包埋固定化微生物的硫自养反硝化实验研究

欧阳丽华,周伟丽*,张振家,王晖

(上海交通大学环境科学与工程学院,上海 200240)

摘要:采用升流式颗粒污泥床,外加 Na₂S₂O₃ 作为电子供体,在室温下连续运行 220 d,结合硫自养反硝化与固定化包埋技术进 行脱氮实验,考察包埋颗粒的驯化条件、影响因素和最佳运行条件.进水负荷(以N计)维持 0.22 kg/(m³·d),包埋颗粒经 23 d 驯化成功,NO₃⁻-N (100 mg/L)几乎完全去除.连续实验结果表明,脱氮效果受温度、进水 NO₃⁻ 浓度和 HRT 因素影响,受温度 制约最大,春秋季室温下进水负荷可达 0.96 kg/(m³·d),最低水力停留时间(HRT)达到 1 h,NO₃⁻-N和 TN 的去除率均达到 90%~100%,最高去除速率均达到 39.8 mg/(L·h),冬季最低 HRT 达 2 h.系统出水无NO₂⁻-N和 S²⁻累积.分子生物学实验显 示包埋颗粒经驯化得到反硝化功能菌并逐渐增殖.

关键词:硝酸氮;自养反硝化;硫代硫酸盐;固定化;包埋

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)06-1644-09

Study on Sulfur-Based Autotrophic Denitrification by Immobilized Pellets

OUYANG Li-hua , ZHOU Wei-li , ZHANG Zhen-jia , WANG Hui

(School of Environmental Science and Engineering , Shanghai Jiao Tong University , Shanghai 200240 , China)

Abstract: Autotrophic denitrification by immobilized microorganisms was investigated in this study. Using thiosulfate as the electron donor, the lab scale up-flow sludge blanket reactor ran continuously for 220 days under the room temperature to investigate the effects of cultivate conditions, influence factors and optimal operating parameters. It took 23 days to finish the initial domestication stage. A nearly complete removal of nitrate (100 mg/L) was attained at nitrate loading rates (NLR) of 0. 22 kg/(m³ · d). The results revealed that the denitrification efficiency was dependent on temperature, influent nitrate concentration and hydraulic retention time (HRT), and temperature was the most important factor. In spring and autumn, nitrate and total nitrogen removal efficiency remained 90% – 100% at the NLR of 0.96 kg/(m³ · d). The shortest HRT and the highest denitrification was detected. Molecular biological analysis indicated that denitrifying bacteria were re-enriched successfully in the immobilized pellets.

 $Key \ words: \texttt{nitrate}; \texttt{autotrophic} \ denitrification; \texttt{thiosulfate}; \texttt{immobilization}; \texttt{embedding}$

在处理湖泊、景观水、饮用水源地源水等低C/N 污水的实际工程中,自养反硝化技术在传统脱氮工 艺中更具优势,如产泥量极少、出水无二次污染、无 外加有机基质降低运行操作费用等^[1].利用还原态 硫作为电子供体的硫自养反硝化研究一直以来是自 养反硝化脱氮研究的热点^[2].万东锦等^[3]利用硫磺 单质在室温厌氧条件下对地下水进行脱氮处理,发 现反应受温度影响较大 20℃以上利于反硝化的进 行,NO, -N去除率可达99%,最低 HRT 达1.8 h,单 质 S 被氧化产生的 SO_4^{2-} 离子与去除掉的 NO_3^- 离子 呈正相关. Sierra-Alvarez 等^[4] 采用硫/石灰石自养反 硝化工艺处理地下水,进水为100 mg/L的 NO₃-N 污水经处理可达到完全去除,最高进水负荷可达 $0.3 \text{ kg/(m^3 \cdot d)}$,出水无 $NO_2^- - N$ 和 S^{2-} 的积累. Vaiopoulou 等^[5]考察不同 S/N 比对于同步脱氮除硫 的影响,表明自养反硝化产泥较少,出水无氮氧化物 积累. Zhang 等^[6] 通过实验对比 PVA 包埋脱氮硫杆 菌进行自养反硝化与未包埋的细菌进行反硝化脱

氮,结果表明二者均不受硫化物的抑制作用,最佳反应温度与 pH 条件保持不变,而包埋菌的反硝化效率更高. Gadekar 等^[7]通过间歇实验和连续实验研究脱氮硫杆菌的反硝化特性,表明针对不同浓度的 NO_3^--N 污水,采用各条件下的最佳 S/N 比和 HRT均能达到良好的脱氮效果,出水中单质 S 与 SO₄²⁻的浓度变化受进水中 S²⁻与 NO_3^--N 浓度的影响.

多数研究认为硫自养反硝化是耗碱产酸反 应^[8,9],以单质 S 为电子供体往往需要添加 CaCO₃ 以提供碱度控制反应 pH 环境,文献 [10~13]都对 该工艺的实验效果和动力学有深入的研究,对硫自 养反硝化功能菌也有相关研究^[14],随着同步脱氮除 硫用于异养和自养反硝化^[15~17]的工艺不断改进,与

收稿日期:2010-07-15;修订日期:2010-09-25

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07106-2-2)

作者简介:欧阳丽华(1985~),女,硕士研究生,主要研究方向为生物脱氮,E-mail: scarlett0923@ yahoo.cn

^{*} 通讯联系人 , E-mail: weilizhou@ sjtu. edu. cn

固定化技术相结合^[18]也成为研究热点,生物固定化 技术可能使系统在更苛刻的条件下获得更好的处理 效果^[19,20].而在各类还原态硫的电子供体中,S₂O₃²⁻ 溶解度高,使得系统传质优于单质S,同时考虑到 Na₂S₂O₃ 较 Na₂S 更稳定,对系统内 pH 环境影响不 大,本研究选用硫代硫酸盐作为电子供体,并采用包 埋颗粒培养驯化出反硝化功能菌进行脱氮实验,旨 在改进自养反硝化工艺,同时考察包埋颗粒驯化条 件、脱氮效果、影响因素及运行稳定性,并进一步在 分子生物学方面对包埋颗粒中功能菌的驯化过程作 初步探究.

1 材料与方法

1.1 实验装置

连续实验装置采用升流式颗粒污泥床反应器, 反应器为密封的有机玻璃柱,内径88 mm,高度500 mm,有效容积3.2 L,采用高分子凝胶材料水性聚氨 酯包埋普通活性污泥制成包埋颗粒,反应器内加入 包埋颗粒1.6 L.反应装置由进水装置、蠕动泵、升 流式反应器、出水装置、排气装置5个部分组成(如 图1).模拟配水中外加 Na₂S₂O₃作为反硝化反应电 子供体 $n(S_2O_3^{-}): n(NO_3^{-}) = 1:1$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 和 NaH₂PO₄ 作为微生物生长所需微量营养元素投加, NaHCO₃ 为系统提供碱度. 模拟配水如表 1 所示.



图 1 连续实验装置示意 Fig. 1 Setup of the continuous experiment system

1.2 分析项目与测定方法

进、出水 NO₃⁻、NO₂⁻、NH₄⁺、TN、S²⁻、SO₄²⁻均采 用标准方法^[21]用于反映连续实验脱氮效果的变化, 产气端的气相组分(N₂/O₂)分析采用气相色谱法 (气相色谱仪 GC-14B,岛津),室温和进出水 pH 值 为每日实测.

表1 模拟配水组成(以 N 100 mg·L⁻¹计)

Table 1 Composition of synthetic water										
项目	NaNO ₃	$Na_2S_2NO_3 \cdot 5H_2O$	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	$\mathrm{KH}_{2}\mathrm{PO}_{4}$	NaHCO ₃					
浓度 /mg•L ⁻¹	607.14	1 771. 43	6	3	134					

1.3 分子生物学分析材料和方法

根据连续实验运行条件的变化确定采样时 间,取部分反应器中的包埋颗粒收集于无菌离心 管中进行样品采集,置于 - 80℃冰箱中保存或直 接用于基因组 DNA 抽提^[22,23].实验中对各阶段包 埋颗粒样品分别取 12 颗颗粒研磨至泥浆,加入裂 解液(包括抽提缓冲液、SDS、RNase A)振荡打碎 1 min,加入氯化苄 50℃培养 1 h,再加入 NaAC 冷却 15 min,离心后加入等体积异丙醇沉淀 DNA,离心 后再以乙醇洗涤干燥,加入 TE 缓冲液溶解即为 DNA 模板.聚合酶链式反应(PCR)扩增采用针对 亚硝酸盐还原酶结构基因 *nirS* 和 *nirK* 的特异引物 对^[24](见表 2),进行 PCR 扩增,所用 PCR 反应体 系为 25 μ L.其中包含 2 μ L DNA 模板,各引物 400 nmol/L,*Taq* 酶(SC0010,上海生工) 2.5 单位, dNTP 混合液(上海生工)200 μ mol/L, 1 × PCR 缓 冲液(上海生工)以及1 500 μ mol/L MgCl₂(上海生 工).

表 2 亚硝酸盐还原酶结构基因 nirS、nirK 的特异引物对

Table 2 Primers for the detection of nitrite reductase genes (nirK and nirS)										
引物	序列(5´-3´)	位置	产物长度/bp							
nirK 1F	GG(A/C)-ATG-GT(G/T)-CC(C/G)-TGG-CA	526 ~ 542	514							
nirK 5R	GCC-TCG-ATC-AG(A/G)-TT(A/G)-TGG	1 023 ~1 040								
nirS 1F	CCT-A (C /T) T-GGC-CGC-C (A /G) C -A (A /G) T	763 ~780	890							
nirS 6R	CGT-TGA-ACT-T(A/G)C-CGG-T	1 638 ~ 1 653								

1.4 实验运行条件

反应器以连续方式运行 驯化阶段和二次启动阶

段采用低负荷运行,后续连续实验分阶段改变运行参数。控制调节进水 NO₃→N 浓度和水力停留时间

(HRT).由于连续实验是在室温条件下进行,在连续运行的 220 d 中经历秋冬春三季,因此依据进水浓度、负荷以及环境温度的变化分为 9 个阶段(如表 3) 依据硝酸氮污染现状^[25 26],设置 3 个进水浓度:70 mg/L用以代表工业废水等高浓度硝酸氮废水,40 mg/L代表硝酸氮污染的地下水和城市污水厂二级处 理出水等中浓度氮污染水 10 mg/L代表如景观水、富 营养化地表水等低浓度硝酸氮进水.B、C、D 阶段分别 为 70、40 和 10 mg/L进水浓度下,通过改变 HRT 调 节进水负荷,对包埋颗粒的脱氮效果进行实验研究.

	衣	3	冱行到	≶安乂		
Tabla	3	On	orotino	naramoto	,	

		Table	e 5 Operating parameter			
运行阶段	运行时间	t	进水 NO ₃ -N	HRT	NLR	
	/ d	/℃	/ mg• L - 1	/ h	/kg• (m ³ •d) ⁻¹	
А	0 ~ 23	22 ~ 28	100	10 ± 0. 5	0.23 ± 0.01	
В	24 ~ 51	15 ~ 23	70	6~2	$0.28 \sim 0.84 \pm 0.01$	
С	52 ~ 65	$9 \sim 14$	40	6~2	$0.16 \sim 0.48 \pm 0.01$	
D	66 ~ 119	5.6~12	10	6 ~ 0. 5	$0.04 \sim 0.5 \pm 0.01$	
Е	120 ~ 143	10 ~ 12	10	6~4	$0.04 \sim 0.06 \pm 0.01$	
F	144 ~ 162	11 ~ 15	10	3~1	$0.08 \sim 0.24 \pm 0.01$	
G	163 ~ 184	12 ~ 21	40	6 ~ 1	0. 16 ~ 0. 96 \pm 0. 01	
Н	185 ~ 194	20 ~ 23	10	1 ~0.62	$0.24 \sim 0.37 \pm 0.02$	
Ι	195 ~ 220	23 ~ 26	40	1.5~1	$0.64 \sim 0.96 \pm 0.01$	

2 结果与分析

2.1 NO₃⁻-N 去除效果

连续实验运行 220 d,阶段 A 和阶段 E 分别为 初始驯化阶段和二次启动阶段,如图 2 所示,进水 NO₃⁻-N浓度为 100 mg/L,维持 HRT 为 10 h,驯化 23 d,出水NO₃⁻-N浓度低于 10 mg/L,脱氮速率达到 9.2 mg/(L·h)并稳定,驯化完成.二次启动在低温下进 行(10~12℃),低负荷进水,进水NO₃⁻-N浓度 10 mg/L,HRT 为 6 h 时,出水NO₃⁻-N浓度低于 1.5 mg/L,NO₃⁻-N去除率高于 85%,连续实验经暂停 40 d之后迅速启动,随后降低 HRT 至 4 h,NO₃⁻-N去除 率有短暂下降,此后又迅速恢复至 85% 以上,表明 系统在低温环境中仍能保持较强的抗冲击负荷能 力.二次启动阶段后期,综合考虑低温环境对脱氮效 果的影响,进水中外加 NaHCO₃ 以增加进水碱度,结 果显示,出水NO₃⁻-N浓度低于 1.5 mg/L,NO₃⁻-N去 除率维持 85% 左右,二次启动完成.

进水 NO₃⁻-N 浓度为 70 mg/L如图 2 中 B 阶段 所示,HRT 为 6 h 和 4 h 时,出水NO₃⁻-N浓度均低于 3 mg/L,NO₃⁻-N去除率达到 95%,当 HRT 为 3 h 和 2 h 时,受负荷提高影响,出水NO₃⁻-N有明显增加再逐 渐减少的过程,其中 HRT 为 3 h 时,NO₃⁻-N去除率 达 90% 以上,HRT 为 2 h 时,出水NO₃⁻-N浓度为 10 mg/L左右,去除率为 85% ~90%.这一阶段实验结 果表明,室温 20℃左右,进水NO₃⁻-N为 70 mg/L条件 下,最低 HRT 可达 2 h,此时负荷达 0.83 ~ 0.85 kg/(m³•d).

进水 NO₃⁻⁻N 浓度 40 mg/L如图 2 中阶段 C、G、I 所示,其中阶段 C 为 12℃左右低温运行,阶段 G 环 境温度由 12℃逐渐上升至 21℃,该阶段逐渐降低 HRT,以考察该浓度条件下的最高进水负荷,阶段 I 在较高环境温度下运行(22℃),着重考察高负荷条 件下脱氮效果.实验结果显示,C 阶段出水NO₃⁻⁻-N平 均浓度低于 2 mg/L,去除率均达 95% 以上,最低 HRT 为 2 h,负荷为 0.48 kg/(m³·d);G 阶段随环境 温度上升不断提高进水负荷,出水NO₃⁻⁻-N均接近于 0 mg/L,当 HRT 降至 1.5 h 和 1 h 时,NO₃⁻⁻-N均接近于 0 mg/L,当 HRT 降至 1.5 h 和 1 h 时,NO₃⁻⁻-N去除率 短暂下降随后迅速恢复;I 阶段运行结果与 G 阶段 相同.实验结果表明,进水NO₃⁻⁻-N为 40 mg/L,低温 下最低 HRT 为 2 h,高温下最低 HRT 为 1 h,最高进 水负 荷达 0.96 kg/(m³·d),出水 NO₃⁻⁻-N 低于 1 mg/L,NO₃⁻⁻N去除率均接近 100% 并保持稳定.

进水 $NO_3^- -N$ 浓度 10 mg/L如图 2 中阶段 D、F、 H 所示 ,D 阶段为 5 ~ 12 °C 低温运行阶段 ,本阶段初 期 ,HRT 由 6 h 逐渐降低至 1 h ,出水 $NO_3^- -N$ 均为 1 mg/L左右 ,去除率维持 98%.运行第 83 d ,当 HRT 降低至 0.5 h ,同时环境温度降低至 8°C ,系统脱氮 效果急剧恶化 , $NO_3^- -N$ 去除率迅速下降至 40% 以 下 ,随后降低负荷以维持反硝化反应在低温下进行 , 当环境温度为 5 ~ 7°C 时 ,控制 HRT 为 2 h ,负荷为 0.12 kg/(m³·d) ,出水 $NO_3^- -N$ 浓度为 3 mg/L ,去除 率维持 70% 并保持稳定.阶段 F 为 11 ~ 15°C 低温运 行阶段,运行 22 d 中,出水 $NO_3^- N$ 浓度均低于 3 mg/L,去除率达 85% 以上,运行第 153 d,由于降低 HRT为1h, $NO_3^- -N$ 去除率下降至 60% 以下,此后降 低负荷,控制 HRT为1.5h,脱氮效果恢复.H 阶段 为较高温度下运行阶段(20~23°C),HRT为1 h 时 $NO_3^- -N$ 去除率接近 100%,降低 HRT为40 min(实 测值 0.62~0.68 h),运行 10 d 结果显示,出水 $NO_3^- -N$ 浓度低于 3 mg/L,平均去除率达 80%,但运 行效果不稳定.综合三阶段实验结果可得,进水 $NO_3^- -N$ 在 10 mg/L 高温下最低 HRT为1 h,负荷达 0.24 kg/(m^3 ·d),因此 15°C 以下的低温条件最低 HRT 为 1.5 h, NO₃ -N去除率均接近 100% 并保持稳 定,室温低于 8℃时,最佳 HRT 应维持 2 h 以上.

图 2 显示在连续实验运行 220 d 中,当系统提 升负荷时,脱氮效果会暂时下降,此后又迅速恢复, 说明系统无论在较高或较低环境温度中,甚至极端 温度下都能保持较强的抗冲击负荷能力.在3类进 水浓度条件下,系统均能在较低 HRT、较高进水负 荷条件下正常运行,出水均达到国家标准^[27,28],达 到高效低耗脱氮目的,说明包埋固定化技术应用于 自养反硝化工艺,较传统自养反硝化技术,具备更高 的脱氮效率以及更良好的抗冲击负荷能力.



图 2 连续实验硝酸氮去除情况 Fig. 2 Variation of c(NO₃⁻-N) in continuous experiments

2.2 NO₂⁻-N 和 NH₄⁺-N 的积累

在驯化阶段初期, NO_3^--N 去除效率低下,存在 NO_2^--N 积累,出水 NO_2^--N 浓度不高于 15 mg/L,且积 累程度不断降低,表明脱氮效果好转,驯化第 10 d, NO_3^--N 去除效率明显提高,出水 NO_2^--N 浓度低于 2 mg/L. 驯化阶段完成后,系统内不再有 NO_2^--N 积累 情况,连续实验正常运行期间,出水 NO_2^--N 均低于 0.2 mg/L. 同时检测出水 NH_4^+-N 浓度,由图 3 所示, 出水中检测有 NH_4^+-N ,均低于 1 mg/L,且其浓度变 化不随 NO_3^--N 去除效果改变而变化,可以认为连续 实验正常运行期间,不存在 NH_4^+-N 积累.

图 3 所示连续运行第 188 d,由于降低 HRT 至 40 min,虽然出水NO₃--N浓度低于 3 mg/L,但是该阶 段出水NO₂--N积累率明显增加,出水NO₂--N由于



HRT 降低而迅速增加至 2~3 mg/L,积累率达到 20% 以上,且出水NH⁺-N浓度变化不稳定.实验结

果表明, $NO_2^- -N$ 积累与脱氮效果直接相关, 测化阶段 初期 $NO_2^- -N$ 积累现象说明随 $NO_3^- -N$ 去除效果好转, $NO_2^- -N$ 积累程度显著降低. 阶段 H 中 HRT 降低至 40 min 引起脱氮效果下降, 直接导致 $NO_2^- -N$ 积累程 度增大,此时进水负荷为0.36 kg/(m³·d), 而 I 阶段 HRT 为 1 h, 进水负荷为 0.96 kg/(m³·d), 并无 $NO_2^- -N$ 积累现象, 可以推测 $NO_2^- -N$ 积累与 HRT 的 相关性较大, HRT 低于 1 h 易导致 $NO_2^- -N$ 累积. 2.3 TN 的去除

由于NO₃⁻-N的去除效率不能完整反映系统内反 硝化情况,故以 TN 的去除效果作为衡量反硝化效 果好坏的指标.由于连续实验正常运行中无NO₂⁻-N 和NH⁺₄-N 的积累,TN 去除率(图 4)与图 2 所示 NO₃⁻-N去除率基本一致,说明连续实验运行效果良 好而且系统有较好的稳定性.





2.4 气体组分分析

连续实验运行期间反应器内 N_2/O_2 测定结果 如图 5 所示,系统内 N_2/O_2 比值均大于空气 N_2/O_2 比值,驯化阶段之后,在 70 mg/L和 40 mg/L较高浓 度进水条件正常运行期间,系统内 N_2 含量均大于 90%,图 5 中显示运行第 85 ~ 161 d 为低温低浓度 运行,环境温度为 8 ~ 12℃,进水 NO_3 -N浓度为 10 mg/L,以及运行第 185 ~ 194 d 低浓度运行期间,气 相测定中 N_2/O_2 比值较小,系统内 N_2 体积分数约 为 85%,可以说明,低浓度进水条件下,产生的 N_2 量较少,系统内 N_2 生成量与进水 NO_3 -N浓度呈正 相关.

2.5 S^{2-} 及 SO_4^{2-}

模拟配水中 $n(S_2O_3^{-}):n(NO_3^{-})$ 维持 1:1,各阶 段进水 $S_2O_3^{2^-}$ 浓度随进水 NO_3^{-} 浓度变化而改变.图 6 显示驯化阶段初期,脱氮效率较低,出水 $SO_4^{2^-}$ 浓



浓度/mg·L⁻¹ 600 **HRT/h** -HRT 6 400 ሞ 200 on rod 2 0 100 120 140 160 180 200 220 20 40 60 80 运行时间/d

Fig. 6 Variation of $c(S^{2-})$ and $c(SO_4^{2-})$ in continuous experiments

度较低,平均浓度为 200 mg/L,有 S²⁻残留,说明驯 化阶段尚未完成,对底物利用不充分,供电子方仍有 残留,转化为 SO₄²⁻ 含量也较低. 驯化阶段完成之 后,出水 SO₄²⁻ 含量较稳定且无 S²⁻残留,SO₄²⁻ 浓度 随进水负荷的变化而维持在不同浓度范围,进水 S₂O₃²⁻ 浓度为 560 mg/L时,出水 SO₄²⁻ 平均浓度为 700 mg/L,进水 S₂O₃²⁻ 浓度为 320 mg/L时,出水 SO₄²⁻ 平均浓度为 400 mg/L,进水 S₂O₃²⁻ 浓度为 80 mg/L时,出水 SO₄²⁻ 平均浓度为 250 mg/L. 实验结果 显示出水 SO₄²⁻ 含量可以在一定程度上作为反硝化 反应运行效果的依据,当系统运行效果良好并稳定 时,出水中无 S²⁻残留,出水 SO₄²⁻ 浓度与进水 S₂O₃²⁻ 浓度正相关并保持稳定.

出水 SO_4^{2-} 浓度与系统消耗的 NO_3^{-} 浓度具有 线性相关性 ,如图 7 所示 ,每消耗 1 mol 的 NO_3^{-} 生 成约 1.9 mol 的 SO_4^{2-} .

2.6 最佳工况选择

连续实验运行 220 d,历经秋冬春三季,由于实验结果显示环境温度低于 8℃ 对运行效果极为不利,因此依据温度范围,综合考虑出水NO₃--N浓度与脱氮效率,总结各进水浓度条件下不同温度、不同HRT的出水NO₃--N平均浓度以及NO₃--N平均去除效率得到不同进水浓度下的最佳工况.

图 6 连续实验出水 S^{2 -} 及 SO₄^{2 -}





中高温条件(15~28℃)下,进水NO₃-N为70 mg/L,最低HRT为2h,出水NO3--N浓度为11 mg/L 左右,去除率为85%;进水NO,-N为40 mg/L,最低 HRT 为1h,出水NO, -N浓度为1.5 mg/L,去除率达 97%;进水NO3-N为10 mg/L,当HRT为40 min时, 虽然出水 NO₃-N 浓度低于 2 mg/L,但是系统内 NO, -N 积累严重, TN 去除率显著降低, 因此选择最 佳 HRT 为 1 h, NO, --N去除率达 100%; 中低温条件 (9~14℃)下,进水NO₃-N为40 mg/L,最低HRT为 1.5 h,出水NO3-N为1.5 mg/L,去除率达97%;低 温条件(5~8℃)下,进水NO₃→N为10 mg/L,最佳 HRT 为 2 h,出水NO₁-N浓度为 2.86 mg/L,去除率 约为77%.

3 影响因素分析

3.1 温度

连续实验在室温下运行,对比相同负荷条件、不 同环境温度下的NO₃-N去除效果,结果显示环境温 度对反硝化运行效果影响较大.图8显示在整个连 续实验运行过程中,系统去除速率与环境温度变化 紧密相关,对比10 mg/L进水浓度、HRT为1h、不同 温度下的脱氮效果 进水负荷不变 环境温度越高脱 氮效果越好、去除速率越大.图8说明自养反硝化的 最适温度为15~28℃,当温度为9~14℃时,系统仍 能在中等负荷条件下保持较好的运行效果,最高进 水负荷达 0.48 kg/(m³•d),去除速率达 20 mg/(L•h). 温度低于8℃是不利于自养反硝化反应 进行的 因此低温阶段 系统只能在低浓度低负荷条 件下运行,此时最佳进水负荷为 0.12 kg/(m³•d), 去除速率可维持 4.27~5.54 mg/(L•h). 实验结果 表明 固定化包埋为自养反硝化菌提供良好的微环 境,使得包埋颗粒在低温下仍保持较高活性,并且低 温下仍可在较低负荷下正常运行,此外驯化后的包 埋颗粒经暂时休眠后也可在低温环境中迅速完成再 次启动.由于自养反硝化菌生长缓慢,且在低温条件 下脱氮效果较差,本实验结果体现了固定化包埋技 术应用与自养反硝化工艺相结合的优势,即提高微 生物在较低温度下的活性 增强脱氮效率 使得自养 反硝化工艺的实际应用具有更高的可行性.



连续实验运行温度与系统去除速率相关性 图 8 Fig. 8 Relationship between the temperature and nitrate removal

3.2 进水负荷

实验中进水负荷的控制是由改变进水浓度和 HRT 完成的,对比相同温度、相同进水负荷条件下, 不同浓度和 HRT 的实验结果 ,考察二者对脱氮效率 的影响. 如图 2 所示,运行第153~194 d 实验结果 显示当进水负荷为 0.16 kg/(m³•d),进水浓度 40 mg/L、HRT 为 6 h 比进水浓度 10 mg/L、HRT 为 1.5 h 运行效果更好,且当进水负荷为 0.35 ~ 0.48 kg/(m³•d)时 40 mg/L进水浓度、HRT 为 2 h,脱氮 效率可维持 100%,10 mg/L进水浓度、HRT 为 40 min 出水 NO₂-N 积累率增大 ,系统脱氮效果急剧恶 化,实验结果说明一定进水负荷条件下,HRT对脱 氮效果影响更大,推测 HRT 过短会造成微生物无法 充分利用底物 引起反硝化效果的恶化.

3.3 碱度

连续实验进出水的 pH 值变化为每日实测 ,实测 结果显示进出水 pH 值相差较小,系统负荷提高初 期 出水 pH 值会略有下降 此后逐渐恢复 连续运行 220 d 期间 ,系统内 pH 环境始终保持相对稳定 ,进水 pH 值为 6.5~6.8 出水 pH 值为 6.0~6.5.

进水由自来水中本身碱度提供系统所需无机碳 源,而在二次启动阶段,由于环境温度较低,系统启 动缓慢,进水中外加 NaHCO₃ 用以提高系统碱度,提高了脱氮效率.由图 2 所示,I 阶段后期通过改变外加 NaHCO₃ 浓度考察碱度对脱氮效果的影响,结果显示在低温环境下,可以通过外加碱度的方式提高系统脱氮效果,而在较高环境温度条件下,可以适量减少外加碱度,对脱氮效果影响较小.

实验结果显示系统在高负荷进水条件下,出水 pH 值有显著下降,此后随着NO₃-N去除率的提高而 上升,稳定运行时,进出水的 pH 值几乎保持一致, 可以推断硫自养反硝化反应是一个耗碱产酸的过 程 S₂O₃²⁻ 作为电子供体对碱度变化影响不大,外加 少量的碱度更有助于反硝化反应保持较高效率,且 有助于提高抗冲击负荷能力,保持系统运行的稳 定性.

4 与其他自养反硝化处理工艺的对比

表 4 为本研究与其他自养反硝化处理工艺的脱

氮效率对比.对比不同电子供体的硫自养反硝化结 果,可以看出以S单质为电子供体,反应最低 HRT 可以降低至1.8 h,但是系统进水负荷较低,且多数 研究均在环境温度高于20℃的条件下进行.

用培养基培养得到脱氮硫杆菌用以进行连续实验,HRT多大于4h,在适宜温度下处理高浓度硝酸 氮污染水,往往需要很长的反应时间,而在较低环境 温度下运行,只能维持较低的进水负荷.

而本研究结果显示,包埋颗粒用于硫代硫酸盐自养反硝化,可以在适宜环境温度下,各进水浓度下最低 HRT 达到 1 h,进水负荷达到 0.96 kg/(m³•d).即使在低温环境下,最高进水负荷也可达到 0.12 kg/(m³•d),高于其他硫自养反硝化处理效率.因此,采用包埋固定化污泥驯化后的硫自养反硝化工艺处理效率高,脱氮效果好,系统抗冲击负荷能力强,运行管理简单,可达到高效低耗脱氮目的.

		Table 1 Gon	ipanison of th	te enterency	or unicient u	atotropine ue	intrineation pro-	205505		
采用工艺	电子 供体	运行方式	环境温度 /℃	进水硝酸氮 /mg•L ⁻¹	n(S) /n(N)	HRT /h	Max NLR /kg•(m ³ •d) ⁻¹	去除效率 /%	备注	文献
S/Ca ,填料床	s	培养基培养后 再进行连续/ 间歇实验	30 ± 2	400 80	0.53 ± 0.02	30.5 ± 3.7 1.8 ± 0.2	0.3 0.25	96	无 亚 硝 酸 积累	[4]
硫自养反硝化脱硫	Na_2S	连续恒温循环	30	130				完全去除	无 亚 硝 酸 积累	[5]
培养 <i>Thiomicrospira</i> sp. CVO 脱硫	Na_2S	间歇连续	22 室温	110	0.28~1.6	4.3			有 亚 硝 酸 积累	[7]
T. denitrificans 3870 PVA 包埋菌	$Na_2S_2O_3$	间歇	30 ± 2	700	3.04	运行 12 d		75	包埋菌优于 未包埋菌	[6]
电化学 + 单质 S 自养	$\mathrm{S}+\mathrm{H}_2$	连续	室温	30		1.9~5	0.381	完全去除		[17]
S/Ca	S	间歇 中试	28 20 ~ 25	100		5.47 ~ 8.86		完全去除	CaCO ₃ 提 供碱度	[11]
单质 S + 膜处理		连续		25		2.6		完全去除		[29]
包埋固定化 + UASB	$Na_2S_2O_3$	连续	5~28,室温	10~70	1.0	1.0	0.96	95 ~100	无 亚 硝 酸 积累	本研究

表 4 本研究与各文献资料的自养反硝化工艺的效率比较 Table 4 Comparison of the efficiency of different autotrophic denitrification processes

5 分子生物学分析

为了考察包埋颗粒内自养反硝化微生物的生长 情况,从反应器内提取包埋颗粒中微生物的基因组 DNA,采用 PCR 技术,对 16S rRNA 基因的 V3 区进 行扩增,通过对比扩增条带的亮度半定量地反映包 埋颗粒内反硝化菌数量的变化.

包埋颗粒样品采集信息如表 5 所示,1~8 号样 品为连续实验不同时期采集的包埋颗粒样品,其中 3 号样品为反应器内颗粒上浮时采集的上浮颗粒, 连续实验长期运行之后,部分包埋颗粒颜色变浅成 为白色,因此分别取黑色颗粒和白色颗粒为7号和 8号样进行对比,9号样品为异养反硝化污泥样,10 号样品为单质硫自养反硝化污泥,与本实验的1~8 号样品进行对比.

采用引物 *nirS* 和 *nirK* 对抽提出的 DNA 样品进 行扩增,扩增条件如表6所示,退火温度经最佳退火 温度实验选定为 58.5℃.扩增结果见图 9、图 10.

PCR 扩增结果显示,由 *nirK* 和 *nirS* 引物对获得的扩增结果不同(图 10 所示),以 10 号样作为阳性

对照,硫自养反硝化实验中,以 S₂O₃²⁻ 为电子供体与 以单质 S 为电子供体驯化培养出的功能菌不同.由 图 9 可得,连续实验运行期间,包埋颗粒内微生物含 量逐渐增加,通过光密度分析可得,1、2、3 号样品 中微生物量变化不大,显示该阶段微生物增殖量较 少 *A*~8 号样品扩增条带明显变亮,说明随着连续 运行时间颗粒内反硝化微生物含量增多,环境温度 上升有利于微生物增殖.由图9所示,对比7号和8 号样品,包埋颗粒长期运行后,部分颗粒颜色变浅, 二者通过半定量分析结果显示,白色颗粒中含有的 微生物量高于黑色颗粒.颗粒颜色的变化不影响反 应器的脱氮效率.

表5 包埋颗粒样品采集说明

Table 5 Illustration of immobilized pallets samples												
样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
采样时间 (月 <i>-</i> 日)	11-09	11-17	12-01	01-08	03-30	04-14	05-05 (黑色)	05-05 (白色)	异养反硝 化泥样	单质硫自养 反硝化泥样		
温度/℃	20.8	11.0	12.9	6.5	12.2	14.0	21.0	21.0	_	_		
代表季节		秋季		冬季		春季		春季		秋季		

表6 PCR	扩增循环条件
--------	--------

Table 6 Protocol for PCR amplification

	预3	预变性		循环条件							循环后延伸	
引物	温度	时间	循环	变	性	退	火	延	伸	温度	时间	
	/℃	/min	次数	温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	温度/℃	时间/s	/℃	/min	
nirK	95.0	10	40	94	30	60	40	72	30	72	5	
nirS	95.0	10	40	94	30	58.5	40	72	30	72	5	





19 mirs 51初扩增广初时旗政电泳图 Fig.9 Gel picture of nirS amplicons



图 10 nirK 引物扩增产物的凝胶电泳图 Fig. 10 Gel picture of nirK amplicons

6 结论

(1)固定化包埋技术结合硫自养反硝化工艺, 利用外加 S₂O₃²⁻ 作为反硝化反应电子供体,可以达 到高效低耗脱氮的目的.实验结果表明脱氮效率与 环境温度、进水NO₃⁻-N浓度和 HRT 相关,连续实验 正常运行期间,出水无 S²⁻ 残留,无NO₂⁻-N、NH⁺₄--N 积累,出水NO₃⁻-N及 TN 含量达到国家标准.固定化 包埋技术应用于硫自养反硝化工艺的优势为:①无 剩余污泥;②生物量高、处理能力高;③固液分离效 果好,出水水质良好;④水力停留时间短;⑤系统抗

冲击负荷能力强.

(2)常温条件下,春秋季进水负荷可达0.96 kg/(m³•d),最低HRT可达1h,脱氮率达95%以上.采用固定化包埋技术,自养反硝化正常运行的适 宜温度范围扩展到10℃以上,其中最适温度为15℃以上.自养反硝化菌在低温条件下(5~8℃),仍旧 保持较高生物活性,可以处理低浓度NO₃-N废水,最 佳进水负荷为0.12 kg/(m³•d),HRT为2h,出水 NO₃-N低于3 mg/L,脱氮率可达77%.

(3) 硫自养反硝化反应的影响因素有温度、进 水浓度和 HRT 等,其中环境温度的影响最大,系统 NO₃⁻-N去除速率随温度上升而提高;相同进水负荷 条件下,HRT对脱氮效率的影响更大,最低HRT与 温度相关,春秋季常温条件下,最低HRT为1h.

(4)分子生物学实验结果显示,包埋颗粒内自 养反硝化菌经历了先被驯化、筛选后增殖、富集的过 程,与异养反硝化分子生物学实验结果对比,固定化 包埋技术使得生长缓慢且易受环境因素影响的自养 反硝化菌能维持较高生物活性,有助于包埋颗粒内 自养反硝化菌的增殖,且不随出水流失,促进反硝化 反应高效稳定运行.

参考文献:

- [1] Campos J L, Carvalho S, Portela R, et al. Kinetics of denitrification using sulphur compounds: Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(5):1293-1299.
- [2] 邓旭亮,王爱杰,荣丽丽,等. 硫自养反硝化技术研究现状与 发展趋势[J]. 工业水处理 2008 28(3):13-16.
- [3] 万东锦,刘会娟,雷鹏举,等.硫自养反硝化去除地下水中硝酸盐氮的研究[J].环境工程学报 2009 3(1):1-5.
- [4] Sierra-Alvarez R, Beristain-Cardoso R, Salazar M, et al. Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment [J]. Water Research ,2007, 41 (6): 1253-1262.
- [5] Vaiopoulou E, Melidis P, Aivasidis A. Sulfide removal in wastewater from petrochemical industries by autotrophic denitrification [J]. Water Research, 2005, 39 (17): 4101-4109.
- [6] Zhang Z Y, Lei Z F, He X Y, et al. Nitrate removal by *Thiobacillus denitrificans* immobilized on poly (vinyl alcohol) carriers [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 163 (2-3): 1090-1095.
- [7] Gadekar S, Nemati M, Hill G A. Batch and continuous biooxidation of sulphide by *Thiomicrospira* sp. CVO: Reaction kinetics and stoichiometry [J]. Water Research, 2006, 40 (12):2436-2446.
- [8] Sher Y, Schneider K, Schwermer C, et al. Sulfide-induced nitrate reduction in the sludge of an anaerobic digester of a zerodischarge recirculating mariculture system [J]. Water Research, 2008 A2(16):4385-4392.
- [9] Aoi Y, Shiramasa Y, Kakimoto E, et al. Single-stage autotrophic nitrogen-removal process using a composite matrix immobilizing nitrifying and sulfur-denitrifying bacteria [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(1):124-130.
- [10] Liu L H, Koenig A. Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification batch experiments [J]. Process Biochemistry, 2002 37 (8):885-893.
- [11] Koenig A , Liu L H. Use fo limestone for pH control in autotrophic denitrification: continuous flow experiments in pilotscale packed bed reactors [J]. Journal of Biotechnology , 2002 , 99(2):161-171.

- Koenig A , Liu L H. Kinetic model of autotrophic denitrification in sulphur packed-bed reactions [J]. Water Research , 2001 35 (8):1969-1978.
- [13] Zeng H , Zhang T C. Evaluation of kinetic parameters of a sulfurlimestone autotrophic denitrification biofilm process [J]. Water Research , 2005 39 (20):4941-4952.
- [14] Sorokin D Y, Tourova T P, Bezsoudnova E Y, et al. Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* gen. nov. sp. nov. — a moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing *Gammaproteo bacterium* from hypersaline lakes [J]. Archives Microbiology, 2007, **187** (6):441-450.
- [15] Reyes J S , Razo E , Gomez J. Simultaneous biological removal of nitrogen , carbon and sulfur by denitrification [J]. Water Research 2004 38(14-15):3313-3321.
- [16] Li W, Zhao Q L, Liu H. Sulfide removal by simultaneous autoreophic and heterotrophic desulfurization denitrification process [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 162 (2-3): 848-853.
- [17] Wang H Y, Qu J H. Combined bioelectrochemical and sulfur autotrophic denitrification for drinking water treatment [J]. Water Research, 2003 37 (15):3767-3775.
- [18] Kimura K, Nakamura M, Watanabe Y. Nitrate removal by a combination of elemental sulfur-based denitrification and membrane filtration [J]. Water Reasearch, 2002, 36 (15): 1758-1766.
- [19] 傅利剑. 反硝化微生物生物学特性及其固定化细胞对硝酸氮 去除的研究[D]. 南京:南京农业大学 2004.
- [20] 王丽丽. 高效反硝化菌的实验研究及其脱氮动力学分析[D]. 天津:天津大学 2003.
- [21] 国家环境保护总局.水和废水监测分析方法[M].(第四版).北京:中国环境科学出版社 2002.132-284.
- [22] Kageyama K , Komatsu T , Suga H. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil[J]. Journal of General Plant Pathology 2003 69 (3):153-160.
- [23] Zhou W ,Kageyama K ,Li F , et al. Monitoring of microbiological water quality by real-time PCR [J]. Environmental Technology , 2007 28 (5):545-553.
- [24] Braker G , Fesefeldt A , Witzel K P. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples [J]. Applied and Environmental Microbiology , 1998 ,64 (10): 3769-3775.
- [25] 聂晓雪,蒋进元,王勇,等.生物循环流化床工艺自养反硝化 研究[J].环境科学研究,2008 21(4):10-13.
- [26] 姜巍,曲久辉,雷鹏举,等.固定床自养反硝化去除地下水中的硝酸盐氮[J].中国环境科学 2001 21(2):133-136.
- [27] GB 5749-2006 ,生活饮用水卫生标准[S].
- [28] GB 8978-1996 ,污水综合排放标准[S].
- [29] Katsuki K , Masahiko N , Yoshimasa W. Nitrate removal by a combination of elemental sulfur-based denitrification and membrane filtration [J]. Water Research , 2002 ,36 (7):1758-1766.