

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2021.23.012

长期运行条件下亚硝酸盐氧化菌的低温适应策略

于莉芳^{1,2}, 莫鹏程^{1,3}, 杨秀玲¹, 李荣乐¹, 文星美¹, 彭党聪¹

(1. 西安建筑科技大学 环境与市政工程学院, 陕西 西安 710055; 2. 西安建筑科技大学
陕西省环境工程重点实验室, 陕西 西安 710055; 3. 西安建筑科技大学 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: 在 20、15 和 10 °C 条件下长期运行 SBR, 分析温度对反应器性能、硝化动力学和硝化菌群落结构等的影响。实验结果表明, 随着温度的降低, 比氨氧化速率 (SAUR) 逐渐降低, 比亚硝酸盐氧化速率 (SNUR) 没有显著变化, 氨氧化菌 (AOB) 和亚硝酸盐氧化菌 (NOB) 的长期温度修正系数分别为 1.078 和 1.007 8, NOB 的低温适应性强于 AOB; 定量 PCR 结果显示, AOB 丰度随着温度的降低而下降, 而 NOB 丰度没有明显变化; 但 NOB 中嗜冷菌 *Nitrotoga* 随着温度的降低而逐渐增加, 并取代 *Nitrospira* 成为 NOB 的优势菌属, 从而在一定程度上缓解因 *Nitrospira* 减少而引起的 SNUR 降低。因此, NOB 群落结构由 *Nitrospira* 向 *Nitrotoga* 迁移是其适应低温环境的关键。

关键词: 低温; 亚硝酸盐氧化菌; *Nitrotoga*; *Nitrospira*

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2021)23-0068-05

Strategy for Nitrite Oxidizing Bacteria Adapting to Low Temperature during Long-term Operation

YU Li-fang^{1,2}, MO Peng-cheng^{1,3}, YANG Xiu-ling¹, LI Rong-le¹, WEN Xing-mei¹,
PENG Dang-cong¹

(1. School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 2. Shaanxi Key Laboratory of Environmental Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 3. Northwest China Key Laboratory of Water Resource and Environment Ecology <Ministry of Education>, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: A sequencing batch reactor (SBR) was operated continuously at 20 °C, 15 °C and 10 °C in a long-running process, and effects of temperature on reactor performance, nitrification kinetics and nitrifying bacterial community structure were analyzed. With the decrease of temperature, specific ammonia uptake rate (SAUR) decreased gradually, but specific nitrite uptake rate (SNUR) did not change significantly. Arrhenius coefficients of ammonia oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB) during long-term operation were 1.078 and 1.007 8, respectively, indicating that NOB was more adaptable to low temperature than AOB. Quantitative PCR indicated that the abundance of AOB decreased with decreasing temperatures, while the abundance of NOB did not change significantly.

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2019ZDLSF06-05)

通信作者: 于莉芳 E-mail: yulifang@xauat.edu.cn

Nitrotoga, a psychrophilic bacterium in NOB, increased gradually with the decrease of temperature and replaced *Nitrospira* to become the dominant bacterium in NOB, thus reducing the SNUR decrease caused by the decrease of *Nitrospira* to a certain extent. Therefore, the migration of NOB community structure from *Nitrospira* to *Nitrotoga* was the key to its adaptation to low temperature environment.

Key words: low temperature; nitrite oxidizing bacteria (NOB); *Nitrotoga*; *Nitrospira*

由于反硝化所需碳源不足,传统生物脱氮工艺的出水总氮往往不能达标。近年来,新型生物脱氮工艺如厌氧氨氧化(Anammox)、SHARON等不断发展^[1-2],为生物脱氮提供了新方向。这些新型生物脱氮工艺需要亚硝酸盐作为电子受体参与反应,其应用的关键在于能否有效实现亚硝酸盐积累。

目前,许多学者对亚硝酸盐积累的实现方法进行了大量研究^[3],虽然采用的方法有所不同,但最终目的都是抑制亚硝酸盐氧化菌(NOB)的生长,逐渐将NOB淘汰。温度在氨氧化菌(AOB)和NOB的生长竞争中具有重要作用,是工艺运行的主要参数之一^[4]。Guo等^[5]研究发现,AOB和NOB的活化能和对温度的敏感性有显著差别。有学者^[4,6]认为,在20~30℃的温度范围内,AOB的比生长速率比NOB高,而当温度低于20℃时,NOB的比生长速率较高。冬季我国污水处理系统的水温约为10~14℃,在一些北方地区甚至会更低。因此,如何在低温条件下实现亚硝酸盐的积累成为新型生物脱氮工艺广泛应用的一个瓶颈,要解决这个问题,必须先了解NOB对低温的适应策略,而以往研究温度对NOB的影响多采用温度骤降的方式得到温度的影响系数,但在实际污水处理过程中,生物脱氮系统水温季节性变化通常是一个长期并且相对缓慢的过程。因此,在长期运行过程中,NOB对于低温的适应策略可能与之前在短期或冲击实验中获得的结果有所不同^[5]。

笔者在20、15和10℃的条件下连续运行以完全硝化方式处理高氨氮废水的SBR反应器,考察了整个运行过程中温度对反应器性能、硝化动力学和硝化菌群落的长期影响,着重分析NOB的低温适应策略,旨在为新型生物脱氮工艺在低温下的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验装置与运行

SBR反应器的有效容积为4L,接种污泥取自西安市第二污水处理厂,反应器每天进水6次,每次

1.5L,运行周期为4h(边进水边曝气5min、曝气181min、沉淀40min、出水5min、闲置9min)。溶解氧(DO)浓度控制在2~3mg/L。通过补充NaHCO₃维持系统pH值为7.5~8.5。

1.2 实验用水

进水为人工配水。为了减少异养菌对硝化菌的影响,采用低C/N值的高氨氮废水。COD为100mg/L, NH₄⁺-N浓度为50~300mg/L。在启动阶段, NH₄⁺-N浓度逐渐升高,直至稳定阶段的300mg/L。1L配水中包括191~1149mg的NH₄Cl、128mg的醋酸钠(NaAc)、44mg的KH₂PO₄、5.8mg的FeSO₄·7H₂O和0.25mL的微量元素溶液。1L微量元素溶液含有50mg的EDTA、1.57mg的CuSO₄·5H₂O、5.06mg的MnCl₂·4H₂O、5mg的ZnSO₄·7H₂O、1.10mg的(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O。

1.3 分析项目及方法

NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N、COD、MLSS、MLVSS和SVI按《水和废水监测分析方法》(第4版)进行测定。DO采用梅特勒溶氧仪测定,pH值采用雷磁pH计测定,活性污泥形态利用显微镜进行观察。比氨氧化速率(SAUR)和比亚硝酸盐氧化速率(SNUR)参照文献[7]进行测定。AOB和NOB的温度修正系数,由Arrhenius方程对三种温度稳定运行期测定的SAUR和SNUR进行拟合所得。

采用qPCR技术对活性污泥中AOB和NOB(包括*Nitrospira*、*Nitrobacter*和*Nitrotoga*)进行定量分析。样品以10000r/min的转速离心5min,采用土壤基因组DNA提取试剂盒从离心后的湿污泥中提取DNA,将提取后的DNA样品储存于-20℃冰箱中保存。PCR引物如表1所示。PCR扩增条件为:94℃预变性5min,94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s,共循环30次,最后一轮循环完成后在72℃条件下再延伸10min。qPCR反应体系为0.5μL(10μmol/L)PCR特异引物F、0.5μL(10μmol/L)PCR特异引物R、10μL2×Taq Master Mix,加水至18μL。反应按95℃预变性30s、40个PCR循环

(95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火延伸 40 s) 的程序进行。

表 1 定量 PCR 所使用的引物序列

Tab. 1 Primer sets included in quantitative PCR assay

硝化菌	目的基因	引物	引物序列 (5' - 3')
AOB	amoA	amoA - 1F	GGGGTTTCTACTGGTGCT
		amoA - 2R	CCCCTCTGCAAAGCCTTCTTC
<i>Nitrospira</i>	<i>nxB</i> gene	<i>nxB</i> - 169F	TACATGTGGTGGAACA
		<i>nxB</i> - 638R	CGGTTCTGGTCRATCA
<i>Nitrobacter</i>	16S rRNA	FGPS1269'	TTTTTTGAGATTTGCTAG
		FGPS872	CTAAAACTCAAAGGAATTGA
<i>Nitrotoga</i>	Nitrotoga-like 16S rRNA	Ntoga124F	ATCGGAACGTACCCGGAAA
		Ntoga1462R	CGAACCCTACCGTGGAAC

2 结果与讨论

2.1 反应器的运行状况

反应器在 20、15 和 10 ℃ 条件下分别运行 127、65 和 78 d, 进出水中氮浓度的变化如图 1 所示。可知, 在前 60 d 启动期内, 进水 NH_4^+ -N 浓度从 50 mg/L 逐渐提高至 300 mg/L, 然后反应器稳定运行。在 15 和 10 ℃ 条件下, 进水 NH_4^+ -N 浓度从 150 mg/L 逐渐提高至 300 mg/L, 之后系统稳定运行。三种温度条件下的稳定运行阶段, 反应器实现了完全硝化, 出水 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 低于检测下限, 平均 NH_4^+ -N 去除率达到 99.6%, 出水 NO_3^- -N 浓度为 239.78 ~ 299.58 mg/L。

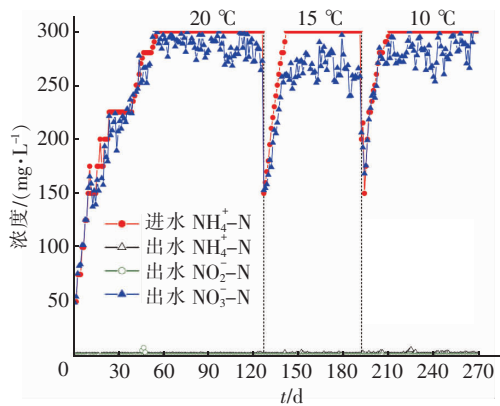


图 1 进出水中氮浓度的变化

Fig. 1 Variation of nitrogen concentration of influent and effluent

图 2 为三种温度条件下 SBR 稳定运行期典型周期内的氮转化过程。可以看出, 三种温度条件下的氮浓度变化趋势相同。进水结束后, NH_4^+ -N 浓度随时间的延长逐渐降低, 直至降解完全, 但随着温度的降低, NH_4^+ -N 完全降解所需时间逐渐延长, 说

明 SAUR 随温度的降低而下降。 NO_2^- -N 浓度先逐渐升高, 达到峰值(最大积累浓度)后逐渐降低。值得注意的是, 20 ℃ 时 NO_2^- -N 峰值为 41.09 mg/L (45 min 时), 15 ℃ 时为 34.10 mg/L (60 min 时), 而 10 ℃ 时为 17.53 mg/L (75 min 时), 可见随着温度的降低, NO_2^- -N 峰值下降, 且峰值出现的时间延后。进水结束后, 由于稀释作用 NO_3^- -N 浓度达到最低, 之后逐渐升高。

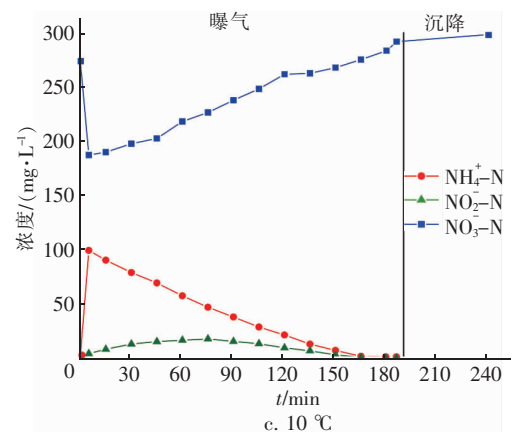
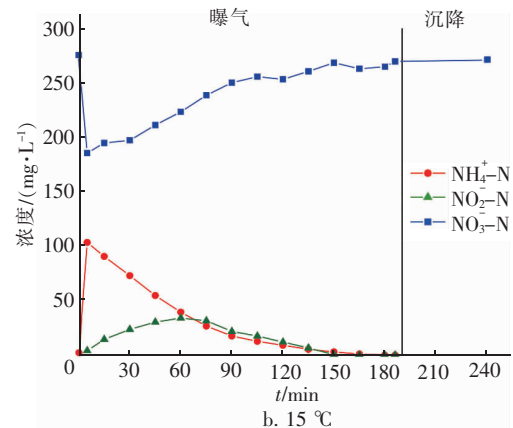
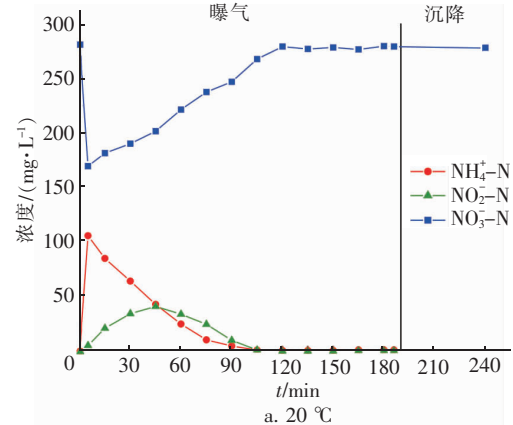


图 2 SBR 典型周期内氮的转化过程

Fig. 2 Conversion of nitrogen in a typical cycle of SBR

2.2 硝化活性

分析接种污泥和不同温度下反应器中活性污泥的硝化活性,结果表明,接种污泥的 SAUR 和 SNUR 分别为 3.85 和 3.09 mgN/(gVSS · h)。由于反应器进水 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度远高于污水厂进水 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度,稳定运行期 SBR 活性污泥的硝化活性显著高于接种污泥。在 20、15 和 10 °C 条件下,稳定期内 SBR 的 SAUR 分别为 (55.38 ± 1.01) 、 (40.03 ± 0.66) 和 (25.11 ± 0.85) mgN/(gVSS · h), SAUR 随着温度的降低而下降。Guo 等^[5]的研究也发现了类似的结果,当温度从 25 °C 下降至 15 °C 后,比氨氧化速率下降约 33%。然而,不同温度下相应的 SNUR 分别为 (58.70 ± 6.83) 、 (56.21 ± 5.64) 和 (54.32 ± 1.03) mgN/(gVSS · h),随着温度的下降,SNUR 未发生明显变化。

值得注意的是,活性污泥在三种温度条件下的 SNUR 值均大于 SAUR 值,而且二者差距随着温度的下降而增大。而实际反应器中,由于硝化反应在低基质浓度条件下符合一级反应动力学,速率受基质浓度影响。由图 2 可知, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 初始浓度较高,氨氧化过程不受限制,氨氧化速率接近各温度条件下的 SAUR,但亚硝酸盐所需基质 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 是氨氧化过程的产物,初始浓度接近于 0,因此实际反应器中亚硝酸盐氧化速率应该远低于 SNUR,从而导致典型周期内 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 积累,但由于三种温度条件下,SNUR 随温度的变化不大,反应器中亚硝酸盐氧化过程受温度的影响较小,因此反应器中 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 峰值随温度的下降逐渐降低。

经计算,温度由 20 °C 降至 10 °C 时,AOB 的温度修正系数为 1.078 ($R^2 = 0.98$),处于传统污水处理厂硝化菌温度修正系数 1.076 ~ 1.127 范围内^[8];而 NOB 的温度修正系数为 1.007 8 ($R^2 = 0.99$),远低于相关研究^[9]中 *Nitrobacter* (1.057) 和 *Nitrospira* (1.053) 的温度修正系数。当 SBR 在 10 ~ 20 °C 范围内长期运行时,SNUR 的温度依赖性较低,与 AOB 相比,NOB 具有较强的低温适应性。

2.3 硝化菌群落分析

图 3 为接种污泥和三种温度条件下稳定运行期内活性污泥 qPCR 的分析结果。由图 3(a)可知,由于稳定期进水 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 浓度高达 300 mg/L 左右,反应器活性污泥中 AOB 和 NOB 的丰度显著高于接种污泥。随着温度的降低,活性污泥中 AOB 的丰度

显著下降(20 °C 时为 4.10×10^{10} copies/gMLSS, 15 °C 时为 2.39×10^{10} copies/gMLSS, 10 °C 为 1.25×10^{10} copies/gMLSS)。然而,NOB 丰度没有显著变化,甚至当温度从 15 °C 降至 10 °C 时,NOB 丰度还略有增加。

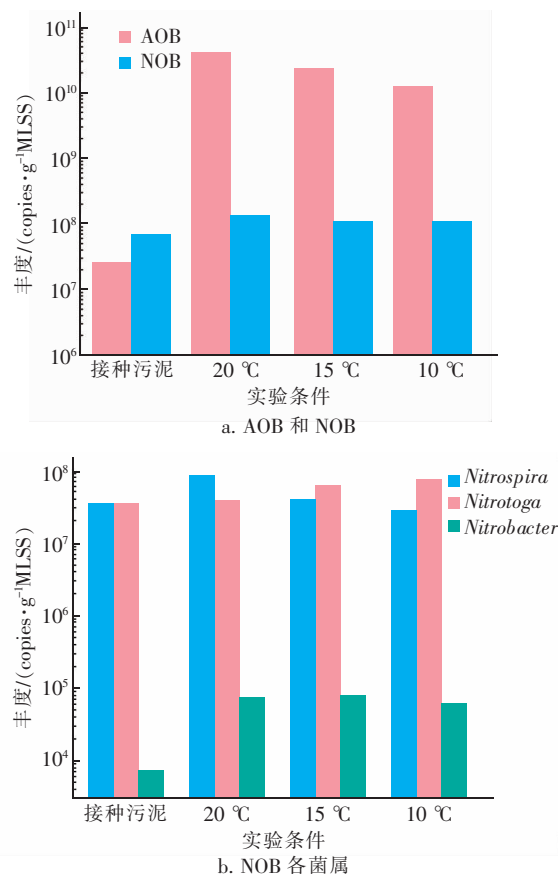


图3 AOB 和 NOB 的丰度变化

Fig.3 Change of abundance of AOB and NOB

从图 3 (b) 可以看出,随着温度的下降,*Nitrospira* 丰度降低,当温度为 20、15、10 °C 时,丰度分别为 9.18×10^7 、 4.28×10^7 、 2.94×10^7 copies/gMLSS;而 *Nitrobacter* 的丰度变化不明显。但是,当温度为 20、15、10 °C 时,*Nitrotoga* 丰度分别为 4.13×10^7 、 6.48×10^7 、 7.85×10^7 copies/gMLSS,即 *Nitrotoga* 丰度随着温度的下降而逐渐增加。上述数据说明,在温度为 20 °C 时,*Nitrospira* 为 NOB 优势菌属,占比为 68.93%。然而,随着温度的降低,*Nitrotoga* 成为 NOB 的优势菌属,在 15 和 10 °C 时其占比分别为 60.18% 和 72.71%。

Nitrotoga 在功能上属于嗜冷 NOB^[10-12]。相关研究表明,在低于 17 °C 的条件下可有效富集 *Nitrotoga*^[13]。本研究中,随着温度的降低,*Nitrotoga*

数量的增多在一定程度上弥补了 *Nitrospira* 数量的减少,因此温度降低对 SNUR 没有显著影响。与 AOB 相比,NOB 表现出较强的低温适应性。另外,温度降低过程中,*Nitrotoga* 替代 *Nitrospira* 成为 NOB 的优势菌属,从而导致研究中 NOB 的温度修正系数小于 *Nitrobacter* 和 *Nitrospira* 的温度修正系数。以上结果表明,要在低温下实现亚硝酸盐积累,必须抑制低温下 NOB 优势菌 *Nitrotoga* 的生长,如对回流污泥进行间歇热处理。

3 结论

随着温度的降低,SAUR 逐渐降低,而 SNUR 没有明显变化,AOB 和 NOB 的温度修正系数分别为 1.078 和 1.007 8,NOB 对低温的适应性更强。温度降低,嗜冷的 *Nitrotoga* 逐步取代 *Nitrospira* 成为 NOB 优势菌属,一定程度上缓解了因 *Nitrospira* 减少引起的 SNUR 降低问题,因此群落结构由 *Nitrospira* 向 *Nitrotoga* 迁移是 NOB 适应低温的关键。要在低温条件下通过部分硝化实现亚硝酸盐积累,应抑制低温下 NOB 优势菌 *Nitrotoga* 的生长。

参考文献:

- [1] SHALINI S S, JOSEPH K. Combined SHARON and ANAMMOX processes for ammoniacal nitrogen stabilisation in landfill bioreactors [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 723 – 732.
- [2] YIN S Y, LI J, DONG H Y, *et al.* Enhanced nitrogen removal through marine anammox bacteria (MAB) treating nitrogen-rich saline wastewater with Fe (III) addition: nitrogen shock loading and community structure [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 287: 121405.
- [3] 吴春英,白鹭. 新型短程硝化同步反硝化除磷工艺的运行调控[J]. *中国给水排水*, 2019, 35 (11): 108 – 112.
WU Chunying, BAI Lu. Operation and regulation of a novel shortcut nitrification coupled with simultaneous denitrifying phosphorus removal process [J]. *China Water & Wastewater*, 2019, 35 (11): 108 – 112 (in Chinese).
- [4] KOWALSKI M S, DEVLIN T R, DI BIASE A, *et al.* Controlling cold temperature partial nitrification in moving bed biofilm reactor[J]. *Chemosphere*, 2019, 227: 216 – 224.
- [5] GUO J H, PENG Y Z, HUANG H J, *et al.* Short- and long-term effects of temperature on partial nitrification in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 179 (1/3): 471 – 479.
- [6] KÄELIN D, MANSER R, RIEGER L, *et al.* Extension of ASM3 for two-step nitrification and denitrification and its calibration and validation with batch tests and pilot scale data[J]. *Water Research*, 2009, 43 (6): 1680 – 1692.
- [7] YU L F, LI R, DELATOLLA R, *et al.* Natural continuous influent nitrifier immigration effects on nitrification and the microbial community of activated sludge systems[J]. *Journal of Environmental Science*, 2018, 74: 159 – 167.
- [8] GRUNDITZ C, DALHAMMAR G. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* [J]. *Water Research*, 2001, 35 (2): 433 – 440.
- [9] BLACKBURNE R, VADIVELU V M, YUAN Z G, *et al.* Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter* [J]. *Water Research*, 2007, 41 (14): 3033 – 3042.
- [10] ISHII K, FUJITANI H, SOH K, *et al.* Enrichment and physiological characterization of a cold-adapted nitrite-oxidizing *Nitrotoga* sp. from an eelgrass sediment [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2017, 83 (14): e005549 – 17.
- [11] LUCKER S, SCHWARZ J, GRUBER-DORNINGER C, *et al.* *Nitrotoga*-like bacteria are previously unrecognized key nitrite oxidizers in full-scale wastewater treatment plants [J]. *The ISME Journal*, 2015, 9 (3): 708 – 720.
- [12] SAUNDERS A M, ALBERTSEN M, VOLLERTSEN J, *et al.* The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms [J]. *The ISME Journal*, 2016, 10 (1): 11 – 20.
- [13] ALAWI M, LIPSKI A, SANDERS T, *et al.* Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic [J]. *The ISME Journal*, 2007, 1 (3): 256 – 264.

作者简介:于莉芳(1981—),女,湖南衡阳人,博士,副教授,主要研究方向为废水生物处理技术。

E-mail: yulifang@xauat.edu.cn

收稿日期:2019-12-04

修回日期:2020-01-13

(编辑:任莹莹)