

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2220520103

**耐盐异养硝化好氧反硝化菌驯化及其
强化高盐废水脱氮研究**

**DOMESTICATION OF SALT-TOLERANT
HETEROTROPHIC NITRIFYING AEROBIC
DENITRIFYING BACTERIA AND ITS
ENHANCED NITROGEN REMOVAL FROM
HIGH-SALINITY WASTEWATER**

论 文 作 者: 王翠翠

校 内 导 师: 李艳宾(教授)

校 外 导 师: 唐金鹏

专业学位类别: 生物与医药

研究方向(领域): 生物技术与工程

论文答辩日期: 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：王翠翠

日期：2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：王翠翠

日期：2025 年 5 月 15 日

指导教师签名：李艳兵

日期：2025 年 5 月 15 日

耐盐异养硝化好氧反硝化菌驯化及其 强化高盐废水脱氮研究

摘 要

随着工业的快速发展，高盐含氮废水的排放量日益增加，导致水体富营养化，已成为水污染控制工程领域亟待解决的重要课题。传统处理方法如物化法和生物法虽已应用，但存在处理时间长、成本高、微生物活性易受抑制等缺点。生物强化技术通过投加特定微生物，可提高污水处理系统对污染物的去除效率，在废水处理领域有着广阔的应用前景。本研究将实验室保存的一株异养硝化好氧反硝化(HNAD)菌株 *Acinetobacter* sp. AHP123 进行耐盐驯化并强化活性污泥系统处理高盐含氮废水，对其运行条件进行了优化，旨在为高盐含氮废水处理提供新的思路与方法。主要研究结果如下：

(1) 以菌株 *Acinetobacter* sp. AHP123 为研究对象，通过向混合氮源培养基中添加不同浓度的 NaCl，研究不同盐胁迫下对菌株生长和脱氮性能的影响。结果表明，菌株能在 0%-2% 的 NaCl 浓度下生长，但随着盐浓度的升高会抑制菌株的生长和脱氮速率。以 1% NaCl 浓度为初始驯化盐浓度，反复驯化 15 代后氨氮和 COD 在 24 h 时的去除率达到稳定分别为 97.02%、70.14%，驯化完成的菌株命名为 *Acinetobacter* sp. AHP1231；继续提高 NaCl 浓度至 1.5%，进行第二轮

驯化，传代 40 代后，COD 和氨氮去除率分别达到 69.55%和 69.59%，较未驯化时氨氮去除率提高了 2.27 倍，驯化完成的菌株命名为 *Acinetobacter* sp. AHP1232。

(2) 对取自污水处理厂的回流污泥使用人工配置的含盐含氮废水进行逐级驯化，监测驯化过程中活性污泥性能指标，并每天定时取上清测定活性污泥对废水中 COD 及氨氮的去除效果。结果显示，在驯化期间污泥浓度稳定升高。在盐胁迫下，随着驯化进行，活性污泥可以处理含 NaCl 浓度为 1%且氨氮浓度为 100 mg/L 左右的废水，此时 COD 和氨氮去除率分别可达 91.56%和 98.48%；处理高浓度氨氮废水时，通过调整碳源添加量，驯化后的活性污泥可以处理氨氮浓度为 200 mg/L 的废水，最终 COD 去除率为 75.36%，氨氮去除率为 76.72%，表明驯化后的活性污泥对高盐含氮废水具有良好的处理能力。

(3) 对五种驯化完成的活性污泥系统进行高通量测序：ASA(100 mg/L 氨氮)、ASB(100 mg/L 氨氮、0.5% NaCl)、ASC(100 mg/L 氨氮、1% NaCl)、ASD(150 mg/L 氨氮)、ASE(200 mg/L 氨氮)。在门水平上，ASA、ASB、ASC 系统中 *Patescibacteria*（骸骨菌门）相对丰度分别为 39.39%、32.13%、4.84%，表明骸骨菌门不能适应较高 NaCl 浓度环境。*Bacteroidota*（拟杆菌门）在 ASD、ASE 中相对丰度较 ASA 分别提高了 1.52 倍和 1.63 倍。在属水平上，ASC 的优势菌属变为 *Propionibacterium*（丙酸杆菌属），相对丰度为 15.15%，表明在盐胁迫下，丙酸杆菌属具有更强的生存能力。根据代谢功能预测显示，碳水化合物代谢的相对丰度随着废水中盐浓度的升高而升高，

分别为 8.45%、9.37%、10.06%、9.29%、8.46%，展现了活性污泥系统在碳水化合物代谢上对盐浓度胁迫的适应性。随着 NaCl 浓度的提高，脂质代谢的相对丰度提高，表明细胞膜稳定性逐渐增强。

(4) 初步探讨了 *Acinetobacter* sp. AHP1231 强化 ASE 系统处理高盐高氮废水的效果。实验结果发现，在第 12 h 时，生物强化系统中氨氮污染物去除率能达到 98.56%，而此时仅添加菌株 AHP1231 和仅添加活性污泥两组处理组对氨氮的去除效果相对较差，分别为 60.25%和 55.02%。AHP1231 的添加能够强化活性污泥系统对氨氮去除效率。根据运行优化工艺条件，当添加 9 g/L 葡萄糖和 3 g/L 丁二酸钠、接种量为 5%、温度为 25 °C 时，该生物强化系统的脱氮效果最好，处理 24 h 时，氨氮（200 mg/L）去除率达到 98.75%，总氮（200 mg/L）去除率达到 85.08%，总磷（59.22 mg/L）去除率达到 89.91%，COD 浓度从 7784.38 mg/L 降到 767.88 mg/L，去除率为 90.14%。并通过分别对不添加菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 系统 AS0 以及添加了菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 的强化系统 AS1 进行微生物群落分析，发现系统中 *Acinetobacter* 的相对丰度由 AS0 中的 0.63%增加到了 AS1 中的 38.11%，说明菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 能够在强化系统中很好的定殖，且 *Acinetobacter* sp. AHP1231 的添加改变了系统中微生物群落结构。

关键词：异养硝化好氧反硝化，*Acinetobacter* sp.，高盐高氮废水，长期驯化，生物强化，微生物群落结构

DOMESTICATION OF SALT-TOLERANT HETEROTROPHIC NITRIFYING AEROBIC DENITRIFYING BACTERIA AND ITS ENHANCED NITROGEN REMOVAL FROM HIGH-SALINITY WASTEWATER

ABSTRACT

With the rapid development of industry, the discharge of high-salinity nitrogen-containing wastewater has been increasing, leading to water eutrophication and inhibition of microbial activity, which has become a critical issue to be addressed in the field of water pollution control engineering. Although traditional treatment methods such as physicochemical and biological approaches have been applied, they suffer from drawbacks such as long processing time, high cost, and susceptibility to microbial activity inhibition. Bioaugmentation technology, which involves the addition of specific microorganisms, can enhance the pollutant removal efficiency of wastewater treatment systems and holds broad application prospects in wastewater treatment. In this study, a heterotrophic nitrification-aerobic denitrification (HNAD) strain,

Acinetobacter sp. AHP123, preserved in the laboratory, was subjected to salt tolerance acclimation and used to enhance an activated sludge system for treating high-salinity nitrogen-containing wastewater. The operational conditions were optimized to provide new insights and methods for the treatment of such wastewater. The main findings are as follows:

(1) The strain *Acinetobacter* sp. AHP123 was investigated by adding different concentrations of NaCl to a mixed nitrogen-source medium to study the effects of salt stress on its growth and nitrogen removal performance. The results indicated that the strain could grow at NaCl concentrations of 0%–2%, but its growth and denitrification rates were inhibited as the salt concentration increased. With an initial acclimation NaCl concentration of 1%, after 15 generations of repeated acclimation, the removal rates of ammonia nitrogen and COD stabilized at 97.02% and 70.14%, respectively, at 24 h. The acclimated strain was named *Acinetobacter* sp. AHP1231. Subsequently, the NaCl concentration was increased to 1.5% for a second round of acclimation. After 40 generations, the COD and ammonia nitrogen removal rates reached 69.55% and 69.59%, respectively, with the ammonia nitrogen removal rate being 2.27 times higher than that of the non-acclimated strain. The resulting strain was named *Acinetobacter* sp. AHP1232.

(2) Return sludge collected from the secondary sedimentation tank of a wastewater treatment plant was acclimated stepwise using artificially

prepared saline nitrogen-containing wastewater. Indicators such as sludge volume index (SV_{30}), mixed liquor suspended solids (MLSS), and sludge volume index (SVI) were monitored, and the supernatant was sampled daily to measure the removal efficiency of COD and ammonia nitrogen by the activated sludge. The results showed that the sludge concentration increased steadily during acclimation. Under salt stress, the acclimated activated sludge could treat wastewater containing 1% NaCl and approximately 100 mg/L ammonia nitrogen, with COD and ammonia nitrogen removal rates reaching 91.56% and 98.48%, respectively. For high-concentration ammonia nitrogen wastewater, by adjusting the carbon source dosage, the acclimated activated sludge could treat wastewater with an ammonia nitrogen concentration of 200 mg/L, achieving final COD and ammonia nitrogen removal rates of 75.36% and 76.72%, respectively. This demonstrated that the acclimated activated sludge exhibited excellent treatment capability for high-salinity nitrogen-containing wastewater.

(3) High-throughput sequencing was performed on five domesticated activated sludge systems: ASA (100 mg/L NH_4^+-N), ASB (100 mg/L NH_4^+-N , 0.5% NaCl), ASC (100 mg/L NH_4^+-N , 1% NaCl), ASD (150 mg/L NH_4^+-N), and ASE (200 mg/L NH_4^+-N). At the phylum level, the relative abundances of *Proteobacteria* in ASA, ASB, and ASC were 39.39%, 32.13%, and 4.84%, respectively. It was demonstrated that

Patescibacteria could not adapt to high NaCl concentrations. The relative abundance of *Bacteroidota* in ASD and ASE was increased by 1.52-fold and 1.63-fold compared to ASA. At the genus level, *Propionibacterium* was found to be the dominant genus in ASC (15.15%). This indicated that *Propionibacterium* had stronger survival ability under salt stress. Based on metabolic function prediction, the relative abundance of carbohydrate metabolism was observed to increase with rising salt concentrations (8.45%, 9.37%, 10.06%, 9.29%, 8.46%). This suggested that the activated sludge system adapted to salt stress through enhanced carbohydrate metabolism. Additionally, lipid metabolism was enhanced with increasing NaCl concentrations, indicating improved cell membrane stability.

(4) The enhancement effect of *Acinetobacter* sp. AHP1231 on the ASE system for treating high-salinity and high-nitrogen wastewater was preliminarily investigated. It was found that at 12 h, the ammonia nitrogen removal rate in the bioaugmented system reached 98.56%, whereas the removal efficiencies in the control groups (only strain AHP1231 or only activated sludge) were significantly lower, at 60.25% and 55.02%, respectively. The addition of AHP1231 was demonstrated to enhance the ammonia nitrogen removal efficiency of the activated sludge system. Under optimized operational conditions (9 g/L glucose, 3 g/L sodium succinate, 5% inoculation volume, and 25 °C), the bioaugmented system exhibited the best nitrogen removal performance. After 24 h of

treatment, the removal rates of ammonia nitrogen (200 mg/L), total nitrogen (200 mg/L), and total phosphorus (59.22 mg/L) reached 98.75%, 85.08%, and 89.91%, respectively, while the COD concentration decreased from 7784.38 mg/L to 767.88 mg/L, achieving a removal rate of 90.14%. The results showed that the relative abundance of *Acinetobacter* increased from 0.63% in AS0 to 38.11% in AS1, indicating that *Acinetobacter* sp.AHP1231 could colonize well in AS0 and the addition of *Acinetobacter* sp.AHP1231 changed the microbial community structure in AS1.

Wang Cuicui (Biology and Medicine)

Supervised by Li Yanbin

KEY WORDS: heterotrophic nitrification, *Acinetobacter* sp., aerobic denitrification, high salinity and high nitrogen wastewater, long-term acclimation, bioaugmentation, microbial community structure

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 高盐浓度氨氮废水的来源及危害	1
1.2 高盐浓度氨氮废水处理方法及存在问题	2
1.2.1 处理方法	2
1.2.2 存在的问题分析	3
1.3 异养硝化好氧反硝化菌的脱氮研究	4
1.3.1 异养硝化好氧反硝化菌的首次分离	4
1.3.2 异养硝化好氧反硝化的作用机理	4
1.4 生物强化技术	7
1.4.1 生物强化技术概述	7
1.4.2 生物强化技术在废水处理领域中的应用	8
1.5 课题研究内容、意义和技术路线图	10
1.5.1 研究内容	10
1.5.2 研究意义	10
1.5.3 技术路线	11
第 2 章 异养硝化好氧反硝化菌 <i>Acinetobacter</i> sp. AHP123 耐盐脱氮的驯化	12
2.1 引言	12
2.2 材料与方法	12
2.2.1 实验材料	12
2.2.2 实验方法	13
2.3 结果与分析	14
2.3.1 不同盐浓度对 <i>Acinetobacter</i> sp. AHP123 的生长状况和脱氮性能影响	14

2.3.2 驯化过程中 <i>Acinetobacter</i> sp. AHP123 生长及脱氮性能	17
2.4 小结	19
第 3 章 活性污泥处理高盐含氮废水的定向驯化	21
3.1 引言	21
3.2 材料与方法	21
3.2.1 实验材料	21
3.2.2 实验方法	23
3.3 结果分析	24
3.3.1 不同时期 SV_{30} 、MLSS 及 SVI 的变化	24
3.3.2 处理高盐废水活性污泥的定向驯化	27
3.3.3 处理高氨氮废水活性污泥的定向驯化	28
3.4 小结	30
第 4 章 驯化完成的活性污泥中微生物多样性及演替规律	32
4.1 引言	32
4.2 材料与方法	32
4.2.1 实验材料	32
4.2.2 实验方法	32
4.3 结果与分析	33
4.3.1 微生物群落组成与结构	33
4.3.2 不同驯化系统内微生物群落组成及结构变化	35
4.3.3 微生物代谢功能预测	38
4.4 小结	39
第 5 章 异养硝化好氧反硝化菌强化高盐高氮废水处理效果研究	41
5.1 引言	41
5.2 材料与方法	41
5.2.1 实验材料	41
5.2.2 实验方法	42
5.3 结果与分析	43
5.3.1 <i>Acinetobacter</i> sp. AHP1231 强化高氨氮废水脱氮	43

5.3.2 生物强化系统处理废水条件优化	44
5.3.3 生物强化处理系统中细菌群落结构	49
5.4 小结	52
第 6 章 结论与展望	54
6.1 结论	54
6.2 展望	56
参考文献	57
附录	70
攻读硕士期间学术论文发表情况	73
致谢	74

第 1 章 绪论

1.1 高盐浓度氨氮废水的来源及危害

高盐度废水一般指无机盐浓度（以 NaCl 计）超过 10 g/L（1%）的工业排放废水^[1]。统计数据显示，在我国废水的排放总量中，高盐废水占比超过 5%，且每年以 3%左右增长率增长^[2]。

依据其来源差异，可将高盐废水划分为以下主要类别^[3]：

1) 工业生产废水：

随着工业化进程的加速，工业废水的排放量及其污染程度日益严重。其中，皮革制造业、冶金、化工、海产品加工及腌制食品等行业是主要含盐废水的污染源^[4]。特别是在精炼、漂白等工艺环节中，次氯酸、氢氧化钠等碱性物质的添加，导致废水中盐分含量显著升高^[5,6]。此外，矿产开发、油气开采等过程同样会产生大量含盐废水^[7]。

2) 海水利用产生的废水

为应对淡水资源短缺问题，沿海地区开始将未经淡化处理的海水直接用于工业生产或者日常生活中。这种海水代用技术在电力、钢铁、化工等行业中作为冷却水和生产用水得到广泛应用，虽然节约了淡水资源，但也导致了高盐废水的增加。同时，部分城市将海水用于道路清洗、消防用水及卫生设施冲洗等市政用途，使得未经处理的高浓度无机盐直接进入城市的污水处理系统中。

3) 其他含盐废水

船舶航行过程中产生的生活污水、小型生产企业排放的废水均属于含盐废水。此外，某些地区因地下矿物影响导致地下水含盐量异常升高，沿海区域则因海水通过下水道系统渗透而增加了城市污水的盐浓度^[8]。

高盐废水不仅具有高浓度的盐含量特征，还因行业差异含有多种污染物^[9]。其中，氨氮污染物的来源尤为广泛，既存在于生活污水中，也普遍存在于工业废水中。这类废水通常含有高浓度无机盐、多种金属离子、酸碱性物质及悬浮物等

复杂成分。未经适当处理的废水直接排入水体可能引发严重的环境问题。其中，氮磷等营养物质的过量输入会刺激藻类（如蓝藻）的异常增殖，进而引发水体富营养化现象，最终导致溶解氧耗竭和水质恶化^[10]。在污水处理系统中，高浓度游离氨对微生物群落具有显著的抑制作用，同时，过高的盐度可能引发微生物细胞脱水及渗透压失衡，从而显著降低生物处理系统的运行效能^[11, 12]。因此，在当前水资源日益紧张背景下，开发高效的高盐度有机废水处理技术已成为废水处理领域的重要研究方向。

1.2 高盐浓度氨氮废水处理方法及存在问题

1.2.1 处理方法

当前，针对高盐氨氮废水的处理，已有多种传统技术得到实际应用。然而，这些方法在实施过程中仍面临诸多挑战，其对处理对象产生的负面影响促使研究者更加关注含盐废水的处理技术。目前，相关研究和工业实践主要采用物理化学法、生物法以及其他创新方法进行处理。

1.2.1.1 物理化学法

物理化学法是一种通过化学转化或氧化还原反应去除废水中氨氮的有效方法。在处理高盐浓度废水时，常用的物化技术主要包括以下几种^[13]：（1）吹脱法，该方法通过将废水调节至强碱性环境，使铵离子（ NH_4^+ ）转化为游离氨（ NH_3 ），随后通入热空气将氨气从液相转移至气相，从而实现脱氮目标。（2）化学沉淀法，该方法通过向废水中引入 Mg^{2+} 和 PO_4^{3-} 等试剂。在适宜条件下，溶液中的 Mg^{2+} 和 PO_4^{3-} 会与 NH_4^+ 发生化学反应，形成六水合磷酸铵镁（ $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）结晶沉淀物。该沉淀物溶解度极低，可通过固液分离过程实现氨氮的高效去除。这种方法通过形成稳定的矿物相，将溶解态的氨氮转化为固态沉淀，从而达到净化水质的目的。（3）折点加氯法，其原理是通过投加过量氯气或次氯酸钠等氧化剂，将铵离子氧化为氮气或硝酸盐，从而实现氨氮的去除。（4）离子交换法，该方法利用离子交换树脂中的可交换基团与废水中的铵离子进行交换反应，通过固液分离实现氨氮的去除。

这些物理化学方法各具特点，在实际应用中可根据废水特性进行选择和优化组合，以达到最佳处理效果。

1.2.1.2 微生物活性污泥法

活性污泥法是一种基于微生物代谢作用的生物脱氮技术。该技术主要依靠活性污泥系统中的特定微生物群落,通过一系列生物化学反应过程,包括氨化作用、硝化作用和反硝化作用等,将废水中的铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)最终转化为氮气(N_2)排出系统,从而达到脱氮目的^[14]。

这种生物处理方法具有处理效果稳定可靠、对各类废水具有较好的适应性、环境友好且不会产生二次污染的技术优势。基于这些优点,活性污泥法在工业废水处理领域得到了广泛应用,成为一种重要的脱氮技术手段。

1.2.1.3 其他方法

在工业废水处理领域,针对氨氮污染物的去除已发展出多种技术路线。除常规的物化处理工艺和微生物降解方法外,近年来涌现出一系列新型处理技术^[15]。其中,基于电化学原理的分离技术和膜吸收工艺因其独特优势而备受关注。

电化学分离技术通过施加外电场驱动铵离子(NH_4^+)定向迁移,借助选择性离子交换膜实现目标物质的富集与分离。在直流电场作用下,阳离子选择性地通过交换膜向阴极区迁移,从而实现废水中氨氮组分的高效浓缩。

膜吸收工艺则采用酸碱转化与选择性渗透相结合的技术路线。该工艺首先通过投加碱性试剂将废水 pH 调节至适宜范围,促使铵盐转化为游离氨(NH_3)。随后利用疏水微孔膜作为传质介质,在膜两侧分别通入待处理废水和酸性吸收液。由于浓度梯度的存在,气态氨分子不断扩散通过膜孔,与吸收液中的硫酸反应生成硫酸铵。理论上,该工艺可实现氨氮的完全去除,具有显著的技术优势。

1.2.2 存在的问题分析

如前述,尽管物理化学法在操作工艺上具有简便的优势,但其处理周期较长、成本较高,且在过程中难以确保不会产生二次污染,这严重制约了其在高盐氨氮废水无害化处理中的应用,尤其不适合大规模废水处理^[16]。传统生物脱氮系统在实际运行中面临硝化过程的微生物世代周期较长、盐度抑制功能菌群的生理活性、系统对水质波动的适应能力有限等技术瓶颈。因此亟需通过技术创新和方法改良来提升其运行稳定性与处理效率。首要任务是解决微生物在高盐环境下实现硝化和反硝化功能的问题,通过生物法降低高盐废水中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 COD Cr 含量,随后提升废水的可生化性,以确保生化处理系统的高效运行。为此,探索一种既高效又经济的新型处理方式显得尤为重要。微生物强化技术的提出不仅有效解决

了物理化学法的局限性,还具备易于实施和成本效益高的优势^[17],更为关键的是,该技术不会引发二次污染。

1.3 异养硝化好氧反硝化菌的脱氮研究

1.3.1 异养硝化好氧反硝化菌的首次分离

传统生物脱氮技术因硝化菌和反硝化菌在生长特性上的显著差异,导致脱氮效率受限且运行成本较高。针对这一问题,研究人员提出了短程硝化反硝化^[18]、厌氧氨氧化^[19]等新型工艺。然而,这些方法仍需依赖不同菌群的协同作用,其生长过程中的相互制约往往影响系统的运行稳定性。

在异养硝化菌研究方面,1972年 W. Verstraete 等^[20]在污水处理厂的废水中成功分离出具有异养硝化性能的菌株 *Arthrobacter* sp.,该菌株在自养型硝化微生物完全丧失活性的环境条件下,仍能保持稳定的生长状态并表现出显著的硝化性能。随后, Willy Verstraete 等^[21]学者于 1973 年在受污染的水体和土壤中观察到有机碳源存在条件下的硝化现象,证实了异养硝化的存在,这为后续研究奠定了重要基础。

20 世纪 80 年代,Robertson LA 和 Cornelisse R 等^[22]研究者取得重大进展,他们成功分离出 *Pseudomonas denitrificans* 菌株。该菌株具有将氨氮直接转化为气态氮的能力,并能同时利用 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 进行硝化与反硝化反应。这一发现推动了异养硝化好氧反硝化(HNAD)菌的研究热潮,随后从 *Pseudomonas*^[23] (假单胞菌属)、*Alcaligenes*^[24] (产碱杆菌属)、*Paracoccus*^[25] (副球菌属)和 *Bacillus*^[26] (芽孢杆菌属)等菌属中陆续分离出多种 HNAD 功能菌株。

HNAD 菌株的发现具有重要的理论和实践意义:其一,实现了好氧条件下硝化与反硝化的同步进行^[27],突破了传统理论限制;其二,显著提升了脱氮效率^[28],为污水处理提供了创新解决方案;其三,推动了环境保护和水资源可持续利用技术的发展。这些优势使得 HNAD 技术在生物脱氮领域迅速获得广泛关注,为废水处理开辟了新的研究方向。

1.3.2 异养硝化好氧反硝化的作用机理

近年来,针对异养硝化-好氧反硝化(HNAD)菌株的研究不仅关注其脱氮效率,还深入探究了其独特的氮代谢机制。与传统生物脱氮微生物不同,这类菌株具备多样化的氮转化途径,能够利用不同有机碳源,并实现多步生化反应的同

步进行。具体而言，HNAD 菌的脱氮过程主要依赖两种方式：一是通过氮同化作用将氮元素整合至细胞物质中，二是借助氮异化途径将氮转化为气态产物，从而实现高效脱氮。

1.3.2.1 HNAD 菌株的氮同化途径

微生物通过同化途径将无机氮转化为生物氮，为氮污染治理提供了环境友好的解决方案^[29]。在这一过程中，微生物以硝酸盐或亚硝酸盐等无机氮化合物为氮源，首先通过 Nas 和 NirBD 酶系将其还原为氨态氮。随后，在谷氨酸代谢关键酶（包括 GDH、GS 和 GOGAT）的催化作用下，氨被进一步转化为氨基酸等有机含氮化合物，最终整合至微生物的蛋白质和核酸等生物大分子中^[30]。这种将环境中的无机氮转化为微生物细胞组成物质的过程，不仅实现了氮资源的生物回收，同时为微生物生长提供了必需的营养元素，在废水脱氮和微生物增殖方面均具有重要作用^[31]。

1.3.3.2 HNAD 菌株的氮异化途径

HNAD 菌株的氮异化途径又可细分为硝酸盐-亚硝酸盐还原脱氮^[32]、羟胺还原脱氮^[33]、不完全 HNAD 脱氮^[34]。

(1) 硝酸盐-亚硝酸盐还原脱氮

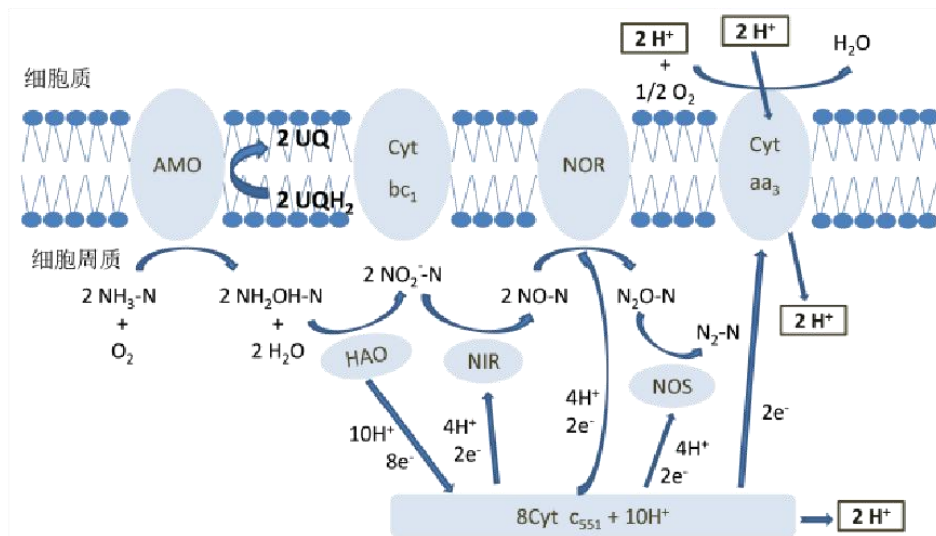


图 1-1 Wehrfritz 等人提出的泛氧硫球菌利用 HNAD 脱氮过程的电子传递模型

Fig. 1-1 Electron transfer model of nitrogen removal by HNAD for *Thiococcus pantothenusus* proposed

1993 年 Wehrfritz 等^[28]根据 Robertson 发现的泛养硫球菌提出了 HNAD 过程的电子传递模型（图 1-1），HNAD 菌株的氮异养代谢包含三条特征性反应路径。第一路径为： $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ^[35]。涉

及的异养硝化作用，其生化过程为 $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ 氨氮通过氨单加氧酶（AMO）催化转化为羟胺，继而在羟胺氧化还原酶（HAO）介导下生成亚硝酸盐，最终由亚硝酸盐氧化还原酶完成硝酸盐的合成。好氧反硝化的过程为 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$ ，在这一路径中硝酸盐在硝酸还原酶作用下转化为亚硝酸盐，该酶系包含周质型（Nap）、呼吸型（Nar）及同化型（Nas）三种功能亚型^[36]，其中 Nap 因具备氧耐受特性，被证实是好氧环境下催化硝酸盐还原的关键酶^[37]。亚硝酸盐的后续转化由两类还原酶调控：含铜酶介导亚硝酸盐至一氧化氮的转化，而细胞色素 cd 型酶则催化生成一氧化氮与氧化亚氮的混合产物^[38]，最终由一氧化二氮还原酶完成氮气的生成。上述多酶协同作用实现了水体无机氮向气态氮的生物转化^[39]。硝酸盐-亚硝酸盐还原脱氮途径是一种最常见的 HNAD 途径，研究中发现的大多数 HNAD 菌株都遵循这一途径。

（2）羟胺还原脱氮

有研究表明，部分 HNAD 菌株存在代谢途径的多样性特征。这些菌株未严格遵循典型异养脱氮代谢网络，其中特定类群通过羟胺还原代谢通道完成脱氮作用。Hung-Soo Joo^[40]就曾发现 *Alcaligenes faecalis* No.4 菌株在异养脱氮代谢过程中，其代谢通量未检出硝酸盐与亚硝酸盐中间产物，关键催化酶系的活性维持在极低水平这类菌株不能利用 NO_2^- -N 和 NO_3^- -N 进行脱氮，而是 NH_4^+ 通过 AMO 氧化为 NH_2OH 后，直接转化成 N_2O ，再经相关酶的作用转化为 N_2 并释放^[41]。其脱氮途径为： $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。值得注意的是，部分菌群在以羟胺为单一氮源底物时仍能维持代谢活性并释放气态氮产物，其脱氮机制可能涉及羟胺还原型代谢模式^[42]，此时硝化途径为： $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ，反硝化途径为： $\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ 。该羟胺依赖型代谢网络通过规避传统反硝化步骤实现氮素高效回收，但需特别关注硝化阶段副产物（硝酸盐/亚硝酸盐）的二次转化问题。

目前，许多学者陆续发现了不同种属的 HNAD 菌，并研究了部分 HNAD 菌株的脱氮途径目前，许多研究学者已系统鉴定多分类单元的 HNAD 菌，并解析其脱氮代谢网络的结构特征^[43, 44]，然而，嗜盐型 HNAD 菌群的研究仍存在显著空白，特别是高盐环境下该类菌群的渗透压适应机制与氮素转化耦联过程仍待阐明^[45]。

1.4 生物强化技术

1.4.1 生物强化技术概述

高盐有机废水的高效处理一直是国内外研究的热点问题^[46-49]。在当前科技快速发展和生态环境保护需求日益提升的背景下,社会各界对微生物法去除水体污染物的效能期望值持续攀升,这促使相关技术必须向更高效、更稳定的方向发展。目前,常用的处理技术主要包括物理化学法和生物法。相较于能耗较高且易产生二次污染的物化方法,生物处理技术更具经济性和实用性。然而,生物法在处理高盐有机废水时面临两大技术瓶颈:其一,高盐环境会导致传统活性污泥沉降性能恶化;其二,高离子强度能抑制微生物生长,这可能引发细胞脱水或质壁分离,造成微生物大量死亡,进而影响处理效果并导致出水水质波动^[50-52]。高盐环境下活性污泥沉降性能下降的主要原因在于废水密度增加,这往往会导致污水处理厂二沉池失效和出水水质恶化。针对这一问题,微生物强化技术应运而生,该技术自 20 世纪 70 年代中期发展至今^[53],已成为解决上述问题的重要方法。

微生物强化技术的核心在于向自然生态系统或现有污水处理系统中引入特定功能的高效降解菌种,通过优化微生物群落结构,提升系统对目标污染物的降解能力^[54]。该微生物强化技术兼具污染物降解效能提升与环境适应性增强的双重优势,在等极端环境条件下仍能维持处理系统的稳定运行^[55-57]。现阶段微生物强化技术的应用主要涉及三类策略:(1)通过强化培养手段富集废水处理体系中的土著功能微生物群落;(2)从环境样本中定向分离具有靶向降解特性的高效菌株^[58];(3)基于合成生物学手段对菌种实施定向改造以优化其代谢功能^[59]。

在我国水污染控制领域,微生物强化技术的应用已成为提升污水处理效能的关键措施。作为污水净化流程中的重要环节,生物处理单元通常被设置在物理处理之后,通过该技术的实施,能够有效应对城镇污水中污染物种类繁多且存在抑制性成分等挑战,从而显著改善生物降解系统的处理效率与稳定性。其作用机制主要可分为以下三类^[60]:(1)直接投加法,即将经过筛选、培养和驯化的高效微生物或共代谢基质直接加入处理系统^[61]。例如,杨倩^[62]通过微生物筛选技术分离获得具有甲基苯磺酸(PTS)高效降解能力的 QY7-2 菌株,该菌株在生物膜系统中的工程化应用使目标污染物的去除效率由初始的 7.07%提升至 89.24%。这是生物强化技术最常用的方法。(2)固定化微生物技术,将优势菌株固定在

特定载体上,从而提高微生物浓度和停留时间,改善出水水质。目前常用的三种固定化方式主要是^[63]:包埋法、交联法和载体结合法。(3)在废水生物处理领域,高效微生物制剂的开发主要基于特定功能菌种的分离与富集,并最终加工成粉状或溶液型生物增强产品,以提升有机污染物的分解效率。

在生物强化工艺的实际运行过程中,其处理效能往往受到环境温度、基质特性以及微生物投加比例等关键运行参数的共同作用。因此,在工程实践中必须对这些变量进行系统优化,才能确保污水处理系统达到理想的运行状态。得益于其针对性强、处理效果好、见效快、操作简便、投资成本低等优势^[9],该技术已广泛应用于生活污水和工业废水处理、土壤修复以及水体净化等多个领域。

1.4.2 生物强化技术在废水处理领域中的应用

近年研究表明,微生物强化技术在提升污水处理效能方面展现出显著优势。通过投加特定功能菌株,不仅能够增强厌氧消化系统对化学需氧量(COD)的去除能力,还可有效降解特殊废水中的多种污染物,同时提高系统应对高有机负荷冲击的恢复性能^[64]。例如,Guo^[65]研究团队从富营养化湖泊中筛选出一组功能菌株,其投加后显著提升了反应器的脱氮效率,且避免了亚硝酸盐的积累。Fang^[66]等学者发现,投加 *Paraclostridium* sp.菌株的系统在处理高浓度环丙沙星(CIP)废水时,其去除效率较对照组提升了近 20%。

在工业废水处理领域,Wang^[67]等人利用皮氏伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pickettii*)强化 A₂/O 系统处理焦化废水,结果显示 COD 去除率达到 59%,同时对喹啉类物质也表现出良好的降解效果。Mohan 团队^[68]将硫酸盐还原菌固定于海藻酸盐载体中,应用于厌氧序批式生物膜反应器(AnSBBR),使 COD 去除率从 35%提升至 78%,硫酸盐去除率从 27%提高至 80%。

此外,微生物强化技术在极端环境或特殊废水处理中也展现出独特优势。在低温污水处理领域,孟雪征等^[69]从城市排水管网中筛选获得低温适应菌株,通过构建复合菌剂应用于低温污水生物处理,其 COD 去除效果优于单菌体系。研究者从市政下水道分离出耐冷菌株,构建复合菌群处理低温生活污水,结果表明复合菌群对 COD 的去除效果显著优于单一菌株。Quan 等^[70]通过基因标记技术将携带红色荧光蛋白示踪标记的 *Pseudomonas putida* SM1443 工程菌株导入序批式反应器系统,实现对 2,4-二氯苯氧乙酸污染物的定向强化降解,显著提高了系统

对目标污染物的降解效率。

在含油废水处理方面, Mongkolthanaruk^[71]研究团队构建了由 *Pseudomonas aeruginosa* LP602、*Bacillus* sp.B304 和 *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 组成的复合菌群, 通过协同作用在 12 天内将 BOD 和油脂含量均降至 20 mg/L 以下。Belia 等^[72]应用生物强化方法, 在两周内成功实现了传统活性污泥工艺向强化生物除磷系统 (EBPR) 的转化, 使系统对磷酸盐负荷变化和低氧环境的适应能力得到明显改善。Hu^[73]等人将微球菌 (*Micrococcus* sp.) 引入序批式反应器, 有效降解了工业废水中的邻苯二甲酸二正丁酯 (DBP); Tuo 等人^[74]证实芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 能够显著增强活性污泥对喹诺酮类药物的去除效果。

邱志平等^[75]从环境样品中分离出 5 种具有高效降解能力的好氧微生物, 构建的复合菌群对渗滤液中 COD 的降解效率达到 45.3%。吉芳英团队^[76]采用定向驯化方法获得 3 株特性菌种, 将其应用于生物活性炭处理系统后, 对分子量介于 100~30 kDa 及大于 100 kDa 的有机组分去除率分别提升至 76.1%和 80.9%。叶晓玫等^[77]评估了复合微生物制剂对高浓度渗滤液的处理效能, BOD₅、COD Cr、NH₄⁺-N、TP 及色度的去除率依次为 89%、77%、67%、67%和 83%, 然而其作用机理尚需系统解析。

微生物强化技术在提升生物系统抗冲击负荷性能方面展现出显著优势。研究表明, 通过在活性污泥系统中引入真菌酶, 可使 COD 去除效率从 75%显著提升至 95%。值得注意的是, 当系统面临污染物负荷增加时, 强化组表现出优异的适应能力, 而对照组则出现明显的性能抑制, 处理效果显著降低^[78]。在 A/O 系统中的应用研究显示, 经过生物强化处理的系统较空白组提前 10 天达到出水标准, 且在有机负荷增加的情况下, 强化组仅需 3 天即可恢复处理性能, 而对照组则需要约 7 天的恢复期^[79]。

总体而言, 微生物强化技术具有多重优势: 其一, 可有效提高特定污染物的降解速率; 其二, 能够优化污泥沉降性能并减少剩余污泥生成量; 其三, 可显著缩短生物处理系统的驯化周期; 其四, 大幅提升处理装置应对水质波动时的抗冲击能力与运行可靠性。经生物强化后的活性污泥体系, 其微生物群落可高效分解各类有机及无机污染物, 最终将其矿化为环境友好的小分子物质。当前研究已充分验证了微生物强化技术在污水有机和无机污染物去除方面的显著效果^[80-82], 然

而,在实际工程应用中,为确保技术实施的有效性,必须系统评估外源菌种的引入条件及其对处理系统的适应性,从而优化该技术的应用成功率。

微生物强化技术在提升生物处理效能方面发挥着重要作用,其凭借经济性、高效性和广泛适用性等特点,在环境修复领域得到广泛应用^[83]。该技术的核心在于深入理解微生物的降解机制,从而筛选出具有特定功能的菌株,显著提高目标污染物的去除效率^[84]。特别是在处理高浓度有机废水、难降解有毒有害物质以及脱氮除磷等方面,该技术展现出优异的处理性能。

1.5 课题研究内容、意义和技术路线图

1.5.1 研究内容

(1) 好氧反硝化菌 *Acinetobacter sp.* AHP123 耐盐脱氮的驯化

以实验室保存的好氧反硝化菌 *Acinetobacter sp.* AHP123 进行耐盐耐高氨氮的驯化,并定期取样测定菌株生长情况以及培养基中氨氮和 COD 的降解情况。并将在 1%和 1.5%盐浓度下驯化完成的菌株分别命名为 *Acinetobacter sp.* AHP1231 和 *Acinetobacter sp.* AHP1232,并进行保存,用于后续研究。

(2) 好氧活性污泥混合菌群处理含盐废水的定向驯化

取自污水处理厂二沉池的回流污泥进行含盐氨氮废水活性污泥的培养与驯化,驯化前测定污泥 MLSS、SV₃₀、SVI、pH 等指标,驯化过程采用含盐人工配置废水进行分批次梯度驯化,并在驯化过程中逐渐增加进水废水的 NaCl 及氨氮浓度,直至达到实验进水水质要求。驯化过程中每天测定进水及出水废水中的 COD 和 NH₄⁺-N 浓度,观测活性污泥驯化期间对 COD 和 NH₄⁺-N 的降解情况。驯化期间保证 pH 值为 6.8-8,当进水基质浓度达到实验要求后,并且系统能够稳定运行则污泥驯化完成。并对驯化完成的活性污泥采用 16Sr DNA Illumina 高通量测序方法来解析微生物群落组成和多样性。

(3) 好氧反硝化菌 *Acinetobacter sp.* AHP1231 强化好氧活性污泥在含盐含氮废水中的应用

通过向运行良好的活性污泥中投加 *Acinetobacter sp.* AHP1231,并对该运行系统的碳源、接种量以及温度进行优化,在运行过程中对废水 COD、氨氮、pH 进行检测,从而确定反应器最佳运行条件。

1.5.2 研究意义

近年来随着石油、印染、造纸、化工和农药等行业的发展，导致大量含高无机盐、难降解或有毒有机污染物废水的排放。废水中的高盐浓度会对常规的生物废水处理产生不利影响，导致大量含氮废水进入自然水体，破坏水体平衡，对人们的生活和居住的环境造成不可挽救的损失。而传统生物法因为世代时间长、脱氮效率低，而且高盐废水对于常规的生物处理，具有很显著的抑制作用，会导致微生物发生脱水，引起质壁分离，进而限制了细菌的生长。因此，研究高盐环境下微生物的抗逆性是至关重要的。

基于此，本研究通过对实验室现存的一株能够高效脱氮的异养硝化好氧反硝化细菌 *Acinetobacter sp.* AHP123 进行驯化，并采用分批次梯度驯化的方式使用人工配置废水进行能够处理含盐含氮废水的好氧活性污泥的驯化。后将经过高盐浓度、高氨氮条件下反复驯化的 *Acinetobacter sp.* AHP1231 接种于运行良好的好氧活性污泥中进行生物强化，并探究该强化系统进行的优化条件，并对驯化期间以及强化系统进行高通量测序，从生物群落结构层面探讨了废水中 NaCl 及氨氮浓度对好氧活性污泥系统的影响。本研究的开展，探究了好氧活性污泥通过在高氨氮以及盐胁迫环境下的耐受性，并探究了微生物群落的变化以及在不同盐浓度及氨氮浓度驯化下活性污泥中功能微生物的功能代谢特性，为高氨氮含盐废水的生物处理提供新的思路和方法。

1.5.3 技术路线

整体技术路线图如图 1-2 所示

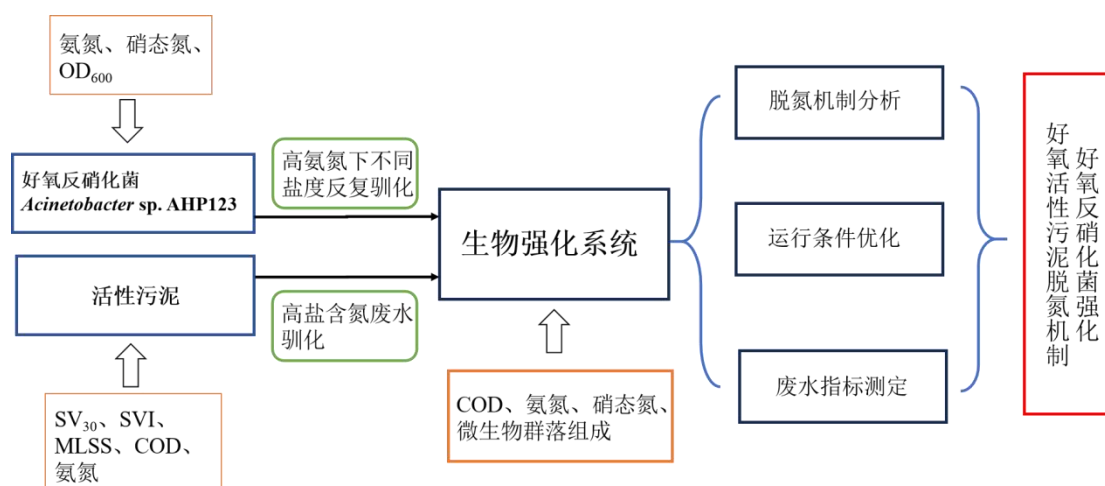


图 1-2 技术路线

Fig. 1-2 Technical route

第 2 章 异养硝化好氧反硝化菌 *Acinetobacter* sp.

AHP123 耐盐脱氮的驯化

2.1 引言

高盐含氮废水排放对环境造成严重威胁,对于高盐高氮废水的处理一直是环境领域的研究热点。生物法脱氮技术通过微生物的同化作用和代谢过程实现废水中氮污染物的去除,较物化处理方法具有显著的环境友好优势,避免了二次污染物的产生,已成为氮污染治理的关键技术之一。其中,异养硝化-好氧反硝化(HNAD)微生物因其独特的代谢特性,能够在单一反应体系内同步去除氨氮、硝酸盐和亚硝酸盐,脱氮效能较传统工艺显著提高^[28],在废水生物脱氮领域展现出广阔的应用前景。目前,虽然已发现多种 HNAD 菌,但针对特定菌株在高盐环境下的脱氮性能及驯化方法研究仍相对较少。而 *Acinetobacter* sp. AHP123 作为一种具有很好脱氮能力的 HNAD 菌株,对其进行耐盐驯化,应用于含盐废水中并在盐胁迫下进行脱氮特性的研究至关重要。深入探究 *Acinetobacter* sp. AHP123 的耐盐脱氮驯化,不仅有助于揭示其高盐环境下的脱氮机制,还能为高盐含氮废水的生物处理提供更有效的技术支持。基于此,本章以 *Acinetobacter* sp. AHP123 为研究对象,通过设置不同盐浓度条件,研究其生长和脱氮性能变化,并对其进行耐盐驯化,旨在提高该菌株在高盐环境下的脱氮能力,为后续实际工程应用奠定基础。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 培养基的制备

混合氮源培养基(g/L): 柠檬酸钠 3.40, 丁二酸钠 3.51, NH_4Cl 0.2, KNO_3 0.3, KH_2PO_4 0.007, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.035, MgSO_4 0.005, 微量元素溶液 2 mL, pH 7.3-7.5, 不同盐浓度驯化通过添加不同 NaCl 含量来实现;

LB 培养基(g/L): NaCl 10, 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, pH 值 7.0~7.5;

微量元素溶液 (g/L) : EDTA 0.1 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0078 , CaCl_2 0.011 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.008 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.0021 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0032 , $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0032 ;

上述培养基均在 121 °C 下灭菌 20 min , 固体培养基则在液体培养基中加入 15g/L 的琼脂。

2.2.1.2 实验样品

本实验所用菌种为实验室保藏菌种 *Acinetobacter* sp. AHP123。

2.2.1.3 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

2.2.2 实验方法

2.2.2.1 *Acinetobacter* sp. AHP123 耐盐性及脱氮探究

通过向混合氮源培养基中添加不同浓度的 NaCl : 0%、0.5%、1%、1.5% 和 2% 探究不同盐浓度下 *Acinetobacter* sp. AHP123 的生长状况及脱氮特性。

菌种 AHP123 在 LB 培养基中在 30 °C、200 rpm 条件下振荡培养 12 h 后, 将活化的种子液使用生理盐水调整菌液 OD_{600} 值为 1.7, 按 2% 的比例接种至装有 100 mL 添加了不同 NaCl 浓度的混合氮源培养基的 250 mL 三角瓶中, 恒温振荡培养 48 h。每 3 h 测定菌体 OD_{600} 值, 并分别在 24 h 和 48 h 时测定上清液中氨氮和硝态氮含量。

2.2.2.2 *Acinetobacter* sp. AHP123 的耐盐驯化

通过反复驯化的方式, 将初始盐浓度设置为 1%, 后续通过逐步提高培养基中 NaCl 浓度的方法对菌株 AHP123 进行耐盐性能驯化。先将 AHP123 在 LB 培养基中以培养条件为 30 °C、200 rpm 振荡培养 12 h 后在添加了 NaCl 浓度为 1% 的混合氮源平板上划线, 长出单菌落后, 挑取生长状况较好的单菌落进行再次划线, 每传代 3 代, 挑取单菌落在 LB 培养基中以 30 °C、200 rpm 振荡培养 12 h 后, 调整菌液 OD_{600} 值为 1.7, 按 2% 的比例接种至装有 100 mL 添加了 1% NaCl 浓度的混合氮源培养基的 250 mL 三角瓶中振荡培养 48 h, 每 24 h 测定上清液中氨氮和硝态氮含量以及 OD_{600} 值。当菌株生长稳定后再以同样的方式提高培养基中 NaCl 浓度为 1.5%, 进行下一阶段的驯化, 对于 1.5% 盐浓度的驯化采用每传代 5 代进行一次测定。将在 1% 和 1.5% 盐浓度下驯化完成的菌株分别命名为 *Acinetobacter* sp. AHP1231 和 *Acinetobacter* sp. AHP1232。

2.2.2.3 分析方法

本研究所检测的主要指标及检测方法有：氨氮（ $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ）采用纳氏试剂分光光度法（GB HJ535-2009）测定；化学需氧量（COD）采用重铬酸钾法（HJ828-2017）测定；硝态氮（ $\text{NO}_3\text{-N}$ ）采用紫外分光光度法（GB HJ/T346-2007）测定；总氮（TN）采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法光度法（GB HJ636-2012）测定；总磷（TP）采用钼酸铵分光光度法（GB11893-89）； OD_{600} 采用比浊法测定。去除率的计算公式如下：

$$\eta = \frac{c_0 - c_1}{c_0}$$

式中： C_0 表示 0 h 相应的 COD 或氮源浓度（mg/L）， C_1 表示培养后某时间相应的 COD 或氮源浓度（mg/L）。每组设置 3 组平行，采用 origin 2018 对实验结果进行统计分析并绘图。

对于 *Acinetobacter* sp. AHP123 脱氮性能研究显示，其脱氮途径推测为是通过羟胺这一中间产物转化为氮气的（ $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ）^[85]，不同于典型的 HNAD 细菌，*Acinetobacter* sp. AHP123 可能具有不完全的 HNAD 脱氮途径和氮同化途径。故本研究中对菌株进行耐盐性能驯化时菌株脱氮特性只需以氨氮去除指标表征即可。

2.3 结果与分析

2.3.1 不同盐浓度对 *Acinetobacter* sp. AHP123 的生长状况和脱氮性能影响

2.3.1.1 不同盐浓度冲击对 *Acinetobacter* sp. AHP123 生长状况影响

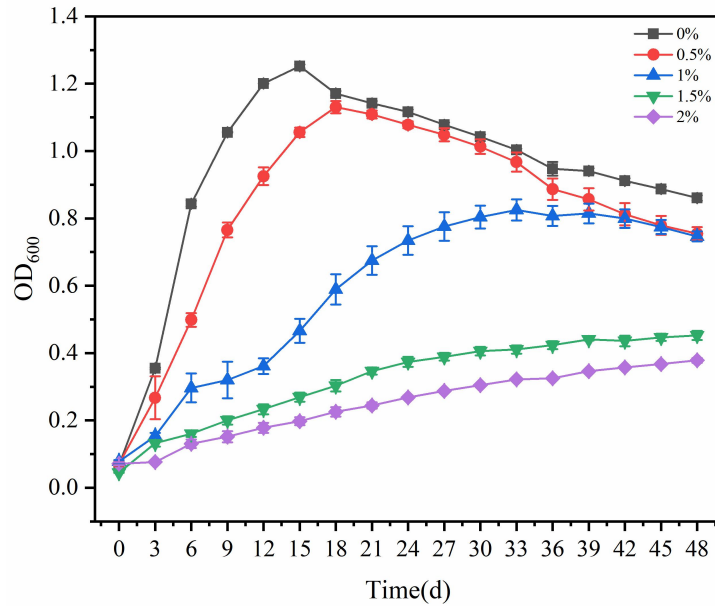
不同盐胁迫（NaCl 浓度为 0%、0.5%、1%、1.5%和 2%）下对菌株 AHP123 的生长状况的影响如图 2-1 和表 2-1 所示。

结果分析可知，不同盐度梯度培养下菌株 AHP123 的初始 OD_{600} 均为 0.066，在盐浓度 $\leq 2\%$ 的培养条件下均表现出增殖能力，然而其生长状况与盐度呈现负相关性，NaCl 浓度越高菌株生长速度越慢。NaCl 浓度为 0%时，菌株在第 15 h 时生长状况 OD_{600} 值达到 1.252。提高 NaCl 浓度分别为 0.5%、1%时，达到生长状况最佳的时间分别是 18 h、33 h，此时的 OD_{600} 值分别为 1.141 和 0.865。在培养后期，0%、0.5%处理组 OD_{600} 值明显下降，可能是由于在培养后期培养基中营养成分被消耗殆尽，导致菌体无法维持正常活性而大量死亡。而 1%处理组 OD_{600} 值略有下降，菌体生长进入衰亡期。当盐浓度分别为 1.5%、2%时，48 h 内均没

达到最佳生长状况，说明盐胁迫对 AHP123 的生长有抑制作用，且盐胁迫延长了菌株生长至最佳生长状况的时间。

表 2-1 不同时间菌株 *Acinetobacter* sp. AHP123 生物量
Table 2-1 Biomass of strain *Acinetobacter* sp. AHP123 at different time

盐度 时间	0%	0.5%	1%	1.5%	2%
0	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066
3	0.355	0.267	0.154	0.132	0.077
6	0.843	0.498	0.296	0.16	0.131
9	1.055	0.765	0.321	0.217	0.152
12	1.221	0.952	0.361	0.233	0.178
15	1.252	1.056	0.466	0.269	0.198
18	1.171	1.130	0.589	0.302	0.226
21	1.141	1.109	0.675	0.347	0.244
24	1.116	1.078	0.734	0.374	0.268
27	1.078	1.048	0.776	0.389	0.287
30	1.042	1.013	0.804	0.406	0.305
33	1.003	0.967	0.825	0.411	0.322
36	0.947	0.887	0.807	0.424	0.325
39	0.941	0.857	0.815	0.441	0.346
42	0.912	0.812	0.799	0.436	0.358
45	0.887	0.779	0.775	0.447	0.367
48	0.856	0.754	0.747	0.453	0.378

图 2-1 菌株 *Acinetobacter* sp. AHP123 在不同盐浓度下生长曲线Fig.2-1 Growth curve of *Acinetobacter* sp. AHP123 under different salt concentrations

2.3.1.2 不同盐浓度冲击对 *Acinetobacter* sp. AHP123 脱氮效果影响

图 2-2 显示了不同盐浓度冲击对 AHP123 菌脱氮效果影响的实验结果。

根据图 2-2a 和 2-2b 分析表明, 当 NaCl 浓度在 0.5% 内, 第 24 h 时, 菌株的生长没有受到明显抑制。盐浓度可能会延长 AHP123 的生长速率, 在第 48 h 时, 在盐浓度 0.5% 下的菌株已经进入衰亡期, 使得盐浓度为 1% 时的菌株生物量反而高于盐浓度为 0.5% 时菌株的生长量。

从图 2-2c 和 2-2d 也可以看出, 氨氮降解速率也与盐浓度呈负相关。对于盐浓度为 0% 的处理组, 在 24 h 时氨氮基本完全降解, 去除率达到 95.72%。在盐浓度为 1%~2% 内, 氨氮的去除率没有明显区别, 但在第 48 h 时, 盐浓度为 1% 时氨氮去除率达到 69.13%。然而, 不同盐浓度下的系统里硝态氮的去除率均为负值, 由菌株 AHP123 的脱氮机制可知, 在混合氮源条件下, 无机氮全部被同化为生物氮, 当氨氮完全去除后才开始利用硝态氮, 硝态氮的利用过程还未发生^[34]。由此可见, 菌株在盐浓度 1% 范围内具有较好的脱氮效果, 但随着盐浓度的升高会抑制 AHP123 的脱氮速率。实验结果表明, 当 NaCl 浓度 $\leq 1\%$ 时, AHP123 菌株表现出良好的脱氮性能。然而, 随着盐浓度的升高, 盐胁迫会抑制菌株的脱氮速率故后续对菌株 AHP123 的耐盐驯化选用 1% 为初始驯化盐浓度。

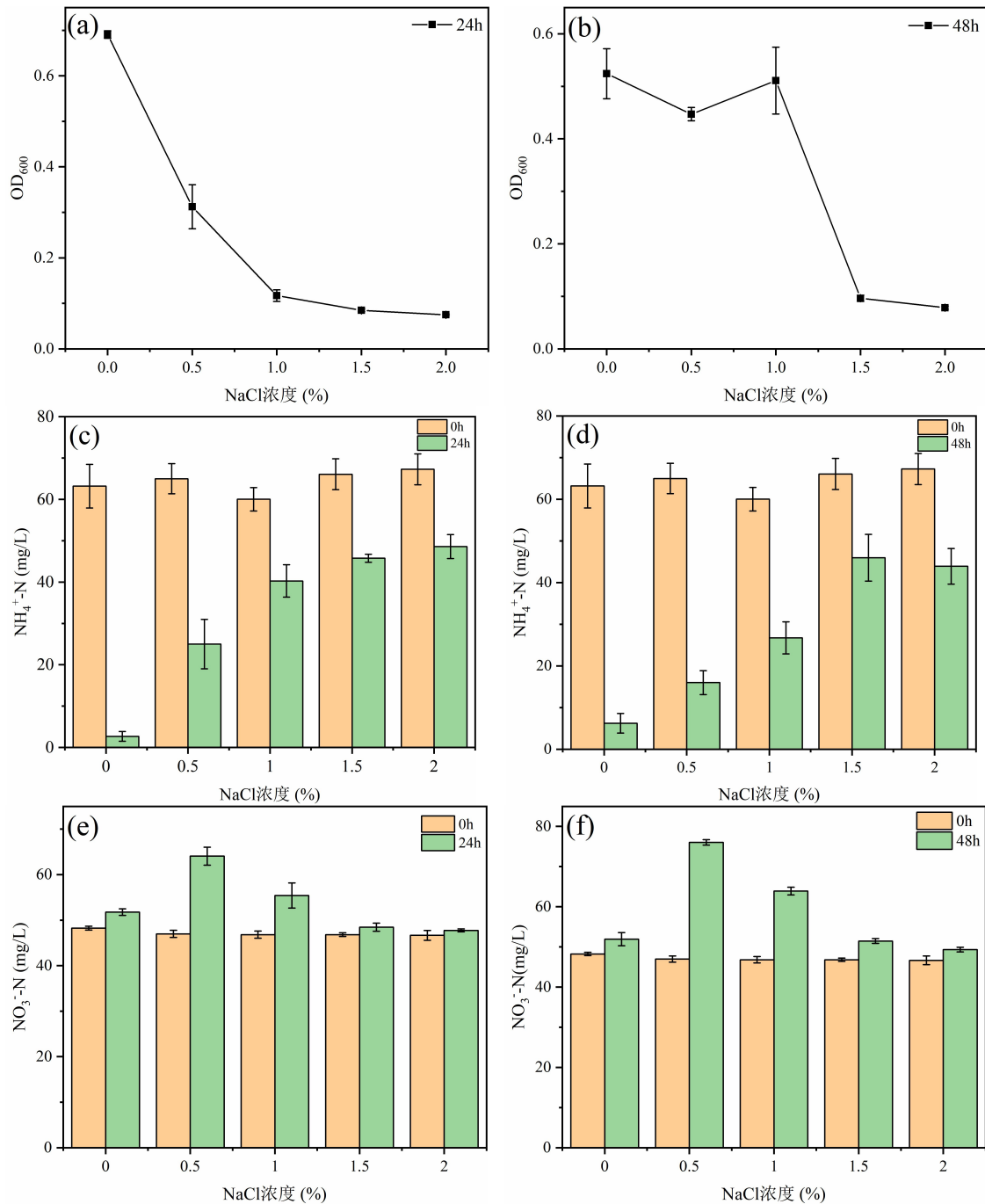


图 2-2 菌株 *Acinetobacter* sp. AHP123 在不同盐浓度下 24 h 和 48 h 时 OD₆₀₀(a、b)、NH₄⁺-N(c、d)浓度、NO₃⁻-N(e、f)浓度

Fig. 2-2 OD₆₀₀(a、b), NH₄⁺-N(c、d) concentration, NO₃⁻-N(e、f) concentration of strain *Acinetobacter* sp. AHP123 at 24 h and 48 h under different salt concentrations

2.3.2 驯化过程中 *Acinetobacter* sp. AHP123 生长及脱氮性能

为了提高 AHP123 的耐盐性,对菌株 AHP123 进行盐胁迫的驯化,图 2-3 展示了在 NaCl 浓度为 1%的混合氮源培养基中驯化期间菌株的生长状况以及 COD 和氨氮的脱除效率。在盐浓度为 1%时,经过 15 代的反复驯化(每传代 3 代驯化进行一次测定),在 24 h 内,AHP123 在 1%的盐浓度下的菌株生物量逐渐由初

始的 0.734 升高到 1.34，氨氮的去除率也一直维持在 97.13%左右。驯化前期，COD 的去除率并不稳定，但随着驯化次数的增加，COD 去除率逐渐升高，在第 48 h 时最高能达到 70.14%。

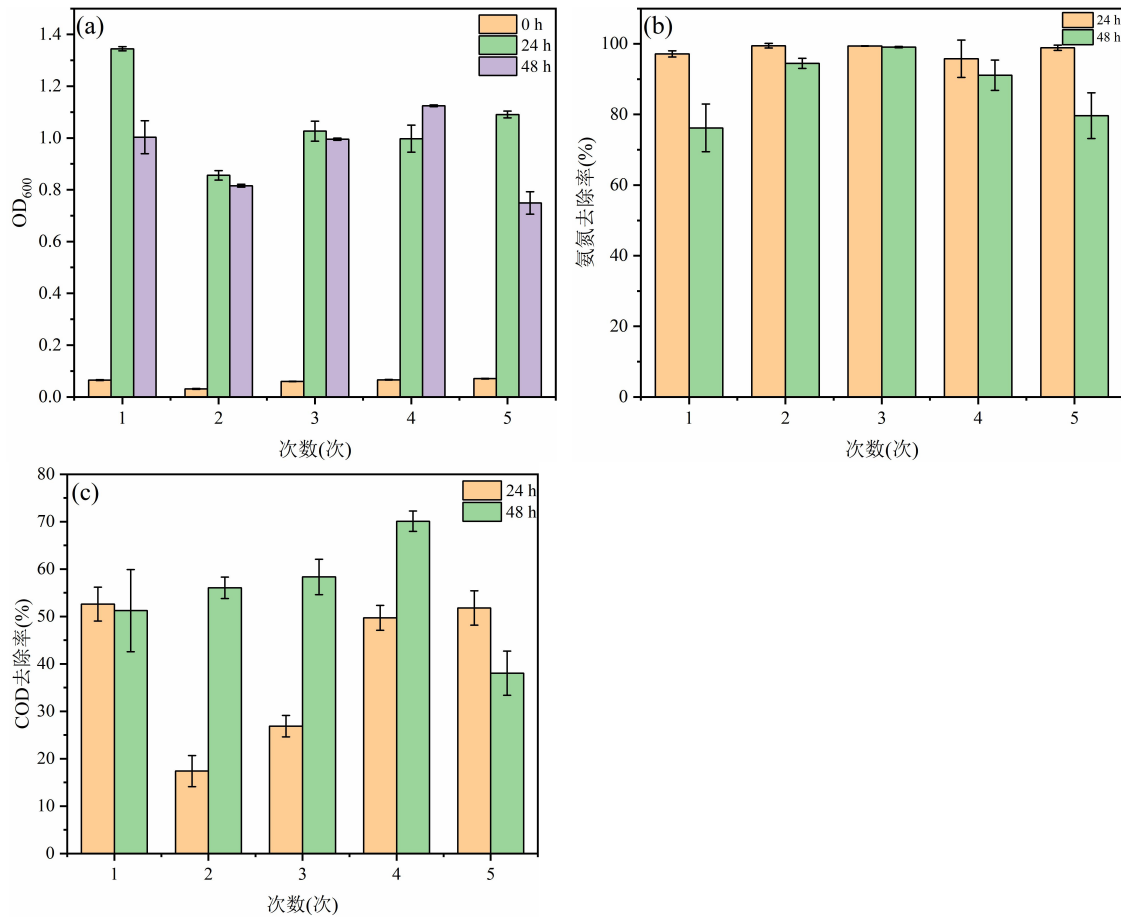


图 2-3 菌株 *Acinetobacter* sp. AHP123 在 1% NaCl 下反复驯化 24h 及 48h 的 OD_{600} (a)、COD 去除率(b)、 NH_4^+-N 去除率(c)

Fig. 2-3 OD_{600} (a), COD(b) removal rate and NH_4^+-N (c) removal rate of strain *Acinetobacter* sp. AHP123 after repeated acclimation in 1% NaCl for 24h and 48h

选取在 1%盐度下驯化完成的菌株 AHP123 继续进行盐浓度为 1.5%的驯化，驯化期间菌株的生长状况以及 COD 和氨氮的脱除效率如图 2-4 所示。由于盐浓度为 1.5%时对 AHP123 的抑制作用更加明显，在进行 40 代驯化（每传代 5 代驯化进行一次测定）后，菌株生物量（ OD_{600} ）由初始的 0.178 最终达到 0.743，较驯化初始时提高了 4.17 倍。COD 和氨氮去除率分别达到 69.55%和 69.59%，较未驯化时氨氮的去除率提高了 2.27 倍。可见，对一株普通的异养硝化好氧反硝化菌株进行盐浓度的驯化，提高其在高盐废水中对污染物的去除能力是可行的。

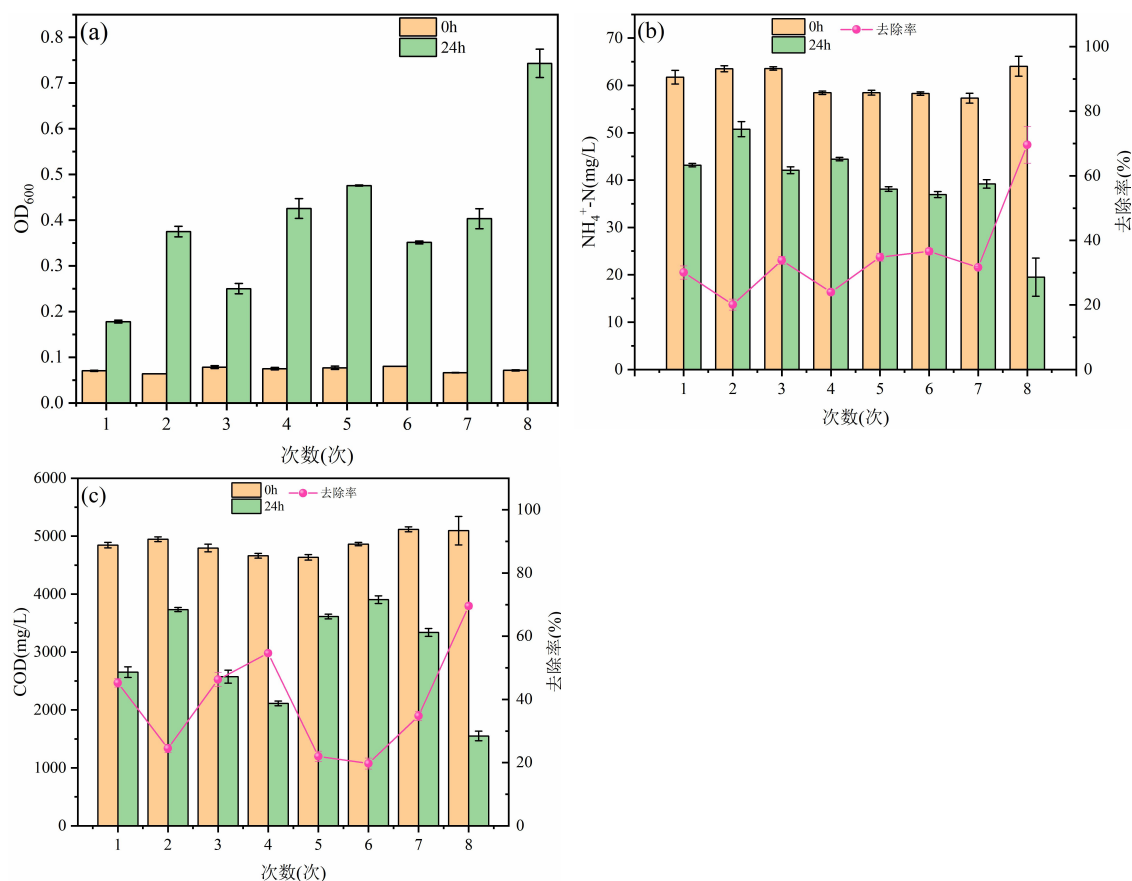


图 2-4 菌株 *Acinetobacter* sp. AHP123 在 1.5% NaCl 下反复驯化 24 h 的 OD₆₀₀(a)、COD 去除率(b)、NH₄⁺-N 去除率(c)

Fig. 2-4 OD₆₀₀(a), COD(b) removal rate and NH₄⁺-N(c) removal rate of strain *Acinetobacter* sp. AHP123 after repeated acclimation in 1.5% NaCl for 24 h and 48 h

2.4 小结

HNAD 菌广泛存在于各种水体、土壤中, 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、不动杆菌 (*Acinetobacter* sp.)、粪产碱菌 (*Alcaligenes* sp.)、红球菌 (*Rhodococcus* sp.)、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 等均为典型的反硝化功能菌属。HNAD 菌能够同时进行硝化和反硝化, 能更加经济有效的去除废水中的污染物。为了使实验室保存一株 HNAD 菌在高盐胁迫下能有效去除废水污染物, 本章考察了不同 NaCl 浓度梯度下的 *Acinetobacter* sp. AHP123 生长情况及脱氮效果, 并进行了耐盐驯化, 得出以下结论:

(1) 通过设置不同盐浓度的混合氮源培养基 (0%、0.5%、1%、1.5%、2%), 探究了 NaCl 浓度对菌株生长状况和脱氮速率的影响。结果表明在 0%-2% 的盐浓度下, 随着盐浓度升高会抑制菌株生长和脱氮速率。NaCl 浓度为 0% 的处理组在 15 h 能达到生长状况最佳, 此时 OD₆₀₀ 值为 1.252。当盐浓度分别为 0.5%、1% 时, 达到生长状况最佳的时间分别被延迟至 18 h 和 33 h。当盐浓度分别为 1.5%、2%

时，48 h 内均没达到最佳生长状况，说明高盐浓度会抑制 AHP123 的生长。

(2) 确定 1%为初始驯化盐浓度进行反复驯化。在 1%盐浓度下驯化 15 代后，菌株生物量提高，氨氮去除率稳定在 97.31%，COD 去除率提升至 70.12%；继续在 1.5%盐浓度下驯化 40 代，氨氮去除率提高了 2.27 倍。

第3章 活性污泥处理高盐含氮废水的定向驯化

3.1 引言

生物法因其处理成本低，且二次污染的风险小在污水净化中广泛应用。在生物法中，活性污泥法是污水处理领域广泛应用的技术，在处理高盐含氮废水方面具有重要作用。曝气池中的活性污泥对有机污染物的降解效率起着决定性作用。这种降解效能主要取决于污泥微生物的代谢活性，而后者又与微生物群落的结构特征及其功能多样性密切相关。

活性污泥法是污水处理领域广泛应用的技术，在处理高盐含氮废水方面具有重要地位。然而，高盐浓度和高氨氮对活性污泥中的微生物具有显著抑制作用，导致传统活性污泥法处理此类废水时面临处理效率低、微生物活性受抑制等问题。为了提高活性污泥对高盐含氮废水的处理效果，需要对活性污泥进行定向驯化，筛选出适应高盐高氨氮环境的微生物菌群。目前，虽然已有一些关于活性污泥处理高盐含氮废水的研究，但针对不同盐浓度和氨氮浓度梯度驯化下活性污泥中微生物群落结构变化、提高处理效果等方面的研究仍不够深入。本章以取自污水处理厂二沉池的回流污泥为研究对象，采用人工配置的含盐含氮废水进行活性污泥的定向驯化，通过监测污泥性能指标和废水处理效果，深入探究活性污泥在驯化过程中的变化规律，为优化高盐含氮废水处理工艺提供理论依据和实践指导。

3.2 材料与方法

3.2.1 实验材料

3.2.1.1 实验装置与运行条件

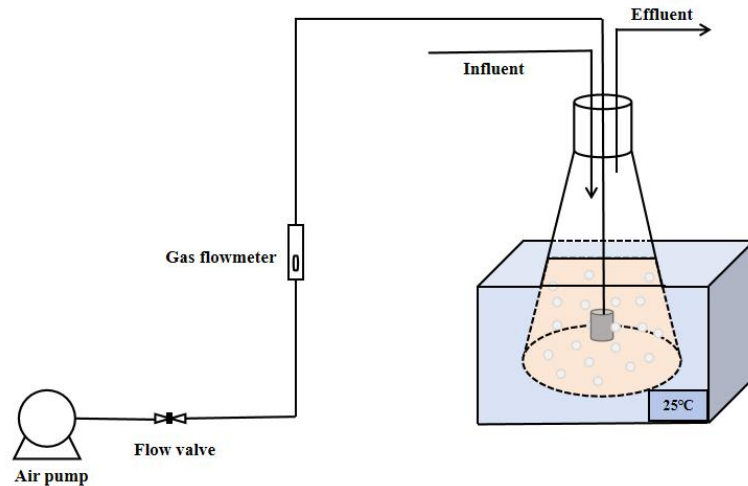


图 3-1 实验驯化装置

Fig. Experimental acclimation device

实验使用的是容积为 5 L 的锥形瓶作为反应器进行好氧活性污泥的驯化，其有效容积为 4 L。驯化过程中，使用水浴锅进行温度的控制，使温度维持在 28 °C。将人工配置的合成废水泵入反应器中并搅拌混合，使用 2 mol/L 的氢氧化钠调节 pH 为 6-8。放入曝气头，使气泵经过底部扩散向反应器供应空气，曝气速率由气体流量计控制在 0.8–1 L/min，水力停留时间（HRT）为 24 h，即每 24 h 进行一次换水，每 12 h 进行一次 pH 检测及调控，污泥沉降时间设置为 30 min，污水由上清倒出。如图 3-1 所示，反应器通过气泵供气，并配有流量阀、气体流量计、进气管，并通过水浴锅进行温度控制。

3.2.1.2 实验用水与接种污泥

人工配水有利于实验水质的稳定便于驯化阶段的污泥培养。本研究的进水采用自来水配置的人工废水。由葡萄糖为碳源、氯化铵为氮源、磷酸二氢钾磷源配制而成，添加 NaCl 进行含盐驯化，并添加 2 mL/L 的微量元素，其中微量元素营养液^[86]组成成分 (g/L): $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024, FeCl_3 1.5, CuSO_4 0.002, H_3BO_3 0.006, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.19, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.061, $\text{H}_4\text{MoNa}_2\text{O}_6$ 0.024 和 ZnCl_2 0.07，分别溶解后混匀，置于 4°C 冰箱保存备用。不同氨氮浓度的废水通过调整氯化铵的添加量实现，并根据驯化情况调整碳源添加量，每阶段驯化完成并稳定后进行下一阶段的驯化。在驯化过程中始终维持 N:P=5:1。表 3-1 显示了每个阶段的进水水质特性，实际浓度以实验过程中测定为准。

表 3-1 人工合成废水进水水质

Table 1.The indicators of the synthetic wastewater samples.

Wastewater	$\text{NH}_4^+\text{-N}(\text{mg/L})$	COD (mg/L)	TP (mg/L)	Salinity (%)
ASA	100	2500	20	0
ASB	100	2500	20	0.5
ASC	100	2500	20	1
ASD	150	3000	30	0
ASE	200	4500	40	0

本实验所用接种污泥取自安徽省芜湖市城南污水处理厂二沉池的回流污泥，污泥呈黄褐色泥水混合液，沉淀性能良好。将所取活性污泥先静置沉淀排出上清液并用自来水清洗 6 遍。然后将其置于实验室塑料桶内闷曝 24 h；闷曝结束后将活性污泥投加反应器中^[87]。取回的活性污泥主要性质由表 3-2 所示。

表 3-2 活性污泥初始特性

Table 3-2 Initial Characteristics of Activated Sludge

初始指标	SV30 (%)	MLSS (mg/L)	SVI (mL/g)	pH
活性污泥	35	5209	67	6.67

3.2.1.3 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

3.2.2 实验方法

3.2.2.1 好氧污泥的驯化

考虑到接种污泥为絮状污泥，为避免培养初期污泥因上浮而流失，反应器在启动初期采用间歇进料的运行方式^[88]。本实验按照一定的梯度逐渐提高进水废水中 NaCl 含量以及氨氮浓度的方式对活性污泥进行培养。水力停留时间定为 24 h，体积交换比为 50 %。反应器污泥接种运行后的污泥浓度为 $\text{MLSS}=4000 \text{ mg/L}$ 。实验过程中每 5 d 取样考察反应器内污泥浓度、污泥沉降性能变化情况，每隔 24 h 定时取样，以系统 COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 等污染物去除率达到 80% 以上作为污泥耐盐和耐高氨氮废水驯化完成的表征指标。

3.2.2.2 活性污泥指标的测定

活性污泥驯化过程中，每隔 5 d 对驯化系统中的活性污泥的污泥沉降比（ SV_{30} ）、污泥浓度的测定（ MLSS ）进行一次测定，并计算污泥体积指数（ SVI ），检测驯化过程中活性污泥特性。

3.2.2.3 水质分析

同第二章 2.2.2.3

3.3 结果分析

3.3.1 不同时期 SV_{30} 、MLSS 及 SVI 的变化

3.3.1.1 SV_{30} 、MLSS 变化

污水生物处理系统的效能很大程度上取决于活性污泥的性能,因此考察表征活性污泥性能的污泥沉降比(SV_{30})、混合液中的悬浮固体(MLSS)、污泥体积指数(SVI)等指标是很有必要的。活性污泥驯化结果的好坏是提高生物处理系统运行效果的关键,为促使系统内微生物量快速繁殖,在实验过程中采用不排泥的方式^[89]。图 3-2 中分别展示了活性污泥处理高盐及高氨氮废水定向驯化过程中 5 个系统(ASA、ASB、ASC、ASD、ASE)的 SV_{30} 、MLSS 随污泥驯化的变化曲线。在驯化期间,除取样分析外没有进行人为的排泥。对于五个驯化系统,反应初期系统中的 SV_{30} 均在 40%左右,初始污泥浓度为 4000 mg/L。对于 ASA 系统(图 3-2a),在驯化到第 30 天时,系统中的污泥浓度出现下降,为 6390 mg/L,此时对污泥系统进行观察,发现曝气装置出现问题而曝气量过大导致大量松散的污泥絮体随着出水被淘洗出反应器,对曝气装置进行调整后系统逐渐恢复。对于 ASB(图 3-2b)系统的驯化,污泥浓度有一个先下降后上升的过程,这个过程可能是由于刚接种的污泥不适应新的环境导致少量微生物死亡从而降低了污泥浓度。五个驯化系统的污泥浓度都随着驯化的进行有所升高,说明系统中的微生物在逐渐适应新的环境,微生物的繁殖促进了污泥浓度的提高。在驯化过程及后期处理过程中,活性污泥的浓度一直处于较高的水平,五个系统最终污泥浓度分别为 6123 mg/L、7690 mg/L、8190 mg/L、13038 mg/L、9126 mg/L。污泥沉降比分别为 65%、87%、91%、95%、91%。

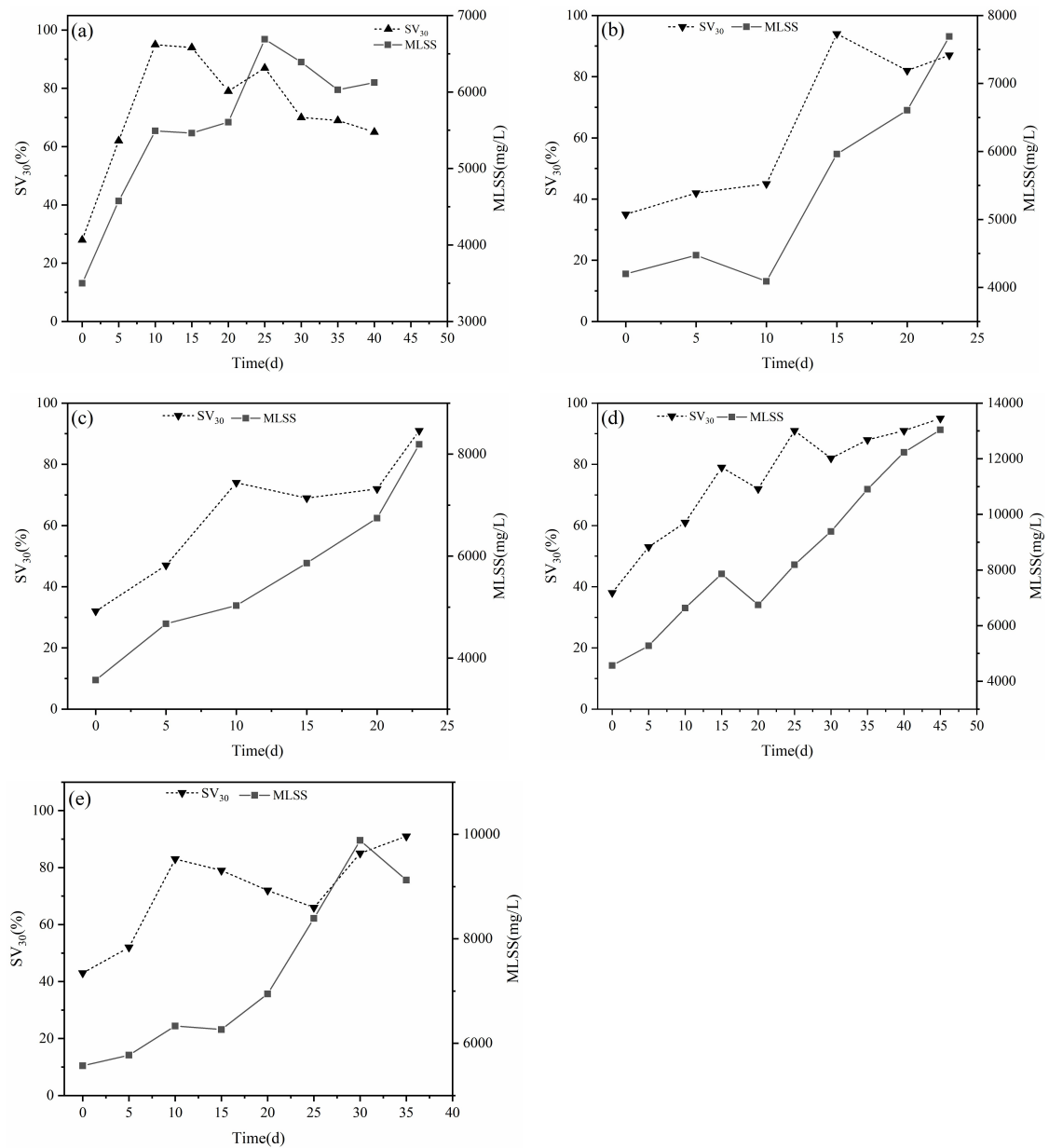


图 3-2 污泥驯化期间系统污泥特性变化：ASA(a)、ASB(b)、ASC(c)、ASD(d)、ASE(e)

Fig. 3-2 Changes of sludge characteristics during aerobic activated sludge acclimation:

ASA(a), ASB(b), ASC(c), ASD(d) and ASE(e)

3.3.1.2 SVI 变化

图 3-3 显示了五个系统在驯化期间污泥体积指数 (SVI) 的变化曲线。据报道，对于处理一般城市污水的活性污泥的 SVI 值为 50~150 mL/g，SVI 值过大时属于污泥膨胀。然而在 ASA (图 3-2a) 系统驯化至第 10 d 及 ASB (图 3-2b) 系统驯化至第 15 d 时，活性污泥的 SVI 分别增加到了 173 mL/g 以及 157 mL/g，污泥沉降性能变差，导致 ASA 和 ASB 系统中氨氮去除率分别下降到 35.41% 和

47.79%。对 ASA 系统的 pH 值进行检测发现过低于 4.5，这可能引起污泥中丝状细菌的丰度增加，从而污泥体积膨胀^[90]；对 ASB 系统进行检测发现气体流量计控制不稳，使得系统中曝气过量。后续通过对 ASA 驯化系统的 pH 值进行定时调整至 pH 值为 7-8 以及对 ASB 驯化系统的曝气量进行控制，ASA 和 ASB 系统污泥沉降性能逐渐恢复正常，待适应工艺条件的微生物逐渐生长繁殖起来以后污泥浓度开始升高并逐渐稳定。而由图 3-3c、3-3d 和 3-3e 可以看出，在驯化期间，系统 ASC、ASD、ASE 系统中污泥特性良好，污泥驯化系统运行稳定。

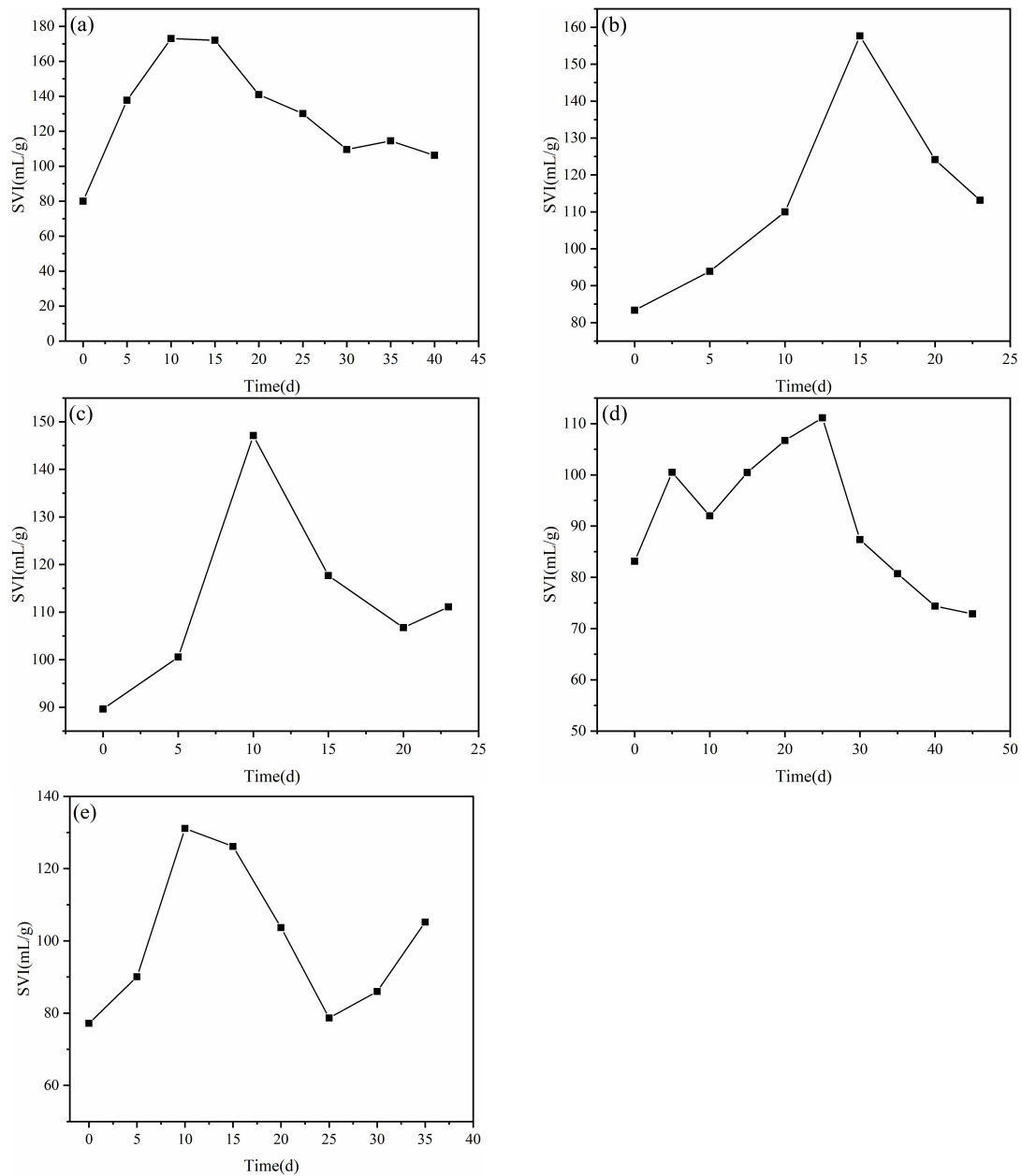


图 3-3 好氧活性污泥驯化期间系统 SVI: ASA(a)、ASB(b)、ASC(c)、ASD(d)、ASE(e)

Fig. 3-3 System SVI during Aerobic Activated Sludge Acclimation:
ASA(a),ASB(b),ASC(c),ASD(d) and ASE(e)

3.3.2 处理高盐废水活性污泥的定向驯化

3.3.2.1 COD 去除效果

图 3-4 展示的是在盐胁迫下好氧活性污泥驯化期间 COD 浓度的变化。对于 ASA 系统，在驯化初期，COD 去除率随着驯化时间的进行在稳定上升，此时系统中进水 COD 浓度为 2600 mg/L 左右，但此时活性污泥处理效果并不理想。在驯化持续到第 6 天开始，COD 的去除率由 95.23% 逐渐开始下降至 55.17%，COD 去除率的降低可能与细菌代谢能力减弱有关^[9]。后续为提高对废水中氨氮的去除效果，通过提高葡萄糖添加量来增加碳源。经过 40 天的驯化，系统可稳定运行，此时进水 COD 浓度均维持在 3300 mg/L 左右，COD 去除率最高可达 98.07%。对于盐胁迫的活性污泥驯化，COD 浓度均维持在 3500 mg/L 的范围内，最终 ASB 和 ASC 驯化系统中的 COD 去除率分别为 90.71% 和 91.56%。

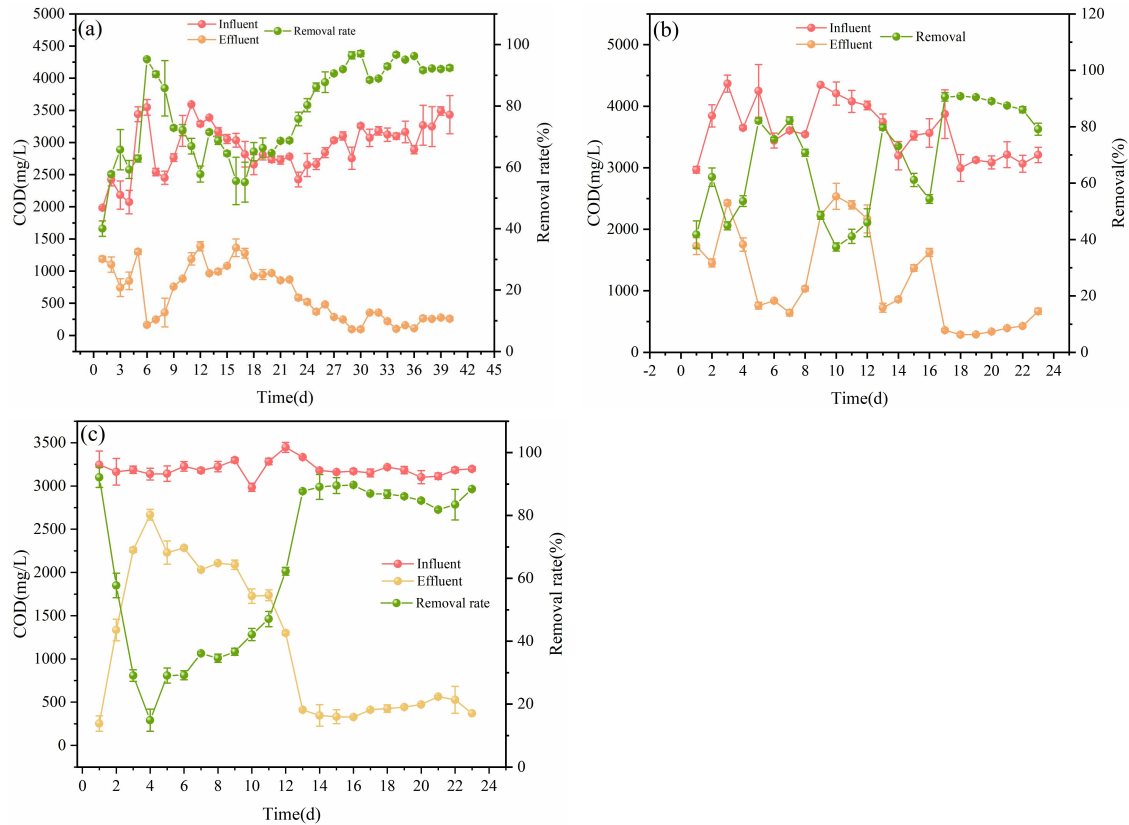


图 3-4 盐胁迫驯化期间 COD: ASA(a)、ASB(b)、ASC(c)

Fig. 3-4 COD during salt stress acclimation: ASA(a),ASB(b) and ASC(c)

3.3.2.2 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除效果

图 3-5 是活性污泥处理高盐废水定向驯化期间系统 ASA、ASB、ASC 中氨氮浓度变化。首先对从污水处理厂取回的活性污泥进行不添加 NaCl 的含氮废水的活性污泥驯化处理(ASA)，使盐胁迫驯化期间进水氨氮浓度维持在 100 mg/L。

在驯化前期，ASA 系统中进水氨氮浓度在逐渐升高，这可能是微生物不适应新环境，抑制了污泥中微生物的生长，甚至导致微生物的死亡，从而使得细胞内氨氮污染物释放到体系中导致氨氮浓度升高。从图 3-4a 可以看出，此时 COD 浓度过低，这可能导致微生物没有充足的碳源提供生长，也是氨氮去除效果不好的原因之一。通过调整碳源添加量，在驯化到第 40 天时，系统出水氨氮浓度基本稳定且最低能达 1.19 mg/L，此时氨氮去除率能达到 97.73%。后保持氨氮浓度为 100 mg/L 采用逐步增加 NaCl 浓度的方式进行含盐废水的驯化（ASB、ASC）。驯化初期，由于 NaCl 的加入，活性污泥中的微生物对于突然的盐浓度冲击并不适应，导致出水中氨氮污染物浓度较高，但随着驯化时间的进行，微生物经过更迭与淘汰，一些耐盐或嗜盐微生物出现，逐渐适应盐环境，氨氮去除率逐渐升高，ASB 和 ASC 系统均在第 23 天时达到稳定，氨氮去除率分别可达到 98.97%和 98.48%。

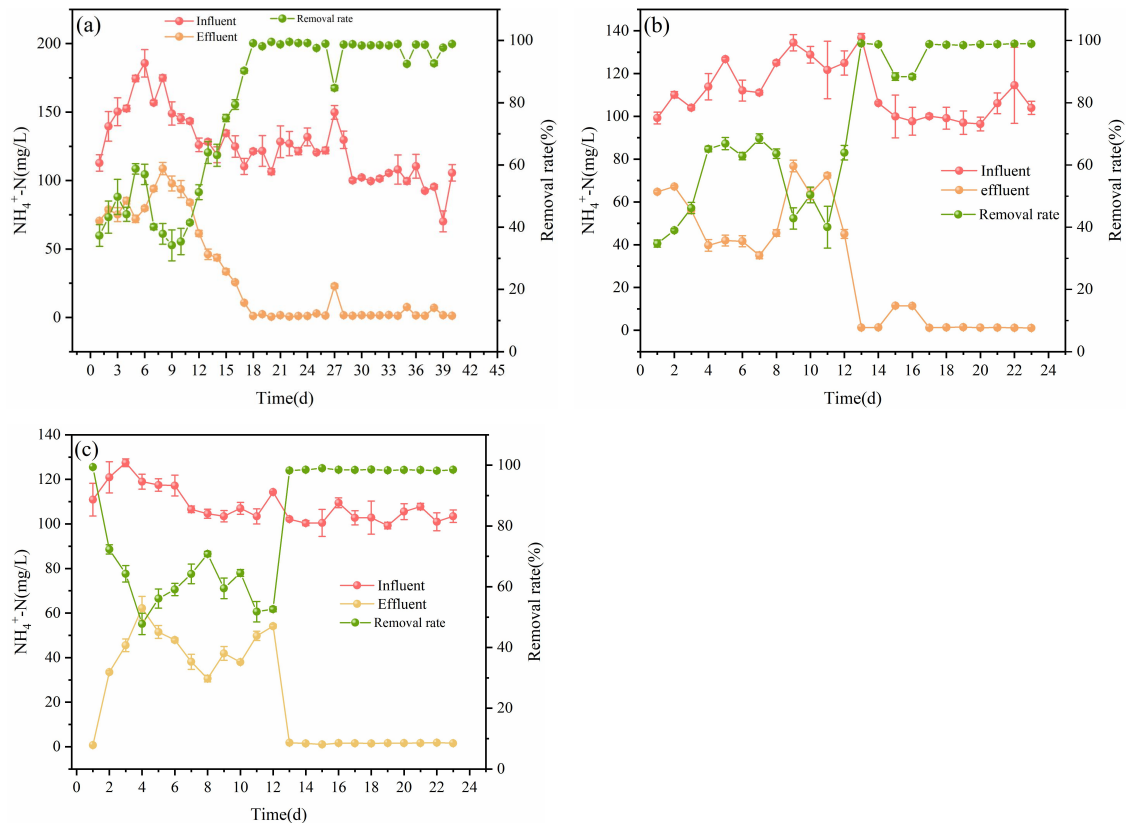


图 3-5 盐胁迫驯化期间 $\text{NH}_4^+\text{-N}$: ASA(a)、ASB(b)、ASC(c)

Fig. 3-5 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ during salt stress acclimation: ASA(a), ASB(b) and ASC(c)

3.3.3 处理高氨氮废水活性污泥的定向驯化

3.3.3.1 COD 去除效果

图 3-6 是处理高氨氮废水活性污泥定向驯化期间 COD 浓度以及 COD 去除率变化曲线。驯化期间采用的是人工配置的合成废水，葡萄糖为驯化系统的唯一碳

源,随着进水中氨氮浓度的提高,为了确保系统中有充足的碳源可供微生物利用,在驯化过程中每天取样检测出水 COD 浓度的变化,并根据同一时间出水中氨氮浓度来调整进水 COD 浓度。在驯化第一天,ASD 和 ASE 系统中 COD 去除率分别达到了 97.36%和 70.78%,而后开始出现下降,出现初始去除率较高的原因可能是由于每阶段驯化完成后,采用的是从上一阶段取出 MLSS=4000 mg/L 的部分污泥进行下一阶段活性污泥的驯化,这一行为直接对系统进行了污泥排泥。而后又由于废水中氨氮浓度的提高,还未适应新环境的微生物活性受到抑制,出现短暂的下降趋势。对于 ASD 系统,当进水氨氮浓度为 150 mg/L 时,此时 COD 浓度为 3500 mg/L,经过 45 天的驯化,COD 出水浓度可达 402.41 mg/L,此时 COD 去除率为 85.83%。当进水氨氮浓度提高到 200 mg/L 时即 ASE 系统,通过调整,COD 去除率最高可达 75.36%。

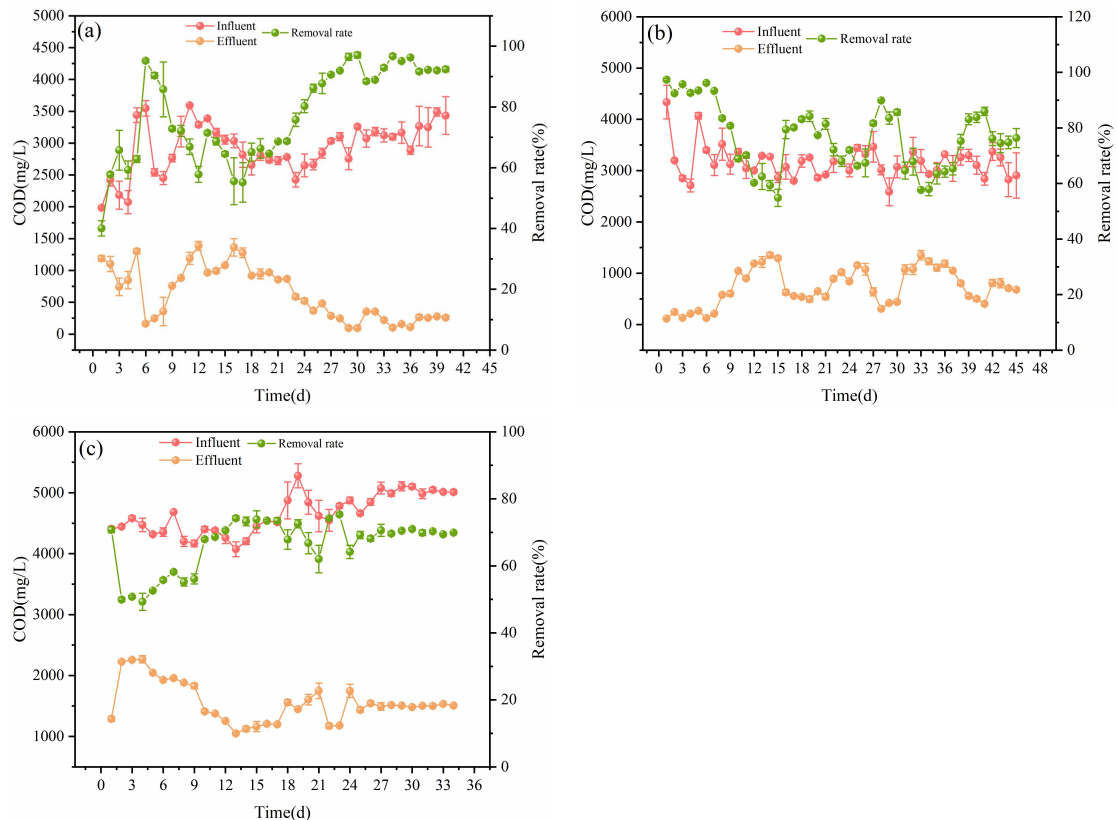


图 3-6 高氨氮废水驯化期间 COD: ASA(a)、ASD(b)、ASE(c)

Fig. 3-6 COD during acclimation of high ammonia nitrogen wastewater:ASA(a),ASD(b) and ASE(c)

3.3.3.2 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除效果

对于处理高氨氮废水活性污泥的定向驯化期间系统中氨氮浓度及去除率如图 3-7 所示。经过 40 天的时间在完成进水废水中氨氮浓度为 100 mg/L 的好氧活

性污泥驯化后。增加系统中氨氮浓度为 150 mg/L（即 ASD）进行高氨氮浓度合成废水的定向驯化。在驯化前期由于系统的污泥排泥，使得氨氮去除率能够达到 89.29%，而后由于废水中氨氮污染物的升高，微生物受到冲击，不适应新环境的微生物代谢变慢，氨氮去除率开始下降，随着驯化的进行，活性污泥对氨氮的去除能力逐渐恢复。当驯化到 45 天时，ASD 系统中氨氮去除率可达到 99.12%，此时出水氨氮浓度为 90.45 mg/L。

再次提高进水废水的氨氮浓度到 200 mg/L 进行驯化（即 ASE 系统）。ASE 系统第一天氨氮去除率可达 90.15%。随着驯化进行到第 24 天时，系统中氨氮去除率达到 76.72%，后又稳定运行了 10 天，后续氨氮去除率保持不变。这可能是过高的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 浓度下硝化细菌代谢能力达到一定阈值，从而导致活性污泥系统的生物量减少，进而降低了硝化性能^[92, 93]，这也是影响硝化作用的因素之一。

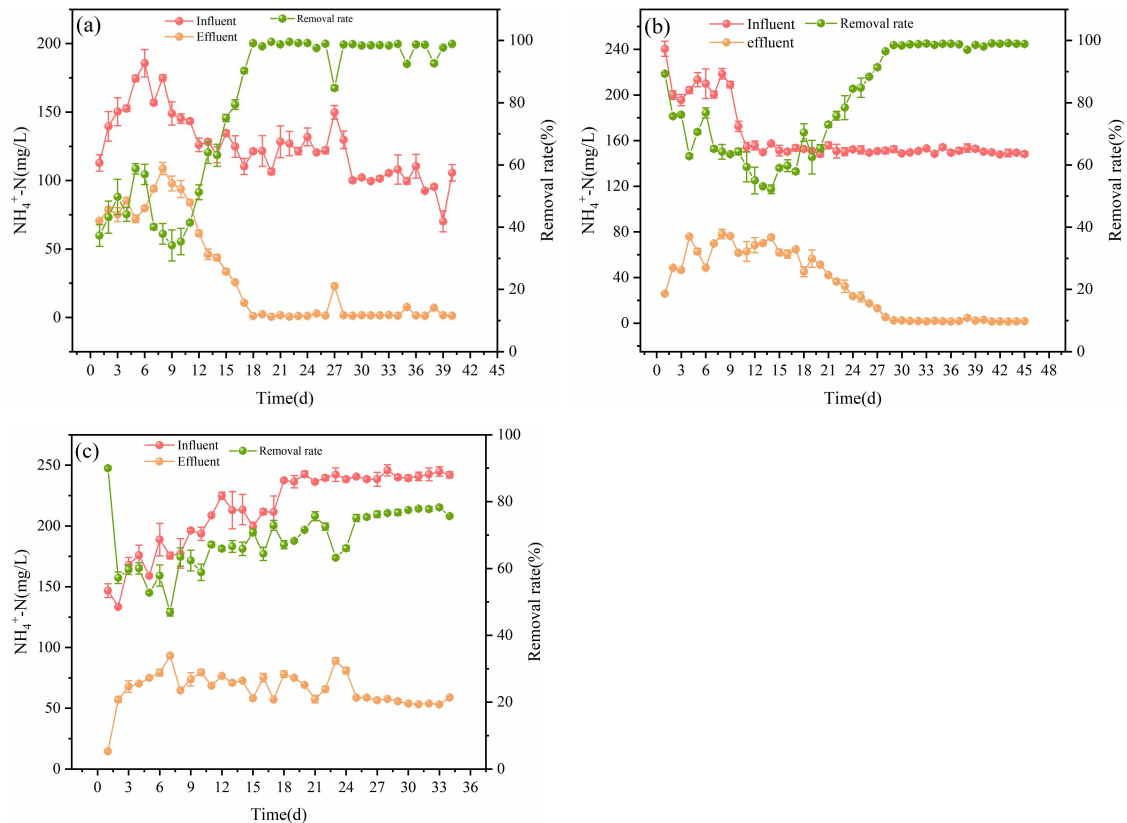


图 3-7 高氨氮废水驯化期间 $\text{NH}_4^+\text{-N}$: ASA(a)、ASD(b)、ASE(c)

Fig. 3-7 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ during acclimation of high ammonia nitrogen wastewater:ASA(a),ASD(b) and ASE(c)

3.4 小结

本章分别对活性污泥混合菌群处理高盐高氨氮废水进行定向驯化研究，并将驯化完成的五组不同的好氧活性污泥分别命名为 ASA（氨氮浓度 100 mg/L）、

ASB（氨氮浓度 100 mg/L 和 NaCl 浓度 0.5%）、ASC（氨氮浓度 100 mg/L NaCl 浓度 1%）、ASD（氨氮浓度 150 mg/L）、ASE（氨氮浓度 200 mg/L）。结果显示：

(1) 驯化前期，ASA 系统和 ASB 系统分别在第 10 天和第 15 天活性污泥的 SVI 分别从 80 mg/L 增加到了 173 mg/L 以及 83 mg/L 增加到了 157 mg/L，出现了污泥膨胀现象。分别对驯化过程中 ASA 系统 pH 值和 ASB 系统的通气量进行调整和控制，污泥沉降性能逐渐恢复正常，后期驯化均稳定进行，且污泥浓度一直处于较高水平。在驯化期间污泥浓度升高，所有系统中微生物繁殖良好。

(2) 对于处理含盐废水好氧活性污泥的定向驯化，在盐胁迫下，随着驯化进行，COD 和氨氮去除率逐渐提高，当系统中 NaCl 浓度为 1%时，氨氮和 COD 去除率最高分别可达 98.48%和 91.56%。

(3) 对于处理高氨氮废水好氧活性污泥的定向驯化，当进水废水中氨氮浓度提高至 200 mg/L 时，通过调整碳源，经过 34 天的驯化，最终 COD 去除率最高为 75.36%，氨氮去除率最高达 76.72%，系统氨氮及 COD 去除率均达到稳定不再上升，此时系统中氨氮浓度达到了活性污泥微生物处理高氨氮废水的极限。实验表明，在一定的盐浓度或者氨氮浓度范围内，经驯化后的活性污泥能够很好的处理高盐高氨氮废水。

第 4 章 驯化完成的活性污泥中微生物多样性及演替规律

4.1 引言

污水生物处理系统中微生物的种群结构及微生物多样性、结构稳定性和功能稳定性在污水处理系统有效性中起着重要作用^[94]。在污水处理过程中,微生物群落结构和多样性对处理系统的稳定性和处理效果起着决定性作用。对于高盐高氨氮废水处理,活性污泥中的微生物在驯化过程中会发生群落结构和功能的动态变化。了解这些变化规律,有助于揭示微生物对高盐高氨氮环境的适应机制,进而优化处理工艺。尽管已有研究关注微生物在废水处理中的作用,但对于不同盐浓度和氨氮浓度驯化下活性污泥微生物群落的演替规律、代谢功能变化等方面的研究还存在诸多空白。本章借助高通量测序技术和生物信息学分析方法,对不同盐浓度和氨氮浓度驯化完成的活性污泥样品进行研究,深入剖析微生物群落组成、结构变化以及代谢功能特征,为深入了解高盐含氮废水处理过程中微生物的作用机制提供理论支撑,为进一步优化废水处理工艺提供科学依据。

4.2 材料与方法

4.2.1 实验材料

4.2.1.1 活性污泥样品

分别对 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE 五个活性污泥驯化系统在驯化完成时取样。将 40 mL 污泥装于已经灭菌的 50 mL 离心管中,每组样品一式三份。取样完成后迅速放入-80 °C冰箱中冷冻保存

4.2.2 实验方法

4.2.2.1 高通量测序

将冻干污泥样品送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行高通量测序。使用细菌引物 341 F (CCTACGGGNGGCWGCAG) 和 805 R (GACTACHVGG

GTATCTAATCC)依次进行 16S rDNA 的 V3 和 V4 区的 PCR 扩增和高通量测序。本研究采用 Shannon、Chao1、ACE、Simpson 和 Coverage 指数来评估微生物群落多样性。基于 97%的序列相似性阈值对操作分类单元 (OTU) 进行聚类分析。在分类学分析过程中, 未能鉴定的微生物类群标记为"unclassified", 同时将各样本中相对丰度低于 1%的微生物类群统一归类为"others"。该实验的测序原始数据已上传到 NCBI 数据库, 注册号为 PRJNA1225472。

4.2.2.1 微生物代谢功能

通过 KEGG 数据库进行对比, 挑选出参与新陈代谢、遗传信息处理、环境信息处理和细胞过程的主要代谢功能, 并使用 RStudio 4.4.3 进行各功能基因相对丰度图绘制。

4.3 结果与分析

4.3.1 微生物群落组成与结构

4.3.1.1 微生物群落丰富度

图 4-1(a)展示的是稀释性曲线 (Rarefaction Curve), 结果表明, 测序量在达到 50000 后, 曲线斜率逐渐降低, 说明测序数据合理, 样品的测序深度较好, 微生物群落的多样性已经达到饱和, 证明本试验的测序量适当, 足以反映样品的物种丰富度。从 Alpha 多样性图可以看出, ASE 的系统的 Shannon 值是所有好氧活性污泥系统中最大的, 表明该系统具有较高的微生物丰富度和良好的生物多样性。

等级丰度曲线 (Rank-abundance) [95] (图 4-1b)主要用来解释检测物种的丰富度及均匀度。这种曲线形态反映了群落中物种的多样性和相对多度分布情况。从图 4-1(b)中可以看出 5 个样品对应的曲线最初丰度下降较为迅速, 表明优势物种的丰度较高, 与其他物种的丰度差距明显; 而当 OTU Rank 大于 200 后, 丰度下降趋势逐渐变缓, 意味着稀有物种的数量较多, 但它们各自的丰度都很低。

对于本图 4-1c, 采用主成分分析 (PCA) 方法对五种样品 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE 间细菌群落在 OTU 水平上的组成差异进行评估。结果显示, 横坐标和纵坐标上各变量对样本组成差异的解释能力分别为 42.55%和 26.89%。此外, 图 4-1 (c) 中描绘的 PCA 图表明, 五个好氧活性污泥系统在图中距离较远, 说明物种相似性较低。

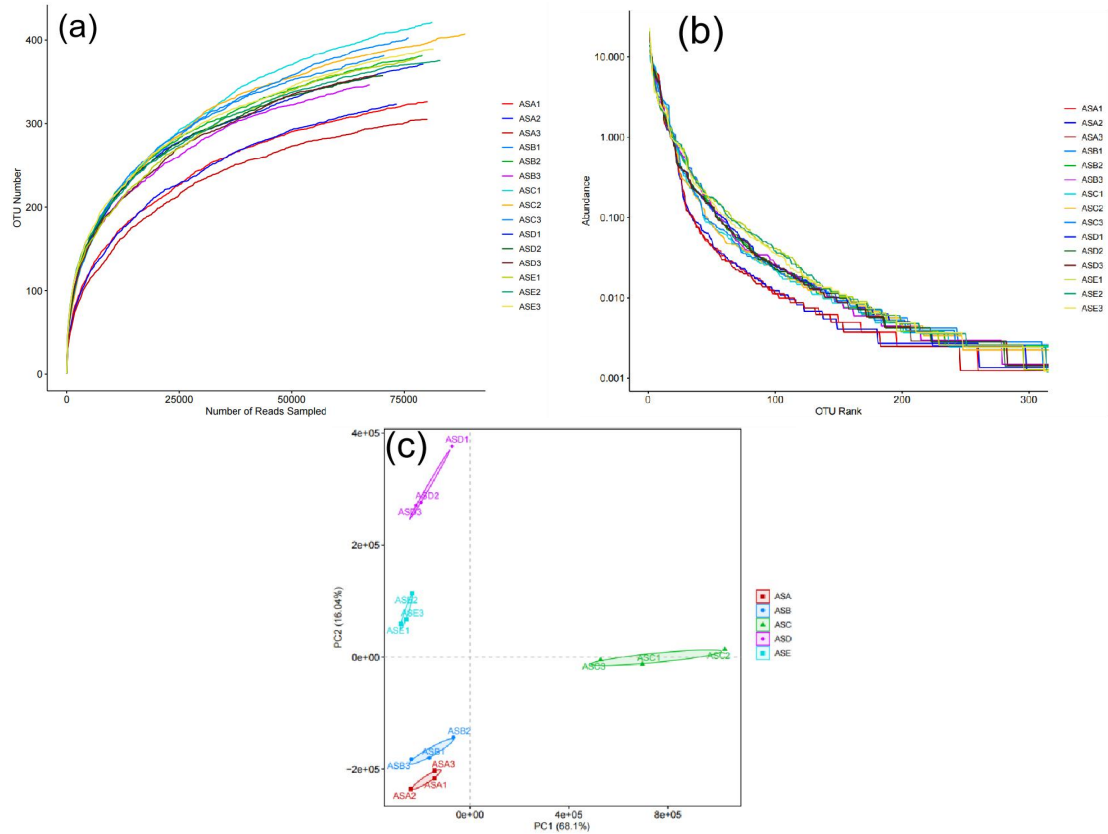


图 4-1 Alpha 指数稀释性曲线图（OTU 水平）(a)、RankAbundance 曲线图(b)、功能 PCA 图（KEGG 功能注释）(c)

Fig. 4- 1 Alpha Exponential Dilution Plot (OTU Level), Rank Abundance Plot, Functional PCA Plot (KEGG Function Note)

4.3.1.2 α 多样性

Alpha 多样性指数是表征微生物群落生态特征的重要指标，主要用于评估特定生境中微生物类群的丰富度。通常包括 Chao1 指数、Simpson 指数、Coverage 指数、Shannon 指数等。其中 Coverage 指数是指微生物覆盖率，其数值越高，则样品中存在未检测出物种的概率就越低，当 Coverage > 0.92 时，即可认为测序深度合理，能够真实的反映出样品内部的微生物情况^[96]。不同盐浓度及氨氮浓度驯化下的微生物多样性指数见表 4-1。从 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE 这 5 个污泥样品中获得 95715、88753、103567、90455、97680 个有效读数。各样本的 Coverage 指数均在 100%，这说明所获得的序列能够覆盖大部分微生物^[97]，本研究的测序结果能够充分显示 5 个活性污泥驯化系统中的微生物多样性和群落演替。通过 Chao 值和基于丰度的覆盖率估计（ACE）评估物种丰富度，用 Shannon 和 Simpson 值表征物种多样性。分别由不同盐浓度进水的 ASA、ASB、ASC 系统和不同氨氮浓度的 ASA、ASD、ASE 系统的可以看出，随着废水中盐浓度的增加，ACE 指数由 368.0589 增加到 477.7851，而随着废水中氨氮浓度的增加，

ACE 指数由 368.0859 增加到 445.7690，表明废水中盐浓度和氨氮浓度的升高，均会使驯化系统中微生物群落丰富度增加。生物系统的多样性对系统的稳定性有一定的影响，抵抗外部环境波动的能力随着多样性的增加而增加^[98]，微生物群落的多样性与 Shannon 指数具有相同的趋势^[98]。在驯化过程中，对于处理不同盐浓度进水废水的定向驯化，ASC 的 Shannon 指数值最高。而对于处理不同氨氮浓度进水废水的定向驯化，ASE 的 Shannon 指数值最高，说明这两组系统中微生物更加丰富。得出的结论是，高丰度和多样性的微生物群落有利于降解高氨氮及盐胁迫下废水中的氨氮。此外，图 4-2a、b 显示，在活性污泥驯化系统中观察到的 OTUs 总数为 2673 个，其中 9.2% 的 OTUs 被所有好氧活性污泥系统共享，ASC 系统的细菌群落中独特 OTU 最多。

表 4-1 活性污泥样品的细菌多样性指数

Table4-1 Bacterial diversity indices of activated sludge samples

Sample	Chao	Shannon	Ace	Simpson	Coverage
ASA	346.5942	2.9896	368.0859	0.0827	100
ASB	399.8260	3.3214	420.7359	0.0706	100
ASC	449.7351	3.3197	477.7851	0.0584	100
ASD	402.8732	3.2821	431.1727	0.0669	100
ASE	422.5970	3.3664	445.7690	0.0794	100

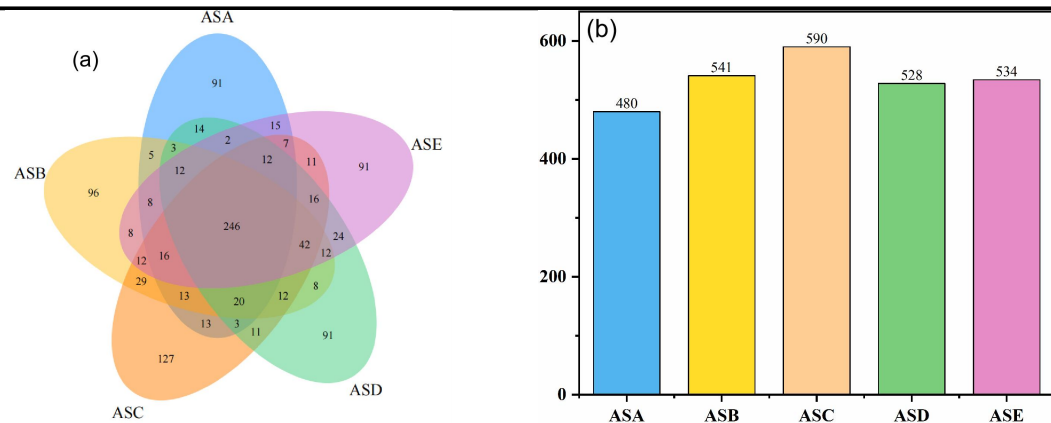


图 4-2 物种分布韦恩图

Fig.4-2 Venn diagram of species distribution

4.3.2 不同驯化系统内微生物群落组成及结构变化

4.3.2.1 门水平微生物群落组成及结构分析

在门水平上，每个系统运行期间的微生物群落结构如图 4-3 所示。从 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE 收集的活性污泥样品中，*Patescibacteria*（骸骨菌门）、*Bacteroidota*（拟杆菌门）、*Actinobacteriota*（放线菌门）、*Proteobacteria*（变形

菌门)、*Firmicutes* (厚壁菌门)、*Desulfobacterota* (脱硫菌门) 是优势菌门, 这些菌门广泛存在于用于有机物去除的活性污泥样品中^[99]。其中, 相较于 ASA 来说, 骸骨菌门的相对丰度在 ASB、ASC、ASD、ASE 中分别降低了 7.26%、34.55%、11.32%、4.64%。骸骨菌门是近年新界定的超级类群, 在地下水中常与反硝化菌共存^[100], 可对脱氮性能产生积极的作用, 能够强化系统的脱氮能力。在本研究中, 随着盐浓度及氨氮浓度的升高, 骸骨菌门丰度有所下降, 可以推断, 在盐胁迫或者高氨氮浓度的抑制下, 一些不能适应系统环境的骸骨菌门被消除, 从而降低了它们的丰度^[101]。拟杆菌门是一种革兰氏阴性细菌^[102], 可利用于含氮物质及类固醇等物质, 提高大分子有机物的降解能力^[103-105]。其代谢活性有利于有机物降解, 提高废水处理效率。与 ASA 相比, ASB、ASD、ASE 中拟杆菌门的丰度分别增加了 1.64%、10.96%、13.32%, 这说明, 随着盐胁迫或氨氮浓度的升高, 为了更好的去除废水中的污染物, 拟杆菌门的丰度也会有所增加。门水平的优势微生物还包括放线菌门、变形菌门、厚壁菌门、脱硫菌门。研究表明, 变形菌门是硝化和反硝化细菌中种类最多的一类, 在脱氮过程中占主导地位^[106], 在去除 COD、反硝化和降解低分子量有机物等过程中发挥重要作用^[105, 107, 108], 是参与污泥生物脱氮脱磷和有机物降解过程的重要微生物物种。据报道, 厚壁菌门能够通过产生内生孢子来抵抗极端环境^[109], 并与反硝化过程呈正相关^[110, 111], 具有良好的反硝化性能^[112], 厚壁菌门在 ASB、ASC、ASD、ASE 系统均有增加。这些门的富集使得活性污泥更好的适应盐胁迫下对氨氮污染物的去除。

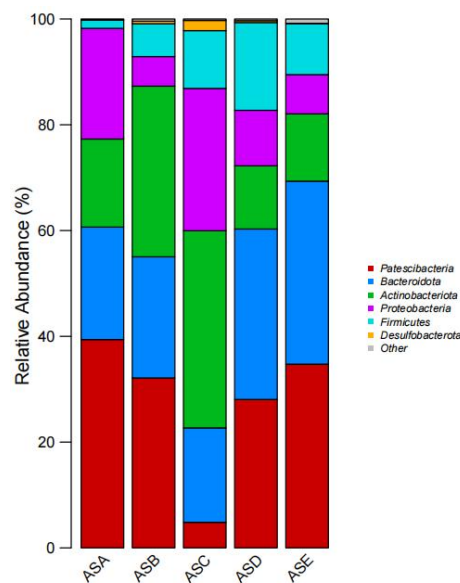


图 4-3 五个系统微生物组成群落门水平
Fig.4-3 Phylum level of microbial composition in five systems

4.3.2.2 属水平微生物群落组成及结构分析

在属水平上,对 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE 驯化系统进一步进行分析(图 4-4),5 个反应器的优势均属主要是 *norank_Saccharimonadales* (鞘氨醇单胞菌)、*Chryseobacterium* (金黄杆菌属)、*Propionibacterium* (丙酸杆菌属)、*Actinomyces* (放线菌属)、*norank_Weeksellaceae*、*Bifidobacterium* (双歧杆菌属)、*Corynebacterium* (棒状杆菌属)、*norank_Bacteroidales*、TM7a (糖细菌)、*Ottowia* (奥托氏菌属)、*Brachymona* (反硝化短枝单胞菌属),每个反应系统中主要菌属的相对丰度差异很大。鞘氨醇单胞菌是 ASA、ASB、ASD、ASE 系统中相对丰度较高的菌属,相对丰度分别为 32.03%、29.19%、26.38%、31.58%,说明该菌属具有较强的水质环境冲击能力。从 ASA 到 ASB 和 ASC 中丙酸杆菌属的丰度逐渐升高,ASC 的优势菌属变为丙酸杆菌属(15.15%),这表明在盐胁迫下,丙酸杆菌属比鞘氨醇单胞菌具有更强的生存能力^[113]。而 ASD、ASE 驯化系统中鞘氨醇单胞菌和丙酸杆菌属的相对丰度变化并不明显,说明鞘氨醇单胞菌抗高氨氮废水冲击力的能力更好。金黄杆菌属是一类无鞭毛,无芽孢,严格好氧生长的革兰氏阴性菌,呈短小杆状^[114],其广泛分布于水体、土壤和环境中,能够代谢包括甘油和海藻糖在内的多种多糖和蛋白类物质,并且其对于多种抗生素都有抗性^[115],其在 ASA 系统中相对丰度最高为 13.89%,随着盐浓度和氨氮浓度的升高,在 ASB、ASC、ASD、ASE 系统中金黄杆菌属相对丰度分别为 13.15%、13.35%、9.11%和 6.91%,较高的盐浓度和氨氮浓度都会抑制金黄杆菌属的生长。双歧杆菌属是反硝化菌株^[116],在 ASA、ASB、ASC 系统中,其相对丰度分别为 4.57%、9.35%、7.86%,随着盐浓度由 0%逐步增加到 1%,双歧杆菌属的丰度分别增加了 4.78%和 3.28%,而 ASC 系统相较于 ASB 系统,丰度降低了 1.49%,在盐胁迫下,系统为了更好的抵抗盐浓度的冲击,双歧杆菌属的丰度有所提升,然而,当盐浓度超过一定阈值时,可能会抑制双歧杆菌属的生长。在 ASD、ASE 系统中几乎没有双歧杆菌属的存在,高浓度的氨氮对双歧杆菌属的生长和繁殖具有明显的抑制作用。

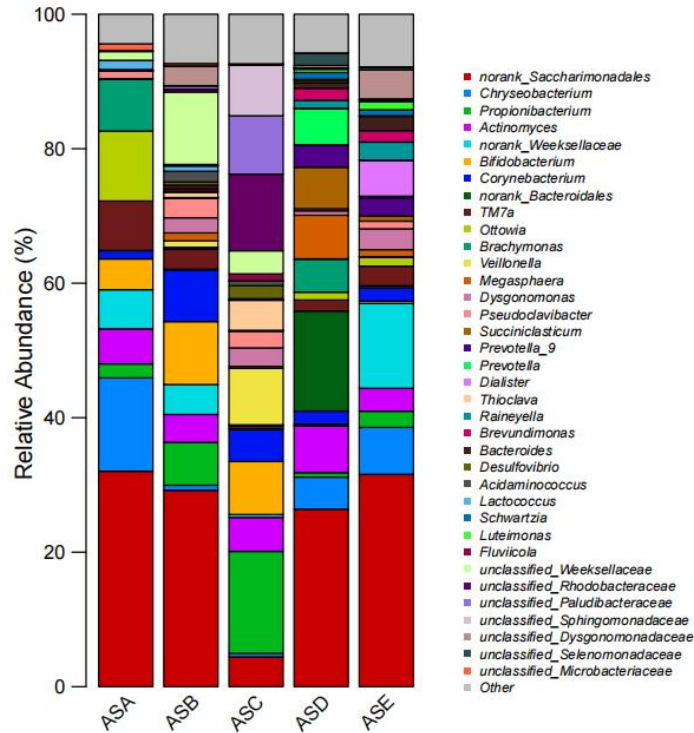


图 4-4 五个系统微生物组成群落属水平

Fig.4-4 The microbial composition of the five systems was at genus level

4.3.3 微生物代谢功能预测

基于 PICRUSt 的代谢功能预测显示，该研究揭示了好氧活性污泥系统中微生物群落的功能特征。参与新陈代谢、遗传信息处理、环境信息处理和细胞过程的主要代谢功能如图 4-5 所示。在环境信息处理中信号转导与膜转运相对活跃，对于 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE 系统中，信号转导与膜转运相对丰度分别为 5.70%、6.24%、5.89%、7.24%、6.10%和 2.99%、2.76%、2.77%、3.03%、2.91%。重要的是，在代谢功能基因中，其他次级代谢物的生物合成在 KEGG 二级基因中含量最高。具体来说，碳水化合物代谢和氨基酸代谢是系统中的主要代谢途径，也是微生物群落的必要代谢^[117, 118]，他们在 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE 系统中的相对丰度分别在 8.45%、9.37%、10.06%、9.29%、8.46%以及 4.41%、4.49%、4.17%、5.77%、5.74%。对于系统 ASA、ASB 和 ASC，随着废水中盐浓度的升高，当盐浓度为 0.5%时，碳水化合物代谢也呈现上升趋势，说明了活性污泥系统在碳水化合物代谢上对盐浓度胁迫的适应性。但在 ASC 系统中开始下降，这表明碳水化合物代谢在 1%盐浓度时减弱；而随着废水中氨氮浓度的升高，系统 ASA、ASD、ASE 的碳水化合物代谢呈现上升趋势，这是由于在驯化过程中，提高废水中氨氮浓度的同时，也会对 COD 浓度进行调整随之升高，使其有充足

的碳源可供微生物利用，而碳水化合物代谢与 COD 的变化一致。

与 ASA 相比，ASB 系统的氨基酸代谢能力变化并不明显，而系统 ASC、ASD、ASE 的氨基酸代谢能力呈现下降趋势，再次表明废水中较高的氨氮浓度及盐浓度会抑制活性污泥对废水中氨氮污染物的降解。据报道，脂质代谢能力增强被认为是细胞膜稳定性增加的表现^[119]。在本研究中，脂质代谢在低盐浓度（0.5%）时的相对丰度为 5.24%，相比于 NaCl 浓度为 0% 时的相对丰度 5.33% 变化并不明显，而当 NaCl 浓度为 1% 时增加到 7.12%，表明在高盐浓度下细胞膜稳定性逐渐增强，从而提高了活性污泥系统耐盐性^[118, 120]。

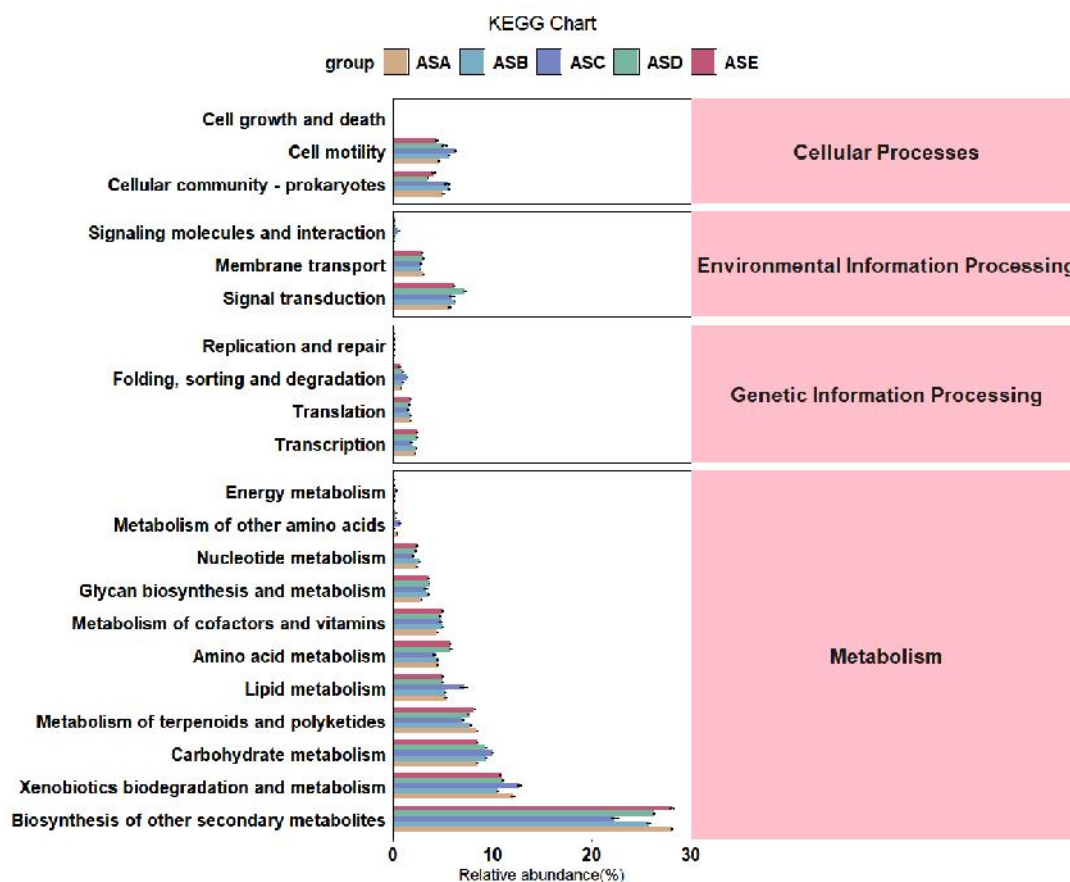


图 4-5 微生物群落中潜在功能基因的预测

Fig. 4-5 Prediction of potential functional genes in microbial communities.

4.4 小结

本章主要对驯化过程中微生物多样性及演替规律进行研究。对五个活性污泥驯化系统（ASA、ASB、ASC、ASD、ASE）在驯化完成后进行高通量测序，对五组不同的好氧活性污泥系统进行微生物多样性分析。通过高通量测序和微生物代谢功能预测分析发现，测序数据合理，能够反映样品微生物多样性。盐浓度和氨氮浓度升高均使微生物群落丰富度增加，对于处理不同盐浓度进水废水的定向

驯化，ASC 的 Shannon 指数值最高，而对于处理不同氨氮浓度进水废水的定向驯化，ASE 的 Shannon 指数值最高，说明这两组系统中微生物更加丰富。高丰度和多样性的微生物群落有利于降解高氨氮及盐胁迫下废水中的氨氮污染物。

(1) 在门水平上，ASA、ASB、ASC 系统中 *Patescibacteria* 的相对丰度分别为 39.39%、32.13%、4.84%，*Actinobacteriota* 的相对丰度分别为 16.64%、32.27%、37.27%，均随着 NaCl 浓度的升高而降低；在 ASD、ASE 系统中，*Patescibacteria* 的相对丰度分别 28.07% 和 34.74%，随着氨氮浓度的升高而提高。*Bacteroidota* 是系统中的优势菌门，在 ASA、ASD、ASE 系统中 *Bacteroidota* 的相对丰度分别为 21.27%、32.23%、34.59%，随着氨氮浓度的提高，ASD 和 ASE 系统中 *Bacteroidota* 的相对丰度分别提高了 1.52 倍和 1.63 倍。*Firmicutes* 菌门也随着氨氮浓度的提高而升高，相对丰度由 ASA 系统中的 1.59% 分别提高到 ASB 系统中的 6.22% 和 ASC 系统中的 10.92%。

(2) 在属水平上，ASA、ASB、ASC 系统中 *norank_Saccharimonadales* 的相对丰度分别为 32.03%、29.19% 和 4.43%，具有较强的水质环境冲击能力，*Chryseobacterium* 的相对丰度分别为 13.89%、0.76%、0.54%，相对丰度均随着 NaCl 浓度的升高而降低。而 *Propionibacterium* 的相对丰度分别为 2.07%、6.38%、15.15%，随着 NaCl 浓度的升高而升高。对于 ASA、ASD、ASE 系统，*norank_Saccharimonadales* 的相对丰度分别为 32.03%、26.38%、31.58%，*Chryseobacterium* 的相对丰度分别为 13.89%、4.78%、6.98%，随着氨氮浓度的升高，相对丰度先上升后下降。而 *Bifidobacterium* 随着氨氮浓度的升高相对丰度由 4.57% 下降到 0.34%，说明 *Bifidobacterium* 难以在高氨氮环境中生长。

(3) 根据代谢功能预测结果显示，在 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE 五种系统中碳水化合物代谢的相对丰度分别为 8.45%、9.37%、10.06%、9.29%、8.46%，随着 NaCl 浓度的升高先上升后下降，说明碳水化合物代谢对低盐浓度胁迫具有适应性，氨基酸代谢的相对丰度分别为 4.41%、4.49%、4.17%、5.77%、5.74%，两者是微生物群落的必要代谢。随着 NaCl 浓度的提高，脂质代谢的相对丰度由 ASA 系统中 5.33%，提高到 ASC 系统中的 7.12%。脂质代谢的增加提高了高盐浓度下细胞膜稳定性。这些结果为深入理解活性污泥处理高盐含氮废水的机制提供了依据。

第 5 章 异养硝化好氧反硝化菌强化高盐高氮废水处理效果研究

5.1 引言

生物强化技术作为提高污水处理效率的有效手段,在高盐含氮废水处理领域具有广阔的应用前景。将耐盐异养硝化好氧反硝化菌添加到活性污泥系统中,能够强化系统的脱氮能力,提高对高盐含氮废水的处理效果。*Acinetobacter* sp. AHP1231 是第二章中 *Acinetobacter* sp. AHP123 经过 1% 盐浓度驯化后的一株异养硝化好氧反硝化细菌,具备一定的耐盐脱氮能力,将其加入到第三章 ASE 系统中运行良好的好氧活性污泥进行生物强化,能提高系统处理废水的能力。但在实际应用中,其强化活性污泥系统处理高盐高氮废水的效果受多种因素影响,如碳源种类、接种量和温度等。目前,针对这些因素对生物强化系统处理效果影响的系统研究较少,限制了该技术的实际应用。本章以菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 和稳定运行的 ASE 系统的好氧活性污泥为材料,构建了生物强化系统,通过单因素优化实验,探究了碳源种类、接种量和温度等因素对生物强化系统处理高盐高氮废水效果的影响,以确定最佳运行条件。并探究了菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 对生物强化系统中微生物群落结构的影响,为生物强化技术在高盐含氮废水处理中的实际应用提供技术参数和理论支持。

5.2 材料与方法

5.2.1 实验材料

5.2.1.1 菌种及活性污泥

菌种: 为第二章驯化完成的 *Acinetobacter* sp. AHP1231;

活性污泥: 从第三章中运行稳定的 ASE 系统中取得的活性污泥,保存在本实验室中。

5.2.1.2 培养基

含盐混合氮源培养基 (g/L) : 10 NaCl, 3.51 丁二酸钠, 3.40 柠檬酸钠, 0.2 NH₄Cl, 0.3 KNO₃, 0.007 KH₂PO₄, 0.035 K₂HPO₄·3H₂O, 0.005 MgSO₄, 微量元素溶液 2 mL, pH 7.3-7.5;

LB 培养基 (g/L) : 10 NaCl, 10 蛋白胨, 5 酵母提取物, pH 值 7.0~7.5;

微量元素溶液 (g/L) : EDTA 0.1, 0.0078 ZnSO₄·7H₂O, 0.011 CaCl₂, 0.008 MnCl₂·4H₂O, 0.01 FeSO₄·7H₂O, 0.0021 (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.0032 CuSO₄·5H₂O, 0.0032 COCl₂·6H₂O;

上述培养基均在 121 °C 灭菌 20 min, 固体培养基则在液体培养基中加入 15 g/L 的琼脂。

5.2.1.3 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

5.2.2 实验方法

5.2.2.1 HNAD 菌强化好氧活性污泥脱氮

将在 1% NaCl 中驯化完成的 AHP1231 与 ASE 系统稳定运行的好氧活性污泥分别添加至有效体积为 1.5 L 的 2 L 的锥形瓶中进行培养, 培养温度为 28 °C, 每 3 h 定时取样测定废水中的 NH₄⁺-N、TN、TP、COD 浓度, 探究耐盐异养硝化好氧反硝化菌 AHP1231 对废水的处理效果。

5.2.2.2 菌种的制备

菌种的活化: 将菌株 AHP1231 的菌体接种于 LB 液体培养基中, 在 30°C, 200rpm 的条件下培养 12 h, 再用生理盐水调 OD₆₀₀ 值为 1.7。

5.2.2.3 合成废水的制备

合成废水: 由葡萄糖、丁二酸钠、氯化铵和磷酸二氢钾进行配置, 并添加 2mL/L 的微量元素, 其中微量元素营养液组成成分: NiCl₂·6H₂O 0.024 g/L, FeCl₃ 1.5 g/L, CuSO₄ 0.002 g/L, H₃BO₃ 0.006 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.19 g/L, MnSO₄·H₂O 0.061g/L, H₄MoNa₂O₆ 0.024 g/L 和 ZnCl₂ 0.07 g/L, 分别溶解后混匀, 置于 4°C 冰箱保存备用。

5.2.2.4 生物强化系统的建立与优化

将菌种以 5% 的接种量接入含 1% NaCl 的人工合成培养基并设置对照组 (仅添加菌种 AHP1231、仅添加 ASE 系统活性污泥), 并添加 ASE 系统中稳定运行

的好氧活性污泥，污泥浓度为 4000 mg/L，培养 24 h，探究生物强化系统对氨氮的降解效果。

为了获得生物强化系统处理高氨氮废水的最佳培养条件，分别考察了碳源种类、菌种接种量、以及温度对生物强化系统中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、TN、TP、COD 的含量影响。其中碳源种类分别设置为 12 g/L 葡萄糖、12 g/L 丁二酸钠、3 g/L 葡萄糖与 9 g/L 丁二酸钠（葡萄糖/丁二酸钠=1/3）、9 g/L 葡萄糖与 3 g/L 丁二酸钠（葡萄糖/丁二酸钠=3/1）四组；菌种 AHP1231 接种量分别设置为 0%、5%、10%、15%、20%、30%；温度分别设置为：10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C；实验采用单因素优化，每 3 h 定时取样测定废水中的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、COD、TN、TP 浓度，污染物检测方法同第二章 2.2.2.3。

5.2.2.5 生物强化处理系统微生物群落组成

含盐高氨氮废水生物强化系统实验装置同第三章 3.2.1.1。本试验以探究后的最佳碳源、温度、接种量进行培养，并设置两组处理，分别为：AS0 组，反应器污泥接种运行后的污泥浓度为 $\text{MLSS}=4000\text{ mg/L}$ 并添加 NaCl 浓度为 1%且氨氮浓度为 200 mg/L 的人工合成废水，每 24 h 进行一次换水，并稳定运行一周；AS1 组，反应器污泥接种运行后的污泥浓度为 $\text{MLSS}=4000\text{ mg/L}$ 并添加 NaCl 浓度为 1%且氨氮浓度为 200 mg/L 的人工合成废水，并以 5%的接种量接种 OD_{600} 为 0.15 的菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231，每 24 h 进行一次换水，并稳定运行一周。并根据 4.2.2.1 的将样品送往上海生工生物工程有限公司进行宏基因组测序，每组样品三个重复。该实验的测序原始数据已上传到 NCBI 数据库，注册号为 PRJNA1263147。

5.3 结果与分析

5.3.1 *Acinetobacter* sp. AHP1231 强化高氨氮废水脱氮

为了验证菌种 *Acinetobacter* sp. AHP1231 生物强化处理高盐高氨氮废水的能力，将运行良好的 ASE 系统的活性污泥以 $\text{MLSS}=4000\text{ mg/L}$ 以及菌种以 5%的接种量添加进含 1% NaCl 的合成废水设为强化组，设置两组对照组分别为仅添加活性污泥和仅添加 AHP1231 进行实验。由于 AHP123 无法利用葡萄糖，会导致其没有充足的碳源可利用而抑制生长^[34, 121]，故在之前合成废水的基础上添加丁二酸钠进行实验，初始碳源为 3 g/L 葡萄糖及 4 g/L 丁二酸钠，实验结果如图 5-1

所示。细菌 AHP1231 主要进行异养过程来去除系统中的 COD，吸收外部碳源供自身繁殖。从图 5-1a 可以看出，由于 ASE 系统在驯化过程中以添加葡萄糖为碳源，活性污泥对丁二酸钠的利用效果并不好，而菌株 AHP1231 无法利用葡萄糖，导致出水时强化组、单菌对照组以及单泥对照组的去除率最终分别达到 77.74%、71.39%和 58.87%，对于 COD 的去除效率，强化组高于对照组。

由图 5-1b 发现，对于氨氮污染物的去除，在第 12 h 时，生物强化系统中氨氮污染物基本去除，去除率为 98.56%，而此时两组对照组对氨氮的去除效果相对较差，分别为 60.25%和 55.02%。随着发酵继续进行，强化组氨氮去除率基本稳定，对照组中氨氮浓度有所下降但并不明显。第 24 h 时，三组处理组中氨氮污染物浓度分别为 65.59 mg/L、58.69 mg/L 和 0.35 mg/L，去除率分别为 67.95%、71.84%和 99.82%。强化组的氨氮去除效果远远高于对照组，因此，对于 AHP1231 强化活性污泥系统脱氮是有效的。

综上所述，将菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 添加进活性污泥系统进行生物强化这一方法是可行的。

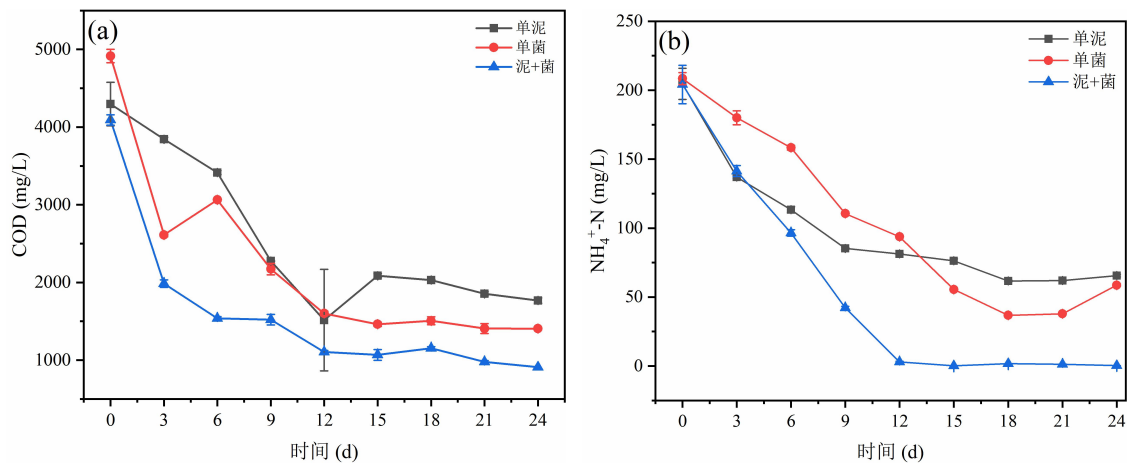


图 5-1 生物强化系统性能：COD (a)、氨氮 (b)

Fig. 5-1. Bioaugmentation system performance: COD(a), NH₄⁺-N(b)

5.3.2 生物强化系统处理废水条件优化

5.3.2.1 碳源种类

菌株 AHP1231 在以丁二酸钠为碳源时对氨氮的去除效果最好，而活性污泥 ASE 是以 12 g 葡萄糖为碳源培养进行驯化的，因此对碳源的种类进行优化以探究生物强化系统的最佳碳源是必要的。所添加的碳源总浓度均为 12 g/L。对于废水中 COD 的去除，由图 5-2a 所示，四组处理组的 COD 浓度均呈现下降趋势，在培养 24 h 时四组处理组的 COD 去除率分别为 83.94%、66.77%、64.41%、68.27%。

虽然系统中在仅添加葡萄糖为碳源时 COD 去除率最高，但此时其氨氮去除率低于碳源种类为 9 g/L 葡萄糖和 3 g/L 丁二酸钠时。

从图 5-2b 中可以看出各个处理组的氨氮浓度均有所下降。当碳源仅为 12 g 丁二酸钠时，处理组中 21 h 时氨氮的去除率能够达到 98.5%，而培养到 24 h 时的氨氮浓度有所升高，不仅如此，碳源为 3 g/L 葡萄糖和 9 g/L 丁二酸钠的处理组在培养到 18 h 至 21 h 的过程中也出现氨氮浓度上升的情况。这可能是由于活性污泥驯化时的最佳碳源是葡萄糖，当强化系统中添加的丁二酸钠占比过高时，系统中的活性污泥没有充足的葡萄糖去利用，导致污泥中的微生物的生长受到抑制，在培养后期出现菌体的大量死亡，导致菌体内氨氮污染物的释放致使体系中氨氮浓度的升高^[38, 122]。而当碳源种类为 9 g/L 葡萄糖和 3 g/L 丁二酸钠时，不仅活性污泥中的微生物有充分的碳源可利用，而且丁二酸钠具有更小的分子量，更易被细菌吸收转化^[123]，使得系统中氨氮去除率效果最好，培养结束时氨氮的去除率达到 98.23%。

对于总氮和总磷污染物的去除如图 5-2c 和 5-2d 所示，因为系统中添加的唯一碳源为氨氮，系统内总氮的去除趋势与氨氮相似。然而在培养 24 h 内，四组处理组的总氮浓度始终高于系统中的氨氮浓度。这可能是由微生物介导的硝化过程在该系统中发挥作用^[124]。首先，氨氧化细菌（AOB）通过 AMO 和 HAO 两种关键酶的催化作用，将 NH_4^+ 氧化为 NO_2^- ^[125]。随后，NOB 利用亚硝酸盐氧化还原酶，以分子氧作为末端电子受体，将亚硝酸盐进一步氧化为硝酸盐（ NO_3^- ）^[126]，由于 NO_2^- 和 NO_3^- 导致了系统中的总氮浓度总是高于氨氮浓度。而对于系统内总磷的去除，碳源种类为 12 g 葡萄糖和 9 g/L 葡萄糖加 3 g/L 丁二酸钠的两组处理组差异不大，最终去除效果分别达到 85.66% 和 86.12%。而另外两组总磷去除效果相对较差。

综上所述，选择碳源为 9 g/L 葡萄糖和 3 g/L 丁二酸钠作为生物强化系统处理废水的最佳碳源。

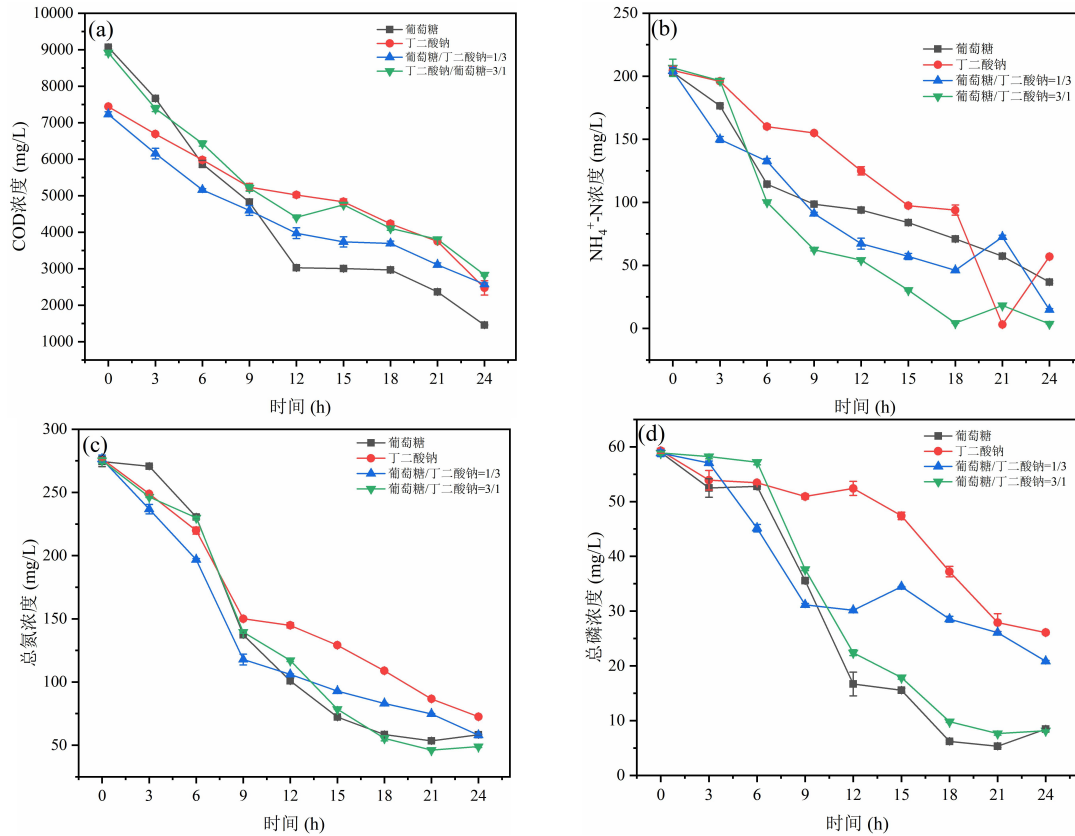


图 5-2 不同碳源添加量对生物强化系统处理废水效果的影响:COD(a)、氨氮(b)、总氮(c)、总磷(d)

Fig. 5-2 Effect of Different carbon source addition amount on wastewater treatment efficiency of biological enhancement system:COD(a), $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (b),TN(c),TP(d)

5.3.2.2 AHP1231 接种量

为了探究菌种 AHP1231 不同接种量对生物强化系统脱氮的影响, 选择五组不同的添加量投入强化系统进行实验, 并设置 AHP1231 接种量为 0% 作为对照组。实验过程中活性污泥的投加量为投入系统后的 MLSS 为 4000 mg/L, 实验结果如图 5-3。对于废水中 COD 的去除效果如图 5-3a 所示, 24 h 内, 接种量为 5% 的处理组中 COD 浓度稳定降低且去除效果最好, 最终去除率可达到 89.15%, 而对于接种量为 10%、15%、20%、30% 的处理组, 24 h 时去除率没有显著差异分别为 75.94%、74.85%、76.92%、74.81%。而其中不添加 AHP1231 的处理组 COD 的去除效果最差, 去除率仅为 59.43%。

对于氨氮污染物的去除如图 5-3b, 在培养前期, 不同接种量时, 氨氮的去除率没有明显区别, 而对照组的氨氮去除率始终低于其他五组。然而, 当接种量大于 5%, 随着 AHP1231 的接种量的增加, 氨氮去除率明显降低, 这可能是由于系统中过高浓度的 AHP1231 与活性污泥中的微生物出现竞争, 抑制了 AHP1231 的生长, 出现菌体死亡, 从而导致了系统内氨氮污染物的释放, 使得氨氮浓度升

高。当 AHP1231 的接种量为 5% 系统中氨氮的去除效果最好, 氨氮去除率最高可达 99.45%。

对于总氮和总磷污染物的去除, 结果如图 5-3c 和 5-4d 所示。当接种量为 10%、15%、20%、25% 时与对照组相比, 总氮的去除效果差别不大, 相比于接种量为 5% 的处理组, 另外五个处理组中总氮和总磷的去除效果较差。对于 5% 的处理组, 总氮和总磷最终去除率分别为 77.78%、88.93%。

综上所述, 接种量选择 5% 可以达到最佳氨氮去除效果。

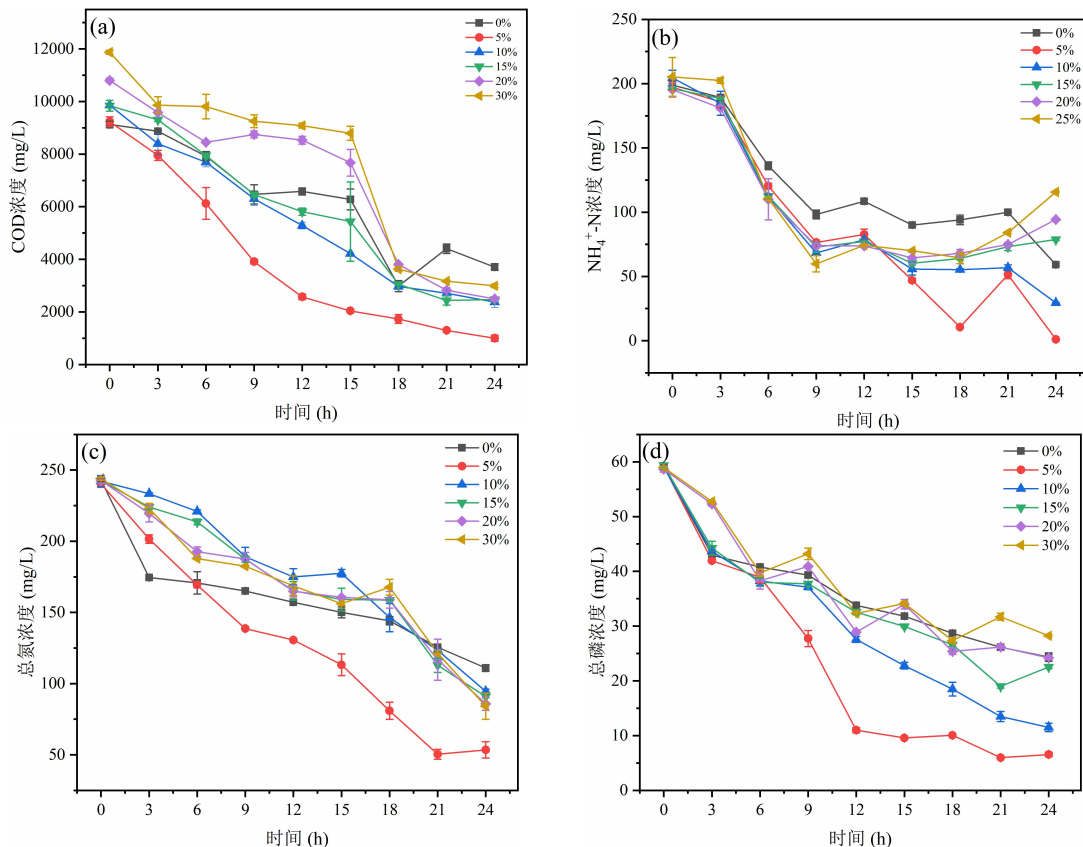


图 5-3 不同接种量对生物强化系统处理废水的影响:COD(a)、氨氮(b)、总氮(c)、总磷(d)

Fig. 5-3 Effect of different inoculation amount on wastewater treatment by bioaugmentation system:COD(a), $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (b)、TN(c)、TP(d)

5.3.2.3 温度

温度是影响微生物生长和生命代谢活性的主要因素, 一般而言, 水温越低, 微生物活性越小, 硝化细菌和反硝化细菌都属于中温细菌, 大多数菌株的生长温度范围为 $5\sim 35^\circ\text{C}$, 最适生长温度为 $25\sim 30^\circ\text{C}$ ^[127]。为了探究不同温度对生物强化系统处理废水的影响, 分别选择 10°C 、 15°C 、 20°C 、 25°C 、 30°C 五组不同的温度进行实验, 实验结果如图 5-4。对于 COD 污染物的去除图 5-4a, 实验发现在温度范围为 $10\sim 25^\circ\text{C}$ 时, 随着温度的升高, COD 去除率也在上升, 然而温度升高到 30°C 时, COD 去除率相比于 25°C 开始下降。当生物强化系统温度为

25 ℃时，第 24 h 时 COD 去除率可达到 90.14%。

由 5-4b 结果显示，温度在 20 ℃~30 ℃时，氨氮的降解效率没有较大差异，24 h 时氨氮去除率分别达到 97.39%、98.75%、98.69%。在 25 ℃下，反应 12 h 时，氨氮去除率可达到 99.09%，此时氨氮浓度为 2.06 mg/L。当运行温度为 10 ℃和 15 ℃时，生物强化系统中氨氮的降解效果相比于另外三组较差，且温度越低氨氮去除率越低。生物硝化的适宜温度是 20~30 ℃，一般温度低于 15 ℃硝化速率降低，这是因为温度对细菌的活性影响不同，12~14 ℃下活性污泥中硝化菌活性会受到严重的抑制^[127]。

对于总氮和总磷污染物的去除如图 5-4c 和 5-4d 所示，当运行温度为 10 ℃和 15 ℃时，强化系统对总氮及总磷的去除效果不及另外三组处理组。发现在温度为 20 ℃、25 ℃、30 ℃时去除效果相差不大，相比之下，温度为 25 ℃时，总氮和总磷的去除效果最好，24 h 时强化系统中总氮和总磷的去除率分别为 85.08% 和 89.91%。

因此，该生物强化系统的最佳运行温度为 25 ℃。

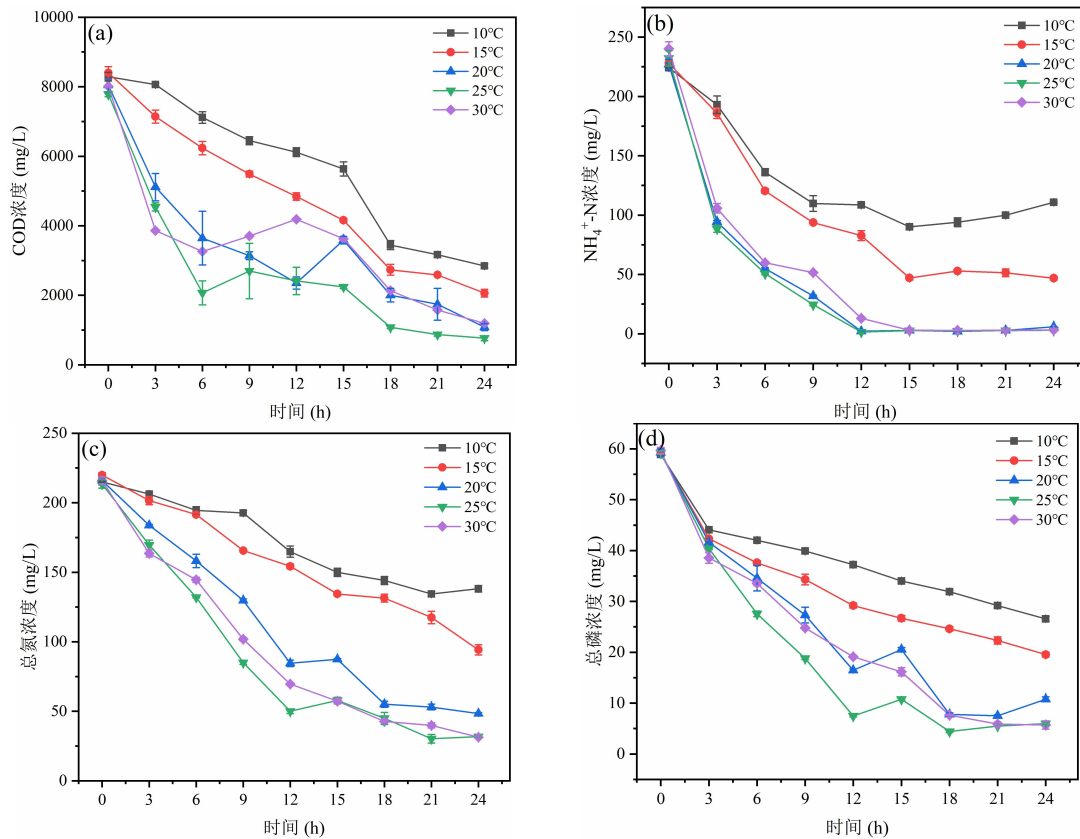


图 5-4 不同接种量对生物强化系统处理废水的影响:COD(a)、氨氮(b)、总氮(c)、总磷(d)
 Fig. 5-4 Effect of different inoculation amount on wastewater treatment by bioaugmentation system:COD(a), $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (b)、TN(c)、TP(d)

5.3.3 生物强化处理系统中细菌群落结构

5.3.3.1 微生物群落多样性变化

为探究菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 生物强化处理含盐高氨氮废水对系统微生物群落的丰富度和多样性的影响, 本研究分别分析了仅添加活性污泥系统 (AS0) 以及添加了菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 和活性污泥的强化系统 (AS1) 在稳定运行一周后两个样本的 Alpha 多样性和 Beta 多样性。Alpha 多样性指数是评估某一生境内 (或样本中) 的生物群落物种的丰富度和多样性的综合指数, 主要包括 Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数。Beta 多样性分析是通过统计学方法计算两两样本间距离以比较不同样本间群落多样性的差异性, 主要包括主坐标分析 (PCoA) 分析、主成分分析 (PCA) 和非度量多维尺度分析 (NMDS) 等。

Chao1 指数越大代表系统的物种总数越多, Shannon 指数越大说明系统生物群落多样性越高, 而 Simpson 指数越小则说明物种均匀越高, 反之亦然。表 5-1 显示了不同时期样本中的微生物丰富度, 从表中可以看出 2 个样本的覆盖深度均在 100%, 这表明高通量测序分析获得的序列涵盖了样本的整个基因组。

各样本的序列读取总数 (Number) 分别为 98528 及 91198, 显然, 样本 AS0 的 OTU 数量大于 AS1, 这说明生物强化打破了原有平衡使得微生物群落结构发生了显著变化。这可能是投加的菌种 *Acinetobacter* sp. AHP1231 与反应器中原有微生物存在竞争关系, 部分微生物由于在竞争中长期处于劣势而被淘汰。此外, 通过 Shannon 指数也可以得出样本 AS0 的生物多样性高于 AS1 的结论。从 OTU 曲线图 (图 5-5) 可以看出, 2 个样本中丰富度最高的 OTU 在 10%~100% 之间, 并且曲线头端下降迅速, 这说明样本中优势菌属占比很高, 生物多样性较差。同时, 系统中 Shannon 指数由 AS0 中的 3.16 下降到 AS1 中的 2.76, 而 Simpson 指数则由 AS0 中的 0.08 增加到 AS1 中的 0.17, 这两项数值变化说明投加 *Acinetobacter* sp. AHP1231 在生物强化系统中降低了微生物群落的多样性。

表 5-1 污泥样品的细菌多样性指数

Table 5-1 Bacterial diversity indices ludge samples

Sample	Chao	Shannon	Ace	Simpson	Coverage
AS0	200.11	3.16	198.92	0.08	100
AS1	209.67	2.76	199.71	0.17	100

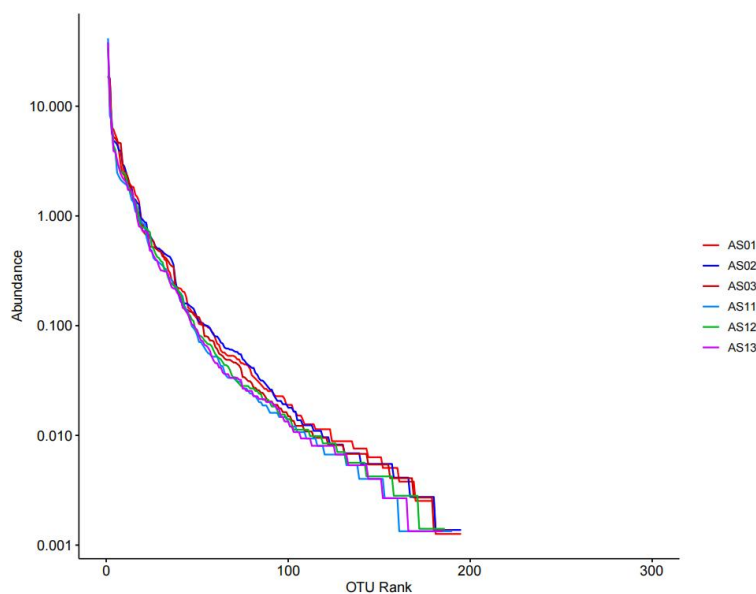


图 5-5 OTU 曲线

Fig.5-5 OTU curve

根据各不同样本间的差异性统计结果,对不同处理和阶段的样本群落组成进行了 PCoA 分析,具有相似 Beta 多样性的样品聚类在一起。PCoA 分析结果表明(图 5-6),主坐标 1 轴和 2 轴对细菌 OUT 水平群落变化解释度为 80.71%。AS0 组和 AS1 组微生物群落在菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 生物强化后生物增强系统 AS1 的微生物组成与未添加 *Acinetobacter* sp. AHP1231 的微生物群落(AS0)的偏差较小,说明菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 生物强化去除废水中污染物的过程中对系统中细菌 Beta 多样性改变较小。

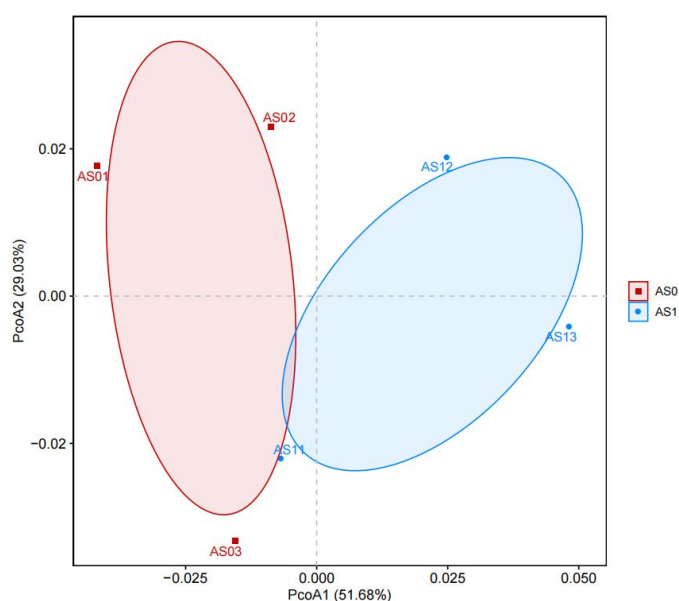


图 5-6 主成分分析(PCoA)不同处理条件下生物强化处理系统中微生物群落组成相似性
Fig. 5-6 Principal component analysis (PCoA) of the three Bio-CFRs respectively

5.3.3.2 微生物群落结构分析

图 5-7 描述了不同时期生物强化后的门水平微生物群落变化，其中主要有 *Patescibacteria*（髌骨菌门）、*Actinomycetota*（放线菌门）、*Pseudomonadota*（假单胞菌门）、*Bacteroidota*（拟杆菌门）、*Bacillota* 五种主要菌门。从图中可以看出髌骨菌门与假单胞菌门为各样本中的主要门。其中髌骨菌门在 2 个污泥样本中的相对丰度分别为 34.64%及 21.12%。有研究表明，髌骨菌门可起到反硝化作用，提高电子供体利用效率，强化滞留池脱氮能力。样本 AS1 中的假单胞菌门相对丰度明显高于样本 AS0，分别为 42.57%、5.03%，相比于 AS0，AS1 中的假单胞菌门相对丰度提高了 37.54%。假单胞菌门在处理过氨氮废水中占有很大比例。一些研究报告指出，假单胞菌门在反硝化过程中发挥着重要作用，主要参与碳和氨的氧化。放线菌门的相对丰度由 AS0 中的 34.07%下降到 14.26%，据报道，放线菌总是在沿海盐沼土壤中被发现，它能快速适应高盐度环境，适合在高盐度下生长，而在低盐度环境中含量相对丰度占比较少，这里放线菌门的下降可能是强化系统中添加了 *Acinetobacter* sp. AHP1231 导致的结果。

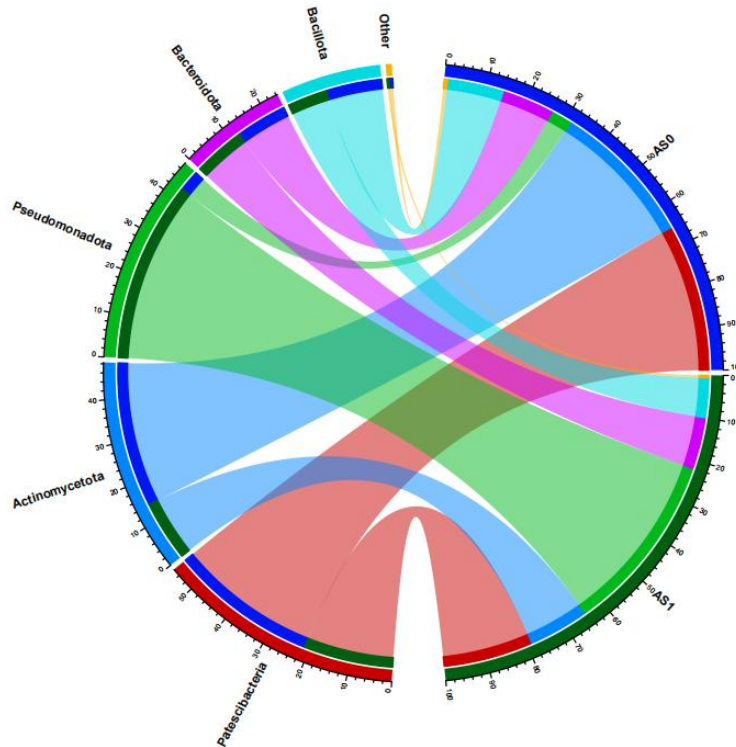


图 5-7 两个系统微生物组成群落门水平
Fig.5-7 Phylum level of microbial composition in two systems

在属水平上（图 5-8），不同污泥样本之间的细菌群落组成也存在明显差异。如 *norank_Saccharimonadales*（19.02~31.69%）、*Acinetobacter*（0.63~38.11%）、

Corynebacterium (7.34~18.03%) 及 *Propionibacterium* (3.99~10.04%) 的相对丰度在各污泥样本间具有较大差别。有研究表明, *norank_Saccharimonadales* 菌属是一种氨氧化细菌 (AOB), 其主要功能是氨代谢, 与 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 呈显著正相关, 因此在整个系统中始终保持较高的丰度占比。由于强化系统中菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 的加入, 使得 AS1 系统中 *Acinetobacter* 菌属的相对丰度由 AS0 中的 0.63% 提高到了 38.11%。在经过一周的稳定运行后不动杆菌属的相对丰度有所提高, 表明在将菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 与活性污泥共同作用于含盐高氨氮废水强化去除废水中污染物是可行的, 菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 能够在该生物强化系统中很好的定殖且能够提高废水中污染物的去除效率。其他菌属相对丰度的变化也说明了投加耐盐菌株 *Acinetobacter* sp. AHP123 后系统内部微生物菌群结构再一次产生了变化, 具备高效去除氨氮污染物能力微生物的相对丰度得到了提高。

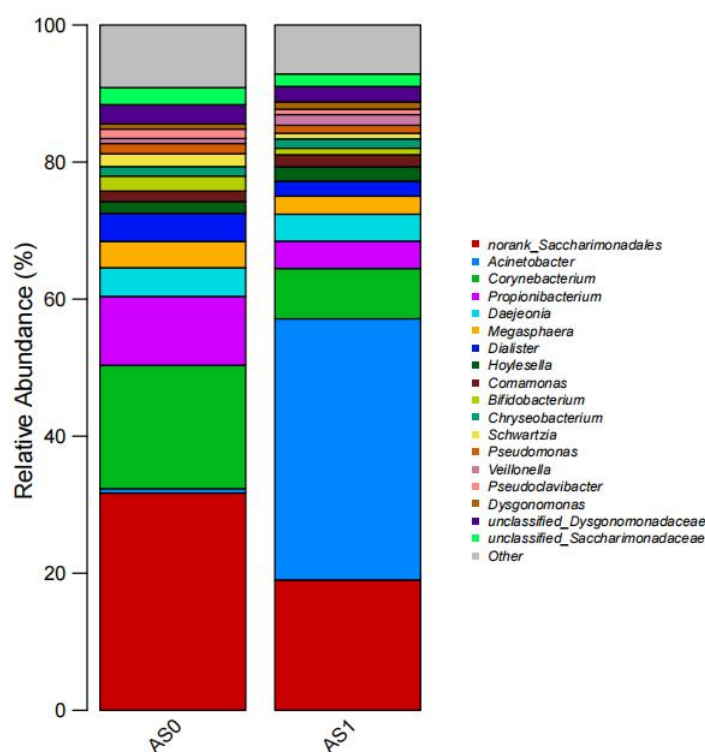


图 5-8 两个系统微生物组成群落属水平

Fig.5-8 The microbial composition of the two systems was at genus level

5.4 小结

首先对生物强化系统是否可行进行了研究, 通过与单菌和单泥处理组进行对比, 结果表明菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 能够强化活性污泥系统提高氨氮去除效果, 在 12 h 时氨氮污染物浓度就降到最低为 0.11 mg/L 且 24 h 时氨氮去除

率能够达到 99.82%，远高于其他对照组。

为了探究菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 强化好氧活性污泥处理含盐高氨氮废水的最佳运行条件，通过设置不同实验组，考察该生物强化系统对废水中氨氮脱氮效果并优化了处理条件，分别对运行系统的碳源种类、接种量以及温度做了优化。结果表明：

(1)首先对碳源种类进行了优化，在碳源种类为添加 9 g/L 葡萄糖和 3 g/L 丁二酸钠时，氨氮、总氮、总磷和 COD 综合去除效果最佳，其中氨氮去除率能达到 98.23%；

(2)对菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 的接种量进行优化，当菌种接种量为 5%时，系统中氨氮、总氮、总磷和 COD 去除效果最好，24 h 去除率分别为 99.45%、77.78%、88.93%、89.15%；

(3)当系统温度为 25 °C时各污染物去除率较高，24 h 系统中氨氮、总氮、总磷和 COD 分别为 98.75%、85.08%、89.91%、90.14%，因此 25 °C为该系统最佳运行温度。

(4)相对于仅添加菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 或者仅添加好氧活性污泥的处理组来说，生物强化系统具有更加优异的污染物去除效果，且处理时间更短，进一步节约了成本。通过高通量测序对生物强化系统中微生物群落结构进行分析，确定菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 在添加进系统后能够稳定生长并定殖。实验确定了生物强化系统处理高盐高氮废水的最佳运行条件，为实际应用提供了参考。

第 6 章 结论与展望

6.1 结论

为了探索能够经济高效处理含高盐高氨氮的废水的方法,本课题成功将实验室保藏的一株能够实现在同一体系进行同步硝化和反硝化的异养硝化好氧反硝化菌株 *Acinetobacter* sp. AHP123 进行了耐盐驯化, HNAD 菌相比于传统的生物脱氮更加经济高效。不仅如此,本文还通过逐步驯化的方法驯化出了能够高效处理高盐和高氨氮废水的好氧活性污泥,并将驯化完成的 HNAD 菌 *Acinetobacter* sp. AHP123 与运行良好的好氧活性污泥投加到同一系统中进行生物强化处理,实现了高效处理高盐高氨氮废水处理系统的完善,本文研究主要内容结论如下:

(1) *Acinetobacter* sp. AHP123 是实验室保藏的一株对异养硝化好氧反硝化菌,具有高效去除废水中氨氮污染物的能力。为了提高其在盐胁迫下的耐受性,使其能够在含盐废水中也能高效脱氮,对其进行了耐盐脱氮驯化。通过对其在不同盐浓度冲击下的生长状况进行探究,发现该菌株能在 0%-2%盐浓度下生长,但盐浓度的升高会抑制其生长以及脱氮速率。在不添加 NaCl 的处理组,在 15 h 菌株 OD₆₀₀ 值就能达到 1.252;而当盐浓度在 0.5%和 1%时,最佳生长状况的时间被延迟至 18 h 和 33 h,此时 OD₆₀₀ 值为 1.141 和 0.856。在 48 h 内,盐浓度为 1.5%和 2%的处理组均未达到对数期。对不同盐浓度处理组的脱氮性能进行探究,菌株在 0.5%和 1%的盐浓度下,能达到 70%以上,而当盐浓度大于 1%时,氨氮去除率明显下降。

后首先对菌株进行在 1%盐浓度下进行耐盐驯化,在经过反复驯化 15 代后,氨氮去除率稳定在 97.13%左右, COD 去除率提升至 70.14%。继续升高盐浓度为 1.5%进行驯化,在驯化至 40 代时,菌株生物量增长了 4.17 倍,氨氮去除率较未经驯化时提高了 2.27 倍,结果表明驯化可有效提升菌株在含盐废水中的污染物去除能力。

(2) 对取自污水处理厂二沉池的活性污泥分别进行高盐和高氨氮废水的定向驯化，一共驯化出五种能够定向处理高盐和高氨氮的好氧活性污泥，分别为 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE。结果显示，在驯化过程中，活性污泥中的微生物能很好的适应新的环境。然而 ASA 和 ASB 系统分别在驯化到第 10 天和第 15 天时，SVI 分别增加到了 173 mg/L 和 157 mg/L，出现污泥膨胀，对两系统分别进行 pH 和通气量的调整，污泥特性逐渐恢复正常。对于盐胁迫下活性污泥的驯化为 ASA、ASB、ASC 系统。ASA 系统经过 40 天、ASB 和 ASC 系统均经过 23 天的驯化，三个驯化系统驯化到稳定期时的氨氮去除率分别为 97.73%、98.97% 和 98.48%；COD 的去除率分别为 98.07%、90.71% 和 91.56%。而对于处理高氨氮废水的定向驯化为 ASA、ASD 和 ASE 系统，在分别经过 40 天、45 天和 34 天的定向驯化，氨氮去除率最终稳定在 97.73%、99.12% 和 76.72%；COD 去除率分别为 98.07%、85.83% 和 75.36%。对于 ASE 系统，当系统内氨氮浓度达到 200 mg/L 时，其最终氨氮去除率仅为 76.72%，已趋于稳定，达到微生物处理能力的阈值。五种不同废水的定向驯化说明了通过驯化后的活性污泥处理高盐含氮废水是可行的，且具有良好处理能力。

(3) 通过高通量测序对驯化完成的五种好氧活性污泥 ASA、ASB、ASC、ASD、ASE 中的微生物多样性及演替规律进行了研究，盐浓度和氨氮浓度的升高均会使微生物群落丰富度增加。在门水平和属水平上，不同盐浓度和氨氮浓度影响微生物群落结构，不同菌属对环境变化的响应各异。通过代谢功能预测结果表明，随着废水中盐浓度的升高碳水化合物代谢会上升，但过高的盐浓度则会抑制碳水化合物代谢；而当系统中氨氮浓度升高时，由于 COD 浓度会随着氨氮浓度的升高而增加葡萄糖添加量，因此碳水化合物代谢表现出上升趋势。为了提高系统耐盐性，在高盐浓度下脂质代谢也在升高，从而增加了细胞膜稳定性。

(4) 以驯化后的 HNAD 菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 强化好氧活性污泥系统处理高盐高氮废水，结果表明与对照组相比该强化系统在 12 h 时便可达到 98.56%，24 h 时氨氮去除率达 99.82%，高于对照组。对生物强化系统进行单因素条件优化结果表明，该系统在碳源种类为葡萄糖/丁二酸钠为 3/1、接种量为 5%、温度为 25 °C 时生物强化系统的脱氮效率最高，处理 24 h 时，氨氮去除率达到 98.75%，总氮去除率达到 85.08%，总磷去除率达到 89.91%，COD 去除率为 90.14%，几乎能做到对系统中氨氮污染物完全脱除且菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 能稳

定生长并定殖。

6.2 展望

本研究虽然为高氨氮含盐废水的生物处理提供了新的思路和方法,但该论文还可以进一步深入探讨:

(1) 虽然对驯化后的菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1231 和菌株 *Acinetobacter* sp. AHP1232 的脱氮途径有一定推测,但仍需借助更先进的分子生物学技术,深入研究其在高盐环境下的脱氮代谢网络,明确关键酶和基因的调控机制,为进一步优化菌株性能提供理论基础。

(2) 在实际工程应用中,需考虑生物强化系统的长期稳定性和运行成本。因此,将驯化后的菌株与活性污泥如何更好地结合应用于废水处理,可以开发合适的固定化技术或生物反应器构型,提高微生物的利用效率,减少微生物流失,降低运行成本,推动生物强化技术在高盐含氮废水处理中的广泛应用。

(3) 目前对于生物强化的研究主要在实验室规模进行,还可以开展中试实验,模拟实际废水处理场景,验证研究成果的可行性和有效性,将优化后的处理工艺应用于实际工程,解决实际运行中可能出现的问题。

参考文献

- [1] 刘常敬, 李泽兵, 郑照明, 等. 厌氧氨氧化耦合异养反硝化的脱氮性能及污泥性状[J]. 环境工程学报, 2014, 8(08): 3137-3142.
- [2] Fu G, Zhao L, Huangshen L, et al. Isolation and identification of a salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain and its application to saline wastewater treatment in constructed wetlands[J]. Bioresource Technology, 2019, 290: 121725.
- [3] Akyon B, Stachler E, Wei N, et al. Microbial mats as a biological treatment approach for saline wastewaters: The case of produced water from hydraulic fracturing[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(10): 6172-6180.
- [4] 韩飞. 基于海洋沉积物构建高盐废水处理菌落的调控机制[D], 2023.
- [5] 于清春. 高盐度、难降解工业废水的处理工程技术[J]. 化工管理, 2021, (14): 42-43.
- [6] 高欢, 周岳溪, 胡翔, 等. 含盐染料废水高温厌氧处理工艺特性研究[J]. 环境工程, 2007, (03): 9-11+12.
- [7] Ko V Y, Wang J, He I, et al. Adsorption of methane on biochar for emission reduction in oil and gas fields[J]. Biochar, 2023, 5(1): 15.
- [8] Hamoda M F, Al-Attar I M S. Effects of high sodium chloride concentrations on activated sludge treatment[J]. Water Science and Technology, 1995, 31(9): 61-72.
- [9] Wang Y, Zhang Y, Liang L, et al. Research progress on membrane separation technology for oily wastewater treatment[J]. Toxics, 2024, 12(11): 794.
- [10] Zhao Y, Chang C, Ji H, et al. Challenges of petroleum wastewater treatment and development trends of advanced treatment technologies: A review[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2024, 12(5): 113767.
- [11] de Almeida Fernandes L, Pereira A D, Leal C D, et al. Effect of temperature on microbial diversity and nitrogen removal performance of an anammox reactor treating anaerobically pretreated municipal wastewater[J]. Bioresource Technology, 2018, 258: 208-219.

- [12] Hu J, Fu W, Ni F, et al. An integrated process for the advanced treatment of hypersaline petrochemical wastewater: A pilot study[J]. *Water Research*, 2020, 182: 116019.
- [13] 尤作亮, 蒋展鹏, 祝万鹏.海水直接利用及其环境问题分析[J]. *给水排水*, 1998, (03): 64-67.
- [14] 刘洪滨. 我国海水淡化和海水直接利用事业前景的分析[J]. *海洋技术*, 1995, (04): 73-78.
- [15] Liu X, Yang H, Wang S, et al. Study on the effectiveness of an independent biological phosphorus removal system based on immobilized biological fillers nitrogen removal system in municipal wastewater[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2021, 156: 17-28.
- [16] Xu Z, Xiao K, Li X, et al. Study on screening and denitrification characteristics of highly efficient aerobic denitrifying bacteria from lake sediments[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2024, 235(3): 195.
- [17] Zhang Q, Zhu Y, Yuan C, et al. Nitrogen removal and mechanism of an extremely high-ammonia tolerant heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Alcaligenes faecalis* TF-1[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 361: 127643.
- [18] He T, Xie D, Ni J, et al. Nitrous oxide produced directly from ammonium, nitrate and nitrite during nitrification and denitrification[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388: 122114.
- [19] Strous M, Fuerst J A, Kramer E H M, et al. Missing lithotroph identified as new planctomycete[J]. *Nature*, 1999, 400(6743): 446-449.
- [20] Verstraete W, Alexander M. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp (strain 9006) as influenced by different cultural conditions, growth state and acetate metabolism[J]. *Journal of Bacteriology*, 1972, 110(3): 955-961.
- [21] Verstraete W, Alexander M. Heterotrophic nitrification in samples from natural environments[J]. *Naturwissenschaften*, 1972, 59(2): 79-80.
- [22] Robertson L A, Cornelisse R, De Vos P, et al. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1989, 56(4): 289-299.

- [23] Huang M-Q, Cui Y-W, Huang J-L, et al. A novel *Pseudomonas aeruginosa* strain performs simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and aerobic phosphate removal[J]. Water Research, 2022, 221: 118823.
- [24] Schwarz G, Senghas E, Erben A, et al. Microbial metabolism of quinoline and related compounds XII. Isolation and characterization of the quinoline oxidoreductase from *Rhodococcus Spec.* B1 compared with the quinoline oxidoreductase from *Pseudomonas Putida* 86[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1988, 10(2): 185-190.
- [25] Cocio T A, Nascimento E, von Zeska Kress M R, et al. Phylogenetic species of *Paracoccidioides* spp. isolated from clinical and environmental samples in a hyperendemic area of paracoccidioidomycosis in southeastern brazil[J]. Journal of Fungi, 2020, 6(3): 132.
- [26] Zebrowska J, Witkowska M, Struck A, et al. Antimicrobial potential of the genera *Geobacillus* and *Parageobacillus*, as well as endolysins biosynthesized by their bacteriophages[J]. Antibiotics, 2022, 11(2): 242.
- [27] 罗志浩. 改进型 SBBR 同步硝化反硝化处理含盐苯酚废水的研究[D], 2020.
- [28] Robertson L A, Kuenen J G. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1990, 57(3): 139-152.
- [29] Banik C, Bakshi S, Andersen D S, et al. The role of biochar and zeolite in enhancing nitrogen and phosphorus recovery: A sustainable manure management technology[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 456: 141003.
- [30] Jin P, Chen Y, Yao R, et al. New insight into the nitrogen metabolism of simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium in mRNA expression[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 371: 295-303.
- [31] Li D, Liang X, Jin Y, et al. Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Klebsiella* sp. TN-10[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 188(2): 540-554.

- [32] Liu T, Lu Y, Zheng M, et al. Efficient nitrogen removal from mainstream wastewater through coupling partial nitrification, anammox and methane-dependent nitrite/nitrate reduction (PNAM)[J]. *Water Research*, 2021, 206: 117723.
- [33] Kao C, Zhang Q, Li J, et al. Rapid start-up and metabolic evolution of partial denitrification/anammox process by hydroxylamine stimulation: Nitrogen removal performance, biofilm characteristics and microbial community[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 418: 131959.
- [34] 周香群. 异养硝化好氧反硝化菌的筛选和脱氮机制及其处理屠宰废水效果研究[D], 2023.
- [35] Shi Z, Zhang Y, Zhou J, et al. Biological removal of nitrate and ammonium under aerobic atmosphere by *Paracoccus versutus* LYM[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 148: 144-148.
- [36] Yang J-R, Wang Y, Chen H, et al. Ammonium removal characteristics of an acid-resistant bacterium *Acinetobacter* sp. JR1 from pharmaceutical wastewater capable of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 274: 56-64.
- [37] Chen H, Zhou W, Zhu S, et al. Biological nitrogen and phosphorus removal by a phosphorus-accumulating bacteria *Acinetobacter* sp. strain C-13 with the ability of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 322: 124507.
- [38] Li C, Yang J, Wang X, et al. Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a phosphate accumulating bacterium *Pseudomonas stutzeri* YG-24[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 182: 18-25.
- [39] Yang J, Feng L, Pi S, et al. A critical review of aerobic denitrification: Insights into the intracellular electron transfer[J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 731: 139080.
- [40] Joo H-S, Hirai M, Shoda M. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification[J]. *Water Research*, 2006, 40(16): 3029-3036.

- [41] Duan S, Yanyan Z, and Zheng S. Heterotrophic nitrifying bacteria in wastewater biological nitrogen removal systems: A review[J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2022, 52(13): 2302-2338.
- [42] Song T, Zhang X, Li J, et al. A review of research progress of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification microorganisms (HNADMs)[J]. Science of The Total Environment, 2021, 801: 149319.
- [43] Shoda M, Ishikawa Y. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of high-strength ammonium in anaerobically digested sludge by *Alcaligenes faecalis* strain No. 4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 117(6): 737-741.
- [44] 袁建华, 赵天涛, 彭绪亚. 极端条件下异养硝化-好氧反硝化菌脱氮的研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(06): 942-955.
- [45] 王露. 耐盐好氧反硝化菌的筛选及其处理海水养殖废水的研究[D], 2022.
- [46] Chen Q, Zhou D, Zhu Y, et al. An insight into freezing crystallization with a perspective on its application in high-salinity industrial wastewater[J]. Desalination, 2024, 590: 117985.
- [47] Zhao Y, Zhuang X, Ahmad S, et al. Biotreatment of high-salinity wastewater: current methods and future directions[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 36(3): 37.
- [48] Kumm M, Guillaume J H, de Moel H, et al. The world's road to water scarcity: shortage and stress in the 20th century and pathways towards sustainability[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38495.
- [49] Song Q, Chen X, Hua Y, et al. Biological treatment processes for saline organic wastewater and related inhibition mechanisms and facilitation techniques: A comprehensive review[J]. Environmental Research, 2023, 239: 117404.
- [50] Chen Y, He H, Liu H, et al. Effect of salinity on removal performance and activated sludge characteristics in sequencing batch reactors[J]. Bioresource Technology, 2018, 249: 890-899.

- [51] Jang D, Hwang Y, Shin H, et al. Effects of salinity on the characteristics of biomass and membrane fouling in membrane bioreactors[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 141: 50-56.
- [52] Ng K K, Shi X, Ong S L, et al. An innovative of aerobic bio-entrapped salt marsh sediment membrane reactor for the treatment of high-saline pharmaceutical wastewater[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 295: 317-325.
- [53] Jia L, Cheng X, Fang L, et al. Nitrogen removal in improved subsurface wastewater infiltration system: Mechanism, microbial indicators and the limitation of phosphorus[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 335: 117456.
- [54] 吴敏. 投加优势菌强化 SBR 处理垃圾渗滤液的实验研究[D], 2008.
- [55] Chettri D, Verma A K, Verma A K. Bioaugmentation: an approach to biological treatment of pollutants [J]. *Biodegradation*, 2024, 35(2): 117-135.
- [56] 黄兆松. 海洋镉抗性和自絮凝菌在含盐污水处理中的应用[D], 2018.
- [57] 张宝. 微生物强化技术在畜禽废水脱氮中的研究与应用[D], 2020.
- [58] Wen H, Cheng D, Chen Y, et al. Review on ultrasonic technology enhanced biological treatment of wastewater[J]. *Science of The Total Environment*, 2024, 925: 171260.
- [59] Alves C F, Melo L F, Vieira M J. Influence of medium composition on the characteristics of a denitrifying biofilm formed by *Alcaligenes denitrificans* in a fluidised bed reactor[J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37(8): 837-845.
- [60] 窦建军. 生物强化技术处理合成制药废水及其生物相恢复的工程实例[D], 2012.
- [61] Cheng M, Chen Z, Wang A, et al. Remediate black-odorous sediment by slow-release calcium nitrate: Migration, transformation and microbial succession[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2023, 413: 137458.
- [62] 杨倩. 对甲基苯磺酸高效降解菌的筛选、代谢机制及其在废水生物强化处理中的应用[D], 2017.

- [63] Li Y, Peng S, Li K, et al. Material extrusion-based 3D printing for the fabrication of bacteria into functional biomaterials: The case study of ammonia removal application[J]. Additive Manufacturing, 2022, 60: 103268.
- [64] Tale V P, Maki J S, Zitomer D H. Bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters restores function and archaeal community[J]. Water Research, 2015, 70: 138-147.
- [65] Guo L, Chen Q, Fang F, et al. Application potential of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier for nitrate and ammonium removal of eutrophic lake water[J]. Bioresource Technology, 2013, 142: 45-51.
- [66] Fang H, Jia Y, Zhou S, et al. A novel biotechnology for enhanced ciprofloxacin removal via bioaugmentation of *Paraclostridium* sp[J]. Bioresource Technology Reports, 2022, 20: 101246.
- [67] Jianlong W, Xiangchun Q, Libo W, et al. Bioaugmentation as a tool to enhance the removal of refractory compound in coke plant wastewater[J]. Process Biochemistry, 2002, 38(5): 777-781.
- [68] Mohan S V, Rao N C, Prasad K K, et al. Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(8): 2849-2857.
- [69] 孟雪征, 曹相生, 姜安玺, 等. 利用耐冷菌处理低温污水的研究[J]. 山东建筑工程学院学报, 2001, (02): 53-57.
- [70] Quan X-c, Tang H, Xiong W-c, et al. Bioaugmentation of aerobic sludge granules with a plasmid donor strain for enhanced degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 179(1): 1136-1142.
- [71] Mongkolthanaruk W, Dharmsthiti S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2002, 50(2): 101-105.

- [72] Belia E, Smith P G. The bioaugmentation of sequencing batch reactor sludges for biological phosphorus removal[J]. Water Science and Technology, 1997, 35(1): 19-26.
- [73] Hu J, Yang Q, Wang J L. Biodegradation of di-n-butyl phthalate in sequencing batch reactor bioaugmented with *Micrococcus* sp. and the bacterial community analysis[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2015, 12(9): 2819-2828.
- [74] Tuo B-h, Yan J-b, Fan B-a, et al. Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of *Bacillus* sp. isolated from petroleum-contaminated soil[J]. Bioresource Technology, 2012, 107: 55-60.
- [75] 邱忠平, 杨立中, 刘丹. 垃圾渗滤液 COD 降解菌株的筛选及其降解特性初探[J]. 四川环境, 2007, (01): 5-8+13.
- [76] 吉芳英, 谢志刚, 邱雪敏, 等. 垃圾渗滤液深度处理功能菌的筛选及应用[J]. 土木建筑与环境工程, 2010, 32(02): 96-101.
- [77] 叶晓玫, 郑曼英, 刘家强. 应用有效微生物(EM)技术处理垃圾渗滤液的研究[J]. 环境卫生工程, 2002, (01): 3-5.
- [78] Manai I, Baligh M, Abdellatif E M, et al. Improvement of activated sludge resistance to shock loading by fungal enzyme addition during textile wastewater treatment[J]. Environmental Technology, 2017, 38(7): 880-890.
- [79] Ma F, Guo J-b, Zhao L-j, et al. Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 597-602.
- [80] Simon-Várhelyi M, Tomoiagă C, Brehar M A, et al. Dairy wastewater processing and automatic control for waste recovery at the municipal wastewater treatment plant based on modelling investigations[J]. Journal of Environmental Management, 2021, 287: 112316.
- [81] Liu L, Cai G, Zhang J, et al. Evaluation of engineering properties and environmental effect of recycled waste tire-sand/soil in geotechnical

- engineering: A compressive review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2020, 126: 109831.
- [82] Feng D, Han Q, Xu L, et al. An ensembled method for predicting dissolved oxygen level in aquaculture environment[J]. Ecological Informatics, 2024, 80: 102501.
- [83] Zhang Y, Lin X, Xia T, et al. Effects of intensive chlorine disinfection on nitrogen and phosphorus removal in WWTPs[J]. Science of The Total Environment, 2024, 918: 170273.
- [84] Okoroafor P U, Ikwuka G s, Zaffar N, et al. Field studies on the effect of bioaugmentation with *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on plant accumulation of rare earth elements and selected trace elements[J]. Minerals, 2022, 12(4): 409.
- [85] Zhao B, An Q, He Y L, et al. N₂O and N₂ production during heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* strain NR[J]. Bioresource Technology, 2012, 116: 379-385.
- [86] 张丹华. 含氮废水生物处理及其微生物群落分析[D], 2014.
- [87] 吴莉娜, 徐莹莹, 史梹, 等.短程硝化-厌氧氨氧化组合工艺深度处理垃圾渗滤液[J]. 环境科学研究, 2016, 29(04): 587-593.
- [88] 马骏. 反硝化颗粒污泥的培养及其工艺特性研究[D], 2021.
- [89] 简陈生. 高盐氨氮废水 MBR 处理效能及微生物特性研究[D], 2016.
- [90] 赖小赛. 微生物镜检在石化废水污泥驯化中的指示应用[J]. 江西化工, 2019, (01): 105-108.
- [91] Yang F, Wang G, Yang Y, et al. Choice of activated sludge microorganisms under phosphate deficiency: Competition for inorganic phosphate or change to organophosphorus metabolism[J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 502: 158058.
- [92] P.S.G. da Silva V E, de S. Rollemberg S L, da Silva e Santos S G, et al. Evaluation of leachate impact on domestic sewage co-treatment in aerobic granular sludge systems[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 470: 144178.

- [93] He Q, Zhang S, Zou Z, et al. Unraveling characteristics of simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal (SNDPR) in an aerobic granular sequencing batch reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 220: 651-655.
- [94] Toczyłowska-Mamińska R. Limits and perspectives of pulp and paper industry wastewater treatment – A review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, 78: 764-772.
- [95] 王敬平. 厌氧氨氧化反应器微生物群落多样性分析及 Cd^{2+} 、 Cr_6^{+} 对其脱氮性能的影响[D], 2017.
- [96] 李敏. 两种铝污泥轻质填料耦合人工湿地微生物燃料电池处理重金属废水效能研究[D], 2024.
- [97] Wan D, Wang J, Shi Y, et al. Construction of continuous-flow electrodialysis ion-exchange membrane bioreactor for effective removal of nitrate and perchlorate: Modelling and impact analysis of environmental variables[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 462: 142144.
- [98] Jiang J, Cai J, Peng R, et al. Establishment and optimization of urban ecological network based on ecological regulation services aiming at stability and connectivity[J]. *Ecological Indicators*, 2024, 165: 112217.
- [99] Chen W, Wei J, Su Z, et al. Deterministic mechanisms drive bacterial communities assembly in industrial wastewater treatment system[J]. *Environment International*, 2022, 168: 107486.
- [100] Zhang Y, Li M, Dong L, et al. Effects of biochar dosage on treatment performance, enzyme activity and microbial community in aerated constructed wetlands for treating low C/N domestic sewage[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 24: 101919.
- [101] Xie X, Cui K, Chen Y, et al. Effects of trimethoprim on activated sludge system: Biological nutrient removal and microbial community structure[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2025, 13(2): 115832.

- [102] Martin H, Rogers L A, Moushtaq L, et al. Metabolism of hemicelluloses by root-associated *Bacteroidota* species[J]. The ISME Journal, 2025, 19(1): wraf022.
- [103] Lee I-S, Parameswaran P, Rittmann B E. Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(22): 10266-10272.
- [104] Hill Vincent R, Kahler Amy M, Jothikumar N, et al. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(19): 6327-6327.
- [105] Jang H M, Ha J H, Kim M-S, et al. Effect of increased load of high-strength food wastewater in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge on bacterial community structure[J]. Water Research, 2016, 99: 140-148.
- [106] Buton A, Bobay L-M. Evolution of chi motifs in proteobacteria[J]. G3 Genes, Genomes, Genetics, 2021, 11(1): jkaa054.
- [107] Rivière D, Desvignes V, Pelletier E, et al. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge[J]. The ISME Journal, 2009, 3(6): 700-714.
- [108] Wang P, Yu Z, Zhao J, et al. Do microbial communities in an anaerobic bioreactor change with continuous feeding sludge into a full-scale anaerobic digestion system?[J]. Bioresource Technology, 2018, 249: 89-98.
- [109] Park J-H, Lee S-H, Yoon J-J, et al. Predominance of cluster I *Clostridium* in hydrogen fermentation of galactose seeded with various heat-treated anaerobic sludges[J]. Bioresource Technology, 2014, 157: 98-106.
- [110] Fernández N, Sierra-Alvarez R, Field J A, et al. Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge[J]. Chemosphere, 2008, 70(3): 462-474.
- [111] Shu D, He Y, Yue H, et al. Microbial structures and community functions of anaerobic sludge in six full-scale wastewater treatment plants as revealed by

- 454 high-throughput pyrosequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 186: 163-172.
- [112] Zhang Q, Zhang C, Zhu Y, et al. Effect of bacteria-to-algae volume ratio on treatment performance and microbial community of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria-chlorella symbiotic system[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 126025.
- [113] Patel P, Brough K, Thompson R. *Propionibacterium acnes* prosthetic valve endocarditis[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2016, 67(13, Supplement): 1093.
- [114] Lim W-G, Tong T, Chew J. *Chryseobacterium indologenes* and *Chryseobacterium gleum* interact and multiply intracellularly in *Acanthamoeba castellanii*[J]. *Experimental Parasitology*, 2020, 211: 107862.
- [115] Landes S J, Kerns S E U, Pilar M R, et al. Proceedings of the fifth biennial conference of the society for implementation research collaboration (SIRC) 2019: where the rubber meets the road: the intersection of research, policy, and practice - part 1[J]. *Implementation Science*, 2020, 15(3): 76.
- [116] Du M, Yang S, Jiang T, et al. Cloning, expression, purification, and characterization of β -Galactosidase from *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*[J]. *Molecules*, 2022, 27(14): 4497.
- [117] Koo H, Hakim J A, Morrow C D, et al. Comparison of two bioinformatics tools used to characterize the microbial diversity and predictive functional attributes of microbial mats from lake obersee, antarctica[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 140: 15-22.
- [118] Ou D, Li W, Li H, et al. Enhancement of the removal and settling performance for aerobic granular sludge under hypersaline stress[J]. *Chemosphere*, 2018, 212: 400-407.
- [119] Wang H, Li H-X, Fang F, et al. Underlying mechanisms of ANAMMOX bacteria adaptation to salinity stress[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2019, 46(5): 573-585.

- [120] Sarvajith M, Nancharaiah Y V. Biological nutrient removal by halophilic aerobic granular sludge under hypersaline seawater conditions[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 318: 124065.
- [121] Huang X, Li W, Zhang D, et al. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification at low temperature[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 44-50.
- [122] Yang L, Wang X-H, Cui S, et al. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121360.
- [123] Hao Z-L, Ali A, Ren Y, et al. A mechanistic review on aerobic denitrification for nitrogen removal in water treatment[J]. *Science of The Total Environment*, 2022, 847: 157452.
- [124] Arun S, Manikandan N A, Pakshirajan K, et al. Novel shortcut biological nitrogen removal method using an algae-bacterial consortium in a photo-sequencing batch reactor: Process optimization and kinetic modelling[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 250: 109401.
- [125] Rahimi S, Modin O, Mijakovic I. Technologies for biological removal and recovery of nitrogen from wastewater[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 43: 107570.
- [126] Capone Douglas G. Discovery of new nitrite-oxidizing bacteria increases phylogenetic and metabolic diversity within this niche[J]. *mBio*, 2018, 9(5): 10.1128/mbio.01619-01618.
- [127] Yang B, Xu H, Yang S, et al. Treatment of industrial dyeing wastewater with a pilot-scale strengthened circulation anaerobic reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 264: 154-162.

附录

表 1 实验试剂表

试剂名称	规格	生产厂家
葡萄糖	AR	生工
硝酸钾	AR	沪试
氯化铵	AR	沪试
蔗糖	AR	沪市
柠檬酸钠	AR	麦克林
丁二酸钠	AR	生工
乙酸钠	AR	生工
三水磷酸氢二钾	AR	生工
EDTA·2Na	AR	生工
七水硫酸锌	AR	生工
氯化钙	AR	沪试
四水氯化锰	AR	生工
七水硫酸亚铁	AR	沪试
钼酸铵	AR	麦克林
钼酸钠	AR	沪试
五水硫酸铜	AR	沪试
六水氯化钴	AR	麦克林
硫酸钴	AR	麦克林
氯化钠	AR	生工
磷酸二氢钾	AR	生工
三氯化铁	AR	生工
硼酸	AR	生工
一水硫酸锰	AR	沪市
氯化锌	AR	沪市
硫酸镁	AR	沪试
碳酸氢钠	AR	生工

六水氯化镍	AR	生工
过硫酸钾	AR	麦克林
重铬酸钾	AR	沪试
硫酸亚铁铵	AR	麦克林
试亚铁灵	AR	麦克林
抗坏血酸	AR	麦克林
纳氏试剂	AR	麦克林
酒石酸钾钠	AR	生工
α -苯胺	AR	麦克林
蛋白胨	AR	生工
酵母提取物	AR	生工
对氨基苯磺酸	AR	麦克林
琼脂粉	AR	生工
盐酸	AR	沪试
硫酸	AR	沪试
乙酸	AR	麦克林
氢氧化钠	AR	麦克林

表 2 实验设备表

实验设备	生产厂家
立式高压蒸汽灭菌锅	上海申安医疗器械厂
超净工作台	浙江孚夏医疗科技有限公司
电热鼓风干燥箱	上海力辰科技有限公司
恒温培养箱	上海力辰科技有限公司
摇床	上海力辰科技有限公司
紫外可见分光光度计	上海美普达仪器有限公司
电磁炉	九阳股份有限公司
微波炉	九阳股份有限公司
电子天平	上海力辰科技有限公司

冰箱	海尔集团公司
高速离心机	湖南湘仪实验仪器开发有限公司
冷冻高速离心机	大龙兴创实验仪器股份公司
紫外可见吸收光谱仪	日本岛津有限公司
多功能消解仪	山东格林凯瑞精密仪器有限公司

攻读硕士期间学术论文发表情况

王翠翠, 张琴, 李艳宾. 土壤微环境对不同林地凋落物的响应研究 ——
以芜湖神山公园为例[J].安徽工程大学学报 (已录用)

致谢

岁月不居，时节如流，日月窗间而过马。论文至此，心中涌现的不是想象已久的欢欣，却是难以言喻的失落。三年研究生生涯，始于盛夏，也即将终于盛夏，回首往昔，目之所及，皆是回忆，纵有百般不舍，这一天终究会在熙熙攘攘的喧嚣中决绝的来临。很幸运我遇到了许多恩师益友给予了我无私的帮助和热心的照顾。感恩之情难以用语言量度，谨以最朴实的话语致以最崇高的敬意。

得遇良师，人生之幸。很幸运在我研究生学习期间遇到了我的导师李艳宾教授。李老师学识渊博，修业严谨，对我所学精心指导，学不分巨细皆用心栽培，事无论大小悉严格要求，每次我在实验上迷茫时，李老师总能提出建设性意见，让我在充满迷雾海中看到一条光亮，指引我到达彼岸。在平时的沟通交流中，李老师平易近人，不仅给了我学术上的指导，更给了我人生的引导，我也逐渐学到了老师乐观从容、严谨谦虚的生活和学术态度，让我学会了自立自强，收获了人生中较为重要的解决问题的能力。我还要感谢 309 生物化工课题组中所有的老师，感谢他们在我的实验遇到困难时提出的宝贵意见，感谢他们为我的科研、生活指引了方向，在此也祝愿他们工作顺利，生活美满。一路走来，从恩师的身上我收获无数，谆谆教诲之情无以为报，谨此文表达我的谢意。

岁月并谢，与友长兮。感谢 309 生物化工课题组所有的同门，我感谢师兄师姐们在科研方面的指导，与你们的探讨让我获益良多，你们一直是我学习的榜样。感谢所有的小伙伴，感谢你们你们的包容与关爱，陪我走过这段旅程，让我在情绪的低谷给我带来欢声笑语，与你们相处的日子十分美妙，你们的鼓励我一直铭记于心，无时或忘。

父母之恩，常记于心。感谢我的父母家人。求学二十载，你们一直在背后支持着我，让我砥砺前行。学生时代的结束，亦是人生新的起点，来日定当继续奋进，不辜负你们的期望。

心怀热忱，脚踏实地。最后用鲁迅先生的一段话为我的学生时代画上句号。愿中国青年都摆脱冷气，只是向上走，不必听自暴自弃者流的话，能做事的做事，能发声的发声，有一分，发一分光，就令萤火一般，也可以在黑暗里发一点光，不必等候炬火，此后如竟没有炬火，我便是唯一的光。

王翠翠

2025 年 5 月 15 日