

# 厌氧氨氧化启动过程细菌群落多样性及 PICRUST2 功能预测分析

闫冰<sup>1,2</sup>, 付嘉琦<sup>1</sup>, 夏嵩<sup>1</sup>, 易其臻<sup>1</sup>, 桂双林<sup>1</sup>, 吴九九<sup>1</sup>, 熊继海<sup>1</sup>, 魏源送<sup>1,2\*</sup>

(1. 江西省科学院能源研究所, 南昌 330096; 2. 中国科学院生态环境研究中心水污染控制实验室, 北京 100085)

**摘要:** 细菌群落是实现厌氧氨氧化系统高效脱氮的核心, 而厌氧氨氧化启动过程细菌群落多样性及其功能特征仍未被充分阐明。本研究采用升流式厌氧污泥床(UASB)反应器进行厌氧氨氧化系统启动, 利用16S rRNA基因高通量测序技术并结合PICRUST2功能预测分析, 研究启动过程不同时间(d0、d30、d60和d90)细菌群落多样性及功能动态变化特征。结果表明, 启动过程共检测到48个门、111个纲、269个目、457个科、840个属和1497个种; *Candidatus\_Brocadia*和*Candidatus\_Kuenenia*为检测到的厌氧氨氧化菌, 且它们的相对丰度在启动过程不同时间存在显著差异( $P < 0.05$ )。启动过程细菌群落 $\alpha$ 多样性指数整体呈现显著的降低趋势( $P < 0.05$ ), 细菌群落结构呈现出明显的空间分异特征, 且差异显著( $R = 0.846, P < 0.01$ )。PICRUST2功能预测分析表明, 启动过程细菌群落具有丰富的功能多样性, 一级功能层表现为有机系统和代谢方面较为活跃, 二级功能层子功能基因丰度在厌氧氨氧化启动过程发生明显变化; 细菌群落涉及49个参与氮素代谢的相关功能基因, 且不同时间阶段参与硝化、反硝化、厌氧氨氧化、硝酸盐同化/异化还原和亚硝酸盐同化/异化还原过程的相关功能基因丰度发生明显变化。

**关键词:** 厌氧氨氧化(ANAMMOX); 细菌群落; 多样性; PICRUST2; 高通量测序

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2021)08-3875-11 DOI: 10.13227/j.hjxx.202010232

## Diversity and PICRUST2-based Predicted Functional Analysis of Bacterial Communities During the Start-up of ANAMMOX

YAN Bing<sup>1,2</sup>, FU Jia-qi<sup>1</sup>, XIA Song<sup>1</sup>, YI Qi-zhen<sup>1</sup>, GUI Shuang-lin<sup>1</sup>, WU Jiu-jiu<sup>1</sup>, XIONG Ji-hai<sup>1</sup>, WEI Yuan-song<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Energy, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China; 2. Laboratory of Water Pollution Control, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** Bacterial communities are vital for efficient nitrogen removal in an anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) system. However, the diversity and functional characteristics of a bacterial community during the start-up of ANAMMOX has not been reported. In this study, an up-flow anaerobic sludge bed reactor was used to start-up the ANAMMOX system, and 16S rRNA high-throughput gene sequencing, combined with PICRUST2-based functional prediction analysis, was used to investigate the dynamic changes in diversity and function of the bacterial community at different times (d0, d30, d60, and d90) during the start-up. The results showed that 48 phyla, 111 classes, 269 orders, 457 families, 840 genera, and 1497 species were present during the start-up of ANAMMOX. *Candidatus\_Brocadia* and *Candidatus\_Kuenenia* were the main detected ANAMMOX bacteria, and their relative abundance was significantly different at different times during the start-up of ANAMMOX ( $P < 0.05$ ). During the start-up, the alpha diversity indices of the bacterial community were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the structure of the bacterial community exhibited significant spatial differentiation ( $R = 0.846, P < 0.01$ ). Functional prediction analysis with PICRUST2 revealed that the bacterial community was active in organic systems and metabolism at hierarchy level 1, implying abundant functional diversity. Further, the abundance of functional genes was significantly different at hierarchy level 2, during the start-up of ANAMMOX. Forty-nine functional genes involving metabolic nitrogen were detected. The abundance of functional genes, involved in nitrification, denitrification, ANAMMOX, and nitrate and nitrite assimilatory/dissimilatory reduction, changed significantly during the start-up of ANAMMOX.

**Key words:** anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX); bacterial community; diversity; PICRUST2; high-throughput sequencing

厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, ANAMMOX)作为一种新型自养生物脱氮技术, 相比于传统生物脱氮技术能耗更低且效率更高<sup>[1]</sup>, 在高氨氮废水处理领域具有广阔的应用前景<sup>[2]</sup>, 已成为废水脱氮领域的研究热点。然而, 作为核心功能微生物的厌氧氨氧化菌(AnAOB), 其细胞产率低、生长速率慢且对环境敏感<sup>[3-5]</sup>, 是导致厌氧氨氧化工艺系统启动时间长的主要原因<sup>[6]</sup>, 也被认为是厌氧氨

氧化工艺实际工程化应用的主要限制因素<sup>[7]</sup>。厌氧氨氧化系统启动过程, 功能菌群不断富集, 而整个微生物群落则在特定基质环境条件下发生演替。因此,

收稿日期: 2020-10-29; 修订日期: 2021-01-21

基金项目: 江西省重点研发计划项目(20171ACG70018); 江西省科学院重点项目(2018-YZD2-07); 江西省科学院博士基金项目(2017-YYB-06)

作者简介: 闫冰(1986-)男, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: yanbing718@126.com

\* 通信作者, E-mail: yswei@cees.ac.cn

全面分析厌氧氨氧化工艺系统启动过程微生物群落特征,进而解析其微生物生态学作用机制,将有助于调控微生物群落进而缩短工艺系统的启动时间。

高通量测序技术的普及,使研究人员得以更全面地掌握和认识微生物群落特征。已有研究发现,厌氧氨氧化系统微生物群落极其复杂,主要菌门包括变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)和浮霉菌门(Planctomycetes)等<sup>[8~10]</sup>。随着厌氧氨氧化系统的启动,AnAOB逐渐富集,变形菌门丰度逐步降低,而浮霉菌门丰度明显提升<sup>[11,12]</sup>。现有的研究结果为人们认识厌氧氨氧化系统微生物群落及其与脱氮性能的关系提供了基础数据。然而,当前研究多集中于工艺系统脱氮效率与厌氧氨氧化菌及群落组成关系,对厌氧氨氧化系统中其他微生物群落及其功能的关注较少,如其他协同脱氮功能菌、起支撑或保护作用的菌群等。

当前,得益于分子生物学及生物信息学的快速发展,人们对厌氧氨氧化系统微生物群落组成及结构有了一定的认识,但关于微生物群落功能信息的研究仍不足。基于16S rRNA基因高通量测序数据,利用PICRUSt软件预测细菌的代谢功能,与宏基因组相比,成本较低并且具有较高的精确度<sup>[13]</sup>,为解析微生物功能提供了新途径。然而,PICRUSt软件依赖于Greengene数据库进行物种比对和功能数据输出,但是Greengene数据库在2013年之后就停止了更新,这限制了PICRUSt的功能预测范围。PICRUSt2作为PICRUSt的全新升级,在各方面进行了优化及改进,精度也得到进一步提升<sup>[14]</sup>。PICRUSt2已广泛地应用于水体微生物和生物反应器的微生物功能预测,并取得了较好的效果<sup>[15~17]</sup>。然而,利用PICRUSt2对厌氧氨氧化启动过程微生物群落进行功能预测研究,尚未见报道。

综上,当前关于厌氧氨氧化系统启动过程微生物群落多样性及功能的研究相对缺乏,导致厌氧氨氧化工艺系统微生物生态学机制研究仍存在不足。本文基于高通量测序数据,分析厌氧氨氧化启动过程微生物群落结构及多样性变化特征,同时,结合PICRUSt2对细菌功能进行预测,探讨微生物群落多样性及功能,从微生物生态学视角深入理解厌氧氨氧化启动过程,以期厌氧氨氧化工艺快速启动提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用水及反应器

本实验用水为人工配制合成的模拟废水,其中

$\text{NH}_4^+-\text{N}$ 和 $\text{NO}_2^--\text{N}$ 分别由 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 和 $\text{NaNO}_2$ 按需提供,其他组分包括: $\text{NaHCO}_3$   $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CaCl}_2$   $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及微量元素浓缩液I、II各 $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ,微量元素I组分( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): EDTA 5、 $\text{FeSO}_4$  5;微量元素II组分( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): EDTA 15、 $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.43、 $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.24、 $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.99、 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.25、 $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.22、 $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.19、 $\text{NaSeO}_4\cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.21和 $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.014。

UASB反应器如图1所示,由有机玻璃制成,柱体内径为10 cm,外径为15 cm,反应区高度为80 cm,有效容积6.3 L。反应器配有水浴夹套保持反应器温度恒定,底部设有放空管,上部设置三相分离器,设有5个等间隔的取样口,外部整体包裹铝箔避光。反应器进水由蠕动泵从底部进水口泵入,反应生成的气体经三相分离器排出,污泥经三相分离器回到反应区,出水经出水口溢流流出,控制反应器温度为 $(32\pm 1)^\circ\text{C}$ ,控制进水pH为7~8。

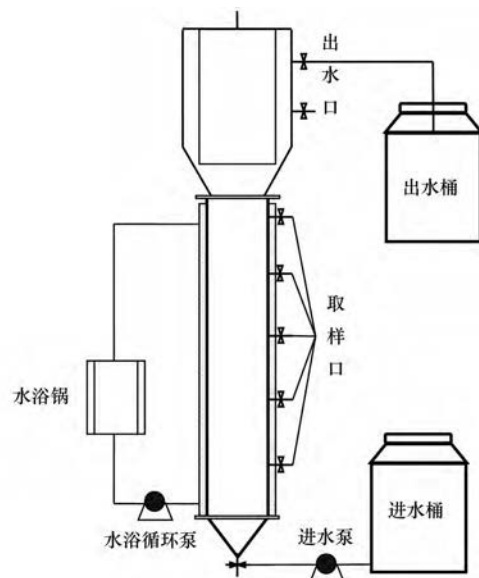


图1 反应器示意

Fig. 1 Schematic of reactor

### 1.2 接种污泥及样品采集

反应器接种污泥为南昌市某污水处理厂 $\text{A}^2\text{O}$ 工艺好氧池的污泥和实验室稳定运行的SBR反应器厌氧氨氧化污泥,以体积比2:1混合接种,接种污泥量约为3 L,混合液悬浮固体浓度(MLSS)和混合液挥发性悬浮固体浓度(MLVSS)分别为 $18.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,MLVSS/MLSS为56.46%。

启动过程,取反应器启动时的种泥,反应器运行第30、60和90 d时反应器内混合均匀的污泥样品,进行3次重复采样,共采集12个样品,污泥样品编号分别记为d0、d30、d60和d90。采集的污泥样品

经离心后,于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存待用. 取样期间反应器的运行工况及脱氮性能如表 1 所示.

表 1 取样期间反应器的运行工况及脱氮性能

Table 1 Operating conditions and treatment efficiency of the reactor during sampling

样品	运行天数 /d	氨氮/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		亚硝氮/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		硝氮 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	总氮去除率 /%	总氮去除负荷 / $\text{kg}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$
		进水	出水	进水	出水			
d0	1	47.13	47.83	49.37	0.89	7.91	41.32	0.04
d30	30	45.62	1.07	47.64	1.83	10.85	85.26	0.08
d60	60	73.95	0.83	96.38	8.95	15.80	84.98	0.15
d90	90	115.56	1.98	149.72	5.41	29.66	86.03	0.46

### 1.3 DNA 提取及高通量测序

利用 FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, U. S) DNA 提取试剂盒根据操作说明进行污泥总 DNA 提取; 采用琼脂糖凝胶电泳对提取得到的样品总 DNA 进行定性检测, 同时, 利用 SMA4000 超微量分光光度计 (Merinton, USA) 对其浓度、纯度测定后, 将提取的总 DNA 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存待用.

采用通用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCC GCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWT CTAAT-3') 对 16S rRNA 基因 V4 区进行 PCR 扩增. PCR 反应体系为: 10  $\times$  Ex Taq buffer 4  $\mu\text{L}$ , dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , BSA 0.2  $\mu\text{L}$ , 2.5 U TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶 0.25  $\mu\text{L}$ , 引物各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 灭菌超纯水补足体系至 25  $\mu\text{L}$ ; PCR 反应条件为: 预变性温度  $94^{\circ}\text{C}$  (2 min); 变性温度  $94^{\circ}\text{C}$  (30 s), 退火温度  $53^{\circ}\text{C}$  (30 s), 延伸温度  $72^{\circ}\text{C}$  (45 s), 25 次循环后  $72^{\circ}\text{C}$  终止延伸 10 min. PCR 扩增产物经检测、纯化及定量分析后, 构建 MiSeq 文库, 利用 MiSeq PE300 测序平台 (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) 进行高通量测序. 本研究测序工作由测序公司完成.

### 1.4 数据处理与统计分析

高通量数据经初步质控后, 采用 QIIME 2 2020.2<sup>[18]</sup> 完成生物信息学分析. 使用 q2-demux 插件对原始序列数据进行拆分并进行质量过滤, 然后使用 DADA2<sup>[19]</sup> 进行去噪; 用 mafft<sup>[20]</sup> (q2-alignment) 对所有扩增序列变体 (ASV) 进行比对, 并用 fasttree2<sup>[21]</sup> (q2-phylogeny) 构建系统发育树; 将样品序列抽平后使用 q2-diversity 计算  $\alpha$  多样性指数 [香农 (Shannon) 多样性指数、Observed OTUs (Sobs)、Faith's 系统发育多样性 (PD)、辛普森 (Simpson) 多样性指数和 Chao1 指数] 和  $\beta$  多样性指数 (Bray-Curtis dissimilarity); 使用 q2-feature-classifier<sup>[22]</sup> 比对 Greengenes 13\_8 99% OTU 参考序列对 ASV 进行分类.

QIIME 2 导出特征表为 biom 格式文件, 利用 PICRUSt2 软件进行 16S rRNA 基因数据功能预测, 参考 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and

genomes) 数据库, 得到 KO (KEGG Orthology) 功能的丰度预测表及 KEGG 代谢途径 (KEGG pathway) 丰度表.

对不同分组间差异检验采用单因素方差分析; 采用基于 Bray-Curtis 距离的非度量多维尺度 (nonmetric multidimensional scaling, NMDS) 分析, 比较不同分组样品间群落  $\beta$  多样性差异, 并用相似性分析 (ANOSIM) 进行差异检验; 统计分析及作图均基于 R (3.5.1) 不同程序包实现.

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌群落特征分析

#### 2.1.1 细菌群落组成

高通量测序结果显示, 全部样品共获得 701 550 条高质量序列, 每个样品 40 825 ~ 65 939 条, 平均 58 462 条. 全部样品共检测到 48 个门、111 个纲、269 个目、457 个科、840 个属和 1 497 个种. 其中, 变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、浮霉菌门 (Planctomycetes)、装甲菌门 (Armatimonadetes)、放线菌门 (Actinobacteria)、广古菌门 (Euryarchaeota) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 占全部序列总和的 87.54% ~ 94.53%, 为门水平上的优势菌群 [图 2 (a)]. 反应器启动运行过程, 不同运行时间拟杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门、装甲菌门、放线菌门、厚壁菌门 (Firmicutes)、匿杆菌门 (Latescibacteria)、互养菌门 (Synergistetes) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia) 相对丰度呈现出显著差异 ( $P < 0.05$ ), 其中浮霉菌门相对丰度显著升高 ( $P < 0.05$ ). 属水平上 norank\_f\_PHOS-HE36、Denitratisoma、norank\_f\_Anaerolineaceae、Candidatus\_Brocadia、unclassified\_o\_Fimbrimonadales、Limnobacter、norank\_f\_norank\_o\_SBR1031、Ignavibacterium、norank\_f\_Desulfarculaceae 和 Blvii28\_wastewater-sludg\_group 为丰度排名前 10 的属 [图 2 (b)], 其中 Ignavibacterium、norank\_f\_Desulfarculaceae 和 norank\_f\_PHOS-HE36 相对丰度在 d30 和 d60 显著高于 d0 和 d90 ( $P < 0.05$ ); Candidatus\_Brocadia 相对丰度随

着启动运行时间呈显著升高的趋势 ( $P < 0.05$ ) ,并在运行 d90 达到 8.08% ; *Candidatus\_Kuenenia* 相对丰度在 d60 显著高于其它时间 ; *Blvii28\_wastewater-sludge\_group* 相对丰度在 d0 较高 ,但随着启动运行时间增加显著降低 ( $P < 0.05$ ) .

### 2.1.2 细菌群落多样性

选择 Sobs、Shannon、Simpson、Chao1 和 PD 指

数 ,对厌氧氨氧化启动过程细菌群落多样性进行评估 .由表 2 可知 ,启动运行过程细菌群落多样性呈现出先下降后略有升高的趋势 ,且多样性指数均为 d0 显著 ( $P < 0.05$ ) 高于 d30 和 d60 ,而 d30、d60 和 d90 间无显著差异 ( $P > 0.05$ ) .值得注意的是 ,虽然多样性指数在 d0 和 d90 间无显著差异 ,但是 d0 均大于 d90 .

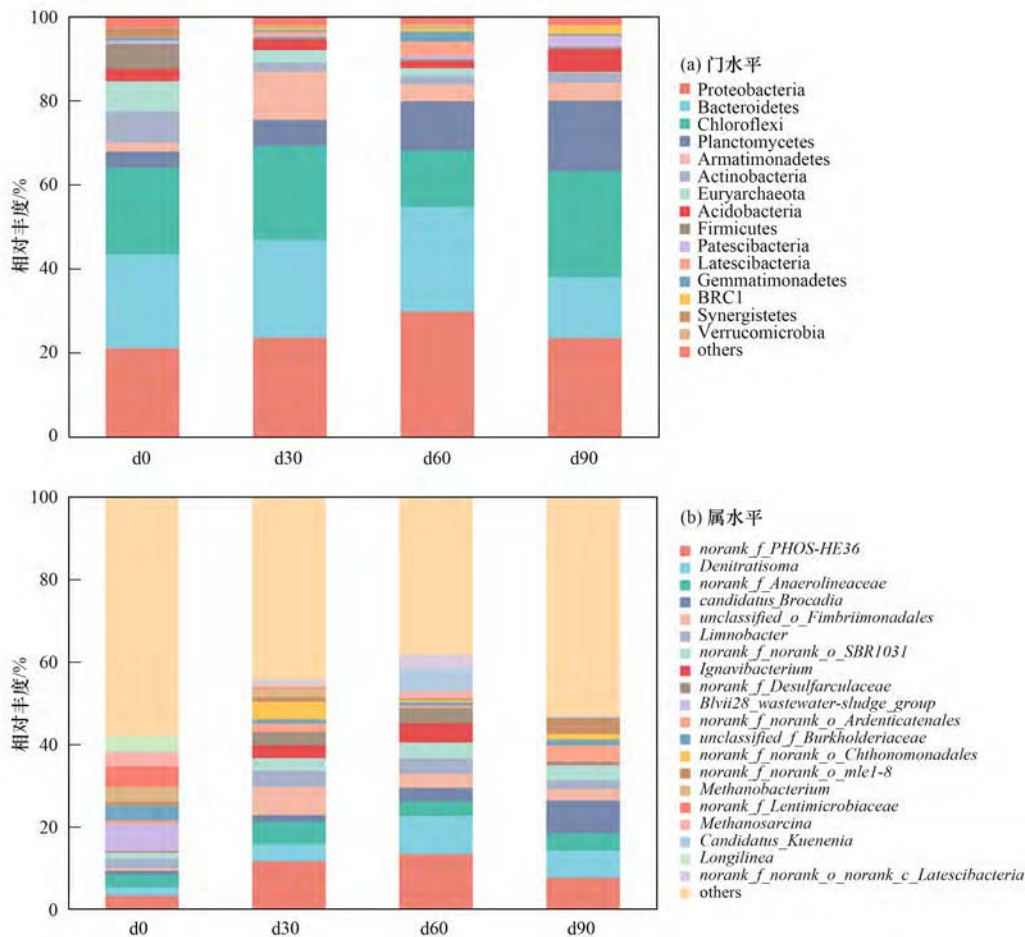


图 2 启动过程细菌群落相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of the bacterial community during the start-up of ANAMMOX

表 2 厌氧氨氧化启动过程细菌群落多样性指数<sup>1)</sup>

Table 2 Diversity indices of bacterial community during the start-up of ANAMMOX

样品	Sobs 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数	PD 指数
d0	1 609.33 ± 111.27a	5.26 ± 0.14a	0.02 ± 0.002b	2 149.65 ± 149.40a	117.49 ± 5.30a
d30	1 317.33 ± 81.00b	4.64 ± 0.25b	0.03 ± 0.009a	1 805.92 ± 64.98b	100.85 ± 5.45b
d60	1 025.67 ± 165.38b	4.13 ± 0.44b	0.05 ± 0.015a	1 431.29 ± 181.17c	86.53 ± 9.53b
d90	1 036.00 ± 528.35ab	4.59 ± 0.56ab	0.03 ± 0.009ab	1 350.32 ± 661.12abc	87.75 ± 31.60ab

1) 同一列中不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

### 2.1.3 细菌群落结构

利用基于 Bray-Curtis 距离的非度量多维尺度 (nonmetric multidimensional scaling, NMDS) 排序 ,分析厌氧氨氧化启动过程中不同时间细菌群落差异 .如图 3 所示 ,压力值 (stress) 为 0.061 小于 0.1 ,表明

NMDS 分析结果具有很好地解释意义 ; 同一分组样品聚集在一起 ,且不同分组样本在空间上呈现出显著的分异特征 ,说明启动过程中不同时间的微生物群落组间差异远大于组内差异 .而微生物群落相似性分析 (ANOSIM) 结果也表明 ,启动过程不同时间

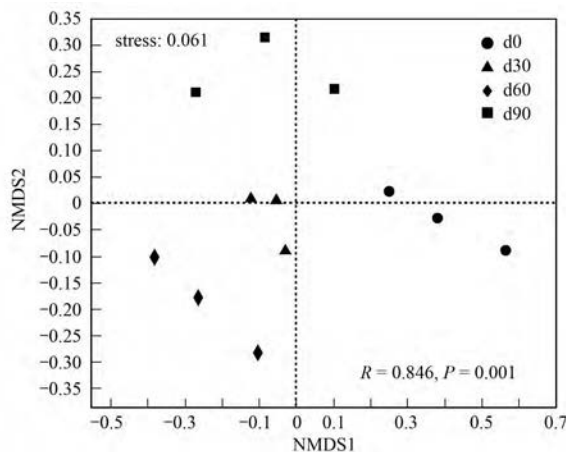


图3 启动过程细菌群落 NMDS 排序

Fig. 3 NMDS ordination diagram of the bacterial community during the start-up of ANAMMOX

微生物群落之间存在显著差异 ( $R = 0.846$ ,  $P = 0.001$ ) ,微生物群落结构在厌氧氨氧化启动过程发生显著变化。

## 2.2 PICRUSt 功能预测分析

### 2.2.1 功能基因代谢通路特征

基于 PICRUSt2 软件 ,进行菌群功能分析 ,得到不同样品细菌的功能预测信息 .利用 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库对测序数据进行比对 ,所有样品共涉及 6 类生物代谢通路: 有机系统 (organismal systems) 、代谢 (metabolism) 、人类疾病 (human diseases) 、遗传信息处理 (genetic information processing) 、环境信息处理 (environmental information processing) 和细胞过程 (cellular processes) ,见图 4. 其中 ,有机系统和代谢是主要功能 ,丰度分别为 78.41% ~ 80.66% 和 19.17% ~ 21.20% .对启动过程不同时间细菌群落功能预测分析发现 ,6 个一级功能层预测基因丰度在不同时间均无显著差异 ( $P > 0.05$ ) .进一步对预测基因二级功能层分析 ,共发现碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism) 、转录 (transcription) 、膜转运 (membrane transport) 、信号传导 (signal transduction) 、氨基酸代谢 (amino acid metabolism) 、细胞生长和死亡 (cell growth and death) 和能量代谢 (energy metabolism) 等 46 个子功能 (图 4) .由图 4 可知 ,启动过程不同时间 ,二级功能层子功能基因丰度发生变化 ,氨基酸代谢 (amino acid metabolism) 、消化系统 (digestive system) 、信号分子及交互作用 (signaling molecules and interaction) 、外源物质的降解与代谢 (xenobiotics biodegradation and metabolism) 、免疫系统疾病 (immune diseases) 、运输和代谢 (transport and catabolism) 等 16 个功能基因在接种污泥中明显高于其它时期 .而能量代谢 (energy metabolism) 、信号

转导 (signal transduction) 、细胞生长和死亡 (cell growth and death) 、维他命及辅助因子代谢 (metabolism of cofactors and vitamins) 和循环系统 (circulatory system) 等 15 个功能基因在启动后期相对高于其它时期。

### 2.2.2 氮素转化相关基因变化

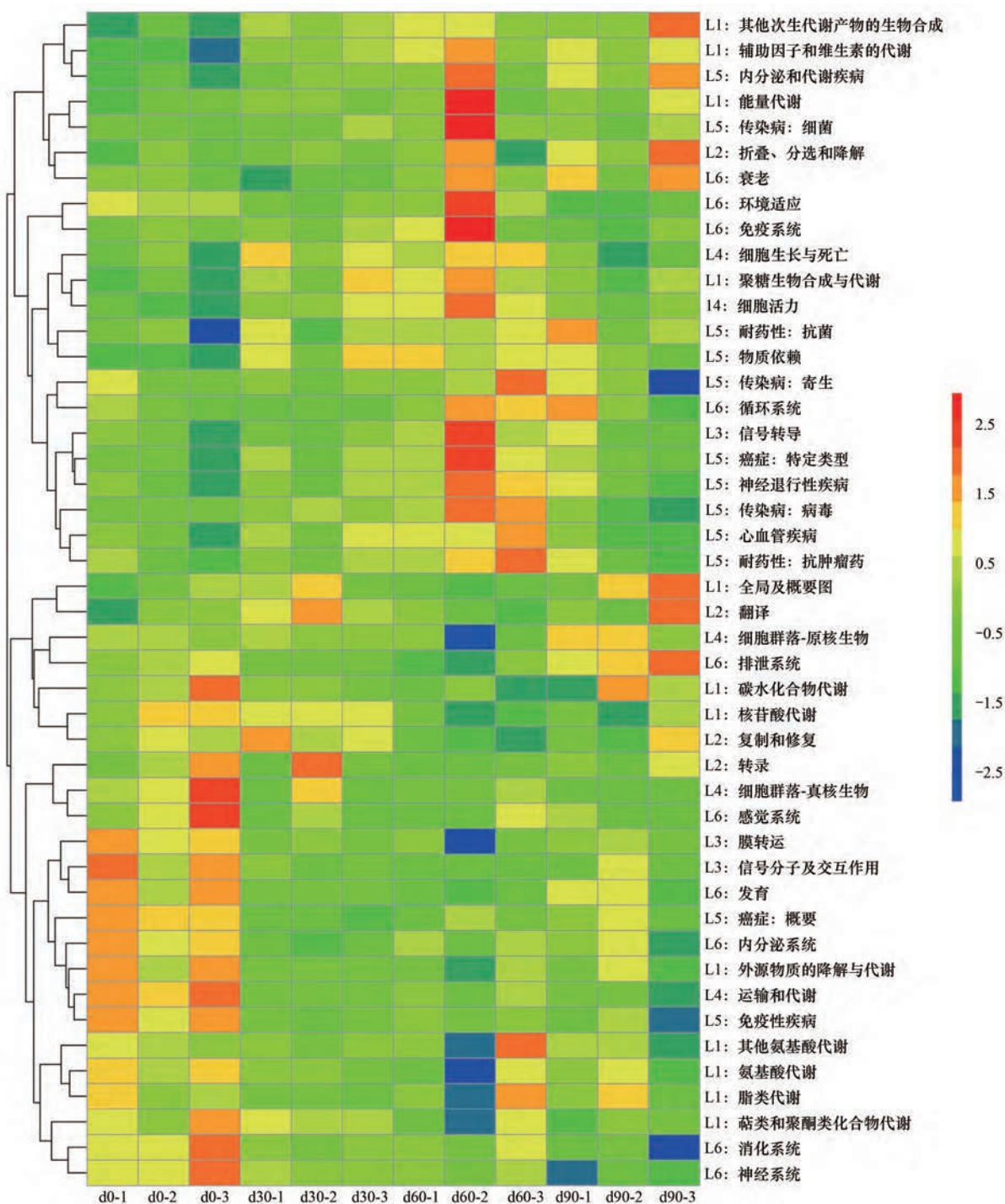
将 PICRUSt2 预测的 KO 结果与 KEGG 数据库中与氮代谢相关的 65 个直系同源基因 (KEGG orthology) 比对 ,获得厌氧氨氧化启动过程中样品预测的具有氮代谢功能的相关基因 (图 5) .预测的 KO 中包含 49 个参与氮代谢的相关基因 ,展现出丰富的氮代谢功能多样性 .其中 ,11 个 KO 在 d0 中明显高于其它时期 ,14 个 KO 在 d0 和 d90 中相对高于 d30 和 d60 ,13 个 KO 在 d60 和 d90 较高 .进一步分析氮素转化过程的主要功能基因 ,其中研究硝化过程常用氨单加氧酶的编码基因 *pmoA-amoA*、*pmoB-amoB* 和 *pmoC-amoC* ,羟胺氧化还原酶的编码基因 *hao* ,亚硝酸盐氧化还原酶的编码基因 *norA* 和 *norB* 作为主要的功能基因 ;厌氧氨氧化过程涉及的主要功能基因包括联氨氧化还原酶基因 *hzo* ,厌氧氨氧化细菌特有的亚硝酸还原酶基因 *nirS* ,联胺合成酶基因 *hzsA* 和 *hzsB* ;研究反硝化过程主要涉及的功能基因包括硝酸还原酶的编码基因 *narG* ,亚硝酸还原酶的编码基因 *nirS* 和 *nirK* ,一氧化氮还原酶的编码基因 *norB* ,以及氧化亚氮还原酶的编码基因 *nosZ* .同时 ,氮素代谢还涉及硝酸盐同化还原酶的编码基因 *nasA*、*narB* 和异化还原酶的编码基因 *napA*、亚硝酸盐同化还原酶的编码基因 *nirA*、*nirB* 和异化还原酶的编码基因 *nrfA* .厌氧氨氧化启动过程 ,硝化过程的 *pmoA-amoA*、*pmoB-amoB* 和 *pmoC-amoC* 丰度呈增加趋势 ,而 *hao* 丰度呈现出先增加后降低的趋势 ;厌氧氨氧化过程的 *nirS* 丰度整体呈现先降低后增加的趋势 ;反硝化过程的 *narG*、*nirK* 和 *norB* 丰度都展现出先下降后升高的情况 ,而 *nirS* 和 *nosZ* 丰度都展现出先下降后升高又下降的情况 .厌氧氨氧化启动过程 ,硝酸盐同化还原的 *nasA* 及异化还原的 *napA* 丰度呈先降低后升高的变化趋势 ;硝酸盐同化还原的 *narB* 和亚硝酸盐同化还原的 *nirB* 丰度都呈现出先下降后升高又下降的变化趋势 ;亚硝酸盐异化还原的 *nrfA* 呈下降趋势。

## 3 讨论

### 3.1 厌氧氨氧化启动过程细菌群落分析

本研究基于高通量测序技术分析厌氧氨氧化启动过程中细菌群落组成、多样性及结构 ,门水平上共检测到 48 个门 ,其中变形菌门、拟杆菌门、绿弯菌





L1 ~ L6 表示一级功能层: L1 表示代谢, L2 表示遗传信息处理, L3 表示环境信息处理, L4 表示细胞过程, L5 表示人类疾病, L6 表示有机系统; d0-1、d0-2 和 d0-3 表示 d0 的 3 个重复, 以此类推, 下同

图 4 不同样品 PICRUS2 功能预测热图(二级功能层)

Fig. 4 Heatmap of PICRUS2-based predicted function for different samples ( hierarchy level 2)

门、浮霉菌门、装甲菌门、放线菌门、广古菌门和酸杆菌门为优势菌群(图 2),这与已有研究的结果一致<sup>[8, 12, 23-26]</sup>. 变形菌门作为厌氧生物反应器内的常见菌门<sup>[27]</sup>,甚至在厌氧氨氧化系统内其相对丰度往往大于浮霉菌门<sup>[28]</sup>,有研究认为变形菌门能起到调节微生物群落的作用<sup>[29]</sup>. 本研究结果显示,变形菌门在厌氧氨氧化启动过程不同时间内都占比较高(21.09%~29.68%),且相对丰度无显著变化( $P >$

0.05),说明变形菌门中具备氮素转化功能的氨氧化细菌、亚硝酸盐氧化菌和反硝化菌等<sup>[30]</sup>,在厌氧氨氧化系统脱氮上发挥重要作用,这也是反应器启动初期总氮去除率达到 41.32%的主要原因. 反应器启动运行过程中,随反应器脱氮性能的逐步提高,拟杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门和装甲菌门相对丰度呈现显著差异( $P < 0.05$ ). 厌氧氨氧化菌所属的浮霉菌门相对丰度显著升高( $P < 0.05$ ),使反应器取

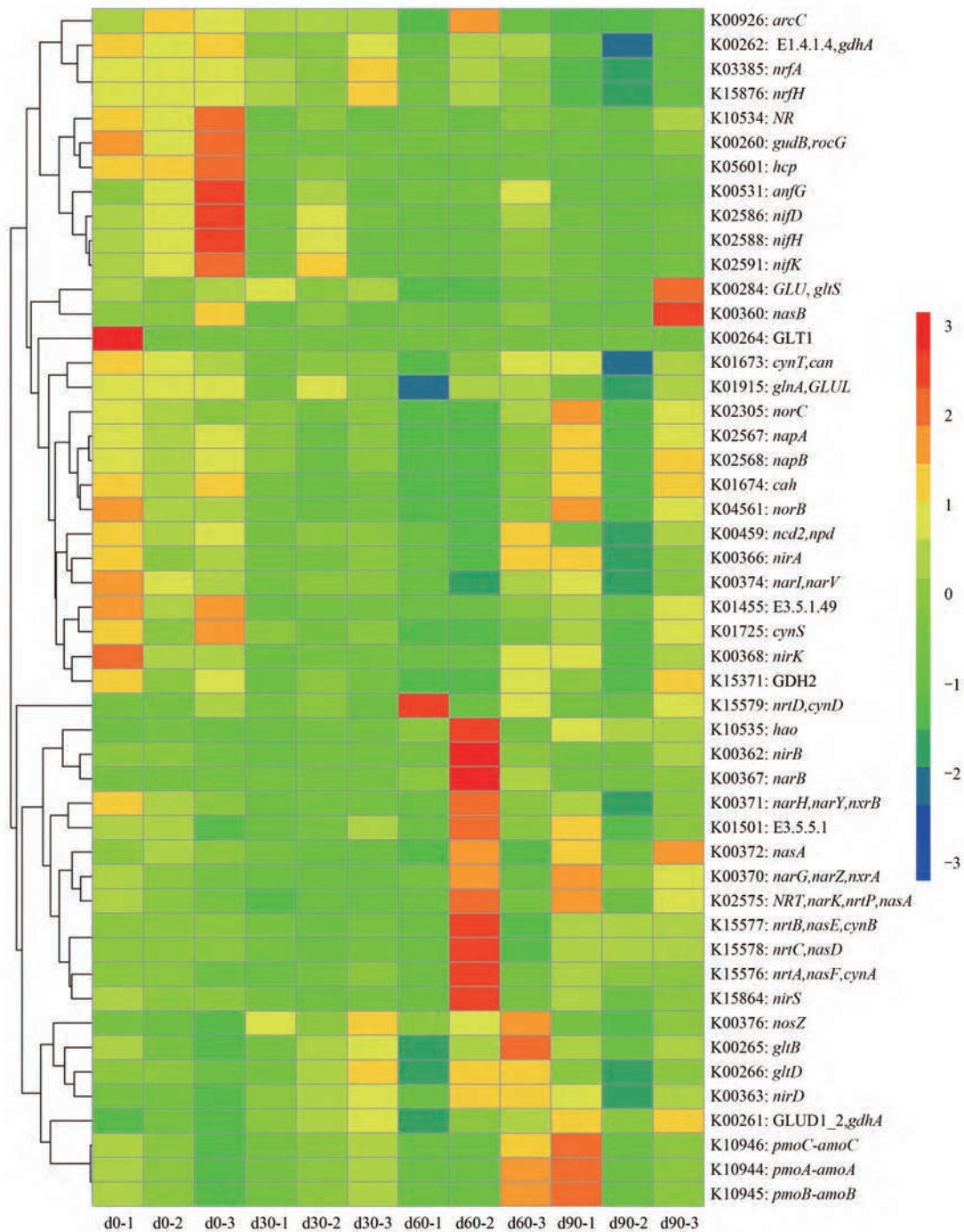


图5 氮代谢相关 KO 基因拷贝数热图

Fig. 5 Heatmap of nitrogen metabolism-related KO based on predicted gene copy

得较好的脱氮效果. 绿弯菌门作为厌氧氨氧化系统内的主要伴生菌<sup>[31]</sup>, 一方面, 支撑着整个污泥体系, 同时被认为是厌氧氨氧化颗粒形成过程的重要载体<sup>[32]</sup>; 另一方面, 其会参与到有机物的降解过程, 在厌氧氨氧化反应器内去除衰亡的菌体及胞外聚合物<sup>[33]</sup>. 有研究发现, 拟杆菌门也参与降解有机物、反硝化和固氮等过程, 并且在促进颗粒污泥形态稳定方面发挥作用<sup>[34]</sup>. 基于宏基因组分析发现, 厌氧氨氧化系统内的装甲菌门可以贡献次生代谢产物钼辅因子和叶酸, 有益于厌氧氨氧化菌活性并促进其生

长<sup>[35]</sup>. 属水平上, 本研究中检测到厌氧氨氧化菌属为 *Candidatus\_Brocadia* 和 *Candidatus\_Kuenenia*, 它们被认为是实验室反应器中的主要厌氧氨氧化菌<sup>[8, 36-38]</sup>. *Candidatus\_Brocadia* 相对丰度随着启动运行时间呈显著升高的趋势 ( $P < 0.05$ ), 并在运行 d90 达到 8.08%; 而 *Candidatus\_Kuenenia* 相对丰度则在 d60 显著高于其它时间, 这可能是由于二者对基质不同的适应力所致<sup>[39]</sup>. 启动过程, 氨氮浓度由 47.13  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  逐步提高到 115.56  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 亚硝氮浓度由 49.37  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  逐步提高到 149.72  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

*Candidatus\_Brocadia* 对基质亲和力弱但繁殖力强, 而 *Candidatus\_Kuenenia* 则能利用低浓度亚硝态氮而且对亚硝态氮的抑制更耐受<sup>[40 41]</sup>. *norank\_f\_norank\_o\_SBR1031* 和 *norank\_f\_Anaerolineaceae* 菌属是厌氧消化的核心微生物种群<sup>[42]</sup>, *Anaerolineaceae* 在反应器内发挥微生物残体降解的作用<sup>[43]</sup>; *Denitratisoma* 和 *Ignavibacterium* 具有反硝化功能<sup>[34 44]</sup>; *Limnobacter* 具有缓解外界环境对厌氧氨氧化菌影响的作用<sup>[32]</sup>. 厌氧氨氧化系统启动过程中, 反应器内存在大量的伴生菌群, 它们在系统启动过程中发挥了重要作用, 一方面为厌氧氨氧化菌创造了适宜环境促进其生长繁殖, 另一方面有助于提升系统脱氮效果.

基于 Sobs、Shannon、Simpson、Chao1 和 PD 指数对厌氧氨氧化启动过程中细菌群落多样性进行了研究, 其中 Sobs 和 Chao1 指数经常被用来评估物种丰富度; Shannon 和 Simpson 指数用来反映微生物群落多样性; PD 指数是谱系多样性常用于微生物群落研究, 其同时考虑了物种丰度及进化距离. 结果表明, 厌氧氨氧化系统启动过程, 细菌群落多样性下降. 这与已有的研究结果一致<sup>[8 45]</sup>, 可能是启动过程基质浓度和脱氮负荷不断提高, 接种污泥中所携带的某些微生物类群无法适应反应器内的环境被淘汰. 有研究发现, 随着厌氧氨氧化反应器稳定运行, 微生物群落多样性增加<sup>[8 26]</sup>. 然而, 本课题组前期研究发现, 一体式厌氧氨氧化系统脱氮效果恶化及恢复过程中, 微生物群落多样性指数先增大后减小<sup>[46]</sup>; Chu 等<sup>[47]</sup> 的研究显示, 一体式亚硝化厌氧氨氧化系统启动过程中微生物群落多样性下降. 可见厌氧氨氧化系统启动及运行过程中微生物群落多样性发生变化, 但不同研究得到的结果不一致. NMDS 分析结果表明, 厌氧氨氧化系统启动过程中, 微生物群落存在明显的空间分异特征. 说明厌氧氨氧化启动过程中, 微生物群落结构发生了显著变化. 这与前文微生物群落组成结果相互印证, 随着厌氧氨氧化系统启动完成进入稳定运行阶段, 微生物群落结构会趋于稳定<sup>[8 47]</sup>. 当前, 已有的关于厌氧氨氧化系统微生物群落的研究, 结果不尽相同. 结合已有研究结果和本研究结果认为, 启动过程多样性发生显著变化, 且随着系统进入稳定运行阶段, 微生物群落结构趋于稳定; 亦或者由于微生物群落多样性及群落结构逐步适应反应器内部环境趋于稳定, 进而使得系统脱氮效率进入稳定运行阶段. 因此, 后续应开展长期实验, 探究系统内细菌群落多样性与系统稳定状况及脱氮性能间的关系.

### 3.2 厌氧氨氧化启动过程细菌群落功能预测分析

利用 PICRUS2 对厌氧氨氧化系统启动过程细菌群落功能进行预测. 结果显示, 启动过程不同时间细菌群落共涉及有机系统和代谢等 6 类生物代谢通路, 碳水化合物代谢、转录、膜转运、信号传导、氨基酸代谢、细胞生长与死亡和能量代谢等 46 个子功能, 展现出丰富的功能多样性. 厌氧氨氧化启动过程不同时间, 一级功能层基因丰度无显著差异, 且主要功能基因均为有机系统及代谢相关功能, 说明有机系统和代谢在厌氧氨氧化启动过程起着极其重要的作用. 此外, 厌氧氨氧化启动过程不同时间, 二级功能层的功能基因丰度存在差异. 已有研究表明, 厌氧氨氧化启动过程, 系统容积负荷不断升高, 系统内微生物群落组成、结构及多样性发生变化<sup>[12 36 45]</sup>. 这可能进一步导致细菌群落功能组成产生差异. 在接种污泥中, 氨基酸代谢、外源物质的降解与代谢、信号分子及交互作用和消化系统等功能基因丰度较高, 其中, 氨基酸代谢主要作用是将蛋白质分解转化为铵态氮. 城市污水处理系统中有多达 20 多种氨基酸代谢途径<sup>[48]</sup>, 说明在有机氮存在的情况下氨基酸代谢较为活跃; 启动后期, 能量代谢、信号转导、细胞生长和死亡等功能基因丰度升高, 其中, 能量代谢主要涉及氮代谢, 这也解释了厌氧氨氧化系统启动过程氮去除率逐渐升高的现象. 本研究中, 厌氧氨氧化启动过程主要为人工配水, 提供无机氮源和碳源, 且整个过程主要是厌氧氨氧化菌及其相关功能菌的富集过程, 其它菌群被淘汰或者活性处于较低水平, 这可能是上述功能基因丰度变化的原因之一.

进一步研究厌氧氨氧化启动过程细菌参与氮素代谢的相关功能基因, 共 49 个 KO 注释为氮代谢, 这涵盖了绝大多数的氮代谢通路. 本研究中, 厌氧氨氧化启动种泥中含有 AnAOB, 而启动过程中其它菌群的竞争导致 AnAOB 活性开始降低, 随着启动过程 AnAOB 大量富集且活性提高<sup>[11 12 26]</sup>, 因此相关功能基因 *nirS* 丰度呈现先降低后升高. 启动初期, 种泥带入的有机物为反硝化菌提供了营养, 而随着启动过程深入, 可供利用的有机物减少, 后期有机物主要来自系统内菌体死亡分解<sup>[33]</sup>. 因此, 反硝化菌群也发生分化, 部分菌群存活, 如厌氧氨氧化系统中常见的反硝化菌 *Denitratisoma* 和 *Ignavibacterium*, 故反硝化相关的功能基因丰度整体先降低后升高. 已有研究认为, 硝酸盐可能是异化硝酸盐还原酶活性的限制因子, 同时对异化硝酸盐还原酶合成具有诱导作用<sup>[49]</sup>. 厌氧氨氧化启动成功的重要标志是生成一定比例的  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ <sup>[50]</sup>, 这可能是硝酸盐同化还原和异化还原相关基因丰度变化的重要原因. 研究氮素



代谢功能基因有助于深入理解厌氧氨氧化启动过程微生物群落结构、功能与脱氮效率的关系。本研究基于 PICRUSt2 初步解析了微生物群落功能及氮代谢相关基因, 考虑到 PICRUSt2 的局限性, 后续应结合宏基因组测序技术深入研究厌氧氨氧化启动及稳定运行过程中微生物群落功能。

#### 4 结论

(1) 基于高通量测序技术分析厌氧氨氧化启动过程细菌群落组成, 共检测到 48 个门 840 个属; 启动过程, 门水平上拟杆菌门、绿湾菌门、浮霉菌门、装甲菌门、放线菌门、厚壁菌门、匿杆菌门、互养菌门和微菌门相对丰度呈现出显著差异 ( $P < 0.05$ ), 属水平相对丰度排名前 10 的属中 *Ignanibacterium*、*norank\_f\_Desulfarculaceae*、*norank\_f\_PHOS-HE36*、*Candidatus\_Brocadia*、*Candidatus\_Kuenenia* 和 *Blvii28\_wastewater-sludge\_group* 相对丰度存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

(2) 厌氧氨氧化启动过程不同时间, 细菌群落多样性指数存在显著差异 ( $P < 0.05$ ); 微生物群落结构在厌氧氨氧化启动过程呈现空间分异特征, 且存在显著差异 (ANOSIM:  $R = 0.846$ ,  $P = 0.001$ )。

(3) 厌氧氨氧化启动过程, 细菌群落功能较为丰富, 且不同时间阶段细菌群落一级功能层在有机系统和代谢方面较为活跃; 二级功能层子功能基因丰度在厌氧氨氧化启动过程发生明显变化。

(4) 厌氧氨氧化启动过程, 细菌群落含有 49 个参与氮素代谢的相关功能基因, 且不同时间阶段参与硝化、反硝化、厌氧氨氧化、硝酸盐同化/异化还原和亚硝酸盐同化/异化还原过程的相关功能基因丰度发生明显变化。

#### 参考文献:

- [1] Oshiki M, Shimokawa M, Fujii N, et al. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium 'Candidatus Brocadia sinica' [J]. *Microbiology*, 2011, **157** (6): 1706-1713.
- [2] Van Loosdrecht M C M, Brdjanovic D. Anticipating the next century of wastewater treatment [J]. *Science*, 2014, **344** (6191): 1452-1453.
- [3] Kartal B, Van Niftrik L, Keltjens J T, et al. Anammox-growth physiology, cell biology, and metabolism [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2012, **60**: 211-262.
- [4] Jin R C, Yang G F, Yu J J, et al. The inhibition of the Anammox process: a review [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, **197**: 67-79.
- [5] Strous M M, Kuenen J G, Jetten M S M. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65** (7): 3248-3250.
- [6] Lotti T, Kleerebezem R, Abelleira-Pereira J M, et al. Faster through training: the anammox case [J]. *Water Research*, 2015, **81**: 261-268.
- [7] Ma B, Wang S Y, Cao S B, et al. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: recent advances [J]. *Bioresource Technology*, 2016, **200**: 981-990.
- [8] 姜滢, 郭萌蕾, 谢军祥, 等. 不同培养条件厌氧氨氧化颗粒污泥性质及微生物群落结构差异 [J]. *环境科学*, 2020, **41** (5): 2358-2366.
- Jiang Y, Guo M L, Xie J X, et al. Characteristics of ANAMMOX granular sludge and differences in microbial community structure under different culture conditions [J]. *Environmental Science*, 2020, **41** (5): 2358-2366.
- [9] Guo J H, Ni B J, Han X Y, et al. Unraveling microbial structure and diversity of activated sludge in a full-scale simultaneous nitrogen and phosphorus removal plant using metagenomic sequencing [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, **102**: 16-25.
- [10] Luo J H, Chen H, Han X Y, et al. Microbial community structure and biodiversity of size-fractionated granules in a partial nitrification-anammox process [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, **93** (6), doi: 10.1093/femsec/fix021.
- [11] 任君怡, 陈林芝, 李慧春, 等. 不同种泥的厌氧氨氧化反应器的启动及动力学特征 [J]. *环境科学*, 2019, **40** (3): 1405-1411.
- Ren J Y, Chen L Y, Li H C, et al. ANAMMOX reactor with two kinds of inoculated sludge: start-up and kinetics characteristics [J]. *Environmental Science*, 2019, **40** (3): 1405-1411.
- [12] 汪瑶琪, 张敏, 姜滢, 等. 厌氧氨氧化启动过程及微生物群落结构特征 [J]. *环境科学*, 2017, **38** (12): 5184-5191.
- Wang Y Q, Zhang M, Jiang Y, et al. Start-up and characteristics of the microbial community structure of ANAMMOX [J]. *Environmental Science*, 2017, **38** (12): 5184-5191.
- [13] Langille M G I, Zaneveld J, Caporaso J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31** (9): 814-821.
- [14] Douglas G M, Maffei V J, Zaneveld J R, et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, **38** (6): 685-688.
- [15] 张菲, 田伟, 孙峰, 等. 丹江口库区表层浮游细菌群落组成与 PICRUSt 功能预测分析 [J]. *环境科学*, 2019, **40** (3): 1252-1260.
- Zhang F, Tian W, Sun F, et al. Community structure and predictive functional analysis of surface water bacterioplankton in the Danjiangkou reservoir [J]. *Environmental Science*, 2019, **40** (3): 1252-1260.
- [16] 董志颖, 洪慢, 胡晗静, 等. 过量氮输入对寡营养海水细菌群落代谢潜力的影响 [J]. *环境科学学报*, 2018, **38** (2): 457-466.
- Dong Z Y, Hong M, Hu H J, et al. Effect of excess nitrogen loading on the metabolic potential of the bacterial community in oligotrophic coastal water [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, **38** (2): 457-466.
- [17] Li X J, Sun S, Yuan H Y, et al. Mainstream upflow nitrification-anammox system with hybrid anaerobic pretreatment: long-term performance and microbial community dynamics [J]. *Water Research*, 2017, **125**: 298-308.
- [18] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 [J]. *Nature Biotechnology*, 2019, **37** (8): 852-857.
- [19] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, et al. DADA2: high-

- resolution sample inference from Illumina amplicon data [J]. *Nature Methods*, 2016, **13**(7): 581–583.
- [20] Katoh K, Misawa K, Kuma K I, *et al.* MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**(14): 3059–3066.
- [21] Price M N, Dehal P S, Arkin A P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments [J]. *PLoS One*, 2010, **5**(3), doi: 10.1371/journal.pone.0009490.
- [22] Bokulich N A, Kaehler B D, Rideout J R, *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin [J]. *Microbiome*, 2018, **6**(1), doi: 10.1186/s40168-018-0470-z.
- [23] Wang G P, Zhang D, Xu Y, *et al.* Comparing two start up strategies and the effect of temperature fluctuations on the performance of mainstream anammox reactors [J]. *Chemosphere*, 2018, **209**: 632–639.
- [24] Liu W R, Yang D H, Chen W J, *et al.* High-throughput sequencing-based microbial characterization of size fractionated biomass in an anoxic anammox reactor for low-strength wastewater at low temperatures [J]. *Bioresource Technology*, 2017, **231**: 45–52.
- [25] Gonzalez-Gil G, Sougrat R, Behzad A R, *et al.* Microbial community composition and ultrastructure of granules from a full-scale anammox reactor [J]. *Microbial Ecology*, 2015, **70**: 118–131.
- [26] 曹雁, 王桐屿, 秦玉洁, 等. 厌氧氨氧化反应器脱氮性能及细菌群落多样性分析 [J]. *环境科学*, 2017, **38**(4): 1544–1550.  
Cao Y, Wang T Y, Qin Y J, *et al.* Nitrogen removal characteristics and diversity of microbial community in ANAMMOX reactor [J]. *Environmental Science*, 2017, **38**(4): 1544–1550.
- [27] Xie Z F, Wang Z W, Wang Q Y, *et al.* An anaerobic dynamic membrane bioreactor (AnDMBR) for landfill leachate treatment: performance and microbial community identification [J]. *Bioresource Technology*, 2014, **161**: 29–39.
- [28] 陈重军, 张海芹, 汪瑶琪, 等. 基于高通量测序的 ABR 厌氧氨氧化反应器各隔室细菌群落特征分析 [J]. *环境科学*, 2016, **37**(7): 2652–2658.  
Chen C J, Zhang H Q, Wang Y Q, *et al.* Characteristics of microbial community in each compartment of ABR ANAMMOX reactor based on high-throughput sequencing [J]. *Environmental Science*, 2016, **37**(7): 2652–2658.
- [29] Lawson C E, Wu S, Bhattacharjee A S, *et al.* Metabolic network analysis reveals microbial community interactions in anammox granules [J]. *Nature Communications*, 2017, **8**, doi: 10.1038/ncomms15416.
- [30] Brenner D J, Krieg N R, Staley J T. *Bergey's manual of systematic bacteriology* [M]. New York: Springer, 2005.
- [31] Hu M, Wang X H, Wen X H, *et al.* Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis [J]. *Bioresource Technology*, 2012, **117**: 72–79.
- [32] Björnsson L, Hugenholtz P, Tyson G W, *et al.* Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal [J]. *Microbiology*, 2002, **148**(Pt 8): 2309–2318.
- [33] Kindaichi T, Yuri S, Ozaki N, *et al.* Ecophysiological role and function of uncultured *Chloroflexi* in an anammox reactor [J]. *Water Science and Technology*, 2012, **66**(12): 2556–2561.
- [34] Cao S B, Du R, Li B K, *et al.* High-throughput profiling of microbial community structures in an ANAMMOX-UASB reactor treating high-strength wastewater [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, **100**(14): 6457–6467.
- [35] Zhao Y P, Liu S F, Jiang B, *et al.* Genome-centered metagenomics analysis reveals the symbiotic organisms possessing ability to cross-feed with anammox bacteria in anammox consortia [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, **52**(19): 11285–11296.
- [36] 姚芳, 刘波, 王德朋, 等. 不同接种污泥的厌氧氨氧化反应器启动特性及菌群结构演替规律分析 [J]. *环境科学学报*, 2017, **37**(7): 2543–2551.  
Yao F, Liu B, Wang D P, *et al.* Start-up of ANAMMOX enrichment with different inoculated sludge and analysis of microbial community structure shift [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, **37**(7): 2543–2551.
- [37] Schmid M C, Maas B, Dapena A, *et al.* Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(4): 1677–1684.
- [38] Wang D P, Li T, Huang K L, *et al.* Roles and correlations of functional bacteria and genes in the start-up of simultaneous anammox and denitrification system for enhanced nitrogen removal [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, **655**: 1355–1363.
- [39] Van Der Star W R L, Miclea A I, Van Dongen U G J M, *et al.* The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, **101**(2): 286–294.
- [40] Puyol D, Carvajal-Arroyo J M, Garcia B, *et al.* Kinetic characterization of *Brocadia* spp.-dominated anammox cultures [J]. *Bioresource Technology*, 2013, **139**: 94–100.
- [41] Zhang L, Narita Y, Gao L, *et al.* Microbial competition among anammox bacteria in nitrite-limited bioreactors [J]. *Water Research*, 2017, **125**: 249–258.
- [42] Xia Y, Wang Y B, Wang Y, *et al.* Cellular adhesiveness and cellulolytic capacity in anaerolineae revealed by omics-based genome interpretation [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, **9**, doi: 10.1186/s13068-016-0524-z.
- [43] Nelson M C, Morrison M, Yu Z T. A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters [J]. *Bioresource Technology*, 2011, **102**(4): 3730–3739.
- [44] Yang W, He S L, Han M, *et al.* Nitrogen removal performance and microbial community structure in the start-up and substrate inhibition stages of an anammox reactor [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018, **126**(1): 88–95.
- [45] 何承兴, 储昭瑞, 谭炳琰, 等. 厌氧氨氧化 SBBR 启动过程中菌群演替分析 [J]. *水处理技术*, 2019, **45**(7): 93–96.  
He C X, Chu Z R, Tan B Y, *et al.* Bacterial community dynamics during the start-up of Anammox SBBR [J]. *Technology of Water Treatment*, 2019, **45**(7): 93–96.
- [46] Wang Y Y, Wang H Y, Zhang J Y, *et al.* Deciphering the evolution of the functional genes and microbial community of the combined partial nitritation-anammox process with nitrate build-up and its *in situ* restoration [J]. *RSC Advances*, 2016, **6**(113): 111702–111712.
- [47] 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.
- [48] 崔迪. 寒区污水生化处理系统微生物群落结构与功能解析 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.

- Cui D. Analysis of microbial community structure and function in cold aera wastewater biological systems [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014.
- [49] 李小平, 方涛, 敖鸿毅, 等. 东湖沉积物中 dNaR 活性和硝酸盐还原菌的垂向分布 [J]. 中国环境科学, 2010, **30**(2): 228–232.
- Li X P, Fang T, Ao H Y, *et al.* Vertical variation of dissimilatory nitrate reductase activity and nitrate reducer in the sediments of Lake Donghu [J]. China Environmental Science, 2010, **30**(2): 228–232.
- [50] Chen H, Hu H Y, Chen Q Q, *et al.* Successful start-up of the anammox process: Influence of the seeding strategy on performance and granule properties [J]. Bioresource Technology, 2016, **211**: 594–602.

---

## 《环境科学》再获“百种中国杰出学术期刊”称号

2020年12月29日,中国科技论文统计结果发布会在北京举行,会议公布了“百种中国杰出学术期刊”获奖名单。《环境科学》连续19次荣获“百种中国杰出学术期刊”称号。“百种中国杰出学术期刊”是根据中国科技学术期刊综合评价指标体系进行评定。该体系利用总被引频次、影响因子、基金论文比、他引总引比等多个文献计量学指标进行统计分析,对期刊分学科进行评比,其评价结果客观公正,为我国科技界公认,并具有广泛影响。