

信号分子在生物脱氮中的作用及检测方法

陈婧^{1,2}, 宋炳峰¹, 储琨¹, 曾嘉¹, 卿荣全¹, 陈宏^{1,2}, 孙士权^{1,2}, 吴莎^{*1,2}

1 长沙理工大学水利与环境工程学院, 湖南 长沙 410114

2 洞庭湖水环境治理与生态修复湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410114

陈婧, 宋炳峰, 储琨, 曾嘉, 卿荣全, 陈宏, 孙士权, 吴莎. 信号分子在生物脱氮中的作用及检测方法[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2249-2264.

CHEN Jing, SONG Binghao, CHU Kun, ZENG Jia, QING Rongquan, CHEN Hong, SUN Shiquan, WU Sha. Role of signal molecules in biological nitrogen removal and detection methods[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2249-2264.

摘要: 生物脱氮是由微生物主导的地球氮循环中的重要环节之一, 主要包括硝化、反硝化和厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, anammox)等过程。在微生物联合作用下, 污水中的有机氮及氨氮经一系列作用转化为氮气, 这种经济高效、环境友好的处理工艺在世界范围内得到广泛应用。群体感应(quorum sensing, QS)以信号分子为媒介通过改变菌群密度和周围环境变化来调节微生物的各种行为。大量的研究已证实调控 QS 信号分子在生物脱氮中具有应用潜力。本文介绍了各种信号分子类型, 从基因组学、实际应用等方面综述了各类信号分子以及检测方法, 同时针对酰基高丝氨酸内酯(acyl homoserine lactones, AHLs)类信号分子在生物脱氮中的作用进行详细介绍。然而不足之处在于信号分子研究只是停留在实验室阶段, 仅仅研究了单一信号分子对生物脱氮的影响。未来可将信号分子应用于实际污水, 研究多种信号分子共同作用以及多种微生物之间的 QS 现象。

关键词: 群体感应; 信号分子; 生物脱氮; 调控; 检测方法

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFE0105600); 湖南省科技厅重点研发项目(2022SK2091); 湖南省教育厅一般项目(20C0057); 湖南创新型省份建设郴州国家可持续发展议程创新示范区专项经费(2021sfq15)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFE0105600), the Key Research and Development Project of Hunan Provincial Department of Science and Technology (2022SK2091), the General Project of Hunan Provincial Department of Education (20C0057), and the Special Fund for Building Chenzhou National Sustainable Development Agenda Innovation Demonstration Zone in Hunan Province (2021sfq15).

*Corresponding author. E-mail: wusha@csust.edu.cn

Received: 2022-07-17; Accepted: 2022-09-21; Published online: 2022-11-23

Role of signal molecules in biological nitrogen removal and detection methods

CHEN Jing^{1,2}, SONG Binghao¹, CHU Kun¹, ZENG Jia¹, QING Rongquan¹, CHEN Hong^{1,2}, SUN Shiquan^{1,2}, WU Sha^{*1,2}

1 School of Hydraulic and Environmental Engineering, Changsha University of Technology, Changsha 410114, Hunan, China

2 Key Laboratory of Dongting Lake Aquatic Eco-environmental Control and Restoration of Hunan Province, Changsha 410114, Hunan, China

Abstract: Biological nitrogen removal is one of the important links in the nitrogen cycle of the earth dominated by microorganisms, mainly including nitrification, denitrification, and anaerobic ammonia oxidation (anammox). Under the combined action of microorganisms, organic nitrogen and ammonia nitrogen in sewage are transformed into nitrogen through a series of actions in sewage. The cost-effective and environment-friendly treatment has been widely applied all over the world. Quorum sensing (QS) is mediated by signal molecules to regulate the behaviors of microorganisms by changing the density of bacteria and the surrounding environment. Many studies have confirmed that the regulation of QS signal molecules has application potential in biological nitrogen removal. This paper introduced various types of signal molecules, summarized the application and detection methods of various signal molecules from the aspects of genomics and practical application, and introduced in detail the role of acyl homoserine lactones (AHLs) in biological nitrogen removal. However, the deficiency was that the study of signal molecules only stayed in the laboratory stage and only studied the effect of a single signal molecule on biological nitrogen removal. In the future, signal molecules can be applied to actual sewage to study the interaction of multiple signal molecules and QS phenomenon among multiple microorganisms.

Keywords: quorum sensing; signal molecules; biological nitrogen removal; regulation; detection method

长期以来人们都在探究细菌间相互交流协作的机制,直到 20 世纪 70 年代,Nealson 等^[1]在研究海洋费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)时发现费氏弧菌菌群密度与其发光现象之间存在联系,从而首次提出细胞间存在信息交流(图 1),这种细胞间的信息交流在 20 世纪 90 年代被 Fuqua 命名为群体感应^[2] (quorum sensing, QS)。已有的研究表明 QS 在微生物的生理调节中广泛存在,它是指微生物在生长过程中分泌的一种被称为自诱导物(auto-inducer, AI)的信号分子在

环境中的浓度积累到一定阈值后,菌群接受信号, AI 通过自由扩散进入细胞质,诱导了相关基因表达,从而调控菌群间的相互作用,达到细菌之间信息交流的目的^[2]。如生物发光、分泌胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)、产生毒力因子等都有 QS 的参与,而 QS 中的信号分子可以通过提高脱氮菌种的活性和生长速率、调节 EPS 产量和促进颗粒污泥生成等来提高脱氮效率^[3]。目前 QS 还可用于协调单种菌群中的基因表达,利用 QS 的自诱导物进行检

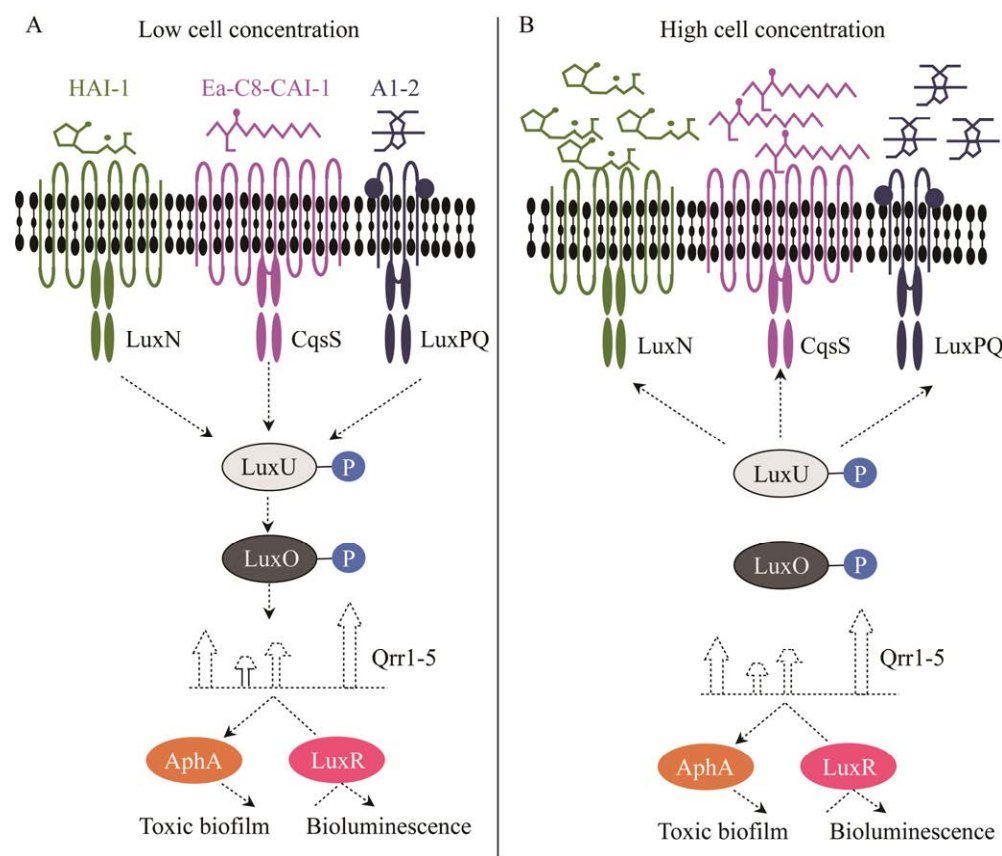


图 1 费氏弧菌群体感应示意图^[2] A: 在细胞密度低时, AI 水平较低, LuxN、LuxPQ 和 CqsS 作为受体酶. LuxO 被磷酸化, 转录群体调控小 RNAs (Qrr sRNAs). Qrr sRNAs 抑制 LuxR 并激活 AphA. AphA 控制与个体行为有关的基因, 并激活致病和生物膜形成所需的基因(在霍乱弧菌中). B: 在细胞密度高时, AI 水平高, LuxN、LuxPQ 和 CqsS 受体作为磷酸酶发挥作用. LuxO 去磷酸化, Qrr sRNAs 不转录; 因此, 不产生 AphA 而产生 LuxR. LuxR 控制群体行为所需的基因, 包括负责生物发光的基因(在哈维弧菌中)

Figure 1 Quorum sensing diagram of *Vibrio fischeri*^[2] A: When the cell density is low, the AI level is low. LuxN, LuxPQ and CqsS act as receptor enzymes. LuxO is phosphorylated and the transcriptional population regulates small RNAs (Qrr sRNAs). Qrr sRNAs inhibit LuxR and activate AphA. AphA controls genes related to individual behavior and activates genes required for pathogenesis and biofilm formation (in *Vibrio cholerae*). B: When cell density is high, AI level is high, LuxN, LuxPQ and CqsS receptors act as phosphatases. LuxO dephosphorylation, Qrr sRNAs not transcribed; Therefore, no AphA is generated, but LuxR is generated. LuxR is a gene required to control group behavior, including genes responsible for bioluminescence (in *Vibrio harveyi*).

测^[4], QS 也是合成生物学中调控胞间通信的重要手段^[5], 同时 QS 信号分子通过增强藻-菌间的相互作用来促进藻-菌共生, 以实现碳减排^[6]。由于 QS 可以提高细菌生存能力, 因此也可以通过抑制 QS 来进行杀菌^[7]。

氮循环是地球上最重要的物质循环之一, 人类排放的生活及生产污水, 以及排放在土壤、大气中的氮使自然氮循环严重失衡^[8-9]。生物处理是去除污水中氮素的最环保、经济的方法之一^[10]。生物脱氮包括硝化、反硝化和厌氧氨氧

化(anaerobic ammonium oxidation, anammox)等反应,然而不论是传统的硝化反硝化脱氮还是 anammox 脱氮都存在一些短板,例如氨氧化细菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB)和厌氧氨氧化细菌(anammox bacteria, AnAOB)都存在倍增时间长、对环境敏感及不易形成细菌聚集造成污泥流失等问题^[11-14]。

QS 中的 AHLs 信号分子可以通过提高硝化污泥对 NH_4^+ 的降解速率,调节 EPS 产量和增强微生物生长形成硝化生物膜,促进颗粒污泥生成来促进硝化作用^[15]。在反硝化过程中, QS 系统主要通过转录功能基因来促进反硝化作用,而在 anammox 中 QS 可以促进 AnAOB 菌群的 EPS 合成来提高 AnAOB 生长速率及生物活性^[16]。

QS 相关领域发表了许多研究论文和综述,但关于生物脱氮方面 QS 的报道还比较少。本文阐述了 QS 中的主要信号分子类型和相应的检测方法,以及现有生物脱氮研究中 QS 的应用,为 QS 在生物脱氮中的实际应用提供理论基础。

1 信号分子类型

QS 是一种包含种内和种间的微生物通讯机制,可以根据不同环境来表达相应的基因,从而调控细菌的生理活动,表现出单个细菌无法实现的生理调节^[17]。信号分子是微生物的代谢产物,作为群体感应介质不仅作用于同类细菌之间,还可以作用于不同细菌之间。下面主要介绍 3 类信号分子: AHLs 类信号分子、自诱导多肽(autoinducing peptide, AIP)类信号分子以及 AI-2 信号分子。

1.1 AHLs 类信号分子

AHLs 类信号分子可以介导革兰氏阴性菌 QS 系统,它是一类水溶性小分子有机物,由酰

胺侧链尾部和高丝氨酸内酯环头部组成,其中酰胺侧链尾部具有亲水性,高丝氨酸内酯环头部具有疏水性^[18]。所有 AHLs 类信号分子都具有高丝氨酸内酯环头部,而尾部酰胺侧链的长短差异决定了 AHLs 的多样性。AHLs 类信号分子头尾两个部分的特性使其既具有水溶性又有膜透水性,不仅能够自由穿越细胞膜并在环境中积累,还可以在细菌之间进行种内和种间传递^[19]。酰基侧链的长短决定了 AHLs 的扩散能力,即短酰基链的 AHLs 主要分布在水中,而长酰基链的 AHLs 则主要分布在污泥内^[18]。

LuxR 蛋白和 LuxI 蛋白是大部分革兰氏阴性菌 QS 系统的重要组成部分^[20]。LuxR 蛋白是 DNA 结合转录激活的元件,同时也是信号分子的受体蛋白,其作用是当浓度达到一定阈值的 AHLs 相结合,使目的基因转录表达; LuxI 蛋白是信号分子的合成酶,其作用是合成 AHLs^[21](工作机制见图 2)。目前,对信号分子的研究更多地集中在革兰氏阴性细菌方面, AHLs 也是当前信号分子研究的重点,逐渐被人们所认识,成为当前研究的热点。

Gao 等^[22]通过实验证明,外源添加 AHLs 可以调节活性污泥中的微生物群落,在氨氧化活性中起重要作用。之后可以通过了解细胞间分子信号作用,使相关研究更有效地利用 QS 技术操纵优势菌种来处理废水。

1.2 AIP 类信号分子

AIP 是介导革兰氏阳性菌 QS 系统的信号分子,由菌体内部产生,通过主动运输传递到细胞外。由于在细菌细胞膜和细胞内均具有特定的信号识别因子,而且不同革兰氏阳性菌分泌的 AIP 信号分子具有结构上的特异性,因此 AIP 信号分子只能用于细菌的种内交流^[23]。革兰氏阳性菌 QS 系统由专一性 ABC 转运系统和信号转导系统组成。其中专一性 ABC 转运系统

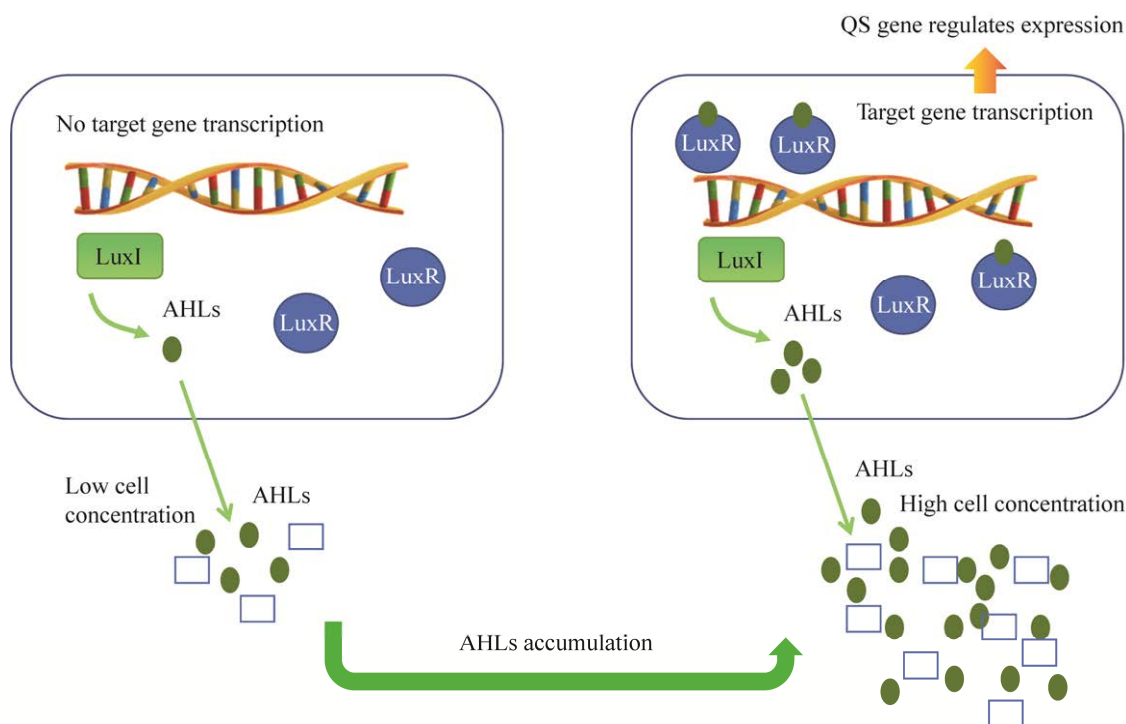


图2 AHLs 群体感应调控系统示意图^[21]

Figure 2 Schematic diagram of AHLs quorum sensing control system^[21].

的作用是将成熟的 AIP 运送至胞外并将活化的受体信号运送到下游；信号转导系统的作用是识别浓度达到阈值的 AIP 信号分子并启动特定靶基因的表达功能^[24]。调控作用原理为：生物膜上的组氨酸蛋白激酶识别到 AIP 信号分子后促进组氨酸残基转化为磷酸，天冬氨酸残基将磷酸基团传递给受体蛋白，磷酸化的受体蛋白与 DNA 的特定位点相结合^[25]（工作机制见图 3）。

1.3 AI-2 信号分子

不同于上述的两类信号分子，AI-2 在革兰氏阴性菌和阳性菌中都存在，而且既能进行种内交流又能进行不同细菌之间的种间交流^[26]。这类信号分子的主要组成成分是呋喃硼酸二酯，目前已在 80 多种细菌内检测到^[27]。AI-2 信号分子由 LuxS 蛋白参与合成，在细菌生长代谢过程中能识别自身及环境中其他细菌分泌的

AI-2 信号分子，细菌在 AI-2 信号分子的调控下进行自身生理调节，以适应环境的变化^[28-29]。微生物群落之间会存在 AI-2 信号分子介导的群体感应现象，可以形成生物膜，促进微生物之间交流，提高脱氮效率^[26]。各类信号分子简介见表 1。

2 信号分子在生物脱氮中的应用

由于生物脱氮工艺一般是依靠微生物代谢活动来去除氮素，污水中存在高浓度的微生物细菌，而 QS 可以影响细菌间的通信，因此细菌的群体行为，如生长、EPS 分泌以及细胞聚集等都受到 QS 系统的调控，从而调节脱氮微生物的生理功能与群落结构，而这些行为都与细菌形成生物膜和污泥颗粒化有关，说明 QS 信号分子在生物脱氮过程中发挥了重要作用。

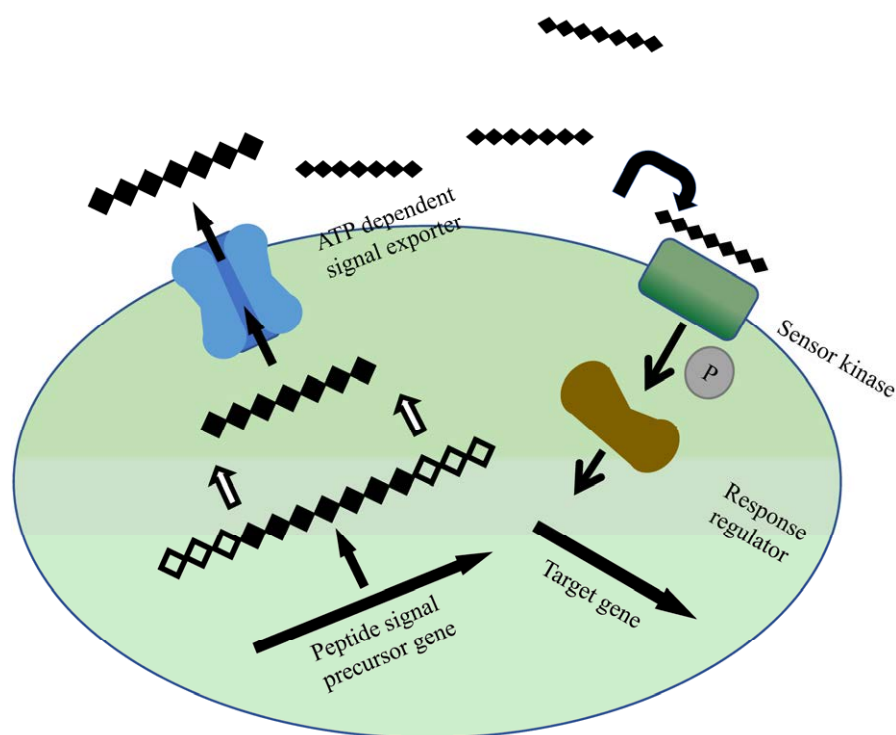
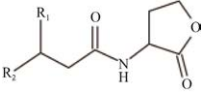
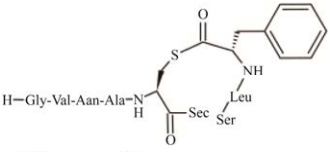
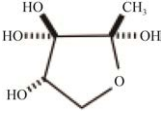
图3 AIP 群体感应调控系统示意图^[25]Figure 3 Schematic diagram of AIP quorum sensing control system^[25].

表1 各类 AI 的介绍

Table 1 Introduction of various AI

Signal molecule	Example of molecular structure	Structural composition	Mediating bacteria type	Synthesis process	Function
AHLs		Lactone ring head and amide side chain	Gram negative bacteria	Controlled by LuxR protein and LuxI protein	1 Intraspecific and interspecific communication 2 Promote EPS generation 3 Promote aerobic sludge granulation 4 Adjust bacterial activity
AIP		Oligopeptide	Gram positive bacteria	Synthesized from bacterial ribosomes	Intraspecific communication
AI-2		Furaboronate diester	Gram positive bacteria and Gram negative bacteria	Synthesis by LuxS protein	1 Intraspecific and interspecific communication 2 Promote biofilm formation 3 Bioluminescence

2.1 信号分子在硝化反应中的作用

AOB 和亚硝酸盐氧化菌(nitrite oxidizing bacteria, NOB)是生物脱氮硝化反应中的主要参与者,硝化反应中 AOB 先将 NH_4^+ 转化为 NO_2^- , NOB 再将 NO_2^- 转化为 NO_3^- ^[9,11]。就生物脱氮中的群体感应而言,目前的研究主要集中于硝化菌的 QS 调控方面。Wu 等^[30]在以亚硝化单胞菌(*Nitrosomonas europaea*)为主的硝化颗粒污泥中证实了 AHLs 的存在。此外,在硝化生物膜反应器和硝化活性污泥反应器的出水中均观察到多种 AHLs^[31],除了在硝化污泥中发现各种 AHLs 外, Gao 等^[32]也在各种硝化菌中发现了 AHLs 合成酶基因和受体基因,此外还有研究证明 NOB 体内的 AHLs 合成酶基因 *nwl* 负责 AHLs 的合成^[33],可见 QS 系统在硝化反应中广泛存在。亚硝化单胞菌是研究最多的 AOB 之一,关于 AOB 群体感应现象的第一篇论文发表于 20 世纪 90 年代末,该论文研究的就是亚硝化单胞菌;在该研究中,高细胞密度的生物膜使亚硝化单胞菌生物膜产生并积累了比悬浮培养更多的 AHLs,而在低细胞密度的悬浮培养液中加入外源性 AHLs 后,细胞可以感应 AHLs 的刺激,之后恢复生长,显著缩短了亚硝化单胞菌的滞后期^[34]。Burton 等^[35]发现,亚硝化单胞菌的菌株 Schmidt 至少产生 C_6 -HSL、 C_8 -HSL 和 C_{10} -HSL 这 3 种感应信号分子;Lux I/R 家族的成员在许多细菌中通常作为常见的 QS 调控系统,但亚

硝化单胞菌全基因组(ATCC 19178)中无 LuxI 同源物作为典型的 AHL 合酶。因此,可以推测在亚硝化单胞菌中存在一种不同于 LuxI/R 的感应系统。全基因组分析显示,多形性亚硝基螺旋体(TCC 25196)中存在 AHL 合酶,类似于假单胞菌的 LasI,该 AHL 合成酶由 *nmul* 编码^[36]。当 *nmul* 被引入大肠杆菌中时,产生多种形式的 AHLs (C_{14} -HSL 和 3-oxo- C_{14} -HSL)^[32]。Li 等^[15]通过投加外源 AHLs 信号分子探究了其对于硝化污泥附着生长及硝化效果的影响,发现 C_6 -HSL 能快速提高硝化污泥对 NH_4^+ 的降解速率, C_6 -HSL 和含 AHLs 的硝化颗粒污泥细胞提取物能显著增强微生物附着生长,有利于形成硝化生物膜。因此,添加合适类型的 AHLs 可以提高硝化污泥中微生物活性,促进生物膜和颗粒污泥的形成,此举可有效避免生长缓慢的硝化菌流失,从而提高整个硝化系统的性能。Sun 等^[37]在硝化生物膜反应器中观察到 AHLs 对不同硝化细菌的影响存在差异,其中 C_4 -HSL 与 AOB 活性相关,而 C_6 -HSL 和 C_8 -HSL 促进 NOB 活性。Shen 等^[38]在维氏硝酸杆菌和大肠杆菌(*Escherichia coli*)中发现了一种新型 AHLs 信号分子 C_{10} :1-HSL,添加 2 $\mu\text{mol/L}$ C_{10} :1-HSL 可以促进硝化活性基因的表达,从而增强系统的硝化作用,表 2 总结了几种典型 AHLs 在硝化反应中的作用。

此外,在部分亚硝化厌氧氨氧化(partial nitrite anaerobic ammonia oxidation, PNA)的反

表 2 信号分子在硝化过程中的应用

Table 2 Application of signal molecules in nitrification process

Signal molecular type	Type of mediating nitrifying bacteria	Effect	References
3-oxo- C_6 -HSL	<i>Nitrosomonas europaea</i>	1 It is conducive to the formation of biofilm 2 Shorten AOB lag	[14] [34]
C_6 -HSL	<i>Nitrosospora multififormis</i>	Increase the degradation rate of NH_4^+	[32]
C_8 -HSL	<i>Nitrospira-like</i>	Promote NOB activity	[37]
C_{10} :1-HSL	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	Increase nitrification rate	[38]

应中, 通常需要强化 AOB 活性、抑制 NOB 活性, 从而提高 AOB 纯度和菌群竞争优势, 将 NH_4^+ 更多地转化为 NO_2^- 而非 NO_3^- , 以实现亚硝态氮积累^[8]。除以往的控制参数如温度、溶解氧(dissolved oxygen, DO)、有机物、游离氨(free ammonia, FA)外, QS 可能会在强化亚硝化过程中发挥重要作用。例如, 可选择性地添加 AHLs 以提高 AOB 活性, 但尚未发现报道特异性抑制 NOB 的 AHLs。

QS 为硝化过程中增强硝化细菌活性, 加快颗粒污泥和生物膜的形成, 以及在部分硝化过程中选择性强化 AOB 活性提供了新思路。

2.2 信号分子在反硝化反应中的作用

硝化和反硝化是生物脱氮中的 2 个基本途径, 可有效缓解水体的富营养化。反硝化细菌可以在厌氧或缺氧的条件下, 利用有机物作为电子供体、 NO_3^- 或 NO_2^- 作为电子受体, 将 NO_3^- 或 NO_2^- 转化为 N_2 或 N_2O 排出, 达到真正意义上的氮素脱除。

反硝化细菌中的 QS 研究较少, 主要研究的目标是铜绿假单胞菌。Kariminik 等^[39]在铜绿假单胞菌发现了两组 AHLs 介导的 QS 系统, 即 rhl I/R 和 las I/R 系统, 分别由信号分子 $\text{C}_4\text{-HSL}$ 和 3-oxo- $\text{C}_{12}\text{-HSL}$ 介导。有研究表明这 2 个系统都参与铜绿假单胞菌的反硝化活性调节^[40]。在厌氧反硝化系统中存在群体感应突变体 $\Delta\text{rhl I}$ 和 $\Delta\text{rhl R}$, 它们具有比不含该突变体更大的 NO_3^- 的反硝化速率, 并可以生成更多的 N_2 , 而在普通的铜绿假单胞菌培养液中加入外源性同源 AHLs 分子可以促进该菌株的 NO_3^- 还原效果^[40]。表明 rhl I/R 系统可以通过转录功能基因促进反硝化作用。

此外, 在反硝化过程中还存在以假单胞菌喹诺酮类信号分子(*Pseudomonas* quinolones signal molecules, PQS)为基础的 QS 系统, PQS 系统通

过由 pqs R/E 介导的 N_2O 还原酶(nitrous oxide reductase, NOS)抑制作用和基于 pqs R/E 独立转录对 NO 还原酶(nitric oxide reductase, NOR)、 NO_3^- 还原酶(nitrate reductase, NAR)和 NO_2^- 还原酶(nitrite reductase, NIR)的调节作用 2 个途径来协调反硝化活性^[41]。PQS 主要是通过螯合铁离子来抑制 NO_3^- 呼吸和 NOR、NAR 的酶活性, 释放铁离子来促进 NIR 的活性^[41]。因此, 反硝化活性的调控可以通过控制 PQS 信号分子的铁离子螯合性能来实现。

QS 在其他反硝化细菌中的存在和作用尚不明确, 而不同信号分子在不同反硝化细菌中的作用也鲜有报道。需要进一步研究以揭示 QS 调节的反硝化作用。

2.3 信号分子在厌氧氨氧化反应中的作用

Anammox 是指在厌氧或缺氧条件下, AnAOB 用 NO_2^- 氧化 NH_4^+ 生成氮气的过程。相较于传统生物脱氮工艺, anammox 工艺跳过了 NO_2^- 氧化成 NO_3^- 的过程, 具有诸多优点^[42]。但是由于生长速度慢、倍增时间长和对环境条件敏感等生长特性, AnAOB 的富集培养很困难^[2], anammox 作为一种低耗高效的污水处理新工艺, 很难应用于实际工程。如何调控加快 anammox 的启动时间和提高 AnAOB 活性, 已成为近年来 anammox 相关研究的热点^[42-44]。

细胞密度影响 AnAOB 生理活动, 当细胞密度大于 $10^{13}\text{--}10^{14}$ 个/L 时, AnAOB 才能表现出生理活性^[45], 这种细菌活性与细胞密度相关的现象是典型的 QS 现象, 而且 AnAOB 作为革兰氏阴性菌, 理论上具备产生信号分子并进行 QS 的能力。在进一步的研究中, 人们对 anammox 工艺中的 AHLs 进行了定性和定量分析。Gao 等^[46]在 anammox 反应器中检测到 $\text{C}_{12}\text{-HSL}$, 在 anammox 培养上清液和生物膜反应器中确认了有 $\text{C}_6\text{-HSL}$ 和 $\text{C}_8\text{-HSL}$ 的分泌^[47]。

截至目前,报道的与 AnAOB 相关的 AHLs 分为两类: 3-碳位有取代基的 AHLs 如 3-oxo-C₆-HSL、3-oxo-C₈-HSL; 3-碳位无取代基的 AHLs 如 C₄-HSL、C₆-HSL^[48] (结构式示意图见图 4)。另外,研究者还在 AnAOB 中发现了编码 AI 合成酶的基因^[49]。Tang 等^[50]在 *Candidatus Jettenia caeni* 中证实了 2 种 HdtS 型 AHL 合成酶的存在和功能,并证实这些合成酶可以在体内产生 AHL。此外, Schuster 等^[51]还发现了编码 AHLs 假定受体蛋白的基因,这表明 *J. caeni* 可能具有完整的 QS 回路,可以实现细菌行为的沟通和协调,这从基因层面证明了 anammox 反应中 QS 的存在。

人们对 anammox 反应中的 QS 现象进行了大量研究, de Clippeleir 等^[52]在一级限氧自养硝化-反硝化生物膜反应器中添加 C₁₂-HSL, 结果发现 AnAOB 的活性增强而对 AOB 影响不大。刘思彤等^[53]在启动 anammox 过程中添加了少量活性较好的 anammox 颗粒污泥,使 AnAOB 活性有了显著提高,反应器的脱氮效果也有了大幅提升;推测原因可能是加入高活性 AnAOB 释放的信号分子浓度较大,从而促进了 AnAOB 相关基因的表达。但这并不代表所有的信号分子的浓度都和 AnAOB 活性呈正相关,例如同

样是添加 C₁₂-HSL, Tang 等却得出了与 de Clippeleir 相反的结果,他在长期运行的 SBR 反应器中加入 C₁₂-HSL 后发现 AnAOB 的活性出现了明显的降低^[54]。这表明 AnAOB 的 QS 调控行为不仅与 AHLs 相关,还与许多实验参数如进水氮负荷、反应器配置及各种环境因素有关。张晶^[55]的研究结果也与上述结论类似,她发现同一种 AHLs 在不同条件下对 AnAOB 污泥活性的影响有很大不同。Liu 等^[56]将反硝化污泥的 EPS 与 AnAOB 一起培养,结果显示 AnAOB 的活性得到提升,这是因为反硝化污泥的 EPS 中含有多种 AHLs,包括 C₄-HSL、C₆-HSL 和 C₈-HSL,其中 C₄-HSL 和 C₆-HSL 可有效地激活 AnAOB 的活性基因,提高了氮去除率。Zhang 等^[57]在长期运行的生物反应器中添加 C₆-HSL 使得 AnAOB 丰度较对照组提高了 10%, Tang 等^[16]也发现 C₆-HSL 能显著提高 AnAOB 的生长速率。这些证实了 C₆-HSL 可提高 AnAOB 生长速率和活性。

由于 AnAOB 生长缓慢(倍增时间为 10–14 d),很容易造成污泥流失,为了维持 anammox 过程的性能,必须采取生物膜和污泥颗粒化的措施来防止悬浮 AnAOB 污泥的流失,因为生物膜和颗粒污泥的固体状态可以对 AnAOB 生物量

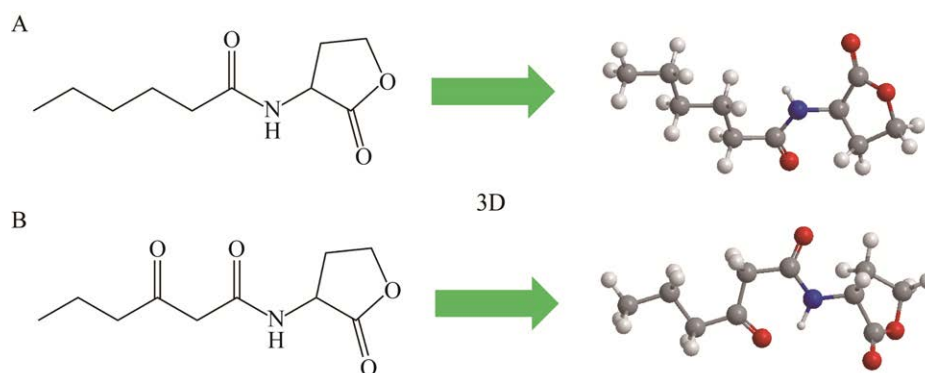


图 4 两类 AHLs 结构示意图 A: C₆-HSL. B: 3-oxo-C₆-HSL

Figure 4 Structure diagram of two types of AHLs. A: C₆-HSL. B: 3-oxo-C₆-HSL.

进行有效滞留^[8]。EPS 在 AnAOB 生物膜形成和污泥颗粒化过程中发挥着重要作用。Zhao 等^[58]在连续运行的 CSTR 反应器中投加香草醛、酰化酶作为 AHLs 的抑制剂,结果发现 AnAOB 颗粒污泥的多糖(polysaccharide)和蛋白(protein)浓度均降低,导致颗粒污泥解体,而多糖和蛋白正是 EPS 的主要组成部分,由此可推测 AnAOB 菌群的 EPS 合成受到 AHLs 的影响。Tang 等^[16]报道 3-oxo-C₆-HSL、3-oxo-C₈-HSL 和 C₁₂-HSL 不同程度地促进了 PN 和 PS 的合成,导致 AnAOB 菌群的絮团大小分别增加了 15%、19%和 23%,以上研究显示 QS 对 AnAOB 菌群的 EPS 合成发挥重要作用,表 3 总结了几种信号分子在 anammox 反应中的作用。

目前,对 AnAOB 群体感应方面的研究还不深入,如何将 anammox 工艺与 QS 相结合使得 anammox 工艺早日投入实际应用是今后研究的重点。现有的研究表明可在 anammox 工艺的反应器中投加适量浓度的信号分子或者高活性的 AnAOB 污泥,从而提高 AnAOB 的活性和生长速度,促进 anammox 污泥聚集和颗粒化,达到让 anammox 工艺快速启动、稳定运行的目的。

3 信号分子的检测

信号分子是 QS 系统的媒介,是必不可少的因子,其能够向细菌反馈周围环境中不同菌体的数量变化并调控细菌基因性状的表达。信号分子的产生与环境因素的变化息息相关,通

过对信号分子的定性和定量检测,有助于间接了解细菌的生长状态和生理行为。因此,总结各种信号分子快速而又精确的检测方法对群体感应的进一步研究与应用发展具有重大意义。

3.1 AHLs 信号分子的检测

AHLs 分子是细菌分泌的水溶性小分子物质,在环境中的积累浓度极低,加之对其作用机制尚不明确,使得 AHLs 分子的检测方法依然存在很多难题。现有的 AHLs 的检测手段可分为物理化学检测和微生物传感菌检测 2 种。此 2 种检测方法均存在一定的缺点和局限性。

物理化学检测方法主要通过高效液相色谱质谱联用(HPLC-MS)、气相色谱质谱联用(GC-MS)、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)等来实现对 AHLs 的分析。Morin 等^[59]建立的 LC-MS/MS 方法可定性定量检测出海洋创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)中 6 种 AHLs。罗梦等^[60]构建了 HPLC-MS/MS 的方法检测活性污泥中的 AHLs,流动相为乙腈-水,采用电喷雾源正离子模式,可对 7 种 AHLs 进行定性定量检测。Cataldi 等^[61]基于 GC-MS 法实现了对多种细胞提取液中 AHLs 的检测,该方法能够在 14 min 内检测出样品中含有的 6 种 AHLs。Hoang 等^[62]使用超临界流体色谱连用高分辨质谱定量分析 AHLs,可以在 16 min 内同时定量 30 个 AHLs 样品。值得注意的是部分 AHLs 由于不耐热,在气相色谱分离过程中会受热分解,因此不能定量检测。

表 3 信号分子在 anammox 反应中的应用

Table 3 Application of signal molecules in anammox

Signal molecular type	Mediated AnAOB type	Effect	References
C ₁₂ -HSL	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	1 Improve the activity of AnAOB 2 Promote EPS secretion	[15,52]
C ₆ -HSL	<i>Candidatus jettenia</i>	Improve the activity and growth rate of AnAOB	[55,57]
C ₈ -HSL	<i>Candidatus Kuenenia</i>	Improve the activity of AnAOB	[55]
3-oxo-C ₆ -HSL	<i>Candidatus jettenia</i>	Promote EPS secretion	[15]

微生物传感菌法选用对信号分子有敏感反应的微生物作为检测菌, 人工剪切去除该菌种合成 AHLs 的功能基因或选取本身不能合成 AHLs 的菌种, 避免细菌自身产生的 AHLs 对检测结果的影响, 保留其受体蛋白的功能基因和对应的启动子序列及报告基因, 这种人工选择后的细菌就是 AHLs 的生物传感器^[63]。当有外源 AHLs 激活报告基因的性状表达, 检测报告基因的活性就能反映出是否存在 AHLs^[64]。微生物传感菌检测法是一种高效的检测方法, 但菌株产生的 AHLs 浓度较低, 通常会低于生物传感器的检测极限, 同时会收到培养基组分等外界环境的影响^[63]。

关于在环境中提取 AHLs 的方法, Schupp 等^[65]采用固相萃取(solid phase extraction, SPE)来提高环境中检测 AHLs 的灵敏度, 经过 SPE 后检测的 3-oxo-C₆-HSL 和 C₆-HSL 与液相萃取后的检测结果相比, 灵敏度分别提高了 2 倍和 10 倍。

3.2 AIP 信号分子的检测

AIP 的检测方法主要有 LC-MS/MS、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDITOF-MS)、超高效液相色谱-电喷雾电离-高分辨率质谱联用(UHPLC-ESI-HRMS)等。MDowell 等^[66]采用固相萃取金黄色葡萄球菌上清液, 然后用反相高效液相色谱两阶段纯化, 得到其 AIP-I 及其亚衍生物的含量分别约 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 14 $\mu\text{mol/L}$, 然而这一过程相当耗时, 并且需要馏分的生物分析来指导分离过程。Kalkum 等^[67]采用 MALDITOF-MS 快速检测金黄色葡萄球菌培养基中的 AIP-I, 该方法不需要预先浓缩培养液, 但由于生长培养基中其他干扰化合物的存在, 无法检测 AIP-I 分子离子, 而且该方法不能定量检测 AIP 的浓度; 而 Junio 等^[68]利用 UHPLC-ESI-HRMS 的检测方法定量检测出了

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌产生的 AIP-I 信号分子, 最低检测限可达 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 方法的线性范围为 2.6–63.0 $\mu\text{mol/L}$ 。该方法全程检测只需要 6 min, 快速高效。邢晓楠^[69]在 Junio 的基础上建立了 4 种 AIPs 信号分子的 LC-MS/MS 检测方法, 以含 0.1%甲酸的乙腈溶液和含 0.1%甲酸的水溶液作为流动相, 并在 MRM 下进行离子检测。在该方法下测得的 4 种 AIPs 分子的检测限范围在 0.001–0.006 mg/L, 线性范围为 0.1–4.0 mg/L, 回收率范围为 65.7%–122.3%^[70]。该方法能快速准确地对 AIPs 分子进行定性定量检测。

3.3 AI-2 信号分子的检测

目前对 AI-2 检测的方法有: (1) 哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)生物发光法^[70], 该方法通过测量添加外部 AI-2 和未添加 AI-2 时哈氏弧菌的发光时间差异来间接检测 AI-2 是否存在, 由于其操作简便, 是最常用的方法之一, 但只能对 AI-2 进行定性检测, 而且检测结果容易受环境及其他物质的干扰。燕彩玲等^[71]通过实验证明了哈氏弧菌生物发光法最佳检测条件, 即待测样品 pH 值为 7.0、加样比例为 1:100 时, 环境影响降低到最小。(2) 基于 AI-2 与受体蛋白结合后荧光检测法^[72], 该方法可实时监测 AI-2 的酶促合成过程, 并可测定多种细菌培养液中细胞外和细胞内的 AI-2 浓度, 但该方法操作复杂, 需要将受体蛋白提纯和标定。(3) 将 AI-2 的中间产物 4,5-二羟基-2,3-戊二酮与 1,2-苯二胺或其衍生物进行反应, 利用 HPLC-MS/MS 或 GC-MS 检测其生成物, 该方法操作复杂且价格昂贵^[73]。表 4 总结了各种信号分子的检测方法及不同方法的特点。

4 结论与展望

本文主要介绍了微生物 QS 调控的研究进展, 总结了信号分子在生物脱氮过程中对微生

表 4 信号分子检测方法

Table 4 Signal molecule detection method

Signal molecular type	Test method	Characteristic
AHLs	Physical and chemical testing	It can effectively separate AHLs, but AHLs will decompose when separated by gas chromatography
	Detection of microbial sensing bacteria	The detection is efficient, but AHLs cannot be purified, and other components affect the detection results
AIP	LC-MS/MS	Rapid and accurate qualitative and quantitative detection of AIPs
	MALDITOF-MS	No pre concentration of culture solution is required, and quantitative detection is not available
AI-2	UHPLC-ESI-HRMS	Fast and efficient detection
	<i>Vibrio hastelli</i> bioluminescence method	It is easy to operate, but it can only be detected qualitatively, and the results are vulnerable to interference
	Fluorescence detection	Complex operation
	Detection of AI-2 intermediate products	Complex and expensive operation

物生长速率、活性、EPS 分泌和细菌聚集等方面的研究进展,可以解决脱氮微生物的活性低、生长速率慢等问题,从而提高脱氮效率,以及各类信号分子定性定量的分析方法。目前, QS 现象在生物脱氮过程中的研究还需在以下几个方面更加深入。

(1) 目前对信号分子在生物脱氮方面的研究仅局限于实验室规模,实际污水处理中信号分子的应用尚未见报道,未来在实际工程领域的应用还有很大的挑战。

(2) 现有研究大多针对单一的信号分子对生物脱氮的影响,对于多种信号分子耦合作用下系统脱氮过程或者不同菌种间 QS 现象相互作用的研究还少有涉及,后续研究可以综合多种信号分子,如 AHLs 与 AI-2 均存在于革兰氏阴性菌中,因此多种信号分子耦合作用下对生物脱氮性能的影响有待进一步明确。

(3) 现阶段研究表明系统中存在 QS 现象,而且 QS 在系统运行过程中发挥作用,但是有关 QS 机制和 QS 系统的生态学意义尚未明确,后续可以研究不同氮素污染条件下 QS 的影响效果,若能对此进行深入探讨,可以为全面理

解 QS 对生物脱氮的调控行为奠定基础。

针对这些问题,后续研究可以在反应器中控制不同信号分子间、不同菌种间信号分子的相互作用来处理实际废水,同时在生态学水平上进行探究,深入研究其对生物脱氮的影响。

REFERENCES

- [1] NEALSON KH, HASTINGS JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance[J]. Microbiological Reviews, 1979, 43(4): 496-518.
- [2] PAPENFORT K, BASSLER BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(9): 576-588.
- [3] 王伟刚, 王彤, 樊宇菲, 王亚宜. 厌氧氨氧化颗粒污泥聚集机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1927-1940.
WANG WG, WANG T, FAN YF, WANG YY. Research progress on the aggregation mechanism of anammox granular sludge[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1927-1940 (in Chinese).
- [4] MILLER C, GILMORE J. Detection of quorum-sensing molecules for pathogenic molecules using cell-based and cell-free biosensors[J]. Antibiotics, 2020, 9(5): 259.
- [5] 郑义, 郭世英, 隋凤翔, 杨骥羽, 卫雅萱, 李晓岩. 群体感应系统在合成生物学中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(11): 100-109.
ZHENG Y, GUO SY, SUI FX, YANG QY, WEI YX, LI XY. Applications of quorum sensing systems in synthetic

- biology[J]. China Biotechnology, 2021, 41(11): 100-109 (in Chinese).
- [6] LIU QX, FENG X, SHENG ZY, SHI WX, WANG S, LI J. Enhanced wastewater treatment performance by understanding the interaction between algae and bacteria based on quorum sensing[J]. Bioresource Technology, 2022, 354: 127161.
- [7] 励建荣, 李婷婷, 王当丰. 微生物群体感应系统及其在现代食品工业中应用的研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(1): 1-11.
LI JR, LI TT, WANG DF. Research progress on microbial quorum sensing system and its application in modern food industry[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(1): 1-11 (in Chinese).
- [8] DASGUPTA S, WU S, GOEL R. Coupling autotrophic denitrification with partial nitrification-anammox (PNA) for efficient total inorganic nitrogen removal[J]. Bioresource Technology, 2017, 243: 700-707.
- [9] 陈宏, 王泓, 吴敏, 余关龙, 陈婧, 刘达山. 淡水湿地生态系统中微生物驱动氮转化过程研究进展[J]. 水利学报, 2020, 51(2): 158-168.
CHEN H, WANG H, WU M, YU GL, CHEN J, LIU DS. Recent advances in microbe-driven nitrogen transformation in freshwater wetland ecosystems[J]. Journal of Hydraulic Engineering, 2020, 51(2): 158-168 (in Chinese).
- [10] LIU K, WU S, CHEN J, CHEN C, WANG H, YANG EZ, ZHANG CF, XIE M, CHEN H. Insights into regulating influent nitrogen load to restore autotrophic nitrogen removal performance of a two-stage reactor[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022, 10(4): 108168.
- [11] 刘珂, 吴莎, 陈婧, 杨恩喆, 瞿畏, 陈宏. 新型单级强化自养脱氮系统关键因子优化研究[J]. 长沙理工大学学报(自然科学版), 2022, 19(2): 28-36.
LIU K, WU S, CHEN J, YANG EZ, QU W, CHEN H. Optimization of key factors for a novel single-stage enhanced autotrophic nitrogen removal system[J]. Journal of Changsha University of Science & Technology (Natural Science), 2022, 19(2): 28-36 (in Chinese).
- [12] CHEN J, WANG RX, WANG XJ, CHEN ZG, FENG XH, QIN MZ. Response of nitrification performance and microbial community structure in sequencing biofilm batch reactors filled with different zeolite and alkalinity ratio[J]. Bioresource Technology, 2019, 273: 487-495.
- [13] CHEN J, WANG XJ, CHEN ZG, FENG XH, CHEN XK. Application of a synthetic zeolite as a storage medium in SBRs to achieve the stable partial nitrification of ammonium[J]. Environmental Science: Water Research & Technology, 2019, 5(2): 287-295.
- [14] WU S, BHATTACHARJEE AS, WEISSBRODT DG, MORGENROTH E, GOEL R. Effect of short term external perturbations on bacterial ecology and activities in a partial nitrification and anammox reactor[J]. Bioresource Technology, 2016, 219: 527-535.
- [15] LI AJ, HOU BL, LI MX. Cell adhesion, ammonia removal and granulation of autotrophic nitrifying sludge facilitated by N-acyl-homoserine lactones[J]. Bioresource Technology, 2015, 196: 550-558.
- [16] TANG X, GUO YZ, WU SS, CHEN LM, TAO HC, LIU ST. Metabolomics uncovers the regulatory pathway of acyl-homoserine lactones based quorum sensing in anammox consortia[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(4): 2206-2216.
- [17] 马艳, 李婷婷, 崔方超, 励建荣. 不同培养条件及群体感应信号分子对蜂房哈夫尼亚菌生物被膜的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 42-47.
MA Y, LI TT, CUI FC, LI JR. Influences of different culture conditions and quorum sensing signaling molecules on the biofilm formation of *Hafnia alvei*[J]. Food Science, 2017, 38(6): 42-47 (in Chinese).
- [18] ZHANG WM, CHENG XZ, FANG D, CAO J. At-hook motif nuclear localized (ahl) proteins of ancient origin radiate new functions[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 214: 290-300.
- [19] FRANCOLINI I, DONELLI G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2010, 59(3): 227-238.
- [20] LIU LL, ZENG XY, ZHENG J, ZOU YM, QIU SY, DAI YF. AHL-mediated quorum sensing to regulate bacterial substance and energy metabolism: a review[J]. Microbiological Research, 2022, 262: 127102.
- [21] 崔理慧, 万俊锋. 酰基高丝氨酸内酯(AHLs)介导群感效应在好氧颗粒污泥中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 627-636.
CUI LH, WAN JF. Research progress of acyl homoserine lactones (AHLs) based quorum sensing in aerobic granular sludge[J]. Microbiology China, 2021, 48(2): 627-636 (in Chinese).
- [22] GAO J, DUAN Y, LIU Y, ZHUANG XL, LIU YC, BAI ZH, MA WL, ZHUANG GQ. Long- and short-chain AHLs affect AOA and AOB microbial community composition and ammonia oxidation rate in activated sludge[J]. Journal of Environmental Sciences, 2019, 78: 53-62.
- [23] MCBRAYER DN, CAMERON CD, TAL-GAN Y.

- Development and utilization of peptide-based quorum sensing modulators in Gram-positive bacteria[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2020, 18(37): 7273-7290.
- [24] NOVICK RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(6): 1429-1449.
- [25] SHROUT JD, NERENBERG R. Monitoring bacterial twitter: does quorum sensing determine the behavior of water and wastewater treatment biofilms?[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(4): 1995-2005.
- [26] GALLOWAY WRJD, HODGKINSON JT, BOWDEN SD, WELCH M, SPRING DR. Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(1): 28-67.
- [27] HARDIE KR, HEURLIER K. Establishing bacterial communities by 'word of mouth': *Lu_s* and autoinducer 2 in biofilm development[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 635-643.
- [28] READING NC, SPERANDIO V. Quorum sensing: the many languages of bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 254(1): 1-11.
- [29] AKIKO T, FUMIAKI T, HIROKO T, EMIKO I, TOMOKO Y. Negative regulation of quorum-sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* by ATP-dependent Lon protease[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(12): 4181-8.
- [30] WU LJ, LI AJ, HOU BL, LI MX. Exogenous addition of cellular extract *N*-acyl-homoserine-lactones accelerated the granulation of autotrophic nitrifying sludge[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 118: 119-125.
- [31] FENG ZL, SUN YP, LI TL, MENG FH, WU GX. Operational pattern affects nitrification, microbial community and quorum sensing in nitrifying wastewater treatment systems[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 677: 456-465.
- [32] GAO J, MA AZ, ZHUANG XL, ZHUANG GQ. An *N*-acyl homoserine lactone synthase in the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosospira multiformis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(3): 951-958.
- [33] MELLBYE BL, BOTTOMLEY PJ, SAYAVEDRA-SOTO LA. Nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* produces *N*-acyl-homoserine lactone autoinducers[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(17): 5917-5926.
- [34] BATCHELOR SE, COOPER M, CHHABRA SR, GLOVER LA, STEWART GS, WILLIAMS P, PROSSER JI. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(6): 2281-2286.
- [35] BURTON EO, READ HW, PELLITTERI MC, HICKEY WJ. Identification of acyl-homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain schmidt[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(8): 4906-4909.
- [36] NORTON JM, KLOTZ MG, STEIN LY, ARP DJ, BOTTOMLEY PJ, CHAIN PSG, HAUSER LJ, LAND ML, LARIMER FW, SHIN MW, STARKENBURG SR. Complete genome sequence of *Nitrosospira multiformis*, an ammonia-oxidizing bacterium from the soil environment[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(11): 3559-3572.
- [37] SUN YP, GUAN YT, WANG D, LIANG K, WU GX. Potential roles of acyl homoserine lactone based quorum sensing in sequencing batch nitrifying biofilm reactors with or without the addition of organic carbon[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 259: 136-145.
- [38] SHEN QX, GAO J, LIU J, LIU SJ, LIU ZJ, WANG YH, GUO BY, ZHUANG XL, ZHUANG GQ. A new acyl-homoserine lactone molecule generated by *Nitrobacter winogradskyi*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22903.
- [39] KARIMINIK A, BASERI-SALEHI M, KHEIRKHAH B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: an updated review article[J]. *Immunology Letters*, 2017, 190: 1-6.
- [40] TOYOFUKU M, NOMURA N, FUJII T, TAKAYA N, MASEDA H, SAWADA I, NAKAJIMA T, UCHIYAMA H. Quorum sensing regulates denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(13): 4969-4972.
- [41] TOYOFUKU M, NOMURA N, KUNO E, TASHIRO Y, NAKAJIMA T, UCHIYAMA H. Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(24): 7947-7956.
- [42] WU S, SHANKAR B, GOEL R. Comparison of performance and microbial communities in single stage suspended and attached growth partial nitrification/anammox reactors under different temperatures[J]. *Environmental Engineering Science*, 2017, 34: 63-72.
- [43] CHEN J, ZENG J, HE YR, SUN SQ, WU HP, ZHOU YY, CHEN ZG, WANG JH, CHEN H. Insights into a novel nitrogen removal process based on simultaneous anammox

- and denitrification (SAD) following nitrification with *in-situ* NOB elimination[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2023, 125: 160-170.
- [44] LAWSON CE, WU S, BHATTACHARJEE AS, HAMILTON JJ, MCMAHON KD, GOEL R, NOGUERA DR. Metabolic network analysis reveals microbial community interactions in anammox granules[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15416.
- [45] STROUS M, FUERST JA, KRAMER EHM, LOGEMANN S, MUYZER G, van de PAS-SCHOONEN KT, WEBB R, KUENEN JG, JETTEN MSM. Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. *Nature*, 1999, 400(6743): 446-449.
- [46] GAO F, ZHANG HM, YANG FL, LI HJ, ZHANG R. The effects of zero-valent iron (ZVI) and ferrous oxide (Fe_3O_4) on anammox activity and granulation in anaerobic continuously stirred tank reactors (CSTR)[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(11): 1970-1978.
- [47] SUN YP, GUAN YT, ZENG DF, HE K, WU GX. Metagenomics-based interpretation of AHLs-mediated quorum sensing in Anammox biofilm reactors for low-strength wastewater treatment[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 344: 42-52.
- [48] 彭永臻, 张向晖, 马斌, 贾方旭, 韩金浩. 厌氧氨氧化菌群体感应机制[J]. *北京工业大学学报*, 2018, 44(3): 449-454.
- PENG YZ, ZHANG XH, MA B, JIA FX, HAN JH. Mechanism of quorum sensing in anaerobic ammonium oxidation(anammox) bacteria[J]. *Journal of Beijing University of Technology*, 2018, 44(3): 449-454 (in Chinese).
- [49] STROUS M, PELLETIER E, MANGENOT S, RATTEI T, LEHNER A, TAYLOR MW, 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 BE, den CAMP HJMO, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome[J]. *Nature*, 2006, 440(7085): 790-794.
- [50] TANG X, GUO YZ, ZHU TT, TAO HC, LIU ST. Identification of quorum sensing signal AHLs synthases in *Candidatus Jettenia caeni* and their roles in anammox activity[J]. *Chemosphere*, 2019, 225: 608-617.
- [51] SCHUSTER M, SEXTON DJ, DIGGLE SP, GREENBERG EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2013, 67: 43-63.
- [52] de CLIPPELEIR H, DEFOIRDT T, VANHAECKE L, VLAEMINCK SE, CARBALLA M, VERSTRAETE W, BOON N. Long-chain acylhomoserine lactones increase the anoxic ammonium oxidation rate in an OLAND biofilm[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(4): 1511-1519.
- [53] 刘思彤, 姜博. Anammox 反应器启动过程中菌群群体感应现象[J]. *北京工业大学学报*, 2015, 41(10): 1455-1461.
- LIU ST, JIANG B. Quorum-sensing of anammox bacteria during the start-up of anammox reactor[J]. *Journal of Beijing University of Technology*, 2015, 41(10): 1455-1461 (in Chinese).
- [54] TANG X, LIU ST, ZHANG ZT, ZHUANG GQ. Identification of the release and effects of AHLs in anammox culture for bacteria communication[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 273: 184-191.
- [55] 张晶. AHLs 对 ANAMMOX 颗粒特性和脱氮性能的影响及调控机制研究[D]. 北京: 北京工业大学博士学位论文, 2020.
- ZHANG J. Study on the effect of AHLs on the characteristics and nitrogen removal performance of ANAMMOX granules and the regulation mechanism[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [56] LIU YM, GUO JB, LIAN J, CHEN Z, LI YJ, XING YJ, WANG T. Effects of extracellular polymeric substances (EPS) and N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) on the activity of anammox biomass[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018, 129: 141-147.
- [57] ZHANG J, LI J, ZHAO BH, ZHANG YC, WANG XJ, CHEN GH. Long-term effects of N-acyl-homoserine lactone-based quorum sensing on the characteristics of ANAMMOX granules in high-loaded reactors[J]. *Chemosphere*, 2019, 218: 632-642.
- [58] ZHAO R, ZHANG HM, ZOU X, YANG FL. Effects of inhibiting acylated homoserine lactones (AHLs) on anammox activity and stability of granules[J]. *Current Microbiology*, 2016, 73(1): 108-114.
- [59] MORIN D, GRASLAND B, VALLÉE-RÉHEL K, DUFAU C, HARAS D. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1002(1/2): 79-92.
- [60] 罗梦, 易皓, 陈静, 张文哲, 韩云平, 肖本益. 高效液相串联质谱法检定活性污泥中 N-高丝氨酸内酯[J]. *环境化学*, 2019, 38(2): 281-286.

- LUO M, YI H, CHEN J, ZHANG WZ, HAN YP, XIAO BY. Determination of N-acyl-homoserine lactones in activated sludge by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(2): 281-286 (in Chinese).
- [61] CATALDI TRI, BIANCO G, PALAZZO L, QUARANTA V. Occurrence of N-acyl-L-homoserine lactones in extracts of some Gram-negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 2007, 361(2): 226-235.
- [62] HOANG TPT, BARTHÉLEMY M, LAMI R, STIEN D, EPARVIER V, TOUBOUL D. Annotation and quantification of N-acyl homoserine lactones implied in bacterial quorum sensing by supercritical-fluid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(10): 2261-2276.
- [63] 何伟佳, 岳思远, 王翔, 孙天妹, 董庆利. 食源性致病菌群体感应信号分子的检测[J]. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1707-1714.
- HE WJ, YUE SY, WANG X, SUN TM, DONG QL. Progress in detection and modeling of quorum sensing molecules of foodborne pathogens[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(9): 1707-1714 (in Chinese).
- [64] BODELÓN G, MONTES-GARCÍA V, LÓPEZ-PUENTE V, HILL EH, HAMON C, SANZ-ORTIZ MN, RODAL-CEDEIRA S, COSTAS C, CELIKSOY S, PÉREZ-JUSTE I, SCARABELLI L, LA PORTA A, PÉREZ-JUSTE J, PASTORIZA-SANTOS I, LIZ-MARZÁN LM. Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering[J]. Nature Materials, 2016, 15(11): 1203-1211.
- [65] SCHUPP PJ, CHARLTON TS, TAYLOR MW, KJELLEBERG S, STEINBERG PD. Use of solid-phase extraction to enable enhanced detection of acyl homoserine lactones (AHLs) in environmental samples[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 383(1): 132-137.
- [66] MDOWELL P, AFFAS Z, REYNOLDS C, HOLDEN MT, WOOD SJ, SAINT S, COCKAYNE A, HILL PJ, DODD CE, BYCROFT BW, CHAN WC, WILLIAMS P. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(2): 503-512.
- [67] KALKUM M, LYON GJ, CHAIT BT. Detection of secreted peptides by using hypothesis-driven multistage mass spectrometry[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(5): 2795-2800.
- [68] JUNIO HA, TODD DA, ETTEFAGH KA, EHRMANN BM, KAVANAUGH JS, HORSWILL AR, CECH NB. Quantitative analysis of autoinducing peptide I (AIP-I) from *Staphylococcus aureus* cultures using ultrahigh performance liquid chromatography-high resolving power mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2013, 930: 7-12.
- [69] 邢晓楠. LC-MS/MS 法检测金黄色葡萄球菌 AIPs 信号分子及该分子对 SEA 和生物膜形成作用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2016.
- XING XN. Analysis of *S.aureus* AIPs using LC-MS/MS and the effect of AIPs on SEA and biofilm formation[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).
- [70] XU F, SONG XN, CAI PJ, SHENG GP, YU HQ. Quantitative determination of AI-2 quorum-sensing signal of bacteria using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Environmental Sciences, 2017, 52: 204-209.
- [71] 燕彩玲, 李博, 顾悦, 贾原博, 刘亚东, 贺银凤. 信号分子 AI-2 的检测方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1333-1338.
- YAN CL, LI B, GU Y, JIA YB, LIU YD, HE YF. Methods for the determination of autoinducer-2: a review[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1333-1338 (in Chinese).
- [72] AHMED F. A hydrologic model of kemptville basin: calibration and extended validation[J]. Water Resources Management, 2012, 26(9): 2583-2604.
- [73] BI DD, ALMPANIS A, NOEL A, DENG YS, SCHOBEL R. A survey of molecular communication in cell biology: establishing a new hierarchy for interdisciplinary applications[J]. IEEE Communications Surveys & Tutorials, 2021, 23(3): 1494-1545.