

进水亚硝氮限制下 Anammox 去除氨氮研究

牛晚霞^{*},袁林江^{*},有小龙,牛泽栋 (西安建筑科技大学,陕西省环境工程重点实验室,西北水资源与环境生态教育部重点实验室,陕西 西安 710055)

摘要: 利用 UASB 反应器分别在降低进水亚硝氮/氨氮比(R)和停供亚硝氮条件下研究了 Anammox 体系运行特性。发现随着进水亚硝氮减少,亚硝氮与氨氮去除摩尔比减小,发生氨氮超量去除现象,即使进水无亚硝氮时也可去除氨氮。当 R 为 1:2 时,氨氮超量去除量达最大,均值为 57.2mg/L;长期停供亚硝氮条件下氨氮能够稳定去除,平均去除量为 45.6mg/L。停供亚硝氮后 Anammox 体系中微生物群落多样性增加,AnAOB、氨氧化菌和反硝化菌相对丰度均增加。其中 AnAOB 相对丰度从 9.44% 增长到 13.26%;氨氧化菌相对丰度从 3.29% 增长到 7.3%;反硝化菌相对丰度由 0.54% 增加到 3.14%。研究表明,溶解氧是氨氮超量去除量的限制性因素,氨氮超量去除的途径包括:好氧氨氧化、厌氧氨氧化与部分内碳源反硝化。在微量溶解氧作用下,主要是氨氧化菌与厌氧氨氧化菌协同实现了氮的去除。

关键词: 厌氧氨氧化; 氨氮超量去除; 氨氧化; 内碳源反硝化

中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2021)07-3212-09

Study on removal of ammonia nitrogen by Anammox with or free of nitrite nitrogen. NIU Wan-xia, YUAN Lin-jiang, YOU Xiao-long, NIU Ze-dong (Key Laboratory of Environmental Engineering, Shanxi Province, Key Laboratory of Northwest Water Resources, Environment and Ecology, Ministry of Education, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China). *China Environmental Science*, 2021,41(7): 3212~3220

Abstract: Operation characteristics of an anammox system under the conditions of constantly reducing influent NO_2^- -N/ NH_4^+ -N ratio (R) and even no nitrite feeding in the UASB were studied. It has been found that as the influent nitrite decreased, the removal ratio of nitrite to ammonium also declined. The phenomenon of ammonium excess removal occurred. Even if there was no nitrite in the influent, ammonium had been removed. When the R was 1:2, the excess removal of ammonium reached the maximum, with an average of 57.2mg/L. The ammonium was removed stably in the reactor even without any nitrite supply, with an average removal of 45.6mg/L. The microbial diversity increased and the abundance of ammonia oxidizing bacteria, anaerobic ammonia oxidizing bacteria, denitrifying bacteria increased in the system. The relative abundance of AnAOB increased from 9.44% to 13.26%, ammonia oxidizing bacteria and denitrifying bacteria, from 3.29% and 0.54% to 7.3% and 3.14%, respectively. This study shows that dissolved oxygen was the limiting factor for the excess removal of ammonium. The pathways of excess removal of ammonium included aerobic ammonia oxidation, anammox and partial endogenous denitrification. While with a small amount of dissolved oxygen, ammonia oxidizing bacteria and anaerobic ammonia oxidizing bacteria removed ammonium collaboratively.

Key words: anammox; ammonium excess removal; ammonia oxidation; endogenous denitrification

与传统生物脱氮技术相比,厌氧氨氧化(Anammox)因不需要曝气、不需要有机碳源、污泥产量低等明显优势,被公认是一种效率高、能耗低的生物脱氮处理技术^[1~3]。相关研究^[4]提出 Anammox 反应中氨氮去除量与亚硝氮去除量以及硝氮产生量之间(ΔNH_4^+ -N/ ΔNO_2^- -N/ ΔNO_3^- -N)的理论比值为 1:1.32:0.26。由于 AnAOB(Aerobic ammonium oxidation bacteria)很难进行纯培养,当 Anammox 体系中存在异养型亚硝酸盐氧化菌或反硝化菌时,利用微生物内碳源消耗部分亚硝氮,使 ΔNO_2^- -N/ ΔNH_4^+ -N 大于 1.32^[5]。然而,有许多 Anammox 研究^[6~8]得到 ΔNO_2^- -N/ ΔNH_4^+ -N 小于 1.32,即氨氮被超量去

除。且当进水中亚硝氮供给比例减少时,Anammox 反应器会出现氨氮相对更多的去除^[9]。

在 Anammox 体系中通过研究氨氮和硫酸盐转化途径时发现在 NO_2^- 缺失且 SO_4^{2-} 未被去除的情况下, NH_4^+ 就能稳定去除,认为该体系中氨氮的去除存在其他未知的电子受体^[10]。有研究^[11]根据 Anammox 化学模型,从化学平衡移动的角度对此进行了分析,但对其中微生物机理尚不清楚。减少进水 NO_2^- -N 进行厌氧氨氧化脱氮,可减少废水中亚硝化过程、且还

收稿日期: 2020-11-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51878538)

* 责任作者, 教授, yuanlinjiang@xauat.edu.cn

能保证废水中氨态氮的去除量,对污水脱氮处理具有重要实用价值.

本研究设计了一系列批式实验,探究了 Anammox 反应器中氨氮超量去除方式以及超量去除氨氮量的限制性因素,同时结合微生物菌群解析对氨氮去除的代谢途径进行分析,旨在为厌氧氨氧化直接脱除水中氨态氮技术开发奠定基础.

1 材料与方法

1.1 反应器实验装置及进水水质

实验采用有机玻璃制作的 UASB 反应器(图 1),有效体积 6.28L,总体积 10.5L.反应器内侧柱高 114.4cm,直径 100mm,壁厚 5mm,外侧为 32℃水浴保温层,厚 10mm;在保温层外包裹铝箔纸进行隔光,进水由蠕动泵打入反应器底部.实验开始前,该反应器在室温条件下饥饿放置 120d 后提供基质短期恢复为氮去除负荷达 $1.3\text{kgN}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 并稳定运行.

表 1 各阶段主要进水基质

Table 1 Components of influent

阶段	运行天数(d)	$\text{NH}_4^+ \text{-N}(\text{mg/L})$	$\text{NO}_2^- \text{-N}(\text{mg/L})$	R
I	1~26	200	150	3:4
II	27~50	200	100	1:2
III	51~75	200	50	1:4
IV	76~120	200	0	0

注:R 为进水 $\text{NO}_2^- \text{-N}/\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 比值.

实验采用人工配制进水,配水成分为: KHCO_3 1250mg/L, KH_2PO_4 27.2mg/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 165mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 250mg/L, 微量元素 I 1mL/L, 微量元素 II 2mL/L, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 分别以 NH_4Cl 、 NaNO_2 按需提供, SO_4^{2-} 由 Na_2SO_4 提供, 投加浓度为 342.3mg/L.各阶段主要进水基质如表 1 所示.利用 1mol/L 的 HCl 调节 pH 值为 (7.5 ± 0.2) ,水力停留时间(HRT)为 20h.

1.2 批式实验装置及运行条件

据实验需求,在反应器的不同阶段,从反应器中分别取 10mL 泥水混合物倒入 50mL 离心管,用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤 2~3 次,然后将清洗后的污泥和 120mL 配制好的基质(基质提前曝高纯氮气除氧 20min),倒入总容积为 130mL 的血清瓶,后利用高纯氮气对血清瓶中泥水进行除氧 5min,将其密闭后

置于恒温振荡器($150\text{r}/\text{min}, 35^\circ\text{C}$)进行反应.在验证 Fe^{3+} 与氨氮超量去除的关系时,主要基质为 NH_4^+ ,取样间隔为 12h;验证内碳源反硝化与氨氮超量去除的关系时,主要基质为 NH_4^+ 和 NO_3^- ,每隔 24h 取一次样;验证 DO 与氨氮超量去除的关系时,主要基质为 NH_4^+ ,每隔 24h 取一次样.其他配水元素与反应器进水相同.

为提高实验代表性,批式实验均设 3 组平行.为保证血清瓶内厌氧环境,每次用注满氮气的注射器取样,且平行组取样体积保持一致.取样后用 $0.22\mu\text{m}$ 有机滤头过滤后测定相关指标.

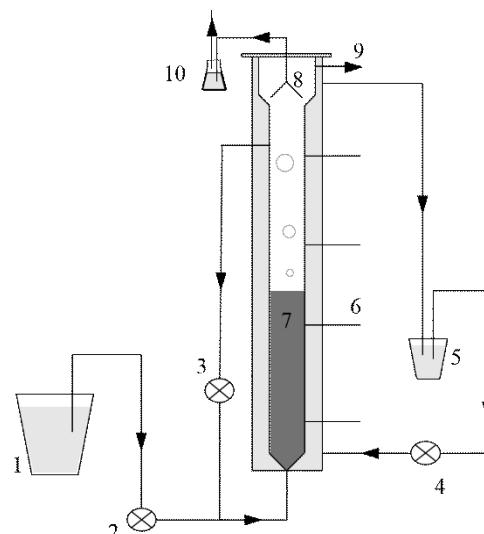


图 1 Anammox-UASB 装置示意

Fig.1 Schematic diagram of the Anammox-UASB reactor

1.进水桶 2.进水蠕动泵 3.回流蠕动泵 4.水浴循环泵 5.保温循环水 6.取样口 7.污泥床 8.沉淀区 9.出水口 10.液封

1.3 分析方法

常规指标的测试方法参考《水和废水监测分析方法》^[12]:pH 值采用 PHS-3S 型 pH 计测定;DO 采用 MO128-2M 型便携式溶解氧仪测定;硝酸盐氮采用紫外分光光度法和离子色谱法;亚硝酸盐氮采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法;氨氮采用纳氏试剂分光光度法;硫酸盐采用 ICS1100 离子色谱仪;总铁采用火焰原子吸收法.

污泥微生物群落结构分析采用基于 Illumina MiSeq 测序平台的细菌 16S rDNA 高通量测序技术.测序流程包括微生物总 DNA 提取、目标片段 PCR 扩增、扩增产物回收纯化、扩增产物荧光定量、MiSeq 文库构建和 MiSeq 测序^[13-14].其中 PCR 扩增

采用的引物为 Miseq 测序平台的 V3-V4 通用引物 341F(5'-CCTACGGGNGGCWG-CAG-3') 和 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3').Miseq 测序得到的 PE reads 首先根据 overlap 关系进行拼接, 同时对序列质量进行质控和过滤, 区分样本后进行 OUT 聚类分析和物种分类学分析. 以上工作均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成.

2 结果与讨论

2.1 不同亚硝氮浓度供给条件下 Anammox 反应器运行特性

2.1.1 氨氮、亚硝氮及硝氮变化规律 阶段 I ~ IV 逐步减小 R (降低进水亚硝氮浓度)条件下, 反应器氨氮、亚硝氮及硝氮变化情况如图 2 所示. 阶段 I 投加 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 为 200mg/L, R 为 3:4, 氨氮平均去除率为 81%, 亚硝氮去除率始终接近 100%, 硝氮平均产生量为 30.8mg/L. 阶段 II 保持 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度不变, 调整 R 为 1:2, 此时氨氮平均去除率为 74.2%, 亚硝氮依然没有剩余, 硝氮平均产生量为 17.7mg/L. 阶段 III 继续减小 R 为 1:4, 氨氮平均去除率为 45.2%, 出水检测到极少量亚硝氮, 硝氮平均产生量为 6.6mg/L. 阶段 IV 对反、应器停供亚硝氮, $R=0$, 连续运行了 45d, 停供亚硝氮后氨氮仍有去除, 平均去除率为 22.5%, 出水监测到少量的亚硝氮, 无硝氮产生. 从阶段 I 至阶段 IV, 随进水 NO_2^- 浓度的降低, 氨氮去除率由 81% 降至 22.5%. 因为较低浓度的亚硝氮不会对 Anammox 系统造成毒性抑制, 故氨氮去除率降低是由于电子受体的减少. Jetten 等^[15]指出厌氧氨氧化过程中产生少量的硝氮, 因此, 硝氮的产量在一定程度上反映了反应器内厌氧氨氧化反应的情况. 随进水 NO_2^- 浓度的降低, 硝氮产量从 30.8mg/L 最后降至 0, 说明厌氧氨氧化反应越来越弱.

2.1.2 Anammox 反应化学计量比及 pH 值变化规律 反应器中 $\Delta\text{NH}_4^+ - \text{N}/\Delta\text{NO}_2^- - \text{N}$, $\Delta\text{NH}_4^+ - \text{N}/\Delta\text{NO}_3^- - \text{N}$ 值对系统中厌氧氨氧化反应以及其它反应可能性的程度具有指导意义. 逐步降低进水亚硝氮浓度条件下, 如图 3(a)所示, 当 R 为 3:4 时, $\Delta\text{NO}_2^- - \text{N}/\Delta\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 平均比值为 0.96; 当 R 为 1:2 时, $\Delta\text{NO}_2^- - \text{N}/\Delta\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 平均比值为 0.76; 当 R 为 1:4 时, $\Delta\text{NO}_2^- - \text{N}/\Delta\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 平均比值为 0.58. 可见 $\Delta\text{NO}_2^- - \text{N}/\Delta\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 均小于厌氧氨氧化理论值 1.32, 说明氨氮实际去除量大于

厌氧氨氧化反应理论去除量, 即存在氨氮超量去除现象^[7,16-17]. 图 2(c)显示了硝态氮实际产生量与理论产生量之间的差异, 阶段 I 到阶段 III, 硝态氮实际产量平均值分别为 30.77, 17.7, 6.62mg/L, 而根据厌氧氨氧化反应理论比值衡算硝态氮理论产量平均值分别为 32.26, 20.7, 10.48mg/L, 可见硝态氮实际产生量均小于理论产生量. 此外, 由图 3(a)可知, 从阶段 I 到 III, $\Delta\text{NO}_3^- - \text{N}/\Delta\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 平均值分别为 0.18, 0.13, 0.07, 随 R 的降低而减小, 且均小于厌氧氨氧化理论值 0.26. 造成这种现象的原因除了氨氮超量去除, 还有另一种可能是厌氧氨氧化生成的硝态氮被部分消耗, 这与硝态氮实际产量总是小于理论产量相吻合, 说明反应器内存在某种消耗硝态氮的反应.

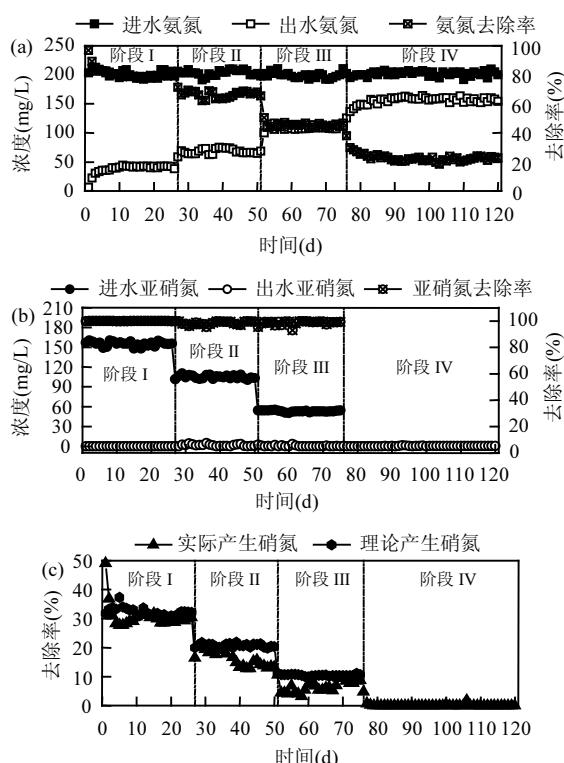


图 2 限 NO_2^- 厌氧氨氧化反应器运行状况
Fig.2 Performance of Anammox reactor with less nitrite

降低进水亚硝氮浓度过程中, 反应器进出水 pH 值变化如图 3(b)所示. 阶段 I 初始, 反应器出水 pH 值高于进水, 从阶段 I 末至阶段 IV, 出水 pH 值均低于进水. 单纯厌氧氨氧化反应是一个产碱的过程, 而反应器出水 pH 值低于进水, 可以判断氨氮超量去除途径是一个 pH 值降低的过程.

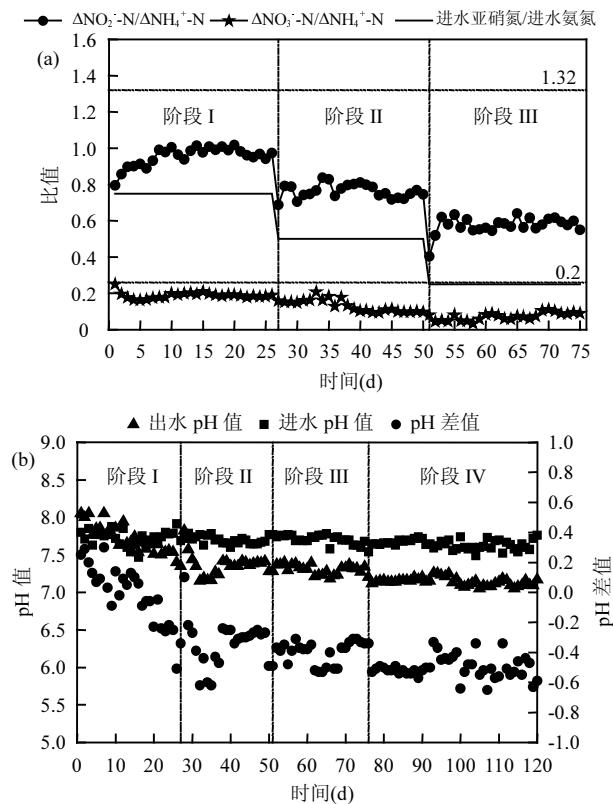


图 3 限 NO_2^- 厌氧氨氧化反应器 $\Delta\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$, $\Delta\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 和进出水 pH 值变化
Fig.3 $\Delta\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$, $\Delta\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ variation and pH value of Anammox reactor with less nitrite

2.2 氨氮超量去除的可能途径

有研究在逐渐提高进水氨氮浓度且体系中始终供给亚硝氮条件下,出现的氨氮超量去除,认为氨氮过量供给使得 Anammox 反应化学平衡向生成 N_2H_4 的方向移动,表现为 Anammox 体系对氨氮的额外吸纳现象^[11].而本研究中始终保持进水氨氮浓度一定、逐渐降低进水亚硝氮浓度直至停供亚硝氮,难以利用该化学平衡说来解释氨氮的超量去除现象.

无机条件下,AnAOB 除了利用最佳电子受体亚硝氮外,还会以 SO_4^{2-} 为电子受体进行反应^[18-19].但是本反应器长期投加 SO_4^{2-} ,并没有 SO_4^{2-} 去除现象(图 4),这与刘福鑫^[20]研究类似.因此,本研究中 NH_4^+ 的超量去除与 SO_4^{2-} 没有明显关系.Bi^[10]通过对 NH_4^+ 和 SO_4^{2-} 同时去除的转化途径研究认为 Anammox 过程不会以 SO_4^{2-} 为电子受体氧化氨,而是两者各自独立转化.

由于本反应器进水未采取除氧措施,故进水中向系统中引入少量的 DO(进水 DO 约 8mg/L),为了

验证进水 DO 对氨氮超量去除的影响,保持其它条件不变,从 85d 开始对反应器进水进行曝氮气除氧,使 DO 降至 2mg/L 以下,并将进水桶密封防止进水复氧,连续 10d 对进水除氧发现氨氮去除量并未发生明显变化,这与严锋^[21]研究结果相同.经计算 6mg/L 的 DO 仅能氧化 1.75mg/L 的 NH_4^+ -N,因此,进水中 DO 远不足以去除如此多的氨氮.故必然存在其他的电子受体参与氨氮的超量去除.

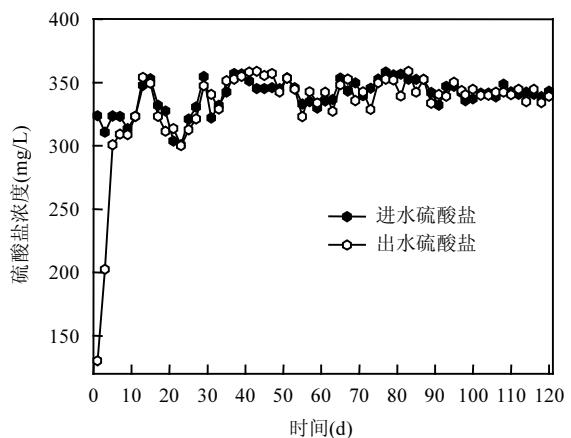


图 4 反应器进出水硫酸盐浓度
Fig.4 SO_4^{2-} concentrations in effluent and influent

2.3 氨氮超量去除的转化方式

2.3.1 Fe^{3+} 与氨氮超量去除关系 研究表明,亚硝氮缺乏时, Fe^{3+} 可以作为电子受体被 AnAOB 利用^[22-23],由于微生物自身细胞含有 0.02% 的铁元素^[24].从反应器取适量污泥测定总铁,发现污泥中的铁含量(0.43mg/gVSS)不足以引起氨氮的超量去除.并且研究发现 AnAOB 体内的铁对其氮代谢途径无显著影响^[25-26].由于配水中加入的微量元素 I 也含有铁盐,推测此类物质参与了氨氮的超量氧化.故设计批式实验验证配水中微量元素 I 中 Fe^{3+} 是否参与了氨氮的超量氧化.

研究认为^[27] Fe^{3+} 投加量为 0.08mmol/L 时,反应器氮去除性能最好,而本研究微量元素 I 中 Fe^{3+} 浓度为 0.02mmol/L.因此设置对照实验,确定 B 组加 4.48mL/L 微量元素 I ,A 组不加微量元素 I ,两组实验主要基质为氨氮.由图 5 可知,前 24h,A 组氨氮从 44.4mg/L 降至 37.7mg/L,B 组从 45.2mg/L 降至 34.8mg/L,在 12h 监测到 A、B 两组亚硝氮积累量分别为 0.02,0.05mg/L,硝氮积累量分别为 2.5, 1.6mg/L.24h 至实验结束,A、B 组氨氮含量均未发生下降,实

验结束时测得 A、B 组氨氮浓度分别为 35.4 和 34.6mg/L。虽然 B 组下降较快,但与 A 组相比,实验结束时 B 组没有去除更多的氨氮,说明本研究中氨氮的超量去除与铁没有明显相关关系。研究报道^[28-29]在厌氧环境下 Fe^{3+} 还原氨氧化的现象,而本研究未发现 Fe^{3+} 参与氨氮的氧化现象,可能是由于实验条件的不同,有待于进一步研究。

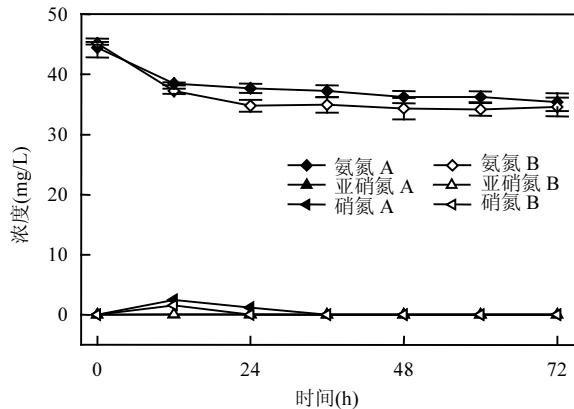


图 5 Fe^{3+} 与氨氮超量去除关系

Fig.5 The relationship between Fe^{3+} and excess removal of ammonium

2.3.2 内碳源反硝化以及与氨氮超量去除之间的关系 对于反应器中可能存在消耗硝酸盐的反应的问题,设计批式实验探究反应器中是否存在内碳源反硝化。如图 6(a)所示,经 48h 反应,硝酸盐浓度从 39.6mg/L 降至 34.3mg/L,同时检测到 2.8mg/L 亚硝氮,pH 值从 7.51 升至 7.81。

早有 Graaf^[30]发现硝酸盐作为间接电子受体与氨氮同步去除。由图 6(b)可知,氨氮和硝氮均匀下降,氨氮由 71.25mg/L 降至 38.77mg/L,硝氮由 54.17mg/L 降至 11.13mg/L,整个过程未监测到亚硝氮,实验结束体系 pH 值为 8.2,高于初始 pH 值。

Waki 等^[31]认为 AnAOB 不能直接以 NH_4^+-N 和 NO_3^--N 作为电子供受体,要使其顺利进行,需要在其他电子供体存在的条件下将 NO_3^--N 还原为 NO_2^--N 后,进行缓慢的 Anammox 反应。该批式实验中氨氮与硝酸盐同步去除,这是由于 Anammox 反应器内存在少量的反硝化菌^[32],无机条件下,异养反硝化菌会利用有限的内碳源将 Anammox 过程产生的硝酸盐部分还原为亚硝酸盐^[33],从而与氨氮发生 Anammox 反应。亚硝酸盐是 Anammox 最适合的电子受体,能

够与氨氮在短暂的时间内完全反应^[34],这为系统中未监测到亚硝氮提供了依据。由于缺乏碳源,硝酸盐还原为亚硝酸盐过程缓慢,内碳源反硝化过程为氨氮的超量去除提供了一种理论依据。

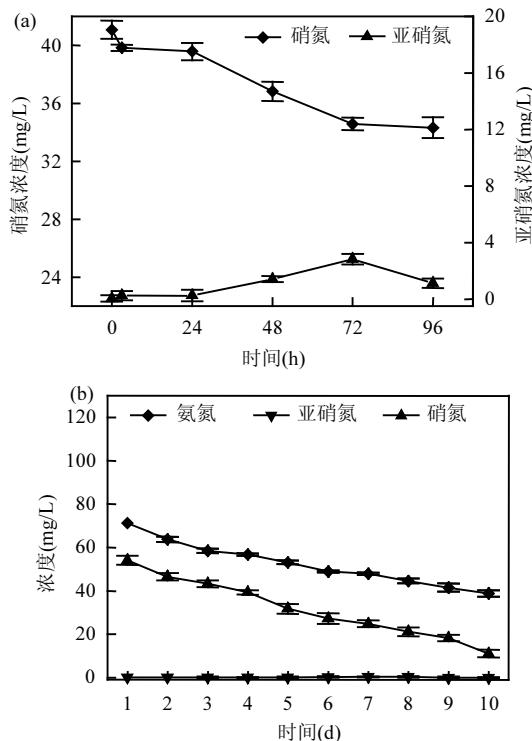


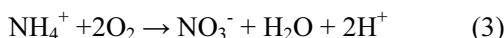
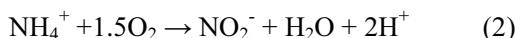
图 6 内碳源反硝化与氨氮超量去除之间的关系

Fig.6 The relationship between endogenous denitrification and excess removal of ammonium

2.3.3 氨氮超量去除的限制性因素 为了进一步探究氨氮超量去除的原因,只投加氨氮进行批式实验。如图 7 所示,初始氨氮浓度为 48.21mg/L,前 24h 氨氮降低了 13.62mg/L,有少量的亚硝氮和硝氮产生,24~72h 氨氮浓度稳定在 35.17mg/L 左右,未监测到亚硝氮和硝氮。72h 时向系统注入约 10mL 空气,96h 氨氮浓度为 20.24mg/L,同时检测到 4.03mg/L 的亚硝氮和 2.24mg/L 的硝氮,pH 值从 7.6 降至 7.29。

前 24h,氨氮浓度下降,紧接着又保持不变,说明反应体系中某种物质含量有限。而向系统注入空气后发现氨氮浓度迅速降低,足以说明氨氮的去除与 DO 有关,认为 Anammox 体系中存在 AOB 参与了氨氮的超量去除。将 DO 和氮去除之间关系衡算,系统总氮损失量为 0.61mmol/L,假定总氮都通过厌氧氨氧化方式去除,通过式(1)计算得所需的氨氮、亚硝氮及通过该步骤产生的硝氮含量分别为 0.3,0.39,

0.08mmol/L;假定 Anammox 所需的亚硝氮和反应体系剩余的亚硝氮均由亚硝化所得,通过式(2)计算出该亚硝化过程所需氧气的量为 1.02mmol/L;根据反应体系共产生硝氮的量,得知 0.083mmol/L 的硝氮由硝化过程产生,通过式(3)可得该过程所需氧气量为 0.17mmol/L.故实验共需氧气量为 1.19mmol/L,通过血清瓶中剩余溶液体积(以 80mL 计)换算得 3.04mg 的氧气,再根据氧气质量分数及实验温度下空气密度(25 °C. 1.184mg/mL)计算出实验所需空气质量为 11.15mL,接近于注入的 10mL 空气.因此,该批式实验中氨氮是通过 AOB 和 AnAOB 共同去除的.



前文已经证实反应器进水中 DO 的量不足以去除反应器中氨氮超量去除的量,但批式实验说明氨氮的去除必与氧气有关,故存在其它 DO 渗入反应器的途径.UASB 回流过程会把部分带有 DO 的出水重新带到反应器底部,同时回流过程会造成三相分离器空间变化引起内外气压差,使得外界空气更容易进入反应器^[35].

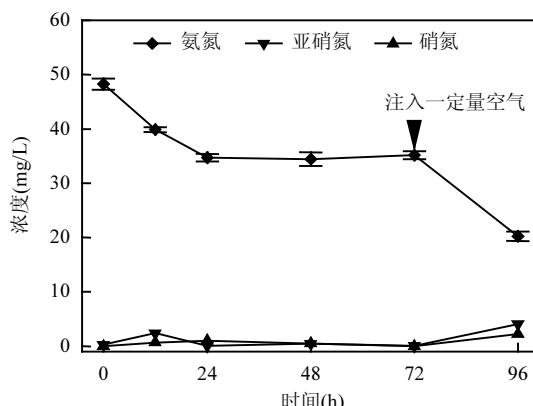


图 7 溶解氧与氨氮超量去除的关系

Fig.7 The relationship between dissolved oxygen and excess removal of ammonium

除了以上原因,还有报道称^[36-37]微生物代谢过程能够产生活性氧类物质,形成超氧自由基(O_2^\cdot)和羟基自由基(OH^\cdot),在缺乏亚硝氮的 Anammox 反应器中,微生物抑制或腐烂过程同样释放出 OH^\cdot 等氧化剂,这些自由基也是氨氮超量氧化的潜在电子受体来源^[38].甚至有研究^[20]认为亚硝氮缺乏时, HCO_3^- 作为电子受体

氧化了氨氮, NH_4^+ 和 HCO_3^- 之间发生的是生物反应.但这些报道只是理论推测,还需进一步研究.

2.4 污泥微生物菌群解析

反应器中氮素的脱除是微生物作用的结果,通过高通量测序进行微生物群落结构的解析能够更进一步对氨氮去除的代谢途径进行预测分析.分别在 R 为 3:4 运行末期和停供亚硝氮后运行 45d 从反应器取 2 个污泥样品,分别记为 A2、A4,进行高通量测序.如表 2 所示,两个样本的 Coverage 指数均为 100%,说明测序结果足够代表样本中的微生物群落组成.ACE 和 Chao 指数^[39]均有所增大,说明从进水供少量亚硝氮阶段到停供亚硝氮阶段,物种总数在增多.Simpson 指数越大,说明优势菌群占总体生物菌群比例越大^[40];Shannon^[41-42]指数越高,群落复杂程度越大.停供亚硝氮后微生物多样性在增加,说明停供亚硝氮后氨氮的去除需要更多类型的微生物共同完成.

表 2 污泥样品 Alpha 多样性
Table 2 Alpha diversity of the two samples

样品	序列数	OUT 数	Coverage (%)	ACE	Chao	Shannon	Simpson
A2	68103	496	1	533.92	533.47	2.22	0.28
A4	72793	537	1	570.37	573.65	2.7	0.22

利用高通量测序技术分别考察了反应器 R 为 3:4 和停供亚硝氮两个阶段污泥在属水平上的微生物菌群结构,如图 8 所示,在限亚硝氮和停供亚硝氮 2 个阶段微生物群落中,厌氧氨氧化菌、好氧氨氧化菌、反硝化菌和亚硝酸盐氧化菌同时存在. Anammox 体系中停供亚硝氮前后亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)相对丰度从 3.29% 增长到 7.3%,虽然 Anammox 体系为厌氧环境,但 *Nitrosomonas* 被认为是需氧氧化铵^[43],说明反应器内部确实存在外界氧气渗入的可能,这与 2.3.3 讨论相吻合.检测到的反硝化菌属主要为 *Ignavibacterium*,其相对丰度由 0.54% 增加到 3.14%, *Ignavibacterium* 能够利用细菌衰老和死亡的细胞产物进行厌氧发酵和反硝化作用^[44].

停供亚硝氮后 *Candidatus_Brocadiaceae* 属有所增长, 相对丰度由 7.67% 增长到 10.83%, 而 *Candidatus_Jettenia* 属无明显变化,这是由于氨氧化菌将部分氨氮氧化为亚硝氮,反硝化菌将部分硝酸盐还原为亚硝氮,为 AnAOB 供应了极少量的亚硝氮,

说明 *Candidatus_Brocadiaceae* 能够适应极低亚硝氮环境并生长繁殖, *Candidatus_Jettenia* 也能够在此环境中生存。反应器从 R 为 3:4 到停供亚硝氮阶段, *Armatimonadetes_gp5* 相对丰度由 20.7% 增长到 24.6%, Mi 等^[45]认为 *Armatimonadetes_gp5* 是一种适合在低氨氮浓度下生存的新型厌氧氨氧化菌。两个污泥样品中还检测到极少量的亚硝酸盐氧化菌属 (*Nitrospira*), 约占总细菌的 0.1%, *Nitrospira* 未增长说明不适合在该环境中生长。

不管是反应器 R 为 3:4 还是停供亚硝氮, 超量去除的这部分氨氮均由氨氧化菌、厌氧氨氧化菌和反硝化菌共同完成。主要有两种途径: 一是在微量 DO 的作用下, 氨氧化菌将部分氨氮氧化为亚硝氮, AnAOB 再将该部分亚硝氮与剩余的氨氮去除; 二是 Anammox 产生的硝氮有一部分被反硝化菌经内碳源反硝化作用还原为亚硝氮, 该部分亚硝氮与体系中其余的氨氮也通过 Anammox 作用去除。

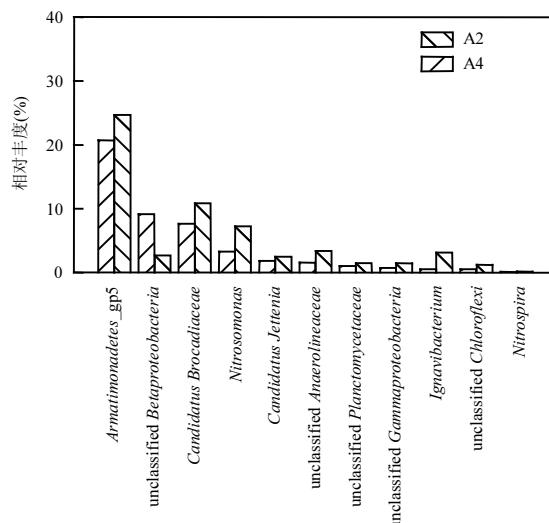


图 8 $\text{NO}_2^- \text{-N}/\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为 3:4 和停供亚硝氮 2 阶段主要脱氮细菌(属)组成变化

Fig.8 Microbial community for nitrogen removal in the reactor $\text{NO}_2^- \text{-N}/\text{NH}_4^+ \text{-N}$ is 3:4 and after no feeding of nitrite

2.5 反应器中氨氮超量去除量变化规律

由图 9 可知, 从阶段 I 到阶段 IV, 当 R 为 3:4 时, 超量去除氨氮量均值为 45.5mg/L; 当 R 为 1:2 时, 均值为 57.2mg/L; 而当 R 为 1:4 时, 其均值为 52mg/L; 当 R 为 0 时, 均值为 45.5mg/L。可见, 当 R 从 3:4 减小为 1:2 时, 超量去除氨氮的量有所增加; 而当 R 从 1:2 降至 0 时, 超量去除氨氮的量缓慢减少; 当 R 为 1:2

时, 超量去除氨氮的量最大。

由前文可知, 氨氧化菌在氨氮超量去除中起着关键的作用。阶段 I (R 为 3:4) 进水亚硝氮浓度为 150mg/L, 污泥层的亚硝酸盐浓度较高可能会对氨氧化菌活性造成抑制, 氨氧化速率较低, 使得氨氮超量去除量较低。而 R 小于 1:2 时, 反应器中厌氧氨氧化菌可利用的基质已相对较少, 反应器中氮的去除主要由氨氧化协同厌氧氨氧化菌完成, 由于 Anammox 过程产生的碱度已相对较少, 体系中 pH 值下降较多 (图 3b)。并且, 通过数据核算了各阶段稳定后硝酸盐实际生成量与理论生成量的差值 (图 2c), 在 R 等于 3:4 (17~27d 稳定) 时为 1mg/L, 在 R 等于 1:2 时 (39~50d 稳定) 为 6.7mg/L, 在 R 等于 1:4 时 (65~75d 稳定) 为 2.7mg/L, 而在不投加亚硝酸盐后, 以亚硝酸盐计的硝酸盐生成量降低为 0。可推测反硝化菌在各阶段所起作用的程度大小, 在 R 等于 1:2 时硝酸盐实际生成量与理论生成量的差值最大。所以本文在 R 等于 1:2 时氨氮超量去除量达最大。

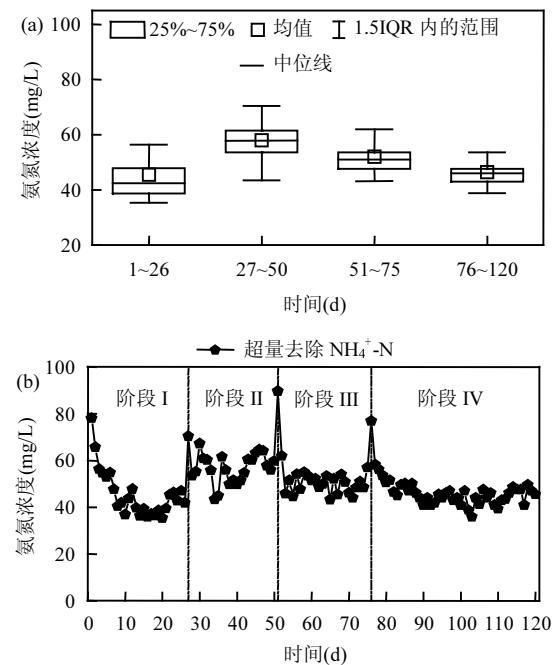


图 9 限 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 厌氧氨氧化反应器氨氮超量去除量

Fig.9 Excess removal of ammonium in the Anammox reactor with less nitrite

3 结论

3.1 当 Anammox 体系中进水 $R(\text{NO}_2^- \text{-N}/\text{NH}_4^+ \text{-N})$ 由理论比值 1.32 减小为 1:2 时, 氨氮超量去除量增加;

而当 R 由 1:2 减小至 1:4 时, 氨氮超量去除量保持稳定。当 R 为 1:2 时, 氨氮超量去除量最大, 为 57.2 mg/L。批式实验证明溶解氧是氨氮超量去除量的限制性因素。

3.2 当 Anammox 体系长期停供亚硝氮时, 氨氮依然得以脱除且 SO_4^{2-} 并未去除, 无证据表明本 Anammox 体系能够利用硫酸盐为电子受体氧化氨氮。此外, 停供亚硝氮后 Anammox 体系中微生物群落多样性有所增加, AnAOB、氨氧化菌 (*Nitrosomonas*) 和反硝化菌 (*Ignavibacterium*) 相对丰度均增加, 氨氧化菌在微量 DO 作用下将部分氨氮氧化为亚硝氮, AnAOB 将与之协同实现氮的去除。*Candidatus Jettenia* 属和 *Candidatus Brocadia* 属都能够在亚硝氮缺失的条件下进行氮的脱除。

3.3 本 Anammox 体系中氨氮超量去除的途径包括好氧氨氧化、Anammox 与部分异养反硝化。参与上述生化反应的微生物有氨氧化菌、厌氧氨氧化菌和反硝化菌。

参考文献:

- [1] Jetten M S M, Cirpus I, Kartal B, et al. 1994–2004: 10 Years of research on the anaerobic oxidation of ammonium [J]. Biochemical Society Transactions, 2005, 33(1):119–123.
- [2] Joss A, Salzgeber D, Eugster J, et al. Full-Scale nitrogen removal from digester liquid with partial nitritation and Anammox in one SBR [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(14):5301–5306.
- [3] Star W R L V D, Abma W R, Blommers D, et al. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale Anammox reactor in Rotterdam [J]. Water Research, 2007, 41(18): 4149–4163.
- [4] Strous M, Heijnen J J, Kuenen J G, et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(5):589–596.
- [5] Yu J J, Jin R C. The Anammox reactor under transient-state conditions: Process stability with fluctuations of the nitrogen concentration, inflow rate, pH and sodium chloride addition [J]. Bioresource Technology, 2012, 119:166–173.
- [6] Yang J, Zhang L, Hira D, et al. High-rate nitrogen removal by the Anammox process at ambient temperature [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2):672–676.
- [7] 刘倩, 郭文龙, 康银花, 等. 进水基质对厌氧氨氧化反应器稳定性性能的影响 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(23):172–176.
Liu Q, Guo W L, Kang Y H, et al. Performance of ASBR Anammox reactor by ratio change of influent concentration of NO_2^- -N/ NH_4^+ -N [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(23):172–176.
- [8] Furukawa K, Rouse J D, Yoshida N, et al. Mass cultivation of anaerobic ammonium-oxidizing sludge using a novel nonwoven biomass carrier [J]. Journal of Chemical Engineering of Japan, 2004, 36(10):1163–1169.
- [9] Jin R C, Xing B S, Yu J J, et al. The importance of the substrate ratio in the operation of the Anammox process in upflow biofilter [J]. Ecological Engineering, 2013, 53:130–137.
- [10] Bi Z, Wan Yan D Q, Li X, et al. Biological conversion pathways of sulfate reduction ammonium oxidation in anammox consortia [J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2020, 14(3):1–11.
- [11] 唐崇俭, 郑平. 厌氧氨氧化膨胀污泥床反应器的化学计量学特性 [J]. 中国环境科学, 2010, 30(11):1446–1452.
Tang C J, Zheng P. Stoichiometric characteristics of anammox expanded sludge bed reactor [J]. China Environmental Science, 2010, 30(11):1446–1452.
- [12] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法(第四版) [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002:258–276.
State Environmental Protection Administration. Water and waste water monitoring and analysis method (Fourth Edition) [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002:258–276.
- [13] 陈重军, 张海芹, 汪瑶琪, 等. 基于高通量测序的 ABR 厌氧氨氧化反应器各隔室细菌群落特征分析 [J]. 环境科学, 2016, 37(7):2652–2658.
Chen C J, Zhang H Q, Wang Y Q, et al. Characteristics of microbial community in each compartment of ABR Anammox reactor based on high-throughput sequencing [J]. Environmental Science, 2016, 37(7): 2652–2658.
- [14] 闫媛, 黎力, 王亚宜, 等. 采用高通量测序分析全程自养脱氮(CANON)系统不同脱氮效能下的微生物群落结构 [J]. 北京工业大学学报, 2015, 41(10):1485–1492.
Yan Y, Li L, Wang Y Y, et al. Microbial community characteristics of a completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) system based on high-throughput sequencing technology [J]. Journal of Beijing University of Technology, 2015, 41(10):1485–1492.
- [15] Jetten M S M, Strous M, Pas-Schoonen K T v d, et al. The anaerobic oxidation of ammonium [J]. FEMS Microbiology Reviews, 1998, 22(5):421–437.
- [16] 严锋, 袁林江, 王洋, 等. 亚硝氮停供及恢复供给对 Anammox 反应器中氮去除的影响 [J]. 环境科学学报, 2017, 37(12):4602–4609.
Yan F, Yuan L, Wang Y, et al. Effect of stop feeding and resupplying of nitrite on nitrogen removal in an Anammox-UASB [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(12):4602–4609.
- [17] Ali M, Chai L Y, Tang C J, et al. The increasing interest of Anammox research in China: Bacteria, process development, and application [J]. BioMed Research International, 2013, 2013(6):134914.
- [18] Liu S, Yang F, 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.
- [19] 秦永丽, 蒋永荣, 刘成良, 等. 硫酸盐型厌氧氨氧化反应器的启动特性 [J]. 环境工程学报, 2015, 9(12):5849–5854.
Qin Y L, Jiang Y R, Liu C L, et al. Starting characteristics of sulfate-dependent anaerobic ammonium oxidation reactor [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2015, 9(12):5849–5854.
- [20] 刘福鑫. 厌氧氨氧化微生物利用不同电子受体的可行性研究 [D]. 苏州: 苏州科技大学, 2014.

- Liu F X. The feasibility study of different electron acceptors by Anammox microorganisms [D]. Suzhou: Suzhou University of Science and Technology, 2014.
- [21] 严 锋.上升流速及基质供给对 Anammox 反应器脱氮的影响研究 [D]. 西安:西安建筑科技大学, 2017.
- Yan F. Effect of upward-flow velocity and substrate supplying in an Anammox-UASB [D]. Xi'an: Xi'an University of Architecture and Technology, 2017.
- [22] Yang W H, Weber K A, Silver W L. Nitrogen loss from soil through anaerobic ammonium oxidation coupled to iron reduction [J]. *Nature Geoscience*, 2012,5(8):538–541.
- [23] Waki M, Yasuda T, Fukumoto Y, et al. Effect of electron donors on anammox coupling with nitrate reduction for removing nitrogen from nitrate and ammonium [J]. *Bioresource Technology*, 2013,130:592–598.
- [24] Andrews S S. Iron storage in bacteria [J]. *Advances in Microbial Physiology*, 1998,40(40):281–351.
- [25] 赵 然. Anammox 细菌铁还原代谢及群体感应现象的研究 [D]. 大连:大连理工大学, 2016.
- Zhao R. Researches of Anammox iron reduction and quorum sensing phenomena [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2016.
- [26] 雷 欣, 闫 荣, 慕玉洁, 等. 铁元素对厌氧氨氧化菌脱氮效能的影响 [J/OL]. 化工进展:1–11[2020–12–29]. <https://doi.org/10.16085/j.issn.1000-6613.2020-1178>.
- Lei X, Yan R, Mu Y J, et al. Effect of iron on nitrogen removal efficiency of anaerobic ammonium oxidation bacteria [J/OL]. *Chemical Industry and Engineering Progress*:1–11[2020–12–29]. <https://doi.org/10.16085/j.issn.1000-6613.2020-1178>.
- [27] 彭 厦. 铁、锰离子对 SBBR 厌氧氨氧化效能的影响研究 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2012.
- Peng X. Impact of ferrous iron and manganese ion on the performance of SBBR Anammox reactor [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2012.
- [28] Clément J-C, Shrestha J, Ehrenfeld J G, et al. Ammonium oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron under anaerobic conditions in wetland soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005,37(12):2323–2328.
- [29] Shrestha J, Rich J J, Ehrenfeld J G, et al. Oxidation of ammonium to nitrite under iron-reducing conditions in wetland soils: Laboratory, field demonstrations, and push-pull rate determination [J]. *Soil Science*, 2009,174(3):156–164.
- [30] van de Graaf A A V, Robertson L A. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor[J]. *Microbiology*, 1996,142(8):2187–2196.
- [31] Waki M, Yasuda T, Yokoyama H, et al. Nitrogen removal by co-occurring methane oxidation, denitrification, aerobic ammonium oxidation, and anammox [J]. 2009,84(5):977–985.
- [32] 陈婷婷, 郑 平, 胡宝兰. 厌氧氨氧化菌的物种多样性与生态分布 [J]. 应用生态学报, 2009,20(5):1229–1235.
- Chen T T, Zhen P, Hu B L. Species diversity and ecological distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria [J]. *The journal of applied ecology*, 2009,20(5):1229–1235.
- [33] 李泽兵, 刘 帅, 张 鹤, 等. 厌氧氨氧化污泥异养反硝化的影响因素分析 [J]. 环境工程, 2019,37(12):12–16,21.
- Li ZB, Liu S, Zhang H, et al. Research on influencing factors on heterotrophic denitrification of Anammox sludge [J]. *Environmental Engineering*, 2019,37(12):12–16,21.
- [34] 李 祥, 林 兴, 王 凡, 等. 厌氧氨氧化污泥中氨氧化的潜在电子受体 [J]. 环境科学, 2017,38(7):2941–2946.
- Li X, Lin X, Wang F, et al. Ammonia oxidation with potential electron acceptor in Anammox sludge [J]. *Environmental Science*, 2017,38(7):2941–2946.
- [35] 完颜德卿. Anammox 培养物对氨与硫酸盐同步转化机制的研究 [D]. 苏州:苏州科技大学, 2017.
- Wan Yan D Q. Study on the mechanism of simultaneous conversion of Anammox for ammonia and sulfate [D]. Suzhou: Suzhou University of Science and Technology, 2017.
- [36] Bodelier P L E, Libocheant J A, Blom C W P M, et al. Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996,62(11):4100–4107.
- [37] Dwyer D J, Camacho D M, Kohanski M A, et al. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis [J]. *Molecular Cell*, 2012,46(5):561–572.
- [38] Zhang Z, Liu S. Insight into the overconsumption of ammonium by anammox consortia under anaerobic conditions [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015,117(6):1830–1838.
- [39] Ma J, Wang Z, Yang Y, et al. Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454high-throughput pyrosequencing [J]. *Water Research*, 2013,47(2):859–869.
- [40] Simpson E H. Measurement of diversity [J]. *Nature*, 1949,163(4148):688–688.
- [41] Shannon C E. A mathematical theory of communication [J]. *Bell System Technical Journal*, 1949,27(4):379–423.
- [42] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Research*, 2003,13(11):2498–2504.
- [43] Zart D, Bock E. High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO₂ or NO [J]. *Archives of Microbiology*, 1998,169(4):282–286.
- [44] Pereira A D, Cabezas A, Et al. Microbial communities in anammox reactors: a review [J]. *Environmental Technology Reviews*, 2017,6(1):74–93.
- [45] Mi W, Zhao J, Ding X, et al. Treatment performance, nitrous oxide production and microbial community under low-ammonium wastewater in a CANON process [J]. *Water Science and Technology*, 2017,76(11/12):3468–3477.

作者简介: 牛晚霞(1994-),女,甘肃天水人,西安建筑科技大学硕士研究生,主要从事生活污水脱氮研究,发表论文 2 篇。