



C/N 对短程反硝化 NO_2^- -N 积累特性影响及机理分析

柳全龙¹, 范亚骏², 张 森¹, 崔亚净¹, 周 杨³

(1. 扬州大学环境科学与工程学院, 江苏扬州 225127; 2. 扬州工业职业技术学院, 江苏扬州 225127;
3. 江苏省水利勘测设计研究院有限公司, 江苏扬州 225000)

[摘要] 采用间歇式批次实验, 考察不同进水 C/N (以 COD/NO_3^- -N 计, 2.0、2.5、3.3、5.0) 条件下短程反硝化过程 NO_2^- -N 的积累特性及影响机理。实验结果表明, 以乙酸钠作为碳源, 当 C/N 为 2.0~2.5 时, NO_2^- -N 转化率(NTR)随 C/N 的升高而升高, 在 C/N=2.5 时, NTR 达到最高值 82.18%; C/N 为 3.3~5.0 时, NTR 随 C/N 的升高急剧下降, 当 C/N=5.0 时, 反应器内几乎没有 NO_2^- -N 的积累。此外, C/N=2.0~2.5 与 C/N=3.3~5.0 工况下 NO_2^- -N 积累的机理是不同的, 前者取决于高浓度 NO_3^- -N 对亚硝酸盐还原酶(NiR)的抑制, 而后者主要依赖于不完全反硝化菌在污泥菌群结构中占优势。对接种污泥及 4 组反应器内的污泥样品进行高通量测序分析, 结果表明 *Thauera*、*Flavobacterium*、*Saprospiraceae* 是实现短程反硝化的主要功能菌属。

[关键词] 碳氮比; 短程反硝化; NO_2^- -N 积累; 微生物特性

[中图分类号] X703.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-829X(2022)06-0159-09

Influence of C/N on NO_2^- -N accumulation characteristic and mechanism analysis in short-cut denitrification

LIU Quanlong¹, FAN Yajun², ZHANG Miao¹, CUI Yajing¹, ZHOU Yang³

(1. College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;
2. Yangzhou Polytechnic Institute, Yangzhou 225127, China; 3. Jiangsu Surveying and Design
Institute of Water Resource Company Limited, Yangzhou 225000, China)

Abstract: The characteristics and influencing mechanism of nitrite (NO_2^- -N) accumulation during short-cut denitrification process were studied in a sequencing batch reactor by controlling initial influent C/N ratios (COD/NO_3^- -N=2.0、2.5、3.3、5.0). The experimental results showed that the nitrate-to-nitrite transformation ratio (NTR) increased with the increasing C/N from 2.0 to 2.5 with sodium acetate as carbon source, and NTR reached the highest value of 82.18% at C/N of 2.5. When C/N was 3.3~5.0, NTR decreased sharply with the increasement of C/N, and there was almost no accumulation of NO_2^- -N in the reactor at C/N of 5.0. In addition, the mechanisms of NO_2^- -N accumulation under the conditions of C/N=2.0~2.5 and C/N=3.3~5.0 were different. The former depended on the inhibition of NO_2^- -N reductase by high NO_3^- -N concentration, while the latter mainly depended on the dominance of incomplete denitrifying bacteria in the sludge microbial structure. The high-throughput sequencing analysis of inoculated sludge and sludge samples in four reactors showed that *Thauera*, *Flavobacterium* and *Saprospiraceae* were the main functional bacteria for short-cut denitrification.

Key words: C/N; short-cut denitrification; nitrite accumulation; microbial characteristic

厌氧氨氧化(Anammox)工艺是一种高效的生物脱氮技术, 但该工艺对污水中的氨氮(NH_4^+ -N)与亚硝态氮(NO_2^- -N)的物质的量比(1:1.32)有着较为严

格的要求^[1]。为了给 Anammox 工艺提供理想的进水, 必须保证反应底物中含有适量的 NO_2^- -N, 因此如何获得稳定的 NO_2^- -N 成为制约 Anammox 工艺推

[基金项目] 江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX21_3224); 扬州工业职业技术学院自然科学类科研课题项目(2021xjzk016)

广应用的瓶颈问题。目前绝大多数研究都是通过短程硝化($\text{NH}_4^+-\text{N} \rightarrow \text{NO}_2^--\text{N}$)来实现 NO_2^--N 的积累,实现稳定的短程硝化主要有3种控制手段:(1)控制操作温度 $>25\text{ }^\circ\text{C}$;(2)提高游离氨浓度;(3)降低溶解氧^[2]。尽管全世界现已建立了200多座短程硝化耦合厌氧氨氧化工程装置,但由于控制条件的严格性和复杂性,这些装置大多是用于特殊废水(如污泥消化液、垃圾填埋场渗滤液、味精废水等)的处理^[3],城市污水处理的工程实例相对较少。

近年来,由于高硝酸盐(NO_3^--N)工业(如化肥、炸药等^[4])的发展,大量 NO_3^--N 废水亟待处理,短程反硝化技术($\text{NO}_3^--\text{N} \rightarrow \text{NO}_2^--\text{N}$)成为耦合Anammox工艺最具潜力的 NO_2^--N 供给技术^[5]。较之传统硝化-反硝化技术,短程反硝化耦合厌氧氨氧化工艺可节省大量碳源,并减少约50%的氧气需求、84%的污泥产量,同时还具有较短的污泥适应期、极低的温室气体排放量^[6]。相关研究表明,短程反硝化过程 NO_2^--N 的积累效果受诸多因素的影响,如碳源类型、初始C/N^[7]、pH^[8-9]等。关于C/N对短程反硝化的影响各说不一,王维奇等^[10]发现,短程反硝化中

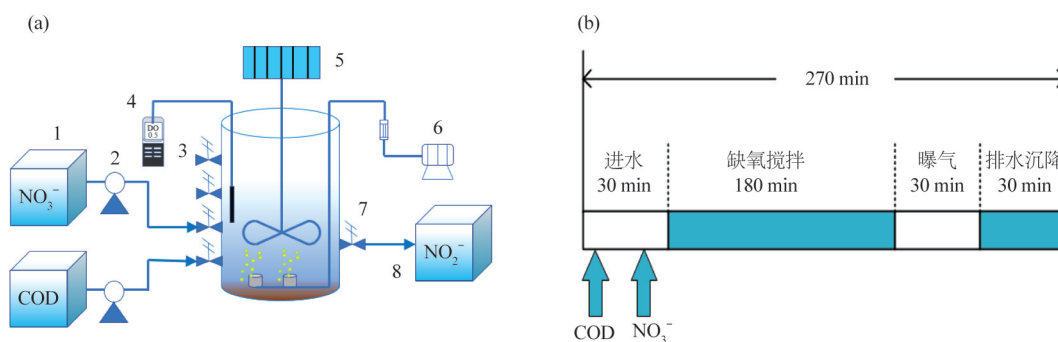
NO_2^--N 积累的最佳C/N范围为2.3~2.7;张阳等^[11]在研究某株特定的反硝化细菌时发现,C/N越高, NO_2^--N 积累效果越好;而田夏迪等^[12]则指出,C/N对 NO_2^--N 积累的影响较小。因此,关于短程反硝化过程中不同C/N对 NO_2^--N 积累的影响仍是当前研究的热点。

本研究采用间歇式SBR工艺,以乙酸钠作为外加碳源,重点考察以下几个方面:(1)不同C/N(以 $\text{COD}/\text{NO}_3^--\text{N}$ 计)条件下,反硝化过程中 NO_2^--N 的积累特性;(2)以稳态运行条件下的第98个周期为例,揭示典型周期污染物(COD利用、 NO_3^--N 反硝化、 NO_2^--N 积累)的降解特性;(3)对接种污泥及不同运行工况下的污泥进行高通量测序,探究不同C/N条件下微生物群落结构的演替规律。通过阐释C/N对 NO_2^--N 积累的内在影响和微观机理,以期为实际工程中短程反硝化工艺的推广应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验装置

实验装置如图1(a)所示,装置运行周期如图1(b)所示。



1—进水箱;2—进水泵;3—进水泵;4—DO探测仪;5—电动搅拌器;6—鼓风机;7—出水口;8—出水水箱

图1 SBR实验装置(a)及运行周期(b)

Fig. 1 SBR reactor(a) and operating cycle(b)

本实验装置由进水箱、SBR反应器、出水水箱顺序连接而成[图1(a)]。SBR反应器的有效容积为5 L,反应器底部安装有微孔曝气装置,顶部安装有电动搅拌器,同时还装有DO探测仪,用于在线检测混合液中的溶解氧。原水由2个进水箱分别泵入不同浓度的COD、 NO_3^--N 混合而成,随后混合液在SBR反应器内完成短程反硝化和脱氮,泥水分离后,上清液进入出水水箱。

反应器采用缺氧/好氧(A/O)模式,包括进水、搅拌、

曝气、沉淀4个阶段[图1(b)],每周期270 min,每天运行2个周期。缺氧段(180 min, $\text{DO}=0.2\sim0.5\text{ mg/L}$)开启电动搅拌器,充分搅拌混合液以保证短程反硝化的发生。好氧段(30 min, $\text{DO}=2.5\sim3.0\text{ mg/L}$)利用微孔曝气装置进行供氧,以恢复污泥的生物活性,同时吹脱反硝化过程中产生的氮气,便于泥水分离。混合液平均VSS为 $(2\ 600\pm100)\text{ mg/L}$,每周期在沉降阶段之前,排出 $(50\pm5)\text{ mL}$ 混合液,以保持反应器稳定的污泥龄[SRT= $(18\pm2)\text{ d}$]和VSS水平。

1.2 实验用水与接种污泥

采用人工配水,碳源由乙酸钠(初始COD为100 mg/L)提供,氮源由硝酸钠提供(初始 NO_3^- -N为50、40、30、20 mg/L),进水C/N分别为2.0、2.5、3.3、5.0。另外,为了维持微生物良好的增殖代谢,废水中添加的微量元素如下:0.03 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.06 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.12 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.12 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.15 g H_3BO_3 、0.15 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.18 g KI 、1.5 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和10 g 乙二胺四乙酸(EDTA)。

接种污泥取自A²/O-MBBR反应器,该反应器脱氮除磷效果稳定(COD去除率>88%、TN去除率>80%、TP去除率>95%),污泥沉降性好且生物活性高。

1.3 检测项目及分析方法

COD采用快速消解分光光度法测量, NO_2^- -N、 NO_3^- -N采用分光光度法测量。考虑到 NO_2^- -N对COD测定的影响,COD^[13]按式(1)校准计算。

$$\text{COD}_{\text{校准后}} = \text{COD}_{\text{检测}} - \frac{8}{7} c(\text{NO}_2^- - \text{N}) \quad (1)$$

NO_3^- -N到 NO_2^- -N的转化率(Nitrate-to-nitrite transformation ratio, NTR)^[14],即 NO_2^- -N积累率,是指在反应时间内系统增加的 NO_2^- -N的浓度与系统减少的 NO_3^- -N的浓度的比值(%),计算方式见式(2)。

$$\text{NTR} = \frac{c(\text{NO}_2^-)_{\text{eff}} - c(\text{NO}_2^-)_{\text{inf}}}{c(\text{NO}_3^-)_{\text{inf}} - c(\text{NO}_3^-)_{\text{eff}}} \times 100\% \quad (2)$$

NO_3^- -N去除率(Nitrate removal efficiency, NRE)^[14]是指反应时间内系统减少的 NO_3^- -N浓度与系统初始的 NO_3^- -N浓度的比值(%),计算方式见式(3)。

$$\text{NRE} = \frac{c(\text{NO}_3^-)_{\text{inf}} - c(\text{NO}_3^-)_{\text{eff}}}{c(\text{NO}_3^-)_{\text{inf}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: $c(\text{NO}_2^-)_{\text{inf}}$ 、 $c(\text{NO}_3^-)_{\text{inf}}$ ——进水 NO_2^- -N、 NO_3^- -N质量浓度,mg/L;

$c(\text{NO}_2^-)_{\text{eff}}$ 、 $c(\text{NO}_3^-)_{\text{eff}}$ ——出水 NO_2^- -N、 NO_3^- -N质量浓度,mg/L。

本实验采用两步反硝化模型^[15],即把 NO_2^- -N作为反硝化过程的唯一中间产物。在两步反硝化模型中, NO_2^- -N还原速率与 N_2 生成速率相等(以N计),且 N_2 生成速率可用反应器内 NO_x^- -N(NO_2^- -N与 NO_3^- -N的浓度和)的变化来表征。 NO_3^- -N还原速率(SN_3RR)和 NO_2^- -N还原速率(SN_2RR)的计算方式

如下:

$$\text{SN}_3\text{RR} = \frac{c(\text{NO}_3^-)_{t_1} - c(\text{NO}_3^-)_{t_2}}{(t_1 - t_2) \times \text{VSS}} \quad (4)$$

$$\text{SN}_2\text{RR} = \frac{c(\text{NO}_x^-)_{t_1} - c(\text{NO}_x^-)_{t_2}}{(t_1 - t_2) \times \text{VSS}} \quad (5)$$

式中: $c(\text{NO}_x^-)_{t_1}$ 、 $c(\text{NO}_3^-)_{t_1}$ —— t_1 时刻 NO_x^- -N和 NO_3^- -N的质量浓度,mg/L;

$c(\text{NO}_x^-)_{t_2}$ 、 $c(\text{NO}_3^-)_{t_2}$ —— t_2 时刻 NO_x^- -N和 NO_3^- -N的质量浓度,mg/L;

VSS——污泥质量浓度,g/L;

SN_3RR 、 SN_2RR ——单位VSS下 NO_3^- -N、 NO_2^- -N还原速率,mg/(g·h),以N计。

1.4 高通量测序

在反应器运行的第98个周期(即反应器运行第49天),分别从4组不同进水C/N的反应器取污泥样品,与接种污泥一起送往上海美吉云生物医药科技有限公司进行高通量测序,依托美吉云生物平台PE300进行处理,所有原始数据都存档在NCBI序列读取档案数据库中,登记号为SRP057140。

2 结果与讨论

2.1 短程反硝化的启动及稳定运行

本实验所接种的污泥脱氮除磷性能较好,故省去了污泥驯化过程,以间歇培养的方式按设计运行周期及设计进水水质的要求运行反应器。反应器共运行101个周期,图2为反应器在不同C/N下(2.0、2.5、3.3、5.0)的长期运行结果。根据NTR的变化趋势,可将整个运行过程划分为2个阶段: NO_2^- -N生成期(1~60周期)和 NO_2^- -N积累稳定期(61~101周期)。

由图2可见, NO_2^- -N生成期(1~60周期),各反应器中的NTR随运行周期的增加而稳步上升,启动初期(1~21周期)各反应器出水 NO_2^- -N皆为0~5 mg/L。而至第60周期,不同运行工况下各反应器出水 NO_2^- -N分别达到15.80 mg/L(C/N=2.0)、22.12 mg/L(C/N=2.5)、8.75 mg/L(C/N=3.3)、1.07 mg/L(C/N=5.0)。从图2还可看出,1~60周期NTR的变化规律与出水 NO_2^- -N的变化规律是一致的,都是稳步升高的,且C/N=2.5时的NTR远优于其他反应器。活性污泥转移至新环境培养后,微生物为了适应新环境,其体内的各种酶系统开始调整,同时由于对新环境适应性的不同,种群结构发生演

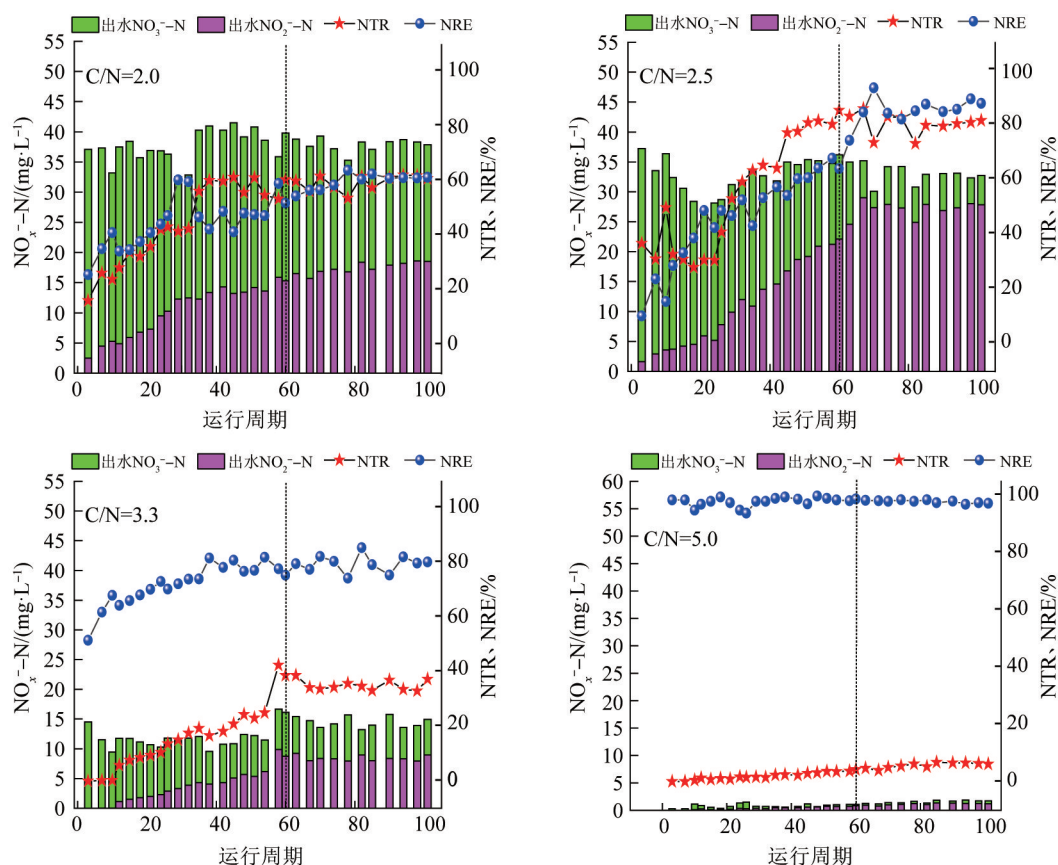


图2 反应器运行过程中NTR和NRE变化规律

Fig. 2 Variations of NTR and NRE during the reactor operation

变。因此,经过一段时间的运行,C/N=2.0、2.5、3.3的反应器中的活性污泥的菌群结构发生了较大变化,使 NO_2^- -N可以有效积累的功能菌群迅速增长。为进一步探究活性污泥中微生物的具体演变规律,后续将结合高通量测序结果详细分析。

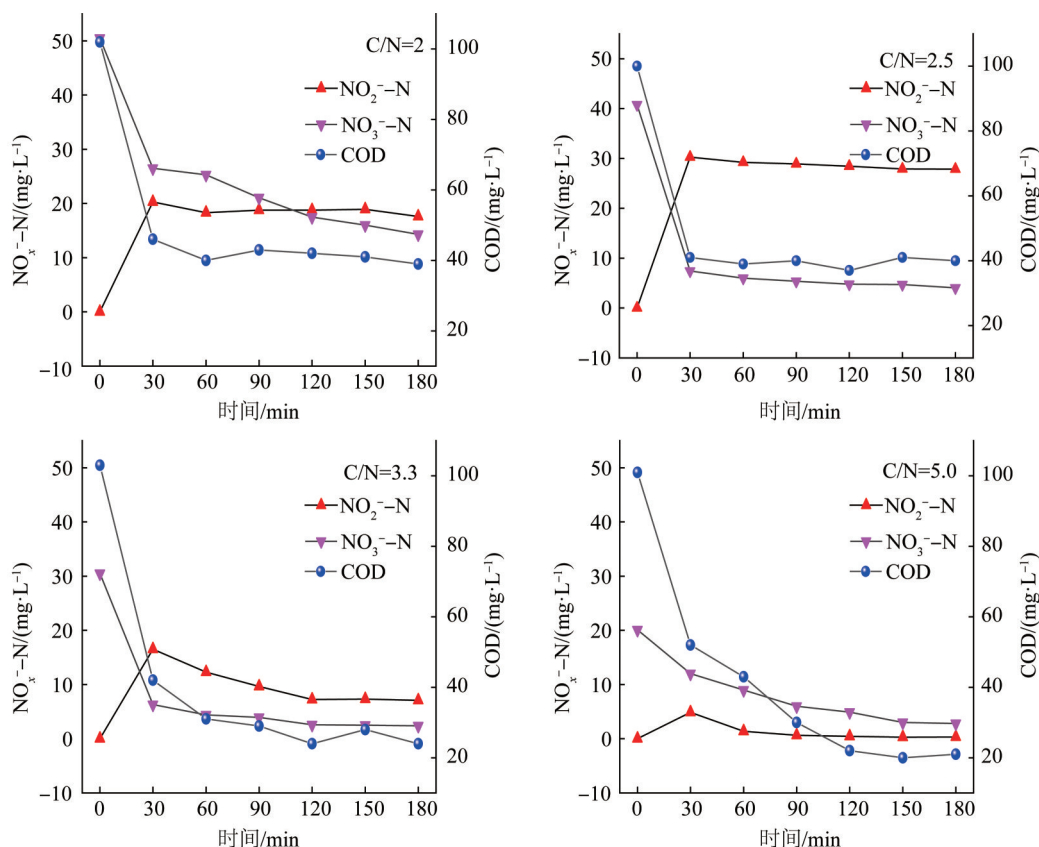
NO_2^- -N积累稳定期(61~101周期),各反应器的NTR趋于稳定,4个运行工况下,稳定期内的平均 NO_2^- -N积累率分别为61.39%(C/N=2.0)、82.18%(C/N=2.5)、35.42%(C/N=3.3)以及5.60%(C/N=5.0)。C/N为2.0、2.5、3.3的3个工况下反应器中的NTR和出水 NO_2^- -N均维持在较高水平并保持稳定,对照田夏迪等^[12]的研究,初步认为这3个C/N下的反应器均成功启动了短程反硝化,这与当前的主流观点也是相吻合的,即低C/N更有利于短程反硝化的发生。而C/N=5.0工况下,尽管总氮去除率始终维持在98%左右,但NTR及出水 NO_2^- -N均较低,短程反硝化效果较差,反应器内几乎没有 NO_2^- -N的积累。

2.2 典型周期COD、 NO_3^- -N和 NO_2^- -N的变化规律

图3给出了稳态运行条件下(反应器运行的第

98周期),4种工况下缺氧段180 min内的COD、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N变化情况。

由图3可知,随着缺氧段反应时间的延长,COD、 NO_3^- -N均逐渐降低,即COD消耗主要用于还原 NO_3^- -N,同时各SBR反应器中都出现了不同程度的 NO_2^- -N积累现象。当C/N=2.0和2.5时,COD在缺氧前30 min内迅速下降,且此后基本稳定在40 mg/L左右;而当C/N=3.3和5.0时,尽管COD也在缺氧前30 min内降至40~50 mg/L,但随后又持续降低至20 mg/L左右。4种运行工况下, NO_3^- -N也是在缺氧前30 min内迅速下降,随后变化缓慢。而 NO_2^- -N在4种运行工况下均是在缺氧前30 min内迅速升高并达到峰值,最高 NO_2^- -N分别为20.3、30.3、16.5、4.8 mg/L;但缺氧30 min后,当C/N=2.0和2.5时, NO_2^- -N波动幅度较小且趋于稳定,而当C/N=3.3和5.0时,随着反应时间的延长, NO_2^- -N被逐步还原,出现了下降趋势,无法得到高效稳定的 NO_2^- -N积累。

图3 反硝化过程中COD、 NO_3^- -N和 NO_2^- -N的变化(第98周期)Fig. 3 Variations of COD, NO_3^- -N and NO_2^- -N during denitrification (cycle 98th)

整体上,在缺氧运行的30~180 min,当C/N=2.0和2.5时,混合液中COD、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N基本维持不变,在含有可利用COD(40 mg/L左右)的情况下,积累的 NO_2^- -N却无法被继续还原,因此,可合理推测该运行条件下培养的污泥生物活性受到了某种抑制。当C/N=3.3和5.0时,COD、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N均随反应时间的延长呈现不同程度的下降趋势,尤其C/N=5.0时COD变化较为明显(从50 mg/L降至20 mg/L),尽管 NO_2^- -N也得到一定的积累,但内在微生物学机理明显与前者不同。

根据G. D. DRYSDALE等^[16]的研究,反硝化菌可划分为5个不同的功能菌群,其中有2种可导致 NO_2^- -N积累的重要菌群:不完全反硝化细菌(仅能将 NO_3^- -N转化为 NO_2^- -N)和不完全亚硝酸盐还原细菌(可完全还原 NO_3^- -N,但高 NO_3^- -N浓度会抑制 NO_2^- -N还原)。结合COD、 NO_3^- -N、 NO_2^- -N的变化规律可知,在C/N=2.0和2.5条件下, NO_2^- -N能够得到稳定积累的原因可能与高 NO_3^- -N浓度对 NO_2^- -N还原的抑制作用有关;而C/N=3.3和5.0时, NO_2^- -N

积累的原因更大程度上取决于不同的不完全反硝化菌群。

2.3 反硝化活性测试

针对反硝化过程中 NO_2^- -N还原速率与 NO_3^- -N还原速率的差异问题,诸多学者^[17-18]在四步反硝化酶活性上做了大量的研究,认为 NO_2^- -N能够得到积累是由硝酸盐还原酶(NaR)活性高于亚硝酸盐还原酶(NiR)活性导致的。张雨婷等^[19]发现,NaR对电子的亲能力比NiR强;李玲玲等^[20]在研究低C/N污水 NO_2^- -N积累特性实验中发现, NO_3^- -N的存在会抑制NiR酶的活性;M. KORNAROS等^[21]同样发现, NO_3^- -N会抑制NiR酶的活性,导致 NO_2^- -N积累。图4为第98周期时,不同C/N条件下缺氧段 NO_2^- -N、 NO_3^- -N的还原速率对比。表1总结了缺氧0~30 min内的平均SN₃RR与SN₂RR。

由图4可知,在缺氧0~30 min,由于COD充足、 NO_3^- -N含量远大于 NO_2^- -N,系统内较多的 NO_3^- -N抑制了NiR酶的活性,故此时4个反应器内的

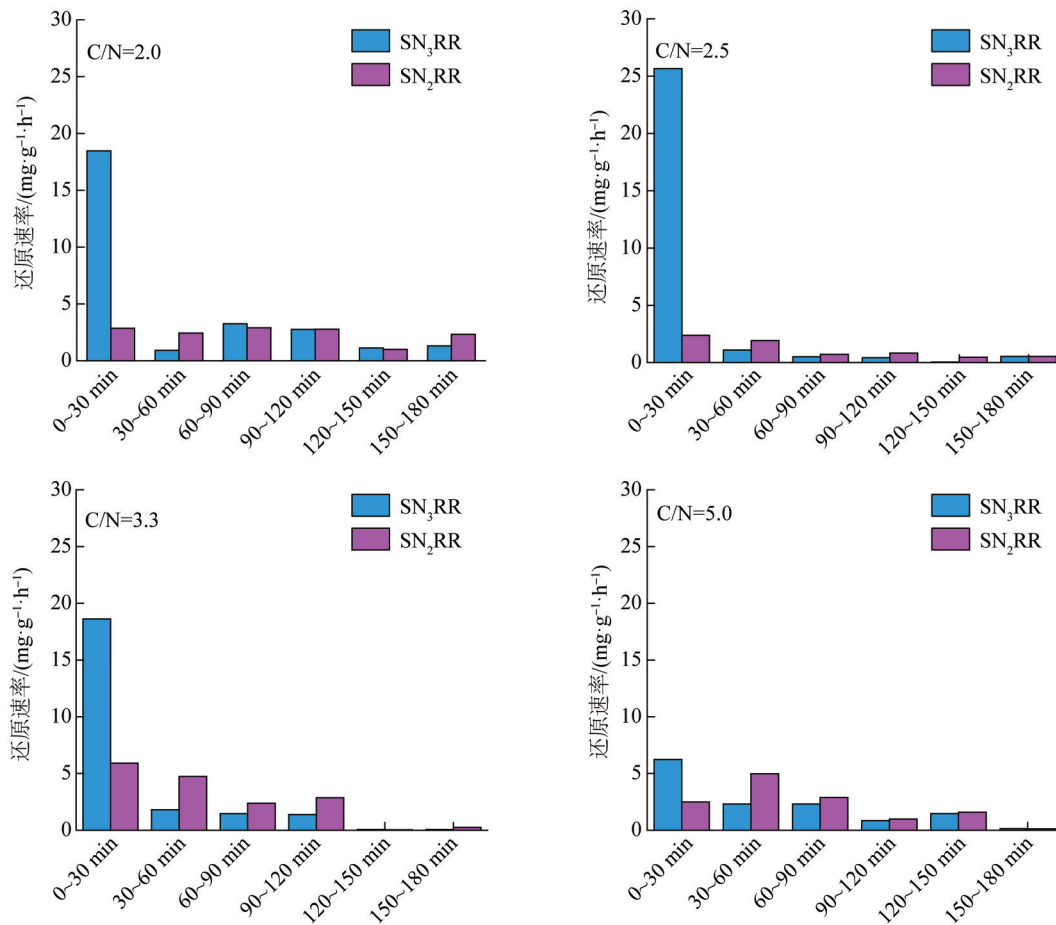


图4 不同C/N条件下缺氧 NO_2^- -N、 NO_3^- -N的还原速率(第98周期)

Fig. 4 Anoxic reduction rates of NO_2^- -N and NO_3^- -N under different C/N (cycle 98th)

表1 缺氧30 min内的平均 SN_3RR 与 SN_2RR

Table 1 Average SN_3RR and SN_2RR of anoxic reaction (0~30 min)

C/N	SN_3RR	SN_2RR	$\text{SN}_3\text{RR}/\text{SN}_2\text{RR}$
2.0	18.46	2.86	6.4
2.5	25.66	2.38	10.7
3.3	18.61	5.90	3.1
5.0	6.23	2.49	2.5

注: SN_3RR 和 SN_2RR 分别为单位VSS下 NO_3^- -N和 NO_2^- -N的还原速率, $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$,以N计。

SN_3RR 皆远大于 SN_2RR 。但是不同C/N条件下 $\text{SN}_3\text{RR}/\text{SN}_2\text{RR}$ 相差较大,4组工况下 SN_3RR 分别是 SN_2RR 的6.4倍(C/N=2.0)、10.7倍(C/N=2.5)、3.1倍(C/N=3.3)和2.5倍(C/N=5.5)(表1),可见低C/N条件下(如C/N=2.0和2.5), NO_2^- -N能够得到高效积累的直接原因在于 SN_3RR 与 SN_2RR 之间较大的差值,这与王淑莹等^[22-23]的研究结果一致,并且当 $\text{SN}_3\text{RR}/\text{SN}_2\text{RR}$ 越大时, NO_2^- -N的积累效果越好,该结果也揭示了图3中典型周期30 min时 NO_2^- -N积累达到

峰值的原因。

随着反应时间的延长,系统内的 NO_3^- -N逐步降低, NO_2^- -N逐步升高,此时 NO_3^- -N对NiR酶活性的抑制作用减弱,但因为反应后期系统内的COD较低, SN_2RR 较缺氧初期的变化却不大。在缺氧30~180 min,当C/N=2.0和2.5时, SN_3RR 与 SN_2RR 基本相等;而当C/N=3.3、5.0时, SN_2RR 普遍大于 SN_3RR ;即当C/N $\leq$ 2.5时, NO_2^- -N可以得到稳定的积累,而当C/N $\geq$ 3.3时,原有的 NO_2^- -N无法得到稳定维持。上述反硝化反应 SN_3RR 、 SN_2RR 的变化规律与典型周期 NO_2^- -N的变化趋势(图3)是一致的,因此导致了稳定期内不同的NTR变化,即C/N=2.0~2.5时的NTR远大于C/N=3.3~5.0时的NTR(图2)。

需要指出的是,各反应器在缺氧初期的 SN_3RR 相差较大,其中当C/N=2.5时取得最大值25.66 $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$,随后 SN_3RR 随C/N的升高(3.3 $\rightarrow$ 5.0)而降低

[18.61 mg/(g·h)→6.23 mg/(g·h)]。因此反硝化过程中 SN_2RR 与 SN_3RR 的差异并不单单是由NaR与NiR的酶活性差异导致的。M. J. MARTIENSSEN等^[24]在连续流实验中分离出了仅能将 NO_3^- -N还原为 NO_2^- -N的细菌;W. PAYNE等^[25]在研究反硝化微生物时,发现了2类异养反硝化细菌,其中a类只含有NaR酶,仅能将 NO_3^- -N还原至 NO_2^- -N,b类则含有全部反硝化酶;R. KNOWLES等^[26]也指出,部分反硝化细菌仅存在NaR酶,当系统中出现了占一定种群优势的这类细菌后,将导致 NO_2^- -N的积累。综上,可推知本研究中不同初始

C/N下各反应器中污泥的菌群结构已发生了演变,其中C/N=2.5时很可能出现了仅含有NaR酶的菌群结构,致使反应器内的NaR与NiR酶浓度出现较大差距,使得 SN_3RR 远大于 SN_2RR ,继而实现了较高的 NO_2^- -N积累。以上结果表明, NO_2^- -N能够得到稳定的积累,不仅是NaR与NiR酶活性差异引起的,而且是含不同反硝化酶的细菌菌群结构演变导致的。

2.4 微生物菌群结构分析

图5为4个工况和接种污泥在门水平和属水平下的微生物群落结构分布情况。

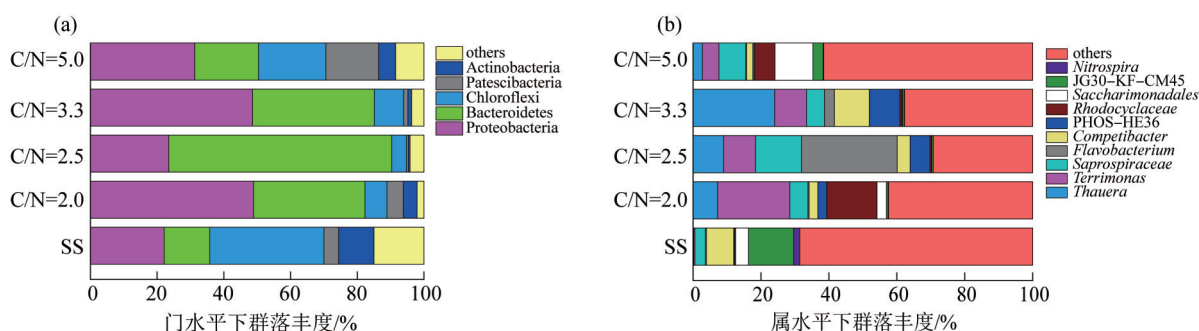


图5 菌群结构分布

Fig. 5 Microbial community structure distribution

由图5(a)可知,包括接种污泥(SS)在内的5个样本中的优势门皆为变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi),其中大部分反硝化菌都属于前2种细菌门^[27],这与现有的污水处理厂已报道的反硝化功能菌菌群结构也是一致的^[28-29]。4个反应器中Proteobacteria与Bacteroidetes所占比例总和分别为82.34%(C/N=2.0)、90.36%(C/N=2.5)、85.11%(C/N=3.3)、50.45%(C/N=5.0),远超接种污泥中的35.85%。初步说明反应器中的菌群结构已发生变化,且活性污泥的反硝化能力增强,这与典型周期缺氧段 NO_3^- -N的变化规律(图3)是一致的。此外,与接种污泥相比,绿弯菌门(Chloroflexi)的种群丰度大大减少,原污泥中Chloroflexi占34.2%,而各反应器中Chloroflexi的相对丰度皆低于20%,进一步说明了污泥菌群结构的较大演变。

在属水平下,对5个样品的微生物群落结构进一步分析,具体分布情况见图5(b)。4个反应器中的优势菌属皆为陶厄氏菌属(*Thauera*)、*Terrimonas*、*Saprospiraceae*以及黄杆菌属(*Flavobacterium*)。根据C. S. SRINANDAN等^[30-31]的研究,多数*Thauera*(属于Proteobacteria)仅含有硝酸盐还原酶;阳丽香等^[32]

在探究好氧反硝化细菌时,发现了部分属于*Flavobacterium*的好氧反硝化菌;W. J. PAYNE等^[25]发现,*Flavobacterium*具有与*Thauera*相同的特性。很明显,当C/N=2.5和3.3时,*Thauera*、*Flavobacterium*的相对丰度较高,分别为9.0%、24.0%及28.2%、2.9%;而C/N=2.0和5.0时,上述2种菌属的总相对丰度仅为7.56%、2.9%。此外,同样具有反硝化功能的厌氧菌属*Saprospiraceae*(属于Bacteroidetes)^[33]在C/N=2.5时的相对丰度为13.50%,高于其他几组反应器。结合 NO_2^- -N积累特性可知,C/N=2.5时,*Thauera*、*Flavobacterium*、*Saprospiraceae*(总丰度50.70%)是实现短程反硝化的优势种群,而这几类菌属又是典型的仅能将 NO_3^- -N还原至 NO_2^- -N的细菌,故可实现最高效的 NO_2^- -N积累。

当然,尽管C/N=2.0时,*Thauera*、*Flavobacterium*总相对丰度仅为7.56%,但该反应器中*Terrimonas*菌属的相对丰度高达21.3%。研究表明,*Terrimonas*菌属也是反硝化系统中的主要优势菌群之一^[34],能将 NO_3^- -N还原至 N_2 。结合该反应器的进水条件[COD=100 mg/L, $c(\text{NO}_3^-$ -N)=50 mg/L]可知,高浓度的 NO_3^- -N一定程度上抑制了 NO_2^- -N还原酶的合

成^[21-22],故该条件下亦可实现较高的 NO_2^- -N积累。作为对比,C/N=5.0条件下,充足的外碳源促进了微生物多样性的形成,但*Thauera*、*Terrimonas*、*Saprospiraceae*、*Flavobacterium*等功能菌属的总相对丰度仅为10.80%,远低于其他3组反应器,故无法实现有效的 NO_2^- -N积累。除此之外,4组反应器的污泥样品几乎检测不到硝化菌的存在(*Nitrospira*<0.1%,未检测到*Nitrobacter*),再次表明30 min好氧曝气不存在 NO_2^- -N被破坏的风险。

3 结论

(1) C/N对短程反硝化过程中 NO_2^- -N积累具有直接的影响,当C/N=2.5时,取得了最优的 NO_2^- -N积累效果,NTR高达82.18%。

(2) C/N=2.0~2.5与C/N=3.3~5.0工况下 NO_2^- -N积累的机理是不同的,前者取决于高浓度 NO_3^- -N对亚硝酸盐还原酶(NiR)的抑制,而后者主要依赖于不完全反硝化菌在污泥菌群结构中占优势。

(3) NO_2^- -N积累的直接原因在于 SN_3RR 大于 SN_2RR ,且当二者的差值越大, NO_2^- -N的积累效果越好,当C/N=2.5和C/N=5.0时, SN_3RR 分别是 SN_2RR 的10.7倍和2.5倍,故导致了截然不同的 NO_2^- -N积累特性。

(4) *Thauera*、*Flavobacterium*、*Saprospiraceae*是实现短程反硝化的主要功能菌属,当C/N=2.5时,上述3种菌属的丰度高达50.70%,显著高于其他C/N条件。

参考文献

- [1] 王沙沙,潘阳,谭宇杰,等. 厌氧氨氧化技术现状、研究进展及主要影响因素[J]. 环境卫生工程, 2020, 28(1): 64-69.
WANG Shasha, PAN Yang, TAN Yujie, et al. Status, research progress and main influence factors of anammox technology[J]. Environmental Sanitation Engineering, 2020, 28(1): 64-69.
- [2] 李松良,林华东,王鹏. 生物脱氮的短程硝化反硝化及影响因素[J]. 能源环境保护, 2007, 21(4): 16-19.
LI Songliang, LI Huadong, WANG Peng. The analysis of the affecting factors for shortcut nitrification-denitrification[J]. Energy Environmental Protection, 2007, 21(4): 16-19.
- [3] NSENGA KUMWIMBA M, LOTTI T, SENEL E, et al. Anammox-based processes: How far have we come and what work remains? A review by bibliometric analysis [J]. Chemosphere, 2020, 238: 124627.
- [4] 汪银龙,冯民权,董向前. 汾河下游雨季硝酸盐污染源解析[J]. 环境科学, 2019, 40(9): 4033-4041.
WANG Yinlong, FENG Minquan, DONG Xiangqian. Analysis of nitrate pollution sources in the rainy season of the lower Fenhe River[J]. Environmental Science, 2019, 40(9): 4033-4041.
- [5] MA Bin, WANG Shanyun, CAO Shenbin, et al. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advances [J]. Biore-source Technology, 2016, 200: 981-990.
- [6] 张星星,张钰,王超超,等. 短程反硝化耦合厌氧氨氧化工艺及其应用前景研究进展[J]. 化工进展, 2020, 39(5): 1981-1991.
ZHANG Xingxing, ZHANG Yu, WANG Chaochao, et al. Research advances in application prospect of partial denitrification coupled with anammox: A review [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2020, 39(5): 1981-1991.
- [7] 田建强. 反硝化过程中亚硝酸盐积累的影响因素[J]. 有色冶金设计与研究, 2008, 29(3): 42-44.
TIAN Jianqiang. Influencing factors of nitrite accumulation during denitrification [J]. Nonferrous Metals Engineering & Research, 2008, 29(3): 42-44.
- [8] 陈凯琦,张亮,孙事昊,等. 新型PD/A工艺同步处理低C/N生活污水和二级出水[J]. 中国环境科学, 2020, 40(4): 1515-1522.
CHEN Kaiqi, ZHANG Liang, SUN Shihao, et al. Novel PD/A process to treat low C/N domestic wastewater and secondary effluent simultaneously [J]. China Environmental Science, 2020, 40(4): 1515-1522.
- [9] 王维奇,王秀杰,李军,等. 不同驯化方式实现SBR中部分反硝化的对比研究[J]. 中国环境科学, 2018, 38(11): 4085-4093.
WANG Weiqi, WANG Xiujie, LI Jun, et al. Comparative study on achieving partial denitrification in a SBR by different acclimation methods [J]. China Environmental Science, 2018, 38(11): 4085-4093.
- [10] 王维奇,王秀杰,李军,等. 部分反硝化耦合厌氧氨氧化脱氮性能研究[J]. 中国环境科学, 2019, 39(2): 641-647.
WANG Weiqi, WANG Xiujie, LI Jun, et al. Study on the performance of partial denitrification coupled with anaerobic ammonia oxidation for nitrogen removal [J]. China Environmental Science, 2019, 39(2): 641-647.
- [11] 张阳,王秀杰,王维奇,等. 一株*Acinetobacter johnsonii*的部分反硝化特性及动力学研究[J]. 中国环境科学, 2019, 39(10): 4369-4376.
ZHANG Yang, WANG Xiujie, WANG Weiqi, et al. Partial denitrification characteristics and kinetics of a strain of *Acinetobacter johnsonii* [J]. China Environmental Science, 2019, 39(10): 4369-4376.
- [12] 田夏迪,张树军,杨岸明,等. 城市污水厂部分反硝化滤池启动及运行[J]. 中国环境科学, 2020, 40(3): 1068-1074.
TIAN Xiadi, ZHANG Shujun, YANG Anming, et al. Study on start-up and operation of partial denitrification filter in municipal wastewater treatment plant [J]. China Environmental Science, 2020, 40(3): 1068-1074.
- [13] 曹相生,付昆明,钱栋,等. 甲醇为碳源时C/N对反硝化过程中亚硝酸盐积累的影响[J]. 化工学报, 2010, 61(11): 2938-2943.
CAO Xiangsheng, FU Kunming, QIAN Dong, et al. Effect of C/N

- ratio on nitrite accumulation in denitrifying process with methanol as carbon source[J]. CIESC Journal, 2010, 61(11): 2938-2943.
- [14] ZHANG Miao, GAO Jing, LIU Quanlong, et al. Nitrite accumulation and microbial behavior by seeding denitrifying phosphorus removal sludge for partial denitrification (PD): The effect of COD/ NO_3^- ratio[J]. Bioresource Technology, 2021, 323: 124524.
- [15] NI Bingjie, YU Hanqing. An approach for modeling two-step denitrification in activated sludge systems[J]. Chemical Engineering Science, 2008, 63(6): 1449-1459.
- [16] DRYSDALE G D, KASAN H C, BUX F. Assessment of denitrification by the ordinary heterotrophic organisms in an NDBEPR activated sludge system[J]. Water Science and Technology, 2001, 43(1): 147-154.
- [17] 周晨, 潘玉婷, 刘敏, 等. 反硝化过程中氧化亚氮释放机理研究进展[J]. 化工进展, 2017, 36(8): 3074-3084.
- ZHOU Chen, PAN Yuting, LIU Min, et al. Advance of mechanism on N_2O emissions from biological denitrification[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2017, 36(8): 3074-3084.
- [18] PAN Yuting, NI Bingjie, LU Huijie, et al. Evaluating two concepts for the modelling of intermediates accumulation during biological denitrification in wastewater treatment[J]. Water Research, 2015, 71: 21-31.
- [19] 张雨婷, 曹利锋, 李乃玉, 等. 反硝化过程中硝酸盐与亚硝酸盐之间对电子的竞争[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2017, 46(4): 483-488.
- ZHANG Yuting, CAO Lifeng, LI Naiyu, et al. Competition for electrons between nitrate and nitrite during denitrification[J]. Journal of Shanghai Normal University: Natural Sciences, 2017, 46(4): 483-488.
- [20] 李玲玲, 刘晓萍, 杨兆雪. 低C/N比污水反硝化过程中亚硝态氮累积特性研究[J]. 环境污染与防治, 2016, 38(12): 72-77.
- LI Lingling, LIU Xiaoping, YANG Zhaoxue. Study on nitrite-N accumulation characteristics during denitrification process in low C/N ratio sewage[J]. Environmental Pollution & Control, 2016, 38(12): 72-77.
- [21] KORNAROS M, ZAFIRI C, LYBERATOS G. Kinetics of denitrification by *Pseudomonas denitrificans* under growth conditions limited by carbon and/or nitrate or nitrite[J]. Water Environment Research, 1996, 68(5): 934-945.
- [22] 王淑莹, 操沈彬, 杜睿, 等. 污泥发酵液为碳源的反硝化过程亚硝酸盐积累[J]. 北京工业大学学报, 2014, 40(5): 743-750.
- WANG Shuying, CAO Shenbin, DU Rui, et al. Nitrite accumulation during the denitrification process with sludge fermentation liquid as carbon source[J]. Journal of Beijing University of Technology, 2014, 40(5): 743-750.
- [23] 孙洪伟, 杨庆, 彭永臻, 等. SBR法处理垃圾渗滤液的反硝化过程中 NO_2^- 积累的研究[J]. 化工学报, 2009, 17(06): 1027-1031.
- SUN Hongwei, YANG Qing, PENG Yongzhen, et al. Study on NO_2^- accumulation in denitrification of landfill leachate treated by SBR[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2009, 17(06): 1027-1031.
- [24] MARTIENSSEN M, SCHÖPS R. Population dynamics of denitrifying bacteria in a model biocommunity[J]. Water Research, 1999, 33(3): 639-646.
- [25] PAYNE W J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms[J]. Bacteriological Reviews, 1973, 37(4): 409-452.
- [26] KNOWLES R. Denitrification[J]. Microbiological Reviews, 1982, 46(1): 43-70.
- [27] 姚芳, 刘波, 王德朋, 等. 不同接种污泥的厌氧氨氧化反应器启动特性及菌群结构演替规律分析[J]. 环境科学学报, 2017, 37(7): 2543-2551.
- YAO Fang, LIU Bo, WANG Depeng, et al. Start-up of ANAMMOX enrichment with different inoculated sludge and analysis of microbial community structure shift[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(7): 2543-2551.
- [28] ZHANG Tong, SHAO Mingfei, YE Lin. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants[J]. The ISME Journal, 2012, 6(6): 1137-1147.
- [29] WAGNER M, LOY A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3): 218-227.
- [30] SRINANDAN C S, SHAH M, PATEL B, et al. Assessment of denitrifying bacterial composition in activated sludge[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(20): 9481-9489.
- [31] LIU Binbin, MAO Yuejian, BERGAUST L, et al. Strains in the genus *Thauera* exhibit remarkably different denitrification regulatory phenotypes[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(10): 2816-2828.
- [32] 阳丽香. 环境因子对好氧反硝化菌活性及其功能基因表达的影响[D]. 华南师范大学, 2010.
- YANG Lixiang. Effects of environmental factors on activity and functional gene expression of aerobic denitrifying bacteria[D]. South China Normal University, 2010.
- [33] ZHANG Linfang, FU Guokai, ZHANG Zhi. Simultaneous nutrient and carbon removal and electricity generation in self-buffered biocathode microbial fuel cell for high-salinity mustard tuber wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2019, 272: 105-113.
- [34] 曾妮. 污水处理厂微生物群落结构及胞外聚合物组分分析[D]. 重庆: 重庆大学, 2015.
- ZENG Ni. Analysis of microbial community structures and compositions of extracellular polymeric substances in a wastewater treatment plant[D]. Chongqing: Chongqing University, 2015.

[作者简介] 柳全龙(1999—), 本科。电话: 19825305348, E-mail: 1617958603@qq.com。通讯作者: 张森, 副教授, E-mail: 006363@yzu.edu.cn。

[收稿日期] 2022-04-14(修改稿)