

回灌渗滤液 C/N 对填埋垃圾生物反应器反硝化特性的影响

黎乾¹, 吴松维², 吴伟祥³, 孙法迁³, 刘晶静³, 蔡传钰³, 陈敏^{1*}

(1. 杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036; 2. 衢州市环境卫生管理处, 衢州 324000; 3. 浙江大学环境与资源学院环境保护研究所, 杭州 310029)

摘要:利用模拟填埋垃圾生物反应器(landfill bioreactor)研究了回灌渗滤液 C/N 对填埋垃圾堆体反硝化性能的影响, 并采用 PCR 扩增、克隆测序等分子生物学技术, 以功能基因 *nirS* 为分子标记考察了 4 次回灌过程中反应器内反硝化微生物群落结构变化。结果表明, 回灌渗滤液的 COD/NO₃⁻-N 比例对反应器的反硝化活性具有显著性影响。当 COD/NO₃⁻-N 从 3.11 提高到 13.08 时, 反应器内硝酸盐还原速率可从 1.14 mg·(kg·h)⁻¹ 提高到 11.40 mg·(kg·h)⁻¹。当回灌渗滤液生物可利用性 COD 与 NO₃⁻-N 比值达到 6.37 时, 可以实现填埋垃圾生物反应器反硝化作用的快速、稳定运行。4 次回灌, 反应器内的反硝化微生物大部分与 β -变形菌纲(β -proteobacteria)细菌相似, 少数属于非培养微生物(uncultured bacteria), 其中 *Thiobacillus denitrificans* 和 *Azoarcus tolulyticus* 是反硝化过程的主要功能微生物, 在回灌渗滤液反硝化过程中可能发挥着重要作用。

关键词: 填埋垃圾生物反应器; 渗滤液; C/N; 反硝化特性; 反硝化细菌

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)11-3386-08

Effect of Injected Leachate C/N Ratio on the Denitrification of a Bioreactor Filled with Landfilled Refuse

LI Qian¹, WU Song-wei², WU Wei-xiang³, SUN Fa-qian³, LIU Jing-jing³, CAI Chuan-yu³, CHEN Min¹

(1. College of Life and Environment Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; 2. Quzhou Environmental Sanitation Department, Quzhou 324000, China; 3. Institute of Environmental Science and Technology, College of Environment and Resource Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The denitrification capacity of a landfill bioreactor was investigated under different ratios of injected leachate C/N; the denitrifying bacteria community compositions over four injection times were also studied using molecular approaches and functional gene *nirS* served as marker. Results showed that COD/NO₃⁻-N ratio of the injected landfill leachate had a significant impact on the denitrification capacity of the bioreactor. Nitrate reduction rate increased from 1.14 mg·(kg·h)⁻¹ to 11.40 mg·(kg·h)⁻¹ when the injected leachate COD/NO₃⁻-N ratio raised from 3.11 to 13.08. It suggested that a stable and rapid denitrification could be obtained when bioavailable COD/NO₃⁻-N ratio in the injected leachate was 6.37. In the bioreactor, the main denitrifying bacteria was similar to β -proteobacteria, and others belonged to uncultured bacteria. *Thiobacillus denitrificans* and *Azoarcus tolulyticus* known as β -proteobacteria were the dominant species and played an important role in NO₃⁻-N consumption during the leachate injection.

Key words: landfill bioreactor; landfill leachate; C/N ratio; denitrification capacity; denitrifying bacteria

生活垃圾生物反应器填埋技术是指通过人为、有目的强化生活垃圾填埋场内微生物, 加速垃圾中易降解有机物分解, 在较短时间内实现填埋垃圾稳定化的一种生活垃圾填埋方式。该技术在一定程度上实现了对生活垃圾的有效管理^[1], 但易引起渗滤液氮氮累积^[2], 污染水体环境。垃圾填埋场堆体外硝化-堆体内反硝化脱氮工艺技术成熟^[3-9], 避免了渗滤液氮氮累积, 但也存在硝化后渗滤液低 C/N 影响反硝化的问题。C/N 被认为是影响反硝化微生物反硝化性能的重要因素, 而且碳源类型不同, 反硝化所需的最佳 C/N 也不同^[10], 故选择合适的 C/N 对提高填埋垃圾堆体内反硝化作用具有重要意义。垃

圾渗滤液作为堆体反硝化的碳源, 一方面可以达到同时去除氨氮和有机污染物的目的; 另一方面也减少了投加外源碳带来的成本。然而, 目前这方面工作尚未见诸报道。因此, 开展这方面的研究对正确评价以垃圾渗滤液为碳源对垃圾堆体反硝化性能的影响具有重要意义。

反硝化过程是微生物在厌氧条件下, 以硝酸盐或亚硝酸盐为电子受体, 将其还原为气态 N₂O 或 N₂

收稿日期: 2011-01-05; 修订日期: 2011-05-05

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA06Z327); 浙江省自然科学基金项目(Y307452)

作者简介: 黎乾(1982~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物分子生态学, E-mail: liqianfly@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: mchen63@163.com

的过程,是垃圾堆体脱氮的重要机制.参与反硝化过程的酶包括硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、一氧化氮还原酶和氧化亚氮还原酶 4 种,其中亚硝酸盐还原酶是该过程的关键酶,编码该酶的功能基因 *nirS* 常用作研究反硝化微生物群落结构的分子标记,近年来已被广泛用于土壤、海洋底泥等生态环境的反硝化微生物多样性的研究^[11~13].但到目前为止,针对垃圾堆体反硝化微生物群落结构的研究还很有限,这阻碍了垃圾填埋场堆体外硝化-堆体内反硝化工艺脱氮机制的研究.因此深入考察垃圾堆体中反硝化微生物结构特征是研究该工艺原位反硝化机制的重要内容.

本研究以新鲜垃圾渗滤液为碳源,考察 C/N 对填埋垃圾生物反应器反硝化特性的影响,并以反硝化细菌亚硝酸还原酶基因 *nirS* 基因为分子标记,应用 PCR-RFLP-克隆测序技术研究填埋垃圾生物反应器反硝化细菌群落结构多样性的变化,以期为垃圾渗滤液原位脱氮技术研发和填埋堆体原位反硝化过程控制提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 填埋垃圾生物反应器

实验用填埋垃圾生物反应器实验室装置采用有机玻璃制成,高 75 cm,内径 20 cm.反应器顶部装有阀门,用于渗滤液回灌;底部装有另一阀门,用于回灌处理后渗滤液的收集;中部设有固体垃圾取样口,填埋垃圾生物反应器装置如图 1 所示.

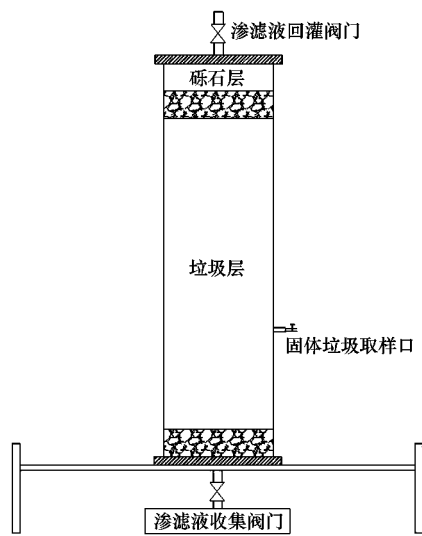


图 1 填埋垃圾生物反应器模拟装置示意
Fig. 1 Configuration of the bioreactor filled with landfilled MSW

由于前期的研究表明,填埋 6 a 左右的垃圾性

质相对稳定(如表 1),反硝化效果最佳^[14].因此,本实验选择杭州市天子岭垃圾填埋场 6 a 填埋龄垃圾为研究对象.供试反应器装置内装 6 a 填埋龄垃圾 15 kg,压实密度为 884 kg·m⁻³.为便于渗滤液的均匀分布和排出,装填垃圾层的顶部和底部分别铺设了一层 5 cm 厚的砾石.

表 1 填埋垃圾物理组分和化学特性
Table 1 Physical composition and chemical properties of the refuse in landfill bioreactor

物理组分	数值	化学组分	数值	化学组分	数值
混合物/%	52.86	pH	8.21	HE/g·kg ⁻¹	8.69
纸类/%	0	含水率/%	31.98	HA/g·kg ⁻¹	3.41
塑料类/%	28.54	TN/g·kg ⁻¹	3.11	FA/g·kg ⁻¹	5.28
纺织物/%	3.51	TP/g·kg ⁻¹	1.83	HM/g·kg ⁻¹	147.06
玻璃/%	0.13	VS/g·kg ⁻¹	268.51	HE/g·kg ⁻¹	0.65
金属/%	0.23	BDM/g·kg ⁻¹	48.46	HA/FA	8.69
竹木/%	7.58	—	—	—	—
其它/%	7.15	—	—	—	—

1.2 回灌渗滤液的特性及样品采集与分析方法

供试渗滤液取自杭州市天子岭垃圾填埋场渗滤液收集池.新鲜渗滤液经磷酸铵镁沉淀法(MAP)去除氨氮^[15],调节渗滤液 COD 和硝酸盐浓度后作为回灌渗滤液备用.回灌渗滤液基本性质如表 2 所示,根据前期的研究结果^[16],确定硝酸盐负荷为 500 mg·L⁻¹.采用间歇式回灌,每一次回灌反应回灌液体积均设置为 5.5 L.回灌反应以渗滤液 COD 浓度由低向高分 4 次运行,依次分别标记为 R6-1、R6-2、R6-3 和 R6-4,整个回灌过程反应器处于密封状态.反应器运行过程中,定期从反应器底部取样口采集经过回灌处理的渗滤液样品,分析样品中 COD、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 与 NO₂⁻-N 的浓度. COD 采用重铬酸钾法测定; NH₄⁺-N 采用纳氏试剂光度法测定; NO₃⁻-N 采用紫外分光光度法测定; NO₂⁻-N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定^[17].当回灌渗滤液中的硝酸盐和亚硝酸盐浓度为 0 时,结束回灌实验;实验结束后,先排空反应器内的渗滤液,并从反应器固体垃圾采样口处(图 1)采集垃圾样品 10 g,用蒸馏水浸洗垃圾堆体,排空保持厌氧环境,开展下一次回灌实验.垃圾样品采集后置于 -70℃ 超低温冰箱保存备用.

1.3 固体垃圾样品 DNA 提取及 nirS 基因克隆文库构建

垃圾样品总 DNA 的提取采用 FastPrep DNA 提取试剂盒法(QBIOGENE,USA),具体方法参照文献[18].反硝化细菌 PCR 扩增以亚硝酸盐还原酶 *nirS*

表 2 供试渗滤液基本性质
Table 2 General properties of the leachates in tests

指标	垃圾填埋生物反应器渗滤液	填埋场渗滤液原液	回灌渗滤液			
			R6-1	R6-2	R6-3	R6-4
pH	7.36	7.18	7.12	7.54	7.41	7.28
COD/mg·L ⁻¹	156.81	6 860.68	1 553.6	2 516.8	4 537.8	6 541.6
NH ₄ ⁺ -N/mg·L ⁻¹	78.26	1 506.80	59.70	65.59	71.47	64.31
NO ₃ ⁻ -N/mg·L ⁻¹	—	—	500	500	500	500
NO ₂ ⁻ -N/mg·L ⁻¹	—	—	—	—	—	—
COD/NO ₃ ⁻ -N	—	—	3.11	5.03	9.08	13.08

基因为扩增对象,以 *nirS1F* 为正向引物和 *nirS6R* 为逆向引物^[12],扩增片段大小为 890 bp. PCR 扩增反应体系:10 × PCR Buffer 2.5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol·L⁻¹)1.0 μL, *nirS6R* (20 μmol·L⁻¹)0.5 μL, *Taq* 酶(5 U, Takara)0.3 μL, DNA 1.0 μL, 补去离子水至 25 μL. PCR 扩增条件:95℃ 预变性 6 min;95℃ 变性 30 s, 60~55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 10 个循环(每个循环退火温度 1℃);95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 25 个循环;72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保持. 扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳回收,用纯化试剂盒纯化(Axygen, USA). 通过 TA 克隆技术将扩增的 *nirS* 片段连接到 pMD18-T 载体(Takara, Japan)上,并转化到 JM109 感受态细胞(Takara, Japan)中. 用 pMD18-T 载体引物 RV-M 和 M13-47 作为 PCR 的引物,验证筛选的克隆其插入的片段大小是否正确. 片断大小正确的 *nirS* 基因 PCR 产物用 *Hha* I (Takara, Japan)限制性内切酶酶切. 酶切产物用浓度为 3% 的琼脂糖凝胶电泳检验,并根据酶切带型划分操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU). 基因文库中每个 OTU 选择 1~2 个代表菌株送往上海英骏生物公司测序.

1.4 *nirS* 基因克隆文库及系统发育树分析

nirS 基因文库的多样性覆盖百分率(Coverage, C)的计算公式为:

C = [1 - (n/N)] × 100% (1)

式中, *n* 表示基因文库中只包含一个克隆的 OTU 数目; *N* 表示基因文库的克隆总数. 稀释曲线用 aRarefactWin 软件(<http://www.uga.edu/strata/software/Software.html>)绘制. 将测序得到的 *nirS* 基因序列与 NCBI 数据库进行同源性比对. 用 Clustalx1.83 软件和 MEGA 软件中的邻接法(neighbor-joining analysis)构建 *nirS* 基因系统发育树,进行系统发育分析. 选择来自 *Pseudomonas aeruginosa* 的 *nirN* 基因(ACCESSION No. D84475)作

为 *nirS* 基因的外类群^[12].

2 结果与讨论

2.1 填埋垃圾生物反应器反硝化特性

图 2 为 4 次回灌过程中渗滤液 NO₃⁻-N 浓度变化情况,在回灌不同 COD 浓度的渗滤液条件下,6 a 龄填埋垃圾生物反应器均表现出较强的反硝化能力. 500 mg·L⁻¹ NO₃⁻-N 在 R6-1、R6-2、R6-3 和 R6-4 中被完全还原的时间分别为 600、552、108 和 60 h. 其中 R6-4 反应器硝酸盐还原速率最高,可达 11.40 mg·(kg·h)⁻¹,为 R6-1 反应器硝酸盐还原速率[1.14 mg·(kg·h)⁻¹]的 10 倍.

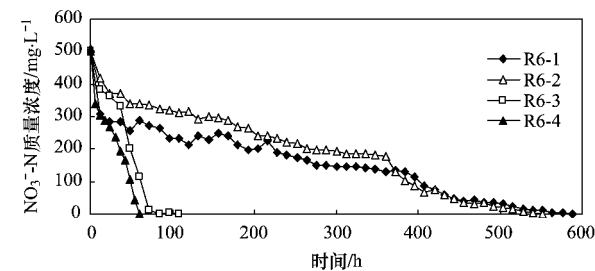


图 2 4 次回灌填埋垃圾生物反应器内 NO₃⁻-N 浓度变化情况
Fig. 2 Variations of NO₃⁻-N in the bioreactor filled with landfilled MSW during four successive treatments

亚硝酸盐是反硝化过程的中间产物,它的累积受到硝酸盐还原速率和亚硝酸盐还原速率的影响^[19]. 由图 3 可见,4 次回灌过程中,填埋垃圾生物反应器内均出现一个 NO₂⁻-N 累积过程. R6-1、R6-2、R6-3 和 R6-4 反应器的峰值分别为 2.60、5.28、5.49 和 13.33 mg·L⁻¹. 与 NO₃⁻-N 相比,NO₂⁻-N 浓度并不高,表明填埋垃圾生物反应器内亚硝酸盐还原酶活性较高. 尽管如此,回灌渗滤液的 COD 浓度对反应器内亚硝酸盐还原酶活性还是具有一定的影响. 在回灌渗滤液 COD 浓度较高的情况下,硝酸盐还原速率大于亚硝酸盐的还原速率,引起 NO₂⁻-N 累

积;但随着反应的进行,亚硝酸盐还原酶被激活,亚硝酸盐还原速率迅速提升, NO_2^- -N 累积现象随即消失(图3). 在回灌渗滤液 COD 浓度较低的情况下, NO_2^- -N 累积现象出现相对较晚,原因可能为反硝化过程中,碳源不足,硝酸盐还原和亚硝酸盐还原速率减缓,且两者处于动态平衡,反应初期,硝酸盐还原速率略高于亚硝酸还原速率,导致 NO_2^- -N 缓慢积累;但随着反应的进行,亚硝酸还原速率逐渐高于硝酸盐还原速率,而使 NO_2^- -N 累积现象消失.

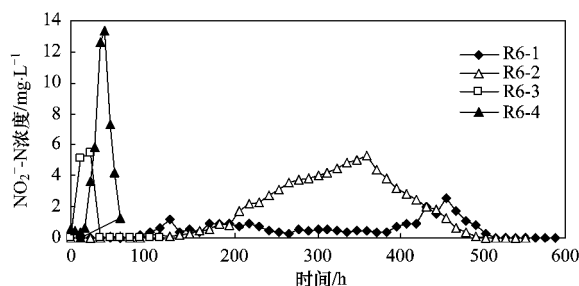


图3 4次回灌填埋垃圾生物反应器内 NO_2^- -N浓度变化情况

Fig. 3 Variations of NO_2^- -N in the bioreactor filled with landfilled MSW during four successive treatments

渗滤液氨氮浓度变化如图4所示. 回灌过程中渗滤液氨氮浓度基本呈现略微上升后逐渐稳定的趋势. 由于回灌反应器整体处于厌氧状态,氨氮的硝化作用不明显. 尽管有研究^[20]表明在厌氧条件下可以发生厌氧氨氧化作用,实现废水中氨氮和亚硝酸盐氮同步去除. 但本实验的每次回灌中,并没有发现回灌渗滤液的氨氮有显著性降低趋势. 相反由于反应器内垃圾和渗滤液有机氮的降解,反应器内氨氮浓度略有上升. 至于4次回灌渗滤液氨氮浓度从R6-1的 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降至R6-4的 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,则可能是由于渗滤液回灌和蒸馏水冲洗对反应器中填埋垃圾的稀释作用所致.

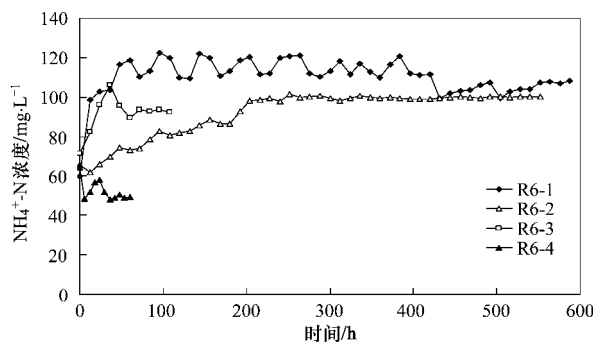


图4 4次回灌填埋垃圾生物反应器内 NH_4^+ -N浓度变化情况

Fig. 4 Variations of NH_4^+ -N in the bioreactor filled with landfilled MSW during four successive treatments

2.2 回灌渗滤液 C/N 对填埋垃圾生物反应器反硝化特性的影响

结合图2和图5可知,填埋垃圾生物反应器硝酸盐还原速率随着回灌渗滤液 COD/ NO_3^- -N比例的提高而提高. R6-1、R6-2、R6-3和R6-4反应器的硝酸盐还原速率分别为 1.14 、 1.24 、 6.33 和 $11.40 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{h})^{-1}$. 4次回灌实验,消耗的COD值分别为 693.1 、 1163.8 、 3178.4 和 $2886.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 由此可见,4次回灌填埋垃圾生物反应器去除 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NO_3^- -N所需的实际C/N为 1.39 、 2.33 、 6.37 和 5.77 ,同时COD的去除率分别为 44.6% 、 46.25% 、 70.0% 和 44.1% . 根据微生物完全反硝化过程COD值需求量计算^[21],理论上,要完全还原 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NO_3^- -N至少需要的COD值为 $1515.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Kuba等^[22]的研究认为,当C/N < 3.4时,要实现完全反硝化,就必须增加碳源的投入. 然而,在本实验R6-1和R6-2反应器中,可利用的COD分别只有 693.1 和 $1163.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,相应的C/N为 1.39 和 2.33 ,碳源供应明显不足. 这种情况下,自养反硝化和异养反硝化可能共同存在^[23]. 一方面,自养微生物可利用渗滤液中硫化物等反硝化作用,另一方面,还原亚硝酸盐的NosZ酶对有机电子供体的亲和力较其它反硝化还原酶低^[24],可能无法竞争获得足够的电子供体而导致 N_2O 积累. Hanki等^[25]以乙酸和酵母浸提液为碳源研究反硝化过程中C/N对 N_2O 排放的影响时发现,低C/N(< 3.5)容易使 N_2O 积累. Kishida等^[26]的研究(C/N为2.6)也得出类似的结论. 因此,推测在R6-1和R6-2反应器反硝化中,异养反硝化的终产物以 N_2O 为主. 但在碳源充足条件下,R6-3和R6-4反应器内,回灌渗滤液COD值是理论值($1515.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的3~5倍,反硝化的终产物可能以 N_2 为主. 此外,从4次回灌硝酸盐还原速率与实际消耗的COD值来看,填埋垃圾生物反应器要实现快速稳定的反硝化,回灌渗滤液C/N为

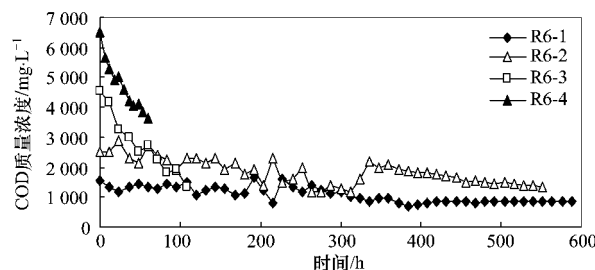


图5 4次回灌填埋垃圾生物反应器内COD浓度变化情况

Fig. 5 Variations of COD in the bioreactor filled with landfilled MSW during four successive treatments

13.08(实际 C/N 为 5.77)时最好,但是考虑到 COD 的去除效果,回灌渗滤液的生物可利用性 COD 与 NO_3^- -N 的比值在 6.37 时最佳.当然在以其它碳源作为外加碳源时,还需要考虑碳源的生物可利用性,不同碳源类型对反硝化反应器完全反硝化所需的最佳 C/N 不同^[27-29].

2.3 填埋垃圾生物反应器反硝化菌群多样性

以编码反硝化过程关键酶——亚硝酸还原酶 *nirS* 基因为分子标记,通过构建 *nirS* 基因文库研究了 4 次回灌填埋垃圾生物反应器反硝化菌群结构多样性的变化,具体情况如表 3 所示.限制性酶切分型分析发现,4 个 *nirS* 基因文库中共有 47 个 OTUs,每个克隆文库仅含有 9~16 个 OTUs,表明填埋垃圾生物反应器中反硝化菌群落结构相对较为单一.当稀释曲线接近平台区或克隆覆盖率接近 1 时,说明该克隆文库较好地反映 *nirS* 基因的多样性情况^[12].结合表 3 和图 6 可知,4 个样品 *nirS* 基因克隆覆盖率分别为 98.7%、94.5%、97.1% 和 97.2%,且曲线接近平台区,表明本实验建立的克隆文库代表了样品中的大多数反硝化微生物.

表 3 填埋垃圾生物反应器 *nirS* 基因克隆文库分析
Table 3 Analysis of *nirS* gene clone libraries from the bioreactor filled with landfilled MSW

样品	总克隆数/个	OTUs/个	覆盖百分率/%
R6-1	79	16	98.7
R6-2	52	9	94.5
R6-3	69	12	97.1
R6-4	69	10	97.2

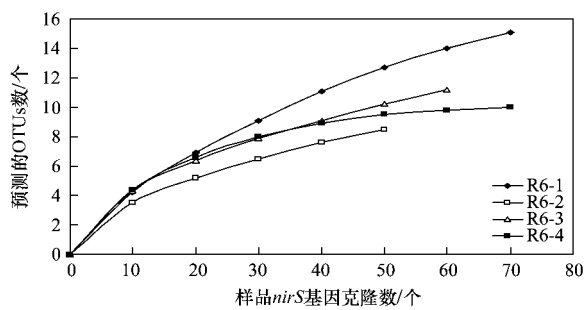


图 6 填埋垃圾生物反应器 *nirS* 基因稀释曲线
Fig.6 Rarefaction curves for *nirS* genes of four successive treatments

图 7 为 4 次回灌填埋垃圾生物反应器 *nirS* 基因序列比对后的系统发育树.从图 7 可以看出,反应器内的反硝化微生物大部分和 β -变形菌纲 (β -proteobacteria) 细菌相似,少数是非培养微生物

(uncultured bacteria).4 次回灌反应器内反硝化细菌群落结构均发生了一定的改变:R6-1 反应器内主要为 β -变形菌纲 (β -proteobacteria) 的 *Thauera* 属、*Azoarcus* 属和 *Thiobacillus* 属细菌;R6-2 反应器以 β -变形菌纲 (β -proteobacteria) 的 *Dechloromonas* 属、*Azoarcus* 属和 *Thiobacillus* 属细菌为主;R6-3 反应器内反硝化细菌最丰富,除了 β -变形菌纲 (β -proteobacteria) 的 *Dechloromonas* 属、*Azoarcus* 属和 *Thiobacillus* 属细菌外,还包括了 γ -变形菌纲 (γ -proteobacteria) 的 *Marinobacter* 属和 *Pseudomonas* 属细菌;而 R6-4 反应器内却仅含有 β -变形菌纲 (β -proteobacteria) 的 *Thiobacillus*、*Azoarcus* 2 个属的细菌.

尽管如此,*Thiobacillus denitrificans* 和 *Azoarcus toluolyticus* 始终是填埋垃圾生物反应器的优势反硝化细菌.但这两者的克隆丰度(占总克隆数)随 C/N 变化而改变.*Azoarcus toluolyticus* 是自然界中广泛存在的甲基苯反硝化降解菌^[30],可以利用苯、甲苯、苯乙烷和二甲苯等芳香化合物^[31]和其它有机物如葡萄糖、甲醇等^[32]作为反硝化的碳源.*Azoarcus toluolyticus* 可耐受渗滤液中一定量的芳香化合物等有毒污染物进行反硝化作用,推测当 C/N 由 R6-1 的 3.11 提高为 R6-2 的 5.03 时,反应器内生物可利用有机物增加,*Azoarcus toluolyticus* 逐渐富集而成为反应器内的优势菌群,其克隆丰度也由 R6-1 的 10.13% 增加到 75%,但过高的芳香化合物浓度增加了渗滤液对 *Azoarcus toluolyticus* 的毒性^[33],C/N 为 9.08 和 13.08 时,其克隆丰度分别减少到了 59.42% 和 7.25%.而 *Thiobacillus denitrificans* 是严格的自养菌,只能利用无机碳源 (CO_2 、 HCO_3^-) 进行生长代谢,已广泛应用于废水的脱硫、脱氮工艺中^[34].本实验中,在低 C/N(3.11)条件下,由于可利用的有机碳源不足,异养反硝化作用受到抑制,而 *Thiobacillus denitrificans* 可利用填埋反应器内其它微生物代谢终产物 CO_2 或其它无机碳作为碳源完成自养反硝化,从而成为优势菌群.在有机碳源充足的情况下,*Thiobacillus denitrificans* 需要和异养反硝化菌竞争代谢底物 NO_3^- -N,在反硝化过程中的优势被削弱,其克隆丰度由 R6-1 反应器中的 77.22% 降到 R6-2 反应器中的 15.38% 及 R6-3 反应器中的 17.39%;但在 C/N 为 13.08 的情况下,*Thiobacillus denitrificans* 重新成为 R6-4 反应器中的优势反硝化菌群(克隆丰度 72.46%),其原因有待进一步研究.

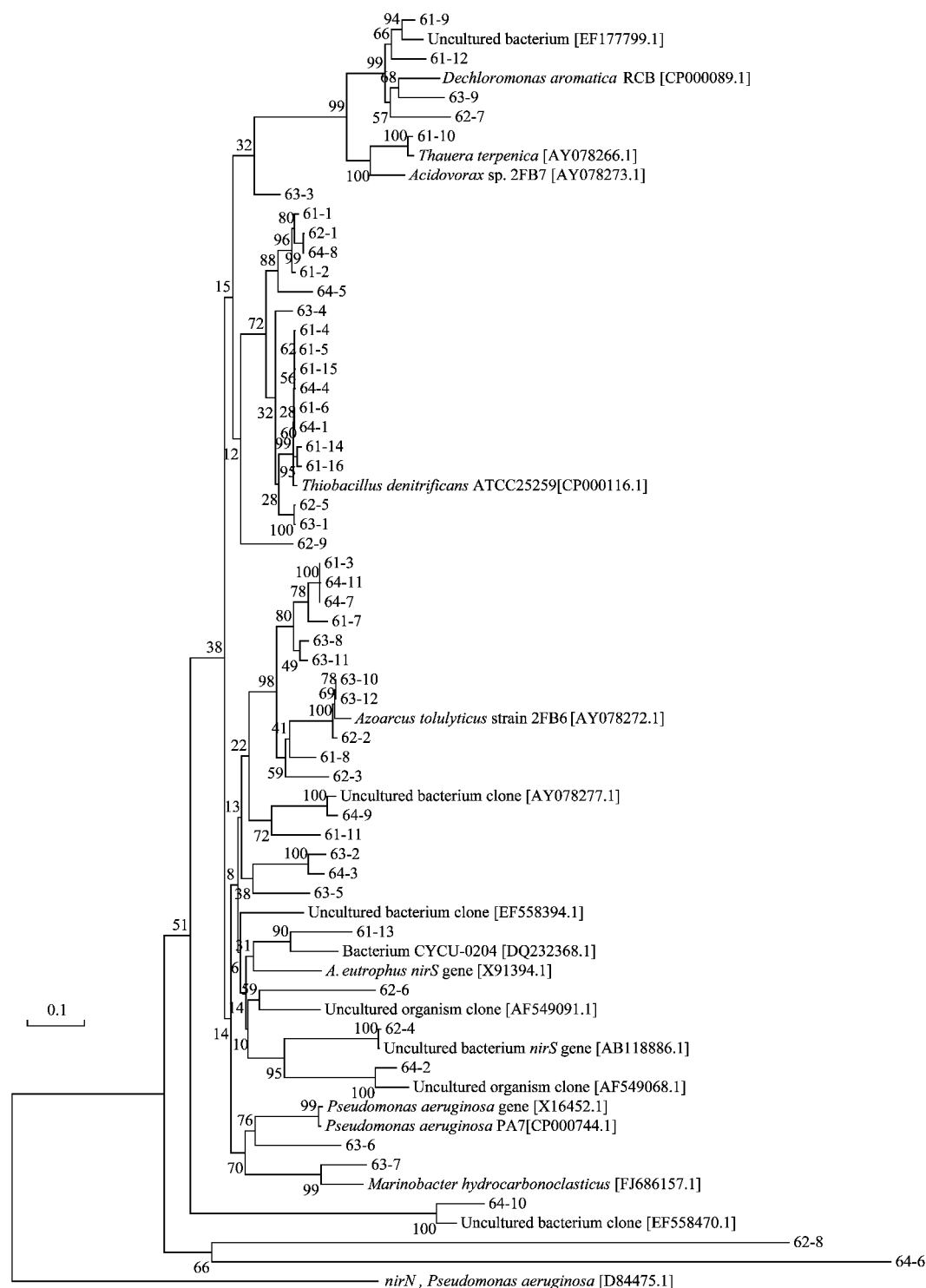


图 7 填埋垃圾生物反应器反硝化菌 *nirS* 基因系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of *nirS* sequences from the bioreactor filled with landfilled MSW

3 结论

(1)6 a 龄填埋垃圾生物反应器反硝化速率随着回灌渗滤液 COD/NO₃⁻-N 的提高而上升。回灌渗滤液生物可利用性 COD 与 NO₃⁻-N 比值达到 6.37

时,可确保填埋垃圾生物反应器反硝化作用的快速、稳定进行。

(2)6 a 龄填埋垃圾生物反应器反硝化菌群结构多样性相对较为单一。*Thiobacillus denitrificans* 和 *Azoarcus tolulyticus* 是填埋垃圾生物反应器内主要的

优势反硝化菌群,在回灌渗滤液的反硝化过程中发挥着重要作用.因此,通过调节以上2种反硝化细菌的数量和活性,有望进一步提升填埋垃圾生物反应器的反硝化性能.

参考文献:

- [1] Swati M, Karthikeyan O P, Joseph K, *et al.* Landfill bioreactor: A biotechnological solution for waste management [J]. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2007, **66**(8): 670-674.
- [2] Price G A, Barlaz M A, Hater G R. Nitrogen management in bioreactor landfills [J]. *Waste Management*, 2003, **23**(7): 675-688.
- [3] He R, Liu X, Zhang Z, *et al.* Characteristics of the bioreactor landfill system using an anaerobic-aerobic process for nitrogen removal [J]. *Bioresource Technology*, 2007, **98**(13): 2526-2532.
- [4] Long Y, Lao H M, Hu L F, *et al.* Effects of in situ nitrogen removal on degradation/stabilization of MSW in bioreactor landfill [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(8): 2787-2794.
- [5] Long Y, Guo Q W, Fang C R, *et al.* In situ nitrogen removal in phase-separate bioreactor landfill [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(13): 5352-5361.
- [6] Huo S L, Xi B D, Yu H C, *et al.* In situ simultaneous organics and nitrogen removal from recycled landfill leachate using an anaerobic-aerobic process [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(14): 6456-6463.
- [7] Zhong Q, Li D P, Tao Y, *et al.* Nitrogen removal from landfill leachate via ex situ nitrification and sequential in situ denitrification [J]. *Waste Management*, 2009, **29**(4): 1347-1353.
- [8] He P J, Shao L M, Guo H D, *et al.* Nitrogen removal from recycled landfill leachate by ex situ nitrification and in situ denitrification [J]. *Waste Management*, 2006, **26**(8): 838-845.
- [9] Long Y, Hu L F, Shen D S. Nitrogen transformation in the hybrid bioreactor landfill [J]. *Bioresource Technology*, 2009, **100**(9): 2527-2533.
- [10] Sobieszuk P, Szewczyk K W. Estimation of (C/N) ratio for microbial denitrification [J]. *Environmental Technology*, 2006, **27**(1): 103-108.
- [11] Braker G, Fesefeldt A, Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(10): 3769-3775.
- [12] Prieme A, Braker G, Tiedje J M. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(4): 1893-1900.
- [13] Throback I N, Enwall K, Jarvis A, *et al.* Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **49**(3): 401-417.
- [14] Chen Y X, Wu S W, Wu W X, *et al.* Denitrification capacity of bioreactors filled with refuse at different landfill ages [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, **172**(1): 159-165.
- [15] 丛培龙, 康建雄, 郑军, 等. MAP 法处理垃圾渗滤液中氨氮的最佳工艺参数探讨 [J]. *平顶山工学院学报*, 2007, **16**(2): 22-24.
- [16] Wu W X, Hao Y J, Ding Y, *et al.* Denitrification capacity in response to increasing nitrate loads and decreasing organic carbon contents in injected leachate of a simulated landfill reactor [J]. *Process Biochemistry*, 2009, **44**(4): 486-489.
- [17] 国家环境保护总局. 水与废水监测分析方法 [M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2004.
- [18] Han J S, Kim C G. Characterization of molecular biological indicators to define stabilization of landfills [J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2010, **27**(3): 868-873.
- [19] Wilderer P A, Jones W L, Dau U. Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite [J]. *Water Research*, 1987, **21**(2): 239-245.
- [20] Strous M, Van Gerven E, Kuenen J G, *et al.* Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) sludge [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(6): 2446-2448.
- [21] Wiesmann U. Biological nitrogen removal from wastewater [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1994, **51**: 113-54.
- [22] Kuba T, Van Loosdrecht M C M, Heijnen J J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system [J]. *Water Research*, 1996, **30**(7): 1702-1710.
- [23] Vigneron V, Ponthieu M, Barina G, *et al.* Nitrate and nitrite injection during municipal solid waste anaerobic biodegradation [J]. *Waste Management*, 2007, **27**(6): 778-791.
- [24] 耿军军, 王亚宜, 张兆祥, 等. 污水生物脱氮革新工艺中强温室气体 N_2O 的产生及微观机理 [J]. *环境科学学报*, 2010, **30**(9): 1729-1738.
- [25] Hanaki K, Hong Z, Matsuo T. Production of nitrous-oxide gas during denitrification of waste-water [J]. *Water Science and Technology*, 1992, **26**(5-6): 1027-1036.
- [26] Kishida N, Kim J H, Kimochi Y, *et al.* Effect of C/N ratio on nitrous oxide emission from swine wastewater treatment process [J]. *Water Science and Technology*, 2004, **49**(5-6): 359-365.
- [27] Henze M. Capabilities of biological nitrogen removal processes from wastewater [J]. *Water Science and Technology*, 1991, **23**(4-6): 669-679.
- [28] Ramakrishnan A, Gupta S K. Effect of COD/ NO_3^- -N ratio on the performance of a hybrid UASB reactor treating phenolic wastewater [J]. *Desalination*, 2008, **232**(1-3): 128-138.
- [29] 郑兰香, 鞠兴华. 温度和 C/N 对生物膜反硝化速率的影响 [J]. *西南给排水*, 2005, **27**(2): 31-32.
- [30] Chee-Sanford J C, Frost J W, Fries M R, *et al.* Evidence for acetyl coenzyme A and cinnamoyl coenzyme A in the anaerobic toluene

- mineralization pathway in *Azoarcus tolueticus* Tol-4 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(3):964-973.
- [31] Zhou J, Palumbo A V, Tiedje J M. Sensitive detection of a novel class of toluene-degrading denitrifiers, *Azoarcus tolueticus*, with small-subunit rRNA primers and probes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63**(6):2384-2390.
- [32] Song B K, Palleroni N J, Kerkhof L J, et al. Characterization of halobenzoate-degrading, denitrifying *Azoarcus* and *Thauera* isolates and description of *Thauera chlorobenzoica* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, **51**:589-602.
- [33] Trois C, Coulon F, de Combret C P, et al. Effect of pine bark and compost on the biological denitrification process of non-hazardous landfill leachate: Focus on the microbiology [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, **181**(1-3):1163-1169.
- [34] 王爱杰, 杜大仲, 任南琪, 等. 脱氮硫杆菌在废水脱硫、脱氮处理工艺中的应用[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2004, **36**(4):423-425.