

ITFB 强化除氨及醌指纹生物群落结构分析

温沁雪¹, 施汉昌¹, 周延俊², 郭玉凤¹

(1. 清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084; 2. 中国矿业大学化学与环境工程学院, 北京 100083)

摘要: 通过改变内循环生物流化床(internal circulation three-phase biofluidized bed, ITFB)的启动水质, 提高 N/C 组成以强化流化床后期的硝化作用. 结果表明, 高 N/C 和低进水 COD 是强化除氨的必要启动条件; 强化启动后以模拟生活污水为研究对象, 在 HRT 为 2h 时, 可以实现 COD 和氨氮的同时高效去除, 氨氮的平均去除率为 74%, 出水氨氮浓度小于 10 mg/L. 研究利用醌指纹技术对反应系统中微生物群落结构变化进行了跟踪分析, 结果表明经过强化除氨启动后, 内循环生物流化床生物膜中以 *Nitrosomonas europaea* 为代表的硝化细菌数量有所增加; 而以 *Acinetobacter* sp. 和 *Pseudomonas* sp. 为代表的变形细菌的 γ 亚类数量减少. *EQ* 值始终在 0.5 左右变化表明生物膜中微生物种群的分布均匀性变化较小. 所有测试样品中 UQ/MK 的比值均大于 1, 说明生物膜系统中以革兰氏阴性菌为主.

关键词: 内循环生物流化床(ITFB); 硝化作用; 醌指纹; 生物膜

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)07-1434-05

Enhanced Ammonia Removal and Microbial Community Structure Analysis Using Bacterial Quinone Profile in ITFB

WEN Qinxue¹, SHI Hanchang¹, ZHOU Yanjun², GUO Yufeng¹

(1. State Key Laboratory of ESPC, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Institute of Chemistry and Environmental Engineering, China University of Mining and Technology, Beijing 100083, China)

Abstract: Water quality during the start-up period was changed in order to enhance the later nitrifying ability of the internal circulation three-phase biofluidized bed (ITFB). The experimental results showed that high N/C ratio and low feeding concentration of COD were two key conditions for enhancing the ammonia removal. After the enhanced start-up, an efficient removal efficiency of both COD and ammonia was achieved with HRT 2h when treating sanitary wastewater, the average ammonia removal rate was 74%, the ammonia concentration in effluent was lower than 10mg/L. Bacterial quinone profile of the system was also analyzed. The results showed that after the enhanced start-up, the number of nitrifying bacteria, such as *Nitrosomonas europaea*, in the biofilm in ITFB was increased, and the number of γ -Proteobacteria, such as *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., was decreased. the equitability of the quinones (*EQ*) fluctuated around 0.5 showed that the distribution of the microbial community in the biofilm changed little. UQ/MK ratio of all the samples was greater than 1 indicated that Gram-negative bacteria was the dominant bacteria in the system.

Key words: internal-circulation three-phase biofluidized bed (ITFB); nitrifying ability; bacterial quinone profile; biofilm

内循环生物流化床是以三相生物流化床为基础设计的新型高效好氧废水生物处理反应器, 其最显著的特点为反应器中生物固体浓度高, 因此相比于其它好氧处理工艺来说内循环生物流化床具有很高的容积负荷. 然而很高的容积负荷和较短的水力停留时间对硝化细菌的生长和发挥处理功能起到了阻碍作用, 因此在内循环生物流化床处理废水的过程中, 同时实现高效除碳和脱氮难度较大. 近年来的研究表明, 废水处理生物膜中最初的微生物组成和基质成分强烈地影响着后续的硝化效果和生物群落的行为^[1,2]. 因此通过改变启动阶段的进水水质实现对生物膜后续的硝化效果的控制, 可以成为内循环生物流化床实现同时除碳脱氮切实可行的

方法.

醌指纹法作为解析微生物群落多样性的一种手段, 由于具有简单快捷的特点, 近年来广泛用于各种环境微生物样品(土壤、活性污泥等)的分析. 呼吸醌存在于微生物的细胞膜中, 是细胞膜的组成成分, 在电子传递链中起重要作用^[3], 主要有泛醌(ubiquinone, UQ)即辅酶 Q 和甲基萘醌(menaquinone, MK)即维生素 K₂ 两大类. 醌可在以按分子结构分类(UQ 和 MK)的基础上依据侧链含异

收稿日期: 2005-08-21; 修订日期: 2005-09-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601200); 中国博士后科学基金项目(2005037368)

作者简介: 温沁雪(1977~), 女, 博士后, 主要研究方向为污染物生物处理技术原理与应用, E-mail: wqxshelly@263.net

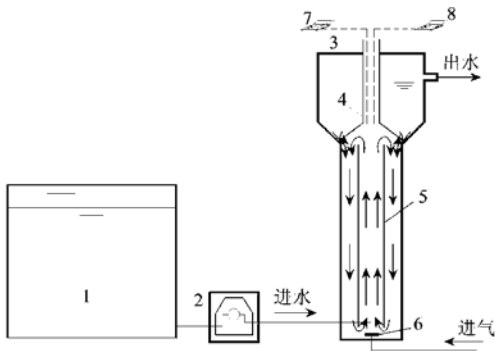
戊二烯单元的数目和饱和度进一步区分. 研究表明, 每一种微生物都含有一种占优势的醌^[3], 不同的微生物含有不同种类和分子结构的醌^[4]. 因此, 醌的多样性可以定量表征微生物的多样性, 醌图谱的变化可以表征群落结构的变化.

本文主要通过调节内循环生物流化床启动阶段的废水 N/C 组成, 以期获得强化其除氨效果的启动方法, 并利用醌指纹技术对不同运行条件下反应器中的生物群落变化进行了跟踪分析.

1 材料与方法

1.1 试验概况

试验流程如图 1 所示. 试验所用内循环生物流化床模型高 0.5m, 直径 0.15m, 有效体积 8L, 模型顶部设置三相分离器. 采用人工配制的生活污水, 通过调节葡萄糖和氯化铵的加入量控制原水 N/C 比, 同时添加硫酸镁、氯化钙、氯化铁等作为微量元素, 试验配水组成及水质见表 1. 试验阶段进水流量为 3.2~ 5.3L/h, 水力停留时间(HRT) 1.5~ 2.5h; 曝气量 250L/h, 保证反应器内溶解氧大于4mg/L; 反应器内温度为 20~ 25℃, pH7.0~ 8.0.



1. 原水箱; 2. 进水计量泵; 3. 内循环生物流化床;
4. 三相分离器; 5. 导流筒; 6. 曝气器;
7. 溶解氧记录仪; 8. pH 记录仪

图 1 内循环生物流化床工艺流程图

Fig. 1 Schematic diagram of the ITFB

1.2 微生物醌指纹法

本试验采用的试验方法如下^[3]: 剥离提取一定量生物膜样品, 用 1% 食盐水清洗 2 次并离心. 沉淀转入 50mL 离心管中, 用氯仿甲醇混合液(2: 1, 体积分数) 30mL, 萃取 3 次. 3 次萃取液合并到 100mL 茄形瓶中, 40℃水浴, 用旋转蒸发仪浓缩. 蒸干后, 茄形瓶中分 2 次加入 20mL 正己烷, 并分别用 10mL 纯水洗涤. 合并正己烷, 用旋转蒸发仪浓缩至蒸干. 再

次加入 20mL 正己烷. 连接 2 个 Sep-Pak Plus Silica 层析柱, 用 5mL 正己烷冲洗小柱子. 将样品注入小柱子, 再用 20mL 的正己烷以同样流速洗柱子. 2% 乙醚的正己烷洗脱液 20mL 洗脱, MK 洗出; 10% 乙醚正己烷洗脱液 20mL 洗脱, UQ 洗出. 最后液相色谱分析.

表 1 配水组成及水质

Table 1 Composition of the influent

组成成分	浓度/ mg•L ⁻¹
葡萄糖	COD 50~ 400
NH ₄ Cl	氨氮 30~ 200
K ₂ HPO ₄	1/2 总磷 ¹⁾
KH ₂ PO ₄	1/2 总磷 ¹⁾
CaCl ₂	5
MgSO ₄ •7H ₂ O	100
FeCl ₃	0.1
NaHCO ₃	调节 pH 7.0~ 8.0

1) 总磷 5mg•L⁻¹

根据微生物醌的摩尔组成可以计算出微生物的多样性 DQ 和微生物种群的分布均匀性 EQ , 其计算见式(1)~(3). DQ 的数值越大, 表明微生物多样性越大. EQ 为 1 时, 表明该样品中所有微生物的比例相同, EQ 数值越小表明微生物种群的分布越不均匀. 另外, 利用非相似性指数 D , 可以定量比较 2 个环境样品中微生物群体组成差异的大小.

$$DQ = [\sum(f_k)^{1/2}]^2 \tag{1}$$

$$EQ = DQ/n \tag{2}$$

$$D(i, j) = (\sum |f_{ki} - f_{kj}|)/2 \tag{3}$$

式中: f_k : 醌 k 的摩尔分数; n : 样品中醌的种类数; i, j : 样品 i 和 j .

1.3 分析方法

氨氮采用纳氏试剂比色法; 亚硝酸盐氮采用 N -(1-萘基)-己二胺光度法; 硝酸盐氮采用紫外分光光度法; COD 采用重铬酸钾法; 醌指纹分析采用的 HPLC 柱型号: Zorbax-ODS, 4.6 × 25cm, Shimadzu Dupont, 流动相组成为甲醇: 异丙醚= 9: 2(体积比), 流速 1mL/min.

2 结果与讨论

2.1 强化除氨试验结果

试验采用 3 种启动条件(见表 2). 3 种不同水质启动结束反应器进入正常运行后, HRT 为 1.5h 时对氨氮的去除效果如图 2 所示. 从图 2 可见, 流化床中生物膜硝化效果的提高, 不但与启动阶段底物较高的 N/C 比值相关, 还与进水 COD 直接相关. 内循

表 2 启动条件

Table 2 Details of conditions of start up

条件	N/C	COD/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	0.25	200
2	2	200
3	2	50

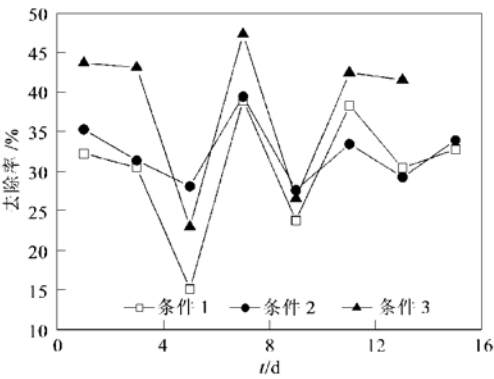


图 2 HRT1.5h 3 种启动条件的氨氮去除效果比较

Fig. 2 Comparison of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ removal rate under HRT 1.5h

环生物流化床中的生物膜在强剪切力的作用下通常仅有 100~ 150 μm , 属于薄层生物膜. 这种生物膜的快速形成需要一定数量的异养菌生长来提供胞外聚合物, 从而将更多的硝化细菌固定, 以获得良好的硝化效果. 在碳源丰富的底物中, 异养菌的数量占较大比例, 一旦离开了高氨氮环境条件, 硝化细菌的生长和累积就会因异养菌的快速生长而受到抑制. 因此, 较低的进水 COD 和高的 N/C 是实现内循环生物流化床强化除氨快速启动的必要条件.

试验还对比了条件 1 和条件 3 启动结束后, 用于处理人工模拟低浓度生活污水的处理效果. 试验分为 4 阶段, 记为 Run1 .Run2 .Run3 .Run4. 各阶段运行条件分别为 Run1: 进水 COD 200~ 250 mg/L , 氨氮 30 mg/L , HRT 1.5h; Run2: 进水 COD 200~ 250 mg/L , 氨氮 30 mg/L , HRT 由 1.5h 延长到 2h; Run3: 进水 COD 提高为 350~ 400 mg/L , 氨氮 30 mg/L , HRT 2h; Run4: 进水 COD 350~ 400 mg/L , 氨氮 30 mg/L , HRT 由 2h 延长到 2.5h. 如图 3 所示

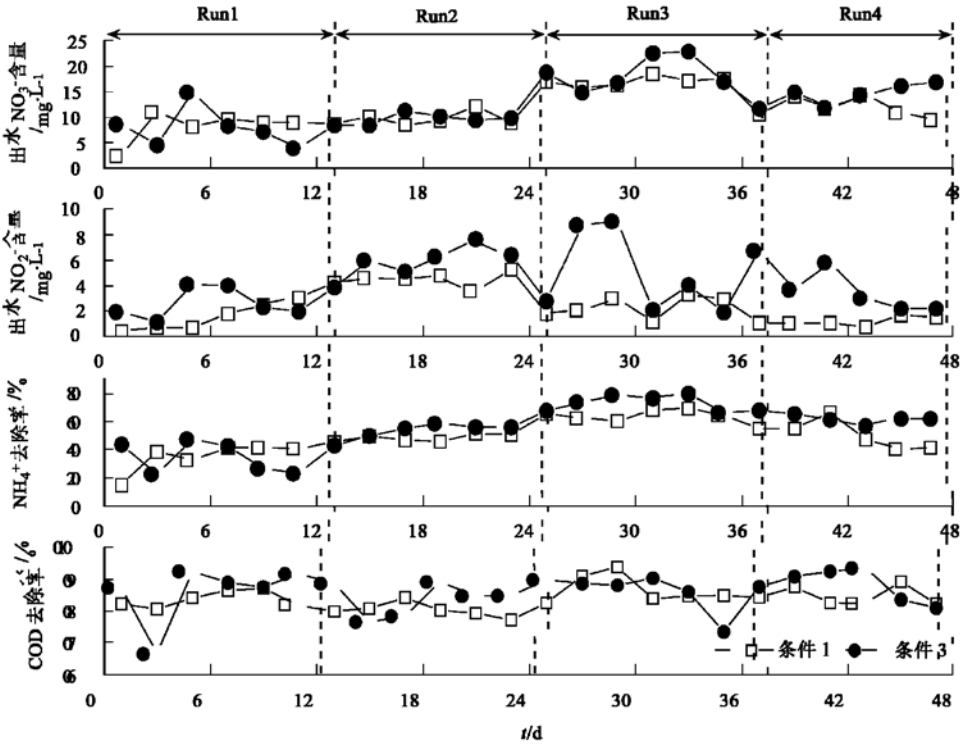


图 3 条件 1 3 启动后处理效果比较

Fig. 3 Comparison of treating efficiency under different start-up conditions

的试验结果表明, 启动条件 3 获得的氨氮去除效果好于启动条件 1, 且在条件 3 启动后, 亚硝酸盐获得了明显的积累. 该试验结果说明高 N/C 和低进水 COD 的启动条件有利于硝化细菌的生长和积累, 且

氨氧化细菌的累积速度高于亚硝酸盐氧化细菌. 对不同水力停留时间下氨氮容积负荷平均值的比较 (图 4) 可见, 随着 HRT 的延长, 2 种启动条件对氨氮去除效果的影响逐渐明显. 这是由于在较短的

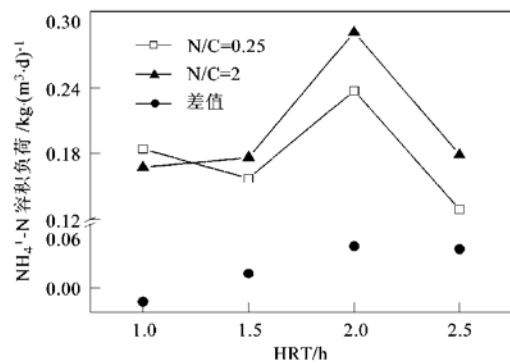


图 4 氨氮容积负荷随 HRT 的变化
Fig. 4 Change of volumetric loading of ammonia with HRT

HRT 条件下, 异养菌的快速生长对氨氮的去除产生了较大的影响. 当 HRT 大于 2h, 由于有机负荷的降低, 造成反应器内生物量的减少, 相应的氨氮去除效果有所降低. 因此, 强化启动后利用内循环生物流化床处理生活污水, 选择 HRT 为 2h, 可以实现 COD 和氨氮的同时高效去除, 处理出水氨氮浓度在 10 mg/L 以下, 平均去除率为 74%.

2.2 生物膜微生物种群结构解析

试验阶段分别对 3 种强化启动条件下内循环生物流化床中生物膜的微生物醌进行了跟踪分析, 微生物醌的组成列于表 3.

从表 3 可知, 所有的生物膜样品中均含有

表 3 内循环生物流化床生物膜中醌的组成(摩尔分数)

Table 3 Composition(molar fraction) of the quinones in biofilm in the internal-circulation three-phase biofluidized bed (ITFB)

醌	条件 1 启动		条件 2 启动			条件 3 启动		
	第 20d	第 40d	第 20d	第 34d	第 48d	第 20d	第 34d	第 48d
VK-1	0.045 8	0.054 3	0.018 0	0.146 1	0.035 7	0.106 7	0.048 3	
MK-6	0.104 5	0.037 2	0.053 0	0.099 0	0.037 5	0.069 0	0.064 6	0.181 6
MK-5(H ₆)	0.005 6	0.002 7		0.017 7		0.002 7	0.002 8	0.016 1
MK-6(H ₂)	0.002 7	0.003 3						
MK-7	0.000 6	0.002 5	0.003 3	0.015 5	0.085 0	0.002 9	0.113 6	0.194 0
MK-5(H ₁₀)						0.000 5	0.012 7	0.007 6
MK-7(H ₂)	0.000 7		0.004 4	0.001 4	0.001 0	0.001 2		
MK-8	0.003 9	0.002 2	0.003 9	0.003 0	0.006 3	0.001 8		0.000 9
MK-7(H ₆)		0.001 8					0.009 4	0.022 5
MK-8(H ₂)			0.005 6	0.014 4	0.001 2	0.002 3		
MK-9	0.000 5				0.006 0		0.006 5	0.004 6
MK-9(H ₂)	0.049 0	0.128 7	0.020 4	0.016 4	0.006 1	0.060 3	0.007 4	0.019 8
MK-8(H ₈)							0.202 8	
MK-9(H ₄)					0.008 8			
MK-10	0.020 6	0.015 8	0.009 9	0.002 2		0.006 0	0.002 7	
MK-10(H ₂)							0.030 9	
UQ-8	0.145 6	0.180 7	0.321 5	0.402 7	0.678 3	0.381 4	0.460 6	0.294 7
UQ-9	0.572 8	0.287 3	0.310 2	0.070 9	0.038 8	0.240 2	0.011 9	0.019 5
UQ-10	0.048 6	0.283 6	0.222 2	0.210 9	0.095 4	0.125 0	0.025 8	0.238 5
DQ	6.366 5	7.032 8	6.065 6	7.295 4	5.749 5	6.902 4	7.005 5	6.972 7
EQ	0.530 5	0.586 1	0.505 5	0.521 1	0.442 3	0.531 0	0.500 4	0.633 9
UQ/MK	3.279 5	3.025 8	7.210 5	2.169 8	4.333 1	2.945 4	0.993 3	1.235 8

UO-8、UO-9 和 UO-10, 且平均含量 UO-8> UO-10> UQ-9. MK 的种类多于 UQ, 且测试样品中以 MK-6 和 MK-7 为主要甲基萘醌种类. 几乎所有的测试样品均含有维生素 K1, 另外还含有 MK-5(H₆)、MK-8(H₂)、MK-9(H₂)、MK-10、MK-9(H₄)、MK-7(H₂) 等十几种甲基萘醌.

通常 UQ-8 主要存在于变形细菌的 β 亚类, UQ-10 存在于变形细菌的 α 亚类. 以 UQ-8 和 UQ-10 为主要醌种类硝化细菌包括 *Nitrosomonas*

europaea 和 *Nitrobacter winogradskii*^[6]. 在本试验中, 高 N/C 的启动条件下, UQ-8 的平均含量可以达到 40% 以上, 而 N/C 比为 0.25 的条件下, UQ-8 的含量仅有 15% 左右. 说明, 强化启动后, 生物膜系统中硝化细菌的含量有了明显增加. UQ-9 含量的变化说明, 以 *Acinetobacter* sp. 和 *Pseudomonas* sp. 为代表的变形细菌的 γ 亚类^[7], 在强化启动后生物膜中的含量有所减少, 平均含量仅有 10% 左右. MK-6 和 MK-7 为系统中主要的甲基萘醌, 以 MK-6 和 MK-7

为主要醌种类的细菌包括 *Flavobacterium* sp. 和 *Cytophaga* sp. . 因此, 从微生物醌的组成可以推断, 经过强化除氨启动后, 内循环生物流化床生物膜中的菌群种类发生了一定的改变, 硝化细菌数量明显增加, 而变形细菌的 γ 亚类细菌有所减少. EQ 值始终在 0.5 左右变化, 说明生物膜中微生物种群分布均匀性变化较小. 另外, 几乎所有测试样品中 UQ/MK 的比值均大于 1, 说明生物膜系统中以革兰氏阴性菌为主.

图 5 所示为不同启动条件下, 测试样品之间非相似性指数 D 的关系图. 图 5 结果表明, 进水 COD 浓度的变化是影响生物膜中微生物群体组成差异的主要原因, 测试样品的非相似性指数受水力停留时间等变化的影响很小.

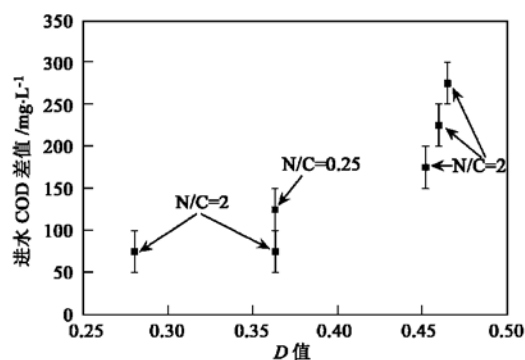


图 5 非相似性指数 D 随进水 COD 变化

Fig. 5 Change of dissimilarity of quinone profiles with differences of influent COD

3 结论

(1) 通过改变进水水质, 调节 N/C 组成启动内循环生物流化床以强化流化床后期的硝化效果是可行的. 高 N/C 和低进水 COD 是内循环生物流化床

强化除氨的必要启动条件;

(2) 强化启动后利用内循环生物流化床处理低浓度生活污水, 选择 HRT 为 2h, 可以实现 COD 和氨氮的同时高效去除, 处理出水氨氮浓度在 10 mg/L 以下, 平均去除率为 74%;

(3) 通过对反应系统微生物醌的跟踪分析, 表明经过强化除氨启动后, 内循环生物流化床生物膜中的硝化细菌数量明显增加, 生物膜系统中以革兰氏阴性菌为主. 且测试样品的非相似性指数 D 受进水 COD 变化影响较大, 受 HRT 等条件变化影响小.

参考文献:

- [1] Okabe S, Oozawa Y, Hitrata K, *et al.* Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C: N ratios [J]. *Wat. Res.*, 1996, **30** (7): 1563~ 1572.
- [2] Tijhuis L, Rekswinkel E, Van Loosdrecht M C M, *et al.* Dynamics of Population and Bifilm Structure in the Biofilm Airlift Suspension Reactor for Carbon and Nitrogen Removal [J]. *Wat. Sci. Tech.*, 1993, **29**(10): 337~ 384.
- [3] Hu H Y, Lim B R, Goto N, *et al.* Analytical precision and respiratory quinones for quantitative study of microbial community structure in environmental samples[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, **47**: 17~ 24.
- [4] 胡洪营, 童中华. 微生物醌指纹法在环境微生物群体组成研究中的应用[J]. *微生物学通报*, 2002, **29**(4): 95~ 98.
- [5] Hu H Y, Fujie K, Nakagome H, *et al.* Quantitative analyses of the change in microbial diversity in a bioreactor for wastewater treatment based on respiratory quinines[J]. *Wat. Res.*, 1999, **33**(15): 3263~ 3270.
- [6] Lim B R, Ahn K H, Songprasert P, *et al.* Microbial community structure in an intermittently aerated submerged membrane bioreactor treating domestic wastewater [J]. *Desalination*, 2004, **161**: 145~ 153.
- [7] Yokota A, Akagawa Matsushita M, Hiraishi A, *et al.* Distribution of quinone systems in microorganisms: gram-negative eubacteria[J]. *Bull. Jpn. Fed. Culture Collection*, 1992, **8**: 136~ 171.