

研究报告



好氧和缺氧条件下游离亚硝酸对氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌的选择性抑制

吕心涛^{1,2,3} 蒋勇^{*1,2,3} 孟春霖^{1,2,3} 张树军^{1,2,3} 谷鹏超^{1,2,3} 杨岸明^{1,2,3}
王佳伟^{1,2,3} 韩晓宇^{1,2,3}

1 北京市污水资源化工程技术研究中心 北京 100124

2 北京城市排水集团有限责任公司 北京 100044

3 北京市水环境技术创新中心 北京 100044

摘要:【背景】稳定短程硝化是实现城市污水厌氧氨氧化技术的瓶颈,目前国内外关于游离亚硝酸(Free nitrous acid, FNA)对硝化菌活性的影响大多是在曝气条件下进行研究,鲜有关于缺氧条件下FNA对硝化菌活性影响的报道。【目的】探究好氧和缺氧下FNA对氨氧化菌(Ammonia oxidizing bacteria, AOB)和亚硝酸盐氧化菌(Nitrite oxidizing bacteria, NOB: *Nitrospira* 和 *Nitrobacter*)活性的抑制影响。【方法】采用序批式反应器(Sequencing batch reactor, SBR),基于混合液悬浮固体浓度(Mixed liquid suspended solids, MLSS)为8 300 mg/L的全程硝化污泥条件,通过批次试验分别考察好氧和缺氧下FNA(初始浓度为1.16 mg/L)处理48 h后, AOB和NOB活性的变化情况。【结果】好氧FNA处理活性污泥48 h后, FNA浓度维持在1.16–1.17 mg/L, 游离氨(Free ammonia, FA)浓度小于0.017 mg/L, AOB、*Nitrospira*、*Nitrobacter*丰度均未发生明显变化;过曝气至99 h时,与空白组相比,比氨氮氧化速率($r_{\text{NH}_4\text{-N}}$)、比亚硝酸盐氮氧化速率($r_{\text{NO}_2\text{-N}}$)均出现小幅下降,分别由3.5、4.828 mg N/(g VSS·h)降至3.3、4.668 mg N/(g VSS·h),且亚硝酸盐氮累积率(Nitrite accumulation rate, NAR)始终低于33.2%。缺氧FNA处理活性污泥48 h后, FNA浓度维持在0.64–1.16 mg/L, FA浓度低于0.039 mg/L, AOB丰度变化较小,而*Nitrospira*、*Nitrobacter*丰度均明显下降,分别由 3.0029×10^9 、 4.245×10^8 copies/g VSS降至 1.6665×10^8 、 5.1638×10^7 copies/g VSS;过曝气至99 h时,与空白组相比, $r_{\text{NH}_4\text{-N}}$ 值下降幅度较小,而 $r_{\text{NO}_2\text{-N}}$ 值明显降低,由4.828 mg N/(g VSS·h)降至0.007 mg N/(g VSS·h),且在过曝气0–292 h内, NAR均大于94%。【结论】好氧FNA处理活性污泥48 h后对AOB和NOB无明显抑制作用,但缺氧FNA处理活性污泥48 h后对AOB具有轻微抑制作用,而对NOB具有强烈的抑制作用,可以实现稳定的短程硝化。

关键词: 游离亚硝酸, 好氧, 缺氧, 亚硝酸盐积累率, 硝化菌活性

Foundation items: Beijing Municipal Science and Technology Project (D171100001017001, Z181100005518003); National Key Research and Development Program of China (2016YFC0401103)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-88386826; E-mail: bjbdcjy@163.com

Received: 09-04-2019; **Accepted:** 28-06-2019; **Published online:** 08-07-2019

基金项目: 北京市科技计划项目(D171100001017001, Z181100005518003); 国家重点研发计划项目(2016YFC0401103)

***通信作者:** Tel: 010-88386826; E-mail: bjbdcjy@163.com

收稿日期: 2019-04-09; **接受日期:** 2019-06-28; **网络首发日期:** 2019-07-08

Inhibitory of FNA on the activity of AOB and NOB under aerobic and anoxic conditions

LÜ Xin-Tao^{1,2,3} JIANG Yong^{*1,2,3} MENG Chun-Lin^{1,2,3} ZHANG Shu-Jun^{1,2,3}
GU Peng-Chao^{1,2,3} YANG An-Ming^{1,2,3} WANG Jia-Wei^{1,2,3} HAN Xiao-Yu^{1,2,3}

1 Beijing Engineering Research Center of Wastewater Resource, Beijing 100124, China

2 Beijing Drainage Group Co. Ltd., Beijing 100044, China

3 Beijing Water Environment Technology Innovation Center, Beijing 100044, China

Abstract: [Background] Stable partial nitrification is the bottleneck to achieve the anammox technology of municipal wastewater. At present, the effect of free nitrous acid (FNA) on the activity of nitrifying bacteria at home and abroad are mostly studied under aeration conditions, while not much research has been reported to discuss the effect of FNA on the activity of nitrifying bacteria under anoxic conditions. [Objective] To investigate the inhibitory effect of FNA on the activities of ammonia oxidizing bacteria (AOB) and nitrite oxidizing bacteria (NOB: *Nitrospira* and *Nitrobacter*) under aerobic and anoxic conditions. [Methods] The activities of AOB and NOB were investigated in a sequencing batch reactor (SBR) after FNA (initial concentration 1.16 mg/L) treatment under aerobic and anoxic conditions for 48 hours, based on the condition that the suspended solid concentration of mixed solution (MLSS) was 8 300 mg/L. [Results] After treatment under aerobic conditions with FNA for 48 hours, the FNA concentration was maintained at 1.16–1.17 mg/L, and the FA concentration was less than 0.017 mg/L after 48 hours, results showed that the abundance of AOB, *Nitrospira* and *Nitrobacter* did not change significantly; Compared with the blank group, the specific ammonia oxidation rate ($r_{\text{NH}_4\text{-N}}$) and specific nitrite oxidation rate ($r_{\text{NO}_2\text{-N}}$) after aeration to 99 h decreased slightly, which decreased from 3.5 and 4.828 mg N/(g VSS·h) to 3.3 and 4.668 mg N/(g VSS·h) respectively, and the nitrite accumulation rate (NAR) was always lower than 33.2%. After treatment under anoxic conditions with FNA for 48 hours, the FNA concentration was maintained at 0.64–1.16 mg/L, and the FA concentration was lower than 0.039 mg/L, the AOB abundance changed slightly, while the *Nitrospira* and *Nitrobacter* abundance decreased significantly, which decreased from 3.0029×10^9 and 4.245×10^8 copies/g VSS to 1.6665×10^8 and 5.1638×10^7 copies/g VSS, respectively; Compared with the blank group, the $r_{\text{NH}_4\text{-N}}$ decreased slightly, but the $r_{\text{NO}_2\text{-N}}$ decreased significantly, which decreased from 4.828 mg N/(g VSS·h) to 0.007 mg N/(g VSS·h), and the NAR is maintained above 94% during over-aeration from 0 h to 292 h. [Conclusion] AOB and NOB were not significantly inhibited by FNA treatment for 48 hours under aeration conditions, but under anoxic conditions, NOB was strongly inhibited while AOB was slightly inhibited by FNA treatment for 48 hours, and stable partial nitrification could be achieved.

Keywords: Free nitrous acid, Aeration, Anoxic, Nitrite accumulation ratio, Activity of nitrifying bacteria

近年来,厌氧氨氧化技术越来越受到水处理行业的青睐,是环境界公认的最具可持续发展特质的废水脱氮技术^[1-3]。厌氧氨氧化工艺突破传统生物脱氮工艺理论和技术,是未来废水处理领域最具潜力、最经济的脱氮工艺^[4]。厌氧氨氧化菌利用亚硝酸盐氮(NO_2^- -N)为电子受体,氨氮(NH_4^+ -N)为电子供体,无需有机物为碳源,实现生物自养脱氮^[5]。对比传统生物脱氮,短程硝化+厌氧氨氧化技术具有减少60%曝气量、100%碳源投加量的技术优

势^[6-7]。稳定短程硝化是实现城市污水厌氧氨氧化技术的必需条件,而城市污水稳定短程硝化一直是难以攻克的课题^[8-9]。短程生物脱氮实质是利用氨氧化菌(Ammonia oxidizing bacteria, AOB)体内的氨单加氧酶(Ammonia monooxygenase, amoA)和羟胺氧化酶(Hydroxylamine oxidoreductase, HAO)将 NH_4^+ -N氧化为 NO_2^- -N的过程^[10],为厌氧氨氧化菌提供 NO_2^- -N。

短程硝化的实质是使亚硝酸盐氧化菌(Nitrite

oxidizing bacteria, NOB)成为劣势菌属并逐渐被淘汰出系统,使 AOB 成为硝化菌群中的优势菌种^[11-13]。研究发现, AOB 的氧饱和常数低于 NOB 的氧饱和常数,在低溶解氧(Dissolved oxygen, DO)下更有利于短程硝化的实现^[14], Blackburne 等^[15]研究认为,在 DO 浓度为 0.4 mg/L 时可以实现 NAR 高达 90%, Ma 等^[16]发现 DO 浓度控制在 0.4–0.7 mg/L 时系统中 NAR 达到 95%,实现短程硝化,但 Zeng 等^[17]研究表明,系统长期处于低 DO 浓度下会导致活性污泥解体,出现丝状菌膨胀。因此单纯通过控制低 DO 浓度并不能长期稳定实现短程硝化。Anthonisen 等^[18]发现一定浓度的游离亚硝酸(Free nitrous acid, FNA)对 NOB 活性具有强烈抑制作用, Vadivelu 等^[19]认为在好氧条件下 FNA 对 NOB 和 AOB 的抑制浓度分别为 0.02 和 0.40 mg/L, 吕心涛^[20]研究发现, FNA 才是 NOB 真正的基质底物,当 FNA 浓度为 0.702 mg/L 时,富集 NOB 活性被完全抑制, Wang 等^[21]发现当 FNA 浓度达到 0.24 mg/L 时 NOB 活性被完全抑制。

现有文献资料关于 FNA 对硝化菌活性的影响大多是在曝气条件下进行研究,鲜有关于缺氧条件下 FNA 对硝化菌活性影响的报道,若在缺氧条件下能够实现 FNA 对 NOB 的强烈抑制效果,且对 AOB 无抑制或较弱抑制作用,进而实现短程硝化,则可以达到快速实现短程硝化的目的,该技术对通过旁侧抑制实现城市污水短程硝化-厌氧氨氧化具有实际的理论指导意义。基于上述背景,本试验采用 2 个平行的序批式反应器(Sequencing batch reactor, SBR),考察在好氧和缺氧条件下, FNA 对 AOB 和 NOB 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 试验装置、废水特性及接种污泥

采用材质为有机玻璃构成的 SBR 反应器,有效容积为 1.8 L,采用磁力搅拌器进行搅拌。整个试验过程 DO 值、pH 值和温度(T 值)均通过 WTW 便携式探头进行测定。缺氧条件(本试验的缺氧是

指在系统中的 DO 不足以维持好氧菌的正常活动,即 DO 浓度小于 0.2 mg/L)和好氧条件抑制时,控制 DO 值分别为 0–0.2 mg/L 和 2.0 mg/L 左右,过曝气试验时, DO 值均在 2.0–5.0 mg/L 范围内。

试验用水取自北京市某污水处理厂初沉池出水,水质情况见表 1。通过投加 NaNO_2 (100 g/L) 调节 NO_2^- -N 浓度, pH 值通过 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 来调节。接种污泥取自北京市某污水处理厂二沉回流污泥,具有良好的全程脱氮和去除有机物能力,回流污泥 MLSS 维持在 5 400–6 500 mg/L 范围内。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒, MP 公司; PCR 反应试剂盒(Promega GoTaq Green Master Mix), Promega 公司;定量 PCR 反应试剂盒, TaKaRa 公司。NanoDrop One、实时定量 PCR 扩增仪、离子色谱, Thermo Fisher Scientific 公司;便携式 pH、DO、温度测定仪, WTW 公司;分光光度计,上海普析通用公司。

1.3 试验方法

抑制试验:取自北京市某污水处理厂二沉池回流污泥,调节 MLSS 为 8 300 mg/L 左右,并均分为两份分别倒入有效容积为 1.8 L 的 SBR 反应器中进行好氧 FNA 和缺氧 FNA 抑制,分别编号为 R1 和 R2。R1 和 R2 的 DO 值分别为约 2.0 mg/L 和小于 0.2 mg/L,温度均为 15–20 °C, pH 值均为 6.0 ± 0.1 ,初始 FNA 浓度均为 1.12 ± 0.40 mg/L,抑制时间均为 48 h,抑制始末各指标变化情况见表 2。

表 1 试验用水水质特性

Table 1 Characteristics of real domestic wastewater used in this study

指标 Index	范围 Range	平均值 Average value
pH	7.2–7.5	7.4
COD (mg/L)	128.4–530.2	315.4
NH_4^+ -N (mg/L)	33.9–65.4	47.1
NO_x^- -N (mg/L)	0.0–0.7	0.01
TN (mg/L)	34.2–65.5	47.7
PO_4^{3-} -P (mg/L)	1.6–7.1	3.7

表 2 抑制过程中各指标变化值

Table 2 Variation value of each indicator during the suppression process

指标 Index	时间 Time (h)	R1	R2
pH	0	6.02	6.02
	48	6.01	6.244
Temperature (°C)	0	15	15
	48	15	15
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	0	48	47.2
	48	33.5	65
NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	0	413	401
	48	408	380
NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	0	16	17
	48	40	14
FA (mg/L)	0	0.017	0.017
	48	0.012	0.039
FNA (mg/L)	0	1.16	1.12
	48	1.17	0.64

过曝气试验:对上述抑制完成后的污泥用自来水进行清洗,直至污泥中 NO₂⁻-N 被清洗完全,分别取清洗后的污泥, R1 和 R2 对应编号分别为 S1 和 S2,控制 MLSS 为 3 000 mg/L,初始 NO₂⁻-N 浓度为 30 mg/L 左右,DO 浓度为 2.0–5.0 mg/L,温度在 15–20 °C,每个周期进水(3 min)、曝气(70–90 h)、静沉(15 min)、排水(3 min),进行过曝气试验。

1.4 分析项目及检测方法

整个试验过程中 MLSS、NH₄⁺-N、NO₃⁻-N、NO₂⁻-N 均采用标准方法^[22]进行检测, pH 值、DO 值和 T 值均采用便携式 WTW-Multi 3420 测定仪进行测定。

定量 PCR (qPCR): 用 1×PBS 清洗污泥样品 3 次, 14 000×g 离心 2 min 去除上清液, 置于 -20 °C 保存。采用试剂盒对 DNA 进行提取, 提取后的 DNA 通过 NanoDrop One 测量核酸浓度及纯度。PCR 反应采用试剂盒, 反应体系(25 μL): GoTaq Green Master Mix 12.5 μL, 正、反向引物(10 mmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 0.5–2.0 μL, ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应条件见表 3。采用特异性引物对 AOB *amoA* 功能基因隶属于 NOB 菌群的 *Nitrospira* 和 *Nitrobacter* 以及全菌的 16S rRNA 基因进行 qPCR 扩增。反应在 QuantStudio™ 7 Flex System 实时定量 PCR 仪上进行, 采用试剂盒进行反应, PCR 体系(25 μL): SYBR 缓冲液 12.5 μL, 正、反向引物(10 mmol/L)各 1 μL, ROX 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 补足 25 μL。通过质粒连接、转化、扩大培养、质粒纯化获得质粒。

表 3 PCR 扩增程序及特异性引物

Table 3 Specific primers and PCR programs

菌群及目的基因 Flora and target gene	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	扩增长度 Amplification length (bp)	PCR 条件 PCR program	参考文献 References
AOB <i>amoA</i> gene	amoA-1F amoA-2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	491	95 °C 15 min; 45 cycles (95 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min)	[23]
Nitrobacter 16S rRNA gene	Nb1000F 1387R	TGCGACCGGTCATGG GGGCGGWGTGTACAAGGC	394	95 °C 10 min; 35 cycles (95 °C 1 min, 62 °C 2 min, 72 °C 2 min)	[24]
Nitrospira 16S rRNA gene	NSR1113F 1264R	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	165	95 °C 10 min; 35 cycles (95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min)	[24]
Bacterial 16S rRNA gene	1055F 1392R	ATGGCTGTCGTCAGCT ACGGCGGTGTGTAC	323	95 °C 10 min; 45 cycles (95 °C 30 s, 50 °C 1 min, 72 °C 20 s)	[25]

标准曲线的建立: 用 NanoDrop One 分光光度计测定质粒的浓度。将纯化后的质粒以 10 倍比梯度稀释用作 qPCR 标准品。反应在 QuantStudio™ 7 Flex System 实时定量 PCR 仪上进行, 采用试剂盒进行反应, PCR 反应体系和条件同上。

FNA、FA、 $r_{\text{NH}_4^+-\text{N}}$ 和 $r_{\text{NO}_2^--\text{N}}$ 计算公式分别见公式(1)、(2)、(3)和(4):

$$\text{FNA} = \frac{[\text{NO}_2^--\text{N}]}{\exp\left(\frac{-2300}{273+T}\right) \times 10^{\text{pH}}} \quad (1)$$

式中, FNA 表示游离亚硝酸浓度, mg/L; $[\text{NO}_2^--\text{N}]$ 表示亚硝酸盐氮浓度, mg/L; T 表示温度值, °C; pH 表示混合液酸碱度。

$$\text{FA} = \frac{17}{14} \frac{[\text{NH}_4^+-\text{N}] \times 10^{\text{pH}}}{\exp\left(\frac{6334}{273+T}\right) + 10^{\text{pH}}} \quad (2)$$

式中, FA 表示游离氨浓度, mg/L; $[\text{NH}_4^+-\text{N}]$ 表示氨氮浓度, mg/L; T 表示温度值, °C; pH 表示混合液酸碱度。

$$r_{\text{NH}_4^+-\text{N}} = \frac{\left([\text{NH}_4^+-\text{N}]_s - [\text{NH}_4^+-\text{N}]_e\right) \times 1000}{\text{MLVSS} \times t_n} \quad (3)$$

式中, $r_{\text{NH}_4^+-\text{N}}$ 表示比氨氮氧化速率, mg N/(g VSS·h); $[\text{NH}_4^+-\text{N}]_s$ 表示曝气开始时氨氮浓度, mg/L; $[\text{NH}_4^+-\text{N}]_e$ 表示曝气结束时氨氮浓度, mg/L; MLVSS 表示混合液挥发性悬浮固体浓度, mg/L; t_n 表示曝气时间, h。

$$r_{\text{NO}_2^--\text{N}} = \frac{\left([\text{NO}_2^--\text{N}]_s - [\text{NO}_2^--\text{N}]_e\right) \times 1000}{\text{MLVSS} \times t_n} \quad (4)$$

式中, $r_{\text{NO}_2^--\text{N}}$ 表示比亚硝酸盐氮氧化速率, mg N/(g VSS·h); $[\text{NO}_2^--\text{N}]_s$ 表示曝气开始时亚硝酸盐氮浓度, mg/L; $[\text{NO}_2^--\text{N}]_e$ 表示曝气结束时亚硝酸盐氮浓度, mg/L; MLVSS 表示混合液挥发性悬浮固体浓度, mg/L; t_n 表示曝气时间, h。

2 结果与讨论

2.1 抑制始末指标变化规律

图 1 为好氧和缺氧条件下抑制始末 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 、 NO_3^--N 、FNA、FA 浓度和 pH 值的变化情况。在好氧条件下, 抑制始末 pH 值和 FNA 浓度均未明显变化, 而 NH_4^+-N 浓度由 48 mg/L 降至 33.5 mg/L, NO_2^--N 浓度由 413 mg/L 降至 408 mg/L, NO_3^--N 浓度由 16 mg/L 升至 40 mg/L,

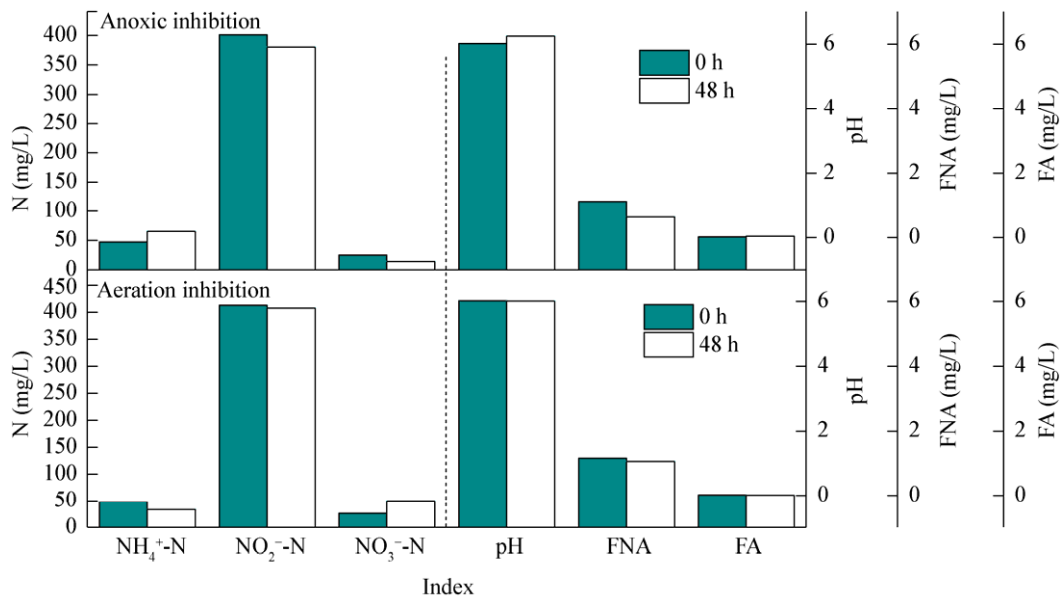


图 1 抑制条件下 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 、 NO_3^--N 、pH、FNA 和 FA 的变化规律

Figure 1 Evolution of ammonia, nitrite, nitrate, pH, FNA and FA in the system under inhibition conditions

说明在好氧条件下 FNA 浓度为 1.16 mg/L 时, 经过 48 h 的抑制, AOB 和 NOB 活性均未被完全抑制。在缺氧条件下, 抑制始末 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度由 47.5 mg/L 升高至 65 mg/L, 分析认为这可能是由于在缺氧抑制过程中 DO 浓度始终小于 0.2 mg/L, 活性污泥发生水解导致系统中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度升高, 而 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度均未显著下降, 分别由 401、17 mg/L 降至 380、14 mg/L, pH 值由 6.020 升高至 6.244, 分析认为这是由于在缺氧条件下 FNA 浓度为 1.16 mg/L 时对反硝化菌活性具有一定的抑制作用造成的, 这也与 Wang 等^[21]研究认为缺氧条件下 FNA 浓度为 0.2 mg/L 时可抑制反硝化菌活性且该抑制可逆的观点基本一致。同时 Liu 等^[26]研究认为在 DO 为 0.16 mg/L 时 AOB 和 NOB 活性并未有明显差异, 且随着试验的进行 NOB 活性大于 AOB 活性, 并不能实现短程硝化, 因此排除在本试验条件下 DO 对试验结果的干扰。

同时, 在整个好氧抑制过程中, FA 浓度始终小于 0.017 mg/L, 而 Anthonisen 等^[18]研究发现 FA 对 AOB 和 NOB 的抑制阈值分别为 10–150 mg/L 和 0.1–1.0 mg/L, Katsou 等^[27]认为当 FA 浓度为 0.19–1.52 mg/L 时 NOB 活性降低 35%–65%, 说明本试验 FA 浓度并不能对硝化菌活性产生影响, 排除 FA 浓度对本试验结果的干扰。在整个缺氧抑制过程中, FA 浓度始终低于 0.039 mg/L, Qian 等^[28]通过缺氧条件控制 FA 浓度为 5 mg/L 处理活性污泥后, NAR 仅为 10%, 因此本试验下的 FA 浓度并未参与对硝化菌的抑制过程。在好氧抑制阶段 FNA 浓度在 1.16–1.17 mg/L 范围内, 而缺氧抑制初始 FNA 浓度为 1.12 mg/L, 抑制 48 h 后 FNA 浓度降为 0.64 mg/L。研究发现, 在好氧条件下 FNA 浓度为 0.02 mg/L 时对 NOB 活性产生抑制作用^[19], Park 等认为在有氧条件下 FNA 浓度为 0.92 mg/L 时对 NOB 活性产生强烈抑制^[29], 而在缺氧条件下 FNA 浓度为 0.24 mg/L 时 NOB

已停止活动^[21], 因此本试验条件下, 在整个好氧和缺氧抑制过程中, FNA 浓度始终在对 NOB 存在抑制的浓度范围内。

2.2 硝化菌活性变化规律

图 2 为空白组、好氧抑制 48 h、缺氧抑制 48 h 后的 AOB、*Nitrospira*、*Nitrobacter* 的丰度变化情况。图 3 显示了空白组的 $r_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ 和 $r_{\text{NO}_3^-\text{-N}}$ 的变化规律、好氧条件下抑制 48 h 后过曝气 99 h 时的 $r_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ 和 $r_{\text{NO}_3^-\text{-N}}$ 变化规律, 以及缺氧条件下抑制 48 h 后过曝气 99 h 时的 $r_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ 和 $r_{\text{NO}_3^-\text{-N}}$ 变化规律。

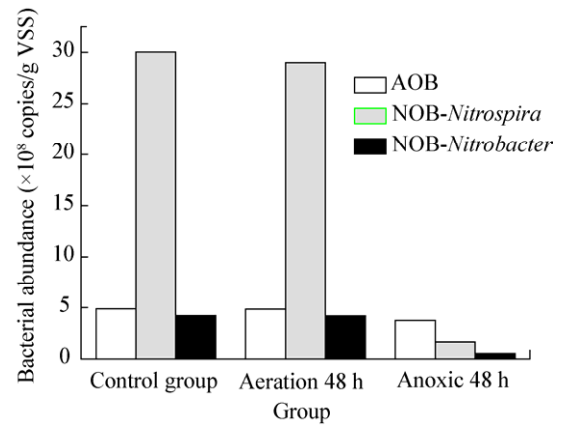


图 2 不同抑制条件下, AOB、*Nitrospira*、*Nitrobacter* 丰度变化规律

Figure 2 Change in abundance of AOB, *Nitrospira* and *Nitrobacter* under different inhibition conditions

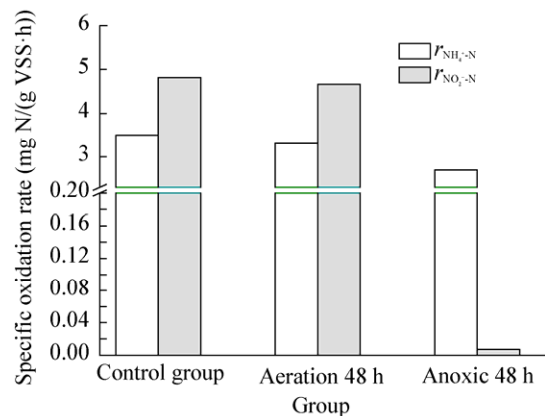


图 3 不同抑制条件下, 过曝气 99 h 后 $r_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ 和 $r_{\text{NO}_3^-\text{-N}}$ 变化规律

Figure 3 The variation of $r_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ and $r_{\text{NO}_3^-\text{-N}}$ under different inhibition conditions

在经过好氧抑制 48 h 后,与空白组相比,AOB、*Nitrospira*、*Nitrobacter* 丰度均未明显变化,分别由 $4.890\ 9 \times 10^8$ 、 $3.002\ 9 \times 10^9$ 、 4.245×10^8 copies/g VSS 降 $4.864\ 6 \times 10^8$ 、 $2.898\ 7 \times 10^9$ 、 $4.186\ 6 \times 10^8$ copies/g VSS。好氧抑制 48 h 后的活性污泥过曝气至 99 h 时,其 $r_{\text{NH}_4\text{-N}}$ 和 $r_{\text{NO}_2\text{-N}}$ 均未明显降低,分别由 3.5、4.828 mg N/(g VSS·h) 降至 3.3、4.668 mg N/(g VSS·h),这与 AOB、*Nitrospira*、*Nitrobacter* 丰度变化结果基本一致,说明在好氧条件 FNA 浓度约为 1.16 mg/L 时,经过 48 h 的抑制,AOB 和 NOB 活性均未受到明显抑制。这与好氧条件下 FNA 浓度为 0.92 mg/L 时对 NOB 活性产生强烈抑制^[29]的结论并不一致,分析认为一方面是由于试验 MLSS 不同导致单位菌量受到抑制的药剂剂量不同造成的,另一方面是整个抑制试验时间不同造成的,本试验只进行约 48 h 的抑制,远不足文献^[29]报道抑制时间。

在缺氧抑制 48 h 后,与空白组对比发现,AOB 丰度并未明显降低,由 $4.890\ 9 \times 10^8$ copies/g VSS 减至 $3.754\ 4 \times 10^8$ copies/g VSS,但 *Nitrospira* 和 *Nitrobacter* 丰度均明显下降,分别由 $3.002\ 9 \times 10^9$ 、 4.245×10^8 copies/g VSS 降至 $1.666\ 5 \times 10^8$ 、

$5.163\ 8 \times 10^7$ copies/g VSS,均降低至少一个数量级,且过曝气至 99 h 时, $r_{\text{NH}_4\text{-N}}$ 和 $r_{\text{NO}_2\text{-N}}$ 值分别由 3.5、4.828 mg N/(g VSS·h) 降至 2.7、0.007 mg N/(g VSS·h), $r_{\text{NO}_2\text{-N}}$ 降低尤其明显。AOB、*Nitrospira*、*Nitrobacter* 丰度变化规律与 $r_{\text{NH}_4\text{-N}}$ 和 $r_{\text{NO}_2\text{-N}}$ 值变化规律均可说明在缺氧条件 FNA 浓度为 1.16 mg/L 时,抑制 48 h 后 AOB 活性受到轻微抑制,而 NOB (*Nitrospira* 和 *Nitrobacter*) 活性受到强烈抑制,这与 Wang 等^[21] 研究在缺氧条件下 FNA 对 NOB 活性具有强烈抑制作用的结果一致。

2.3 过曝气硝化反应类型变化规律

图 4A 和图 4B 分别描述了好氧抑制 48 h 和缺氧抑制 48 h 后,过曝气时系统内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 NAR 变化规律,需要说明的是系统分别在 0、99、162 和 256 h 时静置、排水、进水,由于系统在过曝气初始时控制 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度约为 25 mg/L,因此计算 NAR 时需减去初始 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度值。

由图 4A 可以看出,整个过曝气阶段系统中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度持续下降, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度持续升高, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度在过曝气初始阶段出现 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 升高

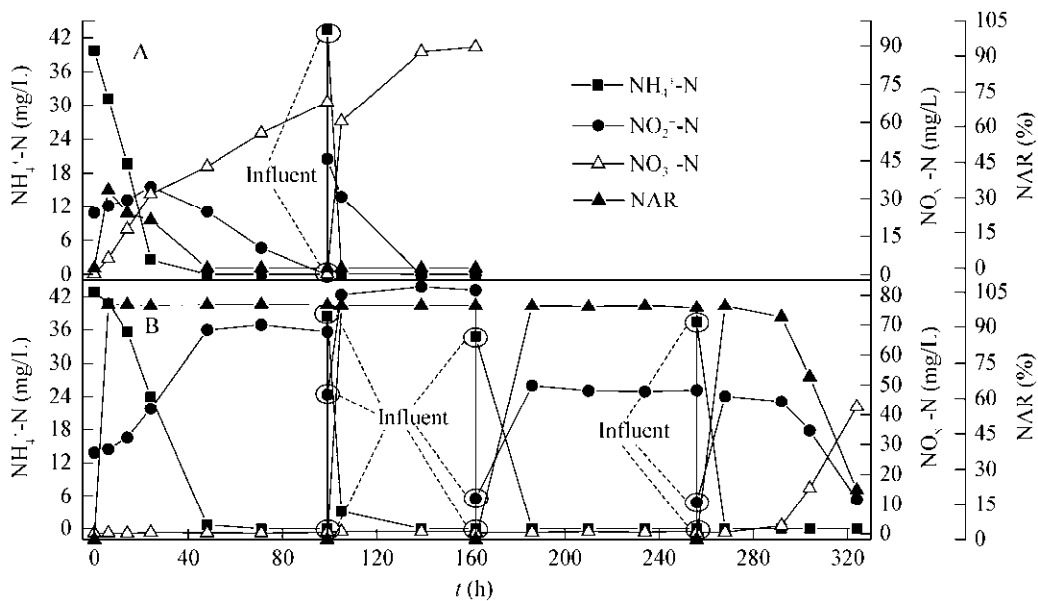


图 4 过曝气下,系统内 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 NAR 变化规律

Figure 4 Evolution of ammonia, nitrite, nitrate and NAR in the system under aeration

的趋势,这是由于在过曝气初始阶段控制 NO_2^- -N 浓度约为 25 mg/L,且随着曝气的进行, NH_4^+ -N 被氧化为 NO_2^- -N 造成的。过曝气至 48 h 时, NAR 由 33.2% 逐渐降低至 0,说明好氧条件 FNA 浓度为 1.16 mg/L,抑制 48 h 时,对 NOB 活性具有轻微的抑制作用,并不能实现短程硝化。

缺氧 FNA 抑制 48 h 后,随着过曝气时间的增加, NH_4^+ -N 浓度持续下降且降解速率逐渐增加,说明随着过曝气时间的延长, AOB 活性快速恢复,表明在缺氧条件下, FNA 对 AOB 活性的抑制具有可逆性,这与 Ma 等^[30]研究结果相似。过曝气 0–268 h 内, NO_2^- -N 浓度并未明显下降且 NO_3^- -N 浓度未明显升高, NAR 始终在 98% 以上,说明系统维持稳定的短程硝化效果,这与 Wang 等^[31]通过缺氧 FNA 旁侧抑制实现主流城市污水短程硝化+厌氧氨氧化具有相似性。而过曝气至 292 h 时, NO_2^- -N 浓度出现下降,由 46.3 mg/L 降至 44.5 mg/L,同时 NO_3^- -N 浓度升高,由 0.5 mg/L 升高至 2.7 mg/L, NAR 降至 94.3%,并随着曝气时间的增加, NO_2^- -N 浓度大幅度下降, NO_3^- -N 浓度大幅度升高,过曝气至 324 h, NAR 降至 21.2%,表明过曝气至 292 h 时,系统短程硝化开始出现破坏现象,持续至 324 h 时,系统由短程硝化转变为全程硝化。

缺氧条件下, FNA 对 AOB 和 NOB 均具有抑制效果,分析认为一方面是由于 FNA 使微生物 DNA 碱基配对发生紊乱,破坏 DNA 合成,最终导致微生物死亡^[28];另一方面是由于在缺氧、酸性条件下, FNA 抑制过程中产生了对微生物具有毒害作用的中间或衍生产物,主要包括^[5]亚硝酸(N_2O_3)、二氧化氮(NO_2)、一氧化氮(NO)等小分子物质与还原态硫醇反应形成亚硝基硫醇,而亚硝基硫醇对微生物具有灭活效应。

3 结论

(1) 好氧条件下 FNA (初始 FNA 为 1.16 mg/L) 处理活性污泥 48 h, AOB 和 NOB 活性均未被抑制。

(2) 缺氧条件下 FNA (初始 FNA 为 1.16 mg/L)

对反硝化菌活性具有抑制作用。

(3) 控制初始 FNA 浓度为 1.16 mg/L 在缺氧条件下处理活性污泥 48 h 后, NOB 活性被抑制强度远大于 AOB 活性被抑制强度,且 AOB 活性很快恢复,过曝气 0–292 h 内 NAR 维持在 94% 以上。

REFERENCES

- [1] Tang X, Guo YZ, Jiang B, et al. Metagenomic approaches to understanding bacterial communication during the anammox reactor start-up[J]. *Water Research*, 2018, 136: 95-103
- [2] Zhu WQ, Li J, Dong HY, et al. Effect of influent substrate ratio on anammox granular sludge: performance and kinetics[J]. *Biodegradation*, 2017, 28(5/6): 437-452
- [3] Wang WQ, Wang XJ, Li J, et al. Study on the performance of partial denitrification coupled with anaerobic ammonia oxidation for nitrogen removal[J]. *China Environmental Science*, 2019, 39(2): 641-647 (in Chinese)
王维奇, 王秀杰, 李军, 等. 部分反硝化耦合厌氧氨氧化脱氮性能研究[J]. *中国环境科学*, 2019, 39(2): 641-647
- [4] Ding C, Enyi FO, Adrian L. Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) with planktonic cells in a redox-stable semicontinuous stirred-tank reactor[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(10): 5671-5681
- [5] Wei Y, Wang SY, Ma B, et al. Selective inhibition effect of free nitrous acid on ammonium oxidizing bacteria and nitrite oxidizing bacteria under anoxic condition[J]. *CIESC Journal*, 2014, 65(10): 4145-4149 (in Chinese)
委燕, 王淑莹, 马斌, 等. 缺氧 FNA 对氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌的选择性抑菌效应[J]. *化工学报*, 2014, 65(10): 4145-4149
- [6] Tang CJ, Duan CS, Yu C, et al. Removal of nitrogen from wastewaters by anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) using granules in upflow reactors[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 15(2): 311-328
- [7] Ma B, Wang SY, Cao SB, et al. Biological nitrogen removal from sewage via anammox: recent advances[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 200: 981-990
- [8] Yang YD, Zhang L, Shao HD, et al. Enhanced nutrients removal from municipal wastewater through biological phosphorus removal followed by partial nitritation/anammox[J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2017, 11(2): 8
- [9] Yang YD, Zhang L, Cheng J, et al. Microbial community evolution in partial nitritation/anammox process: from sidestream to mainstream[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 251: 327-333
- [10] Sun HW, Yu X, Li WW, et al. Inhibitory kinetics of free ammonia on *Nitrobacter*[J]. *CIESC Journal*, 2018, 69(10): 4386-4393 (in Chinese)
孙洪伟, 于雪, 李维维, 等. 游离氨抑制 *Nitrobacter* 活性动力学试验[J]. *化工学报*, 2018, 69(10): 4386-4393
- [11] Sun HW, Lü XT, Wei XF, et al. Synergetic inhibitory effect of free ammonia and aeration phase length control on the activity of nitrifying bacteria[J]. *Environmental Science*, 2016, 37(3): 1075-1081 (in Chinese)

- 孙洪伟, 吕心涛, 魏雪芬, 等. 游离氨(FA)耦合曝气时间对硝化菌活性的抑制影响[J]. 环境科学, 2016, 37(3): 1075-1081
- [12] Wang F, Lu MY, Yin JQ, et al. Treatment of old landfill leachate via a denitrification-partial nitrification-ANAMMOX process[J]. Environmental Science, 2018, 39(8): 3782-3788 (in Chinese)
王凡, 陆明羽, 殷记强, 等. 反硝化-短程硝化-厌氧氨氧化工艺处理晚期垃圾渗滤液的脱氮除碳性能[J]. 环境科学, 2018, 39(8): 3782-3788
- [13] Zhang T, Wang B, Li XY, et al. Achieving partial nitrification in a continuous post-denitrification reactor treating low C/N sewage[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 335: 330-337
- [14] Tokutomi T. Operation of a nitrite-type airlift reactor at low DO concentration[J]. Water Science & Technology, 2004, 49(5/6): 81-88
- [15] Blackburne R, Vadivelu VM, Yuan ZG, et al. Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*[J]. Water Research, 2007, 41(14): 3033-3042
- [16] Ma Y, Peng YZ, Wang SY, et al. Achieving nitrogen removal via nitrite in a pilot-scale continuous pre-denitrification plant[J]. Water Research, 2009, 43(3): 563-572
- [17] Zeng W, Li L, Yang YY, et al. Nitrification and denitrification of domestic wastewater using a continuous anaerobic-anoxic-aerobic (A^2O) process at ambient temperatures[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(21): 8074-8082
- [18] Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TBS, et al. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid[J]. Journal-Water Pollution Control Federation, 1976, 48(5): 835-852
- [19] Vadivelu VM, Yuan ZG, Fux C, et al. The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(14): 4442-4448
- [20] Lü XT. Research on the effect of free ammonia (FA) and free nitrous acid (FNA) on the nitrite-oxidizing bacteria (NOB) activity[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou Jiaotong University, 2017: 47-48 (in Chinese)
吕心涛. 游离氨(FA)和游离亚硝酸(FNA)对亚硝酸盐氧化菌(NOB)活性的影响试验研究[D]. 兰州: 兰州交通大学硕士学位论文, 2017: 47-48
- [21] Wang QL, Ye L, Jiang GM, et al. Side-stream sludge treatment using free nitrous acid selectively eliminates nitrite oxidizing bacteria and achieves the nitrite pathway[J]. Water Research, 2014, 55: 245-255
- [22] State Environmental Protection Administration of China. Inspects and Analysis Methods of Water and Wastewater[M]. 3rd edition. Beijing: China Environmental Science Press, 1997 (in Chinese)
国家环境保护局. 水和废水监测分析方法[M]. 3 版. 北京: 中国环境科学出版社, 1997
- [23] Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4704-4712
- [24] Wang F, Liu Y, Wang JH, et al. Influence of growth manner on nitrifying bacterial communities and nitrification kinetics in three lab-scale bioreactors[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(4): 595-604
- [25] Ferris MJ, Muyzer G, Ward DM. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 340-346
- [26] Liu GQ, Wang JM. Long-term low DO enriches and shifts nitrifier community in activated sludge[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(10): 5109-5117
- [27] Katsou E, Malamis S, Frison N, et al. Coupling the treatment of low strength anaerobic effluent with fermented biowaste for nutrient removal via nitrite[J]. Journal of Environmental Management, 2015, 149: 108-117
- [28] Qian WT, Peng YZ, Li XY, et al. The inhibitory effects of free ammonia on ammonia oxidizing bacteria and nitrite oxidizing bacteria under anaerobic condition[J]. Bioresource Technology, 2017, 243: 1247-1250
- [29] Park S, Chung J, Rittmann BE, et al. Nitrite accumulation from simultaneous free-ammonia and free-nitrous-acid inhibition and oxygen limitation in a continuous-flow biofilm reactor[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 112(1): 43-52
- [30] Ma B, Yang L, Wang QL, et al. Inactivation and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria when exposed to free nitrous acid[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1266-1270
- [31] Wang ZB, Zhang SJ, Zhang L, et al. Restoration of real sewage partial nitrification-anammox process from nitrate accumulation using free nitrous acid treatment[J]. Bioresource Technology, 2018, 251: 341-349