

研究报告

保藏温度对厌氧氨氧化颗粒污泥特性的影响

邢保山, 郭琼, 张珏, 郭立新, 金仁村

杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036

邢保山, 郭琼, 张珏, 等. 保藏温度对厌氧氨氧化颗粒污泥特性的影响. 生物工程学报, 2014, 30(12): 1876-1888.

Xing BS, Guo Q, Zhang J, et al. Influence of preservation temperature on the characteristics of anammox granular sludge. Chin J Biotech, 2014, 30(12): 1876-1888.

摘 要: 为考察保藏温度对厌氧氨氧化颗粒污泥特性的影响, 同时优化保藏厌氧氨氧化颗粒污泥温度参数, 本试验首先通过HRT调控进水基质负荷培养厌氧氨氧化颗粒污泥, 并采用 KHCO_3 和 NaHCO_3 交替提供无机碳源。然后分别在 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $(27\pm4)\text{ }^\circ\text{C}$ 室温和 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下避光保藏。结果表明, NaHCO_3 可代替 KHCO_3 作为厌氧氨氧化菌生长的无机碳源。相比于其他保藏温度, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保藏能够较好地维持生物量和生物活性, 同时能较好地维持颗粒污泥的沉降性能、颗粒污泥和细胞结构完整性。在保藏过程中, 一阶衰减指数模型可拟合厌氧氨氧化颗粒污泥生物量及活性的衰减过程, 衰减指数与胞溶程度正相关, 而且生物量的衰减比活性的衰减更快。同时, 颗粒污泥胞外聚合物中蛋白质与多糖的比值(PN/PS)和血红素不能有效指示保藏过程中颗粒污泥沉降性能和活性的变化, 而生物活性与胞溶程度呈负相关。

关键词: 厌氧氨氧化, 颗粒污泥, 保藏温度, 颗粒特性

Received: April 27, 2014; **Accepted:** July 25, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 51278162), Science and Technology Development Program of Hangzhou (No. 20120433B20).

Corresponding author: Rencun Jin. Tel: +86-571-88062061; Fax: +86-571-28865333; E-mail: jrczju@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (No. 51278162), 杭州市科技计划项目(No. 20120433B20)资助。

Influence of preservation temperature on the characteristics of Anammox granular sludge

Baoshan Xing, Qiong Guo, Jue Zhang, Lixin Guo, and Rencun Jin

College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, Zhejiang, China

Abstract: To study the effect of preservation temperature on the characteristics of anaerobic ammonium oxidation (Anammox) granules and optimize the preservation temperature of Anammox granules, the Anammox granules were cultivated in an upflow anaerobic sludge bed reactor through adjusting the hydraulic retention times, and the inorganic carbon with $\text{KHCO}_3/\text{NaHCO}_3$ was alternately supplied. Subsequently, the enriched Anammox granules were preserved at -40 , 4 and 35 $^{\circ}\text{C}$, and ambient temperature of (27 ± 4) $^{\circ}\text{C}$. NaHCO_3 can be used as the inorganic carbon for the growth of anaerobic ammonium oxidizing bacterium (AnAOB). The best preservation temperature was 4 $^{\circ}\text{C}$ for maintaining Anammox biomass, Anammox activity, settleability, and the integrity of the Anammox granule and AnAOB cell structure. During the preservation period, the first-order exponential decay model can simulate the decay of Anammox biomass and activity, and the decay coefficients (b_{AN}) of Anammox biomass and activity had positive correlation with the degree of AnAOB cell lysis. Meanwhile, the rate of Anammox biomass decay was larger than that of Anammox activity. The ratio of protein to polysaccharide in extracellular polymeric substances and heme c cannot effectively indicate the changes of Anammox granules settleability and activity, respectively, and the bioactivity has a negative association with the degree of AnAOB cell lysis.

Keywords: Anammox, granular sludge, preservation temperature, granule characteristics

厌氧氨氧化是一种新型生物脱氮工艺，能够在厌氧条件下以亚硝酸盐为电子受体将氨氮氧化为氮气，实现两种氮素污染物的同时脱除^[1-2]。相比于传统生物脱氮工艺，厌氧氨氧化具有脱氮效果好、无需外加有机碳源、运行成本低等优点，工业应用前景广阔。然而，厌氧氨氧化菌（AnAOB）倍增时间长，致使厌氧氨氧化工艺启动时间较长，不利于其工业化应用^[1,3]。有关研究表明，部分或全部接种厌氧氨氧化污泥能够快速启动厌氧氨氧化工艺^[4]。同时，采取厌氧氨氧化污泥流加方式能够显著减小低温、有机物和有毒物质等对厌氧氨氧化工艺运行的干扰^[5-6]。此外，在实际运行中，某些工业废水来源的季节性可能导致厌氧氨氧化工艺暂停运作。在上述操作过程中，厌氧氨氧化

污泥的保藏是不可回避的技术问题。

厌氧氨氧化颗粒污泥具有良好的沉降性能，有利于菌体的大量持留，同时具有较高的密度、机械强度以及耐负荷冲击能力，使其成为厌氧氨氧化污泥最佳的存在形态之一。颗粒污泥的生物量及其活性共同决定工艺脱氮能力，颗粒粒径影响传质及沉降性能，同时胞外聚合物（EPS）影响颗粒污泥对逆境的耐受能力。因此，维持保藏期污泥的颗粒特性是优选保藏条件的重要标准。在无基质供给的条件下，较高温度时微生物衰减速率快，不利于微生物的长期保藏；较低温度可减缓微生物衰减速率，然而温度过低有可能破坏微生物细胞结构，不利于微生物活性的恢复。因此，选择适宜的保藏温度对于微生物资源开发利用尤为关键。不

同保藏温度对厌氧氨氧化絮状污泥活性的影响已有报道^[7-8]，然而，有关保藏温度对厌氧氨氧化颗粒污泥特性的影响鲜见较为系统的研究报告。Adav 等^[9]指出-20 °C 适宜维持好氧颗粒污泥沉降性能及其活性。Gao 等^[10]研究表明保藏温度对好氧颗粒污泥的形态结构及其理化特性影响较大；其中，4 °C 保藏更有利于颗粒污泥结构的维持；-25 °C 保藏颗粒污泥沉降性能最优，且 PN 与 PS 的比值 (PN/PS) 无明显变化。Vlaeminck 等^[11]探究了不同温度条件下限氧自养硝化-反硝化 (OLAND) 工艺中污泥长期保藏后重激活过程，结果表明 4 °C 保藏约 5 个月，AnAOB 的活性降为保藏起始值的 55%。Rothrock 等^[12]对比研究了有无甘油添加时-60 °C 和-200 °C 条件下，AnAOB 冷冻保藏 4 个月后重激活过程，结果表明-200 °C 无甘油添加重激活后 AnAOB 的化学计量比与种子反应器最为接近。Heylen 等^[13]在-80 °C 条件下通过添加不同剂量的保护剂 (如海藻糖、二甲亚砜和甘油)，探究了 AnAOB 单细胞和颗粒污泥低温保藏的可行性。Ali 等^[14]分别在-80 °C、4 °C 和室温条件下，研究了厌氧氨氧化污泥活性的变化，认为在实际工业应用中室温条件下添加钼酸盐是最简单经济有效的保藏方法。汪彩华等^[15]重点探讨了温度和基质种类对厌氧氨氧化菌混培物生化性状 (如 EPS、血红素和硫含量) 和形态结构 (如粒径、颜色和菌体结构) 的影响。

本文系统研究保藏温度对厌氧氨氧化颗粒污泥特性的影响，以期优选保藏温度，为厌氧氨氧化颗粒污泥菌种资源库的构建奠定理论基础，进而为厌氧氨氧化工艺的工业化应用提供菌源保障。

1 材料与方法

1.1 接种污泥和模拟废水

本试验接种污泥为实验室厌氧氨氧化反应器流失污泥，接种后反应器内污泥浓度 (SS) 和挥发性污泥浓度 (VSS) 分别为 36.3 g/L 和 22.9 g/L。反应器进水为无机模拟废水，其组成为：(NH₄)₂SO₄ 和 NaNO₂ (按需添加)，NaH₂PO₄ 10 mg/L，CaCl₂·2H₂O 5.6 mg/L，MgSO₄·7H₂O 300 mg/L，KHCO₃ 1 250 mg/L (或 NaHCO₃ 1 049 mg/L)，微量元素浓缩液 I、II 各 1.25 mL/L。其中，微量元素浓缩液 I 的组成为 EDTA 5 g/L，FeSO₄·7H₂O 9.14 g/L；浓缩液 II 的组成为 EDTA 15 g/L，H₃BO₄ 0.014 g/L，MnCl₂·4H₂O 0.99 g/L，CuSO₄·5H₂O 0.25 g/L，ZnSO₄·7H₂O 0.43 g/L，NiCl₂·6H₂O 0.21 g/L，NaMoO₄·2H₂O 0.22 g/L，CoCl₂·6H₂O 0.24 g/L。

1.2 试验装置和试验方法

本试验首先采用实验室规模的 UASB 反应器 (有效体积为 2.5 L) 培养厌氧氨氧化颗粒污泥，经过 346 d 培养后采用 4 个具塞玻璃瓶进行厌氧氨氧化颗粒污泥保藏试验 (图 1)。将待保藏颗粒污泥混合均匀，分别取 300 mL 至具塞玻璃瓶中，用氩气排空 5-10 min 并在瓶口涂抹凡士林密封后，分别置于-40 °C、4 °C、(27±4) °C 室温和 35 °C 条件下避光保藏，分别标记为 R₁、R₂、R₃ 和 R₄。保藏时间共计 107 d，分别在第 1 天，第 51 天和第 107 天取样测定颗粒污泥浓度、厌氧氨氧化活性 (SAA)、血红素、粒径、沉降速度和 EPS 等颗粒污泥特性指标，同时进行透射电镜 (TEM) 观察和 C/H/N/O 元素分析。污泥保藏一段时间后，保藏玻璃瓶内污泥冷冻成块，将其置于 35 °C 水浴锅内加热 1 h，然后混匀取样测定污泥特性。

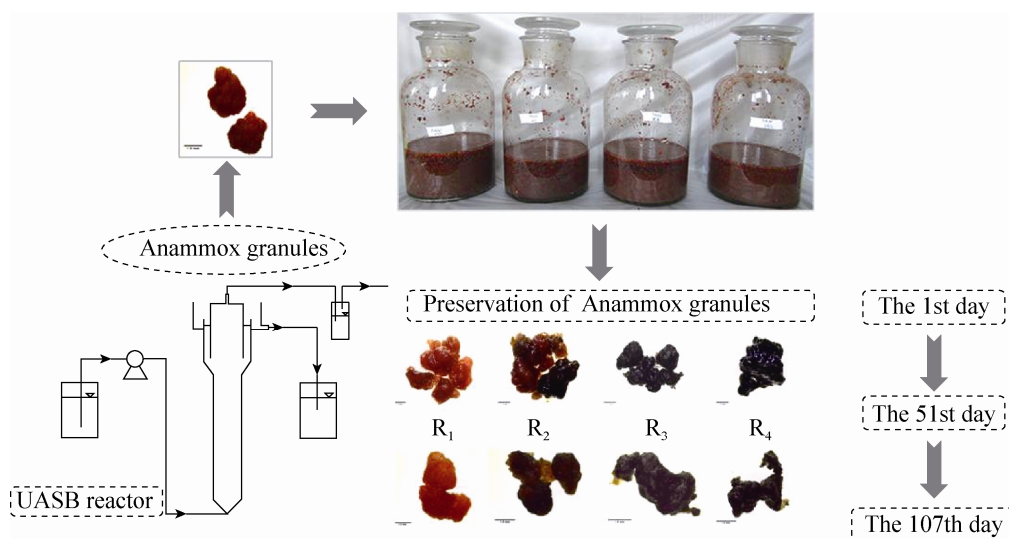


图1 试验装置和试验流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental reactor and test procedure. The scale bar in R_1 – R_4 = 1.5 mm.

1.3 测定项目与方法

NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 分别采用水杨酸-次氯酸盐光度法、N-(1-萘基)-乙二胺光度法和紫外分光光度法^[16]；SS 和 VSS (生物量)：重量法^[16]；沉降速度：重力沉降法^[17]；颗粒粒径：Image-Pro Plus 6.0 软件分析法；EPS 提取采用热提取法^[18]，EPS 中糖类 (PS) 和蛋白质 (PN) 的测定详见 Ma 等^[19]的方法；血红素参照 Berry 和 Trumpower^[20]所述方法进行测定；SAA 的测定步骤详见 Yang 等^[21]的方法；颗粒污泥内细胞结构特性通过 TEM 进行观察，其具体步骤参见 Tang 等^[22]的方法；通过体视镜 (Leica ES2，德国) 观察颗粒污泥外观结构；C/H/N/O 元素含量采用元素分析仪 (EA3000，意大利) 测定分析。

2 结果与讨论

2.1 厌氧氨氧化颗粒污泥培养阶段

在培养厌氧氨氧化颗粒污泥过程中，UASB

反应器进水基质浓度始终为 560 mg N/L。其中，进水基质摩尔比为 1:1。接种厌氧氨氧化污泥后，设定反应器起始 HRT 为 2.16 h，将其避光置于 35 °C 恒温箱中调控运行。当基质去除率 (NRE) 稳定至 $(83.1 \pm 1.1)\%$ 时，缩小 HRT 至 1.94 h，相应的出水亚硝氮浓度逐渐增至 113 mg/L。增大 HRT 至 3.97 h，缓解亚硝酸盐对 AnAOB 的抑制作用^[1,23]。NRE 逐渐增加至 90.5%，改变进水无机碳源，即将模拟废水中 KHCO_3 替换为相同碱度的 NaHCO_3 (图 2)。同时，为维持反应器内较高的 NRE，逐渐增大 HRT 至 14.1 h，相应的进水基质负荷 (NLR) 和基质去除速率 (NRR) 分别降至 $0.96 \text{ kg N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 和 $(0.86 \pm 0.08) \text{ kg N}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ 。其中，当无机碳源为 KHCO_3 时，厌氧氨氧化消耗单位氨氮对应的亚硝氮转化量 (R_S) 与硝氮生成量 (R_P) 分别为 1.27 ± 0.12 和 0.11 ± 0.02 ；当无机碳源为 NaHCO_3 时，相应的化学计量比 R_S 和 R_P 分别为 1.35 ± 0.21

和 0.13 ± 0.04 。第 75 天, 恢复模拟废水无机碳源为 KHCO_3 , 根据 NRE 调整 HRT, 反应器的厌氧氨氧化脱氮性能并未明显改善 (图 2), 相应的化学计量比 R_S 和 R_P 分别为 1.22 ± 0.22 和 0.15 ± 0.04 。第 126 天, 更换模拟废水无机碳源为 NaHCO_3 , 依据 NRE 和出水亚硝氮浓度通过 HRT 调控 NLR, 逐渐培养厌氧氨氧化颗粒污泥, 相应的 R_S 和 R_P 分别为 1.36 ± 0.20 和 0.19 ± 0.07 。运行至第 346 天, 反应器 HRT 逐渐缩短至 1.47 h, 出水氨氮和亚硝氮分别为 28.7 mg/L 和 78.3 mg/L。此时开始厌氧氨氧化颗粒污泥保藏试验。由上述结果可知: 将 NaHCO_3 作为无机碳源, 能够成功替代 KHCO_3 进行厌氧氨氧化颗粒污泥的培养。相比于 KHCO_3 , 以 NaHCO_3 作为无机碳源, 相应的 R_S 值较大且更接近 R_S 理论值 (1.32); 二者 R_P 值略有差异, 但均低于 R_P 理论值

(0.23)^[24]。同时, 阳离子类型 (K^+ 或 Na^+) 对 AnAOB 的脱氮性能具有一定的影响, 其原因可能与 AnAOB 细胞内外渗透压或细胞膜上的钠钾泵有关^[25-26], 其作用机理有待进一步研究。

2.2 厌氧氨氧化颗粒污泥保藏阶段

2.2.1 微生物量与衰减指数

经过 364 d 的培养, 混合后取样测定 SS 和 VSS 分别为 46.91 g/L 和 28.41 g/L, 相应的难挥发性污泥浓度为 18.5 g/L。假定在污泥保藏过程中难挥发性污泥的量不变, 则保藏过程中微生物量可通过测得 SS 后扣除难挥发性污泥浓度得出。不同温度下避光保藏 107 d 的过程中, R_1 – R_4 内微生物量如表 1 所示, 均呈现不同程度的降低。其主要原因在于: 在无基质持续供给的情况下, R_1 – R_4 内 AnAOB 生长停止, 同时微生物内源呼吸作用仍然存在。

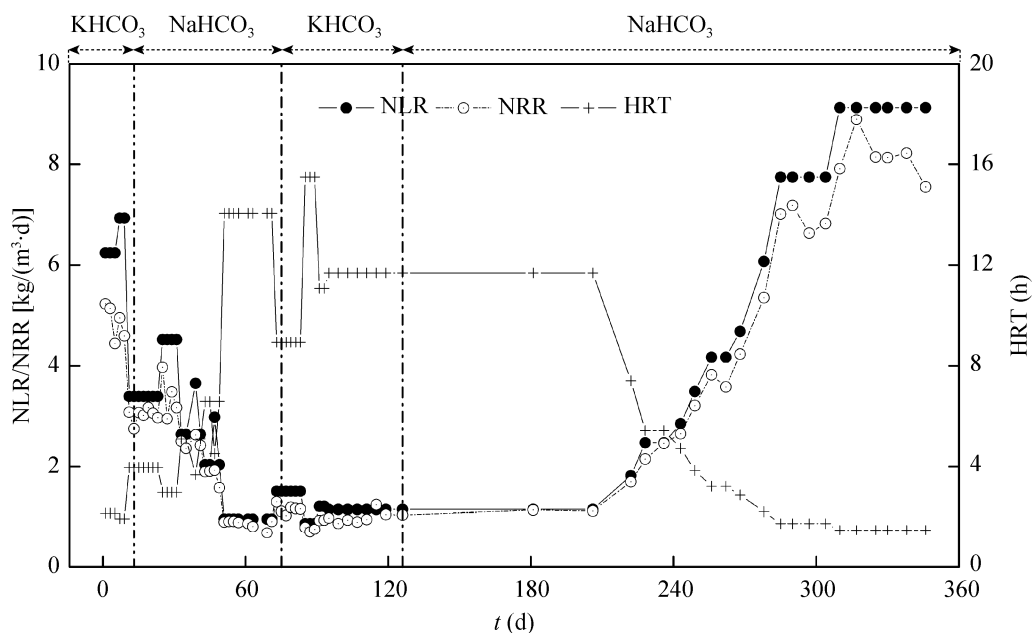


图 2 厌氧氨氧化颗粒污泥培养期 UASB 反应器的脱氮性能

Fig. 2 Performance of nitrogen loading/removal rate and applied HRT in a UASB reactor during the cultivation of Anammox granules.

表 1 保藏阶段 R₁–R₄ 中厌氧氨氧化颗粒污泥特性

Table 1 Characteristics of the Anammox granules in R₁–R₄ during the preservation period

Time (d)	Sludge	SS (g/L)	Biomass (g/L)	SAA (mg TN/(g VSS·h))	Heme c content (μmol/g VSS)	Settling velocity (m/h)	Polysaccharide (mg/g VSS)	Protein (mg/g VSS)	EPS (mg/g VSS)	PN/PS
1	R ₁ –R ₄	46.9	28.4 ¹	1.92±0.11	2.25±0.01 ³	52.7±18.8 (64) ⁴	38.2±15.3	106±10.4	145±7.65	3.11±1.23
	R ₁	34.4	15.9 ²	3.14±0.07	2.45±0.01	41.8±16.4 (92)	42.7±44.0	80.7±10.9	123±48.3	5.44±6.19
	R ₂	33.9	15.4	7.50±0.41	2.21±0.01	60.4±20.5 (62)	5.56±1.59	22.2±3.69	27.8±5.06	4.10±0.72
	R ₃	26.9	8.43	1.22±0.01	1.64±0.02	45.4±15.0 (77)	12.5±5.92	42.6±2.38	55.0±7.11	4.19±2.50
51	R ₄	26.8	8.26	0.94±0.07	2.81±0.03	50.6±17.0 (72)	12.0±6.92	40.5±6.82	52.5±13.7	4.54±3.00
	R ₁	30.4	11.9	3.06±0.12	5.61±0.02	47.3±16.7 (63)	57.0±5.21	314±40.8	371±40.6	5.55±0.92
	R ₂	30.9	12.4	3.50±0.39	6.50±0.00	49.8±17.0 (74)	75.4±1.81	442±20.3	517±19.5	5.86±0.37
	R ₃	23.7	5.17	0.93±0.16	4.06±0.05	48.1±15.6 (78)	35.8±3.00	395±77.4	431±75.7	11.2±2.90
107	R ₄	21.1	2.63	0.80±0.10	0.36±0.02	46.0±13.6 (45)	13.5±0.29	124±11.5	138±11.3	9.23±1.02

Note: ¹ Equal to the value of VSS; ² Equal to the value of SS minus 18.5; ³ Average value ± standard deviation; ⁴ Values between brackets represent the number of granular sludge tested.

利用一阶衰减指数模型 (公式(1)) 拟合 R_1 – R_4 内微生物量的变化, 对其进行衰减动力学分析, 并计算相应的半衰期 (T_{HL}) (公式 (2))。

$$Y = A_0 e^{(-b_{AN} \cdot t)} \quad (1)$$

$$T_{HL} = \frac{\ln 2}{b_{AN}} \quad (2)$$

其中, Y 为剩余微生物量所占质量百分比, %; A_0 为常数; b_{AN} 为衰减指数, $1/d$; t 为保藏时间, d ; T_{HL} 为半衰期, d 。

不同保藏温度下 R_1 – R_4 内厌氧氨氧化颗粒污泥生物量的衰减拟合结果如图 3 所示。一阶衰减指数模型能够较好地拟合较宽温度范围内 ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$) 厌氧氨氧化颗粒污泥保藏过程中生物量的衰减过程。较低温度范围 ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 内, b_{AN} 无显著差异; 较高温度范围 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) 内, b_{AN} 随着保藏温度的增加呈现增加趋势。相应的 R_1 和 R_2 半衰期分别为 76 d 和 77 d , 约为 R_3 和 R_4 的 2.5 倍 (表 2)。由此可知: 低温更适宜保藏过程中厌氧氨氧化颗粒污泥生物量的维持。相关研究表明^[27-28]: 在基质供给充足的条件下, AnAOB 的 b_{AN} 为 0.001 – $0.0048\text{ }1/d$, 相应的 T_{HL} 为 693 – 145 d 。本试验结果表明: 在无基质供给的条件下, R_1 – R_4 内生物量的 b_{AN} 为 0.009 – $0.024\text{ }1/d$, 相应的 T_{HL} 为 29 – 77 d (表 2)。二者相比, 在无基质供给时 AnAOB 的 T_{HL} 显著缩短, 其原因可能与无基质供给导致大量 AnAOB 细胞死亡有关。相比于絮状污泥^[8], 相同保藏温度条件下厌氧氨氧化颗粒污泥的 T_{HL} 更长, 其原因可能与颗粒污泥外 EPS 累积有关。Heylen 等^[13]发现, 相比于待定斯图加特库氏菌 *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*

颗粒污泥, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏易使单细胞培养的 *Ca. K. stuttgartiensis* 和待定黑海阶梯烷菌属 *Ca. Scalindua* sp. 细胞胞溶, 其原因可能是由于缺乏 EPS 对其保护。

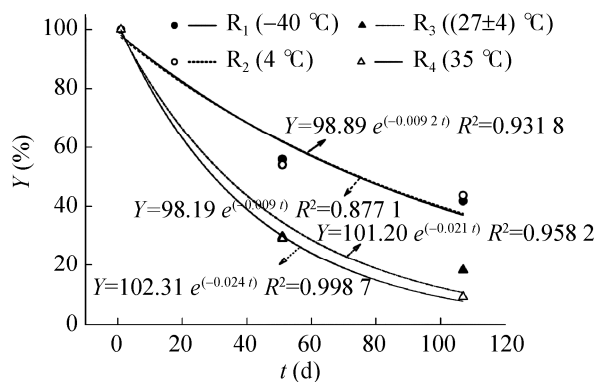


图 3 不同保藏温度下厌氧氨氧化颗粒污泥衰减动力学拟合曲线

Fig. 3 Decay kinetic simulation curves of Anammox granules under different preservation temperature.

表 2 厌氧氨氧化菌 (AnAOB) 衰减动力学参数
Table 2 Decay kinetic parameters of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (AnAOB)

Sludge	Temperature (°C)	b_{AN} (1/d)	T_{HL} (d)	References
Anammox sludge	20	0.001	693	[27]
	35	0.0021	330	[27]
Anammox sludge	35	0.0048	145	[28]
Anammox flocculent sludge	5 ± 2	0.045	11	[8]
	15 ± 2	0.033	25	[8]
	30 ± 2	0.068	17	[8]
Anammox granules	-40	0.0092	76	This study
	4	0.0090	77	This study
	27 ± 4	0.021	33	This study
	35	0.024	29	This study

2.2.2 活性与血红素含量

除生物量外,生物活性也是影响厌氧氨氧化工艺脱氮性能的一个重要指标。不同温度下保藏不同时间, R₁–R₄ 内 SAA 测定结果见表 1。保藏前期, R₁ 和 R₂ 内 SAA 显著增加, 保藏后期呈现降低趋势。整个保藏阶段, R₁ 和 R₂ 内 SAA 值均高于 SAA 初始值 (表 1)。与 R₁ 相比, R₂ 内 SAA 值相对较高且变化幅度较大。整个保藏阶段, R₃ 和 R₄ 内 SAA 均呈现逐渐下降趋势, 且 R₃ 内 SAA 值高于 R₄。保藏前期, R₃ 和 R₄ 内活性保留率分别为 63.5% 和 49.0%; 保藏后期, R₃ 和 R₄ 内活性保留率分别为 48.4% 和 41.7%。与 R₃ 相比, R₄ 内 SAA 值前期降低幅度较大, 后期降低幅度较小。由上述结果可知: R₁–R₄ 内活性保留率大小顺序为 R₂ > R₁ > R₃ > R₄。此外, 采用一阶衰减指数模型分别拟合 R₃ 和 R₄ 内污泥活性的衰减过程, 所得结果如下:

$$Y' = 99.05e^{(-0.0073t)}, R^2 = 0.9509 \quad (3)$$

$$Y' = 97.83e^{(-0.010t)}, R^2 = 0.8303 \quad (4)$$

其中, Y' 为剩余污泥活性所占起始活性的百分比, %。由此可知: R₃ 和 R₄ 内保藏污泥活性的衰减指数分别为 0.007 3 1/d 和 0.010 1/d。根据公式 (2), 计算可得 R₃ 和 R₄ 内污泥活性的半衰期分别为 94 d 和 69 d, 分别约为 R₃ 和 R₄ 内生物量半衰期的 2.9 倍和 2.4 倍。生物量衰减得更快, 尤其值得关注。此外, 生物量与活性共同决定微生物的脱氮能力。由表 1 可知: 在保藏过程中, R₁ 的脱氮能力降低幅度小于 R₃ 和 R₄, 而 R₂ 在保藏前期有增无减, 保藏后期略有降低。经过 107 d 的保藏后 R₁–R₄ 内微生物脱氮能力大小顺序为: R₂ > R₁ > R₃ > R₄。因此, 4 °C 保藏更有利于维持厌氧氨氧化颗粒污泥的脱氮

能力。

血红素是 AnAOB 胞内血红蛋白的重要辅基, 其含量影响厌氧氨氧化污泥外观颜色的同时可用于指示活性^[22,29]。由表 1 可知, 保藏前期, R₁–R₄ 内血红素含量无显著变化, 不同于上述生物活性的变化规律; 保藏后期, R₁ 和 R₂ 内血红素含量比保藏起始值高 2–3 倍, R₄ 内血红素含量降至保藏起始值的 18.8%。保藏前期 R₄ 和保藏后期 R₃ 内血红素含量变化异常, 其原因尚待证实。在厌氧氨氧化颗粒污泥保藏过程中, 无基质供给使得 AnAOB 正常代谢受阻, 限制厌氧氨氧化活性的同时, AnAOB 胞内血红素降解缓慢^[15], 其变化很难和生物活性同步。此外, 通过对比 R₁–R₄ 内血红素含量变化与相应厌氧氨氧化颗粒污泥外观颜色 (图 1), 可知二者变化基本一致。然而, 颗粒污泥外观颜色还与保藏容器内其他组分 (如 S²⁻) 有关。因此, 在厌氧氨氧化颗粒污泥保藏阶段, 血红素不可直接指示活性衰减, 而血红素含量变化可通过污泥外观颜色进行初步判断。

2.2.3 颗粒粒径与沉降性能

厌氧氨氧化颗粒污泥粒径应适宜, 既要足够大, 保证反应器内微生物有效滞留; 又不能过大, 以避免颗粒内部产气形成气囊导致污泥上浮进而造成污泥流失^[21]。同时, 颗粒粒径影响其沉降性能^[17]。在不同保藏阶段, R₁–R₄ 内颗粒污泥的粒径分析结果如表 3 所示。在保藏起始时段, 颗粒污泥的最大粒径为 6.50 mm, 粒径大小为 (1.46±1.10) mm; 同时, 混合均匀后取样测定其沉降速度, 约有 30.0% (按颗粒数计) 的颗粒污泥出现上浮, 其上浮速度为 (97.9±59.4) m/h, 下沉颗粒污泥的沉降速度为 (52.7±18.8) m/h (表 1)。保藏前期, R₁–R₄ 内颗

表 3 保藏阶段 R_1 – R_4 中厌氧氨氧化颗粒污泥粒径Table 3 Diameters of Anammox granules in R_1 – R_4 during the preservation period

Time (d)	Diameter (mm)	R_1	R_2	R_3	R_4
1	Maximum	6.54			
	Minimum	0.19			
	$\bar{x} \pm s$	1.46±1.10 (241)			
51	Maximum	6.50	6.06	5.39	4.46
	Minimum	0.18	0.16	0.14	0.19
	$\bar{x} \pm s$	1.72±1.28 (314)	1.69±1.36 (323)	1.16±1.06 (345)	1.04±0.84 (444)
107	Maximum	6.11	5.67	5.44	4.92
	Minimum	0.24	0.28	0.30	0.38
	$\bar{x} \pm s$	1.86±1.40 (216)	1.88±1.27 (272)	1.56±1.16 (289)	1.28±0.85 (328)

Values between brackets represent the number of granular sludge tested.

粒污泥的最大粒径均减小, 且最大粒径依次降低。粒径分析可知: R_3 内 90% 的粒径小于 2.31 mm, R_4 内 90% 的粒径小于 2.24 mm, 均低于保藏起始相应值 (2.96 mm); R_1 和 R_2 无显著变化。由此可知, 随着保藏温度增加, R_1 – R_4 内颗粒破碎程度依次增加, 低温保藏比高温保藏更有利于颗粒粒径的维持。同时, R_1 内颗粒污泥沉降速度降至 (41.78±16.38) m/h, 上浮颗粒污泥个数百分比降至 4.2%, 相应的颗粒污泥上浮速度降至 (90.45±51.52) m/h; R_2 内颗粒污泥沉降速度波动较大, R_3 和 R_4 内颗粒污泥沉降速度均降低, 且 R_2 – R_4 内均无颗粒上浮。在污泥保藏前期, EPS 降低不利于颗粒污泥聚集成团^[30], 引起颗粒破碎进而导致粒径减小, 使其沉降速度降低, 同时上浮污泥比例及其上浮速度均降低。保藏后期, R_1 和 R_2 内最大颗粒污泥粒径明显降低, 而 R_3 和 R_4 内颗粒污泥粒径无降低; 与保藏起始时相比, 保藏后期 R_1 – R_4 内颗粒污泥沉降速度均降低且无颗粒污泥上浮, 其沉降速度大小顺序为: $R_2 > R_3 > R_1 > R_4$ 。因此, 4 °C 条件下长期保藏颗粒污泥, 颗粒污泥破碎程度相对较小, 沉降性能最优。

2.2.4 胞外聚合物

厌氧氨氧化颗粒污泥中 EPS 主要由 PS 和 PN 组成^[31]。在保藏阶段, R_1 – R_4 内颗粒污泥 EPS 测定结果如表 1 所示。保藏前期, R_1 – R_4 内 EPS 均降低, 用以维持 AnAOB 胞内代谢。保藏后期, R_1 – R_4 内 EPS 均增加, 其原因可能与 AnAOB 细胞衰亡破裂后胞内物质外流有关。保藏阶段, R_1 – R_4 内 EPS 的变化趋势与相关研究结果一致^[15]。此外, 颗粒污泥 EPS 中 PN/PS 能有效指示颗粒污泥的沉降性能, PN/PS 值越大沉降性能越好^[32-34]。保藏前期, PN 降低幅度小于 PS, 使得相应的 PN/PS 值增加, 而相应的颗粒污泥的沉降性能并未改善; 保藏后期, PN 增加幅度大于 PS, PN/PS 值增加, 而相应的颗粒污泥沉降性能更差 (表 1)。因此, 保藏阶段 PN/PS 不能直接用于指示颗粒污泥的沉降性能, 需综合考虑颗粒污泥粒径变化和细胞内部结构是否完善等诸多因素。

2.2.5 透射电镜分析

在保藏初期和末期, R_1 – R_4 内厌氧氨氧化颗粒污泥 TEM 观察结果如图 4 所示。由图 4A 可知, 保藏起始阶段, AnAOB 为球形或椭球形,

厌氧氨氧化体呈月牙形或哑铃形, 与文献报道 AnAOB 的典型结构一致^[21-22]。经过 107 d 的保藏, R_1 – R_4 内 AnAOB 的细胞结构均发生了不同程度的变化。其中, R_1 内 AnAOB 出现部分细胞溶解和细胞浓缩成团现象, 如图 4B 中箭头所示; R_2 内 AnAOB 细胞溶解现象不显著, 而厌氧氨氧化体相对稀疏 (图 4C)。由图 4D 和 4E 可知:

R_3 和 R_4 内均出现大量 AnAOB 细胞溶解和细胞中空现象, 而 R_4 内 AnAOB 胞溶程度更大。由表 2 可知, R_1 – R_4 的 b_{AN} 大小顺序为: $R_4 > R_3 > R_1 > R_2$, 与 R_1 – R_4 内 AnAOB 胞溶程度正相关, 进而验证了一阶衰减指数模型模拟结果。同时, 不同保藏温度下 AnAOB 细胞结构的变化, 进一步揭示了 R_1 – R_4 内污泥活性演变的内在原因。

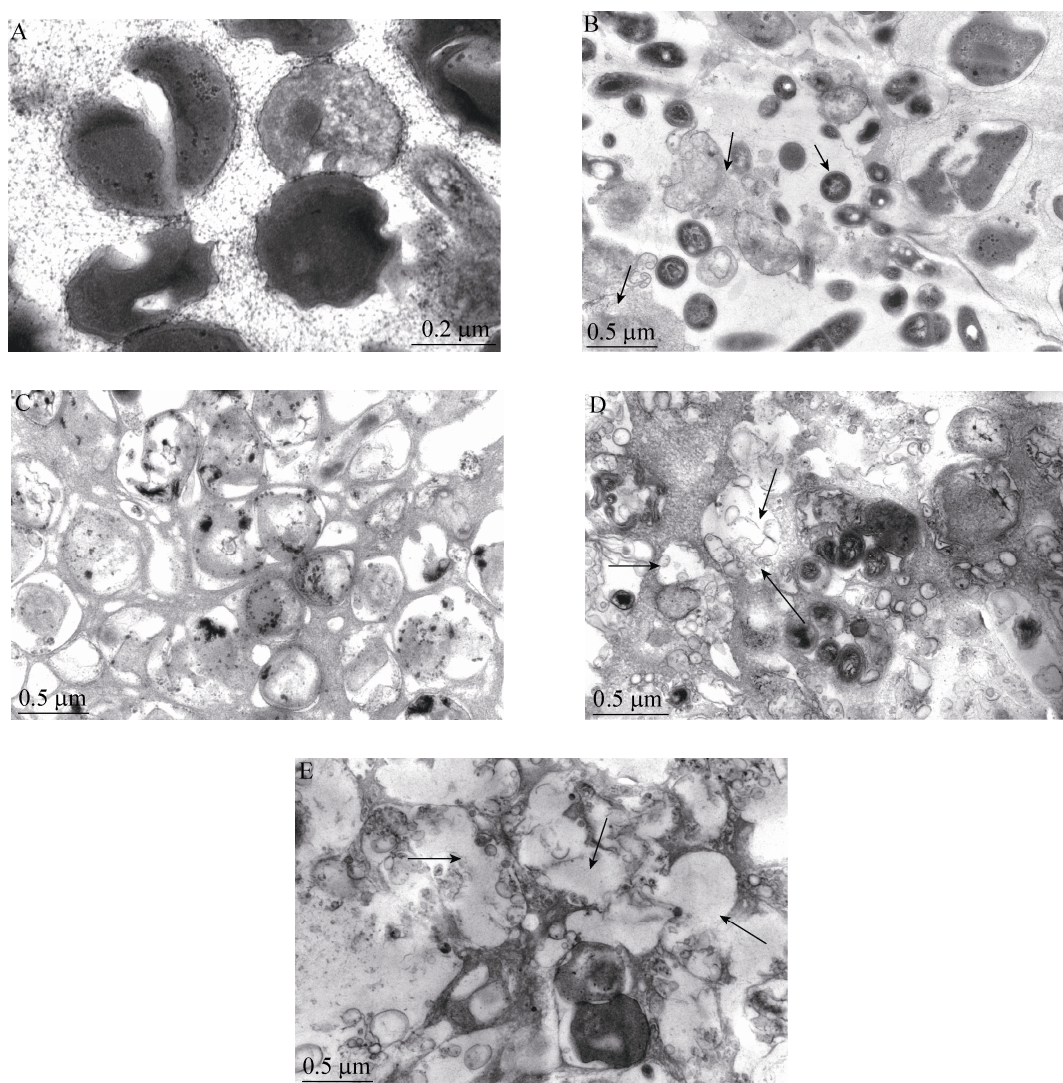


图 4 保藏初期和末期 R_1 – R_4 内厌氧氨氧化颗粒污泥透射电镜图

Fig. 4 TEM images of Anammox granules from R_1 – R_4 on the 1st day (A), R_1 (B), R_2 (C), R_3 (D) and R_4 (E) on the 107th day. The scale bar in A = 0.2 μm ; in B, C, D, and E = 0.5 μm .

表 4 保藏阶段 R_1 – R_4 内厌氧氨氧化颗粒污泥的元素组成及其元素比值Table 4 Elemental composition and atomic ratios of the Anammox granules from R_1 – R_4 during the preservation period

Time (d)	Theoretical value *	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	H/C	C/N	O/C
		49.8	8.3	8.7	33.2	2.00	6.67	0.50
1	R_1 – R_4	33.0	5.8	5.6	55.7	2.09	6.89	1.27
51	R_1	38.6	6.8	7.2	47.3	2.11	6.24	0.92
	R_2	38.7	6.8	7.2	47.3	2.10	6.25	0.92
	R_3	36.7	6.3	5.9	51.1	2.07	7.31	1.05
	R_4	38.9	6.6	6.0	48.5	2.04	7.62	0.93
107	R_1	38.3	6.6	6.9	48.2	2.05	6.44	0.94
	R_2	38.6	6.5	6.9	48.1	2.01	6.52	0.93
	R_3	37.5	6.6	6.1	49.7	2.12	7.19	0.99
	R_4	37.3	6.5	5.4	50.8	2.09	8.04	1.02

Note: * $\text{CH}_2\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.15}$ [24].

2.2.6 元素分析

通过分析颗粒污泥可挥发性部分的元素组成,可初步判断主要功能菌的细胞元素组成。分析所得各元素组分与主要功能菌细胞元素组分的理论值越接近,说明颗粒污泥内主要功能菌丰度越高。因此,颗粒污泥元素组成的变化,可指示主要功能菌丰度的变化。保藏阶段,对 R_1 – R_4 内厌氧氨氧化颗粒污泥进行元素分析,结果如表 4 所示。Strous 等 [24] 报道称 AnAOB 的细胞分子式为 $\text{CH}_2\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.15}$, 将其相应的 C/H/N/O 元素百分比作为理论值。培养阶段所得厌氧氨氧化颗粒污泥中 C/H/N 均低于理论值,而 O 元素高于理论值。保藏前期, R_1 – R_4 内 C/H/N 元素百分比均增加,而 O 元素所占百分比显著下降。同时,混合取样前观察到 R_1 – R_4 内有气泡产生,其中 R_1 、 R_3 和 R_4 气泡较多, R_2 内几乎无气泡,这可能与 AnAOB 细胞溶解程度有关。此外,细胞溶解亦可使部分细胞组分流入液相,影响颗粒污泥 C/H/N/O 元素组成比例。保藏后期, R_1 和 R_2 内 C/H/N/O 变化同步,其中 C/N/H 元素百

分比略有降低, O 元素百分比略有增加; R_3 内 C/H/N/O 元素百分比变化同保藏前期; R_4 内 C/H/N/O 元素百分比变化与保藏后期 R_1 和 R_2 内 C/H/N/O 元素百分比变化趋势相同。同时,混合取样前观察到 R_1 、 R_3 和 R_4 内有少量气泡, R_2 内无气泡生成。进一步检验生成的气泡成分以及液相组分能够更好地揭示污泥保藏过程中 C/H/N/O 的变化规律,进而判定不同保藏温度下 R_1 – R_4 内发生的反应类型和胞溶程度,然后对其进行调控可进一步提高污泥保藏效果。

3 结论

在厌氧氨氧化颗粒污泥培养阶段, KHCO_3 和 NaHCO_3 均可作为 AnAOB 生长的无机碳源。其中,碳酸氢钠相对经济,可作为培养 AnAOB 的优选无机碳源。在厌氧氨氧化颗粒污泥保藏阶段,相比于 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $(27\pm 4)\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $35\text{ }^\circ\text{C}$, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 时生物量和活性衰减较少,沉降性能较优,颗粒污泥破碎程度较小,TEM 观察未见胞溶现象。在厌氧氨氧化颗粒污泥保藏阶段,一阶衰减指

数模型能够较好地拟合生物量及其活性的衰减过程, 衰减指数与胞溶程度正相关, 而且生物量的衰减比活性的衰减更快。

REFERENCES

- [1] Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microb*, 1999, 65(7): 3248–3250.
- [2] Mulder A, van de Graaf AA, Robertson LA, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 16(3): 177–183.
- [3] Tang CJ, Zheng P, Chen JW, et al. Start-up and process control of a pilot-scale Anammox bioreactor at ambient temperature. *Chin J Biotech*, 2009, 25(3): 406–412 (in Chinese).
唐崇俭, 郑平, 陈建伟, 等. 中试厌氧氨氧化反应器的启动与调控. *生物工程学报*, 2009, 25(3): 406–412.
- [4] Tang CJ, Zheng P, Chai LY, et al. Characterization and quantification of anammox start-up in UASB reactors seeded with conventional activated sludge. *Int Biodeter Biodegr*, 2013, 82: 141–148.
- [5] Jin RC, Ma C, Yu JJ. Performance of an Anammox UASB reactor at high load and low ambient temperature. *Chem Eng J*, 2013, 232: 17–25.
- [6] Tang CJ, Ping Z, Chen JW. Effect of sequential biocatalyst addition on Anammox process. *Chin J Biotech*, 2011, 27(1): 1–8 (in Chinese).
唐崇俭, 郑平, 陈建伟. 流加菌种对厌氧氨氧化工艺的影响. *生物工程学报*, 2011, 27(1): 1–8.
- [7] Li X, Zheng YH, Huang Y, et al. Effect of preservation temperature and time on ANAMMOX sludge activity. *Chin Environ Sci*, 2011, 31(1): 56–61 (in Chinese).
李祥, 郑宇慧, 黄勇, 等. 保存温度及时间对厌氧氨氧化污泥活性的影响. *中国环境科学*, 2011, 31(1): 56–61.
- [8] Zheng YH, Li X, Huang Y. Study on the influence of preservation temperature on activity of ANAMMOX sludge. *Environ Pollut & Control*, 2011, 33(5): 82–86 (in Chinese).
郑宇慧, 李祥, 黄勇. 保藏温度对厌氧氨氧化污泥活性的影响研究. *环境污染与防治*, 2011, 33(5): 82–86.
- [9] Adav SS, Lee DJ, Tay JH. Activity and structure of stored aerobic granules. *Environ Technol*, 2007, 28(11): 1227–1235.
- [10] Gao D, Yuan X, Liang H. Reactivation performance of aerobic granules under different storage strategies. *Water Res*, 2012, 46(10): 3315–3322.
- [11] Vlaeminck SE, Geets J, Vervaeren H, et al. Reactivation of aerobic and anaerobic ammonium oxidizers in OLAND biomass after long-term storage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(6): 1376–1384.
- [12] Rothrock MJ, Vanotti MB, Szögi AA, et al. Long-term preservation of anammox bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 92(1): 147–157.
- [13] Heylen K, Ettwig K, Hu ZY, et al. Rapid and simple cryopreservation of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microb*, 2012, 78(8): 3010–3013.
- [14] Ali M, Oshiki M, Okabe S. Simple, rapid and effective preservation and reactivation of an anaerobic ammonium oxidizing bacterium "*Candidatus Brocadia sinica*". *Water Res*, 2014, 57(15): 215–222.
- [15] Wang CH, Zheng P, Cai J, et al. Preservation of ANAMMOX bacteria. *Chin Environ Sci*, 2013, 33(8): 1474–1482 (in Chinese).
汪彩华, 郑平, 蔡靖, 等. 厌氧氨氧化菌混培物保藏方法的研究. *中国环境科学*, 2013, 33(8): 1474–1482.
- [16] China Bureau of Environmental Protection. *Methods for Monitor and Analysis of Water and Wastewater*. 4th ed. Beijing: China Press of Environmental Science, 2002 (in Chinese).
国家环境保护总局. *水和废水监测分析方法*. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [17] Lu HF, Ji QX, Ding S, et al. The morphological

- and settling properties of ANAMMOX granular sludge in high-rate reactors. *Bioresour Technol*, 2013, 143: 592–597.
- [18] Sheng GP, Zhang ML, Yu HQ. Characterization of adsorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from sludge. *Colloids Surface B*, 2008, 62(1): 83–90.
- [19] Ma C, Jin RC, Yang GF, et al. Impacts of transient salinity shock loads on Anammox process performance. *Bioresour Technol*, 2012, 112: 124–130.
- [20] Berry EA, Trumpower BL. Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem*, 1987, 161(1): 1–15.
- [21] Yang GF, Jin RC. Reactivation of effluent granular sludge from a high-rate Anammox reactor after storage. *Biodegradation*, 2013, 24(1): 13–32.
- [22] Tang CJ, Zheng P, Wang CH, et al. Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge. *Water Res*, 2011, 45(1): 135–144.
- [23] Lotti T, van der Star WRL, Kleerebezem R, et al. The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Res*, 2012, 46(8): 2559–2569.
- [24] Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, et al. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50(5): 589–596.
- [25] Jin RC, Zheng P, Mahmood Q, et al. Osmotic stress on nitrification in an airlift bioreactor. *J Hazard Mater*, 2007, 146(1/2): 148–154.
- [26] Wan CL, Yang X, Lee DJ, et al. Partial nitrification of wastewaters with high NaCl concentrations by aerobic granules in continuous-flow reactor. *Bioresour Technol*, 2013, 152: 1–6.
- [27] Hao XD, Heijnen JJ, van Loosdrecht MCM. Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification-ANAMMOX biofilm process. *Water Res*, 2002, 36(19): 4839–4849.
- [28] Scaglione D, Caffaz S, Bettazzi E, et al. Experimental determination of Anammox decay coefficient. *J Chem Technol Biotechnol*, 2009, 84(8): 1250–1254.
- [29] Jin RC, Yang GF, Zhang QQ, et al. The effect of sulfide inhibition on the ANAMMOX process. *Water Res*, 2013, 47(3): 1459–1469.
- [30] Liu XW, Sheng GP, Yu HQ. Physicochemical characteristics of microbial granules. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(6): 1061–1070.
- [31] Xing BS, Qin TY, Chen SX, et al. Performance of the ANAMMOX process using multi- and single-fed upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Bioresour Technol*, 2013, 149: 310–317.
- [32] Cuervo-López FM, Martínez F, Gutiérrez-Rojas M, et al. Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Sci Technol*, 1999, 40(8): 123–130.
- [33] Franco A, Roca E, Lema JM. Granulation in high-load denitrifying upflow sludge bed (USB) pulsed reactors. *Water Res*, 2006, 40(5): 871–880.
- [34] Su KZ, Yu HQ. Formation and characterization of aerobic granules in a sequencing batch reactor treating soybean-processing wastewater. *Environ Sci Technol*, 2005, 39(8): 2818–2827.

(本文责编 陈宏宇)