



好氧甲烷氧化耦合反硝化极限脱氮系统的效能及应用

杨娅男¹, 李彦澄^{1,2*}, 李江^{1,2*}, 吴攀^{1,2}, 艾佳¹, 钟雄¹

¹ 贵州大学资源与环境工程学院, 贵州 贵阳 550025

² 贵州喀斯特环境生态系统教育部野外科学观测研究站, 贵州 贵阳 550025

摘要: 【目的】探究甲烷浓度、温度和氮浓度对好氧甲烷氧化耦合反硝化(AME-D)极限脱氮系统的影响, 分析该系统微生物群落结构, 并对贵阳某污水处理厂尾水进行应用研究。【方法】采用阶段性实验研究甲烷浓度、温度和氮浓度对系统脱氮效能的影响, 通过16S rRNA基因测序技术分析系统中微生物群落结构, 利用共焦显微拉曼光谱仪分析实际废水水质变化特征。【结果】甲烷进气比为3%、温度为30 °C、氮浓度为20 mg/L时脱氮效果最好, 系统的总氮、氨氮和硝酸盐氮平均去除率分别为93.66%、96.13%和92.25%; 系统中的主要甲烷氧化菌分别为*Methylosarcina* (1.84%)、*Methylovulum* (0.01%)和*Crenothrix* (0.14%), 以及兼性甲烷氧化菌属*Methylocystis* (1.9%), 主要的亚硝化菌为*Nitrosomonas* (0.008%), 硝化菌为*Nitrospira* (0.42%), 反硝化菌为*Hyphomicrobium* (1.19%)和*Pseudomonas* (0.61%); 采用该系统处理贵阳某污水处理厂尾水时, 出水总氮平均浓度达到0.96 mg/L, 能达到极限脱氮的目的, 拉曼光谱分析显示系统对硝酸盐氮和亚硝酸盐氮有较高的去除, 甲烷被氧化形成的中间产物可能为醇类或醛类物质, 为反硝化菌提供所需碳源。【结论】AME-D极限脱氮由多种微生物协同实现, 其功能微生物为甲烷氧化菌、亚硝化菌、硝化菌和反硝化菌, 应用研究显示该系统在城镇污水处理系统中具有较大的应用潜力。

关键词: AME-D, 极限脱氮, 效能, 拉曼光谱, 16S rRNA

城镇污水处理厂生化处理后出水中仍含有大量的氮污染物, 如果直接排入自然水体, 会导致严重的水体富营养化, 因此需对污水处理厂生化池出水进行深度脱氮处理。常规的深度脱氮技

术包括反硝化生物滤池、人工湿地、膜分离法等, Lin等^[1]利用基于反硝化除磷(DPR)的单级生物滤池进行深度营养去除, TN和NO₃⁻-N的去除率达到71.08%和74.81%。王宁等^[2]构建曝气生物碳潜

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC0400702-4); 贵州省科技计划(黔科合重大专项字[2019]3009); 贵州省人才基地项目(RCJD2018-21)

*通信作者。E-mail: 李彦澄, ycli3@gzu.edu.cn; 李江, jli82@gzu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-06; 修回日期: 2020-04-21; 网络出版日期: 2020-04-24

流湿地(SW)以常规曝气潜流湿地(CW)作为参照, 探究生物碳投加对系统脱氮性能的影响, SW 系统平均出水 TN 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为 1.98 mg/L 和 0.17 mg/L, 去除率较 CW 系统提高了 6.9% 和 5.1%。黄山等^[3]利用一种新型一体化生物反应器研究不同 DO 浓度和水力停留时间下对城市污水的处理效果, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 平均去除率达 94.5% 以上, TN 平均去除率仅为 40% 左右。但常规深度脱氮技术普遍存在碳源不足的问题, 成为制约生物脱氮的重要因素。

早在 1971 年, Harremoos 和 Christensen 将甲烷作为反硝化的气体碳源应用到污水处理中, 首次发现 AME-D (Aerobic methane coupled to denitrification) 现象^[4]。1978 年 Rhee 等^[5]证实 AME-D 是由好氧甲烷氧化菌和反硝化菌协同作用完成的, 好氧甲烷氧化菌能利用甲烷为唯一的碳源、能源, 在氧化甲烷的同时释放出中间产物为反硝化菌脱氮提供碳源。目前发现的 AME-D 分为 AME 与反硝化菌协同脱氮^[6]、AME 单独完成甲烷氧化与反硝化^[7]两种过程。同时也有研究者^[8]分离、筛选出一株甲烷氧化菌 MO-01, 利用麦芽糖、蔗糖和甲醇等作为碳源。中国正在由“低碳社会”迈入“低氮社会”, 20 世纪 70 年代, “生物脱氮除磷之父” James Barnard^[9]创造出经典的 Bardenpho 污水处理脱氮工艺, 认为未来完全可以设计出可靠的系统实现高标准出水, 即 $\text{TN} < 3 \text{ mg/L}$ 。1996 年, 美国佛罗里达州执行的美国 $\text{TN} < 3 \text{ mg/L}$ 和 $\text{TP} < 0.1 \text{ mg/L}$ 排放标准, 推动州内污水厂的升级, 应用极限脱氮技术主要分布在美国东部。此外, 昆明等重点区域 TN 排放标准从 20 mg/L (一级 B) 和 15 mg/L (一级 A), 提升至 5 mg/L (昆明 A 标), 逐渐向极限脱氮迈进。

研究采用改良型反硝化生物滤池, 探究甲烷浓度、温度和氮浓度对好氧甲烷氧化耦合反硝化 (AME-D) 极限脱氮系统的影响, 在最佳控制参数条件下, 对系统微生物进行 16S rRNA 基因测序分析; 进一步采用贵阳某污水处理厂生化池出水进行实验, 并通过拉曼光谱分析进出水水质, 为城镇污水处理厂深度脱氮技术提供理论及技术支撑。

1 材料和方法

1.1 实验水质

1.1.1 实验配水水质: 影响因素研究阶段采用人工模拟城镇污水厂尾水, 模拟废水水质参数分别为 COD 20 mg/L、氨氮 8 mg/L 和总磷 1 mg/L, 此外, 总氮分别控制为 20 mg/L、30 mg/L 和 40 mg/L。其中葡萄糖模拟 COD, KH_2PO_4 模拟总磷, NH_4Cl 模拟氨氮, NaNO_3 模拟硝酸盐氮。同时添加微生物必需的微量元素^[10], 每升微量元素溶液含 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g、Fe-EDTA 0.38 mg、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.26 mg、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.90 mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mg、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 mg、 H_3BO_3 0.015 mg、Na-EDTA 0.25 mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.40 mg、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.25 mg。

1.1.2 贵阳某污水处理厂二级出水水质: 贵阳某污水处理厂采用“格栅+SBR+活性砂过滤”污水处理工艺, 出水水质执行国家《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB18918-2002)一级 A 标准, 污水处理厂出水排入城市河流。采用该污水处理厂 SBR 出水进行实验, 其水质分别为: COD 为 8 mg/L, 氨氮为 0.7 mg/L, 总氮为 9 mg/L。

1.2 实验装置

实验装置如图 1 所示, 反应器与曝气式反硝化生物滤池构造类似, 主体为双层构造, 反应器内层的有效体积为 2 L, 底部设置曝气管, 并铺设 6–8 mm 的鹅卵石垫层 5 cm, 采用填料为 2–4 mm 石英砂, 外层为水浴保温层, 通过循环水控制温度(10 °C、20 °C 和 30 °C), 反应器为间歇式运行方式。实验所需气体为甲烷与空气形成混合气体, 甲烷比例分别为 3%、2% 和 0%, 并在反应器出气管上设置甲烷在线监测仪。

1.3 实验方法

实验构建成功后采用上方进水下方的间歇式运行方式, 温度控制为(30±1) °C, 运行周期为“进水 0.5 h, 运行 23 h, 出水 0.5 h”, 每个周期结束后更换反应器内部所有液体, 其水量为 1.2 L/d。进水氮浓度为 20 mg/L, 进水和出水时停止进气,

运行时进气甲烷比例为 3%、流量为 30 mL/min。依次探究甲烷浓度(气体公司订制的低浓度甲烷混合气体) (3%、2% 和 0%)、温度(30、20 和 10 °C)、氮浓度(20、30 和 40 mg/L)对反应器效能的影响, 对反应器运行过程中采用甲烷在线监测仪监测出气中甲烷浓度比, 并计算甲烷平均日消耗量(甲烷日消耗量=进气甲烷浓度比–出气甲烷浓度比), 定期检测出水中的温度、DO、氨氮、硝酸盐氮和 COD 等水质指标。

1.4 分析方法

氨氮分析采用水杨酸分光光度法(HJ536-2009), 硝酸盐氮分析采用紫外可见分光光度法(HJ/T346-2007), 甲烷消耗量监测采用 SK-600-CH₄ 型甲烷在线监测仪, DO 采用 DO 便携式分析仪, COD 采用 HACH-COD 快速消解分析法^[11]。

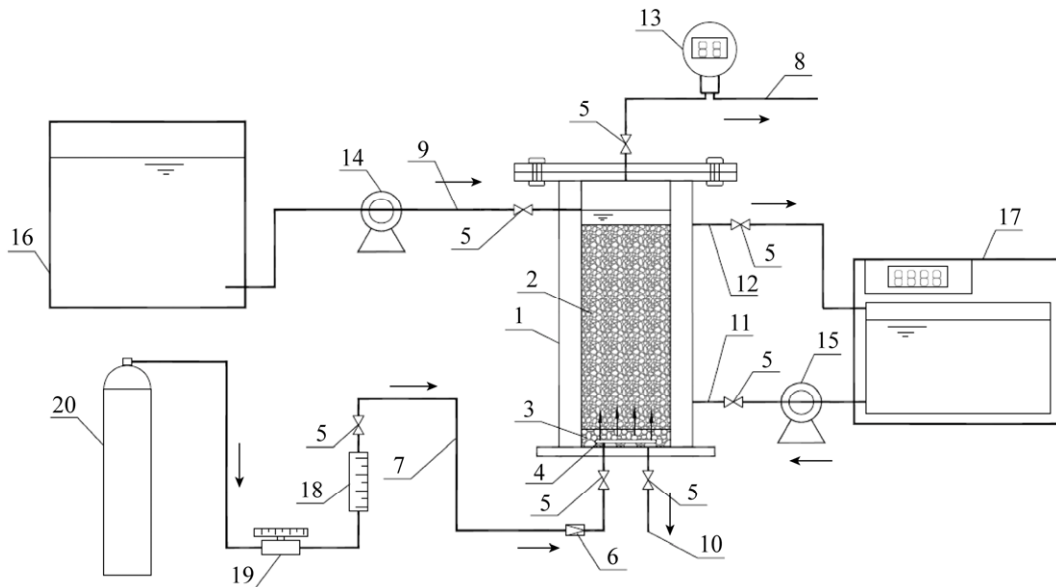


图 1. 实验装置

Figure 1. Experimental reactor. 1: reactor body; 2: packing (2–4 mm quartz sand); 3: cushion (6–8 mm pebbles); 4: aerator or aerator head; 5: valve; 6: check valve; 7: inlet pipe; 8: out of the trachea; 9: waste water inlet pipe; 10: waste water outlet pipe; 11: hot water inlet pipe; 12: hot water outlet pipe; 13: methane online monitor; 14: inlet peristaltic pump; 15: hot water circulating pump; 16: into the water tank; 17: constant temperature water tank; 18: gas flowmeter; 19: gas flow control valve; 20: mixed gas.

1.4.1 拉曼光谱分析方法: 取约 15 mL 样品放于离心管中, 冷冻成冰, 利用真空冷冻干燥机将样品制成干燥的粉末并冷藏保存。采用 LRS-8 共焦显微拉曼光谱仪对干燥的样品进行分析。具体分析方法和杨娅男等^[12]相同。

1.4.2 微生物多样性分析: 采集系统影响因素实验后的微生物进行 16S rRNA 基因测序分析, 将采集的混合液置于离心管中进行离心 1 min, 转速 6000 r/min 去除上清液后立即储存于 -20 °C 条件下冷冻, 然后送至上海美吉(Majorbio)进行 16S rRNA 基因测序分析, 进行 V3-V4 高变区测序^[13], 选用细菌通用引物为: 338F (5'-ACTCCTACG GGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACTACHVG GGTWTCTAAT-3'), 分析测试方法与李彦澄等^[14]方法相同。

2 结果和讨论

2.1 AME-D 极限脱氮系统的效能研究

2.1.1 甲烷浓度对系统的影响: 在温度为 30 °C、进水中总氮浓度为 20 mg/L 时, 控制甲烷浓度分别为 3%、2%和 0%, 系统的脱氮效能如图 2 所示。当甲烷浓度为 3%时, 出水 DO 为 1.94 mg/L, 出水 COD 为 22.27 mg/L, 甲烷平均日消耗量为 0.36%, 出水中氨氮和硝酸盐氮平均浓度分别为 0.68 mg/L 和 0.30 mg/L, 总氮和氨氮平均去除率为 94.93%和 91.54%。2%时出水 DO 为 2.25 mg/L, 出水 COD 上升为 26.18 mg/L, 甲烷平均日消耗量为 0.29%, 总氮和氨氮平均去除率为 31.63%和 90.13%, 此甲烷浓度下甲烷消耗量表现出下降趋势, 由 0.36%下降为 0.29%, 从图 2 可知, 出水硝酸盐氮浓度明显上升, 由 0.30 mg/L 增加至

12.78 mg/L, 而氨氮浓度维持在 0.68 mg/L 与 0.79 mg/L 之间, 主要是由于甲烷浓度降低至 2%后, 系统中 DO 变高, 降低了系统中反硝化菌的活性, 此外, 系统对甲烷的消耗量减少, 产生中间产物减少, 导致反硝化菌脱氮所需碳源不足。由于反硝化菌所需环境为缺氧环境, 故甲烷浓度 0%时, 系统采用停止供应混合气体进行控制, 该条件下系统出水中的 DO 为 1.47 mg/L, 出水 COD 下降趋势为 10.7 mg/L, 氨氮和硝酸盐氮平均浓度分别为 7.52 mg/L 和 0.8 mg/L, 总氮和氨氮平均去除率分别为 57.91%和 6%, 说明在不供应混合气体时, 系统基本无去除氨氮的能力, 而反硝化菌则可利用进水中的部分有机物进行反硝化脱氮, 但由于碳源不足, 导致脱氮效率较低。其他相关研究如 Thalasso 等^[15]发现停止供应氧气, 好氧甲烷氧化菌无法氧化甲烷, 未能释放出作为反硝化电子供体的中间产物, 反硝化作用就会终止。通过上述分析可知, 该系统在甲烷浓度为 3%时, 系统已实现极限脱氮, 并由于增加甲烷浓度会降低该系统应用于实际工程的可能性, 故该 AME-D 系统的最适甲烷浓度为 3%。

2.1.2 温度对系统的影响: Mohanty 等^[16]认为, 温度能影响甲烷氧化菌的生长和群落结构的组成。同时温度也是影响 AME-D 系统的因素之一。完成甲烷浓度对系统的影响研究后, 将系统重新采用甲烷浓度为 3%, 进水中氮浓度为 20 mg/L, 控制系统的温度分别为 30、20 和 10 °C, 系统的脱氮效能如图 3 所示。当温度为 30 °C 时, 出水 COD 为 23.71 mg/L, 出水中氨氮和硝酸盐氮平均浓度分别为 0.37 mg/L 和 0.08 mg/L, 总氮和氨氮平均去除率分别为 97.65%和 95.38%。当温度降低至 20 °C 时, 出水 COD 降低为 21.24 mg/L, 出

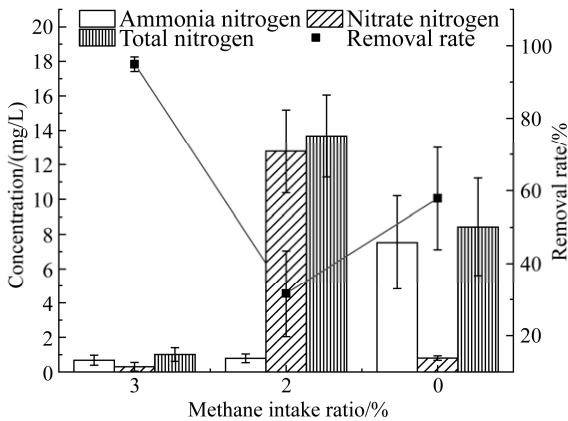


图 2. 不同甲烷进气比下反应器出水 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和去除率

Figure 2. TN, $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ and efficiency in the effluent under the different methane intake ratio. The error bars represent the standard error of the mean. $P < 0.05$.

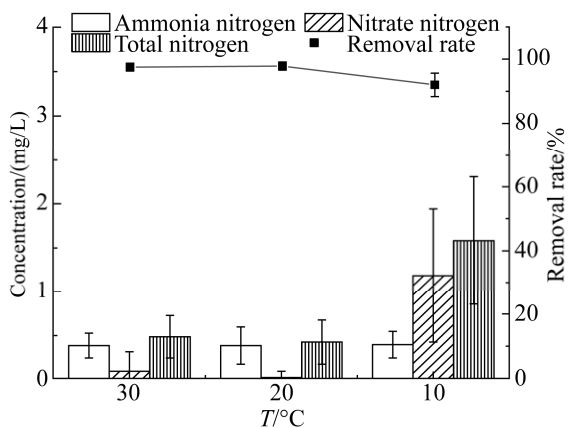


图 3. 不同温度下反应器出水 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和去除率

Figure 3. TN, $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ and efficiency in the effluent under the different temperatures. The error bars represent the standard error of the mean. $P < 0.05$.

水硝酸盐氮和氨氮分别为 0.01 mg/L 和 0.37 mg/L, 总氮和氨氮的平均去除率仍较高, 分别为 97.97% 和 95.38%。而当温度降低至 10 °C 时, 出水 COD 为 20.59 mg/L, 硝酸盐氮平均浓度上升至 1.17 mg/L, 总氮平均去除率下降至 92.16%, 氨氮平均浓度与

平均去除率变化不大, 分别为 0.38 mg/L 和 95.25%, 说明在温度为 10 °C 时, 降低了系统中微生物的活性, 相关研究发现大部分的甲烷氧化菌的生长温度为 20–30 °C^[17], 故该 AME-D 系统在 20–30 °C 均能实现极限脱氮。

2.1.3 氮浓度对系统的影响: 为了进一步探究系统对不同氮浓度的适应能力, (温度为 30 °C, 甲烷浓度为 3%, 控制进水总氮浓度分别为 20 mg/L、30 mg/L 和 40 mg/L, 测定了系统的脱氮性能。如图 4 所示。)当进水中总氮浓度为 40 mg/L 时, 出水 COD 为 39.38 mg/L, 出水氨氮和硝酸盐氮的平均浓度分别为 0.53 mg/L 和 26.76 mg/L, 出水总氮、氨氮和硝酸盐氮平均去除率分别为 31.68%、93.38% 和 16.38%。Modin 等^[18]采用 MBfR 反应器研究发现当进水硝酸盐浓度高时, 混合气体供应下会产生大量的亚硝酸盐, 脱氮效果差, 同时通过亚硝酸还原酶基因 *nirS* 和 *nirK* 的 PCR 扩增证明该实验中的生物膜具有反硝化的遗传潜力。当进水中总氮浓度为 30 mg/L 时, 出水 COD 为 28.6 mg/L, 出水硝酸盐氮和总氮平均浓度分别下降至 3.04 mg/L 和 3.62 mg/L, 硝酸盐氮和总氮平均去除率分别上升至 86.18% 和 87.93%, 而当进水中总氮浓度为 20 mg/L 时, 出水 COD 为 22.89 mg/L, 出水硝酸盐氮和总氮平均浓度表现出明显下降至 0.93 mg/L 和 1.27 mg/L, 出水总氮、氨氮和硝酸盐氮平均去除率上升至 93.66%、96.13% 和 92.25%。由此可知, 虽然该 AME-D 系统在进水中总氮浓度较高时具有一定的脱氮效率, 出水中氮污染物的浓度仍然较高, 而在进水中总氮浓度较低时的脱氮率最高, 即 1.27 mg/L < 3 mg/L 能实现极限脱氮^[9]。

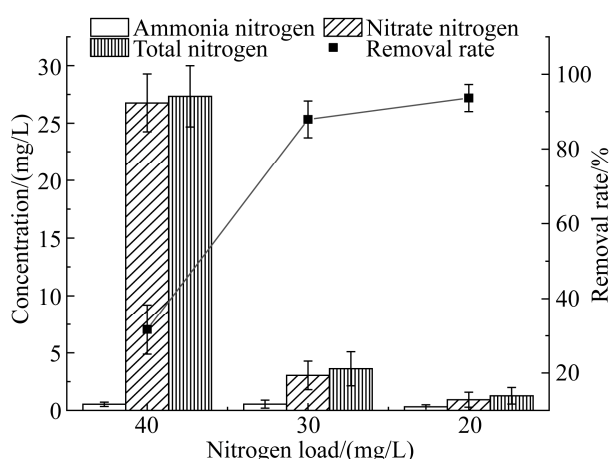


图 4. 不同氮负荷下反应器出水 TN、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和去除率

Figure 4. TN, $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ and efficiency in the effluent under the different nitrogen loads. The error bars represent the standard error of the mean. $P < 0.05$.

2.1.4 微生物群落分析: 采集最佳控制条件下系统中微生物进行 16S rRNA 基因测序分析, 在门水平上(图 5-A), 占优势的菌群是变形菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*), 分别占 41.09%、25.99%、10.76% 和 6.41%, 而在 AME-D 过程中起主要作用为变形菌门, 有研究发现大部分反硝化菌和甲烷氧化菌均属于变形菌门^[19]。

在科水平上(图 5-B), 占优势的菌群是腐螺旋菌科 (*Saprospiraceae*)、A0839 和 *Microscillaceae*, 分别占 12.48%、5.85% 和 4.09%。此外, 嗜甲基菌科 (*Methylophilaceae*)、甲基球菌科 (*Methylococaceae*) 和甲基囊孢菌科 (*Methylocystaceae*) 的相对丰度分别为 3.86%、1.99% 和 1.9%, 甲基球菌科和甲基囊孢菌科均属于好氧甲烷氧化菌, 具有氧化甲烷的能力^[20-21], 同时嗜甲基菌科能以甲醇等为生长基质, 是一种甲基营养菌^[22]。

在属水平上(图 5-C)相对丰度较高的为 *norank_f_Saprospiraceae* (12.31%)、*norank_f_A0839* (5.85%) 和 *Flavobacterium* (3.76%)。系统中检测出的甲烷氧化菌属分别为 *Methylosarcina* (1.84%)、*Methylovulum* (0.01%)^[21] 和 *Crenothrix* (0.14%)^[23], 属于兼性甲烷氧化菌属的为 *Methylocystis* (1.9%), 其中, *Methylosarcina*、*Methylovulum* 和 *Crenothrix* 属于甲基球菌科, 而 *Methylocystis* 属于甲基囊孢菌科, 而属于嗜甲基菌科的微生物为 *Methylophilus* (1.9%)。Chen 等^[24]研究发现 *Methylosarcina* 和 *Methylocystis* 属好氧甲烷氧化菌都在甲烷氧化过程中起重要作用。此外, 系统中检测出的硝化菌属为 *Nitrospira* (0.42%), 亚硝化菌属为 *Nitrosomonas* (0.008%), 而反硝化菌属占优势的分别为 *Hyphomicrobium* (1.19%) 和 *Pseudomonas* (0.61%), 系统中还存在其他丰度较小的反硝化菌属, 如 *Bacillus* (0.13%) 和 *Rhizobium* (0.008%)。Rorbertson 等^[25]最早研究发现反硝化菌能在好氧条件下进行生物脱氮, 同时 Lukow 等^[26]提出, 已报道的好氧反硝化菌包括 *Hyphomicrobium*、*Pseudomonas*、*Bacillus* 和 *Rhizobium* 等。

2.2 AME-D 极限脱氮系统的应用研究

2.2.1 贵阳某污水处理厂生化池出水处理效果:

采集贵阳某污水处理厂二级出水进行实验, 系统的参数控制条件为温度 30 °C, 甲烷浓度 3%。进水中氨氮为 0.7 mg/L、总氮为 9 mg/L, 通过 AME-D 极限脱氮系统处理后, 出水中总氮和氨氮平均浓度为 0.96 mg/L 和 0.38 mg/L, 出水 DO 为 6.02 mg/L, 出水 COD 为甲烷平均消耗量为 0.3%, 出水总氮、氨氮和硝酸盐氮平均去除率分别为 89.28%、45.71% 和 93.25%, 说明该系统对贵阳某污水处理厂生化池出水具有极限脱氮效果。

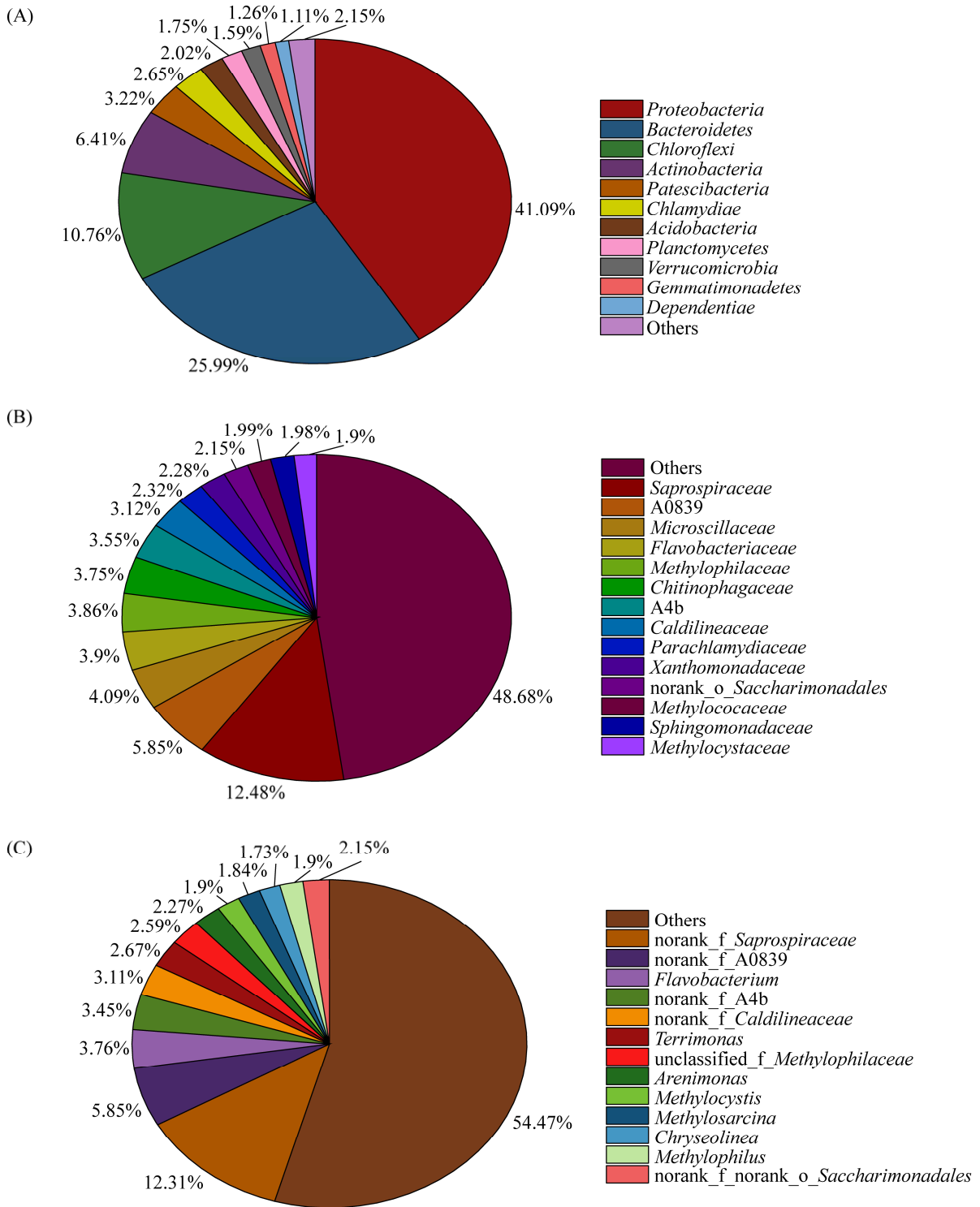


图 5. 门、科和属水平上的微生物分类

Figure 5. Respective microbial classification at the phylum, family and genus level. A: phylum level; B: family level; C: genus level.

2.2.2 拉曼光谱分析: 采集实验配水进出水和实际污水进出水进行拉曼光谱分析, 其图谱如图 6 所示, 拉曼光谱图解如表 1 所示, 通过比对图谱可知, 实验配水经过处理后, 波数为 716.21 cm^{-1} 、1010.53 cm^{-1} 、1050.55 cm^{-1} 、1346.65 cm^{-1} 和 1360.88 cm^{-1} 的峰明显消失, 分别由烯烃(顺式)CH 面外弯曲、亚硫酸酯 $\text{R}^1\text{O-SO-OR}^2$ 的 O-S-O 反对称伸缩、 NO_3^- 对称伸缩、芳香胺的 C-N 伸缩和芳香族 NO_2 对称伸缩引起, 说明系统对硝酸盐氮和亚硝酸盐氮有较高的去除能力, Kauffmann 等^[27]测定硝酸盐溶液的拉曼光谱, 在 1047 cm^{-1} 波长处得到特定 NO_3^- 的阴离子。同时系统中的芳香族化合物也被去除, 此外, 实验出水中明显出现的峰分别为 983.86 cm^{-1} 和 465.46 cm^{-1} , 是由烯烃 CH_2 扭曲和 PO_4^{3-} 的 PO_4 对称变角引起。实际污水经过处理后, 波数为 413.89 cm^{-1} 、619.29 cm^{-1} 、669.97 cm^{-1} 、1052.33 cm^{-1} 、1136.80 cm^{-1} 、3407.80 cm^{-1} 和 3497.61 cm^{-1} 的峰明显消失, 分别由 PO_4^{3-} 的 PO_4 对称变角、 PO_4^{3-} 的 PO_4 不对称变角、醇 COH 面外弯曲、 NO_3^- 对称伸缩、仲胺 $\text{R}^1\text{-NH-R}^2$ 的 C-N 伸缩、芳香族仲胺 NH 伸缩和磷酸 ArP(O)(OH)_2 的 O-H 伸缩引起, 说明系统对

硝酸盐氮有较高的去除能力, 同时系统中的芳香族化合物、醇类物质也被去除, 此外, 实际出水中出现的峰为 1087.80 cm^{-1} , 是由醇类 C-OH 伸缩引起, 进一步说明甲烷被氧化形成的中间产物可能为醇类或醛类物质。李震等^[28]检测了 10 g/L 的 NaNO_2 溶液的拉曼光谱, 发现在 1335 cm^{-1} 附近貌似有 NO_2^- 的拉曼特征峰。由图 6 和表 1 可知, 实际污水中存在磷酸盐类物质、醇类或醛

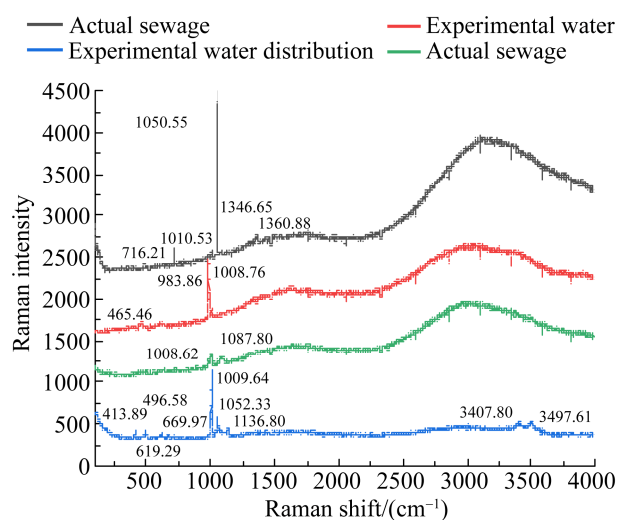


图 6. 系统进出水拉曼光谱图
Figure 6. The Raman spectrum of the inflow and effluent in the methanotrophic system.

表 1. 拉曼光谱图解析

Table 1. Results of Raman spectroscopic analysis

Absorption peak wave number/ cm^{-1}	Group vibration
413.89, 465.46, 619.29	The symmetric Angle of PO_4 of PO_4^{3-} and the asymmetric Angle of PO_4 of PO_4^{3-}
669.97, 716.21	Alcohol COH surface bending and alkene (cis) CH surface bending
983.86	Olefin CH_2 distortion
1008.62, 1008.76, 1009.64, 1010.12	Sulfite $\text{R}^1\text{O-SO-OR}^2$ O-S-O antisymmetric expansion
1050.55, 1052.33, 1087.80	NO_3^- symmetric contraction and alcohol C-OH contraction
1136.80	The C-N expansion of the secondary amine $\text{R}^1\text{-NH-R}^2$
1346.65, 1360.88	The C-N expansion of aromatic amines and the symmetric expansion of aromatic NO_2 groups
3407.80	The aromatic secondary amines NH stretch
3497.61	O-H expansion of phosphonic ArP(O)(OH)_2

类物质和芳香族化合物等,而实验配水中存在芳香族化合物和亚硝酸盐氮等,两种实验进水存在相同的物质均由亚硫酸酯 $R^1O-SO-OR^2$ 的 O-S-O 反对称伸缩和 NO_3^- 对称伸缩引起的,即实验配水 (1010.53 cm^{-1} 和 1050.55 cm^{-1}) 和实际污水 (1009.64 cm^{-1} 和 1052.33 cm^{-1})。

3 结论

(1) AME-D 极限脱氮系统在甲烷进气比为 3%、温度为 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、氮浓度为 20 mg/L 时脱氮效果最好,系统的总氮、氨氮和硝酸盐氮平均去除率分别为 93.66%、96.13% 和 92.25%,此外,该系统在 $20\text{--}30\text{ }^\circ\text{C}$ 均能实现极限脱氮。

(2) 16S rRNA 基因测序分析结果显示系统中的甲烷氧化菌分别为 *Methylosarcina* (1.84%)、*Methylovulum* (0.01%) 和 *Crenothrix* (0.14%), 以及兼性甲烷氧化菌属 *Methylocystis* (1.9%), 硝化菌属主要为 *Nitrospira* (0.42%), 亚硝化菌属主要为 *Nitrosomonas* (0.008%), 而反硝化菌属主要为 *Hyphomicrobium* (1.19%) 和 *Pseudomonas* (0.61%), AME-D 极限脱氮是由好氧甲烷氧化菌、反硝化菌、硝化菌和亚硝化菌协同实现。

(3) 采用该 AME-D 极限脱氮系统处理贵阳某污水处理厂尾水时,出水总氮和氨氮平均浓度达到 0.96 mg/L 和 0.38 mg/L , 能达到极限脱氮的目的,拉曼光谱分析显示 1052.33 cm^{-1} 、 1050.55 cm^{-1} 和 1360.88 cm^{-1} 的峰明显消失,系统对硝酸盐氮和亚硝酸盐氮有较高的去除,同时出水中明显出现的峰分别为 1087.80 cm^{-1} , 甲烷被氧化形成的中间产物可能为醇类或醛类物质。

参考文献

- [1] Lin ZY, Wang YM, Huang W, Wang JL, Chen L, Zhou J, He Q. Single-stage denitrifying phosphorus removal biofilter utilizing intracellular carbon source for advanced nutrient removal and phosphorus recovery. *Bioresource Technology*, 2019, 277: 27–36.
- [2] Wang N, Huang L, Luo X, Liang Y, Wang Y, Cheng YC. Impact of Biochar on nitrogen removal and nitrous oxide emission in aerated vertical flow constructed wetland. *Environmental Science*, 2018, 39(10): 4505–4511. (in Chinese)
王宁, 黄磊, 罗星, 梁岩, 王燕, 陈玉成. 生物炭添加对曝气人工湿地脱氮及氧化亚氮释放的影响. *环境科学*, 2018, 39(10): 4505–4511.
- [3] Huang S, Yang F, Huang QH, Li QW, Gao JF, Qin JY. Study on municipal wastewater treatment effect by a new type of integrated biological reactor. *Technology of Water Treatment*, 2019, 45(11): 107–111. (in Chinese)
黄山, 杨凡, 黄启华, 李秋玮, 高俊发, 秦晋一. 一种新型一体化生物反应器对城市污水的处理效果研究. *水处理技术*, 2019, 45(11): 107–111.
- [4] Harremoes P, Henze Christensen M. Denitrification with methane (denitrifikation med metan). *Vand*, 1971, 1: 7–11.
- [5] Rhee GY, Fuhs GW. Wastewater denitrification with one-carbon compounds as energy source. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 1978, 50(9): 2111–2119.
- [6] Dumont MG, Pommerenke B, Casper P. Using stable isotope probing to obtain a targeted metatranscriptome of aerobic methanotrophs in lake sediment. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(5): 757–764.
- [7] Stein LY, Klotz MG. Nitrifying and denitrifying pathways of methanotrophic bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(6): 1826–1831.
- [8] Gu HB, Sheng Y, Zhou SX, Fan JH, Li SM, Wu ZL, Jin B, Chu WH. Isolation, identification of methanotrophic bacteria and optimization of its fermentation conditions. *Journal of Guizhou University (Natural Sciences)*, 2019, 36(6): 22–25. (in Chinese)
顾华兵, 沈阳, 周淑鑫, 范建华, 李尚民, 吴兆林, 金波, 储卫华. 甲烷氧化菌的分离鉴定及其发酵条件优化. *贵州大学学报(自然科学版)*, 2019, 36(6): 22–25.
- [9] Liu ZX. A new breakthrough in the theory and practice of biological phosphorus removal: from mainstream EBPR to side-stream EBPR. *China Water & Wastewater*, 2018, 34(24):

- 19–25. (in Chinese)
刘智晓. 生物除磷理论及实践新突破——从主流 EBPR 到侧流 EBPR. 中国给水排水, 2018, 34(24): 19–25.
- [10] Whittenbury R, Phillips KC, Wilkinson JF. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1970, 61(2): 205–218.
- [11] Ji FY, Yang Q, Luo GY. Laboratory prepared substitutes for HACH-COD meter. *Water & Wastewater Engineering*, 2003, 29(1): 17–20. (in Chinese)
吉芳英, 杨琴, 罗固源. 实验室自配 HACH-COD 替代试剂研究. 给水排水, 2003, 29(1): 17–20.
- [12] Yang YN, Li YC, Li J, Wu P, Yang Z, Xiang FL. Construction and mechanism of methanotroph-based ultimate denitrification system for tailwater of urban sewage plants. *Environmental Science*, 2020, 41(4): 1787–1793. (in Chinese)
杨娅男, 李彦澄, 李江, 吴攀, 杨钊, 向福亮. 基于甲烷氧化菌的城镇污水厂尾水极限脱氮系统构建及机制. 环境科学, 2020, 41(4): 1787–1793.
- [13] Xu N, Tan GC, Wang HY, Gai XP. Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure. *European Journal of Soil Biology*, 2016, 74: 1–8.
- [14] Li YC, Yang YN, Liu DP, Li L, Li J. Denitrification efficiency and microbial community research in an aerobic methanotroph-based system. *China Environmental Science*, 2019, 39(10): 4387–4393. (in Chinese)
李彦澄, 杨娅男, 刘邓平, 李蕾, 李江. 基于好氧甲烷氧化菌的反硝化效能及微生物群落研究. 中国环境科学, 2019, 39(10): 4387–4393.
- [15] Thalasso F, Vallecillo A, García-Encina P, Fdz-Polanco F. The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Water Research*, 1997, 31(1): 55–60.
- [16] Mohanty SR, Bodelier PLE, Conrad R. Effect of temperature on composition of the methanotrophic community in rice field and forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(1): 24–31.
- [17] Stanley SH, Prior SD, Leak DJ, Dalton H. Copper stress underlies the fundamental change in intracellular location of methane mono-oxygenase in methane-oxidizing organisms: Studies in batch and continuous cultures. *Biotechnology Letters*, 1983, 5(7): 487–492.
- [18] Modin O, Fukushi K, Nakajima F, Yamamoto K. Nitrate removal and biofilm characteristics in methanotrophic membrane biofilm reactors with various gas supply regimes. *Water Research*, 2010, 44(1): 85–96.
- [19] Manz W, Wagner M, Amann R, Schleifer KH. *In situ* characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Water Research*, 1994, 28(8): 1715–1723.
- [20] Yun JL, Wang YF, Zhang HX. Ecology of aerobic methane oxidizing bacteria (methanotrophs). *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(21): 6774–6785. (in Chinese)
俞娟莉, 王艳芬, 张洪勋. 好氧甲烷氧化菌生态学研究进展. 生态学报, 2013, 33(21): 6774–6785.
- [21] Kalyuzhnaya MG, Puri AW, Lidstrom ME. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metabolic Engineering*, 2015, 29: 142–152
- [22] Doronina N, Kaparullina E, Trotsenko Y. The family Methylophilaceae//Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014: 869–880.
- [23] Deng YC, Cui XY, Lüke C, Dumont MG. Aerobic methanotroph diversity in Riganqiao peatlands on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Environmental Microbiology Reports*, 2013, 5(4): 566–574.
- [24] Chen Y, Dumont MG, Cébron A, Murrell JC. Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(11): 2855–2869.
- [25] Robertson LA, Kuenen JG. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*, 1984, 139(4): 351–354.
- [26] Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(11): 1157–1159.
- [27] Kauffmann TH, Fontana MD. Inorganic salts diluted in water probed by Raman spectrometry: data processing and performance evaluation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 209: 154–161.
- [28] 李震. 基于拉曼光谱的水产养殖水体三氮检测研究. 山东农业大学硕士学位论文, 2017.

Efficiency and application of aerobic methane coupled to denitrification ultimate denitrification system

Ya'nan Yang¹, Yancheng Li^{1,2*}, Jiang Li^{1,2*}, Pan Wu^{1,2}, Jia Ai¹, Xiong Zhong¹

¹ College of Resource and Environmental Engineering, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

² Guizhou Karst Eiron Mental Ecosystems Observation and Research Station, Ministry of Education, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Abstract: [Objective] This research is to analyze the effects of methane concentration, temperature and nitrogen concentration on the aerobic methane coupled to denitrification (AME-D) ultimate denitrification system, the microbial communities in this AME-D system, and the application of this system into the tail water of a sewage treatment plant in Guiyang, China. [Methods] The effects of methane concentration, temperature, and nitrogen concentration on the nitrogen removal efficiency of this system were studied in staged experiments. The microbial community in the system was analyzed by 16S rRNA gene sequencing technology, and changes of the wastewater water quality were analyzed by confocal micro-Raman spectrometer. [Results] With the methane intake ratio of 3%, and the nitrogen concentration of 20 mg/L at 30 °C, the average removal rates of total nitrogen, ammonia nitrogen, and nitrate nitrogen in the system reached high up to 93.66%, 96.13% and 92.25%, respectively; The dominant methanotrophs in this system were *Methylosarcina* (1.84%), *Methylovulum* (0.01%) and *Crenothrix* (0.14%); the facultative methanotrophs was *Methylocystis* (1.9%); and the dominant nitroso-bacteria were *Nitrosomonas* (0.008%), nitrifying bacteria were *Nitrospira* (0.42%), and denitrifying bacteria were *Hyphomicrobium* (1.19%) and *Pseudomonas* (0.61%). Applying this system into the tail water of a sewage treatment plant in Guiyang, the average total nitrogen concentration in the effluent reached 0.96 mg/L, reaching the limit of denitrification. Raman spectrum analysis showed that nitrate nitrogen and nitrite nitrogen can be effectively removed in this system. Intermediate products of the oxidized methanotrophs could be alcohols or aldehydes, which can provide the required carbon source for denitrifying bacteria. [Conclusion] AME-D ultimate denitrification was realized by the synergy of microorganisms, including functional microorganisms like methanotrophs, nitroso-bacteria, nitrifying bacteria, and denitrifying bacteria. Research results also exhibited great potential of this system applied into the urban sewage treatment.

Keywords: AME-D, extreme denitrification, efficiency, Raman spectroscopy, 16S rRNA

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Research and Development Program (2016YFC0400702-4); by the Guizhou Provincial Science and Technology Planning Project (Guizhou Science and Technology Cooperation Major Special Word [2019]3009) and by Guizhou Provincial Talent Base Project (RCJD2018-21)

*Corresponding author. E-mail: Yancheng Li, ycli3@gzu.edu.cn; Jiang Li, jli82@gzu.edu.cn

Received: 6 January 2020; Revised: 21 April 2020; Published online: 24 April 2020



杨娅男, 女, 汉族, 1995年4月, 贵州大学硕士研究生, 环境工程专业。研究方向为城镇污水深度处理技术, 主要研究基于甲烷氧化菌的深度脱氮技术。以第一作者发表论文2篇, 分别为《基于甲烷氧化菌的脱氮技术研究进展》、《基于甲烷氧化菌的城镇污水厂尾水极限脱氮系统构建及机理研究》, 申请国家发明专利1项《一种用于城镇污水处理厂深度脱氮氧化系统及构建方法》(2019107749860)。