不同 DO 下 MBR 内微生物群落结构与运行效果关系

高大文^{*},李昕芯,安 瑞,付 源,任南琪 (哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室,黑龙江 哈尔 滨 150090)

摘要:应用 A/O-MBR 处理实际生活污水,考察了不同溶解氧(DO)条件下,微生物群落结构与其处理效果的对应关系.结果表明,DO 浓度在 0.2~4.0mg/L 对 COD 去除效果无明显影响,COD 平均去除率均在 90%以上.DO 浓度变化对 NH4⁺-N 去除影响较大,DO 浓度下降到 0.2mg/L 时,NH4⁺-N 平均去除率由 99%下降到 65%.通过 PCR-DGGE 分析,较高 DO 条件下(4.0,2.0mg/L)的总细菌微生物群落多样性高于较低 DO 条件(0.5,0.2mg/L),但其群落结构变化与与反应器的处理效果对应关系不明显;氨氧化菌的群落结构变化较明显,且在不同的 DO 条件下起 主要作用的氨氧化菌的菌属不同,其群落变化与反应器的 NH4⁺-N 去除效果相对应,DO 为 2.0,0.5mg/L 时氨氧化菌群落结构比较相似,此时 反应系统的脱氮效果也比较好.

关键词:膜生物反应器;溶解氧; PCR-DGGE; 微生物群落结构; 氨氧化菌 中图分类号:X703.1 文献标识码:A 文章编号:1000-6923(2010)02-0209-07

Relationships between microbial community structure and the performance of MBR under different dissolved oxygen. GAO Da-wen^{*}, LI Xin-xin, AN Rui, FU Yuan, REN Nan-qi (1.State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China). *China Environmental Science*, 2010,30(2): 209~215

Abstract: Microbial community structure and nutrient removal performance under different dissolved oxygen were investigated using Anoxic-oxic submerged membrane bioreactor (A/O-MBR) for municipal wastewater treatment. Results showed that the COD removal was not influenced markedly by the variations in DO between 0.2mg/L and 4.0mg/L, and the COD removal was more than 90% during the whole experiment. However, the ammonia nitrogen removal was more sensitive than COD, and the ammonia nitrogen removal dropped from 99% to 65% when DO decreased to 0.2mg/L. The PCR-DGGE analysis showed that the diversity of total bacterial community was abundant when A/O-MBR was run at high DO (4.0mg/L and 2.0mg/L), and the relationships between the total bacterial community structure and the performance of MBR was not very obvious. On the contrary, the ammonia oxidizing bacterial community composition had a more obvious shift with the variation of DO concentration, and the species of ammonia oxidizing bacteria which play major role were different under different DO conditions, which were corresponded to the removal efficiency. The ammonia oxidizing bacterial community composition were similar under the DO concentration of 2.0mg/L and 0.5mg/L, and the nitrogen removal was enhanced.

Key words: membrane bioreactor (MBR); dissolved oxygen; PCR-DGGE; microbial community structure; ammonia oxidizing bacteria

膜生物反应器(MBR)与传统工艺相比,具有 固液分离效果好、反应器内生物量高、污泥产量 低、出水水质好、占地面积小等优点^[1],因此在污 水的净化与处理领域应用广泛.影响 MBR 反应 器运行效率的因素有很多,如污泥浓度、水力停 留时间(HRT)、污泥龄(SRT)、溶解氧(DO)、污 泥负荷等^[2-3].其中 DO 是极其重要的参数.许多 研究^[4-8]表明,将 DO 控制在合适的范围之内,不 仅可以提高整个反应器的效率,而且可以降低能

基金项目:教育部全国优秀博士学位论文专项基金(200544);教育部 新世纪优秀人才资助计划项目(NCET-05-0330);国家自然科学基金 资助项目(50638020)

* 责任作者, 教授, gaodw@hit.edu.cn

收稿日期: 2009-06-04

耗.但从实质上看,微生物是生物法污水处理的主体部分,而目前有关MBR中DO的研究大多数只本研究将结合 PCR-DGGE 技术^[9],对不同 DO 条件下 MBR 处理效果和微生物群落结构进行研究,分析 DO 对 MBR 去除有机物和氨氮效率及其微生物群落结构的影响,探讨 MBR 运行特性与微生物群落结构间的相互关系,从而为 MBR 的设计及应用提供理论及技术依据.

1 材料与方法

1.1 材料

接种污泥取自哈尔滨市文昌污水处理厂.进 水为生活污水,其水质 COD 为 203.9~366.0mg/L, NH₄⁺-N 为 33.24~61.35mg/L,pH 值为 7.28~7.83. **1.2** 反应器装置和运行条件

本研究采用缺氧/好氧工艺(A/O-MBR),缺 氧和好氧反应器的有效体积均为8L.采用日本三 菱公司生产的聚乙烯中空纤维膜,膜孔径为 0.4µm,膜通量 0.27m³/(m²·d),膜丝面积为 0.11m². 装置如图1所示.



图1 反应器装置示意



反应器采用连续进水、间歇出水的方式运行, 膜出水抽吸时间比为 3min/1min.实验中 HRT 控 制为 8h,回流比为 2.5,温度维持在 20~25℃,SRT 为 50 d,反应器初始污泥浓度为 3200mg/L,待污 泥浓度稳定在 5000mg/L 左右时进行排泥.以 DO 为 4mg/L 启动反应器.反应器分别在 DO 为 4.0,2.0, 0.5 和 0.2mg/L 下运行. 1.3 指标测定

每天取水样,对进水和出水水质指标进行分析,检测项目包括温度、DO、COD、NH4⁺-N、NO2⁻-N和NO3⁻-N,均采用标准分析方法^[10].

1.4 反应器微生物群落结构分析

1.4.1 基因组 DNA 的提取 采用小量细菌基 因组提取试剂盒(上海华舜,W6501).

1.4.2 总细菌的 PCR 扩增 采用通用引物 BSF338-GC 和 BSR518 扩增,其反应体系与扩增 条件参考文献[11]中的方法.PCR 反应的产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测.

1.4.3 氨氧化细菌的 PCR 扩增 第一轮扩增采 用氨氧化细菌特异性引物^[12] CTO189f 和 CTO654r 及相应的反应程序.以第一轮 PCR 扩增 产物为模板,采用与总细菌扩增相同的引物进行 第二轮 PCR 扩增,PCR 扩增条件与总细菌的条件 相同.采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测两轮 PCR 产 物,均得到清晰的目标条带.

1.4.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE) 将 PCR 样 品 5μL 和 10 倍加样缓冲液混合,采用 Bio-rad 突 变检测系统,用 8%的聚丙烯酰胺凝胶,变性剂浓 度为 30~60%,在 200V 的电压下,60℃电泳 4h.结 束后,将凝胶进行银染,获得 DGGE 指纹图谱.

1.4.5 目的条带的克隆与测序 挑取 DGGE 图 谱中的目的条带溶于 30μL 的 ddH₂O 中,4℃下静 置过夜,以此为模板,以 BSF338 和 BSR518 为引 物进行 PCR 扩增,其扩增程序同 1.4.2.PCR 产物 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测并切胶回收,应用上 海华舜胶回收试剂盒.回收后产物与 PMD19-T 载体连接,进行转化克隆,最后测序.

1.5 DGGE 图谱及多样性分析

微生物多样性指数采用 Shannon 指数(H)表示, $H=-\Sigma P_i$ lg P_i ,其中条带强度是通过 Quantity One 软件分析后得到的波峰面积表示,即 $P_i=n_i/N$, 其中, n_i 为峰面积;N为所有峰的总面积.

同时对得到的 DGGE 图谱进行 UPGMA 聚 类分析,根据不同 DO 条件下的条带分布相似度 构建系统进化树.

1.6 序列分析

将测序结果进行处理后提交到 GenBank 数

据库,采用 BLAST 进行目标序列和基因库中所 含序列的相似性分析,得到同源性最近的序列,并 应用 MEGA 软件建立进化树.

2 结果与讨论

2.1 DO对反应器处理效果的影响

2.1.1 DO对 COD 去除效果的影响 反应器在 DO为4.0,2.0,0.5和0.2mg/L下运行,由于采用生 活污水,膜出水 COD为11.1~47.7mg/L,在4个 DO 浓度条件下,COD 的平均去除率分别为90.42%、90.82%、91.39%和91.76%(图2).





由此可见,当DO浓度降低时,COD去除效果 未发生明显变化,说明在 MBR 中 DO 的变化对 COD 的去除影响并不显著.

2.1.2 DO对NH4⁺-N去除效果的影响 由于进水 是生活污水,进水 NO3⁻-N 和 NO2⁻-N 含量很低,可 忽略不计.在缺氧段, NO2⁻-N 和 NO3⁻-N 积累很少, 反应器中的氮素主要为NH4⁺-N.由图3可见,在 DO 为4.0,2.0和0.5mg/L条件下的稳定运行期,NH4⁺-N 去除率>99%;当 DO 继续降低时,NH4⁺-N 去除效果 出现了较大波动,DO 浓度下降到 0.2mg/L 时,其平 均去除率由 99%下降到 65%.

在 DO 为 4.0mg/L 时,缺氧区的 NH4⁺-N 在好 氧 MBR 中都转化为 NO3⁻-N;而当 DO 降低时, 缺氧区的 NH4⁺-N 浓度比好氧出水的 NO3⁻-N 浓 度高,说明 DO 浓度降低使反应系统的反硝化作 用增强.DO 浓度为 4.0,2.0,0.5 和 0.2mg/L 时,总氮 的去除率分别为 67.39%、77.00%、80.92%和 56.73%,此结果说明 DO 浓度为 2.0,0.5mg/L 时反 应系统的氮素脱除效果较好.其原因为好氧段 DO 浓度高(4mg/L)时易造成缺氧段氧化还原电 位升高,从而抑制反硝化细菌的反硝化活性,使得 总氮去除率降低^[13].

比较 MBR 中有机物和 NH4⁺-N 的去除效果 可以得出,当 DO 浓度减少时,有机物仍可得到有 效去除,而 NH4⁺-N 去除率却明显降低.其原因是 反应系统内的主要异养菌受 DO 影响较小^[14],因 此 DO 的变化对 COD 的去除效果影响不明显. 而硝化细菌对氧需求较高^[15],过低的 DO 使得硝 化细菌受到了抑制,从而使反应器去除 NH4⁺-N 的效率下降.





a、b、c、d 表示 DO 浓度分别为 4.0,2.0,0.5,0.2mg/L 时 系统的运行状态

-■- 进水 NH4 ⁺ -N -●- 缺氧 NH4 ⁺ -N -	◆ 出水 NO2 - N
— → 出水 NH4 ⁺ -N → 出水 NO3 ⁻ -N	→→ 去除率

2.2 DO对反应器内微生物群落结构的影响 2.2.1 不同 DO 条件下总细菌群落结构的比较 总细菌的 DGGE 图谱如图 4(a)所示,微生物 群落结构随 DO 浓度的变化有所不同,与原泥相 比较,有部分条带随 DO 变化逐渐消失或减弱, 比较明显的有条带 3,5,6,7,8,12,18,21,26,29.说 明这部分条带所代表的细菌对反应系统的环境 适应性降低,转变为非优势种群而不在反应器

共有的条带,如条带 2,4,15,16,17,19,22,36 等. 但 是一些微生物(条带 10,11,13,20,27,33,35)在反 应器运行过程始终存在,且其在总细菌群落结 构中处于优势地位.



图 4 不同 DO 条件下总细菌和氨氧化细菌 DGGE 图谱 Fig.4 DGGE profile of total and ammonia-oxidizing bacteria under different DO concentration A 原泥 B: 4.0mg/L C: 2.0mg/L D: 0.5mg/L E: 0.2mg/L

将图 4(a)中的主要条带进行克隆测序后,在 GenBank 中比对,获得各条带的同源性信息,并构 建其系统发育树(图 5).其结果表明,MBR 中微生 物群落的主要优势种群分布于不同的纲或属,且 进化距离较大.而且实验中分离到的很多菌种为 未鉴定及培养菌种,其所属的具体种属和功能还 不是很清楚,这也与张斌等^[16]的研究结果相符. 同时还发现有些在图谱中处于不同位置的条带, 其序列比对结果相似,进化距离也较近,这些条带 代表的细菌可能属于相同菌属,且有相同功能.在 MBR 中以变形菌门的细菌种类多一些,包括 ß 变 形亚纲和δ变形亚纲,且以β变形亚纲为主,在其他研究^[16-18]中也出现过类似结果,说明这些菌群 对污染物去除起主要作用.条带 19,20,35 遗传距

离较近,都属于红环菌科(*Rhodocyclaceae*), 且在4个条件下均存在,在污水处理的生物降解 中起主要作用;条带 9,36 均为从毛单胞菌科 (*Comamonadaceae*),在 DO 为 4.0 和 2.0mg/L 下 较明显;条带 22,33 均为硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*)^[19],将亚硝酸盐氧化为硝酸盐;条带 14,24 在低 DO 为 0.2mg/L 时较明显,文献中提到 其可能与反硝化作用有关^[20-21].



Fig.5 Phylogenetic tree of total bacteria

2.2.2 不同条件下氨氧化细菌群落结构的比较 硝 化作用是废水处理系统中实现 NH4⁺-N 去除的 主要过程.氨氧化细菌在硝化作用中负责将氨氧 化为亚硝酸盐,实现亚硝化作用,是硝化过程中必 不可少的步骤^[22].但氨氧化细菌的生长速率低, 生物量很少,且 Muyzer^[23]的研究表明,只有在整 个群落细菌数量约 1%或以上的类群能够通过 DGGE 检测到,所以应用 16S 通用引物扩增的 DGGE 条带并不能很好的反应其群落变化.而应 用特异性引物进行 Nested PCR DGGE,可更全面 的分析氨氧化细菌的群落结构.

如图 4(b)所示,随着 DO 不断降低,氨氧化菌的

群落结构也发生了变化,且在不同 DO 条件下氨氧 化菌群落中的优势菌群不同.将氨氧化细菌的主要 条带进行克隆测序,构建其发育树见图 6.由图 6 可 知,MBR 中存在几种不同种属的氨氧化细菌,除了 条带 4,8,10 为未鉴定的菌,反应系统中存在的氨氧 化细菌主要为 β-变形亚纲中的亚硝化单胞菌属 (*Nitrosomonas*)和亚硝化螺旋菌属(*Nitrosospira*).并 且在不同的 DO 条件下起主要作用的氨氧化菌属 不同,在 DO 为 4.0mg/L 条件下主要为 *Nitrosospira* sp.,在 DO 为 2.0mg/L 和 0.5mg/L 时,主要为 *Nitrosomonas* sp.,而在 DO 为 0.2mg/L 时其微生物 主要为未培养菌属,明显亚硝化菌属的条带减弱.





2.3 MBR 的微生物群落结构与其处理效果的 对应关系

根据总细菌和氨氧化细菌的 DGGE 图谱(图 4),进行 MBR 的微生物群落多样性指数计算和聚 类分析.不同条件下的 Shannon 指数如图 7 所示.在 DO为4.0mg/L和2.0mg/L下,总细菌微生物群落的 多样性要略高于 DO在 0.5 和 0.2mg/L 的两个条件. 根据 DGGE 条带的同源性进行聚类分析[图 8(a)], 将不同条件下的 5 个样品分为 3 个独立的群,DO 浓度在 4.0,2.0mg/L 时微生物群落结构比较相似, 较低 DO 条件下(0.5,0.2mg/L)微生物群落结构较相 似,但与原泥相比较,其微生物群落结构均发生较 大变化.这些结果都说明在较高 DO 的条件下微生 物群落的多样性比低 DO 条件下更加丰富.





A: 原泥 B: 4.0mg/L C: 2.0mg/L D: 0.5mg/L E: 0.2mg/L

在总细菌的群落结构分析中,有部分微生物随 DO 的降低发生变化,但反应器的 COD 去除率并未 发生明显变化,这表明微生物的群落结构变化与反 应器的处理效果对应关系不明显,不同 DO 下的微 生物群落结构变化并未影响系统对有机物的去除. 分析其原因可能为大多数微生物属于异养型^[24],所 以不同 DO 条件下异养菌均在总细菌群落中占优 势地位,DO 的变化对 COD 去除影响较小.

氨氧化菌的多样性分析表明原泥中的氨氧 化细菌较少,随着反应器运行,其多样性增加,说 明氨氧化细菌适于在 MBR 反应系统中生长.另 外,在 4.0mg/L DO 下氨氧化细菌的群落表现出 更丰富的多样性.聚类分析的结果图 8(b)显示 DO 为 2.0,0.5mg/L 时氨氧化细菌的群落结构最 相似,说明 DO 在 0.5~2.0mg/L 变化时对 MBR 中 的氨氧化细菌的菌群分布影响不大,同时反应器 在 DO 为 2.0mg/L 和 0.5mg/L 时系统的 NH4⁺-N 和总氮脱除率均较高.



图 8 DGGE 图谱 UPGMA 聚类分析 Fig.8 Cluster analysis of DGGE by UPGMA A:原泥 B: 4.0 mg/L C: 2.0 mg/L D: 0.5mg/L E: 0.2 mg/L

3 结论

3.1 应用 A/O-MBR 处理实际生活污水,DO 浓度在 0.2~4.0mg/L 变化对 COD 去除效果影响不 大,但是对 NH₄⁺-N 去除影响较大.当 DO 下降到 0.2mg/L 及以下时,NH₄⁺-N 平均去除率下降明 显;DO 浓度在 0.5~2.0mg/L 时系统对 NH₄⁺-N 和 总氮的脱除效果均较好.

3.2 DGGE 及测序结果表明,在 4.0,2.0mg/L DO 下,微生物群落的多样性要高于 0.5,0.2mg/L 时的 多样性;DO 对氨氧化细菌群落变化影响较大,在 不同条件下起主要作用的氨氧化菌属不同,但 DO 在 0.5~2.0mg/L 变化时 MBR 中的氨氧化细 菌的菌群分布具有较高相似性.

3.3 反应系统中总细菌的微生物群落结构变化 与反应器的处理效果对应关系不明显,在不同 DO 下微生物菌群结构发生的变化对有机物去除影响较小;但对氨氧化细菌的微生物群落结构分析显示,其氨氧化细菌的变化与反应器的NH4⁺-N去除效果相对应.

参考文献:

- Zheng X, Zhu X L, Zhang S Y, et al. Study and application of membrane bioreactor in the water treatment [J]. Techniques and Equipment for Environment Pollution Control, 2000,1(5):12–20.
- [2] 张小华,何翠彦,李 璟,等.膜生物反应器处理废水的影响因素[J]. 水处理技术, 2008,34(11):7-13.
- [3] Judd S. The status of membrane bioreactor technology [J]. Trends in Biotechnology, 2008,26(2):109–116.
- [4] 顾 平,罗 红,杨造燕,等.中空膜生物床处理生活污水的中试研究 [J]. 中国给水排水, 2000,16(3):5-8.
- [5] Gander M. Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review with cost considerations [J]. Separation and purification Technology, 2000,20(18):119–130.
- [6] 刘志华,陈建中.溶解氧对膜生物反应器硝化反硝化的影响 [J]. 水处理技术, 2007,33(2):21-23.
- [7] Yun M A, Yeon K M, Park J S, et al. Characterization of biofilm structure and its effect on membrane permeability in MBR for dye wastewater treatment [J]. Water Research, 2006,40(1):45–52.
- [8] Kim H Y, Yeon K M, Lee C H, et al. Biofilm Structure and Extracellular Polymeric Substances in Low and High Dissolved Oxygen Membrane Bioreactors [J]. Separation Science and Technology, 2006,41(7):1213–1230.
- [9] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gelelectrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1993,59:695–700.
- [10] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会.水和废水监测分析方法 [M]. 北京:中国环境科学出版社, 1989.
- [11] Ovreas L, Forney L, Daae F L, et al . Distribution of bacterioplankton inmeromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997,63(8):3367–3373.
- [12] Kowalchuk G A, Bodelier P L E, Heilig G H J, et al. Community analysis of ammonium-oxidizing bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridization [J]. FEMS Microbiol. Ecol., 1998,24:339–350.
- [13] 辛明秀,赵 颖,周 军,等.反硝化细菌在污水脱氮中的作用[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4):773-776.
- [14] 杨宗政,顾 平,张晓霞.MBR 的 DO 分布及其对污染物去除的

影响 [J]. 中国给水排水, 2004, 20(8):54-57.

- [15] 陈欣燕,程晓如,陈忠正.从微生物学探讨生物除磷脱氮原理 [J]. 中国给水排水, 1996,12(5):32-33.
- [16] 张 斌,孙宝盛,季 民,等.MBR 中微生物群落结构的演变与分析 [J]. 环境科学学报, 2008,28(11):2192-2199.
- [17] 张 斌,孙宝盛,刘慧娜,等.处理不同废水 MBR 系统中微生物 群落结构的比较 [J]. 环境科学, 2008,29(10):5491-5496.
- [18] Huang L N, Wever H D, Diels L. Diverse and distinct bacterial communities induced biofilm fouling in membrane bioreactors operated under different conditions [J]. Environ. Sci. Technol., 2008,42(22):8360–8366.
- [19] Park H D, Noguera D R. Nitrospira community composition in chemostat reactors operated with two different dissolved oxygen levels [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(8):1470-1474.
- [20] Maestre J P, Rovira R, Gamisans X, et al. Characterization of the bacterial community in a biotrickling filter treating high loads of H(2)S by molecular biology tools [J]. Water Sci. Technol., 2009,59(7):1331–1337.
- [21] Osaka T, Ebie Y, Tsuneda S, et al. Identification of the bacterial community involved in methane-dependent denitrification in activated sludge using DNA stable-isotope probing [J]. FEMS Microbiol. Ecol., 2008,64(3):494–506.
- [22] Limpiyakorn T, Kurisu F, Yagi O. Development and application of real-time PCR for quantification of specific ammoniaoxidizing bacteria in activated sludge of sewage treatment systems [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5):1004–1013.
- [23] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems [J]. Current Opinionin Microbiology, 1999, 2(3):317-322.
- [24] 任南琪,马 放,杨基先,等.污染控制微生物学 [M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社, 2002.

作者简介: 高大文(1967-),男,黑龙江佳木斯市人,教授,博士,主要 从事环境微生物技术和水污染控制研究.发表论文 70 余篇.