

A nammox 反应器的启动及其菌群演变的研究

胡宝兰¹, 郑平¹, 胡安辉¹, 周尚兴², 丁革胜²

(1. 浙江大学环境工程系, 杭州 310029; 2. 浙江蜜蜂集团, 义乌 322002)

摘要: 为了研究工艺条件对反应器内微生物多样性的影响, 该论文采用城市污水处理厂活性污泥接种, 通过培育硝化污泥, 进行了启动厌氧氨氧化(A nammox)反应器的试验, 并对启动过程中细菌的多样性变化作了跟踪研究。研究表明, 以好氧活性污泥作为接种物, 可成功地培育硝化生物膜; 通过反应器运行条件的控制, 硝化生物膜可从进行好氧氨氧化反应过渡到进行厌氧氨氧化反应。在此过程中, 异养型细菌的数量大幅度下降, 硝化细菌、反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌的数量增大, 推测它们都与厌氧氨氧化作用有关。运用 PCR-DGGE 技术证明, 随着反应器运行时间的延长, 菌群发生明显变化并呈现简化趋势。

关键词: 硝化; 厌氧氨氧化; 细菌多样性; DGGE

中图分类号: X703.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2005)07-0107-04

胡宝兰, 郑平, 胡安辉, 等. A nammox 反应器的启动及其菌群演变的研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(7): 107- 110

Hu Baolan, Zheng Ping, Hu Anhui, et al. Start-up of anammox reactor and evolution of bacterial colonies[J]. Transactions of the CSAE, 2005, 21(7): 107- 110 (in Chinese with English abstract)

0 引言

随着工农业生产的发展和人民生活水平的提高, 特别是随着各种“菜篮子工程”的实施, 中国果蔬种植、鱼贝水产和畜禽养殖迅猛扩张, 含氮有机物的排放量急剧增加。氮素污染所致的水体富营养化触目惊心, 湖泊“水华”及近海“赤潮”时有发生, 越演越烈。水体富营养化已危害农业、渔业、旅游业等诸多行业, 并对饮水卫生和食品安全构成巨大威胁^[1]。

对于氮素污染的治理, 生物脱氮是最为经济有效的治理技术。厌氧氨氧化(A naerobic ammonia oxidation, A nammox)是在厌氧氨氧化菌的作用下以氨(NH₄⁺)为电子供体, 亚硝酸盐(NO₂⁻)为电子受体, 生成N₂的生物反应。由于厌氧氨氧化过程能同时去除氨和亚硝酸盐, 且无需外加有机碳源, 与传统的脱氮工艺相比节省40%的运行费用, 因此, 在环境工程上具有较高的开发价值^[1-3]。但是, 由于厌氧氨氧化菌生长缓慢, 倍增时间长达11 d^[4], 菌体扩增成了该工艺进一步开发的瓶颈。

厌氧氨氧化(A nammox)反应器的启动过程实质上是厌氧氨氧化菌的活化和扩增过程, 对装置投入正常工作举足轻重。探明启动过程中菌群的动态变化, 无疑有助于采取适当措施, 促进厌氧氨氧化菌生长, 提高反应器效能。本文拟通过对A nammox反应器的启动过程及

其生物种群演变规律的研究, 搞清工艺条件对反应器内微生物多样性的影响, 为设计和操作提供依据。

1 材料与方法

1.1 接种污泥与实验装置

原始接种污泥取自某污水处理厂曝气池的好氧活性污泥, 部分污泥性状为: TSS(总悬浮固体)39.87 g/L, VSS(挥发性悬浮固体)15.6 g/L, VSS/TSS 39.12%, pH 6.94。

试验所用的反应器由玻璃制成, 总容积2.0 L, 有效容积1.7 L。反应器内充以软性填料作为活性污泥附着生长的介质, 污泥接种量1000 mL。进水采用污泥压滤液, 由蠕动泵泵入反应器底部。整个反应器以黑布包裹, 以避免光对厌氧氨氧化菌的抑制作用。反应器置于30℃恒温室中连续运行。A nammox反应器的装置与流程如图1所示。

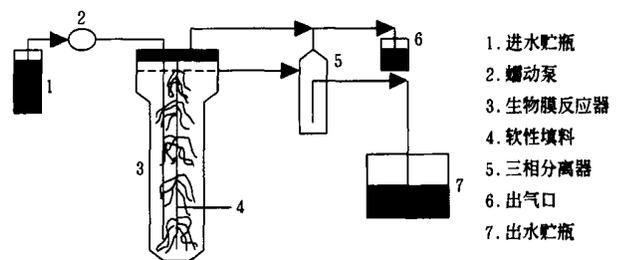


图1 厌氧氨氧化反应器系统

Fig. 1 A nammox biofilm reactor system

1.2 反应器的启动与运行

将好氧活性污泥接种于反应器中, 用曝气头充氧, 通过调节污泥压滤液NH₄⁺-N浓度来富集培养硝化细菌。在生物膜反应器内富集一定量的硝化细菌后, 停止曝气, 用橡皮塞密封反应器, 并用氩气驱除基质中的溶解氧(DO), 使其转变为厌氧状态。然后, 调节污泥压滤

收稿日期: 2004-07-04 修订日期: 2005-05-16

基金项目: 国家自然科学基金(30070017); 浙江省重大攻关项目(2003C13005)

作者简介: 胡宝兰(1972-), 女, 浙江东阳人, 讲师, 博士生, 主要从事环境微生物学的教学和研究工作。杭州 浙江大学环境工程系, 310029。Email: blhu@zju.edu.cn

通讯作者: 郑平(1962-), 男, 浙江金华人, 教授, 博士生导师, 主要从事废水生物处理与环境微生物的教学和研究工作。杭州 浙江大学华家池校区环境工程系, 310029。Email: pzheng@zju.edu.cn

液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度比 (1:1~1:3), 启动 Anammox 反应器。

1.3 四个相关菌群的 MPN (最大可能数) 法计数

Anammox 细菌培养基^[5]: 参照 Van de Graaf 的配方 (g/L), KHCO_3 1.25; NaH_2PO_4 0.05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3; 微量元素 2 mL, 另加 10 mmol/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 10 mmol/L $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 。试管装液量 10 mL/管。以杜氏小管产生气泡作为阳性的判据。

反硝化菌培养基^[6]: 采用酒石酸钾钠硝酸盐培养基, 试管装液量 10 mL/管。以杜氏小管产生气泡或 Griess 反应显现红色作为阳性的判据。

硝化菌培养基^[4]: 参照 Van de Graaf 的配方 (g/L), 另加 30 mmol/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 。试管装液量 5 mL/管。以 Griess 反应显现红色或浓 H_2SO_4 -二苯胺反应显现蓝色作为阳性的判据。

异养菌培养基^[7]: 采用葡萄糖牛肉膏蛋白胨培养基, 试管装液量 10 mL/管。以培养液变为浑浊或出现菌膜作为阳性的判据。

1.4 微生物种群多样性检测

1) DNA 抽提

从反应器中取出污泥, 用 HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸)/ KHCO_3 ($75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}/5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 缓冲液清洗 3 次, 去除残留基质, 用玻璃匀浆器破碎污泥菌胶团, 再用 HEPES/ KHCO_3 缓冲液浸泡。用 K717 试剂盒提取, 方法参照供货商说明。

2) PCR 扩增

采用 PCR (聚合磷酸酶链式反应) 对 DNA 提取物进行扩增, 所用的反应体系为 50 μL 体系 (缓冲液 5 μL ; Mg^{2+} 溶液 3 μL ; dNTP 4 μL ; 正向引物 3 μL ; 反向引物 3 μL ; 模板 3 μL ; Taq 酶液 0.6 μL ; 重蒸水 28.4 μL 。

PCR 扩增所用的通用引物对为: 338F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') 和 518R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')^[8]; PCR 扩增的条件: 94 5 min; 94 1 min; 53 1 min; 72 2 min; 30 个循环 72 5 min。

3) 变性梯度凝胶电泳

先将耐高温玻璃板洗净晾干, 再用酒精擦净制胶面, 然后进行如下操作。

1) 制胶: 用聚丙烯酰胺胶体, 制作 0.75 mm 厚, 16 cm \times 10 cm 的胶板。采用浓度为 10% 聚丙烯酰胺变性梯度胶, 其内添加 10% APS (过硫酸铵) 80 μL , TEMED (N,N,N,N-四甲基乙二胺) 溶液 15 μL 。设定的变性剂浓度梯度范围为 33.8%~50.0%。(变性聚丙烯酰胺含 7 mol/L 尿素和 40% (v/v) 甲酰胺)。

2) 点样: 将 15~20 μL 加样缓冲液与 30 μL PCR 扩增物混合后, 点样。

3) 电泳: 在温度 60 和电压 155 V 的条件下, 于 1 \times TAE 缓冲液中电泳 330 min (注意保持缓冲液的液面介于 "Running" 和 "Max" 之间)。

4) 染色: 用 10% 乙酸固定 20 min; 1% HNO_3 浸泡 10 min (准确定时), 固定 DNA; 用蒸馏水冲洗三次, 5 min/次; 500 μL 甲醛/1000 mL 0.2% AgNO_3 , 在暗室内用摇床振荡 20 min; 用双蒸水洗涤 10 s 后取出; 250 μL 甲醛/1000 mL 2.5% Na_2CO_3 显色, 直至看清条带; 在蒸馏水中浸泡漂洗。

5) 成像: 使用 BIO-RAD 公司的专用拍照软件成像。

1.5 测试项目与方法

- 1) $\text{NH}_4^+\text{-N}$: 水杨酸-次氯酸盐光度法^[9]。
- 2) $\text{NO}_2^-\text{-N}$: N-(1-萘基)-乙二胺光度法^[9]。
- 3) TSS 和 VSS: 重量法^[9]。
- 4) pH: pHS-9v 型酸度计。

2 结果与分析

2.1 硝化污泥的富集培育

硝化工艺多用于城市污水厂的脱氮处理, 城市污水中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度不高, 通常为 30~50 mg/L 。然而, 厌氧氨氧化工艺的特色则在于它能处理高浓度含氮废水。因此, 以城市污水厂活性污泥作为接种物富集硝化污泥时, 应使培养物能够耐受较高的氨浓度。鉴于这种情况, 本文直接采用实际废水 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度为 50~140 mg/L) 运行生物反应器, 进行硝化细菌的培育。在水力停留时间 (HRT) 为 1 d 的条件下, 运行初期, 氨氮去除率波动较大; 运行 9 d 后, 氨氮去除率稳定在 95% 以上 (图 2)。运行至第 10 d, 反应器容积氨氮负荷达 130.96 $\text{mg/L} \cdot \text{d}$, 容积氨氮去除率达 130.19 $\text{mg/L} \cdot \text{d}$ (图 3), 氨氮去除率达 99%, 出水氨氮浓度为 0.77 mg/L (图 2)。经过 20 多天的培养, 反应器效能稳定, 生物膜逐渐成熟。由此推断, 反应器中的硝化细菌得到活化和富集。

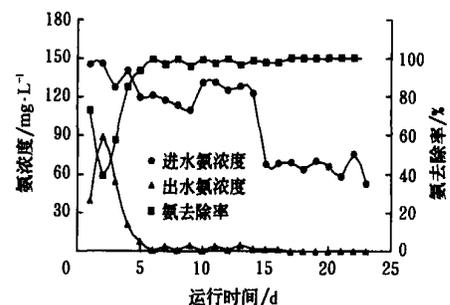


图 2 富集培育硝化污泥阶段反应器运行性能
Fig. 2 Reactor performance during cultivation of nitrifying sludge

2.2 Anammox 反应器的启动运行

业已研究证明, 一些好氧氨氧化菌具有基质多样性和代谢多样性, 它们不仅能利用氨和氧进行硝化作用 (好氧氨氧化), 也能利用氢和有机物进行反硝化作用, 特别值得一提的是, 它们还能利用氨进行硝酸盐的还原 (即厌氧氨氧化)^[10]。鉴于此, 本课题拟通过反应器运行条件的控制, 即首先启动好氧的硝化反应器, 培育好硝

化污泥, 然后将反应器由好氧运行转变成厌氧运行, 使反应器内以硝化反应为主逐渐转变为以厌氧氨氧化反应为主。在转变初期, 氨氮和亚硝氮的去除率均不稳定。运行到 17d~ 22d, 氨氮和亚硝氮去除率大幅度降低, 但随后迅速升高并稳定在较高的水平。在整个启动运行期间, 氨氮和亚硝氮的平均去除率分别为 88.02% 和 90.53% (图 4 和图 5)。

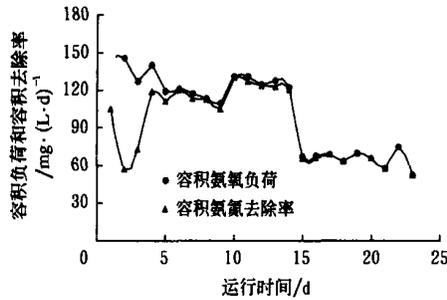


图 3 富集培育硝化污泥阶段反应器容积效率
Fig 3 Volumetric efficiency of reactor during cultivation of nitrifying sludge

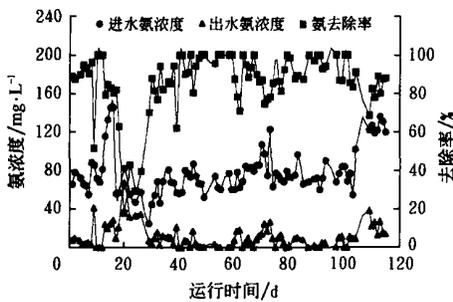


图 4 启动厌氧氨氧化后反应器的氨去除性能
Fig 4 Ammonia removal performance of reactor during anaerobic ammonia oxidation

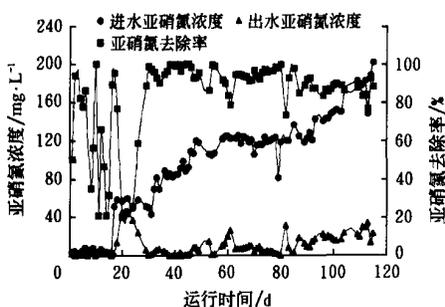


图 5 启动厌氧氨氧化后反应器的亚硝氮去除性能
Fig 5 Nitrite removal performance of reactor during anaerobic ammonia oxidation

氨氮与亚硝氮的同时消失是厌氧氨氧化的重要特性, 可作为厌氧氨氧化的重要判据^[1]。在 A nammox 反应器启动初期, 测得的平均氨氮和亚硝氮去除比为 1.002, 且没有明显的规律, 说明厌氧氨氧化还没有成为反应器中的主导反应。运行 30 d 以后, 氨氮和亚硝氮去除比提高到 1.09~1.4, 处于文献报道的特征值 1.1 (1.2 ± 0.2) 范围内^[4], 说明厌氧氨氧化已成为反应器中主导反应。此时观察到, 生物膜由原来的黑褐色渐变为浅红色, 且随着运行时间的延长, 红色逐渐加深,

这与厌氧氨氧化菌含有丰富的细胞色素 c 而呈红色相吻合^[11]。

2.3 反应器中细菌种群数量的检测

为了了解反应器启动过程中的微生物动态变化, 在几个转型期, 对反应器内的代表性细菌种群数量进行了检测。由表 1 结果可知, 接种污泥投入反应器后, 随着反应器启动过程的推进, 异养菌的数量逐渐降低, 在培育硝化污泥阶段, 由 1.1×10^9 个/mL 降至 9.5×10^7 个/mL, 在厌氧氨氧化阶段, 继续从 9.5×10^7 个/mL 降至 4.5×10^6 个/mL。在整个运行过程中, 硝化细菌虽有增加, 但增幅不大。在培育硝化污泥阶段, 反硝化细菌增加一倍, 从 1.5×10^5 个/mL 提高到 3.0×10^5 个/mL, 在厌氧氨氧化阶段, 反硝化细菌继续增加一个数量级, 从 3.0×10^5 个/mL 提高到 2.5×10^6 个/mL。在接种污泥中, 没有检出厌氧氨氧化菌, 通过培育硝化污泥阶段, 厌氧氨氧化菌数量由 0 增加到 0.3×10^3 个/mL, 再经厌氧氨氧化阶段, 厌氧氨氧化菌数量增加到 0.4×10^3 个/mL。在所检测的 4 个菌群中, 除异养菌外, 其它 3 个菌群都显示了增加的趋势。综合考虑启动进程和菌群变化, 推测后 3 个菌群都与厌氧氨氧化作用有关。

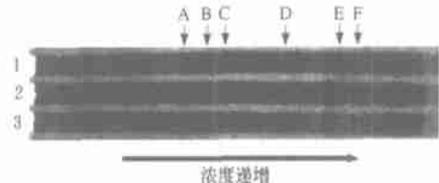
表 1 不同运行时期四个菌群的数量检测结果

Table 1 Measured results of the number of four bacterial colonies in different operational phases

反应器运行阶段	异养菌	硝化细菌	反硝化细菌	A nammox 菌
培育硝化污泥	1.1×10^9	3.0×10^6	1.5×10^5	0
A nammox 启动成功	9.5×10^7	4.5×10^6	3.0×10^5	0.3×10^3
A nammox 稳态运行	4.5×10^6	7.5×10^6	2.5×10^6	0.4×10^3

2.4 反应器中种群多样性的检测

本课题采用 PCR-DGGE (聚合酶链反应-变性梯度胶电泳) 技术, 以细菌通用引物, 对 A nammox 反应器系统中的种群多样性进行了监测。对刚完成启动 (图 6 条带 1)、完成启动后运行 3.5 个月 (图 6 条带 2) 和运行 7 个月 (图 6 条带 3) 的 A nammox 污泥所做的分析结果表明, 随着反应器运行过程的延长, 其中的菌群发生明显的变化, 具有箭头 A 和 D 所指的条带特征的菌群得到有效富集, 而具有箭头 B、C、E 和 F 所指的条带特征的菌群则渐遭淘汰, 菌群组成呈现简化的趋势。



条带 1: 刚完成厌氧氨氧化启动
条带 2: 完成启动后运行 3 个半月
条带 3: 完成启动后运行 7 个月
箭头: 有明显变化的泳带

图 6 A nammox 反应器内 DNA 的 PCR-DGGE 分析
Fig 6 PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) analysis of the DNA from anammox reactor

3 结论与讨论

采用城市污水处理厂的好氧活性污泥作为接种物,可成功地培育硝化生物膜;通过对反应器运行条件的控制,硝化生物膜可从进行好氧氨氧化反应过渡到进行厌氧氨氧化反应。

从生物反应器开始运行到硝化生物膜培育成熟,再由硝化反应转变为厌氧氨氧化反应的过程中,异养型细菌的数量大幅度下降,硝化细菌、反硝化细菌和厌氧氨氧化细菌的数量均有不同程度的增加,这些菌群数量的增加与反应器效能的提高相吻合,推测它们都与厌氧氨氧化作用有关。

运用 PCR-DGGE 技术,对厌氧氨氧化反应器系统中的细菌种群变化进行了跟踪研究。结果表明,随着反应器运行时间的延长,菌群发生明显变化并呈现简化趋势。

[参 考 文 献]

- [1] 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,2004:61-71
- [2] Mulder A, Van de Graaf A A, Robertson A, et al Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor[J] FEMS Microbiol Ecol, 1995, 16: 177-183
- [3] Christian F, Marc B, Philipp H 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

- [4] Strous M, Heijnen J J, Kuenen J G, et al The sequencing batch reactor as a powerful tool to study very slowly growing microorganisms [J] Applied and Environmental Microbiology, 1998, 50(5): 589-596
- [5] Van de Graaf A A, Mulder A, Bruijn P D, et al Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process [J] Appl Environ Microbiol, 1995, 61(4): 1246-1251
- [5] Nicolaisen M H, Ramming N B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria [J] Journal of Microbiological Methods, 2002, 50: 189-203
- [6] 陈绍铭,郑福寿 水生微生物学实验法[M] 北京:海洋出版社,1985:227-238
- [7] 钱存柔,黄仪秀 微生物学实验[M] 北京:北京大学出版社,1999:251-267
- [8] Zhang D, Liu Y P, Xu H, et al DGGE Analysis of 16S rDNA of nitrifying bacteria in OLAND biological N removal system [J] Biotechnology, 2003, 13(5): 1-5
- [9] 国家环保局 水和废水监测分析方法(第三版)[M] 北京:中国环境科学出版社,1989
- [10] Bock E, Schmidt I, Stüven R. 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
- [11] Jetten M S M, Strous M, van de Pas-Schoonen K T, et al The anaerobic oxidation of ammonium [J] FEMS Microbiology Reviews, 1999, 22: 421-437

Start-up of anammox reactor and evolution of bacterial colonies

Hu Baolan¹, Zheng Ping¹, Hu Anhui¹, Zhou Shangxing², Ding Gesheng²

(1. Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Zhejiang Meng Group Co. Ltd, Yiwu 322002, China)

Abstract The nitrification biofilm was cultivated with the activated sludge from municipal wastewater treatment plant. Under controlled conditions the nitrification biofilm was successfully transferred from nitrification to anaerobic ammonia oxidation (Anammox). During the whole process the number of heterotrophic bacteria decreased, but the number of nitrifying bacteria, denitrifying bacteria and anammox bacteria increased. The increase of three bacterial colonies was supposed to relate to anammox. The result from PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) analysis showed that the bacterial colonies obviously changed and the bacterial biodiversity became poorer as the operation time of the anammox bio-reactor went on.

Key words: nitrification; anaerobic ammonia oxidation (Anammox); bacterial biodiversity; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)