

强化生物除磷工艺微生物种群结构分析

李伟光^{1,2}, 田文德¹, 康晓荣¹, 张 卉¹, 郭 旋¹

(¹哈尔滨工业大学市政与环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090;

²城市水资源开发利用(北方)国家工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150090)

关键词: 强化生物除磷; 微生物多样性; RCR-DGGE; 克隆测序

DOI: 10.3969/j.issn.0438-1157.2011.12.034

中图分类号: X 703.1

文献标志码: A

文章编号: 0438-1157(2011)12-3532-07

Analysis of microbial community structure in enhanced biological dephosphorization

LI Weiguang^{1,2}, TIAN Wende¹, KANG Xiaorong¹, ZHANG Hui¹, GUO Xuan¹

(¹School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, Heilongjiang, China; ²National Engineering Research Center of Urban Water Resources, Harbin 150090, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to study the microbial community structure and diversity as well as the performance of phosphorus removal associated with microbial community change, the fingerprint profile technique of PCR amplified 16S rRNA and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) were applied to analyse the microbial communities in Bi-Bio-Selective simultaneous Phosphorus and Nitrogen removal (BBSPN) process. After the characteristic bands eluted from gel were further recovered, cloned (reamplified) and sequenced, the sequences were compared with those in GenBank database and used for homology analysis, and the phylogenetic trees were constructed. The sequence of DGGE bands obtained showed that there is a good dynamic correlation between microbial community variation and its removal performance of process. TP removal efficiency of BBSPN process was lower when α -proteobacteria was the dominant species, which mean α -proteobacteria was not favorable for enhanced biological phosphorus removal; whereas when Bacteroidetes was the dominant species, TP removal efficiency and denitrifying dephosphorization were better and stable, which should attribute to Uncultured Sphingobacteriaceae. So, the Uncultured Sphingobacteriaceae was like to be one of the denitrifying phosphate accumulating organisms (DPAOs) in this process. Moreover, *Acinetobacter*, TM7 and Uncultured Trichococcus are also beneficial for phosphorus and nitrogen removal of BBSNP process.

Key words: enhanced biological phosphorus removal; microbial diversity; RCR-DGGE; cloning and sequencing

2011-05-18 收到初稿, 2011-06-28 收到修改稿。

联系人及第一作者: 李伟光 (1962-), 男, 教授。

基金项目: 国家水体污染控制与治理重大专项 (2009ZX07317-008-01)。

Received date: 2011-05-18.

Corresponding author: Prof. LI Weiguang, hitlwg@126.com

Foundation item: supported by the National Water Pollution Control and Management Technology Major Projects of China (2009ZX07317-008-01).

引 言

强化生物除磷工艺以其高效、低耗、简单易操作在世界范围内得到了广泛的应用^[1-2]，近年来反硝化生物强化除磷工艺一直是个研究热点，主要是由于反硝化生物强化除磷工艺可通过反硝化除磷菌 (DPB) 在传统的厌氧/缺氧/好氧工艺的缺氧池中利用内碳源聚 β -羟基丁酸酯 (PHB) 作为碳源实现反硝化吸磷，同时亦可反硝化脱氮，“一碳两用”，可节省大量的碳源需求，同时也减少了一定的动力消耗和污泥产量^[3-4]，尤其适合低碳氮比的城市生活污水。

尽管国内外很多的研究人员在反硝化除磷方面做了大量的研究^[5-8]，但是采用分子生物学手段分析反硝化生物除磷系统中的微生物菌群结构和多样性，并建立其与工艺处理效果之间的动态关系的研究仍然缺乏。为了实现工艺角度和微生物角度有机结合，本研究利用 16S rRNA 的 PCR-DGGE 指纹图谱技术对两级生物选择同步除磷脱氮工艺中的微生物群落进行分析，并将相应时段系统的缺氧反硝化除磷效率与总除磷率进行比较，旨在建立微生物种群结构的变化与工艺效果的动态关联，为系统的优化运行提供一定的理论基础，从而更好地指导该工艺在现实水厂中的应用。

1 材料和方法

1.1 试验装置及样品采集

试验污泥样品取自两级生物选择同步除磷脱氮反应器，如图 1 所示。反应器由有机玻璃制成，总有效容积为 27 L，其中由移动插板分隔成厌氧选择器、缺氧选择器、缺氧池、好氧池 1 和好氧池 2 五部分，所占有的有效容积分别为 5.4、1.2、6.6、7.8、6 L。试验用水取自哈尔滨工业大学二校区教工家属区生活污水，根据试验需要加入一定的 KH_2PO_4 以调节污水中的磷含量，调整后的实验用水水质如表 1 所示。系统进水流量为 $3 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ，污泥回流比为 100%，硝化液回流比为 200%，缺氧池到厌氧选择器的混合液回流比为

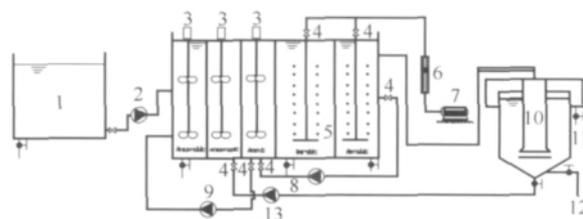


图 1 两级生物选择同步除磷脱氮工艺示意图

Fig. 1 Schematic diagram of Bi-Bio-Selective Phosphorus and Nitrogen removal (BBSPN) reactor
1— influent tank; 2— feed pump; 3— mechanical mixer; 4— check valve; 5— diffuser; 6— airflow meter; 7— air compressor; 8— return nitrifying liquor pump; 9— recycling mixture liquor pump; 10— secondary clarifier; 11— effluent; 12— waste sludge; 13— return sludge pump

150%，MLSS 约为 $3000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，好氧池的 DO 维持在 $1.5 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间，污泥龄为 15 d。

反应器启动期 (30 d) 内，每运行 10 d 取污泥样品一次，进入稳定期以后每隔 15 d 取样一次，均取自缺氧池，每次取 1.5 ml 泥水混合物置于灭菌离心管中，在 $9000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min，倒掉上清液后置于 -20°C 冰箱内保存，待用于 DNA 提取。

1.2 常规指标分析方法

实验中检测的分析项目主要有 COD、TN、 NH_4^+-N 、 $\text{NO}_3^- -\text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- -\text{N}$ 、TP，均采用国家环保总局颁布的标准分析方法测定。

1.3 PCR-DGGE 分析方法

1.3.1 污泥中基因组 DNA 提取 DNA 提取采用上海华舜生物公司的小量细菌基因组提取试剂盒。随后将获得的 DNA 溶于 $50 \mu\text{l}$ 浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 中，然后采用 0.8% 的低熔点琼脂糖进行检测，在 EC3-300 凝胶成像系统下观察。

1.3.2 PCR 扩增 采用真细菌 16S rRNA 基因 V3 特异区通用引物 BSF338F ($5'$ -ACTCCTACGGGAGGCAGCAG- $3'$) 和 BSF534R ($5'$ -ATTACCGCGGCTGCTGG- $3'$) 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增。100 μl 体系包括 10~100 ng 模板，

表 1 废水水质

Table 1 Wastewater characteristic

Item	COD/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	BOD ₅	$\text{NH}_4^+-\text{N}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TN/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TP/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	pH
influent	209.45—281.4	109.65—161.75	45.94—57.85	48.6—64.5	7.44—8.47	7.0—7.7
effluent	17.83—33.79	9.10—21.12	3.14—12.25	5.78—13.3	0.13—3.31	6.8—7.4

10×buffer 10 μl, dNPT 4 μl, 引物 BSF338F 和 BSF534R 各 3 μl, Ex Taq 1.5 U, 其余用无菌超纯水补足。

PCR 反应条件为 94℃ 变性 5 min, 然后进行 30 个循环, 即 94℃ 1 min、55℃ 45 s、72℃ 1 min, 最后延伸 72℃ 10 min, 然后将获得的 PCR 产物放置在 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 采用 8% 的聚丙烯酰胺胶, 变性剂的梯度为 30%~60%, 电泳缓冲液是 1×TAE, 采用美国 Bio-Rad Power Pac Basic 电泳仪在 150 V、60℃ 下电泳 400 min, 完毕后将凝胶进行银染得到 DGGE 图谱。

1.3.4 克隆测序 将 DGGE 得到的 15 个特定条带进行克隆、测序, 参照 Miura 等^[9] 实验所采用的方法。

2 结果与讨论

2.1 系统对总磷的去除

试验过程中反应器经历了 30 d 左右的启动期, 然后进入稳定运行阶段, 在进行常规的指标检测的同时, 每半个月取其缺氧污泥样品进行保存, 采用 PCR-DGGE 等分子生物学手段分析不同运行阶段的微生物种群结构变化, 进而映射强化生物除磷工艺中磷去除效果和微生物种群之间的动态变化关系。本试验中所分析的 5 个污泥样品分别为系统启动开始运行第 10、20、30、45、60 d 的样品。系统总磷不同时段的全流程变化及吸磷率如图 2 所示, 图中每个阶段内总磷量均以 10 d 数据的平均值表示, 从柱状图中可以很清楚地看出从系统启动初期到反应运行稳定期, 在进水总磷平均浓度为 7.9 mg·L⁻¹ 的情况下, 厌氧选择器中释磷的比例

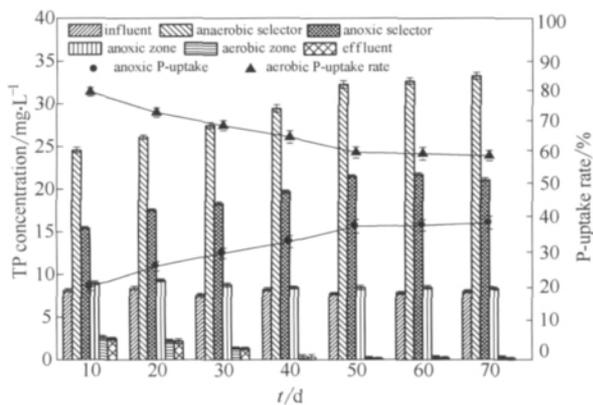


图 2 不同时段 TP 全流程变化及吸磷率

Fig. 2 Variation of TP along flow path and P-uptake rate

逐渐增加, 由启动期开始的近 3 倍释磷增加到稳定期的 4 倍多释磷, 释磷效果越好, 后续的缺氧和好氧的吸磷动力越大, 其吸磷效果就会越好。缺氧选择器中总磷的含量一直较稳定地减少, 其主要原因是由于污泥回流和混合液回流的稀释作用、微生物的同化作用以及反硝化除磷。从图 2 可以看出, 缺氧吸磷量由启动期的 1.7 mg·L⁻¹ 上升到稳定期的 5.4 mg·L⁻¹, 缺氧吸磷率从 21% 上升到 40%, 并趋于稳定, 这也说明了稳定期阶段系统 40% 左右的总磷是由缺氧吸磷来完成的, 此时系统的 TP 平均去除率为 97%, 出水低于 0.5 mg·L⁻¹, 达到了国家《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918—2002) 的一级 A 标准。由于缺氧反硝化除磷的稳定实现, 大大减少了系统的曝气量和剩余污泥产量。

2.2 系统对 COD 和氨氮的去除

对于反硝化除磷系统来说, 若缺氧池 COD 浓度过高, 异氧反硝化细菌会和反硝化聚磷菌竞争外碳源优先进行反硝化作用, 耗尽硝酸盐而影响其作为反硝化除磷的电子受体, 从而抑制反硝化除磷菌, 相反, 较低的 COD 浓度有利于反硝化聚磷菌以硝酸盐为电子受体, 利用内碳源 PHB 反硝化除磷和脱氮同时进行, 达到“一碳两用”的目的, 也节省了一部分曝气的动力消耗。

BBSNP 系统在保持较高的除磷效果的同时, 对 COD 的去除效果较高, 如图 3 所示。系统对 COD 的去除率一直比较稳定, 当进水的 COD 平均浓度为 239.06 mg·L⁻¹ 时, 出水 COD 的平均浓度为 27.30 mg·L⁻¹, 平均去除率为 88.42%, 并且在反应器经过一个月的启动期之后, 系统对 COD

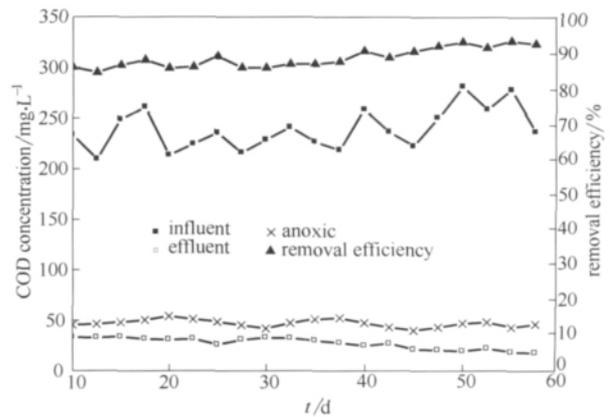


图 3 系统对 COD 的去除效果

Fig. 3 Removal performance of COD in BBSNP system

的去除稳定在 90% 以上，且进入到缺氧池中的 COD 的浓度在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右，此结果与罗固源等^[10]利用螺旋式升流式反应器得出的结论一致，不会影响反硝化吸磷的效果，同时可保持进入后续好氧段的 COD 浓度比较稳定，为硝化细菌的生存环境提供了良好的保证。

系统对氨氮的去除效果如图 4 所示，运行期间进水氨氮平均浓度为 $51.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，在系统启动的前期，氨氮的去除率约 78%，随着系统逐步稳定，氨氮的去除率稳步上升并保持稳定，图 4 中可以看到第 30 d 后氨氮的去除率显著提升，平均去除率为 90%。稳定期系统缺氧段的溶解氧基本保持在 $1.5 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间，好氧池 2 出水平均硝酸盐氮为 $6.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，缺氧池出水的硝酸盐氮低于 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，此时缺氧池混合液回流不影响厌氧选择器的释磷，与王晓莲等^[11]、Yuan 等^[12]研究结果一致。

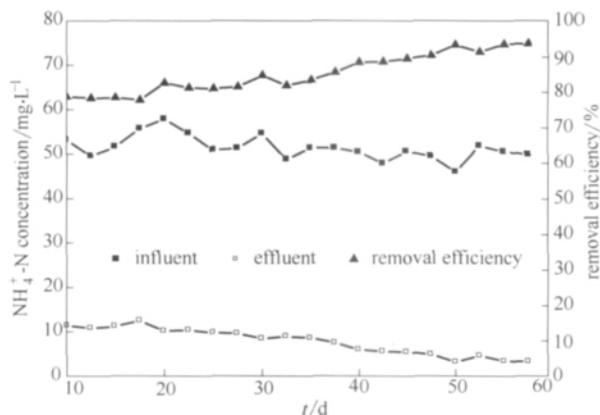


图 4 系统对氨氮的去除效果

Fig 4 Removal performance of NH_4^+-N in BBSPN system

2.3 微生物群落结构的变化及多样性分析

将不同运行阶段所取的 5 个污泥样品基因组总细菌 16S rRNA V3 区片段进行 PCR 扩增，然后再进行 DGGE 分析，结果如图 5 所示。从图中的条带变化可以看出反应器从启动到稳定运行阶段的活性污泥微生物种群结构的变化，条带 10、11、12、13、14、15 基本上一直存在，只是偶尔表现得相对弱一点，条带 1、3、4、8、9 随着反应器运行时间的延长，逐渐弱化成为系统内的非优势种群，条带 5 为后续出现的新菌属，条带 2、6、7 变化不稳定，从弱到强再从强到弱，可能对系统的强化除磷性能影响不是很大。这些变化说明不同时段系统对总磷的去除效果及反硝化除磷的加强，很大程度上

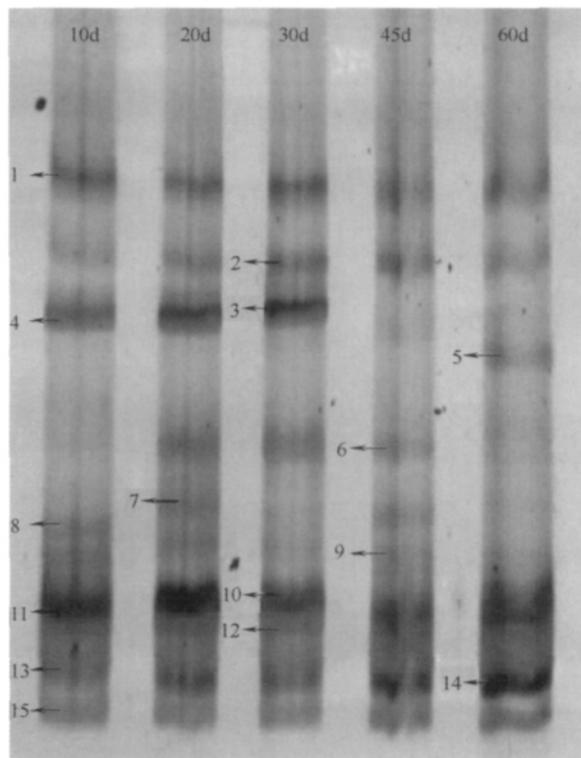


图 5 不同时段微生物 16S rRNA 的 DGGE 图谱

Fig 5 DGGE profiles of 16S rRNA gene fragment at different stages

与系统内部的种群结构发生的变化有关。此外，活性污泥系统中种群结构的变化及其演替不仅与水质有关，还与反应器的运行模式和运行参数密切相关，而本系统能在上述的操作参数下达到较好的除磷效果，尤其是反硝化除磷的稳定实现，说明进入稳定期的反硝化聚磷菌已经成为系统优势菌之一。

2.4 测序结果与系统进化分析

进行细菌同源性分析的时候，一般当微生物的 16S rDNA 同源性达到 97% 或以上，可以将这些菌划为一个种；同源性达到 94% 或以上时，可以将这些菌划为一个属^[13]。通过 NCBI 比对结果发现，条带 1、2、3、4、9、12 分别与 Uncultured alpha proteobacterium、Uncultured Saprospiraceae bacterium、Uncultured Alphaproteobacteria bacterium、*Rhodobacter* sp.、Uncultured *Methylosinus* sp.、Uncultured Saprospiraceae bacterium 的相似性为 100%，可以认为就是同一个种。其余条带的相似性比对均在 94% 以上，可以认为是同一个属。

将上述条带回收、克隆、测序后，将所得序列

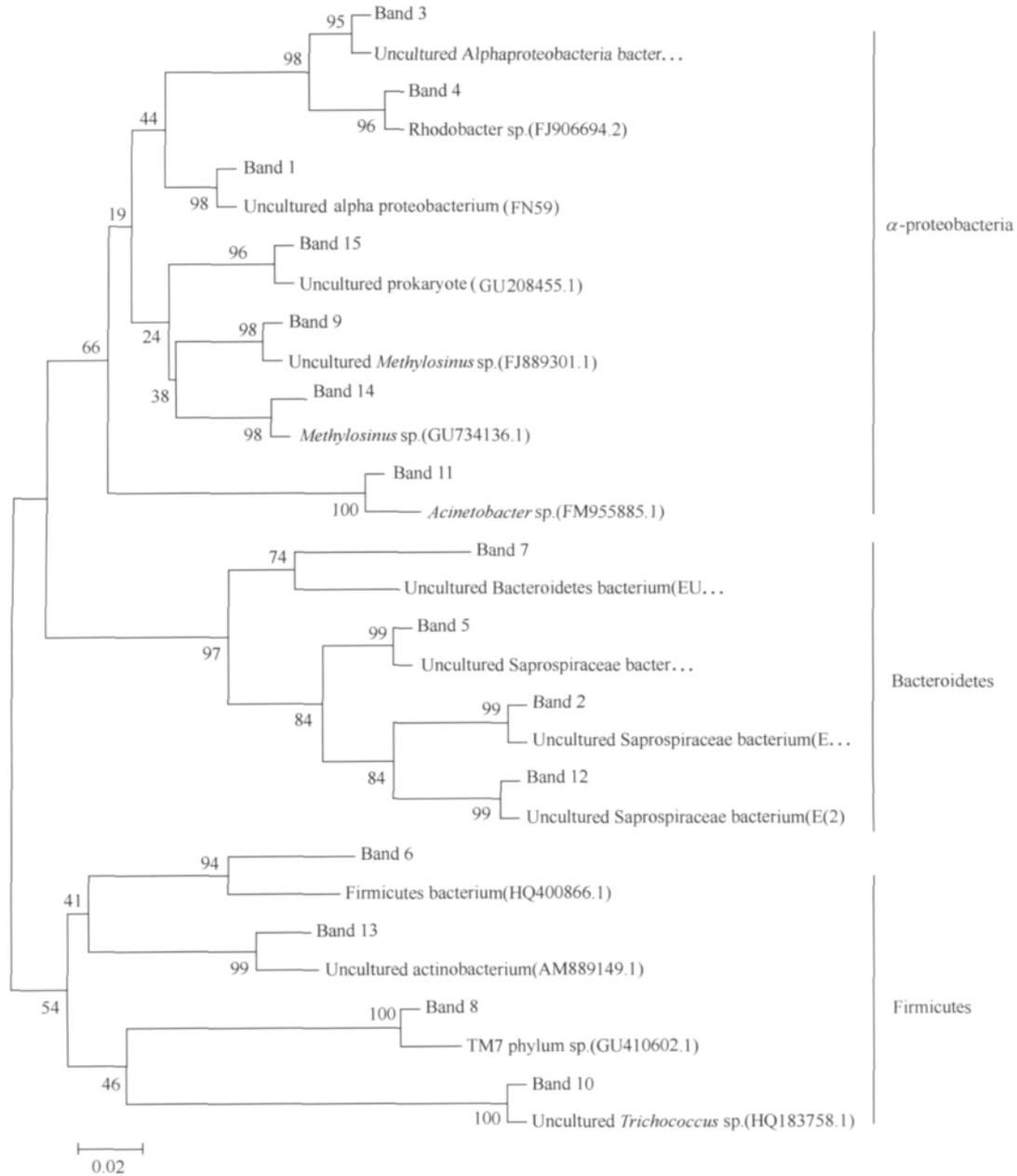


图 6 16S rRNA 下 EBPR 污泥中优势菌群系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of dominant populations of EBPR sludge based on 16S rRNA

与 GenBank 数据库中的基因序列进行同源性分析和比对，并通过 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (version3.0) 分析，建立了系统发育树如图 6 所示。通过系统进化树分析可知系统中的优势菌群主要以 α -变形菌门 (α -proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 三大类为主。测序结果表明，在已测序的 15 个基因片段中，和 α -proteobacteria 相似度很高的有 7 个，对应条带为 1、3、4、9、11、13、14，与 Bacteroidetes 和 Firmicutes 相似度很高的各有 4

个，分别对应的条带为 2、5、7、12 和 6、8、10、13。结合图 3 和图 6，通过对比相应条带发现和 α -proteobacteria 相似的菌属多数在系统运行的初期出现，随着系统内菌群的演替，此类菌属不再成为系统中的优势菌属，这也与相关研究表明的 α -proteobacteria 的大量存在会导致生物强化除磷系统的瘫痪相一致^[14]。但是其中属于假单胞菌目 (Pseudomonadales) 的不动杆菌属 *Acinetobacter* 一直存在，虽然吴昌永等^[15]在研究 A^2O 工艺反硝化除磷过程中发现随着反硝化除磷的强化，

Acinetobacter 逐渐消失, 但有研究认为 *Acinetobacter* 具有反硝化除磷脱氮作用^[14, 16], 在本系统除磷效果较好的稳定期, 该菌群仍然大量存在, 并未引起生物强化除磷系统的扰乱。随着反应器进入稳定运行阶段, 可发现 Bacteroidetes 类菌群逐渐成为优势菌群, 并且伴随着其门下 Uncultured Sphingobacteriaceae 的出现, 系统对磷的去除效果非常好并且很稳定, 同期的反硝化除磷效果也比较明显, 尽管系统的除磷效果是多种细菌共同作用的结果, 但本系统中新出现的 Uncultured Sphingobacteriaceae 可能就是一种反硝化除磷菌。而 Firmicutes 菌群的变化对于系统的除磷效果未见明显影响, 但是有关文献表明 Firmicutes 菌群与 COD_{Cr} 降解有关, 从属于 Firmicutes 菌门的 TM7 菌群绝大多数与系统的脱氮除磷有关^[17], 有报道称 Uncultured *Trichococcus* 菌群会引起葡萄糖厌氧条件下发酵成乙酸和丙酸, 有利于强化生物除磷过程^[18], 从图 5 中可以发现条带 10 基本上一直存在, 可能也对系统的除磷过程做了一定的贡献。虽然上述很多菌群经常在生物强化除磷工艺过程中出现, 但是相应的代谢机理以及功能作用的量化, 仍然有待于使用针对性强的探针和引物, 通过 FISH 等更精确的分子生物学手段来探索。从微生物学角度映射工艺的处理效果, 必定会为生物强化除磷工艺的改造提供坚实的理论基础。

3 结 论

两级生物选择同步除磷脱氮工艺运行期间, 有些菌群始终存在, 而有些初期占优势的菌群随着系统的稳定逐渐变为非优势菌群, 同时也有逐渐富集培养出来的新菌属, 还有部分无规律变化的菌群, 而这些种群的变化和同期的系统处理效果却有着很好的动态关联。测序结果以及系统进化分析表明, 以 α -proteobacteria 为主要优势菌群的运行初期反硝化除磷效果较低, 系统总的除磷效果也较差; 以 Bacteroidetes 为主要优势菌群的运行稳定期系统除磷效果较好, 平均除磷率可达到 97%, 同时反硝化除磷率也较高, 缺氧反硝化除磷率平均为 35%, 这很可能是由于新富集的 Uncultured Sphingobacteriaceae 就是一种反硝化除磷菌; 不动杆菌属 *Acinetobacter* 以及属于 Firmicutes 菌门的 TM7 和 Uncultured *Trichococcus* 对系统的除磷脱氮也有一定的贡献。

References

- [1] Barat R, van Loosdrecht M C M. Potential phosphorus recovery in a WWTP with the BCFS® process: interactions with the biological process [J]. *Water Res.*, 2006, 40: 3507-3516
- [2] Oehmen A, Lemos P C, Carvalho G, Yuan Z, Keller J, Blackall L L, Reis M A M. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale [J]. *Water Res.*, 2007, 41: 2271-2300
- [3] Kuba T, van Loosdrecht M C M, Heijnen J J. Biological dephosphatation by activated sludge under denitrifying conditions: pH influence and occurrence of a full scale wastewater treatment plant [J]. *Water Sci. Technol.*, 1997, 36 (12): 75-82
- [4] Wu Changyong (吴昌永), Peng Yongzhen (彭永臻), Peng Yi (彭轶). Biological nutrient removal in A²O process when treating low C/N ratio domestic wastewater [J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2008, 59 (12): 3126-3131
- [5] Wu Changyong (吴昌永), Peng Yongzhen (彭永臻), Wang Shuying (王淑莹). Effect of enhancing denitrifying phosphorus removal on microbial population variation in A²O process [J]. *CIESC Journal* (化工学报), 2010, 61 (1): 186-191
- [6] Zhang H, Wang X, Xiao J, et al. Enhanced biological nutrient removal using MUCT-MBR system [J]. *Bioresource Technol.*, 2009, 100: 1048-1054
- [7] Ahn J, Daidou T, Tsuneda S, et al. Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay [J]. *Water Res.*, 2002, 36: 403-412
- [8] Peng Y, Wang X, Li B. Anoxic biological phosphorus uptake and the effect of excessive aeration on biological phosphorus removal in the A²O process [J]. *Desalination*, 2006, 189: 155-164
- [9] Miura Y, Hiraiwa M N, Ito T, et al. Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance [J]. *Water Res.*, 2007, 41 (3): 627-637
- [10] Luo Guyuan (罗固源), Zhang Ruixue (张瑞雪), Wang Danyun (王丹云). Effect of the influent concentration of COD on denitrifying phosphorus removal in the spiral up-flow reactor system [J]. *Journal of Chongqing University: Natural Science Edition* (重庆大学学报: 自然科学版), 2005, 28 (1): 121-125
- [11] Wang Xiaolian (王晓莲), Wang Shuying (王淑莹), Ma Yong (马勇). Anoxic biological phosphorus removal and effect of excessive aeration on biological phosphorus removal in A²O process [J]. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2005, 56 (8): 1565-1570
- [12] Yuan Z, Oehmen A, Pernille I. Control of nitrate recirculation flow in predenitrification systems [J]. *Water Sci. Technol.*, 2002, 45 (4/5): 29-36

- [13] Zhang Bin (张斌), Sun Baosheng (孙宝盛), Ji Min (季民). Analysis and succession of microbial community structure in a membrane bioreactor [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* (环境科学学报), 2008, 28 (11): 2192-2199
- [14] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems [J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 13: 218-227
- [15] Wu Changyong (吴昌永), Peng Yongzhen (彭永臻), Peng Yi (彭轶). Characteristics of denitrifying phosphorus removal in A²O process [J]. *Journal of Harbin Institute of Technology* (哈尔滨工业大学报), 2009, 41 (8): 47-49
- [16] Okunuki S, Kawaharasaki M, Tanak H, *et al.* Changes in phosphorus removing performance and bacterial community structure in an enhanced biological phosphorus removal reactor [J]. *Water Res.*, 2004, 38: 2433-2439
- [17] Zhao Linlin (赵林林), Wang Haiyan (王海燕), Yang Huifen (杨慧芬). Bacterial diversity of the combined ozonation-ASBR/SBR sludge reduction with simultaneous nitrogen and phosphorus removal process using PCR-DGGE [J]. *Journal of Environmental Engineering Technology* (环境工程技术学报), 2011, 1 (2): 123-130
- [18] Wu G, Sørensen K B, Rodgers M, *et al.* Microbial community associated with glucose-induced enhanced biological phosphorus removal [J]. *Water Sci. Technol.*, 2009, 60 (8): 2105-2113