DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2013.06.019

# 小试膜生物反应器(MBR)中活性污泥 微生物种群结构的演变

范艳明1 孙宝盛1\* 张 斌2 于凤庆1

(1. 天津大学环境科学与工程学院, 天津, 300072; 2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津, 300050)

摘 要 以膜生物反应器中的活性污泥为研究对象,考察接种驯化至膜污染时期的微生物群落结构的特征和 演变过程.在试验运行中,定期采集样品提取 DNA,并应用 PCR-DGGE 技术探究微生物菌群的变化.结果表 明,在反应器运行接种5d后,微生物群落结构已发生较大改变,与接种污泥相似性指数下降到47.8%;在运 行的整个过程中,微生物种群多样性都要低于接种污泥,随着处理工艺运行,种群间进行逐步有序的演替.在 运行后期,跨膜压力增速提高,此时占优势地位的菌种是 Enterococcus faecalis、Comamonas sp.、不可培养的 Fusobacterium sp.,可能是导致膜污染的主要菌种.

关键词 膜生物反应器,PCR-DGGE,微生物种群结构,微生物多样性,膜污染.

占地面积的限制、严格的出水要求、当地环境和社会经济的考虑推动了膜生物反应器(MBR)的广 泛应用<sup>[1]</sup>.不同处理能力的 MBR 污水厂已证实其运行可靠且操作简便<sup>[2]</sup>.利用光学显微镜观察和纯培 养技术,污水处理厂中的微生物群体已被深入研究<sup>[3]</sup>,但针对 MBR 运行中微生物整体群落结构和多样 性的演变的相应了解还较少.MBR 通常在高混合液污泥浓度(MLSS)和低活性污泥能含量(F/M)情况 下运行,因为碳源供应有限,微生物将优先使用碳源满足其维持能量的需求而不是自身的增殖<sup>[4-5]</sup>.此 外,MBR 其它鲜明的操作条件包括较长的污泥停留时间(SRT)、较短的水力停留时间(HRT)和剪切力 也会对微生物群体造成冲击<sup>[6]</sup>.以 PCR 为基础的 16S rDNA 技术在研究微生物多样性和群落结构方面 是必不可少的工具,它能检测识别迄今为止不可培养的细菌,并且对细菌生态学的发展起到了巨大的推 动作用<sup>[7]</sup>.

本研究从影响 MBR 活性污泥性能的微生物种群出发,利用 PCR-DGGE、克隆测序等分子生物技术, 考察反应器在一个完整运行周期内污泥中微生物群落结构的演替规律和重要功能菌群的变化,找出反 应各阶段的优势种属,以期对优化 MBR 系统运行起到借鉴作用.

## 1 材料和方法

1.1 试验装置和运行条件

接种污泥来自天津纪庄子污水处理厂好氧池回流污泥,进水为人工配水,具体成分见表1.

	Table 1 Components and concernants	Components and concentration of influent $(mg \cdot L^{-1})$				
组分	浓度	组分	浓度			
葡萄糖	400	$KH_2PO_4$	23			
$(NH_4)_2SO_4$	220	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10			
NaHCO <sub>3</sub>	50	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	4			
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	50					

### **表1** 进水组分及浓度(mg·L<sup>-1</sup>)

试验工艺流程见图 1 所示,试验采用 PVDF 中空纤维膜组件和有效容积为 30 L 的 MBR 反应器,其

2012年9月19日收稿.

<sup>\*</sup> 通讯联系人, E-mail:baosheng\_sun@ sina.com

高为1.5 m.反应器为好氧运行,温度维持在15—18 ℃,水力停留时间为6 h,采用恒流间歇出水方式. 系统运行采用穿孔曝气,它能提供活性污泥生长所需的氧气,并且可以加大膜表面的水流速度,减少膜 污染物的累积<sup>[8]</sup>,有效延缓膜污染速率.



图 1 试验工艺流程示意图 Fig. 1 Schematic diagram of the process

反应器运行约3个月始终没有排泥,第1次取样为污泥接种开始期间,在接种期约每5d取样1次,进入稳定期后,污泥逐渐成熟,约10—15d取样1次,当出水水质和污泥性状出现异常,以及跨膜压力超过0.2 MPa时,认定试验进入膜污染期.运行期间共取样10次,具体条件及参数见表2.

Table 2 Operation condition and sample numbers								
	取样时间/			运行条件		污泥性状		<u> </u>
	d	取样编号	DO/ (mg·L <sup>-1</sup> )	рН	气水比	$\frac{MLSS/}{(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})}$	MLVSS/ MLSS	— 屿浜迅/J/ MPa
接种期	1	G1	7.8	7.1		5996	0.54	0.04
	5	G2	8.2	7.3	20:1	4950	0.72	0.06
	11	G3	7.9	7.3		6220	0.78	0.08
	17	G4	7.5	7.5		7340	0.80	0.12
稳定期	28	G5	7.8	6.9	20:1	7860	0.81	0.14
	37	G6	7.5	7.2		9300	0.82	0.15
	50	G7	7.3	7.2		9120	0.85	0.19
膜污染期	62	G8	7.3	7.5	20:1	11440	0.82	0.22
	70	G9	7.0	7.9	35:1	13500	0.84	0.27
	80	G10	6.8	7.8	50:1*	14840	0.83	0.33

表2 运行条件和取样编号

\*为减缓膜污染速率,到试验后期逐渐加大曝气量

1.2 基因组 DNA 提取

采用化学裂解-酚\氯仿\异戊醇抽提-试剂盒纯化的方法提取基因组 DNA,具体方法参见文献[9]. 1.3 基因组 DNA 的 PCR 扩增

采用对大多数细菌和古细菌 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F357-GC 和 R518, 扩增产物 片段长约 240 bp<sup>[10]</sup>.

采用 100 μL 反应体系,其组成为:10—100 ng 模板,10 μL 的 10 × PCR 缓冲液(加 20 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>),200 μmol·L<sup>-1</sup>的 dNTPs,0.5 μmol·L<sup>-1</sup>每种引物,2.5U 的 Ex Tap 酶,其余用无菌超纯水补足. PCR 产物经试剂盒纯化回收最终浓缩于 40 μL 缓冲液<sup>[11]</sup>.

采用降落式 PCR 反应策略,94 ℃下预变性 5 min,前 20 个循环为 94 ℃ 1 min,65—55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min(其中每个循环后退火温度下降 0.5 ℃),后 10 个循环为 94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,最后在 72 ℃下延伸 8 min.扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测.

1.4 PCR 产物的 DGGE 分析

聚丙烯酰胺凝胶浓度为8%,变性梯度为35%—55%,其中变性剂的浓度从胶的上方向下方依次递

增.待胶完全凝固后,将胶板放入装有电泳缓冲液的装置中,先预电泳 30 min.在每个加样孔加入含有 10%加样缓冲液的 PCR 样品 20 μL.在1×TAE 缓冲液中,电压为 150 V,60 ℃电泳 6.5 h,完毕后将凝胶 进行硝酸银染色,并将图像在观测仪中拍照存档.

1.5 多样性指数与聚类分析

Shannon-Weaver 指数公式为:  $H = -\sum_{i=1}^{s} P_i \lg P_i = -\sum_{i=1}^{s} (n_i/N) \lg(n_i/N)$ 

即  $P_i = n_i / N$ ,  $n_i$ 为峰面积, N 为所有峰的总面积.

UPGMA 聚类分析:为研究 MBR 的一个运行周期内微生物群落结构及演替的情况,对图谱进行相似 性和聚类分析.

## 2 结果与讨论

2.1 总细菌的 DGGE 图谱分析和系统进化树的构建

随着反应器的运行,COD的去除率达到了80%—95%,固体悬浮颗粒物浓度(SS)的去除率一直维持在95%—100%.污泥的MLSS不断增加,试验结束已达到14000 mg·L<sup>-1</sup>,污泥沉降比(SV)也由最初的10%升至30%.在污泥浓度增加的同时,微生物的种类和数量也发生相应的变化.如图2所示,污泥样品中不同优势菌群的分布存在差异.接种污泥菌群种类最为丰富.在系统运行过程中,进水营养物质的单一破坏了接种污泥的生物多样性,并且微生物自身的代谢和种群间相互作用也在改变着它们的生存环境.图2中的条带呈现了系统中菌群在运行周期内的变化.条带代表的菌群大致分为4类,见表3.



图 2 污泥样品总细菌 PCR 产物的 DGGE 分离图谱

Fig. 2 DGGE profile of bacteria in ten sludge samples

表3 污泥样品总细菌 DGGE 分离图谱菌种分类

种类	条带
运行期间一直处于稳定优势地位的种属	条带 2、11
运行期间条带强度有波动的优势种属	条带 3、4、8
接种期为优势种属,后期演变为非优势种属或消亡	条带1、5、6、7、9、10、12
接种期为非优势种属,后期演变为优势种属	条带 13、14、15、16、17、18

从图 3 可知,其中大多为不可培养菌种,也存在杆菌(Bacillus)、假单胞菌属(Pseudomonas)及亚硝 态氮生成菌(Aeromonas hydrophila),对有机物去除和脱氮除磷有较好的效果.反应器对氨氮的去除效果 如图 4 所示,在接种期微生物处于新的生存环境,污泥对氨氮的去除能力逐渐增强但不理想,去除率只 达到 40%.进入稳定期后去除率提高,始终维持在 60% —70%,此时具有脱氮功能的菌群作用突出,就 包括假单胞菌属(Pseudomonas)、气单胞菌属(Aeromonas)、丛毛单胞菌属(Comamonas).随着膜污染的加 剧,去除率略有下降,但依然能维持较好的处理效果.上述提到的 3 种菌属已鉴定为反硝化聚磷菌<sup>[12]</sup>,相较 于传统活性污泥处理系统,MBR 拥有额外的反硝化功能,这可能对活性污泥群体结构有显著的影响<sup>[6]</sup>.

95% [Uncultured bacterium clone RL203\_aai63e01 Band\_4 98% Comamonas sp. BS27 Band\_17 98% Enterococcus faecalis Band\_14 Band\_6 Band 7 Bacillus sp. HPC40 100% Bacillus sp. JDM-2-2 99% Aeromonas hydrophila Band\_11 -\_1 10% Band\_1 Uncultured bacterium clone GZKB112 Uncultured Acinetobacter sp clone EHFS1\_S14e 9% Unc. Band\_2 Uncultured bacterium\_clone cs90 99% Band\_5 Band\_8 )0% Pseudomonas nlecoglossicida - Uncultured Fusobacterium sp clone F91\_270306 96% Band 18 Uncultured bacterium clone 054b10\_B\_DI\_P58 Band\_15 0.05 \*分支上数字代表同源性

图3 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences



Fig. 4 Removal effect of ammonia nitrogen

条带 2、11 代表的菌群强弱基本保持稳定,始终处于优势地位.这些细菌对不同的水质和工艺条件 都有较强的适应能力,对污水中污染物的去除作用突出.条带 11 代表 Aeromonas hydrophila,是亚硝态氮 生成菌[13],在污水中分布非常广泛.条带3、4随着反应器运行一直处于优势地位,但在稳定期明显比其 它时期的强度弱. 它们在接种污泥中占优势地位,说明环境的改变没有对它们造成影响. 在稳定期, 膜生 物反应器的 MLSS 不断升高,但这些菌种的微生物量却反而相应降低,说明可能又出现了一些新的优势 菌种,并且它们在 MBR 环境中的竞争力要强于条带 3、4 所代表的菌种,打破了条带 3、4 明显的优势地 位.条带8随着反应进行强度变弱,但在G8又异常突出,该菌属属于假单胞菌属(Pseudomonas),对有 机物、氮、磷均有较强去除作用,同时还能通过反硝化作用强化氮的去除<sup>[14]</sup>;条带 1、5、6、7、9、10、12 在 接种污泥中是优势种群,但随着时间的推移而逐渐被淘汰.说明这类菌种对所处环境敏感,无法适应新 环境而逐渐减少或消亡.条带6、7与杆菌(Bacillus)的同源性为100%,该细菌广泛分布于自然界.杆菌 的种类很多,有的能降解有机物,有些还能起到脱氮除磷的作用[15].条带 13、14、15、16、17、18 代表的菌 种在接种期为非优势种属,到后期演替为优势种属,说明这些菌种能适应所配的进水水质,也能适应 MBR 工艺的环境,可能是 MBR 工艺中特有的微生物. Band 17 属变形菌  $\beta$  亚纲( $\beta$ -Proteobacteria)中的 Comamonas sp., Comamonas sp. BS27 在污泥中能产生大量的粘液胞外聚合物(slime-EPS)和荚膜胞外 聚合物(Capsular-EPS)<sup>[11]</sup>; EPS 能提供嵌入微生物的高度水分凝胶基质,这种基质具有保留周围的细菌 及水、粘附表面、以及絮体和生物膜中细菌的聚合的功能<sup>[16]</sup>,因此,EPS 可能对膜通量起决定性作用.有

研究结果证实, MLSS、EPS 以及污泥粒径是引起膜污染的主导因素<sup>[17]</sup>, 伴随着反应器的运行, MLSS 不断的增加, 大量的微生物附着在膜组件上, 这一阶段跨膜压力不断上升, 反应器膜比通量降低, 说明以条带 17 为代表的菌群导致膜污染物的持续累积, 膜污染加剧, 所以应对它们的生长状况引起足够重视. 2.2 总细菌 Shannon-Wiener 多样性指数及 DGGE 图谱的相似性与聚类分析

样品多样性指数(H)见表 4. 图 5 以接种污泥 G1 作为标准,各泳道与其相似性的顺序分布.由表 4 和图 5 知,同 G1 相比,种群的相似性和多样性呈现整体的降低. 多样性指数最高的是接种污泥 G1,随后逐步降低趋于稳定,在所有样品中 G10 与 G1 相似性差异最大,只有 9%,表明在 MBR 运行期间菌群结构变化巨大. 接种污泥进入新环境使一些微生物的生长暂时或长久的处于劣势,但适应该环境的菌种则较好的生存下来,G10 是反应器进入膜污染较严重时期,同 G1 相比,污泥形成了自己独有的群落结构. 污泥驯化 4—5 d 后与接种污泥比较,相似性下降到 47.8%,接种期过后,Shannon 指数和相似性比较变化幅度较小,说明微生物种群在接种初期受到很大冲击,随后趋于稳定,微生物量一直呈上升趋势但优势种群迅速增殖占据了有限的生存空间而抑制了其它种群的生长,即种群数量不均衡. 在多样性指数降到 0.72 后,微生物种属的数量又有所增加,G8、C9 与 G1 的相似性都要高于 G6 和 G7,这可能与 MBR 能够维持高的污泥浓度有关,使微生物最大限度的截留在反应器中,一部分微生物又存活了下来,多样性指数和相似性都有所提高.

Table 4 Shannon-wiener index of samples											
样品 -	接种期				稳定期			膜污染期			
	$G_1$	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	G <sub>4</sub>	G <sub>5</sub>	G <sub>6</sub>	G <sub>7</sub>	G <sub>8</sub>	G9	G <sub>10</sub>	
多样性指数(H)	1.06	0.95	0.87	0.80	0.77	0.79	0.72	0.78	0.76	0.75	

表4 样品多样性指数

污泥样品 DGGE 图谱的聚类分析如图 6,各样品的聚类分析和反应器的运行状况比较吻合.将10 个样品分为 3 大类,对应实际操作中的 3 个阶段,说明污泥的种群结构随着处理工艺的运行呈现一定规律性的变化.此外,稳定期与膜污染期有一定的同源性,说明二者在运行期间是逐步演变形成的.







图 6 污泥样品总细菌 DGGE 图谱 UPGMA 聚类分析 Fig. 6 Cluster analysis of bacterial DGGE by UPGMA

## 3 结论

(1) 在运行过程中, MBR 中的种群通过结构调整和生物交替形成优势种群, 增强了反应器的系统 功能. 其间既有一些优势种群转变为次优势种群, 也出现了一些新的优势菌属. 污泥中总细菌的种群结 构有着较为明显的变化, 这是由于污泥中细菌群落作为一个整体, 随着生存环境的改变对其自身群落结 构进行的逐步有序的调整.

(2)反应器中微生物多样性的演变为逐渐减少到趋于稳定,尽管 MLSS 不断增加,但微生物种群数 量始终少于接种污泥.试验末期污泥样品与接种污泥差别最大,相似性只有 9%.MBR 系统逐渐形成了 自己特有的生态群落结构. (3) MBR 中微生物种群来源于不同的纲和属,在整个运行周期内存在各种不同的未培养菌种,在 反应前期和后期的优势种属都有 Bacillus 属细菌.在运行后期,以 Comamonas sp.为代表的一批优势种 属加速了膜污染进程.

#### 参考文献

- [1] Fenu A, Roels J, Wambeeq T, et al. Energy audit of a full scale MBR system[J]. Desalination, 2010, 262(1/3): 121-128
- [2] Qin J J, Wai M N, Tao G, et al. Membrane bioreactor study for reclamation of mixed sewage mostly from industrial sources[J]. Separation and Purification Technology, 2007, 53(3):296-300
- [3] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(3):218-227
- [4] Hait S, Tare V. Wastewater treatment by high-growth bioreactor integrated with settling-cum-membrane separation [J]. Desalination, 2011, 270(1/3):233-240
- [5] Low E W, Chase H A. The effect of maintenance energy requirements on biomass production during wastewater treatment [J]. Water Research, 1999, 33(3): 847-853
- [6] Wan C Y, De Weyer H, Diels L, et al. Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment[J]. Water Research, 2011, 45(3):1129-1138
- [7] Namba A, Shigenobu Y, Kobayashi M, et al. A new primer for 16S rDNA analysis of microbial communities associated with Porphyra yezoensis[J]. Fisheries Science, 2010, 76(5):873-878
- [8] 张君,李秀芬,王新华,等.曝气强度对膜生物反应器运行特性的影响[J].环境化学,2012,31(1):82-87
- [9] 孙宝盛, 张斌, 吴卿, 等. 应用 PCR-DGGE 技术解析 MBR 中微生物群落多样性[J]. 天津大学学报(自然科学版), 2008, 41(3): 356-361
- [10] Muyzer G, Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3):695-700
- [11] 张斌, 孙宝盛, 季民, 等. MBR 中微生物群落结构的演变与分析[J]. 环境科学学报, 2008, 28(11):2192-2199
- [12] 吕志堂,纪翠平,苏强,等.3株反硝化聚磷菌的分离与鉴定[J].环境工程学报,2009,3(8):1405-1408
- [13] 盛学敏,潘杨,袁怡,等.一种基于高氨氮、高硝态氮废水的新型脱氮技术[J].水处理技术,2011,37(10):8-11
- [14] 郭飞宏,郑正,张继彪. PCR-DGGE 技术分析塔式蚯蚓生态滤池微生物群落结构[J]. 中国环境科学, 2011, 31(4):597-602
- [15] 牟洁, 孙宝盛, 陈谊. 利用 PCR-DGGE 研究膜生物反应器中微生物的群落结构[J]. 环境科学学报, 2010, 30(4):729-734
- [16] Laspidou C S, Rittmann B E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass[J]. Water Research, 2002, 36(11):2711-2720
- [17] Meng F G, Zhang H M, Yang F L, et al. Identification of activated sludge properties affecting membrane fouling in submerged membrane bioreactors [J]. Separation and Purification Technology, 2006, 51(1); 95-103

# Analysis on succession of activated sludge microbial community composition in a lab-scale membrane bioreactor

FAN Yanming<sup>1</sup> SUN Baosheng<sup>1\*</sup> ZHANG Bin<sup>2</sup> YU Fengqing<sup>1</sup>

(1. School of Environment Science and Technology, Tianjin University, Tianjin, 300072, China;

2. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Sciences, Tianjin, 300050, China)

#### ABSTRACT

In order to investigate the characteristic and succession of the microbial community composition from the inoculation and domestication stage to the membrane fouling stage, the activated sludge in MBR was studied. In the experiment, the sludge samples were collected and the bacterial genomic DNA was extracted periodically. And the PCR-DGGE was applied to analyse the change of the microbial community. The results showed that the change was obvious and the index of similarity dropped to 47.8% in the primary operation process, and the microbial diversity in the entire operation process was lower than the inoculated sludge. In addition, the microbial composition changed dynamically during the operation of MBR. With the rise of transmembrane pressure, the preponderant strains that increased in the later stage of operation were *Enterococcus faecalis*, *Comamonas* sp. and uncultured *Fusobacterium* sp., which probably led to membrane fouling.

Keywords: MBR, PCR-DGGE, microbial community composition, microbial diversity, membrane fouling.