



文章栏目：水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.201904197

中图分类号 X703

文献标识码 A

王淑雅, 刘灵婕, 王芬, 等. 低温等离子体技术改性填料前后 Anammox 工艺运行及微生物群落变化[J]. 环境工程学报, 2020, 14(2): 285-294.

WANG Shuya, LIU Lingjie, WANG Fen, et al. Variation of operating and microbial community of Anammox process with conventional and modified filler by low temperature plasma technology[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(2): 285-294.

低温等离子体技术改性填料前后 Anammox 工艺运行及微生物群落变化

王淑雅, 刘灵婕, 王芬*, 季民

天津大学环境科学与工程学院, 天津 300350

第一作者: 王淑雅(1993—), 女, 硕士研究生。研究方向: 污水自养脱氮。E-mail: 565329699@qq.com

*通信作者: 王芬(1979—), 女, 博士, 副教授。研究方向: 污水生物处理技术。E-mail: wangfen@tju.edu.cn

摘要 采用低温等离子体技术对普通聚氨酯泡沫塑料填料进行表面改性处理, 研究了改性前后填料的表面特征、厌氧氨氧化生物膜量、脱氮性能、微生物群落结构及其功能微生物基因丰度的变化。结果表明: 低温等离子体改性以后填料表面与蒸馏水的静态接触角减少 33.27°, 单点比表面积和吸附平均孔径分别由 8.98 m²·g⁻¹ 和 3.01 nm 提高至 9.66 m²·g⁻¹ 和 4.98 nm, 材料表面粗糙度增加, 亲水性能明显改善; 未改性单位质量填料生物膜干质量为 0.18 g, 改性后单位质量填料生物膜干质量为 0.37 g, 相同时间内单位质量填料上的生物膜量相比于填料改性前提高了 53%; 填料改性前后系统总氮去除率均在 80% 以上。高通量测序结果显示, 2 系统菌群结构相似, 主要功能菌属是 *Candidatus Kuenenia*, 改性填料相比于未改性填料其微生物种类丰富程度更高。实时荧光定量 PCR(qPCR) 结果显示, 改性后 *hzo* 基因相对丰度由 59.50% 增至 73.50%, 提高了 14%, *nxrB* 基因相对丰度由 21.10% 减至 17.70%, 降低了 3%。由此可见, 填料经改性后表面生物膜量增加, 生物膜上功能微生物种类丰富性也有所增加, 但在较低氮基质负荷条件下脱氮效率基本不变。

关键词 厌氧氨氧化; 低温等离子体改性; 高通量测序; 实时荧光定量 PCR 技术

废水生物脱氮是水环境治理中一个重要的方向^[1]。近年来, 工艺流程短、能耗低、污泥产量少的新型生物自养脱氮工艺——厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, Anammox)已成为这个方向的研究热点。

厌氧氨氧化菌(anaerobic ammonium oxidation bacteria, AnAOB)由于世代周期长、对环境条件要求较高, 导致厌氧氨氧化工艺启动时间较长。选择和控制在 AnAOB 生长的条件, 使反应器快速启动和稳定运行是目前 Anammox 应用于实际污水处理中亟待解决的难题^[2]。Anammox 生物膜工艺在一定程度上可以避免微生物的流失, 并持留足够的生物量^[3], 是常用的 Anammox 工艺类型。Anammox 生物膜反应器高效运行的前提是 AnAOB 能附着于填料表面, 形成有活性的生物膜, 因此, 填料性能对 Anammox 生物膜反应器的快速启动与稳定运行有重要的影响。

收稿日期: 2019-04-29; 录用日期: 2019-07-09

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07106)

现阶段对于生物膜填料的研究主要针对不同工艺类型的填料,如流化床中的聚乙烯填料^[4],固定床中的海绵^[5]、木质碳^[5]、火山岩^[5-6]、陶粒^[6]等,膜生物反应器中的无纺布^[7]以及混合填料^[8]等;对于生物填料的改性多采用具有强氧化性的无机或有机试剂,通过化学氧化改变材料表面分子结构,或在惰性填料表面引入羧基、羰基、磺酸基等极性基团,改善材料亲水性;改性过程中须使用大量化学药剂,如硫酸、硝酸等强氧化性酸,高锰酸钾、重铬酸钾等易制毒强氧化剂及氯磺酸、甲基磺酸等有机溶剂,易对环境造成严重污染^[9]。曾涛涛^[6]分别以火山岩和陶粒为填料,研究2种填料对Anammox生物滤柱的脱氮效果的影响,发现火山岩填料的总氮去除率相比于陶粒提高20%,其表面富集的AnAOB相对丰度提高25%,菌群多样性更高;刘杰等^[10]曾采用添加生物酶促进剂配方的新型高分子改性填料BMTM研究了其对上流式填料床生物膜反应器Anammox工艺启动的影响,发现添加改性填料BMTM后,反应器启动时间可以缩短57d。而低温等离子体技术是对材料进行干式处理的表面处理技术^[11],与传统的湿法处理不同,它无须添加化学药剂,对环境无二次污染,且处理高效,效果较好。目前低温等离子体技术主要应用于高分子材料、生物功能材料和无机填料性能的优化,以及废气、废水中各类污染物的净化处理和杀菌等方面^[12]。陈冰等^[13]采用低温等离子体处理苯二甲酸乙二醇酯(PET)高分子材料薄膜表面后,发现材料表面C=O和C=C双键数量增加,酯基减少,亲水性明显改善;田冶等^[14]利用低温等离子体技术成功在壳聚糖膜表面接枝了N-乙烯基吡咯酮,使其接触角变小、粗糙度增加,进而导致材料表面细胞亲和性提高;侯建等^[15]在处理H₂S和CS₂等废气问题时,发现使用低温等离子体技术对H₂S和CS₂的去除率可分别达到90%和70%。

由于低温等离子体改性技术无须添加化学药剂,对环境无二次污染,且对高分子材料表面性能有较好的改性效果,故本研究采用低温等离子体技术对聚氨酯填料进行了改性,对比了改性前后填料表面特性、Anammox工艺生物膜量、长期运行脱氮效果,并结合MiSeq高通量测序技术和实时荧光定量PCR(qPCR)技术对改性前后Anammox生物膜系统的微生物群落结构特征和功能基因相对丰度的变化进行了分析,为低温等离子体技术应用于Anammox生物膜工艺提供参考。

1 材料与方法

1.1 填料

未改性填料为网状聚氨酯泡沫塑料(江苏艾勤环保科技有限公司)填料,其主要性能指标为:孔隙率97.3%,丝径0.98 mm,堆密度27 kg·m⁻³,将其剪切为1.0 cm×1.0 cm×1.0 cm正方体块,备用。

改性填料为未改性填料经低温等离子体技术表面处理后的填料,等离子体表面改性装置采用德国Plasma Technology GmbH公司研发的MiniFlecto®科研用小型真空等离子清洗机。低温等离子体表面处理样品时,选用氧气作为产生等离子体的气体分子,工作功率300 W,气体流量为标况(0℃,101.33 kPa)下6 cm³·min⁻¹,真空度20 Pa,处理时间2 min^[16]。

1.2 改性前后填料性能表征

测试前,采用热压成型工艺对填料进行预处理,将其热压成膜,处理后的膜样使用JCL2000D静态接触角测量仪测试其表面的静态接触角(θ);测试液体为蒸馏水,用微量进样器将液滴缓慢滴于膜样表面,液滴与材料表面接触的瞬间采集图像,用五点拟合法计算接触角,并选择样品不同位置测量5次取平均值,测量误差控制在 $\pm 0.5^\circ$;接触角测试原理参考韩玉香等^[17]的研究;材料表面自由能在接触角测试的基础上依据Young方程^[18]计算得到。

改性前后填料的比表面积和孔径分布采用全自动比表面积和孔隙分析仪(3Flex surface characterization analyzer from micromeritics, USA)^[19],通过N₂吸脱附测试进行测定。在液氮温度77 K下,以He为载气,N₂为吸附气体,在相对压力 p/p_0 为0.01~1.00,测定吸附等温线,结合BET方

程计算比表面积；采用 BJH 法^[20] 计算孔容和孔径分布。

1.3 改性前后填料 Anammox 挂膜与脱氮性能实验

采用 2 套有效容积为 300 mL 的血清瓶作为 Anammox 生物膜小试实验装置。S1 反应器内装填未改性聚氨酯固定填料，S2 反应器内装填改性聚氨酯固定填料，填料填充比均为 12%。接种污泥为已稳定运行 1a 以上的 SBR 中试反应器中的 Anammox 颗粒污泥，接种污泥浓度为 2 000 mg·L⁻¹。

实验进水为人工配水，配水组成参考相关方法^[21]，主要包括：(NH₄)₂SO₄ 和 NaNO₂ 按需配制，KH₂PO₄ 30 mg·L⁻¹，MgSO₄·7H₂O 300 mg·L⁻¹，NaHCO₃ 500 mg·L⁻¹，CaCl₂·2H₂O 150 mg·L⁻¹；微量元素 I (1 mL·L⁻¹)：乙二胺四乙酸二钠 (EDTA·2Na) 6.39 g·L⁻¹，FeSO₄·7H₂O 5 g·L⁻¹；微量元素 II (1 mL·L⁻¹)：EDTA·2Na 19.11 g·L⁻¹，H₃BO₃ 0.014 g·L⁻¹，ZnSO₄·7H₂O 0.43 g·L⁻¹，CoCl₂·6H₂O 0.24 g·L⁻¹，MnCl₂·4H₂O 0.99 g·L⁻¹，CuSO₄·5H₂O 0.25 g·L⁻¹，NiCl₂·6H₂O 0.19 g·L⁻¹，NaMoO₄·2H₂O 0.22 g·L⁻¹。进水前，对人工配水曝氮气 (N₂) 30 min，控制溶解氧 (DO) 小于 0.3 mg·L⁻¹，pH 为 7.8~8.0。

小试实验运行周期 24 h，进水 15 min，反应时间 23 h，静沉 30 min，排水 15 min，排水 90%。将血清瓶放置在恒温振荡摇床中进行实验，控制摇床转速为 150 r·min⁻¹，温度为 30 °C。前 10 d 为启动期，进水氮负荷为 100 mg·(L·d)⁻¹，其中氨氮 (NH₄⁺-N) 为 50 mg·L⁻¹ 和亚硝酸盐氮 (NO₂⁻-N) 为 50 mg·L⁻¹；10~70 d 进水氮负荷为 200 mg·(L·d)⁻¹，其中 NH₄⁺-N 100 mg·L⁻¹，NO₂⁻-N 100 mg·L⁻¹；70~120 d 进水氮负荷为 100 mg·(L·d)⁻¹，其中 NH₄⁺-N 50 mg·L⁻¹，NO₂⁻-N 50 mg·L⁻¹。

1.4 分析方法

常规指标均参照国家环境保护局发布的标准方法^[22] 测定。氨氮 (NH₄⁺-N)：纳氏试剂分光光度比色法；亚硝酸盐氮 (NO₂⁻-N)：N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法；硝酸盐氮 (NO₃⁻-N)：紫外分光光度法；总氮 (TN)：碱性过硫酸钾氧化紫外分光光度法；pH 采用 JENCO 便携式酸度计测定，DO 采用哈希便携式溶氧仪测定。

反应器稳定运行至第 45 天，取挂膜填料用无菌水冲洗，锡纸包裹放入 105 °C 烘箱中，恒温干燥，冷却后称质量，测定其干质量；再将干燥后的填料置于 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液中，70 °C 条件下水浴 1 h，40 Hz 超声波 (KQ-300DE 型数控超声波清洗器) 处理 1 h，水洗数遍至脱落生物膜被洗掉，填料放回称量瓶烘干、冷却，称剩余物质干质量、填料干质量。填料表面生物量^[23] 按式 (1) 计算。

$$q = \frac{(m_{TS} - m_{RS})}{m_{MS}} \quad (1)$$

式中： q 为 1 g 填料表面生物量，g； m_{TS} 为冷却后的干质量，g； m_{RS} 为剩余物后干质量，g； m_{MS} 为填料干质量，g。

稳定运行至第 70 天，取填料放于 50 mL 离心管，并取反应器出水上清液浸没，于小型自动离心机离心振荡 10 min，至生物膜完全脱落，泥水混合物在转速 3 000 r·min⁻¹ 下离心 3 min，弃去上清液，保留泥样提取 DNA，做高通量测序和 qPCR 检测。

DNA 的提取：采用土壤 DNA 提取试剂盒 (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA)，提取微生物基因组 DNA。

MiSeq 高通量测序：对所扩增的 16S rRNA 中的 V3~V4 区域，进行小片段基因文库的构建，并基于 Illumina HiSeq 测序平台对该文库进行双末端测序，经过读写拼接过滤，对所有样本的有效数据，以 97% 的一致性进行 OTUs (operational taxonomic units) 聚类，然后对 OTUs 的序列进行物种注释丰度分析；通过 α 多样性和 β 多样性分析揭示样本的物种组成和群落结构的差异。

2 结果与讨论

2.1 改性前后填料表面性能

改性前后聚氨酯泡沫塑料填料的静态接触角和 BET 比表面积测试结果表明，改性前填料的接

触角为 99.24° ，单点比表面积是 $8.98 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ，平均孔径集中在 3.01 nm ，经低温等离子体改性以后，接触角降为 65.97° ，填料的比表面积提高至 $9.66 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ，孔径分布集中于 4.98 nm 。依据 Young 方程计算改性前后样品表面自由能，分别由 $29.31 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ 升高到 $41.39 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ，比表面积增加 8%。根据低温等离子体技术处理的工作原理，在电磁场的作用下，且在一定的真空度中，氧气气体变稀薄，分子间距及分子或离子的自由运动距变长，氧气分子发生碰撞形成氧等离子体，氧等离子体在电磁场内空间运动，轰击被处理聚氨酯样品表面，引入含氧官能团 ($-\text{OH}$ 、 $-\text{OOH}$) [24]，产生表面刻蚀，生成表面自由基，这使得材料表面粗糙度增加，填料亲水性能得以改善，因此，接触角会显著降低，固体表面自由能增加，提高了聚氨酯填料的生物相容性，从而更有利于微生物附着于其表面生长。

2.2 改性前后填料应用于 Anammox 生物膜工艺启动和稳定运行

反应器运行至第 45 天时，取改性前后填料进行生物膜量的检测，其结果如图 1 所示。在稳定运行期间，未改性单位质量填料生物膜平均干质量为 0.18 g ，改性后填料的质量填料生物膜平均干质量为 0.37 g ，改性后，相同时间内单位质量填料上的生物膜量相比于改性前提高了 53%。这主要是因为采用低温等离子体技术表面处理后，填料表面粗糙度增加，提高了填料的亲水性，有利于细胞黏附生长，故加速生物膜的形成过程，加快了填料挂膜启动速度。同时，改性处理增加了填料比表面积，改性后填料表面生物膜量亦显著增加。

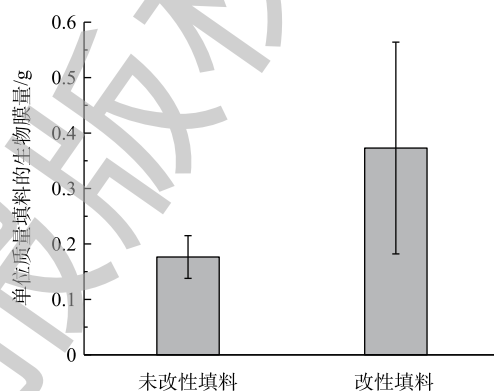


图 1 第 45 天改性前后填料表面生物膜量的变化

Fig. 1 Changes of biomass quantity on fillers before and after modification at 45 d

2.3 填料改性前后对 Anammox 工艺启动和稳定运行期间脱氮效果分析

未改性填料 S1 反应器和改性填料 S2 反应器同时接种 Anammox 种泥，进水 N 负荷为 $100 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ ， $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (如图 2 所示)。第 3 天开始，S1、S2 中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 同步去除，对 TN 的去除率均可以达到 70% 左右，消耗 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 与消耗 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的比值和生成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 与消耗 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的比值分别为 1.12、0.22 和 2.02 和 0.13，与理论的比值 1.32 和 0.26 接近，此时 2 个系统的 TN 去除主要由 AnAOB 完成，AnAOB 的活性开始恢复。从第 4 天开始，S1 和 S2 中 TN 去除率在 80.07%~91.84%，对 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的去除率维持于 96.84% 以上，对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除率维持在 57.88%~83.67%。

当反应器稳定运行至第 10 天时，提升进水 N 负荷至 $200 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ ， $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，此后连续运行 60 d。在此期间，S1 反应器 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN 平均去除率分别为 81.07%、97.14%、84.97%，S2 反应器 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN 平均去除率分别为 80.51%、96.08%、84.20%；消耗 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和消耗 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的实际比值在理论比值 1.32 左右，但生成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 与消耗 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的比值均低于理论比值 0.26，这可能是存在部分反硝化，反硝化利用的有机碳源可能来源于微生物死亡释放的有机碳 [25-26]。

当运行至第 71 天，将进水 N 负荷降至 $100 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ ，目的是为后期处理低氨氮实际废水做驯化。此间 S1 反应器 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN 平均去除率分别为 86.45%、98.98%、84.73%，S2 反应器 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TN 平均去除率分别为 88.28%、99.30%、87.01%。在整个运行期间，2 个体系脱氮效率基本相同，这可能是由于本研究所采用的进水基质负荷较低，水力停留时间较长，使得整个运行期间 2 个系统保持了基本一致的高脱氮效率。

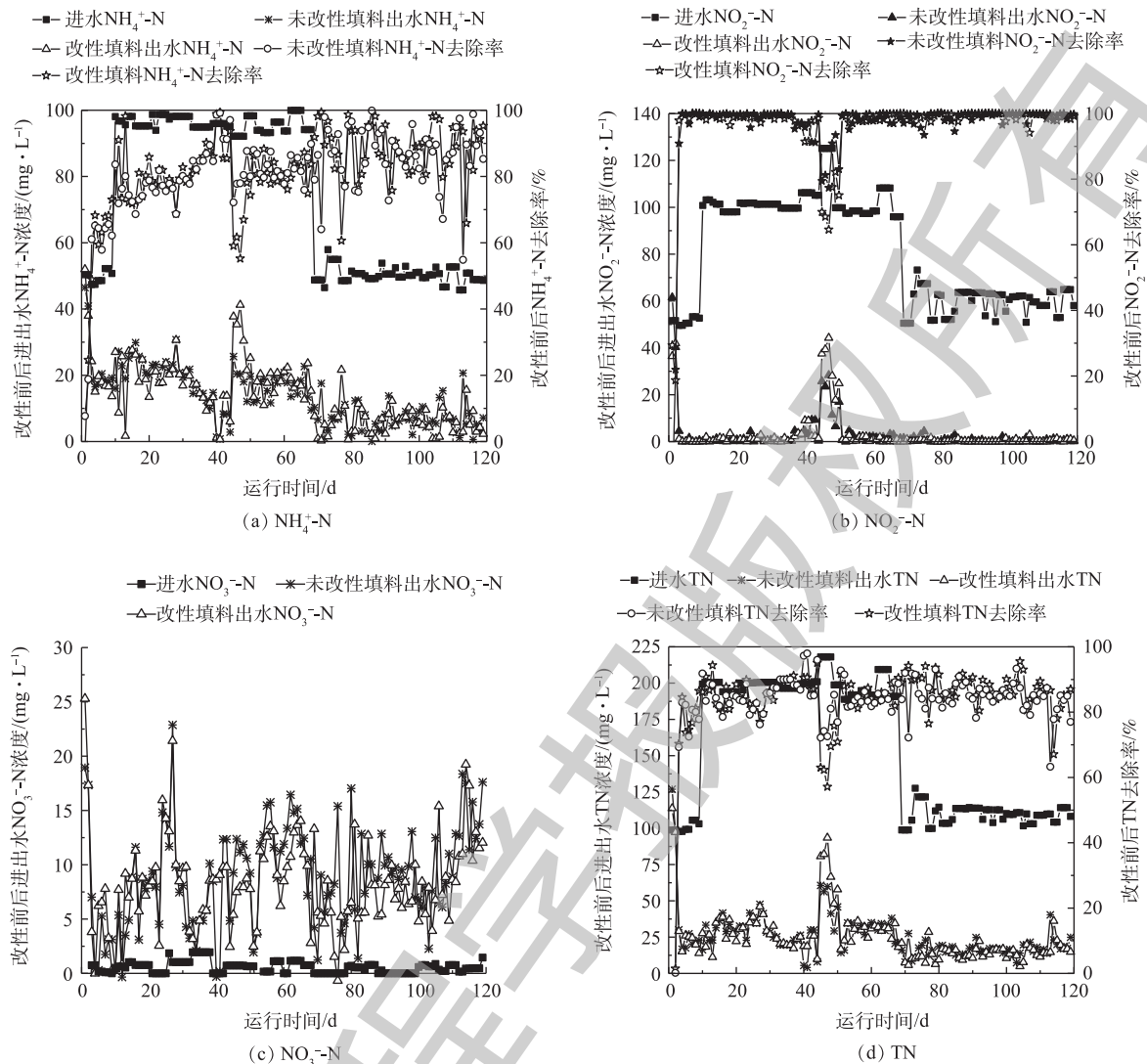


图 2 未改性填料与改性填料厌氧氨氧化工艺进出水氮浓度的对比

Fig. 2 Comparison of influent and effluent nitrogen concentration in two anammox systems with conventional and modified filler

2.4 稳定运行期间, 改性前后填料生物膜微生物群落结构和多样性分析

1) 生物膜微生物群落结构特征分析。采用 MiSeq 高通量测序技术分析填料改性前后生物膜上的特异性 DNA 片段; 对样本的有效数据, 以 97% 的一致性进行 OTUs 聚类, 并对 OTUs 的序列进行物种注释, 根据注释结果对改性前后填料上的细菌在各分类水平 (门、纲、目、科、属) 上进行结构组成和组间对比分析, 其中门水平上的物种相对丰度如图 3 所示; 并选取样品序列比对后的 top100 属的代表序列, 绘制属水平物种系统发育树如图 4 所示。

由图 3 可知, 填料改性前后生物膜上的微生物菌群结构在门水平上相似, 其所含优势微生物菌群主要包括浮霉菌门 (*Planctomycetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*) 等^[27]。其中, 填料改性前后生物膜上浮霉菌门 (*Planctomycetes*) 相对丰度均最高, 分别是 17.55% 和 17.56%, 王衫允^[27] 研究亦发现, 低温低氨氮条件下 Anammox 颗粒污泥的优势菌群以浮霉菌门为主, 其相对丰度为 16.69%; AnAOB 属于分支很深的浮霉菌目的厌氧氨氧化菌科^[28], 故其丰度最高。除此之外, 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)

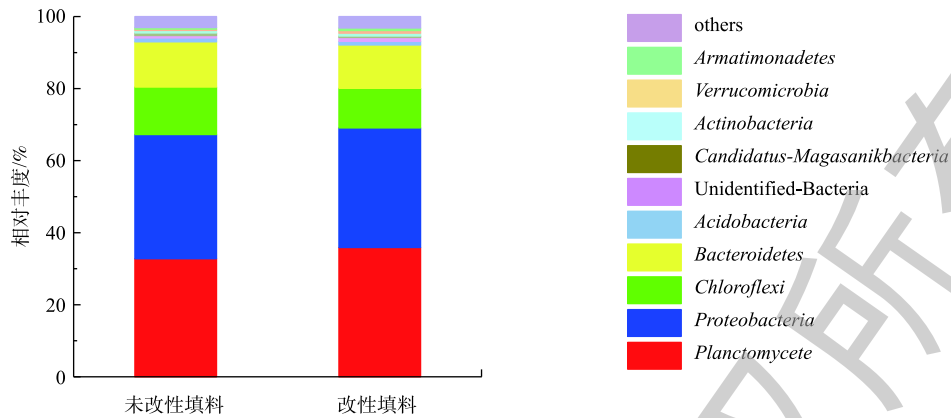
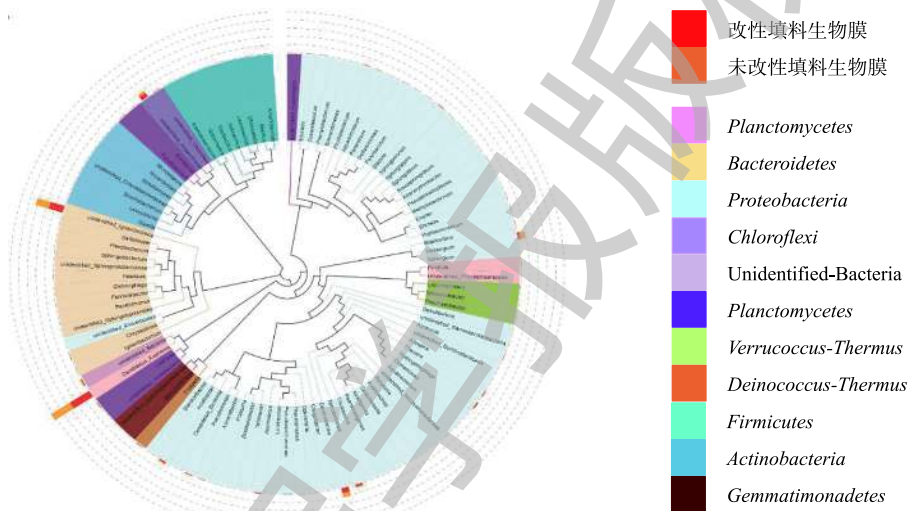


图3 填料改性前后生物膜在门水平上的物种相对丰度

Fig. 3 Relative species abundance of biofilms at the phylum level on fillers before and after modification



注：本研究涉及的菌属类型包括图例所示的11种。

注：本研究涉及的菌属类型包括图例所示的11种。

图4 填料改性前后厌氧氨氧化生物膜在属水平上的物种系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic trees of anammox biofilms at genus level on fillers before and after modification

和绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 的相对丰度也较高；拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 在2种填料生物膜上分别占10.93%和10.72%，拟杆菌门是一类对有机碳源适应性较强的菌群，属于化能有机营养菌，能够代谢碳水化合物，降解复杂有机物^[29]；变形菌门 (*Proteobacteria*) 分别占9.58%和9.50%，有研究^[30-31]表明，变形菌门是在大多数生物脱氮过程中起主要作用的微生物种类。

为进一步揭示改性前后微生物的变化，从属水平上对物种分析(图4)发现，*Candidatus Kuenenia* 是主要的 AnAOB 功能菌属，相对丰度分别是17.55%和17.56%；其中填料改性前后变化较大的菌群是变形菌门 (*Proteobacteria*)，其氨氧化菌 (AOB) 亚硝化单胞菌 *Nitrosomonas* 由3.72%降至1.96%，反硝化菌 (DNB) 脱硝酸盐单胞菌属 *Denitratisoma*^[32] 由3.45%升至4.04%，DNB 的 *Haliangium* 属由3.72%降至1.96%。填料改性后生物膜上氨氧化菌 (AOB) 亚硝化单胞菌 *Nitrosomonas* 丰度降低，*Denitratisoma* 属相对丰度增加的原因可能是改性填料相比于未改性填料，生物膜生长速度更快，生物膜内层的厌氧环境为该菌属的快速繁殖提供了有利条件；*Haliangium* 属是一类与有机质降解相关的反硝化菌群^[33-34]，填料改性前生物膜上含量较多的原因可能是未经低温等离子体处理的聚氨酯填料表面残留有机质，为 *Haliangium* 属提供了有利的生长环境。可见，填料改性前后表面生物膜

AnAOB 丰度远高于其他菌属，保证了 2 个体系较高的氮去除率，且体系中均含有 AOB、DNB，它们与 AnAOB 共同组成脱氮功能菌群，以适应进水氮浓度的微小波动，保证了稳定的脱氮效果。

2) 生物膜微生物群落多样性分析。采用 MiSeq 高通量测序技术测定填料改性前后生物膜上的特异性 DNA 片段，对 2 个样品所得有效序列进行归一化 (64 695) 处理后，按照 97% 的相似度计算 Alpha 多样性指数，如表 1 所示，Alpha 多样性指数包括 ACE 指数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数，指数越大，说明物种丰富度越高^[35-36]。由 Alpha 多样性分析指数结果可知，2 个样品的测序深度指数覆盖率均高于 99%，这说明测序结果可以全面有效地分析微生物群落结构；根据厌氧氨氧化污泥菌群丰富度指数 ACE 和 Chao1 的分析结果可知，改性填料的 ACE 和 Chao1 指数为 866.03 和 847.85，其分别高于未改性填料对应的 816.57 和 803.05，这表明填料改性后填料上生物膜菌群丰富度增加；填料改性后，指示种群多样性和群落复杂程度的 Shannon 和 Simpson 指数均增

表 1 填料改性前后微生物菌群多样性指数统计

Table 1 Diversity statistics of microflora on fillers before and after modification

填料类别	OTUs/个	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	相似度/%
未改性填料生物膜	739	5.36	0.93	803.08	816.57	97
改性填料生物膜	838	5.67	0.94	847.85	866.03	97

加，这说明改性填料生物膜上的功能性微生物种群多样性提高。

基于填料改性前后 2 个样品的 OTUs 数目及分布水平绘制 OTUs 的 Venn 图，结果如图 5 所示。Venn 图可以直观地反映样品间的 OTUs 数目及不同样品间的差异性水平^[37]。由图 5 可知，在 2 个典型的改性前后填料的样品中，一共含有 988 条 OTUs，两者共有的 OTUs 占 OTUs 总数的 63.66%，共计 629 条，并分别占各自 OTUs 总数的 75.06%(改性填料 OTUs 总数 838) 和 80.74%(未改性填料 OTUs 总数 779)；对于不同填料独有 OTUs 而言，改性填料含有 209 个 OTUs，未改性填料含有 150 个 OTUs，分别占各自 OTUs 的 24.94% 和 19.26%，这进一步说明改性填料上附着的生物膜有更丰富的生物多样性。

2.5 改性前后功能微生物基因丰度的变化

应用 qPCR 技术，对填料改性前后生物膜上功能微生物的基因丰度进行检测，选择的目功能基因包括 *hzo* 基因、*nrxB* 基因及 16S rRNA 的基因。16S rRNA 是全细菌目的基因，以此作为 *hzo* 基因、*nrxB* 基因相对丰度的基准值，各基因定量结果如图 6 所示。其中 *hzo* 基因是联氨氧化还原酶 (hydrazine oxidoreductase) 的功能基因，联氨氧化还原酶可以将厌氧氨氧化过

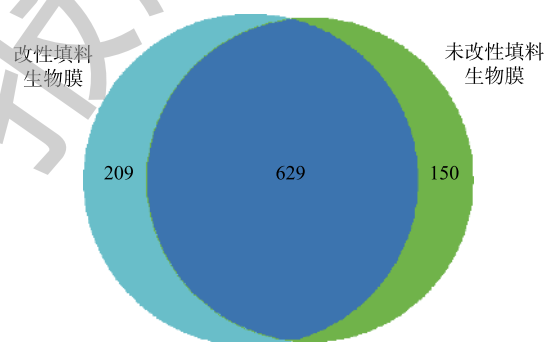


图 5 基于 OTUs 的改性前后生物膜菌群 Venn 图

Fig. 5 Venn diagram of microbial communities in biofilm on fillers before and after modification based on OTUs

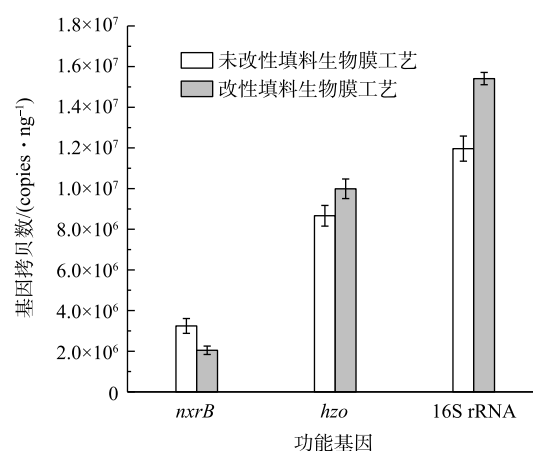


图 6 填料改性前后功能基因拷贝数对比

Fig. 6 Comparison of copy number of functional genes before and after modification of filler

程中的中间产物联氨 N_2H_4 催化氧化成 N_2 ^[6,38]; NXR基因是亚硝酸氧化还原酶 (nitrite oxidoreductase) 的功能基因, 它既可以催化亚硝酸盐氧化为硝酸盐, 也可以催化硝酸盐还原为亚硝酸盐, 因此, 有研究^[39]将 NXR 作为 NOB 的生物标记, 而 *nxB* 是编码 NXR 的 β 亚纲活性位点的功能基因之一。由图 6 可以看出, *hzo* 基因和 *nxB* 基因拷贝数都在 $1 \times 10^6 \text{copies} \cdot \text{ng}^{-1}$ 的数量级, 改性前后 *hzo* 基因相对丰度分别为 59.50%、73.50%, 改性前后 *nxB* 基因相对丰度分别为 21.10% 和 17.70%。由此可见, 改性后 *hzo* 基因丰度提高了 14%, *nxB* 基因丰度减少了 3%, 这表明改性后的系统含 *hzo* 基因的菌群数量增多, 进一步提高改性后 Anammox 生物膜工艺系统的进水氮负荷, 系统可能仍会维持较高的氮去除率。含 *nxB* 基因菌群减少, 可能是由于 NOB 受到一定的抑制。

3 结论

1) 经低温等离子体技术改性后, 聚氨酯泡沫塑料接触角由 99.24° 降至 65.97° , 比表面积由 $8.98 \text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 提高至 $9.65 \text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, 材料表面粗糙度增加, 亲水性得到明显改善。

2) 以改性前后聚氨酯泡沫塑料作填料, 启动 Anammox 生物膜工艺, 工艺稳定运行 120 d, TN 去除率均在 80% 以上。经低温等离子体技术处理后的聚氨酯泡沫塑料的填料, 相同时间内其单位质量填料生物膜干质量为 0.37 g, 较未改性前的 0.18 g 提高了 53%, 生物挂膜速度显著提升。

3) 高通量测序分析结果表明, 改性前后生物膜上存在的主要功能菌属是 *Candidatus Kuenenia*, 改性填料生物膜上微生物种群多样性更高; qPCR 结果表明, 改性后 *hzo* 基因丰度提高了 14%, *nxB* 基因丰度减少了 3%, 改性后的系统含 *hzo* 基因的菌群数量增多, 进一步提高改性后 Anammox 生物膜工艺系统的进水氮负荷, 系统可能仍会维持较高的氮去除效率。含 *nxB* 基因菌群减少, 可能是由于 NOB 受到一定的抑制。

参考文献

- [1] 张永辉. 厌氧氨氧化工艺的启动及影响因素试验研究[D]. 兰州: 兰州交通大学, 2017.
- [2] 韩黎明, 苏本生, 刘广青, 等. 厌氧氨氧化工艺的影响因素及应用进展[J]. 工业水处理, 2018, 38(2): 12-17.
- [3] 郑平. 新型生物脱氮理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [4] MENG J, LI J, LI J, et al. Enhanced nitrogen removal from piggery wastewater with high NH_4^+ and low COD/TN ratio in a novel upflow microaerobic biofilm reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 935-942.
- [5] LU Y F, MA L J, MA L, et al. Improvement of start-up and nitrogen removal of the anammox process in reactors inoculated with conventional activated sludge using biofilm carrier materials[J]. *Environmental Technology*, 2018, 39(1): 59-67.
- [6] 曾涛涛. 常温低基质PN-ANAMMOX耦合工艺脱氮效能及微生物特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
- [7] NI S Q, LEE P H, FESSEHAIE A, et al. Enrichment and biofilm formation of Anammox bacteria in a non-woven membrane reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(6): 1792-1799.
- [8] LIN H L, TSAO H W, HUANG Y W, et al. Removal of nitrogen from secondary effluent of a petrochemical industrial park by a hybrid biofilm-carrier reactor with one-stage ANAMMOX[J]. *Water Science and Technology*, 2014, 69(12): 2526-2532.
- [9] 成国栋. 改性聚氨酯填料的生物膜附着性能及废水处理特性研究[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- [10] 刘杰, 左剑恶, 朱书全, 等. BT^{MT} 生物膜载体对厌氧氨氧化反应器启动的影响[J]. 中国环境科学, 2010, 30(11): 1473-1478.
- [11] 马可可, 周律, 辛怡颖, 等. 低温等离子体技术用于废水处理的研究进展[J]. 应用化工, 2019, 48(1): 145-150.
- [12] 侯倩. 等离子体处理对环氧树脂涂层性能的影响[D]. 西安: 西安理工大学, 2018.

- [13] 陈冰, 陈银, 王红卫. 低温氩等离子体表面改性提高PET亲水性[J]. *纺织学报*, 2007, 28(6): 28-31.
- [14] 田冶, 周长忍, 杨菊林. 壳聚糖膜低温等离子体接枝聚合乙炔吡咯烷酮的表面性能研究[J]. *材料导报*, 2008, 22(1): 141-144.
- [15] 侯健, 郑光云, 蒋洁敏, 等. 低温等离子体处理工业废气中的硫化氢和二硫化碳[J]. *化学世界*, 2000, 41(S1): 70-71.
- [16] 段升霞. 低温等离子体改性纳米材料及其对含铀废水吸附性能研究[D]. 北京: 中国科学技术大学, 2018.
- [17] 韩玉香, 韩平, 王永富, 等. 固体表面自由能及其分量的计算方法(I): 接触角法[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 1995, 18(3): 214-218.
- [18] 秦志永. 木材与胶界面润湿特性表征与影响因素研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- [19] 曾福龙. 石墨化炭材料的制备及其电化学储能性能的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [20] 袁颂东, 胡昆鹏, 罗意, 等. 一种新型高比表面积多孔材料的制备与表征[J]. *武汉理工大学学报*, 2013, 35(3): 15-19.
- [21] TSUSHIMA I, OGASAWARA Y, KINDAICHI T, et al. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors[J]. *Water Research*, 2007, 41(8): 1623-1634.
- [22] 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.
- [23] 江李旺. 牡蛎壳填充改性聚乙烯基填料表面的生物亲和性研究[D]. 成都: 成都理工大学, 2016.
- [24] WAN Y, QU X, LU J, et al. Characterization of surface property of poly(lactide-co-glycolide) after oxygen plasma treatment[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(19): 4777-4783.
- [25] 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[J]. *中国环境科学*, 2012, 32(5): 843-849.
- [26] LOTTI T, VAN DER STAR W R L, KLEEREBEZEM R, et al. The effect of nitrite inhibition on the anammox process[J]. *Water Research*, 2012, 46(8): 2559-2569.
- [27] 王衫允. 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.
- [28] FUERST J A, SAGULENKO E. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9: 403-413.
- [29] 侯爱月, 李军, 卞伟. 不同短程硝化系统中微生物群落结构的对比分析[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(2): 428-436.
- [30] CHANG Y M, YANG Q, HAO C B, et al. Experimental study of autotrophic denitrification bacteria through bioaugmentation of activated sludge from municipal wastewater plant[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(4): 1210-1216.
- [31] 赵志瑞, 马斌, 张树军, 等. 高氨氮废水与城市生活污水短程硝化系统菌群比较[J]. *环境科学*, 2013, 34(4): 1448-1456.
- [32] 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.
- [33] COTTRELL M T, KIRCHMAN D L. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low and high-molecular-weight dissolved organic matter[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1692-1697.
- [34] DING S, BAO P, WANG B, et al. Long-term stable simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process treating real domestic sewage using suspended activated sludge[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 339: 180-188.
- [35] CHU Z R, WANG K, LI X K, et al. Microbial characterization of aggregates within a one-stage nitritation-anammox system using high-throughput amplicon sequencing[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 262: 41-48.
- [36] 蒋绍妍, 王文星, 薛向欣, 等. 利用PCR-DGGE分析茂名油页岩矿区土壤细菌群落组成[J]. *中南大学学报(自然科学版)*,

2015, 46(12): 4719-4724.

- [37] WANG B, PENG Y, GUO Y, et al. Illumina MiSeq sequencing reveals the key microorganisms involved in partial nitrification followed by simultaneous sludge fermentation, denitrification and anammox process[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 207: 118-125.
- [38] WANG D, HE Y, ZHANG X X. A comprehensive insight into the functional bacteria and genes and their roles in simultaneous denitrification and anammox system at varying substrate loadings[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(3): 1523-1533.
- [39] REEVE P J, MOUILLERON I, CHUANG H P, et al. Effect of feed starvation on side-stream anammox activity and key microbial populations[J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, 171: 121-127.

(本文编辑: 曲娜, 郑晓梅, 张利田)

Variation of operating and microbial community of Anammox process with conventional and modified filler by low temperature plasma technology

WANG Shuya, LIU Lingjie, WANG Fen*, JI Min

School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300350, China

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

Abstract The conventional polyurethane foam plastic carrier was modified by low temperature plasma technology. The variations of surface physicochemical properties, anaerobic ammonium oxidation (Anammox) biofilm quantity, nitrogen removal performance, microbial community structure and functional microbial gene abundance of conventional and modified filler were investigated. The results showed that the static contact angle between the surface of modified filler and distilled water decreased by 33.27° compared with conventional filler, single point specific surface area and adsorption average pore diameter of modified filler increased from $8.98 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and 3.01 nm to $9.66 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ and 4.98 nm , respectively. As a result, the surface roughness of modified filler increased, and its hydrophilicity improved obviously. The biomass on the conventional filler was 0.18 g , while the biomass on the modified filler was 0.37 g , over the same period, the biomass on per mass filler increased by 53%, therefore the biofilm formation rate improved obviously. For both the conventional and modified filler, the total nitrogen removal rates maintained over 80%. Furthermore, Illumina MiSeq sequencing indicated that *Candidatus Kuenenia* was the dominant bacterial genus in the biofilm on the conventional and modified filler. Compared with the conventional filler, the biofilm on the modified filler had a higher microbial species diversity. Quantitative real-time PCR (qPCR) showed that the *hzo* gene abundance increased by 14% from 59.50% to 73.50%, while the *nrxB* gene decreased by 3% from 21.10% to 17.70%. It could be concluded that the biofilm quantity on the modified filler increased, and the richness of functional microbial improved, however, the nitrogen removal efficiency presented slight change under low nitrogen influent loading condition.

Keywords Anammox; low temperature plasma modification; Illumina MiSeq sequencing technique; quantitative real-time PCR