

曝气生物滤池处理生物质废水及降解菌分析

杨金水, 刘伟杰, 吴佳莲, 李宝珍, 袁红莉*

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要: 生物质污水含有大量的纤维素、半纤维素、淀粉、糖类、有机酸、蛋白质, COD 值很高, 严重污染环境, 并造成生物质资源浪费. 采用曝气生物滤池(BAF)处理生物质污水, 通过分析污水化学需氧量(COD), 总氮(TN)的去除率表征该系统对高 COD 生物质污水的处理效果. 结果表明, 水力停留时间(HRT)为 10 h, 进水运行 10 h 后, 出水平均 COD 为 74.90 mg/L, 总氮(TN)为 1.21 mg/L, 去除率分别达到 95.7% 与 94.5%, 均达到国家污水综合排放标准(GB 8978-1996)第二类污染物最高允许排放浓度的一级标准. 系统运行稳定后, 利用扫描电镜(SEM)观察载体的表面微生物的挂膜情况, 并结合微生物分离、单菌处理效果评价、16S rDNA 鉴定技术对系统内去除 COD 的优势菌群进行了分析, 优势菌群为假单胞菌属、不动杆菌属、寡养单胞菌属、红球菌属、微杆菌属.

关键词: 曝气生物滤池; 生物质废水; 微生物分离; 16S rDNA 序列

中图分类号: X172; X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3133-05

Application of Biological Aerated Filter in Treating Biomass Wastewater and Its Microbial Population Characteristics

YANG Jin-shui, LIU Wei-jie, WU Jia-lian, LI Bao-zhen, YUAN Hong-li

(College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Biomass wastewater contains plenty of cellulose, hemicellulose, starch, saccharide, organic acid and protein. It has high COD value and leads to environment pollution and resource waste. Biomass wastewater was treated in this investigate using a biological aerated filter (BAF) on laboratory scale, and the effect of treatment in different hydraulic retention time (HRT) had been studied. The results show that the optimum HRT is 10 h. The value of COD and TN in effluent is 74.90 mg/L and 1.21 mg/L respectively when run 10 h, which are under the highest concentration of the second category of pollutant discharge allowed in the state sewage discharge standard (GB 8978-1996). When the system is stabile, evaluating the population characteristics of dominating microorganism in BAF with biology analysis such as microbial screening, single bacteria evaluation and 16S rDNA sequences analysis. The dominant bacteria belonged to *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Rhodococcus* sp. and *Microbacterium* sp..

Key words: biological aerated filter; biomass wastewater; microbial screening; 16S rDNA sequences

以生物质为原料的工业如造纸、制糖、酒精发酵、食品制造等, 在获得产品的同时产生了大量的废水, 这类废水含有大量的纤维素、半纤维素、淀粉、糖类、有机酸、蛋白质, COD 值很高, 严重污染环境, 并造成生物质资源浪费^[1]. 因此采用合适的工艺对其进行高效处理是回收资源、降低成本、减轻环境污染的关键途径.

曝气生物滤池是一种固定化床生物滤池^[2,3]. 反应系统内生物类型丰富繁多, 且呈梯度分布, 加上曝气充足, 处理效率高, 出水水质好, 水力停留时间短, 能耗低, 是近年来研究较多的废水处理新工艺^[4~6]. 但目前曝气生物滤池主要应用于低 COD 出水的深度处理^[7], 其进水 COD 基本上不超过 1000 mg/L^[8,9], 鲜见关于其直接进行高浓度 COD 处理的研究报道. 本实验首次采用单级曝气生物滤池技术直接处理高 COD 生物质废水, 以期缩短污水处理的工艺流程, 研究 BAF 工艺在高 COD 污水处理过程中的

可行性. 本研究以 COD、TN 为分析的指标, 对系统进行优化, 并在此条件下, 分离纯化反应体系内的微生物, 借助单菌处理废水的效价测定和分子生物学技术^[10], 分析系统内优势降解种群的组成, 这对进一步实现高效降解菌株的人工复配, 提高系统运行效率和生产高效污水处理菌剂具有一定的理论意义.

1 材料与方法

1.1 实验用水与设备

实验采用的生物质废水为京郊某啤酒厂经初步处理的废水, 其水质: COD 为 1 752 mg/L, 总氮(TN)为 21.85 mg/L.

收稿日期: 2007-11-13; 修订日期: 2008-01-15

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD07A01); 国家自然科学基金项目(30700010)

作者简介: 杨金水(1975~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为生物有机大分子的微生物降解, E-mail: yangjsh1999@163.com

* 通讯联系人, E-mail: hlyuan@cau.edu.cn

本实验采用的 BAF 单级生物反应器如图 1。

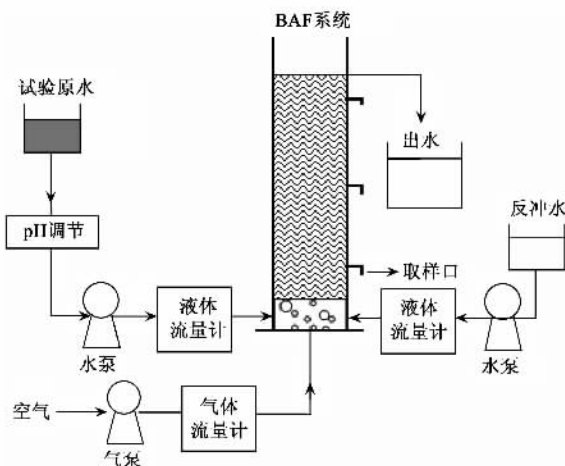


图 1 单级曝气生物滤池反应系统

Fig. 1 Schematic of single biological aerated filter

反应器由有机玻璃制作而成圆柱体,内填充粒径 3~5 mm 的生物菌专用填料(北京丰泽绿源环境技术有限公司),BAF 反应柱内直径 10 cm,高 0.5 m,载体层高度为 0.38 m,有效使用容积为 2.98 L.本试验调节试验原水 pH 为 7.2 后,采取下口进水,上口溢流出水的上流式污水处理方式。

1.2 COD、TN 的测定方法

本实验 COD 的测定采用重铬酸钾氧化法, TN 的测定采用过硫酸钾氧化-紫外分光光度法^[11]。

1.3 HRT 的优化

在前期工艺优化的基础上,本研究采取如下运行参数:气水比 20:1,采用气水联合反冲洗工艺^[12~14],反冲洗周期为 6 d,气反冲强度为 40 L/h,水反冲洗强度为 5 L/h,反冲洗时间 1 h。由于 HRT 是影响曝气生物滤池稳定运行的重要因素^[15,16],且与进水流速直接相关,本实验采取控制进水流速的方法探索最佳水力停留时间^[17,18]。分别调节 HRT 为 10、8、6 和 2 h,连续进行 4 组实验。每组实验开始进水 1 个水力停留时间后取第 1 个水样,之后每隔 12 h 取 1 次样,持续 72 h,每组实验共获得 6 个水样,并在取样后及时测定各水样的 COD 和 TN 值,并绘制系统对废水处理的效果曲线。

1.4 BAF 系统中微生物的分离纯化

当反应器运行稳定,出水 COD、TN 达到国家一级排放标准时,从反应器的上、中、下 3 个部位取 10 mL 水样,分别接种于 LB 液体摇瓶,28℃,180 r/min 富集培养 4 h 后,取 0.2 mL 涂布 LB 平板进行微生物分离纯化,对得到的单菌落,革兰氏染色镜检后进

行单菌降解效果测定。

1.5 单菌处理废水的效果

于 500 mL 三角瓶中装 150 mL 废水,灭菌。将分离纯化得到的菌种经液体活化后转接到装有灭菌废水的三角瓶中,接种量 1 mL,28℃、180 r/min 摇床培养,每隔 24 h 取水样 5 mL,冻存于 -20℃ 冰箱中,整个实验持续 10 d,共获得 200 个水样。离心除菌体后,分别测定水样的 COD 和 TN 值,计算单菌对 COD 及 TN 的去除率。对其中的 COD 去除具有明显优势的菌株进行系统分类地位分析,确定其种属地位。

1.6 DNA 提取及 16S rDNA 序列分析

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物技术公司)进行总 DNA 的提取。采用 16S rDNA 序列比对法对高效废水处理菌株进行了菌种的初步鉴定。PCR 克隆的正向引物为 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3',反向引物为 5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'。PCR 反应总体积为 25 μ L,在 0.2 mL Eppendorf 管中依次加入以下成分:10 $\times$ Buffer 2.5 μ L; dNTP 0.5 μ L; 正向引物 0.5 μ L; 反向引物 0.5 μ L; 模板 DNA 1.5 μ L; Taq 酶 0.3 μ L; 水 19.2 μ L。PCR 的反应条件为 94℃ 预变性 3 min,然后 94℃ 变性 45 s,58℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 2 min,总共 30 个循环,最后在 72℃ 延伸 10 min,4℃ 下保温。扩增得到的 16S rDNA 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将目的条带回收纯化后进行序列测定。将测得的 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对分析,寻找最相似的已知序列及最相似的已知分类地位序列。用 MEGA 软件对测得的所有 16S rDNA 序列及其在 GenBank 中的最相似序列构建系统发育树,进行系统进化分析。

2 结果与讨论

2.1 BAF 运行参数优化结果

分析图 2、图 3 可知,当水力停留时间为 8 h 时,出水平均 COD 为 141.38 mg/L,出水平均 TN 为 3.31 mg/L。当 HRT 为 10 h 时,COD、TN 处理效率最高,系统运行 10 h 时,COD 即可降为 79.88 mg/L,去除率为 95.44%,TN 降为 1.84 mg/L,去除率为 91.58%,且系统运行稳定。而随 HRT 的缩短,COD、TN 的去除率明显下降。本试验为达到国家污水综合排放标准(GB 8978-1996)第二类污染物最高允许排放浓度的一级标准,采用的水力停留时间为 10 h。

2.2 微生物分离结果

当系统运行稳定后,对系统内载体上的微生物

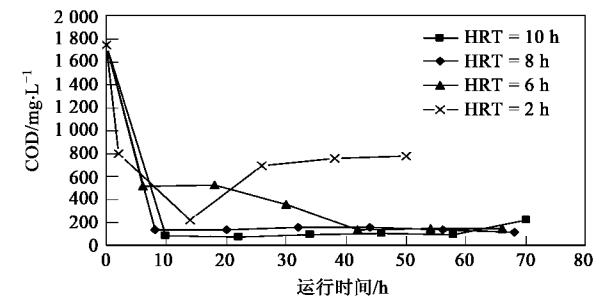


图 2 不同水力停留时间条件下 COD 的去除情况

Fig.2 COD removal in different hydraulic retention time

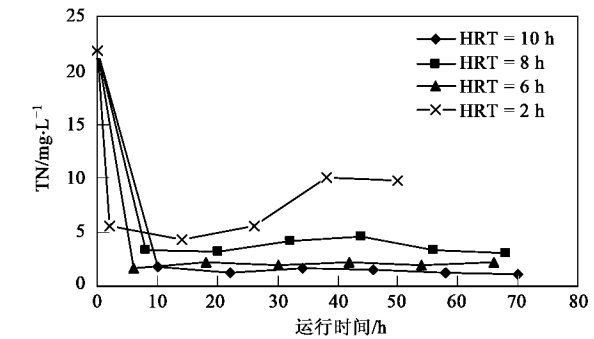


图 3 不同水力停留时间条件下 TN 的去除情况

Fig.3 TN removal in different hydraulic retention time

种群情况进行了电镜观察^[19],结果如图 4 所示.

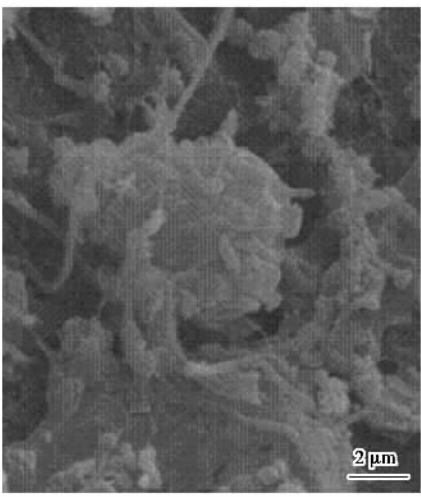


图 4 BAF 系统中载体上的微生物

Fig.4 Microorganisms analysis in BAF

从图 4 中可以看出,系统中微生物类群以细菌为主,除了少量丝状菌之外,大多数为细菌,因此采用 LB 培养基对其中的细菌进行了分离纯化,共分离纯化得到 20 株细菌,其中革兰氏阴性菌 12 株,革兰氏阳性菌 8 株,大部分为杆菌,其形态特征与电镜观察结果基本吻合.菌落特征及革兰氏染色结果如表 1 所示.

表 1 BAF 系统中优势细菌的个体形态
Table 1 Dominant bacteria in BAF system

编号	菌落特点	染色结果	菌体形态
FSh1	白色,圆形,边缘不整齐,有中心突起的褶皱	G ⁺	短杆菌
FSh2	中心橙红色向边缘逐渐变浅,圆形,边缘整齐,表面突起,光滑	G ⁻	短杆菌
FSh3	淡黄色,圆形,边缘整齐,表面突起,光滑	G ⁻	长杆菌
FSh4	淡黄色,圆形,边缘整齐,表面扁平,中心稍突起,光滑	G ⁻	短杆菌
FSh5	白色,圆形,边缘不整齐,表面突起,顶部有圆形褶皱,呈平台状	G ⁺	长杆菌
FSh6	白色,圆形,边缘不整齐,表面扁平,有细小粒状突起	G ⁺	长杆菌
FSh7	乳白色,圆形,边缘不整齐,表面突起,顶部有褶皱围成平台状	G ⁺	短杆菌
FSh8	乳白色,圆形,边缘不整齐,表面扁平,较粗糙	G ⁺	长杆菌
FSh9	中心亮黄色向边缘逐渐变浅,圆形,边缘整齐,表面突起,光滑	G ⁻	短杆菌
FSh10	白色,圆形,边缘不整齐,表面稍突起,顶部有圆形褶皱	G ⁺	短杆菌
FSh11	淡黄色,圆形,边缘整齐,表面稍突起,有光泽	G ⁺	球菌或短杆
FSh12	白色,圆形,边缘整齐,中心稍突起,有光泽	G ⁻	短杆菌
FSh13	白色,菌落很小	G ⁻	短杆菌
FSh14	亮黄色,圆形,边缘整齐,表面突起,光滑,有光泽	G ⁻	短杆菌
FSh15	白色,形状不规则,表面扁平,有光泽	G ⁻	短杆菌
FSh16	中心亮黄色向边缘逐渐变浅,圆形,边缘整齐,表面突起,光滑	G ⁻	短杆菌
FSh17	嫩粉色,圆形,边缘整齐,表面突起,光滑	G ⁺	长杆菌
FSh18	金黄色,圆形,边缘整齐,中心稍突起,光滑,有光泽	G ⁻	短杆菌
FSh19	中心亮黄色向边缘逐渐变浅,圆形,边缘整齐,表面突起,光滑	G ⁻	短杆菌
FSh20	橙红色,圆形,边缘整齐,表面扁平,光滑	G ⁻	长弧形

2.3 单菌处理废水的效价测定结果

对分离到的 20 株单菌株分别进行处理废水的

摇瓶实验,连续取样 10 d,共得到 200 个水样.对其第 10 d 的总去除效果进行了测定,去除情况如表 2.

表 2 单菌对 COD 的去除效果分析
Table 2 COD removal by single bacterium

编号	COD/mg•L ⁻¹	COD 去除率/%
FSh1	590.17	53.98
FSh2	380.33	70.34
FSh3	280.04	78.16
FSh4	462.73	63.92
FSh5	589.3	52.98
FSh6	612.23	52.26
FSh7	494.98	60.19
FSh8	549.9	57.12
FSh9	1 059.49	39.52
FSh10	471.54	63.23
FSh11	338.35	73.62
FSh12	351.4	72.6
FSh13	493.52	61.52
FSh14	1 021.23	20.37
FSh15	564.5	55.98
FSh16	355.91	72.25
FSh17	528.7	58.78
FSh18	327.44	74.47
FSh19	441.33	65.59
FSh20	355.92	72.25

分析表 2 可知,除 FSh9 和 FSh14 2 株菌之外,其

余菌株对废水 COD 的去除效果均能达到 50% 以上,其中 FSh3、FSh11、FSh12、FSh16、FSh18、FSh20 这 6 株菌相对突出,摇瓶实验进行 10 d 后,COD 的总去除率分别达到 78.16%、73.62%、72.6%、72.25%、74.47%、72.25%。而对于水样中 TN 的去除效果并不理想,经过 10 d 摇瓶培养后,水样的 TN 值不但没有降低,反而略有增加。分析原因是在好氧摇瓶培养条件下,分离得到的为高效 COD 降解菌,虽然近年来有关于好氧反硝化菌的报道^[20~22],但本实验中分离得到的菌株不具有好氧反硝化的能力,从而导致对总氮无明显去除效果。

2.4 16S rDNA 鉴定结果

对分离得到的 20 株菌中的 6 株优势菌株: FSh3、FSh11、FSh12、FSh16、FSh18、FSh20 进行 16S rDNA 分析,得到的序列结果,并提交 Genbank,取得登陆号分别为: EU376969、EU376968、EU376970、EU376971、EU376972、EU376973,通过 NCBI 的 Blast 软件和 MEGA 软件与目前报道的 16S rDNA 序列进行比对,构建系统发育树,确定其种属关系和系统分类地位,结果如图 5 所示。

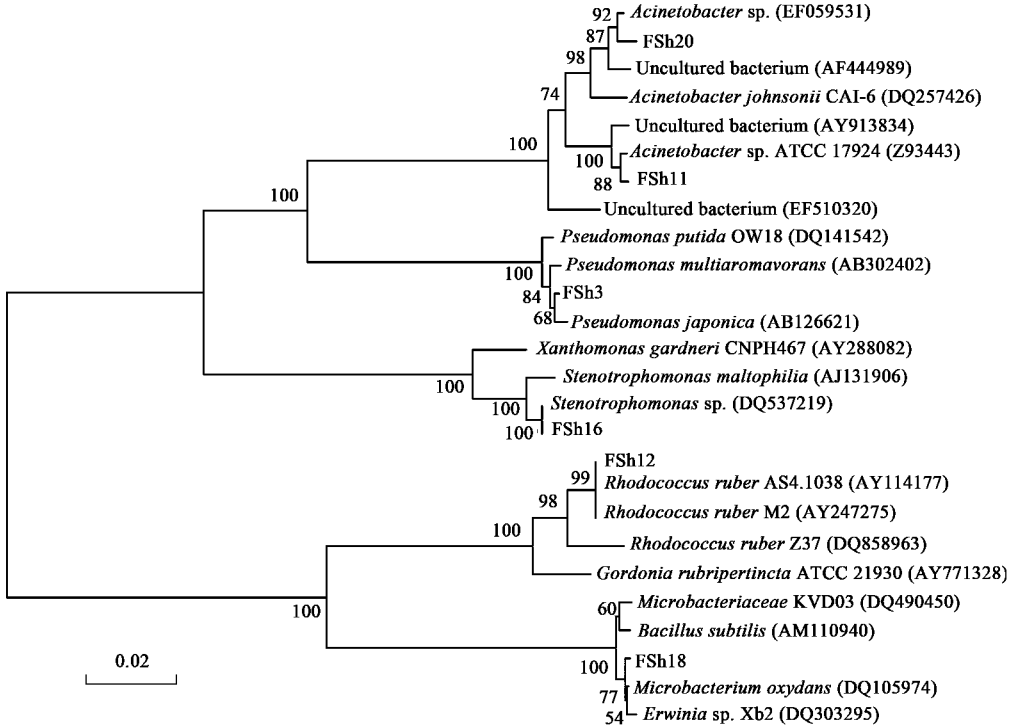


图 5 BAF 系统中优势菌的系统发育树
Fig.5 Phylogenetic tree of dominant bacteria in BAF

BAF 系统中优势细菌的系统发育分析结果表明,对 COD 起主要去除作用的菌分别属于假单胞菌

属 (*Pseudomonas* sp.)、不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)、红球菌

属 (*Rhodococcus* sp.) 和微杆菌属 (*Microbacterium* sp.). 其中 FSh3 与日本假单胞菌 (*Pseudomonas japonica*) 的同源性达到 100%, 与洋葱假单胞菌 (*Pseudomonas multiaromavorans*) 的同源性为 99%; FSh11 与不动杆菌属的菌株 ATCC 17924 的同源性达到 99%; FSh12 与赤红球菌的同源性为 100%; FSh16 与嗜麦芽糖寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 的同源性为 98%; FSh18 与氧化微杆菌 (*Microbacterium oxydans*) 的同源性达到 99%. 由这些结果可以看出, 在 BAF 系统中细菌的种群是非常丰富的, 其优势菌主要分布在一些已知的对木质纤维素类物质具有降解作用的属^[23~25], 与报道基本吻合. 该结果对于指导微生物菌种复配, 从而生产高效处理菌剂, 有针对性地进行废水高效处理, 提高废水处理的效率具有一定的指导意义.

3 结论

(1) 本实验所采用的 BAF 系统的水力停留时间为 10 h. 系统运行 10 h 时, 出水 COD 达到 79.88 mg/L, TN 值为 1.84 mg/L, 达到国家污水综合排放标准 (GB 8978-1996) 第二类污染物最高允许排放浓度的一级标准, 且能稳定运行.

(2) 采用 BAF 处理高 COD 的啤酒厂废水时, 反应体系内的菌株 FSh3、FSh11、FSh12、FSh16、FSh18、FSh20 为优势 COD 去除菌, 且分别属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、不动杆菌属 (*Acinetobacter* sp.)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas* sp.)、红球菌属 (*Rhodococcus* sp.) 和微杆菌属 (*Microbacterium* sp.).

参考文献:

[1] 丁忠浩. 生物质废水处理技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 140-145.

[2] He S B, Xue G, Kong H N. The performance of BAF using natural zeolite as filter media under conditions of low temperature and ammonium shock load[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, **143**: 291-295.

[3] Qiu L, Ma J, Zhang L. Characteristics and utilization of biologically aerated filter backwashed sludge[J]. Desalination, 2007, **208**: 73-80.

[4] Xie W, Wang Q, Song G, et al. Up flow biological filtration with floating filter media[J]. Process Biochemistry, 2004, **39**: 765-770.

[5] Chen J J, Mecarty D, Slcak D, et al. Full scale studies of a simplified aerated filter (BAF) for organic and nitrogen removal[J]. Wat Sci Tech, 2000, **41**: 1-4.

[6] Wang C, Li J, Wang B, et al. Development of an empirical model for domestic wastewater treatment by biological aerated filter[J]. Process Biochemistry, 2006, **41**: 778-782.

[7] 王立立, 刘焕彬, 胡勇有, 等. 曝气生物滤池处理低浓度生活污水的研究[J]. 工业水处理, 2003, **23**(3): 29-32.

[8] 崔福义, 张兵, 唐利. 曝气生物滤池技术研究与进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2005, **6**(10): 1-7.

[9] 贾国正, 张林生, 张显球. 曝气生物滤池技术的研究与应用[J]. 水资源保护, 2006, **22**(4): 71-74.

[10] Daims H, Taylor M W, Wagner M. Wastewater treatment: a model system for microbial ecology[J]. Trends in Biotechnology, 2006, **24**(11): 483-489.

[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] Serra C, Bourlier L D, Clifton M J, et al. Use of air sparging to improve backwash efficiency in hollow-fiber modules[J]. Journal of Membrane Science, 1999, **161**: 95-113.

[13] Kim J O, Jung J T, Yeom I T, et al. Effect of fouling reduction by ozone backwashing in a micro filtration system with advanced new membrane material[J]. Desalination, 2007, **202**: 361-368.

[14] 张宝杰, 闫立龙, 甄捷, 等. 曝气生物滤池最佳反冲洗周期及反冲洗方式研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2006, **38**(7): 1045-1050.

[15] 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.

[16] 邱立平, 马军, 张立昕. 水力停留时间对曝气生物滤池处理效能及运行特性的影响[J]. 环境污染与防治, 2004, **26**(6): 433-436.

[17] 赵昕, 倪晋仁, 叶正芳. 盐度对固定化曝气生物滤池中微生物的影响[J]. 环境科学, 2007, **28**(7): 1553-1559.

[18] Pujol R, Hamon M, Kandel X. Biofilters: flexible, reliable biological Reactors[J]. Wat Sci Technol, 1994, **29**(10-11): 33-38.

[19] Dimitrov D, Hadjiev D, Nikov I. Optimisation of support medium for particle-based biofilm reactors[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, **37**: 238-245.

[20] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 等. 好氧反硝化菌株的鉴定及其反硝化特性研究[J]. 环境科学, 2007, **28**(7): 1548-1552.

[21] Wang P, Li X, Xiang M, et al. Characterization of efficient aerobic denitrifiers isolated from two different sequencing batch reactors by 16S rRNA analysis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, **103**(6): 563-567.

[22] Patureau D, Hellon E, Rustrian E, et al. Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier *Microvirgula aerodenitrificans*[J]. Wat Res, 2001, **35**(1): 189-197.

[23] Kuba T, van Loosdrecht M C M, Heijnen J J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system[J]. Wat Res, 1996, **30**: 1702-1710.

[24] Lokesh K V. ¹⁴C-lignin-lignocellulose biodegradation by bacteria isolation from polluted soil[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2001, **39**(6): 584-589.

[25] Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review[J]. Bioresource Technology, 2000, **72**: 169-183.