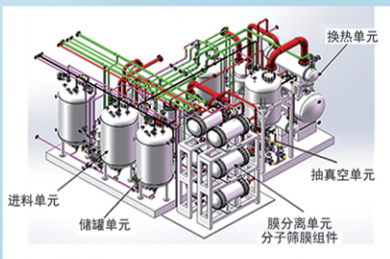




浙江汇甬新材料有限公司

微波合成第二代脱水膜

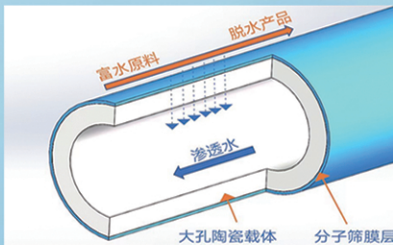


国家自然科学基金二等奖 成果转化

IChemE全球 创新产品冠军

微波分子筛膜 脱水性能遥遥领先

共沸体系、热敏体系、含水有机物脱水精制换代技术



收率高、能耗低、连续脱水、无需再生

在如下领域的有机物脱水精制已有工业化应用

锂电池电解液溶剂及NMP生产、回收
BDO产业链、煤化工、石油化工精细化学品
制药行业、溶媒回收、燃料乙醇、超纯溶剂

广泛适用于醇类、醚类、酯类、酮类、苯系物、卤代烃的脱水精制



网址: www.hymater.com

固定电话: 0574-87648996

电话: 13396592011

地址: 浙江省宁波市江北高新园区庆丰路联东U谷国际港56号楼

铁调控厌氧氨氧化颗粒污泥研究进展

王雪超¹, 李文璇², 杨莉莉¹, 董三强¹, 李杰^{1*}

(1. 兰州交通大学 环境与市政工程学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国环境科学研究院 环境基准与风险评估国家重点实验室 国家环境保护化学品生态效应与风险评估重点实验室, 北京 100012)

摘要: 与其他传统的脱氮技术相比, 厌氧氨氧化工艺作为新型的脱氮技术具有无需外加碳源和节能减排等优点。但厌氧氨氧化在实际应用过程中极易因污泥流失而无法快速培养启动。通过外加铁调控厌氧氨氧化颗粒污泥可以提高厌氧氨氧化脱氮效能, 并保障其长期稳定运行。该文首先, 简述了厌氧氨氧化菌的特性、代谢途径及厌氧氨氧化颗粒污泥的聚集机制; 然后, 重点从调控酶的合成和功能基因的表达、加速功能菌群的富集、供给颗粒污泥凝结核、促进胞外聚合物分泌以及加强系统群体感应等方面对铁调控厌氧氨氧化颗粒污泥的机制研究进展进行了综述; 最后, 从外加铁的系统优化、菌群间物质协同利用及群体感应调控作用的理解和铁在厌氧氨氧化颗粒污泥造粒过程中的机理探究等方面提出未来的研究方向。

关键词: 铁; 调控; 厌氧氨氧化颗粒污泥; 机理; 代谢途径

中图分类号: X703; Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 01-0001-11

Research progress on iron regulation of Anammox granular sludge

WANG Xuechao¹, LI Wenxuan², YANG Lili¹, DONG Sanqiang¹, LI Jie^{1*}

(1. School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, Gansu, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, State Environmental Protection Key Laboratory of Ecological Effect and Risk Assessment of Chemicals, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: Compared with other traditional nitrogen removal technologies, Anammox, as a new nitrogen removal technology, has the advantages of no additional carbon source, energy saving and emission reduction. However, Anammox can not be quickly started due to sludge loss in the practical application process. Regulating Anammox granular sludge by adding iron can improve the efficiency of Anammox nitrogen removal and ensure its long-term stable operation. Herein, the characteristics, metabolic pathways, and aggregation mechanism of anaerobic ammonium oxidation bacteria were briefly introduced. The mechanism of iron regulation on Anammox granular sludge was then reviewed with emphasis on regulating the synthesis of enzymes and the expression of functional genes, accelerating the enrichment of functional bacteria, supplying granular sludge condensation nuclei, promoting the secretion of extracellular polymer, and strengthening the systemic group induction. Finally, the future research direction was discussed from three aspects of systemic optimization with iron added, understanding of cooperative utilization of substances among bacteria and quorum sensing regulation, and mechanism of iron in the granulation process of anaerobic ammonia oxidation granular sludge.

Key words: iron; regulation; Anammox granular sludge; mechanism; metabolism pathways

近年来, 国家和社会越来越需要大量水资源以支持经济的迅速发展, 这导致过量的氮素排放到环境中, 造成了水体富营养化, 甚至危害生命健康^[1],

因此, 脱氮成为污水处理过程中的必需步骤。目前, 水体中含碳有机污染得到有效控制, 但是氮磷污染增多, 逐渐呈现出低碳氮比的趋势。传统的生物脱

收稿日期: 2024-01-15; 定用日期: 2024-02-28; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240053

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51768032)

作者简介: 王雪超 (2001—), 女, 硕士生, E-mail: 1733168085@qq.com。联系人: 李杰 (1964—), 男, 教授, E-mail: 936271028@qq.com。

氮技术虽已非常成熟,但仍需要足够的碳源来满足反应过程中能量和电子的需求^[2-3]。由于低碳氮比污水中碳源不足,且外加碳源不能满足低碳节能的要求,因此,寻找一种高效率、低能耗的新型生物脱氮水处理技术势在必行。

厌氧氨氧化(Anammox)是在缺氧或厌氧环境条件下,利用厌氧氨氧化菌(AnAOB)将氨氮(NH_4^+-N)直接氧化为氮气的自养微生物脱氮技术^[4],它无需外加碳源,可有效解决低碳氮比废水脱氮问题^[5]。然而,AnAOB生长速率仅为 0.048 d^{-1} ^[6],世代周期长(倍增时间1~2周),导致反应器启动缓慢、反应耗时长,限制了其在实际工程中大规模应用^[7-8]。AnAOB是Anammox的基础,而形成抗冲击能力强、沉降性能好的厌氧氨氧化颗粒污泥(AnGS)^[9]是加速Anammox系统启动的关键。颗粒污泥为Anammox反应器提供高效的菌群,从而实现更高的氮体积分担率,确保Anammox反应器的稳定运行和高效脱氮^[10]。颗粒污泥研究可推动Anammox深入发展,解决反应器中污泥损失和难以适应复杂环境条件等问题,在废水处理领域受到广泛关注。如何增强AnAOB生长代谢水平、提高Anammox脱氮效能、保障系统长期稳定运行成为当前研究热点。

铁是微生物生命活动中重要元素之一,除促进血红色素C和Fe-S蛋白合成外,还可以作为辅助因子合成所需的代谢功能酶^[11]。AnAOB细胞内部厌氧氨氧化体中含有大量致密的铁离子微粒,可参与三羧酸(TCA)循环和电子转移中的催化、氧化还原和调节过程,对微生物细胞结构的形成和维持正常新陈代谢有重要影响^[12]。铁能够通过多种途径促进微生物聚集,加速AnGS的形成,以提高脱氮性能。通过外加铁促使污泥颗粒化具有经济性和实用性,

极具工程应用前景,也是研究最为广泛的方法。鉴于铁在加速AnGS形成过程中发挥着重要作用,了解其作用机理对工程应用具有重要意义。

虽然AnGS表现出结构强度高、沉淀性能优良及抗冲击能力强等显著优势,但是目前对于铁元素在Anammox污泥颗粒化过程中发挥的作用仍缺乏系统的认识。本文在总结当前AnGS研究成果的基础上,介绍了AnAOB种类特性及其代谢途径,从多方面总结和梳理铁调控AnGS的机理,旨在为铁强化Anammox的发展与应用提供理论指导,为其实际工程应用提供参考。

1 厌氧氨氧化菌

1.1 种类和特性

早在1999年,科学家便通过密度梯度离心的方法在Gist-Brocades污水处理厂获得纯度99.6%的AnAOB,采用16S rRNA检测分析,将其命名为*Candidatus Brocadia anammoxidans*,并归类于浮霉菌门^[13]。随后,越来越多的AnAOB被陆续发现,截止目前,在自然生态系统(海洋沉积物、淡水湖、稻田土壤)和人工生物反应器中已检测发现的AnAOB共26种,其种类及来源如表1所示。AnAOB分布范围广泛且可以适应多种多样的生存环境,这为AnAOB作为主要功能微生物处理各种类型污水提供了可行性依据。现有的研究明确了少部分AnAOB的种类、特性及分布情况,但数据库中储存着与AnAOB相关的基因序列多达30000个,表明大量的AnAOB种群仍处于科学的未知状态^[14]。随着研究的深入以及分子生物学技术的发展,未来可借助更多的科技手段进一步探索未知菌株。

表1 AnAOB的种类及来源
Table 1 Types and sources of AnAOB

属	种	来源	年份	营养类型	检索码	文献号
<i>Brocadia</i>	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i>	荷兰 Gist-Brocades 污水处理厂	1999	混养	AF375994	[13]
	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	荷兰鹿特丹污水厂	2001	混养	DQ459989	[18]
	<i>Candidatus Brocadia brasiliensis</i>	莫斯科河底泥	2013	自养	GQ896513	[19]
	<i>Candidatus Brocadia caroliniensis</i>	美国猪场废水脱氮系统	2011	—	JF487828	[20]
	<i>Candidatus Brocadia sapporoensis</i>	日本 MBR 脱氮反应器	2017	—	KY659581	[21]
	<i>Candidatus Brocadia sinica</i>	中国脱氮反应器	2010	自养	AB565477	[22-23]
<i>Anammoxo-globus</i>	<i>Candidatus Anammoxoglobus propionicus</i>	荷兰 Delft 实验室 SBR 反应器	2006	混养	DQ317601	[24]
	<i>Candidatus Anammoxoglobus sulfate</i>	中国实验室生物转盘反应器	2008	混养	—	[25]
<i>Jettenia</i>	<i>Candidatus Jettenia asiatica</i>	亚洲实验室生物膜反应器	2008	自养	DQ301513	[26]
	<i>Candidatus Jettenia caeni</i>	日本熊本市污水处理厂	2002	混养	AB057453	[27]
	<i>Candidatus Jettenia ecosi</i>	厌氧生物反应器	—	—	MH220407	[28]
	<i>Candidatus Jettenia moscovienalis</i>	莫斯科消化污泥生物反应器	2015	自养	KF720711	[29]

续表 1

属	种	来源	年份	营养类型	检索码	文献号
<i>Anammoximicrobium</i>	<i>Candidatus Anammoximicrobium moscowii</i>	莫斯科河底泥	2013	自养	KC467065	[30]
<i>Kuenenia</i>	<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	德国 Stuttgart 大学生物滤池	2000	混养	AF375995	[31]
<i>Scalindua</i>	<i>Candidatus Scalindua brodae</i>	英国 Pitsea 垃圾填埋场	2003	自养	AY254883	[32]
	<i>Candidatus Scalindua wagneri</i>	英国 Pitsea 垃圾填埋场	2003	自养	AY254882	[32]
	<i>Candidatus Scalindua sorokinii</i>	黑海次氧层区域	2003	自养	AY257181	[33]
	<i>Candidatus Scalindua marina</i>	瑞典 Gullmar 海湾海洋沉积物	2011	自养	EF602038	[34-35]
	<i>Candidatus Scalindua sinooilfield</i>	中国胜利高温油田	2010	自养	HM208769	[36]
	<i>Candidatus Scalindua arabica</i>	黑海次氧层区域	2008	自养	EU478593	[37]
	<i>Candidatus Scalindua profunda</i>	瑞典 Gullmar 海湾海洋沉积物	2008	自养	EU142947	[38]
	<i>Candidatus Scalindua zhenghei</i>	中国南海海底沉积物	2011	自养	GQ331167	[39]
	<i>Candidatus Scalindua richardsii</i>	黑海次氧层区域	2012	自养	DQ368233	[40]
	<i>Candidatus Scalindua rubra</i>	红海	2017	—	MAYW01000056	[41]
	<i>Candidatus Scalindua flavia</i>	中国东海领海以及黄海	2017	—	KP126678	[42]
	<i>Candidatus Scalindua pacifica</i>	中国渤海海底沉积物	2013	—	JX537310	[43]

注: “—”代表暂不明确; MBR 代表膜生物反应器; SBR 代表序批式反应器。

AnAOB 属于革兰氏阴性菌, 一般为(0.7~1.1) μm × (1.1~1.3) μm 大小不规则的球形或卵状^[15], 细胞壁表面呈现火山口状, 且细胞外表面覆盖网状的胞外聚合物 (EPS)。成熟的 AnAOB 一般呈红色或砖红色, 个体形态具有差异, 少数有菌毛及体内存储颗粒, 其适宜生长温度为 20~43 $^{\circ}\text{C}$, 最佳 pH 范围为 6.7~8.3^[16]。以细胞膜为界, 可将 AnAOB 从内到外分为厌氧氨氧化体、核糖细胞质和外室细胞质三部分。厌氧氨氧化体作为 AnAOB 特有细胞器, 是发生反应的主要场所, 占其细胞总体积的 50%~80%^[17]。

1.2 代谢途径

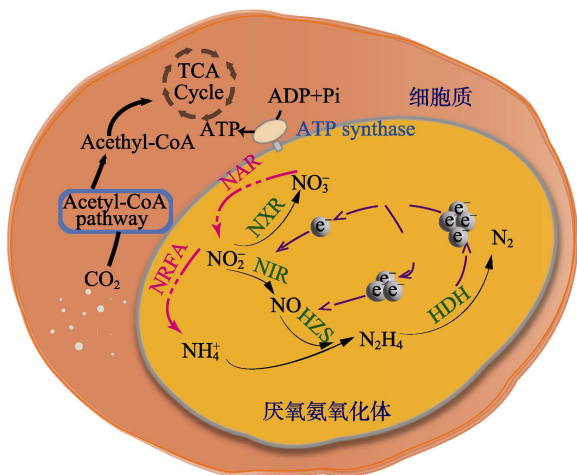
1.2.1 氮代谢途径

AnAOB 能够以 CO_2 或 HCO_3^- 为碳源, 在缺氧条件下催化亚硝酸盐和氨转化为氮气, 通过腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 和还原型辅酶 II (NADPH) 的合成来获得能量^[44]。此过程主要由 AnAOB 参与, 按照中间代谢产物类型可将此过程分为 3 种途径: 途径 (1) 以亚硝酸盐为电子受体, 代谢产物为羟胺 (NH_2OH) + 联氨 (N_2H_4); 途径 (2) 以亚硝酸盐为电子受体, 代谢产物为一氧化氮 (NO) + N_2H_4 ; 途径 (3) 以 NO 为电子受体, N_2H_4 为中间代谢产物。最初, VAN DE VOSSBERG 等^[45]使用 ^{15}N 同位素标记法发现添加的羟胺 (NH_2OH) 可作为反应潜在中间体瞬时转化为 N_2H_4 , 且人为投加两者均能增强反应性能。因此, 在传统微生物学基础上提出 3 步代谢模型 [途径 (1)], 认为反应过程中的代谢途径是 NO_2^- 被还原为 NH_2OH , 随后 NH_2OH 与 NH_4^+ 反应生成 N_2H_4 , 最终转化为 N_2 ^[46]。随着细胞生物学与基因测序技术的发展, 在 *Candidatus*

Brocadia anammoxidans 中首次发现并证实 AnAOB 体膜表面存在相关酶, 是生成 N_2H_4 的主要场所^[13,47]。此外, AnAOB 编码中缺乏 NO_2^- 转化为 NH_2OH 的还原酶基因, 但存在由 NO_2^- 到 NO 的还原酶基因^[48]。因此, STROUS 等^[48-49]在第 1 种模型的基础上进行改进, 提出新 3 步代谢途径 [途径 (2)], 并得到了学者们的普遍认可。相比途径 (1) 的中间产物 NH_2OH , 该途径中 NO 为中间产物, 亚硝酸盐还原酶 (NIR) 将 NO_2^- 催化生成 NO ; NH_4^+ 和 NO 借助联氨合成酶 (HZS) 转化为 N_2H_4 ; N_2H_4 通过氧化还原酶 (HAO) 或联氨氧化还原酶 (HZO) 氧化为 N_2 。后续通过对氨基酸序列测定, 发现联氨脱氢酶 (HDH) 与 HAO 和 HZO 有关, 区别是它只能氧化 N_2H_4 。此过程中质子伴随着各反应之间的电子传递, 在膜的两侧形成梯度, 通过合成酶驱动二磷酸腺苷 (ADP) 和磷酸分子 (Pi) 合成 ATP^[50-51]。2019 年, HU 等^[52]发现, AnAOB 可以将 NO 直接作为电子受体的氮代谢途径 [途径 (3)], 在不生成 NO_2^- 副产物的基础上, NO 与 NH_4^+ 反应生成 N_2H_4 , 并转化为 N_2 。

除以上 3 种 AnAOB 直接参与 Anammox 过程代谢途径外, AnAOB 也具有其他氮代谢途径。随着对 AnAOB 研究的深入, CHICANO 等^[53]发现, 在 AnAOB 中存在亚硝酸盐氧化还原酶 (NXR), 可以将 NO_2^- 转化为 NO_3^- 。最近研究显示, AnAOB 同样能够利用外源有机碳源及细胞内碳源 (糖原) 为电子供体, 为硝酸盐异化还原为铵途径 (DNRA) 提供电子, 借助硝酸盐还原酶 (NAR) 和亚硝酸盐还原酶 (NRFA) 将 NO_3^- 先后转化为 NO_2^- 和 NH_4^+ ^[54]。通过

该途径 AnAOB 便可以在不借助其他微生物条件下独立利用 NO_3^- 来提供反应所需底物, 这是其独特的生存方式。AnAOB 参与的碳氮代谢途径的主要反应如图 1 所示。综合上述研究结果, AnAOB 具有氮代谢多样性, 能够提高其在不同环境下的生存能力。无论是 AnAOB 介导的哪种氮代谢途径均需多种酶参与协同, 其中 HZS 和 HZO 两种酶为 AnAOB 所特有。



TCA 代表三羧酸

图 1 厌氧氨氧化碳-氮代谢模型^[55]

Fig. 1 Carbon-nitrogen metabolism model of anammox^[55]

1.2.2 碳代谢途径

AnAOB 可通过碳固定途径将无机碳源 (CO_2 、 CO_3^{2-} 或 HCO_3^- 等) 还原为有机碳。依靠同位素示踪手段, 人们将 AnAOB 的碳代谢固定方式确定为还原性乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 途径, 又称 Wood-Ljungdahl 途径, 且在此过程中所利用的电子来源于 AnAOB 内的氮代谢过程^[56-57]。当环境中营养物质浓度较高时, AnAOB 通过 Wood-Ljungdahl 途径同化固定 CO_2 为有机物质, 并将过量合成的有机物质转化成糖原进行积累; 一旦环境中营养物质不足, 便通过降解糖原提供细胞生存所需能量。

最初, STROUS 等^[48]通过酶活法推断菌种中存在的碳代谢途径可能为 Wood-Ljungdahl 途径或卡尔文循环, 进一步采用宏基因组技术进行分析, 相比于后者关键基因有所缺失, 前者所需的关键基因在基因组中均完整存在。这一证据直接证明, AnAOB 可通过 Wood-Ljungdahl 途径同化 CO_2 , 完成固碳过程^[58]。同时, AnAOB 内部含有大量的糖原颗粒及糖原合成、分解等中心碳代谢途径相关的基因^[59], 这些糖原颗粒可作为细胞内碳源, 通过糖酵解相关酶的协同作用产生丙酮酸, 并进一步转化为 Acetyl-CoA, 再次进行 TCA 循环^[60]。该过程中生成大量还原型辅酶 I (NADH), 通过电子传递链直

接参与 DNRA 降解 NO_3^- ^[61]。

理论上, 由于 AnAOB 是化能自养的专性厌氧菌, 有机物的存在会促进异养菌的生长, 抑制 AnAOB 的活性。然而, 研究表明, 在有机碳源存在的条件下, AnAOB 仍保持较强的活性并与异养反硝化菌竞争底物^[62]。研究发现, AnAOB 内存在能够代谢有机碳源的酶和基因, 如甲酸脱氢酶^[63]和 ADP 型 Acetyl-CoA 合成酶^[64], 所以 AnAOB 能够通过 Acetyl-CoA 途径将小分子有机酸 (甲酸、乙酸和丙酸) 完全氧化为 CO_2 , 进而合成细胞自身所需营养物质以代谢降解部分有机碳。此外, 还有 4 个额外羧化反应参与 CO_2 中心代谢, 且反应过程中的产物可作为 TCA 循环通路中合成生物的前体代谢物^[23,65]。AnAOB 可利用有机碳源的特性在一定程度上增强其环境适应性。随着研究的不断深入, LAWSON 等^[66]发现, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 可以通过 Wood-Ljungdahl 途径同化直接使用甲酸盐作为碳源而不是将其完全氧化为 CO_2 , 再同化, 其根本原因在于甲酸盐是厌氧环境中发现的常见发酵最终产物。AnAOB 能够代谢转化丙酸、乙酸等有机物质, 则是将其作为电子受体进行 DNRA 代谢^[67-68]。因此, 需要在今后研究中进一步揭示 AnAOB 所有的功能基因, 勾勒出完整的碳代谢网络。

2 厌氧氨氧化颗粒污泥

2.1 组成结构

已报道 AnGS 直径主要分布在 1.0~4.0 mm^[69], 是由 AnAOB 在 EPS 和丝状菌作用下团聚, 并在重力作用下沉降堆积形成污泥床。AnGS 中的功能菌群包括 AnAOB 和其他共生菌, 污泥通过对功能菌群自由选择、组合和固定, 将功能菌尽可能地保留在反应器中。通常, 每 1 g 的 AnGS 中微生物数量可达数百万个, 具有较高的相对生物量密度, 是其拥有良好的沉降性和生物量保留能力的主要原因。

由荧光原位杂交 (FISH) 技术分析表明, AnGS 结构并不是简单的分层或同质结构^[70]。总的来说, AnGS 的形成过程依次经历细胞单体、菌胶团 (细胞簇)、亚基 (细胞簇复合体) 和颗粒污泥 4 个阶段^[71]。首先是微生物单细胞通过分泌的 EPS 吸附大量金属离子形成菌胶团, 随后菌胶团经过异质生长与外来球形微生物簇结合发育, 最终整合生成亚基与颗粒污泥。

2.2 聚集机制

颗粒污泥是由各种微生物聚集而形成的群体, 广义上也是一种生物膜。关于颗粒污泥的机理尚不清晰, 但主要存在以下几种假说^[72-73]: (1) 晶核假

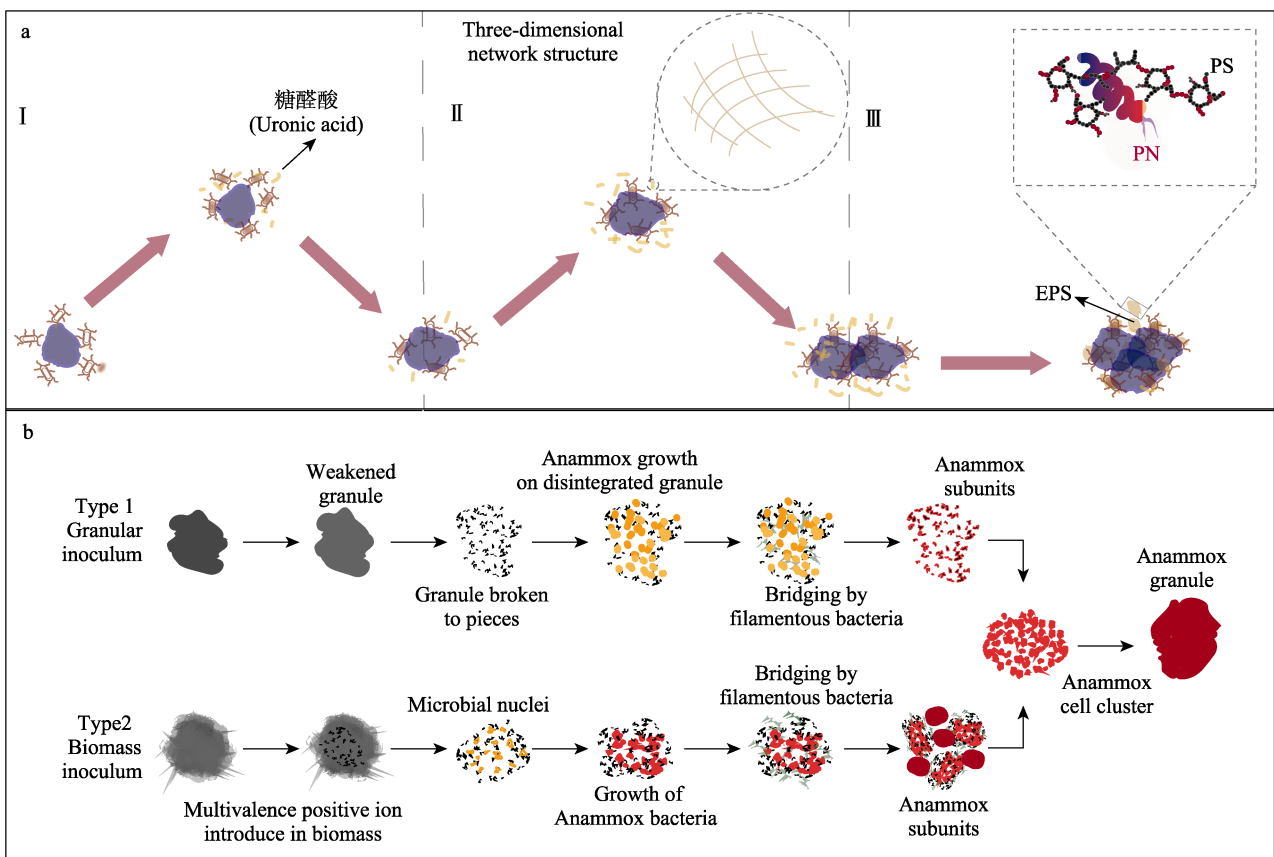
说, (2) 选择压假说, (3) 多价阳离子假说, (4) 胞外多聚物假说, (5) 细胞表面疏水性假说, (6) 自聚集假说, (7) 丝状菌假说。颗粒污泥的形成难以用一种理论解释清楚, 可能此过程是多种过程共同作用的结果, 目前就颗粒污泥的形成过程所涉及的机理尚未达成共识。

AnGS 造粒机理较为复杂且尚未明确, 不同研究者有不同看法, 但目前主要以下述两种观点最具代表性。可以分别从胞外物质聚集黏附和接种物类型两种角度分析 AnGS 聚集演化机理, 进一步完善颗粒污泥形成理论体系。

在总结前人研究的基础上, JIA 等^[74]从胞外物质聚集黏附角度认为, AnGS 形成过程主要包括以下 3 个阶段 (图 2a): (1) 最初 AnAOB 附着在固体表面: 游走在固体表面的 AnAOB, 分泌少量的糖醛酸黏附在表面适宜的点位上; (2) 产生的糖醛酸使 AnAOB 牢靠黏附在固体表面: AnAOB 停留在固体表面, 接触并分泌更多的糖醛酸。糖醛酸独特的

三维网状结构具有网捕作用, 可以防止微生物分解脱落, 从而更加紧密地黏附在固体表面; (3) 进一步发展为微型菌落架构: AnAOB 生长过程中形成大量 EPS 包裹在细胞表面, 具有 β 折叠结构的胞外蛋白通过暴露其内部疏水基团来呈现较高的疏水性, 有助于细胞间聚集并形成牢固的群落结构。

而 MANONMANI 等^[75]从接种物类型角度分析将颗粒污泥聚集机理分为两种 (图 2b): (1) 当污泥以颗粒形式接种时, 由于生化环境变化, 接种颗粒污泥的强度降低, 并逐渐解体作为内核, 在 EPS 和丝状菌作用下互相结合, 形成 Anammox 细胞团簇并黏附, 最终形成 AnGS; (2) 当污泥以絮体形式接种时, 多价阳离子 (如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 以沉淀形式作为 AnAOB 凝结核, 在 EPS 和丝状细菌作用下, 形成细胞簇, 进而形成颗粒。除此之外, 颗粒污泥聚集过程中同样会受到水剪切力、无机离子、EPS、水力停留时间、污泥保留时间、种子污泥、温度和 pH 等多种因素的影响。



PS 代表多糖; PN 代表蛋白质

图 2 AnGS 聚集机制示意图^[74-76]

Fig. 2 Schematic diagram of aggregation mechanism of AnGS^[74-76]

3 铁调控厌氧氨氧化污泥颗粒化

铁调控厌氧氨氧化污泥颗粒化主要表现在菌群本身及颗粒污泥聚集两大方面, 具体可以从调控酶

的合成和功能基因的表达、加速功能菌群的富集、供给 AnGS 凝结核、促进厌氧氨氧化污泥 EPS 分泌及加强系统群体感应等进行梳理总结, 如图 3 所示。

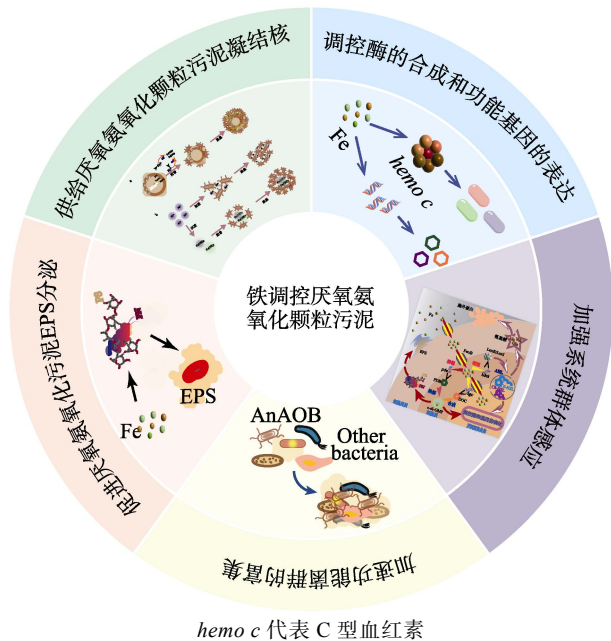


图 3 铁调控厌氧氨氧化污泥颗粒化

Fig. 3 Iron regulation anammox sludge granulation

3.1 铁强化 AnAOB 群

3.1.1 铁调控酶的合成和功能基因的表达

实验室培养的成熟 AnGS 呈红色,这主要是由于 AnAOB 胞内血红素及纳米级的含铁颗粒的存在。血红素 C 参与构成 AnAOB 内近 20% 的细胞蛋白,而铁是合成血红素 C 的主要元素,一定限度内血红素 C 的含量与投加 Fe^{3+} 的浓度呈现正相关性^[77]。与此同时,贮存于 AnAOB 中的铁直接或间接参与氮传输电子转移过程,促进相关酶的合成及 AnAOB 的代谢和增殖。例如:铁能够通过细胞膜上的转运蛋白进入细胞,功能基因分析结果表明, Fe^{2+} 的添加有利于增加转运蛋白编码基因 Feo A 和 Feo B 的丰度^[78]。DING 等^[79]在前人研究基础上进行 RNA-based GeoChip 分析,也表达了类似的观点,即铁的加入在不刺激原有功能基因表达的基础上,诱导了更多基因的表达。与对照组相比,在添加零价铁 (ZVI) 的 Anammox 反应器中, AnAOB 丰度增加了 29.0%,同时功能基因表达量是原来的 1.62 倍。需要注意的是,铁含量过高也会干扰和抑制酶的活动,甚至破坏微生物的结构,影响脱氮效果。

3.1.2 铁加速功能菌群的富集

AnAOB 对环境中溶解氧、温度、pH 等非常敏感,不当的运行条件会影响菌群活性及工艺稳定性^[80]。铁被视为有效的脱氧剂,在 Anammox 生物反应器中, ZVI 可以消耗溶解氧被氧化为 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} ,该过程可强化系统厌氧环境,提高 AnAOB 的活性。同时, ZVI 投加会改变氧化还原电位 (ORP),进一步来影响 AnAOB 的代谢,但现有研究中铁的投

加对 ORP 影响的实验结果不一,尚需要深入研究^[81]。AnAOB 生长趋向偏碱性环境,随着铁的增加,在水中电离会产生一定数量的 OH^- ,菌种的生长速率将会缓慢增加。WANG 等^[82]研究表明,实验组 AnAOB 的相对丰度均高于对照组,且 AnAOB 的富集程度和功能基因 (hzsB) 的丰度与进水中的 Fe^{3+} 成正比,可见, Fe^{3+} 能增强 AnAOB 活性并促进污泥颗粒化。此外,随着铁的投加, EPS 含量及细胞外空间的代谢分泌物增多,对酶的抑制减少,更加有利于增强 AnAOB 活性^[83]。综上所述,添加适量 ZVI 及铁离子可显著提高 AnAOB 的丰度和活性,为污泥颗粒化过程发挥积极作用。

据报道, Anammox 系统内微生物群落具有多样性,但微生物的门水平组成结构表现出高度相似性,除浮霉菌门外,拟杆菌门、变形菌门、绿弯菌门、酸杆菌门及放线菌门等菌群也占据重要地位(相对丰度为 30%~70%)^[84]。其中,大多数共生菌为异养菌,可以提供 AnAOB 碳代谢过程中所需的钼辅因子和叶酸或者分解利用产生的多肽和胞外蛋白,促进 AnAOB 生长代谢^[85-86]。相关研究显示, Fe^{2+} 的投加量和大多数共生菌的相对丰度呈正相关,其中变形菌门的相对丰度直接增加了近两倍^[78]。除此之外,绿弯菌门是以丝状细菌形式存在的共生微生物,它们可以通过缠结连接为颗粒污泥提供支架,增强 AnGS 结构的稳定性^[87]。然而, Anammox 系统中其他共生菌的具体功能仍有待考证,未来应进一步从该角度考察其对 AnGS 颗粒化的影响。

3.2 铁调控厌氧氨氧化颗粒污泥聚集

3.2.1 铁供给厌氧氨氧化颗粒污泥凝结核

在 AnGS 形成进程中,尽管颗粒污泥的形成机制有很多,但普遍认为,从单细胞进化到微生物细胞簇是初始且相对关键的一步^[88]。正如晶核假说所述,凝结核外部附着的絮状污泥逐渐颗粒化类似于晶核结晶过程。凝结核可以提供附着位点以加速 AnAOB 单细胞的聚集,在此过程中许多物质可以充当凝结核,如单细胞本身、外加惰性颗粒或多价阳离子等^[89],后两者所涉及机制示意图分别如图 4 所示。部分研究已尝试添加上述物质来促进 AnGS 的形成,但它们作为凝结核受到的关注有限,缺乏系统研究。

惰性颗粒可以为 AnAOB 提供吸附位点,并与单细胞共同作为凝结核形成微生物细胞簇,在 EPS 和丝状菌的作用下发育为成熟的颗粒^[90]。近年来,铁基材料因其理化性质、催化功能在环境领域受到越来越多的关注。事实上,铁基颗粒具有较大的比表面积可以为 AnAOB 提供附着位点和生长空间,在颗粒污泥的形成过程中具有重要作用^[91](图 4a)。有研究^[92]发现,在厌氧连续搅拌釜式反应器 (CSTR)

中成功获得了以 ZVI 和 Fe_3O_4 为凝结核的颗粒污泥, 并保持其比厌氧氨氧化活性 (SAA) 均大于空白对照组 $0.2 \text{ kg N}/(\text{kg VSS}\cdot\text{d})$ (其中, VSS 代表挥发性悬浮固体)。相比之下, ZVI 在促进 AnGS 形成方

面优于 Fe_3O_4 , 其作用机制仍需进一步研究。通过对常见惰性材料的效益和成本进行综合比较, 铁基材料充当“微核”促进 AnGS 形成更具优势, 但目前铁基材料仍存在诸多问题, 后续需进一步优化。

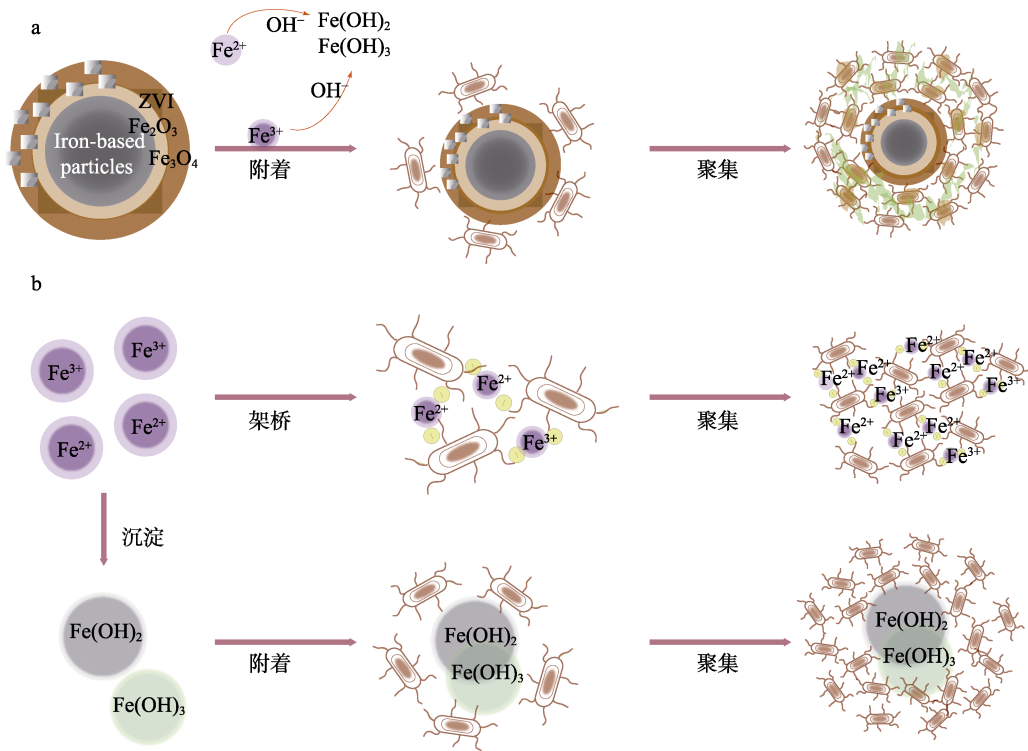


图 4 铁基颗粒 (a) 及多价 Fe 离子 (b) 为凝结核的机制示意图^[91,93]

Fig. 4 Schematic diagram of mechanism of iron-based particles (a) and multivalent Fe ions (b) as condensation nuclei^[91,93]

多价阳离子可以吸附在细胞表面减少 AnAOB 的负电荷, 通过压缩双电子层降低 Zeta 电位来减少细菌之间的静电斥力^[93], 增加细胞之间相互碰撞的概率, 促进相邻 AnAOB 细胞桥接来形成微生物细胞簇, 进而形成 AnGS 来增强沉降速度 (图 4b)。TANG 等^[94]将质量浓度为 5.3 mg/L 的 Fe^{2+} 以 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的形式加入 Anammox 反应器中, 结果显示, 颗粒污泥占总污泥质量的 58.3%, 与 TRIGO 等^[95]的研究结果类似。同时, 将多价金属阳离子投入反应器后, 形成的氢氧化物和磷酸盐等沉淀物可以作为凝结核。彭梦文^[96]用 X 射线断层扫描 AnGS, 随着颗粒污泥深度的增加, 晶核结构逐渐增大, 且颗粒污泥的主要成分是钙、铁元素。由此可见, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 形成的铁氧化物沉淀可作为 Anammox 颗粒形成的凝结核, 有利于 AnAOB 的聚集、自固定及颗粒化^[97]。然而, 同样需要控制其添加质量浓度, 因为高质量浓度 ($120\sim 300 \text{ mg/L}$) Fe^{2+} 会抑制 AnAOB 的活性, 且过量的沉淀会产生一系列负面影响, 如限制底物扩散、减少活性位点和导致颗粒污泥矿化等^[98-99]。

3.2.2 铁促进厌氧氨氧化污泥 EPS 分泌

无论是好氧还是厌氧颗粒污泥内部的 EPS 均含

有大量的阳离子结合位点, 如羟基、羧基等有机官能团, 可通过静电作用或络合反应与金属元素相结合^[100]。与其他类型的活性污泥相比, Anammox 污泥中的 EPS 具有更疏水的蛋白质二级结构和更多的疏水官能团, 其中细胞外蛋白可以与金属及多糖支链桥接, 提高 Anammox 污泥的聚集能力^[101-103]。WENG 等^[104]使用 FTIR 对投加纳米铁颗粒的 EPS 官能团进行表征, 进一步验证了在 Anammox 反应器中 Fe^{2+} 可以与 EPS 官能团结合。可见, EPS 凭借其独特的理化性质和空间结构, 可使颗粒更加致密, 从而促进颗粒污泥的形成。同时, 在颗粒污泥的 EPS 提取物中, 以离子或非离子形式同步存在 Na、Ca、Fe 等金属元素, 且 EPS 含量与铁浓度成正比。HOU 等^[105]研究表明, ZVI、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 共同作用可以提高 EPS 的蛋白质/多糖 (PN/PS) 值, 与多糖相比, 蛋白质分子更容易通过静电作用与金属离子结合, 故 PN 对污泥絮凝的贡献率远大于 PS, 是影响微生物聚集体形成、沉降性能及污泥颗粒化的关键物质。因此, 投加铁可以增加 EPS 的分泌, 促进 AnGS 的形成, 增强颗粒污泥结构稳定性。

- environments: Widespread occurrence but low diversity[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(6): 1476-1484.
- [5] ARORA A S, NAWAZ A, QYYUM M A, *et al.* Energy saving anammox technology-based nitrogen removal and bioenergy recovery from wastewater: Inhibition mechanisms, state-of-the-art control strategies, and prospects[J]. *Sustainable Energy Reviews*, 2021, 135: 110126.
- [6] ZHAO Y, LI J W, LIU Q Y, *et al.* Fast start-up and stable operation of mainstream anammox without inoculation in an A²/O process treating low COD/N real municipal wastewater[J]. *Water Research*, 2023, 231: 119598.
- [7] KUENEN J G. Anammox and beyond[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(2): 525-536.
- [8] ALI M, OKABE S. Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues[J]. *Chemosphere*, 2015, 141: 144-153.
- [9] XIANG T, LIANG H, GAO D W. Comparison of recovery characteristics between AnaAOB and AOB-AnAOB granular sludge after long-term storage[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 802: 149741.
- [10] WANG T, ZHANG H M, YANG F L, *et al.* Start-up of the anammox process from the conventional activated sludge in a membrane bioreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(9): 2501-2506.
- [11] WANG H, FAN Y F, ZHOU M D, *et al.* Function of Fe(III)-minerals in the enhancement of anammox performance exploiting integrated network and metagenomics analyses[J]. *Water Research*, 2022, 210: 117998.
- [12] CHEN Y, JIA F X, LIU Y J, *et al.* The effects of Fe(III) and Fe(II) on anammox process and the Fe-N metabolism[J]. *Chemosphere*, 2021, 285(15): 131322.
- [13] STROUS M, FUERST J A, KRAMER E H, *et al.* Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. *Nature*, 1999, 400(6743): 446-449.
- [14] HU Q Y (胡倩怡), ZHENG P (郑平), KANG D (康达). Taxonomy, characteristics, and biotechniques used for the analysis of anaerobic ammonium oxidation bacteria[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology (应用与环境生物学报)*, 2017, 23(2): 384-391.
- [15] EMILIA RIOS-DEL T E, CERVANTES F J. Anaerobic ammonium oxidation in marine environments: Contribution to biogeochemical cycles and biotechnological developments for wastewater treatment [J]. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, 2019, 18(1): 11-27.
- [16] GUERRERO R. Bergey's manuals and the classification of prokaryotes[J]. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2001, 4(2): 103-109.
- [17] YAN B (闫冰), NIE H B (聂寒冰), FU J Q (付嘉琦), *et al.* An overview of advances in microbial communities of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process[J]. *Energy Research and Management (能源研究与管理)*, 2023, 15(3): 32-41.
- [18] KARTAL B, VAN NIFTRIK L, RATTRAY J, *et al.* *Candidatus 'Brocadia fulgida'*: An autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(1): 46-55.
- [19] BAE H, PARK K S, CHUNG Y C, *et al.* Distribution of anammox bacteria in domestic WWTPs and their enrichments evaluated by real-time quantitative PCR[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(3): 323-334.
- [20] ARAUJO J, CAMPOS A, CORREA M, *et al.* Anammox bacteria enrichment and characterization from municipal activated sludge[J]. *Water Science and Technology*, 2011, 64(7): 1428-1434.
- [21] NARITA Y, ZHANG L, KIMURA Z I, *et al.* Enrichment and physiological characterization of an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium '*Candidatus Brocadia sapporoensis*'[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2017, 40(7): 448-457.
- [22] HU B L, ZHENG P, TANG C J, *et al.* Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors[J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 5014-5020.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] LIU S T, YANG F L, GONG Z, *et al.* Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 6817-6825.
- [26] QUAN Z X, RHEE S K, ZUO J E, *et al.* Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) reactor[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3130-3139.
- [27] ALI M, OSHIKI M, AWATA T, *et al.* Physiological characterization of anaerobic ammonium oxidizing bacterium '*Candidatus Jettenia caeni*'[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(6): 2172-2189.
- [28] BOTCHKOVA E, LITTI Y V, NOVIKOV A, *et al.* Description of '*Candidatus Jettenia ecosi*' sp. nov., A new species of anammox bacteria[J]. *Microbiology*, 2018, 87: 766-776.
- [29] NIKOLAEV Y A, KOZLOV M, KEVBRINA M, *et al.* *Candidatus "Jettenia moscovienalis"* sp. nov., a new species of bacteria carrying out anaerobic ammonium oxidation[J]. *Microbiology*, 2015, 84: 256-262.
- [30] KHRAMENKOV S, KOZLOV M, KEVBRINA M, *et al.* A novel bacterium carrying out anaerobic ammonium oxidation in a reactor for biological treatment of the filtrate of wastewater fermented sludge[J]. *Microbiology*, 2013, 82: 628-636.
- [31] VAN DER STAR W R, MICLEA A I, VAN DONGEN U G, *et al.* The membrane bioreactor: A novel tool to grow anammox bacteria as free cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(2): 286-294.
- [32] SCHMID M, WALSH K, WEBB R, *et al.* *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(4): 529-538.
- [33] KUYPERS M M, SLIEKERS A O, LAVIK G, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea[J]. *Nature*, 2003, 422(6932): 608-611.
- [34] BRANDSMA J, VAN DE VOSSENBERG J, RISGAARD-PETERSEN N, *et al.* A multi-proxy study of anaerobic ammonium oxidation in marine sediments of the Gullmar Fjord, Sweden[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(3): 360-366.
- [35] JETTEN M S M, SLIEKERS O, KUYPERS M, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63: 107-114.
- [36] LI H, CHEN S, MU B Z, *et al.* Molecular detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in high-temperature petroleum reservoirs[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60: 771-783.
- [37] WOEBKEN D, LAM P, KUYPERS M M, *et al.* A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua phylotype* in marine oxygen minimum zones[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3106-3119.
- [38] VAN DE VOSSENBERG J, RATTRAY J E, GEERTS W, *et al.* Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production[J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(11): 3120-3129.
- [39] HONG Y G, LI M, CAO H, *et al.* Residence of habitat-specific anammox bacteria in the deep-sea subsurface sediments of the South China Sea: Analyses of marker gene abundance with physical chemical parameters[J]. *Microbial Ecology*, 2011, 62: 36-47.
- [40] FUCHSMAN C A, STALEY J T, OAKLEY B B, *et al.* Free-living

- and aggregate-associated *Planctomycetes* in the Black Sea[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 80(2): 402-416.
- [41] SPETH D R, LAGKOUVARDOS I, WANG Y, *et al.* Draft genome of *Scalindua rubra*, obtained from the interface above the discovery deep brine in the Red Sea, sheds light on potential salt adaptation strategies in anammox bacteria[J]. Microbial Ecology, 2017, 74: 1-5.
- [42] SHEHZAD A, QISMAT S, IBRAR K, *et al.* Molecular detection of *Candidatus Scalindua flavia*, study of anammox bacterial community structure, composition in the sediments of the East China Sea and the Yellow Sea[J]. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 2017, 46(1): 33-47.
- [43] OSHIKI M, SATOH H, OKABE S. Ecology and physiology of anaerobic ammonium oxidizing bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(9): 2784-2796.
- [44] YANG Y, AZARI M, HERBOLD C W, *et al.* Activities and metabolic versatility of distinct anammox bacteria in a full-scale wastewater treatment system[J]. Water Research, 2021, 206: 117763.
- [45] VAN DE VOSSENBERG J, WOEBKEN D, MAALCKE W J, *et al.* The metagenome of the marine anammox bacterium '*Candidatus Scalindua profunda*' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(5): 275-289.
- [46] DANG H Y, ZHOU H X, ZHANG Z N, *et al.* Molecular detection of *Candidatus Scalindua pacifica* and environmental responses of sediment anammox bacterial community in the Bohai Sea, China[J]. PLOS ONE, 2013, 8(4): e61330.
- [47] ZHANG Y C (张亦弛), QIAO X J (乔雪姣), YU K (余珂). Characteristics of anammox bacteria and the interaction with other bacteria in anammox community: A review[J]. Microbiology China (微生物学通报), 2022, 49(2): 737-755
- [48] STROUS M, PELLETIER E, MANGENOT S, *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome[J]. Nature, 2006, 440(7085): 790-794.
- [49] JETTEN M S M, NIFTRIK L, STROUS M, *et al.* Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 44(2/3): 65-84.
- [50] KARTAL B, MAALCKE W J, DE ALMEIDA N M, *et al.* Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation[J]. Nature, 2011, 479(7371): 127-130.
- [51] KARTAL B, KELTJENS J T. Anammox biochemistry: A tale of heme c proteins[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2016, 41(12): 998-1011.
- [52] HU Z Y, WESSELS H J, VAN ALLEN T, *et al.* Nitric oxide-dependent anaerobic ammonium oxidation[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1244.
- [53] CHICANO T M, DIETRICH L, DE ALMEIDA N M, *et al.* Structural and functional characterization of the intracellular filament-forming nitrite oxidoreductase multiprotein complex[J]. Nature Microbiology, 2021, 6(9): 1129-1139.
- [54] WANG C, QIAO S, BI Z, *et al.* Nitrate removal by anammox biomass with intracellular carbon source as electron donors via DNRA pathway[J]. Environmental Research, 2021, 200: 111390.
- [55] DAI B, YANG Y, WANG Z, *et al.* Enhancement and mechanisms of iron-assisted anammox process[J]. Science of the Total Environment, 2023, 858: 159931.
- [56] KARTAL B, DE ALMEIDA N M, MAALCKE W J, *et al.* How to make a living from anaerobic ammonium oxidation[J]. Fems Microbiology Reviews, 2013, 37(3): 428-461.
- [57] SCHOUTEN S, STROUS M, KUYPERS M M, *et al.* Stable carbon isotopic fractionations associated with inorganic carbon fixation by anaerobic ammonium-oxidizing bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3785-3788.
- [58] ZHOU Y, SHAO W, LI X, *et al.* Genome-based analysis to understanding rapid resuscitation of cryopreserved anammox consortia via sequential supernatant addition[J]. Science of the Total Environment, 2020, 744: 140785.
- [59] CHAMCHOI N, NITISORAVUT S, SCHMIDT J E J B T. Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) and denitrification [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3331-3336.
- [60] PAN C (潘超), ZHENG P (郑平), HU B L (胡宝兰), *et al.* Research progress in glycogen particles in anaerobic ammonium-oxidizing bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica (微生物学报), 2023, 63(12): 4522-4535.
- [61] WANG C, QIAO S. Electron transfer mechanism of intracellular carbon-dependent DNRA inside anammox bacteria[J]. Water Research, 2023, 244: 120443.
- [62] ZHANG T Q, YIN Q D, SHI Y H, *et al.* Microbial physiology and interactions in anammox systems with the intermittent addition of organic carbons[J]. Bioresource Technology, 2021, 319: 124226.
- [63] MA X, WANG Y, ZHOU S, *et al.* Endogenous metabolism of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in response to short-term anaerobic and anoxic starvation stress[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 313: 1233-1241.
- [64] FENG Y, ZHAO Y P, JIANG B, *et al.* Discrepant gene functional potential and cross-feedings of anammox bacteria *Ca. Jettenia caeni* and *Ca. Brocadia sinica* in response to acetate[J]. Water Research, 2019, 165: 114974.
- [65] TANG L, SU C, FAN C, *et al.* Long-term effect of perfluorooctanoic acid on the anammox system based on metagenomics: Performance, sludge characteristic and microbial community dynamic[J]. Bioresource Technology, 2022, 351: 127002.
- [66] LAWSON C E, NUIJTEN G H, DE GRAAF R M, *et al.* Autotrophic and mixotrophic metabolism of an anammox bacterium revealed by *in vivo* ¹³C and ²H metabolic network mapping[J]. The ISME Journal, 2021, 15(3): 673-687.
- [67] WANG W G, WANG T, LIU Q H, *et al.* Biochar-mediated DNRA pathway of anammox bacteria under varying COD/N ratios[J]. Water Research, 2022, 212: 118100.
- [68] KARTAL B, KUYPERS 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.
- [69] AN P, XU X C, YANG F L, *et al.* Comparison of the characteristics of anammox granules of different sizes[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 18(3): 446-454.
- [70] KE Y, AZARI M, HAN P, *et al.* Microbial community of nitrogen-converting bacteria in anammox granular sludge[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 103: 105-115.
- [71] WANG P C, LU B, LIU X J, *et al.* Accelerating the granulation of anammox sludge in wastewater treatment with the drive of "micro-nuclei": A review[J]. Science of the Total Environment, 2023, 860: 160238.
- [72] WANG W G (王伟刚), WANG T (王彤), FAN Y F (樊宇菲), *et al.* Research progress on aggregation mechanism of anaerobic ammonium oxidation granular sludge[J]. Microbiology China (微生物学通报), 2022, 49(5): 1927-1940.
- [73] ADAMS M, XIE J, KABORE A W J, *et al.* Research advances in anammox granular sludge: A review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2022, 52(5): 631-674.
- [74] JIA F X, YANG Q, LIU X H, *et al.* Stratification of extracellular polymeric substances (EPS) for aggregated anammox microorganisms [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(6): 3260-3268.
- [75] MANONMANI U, JOSEPH K. Granulation of anammox microorganisms for autotrophic nitrogen removal from wastewater[J]. Environmental Chemistry Letters, 2018, 16(3): 881-901.
- [76] WANG W, WANG Y. Determining the mechanism for biomass segregation between granules and flocs in anammox granular system from the prospective of EPS[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 475: 146028.
- [77] CHEN H, ZHAO X H, CHENG Y Y, *et al.* Iron robustly stimulates simultaneous nitrification and denitrification under aerobic

- conditions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(3): 1404-1412.
- [78] JIANG Y, CHEN Y, WANG Y, *et al.* Novel insight into the inhibitory effects and mechanisms of Fe(II)-mediated multi-metabolism in anaerobic ammonium oxidation (anammox)[J]. *Water Research*, 2023, 242: 120291.
- [79] DING J, SEOW W, ZHOU J, *et al.* Effects of Fe(II) on anammox community activity and physiologic response[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2021, 15(1): 7.
- [80] HAN X K (韩雪格), WANG Z R (王峥嵘), PENG Y Z (彭永臻), *et al.* A review of several important factors influencing the Anammox process[J]. *China Environmental Science (中国环境科学)*, 2023, 43(5): 2220-2227.
- [81] GUO B, CHEN Y, LYU L, *et al.* Transformation of the zero valent iron dosage effect on anammox after long-term culture: From inhibition to promotion[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 78: 132-139.
- [82] WANG H, PENG L, MAO N, *et al.* Effects of Fe³⁺ on microbial communities shifts, functional genes expression and nitrogen transformation during the start-up of Anammox process[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 320: 124326.
- [83] REN L F, NI S Q, LIU C, *et al.* Effect of zero-valent iron on the start-up performance of anaerobic ammonium oxidation (anammox) process[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(4): 2925-2934.
- [84] ZHANG S, ZHANG L, YAO H, *et al.* Responses of anammox process to elevated Fe(III) stress: Reactor performance, microbial community and functional genes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 414: 125051.
- [85] COTTON C A, EDLICH-MUTH C, BAR-EVEN A J C O I B. Reinforcing carbon fixation: CO₂ reduction replacing and supporting carboxylation[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 49: 49-56.
- [86] ZHAO Y, LIU S, 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.
- [87] 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(1): 15416.
- [88] LU H F, ZHENG P, JI Q X, *et al.* The structure, density and settlability of anammox granular sludge in high-rate reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 312-317.
- [89] XU J, PANG H, HE J, *et al.* Enhanced aerobic sludge granulation by applying carbon fibers as nucleating skeletons[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 373: 946-954.
- [90] DONG J, ZHAO Y, ZHAO R, *et al.* Effects of pH and particle size on kinetics of nitrobenzene reduction by zero-valent iron[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(11): 1741-1747.
- [91] REN S (任爽), WANG P (王鹏), WANG Y E (王亚娥), *et al.* Research progress on reduction of nitrates in water by zero-valent iron materials[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(10): 2005-2015.
- [92] GAO F, ZHANG H M, YANG F L, *et al.* The effects of zero-valent iron (ZVI) and ferrous oxide (Fe₃O₄) on anammox activity and granulation in anaerobic continuously stirred tank reactors (CSTR)[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(11): 1970-1978.
- [93] RONAN E, AQEEL H, WOLFAARDT G M, *et al.* Recent advancements in the biological treatment of high strength ammonia wastewater[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2021, 37(9): 158.
- [94] TANG S M, XU Z H, LIU Y L, *et al.* Performance, kinetics characteristics and enhancement mechanisms in anammox process under Fe(II) enhanced conditions[J]. *Biodegradation*, 2020, 31: 223-234.
- [95] TRIGO C, CAMPOS J, GARRIDO J, *et al.* Start-up of the anammox process in a membrane bioreactor[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126(4): 475-487.
- [96] PENG M W (彭梦文). Ultrastructure and iron regulation mechanism of anammox bacteria[D]. Chongqing: Chongqing University (重庆大学), 2022.
- [97] ZHANG L, WANG Y P, HAO S W, *et al.* Anammox-synchronous zero-valent iron oxidation promoting synergistic nitrogen and phosphorus removal from wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 347: 126365.
- [98] ZHOU B R, CHEN G J, DONG C F, *et al.* The short-term and long-term effects of Fe(II) on the performance of anammox granules[J]. *Water Environment Research*, 2021, 93(9): 1651-1659.
- [99] POLIZZI C, LOTTI T, RICOVERI A, *et al.* Long-term effects of mineral precipitation on process performance, granules' morphology and microbial community in anammox granular sludge[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(1): 107002.
- [100] CHEN C J (陈重军), CAO Q F (曹茜茜), ZOU X Y (邹馨怡), *et al.* Review on function, composition and influencing factors of EPS in anammox granular sludge[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering (环境工程学报)*, 2022, 16(2): 381-389.
- [101] CHEN W, HU F, LI X, *et al.* Deciphering the mechanism of medium size anammox granular sludge driving better nitrogen removal performance[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 336: 125317.
- [102] WANG X T, YANG H, SU Y, *et al.* Characteristics of anammox granular sludge using color differentiation, and nitrogen removal performance of its immobilized fillers based on microbial succession[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 333: 125188.
- [103] YIN C Q, MENG F G, CHEN G H. Spectroscopic characterization of extracellular polymeric substances from a mixed culture dominated by ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Water Research*, 2015, 68: 740-749.
- [104] WENG X, FU H M, MAO Z, *et al.* Fate of iron nanoparticles in anammox system: Dissolution, migration and transformation[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 348: 119323.
- [105] HOU X L, LIU S T, ZHANG Z T. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge[J]. *Water Research*, 2015, 75: 51-62.
- [106] WANG X P, WU Q, WANG X, *et al.* Research advances in application of mainstream anammox processes: Roles of quorum sensing and microbial metabolism[J]. *Chemosphere*, 2023, 333: 138947.
- [107] LIU W B, LI J Z, TANG L G, *et al.* Achieving high-level nutrient removal and wastewater treatment capacity through iron-mediated microbial process and sludge granulation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 460: 141754.
- [108] TANG X, LIU S T, ZHANG Z T, *et al.* Identification of the release and effects of AHLs in anammox culture for bacteria communication[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 273: 184-191.
- [109] GUO Y Z, LIU S T, TANG X, *et al.* Insight into c-di-GMP regulation in anammox aggregation in response to alternating feed loadings[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(16): 9155-9164.
- [110] WANG Z B, LIU X L, NI S Q, *et al.* Nano zero-valent iron improves anammox activity by promoting the activity of quorum sensing system[J]. *Water Research*, 2021, 202: 117491.