

研究报告

Research Report

含苯酚废水生物处理的细菌群落结构初探

段佩玲¹ 孙瑞¹ 王振宇^{2*}

1 郑州铁路职业技术学院, 郑州, 450052; 2 河南师范大学, 新乡, 453007

* 通讯作者, 554776621@qq.com

摘要 本文利用 PCR-DGGE 技术对苯酚生产污水处理中常用的连续缺氧-好氧工艺、连续好氧工艺和缺氧 SBR 工艺的微生物的群落变化进行了对比研究。研究结果表明, 针对苯酚生产废水的生物处理, 与 A/O 工艺和缺氧 SBR 相比较, 连续好氧工艺处理效果最佳, 同时还具有较好的耐冲击力; 生物的种群特性与所选择的工艺有密切关系, 连续好氧体系中微生物的多样性最高, 缺氧 SBR 的微生物多样性最低; 在同一种运行工艺中, 随水质或负荷的改变, 微生物的种群多样性发生变化, 而体系中的优势种群并没发生明显改变。

关键词 苯酚污水, 微生物群落, PCR-DGGE

Study on Community Structure During Industrial Phenol Wastewater Treatment Process

Duan Peiling¹ Sun Rui¹ Wang Zhenyu^{2*}

1 Zhengzhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou, 450052; 2 Henan Normal University, Xinxiang, 453007

* Corresponding author, 554776621@qq.com

DOI: 10.13417/j.gab.034.000125

Abstract In this study, PCR-DGGE technology was employed to study the changes of microbial community in three different bio-processes (continuous anoxic-aeration, continuous aeration and anoxic SBR) during industrial phenol wastewater treatment. The results indicated that the community structure have a close relation with the selected bio-processes. In the three different bio-processes, the richness of community was highest in continuous aeration, then anoxic-aeration and lower in the anoxic SBR process. The removal efficiency on COD had interaction with the biodiversity. In the process of continuous aeration, the community composition was changed with the water quality and organic loading. However, the dominant species kept no evident change.

Keywords Industrial phenol wastewater, Microbial community, PCR-DGGE

生物技术作为一种绿色、经济、高效的处理工艺已被广泛应用于苯酚生产污水的处理(Bux et al., 1999; Sami et al., 2004)。针对苯酚的生物利用已有较多的文献报道, 对其代谢途径也有较明确的认识(褚蓓等, 2008); 对苯酚生产污水的生物处理工艺, 相关报道也进行了处理效果等的研究并取得了一定的应用(Sokol and Korpál, 2004), 但目前生物处理技术只局限于处理低浓度的含酚废水, 高浓度含酚废水的生物毒性制约了这一技术的应用; 对于实际苯酚废水处理过程中微生物的种群结构及优势种群的研究还鲜见报道。核糖体 RNA 基因的 PCR 扩增结合变性梯度凝胶电泳技术(PCR-denaturing gradient gel electrophoresis)可对

不同细菌相同长度的 PCR 扩增片断根据序列的不同得到分离, 表征群落结构多样性和变化, 与传统微生物分离培养技术相比具有快速、允许大量样品的比较研究等优势, 近年来在水处理微生物群落多样性研究方面得到普遍认可和广泛应用, 使人们对污水处理过程中微生物群落的变化产生了新的认识, 研究不同工艺运行中群落微生物动态变化有助于生物处理工艺的选择、维护和高效运行。

本研究利用 PCR-DGGE 技术比较分析了三种不同处理工艺和运行条件下微生物种群的多样性变化, 以揭示微生物的多态性及群落结构变化与工艺、苯酚去除效率等的相关性。

基金项目: 本研究由河南省科技攻关项目(082102220014)和河南师范大学青年基金(01046400008)共同资助

1 结果与分析

1.1 不同工艺的苯酚处理效果

表 1 为不同工艺在第二阶段和第三阶段对污水 COD 和挥发酚的去除率(%). 可以看出, 连续运行工艺的处理效果好于批量工艺, 且有更强的抗冲击性, 尤其当进水从混合废水更换为苯酚生产废水时, 其处理效果没有明显的下降。主要在于连续运行试验中, 含酚废水是按照一定流量逐渐与活性污泥完全混合, 变化的水质很快就被混合反应系统稀释, 不会对系统造成很大影响; 而在批量试验中, 含酚废水瞬时加入, 对活性污泥瞬时冲击更大。

1.2 微生物群落分析

当各系统稳定运行至第三阶段, 即直接进苯酚原废水后, 从各污泥样品中提取基因组总 DNA, 通过用引物 GC341F/534R 对所提取的 DNA 进行 PCR 扩增, 均获得长度约为 200 bp 的特异扩增片段。通过 DGGE 分析比较不同处理工艺生物多样性(图 1; 表 2)。

由图 1 可知, A/O 工艺的缺氧段与其好氧段、连续好氧工艺、缺氧 SBR 工艺的污泥相似性分别为 67.4%、74.7%和 60%, 说明运行工艺的差异对微生物的种群结构有较大的影响。同样为缺氧的 A/O 工艺中的缺氧段与缺氧 SBR 污泥的相似性仅为 60%, 表明运行工艺的变化将改变活性污泥的种群结构。可见, 污水处理中的生物处理工艺的选择是很重要的。同样, 由图 1 和表 2 可以看出, 不同工艺的条带亮度差异也很大, 条带越亮表明其丰度越高, 表明不同的处理工艺导致了不同的优势种群结构, 其中连续流好氧体系中微生物的多样性最高, 缺氧 SBR 的微生物多样性最低, 与其多样性变化相对应的是体系中的 COD 和挥发酚的去除率随

着多样性的上升而增加。可见, 污泥中微生物的多样性与有机物的去除有一定的联系。

图 2 是进一步对 A-O 工艺不同运行阶段的 DGGE 图谱。由图 2 可以得出, 缺氧段的微生物的多

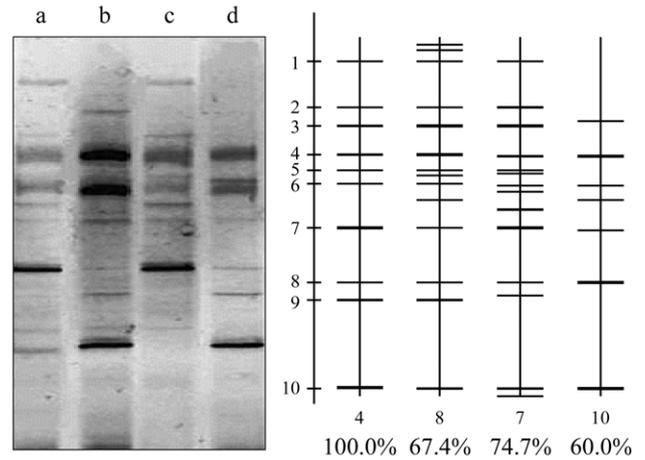


图 1 不同运行工艺的 DGGE 图谱

注: a: A/O 工艺 A 段; b: A/O 工艺 O 段; c: 连续好氧; d: 缺氧 SBR

Figure 1 DGGE profiles of different processes

Note: a: Aerobic unit; b: Anoxic unit; c: Aerobic continuous process; d: Anoxic SBR

表 2 样品多样性指数分析

Table 2 Biodiversity analysis of different processes

多样性指数 Index	A/O 缺氧段 Anoxic phase	A/O 好氧段 Aerobic phase	连续流好氧 Aerobic cont.	批量缺氧 Anoxic SBR
S (条带数) Band No.	10	14	15	8
H (多样性) Diversity	2.33	2.77	2.70	2.12
Cs (相似性)(%) Similarity (%)	100	67.4	74.4	60.0

表 1 不同工艺 COD 和挥发酚的去除率(%)

Table 1 Removal rate of COD and volatile phenol in different processes (%)

参数 Parameter	连续 A/O Continuous A/O		连续流好氧 Aerobic continuous	缺氧 SBR Anoxic SBR
	缺氧段 Anoxic phase	好氧段 Aerobic stage		
	1	1	1	1
混合废水 Composite waste	63.7 70.0	80.2 99.2	81.2 99.3	48.4 73.3
苯酚废水 Industrial phenol wastewater	51.5 73.4	76.3 93.8	81.3 95.5	37.6 63.0

注: 1: COD 挥发酚

Note: 1: Volatile phenol

样性明显高于好氧段,且两体系种群结构都随水质或负荷的改变而发生变化,在一些种群消亡的同时产生一些新的种群以适应水质或负荷的变化,但水质、负荷发生变化后体系中的优势种群并没发生明显改变。表明负责污染物去除的优势微生物群落稳定存在,这为分离并构建复合微生物菌剂提供了思路。

选取好氧段中的优势种群 Y1、Y2、Y3、Y4 和 Y5 (图 2)用引物 341F/534R 进行 DNA 扩增、测序,测序结果通过 NCBI 比对,结果列于表 3。优势菌株不仅具有苯环的裂解功能,同时和硫素循环有关,可能

和废水中存在的含硫物质有关;结合图 2 可以看出,不同运行条件下变形菌和 δ 变形菌始终保持着优势地位,而硫磺菌 Y5 和不可培养的 Y2 菌的数量因工艺的调整出现发生一定的变化。

2 讨论

选用的三套处理工艺对苯酚生产废水的 COD 和苯酚均有良好的去除效果,其中连续好氧工艺处理效果最佳,同时还具有较好的耐冲击力。

PCR-DGGE 技术能够有效地分析环境样品中的微生物种群。利用微生物技术处理苯酚生产废水过程中,微生物的种群特性与所选择的工艺有密切关系;连续好氧体系中微生物的多样性最高,缺氧 SBR 的微生物多样性最低;污水中有机物的去除率与活性污泥中微生物的多样性有一定的关系。

同一种微生物处理工艺,体系中微生物的种群结构随水质或负荷的改变而发生变化,但水质、负荷发生变化后体系中的优势种群并没发生明显改变。

3 材料与方法

3.1 样品的采集及模拟体系的建立

混合水(苯酚生产污水及生产中排放的微污染河道水)和苯酚生产污水取自某石化公司,其水水质特征见表 4。搭建了 3 组处理工艺,分别为连续 A/O(缺氧-好氧工艺)工艺,连续好氧工艺,缺氧 SBR 工艺。各装置的运行参数见表 5。

实验分 4 个阶段运行:(1)第一个阶段为污泥驯化和启动阶段(2007 年 7 月 9 日~7 月 13 日),用生活污水:混合水=1:1 作为进水;(2)第二个阶段(2007 年 7 月 14 日~8 月 8 日):混合废水进水(河道水:苯酚生产污水 1:1);(3)第三个阶段(2007 年 8 月 9 日~9 月 12 日):直接用苯酚原废水进水;(4)第四个阶段为连续好氧工艺的负荷冲击试验(2007 年 9 月 13 日~10 月 3 日),这期间进水量分别为 4.5 L/d、7.5 L/d 和 9 L/d。

3.2 水质分析

COD、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、挥发酚等检测方法参照《水和废水监测分析方法》第 4 版(国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会,1992,中国环境科学出版社,pp.1-784)。

3.3 变性梯度凝胶电泳

3.3.1 DNA 的提取和 PCR 扩增

总 DNA 提取参照文献(Tsai and Olson, 1991),用通

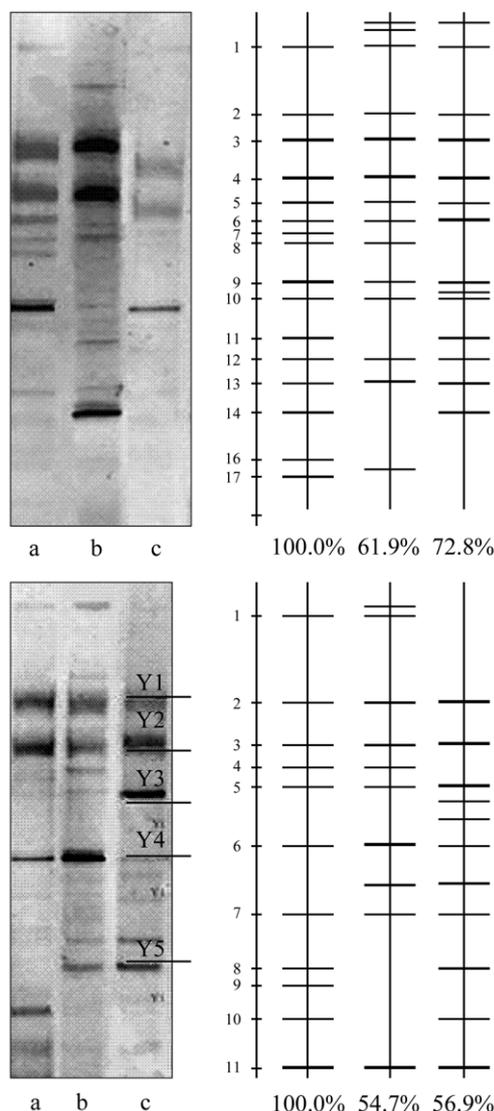


图 2 A/O 工艺不同运行阶段的 DGGE 谱图(上图为缺氧段,下图为好氧段)

注: a: 河道水与苯酚生产污水的 1:1 混合水; b: 苯酚生产污水; c: 苯酚生产污水的冲击实验

Figure 2 DGGE profile of different units during A/O process (up: Anoxic unit; down: Aerobic unit)

Note: a: River water: phenol produced water=1:1; b: Phenol produced water; c: Shock test of phenol produced water)

表 3 部分条带的测序

Table 3 Sequencing of partial gel bands

序号	菌株	同源性(%)	注册号(GenBank)
Sequence number	Bacterial strain	Homology (%)	Registration No. (GenBank)
Y1	Uncultured <i>Arcobacter</i> sp.	100	EF092169
Y2	Uncultured bacterium clone SL24	96	AF379695
Y3	<i>Arcobacter nitrofigilis</i> strain F2176	100	EU106662
Y4	Uncultured <i>delta proteobacterium</i> clone A2124	100	EU283460
Y5	<i>Thiomicrospira denitrificans</i> 16S RNA	98	L40808

表 4 实验用水水质特征

Table 4 Characteristics of target water

废水来源	COD (mg/L)	挥发酚(mg/L)	NH ₃ -N	pH
Wastewater		Volatile phenol (mg/L)		
河道微污染水	60.00±20.34	<0.2	-	8.36±0.36
River water				
苯酚生产废水	1 554.88±620.75	403.93±252.15	15.08±7.59	7.54±0.38
Industrial phenol wastewater				
混合水	959.76±171.57	171.43±52.97	13.95±25.07	7.27±0.69
Mixed water				

表 5 试验装置运行参数

Table 5 operating parameters of biosystem

试验系统	缺氧 SBR	连续实验	
		缺氧 / 好氧	好氧
Testing system	Anoxic SBR	Continuous study	
		Anoxic/Aerobic	Aerobic
缺氧池有效容积(L)	1.0	0.5	1.0
Working volume (L)			
曝气池有效容积(L)	-	1.0	-
Working volume (L)			
水力停留时间(h)	24	缺氧 12 h	24
HRT (h)		Anoxia 12 h	
		好氧 24 h	
		Aerobic 24 h	
溶解氧(mg/L)	<0.5	缺氧<0.5	2~4
DO (mg/L)		Anoxia <0.5	
		好氧 2~4	
		Aerobic 2~4	

用引物 GC341F (5'-CGCCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGG CAGCAG-3')和 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') 进行 PCR 扩增。反应体系为: 10×Buffer 5 μL、dNTP Mix 200 mol/L, 5 μL、引物各 20 pmol, 1 000 ng/μL ABS 1 μL、DNA 模板 1 μL、*Taq* 酶 0.25 U、ddH₂O 加至 50 μL。PCR 条件为: 扩增应用 Touchdown 模式(iCy-

cler Thermal Cycler, BIO-RAD, 美国): 94℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 变性 30 s, 62.5℃ 复性 30 s, 以后每个循环降低复性温度 0.3℃, 72℃ 延伸 40 s, 计 25 个循环; 剩下 10 个循环为: 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 40 s; 最后 72℃ 延伸 10 min。

3.3.2 DGGE

电泳用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶(g/L)变性梯度为 30%~50% (100% 的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺), 电泳上样量为 35 μL 的 PCR 产物; 电泳条件为: 1×TAE 电泳缓冲液, 80 V 恒定电压下, 60℃ 运行 10 h。溴化乙啶(EB)染色和纯水洗涤各 20 min (Muyzer, 1999)。

3.4 DNA 回收和测定

在紫外灯下切取 DGGE 胶上的优势条带, 用 50 μL 无菌水快速洗涤后, 放入 30 μL 无菌水中 -20℃ 冷冻过夜, 然后用 60℃ 的热水温育 10 min, 待凝胶融化后, 在 5 000 r/min 的速度下离心 5 min。取样品进行 PCR 扩增, 条件同上, 引物不带 GC 发夹。PCR 产物送交奥科生物公司测序。

3.5 微生物多样性的分析

在假设每一条带代表一个物种, 条带密度代表物种的丰度的前提下, 按如下公式计算多样性指数 (Shannon-Wiener index, H):

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = - \sum_{i=1}^S (N_i / N) \ln (N_i / N)$$

其中的 p_i 是指某个运行周期所采样品(泳道)中单一条带的强度在该样品中的所有条带总强度中所占的比率, S 是某个样品(泳道)中所有条带数目总和。均匀度(E')和相似性系数(C_s)参考文献(刘新春等, 2005)。

作者贡献

孙瑞负责实验材料收集与方法建立等工作;段佩玲和王振宇主要负责实验方案设计、实验数据分析与整理。

致谢

本研究由河南省科技攻关项目(082102220014)和河南师范大学青年基金(01046400008)共同资助。感谢合作方提供的试验水样和河南师范大学生命科学学院科研平台的帮助。

参考文献

Bux F., Akkinson B., and Kasan H.C., 1999, Zinc biosorption by waste activated and digested sludges, *Water Sci. Technol.*, 39(10-11): 127-130
 Chu B., Wang Y.F., Wang H.L., Ma N., Li B.J., and Liu G.S.,

2008, Screening of phenol-degrading bacterial strain, *Henan Shifan Daxue Xuebao (Zirankexue Ban) (Journal of Henan Normal University (Natural Science))*, 36(2): 139-142 (褚蓓, 王艳芬, 王海磊, 马宁, 李冰洁, 刘国生, 2008, 降解苯酚类污染物细菌的分离筛选, *河南师范大学学报(自然科学版)*, 36(2): 139-142)

Liu X.C., Wu C.Q., Zhang Y., Yang M., and Li H.Y., 2005, Application of polymerase chain-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) to the analysis of changes of microbial ecological communities in activated sludge systems, *Shengtai Xuebao (Acta Ecologica Sinica)*, 25(4): 842-847 (刘新春, 吴成强, 张昱, 杨敏, 李红岩, 2005, PCR-DGGE 法用于活性污泥系统中微生物群落结构变化的解析, *生态学报*, 25(4): 842-847)

Muyzer G., 1999, DGGE/TGGE: a method for identifying genes from natural ecosystems, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2(3): 317-322

Sami S., Swapna T., Tewari U.K., and Iyengar L., 2004, Anoxic treatment of phenolic wastewater in sequencing batch reactor, *Water Research*, 38(4): 965-971

Sokoł W., and Korpál W., 2004, Determination of the optimal operational parameters for a three-phase fluidized bed bioreactor with a light biomass support when used in treatment of phenolic wastewaters, *Biochemical Engineering Journal*, 20(1): 49-56

Tsai Y.L., and Olson B.H., 1991, Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(4): 1070-1074