

实时控制实现短程硝化过程中种群结构的演变

郭建华¹, 王淑莹², 郑雅楠², 彭永臻^{1,2}, 刘洋³, 孙治荣²

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090, pyz@bjut.edu.cn; 2. 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 100124; 3. 中国水务控股有限公司, 北京 100020)

摘要: 为了考察实时控制下实现短程硝化过程中硝化污泥种群结构的演变, 采用荧光原位杂交技术(FISH)和扫描电镜(SEM)对处理生活污水的序批式反应器内污泥进行了跟踪观测. 结果表明: 通过检测pH曲线上的“氨谷”特征点快速启动了短程硝化. 短程硝化维持期间亚硝化积累率平均在93%左右. 接种污泥形态多样, 含长杆、短杆及球状菌, 而随着运行的延续, 污泥形态呈现了向短杆状、球状转变的态势. 实时控制下反应器内亚硝酸氧化菌(NO₂-N)逐渐被淘汰, 而氨氧化菌(AOB)得到了富集. 从短程硝化启动初期到短程硝化稳定运行102 d, AOB的相对数量从3.5%逐渐上升到8.5%, 而对应的NO₂-N相对数量从3.1%下降至0.5%以下. 利用好氧曝气时间实时控制实现短程硝化是一种面向种群优化的控制方法, 有利于短程硝化系统长期稳定的运行.

关键词: 短程硝化; 氨氧化菌; 荧光原位杂交; 扫描电镜; 种群优化; 实时控制

中图分类号: X703.1 文献标志码: A 文章编号: 0367-6234(2010)08-1259-05

Assessment of partial nitrification achieved by real-time aeration duration control through microbial population shift using FISH and SEM

GUO Jian-hua¹, WANG Shu-ying², ZHENG Ya-nan², PENG Yong-zhen^{1,2}, LIU Yang³, SUN Zhi-rong²

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, pyz@bjut.edu.cn; 2. Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environmental Recovery Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 3. China Water Holdings Pte. Ltd., Beijing 100020, China)

Abstract: The shift of nitrifier population within a partial nitrification reactor was investigated using fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) techniques and the floc morphology was observed using scan electron microscope (SEM). Partial nitrification to nitrite was achieved quickly by using real-time aeration duration control when domestic wastewater was treated in a lab-scale sequencing batch reactor (SBR). The average nitrite accumulation ratio was above 93%. The morphology photographs observed using SEM indicated that the sludge showed a shift towards spherical and small rod-shaped clusters from the diverse morphology. FISH analysis showed that ammonia-oxidizing bacteria (AOB) gradually out-competed nitrite-oxidizing bacteria (NOB). AOB population percentage increased from 3.5% (during the start-up period) to 8.5% (after achieving nitrification for 102 days), while NOB population percentage decreased from 3.1% to less than 0.5%. Accordingly, the long-term operation with the use of real-time aeration duration control was not only favorable for AOB community optimisation, but also for the achievement of partial nitrification in practice.

Key words: partial nitrification; ammonia-oxidizing bacteria (AOB); fluorescence *in-situ* hybridization (FISH); scan electron microscope (SEM); microbial population optimization; real-time control

收稿日期: 2008-12-21.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2006AA06Z319); 国家自然科学基金资助项目(50778005); 城市水资源与水环境国家重点实验室开放基金项目(QAK200802).

作者简介: 郭建华(1981—), 男, 博士研究生;

彭永臻(1949—), 男, 教授, 博士生导师.

短程脱氮相对于全程脱氮, 硝化阶段可节约25%的曝气量, 反硝化阶段可减少40%的有机碳源, 同时具有较高的反硝化速率和污泥产率低等优点, 被认为是一种可持续的污水脱氮

新技术^[1-5]. 实现稳定短程脱氮关键在于如何防止好氧阶段 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 向 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的进一步转化, 而长期稳定维持短程脱氮取决于是否能实现氨氧化菌(AOB)的富集和亚硝酸氧化菌(NO_B)的淘洗.

目前国内外对短程脱氮的实现及运行参数对亚硝化积累率的影响进行了较多的研究^[5], 但对于 AOB 和 NOB 两大菌群的相互竞争关系和种群之间的动态演变研究较少. 此外, 目前建立的污水处理控制系统大多数面向的是各种污水物化指标的达标, 并未考虑控制操作对系统中的微生物种群和微生物特性的影响. 建立的控制系统也只能在短期内对工艺的优化运行起到作用, 而且很少考虑到各种微生物之间的种群优化^[6]. 因此如何通过污水处理系统的处理性能和内部微生物种群结构演变的考察, 建立二者之间的关系, 对于新技术在实际中的成功应用和长期稳定运行至关重要. 扫描电镜(SEM)虽然不能对微生物种群进行直接定性, 但可对系统内微生物形态特征的变化进行直观的评价. 此外借助于荧光原位杂交技术(FISH)等分子生物学手段, 可不依赖于传统的纯种分离便能对目标菌群进行定性或定量分析. 因此, 本研究采用实际的生活污水, 通过好氧曝气时间的实时控制实现短程硝化, 并借助 FISH 和 SEM 等手段对系统内微生物种群结构的演变和形态特征的变化进行考察, 力求为建立面向种群

优化的过程控制系统和污水生物短程脱氮的推广应用奠定微生物学基础.

1 材料和方法

1.1 反应器装置

序批式反应器(SBR)由有机玻璃制成, 上部为圆柱形, 底部呈圆锥体, 高 450 mm, 直径 200 mm, 有效容积 10 L. 反应器内设粘砂块作为微孔曝气器, 采用鼓风曝气, 转子流量计调节曝气量; 反应器内温度随室温变化而变化; 用 Multi 340i 型便携式多功能 pH 值、溶解氧(DO)、氧化还原电位(ORP)测定仪在线测定反应过程中的 pH 值、DO 含量和 ORP 值. 反应器每周期进水 5 L, 排水 5 L. 每个周期时间为 4 ~ 6 h, 包括瞬时进水、好氧反应、沉淀 30 min、排水 10 min. 好氧反应时间通过实时控制来分配, 好氧段 DO 含量平均值为 3 mg/L. 反应器内平均污泥含量(MLSS)维持在 2 600 mg/L 左右.

1.2 进水水质和污泥

采用实际的生活污水, 每天从某家属区化粪池抽取生活污水到贮水箱. 进水水质指标如表 1 所示. SBR 接种的污泥来自本实验室运行的 A/O 小试反应器, 该反应器虽然长期在低 DO 含量下运行, 但属于全程硝化, 出水硝化产物以 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 为主, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 基本检测不到.

表 1 试验水质参数

pH	COD 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\text{NO}_2^- - \text{N}$ 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\text{NO}_3^- - \text{N}$ 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	TN 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	碱度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
7.0 ~ 7.8	160 ~ 320	40 ~ 80	0.04 ~ 0.26	0.12 ~ 1.08	50 ~ 100	280 ~ 400

1.3 常规分析方法

COD 采用重铬酸钾法测定, $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 采用 $\text{N} - (1 - \text{萘基}) - \text{乙二胺}$ 光度法测定, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 采用麝香草酚分光光度法测定, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 采用纳氏试剂光度法测定, MLSS 采用滤纸重量法测定.

1.4 扫描电镜

为考察微生物种群形态的变化, 在不同阶段对系统中活性污泥取样进行了扫描电镜观察, 具体步骤如下. 1) 固定, 于污泥样品内加入戊二醛固定并置于 4 °C 冰箱中固定 1.5 h; 2) 冲洗, 用磷酸缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min; 3) 脱水, 依次使用 50%、70%、80%、90% 的乙醇进行脱水, 每次 15 min; 100% 的乙醇脱水 3 次, 每次 15 min; 4) 置换, 体积比为 1:1 的 100% 乙醇和乙酸异戊酯, 纯

乙酸异戊酯各一次, 每次 15 min; 5) 对样品进行干燥; 6) 镀膜, 用 IB25 (Giko) 型离子溅射镀膜仪在样品表面镀上一层 1 500 nm 厚的金属膜(金或铂); 7) 粘样, 将样品观察面向上粘贴在扫描电镜样品台上; 8) 采用 FEI QUANTA200 扫描电镜仪对样品进行观察拍照, 对每个污泥样随机拍摄 20 ~ 25 张照.

1.5 分子荧光原位杂交技术

按照 Amann 的操作方法进行 FISH 分析^[7]. 固定和杂交的具体步骤见文献 [4 8], 所采用的寡核苷酸探针列于表 2. 采用 OLYMPUS BX-52 荧光显微镜对每个污泥样品随机拍摄 30 ~ 40 张照片, 之后用 Image plus-pro 6.0 软件对种群数量进行定量分析.

表 2 分子荧光原位杂交分析中采用的寡核苷酸探针

探针	甲酰胺体积浓度	荧光标记	检测目标
EUB _{mix}	—	FITC	几乎全部 <i>Eubacteria</i>
NSO190	50%	Cy3	β - <i>Proteobacteria</i> AOB
NIT3	40%	Cy3	<i>Nitro bacter</i>
Ntspa662	35%	Cy3	<i>Nitrospira</i>

注: EUB_{mix} 由 EUB338、EUB338 II 和 EUB338 III 按体积比 1:1:1 配成, 其甲酰胺体积浓度不受限制, 可遵循与其混合的另一种目标探针的甲酰胺体积浓度。

2 结果和讨论

2.1 利用实时控制实现短程硝化

如何快速实现短程硝化是今后推广应用短程硝化反硝化技术首先需要解决的问题。通过前期的研究^[3-5,9]在氨氧化过程中 pH 值会随着氨氮的降低而下降, 当氨氧化结束时 pH 曲线上通常出现一谷点, 因此通过在线检测 pH 曲线上的特征点“氨谷”可指示氨氧化过程的结束。此外, 好氧曝气时间的长短与亚硝酸积累率密切相关, 通过实时控制分配曝气时间, 当氨氧化过程完成后及时停止曝气, 可防止 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 向 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的进一步转化, 反应器可以在运行一段时间后启动短程硝化。而且由于及时停止曝气, 每个周期 AOB 获得的能量多于 NOB 获得的能量, 加之 AOB 相对 NOB 具有较大的产率系数, 故长时间运行结果可选择性地积累 AOB 而淘洗掉 NOB。

本试验在 SBR 反应器运行初期, 借助文献 [9] 建立的实时控制策略, 通过检测 pH 曲线上的“氨谷”来实时分配每个周期的好氧曝气时间。经 30 d 的培养, 亚硝化积累率 (Nitrite accumulation ratio, NAR; $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 质量浓度 / $\text{NO}_x^- - \text{N}$ 质量浓度, %) 便从接种初期的 20% 上升至 90%。图 1 给出了短程快速启动后进出水 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, 及出水 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 浓度, 以及亚硝化积累率 NAR 的变化曲线。由于采用实际的生活污水, 每周进水水质略有差别, 进水 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 质量浓度在 40 mg/L 到 80 mg/L 之间波动, 但通过在线检测“氨谷”, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 基本降解完全, 出水 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 质量浓度在短程启动后初期在 5 mg/L 左右波动, 经长期运行后 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 质量浓度低于 1 mg/L。对应地, NAR 启动初期维持在 85% 左右, 之后上升并稳定维持在 95% 左右。图 1 中有几个周期出水 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 质量浓度较高, 这主要在这几个周期未在线检测“氨谷”, 而人为提前停止曝气导致硝化不完全。

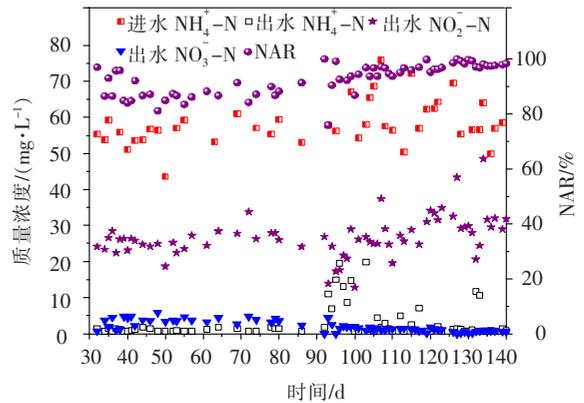


图 1 进出水氮质量浓度和亚硝化积累率

2.2 利用 SEM 观测污泥种群结构形态的变化

硝化过程分别由两类化能自养微生物完成, AOB 进行氨的氧化, NOB 完成亚硝酸氧化, AOB 和 NOB 统称为硝化细菌。据伯杰氏细菌鉴定手册^[10], AOB 主要包括亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属 (*Nitrospira*)、亚硝化球菌属 (*Nitrosococcus*)、亚硝化叶菌属 (*Nitrosolobus*) 和亚硝化弧菌属 (*Nitrosovibrio*)。NOB 主要有硝化杆菌属 (*Nitrobacter*)、硝化刺菌属 (*Nitrospina*)、硝化球菌属 (*Nitrococcus*)、硝化螺菌属 (*Nitrospira*)^[10-11]。AOB 和 NOB 形态多样, 包括球形、杆状、螺旋形等, 一般很难通过形态来区分和鉴定 AOB 和 NOB 的种属。但在污水处理厂经常出现的 AOB 主要是亚硝化单胞菌属和亚硝化球菌属, 形态分别呈短杆状或球状, 经常出现的 NOB 主要是硝化螺菌属和硝化杆菌属, 形态分别呈螺旋状和杆状。

为考察应用实时控制后, 硝化污泥形态的变化过程, 在试验期间定期从反应器中污泥取泥, 对不同阶段活性污泥絮体内的细菌 SEM 观察。图 2 为接种硝化污泥中细菌的形态特征, 可看出其接种污泥中细菌的形态多样, 有长杆菌、短杆菌, 也有球菌和丝状菌。图 3 为污泥经过 120 d 稳定运

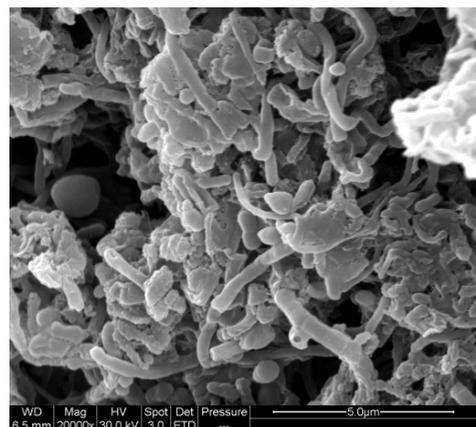


图 2 接种污泥的形态特征

行,亚硝化率达到 95% 以上时污泥中细菌的形态特征.在整个视野范围内,短程硝化污泥中的细菌绝大多数是形状规则的短杆菌.图 4 是短程硝化污泥经过 135 d 稳定运行的电镜图片,随机选取的视野内大部分是排列紧凑的短杆菌.



图 3 120 d 时污泥的电镜图片

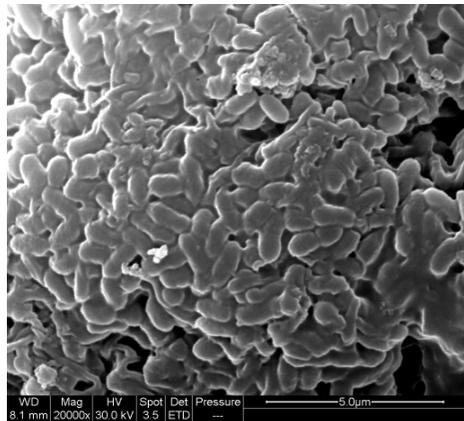


图 4 135 d 时污泥的电镜图片

比较图 2、图 3、图 4,在实时控制下,短程硝化实现和维持的过程中,污泥形态从起初的长杆、短杆、球菌等多形态菌种共存逐渐向短杆状转变,可以推测经过长期的稳定运行后,硝化污泥种群结构发生了变化. Sinha 和 Annachhatre^[2]用 SEM 对连续流系统中实现短程前后的污泥形态观察表明,接种污泥中含有长杆、短杆和球菌以及丝状菌,而随着反应器的运行,污泥形态呈现出了向短杆状、球状迁移的态势,试验结果与本试验基本类似.

2.3 污泥种群变迁的 FISH 半定量研究

从反应器的长期运行效果间接推断,实时控制曝气时间有利于 AOB 的富集和 NOB 的淘洗,SEM 观察的结果也进一步间接说明污泥种群结构发生了变化,但二者都不能直接反映 AOB 和 NOB 数量的变化.为从微观层面对种群演变进行定量考察,本研究采用了 FISH 技术.FISH 技术是根据特定微生物类群的特异性序列设计专一性的探

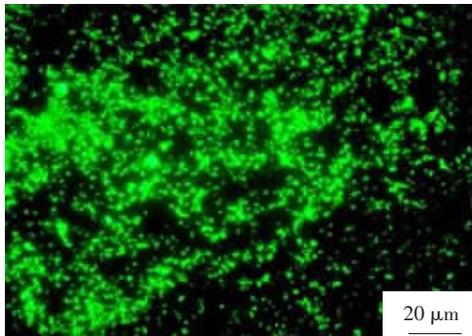
针,利用该探针与固定的组织或细胞中特定的核苷酸序列进行杂交,并用共聚焦激光扫描显微镜或常规荧光显微镜对所标记的细胞进行观察和计数的一种新型微生物分析技术^[7].FISH 技术特异性和灵敏度极高,在分析环境样品中硝化细菌的分布和变迁具有传统方法不可比拟的优势.

对接种污泥进行的 FISH 试验结果表明,接种污泥中大部分为异养菌,而 AOB 和 NOB 的相对数量分别为 $3.5\% \pm 0.5\%$ 和 $3.1\% \pm 0.7\%$.在实时控制下随着反应器运行时间的延长,反应器内 AOB 得到了富集,而 NOB 逐渐被淘洗,AOB 相对于 NOB 已成为明显的优势硝化菌群.反应器中 NOB 以 *Nitrospira* 为主,而 *Nitrobacter* 很少,只在接种污泥中有检出.不同时期取样进行 FISH 检测后的结果如表 3 所示.

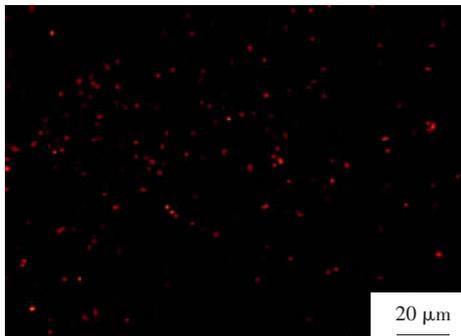
经 102 d 的运行后,AOB 的相对数量逐渐上升到 $8.5\% \pm 1.4\%$,而此时对应的 NOB 相对数量下降至 0.5% 以下.图 5 给出了 102 d 时系统内 AOB 的典型 FISH 图片:图 5(a) 是用 EUBmix 杂交后的全菌,图 5(b) 是与图 5(a) 对应的同一视野下与探针 NSO190 杂交的 AOB.而用探针 Nstpa662 和 Nit3 杂交 NOB,很难检出荧光亮点.可见,在利用实时控制实现和维持短程硝化的过程中,硝化菌群结构发生了变化.由于及时停止曝气,防止了 NOB 将 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 全部转化 $\text{NO}_3^- - \text{N}$,NOB 未能获得足够的能量来进行生长繁殖.随着运行的延续,NOB 的数量将会越来越少,而 AOB 在竞争中的优势地位越来越大,最终导致了 AOB 成为系统中的优势硝化菌,而 NOB 逐渐从系统中淘洗出去.曾薇等人^[8]采用 FISH 技术对 SBR 大型中试反应器、UASB - A/O 小型反应器、A/O 中试反应器和 SBR 小型反应器 4 种污水短程生物脱氮系统的 AOB 与 NOB 进行了初步定量分析,试验同样发现在 4 种短程脱氮系统中,AOB 相对 NOB 已成为明显的优势硝化菌群,但不同反应器中 AOB 的相对数量略有不同.Sinha 和 Annachhatre^[2]用 FISH 对连续流系统中实现短程前后的污泥进行 FISH 跟踪研究发现,同样地随着短程硝化的维持,AOB 同样得到了富集,AOB 从接种污泥的 2% ~ 3% 上升至 48% ~ 53%,但相应的 NOB 上升至 6% ~ 8%.可见,运行条件和控制策略对污泥种群结构具有明显的影响,其直接影响着存在竞争关系的种群之间的此消彼长.而本研究采用的曝气时间实时控制在实现短程硝化的过程中逐渐富集了 AOB 而淘洗掉了 NOB,是一种面向种群优化的控制方法,因此有利于短程硝化系统长期稳定的运行.

表 3 实时控制下硝化菌群结构的变化

取样时间/d	AOB 相对数量/% (NSO190 探针)	NOB 相对数量/%	
		<i>Nitrospira</i> (Nstpa662 探针)	<i>Nitrobacter</i> (NIT3 探针)
0 (接种污泥)	3.5 ± 0.5	2.4 ± 0.4	0.7 ± 0.3
72	4.9 ± 0.7	1.3 ± 0.4	未检出
102	8.5 ± 1.4	< 0.5	未检出
135	8.3 ± 1.1	未检出	未检出



(a) EUBmix, 染料 FITC



(b) NSO190, 染料 Cy3

图 5 短程稳定运行 102 d 时反应器中的 AOB 分布

3 结 论

1) 通过实时控制曝气时间而及时停止曝气, 处理生活污水的 SBR 反应器快速启动了短程硝化, 短程硝化维持期间亚硝化积累率在 93% 左右。

2) 借助 SEM 发现接种污泥形态多样, 含长杆、短杆及球状菌, 而随着运行的延续, 污泥呈现了向短杆状、球状变迁的态势。

3) FISH 分析结果表明, 实时控制下反应器内 AOB 相对 NOB 逐渐成为了优势硝化菌。从短程硝化启动初期到短程硝化稳定运行 102 d, AOB 的相对数量从 3.5% ± 0.5% 逐渐上升到 8.5% ± 1.4%, 而对应的 NOB 相对数量从 3.1% ± 0.7% 下降至 0.5% 以下。

4) 利用好氧曝气时间实时控制实现短程硝化是一种面向种群优化的控制方法, 有利于短程硝化系统长期稳定的运行。

参考文献:

[1] TURK O, MAVINIC D S. Benefits of using selective-inhi-

bition to removal nitrogen from highly nitrogenous wastes [J]. *Environ Technol Lett* 1987, 8: 419 - 426.

[2] TURK O, MAVINIC D S. Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia [J]. *Water Res* 1989, 23: 1383 - 1383.

[3] GUO J H, PENG Y Z, WANG S Y, et al. Long-term effect of dissolved oxygen on partial nitrification performance and microbial community structure [J]. *Bioresour Technol* 2009, 100(11): 2796 - 2802.

[4] GUO J H, PENG Y Z, WANG S Y, et al. Effective and robust partial nitrification to nitrite by real-time aeration duration control in an SBR treating domestic wastewater [J]. *Process Biochem* 2009, 44(9): 979 - 985.

[5] ZHU G B, PENG Y Z, LI B K, et al. Biological removal of nitrogen from wastewater [J]. *Rev Environ Contam Toxicol* 2008, 192: 159 - 195.

[6] YUAN Z G, BLACKALL L L. Sludge population optimisation, a new dimension for the control of biological wastewater treatment systems [J]. *Water Res* 2002, 36(2): 482 - 490

[7] AMANN R I, KRUMHOLZ L, STAHL D A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology [J]. *J Bacteriol* 1990, 172: 762 - 770.

[8] 曾薇, 杨庆, 张树军, 等. 采用 FISH、DGGE 和 Cloning 对短程脱氮系统中硝化菌群的比较分析 [J]. *环境科学学报*, 2006, 26(5): 734 - 739.

[9] YANG Q, PENG Y Z, LIU X H, et al. Nitrogen removal via nitrite from municipal wastewater at low temperatures using real-time control to optimize nitrifying communities [J]. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(23): 8159 - 8164.

[10] HOLT J G, KRIEG N R, SNEATH P H A, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology* [M]. 9th Ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1994. 447 - 450.

[11] 刘志培, 刘双江. 硝化作用微生物的分子生物学研究进展 [J]. *应用与环境生物学报* 2004, 10(4): 521 - 525.

[12] SINHA B, ANNACHHATRE A P. Assessment of partial nitrification reactor performance through microbial population shift using quinone profile, FISH and SEM [J]. *Bioresour Technol*, 2007, 98(18): 3602 - 3610.

(编辑 魏希柱)