

含硝氮废水的好氧反硝化处理及其系统微生物群落动态分析

王弘宇^{1,2}, 马放^{2*}, 苏俊峰², 左薇², 张佳², 张献旭²

(1. 武汉大学市政工程系, 武汉 430072; 2. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

摘要: 利用好氧反硝化细菌强化生物陶粒反应器处理含硝氮废水, 探讨了生物陶粒反应器中好氧反硝化生物脱氮的实现过程, 并运用变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)对微生物菌群结构稳定性进行了分析. 结果表明, 在水力负荷 0.75 m/h, 气水比 5:1 ~ 10:1, 水温 15 ~ 23℃, 进水 COD 负荷 1.92 ~ 5.98 kg/(m³·d), 硝氮负荷 0.60 ~ 1.34 kg/(m³·d) 的条件下, 生物陶粒反应器在稳定运行阶段可以基本实现对硝酸氮的完全去除, 对总氮的去除率最高可达 95.73%, 出水中亚硝酸盐一直保持在较低水平. PCR-DGGE 指纹图谱显示, 微生物多样性与废水的处理效果出现协同变化的特征. 在整个运行阶段, 好氧反硝化菌群 X31 在反应器中稳定存在, 并始终是优势菌群.

关键词: 好氧反硝化; 生物脱氮; 硝氮废水; PCR-DGGE; 微生物群落

中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)12-2856-05

Aerobic Denitrification of Nitrate Wastewater and Changes of Microbial Community Structure in a Bio-ceramic Reactor

WANG Hong-yu^{1,2}, MA Fang², SU Jun-feng², ZUO Wei², ZHANG Jia², ZHANG Xian-xu²

(1. Department of Municipal Engineering, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Biological treatment of nitrate wastewater with aerobic denitrifiers in a bio-ceramic reactor was investigated. And denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) method was used for analyzing the stability of microbial community structure. At the condition of the influent with hydraulic loading 0.75 m/h, gas/water ratio 5:1 ~ 10:1, temperature 15 ~ 23℃, COD loading rate 1.92 ~ 5.98 kg/(m³·d) and NO₃⁻-N loading rate 0.60 ~ 1.34 kg/(m³·d), high nitrate nitrogen removal of almost 100% and the maximum total nitrogen removal of up to 95.73% were achieved during stable operation stage. In addition, the nitrite concentration of effluent was lower. The PCR-DGGE profiles showed that shift of microbial diversity corresponded to the effect of nitrate removal and the preponderant populations for aerobic denitrification were steady during the test period.

Key words: aerobic denitrification; biological nitrogen removal; nitrate wastewater; PCR-DGGE; microbial community

水中硝酸盐氮污染日益受到人们的重视. 水中过量硝酸盐氮的存在会对人类健康构成严重威胁, 主要原因在于其能诱发高铁血红蛋白血症和胃癌^[1]. 鉴于此, 我国饮用水标准规定, 硝酸盐氮含量必须低于 10 mg/L. 当前已经有许多物理化学方法可以实现污染水体中硝酸盐的去除. 譬如, 离子交换、反渗透和电渗析等都是很有效的处理技术^[2]. 但是这些工艺的主要缺点就是成本很昂贵, 而且如何处理由这些工艺本身产生的高浓度的硝酸盐废水也是一个问题. 因而利用生物反硝化方法去除硝酸盐氮是脱除氮素污染的一种经济有效的方法^[3,4]. 一直以来, 反硝化被看作只有在厌氧或缺氧条件下才能实现. 但是在最近几十年中, 好氧反硝化现象不断被报道, 一些好氧反硝化细菌也已被筛选出来^[5-7]. 同传统的缺氧环境中的反硝化相比, 好氧反硝化有以下几个优点^[8]: ① 由于好氧反硝化可以和硝化反应在

同一个反应器中发生, 因而大大减少了系统空间和工程造价; ② 好氧反硝化的经济可行性较好, 其只需要较少的化学药剂来调节系统的 pH 值; ③ 好氧反硝化菌在处理运行中更容易被调控.

目前, 利用好氧反硝化菌群处理高浓度含硝氮废水还鲜见报道. 本研究就是利用固定化技术将好氧反硝化细菌固定于生物陶粒反应器上, 从而实现其好氧条件下对硝态氮的去除. 因而运行期间反应器中好氧反硝化菌群的稳定存在与否是关系到硝酸盐氮能否被持续去除的关键. 在此引入了变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术, 以对运行过程中好氧反硝化

收稿日期: 2006-04-18; 修订日期: 2006-09-27

基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目(50521140075); 黑龙江省科技攻关计划项目(GB05C202)

作者简介: 王弘宇(1976~), 男, 博士, 主要研究方向为环境生物技术和水污染控制, E-mail: cwwflybutter@yahoo.com.cn

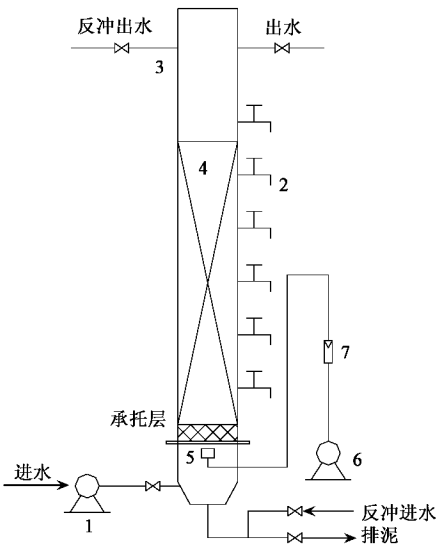
* 通讯联系人, E-mail: mafang@hit.edu.cn

菌群的稳定性进行快速监测. DGGE 是目前研究微生物遗传多样性和种群动态性最有力的分子生物学技术. 自从 1993 年 DGGE 被引入微生物生态学以来^[9], 该技术被广泛地用作分子工具比较微生物群落的多样性和监视种群动态^[10]. 本研究采用生物陶粒反应器, 探讨了固定化的好氧反硝化细菌对含硝氮废水的处理效果, 并运用 PCR-DGGE 技术对运行期间反应器中微生物菌群结构的稳定性进行了分析, 以期最终好氧反硝化细菌应用于工程实践提供基础资料.

1 材料与方法

1.1 试验装置

采用生物陶粒反应器, 试验装置如图 1 所示. 反应器为有机玻璃加工而成, 直径 100 mm, 柱高 2 000 mm. 底部为 100 mm 高的砾石承托层, 填料选用 3 ~ 5 mm 的陶粒, 填充高度 1 400 mm, 承托层筛板以上每隔 250 mm 设有 1 个取样孔. 压缩空气从底部经曝气扩散器进入, 用空气流量计调节曝气量.



1. 蠕动泵 2. 取样口 3. 反应器 4. 填料
5. 空气扩散器 6. 气泵 7. 气体流量计

图 1 试验装置示意

Fig.1 Schematic diagram of the experimental setup

1.2 试验用水和水质

试验用废水采用人工配水, 由 KNO_3 、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 MnSO_4 、 NaAC 和微量元素按一定比例配制. 其水质如表 1 所示.

1.3 试验方法

试验采用上向流进水, 气水同向. 在进行此试验

表 1 试验模拟用水水质/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Table 1 Water quality of the synthetic wastewater/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$					
水质指标	COD	$\text{NO}_3^- - \text{N}$	$\text{NO}_2^- - \text{N}$	TN	pH
浓度	150 ~ 357	46.5 ~ 104	0.07 ~ 8.47	54.3 ~ 114	6.8 ~ 7.5

前, 为了实现快速的固定化, 向反应器中投加了富含大量好氧反硝化细菌 X31^[11] 的脱氮污泥, 淹没所有填料, 此污泥取自本实验室正在运行的好氧脱氮反应器. 在反应器底曝气培养 2 d 后, 改为连续流进水. 低负荷运行 7 d 后, 将水力负荷提高至 0.75 m^3/h , 此时反应器中微生物主要以异养菌和好氧反硝化细菌为主. 试验阶段水力负荷维持在 0.75 m^3/h , 气水比为 5:1 ~ 10:1. 试验过程中, 第 1 ~ 14 d 水温在 15℃ 左右; 第 15 ~ 30 d 控制温度在 23℃ 左右.

1.4 分析方法

采用国家标准方法^[12] 测定 COD、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 和 TN. 采用 pHS-25 型酸度计测量 pH. 采用 YSI5000 型溶解氧测定仪测定 DO.

1.5 基因组总 DNA 16S rDNA V3 区扩增

(1) 引物 采用对大多数细菌和古细菌的 16S rRNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F338G C 和 R518, 它们的序列分别为: F338G C: (5'-CGCCC GCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAC TCCTACGGGAGGCAGCAG-3'), R518: (5'-ATTACCG CGGCT GCTGG-3').

(2) PCR 反应体系 50 μL 的 PCR 反应体系组成: 100 ng 模板、20 pmol 正反引物、200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP (每种 10 mmol/L)、5 μL 的 10× PCR buffer (MgCl_2)、2.5 U 的 *Pfu* DNA 聚合酶, 无菌纯水补齐到 50 μL .

(3) PCR 反应条件 采用降落 PCR 策略扩增, 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 65℃ 退火 1 min, 72℃ 1 min 延伸, 每个循环退火温度降低 0.5℃ 直至 55℃, 30 个循环, 72℃ 最终延伸 8 min. PCR 反应的产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.6 变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 分析采用 Bio-Rad 公司 Dcode™ 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离.

(1) 变性梯度胶的制备 使用梯度混合装置, 制备 8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 变性剂浓度从 30% 到 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺的混合物), 其中变性剂的浓度从胶的上方下方依次递增.

(2) PCR 样品的加样 待变性梯度胶完全凝固后, 将胶板放入装有电泳缓冲液的电泳槽中, 取 PCR

样品 5 μL 和 10 倍加样缓冲液混合后加入上样孔。

(3)电泳及染色 在 150 V 的电压下,60℃电泳 4 h. 电泳结束后,将凝胶进行银染。

(4)胶图扫描 将染色后的凝胶用透射扫描仪扫描后获取胶图,在凝胶两面覆上干胶膜,用干胶夹定型,自然干燥后长期保存。

2 结果与讨论

2.1 对硝氮和总氮的去除效果

试验期间生物陶粒反应器对硝态氮的去除效果如图 2 所示。从图 2 中可以看出,在水力负荷 0.75 m/h,气水比5:1~10:1,水温 15~23℃,进水 COD 负荷 1.92~5.98 $\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$,硝态氮负荷 0.60~1.34 $\text{kg}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$ 的条件下,对硝氮的平均去除率可以达到 80.70%。除初期硝酸盐的去除率波动较大外,其后硝酸盐去除率逐步升高,在第 20 d 时硝酸盐去除率达到其最高值 100%,此后阶段硝酸盐基本被完全去除。而在整个试验期间出水亚硝酸盐含量一直保持在较低水平,其最高值不超过 7.6 mg/L ,平均为 1.71 mg/L 。图 2 中的结果亦显示,在温度为 23℃时,反应器平均出水硝酸盐浓度为 2.78 mg/L ,对硝酸氮的去除率要明显高于温度为 15℃时对硝氮的去除率。这主要是因为随着温度升高,细菌体内的化学反应和酶反应加快,生长和代谢活力增强,相应的脱氮率也随之升高。

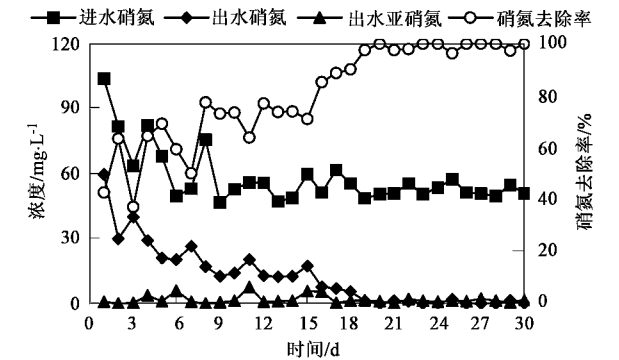


图 2 进出水中硝氮和亚硝氮浓度变化

Fig. 2 Nitrate and nitrite concentration in the influent and effluent

图 3 所示为试验期间生物陶粒反应器对总氮的去除效果。从图 3 可以看出,总氮去除率在前 8 d 的时间内亦呈现无规律的变化;在第 9~30 d,当进水总氮浓度为 54.38~75.47 mg/L 时,总氮去除率渐趋于稳定,并呈现缓慢上升的趋势,在第 20 d 达到最大值为 95.73%,此后总氮去除率一直保持在较高的水平。在第 15~30 d,温度为 23℃左右时,出水总

氮的平均浓度为 6.5 mg/L ,其间最小出水总氮浓度达到 2.5 mg/L 。由此可知,进水硝酸盐氮基本上都被转变成了气态氮逸出。

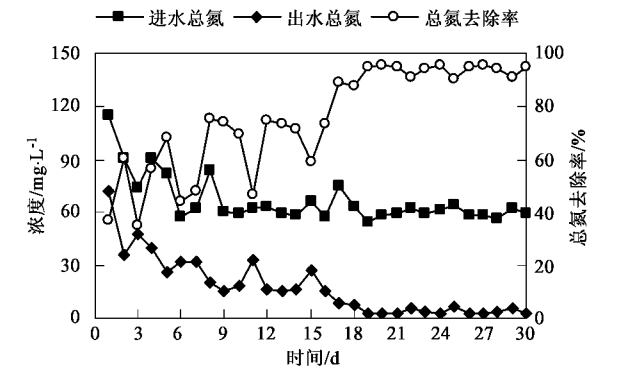


图 3 进出水中总氮浓度变化

Fig. 3 TN concentration in the influent and effluent

2.2 反应器中氮素和 DO 沿程分布规律

为进一步考察生物陶粒反应器内在好氧条件下实现的反硝化过程,研究了反应器内各种不同无机含氮化合物的浓度及 DO 沿水流方向的空间变化。采样时水力负荷 0.75 m/h,气水比8:1,水温 22.5℃。试验结果见图 4。

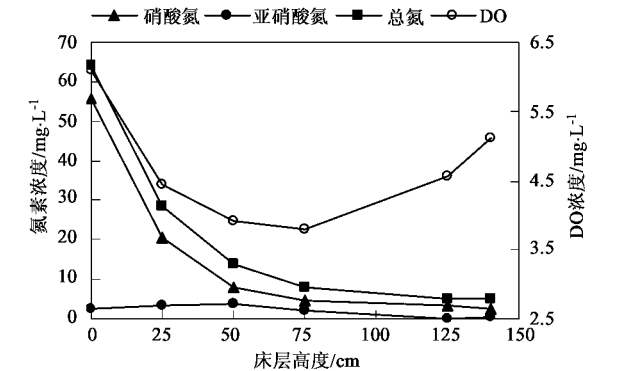


图 4 氮素浓度和 DO 浓度沿床层变化

Fig. 4 Nitrogen and DO concentration along the direction of the water flow in the bio-ceramic reactor

由图 4 中可知,反应器中溶解氧浓度一直处于较高的水平。在从进水到 0.75 m 深滤层处,硝酸氮去除明显,在填料层 0.75 m 处,硝酸氮去除率达到 91.6%,相应的总氮去除率为 87.7%。而在此区域亚硝酸盐只有微量增加,在填料层 0.5 m 处达到最大值 3.59 mg/L 。从图 4 也可以看出,在 0~0.5 m 区域内,DO 迅速消耗,DO 浓度快速下降,在 0.5 m 处达到最小值 3.91 mg/L 。而在 0.75~1.4 m 处,硝酸盐去除不多,在填料层 1.4 m 处的硝酸氮去除率为

95.3%,出水硝酸氮浓度为 2.57 mg/L;总氮去除率为 92.2%,出水总氮浓度为 4.97 mg/L.最终出水亚硝酸氮浓度为 0.22 mg/L.在此区域反应器中 DO 浓度缓慢增加,至出水处达到 5.11 mg/L.

由此可知,硝酸盐还原主要在 0~0.75 m 填料区域内进行,绝大部分总氮也是在此区域得到去除. DO 浓度在此区域从 6.10 mg/L 快速下降到 3.91 mg/L,在此区域内氧气被大量的消耗.这意味着氧气在此硝酸盐还原的过程中也被用作了电子受体.而在整个沿程变化过程中,亚硝酸盐先是微量积累而后又逐渐消失.这些变化说明在反应器中高浓度的溶解氧存在条件下,硝酸盐仍能完全还原成气态氮.根据试验期间反应器内硝酸氮的反硝化数量和有机碳源的消耗量,可以得到在反硝化过程中每去除 1 mg 的硝酸氮约消耗 3.78 mg COD.另外,根据试验结果,当反应器内 DO 浓度控制在 3.6~5.5 mg/L 时,能够取得最佳的好氧脱氮效果,其脱氮率可以稳定在 91.07%~95.73%.分析原因,在反应器中可能引起反硝化的微生物主要有:厌氧反硝化菌、好氧反硝化菌和反硝化聚糖菌等.但是反硝化聚糖菌一般是利用自身吸收储存的胞内物质进行反硝化,其反硝化速率会较低,因而在有充足外碳源存在的情况,其反硝化作用并非主要作用.而厌氧反硝化菌由于反应器中高浓度溶解氧的存在,其在生物膜中的空间位置被限制的很小,一般存在于生物膜的内层.而在外层则是好氧反硝化菌和一些异养菌.这样好氧反硝化菌就可以优先利用溶氧和底物进行反硝化,因而可以认为陶粒反应器中对反硝化起主要作用的应该是生物膜中存在的大量的好氧反硝化菌.而前期相关的实验亦显示^[11],所投放的好氧反硝化菌 X31 中的硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶均具有很强的活性.与已报道的一些好氧反硝化菌相比^[8,13],X31 菌株的反硝化酶系有更强的耐受较高溶解氧的能力.X31 菌株能在好氧条件下进行反硝化主要是菌体中存在着周质硝酸盐还原酶. Patureau 等亦证实^[14],一些异养好氧反硝化菌中周质硝酸盐还原酶在好氧条件下较厌氧条件下能够更好地被表达,因而其能在好氧条件下进行反硝化脱氮.

2.3 好氧反硝化菌群稳定性

为考察陶粒反应器在运行过程中系统内微生物群落的种群演替情况,同时进一步确证系统中好氧反硝化菌群的稳定存在,对不同时期的生物膜样品进行了 DGGE 分析.

本试验分别在正式运行的不同时期(第 1、15、

30 d)取样,采用真细菌 16S rRNA 基因通用引物 F338/R518,所做的 PCR-DGGE 图谱如图 5 所示,图中样品 1、2、3、4 分别代表 X31、1 d、15 d、30 d.从 PCR-DGGE 图谱可以看出样品 2 有 19 条带,样品 3 有 11 条带,样品 4 有 9 条带.由于反应器的初期启动是往其中投加了富含好氧反硝化菌 X31 的脱氮污泥,里面同时含有大量异养细菌和硝化细菌,虽在正式试验开始之前经过 7 d 的低负荷运行,里面仍含有大量异养细菌和部分硝化细菌.因而在 DGGE 图谱中第 1 d 其微生物种群多样性最高,也就是条带数最多,随着时间的推移,一些异养细菌由于营养条件不适而逐渐被淘汰.第 15 d 微生物种群多样性开始降低,到第 30 d 时微生物种群多样性最低,好氧反硝化细菌由于适宜的营养条件而逐渐成为优势菌群,群落结构组成逐渐趋于稳定.活性污泥经过驯化过程,微生物数量和优势种群减少,第 30 d 时微生物多样性显著要低于第 1 d,聚类分析表明(表 2) 15 d 与 30 d 微生物群落相似性最高为 63.64%,1d 与 30 d 微生物群落相似性最低为 23.8%,在菌群演替过程中既存在原有种属消亡,也有新种属的增长.

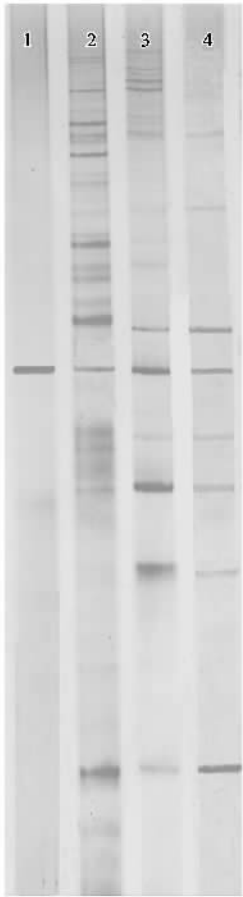


图 5 不同样品的 DGGE 图谱

Fig.5 DGGE profile of different samples

表 2 DGGE 图谱的相似性分析/%

Table 2 Similarity coefficient of the DGGE profiles/%			
时间	1 d	15 d	30 d
1 d	100		
15 d	36.37	100	
30 d	23.8	63.64	100

从 PCR-DGGE 图谱可以看出好氧反硝化细菌 X31 在生物陶粒反应器运行过程中始终是优势菌群,说明 X31 菌株通过物理吸附作用已经固定于陶粒上,由于合适的环境及营养条件使 X31 在陶粒上得以生长繁殖并保持一定的数量,第 30 d 时生物陶粒反应器中除了 X31 还存在数种其它优势细菌,这些细菌可能是其它种类的好氧反硝化细菌或者对环境适应能力较强的细菌,这些细菌通过协同竞争作用形成一个稳定的系统,在这个系统中各种细菌都拥有自己合适的位置,这也进一步体现了生态位的理论.稳定运行期的硝酸氮及总氮去除效率、反应器中溶解氧变化趋势和 DGGE 指纹图谱共同显示,可以判断这一时期反应器中形成了稳定的好氧反硝化菌群,这是生物陶粒反应器能稳定去除硝酸盐氮的基础.

3 结论

- (1)在水力负荷 0.75 m/h,气水比5:1~10:1,水温 15~23℃,进水 COD 负荷 1.92~5.98 kg/(m³·d),硝态氮负荷 0.60~1.34 kg/(m³·d)的条件下,固定了好氧反硝化细菌的陶粒反应器对硝态氮的平均去除率可以达到 80.70%.在稳定运行阶段,其对硝态氮可以基本达到完全去除,对总氮的去除率最高可达 95.73%,并且出水中亚硝酸盐一直保持在较低水平.
- (2)通过反应器内沿程无机氮化合物及 DO 浓度变化可知,硝酸盐还原和氧气消耗主要发生在进水端的 0~0.75 m 填料区域内,反应器中溶解氧浓度一直处于较高的水平.这些表明在反应器中发生了完全的好氧反硝化,究其原因主要是由于反应器内生物膜中存在大量好氧反硝化菌所致.
- (3)PCR-DGGE 结果显示,微生物种群演替过程中,微生物多样性呈直线下降,不同时期的生物陶粒反应器中既存在共同的微生物种属,同时也存在着各自独特的微生物种属,不同微生物种属之间形

成了特定的生态位的群落结构.在整个运行阶段,好氧反硝化菌群 X31 在反应器中稳定存在,并且始终是优势菌群.

参考文献:

[1] Crespi M, Ramazzotti V. Evidence that N-nitroso compounds contribute to the causation of certain human Cancers [A]. In: Bogardi I, Kuzelka R D, (eds.). Nitrate contamination [C]. Germany: Springer, NATO ASI Ser, Vol. G30. 1991.

[2] Shrimali M, Singh K P. New methods of nitrate removal from water [J]. Environ Pollut, 2001, 112: 351 ~ 359.

[3] Foglar L, Briski F, Sipos L, et al. Nitrate removal form synthetic wastewater with the mixed bacterial culture [J]. Bioresour Technol, 2005, 96: 879 ~ 888.

[4] Rabah F K J, Dahab M F. Nitrate removal characteristics of high performance fluidized-bed biofilm reactors [J]. Wat Res, 2004, 38: 3719 ~ 3728.

[5] Robertson L A, van Niel Ed W J, Torremans ROB A M, et al. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha* [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(11): 2812 ~ 2818.

[6] Patureau D, Godon J J, Dabert P, et al. *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions [J]. Int J Sys Bacteriol, 1998, 48: 775 ~ 782.

[7] Scholten E, Lukow T, Auling G, et al. *Thaurea mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant [J]. Int J Sys Bacteriol, 1999, 49: 1045 ~ 1051.

[8] Huang H K, Tseng S K. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55(1): 90 ~ 94.

[9] Muyzer G, DeWaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16SrRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695 ~ 700.

[10] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems [J]. Curr Microbiol, 1999, 2: 317 ~ 322.

[11] 马放,王弘宇,周丹丹,等. 好氧反硝化菌株 X31 的反硝化特性 [J]. 华南理工大学学报, 2005, 33(7): 42 ~ 46.

[12] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法 [M]. (第三版). 北京: 中国环境科学出版社, 1997.

[13] Lukow T, Diekmann H. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL1 [J]. Biotechnol Lett, 1997, 19 (11): 1157 ~ 1159.

[14] Patureau D, Bernet N, Moletta R. Study of the denitrifying enzymatic system of *Comamonas* sp. strain SGLY2 under various aeration conditions with a particular view on nitrate and nitrite reductases [J]. Curr Microbiol, 1996, 32: 25 ~ 32.