

新型生态浮岛在改善水质中的作用及生物膜载体微生物特征研究

马强¹, 高明瑜¹, 谭伟¹, 谢慧君^{1*}, 王文兴^{1,2}

(1. 山东大学环境研究院, 济南 250100; 2. 中国环境科学研究院, 北京 100012)

摘要:设计了一种新型生态浮岛(IEFI),并对浮岛生物膜载体上的微生物进行了研究.结果表明,生物膜载体上的微生物对改善水质起到重要的作用,新型生态浮岛对 COD、TN、TP 的去除效果明显高于普通浮岛(CFI) ($p < 0.05$). COD、TN、TP 的最高去除率分别出现在 9 月、5 月和 11 月.构建了生物膜载体上微生物的克隆文库,结果表明,该生物膜中的微生物群落结构与其他种类生物膜不太相同,其中变形菌门占细菌比例超过了 67%,其次是拟杆菌门.在变形菌门中, Beta-变形菌最多,其次是 Alpha-变形菌和 Delta-变形菌.在 Alpha-变形菌中,超过 60% 为红杆菌属. Beta-变形菌中绝大多数为伯克氏菌门,黄杆菌门占拟杆菌门中的 75%. 酸杆菌, Delta-变形菌和放线菌的作用尚不清楚,需要进一步研究.硅藻类同样在该生物膜载体上被监测到.

关键词:生态浮岛;生物膜载体;微生物群落;克隆文库;16S rRNA

中图分类号:X172; X52 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3301(2011)06-1596-06

Role of New Type Floating Island in Improving Effluent Quality and the Characterization of Microbe on Biofilm Carrier

MA Qiang¹, GAO Ming-yu¹, TAN Wei¹, XIE Hui-jun¹, WANG Wen-xing^{1,2}

(1. Environmental Research Institute of Shandong University, Ji'nan 250100, China; 2. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: A new type of integrated ecological floating island (IEFI) was designed and applied. This study firstly assessed the role of microbe on biofilm carrier. The results showed that the average COD, TN and TP removal efficiencies of IEFI were much higher than those of conventional floating island (CFI), and that the statistical differences were observed in different pollution category ($p < 0.05$). Influent monthly concentrations of COD, TN and TP of IEFI were lower than those of CFI. The highest removal efficiency was present in September, May and November, respectively. Constructing clone library was used to analyze the microbe on biofilm carrier. The results, which were different with microbial group on other biofilms, indicated that clones affiliated Proteobacteria dominated more than 67% of the total clones, following by Bacteroidetes. Within the Proteobacteria, Beta-Proteobacteria group was the most abundant, following by Alpha-Proteobacteria and Delta-Proteobacteria groups. For Alpha-Proteobacteria, more than 60% of the phylum was related to Rhodobacter. The Beta-Proteobacteria clones were mostly related to Burkholderiales. Flavobacteria dominated 75% of Bacteroidetes group. Functions of Acidobacteria, Delta-Proteobacteria, and Actinobacteria are still unknown and need to be further studied. In addition, Bacillariophyta group were also detected in biofilm carriers.

Key words: floating islands; biofilm carrier; microbial community; clone library; 16S rRNA

在过去 30 a, 生物技术被广泛应用于环境保护及修复领域. 传统的化学废水处理系统具有工艺繁杂、耗资大、维持费用高等一系列的弊病^[1]. 新型生态浮岛是在普通浮岛基础上进行改良^[2,3], 将植物固定于浮岛的载体中, 根部深入水面, 可以有效地吸收水中营养物质^[4,5]. 和传统湿地中水生植物修复相比, 浮岛更适用于有小风浪和基质条件较差的富营养化湖泊^[6,7].

传统浮岛的净化效果受限于植被的生长率和生物量, 有些研究试图解决这些问题^[8], 尤其是提供更多的附着面以利于更多微生物的生长^[9,10]. 但是, 对这些附着面上微生物的情况却鲜有报道. 本研究中, 笔者构建了带有空心竹排和生物膜载体的新型

生态浮岛. 研究主要目的为: ①证实生物膜载体的必要性; ②研究生物膜载体中微生物的特征^[11].

1 材料与方法

1.1 新型生态浮岛的设计

浮岛示意图如图 1 所示, 主体是带有圆孔的竹排, 长 2.2 m, 宽 1.5 m, 厚度 0.1 m, 每节竹子均有钻的圆孔. 浮岛由两部分构成: 从上到下依次是植物

收稿日期: 2010-09-21; 修订日期: 2010-10-25

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2009ZX07210-009); 山东大学自主创新基金项目 (2009TS025); 国家自然科学基金项目 (21007032)

作者简介: 马强 (1985 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为水污染修复, E-mail: maqiang85@hotmail.com

* 通讯联系人, E-mail: xiehuij@sdu.edu.cn

部分和微生物载体部分. 芦苇栽种在空心竹排上,弹性立体填料作为生物膜载体悬挂在竹排下方,每个生态浮岛悬挂有 100 束弹性立体填料.

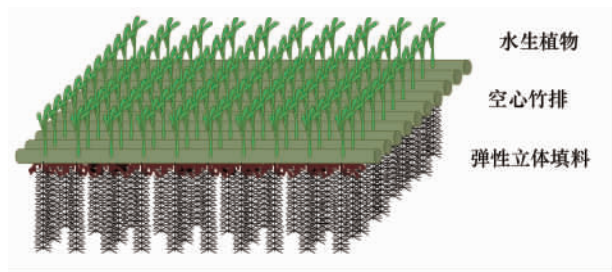


图 1 新型生态浮岛模拟示意

Fig. 1 Framework of the integrated ecological floating island (IEFI)

1.2 中试实验

实验基地位于南四湖入湖口新薛河上游 (N 34° 46. 146', E117°08. 992'), 中试实验在户外流通的 3 个池子中进行,长度 10 m,宽度 5 m,深度 0. 6 m. 所有池子上方均有玻璃顶覆盖,以促进自然光周期和避免雨水造成的影响. 进水为新薛河的河水. 3 个实验池安排如下:空白:为空白水面;CFI:芦苇 + 竹筏;IEFI:芦苇 + 竹筏 + 弹性填料.

1.3 水质分析

水样每月分 2 次在上午的 10:00 ~ 11:00 从实验池取样,所有样品均从进水口和出水口取样. 样品采集后,部分样品经 0. 45 μm 滤膜过滤用于 COD 分析. 未过滤样品用于分析 TN 和 TP. 考虑到物理沉积和水质自身净化的影响,CFI 和 IEFI 实验池中污染物去除率的计算公式为:

去除率(%) = $(c_B - c_T) \times 100 / c_B$
式中, c_B 为空白出水口浓度, c_T 为 CFI 或 IEFI 出水口浓度.

1.4 微生物分析

一定量的生物膜载体样品用已消毒的镊子放入 1. 5 mL 离心管中,添加缓冲液(0. 1 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液, pH 7. 0),在超声波清洗器中超声(f 40 kHz)7 min. 剩余的悬浮微生物在 4℃, 10 000 r/min 下离心 8 min,弃上清,采用快速 DNA 提取试剂盒(百泰克)对沉淀中的 DNA 进行提取. 16S rRNA 基因的扩增引物^[12] 为: 27f (5'-AGAGTTT GATCMTGGCTCAG- 3', M = C or A) 和 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT T- 3', Y = C or T).

PCR 反应体系为: 5 μL buffer, 1. 5 mmol/L MgCl₂, 0. 2 mmol/L dNTPs, 0. 2 μmol 引物, 1. 25U Taq 酶, 2 μL 模板. PCR 扩增条件为: 95℃ 预变性 5

min, 95℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 36 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min.

1.5 数据统计

采用方差分析法(ANOVA)对处理方法进行对比;用最小显著差值(LSD)对平均值进行比对;用 SPSS 11. 0 软件进行统计分析.

2 结果与讨论

2.1 IEFI 污染物平均去除率

实验首先进行了新型生态浮岛和普通浮岛的水质净化效果对比,实验时间为 2009 年 5 月 ~ 2009 年 12 月,结果如图 2 所示. 结果表明,同时带有植物和生物膜载体的 IEFI 系统污染物去除率明显高于 CFI 系统. 在 IEFI 中 COD 的平均去除率为 25. 65%,是 CFI 的 2 倍多. 同样,TN 和 TP 在 2 种系统中的去除率也有显著差异($p < 0. 05$). 在 IEFI 中, TN、TP 去除率分别为 50. 92% 和 25. 42%,而在 CFI 中仅为 25. 08% 和 11. 48%.

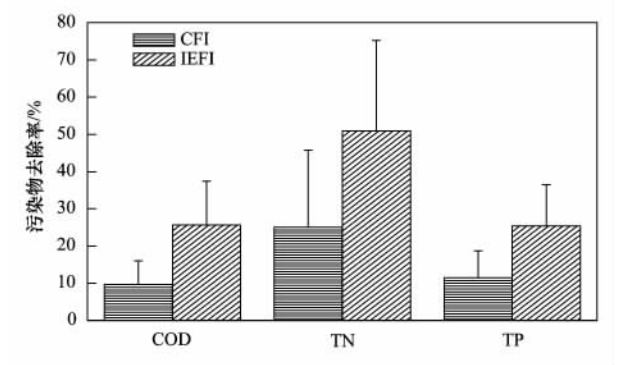


图 2 不同系统的污染物去除率

Fig. 2 Removal rates of pollutants for different systems

2.2 IEFI 对污染物的去除特征

在整个实验周期内,进水中 COD 的浓度为 $(34. 52 \pm 11. 45)$ mg/L,AN 的浓度为 $(1. 09 \pm 0. 77)$ mg/L,较稳定. 新型生态浮岛和普通浮岛的 COD 去除效果如图 3(a)所示. 结果表明,IEFI 体系中,出水 COD 值为 16. 34 ~ 32. 72 mg/L,去除率在 9 月最高为 41. 50%,在 12 月最低为 19. 09%,但不同月份的去除效果明显高于 CFI 体系. 但是本实验中 COD 的去除率(19. 09% ~ 41. 50%)远低于 Rousseau 等^[13]报道的 61% ~ 94%,其主要原因可能是由于本实验池进水中的 COD 值远低于该文献报道中的污水浓度,低浓度的有机负荷导致较低的去除率.

图 3(b)表明,在 8 个月的监测中,IEFI 系统对 TN 有较明显的去除效果. 进水中 TN 的浓度为

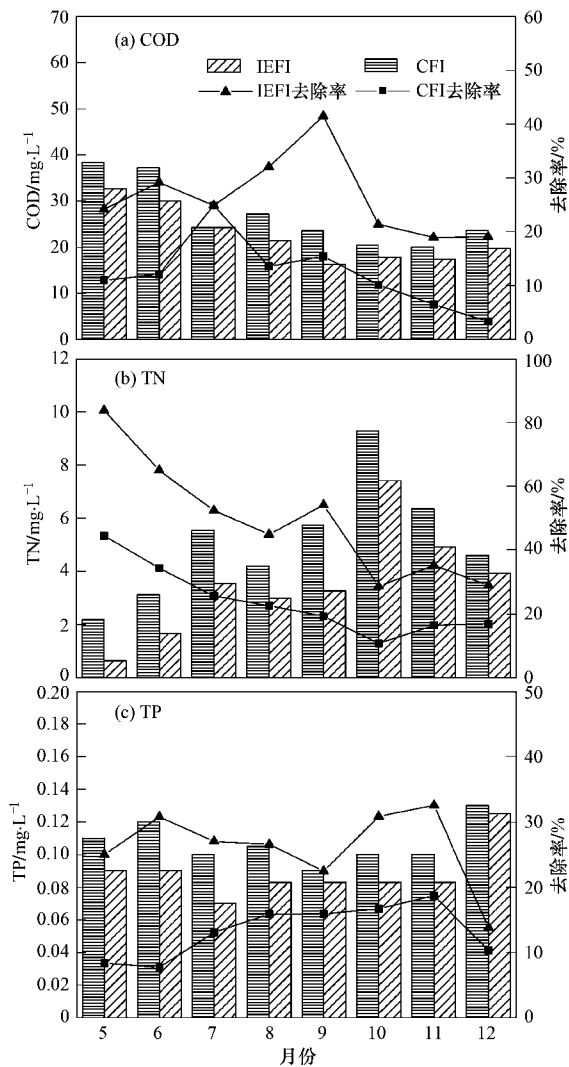


图3 IEFI和CFI两系统月污染物浓度及去除率变化趋势

Fig. 3 Monthly Pollutant removal characteristic of IEFI with biofilm carrier

(8.45 ± 2.61) mg/L, 出水为 ($0.64 \sim 7.41$) mg/L, 去除率最高可达 83.76% (5 月), 明显高于 CFI 系统去除率. 同时, 图 3(b) 表明从 5 ~ 9 月, TN 去除率较高, 10 月较低. 而影响 5 ~ 9 月 TN 去除效果的可能主要有 2 个因素: ① 芦苇的生长促进了 N 的吸收^[14]; ② 附着在根部和生物膜载体上的微生物起到的降解作用^[8,15]. IEFI 和 CFI 两系统对污染物的去除率在 11 月比较高, 主要是 2 个方面的原因造成的: ① 是 10 月份水生植物成熟被收割, 避免了植物因腐烂释放 N 元素导致二次污染^[16]; ② 由于在该年份 10 ~ 11 月, 气温较高, 因此, 微生物的活性也较高. 在 12 月, 两系统去除率迅速下降, 主要是因为低温使得微生物活性降低, 影响了 TN 去除效果.

在整个实验周期内, 进水中 TP 浓度为 ($0.14 \pm$

0.03) mg/L, 出水 TP 浓度变化较小. 结果如图 3(c) 所示. 结果表明, 12 月 TP 去除效果较差, 5 ~ 11 月进水 TP 浓度低但有较高的去除率. 和 IEFI 系统不同, CFI 系统在 7 ~ 11 月 TP 去除率较高, 而在 5、6 和 12 月较低, 主要原因可能是受植物因素影响. 在湿地系统中, 永久性去除磷的主要途径是植物吸收和沉淀^[17]. 虽然植物吸收对磷的去除起主要作用, 但在 IEFI 系统中, 微生物为植物吸收磷提供了更好的条件, 因此磷的去除效果仍然优于 CFI 系统.

2.3 生物膜载体上微生物的特征

在 IEFI 体系中, 微生物在改善水质过程中起到了重要作用. 通过构建克隆文库研究了生物膜载体中微生物的多样性. 从克隆文库中筛选出 168 个克隆进行原位测序. 从中去除不合理的结构, 保留剩余的测序结果进行进一步的分析. 按照相似度 100%、95%、92%、91%、85% 分为种、属、科、目、门等^[18]. 结果如图 4 所示. 结果表明, 变形菌门细菌最多, 占总克隆的 67% 以上, 其次是拟杆菌门. 其他依次为酸杆菌、硅藻类和放线菌, 这些种群所占比例较小, 均不超过 5%. 这些克隆体被分成 7 组采用 BLASTN 进行分析, 结果如图 5 所示. 在变形菌门中, Beta-变形菌所占比例最多, 其次是 Alpha-变形菌和 Delta-变形菌. Beta-变形菌大多属于伯克氏菌目. 红杆菌属和黄杆菌属, 分别占 Alpha-变形菌和拟杆

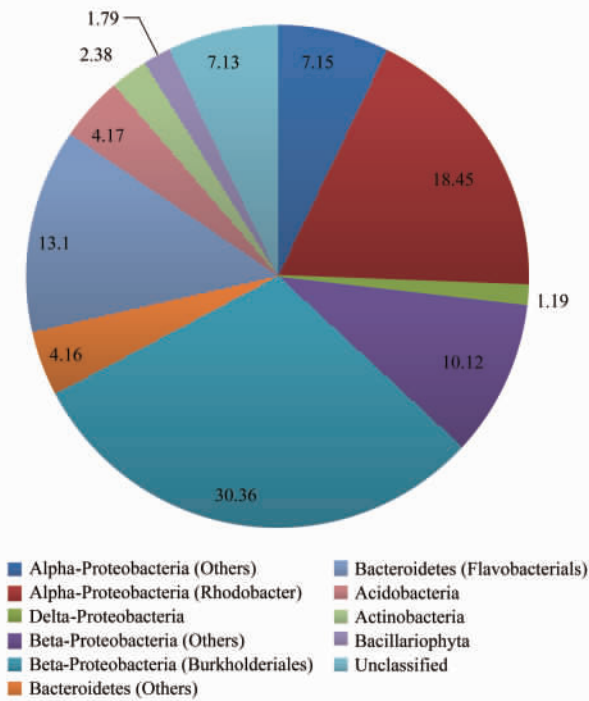


图4 克隆文库中种群分布 (n = 168)

Fig. 4 Distribution of phylogenetic groups in clone library (n = 168)

菌门的 72.09% 和 75.86%。该样品中,大多数的克隆基因与环境样品或未培养微生物相似,这表明生物膜载体上绝大多数微生物群落已被表征。

超过 70% 的 Alpha-变形菌属于红杆菌属,红杆菌属大多数属于光合细菌,有光合自养(厌氧型)、光合异养(厌氧/光照)或化学异养(需氧)型。在红杆菌属中,红细胞通过钼固氮酶及另外一种非金属类固氮酶固定大气中氧化亚氮^[19]。红杆菌属同样在生物膜上被发现,但并非主体^[20]。因此,在需要去除富含氮素中氮的体系中,需要增加红杆菌属比例。另外,有 30% 的 Alpha-变形菌属于不可培养微生物,但是这些微生物均在沼泽地带水生植物和饮用水生物膜中被发现。

值得注意的是, Beta-变形菌中绝大多数为伯克氏菌门。伯克氏菌门功能多样,可以生物固氮、促进

植物生长、控制生物学疾病^[21]。伯克氏菌门-尤其红育菌属,是一种异化的可以降低重金属的微生物,其生长依赖于有机质的氧化分解,例如厌氧条件下的葡萄糖分解,揭示了生物膜载体上微生物群落的复杂性。该实验结果和 Bereschenko 等^[22]报道的伯克氏菌门主要存在于给水而 Alpha-变形菌常见于生物膜上不同。

拟杆菌门在 IEFI 生物膜载体上所占比例仅次于变形菌门^[23],其中,黄杆菌占 80%。据报道,黄杆菌主要存在于好氧颗粒污泥中,而在好氧生物膜上的比例很低,更多被发现存在于去氮生物膜上^[24]。因此,要想在富含 N 的体系中去掉 N,可以适当增加黄杆菌比例。

酸杆菌也出现在其他一些生物膜上,但是它们的主要功能和作用尚不清楚,需进一步研究。生物膜

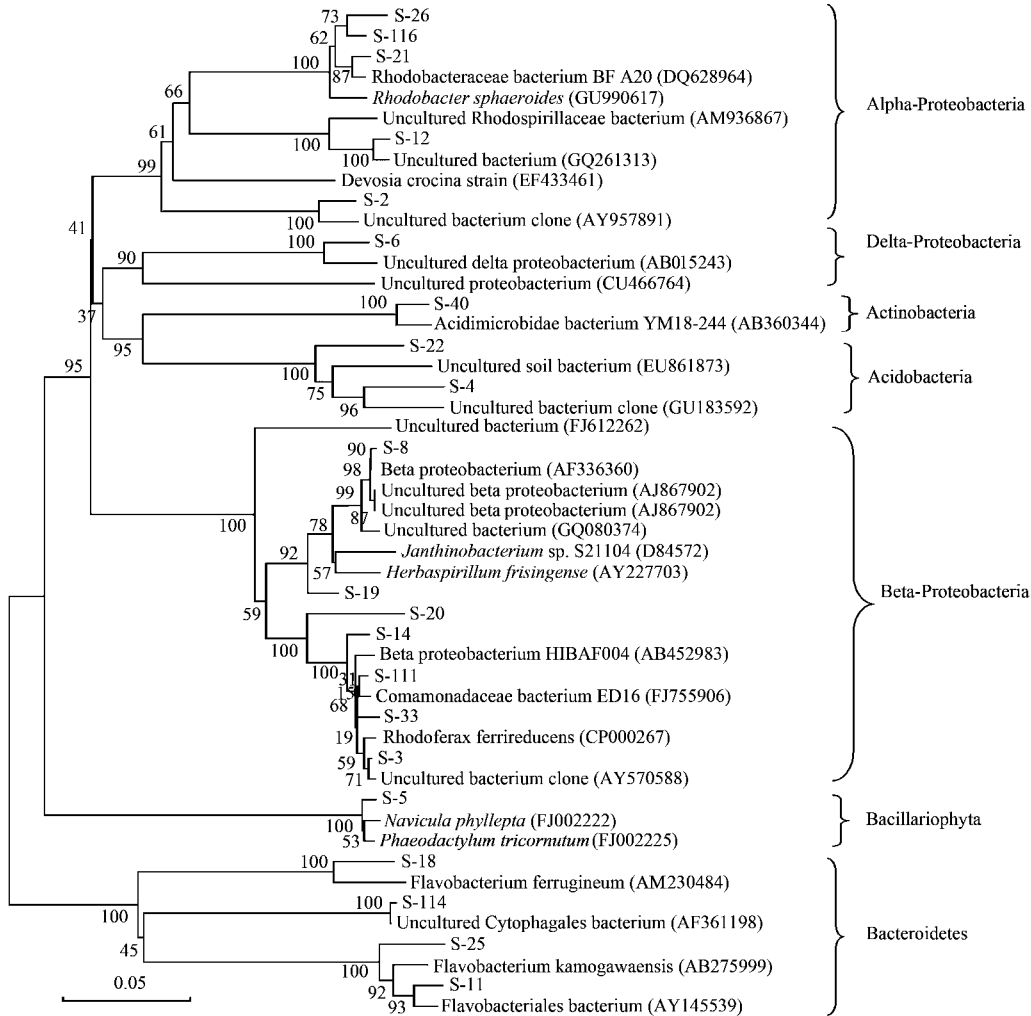


图5 生物膜载体上微生物种群的 Neighbour-joining 分析结果

Fig.5 Neighbour-joining analysis showing the phylogenetic relationship of 16S rRNA gene sequences on biofilm carrier in IEFI with other related organisms

载体上的 Delta-变形菌属于非培养细菌,和生物膜污染相关^[25],其作用也需进一步研究. 体系中同样监测到了硅藻类,据报道,在河道内的生物膜中,起初可能出现硅藻,然后会出现蓝藻. 但在该体系中并未监测到蓝藻^[26].

3 结论

(1)本实验中设计了一种新型的生态浮岛,并首先对浮岛生物膜载体上的微生物对改善水质起的作用进行了研究. 结果表明,IEFI 对 COD、TN、TP 的去除效果明显高于 CFI($p < 0.05$). 在整个实验周期内,IEFI 系统出水的 COD、TN、TP 的浓度均低于 CFI 出水. COD、TN、TP 的最高去除率分别出现在 9、5 和 11 月.

(2)其次,构建了生物膜载体上微生物的克隆文库. 结果表明,该生物膜中的微生物群落结构与其他类膜不太相同,其中变形菌门所占比例超过了 67%,然后是拟杆菌门. 在变形菌门中,Beta-变形菌最多,然后是 Alpha-变形菌和 Delta-变形菌. 在 Alpha-变形菌中,超过 60% 为红杆菌属. Beta-变形菌中绝大多数为伯克氏菌门,黄杆菌门占拟杆菌门中的 75%.

(3)酸杆菌,Delta-变形菌和放线菌的作用尚不清楚,需要进一步研究. 硅藻类同样在体系中的生物膜载体上被监测到.

参考文献:

[1] Carty A, Scholz M, Heal K, *et al.* The universal design, operation and maintenance guidelines for farm constructed wetlands (FCW) in temperate climates [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**: 6780-6792.

[2] Li X N, Song H L, L W, *et al.* An integrated ecological floating-bed employing plant, freshwater clam and biofilm carrier for purification of eutrophic water [J]. *Ecological Engineering*, 2010, **36**: 382-390.

[3] Stewart F M, Mulholland T, Cunningham A B, *et al.* Floating islands as an alternative to constructed wetlands for treatment of excess nutrients from agricultural and municipal wastes - results of laboratory-scale tests [J]. *Land Contamination & Reclamation*, 2008, **16** (1): 25-33.

[4] 代培, 吴小刚, 张维昊, 等. 人工生物浮岛载体的研究进展 [J]. *环境科学与管理*, 2006, **31** (6): 13-16.

[5] 唐林森, 陈进, 黄茁. 人工生物浮岛在富营养化水体治理中的应用 [J]. *长江科学院院报*, 2008, **25** (1): 21-24.

[6] 王劼, 刘阳, 王泽民, 等. 人工浮岛技术应用前景 [J]. *环境保护科学*, 2008, **34** (5): 23-25.

[7] Qin B. Lake eutrophication: control countermeasures and recycling exploitation [J]. *Ecological Engineering*, 2009, **35**:

1569-1573.

[8] Li S, Li H, Liang X, *et al.* Rural wastewater irrigation and nitrogen removal by the paddy wetland system in the Tai Lake region of China [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2009, **9**: 433-442.

[9] 李海英, 杨海华, 柯凡, 等. 微曝气生态浮床的净化效果与生物膜特性研究 [J]. *中国给水排水*, 2009, **25** (7): 35-40.

[10] Sun L, Liu Y, Jin H. Nitrogen removal from polluted river by enhanced floating-bed frown canna [J]. *Ecological Engineering*, 2009, **35**: 135-140.

[11] 魏利, 马放, 王欣宇, 等. 基于 16S rDNA 不同靶序列对厌氧 ABR 反应器微生物多样性分析的影响 [J]. *环境科学*, 2008, **29** (3): 776-780.

[12] Keller R L L. Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaeus* (Coleoptera: Staphylinidae) [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, **32**: 389-395.

[13] Rousseau D, Vanrolleghem P, Pauwa N. Constructed wetlands in Flanders: a performance analysis [J]. *Ecological Engineering*, 2004, **23**: 151-163.

[14] 陈明利, 吴晓芙, 陈永华, 等. 景观型人工湿地污水处理系统构建及植物脱氮效应研究 [J]. *环境科学*, 2010, **31** (3): 660-666.

[15] 张政, 付融冰, 顾国维, 等. 人工湿地脱氮途径及其影响因素分析 [J]. *生态环境*, 2006, **15** (6): 1385-1390.

[16] Alvarez J A, Becares E. The effect of plant harvesting on the performance of a free water surface constructed wetland [J]. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 2008, **8**: 1115-1122.

[17] US EPA. Constructed wetlands treatment of municipal wastewaters [R]. Office of research and development, 2000, EPA/625/R-99/010.

[18] Lasher C, Dyszynski G, Everett K, *et al.* The diverse bacterial community in intertidal, anaerobic sediments at Sapelo Island, Georgia [J]. *Microbiol Ecology*, 2009, **58**: 244-261.

[19] Drepper T, Raabe K, Giaourakis D, *et al.* The Hfq-like protein NrfA of the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* controls nitrogen fixation via regulation of nifA and anfA expression [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, **2**: 221-227.

[20] Koenig A, Zhang T, Liu L H, *et al.* Microbial community and biochemistry process in autotrophic denitrifying biofilm [J]. *Chemosphere*, 2005, **8**: 1041-1047.

[21] Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, **9**: 719-729.

[22] Bereschenko L A, Heilig G H J, Nederlof M M, *et al.* Molecular characterization of the bacterial communities in the different compartments of a full-scale reverse-osmosis water purification plant [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, **74**: 5297-5304.

[23] Xia S Q, Li J X, He S Y, *et al.* The effect of organic loading on bacterial community composition of membrane biofilms in a

- submerged polyvinyl chloride membrane bioreactor [J].
Bioresource Technology, 2009, **17**: 6601-6609.
- [24] Falkentoft C M, Muller E, Arnz P, *et al.* Population changes in
a biofilm reactor for phosphorus removal as evidenced by the use
of FISH [J]. Water Research, 2002, **2**: 491-500.
- [25] Huang L N, De Wever H, Diels L. Diverse and distinct bacterial
communities induced biofilm fouling in membrane bioreactors
operated under different conditions [J]. Environmental Science
and Technology, 2008, **22**: 8360-8366.
- [26] Tien C J, Wu W H, Chuang T L, *et al.* Development of river
biofilms on artificial substrates and their potential for biomonitoring
water quality [J]. Chemosphere, 2009, **9**: 1288-1295.