

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第31卷 第7期 Vol.31 No.7 **2011**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 31 卷 第 7 期

2011 年 4 月 (半月刊)

目 次

川南天然常绿阔叶林人工更新后土壤氮库与微生物的季节变化·····	龚 伟,胡庭兴,王景燕,等 (1763)
IBIS 模拟东北东部森林 <i>NPP</i> 主要影响因子的敏感性·····	刘 曦,国庆喜,刘经纬 (1772)
不同坡位沙棘光合日变化及其主要环境因子·····	靳甜甜,傅伯杰,刘国华,等 (1783)
氮、硫互作对克隆植物互花米草繁殖和生物量累积与分配的影响·····	甘 琳,赵 晖,清 华,等 (1794)
海岛棉和陆地棉叶片光合能力的差异及限制因素·····	张亚黎,姚贺盛,罗 毅,等 (1803)
遮荫对连翘光合特性和叶绿素荧光参数的影响·····	王建华,任士福,史宝胜,等 (1811)
3 种木本植物在铅锌和铜矿砂中的生长及对重金属的吸收·····	施 翔,陈益泰,王树凤,等 (1818)
施氮水平对小麦籽粒谷蛋白大聚合体粒径分布的调控效应·····	王广昌,王振林,崔志青,等 (1827)
强光下高温与干旱胁迫对花生光系统的伤害机制·····	秦立琴,张悦丽,郭 峰,等 (1835)
环境因子和干扰强度对高寒草甸植物多样性空间分异的影响·····	温 璐,董世魁,朱 磊,等 (1844)
利用 CASA 模型模拟西南喀斯特植被净第一性生产力·····	董 丹,倪 健 (1855)
北京市绿化树种紫玉兰的蒸腾特征及其影响因素·····	王 华,欧阳志云,任玉芬,等 (1867)
平衡施肥对缺磷红壤性水稻土的生态效应·····	陈建国,张杨珠,曾希柏,等 (1877)
冬小麦种植模式对水分利用效率的影响·····	齐 林,陈雨海,周勋波,等 (1888)
黄土高原冬小麦地 N_2O 排放·····	庞军柱,王效科,牟玉静,等 (1896)
花前渍水预处理对花后渍水逆境下扬麦 9 号籽粒产量和品质的影响·····	李诚永,蔡 剑,姜 东,等 (1904)
低硫氮比酸雨对亚热带典型树种气体交换和质膜的影响·····	冯丽丽,姚芳芳,王希华,等 (1911)
夹竹桃皂甙对福寿螺的毒杀效果及其对水稻幼苗的影响·····	戴灵鹏,罗蔚华,王万贤 (1918)
海河流域景观空间梯度格局及其与环境因子的关系·····	赵志轩,张 彪,金 鑫,等 (1925)
中国灌木林-经济林-竹林的生态系统服务功能评估·····	王 兵,魏江生,胡 文 (1936)
城郊过渡带湖泊湿地生态服务功能价值评估——以武汉市严东湖为例·····	王凤珍,周志翔,郑忠明 (1946)
黄河三角洲植物生态位和生态幅对物种分布-多度关系的解释·····	袁 秀,马克明,王 德 (1955)
基于景观可达性的广州市林地边界动态分析·····	朱耀军,王 成,贾宝全,等 (1962)
红脂大小蠹传入中国危害特性的变化·····	潘 杰,王 涛,温俊宝,等 (1970)
基于线粒体 <i>Cyt b</i> 基因的西藏马鹿种群遗传多样性研究·····	刘艳华,张明海 (1976)
不同干扰下荒漠啮齿动物群落多样性的多尺度分析·····	袁 帅,武晓东,付和平,等 (1982)
秦岭鼯鼠的洞穴选择与危害防控·····	鲁庆彬,张 阳,周材权 (1993)
京杭运河堤坝区域狗獾的栖息地特征·····	殷宝法,刘宇庆,刘国兴,等 (2002)
专论与综述	
微生物胞外呼吸电子传递机制研究进展·····	马 晨,周顺桂,庄 莉,等 (2008)
厌氧氨氧化菌脱氮机理及其在污水处理中的应用·····	王 惠,刘研萍,陶 莹,等 (2019)
问题讨论	
海河流域森林生态系统服务功能评估·····	白 杨,欧阳志云,郑 华,等 (2029)
研究简报	
体重和盐度对中国蛤蚧耗氧率和排氨率的影响·····	赵 文,王雅倩,魏 杰,等 (2040)
虾塘养殖中后期微型浮游动物的摄食压力·····	张立通,孙 耀,赵从明,等 (2046)

期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 290 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 33 * 2011-04



封面图说:日斜茅荆坝·河北茅荆坝——地处蒙古高原向华北平原过渡地带的暖温带落叶阔叶林,色彩斑斓,正沐浴着晚秋温暖的阳光。

彩图提供:国家林业局陈建伟教授 E-mail: cites.chenjw@163.com

厌氧氨氧化菌脱氮机理及其在污水处理中的应用

王 惠¹, 刘研萍², 陶 莹³, 刘新春^{1,*}

(1. 中国科学院研究生院资源与环境学院, 北京 100049; 2. 北京化工大学环境科学与工程系, 北京 100029;
3. 河南源通环保工程有限公司, 开封 475000)

摘要: 厌氧氨氧化细菌 (anammox) 可以将亚硝酸盐和氨氮转化为氮气从而缩短氨氮转化的过程, 它已经成为新型生物污水脱氮技术研究的热点之一。当前, 有关厌氧氨氧化菌特有的生理结构特点、种群分类及其功能酶等方面的研究取得了一定突破, 为实现其工业应用奠定了良好的理论基础; 同时分子生物学技术在厌氧氨氧化细菌种群分布、群落多样性及其共生关系等方面的应用也大大促进了污水生物脱氮技术的革新和进步。总结了厌氧氨氧化菌主要的生理生化特点、细胞结构特点、脱氮机理、污水处理体系中的应用以及分子生物学方法对污水处理体系中厌氧氨氧化菌种群分析的研究现状, 并指出未来 anammox 细菌在生物特性及在污水脱氮处理实际应用的研究中的热点问题。生物特性方面的主要研究热点有: (1) anammox 细菌除厌氧氨氧化作用外, 其它新陈代谢途径有待探索; (2) anammox 细菌在不同环境中分布的倾向性问题; (3) 新型 anammox 细菌的确定。污水处理的实际应用方面的主要研究热点有: (1) anammox 污泥的快速高效富集问题; (2) 设计高特异性引物; (3) anammox 细菌和其他微生物的共生关系。

关键词: 厌氧氨氧化菌; 生理生化特点; 污水处理工艺; 分子生物学方法

The biochemical mechanism and application of anammox in the wastewater treatment process

WANG Hui¹, LIU Yanping², TAO Ying³, LIU Xinchun^{1,*}

1 College of Resources and Environment, Graduate University Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

2 Department of Environmental Sciences and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

3 Yuan Tong Environmental Engineering Co., Ltd. He Nan, Kaifeng 475000, China

Abstract: Anaerobic ammonium-oxidation (anammox) with nitrite as an electron acceptor has been discovered as both a completely different pathway of the nitrogen cycle and a new cost-effective method for removal of ammonium from wastewater. Recently, the study of the peculiar biochemical mechanism, special structure and function of anammoxosome, functional enzymes and related genes, microbial ecological biotope, and diversity of the anaerobic ammonium oxidation have obtained great improvement, which provided theoretical foundation for the application of anammox bacteria. Especially in the wastewater treatment engineering, the anammox process has become the hotspot in research of new biological N-removal technique for wastewater treatment with its advantages of abbreviation on the N-removal process and low material and energy consumption. Deeper understanding in their species diversity, distribution in the sludge, and qualitative and quantitative relationships with other bacterial species will significantly accelerate the renovation of N-removal technique for wastewater treatment. A summary on the advances in processes on the main physiology characteristics, structural characteristics, biochemical mechanism, applications in the wastewater systems and species analysis of anammox in the engineering process by molecular biological methods are all presented in this paper. Firstly, the anammox reaction takes place inside the anammoxosome; an intracytoplasmic compartment bounded by a single ladderane lipid-containing membrane, and the ladderane membrane lipids have so far been found only in the anammox bacteria. Secondly, all the anammox bacteria are

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-G-054); 国家科技支撑计划 (2007BAD87B12)

收稿日期: 2010-03-10; **修订日期:** 2010-06-02

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xcliu@yahoo.cn

affiliated within 85% sequence similarity of 16S rRNA genes in the branch of *Planctomycetes* and different levels of the anammox bacterial diversity and distribution are found in various ecosystems. Thirdly, the nitrite reductase, hydrazine hydrolase, and hydrazine oxidizing enzyme are the essentially functional enzymes. Fourthly, the discovery of anammox bacteria and its anaerobic metabolism of ammonia oxidizers open up new possibilities for nitrogen removal from wastewater, which made the paradigm that the only way to biologically convert wastewater ammonium to dinitrogen gas necessitates the complete oxidation to nitrate followed by heterotrophic denitrification become obsolete. Finally, the implementation of the molecular biological methods in the ANAMMOX-related wastewater treatment systems has broadened our information towards the anammox bacteria. The research hotspots of anammox bacteria in both biochemical characteristics and application in wastewater treatment systems are also summarized here. On the aspect of biochemical characteristics, the issues addressed are: (1) some new metabolic reactions besides the anammox reaction have been found, while their theories and reasons were still unclear; (2) the distribution inclination of anammox bacteria in different ecosystems seems to provide some rule which is still unidentified; (3) new kinds of anammox bacteria wait for discovery to expend the phylogenetic relationship, all of which would increase the genetic and ecological spectrum of anammox bacteria in the nature. In terms of the wastewater treatment application, the following issues are dealt with: (1) proper designs and methods for higher efficiency in the enrichment and stabilization of anammox bacteria are required in order to shorten the start-up process of the ANAMMOX-like wastewater treatment plants; (2) more primers or probes with high specificity to anammox bacteria are also needed to guarantee the precision and credibility of research study; (3) the coexistence relationship of anammox and other groups of bacteria, which are still not confirmed, would facilitate the exploration of new anammox metabolism and characteristics, all of which would advance the actual application of anammox bacteria in the wastewater treatment plants.

Key Words: anammox; biochemical characteristics; wastewater treatment; molecular biological methods

1 厌氧氨氧化菌(anammox)概述

早在 20 世纪 70 年代, Broda 就根据热力学自由能以及生物进化关系推测自然界中可能存在有类似厌氧氨氧化作用的微生物^[1]。20 世纪 90 年代, 荷兰一个酵母生产厂的污水处理系统中发现了 anammox 细菌的存在^[2], 首次证实了这种推测。在厌氧条件下, anammox 细菌以羟胺和胍为中间产物, 将亚硝酸盐和氨氮转化为氮气。随着多种生物化学方法研究的深入, 研究者发现 anammox 细菌广泛生存于包括海洋水体、海洋沉积物、厌氧水体、淡水湖泊以及温泉等在内的自然环境中^[3-7]。在海洋环境中, 约 50% 的氮转化是由于 anammox 细菌的厌氧氨氧化作用产生的^[8], 这一重要发现改变了人们对于海洋环境中氮循环的传统观点: 海洋环境中氮气的产生只依赖于反硝化作用。在多种人工构建的污水生物处理体系中, anammox 细菌也在发挥着重要作用。基于 anammox 细菌的氨氮转化特点研制开发的 ANAMMOX、SHARON-ANAMMOX、CANON 等新兴的生物脱氮技术为生物脱氮领域带来了技术革新, 使人们能够逐步地摆脱传统脱氮工艺高成本、高消耗的束缚, 实现真正意义上的节能减排。

2 厌氧氨氧化菌的生理生化特点

2.1 生理结构特点

Anammox 细菌是一类生长缓慢的微生物, 世代周期约为 10—12d; 菌体呈球菌状, 直径不足 1 μm; 对光和氧气等较敏感。当前, 还未获得 anammox 细菌的纯培养菌株, 在对 anammox 细菌进行富集培养时, 会发现 anammox 污泥颜色由棕色变为深红色^[9]。Anammox 细菌的细胞结构以及氧化还原过程都呈现出与其它细菌不同的特点:

(1) Anammox 细胞中的脂质由酯-脂肪酸和醚-脂肪酸两类组成, 这些膜脂质呈环形阶梯状, 并成为独特的梯形膜脂质, 目前只在 anammox 细菌中发现有梯形膜脂质的存在^[10];

(2) Anammox 细菌具有独特的细胞结构——anammoxosome(厌氧氨氧化体), 作为厌氧氨氧化作用以及

能量代谢的场所,膜上附着有反应所需的酶。Anammoxosome 的膜是多种梯形膜脂质结构,其结构硬度和形状决定了细胞生物膜特殊的密度和非渗透性,可以有效地减少中间产物肼和质子的流失以避免能量损失,同时阻止毒性的中间产物肼扩散到细胞质中^[10]。

Strous M 等人^[11]利用环境基因组学方法(重塑环境样品中的基因组信息)分析不可分离培养的 *Kuenenia stuttgartiensis* 细菌的基因组序列,发现其编码 ladderane lipid(梯形烷脂)合成的基因有 4 个基因簇组成,其中 2 个是由已知脂肪酸生物合成的相同基因和 S-腺苷甲硫氨酸的核心酶基因组成的。但梯形烷脂具体的合成路径尚未弄清楚,这已成为当前研究的一个热点。

2.2 分子生物学鉴定

16S rRNA 基因分析认为 anammox 细菌是浮酶状菌门(*Phylum Planctomycetales*)分支进化而来的一类自养群体。至今,已报道的 anammox 细菌分属于 5 个可能的属,分别是: *Candidatus "Brocadia"*、*Candidatus "Kuenenia"*、*Candidatus "Scalindua"*、*Candidatus "Anammoxoglobus"* 和 *Candidatus "Jettenia"*^[12]。

利用分子生物学方法对不同生态环境中 anammox 细菌进行观察和鉴定,发现 anammox 细菌多样性有 3 个特点^[13]:

(1) 所有已发现的 anammox 细菌的 16S rRNA 基因序列与浮酶状菌(*Planctomycetes*)的分支的 16S rRNA 基因序列有很高的相似性;

(2) anammox 细菌广泛存在于自然和人工环境中。在深海厌氧污泥、海洋紊流处污泥、富含有机质的淡水污泥、水生附着生物为主的好氧污泥、古冻土冻结污泥、陆面多种水体、多种污水处理系统以及热带、温带、寒带的厌氧海洋环境中均发现有 anammox 细菌的存在^[14-15];

(3) 不同的生态环境中,anammox 细菌会呈现不同的分布和多样性。同一生态系统中,anammox 细菌会呈现出较弱的多样性,不同的 anammox 细菌种群的进化距离较远,即存在这样的可能:一种菌种倾向于一种单一的生存环境^[16]。当前基于 anammox 细菌 16S rRNA 基因的种群多样性分析发现:在厌氧海洋环境中只发现了类 *Candidatus "Scalindua"* 细菌的存在^[14, 17-18];而 *Candidatus "Brocadia"*、*Candidatus "Kuenenia"*、*Candidatus "Anammoxoglobus"* 倾向于在厌氧淡水等水体中生存。但在研究某些自然水体(如日本沿海海洋沉积污泥^[19]、中国新沂河沉积污泥^[20])的 anammox 细菌多样性时, *Candidatus "Brocadia"*、*Candidatus "Kuenenia"* 却成为优势菌种,且其多样性远超过以往对自然环境中此类菌种的估计,这一结果有悖于传统对 anammox 细菌不同种群生存环境倾向性的判断。2005 年, Güven D 等人^[21]在有机化合物环境中发现丙酸盐能被 anammox 细菌氧化,以硝酸盐/亚硝酸盐为电子受体产生 CO₂,这一氧化过程和厌氧氨氧化过程是同时进行的。2007 年, Kartal B 等人^[16]利用分子生物学技术在丙酸、氨氮的环境中发现了一种新的厌氧氨氧化菌——*Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"*,它能高速率的氧化有机酸,并在 anammox 细菌种群结构中占有绝对优势。这些研究不仅为进一步分析不同 anammox 细菌菌群的生存环境倾向性提供了宝贵经验,同时也说明 anammox 细菌可能存在着多种新陈代谢途径,有关这方面的认识有待进一步探索。

2.3 厌氧氨氧化作用及其分子作用机理

厌氧条件下,anammox 细菌以羟胺/NO、肼为中间产物,将亚硝酸盐和氨氮转化为氮气,同时产生微生物生长繁殖需要的能量。

厌氧氨氧化反应发生在 anammoxosome 和细胞质内(图 1)。在细胞质中,4 个电子与 5 个质子在亚硝酸盐还原酶作用下将亚硝酸盐还原生成羟胺,但也有研究发现 anammox 基因中存在有编码亚硝酸盐——NO 的氧化还原酶^[11],说明亚硝酸盐还原酶可能将亚硝酸盐还原为 NO 作为 anammox 细菌的中间产物^[11, 22-23]。然后,氨氮和羟胺/NO 在肼水解酶作用下生成中间产物肼,肼在位于 anammoxosome 内膜上的肼氧化酶的作用下转化为一分子 N₂、4 个质子和 4 个电子。整个厌氧氨氧化反应通过消耗细胞质中的质子,同时在 anammoxosome 中不断产生质子,在两者之间建立质子梯度以及电势梯度,并在 anammoxosome 膜上附着的三磷酸腺苷合成酶(ATPases)作用下产生 ATP 为细菌生长提供能量。质子可以在质子梯度的推动下通过

ATPases 的质子孔返回细胞质。这一机制类似于呼吸链的氧化磷酸化以及光合作用的氧化磷酸化机制^[10]。

2.4 细胞主要功能酶及其特点

2.4.1 亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, NIR)

NIR 将亚硝酸盐还原为 NO/羟胺,为进一步生成中间产物肼提供底物。VandeGraaf A A 等人^[2]利用 N^{15} 标记法研究发现氨氮的氧化过程以羟胺为主要的电子受体,但 Strous M 等人^[11]利用基因组学方法在 *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"* 细菌的基因组中发现了亚硝酸盐-NO 氧化还原酶基因(NirS),它将亚硝酸盐氧化为 NO,进而生成中间产物肼。所以,NIR 还原亚硝酸盐后产生 NO 还是羟胺作为中间产物仍存在很大的争议,有待进一步证实。

2.4.2 肼还原酶/肼水解酶(hydrazine hydrolase, HH)

氨氮和 NO/羟胺在 HH 作用下反应生成肼。HH 在基因组中由 8 个蛋白基因编码,这一独特的基因簇上的部分编码基因还涉及到电子传递、分解代谢、几个细胞色素合成以及一个 β 螺旋桨式复杂体的合成。HH 的结构与一氧化二氮还原酶的结构有相似之处。有研究推测 HH 位于 anammoxosome 膜上,是联系细胞质和 anammoxosome 的通道,使位于细胞质内的氨氮和羟胺在 HH 作用下产生的肼被释放到 anammoxosome 内^[11]。Karlsson R 等人^[23]利用 HH 的抗体蛋白 kuste2860 (KEFDTPTLRD) 和 kuste2861 (RSPYPLPDDRM) 的免疫电镜标记方法对 HH 的亚细胞空间位置进行了分析,发现:免疫标记仅出现在细胞 anammoxosome 内,且呈有序状出现,进一步说明了 HH 和 anammoxosome 的关系。

2.4.3 肼氧化酶(hydrazine oxidizing enzyme, HZO)

HZO 是厌氧氨氧化过程中一个重要的酶,它将中间产物肼氧化为一分子的氮气、4 个质子和 4 个电子。最初发现好氧氨氧化菌(Aerobic ammonia oxidizing bacteria, AOB)和 anammox 细菌中都含有一类 octahem 细胞色素 C 蛋白,两者都具有类 P_{460} 的光谱结构,即含有一个特别的 P_{460} 血红素残余体^[24]。其中, AOB 携带的是氧化羟胺的羟胺氧化还原酶(hydroxylamine oxidoreductase, HAO);anammox 细菌携带的是氧化肼的肼氧化酶(HZO),且 HZO 较 HAO 的分子量小。Shimamura M 等人通过菌体富集培养浮霉菌株 KSU-1 纯化了结构上含有多个血红素且与 *Candidatus "Brocadia anammoxidans"* 有很高的同源性、功能上能够氧化肼的 HZO 蛋白,并对其进行 HZO 基因测序得到两个编码基因:hzoA (BAF36963),hzoB (BAF36964);对比分析发现:这两个基因与任何一个已经报道的 hao 基因的同源性都较低(<30%),但与 *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"* 基因组中发现的两个 hao 基因却有着较高的相似性(分别为 88%,89%)。HZO 纯化后发现其能氧化肼,却不能氧化羟胺;从而证实了 HZO 是不同于 HAO 作用的氧化还原酶^[22, 25]。

同时,作为编码特定蛋白 HZO 的酶基因序列 hzo 与 16S rRNA 基因相比有着更高的特异性,因此 hzo 基因还可以用于分子生物学方法中引物或探针的设计,更好地为 anammox 细菌的多样性研究服务。Quan Z X 等人^[12]、Li X R 等人^[26]就先后成功的利用 Ana-hzo1f (5'-TGT GCA TGG TCA ATT GAA AG-3')/Ana-hzo2r (5'-ACC TCT TC(A/T) GCA GGT GCA T-3')引物对厌氧氨氧化反应器污泥中 anammox 细菌进行功能基因基础上的扩增,并实现了其多样性分析,结果有助于 anammox 细菌种属的确定。

3 Anammox 细菌在污水处理工艺中的应用

传统的污水处理工艺采用硝化-反硝化作用,由于利用的微生物和运行条件的不同,硝化和反硝化两个过程在时间和空间上是分开的,或者是在不同条件的反应器内进行。虽然这些传统工艺在废水生物脱氮领域目前还起着主导作用,但这些工艺本身也存在较多问题,如:工艺流程较长,占地面积大,基建投资高;由于硝

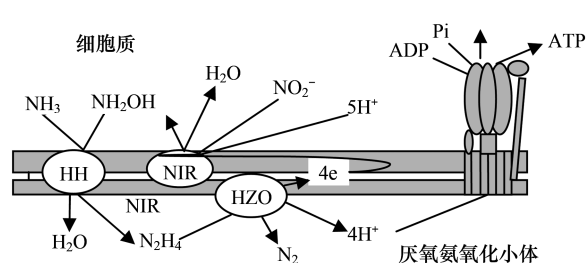


图1 厌氧氨氧化细菌中氨氧化小体(anammoxosome)膜内可能的厌氧氨氧化作用机理,这一过程中产生质子推动力(proton motive force)以及ATP^[10]

Fig. 1 Postulated anaerobic ammonium oxidation coupled to the anammoxosome membrane in anammox bacteria resulting in a proton motive force and subsequent ATP synthesis via membrane-bound ATPases^[10]

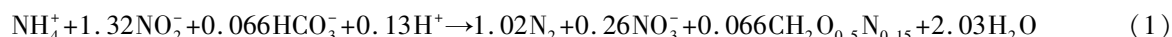
化菌群增殖速度慢而难以维持较高的生物浓度;为维持较高的生物浓度及获得良好的脱氮效果,系统必须同时进行污泥和硝化液回流;其抗冲击负荷能力较弱,高浓度 NH_4^+ 和 NO_2^- 废水会抑制硝化菌生长;另外,硝化过程中产生的酸度需要投加碱中和。这些措施既增加了运行的复杂性和运行成本,又可能造成二次污染等^[27-28]。

Anammox 细菌的氨氧化过程一方面大大缩短了氨氮氧化还原到氮气的过程,从而减少了生物脱氮的物质、能量耗费,另一方面为生物脱氮技术的进步提供了新的发展平台。

3.1 ANAMMOX 工艺

1990 年,荷兰 Delft 技术大学 Kluyver 生物技术实验室设计了 ANAMMOX 工艺;1995 年, Mulder A 等人在脱氮流化床反应器的研究中发现:在缺氧条件下,氨氮的消失和硝酸盐的消耗总是同时发生,并伴有 N_2 的产生^[29]。VandeGraaf A A^[2]、Jetten M K M^[24]、Schalk J^[30] 等人先后利用 N^{15} 作为示踪元素研究了厌氧条件下的氨氧化机理,发现:浮霉菌中一类种群细菌,即 anammox

细菌,以亚硝酸盐为电子受体,以羟胺、联氨为中间产物实现氨氮的转化脱除,这也成为 ANAMMOX 工艺可能的反应机理(图 2 和反应式(1))。研究发现,anammox 细菌消耗底物(氨氮和亚硝酸盐)的比例并不是简单的 1:1,而是 1:1.32 左右,其中多出的约 0.26 mol NO_2^- 在厌氧环境中氧化为硝酸盐,产生的电子可能用于合成 CO_2 ^[31]:



在实验室规模上,ANAMMOX 工艺在不同的反应器中都取得良好的运行效果,包括混合床、流化床、SBR 反应器、上流式反应器等^[32]。当前,ANAMMOX 反应器的主要挑战在于 anammox 细菌的生长缓慢造成的启动时间过长,通常需要 100—150d^[33]。因此如何快速启动 ANAMMOX 反应器是未来研究一个十分重要的问题。

3.2 SHARON-ANOMMOX 工艺

从反应式(1)中可以看到:厌氧氨氧化过程是氨氮和亚硝酸盐以接近 1:1 的比例进行的氧化还原反应,所以,对于高氨氮、低亚硝酸盐的污水处理来说,前期的短程硝化阶段是必要的,即将部分氨氮转化为亚硝酸盐,从而保证厌氧氨氧化的反应底物比例,见反应式(2)^[34]:



为适应这种需要,SHARON-ANAMMOX 工艺应运而生。当约 50% 氨氮被氧化后,pH 的降低以及溶氧受限可以抑制剩余氨氮的进一步氧化,SHARON 反应器就可以达到厌氧氨氧化需要的氨氮/亚硝酸浓度比^[33, 35]。

3.3 CANON 工艺

对于有机质含量低的污水,除了将短程硝化、厌氧氨氧化作用分置于两个反应器中,还可以将两个反应相结合形成一体化反应器,即 CANON (completely autotrophic nitrogen removal over nitrite) 工艺。氨氮在两种细菌 (AOB 和 anammox) 的共同合作下完成转化。在反应器中,AOB 消耗氧气氧化氨氮产生亚硝酸盐,并提供缺氧环境使 anammox 细菌同时生长;然后氨氮和亚硝酸盐在厌氧氨氧化作用下产生氮气脱离反应体系^[36-37],见反应式(3):



CANON 反应在实验室规模上还有待深入研究。Third K A 等人^[37]研究发现:CANON 反应器的氨氮负荷较 ANAMMOX 反应器的低,比如:在上流式反应中为 $1.5\text{kg N m}^{-3} \text{d}^{-1}$,但由于 CANON 工艺只有一个反应器,可以减少运行成本,所以当污水中氨氮日平均负荷较低时,CANON 可以成为最佳选择^[32]。

4 污水处理工艺中 anammox 细菌的分子生物学研究

至今为止,anammox 细菌仍是不可培养的微生物,所以分子生物学方法在研究其多样性、种群分布等特点

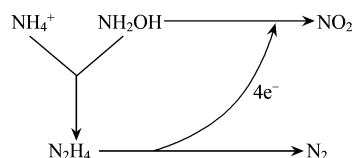


图 2 ANAMMOX 工艺的反应机理^[30]

Fig. 2 Possible reaction mechanism for anaerobic ammonium oxidation proposed

时具有十分重要的意义。对于新型的污水生物脱氮工艺而言,开展分子生物学方法的定性、定量研究对于深入了解生物处理机制、优化运行条件同样重要。

在对 ANAMMOX、CANON 以及 SHARON-ANAMMOX 等反应器中 anammox 细菌的种群分布、定量变化等研究中,已经建立起了较为系统和成熟的分子生物学方法;FISH(荧光原位杂交)、DGGE、克隆、实时定量 PCR (Real-Time PCR)等方法都有了广泛的应用。在特殊的新型污水生物脱氮反应器中,Gong Z 等人^[38]利用 FISH 技术对生物膜-CANON 反应器中 AOB 以及 anammox 细菌的空间分布进行分析,发现:AOB 多位于氧气含量高的生物膜-膜界面,anammox 细菌多位于缺氧的水体-生物膜界面,这与二者的生存环境一致,也为物质的有效传递机制提供了证据。DGGE、克隆方法可以用于种群多样性等方面的研究。Quan Z X 等人^[12]利用克隆-测序方法对运行稳定的 ANAMMOX 反应器进行 anammox 细菌种群多样性的分析,发现了新的优势种群 *Candidatus "Jettenia asiatica"*,丰富了 anammox 细菌的种群组成。鉴于 anammox 细菌生存环境的多样性,科学家们推测自然界中可能存在着多种尚未发现的 anammox 细菌,其多样性的研究仍在进一步的探索中。Li X R 等人^[26]利用 DGGE、克隆等方法对运行稳定的 ANAMMOX 反应器中细菌的多样性进行分析,发现 *N. europaea-eutropha* 种属的 AOB 细菌在厌氧环境中与 anammox 细菌共同存在,推测 AOB 细菌在缺氧或厌氧状态下可能会发生厌氧氨氧化作用,同时发现丝状菌的大量存在,推测其构架作用有助于 anammox 污泥的富集,提出 anammox 与 AOB 细菌的共生关系以及 anammox 与其它异养微生物的共生关系有待进一步研究。Real-Time PCR 方法可以定性定量地分析不同种群间的数量关系以及种群随外界条件的动态变化,从而反映反应体系中微生物的动态机制。Li X R 等人^[26]利用 Real-Time PCR 的方法对厌氧状态下 ANAMMOX 反应器中 AOB 细菌和 anammox 细菌的数量进行了比较,发现虽然 *N. europaea-eutropha* 种属的 AOB 细菌在厌氧环境中与 anammox 细菌共同存在,但其在数量上只是 anammox 细菌数量的 0.8%;Quan Z X 等人^[12]在也利用 Real-Time PCR 方法对一稳定运行的 ANAMMOX 反应器的细菌进行了定量分析,发现主要的 anammox 细菌占总细菌的 50%,而 AOB 只占 3%。这些结果从定量的角度反映了 anammox 细菌对高氨氮污水的脱氮处理起着重要的作用。

当前,利用分子生物学方法研究 ANAMMOX 等工艺中的 anammox 细菌时还存在一些问题:

(1) 普通的 16S rRNA 基因的引物与 anammox 细菌的相应基因片段匹配度较低,有时难以实现 anammox 细菌的 DNA 复制和多样性观察,因此,设计特异性引物对于促进 anammox 细菌的分子生物学研究有着十分重要的意义。

由于 pla46f 对浮霉菌的特异性较低,所以在很多研究中利用 pla46f 等针对浮霉菌的引物进行 PCR 克隆时,发现部分非浮霉菌的细菌得到扩增。Li X R 等人^[26]在利用 pla46f/1390r 引物对 anammox 细菌进行多样性分析时,发现约 60% 的克隆结果分别属于 *Chlorobi*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria* 和 *Proteobacteria* 门,大大降低了对 anammox 细菌多样性判断的准确性。随后 Amano T 等人^[19]设计并验证了针对厌氧氨氧化菌特殊序列的引物 Amx368f/Amx820 以及最佳退火温度,Sánchez-Melsió A 等人^[39]也比较了以 pla46f 为前引物的多组引物和 Amx368f/Amx820,进一步证实了此引物与 pla46f 类引物相比具有较高的特异性;同时采用巢式 PCR 可以提高引物的灵敏度,有利于对 anammox 细菌含量较低的污泥进行检测。Schmid M C 等人^[40]曾总结了观察 anammox 细菌所用的寡核苷酸探针和适宜的 PCR 引物序列(表 1),其中一些针对 anammox 某个种属细菌的引物具有一定的特异性,为 anammox 细菌分子生物学研究的有效开展提供了参考。近几年,人们发现:HZO 作为 anammox 细菌氧化中间产物肼产生氮气的关键酶,其编码基因具有较高的特异性。结合浮霉菌株 KSU-1 分离纯化后的 HZO 蛋白、*Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"* 基因组的研究以及所有已知 anammox 细菌序列的多样性分析^[22, 25, 41],研究者设计了 hzo 引物,即 Ana-hzo1f (5'-TGT GCA TGG TCA ATT GAA AG-3')/ Ana-hzo2r (5'-ACC TCT TC(A/T) GCA GGT GCA T-3')。在 Li X R 等人^[26]的研究中,利用浮霉菌 16S rRNA 基因的引物进行克隆分析,只发现了 *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"* 一类种属,而利用针对 hzo 基因的引物则发现了与 *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"*、*Candidatus "Jettenia asiatica"*、KSU-1 等多类种属

相似度较高的 hzo 序列,提高了多样性结果分析的准确性和可靠性。未来的研究中,高特异性引物的设计仍然是研究者们挑战的难点,但随着基因组技术的发展,相信更多的高特异性引物会被设计并引用到 anammox 细菌的分子生物学研究中。

表 1 用于观察厌氧氨氧化细菌的寡核苷酸探针以及其作为 PCR 引物的适用性^[40]

Table 1 Oligonucleotide probes used for the detection of anammox organisms and their suitability for use as PCR primers ^[40]				
寡核苷酸名称 OPD ^a designation trivial name	特异性 Specificity	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	% 甲酰胺/mM[氯化钠] % Formamide/mM[NaCl] ^b	作为 PCR 引物的检测 Tested as PCR primer ^c
S-P-Planc-0046-a-A-18	<i>Planctomycetales</i>	GACTTGCATGCCTAATCC	25/159	F (58℃)
S-P-Planc-0886-a-A-19	<i>Isosphaera</i> , <i>Gemmata</i> , <i>Pirellula</i> , <i>Planctomyces</i>	GCCTTGGCGACCATACTCCC	30/112	—
S-D-Bact-0338-b-A-18	Bacterial lineages not covered by probes EUB338 and EUB338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	0/900	—
S-D-Bact-0338-d-A-18d	Bacterial lineages not covered by probes EUB338, EUB338 II, EUB338 III d	GCAGCCTCCCCTAGGAGT	0/900	—
S- * -Amx-0368-a-A-18	<i>All anammox organisms</i>	CCTTTCCGGGCATTGCGAA	15/338	F/R (56℃)
L- * -Amx-1900-a-A-21	Genera “ <i>Ca. Brocadia</i> ” and “ <i>Ca. Kuenenia</i> ”	CATCTCCGGCTTGAACAA	30/112	—
S- * -Amx-0820-a-A-22	Genera “ <i>Ca. Brocadia</i> ” and “ <i>Ca. Kuenenia</i> ”	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	40/56	F/R (56℃)
S-G-Sca-1309-a-A-21	Genus “ <i>Ca. Scalindua</i> ”	TGGAGGCGAATTTCAGCCTCC	5/675	R(56℃)
S- * -Scabr-1114-a-A-22	“ <i>Ca. Scalindua brodae</i> ”	CCCCTGTAACTAAAAACAAG	20/225	R(56℃)
S- * -BS-820-a-A-22	“ <i>Ca. Scalindua wagneri</i> ” “ <i>Ca. Scalindua sorokinii</i> ”	TAATTCCTCTACTTAGTGCCC	40/56	R(56℃)
S-S-Kst-0157-a-A-18	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	GTTCCGATTGCTCGAAAC	25/159	—
S- * -Kst-1275-a-A-20	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	TCGGCTTTATAGGTTTCGCA	25/159	—
S-S-Ban-0162(B. anam.)-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CGGTAGCCCCAATTGCTT	40/56	—
S- * -Amx-0156-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CGGTAGCCCCAATTGCTT	40/56	—
S- * -Amx-0223-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GACATTGACCCCTCTCTG	40/56	—
S- * -Amx-0432-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CTTAACCTCCCGACAGTGG	40/56	—
S- * -Amx-0613-a-A-22	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CCGCCATTCTTCCGTTAAGCGG	40/56	—
S- * -Amx-0997-a-A-21	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TTTCAGGTTTCTACTTCTACC	20/225	—
S- * -Amx-1015-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GATACCGTTCGTCGCCCT	60/14	—
S- * -Amx-1154-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TCTTGACGACAGCAGTCT	20/225	—
S- * -Amx-1240-a-A-23	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TTTAGCATCCCTTTGTACCAACC	60/14	—
I- * -Ban-0071(B. anam.)-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	CCCTACCACAAACCTCGT	10/450	—
I- * -Ban-0108(B. anam.)-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	TTTGGGCCCGCAATCTCA	10/450	—
I- * -Ban-0222(B. anam.)-a-A-19	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GCTTAGAATCTTCTGAGGG	10/450	—
I- * -Ban-0389(B. anam.)-a-A-18	“ <i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> ”	GGATCAAATTGCTACCCG	10/450	—
I- * -Kst-0031(K. stutt.)-a-A-18	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	ATAGAAGCCTTTTCGCGG	10/450	—
I- * -Kst-0077(K. stutt.)-a-A-18	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	TTTGGGCCACACTCTGTT	10/450	—
I- * -Kst-0193(K. stutt.)-a-A-19	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	CAGACCGGACGTATAAAAG	10/450	—
I- * -Kst-0288(K. stutt.)-a-A-20	“ <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> ”	GCGCAAAGAAATCAAACCTGG	10/450	—

a: OPD, 寡核苷酸探针数据名称;
b: 原位杂交时杂交缓冲液中甲酰胺的百分数以及洗脱缓冲液中氯化钠的浓度;
c: F, 前引物; R, 后引物; 括号里是常用退火温度; 注意: 用于前引物的探针和给出的探针序列是互补相反的; — 代表不确定

(2) 在解决 ANAMMOX 等反应器启动时间过长的问题上,如何更有效地富集 anammox 细菌成为重点。从接种污泥的选择到最后成功实现 anammox 细菌的高效富集,每一个步骤都可以作为创新的突破点,从而实现 anammox 相关反应器的快速启动和稳定运行。

首先,接种污泥的选择直接关系着 ANAMMOX 等反应器能否成功建立并稳定运行。研究发现,从多种不同类型的反应器,或者处理不同污水性质的反应器中选取活性污泥进行接种,经过 3—4 个月时间,在人工配水的良好环境下生长,最终都可以实现 anammox 细菌的富集^[42-44]。但是,如果接种污泥的性质不同,其反应

器启动过程以及稳定运行后的出现的 anammox 细菌多样性就会存在一定程度的差异。Date Y 等人^[43]分别利用生活污水处理系统中的剩余污泥、消化液处理后产生的污泥以及处理猪圈污水的硝化池中的污泥作为 anammox 接种污泥,在富集成功后,对其多样性进行分析发现:用生活污水污泥接种富集的反应器有着较高的 anammox 多样性。Tsushima I 等人^[45]在对富集成功的污泥中细菌的多样性进行分析时发现了异养微生物和 anammox 细菌的共存现象,虽然二者是否存在相互作用的问题仍在研究中,但部分异养微生物有助于有机碳和 DO(溶解氧)的消耗,可以为 anammox 细菌提供更适宜的生长环境。所以有学者推测在接种污泥多样性较高的反应器中,anammox 细菌或许可以达到更快的富集效果。在如何更好地选择接种污泥方面,Tsushima I 等人^[45]结合 Real-Time 方法对不同污泥中 anammox 细菌进行了具体定量,并选择 anammox 数量高的污泥作为接种污泥,在后续适宜条件的驯化下,反应器达到了 $26\text{ kg Nm}^{-3}\text{ d}^{-1}$ 的总氮去除率,anammox 细菌的生长周期也变为 3.6—5.4d,大大缩短了 anammox 细菌的世代周期。在污泥形态方面,Pathak B K 等人^[46]认为颗粒污泥的使用有助于 anammox 污泥的富集;Bae H 等人^[44]关于颗粒污泥和悬浮污泥中 anammox 细菌的 Real-Time PCR 结果也表明颗粒污泥中 anammox 细菌数量更多。

其次,富集 anammox 细菌时,反应器的类型选择以及运行条件的优化也有助于系统的启动和稳定运行。SBR、升流式固定床等反应器已被很多学者选择作为 anammox 富集培养的反应器^[42-46]。但由于 anammox 生长速度缓慢,而且反应过程中气体的持续产生,anammox 活性污泥容易在反应器中流失^[47],所以反应器的改进成为关键。Tsushima I 等人^[45]和 Date Y 等人^[43]分别利用无纺布作为污泥载体在其各自的反应器中均实现了 anammox 细菌的高效富集。而 Pathak B K 等人^[46]利用特殊的不可移动式微生物储集器(immobilized microbial consortium)实现了在低温、低氨氮条件下 anammox 污泥的富集。在反应器运行条件方面,Tsushima I 等人^[45]对其上升式固定床反应器的 HRT、进水氨氮/亚硝酸盐进行了优化,发现在一定 HRT 下,氮去除率会随着氨氮/亚硝酸盐比例在一定范围内的增加而增加,而 HRT 较低时,氮去除率会有所升高,这可能是由于反应时产生的有抑制作用的副产物随着水流被淘洗掉了而降低了对 anammox 细菌的抑制作用。其它运行条件的优化还需要更多的研究加以完善。

综上所述,anammox 污泥富集过程中的每一个步骤都可以成为反应器快速启动的加速器,更多行之有效的优化措施还有待开发。如果每个步骤都能得到优化,那么 anammox 相关反应器的投入运行应该不会花费太长的时间。

5 研究展望

对 anammox 细菌的研究是当前研究领域中的一个热点,从第一次发现 anammox 细菌的存在到现在也只有二、三十年的历史,而厌氧氨氧化菌真正在污水脱氮、节能减排等实际应用中发挥作用的时间则更短。当前对 anammox 细菌生物特性、实际应用等方面的研究还有待继续深入。生物特性方面:① anammox 细菌除了其厌氧氨氧化作用之外,还存在其它的新陈代谢途径,例如:利用有机质作为电子供体、利用 Fe^{3+} 、 Mn^{4+} 等离子作为电子受体的氧化还原作用^[17];② anammox 细菌在不同环境中分布的倾向性以及 anammox 细菌新种属的发现。在污水处理的实际应用中,主要的问题在于:① anammox 污泥的高效快速富集,如何从各个方面完善富集方法最终实现反应器的快速启动始终是研究者较为关心的问题;② 如何设计高特异性的引物,为 anammox 细菌的多样性分析带来可靠性和准确性;③ 在很多反应器中,存在 anammox 细菌和其他微生物的共生现象^[26, 48],尤其是异养微生物,两者之间的关系将有助于发掘 anammox 细菌新的作用机制和功能。

ANAMMOX 等反应器的开发大多处在实验室研究阶段,真正投入实际运行的并不多,这就需要利用多学科的知识不断提出新的切入点,发现新的问题和研究方向,不断完善工艺运行条件,使 anammox 细菌能够真正地在污水生物脱氮、环保节能的行动中发挥出更加强大的作用。

References:

- [1] Broda E. 2 Kinds of lithotrophs missing in nature. Zeitschrift Fur Allgemeine Mikrobiologie, 1977, 17(6):491-493.
- [2] van de Graaf A A, de Bruijn P, Robertson L A, Jetten M S M, Kuenen J G. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of¹⁵

- N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology-UK*, 1997, 143(7): 2415-2421.
- [3] Kuypers M M M, Olav Sliemers A, Lavik G, Schmid M, Jørgensen B B, Kuenen J G, Sinninghe Damsté J S, Strous M, Jetten M S M. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 2003, 422(6932):608-611.
- [4] Rysgaard S, Glud R N. Anaerobic N_2 production in Arctic sea ice. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49(1):86-94.
- [5] Dalsgaard T, Thamdrup B, Canfield D E. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology*, 2005, 156(4):457-464.
- [6] Engström P, Dalsgaard T, Hulth S, Aller R C. Anaerobic ammonium oxidation by nitrite (anammox): Implications for N_2 production in coastal marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2005, 69(8):2057-2065.
- [7] Jaeschke A, Op den Camp H J M, Harhangi H, Klimiuk A, Hopmans E C, Jetten M S M, Schouten S, Sinninghe-Damsté J S. 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 67(3):343-350.
- [8] Kuenen J G. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(4):320-326.
- [9] Hong Y G, Li M, Gu J D. Bacterial anaerobic ammonia oxidation (Anammox) in the marine nitrogen cycle A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(3):281-286.
- [10] vanNiftrik L A, Fuerst J A, Damsté J S S, Kuenen J G, Jetten M S M, Strous M. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 233(1):7-13.
- [11] Strous M, Pelletier E, Manganot S, Rattei T, Lehner A, Taylor M W, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, Barbe V, Fonknechten N, Vallenet D, Segurens B, Schenowitz-Truong C, Médigue C, Collingro A, Snel B, Dutilh B E, Op den Camp H J M, van de Drift C, Cirpus I, van de Pas-Schoonen K T, Harhangi H R, van Niftrik L, Schmid M, Keltjens J, van de Vossenberg J, Karta B, Meier H, Frishman D, Huynen M A, Mewes H W, Weissenbach J, Jetten M S M, Wagner M, Le Paslier D. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 2006, 440(7085):790-794.
- [12] Quan Z X, Rhee S K, Zuo J E, Yang Y, Bae J W, Park J R, Lee S T, Park Y H. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11):3130-3139.
- [13] Dale O R, Tobias C R, Song B. Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in Cape Fear River Estuary. *Environmental Microbiology*, 2009, 11(5):1194-1207.
- [14] Schmid M C, Risgaard-Petersen N, van de Vossenberg J, Kuypers M M M, Lavik G, Petersen J, Hulth S, Thamdrup B, Canfield D, Dalsgaard T, Rysgaard S, Sejr M K, Strous M, Op den Camp H J M, Jetten M S M. Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(6):1476-1484.
- [15] Penton C R, Deval A H, Tiedje J M. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10):6829-6832.
- [16] Kartal B, Rattray J, van Niftrik L A, van de Vossenberg J, Schmid M C, Webb R I, Schouten S, Fuerst J A, Damsté J S, Jetten M S M, Strous M. *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(1):39-49.
- [17] Woebken D, Lam P, Kuypers M M M, Naqvi S W A, Kartal B, Strous M, Jetten M S M, Fuchs B M, Amann R. A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11):3106-3119.
- [18] Schmid M, Walsh K, Webb R, Rijpstra W I, van de Pas-Schoonen K, Verbruggen M J, Hill T, Moffett B, Fuerst J, Schouten S, Damsté J S S, Harris J, Shaw P, Jetten M, Strous M. *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(4):529-538.
- [19] Amano T, Yoshinaga I, Okada K, Yamagishi T, Ueda S, Obuchi A, Sako Y, Suwa Y. Detection of anammox activity and diversity of anammox bacteria-related 16S rRNA genes in coastal marine sediment in Japan. *Microbes and Environments*, 2007, 22(3):232-242.
- [20] Zhang Y, Ruan X H, Op den Camp H J M, Smits T J M, Jetten M S M, Schmid M C. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater sediments of the Xinyi River (China). *Environmental Microbiology*, 2007, 9(9):2375-2382.
- [21] Güven D, Dapena A, Kartal B, Schmid M C, Maas B, van de Pas-Schoonen K, Sozen S, Mendez R, Op den Camp H J M, Jetten M S M, Strous M, Schmidt I. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2):1066-1071.
- [22] vander Star W R L, van de Graaf M J, Kartal B, Picioreanu C, Jetten M S M, van Loosdrecht M C M. Response of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria to hydroxylamine. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(14):4417-4426.
- [23] Karlsson R, Karlsson A, Backman O, Johansson B R, Hulth S. Identification of key proteins involved in the anammox reaction. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 297(1):87-94.
- [24] Jetten M S M, Strous M, van de Pas-Schoonen K T, Schalk J, van Dongen U G J M, van de Graaf A A, Logemann S, Muyzer G, van Loosdrecht M C M, Kuenen J G. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, 22(5):421-437.
- [25] Shimamura M, Nishiyama T, Shigetomo H, Toyomoto T, Kawahara Y, Furukawa K, Fujii T. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(4):1065-1072.
- [26] Li X R, Du B, Fu H X, Wang R F, Shi J H, Wang Y, Jetten M S M, Quan Z X. The bacterial diversity in an anaerobic ammonium-oxidizing

- (anammox) reactor community. *Systematic and Applied Microbiology*, 2009, 32(4):278-289.
- [27] Yao Y, Zhang W, Ma M. Advances in the process of biological nitrogen removal. *Environmental Science and Technology*, 2005, 28(22):138-140.
- [28] Zhang P, Zhang D J, Zu B, Lu P L, Bai Y H. The differences of several novel microbial nitrogen removal processes. *Environmental Science and Management*, 2006, 31(9):92-95.
- [29] van de Graaf A A, Mulder A, de Bruijn P, Jetten M S, Robertson L A, Kuenen J G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4):1246-1251.
- [30] Schalk J, de Vries S, Kuenen J G, Jetten M S M. Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation. *Biochemistry*, 2000, 39(18):5405-5412.
- [31] Strous M, Heijnen J J, Kuenen J G, Jetten M S M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(5):589-596.
- [32] Schmidt I, Sliekers O, Schmid M, Bock E, Fuerst J, Kuenen J G, Jetten M S M, Strous M. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(4):481-492.
- [33] van Dongen U, Jetten M S M, van Loosdrecht M C M. The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium-rich wastewater. *Water Science and Technology*, 2001, 44(1):153-160.
- [34] Hanaki K, Wantawin C, Ohgaki S. Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Water Research*, 1990, 24(3):297-302.
- [35] Strous M, Van Gerven E, Zheng P, Kuenen J G, Jetten M S M. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, 1997, 31(8):1955-1962.
- [36] Sliekers A O, Third K A, Abma W, Kuenen J G, Jetten M S M. CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 218(2):339-344.
- [37] Third K A, Sliekers A O, Kuenen J G, Jetten M S M. The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: Interaction and competition between three groups of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(4):588-596.
- [38] Gong Z, Liu S T, Yang F L, Bao H, Furukawa K J. Characterization of functional microbial community in a membrane-aerated biofilm reactor operated for completely autotrophic nitrogen removal. *Bioresource Technology*, 2008, 99(8):2749-2756.
- [39] Sánchez-Melsió A, Cáliz J, Balaguer M D, Colprim J, Vila X. Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems. *Chemosphere*, 2009, 75(2):169-179.
- [40] Schmid M C, Maas B, Dapena A, van de Pas-Schoonen K, van de Vossenberg J, Kartal B, van Niftrik L, Schmidt I, Cirpus I, Kuenen J G, Wagner M, Sinninghe Damsté JS, Kuypers M, Revsbech N P, Mendez R, Jetten M S M, Strous M. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4):1677-1684.
- [41] Schmid M C, Hooper A B, Klotz M G, Woebken D, Lam P, Kuypers M M M, Pommerening-Roeser A, Op den Camp H J M, Jetten M S M. Environmental detection of octahem cytochrome *c* hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11):3140-3149.
- [42] Chamchoi N, Nitisoravut S. Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere*, 2007, 66(11):2225-2232.
- [43] Date Y, Isaka K, Ikuta H, Sumino T, Kaneko N, Yoshie S, Tsuneda S, Inamori Y. Microbial diversity of anammox bacteria enriched from different types of seed sludge in an anaerobic continuous-feeding cultivation reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107(3):281-286.
- [44] Bae H, Park K S, Chung Y C, Jung J Y. Distribution of anammox bacteria in domestic WWTPs and their enrichments evaluated by real-time quantitative PCR. *Process Biochemistry*, 2010, 45(3):323-334.
- [45] Tsushima I, Ogasawara Y, Kindaichi T, Satoh H, Okabe S. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Research*, 2007, 41(8):1623-1634.
- [46] Pathak B K, Kazama F, Tanaka Y, Mori K, Sumino T. Quantification of anammox populations enriched in an immobilized microbial consortium with low levels of ammonium nitrogen and at low temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(5):1173-1179.
- [47] Isaka K, Date Y, Sumino T, Tsuneda S. Ammonium removal performance of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier: anammox bacteria immobilized in gel carrier. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(6):1457-1465.
- [48] Kindaichi T, Tsushima I, Ogasawara Y, Shimokawa M, Ozaki N, Satoh H, Okabe S. In situ activity and spatial organization of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(15):4931-4939.

参考文献:

- [9] 洪义国, 李猛, 顾继东. 海洋氮循环中细菌的厌氧氨氧化. *微生物学报*, 2009, 49(3):281-286.
- [27] 姚樱, 张文, 马民. 新型生物脱氮工艺的研究进展. *环境科学与技术*, 2005, 28:138-140.
- [28] 张萍, 张代钧, 祖波, 卢培利, 白玉华. 几种生物脱氮新工艺的比较. *环境科学与管理*, 2006, 31(9):92-95.

ACTA ECOLOGICA SINICA Vol. 31, No. 7 April, 2011 (Semimonthly)

CONTENTS

Seasonal variation of soil nitrogen pools and microbes under natural evergreen broadleaved forest and its artificial regeneration forests in Southern Sichuan Province, China	GONG Wei, HU Tingxing, WANG Jingyan, et al (1763)
Sensitivity analysis for main factors influencing <i>NPP</i> of forests simulated by IBIS in the eastern area of Northeast China	LIU Xi, GUO Qingxi, LIU Jingwei (1772)
Diurnal changes of photosynthetic characteristics of <i>Hippophae rhamnoides</i> and the relevant environment factors at different slope locations	JIN Tiantian, FU Bojie, LIU Guohua, et al (1783)
Interactive effects of nitrogen and sulfur on the reproduction, biomass accumulation and allocation of the clonal plant <i>Spartina alterniflora</i>	GAN Lin, ZHAO Hui, QING Hua, et al (1794)
Difference in leaf photosynthetic capacity between pima cotton (<i>Gossypium barbadense</i>) and upland cotton (<i>G. hirsutum</i>) and analysis of potential constraints	ZHANG Yali, YAO Hesheng, LUO Yi, et al (1803)
Effects of shades on the photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of <i>Forsythia suspensa</i>	WANG Jianhua, REN Shifu, SHI Baosheng, et al (1811)
Growth and metal uptake of three woody species in lead/zinc and copper mine tailing	SHI Xiang, CHEN Yitai, WANG Shufeng, et al (1818)
GMP particles size distribution in grains of wheat in relation to application of nitrogen fertilizer	WANG Guangchang, WANG Zhenlin, CUI Zhiqing, et al (1827)
Damaging mechanisms of peanut (<i>Arachis hypogaea</i> L.) photosystems caused by high-temperature and drought under high irradiance	QIN Liqin, ZHANG Yueli, GUO Feng, et al (1835)
The effect of natural factors and disturbance intensity on spacial heterogeneity of plant diversity in alpine meadow	WEN Lu, DONG Shikui, ZHU Lei, et al (1844)
Modeling changes of net primary productivity of karst vegetation in southwestern China using the CASA model	DONG Dan, NI Jian (1855)
The characteristics of <i>Magnolia liliflora</i> transpiration and its impacting factors in Beijing City	WANG Hua, OUYANG Zhiyun, REN Yufen, et al (1867)
Ecological effects of balanced fertilization on red earth paddy soil with P-deficiency	CHEN Jianguo, ZHANG Yangzhu, ZENG Xibai, et al (1877)
Effects of planting patterns on water use efficiency in winter wheat	QI Lin, CHEN Yuhai, ZHOU Xunbo, et al (1888)
Nitrous oxide emissions from winter wheat field in the Loess Plateau	PANG Junzhu, WANG Xiaoke, MU Yujing, et al (1896)
Effects of hardening by pre-anthesis waterlogging on grain yield and quality of post-anthesis waterlogged wheat (<i>Triticum aestivum</i> L. cv Yangmai 9)	LI Chengyong, CAI Jian, JIANG Dong, et al (1904)
Effects of simulated acid rain with lower S/N ratio on gas exchange and membrane of three dominant species in subtropical forests	FENG Lili, YAO Fangfang, WANG Xihua, et al (1911)
Molluscicidal efficacy of <i>Nerium indicum</i> cardiac glycosides on <i>Pomacea canaliculata</i> and its effects on rice seedling	DAI Lingpeng, LUO Weihua, WANG Wanxian (1918)
Spatial gradients pattern of landscapes and their relations with environmental factors in Haihe River basin	ZHAO Zhixuan, ZHANG Biao, JIN Xin, et al (1925)
The assessment of forest ecosystem services evaluation for shrubbery-economic forest-bamboo forest in China	WANG Bing, WEI Jiangsheng, HU Wen (1936)
Evaluation on service value of ecosystem of Peri-urban transition zone lake: a case study of Yandong Lake in Wuhan City	WANG Fengzhen, ZHOU Zhixiang, ZHENG Zhongming (1946)
Explaining the abundance-distribution relationship of plant species with niche breadth and position in the Yellow River Delta	YUAN Xiu, MA Keming, WANG De (1955)
Forestland boundary dynamics based on an landscape accessibility analysis in Guangzhou, China	ZHU Yaojun, WANG Cheng, JIA Baoquan, et al (1962)
Changes in invasion characteristics of <i>Dendroctonus valens</i> after introduction into China	PAN Jie, WANG Tao, WEN Junbao, et al (1970)
Population genetic diversity in Tibet red deer (<i>Cervus elaphus wallichi</i>) revealed by mitochondrial <i>Cyt b</i> gene analysis	LIU Yanhua, ZHANG Minghai (1976)
Multi-scales analysis on diversity of desert rodent communities under different disturbances	YUAN Shuai, WU Xiaodong, FU Heping, et al (1982)
Cave-site selection of Qinling zokors with their prevention and control	LU Qingbin, ZHANG Yang, ZHOU Caiquan (1993)
The habitat characteristics of Eurasian badger in Beijing-Hangzhou Grand Canal embankment	YIN Baofa, LIU Yuqing, LIU Guoxing, et al (2002)
Review and Monograph	
Electron transfer mechanism of extracellular respiration: a review	MA Chen, ZHOU Shungui, ZHUANG Li, et al (2008)
The biochemical mechanism and application of anammox in the wastewater treatment process	WANG Hui, LIU Yanping, TAO Ying, et al (2019)
Discussion	
Evaluation of the forest ecosystem services in Haihe River Basin, China	BAI Yang, OUYANG Zhiyun, ZHENG Hua, et al (2029)
Scientific Note	
Effects of body size and salinity on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of <i>Macra chinensis</i> Philippi	ZHAO Wen, WANG Yaqian, WEI Jie, et al (2040)
Study on microzooplankton grazing in shrimp pond among middle and late shrimp culture period	ZHANG Litong, SUN Yao, ZHAO Congming, et al (2046)

2009 年度生物学科总被引频次和影响因子前 10 名期刊★

(源于 2010 年版 CSTPCD 数据库)

排序 Order	期刊 Journal	总被引频次 Total citation	排序 Order	期刊 Journal	影响因子 Impact factor
1	生态学报	11764	1	生态学报	1.812
2	应用生态学报	9430	2	植物生态学报	1.771
3	植物生态学报	4384	3	应用生态学报	1.733
4	西北植物学报	4177	4	生物多样性	1.553
5	生态学杂志	4048	5	生态学杂志	1.396
6	植物生理学通讯	3362	6	西北植物学报	0.986
7	JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY	3327	7	兽类学报	0.894
8	MOLECULAR PLANT	1788	8	CELL RESEARCH	0.873
9	水生生物学报	1773	9	植物学报	0.841
10	遗传学报	1667	10	植物研究	0.809

★《生态学报》2009 年在核心版的 1964 种科技期刊排序中总被引频次 11764 次,全国排名第 1;影响因子 1.812,全国排名第 14;第 1~9 届连续 9 年入围中国百种杰出学术期刊;中国精品科技期刊

编辑部主任:孔红梅

执行编辑:刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 31 卷 第 7 期 (2011 年 4 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 31 No. 7 2011

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@csppg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@csppg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元