doi:10.11918/j.issn.0367-6234.2016.02.012

# 有机碳源对 SNAD 工艺脱氮性能及 微生物种群结构的影响

李 冬1,何永平1,张肖静2,梁瑜海1,张玉龙1,范 丹1,张 杰1,3

(1.水质科学与水环境恢复工程北京市重点实验室(北京工业大学),100124 北京;
2.郑州轻工业学院环境污染治理与生态修复河南省协同创新中心,450001 郑州;
3.城市水资源与水环境国家重点实验室(哈尔滨工业大学),150090 哈尔滨)

摘 要:为考察不同有机碳源质量浓度对亚硝化的全程自养脱氮工艺(SNAD)脱氮性能的影响,将该工艺应用到生活污水的处理中,采用 MBR 反应器,以葡萄糖作为有机物来源,通过逐步增大 COD 来实现,并运用 PCR-DGCE 技术研究了微生物种群 结构的变化.反应器运行结果和 DGCE 图谱分析表明:碳氮比为 0~2 时,COD 的增加不会抑制 AOB 和 Anammox 菌,AOB 和 Anammox 菌的菌属种类不受影响,反而通过反硝化作用提高氮去除负荷.总氮去除率和氮去除负荷分别为 67% 和 0.34 kg/(m<sup>3</sup>·d)左右.碳氮比为 3~4 及生活污水运行条件下,Anammox 菌不受影响,AOB 的活性受到抑制,菌属种类减少,脱氮效率下降.生活污水运行阶段,总氮去除率和氮去除负荷平均分别为 73% 和0.17 kg/(m<sup>3</sup>·d).Nitrosomonas 和 Candidatus Kuenenia stuttgartiensis 一直是反应器内的优势菌属,共同完成脱氮过程.

**关键词:** 同步亚硝化厌氧氨氧化和反硝化;有机物;生活污水;聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳;微生物 中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2016)02-0068-08

# Effect of organic carbon on nitrogen removal and the microbial communities in SNAD process

LI Dong<sup>1</sup>, HE Yongping<sup>1</sup>, ZHANG Xiaojing<sup>2</sup>, LIANG Yuhai<sup>1</sup>, ZHANG Yulong<sup>1</sup>, FAN Dan<sup>1</sup>, ZHANG Jie<sup>1,3</sup>

(1.Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering(Beijing University of Technology), 100124 Beijing, China; 2.Collaborative Innovation Center of Environmental Pollution Control and Ecological Restoration, Zhengzhou University of Light Industry, 450001 Zhengzhou, China; 3.State Key Laboratory of

Urban Water Resource and Environment (Harbin Institute of Technology), 150090 Harbin, China)

Abstract: Effect of different organic substrate concentration on nitrogen removal in SNAD and the application of this process to treat domestic wastewater were investigated in a MBR, with gradually increased glucose as a source of organic matter. Besides, changes of microbial communities were observed by PCR-DGGE techniques. Experimental results and DGGE profiles showed that the increase of organic carbon concentration did not inhibited the activity and category species of AOB and Anammox bacteria when the C/N ration was ranged 0 to 2.0. Meanwhile, a significantly improvement of nitrogen removal was observed via effective denitrification, with a total nitrogen removal efficiency of 67% and nitrogen removal rate of 0.34 kg/(m<sup>3</sup>·d), respectively. Under the C/N of 3–4 condition, the anammox bacteria in the system changed insignificantly, but AOB was inhibited and the category species reduced, resulting a decreasing of nitrogen removal efficiency. Total nitrogen removal efficiency and nitrogen removal rate were about 73% and 0.17 kg/(m<sup>3</sup>·d), respectively.*Nitrosomonas* and *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* were the predominant microorganisms in the SNAD reactor and played a major role in autotrophic nitrogen removal.

Keywords: SNAD; organic carbon; domestic wastewater; PCR-DGGE; microbes

- 基金项目:国家自然科学基金(51222807);
- 国家科技重大专项-水专项(2012ZX07202-005).
- 作者简介:李 冬(1976—),女,教授,博士生导师; 张 杰(1938—),男,博士生导师,中国工程院院士.
- 通信作者: 李 冬, lidong2006@ bjut.edu.cn.

目前,水体中氮素污染物的去除仍是水处理领 域研究的热点与难点.传统硝化-反硝化脱氮工艺虽 然脱氮效率高,但投资与运行费用高,耗能大,污泥 产量高<sup>[1]</sup>.基于亚硝化的全程自养脱氮(CANON)<sup>[2]</sup> 工艺有效地克服了传统脱氮工艺中固有的缺点.

收稿日期: 2014-08-08.

• 69 •

CANON 工艺是指氨氧化菌(AOB)和厌氧氨氧化 (Anammox)菌共存于同一反应器内,AOB 在微氧条 件下,以氧作为电子受体将NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N部分氧化为 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N,Anammox 菌以AOB 产生的NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N为电 子受体,与剩余NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N反应,生成N<sub>2</sub>并释放,达到 脱氮目的.CANON系统内化学计量方程式如下

 $1 \mathrm{NH}_3 + 0.85 \mathrm{O}_2 \longrightarrow 0.435 \mathrm{N}_2 + 0.11 \mathrm{NO}_3^- + 0.14 \mathrm{H}^+ + 1.43 \mathrm{H}_2 \mathrm{O}.$ 

(1)

CANON 工艺因具有高效脱氮、耗能少、无需外 加碳源且污泥产量低等优点受到国内外诸多学者的 青睐.但根据式(1),理论上 CANON 工艺只能达到 89%的总氮去除率,产生11%左右的 NO3--N 无法 根除.并且,只含氨氮不含有机物的水体几乎不存 在,由于 AOB 和 Anammox 菌均是自养菌,有机物的 存在势必对这两种菌产生影响.如何同时去除水体 中的氨氮和有机物,进一步提高脱氮效率,是研究学 者努力的方向.Chen 等<sup>[3]</sup>提出了同步亚硝化、厌氧 氨氧化和反硝化(SNAD)工艺,即在同一反应器内 AOB 和 Anammox 菌共同完成 CANON 反应,反硝化 细菌以有机物为电子供体,将产生的少量NO3--N还 原为 N,,解决了上述难题.近年来,SNAD 工艺的研 究多集中在化肥工业废水、养猪废水等高氨氮、低碳 氮比的废水处理中[4-6],而关于不同有机物质量浓 度对 SNAD 工艺的影响及将其应用于低氨氮、高碳 氮比的生活污水的处理少见报道.本研究以 MBR 系 统内 SNAD 工艺为对象, 探讨了不同有机物质量浓 度对 SNAD 工艺的影响及对系统内 AOB 和 Anammox 菌种群结构的影响,进一步考察 SNAD 工 艺应用于实际生活污水同步脱氮除有机物的处理, 以期为该工艺应用于工程实践提供理论依据.

1 实 验

## 1.1 实验装置

本实验在已成功以连续流方式运行 CANON 工 艺的基础上进行.运行期间,曝气量为 0.2 mL/min、 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N质量浓度为150 mg/L时, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N去除率、 总氮去除率和氮去除负荷分别为 88%、51.67% 和 0.45 kg/(m<sup>3</sup>·d).实验装置为有机玻璃制成的圆柱形 MBR 反应器,如图 1 所示.圆柱内径 13 cm,高度 40 cm,有效容积 3 L,内置聚偏氟乙烯(PVDF)中空纤 维膜组件,膜孔径为 0.1 μm,有效膜面积为 0.2 m<sup>2</sup>,膜 通量 36 L/h.反应器底部设置曝气环,采用鼓风曝气,曝气量由转子流量计控制,中间设有搅拌机,用于基 质和 0<sub>2</sub>均匀扩散,外部设置水浴套筒,由温度控制仪 控制反应器内温度.



1—进水箱;2—进水泵;3—膜组件;4—出水泵;5—鼓风机;6—气体 流量计;7—曝气环;8—DO 电极;9—pH 电极;10—DO 在线测定仪; 11— pH 在线测定仪;12—搅拌机;13—水浴.

图1 实验装置示意

## 1.2 实验用水与实验方法

实验用水前期采用人工配水,分别以 ( $NH_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、 $NaHCO_3$ 和葡萄糖作为 $NH_4^+-N$ 、碱度和 COD的来源.进水中额外添加 $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 、CaCl<sub>2</sub>、 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和营养液I、II作为营养物质,营养液I包 括 EDTA 5 000 mg/L和 FeSO<sub>4</sub>5 000 mg/L.营养液II 包括 EDTA 15 000 mg/L、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  430 mg/L、 CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 240 mg/L、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  990 mg/L、 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 250 mg/L、 $Na_2 MoO_4 \cdot 2H_2O$  220 mg/L、 NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 190 mg/L、 $Na_2 SeO_4 \cdot 10H_2O$  210 mg/L 和 H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>14 mg/L,水质情况见表1.后期实验用水取自 北京工业大学教工家属西区化粪池中的生活污水, 不再另外投加任何其他物质,水质情况见表2.

表1 人工配水水质

水质 指标	$\rho(\mathrm{NH_4^+-N})/(\mathrm{mg}\cdot\mathrm{L^{-1}})$	COD(葡萄糖)/ (mg·L <sup>-1</sup> )	碱度(以CaCO <sub>3</sub> 计)/(mg·L <sup>-1</sup> )	$\frac{\rho(\mathrm{MgSO_4}\!\cdot\!5\mathrm{H_2O})/}{(\mathrm{mg}\cdot\!\mathrm{L^{-1}})}$		$ ho(CaCl_2)/$ (mg·L <sup>-1</sup> )	$\rho(\mathrm{KH}_{2}\mathrm{PO}_{4})$ $(\mathrm{mg}\cdot\mathrm{L}^{-1})$	/ 营养液 I / (mL・L <sup>-1</sup> )	营养液Ⅱ/ (mL •L <sup>-1</sup> )
数值	100±5	0~400	1 000	72.7		36.4	36.4	1	1
表 2 生活污水水质									
水质	$ ho(\mathrm{NH_4^+-N})/$	$\rho(\mathrm{NO_2}^-\mathrm{-N})/$	$\rho(\mathrm{NO_3}^-\mathrm{-N})/$	<b>U</b>	COD/	В	DD <sub>5</sub> /	碱度(以 CaCO <sub>3</sub>	SS/
指标	$(mg \cdot L^{-1})$	$( mg  \boldsymbol{\cdot} L^{-1})$	$(mg \cdot L^{-1})$	рп	$(mg \cdot L^{-1})$	) ( mg	$\cdot L^{-1}$ )	↔)/(mg ·L <sup>-1</sup> )	$(mg \cdot L^{-1})$
范围	74~91	<1	<1	7.0~7.8	300~400	0 120	)~150	550~610	76~114

实验在常温(23~25)℃条件下采用连续流方式 运行,分为两个阶段:第 I 阶段,配水运行,COD 为 0、50、100、200、300、400 mg/L;第 II 阶段,生活污水 运行.不同阶段主要运行条件见表 3.

表 3 不同阶段主要运行条件

阶段	$COD/(mg \cdot L^{-1})$	曝气量/(mL ⋅min <sup>-1</sup> )	HRT/h
	0	0.1	5.0±0.5
	50	0.1	5.0±0.5
т	100	0.1	5.0±0.5
1	200	0.1	5.0±0.5
	300	0.1~0.2	$5.0\pm0.5 \sim 7.0\pm0.5$
	400	0.2	$7.0 \pm 0.5$
П	50%配水+ 50%生活污水	0.2	12±3
	100%生活污水	0.2	$7.0\pm0.5 \sim 8.3\pm0.1$

## 1.3 分析项目与方法

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N、COD 等指标均采用 国家规定的标准方法测定<sup>[7]</sup>; DO、ORP、pH 及温度 测定分别采用 EUTECH DO2000PPG 多功能溶解氧 在线测定仪、WTW ORP296 型在线测定仪、WTW pH296 型在线测定仪测定.

#### 1.4 DNA 提取、PCR-DGGE、克隆和测序

1.4.1 基因组 DNA 的提取

在 COD 为 0、200、400 mg/L 及生活污水运行稳

定期,从 MBR 反应器内采集混合液.用 UNIQ-10 柱 式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)提取基 因组 DNA,具体操作按说明书进行.所提取的基因组 DNA 用 0.8%(质量分数)的琼脂糖凝胶电泳检测, 以备 PCR 用.

## 1.4.2 PCR 扩增及 DGGE 电泳

采用巢式 PCR 方法,分别扩增 β-proteobacteria 菌门的 AOB, Planctomycetales 菌门的 Anammox 菌. 为扩增 AOB 的 16S rDNA, 第一轮扩增使用 CTO189fA/B和 CTO189fC 混合引物(体积比 2:1) 作为正向引物,反向引物采用 CTO654r.之后以第一 轮 PCR 扩增产物为模板,使用通用引物对 F338(带 GC 夹)/R518 进行第二轮 PCR 扩增.对于 Anammox 菌特异性片段的扩增,第一轮先以引物对 Pla46F/ 630R 进行浮霉球菌扩增.之后以第一轮 PCR 扩增 产物为模板,使用引物对 Amx368f(带 GC 夹)/ Amx820r 进行第二轮 PCR 扩增. PCR 反应体系为 25 μL,其中包含 2.5 μL 10 × Ex Taq buffer ( Mg<sup>2+</sup> Plus), 2.0 µL DNTP, 1.0 µL BSA, 1.0 µL 引物, 0.125 µL TaKaRa Ex Taq 酶,模板 DNA 约 1.0 ng,用 无菌水补齐至 25 µL.引物碱基序列及反应条件见 表 4.

引物	碱基序列			θ∕°C·	-t/min			文献
F338(GC)	ACTCCTACGGGAGGCAG	04 5	04 2/2	55 2/2	72 1	70 7	4 ~	٦٩٦
R518	ATTACCGCGGCGCTGG	94-3	94-2/3	55-2/5	72-1	12-1	4- x	
CTO189fA/B	GGAGRAAAGCAGGGGATCG							
CTO189fC	GGAGGAAAGTAGGGGATCG	94-5	92-1/2	57-3/4	72-3/4	72-5	4-∝	[9]
CTO654r	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC							
Pla46F	GGATTAGGCATGCAAGTC	04 5	04 2/2	55 2/2	72 1	70 7	4 ~	[10]
630R	CAKAAAGGAGGTGATCC	94-0	94-2/3	55=2/5	/2-1	72-7 4	4- w	
Amx368f(GC)	CCTTTCGGGCATTGCGAA	04 5	04.1	<b>51 1</b>	72-3/2	72-10	4-∝	[11]
Amx820r	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC	94-5	94-1	51-1				

表4 PCR 常用引物对应程序

PCR 扩增产物用 1.5% (质量分数)的琼脂糖凝 胶进行电泳检测.采用 Sanprep 柱式 DNA 胶回收试 剂盒(上海生工)进行 PCR 产物的纯化回收,具体操 作按说明书进行.对 PCR 产物进行 DGGE 分析:聚丙 烯酰胺质量分数 8%,变性梯度为30%~60%,电压 120 V,电泳时间 5 h,电泳在 Dcode Universal Mutation Detection System 仪器上进行.电泳结束后按 Bassam 等<sup>[12]</sup>的方法对凝胶进行银染和拍照.

## 1.4.3 克隆和测序

切取 DGGE 图谱中的目的条带溶于150 μL TE (pH 8.0)溶液中,4℃过夜,以此为模板,以不含 GC 夹的引物进行 PCR 扩增,并对 PCR 产物进行纯化. 按照 pMD19-T plasmid vector system 说明书进行基因片段与载体的连接后,转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,通过蓝白斑法筛选阳性克隆子,过夜培养后进行测序.采用 BLAST 对测序结果和基因库中已知序列进行相似性分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应器运行性能

2.1.1 配水阶段反应器运行性能

此阶段主要探讨不同碳氮比对 SNAD 工艺运行 性能 的 影 响 及 调 控 方 法.  $NH_4^+ - N$  质 量 浓 度 为 100 mg/L,COD 依次从 0 mg/L 逐渐递增到 400 mg/L, 本阶段反应器运行效果如图 2 所示.由图 2(a)可以看 出,0~53 d,随着碳氮比的增大,即分别为 0、0.5、1.0、2.0, 出水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 质量浓度基本不变,维持在24 mg/L,出 水 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N质量浓度逐渐减小,分别下降到 0.2 和5.0 mg/L左右.图 2(b)也显示NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N去除率 ( $R_{AR}$ )一直在 75%左右,总氮去除率( $R_{TN}$ )和氮去除负 荷( $R_{NR}$ )由于出水 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 质量浓度的减 小,不断增大至 67%和 0.34 kg/(m<sup>3</sup>·d)左右.当碳氮比 为 3 时,由于 HRT 控制不稳,导致第54~59 天出水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 质量浓度变化也较大,但第60~64 天 HRT 稳 定后,出水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 质量浓度明显增高,  $R_{TN}$ 和  $R_{NR}$ 降 低,因此,第 65~71 天,曝气量由 0.1 mL/min 调至 0.2 mL/min, 以氧化更多的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - N, 此时, 出水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N质量浓度只是轻微减小.在第72~79 天将 HRT 由(5.0±0.5)增大至(7.0±0.5)h, 出水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 质量浓度进一步降至 13.0 mg/L 左右, 出水 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 质量浓度增加到 9.3 mg/L, *R*<sub>TN</sub>上升到 75%左右, *R*<sub>NR</sub>有 所回升, 为 0.23 kg/(m<sup>3</sup>·d)左右.继续增大碳氮比至 4, 出水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 质量浓度增加至21.0 mg/L, 而出水 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 质量浓度减小至4.0 mg/L, *R*<sub>TN</sub>和 *R*<sub>NR</sub>分别为 72%和 0.24 kg/(m<sup>3</sup>·d).图 2(c)表明,当 COD 为 50 mg/L时, 出水 COD 在23~30 mg/L, 随着 COD 的增 加, 出水 COD 变化范围为9.0~14.0 mg/L, COD 去除率 不断增大,在 95%以上.



## 2.1.2 生活污水阶段反应器运行性能

此阶段引入生活污水,如图 3 所示.第 94~103 天,进水为人工配水和生活污水各一半,混合均匀, 考虑到生活污水中好氧异养微生物较多,会消耗较 多的溶解氧,将 HRT 增大到 12 h 左右.从图 3可以 看出,出水  $NH_4^+ - N$  质量浓度在 3 mg/L 左右,出水  $NO_2^- - N$  接近 0 mg/L,出水  $NO_3^- - N$  质量浓度为 3 mg/L左右,出水 COD 在 25~33 mg/L 波动.  $R_{AR}$ 和  $R_{TN}$ 分别达 95%和 89%以上.第 104~120 天为完全 原水运行时期,由于进水中只加入 50% 生活污水 时, $R_{AR}$ 和 $R_{TN}$ 已较高,便将 HRT 减小到(7.0±0.5) h. 前9 d,随着反应器的运行,出水NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N质量浓度越 来越大,导致 $R_{TN}$ 和 $R_{NR}$ 急剧下降.第 114 天将 HRT 增 加至(8.3±0.1) h,出水NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N质量浓度迅速降至 23.0 mg/L左右,出水 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 质量浓度几 乎为 0 mg/L, $R_{TN}$ 和  $R_{NR}$ 也分别上升到 73% 和 0.17 kg/(m<sup>3</sup>·d)左右,出水 COD 略升至 30.0~ 40.0 mg/L,COD 去除率达 90% 左右.



#### 2.2 反应器运行性能分析

由于 AOB 和 Anammox 菌是自养菌,不需要有 机物作为碳源或能源物质,当反应器中存在有机物 时,势必会改变其生存环境的物化特性,从而促进或

图 3 生活污水阶段反应器运行性能 抑制其生长和脱氮性能.本实验配水运行阶段,当碳 菌,不需要有 氮比 $\leq$ 2时,随着 COD 的增加, $R_{AR}$ 基本保持不变, 中存在有机物  $R_{TN}$ 和 $R_{NR}$ 由于出水NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N和 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 质量浓度的 减少而增大.这是因为在低质量浓度有机碳源下, AOB 和 Anammox 菌未受到影响,而反硝化细菌活性 增强,通过反硝化作用将 NO, --N 和 NO, --N 还原 为 N.,提高了脱氮效率.有学者<sup>[13-15]</sup>认为低质量浓 度的有机物不会显著影响 Anammox 反应,反而通过 反硝化作用提高总氮去除率.当碳氮比为3时,出水 NO3<sup>-</sup>-N质量浓度进一步下降,但出水 NH4<sup>+</sup>-N 质量 浓度上升幅度较大.有机碳源对 AOB 和 Anammox 菌 的抑制作用表现为:有机物的加入会使好氧异养菌 繁殖,与AOB竞争O2,从而抑制AOB的活性;同时, 会使反硝化细菌生长,与 Anammox 菌竞争底物 NO,<sup>-</sup>-N,致使 Anammox 菌活性降低甚至失活<sup>[4]</sup>.周 少奇[16]发现高碳源环境下,由于反硝化菌的生长速 率大于 Anammox 菌,大量繁殖,在竞争NO,<sup>-</sup>-N时占 优势.本研究中导致出水 NH4+-N 质量浓度升高,理 论上可能存在以下原因:①因好氧异养菌大量繁殖, AOB 受到抑制,导致 Anammox 菌所需的底物-NO, -N 减少, 也受到抑制; ②AOB 未受到影响, 因 反硝化菌的过度繁殖,使得 NO2<sup>-</sup>-N 减少 Anammox 菌受到抑制;③因好氧异养菌和反硝化菌均大量繁 殖,致使 AOB 和 Anammox 菌同时受到抑制.分析如 下:如图4(a)所示,当碳氮比为0、0.5、1.0、2.0,曝气 量为0.1 mL/min时, DO 维持在0.3 mg/L, 而 ORP 由 -22 mV逐渐减小到-105 mV 左右.反应器内随着碳 氮比的增加, DO 相对稳定, O, 可供好氧异养菌和 AOB 同时利用,表明在碳氮比≤2的条件下,在竞争 O2时,好氧异养菌未对 AOB 菌造成不利影响,而 ORP 的减小是因为反硝化菌的作用.文献[17]在研 究循环式活性污泥法时认为,在缺氧区 ORP 能指示 反硝化碳源是否充足,即反硝化作用加强会导致 ORP 减小.虽然存在反硝化菌,但在低质量浓度有机 碳源下,其对 NO2<sup>-</sup>-N 的亲和力要小于 Anammox 菌 对 NO2<sup>-</sup>-N 的亲和力<sup>[18]</sup>,所以 Anammox 菌也未受到 抑制,这与反应器内氮素变化情况一致.当碳氮比为 3时,第54~64天,DO和ORP大幅下降(文献[17] 的研究表明, ORP 随着 DO 质量浓度的下降而下 降),高质量浓度有机物的存在使好氧异养菌大量繁 殖,消耗大量 $O_2$ ,AOB可能由于供氧不足受到抑制, 生成少量的NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, Anammox 菌因基质 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 质 量浓度不足活性降低,导致出水NH4+-N质量浓度升 高, R<sub>NB</sub>降低.根据以上分析将 O<sub>2</sub>调至 0.2 mL/min, 此时 DO 仍为 0.1 mg/L, 出水 NH4+-N 质量浓度降 低,但还是较高,第72天,增大HRT,DO为 0.2 mg/L,出水 NH4+-N 质量浓度进一步降低.当碳 氮比为4时,DO减至0.1 mg/L,出水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N质量 浓度轻微升高.如图4(b)所示,生活污水运行阶段



图 4 不同阶段  $O_2$ 、DO、ORP 的变化

由以上分析可知,当碳氮比为3时,出水 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 质量浓度升高的原因符合第①种.若是因为 AOB 未 受到影响,反硝化菌过度繁殖,便会导致反应器内 ORP 的升高,与此时 DO 和 ORP 大幅下降的现象不 符.若是因为好氧异养菌和反硝化菌均大量繁殖,当 增大 DO 质量浓度或 HRT,虽然 AOB 活性恢复,但 由于反硝化菌继续大量增殖与 Anammox 菌竞争 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N,势必会抑制 Anammox 菌,加之后期碳氮比 为4,Anammox 菌一直处于劣势,种群结构会受到影 响,但 2.3 节 DGGE 图谱显示 Anammox 菌种群结构 在运行期间未发生变化.所以,本研究中碳氮比≥3 致使反应器脱氮性能下降,主要是好氧异养菌大量 繁殖,AOB 受到抑制所致.

从图 2(c)可以看出,COD 去除率随 COD 的增加而增大.原因是当 COD 较低时,异养菌数量较少,只能氧化少量的有机物,当 COD 越来越大,异养菌大量增殖,氧化了大量有机物.比较配水运行阶段与生活污水运行阶段出水 COD,后者偏大,主要是由原水中存在难降解有机物所致.

图 5 为实验结束时,曝气量为 0.2 mL/min,以生 活污水为进水的周期实验.0~10 h,COD 逐步下降, 而 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 质量浓度变化不明显,说明 COD 最先被 好氧异养菌氧化,并消耗 O<sub>2</sub>,抑制了 AOB 的活性.当 COD 降至89.42 mg/L时, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 质量浓度开始下 降, AOB 和 Anammox 菌发挥作用,同时反硝化细菌 将生成的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 还原为 N<sub>2</sub>,使得 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 质量浓 度没有升高, AOB、Anammox 菌和反硝化细菌共同完 成脱氮作用.同时也说明在高碳氮比的情况下,由于 好氧异养菌先将大部分 COD 去除,解除了反硝化细 菌过度繁殖竞争基质 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 对 Anammox 菌的不 利影响,这也是本实验中虽然碳氮比高于其他学者 研究值<sup>[15,19]</sup>,但在短期内未对 Anammox 菌产生抑制 的原因.



图 5 周期实验中 COD、三氮质量浓度的变化

## 2.3 AOB 和 Anammox 菌种群结构变化

图 6 中 a、b、c、d 4 个泳道分别对应 COD 为 0、 200、400 mg/L 及生活污水运行阶段 AOB 的 DGGE 图谱.对图中10个条带进行 DNA 基因序列测序,结 果表明,所有 AOB 均属于β-proteobacteria,主要是 Nitrosomonas, 包括 Nitrosomonas sp.、Nitrosomonas europaea、Nitrosococcus mobilis 和 Nitrosomonas oligotropha 且相似度均在 98% 及以上, 如表 5 所示, 表明 Nitrosomonas 是反应器内的优势菌种. Ducey 等<sup>[20]</sup>在 研究亚硝化时,对153个克隆的16SrRNA 基因序列 进行测序分析,结果表明大部分属于 Nitrosomonas. Liu 等<sup>[21]</sup>认为相对于 Nitrosospira, Nitrosomonas 更适 于在 CANON 反应器中生长.对比 4 个阶段 AOB 的 种群结构变化可以看出:碳氮比由0~2,条带数量均 为10,无条带缺失,AOB 菌属种类不受影响;当碳氮 比为4时,条带数量减少到9,缺少了条带4(Nitrosomonas sp.), AOB 种群结构有所变化, 菌属种类减 少,说明在高质量浓度有机碳下,好氧异养菌快速增 殖竞争 O<sub>2</sub>, AOB 受到抑制; 在处理生活污水时, 条带 数量减少至8,缺少了条带4(Nitrosomonas sp.)和条 带 6(Nitrosomonas sp.), AOB 菌属种类进一步减少, 原因是生活污水中存在多而繁杂的好氧异养菌,其 引入对 AOB 更为不利,影响了 AOB 的种群结构.



图 6 AOB 的 DGGE 图谱

图 7 中 a、b、c、d 4 个泳道分别对应 COD 为 0、 200、400 mg/L 及生活污水运行阶段 Anammox 菌的 DGGE 图谱.对图中 3 个条带进行 DNA 基因序列测 序,结果表明均属于 Planctomycetia,包括 Candidatus Kuenenia stuttgartiensis 和 anaerobic ammoniumoxidizing planctomycete,相似度高达 99% 及以上 (表 6).Hu 等<sup>[22]</sup>的研究表明, Candidatus Kuenenia stuttgartiensis 是一种存在于淡水环境中的 Anammox, 且在污水脱氮系统中常见<sup>[23]</sup>.



#### 图 7 Anammox 菌的 DGGE 图谱

从图 7 可以看出,在 4 个阶段中 Anammox 菌菌 属种类没有变化,全部为 3 个同位置的条带,说明在 碳氮比由 0 增到 4 的过程中,通过及时调整运行参 数,短期内 Anammox 菌种群结构不会受到影响.AOB 和 Anammox 菌的 DGGE 图谱分析表明,*Nitrosomonas* 和 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* 一直是反应器 内的优势菌种,共同完成脱氮过程,且有机物对种群 约素5 DGGE 条带上AOB的

程,且有机物对种群 结构的影响与对反应器脱氮性能的影响一致. 表 5 DGGE 条带上 AOB 的 DNA 序列比对结果

条带	最相似菌属	相似度/%	登录号	所属细菌类群
1	Nitrosomonas sp.	99	HF6783781	Betaproteobacteria
2	Nitrosomonas europaea	99	NR_0747741	Betaproteobacteria
3	Nitrosomonas sp.	98	AJ621029.1	Betaproteobacteria
4	Nitrosomonas sp.	99	HF678378.1	Betaproteobacteria
5	Nitrosomonas europaea	99	GQ451713.1	Betaproteobacteria
6	Nitrosomonas sp.	99	AF272415.1	Betaproteobacteria
7	Nitrosomonas europaea	99	AB070983.1	Betaproteobacteria
8	Nitrosomonas europaea	99	NR_040879.1	Betaproteobacteria
9	Nitrosococcus mobilis	99	M96403.1	Betaproteobacteria
10	Nitrosomonas oligotropha	99	FR8284781	Betaproteobacteria

表 6 DGGE 条带上 Anammox 菌的 DNA 序列比对结果

条带	最相似菌属	相似度/%	登录号	所属细菌类群
11	Candidatus Kuenenia stuttgartiensis	99	KF442618.1	Planctomycetia
12	Candidatus Kuenenia stuttgartiensis	100	KF442619.1	Planctomycetia
13	$anaerobic \ ammonium-oxidizing \ planctomycete$	100	AJ250882.1	Planctomycetia

# 3 结 论

1)碳氮比为 0~2(ρ(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)= 100 mg/L、COD 为 0~200 mg/L)条件下,COD 的增加不会抑制 AOB 和 Anammox 菌,反而通过反硝化作用提高氮去除负 荷.总氮去除率和氮去除负荷平均分别为 67% 和 0.34 kg/(m<sup>3</sup>·d).可见,SNAD 工艺对于低碳氮比废 水的脱氮处理有很好的应用前景.

2)碳氮比为 3~4(ρ(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)=100 mg/L、COD 为 300~400 mg/L)及生活污水运行条件下,由于大 量 COD 的存在使得好氧异养菌不断增殖,抑制 AOB 的活性,脱氮效率下降,影响自养系统脱氮性能的稳 定性,可通过调整曝气量和 HRT 改善出水水质.生活 污水运行阶段,总氮去除率和氮去除负荷平均分别 为 73%和 0.17 kg/(m<sup>3</sup>·d),反应器脱氮性能尚需进 一步提高.

3) 人工配水阶段, 随碳氮比的增加, COD 去除率 不断升高, 在 95% 以上. 生活污水运行阶段, 由于存 在难降解有机物, COD 去除率在 90% 左右. 可见, SNAD 工艺可以提高脱氮效率, 还可有效去除有 机物.

4) AOB 和 Anammox 菌的 DGGE 图谱分析表明: 碳氮比为 0~2 时, COD 的增加对 AOB 和 Anammox 菌的菌属种类无影响.碳氮比为 3~4 及生活污水运 行时, COD 的增加使 AOB 菌属种类减少, 而通过及 时调控运行参数(DO、HRT) 短期内 Anammox 菌不 会受到影响,对其长期作用还需进一步研究.这与反应器的脱氮性能变化一致.Nitrosomonas 和 Candidatus Kuenenia stuttgartiensis一直是反应器内的优势菌种,共同完成脱氮过程.以后,可着重研究如何创造 有利于这两种菌生存的环境.

## 参考文献

- BAGCHI S, BISWAS R, NANDY T. Autotrophic Ammonia removal processes: ecology to technology [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2012, 42(13): 1353-1418.
- [2] SLIEKERS A O, DERWORT N, GOMEZ J L, et al. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor[J]. Water Research, 2002, 36(10): 2475-2482.
- [3] CHEN Huihui, LIU Sitong, YANG Fenglin, et al. The development of simultaneous partial nitrification, ANAMMOX and denitrification (SNAD) process in a single reactor for nitrogen removal [J]. Bioresource Technology, 2009, 100 (4): 1548-1554.
- [4] 贾丽,郭劲松,方芳,等. 有机碳源对单级自养脱氮系统 脱氮性能及微生物群落结构的影响[J]. 重庆大学学报, 2013,36(3):96-103.
- [5] KELUSKAR R, NERURKAR A, DESAI A. Development of a simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonia oxidation and denitrification (SNAD) bench scale process for removal of ammonia from effluent of a fertilizer industry [J]. Bioresource Technology, 2013, 130: 390-397.

- [6] DAVEREY A, HUNG N, DUTTA K, et al. Ambient temperature SNAD process treating anaerobic digester liquor of swine wastewater [J]. Bioresource Technology, 2013, 141: 191-198.
- [7]魏复盛,国家环境保护总局,水和废水监测分析方法编 委会.水和废水监测分析方法[M].北京:中国环境科学 出版社,2002.
- [8] KOWALCHUK G A, STEPHEN J R, DEBOER W, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments [J]. Appliedand Environmental Microbiology, 1997, 63 (4): 1489–1497.
- [9] MUYZER G, DEWALL E C, UITTERLINDEN A G, et al. Profilin of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA[J]. Appliedand Environmental Microbiology, 1993, 59 (3): 695-700.
- [10] NEEF A, AMANN R, SCHLESNER H, et al. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targetedprobes [J]. Microbiology-UK, 1998, 144(2):3257-3266.
- [11] 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.
- [12] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLES G, GRESSHOFF P M, et al. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1991, 196(1):80-83.
- [13]杨洋,左剑恶,沈平,等. 温度、pH 值和有机物对厌氧氨 氧化污泥活性的影响[J].环境科学,2006,27(4):691-695.

- [14] 吕永涛,陈祯,吴红亚,等. 有机物质量浓度对厌氧氨氧 化脱氮性能影响实验研究[J]. 环境工程学报, 2009,3
   (7): 1189-1192.
- [15] NI Shouqing, NI Jianyuan, HU Deliang, et al. Effect of organic matter on the performance of granular anammox process[J]. Bioresource Technology, 2012, 110: 701-705.
- [16]周少奇. 厌氧氨氧化与反硝化协同作用化学计量学分析
   [J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2006,34(5):
   1-4.
- [17]申福维,阳春,张智,等. 循环式活性污泥法氧化还原电 位的生产性研究[J]. 水处理技术, 2011,37(1):55-57.
- [18] AHN Y. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(8): 1709-1721.
- [19] 叶建锋, 薄国柱. 低碳源条件下厌氧氨氧化影响因素的 研究[J]. 水处理技术, 2006, 32(9): 30-33.
- [20] DUCEY T F, VANOTTI M B, SHRINER A D, et al. Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(2): 491-500.
- [21] LIU Sitong, YANG Fenglin, XUE Yuan, et al. Evaluation of oxygen adaptation and identification of functional bacteria composition for anammox consortium in non-woven biological rotating contactor [J]. Bioresource Technology, 2008, 99 (17): 8273-8279.
- [22] HU Baolan, ZHENG Ping, CHEN Jianwei, et al. Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors[J]. Water Research, 2010, 44(17): 5014-5020.
- [23] SCHMID M, TWACHTMANN U, KLEIN M, et al. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2000, 23 (1): 93-106.

(编辑 刘 形)