

高效反硝化菌强化固相碳源生物脱氮特性研究

芦婷 杨璐华 杨飞飞 吴为中[†]

北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871; [†] 通信作者, E-mail: wzwu@pku.edu.cn

摘要 以聚丁二酸丁二醇酯(PBS)作为固相可生物降解模式碳源的生物填充床, 针对分离获得的高效反硝化菌开展强化生物脱氮的特性研究, 并利用荧光定量PCR解析反应器的微生物群落结构。结果表明, 投加反硝化菌(W14)可以明显地提高反硝化脱氮效率, 当水力停留时间(HRT)为0.5 h时, 反硝化菌强化脱氮生物反应器的脱氮效率达到90%以上, 且能有效地降低出水残余的DOC浓度。荧光定量PCR结果表明, 高效反硝化菌投加强化能够增加*nirS*基因丰度和比例, 较好地解释了不同接种生物反应器的脱氮效果差异, 即反硝化菌的强化作用能有效增加反硝化菌数量并强化脱氮效果。

关键词 反硝化菌; 生物强化; 脱氮; 固相碳源; 生物填充床; 荧光定量PCR

中图分类号 X172

Denitrification Performance of a Denitrifier-Augmented Packed-Bed Bioreactor with Solid Carbon Source

LU Ting, YANG Luhua, YANG Feifei, WU Weizhong[†]

College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871;

[†] Corresponding author, E-mail: wzwu@pku.edu.cn

Abstract The authors investigated the bioaugmentation performances of a selected bacterial strain for denitrification in a packed bed bioreactor using PBS as solid carbon source. Fluorescence quantitative PCR was employed to analyze the microbial community composition in the bioreactor. Results indicated that the denitrifier named W14 could remarkably improve denitrification efficiency. At HRT of 0.5 h, nitrogen removal was found to be higher than 90% and the residual DOC of effluent was greatly reduced. Addition of selected denitrifiers led to an increase of *nirS* gene abundance and proportion, indicating that inoculation of selected bacterial strain could boost denitrifiers' proliferation and enhance nitrogen removal eventually.

Key words denitrifier; bioaugmentation; nitrogen removal; solid carbon source; packed bed bioreactor; fluorescence quantitative PCR

废水的生物强化处理技术指通过添加一种或多种高效的特定功能微生物来优化污水原有微生物群落结构, 提高降解菌群活性, 增加降解菌群数量, 以期实现强化微生物群落降解目标污染物能力的目的^[1]。通过向污水脱氮系统中投加高效硝化或反硝化菌, 能够有效地提高微生物菌群的硝化或反硝化性能, 进而提高脱氮效率^[2-4]。

分段式硝化-反硝化工艺是污水处理厂应用较为广泛的传统深度脱氮处理工艺, 如 A/O 和 A²/O

等^[5-8], 但这些工艺的脱氮效率较低, 碳源不足是制约其反硝化处理效果的主要原因^[9]。对于多数的污水, 碳源不足往往是由于在一级生化反应中消耗了过量的碳源造成的。此外, 在反硝化单元中也可能有大量非反硝化异养菌存在, 与反硝化菌产生碳源竞争, 进一步限制脱氮效率的提高。

针对内碳源不足的问题, 现有工艺多采用投加液体碳源的方式来补充碳源, 如甲醇、乙醇、乙酸等^[10-12], 但这类工艺往往由于投加量控制困难而发

国家自然科学基金(51378021)和国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07102-002)资助

收稿日期: 2016-05-13; 修回日期: 2017-05-05; 网络出版日期: 2017-09-09

生出水水质波动及出水二次污染。为此,有学者提出应用水不溶性可生物降解物质作为反硝化碳源的设想,利用其仅能在微生物酶作用下得以分解利用的特点来避免外部碳源添加的缺陷,这一工艺称为“固相反硝化”(solid phase denitrification)^[13]。近年来,多种可生物降解聚合物(biodegradable polymers, BDPs)用于固相反硝化研究,如 PCL, PBS, PLA, PHBV 和混合碳源等^[14-18]。但是,有研究表明,使用 BDPs 作为固相碳源进行反硝化,有可能发生出水有机物浓度过高的二次污染^[19]。推测其主要原因是在反硝化系统中除反硝化菌外,还存在大量消耗固相碳源的非反硝化异养菌,使得碳源被过量分解,从而导致残余有机物随出水流出。使用高效反硝化菌强化的固相反硝化系统,有望提高反硝化菌数量和活性,提高对有机碳源的有效利用并抑制非反硝化异养菌的生长,从而避免以上问题的发生。

本研究从实验室运行效果良好的反硝化生物滤池中分离出一株高效反硝化细菌,富集培养后,投入固相反硝化反应器系统,探讨其生物强化脱氮效果及出水残余有机物水平,并利用荧光定量 PCR 技术,对反应器内部微生物丰度变化进行研究,揭示菌群结构与反应器处理效率之间的关系,以期为深度脱氮工艺技术提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 高效菌种来源

从实验室已有的长效稳定运行的多个固相碳源反硝化生物反应器中,取固相碳源填料上的生物膜,分离、纯化、筛选出相对高效的反硝化菌株菌(W14),经初步鉴定为 *Diaphorobacter* 属,其菌落形态为圆形,表面光滑有光泽,边缘整齐,呈橘红色。

1.2 试验材料

模式碳源:选择聚丁二酸丁二醇酯(PBS)作为模式固相碳源,即反硝化固相碳源和生物膜载体。采购自安徽省安庆市和兴化工有限责任公司,为直径 3 mm 左右的椭圆球状体。

高效菌剂是本研究实验室分离的反硝化菌种经富集培养后形成菌液,与活性污泥按照不同体积比组合形式对固相碳源反硝化生物填充床进行投加强化。活性污泥取自北京市海淀区肖家河污水处理厂的二沉池。

模拟配水:采用 NaNO_3 和 KH_2PO_4 配制而成,其中 NO_3^- -N 浓度约为 15 mg/L, PO_4 -P 浓度约为 3

mg/L。

1.3 反硝化菌强化脱氮的摇床序批实验

在摇床序批实验中,以 500 mL 锥形瓶为反应体系。在 500 mL 锥形瓶中加入 300 mL 人工配水溶液(最终浓度: NO_3^- -N 为 50 mg/L, PO_4 -P 为 5 mg/L),固体碳源 PBS 80 g。装置如图 1 所示。锥形瓶置于恒温振荡器反应器中,在 25°C, 100 rpm 条件下反应,每 24 小时换一次配水(配水浓度: NO_3^- -N 为 50 mg/L, PO_4 -P 为 5 mg/L)。

设置两组上述的反应体系,接种来源如表 1 所示,分别进行挂膜驯化,每 24 小时测定一次溶液中 NO_3^- -N 浓度,当溶液中 NO_3^- -N 去除率在 90% 以上,并连续一周效果保持稳定时,即认为挂膜成功。待反硝化效果稳定后,进行动力学实验,每两小时取一次样,监测不同体系中硝酸盐氮浓度和 DOC 随时间的变化。

1.4 反硝化菌强化固相碳源的生物填充床试验

固相反硝化填充床试验装置如图 2 所示。填充床反应器由有机玻璃制成,反应器主体为圆柱形,内径 50 mm,高 500 mm。反应器中填充有固体碳源 PBS,填充高度为 250 mm,质量约 340 g。模拟的人工配水从配水箱经过蠕动泵泵入填充床底部,经过反应器处理的出水从填充床顶部流出。反应器置于水槽中,恒温水浴控制温度为 25°C。

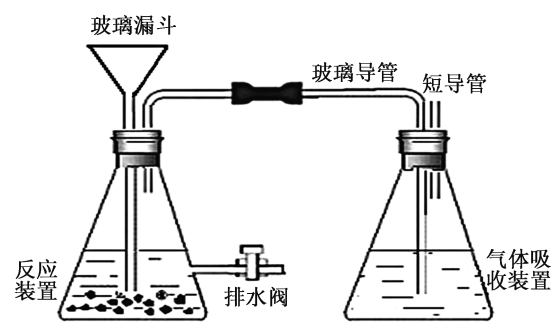


图 1 摇床序批实验装置示意图

Fig. 1 Experimental setups of shaking incubator

表 1 序批实验反应体系接种来源

Table 1 Inoculation sources of batch tests reaction systems

反应体系编号	接种来源
1	100 mL 活性污泥(肖家河污水处理厂二沉池)
2	100 mL 菌液(W14)

说明: 菌液浓度 $\text{OD}_{600} \approx 0.8$ 。

固相反硝化填充床设置 3 组平行试验, 生物强化方式分别为: 100 mL 活性污泥接种(1 号)、活性污泥(50 mL)与 W14 反硝化菌液(50 mL)按 1:1 接种(2 号)、W14 反硝化菌液(100 mL)接种(3 号), 比较高效反硝化菌强化对脱氮效果和出水水质的改善。采用静态方式进行接种和挂膜驯化, 每隔 5 小时换水, 反复换水驯化 3 天后开始连续进水试验。以空床水力停留时间(HRT)为 2 h, 启动连续运行(0~31 天), 待效果稳定后, 依次缩短至 1 h (32~62 天)和 0.5 h (62~140 天), 考察反应系统的抗冲击负荷能力。对反应器进水 NO_3^- -N 及出水 NO_3^- -N, NO_2^- -N, NH_4^+ -N, DOC 这 5 个水质指标进行监测。反应器运行过程中, 根据需要定期投菌, 进行强化。

1.5 荧光定量 PCR 试验

在反应器运行的第 20, 59, 106 和 140 天(分别记为第 1, 2, 3 和 4 次取样), 分别从 3 组反应器中随机取出 1 g 填料, 经超声波(36 kHz)振荡 30 分钟后, 使生物膜完全脱落下来。将全部菌液抽滤通过 0.22 μm 滤膜, 将微生物转移至滤膜上; 把滤膜剪碎在 2 mL 离心管中, 采用 3S 柱离心式环境样品 DNA 回收试剂盒(上海博彩)进行 DNA 提取。由上海美吉生物医药科技有限公司协助测定, 对细菌 16S rRNA 和亚硝酸盐还原酶基因 *nirS* 进行定量。采用引物序列分别为 16S rRNA (Eub338: 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'; Eub518: 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')和 *nirS* (cd3AF: 5'-GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG -3'; R3cd: 5'-GAS TTC GGR TGS GTC TTG A-3')。

1.6 水质分析方法

水样经 0.45 μm 滤膜过滤后测定各项指标。 NO_3^- -N 采用紫外分光光度法进行测定, NO_2^- -N 和

NH_4^+ -N 分别采用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法和水杨酸-次氯酸钠分光光度法进行测定, 水样 DOC 浓度使用 TOC 分析仪(HACH, IL530 TOC-TN)进行分析。

2 结果与分析

2.1 反硝化菌强化脱氮的摇床序批实验脱氮特性分析

在序批实验的两个反应体系均达到稳定运行状态后, 共进行 3 次动力学实验, 结果如图 3 所示。

从图 3(a)可以看出, 污泥接种的摇床 1 号反应体系在前 5 个小时内, NO_3^- -N 浓度和降解时间近似呈线性关系, 降解过程符合零级动力学, 在 7 h 时下降到 1.24 mg/L, 此时降解过程基本上结束, 之后溶液中的 NO_3^- -N 浓度保持在 1 mg/L 左右。在反应初期, 溶液中的 DOC 呈上升趋势, 3~5 h 内急剧上升, 增长速率为 42.21 mg/(L·h), 5 h 时达到一个峰值 110.99 mg/L 后, 又在 2 小时内迅速下降到 28.62 mg/L。此后, DOC 持续上升, 24 h 时 DOC 浓度升高至 136.13 mg/L, 与 7 h 时相比, 浓度上升 107.51 mg/L。

从图 3(b)可以看出, 用 W14 号反硝化纯菌接种的摇床 2 号反应体系完成整个系统的反硝化脱氮用时 7 h, 7 h 时溶液中 NO_3^- -N 浓度平均值为 1.02 mg/L, 之后溶液中 NO_3^- -N 浓度维持在 1 mg/L 左右。摇床 2 号反应体系的 DOC 浓度在 1~3 h 之间出现小幅度(5.62 mg/L)的下降, 从 3 h 起迅速上升, 5 h 时达到峰值 114.83 mg/L, 此后的 2 小时又迅速下降, 7 h 时降至 23.29 mg/L, 之后保持相对稳定, 24 h 时测得 DOC 浓度为 26.87 mg/L, 可以推算出, 在 13 个小时内摇床 4 号的 DOC 浓度增幅不到 4 mg/L。

微生物分解释放的碳源一方面为自身生长提供能量, 同时也为还原硝酸盐进行反硝化提供电子供体。将 DOC 浓度的变化与硝酸盐氮浓度的变化关联在一起来看, 可以发现, 反应初期 NO_3^- -N 较为充足, 微生物大量分解碳源, 导致溶液中 DOC 快速上升, DOC 浓度在 NO_3^- -N 降解过程中先上升后下降, DOC 峰值均出现在 5 h 时。当 DOC 降至最低值时, NO_3^- -N 也已降至最低值。在反硝化过程基本上完成后, 污泥接种的摇床 1 号反应体系 DOC 大幅度上升。这是因为污泥接种条件下存在大量不具有反硝化脱氮功能的有机异养菌, 仍然继续分解

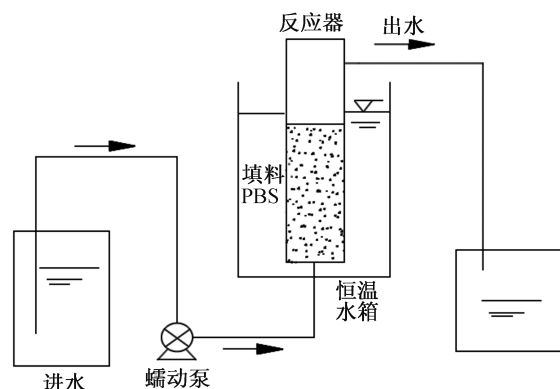


图 2 填充床试验装置示意图

Fig. 2 Experimental setups of packed bed bioreactor

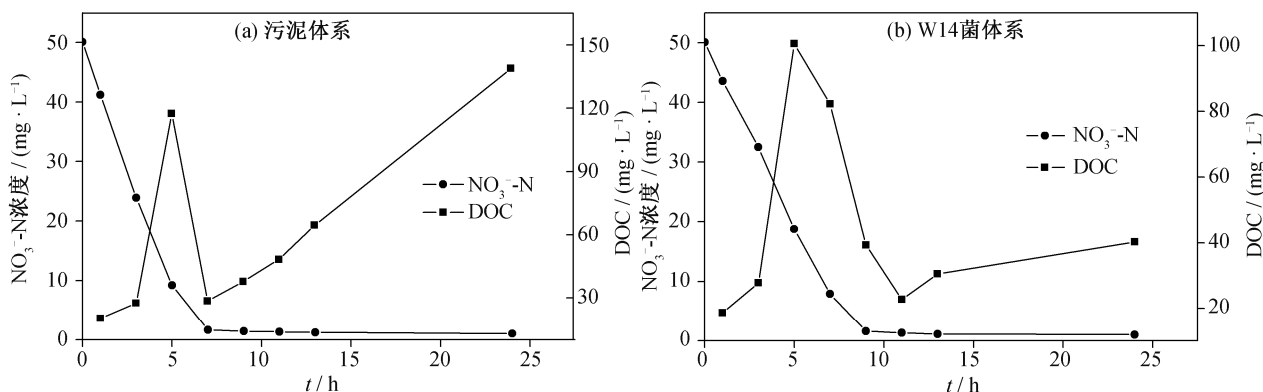


图 3 摇床 1 号和 2 号脱氮的动力学过程
Fig. 3 Kinetic study of denitrification in shaking system 1 and 2

释放碳源,导致 DOC 浓度较快地持续上升。反硝化菌(W14)强化的摇床 2 号反应体系为单纯投加的具有脱氮功能的一种有机异养菌,在反硝化反应基本上完成后,对碳源的分解速度大大降低,DOC 浓度仅有少量增长。可以推断,在有反硝化菌剂强化脱氮的反应体系中,反硝化菌的生物强化对其他有机异养菌微生物生长会起到一定的抑制作用,在一定程度上可以抑制微生物对有机碳源的无效利用。

2.2 不同 HRT 运行条件下不同强化组合填充床脱氮效果分析

2.2.1 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 去除效果分析比较

由于在所有反应器运行过程中,出水 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 和 $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 的浓度均低于 1 mg/L,因此主要考察 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的去除情况。图 4(a)~(c)分别为 1 号(污泥接种)、2 号(污泥与菌液 1:1 接种)和 3 号(纯菌液接种)反应器在 HRT 分别为 2, 1 和 0.5 h 时的进出水 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 变化。

3 组反应器进水 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 浓度维持在 15 mg/L 左右,启动阶段 HRT 为 2 h,在此条件下运行至稳定状态时,1 号、2 号和 3 号反应器出水 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 浓度分别为 1.59, 1.93 和 1.57 mg/L,无明显差别。当 HRT 缩短为 1 h 后,3 组反应器出水 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 浓度未出现明显波动,去除效果仍保持稳定,对 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的平均去除率分别为 94.52%, 94.29% 和 96.07%,也无明显差异。但当 HRT 缩短为 0.5 h 时,3 组反应器 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 去除效果均受到明显影响。其中,1 号反应器出水水质波动最大,经过较长一段时间的运行后,对 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 的去除率仅为 81.14%。2 号反应器出水 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 浓度在 HRT 缩短后较明显地上升,但在一段时间后逐渐稳定,最终 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 平均去除率

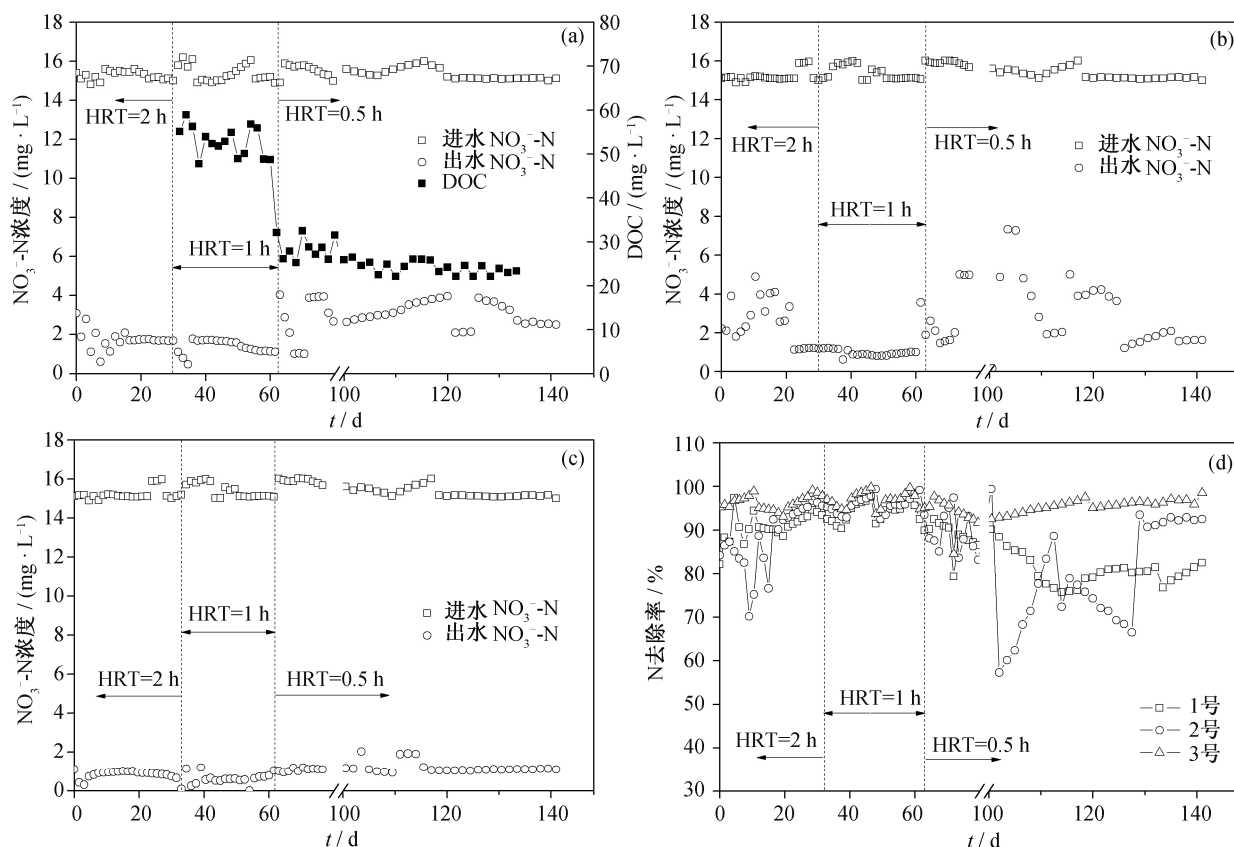
为 89.47%,明显高于 1 号。与 1 号和 2 号反应器相比,3 号反应器在水力负荷增大后,受到的影响不明显,出水水质很快趋于稳定,最终去除率达到 93.48%,明显优于 1 号和 2 号反应器。比较图 2(d)中各反应器的 N ($\text{NO}_3^- \text{-N} + \text{NO}_2^- \text{-N} + \text{NH}_4^+ \text{-N}$)去除率变化,可以明显看出在水力负荷较高的条件下(HRT=0.5 h),W14 纯菌液强化的 3 号反应器具有更佳的抗冲击负荷能力。

在 HRT 从 2 h 缩短至 1 h 时,水力冲击负荷对 3 组反应器的影响差异不明显,HRT 继续缩短至 0.5 h 后,W14 纯菌接种强化的 3 号反应器表现出最好的抗冲击负荷能力,且脱氮效率最高,明显优于 1 号和 2 号反应器。W14 反硝化菌分离自反硝化系统,在有固相碳源存在的适宜条件下具有较大的活性,且随着生物强化过程的进行,反硝化微生物的数量可能会实现有效增加,因而增强了生物强化反硝化系统的脱氮性能和抗冲击负荷能力。通过定量 PCR 技术,可以进一步解析具体机理。

2.2.2 出水 DOC 浓度分析比较

图 5 为 3 组反应器在 HRT 分别为 1 h 和 0.5 h 条件下出水 DOC 浓度变化。可以看到,在 HRT 为 1 h 的运行条件下,以活性污泥与 W14 菌液混合接种和 W14 纯菌液接种的 2 号和 3 号反应器出水 DOC 浓度明显低于以活性污泥接种的 1 号反应器。当 HRT 缩短为 0.5 h 后,3 组反应器出水 DOC 浓度均显著下降,但 W14 接种的 2 号和 3 号反应器仍显著低于 1 号反应器。

一般认为,固相反硝化出水 DOC 浓度残余是由于细菌在厌氧条件下对固相碳源分解后形成的溶解性有机物质不能被反硝化微生物完全利用而导致



0~31 d, HRT=2 h; 32~62 d, HRT=1 h; 63~140 d, HRT=0.5 h

图 4 1 号(a)、2 号(b)和 3 号(c)反应器的 NO_3^- -N 去除效果以及三组反应器 NO_3^- -N 去除率比较(d)

Fig. 4 NO_3^- -N removal performances of reactor 1 (a), 2 (b) and 3 (c), and comparison of NO_3^- -N removal performances of 3 reactors (d)

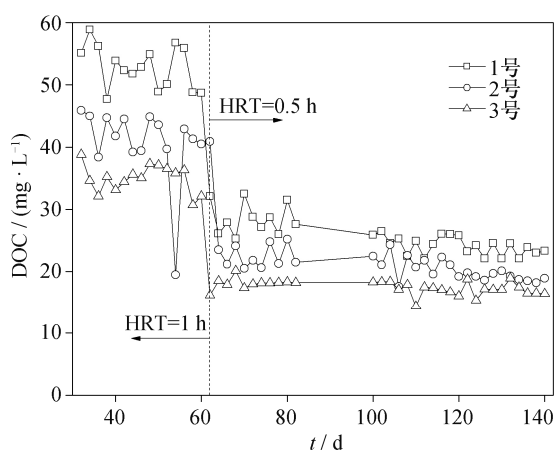


图 5 3 组反应器出水 DOC 浓度比较

Fig. 5 Comparison of effluent DOC concentration of 3 reactors

的。在以 W14 反硝化菌接种的反应器中,反硝化菌数量可能具有更强的竞争优势,增大反硝化过程对溶解性有机碳源的利用率,并能够在一定程度上

抑制非反硝化异养菌的生长,因而有效缓解出水有机物浓度较高的问题,减少碳源浪费,并可在一定程度上延长固相碳源的可持续利用时间。

2.3 定量 PCR 结果分析

各反应器在不同运行阶段的 16S rRNA 基因和 *nirS* 基因定量结果分别如图 6(a)和(b)所示。可以看出,在反应器不同运行阶段,污泥与菌液混合强化的 2 号反应器中细菌数量均低于污泥接种和纯菌液接种的 1 号和 3 号反应器。从不同运行阶段各反应器的细菌数量变化可以发现,随着反应器稳定运行,微生物量明显增加(第 1 次与第 2 次采样结果比较),增大水力负荷至 0.5 h 后(第 2 次与第 3, 4 次采样比较),微生物量则显著降低。

图 6(b)为各反应器不同运行阶段细菌 *nirS* 基因丰度,可以发现在不同运行阶段,纯菌液接种的 3 号反应器 *nirS* 基因丰度明显高于混合接种的 2 号反应器,而以污泥接种的 1 号反应器 *nirS* 基因丰度最低。通过不同运行阶段的 *nirS* 基因丰度变化,观

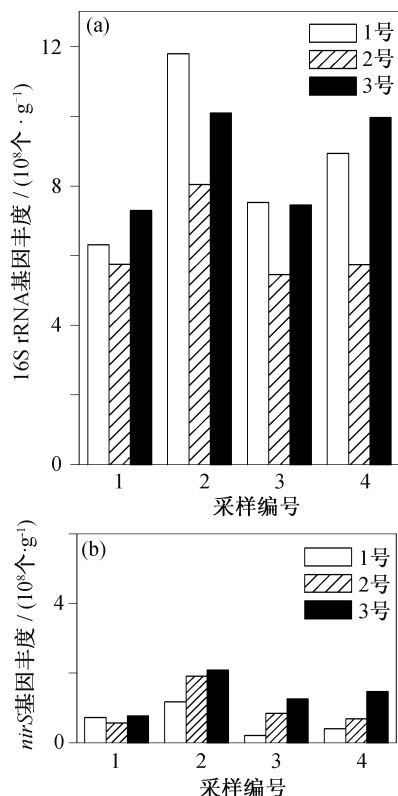


图 6 各反应器不同运行阶段细菌 16S rDNA 基因(a) 和 *nirS* 基因(b)拷贝数

Fig. 6 Bacterial 16S rDNA and *nirS* gene copies of each reactor in different operation time

察到当水力负荷增大至 0.5 h 后, 3 组反应器 *nirS* 基因数量明显下降, 表明反硝化细菌数量的减少。

图 7 为 *nirS* 与 16S rDNA 基因比值, 可以发现, 在运行初期, 3 组反应器反硝化菌比例无明显差异, 而当 HRT 缩短为 1 h 后, 混合强化 2 号反应器与纯菌强化的 3 反应器反硝化细菌比例逐渐增大, 可达 20% 以上, 远高于 1 号反应器。而 HRT 缩短为 0.5 h 至稳定状态后, 1 号反应器反硝化细菌比例显著降低, 而 2 号和 3 号反应器反硝化菌比例虽然降低,

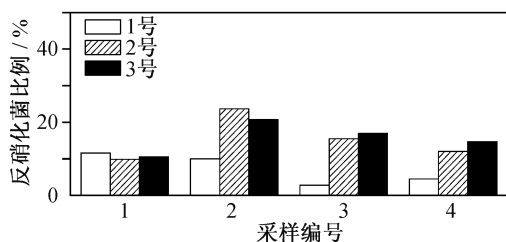


图 7 各反应器不同时期反硝化菌在总菌群中比例
Fig. 7 Percentage of denitrifiers in microbial community in each reactor

但仍保持较高的数值。

研究中常用 16S rRNA 编码基因的定量来反映微生物量的丰度。2 号反应器细菌丰度最低, 可能是由于投加的高效反硝化菌与污泥土著菌之间存在竞争关系, 影响了土著细菌的生长繁殖, 导致反应器中微生物总量相对较低。水力负荷增大会造成较大的水力剪切作用, 导致部分生物膜脱落而使细菌总量减少, 但在继续运行一段时间后, 微生物量会有所恢复。亚硝酸盐到 NO 的还原过程是反硝化过程区别于其他硝酸盐代谢的标志反应, 所以编码亚硝酸盐还原酶 *NIR* 的两种基因常用来研究反硝化功能微生物的丰度和多样性等^[20-21]。研究表明, 污水处理反应器中 *nirK* 基因丰度远低于 *nirS* 基因^[22], 因此本文仅对 *nirS* 基因丰度进行定量分析。在不同运行阶段 *nirS* 基因的丰度变化和差异较好地解释了 3 组反应器随 HRT 变化所表现出脱氮效果的差异, 表明反硝化细菌数量是决定脱氮效果差异的主要因素。研究中经常使用功能基因与 16S rRNA 基因的比值来衡量具有该功能基因的微生物在整个微生物群落中的比例和重要性^[23], 因而本研究用 *nirS* 基因与 16S rRNA 基因的比值来反映反硝化细菌在总菌群中的比例。2 号和 3 号反应器表现出更高的反硝化细菌比例, 且在高水力负荷条件下也能保持较高的比例, 这是 2 号和 3 号反应器比 1 号反应器具有更强的抗冲击负荷能力的主要原因。可见, 通过高效菌投加强化, 使反应器反硝化脱氮能力更稳定。反硝化细菌比例更高, 使得有机碳源更充分地被利用, 因而出水 DOC 浓度也更低(图 5)。

3 结论

将分离得到的高效反硝化菌(W14)用于强化固相碳源的反硝化脱氮研究, 得到以下结论。

1) 强化了固相碳源生物填充床反应器的脱氮性能, 并进一步提高了该系统的抗冲击负荷能力, 在空床水力停留时间(HRT)为 0.5 h 的运行条件下, 高效反硝化菌强化系统的脱氮效率达到 93.48%。

2) 序批实验与连续流生物填充床实验结果表明, 通过反硝化菌(W14)的投加强化, 能够进一步缓解污泥培养体系固相反硝化系统中存在的固相碳源过度释放导致出水有机物浓度较高的问题。

3) 定量 PCR 结果较好地解析了不同强化形式反应器脱氮效果和出水有机物浓度水平差异的微生物机理, 反硝化菌强化条件可能在一定程度上抑制

其他有机异养菌对固相碳源的利用释放,验证了高效化反硝化菌强化能够进一步提高反硝化菌丰度,实现更好的脱氮效果。

参考文献

- [1] 曲洋. 耐盐异养硝化—好氧反硝化菌的筛选方法与脱氮机制及其生物强化短程硝化系统的研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2010
- [2] Ivanov V, Wang X H, Tay S T L, et al. Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(3): 374–381
- [3] 姚晓丽, 梁运祥. 一株反硝化细菌在景观水净化处理中的应用. *环境科学与技术*, 2006, 29(11): 62–64
- [4] Jiao Y, Zhao Q L, Jin W B, et al. Bioaugmentation of a biological contact oxidation ditch with indigenous nitrifying bacteria for in situ remediation of nitrogen-rich stream water. *Biores Technol*, 2011, 102(2): 990–995
- [5] Canals O, Salvado H, Auset M, et al. Microfauna communities as performance indicators for an A/O Shortcut Biological Nitrogen Removal moving-bed biofilm reactor. *Water Res*, 2013, 47(9): 3141–3150
- [6] Du P, Li W H, Liang Z W, et al. Treatment of mixed chemical wastewater by a two-stage A/O process for elimination of COD nitrogen and toxic matters. *Pol J Environ Stud*, 2013, 22(1): 85–91
- [7] Chen Y Z, Peng C Y, Wang J H, et al. Effect of nitrate recycling ratio on simultaneous biological nutrient removal in a novel anaerobic/anoxic/oxic(A²/O)-biological aerated filter (BAF) system. *Biores Technol*, 2011, 102(10): 5722–5727
- [8] Yu J H, Zhou S Q, Wang W F. Combined treatment of domestic wastewater with landfill leachate by using A²/O process. *J Hazard Mater*, 2010, 178: 81–88
- [9] 王翠. 不同 C/N 比低浓度污水的 A/O/N 脱氮研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006
- [10] Pan Y T, Ni B J, Bond P L, et al. Electron competition among nitrogen oxides reduction during methanol-utilizing denitrification in wastewater treatment. *Water Res*, 2013, 47(10): 3273–3281
- [11] Shen Z Q, Zhou Y X, Wang J L. Comparison of denitrification performance and microbial diversity using starch/polylactic acid blends and ethanol as electron donor for nitrate removal. *Biores Technol*, 2013, 131: 33–39
- [12] Rustige H, Nolde E. Nitrogen elimination from landfill leachates using an extra carbon source in subsurface flow constructed wetlands. *Water Sci and Technol*, 2007, 56(3): 125–133
- [13] Hiraishi A, Khan S T. Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(2): 103–109
- [14] Boley A, Muller W R. Denitrification with polycaprolactone as solid substrate in a laboratory-scale recirculated aquaculture system. *Water Sci Technol*, 2005, 52(10/11): 495–502
- [15] Wu W Z, Yang L H, Wang J L. Denitrification using PBS as carbon source and biofilm support in a packed-bed bioreactor. *Environ Sci Pollut R*, 2013, 20(1): 333–339
- [16] Fan Z X, Hu J, Wang J L. Biological nitrate removal using wheat straw and PLA as substrate. *Environ Technol*, 2012, 33(21): 2369–2374
- [17] 徐影, 仇天雷, 韩梅琳, 等. 响应曲面法优化固相反硝化的工艺条件. *环境工程学报*, 2013, 7(2): 489–493
- [18] Wu W Z, Yang F F, Yang L H. Biological denitrification using a novel biodegradable polymer as carbon source and biofilm carrier. *Biores Technol*, 2012, 118: 136–140
- [19] 吴伟龙, 杨璐华, 杨飞飞, 等. 低温条件下 BAF+SPD 组合工艺对滇池入湖河水的脱氮效果. *环境工程学报*, 2013, 7(12): 4597–4602
- [20] Kyongmi C, Kim Y, Chang N I, et al. Evaluating wastewater stabilizing constructed wetland, through diversity and abundance of the nitrite reductase gene *nirS*, with regard to nitrogen control. *Desalination*, 2010, 264(3): 201–205
- [21] Yoshida M, Ishii S, Otsuka S, et al. Temporal shifts in diversity and quantity of *nirS* and *nirK* in a rice paddy soil. *Soil Biol Biochem*, 2009, 41(10): 2044–2051
- [22] Jung J, Yeom J, Han J, et al. Seasonal changes in nitrogen-cycle gene abundances and in bacterial communities in acidic forest soils. *J Microbiol*, 2012, 50(3): 365–373
- [23] Geets J, De Cooman M, Wittebolle L, et al. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(1): 211–221