

降解苯胺和氯苯胺类污染物好氧污泥颗粒化及微生物种群结构分析

朱 亮, 徐向阳*, 曹丹凤, 罗伟国, 杨燕妮

(浙江大學環境與資源學院環境工程系 杭州 310029)

摘 要: 以序批式氣提生物反應器(SABR)為平台, 研究了苯胺和氯苯胺類有毒有機廢水處理過程好氧污泥顆粒化。結果表明, 通過縮短污泥沉降時間、逐步提升目標污染物進水負荷, 反應器連續運行 3 個月, 最終在污泥沉降時間 5 min、COD 負荷 1.0 ~ 3.6 kg/(m³·d) 苯胺和氯苯胺負荷 1 kg/(m³·d) 條件下實現污泥顆粒化, COD、苯胺和氯苯胺去除率分別穩定在 90%、99.9% 以上, 獲得的成熟好氧顆粒粒徑在 0.45 ~ 2.5 mm, SOUR 穩定在 150 mgDO/(gVSS·h) 以上, 顆粒污泥 EPS 中 PN 含量為 28.0 ± 1.9 mg/gVSS, PN/PS 比值為 6.5 mg/mg, 苯胺類比降解速率達 0.18 g/(g·d); 應用 PCR-DGGE 分子指紋圖譜技術分析了穩定運行的顆粒化反應器內好氧污泥微生物種群結構, 結果表明好氧顆粒內主要細菌分屬 β-Proteobacteria、γ-Proteobacteria 及 Flavobacteria 等類群, 優勢菌為 *Pseudomonas* sp.、*Flavobacterium* sp.; 與已獲得的降解氯苯胺好氧顆粒相比, 苯胺存在下培養獲得的好氧顆粒污泥微生物菌群結構更為豐富。

關鍵詞: 序批式氣提生物反應器, 苯胺, 氯苯胺, 好氧污泥顆粒化, 微生物種群結構

中圖分類號: Q939 文獻標識碼: A 文章編號: 1001-6209(2007)04-0654-08

90 年代中後期, 國內外研究者先後發現在具有兼氧/好氧環境、水力條件良好的 USB、SBR 等生物反應器中可形成結構致密、沉降性能好、抗沖擊負荷能力強的好氧顆粒污泥, 並在好氧顆粒污泥的形成條件、脫氮除磷特性及其功能菌群等方面進行了較深入的研究^[1-2], 有關降解有毒有機物污泥顆粒化的研究相對較少^[3-5]。本研究在前期已有工作基礎上^[6], 從苯胺作為氯苯胺的結構類似物、強化氯苯胺類生物降解效率出發, 以苯胺和氯苯胺類有毒有機物作為目標污染物, 通過控制進水污染負荷、污泥沉降時間、水力剪切力等操作條件, 探索研究降解苯胺、氯苯胺好氧污泥的顆粒化, 並在分子水平上解析苯胺存在下培養獲得的降解氯苯胺好氧顆粒污泥的微生物種群結構差異。

1 材料和方法

1.1 主要試劑和儀器

苯胺、氯苯胺等化學試劑購於華東醫藥股份有限公司; 3S 柱離心式環境樣品 DNA 回收試劑盒 V2.2 購於上海申能博彩生物科技股份有限公司; 引物及其它 PCR 反應試劑購自 TaKaRa 公司; Goldviewna II 型染料購於北京博大泰克生物基因技術有限責任公

司; 牛血清白蛋白等其它生化試劑購自生工生物工程(上海)有限公司。iCycler thermal Cycler、DCode System 及 GelDoc2000 凝膠成像系統(Bio-rad, 美國); 高效液相色譜儀 1525 二元泵/2487 雙通道紫外檢測器/717plus 自動進樣器(Waters, 美國); 研究顯微鏡 DMLB/QCOLit(Leica, 德國); 環境掃描電鏡 XL-30-ESEM(Philip, 荷蘭); 紫外分光光度計 UV-2401PC(Shimadzu, 日本); 溶氧儀 MODEL5X(YSI, 美國)。

1.2 反應器操作參數

實驗選用序批式氣提生物反應器(SABR), 該反應器由內外兩套管與上部分離區構成, 高 74 cm, 升流管內徑 5 cm, 降流管內徑 8 cm, 高徑比 6:1, 有效容積 5 L; 反應器底部進水, 根據污泥沉降性能從中部出水, 由曝氣機在反應器底部均勻布氣^[6]。SABR 進水以模擬有機廢水與多種目標污染物混合配制而成, 其中目標污染物為苯胺(AN)、2-氯苯胺(2-ClA)、3-氯苯胺(3-ClA)、4-氯苯胺(4-ClA)和 3,4-二氯苯胺(3,4-DCIA), 模擬有機廢水與微量元素組成參見^[6,7]。反應器接種污泥取自杭州市四堡污水處理廠曝氣池的絮狀活性污泥, 接種污泥 MLSS 為 3.5 g/L。

SABR 在 25 ± 2 °C 恆溫下運行, 由 PLC 系統控制進水(兼氧)曝氣/沉降/排水交替時間, 體積交換率

基金項目 國家自然科學基金(30470039)、高等學校博士學科點專項科研基金(20050335133)

* 通信作者。Tel/Fax 86-571-86971648; E-mail: xuxy@zju.edu.cn

作者簡介 朱 亮(1979-)男, 浙江人, 博士研究生, 主要從事環境微生物與廢水處理工程技術研究。E-mail: felix79cn@zju.edu.cn

其他作者 張妮妮, 查 莹

收稿日期 2006-11-27, 接受日期 2007-02-02, 修回日期 2007-05-25

70% ,升流管、降流管 DO 分别为 7.6、6.2mg/L ,表 1 为反应器主要操作条件。

表 1 SABR 好氧颗粒污泥颗粒化过程操作条件

Table 1 The operational conditions for sludge granulation in SABR

Operational parameter	Stage			
	I(1~15d)	II(16~47d)	III(48~100d)	IV(101~120d)
Cycle time /h	24	12	12	12
Influent/min	32	55	55	50
Aeration/min	1390	649	649	655
Settling/min	8	6	6	5
Effluent withdrawal/min	10	10	10	10
Influent COD(mg/L)	500~800	500~1000	500~1800	600~1500
* Influent AN/CIAs(mg/L)	5~10	10~20	20~100	70~100
Superficial air velocity(cm/s)	1.2	1.2	2.4	2.4

* Influent AN/CIAs is mean of the respective concentrations of AN , 2-ClA , 3-ClA , 4-ClA or 3 4-DClA in the influent.

1.3 常规分析方法

1.3.1 pH、COD、MLVSS/MLSS、SV、SVI、SOUR、比重、含水率等指标 均按标准方法测定。

1.3.2 颗粒污泥粒径 :采用湿式筛分法 ,颗粒样品经磷酸缓冲液(pH 7.6)适度清洗后 ,依次通过网眼为 4、3.2、2.5、2、1.25、0.9、0.45mm 的不锈钢标准筛进行粒径分析 ;污泥样品镜检与扫描电镜预处理方法参见文献 [8]。

1.3.3 目标污染物分析 :废水经 7400 × g 离心 10min、0.22μm 滤膜过滤后 ,采用 HPLC 分析。检测条件选用 :ZORBAX Eclipse XDB-C18 分离柱(4.6mm × 150mm 5μm) ;检测波长 240 nm ;流动相为甲醇/磷酸溶液(pH 3.8) 55/45 ,流速 1.0mL/min ,进样量 5μL ,柱温 25℃。

1.3.4 胞外多聚物(EPS) :泥水混合液经 PBS 清洗后 ,冰浴、50W、20KHz 条件下超声 4 次(每次 30s ,间隔 10s) ,经 14000 × g 离心 20min 后上清液即含污泥中的 EPS ,酚-硫酸法测定 EPS 中多聚糖含量 ,以牛血清白蛋白为标准物的考马丝亮蓝法测定蛋白含量^[3]。

1.3.5 邻苯二酚双加氧酶活测定 :取泥水混合液 10mL ,PBS 清洗 3 次后加入石英砂和甲苯一并研磨至污泥变为浆状 ,8000 × g 离心 20min 取水层(中间层) ,再经 12000 × g 离心 15min ,中间层即为蛋白提取液 ,蛋白含量测定参见文献 [9] ;C23O、C12O 酶活测定与计算方法参见文献 [10 , 11]。

1.4 16S rDNA PCR、DGGE 和序列分析

1.4.1 16S rDNA 提取 :采用环境样品 DNA 回收试剂盒进行总 DNA 提取和纯化 ,1.0% 琼脂糖凝胶电泳判定基因组 DNA 完整性 ,于 -20℃ 保存。

1.4.2 PCR 扩增 :选用细菌通用引物 GC-PRBA338f (5'-CGCCGGGGCGCGCCCCGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 PRUN

518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 进行 PCR 扩增 ,其中下划线部分为“ GC 夹 ” ;PCR 反应采用 50μL 体系 ,反应条件 :94℃ 10min ;94℃ 30s ,55℃ 30s ,72℃ 60s ,30 个循环 ;72℃ 7min ;扩增产物经 1.5% Agarose 胶检验后于 -20℃ 保存。

1.4.3 DGGE :8% 聚丙烯酰胺凝胶中加入 80μL 10% APS 和 18μL TEMED 溶液 ,变性梯度范围 30% ~ 60% (100% 变性剂包含 7M 尿素和 40% 去离子甲酰胺) ;15μL 上样缓冲液与 30μL PCR 产物混合后上样 20~40V 预电泳 30min ,150~160V 电压、60℃ 恒温电泳 5~6h ;电泳结束后 Goldviewna II 型染料避光染色 20 min ,dH₂O 浸洗胶片 5min ,洗去表面溶液后进行图像采集。

1.4.4 割胶回收 DNA、克隆测序 :将含目标条带的凝胶块割下、挤碎后 ,加入 50μL TE (pH = 8) ,4℃ 放置 16h ;37℃ 水浴 2h 后 ,4℃ 冰水中静置 0.5h ,8000 × g 离心 1min ,取上清回收 DNA 模板进行 PCR 扩增 ,引物为 PRBA 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 PRUN 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') ;PCR 程序如下 :94℃ 5min ;94℃ 30s ,55℃ 30s ,72℃ 60s ,35 个循环 ;72℃ 7 min。克隆测序由上海泽衡生物技术有限公司完成 ,测序结果在 GenBank 中比对分析。相关序列应用 DNAMAN (version 5.2) 进行比对 ,并构建系统发育树 ,用 Bootstrap 分析评估树的稳定性。

2 结果

2.1 SABR 污泥颗粒化过程

根据反应器运行期间的污泥形态、沉降性能与污染物降解的变化趋势 ,可将整个好氧污泥颗粒化过程分为启动期、颗粒污泥形成期、颗粒污泥生长期和颗粒污泥成熟期 ,有关污泥性状见图 1 和表 2。

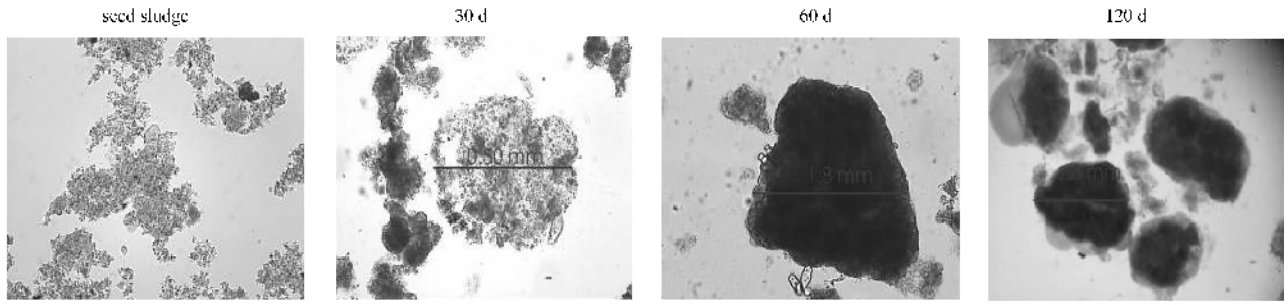


图1 SABR 反应器污泥颗粒化过程污泥形态变化

Fig.1 Morphology of aerobic sludge during aerobic granulation in SABR.

表2 SABR 反应器不同运行阶段污泥表征

Table 2 Characteristics of granular sludge in different operation stages

Stage	Results					
	MLSS (g/L)	MLVSS/MLSS /%	Effluent SS (g/L)	SVI (mL/g)	SRT (d)	Minimal settling velocity (m/h)
Seed sludge	3.5	61	-	140	-	< 8
I Start-up	1.15 ~ 5.98	34.3 ~ 78.8	0.22 ~ 1.28	105.2	5.3	< 8
II Granules formation	5.33 ~ 8.90	74.1 ~ 79.6	0.5 ~ 0.83	60.2	10.7	> 10
III Granules growth	3.51 ~ 8.46	70.6 ~ 80.5	0.44 ~ 1.24	61.2	6.8	> 30
IV Granules maturation	6.34 ~ 6.69	86.5 ~ 88.1	0.95 ~ 1.00	56	6.7	62.1

2.1.1 启动期 SABR 在污泥沉降时间 8min、COD 负荷 0.5 ~ 0.8kg(m³ · d) 苯胺和四种氯苯胺负荷各为 5 ~ 10g(m³ · d) 条件下启动 15d, 苯胺和 3 种单氯苯胺出水浓度均小于 0.5mg/L, 去除率逐渐达到 95% (图 2), 出水 COD 浓度小于 100mg/L (图 3); 而且 3,4-DClA 不能得到有效降解, 去除率仅为 50%。在

较短的污泥沉降时间选择压下, 沉降性能较差的分散、细小絮体污泥不断被洗出, 反应器污泥 MLSS 降至 1.15g/L; 两周后反应器内出现粒径约 0.5mm 的细小污泥颗粒, 污泥最小沉降速率也从接种时约 1m/h 增加到 8m/h 左右, SVI 达 105.2mL/g, 与絮体活性污泥相差不大^[18]。

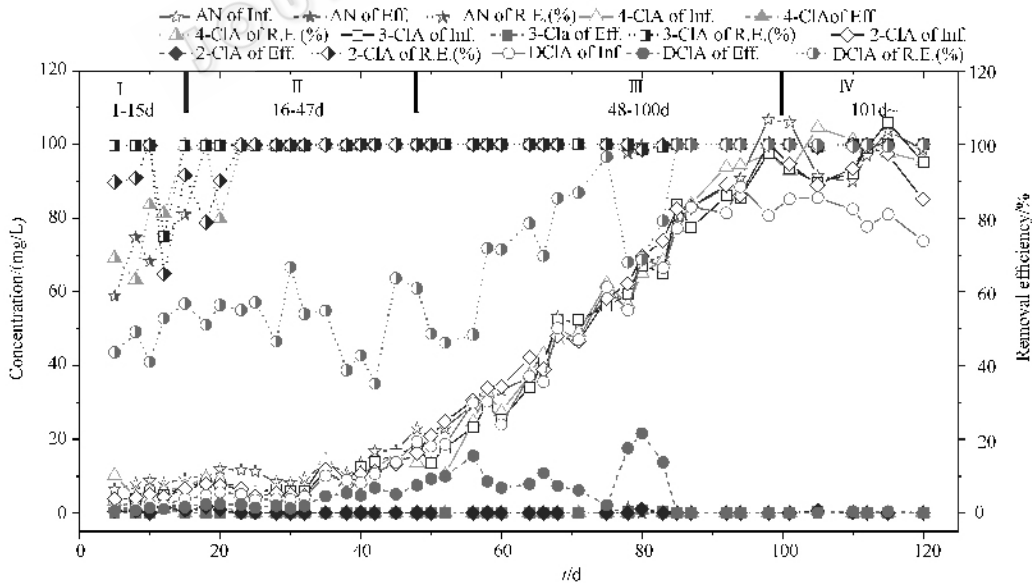


图2 SABR 污泥颗粒化过程苯胺和氯苯胺去除情况

Fig.2 Removal performances of aniline and chloroanilines during sludge granulation in SABR.

2.1.2 颗粒污泥形成期: 反应器污泥沉降时间减至 6min, 苯胺和 4 种氯苯胺负荷各增至 10 ~ 20g(m³ · d), 继续运行 30d 出水 COD 维持在 90mg/L 以下(图 3),

出水苯胺和 3 种单氯苯胺均未检出, 3,4-DClA 降解效率略有改善, 平均去除率达 65%。该阶段污泥小颗粒及部分沉降性能较好的絮状污泥持留在反应器

内,污泥浓度明显提高,MLSS 比启动期提高了 142% 达 8.90g/L,污泥最小沉降速率提高到 13.5m/h,SVI 降至 60mL/g 左右,与启动期污泥性状已有明显区别。

2.1.3 污染负荷提高期:为培养高活性降解苯胺和氯苯胺类的好氧颗粒污泥,SABR 运行 48d 后,进水苯胺和氯苯胺类负荷分别逐渐提升至 200g/(m³·d),表面气速增至 2.4cm/s,期间 COD 出水浓度逐渐稳定在 70mg/L 左右,出水苯胺和单氯苯胺均未检出,3,4-DClA 去除率由 65% 提升至 95% 以上,90d 后稳定在 99% 以上。在较强的水力剪切力下,随着反应器进水苯胺和氯苯胺类负荷对好氧颗粒污泥选择压的持续增强,反应器污泥浓度经历了从高到低、再稳定的过程,MLSS 最终稳定在 6g/L 以上,污泥龄达 6.8d。形成的好氧颗粒粒径在 0.5~2.1mm,污泥最小沉降速率达 30m/h 以上,SVI 稳定在 60mL/g 左右。

2.1.4 高负荷稳定运行期:SABR 运行 100d 后,污泥沉降时间降至 5min,反应器在高苯胺氯苯胺类负荷下稳定运行。进水 COD 负荷 1.2~3.0kg/(m³·d) 条件下,出水 COD 浓度稳定在 60mg/L 左右,去除率大于 90% (图 3);苯胺、氯苯胺类负荷均维持在 180~200g/(m³·d),出水均未检出;反应器 MLSS 维持 6.34~6.69g/L,污泥最小沉降速率达 62.1m/h,SVI 降至 56mL/g,反应器污泥主要指标相对稳定。由此表明,在该操作条件下成功地实现处理苯胺氯苯胺类有机废水好氧污泥的颗粒化。

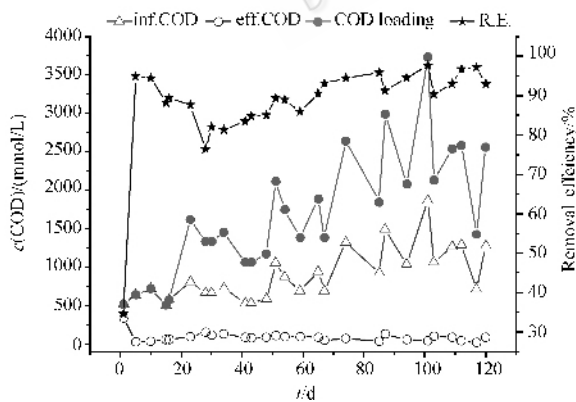


图 3 SABR 污泥颗粒化过程 COD 负荷与去除性能

Fig.3 COD loadings and removal performances of SABR during sludge granulation.

2.2 目标污染物降解性能

反应器运行 15d 出现污泥小颗粒,污泥苯胺类(含氯苯胺)比降解速率增至 0.008g/(g·d)(以 MLVSS 计)(图 4),可见通过驯化污泥初步富集了可降解苯胺、氯苯胺类的功能菌,随其负荷的逐步提高

(约 1kg/(m³·d))和污泥颗粒的逐渐形成(图 1),污泥苯胺类比降解速率逐渐提高到 0.180g/(g·d),去除率稳定在 99% 以上。因此通过污泥颗粒化,可明显提高好氧污泥降解苯胺、氯苯胺类活性。

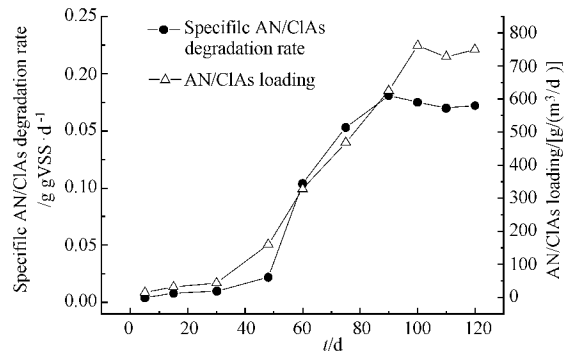


图 4 SABR 污泥颗粒化过程苯胺类比降解速率变化

Fig.4 Specific AN/CIA degradation rates of aerobic sludge during granulation in SABR.

在苯胺和氯苯胺混合浓度高达 382mg/L 时,成熟颗粒污泥对 AN 和 CIA 的去除率均 $\geq 99\%$ 。从整个苯胺氯苯胺降解动态来看(图 5),经 2h 苯胺完全降解,4 种氯苯胺仅降解了 40% 左右,2h 后 3 种单氯苯胺得到完全降解,而 3,4-DClA 降解主要发生在单氯苯胺降解完全后 4h 内。可见几种同系污染物共存下,颗粒污泥降解苯胺、单氯苯胺与 3,4-DClA 存在优先降解或依次降解现象。与已报道的降解氯苯胺好氧颗粒污泥相比^[6],实验获得的好氧颗粒污泥在 80mg/L 苯胺存在下降解 2-CIA、3-CIA、4-CIA 和 3,4-DClA 过程遵循一级反应动力学,速率常数 k 分别为 0.56、0.51、0.48 和 0.21 h⁻¹,其单氯苯胺降解的 k 值均要高于相同氯苯胺负荷下降解氯苯胺好氧颗粒的相应 k 值(2-CIA、3-CIA、4-CIA 和 3,4-DClA 降解速率常数 k 分别为 0.52、0.48、0.45 和 0.23 h⁻¹),因此可以认为苯胺强化了好氧颗粒污泥的氯苯胺类生物

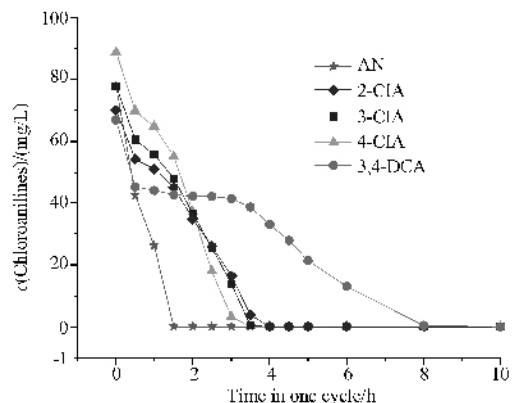


图 5 成熟好氧颗粒降解苯胺和氯苯胺动态

Fig.5 Degradation dynamics of chloroanilines in granulated SABR in one cycle.

降解效率。

2.3 成熟好氧颗粒理化特性

2.3.1 颗粒粒径与沉降性能 :实验获得的成熟颗粒污泥为圆形或椭圆形,呈现橙黄色,粒径在 0.45 ~ 2.5mm 的好氧颗粒质量分数占 87.6%,与部分文献报道的厌氧颗粒和以易降解基质培养的好氧颗粒相比,粒径相对较小^[2,12],这与运行过程中水力剪切力、进水基质种类与负荷等操作参数有关。成熟颗粒污泥最小沉降速率达 60m/h 以上(表 2),远大于传统絮状污泥^[12,18],其 97.5% 的含水率也明显低于接种污泥(99.6%)。

2.3.2 耗氧速率(SOUR) :实验获得的成熟颗粒污泥 SOUR 达 154mgDO(gVSS·h),明显高于接种污泥的 SOUR(26mgDO(gVSS·h)),同样也高于一般絮状活性污泥的 SOUR,约 50mg(g·h)⁻¹。^[7]

2.3.3 胞外多聚物(EPS) :EPS 通常由多糖(PS)、蛋白质(PN)、糖蛋白、核酸、磷脂和腐殖酸等组成,在生物膜、生物颗粒的形成过程中起着重要的作用。实验获得的成熟好氧颗粒污泥 EPS 中 PN 含量从接种污泥的 4.2mg/gVSS 增至 28.0 ± 1.9mg/gVSS,PS 含

量从 1.2mg/gVSS 增至 4.3 ± 1.2mg/gVSS,PN/PS 比值则从 3.5mg/mg 提高到 6.5mg/mg,可见随着好氧颗粒污泥的形成,其 PN、PS 含量分别增至接种污泥的 6.7 倍和 3.6 倍,同时 PN/PS 比值增加到初始的 1.9 倍,推测在好氧污泥颗粒化过程 EPS 中 PN 的大量生成,既可在好氧饥饿期提供一定的碳源和能源,又利于提高细胞表面疏水性,从而一定程度上提高了颗粒内微生物的抗毒物冲击能力,与已有部分研究结果相一致^[8,13]。

2.3.4 好氧颗粒污泥结构 :成熟好氧颗粒污泥具有致密、规则、较为光滑的外表面(图 6-A),颗粒外层富含丰富的微生物群落,如类球菌、类短杆菌等,以及少量纤毛和丝状物(图 6-C),表层存在的空穴可能是基质、O₂ 的传输通道,颗粒内部以类球菌、类短杆菌为主,同时存在不规则的空隙(图 6-B)。此外,颗粒外表的类球菌和类短杆菌被 EPS 包埋交织在一起,分布比颗粒内部空隙表面更为紧密,这种结构赋予好氧颗粒污泥具有良好的颗粒强度、沉降性能和生物活性。

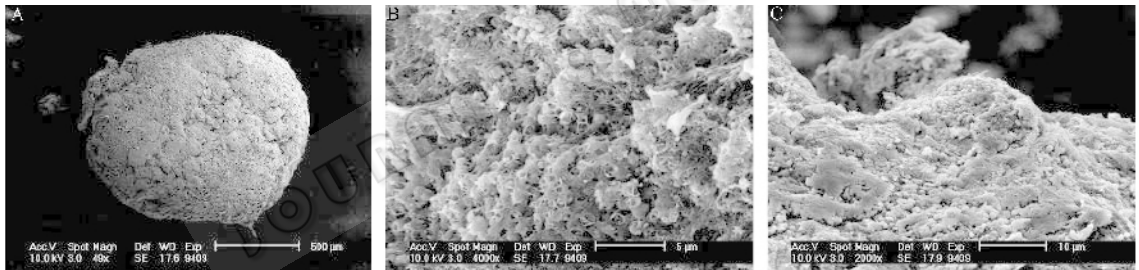


图 6 成熟颗粒污泥扫描电镜图

Fig.6 Mature aerobic granule observed by scanning electron microscopy. A : Whole granule ; B : Inter surface ; C : Outer surface.

2.4 颗粒污泥微生物种群多样性

对稳定运行 280d 的 SABR 反应器内好氧颗粒污泥 16S rDNA V3 的 PCR-DGGE 凝胶上的 11 条可能代表优势细菌的条带进行割胶回收、克隆测序,通过 Blast 程序与 GenBank 中的核酸数据进行比对分析。结果表明(表 3),BandD、BandE、BandF 和 BandH 为 SABR 反应器培养获得好氧颗粒污泥的特异性条带,其中 BandD 与 *Pseudomonas* sp. AN30 菌株的一致性为 96%,BandF 与 *Pseudomonas* sp. PHD-1 菌株的一致性达 97%,BandH 与 *Flavobacterium columnar* (Rickard et al., 2003) 一致性高达 96%,与 BandE 一致性最高的菌种为从环境样品中分离的不可培养细菌,可见实验获得的好氧颗粒污泥内主要细菌分别属于 β -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria、Flavobacteria 等类群,优势菌为 *Pseudomonas* sp.,*Flavobacterium* sp.。

表 3 部分优势菌 16S rDNA DGGE 片段测序分析结果

Table 3 The sequences of several 16S rDNA DGGE fragments			
Band	Database match with accession NO. in parentheses	Identity/%	Phylogenetic group
A	<i>Acidovorax</i> sp. JS42 (AY228545)	96	β -Proteobacteria
B	<i>Pseudomonas pseudocaligenes</i> (AB231158)	97	γ -Proteobacteria
C	<i>Pseudomonas</i> sp. HPC1290 (AY999062)	95	γ -Proteobacteria
D	<i>Pseudomonas</i> sp. AN30 (AY734880)	96	γ -Proteobacteria
E	Uncultured bacterium (AB184982)	99	β -Proteobacteria
F	<i>Pseudomonas</i> sp. PHD-1 (DQ227339)	97	γ -Proteobacteria
G	<i>Comamonadaceae</i> CDC Group NO-1	88	β -Proteobacteria
H	<i>Flavobacterium columnar</i> (AJ491824)	96	Flavobacteria
I	uncultured bacterium Dw-19(AF128792)	97	unknow
J	<i>Comamonas</i> sp. HBL1(AB088541)	93	β -Proteobacteria
K	<i>Nitrosomonas communis</i> (AF272417)	93	β -Proteobacteria

3 讨论

本研究以 SABR 为平台成功培养获得具有高苯胺、氯苯胺降解活性的好氧颗粒污泥,在苯胺氯苯胺负荷 1kg(m³·d)条件下,污染物去除率稳定在 99.9% 以上,反应器内可滞留高浓度的活性污泥,并实现了颗粒化反应器长时间稳定运行,而且目前氯苯

胺废水生物处理工艺大多采用活性污泥法或生物膜法,因其生物毒性导致功能菌难以持留,系统处理效率通常较低,已有研究报道当 3-ClA 浓度达 250mg/L 时处理系统即失效^[14];也有研究者报道了外源投加 3-ClA 降解菌(*Comamonas testosteroni* strain, I2gfp)的生物强化技术,在半连续活性污泥系统中获得高 3-ClA 降解性能,但随着降解菌的流失反应器处理性能逐渐下降^[15]。因此,本研究所采用的污泥颗粒化培养策略是有效的,同时颗粒化 SABR 反应器的稳定运行也为结构化柔性化持留污染物降解功能菌、开发高效有毒有机废水好氧生物处理反应器提供应用基础。新加坡南洋理工大学 Tay 等新近陆续报道处理含苯酚(2.5 kg/(m³·d))、硝基酚(40.1mg/L)、TBA(600mg/L)等有机废水过程好氧污泥颗粒化的研究^[3-5,16]。

污泥沉降时间与水力剪切力是好氧污泥颗粒化过程最主要的二个选择压,已有研究表明当污泥沉降时间 ≤ 15min、表面气速 ≥ 1.2cm/s 时, SBR 反应器才会发生好氧污泥颗粒化,而污泥颗粒化进程及其形成的颗粒特性(粒径、三维结构等)与进水组分密切相关^[7,8,12]。对于培养高效降解有机毒物的好氧颗粒,如何选择合适的有机污染负荷,在驯化污泥、富集功能降解菌的同时实现颗粒化过程中显得尤为重要^[7,17]。本实验基于已有的污泥颗粒化研究成果^[6],在表面气速 1.2cm/s、污泥沉降时间 8min 等条件下启动 SABR,运行 15d 后出现污泥小颗粒,苯胺、氯苯胺比降解速率增至 0.008g/(g·d)(图 4),表明通过驯化,污泥初步富集了可降解(氯)苯胺的功能菌;随着水力选择压的增强和苯胺、氯苯胺负荷逐步提高至 1kg/(m³·d),反应器污泥在细胞自絮凝作用下逐渐聚集形成污泥颗粒(图 1),污泥苯胺、氯苯胺比降解速率逐渐增至 0.18g/(g·d),目标污染物降解效率均稳定在 99% 以上,推测功能降解菌随污泥颗粒化不断得以发育、富集,提高了反应器生物量,强化了酶活性;另外,污泥黏附性能和细胞表面疏水性逐渐增强,颗粒外围逐渐形成一定厚度的透明黏胶层(推测为 EPS),这对高苯胺、氯苯胺负荷下维持颗粒结构特性和目标污染物降解活性也起到重要作用^[18]。

苯胺作为氯苯胺的结构类似物,在污泥驯化过程中一方面与氯苯胺共同充当诱导物,刺激、诱导产生相应的酶系,强化降解氯苯胺类污染物,如多食假单胞菌 AN(*Pseud. multivorans*) 在苯胺存在条件下,可将 2-氯苯胺转化为 3-氯苯二醇、3-氯苯胺和 4-氯苯胺转化为 4-氯苯二醇;另一方面,苯胺与氯苯胺

类污染物共存时可能会对微生物产生联合抑制作用^[20]。比较本研究获得的好氧颗粒与降解氯苯胺好氧颗粒污泥的微生物种群结构(图 7 和图 8),发现两个反应器运行 280d 后获得的好氧颗粒污泥存在大致相同的特异性条带,分别为 BandD、BandE、BandF 和 BandH;一致性分析结果表明,其共有的优势菌分属于 *Pseudomonas* sp. 和 *Flavobacterium* sp.(图 8)。已有研究证实, *Pseudomonas* 属细菌具有降解氯苯胺活性, *Flavobacterium* 属细菌也有降解氯代芳烃类化合物如 3-氯苯甲酸等的的能力^[21]。图 8 结果还表明,降解氯苯胺好氧颗粒的 BandB 和 BandC 两条特异性条带属于同一菌属 *Pseudomonas* sp., 而本实验获得的好氧颗粒的特异性条带 BandG、BandI、BandJ 和 BandK 分别来自不同的菌属。从某种意义上讲,降解氯苯胺好氧颗粒的微生物群落结构相对较为简单,但个别菌群出现较高的丰度,这从 BandB、C、F、H 中可明显看出(图 7);而本实验获得的降解苯胺和氯苯胺好氧颗粒的微生物种群多样性则较为丰富,分布也相对均匀,且降解氯苯胺好氧颗粒中出现的 DNA 条带在其中基本都可以找到相应位置的条带。

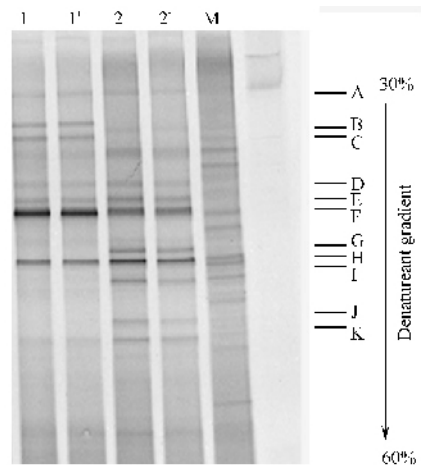


图 7 成熟颗粒污泥的 DGGE 图谱

Fig.7 DGGE profiles of sludge obtained from different reactors. Lane 1 (1'): chloroanilines-degrading aerobic granules; Lane 2 (2'): aniline and chloroanilines-degrading aerobic granules; M: inoculum.

因此,推测由于苯胺与氯苯胺具有相同的开环及 β -氧化途径,如具有相同的双加氧酶等,相关降解基因可能在不同优势菌种间发生水平转移,导致苯胺存在下培养获得的好氧颗粒微生物种群结构更为丰富。上述结果也初步揭示,采用 FISH、RTQ-PCR 等技术可对降解苯胺类功能菌的空间分布做进一步的定性与定量化分析,从而实现好氧颗粒内优势菌群的调控,确保颗粒化反应器的长期稳定化运行。

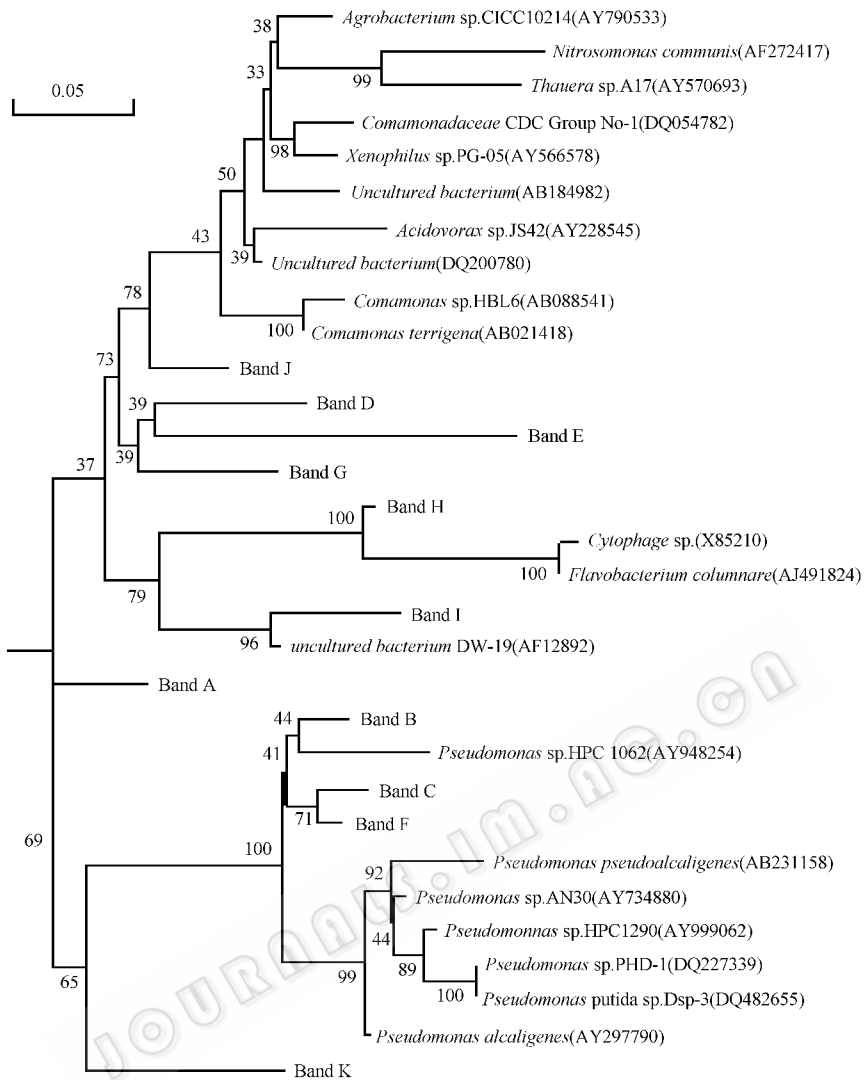


图 8 好氧颗粒污泥优势菌群的系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree showing the affiliation dominant bacteria from aerobic granules. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

有关苯胺、氯苯胺类物质好氧生物降解的代谢途径已有较为系统的研究,一般通过苯胺双加氧酶初始氧化和羟基化,再在(氯代)邻苯二酚双加氧酶以及其它一系列酶的作用下,经邻位开环(ortho cleavage pathway, C120)或间位开环(meta cleavage pathway, C230)两种途径开环,最终进入三羧酸循环实现完全矿化^[19~21]。分析本实验培养获得的好氧颗粒污泥有关酶活,发现其 C230 酶活为 C120 酶活的 65-170 倍,故推测好氧颗粒内功能菌降解苯胺氯苯胺途径,以间位开环(meta-cleavage)为主。鉴于有关(氯)苯胺类物质的降解途径及其相关降解功能基因的探索十分贫乏,因此利用二维蛋白电泳技术研究有毒污染物胁迫环境下功能降解菌蛋白表达图谱的变化,并对特异性表达的蛋白质点进行序列与功能分析,这对了解(氯)苯胺类物质降解途径及构建

功能蛋白质组数据库具有极大的研究意义。

参 考 文 献

- [1] Morgenroth E, Sherden T, Van Loosdrecht, *et al.* Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Wat Res*, 1997, **31**: 3191 - 3194.
- [2] Beun JJ, Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Wat Res*, 2002, **36**: 702 - 712.
- [3] Jiang HL, Tay JH, Tay STL. Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **63**: 602 - 608.
- [4] Tay JH, Jiang HL, Tay STL. High-rate biodegradation of phenol by aerobically grown microbial granules. *J Environ Eng*, 2004, **130**: 1415 - 1423.
- [5] Tay SL, Zhuang WQ, Tay JH. Start-Up, Microbial community analysis and formation of aerobic granules in a tert-butyl alcohol degrading sequencing batch reactor. *Environ Sci Technol*, 2005, **39**: 5774 - 5780.

- [6] 朱 亮,徐向阳,郑 昱. 序批式气提生物反应器(SABR)处理氯苯胺类有机废水好氧污泥颗粒化研究. 环境科学学报, 2005, **25**(11): 1448 – 1456.
- [7] Tay JH, Liu QS, Liu Y. The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules grown. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 227 – 233.
- [8] Tay JH, Pan H, He A, *et al.* Effect of organic loading rate on aerobic granulation. II: Characteristics of aerobic granules. *J Environ Eng*, 2004, **130**: 1102 – 1109.
- [9] Stickland L H. The determination of small quantities of bacteria by means of the Biuret reaction. *J gen Microbiol*, 1951, **5**: 698 – 703.
- [10] Nakazawa T, Nakazawa A. Pyrocatechase (Pseudomonas). In: Tabor H, Tabor CW. eds. *Methods Enzymol*, 1970, **17A**: 518 – 522.
- [11] Nozaki M. Metapyrocatechase (Pseudomonas). In: Tabor H, Tabor CW. eds. *Methods Enzymol*, 1970, **17A**: 522 – 525.
- [12] Jang A, Yoon Y, Kim S, *et al.* Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor. *J Biotechnology*, 2003, **105**: 71 – 82.
- [13] McSwain BS, Irvine RL, Hausner M, *et al.* Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 1051 – 1057.
- [14] Boon N, Top E M, Verstraete W, *et al.* Bioaugmenting as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 1511 – 1520.
- [15] Boon N, de Gelder LD, Lievens H, *et al.* Bioaugmenting bioreactors for the continuous removal of 3-Chloroaniline by a slow release. *Environ Sci Technol*, 2002, **36**: 4698 – 4704.
- [16] Jiang HL, Tay ST, Maszenan AM, *et al.* Physiological traits of bacterial strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, **57**: 182 – 191.
- [17] Liu Y, Tay JH. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Wat Res*, 2002, **36**: 1653 – 1665.
- [18] Qin L, Tay JH, Liu Y. Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Process Biochemistry*, 2004, **39**: 579 – 584.
- [19] 任华峰,李淑芹,刘双江,等. 一株对氯苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性. 环境科学, 2005, **26**(1): 154 – 158.
- [20] Van Agteren MH, Keuning S, Janssen DB. Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds. Dordrecht, The Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1998.
- [21] Latorre J, Reineke W, Knackmuss HJ. Microbial metabolism of chloroanilines: enhanced evolution by natural genetic exchange. *Arch Microbiol*, 1984, **140**: 159 – 165.

Start-up, formation and microbial community analysis of aerobic granules in SABR for treatment of organic wastewater containing aniline and chloroanilines

ZHU Liang, XU Xiang-yang^{*}, CAO Dan-feng, LUO Wei-guo, YANG Yan-ni

(Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract The granulation of aerobic sludges for high-rate biodegradation of organic wastewater containing aniline and chloroanilines was investigated in a laboratory-scale sequencing airlift bioreactor (SABR). Aerobic granules were observed in 15 days after start-up in SABR. After subsequent 83 days, SABR was operated sequentially in superficial air velocity of 2.4 cm/s, COD loadings of 1.0 ~ 3.6 kg/(m³·d) and (chloro-)anilines loadings increased stepwise to 1 kg/(m³·d), a steady-state performance of aerobic granular SABR was achieved at last, as evidenced by high and stable COD and (chloro-)anilines removal efficiencies of above 90% and 99.9%, respectively. Mature granules with median size of 0.45 ~ 2.5 mm, minimal settling velocity of 62.1 m/h, and SVI of 56 mL/g were developed. Aerobic granular sludge displayed noteworthy SOUR, specific (chloro-)anilines degradation rates, PN content and PN/PS ratio in EPS extracts as 154 mg DO/(gVSS·h), 0.18 g/(gVSS·d), 28.0 ± 1.9 mg/gVSS and 6.5 mg/mg respectively, indicating that they had high activity and ability to withstand high (chloro-)anilines loadings. Phylogenetic analysis of (chloro-)anilines-degrading aerobic granules indicated that β - and γ -Proteobacteria and Flavobacteria were dominant classes and the predominance bacteria were closely related to Pseudomonas sp. and Flavobacterium sp. Compared to chloroanilines-degrading aerobic granules, the population diversity was higher in the aniline and chloroaniline-degrading aerobic granules.

Keywords : sequencing air-lift bioreactor (SABR); aniline; chloroanilines; aerobic sludge granulation; microbial population structure

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30470039), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, ministry of Education, China (20050335133)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971648; E-mail: xuxy@zju.edu.cn

Other authors: ZHANG Ni-ni, ZHA Ying

Received: 27 November 2006/Accepted: 2 February 2007/Revised: 25 May 2007