

三价铁对有机物存在下厌氧氨氧化脱氮的影响

王海月,彭 玲,毛念佳,耿金菊,任洪强,许 柯* (南京大学环境学院,污染控制与资源再利用国家重点实验室,江苏 南京 210023)

摘要: 考察了三价铁(2.24~7.84mg/L)存在下厌氧氨氧化系统对有机物的耐受性能,并通过 16SrRNA 高通量测序技术和定量 PCR 探究其机理.结果表明,进水 COD 浓度为 50 和 100mg/L 时,4 个反应器的氨氮和总氮去除率均较高(>90%),三价铁的强化作用不明显;进水 COD 浓度继续升高(150 和 200mg/L),厌氧氨氧化受到抑制,三价铁的强化作用逐渐增加;COD 浓度为 200mg/L 时,添加三价铁(7.84mg/L)可将氨氮和总氮去除率由 61.3%和 79.8%(对照组)提升至 71.2%和 84.7%.16SrRNA 高通量测序技术表明,有机物存在下,污泥微生物群落结构出现变化,主要表现为厌氧氨氧化菌丰度的降低及反硝化菌群的大量增殖,进水添加三价铁可提高浮霉菌(Planctomycetes)的丰度.定量 PCR 结果表明,三价铁能够提高厌氧氨氧化菌 16S rRNA 及功能基因 *hzsB* 的丰度.

关键词: 三价铁; 生物脱氮; 厌氧氨氧化; 厌氧颗粒污泥膨胀床; COD

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2021)04-1672-09

Effect of Fe³⁺ on nitrogen removal of Anammox in the presence of organic matter. WANG Hai-yue, PENG Ling, MAO Nian-jia, GENG Jin-ju, REN Hong-qiang, XU Ke* (State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China). *China Environmental Science*, 2021,41(4): 1672~1680

Abstract: The tolerance of Anammox to organic matter in the presence of Fe³⁺ (2.24~7.84mg/L) was investigated by running four reactors (R1 control, R2 2.24mg/L Fe³⁺, R3 4.48mg/L Fe³⁺, R4 7.84mg/L Fe³⁺). The mechanism was clarified by using 16SrRNA high-throughput sequencing technology and qPCR. The results showed that high NH₄⁺-N and TN removal rates (> 90%) of all four reactors could be achieved at the influent COD concentration of 50 and 100mg/L, and the presence of Fe³⁺ did not show the obvious positive effect. As the influent COD concentration increased to 150 and 200mg/L, the performance of Anammox was inhibited and the positive effect of Fe³⁺ increased. When the influent COD concentration was 200mg/L, the addition of Fe³⁺ (7.84mg/L) increased the NH₄⁺-N and TN removals from 61.3% and 79.8% (R1) to 71.2% and 84.7%, respectively. 16SrRNA high-throughput sequencing results indicated the decrease of Anammox bacteria and the proliferation of denitrifying bacteria in the presence of organic matter. The presence of Fe³⁺ could increase the abundance of Planctomycetes. Fe³⁺ had promoting effects on the abundance of Anammox 16S rRNA and functional gene *hzsB* by qPCR data analysis.

Key words: Fe³⁺; biological nitrogen removal; Anammox; expanded granular sludge bed (EGSB); COD

厌氧氨氧化(Anammox)可在厌氧条件下实现氨氮和亚硝酸盐的同时去除,相较于传统硝化反硝化工艺,具有节省 60%曝气消耗,无需外加有机碳源,减少 90%污泥产生量等优势,近年来得到广泛关注^[1-2].

迄今为止,全世界已建立了 200 多个基于 Anammox 工艺的全规模污水处理厂^[3].Anammox 工艺主要适用于处理低碳氮比的高氨氮废水^[4],而实际废水中含有浓度,种类不同的有机物质^[5],通常认为有机物的存在会对厌氧氨氧化菌产生负面影响^[6-8].在 Anammox 系统中,脱氮性能取决于厌氧氨氧化和反硝化的竞争共存,但是,由于反硝化反应在热力学上比厌氧氨氧化反应更有利,以及厌氧氨氧化菌的低生长速率和低产率,在有足够化学需氧量(COD)的系统中很难维持厌氧氨氧化菌的高丰度,

从而影响系统的稳定性^[9].相关研究发现进水 COD 浓度约为 280mg/L 时会完全抑制厌氧氨氧化过程^[6].因此,为避免有机负荷过大,通常在主流厌氧氨氧化工艺中采取有机碳分离预处理措施.例如,以混合厌氧反应器(HAR)作为预处理捕集 COD 并进行资源回收^[10],但低温和低底物浓度会阻碍厌氧预处理的应用.由此可见,当前的研究重点是提高 Anammox 工艺自身耐受有机物的性能,开发可行有效的新技术至关重要.

铁作为含铁蛋白的组成部分,在微生物的代谢和生长中起着关键作用^[11].铁元素可能影响厌氧

收稿日期: 2020-07-27

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07202003)

* 责任作者, 副教授, kexu@nju.edu.cn

氨氧化菌的代谢, Van Niftrik 等^[12]发现厌氧氨氧化菌体内含有铁储存颗粒. 研究表明, 在合理的 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 浓度下, Anammox 的活性可以通过维持较高的氧化还原电位和聚集酰基-高丝氨酸内酯 (AHLs) 来增强, 而 AHLs 被认为是细胞间通讯的重要物质^[13]. Wang 等^[14]发现添加到聚乙烯醇/壳聚糖/铁凝胶珠中的铁离子与带负电的细胞外聚合物之间的相互作用可以提升 Anammox 生物质颗粒的致密性, 从而有效地提高反应器中的生物质保留能力, 保护细胞抵御外部压力. Yin 等^[15]报道添加 Fe^{3+} (5mg/L) 促进了海洋厌氧氨氧化菌的生长速度, 从而实现了更高的总氮去除率. 此外, 研究发现 Fe^{3+} 浓度从 2.24mg/L 增加至 5.6mg/L 时, 厌氧氨氧化菌生长速率从 0.1343d^{-1} 增加到 0.1709d^{-1} ^[16]. 然而, 关于 Fe^{3+} 对有机物存在下厌氧氨氧化系统的脱氮规律变化及污泥微生物群落动态变化的研究报道尚少, 且 Fe^{3+} 对相关氮素转化功能基因的长期影响仍不清楚.

本文系统考察了三价铁存在下厌氧氨氧化系统对有机物的耐受性能, 阐述了三价铁对厌氧氨氧化工艺运行中氮素转化, 污泥活性的影响, 分析了微生物群落结构的变化及相关氮素转化功能基因的表达. 通过这些研究, 为三价铁强化厌氧氨氧化工艺提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 实验装置

实验采用厌氧膨胀床反应器(EGSB), EGSB 反应器能使微生物有效滞留, 并使污泥流态化, 促进基质传递及产气释放. 此外, 维持污泥膨胀所进行的出水回流, 可削弱基质自抑制效应, 非常适于厌氧氨氧化工艺的启动及运行. 实验采用的 EGSB 反应器由有机玻璃制成, 其高径比为 6, 有效容积为 0.8L. 模拟废水由蠕动泵泵入反应器, 在升流运动中完成氮素转化, 气体由顶部的气室排出, 出水由溢流堰排放. 反应器出水回流比为 8, 液面上升速度为 0.1m/h , 为防止光的负面影响, 反应器外裹锡纸. 实验装置如图 1 所示.

实验采用 4 个完全一致的 EGSB 反应器, 编号 R1, R2, R3, R4, 其中 R1 为对照组, R2, R3, R4 为实验组, 进水添加三价铁浓度分别为 2.24, 4.48, 7.84mg/L, 以

氯化铁形式提供. 模拟废水 pH 值调节在 6.7~6.8, 曝高纯氮气(>99.5%)至溶解氧(DO)低于 0.5mg/L 后, 进入密封进水箱. 反应器连续进水, 温度通过夹层层控制在 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$.

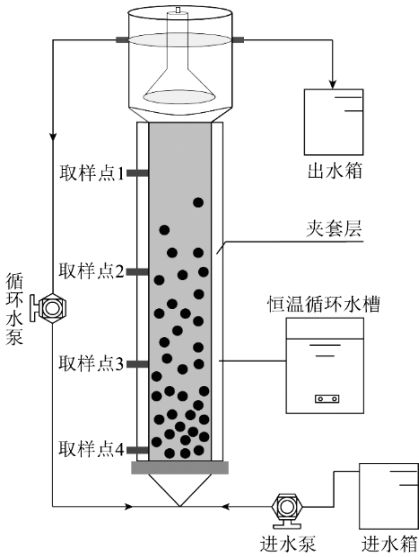


图 1 实验装置示意
Fig.1 Schematic diagram of the experimental device

1.2 接种污泥与实验进水

试验污泥取自于南京大学污染控制与资源再利用国家重点实验室的具有良好厌氧氨氧化性能的污水处理反应器, 污泥含量为 3.65g VSS/L. 稳定运行后反应器引入有机物(葡萄糖), 并加入三价铁. 实验采用模拟废水, 氮素以硫酸铵及亚硝酸钠提供, 浓度按需配制. 模拟废水组分如表 1 所示, 为满足微生物生长要求, 模拟废水中加入 1.25mL/L 微量元素浓缩液, 组分参考已发表文献[17].

表 1 模拟废水组分
Table 1 Components of simulated wastewater

组分	浓度(mg/L)	组分	浓度(mg/L)
硫酸铵	-	七水合硫酸镁	300
亚硝酸钠	-	碳酸氢钠	500
磷酸二氢钾	10	乙二胺四乙酸	25
二水合氯化钙	5.6	微量元素	1.25mL/L

1.3 分析项目与检测方法

1.3.1 常规指标测定与分析 采集进水和出水水样, 经 $0.45\mu\text{m}$ 玻璃纤维膜过滤后进行分析. NH_4^+-N , NO_2^--N , NO_3^--N , COD 采用标准方法测定 (APHA

1998).溶解氧(DO),pH 值采用便携式溶氧仪(HQ40d, HACH, America and PB-10, Sartorius, Germany)和 pH 计(FE20, METTLER TOLEDO Inc., USA)测定.

氨氮,亚硝酸盐及总氮去除率参照式 1,2,3 计算.

$$R(\text{NH}_4^+ - \text{N}) = \frac{C(\text{Inf.NH}_4^+) - C(\text{Eff.NH}_4^+)}{C(\text{Inf.NH}_4^+)} \times 100\% \quad (1)$$

$$R(\text{NO}_2^- - \text{N}) = \frac{C(\text{Inf.NO}_2^-) - C(\text{Eff.NO}_2^-)}{C(\text{Inf.NO}_2^-)} \times 100\% \quad (2)$$

$$R(\text{TN}) = \frac{C(\text{Inf.TN}) - C(\text{Eff.TN})}{C(\text{Inf.TN})} \times 100\% \quad (3)$$

式中: $C(\text{Inf.NH}_4^+)$, $C(\text{Eff.NH}_4^+)$, $C(\text{Inf.NO}_2^-)$, $C(\text{Eff.NO}_2^-)$, $C(\text{Inf.TN})$, $C(\text{Eff.TN})$ 分别代表进出水中氨氮,亚硝酸盐及总氮浓度,mg/L.

1.3.2 微生物特性指标检测 (1)比厌氧氨氧化活性(SAA)测定:从反应器中取一定量污泥加入 100mL 血清瓶中,使瓶内 VSS 为 2.0g/L,加入 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 及 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 浓度分别为 70 和 92mg/L 的模拟废水 80mL,通入高纯氮(>99.5%)15min,保证其无氧环境.血清瓶置于恒温振荡器中,温度设定为 35℃.用注射器间隔取样,测定血清瓶中 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度以确定比厌氧氨氧化活性.(2)氮素转化功能基因及功能菌丰度测定:取定量污泥,使用试剂盒 FastDNA™ Spin Kit for soil 提取 DNA.定量 PCR 分析选取细菌 16S rRNA,厌氧氨氧化菌 16S rRNA 及相关氮素转化功能基因.引物选取参考已发表文献[17],并由南京金斯瑞生物科技有限公司合成.反应体系为 25μL,包括:12.5μL 的 2×EasyTaq® PCR SuperMix,2μL DNA 模板(稀释至 20ng/μL),正反向引物各 1μL(20μM)及 8.5μL 的 ddH₂O,扩增程序循环数为 25.定量 PCR 扩增在实时荧光定量 PCR 仪 AB7500(Life Technologies,美国)上进行.(3)微生物群落结构分析:取适量污泥样品,用 FastDNA SPIN Kit for soil 试剂盒进行 DNA 提取.采用细菌通用引物对污泥样品 DNA 进行 16S rRNA 扩增,引物序列及扩增体系参考已发表文献[17].混合 4 份 PCR 扩增产物,用 E.Z.N.A.™ Cycle-Pure Kit 试剂盒进行纯化,送至江苏中宜金大分析检测有限公司进行分析.所有测序数据均已上传至 Figshare 平台,DOI 为 10.6084/m9.figshare.12850043,各样品的序列信息见表 2.

1.3.3 数据分析 运用 SPSS 22.0 软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA,置信水平 95%), $P < 0.05$

视为具有显著性影响.采用 Canoco 软件进行冗余分析(RDA),进一步分析细菌群落相对丰度和功能基因及功能菌丰度与环境因子间的相关性.

表 2 样品序列信息

Table 2 Information about the reads of samples

生物膜样品	总序列数	均一化后序列数
R1-20d	24189	20000
R2-20d	24601	
R3-20d	24820	
R4-20d	26847	
R1-60d	28517	
R2-60d	22878	
R3-60d	34747	
R4-60d	32929	

2 结果与讨论

2.1 有机物存在下的进出水水质

反应器中污泥含量为 3.65g VSS/L.运行前 20d,各组反应器平行运行.20d 达到稳定,进水添加三价铁和有机物,有机物按 50,100,150,200mg/L COD 梯度同步提高.0~60d 进水氨氮及亚硝酸盐浓度分别稳定为 152.5,200mg/L.出水氨氮,亚硝酸盐,硝酸盐浓度及其去除率如图 2 所示.

由图 2 可知,反应器 R1 在 20~30d 时,平均氨氮,亚硝酸盐及总氮去除率分别提高为 95.5%,98.1%及 95.1%,相较于未添加有机物,总氮去除率明显提高;30~40d 时,COD 浓度提高为 100mg/L,反应器氮素去除率仍较高;进水 COD 提高为 150mg/L 时(40~50d),反应器中氨氮去除率降低至 83.2%,平均亚硝酸盐及总氮去除率分别为 97.5%及 89.6%;而当进水 COD 进一步提升至 200mg/L 时(50~60d),氨氮去除率下降为 61.3%,亚硝酸盐平均去除率为 97.3%,总氮去除率下降为 79.8%,出水 pH 值为 8.3 ± 0.2 ,几乎超过厌氧氨氧化菌最适生长 pH 值范围.

有机物存在下,实验组 R2,R3,R4 呈现出与 R1 类似的运行特征,但由于进水三价铁添加量的不同,反应器在不同阶段运行效能存在一定差异.R2,R3,R4 中在同一时段氮素去除率高于 R1.当 COD 浓度提升至 200mg/L 时, R2,R3,R4 的氨氮去除率分别为 63.0%,68.2%,71.2%;总氮去除率分别为 80.5%,82.9%,84.7%.

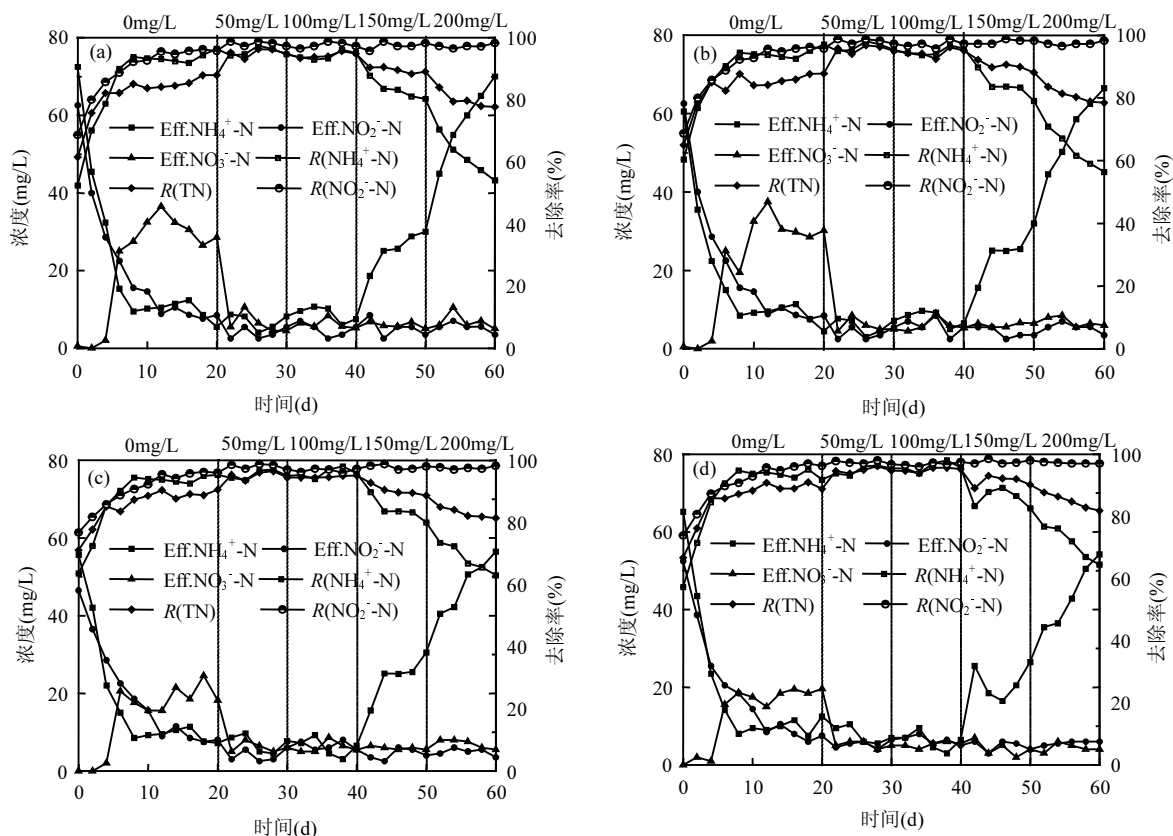


图2 有机物存在下水氮素浓度及其去除率

Fig.2 Nitrogen concentration and removal efficiency of effluent in the presence of organic matter

(a) R1; (b) R2; (c) R3; (d) R4;上方浓度为 COD 梯度,下同

厌氧氨氧化反应器为混菌系统,胡勇有等^[18]发现葡萄糖存在下厌氧氨氧化菌与反硝化菌协同脱氮适宜的 COD 与氨氮的比值在 0~1.57;Winkler 等^[19]认为在进水的 C/N 比小于 0.5 时,厌氧氨氧化菌能胜过异养反硝化菌.在本实验中,进水 COD 浓度为 50,100mg/L 时,各反应器中氮素去除率提升明显,此时厌氧氨氧化作用起主导作用,反硝化菌协同降解厌氧氨氧化反应产生的硝酸盐,提高了总氮去除率,其他研究也观察到了类似现象^[6].而 COD 浓度提升为 150mg/L 时,出水中氨氮浓度明显提升,这一现象,在进水 COD 浓度升高为 200mg/L 时更明显,此时 COD 与氨氮比值为 1.32,出水氨氮浓度显著升高,同时亚硝酸盐及硝酸盐去除效果明显,主要的脱氮途径从厌氧氨氧化转变为反硝化.厌氧氨氧化活性降低的一种可能解释是,在高有机物含量下,异养反硝化菌将以更快的速率生长,厌氧氨氧化菌在与反硝化菌竞争生存空间和亚硝酸盐(电子受体)时占劣势,同时反硝化过程使 pH 值升高,可能超出厌氧氨氧化菌生长范围^[20].朱

葛夫等^[21]采用 CSTR 反应器研究了以异养反硝化污泥启动厌氧氨氧化系统的可行性,并指出系统的最适 C/N 比为 2.14,与本研究结果有明显不同,这可能与采用的反应器载体,接种污泥的来源有关,推测是电子受体竞争而不是 COD 浓度本身导致了厌氧氨氧化活性降低.

在进水存在有机物的条件下,由于实验组中三价铁的加入,反应器在整体运行中的氮素转化呈现出一定的不同.在同一时段,实验组中氨氮,亚硝酸盐及总氮去除率略高于对照组 R1,这在 R3,R4 中体现得更为明显.有研究表明,三价铁作为酶的常见活性剂,有可能提高微生物代谢活性,促进其生长^[22],实验组中较高的氮素去除率,可能因为三价铁的添加,提高了反硝化菌及厌氧氨氧化菌的活性.

2.2 污泥比厌氧氨氧化活性

为探究有机物存在下污泥活性的变化,选取各反应器 20,30,40,50,60d 时的污泥,测定其比厌氧氨氧化活性,其结果如图 3 所示.

各反应器运行至 20d 时,由于接种污泥相同且

同步运行, SAA 几乎一致. 20d 时进水加入葡萄糖, COD 浓度为 50mg/L. 运行至 30d 时, 各反应器污泥 SAA 分别为 106.5, 115.2, 118.6, 118.2mg N/(g VSS·d). 由出水水质可得, 由于反应器中反硝化作用, 总氮去除率有一定升高, 同时厌氧氨氧化活性并未受到抑制, 氮素去除效果较好. 40d 时, R2, R3, R4 污泥 SAA 分别比 R1 高 7.9, 11.9, 13.8mg N/(g VSS·d), 说明添加三价铁提高了污泥厌氧氨氧化活性.

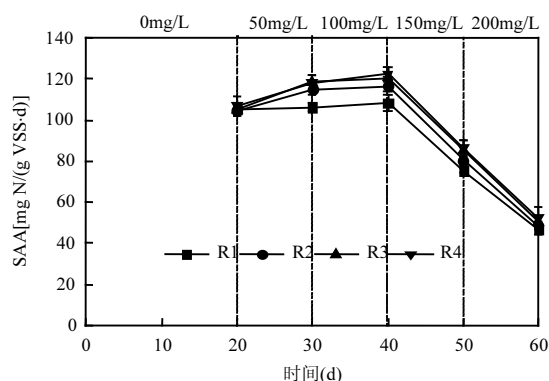


图3 有机物存在时各反应器污泥厌氧氨氧化活性的变化

Fig.3 Variation of specific anammox activity in sludge samples in reactors in the presence of organic matter

当进水 COD 浓度为 150 和 200mg/L 时, 各反应器污泥 SAA 明显下降, 实验组中污泥 SAA 高于对照组, 60d 时, R1, R2, R3, R4 污泥 SAA 分别为 46.8, 48.5, 50.3, 52.4mg N/(g VSS·d), 可推断出在高有机物浓度下, 三价铁的添加可以提高厌氧氨氧化污泥的活性, 增强污泥的有机物耐受能力.

由图 3 可知, 无论进水 COD 浓度如何, 同一时间点各反应器中污泥 SAA 均与三价铁添加量呈现出一定的正相关, SAA 高低顺序为: R4 > R3 > R2 > R1, 与各反应器氮去除率结果一致.

2.3 微生物群落变化

由于厌氧氨氧化反应器为混菌系统, 研究有机物存在下污泥微生物群落的变化, 可从微观层面上解释三价铁对厌氧氨氧化运行过程的影响. 本研究选取 16S rRNA 高通量测序技术分析微生物群落结构, 比较有机物存在时不同三价铁添加量对微生物群落结构的影响, 探讨微生物群落结构变化与脱氮效能之间的关系.

2.3.1 有机物存在下细菌门水平群落结构变化 图 4 为有机物存在下反应器中微生物群落结构

门水平分布图. 由图 4 得, 20d 时各反应器中污泥微生物群落结构接近一致, 变形菌(Proteobacteria)和绿弯菌(Chloroflexi)为优势菌门, 其丰度分别为 34.72%~35.25%及 19.60%~20.38%. 据报道, 主要的反硝化微生物属于变形菌(Proteobacteria)^[23]. 绿弯菌(Chloroflexi)可支持生物膜结构的完整性, 并且可以在缺氧条件下清除源自厌氧氨氧化菌的代谢产物^[24]. 放线菌(Actinobacteria)及拟杆菌(Bacteroidetes)在各反应器中也有一定比例. 此外, 各反应器中与厌氧氨氧化菌相关的浮霉菌(Planctomycetes)丰度接近, 为 5.52%~5.54%, 这与其他厌氧氨氧化反应器的报道相似^[4].

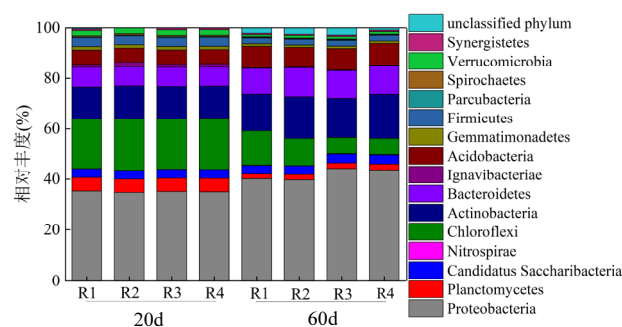


图4 有机物存在下污泥中门水平优势菌分布

Fig.4 Distribution of dominant bacteria in phylum level in sludge under the presence of organic matter

经历有机负荷冲击后, 60d 时反应器中门水平群落结构变化明显. R1, R2, R3, R4 中变形菌(Proteobacteria)丰度分别提升至 40.16%, 39.69%, 44.25%, 43.67%; 绿弯菌(Chloroflexi)则分别下降至 13.53%, 10.66%, 6.21%, 6.23%; 放线菌(Actinobacteria)及拟杆菌(Bacteroidetes)均有一定增长. 门水平上浮霉菌(Planctomycetes)明显减少, 这种变化也类似于处理高浓度 COD 废水的其他厌氧氨氧化菌反应器^[4]. 但各反应器中浮霉菌(Planctomycetes)减少的程度不同, R1, R2, R3, R4 中浮霉菌(Planctomycetes)丰度分别降至 1.83%, 2.16%, 2.24%, 2.45%. 结果表明, 浮霉菌(Planctomycetes)丰度与所添加三价铁浓度呈正相关性($R^2=0.962$, $P<0.05$), 而所有已确认的厌氧氨氧化菌均属于浮霉菌(Planctomycetes)门, 其丰度可反映厌氧氨氧化菌的生存状态^[5], 可以推断三价铁的添加促进了厌氧氨氧化菌的富集生长.

2.3.2 有机物存在下细菌属水平群落结构变

化 图 5 为有机物存在下污泥属水平下优势菌群分布变化.*Candidatus Brocadia*是具有厌氧氨氧化能力的优势属,但其丰度随着进水 COD 的升高而降低,这在 R1,R2 中体现的更为明显. 60d 时,各反应器中其丰度分别为 0.83%,0.93%,1.03%,1.13%,可见三价

铁添加的实验组中 *Candidatus Brocadia* 菌富集效果更好,这与反应器 SAA 及运行效能一致.可以推断,在一定浓度范围内,厌氧氨氧化菌 *Candidatus Brocadia* 的富集效果与进水铁离子添加量呈正相关 ($R^2=0.994, P<0.01$).

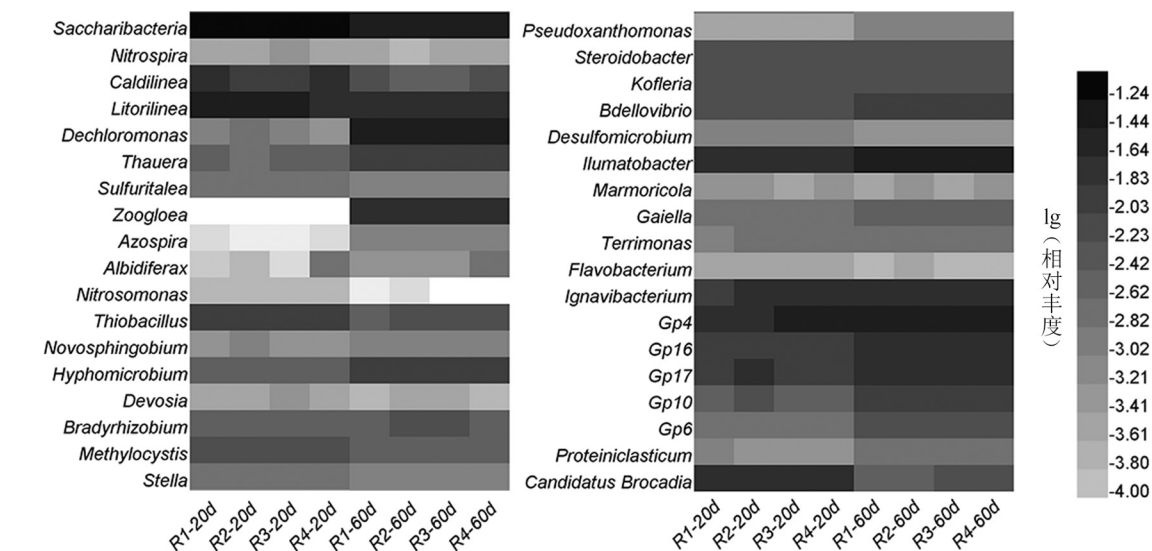


图 5 有机物存在下污泥中属水平优势菌分布(>0.1%)
Fig.5 Distribution of dominant bacteria in genus level in sludge under the presence of organic matter (>0.1%)

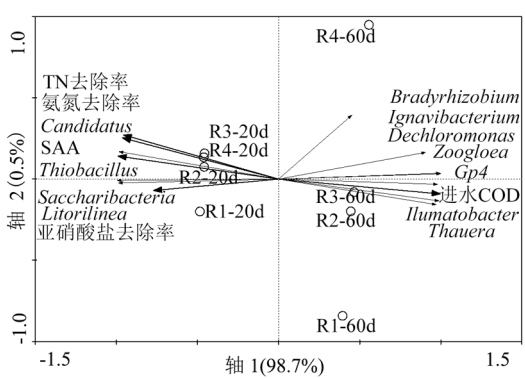


图 6 环境因子与属水平优势细菌种群间 RDA 分析
Fig.6 Redundancy analysis between environmental factors and dominant bacteria in genus level

有机物存在下,反硝化菌属 *Zoogloea*, *Dechloromonas* 丰度明显增加.在 20d 时,几乎难以检测到 *Zoogloea* 属,而在 60d 时,各反应器中 *Zoogloea* 属丰度分别提升为 2.43%,2.52%,2.89%,3.12%,与对照组 R1 相比,添加三价铁的反应器中 *Zoogloea* 属丰度较高.反硝化菌 *Dechloromonas* 属于 β -变形菌,20d 时,各反应器中其丰度为 0.23%~0.53%,而运行至 60d 时,其在各反应器中丰度分别提升至 4.28%,

4.53%,4.59%,5.34%.说明 COD 的存在使反硝化菌得以生存和占据优势地位.

运用 Canoco 4.5 软件,将细菌群落结构的相对丰度与环境因子进行冗余分析(图 6).

由图 6 可看出,20d 时,各反应器无明显差异,而运行 60d 时,表现出明显差异,表明三价铁的添加对有机物存在下细菌群落影响较大.厌氧氨氧化菌 *Candidatus Brocadia* 和一些反硝化菌属 *Saccharibacteria*,*Thiobacillus* 与 SAA 以及氨氮,亚硝酸盐及总氮去除率呈正相关,与进水 COD 呈负相关.而其余反硝化菌属 *Zoogloea*,*Dechloromonas*, *Ignavibacterium*,*Thauera* 则相反,即与进水 COD 呈正相关,与 SAA 以及氨氮,亚硝酸盐及总氮去除率呈负相关.表明 COD 抑制了 Anammox 过程,而三价铁可以通过促进 *Candidatus Brocadia* 丰度的增加,进而促进氨氮,亚硝酸盐和总氮的去除.

2.4 功能基因及功能菌丰度变化

本研究中,有机物存在下反应器污泥细菌 16S rRNA,厌氧氨氧化菌 16S rRNA,氮素转化功能基因 *hzsB* 及 *amoA* 丰度如图 7 所示.

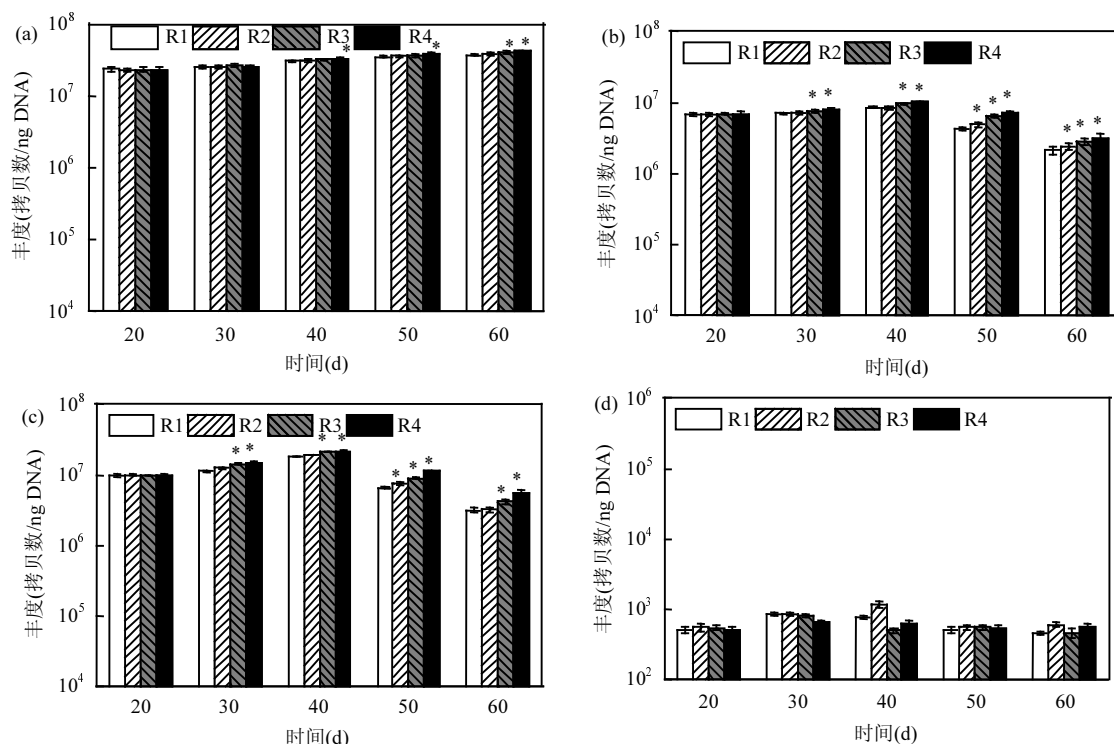


图7 有机物存在下 *amoA* 基因, *hzsB* 基因, 细菌及厌氧氨氧化菌 16S rRNA 丰度变化

Fig.7 Abundance shift of gene *amoA*, *hzsB*, bacterial 16S rRNA and Anammox 16S rRNA

(a)细菌 16S rRNA;(b)厌氧氨氧化菌 16S rRNA;(c)*hzsB* 基因;(d)*amoA* 基因;“*”表示实验组与对照组之间差异显著($P < 0.05$)

运行至 60d 时,各反应器中细菌 16S rRNA 含量分别为 3.67×10^7 , 3.80×10^7 , 4.01×10^7 , 4.12×10^7 拷贝数/ng DNA, 反应器 R3, R4 中丰度显著高于对照组 R1 ($P < 0.05$), R3, R4 中较多的微生物量或是因为三价铁的添加。

20d 时,各反应器中厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因丰度几乎一致;运行至 40d 时,由于低浓度有机物的促进作用,各反应器中厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因丰度有所提升, R3, R4 中丰度显著高于 R1 ($P < 0.05$), 且丰度与三价铁添加量呈现出一定的正相关。随着进水 COD 进一步提高,由于较高浓度有机物下反硝化菌的竞争作用,厌氧氨氧化菌含量均有不同程度下降,实验组中丰度均高于对照组 R1 ($P < 0.05$)。可以发现,厌氧氨氧化菌的丰度与厌氧氨氧化菌的活性有很强的相关性,这与前人的研究一致^[25],因此实现良好的厌氧氨氧化菌保留率可能是在污水处理系统中增强 Anammox 的关键。

厌氧氨氧化功能基因 *hzsB* 丰度变化与厌氧氨氧化菌 16S rRNA 基因变化趋势一致,均先增加而后减少。同一时间, R2, R3, R4 中 *hzsB* 的丰度显著高于 R1 ($P < 0.05$)。

由于反应器运行过程中严格的条件控制,功能基因 *amoA* 在运行过程中含量几乎保持稳定,反应器 R1 中其丰度为 $5.00 \times 10^2 \sim 8.60 \times 10^2$ 拷贝数/ng DNA, R2 中其丰度保持在 $5.50 \times 10^2 \sim 1.13 \times 10^3$ 拷贝数/ng DNA, R3, R4 中其丰度则分别为 $4.50 \times 10^2 \sim 8.00 \times 10^2$ 拷贝数/ng DNA, $5.00 \times 10^2 \sim 6.50 \times 10^2$ 拷贝数/ng DNA。

如前所述,有机物添加使得厌氧氨氧化反应器中反硝化菌增长,而整体氮素脱除,依赖于厌氧氨氧化菌及反硝化菌的共同作用。为探究此过程中反硝化作用的变化,选取 4 种反硝化功能基因 *narG*, *napA*, *nirS*, *nirK* 测定,其结果如图 8 所示。

由图 8 得,存在有机物时,反硝化功能基因 *narG*, *napA*, *nirK*, *nirS* 的丰度随着 COD 的增加而增加,这与前人的研究一致^[26]。

运行至 60d 时,基因 *narG* 的丰度在各反应器中分别提高至 2.13×10^6 , 2.65×10^6 , 2.76×10^6 , 3.01×10^6 拷贝数/ng DNA, 实验组 R2, R3, R4 中丰度显著高于 R1 ($P < 0.05$)。 *napA*, *nirS* 及 *nirK* 也呈现类似的变化规律,说明三价铁的添加显著提高了反硝化功能基因的丰度。

功能基因及功能菌丰度与环境因子的冗余分析见图 9。

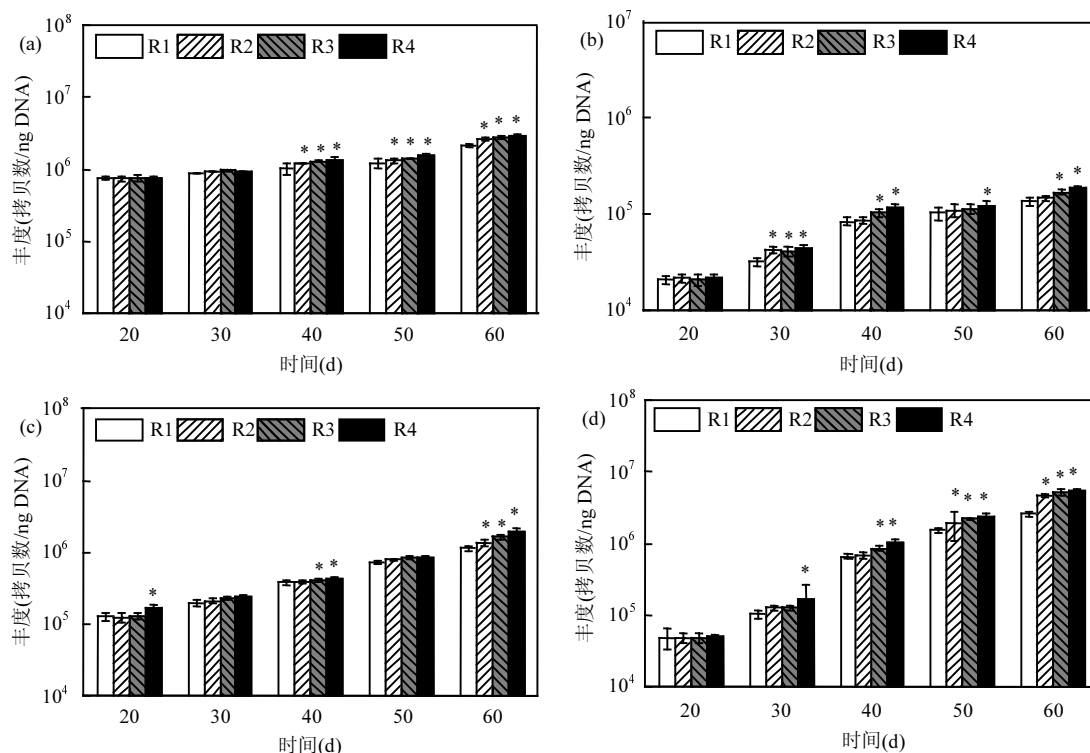


图 8 有机物存在下反硝化功能基因丰度变化

Fig.8 Variation in the abundance of denitrification function genes in the presence of organic matter

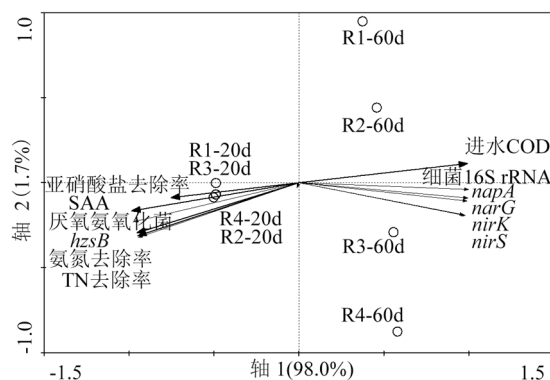
(a)*narG* 基因;(b)*napA* 基因;(c)*nirS* 基因;(d)*nirK* 基因;“*”表示实验组与对照组之间差异显著($P < 0.05$)

图 9 环境因子与功能基因及功能菌丰度间 RDA 分析

Fig.9 Redundancy analysis between environmental factors and functional genes and functional bacteria abundance

由图 9 可看出,20d 时,R1,R2,R3,R4 无明显差异,而运行 60d 时差异明显,表明三价铁的添加使各反应器之间功能基因及功能菌丰度的差异变大.厌氧氨氧化菌 16S rRNA 和厌氧氨氧化功能基因 *hzsB* 的丰度均与 SAA 以及氨氮、亚硝酸盐及总氮去除率呈正相关,与进水 COD 呈负相关,这也进一步验证了当 COD 浓度较高时,厌氧氨氧化菌及厌氧氨氧化功能基因受到抑制,氨氮、亚硝酸盐及总氮的去除率下降.而功能基因 *amoA* 的丰度与 SAA 以及氨氮、亚硝酸

盐及总氮去除率,进水 COD 之间均无明显相关性.反硝化功能基因 *narG*,*napA*,*nirS*, *nirK* 的丰度与进水 COD 呈正相关,与 SAA 以及氨氮、亚硝酸盐及总氮去除率呈负相关,这也进一步验证了有机物的添加可以提高反硝化功能基因的丰度.

3 结论

3.1 在高浓度的有机物(200mg/L COD)下,与空白组相比,投加 7.84mg/L Fe^{3+} 可使氨氮和总氮去除率分别提高 9.9%和 4.9%.

3.2 有机物存在下,污泥微生物群落结构出现变化,表现为厌氧氨氧化菌 *Candidatus Brocadia* 丰度的降低及反硝化菌属 *Zoogloea*,*Dechloromonas* 丰度的提升.同一有机物浓度下,添加三价铁组的污泥微生物的丰度更高.

3.3 厌氧氨氧化菌 16S rRNA 及 *hzsB* 基因丰度在一定范围内与三价铁添加量呈正相关.

参考文献:

- [1] Miao L, Yang G, Tao T, et al. Recent advances in nitrogen removal from landfill leachate using biological treatments - A review [J]. Journal of Environmental Management, 2019,235:178-185.

- [2] 吕 恺,王康舟,姚雪薇,等.基于氨氮,硝氮及乙酸条件下 Anammox 菌的培养 [J]. 中国环境科学, 2020,40(10):4348-4353.
- Lü K, Wang K Z, Yao X W, et al. Enrichment of Anammox under conditions of ammonium, nitrate and acetic acid as substrates [J]. China Environmental Science, 2020,40(10):4348-4353.
- [3] Ma W, Li G, Huang B, et al. Advances and challenges of mainstream nitrogen removal from municipal wastewater with anammox-based processes [J]. Water Environment Research, 2020,92(11):1899-1909.
- [4] Pijuan M, Ribera-Guardia A, Balcázar J L, et al. Effect of COD on mainstream anammox: Evaluation of process performance, granule morphology and nitrous oxide production [J]. Science of the Total Environment, 2020:712:136372.
- [5] 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]. Bioresource Technology, 2018,265:498-505.
- [6] Chen C, Sun F, Zhang H, et al. Evaluation of COD effect on anammox process and microbial communities in the anaerobic baffled reactor (ABR) [J]. Bioresource Technology, 2016,216:571-578.
- [7] Qin Y, Cao Y, Ren J, et al. Effect of glucose on nitrogen removal and microbial community in anammox-denitrification system [J]. Bioresource Technology, 2017,244:33-39.
- [8] 陈重军,汪瑶琪,姜 滢,等.有机物对连续流 Anammox 脱氮及微生物群落影响 [J]. 中国环境科学, 2019,39(12):5049-5055.
- Chen C J, Wang Y Q, Jiang Y, et al. Effects of organic matter on nitrogen removal and microbial community in anammox reactor [J]. China Environmental Science, 2019,39(12):5049-5055.
- [9] Zhang M, Wang S, Ji B, et al. Towards mainstream deammonification of municipal wastewater: Partial nitrification-anammox versus partial denitrification-anammox [J]. Science of the Total Environment, 2019, 692:393-401.
- [10] Li X, Sun S, Yuan H, et al. Mainstream upflow nitrification-anammox system with hybrid anaerobic pretreatment: Long-term performance and microbial community dynamics [J]. Water Research, 2017,125: 298-308.
- [11] Ferousi C, Lindhoud S, Baymann F, et al. Iron assimilation and utilization in anaerobic ammonium oxidizing bacteria [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2017,37:129-136.
- [12] Van Niftrik L, Geerts W J C, Van Donselaar E G, et al. Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: A membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria [J]. Journal of Structural Biology, 2008,161:401-410.
- [13] Liu H, Chen Z, Guan Y, et al. Role and application of iron in water treatment for nitrogen removal: A review [J]. Chemosphere, 2018,204: 51-62.
- [14] Wang J, Liang J, Sun L, et al. Granule-based immobilization and activity enhancement of anammox biomass via PVA/CS and PVA/CS/Fe gel beads [J]. Bioresource Technology, 2020,309:123448-123448.
- [15] Yin S, Li J, Dong H, 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.
- [16] Wang X, Shu D, Yue H. Taxonomical and functional microbial community dynamics in an Anammox-ASBR system under different Fe (III) supplementation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016,100:10147-10163.
- [17] 毛念佳,嵇鸿民,许 柯,等.铁离子对厌氧氨氧化污泥富集培养的影响 [J]. 净水技术, 2018,37(1):22-29.
- Mao N J, Ji H M, Xu K, et al. Effect of ferric iron on enrichment cultivation process of anammox sludge [J]. Water Purification Technology, 2018,37(1):22-29.
- [18] 胡勇有,梁辉强,朱静平,等.有机碳源环境下的厌氧氨氧化批次实验 [J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2007,35(6):116-119.
- Hu Y Y, Liang H Q, Zhu J P, et al. Batch experiment of anammox under organic carbon source environment [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2007,35(6):116-119.
- [19] Winkler M, Yang J, Kleerebezem R, et al. Nitrate reduction by organotrophic Anammox bacteria in a nitrification/anammox granular sludge and a moving bed biofilm reactor [J]. Bioresource Technology, 2012,114:217-223.
- [20] Du R, Cao S, Zhang H, et al. Flexible nitrite supply alternative for mainstream anammox: Advances in enhancing process stability [J]. Environmental Science & Technology, 2020,54:6353-6364.
- [21] 朱葛夫,张净瑞,刘超翔,等.厌氧氨氧化工艺的启动及有机物浓度对其影响研究 [J]. 环境工程, 2016,34(2):27-32.
- Zhu G F, Zhang J R, Liu C X, et al. Study on start-up of anaerobic ammonia oxidation and the effect of COD concentration [J]. Environmental Engineering, 2016,34(2):27-32.
- [22] 丁帮琛,徐梦珊,李丹丹,等.不同菜地土壤的铁氨氧化脱氮过程探究 [J]. 中国环境科学, 2020,40(8):3506-3511.
- Ding B J, Xu M S, Li D D, et al. Investigation of nitrogen removal by feammox in soils from different vegetable fields [J]. China Environmental Science, 2020,40(8):3506-3511.
- [23] Zhang X, Damacharla D, Ma D, et al. Quantitative proteomics reveals novel protein interaction partners of PP2A catalytic subunit in pancreatic beta-cells [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2016,424:1-11.
- [24] Kindaichi T, Yuri S, Ozaki N, et al. Ecophysiological role and function of uncultured Chloroflexi in an anammox reactor [J]. Water Science and Technology, 2012,66:2556-2561.
- [25] Wang S, Peng Y, Ma B, et al. Anaerobic ammonium oxidation in traditional municipal wastewater treatment plants with low-strength ammonium loading: Widespread but overlooked [J]. Water Research, 2015,84:66-75.
- [26] Wang, Yang R, Guo Y, et al. Investigation of COD and COD/N ratio for the dominance of anammox pathway for nitrogen removal via isotope labelling technique and the relevant bacteria [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019,366:606-614.

作者简介: 王海月(1997-),女,新疆伊犁人,南京大学硕士研究生,研究方向为污水生物脱氮。