

C/N 对 SBR 生物脱氮硝化过程微生物结构的动态影响

宁高阳^{1,2}, 牛永健³, 李维维³, 杨浩¹, 孙洪伟^{1,2*} (1.兰州交通大学环境与市政工程学院, 甘肃 兰州 730070; 2.甘肃省污水处理行业技术中心, 甘肃 兰州 730070; 3.甘肃省轻工研究院, 甘肃 兰州 730030)

摘要: 为揭示碳氮比(C/N)对硝化过程影响的机理本质, 试验以人工模拟废水为研究对象, 采用4组平行的SBR(R₀、R₅、R₁₀、R₁₅)反应器, 基于16S rRNA基因-Illumina MiSeq高通量测序技术, 考察了4种C/N(0、5、10、15)对硝化过程功能微生物组成和结构特征的影响。结果表明: 4种C/N条件下, 系统均获得了较好的去除氨氮(去除率>95%)和COD(去除率>90%)效果, TN也有不同程度的降低。此外, C/N会显著影响系统内微生物的多样性、种群结构和功能。R₀系统Chao1指数(922)、ACE指数(1232.4)、Shannon指数(6.76)和Simpson指数(0.96)均最大, 故微生物多样性最丰富, 而R₅的物种丰富度最低。在微生物门水平上, 变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)等9个相对丰度较高的门是重要的微生物门, 其中变形菌门(Proteobacteria)约全部微生物的40.7%~65.2%, 是4个系统中最优势的菌门。硝化过程的关键菌群亚硝化单胞菌科(Nitrosomonadaceae)及硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)的相对丰度表现出随着C/N升高而急剧降低的趋势。基于LEfSe分析共获得了34组具有显著差异的微生物, 从而得到了每种C/N条件下在微生物学分类水平上的菌群关键生物标记物。

关键词: C/N; Illumina MiSeq 高通量测序; 硝化过程; 微生物多样性; LEfSe 组间差异

中图分类号: X703.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2020)05-2053-09

Dynamic effect of C/N on microbial structure in SBR's biological nitrification process. NING Gao-yang^{1,2}, NIU Yong-jian³, LI Wei-wei³, YANG Hao³, SUN Hong-wei^{1,2*} (1.School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China; 2.Gansu Sewage Treatment Industry Technical Center, Lanzhou 730070, China; 3.Gansu Province Light Industry Research Institute, Lanzhou 730070, China). *China Environmental Science*, 2020,40(5): 2053~2061

Abstract: Based on 16S rRNA genes-Illumina MiSeq high-throughput sequencing, this study is to investigate the community and structure of characteristic microbial communities related to nitrification under four C/N ratios (0、5、10、15) settled in four parallel laboratory-scale sequencing batch reactors (SBRs, denoted as R₀、R₅、R₁₀、R₁₅) to better understand the biological mechanisms of how does C/N ratio influence the nitrification. Results indicated that effective removal of ammonia nitrogen (removal efficiency > 95%) and COD (removal efficiency > 90%) were achieved in four C/Ns, and TN has also been reduced to varying degrees. In addition, C/N ratio has an important impact on the diversity, community and function of the bacterial communities. The largest α -diversity values of Chao1 (922), ACE (1232.4), Shannon (6.76) and Simpson (0.96) were achieved in R₀, which represents with highest richness and diversity of bacterial community, while the lowest was achieved in R₅. 9 phyla such as Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria and so on were found to be major groups with higher relative abundance at the phylum. The most dominant bacterial is affiliated with Proteobacteria comprised 40.7%~65.2% in the four sludge samples. The relative abundance of key microorganisms as Nitrosomonadaceae and *Nitrospira* related to nitrification decreased sharply with increasing C/N. A total of 34 groups of microorganisms with significant differences were obtained based on LEfSe analysis, thereby key biomarkers of the microflora were obtained at the microbiological classification level under each C/N condition.

Key words: C/N; Illumina MiSeq high-throughput sequencing; nitrification; microbial diversity; group differences based on LEfSe

污水生物处理系统中,碳氮比(C/N)是影响生物脱氮效率的关键因素之一^[1-2]。硝化过程,随着C/N升高,氨氮去除率降低而总氮(TN)去除率增加^[3-7]。其原理在于:C/N较低时,硝化菌为优势菌种,有利于硝化反应的进行,反之则异养菌大量出现,抑制了硝化菌的活性。C/N较高时可为反硝化提供大量的电子供体,可能会发生同步硝化反硝化,有利于总氮的去除^[7-8]。

高通量测序是以微生物目标基因的PCR产物

为样品进行测序,一个反应得到几万至几百万条序列,测序广度和深度大大提高^[9],被广泛用于对土壤、沉积物、水体等环境样品中细菌、真菌、古菌以及功能菌(如氨氧化菌、反硝化菌和甲烷氧化菌等)的群落组成和数量进行分析^[10]。很多学者利用高通量测序技术研究了生物脱氮过程中的菌群特征。赵诗

收稿日期: 2019-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(51668031)

* 责任作者, 教授, 12821306@qq.com

惠等^[11]研究发现通过 ABR-MBR 组合工艺实现短程硝化过程中,逐步提高进水氨氮负荷可使氨氧化菌(AOB)丰度由 4.97%提高至 22.56%,而亚硝酸盐氧化菌(NO₂-N)丰度一直维持在 0.06%~2.12%。张铃敏等^[12]采用 SBR 反应器对全程自养脱氮工艺(CANON)中短程硝化恶化的污泥进行恢复,通过短期提高氨氮浓度(NH₄⁺-N≥300mg/L)并控制曝停比为 1:3,经高通量测序检测,恢复过程 NO₂-N 主要菌属 *Nitrospira* 的相对丰度由 3.96%降至 0.64%,成功抑制了亚硝酸盐氧化菌(NO₂-N)的生长,CANON 系统得以恢复。Zielinska 等^[13]采用两组连续曝气序批式反应器(SBRs),C/N 控制为 0.7 和 6.8,曝气阶段氨氧化率均超 90%,研究发现 C/N=0.7 时 AOB 相对丰度为 10.2%,而 C/N=6.8 时 AOB 相对丰度为 7.8%。

目前的研究主要集中于依据废水特性制定处理工艺后对污泥中的微生物种群进行探究,缺乏在既定反应器中控制一定运行条件并长期运行后对活性污泥进行微生物多样性的研究。本试验采用 4 个平行的 SBR,进水 C/N 分别控制为 0,5,10,15,基于 16S rRNA 基因-Illumina MiSeq 高通量测序技术,分析了不同 C/N 条件下微生物的组成和结构特征,从而揭示 C/N 对 SBR 生物脱氮硝化过程影响的机理本质。

1.3 污泥样品 DNA 的提取及高通量测序

采用 Water DNA Isolation Kit 试剂盒(成都福际生物技术有限公司)对活性污泥样品中的细菌基因组 DNA 进行提取,以 TE 缓冲液为空白对照。将样品中提取到的基因组 DNA,对 16S rRNA V4 区进行扩增,通用引物序列为:F:520F:(5'-AYTGGGYDTA-AAGNG-3'),R:802R:(5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3')。PCR 反应条件为:98℃预变性 3min;98℃变性 30s;50℃退火 30s;72℃延伸 30s 后保温 5min。如此 27

1 材料与方法

1.1 试验用水、接种污泥及装置

试验用水采用人工模拟废水,由碳源液、磷液、浓缩液和微量元素液按照一定比例配制。废水主要成分包括:氯化铵,乙酸钠,磷酸二氢钾和微量元素浓缩液。接种污泥取自甘肃省兰州市七里河安宁区污水处理厂 A²/O 工艺好氧段,污泥脱氮除磷性能良好。试验采用的 SBR 由有机玻璃制成,有效容积 8L。

1.2 试验方案及泥样采集

对接种污泥进行长达 20d 的驯化,使系统具备高效稳定的脱氮性能,然后将其均分入 4 个 SBR 反应器,以 R₀、R₅、R₁₀ 和 R₁₅ 分别表示 4 个 SBR 系统(C/N 分别为 0、5、10、15)。反应器运行温度均维持在(25±2.0)℃,溶解氧维持在 1.0~2.5mg/L,具体运行参数见表 1。每天运行一个周期,每隔 2~3 个周期对系统硝化开始和硝化结束的污泥取样,沉淀过滤后测定 NH₄⁺-N、COD 等水质指标。

在试验末期,当 SBR 反应器运行达到稳定状态时(COD 和 NH₄⁺-N 去除率稳定维持在 90%以上),取各反应器曝气结束后的活性污泥样品进行高通量测序。每种 C/N 各取 3 个平行污泥样品,并进行编号(表 1)。污泥样品在 DNA 提取前保存至 -80℃的超低温冰箱中。

表 1 四个 SBR 反应器运行条件
Table 1 Operating conditions for four SBR reactors

反应器	运行周期及各阶段反应时间(min)				运行条件			平行样编号		
	周期时间	进水	曝气	沉淀排水	T(℃)	DO(mg/L)	pH 值	平行样 1	平行样 2	平行样 3
R ₀	300	5	270	25	25±2.0	1.0~2.5	7.5±0.2	0-1	0-2	0-3
R ₅	340	5	300	35	25±2.0	1.0~2.5	7.5±0.2	5-1	5-2	5-3
R ₁₀	330	5	270	55	25±2.0	1.0~2.5	7.5±0.2	10-1	10-2	10-3
R ₁₅	270	5	210	55	25±2.0	1.0~2.5	7.5±0.2	15-1	15-2	15-3

个循环,提取后于 4℃保存。委托上海派森诺生物科技有限公司进行 Illumina MiSeq 高通量测序。

1.4 多样性及结构差异性分析

菌群的多样性分析:应用软件 Mothur 中的 summary.single 命令,计算菌群 Chao、ACE、Shannon、Simpson 多样性指数。组间差异分析:在 Qiime 软件中导入各样品数据,得到各个分类水平上的物种丰度表和分布图,并可以利用 Galaxy 在线平台进行 LEfSe 分析。

2 结果与分析

2.1 C/N 对 SBR 脱氮效果影响

表 2 为 4 种 C/N 条件下,280 个周期的稳定运行,系统内氨氮和 COD 的进水、出水及去除情况;表 3 则给出了氨氮、亚硝氮、硝氮和总氮反应前后的含量及总氮的去除情况.4 个反应器进水氨氮平均浓度分别为 (19.0±2.6),(56.3±0.6),(26.6±2.8),(20.0±4.2) mg/L.为了获得充分的硝化作用,由于进水氨氮浓度的差异,4 个反应器曝气时间(R₀、R₅、R₁₀、R₁₅)分别为 270,300,270,210min,并且出水氨氮浓度始终维持在 1.5mg/L 以下,同时获得了 95%以上的氨氮去除率,这与郭英等^[14]及王翠等^[15]研究结果一致.亚硝氮进水含量在 4 个系统中均较低(<0.7mg/L),曝气结束后含量均接近于 0.硝氮初始含量在 R₀中最高(20mg/L),而在其他反应器中随 C/N 增加急剧降低,硝化反应

过后,硝氮含量明显增加,增加量与初始氨氮含量成正比,说明很大一部分氨氮被氧化成硝氮.从总氮(TN)的去除效果看,R₀ 去除率最低(8.3%),R₁₅ 最高(42.0%).但并不是 C/N 越高 TN 去除率越高,比如 R₁₀ 去除率(17.8%)还低于 R₅(25.7%).笔者推测 SBR 中发生了同步硝化反硝化(SND)反应,使得 TN 在仅进行曝气下还能去除一部分.TN 去除速率是 R₅中最大,推测该条件下实现 SND 反应的微生物最活跃.而 R₁₅ 中 TN 去除率最高(42%),且其 TN 去除速率仅次于 R₅ 排名第二,说明高 C/N 下 SND 反应更彻底,更有利于相关微生物活动.此外还可以看出,除了 R₀ 以外,3 个系统 COD 去除速率随着 C/N 的升高而逐渐增加,原因在于:低 C/N 条件下,硝化菌等好氧自养微生物处于优势地位,抑制了好氧异养微生物的活动,随着 C/N 升高,异养微生物逐渐削弱自养微生物从而占据主导地位,因此 COD 去除速率上升^[16].

表 2 实际反应中的运行条件及结果
Table 2 Operating conditions and results of actual reactions

反应器	起始含量(mg/L)		曝气结束含量(mg/L)		去除率(%)		去除速率[mg/(L·h)]	
	COD	NH ₄ ⁺ -N	COD	NH ₄ ⁺ -N	COD	NH ₄ ⁺ -N	COD	NH ₄ ⁺ -N
R ₀	—	19.0±2.6	—	1.1±0.6	—	94.6±2.8	—	4.0
R ₅	266.1±19.0	56.3±4.2	28.0±6.8	1.2±1.1	89.5±2.2	97.8±2.0	47.6	11.0
R ₁₀	256.3±18.3	26.6±2.4	25.3±5.5	0.9±0.7	90.2±1.9	96.9±2.5	51.3	5.7
R ₁₅	259.2±15.9	20.0±2.2	25.1±4.9	0.7±0.6	90.3±1.9	96.4±3.0	66.9	5.5

表 3 反应前后各类氮含量及去除率
Table 3 Various nitrogen content and their removal efficiency before and after the reaction

反应器	起始含量(mg/L)				曝气结束含量(mg/L)				TN 去除率(%)	TN 去除速率 [mg/(L·h)]
	NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	TN	NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	TN		
R ₀	19.0±2.6	0.7±0.5	20.0±5.1	39.8±5.4	1.1±0.6	0.1±0.2	35.3±6.1	36.5±6.0	8.3±5.2	0.73
R ₅	56.3±4.2	0.5±0.7	5.9±4.2	62.7±6.1	1.2±1.1	0.2±0.5	45.1±5.2	46.4±5.3	25.7±8.3	3.26
R ₁₀	26.6±2.4	0.2±0.2	0.9±2.7	27.7±3.7	0.9±0.7	0.1±0.2	21.6±1.9	22.6±2.0	17.8±10.1	1.13
R ₁₅	20.0±2.2	0.1±0.2	0.7±1.6	20.7±3.0	0.7±0.6	0.2±0.4	11.1±1.9	11.9±2.1	42.0±9.6	2.51

2.2 C/N 对 SBR 系统微生物多样性的影响

2.2.1 C/N 对微生物 α 多样性的影响 为了解 C/N 对 SBR 硝化过程微生物群落多样性和丰富度的影响,对各组平行样的测序结果取平均值,如表 4 所示.其中各样品测序序列数范围介于 30000~35000,得到可操作单元(OTU)数(R₀、R₅、R₁₀、R₁₅)分别为 1513、1023、1410、1139.从门到属的物种分类可以看出,微生物种类 R₁₀ 最多,R₀、R₁₅ 次之,R₅ 最少.此外,Chao1 指数^[17]和 ACE 指数^[18]可反映微生物群落中

物种的丰富度,而 Shannon 指数和 Simpson 指数可反映微生物种群的均匀度.从表 3 可看出,4 个指数在 R₀ 均具有最大值,表明 R₀ 中物种的丰富度和均匀度都最高.由于 R₅ 中 Chao1 指数(624)和 ACE 指数(836.6)最低,因此 R₅ 群落中物种的丰富度最低,而 R₁₅ 的 Shannon 指数(4.59)和 Simpson 指数(0.82)最低,表明 R₁₅ 微生物种群均匀度最低.

稀疏曲线可清楚地反映样品所包含的微生物多样性特征,曲线越平缓,说明继续增加测序深度已较难

检测到大量的尚未发现的新 OTU.Chao1 指数稀疏曲线(图 1a)趋于平坦,Shannon 指数稀疏曲线(图 1b)平坦,表明测序深度已足够.而丰度等级曲线(图 1c)斜率较大,表明样品中优势菌种的丰度差异较大,且折线在横轴上的长度反映了样品的 OTU 数,因此,R₀ 的 OTU 数最多,R₅ 最少,该结果与表 3 反映的情况吻合.

表 4 四种 C/N 条件下活性污泥中微生物的 16S rRNA 序列、丰富度及多样性

Table 4 The 16S rRNA sequences, richness and diversity of microbial community in the activated sludge sampled from the four C/N ratios SBRs

反应器	序列数	OTU 数量	门	纲	目	科	属	种	Chao1	ACE	Shannon	Simpson
R ₀	35289	1513	23	51	97	138	199	209	922	1232.4	6.76	0.96
R ₅	33073	1023	19	43	72	96	133	137	624	836.6	4.69	0.82
R ₁₀	32501	1410	28	66	116	154	208	217	844	1155.0	6.07	0.94
R ₁₅	30617	1139	28	63	106	141	180	185	650	842.2	4.59	0.82

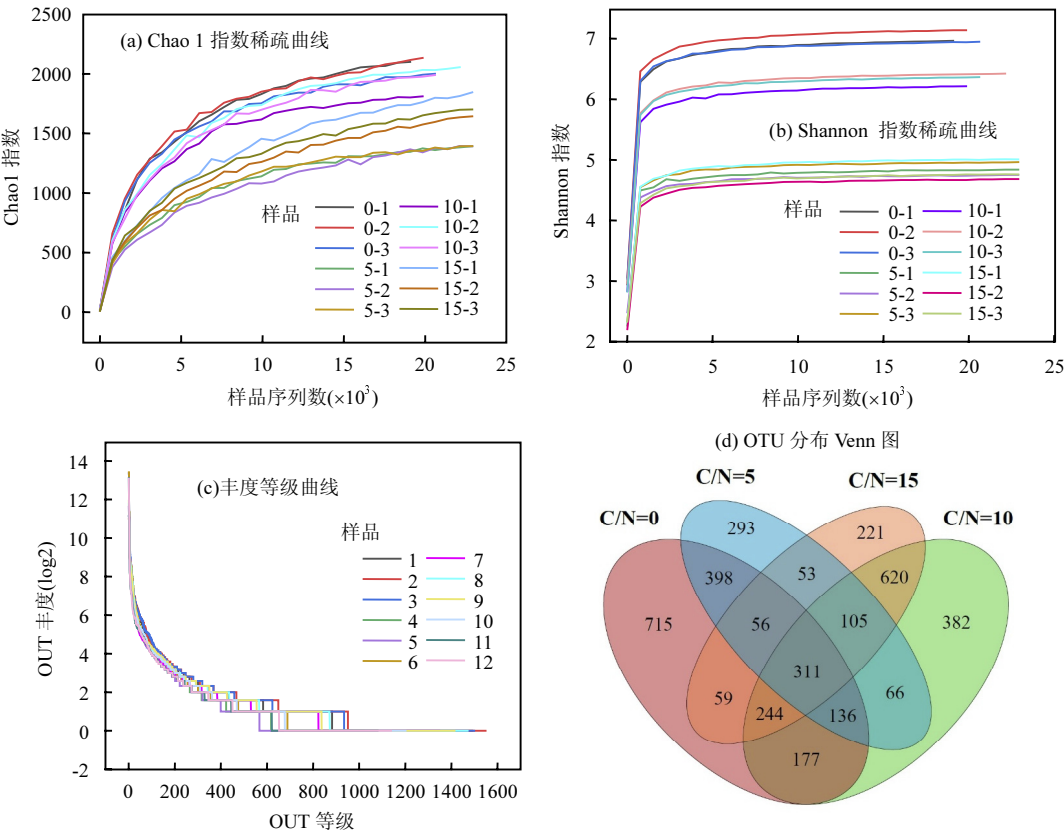


图 1 各污泥样品的 Chao1 指数稀疏曲线、Shannon 指数稀疏曲线、丰度等级曲线及 OTU 分布 Venn 图

Fig.1 Sparse curve of Chao1 index, Sparse curve of Shannon index, Curve of abundance grade and OTU distribution Venn diagram of sludge samples

从 Venn 图(图 1d)可以看出,C/N 对微生物种群特有和共有 OTU 数具有显著的影响.随着 C/N 的增加,SBR 内特有的 OTU 数量表现为先下降后略微上升的趋势(715→293→221→382).对于系统两两共有的 OTU 数量,R₁₀ 和 R₁₅ 共有 OTU 数最多,为 620 条,R₅ 和 R₁₅ 共有 OTU 数最少,仅为 53 条.

2.2.2 C/N 对微生物 β 多样性的影响 微生物 β 多

样性分析主要是考察样品之间群落结构相似性和差异性.可以采用非度量多维尺度分析(NMDS)方法对样品组内和组间差异进行分析,并可基于 UniFrac 距离尺度评价样品之间的相似度.Unifrac 是基于不同样品之间微生物的系统进化及丰度信息,从而获得样品之间差异性的距离矩阵,可分为 Unweighted 和 Weighted 两种距离表示方法,前者仅仅考虑 OTU

在样品中存在与否,不考虑其丰度高^[19];后者则兼顾群落成员之间的系统发育关系以及它们在各自样品中的丰度高^[17].

图 2 为 4 个 C/N 条件下微生物种群结构的 Unweighted UniFrac NMDS 和 Weighted UniFrac NMDS 样品二维排序图.由图 2 可知,两点之间的距离越近,表明两个样品之间的微生物群落结构相似度越高,差异性越小.

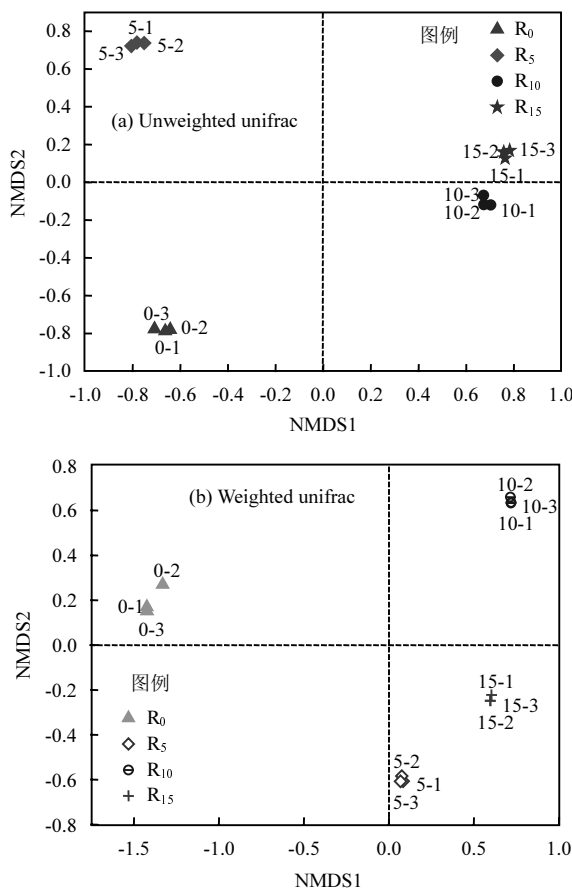


图 2 样品基于 NMDS 分析的 Unweighted unifrac 和 Weighted unifrac 二维排序

Fig.2 The Unweighted unifrac and Weighted unifrac 2d collation diagrams of the samples based on NMDS analyses

Unweighted UniFrac 和 Weighted UniFrac 二维排序图反映样品组间差异性的趋势是相同的,4 个系统活性污泥样品组间距离较大,说明不同 C/N 条件下微生物群落结构差异性较大.此外,图 2(a)中, R_{10} 和 R_{15} 样品间距离较近,说明 R_{10} 和 R_{15} 的 OTU 组成较为相似;图 2(b)中, R_5 和 R_{15} 样品间距离较近,说明 R_5 和 R_{15} 的微生物群落成员系统发育关系及丰度高低较为接近.而观察组内差异性和相似性,各平行样之

间距离较小,反映了组内物种相似度较高,群落结构差异性较小.

2.3 C/N 对 SBR 系统微生物群落组成影响

2.3.1 门分类水平的微生物群落分布特征 图 3 为门分类水平细菌群落结构及分布,可以看出,4 个系统活性污泥样品中微生物群落在门分类水平上多样性丰富,达到 35 个门,其中共有且丰度较高的门类包括:变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、浮霉状菌门(Planctomycetes)、绿菌门(Chlorobi)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)等,相对丰度总和约占总微生物门水平的 95.4%.4 个系统共有的菌门除了前述 9 个丰度最高的门类,还有酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、OD1、Armatimonadetes、Chlamydiae,其相对丰度均很低(<2.0%).

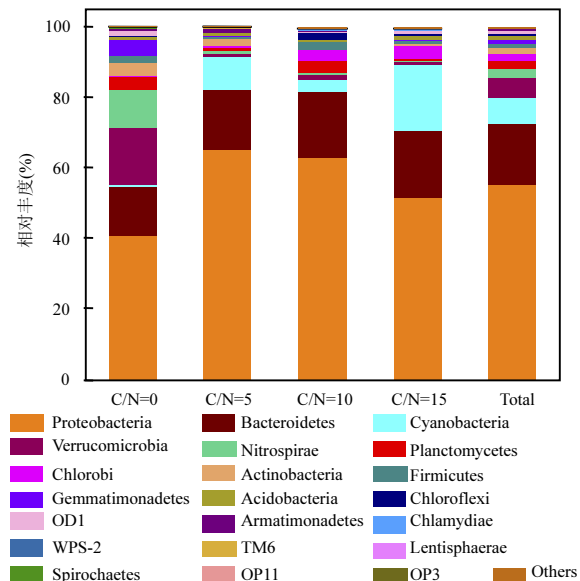


图 3 门分类水平细菌群落结构及分布

Fig.3 Microbial communities and distribution at the phylum level

4 个系统中,变形菌门(Proteobacteria)丰度均最高,其中 R_5 丰度最高(65.2%),而 R_0 丰度最低(40.7%).相关研究报道,城市污水活性污泥系统中,变形菌门是最主要的功能菌群,相对丰度约占 27.5%~65%^[18-19].各系统中拟杆菌门(Bacteroidetes)的相对丰度(14%~19.3%)均仅次于变形菌门,且随着 C/N 升高,拟杆菌门丰度也逐渐升高,平均达到 17.4%.其它

相对丰度随 C/N 升高而升高的门类还有绿菌门 (Chlorobi), 丰度随 C/N 升高而降低的有放线菌门 (Actinobacteria)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 等。

此外, C/N 对疣微菌门 (Verrucomicrobia)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae) 和芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 的丰度也存在一定程度的影响, 它们在 R_0 中相对丰度分别达到 16.3%、10.7% 和 4.4%, 而在其它 3 个样品中, 丰度均分别低于 1.8%、0.3% 和 0.1%。可以看出, 参与硝化反应的主要门类硝化螺旋菌门在 R_0 中的相对丰度明显高于其它 3 个系统, 说明自养型的硝化菌在缺少外加碳源的条件下更具有竞争力, 而添加碳源的系统中硝化菌相对丰度显著下降。另外, 一些丰度较低的特有菌门仅出现在特定系统中, 如 WPS-2 仅出现在 R_0 中, OP11、OP3、软皮菌类 (Tenericutes) 仅出现在 R_{10} 中, 黏胶球形菌门 (Lentisphaerae)、Elusimicrobi 仅出现在 R_{15} 中。

2.3.2 属水平的微生物群落分布特征 基于微生物属水平物种组成及丰度, 对 4 个 C/N 活性污泥样品丰度前 50 的菌属进行聚类分析, 绘制聚类热图 (图 4)。不同菌属在各样品中的相对丰度大小用小方格的颜色表示, 丰度越大颜色越深 (红色为上调, 蓝色为下调)。

从列聚类可以看出样品组间的相似性。同一系统的污泥样品之间相关性最高。 R_0 与 R_5 关系较近, 而 R_{10} 和 R_{15} 关系较紧密。分析原因, 不同 C/N 为微生物提供了不同的生长环境, 进而筛选出适宜该环境的微生物类群, 因此较低和较高 C/N 下菌群差异性较为明显。

从行聚类上看各系统的特有菌群。50 大菌群可划分为两大分支, 进而分为 4 大区域, 对应 4 个 C/N。其中 *Nitrospira* (硝化螺菌属) 到 *Rhabdochlamydia* (棍衣原体属) 为 C/N=0 的特有菌属; *Zoogloea* (动胶菌属) 到 *Nostocoida* 为 C/N=5 的特有菌属; *Dechloromonas* 到 *Carnobacterium* (肉食杆菌属) 为 C/N=10 的特有菌属; *Sulfuritalea* 到 *Limnohabitans* 为 C/N=15 的特有菌属。从聚类关系上能看到丰度最高的动胶菌属 (*Zoogloea*) 与其它菌属关系较远, 其在 R_0 中丰度很低, 在 R_5 和 R_{15} 中丰度最高, 可见低 C/N 不利于动胶菌属生长。动胶菌属是污水处理中常见的兼性好氧细菌, 对氨氮、亚硝氮及硝氮等都有一定去除效果^[20]。硝化螺菌属 (*Nitrospira*) 是在硝化过程中主要负责亚硝酸盐氧化的菌群^[21-23], 其在 R_0 中丰度明显高于其它 3 个系统。表 3 中可看到, 反应前, R_0 所含亚硝态氮

最多, 反应后, 各系统亚硝态氮均趋于零, 因此硝化螺菌属的丰度分布与反应条件及结果较吻合。

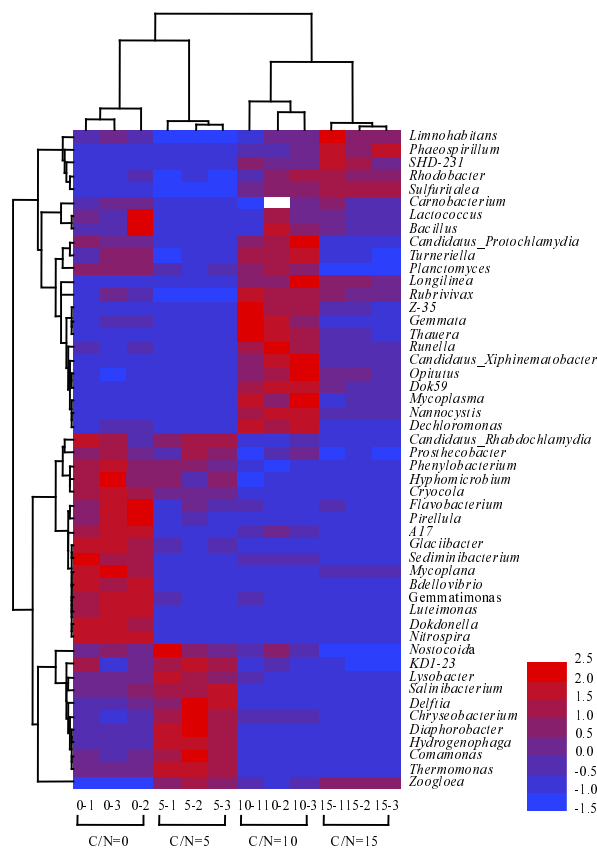


图 4 属分类水平热图

Fig.4 Heat-map of the top 50 classified genera

4 个 SBR 系统活性污泥样品中属水平的微生物种类相当丰富, 共有 318 个。其中动胶菌属 (*Zoogloea*, 30.8%), *MLE1-12* (7.9%), 丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae, 5.8%), Chitinophagaceae (5.2%), 腐螺旋菌科 (Saprospiraceae, 4.6%) 等相对丰度大于 1.0% 的菌群达 15 属, 构成了污泥样品在属水平上的主要群落组成。亚硝化单胞菌科 (Nitrosomonadaceae) 能将水中的氨氮氧化为亚硝态氮, 它和硝化螺菌属 (*Nitrospira*) 共同完成污水中氨氮的全程硝化, 是硝化过程的关键细菌之一。其在系统中的相对丰度随 C/N 升高呈下降趋势 (该趋势近似同各系统进水氨氮含量), 且 R_0 中的相对丰度远高于其它 3 个系统, 但由于整体的相对丰度较低而未能在热图上体现。 R_0 中丰度升高显著的原因在于硝化细菌是自养菌, 它们在缺乏碳源的情况下成为优势菌种, 而在碳源充足时逐渐被异养菌占据主导地位。

从系统菌群丰富度来说, 对于总平均相对丰度大于 1% 的 15 个菌属, R_0 和 R_{10} 全部包含, 而 R_{15} 缺少

Cryocola 菌属, R_5 则缺少腐螺旋菌科(Saprospiraceae)、丰祐菌科(Opitutaceae)、*Dechloromonas* 和陶厄氏菌属(*Thauera*)共 4 类,其中 *Dechloromonas* 菌的功能为好氧反硝化^[24]与氨氧化^[25],陶厄氏菌属(*Thauera*)中某些细菌具有高效反硝化能力,也是污水处理中重要的脱氮菌^[26]。从热图上看,上述两种菌属在 R_{10} 中热度最高,其次是 R_{15} ,而 R_5 中最低,其中 R_{15} 的总氮去除率最高,推测跟这些菌属的活动有关。可以看出 R_5 物种丰富度较低。 R_0 中相比其它系统有明显丰度优势的菌群有丰祐菌科(Opitutaceae)、硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)、*Cytophagaceae*、*Cryocola* 等; R_{10} 中具有明显优势的菌群有腐螺旋菌科(Saprospiraceae)、*Dechloromonas*、陶厄氏菌属(*Thauera*)、*ASSO-13* 等; R_{15} 中较有优势的则有 *MLE1-12*、鞘脂杆菌目(*Sphingobacteriales*)。

2.4 不同 C/N 活性污泥样品组间显著性差异及微生物群落标记物

为了进一步探究不同 C/N 活性污泥系统中的微生物群落标记物,基于 LEfSe(LDA Effect Size)分析方法,对样品组间菌群丰度差异特征进行分析。LEfSe 线性判别分析值(LDA score)设定为 3.5。图 5b 为微生物各分类水平上的分类等级树,分类等级树

可以表现微生物群落从门到属分类单元的等级关系(由内圈到外圈),节点大小表示分类单元的丰度高,黄色节点代表组间无显著差异的分类单元,其它颜色的节点表示该分类单元在对应样品中丰度较高且组间具有显著差异。

基于 LEfSe 分析,总共可以得到 34 个具有显著差异的微生物分类单元,即得到 4 组 SBR 在微生物学分类水平上的菌群关键生物标记物。结果表明, R_0 菌群关键生物标记物共有 14 个,包括疣微菌门(Verrucomicrobia)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、硝化螺旋菌(门到属)、丰祐菌(纲到科)等; R_5 菌群关键生物标记物共有 5 个,包括变形菌门(Proteobacteria)、 β -变形菌纲(Betaproteobacteria)、伯克霍尔德氏菌目(Burkholderiales)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)等; R_{10} 菌群关键生物标记物共有 7 个,包括腐螺旋菌(纲到科)、 α -变形杆菌纲(Alphaproteobacteria)、脱氯单胞菌属(*Dechloromonas*)、陶厄氏菌属(*Thauera*)等; R_{15} 菌群关键生物标记物共有 8 个,包括拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿菌门(Chlorobi)、蓝藻细菌(门到目)、鞘脂杆菌纲(Sphingobacteriia)等。这些关键菌属与热图中的分布基本一致。

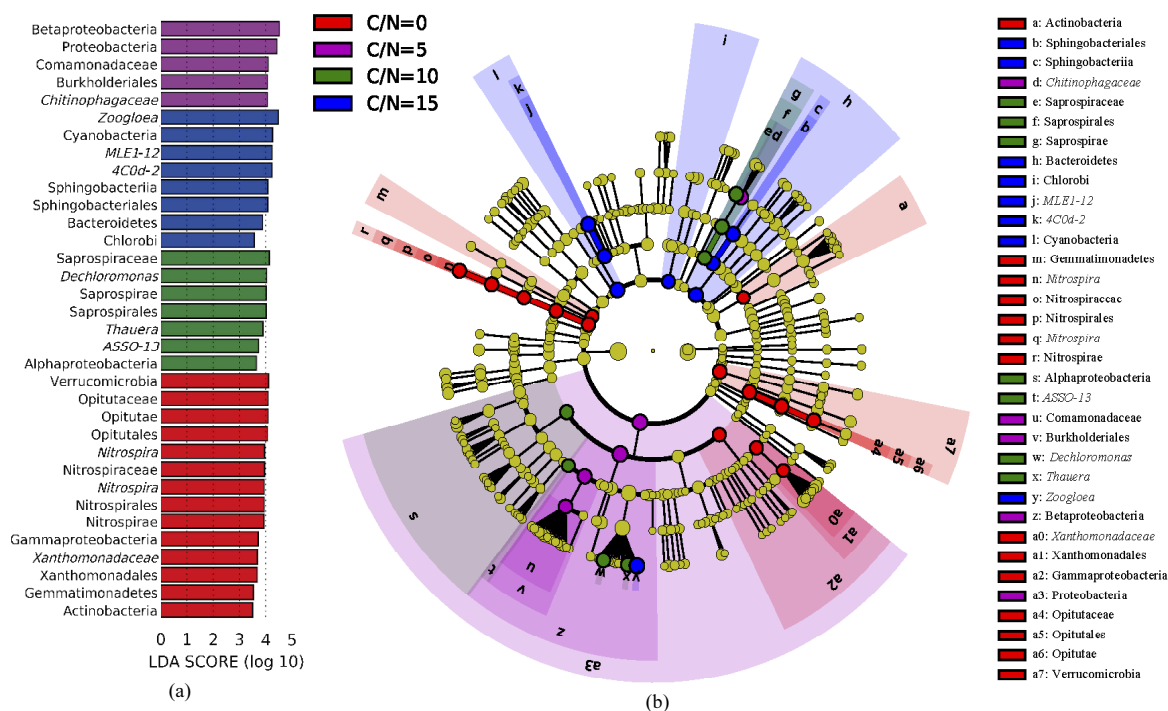


图 5 4 个活性污泥样品基于 LEfSe 组间差异分析结果(LDA 值设为 3.5)的 LDA 评分(a)和 5 级分类等级树(b)

Fig.5 LDA score identifying the size differentiation among the four activated sludge samples with a threshold score of 3.5 (a) and five-level cladogram of microbial communities of LEfSe (b)

此外,通过分析可知,各分类水平上的微生物标记物 35.3%属于变形菌门,4个系统样品中,变形菌门(Proteobacteria)出现在所有系统中;硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)只在 R_0 中出现; R_5 和 R_{10} 类似,只有变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes),说明这两组样品微生物种类分布较均匀,无明显标记物;而蓝菌门(Cyanobacteria)和绿菌门(Chlorobi)仅出现在 R_{15} 中,说明高 C/N 有利于它们的生长.此外,在丰度较高的几个门类中,浮霉状菌门(Planctomycetes)、厚壁菌门(Firmicutes)未能体现,可认为它们的组间差异性不明显.

3 结论

3.1 试验仅进行曝气硝化过程,各系统氨氮去除率均达 95%以上,COD 去除率均在 90%左右,且各系统总氮均得到部分去除,其中 R_{15} 的总氮去除率最高,达 42%, R_0 总氮去除率最低,为 8.3%.去除速率上看, R_5 的氨氮及总氮去除速率均为各系统最高.

3.2 从 α 多样性指数来看, R_0 物种多样性最高, R_5 物种丰富度最低, R_{15} 种群均匀度最低.

3.3 各系统中丰度最高的门类均为变形菌门(Proteobacteria,40.7%~65.2%),从各门类相对丰度与 C/N 的关系来说,拟杆菌门、绿菌门相对丰度随 C/N 升高而升高,而相对丰度随 C/N 升高而降低的有放线菌门、芽单胞菌门等.此外,参与硝化作用的硝化螺旋菌门在 R_0 中相对丰度最大(10.7%),在其他系统中相对丰度均低于 0.3%,说明外加碳源会促进异养微生物的生长从而抑制自养型硝化菌的生长.

3.4 在微生物属水平上,4个系统中动胶菌属(Zoogloe)的丰度(14.2%~43.0%)均最高,且在 R_5 中热度最高.硝化反应的关键菌属硝化螺旋菌属(Nitrospira)和亚硝化单胞菌科(Nitrosomonadaceae)在 R_0 中丰度最大,分别为 10.67%和 3.37%,且二者相对丰度随着 C/N 增加均呈现出下降的趋势.从热图中也反映出硝化螺旋菌属(Nitrospira)在 R_0 中热度最高,而其它脱氮相关细菌 Dechloromonas 菌与陶厄氏菌属(Thauera)在 R_{10} 中热度最高.

3.5 基于 LEfSe 分析得知,变形菌门(Proteobacteria)在各系统中组间差异均较大,硝化螺旋菌(门到属)为 R_0 的关键生物标记物,且硝化螺旋菌门仅在 R_0 中体

现出较大组间差异,这源于其在 R_0 中相对丰度较高,并与其它系统差距明显. R_{15} 中蓝菌门和绿菌门组间差异明显,丰度高于其它系统,说明高 C/N 有利于它们生长.

参考文献:

- [1] Wang B, Peng Y Z, Guo Y Y, et al. Impact of partial nitrification degree and C/N ratio on simultaneous Sludge Fermentation, Denitrification and Anammox process [J]. Bioresource Technology, 2016,219:411-419.
- [2] 魏旖旎,何志仙,袁林江.进水碳氮比对脱氮污泥羟胺氧化酶活性及 N_2O 产生的影响 [J]. 中国环境科学, 2016,36(5):1417-1425.
Wei Y N, He Z X, Yuan L J. Effect of carbon to nitrogen ratios of influent on the activity of hydroxylamine oxidase of the sludge and the produce/emission of nitrous oxide [J]. China Environmental Science, 2016,36(5):1417-1425.
- [3] 严迎燕.短程同步硝化反硝化过程的 N_2O 释放特性及其微生物群落特征研究 [D]. 广州:华南理工大学, 2014.
Yan Y Y. Study on the N_2O emission characteristics and microbial community succession during the shortcut simultaneous nitrification and denitrification process [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.
- [4] 陈静雯.短程硝化反硝化生物滤池脱氮效果研究 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2017.
Chen J W. Study on nitrogen removal in partial nitrification denitrification biological filters [D]. Harbin:Harbin Institute of Technology, 2017.
- [5] Jia L X, Wang R G, Feng L K, et al. Intensified nitrogen removal in intermittently-aerated vertical flow constructed wetlands with agricultural biomass: Effect of influent C/N ratios [J]. Chemical Engineering Journal, 2018,345:22-30.
- [6] Sheng S X, Liu B, Hou X Y, et al. Effects of different carbon sources and C/N ratios on the simultaneous anammox and denitrification process [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018,127: 26-34.
- [7] Zhu H, Yan B X, Xu Y Y, et al. Removal of nitrogen and COD in horizontal subsurface flow constructed wetlands under different influent C/N ratios [J]. Ecological Engineering, 2014,63:58-63.
- [8] 胡杰,李大平,陶勇,等.不同 C/N 值下亚硝酸盐氧化菌和异养菌混合体系的微生物多样性(英文) [J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(3):351-355.
Hu J, Li D P, Tao Y, et al. Microbial diversity of nitrite-oxidizing and heterotrophic bacterial communities under different C/N ratios [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2009,15(3): 351-355.
- [9] 姬洪飞,王颖.分子生物学方法在环境微生物生态学中的应用研究进展 [J]. 生态学报, 2016,36(24):8234-8243.
Ji H F, Wang Y. Advances in molecular approach applications in microbial ecology studies [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016,36(24): 8234-8243.
- [10] 王新珍,王凤花,孙瑞波,等.高通量测序技术在微生物分子生态学中的应用 [J]. 中国生态农业学报, 2018,26(10):1593-1600.

- Wang X Z, Wang F H, Sun R B, et al. Application of high-throughput DNA sequencing in microbial ecology [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2018,26(10):1593-1600.
- [11] 赵诗惠,吕 亮,蒋志云,等.ABR-MBR 组合工艺短程硝化过程的微生物种群 [J]. 中国环境科学, 2018,38(2):566-573.
- Zhao S H, Lv L, Jiang Z Y, et al. Analysis of microbial population of shortcut nitrification in ABR-MBR process [J]. China Environmental Science, 2018,38(2):566-573.
- [12] 张铃敏,常青龙,史 勤,等.CANON 工艺短程硝化恢复调控及微生物种群结构变化 [J]. 中国环境科学, 2019,39(6):2354-2360.
- Zhang L M, Chang Q L, Shi Q, et al. The recovery regulation of a CANON system and variations in the microbial community [J]. China Environmental Science, 2019,39(6):2354-2360.
- [13] Zielinska M, Bernat K, Cydzik-Kwiatkowska A, et al. Nitrogen removal from wastewater and bacterial diversity in activated sludge at different COD/N ratios and dissolved oxygen concentrations [J]. Journal of Environmental Sciences, 2012,24(6):990-998.
- [14] 郭 英.SBR 生物脱氮过程进水 C/N 及 FA 对微生物硝化特性影响试验研究 [D]. 兰州:兰州交通大学, 2013.
- Guo Y. Study on the effect of influent C/N and FA on the nitrification characteristic of microbial populations in the biological nitrogen removal of sequencing batch reactor [D]. Lanzhou: Lanzhou Jiaotong University, 2013.
- [15] 王 翠,章北平,杨高华,等.碳氮比对 A-O-N 工艺脱氮效果的影响 [J]. 工业用水与废水, 2008,(4):32-35.
- Wang C, Zhang B P, Yang G H, et al. Influence of C/N ratio on nitrogen removal by A-O-N process [J]. Industrial Water & Wastewater, 2008,(4):32-35.
- [16] 王序驰.不同 C/N 及盐度对 Atmosphere-Exposed Biofilm 系统污染物处理特性的影响研究 [D]. 延吉:延边大学, 2017.
- Wang X C. Study on the pollutants treatment characteristics at different C/N and salinity in atmosphere-exposed biofilm [D]. Yanji: Yanbian University, 2017.
- [17] A L C, Micah H, T K S, et al. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007,73(5):1576-1585.
- [18] Zhang T, Shao M F, Ye L. 454pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14sewage treatment plants [J]. The ISME Journal, 2011,6(6):1137-1147.
- [19] Fang D X, Zhao G, Xu X Y, et al. Microbial community structures and functions of wastewater treatment systems in plateau and cold regions [J]. Bioresource technology, 2018,249:684-693.
- [20] 安卫星,高 娜,夏 明,等.动胶菌属系统分类、生理特征及其在活性污泥中的作用 [J]. 应用与环境生物学报, 2016,22(6):1167-1174.
- An W X, Gao N, Xia M, et al. Physiological characteristics and systematic classification of the Zoogloea species and their role in the activated sludge [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2016,22(6):1167-1174.
- [21] Norisuke U, Hirotsugu F, Yoshiteru A, et al. Isolation of *Nitrospira* belonging to Sublineage II from a wastewater treatment plant [J]. Microbes and environments / JSME, 2013,28(3):346-353.
- [22] Gilbert E M, Agrawal S, Brunner F, et al. Response of different nitrospira species to anoxic periods depends on operational do [J]. Environmental science & technology, 2014,48(5):2934-2941.
- [23] Chiellini C, Munz G, Petroni G, et al. Characterization and comparison of bacterial communities selected in conventional activated sludge and membrane bioreactor pilot plants: A focus on *Nitrospira* and Planctomycetes Bacterial Phyla [J]. Current Microbiology, 2013,67(1): 77-90.
- [24] 王 硕,徐 巧,张光生,等.完全混合式曝气系统运行特性及微生物群落结构解析 [J]. 环境科学, 2017,38(2):665-671.
- Wang S, Xu Q, Zhang G S, et al. Operational performance and microbial community structure in a completely mixed aeration system [J]. Environmental Science, 2017,38(2):665-671.
- [25] 郑林雪,李 军,胡家玮,等.同步硝化反硝化系统中反硝化细菌多样性研究 [J]. 中国环境科学, 2015,35(1):116-121.
- Zheng L X, Li J, Hu J W, et al. Analysis of denitrifying bacteria community composition in simultaneous nitrification and denitrification systems [J]. China Environmental Science, 2015,35(1): 116-121.
- [26] 毛跃进.废水处理系统中重要功能类群 *Thauera* 属种群结构与功能的研究 [D]. 上海:上海交通大学, 2009.
- Mao Y J. Structural and functional analysis of *Thauera* Genus in wastewater treatment plants [D]. Shanghai:Shanghai Jiao Tong University, 2009.

作者简介: 宁高阳(1994-),男,湖南衡阳人,兰州交通大学硕士研究生,主要从事高氨氮废水生物脱氮相关研究。