Chinese Journal of Applied Ecology, Dec. 2017, **28**(12): 4075-4082 DOI: 10.13287/j.1001-9332.201712.038

# 进水碳氮比对 CANON 型人工湿地脱氮性能的影响

黄梦露[1] 李战朋[2] 王 振[1*]

([1]安徽农业大学资源与环境学院农田生态保育与污染防控安徽省重点实验室, 合肥 230036; [2]中国市政工程华北设计研究总院有限公司, 天津 300074)

**摘 要** 通过逐步提高进水中的有机碳源浓度,探讨进水碳氮比(C/N)对基于亚硝化的全程自养脱氮(CANON)型潮汐流人工湿地(TFCW)脱氮效能及其微生物特性的影响.结果表明:进水 C/N 可显著影响 CANON 型 TFCW 中脱氮功能微生物的数量与活性,进而影响其氮素转化速率.当进水 C/N 由 0.0 增至 6.0 时,TFCW 中反硝化功能基因的丰度随之增加,系统反硝化性能提高,TFCW 中逐渐形成同步亚硝化、厌氧氨氧化与反硝化(SNAD)耦合反应体系,其脱氮效果得以强化.当进水 C/N>6.0 时,好氧氨氧化菌活性受到抑制,数量逐渐减少,TFCW 中的厌氧氨氧化作用与反硝化作用受阻,系统脱氮性能恶化.当进水 C/N 为 6.0 时,TFCW 中的 SNAD 作用可得到最大限度的强化,其总氮(TN)去除率和去除负荷分别达(93.3±2.3)%和(149.30±8.00) mg·$L^{-1}$·$d^{-1}$,高于 CANON 系统中 TN 去除率的理论值.

**关键词** 潮汐流人工湿地(TFCW); 碳氮比(C/N); 基于亚硝化的全程自养脱氮(CANON); 反硝化; 厌氧氨氧化

**Effect of influent C/N on nitrogen removal performance in tidal flow constructed wetland via CANON process.** HUANG Meng-lu[1], LI Zhan-peng[2], WANG Zhen[1*] ([1]*Anhui Province Key Laboratory of Farmland Ecological Conservation and Pollution Prevention, School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei* 230036, *Anhui, China*; [2]*North China Municipal Engineering Design & Research Institute Co., Ltd., Tianjin* 300074, *China*).

**Abstract**: This study was conducted to explore nitrogen transformation and associated microbial characteristics in a tidal flow constructed wetland (TFCW) with the complete autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) process under influent COD/TN (C/N) constraints. The influent C/N increased from 0.0 to 10.0 via the addition of glucose in the influent as a source of organics. The results showed that influent C/N significantly affected nitrogen transformation rates in the TFCW throughout the experiment. As the influent C/N increased from 0.0 to 6.0, the absolute abundance of functional genes involved in denitrification could be enriched as a consequence of the addition of organics in influent, and then the simultaneous nitrification, anammox, and denitrification (SNAD) processes occurred in the TFCW, resulting in the enhancement of nitrogen removal in the system. However, as the influent C/N was more than 6.0, the activity of aerobic ammonia-oxidizing bacteria was inhibited and its quantity reduced, leading to the deterioration in nitrogen removal of the system. When the influent C/N was 6.0, the SNAD process was enhanced most effectively in the system owing to the development of multiple and complete nitrogen removal pathways in the TFCW. The TFCW respectively had the best TN removal efficiency and removal loading rate [(93.3±2.3)% and (149.30±8.00) mg·$L^{-1}$·$d^{-1}$], indicating that the results had been than the maximal TN removal efficiency in a CANON process under ideal conditions.

**Key words**: tidal flow constructed wetland (TFCW); COD/TN (C/N); completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON); denitrification; anammox.

本文由国家自然科学基金项目(51508002)、安徽省自然科学基金项目(1508085QE99)、安徽农业大学引进与稳定人才项目(YJ201520)和农田生态保育与污染防控安徽省重点实验室开放基金项目(FECPP201704)资助 This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (51508002), the Natural Science Foundation of Anhui Province (1508085QE99), the Youth Fund Project of Anhui Agricultural University (YJ201520) and the Open Fund of Anhui Province Key Laboratory of Farmland Ecological Conservation and Pollution Prevention (FECPP201704). 2017-05-22 Received, 2017-09-15 Accepted.

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zwang@ahau.edu.cn

强化人工湿地中基于亚硝化的全程自养脱氮(CANON)作用,构建 CANON 型人工湿地反应体系已成为当前人工湿地强化脱氮研究的热点[1-5].CANON 作用依赖于好氧氨氧化菌(AOB)和厌氧氨氧化菌(anammox)的相互作用关系:AOB 在有氧条件下将 $NH_4^+$-N 氧化成 $NO_2^-$-N 并消耗 $O_2$,从而为 anammox 创造了缺氧环境;anammox 则在缺氧条件下把前者生成的 $NO_2^-$-N 与未参与氧化的 $NH_4^+$-N 转化成 $N_2$,并生成少量的 $NO_3^-$-N[6].相比于传统脱氮技术,CANON 作用可节省 63%的耗氧量和将近 100%的外加有机碳源[7],因而其在污水生物脱氮过程中具有诸多优势.在前期研究中,Wang 等[8]通过改进潮汐流人工湿地(TFCW)的运行方式,成功构建了 CANON 型人工湿地反应体系,并对系统中的微生物群落结构进行了初步分析.

然而,CANON 型人工湿地工艺本身仍存在缺陷,且其运行性能亦受到诸多因素的影响[7].其中,污水的 C/N 是影响该系统脱氮效果及其稳定性的关键因素之一[9].众所周知,废水中不可避免地会含有一定量的有机物,而不同浓度的有机碳源则会对 CANON 型人工湿地的脱氮性能产生不同的影响.一方面,CANON 作用理论上只能达到 89%的 TN 去除率,产生的 11%左右的 $NO_3^-$-N 无法被脱除[10],若能通过适量有机碳源的引入在系统中培养一定量的反硝化菌,将生成的 $NO_3^-$-N 予以去除,则能够使 CANON 系统获得更高的脱氮效率[11];另一方面,由于 AOB 和 anammox 均是自养菌,当进水 C/N 过高时,较高浓度的有机碳源又会对 AOB 和 anammox 产生抑制作用,使其活性降低甚至失活,进而恶化 CANON 系统的脱氮性能[12].

鉴于此,本文在前期研究基础上,以 CANON 型潮汐流人工湿地(TFCW)为试验装置,探究了不同的进水 C/N 对系统脱氮性能及微生物特性的影响,并确定了系统较佳的进水 C/N 范围,以期在CANON 型 TFCW 的基础上构建同步亚硝化、厌氧氨氧化和反硝化(SNAD)耦合脱氮体系,实现该系统对污水中有机物和氮素的高效同步去除,进而为 CANON 型人工湿地工艺的工程化应用提供理论依据和数据支持.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验装置

TFCW 试验装置位于温室内(温度 $T \approx 25$ ℃),其表面积约为 314 $cm^2$(直径 $\varphi \approx 20$ cm),系统的构型与运行方式如图 1 所示.湿地填料层孔隙率为 40.3%(即其有效体积为 10.12 L),厚度为 80 cm:下层(70~80 cm)为砾石支撑层(填充粒径为 10~15 mm);上层(0~70 cm)为海蛎壳填料层(填充粒径

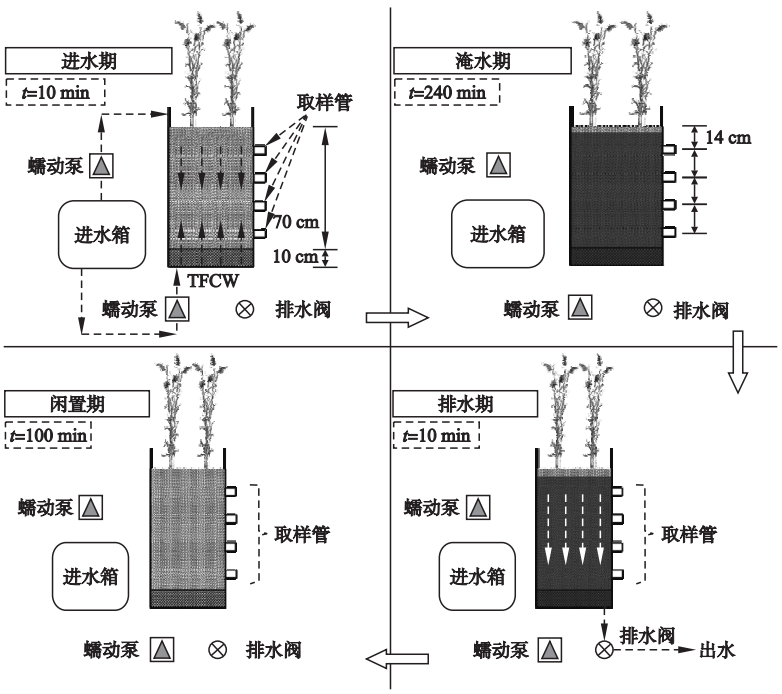



**图 1** CANON 型潮汐流人工湿地的构型与运行方式

**Fig.1** Configuration and operation schematic diagram of the tidal flow constructed wetland with the CANON process.

为 2~5 mm).湿地中种植芦苇,芦苇数量为 2 株.TFCW 顶部设置有“Ω”型穿孔管,以此作为系统的进水管,出水管则设置于距试验装置底部 5 cm 处,湿地装置底部设置有另一个“Ω”型穿孔管作为其分流进水管.湿地装置侧壁按不同高度设置有 4 个取样管.该取样管主要用于填料样品的采集.

**1.2**　运行方式

试验装置为已经成功启动的 CANON 型 TFCW,其 TN 去除负荷为(127.00±13.78) mg·$L^{-1}$·$d^{-1}$[8].此 CANON 型 TFCW 按照两段式潮汐流运行方式连续运行(图 1),系统每天运行 4 个周期,每个周期 6 h:每个周期之初,将 5 L 进水由进水管泵入系统中($t$=10 min);与此同时,剩余的 5 L 进水自分流进水管由蠕动泵泵入系统($t$=10 min),分流管进水流向为上向流,可在一定程度上降低系统中的溶解氧(DO)含量;然后,填料层整体处于淹水状态并反应 4 h;反应结束后,通过出水管将系统排空($t$=10 min);而后湿地系统进入闲置期($t$=100 min),即一个周期共包括进水期、淹水期、排水期和闲置期 4 个阶段.该过程中 TFCW 的水力负荷(HLR)为 1.28 $m^3$·$m^{-2}$·$d^{-1}$.

本研究中 CANON 型 TFCW 共运行了 371 d,可划分为 6 个时期,分别定义为:A(C/N≈0.0,时长为 41 d)、B(C/N≈2.0,时长为 66 d)、C(C/N≈4.0,时长为 66 d)、D(C/N≈6.0,时长为 66 d)、E(C/N≈8.0,时长为 66 d)和 F(C/N≈10.0,时长为 66 d).

**1.3**　进水水质

CANON 型 TFCW 进水为人工模拟废水.其中,进水中 $NH_4^+$-N 浓度为(38.51±2.24) mg·$L^{-1}$,$NO_2^-$-N 浓度为(0.50±0.33) mg·$L^{-1}$,$NO_3^-$-N 浓度为(0.99±0.67) mg·$L^{-1}$,总氮(TN)浓度为(40.00±1.90) mg·$L^{-1}$,总磷(TP)浓度为(10.64±2.39) mg·$L^{-1}$,pH 值为(7.74±0.58),进水中 C/N 的调节通过改变进水中 $C_6H_{12}O_6$ 的浓度来实现.当进水中 C/N 分别为 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 时,进水中化学需氧量(COD)的浓度则分别为 0、80、160、240、320 和 400 mg·$L^{-1}$.

**1.4**　分析方法

**1.4.1** 水样采集及分析方法　每天采集 TFCW 进出水水样进行分析.水样中 COD、TN、$NH_4^+$-N、$NO_3^-$-N、$NO_2^-$-N 和 TP 的测定方法均参照《水和废水监测分析方法》[13]中的标准方法.

**1.4.2** 脱氮功能基因定量分析　分别在不同时期对稳定后的 TFCW 进行填料样品的采集,采集次数为 2~3 次.采集过程中,首先从各个取样管中采集填料样品,然后混合均匀,获取填料层生物膜后,使用土壤 DNA 试剂盒(D5625-01 Omega USA)对生物膜中的 DNA 进行提取纯化.提取后的 DNA 产物经紫外分光光度计测定核酸浓度和纯度,置于冰箱中-20 ℃保存.基于提取的 DNA 样品,对其中的细菌 16S rRNA 以及生物脱氮过程中的关键功能基因(即 *amoA*、anammox 16S rRNA、*nxrA*、*narG*、*napA*、*nirS*、*nirK*、*qnorB* 和 *nosZ*)进行荧光定量 PCR 测定.荧光定量 PCR 分析使用的仪器为 Applied Biosystems StepOneTM,试验采用 SYBR Green I 荧光染料法进行测试,扩增体系如下:10 μL SYBR Green I PCR master mix (Applied Biosystems, USA)、8 μL DEPC 处理水(Applied Biosystems, USA)、正反向引物各 0.5 μL、DNA 模板 1 μL,共 20 μL.每种功能基因的引物种类及反应条件均参照文献[14]进行.

**1.5**　数据处理

采用 Excel 2010 和 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析.采用单因素(one-way ANOVA)进行方差分析,采用利用逐步线性回归模型解析氮素转化速率与相关脱氮功能基因的定量响应关系.利用 Origin 8.5 软件作图.图中相关数据为平均值±标准差.

## 2　结果与分析

**2.1**　不同 C/N 条件下 TFCW 的脱氮效果

由图 2 可知,当 C/N 为 0.0 时,CANON 型 TFCW 对 TN 和 $NH_4^+$-N 的去除负荷分别达 127.89 和 148.64 mg·$L^{-1}$·$d^{-1}$,与同类型的研究结果相比[15],该系统的脱氮性能较为理想.此时 TFCW 的 TN 和 $NH_4^+$-N 去除率分别为 80.0%和 96.7%,系统出水中 TN、$NH_4^+$-N、$NO_3^-$-N 和 $NO_2^-$-N 的浓度分别为 7.99、1.27、6.28 和 0.45 mg·$L^{-1}$,系统在典型周期内 $NO_3^-$-N 的生成量与 $NH_4^+$-N 的消耗量之比约为 0.14.随着进水中有机碳源浓度的增加(图 3),进水 C/N 逐渐增至 6.0,但 TFCW 始终保持着较高的 COD 去除率,出水 COD 浓度小于 20 mg·$L^{-1}$.当进水 C/N 为 6.0 时,系统对 COD 的去除负荷达(920.79±38.28) mg·$L^{-1}$·$d^{-1}$.值得注意的是,进水中有机碳源浓度的适量增加并未显著影响 TFCW 对 $NH_4^+$-N 的去除效果,且在一定程度上强化了系统对 TN 的去除效果.由图 2 和图 3 可知,当进水 C/N 为 6.0 时,TFCW 对 TN 和 $NH_4^+$-N 的去除率和去除负荷分别为(93.3±2.3)%、(149.30±8.00) mg·$L^{-1}$·$d^{-1}$和(93.6±0.2)%、(143.33±9.86) mg·$L^{-1}$·$d^{-1}$,

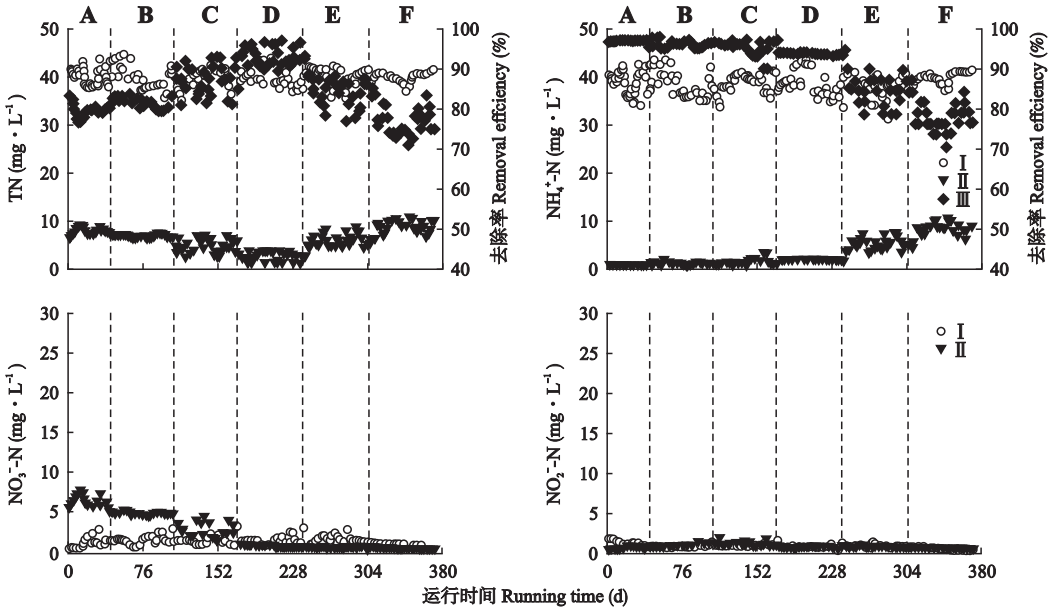



**图 2** 不同进水 C/N 条件下 TFCW 中氮素的转化与去除性能

**Fig.2** Nitrogen transformation and treatment performances of the TFCW under influent C/N constraints.

A-F: 运行时期 Running periods. Ⅰ: 进水 Influent; Ⅱ: 出水 Effluent; Ⅲ: 去除率 Removal efficiency; Ⅳ: 去除负荷 removal rate. TN: 总氮 Total nitrogen. 下同 The same below.

此时系统的 TN 去除率已超过CANON反应体系 TN 去除率的最大值($\eta$ = 89%).随着进水 C/N 的进一步增大,TFCW 对 TN 和 $NH_4^+$-N 的去除率均开始下降.当进水 C/N 增至 10.0 时,系统对 COD 的去除负荷高达(1537.91±53.33) mg · $L^{-1}$ · $d^{-1}$,但其对 TN 和 $NH_4^+$-N 的去除率和去除负荷分别降至(77.5±3.5)%、(124.10±7.20) mg · $L^{-1}$ · $d^{-1}$和(78.5±3.5)%、(124.31±6.75) mg · $L^{-1}$ · $d^{-1}$,出水中 $NH_4^+$-N 随之增至(8.49±1.35) mg · $L^{-1}$,$NO_2^-$-N 和 $NO_3^-$-N 的浓度则分别为(0.28±0.15)和(0.23±0.12) mg · $L^{-1}$.由此可知,进水 C/N 的适当提高可强化 TFCW 的脱氮性能;但当进水C/N>6.0后,过高的有机碳源浓度反而会对CANON型人工湿地系统产生抑制作用,进而恶化系统的脱氮效果.

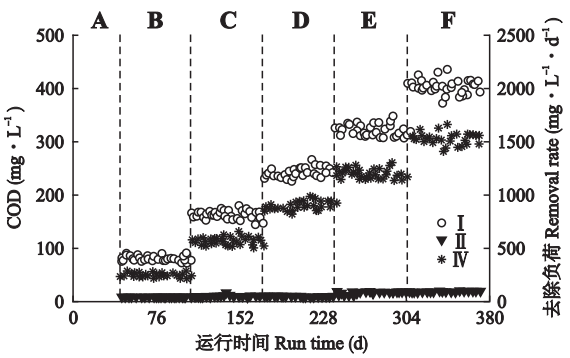



**图 3** 不同进水 C/N 条件下 TFCW 的化学需氧量(COD)去除性能

**Fig.3** COD removal of the TFCW under different influent C/N constraints.

**2.2** 不同 C/N 条件下 TFCW 中脱氮功能基因的变化

研究表明,微生物作用是人工湿地中氮素脱除的主要途径[16-17].本文探究了不同进水 C/N 条件下 TFCW 中脱氮功能基因的丰度变化,以期解析进水 C/N 与系统脱氮性能的关系.图 4 表明,当进水 C/N 由 0.0 增至 10.0 时,系统中的细菌 16S rRNA 基因拷贝数由 $1.27\times10^9$ 增至 $1.32\times10^9$ copies · $g^{-1}$.究其原因,可能与进水中有机碳源添加后 TFCW 中异养菌的过量增殖有关.

对于 CANON 型 TFCW,*amoA* 和 anammox 16S rRNA 分别是参与 $NH_4^+$-N 转化的关键基因[9,18-19].由图 4 可知,当进水 C/N 为 0 时,样品中的 *amoA* 和 anammox 16S rRNA 基因拷贝数分别为 $6.91\times10^5$ 和 $2.49\times10^5$ copies · $g^{-1}$.当进水 C/N 增至 6.0 时,样品中的 *amoA* 基因拷贝数逐渐降至 $5.64\times10^5$ copies · $g^{-1}$,anammox 16S rRNA 基因拷贝数却无显著变化.随着进水 C/N 进一步增加,样品中的 *amoA* 基因拷贝数显著下降.当进水 C/N 为 10.0 时,样品中的 *amoA*基因拷贝数最终降至 $7.43\times10^4$ copies · $g^{-1}$,anammox 16S rRNA 基因拷贝数亦降至 $1.12\times10^5$ copies · $g^{-1}$.*nxrA* 是参与 $NO_2^-$-N 氧化过程的关键基因[20].不同进水C/N条件下TFCW中的*nxrA*基因

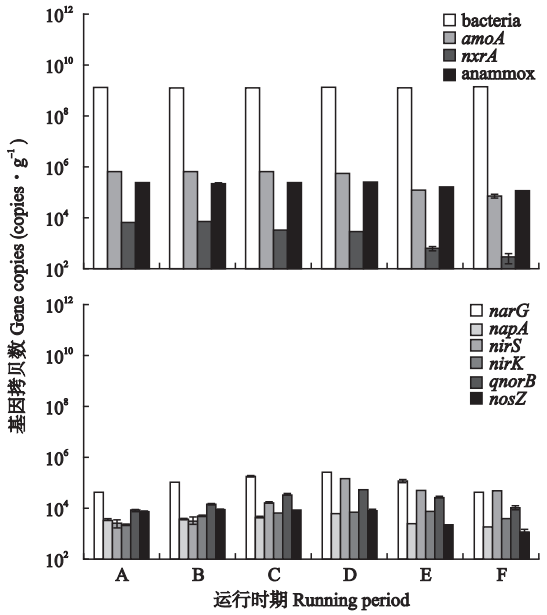



**图 4**　不同进水 C/N 条件下 TFCW 中相关脱氮功能基因的变化

**Fig.4**　Absolute abundance of nitrogen transformation functional genes in the TFCW under influent C/N constraints.

bacteria：细菌 Bacteria.

拷贝数远低于 *amoA*.基于 CANON 型人工湿地反应体系的特点,亚硝酸盐氧化菌(NOB)的数量应保持在较低水平.另外,随着进水中 C/N 的增加,好氧异养菌对 $O_2$的竞争会抑制 NOB 的活性,导致样品中的 *nxrA* 基因拷贝数进一步降低.当进水 C/N 由 0.0 增至 10.0 时,填料样品中的 *nxrA* 基因拷贝数由 $7.00\times10^3$降至 $2.89\times10^2$ copies · $g^{-1}$.

反硝化过程是反硝化菌将 $NO_3^-$-N 最终还原为 $N_2$的生物化学过程.该过程可表述为[21]:$NO_3^-$-N→$NO_2^-$-N→NO→$N_2O$→$N_2$.参与上述 4 步还原过程的关键基因分别为 *narG*、*napA*、*nirK*、*nirS*、*qnorB* 和 *nosZ*.其中,*narG* 和 *napA* 均可编码 $NO_3^-$-N 还原酶的催化中心,是参与反硝化过程第一步还原反应($NO_3^-$-N→$NO_2^-$-N)的 2 种关键基因[22];而亚硝酸盐还原酶 *Nir* 催化 $NO_2^-$-N 还原为 NO 的过程则通常是反硝化过程的限速步骤,也是区别于其他硝酸盐代谢的标志性反应[23].亚硝酸盐还原酶包括细胞色素型(由 *nirS* 基因编码)和 Cu 型(由 *nirK* 基因编码),对 *nirS* 和 *nirK* 基因的定量研究能够准确反映出系统中反硝化菌群的丰度[24].另外,*qnorB* 和 *nosZ* 基因分别编码 NO 还原酶和 $N_2O$ 还原酶的催化中心[25-26],分别是参与反硝化过程第 3 步和第 4 步还原反应的关键基因.图 4 表明,当进水 C/N 由 0.0 增至 6.0 时,系统中 6 种功能基因拷贝数的变化特征基本一致,*narG*、*napA*、*nirS*、*nirK*、*qnorB* 和 *nosZ* 基因拷贝数分别由 $4.28\times10^4$、$3.65\times10^3$、$2.73\times10^3$、$2.39\times10^3$、$8.53\times10^3$ 和 $7.41\times10^3$ copies · $g^{-1}$ 增至 $2.70\times10^5$、$6.29\times10^3$、$1.49\times10^5$、$6.98\times10^3$、$5.50\times10^4$ 和 $8.14\times10^3$ copies · $g^{-1}$.然而,随着进水 C/N 进一步增大,上述 6 种功能基因的拷贝数均呈现下降趋势.当进水 C/N 为 10.0 时,填料样品中 6 种功能基因的拷贝数分别降至 $4.53\times10^4$、$1.92\times10^3$、$5.03\times10^4$、$3.77\times10^3$、$1.10\times10^4$和 $1.30\times10^3$ copies · $g^{-1}$.

结合 **2.1** 的试验结果可知,进水中有机碳源的增加影响了 TFCW 中相关脱氮功能基因的丰度,进而造成了系统脱氮性能的变化.当进水 C/N 由 0.0 增至 6.0 时,TFCW 中的 DO 相对充足,好氧异养菌在利用 $O_2$时未对 AOB 造成不利影响(即 *amoA* 基因拷贝数并无显著下降),而有机碳源的增加则强化了系统的反硝化活性,使得 6 种反硝化功能基因的基因拷贝数增加.由于该条件下有机碳源浓度仍相对较低,反硝化菌对 $NO_2^-$-N 的亲和力要小于 anammox 对 $NO_2^-$-N 的亲和力[27],致使 anammox 16S rRNA 基因拷贝数并未下降,anammox 活性亦未受到抑制.由此可推断,此条件下系统中已逐步形成了 SNAD 耦合反应体系,从而使 CANON 型 TFCW 的 TN 去除率和去除负荷得以进一步提高.当进水 C/N 为 6.0 时,系统中的 SNAD 作用可得到最大限度的强化,其 TN 去除率和去除负荷分别达(93.3±2.3)%和(149.30±8.00) mg · $L^{-1}$ · $d^{-1}$.随着进水 C/N 的进一步增大,进水中过量的有机碳源使得好氧异养菌大量繁殖,好氧异养菌对 $O_2$的大量消耗导致 AOB 开始受到抑制,*amoA* 基因拷贝数随之显著下降,进而阻碍了亚硝化反应的进行,使得出水中 $NH_4^+$-N 的浓度升高,anammox 则由于底物 $NO_2^-$-N 的不足受到抑制(即 anammox 16S rRNA 基因拷贝数出现下降).另一方面,由于亚硝化反应受阻,好氧异养菌又消耗掉了系统中大部分的有机碳源,使系统的反硝化过程受到阻碍,6 种反硝化功能基因的基因拷贝数随之显著减少.当进水 C/N 增至 10.0 时,TFCW 的 TN 去除率和去除负荷分别降至(77.5±3.5)%和(124.10±7.20) mg · $L^{-1}$ · $d^{-1}$.

**2.3**　TFCW 中氮素转化与脱氮功能基因的响应关系

利用逐步线性回归模型解析了试验阶段各形态氮素转化速率与相关脱氮功能基因的定量响应关系(表 1).由表 1 可知,4 组回归模型的 $R^2$ 值均大于 0.986.

**表 1 TFCW 中氮素转化速率与脱氮功能基因的定量响应关系**

**Table 1 Quantitative response relationships between nitrogen transformation rates and functional genes ($n=18$)**

| 逐步线性回归方程式 Stepwise linear regression equation | $R^2$ | $P$ |
|---|---|---|
| $v(TN)=345.03+15.13[(amoA+\text{anammox 16S rRNA})/\text{bacteria 16S rRNA}]+6.12\times10^{-8}\cdot\text{bacteria 16S rRNA}+8.52\times10^{2}[(nirS+nirK)/\text{bacterial 16S rRNA}]+1.52\times10^{4}(amoA/\text{bacteria 16S rRNA})$ | 0.999 | 0.001 |
| $v(NH_4^+\text{-N})=1.39\times10^{-5}amoA+8.19[(amoA+\text{anammox 16S rRNA})/\text{bacteria 16S rRNA}]-184.90$ | 0.986 | 0.012 |
| $v(NO_3^-\text{-N})=2.09\times10^{-2}nxrA+59.61[(amoA+nxrA)/(nirS+nirK)]+13.64[(amoA+\text{anammox 16S rRNA})/(narG+napA)]+4.19$ | 1.000 | 0.004 |
| $v(NO_2^-\text{-N})=9.33\times10^{-2}[(narG+napA)/\text{anammox 16S rRNA}]+1.55\times10^{3}[amoA/(nirS+nirK)]-7.27\times10^{6}[(qnorB+nosZ)/\text{bacteria 16S rRNA}]-1.62\times10^{6}(nxrA/\text{bacteria 16S rRNA})+10.25$ | 0.993 | 0.007 |

表 1 表明,TN 去除速率[$v$(TN)]主要受 4 个变量的影响:[(*amoA*+anammox 16S rRNA)/细菌 16S rRNA]、16S rRNA 丰度、(*nirS*+*nirK*)/细菌 16S rRNA 和(*amoA*/细菌 16S rRNA).上述 4 组变量均与 $v$(TN)呈正相关关系.其中,[(*amoA*+anammox 16S rRNA)/细菌 16S rRNA]表明 CANON 作用是 TFCW 中 TN 去除的主要途径之一,且功能基因相对丰度的提高更加有助于系统中 $v$(TN)的提高.细菌 16S rRNA 则表明 TFCW 中微生物量的增加亦会促进系统对 TN 的去除效果.由(*amoA*/细菌 16S rRNA)可知,功能基因 *amoA* 相对丰度的增加有利于系统中 $NO_2^-$-N 的生成,有助于后续脱氮作用的进行(如反硝化作用与厌氧氨氧化作用).当进水中有机碳源含量增加时,TFCW 中的反硝化活性逐渐增强,亚硝化作用产生的 $NO_2^-$-N 与 CANON 作用产生的 $NO_3^-$-N 均可被反硝化作用脱除.[(*nirS*+*nirK*)/细菌 16S rRNA]表明,亚硝酸盐还原酶 *Nir* 催化 $NO_2^-$-N 还原为 NO 的过程是反硝化过程的限速步骤,反硝化菌群丰度的适当增加有利于系统中 TN 的去除.由此可推断,TFCW 中 TN 的去除应主要依靠 SNAD 耦合反应.

$NH_4^+$-N 去除速率[$v$($NH_4^+$-N)]主要受 *amoA* 和[(*amoA*+anammox 16S rRNA)/细菌 16S rRNA]2 个变量的影响,且其均与 $v$($NH_4^+$-N)呈正相关关系.如前所述,*amoA* 基因是参与好氧氨氧化过程的关键基因,其丰度变化可在一定程度上反映出系统对 $NH_4^+$-N 的去除效果.而[(*amoA*+anammox 16S rRNA)/细菌 16S rRNA]则表明 CANON 作用也是 TFCW 中 $NH_4^+$-N 去除的主要途径之一.由此可知,TFCW 中 $NH_4^+$-N 的去除主要依靠好氧氨氧化作用和 CANON 作用 2 种途径.

*nxrA*、[(*amoA*+*nxrA*)/(*nirS*+*nirK*)]和[(*amoA*+anammox 16S rRNA)/(*narG*+*napA*)]是影响 $NO_3^-$-N 累积速率[$v$($NO_3^-$-N)]的 3 个变量,且均与 $v$($NO_3^-$-N)呈正相关关系.由于 *amoA* 与 *nxrA* 基因均是参与硝化过程的关键基因,两种基因丰度的增加有利于 TFCW 中 $NO_3^-$-N 的累积.(*amoA*+anammox 16S rRNA)表明 CANON 作用可引起系统中 $NO_3^-$-N 累积.*narG*、*napA*、*nirS* 和 *nirK* 基因均是参与反硝化过程的关键基因,上述 4 种基因丰度的增加会促进系统中 $NO_3^-$-N 的还原.由此方程可知,硝化作用和 CANON 作用是造成 TFCW 中 $NO_3^-$-N 累积的主要原因,而反硝化作用则是系统中 $NO_3^-$-N 去除的主要途径.此结果亦与 Wang 等[28]的研究结论一致.

表 1 还表明,$NO_2^-$-N 累积速率[$v$($NO_2^-$-N)]主要受到[(*narG*+*napA*)/anammox 16S rRNA]、[*amoA*/(*nirS*+*nirK*)]、[(*qnorB*+*nosZ*)/细菌 16S rRNA]和(*nxrA*/细菌 16S rRNA)4 个变量的影响.其中,[(*narG*+*napA*)/anammox 16S rRNA]和[*amoA*/(*nirS*+*nirK*)]均与 $v$($NO_2^-$-N)呈正相关关系,而变量[(*qnorB*+*nosZ*)/细菌 16S rRNA]和(*nxrA*/细菌 16S rRNA)则与 $v$($NO_2^-$-N)呈负相关关系.此方程表明,由于 TFCW 中生物膜结构及其内部微环境的复杂性,使得硝化菌、反硝化菌和厌氧氨氧化菌等脱氮功能微生物均参与了系统中 $NO_2^-$-N 的转化,进一步证实了 TFCW 中有 SNAD 耦合反应发生.

## 3 讨论与结论

人工湿地中脱氮功能微生物的种类与丰度受多种因素的影响,如环境条件、进水水质和运行工况参数等.一旦某种因素改变,则系统中脱氮微生物的群落结构随之会发生变化,其不同形态氮素的转化速率亦会受到影响[29].本试验结果表明,当进水 C/N 由 0.0 增至 6.0 时,随着进水中有机碳源浓度的增加,CANON 型 TFCW 出水中的 $NO_x^-$-N 浓度会随之降低,系统对 TN 去除率和去除负荷可得到进一步地强化.究其原因,主要是进水中有机碳源的适量增加促使 TFCW 内形成了 SNAD 反应体系(即在同一个系统内 AOB 和 anammox 共同完成 CANON 反应,反硝化细菌则以有机碳源为电子供体,将体系中剩余的 $NO_2^-$-N 以及 CANON 反应产生的少量 $NO_3^-$-N 还原为 $N_2$ 的过程),从而进一步提高了 CANON 型

TFCW 的 TN 脱除效果.有研究表明,进水中低质量浓度的有机物不会显著影响 anammox 反应,反而可通过反硝化作用提高 TN 去除率[27,30-31].本研究得出的试验结果与其结论一致.然而,当进水 C/N>6.0 后,TFCW 出水中的 $NO_x^-$-N 浓度虽进一步降低,但系统出水中的 TN 和 $NH_4^+$-N 浓度却开始上升,即系统对 TN 和 $NH_4^+$-N 的去除率和去除负荷均下降.此结果可归咎于以下原因:进水中过量有机碳源的添加引起 TFCW 中好氧异养菌大量繁殖,使 AOB 受到抑制,其数量和活性随之急剧减少和降低,进而导致系统中的厌氧氨氧化作用和反硝化作用受阻,使 TFCW 的脱氮性能恶化.

综上所述,进水中有机碳源的适当增加可在一定程度上强化系统的反硝化性能,即能够在单级 CANON 型 TFCW 的基础上构建出 SNAD 反应体系,使人工湿地系统的脱氮效果得到进一步强化.当进水 C/N 为 6.0 时,TFCW 中的 SNAD 作用可得到最大限度的强化,其 TN 的去除率与去除负荷达到最高.

在试验过程中,由于 TFCW 试验装置的表面积有限,致使湿地植物在系统脱氮过程中所起的作用较小(数据未列出).考虑到在实际工程中植物对人工湿地中污染物的去除贡献[16],在后续的中试研究中,会进一步深入考察湿地植物对 CANON 型 TFCW 脱氮机制的影响.

## 参考文献


[1] Hu Y, Zhao X, Zhao Y. Achieving high-rate autotrophic nitrogen removal via CANON process in a modified single bed tidal flow constructed wetland. *Chemical Engineering Journal*, 2014, **237**: 329-335

[2] Dong Z, Sun T. A potential new process for improving nitrogen removal in constructed wetlands: Promoting coexistence of partial-nitrification and ANAMMOX. *Ecological Engineering*, 2007, **31**: 69-78

[3] Sun G, Austin D. Completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite in lab-scale constructed wetlands: Evidence from a mass balance study. *Chemosphere*, 2007, **68**: 1120-1128

[4] Tao W, Wang J. Effects of vegetation, limestone and aeration on nitritation, anammox and denitrification in wetland treatment systems. *Ecological Engineering*, 2009, **35**: 836-842

[5] Tao W, Wen J, Huchzermeier M. Batch operation of biofilter-free-water surface wetland series for enhancing nitritation and anammox. *Water Environment Research*, 2011, **83**: 541-548

[6] Joss A, Salzgeber D, Eugster J, *et al*. Full-scale nitrogen removal from digester liquid with partial nitritation and anammox in one SBR. *Environmental Science and Technology*, 2009, **43**: 5301-5306

[7] Khin T, Annachhatre AP. Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*, 2004, **22**: 519-532

[8] Wang Z, Huang M, Qi R, *et al*. Enhancing nitrogen removal via the complete autotrophic nitrogen removal over nitrite process in a modified single-stage tidal flow constructed wetland. *Ecological Engineering*, 2017, **103**: 170-179

[9] Wang Z, Huang M, Qi R, *et al*. Enhanced nitrogen removal and associated microbial characteristics in a modified single-stage tidal flow constructed wetland with step-feeding. *Chemical Engineering Journal*, 2017, **314**: 291-300

[10] Li D (李　冬), Yang Z (杨　卓), Liang Y-H (梁瑜海), *et al*. Nitrogen removal performance by CANON biological filtration with denitrification. *China Environmental Science* (中国环境科学), 2014, **34**(6): 1448-1456 (in Chinese)

[11] Huang X-X (黄孝肖), Chen C-J (陈重军), Zhang R (张　蕊), *et al*. Research progress in anammox-denitrification coupling process. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2012, **23**(3): 849-856 (in Chinese)

[12] Magrí A, Béline F, Dabert P. Feasibility and interest of the anammox process as treatment alternative for anaerobic digester supernatants in manure processing: An overview. *Journal of Environmental Management*, 2013, **131**: 170-184

[13] Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China (国家环境保护总局). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Beijing: China Environmental Science Press, 2002 (in Chinese)

[14] Ji G, Zhi W, Tan Y. Association of nitrogen micro-cycle functional genes in subsurface wastewater infiltration systems. *Ecological Engineering*, 2012, **44**: 269-277

[15] Wu S, Kuschk P, Brix H, *et al*. Development of constructed wetlands in performance intensifications for wastewater treatment: A nitrogen and organic matter targeted review. *Water Research*, 2014, **57**: 40-55

[16] Saeed T, Sun G. A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management*, 2012, **112**: 429-448

[17] Wen Y (闻　岳), Zhou Q (周　琪). Horizontal subsurface flow constructed wetland models. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2007, **18**(2): 456-462 (in Chinese)

[18] Hou A-Y (侯爱月), Li J (李　军), Bian W (卞伟), *et al*. Analysis of microbial community structure in different partial nitrification system. *China Environmental Science* (中国环境科学), 2016, **36**(2): 428-436 (in Chinese)

[19] Chen T-T (陈婷婷), Zheng P (郑　平), Hu B-L (胡宝兰). Species diversity and ecological distribution of

anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2009, **20**(5): 1229-1235 (in Chinese)

[20] Poly F, Wertz S, Brothier E, *et al*. First exploration of Nitrobacter diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene *nxrA*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, **63**: 132-140

[21] Zhu X, Chen Y. Reduction of $N_2O$ and NO generation in anaerobic-aerobic (low dissolved oxygen) biological wastewater treatment process by using sludge alkaline fermentation liquid. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**: 2137-2143

[22] Bru D, Sarr A, Philippot L. Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**: 5971-5974

[23] Yan T, Fields MW, Wu L, *et al*. Molecular diversity and characterization of nitrite reductase gene fragments (*nirK* and *nirS*) from nitrateand uranium-contaminated groundwater. *Environmental Microbiology*, 2003, **5**: 13-24

[24] Kandeler E, Deiglmayr K, Tscherko D, *et al*. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**: 5957-5962

[25] Braker G, Tiedje JM. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**: 3476-3483

[26] Stres B, Mahne I, Avguštin G, *et al*. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**: 301-309

[27] Li D (李 冬), He Y-P (何永平), Zhang X-J (张肖静), *et al*. Effect of organic carbon on nitrogen removal and the microbial communities in SNAD process. *Journal of Harbin Institute of Technology* (哈尔滨工业大学学报), 2016, **48**(2): 68-75 (in Chinese)

[28] Wang S, Zhu G, Peng Y, *et al*. Anammox bacterial abundance, activity, and contribution in riparian sediments of the Pearl River estuary. *Environmental Science & Technology*, 2012, **46**: 8834-8842

[29] Truu M, Juhanson J, Truu J. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 2009, **407**: 3958-3971

[30] Hu S (胡 石), Gan Y-P (甘一萍), Zhang S-J (张树军). The completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) crafts and its progress. *Technology of Water Treatment* (水处理技术), 2013, **39**(7): 1-5 (in Chinese)

[31] Zhang Z, Li Y, Chen S, *et al*. Simultaneous nitrogen and carbon removal from swine digester liquor by the Canon process and denitrification. *Bioresource Technology*, 2012, **114**: 84-89

**作者简介** 黄梦露, 女, 1993 年生, 硕士研究生. 主要从事污水生态处理与回用研究. E-mail: vanhalenwz@ qq.com

**责任编辑** 肖 红

黄梦露, 李战朋, 王振. 进水碳氮比对 CANON 型人工湿地脱氮性能的影响. 应用生态学报, 2017, **28**(12): 4075-4082
Huang M-L, Li Z-P, Wang Z. Effect of influent C/N on nitrogen removal performance in the tidal flow constructed wetland via CANON process. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, **28**(12): 4075-4082 (in Chinese)