污泥形态。然而, 目前对于厌氧氨氧化菌的理化特性及厌氧氨氧化颗粒污泥的形成机制认识尚不清晰, 颗粒内部多种功能菌间的相互作用规律仍有待揭示, 因此缺乏快速形成厌氧氨氧化颗粒及对颗粒形态进行调控的有效手段。同时, 高厌氧氨氧化菌丰度、高脱氮活性和高强度的高品质厌氧氨氧化颗粒污泥对于厌氧氨氧化工艺在实际高氨氮废水中的高效稳定运行至关重要, 但是目前仍缺乏简单地强化厌氧氨氧化颗粒污泥的方法。

3 厌氧氨氧化颗粒污泥聚集机制

颗粒污泥是由多种微生物相互聚集而形成的团体, 是一种特殊的微生物自固定化的结果, 在广义上也属于生物膜的一种。厌氧氨氧化颗粒具有多个优点: (1) 较高的沉速, 易与水分离, 避免了污泥随水流失; (2) 颗粒污泥内部创造了不同的微环境, 适合厌氧氨氧化菌与好氧氨氧化菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)及反硝化菌等多种功能氮素转化菌的协同共生或互生, 颗粒污泥也可看成一个小微

生态系统; (3) 较高的生物浓度, 颗粒内部微生物密度极大, 可缩短微生物代谢中间产物的扩散距离、增强微生物之间的代谢及信息交流; (4) 总氮负荷高, 总氮去除速率大; (5) 对外部不利环境具有较高的抵抗能力等。由于厌氧氨氧化颗粒污泥的显著优势, 研究学者对其形成假说及与颗粒污泥聚集密切相关的 EPS 特性和群体感应现象等进行了大量的研究。

3.1 厌氧氨氧化颗粒污泥形成假说

3.1.1 颗粒污泥形成假说

厌氧氨氧化颗粒污泥在广义上属于厌氧颗粒污泥的一种, 与之相对应的是好氧颗粒污泥^[46]。除这 2 种类型的颗粒污泥外, 污水处理中常用的还有光颗粒污泥(菌藻颗粒污泥)^[47]。目前, 研究学者对于颗粒污泥的形成机理仍未达成共识。

关于颗粒污泥的形成机理主要存在以下几种假说: (1) 晶核假说(*inert nuclei model*)。该假说于 1980 年由荷兰瓦赫宁根大学 UASB 技术发明人 Lettinga 等首次提出, 类比化学领域晶体生长理论, 认为颗粒的形成首先需惰性颗粒(如无机盐沉淀、惰性有机物质等)作载体, 然后微生物黏附于惰性颗粒上形成胚胎颗粒(*embryonic granules*), 被黏附的微生物进一步生长进而形成成熟的颗粒^[48]。(2) 选择压假说(*selection pressure model*)。该假说于 1988 年由 Lettinga 等提出, 认为颗粒形成的基础是反应器对污泥的连续选择, 颗粒的形成是污泥对抗高选择压(如上升流速、水力剪切力等)的保护策略^[49]。(3) 多价阳离子连接假说(*multi-valence positive ion-bonding model*)。该假说认为由于微生物细胞表面一般带负电, 添加多价阳离子可中和微生物细胞表面负电荷、减少微生物细胞间的静电斥力, 进而促进微生物聚集和颗粒形成; 此外, 多价阳离子也可通过对双电层的

压缩及与胞外聚合物 EPS 的结合来促进颗粒污泥的形成^[50-51]。(4) 胞外多聚物连接假说(*EPS bonding model*)。该假说认为 EPS 的组分和比例可改变微生物细胞表面的负电荷, 使其在物理上与其他微生物细胞及惰性载体相连接, 并维持颗粒污泥的结构^[52-53]。(5) 局部脱水和疏水性相互作用假说(*local dehydration and hydrophobic interaction model*)。该假说于 1984 年由荷兰格罗宁根大学 Wilschut 和 Hoekstra 提出, 认为微生物细胞的外表面是水化的, 这层水层阻止了细菌与细菌的接触; 当细菌表面的疏水性增强时, 其表面多余的吉布斯能相应减少, 从而使其发生不可逆聚集^[54]。(6) 自聚集假说(*self-immobilization model*)。该假说认为颗粒污泥的形成是在适宜的环境条件下, 微生物细胞自发的、缓慢进化形成的一种体积大、传质好的微生物同生聚集体的过程^[55-56]。(7) 丝状菌假说(*filamentous bacteria model*)。该假说于 1999 年由荷兰代尔夫特理工大学 Beun 等提出, 认为丝状菌在较强的水力剪切力下形成球状, 进而为细菌的大量繁殖提供了良好的栖息地, 使其大量繁殖并逐步发展为颗粒污泥^[57]。

值得指出的是, 以上几种假说并不孤立, 如晶核假说与胞外多聚物连接假说或胞外多聚物连接假说与丝状菌假说均可同时在同一反应器中发生。颗粒污泥的形成是一个复杂的包括物理、化学和生物作用的微生物自固定化过程, 难以用单一理论解释, 颗粒污泥的形成可能同时涉及多种形成机理; 同一反应器内的颗粒个体间存在异质性, 异质颗粒的形成过程也可能存在差异。同时, 颗粒污泥的形成过程还会受到外部环境的影响, 如反应器构型、水力条件等对颗粒污泥的形成方式均具有选择作用, 颗粒污泥的形成是多方面因素共同作用的结果。

3.1.2 厌氧氨氧化颗粒污泥形成假说

在总结前人研究结果的基础上, Liu 等认为, 厌氧颗粒污泥的形成主要包括 4 个阶段: (1) 由流体力学、扩散传质、重力、热力学效应和细胞活性等决定的物理运动使得微生物细胞与细胞及凝结核之间相互接触; (2) 由范德华力、电荷引力及细胞表面疏水性等物理、化学和生物因素导致稳定多细胞团簇形成; (3) 由 EPS 生成和细胞团簇生长等导致细胞团簇成熟; (4) 由水力剪切力等导致微生物聚集体稳态三维结构最终形成^[58]。

对厌氧氨氧化颗粒而言, 研究学者提出了 2 种类型的颗粒化过程: (1) 接种污泥为颗粒污泥时, 由于环境条件变化, 接种的颗粒污泥强度变弱并逐渐解体, 厌氧氨氧化菌通过 EPS 及丝状菌的作用, 与解体的颗粒污泥黏附并形成厌氧氨氧化细胞团簇, 多个厌氧氨氧化细胞团簇间相互黏附, 最终形成厌氧氨氧化颗粒; (2) 接种污泥为絮体污泥时, 厌氧氨氧化菌以多

价阳离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)沉淀物为凝结核, 通过 EPS 及丝状菌的作用形成厌氧氨氧化细胞团簇, 进而形成厌氧氨氧化颗粒^[59]。Wang 等前期研究将厌氧氨氧化颗粒污泥的形成分为以厌氧氨氧化菌为主导微生物的絮体污泥初期聚集和厌氧氨氧化颗粒粒径增大 2 部分, 发现分层 EPS 分泌不利于厌氧氨氧化菌团之间的相互团聚, 但有利于促进厌氧氨氧化菌团在惰性表面的黏附; 同时还发现, 厌氧氨氧化颗粒能够通过微小厌氧氨氧化颗粒聚集的方式增大其粒径尺寸, 反应器构型及流态等对厌氧氨氧化颗粒污泥形态具有选择作用, 进而提出了厌氧氨氧化颗粒的初期形成及粒径演化机理, 进一步完善了厌氧氨氧化颗粒形成理论体系^[60-62](图 2)。

3.1.3 厌氧氨氧化污泥颗粒化的影响因素

厌氧氨氧化颗粒化的影响因素主要包括水力剪切力、无机盐离子、EPS 特性、水力停留时间(hydraulic retention time, HRT)和污泥停留时间(sludge retention time, SRT)等^[59,63]。

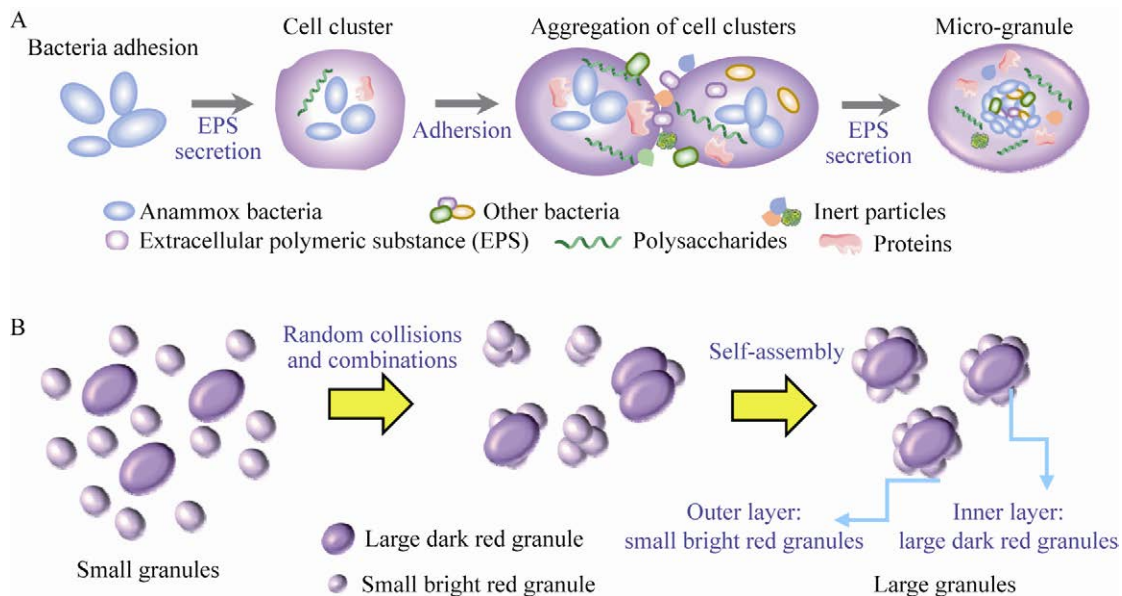


图 2 厌氧氨氧化颗粒污泥形成机制^[60-62] A: 初期黏附机制; B: 粒径增大机制

Figure 2 The formation mechanism of anammox granular sludge^[60-62]. A: The initial adhesion mechanism; B: The enlargement mechanism of granular size.

由水流、气流流动及机械搅拌等产生的水力剪切力对厌氧氨氧化菌的初始黏附及厌氧氨氧化颗粒紧密结构的形成至关重要, 适宜的水流上升流速、反应器高径比及搅拌速度可筛选出密度大、沉降性好且活性高的厌氧氨氧化颗粒^[59]。带正电的无机盐离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)可通过与带负电的厌氧氨氧化菌表面相结合促进厌氧氨氧化颗粒的形成, 同时形成的无机盐沉淀也可作为厌氧氨氧化颗粒形成的凝结核^[63]。EPS 组成可影响微生物细胞的表面性质, 较高的蛋白含量及较大的蛋白/多糖比值有利于增加厌氧氨氧化菌表面疏水性、促进污泥聚集及形成强度大且沉淀性好的厌氧氨氧化颗粒^[11,64-65]。此外, 维持较低 HRT 和较长 SRT 也有利于实现厌氧氨氧化污泥在高负荷下的颗粒化。

3.1.4 加速厌氧氨氧化颗粒污泥形成的方法

近年来, 有学者根据现有的颗粒污泥形成假说, 开发了提高无机盐离子(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)浓度、外加惰性凝结核及振动等多种促进厌氧氨氧化颗粒污泥形成的方法。

研究表明利用高无机盐浓度产生的盐沉淀作为厌氧氨氧化菌聚集的促进剂, 可促进厌氧氨氧化颗粒污泥的形成; 利用沸石颗粒作为载体, 也可促进厌氧氨氧化颗粒的形成。2 种方法均大大减少了出水微生物含量, 分别为 18 mg-VSS/L 和 3 mg-VSS/L^[66]。以灭活的产甲烷颗粒作为惰性载体, 反应器运行 90 d 后, 可成功培育出厌氧氨氧化颗粒污泥, 颗粒粒径可达 (1.3 ± 0.4) mm, 厌氧氨氧化菌丰度达到 67%^[67]。通过接种好氧硝化颗粒污泥和厌氧氨氧化生物膜混合物, 可在第 80 天成功培育出粒径为 0.6 mm 的厌氧氨氧化颗粒污泥, 反应器总氮去除负荷达 $4.6 \text{ g-N}/(\text{L}\cdot\text{d})$ ^[68]。采用振动厌氧污泥床反应器(vibration anaerobic sludge

blanket), 第 80 天也可在生物膜表面观察到粒径为 1.5–3.1 mm 的厌氧氨氧化颗粒污泥, 在比较高的振动强度下, 沉降的颗粒污泥占到总厌氧氨氧化污泥生物量的 82%, 比厌氧氨氧化活性可达 $0.62 \text{ g-N}/(\text{g-VSS}\cdot\text{d})$ ^[69]。

3.2 厌氧氨氧化颗粒污泥 EPS 特性

EPS 是微生物细胞外一系列有机物的总称。EPS 的来源主要有 3 方面: 微生物自分泌、微生物死亡裂解及大分子水解产物。一般认为 EPS 主要由蛋白质和多糖类物质构成, 腐殖酸类物质也占到总 EPS 的 20%左右; 此外, EPS 中还包含少量脂质和核酸等^[70]。EPS 在厌氧氨氧化污泥的聚集及颗粒结构的维持等方面发挥重要的作用^[11,64-65,71]。

以厌氧氨氧化菌为主导微生物的厌氧氨氧化污泥的高聚集潜力已被研究学者普遍接受和广泛报道(表 2), 围绕厌氧氨氧化污泥 EPS 的大量研究表明, 蛋白质作为 EPS 最主要的组分, 似乎在厌氧氨氧化菌聚集过程发挥主要作用^[11,64-65]。通过比较厌氧氨氧化颗粒污泥与普通硝化污泥、反硝化污泥 EPS 的组成及结构, 研究学者发现了厌氧氨氧化污泥 EPS 中含有较多疏水性基团、氨基酸及更为疏松的蛋白质二级结构; 疏松的蛋白质二级结构易暴露内部的疏水性官能团, 进而促进了厌氧氨氧化菌优越的聚集特性^[11]。通过对 18 个实验室水平及中试水平的厌氧氨氧化污泥 EPS 进行分析发现: 黏液层(slime)和紧密结合层 EPS (tightly-bound EPS, TB-EPS)与水质和污泥形态密切相关: slime 层导致厌氧氨氧化污泥表面具有较高黏度, 易形成凝胶网络进行聚集; TB-EPS 蛋白质中大量的疏水基团促进了厌氧氨氧化菌的聚集^[65]。进一步通过对厌氧氨氧化膜生物反应器中初始生物膜、成熟生物膜和脱落生物膜胞外蛋白质的定量蛋白质组学分析发现, 蛋白质与

表 2 导致厌氧氨氧化污泥其高聚集特性及稳定颗粒结构的 EPS 原因

Table 2 The EPS causes of anammox sludge's high aggregation characteristics and stable granular structure

污泥形态 Sludge form	高聚集能力原因 Reasons for high aggregation capacity	参考文献 References
生物膜 Biofilm	高蛋白/多糖; 高 α -螺旋 High proteins/polysaccharides value; high α -helix content	[64]
颗粒 Granule	疏水性基团、氨基酸; 疏松的蛋白质二级结构 Hydrophilic functional groups and amino acids; protein loose structure	[11]
颗粒/絮体/生物膜 Granule/floc/biofilm	Slime 层; TB-EPS 蛋白质中疏水基团 Slime layer; hydrophobic groups of protein in TB-EPS	[65]
生物膜 Biofilm	胞外蛋白与金属离子相互作用; β -折叠 Extracellular proteins bridge with metal ions; β -sheet content	[72]
颗粒 Granule	多糖支链 Polysaccharide branched chains	[73]
颗粒 Granule	唾液酸和硫酸糖胺聚糖 Sialic acids and sulfated glycosaminoglycans	[74]
颗粒 Granule	厌氧氨氧化菌自身特性 Anammox bacteria inherent properties	[61]

金属离子的相互作用和蛋白质诱导的疏水相互作用有助于厌氧氨氧化生物膜的形成^[72]。

多糖作为厌氧氨氧化污泥 EPS 中的另一主要组分, 对厌氧氨氧化颗粒稳定结构的维持至关重要。特异性酶解实验发现, 破坏厌氧氨氧化颗粒多糖支链的结构后, 厌氧氨氧化污泥的 Zeta 电位和疏水性均会降低, 同时厌氧氨氧化颗粒解体, 推测厌氧氨氧化颗粒 EPS 中的多糖支链对其结构的稳定性具有重要作用^[73]。Wang 等研究发现, 提取三层 EPS 后, 厌氧氨氧化污泥在生物表面的聚集速率加快; 在非生物表面的黏附则变慢, 并且结构更为疏松; 推测厌氧氨氧化污泥的高聚集特性由厌氧氨氧化菌自身的特性(如表达黏附因子等)所决定, 而 EPS 对厌氧氨氧化菌在非生物表面黏附及形成紧密的聚集体结构具有重要意义^[61]。

综上所述, 关于厌氧氨氧化污泥 EPS 特性与其黏附特性关系的大部分研究认为 EPS 中的蛋白质发挥关键作用, 但目前仍未达成共识。值得指出的是, EPS 是一个混合物, 而与厌氧氨氧化菌聚集或厌氧氨氧化颗粒形成相关的蛋

白或多糖可能只是其中的某一组分。因此, 后续有必要对厌氧氨氧化颗粒 EPS 中关键的特定组分进行单独研究, 比如结构蛋白^[75-76]、糖蛋白^[77]、唾液酸和硫酸糖胺聚糖^[74]等。

3.3 厌氧氨氧化菌的群体感应

群体感应是指微生物种群在其生长过程中, 由于种群密度增加而发生生理生化特征的变化, 进而表现出少数细菌或单个细菌所不具备特征的特性。研究厌氧氨氧化菌这一特性对于提高对厌氧氨氧化颗粒形成机制的认识、促进厌氧氨氧化颗粒污泥的形成具有重要意义。厌氧氨氧化菌的 3 个特性表明其可能存在群体感应现象: (1) 厌氧氨氧化菌活性只有当其细胞密度大于 10^{10} – 10^{11} 个/mL 时才能被检出^[1]; (2) 厌氧氨氧化污泥被广泛观察到以生物膜或颗粒等聚集体形式生长, 以及黏附在反应器壁上; (3) 厌氧氨氧化菌 *Ca. K. stuttgartiensis* 的全基因序列中包含合成信号分子关键代谢通路的基因^[17,78]。

为探究厌氧氨氧化菌的群体感应机理, 研究者主要对革兰氏阴性菌种内的通用信号分

子 N-酰基高丝氨酸内酯类化合物(N-acyl-homoserine lactones, AHLs)以及细胞内第二信使环二鸟苷酸[bis-(30-50)-cyclic dimeric guanosine monophosphate, c-di-GMP]进行了研究。

对于 AHLs 信号分子, 研究学者首先在厌氧氨氧化反应器中检测到了多种 AHLs 信号分子的存在, 包括 C₆-HSL、C₈-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL 和 3-oxo-C₁₄-HSL 等^[79-81]。研究发现氮负荷、pH 及生物量密度等均会显著影响 AHLs 信号分子分泌的种类和浓度: 氮负荷高(110 mg-NH₄⁺-N/L)的反应器中 AHLs 浓度高于进水氮负荷低(50 mg-NH₄⁺-N/L)的反应器, 表明氮负荷高的厌氧氨氧化反应器中存在更活跃的群体感应过程^[81]; pH 降低(7.0-6.0)及提高总氮浓度(200-2 100 mg/L)时, 高生物量密度(1.178-1.261 g/mL)的厌氧氨氧化颗粒污泥较低生物量密度(0.863-0.977 g/mL)的厌氧氨氧化颗粒污泥可释放更多的 AHLs 信号分子(C₆-HSL 和 C₈-HSL), 以减少冲击^[82-83]。反向投加实验表明, 添加 C₆-HSL 可增加厌氧氨氧化颗粒污泥活性和厌氧氨氧化菌生长速率, 添加 C₈-HSL 可增加厌氧氨氧化颗粒污泥沉降性能和厌氧氨氧化菌活性, 而添加 C₁₂-HSL 会促进异养菌的增殖, 抑制厌氧氨氧化菌活性^[79,84]。同时, 初期(40 d)投加信号分子对于厌氧氨氧化颗粒污泥特性的影响是长期的(150 d)^[84]。当采用香兰素和猪肾酰化酶 I 灭活 AHLs 信号分子后, 厌氧氨氧化反应关键酶活性下降, 厌氧氨氧化颗粒污泥的胞外蛋白和多糖含量及比例均发生变化, 颗粒强度下降^[85]。进一步利用宏基因组测序方法, 研究学者在厌氧氨氧化反应器启动过程中识别出 *HdtS* 和 *RpfF* 这 2 个与信号分子有关的基因, 其中, *HdtS* 是产生种内信号分子 AHLs 的关键基因之一, *RpfF* 是产生种间信号分子的关键基因之一^[86]。同样, 在厌氧氨

氧化菌 *Ca. J. caeni* 中也识别出 *JqsI-1* 和 *JqsI-2* 这 2 个与信号分子 AHLs 合成有关的基因, 这 2 个基因可以合成 4 种信号分子, 分别为 C₆-HSL、3-oxo-C₆-HSL、C₈-HSL 和 3-oxo-C₈-HSL, 可以通过影响 *hzsA* 基因的表达来调控厌氧氨氧化菌活性^[87]。

对于第二信使 c-di-GMP, 研究发现厌氧氨氧化菌可通过第二信使 c-di-GMP 的调控来促进聚集, 以增强对不利环境(如低温、溶解氧和低 pH 等)的抵抗能力^[88]。在同步短程硝化、厌氧氨氧化、反硝化的固定生物膜-活性污泥(integrated fixed-film activated sludge, IFAS)体系中, 提高 pH 会降低絮体污泥微生物细胞内第二信使 c-di-GMP 含量, 而生物膜中第二信使 c-di-GMP 含量却无显著变化; c-di-GMP 含量的减少增加了微生物细胞的运动性, 进而引起微生物群落组成的变化^[89]。

综上所述, 厌氧氨氧化污泥中存在基于 AHLs 和 c-di-GMP 的群体感应现象, 但在厌氧氨氧化颗粒形成过程中, 何种 AHLs 信号分子发挥作用及其具体作用机制仍不明晰, 这有赖于厌氧氨氧化纯菌或高丰度厌氧氨氧化菌的培育及后续研究。

4 总结与展望

厌氧氨氧化工艺作为一种低碳、经济的污水自养脱氮工艺日益受到研究学者的重视。其中, 以厌氧氨氧化菌为主要功能微生物的厌氧氨氧化颗粒污泥因其突出的污泥持留能力, 成为实现厌氧氨氧化工艺高效、稳定运行最具前景的污泥形态。本文综述了厌氧氨氧化菌特性、厌氧氨氧化工艺应用现状与挑战及厌氧氨氧化颗粒污泥聚集机制研究热点, 重点介绍了近年来围绕厌氧氨氧化颗粒污泥形成假说、EPS 特性和群体感应现象等方面的研究进展,

以期厌氧氨氧化颗粒的后续研究及应用提供参考。对于厌氧氨氧化颗粒污泥的研究,目前仍存在如下问题值得后续深入分析:

(1) 厌氧氨氧化颗粒污泥的形成是一个复杂的微生物自固定过程,其EPS特性、群体感应现象均包含其中。有关厌氧氨氧化颗粒污泥形成的假说已有研究报道,但多数研究采用合成废水。厌氧氨氧化颗粒污泥在实际污水中的形成过程、EPS特性及群体感应等是否会受到复杂水质的影响仍不清晰。

(2) 厌氧氨氧化颗粒污泥中包含丰富的微生物种群,然而除厌氧氨氧化菌以外的其他菌群在厌氧氨氧化颗粒污泥中的作用仍有待揭示。

(3) 充足的高品质厌氧氨氧化颗粒污泥对于厌氧氨氧化工艺的启动及维护至关重要。因此,开发快速的厌氧氨氧化颗粒污泥培育方法、经济高效的厌氧氨氧化颗粒污泥强化方法及简便的厌氧氨氧化颗粒污泥储存方法仍亟待研究。

REFERENCES

- [1] Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, Van De Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MSM. Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. *Nature*, 1999, 400(6743): 446-449
- [2] Wang WG, Wang YY, Wang XD, Zhang Y, Yan Y. Dissolved oxygen microelectrode measurements to develop a more sophisticated intermittent aeration regime control strategy for biofilm-based CANON systems[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 365: 165-174
- [3] Lackner S, Gilbert EM, Vlaeminck SE, Joss A, Horn H, Van Loosdrecht MCM. Full-scale partial nitrification/anammox experiences: an application survey[J]. *Water Research*, 2014, 55: 292-303
- [4] Li XC, Peng YZ, Zhang JW, Du R. Highly efficient and synchronous nitrogen removal from ammonia-rich wastewater and domestic wastewater via a novel anammox coupled with double-nitrite-shunt process at low temperature[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 425: 131449
- [5] Van Der Star WRL, Abma WR, Blommers D, Mulder JW, Tokutomi T, Strous M, Picioreanu C, Van Loosdrecht MCM. 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
- [6] Cao YS, Loosdrecht MCM, Daigger GT. Mainstream partial nitrification-anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(4): 1365-1383
- [7] Zhang L, Narita Y, Gao L, Ali M, Oshiki M, Okabe S. Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited[J]. *Water Research*, 2017, 116: 296-303
- [8] Wang WG, Xue H, Wang H, Ma J, Wu M, Wang YY. High adhesion ability of anammox granular microbes directly revealed by QCM-D technique[J]. *Environmental Research*, 2021, 194: 110646
- [9] Lotti T, Kleerebezem R, Abelleira-Pereira JM, Abbas B, Van Loosdrecht MCM. Faster through training: the anammox case[J]. *Water Research*, 2015, 81: 261-268
- [10] 许冬冬, 康达, 郭磊艳, 郑平. 厌氧氨氧化颗粒污泥研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(8): 1988-1997
Xu DD, Kang D, Guo LY, Zheng P. Research progress on anammox granular sludge[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(8): 1988-1997 (in Chinese)
- [11] Hou XL, Liu ST, Zhang ZT. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge[J]. *Water Research*, 2015, 75: 51-62
- [12] Niftrik L. Cell biology of unique anammox bacteria that contain an energy conserving prokaryotic organelle[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 104(4): 489-497
- [13] Kuenen JG. Anammox and beyond[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(2): 525-536
- [14] Van Niftrik L, Geerts WJC, Van Donselaar EG, Humbel BM, Webb RI, Fuerst JA, Verkleij AJ, Jetten MSM, Strous M. Linking ultrastructure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: cell plan, glycogen storage, and localization of cytochrome C proteins[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(2): 708-717
- [15] Nsenga Kumwimba M, Lotti T, Şenel E, Li XY, Suanon F. Anammox-based processes: how far have we come and what work remains? A review by bibliometric analysis[J]. *Chemosphere*, 2020, 238: 124627
- [16] Kartal B, Van Niftrik L, Rattray J, Van De Vossenberg

- JLCM, Schmid MC, Sinninghe Damsté J, Jetten MSM, Strous M. *Candidatus* ‘Brocadia fulgida’: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 63(1): 46-55
- [17] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, Rattei T, Lehner A, Taylor MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome[J]. Nature, 2006, 440(7085): 790-794
- [18] Hu BL, Rush D, Van Der Biezen E, Zheng P, Van Mullekom M, Schouten S, Sinninghe Damsté JS, Smolders AJP, Jetten MSM, Kartal B. New anaerobic, ammonium-oxidizing community enriched from peat soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(3): 966-971
- [19] Quan ZX, Rhee SK, Zuo JE, Yang Y, Bae JW, Park JR, Lee ST, Park YH. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 3130-3139
- [20] Schmid M, Walsh K, Webb R, Rijpstra WI, Van De Pas-Schoonen K, Verbruggen MJ, Hill T, Moffett B, Fuerst J, Schouten S, 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
- [21] Kartal B, Rattray J, Van Niftrik LA, Van De Vossenberg J, Schmid MC, Webb RI, Schouten S, Fuerst JA, Damsté JS, Jetten MSM, et al. *Candidatus* “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007, 30(1): 39-49
- [22] Khramenkov SV, Kozlov MN, Kevbrina MV, Dorofeev AG, Kazakova EA, Grachev VA, Kuznetsov BB, Polyakov DY, Nikolaev YA. A novel bacterium carrying out anaerobic ammonium oxidation in a reactor for biological treatment of the filtrate of wastewater fermented sludge[J]. Microbiology, 2013, 82(5): 628-636
- [23] Viancelli A, Kunz A, Esteves PA, Bauermann FV, Furukawa K, Fujii T, Antônio RV, Vanotti M. Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2011, 54(5): 1035-1041
- [24] Kartal B, Van Niftrik L, Sliemers O, Schmid MC, Schmidt I, Van De Pas-Schoonen K, Cirpus I, Van Der Star W, Van Loosdrecht M, Abma W, et al. Application, eco-physiology and biodiversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria[J]. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2004, 3(3): 255-264
- [25] Oshiki M, Shimokawa M, Fujii N, Satoh H, Okabe S. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium ‘*Candidatus* Brocadia sinica’[J]. Microbiology, 2011, 157(6): 1706-1713
- [26] Araujo JC, Campos AC, Correa MM, Silva EC, Matté MH, Matté GR, Von Sperling M, Chernicharo CAL. Anammox bacteria enrichment and characterization from municipal activated sludge[J]. Water Science and Technology, 2011, 64(7): 1428-1434
- [27] Rothrock MJ, Vanotti MB, Szögi AA, Gonzalez MCG, Fujii T. Long-term preservation of anammox bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(1): 147-157
- [28] Narita Y, Zhang L, Kimura ZI, Ali M, Fujii T, Okabe S. Enrichment and physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium ‘*Candidatus* Brocadia sapporoensis’[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2017, 40(7): 448-457
- [29] Schmid M, Twachtmann U, Klein M, Strous M, Juretschko S, Jetten M, Metzger JW, Schleifer KH, Wagner M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2000, 23(1): 93-106
- [30] Ali M, Oshiki M, Awata T, Isobe K, Kimura Z, Yoshikawa H, Hira D, Kindaichi T, Satoh H, Fujii T, et al. Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium ‘*Candidatus* Jettenia caeni’[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(6): 2172-2189
- [31] Nikolaev YA, Kozlov MN, Kevbrina MV, Dorofeev AG, Pimenov NV, Kallistova AY, Grachev VA, Kazakova EA, Zharkov AV, Kuznetsov BB, et al. *Candidatus* “Jettenia moscovienalis” sp. nov., a new species of bacteria carrying out anaerobic ammonium oxidation[J]. Microbiology, 2015, 84(2): 256-262
- [32] Kuypers MMM, Sliemers AO, Lavik G, Schmid M, Jørgensen BB, Kuenen JG, Sinninghe Damsté JS, Strous M, Jetten MSM. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea[J].

- Nature, 2003, 422(6932): 608-611
- [33] Van De Vossenberg J, Woebken D, Maalcke WJ, Wessels HJCT, Dutilh BE, Kartal B, Janssen-Megens EM, Roeselers G, Yan J, Speth D, et al. The metagenome of the marine anammox bacterium '*Candidatus Scalindua profunda*' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(5): 1275-1289
- [34] Woebken D, Lam P, Kuypers MMM, Naqvi SWA, Kartal B, Strous M, Jetten MSM, Fuchs BM, Amann R. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(11): 3106-3119
- [35] Li H, Chen S, Mu BZ, Gu JD. Molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(4): 771-783
- [36] Hong YG, Li M, Cao HL, Gu JD. Residence of habitat-specific anammox bacteria in the deep-sea subsurface sediments of the South China sea: analyses of marker gene abundance with physical chemical parameters[J]. Microbial Ecology, 2011, 62(1): 36-47
- [37] Fuchsman CA, Staley JT, Oakley BB, Kirkpatrick JB, Murray JW. Free-living and aggregate-associated *Planctomycetes* in the black sea[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 80(2): 402-416
- [38] Brandsma J, Van De Vossenberg J, Risgaard-Petersen N, Schmid MC, Engström P, Eurenium K, Hulth S, Jaeschke A, Abbas B, Hopmans EC, et al. A multi-proxy study of anaerobic ammonium oxidation in marine sediments of the Gullmar Fjord, Sweden[J]. Environmental Microbiology Reports, 2011, 3(3): 360-366
- [39] Liu ST, Yang FL, Gong Z, Meng FG, Chen HH, Xue Y, Furukawa K. Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(15): 6817-6825
- [40] Oshiki M, Satoh H, Okabe S. Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(9): 2784-2796
- [41] Kartal B, Keltjens JT. Anammox biochemistry: a tale of heme C proteins[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2016, 41(12): 998-1011
- [42] Wang WG, Xie HC, Wang H, Xue H, Wang JJ, Zhou MD, Dai XH, Wang YY. Organic compounds evolution and sludge properties variation along partial nitrification and subsequent anammox processes treating reject water[J]. Water Research, 2020, 184: 116197
- [43] Zhang FZ, Peng YZ, Liu YW, Zhao L. Improving stability of mainstream anammox in an innovative two-stage process for advanced nitrogen removal from mature landfill leachate[J]. Bioresource Technology, 2021, 340: 125617
- [44] Kindaichi T, Awata T, Mugimoto Y, Rathnayake RMLD, Kasahara S, Satoh H. Effects of organic matter in livestock manure digester liquid on microbial community structure and *in situ* activity of anammox granules[J]. Chemosphere, 2016, 159: 300-307
- [45] Shen LD, Hu AH, Jin RC, Cheng DQ, Zheng P, Xu XY, Hu BL. Enrichment of anammox bacteria from three sludge sources for the startup of monosodium glutamate industrial wastewater treatment system[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 199/200: 193-199
- [46] Liu L, Li WW, Sheng GP, Liu ZF, Zeng RJ, Liu JX, Yu HQ, Lee DJ. Microscale hydrodynamic analysis of aerobic granules in the mass transfer process[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(19): 7555-7560
- [47] Trebuch LM, Oyserman BO, Janssen M, Wijffels RH, Vet LEM, Fernandes TV. Impact of hydraulic retention time on community assembly and function of photogranules for wastewater treatment[J]. Water Research, 2020, 173: 115506
- [48] Lettinga G, Van Velsen AFM, Hobma SW, De Zeeuw W, Klapwijk A. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1980, 22(4): 699-734
- [49] Liu Y, Xu HL, Yang SF, Tay JH. Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor[J]. Water Research, 2003, 37(3): 661-673
- [50] Mahoney EM, Varangu LK, Cairns WL, Kosaric N, Murray RGE. The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up[J]. Water Science and Technology, 1987, 19(1/2): 249-260
- [51] Schmidt JE, Ahring BK. Effects of magnesium on thermophilic acetate-degrading granules in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1993, 15(4): 304-310
- [52] Schmidt JEE, Ahring BK. Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 42(2/3): 457-462

- [53] Chen J, Lun SY. Study on mechanism of anaerobic sludge granulation in UASB reactors[J]. *Water Science and Technology*, 1993, 28(7): 171-178
- [54] Wilschut J, Hoekstra D. Membrane fusion: from liposomes to biological membranes[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1984, 9(11): 479-483
- [55] 周律, 钱易. 好氧颗粒污泥的形成和技术条件[J]. *给水排水*, 1995, 21(4): 11-13, 3
Zhou L, Qian Y. Formation and technical conditions of aerobic sludge pellet[J]. *Water & Wastewater Engineering*, 1995, 21(4): 11-13, 3 (in Chinese)
- [56] Fang HH. Microbial distribution in UASB granules and its resulting effects[J]. *Water Science and Technology*, 2000, 42(12): 201-208
- [57] Beun JJ, Hendriks A, Van Loosdrecht MCM, Morgenroth E, Wilderer PA, Heijnen JJ. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor[J]. *Water Research*, 1999, 33(10): 2283-2290
- [58] Liu Y, Tay JH. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment[J]. *Biotechnology Advances*, 2004, 22(7): 533-563
- [59] Manonmani U, Joseph K. Granulation of anammox microorganisms for autotrophic nitrogen removal from wastewater[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2018, 16(3): 881-901
- [60] Wang WG, Wang H, Jiang ZW, Wang YY. Visual evidence for anammox granules expanding their size by aggregation of anammox micro-granules[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 745: 141052
- [61] Wang WG, Yan Y, Zhao YH, Shi Q, Wang YY. Characterization of stratified EPS and their role in the initial adhesion of anammox consortia[J]. *Water Research*, 2020, 169: 115223
- [62] Wang WG, Wang JJ, Wang H, Ma J, Wu M, Wang YY. Anammox granule enlargement by heterogenous granule self-assembly[J]. *Water Research*, 2020, 187: 116454
- [63] Adams M, Xie JX, Kabore AWJ, Chang YF, Xie JW, Guo ML, Chen CJ. Research advances in anammox granular sludge: a review[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2020: 1-44
- [64] Yin CQ, Meng FG, Chen GH. Spectroscopic characterization of extracellular polymeric substances from a mixed culture dominated by ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Water Research*, 2015, 68: 740-749
- [65] Jia FX, Yang Q, Liu XH, Li XY, Li BK, Zhang L, Peng YZ. Stratification of extracellular polymeric substances (EPS) for aggregated anammox microorganisms[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(6): 3260-3268
- [66] Fernández I, Vázquez-Padín JR, Mosquera-Corral A, Campos JL, Méndez R. Biofilm and granular systems to improve anammox biomass retention[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 42(3): 308-313
- [67] Ni SQ, Fessehaie A, Lee PH, Gao BY, Xu X, Sung S. Interaction of anammox bacteria and inactive methanogenic granules under high nitrogen selective pressure[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(18): 6910-6915
- [68] 丛岩, 黄晓丽, 王小龙, 高大文. 厌氧氨氧化颗粒污泥的快速形成[J]. *化工学报*, 2014, 65(2): 664-671
Cong Y, Huang XL, Wang XL, Gao DW. Faster formation of anammox granular sludge[J]. *CIESC Journal*, 2014, 65(2): 664-671 (in Chinese)
- [69] Zhang K, Lyu LT, Kang TL, Yao S, Ma YG, Pan Y, Wang YZ, Furukawa K, Hao LY, Zhu T. A rapid and effective way to cultivate anammox granular sludge through vibration[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, 143: 104704
- [70] Sheng GP, Yu HQ, Li XY. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882-894
- [71] Peeters SH, Van Niftrik L. Trending topics and open questions in anaerobic ammonium oxidation[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2019, 49: 45-52
- [72] Chen ZJ, Meng YB, Sheng BB, Zhou ZB, Jin C, Meng FG. Linking exoproteome function and structure to anammox biofilm development[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(3): 1490-1500
- [73] Wang S, Liu LJ, Li HX, Fang F, Yan P, Chen YP, Guo JS, Ma TF, Shen Y. The branched chains and branching degree of exopolysaccharides affecting the stability of anammox granular sludge[J]. *Water Research*, 2020, 178: 115818
- [74] Boleij M, Kleikamp H, Pabst M, Neu TR, Van Loosdrecht MCM, Lin YM. Decorating the anammox house: sialic acids and sulfated glycosaminoglycans in the extracellular polymeric substances of anammox granular sludge[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(8): 5218-5226
- [75] Boleij M, Seviour T, Wong LL, Van Loosdrecht MCM, Lin YM. Solubilization and characterization of extracellular proteins from anammox granular sludge[J]. *Water Research*, 2019, 164: 114952
- [76] Wong LL, Natarajan G, Boleij M, Thi SS, Winnerdy

- FR, Mugunthan S, Lu Y, Lee JM, Lin YM, Loosdrecht M, et al. Extracellular protein isolation from the matrix of anammox biofilm using ionic liquid extraction[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(8): 3643-3654
- [77] Boleij M, Pabst M, Neu TR, Van Loosdrecht MCM, Lin YM. Identification of glycoproteins isolated from extracellular polymeric substances of full-scale anammox granular sludge[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(22): 13127-13135
- [78] 丁爽, 郑平, 张萌, 陆慧锋. 厌氧氨氧化菌群体感应系统研究[J]. *生态学报*, 2012, 32(8): 2581-2587
Ding S, Zheng P, Zhang M, Lu HF. Quorum sensing in anaerobic ammonium oxidation bacteria[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(8): 2581-2587 (in Chinese)
- [79] Tang X, Liu ST, Zhang ZT, Zhuang GQ. Identification of the release and effects of AHLs in anammox culture for bacteria communication[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 273: 184-191
- [80] Li JL, Li JZ, Meng J, Sun K. Understanding of signaling molecule controlled anammox through regulating C/N ratio[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 315: 123863
- [81] Sun YP, Guan YT, Zeng DF, He K, Wu GX. Metagenomics-based interpretation of AHLs-mediated quorum sensing in anammox biofilm reactors for low-strength wastewater treatment[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 344: 42-52
- [82] Zhang J, Zhang YZ, Zhao BH, Zhang K, Liang DB, Wei J, Wang XJ, Li J, Chen GH. Effects of pH on AHL signal release and properties of ANAMMOX granules with different biomass densities[J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2019, 5(10): 1723-1735
- [83] Zhang J, Zhang YC, Wang XJ, Li J, Zhou RX, Wei J, Liang DB, Zhang K. Effects of substrate shock on release of AHL signals in ANAMMOX granules and properties of granules[J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2019, 5(4): 756-768
- [84] Zhang J, Li J, Zhao BH, Zhang YC, Wang XJ, Chen GH. 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
- [85] Zhao R, Zhang HM, Zou X, Yang FL. Effects of inhibiting acylated homoserine lactones (AHLs) on anammox activity and stability of granules[J]. *Current Microbiology*, 2016, 73(1): 108-114
- [86] Tang X, Guo YZ, Jiang B, Liu ST. Metagenomic approaches to understanding bacterial communication during the anammox reactor start-up[J]. *Water Research*, 2018, 136: 95-103
- [87] Tang X, Guo YZ, Zhu TT, Tao HC, Liu ST. Identification of quorum sensing signal AHLs synthases in *Candidatus* *Jettenia caeni* and their roles in anammox activity[J]. *Chemosphere*, 2019, 225: 608-617
- [88] Guo YZ, Liu ST, Tang X, Yang FL. Role of c-di-GMP in anammox aggregation and systematic analysis of its turnover protein in *Candidatus* *Jettenia caeni*[J]. *Water Research*, 2017, 113: 181-190
- [89] Wang C, Liu ST, Xu XC, Guo YZ, Yang FL, Wang D. Role of cyclic diguanylate in affecting microbial community shifts at different pH during the operation of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification process[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 637/638: 155-162