

**Environmental Engineering** 

第 13卷 第 11期 2019年 11月 Vol. 13, No.11 Nov. 2019



http://www.cjee.ac.cn

E-mail: cjee@rcees.ac.cn

(010) 62941074



# 文章栏目:水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.201812108

中图分类号

文献标识码

万章弘, 彭书传, 岳正波, 等. 饥饿对厌氧氨氧化污泥颗粒化及污泥形态的影响[J]. 环境工程学报, 2019, 13(11): 2570-

WAN Zhanghong, PENG Shuchuan, YUE Zhengbo, et al. Effects of starvation on granulation and morphology of Anammox sludge[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2019, 13(11): 2570-2575.

# 饥饿对厌氧氨氧化污泥颗粒化及污泥形态的影响

万章弘,彭书传,岳正波,王进\*

合肥工业大学资源与环境工程学院,合肥 230009

第一作者: 万章弘(1993—), 女, 硕士研究生。研究方向: 水污染控制技术。E-mail: wanzhgz@163.com \*通信作者:王进(1978—),女,博士,教授。研究方向:环境污染控制与修复。E-mail: sophiawj@hfut.edu.cn

摘 要 厌氧氨氧化颗粒污泥经过长期保存会逐渐解体成絮状,但目前关于保存后期的饥饿环境对不同形态污 泥的影响尚缺乏深入研究。针对该问题,以饥饿15d颗粒解体后的厌氧氨氧化絮状污泥作为接种污泥,考察了 其颗粒化过程及其对于反应器启动和运行的影响,同时对比研究了絮状和颗粒状厌氧氨氧化污泥对于饥饿的响 应及其活性恢复情况。结果表明:饥饿10点后补料继续培养3个批次,厌氧氨氧化颗粒污泥反应活性的恢复速 率高于絮状污泥;接种厌氧氨氧化絮状污泥80 d左右,反应器中NH4-N和NO5-N的去除率均达到100%,160 d 可以实现污泥的颗粒化。此研究结果可为利用长期保存下的种泥启动厌氧氨氧化反应器提供参考。

关键词 厌氧氨氧化;颗粒污泥;絮状污泥;污泥颗粒化;污泥饥饿

厌氧氨氧化 (Anammox) 是一种高效节能的新型脱氮水处理工艺,主要通过将NO5-N 和NH4-N 在厌氧条件下转化为氮气来减少废水中氮的含量。但厌氧氨氧化菌长达11~19 d的倍增时间使得厌 氧氨氧化反应器启动时间过长,限制了其实现工程化应用。有研究表明,用传统的硝化污泥启 动,整个周期过程长达6~24个月[1-2],而部分或全部使用厌氧氨氧化污泥接种可以使启动时间缩短 到 1~6个月[3-4],是快速启动 Anammox 工艺的首要选择。因此, Anammox 工艺工程化需要重视厌氧 氨氧化污泥种泥的保存问题,但长期保存会使污泥处于饥饿状态,从而对接种污泥的活性产生一 定影响。

饥饿状态下厌氧氨氧化污泥的活性和形态变化已有较多研究。黄佳路[5]发现,室温是污泥贮 存的最佳温度,在室温无外源基质添加的存储条件下,厌氧氨氧化菌活性随保藏时间的延长而直 线下降,储存到180d的饥饿污泥恢复后,其比厌氧氨氧化活性仅为存储前的82.7%。汪彩华等<sup>6</sup> 对 4 ℃ 保存下的厌氧氨氧化污泥进行了研究,发现随保存时间的延长,污泥的颗粒结构会逐渐解 体,保存到5个月时,混培物颜色变黑。由此可见,污泥形态和污泥储存有一定的相关性。颗粒 污泥和絮状污泥的活性和其他特性均有较大差别,且这2种不同形态的厌氧氨氧化污泥在饥饿期 后重新补加营养基质时的响应如何? 饥饿后形态解体的污泥是否可以用作接种污泥启动厌氧氨氧 化反应器?基于此,关于不同形态的厌氧氨氧化污泥对饥饿的响应问题还须进一步研究。

本研究将饥饿后的厌氧氨氧化絮状污泥接种到发酵罐,观察了启动所需时间及期间的活性和

收稿日期: 2018-12-16; 录用日期: 2019-04-23

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(41372347)

形态变化,同时通过批式实验考察了絮状和颗粒状厌氧氨氧化污泥对饥饿的响应规律,以期为长期保存下的厌氧氨氧化接种污泥的活性恢复和应用提供技术参考。

# 1 材料与方法

### 1.1 反应器运行

用 5 L 发酵罐 (SBJX, 上海连环生物工程设备有限公司) 作为反应器,接种厌氧氨氧化污泥 (来自柠檬酸厂的厌氧氨氧污泥,接种前在室温环境下保持饥饿状态 15 d)。培养过程中进水NH<sup>+</sup><sub>4</sub>-N、NO<sup>-</sup><sub>2</sub>-N 初始浓度均为 25 mg·L<sup>-1</sup>,逐步分别提高到 200 mg·L<sup>-1</sup> 和 260 mg·L<sup>-1</sup>。其他营养物添加量为 500 mg·L<sup>-1</sup> KHCO<sub>3</sub>、27.2 mg·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300 mg·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、155 mg·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>。微量元素添加量为 1 mL·L<sup>-1</sup>,组成为 15 g·L<sup>-1</sup> EDTA、9 g·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.43 g·L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.25 g·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、0.19 g·L<sup>-1</sup> NiCl·6H<sub>2</sub>O、0.014 g·L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>、0.24 g·L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、0.99 g·L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、0.22 g·L<sup>-1</sup> NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、0.21 g·L<sup>-1</sup> NaSeO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O。

# 1.2 饥饿实验设计

为了考察不同形态污泥对饥饿的耐受能力,首先进行常规培养 (批次 1): 取反应器泥水混合液静置,弃去上清液后,分别收集絮状污泥和颗粒污泥,去离子水洗涤后制备成 50 mL 的污泥悬液备用; 以 50 mL 血清瓶作为反应瓶,装入 40 mL 营养液并分别接种 10 mL 上述絮状/颗粒污泥悬液,再用氩气曝气 2 min 后封瓶,置于 35  $^{\circ}$  恒温箱避光培养 8 d; 以不接种污泥的空白液作为对照,每组设置 3 个平行。批式实验培养基中  $NH_4Cl$  60 mg  $L^{-1}$ 、 $NaNO_2$  60 mg· $L^{-1}$ ,其余常量和微量元素配方同上。

反应结束后,设置 10 d 不加营养液的饥饿期,最后再次进行常规培养,重复 3 个批次 (批次 2~批次 4),考察不同形态污泥的活性恢复情况。

#### 1.3 分析方法

利用纳氏试剂分光光度法测定 $NH_4^+N^{[7]}$ ; 离子色谱仪 (ICS 900, 美国戴安) 测量 $NO_2^-N$  和 $NO_3^-N$ ; 利用重量法测定污泥 VSS 浓度<sup>[7]</sup>; 比厌氧氨氧化活性 (specific anammox activities, SAA) 根据文献中的方法<sup>[6]</sup> 测定;利用体式显微镜 (LEICA S8APO, 徕卡仪器有限公司) 观察污泥形态<sup>[8]</sup>。

# 2 结果与讨论

# 2.1 反应器培养实验

1) 絮状污泥反应器颗粒化过程。图 1 为反应器启动运行 50 d 内NH<sub>4</sub>-N 和NO<sub>2</sub>-N 浓度的变化过程。初始培养时,进水NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N 均为 25 mg·L<sup>-1</sup>,到 50 d 时已逐步分别提高至 80 mg·L<sup>-1</sup> 和 104 mg·L<sup>-1</sup>。接种的厌氧氨氧化污泥为饥饿后解体的絮状污泥,初期反应器的基质消耗速率较低,总氮去除速率仅为 14.39 g·(m³·d)<sup>-1</sup>;随着基质浓度的提高,基质消耗速率也逐步增加 (如图 1 中标识线段斜率所示),反应器总氮的消耗速率逐步增加至 51.88 g·(m³·d)<sup>-1</sup>。运行前期,NO<sub>2</sub>-N 的去除速率比NH<sub>4</sub>-N 的去除速率要高,这表明反应器前期仍然发生了反硝化过程。反应器启动未添加有机碳源,部分异养菌死亡裂解释放的有机物可供反硝化菌利用[9]。而随着时间的延长,NO<sub>2</sub>-N 和NH<sub>4</sub>-N 消耗比率逐渐增大,这说明厌氧氨氧化菌群浓度逐步增加。

随着反应器的长期运行,污泥逐渐发生了颗粒化,NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 去除率稳步提升 (见图 2(a))。图 2(b) 为反应器启动及颗粒化过程中  $\Delta$ NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/ $\Delta$ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的变化。反应器启动时厌氧氨氧化现象不明显, $\Delta$ NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/ $\Delta$ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 比值高于 1. 32,而  $\Delta$ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/ $\Delta$ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 低于 0. 26,这说明有反硝化菌参与反应。此阶段反应器内部厌氧氨氧化作用弱于反硝化作用。反应器内脱氮功能微生物种类较多,可能有Anammox 菌、氨氧化细菌 (ammonium-oxidising bacteria, AOB)、亚硝酸盐氧化菌 (nitrite-oxidizing bacteria, NOB)、反硝化细菌 (denitrifying bacteria, DNB)等。因此,运行前期 50 d 内的  $\Delta$ NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/ $\Delta$ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 与  $\Delta$ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/ $\Delta$ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的比值没有规律性变化。随着反应器运行时间的延长,厌氧氨氧化菌逐渐成为

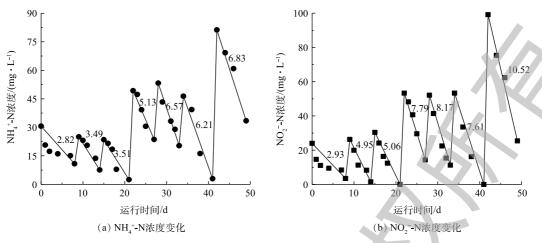


图 1 颗粒化培养过程中初期 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 浓度变化

Fig. 1 Variation of ammonia nitrogen and nitrite concentration at initial stage in the granulation process.

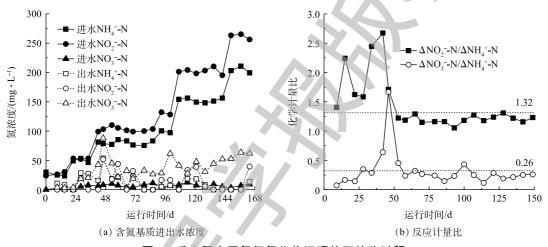
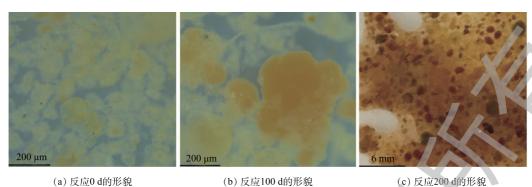


图 2 反应器中厌氧氨氧化物污泥的颗粒化过程

Fig. 2 Granulation process of Anammox sludge in the reactor

优势菌种,但依然存在氨氧化细菌、从而导致氨的额外消耗,此时, $\Delta NO_2^2$ -N/ $\Delta NH_4^4$ -N 略低于理论值 1.32, $\Delta NO_3^2$ -N/ $\Delta NH_4^4$ -N 略低于理论值 0.26。但在 80 d 后,两者的实际值已经非常接近理论值,且此时基质去除率稳定达到 100% 左右,故可认定厌氧氨氧化反应器启动成功<sup>[10]</sup>。反应器运行 160 d 后,进水 $NH_4^4$ -N 和 $NO_2^2$ -N 分别达到 200 mg· $L^{-1}$  和 260 mg· $L^{-1}$ ,总氮容积去除速率为 150.90 g· $(m^3 \cdot d)^{-1}$ ,此时污泥以颗粒态形式存在,活性显著高于启动阶段的絮体状态污泥。对比张龙等<sup>[11]</sup>的研究,直接用厌氧氨氧化混培菌接种反应器在 60 d 左右即完成启动,比本研究的启动时间提前了约 20 d,这说明饥饿后的厌氧氨氧化种泥会在一定程度上延迟反应器的启动。

2) 絮状污泥颗粒化过程表征。图 3 为污泥颗粒化过程中不同阶段的形貌。经过约 160 d 的培养,污泥颗粒粒径由最初的 0.2 mm左右生长到 1 mm 左右。接种污泥逐渐由棕黄色絮状污泥转变成暗红色颗粒污泥和棕色颗粒污泥的混合絮状污泥。接种污泥中仅存在少量的红色厌氧氨氧化菌,被包裹于透明絮体内(图 3(a))。而随着颗粒化的进行,逐渐聚集形成颗粒污泥(图 3(b))。反应器持续运行 200 d 后,形成以红色厌氧氨氧化菌为主的颗粒污泥。通常颗粒粒径不会无限制增加,主要是因为颗粒内部通常存在空腔。这是由于基质不足引起颗粒内部细胞自溶造成的,此类颗粒污泥容易被反应器内的紊动水流破碎,这些碎片成为新颗粒污泥的内核<sup>[12]</sup>。絮状周围包裹的物质可能是胞外多聚物(图 3(c)),这是絮状污泥实现颗粒化的重要原因之一<sup>[5,13]</sup>;图 3 中厌氧氨氧化颗粒形



1) <u>火型</u>0 d的形貌 (b) <u>火型</u>100 d的形貌

图 3 厌氧氨氧化污泥颗粒化过程中不同时期形貌

Fig. 3 Morphology of Anammox sludge granulation at different stages

状不规则,表面不平坦,主要表现为包裹在薄膜内的簇状粒子团的积聚形态,与 ARROJO 等[14] 和 TANG 等[15] 研究结果相似,同时符合已有研究[16] 报道的厌氧氨氧化菌的形态。这些均表明成功培养出了厌氧氨氧化颗粒污泥。

# 2.2 饥饿实验

不同形态污泥对饥饿的耐受能力的研究结果如图 4 所示。在批次 1 的正常培养中,颗粒污泥的 SAA、去除率和平均反应速率明显好于絮状污泥。进行饥饿实验之前的絮状和颗粒状污泥的 SAA 分别为 8.31 mg·(g·d)<sup>-1</sup> 和 17.71 mg·(g·d)<sup>-1</sup>, 而饥饿期结束后,第 1 批的絮状和颗粒状的 SAA 分别达到了 21.56 mg·(g·d)<sup>-1</sup> 和 24.38 mg·(g·d)<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>-N 和NO<sub>2</sub>-N 的去除率也由 44.3% 和 44.5% 分别上升到 95.9% 和 92%,絮状污泥的反应速率上升速度高于颗粒污泥 (图 4(a)~(c))。这可能是由于絮状污泥对基质消耗速率较慢,因此,相同饥饿时间下活性保存时间比颗粒污泥更长,使得在第 1 次恢复培养时,絮状污泥的反应速率要高于颗粒污泥。批式实验中的 ΔNO<sub>2</sub>-N/ΔNH<sub>4</sub>-N 和 ΔNO<sub>3</sub>-N/ΔNH<sub>4</sub>-N 远低于连续运行的结果 (图 4(d)),这可能是由于基质浓度较低、微生物接种量较少以及传质性能不佳等因素所致。相对较高的NH<sub>4</sub>-N 消耗量可能是由于其他氨氧化微生物的参与造成的。2015 年,DAIMS等[17] 和 KESSEL等[18] 同时发现了全程硝化菌 (complete ammonia oxidizer, Comammox),且提出了氮循环的新路径。Comammox 拥有氨氧化功能和亚硝酸氧化功能全套编码基因,能够进行从铵到硝态氮的单步完全硝化过程。而 Anammox 菌可以与 Comammox 共生,并且在低浓度下更容易生长[19]。本研究使用的絮状和颗粒状 Anammox 污泥中很可能也存在 Comammox。此外,由于 Anammox 菌活性的衰减,死亡的菌体水解后可以作为碳源提供给反硝化菌,导致 ΔNO<sub>3</sub>-N/ΔNH<sub>4</sub>-N 低于理论值。

结合图 4(a) 和图 4(c),批次 2 的 SAA 和平均反应速率迅速上升,但批次 3 均有所下降,这说明在饥饿期,适应低营养环境的 Comammox 得到富集。因此,添加基质后,显示了较高的NH $_4^4$ -N 和NO $_2^2$ -N 去除率。此时 Anammox 菌在饥饿期受到的损伤尚未恢复。批次 3 中NH $_4^4$ -N 和NO $_2^2$ -N 的去除速率下降是由于 Comammox 不适应较高基质培养的环境,Anammox 菌低活性状态显现出来。此外,絮状污泥的 SAA 高于批次 1 结果,而颗粒污泥整体 SAA 甚至低于第 1 批絮状污泥。这可能是因为颗粒污泥活性较高,相等浓度初始基质下更早进入饥饿状态,使得颗粒中 Anammox 菌活性损伤高于絮状污泥。由批次 4 可以观察到,颗粒污泥的 SAA 开始回升到第 1 批状态,说明颗粒污泥的 Anammox 菌在第 4 批开始恢复,而絮状污泥 Anammox 菌活性较差,饥饿后恢复较慢,使得絮状污泥 SAA 依旧处于下滑趋势。

因此,短期的饥饿条件下颗粒污泥的厌氧氨氧化菌恢复较强,而长时间的贮存可能会对厌氧氨氧化菌产生不可逆转的损伤,使得接种后反应器启动效率不高。有研究<sup>[20]</sup>表明,8个月长期存储下的颗粒污泥中微生物长期处于内源呼吸阶段,由于无法获得基质而死亡,颗粒污泥系统内整体活性降低并会部分解体,厌氧发酵产生了硫酸盐、甲烷、硫化氢等,使得污泥颜色变黑并产生臭鸡蛋味的刺激性气体。

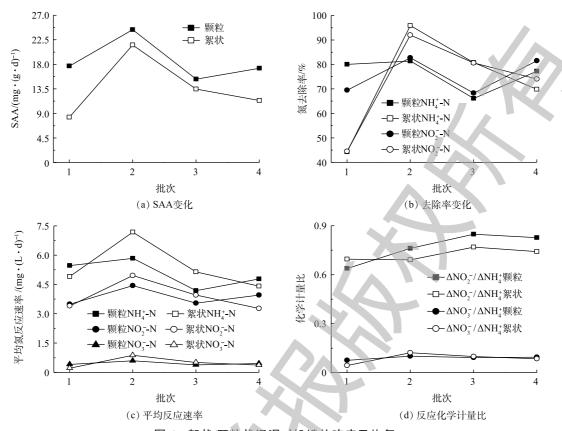


图 4 絮状/颗粒状污泥对饥饿的响应及恢复

Fig. 4 Response and recovery of flocculent/granular sludge to starvation

# 3 结论

1) 用饥饿后解体成絮状的厌氧氨氧化污泥接种反应器可以在80d内完成启动,160d培养后,反应器完成颗粒化,总氮容积去除速率从初始的14.39g·(m³·d)<sup>-1</sup>逐步提高到150.90g·(m³·d)<sup>-1</sup>。颗粒化过程中,接种污泥由棕黄色絮状污泥转变成暗红色颗粒污泥和棕色颗粒污泥的混合,粒径由0.2mm生长到1mm左右,成功形成厌氧氨氧化颗粒污泥。

2) 批式实验结果表明, 厌氧氨氧化污泥颗粒的除氮效果优于絮状污泥, 且经历 10 d 短期饥饿后, 饥饿期污泥优势菌群可能会发生改变, 但经过连续培养, 可以在一定程度上恢复, 恢复后颗粒污泥的活性要比絮状污泥更好。

### 参 考 文 献

- [1] TAO W, HANMIN Z, FENGLIN Y, et al. Start-up of the Anammox process from the conventional activated sludge in a membrane bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(9): 2501-2506.
- [2] 李津, 于德爽. C/N比对Anammox与反硝化协同脱氮性能影响及其动力学研究[J]. 环境工程学报, 2016, 10(6): 2813-2818.
- [3] MALAMIS S, KATSOU E, FRISON N, et al. Start-up of the completely autotrophic nitrogen removal process using low activity Anammox inoculum to treat low strength UASB effluent[J]. Bioresource Technology, 2013, 148: 467-473.
- [4] ALI M, OSHIKI M, OKABE S. Simple, rapid and effective preservation and reactivation of anaerobic ammonium oxidizing bacterium *Candidatus Brocadia sinica*[J]. Water Research, 2014, 57(5): 215-222.
- [5] 黄佳路. 厌氧氨氧化污泥的储存及活性恢复研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
- [6] 汪彩华, 郑平, 唐崇俭, 等. 间歇性饥饿对厌氧氨氧化菌混培物保藏特性的影响[J]. 环境科学学报, 2013, 33(1): 36-43.

- [7] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [8] 彭诚, 任涛, 段侪杰. 基于体视显微镜的立体视觉测量系统[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2015, 55(2): 223-230
- [9] 张蕾. 厌氧氨氧化性能的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [10] STROUS M M, KUENEN J G J, JETTEN M S M. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(7): 3248-3250.
- [11] 张龙, 肖文德. 厌氧氨氧化菌混培物的培养及上流式厌氧污泥床反应器运行[J]. 华东理工大学学报 (自然科学版), 2005, 31(1): 99-102.
- [12] 李建政, 张立国, 班巧英, 等. 好氧活性污泥在升流式厌氧污泥床反应器中的厌氧颗粒化过程及机制[J]. 科技导报, 2012, 30(36): 19-23.
- [13] 唐崇俭, 郑平, 汪彩华, 等. 高负荷厌氧氨氧化EGSB反应器的运行及其颗粒污泥的ECP特性[J]. 化工学报, 2010, 61(3): 732-739.
- [14] ARROJO B, MOSQUERA-CORRAL A, CAMPOS J L, et al. Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR)[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 123(4): 453-463.
- [15] TANG C J, ZHENG P, MAHMOOD Q. The shear force amendments on the slugging behavior of upflow Anammox granular sludge bed reactor[J]. Separation & Purification Technology, 2009, 69(3): 262-268.
- [16] KUENEN J G. Anammox bacteria: From discovery to application[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(4): 320-326.
- [17] DAIMS H, LEBEDEVA E V, PJEVAC P, et al. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria[J]. Nature, 2015, 528(7583): 504-509.
- [18] KESSEL M A H J V, SPETH D R, ALBERTSEN M, et al. Complete nitrification by a single microorganism[J]. Nature, 2015, 528(7583): 555-559.
- [19] KITS K D, SEDLACEK C J, LEBEDEVA E V, et al. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle[J]. Nature, 2017, 549(7671): 269-272.
- [20] 董兴水, 王智慧, 黄学茹, 等. 硝化作用研究的新发现: 单步硝化作用与全程氨氧化微生物[J]. 应用生态学报, 2017, 28(1): 345-352.

(本文编辑:金曙光,曲娜,郑晓梅)

# Effects of starvation on granulation and morphology of Anammox sludge

WAN Zhanghong, PENG Shuchuan, YUE Zhengbo, WANG Jin\*

School of Resource and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China \*Corresponding author, E-mail: sophiawj@hfut.edu.cn

Abstract Anammox granular sludge will gradually disintegrate into floccus structure after long-term preservation, but the research on the effect of starvation on sludge with different forms at late stage of preservation is not sufficient at present. To solve this problem, this study focused on the start-up and granulation process of the reactor when Anammox floc sludge after 15 days starvation and granular disintegration was taken as inoculum, the responses of floc and granular Anammox sludge to starvation and their activity recovery were investigated. The experiment results showed that the reactivity recovery rate of Anammox granular sludge was higher than that of floc sludge after 10 days of starvation and continuous cultivation of three batches with addition of substrates. After about 80 days of Anammox floc sludge inoculation, the removal rates of both ammonia nitrogen and nitrous acid state reached 100%, and the sludge granulation could be realized within 160 days. The study provides reference for Anammox reactor start-up by using long-term preserved sludge.

**Keywords** Anammox; granular sludge; floc sludge; granulation; starvation