

袁宏林, 刘永军, 王晓昌, 等. 2007. 生物造粒流化床污水处理反应器中微生物生长比较分析 [J]. 环境科学学报, 27 (6): 973 - 978

Yuan H L, Liu Y J, Wang X C, et al. 2007. Comparison of microbial growth in a fluidized-pellet-bed bioreactor and an A^2/O process [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 27 (6): 973 - 978

生物造粒流化床污水处理反应器中微生物生长比较分析

袁宏林, 刘永军*, 王晓昌, 王黎

西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055

收稿日期: 2006-07-13 修回日期: 2007-01-14 录用日期: 2007-03-15

摘要: 利用传统细菌计数方法及分子生物学方法对新近发展起来的生物造粒流化床反应器与 A^2/O 工艺的微生物特性进行比较研究. 反应器中好氧菌、反硝化菌及反硫化菌的计数结果显示, 单位质量的活性污泥中, 生物造粒流化床中好氧菌的分布数是 A^2/O 工艺好氧区的 1~2 倍, 反硝化菌总数介于 A^2/O 工艺的好氧区和缺氧区之间, 而反硫化菌的总数介于 A^2/O 工艺的缺氧区和厌氧区之间. 用 PCR-DGGE 技术对生物造粒流化床反应器及 A^2/O 工艺中的微生物进行多样性分析, 结果显示, 生物造粒流化床反应器的微生物群落比 A^2/O 工艺丰富; DGGE 指纹图谱聚类分析表明, 生物造粒流化床反应器与 A^2/O 工艺的微生物群落相似性为 57.6%.

关键词: 生物造粒流化床 (FPB); A^2/O 工艺; 变性梯度凝胶电泳 (DGGE); 微生物特性

文章编号: 0253-2468 (2007) 06-0973-06 中图分类号: X172 文献标识码: A

Comparison of microbial growth in a fluidized-pellet-bed bioreactor and an A^2/O process

YUAN Honglin, LIU Yongjun*, WANG Xiaochang, WANG Li

College of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture & Technology, Xi'an 710055

Received 13 July 2006; received in revised form 14 January 2007; accepted 15 March 2007

Abstract: The microbiological characteristics of a newly developed fluidized-pellet-bed (FPB) bioreactor in comparison with an A^2/O process were investigated by cell count statistics and molecular biological methods. The total aerobic bacteria count per unit weight of sludge in the FPB bioreactor was 1~2 times that in the aerobic region of the A^2/O process. The denitrifying bacteria count in the FPB bioreactor was between that in the aerobic and anoxic regions of the A^2/O process, and the sulphate-reducing bacteria count in the FPB bioreactor was between that in the anoxic and anaerobic regions of the A^2/O process. To analyze the microbial diversity in the FPB bioreactor, the polymerase chain reaction (PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were applied. DNA fingerprinting by DGGE showed that the microbial species in the FPB bioreactor were more abundant than in the A^2/O process. Analysis of the fingerprinting using the UPGMA clustering algorithm showed the similarity of the microbial communities in the two processes was 57.6%.

Keywords: fluidized-pellet-bed bioreactor (FPB); A^2/O process; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); microbiological characteristics

1 引言 (Introduction)

生物造粒流化床反应器 (FPB) 是近年发展起来的一种集混凝、造粒、生物降解、固液分离于一体的污水处理系统 (Yuan et al, 2005). 已有研究显示,

该反应器在水力停留时间 (HRT) 小于 33min 的条件下, SS、COD、BOD 和 TP 的去除率达到 90% 以上, 并具有一定的硝化、反硝化作用, TN 和 NH_4^+-N 的去除率分别可达到 40% 和 35% (Wang et al, 2005a; 2005b). 但是, 生物造粒流化床反应器对有

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 50578132); 国家自然科学基金重大国际合作项目 (No. 50621140001); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (No. 2006AA06Z328)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 50578132), NSFC-JST (Japan Science and Technology Agency) Joint Research Program (No. 50621140001) and High-Tech Research and Development Program of China (No. 2006AA06Z328)

作者简介: 袁宏林 (1965—), 男, 副教授 (博士生), E-mail: hlyuan@xauat.edu.cn; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: liuyongjun@xauat.edu.cn

Biography: YUAN Honglin (1965—), male, associate professor (Ph.D. candidate); * Corresponding author, E-mail: liuyongjun@xauat.edu.cn

机物的降解原理,及与传统污水处理工艺相比较其微生物的生长状况等尚未见文献报道。

本研究采用微生物计数法及 PCR-DGGE 技术对生物造粒流化床反应器的微生物特性进行研究,并将生物造粒流化床污水处理工艺与现有 A²/O 污水处理工艺进行比较分析,旨在全面了解生物造粒流化床反应器微生物特性及其与传统活性污泥法的异同。

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 污水处理工艺

本研究所用的生物造粒流化床反应器系统如图 1 所示,实验是在西安市北石桥污水处理厂进行的现场实验。城市生活污水通过水泵加压进入反应器,在压水管中在线投入无机盐混凝剂(聚合氯化铝 PAC),经静态混合器充分混合,在进入上向流造粒流化床之前,在线注入有机高分子混凝剂(聚丙烯酰胺 PAM)。这一部分的投药混合,以及后续的上向流造粒流化床,在原理和操作方法上与用于固液分离的工艺是相同的。鉴于污水好氧生物处理的需要,我们在工艺流程中增加了如图所示的曝气回路(Aeration loop),将上向流造粒流化床上部出水部分回流,通过溶气泵向回流水供应溶解氧,并反复循环溶气;这一方面使溶解氧达到接近饱和的程度,另一方面可除去水中的气泡。充分溶氧的回流水与原污水混合后,再从底部进入造粒流化床,利用水

中的溶解氧保持床内形成的颗粒污泥处于好氧状态,保证微生物的繁殖和生长,在流化床内同时完成混凝造粒、有机物生化降解、固液分离等过程,形成物化生化法高度集成的生物造粒流化床 (Wang *et al*, 2005a)。图 2 为生物造粒流化床内形成的颗粒污泥的形态。

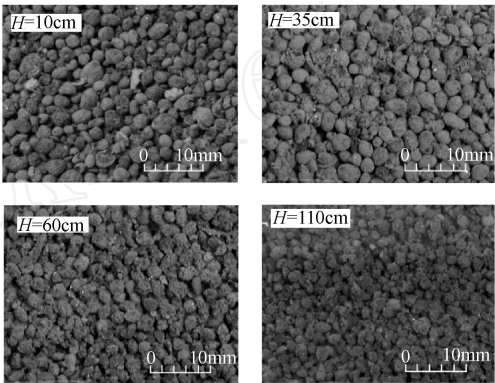


图 2 生物造粒流化床反应器内形成的颗粒污泥外观 (H: 距流化床柱底的高度)

Fig 2 Photographs of the pellets formed in the FPB bioreactor system (H: height from the bottom of FPB bioreactor)

A²/O 工艺: A²/O 工艺是现有的西安市生活污水处理厂 (西安市邓家村污水处理厂) 所采用的工艺。该厂的污水处理能力为 160000 m³·d⁻¹, 由 2 条生产线组成, 每条生产线依次分为一个厌氧区、一个缺氧区和一个好氧区。该工艺的 3 个工艺段在微生物生长环境方面与生物造粒流化床反应器有相似之处, 以此作为生物造粒流化床反应器微生物特性研究的参比工艺。表 1 所示为生物造粒流化床反应器及 A²/O 基本工艺条件。

表 1 生物造粒流化床反应器及 A²/O 工艺条件

Table 1 Operation parameters of the FPB bioreactor and the A²/O process

项目	生物造粒流化床		A ² /O	
	进水 / (mg·L ⁻¹)	出水 / (mg·L ⁻¹)	进水 / (mg·L ⁻¹)	出水 / (mg·L ⁻¹)
COD	275.8	22.5	289.4	60.2
BOD ₅	134.7	7.9	157.3	20.3
TN	38.8	23.3	41.2	16.7
NH ₄ ⁺ -N	26.2	16.9	30.6	13.4
NO ₃ ⁻ -N	0.48	0.66	1.20	0.46
TP	8.16	1.30	11.20	3.70
DO	流化床 10cm 处		3.8	好氧区
	流化床 60cm 处		1.6	缺氧区
	流化床 110cm 处		0.5	厌氧区
HRT	35 ~ 40 min		11 ~ 12 h	

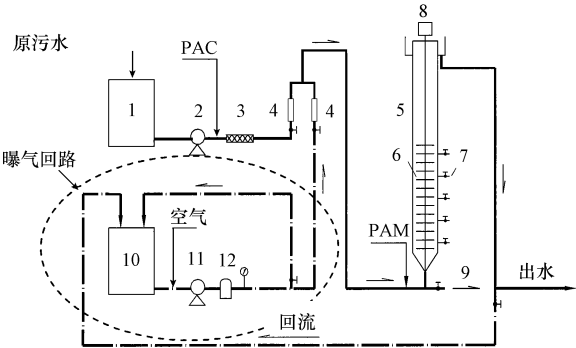


图 1 生物造粒流化床反应器系统流程图 (1. 原水罐, 2. 原水泵, 3. 静态混合器, 4. 流量计, 5. 流化床柱, 6. 螺旋叶片, 7. 取样口, 8. 电动机, 9. 出口, 10. 回流水罐, 11. 空气压力泵, 12. 压力罐)

Fig 1 Diagram of the FPB bioreactor system (1. raw water tank; 2. raw water pump; 3. static mixer; 4. flow meter; 5. FPB column; 6. agitating blades; 7. sampling tube; 8. motor; 9. outlet; 10. recycling water tank; 11. air pressure pump; 12. pressure tank)

2.2 样品采集

生物造粒流化床反应器内粒状污泥样品从生物造粒流化床柱壁上预留的取样管取样(见图1)。为了研究流化床柱底层、中层及顶层微生物情况,用一个特制的取样器从取样管10cm、60cm、110cm处分别取样(柱的有效高度是160cm)。

A²/O工艺活性污泥样品:活性污泥样品分别从A²/O污水处理厂的厌氧区、缺氧区、好氧区末端处取得,取样处为液面下50cm。

2.3 样品处理与分析方法

用平皿分离法对好氧菌计数。对于水样,所取样品经梯度稀释后,直接涂平板,37℃条件下培养24h后记录菌落数。对于污泥样品,在5000 r·min⁻¹下离心5min后,去掉上清液;用无菌水重悬沉淀物,充分震荡后静置10min;上清液经梯度稀释后,涂平板,37℃培养24h;记录菌落数。

反硝化菌和反硫化菌样品处理方法和好氧菌相同,反硝化菌和反硫化菌的检测及计数方法参见文献(马放等,2002)。

基因组DNA的提取:采用改进的化学裂解法直接从活性污泥中提取基因组DNA,方法如下:将1mL污泥样品在8000 r·min⁻¹离心5min;加入567μL的TE缓冲液重悬;加30μL质量浓度10%的SDS和3μL 20mg·mL⁻¹的蛋白酶K,混匀,于

37℃温育1h;加入100μL 5mol·L⁻¹ NaCl,充分混匀,再加入80μL CTAB/NaCl缓冲液(10% CTAB, 0.7mol·L⁻¹ NaCl),混匀,于65℃温育10min;加入等体积的氯仿/异戊醇,混匀,12000 r·min⁻¹下离心5min;将上清液转入一只新离心管中,加入0.6倍体积异丙醇,30min后12000 r·min⁻¹下离心10min;弃上清,干燥;重溶于30μL TE缓冲液中。

基因组DNA的PCR扩增:使用PE9700型基因扩增仪,以大多数细菌和古细菌的16s rRNA基因通用引物530F(5'-GTGCCAGCAGGCGCGG-3')和1490R(5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增。PCR反应体系:50μL的PCR反应体系包括50ng模板、20pmol正反引物、100μmol·L⁻¹ dNTP、10μL 10×PCR buffer、2U Taq DNA聚合酶,无菌纯水补齐到50μL。反应条件:95℃预变性5min,94℃变性50s,55℃退火1min,72℃延伸1min,30个循环,最终延伸7min。反应的产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析:变性梯度胶的制备使用梯度混合装置,制备8%的聚丙烯酰胺凝胶,变性剂浓度从30%到60%(100%的变性剂为7mol·L⁻¹的尿素和40%的去离子甲酰胺的混合物,其中,变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递增)。

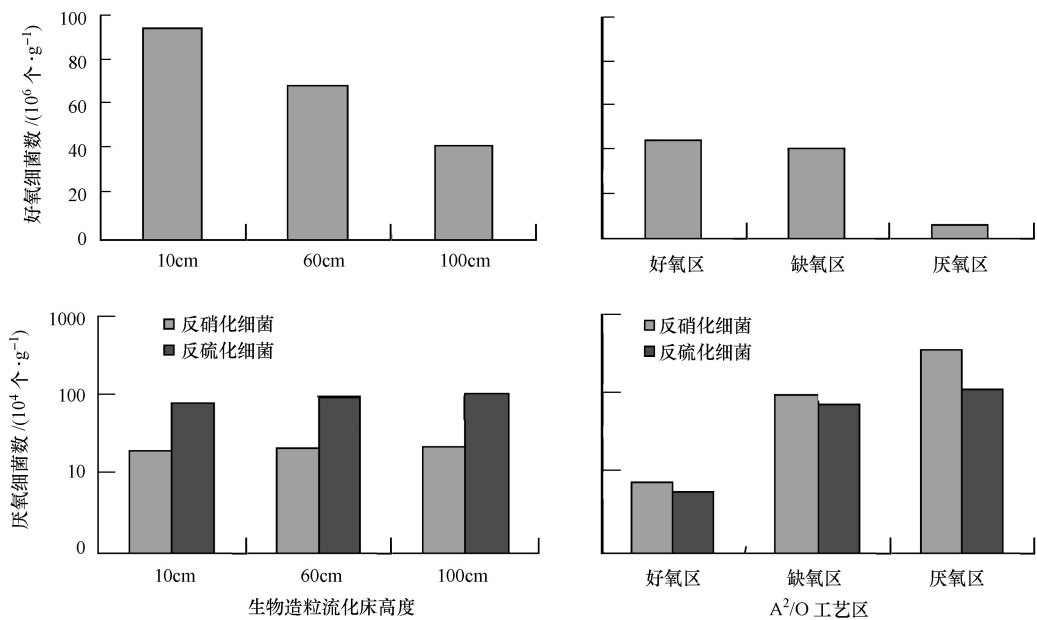


图3 生物造粒流化床反应器和A²/O工艺好氧细菌总数及反硝化菌、反硫化菌总数的比较

Fig. 3 Total counts of aerobic bacteria, denitrifying bacteria and sulphate-reducing bacteria in the FPB bioreactor compared with the aerobic, anoxic and anaerobic regions of the A²/O process

待变性梯度胶完全凝固后,将胶板放入装有电泳缓冲液的电泳槽中,取 8μL PCR 回收样品和 10 倍加样缓冲液混合后加入上样孔. 在 150V、60 条件下电泳 4h,然后用 AgNO₃染色. DGGE 聚类分析采用 UPGMA 聚类运算法则.

3 结果 (Results)

3.1 生物造粒流化床反应器细菌总数

图 3 显示的是生物造粒流化床反应器及 A²/O 污水处理工艺好氧区、缺氧区、厌氧区的好氧细菌总数、反硝化菌、反硫化菌的分布情况. 在生物造粒流化床反应器底部,单位质量活性污泥中所含的好氧菌总数大约是 A²/O 污水处理工艺好氧区的 2 倍,随着生物造粒流化床柱床高度的升高,好氧菌总数逐渐减少. 然而,即使在流化床上层 110cm 处,好氧菌总数也与 A²/O 工艺好氧区细菌总数相当. 对于反硝化菌和反硫化菌的分布情况,生物造粒流化床反应器内反硝化菌总数介于 A²/O 工艺的好氧区和缺氧区之间,而反硫化菌的总数介于 A²/O 工艺的缺氧区和厌氧区之间,这说明在生物造粒流化床反应器内存在一定的缺氧和厌氧环境.

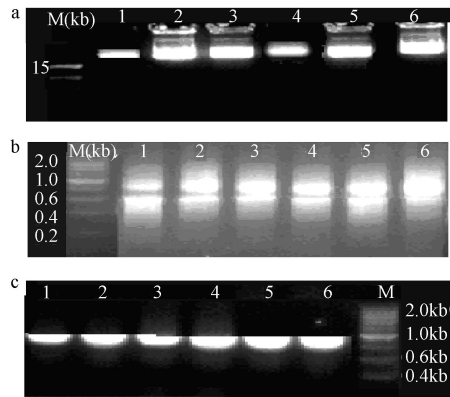


图 4 基因组 DNA、PCR 扩增产物及扩增产物回收电泳图谱 (M. Marker; 1、2、3: 分别为 A²/O 厌氧区、缺氧区、好氧区活性污泥; 4、5、6: 分别为生物造粒流化床 10cm, 60cm, 110cm 处颗粒污泥) (a 总 DNA 提取结果, b PCR 结果, c PCR 产物回收结果)

Fig 4 Agarose gel electrophoregrams of the genome DNA, PCR products and purified PCR products (M. marker; 1, 2, 3: samples of activated sludge from anaerobic, anoxic, aerobic regions of the A²O process; 4, 5, 6: samples of pellets from the FPB bioreactor at h = 10, 60, 110 cm) (a Agarose gel electrophoregram of the genome DNA, b agarose gel electrophoregram of the PCR product, c agarose gel electrophoregram of the purified PCR product)

3.2 DNA 提取和 PCR 扩增

采用化学裂解法从生物造粒流化床以及 A²/O 不同工艺段所取得的活性污泥中提取细菌基因组 DNA,然后用 16s rRNA 基因通用引物 530F/1490R 进行 PCR 扩增,PCR 产物采用上海申博 DNA 柱式胶回收试剂盒回收纯化. 图 4 为细菌基因组 DNA、PCR 扩增产物及产物回收纯化后的琼脂糖凝胶电泳图谱.

如图 4a 所示,所提取的各种活性污泥样品的细菌基因组 DNA 大于 15kb,所得的总 DNA 较为完整. 以细菌基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增后获得了各种污泥微生物的 16s rRNA 基因的目的片段,大小约 1kb 左右 (图 4b). 由于所提取的基因组 DNA 不是很纯,加之所用引物为通用引物,所以 PCR 扩增产物中还有杂带,但是经过回收纯化,杂带完全去除 (图 4c).

3.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 及微生物群落相似性分析

图 5 所示为不同活性污泥样品的 DGGE 指纹图谱. 不同活性污泥样品经过变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 都可以分离出数目不等的电泳条带,且各

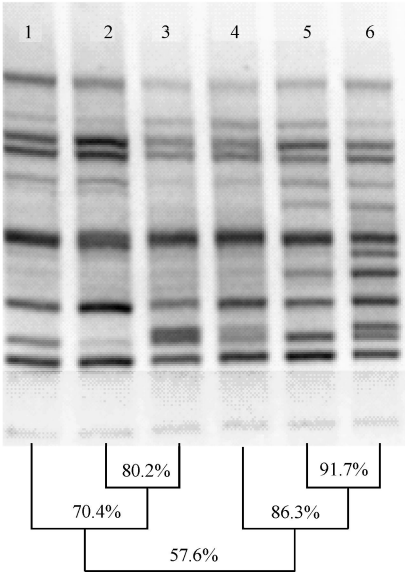


图 5 DGGE 指纹图谱及微生物群落聚类分析 (1、2、3: 分别为 A²/O 厌氧区、缺氧区、好氧区活性污泥; 4、5、6: 分别为生物造粒流化床 10cm、60cm、110cm 处颗粒污泥)

Fig 5 Finger printing by DGGE and analysis of the UPGMA clustering (1, 2, 3: samples of activated sludge from anaerobic, anoxic, aerobic regions of the A²O process; 4, 5, 6: samples of pellets from the FPB bioreactor at h = 10, 60, 110 cm)

个条带的信号强度和迁移位置不同。

从图 5 可以看出,生物造粒流化床粒状污泥的电泳条带多于 A^2/O 工艺活性污泥的电泳条带;同时,生物造粒流化床不同高度及 A^2/O 工艺的厌氧区、缺氧区、好氧区都有一些各自的特征条带。同样,在不同活性污泥样品中也有一些电泳位置相同的条带,说明生物造粒流化床反应器以及 A^2/O 工艺不同运行段的微生物群落有一定的相似性。进一步对图 5 所示的指纹图谱用 UPGMA 聚类运算方法进行聚类分析。结果显示,生物造粒流化床反应器底层、中层、上层的微生物群落相似性为 86.3%,而 A^2/O 工艺厌氧区、缺氧区、好氧区的微生物群落相似性为 70.4%,生物造粒流化床反应器与 A^2/O 工艺的微生物群落相似性为 57.6%。对这些污水处理工艺中特殊种属的鉴别有待于进一步的研究。

4 讨论 (Discussion)

4.1 生物造粒流化床中微生物的分布

生物造粒流化床污水处理反应器中好氧微生物分布非常丰富,这说明生物造粒流化床反应器能够提供好氧菌繁殖生长的良好条件。随着生物造粒流化床床体高度的升高,好氧菌总数逐渐减少,其原因可能是溶解氧(DO)随着柱床高度的升高,含量越来越少(Yuan *et al*, 2005);和传统活性污泥法比较,单位体积生物造粒流化床反应器中所分布的好氧菌总数,是传统活性污泥法的 4~8 倍,加之生物造粒流化床反应器 MLSS 和 MLVSS 的含量分别高达 $20000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其含量是传统活性污泥法的 4 倍(Wang *et al*, 2005a)。这可能是生物造粒流化床反应器有机物生物降解效率非常高的原因之一。在生物造粒流化床污水处理反应器中分布有大量的反硝化菌和反硫化菌,其原因是沿流化床床体高度的增加,DO 逐渐降低,由好氧环境逐渐转变为缺氧环境。同时,考虑到生物造粒流化床中的粒状污泥体积较大,且结构紧密,溶解氧从其表层向内层传递存在一定的困难,所以在颗粒污泥中可能存在一定的缺氧区,甚至厌氧区,这就给反硝化菌和反硫化菌等兼性细菌甚至厌氧细菌在生物造粒流化床中的生长提供了条件。

4.2 生物造粒流化床的微生物多样性

变性梯度凝胶电泳(DGGE)是目前研究微生物遗传多样性和种群动态性最有力的分子生物学技术。自从 10 年前首次将该技术应用于微生物生态的

研究以来(Muyzer *et al*, 1993),该技术已被广泛应用于各种环境微生物生态的研究(Araya *et al*, 2003; Schafer *et al*, 2000; Wen - Tao *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2001)。在 DGGE 指纹图谱中,每个独立分离的 DNA 片段原理上可以代表一个微生物种属。电泳条带越多说明生物多样性丰富,条带信号越强,表示该种属的数量越多,从而可以确定不同活性污泥中所含有的微生物的种类和数量关系,得出其中微生物多样性的信息。

在本研究中,生物造粒流化床粒状污泥的电泳条带多于 A^2/O 工艺活性污泥的电泳条带,说明生物造粒流化床反应器的微生物群落丰富。在不同活性污泥样品中也有一些电泳位置相同的条带,说明生物造粒流化床反应器以及 A^2/O 工艺不同运行段的微生物群落有一定的相似性。通过聚类分析,生物造粒流化床反应器与 A^2/O 工艺的微生物群落相似性为 57.6%。同时,生物造粒流化床不同高度及 A^2/O 工艺的厌氧区、缺氧区、好氧区都有一些各自的特征条带,说明反应器内由于溶解氧的变化,微生物生长的微环境也发生着变化,在特定生态条件下出现一些微生物群落的特征种属。

5 结论 (Conclusions)

1)生物造粒流化床中好氧菌的分布数是 A^2/O 工艺好氧区的 1~2 倍,反硝化菌总数介于 A^2/O 工艺的好氧区和缺氧区之间,而反硫化菌的总数介于 A^2/O 工艺的缺氧区和厌氧区之间。生物造粒流化床反应器内丰富的微生物为有机物高效降解提供了保障。

2)生物造粒流化床粒状污泥中分布的微生物群落比 A^2/O 工艺活性污泥中分布的微生物丰富;生物造粒流化床反应器与 A^2/O 工艺的微生物群落相似性为 57.6%。

责任作者简介:刘永军(1969—),男,副教授(博士)。研究方向:环境微生物学,环境毒理学。

References:

- Araya R, Tani K, Takagi T. 2003 Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis [J]. *FEMS Microbial Ecol*, 43: 111—119
- Ma F, Ren N Q, Yang J X. 2002 Microbiological experiment for pollution control[M]. Harbin: Harbin Institute Technology Press (in Chinese)

- Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 59: 695—700
- Schafer H, Servais P, Muyzer G. 2000. Successional changes in the genetic diversity of a marine bacterial assemblage during confinement [J]. *Arch Microbiol*, 173: 138—145
- Wang X C, Yuan H L, Liu Y J. 2005a. Fluidized-pellet-bed bioreactor: a promising technology for onsite wastewater treatment and reuse-Part 1 [A]. //The Specialty Conference of Wastewater Reclamation & Reuse for Sustainability (WRRS2005) [C]. Jeju, Korea, 382—389
- Wang X C, Liu Y J, Yuan H L. 2005b. Fluidized-pellet-bed bioreactor: a promising technology for onsite wastewater treatment and reuse - Part 2 [A]. //The Specialty Conference of Wastewater Reclamation & Reuse for Sustainability (WRRS2005) [C]. Jeju, Korea, 340—346
- Wen-Tao L, On-Chin C, Herbert H. 2002. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors [J]. *Wat Res*, 36: 3203—3210
- Yuan H L, Wang X C, Liu Y J, *et al*. 2005. Pilot study of a fluidized-pellet-bed bioreactor for simultaneous biodegradation and solid/liquid separation in municipal wastewater treatment [A]. //Future of Urban Wastewater Systems - Decentralization and Reuse, Proceedings of WA Conference [C]. Xi'an, 253—260
- Zhang T, Herbert H, Fang P. 2001. Phylogenetic diversity of a SRB rich marine biofilm [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 437—440

中文参考文献:

- 马放,任南琪,杨基先. 2002. 污染控制微生物学实验 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社

环境科学领域学术论文中常用数理统计方法的正确使用问题(一)——统计软件的选择

在进行统计分析时,尽管作者可以自行编写计算程序,但在统计软件很普及的今天,这样做是毫无必要的.因此,出于对工作效率以及对算法的可靠性、通用性和可比性的考虑,多数科技期刊都要求作者采用专门的数理统计软件进行统计分析.我们在处理稿件时经常发现的问题是,作者未使用专门的数理统计软件,而采用 Excel 这样的电子表格软件进行统计分析.由于电子表格软件提供的统计分析功能十分有限,很难满足实际需要,除非比较简单的分析,我们不主张作者采用这样的软件.目前,国际上已开发出的专门用于统计分析的商业软件很多,比较著名有 SPSS (Statistical Package for Social Sciences)、SAS (Statistical Analysis System)、BMDP 和 STATISTICA 等.其中,SPSS 是专门为社会科学领域的研究者设计的(但是,此软件在自然科学领域也得到广泛应用);BMDP 是专门为生物学和医学领域研究者编制的统计软件.目前,国际学术界有一条不成文的约定:凡是用 SPSS 和 SAS 软件进行统计分析所获得的结果,在国际学术交流中不必说明具体算法.由此可见,SPSS 和 SAS 软件已被各领域研究者普遍认可.我们建议《环境科学学报》的作者们在进行统计分析时尽量使用这 2 个专门的统计软件.目前,有关这 2 个软件的使用教程在书店中可很容易地买到.

注:摘自《环境科学学报》27 卷 1 期 171~173 页