

# Enrichment of Anammox Bacteria with Different Inoculation Sludge

Lingling Li, Xiaoping Liu, Huizi Zhang, Ting Jiang, Jing Zhao, Xiujuan Li, Rui Ding

College of Environment and Safety Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao Shandong

Email: realjade@163.com

Received: Aug. 23<sup>rd</sup>, 2017; accepted: Sep. 6<sup>th</sup>, 2017; published: Sep. 13<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

The effect of different types of seed sludge on the enrichment of anammox bacteria was investigated by inoculating the sludge with high nitrifying and denitrifying activity in two reactors, namely R1 and R2, respectively. The results showed that the bacteria autolysis was not obviously observed in R1, which was seeded with nitrifying sludge. And after about 60 days the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process was started up in R1. However, a long period of bacteria autolysis phase appeared in R2, which was seeded with denitrifying sludge. Thus the start-up time of ANAMMOX in R2 was about 20 days longer than in R1. During the stationary stage, the average ratios of  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  removal,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  removal and  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  production in R1 and R2 were 1:1.30:0.23 and 1:1.35:0.10, respectively.

## Keywords

ANAMMOX, Enrichment, Nitrifying Sludge, Denitrifying Sludge

# 不同接种污泥对厌氧氨氧化菌富集过程的影响研究

李玲玲, 刘晓萍, 张惠姿, 姜婷, 赵静, 李秀娟, 丁瑞

青岛科技大学环境与安全工程学院, 山东 青岛

Email: realjade@163.com

收稿日期: 2017年8月23日; 录用日期: 2017年9月6日; 发布日期: 2017年9月13日

## 摘要

本研究在R1和R2两个反应器中分别接种活性高的硝化污泥和反硝化污泥以考察不同接种污泥对厌氧氨氧

化菌富集过程的影响。研究表明, R1反应器以硝化污泥作为接种污泥, 培养过程中未出现明显的菌体自溶阶段, 经过约60 d成功启动厌氧氨氧化反应; R2反应器以反硝化污泥作为接种污泥, 出现较长的菌体自溶期, 启动厌氧氨氧化反应时间比R1反应器约长20天。R1反应器和R2反应器中厌氧氨氧化反应稳定运行期间,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除量: $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量: $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量平均值分别为1:1.30:0.23和1:1.35:0.10。

## 关键词

厌氧氨氧化, 富集, 硝化污泥, 反硝化污泥

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

自20世纪90年代 Mulder 等[1]发现厌氧氨氧化菌以来, 研究人员开发了多种以厌氧氨氧化反应为核心的高效脱氮工艺。厌氧氨氧化菌生长慢(倍增时间约为11天)[2], 其作为执行厌氧氨氧化反应的主体, 能否在反应器中快速富集成为厌氧氨氧化工艺在工程中推广应用的一个重要因素。

据文献报道, 以普通好氧活性污泥、硝化污泥、反硝化污泥、厌氧污泥以及河流底泥作为接种污泥均可成功富集厌氧氨氧化菌[3][4][5][6]。但是, 因不同的接种污泥中菌群结构不同, 导致其在富集厌氧氨氧化菌的过程中对氮的转化性能产生较大的差异, 进而影响厌氧氨氧化反应器启动时间。本研究分别采用高活性的硝化污泥和反硝化污泥作为接种污泥, 探究两者在富集厌氧氨氧化菌过程中对氮的转化规律, 并观察两者在厌氧氨氧化菌富集时间方面的差异。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 接种污泥

将取自青岛市李村河污水处理厂回流污泥渠的活性污泥在实验室两个反应器中分别进行好氧硝化培养和缺氧反硝化培养。活性污泥进行好氧硝化培养时, 进水中投加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 以及 $\text{NaHCO}_3$ 。活性污泥进行缺氧反硝化培养时, 以乙酸钠为碳源,  $\text{NaNO}_3$ 和 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 为氮源和磷源。经过2个月的培养获得高活性的硝化污泥和异养反硝化污泥后, 分别置于R1反应器和R2反应器中富集厌氧氨氧化菌。

### 2.2. 实验用水

实验用水采用人工配制废水, 其组分包括:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (浓度按需配制)、 $\text{NaNO}_2$ (浓度按需配制)、 $\text{NaHCO}_3$  1.0 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.021 g/L、 $\text{CaCl}_2$  0.14 g/L、 $\text{MgSO}_4$  0.166 g/L、微量元素 I 1 ml/L 和微量元素 II 1 ml/L。其中微量元素 I 组分为:  $\text{FeSO}_4$  5 g/L、EDTA 5 g/L; 微量元素 II 组分为: EDTA 15 g/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.43 g/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.24 g/L、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.25 g/L、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.22 g/L、 $\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.19 g/L、 $\text{H}_3\text{BO}_4$  0.014 g/L、 $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.05 g/L。

### 2.3. 厌氧氨氧化菌富集方法

本研究采用2个2.5 L的棕色玻璃瓶作为反应器富集厌氧氨氧化菌, 瓶口用橡胶塞密封, 橡胶塞上留有进出水管。为避免光照影响厌氧氨氧化菌的生长, 玻璃瓶外用黑布包裹。将R1和R2两个反应器置于

恒温水浴振荡器中, 振荡器转速 140 r/min, 温度控制在  $34^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。实验进水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  浓度约为 40~50 mg/L,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度约为 50~60 mg/L, pH 值为 7.8~8.0。R1 反应器接种的硝化污泥浓度 MLVSS 为 9.375 g/L, 该反应器在前 50 d 平均每个运行周期为 4 d, 此后每个运行周期为 2 d, 运行 100 d 后每个运行周期为 1 d; R2 反应器接种的反硝化污泥浓度 MLVSS 为 7.117 g/L, 该反应器在前 85 d 每个运行周期为 2 d, 此后, 每个运行周期为 1 d。各运行周期采用瞬时进水, 沉淀及排水时间为 6 小时, 其余为反应时间。

## 2.4. 分析项目与方法

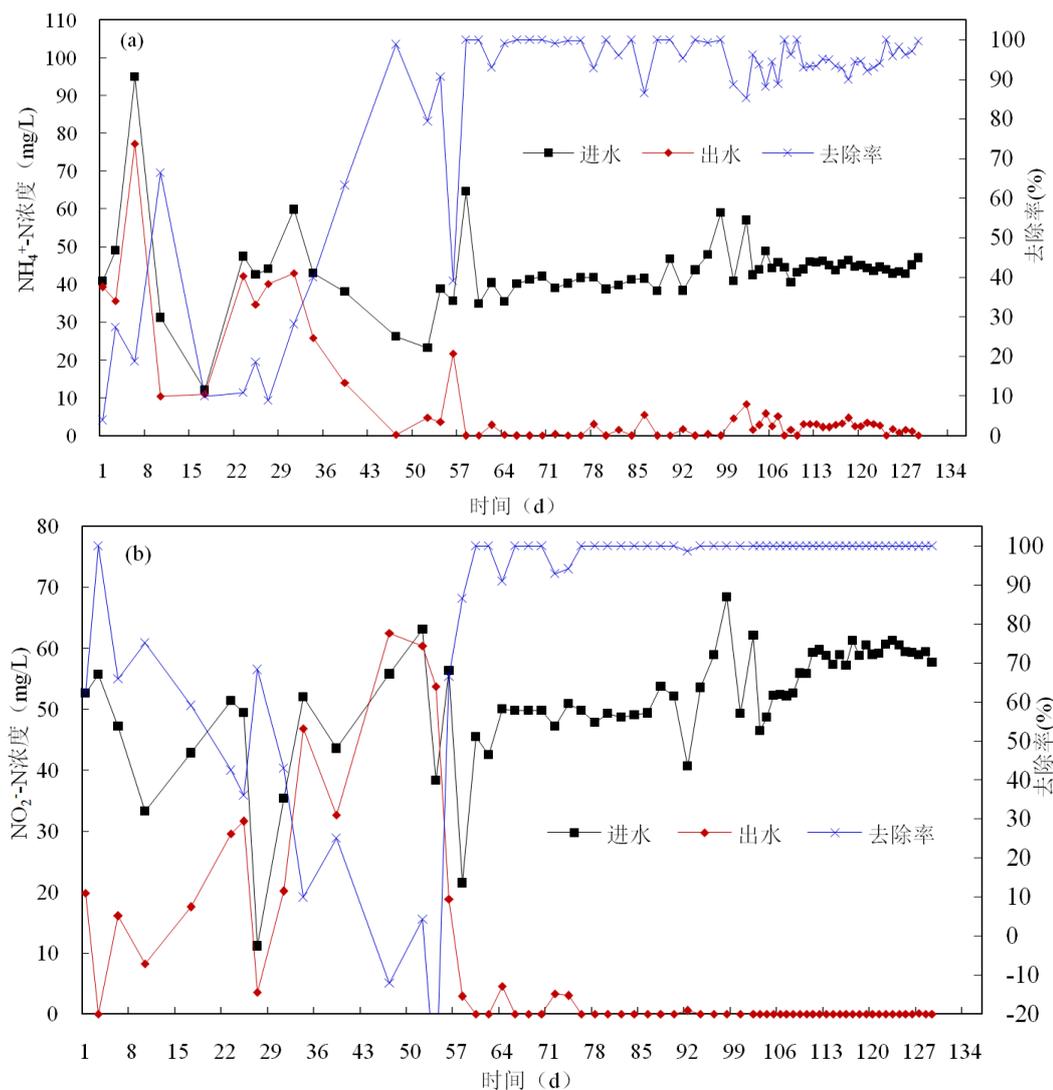
$\text{NH}_4^+ - \text{N}$ : 纳氏试剂分光光度法;  $\text{NO}_2^- - \text{N}$ : N-(1-萘基)-乙二胺光度法;  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ : 紫外分光光度法; MLVSS: 重量法。

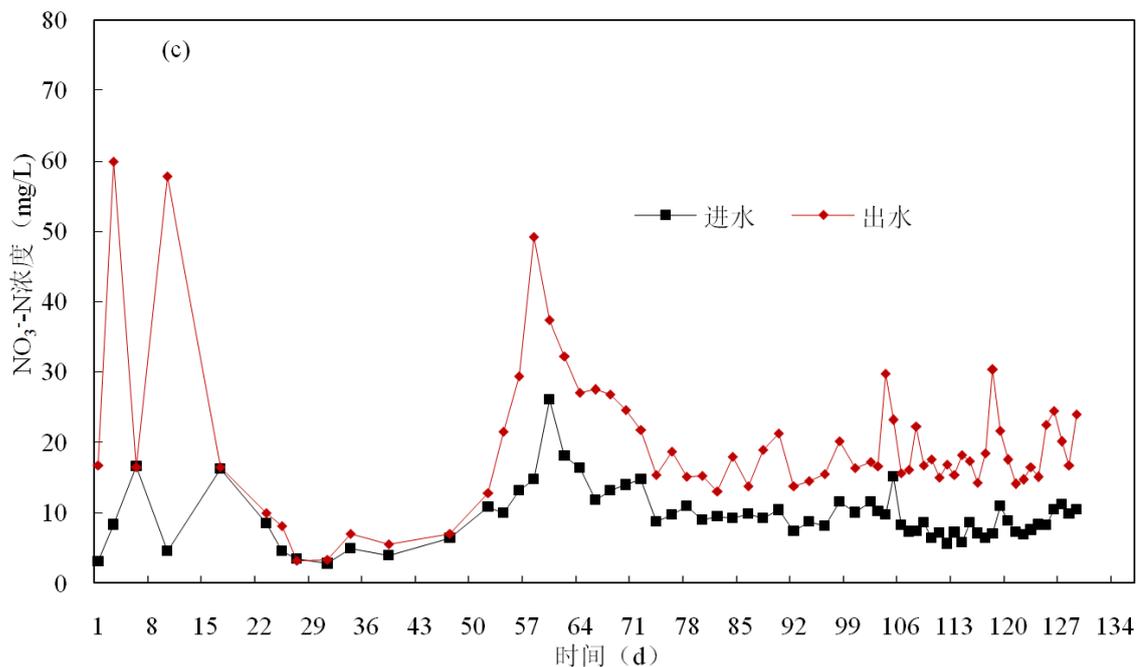
## 3. 结果与讨论

### 3.1. 厌氧氨氧化菌的富集

#### 3.1.1. R1 反应器中厌氧氨氧化菌的富集过程

图 1 所示为 R1 反应器进出水中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度随培养时间变化曲线。





**Figure 1.** Profile of  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  and  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  concentrations in the influent and effluent of R1

**图 1.** R1 反应器进出水中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度的变化

由图 1 可知, R1 反应器在前 17 d 能去除一部分氨氮,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除率最高为 67%。在此段时间内, 出水中  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度降幅较大,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率超过 60%; 出水中  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度明显高于进水  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度。因 R1 反应器接种的是活性较高的硝化污泥, 在该反应器启动初期, 进水未进行除氧, 反应器中主要发生硝化反应; 对进水和出水三氮( $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ )浓度进行分析, 有 20 mg/L 左右的氮损失, 推断一部分氮用于合成细胞物质, 此外还发生反硝化反应。

第 17 d 至第 30 d, R1 反应器中氨氮去除量明显降低,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除率低于 20%;  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量呈下降的趋势, 但  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率仍在 30%~60% 之间; 出水  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度略高于进水  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度 1~3 mg/L。实验结果表明, 此段时间内 R1 反应器中硝化反应已明显减弱, 其原因是硝化菌长期处于溶解氧缺乏的环境中, 硝化菌代谢功能受到抑制, 致使氨氮去除量降低。此阶段内约有 20~30 mg/L 的氮损失, 推断在反应器中除了发生反硝化反应以外, 可能还存在微弱的厌氧氨氧化反应, 而且反硝化反应逐渐减弱。

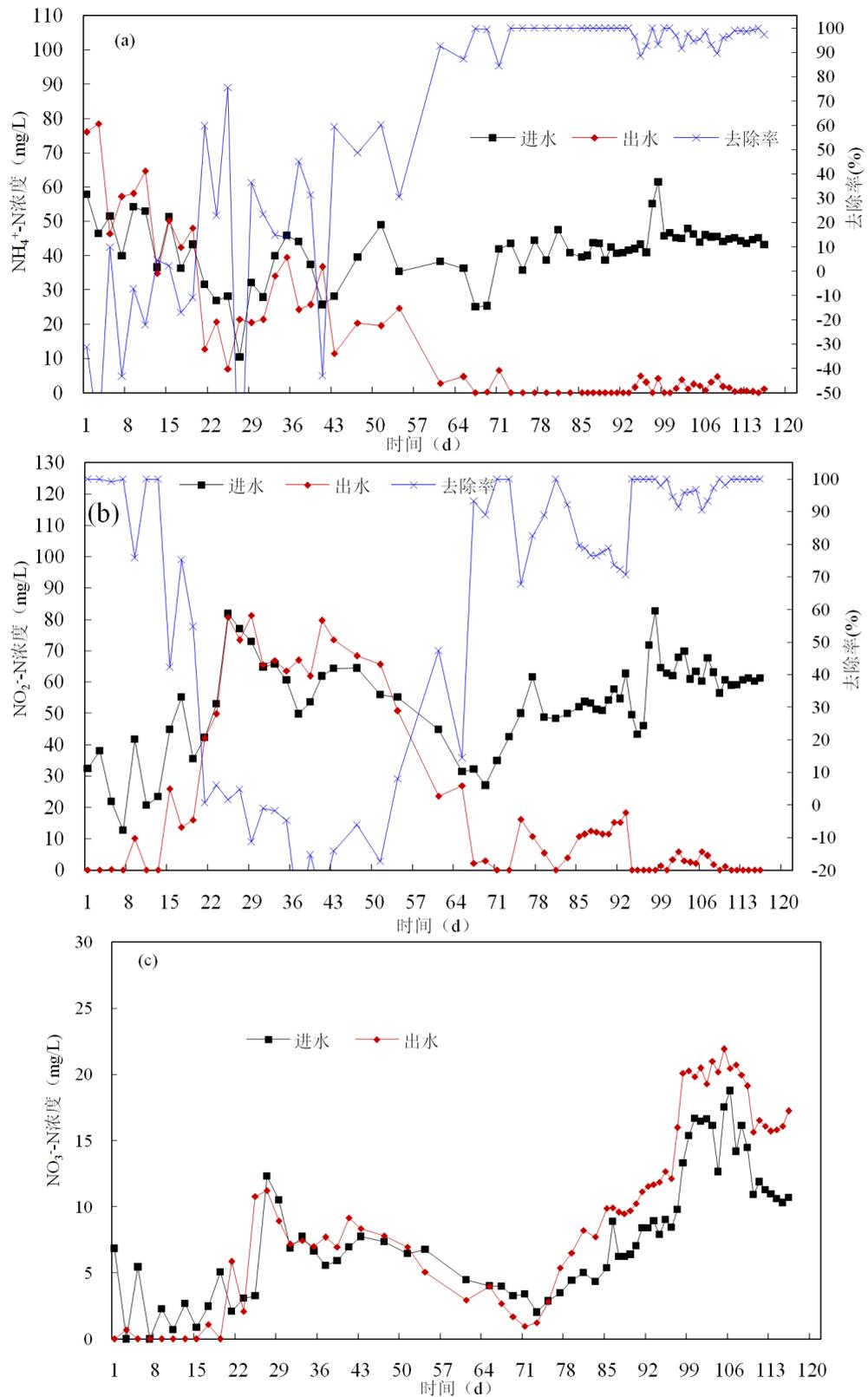
此后, R1 反应器中氨氮去除量逐渐增加, 至第 54 d 时,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除率达到 90%。而在此段时间内  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量继续呈下降的趋势, 出水  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度高于进水  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度约 1~2 mg/L。由实验结果可知, 在此阶段内, 反硝化反应已很微弱, 反应器中厌氧氨氧化反应逐渐增强。

第 60 d 后, 反应器中氨氮和亚硝态氮基本完全去除,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率均超过 95%;  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量约为 6~15 mg/L。  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除量:  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量:  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量平均值为 1:1.30:0.23, 接近厌氧氨氧化反应的理论值 1:1.32:0.26, 说明 R1 反应器中厌氧氨氧化反应已稳定启动。

第 100 d 后, 为提高反应器氮负荷, 每个周期的运行时间降为 1 d, 出水中氨氮浓度略有升高, 但  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除率仍超过 90%,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  能完全去除,  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量约为 10 mg/L 左右, 表明 R1 反应器中厌氧氨氧化菌具有较高的活性。

### 3.1.2 R2 反应器中厌氧氨氧化菌的富集过程

图 2 所示为 R2 反应器进出水中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度随培养时间变化曲线。



**Figure 2.** Profile of  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ,  $\text{NO}_2^--\text{N}$  and  $\text{NO}_3^--\text{N}$  concentrations in the influent and effluent of R2

**图 2.** R2 反应器进出水中  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 、 $\text{NO}_2^--\text{N}$  和  $\text{NO}_3^--\text{N}$  浓度的变化

R2 反应器接种的是反硝化污泥, 由于反应器进水所含成分为无机物, 污泥中的异养微生物因缺乏维持生命活动的有机物而发生溶胞, 组成菌体的蛋白质转化为氨氮, 导致 R2 反应器启动后 21 d 内多数周期出水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  浓度高于进水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  浓度(见图 2)。微生物溶胞释放出有机物, 为反硝化菌提供了电子供体, 可以观察到在 R2 反应器中发生明显的反硝化反应, 反应器启动前 15 d 内,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  和  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  去除率接近 100%。15 d 后, 微生物溶胞作用减弱, 出水氨氮浓度增加量减小, 反硝化反应随之减弱, 至 21 d 时,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率降到 54%。

第 21 d 至第 54 d, 出水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  浓度基本低于进水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  浓度, 多数运行周期  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除量在 5~20 mg/L 范围内波动, 由此可以推断, R2 反应器中异养微生物已逐渐被淘汰, 能在反应器中生存的主要是能适应无机环境的自养微生物, 微生物自溶作用已很微弱。因反硝化菌数量减少, 相应地 R2 反应器中反硝化反应已不占主导作用, 第 23 d 时  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率降到 0.7%, 此后几个运行周期  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率仅为 5% 左右; 第 29 d 至第 54 d, 出水  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度甚至高于进水  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度, 其原因可能是反应器内有少量的溶解氧, 将部分  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  氧化为  $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 。出水  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度与进水  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度接近。通过对进出水三氮浓度分析可知, 此段时间内, R2 反应器中主要存在硝化反应和厌氧氨氧化反应, 而反硝化反应很微弱。

此后, 随着厌氧氨氧化菌数量在 R2 反应器中不断增加,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率也随之增加, 至第 81 d 时,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率接近 100%。第 85 d 后, R2 反应器每个周期的运行时间降为 1 d, 氨氮基本能完全去除, 而  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率降到 70%~80% 之间, 继续培养约 10d 后,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率再次增加到 95% 以上。各周期  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量约为 5 mg/L 左右。 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除量:  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量:  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量平均值为 1:1.35:0.10, 说明厌氧氨氧化反应已成为 R2 反应器中的主导反应。与 R1 反应器相比, R2 反应器中  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量较低, 可能是 R2 反应器中反硝化菌数量较多, 导致有一部分由厌氧氨氧化反应生成的  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  被还原成  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  或  $\text{N}_2$ 。

### 3.2. 讨论

研究人员以厌氧颗粒污泥作为接种污泥启动厌氧氨氧化反应器时, 将启动过程分为菌体自溶、活性迟滞、活性提高和活性稳定四个阶段[7]。本研究以活性高的硝化污泥作为接种污泥, 并未出现明显的菌体自溶现象, 出水氨氮浓度始终低于进水氨氮浓度, 其主要原因是培养硝化污泥时进水中不含有有机物, 污泥经过两个月的培养已能适应无机环境。R1 反应器启动后 17 d 内硝化菌仍有一定的活性, 反应器中主要发生硝化反应, 此外, 还发生了反硝化反应; 此后 14 d 内, 因硝化菌长期处于缺氧的环境中, 活性降低, 硝化反应很微弱, 反应器中主要发生反硝化反应, 可能还存在微弱的厌氧氨氧化反应, 此阶段污泥处于活性迟滞阶段; R1 反应器启动 30 d 后, 厌氧氨氧化菌活性逐渐提高, 反硝化反应已明显减弱; 60 d 后, R1 反应器中厌氧氨氧化反应成为主导反应。

而以反硝化污泥作为接种污泥时, 因污泥中主要为异养微生物, 在无机的培养环境中缺乏代谢基质而发生溶胞, 出现约 20 d 的菌体自溶期, 此段时间内 R2 反应器中以反硝化反应为主。此后, R2 反应器中反硝化反应明显减弱, 在近 35 d 的活性迟滞阶段内, 发生微弱的厌氧氨氧化反应。R2 反应器启动 54 d 后, 厌氧氨氧化菌活性逐渐增强; 启动近 80 d 后, 进入活性稳定阶段, 反应器中主要发生厌氧氨氧化反应。

据文献报道, 在厌氧氨氧化菌大量富集过程中,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除率一般逐步提高[8]。而本研究与文献报道的不同, 无论以硝化污泥还是反硝化污泥作为接种污泥, 在典型的厌氧氨氧化反应特征出现之前一段时间, 反应器出水  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度常高于进水  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  浓度, 即在厌氧氨氧化菌大量富集过程中出现好氧氨氧化现象。郑平等[9]研究发现, 厌氧氨氧化菌和好氧氨氧化菌之间具有许多共性, 厌氧氨氧化菌混培物可以将氨和羟胺转化为亚硝酸, 并推断厌氧氨氧化反应由好氧氨氧化菌所致的可能性很大。根据本

研究结果, 笔者推断厌氧氨氧化菌本身具有好氧氨氧化的性能, 尤其是在厌氧氨氧化菌富集过程中, 若环境中存在少量的溶解氧, 厌氧氨氧化菌将通过好氧氨氧化功能获得快速增长, 当厌氧氨氧化菌富集到一定数量后, 将表现出典型的厌氧氨氧化反应特征, 即氨氮和亚硝态氮按一定比例同步去除。

本研究结果表明, 以硝化污泥和反硝化污泥作为接种污泥均可启动厌氧氨氧化反应, 但是以反硝化污泥作为接种污泥时, 因异养微生物不能适应无机的培养环境, 出现较长的菌体自溶期, 且活性迟滞阶段也较长, 导致 R2 反应器厌氧氨氧化反应启动时间比 R1 反应器约长 20 天。为了缩短厌氧氨氧化反应启动时间, 可以选择活性高的硝化污泥作为接种污泥。

#### 4. 结论

(1) R1 反应器和 R2 反应器分别以硝化污泥和反硝化污泥作为接种污泥, 均可成功启动厌氧氨氧化反应。R1 反应器和 R2 反应器中厌氧氨氧化反应启动后,  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除量:  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  去除量:  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  生成量平均值分别为 1:1.30:0.23 和 1:1.35:0.10。

(2) 以活性高的硝化污泥作为接种污泥, 在厌氧氨氧化启动过程中, 未出现明显的菌体自溶阶段, 经过约 60 d 启动厌氧氨氧化反应。而以反硝化污泥作为接种污泥时, 出现较长的菌体自溶期, R2 反应器厌氧氨氧化反应启动时间比 R1 反应器约长 20 天。

#### 参考文献 (References)

- [1] Mulder, A., Vande Graaf, A.A., Robertson, L.A., *et al.* (1995) Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized Bed Reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, **16**, 177-184. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00281.x>
- [2] Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G., *et al.* (1998) The Sequencing Batch Reactor as a Powerful Tool for the Study of Slowly Growing Anaerobic Ammonium Oxidizing Microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **50**, 589-596. <https://doi.org/10.1007/s002530051340>
- [3] 路青, 李秀芬, 华兆哲, 等. 接种污泥源对厌氧氨氧化启动效能的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2009, 25(4): 60-65.
- [4] 李祥, 黄勇, 袁怡, 等. 不同泥源对厌氧氨氧化反应器启动的影响[J]. 环境工程学报, 2012, 6(7): 2143-2148.
- [5] 张蕾, 郑平. 厌氧氨氧化膨胀床反应器的运行性能[J]. 生物工程学报, 2008, 24(7): 1240-1247.
- [6] 阮晓红, 张瑛, 张亚平, 等. 淡水水体底泥厌氧氨氧化菌的初步富集培养与氨氧化特性[J]. 环境科学学报, 2010, 30(10): 1999-2003.
- [7] Tang, C.J., Zheng, P., Mahmood, Q., *et al.* (2009) Start-Up and Inhibition Analysis of the Anammox Process Seeded with Anaerobic Granular Sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **36**, 1093-1100. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0593-0>
- [8] 储昭瑞. 厌氧氨氧化反应器启动及微生物群落结构解析[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012.
- [9] 郑平, 胡宝兰, 徐向阳. 厌氧氨氧化菌好氧代谢特性的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(5): 521-526.

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2327-0810，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[amb@hanspub.org](mailto:amb@hanspub.org)