

好氧亚硝化颗粒污泥中硝化细菌群落结构分析

孙寓姣, 左剑恶*, 杨洋, 鲁颐琼, 邢薇, 卜德华

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要: 在小试好氧上流式污泥床(AUSB)反应器中, 实现了由厌氧颗粒污泥到好氧硝化污泥再到亚硝化颗粒污泥的转化, AUSB反应器的亚硝化率稳定在 90% 以上. 利用 FISH、荧光实时定量 PCR 等技术, 考察了 AUSB 反应器中好氧颗粒污泥中硝化细菌的生态分布. 结果表明: 好氧亚硝化颗粒污泥呈层状结构, 氨氧化细菌(AOB)主要分布在颗粒污泥表层, 亚硝酸盐氧化细菌(NOB)多分布在内层, 颗粒内核则无活性细胞; 随反应器氨氮负荷逐渐提高, 颗粒污泥中 AOB 的相对含量逐渐升高, 当 $\text{NH}_3\text{-N}$ 负荷分别为 0、0.4、1、2.2 $\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$, 亚硝化率分别为 0%、35%、50%、99% 时, 污泥中 AOB 在真细菌总量中所占比例分别为 0.45%、5.20%、15.37% 和 48.55%.

关键词: 亚硝化; 好氧颗粒污泥; 分子生态学; 群落结构

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)09-1858-04

Community Structure of Nitrification Bacteria in Aerobic Short-Cut Nitrification Granule

SUN Yurjiao, ZUO Jian'e, YANG Yang, LU Yiqiong, XING Wei, BU Dehua

(Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: By using a lab-scale aerated upflow sludge bed reactor, the inoculated anaerobic granule was cultivated to aerobic nitrification granule, and then converted to short-cut nitrification granule with the short-cut nitrification efficiencies above 90%. Applying real-time quantity PCR, and florescent *in situ* hybridization techniques, the ecological community structure of nitrification bacteria in aerobic granules were studied. The results show that there existed a layered structure in the aerobic granule, the ammonia oxidizing bacteria (AOB) was mainly located in the surface area of the granule, and the nitrite oxidizing bacteria (NOB) was mainly located in the inner area of the granule, was just adjacent to the AOB. There was no active bacteria in the inner core area. The amount of AOB in the granules increased, as the ammonia loading rate of the reactor was increased gradually. The percentage of AOB in the total amount of Eubacteria in the granule was 0.45%, 5.20%, 15.37%, 48.55% respectively, as the ammonia loading rate of the reactor were 0, 0.4, 1.0 and 2.2 $\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ respectively, and the nitrosification efficiency were 0%, 35%, 50%, 99% relatively.

Key words: short-cut nitrification; aerobic granular sludge; molecular ecology; community structure

废水生物脱氮工艺可以有效将废水中的氮素污染物转化为氮气, 最终达到去除废水中氮素污染物的目的, 但传统的先硝化再反硝化的工艺流程很长, 而且在硝化过程中还需要消耗大量的氧气和碱度, 在反硝化过程中又需要加入足量的有机碳源, 因此如何缩短生物脱氮途径、简化工艺流程以及降低运行能耗是目前废水生物脱氮领域的研究热点. 实现稳定高效的亚硝化工艺是缩短生物脱氮途径、简化工艺流程的关键第一步, 也是众多新型生物脱氮工艺的关键步骤^[1,2]. 本研究以厌氧产甲烷颗粒污泥和少量好氧硝化污泥接种启动 1 个好氧上流式污泥床(Aerated Upflow Sludge Bed, AUSB)反应器, 实现了由厌氧颗粒污泥到硝化颗粒污泥, 再到亚硝化颗粒污泥的转化, 亚硝化颗粒污泥反应器运行稳定; 利用分子生物学技术对该反应器运行过程中 4 个不同阶段的颗粒污泥样品中的微生物种群结构进行了研究.

1 材料与方法

1.1 颗粒污泥样品

试验中共采集了 4 个颗粒污泥样品, 均取 1 个接种厌氧颗粒污泥与少量好氧硝化污泥的小试 AUSB 反应器. 该反应器的总容积 3.05L, 其中反应区 1.6L, 底部安装曝气装置, 全无机含氮氮自配水从底部进入反应器, 经污泥床进入沉淀区后排出, 经过长期运行, 逐渐实现了稳定的亚硝化功能, 并成功地使接种的厌氧颗粒污泥转化为好氧硝化颗粒污泥, 并最终转化为好氧亚硝化颗粒污泥.

1.2 仪器与试剂

DNA 提取试剂盒(天为时代 DP301); DNA 纯

收稿日期: 2005-09-17; 修订日期: 2005-10-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2002AA601190)

作者简介: 孙寓姣(1975~), 女, 博士, 主要研究方向为水污染控制中微生物生态学, E-mail: sunyj@tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: jiane.zuo@tsinghua.edu.cn

化试剂盒(鼎国 A014);杂交仪(Thermo Hybaid Biorad);激光共聚焦显微镜(Olympus);Promega 公司 pGEM -T Vector System I;SYBR Green 荧光定量试剂盒(天为时代 FP201);博日荧光定量 PCR 仪(Bioer FQD-33A).

1.3 方法与步骤

1.3.1 颗粒污泥基因组 DNA 的提取

采用冻融破壁法提取颗粒污泥样品的总基因组 DNA,首先利用蛋白酶 K 水解,Tris-饱和酚萃取与异丙醇沉淀分离^[3],最后采用 DNA 纯化试剂盒进行纯化.

1.3.2 荧光原位杂交(FISH)

采集污泥样品,立即用新配制的 4% 多聚甲醛溶液固定, PBS 缓冲液洗涤后,于 PBS 缓冲液和无水乙醇等体积混合液中在- 20 ℃保存.利用石蜡包埋切片技术对颗粒污泥进行处理^[4,5],首先将颗粒污泥固定,之后采用乙醇、水、叔丁醇混合物处理,再用石蜡进行包埋后切片,切片厚度为 8μm,展片之

后移入涂有 Vectaboud 的载玻片上,干燥后用 TBA、乙醇及二甲苯等进行脱蜡.

采用 ROX(红色)标记的氨氧化细菌 NSO190 探针(5'CGATCCCC TGCTT TTCTCC3')和 FITC(绿色)标记的亚硝酸盐氧化杆菌 NIT3 探针(5'CCTGTGCTCCATGCTCCG3')^[6]对颗粒污泥切片进行双重杂交^[7],杂交温度 46 ℃,甲酰胺浓度分别为 55% 和 40%,同时利用 DAPI 染色作为背景,最后在激光共聚焦显微镜上扫描成像.

1.3.3 荧光定量 PCR(RTQ-PCR)

分别选用 2 对针对真细菌和氨氧化细菌的引物,经运行 PCR 确定各自的最佳运行条件和参数,如表 1 所示.以氨氧化细菌 16S rDNA 的 189~ 654 序列片段的 T 质粒载体克隆^[8]作为定量标准品,采用 TA 粘末端克隆法制备重组质粒,并将其进行倍比稀释,稀释度分别为:10⁶、10⁷、10⁸、10⁹ copies/mL.在荧光定量 PCR 检测中,利用标准品扩增得到定量标准曲线,并结合标准曲线对样品进行定量分析.

表 1 RTQ-PCR 的引物及运行参数
Table 1 Primers and parameters of RTQ-PCR

细菌种类	引物名称	序列	运行条件
真细菌	P338f	5' ACTCCTACGGGAGGCAG3' ^[9]	预变性 94 ℃ 3min, 变性 94 ℃ 15s, 延伸 72 ℃ 30s, 35 个循环
	P518r	5' ATTACCGCGGCTGCTGG3'	
氨氧化细菌	P189f	5' GGAGRAAAGCAGGGGATCG3' ^[10]	预变性 94 ℃ 3min, 变性 94 ℃ 20s, 延伸 72 ℃ 25s, 35 个循环
	P654r	5' CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC3'	

2 结果与讨论

2.1 好氧亚硝化工艺的实现及颗粒污泥的获得

AUSB 反应器 180d 运行情况如图 1 所示.反应器接种启动后,对进水中氨氮的去除率在前 40d 内均较低,仅为 65% 左右;在随后 40d 的运行中,氨氮去除率明显提高,平均达到 85% 以上;但此时,反应器的亚硝化率(即出水中亚硝酸盐占总硝态氮的比例)很低,说明该反应器此时主要完成的仍是全程硝化.从运行第 81d 开始,通过对工艺运行条件的调控,反应器逐渐向短程硝化转化,在第 81~ 145d 之间,反应器的亚硝化率有较大提高,基本维持在 95%;从第 146d 开始直到试验结束时,反应器的运行效果良好,其氨氮负荷高达 2.5kg/m³·d,氨氮去除率为 95% 以上,亚硝化率也高达 99%.因此,在持续 180d 的运行中,AUSB 反应器实现了稳定的亚硝化功能,其运行结果如图 1 所示.在反应器的运行过程中,分 4 次取得颗粒污泥样品 A、B、C、D,从表 2

中可以看出 4 次取样点相应的反应器工艺运行状况.

2.2 AOB 与 NOB 在颗粒污泥中的空间分布

利用分别针对 AOB 以及 NOB 中硝化杆菌的 NSO190 和 NIT3 探针对 4 个污泥样品中的 AOB 和 NOB 的空间分布进行原位观察,结果如图 2 所示.从图 2 中可看出,在接种的厌氧颗粒污泥(样品 A)中,2 类细菌都几乎未能见到;而在样品 B 和 C 中,则可同时发现 AOB 和 NOB, AOB 的数量要多于 NOB 的,而且, AOB 较明显地生长在颗粒表层, NOB 则生长在表层的下层,颗粒的中心部分则未发现微生物,可以推测此处应为接种的厌氧颗粒污泥的残余,即死亡的厌氧细菌.

氨氮转化为硝酸盐的生物硝化过程是由 AOB 和 NOB 共同完成的, AOB 和 NOB 均是强烈好氧的自养型细菌,但 AOB 的氧化对象是原水中的氨氮,而 NOB 的氧化对象则是 AOB 的产物亚硝酸盐^[11].在颗粒污泥外侧的主体水流中,含有较高的溶解氧

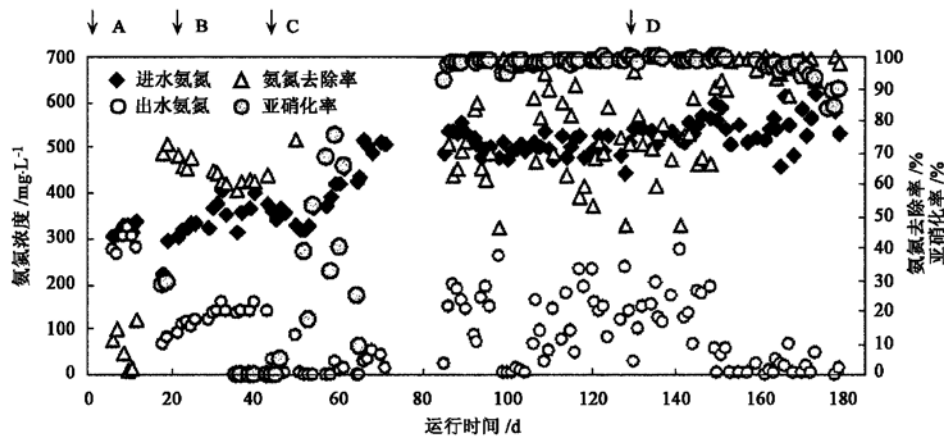


图 1 好氧上流式污泥床(AUSB)反应器的运行结果
Fig. 1 Performance of aerated upflow sludge bed reactor

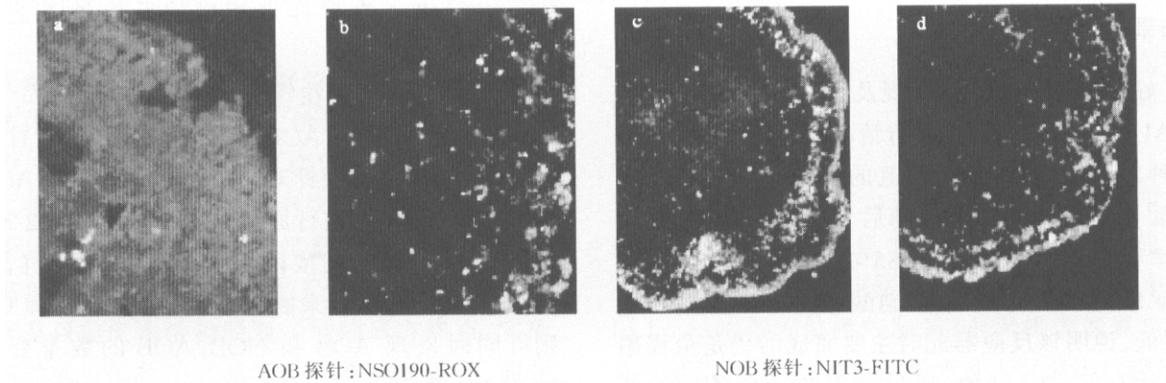
表 2 4 次取样时反应器的运行状况

Table 2 Operational status of AUSB reactor at different sampling points

样品名	取样时间 /d	氨氮负荷 /kg·(m ³ ·d) ⁻¹	氨氮去除率 /%	亚硝化率 /%	溶解氧 /mg·L ⁻¹
A	1	0	0	0	6.3
B	25	0.4	78	35	6.5
C	50	1.0	80	50	6.6
D	125	2.2	92	99	6.5

和氨氮,为 AOB 的生长提供了良好条件,所以 AOB 倾向于生长在颗粒的表层;NOB 虽然也需要较高浓度的溶解氧,但它同时还需要 NO₂⁻,因此,NOB 通

常生长在 AOB 的内层,如图 2 中 b 和 c 所示。
在样品 D 中,可发现其中主要为 AOB,NOB 的数量很少,对比反应器此时的运行状况,可知,此时反应器的氨氮负荷已提高至 2.2(kg/m³·d),氨氮去除率为 92%,而亚硝化率已高达 99%,而更重要的是,反应器从第 90d 开始实现了较高的亚硝化功能后,一直在较高的亚硝化率下运行,至此,又已运行了 30d,所以,颗粒污泥中的 NOB 在较长时间内持续受到生长抑制,与 AOB 相比,其相对数量已有明显下降。



AOB 探针: NSO190-ROX
NOB 探针: NIT3-FITC
图 2 AOB 与 NOB 菌群荧光原位杂交结果
Fig. 2 Results of FISH with AOB and NOB probe

颗粒污泥功能的变化与其中微生物种群的变化是相应的. 利用 FISH 技术可以直观地观察到 AOB 和 NOB 在不同运行阶段的空间分布情况,这是好氧硝化颗粒污泥中 AOB 和 NOB 等不同类型的微生物在不同运行条件进行下优化调整的结果.

2.3 颗粒污泥中 AOB 的定量化研究

利用荧光实时定量 PCR 分别测定了 4 个颗粒样品中 AOB 与真细菌总 16S rDNA 的拷贝数,结果如表 3 所示。
通常认为,一般的细菌中平均含有 rDNA 的拷贝数是基本固定的,约为 2~ 3^[12],因此可以计算出 4 个样品中, AOB 在真细菌总量中所占的比例分别

表 3 颗粒污泥中 AOB 与真细菌的 16S rDNA 基因拷贝数

Table 3 16S rDNA copies of AOB and Eubacteria in different samples

样品名	AOB 总 16S rDNA 拷贝数/ copies·mL ⁻¹	真细菌总 16S rDNA 拷贝数/ copies·mL ⁻¹
A	5.48 × 10 ⁶	1.22 × 10 ⁹
B	4.74 × 10 ⁷	9.11 × 10 ⁸
C	2.26 × 10 ⁸	1.47 × 10 ⁹
D	2.36 × 10 ⁹	4.86 × 10 ⁹

为 0.45%、5.20%、15.37%、48.55%，如图 3 所示。由此可以看出，随着反应器的运行，AOB 的含量逐渐增加。在接种污泥中，几乎检测不到 AOB 的存在；而在样品 B，即当反应器运行 25d，进水氨氮负荷为 0.4kg/(m³·d)，此时，接种的絮状硝化污泥中的 AOB 已经开始在颗粒污泥表面生长，污泥中 AOB 含量约为 5.20%；随着反应器的继续运行，其氨氮负荷以及氨氮去除率均逐渐升高，到第 50d，反应器的氨氮负荷达到 1.0kg/(m³·d) 时，污泥中 AOB 占真细菌总量的比例已经提高到 15.37%，说明此时 AOB 在污泥中已有大量生长；当反应器运行至第 120d 时，进水氨氮负荷提高到 2.2kg/(m³·d)，氨氮去除率已经在较长时间内一直稳定在 90% 以上，此时，AOB 含量已经达到 48.55%，几乎占真细菌总量的一半，此时的 AOB 已经明显成为真细菌中的优势菌群。这也从另一个角度证实，此时的反应器已经成功实现了亚硝化功能，反应器中的颗粒污泥也已成功地从接种的厌氧颗粒污泥培养转变成了好氧亚硝化颗粒污泥。

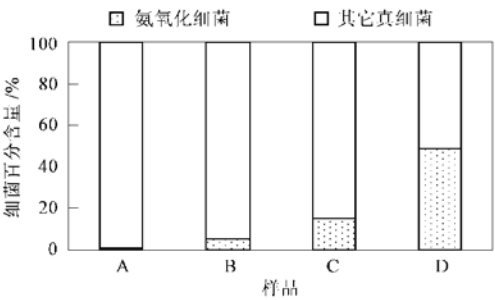


图 3 颗粒污泥中氨氧化细菌与真细菌含量变化
Fig. 3 Abundance of AOB in 4 granule samples

3 结论

(1) 在小试 AUSB 反应器中，成功培养获得了好氧亚硝化颗粒污泥，在氨氮负荷为 2.2 kg/(m³·d) 下，氨氮去除率可达 90% 以上，亚硝化率可达 95% 以上；
(2) 利用 FISH 技术对 4 个取自不同运行工况下的颗粒污泥中 AOB 和 NOB 的空间分布的研究表

明，AOB 主要生长分布在表层，NOB 则多分布在表层之下；在反应器的亚硝化率维持在 90% 以上并持续运行较长时间后，颗粒污泥中主要生长分布着 AOB，而 NOB 很少见；

(3) 利用 RTQ-PCR 对 4 个颗粒污泥样品中 AOB 占真细菌总量的比例的研究表明，接种的厌氧污泥中，基本检测不到 AOB；随着氨氮负荷的逐渐增加，AOB 的含量也逐渐提高，当运行至 120d，氨氮负荷为 2.2 kg/(m³·d) 时，AOB 在真细菌总量中的含量已经达到 48.55%。

参考文献：

[1] 郑平, 徐向阳, 胡宝兰. 新型生物脱氮理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004. 115~ 189.
[2] Fang H P, Chui H K, Li Y Y, *et al.* Performance and granule characteristics of UASB process treating wastewater with hydrolyzed proteins [J]. *Water Sci. Technol.*, 1994, **30**: 55 ~ 63.
[3] Joseph S, David W R. *Molecular Cloning* [M]. America: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 6.4~ 6.62.
[4] Yuji S, Yoichi K, Kazunori N, *et al.* Florescence *in situ* hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(3): 1280~ 1288.
[5] Wu J H, Liu W T, Cheng S S. Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system [J]. *Microbiology*, 2001, **147**: 373~ 382.
[6] Mobarry B K, Wagner M, Urbain V, *et al.* Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacterial [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62** (7): 2156~ 2162.
[7] Amann R I. *Molecular Microbial Ecology Manual: In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA targeted nucleic acid probes [M]. Kluwer Academic: Dordrecht, 1995. 1~ 15.
[8] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 308 ~ 384.
[9] Ovreas L, Forney L, Daae F L, *et al.* Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevanner, 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.
[10] Kowalchuk G A, Bodelier P L E, Heilig G H J, *et al.* Community analysis of ammonium-oxidizing bacterium, 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.
[11] 任南琪, 周大石, 马放. 水污染控制微生物学 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1993. 111~ 118.
[12] Bercovier H, Kafri O, Sela S. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **136**: 1136~ 1141.