



文章栏目：水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.202203196 中图分类号 X703.1 文献标识码 A

康沛伦, 李俊达, 叶晟祺, 等. 不同阳离子和碳氮比对反硝化性能及亚硝酸盐氮积累的影响[J]. 环境工程学报, 2022, 16(8): 2540-2548.  
[KANG Peilun, LI Junda, YE Shengqi, et al. Effects of different cations and C/N on denitrification performance and nitrite accumulation[J].  
Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(8): 2540-2548.]

## 不同阳离子和碳氮比对反硝化性能及亚硝酸盐氮积累的影响

康沛伦<sup>1</sup>, 李俊达<sup>1</sup>, 叶晟祺<sup>1</sup>, 陈泽彬<sup>1</sup>, 黄博创<sup>1</sup>, 崔理华<sup>1</sup>, 余光伟<sup>1,2</sup>, 梁瑜海<sup>1,2,✉</sup>

1. 华南农业大学资源环境学院, 广东省农业农村污染治理与环境安全重点实验室, 广州 510642; 2. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广州 510642

**摘要** 在序批式反应器(SBR)中, 采用乙酸钠为碳源, 通过硝酸钠和硝酸钙的交替投加、微量元素的投加以及碳氮比(COD/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)的改变, 探究了不同控制条件对反硝化性能及NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N积累的影响, 并分析了反应器中微生物种群演替特征。结果表明, 在以乙酸钠为碳源的SBR中, Ca<sup>2+</sup>浓度过高会抑制反硝化。以NaNO<sub>3</sub>为NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N来源时, 硝酸盐氮还原率维持在50%左右; 相同条件下, 以Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>为NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N来源时, 硝酸盐氮还原率仅有20%。反应器中补充适量磷元素后, 硝酸盐氮还原率提高至62%, 同时有少量的亚硝酸盐氮积累。当C/N比提高为4后, 硝酸盐氮还原率大于98%, 长期运行下亚硝酸盐氮积累率平均为83.8%。高通量测序分析结果表明, 变形菌门和拟杆菌门在系统中占主导地位。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N积累的关键功能菌属是Thauera菌属, 其最高占比为17.25%。以Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>为NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N来源时, Thauera菌属占比仅为0.14%。以上研究结果为短程反硝化的快速启动和稳定运行提供参考。

**关键词** 短程反硝化; 阳离子; 碳氮比; 微生物种群

大量含氮废水的排放会造成水体富营养化现象。从成本和去除效果考虑, 生物脱氮是公认的最佳脱氮方法<sup>[1-3]</sup>。厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, Anammox)工艺可以解决传统硝化反硝化存在的剩余污泥产量高、碳源和能源消耗等问题<sup>[4]</sup>。在缺氧条件下, 厌氧氨氧化菌利用亚硝酸盐氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)为电子受体, 将氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)转化为氮气, 其具有节约碳源、能耗和污泥产量少等优点<sup>[5-6]</sup>。在与Anammox组合的工艺中, 如何高效稳定地获取NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N是工艺运行的关键。短程硝化<sup>[7-8]</sup>、短程反硝化(partial denitrification, PD)<sup>[9]</sup>工艺等可为厌氧氨氧化工艺提供NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N。从反应路径和节省物耗能耗等方面来讲, 短程硝化是提供亚硝酸盐氮的最佳方法。但其在实际应用中抑制亚硝酸盐氧化菌(nitrite oxidizing bacteria, NOB)难度大, 控制要求高, 很难高效稳定的实现NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N积累<sup>[4,10-13]</sup>。

PD工艺是指通过调控相关条件, 将全程反硝化(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N→NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N→NO→N<sub>2</sub>O→N<sub>2</sub>)控制在NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N阶段<sup>[14]</sup>。PD工艺的关键在于以NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N为产物的反硝化菌属的富集<sup>[15-16]</sup>。目前影响PD工艺NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N

收稿日期: 2022-03-30; 录用日期: 2022-07-14

基金项目: 广东省自然科学基金-面上项目(2021A1515010904); 国家自然科学基金资助项目(51708229); 广东省科技计划项目(2021B1212040008)

第一作者: 康沛伦(1997—), 男, 硕士研究生, 13160619179@163.com; ✉通信作者: 梁瑜海(1986—), 男, 博士, 讲师, liangyuhai@scau.edu.cn

积累的主要因素有 C/N、pH、反应时间、反应器类型、碳源类型以及温度等。CAO 等<sup>[17]</sup> 在长期运行研究中发现, 上流式厌氧污泥床反应器的亚硝酸盐积累率 (nitrite accumulation rate, NAR) 仅为 51.0%, 而序批式反应器 (sequencing batch reactor, SBR) 中的 NAR 稳定高于 80%。袁怡等以乙酸钠为唯一碳源进行研究, 发现高 NAR 通常发生在低 C/N 条件下。DU 等<sup>[18]</sup> 发现, C/N 对高 NAR 的短程反硝化污泥影响不大, 认为系统富集的 *Thauera* 菌是只能还原  $\text{NO}_3^-$ -N 为  $\text{NO}_2^-$ -N 的短程反硝化菌。基于此, 不少研究者均实现了稳定的亚硝酸盐氮累积率<sup>[19-22]</sup>。在 PD 工艺的研究中, 既有以硝酸钠作为  $\text{NO}_3^-$ -N 来源<sup>[23-24]</sup>, 也有以硝酸钙作为  $\text{NO}_3^-$ -N 来源<sup>[25-26]</sup>, 但两者对 PD 快速启动以及微生物变化的影响却鲜有报道。此外, 关于磷元素添加对 PD 工艺的反硝化性能及微生物种群的影响也需进一步研究。

因此, 本研究以乙酸钠为碳源, 在 SBR 中通过硝酸钠和硝酸钙的交替投加、微量元素的投加量以及 C/N 比的改变, 考察了不同条件对反硝化的性能及  $\text{NO}_2^-$ -N 积累的影响, 并分析了反应器微生物种群演替特征, 以期对短程反硝化的快速启动及稳定运行提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验装置与运行

本研究采用容积为 40 L 的圆柱形塑料容器 (敞口) 为反应器, 有效容积为 30 L。采用 2 个蠕动泵分别进行加水和排水, 并通过电动搅拌器进行搅拌。实验在缺氧的条件下运行, 温度为 25~30 °C。本实验共运行 111 d, 分为表 1 中所示的 4 个阶段。每天需进行 2 次洗泥, 用蠕动泵抽排上清液至 10 L, 再用自来水冲洗底泥, 加水至 30 L, 打开搅拌机 30 s, 后静置沉淀 10 min, 再重复 1 次上述步骤。随后运行 1 个周期, 1 个周期包括进水 (15 min)、反应 (表 1)、沉淀 (30 min)、排水 (15 min)、闲置 5 个阶段。反应时间为搅拌时间, 闲置时间为结束反应后至隔天洗泥前, 根据进水硝酸盐氮还原率 (nitrate reduction rate, NRR) 以及亚硝酸盐氮积累率 (nitrite accumulation rate, NAR) 的改变而改变, 在前者几乎完全还原的基础上, 后者累积达到最大时, 停止搅拌。在搅拌开始后 2 min 和结束后 2 min 取水样测定  $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N, 并测定温度、pH。

表 1 短程反硝化 SBR 运行阶段

Table 1 Operation stage of partial denitrification SBR

阶段	时间/d	反应时间/min	COD/N	换水比/%
I	1~36	360	3	70
II	37~61	480	3	70
III	62~76	480	3	70
	77~80	480	4	70
IV	81~84	120~300	4	70
	85~111	70	4	70

### 1.2 实验用水与实验接种污泥

实验用水采用人工配水, 主要成分是以硝酸钠 (阶段 I、III 和 IV)、硝酸钙 (只阶段 II) 和无水乙酸钠配制的  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NO}_3^-$ -N 以及  $300\sim 400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 COD; 其他组分如下所示:  $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (阶段 III、IV)。本实验 SBR 反应器接种泥为城市污水厂的污泥经短暂驯化后的反硝化污泥, 污泥质量浓度为  $9.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。阶段 I 结束时测得污泥质量浓度为  $1.40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 在阶段 II~IV, 控制污泥质量浓度在  $1.40\sim 1.60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 1.3 典型周期实验

在 PD 启动成功后 (阶段 IV) 进行 1 次典型周期实验。在第 0、30、75、90、105、135、195、255 和 315 min 取水样, 测定  $\text{NO}_3^-$ -N、COD 和  $\text{NO}_2^-$ -N。其他实验条件与长期实验中阶段 IV 相同。

### 1.4 污泥的微生物特征分析

在前 3 个阶段的最后一天 (第 36、61、76 天) 以及阶段 IV 稳定运行 8 d 时 (第 85 天) 从反应器中采集污泥样品, 编号分别为 P1、P2、P3 和 P4。测序工作由上海生工生物工程股份有限公司负责进

行, 测序方法见文献<sup>[27]</sup>。

### 1.5 分析方法和计算方法

整个实验过程每天取进、出水样进行检测, 采用N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定 $\text{NO}_2^-$ -N, 采用紫外分光光度法测定 $\text{NO}_3^-$ -N, 采用多参数便携式水质分析仪(WTW Multi 3630 IDS)测定温度和pH, 采用连华科技多参数水质测定仪(5B-6C)进行测定。COD为校准值, 因为 $\text{NO}_2^-$ -N对COD测定贡献为 $1.14 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (以 $\text{COD}/\text{NO}_2^-$ -N计)<sup>[28]</sup>; 硝酸盐氮还原率(NRR)、亚硝酸盐氮积累率(NAR)根据文献<sup>[21]</sup>计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同条件下反硝化性能的比较

1) 硝酸钠和硝酸钙为 $\text{NO}_3^-$ -N来源对反硝化性能影响的对比。如图1(a)所示, 阶段I和II中 $\text{NO}_3^-$ -N来源分别为 $\text{NaNO}_3$ 以及 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ -N质量浓度为 $(100 \pm 5) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。接种污泥前1~6 d, 反应后 $\text{NO}_3^-$ -N的平均质量浓度大于 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NRR小于40%。由图1(b)可见, 第1天时, 反应后 $\text{NO}_2^-$ -N质量浓度为 $25.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 第2~6天反应后 $\text{NO}_2^-$ -N质量浓度呈下降趋势, 至 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这主要是因为接种泥源中反硝化菌属所占比例较低, 且受进水条件影响导致活性被抑制, 从而使得反应器反硝化性能较差。在阶段I第7~36天中, 出水 $\text{NO}_3^-$ -N质量浓度由 $(100 \pm 5) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下降至 $(50 \pm 5) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NRR大于50%, 反硝化性能比前一周明显增强。此时, 出水 $\text{NO}_2^-$ -N质量浓度接近于0, 反应器仍然不具备短程反硝化性能。而出水COD为 $215 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 说明并不是因为缺少有机碳源导致反硝化性能差。在阶段II(37~61 d), 将原配水中所用 $\text{NaNO}_3$ 换为 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 后, NRR下降至20%, 反硝化性能明显变差, 且反应器出水 $\text{NO}_2^-$ -N质量浓度为 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

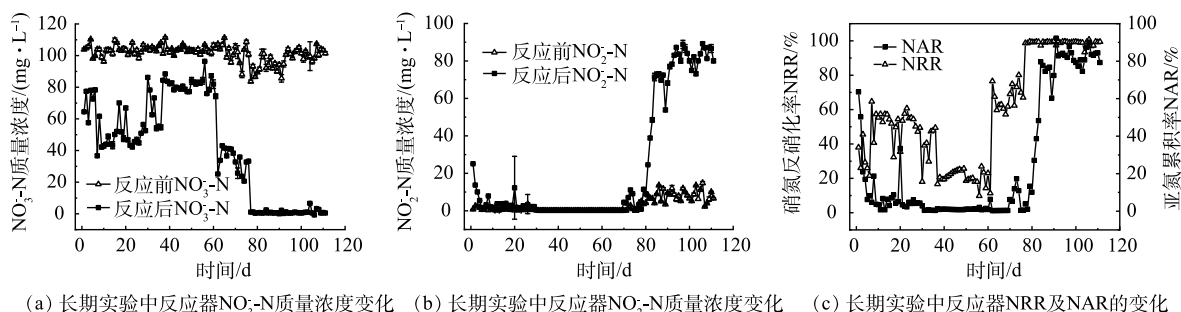


图1 长期实验中反应器氮素质量浓度、NRR及NAR的变化

Fig. 1 Changes of reactor nitrogen compounds, nitrate and nitrite accumulation rate in long-term experiments

对比阶段I与阶段II, 将 $\text{NO}_3^-$ -N来源由 $\text{NaNO}_3$ 换为 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 反应时间由360 min延长至480 min, 但反硝化性能反而变弱。 $\text{Ca}^{2+}$ 会与水中的磷酸盐结合, 生成钙的配合物或沉淀, 使得水中可供微生物利用的磷的含量减少。FERNANDEZ-NAVA等<sup>[26]</sup>发现随着反硝化反应器中钙盐质量浓度的增加, 生物量生长速率和反硝化速率会受到抑制。姜红春等<sup>[29]</sup>在稳定运行的活性污泥反应器中引入不同浓度的 $\text{Ca}^{2+}$ , 来观测污泥形状、微生物酶活性、pH变化等, 结果表明, 过量的 $\text{Ca}^{2+}$ 引起污泥中无机成分增加, 生物酶的催化活性降低, 从而影响微生物的活性。而微生物的活性也直接影响着整个系统的性能。周昌琴等<sup>[30]</sup>发现随着脱氮系统中的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增加, 影响微生物的酶的活性受到一定程度的抑制, 包括过氧化氢酶、磷酸酶、脲酶和蛋白酶4种酶。此外, 反应器中投加 $\text{Ca}^{2+}$ 后, pH有所降低(图2)。其原因是 $\text{Ca}^{2+}$ 会消耗 $\text{CO}_3^{2-}$ 产生少部分碳酸钙沉淀, 使系统中的pH平衡遭到破坏。因此, 阶段II进出水的pH明显小于阶段I进出水的pH。而 $\text{NO}_3^-$ -N还原为 $\text{N}_2$ 是一个酶还原的过程, 主要取决于电子生产、转移和利用, 溶液中离子质量浓度和pH的会影响

响相关还原酶的活性, 从而影响了反硝化性能。QIAN 等<sup>[28]</sup>研究表明, 当 pH 为 9.0 时, 反应器的反硝化性能远高于 pH 为 5.0 和 7.0; 当 pH 为 9.0、进水  $\text{NO}_3^-$ -N 质量浓度为  $30\sim 40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 出水质量浓度几乎为零。这与本实验中阶段 I 所得结果基本一致。CAO 等<sup>[17]</sup>的研究表明, 系统配水为硝酸钠与甲醇, 并通过相关操作控制系统 pH 维持在 7.5, 当进水  $\text{NO}_3^-$ -N 为  $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 50 min 左右已经全部被还原。值得注意的是, 本研究中 pH 与前者接近, 在 480 min 的反应时间内,  $\text{NO}_3^-$ -N 仅还原了  $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  左右。由此可以说明, 在启动短程反硝化过程中, 高 pH 有利于反硝化的进行; 过量的  $\text{Ca}^{2+}$  可通过影响 pH 直接或间接抑制微生物活性, 从而导致反硝化性能降低。

由图 1 可见, 当阶段 III 反应时间为 480 min 时, 反应器中的  $\text{NO}_3^-$ -N 仍然未被完全还原, 但与阶段 I (1~36 d) 相比,  $\text{NRR}>62\%$ , 反硝化性能有明显提升; 对比配水条件, 阶段 III 仅比阶段 I 新增了磷酸二氢钾、硫酸镁和氯化钙。在 62~69 d 内, 反应后  $\text{NO}_3^-$ -N 质量浓度平均为  $35\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  左右, 呈现先下降后上升的趋势, 且在此期间, 反应后  $\text{NO}_2^-$ -N 质量浓度几乎降至 0; 在随后的 7 d 内,  $\text{NRR}$  对比之前有明显的上升,  $\text{NO}_2^-$ -N 的累积率为 10%。这也说明以  $\text{NO}_2^-$ -N 为产物的短程反硝化菌的生长环境有所改善, 使得系统的 PD 性能有明显的提升。磷源在微生物的代谢中其重要作用, 磷源用于合成生物细胞中核酸、磷脂、辅酶及其他化合物, 缺乏磷源易造成 SBR 系统中活性污泥丝状菌膨胀。滕李军等<sup>[31]</sup>通过控制不同磷源比例, 考察了不同 C/N/P 比对 SBR 系统的脱氮影响, 发现在磷源占比较低的系统内, 系统中微生物活性较低, 脱氮效果不佳; 在 C/N/P=100/5/1 和 C/N/P=100/5/0.8 时, 系统微生物活性较高, 脱氮效果较好, 而当系统中磷不足时, 无法产生足量微生物分解有机物。因此, 在短程反硝化实际应用中, 废水进水中如果磷源不足时, 应及时补充磷源。

2) 阶段 IV 典型周期实验分析。由图 1 可见, 当 C/N 比增加到 4 之后, 在第 77~80 天中,  $\text{NO}_3^-$ -N 的质量浓度由反应前的  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  降低至反应后的  $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  左右,  $\text{NRR}$  大于 99%。这表明系统已具备高效的反硝化性能。此外, 反应后  $\text{NO}_2^-$ -N 的质量浓度为  $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 几乎没有  $\text{NO}_2^-$ -N 的累积。当反应时间由 480 min 降至 300 min 时,  $\text{NAR}$  由 10% 升高至 27%, 停止搅拌时  $\text{NO}_2^-$ -N 质量浓度为  $24.58\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 进一步将反应时间缩短至 240 min 时,  $\text{NAR}$  升高至 38%; 缩短至 120 min 时,  $\text{NAR}$  增大至约 80%。研究人员普遍认为,  $\text{NAR}$  大于 80% 是 PD 反应器成功启动的标志<sup>[32]</sup>。这说明本研究成功启动了短程反硝化。在此后的运行中, 由于短程反硝化菌的富集, PD 性能有了进一步的提升。缺氧运行时间由 120 min 降低至 70 min,  $\text{NO}_3^-$ -N 已全部被还原,  $\text{NAR}$  稳定在 80% 及以上 (均值 83.8%)。这说明反应器已具备稳定高效的 PD 性能, 且略优于文献所报道结果<sup>[19, 21-22]</sup>。在启动 PD 工艺的过程中, 当  $\text{NO}_3^-$ -N 已被完全还原, 缩短反应时间有利于  $\text{NO}_2^-$ -N 的累积。

图 3 为阶段 IV 稳定阶段典型周期内氮素的转化、COD 的去除以及 pH 的变化图。由图 3 可见, 在反应器初始阶段 (0~75 min) 内, 由于碳源充足,  $\text{NO}_3^-$ -N 与 COD 在短时间内被迅速转化和消耗, pH 随着有机物的消耗也相应地升高。 $\text{NO}_2^-$ -N 的质量浓度呈直线上升且在反应器中迅速累积, 由  $7.27\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  增加至  $97.94\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 75 min 时系统  $\text{NAR}$  达到周期内峰值, 此时  $\text{NAR}$  为 92%, 高于文献报道的平均水平。在随后的 240 min 内, 由于基质匮乏, 除了 pH 有明显降低外, 其他指标均维持在一定水平且略有降低; pH 由 9.364 降至 8.697,  $\text{NO}_2^-$ -N 仍然保持较高水平, 反应结束时质量浓度仅降低至  $93.35\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{NAR}$  仍然保持在 89%。这表明反应器 PD 性能已达到较优状态。而  $\text{NO}_3^-$ -N

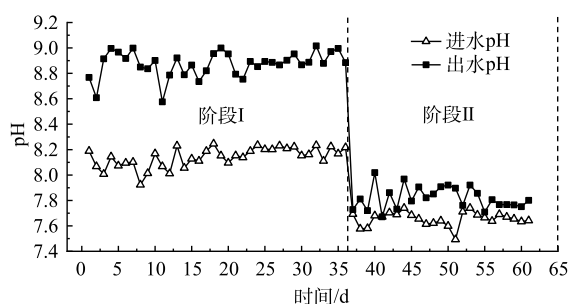


图 2 阶段 I、阶段 II 的 pH 变化

Fig. 2 pH changes in stage I and stage II

和 COD 在反应结束时仍然未被完全反应, 分别为  $3.22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $7.47 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 还原率和去除率分别为 97% 和 98%。在实验的 75 min 后继续搅拌,  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  浓度并没有显著下降。这是因为反硝化菌可以利用的有机物几乎完全被消耗, 碳源的匮乏使得反硝化速率较低。

## 2.2 反应器中功能微生物特征

1) 生物多样性。本研究采用 Shannon 指数和 ACE 指数对样品微生物进行综合评估。Shannon 指数的大小与微生物生物多样性的 高低以及污泥中微生物的均匀程度成正比。ACE 指数的高低与污泥样品中的微生物群落丰富度呈正比。ACE 指数越高, 表明污泥样品中的群落丰富度越高。微生物数据统计结果表明, 4 个阶段的污泥样品 Shannon 指数和 ACE 指数分别为 3.38、1.91、2.50、2.93 和 714.48、650.16、644.91、615.11。污泥样品的 Shannon 指数排序为  $\text{P1} > \text{P4} > \text{P3} > \text{P2}$ , ACE 指数排序为  $\text{P1} > \text{P2} > \text{P3} > \text{P4}$ 。造成这种差异的原因是微生物的均匀程度不同。综合各指数可以看出, 污泥样品 P4 中微生物的群落丰富度较低, 种群分布较均匀, 富集程度较高, 微生物系统较为稳定。

2) 各阶段微生物门水平变化。图 4 为不同条件下反应器中活性污泥在门水平上的微生物特征。由图 4 可见, 在 4 个阶段中, 相对丰度最高的是 *Proteobacteria*(变形菌门), 其次是 *Chloroflexi*(绿弯菌门) 以及 *Bacteroidetes*(拟杆菌门)。

在阶段 I~IV 中微生物相对丰度存在一定的差别。在阶段 I 中分别为变形菌门 (50.79%)、绿弯菌门 (20.89%)、拟杆菌门 (3.85%); 在阶段 II 中分别为变形菌门 (88.72%)、绿弯菌门 (3.70%)、拟杆菌门 (0.88%)。而在阶段 III 中, 变形菌门 (77.17%)、拟杆菌门 (7.01%)、绿弯菌门 (6.31%); 在阶段 IV 中, 变形菌门 (74.71%)、拟杆菌门 (5.19%)、绿弯菌门 (8.27%) 这 3 个门的总比例接近 90%。这进一步地证明了反应器中相关功能菌富集程度高<sup>[23]</sup>。其中, 变形菌门在反应器中处于主导地位, 大多数与脱氮相关的功能菌(如氨氧化菌、亚硝酸盐氧化菌和反硝化菌等)都属于变形菌门, 在各阶段丰度依次为  $\text{P2} > \text{P3} > \text{P4} > \text{P1}$ 。变形菌门的相对丰度在阶段 II 进一步增大, 占绝对的主导地位。高丰度的变形菌门是反应器能取得高效稳定的 NAR 的基础, 但反应器的 NRR 和 NAR 反而降低了, 可见过量的  $\text{Ca}^{2+}$  会对菌群的脱氮功能的实现产生负面影响。在此前关于短程反硝化的研究中也表明, 变形菌门通常在反应器中占比较高 (44%~82%)<sup>[32]</sup>。这与本研究所得结果相似。绿弯菌门和拟杆菌门可以降解易溶有机物和胞外聚合物<sup>[33]</sup>, 而  $\text{Ca}^{2+}$  可以将水中可溶性的蛋白质和多糖絮凝沉淀<sup>[34]</sup>。这可能是绿弯菌门和拟杆菌门的相对丰度在阶段 II 幅减小的原因之一。拟杆菌门在氮循环中还能起到反硝化的作用<sup>[35-36]</sup>, 所以在阶段 IV 中拟杆菌门占比 (8.27%) 大于前 3 个阶段。

3) 各阶段微生物属水平变化。图 5 为反应器 4 个阶段污泥样品在属水平上的微生物特征。由

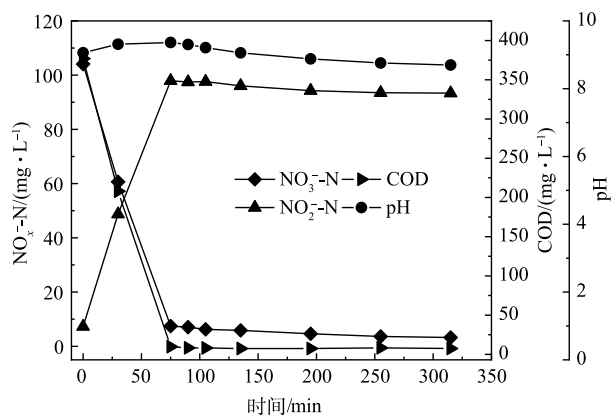


图 3 阶段 IV 反应器典型周期内氮素转化、COD 的去除以及 pH 的变化曲线

Fig. 3 Variation curves of nitrogen conversion, COD removal and pH in typical cycle of stage IV

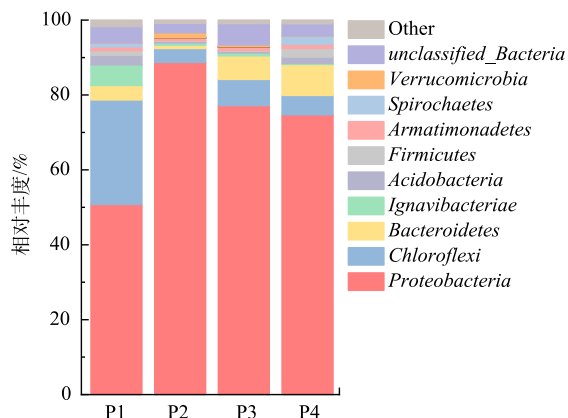


图 4 反应器门水平微生物群落柱状图

Fig. 4 Bar chart of the microbial community at the phylum level of SBR reactors

图 5 可见，反应器在 4 个阶段中，*unclassified\_Rhodobacteraceae*(红杆菌科)所占比例都比较大，分别为 23.89%、63.69%、54.22%、36.29%。*Nitrosomonas*(亚硝化单胞菌属)也有一定占比，在 4 个阶段的样品中相对丰度分别为 0.87%、0.96%、0.99%、1.18%。亚硝化单胞菌属是自养型 AOB，在有氧条件下能将  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  氧化为  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 。在阶段 I，占比超过 10% 的其余菌属分别为 *unclassified\_Rhodocyclaceae*(16.81%)，*unclassified\_Anaerolineaceae*(12.83%)。*Rhodocyclaceae*(红藻科)是反硝化系统中经常被发现的一种反硝化聚磷菌，在污水厂除磷中起到重要作用，但也不具备脱氮性能<sup>[37-38]</sup>。*Longilinea* 菌属和 *Ignavibacterium* 菌属的占比也相对较高，分别为 9.28% 及 5.50%，而 *Thauera* (陶厄氏菌属)，占比仅为 0.39%。与其他阶段不同的是，阶段 I 中 *Ignavibacterium* 菌属是其他阶段的数百倍，是反应器中占优势地位的反硝化菌<sup>[39]</sup>。由于反硝化菌占比较低，使得阶段 I 中 NRR 不高。与其他以硝酸钠作为  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的阶段相比，在阶段 II 中，系统中的反硝化菌 *Ignavibacterium* 在两周时间几乎消失，且 *Thauera* 菌也仅有 0.14%，在 4 个阶段中处于最低水平。这也说明在乙酸钠为碳源的反应器中，过多的  $\text{Ca}^{2+}$  会影响反硝化菌 *Thauera* 和 *Ignavibacterium* 的富集，使得反应器的反硝化性能变差。阶段 II 中优势菌属为红杆菌科。有研究表明，红杆菌科多为化学异养菌，可以促进胞外聚合物 EPS 的分泌<sup>[40]</sup>，被认为是重要的反硝化菌群<sup>[41-42]</sup>，并且能够降解复杂的有机物<sup>[43]</sup>。作为反硝化菌，*unclassified\_Rhodobacteraceae* 的相对丰度由阶段 I 时的 23.89% 增加到阶段 II 的 63.69%，其在反应器中主导菌属的地位得到进一步巩固。有研究<sup>[44]</sup>表明，微生物群落的多样越高，反应器脱氮效率越高。在本研究中，阶段 II 时 PD 反应器内的微生物多样性是整个启动过程中最低的，可见过量的  $\text{Ca}^{2+}$  会将无法适应的细菌淘汰出 PD 反应器，从而降低短程反硝化系统的微生物多样性，影响反应器的反硝化性能。在阶段 III 中，*Thauera* 相比阶段 II 时数量翻了 16 倍，短程反硝化菌的富集较为迅速。研究显示，对于缺磷的系统会限制细菌的生长<sup>[45]</sup>，投加磷酸盐可以富集异养反硝化菌和反硝化聚磷生物 (denitrifying phosphorus accumulation organisms, DPAOs)，从而提高反应器的反硝化性能<sup>[46]</sup>。这也表明适量的磷源有利于短程反硝化菌的富集。因此，在实际废水处理中，如若进水含磷量较少的话可以适量补充，有利于反硝化的顺利进行。在阶段 IV 中，反应器的平均 NAR 为 83.8%，而 *Thauera* 是反应器中的优势菌属之一，占比高达 17.25%。*Thauera* 已经被确定为短程反硝化过程中高效产生  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  的功能性细菌，在先前关于 PD 的研究中被广泛检测到，且在微生物群落中占据主导地位<sup>[15,47]</sup>。

4) 微生物功能预测分析。本研究基于 FAPROTAX 分析绘制 heatmap 对微生物功能进行预测，FAPROTAX 是基于目前对可培养菌的文献资料手动整理的原核功能注释数据库。由图 6 可知， $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的还原 (nitrate reduction) 在各阶段占比与各阶段的 NRR 呈正相关，P4(9.14%)>P3(2.65%)>P1(1.64%)>P2(0.89%)。这进一步验证了在阶段 IV 中，反应器的反硝化性能最强；与此同时，阶段 IV 中氮呼吸 (nitrogen respiration)、硝酸盐呼吸 (nitrate respiration) 和亚硝酸盐呼吸 (nitrite respiration) 的占比也是最高的，分别为 9.91%、9.11% 和 8.83%。这使得反应器在阶段 IV 保持着高效稳定的 NRR，

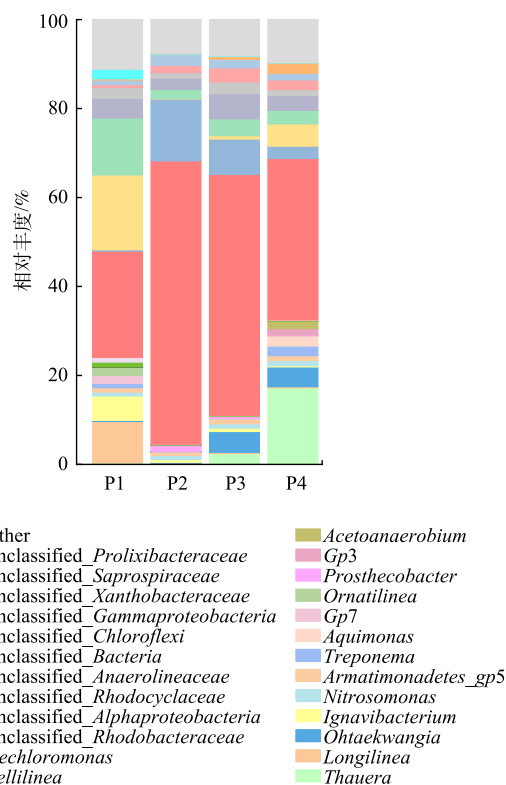


图 5 反应器属水平微生物群落柱状图

Fig. 5 Bar chart of the microbial community at the genus level of SBR reactors

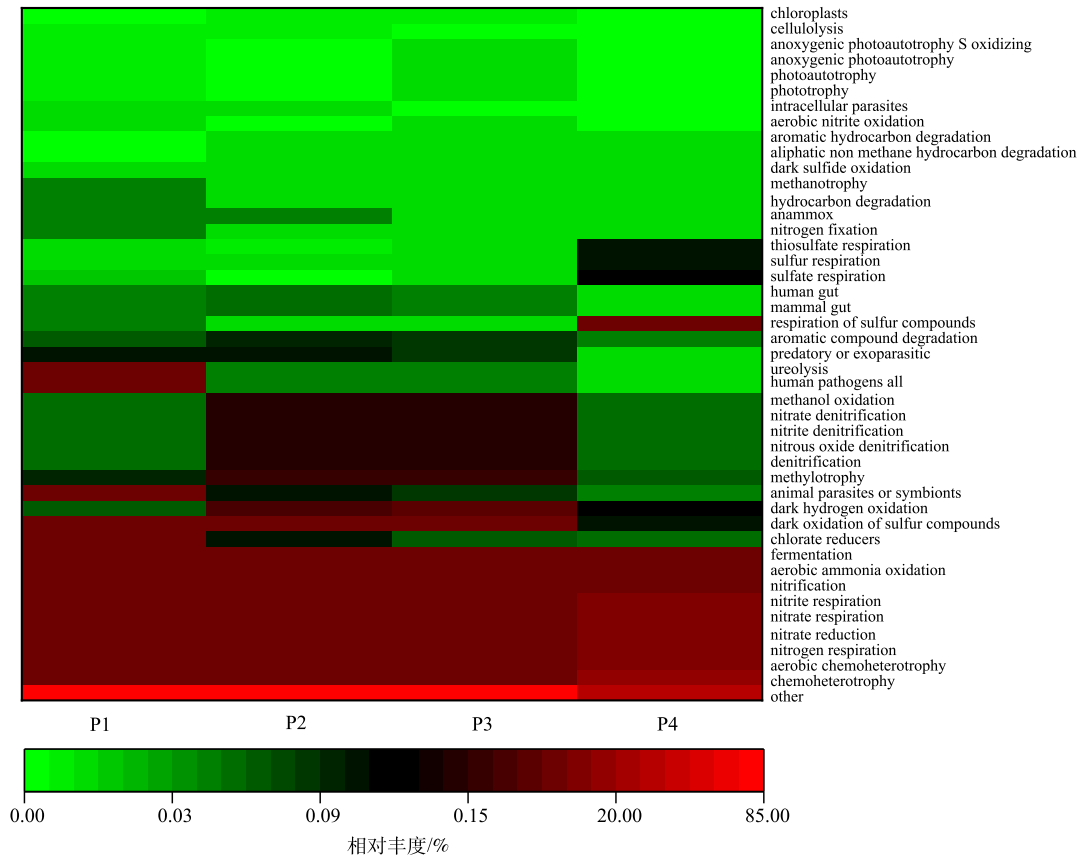


图 6 微生物 FAPROTAX 分析

Fig. 6 Microbial FAPROTAX Analysis

比其他研究所得结果略高<sup>[22]</sup>。此外，反应器中存在部分的好氧氨氧化 (aerobic ammonia oxidation)，这是微生物中亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*) 的存在导致的。一方面，本研究中 PD 反应器是在敞口条件下搅拌运行的，并非严格缺氧环境，由于搅拌使得空气中的氧气进入反应器，为氨氧化细菌的生长创造了有氧环境；另一方面，氨氧化所需底物  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  来源于微生物的内源过程，利用微生物代谢、衰亡产生的蛋白质或其他含氮有机物，产生  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ，从而为氨氧化提供反应底物。

### 3 结论

1) 以乙酸钠为碳源时， $\text{Ca}^{2+}$  质量浓度过高会抑制反硝化。以  $\text{NaNO}_3$  为  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的来源时，硝酸盐氮还原率维持在 50% 左右；相同条件下，以  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  为  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的来源时，硝酸盐氮还原率仅有 20%。在实际废水处理中，适量的磷有利于反硝化脱氮的顺利进行。长期运行下亚硝酸盐氮积累率平均为 83.8%。

2) 当碳氮比 ( $\text{COD}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) 提高为 4 时，反应器实现了稳定的短程反硝化，硝酸盐氮还原率大于 98%，平均 NAR 为 83.8%。

3) 在反应器中变形菌门和拟杆菌门占主导地位。 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  积累的关键功能菌属是 *Thauera* 菌属，其最高占比为 17.25%。以  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  为  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  的来源时，*Thauera* 菌属占比仅为 0.14%。

### 参考文献

- [1] JIN L, ZHANG G, TIAN H. Current state of sewage treatment in China[J]. *Water Research*, 2014, 66: 85-98.
- [2] KOWALSKI M S, DEVLIN T R, DI BIASE A, et al. Effective nitrogen removal in a two-stage partial nitrification-anammox reactor treating municipal wastewater - Piloting PN-MBBR/AMX-IFAS configuration[J]. *Bioresour Technol*, 2019, 289: 121742.

- [3] ZHANG Q H, YANG W N, NGO H H, et al. Current status of urban wastewater treatment plants in China[J]. *Environment International*, 2016, 92-93: 11-22.
- [4] WINKLER M K, STRAKA L. New directions in biological nitrogen removal and recovery from wastewater[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 57: 50-5.
- [5] ALI M, OKABE S. Anammox-based technologies for nitrogen removal: Advances in process start-up and remaining issues[J]. *Chemosphere*, 2015, 141: 144-53.
- [6] WAKI M, YASUDA T, FUKUMOTO Y, et al. Effect of electron donors on anammox coupling with nitrate reduction for removing nitrogen from nitrate and ammonium[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 592-598.
- [7] CHI Y, SHI X, JIN P, et al. Enhanced nitrogen removal by partial nitrification-anammox process with a novel high-frequency micro-aeration (HFMA) mode: Metabolic interactions among functional bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 125917.
- [8] 张肖静, 张涵, 周月, 等. 亚硝化-厌氧氨氧化工艺的启动及微生物种群演替规律研究[J]. *轻工学报*, 2019, 34(6): 56-63.
- [9] LU W, ZHANG Y, WANG Q, et al. Achieving advanced nitrogen removal in a novel partial denitrification/anammox-nitrifying (PDA-N) biofilter process treating low C/N ratio municipal wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125661.
- [10] LIU Y J, GU J, LIU Y. Energy self-sufficient biological municipal wastewater reclamation: Present status, challenges and solutions forward[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 269: 513-9.
- [11] MA B, WANG S, CAO S, et al. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: Recent advances[J]. *Bioresource Technology*, 2016: 200981-90.
- [12] LACKNER S, GILBERT E M, VLAEMINCK S E, et al. Full-scale partial nitrification/anammox experiences: An application survey[J]. *Water Research*, 2014, 55: 292-303.
- [13] KUENEN J G. ANAMMOX bacteria: From discovery to application[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(4): 320-326.
- [14] 赖城, 张大超, PHILIP A, 等. 短程反硝化/厌氧氨氧化工艺研究进展[J]. *环境污染与防治*, 2021, 43(11): 1452-1459.
- [15] DU R, PENG Y, JI J, et al. Partial denitrification providing nitrite: Opportunities of extending application for anammox[J]. *Environment International*, 2019, 131: 105001.
- [16] MA B, XU X, WEI Y, et al. Recent advances in controlling denitrification for achieving denitrification/anammox in mainstream wastewater treatment plants[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 299: 122697.
- [17] CAO X, QIAN D, MENG X. Effects of pH on nitrite accumulation during wastewater denitrification[J]. *Environment International*, 2013, 34(1-4): 45-51.
- [18] DU R, PENG Y, CAO S, et al. Mechanisms and microbial structure of partial denitrification with high nitrite accumulation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(4): 2011-21.
- [19] 毕春雪, 于德爽, 杜世明, 等. 乙酸钠作为碳源不同污泥源短程反硝化过程亚硝酸盐积累特性[J]. *环境科学*, 2019, 40(2): 783-790.
- [20] 董晓莹, 彭党聪. 不同碳氮比下污水反硝化过程中亚硝酸盐氮积累的特性研究[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(9): 3349-3355.
- [21] SI Z, PENG Y, YANG A, et al. Rapid nitrite production via partial denitrification: pilot-scale operation and microbial community analysis[J]. *Environmental Science:Water Research & Technology*, 2018, 4(1): 80-86.
- [22] 张星星, 王超超, 王垚, 等. 基于不同废污泥源的短程反硝化快速启动及稳定性[J]. *环境科学*, 2020, 41(8): 3715-3724.
- [23] DU R, CAO S, ZHANG H, et al. Formation of partial-denitrification (PD) granular sludge from low-strength nitrate wastewater: The influence of loading rates[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384: 121273.
- [24] 申慧彦, 汪河, 姚亮, 等. 硝酸盐对短程反硝化过程中亚硝酸盐积累影响[J]. *环境科学与技术*, 2021, 44(5): 1-7.
- [25] SHENG H, WENG R, ZHU J, et al. Calcium nitrate as a bio-stimulant for anaerobic ammonium oxidation process[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 760: 143331.
- [26] FERNANDEZ-NAVA Y, MARANON E, SOONS J, et al. Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(17): 7976-81.
- [27] 王衫允, 贾方旭, 高梦佳, 等. 不同基因水平的厌氧氨氧化污泥功能微生物特性[J]. *中国给水排水*, 2016, 32(13): 96-101.
- [28] QIAN W, MA B, LI X, et al. Long-term effect of pH on denitrification: High pH benefits achieving partial-denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 278: 444-9.
- [29] 娄红春, 林青山, 高敏杰, 等. 钙离子对污泥系统脱氮的影响及恢复研究[J]. *淮阴工学院学报*, 2018, 27(1): 41-45.
- [30] 周昌琴, 孔秀琴, 陈磊, 等. PESA对高钙废水中污泥酶活性的影响[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(4): 2212-2218.
- [31] 滕李军. SBR法处理磷源缺乏模拟污水的试验研究[D]. 沈阳: 沈阳建筑大学, 2014.
- [32] CAO S, DU R, LI B, et al. Nitrite production from partial-denitrification process fed with low carbon/nitrogen (C/N) domestic wastewater: performance, kinetics and microbial community[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 326: 1186-96.
- [33] KINDAICHI T, YURI S, OZAKI N, et al. Ecophysiological role and function of uncultured Chloroflexi in an anammox reactor[J]. *Water Science and Technology*, 2012, 66(12): 2556-61.
- [34] ZHOU L, DONG N, YE B, et al. Assessing effects of Ca(2+) addition on membrane bioreactor performance and macro-floc sludge characteristics[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 798: 149223.
- [35] 王晗, 李瀚翔, 陈猷鹏, 等. 盐度条件下ANAMMOX-EGSB反应器颗粒污泥微生物群落[J]. *环境科学*, 2019, 40(4): 1906-1913.
- [36] HU M, WANG X, WEN X, et al. Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 72-9.
- [37] VILAR-SANZ A, POU S, PUIG S, et al. Denitrifying nirK-containing alphaproteobacteria exhibit different electrode driven nitrite reduction capacities[J]. *Bioelectrochemistry*, 2018, 121: 74-83.
- [38] ZHANG Q, ZHANG C, ZHU Y, et al. Effect of bacteria-to-algae volume ratio on treatment performance and microbial community of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria-chlorella symbiotic system[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 126025.
- [39] SONG H, LIU J. Forward osmosis membrane bioreactor using bacillus and membrane distillation hybrid system for treating dairywastewater[J].



- [Environmental Technology](#), 2021, 42(12): 1943-1954.
- [40] HAN F, ZHANG M, LIU Z, et al. Enhancing robustness of halophilic aerobic granule sludge by granular activated carbon at decreasing temperature[J]. [Chemosphere](#), 2022, 292: 133507.
- [41] ZHANG Z, YU Z, WANG Z, et al. Understanding of aerobic sludge granulation enhanced by sludge retention time in the aspect of quorum sensing[J]. [Bioresource Technology](#), 2019, 272: 226-34.
- [42] HANKE A, BERG J, HARGESHEIMER T, et al. Selective pressure of temperature on competition and cross-feeding within denitrifying and fermentative microbial communities[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1461.
- [43] NGUYEN N H A, EL-TEMSAH Y S, CAMBIER S, et al. Attached and planktonic bacterial communities on bio-based plastic granules and micro-debris in seawater and freshwater[J]. *Science of the Total Environment*, 2021: 147413.
- [44] 邱斌宇, 史青, MONTCHO L M, 等. A/O MBR处理生活污水效率与菌群多样性的关系[J]. *环境科学*, 2012, 33(6): 2061-2067.
- [45] ROMANO S, SCHULZ-VOGT H N, GONZALEZ J M, et al. Phosphate limitation induces drastic physiological changes, virulence-related gene expression, and secondary metabolite production in *Pseudovibrio sp.* strain FO-BEG1[J]. [Applied and Environmental Microbiology](#), 2015, 81(10): 3518-28.
- [46] WANG Z, HE S, HUANG J, et al. Comparison of heterotrophic and autotrophic denitrification processes for nitrate removal from phosphorus-limited surface water[J]. [Environmental Pollution](#), 2018, 238: 562-72.
- [47] SHI L, DU R, PENG Y. Achieving partial denitrification using carbon sources in domestic wastewater with waste-activated sludge as inoculum[J]. [Bioresource Technology](#), 2019, 283: 18-27.

(责任编辑: 曲娜)

## Effects of different cations and C/N on denitrification performance and nitrite accumulation

KANG Peilun<sup>1</sup>, LI Junda<sup>1</sup>, YE Shengqi<sup>1</sup>, CHEN Zebin<sup>1</sup>, HUANG Bochuang<sup>1</sup>, CUI Lihua<sup>1</sup>, YU Guangwei<sup>1,2</sup>, LIANG Yuhai<sup>1,2,\*</sup>

1. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Agricultural & Rural Pollution Abatement and Environmental Safety, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China

\*Corresponding author, E-mail: liangyuhai@scau.edu.cn

**Abstract** Sodium acetate was used as the carbon source in a sequencing batch reactor (SBR), and the effects of different control conditions on denitrification performance and  $\text{NO}_2^-$ -N accumulation were investigated by alternate dosing of sodium nitrate and calcium nitrate, the dosing of trace elements and the change of C/N ratio, and the characteristics of microbial population succession in SBR were also analyzed. The results showed that high  $\text{Ca}^{2+}$  concentration inhibited denitrification performance in the SBR reactor with sodium acetate as the carbon source. The nitrate nitrogen reduction rate was maintained at about 50% when  $\text{NaNO}_3$  was used as the  $\text{NO}_3^-$ -N source; under the same conditions, the nitrate nitrogen reduction rate was only 20% when  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  was used as the  $\text{NO}_3^-$ -N source. When SBR was supplemented with appropriate amount of phosphorus, the nitrate reduction rate could increase to 62%, while the accumulation of a small amount of nitrite occurred. When the carbon to nitrate ratio (COD/ $\text{NO}_3^-$ -N) increased to 4, the nitrate reduction rate was greater than 98%, and the nitrite accumulation rate was 83.8% on average under long-term operation. High-throughput sequencing analysis showed that *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* dominated the system, the key functional genus for  $\text{NO}_3^-$ -N accumulation was *Thauera*, which had the highest percentage of 17.25%. The percentage of *Thauera* was only 0.14% when  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  was used as the source of  $\text{NO}_3^-$ -N. These results provide a theoretical support for the rapid start-up and stable operation of partial denitrification.

**Keywords** partial denitrification; cation; COD/ $\text{NO}_3^-$ -N; microbial community