

# 中试 SBBR 内厌氧氨氧化的快速启动及微生物特性

刘福长<sup>1</sup>, 张健<sup>2</sup>, 陈益明<sup>2</sup>, 李俊<sup>1</sup>, 张新颖<sup>1</sup>

(1. 福州大学 环境与资源学院, 福建 福州 350108; 2. 福建省环境科学研究院, 福建 福州 350013)

**摘要:** 采用中试规模的序批式生物膜反应器(SBBR),在温度为 25~32℃、pH 值=7.6~8.3、投加少量厌氧氨氧化(Anammox)菌的条件下,经过 120 d 的培养,成功启动 Anammox 工艺。反应器稳定运行期间,对  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  的去除率分别为 81.45% 和 99.00%,平均总氮去除负荷达 0.41 kgN/( $\text{m}^3 \cdot \text{d}$ )。 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量与  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量之比为 1 : 1.39 : 0.25,与理论值接近。反应器中以 Anammox 反应为主导作用并伴有微弱的亚硝酸盐反硝化,Anammox 速率达 0.103 kgN/(kgVSS · d)。填料上生物膜的 Anammox 菌联氨氧化酶活性明显高于反应器中的悬浮污泥,表明填料对 Anammox 菌具有较好的富集效果。经过驯化培养,SBBR 内污泥群落结构及丰度发生明显变化,稳定运行阶段 Anammox 菌属含量达 23.57%,成为反应器中的优势菌种。

**关键词:** 序批式生物膜反应器; 厌氧氨氧化; 生物膜; 联氨氧化酶; 高通量测序

**中图分类号:** TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2019)01-0006-08

## Rapid Start-up of Anammox in a Pilot-scale Sequencing Batch Biofilm Reactor and Its Microbial Community Characteristics

LIU Fu-chang<sup>1</sup>, ZHANG Jian<sup>2</sup>, CHEN Yi-ming<sup>2</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, ZHANG Xin-ying<sup>1</sup>

(1. College of Environment and Resources, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China; 2. Fujian Provincial Academy of Environmental Science, Fuzhou 350013, China)

**Abstract:** A pilot-scale sequencing batch biofilm reactor (SBBR) was applied to start up anaerobic ammonium oxidation (Anammox) at temperature of 25–32℃, pH of 7.6–8.3, and with a small amount of Anammox bacteria addition. The Anammox reactor was successfully started up after 120 days. The removal loading rate of TN reached to 0.41 kgN/( $\text{m}^3 \cdot \text{d}$ ), with the  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  removal rate of 81.45% and  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  removal rate of 99.00%. The ratio of ammonium removal, nitrite removal and nitrate production was 1 : 1.39 : 0.25. The Anammox dominated in the SBBR with a reaction rate of 0.103 kgN/(kgVSS · d), and weak nitrite denitrification also occurred. The activity of hydrazine-oxidizing enzyme in biofilm was significantly higher than that of suspended sludge in the reactor, which indicated that the filler had a good enrichment effect of Anammox bacteria. After acclimation, the microbial community structure and abundance of the inoculated sludge were significantly changed, and the content of Anammox bacteria reached 23.57% in the stable operation stage, which became the dominant species in SBBR.

基金项目: 福建省科技计划项目(2015R1004-3); 福建省科技计划项目(2017R1004-2); 福建省环保厅科技计划项目(2015R024)

通信作者: 张新颖 E-mail:xyz\_8471@163.com

**Key words:** sequencing batch biofilm reactor; anaerobic ammonium oxidation; biofilm; hydrazine-oxidizing enzyme; high-throughput sequencing

与传统硝化反硝化脱氮工艺相比,厌氧氨氧化 (Anammox) 工艺具有能耗低、无需外加碳源、产泥量少等优点。然而在实验室规模的反应器中启动 Anammox 往往需要几个月甚至一年的时间<sup>[1]</sup>,在实际工程中启动则要 3 年左右<sup>[2]</sup>。Anammox 菌生长速度慢、倍增时间长(10~12 d)<sup>[3]</sup>,对温度、pH 值极为敏感,且污泥沉降性能差、污泥流失严重,以上原因使得 Anammox 工艺启动缓慢,成为该工艺大规模应用的主要限制性因素。荷兰 Rotterdam 的世界上第一座 70 m<sup>3</sup> 的 Anammox 反应器启动时间长达 3.5 年<sup>[4]</sup>;奥地利 Strass 污水厂的反应装置由小试、中试(2.4 m<sup>3</sup>)逐步发展到工程应用耗时近 3 年<sup>[5]</sup>;郑平在环境温度条件下接种混合污泥,经过 255 d 才成功启动中试规模(2.5 m<sup>3</sup>)的 Anammox 反应器<sup>[6]</sup>。

Anammox 反应器的启动实质上是 Anammox 菌大量增殖的过程,由于 Anammox 菌非常小(直径不到 1 μm),极易流失,使得很难使用普通生物反应器进行培养<sup>[7]</sup>。在启动阶段获得较高的生物保留量非常关键,因为即使是极少的生物量流失也会导致启动时间的延长<sup>[8]</sup>。序批式生物膜反应器(SBBR)最早由 Wilderer 提出,实质上是生物膜法的间歇操作模式,兼具生物膜反应器和 SBR 反应器的优点,结构上更加适合培养世代周期较长、细胞产率低的 Anammox 菌<sup>[9]</sup>。间歇式的进水可以提高系统的抗冲击负荷能力,同时生物膜能保证世代周期较长的 Anammox 菌富集,利于 Anammox 反应<sup>[10]</sup>。因此,运用 SBBR 启动 Anammox 工艺越来越受到学者们的青睐,但相关研究仍主要集中于实验室小试规模,采用中试规模的 SBBR 反应器启动 Anammox 工艺的研究鲜见报道。

笔者采用中试 SBBR 反应器实现 Anammox 工艺的快速启动,对稳定运行阶段的厌氧氨氧化污泥进行脱氮活性分析,探究了 Anammox 工艺的脱氮路径及脱氮速率。对 SBBR 反应器中悬浮污泥及填料上生物膜进行联氨氧化酶(HZO)活性测试,并通过高通量测序分析,明确了厌氧氨氧化工艺驯化过程中菌群结构以及丰度的变化,旨在为厌氧氨氧化工艺的工程应用提供技术指导和理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验装置及运行条件

中试装置采用圆柱形 SBBR 反应器(见图 1),其由不锈钢制成,内径为 1 000 mm,高为 1 230 mm,有效容积为 1.0 m<sup>3</sup>。辫带式填料被固定在长方形不锈钢框架上,每根填料直径为 4 cm、高为 120 cm,每个不锈钢框架固定 5 根填料,共 20 个不锈钢框架等间距布置在反应器四周,呈六面体状。在反应器壁的垂直方向设置一排取样口(取样、排水),每个运行周期由进水、曝气、沉淀和排水 4 个工序组成。采用机械搅拌,搅拌器转速约为 150 r/min。反应器顶部用黑色遮光布遮住以达到避光效果,反应在环境温度下进行,整个启动阶段温度范围为 25~32℃,HRT 为 24 h(包括进水 1 h、反应 18 h、沉淀 4 h、排水 1 h),充水比为 1:2,进水 pH 值为 7.6~8.3。

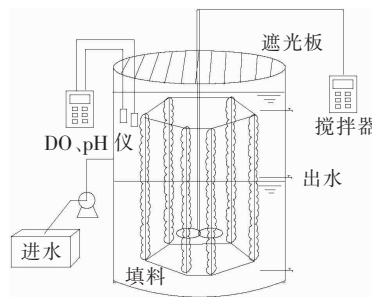


图 1 中试 SBBR 反应器示意

Fig. 1 Schematic diagram of pilot-scale SBBR

### 1.2 接种污泥及试验用水

接种污泥取自福州某城镇生活污水处理厂污泥贮存池,接种后反应器中 MLSS 为 9.76 g/L,MLVSS 为 3.52 g/L,MLVSS/MLSS 为 0.36。并于反应器启动第 35 天,一次性投加课题组小试培养的 Anammox 污泥 1 L(MLSS 为 9.34 g/L),总氮容积负荷去除速率(NRR)为 0.40 kgN/(m<sup>3</sup>·d)。试验采用人工配水,各运行工况的进水水质见表 1。

表 1 反应器各运行工况的进水水质

Tab. 1 Operation conditions of the reactor at different phases

项 目	启动初期 (1~48 d)	活性提高期 (49~67 d)	负荷提高期 (68~88 d)	稳定运行期 (89~120 d)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N	40~60	60~80	90~180	180
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N	50~70	70~100	130~200	200
NaHCO <sub>3</sub>	500	500	800	1 000

模拟废水其他组分的配制采用 Strous 等<sup>[11]</sup>的方法并加以改进,  $\text{NaHCO}_3$  按需配制,  $\text{MgSO}_4$  为 200 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为 10 mg/L,  $\text{CaCl}_2$  为 5 mg/L, 微量元素 I、II 均为 10 mL/L。其中, 微量元素 I: EDTA 和  $\text{FeSO}_4$  均为 5.0 g/L; 微量元素 II: EDTA 为 5.0 g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  为 0.014 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为 0.43 g/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  为 0.24 g/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  为 0.99 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  为 0.25 g/L,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  为 0.22 g/L,  $\text{NaSeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  为 0.21 g/L,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  为 0.19 g/L,  $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  为 0.05 g/L。pH 值采用工业盐酸调控。所用药品均为工业级。

### 1.3 分析项目及方法

#### 1.3.1 常规指标分析测试方法

$\text{NH}_4^+ - \text{N}$ : 纳氏试剂分光光度法;  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ : 麝香草酚分光光度法;  $\text{NO}_2^- - \text{N}$ :  $\text{N} - (1 - \text{萘基}) - \text{乙二胺}$  分光光度法; MLSS、MLVSS: 重量法; pH 值和温度: WTW pH330i 分析仪。

#### 1.3.2 表观形貌观测

SBBR 内填料、污泥混合液和填料表面生物膜形貌采用数码照相机和环境扫描电镜 (ESEM) 进行观测。

#### 1.3.3 脱氮路径及脱氮速率测试

对反应器中污泥进行批次活性测定, 以验证 Anammox 工艺的脱氮路径及脱氮活性。活性测定参照郑照明等<sup>[12]</sup>的方法。测定脱氮活性时所用配水的组分见表 2。

表 2 测定脱氮活性时的主要配水组分

Tab. 2 Synthetic wastewater used for measuring nitrogen removal performance  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

项 目	厌氧氨氧化	亚硝态氮反硝化	硝态氮反硝化
$\text{NH}_4^+ - \text{N}$	50	0	0
$\text{NO}_2^- - \text{N}$	65	50	0
$\text{NO}_3^- - \text{N}$	0	0	30
$\text{NaHCO}_3$	200	200	200
乙酸钠	0	90	90

#### 1.3.4 粗酶提取及 HZO 活性测定

在稳定运行阶段, 取反应器内悬浮污泥和距水面不同深度处 (上部: 0 ~ 10 cm, 中部: 50 ~ 60 cm, 下部: 110 ~ 120 cm) 填料上生物膜样品进行粗酶提取及 HZO 活性测定<sup>[13]</sup>。

#### 1.3.5 Miseq 高通量测序分析方法

分别于反应器接种污泥后第 1 天及 Anammox 稳定运行第 110 天采集样品, 采集样品时保证反应

器中污泥处于完全混匀状态。样品总 DNA 的提取采用 FastPrep DNA 提取试剂盒。利用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒对基因组 DNA 进行精确定量, 以确定 PCR 反应需加入的 DNA 量<sup>[14]</sup>。PCR 所用引物是已经融合了 Miseq 测序平台的 V3 - V4 通用引物 341F 和 805R。按照 Illumina 公司 Miseq 的操作说明对形成的 cDNA 文库进行  $2 \times 300$  bp 高通量测序, 利用 CASAVA 1.8 软件, 设置 97% 相似性, 对有效 DNA 序列数据进行操作分类单元 (OTU) 分类<sup>[15]</sup>。Miseq 测序、序列拼接及 OTU 分类均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Anammox 快速启动

SBBR 反应器接种污泥后, 维持 pH 值在 7.6 ~ 8.3、温度为 25 ~ 32 °C, 历时 120 d 成功实现厌氧氨氧化的启动。整个启动阶段, 根据反应器进出水氮浓度变化情况, 将其分为 4 个时期: 启动初期、活性提高期、负荷提高期和稳定运行期 (记作阶段 I ~ IV)。在各阶段进出水氮浓度的变化见图 2。

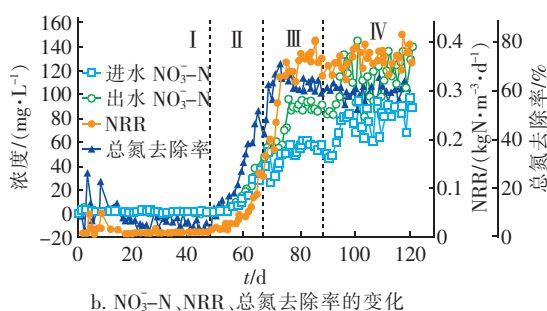
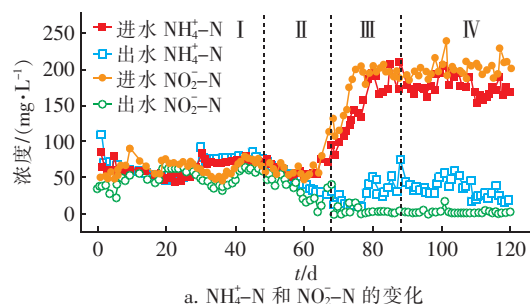


图 2 反应器各阶段运行性能

Fig. 2 Performance of SBBR reactor during the whole phase

阶段 I: 该阶段从接种污泥开始, 共历时 48 d, 由于污泥处于厌氧状态, 好氧菌出现大量自溶现象, 导致出水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  高于进水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 。此外, 出水  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度均呈现小幅度降低, 主要是由于在厌氧条件下, 反硝化菌利用菌体解体释放



的有机物进行反硝化。但该阶段对  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  的去除率仅为 10% ~ 30%, 与其他文献中出水  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度几乎为零<sup>[16]</sup> 存在明显不同, 这可能与接种污泥的性质不同有关。鉴于反应器出水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  浓度一直高于进水浓度, Anammox 活性未能体现, 于反应器启动第 35 天一次性投加小试培养的 Anammox 污泥 1 L, 以加快启动进程, 实现 Anammox 菌的快速富集。

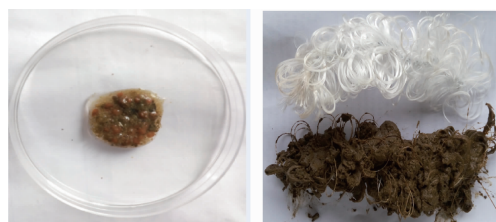
阶段 II: 由于进水中未添加有机物, 反应器长期处于无机自养状态, 且菌体自溶释放的有机物被逐步降解, 反硝化菌缺少有机供体, 逐渐被淘汰。厌氧氨氧化菌逐步显现作用, 出水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  浓度开始低于进水浓度, 并逐渐降低, 在该阶段末期, 氨氮去除量能达到 40 mg/L 左右。出水  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度也逐渐降低, 去除率逐渐增大, 维持在 60% ~ 80%。在该阶段后期,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  开始呈比例去除, 表明 Anammox 菌已成为反应器中的优势菌群<sup>[17]</sup>。

阶段 III:  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  呈比例去除, 平均去除率分别为 83.19% 和 96.81%。前阶段的低基质进水负荷已不能满足要求, 此后逐步提高进水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度至 160 ~ 200 mg/L, 以实现 Anammox 菌的快速增殖。

阶段 IV: 该阶段维持进水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度不变(分别为 180、200 mg/L), 进水总氮负荷达 0.61 kgN/(m<sup>3</sup> · d)。稳定运行期间对  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  的去除率分别为 81.45% 和 99.00%, 总氮去除负荷达 0.41 kgN/(m<sup>3</sup> · d)。  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除量、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量及  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量的比值为 1 : 1.39 : 0.25, 较接近于理论值<sup>[11]</sup>。

## 2.2 启动初期和稳定运行阶段污泥形态变化

分别于接种污泥后第 1 天及驯化成熟阶段取反应器内悬浮污泥及填料中部生物膜进行表面形貌观测。驯化前期, 污泥呈黑褐色、絮状, 反应器出水浑浊并伴有异臭味, 随着污泥的不断驯化, 污泥逐渐转为棕色, 并有少量粒状污泥上浮, 最后逐渐变为红棕色, 污泥中夹杂着少量颗粒状红褐色的 Anammox 污泥, 见图 3(a)。辫带式填料与接种污泥一同放入反应器, 填料未挂膜时呈白色水草状, 该填料具有比表面积大、孔隙率高、启动挂膜快、脱膜易更新等优点。挂膜后, 填料上附着了大量生物膜, 呈棕褐色且较密实, 紧附于填料内部, 见图 3(b)。

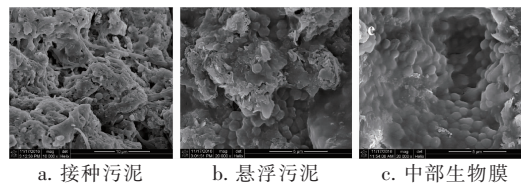


a. 驯化成熟的 Anammox 污泥 b. 填料上 Anammox 污泥

图 3 Anammox 污泥的形貌

Fig. 3 Morphology of Anammox sludge

由 ESEM 分析可知, 接种污泥表面较粗糙, 菌体呈絮状、杆状、球状等杂乱分布, 菌体较复杂, 多样性较丰富。驯化成熟后的菌体主要呈球状, 表面光滑, 排列紧密, 也有少量呈短杆状。球状细菌具有漏斗状缺口, 呈典型的 Anammox 菌特征<sup>[18]</sup>。对比发现, 反应器内悬浮污泥菌种较复杂, Anammox 菌含量较少, 隐藏于污泥内部, 填料中部生物膜 Anammox 菌种类单一, 含量丰富(见图 4)。



a. 接种污泥 b. 悬浮污泥 c. 中部生物膜

图 4 反应器内污泥的 ESEM 照片

Fig. 4 ESEM pictures of sludge in the reactor

## 2.3 脱氮路径分析

由 SBBR 稳定运行期间污染物去除效果可知反应器中 Anammox 占主导作用, 为 TN 的主要去除方式。但  $\text{NO}_2^- - \text{N}/\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{NH}_4^+ - \text{N}$  这两个比值与理论值略有偏差, 说明仍有部分 TN 是通过反硝化途径去除的。为了验证系统中发生的主要生化反应和脱氮路径, 从反应器中取样进行批次试验。

Anammox 活性: 在底物充足的条件下, 系统内  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  及 TN 均出现较明显的降解(见图 5), 整个反应阶段,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和 TN 的降解速率分别为 0.057 5、0.059 9 和 0.103 kgN/(kgVSS · d), 伴随着  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  的降解,  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度出现小幅升高, 由反应初期的 2.44 mg/L 上升至 9.34 mg/L, 增长速率为 0.014 7 kgN/(kgVSS · d)。3 个平行试验中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除量、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量之比分别为 1 : 1.04 : 0.24、1 : 1.13 : 0.21、1 : 1.08 : 0.19, 与

Strous 等人<sup>[11]</sup>的研究结果较为接近。

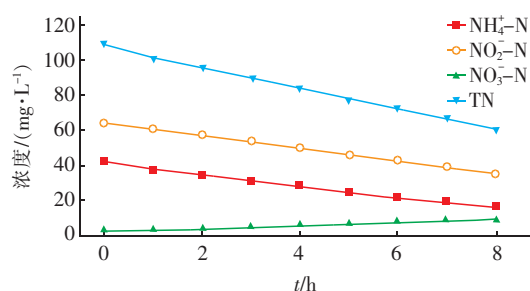


图5 SBBR 内 Anammox 活性

Fig. 5 Determination of Anammox activity in SBBR

亚硝酸盐反硝化性能:在整个运行阶段,亚硝态氮浓度出现了小幅度降低,从反应开始的 50.18 mg/L 降至结束时的 44.68 mg/L,降解速率为 0.012 kgN/(kgVSS · d),为厌氧氨氧化的 20.03%。可见,反应器中可能存在亚硝酸盐型反硝化与厌氧氨氧化的协同作用,但亚硝酸盐型反硝化作用较微弱。

硝酸盐反硝化性能:整个反应阶段,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 仅出现微弱降解,降解速率为 0.003 3 kgN/(kgVSS · d),远小于 Anammox 和亚硝酸盐反硝化作用对 TN 的去除速率。

由批次试验可知,系统对 TN 的去除以厌氧氨氧化反应占主导作用,同时残留的部分反硝化菌利用 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 进行反硝化,实现对部分 TN 的去除,而硝酸盐型反硝化基本未发生。

## 2.4 反应器中联氨氧化酶活性测定

联氨氧化酶(HZO)是 Anammox 菌中脱氮关键酶,它能将 Anammox 反应的中间产物联氨氧化为氮气,其活性能够很好地衡量 Anammox 菌的脱氮效能<sup>[19]</sup>。通过批次试验,可知反应器中的氨氮主要是通过 Anammox 菌去除的,因此,联氨氧化酶活性可以用来表征 Anammox 菌在系统中的活跃程度。通

过对比反应器中悬浮污泥与填料上生物膜的酶活性高低,探究 Anammox 菌在反应器内和填料上的分布及活性。

测定显示,反应器内悬浮污泥及填料上、中、下部的 HZO 活性分别为 5.645、5.375、7.229、7.655 μmolecyto-c/(gVSS · min)。所以,不同位置的酶活性排序为:填料上部 < 反应器内部 < 填料中部 < 填料下部。

随着到水面距离的增加,生物膜的 HZO 活性呈不断上升的趋势。可能的原因是距离水面越远,菌群周围溶解氧含量越低,而 Anammox 菌属于厌氧菌,对环境要求严格,溶解氧低的环境更有利于其生存。反应器中悬浮污泥 HZO 活性除略大于填料上部生物膜外,远小于填料中部及下部生物膜的 HZO 活性,降幅分别达到 21.91% 和 26.26%。说明由于辫带式填料比表面积大、孔隙率高,其生物膜内富集了大量的 Anammox 菌,而这正是 SBBR 反应器能够快速启动 Anammox 的原因。

## 2.5 SBBR 反应器中微生物群落结构解析

### 2.5.1 菌群丰度及多样性

由高通量测序数据(见表3)可知,反应器中接种污泥(S2)与驯化成熟的 Anammox 污泥多样性指数差异很大,S2 的 OTU 数及 Chao、ACE、Shannon、Simpson 指数值均明显大于 Anammox 样品。Chao、ACE、Shannon、Simpson 指数表明细菌群落和物种的丰富度,其中丰富度指数 Chao 和 ACE 是可以估算群落中含 OTU 数目的指数,在生态学中常用来估计物种总数,值越大代表物种越多<sup>[20]</sup>。由此可知,从反应器中接种污泥至 Anammox 驯化成熟,物种群落结构及物种丰富度呈明显下降趋势,下降的比例达到了 63.93% 和 63.95%。

表3 SBBR 反应器中 Anammox 菌丰度变化情况

Tab.3 Variations of richness and diversity estimators of microbial communities in SBBR reactor

项 目	序列数	OTU	Chao	ACE	Shannon	Simpson
S2	45 872	2 949	3 529.75	3 641.73	6.40	0.080
Anammox	49 245	995	1 273.04	1 312.54	3.77	0.006

Shannon 指数反映了基于物种数量的群落种类多样性,指数值越大表明群落的复杂程度越高<sup>[21]</sup>,Shannon 指数的变化趋势与 Chao、Ace 指数的变化趋势基本一致,也呈现明显下降趋势,降幅达到了 41.09%。原因可能是污水厂进水成分较复杂,组分多样性高且有机物充足,适合此环境生存的菌种范

围广、数量多,因此接种污泥的群落结构及物种丰富度相对较高。而 Anammox 污泥菌种长期处于单一基质进水条件下的无机自养状态,大量异养菌分解死亡,物种群落结构及丰富度相对较低。

### 2.5.2 反应器菌群在门和属层面的演变规律

通过高通量测序,S2 样品共检测到 37 个门类

(见图6),占比较高的有变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)。涉及到脱氮功能的微生物有变形菌门、浮霉菌门和硝化螺旋菌门3种,占总细菌的49.19%。Anammox样品共检测到22个门类,占比较高的有变形菌门(*Proteobacteria*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、绿菌门(*Ignavibacteriae*),涉及到脱氮功能微生物的3大门类占总细菌的54.21%,含量略有提高。其中,变形菌门在两个样品中含量分别为44.99%和27.12%,下降39.72%;Anammox菌所在的浮霉菌门含量由S2样品中的3.05%提高至27.07%,说明反应器启动成功后Anammox菌含量有明显提高;硝化螺旋菌门含量由1.15%降低至0.02%,说明反应器正常运行条件已不适于硝化螺旋菌门细菌的生长。

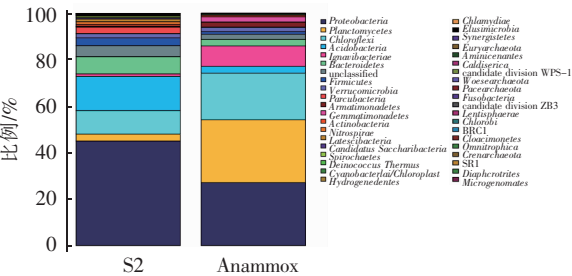


图6 反应器中菌群在门水平上的组成和相对丰度变化  
Fig.6 Changes of bacteria composition and relative abundance at phylum level

基于属水平的分析结果如图7所示,除未分类和其他菌属之外,两个样品相对含量较高的有48个属,S2污泥样品中占据比例较高的优势菌属有Gp7(4.37%)、*Longilinea*(3.99%)、*Azoarcus*(3.64%)和*Dechloromonas*(3.14%)。各菌属含量相对均匀,没有明显优势种群,说明接种污泥中菌群相对复杂,生活污水水质有利于各种菌属的共存。Anammox样品中占比较高的优势菌群有*Candidatus Kuenenia*(23.57%)、*Bellilinea*(15.86%)、*Ignacibacterium*(7.6%)、*Vulcaniibacterium*(3.2%)。*Candidatus Kuenenia*属是Anammox工艺中最常见的菌属之一,最早于德国斯图加特处理废水的滴滤池中发现,其以CO<sub>2</sub>为唯一碳源,通过将NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N氧化为NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N来获取能量。经过驯化培养之后,*Candidatus Kuenenia*含量大幅提高,逐渐成为反应器内优势种群,从微生物学角度验证了启动成功后反应器内的脱氮路径以

Anammox反应为主。

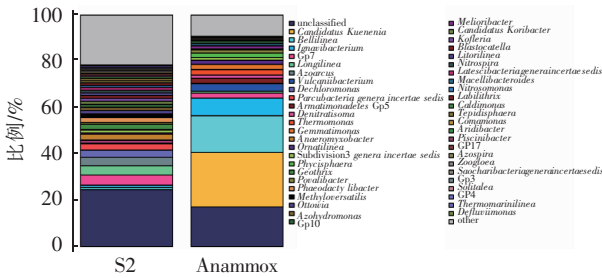


图7 反应器菌群在属水平上的组成和相对丰度变化  
Fig.7 Changes of bacteria composition and relative abundance at genus level

表4列举了反应器启动过程中与脱氮有关菌属相对丰度的变化。其中,检测到亚硝化菌属2种,分别为*Nitrosomonas*和*Nitrosospira*。亚硝化菌属在工艺运行各阶段的含量均在1%以下,并呈逐渐下降趋势,说明Anammox工艺的运行条件不利于亚硝化菌属的繁殖。与硝化作用有关的菌属有3种,分别为*Nitrospira*、*Nitrococcus*和*Nitrobacter*,在Anammox污泥样品中这3种菌属的含量分别仅为0.02%、0.01%和0.01%,说明好氧硝化菌属在厌氧状态下逐渐被淘汰。

表4 生物脱氮相关菌属相对丰度变化  
Tab.4 Changes of relative abundance of biological nitrogen removal genus %

项 目		S2 相对丰度	Anammox 相对丰度
亚硝化	<i>Nitrosomonas</i>	0.87	0.19
	<i>Nitrosospira</i>	0.10	0.06
硝化	<i>Nitrospira</i>	1.15	0.02
	<i>Nitrococcus</i>	0.11	0.01
	<i>Nitrobacter</i>	0.11	0.01
反硝化	<i>Thauera</i>	0.32	0.01
	<i>Azoarcus</i>	3.64	0
	<i>Sulfuritalea</i>	0.42	0.02
	<i>Denitratisoma</i>	1.09	1.40
	<i>Hyphomicrobium</i>	0.18	0.21
	<i>Pseudomonas</i>	0.06	0.01
厌氧氨氧化	<i>Candidatus Kuenenia</i>	0.01	23.57
	<i>Candidatus Brocadia</i>	0.04	0

两个样品中检测到的反硝化相关菌属共有6种,按丰度情况由大到小分别为*Azoarcus*、*Denitratisoma*、*Sulfuritalea*、*Thauera*、*Hyphomicrobium*和*Pseudomonas*。接种污泥S2样品中反硝化菌属总含量为5.71%,而Anammox污泥样品中总含量仅为



1.65%。其中,接种污泥中优势菌种 *Azoarcus* 降幅最大,含量由3.64%降至零。由于 Anammox 工艺中不添加有机物,使得异养反硝化菌逐渐分解死亡。两个样品中检测到的 Anammox 菌属有2种(*Candidatus Kuenenia* 和 *Candidatus Brocadia*), *Candidatus Kuenenia* 属是 Anammox 反应器中的主要种群,在污水处理 Anammox 反应器中分布较广<sup>[22]</sup>,其相对丰度的变化表明在反应器启动过程中 Anammox 菌属逐渐占据了主要地位。

### 3 结论

① 采用中试 SBBR 反应器,接种污水厂污泥、投加少量 Anammox 菌,经过120 d的培养成功启动 Anammox 工艺。工艺稳定运行阶段,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除量、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量与  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量的比值为1:1.39:0.25, NRR 达  $0.41 \text{ kgN}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 。

② 反应器中 Anammox 占主导作用, Anammox 脱氮速率达到  $0.103 \text{ kgN}/(\text{kgVSS} \cdot \text{d})$ 。填料上生物膜内 Anammox 菌的 HZO 活性明显高于反应器内悬浮污泥,形成了更有利于 Anammox 菌富集的生长环境。

③ 反应器内微生物群落出现明显演替现象,稳定运行阶段 Anammox 菌 *Candidatus Kuenenia* 成为优势菌种,含量达23.57%。

### 参考文献:

- [1] Jin R C, Zheng P, Hu A H, et al. Performance comparison of two anammox reactors: SBR and UBF[J]. Chemical Engineering, 2008, 138: 224 - 230.
- [2] Liu S T, Yang F L, Meng F G, et al. Enhanced anammox consortium activity for nitrogen removal: Impacts of static magnetic field[J]. Biotechnology, 2008, 138: 96 - 102.
- [3] Li J, Li J, Gao R, et al. A critical review of one-stage Anammox processes for treating industrial wastewater: optimization strategies based on key functional microorganisms[J]. Bioresour Technol, 2018, 265: 498 - 505.
- [4] van der Star W R L, 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 Res, 2007, 41(18): 4149 - 4163.
- [5] Wett B. Solved up-scaling problems for implementing deammonification of rejection water[J]. Water Sci Technol, 2006, 53(12): 121 - 128.
- [6] 唐崇俭, 郑平, 陈建伟, 等. 中试厌氧氨氧化反应器的启动与调控[J]. 生物工程学报, 2009, 25(3): 406 - 412.
- Tang Chongjian, Zheng Ping, Chen Jianwei, et al. Start-up and process control of a pilot-scale Anammox bioreactor at ambient temperature[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(3): 406 - 412 (in Chinese).
- [7] Egli K, Bosshard F, Werlen C, et al. Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon[J]. Microbial Ecology, 2003, 45(4): 419 - 432.
- [8] Dirlei D K, Valeria R, Willibaldo S, et al. Sludge washout as strategy for Anammox process start-up[J]. Process Biochem, 2007, 42: 1579 - 1585.
- [9] 李祥, 黄勇, 袁怡. DO 在厌氧序批式生物膜反应器中对厌氧氨氧化反应启动的影响[J]. 环境污染与防治, 2009, 31(10): 43 - 47.
- Li Xiang, Huang Yong, Yuan Yi. Effect of dissolved oxygen on the start-up of ANAMMOX in the ASBBR[J]. Environmental Pollution & Control, 2009, 31(10): 43 - 47 (in Chinese).
- [10] 王荣娟, 杨朝晖, 曾光明, 等. 不同供氧策略对 SBBR 反应器实现短程硝化厌氧氨氧化的影响分析[J]. 环境科学学报, 2007, 27(11): 1809 - 1817.
- Wang Rongjuan, Yang Zhaohui, Zeng Guangming, et al. Impact of different aeration strategies on start-up of short nitrification-anaerobic ammonia oxidation[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(11): 1809 - 1817 (in Chinese).
- [11] Strous M, van Gerven E, Kuenen J G. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium oxidizing (anammox) sludge[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(6): 2446 - 2448.
- [12] 郑照明, 杨函青, 马静, 等. SNAD 反应器中颗粒污泥和絮体污泥脱氮特性[J]. 中国环境科学, 2015, 35(10): 2996 - 3002.
- Zheng Zhaoming, Yang Hanqing, Ma Jing, et al. The nitrogen removal performance of granules and flocs in SNAD reactor[J]. China Environmental Science, 2015, 35(10): 2996 - 3002 (in Chinese).
- [13] Shimamura M, Nishiyama T, Shigetomo H, et al. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(4): 1065 - 1072.
- [14] Wang Q, Garrity J M, Tiedje M, et al. Naïve Bayesian classifier

- for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73 (16): 5261 – 5267.
- [15] Huttly G A, Knights D, Walters W A, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335 – 336.
- [16] 赵云霞. 厌氧氨氧化菌种培养与动力学特性研究 [D]. 北京: 北京交通大学, 2005.
- Zhao Yunxia. Study on Culture and Kinetic Characteristics of Anammox Bacteria [D]. Beijing: Beijing Jiaotong University, 2005 (in Chinese).
- [17] 于英翠, 高大文, 陶彧, 等. 利用序批式生物膜反应器启动厌氧氨氧化研究 [J]. 中国环境科学, 2012, 32 (5): 843 – 849.
- Yu Yingcui, Gao Dawen, Tao Yu, *et al.* Start-up of anammox in a sequencing batch biofilm reactor (SBBR) [J]. China Environmental Science, 2012, 32(5): 843 – 849 (in Chinese).
- [18] 吴立波, 宫玥, 龙斌, 等. 厌氧氨氧化工艺在厌氧复合床反应器中的启动运行 [J]. 天津大学学报, 2008, 41 (11): 1367 – 1371.
- Wu Libo, Gong Yue, Long Bin, *et al.* Start-up of anaerobic ammonium oxidation process in an upflow blanket filter bioreactor [J]. Journal of Tianjin University, 2008, 41(11): 1367 – 1371 (in Chinese).
- [19] 李媛. 厌氧氨氧化工艺启动和运行特性及其受抑机理研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- Li Yuan. Start-up and Performance Characteristics of Anaerobic Ammonium Oxidation Process and Its Repressed Mechanisms [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014 (in Chinese).
- [20] Shu D T, He Y L, Yue H, *et al.* Metagenomic insights into the effects of volatile fatty acids on microbial community structures and functional genes in organotrophic anammox process [J]. Bioresour Technol, 2015, 196: 621 – 633.
- [21] 刁晓君, 李一葳, 王曙光. 水华生消过程对巢湖沉积物微生物群落结构的影响 [J]. 环境科学, 2015, 36 (1): 107 – 113.
- Diao Xiaojun, Li Yiwei, Wang Shuguang. Effects of outbreak and extinction of algal blooms on the microbial community structure in sediments of Chaohu Lake [J]. Environmental Science, 2015, 36 (1): 107 – 113 (in Chinese).
- [22] Zhan X J, Zhang H Z, Ye C M, *et al.* Effect of COD/N ratio on nitrogen removal and microbial communities of CANON process in membrane bioreactors [J]. Bioresour Technol, 2015, 189: 302 – 308.



作者简介: 刘福长 (1992 – ), 男, 福建三明人, 硕士, 研究方向为水污染控制技术。

E-mail: 599059702@qq.com

收稿日期: 2018 – 05 – 12

大力推进水利薄弱环节建设,  
提高防灾减灾能力