

# 城市污水 SBR 法短程生物脱氮系统 硝化菌群的定量分析

杨 庆<sup>1</sup>, 彭永臻<sup>1</sup>, 曾 薇<sup>1</sup>, 杨岸明<sup>1</sup>, Hiroyasu Satoh<sup>2</sup>, Takashi Mino<sup>2</sup>

(1. 北京工业大学 北京市水质科学与水环境恢复工程重点实验室, 北京 100022;

2. Institute of Environmental Studies, University of Tokyo, Tokyo 113-8656, Japan)

**摘 要:** 为了研究实时控制对短程生物脱氮中试系统内硝化菌群结构组成的影响, 在考察系统常温条件下处理城市污水时短程硝化效果的同时, 采用 FISH、PCR-DGGE 和 PCR-克隆序列(Cloning Sequencing)分子生物学方法对 SBR 中试系统(有效容积为 54 m<sup>3</sup>)硝化菌群中的氨氧化菌(AOB)和亚硝酸氧化菌(NO<sub>2</sub>-OB)进行定性与定量分析。FISH 结果表明, 在短程脱氮系统中, AOB 相比于 NO<sub>2</sub>-OB 已成为明显的优势菌群, 占总菌群的 3%~12%; 且没有检测出 NO<sub>2</sub>-OB。PCR-DGGE 结果表明, SBR 短程脱氮中试系统中的 AOB 均以 *Nitrosomonas-like* 为主。污泥样品的 PCR-Cloning-Sequencing 结果表明, 所有的克隆相似于 *Nitrosomonas*, 其中 60% 以上的克隆相似于 *Nitrosomonas europaea*。

**关键词:** SBR; 短程生物脱氮; Fish; PCR-DGGE; PCR-克隆序列

**中图分类号:** X 703.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0254-0037(2007)08-0843-06

近年来由于氮磷的过量排放, 受纳水体的富营养化现象日益严重, 而我国城市污水处理厂的 N、P 去除率普遍不高, 尤其是低 C/N 城市污水的脱氮问题已成为当今城市污水处理厂亟待解决的主要难题。短程生物脱氮工艺由于具有节约能耗、节省碳源等优点, 在一定程度上是解决低 C/N 废水脱氮问题的方法, 因此已成为国内外污水处理的研究热点<sup>[1]</sup>。目前的研究多是在对短程生物脱氮影响因素的研究, 较少涉及以优化工艺为目的的硝化菌群内部结构分析, 缺少对“微生物”在不同状态下动态变化的调控研究<sup>[2-3]</sup>。近年来快速发展的以分子生物学手段为活性污泥的种群分析提供了新的拓展空间, 以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, 简称 PCR)和荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, 简称 FISH)为代表的分子生物学分析方法应用于污水生物处理系统硝化菌<sup>[4]</sup>的原位检测已有文献资料报道。为了充分了解氨氧化菌(ammonia-oxidizing bacteria, 简称 AOB)和亚硝酸盐氧化菌(nitrite-oxidizing bacteria, 简称 NO<sub>2</sub>-OB)两大菌群在实时控制模式下的结构分布及生物活性的动态变化, 有必要在对短程脱氮系统特性研究的基础上, 进一步研究硝化菌群的结构组成及空间分布。

## 1 试验材料和方法

### 1.1 试验设备与运行方案

试验用水采用北京某城市污水厂初沉池出水, 活性污泥的种泥取自该污水厂的回流污泥, 原水水质情况如表 1 所示。试验的中试反应器建于该污水处理厂初沉池附近, SBR 反应器池体由钢板焊制, 内部做防腐处理, 反应器的有效容积为 54 m<sup>3</sup>, 装置如图 1 所示。在试验过程中, 为节省外碳源的投量, 均采用多段进水的运行方式, 进水泵设置在初沉池的出水检查井中, 进水量既可通过浮球液位计来控制, 也可通过时间控制。当进水量满足要求后, 停止进水泵, 启动鼓风机进行曝气, 恒定曝气量为 1.44 m<sup>3</sup>/min; 硝化反结

收稿日期: 2006-12-05。

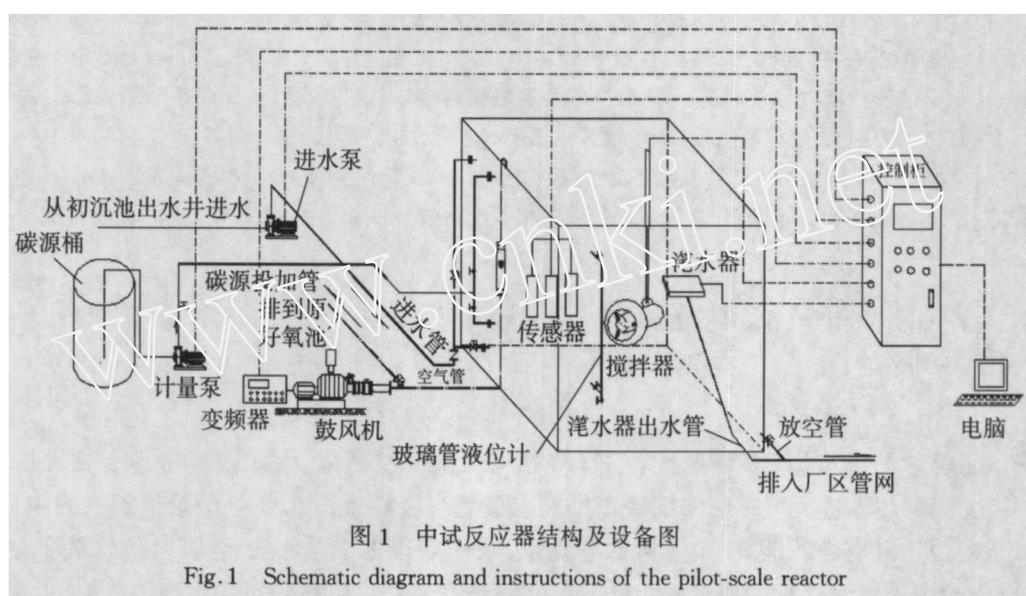
基金项目: 国家“八六三”重大科技专项资助项目(2004AA601020); 国家自然科学基金重大国际合作项目(50521140075); “十一五”国家科技支撑计划(2006BAC19B03); 国家自然科学基金资助项目(50608001)。

作者简介: 杨 庆(1979-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士生。

束后,鼓风机停止曝气.第2次进水并启动潜水搅拌机利用原水中有机物进行缺氧反硝化,反硝化反应结束后,停止搅拌、继续曝气.重复进行好氧/缺氧交替的进程,直至反应器加满水,最后一次反硝化过程启动碳源投加泵为系统补充碳源.整个反应过程按照实时控制策略操作运行.反应全部完成后按照设定的时间进行沉淀,之后通过滗水器排水,排水完成后进入闲置阶段等待进入下一个周期.系统的平均污泥浓度控制在 2 500 mg/L 左右,污泥龄为 12~15 d.

表 1 试验用水水质情况

Table 1 The character of experimental wastewater				
mg·L <sup>-1</sup>				
$\rho_{\text{SCOD}}$	$\rho_{\text{NH}_4^+ - \text{N}}$	$\rho_{\text{NO}_3^- - \text{N}}$	$\rho_{\text{NO}_2^- - \text{N}}$	$\rho_{\text{TN}}$
120~210	40~80	0~0.9	0~0.3	45~100



## 1.2 试验分析方法

试验过程每 10 s 读取 1 次在线参数,包括 pH 值、 $\rho_{\text{DO}}$ 、氧化还原电位(oxidation reduction potential, 简称 ORP),并根据其变化规律间隔 30~60 min 取水样.根据标准方法测定水样中的  $\rho_{\text{SCOD}}$ 、 $\rho_{\text{NH}_4^+ - \text{N}}$ 、 $\rho_{\text{NO}_3^- - \text{N}}$ 、 $\rho_{\text{NO}_2^- - \text{N}}$ 、 $\rho_{\text{TN}}$ ;pH 值、 $\rho_{\text{DO}}$ 和 ORP 的检测采用德国 WTW 公司的 IQ sensor net system184 系列在线仪表及传感器测定.

### 1) FISH 及寡核苷酸探针

按照 Amann 的操作方法进行 FISH 分析<sup>[5]</sup>.采用质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液,在 4℃ 下对污泥样品固定 2~3 h.对固定后的污泥样品进行超声分散 1 min,然后将样品滴加在明胶包被过的载玻片上,在空气中干燥后,将其先后浸泡于体积分数为 50%、80% 和 98% 的乙醇溶液中脱水各 3 min.杂交缓冲液包括 0.9 mol/L NaCl、20 mmol/L Tris/HCl,质量分数为 0.01% 的十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, 简称 SDS)和甲酰胺(质量分数见表 2),pH 值为 7.2.将荧光标记的寡核苷酸探针溶解于杂交缓冲液中,在 46℃ 下与污泥样品杂交 2 h.采用的寡核苷酸探针列于表 2.杂交结束后,采用洗脱缓冲液在 48℃ 下洗脱 20 min.在干燥后的样品上滴加抗荧光衰减液,采用 OLYMPUS BX52 型荧光显微镜对每个污泥样品随机拍摄 20~25 张照片,并用于 Leica QWIN 软件进行定量分析.

### 2) PCR-变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, 简称 DGGE)

采用 FastDNA spin for soil 试剂盒进行污泥样品的 DNA 提取. PCR 引物采用 AmoA-1F-Clamp(其基因序列为 5'-Clamp-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3')和 AmoA-2R-TC(其基因序列为 5'-CCC CTC TGC AAA GCC TTC TTC-3'),特异性扩增 AOB. PCR 混合液(50  $\mu\text{L}$ )包括:35.5  $\mu\text{L}$  超纯水;5  $\mu\text{L}$  PCR 缓冲液;1  $\mu\text{L}$  正向引物(50 pmol/ $\mu\text{L}$ );1  $\mu\text{L}$  反向引物(50 pmol/ $\mu\text{L}$ );0.5  $\mu\text{L}$  5U Taq DNA 聚合酶;5  $\mu\text{L}$  dNTP(1.25

mmol·L<sup>-1</sup>); 2 μL DNA 模板. PCR 反应条件: 95 ℃ 下 10 min, 35 个循环(94 ℃ 下 15 s, 55 ℃ 下 20 s, 72 ℃ 下 2 min), 最后 72 ℃ 下延伸 5 min.

表 2 Fish 分析中采用的寡核苷酸探针

Table 2 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used

探针	w <sub>甲酰胺</sub> /%	荧光标记物	检测目标
EUBmix *		FITC	几乎全部 Eubacteria
NSO1225	35	Cy3	Ammonia-oxidizing β-Proteobacteria
NIT3	40	Cy3	Nitrobacteria
Ntspa662	35	Cy3	Nitrospira

\* EUBmix 由 EUB338Ⅰ:EUB338Ⅱ:EUB338Ⅲ = 1:1:1 混合组成, 其甲酰胺浓度不受限制, 可遵循与其混合的另一种目标探针的甲酰胺浓度.

采用美国 Bio Rad 公司的 Dcode System 检测系统对 AmoA PCR 产物进行 DGGE 分析. 分别准备 2 种质量分数为 30% 和 70% 的凝胶溶液变性剂, 在 100 V、60 ℃、1×TAE 缓冲液中运行 15 h. Vistra Green 染色凝胶 20 min, 然后在 FluorImage 595 成像系统中进行观察.

### 3) PCR-克隆序列(Cloning sequencing)分析

PCR 引物采用标准的 AmoA-1F(基因序列为 5'-GGG GTT TCT ACT GGT GGT-3')和 AmoA-2R(基因序列为 5'-CCC CTC KGS AAA GGC TTC TTC-3'), 特异性扩增 AOB. PCR 混合液(50 μL)包括: 35.5 μL 超纯水; 5 μL PCR 缓冲液; 1 μL 0.25 μmol/L 正向引物; 1 μL 0.25 μmol/L 反向引物; 0.5 μL 1.25U Taq DNA 聚合酶; 5 μL 0.2 mmol/L dNTPs; 2 μL DNA 模板. 反应条件同 2).

PCR 产物采用 QIAquick PCR purification 试剂盒进行纯化后, 与 pDrive Cloning 载体连接. 重组体在 QIAGEN PCR Cloning 试剂盒中导入 QIAGEN EZ 感受态细胞. 将转化混合液涂布于含有氨卡青霉素的琼脂培养皿, 在 37 ℃ 下培养 18 h. 通过蓝白斑筛选阳性克隆体. 采用 M13 正向引物和反向引物直接对阳性克隆体中的 AmoA 基因片段进行特异性扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳检验 M13 PCR 产物, 从中选取 8 个阳性克隆体(E8, E9, F8, E12, F11, F12, C9, D8)的 M13 PCR 产物, 采用 ABI3100 基因测序仪进行测序分析. 应用 Auto Assembler 软件对测序结果进行处理后提交到网站 <http://www.ddbj.nig.ac.jp>, 采用 BLAST search 软件进行目标序列和基因库中所含序列的相似性分析. 参考 BLAST 分析结果, 选取相关性 AmoA 基因序列, 建立包含目标序列和相关性序列的 FASTA 格式的文件, 提交到网站 <http://www.ddbj.nig.ac.jp>, 采用 ClustalW 软件进行目标序列和相关性序列的对比分析并建立系统发育树.

## 2 结果与分析

### 2.1 实时控制模式下短程生物脱氮的实现与稳定

为了避免过度曝气, 准确地把握 SBR 法氨氧化反应的终点, 以实现短程硝化. 彭永臻等选择了可在线检测、响应时间短、精度较高的 ORP、 $\rho_{DO}$  和 pH 值作为被控变量进行了大量研究<sup>[6-7]</sup>. 在此基础上, 本试验采用分段进水的模式对实时控制好氧/缺氧时间条件下短程生物脱氮的实现与稳定进行了中试研究, 分 3 次进水的 SBR 法交替硝化反硝化过程中  $\rho_{SCOD}$ 、 $\rho_{NH_4^+-N}$ 、 $\rho_{NO_2^- -N}$ 、 $\rho_{NO_3^- -N}$  随时间的变化规律及在线参数 pH 值相应的变化规律见图 2. 当好氧曝气过程进行到 30 min 时, 有机物基本降解完成, 此时在 pH 曲线上会出现由上升变下降的 a 点, 之后出现的 b 点、c 点、d 点可分别指示每阶段氨氧化反应的终点. 通过对交替好氧/缺氧过程的实时控制, 系统的总氮去除率达到 98.2%, 而且获得了较好的短程硝化效果, 各段硝化反应结束时的亚硝化率均在 95% 以上. 实时控制是短程硝化得以实现的主要因素, 由于 NOB 必须在 AOB 产生亚硝酸盐后方可生长, 因此, 如果在氨氮刚好氧化完成时或之前停止曝气, 亚硝酸盐将有所累积, 应用实时控制, 既可保证氨氮被完全氧化, 又防止了亚硝酸盐的进一步氧化, 是短程硝化实现的必要条

件.同时交替缺氧/好氧的运行模式也加快了短程硝化实现的步伐,每个缺氧段之后的好氧段 AOB 总是比 NOB 提前恢复活性,因此 AOB 在硝化菌中的比例被大大提高,并最终成为优势菌种.为了更加直观地考察中试系统内硝化菌群的结构和演替规律,进行了一系列分子生物学试验.

## 2.2 中试系统内 AOB 与 NOB 的 FISH 定量分析结果

SBR 中试短程生物脱氮系统的 FISH 定量分析结果为:AOB 占总菌数的 3% 以上,NOB 的量极少,几乎没有检出. FISH 定量结果表明,在亚硝酸盐积累率高于 80% 后,AOB 在活性污泥中所占的比例与亚硝酸盐积累率没有明显的相关性,但 AOB 相比 NOB 已成为明显的优势菌群,或者已实现从系统中淘汰 NOB.

## 2.3 AOB 的 PCR-DGGE 分析结果

SBR 中试短程生物脱氮系统的 DGGE 分析结果如图 3 所示,同时做 4 个污泥样品平行样,污泥样品 DGGE 条带的重现性很好.

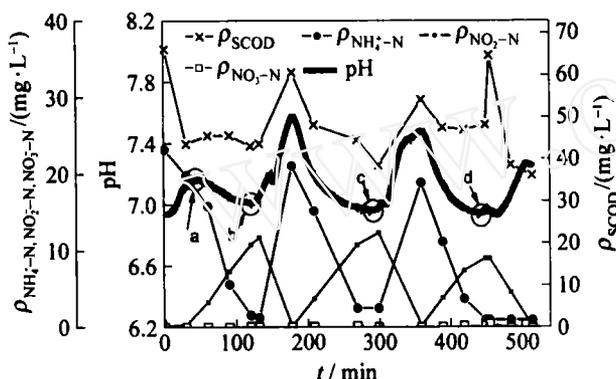


图2 实时控制模式下 SBR 法脱氮效果及在线参数变化规律

Fig.2 Nitrogen removal efficiency and the on-line control parameters' variations with the real-time control mode

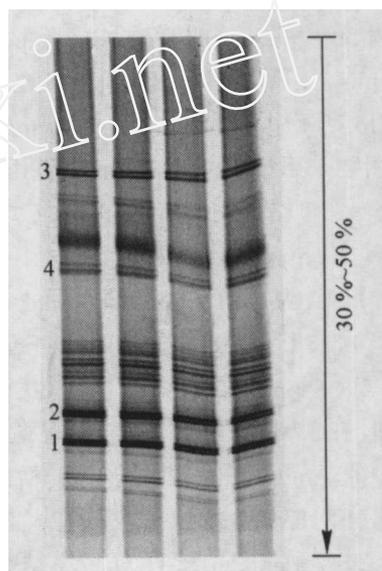


图3 DGGE 的分析结果

Fig.3 DGGE gel results

由于 PCR 引物的目标序列是 AOB 的功能基因 *AmoA*, 因此 DGGE 凝胶上标记的主要条带应属于 AOB. 污泥样品 DGGE 条带的特点均出现在变性剂浓度 30% ~ 50% 的范围内, 根据文献资料, 在该变性剂浓度范围内出现的条带应属于 *Nitrosomonas-like*<sup>[8]</sup>. 由于 DGGE 分析结果提供的信息是有限的, 无法在“种”的水平上确定 AOB 的种类. 如要获得更准确的分析结果, 需要切割 DGGE 条带, 继续进行 PCR-DGGE-克隆序列分析, 从而确定 AOB 的种类.

## 2.4 AOB 的 PCR-克隆序列分析结果

对 SBR 中试反应器的污泥样品进行 PCR-克隆序列分析. 由于 PCR 引物的目标序列是 AOB 的功能基因 *AmoA*, 因此阳性克隆体的外源基因片段为 *AmoA* 基因, 测序分析及序列对比分析都是针对 AOB 的 *AmoA* 基因序列. 选取 8 个阳性克隆体 (E8, E9, F8, E12, F11, F12, C9, D8) 的测序结果进行 BLAST search 的相似性分析, 结果为: 88% 的 E8 基因序列相似于 *Nitrosomonas europaea*; 82% 的 E9 基因序列相似于 *Nitrosomonas sp*; 88% 的 F8 基因序列相似于 *Nitrosomonas europaea*; 88% 的 E12 基因序列相似于 *Nitrosomonas europaea*; 88% 的 F11 的基因序列相似于 *Nitrosomonas europaea*; 88% 的 F12 基因序列相似于 *Nitrosomonas europaea*; 84% 的 C9 基因序列相似于 *Nitrosomonas sp*; 98% 的 D8 基因序列相似于 *Nitrosomonas sp*. 所有的克隆相似于 *Nitrosomonas*, 这与 PCR-DGGE 分析结果完全一致, 其中 60% 以上的克隆

类似于 *Nitrosomonas europaea*。采用 ClustalW 进行目标序列和相关性序列的对比分析并建立系统发育树, 如图 4 所示。

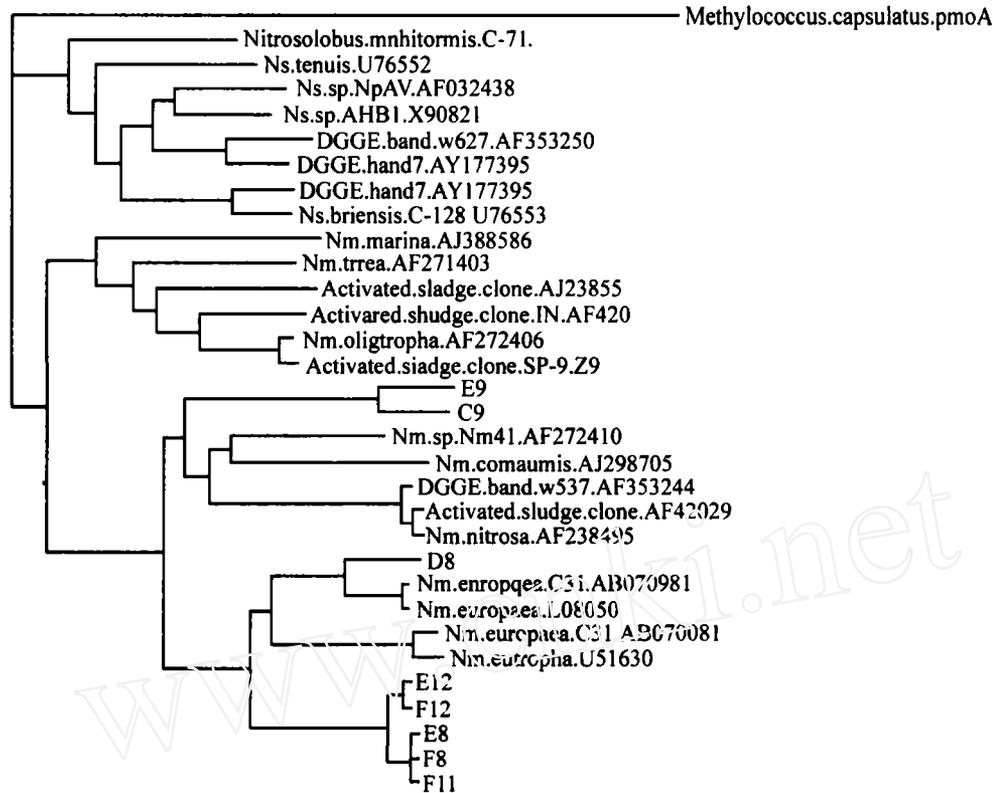


图 4 利用 AOB AmoA 基因建立的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree generated by using AmoA gene of AOB

### 3 结论

1) 应用有效容积为  $54 \text{ cm}^3$  的 SBR 系统对低碳氮比城市污水短程生物脱氮进行了中试研究。通过采用分段进水交替缺氧/好氧的运行方式, 结合过程实时控制, 系统在保证总氮去除率在 98.2% 的基础上, 成功实现了短程硝化, 各反应段亚硝化率均在 95% 以上。

2) 系统不仅在处理效果上实现了短程生物脱氮, 而且在污泥种群上也发生了“质”的变化。应用 FISH 技术定量地对系统内 AOB、NOB 进行了分析。结果表明, 在长期实时控制的作用下, AOB 占总菌数的 3% 以上, NOB 的量极少, 几乎没有检出。这说明 AOB 已成为硝化菌群中的绝对优势菌种, NOB 逐渐被淘汰。

3) 采用 PCR-DGGE 对污泥样品中的 AOB 做初步定性分析, DGGE 结果显示短程生物脱氮系统中的 AOB 均以 *Nitrosomonas-like* 为主。污泥样品的 PCR-Cloning-Sequencing 结果指示所有的克隆类似于 *Nitrosomonas*, 与 DGGE 分析结果完全一致, 其中 60% 以上的克隆类似于 *Nitrosomonas europaea*。

#### 参考文献:

- [1] KIM Dong-jin, KIM Sun-hee. Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitrification reactor systems and their kinetic characteristics[J]. Wat Res, 2006(40): 887-894.
- [2] ZENG Wei, PENG Yong-zhen, WANG Shu-ying. A two-stage SBR process for removal of organic substrate and nitrogen via nitrite-type nitrification-denitrification[J]. Journal of Environmental Science and Health Part a, 2004, 39(8): 2229-2239.
- [3] YOO Hyung-seok, AHN Kyu-hong, LEE Hyung-jib, et al. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an intermittently-aerated reactor[J]. Wat Res, 1999, 33(1): 145-154.
- [4] DAIMS H, NIELSEN J L, NIELSEN P H, et al. In situ characterization of nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in

- wastewater treatment plants [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 5273-5284.
- [5] AMANN R I. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995: 1-15.
- [6] 曾薇, 彭永臻, 王淑莹, 等. 以溶解氧浓度作为 SBR 法模糊控制参数[J]. 中国给水排水, 2000, 16(4): 5-10.  
ZENG Wei, PENG Yong-zhen, WANG Shu-ying, et al. Fuzzy control of SBR process using DO as parameter[J]. *China Water & Wastewater*, 2000, 16(4): 5-10. (in Chinese)
- [7] 高景峰, 彭永臻, 王淑莹. 以 pH 作为 SBR 法硝化过程模糊控制参数的基础研究[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(5): 549-553.  
GAO Jing-feng, PENG Yong-zhen, WANG Shu-ying. Use of pH as fuzzy control parameter for nitrification in SBR process [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2003, 9(5): 549-553. (in Chinese)
- [8] NICOLAISEN M H, RAMSING N B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 50: 189-203.

## Quantitative Analysis of Nitrifying Communities in Short-cut Nitrogen Removal From Municipal Wastewater of SBR

YANG Qing<sup>1</sup>, PENG Yong-zhen<sup>1</sup>, ZENG Wei<sup>1</sup>, YANG An-ming<sup>1</sup>, Hiroyasu Satoh<sup>2</sup>, Takashi Mino<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Beijing Water Quality Science and Water Environmental Recovery Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China; 2. Institute of Environmental Studies, University of Tokyo, Tokyo 113-8656, Japan)

**Abstract:** To investigate the effects of real-time control on the structure of nitrifying communities of the short-cut nitrogen removal in SBR pilot-scale plant with a working volume of 54 m<sup>3</sup>, molecular techniques of Fish, PCR-DGGE and PCR-Cloning-Sequencing were used to analyze ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) with the performance of short-cut nitrogen removal. Fish results show that in short-cut nitrogen removal process, AOB became dominant with compared to NOB and accounted for 3% ~ 12% of the total biomass. More importantly, no NOB was detected. PCR-DGGE gel results show that AOB were phylogenetically related to *Nitrosomonas*-like species with a melting point at the range between 30% to 50%. PCR-Cloning-Sequencing results show that all clones were affiliated with *Nitrosomonas corresponding* to DGGE results and 60% of the clones were affiliated with *Nitrosomonas europaea*.

**Key words:** SBR; short-cut nitrification-denitrification; Fish; PCR-DGGE; PCR-Cloning-Sequencing