

亚铁离子对厌氧氨氧化反应器脱氮性能的影响

张黎, 胡筱敏, 姜彬慧, 黄永刚
(东北大学资源与土木工程学院, 辽宁沈阳 110819)

摘 要: 研究通过投加厌氧氨氧化污泥,待反应器稳定运行后考察不同浓度 Fe^{2+} 对厌氧氨氧化污泥活性的影响.实验结果表明:经过 210 d 的连续培养,发现 Fe^{2+} 可以促进厌氧氨氧化菌的细胞合成并且增加其基质代谢,当溶液中 Fe^{2+} 浓度为 0.085 mmol/L (4.76 mg/L) 时,氨氮转化率维持在 90% 以上;添加 Fe^{2+} 可以增加厌氧氨氧化菌亚铁血红素含量.此时样品中亚铁血红素 C 含量达到 0.143 $\mu\text{mol}/\text{mg}$,是同期对照反应器的 2.04 倍.通过 SEM 电镜发现当 Fe^{2+} 浓度为 0.085 mmol/L 时,厌氧氨氧化菌群结构与形态趋于稳定.

关 键 词: 厌氧氨氧化;铁离子;血红素含量;SEM;亚铁离子

中图分类号: X 506 文献标志码: A 文章编号: 1005-3026(2015)12-1753-04

Effect of Iron Ions on Denitrification Performance in Anammox Reactor

ZHANG Li, HU Xiao-min, JIANG Bin-hui, HUANG Yong-gang

(School of Resources & Civil Engineering, Northeastern University, Shenyang 110819, China. Corresponding author: HU Xiao-min, professor, E-mail: hxmin_jj@163.com)

Abstract: The effect of different concentration of Fe^{2+} on the activity of anaerobic ammonium oxidation sludge was experimentally investigated by the addition of anammox sludge in stable operation at reactor. The experimental results show that: Fe^{2+} can promote cell synthesis of anaerobic ammonia oxidation bacteria and increase its matrix metabolism, through 210 days continuous operation. When the concentration of Fe^{2+} in the solution is 0.085 mmol/L (4.76 mg/L), the ammonia nitrogen conversion rate remains at more than 90%. The heme content of anaerobic ammonia oxidation bacteria is increased by the addition of Fe^{2+} . At this point, the heme C content reaches 0.143 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ in the sample. It is 2.04 times heme content of anaerobic ammonia oxidation bacteria in comparison reactor at the same period. It is found that using SEM when the concentration of Fe^{2+} is 0.085 mmol/L, the anaerobic ammonia oxidation bacteria form approaches to a steady state.

Key words: anaerobic ammonium oxidation (anammox); Fe^{3+} ; heme content; SEM; Fe^{2+}

厌氧氨氧化基本原理是指在厌氧条件下,以 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 为电子供体, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 为电子受体,直接将 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 转化为 N_2 的过程^[1].该反应最早是由 Mulder 等^[2]发现于反硝化流动床中,在反硝化工厂的脱氮反应进行氮平衡计算时,发现传统的硝化-反硝化不能解释其中大量的氮损失,因此推断这将是一种新型的厌氧脱氮反应.但众所周知,厌氧氨氧化菌生长非常缓慢,对细菌生长条件要求极为严格^[3],如何缩短

反应器启动时间,增加污泥活性逐渐成为研究的热点.

Chen^[4]等通过批次试验对添加 Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} 的厌氧氨氧化污泥活性进行考察,当 Fe^{3+} 质量浓度达到 36 mg/L 时,厌氧氨氧化污泥量增长 53.32%,在适当条件下, Fe^{3+} , Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 同时投加其容积氮去除率比对照反应器高 52.8%.由此可见,金属离子对污泥活性有显著影响.现在,关于 Fe^{2+} 对 Anammox 污泥活性的影响依然存在

收稿日期: 2014-12-26

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项(2013ZX07202-010-02).

作者简介: 张黎(1983-),女,辽宁沈阳人,东北大学博士研究生;胡筱敏(1958-),男,江西婺源人,东北大学教授,博士生导师.

争议.

本文通过在实验反应器中添加不同浓度 Fe^{2+} 并通过实验反应器与对照反应器氨氮去除率、酶活性、微生物形态等变化考察 Fe^{2+} 对反应器脱氮效能的影响及其在厌氧氨氧化过程中作为电子供体/受体的潜在可能性. 从而探索出能使厌氧氨氧化菌在有限条件下快速繁殖的方法, 使厌氧氨氧化反应被广泛应用.

1 实验材料和实验方法

1.1 实验装置与运行条件

实验采用 2 个 ASBR 反应器(图 1)来考察不同浓度 Fe^{2+} 对厌氧氨氧化菌脱氮性能的影响, 装置采用有机玻璃制作, 有效容积为 2.0 L. 内部装有改性生物膜载体, 用聚乙烯网固定好后置于反应器内部, 以便拆卸. 装置表面用遮光布包裹, 防止光线对污泥的负面影响. R1 用作对照, 控制 Fe^{2+} 浓度为 0.035 mmol/L, R2 用于实验, Fe^{2+} 浓度由 0.035 mmol/L 逐步增加至 0.055, 0.085 mmol/L.

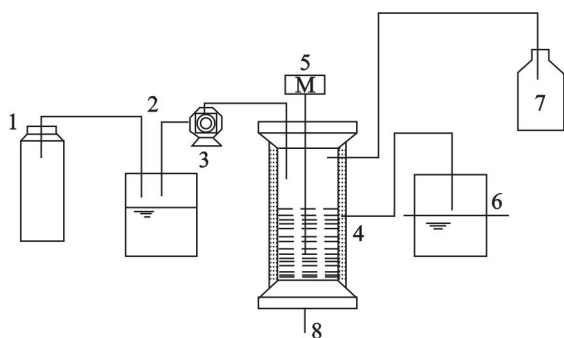


图 1 厌氧氨氧化反应器

Fig. 1 The reactor of anammox

1—氮气瓶; 2—进水箱; 3—蠕动泵; 4—ASBR 反应器;
5—搅拌器; 6—排水箱; 7—气瓶; 8—排泥口.

1.2 接种污泥生物量和配水组成

用于接种的微生物取自于实验室已经稳定运行一年以上的厌氧氨氧化生物膜反应器内. 人工配制废水主要含有亚硝态氮和氨氮以维持厌氧氨氧化生物活性. $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 和 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 分别用 NH_4Cl 和 NaNO_2 提供, 浓度按需配置. 其他成分为: KHCO_3 500 mg/L, KH_2PO_4 50 mg/L, EDTA 10 mg/L, KCl 1.4 mg/L, NaCl 1.0 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg/L. 不同浓度铁离子溶液由临时配制的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液提供. 反应器 R1 中 Fe^{2+} 浓度为 0.035 mmol/L, 反应器 R2 中 Fe^{2+} 浓度由 0.035 mmol/L 逐渐增至 0.055, 0.085 mmol/L.

1.3 分析方法

指标测定方法按照《水和废水检测方法》^[5], $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 采用纳氏分光光度法; $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 采用 $\text{N} - (1 - \text{萘基}) - \text{乙二胺}$ 分光光度法; $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 采用紫外分光光度法; 铁离子浓度采用火焰原子吸收光谱法测定; pH 值和 DO 采用 WTW 手提式多参数测定仪.

1.4 样品电镜扫描观察

颗粒污泥扫描电镜观察的样品预处理方法如下: 取适量颗粒污泥样品经戊二醛固定、缓冲液冲洗三次、乙酸戊酯置换、临界点干燥、离子溅射喷金处理后, 使用 Hitachi S-4700 型扫描电镜对样品进行观察并拍照^[6].

1.5 生物量提取和酶活性的测定

反应运行到第 1, 70, 140, 210 d 时, 每个反应器取出污泥样品 1.5 g (干质量). 污泥样品在 4 °C, 9 000 r/min 通过冷冻离心机离心 10 min, 之后用 20 mmol, pH = 7.0 的磷酸钠缓冲液冲洗两次保存备用. 冲洗后的小球重新悬浮在 20 mL 的缓冲液中, 通过超声破碎仪冻融法使细胞溶解. 之后细胞群通过 22 000 r/min, 4 °C 冷冻离心机离心 4 min, 上清液 -20 °C 冷冻保存, 以备做蛋白质和酶活性测定时的细胞提取. 蛋白质浓度测定依据 Bradford^[7] 的程序. 用 BSA 作为标准溶液. 联氨脱氢酶的活性 (HDH) 测定依据文献^[8] 的方法. 用分光光度计在 550 nm 测试标准混合液时, 可见反应的细胞色素碳吸收量有所增加.

2 结果与讨论

2.1 Fe^{2+} 对反应器脱氮性能的影响

在投加了一定量厌氧氨氧化污泥的反应器, 通过逐步提高氮负荷的方式, 考察厌氧氨氧化反应器的启动情况. 待反应器稳定运行后考察不同浓度 Fe^{2+} 对厌氧氨氧化反应器脱氮效能的影响. 对照反应器 (R1) 中 Fe^{2+} 浓度为 0.035 mmol/L. 根据投加不同浓度的金属离子 (0.035, 0.055, 0.085 mmol/L) 将反应器 (R2) 运行分为 3 个阶段, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 变化分别见图 2. 可以看出 3 个阶段的平均氨氮去除率分别为 65.43%, 80.60% 和 89.22%, 平均亚硝态氮去除率分别为 78.24%, 81.23% 和 91.70%. 氨氮和亚硝态氮的最大去除率均在 Fe^{2+} 0.085 mmol/L 时测得. 这与文献^[9] 经过 71 个周期培养, 含 Fe^{2+} 进水的厌氧氨氧化反应器 R1 脱氮效能由 $0.28 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$

升高到 $0.65 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 一致. 本研究出水中的硝态氮浓度与对照没有显著变化.

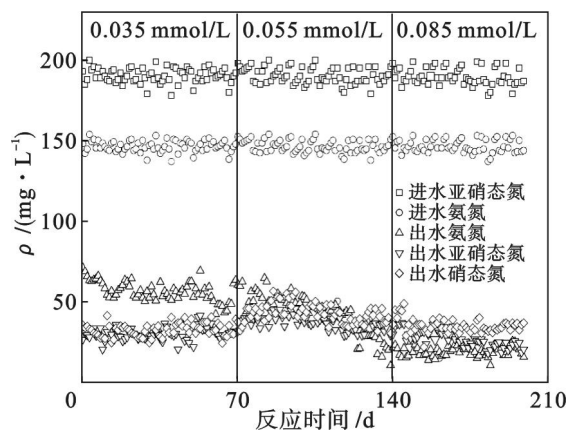


图2 不同铁离子浓度下氮素转化情况

Fig. 2 The nitrogen transformation under different concentrations of iron ion

2.2 对厌氧氨氧化效能的影响

在厌氧氨氧化反应过程中,消耗的 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 与 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 理论值之比为 $1.32:1$, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 生成量与 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 去除量之比为 $0.26:1$ ^[10]. 由图3可以看出,反应器(R2)中氨氮和亚硝态氮的去除比例并不相同,三个阶段的平均值分别为 1.26 ± 0.09 , 1.23 ± 0.03 和 1.19 ± 0.05 ,单边检测 $t(p5)$ 显示其显著低于 1.32 ,并且随 Fe^{2+} 浓度的升高缓慢下降. 反应产生的硝态氮与转化的氨氮比值没有显著变化. R1 中,添加 Fe^{2+} 后,根据单边 t 检测,氨氮和亚硝态氮的去除比例均低于理论值 1.32 .

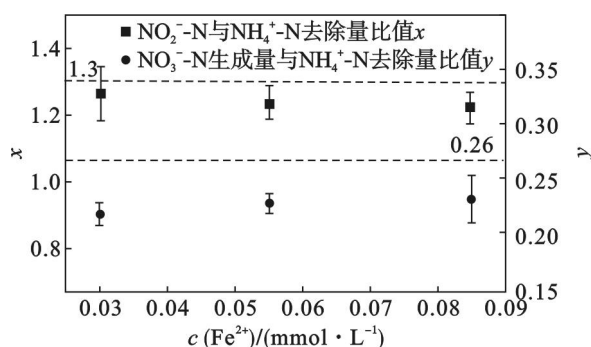


图3 Nitrite 与 Ammonium 的去除量比例和 Nitrate 生成量与 Ammonium 去除量比例

Fig. 3 Conversion ratio of nitrite and ammonium and ratio between nitrate production and ammonium conversion

2.3 亚铁血红素 C 含量

在实验运行到第 1, 70, 140, 210 d 时分别检测了反应器内不同样品亚铁血红素 C 含量. 在每个阶段亚铁血红素 C 含量和氨氮的去除率有直

接关系. 由图4可见,在整个实验阶段,当反应进行到的第 210 d 时,样品中亚铁血红素 C 含量达到 $0.143 \text{ } \mu\text{mol}/\text{mg}$,是同期对照反应器的 2.04 倍. 由此可见, Fe^{2+} 浓度直接影响细胞中亚铁血红素含量.

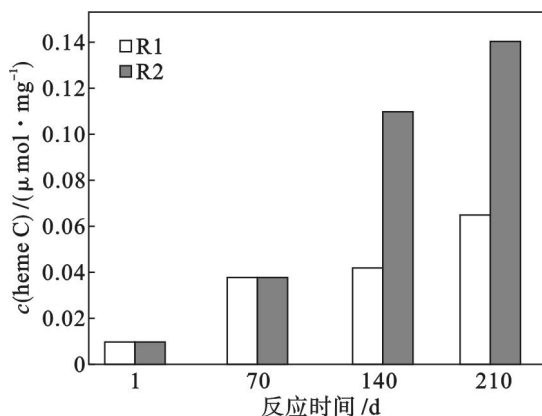


图4 不同反应器内当 Fe^{2+} 浓度为 0.035, 0.055, 0.085 mmol/L 时亚铁血红素 C 含量

Fig. 4 The heme C content in different reactors when the concentration of Fe^{2+} was 0.035, 0.055, 0.085 mmol/L

2.4 Fe^{2+} 对厌氧氨氧化菌形态的影响

经过 210 d 的连续培养,对照和实验反应器内污泥样品的扫描电镜图片如图5所示. 从图5

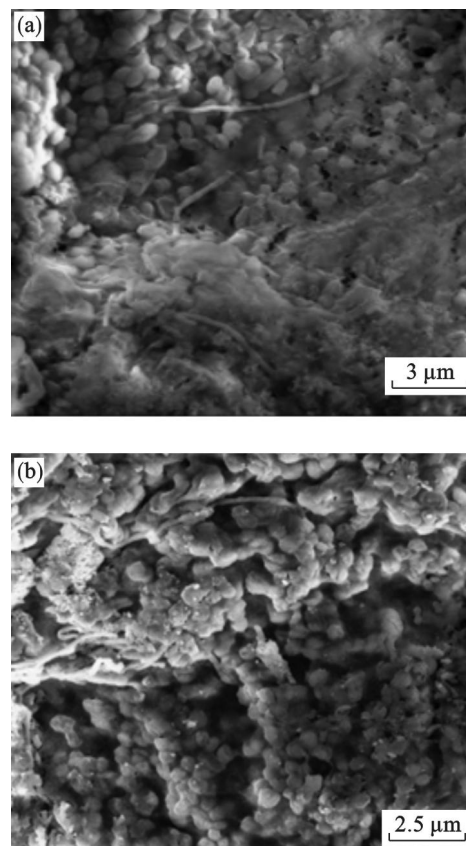


图5 不同反应器内污泥 SEM 照片

Fig. 5 The SEM photos of different reactor sludges
(a)—R1; (b)—R2.

可以看出,实验反应器 R2 中厌氧氨氧化菌群数量明显高于对照反应器.由图 5b 可以看出厌氧氨氧化颗粒内部微生物排列紧密,并且可以清楚观察到,单个厌氧氨氧化菌的大小在 $0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$,与现有文献报道的厌氧氨氧化菌的形态结构^[11]一致.这些均表明当 Fe^{2+} 浓度为 0.085 mmol/L 时,反应器内厌氧氨氧化菌体结构和形态趋于稳定.

2.5 铁离子的关键作用

铁是厌氧氨氧化微生物生长所必需的元素^[12].厌氧氨氧化菌富含血红素,它是能量代谢与细胞合成的重要电子载体^[13].Van Niftrik 等^[12]认为,厌氧氨氧化菌吸收并且储存铁离子来满足血红蛋白的合成.这足以证明,铁离子在厌氧氨氧化反应过程中起了重要作用.因此假设添加 Fe^{2+} 可以促进细胞血红素的合成,从而增强细菌的能量代谢.本文验证,当 Fe^{2+} 浓度为 0.085 mmol/L 时,氮的转化率比浓度为 0.035 , 0.055 mmol/L 时明显增高,均保持在 90% 以上(图 2).

2.6 铁离子作为潜在电子供体

在厌氧条件下,氨氧化反应异化还原 Fe^{2+} 的现象(铁氨氧化)已经在自然界中发现^[14].当铁离子浓度达到 0.085 mmol/L 时, $\text{NO}_2^- - \text{N}/\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的比值仍然小于 1.32,这可能和铁离子代替亚硝酸盐做电子供体有关,如图 3 所示.这与文献^[13]验证的 Fe^{2+} 可以作为这种菌的电子供体在还原硝酸盐过程中起关键作用相一致.

3 结 论

研究发现当 Fe^{2+} 浓度提高到 0.085 mmol/L 时,氮的转化率均保持在 90% 以上.这为传统的厌氧氨氧化培养基配比提供了新的参考.更值得注意的是,本实验发现 Fe^{2+} 不仅是厌氧氨氧化菌生长的必须元素,更是厌氧氨氧化过程中亚硝酸盐的电子供体.

参考文献:

[1] Van de Graaf A A, de Bruijn P, Robertson L A, et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor[J]. *Microbiology*, 1996, 142: 2187 – 2196.

[2] Mulder A, Van de Graaf A A, Robertson L A, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying

fluidized bed reactor [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, 16: 177 – 184.

- [3] Jetten M S M, Wagner M, Fuerst J, et al. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12: 283 – 288.
- [4] Chen H, Yu J J, Jia X Y, et al. Enhancement of anammox performance by Cu(II), Ni(II) and Fe(III) supplementation [J]. *Chemosphere*, 2013, 117: 610 – 616.
- [5] 国家环境保护局. 水和废水检测方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 258 – 282.
- (State Environmental Protection Agency. Water and waste water detection method [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 258 – 282.)
- [6] 刘涛, 李冬, 曾辉平, 等. 常温下 CANON 反应器中功能微生物的沿程分布[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2012, 44(10): 22 – 27.
- (Liu Tao, Li Dong, Zeng Hui-ping, et al. Distribution of functional bacteria along bio-filter of CANON reactor at room temperature[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2012, 44(10): 22 – 27.)
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248 – 254.
- [8] Qiao S, Bi Z, Zhou J T, et al. Long term effects of divalent ferrous ion on the activity of anammox biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 490 – 497.
- [9] 李祥, 黄勇, 巫川, 等. Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对厌氧氨氧化污泥活性的影响[J]. 环境科学, 2014, 35(11): 4224 – 4229.
- (Li Xiang, Huang Yong, Wu Chuan, et al. Effect of Fe^{2+} and Fe^{3+} on the activity of anammox [J]. *Environmental Science*, 2014, 35(11): 4224 – 4229.)
- [10] Strous M, Heijnen J J, Kuenen J G, et al. The sequencing batch reactor as powerful tool for the study slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms [J]. *Applied and Microbiological Biotechnology*, 1998, 50(5): 589 – 596.
- [11] Kuenen J G. Anammox bacteria: from discovery to application [J]. *Nature Review Microbiology*, 2008, 6(4): 320 – 326.
- [12] Van Niftrik L, Geerts W J, Van Donselaar E G, et al. Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: a membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria [J]. *Journal of Structural Biology*, 2008, 161(3): 401 – 410.
- [13] Strous M, Pelletier E, Mangenot S, et al. Deciphering the evolution and metabolism of anammox bacterium from a community genome [J]. *Nature*, 2006, 440(7085): 790 – 794.
- [14] Sawayama S. Possibility of anoxic ferric ammonium oxidation [J]. *Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(1): 70 – 72.