

# 好氧颗粒污泥对盐酸氯苯胍的响应试验研究

苏馈足, 袁 瑞, 陈丁丁, 林 坦, 陈文静  
(合肥工业大学 土木与水利工程学院, 安徽 合肥 230009)

**摘 要:** 以絮体污泥作为接种污泥,在序批式反应器中分析好氧颗粒污泥对盐酸氯苯胍(RH)的去除效果,阐述污泥体积指数以及COD、氨氮、RH去除率的变化,并利用三维荧光光谱研究污泥胞外聚合物(EPS)中具有荧光特性的组分变化,解析好氧颗粒污泥微生物群落的结构特征。结果表明,颗粒污泥具有良好的沉降性能,COD去除率高达90%以上, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 去除率约为98%。当RH浓度为10 mg/L时,颗粒污泥对COD、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的去除率分别下降至60%和70%左右,EPS组分发生明显变化,运行稳定前期,颗粒污泥对RH的去除率可达90%以上,而后期仅为70%。

**关键词:** 好氧颗粒污泥; 胞外聚合物; 盐酸氯苯胍; PCR-DGGE

**中图分类号:** X703 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2017)09-0092-05

## Response of Aerobic Granular Sludge to Robenidine Hydrochloride

SU Kui-zu, YUAN Rui, CHEN Ding-ding, LIN Tan, CHEN Wen-jing

(School of Civil Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

**Abstract:** The effect of aerobic granular sludge on robenidine hydrochloride (RH) degradation was evaluated, using floccular sludge as the seed sludge in a sequencing batch reactor. Variations in sludge volume index, removal efficiency of COD, ammonia nitrogen and RH were assessed. The changes in fluorescence properties of extracellular polymer substances (EPS) were analyzed using a three-dimensional fluorescence spectrum. The microbial community was investigated with the technique of PCR-DGGE in various phases of the reactor operation. The results showed that aerobic granular sludge had good settlement characteristics. The results also demonstrated reduction of COD up to 90% and around 98% for that of ammonia nitrogen. At a RH concentration of 10 mg/L, about 60% and 70% removal efficiency was achieved for COD and ammonia nitrogen, respectively, and substantial changes were observed in the component of EPS. The removal efficiency of RH could reach more than 90% at the beginning of stable operation; however, it decreased to 70% later in the operation.

**Key words:** aerobic granular sludge; EPS; RH; PCR-DGGE

盐酸氯苯胍(RH)是一种胍基衍生物,属于药物及个人护理用品(PPCPs),对多种急性或慢性鸡球虫病均有良好的治疗效果,被广泛应用于畜禽养殖业中。PPCPs进入环境后形成对人类健康和生态环境的威胁,其带来的水体环境污染问题已引起人们的高度重视。好氧颗粒污泥结构致密、沉速快、活性高、含水率低、可同时脱氮除磷、具有丰富的微生物相,因此可应用于对RH的高效去除。

笔者在序批式反应器(SBR)中以蔗糖为唯一碳源培养好氧颗粒污泥,在成功培养出好氧颗粒污泥后采用甲醇、盐酸氯苯胍作为碳源,分析好氧颗粒污泥对RH的去除效果,采用三维荧光光谱(3D-EEM)解析污泥胞外聚合物(EPS)中具有荧光特性的组分变化,并运用PCR-DGGE技术表征好氧颗粒污泥微生物群落的结构特征,为工艺改进和进一步的应用提供基础。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验装置与方法

试验装置为 SBR 反应器,材质为有机玻璃,内径为 10 cm,高为 65 cm,有效体积为 4.3 L。废水经蠕动泵由反应器顶部注入,采用电磁阀控制出水,采用空气压缩机连接砂芯曝气头均匀曝气。

反应器运行分为 5 个阶段,第 I ~ V 阶段的运行时间分别为 1 ~ 10、11 ~ 24、25 ~ 36、37 ~ 47、48 ~ 76 d,曝气时间分别为 240、240 ~ 250、250 ~ 255、255 ~ 258、258 ~ 259 min,沉降时间分别为 20、20 ~ 10、10 ~ 3、3 ~ 1、2 min,排水时间均为 5 min,COD 浓度分别为 500 ~ 700、700 ~ 1 000、1 000 ~ 1 200、1 200 ~ 1 000、1 000 ~ 600 mg/L,RH 浓度只有第 V 阶段为 10 mg/L,其他阶段均为零。反应器每个周期进水/曝气/沉降/排水的变换由时间控制器(PLC)操作。

### 1.2 试验废水和接种污泥

试验废水前期以蔗糖为唯一碳源,氮和磷分别由  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  提供,其中 COD : N : P = 100 : 5 : 1。反应器启动时 COD 为 500 mg/L,根据反应器运行性能及 COD 去除情况逐渐提升进水 COD 负荷。待颗粒污泥成熟后,往反应器内加入 RH。

以合肥市王小郢污水处理厂氧化沟内污泥作为接种污泥,污泥呈青褐色,接种污泥浓度(MLSS)为 3 ~ 4 g/L,污泥体积指数(SVI)为 129 mL/g。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 常规性测定

运行周期为 6 h,进水时间恒定为 10 min,换水量和换水率分别为 2.6 L 和 60%。 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、COD、SVI 浓度均按标准方法测定<sup>[1]</sup>;粒径分布的测定采用图像分析法<sup>[2]</sup>;EPS 中荧光特性组分测定采用三维荧光光谱法<sup>[3]</sup>。

#### 1.3.2 RH 测定

RH 浓度的测定采用液相色谱法。称取 10 mg 对照品,用甲醇溶解并定容至 100 mL,存储于 0 ~ 8 °C 的环境中,作为储备液。取 2 mL 乙酸(优级纯),用甲醇定容至 1 000 mL,取 900 mL 该溶液与 100 mL 超纯水混合,并加入 1 mL 三乙醇胺,即为流动相,使用前超声脱气 5 ~ 10 min。取 2 mL 储备液于蒸发器中蒸干,用乙酸/甲醇溶液溶解并定容至 10 mL,需现用现配。样品经过离心过滤处理,色谱柱

为 Agilent C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),在检测波长 352 nm 处测定。

#### 1.3.3 DNA 提取

采用 DNA 试剂盒进行污泥样品总 DNA 的提取和纯化。

#### 1.3.4 基因组 DNA 的 PCR 扩增

对细菌的 16S rDNA 可变区进行 PCR 扩增,选用细菌的通用引物为 PRBA338f 和 PRUN518r,序列分别为:PRBA338f(5' - CCT ACG GGA GGC AGC AG);PRUN518r(5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG)。PCR 扩增产物经 1% 的 Agarose 检验后于 -20 °C 下保存备用(保存时间不超过 7 d)。

#### 1.3.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析

PCR 扩增后的产物采用 T-gradient 电泳仪进行分析,并用变性梯度为 35% ~ 55%、浓度为 8% 的聚丙烯酰胺凝胶(化学变性剂为 7 mol/L 的尿素和 40% 的丙烯酰胺)在 1 × TAE 缓冲液中于 150 V、60 °C 条件下电泳 4 h。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)完毕后,采用银染法染色。将染色后的凝胶用凝胶成像分析系统进行检测,观察每个条带并拍摄。

#### 1.3.6 优势菌测序及系统发育树的构建

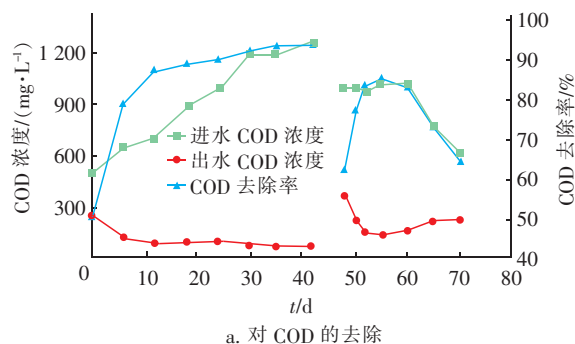
采用经灭菌后的手术刀切下待回收的 DGGE 条带,并用 Poly-Gel DNA Extraction Kit 对目的条带进行回收。PCR 扩增引物为 338f/518r,扩增模板为 2 μL 回收产物。

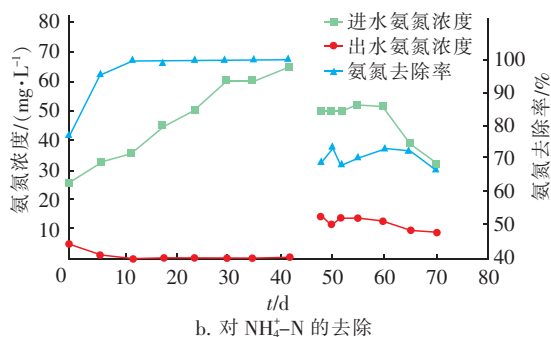
将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化后,连接到 Pmd18-T 载体上,并纯化至 DH5α 感受态细胞中,筛选阳性克隆,对菌液中插入的细菌 16S rDNA 片段进行序列测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 污泥理化性质变化

图 1 为反应器对 COD、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  的去除效果。



图1 颗粒污泥反应器对 COD、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 的去除效果Fig. 1 Removal efficiency of COD and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N

由图1可知,随着颗粒的逐步成型,好氧颗粒污泥去除水中有机物的能力也逐渐增大,在28 d左右时,系统对COD和氨氮的去除率开始趋于稳定并分别维持在90%和98%左右;第48天开始添加RH后,反应器对COD、氨氮的去除率急剧下降;当加入浓度为10 mg/L的RH后,颗粒污泥对COD、氨氮的去除率分别下降至60%和70%左右。

图2为颗粒污泥反应器中SVI的变化情况。可以看到,SVI在0~47 d内随着反应器的持续运行先急剧减小至20 mL/g然后略有上升,之后一直稳定在40 mL/g左右。加入药物后,SVI上升,说明污泥体积膨胀,最终解体。

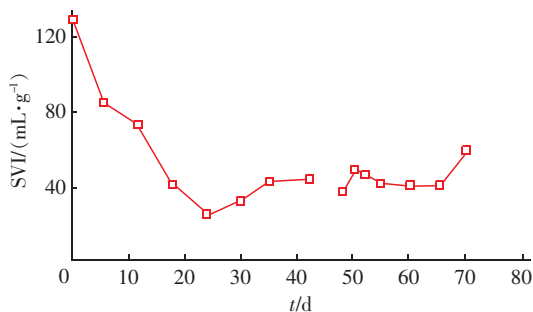


图2 SVI的变化

Fig. 2 Change of SVI in AGS reactor

对RH的去除效果表明,刚加入RH后,颗粒污泥对RH的去除率可达90%左右,而后期仅为70%。好氧颗粒污泥对盐酸氯苯胍有一定的去除效果,且有较明显的吸附作用,并产生少量微生物,但降解中间产物对好氧颗粒污泥有毒害抑制作用,长期累积导致颗粒污泥解体。

## 2.2 颗粒污泥EPS变化

分别取不同运行阶段的污泥为研究对象,污泥性状分别为接种絮体污泥、沉降性能良好的絮体污

泥、形成初期的颗粒污泥、成熟颗粒污泥以及降解盐酸氯苯胍后的好氧颗粒污泥,提取其EPS。测定结果表明,0、12、24、48、60 d的MLSS分别为3.2、4.6、11.2、4.1、3.5 g/L;平均粒径分别为289、650、686、756、870 μm。可以看出,加入RH之前,随着反应器的持续运行,MLSS不断增加,颗粒粒径也不断增大,第48天加药后,由于受到农药毒害作用,MLSS突然降低至4.1 g/L,60 d后维持在3.5 g/L左右。

众多研究表明,EPS化学组分差异很大,但蛋白质(PN)和多糖(PS)为其主要组成成分<sup>[3]</sup>。图3为PN和PS的变化情况。

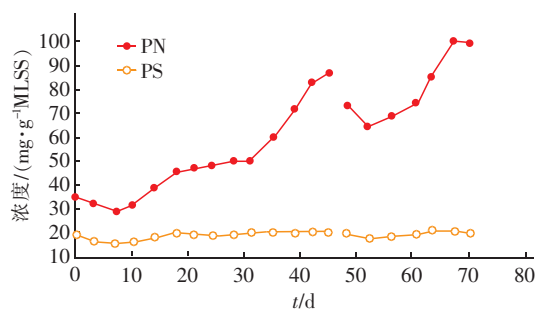


图3 PN和PS的浓度变化

Fig. 3 Variation of PS and PN contents in EPS

由图3可知,在好氧颗粒污泥颗粒化过程中,添加RH前,污泥PN含量由34.91 mg/gMLSS增至86.76 mg/gMLSS,添加RH后,PN含量先减少至63 mg/gMLSS,随着RH对污泥的驯化作用,PN含量又开始恢复,最终增至100 mg/gMLSS;而PS波动稍小,始终在20 mg/gMLSS左右变化。刚添加RH时,由于微生物对药物的不适应以及药物的抑制作用,PN和PS的分泌都有所降低,随着微生物对药物适应性的增强,PN的含量有所恢复并高于添加RH之前的水平,并且颗粒粒径也在逐渐变大,颗粒污泥结构维持稳定。这说明在有毒物胁迫作用下,颗粒污泥能通过分泌PN来维持其颗粒结构。

为进一步揭示污泥EPS组分中具有荧光基团的生物大分子在污泥颗粒化以及降解有机物质过程中的作用,应用3D-EEM技术分析污泥EPS中芳香族类蛋白、类富里酸和类胡敏酸3类具有荧光特性的组分变化,测定结果如图4所示。

一般而言,天然环境中各种溶解性有机物质激发/发射荧光峰位置可以归纳为:①Ex/Em = 225 ~ 240 nm/340 ~ 350 nm(峰A);②Ex/Em = 240 ~ 270 nm/370 ~ 440 nm(峰B);③Ex/Em = 260 ~ 290 nm/

300 ~ 350 nm (峰 C); ④Ex/Em = 310 ~ 360 nm/370 ~ 450 nm (峰 D); ⑤Ex/Em = 350 ~ 440 nm/430 ~ 510 nm (峰 E)。其中①和③为类蛋白荧光峰,②和④为类富里酸荧光峰,⑤为类腐殖酸荧光峰<sup>[3]</sup>。研究结果表明,类蛋白质是颗粒污泥中的关键组分,而腐殖酸和富里酸则可能不利于污泥颗粒形成。这一结果与之前的研究成果相符<sup>[4,5]</sup>。Tu 等<sup>[5]</sup>研究表明,好氧颗粒污泥的形成和结构稳定依赖于蛋白荧光物质,而富里酸类物质则会导致颗粒结构的破坏。

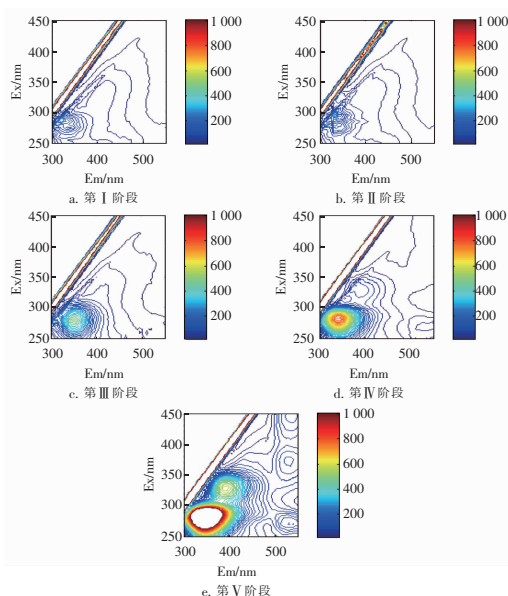


图 4 污泥颗粒化过程中 EPS 的 3D-EEM 图谱

Fig. 4 3D-EEM fluorescence spectra of EPS during aerobic sludge granulation

由图 4 可知,加入盐酸氯苯胍 13 d 后,EPS 组分发生显著变化,与成熟好氧颗粒污泥相比,峰 C 依然存在,且荧光强度增强,同时出现特征峰 E,表明代表类腐殖酸的峰 E 被合成,以适应生存环境的变化。已有研究表明,PN 的分泌受外界环境的影响,微生物通过其分泌可抵抗恶劣环境的影响,推测峰 E 的出现可能是为了抵抗盐酸氯苯胍的毒害作用。同时峰 C 的荧光强度增加表明 RH 可以促进 EPS 的产生。但由于后期盐酸氯苯胍吸附饱和,毒性作用累积,因此导致了颗粒污泥的解体。

## 2.3 PCR-DGGE 分析

与 EPS 相同,取上述 5 个阶段的污泥提取 DNA。

### 2.3.1 PCR 扩增产物分析

将提取的 DNA 用于 16S rDNA V3 可变区特异

性片段 PCR 扩增,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明,扩增出的 DNA 片段大小为 200 bp,且扩增片段的亮度和纯度都较好,未出现非特异性扩增,说明 PCR 扩增效果良好。

### 2.3.2 DGGE 指纹图分析

针对提取出的 DNA,经过 PCR 扩增后采用 DGGE 技术对 5 种污泥微生物种群进行分析,结果如图 5 所示。

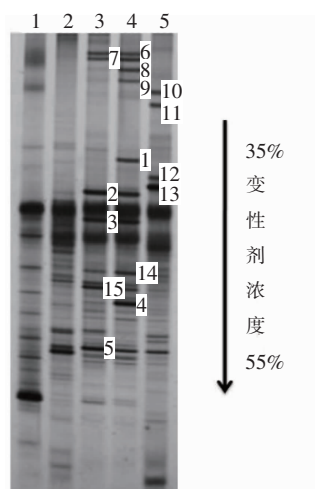


图 5 不同运行时期的好氧颗粒污泥 DGGE 图谱

Fig. 5 DGGE fingerprints of aerobic granular sludge at different operational periods

由图 5 可知,各泳道条带大约有 20 条以上,说明反应器内微生物种群结构丰富。整个反应过程中,微生物种群演替显著,接种污泥原有条带大部分消失,并出现了新的特异性条带,条带的变化与颗粒污泥的生长以及盐酸氯苯胍降解菌群发育有关,而有些条带的亮度也随反应器的运行有所变化,其原因可能是优势菌的相对含量随反应器的运行而变化。

Dice 系数(Cs)可量化表征 DGGE 图谱中两泳道之间的相似程度,Cs 值越大则表面相似性越高。试验结果表明,各泳道的条带相关性较差,相似性系数多在 40% 以下,说明在好氧颗粒污泥颗粒化和去除 RH 过程中,微生物菌群结构发生了较大变化。第Ⅲ阶段(泳道 3)和第Ⅳ阶段(泳道 4)的反应器内污泥微生物种群相似性 Cs 值为 50.1%,说明其种群结构较为接近,但泳道条带亮度稍有变化,说明污泥中的各菌群在不同运行阶段微生物数量略有变化。



由相似性结果分析可以看出,接种污泥、沉降性能良好但未颗粒化的污泥、形成初期的颗粒污泥、成熟颗粒污泥以及降解盐酸氯苯胍后的好氧颗粒污泥之间,前者与后者的微生物种群相似性分别为29.8%、33.2%、50.1%、30.7%,带谱的变化与污泥颗粒化过程中微生物种群演替、参与RH降解的菌群发育有关。

对 DGGE 图谱上的几个特征性条带进行割胶回收、重新扩增和电泳检测,将所得到的样品经克隆序列测序后,采用 Blast 程序再与 GeneBank 中核酸数据进行比对分析,以盐酸氯苯胍为目标污染物的 SBR 反应器内,与序列相似性最高的主要菌群分别为 Uncultured alpha proteobacterium (JQ858698.1)、Uncultured bacterium (KF632521.1、JN090797.1、KC298942.1)、Uncultured epsilon proteobacterium (AY154391.1)、Uncultured *Chloroflexi* bacterium (JQ919719.1)、*Raoultella ornithinolytica* strain (KF358448.1)、Uncultured candidate division TM7 bacterium (HM215443.1)、Uncultured *Zoogloea* sp. (EU639302.1、EU639183.1)、Uncultured *Paludibacter* sp. (JX301552.1)、*Rothia dentocariosa* strain (KC632226.1)。

### 3 结论

① 以絮体污泥为接种污泥培养的好氧颗粒污泥具有良好的沉降性能,内部细菌种群丰富,对 COD、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  的去除率分别为 60% 和 70%。

② 好氧颗粒污泥成熟以后,向反应器中投加 RH 对颗粒污泥进行驯化。反应器运行稳定时,经过 RH 驯化后的好氧颗粒污泥对 COD、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  的去除率分别降至 60% 和 70% 左右;对 RH 的去除率前期较高,后期由于 RH 的毒性作用,去除效果显著降低。

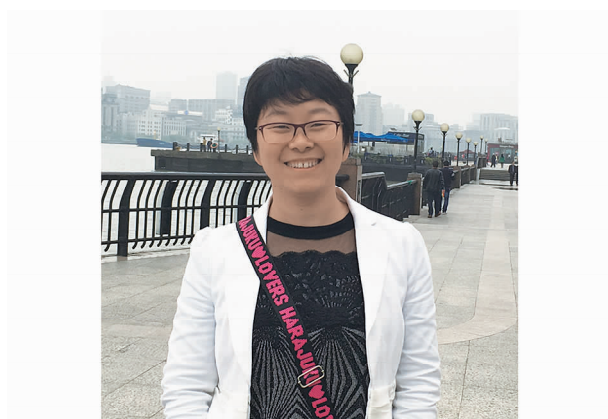
③ 好氧颗粒污泥颗粒化过程中 PN 含量增加明显,PN 是维持颗粒结构稳定的主要成分,表面 PN 的分泌有利于颗粒污泥的形成。其中类蛋白质是颗粒污泥的关键组分,而腐殖酸和富里酸则可能不利于污泥颗粒形成,且选择压的改变可以促进微生物 EPS 的分泌。

物 EPS 的分泌。

④ 根据种属鉴定结果,以盐酸氯苯胍为目标污染物的 SBR 反应器内,主要菌群分别为 Uncultured alpha proteobacterium (JQ858698.1)、Uncultured bacterium (KF632521.1)、Uncultured epsilon proteobacterium (AY154391.1) 等。

### 参考文献:

- [1] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法(第4版) [M]. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [2] 张子健,吴伟伟,王建龙. 全自养硝化污泥的颗粒化过程研究[J]. 环境科学,2010,31(1):140-146.
- [3] 戚韩英. 影响好氧颗粒污泥形成与结构稳定的胞外多聚物关键组分研究[D]. 杭州:浙江大学,2012.
- [4] Sheng G P, Yu H Q. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy[J]. Water Res, 2006, 40(6):1233-1239.
- [5] Tu X, Su B S, Li X N, et al. Characteristics of extracellular fluorescent substances of aerobic granular sludge in pilot-scale sequencing batch reactor[J]. Journal of Central South University of Technology, 2010, 17(3):522-528.



作者简介:苏馈足(1977-),女,河北饶阳人,博士,教授,研究方向为污水处理理论与数学模拟。

E-mail:sukz@hfut.edu.cn

收稿日期:2016-11-05