

超高盐度对耐盐活性污泥脱氮、微生物活性和群落结构的影响*

王旭¹, 王福浩², 吴澜¹, 余宗莲^{1**}

(1. 中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266100; 2. 青岛水务环境公司, 山东 青岛 266021)

摘要: 采用能耐受 3% 盐度的活性污泥处理高盐度废水, 探究了盐度升至 4%~7% 对污染物去除的影响, 考察了微生物活性和群落结构随盐度升高的变化。结果表明, 盐度提升到 4%、5% 和 6% 对 COD、NH₄⁺-N 和总无机氮(TIN) 去除几乎没有影响, 而 7% 盐度时三者的去除率均明显下降; 盐度提高到 4% 对污泥的氨氧化活性和亚硝酸盐氧化活性有刺激作用, 使两者提高, 而盐度提高到 5%、6% 和 7% 时氨氧化活性受到明显抑制, 亚硝酸盐氧化活性在 6% 和 7% 盐度条件下明显降低; 盐度提升使硝酸盐和亚硝酸盐还原活性均受到明显抑制; 耗氧速率测试结果表明, 盐度提升对自养硝化菌的负面影响较异养好氧菌更大。微生物群落结构随盐度升高发生了明显变化, 微生物群落丰富度和多样性均在 6% 盐度时最大, 3% 盐度时 *Roseovarius* 为优势菌属, 而盐度提高至 4%~7% 时 *Azoarcus* 成为优势菌属。氨氧化菌(AOB) 只在 3%、4% 和 6% 盐度下被检出, 亚硝酸盐氧化菌(NO₂⁻) 在所有盐度下均未检出, 短程硝化反硝化(PND) 为主要脱氮途径; 自养反硝化菌、好氧反硝化菌和厌氧氨氧化菌的存在说明脱氮途径不局限于传统的自养硝化-异养反硝化。盐度驯化提高了活性污泥的抗盐能力, 使生物法处理超高盐废水成为可能。

关键词: 盐度; SBR; 耐盐污泥; 微生物活性; 微生物群落

中图法分类号: X703

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2021)07 II-050-10

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20210078

引用格式: 王旭, 王福浩, 吴澜, 等. 超高盐度对耐盐活性污泥脱氮、微生物活性和群落结构的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2021, 51(增 I): 50-59.

Wang Xu, Wang Fuhao, Wu Lan, et al. The effects of hypersaline wastewater on nitrogen removal, microbial activity and community of halotolerant activated sludge[J]. Periodical of Ocean University of China, 2021, 51(Sup. I): 50-59.

含盐废水主要来自海产品加工、食品加工、海水养殖、石油开采、制药和化工等行业^[1], 这类废水中含有大量无机盐离子所产生的高渗透压会使微生物细胞质壁分离, 导致细胞活性降低^[2], 对废水生物处理系统产生不利影响; 但有研究表明, 不耐盐的微生物通过逐步提高盐度进行驯化, 可在 4%~4.5% 盐度或 30~38 g·L⁻¹ NaCl 浓度条件下得到较好的有机物和氮去除效果^[1-4], 而盐度进一步提高会对有机物降解和脱氮过程产生强烈抑制作用, 有机物和氮去除率明显下降^[2-4]。一些工业废水, 如榨菜废水、高盐含酚废水、糖精钠废水等盐度高达 7%~15%^[2,5-6], 这类超高盐度废水的生物处理是需要解决的难题。据王玉凤的研究, 利用接种耐盐活性污泥的序批式反应器处理苯酚废水, NaCl 浓度由 30 g·L⁻¹ 提升到 80 g·L⁻¹ 过程中, 苯酚处理效果基本不受影响^[6], 因此, 利用耐盐活性污泥处理超高盐度废水是可行的。

盐度是影响微生物活性和群落结构的重要因素, 高盐条件下亚硝酸盐氧化菌(NO₂⁻) 比氨氧化菌(AOB) 更易受到抑制, AOB 活性一般高于 NO₂⁻-N 积累, 氮去除通过短程硝化反硝化(Partial Nitrification and Denitrification, PND) 途径实现^[4,7]。随着盐度升高, 耐盐菌或嗜盐菌成为微生物群落中的优势菌; 一些菌只适应低盐或无盐环境, 在高盐环境下丰度降低, 如 *Nitrospira*^[3] 和 *Hyphomicrobium*^[8]; 变形菌和拟杆菌是污水处理系统中常见的菌门, 在淡水或咸水环境中均可生存, 可以耐受较广的盐度范围^[9-10]; 还有一部分菌在高盐度下富集, 如 *Marinobacterium* 是 7% 盐度时的优势菌^[2], *Halomonas alkaliphila* 只在 7%~8% 盐度条件下被检出^[1]。

目前, 有关利用耐盐活性污泥处理超高盐度废水的研究很少, 特别是长期驯化的耐盐活性污泥在超高盐度条件下对氮去除效果、微生物活性和群落结构影

* 基金项目: 中央高校基本科研业务费专项项目(201964003)资助

Supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities(201964003)

收稿日期: 2021-02-24; 修订日期: 2021-04-06

作者简介: 王旭(1995-), 女, 硕士生, 研究方向为水污染控制工程。E-mail: wang1214xu@126.com

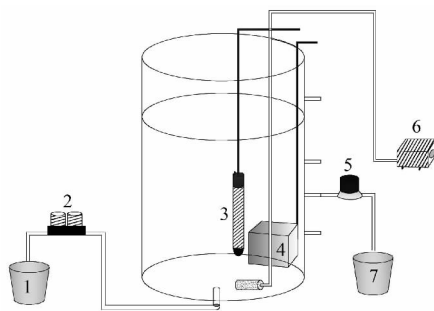
** 通讯作者: E-mail: szlszl@ouc.edu.cn

响的研究尚未见有报道。本研究利用 3% 盐度下长期驯化的活性污泥在序批式反应器 (Sequencing Batch Reactor, SBR) 中处理超高盐度废水,考察了 4%~7% 盐度条件下有机物和氮的去除效果,采用批量实验测试了活性污泥的硝化活性、反硝化活性和耗氧活性随盐度升高的变化,利用高通量测序技术揭示了微生物群落结构及脱氮功能菌的演替过程,从微生物角度解析了超高盐度对氮转化的影响。

1 实验方法

1.1 实验装置及运行方式

本实验采用 4 个有效容积为 1 L 的 SBR(子反应器)和 1 个 7 L 的 SBR(母反应器)(结构如图 1 所示),4 个子反应器的接种污泥来自母反应器,使 4 个子反应器最初的混合液悬浮固体 (MLSS) 浓度均为 $2\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。母反应器在 3% 盐度条件下运行了 330 d,实现了高效的有机物和氮去除,氮去除途径为短程硝化反硝化。反应器每个周期历时 8 h,包括 6 个阶段,即进水 15 min,好氧 330 min,缺氧 60 min,静置 60 min,出水 10 min 和闲置 5 min。每个周期进出水 0.5 L,换容比为 50%,水力停留时间为 16 h。在好氧阶段,由空气压缩机向反应器内供气,转子流量计控制曝气流量,使混合液 DO 浓度保持在 $2.0\sim 6.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;在好氧和缺氧阶段采用机械搅拌使混合液混匀;用加热棒控制反应器内温度恒定在 $(28\pm 1)\ ^\circ\text{C}$ 。所有设备的启动和停止均通过时间继电器控制。



(1.进水桶 Influent tank; 2.进水泵 Influent pump; 3.恒温加热棒 Thermostatic heater; 4.搅拌器 Stirrer; 5.电磁阀 Solenoid valve; 6.空气压缩机 Air compressor pump; 7.出水桶 Effluent tank)

图 1 SBR 结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of SBR

1.2 实验用水

本实验进水为人工配制的含盐废水,所有反应器的进水除盐度不同外其它物质浓度相同,4 个子反应器通过在 1 L 进水中分别投加 40、50、60 和 70 g 的海水晶配制成盐度分别为 4%、5%、6% 和 7% 的废水,母反

应器进水中加入 30 g/L 海水晶配制成 3% 盐度的废水,每 10 g 海水晶中主要物质含量为:5.3 g Cl^- , 3.3 g Na^+ , 0.62 g SO_4^{2-} , 0.3 g Mg^{2+} , 0.1 g K^+ 和 0.09 g Ca^{2+} 。进水 COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和总磷 (TP) 浓度为 400、30 和 $8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (分别由 CH_3COONa 、 NH_4Cl 、 K_2HPO_4 提供),进水 pH 控制在 7.5~8.0 范围内。

1.3 分析方法

1.3.1 水质测定 每隔一天取反应器进水、曝气结束和出水水样,按照国家规定的标准方法检测 COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度^[11],总无机氮 (TIN) 为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度之和。pH 及 DO 分别用便携式 pH 计 (PHB-4, 雷磁, 中国) 和溶解氧仪 (Oxi 330i, WTW, 德国) 测定。

曝气结束时的亚硝酸盐氮积累率 (NAR) 根据公式 (1) 计算:

$$\text{NAR} = \text{NO}_2^-\text{-N} / (\text{NO}_2^-\text{-N} + \text{NO}_3^-\text{-N}) \times 100\% \quad (1)$$

其中, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 分别指曝气结束时反应器内 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的浓度。

1.3.2 微生物活性实验 为探究升高盐度对耐盐活性污泥硝化活性、反硝化活性和耗氧活性的影响,待反应器运行稳定后,取各反应器内活性污泥样品通过批量实验测定比氨氧化速率 (SAOR)、比亚硝酸盐氧化速率 (SNOR)、比亚硝酸盐还原速率 (SNIRR)、比硝酸盐还原速率 (SNARR) 和比耗氧速率 (SOUR),每个盐度条件下设置 3 个平行实验,具体检测方法参照 She 等^[12] 和 Surmacz-Gorska 等^[13] 的报道。

1.3.3 微生物群落分析 为了揭示微生物群落结构和脱氮功能菌随盐度升高的变化,反应器运行稳定后取悬浮污泥样品,用 PowerSoil DNA 试剂盒 (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, 美国) 提取 DNA,然后通过聚合链式反应 (PCR) 扩增 16S rDNA 的 V4-V5 高变区,扩增引物为 515F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3') 和 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'),扩增产物通过北京 Novogene 公司的 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序。有效序列以 97% 的相似性聚类为 OTUs,对 OTUs 序列进行物种注释。

2 结果与讨论

2.1 污染物去除和污泥性能

各盐度条件下污染物去除效果如图 2 所示。3% 盐度条件下运行的母反应器中 COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TIN 去除率分别为 100%、100% 和 99.9%,曝气结束时 NAR 达 98.6%,氮去除是通过短程硝化反硝化实现的。盐度提升至 4%、5% 和 6% 的 3 个子反应器中,稳定状态时 COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TIN 去除率均保持在 95.0% 以上,表明 4%~6% 盐度没有对有机物和氮去

除效果产生明显负面影响。7%盐度对有机物去除没有明显影响, COD平均去除率为93.6%, 但氮去除效果明显下降, 与3%盐度对比 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 TIN去除率分别下降了28.4%和28.2%, 说明此盐度条件对氮去除功能的影响比对有机物降解更大; 出水中未检出 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, 表明总无机氮去除效率的降低是由氨氮氧化功能的下降导致的。4个子反应器中曝气结束时氮的主要形态仍为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$, NAR 高于94.0%, 短程硝化反硝化仍是脱氮的主要途径, 表明本研究条件下盐度的增加没有改变氮的去除途径。Wang等^[1]分析了盐度对好氧颗粒污泥 SBR 处理功能的影响, 历经105 d 盐度从0%逐步提高到7%; 当盐度提升至6%时 COD 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率分别从92%和93%降至50%和40%左右, 盐度进一步增加至7%时 COD 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除

率降至35%和30%左右; 说明逐步提升盐度的驯化方式, 达到超高盐度时对有机物降解和氨氮转化会产生严重抑制作用。王玉凤^[6]的研究表明, 接种耐盐活性污泥的 SBR, 在盐度由30 g/L 提高到80 g/L NaCl 过程中, 对苯酚的降解一直比较稳定, 说明接种耐盐活性污泥可以提高反应器的抗盐能力。

提高盐度对污泥浓度基本没有影响, 实验结束时盐度为4%~7%的4个子反应器中污泥浓度仍保持在2000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右。但随盐度升高污泥的沉降性能变差, 接种污泥的污泥体积指数(SVI)为80 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 实验结束时4%、5%、6%和7%盐度的反应器中污泥SVI分别升高至117、143、121和175 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$, Wang等^[1]的研究也发现, 盐度升高使污泥沉降性能变差。

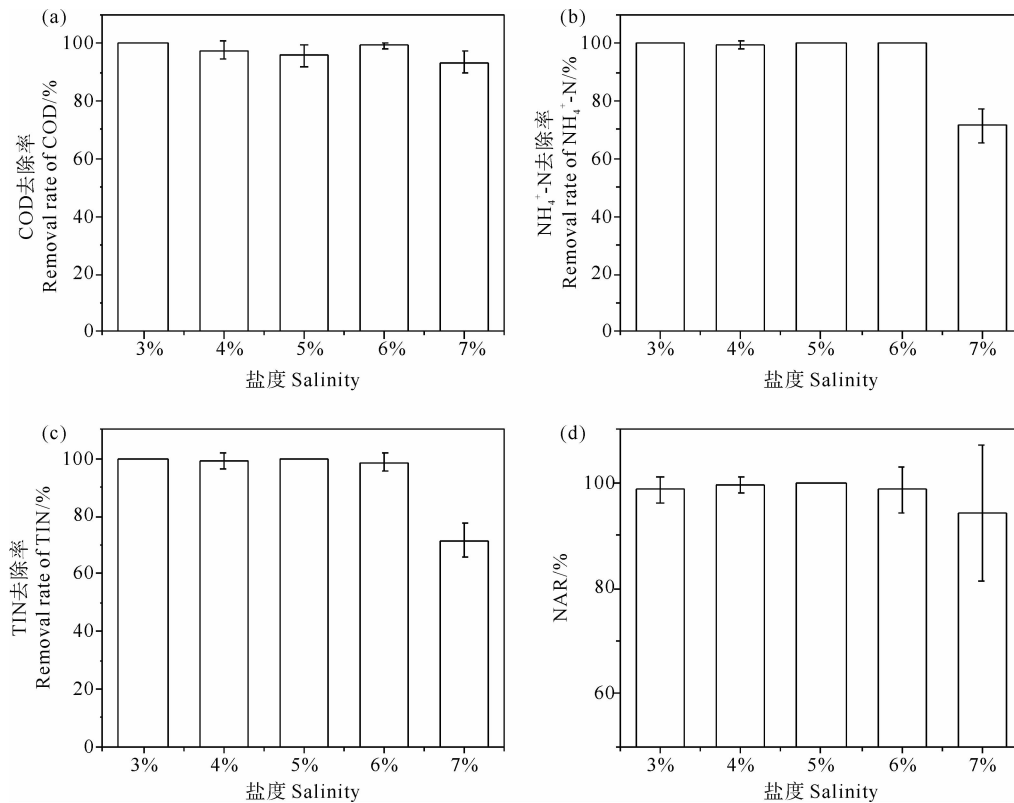


图2 SBR 反应器运行性能

Fig.2 The performance of the SBRs

2.2 微生物活性

实验结束时取各盐度反应器中的活性污泥测定硝化活性、反硝化活性和耗氧活性, 结果如图3所示。4%盐度时 SAOR 较3%盐度提升10.9%, 说明小幅度提升盐度可促进氨氧化菌活性; 盐度提升到5%、6%和7%对氨氧化活性产生了明显抑制作用, SAOR 值较3%盐度分别下降44.4%、47.7%和96.4%。与3%盐度比较, 5%和6%盐度时 SAOR 虽然降低了近一半,

但反应器中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率仍保持在95%以上, 可能是由于5%和6%盐度下的 SAOR 与其他文献相比处于较高水平^[14-15], 推测此时反应器中仍含有足够量的氨氧化菌, 可以将 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 完全氧化, 从而保持高 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率。这与张磊^[16]的研究结果类似, 该研究表明 SAOR 在2.5%盐度时为0.6%盐度的50%左右, 但2.5%盐度时 TN 和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除效果未受到明显影响。本研究中, 7%盐度时氨氧化活性很低, SAOR

降至 $0.229 \text{ mg} \cdot (\text{h} \cdot \text{g VSS})^{-1}$, 导致反应器中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除效果明显下降(见图 2(b)), Wang 等^[1]的研究得到类似结果。4%和 5%盐度对亚硝酸盐氧化菌有刺激作用,使 SNOR 较 3%盐度升高了 11.8%和 9.9%,但 6%和 7%盐度导致 SNOR 值明显降低,说明对亚硝酸盐氧化菌有明显负面影响。所有盐度条件下,SNOR 值均远低于 SAOR 值,是后者的 7%~18%,表明亚硝酸盐氧化活性远低于氨氧化活性,这导致好氧阶段结束时 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度 ($0.65 \sim 3.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 高于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($0.00 \sim 0.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 结合曝气结束时高达 94.0% 以上的 NAR, 说明盐度提升至 4%~7%后各反应器内硝化反应仍以短程硝化为主,氮去除途径仍为短程硝化反硝化过程。盐度由 3%提升到 4%~7%导致亚硝酸盐还原活性和硝酸盐还原活性明显降低,SNIRR 和 SNARR 分别降低了 54.3%~92.3%和 67.0%~93.2%,两者分别在 6%和 5%盐度时达到最低。虽然盐

度升高至 4%~7%使亚硝酸盐和硝酸盐还原活性明显降低,但没有导致出水中 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的积累(浓度接近或等于零),这可以从两方面解释,一是好氧曝气阶段可以同时进行氨氧化和反硝化反应(即同步硝化反硝化),实现 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的还原,曝气结束时的低 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度 ($0.65 \sim 3.72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.00 \sim 0.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 说明曝气阶段确实存在同步硝化反硝化现象,且氨氧化产生的 $\text{NO}_x^-\text{-N}$ 大部分在好氧阶段被转化去除;二是在较高盐度条件下反应器内仍存在丰富的反硝化菌,且缺氧阶段反硝化时间足够长(60 min),可以将曝气结束时残留的 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 基本全部还原。另外,6%盐度时 SNIRR 值低于 SAOR,但没有导致出水中 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 积累,这也可以从上述两方面解释,而且此盐度时反应器内好氧反硝化菌被检测出(如 2.2.3 节分析),从微生物角度支持了好氧阶段可发生反硝化反应。

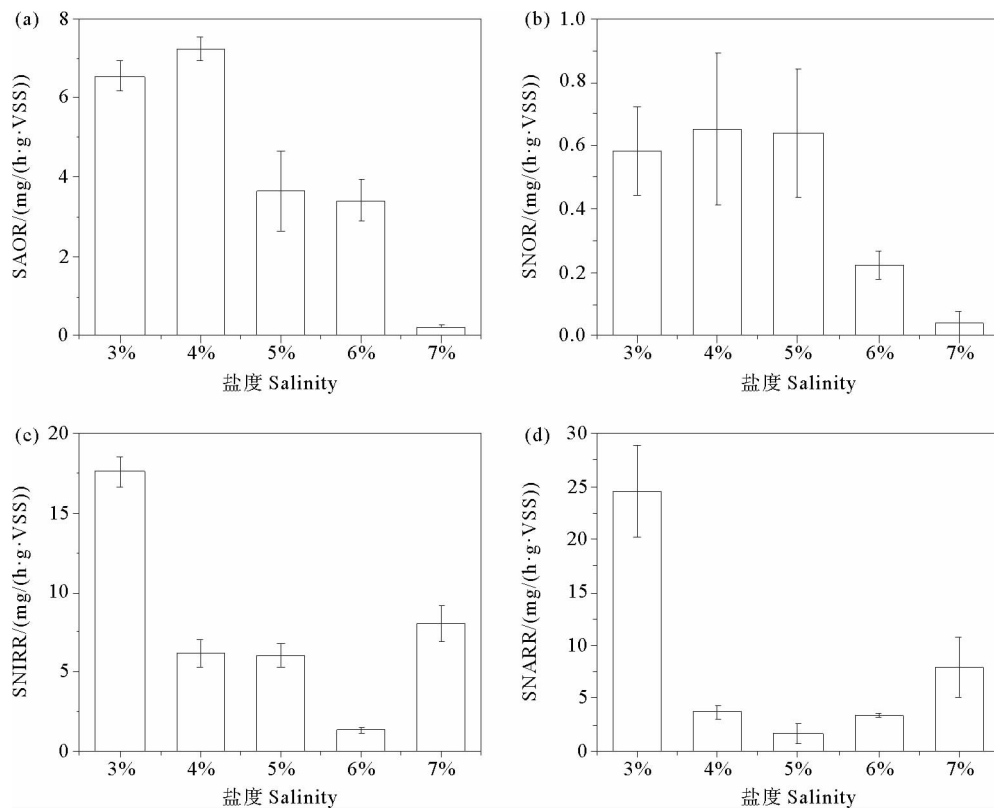


图 3 不同盐度时活性污泥的硝化速率和反硝化速率

Fig.3 The nitrogen removal rate of halotolerant activated sludge under different salinities

不同盐度下活性污泥的耗氧速率如图 4 所示。 $\text{SOUR}_{\text{异养}}$ 、 $\text{SOUR}_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ 、 $\text{SOUR}_{\text{NO}_2^-\text{-N}}$ 和 TSOUR 均在提升盐度后明显减小,这是因为盐度升高细胞渗透压提高,导致细胞脱水、裂解和活性丧失,从而使污泥的耗氧活性降低^[1]。升高盐度对 $\text{SOUR}_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ 的抑制作用最明显,使 $\text{SOUR}_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ 从 3%盐度时的 $2.499 \text{ mg} \cdot (\text{min} \cdot$

$\text{g VSS})^{-1}$ 降至 $0.300 \text{ mg} \cdot (\text{min} \cdot \text{g VSS})^{-1}$ 以下,减少了 88.7%~99.0%。4%盐度时 $\text{SOUR}_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ 仅为 3%盐度时的 1.0%,而 SAOR 却在 4%盐度时最高,这是由于 SAOR 和 $\text{SOUR}_{\text{NH}_4^+\text{-N}}$ 的测定条件不同导致参与反应的微生物不同,因而指标意义不同。SAOR 测定结果体现了活性污泥中所有氨氧化菌参与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 转

化的反应速率, $SOUR_{NH_4^+-N}$ 测定结果表征一种氨氧化菌属 *Nitrosomonass* 参与 NH_4^+-N 氧化反应的耗氧速率^[13], 由于不同氨氧化菌对盐度适应条件不同导致 SAOR 与 $SOUR_{NH_4^+-N}$ 随盐度提升表现出不同的变化特征, 依据 2.3.3 节脱氮功能菌分析结果可知, 盐度由 3% 升至 4% 后菌属 *Nitrosomonas* 的丰度降低, 另一种氨氧化菌属 *Limnohabitans* 被检出, 且两种菌属的总丰度与 3% 盐度时相同, 这从微生物角度说明了 4% 盐度时 $SOUR_{NH_4^+-N}$ 值较低但 SAOR 较高的原因; 同时, 4% 盐度下较高的氨氧化菌总丰度也可以解释, 为什么此盐度时 $SOUR_{NH_4^+-N}$ 最低但可以实现高达 95% 以上的

NH_4^+-N 去除率。目前, 有关 SAOR 与 $SOUR_{NH_4^+-N}$ 随盐度提升呈现不同变化趋势的研究尚未见有文献报道, 笔者认为这方面内容有必要以后进行更深入的研究。盐度由 3% 提升到 4% 时, SNOR 与 $SOUR_{NO_2^- -N}$ 也存在变化趋势不同的问题, 但本研究缺乏充足的实验结果给予合理的解释, 有待以后进一步研究。与 $SOUR_{NH_4^+-N}$ 和 $SOUR_{NO_2^- -N}$ 相比, $SOUR_{异养}$ 在 4%~6% 盐度下, 受到的抑制作用较弱, 说明硝化菌对升高盐度比异养菌更敏感; 而在 7% 盐度下, $SOUR_{异养}$ 降低了 92.1%, 异养菌在该盐度下受到强烈的抑制, 导致 COD 去除率降低。

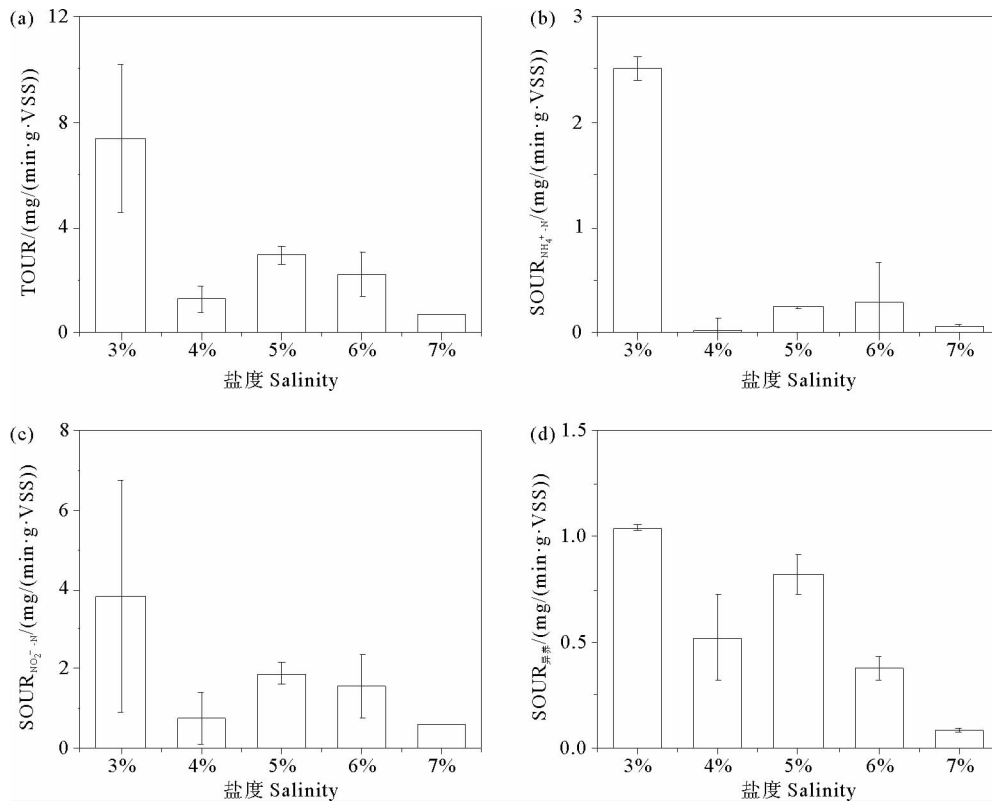


图 4 不同盐度时活性污泥的耗氧速率

Fig.4 The oxygen update rate of halotolerant activated sludge under different salinities

2.3 微生物群落结构分析

2.3.1 微生物群落多样性及丰富度 为了探究升高盐度对微生物群落的影响, 取 3%、4%、6% 和 7% 盐度 SBR 中的活性污泥进行高通量测序, 从分子生物学角度分析了不同盐度条件下微生物群落的结构。微生物群落多样性及丰富度指标如表 1 所示, 所有样品的测序覆盖率均大于 0.99, 说明测序结果可以合理地反映样品中的微生物群落结构。Shannon 和 Simpson 指数在 3%~6% 盐度条件下随盐度升高而升高, 微生物群落多样性升高, 而在 7% 盐度时减小。与之类似, 表示微生物群落丰富度的指标, Chao1 和 ACE 指数也在 6% 盐度时达到最大。微生物群落多样性和丰富度指

标的变化趋势表明, 当盐度在 3%~6% 范围内时, 微生物群落多样性和丰富度均随盐度升高而升高; 而在 7% 盐度条件下, 部分微生物受到高盐度的抑制, 导致微生物群落多样性和丰富度降低。

2.3.2 微生物群落结构变化 四个污泥样品中共检出 18 个菌门, 相对丰度 $\geq 1\%$ 的菌门如图 5 所示, 优势菌门包括 Proteobacteria (变形菌, 44.20%~68.10%)、Bacteroidetes (拟杆菌, 18.60%~41.90%)、Planctomycetes (浮霉菌, 0.80%~8.00%)、Chloroflexi (绿弯菌, 0.80%~5.70%) 和 Ignavibacteriae (1.60%~3.40%)。变形菌和拟杆菌在所有盐度下相对丰度最高, 是废水处理系统中最常见的菌门^[9], 通常作为异养

菌和脱氮功能菌(氨氧化菌、亚硝酸盐氧化菌和反硝化菌)参与到废水处理过程中^[17-18]。变形菌的丰度在 4% 盐度时达到最低,盐度由 4% 升高到 7% 时,其丰度随盐度升高而升高;变形菌是含盐/高盐废水处理系统中的主要耐盐菌^[10]。拟杆菌的相对丰度在 4% 盐度时最大,丰度随盐度进一步升高而减小,绿弯菌门和 Ignavi-

bacteriae 的变化趋势与之相似,这说明拟杆菌、绿弯菌和 Ignavibacteriae 具有较好的耐盐性^[19-20]且适宜盐度在 4% 左右。浮霉菌在 6% 和 7% 盐度条件下,相对丰度较 3% 和 4% 盐度有了大幅提高,该菌门广泛存在于咸水和淡水环境中^[21],在有机物降解和氮循环过程中起重要作用^[22-23]。

表 1 微生物群落多样性和丰富度指数

Table 1 The diversity and richness indices of microbial community

盐度 Salinity	有效序列数 Effective sequences	OTUs	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	样品覆盖率 Good's coverage
3%	75896	340	4.53	0.89	397.0	390.4	0.998
4%	65494	401	4.76	0.91	420.4	437.7	0.998
6%	71482	398	4.96	0.92	442.1	448.0	0.998
7%	80123	348	4.56	0.89	417.7	420.1	0.998

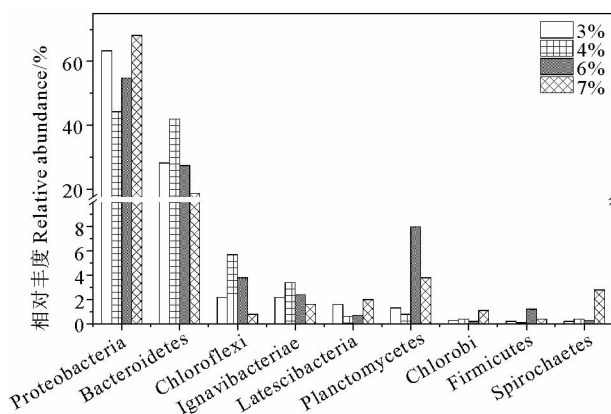


图 5 不同盐度下各菌门的相对丰度

Fig.5 The relative abundance of phyla under different salinities

由属水平上的微生物群落结构分析(见图 6)可知,优势菌属在不同盐度表现出差异性,*Roseovarius* 是 3% 盐度时相对丰度最高的属(35.9%),当盐度提高至 4%、6% 和 7%,其丰度分别降至 7.0%、8.0% 和 5.0%,该菌属具有耐盐性和嗜盐性^[8],3% 盐度为其较适宜生长盐度。*Azoarcus* 的丰度随盐度升高而增大,成为盐度 4%~7% 时相对丰度最高的属(21.00%~42.40%);但据 Osaka 等^[24]报道,*Azoarcus* 的丰度在盐度为 1%~3% 时呈上升趋势,但不能适应 4% 的盐度;两种结果的差异性可能是由于本实验所用接种污泥在 3% 盐度下长时间的驯化使 *Azoarcus* 中耐盐或嗜盐种进一步富集,从而提高了该属在高盐条件下的适应性。*Candidatus_Competibacter* 在盐度 4~7% 时相对丰度随盐度升高呈降低趋势,*Thioclava*、*Sedimenticola* 和 *Candidatus_Accumulibacter* 只在 3% 盐度条件下是优势菌属,以上四种菌属具有一定耐盐性^[3, 25-29]但

不能适应 4%~7% 的超高盐度。*Phaeodactylibacter* 和 *Marinicella* 的相对丰度在 6% 盐度时达到最大值,具有良好的耐盐性。一些嗜盐菌只在高盐度下富集,如 *Muricauda*、*SM1A02*、*Marinobacter*、*Desulfofipila*、*Spirochaeta_2* 和 *Marinobacterium*。*SM1A02* 是 6% 盐度下丰度位居第三的属,丰度达 7.20%;*Desulfofipila* 的丰度在 7% 盐度时为 8.80%,仅次于 *Azoarcus*,有报道称 *Desulfofipila* 可以在 8% 盐度下生存^[1];而 *Marinobacterium* 被报道为 7% 盐度下的优势菌^[2]。无机盐离子浓度对嗜盐菌保持细胞增殖和胞内酶活性至关重要,大多数嗜盐菌无法在低盐度下生存^[17]。

2.3.3 功能菌分析 微生物群落脱氮功能菌的分析是了解不同盐度下脱氮性能变化的重要途径。四个活性污泥样品中仅检测出两种氨氧化菌(AOB),即 *Nitrosomonas*(亚硝化单胞菌属)和 *Limnohabitans*,总丰度在 3%、4%、6% 和 7% 盐度时分别为 0.20%、0.20%、0.10% 和 0.00%。与 3% 盐度相比,4% 的盐度对 *Nitrosomonas* 产生抑制作用,*Nitrosomonas* 丰度降至 0.1%,导致活性污泥的 $\text{SOUR}_{\text{NH}_4^+-\text{N}}$ 降低(见图 4(b)),但 4% 盐度时还检出了氨氧化菌属 *Limnohabitans*,使 AOB 总丰度与 3% 盐度相同,较高丰度的氨氧化菌使 4% 盐度的 SAOR 和 NH_4^+-N 去除效果保持了较高水平(见图 2(b),图 3(a))。而当盐度超过 6% 时,AOB 受到抑制,7% 盐度时 AOB 被完全抑制,从而导致该盐度下 NH_4^+-N 去除率降低。所有样品中均未检出亚硝酸盐氧化菌(NO₂),这为本研究呈现的高亚硝酸盐累积率和低亚硝酸盐氧化活性提供了分子生物学依据,可以解释为什么各盐度条件下主要脱氮途径均为短程硝化反硝化。

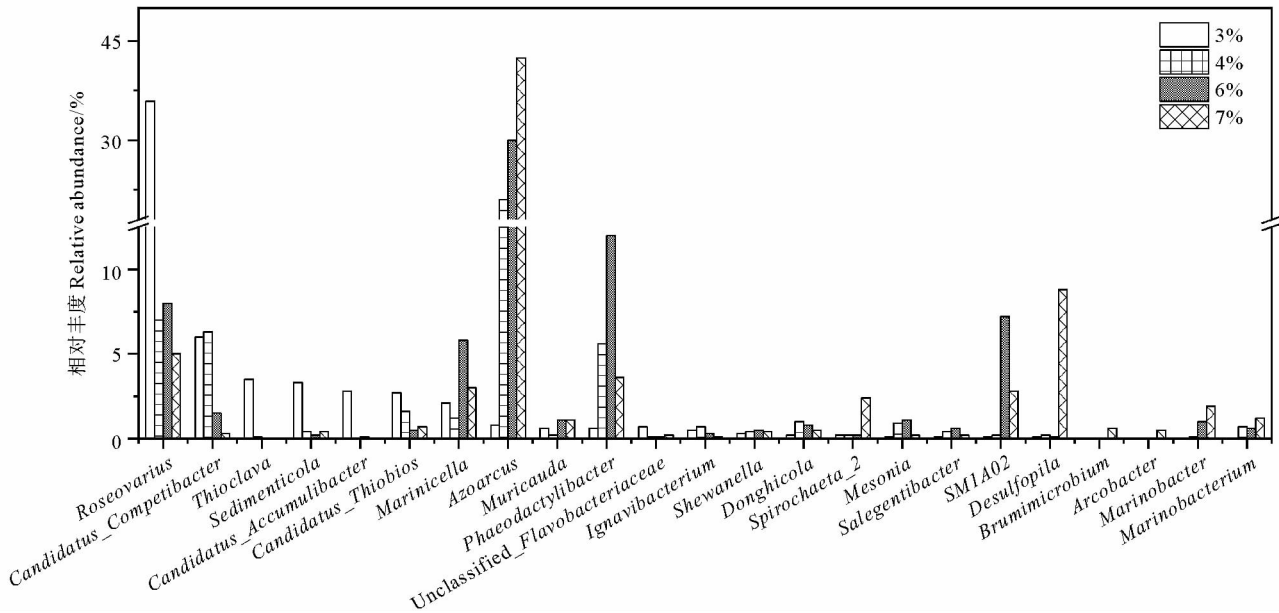


图6 不同盐度下优势菌属的相对丰度

Fig.6 The relative abundance of predominant genus under different salinities

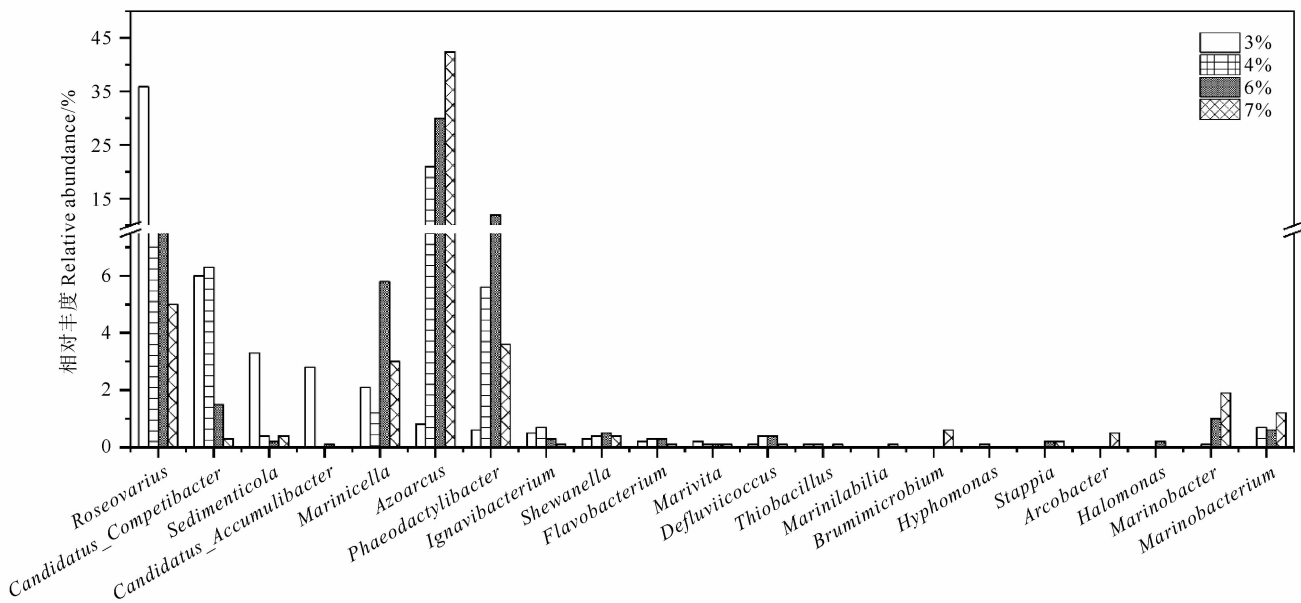


图7 反硝化菌属相对丰度

Fig.7 The relative abundance of genus with function of denitrification

本研究共检出 21 种反硝化菌属 (DNB), 如图 7 所示。Candidatus _ Competibacter、Sedimenticola 和 Candidatus_Accumulibacter 是 3% 盐度时最主要的反硝化菌, 丰度分别为 6.00%、3.30% 和 2.80%, Candidatus _ Competibacter 的丰度在 4% 盐度时升高至 6.30%, 随盐度进一步提高至 5% 和 6% 而下降, Sedimenticola 和 Candidatus_Accumulibacter 的丰度随着盐度的升高均降至 0.5% 以下。Candidatus_Accumulibacter 是一种反硝化聚磷菌, 可将 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 作为电子受

体吸收磷^[28], 对盐度变化不敏感^[26]。反硝化菌 Azoarcus 可利用有机物或无机物做电子供体进行反硝化^[29-30], 是 4%、6% 和 7% 盐度时丰度最高的反硝化菌, 丰度分别为 21.00%、30.00% 和 42.40%。此外, Phaeodactylibacter、Marinobacter 和 Marinobacterium 只在较高盐度下富集, 耐盐/嗜盐 DNB 在高盐度下的富集保证了反硝化效果。Candidatus _ Competibacter 和 Defluviicoccus^[31] 为典型的聚糖菌 (GAOs)^[28], 可将外部碳源转化为聚 β -羟基烷酸 (PHA) 储存在细胞

内,为缺氧条件下 NO_2^- -N 或 NO_3^- -N 还原提供碳源^[7]。*Sedimenticola* 和 *Thiobacillus* 是基于硫氧化的自养反硝化菌,通过氧化还原态硫(S^{2-} , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 等)为 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 还原提供电子^[25, 32-33]。*Halomonas* 是具有好氧反硝化功能的嗜盐菌^[17],只在 6% 盐度时检出(丰度为 0.20%)。耐盐菌 *Ignavibacterium* 在 6% 盐度时丰度最高(0.70%),具有厌氧氨氧化(ANAMMOX)能力,可在厌氧条件下利用 NO_2^- -N 作为电子供体,氧化 NH_4^+ -N 进行脱氮^[34]。多种脱氮功能菌属的存在说明,本试验中短程自养硝化-异养反硝化不是唯一的脱氮途径,自养反硝化、好氧反硝化和厌氧氨氧化也是可能存在的氮去除方式。

3 结论

本研究结果表明,在 3% 盐度条件下长期驯化的活性污泥可以在超高盐度条件下实现较好的有机物和氮去除效果,但污泥的微生物活性和群落结构随盐度升高发生明显变化。

(1) 经过 3% 盐度驯化的活性污泥可以在 4%~6% 盐度下实现较好的 COD、 NH_4^+ -N 和 TIN 去除效果,去除率均保持在 97% 以上;当盐度升高至 7% 时,盐度对 COD、 NH_4^+ -N 和 TIN 去除效果产生明显影响,去除率分别降低了 4.7%、12.0% 和 12.8%。

(2) 盐度为 4% 时,SAOR 和 SNOR 较接种污泥升高了 10.9% 和 11.8%,5%~7% 盐度对污泥 SAOR 产生了明显抑制作用,SNOR 在 6%~7% 盐度下受到强烈抑制。反硝化活性 SNIRR 和 SNARR 随盐度升高值 5%~7% 分别降低了 54.3%~92.3% 和 67.6%~95.1%。与异养菌相比,硝化菌的耗氧速率更易受到盐度的影响。

(3) 盐度提高使微生物群落结构发生了明显的变化。变形菌门和拟杆菌门是所有盐度条件下的优势菌门;*Roseovarius* 是 3% 盐度条件下丰度最高的属,当盐度升至 4%~7% 时优势菌属演变为 *Azoarcus*。3%、4% 和 6% 盐度的活性污泥样品中均检测出氨氧化菌,亚硝酸盐氧化菌在所有条件下均未检出;本研究中短程自养硝化-异养反硝化是主要脱氮方式,自养反硝化、好氧反硝化和厌氧氨氧化等也是可能的氮去除途径。

参考文献:

- [1] Wang Z C, Gao M C, She Z L, et al. Effects of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor[J]. Separation and Purification Technology, 2015, 144: 223-231.
- [2] Qu J H, Chen X L, Zhou J, et al. Treatment of real sodium saccharin wastewater using multistage contact oxidation reactor and microbial community analysis[J]. Bioresource Technology, 2019, 289: 121714.
- [3] Wang J L, Gong B Z, Huang W, et al. Bacterial community structure in simultaneous nitrification, denitrification and organic matter removal process treating saline mustard tuber wastewater as revealed by 16S rRNA sequencing[J]. Bioresource Technology, 2017, 228: 31-38.
- [4] She Z L, Zhao L T, Zhang X L, et al. Partial nitrification and denitrification in a sequencing batch reactor treating high-salinity wastewater[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 288: 207-215.
- [5] 渠光华. 超高盐榨菜废水微电解-电解预处理工艺研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2012.
Qu G H. Study on Pretreatment Technology for Ultrahigh-salt Tuber Mustard by Micro-Electrolysis and Electrolysis[D]. Chongqing: Chongqing University, 2012.
- [6] 王玉凤. SBR 工艺处理高盐含酚废水及活性污泥群落结构研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2014.
Wang Y F. Treatment of High Salinity Phenol-Laden Wastewater Using a Sequencing Batch Reactor and Dynamics of Microbial Community Structure During the Treatment Process[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2014.
- [7] 韩亚琳, 王福浩, 王群, 等. 运行模式对同步短程硝化反硝化脱氮及微生物群落特征的影响[J]. 环境工程, 2021, 39(1): 51-57.
Han Y L, Wang F H, Wang Q, et al. Effect of operational mode on nitrogen removal and microbial community in the process of simultaneous partial nitrification and denitrification[J]. Environmental Engineering, 2021, 39(1): 51-57.
- [8] Xia Z G, Wang Q, She Z L, et al. Nitrogen removal pathway and dynamics of microbial community with the increase of salinity in simultaneous nitrification and denitrification process[J]. Science of the Total Environment, 2019, 697: 134047.
- [9] Luján-Facundo M J, Fernández-Navarro J, Alonso-Molina J L, et al. The role of salinity on the changes of the biomass characteristics and on the performance of an OMBR treating tannery wastewater [J]. Water Research, 2018, 142: 129-137.
- [10] He Q L, Wang H Y, Chen L, et al. Robustness of an aerobic granular sludge sequencing batch reactor for low strength and salinity wastewater treatment at ambient to winter temperatures [J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 384: 121454.
- [11] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法(第四版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2001.
State Environmental Protection Agency. Determination Methods for Examination of Water and Wastewater (fourth edition)[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2001.
- [12] She Z L, Wu L, Wang Q, et al. Salinity effect on simultaneous nitrification and denitrification, microbial characteristics in a hybrid sequencing batch biofilm reactor[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(1): 65-75.
- [13] Surmacz-Gorska J, Gernaey K, Demuyne C, et al. Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements[J]. Water Research, 1996, 30(5): 1228-1236.
- [14] Panswad T, Anan C. Specific oxygen, ammonia, and nitrate uptake rates of a biological nutrient removal process treating elevated salinity wastewater[J]. Bioresource Technology, 1999, 70(3): 237-243.

- [15] Wang Z C, Gao M C, Wei J F, et al. Long-term effects of salinity on extracellular polymeric substances, microbial activity and microbial community from biofilm and suspended sludge in an anoxic-aerobic sequencing batch biofilm reactor[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016, 68: 275-280.
- [16] 张磊. 盐度和苯胺对序批式反应器性能影响的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
Zhang L. Effects of Salinity and Aniline on the Performance of Sequencing Batch Reactors[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.
- [17] Pan Z L, Zhou J, Lin Z Y, et al. Effects of COD/TN ratio on nitrogen removal efficiency, microbial community for high saline wastewater treatment based on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 301: 122726.
- [18] Huang Z R, Liu F, Luo P, et al. Pilot-scale constructed wetlands for swine wastewater treatment; Microbial community analysis in bacterioplankton and epiphyton and options for resource recovery [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2020, 37: 101466.
- [19] Yuan Y, Zhou Z, Jiang J, et al. Partial nitrification performance and microbial community evolution in the membrane bioreactor for saline stream treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 320: 124419.
- [20] Wang Q, Ding J W, Xie H J, et al. Phosphorus removal performance of microbial-enhanced constructed wetlands that treat saline wastewater [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 188: 125119.
- [21] Ma X C, Li X K, Wang X W, et al. Impact of salinity on anaerobic microbial community structure in high organic loading purified terephthalic acid wastewater treatment system [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 383: 121132.
- [22] Cai Q Q, Wu M Y, Li R, et al. Potential of combined advanced oxidation-Biological process for cost-effective organic matters removal in reverse osmosis concentrate produced from industrial wastewater reclamation; Screening of AOP pre-treatment technologies[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 389: 123419.
- [23] 卜魁勇, 帅异莹, 周少雄, 等. 微生物膜法处理高含盐废水的细菌群落特征[J]. *工业安全与环保*, 2019, 45(8): 92-95.
Bu K Y, Shuai Y Y, Zhou S X, et al. Characteristics of bacterial community in high-salinity wastewater treatment plant by biological contact oxidation[J]. *Industrial Safety and Environmental Protection*, 2019, 45(8): 92-95.
- [24] Osaka T, Shirohani K, Yoshie S, et al. Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process[J]. *Water Research*, 2008, 42(14): 3709-3718.
- [25] Cui Y X, Biswal B K, van Loosdrecht M C M, et al. Long term performance and dynamics of microbial biofilm communities performing sulfur-oxidizing autotrophic denitrification in a moving-bed biofilm reactor[J]. *Water Research*, 2019, 166: 115038.
- [26] Xu F, Ouyang D L, Rene E R, et al. Electricity production enhancement in a constructed wetland-microbial fuel cell system for treating saline wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 288: 121462.
- [27] Chen Y J, He H J, Liu H Y, et al. Effect of salinity on removal performance and activated sludge characteristics in sequencing batch reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 890-899.
- [28] Fan Z W, Zeng W, Wang B G, et al. Microbial community at transcription level in the synergy of GAOs and *Candidatus Accumulibacter* for saving carbon source in wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 297: 122454.
- [29] Zhang L F, Fu G K, Zhang Z. Long-term stable and energy-neutral mixed biofilm electrode for complete nitrogen removal from high-salinity wastewater; Mechanism and microbial community [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 123660.
- [30] Sun G Z, Zhu Y F, Saeed T, et al. Nitrogen removal and microbial community profiles in six wetland columns receiving high ammonia load[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 203: 326-332.
- [31] Li D C, Gao J F, Dai H H, et al. Long-term responses of antibiotic resistance genes under high concentration of enrofloxacin, sulfadiazine and triclosan in aerobic granular sludge system[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 312: 123567.
- [32] Xu X C, Zhang R, Jiang H B, et al. Sulphur-based autotrophic denitrification of wastewater obtained following graphite production: Long-term performance, microbial communities involved, and functional gene analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 306: 123117.
- [33] 马潇然, 郑照明, 卞伟, 等. 硫自养反硝化系统运行效能和微生物群落结构研究[J]. *中国环境科学*, 2020, 40(10): 4335-4341.
Ma X R, Zheng Z M, Bian W, et al. Study on operation efficiency and microbial community structure of sulfur-based autotrophic denitrification system[J]. *China Environmental Science*, 2020, 40(10): 4335-4341.
- [34] Zhang Q Q, Bai Y H, Wu J, et al. Microbial community evolution and fate of antibiotic resistance genes in anammox process under oxytetracycline and sulfamethoxazole stresses[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 293: 122096.

The Effects of Hypersaline Wastewater on Nitrogen Removal, Microbial Activity and Community of Halotolerant Activated Sludge

Wang Xu¹, Wang Fuhao², Wu Lan¹, She Zonglian¹

(1. The Key Lab of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2. Qingdao Water Group Corporation Limited, Qingdao 266021, China)

Abstract: Halotolerant activated sludge under 3‰ salinity was seeded to treat hypersaline wastewater, to demonstrate the effects of salinity rising to 4‰~7‰ on performance, microbial activity and community. The results showed that the removal of COD, ammonia and total inorganic nitrogen (TIN) was hardly affected by 4‰, 5‰ and 6‰ salinity, while that decreased at 7‰ salinity. Specific ammonia oxidizing rate (SAOR) and specific nitrite oxidizing rate (SNOR) were promoted by 4‰ salinity. SAOR was significantly inhibited under 5‰, 6‰ and 7‰ salinity, while SNOR decreased at 6‰ and 7‰ salinity significantly. Specific nitrite reducing rate (SNIRR) and specific nitrate reducing rate (SNARR) were obviously inhibited by increasing salinity. The results of specific oxygen uptake rate (SOUR) tests indicated that increasing salinity had a greater influence on autotrophic nitrifying organisms than heterotrophic aerobic bacteria. Microbial community structure changed significantly with increasing salinity. The diversity and richness of microbial community were highest at 6‰ salinity. *Roseovarius* was the predominant genus at 3‰ salinity, while the most abundant genus changed to *Azoarcus* when salinity increased from 3‰ to 4‰~7‰. Ammonia oxidation bacteria (AOB) were only detected under 3‰, 4‰ and 6‰ salinity, while nitrite oxidation bacteria (NOB) were not detected in all samples. In this study, partial nitrification and denitrification (PND) was the main nitrogen removal pathway. In addition, autotrophic and aerobic denitrifiers and ANAMMOX bacteria were detected, confirming that traditional nitrification and denitrification process was not the only nitrogen removal pathway. Salinity acclimation had improved the salt resistance of activated sludge and had made it possible to treat hypersaline wastewater by biological methods.

Key words: salinity; SBR; halotolerant sludge; microbial activity; microbial community

责任编辑 徐 环