

膜生物反应器与传统活性污泥反应器内生物群落特征

欧阳科, 刘俊新*

(中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要: 采用膜生物反应器(MBR)和传统活性污泥法(CAS)2种反应器处理相同的生活污水, 考察了MBR和CAS的运行和生物群落结构及其动态变化。结果表明, MBR对COD和氨氮的去除效率均比CAS高, MBR和CAS出水COD的平均值分别为39.6 mg/L和62.9 mg/L, 出水氨氮的平均值分别为6.8 mg/L和14.5 mg/L, 可以看出无论是对于有机物还是 NH_4^+-N , MBR的去除效果都比CAS要好。由于MBR的污泥处于大的曝气剪切力、过低的污泥负荷、以及长SRT导致的各种惰性物质积累等环境中, 使MBR中污泥的群落及其变化与CAS相比有明显的不同。随着反应器运行时间的增加, DGGE的结果表明MBR的种群数量始终高于CAS, MBR群落相似性系数的变化也比CAS要大很多, 在第15、124、186和230 d时, MBR的条带数分别是22、25、24和20条, 而CAS在相应的运行时间时条带数分别为19、14、17和20条。MBR污泥与种泥的相似性系数分别是54.1%、63.7%、63.9%和66.8%, 而CAS污泥与种泥的相似性系数分别是71.8%、61.4%、9.1%和65.9%。说明CAS的排泥导致非选择性的微生物流失, 同时, 也说明MBR的群落具有更好的适应环境因素变化的能力, 这是MBR抗冲击负荷能力较强的原因之一。从戴系数来看, 尽管群落相似性越来越高, 但群落始终处于变化状态, 说明环境的微小变化(进水水质、环境温度等)都会引起生物群落的变化。

关键词: 膜生物反应器; 活性污泥法; 群落结构特征; 污泥特征

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)02-0499-05

Analysis of Characteristics of Microbial Communities in Membrane Bioreactor and Conventional Activated Sludge Process

OUYANG Ke, LIU Jun-xin

(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: A submerged MBR and CAS were used for municipal wastewater treatment to investigate their performance and the microbial community. The effluent COD concentrations of MBR and CAS were 39.6 mg/L and 62.9 mg/L on average, respectively. The effluent concentrations of NH_4^+-N in MBR and CAS were 6.8 mg/L and 14.5 mg/L on average, respectively. MBR demonstrated a more stable and excellent effluent quality than CAS. The microbial community in the MBR and CAS indicate a clear difference in despite of same inoculation due to operation conditions of the MBR with the lower F/M ratio, accumulation of inert substance and strong shear force in aeration. The results of DGGE indicate that the quantity of the bacteria and the change of the similarities coefficient of the microbial community in MBR are more than those in the CAS. The result of DGGE showed that the quantity of bacteria in MBR is always larger than that in CAS, on 15, 124, 186 and 230 d, the quantity of lanes are 22, 25, 24 and 20 in MBR and 19, 14, 17 and 20 in CAS, respectively. The Dice similarity index are 54.1%, 63.7%, 63.9% and 66.8% in MBR and 71.8%, 61.4%, 9.1% and 65.9% in CAS, respectively. These phenomena show that the discharge of the excess sludge from CAS results in a loss of some non-selective bacteria, and the microbial community in the MBR has higher capability acclimatized the environment variable than that in the CAS. According to the Dice coefficient of the microbial community was higher and higher during the whole operation, it was influenced by the changes of environments, e.g. influent concentration, temperature and so on.

Key words: membrane bioreactor; conventional activated sludge system; community structure; sludge characteristics

膜生物反应器(membrane bioreactor, MBR)是膜与生物技术的结合, 与传统活性污泥法(conventional activated sludge process, CAS)相比, 具有出水水质好、占地面积小、便于自控等优点。目前MBR工艺已在城市污水处理、难降解废水处理 and 污水回用等方面得到日益广泛的应用^[1]。MBR由于膜的高效截留, 实现了SRT和HRT的完全分离。相比于CAS, MBR能保持较高的污泥浓度和较强的抗冲击负荷能力。

尽管微生物是MBR工艺处理过程中的主体, 然

而迄今为止, 关于MBR的研究主要集中在反应器的设计、运行效果和相关的因素上, 关于MBR的污泥中生物群落特征, 及其与运行效果关系的相关研究十分有限^[2]。主要原因之一是许多环境微生物

收稿日期: 2008-03-05; 修订日期: 2008-05-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(50678170); 国家高新技术研究发展计划(863)项目(2004AA601070)

作者简介: 欧阳科(1978-), 男, 博士研究生, 主要研究方向为水污染控制。

* 通讯联系人, E-mail: jxliu@rcees.ac.cn

都不可培养, 依靠培养技术为基础的传统微生物学研究方法不能全面准确地表征生物处理系统中微生物种群的演变动态. 近年来分子生物学技术和现代分析技术的快速发展为研究水处理工艺中的微生物群落结构及其动态变化提供了一个非常有效的手段^[3]. PCR-DGGE 作为一种指纹分析技术, 具有可重复、快速和操作简便等特点, 近年来在分子微生物生态研究方面得到了广泛的应用, 比如: 用 DGGE 研究微生物群落的复杂性^[4], 观察种群动态, 跟踪相关基因在环境中的表达^[5], 对分离的细菌样品检查其在丰富培养基上的培养效率^[6]等. 而 PCR-DGGE 方法在污水处理中的应用, 则使人们对污水处理过程中微生物群落变化产生了新的认识^[7]. MBR 具有长污泥龄、较大的剪切力和较小的 F/M 值等特点, 它的群落结构应该会比相同状况下的 CAS 有很大的不同, 有必要开展深入的研究^[2]. 虽然目前有些关于 MBR 的细菌群落结构的调查研究成果发表^[8-10], 但是这些研究大部分采用人工合成废水, 同时操作的时间都比较短. 因此, 研究 MBR 在长期运行状况下的污泥活性和群落结构特征, 对于其推广应用和优化具有十分重要的意义.

本研究通过考察处理实际生活污水的 MBR 长期运行过程中, 污泥群落结构特征及其与活性污泥法的区别, 揭示运行条件与生物群落结构之间的联系.

1 材料与方法

1.1 实验装置

本研究中 MBR 的反应器体积为 30 L, 膜组件采用束孔径为 0.2 μm 的状聚偏氟乙烯中空纤维膜 (PVDF), 膜面积为 0.32 m^2 . 膜组件的出水量通过抽吸泵控制, 间歇抽吸出水 (抽吸泵为 4 min 开、1 min 关), 通过控制出水量保持 HRT 约为 12 h. 膜下方采用微孔鼓风曝气, 在 230 d 的运行期间没有剩余污泥排放.

CAS 由曝气池和二沉池系统组成. 曝气池有效容积约为 10 L, 二沉池有效容积为 1 L, 建在曝气池的一侧. 曝气池采用微孔曝气, 混合液从曝气池溢流到二沉池进行固液分离, SRT 约为 10 d 左右, HRT 为 10 h.

试验用水为某小区生活污水, 污水水质如表 1 所示, 在试验启动时, MBR 和 CAS 试验装置用相同的污泥接种. 接种污泥取自北京某污水处理厂.

1.2 分析方法

表 1 生活污水水质/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Table 1 Quality of influent/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

COD	BOD ₅	NH ₄ ⁺ -N	PO ₄ ³⁻ -P
85~750	55~300	45.6~186.3	3.1~10.5

(1) COD、NH₄⁺-N、TN、MLSS、MLVSS、DO、pH 值等各项指标均采用文献[11]的方法进行检测.

(2) DNA 的提取与检测 DNA 的提取采用 Omega 公司细菌 DNA 提取试剂盒, 用 2 mL 离心管将活性污泥样品离心, 得湿重 50~100 mg; 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS 溶液) 洗涤 3 次, 然后参考其说明书步骤进行. DNA 的检测首先在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴化乙锭溶液中染色 30 min, 然后用去离子水漂洗后, 再放在 254 nm 的紫外下照相.

(3) 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增 用于 PCR 扩增的引物为细菌通用引物, 上游引物为 GC341F (5'-CGCCGCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCC GCCGCCG-CCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'); 下游引物 p2 为 EU500R (5'-GTATTACCGCGCTGCTGG-3'), 扩增片段长度为 159 bp, 加上 40 bp 的 GC 发夹结构, 总长度为 199 bp. PCR 反应采用 50 μL 的反应体系, 其组分为: 10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+}) 5 μL ; 4 种脱氧核苷酸 (dNTP) 的混合物各 2.5 mmol/L, 4 μL ; 上游引物 GC341F 15 pmol; 下游引物 EU500R 15 pmol; *Taq* 酶 5 U (大连宝生物); 模板 DNA 约 10 ng 左右; 最后加灭菌超纯水至 50 μL . 扩增反应采用 Touchdown PCR 模式运行. 具体运行条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min. 然后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 65 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 之后每 2 个循环降低复性温度 1 $^{\circ}\text{C}$, 共计 20 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s; 剩下 10 个循环的扩增参数为 94 $^{\circ}\text{C}$, 变性 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s. 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min.

(4) PCR 扩增产物的检测 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检查, 溴化乙锭染色 30~45 min, 用去离子水漂洗 2 次各 10 min, 254 nm 下观察并照相.

(5) DGGE 凝胶电泳 DGGE 所用仪器为 DcodeTM Universal Mutation Detection System (U. S. A., Bio-Rad Co.). DGGE 电泳所用的胶浓度为 10% (丙烯酰胺/双丙烯酰胺 37.5:1), 其变性梯度范围为 35%~55% (100% 的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺), 上样量为 20 μL 的 PCR 产物. 其运行条件是: 在 1 \times TAE (20 mmol/L Tris, 10 mmol/L 乙酸, 0.5 mmol/L EDTA pH 8.0) 电泳缓冲液中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 60 V 运行 20 min, 然后 100 V 运行 8 h. 电泳完成后, 用 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴化乙锭染色 20

min, 再用去离子水漂洗 2 次, 各 10 min, 然后在紫外 (254 nm) 照射下观察电泳结果并照相 [Gel Documentation Systems (Gel Doc 2000), BIO-RAD 公司]. 所得图像用 BIO-RAD QUANTITY ONE 4.3.0 软件处理, 有关泳道和条带的技术处理都用该软件进行.

2 结果与讨论

2.1 运行效果

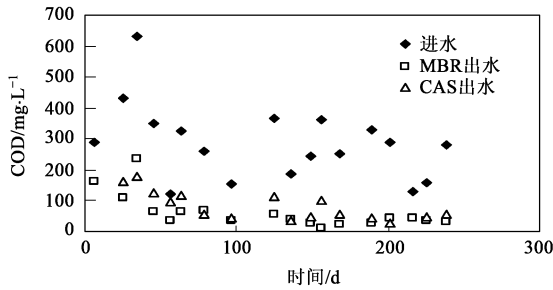


图 1 MBR 和 CAS 对污染物的去除效果

Fig. 1 Removal efficiency of pollutants in MBR and CAS

对于生物反应器, 出水水质通常与负荷有关^[12]. MBR 是一个相对封闭的体系, 不排泥运行, 污泥浓度随运行时间的延续而增长, 导致污泥负荷降低. 由图 2 可见, MBR 的污泥负荷在运行稳定阶段明显低于 CAS 的污泥负荷. 此外, 由于长污泥龄和强曝气及膜丝产生的剪切力作用, MBR 的污泥絮体比较细碎, 其污泥粒径及分布曲线明显低于 CAS (见图 3). 从平均粒径来看, MBR 和 CAS 中污泥平均粒径分别为 45 μm 和 106 μm . 通常, 污泥颗粒越小越有利于细胞在营养条件受限制的情况下争夺碳源和溶解氧^[13].

2.2 MBR 和 CAS 群落结构分析

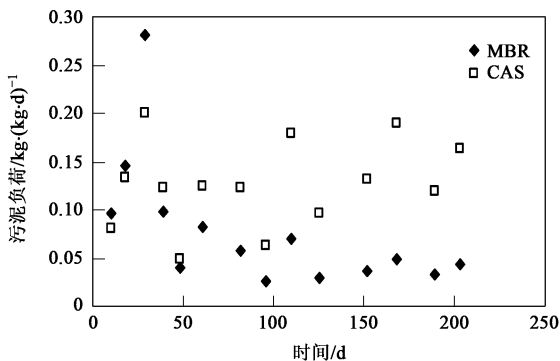


图 2 污泥负荷的变化

Fig. 2 Variation of sludge loading rates

图 1 是 MBR 和 CAS 2 种反应器处理同一生活污水的运行效果. 在 240 d 的试验装置运行期间, MBR 系统出水 COD 和氨氮的平均值分别为 39.6 mg/L 和 6.8 mg/L, 而 CAS 系统出水 COD 和氨氮的平均值分别为 62.9 mg/L 和 14.5 mg/L. MBR 对 COD 和氨氮的平均去除率分别为 81.9% 和 90.2%, CAS 对 COD 和氨氮的平均去除率分别为 72.2% 和 81.1%. 对比 MBR 与 CAS 对污染物的去除效果可知, 相同的条件下, MBR 具有更强的污染物去除能力.

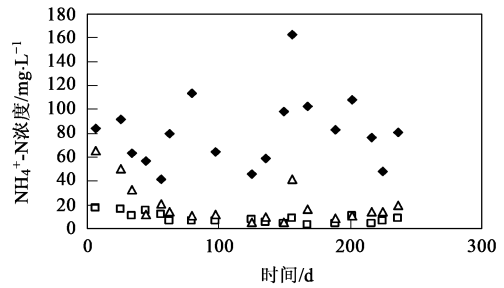


图 3 MBR 和 CAS 反应器污泥粒径

Fig. 3 Granular distribution in sludge of MBR and CAS

图 4 为 DGGE 的凝胶电泳图, 图 5 为以第一泳道为标准作出的各泳道比较图. 泳道中条带粗细不一, 对应其在 DGGE 胶上的密度大小不同. 密度大, 则条带比较粗黑; 密度小, 则条带比较细. 从中可对各样品的条带多样性及均匀分布程度作一直观了解. 各条泳道的条带数见表 2. MBR 在运行时间为 15、124、186 和 230 d 的条带数分别是 22、25、24 和 20 条, 而 CAS 在相应的运行时间时条带数分别为 19、14、17 和 20 条. 虽然不同序列的 DNA 存在共迁移的可能性^[14-16], 在 DGGE 分析中不能完全排除假阳性的结果, 但通常假设 DGGE 谱图中一条带代表一个种^[17]. 结果表明 MBR 的种群数量始终多于

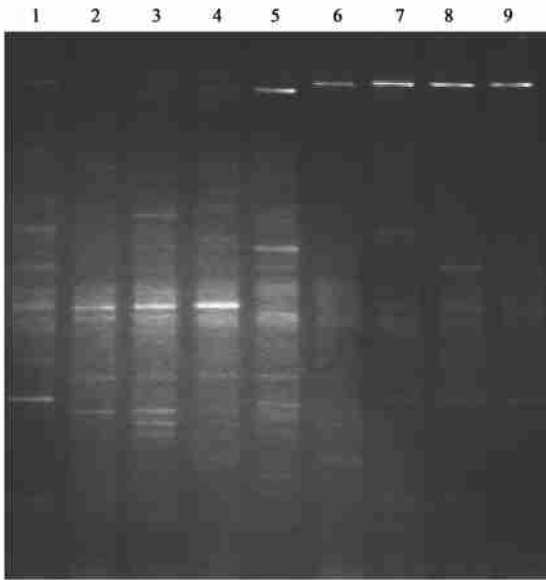


图4 DGGE 凝胶电泳图

Fig. 4 Electrophoresis profile of DGGE

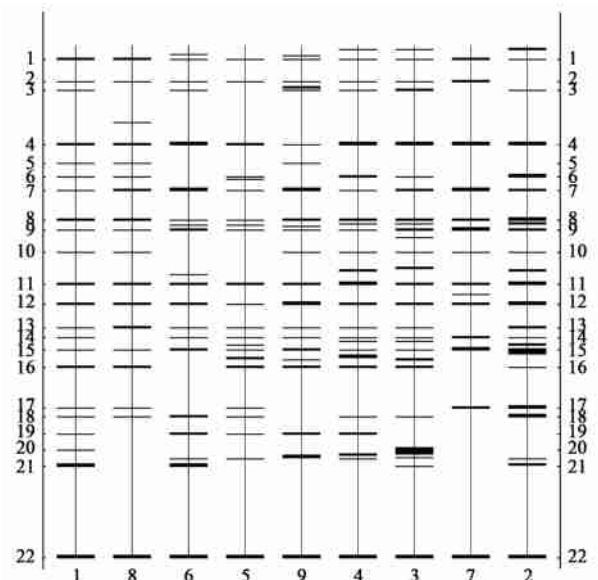


图5 泳道比较图

Fig. 5 Profile of lanes compare

表2 条带检测结果

Table 2 Result of bands detection

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9
条带数/条	21	22	25	24	21	19	13	17	20
相似性/%	100	54.1	63.7	63.9	66.8	71.8	61.4	79.1	65.9

CAS, 显示了复杂的群落结构. 随着反应器的运行, DGGE 胶上的一些条带消失了, 同时产生了一些新的条带, MBR 和 CAS 群落结构都发生了变化. 除了种群存在与否的变化外, 种群丰度也发生了变化, 反应在谱图上就是条带的亮度和粗细发生了变化.

表3 是根据戴丝系数(Dice coefficient) 计算出的样品相似性矩阵图. 在第 15、124、186 和 230d 时, MBR 污泥与种泥的相似性系数分别是 54.1%、63.7%、63.9% 和 66.8%, 而 CAS 污泥与种泥的相似性系数分别是 71.8%、61.4%、9.1% 和 65.9%. 总体而言, CAS 中的群落结构比 MBR 中的变化小. 另外, 随着时间的增加, MBR 的污泥群落相似性系数逐渐增加, 在第 15、124、186 和 230d 时分别是 57.8%、68.4%、76.2% 和 100%, 这表明污泥中的群落相似性逐渐增加, 群落结构逐渐稳定. 而相应的 CAS 的相似性系数则变化不大, 分别是 66.5%、62%、68.4% 和 100%, 呈现出一种无序的变化, 表明从微生物种类的角度分析, CAS 排泥导致的生物流失可能是一种非选择性的流失.

与 CAS 相比, MBR 中生物群落结构的变化程度大, 变化速度快, 这与两系统的运行方式有关. 首先

MBR 处于低负荷运行, 很长时间内甚至低于 $0.03 \text{ kg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ (见图 2), 这样低的负荷无法满足微生物正常生长的需要, 因此大部分微生物处于内源呼吸状态, 而 CAS 系统污泥的营养条件明显好于 MBR, 这必然导致 MBR 和 CAS 的种群出现较大差异; 其次, MBR 的在膜组件处的局部曝气强度非常大, 本试验中曝气强度达到了 $1000 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, 这是 CAS 工艺无法达到的, 因此 MBR 的污泥粒径大大小于 CAS 工艺. 这种污泥结构的巨大改变也引起为生物群落结构的改变. 总之, 较低的负荷、较大的剪切力对于 MBR 中的微生物种群的存在和丰度产生了较大的选择压力, 不适应这种极端而又剧烈变化环境的微生物将被淘汰, 这是 MBR 的污泥生物群落结构变化更大更快的原因. 这种快速变化的种群特点使得 MBR 的生物群落具有更好的适应环境因素变化的能力. 因为稳定的出水水质除了与稳定的群落有关外, 也与群落适应环境的能力有关. 当进水水质波动较大时候, 群落结构如果能快速改变以适应这种变化, 并且快速达到新的平衡, 那么这种群落结构就能具有较强的抗冲击负荷的能力, 出水水质就有保障. 如果群落结构不能快速适应变化, 则出水水质就

会恶化. 由于 MBR 具有这种群落特征, 所以 MBR 具有较强的抗冲击负荷能力较强. 从表 2 的运行效果来看, 当进水 COD 出现比较大的变化的时候, MBR 的出水水质明显要好于 CAS.

与此同时, 群落相似性结果还表明, 即使在长期运行中, 群落依然处于变化之中(表 3), 这是由于污泥中的生物群落始终处于一个变化的环境之中, 环境因素对群落结构有很大的影响, 比如进水水质波动、pH 值、温度的变化等. 对于实际的生活污水来说, 这些因素很难维持不变, 所以群落始终处于变化状态, 但是变化幅度不大.

表 3 相似性矩阵图

Table 3 Similarities matrix of DGGE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100.0	54.1	63.7	63.9	66.8	71.8	61.4	79.1	65.9
2	54.1	100.0	64.7	67.4	57.8	55.3	54.4	56.4	55.8
3	63.7	64.7	100.0	79.4	68.4	62.9	61.1	61.5	62.9
4	63.9	67.4	79.4	100.0	76.2	66.0	59.8	61.9	66.1
5	66.8	57.8	68.4	76.2	100.0	64.1	62.2	71.3	61.8
6	71.8	55.3	62.9	66.0	64.1	100.0	67.8	57.9	66.5
7	61.4	54.4	61.1	59.8	62.2	67.8	100.0	66.3	62.0
8	79.1	56.4	61.5	61.9	71.3	57.9	66.3	100.0	68.4
9	65.9	55.8	62.9	66.1	61.8	66.5	62.0	68.4	100.0

3 结论

(1) MBR 比 CAS 有更强的对有机物和氨氮的去除能力, 这与 MBR 的低负荷运行和污泥特性有关.

(2) 相比于 CAS 系统, MBR 的群落结构变化更大更快, 说明 MBR 具有更强的抗环境因素变化的能力.

(3) 从戴丝系数来看, 尽管群落相似性越来越高, 但群落始终处于变化状态, 这说明环境的微小变化(进水水质、环境温度等)都会引起生物群落的变化. 运行过程中, MBR 的种群数量始终多于 CAS.

参考文献:

[1] 张树国, 顾国唯, 吴志超. MBR 中污泥特征对膜污染的影响研究[J]. 工业水处理, 2003, 23(12): 8-12.

[2] Yuki M, Mirian N H, Tsukasa I. Bacteria community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance[J]. Wat Res, 2007, 41: 627-637.

[3] 李红岩, 张昱, 高峰, 等. 水力停留时间对活性污泥系统的硝化性能及其生物结构的影响[J]. 环境科学, 2006, 27(9): 1862-1865.

[4] Murray A E, Hollibaugh J T, Orrego C. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 2676-2680.

[5] Wawer C, Jetten M, Muyzer G. Genetic diversity and expression of the (NiFe) hydrogenase large subunit gene of *Desulfotomobium* spp. in environmental samples[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 4360-4369.

[6] Felske A, Engelen B, Nubel U. Direct ribosomal isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 4162-4167.

[7] 刘新春, 吴成强, 张昱, 等. PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析[J]. 生态学报, 2005, 25(4): 842-849.

[8] Luxmy B S, Nakajima F, Yamamoto K. Analysis of bacterial community in membrane separation bioreactors by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques[J]. Water Sci Technol, 2000, 41(10-11): 259-268.

[9] Stamper D M, Walch M, Jacobs R N. Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(2): 852-860.

[10] Witzig R, Manz W, Rosenberger S, et al. Microbiological aspects of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater[J]. Water Res, 2002, 36(2): 394-402.

[11] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[12] 张自杰, 林荣忱, 金儒霖, 等. 排水工程[M]. (第四版). 北京: 中国建筑工业出版社, 2000. 102-104.

[13] Farrelly V, Rainey F A, Stackebrandt E. Effect of genome size and copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 2798-2801.

[14] Luxmy B S, Nakajima F, Yamamoto K. Analysis of bacterial community in membrane separation bioreactors by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques[J]. Wat Sci Tec, 2000, 41(10-11): 259-268.

[15] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 3724-3730.

[16] Suzuki M T, Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixture of 16S rRNA genes by PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 625-630.

[17] 王振宇, 张昱, 刘新春, 等. O₂-BAC 工艺的微生物群落结构解析[J]. 中国给水排水, 2006, 22(1): 1-4.