

电气石对厌氧氨氧化菌驯化与反应器启动的影响

张捍民, 李义菲, 赵 然, 高 范, 杨凤林

(大连理工大学 环境学院 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连 116024)

摘要: 为了研究电气石对厌氧氨氧化菌驯化过程的影响, 采用2个平行的连续搅拌式生物反应器, 其中一个添加电气石(记为R1), 另一个未添加电气石作为空白对照(记为R2)。2个反应器均在第23天观察到显著的 NH_4^+ -N和 NO_2^- -N同时去除, 即表现出厌氧氨氧化活性。添加电气石反应器R2的污泥适应期比对照反应器R1缩短42 d (R2为12 d, R1为54 d), 且最高氮负荷达到 $205.0 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 比对照表现出更好的耐负荷冲击能力。此外, 电气石可以调控pH和氧化还原电位使其保持在厌氧氨氧化菌适合范围内, 为驯化提供稳定环境。厌氧氨氧化活性批次实验显示, 添加电气石驯化得到的菌体的SAA最高比对照增加48.8%, 微生物胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)检测结果显示, 添加电气石反应器R2的多糖、蛋白质和总EPS分别比对照反应器R1增加7.6%、86.7%和43.8%, 说明电气石可以促进微生物生长代谢, 提高厌氧氨氧化反应活性。粒径与扫描电子显微镜检测说明: 电气石并不利于污泥颗粒化, 而是大部分污泥与电气石分散生长。谱系分析说明: 驯化过程中, 微生物组成由接种活性污泥中大量杆菌与丝状菌逐渐演变, 筛选出如反硝化菌、亚硝化菌等功能菌种。

关键词: 厌氧氨氧化; 电气石; 驯化; 启动; 氮去除

中图分类号: X 703

文献标志码: A

文章编号: 0254-0037(2015)10-1469-10

doi: 10.11936/bjtxb2014030088

Effect of Tourmaline on Enrichment of Anammox Bacteria and Start-up of Reactors

ZHANG Han-min, LI Yi-fei, ZHAO Ran, GAO Fan, YANG Feng-lin

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering (MOE), School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: In this study, the effect of tourmaline on the enrichment of Anammox bacteria for nitrogen removal was investigated by two parallel lab-scale continuously stirred tank bioreactors (CSTR) with tourmaline addition R2 and without tourmaline as control R1, respectively. After 23 days of operation, Anammox activity was achieved with a simultaneous consumption of NH_4^+ -N and NO_2^- -N in both reactors. Time of sludge adaptation period of R2 was shorter than that of R1 by 42 days (R2: 12 d, R1: 54 d). R2 showed a stronger capacity for nitrogen removal and resisting nitrogen shock load with the maximum nitrogen loading rate (NLR) of $205.0 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$. In addition, tourmaline can control pH and oxidation reduction potential (ORP) values to provide a stable environment for enrichment of Anammox bacteria. Anammox activity batch tests demonstrate that addition of tourmaline can enhance the activity of Anammox bacteria with a maximum increase of 48.8% higher than the control. Analysis of extracellular polymeric substances (EPS) show that the maximum increase of carbohydrate, protein and total EPS

收稿日期: 2015-03-06

基金项目: 国家水体污染控制与治理重大专项(2013ZX07202010)

作者简介: 张捍民(1973—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事水污染控制、膜材料制备方面的研究, E-mail: zhanghm@dlut.edu.cn

production is obtained in R2 by 7.6%, 86.7% and 43.8%, respectively, which indicate that tourmaline can promote the growth and metabolism of bacteria and enhance the activity of Anammox reaction. According to the results of the particle size observation and scanning electron microscope (SEM) images, there is no visible benefit for the granulation of Anammox sludge by adding tourmaline and great number of the Anammox sludge and tourmaline developed separately in the component. Phylogenetic tree of bacteria demonstrates that numbers of the functional bacteria such as denitrifying bacteria and *nitrococcus* are extracted from the seed sludge which contain a big quantity of *brevibacterium* and filamentous bacteria during the enrichment process.

Key words: Anammox; tourmaline; enrichment; start-up; nitrogen removal

传统的硝化-反硝化工艺是目前应用最广泛的生物脱氮工艺,但因其硝化阶段需要外加氧气,反硝化阶段需要外加有机碳源,因而造成运行成本大大增加^[1]. 厌氧氨氧化(anaerobic ammonium oxidation, Anammox)反应在厌氧条件下以亚硝酸氮为电子受体,氨氮为电子供体,完成自养脱氮^[2]. 与传统硝化-反硝化相比,Anammox工艺可以减少63%的氧气消耗^[3],无需外加碳源^[4],活性污泥产量更低^[5],CO₂释放量更低^[6],因而节省近90%的运行成本^[7],因此Anammox被认为是一种极具发展前景的生物脱氮工艺. 研究得出实验室规模反应器的氮去除率为26~77 kg/(m³·d)^[8-9],实际规模反应器的氮去除率为9.5 kg/(m³·d)^[10]. 然而,Anammox菌生长速率低,倍增时间为10~12 d^[11],并且对环境条件敏感^[12],因此Anammox菌的驯化是该工艺工程应用的重大挑战.

前研究表明,反应器类型(SBR^[7,13]、UASB^[14-17]、CSTR^[18]和MBR^[19-20])、接种污泥(传统活性污泥^[7,13,15,17]、反硝化污泥^[21]、硝化污泥^[22]、厌氧消化污泥^[20,23]和产甲烷污泥^[24-25])以及运行条件(如反应温度)等条件都会对Anammox污泥的驯化产生正面或负面影响. 其中UASB反应器因具有较高的生物截留率,能成功启动Anammox反应器,并获得74.3~76.7 kg/(m³·d)的氮去除率^[9]. 此外,研究者也尝试一些新型手段,如添加载体填料或电极等. 用沸石作为填料可以促进Anammox生物膜的形成并且减少冲刷过程中的生物流失^[26]. Chen等^[23]通过添加竹炭成功启动Anammox工艺并且获得的Anammox菌体数量显著增加. Zhang等^[27]运用一种具有铁电极的新型Anammox反应器来提高Anammox菌群落活性并加速启动过程. 但上述方法仍需要较长的启动时间及外加成本,因此通过经济高效的方法实现Anammox菌的驯化与工

艺的快速启动非常必要.

电气石是一种以含硼为特征的含有铝、钠、铁、钙、镁的环状硅酸盐晶体矿物^[28],具有较高的物理化学稳定性. 电气石具有显著的热电性、压电性和自发电极性^[29]. 前研究表明电气石对微生物生长代谢有积极作用. Xia等^[28]研究表明,电气石能降低水分子缔合度,提高沼泽红假单胞菌脱氢酶活性. Zhang等^[30]研究表明电气石可以提高固定在菌丝小球上的苯胺降解细菌的数量和活性. Qiu等^[31]研究表明低浓度电气石可以提高大肠杆菌细胞膜渗透性,促进其对周围介质中营养的吸收. 因此电气石可能是一种促进Anammox菌驯化的有效选择.

本研究的目的是:1)通过2个平行的CSTR反应器证明添加电气石促进Anammox菌驯化并加快反应器启动;2)分析电气石对Anammox菌活性、环境调节、污泥颗粒化及菌种筛选与进化方面的作用.

1 材料与方法

1.1 电气石

电气石购买于物华天宝公司,产于内蒙古赤峰地区,属于黑电气石. 电气石的化学组成如下(质量百分比):NaO₂ 1.19;MgO 8.05;Cr₂O₃ 0.22;SiO₂ 37.05;K₂O 0.09;CaO 1.18;TiO₂ 0.44;B₂O₃ 10.16;FeO 8.33和Al₂O₃ 29.8. 平均粒径为62 μm(d(0.1)35 μm;d(0.5)58 μm;d(0.9)96 μm). SEM观察电气石主要成颗粒状或短棒状.

1.2 接种污泥

用活性污泥作为接种物,该活性污泥取自当地的城市生活污水处理厂——凌水河污水处理厂,采用CAST工艺,进水中的氮主要以氨氮形式存在.

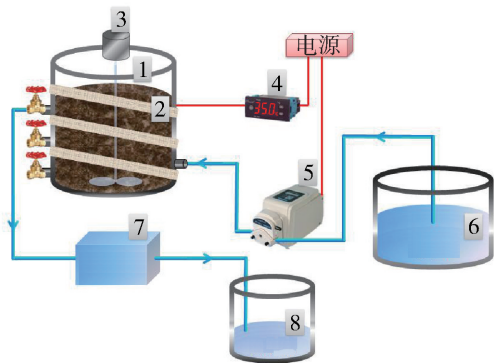
1.3 合成污水

合成污水成分改自van de Graaf等^[32]报道的成分,NH₄Cl和NaNO₂作为主要氮源物质,质量浓度按

照化学计量比 1:1.32^[2]投加,分别为 50 mg/L 和 66 mg/L,其他组成(g/L)包括:KHCO₃ 1.25;KH₂PO₄ 0.025;CaCl₂·2H₂O 0.3;MgSO₄·7H₂O 0.2;FeSO₄ 0.00625;EDTA 0.00625 和微量元素液 1.25 mL/L. 微量元素液组成为(g/L):EDTA 15,ZnSO₄·7H₂O 0.43;CoCl₂·6H₂O 0.24;MnCl₂·4H₂O 0.99;CuSO₄·5H₂O 0.25;NaMoO₄·2H₂O 0.22;NiCl₂·2H₂O 0.19;NaSeO₄·10H₂O 0.21;H₃BO₄ 0.014 和 NaWO₄·2H₂O 0.050.

1.4 连续实验

采用 2 个相同的连续搅拌式生物反应器(continuously stirred tank reactor, CSTR),高 150 mm,直径 140 mm,总有效工作体积为 2 L,装置如图 1 所示.



1—厌氧连续搅拌式主反应器;2—加热带;3—电磁搅拌装置;4—PID 温度控制器;5—蠕动泵;6—进水池;7—密闭二沉池;8—出水池.

图 1 厌氧连续搅拌式生物反应器装置

Fig. 1 Schematic diagram of experimental anaerobic continuously stirred tank bioreactor (CSTR)

用 1.2 部分中所述活性污泥接种 2 个平行的厌氧 CSTR 反应器(R1 和 R2). 反应器中污泥 VSS 质量浓度为 5.0 g/L. R1 不加电气石,作为空白对照反应器,R2 投加 200 g 电气石,搅拌速度设为 100 r/min 使微生物和电气石充分悬浮. 初始 HRT 分别设为 R1: 1.4 d 和 R2: 1.6 d. 通过缩短 HRT 来提高氮负荷. 合成污水进水时按 N₂:CO₂ 为 95%:5% 曝气,并且每日更换以避免由于生物活性或其他原因造成的组成改变. 反应器中 pH 保持在 7.5~8.5,温度控制在(35±1)℃,整个反应器用黑布包围,以避免光合菌的生长.

1.5 厌氧氨氧化活性批式实验

在驯化结束后,取反应器中污泥进行批式实验来详细比较 R1 和 R2 中污泥的 Anammox 活性. 100

mL 血清瓶装 50 mL Anammox 菌悬浮液,初始微生物 VSS 质量浓度为 1 g/L. 合成污水如 1.3 部分所述,调节 pH 为 8.0±0.1. 血清瓶用橡胶塞严格密封,于恒温 35℃,150 r/min 摇床中避光培养.

厌氧氨氧化活性(specific activity of Anammox, SAA)

$$SAA = \frac{24\rho(NH_4^+ - N + NO_2^- - N)}{1000h\rho_0} \quad (1)$$

式中: ρ_0 为初始微生物质量浓度,m/L; h 为培养时间,h; $NH_4^+ - N$ 、 $NO_2^- - N$ 为 $NH_4^+ - N$ 和 $NO_2^- - N$ 消耗量.

1.6 分析方法

驯化过程中每隔 1 d 收集 1 次样品. NH_4^+ 、 NO_2^- 、EPS 和 VSS 按照标准方法^[33]测定. $NO_3^- - N$ 用离子色谱测定(Shimadzu SCL-10A sp, Japan). pH 和 ORP 用便携式分析仪(WTW-inolab, Germany)测定. 粒径用激光粒度仪(MASTER SIZER2000 laser particle analyzer, UK)测定. 所有化学品均采用分析纯,结果取 2 次测定平均值.

1.7 扫描电子显微镜(SEM)观察

驯化第 1 天和最后 1 天反应器 R1 和 R2 中的污泥,用扫描电子显微镜(SEM, FEI, USA)观察其形态学特征. 样品首先用 2.5% 体积分数,pH 为 7.2 的戊二醛溶液在 4℃ 下固定 2 h,然后用乙醇梯度脱水,体积浓度从低到高分别为 50%、70%、80%、90%、95% 和 100%,每个体积浓度脱水 10 min,最后真空干燥并喷金.

1.8 DNA 提取、PCR、DGGE 及谱系分析

驯化第 1 天和最后 1 天反应器 R1 和 R2 中的污泥,用 16S rRNA PCR、变性梯度凝胶电泳(DGGE)以及基因谱系分析来研究微生物组成. DNA 提取采用 FastDNA® SPIN Kit for Soil (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). 使用 TaKaRa EX Taq(Code No. DRR001A),对污泥 DNA 进行 PCR 扩增,引物分别为 GC-341F(正向引物)和 758R(反向引物). DGGE 变性梯度凝胶线性梯度范围为 30% 到 60%,60℃ 条件下在通用变异检测系统(D-CODE UMDS 系统)中运行,并通过 Fluor Chem HD2 (Protein Simple, USA)获取凝胶数字成像.

根据 DGGE 结果,将优势条带切胶洗脱,再用上述引物(正向引物不含 GC 夹)进行第 2 次 PCR 扩增. 以纯化后的 PCR 产物为模板,用 DNA 测序试剂盒 BigDye Terminator V3.1 (Sangon Company, Shanghai, China)进行循环测序,并通过测序系统 ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, California,

USA)形成16S rRNA片段序列.采用BLAST工具将获得的16S rRNA序列与GenBank中参考微生物基因序列进行比对,再用MEGA6软件建立微生物进化树.

2 结果与讨论

2.1 厌氧氨氧化菌驯化及反应器脱氮性能

根据反应器中 NH_4^+-N 和 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 的质量浓度变化(图2),Anammox工艺的启动过程可以分为3个阶段:第1阶段为污泥转换期;第2阶段为污泥适应期;第3阶段为活性提高期.该划分与其他研究报道类似^[34-35].

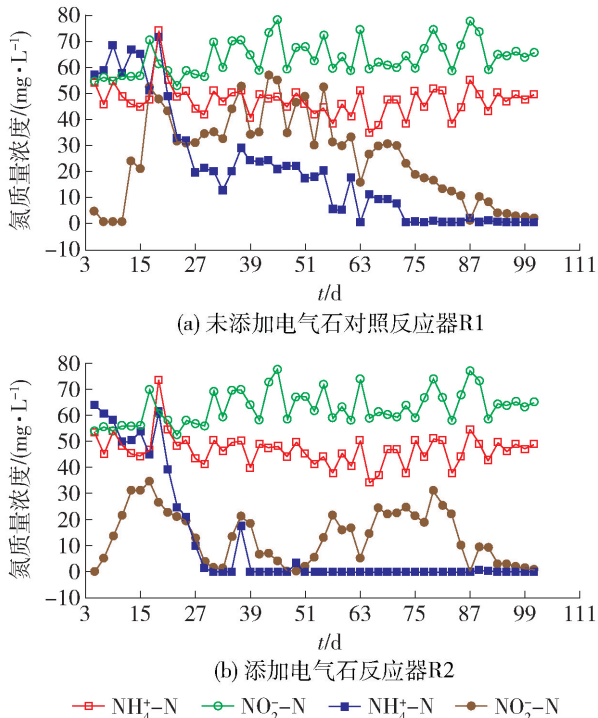


图2 反应器启动过程中脱氮性能

Fig.2 Nitrogen removal performance of reactors during the start-up period

反应器R1的污泥转换期为第1天—第19天,添加电气石反应器R2的污泥转换期为第1天—第17天.此阶段由于细胞溶菌作用^[36]R1、R2出水 NH_4^+-N 质量浓度始终高于进水,反硝化活性非常显著^[37],而未表现出Anammox活性.添加电气石反应器R2出水 NH_4^+-N 质量浓度低于对照反应器R1,但并未明显缩短污泥转换期时间.

反应器R1的污泥适应期为第19天—第73天,添加电气石反应器R2的污泥适应期为第17天—第29天.两反应器均在第23天观察到显著的

NH_4^+-N 和 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 同时去除,表现出Anammox活性,R1和R2的 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 与 NH_4^+-N 消耗量比值分别为1.33和1.32,理论化学计量比为1.32^[2].初次表现出Anammox活性时,R1的 NH_4^+-N 和 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 去除率分别为32.8%和40.2%,R2的 NH_4^+-N 和 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 去除率分别为49.0%和50.6%.可见添加电气石会明显缩短污泥适应期.

反应器R1的活性提高期为第73天—第100天,添加电气石反应器R2的活性提高期为第29天—第100天.反应器中Anammox活性显著并趋于稳定,这标志着Anammox工艺成功启动.本阶段,R1出水 NH_4^+-N 和 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 的平均去除率分别为99.5%和85.5%,R2出水 NH_4^+-N 和 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 的平均去除率分别为98.7%、81.9%,R1和R2的 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 与 NH_4^+-N 消耗量平均比值分别为1.21、1.19.

从启动第1天—第33天,反应器R1和R2的HRT分别为1.4d和1.6d,平均NLR分别为75.0、65.7 $\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$,最后R1和R2的NRR分别达到42.5、65.4 $\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$,如图3所示.从首次出现厌氧氨氧化活性到第1次提高氮负荷,分别对R1和R2的NLR(x)和NRR(y)进行拟合,得出R1: $y = 3.07x + 53.16$ ($r^2 = 0.680$),R2: $y = 13.22x + 83.14$ ($r^2 = 0.977$),可以看出,R2更符合生化反应一级动力学特征,说明添加电气石的混培物中的Anammox菌占绝对优势并且活性更强.从第35天开始,R1和R2的HRT均缩短至0.8d,R1和R2的NLR分别增加至157.9、145.8 $\text{mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$.对于氮负荷的提高,2个反应器中驯化得到的Anammox混培体均表现出一定的耐负荷冲击能力,其中添加电气石反应器R2的适应期较短,出水 NH_4^+-N 和 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 的质量浓度在小幅增加后能很快地降到一个很低的水

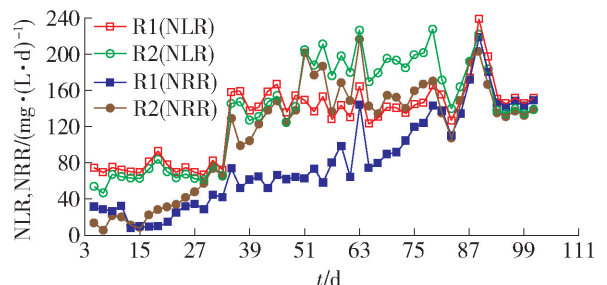


图3 反应器R1与R2中进水氮负荷(NLR)和氮去除率(NRR)的变化趋势

Fig.3 Profile of the influent nitrogen loading rate (NLR) and the nitrogen removal rate (NRR) in reactor R1 and R2

平并趋于稳定. 从反应器运行第 51 天开始, 由于对照反应器 R1 的 NRR 仍处于较低水平, 因此只将反应器 R2 的 NLR 提高至 $205.0 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$, R2 仍表现出较好的脱氮能力, NH_4^+-N 和 NO_2^--N 去除率分别为 100%、96.9%. 由于从第 73 天起, R2 的 NO_2^--N 积累明显, 第 81 天将 R2 的 NLR 降低至 $171.6 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{d})$, 第 85 天性能基本恢复. 由此可见, 电气石作用下驯化得到的 Anammox 菌耐负荷冲击能力更好.

从实验结果可以看出: 电气石的加入明显缩短了污泥适应期的时间, 并且增强了反应器脱氮效能. 这是由于电气石能促进 Anammox 菌生长代谢, 提高菌种活性. 上述作用与电气石材料能自发极化形成永久电场的特性有很大关系^[29,38]. 其永久电极性使电气石表面在厚度 $10 \mu\text{m}$ 左右的范围内存在高达 $10^7 \text{ V}/\text{m}$ 的电场强度^[39]. 电场可以调节细胞膜表面蛋白质和脂类的活性^[40], 电气石的加入会导致细胞膜流动性显著降低, 渗透性增强^[31], 有利于细胞从周围介质吸收营养. 外加电场还可以减弱或破坏水分子间氢键, 从而影响水团簇结构^[41]. 电气石可以减小水分子团体积, 加快细胞生长代谢. 此外, 电气石在粉碎过程中因价键断裂而在表面产生裸露的金属阳离子 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 等, 并释放入水中, 对微生物活性产生影响. 如 Ca^{2+} 可以作为某种酶的辅因子以及内孢子的组成成分^[31]. Fe 是亚铁血红素 c 的组成元素, 亚铁血红素 c 是 Anammox 菌一些功能性酶的组成部分, Fe^{2+} 参与 Anammox 过程能提高 Anammox 群落活性^[27].

2.2 COD 与硝酸氮产量

初始阶段, R1 反硝化强烈, COD 质量浓度较高, NO_3^--N 质量浓度更低. 表现出 Anammox 活性后, 反硝化减弱, R1 和 R2 的 NO_3^--N 质量浓度均逐渐升高, 并基本维持在一定水平, 如图 4 所示. 整个驯化过程中, R1 的 COD 普遍高于 R2, 在 R1 进入 Anammox 性能稳定阶段后, COD 与 R2 相当, 均保持较低水平.

2.3 厌氧氨氧化活性批式实验

在驯化培养 100 d 后, 采用批式实验检测 2 个反应器中培养物的 SAA. 在培养开始时 (3 h), 添加电气石反应器 R2 中微生物的 SAA 即表现出比空白对照 R1 有明显的提高. 培养 9 h 时, R2 中微生物的 SAA 达到最大值, 比对照反应器 R1 提高 48.8%, 如图 5 所示. 培养结束 (36 h) 时, 对照反应器 R1 中微生物的 NH_4^+-N 和 NO_2^--N 去除率分别达到 82.6%

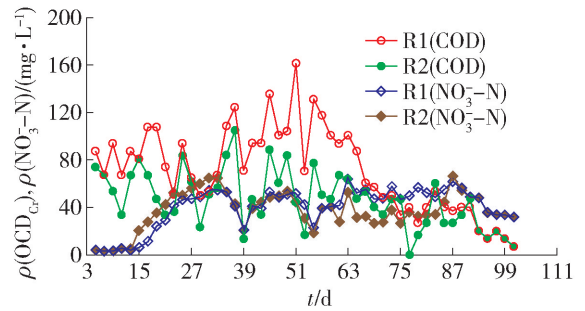
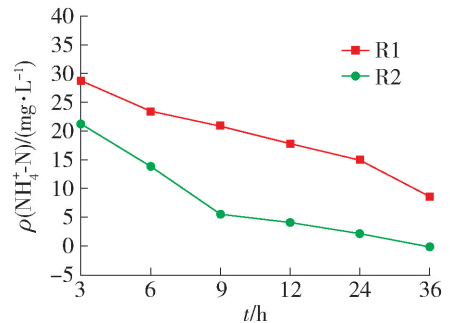
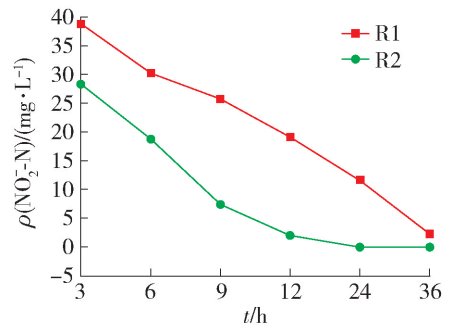


图 4 反应器 R1 (未添加电气石) 与 R2 (添加电气石) 的 COD 浓度与硝酸氮产量

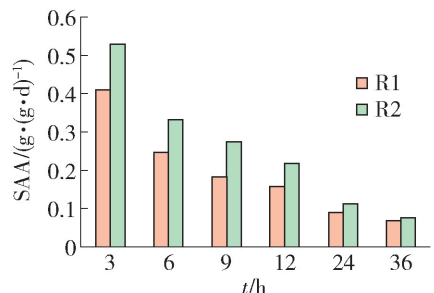
Fig. 4 COD concentration and nitrate production of reactor R1 (without tourmaline) and R2 (with tourmaline)



(a) NH_4^+-N 质量浓度变化



(b) NO_2^--N 质量浓度变化



(c) SAA 变化

图 5 Anammox 活性批式实验, 反应器 R1 和 R2 中培养物 NH_4^+-N 、 NO_2^--N 和 SAA 变化

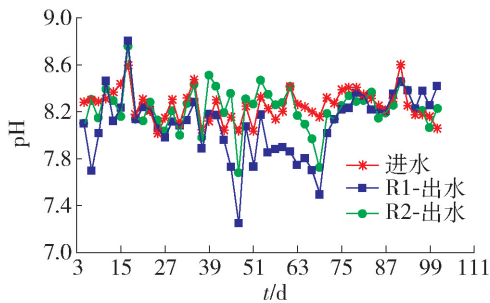
Fig. 5 Variations of ammonium, nitrite and SAA of reactor R1 and R2 in the batch tests

和 96.4%, 添加电气石反应器 R2 中微生物的 NH_4^+-N 和 NO_2^--N 去除率均达到 100%. R1 与 R2 中微生物

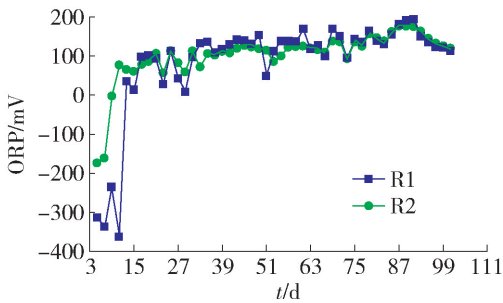
物 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 与 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 消耗量比值的平均值分别为 1.43 和 1.34. 因此, 添加电气石的微生物 Anammox 反应活性有所提高.

2.4 电气石对驯化环境的调节 (pH 和 ORP)

整个驯化过程, R1 和 R2 的 pH 变化范围 ($\text{pH}_{\text{max}} - \text{pH}_{\text{min}}$) 分别是 1.56 和 1.08, 说明添加电气石对 pH 变化能产生一定调控作用, 使其更接近并维持在 Anammox 菌适合范围 6.7 ~ 8.3^[1]. 污泥期和适应期的 pH 波动较大, 活性稳定期 pH 均较之前升高并基本保持稳定, 这是由于 Anammox 反应酸度消耗^[42]. 在进水条件和 HRT 恒定条件下, 出水 pH 的增加可以指示 Anammox 工艺表现的提升^[15], 如图 6 所示.



(a) 反应器进出水 pH 变化



(b) 反应器中 ORP 变化

图 6 反应器启动过程中, R1 (未添加电气石) 和 R2 (添加电气石) 的 pH 和 ORP 变化

Fig. 6 pH and ORP of R1 (without tourmaline) and R2 (with tourmaline) during the start-up period

在污泥转换期, R1 和 R2 的 ORP 都随时间升高, 这是因为有机碳源不断被消耗, 反硝化减弱, 氧化态的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 不断升高 (见图 4). 添加电气石反应器 R2 的 ORP 显著高于 R1, 是因为电气石促进 Anammox 菌生长, 加快 Anammox 反应进行, 生成氧化态的 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 较多 (见图 4). 进入适应期后, R1 与 R2 的 ORP 平均值分别为 125.9、121.4 mV, R1 和 R2 的 ORP 波动范围 ($\text{ORP}_{\text{max}} - \text{ORP}_{\text{min}}$) 分别为 183.0、121.1 mV, 可见电气石有调节 ORP 稳定的作用. R2 在中后期 ORP 低于 R1 可能由于电气石刺

激菌体生长导致 EPS 含量增加, 如图 7 所示.

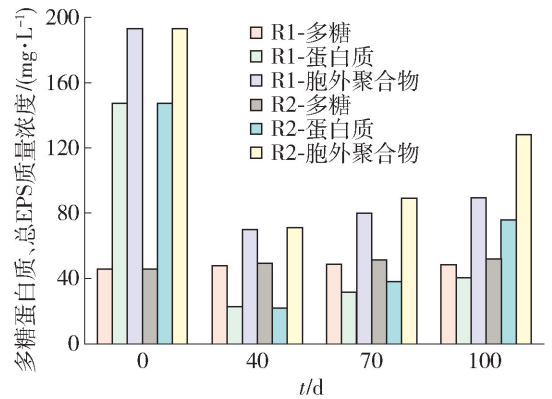


图 7 反应器启动过程中, R1 (未添加电气石) 和 R2 (添加电气石) 中微生物的 EPS 变化

Fig. 7 EPS of the bacteria in reactor R1 (without tourmaline) and R2 (with tourmaline) during the start-up period

由于电气石表面存在强电场, 水分子会通过瞬间放电而被电离. 存在如下反应: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$, $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 \uparrow$, $\text{OH}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}_2^-$. 该过程可以使 H^+ 质量浓度降低^[43], 调节 pH 使其更接近 Anammox 菌最佳 pH 8.0^[1], 有利于维持细胞的酸碱平衡以及内环境稳定.

Strous 等^[44] 研究表明 Anammox 菌通过亚硝酸氮厌氧氧化生成硝酸氮来获得电子, 需要的电位为 +0.43 V. 因此, Anammox 反应过程中的微生物处于较高的氧化态, 这不同于其他厌氧菌需要较低的 ORP (一般为负值).

pH 和 ORP 是废水生物处理系统中重要的操作参数, 尤其是 Anammox 菌对生长环境要求极为苛刻, 电气石的存在能调节 pH 和 ORP 使其更适应 Anammox 菌, 并保持在一定范围内, 为菌种驯化提供了更稳定的生长运行环境.

2.5 污泥形态与颗粒化

在启动过程中, 污泥颜色由第 1 天的深棕色到培养末期变为红棕色. 初始阶段, 可能由于溶菌作用以及适应新环境, EPS 产量较高. 随着驯化进行, 添加电气石反应器 R2 的总糖与对照 R1 没有明显变化, 但是蛋白质明显增加, 如图 7 所示. 驯化结束后, R2 的多糖、蛋白质和总 EPS 产量分别比 R1 增加 7.6%、86.7% 和 43.8%. 据报道^[45], Anammox 菌的 EPS 与其生长有关, 高活性的 Anammox 菌将分泌更多的 EPS, 这与本实验中 EPS 产量与 Anammox 菌活性表现出一定正相关性的结果相符合. 此外, EPS 产量增加又可以促进更多电气石颗粒均匀分散

在 EPS 形成的类胶体矩阵的多孔状结构中, 与 Anammox 菌更紧密接触, 从而刺激生长代谢, 提高反应活性, 形成相互促进的良性生长状态。

驯化初期活性污泥的 $D[4,3]$ -体积加权平均粒径为 $77.6 \mu\text{m}$, 驯化结束后, 反应器 R1 和 R2 的平均粒径分别增加到 179.4 、 $101.6 \mu\text{m}$ 。理论上, EPS 产量增加(见图 7)会促进污泥颗粒化, 然而结果相反, 添加电气石 R2 反应器中 Anammox 菌虽然 EPS 产量提高, 但平均粒径并未明显增加, 原因可能是蛋白质的增加会表现出更强的负电性, 与此同时电气石因表面阳离子释放入水中而荷负电, 因此两者由于电性相斥原因, 不利于污泥颗粒形成, 如图 8 所示。

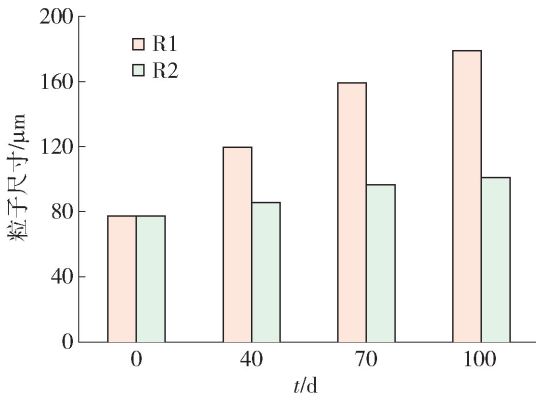


图 8 反应器启动过程中, R1 (未添加电气石) 和 R2 (添加电气石) 中微生物的粒径变化

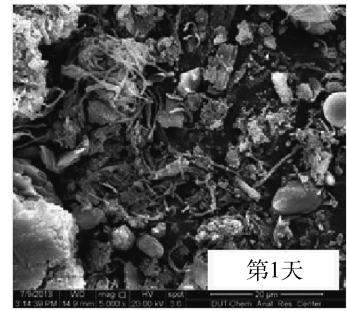
Fig. 8 Particle size of the bacteria in reactor R1 (without tourmaline) and R2 (with tourmaline) during the start-up period

用扫描电镜可以观察到菌体与电气石的生长状态, 如图 9 所示。接种活性污泥中存在球状菌、杆菌以及大量丝状菌, 菌体分散生长。经过 100 d 驯化后, R1 反应器中丝状菌减少, 基本呈球状, 紧密生长。R2 反应器中菌体并未以电气石为核心形成颗粒, 而是大部分与电气石分散生长, 很少部分附着在电气石上生长。

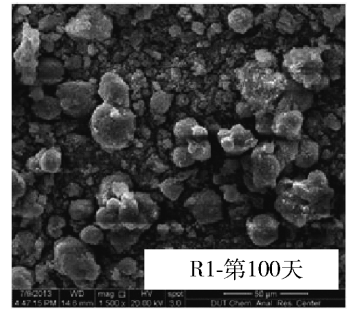
2.6 微生物谱系分析

驯化初期(第 1 天), 污泥中存在大量杆菌、球菌与丝状菌, 如图 10、11 所示。其中包括叶杆菌 *Thermovum composti* (band 1)、链球菌 *Streptococcus mitis* 与乳酸杆菌 *Lactobacillus* (band 2)、放线菌 *Actinobacterium* 和丝状菌 *Microthrix parvicella* (band 6), 与 SEM 观察结果相一致。

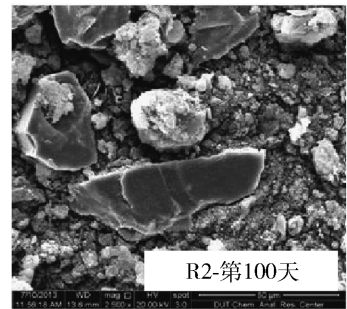
驯化末期(第 100 天), 接种污泥中的部分杆菌 (band 2) 和丝状菌 (band 6) 在反应器 R1 和 R2 中均大量减少甚至未出现。这可能由于驯化过程中严格



(a) 第1天



(b) R1-第100天



(c) R2-第100天

图 9 反应器启动过程中, R1 (未添加电气石) 和 R2 (添加电气石) 中微生物的 SEM 成像

Fig. 9 SEM observation of the bacteria in reactor R1 (without tourmaline) and R2 (with tourmaline) during the start-up period

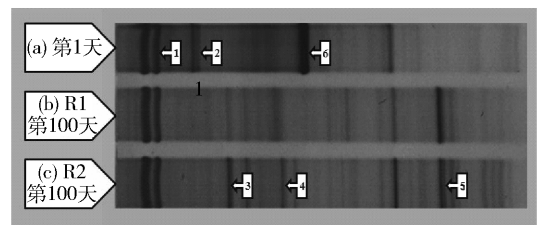


图 10 启动过程中反应初期与末期微生物的 DGGE 分析
Fig. 10 DGGE analysis of the bacteria in reactors at the first and last day of the start-up period

的厌氧环境以及 COD 不断被消耗造成上述菌种竞争减弱甚至消亡。

反应器 R1 和 R2 中出现一类新的菌属, 寡养单

胞菌属 *Stenotrophomonas* (band 5), 研究表明其具有较好的硝酸盐和亚硝酸盐还原能力, 是一类反硝化菌^[46-47], 这说明驯化过程中, 底物(亚硝酸氮)负荷的不断增加为此类微生物的生长提供了必要的环境

条件. 与 R1 相比, 添加电气石反应器 R2 出现了 β -变形菌纲 *Beta proteobacterium* (band 3), 而其中一种无机化能种类是可以在厌氧条件下氧化氨的亚硝化单胞菌属 *Nitrosomonas*.

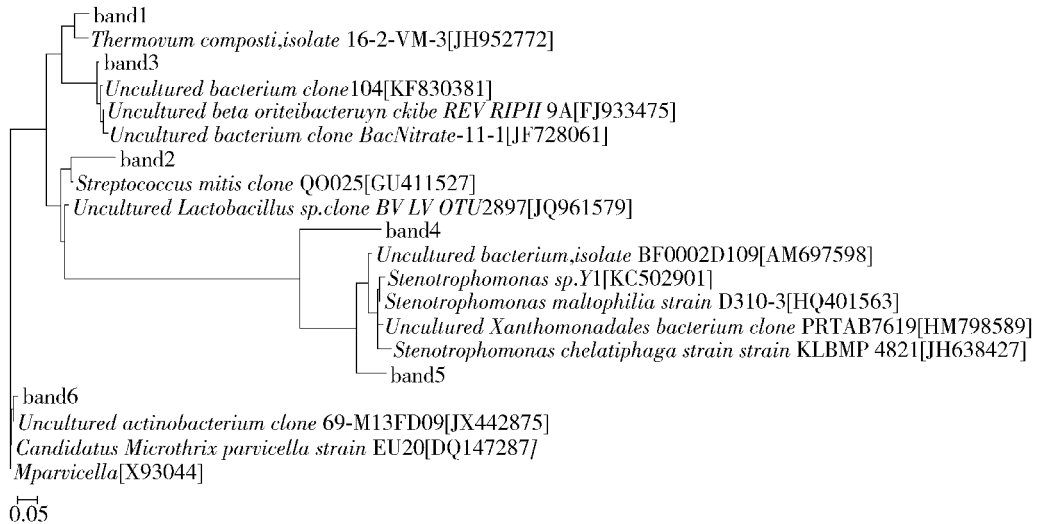


图 11 反应器中基于 UPGMA 模型建立的微生物基因谱系

Fig. 11 Phylogenetic tree of bacteria in reactors constructed by the UPGMA method based on partial 16S rRNA gene sequences

3 结论

1) 2 反应器均在第 23 天观察表现出 Anammox 活性, 添加电气石反应器 R2 的污泥适应期从空白 (R1) 的 54 d 缩短至 12 d, 且耐负荷冲击能力更好.

2) 电气石可以调控 pH 和 ORP 在 Anammox 菌适合范围内, 为驯化提供稳定环境.

3) 添加电气石反应器 R2 的多糖、蛋白质和总 EPS 分别比 R1 增加 7.6%、86.7% 和 43.8%, 说明电气石促进细胞生长代谢.

4) Anammox 活性批式实验显示, 添加电气石驯化得到的菌体的 SAA 最高比对照增加 48.8%.

5) 粒径与 SEM 检测说明, 电气石并不利于污泥颗粒化.

6) 谱系分析说明, 驯化过程中, 微生物组成由接种活性污泥中大量杆菌与丝状菌逐渐演变, 筛选出如反硝化菌、亚硝化菌等功能菌种.

参考文献:

- [1] JETTEN M S M, STROUS M, VAN DE PAS-SCHOONEN K T, et al. The anaerobic oxidation of ammonium [J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 22: 421-437.
- [2] STROUS M, HEIJNEN J J, KUENEN J G, et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of

slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50: 589-596.

- [3] VOLCKE E I P, VAN HULLE S W H, DONCKELS B M R, et al. Coupling the SHARON process with Anammox: model-based scenario analysis with focus on operating costs [J]. Water Sci Technol, 2005, 52(4): 107-115.
- [4] FURUKAWA K, INATOMI Y, QIAO S, et al. Innovative treatment system for digester liquor using anammox process [J]. Bioresour Technol, 2009, 100: 5437-5443.
- [5] KARTAL B, KUENEN J G, VAN LOOSDRECHT M C. Sewage treatment with anammox [J]. Science, 2010, 328(5979): 702-703.
- [6] LIU Si-tong, YANG Feng-lin, XUE Yuan, et al. Evaluation of oxygen adaptation and identification of functional bacteria composition for anammox consortium in non-woven biological rotating contactor [J]. Bioresour Technol, 2008, 99: 8273-8279.
- [7] SHEN Li-dong, HU An-hui, JIN Ren-cun, et al. Enrichment of anammox bacteria from three sludge sources for the startup of monosodium glutamate industrial wastewater treatment system [J]. J Hazard Mater, 2012, 199-200: 193-199.
- [8] TSUSHIMA I, OGASAWARA Y, KINDAICHI T, et al. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactor [J]. Water Res, 41: 1623-

- 1634.
- [9] TANG Chong-jian, ZHENG Ping, WANG Cai-hua, et al. Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge [J]. *Water Res*, 2011, 45: 135-144.
- [10] VAN DER STAR W R L, ABMA W R, BLOMMERS D, et al. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam [J]. *Water Res*, 2007, 41 (18): 4149-4163.
- [11] STROUS M, KUENEN J G, JETTEN M S M, et al. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 65: 3248-3250.
- [12] ISAKA K, DATE Y, KIMURA Y, et al. Nitrogen removal performance using anaerobic ammonium oxidation at a low temperatures [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 282: 32-38.
- [13] WANG Tao, ZHANG Han-min, GAO Da-wen, et al. Enrichment of Anammox bacteria in seed sludges from different wastewater treating processes and start-up of Anammox process [J]. *Desalination*, 2011, 271: 193-198.
- [14] NI Shou-qing, GAO Bao-yu, WANG Chi-cheng, et al. Fast start-up, performance and microbial community in a pilot-scale anammox reactor seeded with exotic mature granules [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 2448-2454.
- [15] LI Huo-sheng, ZHOU Shao-qi, MA Wei-hao, et al. Fast start-up of ANAMMOX reactor: operational strategy and some characteristics as indicators of reactor performance [J]. *Desalination*, 2012, 286: 436-441.
- [16] SINAN U, OZAN K B, ADEM Y. Strategies for successful anammox enrichment at laboratory scale [J]. *Clean-Soil Air Water*, 2011, 39(7): 653-657.
- [17] TANG Chong-jian, ZHENG Ping, CHAI Li-yuan, et al. Characterization and quantification of anammox start-up in UASB reactors seeded with conventional activated sludge [J]. *Int Biodeter Biodegr*, 2013, 82: 141-148.
- [18] BAGCHI S, BISWAS R, NANDY T. Start-up and stabilization of an Anammox process from a non-acclimatized sludge in CSTR [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37: 943-952.
- [19] WANG Tao, ZHANG Han-min, YANG Feng-lin, et al. Start-up of the Anammox process from the conventional activated sludge in a membrane bioreactor [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100: 2501-2506.
- [20] SUNEETHI S, JOSEPH K. ANAMMOX process start up and stabilization with an anaerobic seed in anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 8860-8867.
- [21] TSUSHIMA I, OGASAWARA Y, KINDAICHI T, et al. Development of highrate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors [J]. *Water Res*, 2007, 41: 1623-1634.
- [22] VAN DER STAR W R L, ABMA W R, BLOMMERS D, et al. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam [J]. *Water Res*, 2007, 41: 4149-4163.
- [23] CHEN Chong-jun, HUANG Xiao-xiao, LEI Chen-xiao, et al. Improving Anammox start-up with bamboo charcoal [J]. *Chemosphere*, 2012, 89: 1224-1229.
- [24] TANG Chong-jian, ZHENG Ping, ZHANG Lei, et al. Enrichment features of anammox consortia from methanogenic granules loaded with high organic and methanol contents [J]. *Chemosphere*, 2010, 79: 613-619.
- [25] TANG Chong-jian, ZHENG Ping, MAHMOOD Q, et al. Start-up and inhibition analysis of the Anammox process seeded with anaerobic granular sludge [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009, 36: 1093-1100.
- [26] FERNANDEZ I, VAZQUEZ-PADIN J R, MOSQUERA-CARRAL A, et al. Biofilm and granular systems to improve anammox biomass retention [J]. *Biochem Eng J*, 2008, 42: 308-313.
- [27] ZHANG Jing-xin, ZHANG Yao-bin, LI Yang, et al. Enhancement of nitrogen removal in a novel anammox reactor packed with Fe electrode [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 114: 102-108.
- [28] XIA Mei-sheng, HU Cai-hong, ZHANG Hong-mei. Effects of tourmaline addition on the dehydrogenase activity of *rhodospseudomonas palustris* [J]. *Process Biochem*, 2006, 41: 221-225.
- [29] NAKAMURA T, KUBO T. The tourmaline group crystals reaction with water [J]. *Ferroelectrics*, 1992, 137 (1): 13-31.
- [30] ZHANG Si, LI Ang, DI Cui, et al. Biological improvement on combined mycelia pellet for aniline treatment by tourmaline in SBR process [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 9282-9285.
- [31] QIU Shan, MA Fang, WO Yuan, et al. Study on the biological effect of tourmaline on the cell membrane of *E. coli* [J]. *Surf Interface Anal*, 2011, 43: 1069-1073.
- [32] VAN DE GRAAF A A, DE BRUIJN P, ROBERTSON L A, et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor [J]. *Microbiol*, 1996, 142: 2187-2196.

- [33] APH A. Standard methods for the examination of water and wastewater[M]. Washing D C: United Book Press, 1998: 60-80.
- [34] NUTCHANAT C, SUWANCHAI N. Anammox enrichment from different conventional sludges [J]. *Chemosphere*, 2007, 66: 2225-2232.
- [35] TRIGO C, CAMPOS J L, GARRIDO J M, et al. Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor [J]. *J Biotechnol*, 2006, 126(4): 475-487.
- [36] DAPENA-MORA A, VAN HULLE S W H, LUIS C J, et al. Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2004, 79: 1421-1428.
- [37] CHEN Jian-wei, ZHANG Ping, YU Yi, et al. Promoting sludge quantity and activity results in high loading rates in Anammox UBF [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(8): 2700-2705.
- [38] KUBO T. Interface activity of water given rise to by tourmaline[J]. *Solid State Phys*, 1989, 24(12): 1055-1060.
- [39] YAMAGUCHI. Surface electric fields of tourmaline[J]. *Appl Phys A*, 1983, 31: 183-185.
- [40] LECHLEITER J, GIRARD S, PERALTA E, et al. Spiral calcium wave propagation and annihilation in xenopus laevis oocytes[J]. *Science*, 1991, 252: 123-126.
- [41] SERGEI V S, ALICE V. Electric induced transition in water cluster[J]. *J Mol Stru*, 2002, 593: 19-32.
- [42] ZHANG Li, YANG Jia-chun, MA Yong-guang, et al. Treatment capability of an up-flow anammox column reactor using polyethylene sponge strips as biomass carrier [J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 110: 72-78.
- [43] YOSHITAKE N, AYUMU Y, KAZUYA O. pH self-controlling induced by tourmaline[J]. *J Intell Mater Syst Struct*, 1996, 7: 260-263.
- [44] STROUS M, PELLETIER E, MANGENOT S, et al. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome[J]. *Nature*, 2006, 440(7085): 790-794.
- [45] GAO Fan, ZHANG Han-min, YANG Feng-lin, et al. The contrast study of anammox-denitrifying system in two non-woven fixed-bed bioreactors (NFBR) treating different low C/N ratio sewage [J]. *Bioresour Technol*, 2012, 114: 54-61.
- [46] 吕志堂, 纪翠平, 苏强, 等. 3株反硝化聚磷菌的分离与鉴定[J]. *环境工程学报*, 2009, 3(8): 1406-1408. LÜ Zhi-tang, JI Cui-ping, SU Qiang, et al. Isolation and identification of 3 denitrifying phosphate-accumulating organisms [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3(8): 1406-1408. (in Chinese)
- [47] 廖绍安, 郑桂丽, 王安利, 等. 养虾池好氧反硝化细菌新菌株的分离鉴定及特征[J]. *生态学报*, 2006, 26(11): 3718-3724. LIAO Shao-an, ZHENG Gui-li, WANG An-li, et al. Isolation and characterization of a novel aerobic denitrifier from shrimp pond[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(11): 3718-3724. (in Chinese)

(责任编辑 杨开英)