

文章编号: 1000-0615(2019)04-0978-10

DOI: 10.11964/jfc.20180611331

褐煤的碳缓释特征及其对池塘底泥脱氮作用的影响

曹娟^{1,2,3,4}, 刘兴国^{1*}, 高美云¹, 朱浩¹, 曾宪磊¹, 刘雪¹

(1. 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 上海 200092;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

4. 上海海洋大学, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306)

摘要: 厌氧氨氧化和反硝化作用是底泥生物脱氮的主要过程, 碳源是调控厌氧氨氧化和反硝化作用的关键因子。本研究以褐煤为对象, 对褐煤的静态碳释情况及其对池塘底泥中脱氮作用的影响进行了研究。结果显示, 褐煤在室温条件下的碳释放规律符合二级动力学方程, 具备作为反硝化碳源的可行性; 在脱氮实验中, 发现褐煤对底泥上覆水体中的亚硝酸盐氮(NO_2^- -N)的去除具有促进作用, NO_2^- -N的去除率随褐煤浓度的增加而升高, 当褐煤质量浓度为40 g/L时, NO_2^- -N去除率最高达99.61%, 此时硝酸盐氮(NO_3^- -N)的浓度也最低; 同时发现, 水体中氨氮(NH_4^+ -N)氧化的最适褐煤质量浓度为10 g/L, 其去除率达99.39%; 对底泥中的厌氧氨氧化菌群进行Illumina高通量测序发现, 其中浮霉菌门占比最大(39.6%~71.8%), 优势菌属为*Candidatus Brocadia* (13.9%~35.8%)和*Desulfovibrio* (17.1%~34.8%), 添加褐煤组*Candidatus Scalindua*菌属比例高于未添加组; 荧光定量PCR得出, 随着褐煤质量浓度升高, 底泥中的反硝化菌丰度呈增长趋势, 而厌氧氨氧化菌丰度则低于无褐煤添加组, 表明添加褐煤对底泥反硝化有促进作用, 而对厌氧氨氧化有一定的抑制作用。研究表明, 褐煤具备作为反硝化碳源的条件, 可用于池塘养殖底泥脱氮作用。

关键词: 褐煤; 碳释放; 池塘底泥; 厌氧氨氧化; 反硝化

中图分类号: TQ 536; S 917.1

文献标志码: A

养殖水体中, 氮的各种形态转化参与整个养殖水环境氮循环的主要构成, 其中生物过程起重要作用^[1]。池塘沉积物作为氮和其他元素的集中地, 其中脱氮微生物菌群对池塘氮素的有效循环和去除起重要作用^[2]。近年来, 反硝化菌和厌氧氨氧化菌协同作用的研究较为广泛^[3-4]。从反硝化和厌氧氨氧化的方程式看出反硝化能够消耗有机碳源, 为厌氧氨氧化减轻有机物的抑制作用。另外, 反硝化在电子供体不足的情况下能够将 NO_3^- -N转化为 NO_2^- -N, 从而为厌氧氨氧化提供 NO_2^- -N底物^[5]。厌氧氨氧化过程中产

生一定量的 NO_3^- -N用作反硝化底物。张美雪等^[6]采用低浓度乙酸盐对厌氧氨氧化颗粒污泥进行驯化, 实现了厌氧氨氧化与异养反硝化的高效耦合脱氮作用。有机碳源是调控厌氧氨氧化和反硝化作用的关键因子。

褐煤是煤化程度最低的矿产煤, 我国褐煤资源丰富, 井柳新^[7]使用褐煤作为固相有机碳源进行地下水硝酸盐的去除, 取得明显效果, 并通过显微红外光谱照射发现其中含大量芳烃、醇、酚、羧酸和烷烃等有机基团, 可作为反硝化过程中的有机碳源。褐煤中弱碳氧键断裂可

收稿日期: 2018-06-20 修回日期: 2018-09-07

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 公益性行业(农业)科研专项(201503108); 盐碱池塘生态工程构建配套技术(2016HY-ZD0603)

通信作者: 刘兴国, E-mail: liuxingguo@fmiri.ac.cn

以产生大量水溶性有机化合物,同时许多羧基在凝聚态周围形成芳香环,然后芳香环带着羧基逐渐分解成小分子酸,芳香环也能氧化产生小分子酸^[8-9]。将褐煤用于养殖池塘的研究相对较少,但有研究以竹炭作为厌氧氨氧化反应器的填料,发现其不仅可以增强厌氧氨氧化活性,而且可以降低硝酸盐氮的浓度^[10]。本实验以褐煤为对象,研究其在去离子水中的静态释碳规律,作为反硝化碳源的可行性以及对厌氧氨氧化、反硝化作用的影响。并利用MiSeq测序技术对系统中的微生物结构进行分析,考察系统的脱氮及微生物特性。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

室温条件下称取1 g褐煤于三角烧瓶中,加入1 L去离子水,每2 d取水样5 mL检测DOC浓度,考察30 d内褐煤浸出液可溶性有机碳平均浓度。设置不含褐煤的对照组(A组)、10 g/L(B组)、20 g/L(C组)、40 g/L(D组)、80 g/L(E组)组分别置于三角烧瓶中,接种50 g搅拌均匀的池塘底泥,各加入1 L人工配水^[11],使用1 mol/L的HCl和NaOH调节pH为7.5~8.0,所有实验各设置2组平行。实验三角烧瓶置于温度为30 °C的恒温培养箱中,静置,密封前通入10 min N₂。31 d实验周期内,每3 d取20 mL水样测量NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N以及DOC值,每7 d采集装置中5 g底泥于-20 °C保存。

本实验所用底泥采自上海大宗淡水鱼养殖池塘,底泥中厌氧氨氧化细菌的系统发育分析鉴定出Candidatus *Brocadia*、Candidatus *Kuenenia*两类Anammox菌,丰度为8.0×10⁴~9.4×10⁶拷贝/g,底泥中TOC含量为(3.75±0.77) g/kg、TN含量为(2.29±0.13) g/kg(Candidatus代表暂定种)。人工配水中NH₄⁺-N和NO₂⁻-N分别由NH₄Cl和NaNO₂提供,浓度分别为58.5和32.5 mg/L。废水中微量元素I和II的添加量分别为1.25和1 mL/L。微量元素I(g/L): EDTA 5; FeSO₄·9H₂O 9.14; 微量元素II(g/L): EDTA 15; H₃BO₃ 0.014; MnCl₄·4H₂O 0.99; CuSO₄·5H₂O 0.25; CoCl₂·6H₂O 0.24; ZnSO₄·7H₂O 0.43; NiCl₂·6H₂O 0.19; NaMoO₄·2H₂O 0.22。

1.2 检测方法

水样测定 底泥上覆水经0.45 μm滤膜过

滤, NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N、DOC和pH分别采用纳氏试剂光度法(GB/T7479-1987)、N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法(GB/T7493-1987)、紫外分光光度法(HJ/T346-2007)、Multi N/C2100仪、瑞士万通Metrohm 914 pH/Conductometer测定。

总DNA提取及PCR扩增 FastDNA SPIN Kit for Soil(美国Mpbio公司)试剂盒提取收集底泥总DNA, Colibri (Titerter Berthold)检测所提核酸的浓度与纯度并于-20 °C保存。nirS基因扩增的引物对为Cd3aF-R3cdR^[12], PCR反应体系(20 μL): 模板DNA 1 μL、Primer F 0.8 μL、Primer R 0.8 μL、SYBR II (TaKaRa) 10 μL、ddH₂O 7.4 μL。扩增条件为95 °C 30 s、95 °C 5 s、55 °C 35 s、72 °C 1 min, 35个循环, 72 °C 5 min。Anammox基因扩增的引物对为AMX808F-AMX1040R^[13]。PCR反应体系(20 μL): 模板DNA 1 μL、Primer F 0.8 μL、Primer R 0.8 μL、SYBR II (TaKaRa) 10 μL、ddH₂O 7.4 μL。扩增条件为95 °C 30 s、95 °C 5 s、60 °C 2 min, 40个循环, 72 °C 5 min。扩增产物以1%琼脂糖凝胶电泳检测, 电压为100 V、时间为30 min。

荧光定量PCR PCR产物经MiniBEST DNA片段纯化试剂盒(TaKaRa)纯化后检测其浓度用于制作荧光定量PCR标准曲线的模板。以提取的总DNA为模板进行定量分析, 每个样品重复2次。反硝化细菌引物对为Cd3aF-R3cdR^[12], 定量体系(20 μL): 模板DNA 1 μL、Primer F 0.8 μL、Primer R 0.8 μL、2×Master (Roche) 10 μL、ddH₂O 7.4 μL, 扩增条件为95 °C 10 min、95 °C 5 s、55 °C 35 s、72 °C 1 min, 35个循环; 厌氧氨氧化菌采用TaqMan探针AMX-931^[14-15](5'-TCGCACAAGCG-GTGGAGCATGTGGCTTA-3'), 厌氧氨氧化菌引物对为AMX808F-AMX1040R^[13], 定量体系(20 μL): 模板DNA 1 μL、Primer F 0.8 μL、Primer R 0.8 μL、AMX-931探针 1 μL, SYBR II (TaKaRa) 10 μL、ddH₂O 6.4 μL, 扩增条件为95 °C 30 s、95 °C 5 s、60 °C 2 min、72 °C 1 min, 45个循环。

高通量测序 Illumina MiSeq测序系统对采集的底泥样品进行高通量测序(上海派森诺生物科技股份有限公司)。

1.3 数据处理

使用SPSS 20.0软件对数据进行分析, 图表采用Origin 8.5软件处理。

2 结果

2.1 褐煤在去离子水中的释碳动力学

30 d实验期内，每2天测量水体DOC含量，随着时间的延长，水体中的有机物含量不断增加，且在0~8 d释碳较快，从1.31至4.77 mg/L，随后释放速率逐渐减缓至基本保持平衡。根据实验数据进行二级动力学模拟：

$$dc/dt = kc^2 \tag{1}$$

即

$$1/c - 1/c_m = k/t \tag{2}$$

式中， c_m 为单位质量材料在溶液中释放的饱和DOC浓度，mg/(g·L)， c_m 越大，材料最终释放的DOC浓度越高，表明材料释碳能力越大； k 为常数，h·g/L/mg。令 $K=1/k$ ，则式(2)：

$$1/c - 1/c_m = 1/Kt \tag{3}$$

式中 K 为传质系数，反映释放阻力，mg/(h·L·g)， K 值越大，表明材料释放阻力越小，有机碳越容易释放。

$$K = c_m/t_{1/2} \tag{4}$$

式中 $t_{1/2}$ 为DOC释放浓度达饱和浓度一半时所用时间，d。 $t_{1/2}$ 越小说明有机碳释放达平衡状态的时间越短。

褐煤的释碳拟合参数如表1所示，释碳拟合曲线具有较高的相关系数0.996 9(图1)。有研究表明褐煤颗粒中的游离态小分子化合物在水体中可迅速溶解，而嵌入态小分子化合物不易溶出，使得分解速率变缓，并且达到平衡状态^[16]。由此可见，褐煤作为有机缓释碳源具有可行性。

2.2 对上覆水中脱氮作用的影响

水体中NO₂⁻-N、NO₃⁻-N、NH₄⁺-N及DOC的变化 在人工配水中加入不同质量的褐煤并接种池塘底泥，研究废水中厌氧氨氧化和反硝化脱氮，NO₂⁻-N和NH₄⁺-N的进水浓度分别为32.5和58.5 mg/L (图1)。NO₂⁻-N从第1~25天处于下降

趋势，B、C、D、E组的去除率分别为97.29%、99.48%、99.61%、99.46%，均高于A组的94.03%。第25~31天各组NO₂⁻-N几乎处于稳定状态，A和B组的最终NO₂⁻-N浓度低于2 mg/L，其他组的最终NO₂⁻-N浓度均低于0.2 mg/L。由此得出褐煤的添加对NO₂⁻-N的去除具有一定的促进作用，D组NO₂⁻-N的去除率最高(图1-a)。

各组NH₄⁺-N的浓度均呈下降趋势，A、B组的下降趋势较C、D、E组明显。NH₄⁺-N浓度在1~25 d内，A、B、C、D、E组的去除率分别为99.14%、99.39%、95.81%、97.15%、95.34%，之后至实验结束呈平稳状态。最终A组NH₄⁺-N出水浓度低于0.2 mg/L，B、C、D、E组的NH₄⁺-N出水浓度稳定在2.5 mg/L以下(图1-b)。

各组DOC浓度随褐煤浓度的增大而升高，对照A组的DOC浓度一直处于下降趋势，从初始的15.12 mg/L下降到10.78 mg/L (图1-c)。与A组相比，B、C、D、E组的DOC浓度处于上升趋势，分别上升至21.19、23.86、28.33和30.72 mg/L。

不同褐煤浓度下，NO₃⁻-N浓度呈波动变化，但总体呈下降趋势。NO₃⁻-N的初始浓度约为9 mg/L，可能是进水时的溶解氧将部分NO₂⁻-N氧化为NO₃⁻-N，其次接种污泥中的NO₃⁻-N也是原因之一(图1-d)。A组的NO₃⁻-N浓度高于其他组，可知添加褐煤减少了B、C、D、E组装置中的NO₃⁻-N浓度，D组NO₃⁻-N去除效果最好。

底泥中厌氧氨氧化和反硝化细菌丰度变化 荧光定量PCR实验得出，不同褐煤浓度下，各组反硝化细菌丰度呈先上升后下降的趋势(图2-a)。A、B、C、D、E组的反硝化菌丰度在1~19 d内呈上升趋势，分别从初始的[(1.04±0.34)~(3.03±0.25)]×10⁸拷贝/g上升为(1.38±0.14)×10⁹、(1.05±0.04)×10⁹、(2.45±0.50)×10⁹、(3.40±0.12)×10⁹和(2.76±0.07)×10⁹拷贝/g；19 d后呈下降趋势。反硝化细菌丰度随着褐煤浓度的增加而上升，褐煤质量浓度为40 g/L，反硝化细菌丰度最高，得出添加褐煤对反硝化细菌丰度升高具有促进作用。

表 1 褐煤材料的释碳拟合参数

Tab. 1 Carbon releasing fitting parameters of lignite

材料 material	拟合公式 fitting formula	相关系数 R^2	单位质量材料释放的饱和DOC浓度 c_m /[mg/(g·L)] saturated DOC released from unit mass materials in solution	传质系数 K /[mg/(h·L·g)] transfer coefficient	DOC达饱和一半浓度的时间/d $t_{1/2}$
褐煤 lignite	$1/c = 0.605 1/t + 0.148 5$	0.996 9	6.73	1.65	4

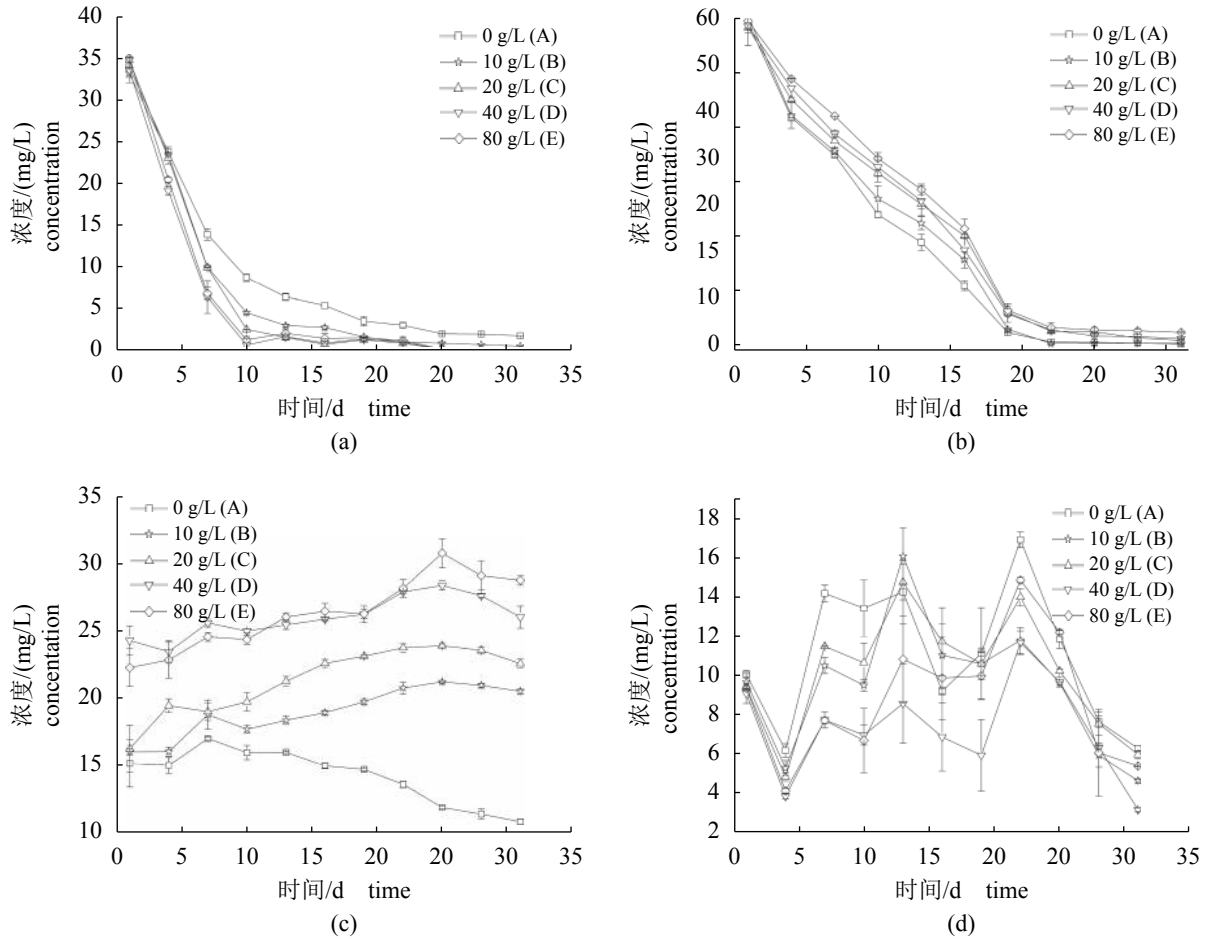


图 1 不同褐煤条件下 NO_2^- -N (a)、 NO_3^- -N (b)、DOC (c)及 NH_4^+ -N (d)浓度的变化趋势

Fig. 1 The change of NO_2^- -N (a), NO_3^- -N (b), DOC (c) and NH_4^+ -N (d) concentration under different addition of lignite

不同褐煤浓度下, 各组厌氧氨氧化菌丰度整体呈上升趋势(图2-b), 其中A组厌氧氨氧化菌的丰度升高最为明显, 从初始的 $(3.46 \pm 0.07) \times 10^6$ 上升为 $(5.78 \pm 0.18) \times 10^7$ 拷贝/g; 其次是B组, 从 $(3.57 \pm 0.29) \times 10^6$ 上升为 $(4.33 \pm 0.25) \times 10^7$ 拷贝/g; C、D组分别从 $(2.50 \pm 0.10) \times 10^6$ 、 $(3.01 \pm 0.39) \times 10^6$ 升到 $(3.07 \pm 0.55) \times 10^7$ 、 $(3.52 \pm 0.35) \times 10^7$ 拷贝/g; E组的丰度上升最小, 仅从 $(1.29 \pm 0.07) \times 10^6$ 升高至 $(1.52 \pm 0.46) \times 10^7$ 拷贝/g。各组反应体系底物在25 d后几乎被消耗殆尽, 厌氧氨氧化菌丰度仍然呈上升趋势, 可能是 NO_3^- -N异养反硝化的产物 NO_2^- -N补充了厌氧氨氧化细菌的底物需求^[17], 异化硝酸盐还原产氨(DNRA)使 NO_3^- -N还原为 NH_4^+ -N。

底泥中Anammox菌群多样性分析 通过高通量测序鉴定出门水平上的细菌分别为浮霉菌门(Planctomycetes)、变形菌门(Proteobacteria)、绿菌门(Chlorobi)和厚壁菌门(Firmicutes)(图3-a)。

其中浮霉菌门丰度相对较高, 占主导地位, 比例为39.6%~71.8%。绿菌门是一类不进行产氧光合作用的细菌。厚壁菌门在污水处理的污泥中较为常见, 在厌氧氨氧化反应器中常被检测到。

浮霉菌门中鉴定出属的细菌有6种, 分别为Candidatus Brocadia、Candidatus Kuenenia、Candidatus Scalindua、Candidatus Jettenia、Candidatus Anammoximicrobium和Candidatus Anammoxoglobus。其中Candidatus Brocadia所占比例最高, 为13.9%~35.8%, 是优势菌属, 与多数淡水水域厌氧氨氧化细菌优势种一致^[18]。Candidatus Brocadia菌属在第3次底泥样品中相对丰度最高(图3-b)。浮霉菌门中占比较高的还有Candidatus Kuenenia (5.1%~11.3%)和Candidatus Scalindua (3.2%~8.2%)菌属。有研究表明除了Scalindua属的厌氧氨氧化细菌外, Kuenenia和Brocadia菌属在自然界也广泛分布^[19]。Candidatus Anammoximicrobium菌属占比随

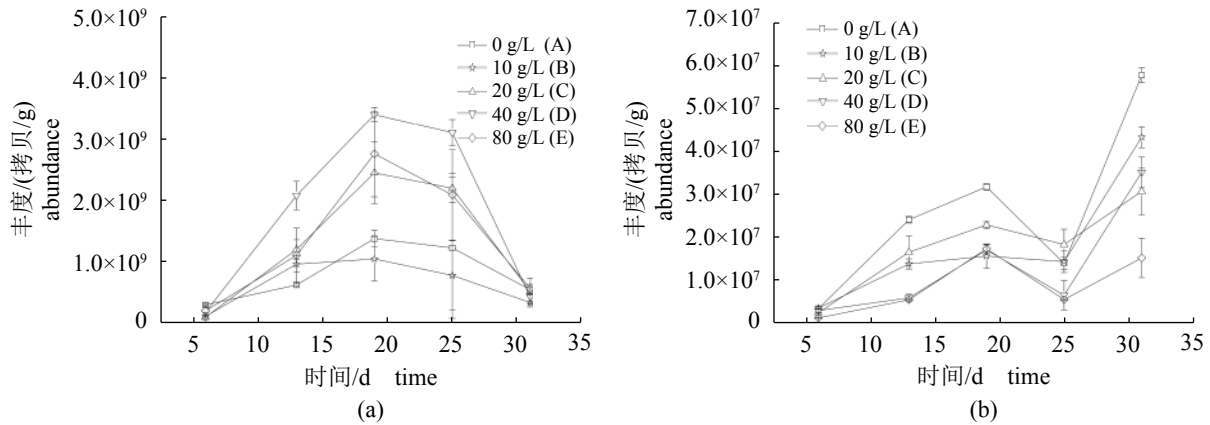


图2 不同褐煤条件下反硝化和厌氧氨氧化菌的丰度变化

Fig. 2 The abundance of denitrification bacteria and anammox bacteria in different addition of lignite

时间和褐煤添加量的增加而减少。*Candidatus Anammoxoglobus*菌属前期没有出现,在第5次底泥样品中才检测到,且占比较低。Kartal等^[20]研究发现了*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*能够氧化丙酸等有机小分子。*Candidatus Scalindua*菌属所占比例逐渐变大,*Candidatus Scalindua*菌属大多存在于海洋中,且对盐度敏感。变形菌门中鉴定出的4个菌属,分别为*Desulfovibrio*、*Denitratisoma*、*Castellaniella*、*Pseudomonas*。其中*Desulfovibrio*和*Pseudomonas*菌属的占比随时间和褐煤投加量的增加而减少。

3 讨论

褐煤在去离子水中的释放特征符合二级动力学公式,相关系数为0.996 9,释放达到饱和浓度一半的时间为4 d,与木屑、稻草等相比具有缓慢释放特性^[21]。褐煤作为一种半惰性材料,国内闲置量较多,将其用于养殖水体中氮的去除,既能够节省成本,也为闲置资源的再利用提供了途径。

研究表明,添加褐煤对 NO_3^- -N和 NO_2^- -N的去除有促进作用,说明褐煤中释放的部分有机物能够被利用。刘常敬等^[22]在研究不同有机物对反硝化和厌氧氨氧化的影响时,发现以苯酚为有机物时耦合反应器能够长期运行。 NO_3^- -N浓度的上下波动幅度较明显,造成这一现象的原因可能是厌氧氨氧化反应生成 NO_3^- -N。 NO_3^- -N的降低除了可以通过反硝化途径以外,还有异化硝酸盐产氨的作用(DNRA)^[23]。有研究以竹炭作为厌氧氨氧化反应器,发现竹炭的添加使厌

氧氨氧化污泥异化硝酸盐还原产氨,是反应器中 NO_3^- -N去除的主要原因^[10]。A、B组 NH_4^+ -N下降率高于其他组的原因可能是褐煤的投加并没有明显地促进 NH_4^+ -N的去除,也可能是DNRA作用产生氨,对系统中 NH_4^+ -N的浓度有一定影响。B、C、D、E组DOC处于上升趋势的原因是褐煤的添加为系统中增加了可溶性有机小分子,25 d以后呈缓慢下降趋势的原因可能是释放的有机小分子减少,释放量小于利用量。

荧光定量PCR结果得出D组反硝化细菌丰度最高,添加褐煤对反硝化细菌丰度增长具有促进作用。 NO_2^- -N在10 d左右下降到最低水平,然而反硝化细菌丰度在20 d之后才出现下降的原因是褐煤的添加使反硝化作用加强,能够降解厌氧氨氧化过程中生成的 NO_3^- -N,使得反硝化细菌丰度的下降时间延缓。实验进行到20 d左右时, NO_2^- -N几乎被消耗殆尽,而厌氧氨氧化菌丰度仍增加,其与DNRA过程有关。各组反硝化细菌丰度在19 d以后呈下降趋势的原因是各组反应系统中底物逐渐被消耗,直到25 d后底物浓度几乎被消耗完全,此时反硝化细菌丰度下降明显。相关研究表明系统为饥饿状态时反硝化细菌丰度下降^[24]。A组厌氧氨氧化菌丰度高于其他组,添加褐煤没有促进厌氧氨氧化菌丰度增长,原因可能是褐煤中有机物对部分厌氧氨氧化菌的活性有抑制作用。Ramos等^[25]发现酚类物质对微生物有抑制作用,但是可以作为电子供体进行反硝化。但也有研究以竹炭为厌氧氨氧化反应器填料,发现竹炭的添加使得厌氧氨氧化菌丰度比无填料组高出22倍,竹炭填料的添加极大地

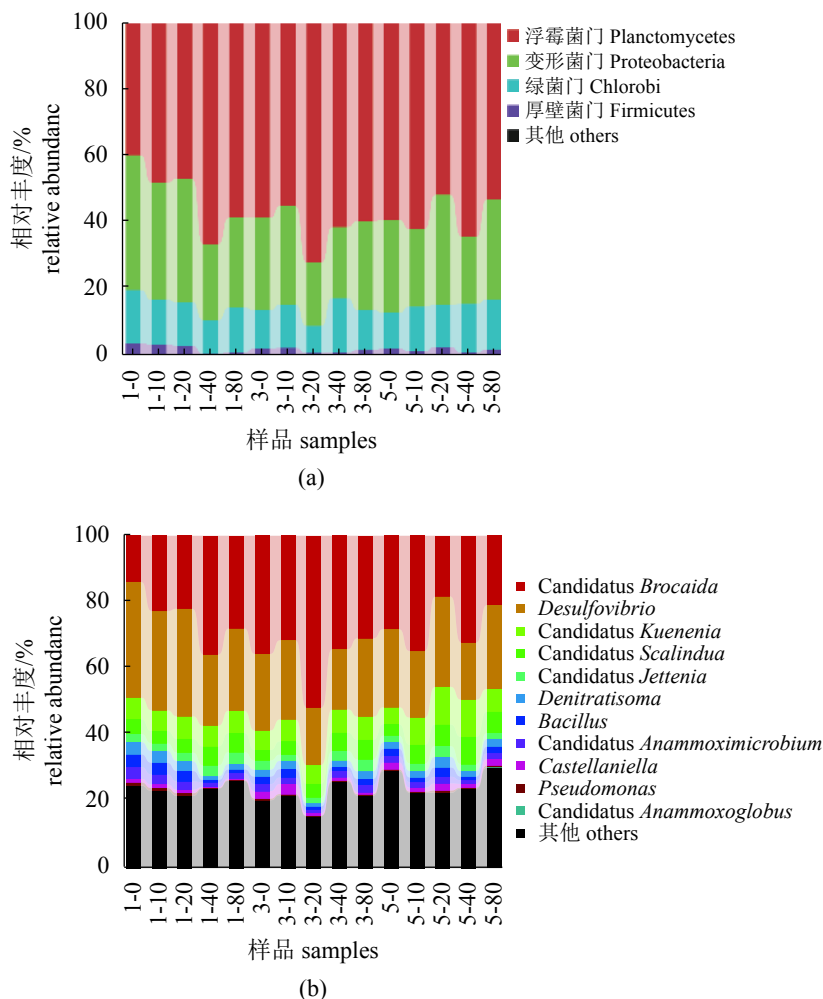


图 3 不同褐煤添加量下厌氧氨氧化菌群落分布变化

1-0, 1-10, 1-20, 1-40, 1-80 分别表示不同褐煤添加量的第1次测序结果; 3-0, 3-10, 3-20, 3-40, 3-80 分别表示不同褐煤添加量的第3次测序结果; 5-0, 5-10, 5-20, 5-40, 5-80 分别表示不同褐煤添加量的第5次测序结果。(a)门水平; (b)属水平

Fig. 3 The distribution of anammox bacteria communities in different addition of lignite

1-0, 1-10, 1-20, 1-40, 1-80 represent the first sequencing results of different lignite addition. 3-0, 3-10, 3-20, 3-40, 3-80 represent the third sequencing results of different lignite addition. 5-0, 5-10, 5-20, 5-40, 5-80 represent the fifth sequencing results of different lignite addition respectively. (a) means the level of phylum; (b) means the level of genus

促进了厌氧氨氧化菌的生长^[26]。本实验中A组池塘底泥中厌氧氨氧化菌丰度上升趋势较为明显的原因可能是底泥中的厌氧氨氧化菌已经有一定富集, 具有厌氧氨氧化活性, 且未受到有机物的抑制。

高通量测序结果显示浮霉菌门丰度相对较高。目前研究表明厌氧氨氧化菌主要属于浮霉菌门^[27]。有研究表明厌氧氨氧化反应器成功启动时, 浮霉菌门会超过变形菌门成为优势类群^[28]。添加褐煤组 *Candidatus Brocadia* 菌属比例随时间延长而降低, 原因可能是褐煤的添加对 *Candidatus Brocadia* 菌属有抑制作用, 或与其生长方式相

关。Puyol^[29]研究表明 *Candidatus Brocadia* 属于R-对策, 具有较高生长率但基质的亲和力较差。添加褐煤组 *Candidatus Scalindua* 菌属高于未添加组, 原因可能与有机碳源种类相关, 褐煤不会对 *Candidatus Scalindua* 菌属产生抑制作用。有研究表明 *Candidatus Scalindua* 菌属的变化与沉积物中有机碳氮比值、亚硝酸根浓度、沉积物中粒值等环境因子有关^[13]。 *Desulfovibrio* 的相对丰度仅次于 *Candidatus Brocadia*, 其原因可能是褐煤中的硫化物可供 *Desulfovibrio* 利用。 *Desulfovibrio* 是一种能够发生DNRA过程的专性厌氧菌属, 可利用硫化物作为电子供体, 为DNRA提供电子,

促进DNRA的发生^[30]。未添加褐煤组 *Denitratisoma* 占比高于添加褐煤组, *Denitratisoma* 属于变形菌门(Proteobacteria)β-变形菌纲(Betaproteobacteria)红环菌目(Rhodocyclales), 是一种革兰氏阴性反硝化细菌^[31]。添加褐煤组 *Castellaniella* 和 *Bacillus* 菌属丰度有上升趋势, 可能与褐煤释放的酚类小分子易于降解有关。相关报道称 *Pseudomonas* 菌属、变形菌门的 *Castellaniella* 菌属和厚壁菌门的 *Bacillus* 菌属都具有降解酚的能力^[32-33]。

参考文献:

- [1] 舒廷飞, 温琰茂, 汤叶涛. 养殖水环境中氮的循环与平衡[J]. 水产科学, 2002, 21(2): 30-34.
Shu T F, Wen Y M, Tang Y T. Cycle and budget balance of nitrogen in the cultivated water[J]. Fisheries Science, 2002, 21(2): 30-34(in Chinese).
- [2] 陈瑾. 池塘表层底泥反硝化菌丰度与群落结构的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
Chen J. Assessment of abundance and composition of denitrifiers in the surface sediment of aquaculture ponds[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014(in Chinese).
- [3] Pathak B K, Kazama F, Saiki Y, *et al.* Presence and activity of anammox and denitrification process in low ammonium-fed bioreactors[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(11): 2201-2206.
- [4] 郑平, 吴明生, 金仁村. 有机物对ANAMMOX反应器运行性能的影响[J]. 环境科学学报, 2006, 26(7): 1087-1092.
Zheng P, Wu M S, Jin R C. Effect of organic matter on performance of ANAMMOX reactor[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006, 26(7): 1087-1092(in Chinese).
- [5] 赖杨岚, 周少奇. 厌氧氨氧化与反硝化的协同作用特性研究[J]. 中国给水排水, 2010, 26(13): 6-10.
Lai Y L, Zhou S Q. Study on synergism characteristics of ANAMMOX and denitrification[J]. China Water & Wastewater, 2010, 26(13): 6-10(in Chinese).
- [6] 张美雪, 李芸, 李军, 等. 低浓度乙酸盐诱导下厌氧氨氧化与异养反硝化高效耦合脱氮[J]. 环境工程学报, 2016, 10(11): 6127-6132.
Zhang M X, Li Y, Li J, *et al.* Nitrogen removal performance of anammox coupling heterotrophic denitrification in low concentration of acetate[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(11): 6127-6132(in Chinese).
- [7] 井柳新. 褐煤作为固相有机碳源载体修复地下水硝酸盐污染试验研究[D]. 北京: 中国地质大学, 2011.
Jing L X. The experiment research on using lignite as the solid-phase organic carbon-source to remove the nitrate from the groundwater[D]. Beijing: China University of Geosciences, 2011(in Chinese).
- [8] Miura K, Mae K, Okutsu H, *et al.* New oxidative degradation method for producing fatty acids in high yields and high selectivity from low-rank coals[J]. Energy & Fuels, 1996, 10(6): 1196-1201.
- [9] Mae K, Maki T, Okutsu H, *et al.* Examination of relationship between coal structure and pyrolysis yields using oxidized brown coals having different macromolecular networks[J]. Fuel, 2000, 79(3-4): 417-425.
- [10] 黄孝肖. 竹炭对厌氧氨氧化反应的影响及其作用机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
Huang X X. Effect of bamboo charcoal on the performance of anammox reactor and its mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013(in Chinese).
- [11] van de Graaf A A, de Bruijn P, Robertson L A, *et al.* Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of 15N studies in a fluidized bed reactor[J]. Microbiology, 1997, 143(7): 2415-2421.
- [12] Throbäck I N, Johansson M, Rosenquist M, *et al.* Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel *nirK* genotypes in soil[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 270(2): 189-194.
- [13] Dang H Y, Chen R P, Wang L, *et al.* Environmental factors shape sediment anammox bacterial communities in hypernutrified Jiaozhou Bay, China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(21): 7036-7047.
- [14] Hamersley M R, Lavik G, Wobken D, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone[J]. Limnology and Oceanography, 2007, 52(3): 923-933.
- [15] Zhu G B, Wang S Y, Feng X J, *et al.* Anammox bacterial abundance, biodiversity and activity in a constructed wetland[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(23): 9951-9958.
- [16] 贾伟. 煤中小分子化合物对煤高温快速液化的影响[D]. 太原: 太原理工大学, 2010.
Jia W. Study on the effect of small molecular compound in coal on quick coal liquefaction at high temperature[D].

- Taiyuan: Taiyuan University of Technology, 2010(in Chinese).
- [17] 刘斌. 厌氧氨氧化耦合异养反硝化反应器的启动研究[J]. 兰州交通大学学报, 2016, 35(4): 107-110.
- Liu B. Start-up of anaerobic ammonia oxidation coupled with heterotrophic denitrifying in UASB-biofilm Reactor[J]. Journal of Lanzhou Jiaotong University, 2016, 35(4): 107-110(in Chinese).
- [18] Wenk C B, Bles J, Zopfi J, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria and sulfide - dependent denitrifiers coexist in the water column of a meromictic south-alpine lake[J]. Limnology and Oceanography, 2013, 58(1): 1-12.
- [19] 沈李东, 胡宝兰, 郑平, 等. 西湖底泥中厌氧氨氧化菌的分子生物学检测[J]. 环境科学学报, 2011, 31(8): 1609-1615.
- Shen L D, Hu B L, Zheng P, *et al.* Molecular detection of anammox bacteria in the sediment of West Lake, Hangzhou[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2011, 31(8): 1609-1615(in Chinese).
- [20] Kartal B, Rattray J, van Niftrik L A, *et al.* Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007, 30(1): 39-49.
- [21] 邵留, 徐祖信, 王晟, 等. 新型反硝化固体碳源释碳性能研究[J]. 环境科学, 2011, 32(8): 2323-2327.
- Shao L, Xu Z X, Wang S, *et al.* Performance of new solid carbon source materials for denitrification[J]. Environmental Science, 2011, 32(8): 2323-2327(in Chinese).
- [22] 刘常敬, 李泽兵, 郑照明, 等. 苯酚对厌氧氨氧化工艺耦合反硝化的启动及脱氮性能的影响[J]. 中国环境科学, 2014, 34(5): 1145-1151.
- Liu C J, Li Z B, Zheng Z M, *et al.* Effect of phenol on startup and nitrogen removal performance of anammox coupling denitrifying[J]. China Environmental Science, 2014, 34(5): 1145-1151(in Chinese).
- [23] Kartal B, Kuypers M M M, Lavik G, *et al.* Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(3): 635-642.
- [24] 高美云, 刘兴国, 曾宪磊, 等. 有机碳对养殖池塘沉积物中反硝化、厌氧氨氧化的影响[J]. 环境工程学报, 2018, 12(1): 49-56.
- Gao M Y, Liu X G, Zeng X L, *et al.* Effects of organic carbon for denitrification and anaerobic ammonium oxidation in sediments of aquaculture pond[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2018, 12(1): 49-56(in Chinese).
- [25] Ramos A F, Gómez M A, Hontoria E, *et al.* Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 142(1-2): 175-183.
- [26] 陈重军, 朱为静, 黄孝肖, 等. 厌氧氨氧化启动过程 Anammox 菌富集规律和差异分析[J]. 生物工程学报, 2014, 30(6): 891-900.
- Chen C J, Zhu W J, Huang X X, *et al.* Enrichment regulation of Anammox bacteria in the Anammox start-up process[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(6): 891-900(in Chinese).
- [27] 王亚宜, 黎力, 马骁, 等. 厌氧氨氧化菌的生物特性及 CANON 厌氧氨氧化工艺[J]. 环境科学学报, 2014, 34(6): 1362-1374.
- Wang Y Y, Li L, Ma X, *et al.* Bio-characteristics of anammox bacteria and CANON anammox process[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2014, 34(6): 1362-1374(in Chinese).
- [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(in Chinese).
- [29] Puyol D, Carvajal-Arroyo J M, Garcia B, *et al.* Kinetic characterization of *Brocadia* spp. -dominated anammox cultures[J]. Bioresource Technology, 2013, 139(7): 94-100.
- [30] 陶怡乐, 温东辉. 细菌硝酸盐异化还原成铵过程及其在河口生态系统中的潜在地位与影响[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1): 172-181.
- Tao Y L, Wen D H. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium: the potential and impacts in estuarine regions[J]. Microbiology China, 2016, 43(1): 172-181(in Chinese).

- [31] Guo Y H, Gong H L, Guo X Y. Rhizosphere bacterial community of *Typha angustifolia* L. and water quality in a river wetland supplied with reclaimed water[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(6): 2883-2893.
- [32] 曹军伟, 董纯明, 曹宏斌, 等. 焦化废水中酚降解菌及其降解基因的研究[J]. 环境科学, 2011, 32(2): 560-566.
- Cao J W, Dong C M, Cao H B, *et al.* Isolation of phenol-degrading bacteria from coking wastewater and their degradation gene[J]. Environmental Science, 2011, 32(2): 560-566(in Chinese).
- [33] 袁利娟, 姜立春, 彭正松, 等. 一株高效苯酚降解菌的选育及降酚性能研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 587-592.
- Yuan L J, Jiang L C, Peng Z S, *et al.* Breeding of the high phenol-degraded bacterium JY01 and study on phenolic biodegradation[J]. Microbiology China, 2009, 36(4): 587-592(in Chinese).

Carbon release performance of lignite and its effect on nitrogen removal from pond sediments

CAO Juan^{1,2,3,4}, LIU Xingguo^{1*}, GAO Meiyun¹, ZHU Hao¹, ZENG Xianlei¹, LIU Xue¹

(1. Fishery Machinery and Instrument Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200092, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Anaerobic ammonium oxidation and denitrification are the main processes of biological nitrogen removal from sediments. Carbon sources are the key factors regulating anaerobic ammonium oxidation and denitrification. In this study, the static carbon release of lignite and its effect on nitrogen removal from pond sediment were studied. The results show that the carbon release rule of lignite at room temperature accords with the second-order kinetic equation and has the feasibility of being a denitrification carbon source. In the denitrification experiment, it was found that lignite promoted the removal of nitrite nitrogen (NO_2^- -N) in the overlying water. The removal rate of NO_2^- -N increased with the increase of lignite concentration. When the mass concentration of lignite was 40 g/L, the removal rate of NO_2^- -N was up to 99.61%. At this time, the concentration of nitrate nitrogen (NO_3^- -N) was also the lowest; at the same time, it was found that the optimum concentration of ammonia nitrogen (NH_4^+ -N) in water was 10 g/L, and the removal rate was 99.39%. Illumina high-throughput sequencing of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in the sediment found that the proportion of *Fusarium* was the largest (39.6%-71.8%), and the dominant genus was *Candidatus Brocadia* (13.9%-35.8%), *Desulfovibrio* (17.1%-34.8%), the proportion of *Candidatus Scalindua* added to the lignite group was higher than that of the unadded group; fluorescence quantitative PCR showed that with the increase of lignite mass concentration, the abundance of denitrifying bacteria in the sediment increased, while the abundance of anaerobic ammonium oxidizing bacteria was lower than that in the zero-brown coal addition group, indicating that the addition of lignite promoted the sediment denitrification. It has a certain inhibitory effect on anaerobic ammonium oxidation. Studies have shown that lignite has the conditions of denitrifying carbon source and can be used for denitrification of pond culture sediments.

Key words: lignite; carbon release; sediments; anaerobic ammonia oxidation; denitrification

Corresponding author: LIU Xingguo. E-mail: liuxingguo@fmiri.ac.cn

Funding projects: National Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-46); Public Welfare Industry (Agriculture) Research Projects (201503108); Construction Technology of Saline Alkali Pond Ecological Engineering (2016HY-ZD0603)