

厌氧同时产甲烷反硝化的研究进展

王 静, 韩 晶, 廖润华*, 韩银辉, 饶江锋

景德镇陶瓷大学材料科学与工程学院, 江西 景德镇

收稿日期: 2022年11月9日; 录用日期: 2022年12月8日; 发布日期: 2022年12月15日

摘 要

同时产甲烷和短程反硝化过程由于能够在同一反应器中去除有机物和氮而引起人们的关注。近年来, 该技术在实际和模拟废水处理中取得了较好的发展。本文分析了同时产甲烷反硝化(SMD)的机理, 介绍了不同影响因素(碳源、C/N比、HRT、温度、pH)对反应过程的影响, 综述了同时产甲烷反硝化工艺在不同反应器中的应用情况以及系统内微生物的群落结构分布, 并且对近几年热门研究的微氧环境下同时产甲烷反硝化以及厌氧氨氧化进行介绍, 为相关研究者与工程实践者提供借鉴。

关键词

反应机理, 影响因素, 研究现状, 菌群分析

Advances in Simultaneous Methanogenesis and Denitrification in an Anaerobic Environment

Jing Wang, Jing Han, Runhua Liao*, Yinhui Han, Jiangfeng Rao

School of Materials Science and Engineering, Jingdezhen Ceramic University, Jingdezhen Jiangxi

Received: Nov. 9th, 2022; accepted: Dec. 8th, 2022; published: Dec. 15th, 2022

Abstract

Simultaneous methanogenesis and denitrification have attracted considerable attention because they can remove organics and nitrogen in a reactor. In recent years, the technology has made good progress in treating practical and simulated liquid water. In this paper, the mechanism of simultaneous methanogenesis and denitrification (SMD) was analyzed, the influence of different envi-

*通讯作者。

ronmental conditions (carbon source, C/N ratio, HRT, temperature, pH) on the reactor was introduced, the application of simultaneous methanogenesis and denitrification in different reactors and the distribution of microbial community structure in the system were reviewed, and the simultaneous methanogenesis denitrification and ANAMMOX under micro-oxygen environment, which are popular researches in recent years, are introduced to provide references for relevant researchers and engineering practitioners.

Keywords

Reaction Mechanism, Influence Factors, Research Status, Flora Analysis

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

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



Open Access

1. 引言

厌氧生物技术是一种可持续技术,其污泥产量少,具有废物处理、回收副产物和可再生物质能源等优势。厌氧过程是指有机物在无溶解氧环境中代谢的生物过程。很多工业生产废水,如大豆蛋白生产废水[1]、制药废水[2]、淀粉生产废水[3],农业活动[4]中不仅含有大量的有机碳化合物,还含有大量的有机氮化合物,硝酸盐过量排放到水体中,不仅会造成水体富营养化、地下水污染、水生生态系统恶化等严重的环境问题,而且还会对人类和水生动物造成健康问题。有人提出在一个反应器里,将产甲烷过程和反硝化过程进行耦合的想法,将含硝态氮的废水泵入厌氧产甲烷反应器,使产甲烷和反硝化过程在一个反应器内顺次实现,产甲烷细菌和反硝化细菌能够共同存在同一反应器中,实现废水中有机物和硝酸盐氮同时降解[5] [6] [7] [8]。这样,可以减少系统复杂性,节省资金和土地;通过产甲烷反硝化的耦合,反硝化产生的碱度能有效避免反应器出现酸化现象;且厌氧产甲烷过程中产生的部分有机物可为反硝化提供碳源,从而可无须外加或者少量添加碳源,这引起了国内外研究者的广泛关注与研究,同时产甲烷反硝化(SMD)工艺深入研究具有广泛的现实与实际工程应用意义。本文将从以下几个方面对 SMD 目前研究的现状与进展进行归纳与总结,为广大研究者提供参考。

2. 同时产甲烷反硝化概述

2.1. 同时产甲烷反硝化机理探讨

反硝化是指反硝化细菌在厌氧条件下将硝态氮或者亚硝态氮转化为 N_2 的过程,从微生物学角度来讲,反硝化就是反硝化菌的无氧呼吸代谢过程。反硝化菌大多数是异养、兼性厌氧型细菌,在有氧的时候利用氧气进行呼吸,在无氧状态下利用硝态氮进行呼吸。而产甲烷过程首先需要通过发酵菌、产氢产乙酸菌等细菌的协同作用将有机碳降解为乙酸或 H_2 和 CO_2 ,最后在产甲烷菌的作用下转变为甲烷。产甲烷细菌对生存条件的要求与反硝化菌不同。产甲烷菌是专性厌氧菌,属于古菌域,对生存环境非常敏感,需要及其严格的厌氧生存环境。通常情况下,体系中反硝化反应优先发生。反硝化菌在 100 mV 的氧化还原电位下正常生存,产甲烷菌在-300 mV 左右的氧化还原电位才能正常生存[9] [10],在厌氧条件下,氧化还原电位是依次降低的,所以在耦合过程中,反硝化细菌优先适应环境进行硝态氮的还原过程,随着氧化还原电位降低,逐渐满足产甲烷菌的电位要求,开始进行产甲烷过程。就热力学方面来说,当获

得等摩尔的电子当量时,反硝化菌还原硝态氮产生的自由能高于整个产甲烷过程释放的自由能[11],并且产甲烷菌世代时间远远长于反硝化菌。

反硝化反应先于产甲烷反应进行,这有利于碳源实现最佳利用。然而,大量研究证明,硝酸盐及其中间产物对产甲烷过程具有抑制效应。Biing T W [12]证明,在以丁酸盐为碳源的体系中硝酸盐氮达到 25~75 mg/L 浓度时,甲烷生成过程被严重阻碍;洗萍[13]证明氨氮含量小于 900 mg/L,体系中产甲烷活性增强,氨氮含量大于 3000 mg/L 时,产甲烷活性下降 32%;Tugtas A E [14]通过对比实验研究 NO、NO₂、N₂O、NO₃ 对产甲烷过程的影响,毒性大小顺序依次是 NO > NO₂ > N₂O > NO₃。这些文献报道认为硝态氮及其中间产物对产甲烷菌具有直接毒害作用,也有研究认为硝态氮及其中间产物抑制了产甲烷过程的酶活性。如刁明月等人[15]研究不同硝态氮负荷下反应器内 COD、以及与产甲烷菌和糖类水解菌群活性有关的辅酶 F₄₂₀、β-葡萄糖苷酶等指标的变化,COD/NO₂-N 为 10/1 和 20/1 时,辅酶 F₄₂₀ 含量和 β-葡萄糖苷酶含量偏低。另外, M. Andalib [16]发现,产甲烷菌和反硝化菌分别竞争产生氮和甲烷的电子,也会抑制甲烷产生。

要实现产甲烷与反硝化的耦合,寻找一种合适的微生物载体就尤为重要,生物膜和颗粒污泥能够实现微生物生境分离,产甲烷和反硝化过程相互独立分开,为同时反硝化产甲烷提供了可能。Lin Y F 等[17]报道了空间中 SMD 过程耦合菌群的分布情况,兼性的反硝化菌往往分布在颗粒污泥或者生物膜的外层,通过利用废水中的有机碳作为营养物质,同时还原硝酸盐进行反硝化;产甲烷菌分布在颗粒污泥或者生物膜的内层,避免了废水中 NO₃ 的毒性抑制,在内层形成严格稳定的厌氧环境大量繁衍增殖,进行产甲烷,从而实现除碳脱氮的耦合。

2.2. 过程分析

对于整个厌氧反应系统来说,当进水中同时含有有机碳、硝酸盐时,在反应器内就满足了耦合产甲烷和反硝化的要求。针对体系中的碳源,反硝化菌利用有机碳源作为电子供体将硝态氮转化为 N₂ 实现氮的脱除,剩余的有机碳再通过产甲烷过程转化为 CH₄ 产生能量。目前公认的产甲烷过程遵循经典的三阶段理论[18]: 1) 水解酸化阶段:大分子有机物如蛋白质、脂类、碳水化合物、纤维素等在胞外酶和水解产酸菌的作用下氧化分解为挥发性脂肪酸和醇类。2) 产氢产乙酸阶段:在产氢产乙酸菌的作用下醇类和挥发性脂肪酸如乳酸、丁酸、丙酸等被转化为乙酸、H₂ 和 CO₂。3) 产甲烷阶段:产甲烷菌将乙酸或者 H₂ 和 CO₂ 转化为 CH₄。在这一阶段,根据菌群代谢机制差异产甲烷菌群分为乙酸营养型和氢营养型产甲烷菌群,各自对于体系中产甲烷贡献率大致为 70% 和 30% [19]。后来 J. G. Zeikus [20]发现了同型产乙酸菌,形成了四阶段理论,指出在同型产乙酸菌的作用下,第二阶段产生的 CO₂ 和 H₂ 也能够转化为乙酸用做后续产甲烷阶段的基质。由于同型产乙酸菌相对于产氢产乙酸菌来说对乙酸产率贡献可忽略不计,当前研究较少。

其同时产甲烷反应流程如图 1。

针对体系中的氮源,根据厌氧反应条件设置的差别,在同时产甲烷反硝化反应器内,NO₃⁻-N 除了参与反硝化作用外,或伴随着有机氮的厌氧氨氧化、异化硝酸盐还原为氨(DNRA)等反应。有机氮的厌氧氨氧化是指微生物通过自身代谢活动降解有机氮化合物转变为无机氨氮的过程,本质上无法将氮真正的从废水中除去,在废水处理过程中作用不大,因此希望通过反应条件的设置避免该过程的发生,合理分配基质降解产生的电子流,使更多的电子流向反硝化和产甲烷过程[16]。厌氧氨氧化是在厌氧氨氧化菌的作用下,将亚硝酸盐作为电子受体,将氨氮氧化为 N₂ 的过程。该技术目前在生物脱氮处理方面已取得成熟进展,在我国含氮工业废水处理方面得到广泛应用,为同时产甲烷反硝化工艺实现功能扩展做出了贡献 [21] [22] [23] [24] [25]。厌氧氨氧化菌是自养型微生物,反应过程不需要氧气和有机物的参与,产碱量为零,具有可持续发展的优势。

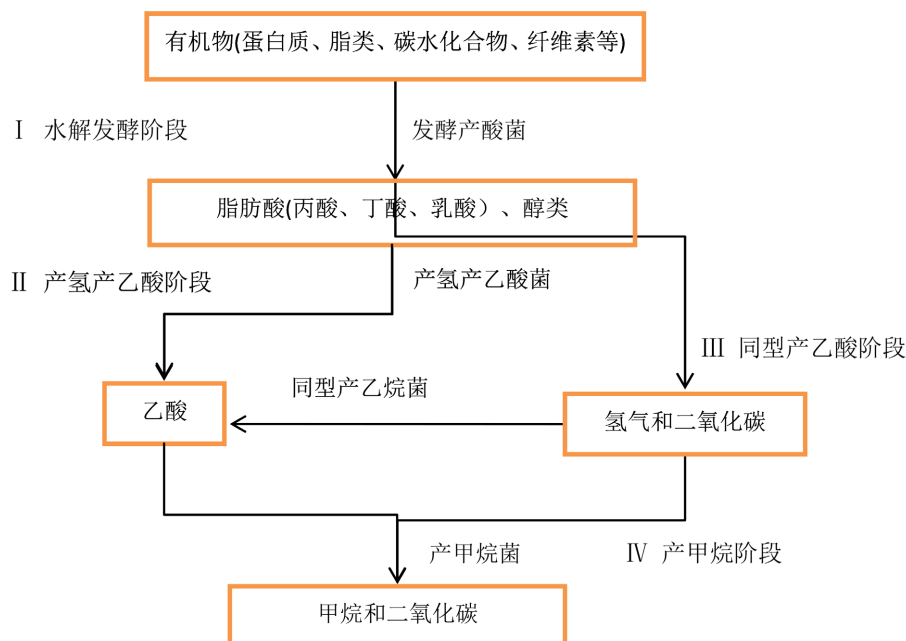


Figure 1. Simultaneous methane production reaction flow diagram
图 1. 同时产甲烷反应流程图

3. 厌氧同时产甲烷反硝化的启动与运行

3.1. 主要影响因素

3.1.1. 碳源

碳在反应体系中作为电子供体既参与产甲烷过程，又参与反硝化过程，碳源的种类和数量是影响微生物对碳的利用方式和硝酸盐的还原方式的重要因素。在 Hendriksen H V [6]的实验中，证明在单纯产甲烷体系中，优先利用乙酸，丙酸和丁酸分解为乙酸后被利用，在单纯反硝化体系中，碳源降解优先顺序为乙酸 > 丁酸 > 丙酸。在同时产甲烷反硝化体系中，丙酸、丁酸优先被利用，当 NO_3^- -N 还原完全，剩余的乙酸被用于产甲烷过程。并且，大量研究证明，在厌氧发酵过程中，当废水中的有机物主要是葡萄糖等易发酵的有机物时，有利于硝酸盐还原为氨氮，而处理水中的有机物主要是醋酸盐等不易发酵的有机物有利于硝酸盐反硝化为氮气[26] [27] [28]。Akunna 等[27]分别以葡萄糖、丙三醇、乙酸和乳酸为碳源研究对 NO_3^- 的还原作用，当以乙酸和乳酸为碳源， NO_3^- -N 100%被还原。当以葡萄糖和丙三醇为碳源时，有 50%和 38%的碳通过厌氧氨氧化作用被还原为氨。姬保华等[28]也通过类似实验分别以乙酸钠、丙酸钠、葡萄糖、淀粉为碳源研究其反硝化效果，当以乙酸钠和丙酸钠作为碳源时，出水氨氮含量没有发生改变，而当以淀粉和葡萄糖作为碳源时，其出水中氨氮含量高于原始含量，分别有 7.44%、4.04%的硝酸盐被还原为氨氮。

3.1.2. C/N

C/N 会影响电子流向。迟文涛、Ramakrishnan、Ruiz G 等[29] [30] [31]在低 COD/ NO_3^- 比的情况下启动反应器，不增加硝态氮负荷，发现产甲烷得电子的机率增大，通过产甲烷去除 COD 的比例增加，通过反硝化去除 COD 的比例下降。Akunna 等[32]通过实验论证，当有机负荷和硝态氮负荷在一定的范围内变化时，满足产甲烷或反硝化的同时，有时也会伴随着有机氮的厌氧氨氧化反应。结果表明进水 C/N > 53.0 时，碳氮代谢以产甲烷和氧化还原为氨(DNRA)为主，最终产物检测中有大量的氨存在；C/N < 53.0 时，

反硝化最终产物以 N_2 为主, 且 $C/N < 8.86$ 时, 仅发生反硝化过程; $C/N = 8.86 \sim 53.0$, 产甲烷与反硝化良性耦合, 并能获得比独立产甲烷和反硝化体系更高的有机物降解效率。Deng [33] 设置两个反应器, 其中一个反应器(R1)以蔗糖为碳源, 而另一个反应器(R2)以醋酸盐为碳源, 当 C/N 大于 4 时, R1 的平均氮去除率和 COD 去除率分别达到 89.1% 和 91.8%; 当 C/N 大于 10 时, R2 的平均氮去除率和 COD 去除率分别达到 81.8% 和 83.4%。

3.1.3. HRT

HRT 是指废水与污泥的接触时间, 合理的 HRT 有利于有机物对微生物的吸附, 达到良好的出水效果。悬浮污泥对进水 SS 没有要求, 但是 COD 去除率达不到颗粒污泥的去除效果。一方面是由于在连续流中颗粒污泥较悬浮污泥而言不容易流失, 另一方面原因就是固定化污泥系统, 颗粒污泥的存在能够使废水和微生物之间保有充分的传质, 保持更长的水力停留时间。Meng [34] 研究 HRT 从 24 h 到 18 h、12 h、8 h 对 EGSB 反应器处理抗生素废水的影响, 当 HRT 从 24 h 到 18 h、12 h 阶段废水 COD 去除率变化不大, 大约保持在 85%, 可降解的有机污染物在前 12 h 被去除, 其余时间只有少量降解, 当 HRT 下降到 8 h, COD 去除率快速下降到 60%, 并且不发生恢复。当 HRT 再恢复到 24 h, 也要经过 26 d 才能恢复到 85% 的 COD 去除率。另有证据表明[35], 较高的水力搅拌强度有利于形成更光滑、更致密的生物膜, 有利于微生物的高速增殖, 剪切力过高颗粒之间可能导致颗粒污泥的严重磨损和破碎。

3.1.4. 温度

微生物由于对环境的适应性, 往往只能在一定的温度范围内才能正常生存繁殖, 温度往往会影响微生物生长和代谢速率的变化, 依据微生物生长温度范围, 通常将厌氧处理分为低温、中温和高温三种处理方式, 常见中温厌氧处理通常将温度设置在 $35^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, 微小的温度波动不会导致处理效果发生改变, 但如果温度大幅提升或者下降, 微生物活性会受到明显抑制。

笔者研究了膨胀颗粒污泥床(EGSB)反应器中高硝态氮反硝化过程的温度依赖性。最佳反应温度为 $15^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$, COD 去除率维持在 80% 以上, 脱氮效果接近完全。 10°C 时, 亚硝酸盐积累, 表明低温脱氮不完全, 低温抑制了部分反硝化菌的生长, 当温度回升到 35°C 时, 硝态氮降解率回升。温度为 52°C 时, 硝态氮也能几乎完全去除, 但是产甲烷过程备受抑制, COD 的去除率明显下降。这与温度胁迫微生物活性有关, 研究发现, 在 35°C 条件下微生物多样性最高, EGSB 反应器共检测到 7 个细菌门和 84 个细菌属。与 25°C 和 35°C 相比, 低温 10°C 和高温 52°C 下变形细菌(Proteobacteria)在胁迫条件下仍能大量繁殖和富集, 相对而言, 厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)丰度下降, 温度胁迫限制了厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)中部分细菌的活性。在高温胁迫下, 盐单胞菌属(Halomonas)在反硝化阳离子中起重要作用。偶氮菌属(Azoarcus)的还原作用对于亚硝酸盐在 10°C 条件下的积累起到了作用[36]。

3.1.5. pH 值

水解发酵菌和产氢产乙酸菌具有较强的适应酸碱变化的能力, pH 维持在 5.0~8.5 范围内均生长良好; 对 pH 敏感的产甲烷菌, 只有 pH 在 6.5~7.8 范围内才具有较强的活性。反硝化菌对于酸碱度不敏感, 在 $\text{pH} = 5.5 \sim 9.5$ 之间有效生存。所以要实现同时产甲烷反硝化耦合成功, 其实验过程中进水 pH 应控制在它们的重叠区, 这样才能有效发挥其处理效果。

3.2. 其他影响因素——微氧环境

对于厌氧反应系统来说, 由于涉及到微生物的生存代谢, 环境因素的变化以及参数的不同设置往往都会影响反应过程的进行, 当前对于微生物微环境方面的研究还是很不足, 通过改变宏观条件来达到良好的处理效果仍然是研究重点。上述影响因素的研究已然较成熟, 随着微氧环境促进产甲烷过程的兴起

[37] [38], 创造同时产甲烷反硝化微氧环境来提高同时产甲烷反硝化效果成为热点。

翟伟[39]通过 EGSB 反应器研究微氧条件下反应器的运行特性, 发现微氧条件有利于颗粒污泥中多种菌群进行协同代谢。陈莉莉[40]通过接种厌氧颗粒污泥到 UASB 反应器中研究其在微氧条件下的运行性能, 当进水负荷维持在 $11.0 \text{ kg COD}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 和 $0.52 \text{ kg NO}_3\text{-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 左右, DO/COD 值设置 0.14%、0.19%, 有机物的平均去除率分别达到了 96.9%、90.1%。游胜[41]通过对比实验, 得出结论: 微氧条件下 COD 去除率和沼气产生量均有所增加, 出水 VFA 值更低, 变化更平稳, 并且微氧还能起到增强颗粒污泥活性的作用。董春娟[42]利用两级微氧 EGSB 反应器同步处理焦化废水和剩余污泥, 证明微氧能够创造的厌氧/好氧交替的微生物生存条件, 有助于促进去除污泥中惰性难降解的有机物。

4. 同时产甲烷反硝化研究现状

4.1. 同时产甲烷反硝化工艺在不同反应器中的实现

到目前为止, 废水的厌氧同时产甲烷反硝化技术已经得到了很大的发展, 大量的研究学者采用不同类型的反应装置, 包括 UASB、EGSB、SBR 等反应器, 实现了单一反应器内同时脱碳除氮的运行, 并且通过与后续好氧反应器连用组成一整套废水处理工艺, 处理各种的模拟和实际废水, SMD 工艺得到广泛的应用。

An Y Y [43]等利用 UASB-MBR 联合工艺对低浓度模拟废水进行同时产甲烷反硝化研究, 经过 250d 的运行, TOC 和 TN 去除率分别达到 98% 和 48%~82%。袁志丹[44]采用同时产甲烷反硝化 UASB 反应器与好氧硝化 AUSB 反应器串联工艺能够有效处理实际淀粉废水。陈莉莉[45]采用小试 UASB 反应器, 以葡萄糖为碳源, NaNO_3 为氮源, 以 $\text{COD}:\text{NO}_3\text{-N} = 10:1$ 的比例配置进水, 经过 76 天的运行, 同时产甲烷反硝化顺利启动。

赵蕾[46]在成功启动 EGSB 反应器、完成 EGSB 反应器快速二次启动以及 EGSB 反应器驯化的基础上, 实现了 EGSB-SBR 联合工艺处理果汁废水。在膨胀颗粒污泥床反应器中厌氧处理高亚硝酸盐和氨氮废水是可行的。杨丽英[47]采用 EGSB 反应器来处理抗生素含量较高的制药废水, 在最适容积负荷为 $9.5 \text{ kg COD}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ (HRT 40 h) 的条件下, COD 平均去除率可达 $91.4\% \pm 0.8\%$, 甲烷产率为 $(2.56 \pm 0.05) \text{ L}/(\text{L} \cdot \text{d})$ 。朱明[48]采用 EGSB 反应器进行试验, 处理低浓度猪粪废水, 当进水 COD 浓度为 1200~1300 mg/L 时, COD 去除率可达到 80%, 平均日产沼气量为 1.33 L。

陈晨[49]采用 IC 反应器, 以葡萄糖为碳源, 硝酸钠为氮源, $\text{C}/\text{N} = 10$ 的条件下, 30 天完成同时产甲烷反硝化颗粒污泥的驯化, 稳定运行后, COD 的去除率达到 95%, $\text{NO}_3\text{-N}$ 的去除率达到 96%。Pozo [50]将两级固定填料生物膜(FFB)组合系统用于家禽屠宰废水的处理, 运行 133 d, COD 去除率达到 92.5%, TKN 去除率达到 95%。Bernet [51]等采用厌氧 SBR-好氧 SBR 联合工艺处理猪场废水。Corral 等[52]应用 USBF 反应器处理低碳氮比鱼加工废水。

Xin [53]在葡萄糖喂养的微氧膨胀颗粒污泥包层生物膜反应器(EGSBBR)中, 通过原位利用产生的甲烷进行脱氮, 研究了一种新型好氧甲烷氧化-反硝化-产甲烷耦合(AMODM)工艺, 最佳 C/N 比值为 16.7, AMODM 系统平均 COD 去除率为 98.8%, TN 去除率为 82.7%。

4.2. 研究热点

目前, 随着我国工业化的迅速发展, 采矿业、金属加工和冶炼、食品加工等商业制造活动日益增多, 农业活动中农药化肥的大量使用, 以及日常生产活动中排放的大量废水中重金属含量不断增加, 这些废水渗入地下成为地下水或者汇入湖泊河流, 导致我国水体重金属污染范围不断扩大, 水体中重金属含量超标, 对人类健康和水生态环境造成了严重威胁。研究表明, 重金属能够与蛋白质分子中的配位基结合,

导致酶活性降低甚至失活, 重金属还能与核酸结合导致微生物遗传物质发生变化, 高浓度的重金属还能破坏细胞渗透压影响物质交换[54] [55] [56], 这对于微生物代谢极为不利。微生物对重金属具有不同的耐受范围, 低浓度重金属作为微量营养元素能促进微生物的新陈代谢, 但当重金属浓度累计到一定程度就会对微生物产生抑制效应。重金属具有生物累积效应, 不能被生物降解, 因此需要对含重金属废水的处理进行必要研究。孙峰[57]等通过调查 9 种不同污水处理厂污泥中的重金属含量及分布情况发现, 不同废水中重金属含量复杂多变, 生活污水、污泥中重金属 Zn 的含量最高, Cu 次之。王思菊等[58]研究重金属对厌氧发酵的抑制作用, 结果表明, 厌氧微生物可以耐受较高浓度的镍离子, 而对铬和铅离子的耐受浓度很低, 并且锌离子高浓度抑制, 在低浓度下促进产甲烷; 可欣[59]对猪粪废水厌氧发酵过程进行研究, 发现高浓度的 Cu^{2+} 容易导致系统中氨积累, 对系统产生毒性效应, 抑制产甲烷过程。段学军[60]探究 Cd 胁迫厌氧发酵的影响, 产甲烷菌活性发挥受影响最大, 硫酸盐还原活性次之, 对于反硝化活性影响最小。Stasinakis 等[61]认为 Cr^{6+} 浓度小于 10 mg/L, 细菌的代谢活性增加, 可促进污泥的生长, 大于或等于 10 mg/L 时, 活性污泥的生长受阻, 污泥产率系数和最大比生长速率降低。

近年来, 对于厌氧发酵过程重金属胁迫的影响研究不断增加, 并且研究较多的主要集中在 Cu、Zn、Cr、Cd、Ni 等含量较高的重金属[62] [63] [64]。而对于重金属对厌氧废水处理过程的影响, 研究者们分析研究出了众多方法, 通过添加不同种类的调节剂, 如粉煤灰(FA)、生物炭(BC)、 F_3O_4 、 FeS_2 、生物炭负载金属氧化物或者添加玉米秸秆等取得了不错的成效。但相对来说重金属胁迫条件下对于同时产甲烷反硝化耦合过程的影响研究还较少。

5. 微生物群落分析

5.1. 颗粒污泥

厌氧反应器启动的关键是培养沉降性好、生物量浓度高的颗粒污泥。同时产甲烷反硝化颗粒污泥通常由产甲烷污泥作为种子污泥培养而来, 对种子污泥和培养后的颗粒污泥进行电镜扫描观察, 两者粒径和密度无明显区分, 但是培养之后的污泥强度略低[65], 污泥外层表面粗糙, 呈蓬松的绒毛状结构, 颜色往往由黑色或棕色变为米黄色或白色, 整个过程伴随着细菌死亡更替和颗粒粒径变化。不同的培养条件跟不同的反应器培养出的颗粒污泥往往会影响微生物活性, 从而影响同时产甲烷反硝化效果, 越来越多的证据表明, 微生物分泌的胞外聚合物(EPS)在污泥颗粒化过程中发挥了关键作用[66] [67] [68]。Toshimitsu Kodera [69]首次从分散消化反硝化污泥中形成了同时反硝化产甲烷(SMD)颗粒, SMD 颗粒的成功形成仅通过提高废水的基质浓度就可以实现, 相比之下, 传统产甲烷颗粒的形成需要上升流速和底物浓度增加, 在颗粒形成过程中产生的细胞外聚合物(EPS)明显促进了 SMD 颗粒的形成, 在高 OLR (10 $\text{g-COD L}^{-1} \text{d}^{-1}$)和 NLR (0.67 $\text{g-NO}_3^- \text{-N L}^{-1} \text{d}^{-1}$)条件下, 形成的 SMD 颗粒对 COD 和硝酸盐的去除率均超过 90%。Xu 等[70]采用膨胀颗粒污泥毯式反应器(EGSB)处理低强度生活污水, 对污泥颗粒化工艺进行了系统研究。在水力停留时间(HRT)为 5 h、上流式流速(V_{up})为 1.9 m/h、有机负荷率(OLR)为 2.16 $\text{kg COD/m}^3/\text{d}$ 时, COD 的平均去除率为 $71.5\% \pm 2.3\%$, 高通量测序分析表明, 在污泥发酵过程中, 代谢由氢营养型甲烷菌(*Methanobacterium*)向乙酸碎屑型甲烷菌(*Methanosaeta*)转移。

5.2. 微生物的种群结构

颗粒污泥表面多附着丝状菌、短杆菌和球状菌株, 在孙寓娇[71]的实验中发现, 在单纯产甲烷颗粒污泥表面几乎检测不到的链球菌属, 疑似增殖附着在同时产甲烷颗粒污泥表面, 在单纯产甲烷颗粒污泥中占优势的产甲烷八叠球菌, 培养后的污泥中却未曾检测到。就数量和多样性而言, 两类颗粒污泥中细菌均高于古菌, 细菌中的主要优势菌属是低 GC 革兰阳性菌和 ϵ 变形菌纲分支, 这两类细菌的 16S rDNA 序

列分别占细菌总量的 49.62%、12.03%。

辛普森指数是指一种简便的测定群落中物种多样性的指数。借助变性梯度凝胶电泳和高通量测序分析微生物群落结构,耦合颗粒污泥中三大细菌类群分别是变形菌门(Proteobacteria),拟杆菌门(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes) [72],同时还有绿弯菌门(Chloroflexi)伴随着不同的耦合条件分别成为优势菌种。主要的产甲烷菌是产甲烷鬃毛菌属(Methanosaeta)和甲烷杆菌属(Methanobacterium) [73] [74]。在不同的运行条件下,往往会伴随着物种丰富度和优势菌种的更替。

笔者以乙酸钠为碳源,采用膨胀颗粒污泥床反应器对高浓度硝酸盐废水进行了脱氮研究。当 C/N 摩尔比为 2.0,液体上行流速(Vup)为 3.0 m/h, pH 值为 6.2~8.2 时,可获得最佳工艺参数。硝酸盐浓度高达 14000 mg/L 时,也能达到完全反硝化。利用 454-焦磷酸测序技术分析细菌多样性。结果共获得 5573 条序列,隶属于 6 个系统发育类群,包括变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)和未分类门。其中,变形菌门(Proteobacteria) (84.53%)占比最高,其次为厚壁菌门(Firmicutes) (13.24%)和放线菌门(Actinobacteria) (0.38%) [75]。

6. 总结和展望

在同时产甲烷反硝化系统中,碳源首先满足反硝化反应的需求,剩余的碳源再用于产甲烷过程,并且氮氧化物对产甲烷过程具有抑制性危害,生物膜和颗粒污泥成为实现产甲烷反硝化污泥耦合形态的最佳选择,产甲烷菌和反硝化菌通过生境分离共存。

上个世纪八十年代以来,首次报道了同时产甲烷反硝化现象,国内外学者纷纷展开研究,证明了在不同的反应器中同时产甲烷反硝化效果是不同的,不同的工艺参数条件下(碳源、C/N 比、pH、HRT、温度等)也会影响同时产甲烷反硝化进程,随着微氧条件促进产甲烷现象的出现,微氧条件对于厌氧发酵的研究成为热点。

耦合颗粒污泥中三大细菌类群分别是变形菌门(Proteobacteria),拟杆菌们(Bacteroidetes)和厚壁菌门(Firmicutes),产甲烷菌的优势菌属是产甲烷鬃毛菌属(Methanosaeta)和甲烷杆菌属(Methanobacterium)。目前 SMD 种群比对分析资料还较少,仍有待于进一步丰富。

针对于目前反应器运行存在的问题,有待于继续研发稳定性能高,耐高负荷,高 SS,对于低浓度有机废水和含有高浓度有毒物质的废水也能取得良好处理效果的厌氧反应器。

基金项目

国家自然科学基金项目(No: 51468024),江西省自然科学基金项目(No: 20202BABL203037),江西省教育厅项目(No: GJJ201311)景德镇市科技计划项目(No.20212GYZD009-09, No.20192GYZD008-33)。

参考文献

- [1] 郭春明. 大豆蛋白废水处理技术研究的现状与展望[J]. 现代园艺, 2012(14): 38.
- [2] 李宇庆, 马楫, 钱国恩. 制药废水处理技术进展[J]. 工业水处理, 2009, 29(12): 5-7.
- [3] 张永辉. 淀粉废水处理方法研究进展[J]. 广东化工, 2020, 47(20): 63-64.
- [4] 刘昱. 中国农业生态系统的碳氮平衡模拟、耦合和政策评估[D]: [博士学位论文]. 北京: 清华大学, 2016.
- [5] Hendriksen, H.V. and Ahring, B.K. (1996) Integrated Removal of Nitrate and Carbon in an Upflow Anaerobic Sludge(UASB) Reactor: Operating Performance. *Water Research*, **30**, 1451-1458. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00041-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00041-3)
- [6] Hendriksen, H.V. and Ahring, B.K. (1996) Combined Removal of Nitrate and Carbon in Granular Sludge: Substrate Competition and Activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**, 33-39. <https://doi.org/10.1007/BF00641609>

- [7] Hanaki, K. and Polprasert, C. (1989) Contribution of Methanogenesis to Denitrification with an Upflow Filter. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, **61**, 1604-1611.
- [8] Chen, K.-C. and Lin, Y.-F. (1993) The Relationship between Denitrifying Bacteria and Methanogenic Bacteria in a Mixed Culture System of Acclimated Sludge. *Water Research*, **27**, 1749-1759. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90113-V](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90113-V)
- [9] 张希衡. 废水厌氧生物处理工程[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1996.
- [10] 闵航, 等. 厌氧微生物学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1993.
- [11] 谢丽, 陈金荣, 周琪. 厌氧同时反硝化产甲烷研究进展[J]. 化工学报, 2011, 62(3): 589-597.
- [12] Wong, B.T. and Lee, D.J. (2011) Denitrifying Sulfide Removal and Carbon Methanogenesis in a Mesophilic Methanogenic Culture. *Bioresource Technology*, **102**, 6673-6679. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.097>
- [13] 洗萍, 李英比, 邓超冰, 等. 生活垃圾渗滤液对厌氧颗粒污泥产甲烷活性的影响研究[J]. 环境工程学报, 2009, 3(10): 1767-1772.
- [14] Tugtas, A.E., Tezel, U. and Pavlostathis, S.G. (2010) A Comprehensive Model of Simultaneous Denitrification and Methanogenic Fermentation Processes. *Biotechnology and Bioengineering*, **105**, 98-108. <https://doi.org/10.1002/bit.22443>
- [15] 刁明月, 谢影, 彭绪亚, 等. 亚硝态氮对同时产甲烷反硝化工艺处理畜禽粪水的影响[J]. 环境工程学报, 2014, 8(4): 1333-1338.
- [16] Andalib, M., Nakhla, G., Mcintee, E. and Zhu, J. (2011) Simultaneous Denitrification and Methanogenesis (SDM): Review of Two Decades of Research. *Desalination*, **279**, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.018>
- [17] Lin, Y.-F. and Chen, K.-C. (1995) Denitrification and Methanogenesis in a Commobilized Mixed Culture System. *Water Research*, **29**, 35-43. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00144-V](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00144-V)
- [18] Bryant, M.P. (1979) Microbial Methane Production—Theoretical Aspects. *Journal of Animal Science*, **48**, 193-201. <https://doi.org/10.2527/jas1979.481193x>
- [19] Gallert, C. and Winter, J. (2008) Propionic Acid Accumulation and Degradation during Restart of a Full-Scale Anaerobic Biowaste Digester. *Bioresource Technology*, **99**, 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.014>
- [20] Zeikus, J.G. (1980) *Microbial Population in Digesters*. Applied Science Publishers, London.
- [21] 祖波, 张代钧, 白玉华. EGSB 反应器中耦合厌氧氨氧化与甲烷化反硝化的研究[J]. 环境科学研究, 2007, 20(2): 51-57.
- [22] 林皓. 厌氧氨氧化-反硝化耦合处理合成革废水研究[J]. 水处理技术, 2020, 46(2): 98-103.
- [23] Zhang, D.J. (2003) The Integration of Methanogenesis with Denitrification and Anaerobic Ammonium Oxidation in an Expanded Granular Sludge Bed Reactor. *Journal of Environmental Science*, **15**, 423-432.
- [24] Zhang, W., Zhang, Y.Y., Li, L., Zhang, X. and Jin, Y. (2014) Fast Start-Up of Expanded Granular Sludge Bed (EGSB) Reactor Using Stored Anammox Sludge. *Water Science & Technology*, **69**, 1469-1474. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.030>
- [25] 姜滢, 郭萌蕾, 谢军祥, 等. 不同培养条件厌氧氨氧化颗粒污泥性质及微生物群落结构差异[J]. 环境科学, 2020, 41(5): 2358-2366.
- [26] Wilderer, P.A., Jones, W.L. and Dau, U. (1987) Competition in Denitrification Systems Affecting Reduction Rate and Accumulation of Nitrite. *Water Research*, **21**, 239-245. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(87\)90056-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90056-X)
- [27] Akunna, J.C., Bizeau, C. and Moletta, R. (1993) Nitrate and Nitrate Reduction with Anaerobic Sludge Using Various Carbon Sources Glucose Glycerol Acetic Acid Lactic Acid and Methanol. *Water Research*, **27**, 1303-1312. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90217-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90217-6)
- [28] 姬保华, 万金泉, 马邕文, 等. 不同碳源对厌氧同时反硝化产甲烷的影响[J]. 工业水处理, 2017, 37(12): 87-90.
- [29] 迟文涛, 江瀚, 王凯军. 厌氧悬浮颗粒污泥床同时反硝化产甲烷研究[J]. 中国沼气, 2007, 25(3): 10-13.
- [30] Ramakrishnan, A. and Gupta, S.K. (2008) Effect of COD/NO₃⁻-N Ratio on the Performance of a Hybrid UASB Reactor Treating Phenolic Wastewater. *Desalination*, **232**, 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.09.016>
- [31] Ruiz, G., Jeison, D. and Chamy, R. (2006) Development of Denitrifying and Methanogenic Activities in USB Reactors for the Treatment of Wastewater: Effect of COD/N Ratio. *Process Biochemistry*, **41**, 1338-1342. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.007>
- [32] Akunna, J.C., Bizeau, C. and Moletta, R. (1992) Denitrification in Anaero-Bic Digesters: Possibilities and Influence of Wastewater COD/N-NO_x Ratio. *Environmental Technology*, **13**, 825-836. <https://doi.org/10.1080/09593339209385217>

- [33] Deng, G. and Shi, X. (2020) The Effects of Carbon Source and COD/N Ratio on Simultaneous Denitrification and Methanogenesis in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *Renewable Energy*, **157**, 867-873. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.105>
- [34] Meng, L., Wang, J., Li, X., Yu, Y. and Zhu, Y. (2021) Microbial Community and Molecular Ecological Network in the EGSB Reactor Treating Antibiotic Wastewater: Response to Environmental Factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **208**, Article No. 111669. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111669>
- [35] Zhang, C., Wang, A., Jia, J., Zhao, L. and Song, W. (2017) Effect of Parameters on Anaerobic Digestion EGSB Reactor for Producing Biogas. *Procedia Engineering*, **205**, 3749-3754. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.10.325>
- [36] Liao, R.H., Miao, Y., Li, J., et al. (2018) Temperature Dependence of Denitrification Microbial Communities and Functional Genes in an Expanded Granular Sludge Bed Reactor Treating Nitrate-Rich Wastewater. *RSC Advances*, **8**, 42087-42094. <https://doi.org/10.1039/C8RA08256A>
- [37] Eriksen-Hamel, N.S. and Whalen, J.K. (2007) Impacts of Earthworms on Soil Nutrients and Plant Growth in Soybean and Maize Agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **120**, 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.11.004>
- [38] 初里冰, 张兴文, 李晓惠, 等. 微氧膜生物反应器同时去除有机物和氮的研究[J]. 环境污染治理技术与设备, 2005, 5(6): 78-82.
- [39] 翟伟, 董春娟, 申曙光, 等. 处理焦化废水微氧 EGSB 反应器运行特性研究[J]. 工业水处理, 2012, 32(10): 43-46.
- [40] 陈莉莉, 左剑恶, 楼俞. 微氧条件下同时产甲烷反硝化工艺的试验研究[J]. 中国给水排水, 2015, 31(21): 39-43.
- [41] 游胜, 周兴求, 牛晓君, 等. IC 反应器在微氧条件下的运行特性研究[J]. 中国给水排水, 2009, 25(9): 16-24.
- [42] 董春娟, 潘青业, 孙亚全, 等. 两级微氧 EGSB 同步处理焦化废水和剩余污泥[J]. 中国给水排水, 2018, 34(17): 89-93.
- [43] An, Y.Y., Yang, F.L., Chua, H.C., Wong, F.S. and Wu, B. (2008) The Integration of Methanogenesis with Shortcut Nitrification and Denitrification in a Combined UASB with MBR. *Bioresource Technology*, **99**, 3714-3720. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.020>
- [44] 袁志丹, 左剑恶, 甘海南, 等. 同时产甲烷反硝化与硝化串联工艺处理淀粉废水[J]. 环境科学学报, 2008, 28(7): 1272-1278.
- [45] 陈莉莉, 左剑恶, 楼俞, 等. 同时产甲烷反硝化在 UASB 反应器中的实现[J]. 中国沼气, 2006, 24(2): 3-7.
- [46] 赵蕾. EGSB-SBR 处理果汁废水联合工艺及厌氧颗粒污泥物化特性研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 西安工程大学, 2011.
- [47] 杨丽英, 刘伟东, 王红梅, 等. EGSB 反应器处理抗生素制药废水的性能研究[J]. 工业水处理, 2020, 40(5): 52-56.
- [48] 朱明, 尹芳, 刘健峰, 等. EGSB 反应器处理低浓度猪粪废水的效能研究[J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2018, 38(3): 8-13.
- [49] 陈晨. 处理不同 C/N 废水厌氧工艺的选择及机理研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [50] Pozo, R. and Diez, V. (2003) Organic Matter Removal in Combined Anaerobic-Aerobic Fixed-Film Bioreactors. *Water Research*, **37**, 3561-3568. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00273-2)
- [51] Bernet, N., Delgenes, N., Akunna, J.C., Delgenes, J.P. and Moletta, R. (2000) Combined Anaerobic-Aerobic SBR for the Treatment of Piggery Wastewater. *Water Research*, **34**, 611-619. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00170-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00170-0)
- [52] Mosquera-Corral, A., Sanchez, M., Campos, J.L., Mendez, R. and Lema, J.M. (2001) Simultaneous Methanogenesis and Denitrification of Pretreated Effluent from a Fish Caning Industry. *Water Research*, **35**, 411-418. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00288-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00288-8)
- [53] Zhou, X., Wang, G., Ge, D. and Yin, Z. (2020) Development of Aerobic Methane Oxidation, Denitrification Coupled to Methanogenesis (AMODM) in a Microaerophilic Expanded Granular Sludge Blanket Biofilm Reactor. *Journal of Environmental Management*, **275**, Article No. 111280. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111280>
- [54] Vallee, B.L. and Ulmer, D.D. (1972) Biochemical Effects of Mercury, Cadmium, and Lead. *Annual Review of Biochemistry*, **41**, 91-128. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.41.070172.000515>
- [55] 李健中. 重金属对生物脱氮除磷系统中微生物的毒性影响[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广州大学, 2010.
- [56] Riggle, P.J. and Kumamoto, C.A. (2000) Role of a *Candida albicans* P1-Type ATPase in Resistance to Copper and Silver Ion Toxicity. *Journal of Bacteriology*, **182**, 4899-4905. <https://doi.org/10.1128/JB.182.17.4899-4905.2000>
- [57] 孙峰, 翁焕新, 马学文, 等. 污泥中重金属和多环芳烃(PAHs)的存在特性及其相互关系[J]. 环境科学学报, 2008, 28(12): 2540-2548.
- [58] 王菊思, 赵丽辉, 贾智萍, 等. 锌对厌氧体系的影响及 5 种重金属离子抑制作用的比较[J]. 环境科学, 1994, 15(2):

20-22.

- [59] 可欣, 赵鑫, 李润东. 铜离子对猪粪厌氧消化性能的影响研究[J]. 可再生能源, 2013(7): 60-63+69.
- [60] 段学军, 闵航. Cd 胁迫下稻田土壤生物活性与酶活性综合研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 422-427.
- [61] Stasinakis, A.S., Mamais, D., Thomaidis, N.S. and Lekkas, T.D. (2002) Effect of Chromium(VI) on Bacterial Kinetics of Heterotrophic Biomass of Activated Sludge. *Water Research*, **36**, 3341-3349. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00018-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00018-0)
- [62] 张然然. 重金属铜和锌对厌氧发酵过程中抗生素抗性基因影响机制研究[D]: [博士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019.
- [63] 黄奕亮. 短程硝化厌氧氨氧化联合处理垃圾渗滤液及重金属毒性效应研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广州大学, 2018.
- [64] 徐艳高. Cu^{2+} 对电活性生物膜葡萄糖发酵途径及膜微生物种群多样性的影响研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广东工业大学, 2020.
- [65] 韩晓宇, 彭玉臻, 张树军, 等. 厌氧同时反硝化产甲烷工艺的应用及进展[J]. 中国给水排水, 2008, 24(6): 15-19.
- [66] Subramanian, S.B., Yan, S., Tyagi, R.D. and Surampalli, R.Y. (2010) Extracellular Polymeric Substances (EPS) Producing Bacterial Strains of Municipal Wastewater Sludge: Isolation, Molecular Identification, EPS Characterization and Performance for Sludge Settling and Dewatering. *Water Research*, **44**, 2253-2266. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.046>
- [67] Shi, Y.H., Huang, J.H., Zeng, G.M., et al. (2017) Exploiting Extracellular Polymeric Substances (EPS) Controlling Strategies for Performance Enhancement of Biological Wastewater Treatments: An Overview. *Chemosphere: Environmental Toxicology and Risk Assessment*, **180**, 396-411. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.042>
- [68] Chen, J., Zhang, M., Li, F., et al. (2016) Membrane Fouling in a Membrane Bioreactor: High Filtration Resistance of Gel Layer and Its Underlying Mechanism. *Water Research*, **102**, 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.028>
- [69] Kodera, T., Akizuki, S. and Toda, T. (2017) Formation of Simultaneous Denitrification and Methanogenesis Granules in Biological Wastewater Treatment. *Process Biochemistry*, **58**, 252-257. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.038>
- [70] Xu, H., Liu, Y.B., Gao, Y.Y., et al. (2018) Granulation Process in an Expanded Granular Sludge Blanket (EGSB) Reactor for Domestic Sewage Treatment: Impact of Extracellular Polymeric Substances Compositions and Evolution of Microbial Population. *Bioresour Technol*, **269**, 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.100>
- [71] 孙寓姣, 左剑悉, 陈莉莉. 同时产甲烷反硝化颗粒污泥中微生物群落结构[J]. 中国环境科学, 2007, 27(1): 44-48.
- [72] Yi, X.H., Wan, J.Q., Ma, Y.W. and Wang, Y. (2016) Characteristics and Dominant Microbial Community Structure of Granular Sludge under the Simultaneous Denitrification and Methanogenesis Process. *Biochemical Engineering Journal*, **107**, 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.003>
- [73] Goux, X., Calusinska, M., Fossépré, M., Benizri, E. and Delfosse, P. (2016) Start-Up Phase of an Anaerobic Full-Scale Farm Reactor—Appearance of Mesophilic Anaerobic Conditions and Establishment of the Methanogenic Microbial Community. *Bioresour Technol*, **212**, 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.040>
- [74] 谢丽, 陈金荣, 周琪. 厌氧同时反硝化产甲烷研究进展[J]. 化工学报, 2011, 62(3): 589-597.
- [75] Liao, R.H., Shen, K., Li, A.M., et al. (2013) High-Nitrate Wastewater Treatment in an Expanded Granular Sludge Bed Reactor and Microbial Diversity Using 454 Pyrosequencing Analysis. *Bioresour Technol*, **134**, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.057>