

溶解氧对单级自养脱氮系统功能菌数量的影响

秦宇, 方芳, 郭劲松*, 杨国红, 董俐

(重庆大学三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400045)

摘要:【目的】研究溶解氧(Dissolved oxygen, DO)对单级自养脱氮系统功能菌数量的影响,为系统运行操控提出理论指导。【方法】从不同 DO 水平下的单级自养脱氮反应器中,分别提取活性污泥及生物膜样品基因组 DNA,通过特异引物扩增系统内亚硝化菌(Ammonia oxidizing bacteria, AOB)、硝化菌(Nitrite oxidizing bacteria, NOB)及厌氧氨氧化菌(Anaerobic ammonia oxidizing bacteria, ANAMMOX)基因序列,PCR 产物经回收克隆测序后,证实扩增产物为 AOB、NOB 及 ANAMMOX 16S rDNA 保守序列,以含该序列的重组质粒作为定量 PCR 标准品。用荧光定量 PCR 技术对单级自养脱氮系统中各类功能菌进行定量分析。【结果】高 DO 有利于 AOB 及 NOB 生存,同时,活性污泥中 AOB、NOB 数量多于生物膜。DO 对厌氧氨氧化菌 ANAMMOX 数量影响明显,高 DO 浓度将对 ANAMMOX 数量产生直接抑制,低 DO 浓度水平时,由于系统内缺乏厌氧氨氧化反应的电子受体 NO_3^- 或 NO_2^- ,也将间接影响 ANAMMOX 数量。【结论】本试验研究条件下,DO 为(曝气)2.0/(停曝)0.4 mg/L 时系统运行效能最佳,ANAMMOX 数量最多,AOB、NOB 及 ANAMMOX 构成一个协同代谢的稳定状态。

关键词: 单级自养脱氮; 荧光定量 PCR; AOB; NOB; ANAMMOX

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0773-07

自养脱氮工艺是诸多新型生物脱氮工艺中的一种,该工艺在同一构筑物内由自养菌实现整个氨氮至 N_2 全部转化过程,在处理垃圾渗滤液、污泥析出液和家禽粪便等高氨氮、低 C/N 比废水方面极具潜力^[1-2]。然而该工艺由于研发较晚,目前仍处于实验室小试阶段,主流观点认为,单级自养脱氮工艺是由亚硝化反应和厌氧氨氧化反应联合实现的,而参与反应的微生物主要有亚硝化菌 AOB、硝化菌 NOB 及厌氧氨氧化菌 ANAMMOX 3 大类^[3-5]。

在实现自养脱氮的诸多控制因素中,溶解氧(DO)是较受关注的指标之一。Hippen 等^[6]发现,在 DO 浓度为 0.8~1.0 mg/L,超过 60%的氨氮被转化成 N_2 而得到去除。廖德祥等^[7]的研究中,DO 控制在 0.5~0.7 mg/L 时,氨氮转化率达 90% 以上,出水亚

硝态氮和硝态氮浓度很低;DO 为 0.2~0.3 mg/L 时,氨氮转化率只有 54.6%。Helmer 等^[8]的研究中,以氨氮为唯一氮源,不向反应器提供 O_2 时,氨氮几乎不会发生转化;DO 为 0.7 mg/L 时,硝化反应和厌氧氨氧化达到平衡;DO 为 5 mg/L 时,氨氮全部转化为亚硝态氮和硝态氮。这些研究虽有助于了解 DO 与系统宏观运行效能的相关性,但由于运行效能由反应器内各微生物的协同代谢作用决定,DO 的高低直接影响着系统中亚硝化菌、硝化菌和厌氧氨氧化菌的数量和活性,并制约着氨氮、亚硝态氮、硝态氮和总氮之间的转化关系,而关于 DO 对系统内各功能菌数量的影响鲜有报道,所以导致了该工艺目前仍处于“黑箱”研究阶段。本研究从不同 DO 水平下的单级自养脱氮反应器中提取基因组 DNA,通过荧光

基金项目: 国家自然科学基金(50608071); 教育部重大科技项目(308020); 重庆大学研究生科技创新基金(200811A1A0120301)

* 通信作者。Fax: +86-23-65127370; E-mail: guo0768@126.com

作者简介: 秦宇(1981-),女,重庆市人,博士研究生,主要研究方向为废水生物脱氮技术及环境微生物学。E-mail: qinyu54001@163.com

收稿日期: 2009-01-23; **修回日期:** 2009-03-12

定量 PCR 技术对各类功能菌进行定量分析,拟掌握 DO 对亚硝化菌、硝化菌和厌氧氨氧化菌的数量的影响,为探讨该工艺机理奠定微生物学基础。

1 材料和方法

1.1 试验装置

单级自养脱氮反应器如图 1 所示,反应器由有机玻璃制成,呈方形,有效容积 30 L,反应器内置空心球填料以强化微生物附着能力。接种污泥在温度为 30℃、pH 为 8.0 左右的条件下,加入合成氨氮废水进行逐步培养和驯化。采用预置 1 d 以去除水中残留余氯的自来水为溶剂配置合成氨氮废水,配水中不含有机碳源, NH_4HCO_3 浓度为 160 mg/L 左右,同时加入适量的 KH_2PO_4 以供给微生物足够的磷源,磷酸盐终浓度为 2 mg/L。配制微量元素贮备液 (EDTA 5.0 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.6 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.2 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5.1 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.6 g/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.1 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g/L),按每升人工配液 2 mL 微量元素的比例加入反应器。以 NaHCO_3 调节溶液 pH 值。系统水力停留时间 HRT 为 2 d,除换水时流失少量污泥及试验采样外,不人工排泥。

球填料及软性组合填料,用无菌刷和无菌剪取下生物膜样品后溶于 100 mL 无菌水中,以 $9300 \times g$ 离心 5 min,将离心污泥置于 -20°C 冰箱保存,待 DNA 提取。接种污泥样品于系统接种时同期采取,将该离心污泥样品于 -70°C 保存。

1.3 DNA 提取

采用上海博彩生物试剂公司 K717 环境基因组 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA。提取后的 DNA 样品用 0.7% 琼脂糖(含 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴化乙锭溶液)电泳, BIO-RAD Versa Doc 系统照像。

同时取 $1 \mu\text{L}$ DNA 样品稀释 50 倍后通过 BECKMAN COULTER DU640 系统进行定量测定,计算公式为 $[\text{DNA}] = 50 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{310}) (\text{ng}/\mu\text{L})$, 根据公式计算 DNA 的浓度。

1.4 重组质粒的构建

采用 TAKARA 公司 Taq DNA 聚合酶进行常规 PCR 扩增,用 BIORAD 公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化目标 DNA 片段,并测定其浓度。

用 TAKARA 公司生产的 pMD18-T 载体试剂盒,在微量离心管中制备下列连接反应液,全量 $10 \mu\text{L}$, pMD18-T 载体 $1 \mu\text{L}$, 靶 DNA 片段 $1 \mu\text{L}$, dH_2O $3 \mu\text{L}$, Ligation Solution I $5 \mu\text{L}$, 16°C 反应过夜。

取 $100 \mu\text{L}$ 制备好的大肠杆菌 JM109 感受态细胞,加入 $3 \mu\text{L}$ 连接反应液,温和混匀,冰上放置 30 min,再将离心管放到 42°C 保温瓶中水浴 90 s 进行热休克,迅速放回冰中,将细胞冷却 1~2 min 后加入 37°C $900 \mu\text{L}$ LB 培养液于每支离心管中,置于 37°C 摇床 ($150 \text{ r}/\text{min}$) 培养 1 h。将菌液离心,弃上清液后取 $50 \mu\text{L}$ 涂布于含氨苄青霉素(终浓度 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 平板培养基上,于 37°C 温箱培养约 16 h,挑取白色菌落进行下一步操作。

阳性转化子复筛与鉴定:用无菌牙签挑取少量白色菌落悬浮于 $10 \mu\text{L}$ 超纯水中,取 $1 \mu\text{L}$ 作为模板进行 PCR 扩增,快速筛选重组子。挑取经验证成阳性的菌落 37°C 摇床 ($250 \text{ r}/\text{min}$) 过夜培养,然后用质粒 DNA 提取试剂盒 (PROMEGA) 提取质粒 DNA,同时将菌液送上海生工生物工程技术有限公司测序验证。

1.5 荧光定量 PCR (Real-time PCR)

SYBR Green I 荧光染料法: $25 \mu\text{L}$ 的反应体系,含有终浓度为 $1 \times$ SYBR Green I 定量 PCR Master Mix (Bio-Rad)、 $0.8 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的引物对以及模板适量。各类细菌引物对及 Real-time PCR 反应程序见表 1。PCR 扩增结束后立即进行溶解曲线分析,以验证扩

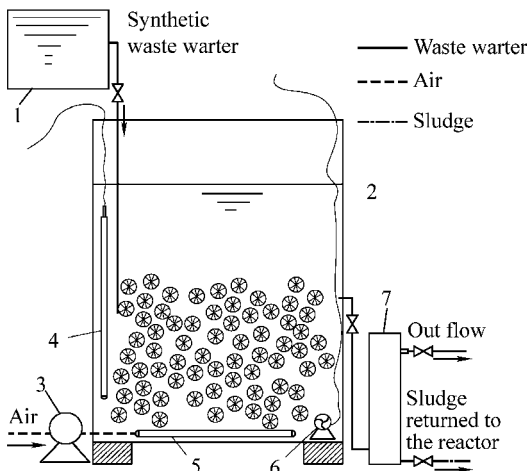


图 1 试验装置示意图

Fig. 1 Schematic representation of the reactor and work flow. 1. Wastewater tank; 2. Sequencing batch reactor; 3. Air pump; 4. Calorstat; 5. Aerating stick; 6. Stirrer; 7. Effluent tank.

1.2 样品准备

活性污泥样品从 SBBR 单级自养脱氮反应器中吸取泥水混合物 10 mL,于 $9300 \times g$ 离心 5 min,将离心污泥置于 -20°C 冰箱保存,待 DNA 提取。生物膜样品取自反应器内不同垂直深度及水平位置的空心

增的特异性。做溶解曲线的程序为: 95℃, 1 min; 55℃, 1 min; 从 55℃ 开始每升高 0.5℃ 保持 10 s, 连续升高 80 次(到 95℃ 为止)。

表 1 各类细菌 Real-time PCR 引物及反应条件

Group	Primers(5'→')	Reaction Program	Reference
AOB	GGAGRAAAGCAGGGGATGG CGTCCTCTCAGACCARCTACTG	95℃ × 5 min; 95℃ × 15 s, 60℃ × 45 s, 45 cycles	[9]
NOB	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	95℃ × 5 min; 95℃ × 1 min, 60℃ × 1 min, 72℃ × 2 min, 35 cycles	[10]
ANAMMOX	ATGGGCACTMRGTAGAGGGGTTT AACGTCTCAGCACAGGACTG	50℃ × 2 min; 94℃ × 10 min; 94℃ × 15 s, 60℃ × 1 min, 40 cycles	[11]

1.6 标准曲线的建立

将各类细菌测序验证后的重组质粒作为本研究标准阳性样品使用。采用分光光度计(BECKMAN COULTER DU640)检测其纯度和浓度, 进行 10 倍梯度稀释制成一系列的标准样品。本研究中细菌数量根据文献[12], 将拷贝数换算为细胞数。计算公式为:

$$CN = \frac{M \times N}{L \times D}$$

其中 M = 质量浓度(g/mL);

N = 阿佛加德罗常数(6.022×10^{23} 分子/mol);

L = 核酸分子长度(总长度 = 靶片段 + 载体, 单位 kb);

D = 转换因子(对 dsDNA 为 6.6×10^5 g/mol/kb)。

同期检测各样品 MLVSS 值, 将试验结果单位转化为以单位干污泥计。

1.7 分析测试项目与方法

pH: Sension2 型便携式 pH/ISE 测量仪; 溶解氧:

LDO™ HQ10 便携式溶解氧测量仪。

总氮: 过硫酸钾氧化法^[13]; 氨氮: 纳氏试剂比色法^[13]; 亚硝酸盐: N-1-萘基-乙二胺比色法^[13]; 硝酸盐: 紫外分光光度法^[13]。

混合液悬浮固体(MLSS)和挥发性悬浮固体(MLVSS): 标准重量法^[13]。

2 结果和分析

2.1 反应器运行

本研究在单级自养脱氮系统成功启动并稳定运行之后进行, 共运行 77 d 左右, 在曝停比为 2 h: 2 h 的条件下调整 DO 浓度, 分别针对 DO 的高、中、低 3 种控制条件进行单因素分析。反应器运行情况见图 2。第 1~17 天为第一阶段, 反应器曝气时 DO 控制在 2.0 mg/L 左右。该阶段氨氮转化率和总氮去除率较高, 分别可达 100% 及 80%, 出水中几乎检测不到 NH_4^+ -N 及 NO_2^- -N, NO_3^- -N 基本稳定在 30 mg/L

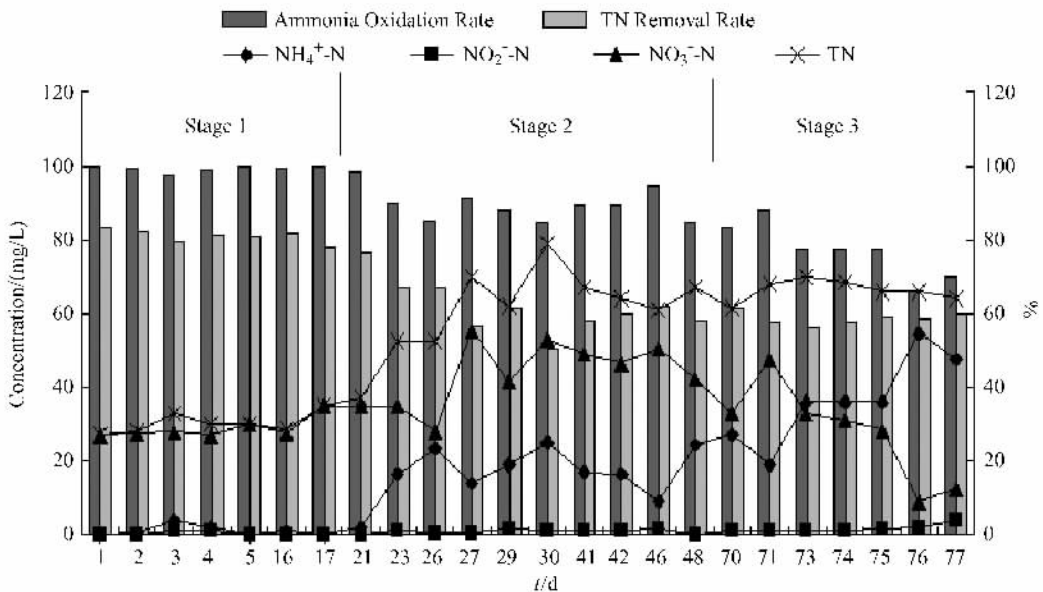


图 2 反应器运行效能图

Fig. 2 Nitrogen removal efficiency of the reactor.

左右。第 18~48 d 为系统运行的第二阶段,调整反应器内曝气 DO 浓度至 2.5 mg/L 左右后,系统运行效能明显降低,出水 NH_4^+ -N 和 NO_3^- -N 浓度分别升高至 20 mg/L 和 50 mg/L 左右,但 NO_2^- -N 仍然保持在 1 mg/L 左右。第 49~77 天为第三阶段,研究系统在低 DO 浓度条件下的运行效能,该阶段曝气时 DO 浓度为 1.0 mg/L 左右。从图 2 中可以看出, NO_3^- -N 浓度在该阶段出现了下降,而 NH_4^+ -N 则进一步上升,

最高时可到 55 mg/L。该阶段与前 2 个阶段相比较, TN 去除率下降明显,而氨氮转化率与第二阶段相当。

在反应器运行期间,分别对高、中、低 3 种 DO 水平下的活性污泥及生物膜样品进行了采样,用以研究 DO 对单级自养脱氮系统脱氮细菌数量的影响。表 2 表述了各样品对应的反应器工艺运行状况。

表 2 样品类型及取样时系统运行效能表

Table 2 Comparison of the different sludge samples and operational status of reactor

Sample	Type	Time/d	DO* / (mg/L)	Effluent NH_4^+ -N / (mg/L)	Effluent NO_2^- -N / (mg/L)	Effluent NO_3^- -N / (mg/L)	Effluent TN / (mg/L)	NH_4^+ -N oxidation rate / %	TN removal rate / %
O	Inoculation sludge	0							
A	Activated sludge	16	2.0/0.4	1.1	0	27.3	28.4	100	80
B	Biofilm								
C	Activated sludge	42	2.5/0.4	16.5	1	46.5	64	90	60
D	Biofilm								
E	Activated sludge	73	1.0/0.2	36.2	1	33	70.2	77	56
F	Biofilm								

*: The DO concentration of aeration/non-aeration time.

2.2 重组质粒的鉴定

将重组质粒基因序列在 GenBank 中 BLAST 比

对,结果显示,各类细菌的转化子均为阳性。部分比对结果见表 3。

表 3 克隆测序在 GenBank 比对的部分结果

Table 3 Partial results of the recombinant sequence alignment with genes in GenBank

Sample	Length/bp	GenBank number	Comparability of similar gene	Blast result
I	117	FJ445022	CP000450 (98%)	<i>Nitrosomonas</i>
II	151	FJ490152	AJ224046 (100%)	<i>Nitrospira</i>
III	275	FJ490144	AF375995 (99%)	<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>

表 3 结果表明,已获得了各类细菌 16S rDNA 的保守区域,上述重组质粒可以作为 AOB、NOB 及 ANAMMOX 用荧光定量 PCR 方法进行定量的标准 DNA。

2.3 DO 对功能菌数量的影响

不同 DO 水平下各样品中脱氮功能菌荧光定量 PCR 结果见表 4。

水平下变化较大,说明 DO 对系统内各类功能菌数量均存在影响。接种污泥样品(O)与其他样品相比,AOB 及 NOB 数量少 3~5 个数量级,且接种污泥中 ANAMMOX 数量在检测限以下。由于该单级自养脱氮系统接种污泥为城市污水处理厂曝气池中的好氧污泥及浓缩池中的厌氧污泥混合物,接种前在城市污水处理厂中没有强化进行相关脱氮功能的驯化,所以虽然含有 AOB 及 NOB,具备一定的脱氮效果,但 AOB、NOB 及 ANAMMOX 均不是接种污泥中的优势菌群,同时也说明经过驯化,本研究反应器中 AOB、NOB 及 ANAMMOX 数量均已大幅度提高,该单级自养脱氮系统已经成功建立。

AOB 在不同 DO 水平活性污泥及生物膜样品中的数量分布见图 3。AOB 在各 DO 水平样品中数量级从 10^9 到 10^{11} 不等。曝气 DO 为 2.5 mg/L 时,活性污泥样品 C 和生物膜样品 D 中数量与其他活性污泥与生物膜样品分别相比均最多,达到 1.98×10^{11}

表 4 污泥样品中各类细菌数量(细胞数/g 干污泥)

Table 4 Bacterial population in different samples (cells/g dried sludge)

Sample	AOB	NOB	ANAMMOX
O	4.92×10^6	1.05×10^5	ND*
A	1.88×10^{11}	1.19×10^9	1.04×10^{12}
B	1.90×10^{10}	7.62×10^8	2.66×10^{12}
C	1.98×10^{11}	2.48×10^9	7.38×10^{10}
D	2.62×10^{10}	8.40×10^8	6.30×10^{10}
E	1.34×10^9	3.07×10^8	2.78×10^{11}
F	1.20×10^9	5.31×10^7	4.22×10^{11}

*: Under the detection limit.

从表 4 可以看出,各类功能菌的数量在不同 DO

和 2.62×10^{10} 细胞数/g 干污泥, DO 为 1.0 mg/L 低浓度时样品 E 和 F 中数量最少, 分别为 1.34×10^9 和 1.20×10^9 细胞数/g 干污泥。相同 DO 水平下活性污泥样品与生物膜样品中, AOB 的数量也存在差异, 生物膜样品中 AOB 含量均低于活性污泥。这是因为 AOB 是一种典型的好氧细菌, 高 DO 利于其生理代谢; 相同 DO 水平下, 活性污泥及生物膜表层氧气充足, 氧传质阻力使得沿生物膜纵向深度 DO 越来越低, 加上生物膜外侧的反应器主体液相中, AOB 代谢基质氨氮充足, 为其生长提供了良好条件, 所以 AOB 倾向于生长在活性污泥和生物膜表层, 造成了相同 DO 水平下生物膜中 AOB 数量低于活性污泥。

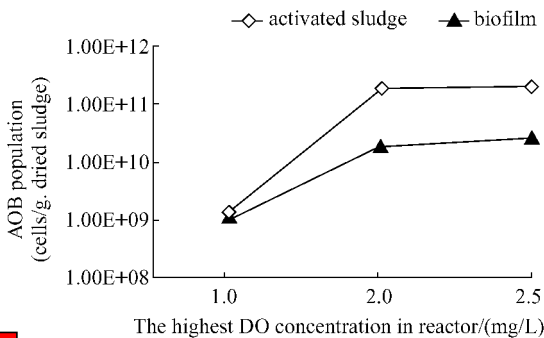


图3 DO与AOB数量关系图

Fig. 3 The relationship between DO and AOB population.

为达到一个稳定的自养脱氮效果, 通过调节控制参数, 使该单级自养脱氮反应器一直处于 NH_4^+ -N 氧化至 NO_2^- -N 阶段, 所以系统内 NOB 与 AOB 相比, 在相同 DO 水平下各样品中数量均少 1~2 个数量级, 非系统内优势功能菌。与 AOB 生理生化条件相似, NOB 也是典型的好氧菌, 所以 NOB 在各样品中数量上的差异与 AOB 具有一定的相似性: 相同 DO 水平条件下活性污泥样品中数量多于生物膜样品; DO 浓度越高的样品中 NOB 数量越多。图 4 中进一步可以看出, DO 从 1.0 mg/L 到 2.0 mg/L 变化时, DO 对 NOB 的影响显著, 无论是活性污泥样品还是生物膜样品, 细菌数量变化曲线斜率较大; 当 DO 继续升高到 2.5 mg/L 时, 这种影响对生物膜样品中 NOB 数量的显著性有所下降。

从数量级上比较, ANAMMOX 为系统内数量上最占优势的功能菌, 无论在何种 DO 水平下, 均比其他功能菌多几个数量级。与 AOB、NOB 不同, ANAMMOX 是一种严格的厌氧菌, 在 0.5%~2.0% 的空气饱和度下, 厌氧氨氧化菌的活性将被完全抑制^[14]。所以低 DO 条件下(样品 E、F)细菌数量高于高 DO 条件(样品 C、D)。在单级自养脱氮系统中,

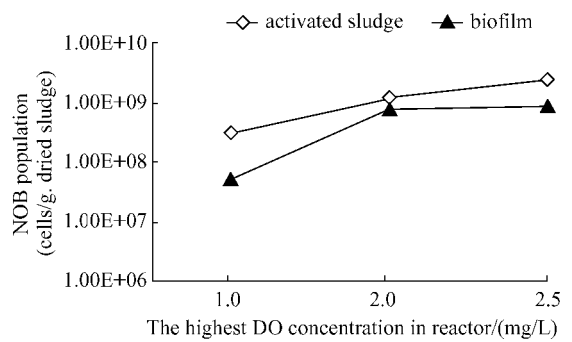


图4 DO与NOB数量关系图

Fig. 4 The relationship between DO and NOB population.

生物膜的氧传质阻力及生物膜内生长的各类好氧微生物对氧气的代谢作用, 使得生物膜内部处于厌氧状态, 从而为 ANAMMOX 提供了一个良好的生存环境, 也造成中低 DO 浓度下 (DO = 1.0 mg/L、2.0 mg/L) 生物膜样品中数量高于活性污泥样品。然而在高 DO 浓度时 (DO = 2.5 mg/L), 生物膜 ANAMMOX 数量比活性污泥略低, 这是 DO 由 2.0 mg/L 上升至 2.5 mg/L 的过程中, 一方面, 活性污泥中 NOB 细菌数量增加明显, NOB 增强了 DO 的利用能力, 将 DO 对 ANAMMOX 的冲击起到了一定缓冲效应, 造成 DO 对 ANAMMOX 的影响下降, 从而 ANAMMOX 数量虽有所下降但并不显著。而另一方面, 生物膜中的好氧细菌无论 AOB 还是 NOB, 数量均没有大幅增加(图 2、3), 生物膜内的氧传递能力增强, DO 已深入到膜内层, 使得膜内 ANAMMOX 数量大量降低。对 ANAMMOX 而言, DO = 2.5 mg/L 的状态下, 膜内膜外均已超出其正常代谢范围, 所以此时系统已缺乏了 ANAMMOX 所需的空间上的厌氧环境, 使得生物膜样品与活性污泥相比, 在 ANAMMOX 细菌数量上没有了优势。

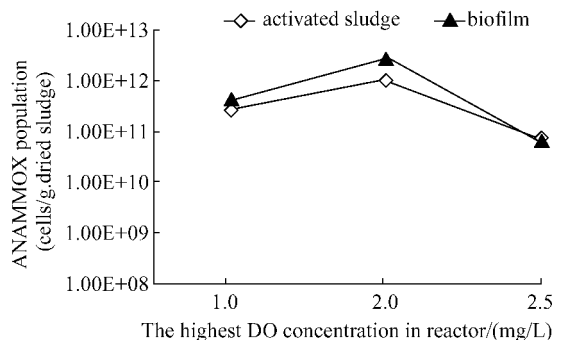


图5 DO与ANAMMOX数量关系图

Fig. 5 The relationship between DO and ANAMMOX population.

细菌数量最大值出现在运行效能最佳的工况: 由 DO 浓度样品 A、B 中。出现这一现象的原因笔者

认为:单级自养脱氮的实质是在同一反应器中实现氮的亚硝化与亚硝化产物以氨为电子供体的还原相偶联,其脱氮过程主要包括 2 步:第一步是在 AOB 及 NOB 的作用下,氮氮的亚硝化、硝化过程;第二步为在 ANAMMOX 的作用下,以剩余的氨氮为电子供体,以第一步生成的硝氮或亚硝氮为电子受体,将 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 NO_2^- 转变为 N_2 的生物氧化过程。ANAMMOX 属于厌氧类细菌,在高 DO 浓度水平下,DO 对 ANAMMOX 数量将会产生直接抑制。低 DO 浓度水平时,虽理论上 DO 越低越有利于其代谢,但此时系统中 AOB、NOB 数量较少,从而厌氧氨氧化反应的电子受体 NO_3^- 或 NO_2^- 浓度低,中断了 ANAMMOX 的正常代谢,间接影响了 ANAMMOX 数量。

3 讨论

单级自养脱氮反应器是一个复杂的系统,需要协调好系统内好氧菌及厌氧菌在不同 DO 水平上的矛盾才能使反应器获得较好的运行效能。DO 对单级自养脱氮系统功能菌的影响主要受以下原因综合作用的结果:(1)完成氨氮转化第一步的 AOB、NOB 好氧,氧气是该步反应的电子受体,因此反应器中 DO 浓度的大小会影响着这 2 类细菌的活性;(2)AOB 对有限 DO 的竞争能力强于 NOB;(3)ANAMMOX 菌是专性厌氧菌,反应器内较高的 DO 会抑制 ANAMMOX 菌的代谢;(4)当底物中同时含有 NO_3^- 、 NO_2^- 时, NO_2^- 是 ANAMMOX 的主要电子受体^[15],在低 DO 下可以节约供氧量及获得较高的亚硝酸盐积累(氨氮的亚硝化),进而使 ANAMMOX 有足够的代谢底物。

对比表 2 和表 4 相关数据,系统在 DO = 2.5/0.4 mg/L 浓度工况时,好氧菌 AOB 及 NOB 数量与其他工况相比都最多(样品 C、D),系统具有较高的氨氮氧化率。但同时由于系统 DO 浓度过高,使得最终完成 TN 去除的 ANAMMOX 数量和活性受到抑制,未被 AOB 氧化的剩余 NH_4^+ 不能较好地进行厌氧氨氧化过程,所以 TN 去除率并不高,仅为 60%,出水含有未反应完全的 NH_4^+ 、 NO_2^- 及 NO_3^- 。低 DO 浓度下(DO = 1.0/0.2 mg/L),AOB 及 NOB 数量最少(样品 E、F),系统的氨氮转化率最低,仅为 77%。但由于 ANAMMOX 在低 DO 下有较强活性,系统内剩余的 NH_4^+ 均发生了厌氧氨氧化反应,所以 TN 去除率与高 DO 水平下相比相差不大,为 56%。中浓度

(DO = 2.0/0.4 mg/L)时,系统宏观运行效能最佳,各类功能菌在此时构成一个协同代谢的稳定状态,系统出水 NH_4^+ 和 NO_2^- 都几乎为零,只有部分剩余的 NO_3^- 没有反应完全。样品 A、B 与其它 DO 水平样品相比,ANAMMOX 数量最大,由 AOB 氧化生成的 NO_2^- 及剩余 NH_4^+ 在 ANAMMOX 作用下全部发生反应,系统氨氮转化率及 TN 去除率分别可达到 100% 及 80%。

综合以上分析,自养脱氮的过程是各类微生物协同作用的结果,在不同阶段,起主要作用的微生物菌群不同。同时,与某阶段相对应的微生物数量不同,氮的相应转化程度也不同。因此,微生物的数量及种类就成了影响自养脱氮技术的关键因素,而 DO 又直接影响着系统中亚硝化菌、硝化菌和厌氧氨氧化菌的数量与活性。

4 结论

(1)与接种污泥相比,单级自养脱氮反应器内 AOB、NOB 及 ANAMMOX 数量大幅度提高,成为优势菌群,系统成功构建。

(2)高 DO 条件利于 AOB、NOB 生存,同时也将对 ANAMMOX 数量产生直接抑制,而低 DO 浓度水平时,由于缺乏厌氧氨氧化反应的电子受体 NO_3^- 或 NO_2^- ,也将间接影响 ANAMMOX 数量。相同 DO 水平下活性污泥中 AOB、NOB 数量多于生物膜。

(3)在本试验系统运行效能最佳条件下,ANAMMOX 数量最多,AOB、NOB 及 ANAMMOX 在此时构成一个协同代谢的稳定状态。ANAMMOX 是单级自养脱氮系统的最重要功能菌群。

参考文献

- [1] Ahn YH, Choi HC. Autotrophic nitrogen removal from sludge liquids in upflow sludge bed reactor with external aeration. *Process Biochemistry*, 2006, 41 (9): 1945 - 1950.
- [2] Dong X, Tollner EW. Evaluation of anammox and denitrification during anaerobic digestion of poultry manure. *Bioresource Technology*, 2003, 86 (2): 139 - 145.
- [3] Hao XD, Heijnen JJ, Van Loosdrecht MCM. Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 77 (3): 266 - 277.
- [4] Slikkers AO, Derworth N, Gomez JLC, et al. Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single

- [5] Third KA, Slikers AO, Kuenen JG, et al. The CANON (completely autotrophic nitrogen removal over nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24: 588 – 596.
- [6] Hippen A, Rosenwinkel KH, Baumgarten G, et al. Aerobic deammonification: a new experience in the treatment of wastewater. *Water Science Technology*, 1997, 35: 111 – 120.
- [7] 廖德祥, 李小明, 曾光明, 等. 单级 SBR 生物膜中全程自养脱氮的研究. *中国环境科学 (China Environmental Science)*, 2005, 25 (2): 222 – 225.
- [8] Helmer C, Tromm C, Hippen A, et al. Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems. *Water Science Technology*, 2001, 43 (1): 311 – 320.
- [9] 李光伟, 刘和, 张峰. 荧光定量 PCR 监测五氯酚对好氧颗粒污泥和活性污泥中氨氧化细菌数量的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47 (1): 136 – 140.
- [10] Hebe MD, Alice CL, Gerda H, et al. Quantification of nitrosomonas oligotropha-Like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (1): 245 – 253.
- [11] Ikuo T, Tomonori K, Satoshi O, et al. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research*, 2007, 41: 785 – 794.
- [12] Hermansson A, Lindgren PE. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by Real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (2): 972 – 976.
- [13] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002, 276 – 279.
- [14] Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM. Key physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (7): 3248 – 3250.
- [15] Van de Graaf AA, Mulder A, Peter de Bruijn, et al. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61 (4): 1246 – 1255.

Quantification of functional bacteria in one-step completely autotrophic nitrogen removal process influenced by dissolved oxygen

Yu Qin, Fang Fang, Jinsong Guo^{*}, Guohong Yang, Li Dong

(Key Laboratory of the Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

Abstract: [Objective] To study the influence of dissolved oxygen (DO) on bacterial population in a one-step autotrophic nitrogen removal process and to improve the system operation. [Methods] Ammonia oxidizing bacteria (AOB), nitrite oxidizing bacteria (NOB) and anaerobic ammonium oxidizing bacteria (ANAMMOX) were amplified directly from the one-step completely autotrophic nitrogen removal reactor by using the specific PCR primers. The purified PCR products were cloned into T-vector and identified as the target fragments of AOB, NOB and ANAMMOX by sequencing. Recombined plasmid was used as standard molecule sample in Real-time PCR for quantification. [Results] High DO was beneficial to AOB and NOB. The population of both AOB and NOB were higher in activated sludge than biofilm samples. High DO had the directly influence on ANAMMOX population whereas low DO had the inhibitory effect of ANAMMOX activity if the system was lack of NO_3^- and NO_2^- . [Conclusion] DO of 2.0 (aeration)/ 0.4 (non-aeration) mg/L was the best operation concentration. Meanwhile, ANAMMOX population reached the peak in this condition and AOB, NOB as well as ANAMMOX composes of a steady co-metabolisms system.

Keywords: one-step completely autotrophic nitrogen removal; Real-time PCR; AOB; NOB; ANAMMOX

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (50608071), Key Grant Project of Chinese Ministry of Education (308020) and Chongqing University Postgraduates' Science and Innovation Fund (200811A1A0120301)

^{*} Corresponding author. Fax: +86-23-65127370; E-mail: guo0768@126.com

Received: 23 January 2009/Revised: 12 March 2009

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>