环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心
■ 出版 科学出版社

2020
Vol.41 No.5
第41卷 第5期

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第41卷 第5期
2020年5月15日

目 次

Eco-Environmental Knowledge Web
环 境 科 学
Environmental Science
第41卷第5期 2020年5月
Vol.41, No.5 May, 2020

连续流 SNAD 工艺处理猪场沼液启动过程中微生物种群演变及脱氮性能

秦嘉伟[1], 信欣[1,2*], 鲁航[1], 张萍萍[1], 王露蓉[1], 邹长武[1], 郭俊元[1]
(1. 成都信息工程大学资源环境学院, 成都 610225; 2. 中-塞环境与能源"一带一路"联合实验室, 成都 610225)

摘要: 为了实现合建式连续流同步部分亚硝化、厌氧氨氧化和反硝化 SNAD(simultaneous partial nitrification, ANAMMOX, and denitrification)工艺处理实际猪场沼液,保持温度为(30 ± 1)℃,控制溶解氧(DO)为(0.4 ± 0.1) mg·L^{-1},首先通过逐步提高模拟进水氨氮浓度来实现 SNAD 工艺的启动,然后实现 SNAD 工艺处理实际猪场沼液的稳定运行. 同时,采用高通量测序和实时定量 PCR(qPCR)技术对反应器启动前后及沼液替换成功时关键生物种群进行分析. 结果表明,150 d 左右可实现 SNAD 工艺的启动, 298 d 完成实际沼液的替换,其出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N小于 0.11,对NH_4^+-N和 TN 的平均去除率为 63.26% 和 55.71%. 高通量测序结果表明,绿弯菌门(Chloroflexi, 相对丰度 50.78%)、变形菌门(Proteobacteria, 13.34%)、浮霉菌门(Planctomycetes, 9.26%)是沼液替换成功时污泥中的优势菌门;主要优势脱氮菌属 *Nitrosomonas* 的相对丰度由启动前 1.55% 增加到 1.98%;两类具有厌氧氨氧化(ANAMMOX)功能菌 *Candidatus_Brocadia* 和 *Candidatus_Kuenenia* 的相对丰度分别从启动前 0.01% 和未检出(<0.01%)增加到 4.66% 和 4.18%;*Denitratisoma* 作为主要的反硝化菌,丰度由启动前未检出(<0.01%)增加到 2.06%. qPCR 结果表明,与接种污泥相比,沼液替换成功后 AOB、ANAMMOX 菌和反硝化菌的含量均有明显增加. 将 SNAD 工艺用于实际猪场沼液处理,可实现高效稳定脱氮,节约后续处理成本.

关键词:SNAD 工艺; 猪场沼液; 高通量测序技术; 定量 PCR; 微生物种群
中图分类号: X172; X703 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2020)05-2349-09 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201910018

Bacterial Community Shifts and Nitrogen Removal Characteristics for a SNAD Process Treating Anaerobic Digester Liquor of Swine Wastewater (ADLSW) in a Continuous-Flow Biofilm Reactor (CFBR)

QIN Jia-wei[1], XIN Xin[1,2*], LU Hang[1], ZHANG Ping-ping[1], WANG Lu-rong[1], ZOU Chang-wu[1], GUO Jun-yuan[1]
(1. College of Resources and Environment, Chengdu University of Information Technology, Chengdu 610225, China; 2. China-Serbia "the Belt and Road" Joint Laboratory on Environment and Energy, Chengdu 610225, China)

Abstract: To realize a simultaneous partial nitrification, ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation), and denitrification (SNAD) process treating anaerobic digester liquor of swine wastewater (ADLSW) in a continuous-flow biofilm reactor (CFBR), we first gradually increased the influent ammonium (NH_4^+-N) concentration, and then enhanced the ADLSW ratio in the influent during operation; dissolved oxygen (DO) was controlled at (0.4 ± 0.1) mg·L^{-1} by adjusting the air flow rate, and the temperature was kept at (30 ± 1)℃. Meanwhile, high-throughput sequencing and quantitative PCR (polymerase chain reaction) techniques were used to analyze the bacterial community shifts and the amount of dominant nitrogen removal bacteria. The results demonstrated that a successful start-up of the SNAD process was accomplished in 150 d, and replacement of the actual biogas slurry was completed in 298 d. The effluent (NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N value was less than 0.11, and the average removal rates of NH_4^+-N and TN (total nitrogen) increased to 63.26% and 55.71%, respectively. Moreover, high-throughput sequencing results demonstrated that the dominant microbial populations at phylum level were Chloroflexi (with a relative abundance of 50.78%), Proteobacteria (13.34%), and Planctomycetes (9.26%). The relative abundance of *Nitrosomonas* increased from 1.55% to 1.98%. In addition, the relative abundance of *Candidatus_Brocadia* and *Candidatus_Kuenenia* increased from 0.01% and (<0.01%) to 4.66% and 4.18%, respectively, and the relative abundance of *Denitratisoma* increased from (<0.01%) to 2.06%. Meanwhile, qPCR analysis showed that the amounts of ammonia-oxidizing bacteria, ANAMMOX, and denitrifying bacteria increased significantly compared with the inoculated sludge. An efficient and stable nitrogen removal rate can be achieved, and the follow-up processing cost can be reduced, by application of the SNAD treatment process for ADLSW.

Key words: simultaneous partial nitrification, ANAMMOX, and denitrification (SNAD); anaerobic digester liquor of swine wastewater (ADLSW); high-throughput sequencing; quantitative PCR; bacterial community shifts

收稿日期: 2019-10-07; **修订日期**: 2019-12-17
基金项目: 四川省教育厅科研项目(17ZA0067);成都信息工程大学中青年学术带头人科研基金项目(J201614)
作者简介: 秦嘉伟(1995~),男,硕士研究生,主要研究方向为水污染控制理论与技术,E-mail:965687512@qq.com
* 通信作者,E-mail:xx@cuit.edu.cn

随着我国肉类食品需求量的增加,生猪养殖在各种肉类养殖业中占据主导地位,随之带来的环境问题也越来越突出[1]. 养猪场在养殖中会产生大量废水,其中富含有机物、氨氮和磷等物质,若不经有效处理,会严重污染地表水和地下水,危害人体健康[2]. 目前,许多规模化猪场多采用厌氧-好氧工艺处理该类废水[3]. 猪场废水经厌氧发酵后,含碳有机物得到初步降解和去除,虽然有机态氮转化为无机态氮,但氮素含量并没有减少,氨氮浓度仍然很高,这就造成了低碳高氨氮猪场沼液的产生[4,5]. 尽管传统的好氧工艺处理猪场沼液已经发展成熟,可是出现了由于碳源不足导致其脱氮性能差等实际问题[6].

SNAD 工艺(simultaneous partial nitrification, ANAMMOX, and denitrification)是一种高效、低能耗的脱氮除碳新工艺,适合低 C/N 废水的处理. 该工艺首先通过氨氧化菌、(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)的作用,把废水中的 NH_4^+-N 部分转化为 NO_2^--N[式(1)],接着厌氧氨氧化菌(anaerobic ammonium oxidation bacteria, AnAOB)将 NO_2^--N 和部分剩余的 NH_4^+-N 转化为 N_2[式(2)],最终,反硝化菌则在有机物存在的情况下,将自养脱氮产生的少量 NO_3^--N 还原为 N_2[式(3)][7].

$$2NH_4^+ + 3O_2 \longrightarrow 2NO_2^- + 2H_2O + 4H^+ \quad (1)$$

$$NH_4^+ + 1.31NO_2^- + 0.066HCO_3^- + 0.13H^+ \longrightarrow 0.26NO_3^- + 1.02N_2 + 0.066CH_2O_{0.5}N_{0.15} + 2.03H_2O \quad (2)$$

$$2NO_3^- + 1.25CH_3COOH \longrightarrow 2OH^- + N_2 + 2.5CO_2 + 1.5H_2O \quad (3)$$

李冬等[8]采用序批式活性污泥反应器(SBR),通过人工配水,启动了 SNAD 颗粒污泥工艺. 范强等[9]通过人工模拟配水考察了 SNAD 系统各种细菌丰度的变化,对主要脱氮菌群进行 qPCR 分析,得出了 AOB 和 ANAMMOX 菌是系统中的优势菌群. Li 等[10]在氧化沟工艺中,通过人工配水在连续流态下成功启动 SNAD 工艺,并在处理实际生活污水时,NH_4^+-N 和 TN 的最大去除率达到了 85.6% 和 76.1%. 但是目前关于 SNAD 工艺的研究多集中于实验室模拟配水且进水 NH_4^+-N 浓度较低(多在 200 $mg \cdot L^{-1}$ 以下),并常用序批式反应器启动,鲜有关于连续流反应器处理实际猪场沼液和启动过程中微生物种群结构演变的研究.

本研究以低碳高氨氮的实际猪场沼液作为处理对象,连续流状态下进行 SNAD 工艺启动,并通过高通量测序技术分析启动过程中微生物种群演变规律和脱氮性能,采用 qPCR 对关键脱氮菌群进行定量分析,以期为 SNAD 工艺处理实际猪场沼液高效脱氮提供可靠的实验依据.

1 材料与方法

1.1 实验装置

SNAD 反应器如图 1 所示. 反应器为长方体形有机玻璃容器,其长、宽均为 12 cm,高为 24 cm,有效容积为 2 L. 反应器分为反应区和沉淀区,由挡板隔开底部连通,有效容积比为 5∶1. 反应器通过蠕动泵连续进水,接种污泥为本课题组实验室前期培养的厌氧氨氧化污泥和部分半硝化污泥[11]以体积比 7∶3 的比例混合,接种量约为 300 mL, MLSS 约为 4 000 $mg \cdot L^{-1}$,同时向反应器中添加 PVC 聚酯填料(填充率约为有效容积的 40%),填料为圆柱形,直径约为 0.9 cm,长度约为 0.9 cm. 反应器底部安装有曝气盘,通过转子流量计控制 DO 为(0.4 ± 0.1) $mg \cdot L^{-1}$,反应器运行温度为(30 ± 1)℃,水力停留时间(HRT)为 1.5 d.

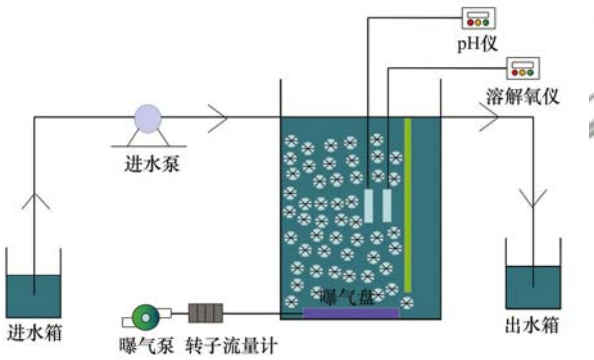

图 1 实验装置示意

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental apparatus

1.2 实验用水

本实验分为人工配水启动和实际猪场沼液替换两个阶段. 第一阶段:低 DO[(0.4 ± 0.1) $mg \cdot L^{-1}$]条件下,采用人工模拟废水,通过逐步提高氨氮浓度来启动 SNAD 工艺,以葡萄糖(106.5 $mg \cdot L^{-1}$)、柠檬酸三钠(290.4 $mg \cdot L^{-1}$)为碳源, NH_4Cl(560 $mg \cdot L^{-1}$)为氮源、KH_2PO_4(85 $mg \cdot L^{-1}$)为磷源、$NaHCO_3$(105 $mg \cdot L^{-1}$)提供碱度,同时添加微量元素. 其中微量元素的组成为($mg \cdot L^{-1}$): $CuCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1、$FeCl_3$ 0.3、H_3BO_4 0.1、$CoCl_2$ 0.1 和 EDTA 0.1[12]. 第二阶段:采用实际沼液逐步替换阶段,沼液采用成都市双流区某大型猪场实际沼液. 其主要水质指标见表 1.

1.3 分析方法

本实验中 NH_4^+-N 采用纳氏试剂分光光度法;

表 1　实验进水水质

Table 1　Key water quality indicators of the influent

阶段	天数/d	水质指标				
		NH_4^+-N/mg·L^{-1}	COD/mg·L^{-1}	TN/mg·L^{-1}	TP/mg·L^{-1}	pH
启动	1～40	188～213	200～350	194～219	20～40	7.5～8.0
	40～90	288～317	200～350	295～332	20～40	7.5～8.0
	90～180	440～468	200～350	450～474	20～40	7.5～8.0
沼液替换	180～226	440～464	200～350	448～482	20～50	6.0～7.0
	226～274	443～464	200～350	458～480	20～50	6.0～7.0
	274～326	455～473	200～350	464～484	20～50	6.0～7.0

NO_3^--N采用紫外分光光度法；NO_2^--N采用 *N*-(1-萘基)-乙二胺光度法；TN 采用碱性过硫酸钾-紫外分光光度法；COD 测定采用重铬酸钾法[13]. DO 和 pH 分别采用 JPB-607A 便携式溶解氧分析仪和 pHTestr30 型 pH 计测定. 游离氨(FA)的计算方法参考 Anthonisen 平衡方程[14].

1.4　微生物种群组成分析

分别取接种污泥(编号为 S1)、SNAD 工艺初次启动成功阶段污泥(编号为 S2)以及沼液替换成功阶段的污泥样品(编号为 S3)于离心管内 -20℃冷冻保存. 采用 DNA 快速提取试剂盒(离心柱型)提取[15],并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA. 对细菌 16S rRNA 进行 PCR 扩增,引物名称和序列分别是 F338(ACTCCTACGGGAGGCAG)和 806R(GGACTACHVGGGTWTCTAAT)[16]. 具体如下:95℃预变性 3 min, 95℃变性 30 s, 55℃退火 30 s、72℃延伸 45 s,共 27 个循环,最后 72℃终延伸 10 min,每个样品的扩增均做 3 次重复,将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,采用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物[17]. 参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司)进行检测定量[11]后由 Illumina Miseq 系统测序(上海美吉生物医药科技有限公司). 应用 I-sanger 生物信息云数据分析系统(http://www.i-sanger.com/)分析数据. 使用 UPARSE 软件,根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类;使用 UCHIME 软件剔除嵌合体. 为了得到每个 OTU 对应的物种分类信息,采用 RDP classifier 对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行物种分类注释,分别统计样本中 phylum(门)、class(纲)和 genus(属)的物种丰度[18].

1.5　qPCR 分析

以 AOB、ANAMMOX 菌、NOB 和反硝化菌的目的基因为引物进行 PCR 扩增[19],表 2 和表 3 为各功能菌引物序列和扩增程序[20].

表 2　PCR 扩增引物

Table 2　Primers of RCR

引物名称	碱基序列	基因	种群
F338-GC	ACTCCTACGGGAGGCAG	16S	细菌
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT		
CTO189fA/B	GGAGRAAAGCAGGGGATCG	CTO	氨氧化菌
CTO189fC	GGAGGAAAGTAGGGGATCG		
CTO654r	CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC		
nirS4F-GC	CCGCCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGG	*nirS*	反硝化菌
nirS6R	CGTTGAACTTRCCGGT		
NSR1113f	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	NSR	硝化细菌
NSR1264r	GTTTGCAGCGCTTTGTACCG		
Amx368f-GC	CGTCCTCTCAGACCARCTACTG	AMX	厌氧氨氧化菌
Amx820r	AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC		

表 3　PCR 反应程序

Table 3　Amplification program of PCR

基因	预变性	变性(循环)	退火延伸	溶解曲线采集
16S	94℃/5 min	94℃/30s	55℃/1.5 min	72℃/1 min
CTO	94℃/5 min	94℃/30s	58℃/1 min	72℃/1 min
AMX	94℃/5 min	94℃/30s	52℃/1 min	72℃/1 min
NSR	94℃/5 min	94℃/30s	50℃/1 min	72℃/2 min
nirS	94℃/5 min	94℃/30s	58℃/1 min	72℃/2 min

2 结果与讨论

2.1 SNAD 反应器启动及沼液替换过程中脱氮性能

2.1.1 NH_4^+-N及 TN 的去除变化分析

SNAD 反应器分为启动阶段(1 ~ 180 d)和实际沼液替换(181 ~ 326 d)两个阶段,整个运行过程中,反应器进出水NH_4^+-N、TN 浓度及其去除率的变化情况如图 2 和图 3 所示.

反应器初步启动阶段(1 ~ 180 d). 第 1 ~ 40 d,反应器进水NH_4^+-N浓度控制在(200 ± 15) $mg \cdot L^{-1}$,出水平均浓度为 40.19 $mg \cdot L^{-1}$,平均去除率为 80.08%,对氨氮具有较好的去除;总氮的平均出水浓度为 128.65 $mg \cdot L^{-1}$,平均去除率为 38.82%,略高于传统活性污泥. 原因在于本实验中接种污泥取自本课题组实验室前期培养的厌氧氨氧化污泥和部分半硝化污泥,AOB 和 ANAMMOX 菌的活性很高,大部分能很快适应新的污水处理环境.

第 41 ~ 88 d 里,提高进水氨氮浓度为(300 ± 15) $mg \cdot L^{-1}$,反应器对氨氮和 TN 的去除率有明显的下降,平均去除率分别为 38.29% 和 24.85%. 原因在于,随着进水中氨氮浓度的进一步升高,其产生的游离氨浓度也越高,当反应器中 FA 浓度超过 8.5 $mg \cdot L^{-1}$时,AOB 的活性受到抑制[21,22]. 郑照明等[23]通过研究不同氨氮浓度条件下厌氧氨氧化过程中NO_2^--N的浓度变化,发现随着氨氮浓度的提高,SNAD 工艺中的NO_2^--N去除速率下降,较高的NO_2^--N会抑制 AOB 的活性,对反应器有一定的抑制作用. 但随着反应器内微生物对高氨氮环境越来越适应,AOB 的活性逐渐恢复,厌氧氨氧化过程的加强也使NO_2^--N浓度降低,第 74 d 后,反应器对废水NH_4^+-N和 TN 的去除率开始提升,到第 82 d 时,分别上升到 59.7% 和 35.8%.

第 90 ~ 180 d,进一步提高进水氨氮浓度为(450 ± 15) $mg \cdot L^{-1}$, NH_4^+-N 平均去除率达到 55.53%,出水中的平均 NH_4^+-N 浓度为 201.49 $mg \cdot L^{-1}$;此时 TN 平均去除率达到 47.41%. 随着微生物对高氨氮环境的逐渐适应,反应器的脱氮性能逐步增加. 第 150 d 后,反应器对NH_4^+-N和 TN 的去除率分别达到了 70% 和 55% 以上,脱氮效果明显. 可见,本实验中控制低 DO,逐步提高进水氨氮浓度的方式有利于 SNAD 工艺的快速启动. 陈国燕[24]等采用 SBR 反应器,通过接种厌氧氨氧化菌与部分反硝化菌形成厌氧氨氧化与部分反硝化耦合处理模拟城镇污水,在 C/N 为 2.5, NH_4^+-N浓度为 20 ~ 40 $mg \cdot L^{-1}$, NO_3^--N/NH_4^+-N 比为 1.2 时,耦合效果最佳,对 NH_4^+-N 和 TN 的去除率为 92.85% 和 96.42%. 本实验脱氮效率低于前者的原因在于:其一,进水氨氮浓度在启动成功时达到了(450 ± 15) $mg \cdot L^{-1}$,明显高于文献[24]的报道,氨氮浓度过高会影响某些脱氮菌群的活性,导致脱氮性能不好;其二,本实验中其进水 C/N 接近或低于 1,并且反应器是在连续流态下进行,对污染物去除难度更高.

实际沼液替换阶段(181 ~ 326 d). 在模拟废水启动 SNAD 工艺的基础上,逐步采用实际猪场沼液替换. 在第 181 ~ 226、227 ~ 252 和 275 ~ 326 d,依

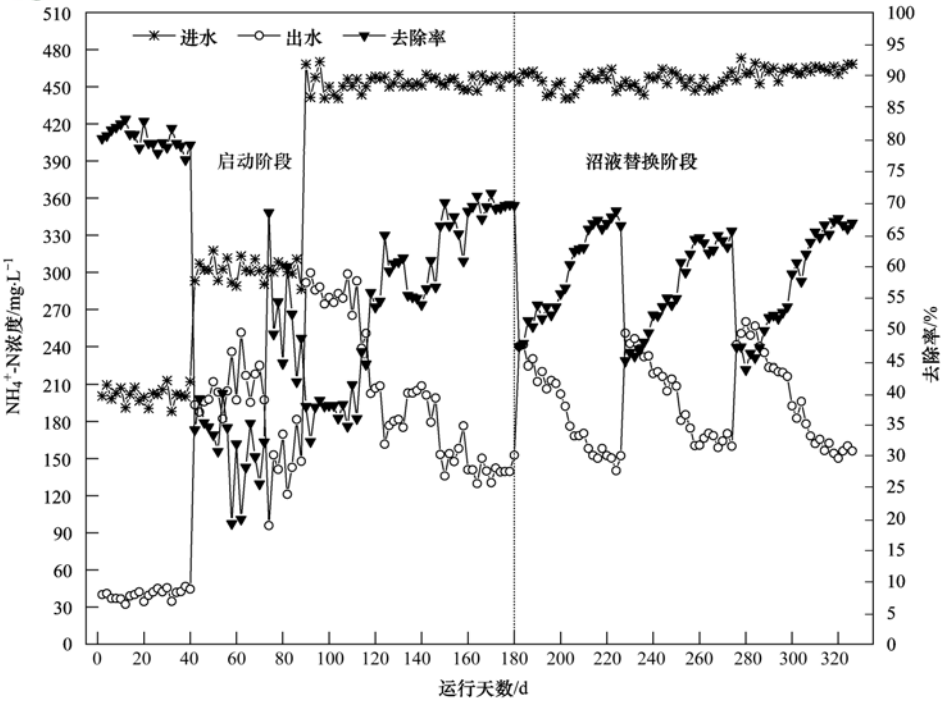

图 2 NH_4^+-N去除率变化

Fig. 2 Change in NH_4^+-N removal efficiency

次用 30%、70% 和 100% 的猪场沼液替换进水. 从图 2 和图 3 可以看出，每一次提升进水猪场沼液比例的运行初期，反应器对 NH_4^+-N 和 TN 的去除率都会有短时间的下降. 由于实际猪场沼液成分复杂，可能对反应器中的脱氮功能菌群产生一定的毒害和抑制作用，影响了 AOB、AnAOB 等的活性. 但是，随着微生物对实际沼液的快速适应，反应器对猪场沼液的脱氮性能也越来越好. 第 298 d 后，反应器对废水 NH_4^+-N 和 TN 的平均去除率分别为 63.26% 和 55.71%. 结合本文 2.3 节中脱氮菌群含量的结果，表明在实际猪场沼液处理系统存在着短程硝化、厌氧氨氧化和反硝化的脱氮途径.

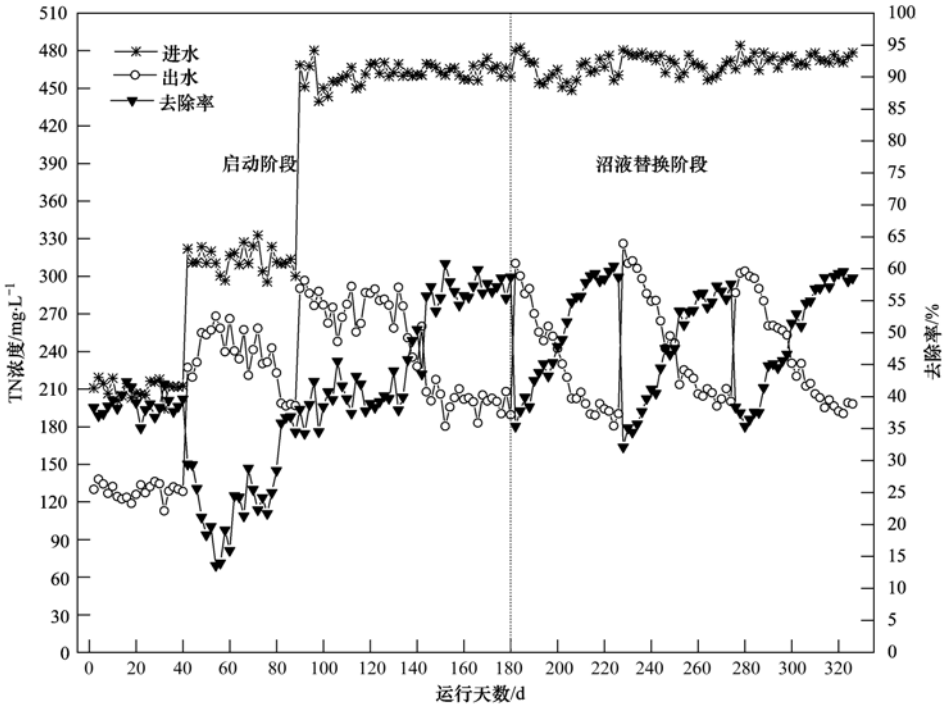

图 3　TN 去除率变化

Fig. 3　Change in TN removal efficiency

2.1.2　出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N

在 SNAD 系统中，NH_4^+-N 最终会转化成为 N_2 和少于 11% 的 NO_3^--N，故可把硝态氮和亚硝态氮的生成量占氨氮的去除量之比(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N 用于评价 SNAD 工艺是否启动成功及 SNAD 反应器的性能，且出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N 应低于 0.11[25].

整个反应器运行阶段，出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N 的比值变化情况如图 4 所示. 在反应器启动初期(1 ~ 40 d)，出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N 值较高，为 0.49；第 41 ~ 90 d，提高进水氨氮浓度，反应器氨氮转化率降低，而出水 NO_2^--N 浓度和积累率提高. 第 150 d 之后出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N 开始低于 0.11，说明反应器内初步形成了反硝化过程，将厌氧氨氧化反应生成的少量硝态氮转化为气态氮，结合反应器的脱氮效果，表明 SNAD 反应器初步启动成功，在 151 ~ 180 d 期间，反应器出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N 值一直稳定在 0.11 以下. 实际猪场沼液替换阶段，反应器出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N 的比值在 0.13 ~ 0.24 波动，说明实际高氨氮猪场沼液的加入，会对反应器系统带来轻微的不良影响，但是，随着反应器的继续运行，相关微生物种群能对实际沼液环境快速适应，第 298 d 后，其出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N 的值均小于 0.11.

2.2　微生物种群结构分析

2.2.1　门水平菌群结构分析

在整个启动运行期间，反应器内接种污泥 S1、

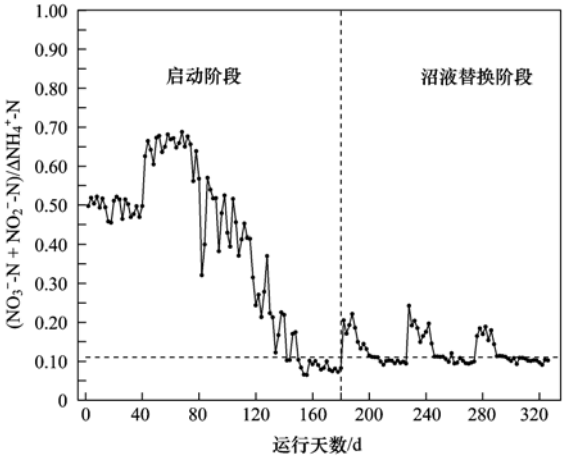

图 4　出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N 的变化情况

Fig. 4　Effluent (NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N variation

模拟废水启动成功时污泥 S2 及猪场沼液替代成功后的污泥 S3 的微生物种群组成(门水平)如图 5 所示. 3 个污泥样品中共同菌门有:绿弯菌门(Chloroflexi)、浮霉菌门(Armatimonadetes)、Planctomycetes、变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和伊格氏杆菌门(Ignavibacteriae)等. 随着反应器的运行,绿弯菌门(Chloroflexi)的相对丰度逐渐增加,从 S1 时的 18.34% 增加到 S2 时的 25.21%, 到 S3 时占 50.78%. 由于绿弯菌门多为兼性厌氧生物,常存在于污泥菌胶团絮状体内部,能够起到充当骨架的作用[26],本研究中,S3 污泥样品中其相对丰度最大,其形成的菌胶团能为 ANAMMOX 菌提供较好的生长环境. 同时,浮霉菌门(Planctomycetes)是厌氧氨氧化的重要菌群,其相对丰度在 3 个污泥样品中呈上升趋势,其相对丰度从接种污泥的 1.24% 上升到 SNAD 工艺初步启动成功的 8.37%,当沼液完全替代模拟进水后,其相对丰度为 9.26%,可见,采用模拟废水启动 SNAD 工艺,再逐步以实际沼液替代的启动方式有利于维系 SNAD 工艺处理实际猪场沼液时较高数量的厌氧氨氧化菌群,保证其良好的脱氮性能[27,28]. 然而,变形菌门(Proteobacteria)的相对丰度在 3 个样品中相对丰度有所下降,由接种时的 42.36% 逐渐下降到 19.23% 和 13.34%,说明进水中氨氮浓度过高可能会对变形菌门中的某些微生物种群产生抑制作用.

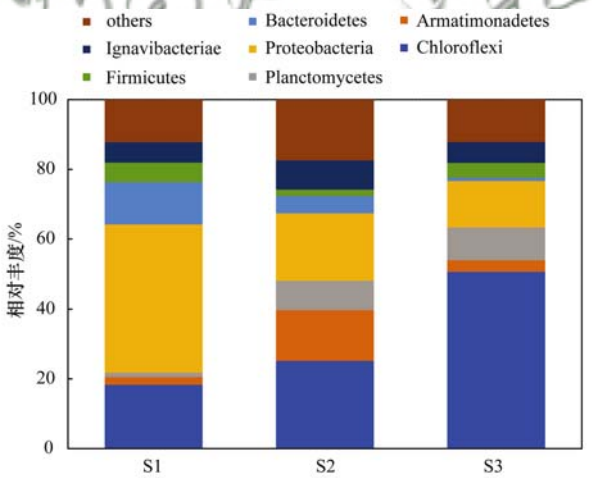

图 5 污泥样品微生物菌群结构分布(门水平)

Fig. 5 Distribution of bacterial community structures in three samples on the phylum level

2.2.2 微生物纲水平菌群结构分析

反应器启动运行过程中,污泥微生物种群在纲水平的变化如图 6 所示. 其中,厌氧绳菌纲(Anaerolineae)大多数为严格厌氧的细菌,一般隐藏在污泥菌胶团絮状体内部[29],其相对丰度增加明显,从 S1 时的 13.43% 增加到 S2 时的 23.59%,到 S3 时占 44.87%. 对变形菌门在纲分类水平的分布特征进行分析可以看出, α-变形菌纲(α-Proteobacteria)的相对丰度较 S1 时降低,可能是属于 α-Proteobacteria[30]的多数 NOB 由于进水氨氮浓度的增加而逐渐失去竞争优势,导致含量下降. 3 个污泥样品中,β-变形菌纲(β-Proteobacteria)的相对丰度分别为 16.87%, 9.64% 和 7.89%,随着反应器的启动运行,由于高氨氮的实际猪场沼液成分复杂,引起其相对丰度有所下降,但本实验中,β-变形菌纲仍是变形菌门中丰度最大的菌群. 已有研究表明,进行亚硝化反应的 AOB 多属于 β-Proteobacteria[31],有利于保证系统氨氮的转化和亚硝态氮的积累,在脱氮和污染物的去除起着重要作用[32]. δ-变形菌纲(δ-Proteobacteria)的相对丰度有所增加,其厌氧生长,具有去除 COD 的功能. 再者,浮霉菌纲(Planctomycetacia)在 3 个污泥样品中的相对丰度分别为 1.19%、8.24% 和 9.13%, 本实验中 Planctomycetacia 作为 SNAD 系统中典型的厌氧氨氧化菌群[33],其丰度的增加,表明启动成功的反应器中明显存在厌氧氨氧化的脱氮途径.

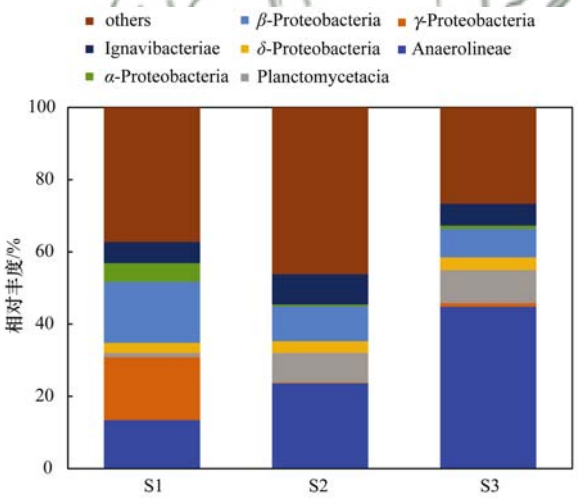

图 6 污泥样品微生物菌群结构分布(纲水平)

Fig. 6 Distribution of bacterial community structures in three samples on the class level

2.2.3 与脱氮功能相关的微生物菌群(属水平)分析

反应器在启动过程中微生物种群结构组成(属水平)变化如图 7 所示. *Nitrosomonas* 作为 Proteobacteria 门 β-Proteobacteria 纲一种典型的 AOB 存在于 SNAD 反应器中[34],其相对丰度从 S1 时的 1.55% 增加到 S2 时的 2.08%,表明逐步提高模拟废水中氨氮的浓度有利于反应器内富集一定数量的 AOB,促进短程硝化的实现;随着实际沼液的替换,而其在 S3 的丰度略有下降,但其相对丰度仍有 1.98%,略高于相对于接种污泥. 由于实际沼液成分复杂,可能抑制了 AOB 的生长繁殖,但 *Nitrosomonas*

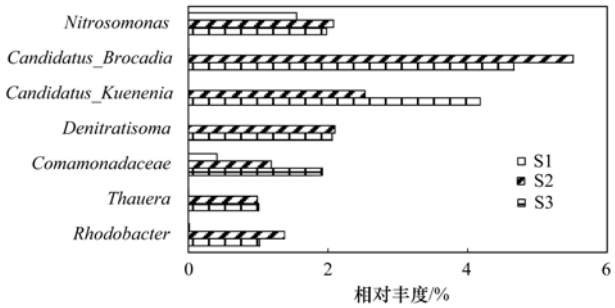

图 7　污泥样品与脱氮功能相关的微生物菌群结构分布(属水平)

Fig. 7　Distribution of bacterial community structures associated with denitrification in three samples on the genus level

仍然是 SNAD 工艺处理猪场沼液的优势脱氮菌群之一,完成短程硝化过程. 反应器在整个启动过程中,属于厌氧氨氧化菌 *Candidatus _ Brocadia* 和 *Candidatus_Kuenenia* 的相对丰度均有较大的上升. *Candidatus_Brocadia* 和 *Candidatus_Kuenenia* 在 3 个污泥样品中的相对丰度分别由接种污泥 S1 样品中的 0.01% 和未检出(<0.01%),上升到 S2 样品中的 5.51% 和 2.53%, 随着沼液的替换成功, *Candidatus_Brocadia* 的相对丰度略下降至 4.66%,但其丰度仍然很高;而 *Candidatus_Kuenenia* 的相对丰度却由 2.53% 继续增加到 4.18%. 厌氧氨氧化菌群的明显富集,有利于 SNAD 工艺高效脱氮[35]. 同时,在处理猪场沼液的 SNAD 工艺中(S3),反应器中出现了一些与反硝化功能密切相关的菌群. 其中,典型的反硝化菌属代表为 *Denitratisoma*、*Comamonadaceae*、*Thauera* 和 *Rhodobacter*. *Denitratisoma* 是红环菌科的一个新属且具有反硝化能力,能将亚硝态氮还原为氮气[11],丰度由启动前(S1)的未检出(<0.01%)增加到启动初步成功(S2)的 2.10%,沼液替换成功时(S3)的丰度也达到了 2.06%. *Comamonadaceae* 是一种可将硝酸盐作为电子受体来降解 COD 的反硝化菌[36],S1、S2 和 S3 时的丰度分别为 0.41%、1.19% 和 1.92%,在高氨氮浓度猪场沼液的处理系统内具有优势. 变形菌门(Proteobacteria)的 *Thauera* 属的相对丰度由 S1 时的 0.01% 增加到 S2 时的 0.99%,到 S3 时增至为 1.01%. 相关研究表明,*Thauera* 属于氢自养反硝化菌[37],常出现在高氨氮废水中,具有高效的反硝化能力[38]. *Rhodobacter* 可在厌氧条件下进行自养反硝化作用[39],其在样品 S1、S2 和 S3 中的相对丰度占比分别为 0.02%、1.38% 和 1.02%. 可见,相关反硝化功能菌属在模拟启动阶段以及实际沼液替换成功阶段的相对丰度有明显增长,说明该类菌群能利用废水中的 COD,通过反硝化作用将多余的 NO_3^--N 还原为 N_2,实现了 SNAD 工艺同步脱氮除碳的功能.

2.3　与脱氮功能相关菌群的 qPCR 分析与讨论

采用 qPCR 对反应器内污泥样品 S1、S2 和 S3 的 AOB、ANAMMOX 菌、NOB 和反硝化菌进行定量分析,结果如图 8 所示. 启动前污泥样品(S1)中的 AOB(以 DNA 计,下同)为 4.29×10^8 copies·mg^{-1},启动成功(S2)和沼液替换成功(S3)分别升高为 4.34×10^9 copies·mg^{-1} 和 8.69×10^8 copies·mg^{-1}. ANAMMOX 菌由 S1 中的 4.54×10^{11} copies·mg^{-1} 分别增加到 1.41×10^{12} copies·mg^{-1}(S2)和 9.49×10^{11} copies·mg^{-1}(S3). 本实验中,ANAMMOX 菌的

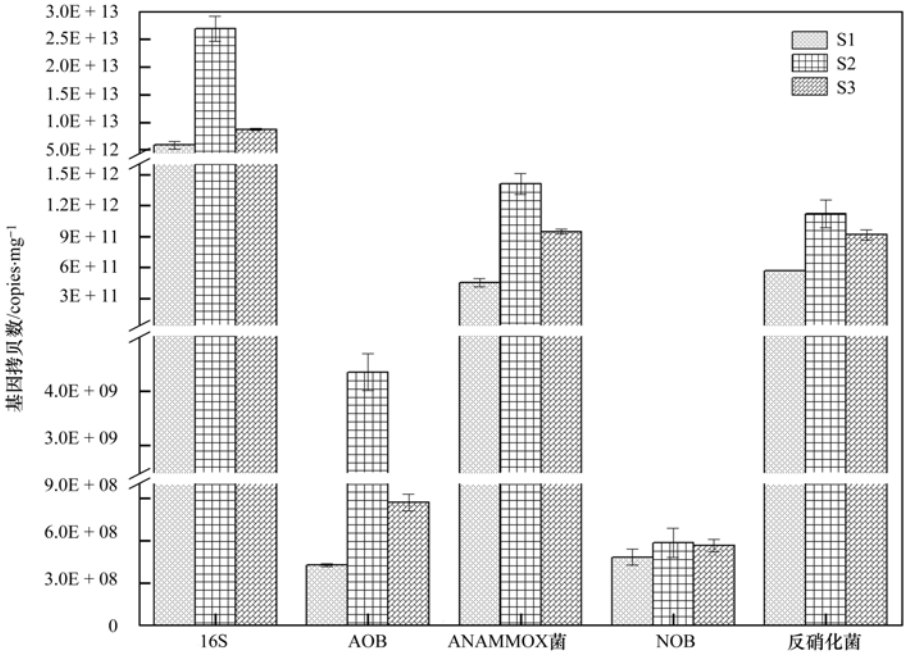

图 8　定量 PCR 结果分析

Fig. 8　Results of qPCR

含量在相关脱氮菌中最高,与 2.2.3 节中微生物属水平出现的 *Candidatus _ Brocadia* 和 *Candidatus _ Kuenenia* 的研究结果趋势一致. NOB 在反应器启动运行期间,其含量变化不大,在 S1、S2 和 S3 污泥样品中的含量分别为 4.82×10^{8}、5.84×10^{8} 和 5.66×10^{8} copies·mg^{-1}. 由于反应器一直处于微曝气状态,NOB 可以利用 AOB 产生的NO_2^--N进行硝化反应,但一直处于被抑制状态,导致其含量比 ANAMMOX 菌低得多. 与此同时,反应器启动成功时,反硝化菌含量明显提高,反硝化菌由接种污泥时的 5.71×10^{11} copies·mg^{-1} 增加到 1.12×10^{12} copies·mg^{-1}(S2)和 9.17×10^{11} copies·mg^{-1}(S3).

由 qPCR 分析结果可以看出,AnAOB、反硝化菌和 AOB 在 SNAD 工艺中占据的主导地位,AnAOB 的含量比 AOB 和反硝化菌群的数量要高,一方面,由于接种污泥是由 30% 的部分半硝化污泥和 70% 的厌氧氨氧化污泥混合构成,接种污泥本身 AOB 相对较少;另一方面,为了促使 AnAOB 的快速富集,反应器是在黑色遮光布的蔽光状态下启动运行的. 同时,qPCR 结果表明,AOB 对猪场沼液处理的 SNAD 系统敏感,其含量在 S3 样品中显著下降,但是 AnAOB 和反硝化菌的数量在猪场沼液替代前后的 SNAD 系统中变化不大. 本实验,通过高通量测序和 qPCR 分析手段,得到了 SNAD 工艺处理低碳高氨氮废水启动过程中微生物种群的演变以及各脱氮功能菌群的定量结果,结合反应器宏观脱氮性能的实验结果(2.1 节),可以初步对本实验中 SNAD 工艺处理猪场沼液的脱氮途径进行分析:AOB 将废水中的NH_4^+-N部分转化为NO_2^--N,ANAMMOX 菌将废水中NO_2^--N和剩余部分的氨氮转化为气态氮,并产生少量NO_3^--N;同时反硝化细菌从废水中 COD 中获得电子供体将 COD 氧化的同时将 NO_3^- 和少部分 NO_2^- 还原成气态氮. 反硝化菌通过反硝化作用对硝态氮的去除,进一步提高了反应器对于氮素的去除效果,同时也实现了对废水中 COD 的去除. 可见,AOB 和反硝化菌共同参与进行的厌氧氨氧化反应是 SNAD 系统对总氮去除的主要手段,各脱氮功能菌不同分工和所占比重的不同,保证了 SNAD 工艺高效脱氮除碳的实现.

3 结论

(1)在控制 DO 为(0.4 ± 0.1) mg·L^{-1},温度为(30 ± 1)℃,HRT 为 1.5 d 的条件下,通过人工配水逐步提高进水氨氮浓度能实现连续流 SNAD 工艺的启动;然后采用猪场沼液逐步替换的方式,在第 298 d 完成了 SNAD 工艺处理实际猪场沼液的启动,出水(NO_3^--N + NO_2^--N)/ΔNH_4^+-N的值低于 0.11,此后稳定运行期间,对NH_4^+-N和 TN 的平均去除率分别为 63.26% 和 55.71%.

(2)SNAD 工艺处理实际猪场沼液中,优势菌种为 Planctomycetacia 中的 *Candidatus _ Brocadia* (4.66%)和 *Candidatus_Kuenenia* (4.18%),以及 β-Proteobacteria 中的 *Nitrosomonas* (1.98%)和反硝化菌 *Denitratisoma* (2.06%),通过协同作用保证了 SNAD 工艺高效脱氮的实现.

(3) qPCR 结果表明,处理实际猪场沼液的 AOB、ANAMMOX 菌和反硝化菌含量分别为 8.69×10^{8}、9.49×10^{11} 和 9.17×10^{11} copies·mg^{-1},与接种污泥相比,均有明显增长.

参考文献:

[1] 徐伟朴, 陈同斌, 刘俊良, 等. 规模化畜禽养殖对环境的污染及防治策略[J]. 环境科学, 2004, **25**(S1): 105-108.
Xu W P, Chen T B, Liu J L, *et al*. Environmental pollution, comprehensive prevention and control tactics of the scale and intensify poultry farming[J]. Environmental Science, 2004, **25**(S1): 105-108.

[2] 赵国华, 陈贵. 养猪废水处理与资源化利用的研究进展[J]. 四川环境, 2015, **34**(6): 156-161.
Zhao G H, Chen G. Research progress on swine wastewater treatment and resource utilization[J]. Sichuan Environment, 2015, **34**(6): 156-161.

[3] Zhao B W, Li J Z, Leu S Y. An innovative wood-chip-framework soil infiltrator for treating anaerobic digested swine wastewater and analysis of the microbial community [J]. Bioresource Technology, 2014, **173**: 384-391.

[4] Zhang L, Lee Y W, Jahng D. Ammonia stripping for enhanced biomethanization of piggery wastewater[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, **199-200**: 36-42.

[5] 张春, 郑利兵, 郁达伟, 等. 沼液处理与资源化利用现状与展望[J]. 中国沼气, 2018, **36**(5): 36-46.
Zhang C, Zheng L B, Yu D W, *et al*. Current situation and prospect of biogas slurry treatment and its resource utilization [J]. China Biogas, 2018, **36**(5): 36-46.

[6] 邓玮玮, 王晓昌. 低碳氮比废水脱氮研究进展[J]. 工业水处理, 2015, **35**(2): 15-19.
Deng W W, Wang X C. Research progress in the denitrification of sewage at low C/N ratio[J]. Industrial Water Treatment, 2015, **35**(2): 15-19.

[7] Anjali G, Sabumon P C. Development of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) in a non-aerated SBR [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, **119**: 43-55.

[8] 李冬, 崔雅倩, 赵世勋, 等. 生活污水预沉淀-SNAD 颗粒污泥工艺小试[J]. 环境科学, 2019, **40**(4): 1871-1877.
Li D, Cui Y Q, Zhao S X, *et al*. Pre-precipitation of sewage-SNAD granular sludge process test[J]. Environmental Science, 2019, **40**(4): 1871-1877.

[9] 范强, 刘国华, 徐相龙, 等. 同步半硝化-厌氧氨氧化-反硝化一体式反应器的运行条件和微生物丰度研究[J]. 环境工程, 2016, **34**(5): 6-10, 40.
Fan Q, Liu G H, Xu X L, *et al*. Study on operation conditions and microbial abundance in simultaneous partial nitritation-anammox-denitrification system[J]. Environmental Engineering, 2016, **34**(5): 6-10, 40.

[10] Li X L, Zhang J, Zhang X Y, *et al*. Start-up and nitrogen removal performance of CANON and SNAD processes in a pilot-scale oxidation ditch reactor[J]. Process Biochemistry, 2019, **84**: 134-142.

[11] 鲁航, 信欣, 管蕾, 等. 部分半硝化 AGS-SBR 工艺的启动及其种群结构分析[J]. 环境科学, 2016, **37**(12): 4741-4749.
Lu H, Xin X, Guan L, *et al*. Start-up of partial nitritation AGS-SBR and analysis of its microbial community composition[J]. Environmental Science, 2016, **37**(12): 4741-4749.

[12] 王子凌, 信欣, 王锣, 等. CANON 工艺处理猪场沼液的启动及微生物种群结构分析[J]. 环境科学学报, 2018, **38**(10): 3945-3953.
Wang Z L, Xin X, Wang L, *et al*. Start-up and microbial communities analysis of CANON process for the treatment of anaerobic digester liquor of swine wastewater (ADLSW)[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2018, **38**(10): 3945-3953.

[13] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[14] Anthonisen A C, Loehr R C, Prakasam T B S, *et al*. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid[J]. Journal (Water Pollution Control Federation), 1976, **48**(5): 835-852.

[15] 王衫允. 低氨氮浓度厌氧氨氧化工艺强化及颗粒污泥菌群特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.

[16] Xing W, Li D S, Li J L, *et al*. Nitrate removal and microbial analysis by combined micro-electrolysis and autotrophic denitrification[J]. Bioresource Technology, 2016, **211**: 240-247.

[17] Yang Z H, Xiao Y, Zeng G M, *et al*. Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, **74**(4): 918-925.

[18] 姚松. 磷氮比对高氨氮废水短程硝化—反硝化处理效能及微生物种群分布的影响研究[D]. 北京: 北京交通大学, 2018.

[19] Daverey A, Su S H, Huang Y T, *et al*. Partial nitrification and anammox process: a method for high strength optoelectronic industrial wastewater treatment[J]. Water Research, 2013, **47**(9): 2929-2937.

[20] Avrahami S, Liesack W, Conrad R. Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers[J]. Environmental Microbiology, 2003, **5**(8): 691-705.

[21] 孙洪伟, 吕心涛, 魏雪芬, 等. 游离氨(FA)耦合曝气时间对硝化菌活性的抑制影响[J]. 环境科学, 2016, **37**(3): 1075-1081.
Sun H W, Lü X T, Wei X F, *et al*. Synergetic inhibitory effect of free ammonia and aeration phase length control on the activity of nitrifying bacteria[J]. Environmental Science, 2016, **37**(3): 1075-1081.

[22] 傅金祥, 汪洋, 杨勇. FA 与 FNA 对 A/O 工艺短程硝化处理垃圾渗滤液的影响[J]. 工业水处理, 2012, **32**(5): 48-51.
Fu J X, Wang Y, Yang Y. Effect of FA and FNA on the short-cut nitrification of landfill leachate in an A/O system[J]. Industrial Water Treatment, 2012, **32**(5): 48-51.

[23] 郑照明, 李军, 马静, 等. SNAD 生物膜厌氧氨氧化活性的氨氮抑制动力学研究[J]. 中国环境科学, 2016, **36**(10): 2957-2963.
Zheng Z M, Li J, Ma J, *et al*. The kinetic coefficients of ammonium inhibition on the Anammox activity of SNAD biofilm[J]. China Environmental Science, 2016, **36**(10): 2957-2963.

[24] 陈国燕, 彭党聪, 李惠娟, 等. 厌氧氨氧化耦合部分反硝化处理低浓度氨氮废水[J]. 环境工程学报, 2018, **12**(7): 1888-1895.
Chen G Y, Peng D C, Li H J, *et al*. Treating low-nitrogenous wastewater by coupling anammox with partial denitrification[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2018, **12**(7): 1888-1895.

[25] Keluskar R, Nerurkar A, Desai A. Development of a simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonia oxidation and denitrification (SNAD) bench scale process for removal of ammonia from effluent of a fertilizer industry[J]. Bioresource Technology, 2013, **130**: 390-397.

[26] Kragelund C, Caterina L, Borger A, *et al*. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, **59**(3): 671-682.

[27] Yue X, Yu G P, Lu Y Q, *et al*. Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and the microbial community of the completely autotrophic nitrogen removal over nitrite process in a submerged aerated biological filter[J]. Bioresource Technology, 2018, **254**: 67-74.

[28] Fuerst J A. Beyond prokaryotes and eukaryotes: planctomycetes and cell organization[J]. Nature Education, 2010, **3**(9): 44.

[29] 王萍, 余志晟, 齐嵘, 等. 丝状细菌污泥膨胀的 FISH 探针研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2012, **18**(4): 705-712.
Wang P, Yu Z S, Qi R, *et al*. Progress on FISH probes of sludge bulking caused by filamentous bacteria[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2012, **18**(4): 705-712.

[30] Daims H, Nielsen J L, Nielsen P H, *et al*. In situ characterization of *nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(11): 5273-5284.

[31] 李冬, 何永平, 张肖静, 等. MBR 系统 CANON 工艺的快速启动及微生物种群特征[J]. 中国环境科学, 2014, **34**(11): 2788-2795.
Li D, He Y P, Zhang X J, *et al*. The fast start-up of CANON process in MBR system and the characterization of microbes[J]. China Environmental Science, 2014, **34**(11): 2788-2795.

[32] Thomsen T R, Kong Y H, Nielsen P H. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, **60**(3): 370-382.

[33] 刘竹寒, 岳秀, 于广平, 等. CANON 在 SBAF 中的快速启动及其微生物特征[J]. 环境科学, 2017, **38**(1): 253-259.
Liu Z H, Yue X, Yu G P, *et al*. Fast start-up of SBAF system assisted CANON process and the microbial analysis[J]. Environmental Science, 2017, **38**(1): 253-259.

[34] Ducey T F, Hunt P G. Microbial community analysis of swine wastewater anaerobic lagoons by next-generation DNA sequencing[J]. Anaerobe, 2013, **21**: 50-57.

[35] 付昆明. 全程自养脱氮(CANON)反应器的启动及其脱氮性能[D]. 北京: 北京工业大学, 2010.

[36] Sadaie T, Sadaie A, Takada M, *et al*. Reducing sludge production and the domination of Comamonadaceae by reducing the oxygen supply in the wastewater treatment procedure of a food-processing factory[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 2007, **71**(3): 791-799.

[37] Mao Y P, Xia Y, Zhang T. Characterization of *Thauera*-dominated hydrogen-oxidizing autotrophic denitrifying microbial communities by using high-throughput sequencing[J]. Bioresource Technology, 2013, **128**: 703-710.

[38] 毛跃建. 废水处理系统中重要功能类群 *Thauera* 属种群结构与功能的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.

[39] Prakash O, Green S J, Jasrotia P, *et al*. *Rhodanobacter denitrificans* sp. nov., isolated from nitrate-rich zones of a contaminated aquifer[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, **62**(10): 2457-2462.

HUANJING K0EXUE Vol. 41 No. 5
Environmental Science (monthly) May 15, 2020

CONTENTS