

文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202212110 中图分类号 X703 文献标识码 A

赵杰俊. 多级好氧生物膜/厌氧颗粒反应器的 PN/A 工艺启动与调控[J]. 环境工程学报, 2023, 17(5): 1683-1694. [ZHAO Jiejun. Start-up and regulation of PN/A process in a multi-stage aerobic-biofilm/anoxic-particle reactor[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(5): 1683-1694.]

多级好氧生物膜/厌氧颗粒反应器的 PN/A 工艺启动与调控

赵杰俊[✉]

中交(天津)生态环保设计研究院有限公司, 天津 300000

摘要 厌氧氨氧化细菌(AnAOB)和氨氧化细菌(AOB)的同时快速富集是短程硝化/厌氧氨氧化(PN/A)工艺高效运行的关键。本研究构建了一种多级好氧生物膜/厌氧颗粒污泥反应器(MOBAPR)。MOBAPR的好氧生物膜/厌氧颗粒结构不仅可有效保留生物质,还为AnAOB和AOB同时富集创造空间条件。在MOBAPR中,首先通过控制pH和间歇曝气在15d内实现PN工艺的快速启动,然后在稳定运行的PN工艺基础上,61d后实现了PN/A工艺的快速启动,脱氮率达到(83.41±2.45)%。16S rRNA基因测序结果表明,MOBAPR中AOB(27.09%)和AnAOB(9.99%)成功实现同时富集。此外,在PN/A工艺运行过程中,气液比(曝气速率与进水速率的比值)是一个与NRE高度相关的操作参数。气液比的优化控制不仅可以提高MOBAPR的脱氮性能,还可以在溶解氧(DO)低至无法控制时代替DO控制。

关键词 短程硝化; 厌氧氨氧化; 自养脱氮; 微生物特性

减少废水中的氮化合物是改善水环境和水质的措施之一^[1]。与传统硝化/反硝化工艺相比,短程硝化/厌氧氨氧化(partial nitrification/anaerobic ammonia oxidation, PN/A)工艺可以将脱氮需氧量降低50%,有机碳需求量降低100%,污泥产量降低90%^[2-3]。因此,PN/A工艺被认为是最经济、最有前景的脱氮工艺^[4]。

反应器内生物质的保留能力对厌氧氨氧化(Anammox)工艺的启动周期有着重要影响^[5]。据报道,颗粒和生物膜污泥都具备良好的生物质截留能力^[6-7],但已知这两种污泥形式分别单独运行时都会存在较长的启动时间^[8-9]。生物膜系统形成周期短,但长期运行后载体上太厚的生物膜会导致生物质脱落并被水流冲刷^[7]。Anammox颗粒污泥的形成是一个漫长的过程,但可以有效地拦截污泥流失并保持较高的生物量^[10]。因此,生物膜和颗粒污泥的组合应用可能最大程度上保留反应器内生物质,从而实现PN/A的快速启动和功能菌的高效富集。然而,将好氧生物膜和厌氧颗粒相结合来启动PN/A工艺目前尚未见报道。

不同于传统的单阶段和两阶段PN/A反应器,在多级PN/A反应器中,交替的缺氧室和好氧室不仅为(anaerobic ammonia oxidizing bacteria(AnAOB)和 ammonia oxidizing bacteria(AOB)这2种功能细菌的同时生长和富集提供了空间条件,而且在缺氧区亚硝酸盐氮(NO_2^- -N)和氨氮(NH_4^+ -N)共存的环境有利于厌氧氨氧化菌的自然富集^[7-8]。此外,实现PN/A工艺的关键不仅需要同时富集AOB和

收稿日期: 2022-12-26; 录用日期: 2023-03-23

作者简介: 赵杰俊(1996—),男,硕士, 2867853172@qq.com; ✉通信作者

AnAOB, 还必须尽可能抑制亚硝酸盐氧化菌 (nitrite oxidizing bacteria, NOB) 活性^[11]。据报道, 间歇曝气和 pH 控制等策略可以有效控制 PN/A 工艺中不同菌群的活性 (富集 AnAOB 和 AOB, 抑制 NOB)^[12]。然而, 具有间歇曝气、pH 控制、多级反应器和生物膜/颗粒污泥系统等优点的组合 PN/A 反应器的运行策略仍需要研究。

本研究构建了由 3 个好氧反应柱和 3 个厌氧反应柱组成的新型多级好氧生物膜/厌氧颗粒反应器 (multistage aerobic-biofilm/anaerobic-granular sludge reactor, MOBAPR), 以同时促进 AnAOB 和 AOB 的富集。本研究的主要目的为: 拟通过 MOBAPR 实现 PN/A 工艺的快速启动和高效运行; 考察 MOBAPR 各反应柱的氮转化过程; 探索不同 MOBAPR 柱中功能菌丰度的变化和微生物群落结构的差异; 通过优化气液比 (gas/liquid ratio, G/L), 进一步提高 PN/A 工艺的脱氮效率 (nitrogen removal efficiency, NRE)。

1 材料与方法

1.1 进水水质与接种污泥

接种物取自中国江西省赣州市白塔生活污水处理厂的剩余污泥 (普通活性污泥)。在第 1 天分别向每个反应柱加入 100 mL 接种物, 其活性污泥浓度 (MLSS) 大约为 $5\ 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

本研究采用模拟废水 (含 $150\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NH}_4^+\text{-N}$), 其改编自前人研究^[13]。主要成分包括 $0.708\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $1.05\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaHCO}_3$, $0.02\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$, $0.022\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgSO}_4$, $0.008\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CaCl}_2$, $1.25\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 营养液 I ($5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{EDTA}$ 、 $0.00625\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{FeSO}_4$) 和营养液 II ($15\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{EDTA}$ 、 $0.43\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.19\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.99\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.24\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.22\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.014\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{H}_3\text{BO}_4$)。

1.2 实验装置

MOBAPR 的示意图如图 1 所示。该反应器由 6 个高 30 cm、直径 4.5 cm 的有机玻璃柱相互串联构成, 总有效容积为 2.5 L。从进水到出水的 6 个反应柱 (reaction column, Rc) 分别标记为 Rc1、Rc2、Rc3、Rc4、Rc5 和 Rc6 (隔室数量可根据出水水质增减)。在好氧反应柱 (Rc1、Rc3 和 Rc5) 中添加无纺布作为填料, 并采用间歇曝气。厌氧隔室 (Rc2、Rc4 和 Rc6) 采用低速搅拌装置。当 PN 工艺成功启动后停止搅拌。曝气量由玻璃转子流量计调节, 并采用自动断电定时器电路实现间歇曝气。根据之前的报道^[14], 由蠕动泵 (Langer, BT101L, UK)、pH 控制器 (WEIPRO, pH-2010B,

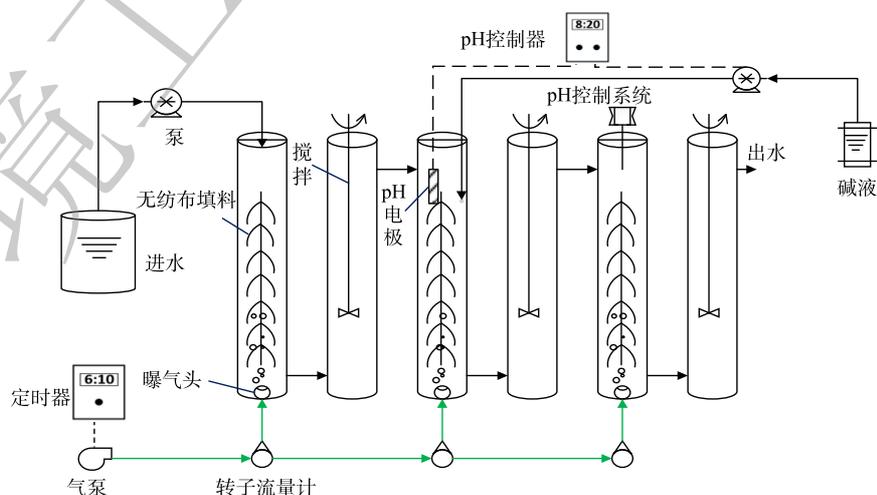


图 1 实验室规模的 MOBAPR 示意图

Fig. 1 Schematic diagram of MOBAPR at lab-scale

China) 和 NaOH 溶液组成的 pH 控制系统将 MOBAPR 中的 pH 保持在 8.2~8.5。在每次曝气 15 min 后开始检测 DO(dissolved oxygen) 质量浓度。

1.3 运行条件

本研究在 MOBAPR 中依次启动 PN 和 PN/A 工艺。第 I 阶段 (1~7 d), 为快速恢复硝化细菌 (AOB 和 NOB) 的活性, 在好氧区 (Rc1、Rc3 和 Rc5) 中连续曝气, 并在厌氧区 (Rc2、Rc4 和 Rc6) 连续搅拌。此外, 此阶段由于污泥处于悬浮状态, 会随着进水流动, 因此, 启动污泥回流以保证反应器内充足的生物质含量。第 II 阶段 (8~15 d) 为抑制 NOB, 在好氧区中使用间歇曝气。第 III 阶段 (16~60 d) 好氧区微生物已成功挂膜生长, 基本没有污泥流失, 停止回流。此外, 为进一步抑制 NOB, 第 29 天水力停留时间 (hydraulic residence time, HRT) 降低至 8 h (16~28 d 的 HRT 为 12 h)。第 IV 阶段 (61~86 d) 为避免搅拌影响厌氧区 AnAOB 富集, 厌氧区停止搅拌。第 V 阶段 (87~110 d), 调整曝气量以保证反应器内充足的 NO_2^- -N。各阶段运行参数详见表 1。在第 VI 阶段 (111~162 d), 在进水 NH_4^+ -N 为 $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和好氧/厌氧时间为 90 min/30 min 条件下, 分别调节曝气量和 HRT 来探讨不同 G/L 对 NRE 的影响。

表 1 实验条件及操作参数
Table 1 Experimental conditions and operating parameters

时期	阶段	时间/d	HRT/h	曝气量/($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)	好氧(厌氧)时间/min	好氧区DO/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	回流比/%
适应期	I	1~7	24	0.02	好氧	—	200
PN 启动期	II	8~15	12	0.05	80/40	0.5 ± 0.2	100
PN 运行期	III	16~60	12/8	0.05	80/40	0.5 ± 0.2	0
PN/A 启动期	IV	61~86	8	0.08	90/30	0.0 ± 0.2	0
PN/A 运行期	V	87~110	6	0.10	90/30	0.0 ± 0.1	0
气液调控期	VI	111~162	—	—	90/30	—	0

注: 表中曝气量和 DO 值均为好氧区 (Rc1、Rc3 和 Rc5) 的平均值; “—”表示无法检测。

1.4 分析方法

实验中反应器内 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 的检测分析均根据《水和废水检验标准方法》中制定的方案, 使用实验室规模的紫外/可见分光光度计 (SQ2800, 意大利 UNICO) 进行测定, 包括纳氏试剂分光光度法 (NH_4^+ -N)、(1-萘基)-乙二胺分光光度法 (NO_2^- -N) 和氨基磺酸紫外分光光度法 (NO_3^- -N)。此外, 为了更好地揭示 MOBAPR 中 PN/A 过程的氮转化机理, 每天对各反应柱的氮质量浓度进行检测, 并分析其亚硝酸盐积累率 (nitrite accumulation rate, NAR)、氨氮去除率 (ammonia nitrogen removal rate, ANR)、氮去除率 (NRE)、氮负荷率 (nitrogen load rate, NLR) 和氮去除负荷 (nitrogen removal load rate, NRR)^[13-14]。

1.5 16S rRNA 基因测序与微生物菌群分析

为探索 MOBAPR 中不同阶段微生物群落的演变, 阐明连续多阶段 PN/A 过程中所涉及的生物学机制, 分别对接种植物、第 56 天 (阶段 III) 和第 110 天 (阶段 V) 的泥样进行微生物功能菌群分析。接种物命名为 A0, 第 III 阶段在 Rc1~Rc6 收集的污泥样品分别命名为 A1、A2、A3、A4、A5 和 A6, 第 V 阶段分别命名为 B1、B2、B3、B4、B5 和 B6。这些样本保存在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$, 直到提取 DNA 结束。

在成功提取样本内微生物的 DNA 后, 使用 16S rRNA 基因的通用扩增引物进行 PCR 扩增, 并且 PCR 产物使用 AxyPrep™ DNA 凝胶提取试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City, USA) 按照制造

商的说明进行纯化。然后通过 Illumina MiSeq 测序平台 (PE300) 对样品高通量测序, 并得到原始序列。为了解样本测序结果中的菌种、菌属、物种功能等信息, 将在 MiSeq 测序得到的原始序列数据利用 cutadapt(version 1.18) 和 PRINSEQ(version 0.20.4) 软件进行去除引物接头序列、拼接、识别的处理以得到各样本的有效数据。然后利用 Usearch(version 11.0.667) 按照 97% 相似性对非重复序列 (不含单序列) 进行 OTU 聚类。然后利用 RDP classifier(version 2.12) 等软件进行 OTU 物种分类, 并根据得到的 OTU 序列进行微生物菌群分析与功能预测。

1.6 优化 MOBAPR 操作

由于在第 V 阶段 DO 值较低, MOBAPR 的性能无法通过 DO 来进行控制。因此, 在第 VI(111~162 d), 阶段, 为了代替 DO 控制 (当 DO 低至无法控制), 本研究提出了一种新型控制参数—气液比 (式 (1))。分别在 2、4、6 和 8 h 的 HRT 条件下调控曝气量 (0.05、0.1、0.15 和 0.2 L·min⁻¹), 从而得到 G/L 比为 2.4、4.8、7.2、9.6、4.4、19.2、21.6、28.8 和 38.4。并且在每次操作条件调整后, MOBAPR 连续运行 3~4 d。此外, 利用高斯模型预测了 G/L 与 NRE 之间的相关性 (式 (1))。

$$q = \frac{60rv}{V} \quad (1)$$

式中: q 为 G/L 值; t 为 HRT, h; v 为曝气速率, L·min⁻¹; V 为 MOBAPR 的总有效容积, L。

2 结果与讨论

2.1 MOBAPR 中 PN/A 工艺的脱氮性能

1) 接种物驯化。阶段 I(1~7 d) 在进水 NH₄⁺-N 为 150 mg·L⁻¹、曝气速率为 0.02 L·min⁻¹、DO 为 2~4 mg·L⁻¹ 和 HRT 24 h 的条件下运行 MOBAPR。如图 2 所示, 出水 NO₃⁻-N 由 64.03 mg·L⁻¹ 增加到 122.71 mg·L⁻¹。这说明在被重新接种后, 硝化细菌 (AOB 和 NOB) 的活性在高 DO 水平下得到了快速恢复。此外, 在阶段 I 中 NRE 大多低于零 (图 2(c))。这可能是一些细菌 (主要是异养菌) 不能适应无碳源下的 MOBAPR, 细菌死亡后细胞溶解释放出额外的氮源到反应器内。

2) PN 工艺的启动。在阶段 II(8~15 d), MOBAPR 的 pH 为 8.3, 好氧区平均溶解氧为 0.5 mg·L⁻¹,

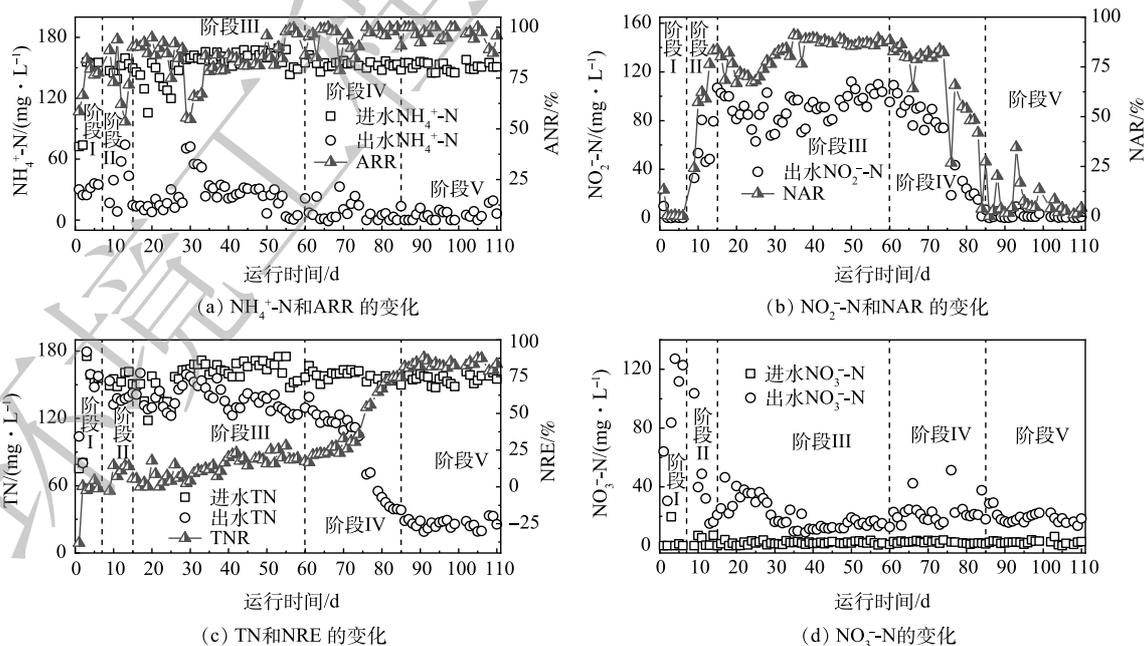


图 2 MOBAPR 中的氮的变化

Fig. 2 Variation of nitrogen in MOBAPR in MOBAPR

间歇曝气(好氧/厌氧时间为 80 min/40 min)。结果表明, NO_2^- -N 由 $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $106.89 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2(b)), NO_3^- -N 由 $122.71 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 减少到 $20.92 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2(d)), 这表明 NOB 被有效抑制的同时 AOB 成功富集。因此, 此阶段 PN 工艺在 MOBAPR 成功启动。此外, PN 工艺中的 NO_2^- -N 稳定供应是实现 Anammox 工艺的前提^[15], 其关键是高效稳定地抑制反应器中的 NOB 活性^[14]。有研究表明, 控制 pH 和间歇曝气是抑制 NOB 活性的重要手段^[13]。因此, 将以上 2 种抑制策略的结合是实现 PN 过程快速启动的关键。

在阶段 III(16~60 d), 出水 NO_3^- -N 逐渐增加, 第 16~28 天处于较高水平 ($30\sim 46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。因此, 要实现 PN 过程的稳定运行, 需要对控制条件进行调整。在第 17 天好氧区在已经形成稳定生物膜结构后, MOBAPR 停止回流。结果 NAR 短暂升至 81%, 然后逐渐下降 (图 2(b))。在第 20~28 天, 出水 NO_3^- -N 相对稳定 ($30\sim 41 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 说明综合控制策略仍能有效抑制 NOB 活性。第 29 天, HRT 由 12 h 缩短到 8 h, 出水 NO_3^- -N 由 $29.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 逐渐降至 $16.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAR 也增加到 90%。因此, HRT 是影响 PN 工艺稳定性的重要参数, HRT 过长会产生额外的 NO_3^- -N。

随着 PN 过程成功启动和 AOB 被富集积累^[16-17], 反应器中 DO 被 AOB 大量消耗, 这导致厌氧区室中的 DO 质量浓度降低至 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, 从而为厌氧菌提供了适宜的生长环境。由图 2(c) 可知, NRE 由 5.51% 逐渐增加到 25.52%。这表明 AnAOB 可能在此阶段自然富集。有研究表明, AOB 是从微需氧甚至厌氧的祖先进化而来的, 在亚硝酸氧化还原酶 (NXR) 和其他反射蛋白的形式上与 AnAOB 高度相似^[18]。MIAO 等的研究结果同样表明接种硝化污泥可以缩短 Anammox 的启动时间^[19]。因此, 基于 PN 工艺, AnAOB 可能更容易富集。此外, 高通量测序结果表明阶段 III 中 AnAOB 的增加。

3)PN/A 工艺的启动与运行。有研究^[20]表明, 较大污泥絮凝物中的 AnAOB 具有更高的活性。厌氧区中污泥絮体的生长可能会受到搅拌的限制, 从而抑制 AnAOB 的活性^[20]。因此, 在阶段 IV(61~86 d) 停止搅拌以增加 AnAOB 的活性。并且有研究表明, NO_2^- -N 质量浓度越高越有利于 Anammox 的积累^[21]。因此, 延长好氧区的相对曝气时间以进一步增加反应器中 NO_2^- -N 质量浓度。在第 IV 阶段, 厌氧区中停止搅拌, 并且好氧区中好氧/厌氧时间从 80 min/40 min 变为 90 min/30 min。在第 61 天后, MOBAPR 的 TN 质量浓度逐渐下降, 由 $126.96 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (第 61 天) 降低至 $(32.79\pm 6.21) \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (77~86 d), NRE 也从 21.5% 迅速增加到 $(78.86\pm 4.6)\%$ (图 2(c))。这表明在本研究采用的操作策略下, 61 d 内成功实现 PN/A 工艺的快速启动。

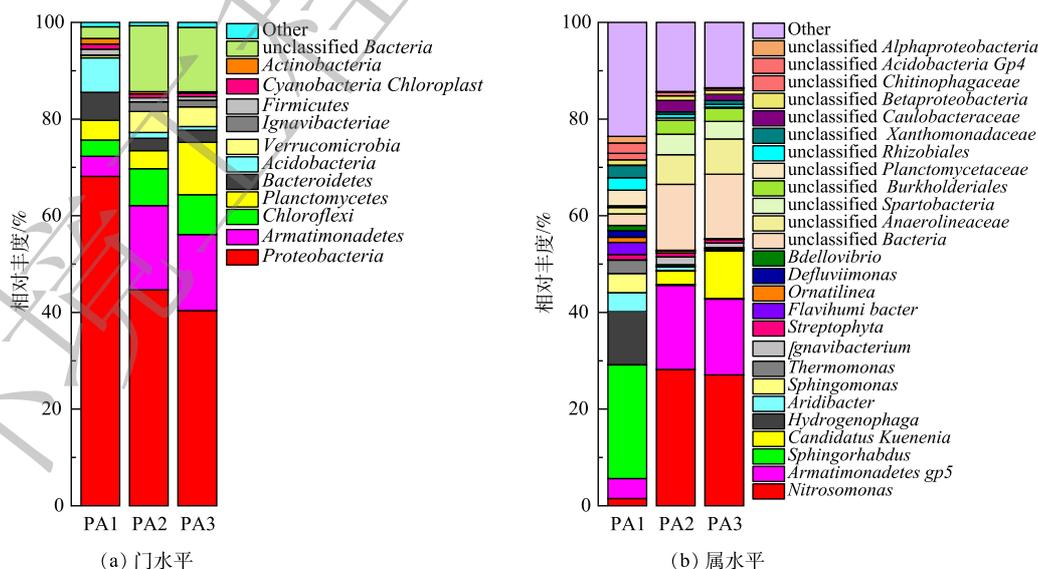
此外, 随着 AnAOB 成功富集, MOBAPR 中脱氮速率增加, 导致进水中大部分的 NH_4^+ -N 在 Rc1~Rc4 中已经被去除, 而 Rc5 和 Rc6 中功能微生物缺乏营养物质。因此, 有必要适当缩短 HRT 以保证 MOBAPR 中功能微生物的进一步富集。在阶段 V(87~110 d), HRT 由 8 h 缩短至 6 h。此阶段反应稳定后 (102~110 d), 出水 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 质量浓度分别为 (0.63 ± 0.50) 、 (16.72 ± 1.78) 和 $(8.29\pm 6.65) \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其中, 出水 NO_3^- -N 质量浓度 (NO_3^- -N 产生/ NH_4^+ -N 去除=0.12) 与 Anammox 的 NO_3^- -N 理论产生值 (NO_3^- -N 产生/ NH_4^+ -N 去除=0.11) 接近, 这表明 NOB 被稳定抑制^[21]。此外, PN/A 工艺的 NRE、ANR 和 NRR 分别为 $(83.41\pm 2.45)\%$ 、 $(97\pm 3.61)\%$ 和 $(0.41\pm 0.09) \text{ kg}\cdot(\text{m}^3\cdot\text{d})^{-1}$ (图 2)。这表明该操作策略可用于 MOBAPR, 以实现 PN/A 过程的长期高效稳定运行。

有趣的是, 在第 IV 和第 V 阶段(曝气量分别为 $0.08 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 $0.10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$), 所测得 DO 质量浓度接近 0。有研究^[14]表明, 当 AOB 的耗氧速率高于曝气效率, 反应器曝气后的 DO 质量浓度仍会保持在较低水平。因此, 在 MOBAPR 中非曝气后, 好氧区的曝气会被 AOB 等好氧细菌及时转化, 从而维持反应器内低 DO 水平。此外, 在 MOBAPR 中, AOB 的富集是 AnAOB 快速启动的关键。AOB 不仅可以为 AnAOB 创造环境, 还提供营养物质。然而 AOB 主要是在好氧区活性较高。因此, 在整个启动期间, 基本不对厌氧区进行直接调控(搅拌停止后)。

2.2 各阶段微生物群落演替分析

为了探索 MOBAPR 中微生物群落的变化规律, 对接种物、第 56 天(第 III 阶段末期)和第 110 天(第 V 阶段)末期采集的污泥样品进行微生物群落进行分析。其中 PA1 为接种物 A0, PA2 为第 III 阶段各反应柱(A1、A2、A3、A4、A5 和 A6)内微生物丰度的平均值, PA3 为第 V 阶段(B1、B2、B3、B4、B5 和 B6)微生物丰度的平均值。高通量测序得到的优质细菌序列被划分为不同的分类类别(门和属), 结果如图 3(a) 和图 3(b) 所示。*Proteobacteria* 包括具有硝化反硝化功能的细菌^[16], 是门水平上的主要细菌(图 3(a))。*Proteobacteria* 在接种物中的丰度为 68.15%, 而在阶段 III 和阶段 V 后分别下降到 44.68% 和 40.39%(图 3(a))。这表明在变形菌门中许多异养硝化或反硝化细菌由于有机物的缺乏而被淘汰。有研究表明, *Planctomycete* 门中不仅拥有一些专性好氧菌, 还包含了所有已知的 AnAOB^[2]。接种物(PA1)中的 *Planctomycete* 相对丰度接近第 III 阶段(PA2), 分别为 4.07% 和 3.71%。而到了第 V 阶段(PA3), *Planctomycete* 丰度达到 10.85%, 这表明 *Planctomycete* 主要在第 III 阶段后被富集。此外, 在属水平上 PA1 的 *Candidatus Kuenenia* 的相对丰度极低, 约 0.05%(图 3(b))。这表明在接种物中几乎不含 AnAOB。与接种物(PA1)相比, PA2 和 PA3 中 *Armatimonadetes* 和 *Chloroflexi* 的丰度显著增加(图 3(a))。有研究表明, 在 *Armatimonadetes* 和 *Chloroflexi* 中的许多细菌含有与氮代谢相关的功能基因(*Nar*、*NirK* 或 *Nos*)^[22]。因此, *Armatimonadetes* 和 *Chloroflexi* 可能含有多种 AOB 和 AnAOB 协同细菌, 为 PN/A 工艺的启动和运行做出了贡献。

图 3(b) 反映了 PN/A 工艺中所有样品在属水平上的微生物群落。在第 III 阶段 *Nitrosomonas* 的丰度由 1.49% 增加到 28.20%(图 3(b)), 证实了该操作策略可以成功富集 AOB。并且, 16s 结果表明 *Candidatus Kuenenia* 是 MOBAPR 中主要的 AnAOB, 其由接种物 PA1(0.05%) 增长到 2.97%。这表明随着 PN 工艺的长期运行, 此阶段(第 56 天)AnAOB 开始富集。在第 V 阶段, PN/A 工艺启动成功并长期运行后, *Nitrosomonas* (27.09%) 和 *Candidatus Kuenenia*(9.99%) 的丰度得到了较高程度富集, 这表明 AOB 和 AnAOB 在 MOBAPR 中可以同时富集。因此, 通过第 IV 和第 V 阶段的综合运行策略, AOB 和 AnAOB 作为优势菌被富集, 并形成细菌协同关系完成脱氮。此外, NOB 的主要菌属 *Nitrobacter*、*Nitrospira* 和 *Nitrospina* 等可能由于含量太低 (<0.1), 均未被检测到。



注: PA1 为接种物 A0, PA2 为第 III 阶段各反应柱(A1、A2、A3、A4、A5 和 A6)内微生物丰度的平均值, PA3 为第 V 阶段(B1、B2、B3、B4、B5 和 B6)微生物丰度的平均值。

图 3 第 I、第 III 和第 V 阶段微生物群落系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the microbial community at stage I, stage III and stage V

2.3 不同阶段各反应柱内的氮转化途径

1) 氮转化途径分析。为了更深入地了解 MOBAPR 各反应柱内 PN/A 工艺的氮转化过程, 对 PN (阶段 III) 和 PN/A 工艺 (阶段 V) 长期运行阶段分别进行测试分析, 结果如图 4 所示。在第 III 阶段, 出水 NO_2^- -N 质量浓度从 Rc1 到 Rc6 逐渐增加, NH_4^+ -N 相应降低 (图 4(a))。这表明各反应柱内均参与到氨氧化过程中。每个反应柱内都含有 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N (图 4(a)), 这为 AnAOB 的富集提供了必要条件。并且由于氨氧化过程需要氧气参与, 好氧区 (Rc1、Rc3 和 Rc5) 内的 ANR 显著高于厌氧区 (Rc2、Rc4 和 Rc6) (图 4(c))。此外, NO_3^- -N 浓度一直处于较低水平 ($<10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (图 4(a)), 这表明通过本研究采用的操作策略, NOB 活性长期受到有效抑制。在这一阶段, MOBAPR 的平均氮损失约为 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 4(a)), 证实了反硝化细菌或 AnAOB 的增加。特别是 Rc1、Rc3 和 Rc5 中 NRE 的增加也显著高于 Rc2、Rc4 和 Rc6 (图 4(e)), 说明好氧区内氮损失主要是反硝化细菌或 AnAOB 造成的。

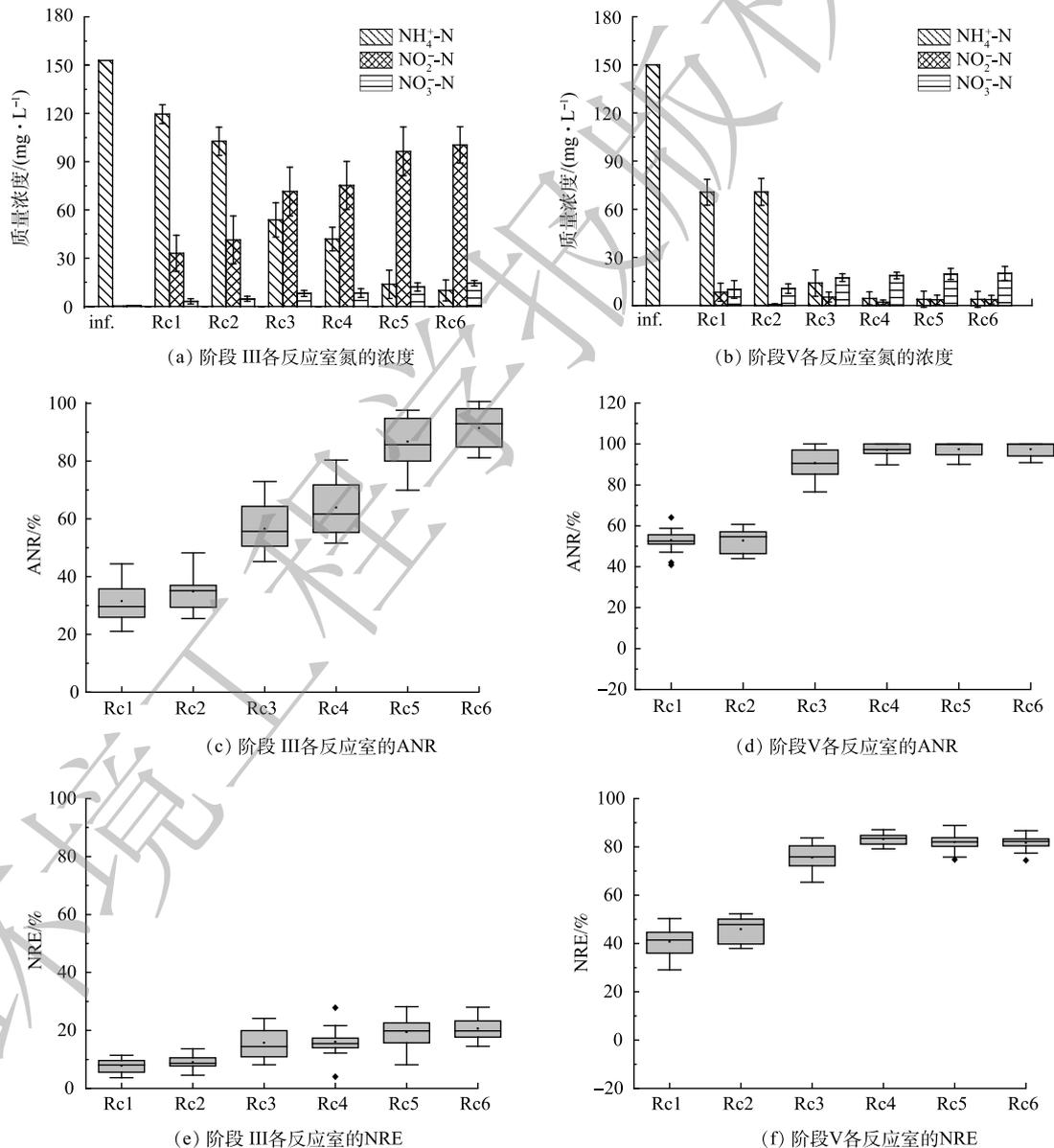


图 4 PN 工艺 (阶段 III) 和 PN/A 过程 (阶段 V) 各反应柱内的氮转化途径

Fig. 4 The nitrogen conversion pathways in the reactor after the PN process (stage III) and PN/A process (stage V)

在第V阶段,由于进水中的氨($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)通过前4个反应柱被PN/A完全转化,最后2个反应柱(Rc5和Rc6)在此阶段被废弃。模拟废水在流经Rc4后被排出。如图4(b)所示,在此阶段出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 降至较低水平。这表明经过长期运行,PN/A工艺的NRE有所提高。此外,由图4(d)可以看出,大部分氨氧化过程基本在Rc1完成,而在Rc4之后脱氮量达到最高(图4(f))。此外,在第V阶段各反应柱内 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 含量低于阶段III(图4(a)),这表明由AOB产生的 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 被AnAOB快速利用,即AnAOB与AOB之间形成了良好的协同脱氮效果。Rc1和Rc3中NRE和ANR均显著增加(图4(f)),因此,PN和Anammox过程主要在好氧室中进行。这是由于在好氧区内形成了内层AnAOB和外层AOB的微生物生物膜协同脱氮系统。依赖于外部的AOB提供的 $\text{NO}_2^-\text{-N}$,内部的厌氧微生物将剩余的氨转化为氮。其中,由图4(f)可知,厌氧区(Rc2和Rc4)中NRE的增加远低于好氧区(Rc1和Rc3),并且厌氧区的出水 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 几乎为0(图4(b))。因此, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的缺乏可能限制了厌氧区的NRE。此外,在MOBAPR的好氧室中添加填料形成生物膜系统,不仅有效避免了DO对AnAOB的抑制,而且还有利于AnAOB的富集。在此阶段稳定的生物膜和颗粒污泥系统分别在好氧区和厌氧区形成。一方面,在好氧区的生物膜系统中形成了分层分布的好氧外层和厌氧内层。AnAOB在厌氧环境的生物膜内层得到富集,并与外层AOB协同脱氮。另一方面,AOB产生的大部分 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 被生物膜内层的AnAOB利用,剩余少量 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 流出并被位于厌氧区的AnAOB颗粒污泥消耗。此阶段在好氧区的脱氮方式与单阶段PN/A工艺相似,而厌氧区脱氮方式与两阶段PN/A工艺相似。因此,生物膜和颗粒污泥结构成功将单阶段与两阶段PN/A工艺的优势结合在一起,不仅具备两阶段PN/A更快的启动速度,还具备单阶段PN/A的更高效的反应速率。

2)各反应柱中AOB和AnAOB的动态分析。为了探究在PN工艺和PN/A工艺长期运行过程中,MOBAPR中不同反应柱内微生物群落的差异,对接种污泥、阶段III和阶段V获得的污泥样品进行高通量测序。其中,接种污泥样品命名为A0,在第56天(阶段III)Rc1、Rc2、Rc3、Rc4、Rc5和Rc6采集的样品分别命名为A1、A2、A3、A4、A5和A6,在第110天(阶段V)采集的样品命名为B1、B2、B3、B4、B5和B6。高通量测序得到的相关参数如表2所示。厌氧区中的Simpson

表2 微生物多样性分析
Table 2 Microbial diversity analysis

阶段	样品	序列数	丰富度		OTU数	多样性		覆盖率/%	
			Ace指数	Chao1指数		Simpson指数	Shannon指数		
I	A0	52 844	913.5	933.6	841	0.07	4.27	99.8	
	A1	57 036	886	863	724	0.11	3.48	99.7	
	A2	64 451	1 006.4	1 024.1	877	0.05	4.13	99.7	
	A3	70 746	891	932.1	751	0.16	3.05	99.7	
	III	A4	54 252	949.5	953.5	801	0.08	3.78	99.7
		A5	59 513	899.5	902.3	786	0.18	3.13	99.7
A6		52 884	962.5	1 003.1	842	0.07	3.99	99.7	
V	B1	61 553	844.7	837.2	666	0.12	3.21	99.7	
	B2	64 627	892.2	896.5	742	0.09	3.57	99.7	
	B3	75 032	845.7	863.1	692	0.11	3.2	99.8	
	B4	62 284	900.8	909.7	764	0.06	3.86	99.7	
	B5	62 838	853.3	852	703	0.21	2.84	99.7	
	B6	59 777	984.9	1 014.6	851	0.13	3.64	99.7	

注: A1、A3、A5、B1、B3和B5是来自好氧区的污泥样品; A2、A4、A6、B2、B4和B6是来自厌氧区的污泥样品。

指数明显低于好氧区(表 2)，这说明好氧区的物种富集程度是高于厌氧区的，Shannon 指数也得到了类似的结论。每个污泥样品的覆盖率超过 99.70%(表 2)，说明高通量测序基本代表了污泥样品的实际微生物群落结构。

为深入了解好氧生物膜/厌氧颗粒污泥的微生物分布情况，在阶段 III 和阶段 V，从 MOBAPR 中的 6 个反应柱中获得的污泥样品进行了微生物群落分析。PN 工艺启动并长期运行后，A1、A3 和 A5 中亚硝基单胞菌 (*Nitrosomonas*) 的相对丰度分别从 1.49% 提高到 30.99%、39.77% 和 40.74%，A2、A4 和 A6 中亚硝基单胞菌的相对丰度分别从 1.49% 提高到 11.42%、22.25% 和 22.15%(图 5(c))，这证实了 AOB 在每个隔间中都被富集。厌氧区中 AOB 的富集与好氧区出水的 DO 有关。因此，厌氧区的 AOB 丰度明显低于好氧区(图 5(c))。此外，在 A1、A2、A3、A4、A5 和 A6 中，AnAOB(*Candidatus Kuenenia*) 的丰度分别由 0.05% 提高到 0.16%、5.25%、0.56%、5.87%、0.39% 和 5.06%(图 5(c))，这表明 AnAOB 已经开始富集。AOB 不仅通过消耗溶解氧为 AnAOB 创造厌氧环境还为 AnAOB 提供必需的基质 (NO_2^- -N)。因此，此阶段 *Nitrosomonas* 富集可能为 Anammox 的启动奠定了基础。

在 PN/A 工艺成功启动和运行后(第 V 阶段)，B1、B2、B3 和 B4 中 *Candidatus Kuenenia* 的丰度分别增加到 12.67%、19.07%、12.41% 和 11.43%(图 5(a))。由于 Rc5 和 Rc6 中 NO_2^- -N 的缺乏，B5 和 B6 中 *Candidatus Kuenenia* 的丰度较低(分别为 0.24% 和 2.29%)。在各反应柱中，*Nitrosomonas* 和 *Candidatus Kuenenia* 都得到了较高水平的积累(图 5(b))。这证实了微生物之间协同脱氮系统的存在。有趣的是，*Candidatus Kuenenia* 不仅被富集在厌氧区，而且在好氧区中也有较高的丰度，这表明好氧区已形成分层分布的生物膜系统。此外，在 PN/A 工艺的长期运行阶段，未分类菌数量较多

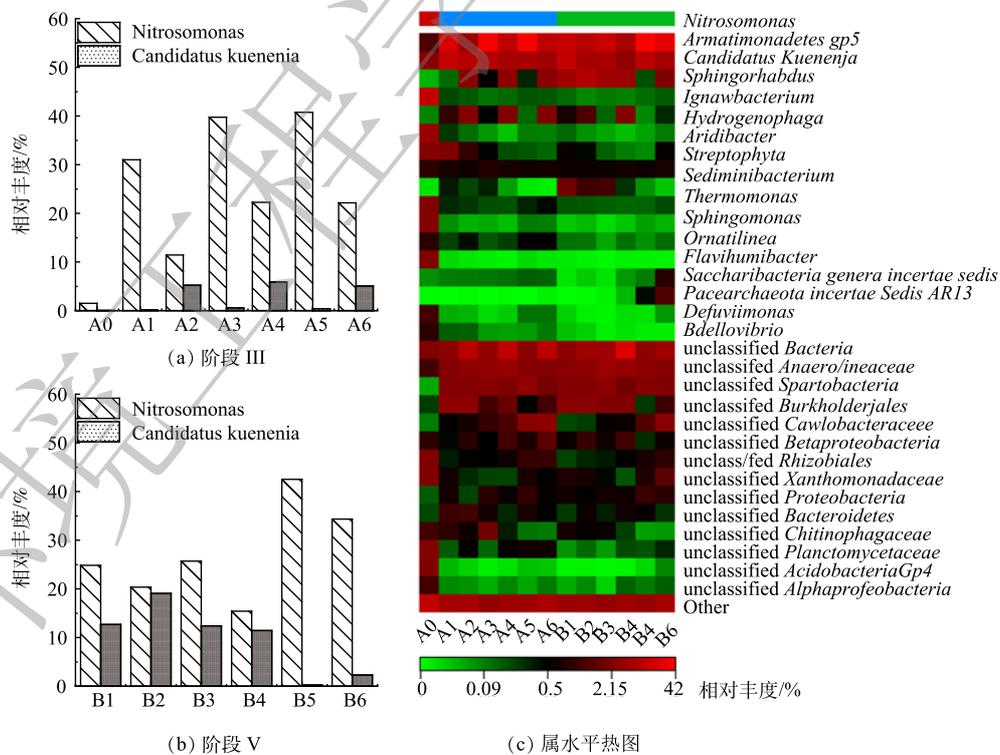


图 5 PN 和 PN/A(阶段 III 和阶段 V) 稳定运行后各反应柱内微生物群落结构

Fig. 5 The microbial community structure in each reaction column of PN and PN/A (Stage III and Stage V) under stable operation conditions

(图5(c))。有研究表明, PN/A工艺微生物群落由各种功能菌和协作菌共同组成的^[14]。因此, 在演替过程中会出现一些未分类协作菌以促进功能菌更好的富集。

2.4 G/L对NRE的影响

在第V阶段, MOBAPR中的DO值接近于零。一方面, 不能通过控制DO值来进一步优化反应器性能; 另一方面, 不能人为直接调控DO值, 即只能通过曝气量或流量等来间接调控DO值。因此, 在PN/A工艺在运行过程中, DO控制会存在一定的滞后性。此外, 在此阶段发现曝气速率越高, 厌氧菌活性会降低; 而曝气速率越低, 厌氧菌的氮转化性能同样会将低。因此, 在MOBAPR中提供合适的曝气量非常重要。

第2.1节和2.2节中的结果表明可通过缩短HRT将MOBAPR的NRE进一步提高, 但好氧区中AOB的需氧量随着进水氨氮浓度的增加而增加。因此, 本研究通过控制G/L, 一方面可以为MOBAPR中的功能微生物提供稳定适宜的 $\text{NO}_2^- \text{-N}/\text{NH}_4^+ \text{-N}$, 从而促进MOBAPR的总氮去除率; 另一方面, 直接调控反应器参数(代替DO控制), 从而简化操作。为探讨G/L对总氮去除率的影响, 通过调节曝气量和HRT, 在进水 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 为 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 好氧/厌氧时间为 $90 \text{ min}/30 \text{ min}$ 条件下, G/L参数分别设置为2.4、4.8、7.2、9.6、14.4、19.2、21.6、28.8和38.4。用高斯模型对得到的NRE和相应的G/L进行拟合(极点拟合)以得出最适G/L, 拟合结果如图6所示。可以看出, PN/A工艺的NRE在G/L为0~19.2时增大, 而在G/L为21.6~38.4时减小。高斯模型的相关系数(R^2)为0.9922(图6(b)), 说明该模型较好地描述了NRE与G/L之间的关系。模型拟合结果表明, 当G/L比值参数为20~30时, NRE可达到较高水平。

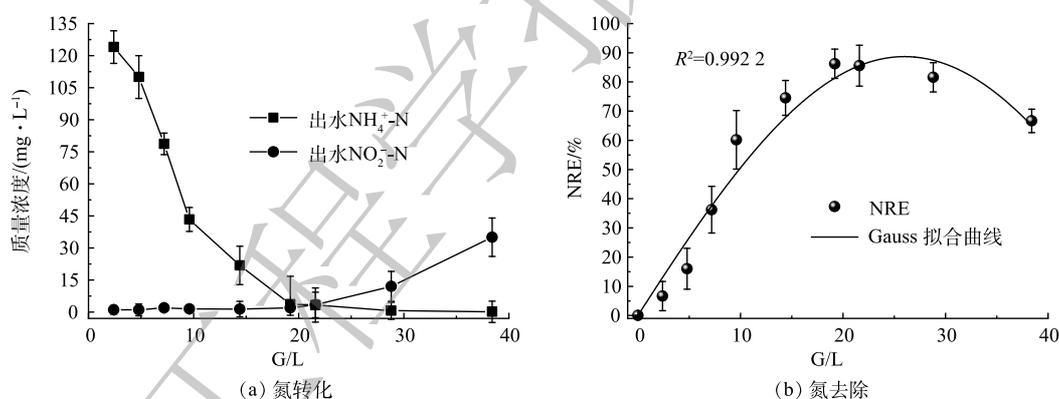


图6 G/L对MOBAPR氮去除和氮转化的影响

Fig. 6 Effect of G/L on nitrogen removal and nitrogen conversion in MOBAPR

3 结论

- 1) 本研究构建了厌氧和好氧区共存、悬浮污泥系统与生物膜系统相结合的MOBAPR。
- 2) 在MOBAPR中15天内成功启动PN工艺, PN/A工艺在61天内成功启动。在运行阶段, PN工艺的NAR为 $(87.35 \pm 2.7)\%$, PN/A工艺的NRE为 $(83.41 \pm 2.45)\%$ 。
- 3) 高通量测序结果表明, *Nitrosomonas*(27.09%)和*Candidatus Kuenenia*(9.99%)在厌氧区和好氧区被同时富集。在长期运行阶段, PN工艺的NAR为 $(87.35 \pm 2.7)\%$, PN/A工艺的NRE为 $(83.41 \pm 2.45)\%$ 。
- 4) 在DO低至无法控制时, G/L可能是一种可以代替DO控制的重要策略, 并且高斯模型拟合结果表明, 当G/L比值参数为20~30时, NRE可达到较高水平。

参考文献

- [1] AHN Y-H. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(8): 1709-1721.
- [2] XU Y, XU Y, LI T, et al. Two-step partial nitrification-anammox process for treating thermal-hydrolysis anaerobic digester effluent: Start-up and microbial characterisation[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 252: 119784.
- [3] FENG Z, WU G. Start-up of anammox systems with different feeding patterns: System performance, microbial community and potential microbial interactions[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 39: 101694.
- [4] CHEN G, ZHANG Y, WANG X, et al. Optimizing of operation strategies of the single-stage partial nitrification-anammox process[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 256: 120667.
- [5] WANG T, WANG X, YUAN L, et al. Start-up and operational performance of Anammox process in an anaerobic baffled biofilm reactor (ABBR) at a moderate temperature[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 279: 1-9.
- [6] ANTM I P, ZHANG D, SU H, et al. Nitrogen removal from landfill leachate by single-stage anammox and partial-nitrification process: effects of microaerobic condition on performance and microbial activities[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2020, 38: 101572.
- [7] CAI F, LEI L, LI Y. Rapid start-up of single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitrification (SNAP) process in a sequencing batch biofilm reactor (SBBR) inoculated with conventional activated sludge[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2020, 147: 104877.
- [8] 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.
- [9] LI Y Y, HUANG X W, LI X Y. Using anammox biofilms for rapid start-up of partial nitrification-anammox in integrated fixed-film activated sludge for autotrophic nitrogen removal[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 791: 148314.
- [10] CHEN C, JIANG Y, LIU J, et al. The structure of anammox granular sludge under varying long-term organic matter stress: Performance, physiochemical and microbial community[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 323: 129117.
- [11] KUAI V. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1998, 64(11): 4500-6.
- [12] MIAO Y, ZHANG L, YU D, et al. Application of intermittent aeration in nitrogen removal process: Development, advantages and mechanisms[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 430: 133184.
- [13] ZHANG D, SU H, ANTM I P, et al. High-rate partial-nitrification and efficient nitrifying bacteria enrichment/out-selection via pH-DO controls: Efficiency, kinetics, and microbial community dynamics[J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 692: 741-755.
- [14] SU H, ZHANG D, ANTM I P, et al. Unraveling the effects of light rare-earth element (Lanthanum (III)) on the efficacy of partial-nitrification process and its responsible functional genera[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 408: 127311.
- [15] SU H, ZHANG D, ANTM I P, et al. Adaptation, restoration and collapse of anammox process to La(III) stress: Performance, microbial community, metabolic function and network analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 325: 124731.
- [16] SU H, ZHANG D, ANTM I P, et al. Exploring potential impact(s) of cerium in mining wastewater on the performance of partial-nitrification process and nitrogen conversion microflora[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 209: 111796.
- [17] CHI Y, ZHANG X, SHI X, et al. Quick start-up of partial nitrification in a novel anaerobic/ pulse washout (APW) process for treating municipal wastewater[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 285: 124850.
- [18] LUCKER S, WAGNER M, MAIXNER F, et al. A Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(30): 13479-13484.
- [19] MIAO Y, ZHANG J, PENG Y, et al. An improved start-up strategy for mainstream anammox process through inoculating ordinary nitrification sludge and a small amount of anammox sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384: 121325.
- [20] VARAS R, GUZM V, GIUSTINIANOVICH E, et al. Startup and oxygen concentration effects in a continuous granular mixed flow autotrophic nitrogen removal reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 190: 345-351.
- [21] ZUO F, SUI Q, ZHENG R, et al. In situ startup of a full-scale combined partial nitrification and anammox process treating swine digestate by regulation of nitrite and dissolved oxygen[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 315: 123837.
- [22] YIN X, RAHAMAN M H, LIU W, et al. Comparison of nitrogen and VFA removal pathways in autotrophic and organotrophic anammox reactors[J]. *Environmental Research*, 2021, 197: 111065.

(责任编辑: 曲娜)

Start-up and regulation of PN/A process in a multi-stage aerobic-biofilm/anoxic-particle reactor

ZHAO Jiejun*

CCCC(Tianjin) Eco-Environmental Protection Design & Research Institute Co, Tianjin 300000, China

*Corresponding author, E-mail: 2867853172@qq.com

Abstract The simultaneous and rapid enrichment of anaerobic ammonia-oxidizing bacteria (AnAOB) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) is the key to efficiently perform the partial nitrification/anaerobic ammonia oxidation (PN/A) process. In this study, a multistage aerobic-biofilm/anaerobic-granular sludge reactor (MOBAPR) was constructed. The aerobic-biofilm/anaerobic-particle structure of MOBAPR not only effectively retains biomass, but also provides the spatial conditions for simultaneous enrichment of AnAOB and AOB. In MOBAPR, fast start-up of the PN process was achieved by controlling pH and intermittent aeration within 15 days. Then on the basis of the stable running of PN process, the rapid start of PN/A process was accomplished 61 days later, and the nitrogen removal efficiency (NRE) reached $(83.41 \pm 2.45)\%$. 16S rRNA gene sequencing revealed that the simultaneous enrichment of AOB (27.09%) and AnAOB (9.99%) in MOBAPR occurred. During the operation of the PN/A process, The Gas/Liquid ratio (aeration rate to water inflow rate) was an operational parameter highly correlated (0.992) with NRE. The optimal control of G/L can not only improve the nitrogen removal performance of MOBAPR, but also replace DO control when DO is too low to control.

Keywords partial nitrification; anammox; autotrophic nitrogen removal; microbial characteristics