

用生物膜缺氧修复受污染的城市河道水

张永明, 胡一珍, 严荣, 刘芳

(上海师范大学生命与环境科学学院环境工程系, 上海 200234)

摘要:采用一种类似氧化沟的反应器, 其中利用蜂窝陶瓷为载体形成生物膜替代活性污泥, 对城市受污染的河道水体进行缺氧生物修复. 修复过程中控制溶解氧含量在 0.5 mg/L 以下, 使生物反应在缺氧状态下运行. 在此过程中, 水中的氨氮去除率为 40% ~ 60%, 总氮的去除率达到 40% ~ 45%, 即氨氮和总氮得到同步去除, 且没有亚硝酸盐积累. 提取生物膜置于摇瓶内进行厌氧培养发现, 氨氮和亚硝酸盐氮也得到同步去除, 这表明在低碳氮比的微污染地表水的生物修复过程中同时有硝化-反硝化和厌氧氨氧化现象. 通过分子生物学分析, 证实在生物膜群落里存在具有厌氧氨氧化能力的微生物. 这一结果有可能为富营养化水体的修复提供一种经济、实用的技术途径.

关键词:城市河道水体; 生物修复; 厌氧氨氧化; 富营养化

中图分类号: X522 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)07-1920-05

Anoxic Bioremediation of Urban Polluted River Water with Biofilm

ZHANG Yong-ming, HU Yi-zhen, YAN Rong, LIU Fang

(Department of Environmental Engineering, College of Life and Environmental Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Reactor like oxidation ditch was used for anaerobic bioremediation of urban river water, in which biofilm formed on ceramic honeycomb carrier was used instead of activated sludge. The dissolved oxygen in the wastewater was controlled under 0.5 mg/L for anoxic oxidation, and ammonia nitrogen was removed 40 to 60 percent, and total nitrogen removed 40 to 45 percent, that is ammonia nitrogen and total nitrogen were removed at the same time, also, nitrite was not any accumulated during the process. The biofilm was taken into flask to culture under anoxic oxidation condition in order to prove if anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) occurred in the process, and ammonia and nitrite nitrogen were also removed at the same time in the experiment, which suggested that nitrification-denitrification and ANAMMOX occurred in bioremediation of urban surface water with low ratio of carbon and nitrogen at the same time. The anammox bacteria were existed in the biofilm according to molecular biological analysis. The experiment will be significant for bioremediation of eutrophication water body.

Key words: urban river water body; bioremediation; anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX); eutrophication

城市地表水包括河道水、景观水等, 对美化城市、解决城市热岛效应、满足人们心理对美感的需求都具有重要的意义. 然而, 工农业的快速发展和人们生活水平的不断提高, 导致大量复杂的污染物, 尤其是氮元素通过各种途径输入地表水体, 大量的河流、湖泊呈现富营养化, 不仅影响了人们正常生活, 还制约着经济发展, 因而受污染地表水修复的研究十分迫切^[1, 2].

近年来, 随着湖泊、水库以及城市河道的富营养化而导致蓝藻的频繁暴发, 氮污染所造成的环境问题已日益引起人们的关注, 生物脱氮新方法、新技术已成为近年来研究开发的热点. 生物修复是一种经济可行的方法, 水体的生物修复包括原位和异位^[3]. 其中异位修复是将待修复水体抽入反应器中, 通过微生物作用, 在好氧条件下使其中的氨氮得到氧化. 但完全采用氧化方法, 总氮的去除率通常较低, 因此采用好氧-缺氧组合的方式, 可使水体中的氮元素分

别进行硝化和反硝化, 最后转化为氮气挥发, 从而实现脱氮的目的. 从经济性的角度来看, 单纯采用好氧方法动力消耗较大. 若能采用缺氧方法进行地表水修复, 经厌氧氨氧化途径, 水中的氮元素也可以得到去除, 这样则可实现降低动力消耗的目的.

以往在微污染地表水生物修复或微污染水处理过程中, 还很少见这方面的报道. 自从 Mulder 等^[4]于 1995 年首先报道了在厌氧流化床反应器内发现了氨的厌氧氨氧化现象后, 围绕着厌氧氨氧化的各种研究不断出现. Carsten 等^[5]曾报道在淡水湖泊中也发现了厌氧氨氧化的现象. 随后有关厌氧氨氧化

收稿日期: 2008-07-26; 修订日期: 2008-10-28

基金项目:国家自然科学基金项目(50678102); 上海市教育委员会发展基金重点项目(ZZ0622); 上海市重点学科建设项目(S30406); 上海师范大学重点学科建设项目(DZL711); 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室开放项目

作者简介:张永明(1958~), 男, 博士, 博士研究生导师, 主要研究方向为环境生物技术、水处理技术、新型生物反应器开发, E-mail: zhym@shnu.edu.cn

在水处理领域里的应用和研究,以及厌氧氨氧化菌的分子生物学方面的研究都取得了不少进展^[6~10]。

在采用厌氧氨氧化方法进行水处理方面,大多数的研究主要还是集中在浓度相对比较高的废水处理,或是实验室处理模拟废水^[11~13]。若能在地表水修复过程中通过缺氧方式,以厌氧氨氧化方式将氮元素脱除,实现氨氮和硝酸盐或亚硝酸盐的同步去除,既可大大减少动力消耗,对地表水的修复也具有重大理论和实际意义。

1 材料与方法

1.1 反应器

所用反应器类似氧化沟的反应器,将蜂窝陶瓷载体置于反应器内,在该载体上形成生物膜,替代通常氧化沟反应器内活性污泥。该反应器系统及结构的俯视图如图 1 所示。反应器总体积为 23 L,工作体积为 18 L。在反应器的进水前端,设置一个消耗氧的装置,该装置为高 100 mm,直径 50 mm 的圆柱形有机玻璃,里面填充有直径约 2 mm 的陶粒,目的是使通过该装置的水中溶解氧降低到 0.5 mg/L 以下,为

总氮的去除创造条件。在运行的初期(前 17 d),进水不经过消氧装置,从第 18 d 开始,则经过消氧装置。反应器内有一个循环潜水泵驱动水沿着折流板在反应器内循环流动以强化传质。

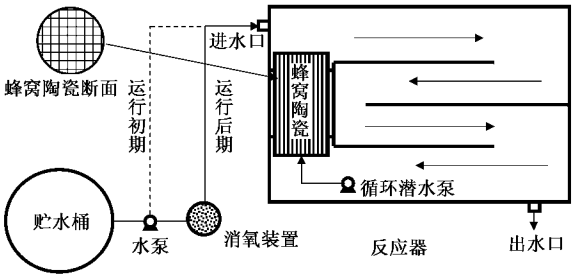


图 1 类似氧化沟的生物膜反应器

Fig. 1 Planform of biofilm reactor like oxidation ditch

1.2 实验用水

废水取自上海市区龙华港水系漕河泾河段。从 2006 年 7~12 月连续对该河段断面进行监测,所得平均值数据如表 1 所示。可以看出,参照国家地表水环境质量标准^[14],该断面水质为劣 V 类水体。

表 1 2006 年 7~12 月漕河泾断面水质监测数据

Table 1 Monitoring data of river water quality in the section of Caohejing from July to December 2006								
水温/℃	氨氮/mg•L ⁻¹	总氮/mg•L ⁻¹	总磷/mg•L ⁻¹	浊度/NTU	COD/mg•L ⁻¹	亚硝酸盐氮/mg•L ⁻¹	pH	DO/mg•L ⁻¹
17.5	8.37	9.37	0.89	30.6	44.7	0.20	7.75	0.20

1.3 反应器的运行

反应器连续运行近 100 d,从 9~12 月,运行温度变化较大,从 32℃ 逐渐降低至 20℃。整个运行分为 3 个阶段,各阶段主要运行参数如表 2 所示。在第 1 阶段,直接将水泵入反应器内,此阶段包括生物膜挂膜过程。18~69 d 为第 2 阶段,此阶段在进水中加入 20 mg/L 葡萄糖,并将水先泵入消氧装置,然后再流入反应器内,使进入反应器的溶解氧(DO)在 0.5 mg/L 以下。从第 70 d 开始为第 3 阶段,此阶段水温比第 1 和第 2 阶段要低。整个反应器封闭,且避光。控制进水量,水力停留时间为 7.2 h。反应器内的潜水泵连续工作,驱动水在反应器内循环。

表 2 反应器运行各阶段参数与方式

Table 2 Operation parameters and methods for every stage			
运行状况	第 1 阶段	第 2 阶段	第 3 阶段
运行天数/d	1~17	18~69	70~99
温度/℃	25~32	25~32	20~25
是否添加碳源	不添加	添加	添加
是否经过消氧装置	不经过	经过	经过

1.4 分析方法

每隔 1~2 d 分别取进出水样进行分析,主要测试内容及方法如下。

总氮:过硫酸钾氧化,紫外分光光度法 GB 11894-89,UV-2550 型,岛津 Shimadzu 有限公司;DO:便携式溶解氧仪法,YSI550A,美国金泉仪器有限公司;COD:重铬酸钾法(GB 11914-89);水温:水温计法(GB 13195-91);pH:便携式 pH 计法,LP-3000 系列,上海艾旺工贸有限公司;氨氮:纳氏试剂比色法(GB 7479-87),上海光谱仪器有限公司;亚硝酸盐氮:N-(1-萘基)-乙二胺光度法(GB 7493-87),SP-2000 型 Spectrum 可见分光光度计。

1.5 厌氧氨氧化的验证

在运行的后期(第 90 d),从反应器内取 15 mL 的生物膜加入到 250 mL 的锥形瓶内,然后再加入 200 mL 含有氨氮和亚硝酸盐氮的配水,通氮气 5 min,将水中溶解氧驱除。最后将该摇瓶放在摇床内,在 30℃ 条件下振荡反应。每 5 h 取水样进行分析,共

反应 25 h. 配水的主要成分为(mg/L): NH_4Cl 19, NaNO_2 24, NaHCO_3 69, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 37.

1.6 厌氧氨氧化菌的分子生物学鉴定

从反应器内取生物膜样品,采用试剂盒提取 DNA,所用引物为:F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), R(5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3')^[15]. PCR 反应体系如表 3 所示.

表 3 PCR 反应体系	
Table 3 Reaction systems for PCR	
项目	用量
2 × Hotstart-PCR mix	25 μL
Primers (25 pmol/μL)	0.8 μL × 2
模板(DNA)	1 μL
水	22.4 μL
Total	50 μL

PCR 扩增条件:94℃, 4 min;(94℃, 30 s; 53℃, 30 s; 72℃, 60 s)循环 35 次,72℃, 5 min. 然后经琼脂糖凝胶电泳检测,将 PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒回收(鼎国生物).使用 pUc-T Vector Kit,把靶基因片段连入载体.转化入 *E. coli* DH5α,挑取克隆经液体

培养后,提取质粒鉴定,最后送至上海闪晶分子生物科技有限公司进行测序.测序结果提交 GenBank 进行 Blast 检索.

2 结果与讨论

2.1 总氮和氨氮去除过程的分析

近 100 d 的实验过程中,进出水中氨氮和总氮变化如图 2 所示.溶解氧与氨氮、总氮去除率的关系如图 3 所示.整个实验分为 3 个阶段,在第 1 阶段,氨氮的去除率在 50% 左右,但总氮的去除率不到 20%.此阶段,水中溶解氧含量在 0.5 mg/L 左右,这说明在此溶解氧条件下,通过生物膜的作用,部分氨氮已转化为硝酸盐和亚硝酸盐,此时以氧原子作为电子受体,使部分氨氮发生硝化反应.当少量的溶解氧被消耗完之后,氨氮不能进一步被硝化,所以此时氨氮的去除率维持在 40% ~ 60% 之间较低的水平.同时又由于没有足够的有机碳源,虽然溶解氧已降低到 0.5 mg/L 以下,硝酸盐和亚硝酸盐也得不到进一步地反硝化,导致总氮去除率较低.

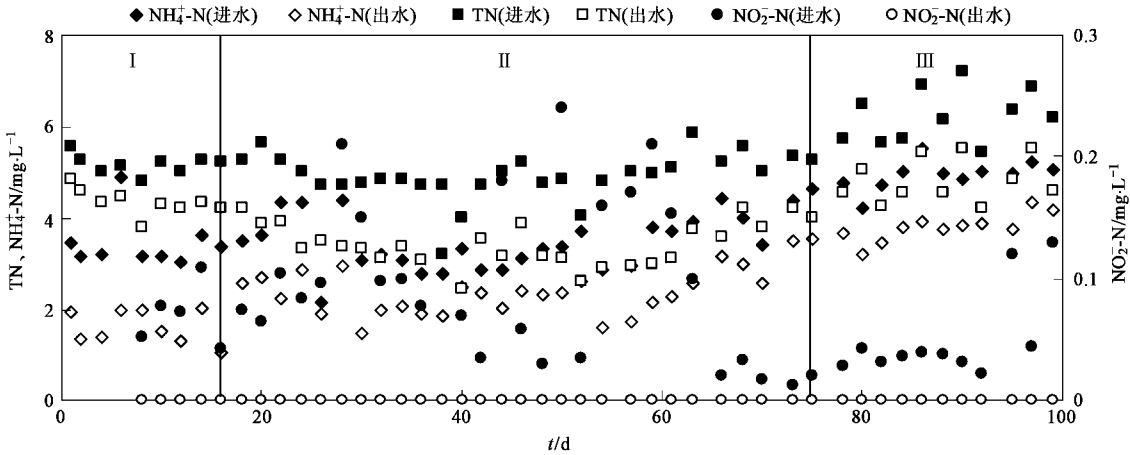


图 2 反应器运行 3 个阶段进出水的氨氮、总氮和亚硝酸盐氮的变化
Fig. 2 Influent and effluent changes of ammonia, total nitrogen and nitrite for three stages

从第 18 d 开始为反应器运行的第 2 阶段,此时在进水中添加 20 mg/L 的葡萄糖,并且先经过消氧装置后再进入反应器,在消氧装置内,消耗了部分有机碳源和溶解氧,使得进入到反应器时溶解氧下降至 0.2 ~ 0.3 mg/L. 由于消氧装置体积较小,水力停留时间不到 3 min,因此在消氧装置内的脱氮反应可以忽略,可以认为主要还是在反应器内进行的.在该阶段,反应器内总氮的去除率提高到 40% ~ 45%. 同时在该阶段可以发现,虽然处于缺氧条件,氨氮的去除率和总氮的去除率几乎呈同步变化.该阶段在反

应器内的溶解氧已降低到 0.2 mg/L 以下,此时总氮下降可以理解为剩余的葡萄糖作为有机碳源为硝酸盐和亚硝酸盐提供电子,发生了反硝化反应.但在此情况下,氨氮的去除率也呈同步变化,因此笔者分析在此过程中还同步发生了厌氧氨氧化反应.

随后进入第 3 阶段,由于水温下降到 25℃ 以下,总氮和氨氮的去除率有所下降,降低至 20% ~ 30%. 但从图 3 可以发现,在近 100 d 的实验过程中,当 DO 在 0.5 ~ 0.6 mg/L 之间时,氨氮和总氮去除率相差较大,而当 DO 在 0.2 ~ 0.3 mg/L 之间时,即使温

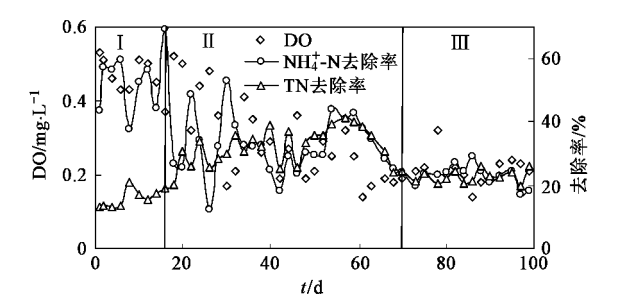


图3 溶解氧与氨氮和总氮去除率的关系
Fig.3 Relation between dissolved oxygen and ammonia and total nitrogen

度下降到较低水平,但氨氮和总氮的去除率相近。
从图2还可以看出,在出水中已没有亚硝酸盐的积累,即亚硝酸盐的去除率达到100%。据报道^[16],在厌氧氨氧化反应器的运行中,偶尔操作不当会使空气进入反应器,从而造成出水NO₂⁻-N浓度急剧上升,大大超过进水NO₂⁻-N浓度。但在本实验过程中,没有出现NO₂⁻-N的积累,这说明在本实验的反应器中,确实处于缺氧状态。所发生的NH₄⁺-N消失很有可能是由于厌氧氨氧化菌存在,从而导致在反应器内发生了厌氧氨氧化反应。

2.2 厌氧氨氧化的验证

在实验的第2阶段,从反应器中提取生物膜进行厌氧氨氧化的验证实验,其结果如图4所示。可以看出,由于处于缺氧状态,氨氮和亚硝酸盐氮是同步去除的,且总氮去除率随着氨氮和亚硝酸盐氮的去除而逐步上升。这一结果表明,所提取的生物膜中确实含有厌氧氨氧化菌,说明低碳氮比的地表水通过生物膜修复时,在反硝化过程中,由于溶解氧浓度下降,也同时存在着厌氧氨氧化反应。

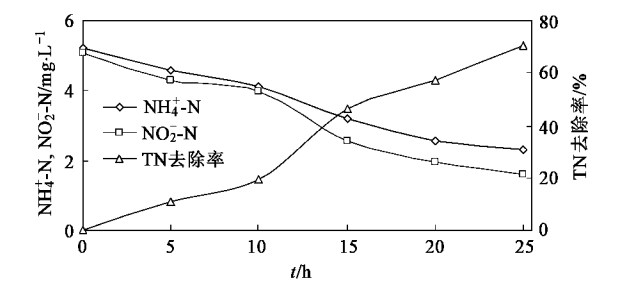


图4 缺氧条件下氨氮、亚硝酸盐氮和总氮去除率的变化
Fig.4 Changes of ammonia nitrogen, nitrite nitrogen and total nitrogen removal rate under anaerobic oxidation

2.3 厌氧氨氧化菌的16S rRNA 鉴定

由于16S rRNA(16S rDNA)的碱基序列十分保守,代表了微生物在系统进化中的地位,已广泛用于

微生物的鉴定。在GenBank数据库中包含大量的微生物的基因组序列,这为微生物的分类鉴定提供了丰富的数据资源。以细菌的16S rRNA来设计引物,采用PCR技术鉴定混合培养物中是否存在可能参与厌氧氨氧化途径的菌种。由于样品是混合培养物,并且河道水成分复杂,导致混合培养物中杂菌较多,通过克隆及测序和碱基序列的比对来鉴定混合培养物中的菌种。PCR扩增实验表明,样品中存在目标扩增产物,即大小为200 bp、500 bp、700 bp和1 kb的PCR产物(图5)。将测序得到的碱基序列送Genbank数据库(NCBI BLAST database, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),寻找相近序列。

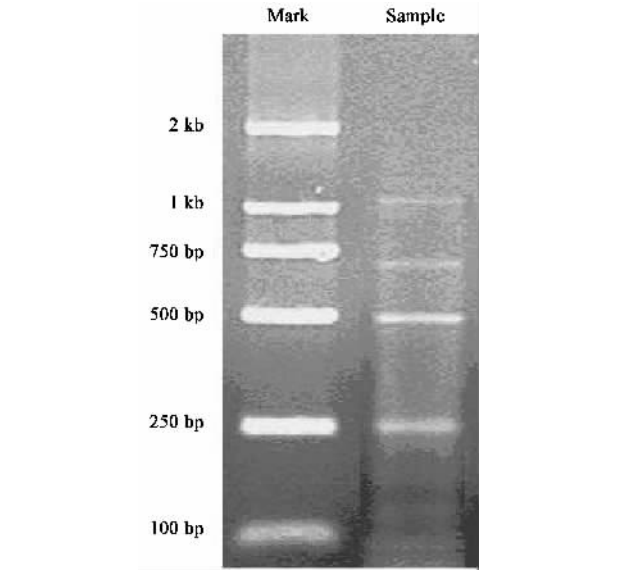


图5 PCR电泳检测结果
Fig.5 Detection results of electrophoresis for PCR

经过BLAST检索后的相似性比较结果表明,在500 bp测序得到的厌氧混合培养物中的细菌与*Nitrosomonas eutropha*的同源性达到93%。据报道,*Nitrosomonas eutropha*的一些菌株具有厌氧氨氧化的能力,会导致氨氮损失^[17,18]。通过分析,可以认为在地表水修复过程中,由于存在具有厌氧氨氧化能力的微生物,从而发生了厌氧氨氧化现象。而200 bp、700 bp及1 kb产物可能为杂菌的16S rRNA片段。

3 结论

(1) 对于受到污染,且具有低碳氮比特点的城市河道水进行生物修复过程中,采用陶瓷作为生物膜的载体,可以较快地形成活性较好的生物膜。当采用缺氧生物膜修复时,根据溶解氧含量的变化,同时会出现硝化-反硝化和厌氧氨氧化现象。这一研究结

果对城市地表水的生物修复具有一定的理论意义和实际应用价值.

(2) 经过分子生物学分析得知,在类似于氧化沟反应器中陶瓷载体上所生成的生物膜中,存在具有厌氧氨氧化能力的微生物,在缺氧条件下可使 $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 同步去除.

参考文献:

[1] 朱颜明,黎劲松,杨爱玲,等.城市饮用水地表水源非点源污染研究[J].城市环境与城市生态, 2000, **13**(4): 1-4.

[2] 杨爱玲,朱颜明.地表水环境非点源污染研究[J].环境科学进展,1999, **7** (5): 60-67.

[3] 李海波,李培军,张轶,等. 静止或缓流污染地表水微生物固定化修复技术研究进展[J]. 生态学杂志, 2005, **24**(5): 561-566.

[4] Mulder A, van de Graaf A A, Robertson L A, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1995, **16**: 177-184.

[5] Carsten J, Schubert C J, Durisch-Kaiser E, *et al.* Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika)[J]. Environmental Microbiology, 2006, **8**(10): 1857-1863.

[6] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, *et al.* Deciphering the evolution and metabolism of an ANAMMOX bacterium from a community genome[J]. Nature, 2006, **440**(6): 790-794.

[7] 贾振杰, 杨清香, 刘如钢. 厌氧氨氧化菌的研究进展[J].微生物学杂志,2006, **26**(6): 74-79.

[8] Trimmer M, Nicholls J C, Deflandre B. Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames Estuary, United

Kingdom[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69** (11): 6447-6454.

[9] 张树德,李捷,尹文选,等. ANAMMOX 工艺在生活污水深度处理中的应用研究[J]. 给水排水,2005, **31**(6): 12-17.

[10] Tsushima I, Ogasawara Y, Kindaichi T, *et al.* Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors[J]. Water Research, 2007, **41**: 1623-1634.

[11] Fux C, Bohler M, Huber P, *et al.* Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) in a pilot plant[J]. Journal of Biotechnology, 2002, (99): 295-306.

[12] Liao D, Li X, Yang Q, *et al.* Enrichment and granulation of ANAMMOX biomass started up with methanogenic granular sludge [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2007, (23): 1015-1020.

[13] 梁辉强,胡勇有,维怀庆. 厌氧序批式反应器的厌氧氨氧化工艺启动运行[J]. 工业用水与废水, 2005, **36**(5):39-44.

[14] GB 3838-2002,地表水环境质量标准[S].

[15] Fang H P P, Liang D W, Zhang T, *et al.* Denitrifying degradation of dimethyl phthalate[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, **74**: 221-229.

[16] 郑平,胡宝兰,徐向阳. 厌氧氨氧化菌好氧代谢特性的研究 [J].浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, **26**(5): 521-526.

[17] Bruijn P D, Graaf A A V, Jetten M S M, *et al.* Growth of *Nitrosomonas europaea* on hydroxylamine[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, **125**: 1792-1841.

[18] Bock E, Schmidt I, Stuvén R, *et al.* Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor[J]. Arch Microbiol, 1995, **163**: 16-20.