



文章栏目: 水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.201907043

中图分类号 X703.1

文献标识码 A

姚仁达, 苑泉, 王凯军. 底物流加-间歇运行方式下氨氧化细菌富集培养的效果及影响因素分析[J]. 环境工程学报, 2020, 14(4): 925-934.

YAO Renda, YUAN Quan, WANG Kaijun. Analysis on the effect of ammonia-oxidizing bacteria enrichment and its influence factors under the substrate continuous feeding in a sequencing batch reactor[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(4): 925-934.

底物流加-间歇运行方式下氨氧化细菌富集培养的效果及影响因素分析

姚仁达, 苑泉, 王凯军*

清华大学环境学院, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084

第一作者: 姚仁达(1985—), 女, 博士, 助理研究员。研究方向: 水污染控制理论与技术。E-mail: yaorenda@163.com

*通信作者: 王凯军(1960—), 男, 博士, 教授。研究方向: 水污染控制与资源化。E-mail: wkj@tsinghua.edu.cn

摘要 富集培养氨氧化细菌(AOB)可为污水处理工艺提高氨氮氧化速率、促进亚硝酸盐积累提供物质基础。在(20±2)℃下,采用底物流加-间歇运行方式进行氨氧化细菌富集培养,重点考察了游离氨(FA)、游离亚硝酸(FNA)、溶解氧(DO)等因素的影响,并对富集前后活性污泥样品中的AOB进行了定性定量分析。结果表明:第15天左右AOB增殖进入稳定生长期,比氨氮氧化速率由接种时的4.45 mg·(g·h)⁻¹升高至57.22 mg·(g·h)⁻¹;通过pH、底物流加速率和实际反应速率关系的联合控制,可以实现整个反应过程中FA和FNA在预期范围内波动;即使在极低的DO条件下,高纯度的AOB也可进行氨氮氧化。高通量测序结果表明,体系内*Nitrosomonas*属的AOB大幅度增长,可由0.23%上升至54.18%,亚硝酸盐氧化细菌(NO₂-OB)的生长得到了有效抑制,培养结束时仅为0.12%。荧光定量PCR对AOB功能基因*amoA*的绝对含量结果表明,富集前后平均拷贝数由2.67×10⁵ copies·g⁻¹升至最大,可达9.67×10⁹ copies·g⁻¹,AOB成为活性污泥中的优势菌。本研究结果可为常温条件下快速富集AOB提供参考。

关键词 底物流加-间歇运行;氨氧化细菌;比氨氮氧化速率;游离氨;游离亚硝酸;溶解氧;定性定量

短程硝化技术较现行污水处理厂普遍应用的传统全程硝化技术具有显著的经济优势,对于活性污泥工艺处理普遍面临的低碳氮比(COD/N)污水具有可持续发展意义^[1-2]。短程硝化即通过氨氧化细菌(AOB)的作用将氨氮氧化为亚硝酸盐,由亚硝酸盐氧化细菌(NO₂-OB)将亚硝酸盐进一步氧化为硝酸盐,通过以上2步过程完成全程硝化^[2]。有研究表明,通过调节运行参数可以实现亚硝酸盐积累,如采用较低的溶解氧(DO)、高温、调节pH从而实现较高的游离氨(FA)或游离亚硝酸(FNA)浓度等。李培根等^[3]在DO约0.3 mg·L⁻¹,pH为8.0的条件下,采用序批式反应器(SBR)成功实现短程硝化。ZHENG等^[4]将DO、温度和pH分别控制在0.4~0.6 mg·L⁻¹、35℃和8~8.2,在无纺布生物转盘反应器内实现同步短程硝化、厌氧氨氧化和反硝化过程。SAUDER等^[5]的研究表明,在21~33℃时,温度升高可提高亚硝酸盐积累的程度。此外,DURAN等^[6]采用完全混合反应器

收稿日期: 2019-07-09; 录用日期: 2019-10-25

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07102-003, 2017ZX07103-003)

(CSTR)进行了短程硝化,在pH为7.1~8.5进行调节,控制FA低于 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、FNA高于 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然而实际中的低温地区或时节的大型污水处理厂若长期通过加热设备实现温度控制,或通过投加碱以提高pH所需费用较高,控制DO的实现亚硝酸盐积累具有实际可行性。虽然已证实采用低DO可以实现亚硝酸盐积累,但是氨氮氧化速率随着DO的降低也会随之下降^[7-9]。

活性污泥生物污水处理工艺中功能菌的比例直接影响生物降解速率^[7,10]。著名的生物添加强化技术(BABE)正是基于此原理,通过在污水处理工艺的侧流反应器培养硝化细菌,将侧流中富含硝化细菌的污泥回流于主流工艺,从而强化主流工艺的硝化能力^[11-12]。此外,已有研究表明,载体挂膜、细胞固定化等方式也可以实现增加反应器内的目标功能菌的目标。ANTILEO等^[9]采用内有纺织材料载体的生物转盘反应器,将DO控制 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下,通过pH控制以及在氨氮氧化完成时停止曝气的运行策略,实现AOB的优势增长,长期实验结果表明亚硝酸盐积累率稳定维持在84%~88%。徐浩等^[13]的研究结果表明,添加立体弹性填料的序批式生物膜反应器(SBBR)利于AOB菌种的富集,亚硝酸盐积累率达到90%以上。DANIEL等^[14]证实了固定化载体利于AOB菌体附着其上,促进亚硝酸盐积累的形成。因此,为加速在低DO条件下实现亚硝酸盐积累的同时实现较高的氨氮氧化速率,向主流工艺中投加AOB,以实现其相对于NOB的菌群优势,从而强化氨氮氧化至亚硝酸盐的能力,具有重要的现实意义。

在水污染控制领域,生物反应器通常采用连续流或间歇运行方式。已有研究^[15-16]采用此2种运行方式,在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的温度条件下,实现了AOB的富集培养,历时1个月至数月。本研究在常温($20\text{ }^{\circ}\text{C}$)条件下,采用底物流加-间歇运行方式进行AOB富集培养,探讨了pH、FA、FNA、DO等因素对其的影响,并对富集过程中AOB进行了定性和定量分析,为常温快速富集高纯度的AOB提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验装置和原水

采用全自动发酵罐(BLBIO-5GJ,上海百仑生物科技有限公司,中国)为SBR,有效容积为4L,如图1所示。DO、pH和温度电极实时监测反应液的DO浓度、pH和温度;以 $50\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌,使反应液与活性污泥完全混合;温度调节装置自动调节至预期温度($20\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$);空气通过微孔曝气头均匀曝气,气体流量计控制曝气量;采用反应器自带的蠕动泵用于向反应器内补充氨氧化反应底物 NH_4^+ (NH_4Cl),流量为 $21\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$;另一蠕动泵根据设定的pH自动补充溶液($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{ }200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)作为碱液和无机碳源;取样口用于加培养液、虹吸排水和取样。

接种污泥取自北京高碑店污水处理厂A²/O工艺回流污泥。原水采用人工配水,由高浓度基础培养液和自来水配制成预期浓度,基础培养液具体组成成分为 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{ }7.02\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\text{ }2.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CaCl}_2\text{ }1.20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\text{ }2.00\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。微量元素: $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}\text{ }0.50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}\text{ }0.50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}\text{ }0.40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}\text{ }0.40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}\text{ }0.20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2 实验方法

采用底物流加-间歇运行方式^[17-18],每个周期具体为4个阶段:加培养液、反应、污泥沉淀和

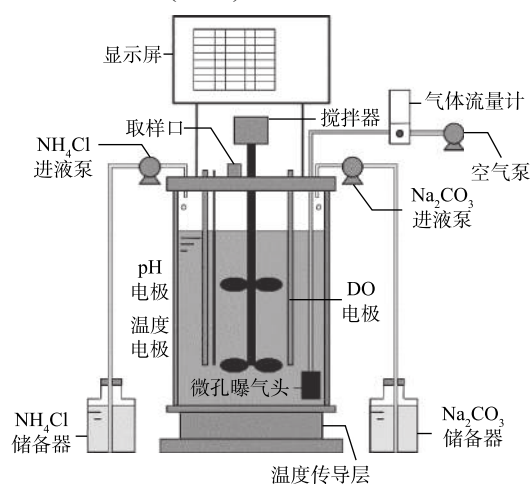


图1 全自动发酵罐示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the fermenter

排水。培养时间为 18 d, 其中第 1~7 天每天 1 周期 (22 h), 第 8 天开始每天 2 周期 (8 h 和 12 h), 共运行 18 天、29 周期。具体步骤为: 将自来水与计算好体积的基础培养液加入反应器, 使得反应液初始浓度为 $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4^+\text{-N}$ (视情况添加), $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ PO}_4^{3-}\text{-P}$, $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 微量元素; 打开搅拌器、温度控制器、pH 调节器、DO 检测器、曝气装置和 NH_4C 进液泵, 开始反应, 预先配制底物和碱溶液于原液储备器中, 根据前一周期的底物反应速率, 适当调整本周期的底物流加速率; 反应结束, 停止搅拌、温度控制、pH 调节、曝气、底物流加和补碱装置; 虹吸排水以确保下一周期培养液添加前剩余液体体积小于 4 L, 并视亚硝酸盐积累程度进行“污泥清洗”。采用此运行方式须在反应开始和结束时进行取样。

通过调节反应液的 pH, 控制底物流加速率和实际反应速率的关系, 以实现体系内预期氨氮和亚硝酸盐浓度范围及预期的 FA 和 FNA 浓度, 考察了 pH、FA、FNA 对 AOB 富集的影响, 并结合污泥浓度以及采用不同 DO 浓度考察生物量及 DO 对反应速率的影响。

1.3 测定方法

在进行化学分析前, 样品首先采用中速定性滤纸进行过滤。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度采用分光光度法测定, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度采用离子色谱法测定, 污泥浓度 (MLSS)、挥发性悬浮固体浓度 (MLVSS) 等按照国家环保总局规定的标准方法^[19] 测定。

游离氨 (FA) 和游离亚硝酸 (FNA) 浓度^[20] 根据公式 (1) 和式 (2) 进行计算。

$$C_{\text{FA}} = \frac{17}{14} \times \frac{C_{\text{NH}_4^+} 10^{\text{pH}}}{e^{6.344/(273+T)} + 10^{\text{pH}}} \quad (1)$$

$$C_{\text{FNA}} = \frac{46}{14} \times \frac{C_{\text{NO}_2^-}}{e^{-2.300/(273+T)} 10^{\text{pH}}} \quad (2)$$

式中: C_{FA} 为游离氨浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; C_{FNA} 为游离亚硝酸浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $C_{\text{NH}_4^+}$ 为氨氮浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $C_{\text{NO}_2^-}$ 为亚硝酸盐浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; T 为温度, $^{\circ}\text{C}$ 。

底物流加-间歇运行方式的每个周期氨氮氧化速率和底物原液储备器中底物质量^[17-18, 21] 分别采用式 (3) 和式 (4) 进行计算。

$$v_{\text{NH}_4^+} = \frac{C_{\text{T,NH}_4^+} + v_{\text{A,NH}_4^+} t - C_{\text{R,NH}_4^+}}{t} \quad (3)$$

式中: $v_{\text{NH}_4^+}$ 为每个周期氨氮氧化速率, $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$; $C_{\text{T,NH}_4^+}$ 为每个周期初始氨氮浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $v_{\text{A,NH}_4^+}$ 为每个周期氨氮流加速率, $\text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$; $C_{\text{R,NH}_4^+}$ 为每个周期反应结束氨氮浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; t 为每个周期氨氮流加时间也即反应时间, h。

$$m = \frac{v_{\text{A,NH}_4^+} t S V}{100} \quad (4)$$

式中: m 为每个周期所用 NH_4Cl 的总质量, g; V 为反应液体积, L; S 为计算基准值, 本研究取 0.382 g , 即 $0.382 \text{ g NH}_4\text{Cl}$ 为 1 L 反应液提供氨氮浓度 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

每个周期亚硝酸盐积累率根据每周期反应开始和结束时亚硝酸盐和硝酸盐浓度生成量^[16] 进行计算, 计算方法见式 (5)。

$$\eta = \frac{C_{\text{R,NO}_2^-} - C_{\text{T,NO}_2^-}}{(C_{\text{R,NO}_2^-} - C_{\text{T,NO}_2^-}) + (C_{\text{R,NO}_3^-} - C_{\text{T,NO}_3^-})} \times 100\% \quad (5)$$

式中: η 为每个周期亚硝酸盐积累率; $C_{\text{T,NO}_2^-}$ 为每个周期初始亚硝酸盐浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $C_{\text{R,NO}_2^-}$ 为每个周期结束亚硝酸盐浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $C_{\text{T,NO}_3^-}$ 为每个周期初始硝酸盐浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $C_{\text{R,NO}_3^-}$ 为每个周期结束硝酸盐浓度, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.4 扫描电镜

采用扫描电镜观察 AOB 富集培养前后的污泥中细菌的形态。制样步骤如下：在 4 ℃ 下，使用戊二醇浸泡样品 2 h 以上，以固定细胞；吸出戊二醇固定液，加入去离子水浸泡样品数分钟；加入去离子水再浸泡 2 次；再分别加入 50%、70%、85%、95% 和 100% 乙醇浸泡；之后将样品置于纸包中进行临界点干燥，完成后取出样品并粘至金属台上，喷金处理；最后，在扫描电镜 (SU8010, 日立公司, 日本) 下进行观察。

1.5 高通量测序

取污泥样品进行 DNA 提取、PCR 扩增 (V3~V4)、琼脂糖凝胶电泳、DNA 纯化，采用 Illumina Miseq03 测序平台进行 16S rRNA 高通量测序 (生工生物工程股份有限公司, 上海)。对结果进行过滤处理，得到优化序列。在 97% 相似度水平下进行操作分类单元 (OTU) 聚类分析，研究结果用于描述不同微生物群落在污泥中的丰度，明确了主要物种的比例。相应序列的原始数据存储于 NCBI 数据库中 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA563303>)，编号为 SRR10064655、SRR10064654、SRR10064653 和 SRR10064652 (BioProject ID: PRJNA563303; BioSample 编号: SAMN12675027, SAMN12675028, SAMN12675029, SAMN12675030)。

1.6 荧光定量 PCR

采用荧光定量 PCR 法检测污泥样品中 *amoA* 基因的绝对含量 (生工生物工程股份有限公司, 上海)。引物序列为 *amoA*-1F: GGGGTTTCTACTGGTGGT 和 *amoA*-2R: CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC。PCR 反应体系: 模板 DNA 0.5 μL; 引物 F (10 μmol·L⁻¹ 0.5 μL; 引物 R (10 μmol·L⁻¹) 0.5 μL; dNTP (10 mmol·L⁻¹) 0.5 μL; Taq Buffer (10×) 2.5 μL; MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 2 μL; Taq 酶 (5 U·μL⁻¹) 0.2 μL; H₂O 18.3 μL。反应条件: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s; 57 ℃ 退火 30 s; 72 ℃ 延伸 30 s; 72 ℃ 修复延伸 8 min; 35 个循环。PCR 产物回收后进行克隆测序和定量质粒信息，DNA 样品稀释 50 倍后上机进行荧光定量 PCR 检测，得到平均拷贝数。

2 结果与讨论

2.1 FA 和 FNA 浓度对 NOB 的抑制

根据式 (1) 和式 (2)，在一定温度下，反应体系的 pH、NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 浓度影响 FA 和 FNA 浓度。先前研究证实，控制 FA 和 FNA 浓度是实现 NOB 抑制的有效方式，AOB 对所能承受的 FA 和 FNA 的抑制浓度均高于 NOB。有研究^[22-23]表明，4~6 mg·L⁻¹ FA 可有效抑制 NOB 的生长，16 mg·L⁻¹ FA 未对 AOB 产生明显的抑制。对于 FNA 的抑制作用，有研究^[22, 24]表明，其对 NOB 和 AOB 的抑制浓度分别为 0.02 mg·L⁻¹ 和 0.10 mg·L⁻¹，且达到 0.40 mg·L⁻¹ 时，对 AOB 的抑制作用严重。此外，AOB 和 NOB 各有其适宜生长的 pH 范围，有研究^[25-26]表明，适宜 AOB 和 NOB 生长的 pH 分别为 7.0~8.5 和 6.0~7.5。

本研究通过调节反应液的 pH、控制底物流加速率和实际反应速率的关系，以实现体系内预期 NH₄⁺-N 和 NO₂⁻-N 浓度范围和预期的 FA 和 FNA 浓度，考察 pH、FA、FNA 变化对 AOB 富集的影响。AOB 富集过程中每周期开始和结束时 NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 的浓度变化如图 2(a) 所示。根据式 (1) 和式 (2)，温度以 20 ℃ 计，结合反应体系内的 pH 波动范围 (设定为 ±0.1)，计算得出每周期开始和结束时体系内的 FA 和 FNA 浓度，结果如图 2(b) 和图 2(c) 所示。结果表明，在整个培养过程中，各周期反应体系内每一时刻的 FA 浓度基本保持在 3~8 mg·L⁻¹；随着氨氮氧化能力的增强，每周期结束时体系内积累的 NO₂⁻-N 浓度逐渐升高，因此，体系内 FNA 浓度逐渐升高，各周期 FNA 的浓度基本保持在 0.15 mg·L⁻¹ 以下，这符合先前已得到的对 NOB 产生抑制的浓度，且低于对 AOB 活性产生抑制的浓度。此外，通过在适宜 AOB 生长的 pH 范围内调节反应体系的 pH，且随着 AOB 富集

的进行，在保证 FA 和 FNA 浓度未对 AOB 活性产生抑制的前提下，灵活调节 pH，使其逐渐降低至近 7.5，更接近于实际污水的 pH。然而，降低 pH 会导致 FNA 升高，因此，可以通过缩短每周期的反应时间以减少周期反应结束时亚硝酸盐积累量，从而防止 FNA 对 AOB 活性产生抑制。

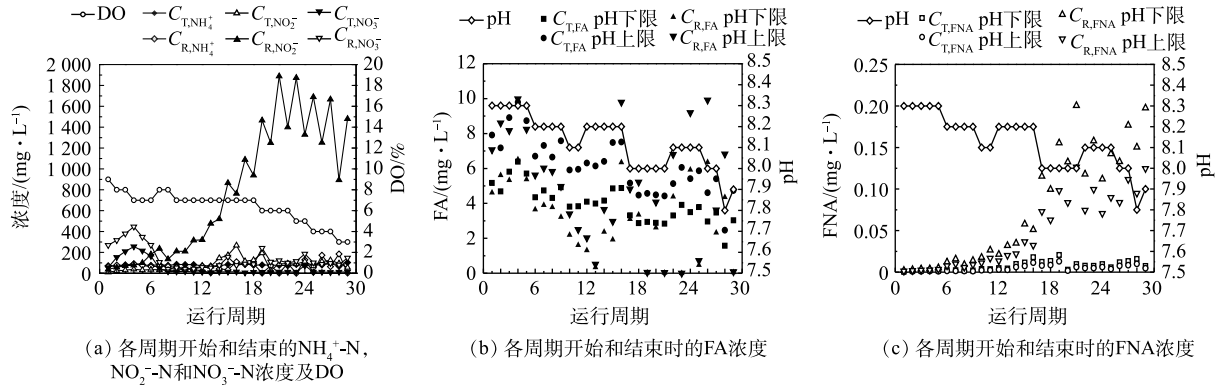


图 2 FA 和 FNA 浓度调节及低 DO 环境

Fig. 2 Regulation on FA and FNA concentrations at low DO conditions

2.2 AOB 富集过程中的比氨氮氧化速率

根据图 2(a) 各周期初始 NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 浓度，反应结束 NH₄⁺-N、NO₂⁻-N 和 NO₃⁻-N 浓度，采用式 (3) 和式 (5) 计算各周期的氨氮氧化速率和亚硝酸盐积累率，考察 AOB 富集培养效果，结果如图 3 所示。约从第 9 天(第 10 周期)开始，AOB 生长进入对数生长期，氨氮氧化速率由约 15 mg·(L·h)⁻¹ 大幅升高，在第 15 天(第 22 周期)达到最高，约为 180 mg·(L·h)⁻¹。与此同时，亚硝酸盐积累率逐渐升高至 90% 左右。在第 1、10、20、29 周期，氨氮氧化速率分别达到 12.35、21.39、160.89、148.40 mg·(L·h)⁻¹；污泥的 MLSS 分别为 (4 414±92)、(5 441±211)、(6 008±162)、(4 583±51) mg·L⁻¹；MLVSS 分别为 (2 776±48)、(2 836±174)、(2 812±48)、(2 725±79) mg·L⁻¹。结合 MLVSS 计算比氨氮氧化速率，得出比氨氮氧化速率分别为 4.45、7.54、57.22、54.46 mg·(g·h)⁻¹。这表明活性污泥的生物量对 AOB 富集具有一定影响，保证较高的生物量对其快速富集具有积极意义。

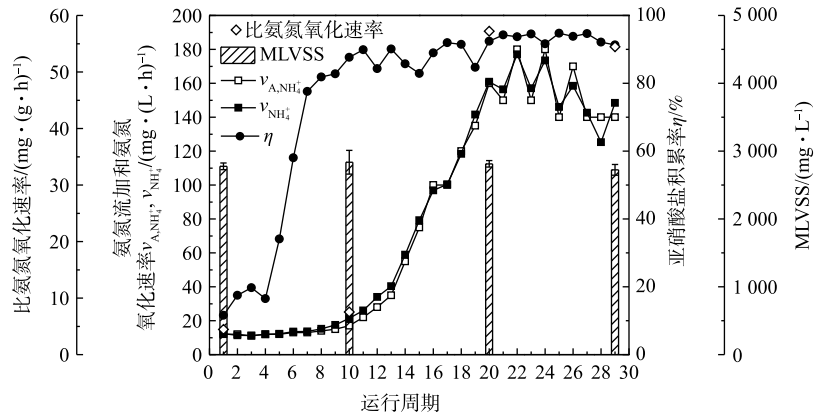


图 3 AOB 富集培养期间比氨氮氧化速率和亚硝酸盐积累率

Fig. 3 Specific ammonia oxidation rate and nitrite accumulation ratio during the AOB enrichment period

2.3 DO 浓度对氨氮氧化速率的影响

已有研究^[7-9]证实，采用低 DO 可以实现亚硝酸盐积累，但是氨氮氧化速率随着 DO 降低也会随之下降。由图 2(a) 可知，因室内曝气机所能提供的 DO 有限(若需提高 DO，可采用室外大型曝气机^[18])，在培养后期，体系内的 DO 已达到了极限(波动范围为±2%)，仅为 0.2~0.4 mg·L⁻¹，但仍可

以实现较高的氨氮氧化速率。

在 AOB 富集过程中, 本研究采用间歇运行方式对 DO 的影响进行分析, 结果如图 4 所示。由图 4 可知, DO 浓度由 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右降低至 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, 对于相同的初始氨氮浓度, 在低 DO 的条件下, 氨氮氧化完全的历时较长, 因此, 氨氮氧化速率的确有所降低。然而在极低的 DO 条件下, 因 AOB 的大量富集, 仍可以实现高氨氮氧化速率。ANTILEO 等^[9] 的实验结果表明, 当 DO 浓度分别为 1.0 、 0.8 和 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 氨氮氧化速率呈降低的趋势, 分别为 0.10 、 0.04 、 $0.03 \text{ kg}(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$ 。WANG 等^[27] 的研究结果同样表明, 在 DO 分别为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 最大氨氮氧化速率增长约为 50%。

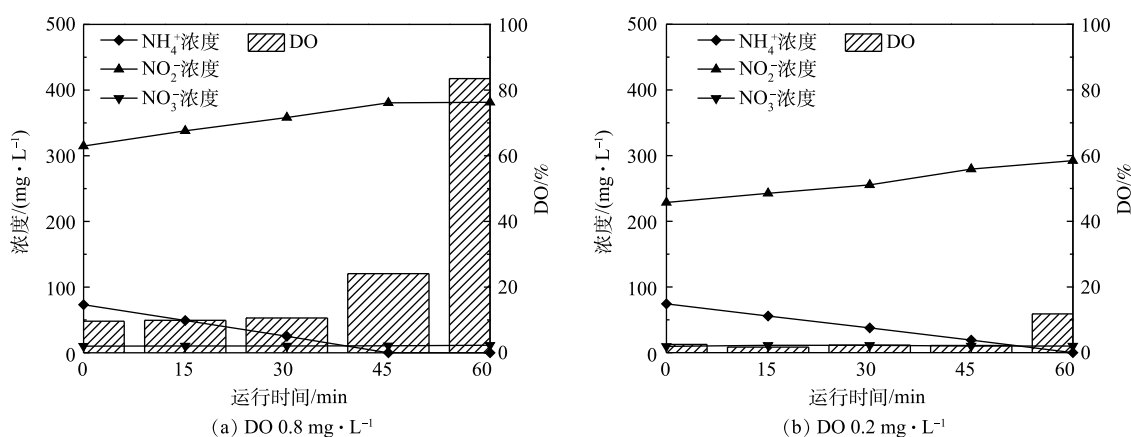


图 4 DO 浓度对氨氮氧化速率的影响

Fig. 4 Effects of DO concentrations on the ammonia oxidation rate

2.4 定性分析微生物的种群分布

《伯杰氏细菌鉴定手册》中将 AOB 分为 5 个属, 分别为亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)、亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*)、亚硝化螺菌属 (*Nitrospira*)、亚硝化弧菌属 (*Nitrosovibrio*) 和亚硝化叶菌属 (*Nitrosolobus*); 将 NOB 分为 4 个属, 分别为硝化杆菌属 (*Nitrobacter*)、硝化球菌属 (*Nitrococcus*)、硝化刺菌属 (*Nitrospina*) 和硝化螺菌属 (*Nitrospira*)。有研究^[28-29] 表明, 在污水处理厂经常出现的 AOB 主要是 *Nitrosomonas* 和 *Nitrospira*; 经常出现的 NOB 主要是 *Nitrobacter* 和 *Nitrospira*^[30]。图 5 为属水平高通量测序结果, yrd1_1、yrd1_2、yrd1_3 和 yrd1_4 分别为接种、富集培养第 9、15 和 18 天的污泥样品。接种污泥中微生物多样性较高, 因 AOB 大量增殖, 故随着 AOB 逐渐富集, 其他细菌被淘洗出反应器, 污泥中微生物多样性则随之降低。接种污泥 *Nitrosomonas* 的比例仅为 0.23%, 随着 AOB 富集的进行, 在第 9、15 和 18 天, 其比例逐渐上升至 5.9%、51.61% 和 54.18%。从第 9~15 天增幅较大, 结合图 3 的结果, 原因为此期间 AOB 生长进入对数期。与 *Nitrosomonas* 属 AOB 相比, *Nitrospira* 属的 NOB 一直处于非常低的水平, 最高值仅为 1.7%, 最终比例仅为 0.12%, 并未完全淘洗出反应器。上述结果表明, AOB 在富集培养期间大量生长, 与反应器接近 $180 \text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ 的高氨氮氧化速率相符。此外, 有研究^[31] 已证实, 采用含有机物的实际污水也可以成功培养 *Nitrosomonas* 属的 AOB, 因此, 有机物的存在不是 AOB 富集的限制因素。

此外, AOB 形态多样, 包括球状、杆状、螺旋状等, 不同属的形态有所差异, 已证实 *Nitrosomonas* 属的 AOB 为杆状或椭球状, *Nitrospira* 属的 AOB 为螺旋状^[32]。本研究通过扫描电镜观察污泥样品中细菌的形态结构, 如图 6 所示, 富集培养后存在大量具有椭球状特征的细菌。

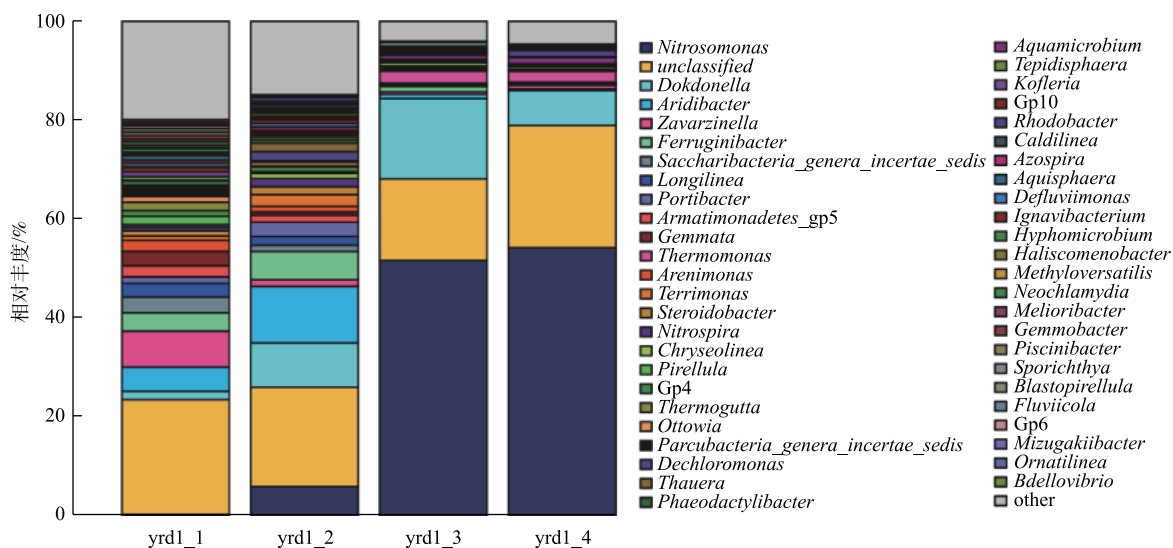
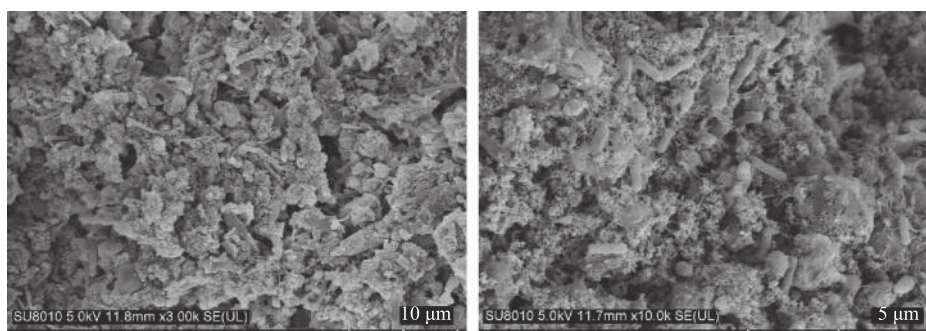


图 5 属水平高通量测序结果

Fig. 5 Results of gene sequencing at the genus level



(a) 接种污泥样品

(b) 第18天的污泥样品

图 6 扫描电镜微生物形态分析

Fig. 6 Microbial morphology analysis by scanning electron microscopy

2.5 定量分析 AOB 富集效果

采用荧光定量 PCR 技术对 AOB 富集各阶段的污泥样品进行检测分析，以通过数量变化考察 AOB 的生长状况，结果如表 1 所示。*amoA* 基因是 AOB 的特征序列，随着 AOB 富集的进行，可以看出活性污泥中 *amoA* 基因平均拷贝数显著增加。DNA 提取时采用 200 mg 污泥样品，按照 60 μL 进行洗脱得到 DNA 溶液，荧光定量 PCR 检测上机时 DNA 稀释 50 倍，反应体系加 1 μL DNA 模板。因此，换算得出 *amoA* 基因平均拷贝数在接种、富集培养第 9、15 和 18 天分别为 2.67×10^5 、 4.24×10^8 、 9.67×10^9 、 7.30×10^9 copies·g⁻¹。

结合比氨氮氧化速率(图 3)和 AOB 群落占活性污泥中的比例(图 5)的结果，比氨氮氧化速率、AOB 在活性污泥中的比例和功能基因数量等几个方面均可证实，AOB 群落得到了高度增殖，逐渐成为活性污泥中的优势菌属。

表 1 *amoA* 基因平均拷贝数

Table 1 Average copy number of gene *amoA* for AOB

样品	平均C _t 值	平均拷贝数/(copies·g ⁻¹)
接种污泥	32.238 64	17.799 9
第9天污泥	21.602 48	28 254.01
第15天污泥	17.185 25	644 733.5
第18天污泥	17.511 69	486 618

3 结论

1) 在适宜 AOB 生长的 pH 范围内, 调节反应体系内的 pH, 结合底物流加速率和实际反应速率关系的联合控制, 实现了整个反应过程中预期的 FA 和 FNA 水平, 以抑制 NOB 生长, 而未对 AOB 活性产生抑制。在确保实现合理 FA 和 FNA 浓度范围的前提下, 逐渐降低体系内的 pH, 至接近实际污水的 pH 范围, 使得富集得到的 AOB 更利于实际应用。

2) 低 DO 导致氨氮氧化速率降低, 体系内高纯度的 AOB 可以确保在极低 DO 条件下, 氨氮氧化速率维持在较高水平。

3) 综合比氨氮氧化速率指标、高通量测序定性分析活性污泥中 AOB 的比例以及荧光定量 PCR 检测其功能基因 *amoA* 的平均拷贝数, 可以看出 AOB 的数量在富集期间大幅度增加。

参考文献

- [1] HOSSEINLOU D, SARTAJ M, DELATOLLA R. Simultaneous anaerobic oxidation/partial nitrification-denitrification for cost-effective and efficient removal of organic carbon and nitrogen from highly polluted streams[J]. *Environmental Technology*, 2019, 40(16): 2114-2126.
- [2] RUIZ G, JEISON D, CHAMY R. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration[J]. *Water Research*, 2003, 37(6): 1371-1377.
- [3] 李培根, 王宇佳, 胡筱敏. 低DO与化学控制相结合的半亚硝化运行[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(4): 2170-2176.
- [4] ZHENG Z M, HUANG S, BIAN W, et al. Enhanced nitrogen removal of the simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) biofilm reactor for treating mainstream wastewater under low dissolved oxygen (DO) concentration[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 283: 213-220.
- [5] SAUDER L A, ALBERTSEN M, ENGEL K, et al. Cultivation and characterization of *Candidatus Nitrosocosmicus* exaquare, an ammonia-oxidizing archaeon from a municipal wastewater treatment system[J]. *ISME Journal*, 2017, 11(5): 1142-1157.
- [6] DURAN U, VAL DEL RIO A, CAMPOS J L, et al. Enhanced ammonia removal at room temperature by pH controlled partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation[J]. *Environmental Technology*, 2014, 35(4): 383-390.
- [7] YAN J, HU Y Y. Partial nitrification to nitrite for treating ammonium-rich organic wastewater by immobilized biomass system[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(8): 2341-2347.
- [8] WANG L K, ZENG G M, YANG Z H, et al. Operation of partial nitrification to nitrite of landfill leachate and its performance with respect to different oxygen conditions[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 87: 62-68.
- [9] ANTILEO C, WERNER A, CIUDAD G, et al. Novel operational strategy for partial nitrification to nitrite in a sequencing batch rotating disk reactor[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 32(2): 69-78.
- [10] JOHNSON D R, LEE T K, PARK J, et al. The functional and taxonomic richness of wastewater treatment plant microbial communities are associated with each other and with ambient nitrogen and carbon availability[J]. *Environmental Microbiology*,

- 2015, 17(12): 4851-4860.
- [11] SALEM S, BERENDS D H J G, HEIJNEN J, et al. Bio-augmentation by nitrification with return sludge[J]. *Water Research*, 2003, 37(8): 1794-1804.
- [12] BERENDS D, SALEM S, VAN DER ROEST H F, et al. Boosting nitrification with the BABE technology[J]. *Water Science and Technology*, 2005, 52(4): 63-70.
- [13] 徐浩, 李捷, 罗凡, 等. 低C/N比城市污水短程硝化特性及微生物种群分布[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(3): 1477-1481.
- [14] DANIEL L M, POZZI E, FORESTI E, et al. Removal of ammonium via simultaneous nitrification-denitrification nitrite-shortcut in a single packed-bed batch reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(3): 1100-1107.
- [15] TERADA A, SUGAWARA S, YAMAMOTO T, et al. Physiological characteristics of predominant ammonia-oxidizing bacteria enriched from bioreactors with different influent supply regimes[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 79: 153-161.
- [16] 章正勇, 陈旭, 安立超. 氨氧化细菌富集培养的实验研究[J]. *化学与生物工程*, 2007, 24(7): 63-67.
- [17] YAO R D, YANG H, YU M Y, et al. Enrichment of ammonia-oxidizing bacteria and microbial diversity analysis by high-throughput sequencing[J]. *Journal of Residuals Science and Technology*, 2017, 14(1): 77-84.
- [18] 姚仁达. 氨氧化和硝化细菌菌群筛选与富集培养及其固定化研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2017.
- [19] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [20] 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.
- [21] YAO R D, YANG H, YU M Y, et al. Enrichment of nitrifying bacteria and microbial diversity analysis by high-throughput sequencing[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(115): 113959-113966.
- [22] VADIVELU V M, KELLER J, YUAN Z. Free ammonia and free nitrous acid inhibition on the anabolic and catabolic processes of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*[J]. *Water Science and Technology*, 2007, 56(7): 89-97.
- [23] BAE W, BAEK S, CHUNG J, et al. Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors[J]. *Biodegradation*, 2001, 12(5): 359-366.
- [24] VADIVELU V M, KELLER J, YUAN Z. Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 95(5): 830-839.
- [25] 王淑莹, 李论, 李凌云, 等. 快速启动短程硝化过程起始pH值对亚硝酸盐积累的影响[J]. *北京工业大学学报*, 2011, 37(7): 1067-1072.
- [26] 孙振世, 柯强, 陈英旭. SBR生物脱氮机理及其影响因素[J]. *中国沼气*, 2001, 19(2): 16-19.
- [27] WANG J L, YANG N. Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(10):

1223-1229.

- [28] SIRIPONG S, RITTMANN B E. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants[J]. *Water Research*, 2007, 41(5): 1110-1120.
- [29] WANG X H, WEN X H, CRIDDLE C, et al. Community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of eight wastewater treatment systems[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(4): 627-634.
- [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] 于莉芳, 陈青青, 杨晋, 等. 污泥水富集硝化菌的群落结构及动力学参数研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(7): 2035-2039.
- [32] 郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
(本文编辑: 曲娜, 郑晓梅, 张利田)

Analysis on the effect of ammonia-oxidizing bacteria enrichment and its influence factors under the substrate continuous feeding in a sequencing batch reactor

YAO Renda, YUAN Quan, WANG Kaijun*

State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China

*Corresponding author, E-mail: wkj@tsinghua.edu.cn

Abstract The enriched ammonia-oxidizing bacteria (AOB) was added into wastewater treatment systems, which could provide the foundation for promoting the ammonia oxidation and nitrite accumulation. AOB was enriched in a sequencing batch reactor (SBR) with continuous feeding of ammonia at the temperature of (20 ± 2) °C, and the effects of free ammonia (FA), free nitrous acid (FNA) and dissolved oxygen (DO) were evaluated, and the identification and quantification analysis of AOB was also performed in the sludge samples before and after the enrichment. The results indicated that the AOB reached the growth stability period around day 15, and the specific ammonia oxidation rate increased from $4.45 \text{ mg}\cdot(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}$ at inoculation stage to a maximum level of $57.22 \text{ mg}\cdot(\text{g}\cdot\text{h})^{-1}$. The expected FA and FNA concentrations could be controlled systematically with the regulation on pH and the relationship between the substrate continuous feeding rate and the real reaction rate. Even at very low DO conditions, ammonia could be oxidized by AOB with high ratio. High-throughput sequencing demonstrated that AOB affiliated to *Nitrosomonas* was highly enriched, and increased from 0.23% to 54.18%. The nitrite-oxidizing bacteria (NOB) growth was inhibited, and only remained 0.12% at the end of cultivation. The copy number of gene *amoA* for AOB increased from $2.67\times 10^5 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ to a maximum value of $9.67\times 10^9 \text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ during the enrichment period by quantitative real-time fluorescence polymerase chain reaction (qPCR), and AOB became the predominated bacteria in the cultivated sludge. This work can guide rapid enrichment of AOB at normal temperature.

Keywords continuous feeding of substrate in a sequencing batch reactor; ammonia-oxidizing bacteria; specific ammonia oxidation rate; free ammonia; free nitrous acid; dissolved oxygen; identification and quantification