

## ИЗМЕНЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЧИСЛЕННОСТИ МИКРОБНЫХ ГРУПП, УЧАСТВУЮЩИХ В УДАЛЕНИИ АЗОТА В СИСТЕМЕ РЕАКТОРОВ АНАММОКС–ЧАСТИЧНОЙ НИТРИФИКАЦИИ ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ НАГРУЗКИ ПО АММОНИЙНОМУ АЗОТУ И ХПК

© 2020 г. А. В. Вишнякова<sup>а</sup>, \*, Ю. В. Литти<sup>а</sup>, Е. А. Бочкова<sup>а</sup>, А. А. Ермошин<sup>а</sup>, А. Н. Ножевникова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: nast366760404@mail.ru

Поступила в редакцию 19.06.2019 г.

После доработки 30.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

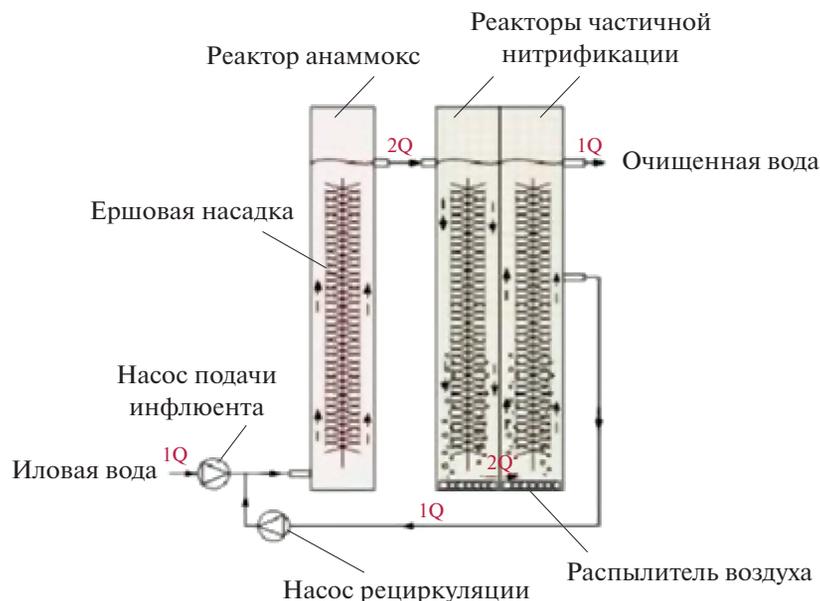
В работе исследованы эффективность очистки иловой воды метантенков и изменения относительной численности основных групп микроорганизмов, участвующих в удалении из нее азота при увеличении нагрузки по аммонийному азоту и ХПК (химическое поглощение кислорода). Использовали лабораторную двухреакторную систему очистки: 1) анаммокс и 2) частичной нитрификации с иммобилизацией биомассы на ершовом носителе и рециклом очищаемой воды, с концентрацией в ней азота от 50 до 250 мг N-NH<sub>4</sub>/л и вариациями величины ХПК от 50 до 1650 мг O<sub>2</sub>/л. Об эффективности процесса судили по изменению концентраций N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub>, ХПК, а также рН и растворенного кислорода в исходной и очищенной иловой воде. Максимальная представленность анаммокс-бактерий и нитрификаторов первой ступени наблюдалась при концентрации 150 мг N-NH<sub>4</sub>/л и ХПК до 600 мг O<sub>2</sub>/л в исходной среде. Эффективность очистки иловой воды от азота при этом составляла 75–90%. В анаммокс-реакторе наблюдалось активное развитие анаммокс-бактерий и нитрификаторов первой ступени, а нитрификаторы второй ступени практически отсутствовали. Обнаружено, что повышенное содержание органических веществ в иловой воде обуславливает существенное снижение степени очистки иловой воды, что объясняется снижением относительной численности анаммокс-бактерий и нитрификаторов первой ступени р. *Nitrosomonas* в реакторе частичной нитрификации и, напротив, увеличением численности нитрификаторов второй ступени р. *Nitrospira*. Представленность основных групп микроорганизмов, участвующих в удалении азота, было больше в биопленках, нежели в свободноплавающем иле (флоккулах и гранулах). По мере увеличения нагрузки размеры гранул и флоккул не менялись, но менялся цвет с серо-красного на более темный.

**Ключевые слова:** анаммокс-бактерии, нитрификаторы первой и второй ступени, иловые воды метантенков, типы илов, рецикл

DOI: 10.31857/S0026365620020147

На станциях очистки сточных вод осадки первичных и вторичных отстойников после сбраживания в анаэробных биореакторах подвергаются обезвоживанию, в результате чего образуются иловые воды, содержащие высокие концентрации аммония ( $\geq 350$  мг/л) и часто имеющие низкое соотношение ХПК/N ( $\leq 1$ ). Для снижения дополнительной нагрузки на основные очистные сооружения, возникающей при возврате иловых вод в начало процесса очистки, целесообразно проводить их предобработку в отдельных очистных установках. Это связано с тем, что для удаления азота в процессе очистки сточных вод на основе нитриденитрификации крайне важно наличие достаточного количества доступного органического вещества: отношение ХПК/N должно быть не менее 5

(Xu et al., 2014). Наиболее эффективными в настоящее время считаются методы предобработки иловой воды с использованием процессов 1) частичной нитрификации, то есть окисления аммонийного азота до нитрита, и последующего 2) анаэробного окисления аммония нитритом (анаммокс), позволяющих значительно снизить затраты энергии на аэрацию, а также внесение источника органического углерода для гетеротрофной денитрификации (van Hulle et al., 2010; Марданов и соавт., 2016). Технология частичной нитрификации–анаммокс сочетает в себе два микробиологических процесса, осуществляемых хемолитоавтотрофными микроорганизмами: аэробными нитрифицирующими бактериями и анаэробными анаммокс-бактериями.



**Рис. 1.** Схема системы реакторов анаммокс–частичной нитрификации с иммобилизацией биомассы на ершовом носителе и рециклом очищаемой воды.

Структура микробных сообществ в системах частичной нитрификации–анаммокс зависит от условий эксплуатации и от преобладающего морфологического типа ила (гранулы, флоккулы, биопленки) (Guo et al., 2016; Марданов и соавт., 2016). Во флоккулах, в отличие от гранул, нет четко выраженной стратификации, и накапливаются нитрат и нитрит. Гранулы и биопленки имеют аэробный наружный слой, в котором присутствуют нитрификаторы, и анаэробное внутреннее ядро, где развиваются анаммокс-бактерии, окисляющие аммоний нитритом. Размер гранул влияет на обилие и активность микроорганизмов, участвующих в цикле азота (Wang et al., 2014). Во внутренних слоях крупных гранул и толстых биопленок анаммокс-бактерии интенсивно конкурируют за нитрит с нитрификаторами второй ступени (Speth et al., 2016). С другой стороны, при высоких нагрузках биопленки могут становиться слишком толстыми, а гранулы крупными, что ухудшает массообмен, в том числе кислорода, и может привести к значительному изменению численности и активности микроорганизмов, участвующих в удалении азота (анаммокс-бактерии, нитрификаторы первой и второй ступеней, гетеротрофные денитрификаторы), и ухудшению качества очистки.

Целью настоящей работы было исследовать представленность в морфологически разных типах ила основных групп микроорганизмов, участвующих в удалении азота из иловой воды термофильного метантенка в двухреакторной системе очистки при повышении нагрузки по азоту и ХПК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Система очистки иловых вод.** В работе была использована двухэтапная система очистки иловых вод с разделением в двух реакторах аэробных (частичная нитрификация) и анаэробных (анаммокс) процессов, с иммобилизацией части микробной биомассы на ершовом носителе. Иловая вода поступала в анаэробный анаммокс-реактор, далее в аэробный реактор частичной нитрификации, а затем, с помощью постоянного рецикла очищаемой воды, возвращалась в реактор анаммокс, в который поступала исходная иловая вода (рис. 1).

Для иммобилизации и удержания бактериальной биомассы в биореакторах использовали ерши из синтетических волокон разной толщины и длины, что позволяло удерживать бактерии в протоке очищаемой воды за счет образования ими биопленок на поверхности волокон.

**Объект исследования** – иловая вода – жидкость, отделенная от сброженной в термофильном метантенке смеси осадков сточных вод Люберецких очистных сооружений и органической фракции твердых коммунальных отходов. Иловую воду, содержащую до 1000 мг N-NH<sub>4</sub>/л и до 10000 мг O<sub>2</sub>/л ХПК, перед подачей в установку разбавляли водопроводной водой в требуемое количество раз (3–10 раз). Столь высокое содержание ХПК в иловой воде было вызвано недостаточным полным сбраживанием субстрата в метантенке при его сверхвысокой нагрузке по органическому веществу.

**Концентрацию биомассы** определяли перед переходом на иловую воду путем стряхивания био-

массы с ершей и опорожнения содержимого реакторов в мерные цилиндры с определением сухого и органического вещества в осадке. Содержание сухого вещества (СВ) определяли после высушивания образца биомассы до постоянной массы при 105°C. Зольный остаток определяли при сжигании сухого образца биомассы в муфельной печи до постоянной массы при 650°C. Содержание органического вещества (ОВ) рассчитывали, как разницу между СВ и зольным остатком.

**Оценку относительной численности основных групп микроорганизмов**, включая анаммокс-бактерии (АМХ), нитрификаторы первой (АОБ) и второй ступеней (НОБ) проводили с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) (Ni et al., 2012; Dai et al., 2019). Биомассу отбирали из реакторов 1) анаммокс и 2) частичной нитрификации в начале работы и в конце каждого из этапов повышения концентрации аммонийного азота, и, соответственно, ХПК в очищаемой иловой воде. Биомассу отобранных проб тщательно растирали в фарфоровой ступке пестиком, дважды отмывали в буфере PBS, центрифугируя 15 мин при 4000 g, и собирали осадок для определения численности основных групп бактерий. Для гибридизации использовали Су3-меченые олигонуклеотидные зонды: Amx368 (Schmid et al., 2003) – на все виды анаммокс-бактерий, Nsm156 (Wagner et al., 1995) – на нитрификаторы первой ступени и Ntspa662 (Daims et al., 2001) – на нитрификаторы второй ступени. Анализ наличия основных бактериальных групп в микробных сообществах реакторов и оценку их относительной численности проводили по ранее описанной методике (Ножевникова и соавт., 2012; Бочкова и соавт., 2018). После гибридизации клетки в образцах визуализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Zeiss Lab.A1 (“Carl Zeiss”, Германия) с цифровой камерой AxioCamHR и светофильтром Zeiss 20 для Су3-меченых зондов. Оценивали численность гибридизовавшихся с зондом клеток (по занимаемой ими площади в поле зрения), по отношению к общей численности клеток (по занимаемой ими площади в поле зрения) в образце. Анализировали 50 полей зрения микроскопа. В каждом измерении сначала оценивали численность клеток, гибридизовавшихся с зондом, с использованием фильтра Zeiss 20, затем осуществляли в том же поле зрения оценку относительной численности в фазово-контрастном режиме. Погрешность метода составляет примерно 10–15%.

**Статистическую обработку** данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0. Пробы анализировали в 3-кратной повторности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Очистка иловых вод**, полученных с термофильного метантенка, осуществлялась в двухреактор-

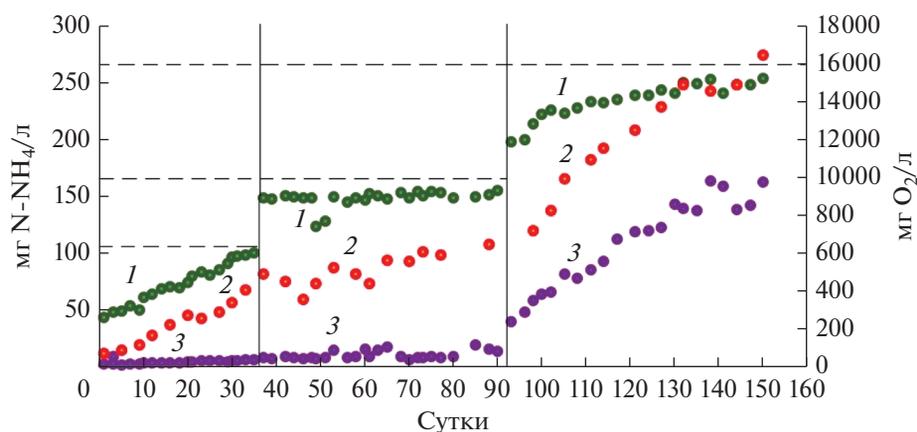
ной лабораторной системе. Похожая схема использовалась для очистки реальных хозяйственно-бытовых сточных вод на 9 очистных станциях во временных поселках строителей комбинированной автомобильно-железнодорожной магистрали Адлер–Роза Хутор – объекта зимней олимпиады 2014 года (Nozhevnikova et al., 2012; Зубов и соавт., 2013; Литти и соавт., 2013; Nozhevnikova et al., 2015, 2019; Ножевникова и соавт., 2017), а также в экспериментах с модельными иловыми водами (Kalyuzhnyi et al., 2009; Xu et al., 2014).

Реактор частичной нитрификации изначально был инокулирован активным илом Курьяновских очистных сооружений (г. Москва), а анаммокс-реактор – постоянно культивируемой и имеющейся в наличии в лаборатории биомассой анаммокс-бактерий *Jettenia ecosii*. Культура была получена из станции очистки бытовых сточных вод в Красной Поляне (Бочкова и соавт., 2018). Система из двух реакторов работала в течение года на синтетической среде, содержащей 300–350 мг/л N-NH<sub>4</sub>, 50 мг/л глюкозы и расходом 6 л/сут. На момент перехода на иловую воду концентрация биомассы в реакторах частичной нитрификации (5.0 л) и анаммокс (2.5 л) составляла примерно 13.5 и 34.7 г органического вещества на 1 л реактора соответственно.

Отметим, что используемые в реакторах ерши способствовали эффективному удержанию и накоплению микробной биомассы. В анаммокс-реакторе не наблюдался дефицит нитрита благодаря рециклу обогащенной нитритом очищаемой воды из реактора частичной нитрификации. Нитраты, образующиеся в реакторе частичной нитрификации, также восстанавливались в анаммокс-реакторе до нитритов и молекулярного азота в сопряженных процессах гетеротрофной денитрификации и анаммокс-процессе (Xiaochen et al., 2014).

В ходе эксперимента постепенно увеличивали концентрацию N-NH<sub>4</sub> в исходной среде от 50 до 250 мг N-NH<sub>4</sub>/л за счет разбавления иловой воды метантенка. Эксперимент состоял из трех этапов (рис. 2). Первый этап длился 40 сут с постепенным увеличением концентрации N-NH<sub>4</sub> от 50 до 100 мг/л, величина ХПК составляла 50–400 мг O<sub>2</sub>/л. Второй этап длился 55 сут при средней концентрации N-NH<sub>4</sub> 150 мг/л и ХПК 350–600 мг O<sub>2</sub>/л. На третьем этапе концентрацию N-NH<sub>4</sub> повышали до 200–250 мг/л и ХПК 650–1650 мг O<sub>2</sub>/л; продолжительность этапа составляла 55 сут. Скорость подачи иловой воды в реактор составляла 6 л/сут, рециркуляции – 5.25 л/сут на протяжении всех трех этапов эксперимента. Процесс вели при температуре окружающей среды (20–24°C).

**В анаммокс-реакторе**, куда поступала исходная иловая вода с концентрацией в ней аммонийного азота 50–100 мг N-NH<sub>4</sub>/л и ХПК 50–400 мг O<sub>2</sub>/л, относительная численность анаммокс-бактерий в свободноплавающем иле, представляющем из



**Рис. 2.** Динамика изменения концентрации: аммонийного азота (1) и ХПК (2) в исходной иловой воде и аммонийного азота (3) на выходе из реактора частичной нитрификации.

себя агрегаты небольших размеров (1–2 мм и менее), составляла не менее 40% от общего числа микробных клеток в поле зрения микроскопа (100%) (рис. 3). Большая часть оставшегося сообщества была представлена нитрификаторами первой ступени (35–40%) (табл. 1). На ершовом носителе содержание анаммокс-бактерий составляло 50–55% от общего числа иммобилизованных в составе биопленок клеток. В свою очередь, представителей нитрификаторов первой ступени р. *Nitrosomonas* насчитывалось приблизительно столько же, сколько и в свободноплавающих флоккулах — около 40% от общего числа видимых в микроскоп клеток. Относительно высокая численность бактерий р. *Nitrosomonas* в анаммокс-реакторе связана

со стабильным небольшим содержанием растворенного кислорода (0.5–1.5 мг O<sub>2</sub>/л), определенного с помощью оптического датчика кислорода, поступающего с 1) исходной иловой водой (0–1 мг O<sub>2</sub>/л) и 2) рециркулируемой жидким потоком (4–7 мг O<sub>2</sub>/л). Также при низкой нагрузке по азоту среди микроорганизмов свободноплавающей биомассы ила были обнаружены нитрифицирующие бактерии второй ступени р. *Nitrospira* (5–10% от общего числа клеток), формирующие небольшие кластеры по 10–15 извитых клеток в каждом.

Концентрация аммонийного азота 150 мг N-NH<sub>4</sub>/л оказалось оптимальной для анаммокс-бактерий, при этом ХПК иловой воды составлял

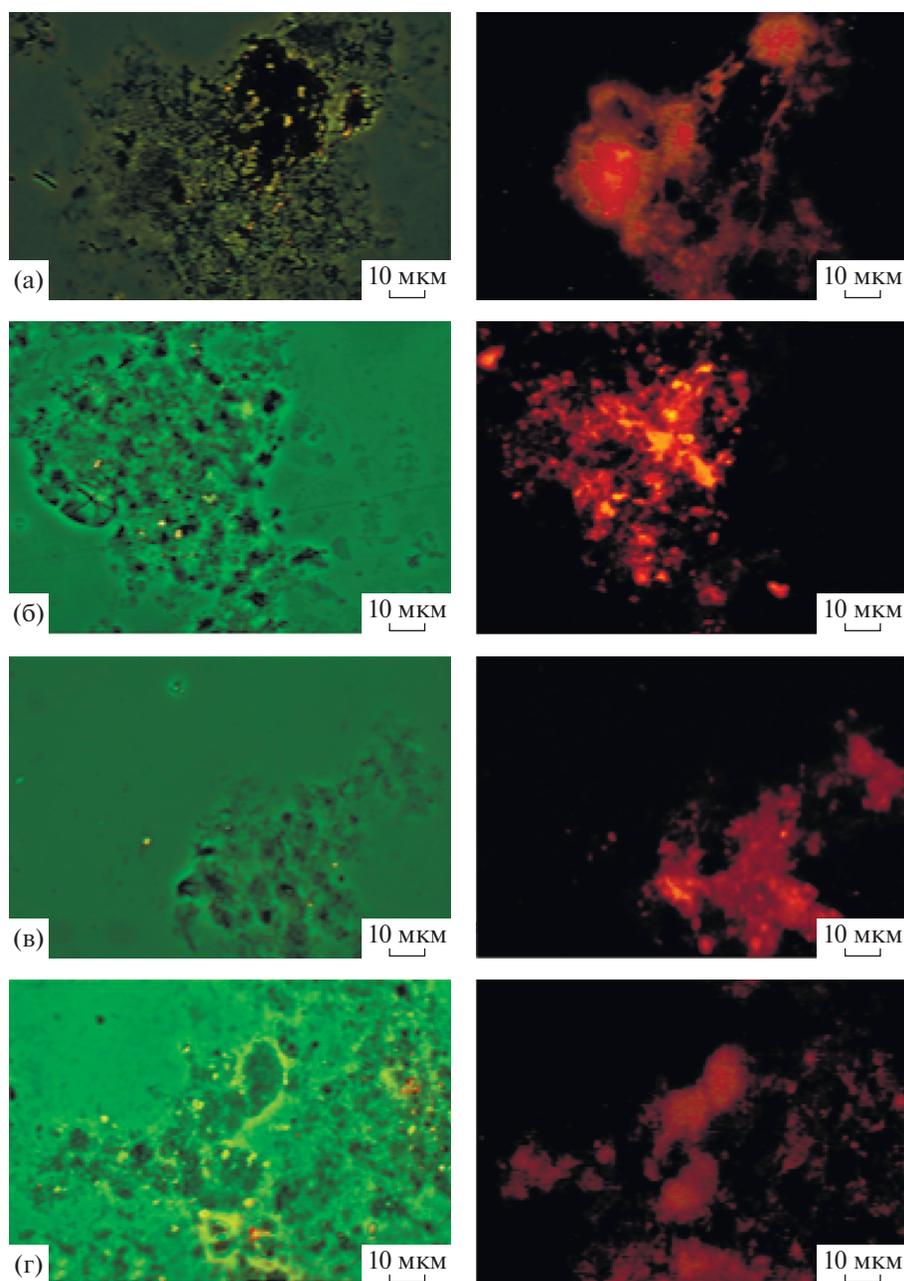
**Таблица 1.** Относительная численность микробных групп, участвующих в удалении азота, в системе реакторов анаммокс-частичной нитрификации при разной концентрации аммонийного азота и ХПК в исходной среде: АМХ — анаммокс-бактерии, АОБ — нитрификаторы первой ступени, НОБ — нитрификаторы второй ступени

Концентрация аммонийного азота и ХПК в иловой воде	50–100 мг N-NH <sub>4</sub> /л, ХПК 50–400 мг O <sub>2</sub> /л			150 мг N-NH <sub>4</sub> /л, ХПК 350–600 мг O <sub>2</sub> /л			200–250 мг N-NH <sub>4</sub> /л, ХПК 650–1650 мг O <sub>2</sub> /л		
	АМХ	АОБ	НОБ	АМХ	АОБ	НОБ	АМХ	АОБ	НОБ
<b>Анаммокс-реактор</b>									
Биомасса с ершей (биопленки) (% клеток**)	50–55	35–40	5–10	75	20	Н.о.*	35	55	Н.о.*
Гранулы и флоккулы (% клеток**)	40	40	Н.о.*	55	25	Н.о.*	40	50	Н.о.*
<b>Реактор частичной нитрификации</b>									
Биомасса с ершей (биопленки) (% клеток**)	30	60	Н.о.*	20	70	Н.о.*	5	55	25
Гранулы и флоккулы (% клеток**)	25	50	Н.о.*	15	60	Н.о.*	Н.о.*	50	20

Примечание. АМХ — анаммокс-бактерии; АОБ — аммонийокисляющие бактерии (нитрификаторы первой ступени); НОБ — нитритокисляющие (нитрификаторы второй ступени).

\* Н. о. — не обнаруживались.

\*\* За 100% принимали общую численность клеток.



**Рис. 3.** Микрофотографии анаммокс-бактерий в анаммокс-реакторе (а, б) и нитрификаторов первой ступени в реакторе частичной нитрификации (в, г) при концентрации 150 мг N-NH<sub>4</sub>/л в иловой воде: а, в – свободноплавающая микробная биомасса; б, г – иммобилизованная биомасса на ершовом носителе. Справа – фазовый контраст, слева – гибридизация. Масштабная метка – 10 мкм.

350–600 мг O<sub>2</sub>/л. При таких условиях поддерживалась максимальная представленность анаммокс-бактерий: 50% от общего числа клеток в свободноплавающей биомассе и 70–75% – в иммобилизованной. При дальнейшем увеличении концентрации аммонийного азота до 200–250 мг N-NH<sub>4</sub>/л относительная численность анаммокс-бактерий как в прикрепленном, так и в свободноплавающем иле, значительно уменьшилась до 35–40%. Это, вероятно, связано с соответствующим увеличением ХПК в иловой воде до 650–

1650 мг O<sub>2</sub>/л, что вызвало ингибирование анаммокс-процесса и/или резкий рост гетеротрофных, в том числе денитрифицирующих бактерий, конкурирующих с анаммокс-бактериями за общий субстрат – нитрит.

Полученные результаты согласуются с данными о том, что в системах очистки сточных вод удаление азота в виде N<sub>2</sub> происходит в сопряженных процессах нитрификации, гетеротрофной денитрификации и анаммокс (Сао et al., 2016). Денит-

рификаторы преобладают в системе, если соотношение ХПК/N выше 5, и имеются в достаточном количестве доступные органические вещества, используемые ими в качестве субстратов роста и доноров электронов (Fang et al., 2018; Zhang et al., 2019). По мере исчерпания органических веществ начинают преобладать литотрофные анаммокс-бактерии (van Hulle et al., 2010; Mattei et al., 2015). Интересным, на наш взгляд, является увеличение при максимальной испытанной нагрузке по азоту и ХПК представленности нитрифицирующих бактерий первой ступени в анаммокс-реакторе до 50–55%, что было лишь немногим ниже их относительной численности в реакторе частичной нитрификации. Можно предположить, что это могло произойти благодаря довольно интенсивному рециклу.

Примечательно, что в отличие от представителей нитрификаторов первой ступени р. *Nitrosomonas*, нитрификаторы второй ступени р. *Nitrospira* в анаммокс-реакторе практически не обнаруживались ни в свободноплавающем иле, ни в биопленках вне зависимости от нагрузки по азоту. Это, видимо, связано с тем, что они проигрывали конкуренцию за кислород нитрификаторам первой ступени (АОБ), которые имеют более высокое сродство к кислороду (Wyffels et al., 2004; Blackburne et al., 2008). Сродство к кислороду выражается константой полунасыщения  $O_2$  ( $K_{s,O_2}$ ), которая по данным Gujer et al. (1999) для АОБ равна 0.3 мг/дм<sup>3</sup>, а для НОБ равна 1.2 мг/дм<sup>3</sup>. Также, по данным Pérez et al. (2014), для АОБ характерна более высокая скорость потребления кислорода, чем для НОБ, при его концентрации до 1.4 мг  $O_2$ /л.

**В реакторе частичной нитрификации** в биопленках иммобилизованного ила относительная численность нитрификаторов первой ступени р. *Nitrosomonas* возрастала с 60 до 70% при увеличении концентрации N-NH<sub>4</sub> в исходной среде с 50–100 до 150 мг/л (соответственно, ХПК увеличивалось с 50–400 до 350–600 мг  $O_2$ /л) и снижалась до 50% при дальнейшем увеличении нагрузки по азоту и ХПК. Такая же закономерность наблюдалась и в образцах свободноплавающего ила, хотя представленность бактерий р. *Nitrosomonas* в них по сравнению с иммобилизованным илом была чуть ниже при всех нагрузках. В биомассе активно аэрируемого реактора частичной нитрификации обнаруживалось относительно большое количество анаэробных анаммокс-бактерий (табл. 1). Скорее всего, толщина биопленок на ершовых носителях и размеры гранул свободноплавающего ила были достаточными для поддержания анаэробных условий в их наиболее глубоких слоях, благоприятных для развития анаммокс-бактерий. Также это связано с выносом части анаммокс-бактерий из первого реактора. Представленность анаммокс-бактерий в биопленках

была чуть выше, чем в свободноплавающем иле, состоящим, помимо гранул, из более рыхлых и меньших по размеру флоккул. Однако при увеличении нагрузки относительная численность анаммокс-бактерий снижалась независимо от типа ила. Так, при концентрации 50–100 мг N-NH<sub>4</sub>/л и ХПК 350–600 мг  $O_2$ /л в исходной воде относительная численность анаммокс-бактерий составляла 25–30%. С увеличением концентрации на втором этапе до 150 мг N-NH<sub>4</sub>/л и ХПК до 350–600 мг  $O_2$ /л и на третьем этапе до 200–250 мг N-NH<sub>4</sub>/л и ХПК 650–1650 мг  $O_2$ /л количество клеток анаммокс-бактерий уменьшалось на 10–15% на каждом этапе. Такой результат позволяет предположить, что в неразбавленной исходной иловой воде могли содержаться вещества, ингибирующие рост анаммокс-бактерий.

При увеличении в исходной среде концентрации аммонийного азота до 200–250 мг N-NH<sub>4</sub>/л и соответствующем возрастании ХПК более 650 мг  $O_2$ /л, в реакторе частичной нитрификации относительное количество нитрификаторов первой ступени р. *Nitrosomonas* снизилось, и наблюдалось активное развитие нитрифицирующих бактерий второй ступени р. *Nitrospira* до их относительной численности 20–25% в образцах свободноплавающего ила и в иммобилизованной биомассе на ершовом носителе. Следует отметить, что при наиболее высокой нагрузке анаммокс-бактерии практически не обнаруживались (0–5%). Видимо, совокупность повышенной концентрации аммонийного азота и одновременно высокого соотношения C/N, вызванного особенностью состава иловой воды в этот период (не полностью выброженный эффлюент, вследствие этого высокая концентрация ХПК), подавляли рост анаммокс-бактерий и АОБ (Du et al., 2014). Необходимо отметить, что такое изменение относительной численности исследованных групп микроорганизмов сопровождалось значительным снижением эффективности удаления азота в системе очистки – до 40% и менее. Возможно, это также объясняется чрезмерным утолщением биопленок на ершах, однако этот параметр в работе не учитывался. Необходимо отметить, что в эксплуатируемых очистных сооружениях, использующих ершовую загрузку, для контроля толщины биопленки используют их периодическую регенерацию сильным потоком очищаемой воды и/или воздуха (<http://www.ecos.ru/articles/pochemu-ersh-rabotaet/>, 2012).

Из результатов, полученных в настоящей работе, видно, что концентрация аммонийного азота 150 мг N-NH<sub>4</sub>/л и ХПК до 600 мг  $O_2$ /л в разбавленной иловой воде являлись оптимальными для процесса ее очистки, поскольку в этих условиях наблюдалась максимальная представленность важных для процесса частичной нитрификации – анаммокс групп нитрификаторов первой ступени р. *Nitrosomonas* и анаммокс-бактерий. Эффектив-

ность очистки иловой воды от азота при этом составляла от 75 до 90%. В целом, в анаммокс-реакторе наблюдалось активное развитие анаммокс-бактерий и нитрификаторов первой ступени, а нитрификаторы второй ступени практически отсутствовали. Обнаружено, что при повышенном содержании органических соединений в иловой воде (ХПК более 600 мг O<sub>2</sub>/л) относительное количество анаммокс-бактерий и нитрификаторов первой ступени р. *Nitrosomonas* в реакторе частичной нитрификации, в целом, снижается, а нитрификаторов второй ступени р. *Nitrospira*, наоборот, увеличивается. Схема с 1) разделением аэробных и анаэробных процессов в двух реакторах, 2) иммобилизацией части микробной биомассы на ершовом носителе и 3) рециклом воды из аэробного нитрифицирующего реактора (2 ступень) в анаэробный анаммокс-реактор (1 ступень) эффективно используется для очистки хозяйственно-бытовых сточных вод от азота (Nozhevnikova et al., 2012; Зубов и соавт., 2013; Литти и соавт., 2013; Nozhevnikova et al., 2015, 2019). Полученные в работе данные о процессах трансформации соединений азота и участвующих в них микроорганизмах в системах анаммокс-частичной нитрификации могут представлять практический интерес для использования такой схемы при очистке концентрированных сточных вод, в том числе иловых вод метантенков.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Новиков А.А., Груздев Д.С., Бочкарева Е.С., Бескоровайный А.В., Кузнецов Б.Б., Ножевникова А.Н. Описание нового вида анаммокс-бактерии “*Candidatus Jettenia ecosi*” // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 659–671.
- Botchkova E.A., Litt Y.V., Novikov A.A., Grouzdev D.S., Bochkareva E.S., Beskorovayny A.V., Kuznetsov B.B., Nozhevnikova A.N. Description of “*Candidatus Jettenia ecosi*” sp. nov., a new species of anammox bacteria // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 766–776.
- Зубов М.Г., Бояренев С.Ф., Зубов Г.М., Куликов Н.И., Шрамов Ю.М., Литти Ю.В., Некрасова В.К., Ножевникова А.Н. Биотехнология очистки сточных вод с иммобилизацией активного ила и удалением азота // Водоснабжение и санитарная техника. 2013. № 8. С. 72–75.
- Литти Ю.В., Некрасова В.К., Куликов Н.И., Симанькова М.В., Ножевникова А.Н. Обнаружение анаэробных процессов и микроорганизмов в иммобилизованном активном иле станции очистки сточных вод с интенсивной аэрацией // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 672–680.
- Litti Yu., Nekrasova V., Kulikov N., Siman'kova V., Nozhevnikova A. Detection of anaerobic processes and microorganisms in immobilized activated sludge of a wastewater treatment plant with intense aeration // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 690–697.
- Марданов А.В., Белецкий А.В., Каллистова А.Ю., Котляров Р.Ю., Николаев Ю.А., Кевбрина М.В., Агарев А.М., Равин Н.В., Пименов Н.В. Динамика изменения состава микробного консорциума в процессе запуска одно-реакторной проточной лабораторной установки нитрификации/анаммокс // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 663–675.
- Mardanov A., Beletskii A., Kallistova A., Kotlyarov R., Nikolaev Y., Kevbrina M., Agarev A., Ravin N., Pimenov N. Dynamics of the composition of a microbial consortium during start-up of a single-stage constant flow laboratory nitrification/anammox setup // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 681–692.
- Ножевникова А., Литти Ю., Некрасова В., Куличевская И., Григорьева Н., Куликов Н., Зубов М. Анаэробное окисление аммония (анаммокс) в биопленках иммобилизованного активного ила при очистке сточных вод с низкой концентрацией загрязнений // Микробиология. 2012. Т. 81. С. 28–38.
- Nozhevnikova A.N., Litt Y.V., Nekrasova V.K., Kulichevskaya I.S., Grigoryeva N.V., Kulikov N.I., Zubov M.G. Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in immobilized activated sludge biofilms during the treatment of weak wastewater // Microbiology (Moscow). 2012. V. 81. P. 25–34.
- Ножевникова А.Н., Литти Ю.В., Бочкова Е.А., Зубов М.Г., Зубов Г.М. Анаммокс-бактерии в природе и экобиологии. Монография / Под общей редакцией А.Н. Ножевниковой. М.: Университетская книга, 2017. 280 с.
- Почему ЁРШ® работает [Электронный ресурс]: <http://www.ecos.ru/articles/pochemu-ersh-rabotaet/>. 2012.
- Cao Y., Kwok B., van Loosdrecht M., Daigger G., Png H., Long W., Chye C. The occurrence of enhanced biological phosphorus removal in a 200,000 m<sup>3</sup>/day partial nitrification and Anammox activated sludge process at the Changi water reclamation plant, Singapore // Water Sci. Technol. 2017. V. 75. P. 741–751.
- Dai F., Celant De Práb M., Vanottic M., Gilmored K., Cumbiea W. Microbial characteristics of nitrifiers, denitrifiers and anammox bacteria on different support media to treat space mission wastewater // J. Environ. Manage. 2019. V. 232. P. 943–951.
- Daims H., Nielsen J., Nielsen P., Schleifer K., Wagner M. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants // Appl. Microbiol. 2001. V. 67. P. 5273–5284.
- Du R., Peng Y., Cao S., Wu C., Weng D., Wang S., He J. Advanced nitrogen removal with simultaneous Anammox and denitrification in sequencing batch reactor // Bioresour. Technol. 2014. V. 162. P. 316–322.
- Fang Q., Xu W., Xia G., Pan Z. Effect of C/N ratio on the removal of nitrogen and microbial characteristics in the water saturated denitrifying section of a two-stage constructed rapid infiltration system // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2018. V. 7. pii: E1469. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071469>

- Gujer W., Henze M., Mino T., van Loosdrecht M. Activated sludge model No. 3 // *Water Sci. Technol.* 1999. V. 39. P. 183–193.
- Guo J., Peng Y., Fan L., Zhang L., Ni B.J., Kartal B., Feng X., Jetten M.S., Yuan Z. Metagenomic analysis of anammox communities in three different microbial aggregates // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18. P. 2979–2993.
- Kalyuzhnyi S., Gladchenko M. DEAMOX – New microbiological process of nitrogen removal from strong nitrogenous wastewater // *Desalination.* 2009. V. 248. P. 783–793.
- Mattei M.R., Frunzo L., D'Acunto B., Esposito G., Pirozzi F. Modelling microbial population dynamics in multispecies biofilms including Anammox bacteria // *Ecol. Modell.* 2015. V. 304. P. 44–58.
- Ni B., Ruscalleda M., Smets B. Evaluation on the microbial interactions of anaerobic ammonium oxidizers and heterotrophs in Anammox biofilm // *Water Res.* 2012. V. 46. P. 4645–4652.
- Nozhevnikova A., Litty Y., Zubov M. Biotechnology of wastewater treatment with the effective removal of nitrogen due to the participation of anammox-bacteria, developed for the 2014 Winter Olympics in Sochi // *Ecol. Engin. Environ. Protect.* 2015. V. 2. P. 24–29.
- Nozhevnikova A., Zubov M., Litty Y., Botchkova E., Russkova Y., Zubov G. Development and practical implementation of partial nitrification-anammox technology for full-scale mainstream treatment // *Advances in Environmental Research.* Nova Science Publishers, Inc. (USA). 2019.
- Pérez J., Lotti T., Kleerebezem R., Picoreanu C., van Loosdrecht M. Outcompeting nitrite-oxidizing bacteria in single stage nitrogen removal in sewage treatment plants: a model-based study // *Water Res.* 2014. V. 66. P. 208–218.
- Schmid M., Walsh K., Webb R., Rijpstra W., van de Pas Schoonen K., Verbruggen M., Hill T., Moffett B., Fuerst J., Schouten S., Damsté J., Harris, J., Shaw P., Jetten M., Strous M. *Candidatus* “*Scalindua brodae*,” sp. nov., *Candidatus* “*Scalindua wagneri*,” sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria // *Appl. Microbiol.* 2003. V. 26. P. 529–538.
- Speth D., Zandt M., Guerrero-Cruz S., Dutilh B.E., Jetten M.S.M. Genome-based microbial ecology of anammox granules in a full-scale wastewater treatment system // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 1–10.
- Thorndahl U. Nitrogen removal from returned liquors // *J. IWEM.* 1993. V. 7. P. 492–496.
- van Hulle S.V.H., Vandeweyer H.J.P., Meesschaert B.D. Vanrolleghem P.A., Dejans P., Dumoulin A. Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams // *Chem. Eng. J.* 2010. V. 162. P. 1–20.
- Wagner M., Rath G., Amann R., Koops H., Schleifer K. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria // *Appl. Microbiol.* 1995. V. 18. P. 251–264.
- Wang L., Zheng P., Xing Y., Li W., Yang J., Abbas G., Liu S., He Z., Zhang J., Zhang H., Lu H. Effect of particle size on the performance of autotrophic nitrogen removal in the granular sludge bed reactor and microbiological mechanisms // *Bioresour. Technol.* 2014. V. 157. P. 240–246.
- Xu X., Xue Y., Wang D., Wang G., Yang F. The development of a reverse anammox sequencing partial nitrification process for simultaneous nitrogen and COD removal from wastewater // *Bioresour. Technol.* 2014. V. 155. P. 427–431.
- Zhang Y., Wang Y., Yan Y., Han H., Wu M. Characterization of CANON reactor performance and microbial community shifts with elevated COD/N ratios under a continuous aeration mode // *Front. Environ. Sci. Eng.* 2019. V. 13. P. 7.

## Changes in Relative Abundance of Microbial Groups Involved in Nitrogen Removal in the Anammox–Partial Nitrification Reactor System at Increase in Ammonium Nitrogen and COD Load

A. V. Vishnyakova<sup>1,\*</sup>, Yu. V. Litty<sup>1</sup>, E. A. Botchkova<sup>1</sup>, A. A. Ermoshin<sup>1</sup>, and A. N. Nozhevnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: nast366760404@mail.ru

Received June 19, 2019; revised October 30, 2019; accepted November 1, 2019

**Abstract**—This is the study of efficiency of anaerobic sludge digester liquor treatment and of changes in the relative abundance of the major microbial groups involved in nitrogen removal at increase in nitrogen and COD (chemical oxygen demand) load. A two-reactor laboratory system carried out anammox and partial nitrification, with the biomass immobilized on a brush carrier and water recycling. Nitrogen concentration in the water varied from 50 to 250 mg N-NH<sub>4</sub>/L, while COD varied from 50 to 1650 mg O<sub>2</sub>/L. Efficiency of the process was assessed by monitoring the concentrations of N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub>, COD, dissolved oxygen, and pH in the inflowing and treated sludge liquor. The efficiency of nitrogen removal was 75–90%. Active development of anammox bacteria and first step nitrifiers was observed in the anammox reactor, while almost no second step nitrifiers were present. Elevated content of organic matter in sludge liquor was shown to cause a significant decrease in the water purification degree due to lower abundance of anammox bacteria and first step nitrifying *Nitrosomonas* species, while the abundance of the second step nitrifying *Nitrospira* species increased. The major microbial groups involved in nitrogen removal were better represented in biofilms than in free-floating sludge (flocs and granules). While the size of the granules and flocs did not change at increased load, their color changed from gray-red to a darker one.

**Keywords:** anammox bacteria, first and second step nitrifiers, anaerobic sludge digester liquor, sludge types, recycling