

论述与研究

城市污水生物脱氮系统中 DNRA 的检测与分析

刘 芹，彭党聪

(西安建筑科技大学 环境与市政工程学院，陕西 西安 710055)

摘要：在污水生物脱氮过程中，硝化阶段产生的硝酸盐在反硝化阶段被还原为氮气从而达到脱氮目的，此外，硝酸盐还可能被还原为铵(DNRA过程)，但在污水处理中是否存在这一过程尚有争议。为此，以西安市某污水处理厂A²/O工艺中的厌氧池为研究对象，在氮平衡分析的基础上，对污泥进行连续培养，探讨DNRA现象。现场检测结果表明，在6 500 m³的厌氧池中TN的平均损失量为177.6 kg/d，硝态氮的平均损失量为235.2 kg/d，TN损失量低于硝态氮损失量，说明可能存在DNRA过程。在进水NO₃⁻-N和COD浓度分别为20、200 mg/L的条件下，对活性污泥进行了50个周期的连续富集培养，出水氨氮浓度达到了10 mg/L，证明城市污水生物脱氮系统中确实存在DNRA过程；接种污泥和培养污泥的16S rRNA和nrfA功能基因测序结果显示，进行DNRA的主要菌属为变形菌门中的Thauera、Hydrogenophaga和Geobacter。

关键词：污水处理；生物脱氮；DNRA过程；氮平衡；高通量测序

中图分类号：TU992.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1000-4602(2019)19-0001-06

Detection and Genetic Analysis of Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium in Biological Nitrogen Removal System for Municipal Sewage

LIU Qin, PENG Dang-cong

(School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: The nitrate produced in the nitrification stage is reduced to N₂ in the denitrification stage to achieve the purpose of denitrification in the biological nitrogen removal process of sewage. In addition, nitrate may also be reduced to ammonium (dissimilatory nitrate reduction to ammonium, DNRA), but whether the process takes place in the sewage treatment is still controversial. Therefore, nitrogen equilibrium analysis was carried out in an anaerobic tank in A²/O process of a sewage treatment plant in Xi'an. On this basis, the sludge was continuously cultured to explore the phenomenon of DNRA. Field measurement results showed that the average loss of total nitrogen was 177.6 kg/d, and the average loss of nitrate nitrogen was 235.2 kg/d in the anaerobic tank with a volume of 6 500 m³. The loss of total nitrogen was lower than that of nitrate nitrogen, indicating that DNRA process might exist. Under the condition of NO₃⁻-N concentration of 20 mg/L and COD concentration of 200 mg/L, activated sludge was continuously enriched and cultured for 50 cycles, and the ammonia nitrogen concentration of

基金项目：陕西省住房城乡科技开发项目(2015-K65)

the effluent reached 10 mg/L, which proved that DNRA process indeed existed in the municipal sewage biological nitrogen removal system. Sequencing results of 16S rRNA and functional genes of nrfA in inoculated sludge and cultured sludge showed that the major genera for DNRA were *Thauera*, *Hydrogenophaga* and *Geobacter* in phylum of *Proteobacteria*.

Key words: sewage treatment; biological nitrogen removal; dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA); nitrogen balance; high throughput sequencing

在污水生物脱氮过程中,硝化阶段产生的硝酸盐通过反硝化作用被还原为氮气,从而达到脱氮目的。但是硝酸盐除了被还原为氮气外,还有可能被还原为铵($\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^-$),即DNRA过程^[1-2],该过程会降低脱氮效率,因此在污水生物脱氮过程中并不希望存于此反应。大量现场检测结果表明,城市污水处理厂A²/O系统的厌氧池中存在着较高的有机物浓度,而且回流污泥中通常会含有一定量的硝酸盐,具备了适合DNRA菌生存的环境,所以在城市污水生物处理过程中有可能存在DNRA过程。

实际上,早在20世纪80年代末期就已验证了DNRA过程的存在,其中河口、盐碱地沉积物、土壤和湖泊等^[3-6]自然环境中易发生DNRA过程。随着对DNRA过程的深入研究,van den Berg等人在荷兰的Leiden-Noord污水处理厂,通过接种活性污泥富集出了DNRA菌,探究了电子受体(NO_3^- 和 NO_2^-)对DNRA的影响^[7-9]。目前国内关于方面的研究重心仍然是自然环境中的DNRA过程,而对于城市污水处理厂中是否存在DNRA过程的研究很少。

基于此,笔者对西安市某污水处理厂厌氧池进、出水中的氮组分进行测定,通过平衡计算分析氮的去向,此外,对活性污泥采用连续进水方式进行富集培养,并应用16S rRNA基因扩增子测序和nrfA功能基因测序等方法,探讨城市污水生物脱氮系统中是否存在DNRA现象,以期为提高城市污水处理厂的脱氮效率提供参考。

1 试验材料与方法

1.1 现场检测

西安市第四污水处理厂的A²/O工艺处理流量为2 300~2 500 m³/h,进水COD和TN浓度分别为340~480、40~70 mg/L。现场取样测定 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N、TN等指标,A²/O工艺以及取样点的设置如图1所示。

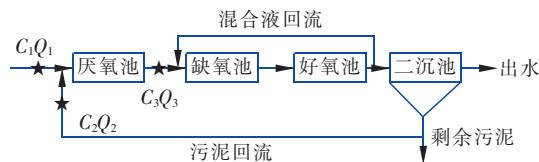


图1 A²/O工艺流程

Fig. 1 Flow chart of A²/O process

1.2 活性污泥的连续培养

接种污泥为该污水处理厂A²/O工艺厌氧池中的活性污泥,经纯水淘洗3次后置于反应器中。

试验用水为人工配水,组成成分如下:144 mg/L的 KNO_3 (NO_3^- -N浓度为20 mg/L),256 mg/L的 CH_3COONa (COD浓度为200 mg/L),1.0 g/L的 KH_2PO_4 ,49.2 mg/L的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,14.8 mg/L的NaOH,4 mL/L微量元素。微量元素的基本成分为:5.0 g/L的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,2.0 g/L的 KNO_3 ,2.0 g/L的 K_2HPO_4 ,1.0 g/L的 NaHCO_3 ,0.6 g/L的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,10 mg/L的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

DNRA菌的富集培养:取200 mL接种活性污泥,经过无氧水淘洗后置于500 mL广口瓶中,通过连续进水方式加入相应基质(NO_3^- -N为20 mg/L,COD为200 mg/L),然后用含有微量元素的无氧水定容至500 mL,用橡胶塞塞紧后充入高纯度氮气,以维持厌氧环境;将广口瓶置于35 ℃、140 r/min的摇床中,维持pH值在7~8,定时取样,测定 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N等指标。硝酸盐还原速率和氨氮生成速率分别代表反硝化菌活性和DNRA菌活性。

1.3 分析项目与方法

1.3.1 常规指标测定

NH_4^+ -N:纳氏试剂分光光度法, NO_3^- -N:紫外分光光度法,TN:碱性过硫酸钾消解-紫外分光光度法,MLSS和MLVSS:重量法。

1.3.2 高通量测序

本研究采用16S rRNA基因扩增子测序和nrfA功能基因测序,对富集培养的微生物群落结构和

DNRA 菌组成进行分析。扩增引物分别为 341F(5' CCTACGGGAGGCAGCAG3')、nrfA2aw (CARTGYCAYGTBARTA) 和 nrfAR1 (TWNGGCATRTGRCARTC)。测序步骤如下:样品预处理后经由 OMEGA 试剂盒中的 E. Z. N. ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 试剂盒提取 DNA,然后进行两轮 PCR 扩增(第 1 轮引物为 341F、nrfA2aw 和 nrfAR1,第 2 轮引物为 Illumina 桥式 PCR 兼容引物),对 PCR 扩增产物采用 0.6 倍的磁珠处理。最后利用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量,以方便按照 1:1 等量混合后测序。等量混合时,每个样品的 DNA 量取 10 ng,最终上机测序浓度为 20 pmol。

2 结果与讨论

2.1 厌氧池中的氮平衡

对厌氧池的总氮、氨氮、硝态氮以及亚硝态氮等指标进行跟踪检测,在此期间污水厂基本处于稳定运行状态,厌氧池进水、出水、回流污泥中的氮浓度以及流量见表 1。

表 1 厌氧池进水、出水、回流污泥中的氮浓度以及流量

Tab. 1 Nitrogen concentration and flow of influent, effluent and reflux sludge in anaerobic tank

项 目	流 量/ (m ³ · h ⁻¹)	浓 度/(mg · L ⁻¹)		
		TN	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N
进水	2 360	31.47	22.97	0.74
出水	4 760	18.95	12.79	0.83
回流污泥	2 400	9.8	2.9	4.75

厌氧池中 TN、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 的损失量按式(1)计算:

$$\Delta M_J = [Q_1 C_1^J + Q_2 C_2^J - (Q_1 + Q_2) C_3^J] \times 24 \quad (1)$$

式中: ΔM_J 为厌氧池中氮的损失量,kg/d; Q_1 和 Q_2 分别为进水和回流污泥的流量,m³/h; C_1^J 、 C_2^J 和 C_3^J 分别为进水、回流污泥和出水中的氮浓度,mg/L; J 代表 TN、NH₄⁺-N 或者 NO₃⁻-N。

若硝态氮的减少主要是由反硝化和 DNRA 作用导致的,则进行 DNRA 和反硝化作用的硝态氮占整个系统中总氮的百分比计算方法如下:

$$R_{DNRA} = \frac{\Delta M_{NO_3^-} - \Delta M_{TN}}{Q_1 C_1^{TN} + Q_2 C_2^{TN}} \times 100\% \quad (2)$$

$$R_{DN} = \frac{\Delta M_{TN}}{Q_1 C_1^{TN} + Q_2 C_2^{TN}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: R_{DNRA} 和 R_{DN} 分别表示 DNRA 和反硝化的

占比; $\Delta M_{NO_3^-}$ 和 ΔM_{TN} 分别为硝态氮和总氮的损失量,kg/h; Q_1 和 Q_2 为进水和回流污泥的流量,m³/h; C_1^{TN} 和 C_2^{TN} 为进水和回流污泥中的总氮浓度,mg/L。

利用表 1 中的数据和式(1)进行氮平衡计算,结果表明,总氮的损失量为 177.6 kg/d,硝态氮的损失量为 235.2 kg/d,氨氮的损失量为 4.08 kg/d。现场检测发现,NO₂⁻-N 浓度很低,可以忽略不计;氨氮每天的损失量较低,主要是因为厌氧池中存在有机物水解、DNRA 以及微生物合成等过程;NO₃⁻-N 损失量高于 TN 损失量,表明有一部分 NO₃⁻-N 转化为 NH₄⁺-N,若假设硝态氮的减少主要是因为反硝化和 DNRA 过程,则表 1 中的数据经由式(2)和(3)计算,结果显示,进行 DNRA 作用的硝态氮占比为 1.64%,进行反硝化作用的硝态氮占比为 7.76%,表明在城市污水生物脱氮系统中可能存在 DNRA 过程,且与反硝化过程共存。

2.2 DNRA 菌的富集培养

2.2.1 硝态氮、氨氮及 COD 浓度的变化

在硝态氮为唯一氮源、COD/NO₃⁻-N 值为 10 的条件下,对接种污泥进行了 50 个周期的连续培养,其 HRT 为 4 h,试验期间进出水硝态氮、氨氮和 COD 浓度的变化见图 2。

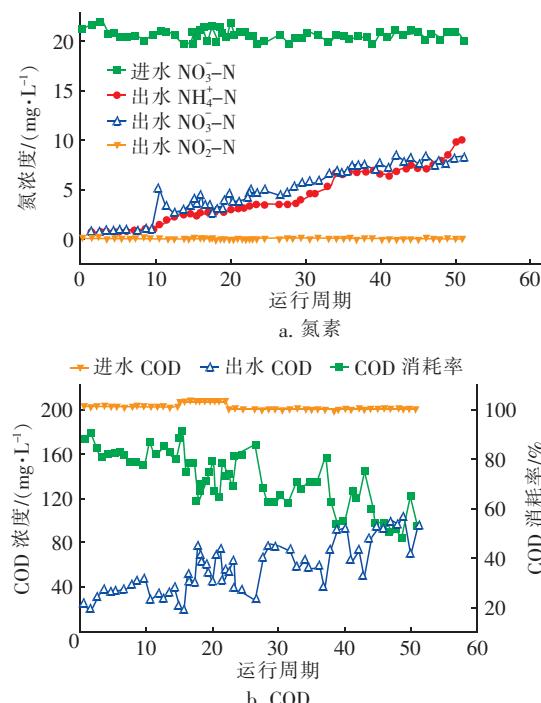


图 2 进出水中硝态氮、氨氮及 COD 浓度的变化

Fig. 2 Change of nitrate nitrogen, ammonia nitrogen and COD in influent and effluent

试验初期,由于接种污泥中主要为反硝化菌,DNRA 菌较少,因此,进水中的硝态氮几乎全部被反硝化为氮气,出水氨氮浓度很低;而在整个培养过程中亚硝态氮浓度几乎没有变化,且出水浓度很低,可以忽略不计,主要是由于亚硝态氮对 DNRA 菌没有影响^[8]。随着运行时间的延长,出水氨氮浓度逐渐增加,说明 DNRA 菌被逐渐富集;由于 DNRA 菌与反硝化菌争夺碳源,因此导致出水中的硝态氮浓度同时逐渐上升,而硝态氮浓度的上升,使得反硝化所需的碳源减少,造成出水 COD 浓度的升高和 COD 消耗率的降低,实际上,单位硝态氮被 DNRA 菌还原为氨氮所需的 COD 量(1 g 硝态氮还原为氨氮所需的 COD 为 4.57 g)比其被反硝化菌还原为氮气所需的 COD 量(1 g 硝态氮还原为氨氮所需的 COD 为 2.86 g)要多,硝态氮还原为氨氮而多消耗的 COD 量小于由于剩余硝态氮而减少的 COD 消耗量,从而造成出水 COD 浓度升高和消耗量减少。到试验结束时,出水氨氮、硝态氮和 COD 浓度分别为 9.85、8.27 和 80.00 mg/L,氨氮的转化率达到总氮的 49.25%,DNRA 菌得到了大量富集。

2.2.2 污泥浓度及活性变化

反硝化速率表征反硝化菌活性,氨氮生成速率表征 DNRA 菌活性,在培养周期内反硝化菌活性和 DNRA 菌活性的变化见图 3,其中,反硝化速率定义为硝酸盐的减少速率减去氨氮的生成速率。

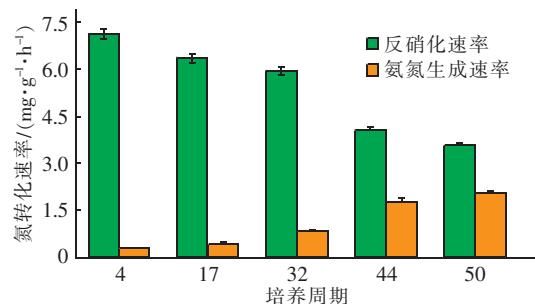


图 3 反硝化活性和 DNRA 活性的变化

Fig. 3 Activity change of denitrification and DNRA

富集培养期间,起始接种污泥的浓度为 350.64 mg/L,经过 50 个周期的连续培养,污泥浓度为 423.28 mg/L,污泥表观产率系数为 0.343 gVSS/gNO₃⁻ - N,折算为 DNRA 菌的产率系数为 0.042 gVSS/gNH₄⁺ - N。由图 3 可知,培养初期(第 4 周期)污泥的反硝化活性高达(7.12 ± 0.17) mg/(g · h),而氨氮生成速率仅为 0.44 mg/(g · h),污泥中

的微生物主要为反硝化菌。随着培养过程的进行,氨氮生成速率逐渐提高,试验结束时达到(2.04 ± 0.018) mg/(g · h),与此对应,进水中的硝态氮有 49.25% 转化为氨氮,说明污泥中的 DNRA 菌已得到成功富集(富集倍数超过 5 倍以上),同时,由于进水中的 C/N 值较高,硝态氮为整个反应的速率控制步骤,有利于 DNRA 过程的进行,而不利于反硝化菌的增殖,从而导致反硝化速率不断下降^[7,10],由接种污泥的(7.12 ± 0.17) mg/(g · h)降低到试验结束时的(3.52 ± 0.13) mg/(g · h)。试验结果表明,采用高 C/N 值可成功富集和培养 DNRA 菌。

2.2.3 微生物群落结构

为了分析微生物种群变化,对接种污泥和培养污泥进行 Alpha 多样性指数分析,结果见表 2。同时,为了分析微生物群落结构,对接种污泥和培养污泥进行 16S rRNA 高通量测序,两种污泥中微生物在门和纲水平上的相对分布情况见图 4。

表 2 接种污泥和培养污泥 Alpha 多样性指数

Tab. 2 Alpha diversity index of cultured sludge and inoculated sludge

项 目	序列数	Shannon 指数	ACE 指数	Chao1 指数
接种污泥	25 387	6.26	26 733.78	14 041.52
培养污泥	28 446	5.13	15 127.97	9 097.72

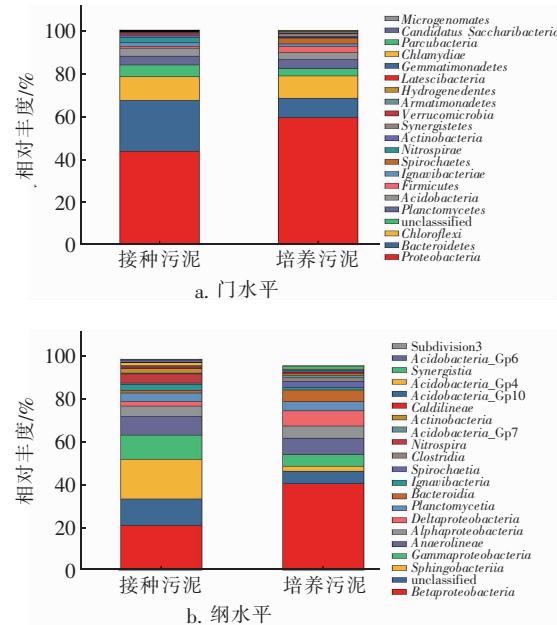


图 4 接种污泥和培养污泥中微生物在不同水平上的分布

Fig. 4 Relative abundances of the predominant phylogenetic groups of inoculated sludge and cultured sludge

由表 2 可知,培养污泥的 Chao1、ACE、Shannon

等指数均低于接种污泥,表明富集培养后微生物的丰富度和多样性均降低,一系列不适应环境的微生物死亡,特定环境条件使得微生物种类减少。由图 4(a)可知,两个样品中共有 11 个主要门类,相对丰度均在 1% 以上。相对于接种污泥,培养污泥中起主导作用的门类没有发生变化,依旧是 *Proteobacteria*(变形菌门)、*Bacteroidetes*(拟杆菌门)、*Chloroflexi*(绿弯菌门)和 *Planctomycetes*(浮霉菌门),占总序列的 82. 68%;另外, *Proteobacteria*、*Spirochaetes*、*Firmicutes* 和 *Synergistetes* 丰度增加,其中 *Proteobacteria* 的增加量为 18% 居首位,其余门类均减少。由图 4(b)可知,在纲水平上, *Proteobacteria* 中的 *Betaproteobacteria* 和 *Deltaproteobacteria* 丰度增加量较大,其中 *Betaproteobacteria* 由接种污泥的 20. 84% 增加到培养污泥的 40. 41%,扩大了 1. 94 倍, *Deltaproteobacteria* 由接种污泥的 2. 09% 增加到培养污泥的 7. 3%,扩大了 3. 49 倍; *Bacteroidetes* 中的 *Bacteroidia* 增大了 2 倍; *Spirochaetes* 中的 *Spirochaetia* 增加量较少。依照门和纲水平上各微生物的丰度增加量,推测 DNRA 菌可能隶属于 *Proteobacteria* 中的 *Betaproteobacteria*^[11] 和 *Deltaproteobacteria*^[12]。

2.2.4 DNRA 功能菌群落结构分析

对培养污泥中的微生物进行焦磷酸功能基因 *nrfA* 测序,确认 DNRA 菌群组成。采用 GraPhlAn 绘制的分类等级树结果见图 5。

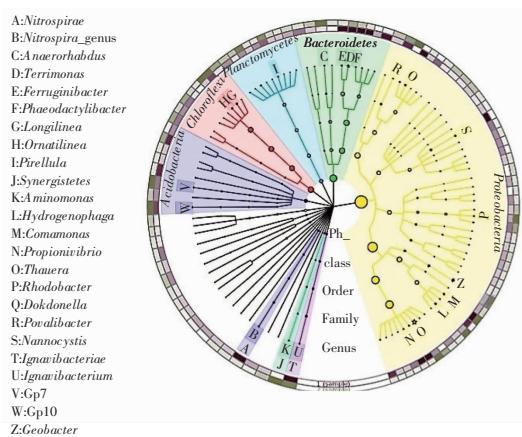


图 5 接种污泥和培养污泥中主要 DNRA 菌的分类等级树

Fig. 5 Hierarchical tree of dominant DNRA microbial populations of the predominant phylogenetic groups of inoculated sludge and cultured sludge

由图 5 可知,从属水平上,DNRA 菌群丰度增加

的微生物为 *Thauera*、*Hydrogenophaga*、*Rhodobacter*、*Geobacter*、*Longilinea*、*Ornatilinea* 和 *Aminomonas* 等。在 DNRA 功能菌群中 *Thauera* 的丰度最大,部分 *Thauera* 菌(*Thauerasp* MZIT)能够将硝酸盐转化为铵盐,具有 DNRA 功能,Arshad 等人^[13]的研究支持此结论;*Hydrogenophaga* 丰度较大,Yoon 等人^[10]认为 *Hydrogenophaga* 不仅能够将硝酸盐转化为亚硝酸盐,而且可以将硝酸盐还原为铵盐;除硫单胞菌目 *Desulfuromonadales* 中的 *Geobacter* 也是重要的 DNRA 菌属^[9];其余增加的菌属目前无法判断是否具有 DNRA 功能。此外,高通量测序结果显示,接种污泥中存在少量的厌氧氨氧化菌,仍需要对其做进一步探究。

3 结论

现场检测和富集培养试验结果表明,具有硝化/反硝化功能的城市污水处理厂营养物去除系统中存在 DNRA 过程。回流污泥中的硝酸盐和进水中的有机物为厌氧池创造了高 C/N 值这一有利于 DNRA 菌增殖的环境,部分硝态氮被转化为氨氮,从而使得厌氧池的硝态氮损失量明显高于总氮损失量。通过对连续富集培养系统中接种污泥和富集污泥的高通量测序和功能基因 *nrfA* 焦磷酸测序,证明城市污水处理厂中进行 DNRA 的菌属主要为 *Thauera*、*Hydrogenophaga* 和 *Geobacter*。鉴于 DNRA 对反硝化脱氮过程的负面效应,如何抑制和削减 DNRA 同时强化反硝化有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Giblin A E, Tobias C R, Song B, et al. The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems [J]. Oceanography, 2013, 26(3): 124–131.
- [2] Souza F V, Santoro A L, van Weerelt M, et al. Sediment denitrification, DNRA and anammox rates in tropical floodplain lake (Pantanal, Brazil) [J]. Oecologia Australis, 2012, 16(4): 734–744.
- [3] 陶怡乐,温东辉. 细菌硝酸盐异化还原成铵过程及其在河口生态系统中的潜在地位与影响[J]. 微生物学通报,2016,43(1):172–181.
Tao Yile, Wen Donghui. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium: the potential and impacts in estuarine regions[J]. Microbiology China, 2016, 43 (1): 172 – 181 (in Chinese).

- [4] 胡晓婷,程吕,林贤彪,等. 沉积物硝酸盐异化还原过程的温度敏感性与影响因素——以长江口青草沙水库为例[J]. 中国环境科学,2016,36(9):2624–2632.
- Hu Xiaoting, Cheng Lü, Lin Xianbiao, et al. Temperature sensitivity and controlling factors of dissimilatory nitrate reduction processes in sediments of Qingcaosha reservoir, Yangtze Estuary [J]. China Environmental Science, 2016, 36(9): 2624–2632 (in Chinese).
- [5] 朱艺双,朱瑾,何岩,等. 黑臭河道内源硫对硝酸盐异化还原过程的影响研究进展[J]. 环境工程,2018,36(8):8–13,59.
- Zhu Yishuang, Zhu Jin, He Yan, et al. Effect of endogenous sulfur on dissimilatory nitrate reduction processes in malodorous river: a review [J]. Environmental Engineering, 2018, 36(8): 8–13, 59 (in Chinese).
- [6] 陈韬,李剑沣,邹子介,等. 氧化还原电位和pH对生物滞留系统硝酸盐异化还原为氨作用的影响[J]. 科学技术与工程,2018,18(4):368–373.
- Chen Tao, Li Jianfeng, Zou Zijie, et al. Effects of redox potential and pH on the effect of dissimilatory nitrate reduction to ammonium in bioretention system [J]. Science Technology and Engineering, 2018, 18 (4): 368 – 373 (in Chinese).
- [7] van den Berg E M, Boleij M, Kuenen J G, et al. DNRA and denitrification coexist over a broad range of acetate/ NO_3^- –N ratios, in a chemostat enrichment culture[J]. Frontiers in Microbiology, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01842.
- van den Berg E M, Rombouts J L, Kuenen J G, et al. Role of nitrite in the competition between denitrification and DNRA in a chemostat enrichment culture[J]. AMB Express, 2017. DOI: 10.1186/s13568-017-0398-x.
- [9] van den Berg E M, van Dongen U, Abbas B, et al. Enrichment of DNRA bacteria in a continuous culture [J]. The ISME Journal, 2015, 9: 2153–2161.
- [10] Yoon K S, Tsukada N, Sakai Y, et al. Isolation and characterization of a new facultatively autotrophic hydrogen-oxidizing *Betaproteobacterium*, *Hydrogenophaga* sp. AH-24[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 278(1): 94 – 100.
- [11] Canion A, Prakash O, Green S J, et al. Isolation and physiological characterization of psychrophilic denitrifying bacteria from permanently cold Arctic fjord sediments (Svalbard, Norway) [J]. Environ Microbiol, 2013, 15(5): 1606 – 1618.
- [12] Masuda Y, Itoh H, Shiratori Y, et al. Predominant but previously-overlooked prokaryotic drivers of reductive nitrogen transformation in paddy soils, revealed by metatranscriptomics [J]. Microbes Environ, 2017, 32(2): 180 – 183.
- [13] Arshad A, Martins P D, Frank J, et al. Mimicking microbial interactions under nitrate-reducing conditions in an anoxic bioreactor: enrichment of novel *Nitrospirae* bacteria distantly related to *Thermodesulfobacter* [J]. Environ Microbiol, 2017, 19(12): 4965 – 4977.



作者简介:刘芹(1992—),女,河北衡水人,硕士研究生,研究方向为污(废)水处理与修复。

E-mail:18335191197@163.com

收稿日期:2019-04-15