

鉴定、检测技术，定性分析（如特异性引物PCR-DGGE）和定量分析（如FISH或实时PCR）的结合将会是今后获取活性污泥微生物种群分析的更有力的工具。

关键词：聚合酶链式反应、套式引物PCR、变性梯度凝胶电泳、活性污泥、微生物种群结构

ABSTRACT

The study is a part of the project supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) No.:2002AA601320, Optimization Research on Chemical and Biological Flocculation-Suspended Packed Bed Process. In this thesis, aiming emphatically at the characteristic of the chemical and biological flocculation wastewater treatment process, the microbial community structure of the process was researched with molecular biological method, such as polymerase chain reaction(PCR) and denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE). Based on this, the differences of the microbial community structure between the chemical-biological flocculation process and the chemical coagulation process, the traditional activated sludge treatment process, A/O denitrification process was studied preliminarily.

The results show that some microorganisms existing in acclimated sludge are eliminated when the coagulant was added to the reactor. This indicates that though these microorganisms can metabolize the organic substance with dissolved oxygen in the wastewater, they can't adapt to the biological action in the chemical-biological flocculation system.

Changes take place in the microbial community structure when the chem-bio. flocculation treatment process are under three different operation parameter. The microbial community structure in the reactor with great stability and impact absorption can adapt itself to the changes of the environment. The bacteria distribution in the three passage of the reactor are very equable during the same operating condition.

There are abundant species in the reactor, but the quantity of the microorganism in the chem-bio. flocculation treatment process are much more than the chemical coagulation treatment process. The removal efficiency of the pollutant in the chem-bio. flocculation reactor are distinctly higher than the chemical coagulation reactor due to the biological action.

Abundance of bacteria species with stable microbial community structure are in the suspended packed bed process, including a lot of ammonia oxidizing bacteria playing an important role in the removal of ammonia nitrogen. The ammonia oxidizing bacteria can sustain a stable microbial community structure which makes the suspended packed bed can resist the shocking load and remove the ammonia nitrogen with high efficiency.

Comparing with several traditional wastewater treatment process, the chem-bio. flocculation treatment process has different microbial community structure and the most abundant species, the biological action mechanism may has great distinction.

This study clearly shows that it is possible to obtain a view on activated sludge bacterial communities in the chem-bio. flocculation reactor with the molecular biological methods such as PCR, group-specific PCR and DGGE. In this study, it is too simple to analyse only four bacteria species only according to the type of the influen. In the future, when specific primers will be designed for an increasing number of groups, a more complete picture of bacterial communities will be obtained. Combination of traditional microorganism monitor techniques and qualitative (such as DGGE with group-specific primers) and quantitative techniques (such as FISH or real time PCR) would be a next step in acquiring a good descriptive tool for microbial community analysis of activated sludges.

Key Words: PCR; nested PCR; DGGE; activated sludge; microbial community structure

学位论文版权使用授权书

本人完全了解同济大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，同意如下各项内容：按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版；学校有权保留学位论文的印刷本和电子版，并采用影印、缩印、扫描、数字化或其它手段保存论文；学校有权提供目录检索以及提供本学位论文全文或者部分的阅览服务；学校有权按有关规定向国家有关部门或者机构送交论文的复印件和电子版；在不以赢利为目的的前提下，学校可以适当复制论文的部分或全部内容用于学术活动。

学位论文作者签名：史妍

2005 年 3 月 16 日

同济大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下，进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本学位论文的研究成果不包含任何他人创作的、已公开发表或者没有公开发表的作品的内容。对本论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本学位论文原创性声明的法律责任由本人承担。

签名：史妍

2005年3月16日

第一章 综述

1.1 课题研究的背景、意义

化学生物絮凝工艺是近年来发展起来的一种新型污水处理工艺,它根据化学混凝处理工艺和生物絮凝处理工艺的各自特点,将两者有机结合起来,达到在很短的时间内实现去除主要有机污染物和总磷的目的,且污泥产量少、运行成本和投资费用均较低^[1,2]。由于污水在整个系统中的水力停留时间较短,所以化学生物絮凝工艺对于氨氮的去除效果较差,而悬浮填料床工艺对氨氮却有很好的去除效果,将两种工艺结合起来,就能形成一个高度集成的、高效的物化—生化组合工艺,达到高效去除废水中有机污染物和氮、磷的目的,是一种适合我国大部分地区的城市污水处理的一种新工艺。

在这样一个化学生物絮凝—悬浮填料床组合工艺中,研究在不同工况条件下微生物群落结构和污染物去除的关系,考察化学生物絮凝污水处理工艺的微生物种群结构与传统活性污泥法处理工艺的区别,能够使人们更深入地了解化学生物絮凝污水处理工艺的微生物作用,从而更有目的地进行工艺的优化研究。

传统的显微镜观察和培养分离技术可分离取得单一菌株进行鉴定分析,但是这种方法受到微生物可培养性的限制,实际分离出的菌株往往只占样品中微生物种类很小的一部分。同时对于环境样品的培养分离周期一般较长,工作量大。应用PCR-DGGE方法对环境微生物进行研究,就可以不经过培养,直接从样品里提取细菌的DNA或RNA,进行PCR-DGGE,并且可以对一些条带进行测序比对出其种群,通过这种方法能够直接了解样品中细菌分布结构,并能大致比较相同条件下单一菌群的生物量。目前,将分子生物学技术应用于环境领域的研究已成为国内外研究的热点。

1.2 国内外的研究现状与发展动态

1.2.1 用于环境微生物的分子生物学技术

1.2.1.1 概述

污水处理厂中的活性污泥是由数量庞大,种类丰富的微生物构成的絮凝结构,是污水处理过程的主要载体。其中的某些微生物种群也是引起污泥膨胀、固液分离效果差、气泡等问题的罪魁祸首。因而,研究活性污泥微生物种群,了解

第一章 综述

1.1 课题研究的背景、意义

化学生物絮凝工艺是近年来发展起来的一种新型污水处理工艺,它根据化学混凝处理工艺和生物絮凝处理工艺的各自特点,将两者有机结合起来,达到在很短的时间内实现去除主要有机污染物和总磷的目的,且污泥产量少、运行成本和投资费用均较低^[1,2]。由于污水在整个系统中的水力停留时间较短,所以化学生物絮凝工艺对于氨氮的去除效果较差,而悬浮填料床工艺对氨氮却有很好的去除效果,将两种工艺结合起来,就能形成一个高度集成的、高效的物化—生化组合工艺,达到高效去除废水中有机污染物和氮、磷的目的,是一种适合我国大部分地区的城市污水处理的一种新工艺。

在这样一个化学生物絮凝—悬浮填料床组合工艺中,研究在不同工况条件下微生物群落结构和污染物去除的关系,考察化学生物絮凝污水处理工艺的微生物种群结构与传统活性污泥法处理工艺的区别,能够使人们更深入地了解化学生物絮凝污水处理工艺的微生物作用,从而更有目的地进行工艺的优化研究。

传统的显微镜观察和培养分离技术可分离取得单一菌株进行鉴定分析,但是这种方法受到微生物可培养性的限制,实际分离出的菌株往往只占样品中微生物种类很小的一部分。同时对于环境样品的培养分离周期一般较长,工作量大。应用PCR-DGGE方法对环境微生物进行研究,就可以不经过培养,直接从样品里提取细菌的DNA或RNA,进行PCR-DGGE,并且可以对一些条带进行测序比对出其种群,通过这种方法能够直接了解样品中细菌分布结构,并能大致比较相同条件下单一菌群的生物量。目前,将分子生物学技术应用于环境领域的研究已成为国内外研究的热点。

1.2 国内外的研究现状与发展动态

1.2.1 用于环境微生物的分子生物学技术

1.2.1.1 概述

污水处理厂中的活性污泥是由数量庞大,种类丰富的微生物构成的絮凝结构,是污水处理过程的主要载体。其中的某些微生物种群也是引起污泥膨胀、固液分离效果差、气泡等问题的罪魁祸首。因而,研究活性污泥微生物种群,了解

其细菌种类和数量,认识细菌群落的稳定性和研究一些功能菌在降解有毒有害物质过程中的作用,对提高活性污泥处理污水的效果具有重要意义。

然而,由于研究方法的限制,各种污染物处理工艺中微生物种群的研究仍然停留在传统的纯菌培养阶段,这种利用特定培养基对特定微生物的培养方法可能会导致相当大的误差而无法将微生物种群真实的定性出来。再加上如选择性培养基计数等定量方法的不准确性,使得现今对于处理工艺中微生物对处理效果关系性的研究仍处于“黑盒子”阶段。

近年发展起来的分子生物学技术很好地解决了这一问题,该技术利用微生物遗传演变时遗传讯息16S rDNA的保守性和差异性来进行微生物细菌种类的鉴定和定量分析。如此一来,各种处理程序中微生物种类、数量与处理效率间的模式关系便可加以建立。

整个分析流程大体为:采集到的活性污泥样品进行预处理后,进行DNA提取分离和纯化,进行PCR扩增以得到大量16S rDNA分子,扩增的DNA片段进行群落指纹分析(DGGE等),建立16S rDNA资料库,DNA测序及微生物分类鉴定,之后还可进行核酸探针的设计及微生物的定量分析。

目前,国外该技术在活性污泥、生物膜种群和数量分析上的研究和应用已有大量报道,国内较少。

Timothy等人用PCR-DGGE方法,研究了在处理制药废水的七段生物好氧反应器中的细菌群落稳定性,发现在功能稳定的废水处理生物反应器中,在正常运行条件下有着稳定的微生物群落结构,并且在进水水质发生改变的情况下,微生物群落能够随之发生变化,以维持良好的出水水质^[3]。

Kazuya Watanabe等人研究了降解苯酚的活性污泥中的细菌群落情况。从降解苯酚的活性污泥中提取DNA,进行PCR扩增,通过温度梯度凝胶电泳分析扩增片段后,得到两条主要16S rDNA条带,其中含有两条主要的大片段多组分苯酚羟化酶条带,并测定这些条带的核酸序列;同时采用直接平板培养方法、分批培养富集后平板培养的方法和恒化培养富集后平板培养的方法进行菌种分离,通过动力学等的分析得到活性污泥中降解苯酚的主要菌种*Valivorax paradoxus*^[4]。

Susanne Logemann等人用PCR-DGGE-FISH(荧光原位杂交)技术研究无污泥停留的硝化反应器中的微生物群落情况,结果表明反应器中主要优势菌群为

N. eutropha, 通过16S rRNA文库检索到次优势菌群为 β -*proteobacteria*, 第三优势菌群为*Cytophagal Flexibacter*门^[5]。

李志岗等人用PCR-限制性片段长度多态性及其统计分析的方法, 研究污水处理池中环境微生物遗传多样性, 结果表明直接排放池污水环境中细菌种群优势种单一, 水质较好的间接排放池细菌种群比较丰富^[6]。

谢冰等人采用基于16S rDNA序列分析方法, 分析了未受重金属驯化和受重金属驯化的两类活性污泥在重金属作用下优势菌种和多样性的变化, 结果显示未驯化的活性污泥系统多样性减少但优势种的变化微小, 而驯化系统优势菌种有较大的变化, 但多样性基本不变。这一结果证实驯化有助于提高微生物对重金属的抗性^[7]。

1.2.1.2 DNA提取和纯化

1) 样品的预处理

用于分析的土壤样品, 在采集后可以直接进行DNA提取, 但是活性污泥样品通常是泥水混合物的形式, 为了达到高度的细胞裂解率, 必须对样品进行预处理。可以采用的预处理包括以下几种:

(1) 高速离心, 通常离心速度在2500~8000g左右, 离心时间5~10min^[8,9], 弃上清液, 将沉淀部分溶于无菌水。

(2) 玻璃珠击打, 经过离心后的污泥中加入数粒灭菌玻璃珠(直径根据需要选择在0.1~2mm之间), 在漩涡混合器上或人为摇动几分钟, 这能够打开活性污泥的絮凝, 便于后面的细胞破碎和裂解^[9,10]。

(3) 有机物去除, 在进行总DNA提取之前, 向污泥样品中加入非离子活性剂、丙酮、石油醚等物质并且低速搅拌、离心, 使污泥当中的有机物的以去除, 以免影响后续的DNA提取和PCR扩增过程^[8]。

2) DNA的提取

DNA通常与蛋白质及部分RNA结合成染色体存在, 因此分离核酸首先要破碎细胞, 然后采用各种方法将DNA中的蛋白质、糖类、脂类和盐类等物质去除以纯化DNA。在提取过程中, 要保证DNA不被内源或外界污染的Dnase降解以保持DNA的完整性, 并要排除其他分子的污染。

常用的细胞破碎(在缓冲液中)有以下几种方法。

(1) 机械法：包括用组织捣碎机、玻璃匀浆器、研钵研磨，但是由于机械法在操作过程中不够温和，容易使DNA被机械破碎，所以这种方法多用于小质粒分离，而在研究活性污泥过程中使用较少。

(2) 物理法：反复冻融法（ $-15^{\circ}\text{C}\sim 20^{\circ}\text{C}$ ，主要用于动物细胞）^[11]、冷热交替法（ $90^{\circ}\text{C}\sim$ 冰冻，主要用于细菌病毒）^[11]、超声波处理法（多用于微生物）^[12]。

(3) 化学及生化法：自溶法（在一定的条件下加防腐剂，自身酶系破坏细胞，因时间长不易控制，一般少用）、溶菌酶（破坏细菌细胞壁）、纤维素酶（用于植物细胞）、表面活性剂（SDS和TritonX-100等）^[11,13,14]。

各种方法的提取效率因细胞壁结构、细胞大小、DNA分子量等不同，一般来说，温和的提取方法如超声波、溶菌酶易造成细胞裂解不完全，损失微生物种类的问题；而较剧烈的提取方法如强烈的玻璃珠击打，又易造成DNA片段的破碎^[15]。因此，根据所分析活性污泥的特点，反复进行提取方法的检验和修正，是极为必要的。

3) DNA的纯化

无论采取哪种方法提取DNA，都有不同程度的蛋白质、多糖以及一些盐类污染，因此进一步纯化DNA是非常必要的，常用的方法有有机溶剂抽提、沉淀、梯度离心法、用酶温和消化杂质等^[13,14]。

1.2.1.3 PCR反应

1) PCR的原理

经上述步骤提取到的DNA分子浓度相当低，以至于无法直接进行后续分析，若要得到足够量的DNA浓度则需要提取相当大量的样品才可，这在实际应用上相当耗时且不经济。然而，这个缺点可藉由聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）的实验过程解决。PCR是一种将原样品DNA一直复制的步骤，藉由加入适当的两段寡核苷酸作为反应的引物（Primer）、四种脱氧核苷三磷酸dNTP、DNA聚合酶等反应物，利用机器反复的升温降温，将上面提取到的DNA（称为模板DNA）片段精确扩增。

PCR反应分变性、退火、延伸三步。反应时，首先在引物dNTP参与下对模板DNA进行加热变性。随后，将反应混合液冷却至某一温度，在这一温度下引物与它的靶序列发生退火。此后退火引物在DNA聚合酶作用下得以延伸。如此

反复进行变性、退火和延伸的这种循环。由于这种扩增产物是以指数形式积累的，经25~30个循环后，扩增倍数可达 10^6 。

2) PCR引物的设计选择

进行PCR反应时，可随着目的的不同而设计出针对不同特异性的引物，也就是说，藉由不同的引物，可针对不同微生物分类层级进行PCR反应，其PCR产物可为具有某科、某属或某种微生物特性的DNA。以硝化细菌为例，活性污泥中可进行硝化反应的微生物很多，通称为硝化细菌或氨氧化细菌 (*Ammonia oxidizing bacteria*)，在引物的设计上便可针对这些硝化细菌其16S rDNA所共同保留的DNA序列设计，使得进行PCR反应时可仅针对硝化细菌进行双股DNA开链（变性）—引物结合（退火）—延伸的重复反应，其PCR产物中所有的DNA便皆为具有硝化细菌特性的菌种DNA。因此，在整个PCR反应中引物的设计决定了PCR反应的特异性和成败与否。

引物是与扩增DNA 片段两端互补的寡核苷酸，为单链DNA 片段。引物是PCR 成功的关键，引物与模板退火的温度和所需的时间取决于引物的碱基组成、长度和溶液中引物的浓度。一般引物含有15~30 个碱基，碱基组成为G+C%占50~60%，主要根据研究目的的不同而设计。PCR 扩增时，是从引物的3'端开始按照5'→3'的方向延伸，因此引物3'端的碱基必须严格与模板碱基互补，而对5'端要求则不如3'端严格，有时候还可在5'端加上特殊的序列使扩增后产物作为探针用于核酸检测。

一般而言，作PCR引物用的寡核苷酸至少应含16个碱基，引物长度愈长，其PCR的特异性愈佳，18~24个碱基是最具特异性的。根据生物基因组大小，最短长度在几个碱基范围内变动，最好在特异性允许的范围内寻找安全性。每增加一个碱基，引物特异性提高4倍。为了防止两对引物内的同源性，应特别注意引物不能互补，尤其是3'末端，引物间的互补将导致不想要的引物二聚体的出现，这样获得的PCR产物其实是引物自身的扩增。这将会在引物二聚体产物和天然模板之间产生竞争PCR状态，从而影响扩增成功^[13,14]。几种在环境分析领域常用的引物见下表1-1。

表1-1 环境分析领域常用的PCR引物

	总细菌	放线菌	酸杆菌 属	氨氧化细菌	α 变形 菌纲	β 变形 菌纲	卵囊	厌氧细 菌
引物	P63F R1378r P338F P518r	F243 R1378r	31f R1378r	CTO189fAB CTO189fC CTO653r	F203a R1378	P338F BET42a	HB-1 HB-2	MB9 α R1378r
参考 文献	[16]	[17]	[17,18]	[19]	[17,20]	[21]	[22]	[23]

3) DNA聚合酶

DNA的体外扩增是由耐热的DNA聚合酶完成的，通常是Taq DNA聚合酶，Taq酶是从生存在热泉水中的耐热的水生嗜热菌内分离得到的，可在高温（72℃）下催化DNA合成，并且加热至95℃不会变性，使PCR反应得以自动化。

其他常用的高温DNA聚合酶有Vent, Deep Vent, Tli, Pwo, Pfu, UITma等，这些酶不仅有高的热稳定性，还能扩增大于12kb的模板DNA，更主要的是具有校正功能，因此比TaqDNA聚合酶具有更高的保真度，尤其是PfuDNA聚合酶具有超强的纠错功能^[14]。

目前，这些DNA聚合酶已经被商品化。

4) 缓冲液

用于PCR的标准缓冲液含：10~15mmol/l Tris·HCl（pH8.3，室温），50mmol/l KCl，1.5~2mmol/l MgCl₂，提供DNA合成反应所需pH、离子强度等环境。Mg²⁺的存在极为重要，它能影响引物退火的程度、模板及PCR产物的解链温度、产物的特异性、酶的活性及精确性，因此反应体系中不可含有高浓度的螯合剂如EDTA，不可含有高浓度的带负电荷的离子基团如磷酸根等。

5) 脱氧核苷三磷酸（dNTP）

dNTP液包括dATP、dGTP、dCTP、dTTP，在饱和浓度下使用，参与PCR反应。但dNTP是反应中磷酸根的主要来源，其浓度的任何变化都将影响到磷酸根的浓度，所以在设计反应体系中应予以注意。

6) 模板DNA

模板对PCR的影响主要有两个方面：(1)模板DNA的量：模板DNA的量太多，易于两条模板DNA单链重新结合，会使扩增反应失败；(2)模板的纯度：一

一般来说, PCR对模板纯度的要求不高, 但在模板DNA 溶液中, 不能有蛋白质、核酸酶、尿素、十二烷基磺酸钠、EDTA 等影响扩增反应的物质存在。对于个别成分复杂的环境样品, 提取的总DNA需用专门的纯化试剂盒纯化后即可用于PCR扩增, 或将模板稀释10~100倍后使用。

1.2.1.4 变性梯度凝胶电泳技术

群落指纹 (Community Finger Print) 是指一个混合菌种经电泳后所呈现的分布情形。所谓电泳, 是指在凝胶 (gel) 中通入电场, 由于DNA分子带负电, 因此会往电场中正极的方向移动, 而gel是一种具有网状结构的物质, 不同大小的DNA分子在gel中移动的速度也会因此而不同, 分子量小的移动比较快, 分子量大的移动比较慢, 因此便可区分出不同分子量的DNA。不同的样品在经过相同的处理 (如DGGE) 之后, 经电泳后所呈现的相对位置可能不同, 反之, 相同样品经电泳后的相对位置则相同, 因此, 便可据此区分两未知样品之间菌种差异的程度。变性梯度凝胶电泳法 (Denaturing Gradient Gel Electrophoreses) 是一种常用的群落指纹分析方法。

DNA为一双股结构, 其两单股间是由互补的碱基所形成的氢键所结合而成, A与T之间有二个氢键, G与C之间则有三个氢键。如果加入尿素等可使DNA氢键打断 (即变性) 的物质, 则由于AT与GC二种互补DNA的结合力不同, 将会造成不同的变性效果, 由于两种菌种其序列AT键与GC键的位置不同、数量不同, 其变性程度也不同, 即双股DNA遭到开链的程度及形状也不相同, 因此电泳时两条序列穿过网状结构的难易度便因而不同, 而这种难易度是依DNA序列遭变性的程度不同来区分的。

如果在电泳过程中加上变性程度的梯度, 则更能使这种差异性加大, 进而降低不同样品但有相同变性程度的机率。在DGGE电泳法中不同位置所呈现的亮带表示不同的16S rDNA序列, 这是一段经PCR反应后的完整序列, 因此, 不同位置的亮带便对应为一单一菌种。然而, 由于分辨率的关系, 此亮带需切下再重复做PCR、DGGE试验方能加以纯化。如此, 将经纯化的DGGE亮带进行测序便能得知其种群的组成。

1.2.1.5 DNA测序、16S rDNA文库的建立及微生物分类鉴定

将纯化的DGGE亮带置入水中以后, 其DNA 会再度溶解出来, 之后, 再经

由PCR反应将溶解于水中的DNA进行扩增反应，以获得高浓度的16S rDNA，接着便可进行以16S rDNA为序列的微生物测序及16S rDNA文库的建立。

为了使回收的DNA序列具有代表性，通常需要选取至少100个左右的单菌落进行序列回收。回收的序列最好全部进行测序，以便进行后续微生物分类分析。但有时限于测序费用，不能将回收的全部序列测序，则需要先进行筛选，剔除重复序列，仅将代表性的、丰度较大的序列测序。序列筛选一般采用前面提到的DNA指纹技术（如DGGE）或蓝白斑筛选等。

1.2.2 微生物分类学研究进展

生物进化或生命的系统发育学一直是人们所关注的热点，也是生命科学的中心。1977年Woese的rRNA生命树研究，使得细菌进化研究出现了包括了古菌这个“第三生命”的新的曙光。Woese在1987年将细菌域中可培养的细菌分为11个类群^[24]，包括：栖热袍菌目(*Thermotoga*)；绿色非硫细菌(*Green non-sulfur bacteria*)；奇异球菌(*Deinococci*)；螺旋体群(*Spirochetes*)；绿色硫细菌(*Green sulfur bacteria*)；拟杆菌/黄质菌属(*Bacteroides/Flavobacteria*)；浮霉菌状菌(*Planctomyces*)；衣原体菌(*Chlamydiae*)；革兰氏阳性细菌群(*Gram-positive bacteria*)；蓝细菌(*Cyanobacteria*)；紫细菌(*Purple bacteria*)（见图1-1）。

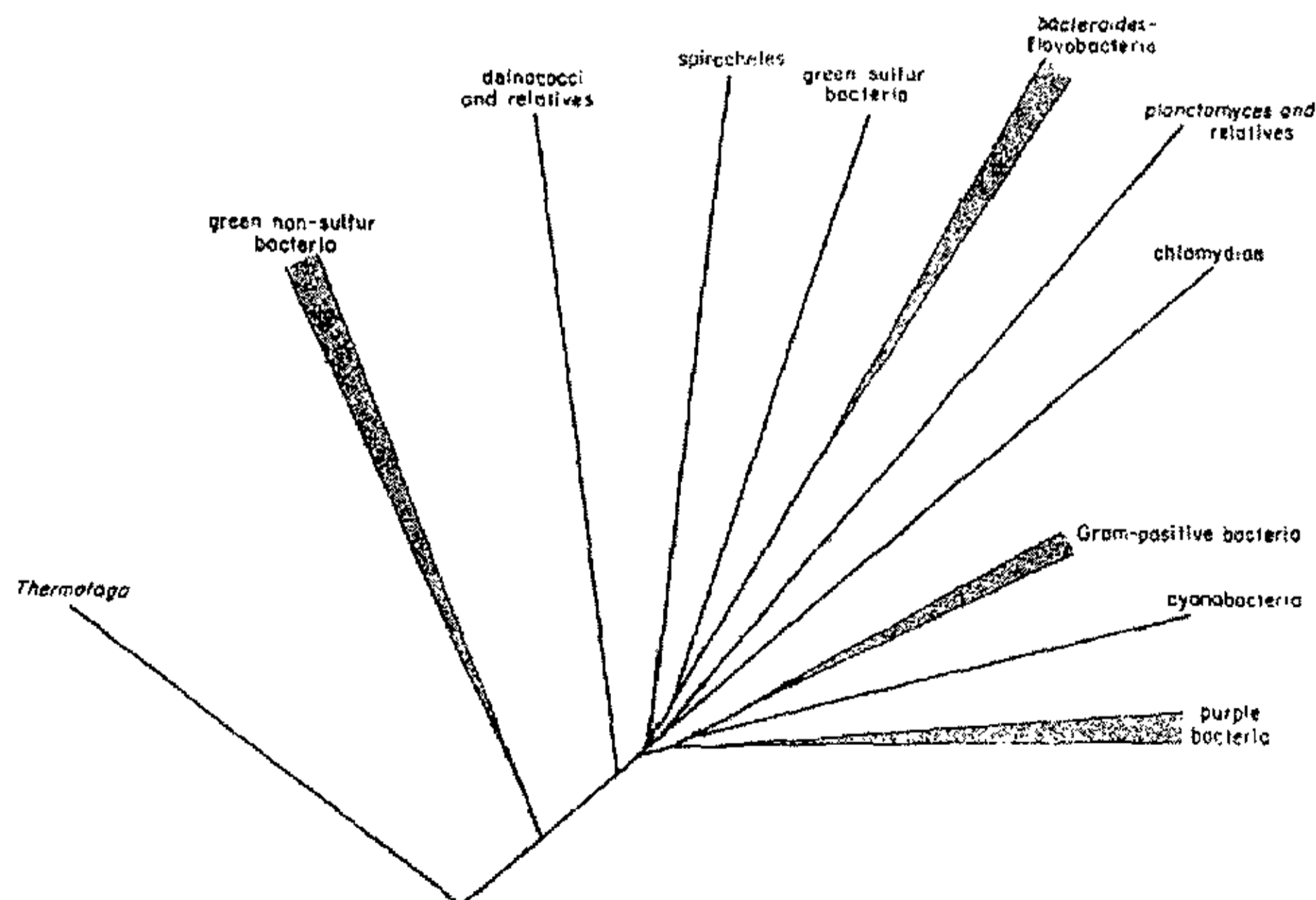


图1-1 基于16S rRNA序列比较而构成的真细菌系统发育树^[24]

1998年N. R. Pace等根据环境中的16S rRNA序列的多样性，认为细菌域可能由36或40多个大纲组成^[25]（见图1-2），其中可培养的细菌群又增加了热脱硫杆菌

由PCR反应将溶解于水中的DNA进行扩增反应，以获得高浓度的16S rDNA，接着便可进行以16S rDNA为序列的微生物测序及16S rDNA文库的建立。

为了使回收的DNA序列具有代表性，通常需要选取至少100个左右的单菌落进行序列回收。回收的序列最好全部进行测序，以便进行后续微生物分类分析。但有时限于测序费用，不能将回收的全部序列测序，则需要先进行筛选，剔除重复序列，仅将代表性的、丰度较大的序列测序。序列筛选一般采用前面提到的DNA指纹技术（如DGGE）或蓝白斑筛选等。

1.2.2 微生物分类学研究进展

生物进化或生命的系统发育学一直是人们所关注的热点，也是生命科学的中心。1977年Woese的rRNA生命树研究，使得细菌进化研究出现了包括了古菌这个“第三生命”的新的曙光。Woese在1987年将细菌域中可培养的细菌分为11个类群^[24]，包括：栖热袍菌目(*Thermotoga*)；绿色非硫细菌(*Green non-sulfur bacteria*)；奇异球菌(*Deinococci*)；螺旋体群(*Spirochetes*)；绿色硫细菌(*Green sulfur bacteria*)；拟杆菌/黄质菌属(*Bacteroides/Flavobacteria*)；浮霉状菌(*Planctomyces*)；衣原体菌(*Chlamydiae*)；革兰氏阳性细菌群(*Gram-positive bacteria*)；蓝细菌(*Cyanobacteria*)；紫细菌(*Purple bacteria*)（见图1-1）。

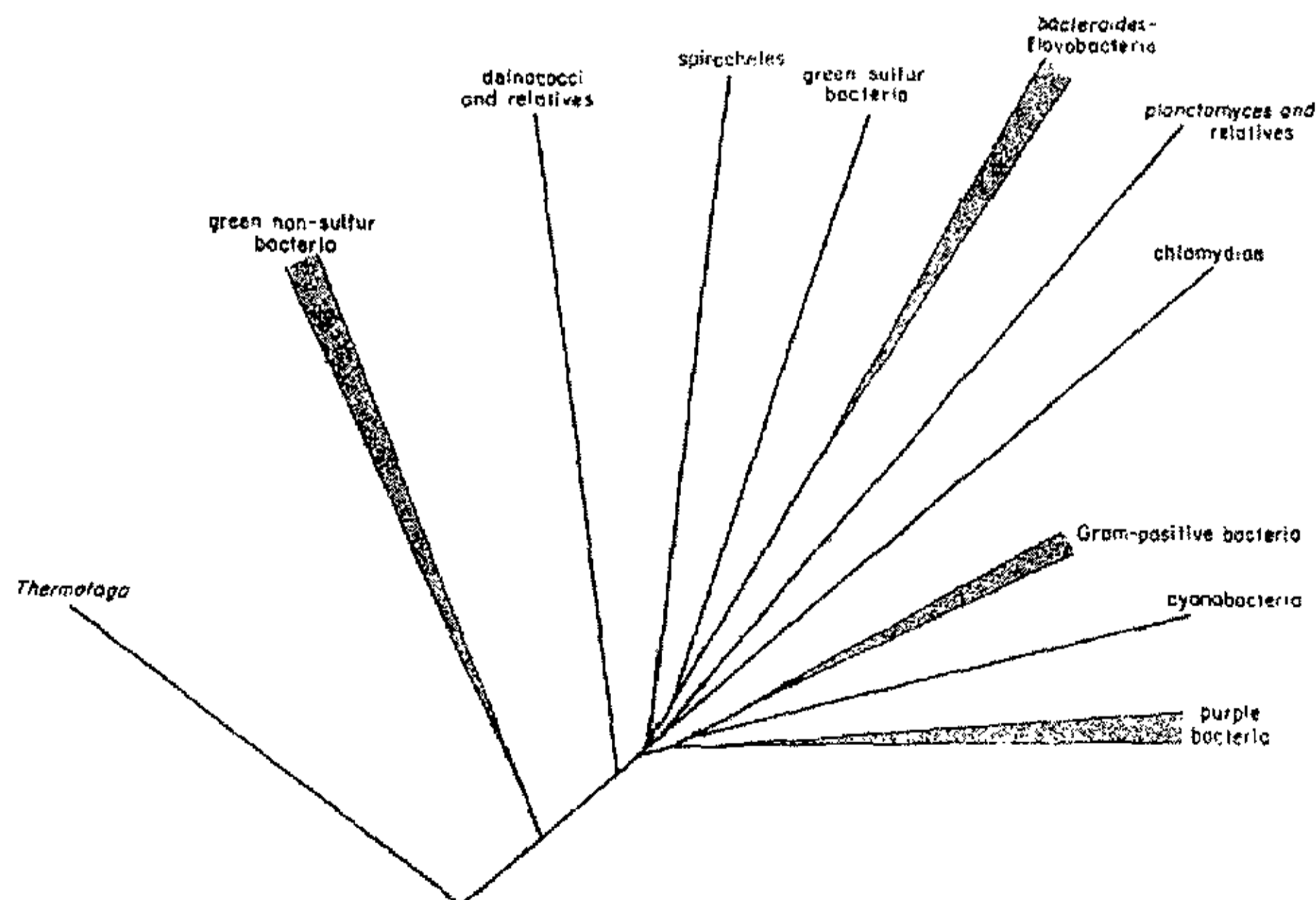


图1-1 基于16S rRNA序列比较而构成的真细菌系统发育树^[24]

1998年N. R. Pace等根据环境中的16S rRNA序列的多样性，认为细菌域可能由36或40多个大纲组成^[25]（见图1-2），其中可培养的细菌群又增加了热脱硫杆菌

属 (*Thermodesulfobacterium*)、粪热杆菌属 (*Coprothermobacter*)、网球菌属 (*Dictyoglomus*)、疣微菌属 (*Verrucomicrobia*)、硝化螺菌属 (*Nitrospira*)、酸杆菌属 (*Acidobacterium*) 及互养菌属 (*Synergistes*)。

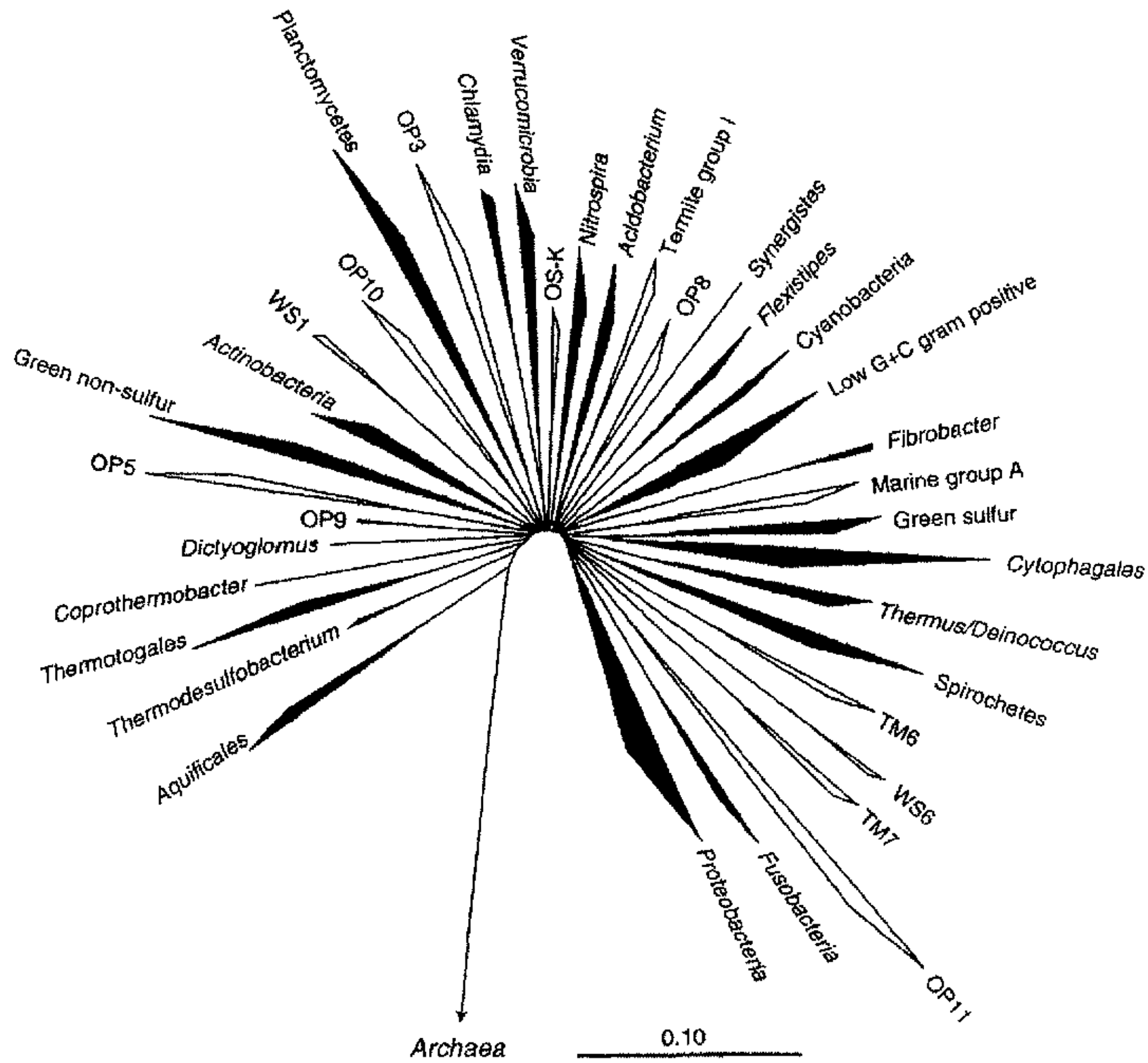


图1-2 细菌域的进化距离树

表示了目前被承认的细菌门和推测（候补）的细菌门。树的构建采用ABR软件包和1997年3月ABR释放的序列数据。含有2个或更多序列的聚类成的细菌门用楔状表示，楔的深度反映了分支的深度。可培养的细菌门用黑色表示，只是环境中的序列聚类的细菌门用框表示。线段长度代表10%核苷酸差异的距离^[25]。

本论文所研究的细菌种类为总细菌 (*Bacteria*)、放线菌 (*Actinomycete*)、酸杆菌属 (*Acidobacteria*)、氨氧化细菌 (*Ammonia oxidizing bacteria*) 和 α -变形菌 (*α -proteobacteria*)。

放线菌在微生物中属原核生物界，高G+Cmol%革兰氏阳性细菌，放线杆菌纲 (*Actinobacteria*)，放线杆菌亚纲 (*Actinobacteridae*)，放线菌目

(*Actinomytales*)^[26,27]。

酸杆菌属是近期刚刚发现的一类细菌,它只包括3个可培养的目:*Acidobacterium capsulatum*, *Holophaga foetida*, *Geothrix fermentans*^[25]。酸杆菌属在土壤、泥炭沼、矿山酸性排水、受污染蓄水层、温泉、淡水湖等许多环境样品中都被检测到,甚至包括深1,000m的大西洋水体中,通过荧光杂交探针技术进行的单细胞原位分析使得人们认识到,酸杆菌属具有与变形菌纲几乎同样庞大的系统发育进化树和同样重要的生态作用^[18,25]。

氨氧化细菌是革兰氏阴性细菌,在系统发育上至少代表了两个进化分支,根据16S rRNA同源性分析可知,亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)属于变形菌纲的 α 亚纲,而亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)及亚硝化弧菌属(*Nitrosovibrio*)形成了变形菌纲的 β 亚纲中的一个簇群^[27]。

1988年Stackebrandt等将“紫细菌及有关细菌”即革兰氏阴性细菌命名为“变形细菌”(Proteobacteria),它们由Woese等(1978)命名的 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 亚纲的细菌组成。 α -亚纲是一个大群表观特征十分异源的细菌^[27],包括光能自养型、化能无机营养和化能有机营养类群,它们是土壤杆菌(*Agrobacterium*)—根瘤菌(*Rhizobium*)—叶杆菌(*Phyllobacterium*)—布鲁氏菌(*Brucella*)—苍白杆菌(*Ochrobacterium*) rRNA簇;醋杆菌科(*Acetobacteraceae*);拜叶林克氏菌(*Beijerinckia*)—固氮根瘤菌(*Azorhizobium*)—慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)—红假单胞菌(*Rhodopseudomonas*) rRNA簇;发酵单胞菌(*Zymomonas*);红螺菌(*Rhodospirillum*)—固氮螺菌(*Azospirillum*) rRNA簇;突柄和芽殖细菌;红杆菌(*Rhodobacter*)—副球菌(*Paracoccus*) rRNA簇及立克次氏体。

根据以上对放线菌(*Actinomycete*)、酸杆菌属(*Acidobacteria*)、氨氧化细菌(*Ammonia oxidizing bacteria*)和 α -变形菌属(α -proteobacteria)的系统分类的分析可知,放线菌、酸杆菌属属于独立的细菌种属,而氨氧化细菌中,有部分菌属(亚硝化球菌属)属于 α -变形菌属,这就使得针对氨氧化细菌和 α -变形菌属进行的nested PCR-DGGE分析中,DGGE图谱内所代表的两类细菌会有部分重复,但对于这些细菌在污水处理过程中所表现的功能和作用的讨论中并没有影响。

1.2.3 化学生物絮凝污水处理工艺的发展状况

随着社会经济的发展,城市污水排放量持续增加,解决城市污水污染水体的

(*Actinomytales*)^[26,27]。

酸杆菌属是近期刚刚发现的一类细菌,它只包括3个可培养的目:*Acidobacterium capsulatum*, *Holophaga foetida*, *Geothrix fermentans*^[25]。酸杆菌属在土壤、泥炭沼、矿山酸性排水、受污染蓄水层、温泉、淡水湖等许多环境样品中都被检测到,甚至包括深1,000m的大西洋水体中,通过荧光杂交探针技术进行的单细胞原位分析使得人们认识到,酸杆菌属具有与变形菌纲几乎同样庞大的系统发育进化树和同样重要的生态作用^[18,25]。

氨氧化细菌是革兰氏阴性细菌,在系统发育上至少代表了两个进化分支,根据16S rRNA同源性分析可知,亚硝化球菌属(*Nitrosococcus*)属于变形菌纲的 α 亚纲,而亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、亚硝化螺菌属(*Nitrosospira*)及亚硝化弧菌属(*Nitrosovibrio*)形成了变形菌纲的 β 亚纲中的一个簇群^[27]。

1988年Stackebrandt等将“紫细菌及有关细菌”即革兰氏阴性细菌命名为“变形细菌”(Proteobacteria),它们由Woese等(1978)命名的 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 亚纲的细菌组成。 α -亚纲是一个大群表观特征十分异源的细菌^[27],包括光能自养型、化能无机营养和化能有机营养类群,它们是土壤杆菌(*Agrobacterium*)—根瘤菌(*Rhizobium*)—叶杆菌(*Phyllobacterium*)—布鲁氏菌(*Brucella*)—苍白杆菌(*Ochrobacterium*) rRNA簇;醋杆菌科(*Acetobacteraceae*);拜叶林克氏菌(*Beijerinckia*)—固氮根瘤菌(*Azorhizobium*)—慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)—红假单胞菌(*Rhodopseudomonas*) rRNA簇;发酵单胞菌(*Zymomonas*);红螺菌(*Rhodospirillum*)—固氮螺菌(*Azospirillum*) rRNA簇;突柄和芽殖细菌;红杆菌(*Rhodobacter*)—副球菌(*Paracoccus*) rRNA簇及立克次氏体。

根据以上对放线菌(*Actinomycete*)、酸杆菌属(*Acidobacteria*)、氨氧化细菌(*Ammonia oxidizing bacteria*)和 α -变形菌属(α -proteobacteria)的系统分类的分析可知,放线菌、酸杆菌属属于独立的细菌种属,而氨氧化细菌中,有部分菌属(亚硝化球菌属)属于 α -变形菌属,这就使得针对氨氧化细菌和 α -变形菌属进行的nested PCR-DGGE分析中,DGGE图谱内所代表的两类细菌会有部分重复,但对于这些细菌在污水处理过程中所表现的功能和作用的讨论中并没有影响。

1.2.3 化学生物絮凝污水处理工艺的发展状况

随着社会经济的发展,城市污水排放量持续增加,解决城市污水污染水体的

根本途径就是要建设城市污水处理厂。我国中小城镇数量多，分布面广，污水排放量大，资金缺乏，而建设二级污水处理厂投资较高，因此，目前我国可以在很多城市建设强化一级处理厂，以减少投资消减大量的污染负荷，到条件成熟后再改建二级污水处理工艺。

强化一级处理就是利用一定的物理的、化学的或生物的方法是污水中的呈悬浮或胶体状态的污染物质颗粒发生凝聚和絮凝，改善污染物质的可沉降性能，提高沉淀分离效果和去除能力，从而改善出水水质的一种处理工艺。

按照产生絮凝的方法，强化一级处理方法可分为：化学强化一级处理、生物絮凝强化一级处理、化学生物絮凝强化一级处理。

1.2.3.1 化学强化一级处理工艺

化学强化一级处理（Chemically Enhanced Primary Treatment，简称CEPT）主要采用的是铁系和铝系的混凝药剂，有时与有机高分子絮凝剂如聚丙烯酰胺、聚丙烯酸钠等配合使用，以达到更好的去除SS、BOD₅和磷的目的。化学强化一级处理技术与絮凝剂的发展密切相关，由于城市污水水量大，投加絮凝剂处理成本太高，过去CEPT应用较少；随着新型、高效、廉价絮凝剂的出现，CEPT法在城市污水处理中逐步得到应用^[28]。

CEPT法主要用于去除以悬浮状或胶体形式存在的污染物。胶体颗粒不能在静置时下沉，也不能用常规的物理处理法加以去除。胶体带有电性，能产生斥力并避免集结和沉降。如果是亲水胶体，还因为溶剂化作用在胶体之外包裹了一层水，阻止凝聚。絮凝剂的加入能引起凝聚和絮凝作用，增强了沉淀性能，沉降速度加快^[29]。

香港昂船洲污水处理厂成功地利用了化学强化沉淀技术处理城市废水。根据该厂1999年的运行数据，当进水BOD₅=153mg/l，SS=169 mg/l，投药量为10 mg/l FeCl₃和1.0 mg/l聚丙烯酰胺时，出水BOD₅=43 mg/l，SS=32 mg/l。BOD₅与SS去除率分别达到71.9%和81.1%，出水直接排海^[30]。

在德国利用化学强化沉淀法对处理合流制废水溢流进行了一系列的小试。结果表明，利用FeCl₃和AlClSO₄进行化学强化沉淀的效果较好。当三价铁离子的投加量为20~30 mg/l时，COD的去除率大于50%，而总磷的去除率则可达到80%以上^[31]。

1.2.3.2 生物絮凝吸附强化一级处理工艺

生物絮凝吸附强化一级处理工艺主要是利用活性污泥的絮凝吸附作用,来提高沉淀池对废水中非溶解性有机污染物的去除率。其去除机理既有物理吸附、化学吸附和生物吸附作用,又有吸附架桥、沉淀网捕等絮凝作用,同时还进行着一定量的生物降解,相互作用十分复杂。迄今为止,已提出了多种解释机理,其中广为接受的是聚合物架桥理论。一般认为,对重金属离子的去除以物化吸附作用为主,对悬浮颗粒的去除以生物絮凝作用为主。起絮凝作用的主要物质是胞外聚合物,不同微生物表面间细微成分和结构的差别也可以导致絮凝,大量微生物形成的絮体又可以通过接触絮凝等作用去除水中的污染物质^[30]。二价阳离子在絮凝吸附过程中起着重要的架桥作用。

生物絮凝吸附处理中不必投加任何外部药剂,污泥产量相对较少,运行费用较低。但目前尚没有应用实例,对其运行机理、影响因素、控制参数等也都缺乏系统深入地研究。工艺中需要曝气设备与污泥回流设备,使能耗较高,且剩余污泥量仍比传统生物处理法大,污泥稳定性差^[30]。

清华大学蒋展鹏等的研究表明,当絮凝吸附池污泥浓度为1~2 g/l, HRT为30min,沉淀池沉淀时间为1h,曝气再生池曝气2h时,COD和SS去除率分别可达60~70%和70~90%^[32]。与常规一级处理工艺相比,其处理效果提高显著。

1.2.3.3 化学生物絮凝强化一级处理工艺

化学强化一级处理工艺中,以去除悬浮颗粒物和胶体颗粒为主,对溶解性的COD和BOD₅的去除率不高,对磷具有较好的去除效果,但所需药剂费用较高。生物絮凝吸附强化一级处理工艺通常由一个停留时间较短(30min左右)的曝气池和沉淀池构成,进水的可沉固体和回流污泥在系统中得到活化,具有佳好的絮凝吸附作用和沉降性能,污泥产量较少,但污泥稳定性较差。

化学絮凝处理工艺和生物絮凝处理工艺各有特点,如果能将二者很好地结合起来,从理论上分析,可以得到一种加药量少、污泥产量少、运行成本低、处理效果好的工艺—化学生物絮凝污水处理工艺。

化学生物絮凝处理工艺由加药设备、混合水箱、絮凝反应池、沉淀池、污泥回流和空气混合系统构成。污水在混合水箱内与投加的化学药剂混合均匀,进入絮凝反应池与回流的污泥在空气搅拌的情况下实现化学生物絮凝过程,形成沉降

性能良好的污泥絮体和磷酸盐化学沉淀物，在沉淀池完成固液分离。

化学生物絮凝具有化学絮凝强化和生物絮凝强化处理二者的优点，以化学絮凝沉淀为主，生物絮凝沉淀为辅，达到降低药剂消耗量、减少污泥产量、降低处理成本的目的。另外化学生物絮凝处理工艺的一个优点是，可以根据进水水质、水量和季节的变化进行灵活切换，可以以三种不同方式运行：化学生物絮凝处理方式、化学絮凝处理方式、生物絮凝处理方式。

郑兴灿^[33]等的研究表明，通过化学絮凝沉淀作用、生物絮凝与不完全氧化作用，可以提高和保证SS、COD、BOD、TP的去除效果，去除率一般为COD：60~80%、BOD₅：60~80%、SS：80~90%、TP：75~90%、TN：25%左右。

夏四清^[34]等在将化学生物絮凝污水处理工艺用于上海合流污水试验时的研究表明，在回流比为20~25%，水力停留时间为35min，投加PAC 70 mg/l，PAM 0.5 mg/l药剂时，出水COD：60 mg/l，TP：0.75 mg/l，SS：13 mg/l，均优于设计要求。

1.2.4 悬浮填料床处理工艺研究进展

悬浮填料床生物膜法（suspended bio-media moving bed biofilm）是近年来在生物接触氧化法和生物流化床的基础上开发的一种新型高效生物膜法废水处理装置，为微生物提供了更加有利的生存环境，附着和悬浮生长的微生物协作完成对污染物的降解过程，其中附着生长微生物占多数，两相之间的可转化性增强了系统的调节机制，使系统具有更强的适应性和稳定性以及较强的抗冲击负荷能力。

悬浮填料床的核心部分是一种特殊的在反应器中能保持悬浮的塑料填料，这些填料随反应器内混合液的回旋翻转作用而自由移动。填料在水中充分流化，可以使填料上的微生物获得充分的溶解氧和有机养料，提高了微生物的浓度，降低了污泥负荷，同时也为世代时间长的硝化细菌提供了栖息场所，为氨氮的硝化创造了条件。

夏四清^[35]等对悬浮填料浮动床进行了充氧能力试验和石化废水处理试验，结果表明，当填料投加率为50%时，在与普通曝气池相同的条件下，可使反应器充氧能力提高至无填料时的2倍以上。在普通生物反应器内投加填料在不改变其生化反应条件下，进水COD：300~500 mg/l，NH₃-N：24~35 mg/l时，出水COD <

性能良好的污泥絮体和磷酸盐化学沉淀物，在沉淀池完成固液分离。

化学生物絮凝具有化学絮凝强化和生物絮凝强化处理二者的优点，以化学絮凝沉淀为主，生物絮凝沉淀为辅，达到降低药剂消耗量、减少污泥产量、降低处理成本的目的。另外化学生物絮凝处理工艺的一个优点是，可以根据进水水质、水量和季节的变化进行灵活切换，可以以三种不同方式运行：化学生物絮凝处理方式、化学絮凝处理方式、生物絮凝处理方式。

郑兴灿^[33]等的研究表明，通过化学絮凝沉淀作用、生物絮凝与不完全氧化作用，可以提高和保证SS、COD、BOD、TP的去除效果，去除率一般为COD: 60~80%、BOD₅: 60~80%、SS: 80~90%、TP: 75~90%、TN: 25%左右。

夏四清^[34]等在将化学生物絮凝污水处理工艺用于上海合流污水试验时的研究表明，在回流比为20~25%，水力停留时间为35min，投加PAC 70 mg/l, PAM 0.5 mg/l药剂时，出水COD: 60 mg/l, TP: 0.75 mg/l, SS: 13 mg/l, 均优于设计要求。

1.2.4 悬浮填料床处理工艺研究进展

悬浮填料床生物膜法（suspended bio-media moving bed biofilm）是近年来在生物接触氧化法和生物流化床的基础上开发的一种新型高效生物膜法废水处理装置，为微生物提供了更加有利的生存环境，附着和悬浮生长的微生物协作完成对污染物的降解过程，其中附着生长微生物占多数，两相之间的可转化性增强了系统的调节机制，使系统具有更强的适应性和稳定性以及较强的抗冲击负荷能力。

悬浮填料床的核心部分是一种特殊的在反应器中能保持悬浮的塑料填料，这些填料随反应器内混合液的回旋翻转作用而自由移动。填料在水中充分流化，可以使填料上的微生物获得充分的溶解氧和有机养料，提高了微生物的浓度，降低了污泥负荷，同时也为世代时间长的硝化细菌提供了栖息场所，为氨氮的硝化创造了条件。

夏四清^[35]等对悬浮填料浮动床进行了充氧能力试验和石化废水处理试验，结果表明，当填料投加率为50%时，在与普通曝气池相同的条件下，可使反应器充氧能力提高至无填料时的2倍以上。在普通生物反应器内投加填料在不改变其生化反应条件下，进水COD: 300~500 mg/l, NH₃-N: 24~35 mg/l时，出水COD <

90 mg/l, $\text{NH}_3\text{-N} < 15 \text{ mg/l}$ 。

M. X. Loukidou^[36]用MBBR和SBR联合工艺对垃圾渗滤液进行了处理, COD、BOD₅、TP的去除率分别为65%、95%、65%, 且基本可以达到完全硝化, 运行稳定时对色度和浊度也有很好的去除效果。

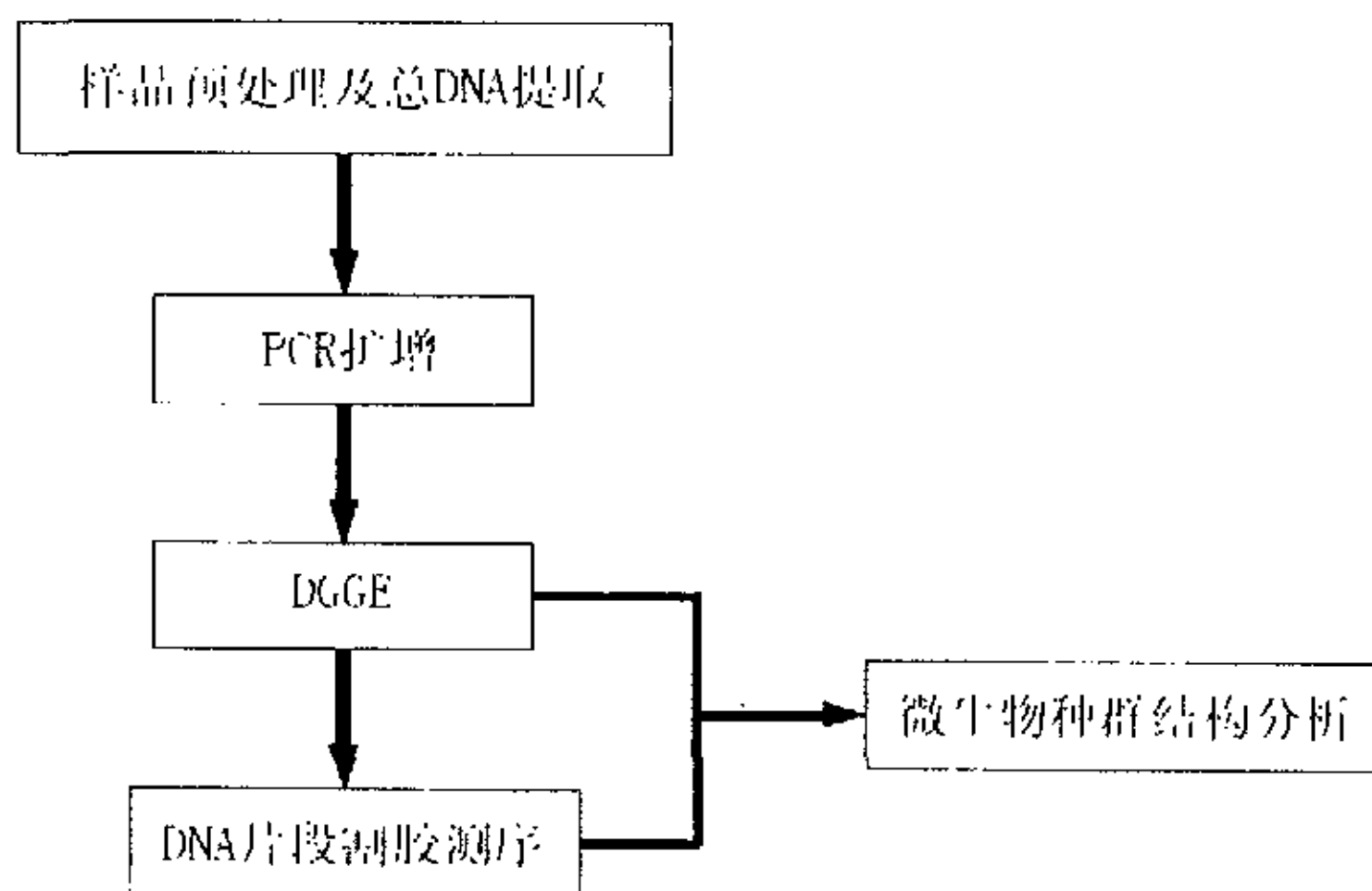
1.3 主要研究内容和技术路线

1.3.1 研究内容

化学生物絮凝污水处理工艺结合了化学絮凝和生物絮凝工艺的优点, 是一种加药量少、污泥产量少、运行成本低、处理效果好的工艺, 然而关于化学生物絮凝工艺中微生物种群的结构, 人们知之甚少。以往对于其微生态的研究都是停留在耗氧速率试验、微生物镜检和培养方面^[37], 并不能够完整确切地反映出微生物种群的状况。本课题拟将PCR-DGGE方法应用于化学生物絮凝工艺和悬浮填料床中微生物种群结构的研究, 具体研究内容包括:

- (1) 化学生物絮凝污水处理工艺调试阶段微生物种群结构初步分析;
- (2) 化学生物絮凝工艺微生物种群结构分析;
- (3) 化学生物絮凝与化学混凝工艺微生物结构比较分析;
- (4) 悬浮填料床微生物种群结构初步分析;
- (5) 化学生物絮凝工艺与几种传统污水处理工艺微生物种群结构比较分析。

1.3.2 技术路线



90 mg/l, $\text{NH}_3\text{-N} < 15 \text{ mg/l}$ 。

M. X. Loukidou^[36]用MBBR和SBR联合工艺对垃圾渗滤液进行了处理, COD、BOD₅、TP的去除率分别为65%、95%、65%, 且基本可以达到完全硝化, 运行稳定时对色度和浊度也有很好的去除效果。

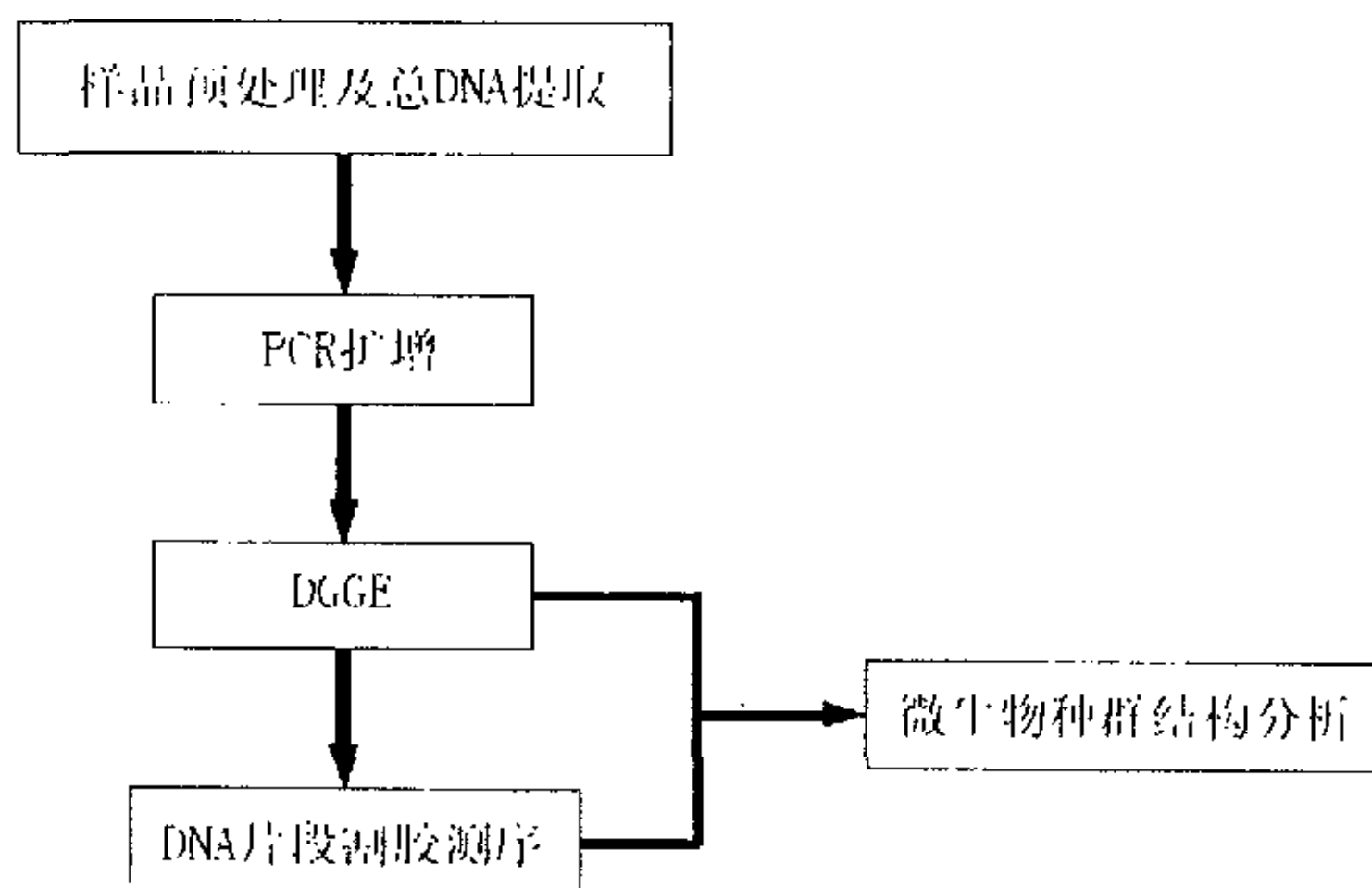
1.3 主要研究内容和技术路线

1.3.1 研究内容

化学生物絮凝污水处理工艺结合了化学絮凝和生物絮凝工艺的优点, 是一种加药量少、污泥产量少、运行成本低、处理效果好的工艺, 然而关于化学生物絮凝工艺中微生物种群的结构, 人们知之甚少。以往对于其微生态的研究都是停留在耗氧速率试验、微生物镜检和培养方面^[37], 并不能够完整确切地反映出微生物种群的状况。本课题拟将PCR-DGGE方法应用于化学生物絮凝工艺和悬浮填料床中微生物种群结构的研究, 具体研究内容包括:

- (1) 化学生物絮凝污水处理工艺调试阶段微生物种群结构初步分析;
- (2) 化学生物絮凝工艺微生物种群结构分析;
- (3) 化学生物絮凝与化学混凝工艺微生物结构比较分析;
- (4) 悬浮填料床微生物种群结构初步分析;
- (5) 化学生物絮凝工艺与几种传统污水处理工艺微生物种群结构比较分析。

1.3.2 技术路线



第二章 试验方法与材料

2.1 样品的采集及预处理

2.1.1 装置描述

污泥样品取自上海安亭污水处理厂国家“863计划”课题污水处理中试装置，该装置主体分为两大部分：前面并联的化学生物絮凝工艺和化学混凝工艺，这是为对两种工艺进行类比试验而设计的；后续的悬浮填料床工艺，主要用于去除氨氮，提高出水水质。原水主要来自上海安亭国际汽车城排放的合流污水，进水水质及装置要求的出水水质见表2-1。原水经进水箱进入进水分配池，平均分配给化学混凝池和化学生物絮凝池，进行强化一级处理后，再通过后续的悬浮填料床脱氮。装置的处理工艺流程如图2-1所示。

表 2-1 装置进出水水质

	COD _{Cr} (mg/l)	BOD ₅ (mg/l)	SS (mg/l)	NH ₃ -N (mg/l)	TP (mg/l)
进水	150-250	100-140	130-200	15	2-4
出水	≤100	≤30	≤20	15	≤1.0

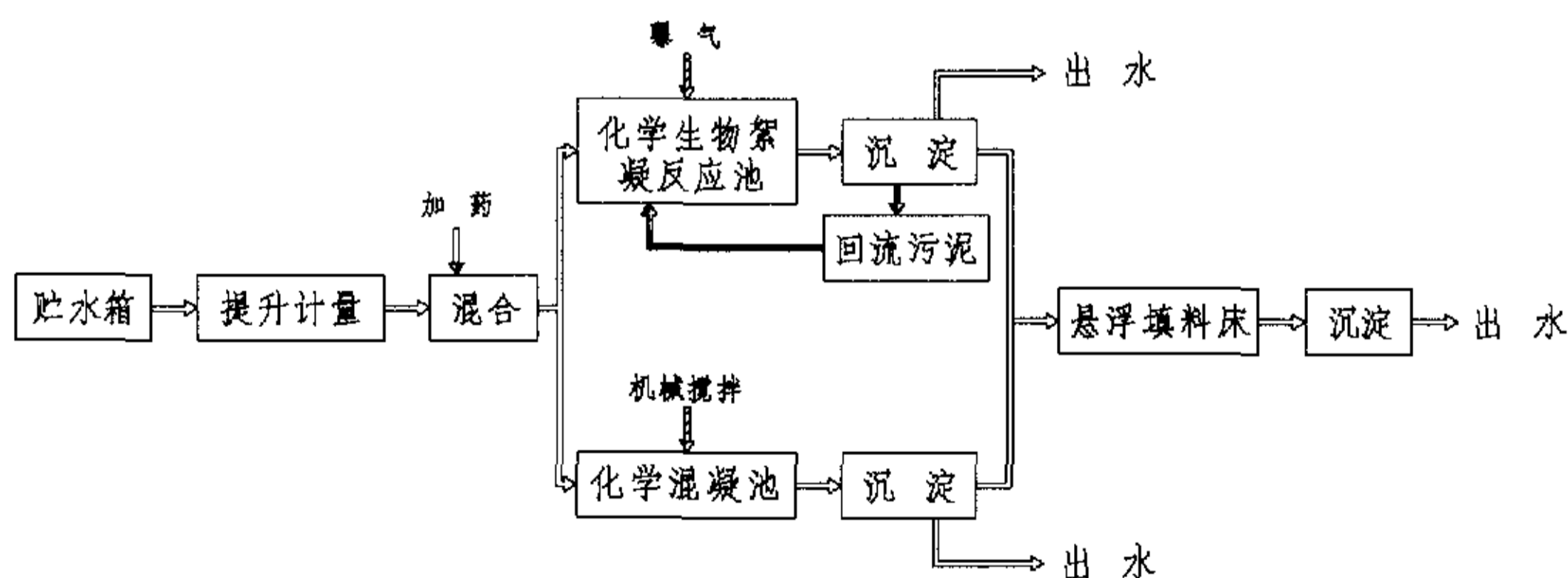


图2-1 化学生物絮凝、化学混凝处理工艺中试装置图 (50t/d)

进水箱用于储存原水。原水来自安亭水质净化厂曝气沉砂池中污水，经进水管自流进入进水箱。进水箱尺寸为A×B×H=2.4m×2m×1.2m，其有效容积为4.8m³。进水箱配置2台潜污泵（1用1备），单台流量为10m³/h，扬程为20m。箱中的原水经潜污泵提升进入分配水箱，平均分配给化学生物絮凝池和化学混凝池，并通过电磁流量计进行计量。进水箱中装有浮球液位控制器可控制水泵开停。

第二章 试验方法与材料

2.1 样品的采集及预处理

2.1.1 装置描述

污泥样品取自上海安亭污水处理厂国家“863计划”课题污水处理中试装置，该装置主体分为两大部分：前面并联的化学生物絮凝工艺和化学混凝工艺，这是为对两种工艺进行类比试验而设计的；后续的悬浮填料床工艺，主要用于去除氨氮，提高出水水质。原水主要来自上海安亭国际汽车城排放的合流污水，进水水质及装置要求的出水水质见表2-1。原水经进水箱进入进水分配池，平均分配给化学混凝池和化学生物絮凝池，进行强化一级处理后，再通过后续的悬浮填料床脱氮。装置的处理工艺流程如图2-1所示。

表 2-1 装置进出水水质

	COD _{Cr} (mg/l)	BOD ₅ (mg/l)	SS (mg/l)	NH ₃ -N (mg/l)	TP (mg/l)
进水	150-250	100-140	130-200	15	2-4
出水	≤100	≤30	≤20	15	≤1.0

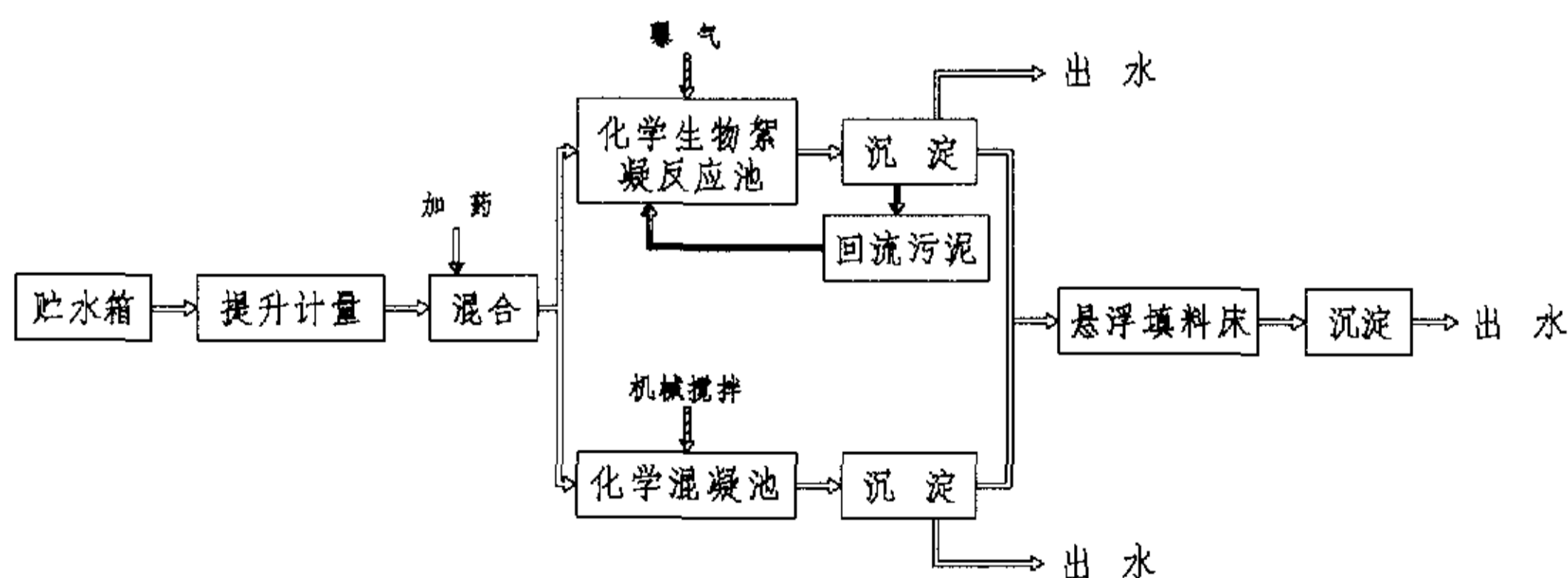


图2-1 化学生物絮凝、化学混凝处理工艺中试装置图 (50t/d)

进水箱用于储存原水。原水来自安亭水质净化厂曝气沉砂池中污水，经进水管自流进入进水箱。进水箱尺寸为 $A \times B \times H = 2.4\text{m} \times 2\text{m} \times 1.2\text{m}$ ，其有效容积为 4.8m^3 。进水箱配置2台潜污泵（1用1备），单台流量为 $10\text{m}^3/\text{h}$ ，扬程为20m。箱中的原水经潜污泵提升进入分配水箱，平均分配给化学生物絮凝池和化学混凝池，并通过电磁流量计进行计量。进水箱中装有浮球液位控制器可控制水泵开停。

化学生物絮凝池是有污泥回流的活性污泥和化学混凝系统的组合,采用空气完成搅拌及絮凝反应,充分发挥化学和生物协同作用,从而高效去除有机污染物和总磷。化学生物絮凝池尺寸为 $A \times B \times H = 2.5\text{m} \times 0.9\text{m} \times 0.8\text{m}$,有效水深为 0.6m ,设计水量为 $50\text{m}^3/\text{d}$,设计最大水力停留时间为 35min 。池体采用三段推流回转式布置^[37],由两道长 2.2m 相互错开的隔板沿宽度方向分成三条廊道,污水从第一条廊道进入池中,从第三条廊道流出。利用空气搅拌作为污水快速混合的动力,在每条廊道底部布置微孔曝气管,采用三叶式小型回转鼓风机进行曝气,可通过电动调节阀独自调节曝气量以改变速度梯度,并安装有玻璃转子流量计计量。回转式布置能够保证池中污水充分混合和对溶解氧的充分利用,并有利于对曝气量进行调节和控制。在第一条廊道开端处设有污泥回流管,后续沉淀池中污泥可通过1台螺杆泵回流至絮凝池中,设计回流比为 30% ,水泵单台流量为 $2.5\text{m}^3/\text{h}$,扬程为 30m 。通过2台加药计量泵可向池中投加无机絮凝剂和有机助凝剂,加药点位置设置可调,有利于在试验研究中寻找最佳药剂投加点。

化学混凝池是为与化学生物絮凝池进行类比试验而设计,为常规的强化一级处理反应池。为方便试验,化学混凝池的池体尺寸、有效水深、停留时间以及处理规模采取与化学生物絮凝池完全相同的设计。池体由两块隔板沿长度方向分成三格,分别在两块隔板下端和上端设置过流口。该池利用机械搅拌作为污水快速混合的动力,在每格小池各设有1台减速搅拌机。化学混凝池的加药方式与化学生物絮凝池基本相同,不同之处在于化学混凝池进水管前安装有1个管道混合器,无机药剂药先经管道混合器与污水充分混合后再进入混凝池中。为方便化学混凝池的放空,在混凝池的三格小池底各设1根放空管。

悬浮填料床是一种生物膜法反应器,其主要作用是脱氮,需要往池中投加高比表面积的球形悬浮填料。悬浮填料床尺寸为 $A \times B \times H = 1.8\text{m} \times 0.9\text{m} \times 5.5\text{m}$,有效水深 5m ,设计处理水量 $100\text{m}^3/\text{d}$ 。池体由于采用竖向设计,占地面积省。池体沿长度方向用隔板分成两格,隔板距池底 0.3m ,纵向长度为 4.4m ,这样使得每格的上下两端连通,每格底部各放置两根穿孔曝气管。在其中一格的中间和上端各设1根进水管,可根据试验需要选择任一管道进水或者两点同时进水。顶端设1根混合液回流管,回流混合液来自后续沉淀池,通过1台离心泵送至悬浮填料床,水泵单台流量为 $0 \sim 7\text{m}^3/\text{h}$,扬程为 8m 。当以氨氮作为出水控制标准时,池中球

形悬浮填料的表层生物膜通过硝化作用把氨氮转化为硝态氮,此时不需要混合液回流;当以总氮作为出水控制标准时,填料表层好氧硝化、内部厌氧反硝化作用同时进行,为增加池中硝态氮的浓度,则需混合液回流,回流比可通过阀门进行调节。池中投加的球形悬浮填料直径为25mm,投加量约为 0.5 m^3 填料/ m^3 容积。在水流和气体的共同推力作用下,悬浮填料可在两个小池间循环流动,大大提高了填料上生物膜的吸氧能力和与污水的接触频率。

2.1.2 样品预处理

进水及化学混凝池各格样品,取池中泥水混合物1000ml,沉淀30min,去上清液,取污泥约25ml于50ml灭菌离心管,重复二次,再次沉淀,去约40ml上清液,剩余泥水混合物10ml混匀后取1ml置于1.5ml的灭菌离心管中离心1min(9000r/min, 25°C),弃上清,沉淀(约100mg)于 -30°C 冰冻保存用于细胞裂解。

化学生物絮凝池各廊道,取池中泥水混合物100ml,沉淀30min,去上清液,取污泥于50ml灭菌离心管,再次沉淀,去约30ml上清液,剩余泥水混合物20ml混匀后取1ml置于1.5ml的灭菌离心管中离心1min(9000 r/min, 25°C),弃上清,沉淀(约100mg)于 -30°C 冰冻保存用于细胞裂解。

悬浮填料床内生物膜样品用无菌刷刷取10个填料上的生物膜,悬浮于无菌水20ml中,9000 r/min离心后取生物膜沉淀 -30°C 冰冻保存待DNA提取。

2.2 总DNA提取和纯化

2.2.1 DNA提取方法

分子生物学技术不采用传统的微生物培养方法,直接对环境样品中的细菌基因组DNA组成状况进行分析评价。同时,样品中总DNA的提取也直接影响到了后续PCR-DGGE分析的准确和精度。因此,建立高效、可靠的DNA提取方法是研究环境中微生物的技术关键之一。

担负着污水中污染物降解的活性污泥和生物膜样品,由于含有大量理化性质极为复杂的无机颗粒、有机颗粒和盐类物质,微生物仅仅是其组成的一小部分,微生物的细胞通常紧密地吸附于颗粒表面,细菌种类组成十分复杂,因此,为了更准确、快捷地从活性污泥和生物膜中提取到总DNA,在研究中参考了许多已有的研究成果,总结出一套便捷、有效的DNA提取方法。

从样品中提取总DNA方法^[12,13,38-39];

形悬浮填料的表层生物膜通过硝化作用把氨氮转化为硝态氮,此时不需要混合液回流;当以总氮作为出水控制标准时,填料表层好氧硝化、内部厌氧反硝化作用同时进行,为增加池中硝态氮的浓度,则需混合液回流,回流比可通过阀门进行调节。池中投加的球形悬浮填料直径为25mm,投加量约为 0.5 m^3 填料/ m^3 容积。在水流和气体的共同推力作用下,悬浮填料可在两个小池间循环流动,大大提高了填料上生物膜的吸氧能力和与污水的接触频率。

2.1.2 样品预处理

进水及化学混凝池各格样品,取池中泥水混合物1000ml,沉淀30min,去上清液,取污泥约25ml于50ml灭菌离心管,重复二次,再次沉淀,去约40ml上清液,剩余泥水混合物10ml混匀后取1ml置于1.5ml的灭菌离心管中离心1min(9000r/min, 25℃),弃上清,沉淀(约100mg)于-30℃冰冻保存用于细胞裂解。

化学生物絮凝池各廊道,取池中泥水混合物100ml,沉淀30min,去上清液,取污泥于50ml灭菌离心管,再次沉淀,去约30ml上清液,剩余泥水混合物20ml混匀后取1ml置于1.5ml的灭菌离心管中离心1min(9000 r/min,25℃),弃上清,沉淀(约100mg)于-30℃冰冻保存用于细胞裂解。

悬浮填料床内生物膜样品用无菌刷刷取10个填料上的生物膜,悬浮于无菌水20ml中,9000 r/min离心后取生物膜沉淀-30℃冰冻保存待DNA提取。

2.2 总DNA提取和纯化

2.2.1 DNA提取方法

分子生物学技术不采用传统的微生物培养方法,直接对环境样品中的细菌基因组DNA组成状况进行分析评价。同时,样品中总DNA的提取也直接影响到了后续PCR-DGGE分析的准确和精度。因此,建立高效、可靠的DNA提取方法是研究环境中微生物的技术关键之一。

担负着污水中污染物降解的活性污泥和生物膜样品,由于含有大量理化性质极为复杂的无机颗粒、有机颗粒和盐类物质,微生物仅仅是其组成的一小部分,微生物的细胞通常紧密地吸附于颗粒表面,细菌种类组成十分复杂,因此,为了更准确、快捷地从活性污泥和生物膜中提取到总DNA,在研究中参考了许多已有的研究成果,总结出一套便捷、有效的DNA提取方法。

从样品中提取总DNA方法^[12,13,38-39];

形悬浮填料的表层生物膜通过硝化作用把氨氮转化为硝态氮,此时不需要混合液回流;当以总氮作为出水控制标准时,填料表层好氧硝化、内部厌氧反硝化作用同时进行,为增加池中硝态氮的浓度,则需混合液回流,回流比可通过阀门进行调节。池中投加的球形悬浮填料直径为25mm,投加量约为 0.5 m^3 填料/ m^3 容积。在水流和气体的共同推力作用下,悬浮填料可在两个小池间循环流动,大大提高了填料上生物膜的吸氧能力和与污水的接触频率。

2.1.2 样品预处理

进水及化学混凝池各格样品,取池中泥水混合物1000ml,沉淀30min,去上清液,取污泥约25ml于50ml灭菌离心管,重复二次,再次沉淀,去约40ml上清液,剩余泥水混合物10ml混匀后取1ml置于1.5ml的灭菌离心管中离心1min(9000r/min, 25°C),弃上清,沉淀(约100mg)于 -30°C 冰冻保存用于细胞裂解。

化学生物絮凝池各廊道,取池中泥水混合物100ml,沉淀30min,去上清液,取污泥于50ml灭菌离心管,再次沉淀,去约30ml上清液,剩余泥水混合物20ml混匀后取1ml置于1.5ml的灭菌离心管中离心1min(9000 r/min, 25°C),弃上清,沉淀(约100mg)于 -30°C 冰冻保存用于细胞裂解。

悬浮填料床内生物膜样品用无菌刷刷取10个填料上的生物膜,悬浮于无菌水20ml中,9000 r/min离心后取生物膜沉淀 -30°C 冰冻保存待DNA提取。

2.2 总DNA提取和纯化

2.2.1 DNA提取方法

分子生物学技术不采用传统的微生物培养方法,直接对环境样品中的细菌基因组DNA组成状况进行分析评价。同时,样品中总DNA的提取也直接影响到了后续PCR-DGGE分析的准确和精度。因此,建立高效、可靠的DNA提取方法是研究环境中微生物的技术关键之一。

担负着污水中污染物降解的活性污泥和生物膜样品,由于含有大量理化性质极为复杂的无机颗粒、有机颗粒和盐类物质,微生物仅仅是其组成的一小部分,微生物的细胞通常紧密地吸附于颗粒表面,细菌种类组成十分复杂,因此,为了更准确、快捷地从活性污泥和生物膜中提取到总DNA,在研究中参考了许多已有的研究成果,总结出一套便捷、有效的DNA提取方法。

从样品中提取总DNA方法^[12,13,38-39];

(1) 在1.5ml无菌离心管中, 加入约100mg污泥样品和0.8ml DNA提取缓冲液、10 μ l 蛋白酶K (10mg/ml), 放置于37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床30min;

(2) 加入100 μ l 20% SDS (十二烷基硫酸钠), 65 $^{\circ}$ C水浴2h, 每隔15~20min 轻轻摇动一次;

(3) 所得产物于室温下6000 r/min 离心10min, 取上清液于另一1.5ml离心管中;

(4) 沉淀中加入0.4ml DNA提取缓冲液, 50 μ l 20% SDS, 65 $^{\circ}$ C水浴10min, 室温下6000 r/min离心10min, 上清液与步骤3合并;

(5) 于上清液中加入等体积氯仿/异戊醇(体积比24:1), 6000 r/min离心10min, 取水层;

(6) 加入0.6倍体积异丙醇, 室温放置1h, 9000 r/min室温离心10 min;

(7) 沉淀中加入1ml70%乙醇溶液, 9000 r/min室温离心10 min;

(8) 弃液体, 待干燥后加入300 μ l pH7.6的TE缓冲液溶解沉淀。

2.2.2 DNA提取试剂

(1) DNA提取缓冲液^[13] (121 $^{\circ}$ C, 20min灭菌): 100mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 100mmol/l 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0), 1.5mol/l NaCl, 1%CTAB (十六烷基三甲基溴化铵);

(2) TE缓冲液 (121 $^{\circ}$ C, 20min灭菌): 10mmol/l Tris-HCl (pH 7.6); 1mmol/l EDTA (乙二胺四乙酸二钠) (pH 8.0)。

(3) Marker: 宝生物工程(大连)有限公司生产的 λ -Hind III digest, 包括23130bp, 9416bp, 6557bp, 4361bp, 2322bp, 2027bp, 564bp和125bp。

2.3 PCR扩增

2.3.1 PCR扩增程序及引物

2.3.1.1 通用引物PCR

论文中第三章、第七章使用的是通用引物PCR, 引物为P338F和P518r, 扩增程序94 $^{\circ}$ C, 2min; 94 $^{\circ}$ C, 45s, 60 $^{\circ}$ C, 45s, 72 $^{\circ}$ C, 90s, 30cycles; 72 $^{\circ}$ C, 10min。

2.3.1.2 套式PCR (nested PCR)

为使PCR扩增的敏感性更强和DGGE分析更具有针对性, 试验中参考了部分文献, 在论文的第四章、第五章、第六章采用了套式PCR (nested PCR) 技术。

(1) 在1.5ml无菌离心管中, 加入约100mg污泥样品和0.8ml DNA提取缓冲液、10 μ l 蛋白酶K (10mg/ml), 放置于37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床30min;

(2) 加入100 μ l 20% SDS (十二烷基硫酸钠), 65 $^{\circ}$ C水浴2h, 每隔15~20min 轻轻摇动一次;

(3) 所得产物于室温下6000 r/min 离心10min, 取上清液于另一1.5ml离心管中;

(4) 沉淀中加入0.4ml DNA提取缓冲液, 50 μ l 20% SDS, 65 $^{\circ}$ C水浴10min, 室温下6000 r/min离心10min, 上清液与步骤3合并;

(5) 于上清液中加入等体积氯仿/异戊醇(体积比24:1), 6000 r/min离心10min, 取水层;

(6) 加入0.6倍体积异丙醇, 室温放置1h, 9000 r/min室温离心10 min;

(7) 沉淀中加入1ml70%乙醇溶液, 9000 r/min室温离心10 min;

(8) 弃液体, 待干燥后加入300 μ l pH7.6的TE缓冲液溶解沉淀。

2.2.2 DNA提取试剂

(1) DNA提取缓冲液^[13] (121 $^{\circ}$ C, 20min灭菌): 100mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 100mmol/l 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0), 1.5mol/l NaCl, 1%CTAB (十六烷基三甲基溴化铵);

(2) TE缓冲液 (121 $^{\circ}$ C, 20min灭菌): 10mmol/l Tris-HCl (pH 7.6); 1mmol/l EDTA (乙二胺四乙酸二钠) (pH 8.0)。

(3) Marker: 宝生物工程(大连)有限公司生产的 λ -Hind III digest, 包括23130bp, 9416bp, 6557bp, 4361bp, 2322bp, 2027bp, 564bp和125bp。

2.3 PCR扩增

2.3.1 PCR扩增程序及引物

2.3.1.1 通用引物PCR

论文中第三章、第七章使用的是通用引物PCR, 引物为P338F和P518r, 扩增程序94 $^{\circ}$ C, 2min; 94 $^{\circ}$ C, 45s, 60 $^{\circ}$ C, 45s, 72 $^{\circ}$ C, 90s, 30cycles; 72 $^{\circ}$ C, 10min。

2.3.1.2 套式PCR (nested PCR)

为使PCR扩增的敏感性更强和DGGE分析更具有针对性, 试验中参考了部分文献, 在论文的第四章、第五章、第六章采用了套式PCR (nested PCR) 技术。

(1) 在1.5ml无菌离心管中, 加入约100mg污泥样品和0.8ml DNA提取缓冲液、10 μ l 蛋白酶K (10mg/ml), 放置于37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 摇床30min;

(2) 加入100 μ l 20% SDS (十二烷基硫酸钠), 65 $^{\circ}$ C水浴2h, 每隔15~20min 轻轻摇动一次;

(3) 所得产物于室温下6000 r/min 离心10min, 取上清液于另一1.5ml离心管中;

(4) 沉淀中加入0.4ml DNA提取缓冲液, 50 μ l 20% SDS, 65 $^{\circ}$ C水浴10min, 室温下6000 r/min离心10min, 上清液与步骤3合并;

(5) 于上清液中加入等体积氯仿/异戊醇(体积比24:1), 6000 r/min离心10min, 取水层;

(6) 加入0.6倍体积异丙醇, 室温放置1h, 9000 r/min室温离心10 min;

(7) 沉淀中加入1ml70%乙醇溶液, 9000 r/min室温离心10 min;

(8) 弃液体, 待干燥后加入300 μ l pH7.6的TE缓冲液溶解沉淀。

2.2.2 DNA提取试剂

(1) DNA提取缓冲液^[13] (121 $^{\circ}$ C, 20min灭菌): 100mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 100mmol/l 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0), 1.5mol/l NaCl, 1%CTAB (十六烷基三甲基溴化铵);

(2) TE缓冲液 (121 $^{\circ}$ C, 20min灭菌): 10mmol/l Tris-HCl (pH 7.6); 1mmol/l EDTA (乙二胺四乙酸二钠) (pH 8.0)。

(3) Marker: 宝生物工程(大连)有限公司生产的 λ -Hind III digest, 包括23130bp, 9416bp, 6557bp, 4361bp, 2322bp, 2027bp, 564bp和125bp。

2.3 PCR扩增

2.3.1 PCR扩增程序及引物

2.3.1.1 通用引物PCR

论文中第三章、第七章使用的是通用引物PCR, 引物为P338F和P518r, 扩增程序94 $^{\circ}$ C, 2min; 94 $^{\circ}$ C, 45s, 60 $^{\circ}$ C, 45s, 72 $^{\circ}$ C, 90s, 30cycles; 72 $^{\circ}$ C, 10min。

2.3.1.2 套式PCR (nested PCR)

为使PCR扩增的敏感性更强和DGGE分析更具有针对性, 试验中参考了部分文献, 在论文的第四章、第五章、第六章采用了套式PCR (nested PCR) 技术。

第一轮PCR使用特定的目标细菌的引物及其相应的PCR条件；第二轮PCR以第一轮PCR的产物作为模板，使用引物P338F和P518r进行扩增，并于P338F的5'端加上“GC钳”（见表2-2）。由于第二轮PCR引物P338F和P518r的设计片段均位于第一轮PCR扩增得到的片段之内，所以第一轮PCR反应得到的产物均可在第二轮PCR中得到再次扩增，这样既增加了反应的特异性，又可得到丰产的特异性靶序列，增加敏感性。

表2-2 PCR引物及条件

扩增目标	引物	PCR条件						参考文献	
		循环	变性		退火		延伸		
			°C	s	°C	s	°C		s
第一轮PCR									
总细菌	P63F,R1378	30	95	60	53	60	72	120	[16]
放线菌	F243,R1378	35	95	60	63	60	72	120	[17]
酸杆菌属	31f,R1378	30	95	60	53	60	72	120	[17,18]
氮氧化细菌	CTO189fAB,CTO189fC, CTO653r	35	94	60	57	60	72	120	[19]
α -变形菌纲	F203a,R1378	35	94	62	56	60	72	2	[17,20]
第二轮PCR									
总细菌	P338FGC ^a ,P518r	30	94	45s	60	45s	72	90s	[16]

在PCR反应循环开始前，95°C预变性10min，循环结束后72°C延伸12min。

^a为满足DGGE的温度和分析在5'端加上“GC钳”^[40]。

2.3.2 PCR扩增实验步骤和方法

(1) 反应体系：向一个0.5ml灭菌薄壁离心管中依次加入：

	第一轮PCR	第二轮PCR
灭菌ddH ₂ O	78 μ l	80 μ l
10×PCR缓冲液	10 μ l	10 μ l
dNTPs	2 μ l	2 μ l
引物1	2 μ l	2 μ l
引物2	2 μ l	2 μ l
TaqDNA聚合酶	2 μ l	2 μ l

第一轮PCR使用特定的目标细菌的引物及其相应的PCR条件；第二轮PCR以第一轮PCR的产物作为模板，使用引物P338F和P518r进行扩增，并于P338F的5'端加上“GC钳”（见表2-2）。由于第二轮PCR引物P338F和P518r的设计片段均位于第一轮PCR扩增得到的片段之内，所以第一轮PCR反应得到的产物均可在第二轮PCR中得到再次扩增，这样既增加了反应的特异性，又可得到丰产的特异性靶序列，增加敏感性。

表2-2 PCR引物及条件

扩增目标	引物	PCR条件								参考文献
		循环	变性		退火		延伸			
			°C	s	°C	s	°C	s		
第一轮PCR										
总细菌	P63F,R1378	30	95	60	53	60	72	120	[16]	
放线菌	F243,R1378	35	95	60	63	60	72	120	[17]	
酸杆菌属	31f,R1378	30	95	60	53	60	72	120	[17,18]	
氮氧化细菌	CTO189fAB,CTO189fC, CTO653r	35	94	60	57	60	72	120	[19]	
α -变形菌纲	F203a,R1378	35	94	62	56	60	72	2	[17,20]	
第二轮PCR										
总细菌	P338FGC ^a ,P518r	30	94	45s	60	45s	72	90s	[16]	

在PCR反应循环开始前，95°C预变性10min，循环结束后72°C延伸12min。

^a为满足DGGE的温度和分析在5'端加上“GC钳”^[40]。

2.3.2 PCR扩增实验步骤和方法

(1) 反应体系：向一个0.5ml灭菌薄壁离心管中依次加入：

	第一轮PCR	第二轮PCR
灭菌ddH ₂ O	78 μ l	80 μ l
10 \times PCR缓冲液	10 μ l	10 μ l
dNTPs	2 μ l	2 μ l
引物1	2 μ l	2 μ l
引物2	2 μ l	2 μ l
TaqDNA聚合酶	2 μ l	2 μ l

模板DNA 4 μ l 2 μ l

混匀后，轻度离心20s，使反应成分集于管底。注：阴性对照中模板用灭菌ddH₂O代替。

(2) 加入液体石蜡油50 μ l于反应液表面防止蒸发；

(3) 置于PCR仪，在相应程序下反应。

2.3.3 PCR扩增试剂

(1) TaqDNA聚合酶：5U/ μ l，稀释至1U/ μ l使用，购自上海博亚生物技术有限公司；

(2) 10 \times PCR buffer: 20mmol/l Mg²⁺，100 mmol/l KCl, 80 mmol/l/(NH₄)₂SO₄, 100 mmol/l Tris-HCl, pH9.0, 0.5%NP-40, 购自上海博亚生物技术有限公司。

(3) dNTPs: 10mmol/l dATP, dGTP, dCTP和dTTP四种碱基的混合物（购自上海博亚生物技术有限公司）。

(4) DNA Marker DL2000: 片段大小依次为2000bp, 1000 bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp购自宝生物工程（大连）有限公司。

(5) PCR扩增引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

(6) 超纯水（ddH₂O）：用Millipore公司的Simplicity型纯水机自制。

2.4 总DNA提取及PCR扩增结果检测

2.4.1 总DNA提取结果检测

提取到的总DNA用0.8%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。电泳条件如下：

电泳缓冲液为0.5 \times TBE缓冲液；琼脂糖凝胶浓度：0.8%，含琼脂糖0.8g，0.5 \times TBE缓冲液100ml；电压：150V；电泳时间：大约20min；溴化乙锭（EB）终浓度是1 μ g/ml。

2.4.2 PCR扩增结果检测

PCR扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。电泳条件除琼脂糖凝胶浓度为1%，其余与总DNA检测电泳条件相同。

2.5 PCR产物浓缩

合并2管第二轮PCR产物，用Parafilm膜封口，-70 $^{\circ}$ C冷冻过夜，取出后用冷冻干燥机抽干4小时，将得到的干粉溶解于15 μ l ddH₂O中，-20 $^{\circ}$ C保存。

模板DNA 4 μ l 2 μ l

混匀后，轻度离心20s，使反应成分集于管底。注：阴性对照中模板用灭菌ddH₂O代替。

- (2) 加入液体石蜡油50 μ l于反应液表面防止蒸发；
- (3) 置于PCR仪，在相应程序下反应。

2.3.3 PCR扩增试剂

- (1) TaqDNA聚合酶：5U/ μ l，稀释至1U/ μ l使用，购自上海博亚生物技术有限公司；
- (2) 10 \times PCR buffer: 20mmol/l Mg²⁺，100 mmol/l KCl, 80 mmol/l/(NH₄)₂SO₄, 100 mmol/l Tris-HCl, pH9.0, 0.5%NP-40, 购自上海博亚生物技术有限公司。
- (3) dNTPs: 10mmol/l dATP, dGTP, dCTP和dTTP四种碱基的混合物（购自上海博亚生物技术有限公司）。
- (4) DNA Marker DL2000: 片段大小依次为2000bp, 1000 bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp购自宝生物工程（大连）有限公司。
- (5) PCR扩增引物由上海博亚生物技术有限公司合成。
- (6) 超纯水（ddH₂O）：用Millipore公司的Simplicity型纯水机自制。

2.4 总DNA提取及PCR扩增结果检测

2.4.1 总DNA提取结果检测

提取到的总DNA用0.8%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。电泳条件如下：

电泳缓冲液为0.5 \times TBE缓冲液；琼脂糖凝胶浓度：0.8%，含琼脂糖0.8g，0.5 \times TBE缓冲液100ml；电压：150V；电泳时间：大约20min；溴化乙锭（EB）终浓度是1 μ g/ml。

2.4.2 PCR扩增结果检测

PCR扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。电泳条件除琼脂糖凝胶浓度为1%，其余与总DNA检测电泳条件相同。

2.5 PCR产物浓缩

合并2管第二轮PCR产物，用Parafilm膜封口，-70 $^{\circ}$ C冷冻过夜，取出后用冷冻干燥机抽干4小时，将得到的干粉溶解于15 μ l ddH₂O中，-20 $^{\circ}$ C保存。

2.6 样品的DGGE分析

第二轮PCR产物用DGGE（变性梯度凝胶电泳）分离。聚丙烯酰胺浓度8%，胶厚0.75mm或1mm，电泳缓冲液为0.5×TAE（20mmol/l Tris，10mmol/l 醋酸，0.5mmol/l EDTA[pH 8.0]）。凝胶变性梯度为45~60%（总细菌、氨氧化细菌）或50~65%（放线菌、酸杆菌属、 α -变形菌纲）（100%变性剂含7 mol/l尿素及40%去离子甲酰胺），电压37V（总细菌、氨氧化细菌、 α -变形菌纲）或40V（放线菌、酸杆菌属），电泳温度60℃，电泳时间16h。在含溴乙锭（0.5mg/l）的0.5×TAE缓冲液中染色后，在紫外灯下观察拍照。

2.7 PCR产物的序列分析

聚丙烯酰胺凝胶经溴乙锭染色后，在紫外灯下割下含目的DNA条带的凝胶块。转移到微量离心管中，用纸巾吸去凝胶块上的水滴，加入30 μ l灭菌ddH₂O，4℃过夜保存。取溶有DNA分子的上述ddH₂O进行第二轮PCR扩增，扩增产物送由上海博亚生物技术有限公司纯化并测序。

运用BLAST程序将测序结果与NCBI核酸数据库中的公开序列进行比较，推测系统中细菌的种群组成。

运用Clustal X软件比较不同菌种片段的同源性。

采用Phylip软件包对基因的系统发育关系进行研究，建立菌种的系统发育进化树。

2.8 生物多样性分析

分析出DGGE图谱的密度曲线后（SmartView软件），利用Shannon多样性指数计算样品的生物多样性，Shannon多样性指数计算公式如下^[41]：

$$H = -\sum_{i=1}^N (n_i / N) \cdot \log(n_i / N)$$

其中：H-Shannon多样性指数； n_i -第i个条带的峰高值；N-密度曲线中所有峰高之和。

2.9 主要试验仪器

- (1) 电热恒温水浴锅(上海医疗器材三厂)
- (2) 台式高速冷冻离心机, 型号Thermo IEC Micromax RF, 用于样品离心, 在DNA提取过程和PCR过程相关步骤中使用;
- (3) PCR仪, 型号AMPLITRAON® II;
- (4) 普通电泳仪, 型号上海博通DYB-1, 用于总DNA提取结果、PCR扩增结果的电泳检测;
- (5) DGGE电泳仪: bio-Rad Dcode™ System;
- (6) 电泳紫外与可见光分析装置, 复日科技FR-200, 用于普通电泳和DGGE结果的检查;
- (7) 电泳分析软件, SmartView2001, 用于电泳结果的分析;
- (8) 冷冻干燥设备: LGJ台式冷冻干燥机, 用于PCR产物的冷冻浓缩、干燥;
- (9) 无菌操作室;
- (10) 纯水机: Simplicity型, Millipore公司生产。

第三章 化学生物絮凝污水处理工艺调试阶段微生物种群结构初步分析

3.1 工艺描述及取样条件

试验共取样品两次，第一次为试验装置污泥驯化期间，正常曝气但不加化学药剂，第二次取样反应器中加药量为：PAFC 70mg/l。取样条件以及运行参数见表3-1。

表3-1 取样位置和条件

取样时间	调试阶段				运行阶段				
取样位置	化学生物絮凝反应池一、二、三廊道				进水,化学生物絮凝反应池一、二、三廊道				
样品名称	Sample 1, 2, 3				Sample 4, 5, 6, 7				
运	DO	-----				一、二、三廊道分别为2.9、2.0、1.3 mg/l			
行	pH	6.9~7.3				6.8~7.53			
条	絮凝剂	无				投加聚合硫酸铝铁70 mg/l			
件	污泥回流比	30%				30%			
水		COD	NH ₃ -N	TP	SS	COD	NH ₃ -N	TP	SS
质	进水(mg/l)	160.5	14.1	---	156	180.5	14.5	2.54	210.7
参	出水(mg/l)	---	---	---	---	54.9	10.6	0.79	14.5
数									

3.2 活性污泥样品总DNA提取结果

从样品中提取的总DNA通过0.8%的琼脂糖凝胶电泳检验，通过SmartView软件分析提取出的DNA片段大小约为23kb（见图3-1）。

第三章 化学生物絮凝污水处理工艺调试阶段微生物种群结构初步分析

3.1 工艺描述及取样条件

试验共取样品两次，第一次为试验装置污泥驯化期间，正常曝气但不加化学药剂，第二次取样反应器中加药量为：PAFC 70mg/l。取样条件以及运行参数见表3-1。

表3-1 取样位置和条件

取样时间	调试阶段				运行阶段				
取样位置	化学生物絮凝反应池一、二、三廊道				进水,化学生物絮凝反应池一、二、三廊道				
样品名称	Sample 1, 2, 3				Sample 4, 5, 6, 7				
运	DO	-----				一、二、三廊道分别为2.9、2.0、1.3 mg/l			
行	pH	6.9~7.3				6.8~7.53			
条	絮凝剂	无				投加聚合硫酸铝铁70 mg/l			
件	污泥回流比	30%				30%			
水		COD	NH ₃ -N	TP	SS	COD	NH ₃ -N	TP	SS
质	进水(mg/l)	160.5	14.1	---	156	180.5	14.5	2.54	210.7
参	出水(mg/l)	---	---	---	---	54.9	10.6	0.79	14.5
数									

3.2 活性污泥样品总DNA提取结果

从样品中提取的总DNA通过0.8%的琼脂糖凝胶电泳检验，通过SmartView软件分析提取出的DNA片段大小约为23kb（见图3-1）。

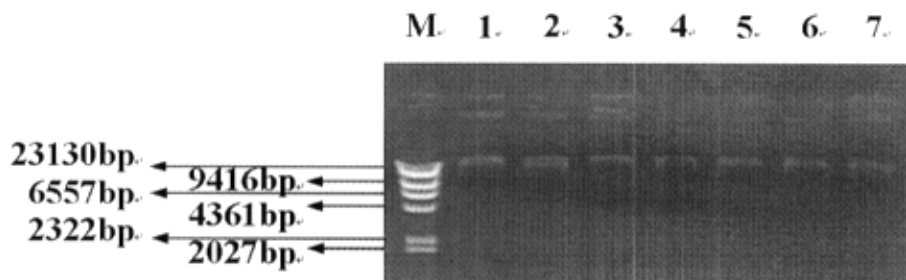


图3-1 活性污泥样品总DNA提取结果

注：图中1-7分别为sample 1-7，M为marker： λ -Hind III digest

3.3 总DNA的PCR扩增结果

将提取出的DNA进行16S rDNA 片段PCR扩增，结果用1%的琼脂糖凝胶电泳检验，扩增出的DNA片段大小为220-240bp左右（图3-2），证实为扩增的目的片段。

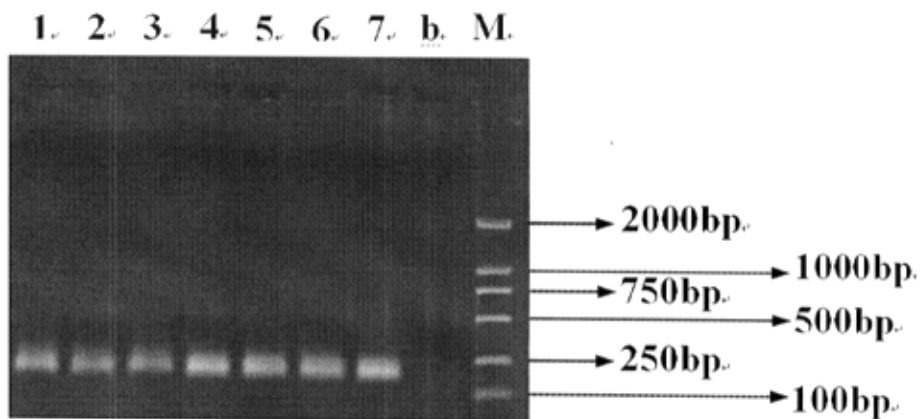


图3-2 PCR扩增结果

注：图中1-7分别为sample 1-7，M: DNA Marker DL2,000，b:blank 阴性对照空白样

3.4 变性梯度凝胶电泳分离扩增的16S rDNA片段结果

合并6管扩增出的PCR样品浓缩后进行变性梯度凝胶电泳（图3-3），可以看出在活性污泥样品中微生物多样性相当丰富。

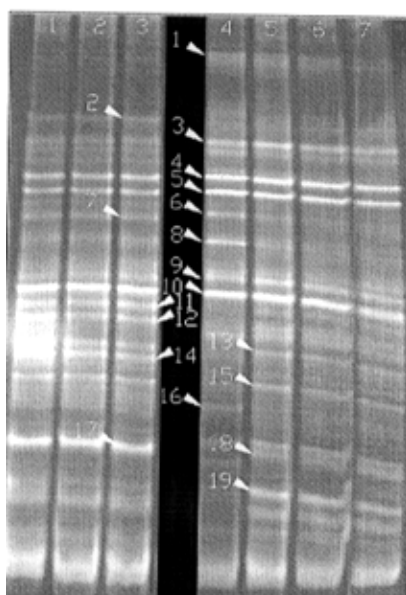


图3-3 扩增后样品DGGE

参照进水样品，可将图3中条带代表的细菌种类大致分为三类（见表2）。

表3-2 样品细菌种类分类

细菌种类	典型条带	
	Sample 1,2,3	Sample 4,5,6
与进水样品比较，细菌数量增加的	Band 2,7,11,12,13,14,15,17	Band 13,15,18,19
与进水样品比较，细菌数量变化不大的	Band 3,4,5,9,10	Band 3,4,5,9,10
与进水样品比较，细菌数量减少的	Band 1,6,8,16	Band 1,6,8,16

进水中的部分菌种在反应器当中数量明显增加，一方面这是因为反应器中30%的污泥回流量增加了微生物量，另一方面也说明这些细菌能够很好地适应环境的变化，在反应器内进入了细菌生长曲线的对数生长期，细菌浓度增加。与进水中微生物数量相比较，在调试阶段浓度增加的细菌种类（Band 2, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 17）明显多于反应器运行期间（Band 13,15,18,19），这说明反应器在调试期间系统提供了较好的好氧条件，使得较多的微生物浓度有所增加，然而在运行

过程中的运行条件(如投加混凝剂等)对系统内的微生物产生了一定的抑制作用,使得浓度增加的微生物种类少于调试阶段。

进水样品中一些优势菌群(Band 3,4,5,9,10)在反应器的几个廊道中,基本上维持了数量的稳定,这些细菌对环境具有较强的适应能力。

进水样品的部分菌种(Band 1,6,8,16)在化学生物絮凝反应器的三个廊道中在数量上有明显的递减趋势,甚至有部分菌种遭到了淘汰,这显然是由于这部分细菌在进入反应池后无法适应环境的变化而逐渐减少。

对于两次试验条件的样品,在化学生物絮凝反应器的三个廊道中,活性污泥样品中微生物的数量和浓度(如Band 4,5,10)都差异很小,微生物种群结构基本相同,表明细菌在同一时期反应器不同位置的分布比较均匀。

考察图3-3中的部分条带(如Band 7等),这些条带在驯化污泥样品(sample 1,2,3)中的浓度较大,而在反应器加药剂运行期间(sample 5,6,7)污泥样品中浓度明显降低,说明这部分微生物在污泥驯化过程中能够很好的生存,而在添加了化学混凝剂后,由于不能适应环境的变化部分微生物被淘汰。

3.5 样品多样性指数分析

根据Shannon多样性指数计算公式进行计算,结果列于表3-3中。

表3-3 Shannon多样性指数计算结果

sample	1	2	3	4	5	6	7
S	1.88	1.60	1.54	1.52	1.55	1.60	1.50

由表3-3可以看出,进水样品中微生物种群最为丰富,在进入化学生物反应器后,由于外部环境的改变,微生物种群数量有一定的减少,说明微生物种群在反应器中正逐步趋于稳定化,存活的菌种能够很好的适应反应器的条件。

3.6 部分优势菌群的16S rDNA片段测序结果及入库比对

将样品中几条优势菌种片段(见图3-3)割胶后进行PCR扩增并测序,进行NCBI比对(结果见表3-4)。

过程中的运行条件(如投加混凝剂等)对系统内的微生物产生了一定的抑制作用,使得浓度增加的微生物种类少于调试阶段。

进水样品中一些优势菌群(Band 3,4,5,9,10)在反应器的几个廊道中,基本上维持了数量的稳定,这些细菌对环境具有较强的适应能力。

进水样品的部分菌种(Band 1,6,8,16)在化学生物絮凝反应器的三个廊道中在数量上有明显的递减趋势,甚至有部分菌种遭到了淘汰,这显然是由于这部分细菌在进入反应池后无法适应环境的变化而逐渐减少。

对于两次试验条件的样品,在化学生物絮凝反应器的三个廊道中,活性污泥样品中微生物的数量和浓度(如Band 4,5,10)都差异很小,微生物种群结构基本相同,表明细菌在同一时期反应器不同位置的分布比较均匀。

考察图3-3中的部分条带(如Band 7等),这些条带在驯化污泥样品(sample 1,2,3)中的浓度较大,而在反应器加药剂运行期间(sample 5,6,7)污泥样品中浓度明显降低,说明这部分微生物在污泥驯化过程中能够很好的生存,而在添加了化学混凝剂后,由于不能适应环境的变化部分微生物被淘汰。

3.5 样品多样性指数分析

根据Shannon多样性指数计算公式进行计算,结果列于表3-3中。

表3-3 Shannon多样性指数计算结果

sample	1	2	3	4	5	6	7
S	1.88	1.60	1.54	1.52	1.55	1.60	1.50

由表3-3可以看出,进水样品中微生物种群最为丰富,在进入化学生物反应器后,由于外部环境的改变,微生物种群数量有一定的减少,说明微生物种群在反应器中正逐步趋于稳定化,存活的菌种能够很好的适应反应器的条件。

3.6 部分优势菌群的16S rDNA片段测序结果及入库比对

将样品中几条优势菌种片段(见图3-3)割胶后进行PCR扩增并测序,进行NCBI比对(结果见表3-4)。

过程中的运行条件(如投加混凝剂等)对系统内的微生物产生了一定的抑制作用,使得浓度增加的微生物种类少于调试阶段。

进水样品中一些优势菌群(Band 3,4,5,9,10)在反应器的几个廊道中,基本上维持了数量的稳定,这些细菌对环境具有较强的适应能力。

进水样品的部分菌种(Band 1,6,8,16)在化学生物絮凝反应器的三个廊道中在数量上有明显的递减趋势,甚至有部分菌种遭到了淘汰,这显然是由于这部分细菌在进入反应池后无法适应环境的变化而逐渐减少。

对于两次试验条件的样品,在化学生物絮凝反应器的三个廊道中,活性污泥样品中微生物的数量和浓度(如Band 4,5,10)都差异很小,微生物种群结构基本相同,表明细菌在同一时期反应器不同位置的分布比较均匀。

考察图3-3中的部分条带(如Band 7等),这些条带在驯化污泥样品(sample 1,2,3)中的浓度较大,而在反应器加药剂运行期间(sample 5,6,7)污泥样品中浓度明显降低,说明这部分微生物在污泥驯化过程中能够很好的生存,而在添加了化学混凝剂后,由于不能适应环境的变化部分微生物被淘汰。

3.5 样品多样性指数分析

根据Shannon多样性指数计算公式进行计算,结果列于表3-3中。

表3-3 Shannon多样性指数计算结果

sample	1	2	3	4	5	6	7
S	1.88	1.60	1.54	1.52	1.55	1.60	1.50

由表3-3可以看出,进水样品中微生物种群最为丰富,在进入化学生物反应器后,由于外部环境的改变,微生物种群数量有一定的减少,说明微生物种群在反应器中正逐步趋于稳定化,存活的菌种能够很好的适应反应器的条件。

3.6 部分优势菌群的16S rDNA片段测序结果及入库比对

将样品中几条优势菌种片段(见图3-3)割胶后进行PCR扩增并测序,进行NCBI比对(结果见表3-4)。

表3-4 部分优势菌16S rDNA DGGE片断测序分析结果

测序条带	测得序列	NCBI比对结果	查询号
Band 3	AGCCGGTGCTTATTCATATAGTACCGT CATTATCTTCCCATATAAAAGGAGTTT ACGCCCCGACATGTGTCATCCTCCAC GCGGCGTAGCGGCTTCATACTTTAGT CGGTTGTGCTAGATTCCCCACTGCTG CCTCCTGTTAGATTCCCCGTGCCCGG	<i>Uncultured bacterium 16S rRNA gene, clone DGGE band BKB2(91%)</i> <i>Arcoactber sp. A3b2(91%)</i> <i>Arcobacter sp. B4b1 (91%)</i> <i>Marine bacterium MSC2 16S ribosomal RNA gene(91%)</i> <i>Uncultured marine bacterium SNT1 gene for 16S rRNA, V3 region(91%)</i>	10863116 63-25326 -9910809 8274.BL ASTQ4
Band 4	GGTGCTTATTCATATAGTACCGTCATTA TCTTCTCATATAAAAGGAGTTTACGCA CCGAAATGTGTCATCCTCCACGCGGC GTAGCTGCTTCATACTTTCGTCCATTG TGCTATATTCCCCACTGCTGCCTCCCG TAG	<i>Unidentified bacterium DNA for 16S ribosomal RNA(96%)</i> <i>Arcobacter cryaerophilus 16S rRNA gene(96%)</i>	1086321 342-2471 7-196865 077585.B LASTQ4
Band 5	TAGCCGGTGCTTATTCATATAGTACCG TCATTATCTTCCCATATAAAAGGAGTT TACGCCCCGAAATGTGTCATCCTCCA CGCGGCGTAGCTGCTTCTTACTTTTCGT CCATTGTGCTATATTCCCCACTGCTGC CTC	<i>Uncultured bacterium BKB2(94%)</i> <i>Arcobacter sp. A3b2(94%)</i> <i>Arcobacter sp. B4b1(94%)</i> <i>Marine bacterium MSC2 (94%)</i>	10863119 81-16008 -1589649 84709.B LASTQ4
Band 6	CCGGTGCTTATTCATATGGTACCGTCA TTATCTTCCCATATAAAAGGAGTATAC ACACCCAAATGTGTCATCCTCCACGC AGCGTAGCTGCTTCTTACTTTCCCTCCG TTGTGCTATATTCCCCANCTGCTGCCT CCCGTAAG	<i>Uncultured bacterium BKB2 (91%)</i> <i>Epsilon proteobacterium 49MY gene(91%)</i> <i>Epsilon proteobacterium 42BKT gene(91%)</i> <i>Proteobacterium Dex80-90 16S rRNA gene, strain Dex80-90(91%)</i>	1086312 937-2560 6-130218 558716.B LASTQ4
Band 8	CGGTGCTTATTCATATNGTACCGTCAT TATCTTCCCATATAAAAGGAGTTTACG CACCGAAATGTGTCATCCTCCACGCG GCGTAGCTGCTTCATACTTTCCTCCAT TGTGCTATATTCCCCACTGCTGCCTCC CGTA	<i>Uncultured bacterium BKB2 (95%)</i> <i>Epsilon proteobacterium 49MY (95%)</i> <i>Uncultured epsilon proteobacterium P. palm C/A 18 (95%)</i> <i>Uncultured epsilon proteobacterium P. palm C 84 (95%)</i>	1086312 563-2359 -1621582 91355.B LASTQ4
Band 9	CGGTGCTTATTCTTATGGTACCGTCAT CATCCCCCATATAAAAGGACTCTACC CCCCACGGGCGACATAGCTCTCCA GCCTAGGGGCTTCTACTTCACGCGGT TGGGCTGGATTTCGGCTCTGTTGCATC GTGTAA	<i>Uncultured epsilon proteobacterium (93%)</i> <i>Unidentified epsilon roteobacterium, strain NKB12(93%)</i> <i>Uncultured bacterium BKB2(91%)</i> <i>Oilfield bacterium 'FWKO B' (91%)</i>	1086313 886-1542 3-529918 54095.B LASTQ4
Band	TGGTGCTTATTCTGAAGGTACGTCATC	<i>Eubacterium from Aleurodicus dugesii</i>	1086184

11	ATCCCAAGGTATTAAACAAAACCACT TTCCTCACCGATGAAAGTACTTTACA ACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCG GCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCA T	(95%) <i>Marine gamma proteobacterium LHFL4</i> (94%) <i>Vibrio rotiferi, strain LMG 20610(94%)</i>	789-2237 4-139138 784739.B LASTQ3
Band	TTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACC	<i>Unidentified bacterium (98%)</i>	1086310
12	GTCATCAGCCTCCCGTATTAGGAAAG ACCTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGT TTACAACCCGAAGGCCTTCTTCCTGC ACGCGGCATNGCTGGATCAGGCTTGC GCCCATTTGTCCAAAATTCCC	<i>Bacteria species 16S rRNA gene, strain T25(97%)</i>	767-3419 -7587412 5030.B1. ASTQ4

比对结果表明, 这些优势菌种大部分为未经培养菌种(Uncultured bacterium)或未鉴定菌种(Unidentified bacterium)以及好氧菌群*Acinetobacter*属, 在Rudolf I.等人的研究中曾得出结论^[42]: 自然环境尤其是极端环境中存在大量不可培养的微生物(unculturable microorganisms, UCM), 已经被分离并鉴定的微生物仅占估计数量的极少一部分。本研究所得结论与Rudolf I.的结论一致。

3.7 本章小结

在化学生物絮凝反应器中, 微生物多样性相当丰富(表3-3), 微生物种群结构也比较复杂。由于外界环境的变化, 进水中的微生物根据其在反应器中浓度的变化大致可以划分为三类: 增加、维持不变和减少。污泥驯化过程中的某些微生物, 在反应器投加药剂运行时遭到淘汰, 证明这些菌种虽然在好氧状态下能够利用污水中的有机物质进行代谢繁殖, 但并不适合于化学生物絮凝反应体系的生物作用。

11	ATCCCAAGGTATTAAACAAAACCACT TTCCTCACCGATGAAAGTACTTTACA ACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCG GCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCA T	(95%) <i>Marine gamma proteobacterium LHFL4</i> (94%) <i>Vibrio rotiferi, strain LMG 20610(94%)</i>	789-2237 4-139138 784739.B LASTQ3
Band	TTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACC	<i>Unidentified bacterium (98%)</i>	1086310
12	GTCATCAGCCTCCCGTATTAGGAAAG ACCTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGT TTACAACCCGAAGGCCTTCTTCCTGC ACGCGGCATNGCTGGATCAGGCTTGC GCCCATTTGTCCAAAATTCCC	<i>Bacteria species 16S rRNA gene, strain T25(97%)</i>	767-3419 -7587412 5030.B1. ASTQ4

比对结果表明, 这些优势菌种大部分为未经培养菌种(Uncultured bacterium)或未鉴定菌种(Unidentified bacterium)以及好氧菌群*Acinetobacter*属, 在Rudolf I.等人的研究中曾得出结论^[42]: 自然环境尤其是极端环境中存在大量不可培养的微生物(unculturable microorganisms, UCM), 已经被分离并鉴定的微生物仅占估计数量的极少一部分。本研究所得结论与Rudolf I.的结论一致。

3.7 本章小结

在化学生物絮凝反应器中, 微生物多样性相当丰富(表3-3), 微生物种群结构也比较复杂。由于外界环境的变化, 进水中的微生物根据其在反应器中浓度的变化大致可以划分为三类: 增加、维持不变和减少。污泥驯化过程中的某些微生物, 在反应器投加药剂运行时遭到淘汰, 证明这些菌种虽然在好氧状态下能够利用污水中的有机物质进行代谢繁殖, 但并不适合于化学生物絮凝反应体系的生物作用。

第四章 化学生物絮凝污水处理工艺微生物种群结构分析

4.1 工艺描述及取样条件

本章实验对象活性污泥样品取自三个典型工况中化学生物絮凝池的三个廊道，三个工况运行参数见表4-1和图4-1。

表4-1 取样工况加药情况

加药情况	
工况1	PAFC 70mg/l
工况2	PAFC 70 mg/l + PAM 0.5 mg/l
工况3	PAFC 100 mg/l + PAM 0.5 mg/l

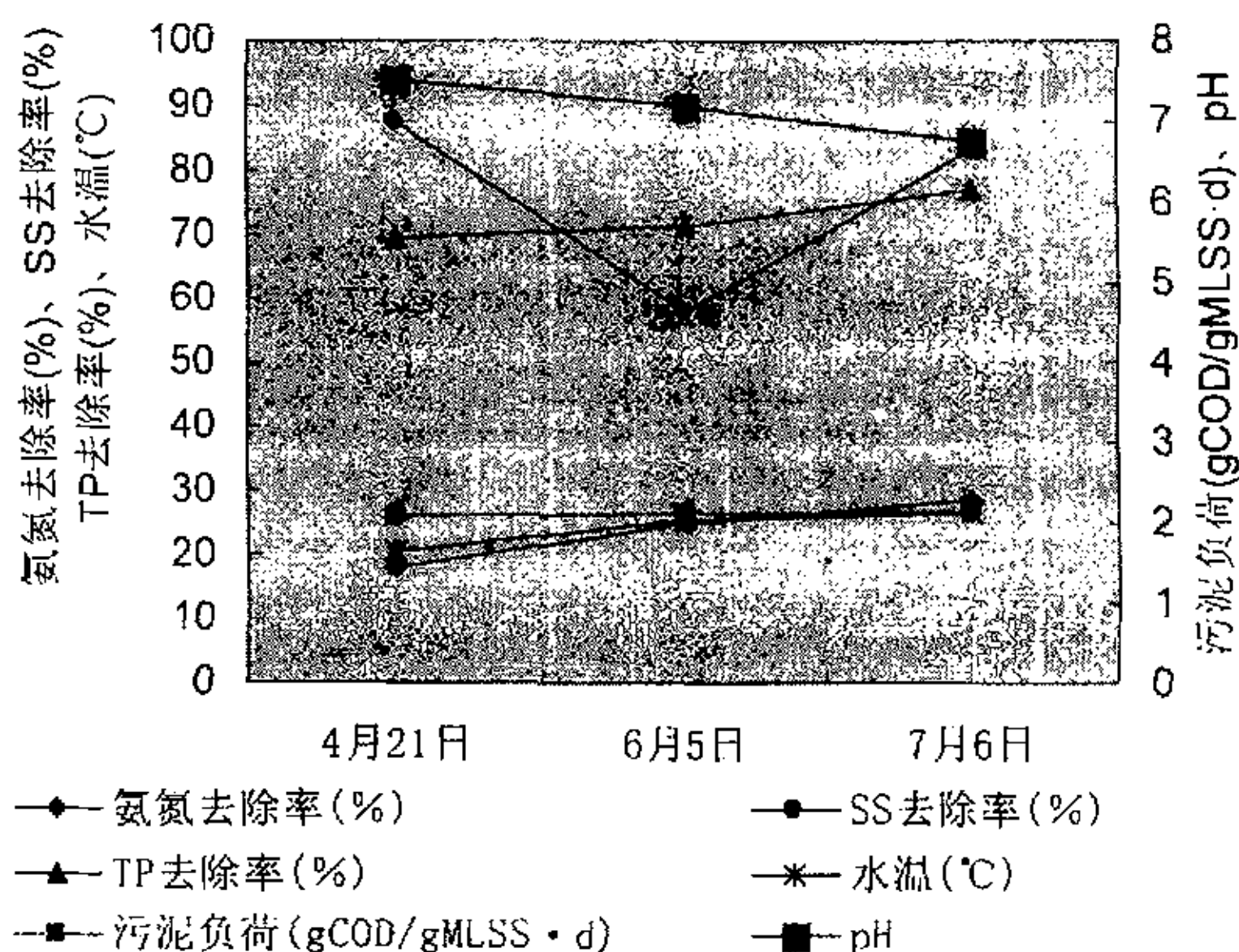


图4-1 取样工况装置运行参数

考虑到在污水处理系统的运行状态发生改变时，微生物种群状态变化比较缓慢，因此在描述工艺运行条件时，图4-1中所描述的装置运行参数是以各取样日期为基准，以取样日期前后一周时间内的平均值作为应用数据。

三个取样工况下，进水pH值基本稳定在6.7~7.5，水温由4月20℃升至27℃。以COD为表示方法的污泥负荷在工况1时最低，工况3最高。SS去除率工况1最高，工况2由于处于雨量较多时期，进水中SS浓度相对较低，故去除率稍低。总磷在三个工况的去除率依次升高，这与在三个工况下，加药量的不同是有直接联系的，工况1仅仅投加PAFC 70 mg/l，总磷去除率平均为69.5%，工况2比工况1多投加了PAM 0.5 mg/l，总磷去除率平均为71.5%，工况3投加PAFC 100 mg/l + PAM 0.5

第四章 化学生物絮凝污水处理工艺微生物种群结构分析

4.1 工艺描述及取样条件

本章实验对象活性污泥样品取自三个典型工况中化学生物絮凝池的三个廊道，三个工况运行参数见表4-1和图4-1。

表4-1 取样工况加药情况

加药情况	
工况1	PAFC 70mg/l
工况2	PAFC 70 mg/l + PAM 0.5 mg/l
工况3	PAFC 100 mg/l + PAM 0.5 mg/l

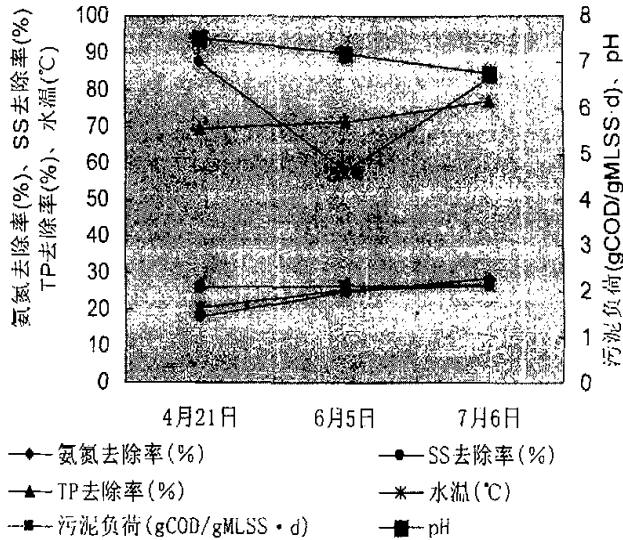


图4-1 取样工况装置运行参数

考虑到在污水处理系统的运行状态发生改变时，微生物种群状态变化比较缓慢，因此在描述工艺运行条件时，图4-1中所描述的装置运行参数是以各取样日期为基准，以取样日期前后一周时间内的平均值作为应用数据。

三个取样工况下，进水pH值基本稳定在6.7~7.5，水温由4月20℃升至27℃。以COD为表示方法的污泥负荷在工况1时最低，工况3最高。SS去除率工况1最高，工况2由于处于雨量较多时期，进水中SS浓度相对较低，故去除率稍低。总磷在三个工况的去除率依次升高，这与在三个工况下，加药量的不同是有直接联系的，工况1仅仅投加PAFC 70 mg/l，总磷去除率平均为69.5%，工况2比工况1多投加了PAM 0.5 mg/l，总磷去除率平均为71.5%，工况3投加PAFC 100 mg/l + PAM 0.5

mg/l, 总磷去除率平均达77.1%。在工况1至工况3加药量逐渐增加的情况下, 氨氮的去除率也由18%增加到25.1%和28.4%。三个工况下, 活性污泥SVI值由146.3 ml/g降低到119.2 ml/g和97.6 ml/g。

在化学生物絮凝反应池三个廊道中部取得样品后, 预处理后保存于-30℃, 用于总DNA提取。

4.2 活性污泥样品总DNA提取结果

总DNA提取方法的选择对于PCR反应的成功与否十分关键。为了从化学生物絮凝池活性污泥样品中获取最大量的细菌总DNA, 并确保得到的模板DNA可进一步用于PCR分析, 我们参照了有关文献进行摸索和比较, 最终采用SDS裂解法破碎菌体提取DNA, 以氯仿/异戊醇、异丙醇、70%乙醇进行纯化, 提取结果采用0.7%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 得到纯度较高的模板DNA, 如图4-2所示, 电泳检验结果经SmartView软件分析提取出的总DNA片段大小略大于23kb。实验中, 由于在提取时采用小离心管方案, 作为样品的污泥量只要在100~200mg以上既可满足试验要求, 这样既节省了提取前污泥预处理的时间, 同时避免了使用较为复杂的提取步骤如超声波振荡等, 也能避免因较多提取步骤而产生的偏差。

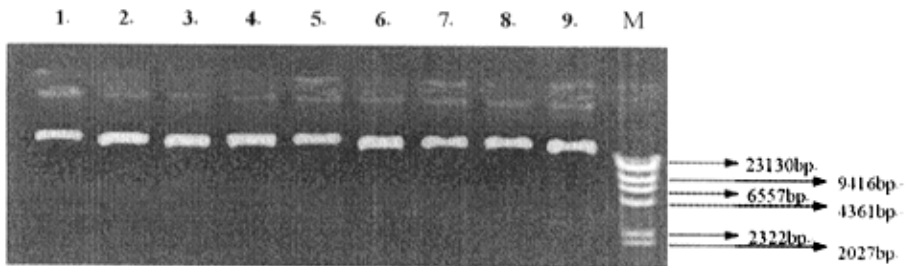


图4-2 活性污泥样品总DNA提取结果

注: 图中1-9分别为sample 1-9, M: λ -Hind III digest

4.3 总DNA的PCR扩增结果

将提取出的DNA进行套式PCR扩增, 结果用1%的琼脂糖凝胶电泳检验。第一轮PCR产物检测电泳图见图4-3至图4-7, 经SmartView软件分析, 总细菌、放线菌、酸杆菌属、氨氧化细菌、 α -变形菌纲扩增出的DNA片段大小分别为1300、1000、1300、470、1000bp左右, 是目的扩增片段。总细菌类第二轮PCR产物电泳图见图4-8, 片段大小约为220bp左右, 是扩增的特异性片段。

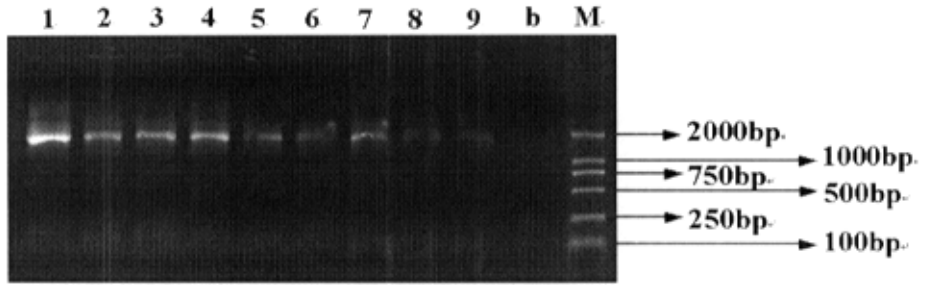


图4-3 Bacteria PCR扩增结果

注：图中1-9分别为sample 1-9，M: DNA Marker DL2,000，b:blank 阴性对照空白样

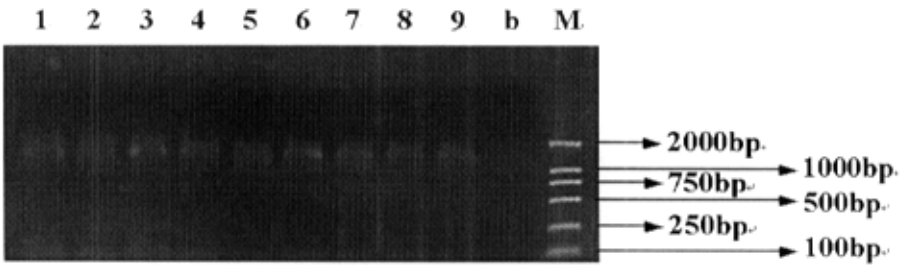


图4-4 Actinomycete PCR扩增结果

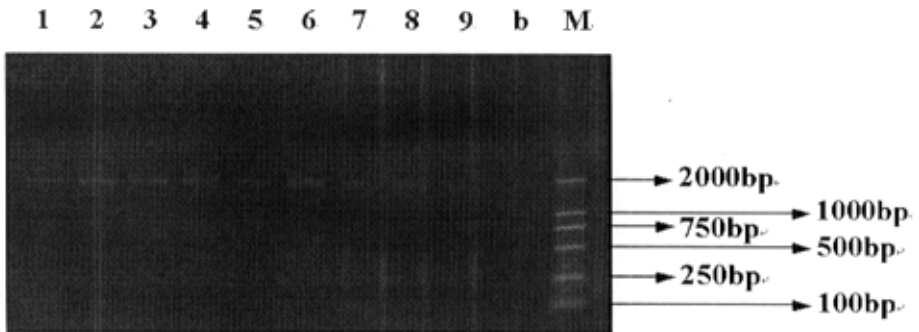


图4-5 Acidobacteria PCR扩增结果

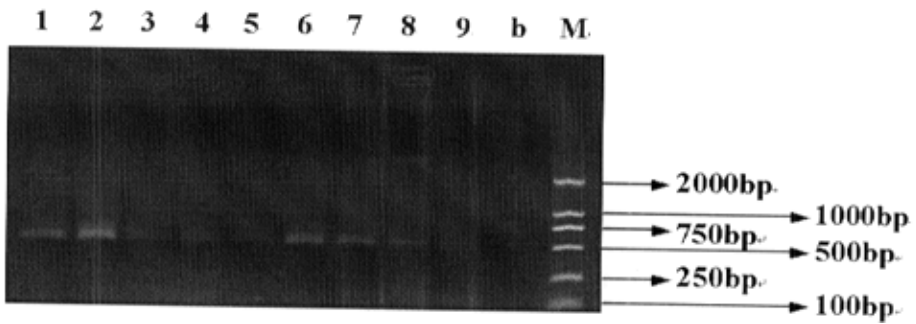


图4-6 Ammonia bacteria PCR扩增结果

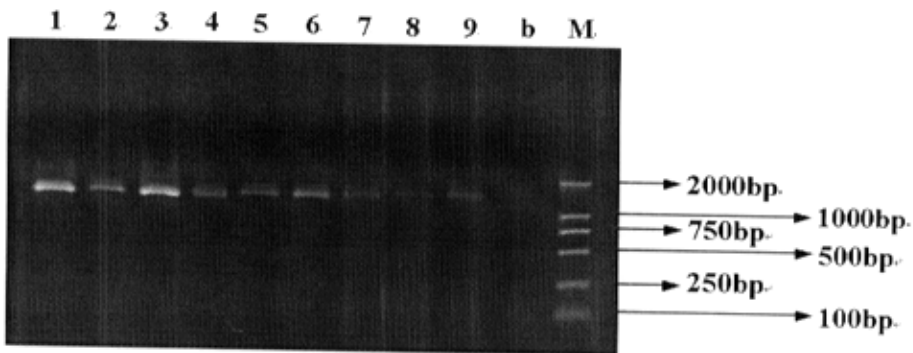
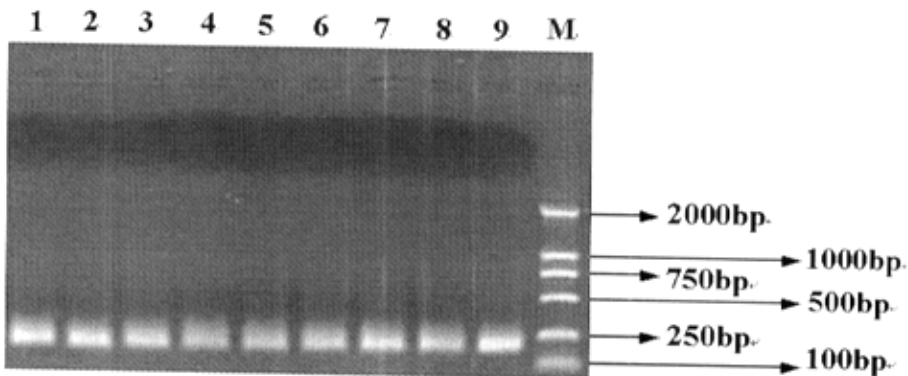
图4-7 α -protobacteria PCR扩增结果

图4-8 Bacteria Second Round PCR扩增结果

研究中采用了套式PCR方法,使得经DGGE分离后的不同种类细菌的16S rRNA基因片段的分析更易于进行。Heuer等人^[15]曾用相同的方法检测了土豆根部放线菌种群的变化并调查了不同土壤的放线菌多样性,他们使用的放线菌特异性引物F243与本研究相同,第二轮扩增采用的是细菌引物F984GC和R1378。

本研究采用套式PCR方法的一个优点在于,由于第二轮PCR扩增采用相同的引物P338FGC和P518r扩增了相同的16S rRNA基因片段,最终得到的五种菌种的DGGE图谱可以直接进行比较(在相同的DGGE条件下)。

使用特定引物进行套式PCR的第二个优点在于增加了扩增的敏感性,使得样品中数量极少的一些菌种也得到扩增并在DGGE图谱中观察到。Phillips等人用特定的引物进行的套式PCR方法,检测到氨氧化细菌在土壤微生物群落中最大比例仅为0.01%^[43]。在本试验中,图4-9所代表的总细菌条带数目要远远小于其他四类菌种的条带数目之和,这说明在总细菌类引物进行的DGGE图谱中,有很多菌种由于数量较少扩增不充分而无法在凝胶中以明亮条带的形式表现出来。

使用套式PCR的一个可能存在的缺点是,在两次成功地PCR扩增的情况下,根据优先扩增的存在,可能会引入较大的偏差^[44]。然而根据以往的研究,这种优先扩增所带来的偏差也常常会被过高地估计,DGGE图谱中的16S rDNA条带的亮度与相应菌种间至少可以认为是半定量的关系^[17]。

DGGE图谱中条带的数目和密度并非十分准确地表达了微生物群落中相应种群的数目和丰度。由于rRNA操纵子的多样性和异相性,一种微生物可以产生不止一条的DGGE条带^[45-47]。另一方面部分16S rDNA序列并非总是能够达到种群的区分,比如一个DGGE条带可能会代表了几种不同的16S rDNA序列^[48]。此外,在浓度不同的模板DNA的混合液中,数量少的序列常常扩增不充分,在DGGE图谱中就看不到相应的条带。因此,DGGE图谱中的条带仅仅反映了微生物群落中最为丰富的类型^[41]。由于16S rDNA DGGE存在的这些缺陷,根据DGGE条带计算的多样性指数仅仅能够作为一种指示,而不能全面地评价生物多样性^[49]。

将这些不同细菌的特异性引物应用于自然界微生物群落分析的一个问题在于对这些引物特异性的预测是基于可培养分离和数据库中已有的序列进行的,这就难免会遗漏相当一部分无法人工培养的同种类细菌的16S rDNA序列。在本研究中同样不能说DGGE胶片中所有被扩增的条带都代表了相应细菌的真正种属。然而,在DGGE条带中针对每组引物任意选择的几组条带进行测序分析,证明了各组的测得序列属于相应的细菌组。在今后的研究中,序列信息的发展,引物设计的改进会使特异性PCR-DGGE方法发展得更为准确。

4.4 变性梯度凝胶电泳分离PCR产物的结果

合并4管扩增出的PCR产物进行变性梯度凝胶电泳,图4-9至图4-13是5类细菌组分的DGGE凝胶图,可以看出在活性污泥样品中的微生物种类相当丰富。总细菌类引物扩增得到的电泳图中没有密度特别高的条带(图4-9),Sample 1至9中的存在少量优势菌种,在样品中存在的大量的较暗的条带使得图谱中显示出一些模糊,这应该是由于污泥当中存在着大量的不同种类的细菌所致。酸杆菌属、 α -变形菌纲得到的DGGE图谱中同样含有大量的模糊条带(图4-11和图4-13),说明这两种细菌在污泥样品中种类也很丰富。放线菌、氨氧化细菌DGGE图谱中含有数量明显的优势种群,而且没有模糊条带(图4-10和图4-12)。

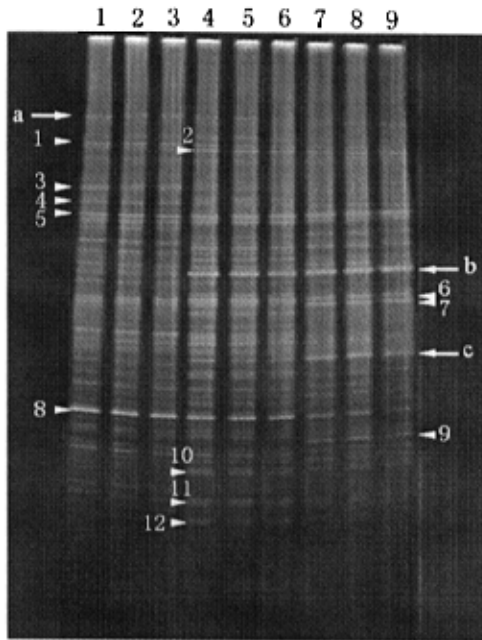


图4-9 Bacteria DGGE电泳图

注: 图中1-9分别为sample 1-9

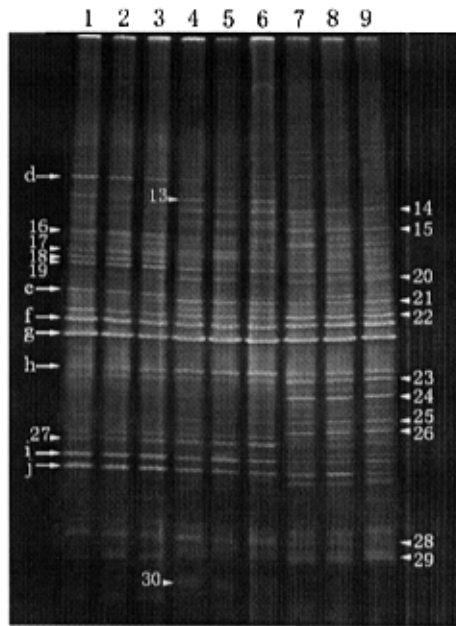


图4-10 actinomycete DGGE电泳图

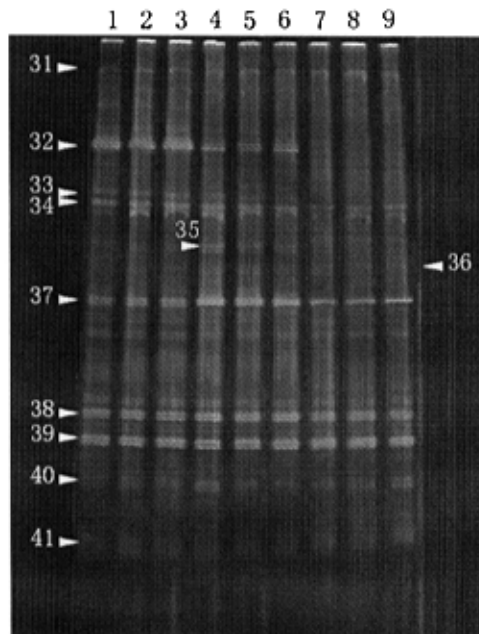


图4-11 Acidobacteria DGGE电泳图

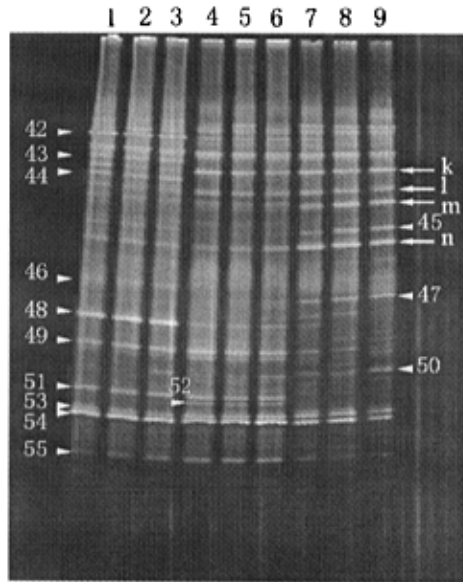


图4-12 Ammonia bacteria DGGE电泳图

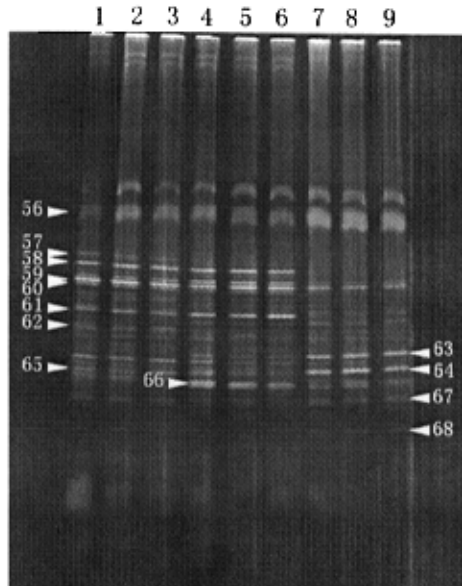


图4-13 α -protobacteria DGGE电泳图

在对五种菌种的DGGE图谱进行光密度曲线扫描后，根据Shannon多样性指数公式进行计算，结果绘成图4-14。Shannon多样性指数 H 通常用于评价一个微生物种群内物种的丰富性， H 值越高，微生物种群越丰富。多样性指数通常由两个

因素构成：①样品中物种的数量或称为种的丰富度，②各个物种的量的分布或称为种的均匀度。根据图4-14结果可以看出，五种菌种中，总细菌和 α -变形菌纲多样性指数 H 值最高，氨氧化细菌Shannon多样性指数 H 值的平均值最低。

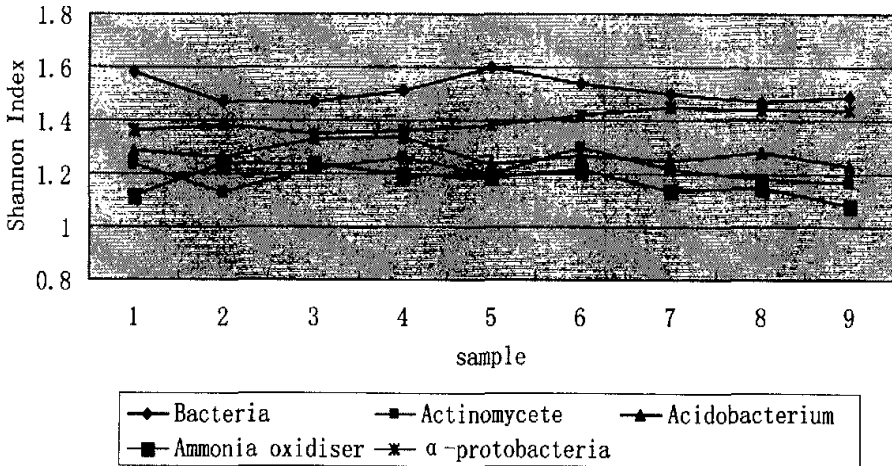


图4-14 五类细菌的多样性指数

根据图4-9至图4-13所示DGGE图谱，对图中较为优势的种群进行分析，见表4-2。由于总细菌类电泳图中，条带较为密集，可识别的共有条带和各组样品特有带较少；放线菌类引物的电泳图中，可识别的共有条带数目较多，Sample 4,5,6 和Sample 7,8,9的特有条带较多，并且两组样品都有的特有条带也较多（Band 14,20,21,25,28），而Sample 1,2,3的特有条带中，有三条（Band 16,17,27）也在Sample 4,5,6中存在；酸杆菌属的共有条带最多，而其个组样品的特有条带却非常少；氨氧化细菌由于DGGE图谱中优势种群较多，因此可识别条带较多，Sample 1-9 共有条带数目较多； α -变形菌纲的特有条带数目多于共有条带数目。

表4-2 样品DGGE条带分析

	Sample 1-9 共有条带	特有带		
		Sample 1,2,3	Sample 4,5,6	Sample 7,8,9
总细菌	Band a,5,6,7,8	1,3,4	1,2,b,c,10,11,12	2.b.c.9
放线菌	Band 19,22,f,g,h,i,j	d,16,17,18,e,27	13,14,16,17,20,21, 25,27,28,30	14,15,20,21,23,24, 25,26,28,29
酸杆菌属	Band 31,34,37,38,39,40,41	32,33	32,35,36	36
氨氧化细菌	Band 42,k,n,53,54,55	43,44,46,48,51	1,49,51,52	l,m.45,47,50
α -变形菌纲	Band 56,59	57,58,60,61,62,65	58,60,61,65,66	63,64,66,67,68

对于很多污泥样品,被分析的特定细菌的一些条带无法在相应的细菌图谱中找到。Heuer等人^[17]用同样的方法研究土壤样品中的放线菌时,观察到相似的结果。这表明一些被分析的种属,在活性污泥样品中十分丰富,因此遮掩了样品中存在的一些亚纲类细菌。使用特异性引物时出现的一些新的条带,证实了由细菌DGGE图谱计算的多样性仅仅与优势种群的数目有关,而与样品不同种群的总数目无关,即在存在优势种群的情况下,背景细菌群体被忽略。Muyer^[11]等人的研究表明一些优势种群的存在导致了细菌群落的简单化,以及被分析群落中那些少于0.1%的种群被忽略。这对于种类丰富的细菌种群的PCR-DGGE方法也是肯定的:只有占优势的种群才可能被观察到。对于仍然含有大量不同16S rRNA类型的亚纲类细菌,如果需要更详细的分析,需要使用特异性更强,分类更加细化的引物才能再进行分类。

Michael Wagner的研究表明,活性污泥中细菌种类有60~75%的proteobacteria(变形菌纲),而且 β -proteobacteria在高负荷和低负荷曝气池中存在都很大量, α -proteobacteria在低负荷曝气池中存在更多^[21]。以往的研究表明, α -proteobacteria在活性污泥中存在数量非常庞大^[50,51],并且其中的一些种属在活性污泥中构成放线体^[52,53]。在本研究中,总细菌和 α -变形菌纲的DGGE图谱较为复杂,这是因为活性污泥样品中不仅含有大量的微生物细胞,而且含有大量不同的种属。这一点在Shannon多样性指数上亦有所反映,总细菌和 α -变形菌纲的多样性指数最高,

这是由于DGGE图谱中条带数目较多并且缺少明显优势种群的结果。

极少量的放线菌有利于增强絮体颗粒,但当数量增多时则是有害的,即便放线菌的质量百分比只占微生物群落的一小部分,也能使生物絮体的有效比重减小,极难用重力沉降法除去活性污泥,使得SVI值变高,造成污泥膨胀^[54]。在Eikelboom的研究以前,人们一直认为球衣菌(*Sphaerotilus natans*)是引起污泥膨胀的主要微生物,却一直无法找出有力的证据,Eikelboom的研究^[55]使人们认识到许多种类的放线微生物都可能引起污泥膨胀,并且不同类型的微生物对应着不同的生长条件。在本研究的活性污泥样品中,从DGGE图谱(图4-10)可以看出,放线菌中有一定量的优势菌种。然而在放线菌的Shannon多样性指数和SVI值之间并没有看到预期的正向关系。这可能是由于在化学生物絮凝反应池中,添加的混凝剂和助凝剂使得反应池中的活性污泥已经不同于传统的活性污泥法中的活性污泥,化学药剂的存在使微生物的絮凝作用成为污泥沉降的次要因素,所以根据放线菌的DGGE图谱所计算出的多样性指数和SVI值之间呈现了预期之外的反向关系。另外,由于本试验中调查样品较少,无法得出关于这个现象的必然结论,关于化学生物絮凝池内污泥沉降性能与放线菌种群结构多样性的关系,需要在此基础上做更为深入的研究。

酸杆菌属是近期刚刚发现的一类细菌,目前可培养细菌仅有很少一部分^[56,18]。酸杆菌属在许多生态系统当中存在,目前关于这类细菌在废水中的报道较少^[57]。酸杆菌属的确切功能和生态特性目前仍然不是很明确,但也有发现表明酸杆菌属属于甲烷代谢细菌类^[58]。Barns^[18]等人认为酸杆菌属的遗传多样性、代谢多样性同环境中的微生物一样广泛,并且具有与变形菌纲、革兰氏阳性细菌同样重要的生态作用。本研究的结果表明,酸杆菌属的Shannon多样性指数稍低于总细菌和 α -变形菌纲,虽然酸杆菌属的DGGE图谱非常模糊,几乎没有优势种群存在,但其微生物种群同样极为丰富,这证明了在活性污泥样品中同样含有大量的酸杆菌属。

由于 β -proteobacteria中氨氧化细菌在脱氮工艺中的重要性,本试验将氨氧化细菌的16S rRNA基因片段也列入研究对象。在活性污泥样品中,最经常涉及的这类 β 亚纲通常是亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和亚硝化螺菌属(*Nitrospira*)^[59]。虽然化学生物絮凝工艺对污水中氨氮的去除能力较差(取

样的三个工况中最高去除率为28.4%)，但是在DGGE图谱(图4-12)中，仍旧可以观察到，氨氧化细菌具有较多的优势种群，这些氨氧化细菌优势种群在氨氮去除的过程中起到的作用则需要更多的工作来证明。

化学生物絮凝处理工艺三个不同工况的活性污泥取样结果显示，在絮凝剂添加情况发生改变，COD、TP、SS去除率发生明显改变时，三个工况反应池污泥中微生物种群结构发生了一定变化(图4-9至图4-13)。但根据光密度曲线计算的Shannon多样性指数显示(图4-14)，三个工况微生物多样性指数没有太大变化，这说明即使在添加的混凝剂和絮凝剂发生较大变化，污染物去除率发生变化的情况下，系统的稳定性和缓冲性并没有降低，证明反应池内微生物种群多样性受影响较小，反应池运行十分稳定。

在同一工况下，化学生物絮凝池三个廊道内(Sample 1,2,3 or Sample 4,5,6 or Sample 7,8,9)微生物的结构差异很小，三种污泥样品中微生物种群结构基本相同，从三个样品的共有条带(表4-2)和这些条带的亮度上都有所反映，表明各类细菌在反应器不同位置的分布相当均匀。

4.5 部分优势菌群的DGGE片段测序及比对

将化学生物絮凝反应池活性污泥样品中几条优势菌种片段Band a-n(见图4-9至图4-13中)割胶后进行PCR扩增并测序，进行NCBI比对(结果见表4-3)。

表4-3 部分优势菌DGGE片段测序分析结果

条带	序列长度	序列系统发育关系		
		种属	查询号	相似性
a	123	<i>Mycoplasma caviae</i> isolate G122(T) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1097137548-55 46-1221883399 2.BLASTQ4	96%
b	116	Uncultured alpha proteobacterium isolate DGGE band SM00-19D-302N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1097132544-19 232-550611204 45.BLASTQ1	100%
c	120	Uncultured alpha proteobacterium isolate DGGE band SM00-19D-302N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1097195847-26 278-154566418 886.BLASTQ1	100%

样的三个工况中最高去除率为28.4%)，但是在DGGE图谱（图4-12）中，仍旧可以观察到，氨氧化细菌具有较多的优势种群，这些氨氧化细菌优势种群在氨氮去除的过程中起到的作用则需要更多的工作来证明。

化学生物絮凝处理工艺三个不同工况的活性污泥取样结果显示，在絮凝剂添加情况发生改变，COD、TP、SS去除率发生明显改变时，三个工况反应池污泥中微生物种群结构发生了一定变化（图4-9至图4-13）。但根据光密度曲线计算的Shannon多样性指数显示（图4-14），三个工况微生物多样性指数没有太大变化，这说明即使在添加的混凝剂和絮凝剂发生较大变化，污染物去除率发生变化的情况下，系统的稳定性和缓冲性并没有降低，证明反应池内微生物种群多样性受影响较小，反应池运行十分稳定。

在同一工况下，化学生物絮凝池三个廊道内（Sample 1,2,3 or Sample 4,5,6 or Sample 7,8,9）微生物的结构差异很小，三种污泥样品中微生物种群结构基本相同，从三个样品的共有条带（表4-2）和这些条带的亮度上都有所反映，表明各类细菌在反应器不同位置的分布相当均匀。

4.5 部分优势菌群的DGGE片段测序及比对

将化学生物絮凝反应池活性污泥样品中几条优势菌种片段Band a-n（见图4-9至图4-13中）割胶后进行PCR扩增并测序，进行NCBI比对（结果见表4-3）。

表4-3 部分优势菌DGGE片段测序分析结果

条带	序列长度	序列系统发育关系		
		种属	查询号	相似性
a	123	<i>Mycoplasma caviae</i> isolate G122(T) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1097137548-55 46-1221883399 2.BLASTQ4	96%
b	116	Uncultured alpha proteobacterium isolate DGGE band SM00-19D-302N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1097132544-19 232-550611204 45.BLASTQ1	100%
c	120	Uncultured alpha proteobacterium isolate DGGE band SM00-19D-302N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1097195847-26 278-154566418 886.BLASTQ1	100%

d	152	<i>Uncultured bacterium Nso_WWW-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1097196141-24 082-260563018 75.BLASTQ4	97%
e	150	<i>Uncultured bacterium STB088 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1097197753-31 545-333379038 27.BLASTQ1	100%
f	148	<i>Uncultured bacterium clone E5-46-BH1-12/7/98-006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1097197572-27 737-814535390 62.BLASTQ4	100%
g	153	<i>Uncultured organism clone A85 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1097655176-14 455-197719808 795.BLASTQ4	96%
h	101	<i>Uncultured bacterium mle1-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1098344137-10 218-339999291 44.BLASTQ4	87%
i	124	<i>Uncultured Staphylococcus sp. clone 1622 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1098347587-15 193-169768196 533.BLASTQ4	89%
j	125	<i>Carboxydocella sporofoma strain Kar 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1098348292-47 56-9369766904 4.BLASTQ4	89%
k	142	<i>Uncultured bacterium mle1-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1098349351-31 416-321718914 22.BLASTQ4	98%
l	134	<i>Uncultured bacterium mle1-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1098349821-82 98-8981076109 6.BLASTQ4	96%
m	128	<i>Uncultured actinobacterium clone SIMO-1115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1098496608-27 993-132124767 580.BLASTQ4	89%
n	128	<i>Dietzia maris strain SAFR-019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1098498723-29 580-110511348 269.BLASTQ4	95%

表4-3中选取测序的14个条带测序结果相似性都高于87%，证明在第一轮PCR反应中，使用特异性引物取得了预期的分类作用，测序条带准确性较高。根据表

4-3 NCBI中查询后的结果可以看出, 测序的14个条带全部属于未经培养的(Uncultured)菌种, 这说明在污水处理工艺中, 有大量的不可培养微生物存在, 同时也证明了传统的镜检、培养等微生物检测鉴定技术不能完整地反映出系统中微生物种群的实际情况, 而PCR-DGGE方法则能够很好地克服这个缺点。

4.6 本章小结

对文献中提取总DNA的方法在做适当的改变调整之后, 采用小离心管提取样品总DNA, 用于化学生物絮凝及化学混凝污泥样品, 可以在样品量较少的情况下, 取得浓度及纯度较高的总DNA, 片段大小在23kb左右; 提取得到的总DNA经适当稀释后, 可以成功用于PCR扩增, 并且两轮PCR扩增均可取得预期的片段大小;

化学生物絮凝处理工艺三个不同工况反应池污泥中微生物种群结构有一定变化, 但三个工况微生物多样性指数没有太大变化, 说明在环境条件发生明显变化的情况下, 反应池内微生物种群做出了适应环境的调整, 系统的稳定性和缓冲性能力较强, 反应池运行十分稳定;

在同一工况下, 化学生物絮凝池三个廊道内微生物的结构差异很小, 细菌在反应器不同位置的分布相当均匀;

将DGGE图谱中的典型条带测序后, 通过NCBI比对可知在化学生物絮凝池污水处理系统中, 存在较多的未经培养(Uncultured)菌种, PCR-DGGE方法克服了传统微生物鉴定技术的缺点, 使系统中的微生物种群结构清晰地呈现出来;

本研究通过使用特异性引物套式PCR, 结合DGGE的方法, 给出了一个化学生物絮凝反应池活性污泥细菌种群结构的轮廓。群落指纹图谱和统计工具的结合使用可以让人清楚地知道不同活性污泥的微生物关系。对活性污泥微生态的更深入了解可以使处理工艺的控制得到改善。化学生物絮凝污水处理工艺与传统的活性污泥法相比较, 由于添加了具有絮凝作用的化学药剂, 活性污泥系统中微生物种群的变化必然存在, 但在其活性污泥样品内同样含有极为复杂的微生物种群, 仅仅根据进水类型将其分为四类细菌进行分析仍旧显得太过简单。在今后的研究中, 以增加特定组的细菌数目为目的的引物设计可以使人们看到更完整的细菌种群结构。以特定16S rRNA引物进行的DGGE不仅可以比较不同的微生物种群, 而且可以用于实时监测微生物种群的功能。定性分析(如以特定16S rRNA

4-3 NCBI中查询后的结果可以看出, 测序的14个条带全部属于未经培养的(Uncultured)菌种, 这说明在污水处理工艺中, 有大量的不可培养微生物存在, 同时也证明了传统的镜检、培养等微生物检测鉴定技术不能完整地反映出系统中微生物种群的实际状态, 而PCR-DGGE方法则能够很好地克服这个缺点。

4.6 本章小结

对文献中提取总DNA的方法在做适当的改变调整之后, 采用小离心管提取样品总DNA, 用于化学生物絮凝及化学混凝污泥样品, 可以在样品量较少的情况下, 取得浓度及纯度较高的总DNA, 片段大小在23kb左右; 提取得到的总DNA经适当稀释后, 可以成功用于PCR扩增, 并且两轮PCR扩增均可取得预期的片段大小;

化学生物絮凝处理工艺三个不同工况反应池污泥中微生物种群结构有一定变化, 但三个工况微生物多样性指数没有太大变化, 说明在环境条件发生明显变化的情况下, 反应池内微生物种群做出了适应环境的调整, 系统的稳定性和缓冲性能力较强, 反应池运行十分稳定;

在同一工况下, 化学生物絮凝池三个廊道内微生物的结构差异很小, 细菌在反应器不同位置的分布相当均匀;

将DGGE图谱中的典型条带测序后, 通过NCBI比对可知在化学生物絮凝池污水处理系统中, 存在较多的未经培养(Uncultured)菌种, PCR-DGGE方法克服了传统微生物鉴定技术的缺点, 使系统中的微生物种群结构清晰地呈现出来;

本研究通过使用特异性引物套式PCR, 结合DGGE的方法, 给出了一个化学生物絮凝反应池活性污泥细菌种群结构的轮廓。群落指纹图谱和统计工具的结合使用可以让人清楚地知道不同活性污泥的微生物关系。对活性污泥微生态的更深入了解可以使处理工艺的控制得到改善。化学生物絮凝污水处理工艺与传统的活性污泥法相比较, 由于添加了具有絮凝作用的化学药剂, 活性污泥系统中微生物种群的变化必然存在, 但在其活性污泥样品内同样含有极为复杂的微生物种群, 仅仅根据进水类型将其分为四类细菌进行分析仍旧显得太过简单。在今后的研究中, 以增加特定组的细菌数目为目的的引物设计可以使人们看到更完整的细菌种群结构。以特定16S rRNA引物进行的DGGE不仅可以比较不同的微生物种群, 而且可以用于实时监测微生物种群的功能。定性分析(如以特定16S rRNA

引物进行的DGGE)和定量分析(FISH或实时PCR)的结合将会是今后获取活性污泥微生物种群分析的更有力的工具。

第五章 化学生物絮凝与化学混凝工艺微生物结构比较分析

5.1 工艺描述及取样条件

本章实验对象活性污泥样品取自两个典型工况中化学生物絮凝池的三个廊道和化学混凝池的三格，两工况运行参数见表5-1。样品经沉淀后，取混合液9000r/min离心1min，取沉淀保存于-20℃用于DNA提取。

表 5-1 取样条件

取样位置	化学生物絮凝池一、二、三廊道，化学混凝池第一、二、三格及工况2进水					
取样时间	工况 1		工况 2		工况2进水	
添加化学药剂	PAFC 70mg/l		PAFC 70mg/l + PAM 0.5mg/l		---	
样品名称	Sample 1,2,3	Sample 4,5,6	Sample 7,8,9	Sample 10,11,12	Sample 13	
	化学生物絮凝池	化学混凝池	化学生物絮凝池	化学混凝池	进水	
DO(mg/l)	1.9, 1.6, 1.1	---	1.9, 1.6, 0.9	---	---	
pH	7.34	7.39	7.22	7.35	7.47	
运行情况	污泥回流比	30%	---	70%	---	
	污泥负荷 (gCOD/gMISS-d)	1.91	---	2.39	---	
去除率 (%)	NH ₃ -N	22.8	20.9	15.3	12.6	16.0(mg/l)
	COD	56.7	61.0	48.0	27.5	81.8(mg/l)
	TP	72.7	53.1	78.3	77.2	4.83(mg/l)
	SS	87.2	63.8	25.2	30.1	150.0(mg/l)

5.2 活性污泥样品总DNA提取结果

从13个样品中提取的DNA 通过0.7%的琼脂糖凝胶电泳检验（图5-1）。通过SmartView 软件分析提取出的DNA 片段大小约为23kb，同时通过密度扫描和取

第五章 化学生物絮凝与化学混凝工艺微生物结构比较分析

5.1 工艺描述及取样条件

本章实验对象活性污泥样品取自两个典型工况中化学生物絮凝池的三个廊道和化学混凝池的三格，两工况运行参数见表5-1。样品经沉淀后，取混合液9000r/min离心1min，取沉淀保存于-20℃用于DNA提取。

表 5-1 取样条件

取样位置	化学生物絮凝池一、二、三廊道，化学混凝池第一、二、三格及工况2进水					
取样时间	工况 1		工况 2		工况2进水	
添加化学药剂	PAFC 70mg/l		PAFC 70mg/l + PAM 0.5mg/l		---	
样品名称	Sample 1,2,3	Sample 4,5,6	Sample 7,8,9	Sample 10,11,12	Sample 13	
	化学生物 絮凝池	化学混 凝池	化学生物 絮凝池	化学混 凝池	进水	
DO(mg/l)	1.9, 1.6, 1.1	---	1.9, 1.6, 0.9	---	---	
pH	7.34	7.39	7.22	7.35	7.47	
运行 情况	污泥回流比	30%	---	70%	---	
	污泥负荷 (gCOD/gMISS·d)	1.91	---	2.39	---	
去除 率 (%)	NH ₃ -N	22.8	20.9	15.3	12.6	16.0(mg/l)
	COD	56.7	61.0	48.0	27.5	81.8(mg/l)
	TP	72.7	53.1	78.3	77.2	4.83(mg/l)
	SS	87.2	63.8	25.2	30.1	150.0(mg/l)

5.2 活性污泥样品总DNA提取结果

从13个样品中提取的DNA 通过0.7%的琼脂糖凝胶电泳检验（图5-1）。通过SmartView 软件分析提取出的DNA 片段大小约为23kb，同时通过密度扫描和取

样过程的污泥量计算样品中总DNA浓度，结果列于表2。

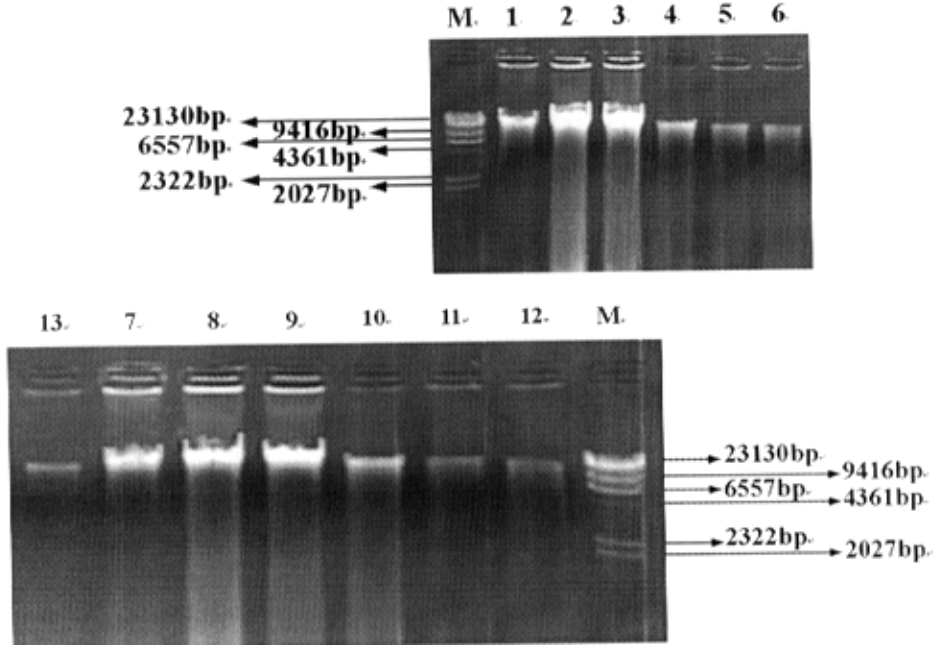


图5-1活性污泥样品总DNA提取结果

注：图中1-13 分别为 sample 1-13, M: λ -Hind III digest

表5-2 样品DNA浓度

样品	1	2	3	4	5	6	---
DNA浓度($\mu\text{g/l}$)	986	1198	1235	40.5	19.7	17.6	---
样品	7	8	9	10	11	12	13
DNA浓度($\mu\text{g/l}$)	1023	997	1062	39.8	20.5	15.5	0.11

从表5-2可以看出化学生物絮凝反应体系中DNA含量约为化学混凝池体系中的20-60倍左右，这说明在前者的反应体系中存在含量较高的微生物；另外从表5-1可以看出，在投加相同剂量的絮凝剂时，化学生物絮凝工艺对污水当中污染物的去除表现出更高的去除率，由此可以初步判断，在化学生物絮凝工艺中，微生物的存在及其作用是比较明显的。

5.3 总DNA的PCR扩增结果

将提取出的DNA 进行套式PCR扩增，结果用1%的琼脂糖凝胶电泳检验。第一轮PCR产物检测电泳图见图5-2至图5-6，经SmartView软件分析，各类引物扩增

出的DNA片段均为目的扩增片段。各类引物第二轮PCR扩增，片段大小约为220bp左右（图略），是扩增的特异性片段。

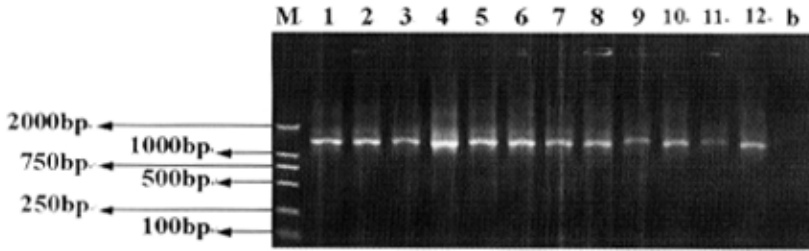


图5-2 Bacteria PCR扩增结果

注：图中1-12分别为sample 1-12，M: DNA Marker DL2,000，b:blank 阴性对照空白样

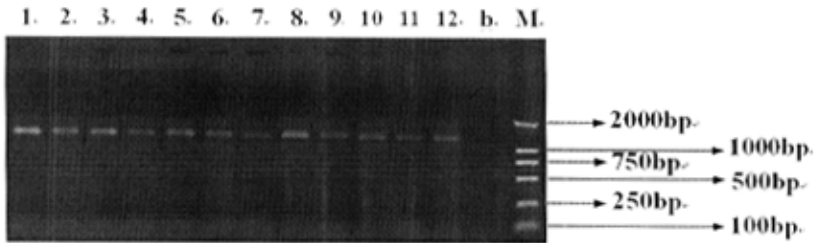


图5-3 Actinomycete PCR扩增结果

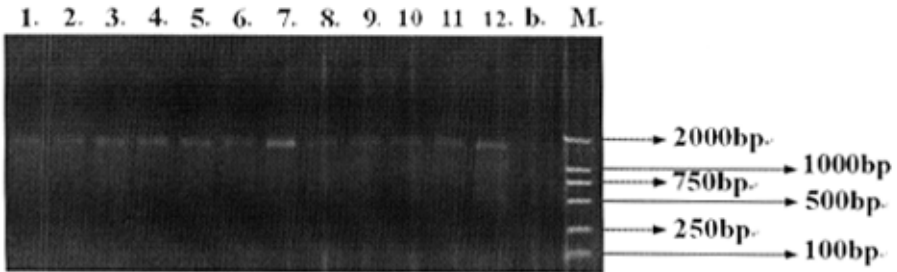


图5-4 Acidobacteria PCR扩增结果

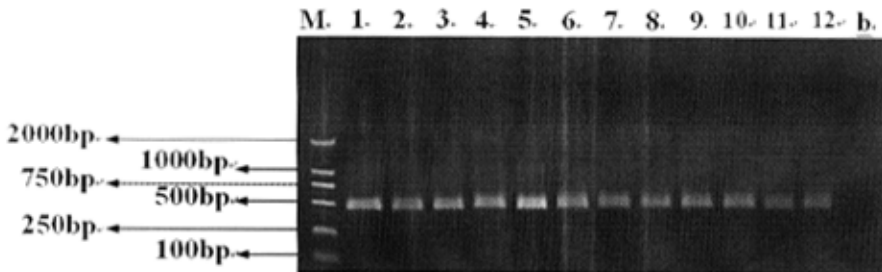
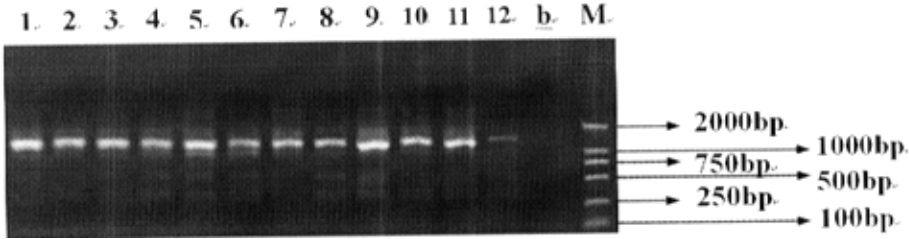


图5-5 Ammonia bacteria PCR扩增结果

图5-6 α -protobacteria PCR扩增结果

5.4 变性梯度凝胶电泳分离PCR产物的结果

PCR扩增产物经过浓缩后,进行变性梯度凝胶电泳,电泳图见图5-7至图5-11。由电泳图可以看出,化学生物絮凝池和化学混凝池中都含有极为丰富的细菌种类,其中以细菌类引物扩增得到的样品中所含的细菌最为丰富,其次是放线菌和氨氧化细菌。

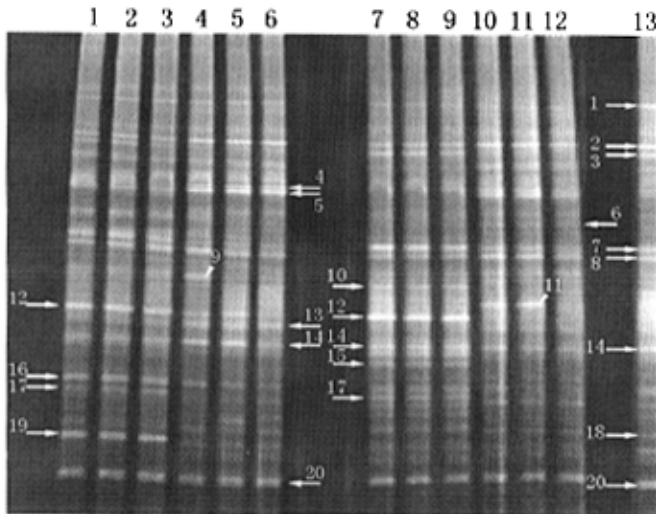


图5-7 Bacteria DGGE电泳图

各类细菌的电泳图中,可以看出化学生物絮凝池与化学混凝池的微生物种群结构有一定的差别,但是这个差别并非十分明显。在对细菌DGGE图谱(图5-7)进行分析时,可以把图谱上的条带大致分为4类:

Band 1,2,7,8,14,20等,这些条带在细菌图谱的13个样品中都存在,并且在13个样品中其亮度变化都不大,说明这些菌种是从进水样品中带入反应池的。

Band 4,5,6,9,11,13,18等,这些菌种都存在于化学混凝池样品(Sample 4,5,6,10,11,12)中,而在化学生物絮凝池样品中,它们的量则很少,这似乎是不

符合化学生物絮凝池微生物种群结构优于化学混凝池的这个论断的。在第三章曾讨论过，PCR扩增过程中，有一个“优先扩增”的原则，即浓度比较高的优势种群能够在PCR反应过程中得到优先扩增。在化学生物絮凝池中，有一些优势菌种数量较多，它们得到了比较充分的扩增，而数量相对少的细菌（Band 4,5,6,9,11,13,18等）则扩增数量也较少，这就使得这些细菌的条带也相对较暗。然而在化学混凝池中，所有细菌的数量都相对较少（表5-2），这就使得Band 4,5,6,9,11,13,18这类条带代表的菌种浓度相对于在化学生物絮凝池中“看上去”高一些，“优先扩增”的优势对于其他菌种就不再明显，所以这些菌种也就显得比在化学生物絮凝池中浓度高了。

Band 12,15,16,17,19等，这些细菌在化学生物絮凝反应池样品中的浓度明显高于在化学混凝池样品中的浓度，是化学生物絮凝池污水处理过程中微生物作用的主体。

Band 3,10等，这类条带在工况2的进水样品（Sample 13）中存在，在工况2的化学生物絮凝池样品（Sample 7,8,9）中存在，而在化学混凝池样品（Sample 10,11,12）中则不存在，可以认为在化学生物絮凝池中，充分的溶解氧和70%的污泥回流使得这些菌种得以增殖，这也是化学生物絮凝池中微生物种群结构优于化学混凝池的一个很好证明。

在放线菌、酸杆菌属、 α -变形菌纲和氨氧化细菌的DGGE图谱中，可以看出各类细菌都较为丰富，在这四类菌种图谱中，各类菌种都有其优势菌出现，但总体来说菌种的变化并无明显的规律可循，在氨氧化细菌的图谱中，割下13个典型条带测序，在NCBI中比对后绘制系统发育进化树。

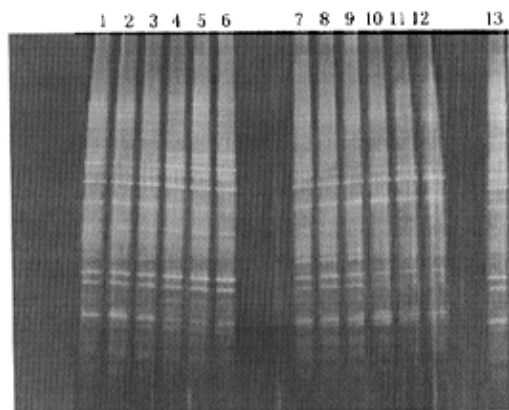


图5-8 Actinomycete DGGE电泳图

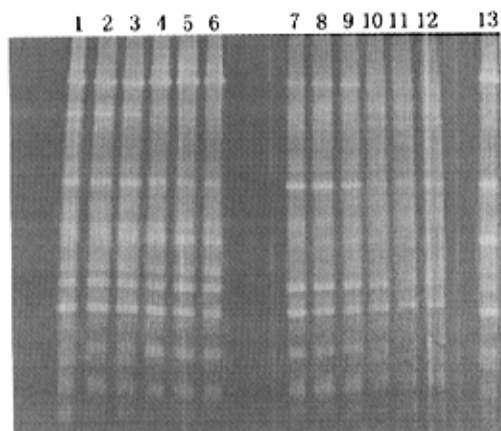


图5-9 Acidobacteria DGGE电泳图

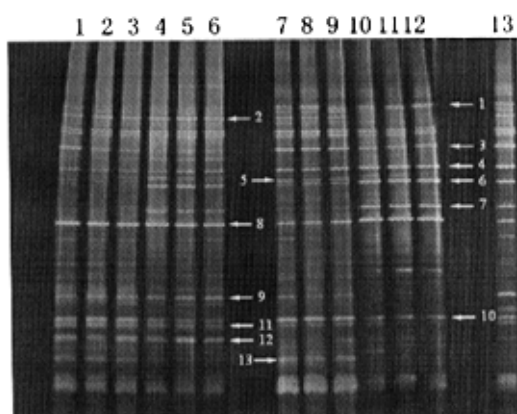


图5-10 Ammonia bacteria DGGE电泳图

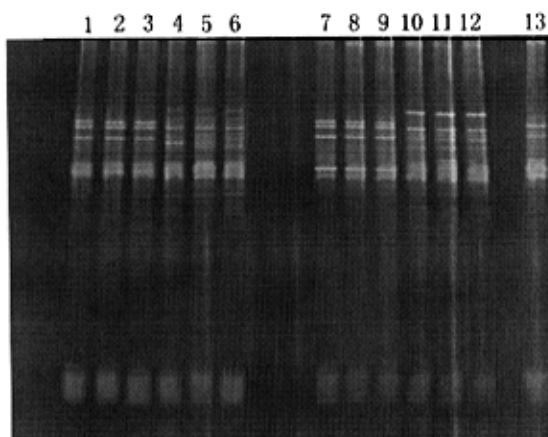


图5-11 α -protobacteria DGGE电泳图

5.5 部分优势菌群的DGGE片段测序及比对

在氨氧化细菌的DGGE图谱中,选择了比较典型的13个条带,割胶并且测序,通过在NCBI中比对后,查找与其最相近的序列列于表5-3,并用Clust X软件绘制系统进化树,见图5-12。

表5-3 测序片段长度及比对序列

条带	序列长度	系统发育关系		
		种属	查询号	相似性
1	128	<i>Nitrosomonas sp. 16S rRNA gene, clone 74</i>	1091597393-31953-19 695194159.BLASTQ4	100%
2	113	<i>Nitrosomonas sp. Nm59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1091598619-11507-95 743581839.BLASTQ4	99%
3	130	<i>Nitrosomonas communis partial 16S rRNA gene, isolate Nm2</i>	1091599282-21338-33 716923856.BLASTQ4	100%
4	114	<i>Nitrospira sp. III7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1091600593-815-2606 8653218.BLASTQ4	98%
5	117	<i>Uncultured Nitrosomonas partial 16S rRNA gene, DGGE band6a1</i>	1091674179-27736-12 2086505385.BLASTQ 4	100%
6	110	<i>Nitrospira sp. III7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1091601559-8103-382 89001130.BLASTQ4	98%
7	103	<i>Bacterium Ellin6067 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1091601895-11909-14 4518155181.BLASTQ 4	98%
8	133	<i>Nitrosomonas communis partial 16S rRNA gene, isolate Nm2</i>	1091602495-15944-31 580079444.BLASTQ4	99%
9	132	<i>Dechlorimonas sp. SIUL 16S rRNA gene, strain ED1</i>	1091669296-20186-23 782907931.BLASTQ4	100%
10	144	<i>Perchlorate-reducing bacterium EAB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</i>	1091669570-22525-19 3635238891.BLASTQ 4	98%

11	130	<i>Dechloromonas</i> sp. HZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S intergenic spacer, complete sequence and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1091669895-25007-24 340521235.BLASTQ4	99%
12	169	<i>Beta proteobacterium</i> OcN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1091670531-29318-13 0671795008.BLASTQ4	100%
13	144	<i>Beta proteobacterium</i> ASRB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1091671411-4355-139 752103820.BLASTQ4	98%

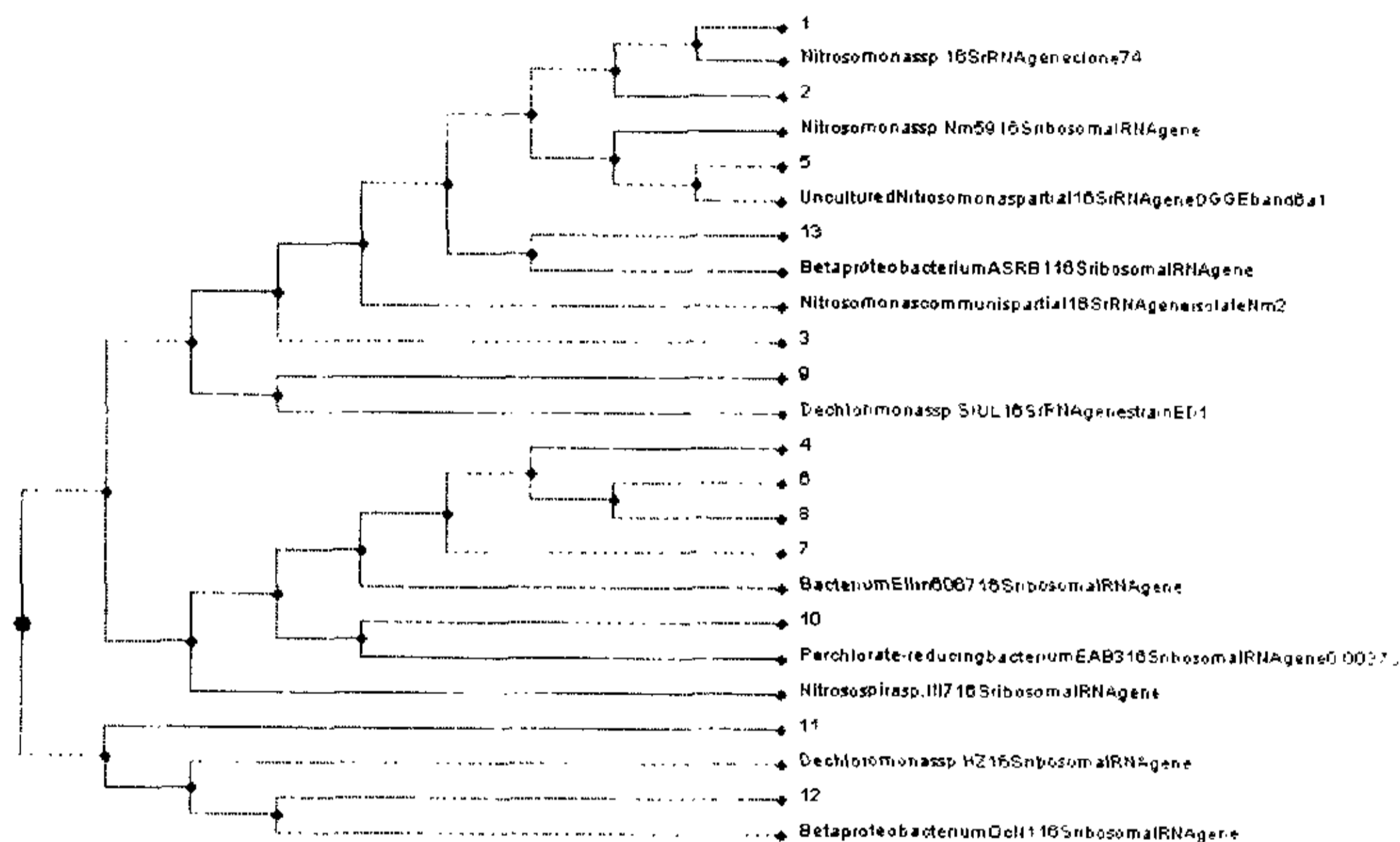


图5-12 部分测定的序列代表的系统发育树

根据表5-3的结果NCBI中查询后可以看出, 测序的13个条带全部属于 *Betaproteobacteria*, 即 β -变形菌纲。其中条带1,2,3,5,8属于 *Nitrosomonadales* 的 *Nitrosomonadaceae Nitrosomonas* (亚硝化单胞菌属), 条带4,6属于 *Nitrosomonadales* 的 *Nitrosomonadaceae Nitrospira* (亚硝化螺菌属), 条带9,11属于 *Rhodocyclales* 的 *Rhodocyclaceae Dechloromonas*, 条带10属于 *Rhodocyclales* 的 *Rhodocyclaceae*, 条带7,12,13仅分类于 *Betaproteobacteria*。这证明在第一轮PCR反应中, 使用特异性引物取得了预期的分类作用, 测序条带准确性较高。

5.6 本章小结

在化学生物絮凝池中, 充分的溶解氧和70%的污泥回流使得细菌得以增殖, 然而化学混凝池内的微生物大部分来自进水, 并且在化学混凝池内没有溶解氧,

11	130	<i>Dechloromonas</i> sp. HZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S intergenic spacer, complete sequence and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	1091669895-25007-24 340521235.BLASTQ4	99%
12	169	<i>Beta proteobacterium</i> OcN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1091670531-29318-13 0671795008.BLASTQ4	100%
13	144	<i>Beta proteobacterium</i> ASRB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1091671411-4355-139 752103820.BLASTQ4	98%

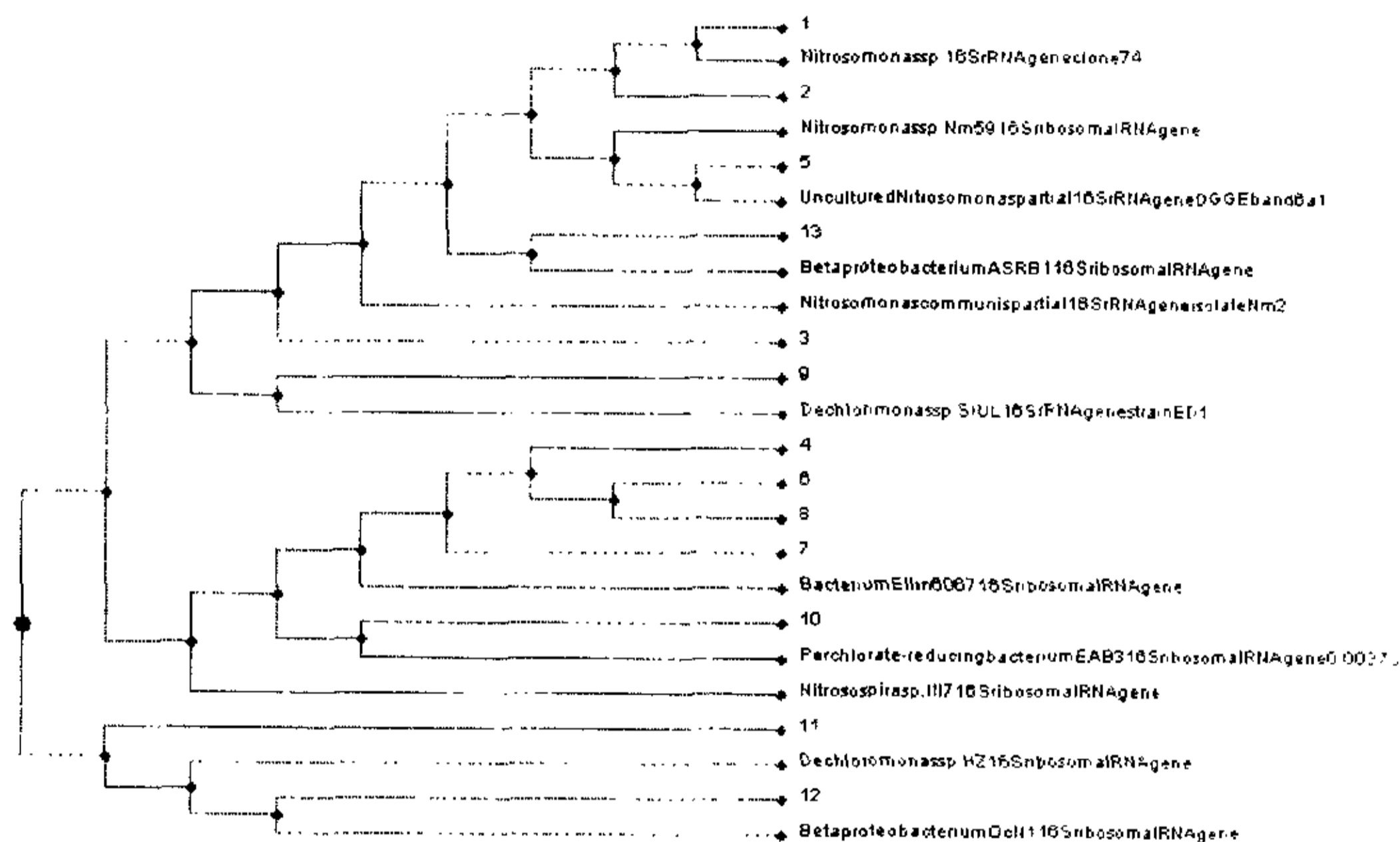


图5-12 部分测定的序列代表的系统发育树

根据表5-3的结果NCBI中查询后可以看出，测序的13个条带全部属于 *Betaproteobacteria*，即 β -变形菌纲。其中条带1,2,3,5,8属于 *Nitrosomonadales* 的 *Nitrosomonadaceae Nitrosomonas*（亚硝化单胞菌属），条带4,6属于 *Nitrosomonadales* 的 *Nitrosomonadaceae Nitrospira*（亚硝化螺菌属），条带9,11属于 *Rhodocyclales* 的 *Rhodocyclaceae Dechloromonas*，条带10属于 *Rhodocyclales* 的 *Rhodocyclaceae*，条带7,12,13仅分类于 *Betaproteobacteria*。这证明在第一轮PCR反应中，使用特异性引物取得了预期的分类作用，测序条带准确性较高。

5.6 本章小结

在化学生物絮凝池中，充分的溶解氧和70%的污泥回流使得细菌得以增殖，然而化学混凝池内的微生物大部分来自进水，并且在化学混凝池内没有溶解氧，

不利于微生物的繁殖。在两种反应器中，微生物多样性都相当丰富，微生物种群结构也比较复杂，但化学混凝池内微生物的数量与化学生物絮凝反应器比较则极少（表5-2）。

化学生物絮凝池内由于生物作用的存在，使得其对污染物的去除率显著高于化学混凝池，这是化学生物絮凝处理工艺优于化学混凝处理工艺的很好证明。

第六章 悬浮填料床微生物种群结构初步分析

6.1 工艺描述及取样条件

试验中共取了三个工况的6个样品，研究在悬浮填料床进水流量，气水比，停留时间不同的情况下，悬浮填料床中微生物群落的变化和组成。各样品的取样条件见表6-1，取样时氨氮在各位置的浓度和去除率见图6-1。

表6-1 Sample 1-6 取样条件

Sample	PAFC投加量(mg/l)	PAM投加量(mg/l)	pH	悬浮填料床进水流量(m ³ /h)	悬浮填料床气水比	悬浮填料床水力停留时间(h)
1	70	0.5	7.0	1.0	1:1	8.0
2	70	0.5	7.3	1.4	1:1	5.7
3	70	0.5	7.5	2.1	1:1	3.8
4	100	0.5	5.6	2.0	2:1	4.0
5	80	0.5	6.8	2.0	1.5:1	4.0
6	80	0.5	7.0	2.0	1.5:1	4.0

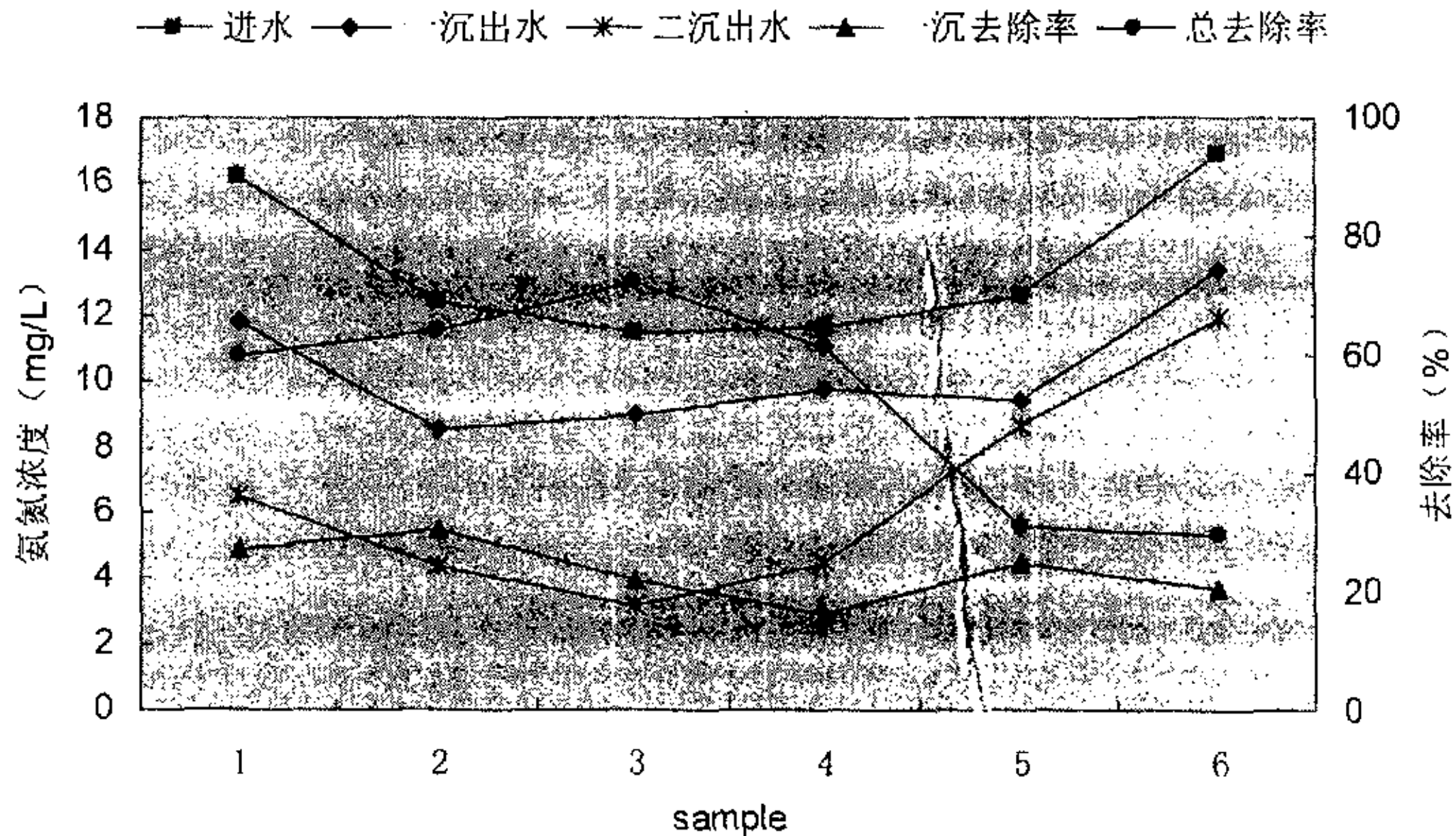


图6-1 取样工况的氨氮去除效果

注：“一沉出水”指化学生物絮凝池出水经一次沉淀池沉淀后出水。

“二沉出水”指悬浮填料床出水经二次沉淀池沉淀后的出水。

第六章 悬浮填料床微生物种群结构初步分析

6.1 工艺描述及取样条件

试验中共取了三个工况的6个样品，研究在悬浮填料床进水流量，气水比，停留时间不同的情况下，悬浮填料床中微生物群落的变化和组成。各样品的取样条件见表6-1，取样时氨氮在各位置的浓度和去除率见图6-1。

表6-1 Sample 1-6 取样条件

Sample	PAFC投加量(mg/l)	PAM投加量(mg/l)	pH	悬浮填料床进水流量(m ³ /h)	悬浮填料床气水比	悬浮填料床水力停留时间(h)
1	70	0.5	7.0	1.0	1:1	8.0
2	70	0.5	7.3	1.4	1:1	5.7
3	70	0.5	7.5	2.1	1:1	3.8
4	100	0.5	5.6	2.0	2:1	4.0
5	80	0.5	6.8	2.0	1.5:1	4.0
6	80	0.5	7.0	2.0	1.5:1	4.0

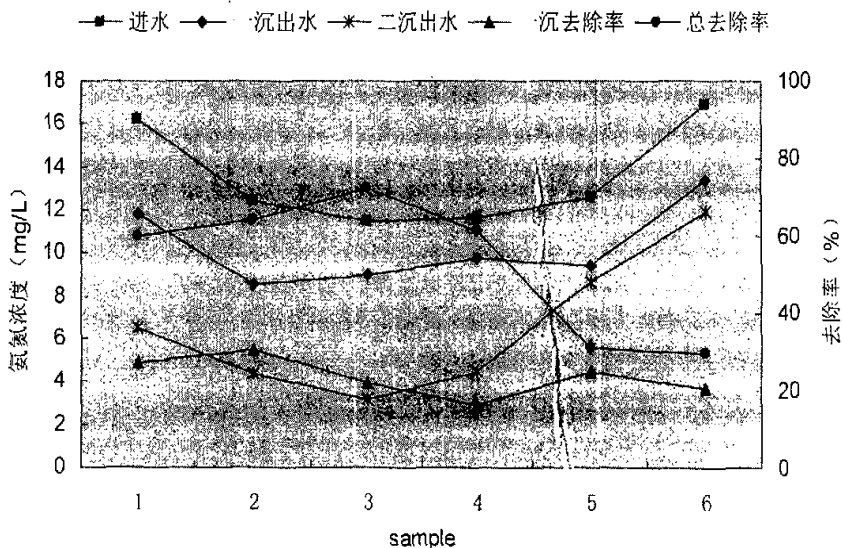


图6-1 取样工况的氨氮去除效果

注：“一沉出水”指化学生物絮凝池出水经一次沉淀池沉淀后出水。

“二沉出水”指悬浮填料床出水经二次沉淀池沉淀后的出水。

从图6-1可以看出,在取样的几个工况下,进水 $\text{NH}_3\text{-N}$ 浓度为11.5-16.9 mg/l,浓度较低,一沉出水、二沉出水平均氨氮浓度分别为10.3 mg/l、6.5mg/l,平均去除率分别为23.8%、51.8%。吴志平在《化学生物絮凝-悬浮填料床组合工艺优化研究》的硕士论文^[60]中得出结论:①在水力停留时间为2.3h和4.1h的情况下,气水比为3:1时,悬浮填料床对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除率最高可达99%;②在水力停留时间为2.3h,气水比为2:1和1.5:1时, $\text{NH}_3\text{-N}$ 的平均去除率分别为51.5%和50.5%;③在水力停留时间为4.1 h,气水比为2:1和1.5:1时, $\text{NH}_3\text{-N}$ 的平均去除率分别为66.1%和59.3%。在本试验取样的几个工况中, $\text{NH}_3\text{-N}$ 的平均去除率为51.8%,这与吴志平的上述结论基本吻合。

6.2 活性污泥样品总DNA提取结果

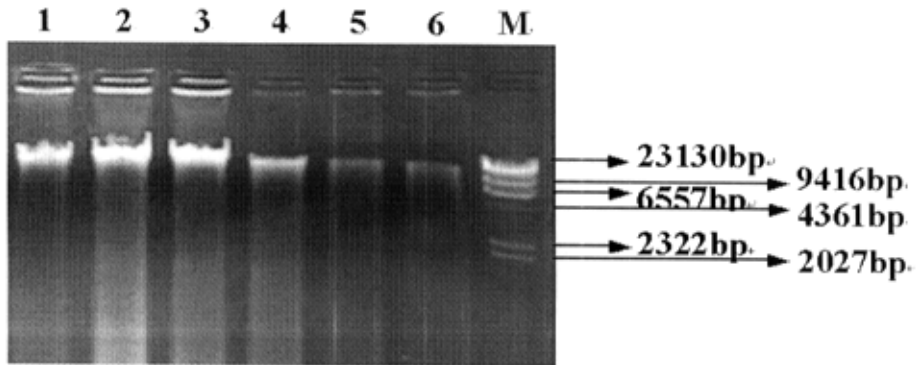


图6-2 活性污泥样品总DNA提取结果

注:图中1-6 分别为 sample 1-6, M: λ -Hind III digest

6.3 总DNA的PCR扩增结果

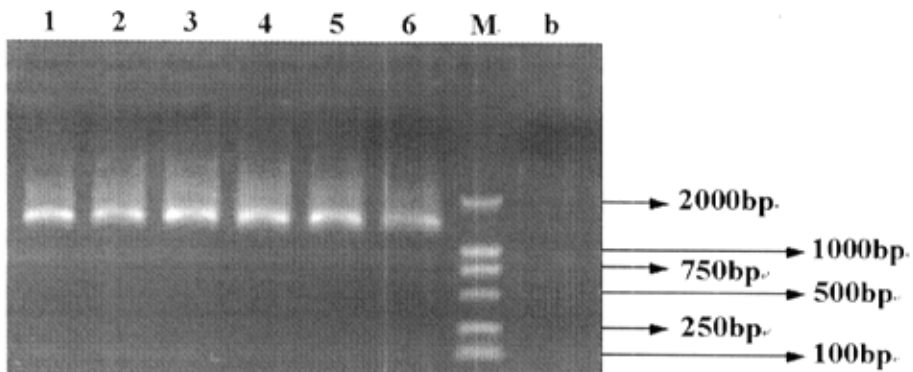


图 6-3 bacteria PCR扩增结果

注：图中1-6分别为sample 1-6，M: DNA Marker DL2,000，b:blank 阴性对照空白样

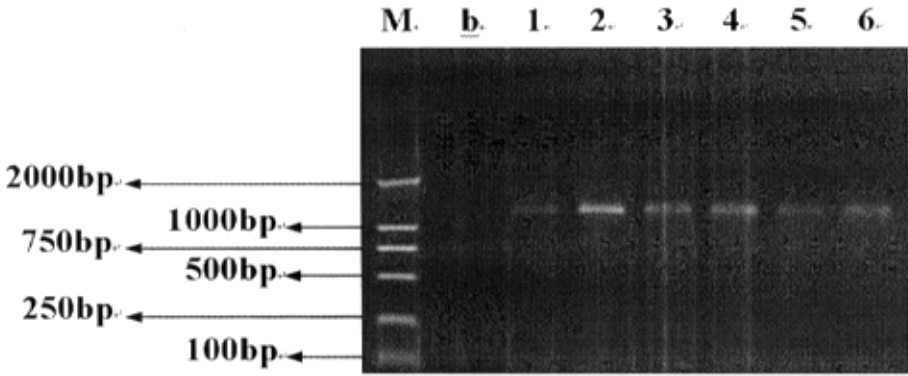


图6-4 actinomycete PCR扩增结果

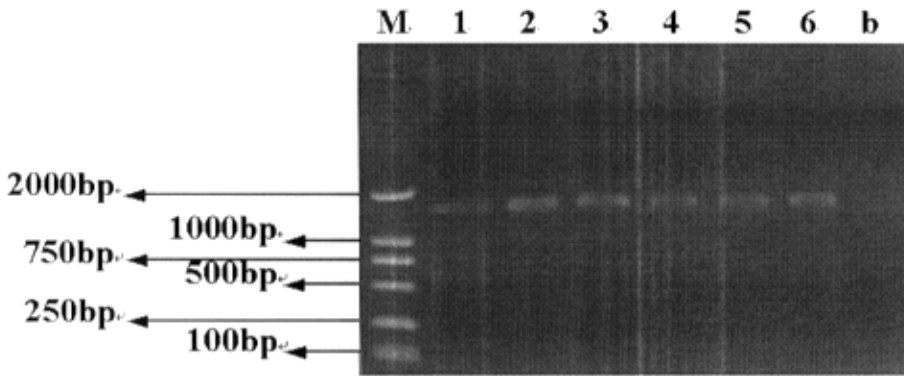


图6-5 acidobacteria PCR扩增结果

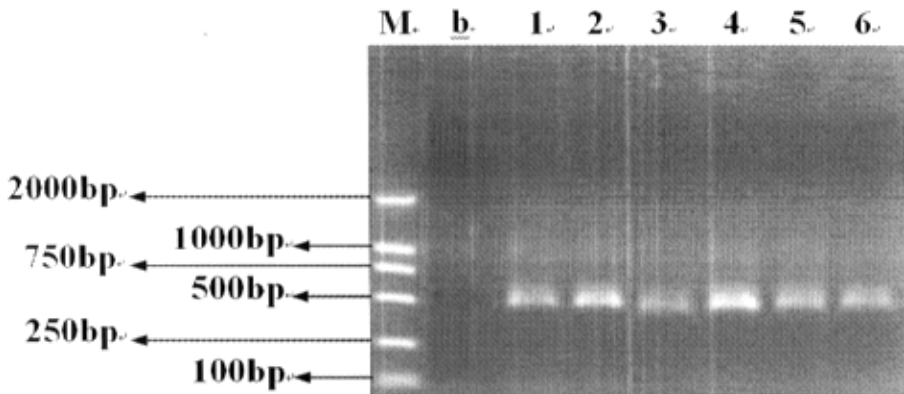
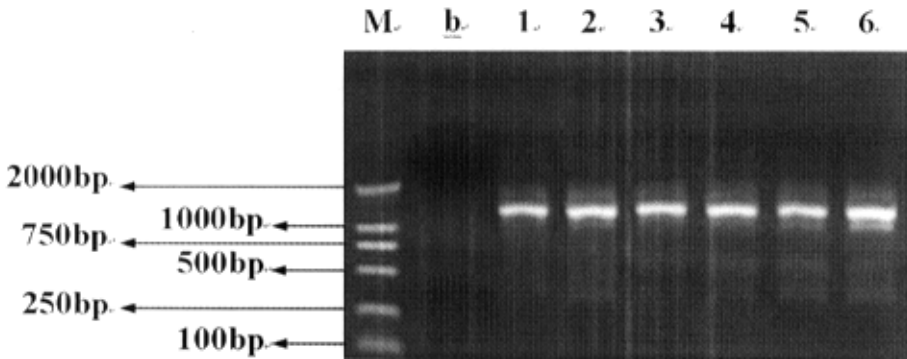


图6-6 ammonia bacteria PCR扩增结果

图6-7 α -protobacteria PCR扩增结果

6.4 变性梯度凝胶电泳分离PCR产物的结果

悬浮填料床六个样品经两轮PCR后，DGGE图谱见图6-8至图6-10。

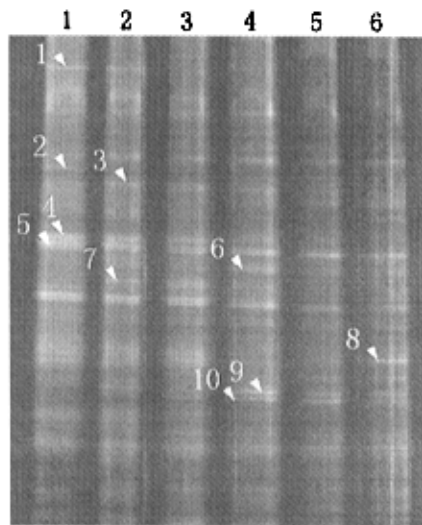


图6-8 总细菌DGGE图谱

在总细菌DGGE图谱中（图6-8），由于存在大量的微生物，明显的优势种群数目较少，条带较为模糊，在图中选取10条典型条带进行分析，将各分析条带在不同样品中的描述列于表6-2。

表6-2 总细菌DGGE图谱典型条带分析

分析条带	变化规律
Band 1	仅在sample 1,2 中出现, 取样期间悬浮填料床水力停留时间较长。
Band 2	仅在sample 1中出现, 其他样品中没有, sample 1取样期间悬浮填料床水力停留时间最长。
Band 3	在sample 1,2,3,4中出现, sample 5,6中几乎没有。
Band 4	在sample 1,2,3浓度逐渐递减, 取样期间悬浮填料床水力停留时间依次递减。
Band 5	在sample 1-4中浓度有递增趋势, 但条带较为模糊, sample 5,6条带清晰, 呈现为优势种群。
Band 6	由sample 4至5,6至2,3中浓度呈递减趋势, 取样时的PAFC投加量也呈递减趋势。
Band 7	仅在sample 2,3,4中存在。
Band 8	仅在sample 6中呈现为优势种群, 在sample 1,2,3中条带模糊, 无法分辨。sample 6取样条件同sample 5相近, 但Band 8在sample 5中不存在, 可能是未知因素导致的菌种变异。
Band 9,10	在sample 2-6中存在, 在sample 4中浓度最高。sample 4取样时, PAFC投加量最高, pH最低, 气水比最高。

在不同取样条件下, 上表中列出的悬浮填料床内菌种大致可以分为4类:

在悬浮填料床各取样条件下都存在的, 如Band 5, 这类菌种受悬浮填料床内环境变化影响很小, 在各种工况下浓度都较高, 是悬浮填料床处理污水的优势菌种;

随悬浮填料床水力停留时间变化而变化的菌种, 如Band 4,5; 只有悬浮填料床水力停留时间较长时才可以存在的菌种, 如Band 1,2, 这类菌种世代时间较长, 当悬浮填料床水力停留时间小的情况下, 水力冲刷的强度比较大, 会发生“洗脱”现象, 从而不能在反应器中大量存活;

随PAFC投加量变化而变化的菌种, 如Band 3, 当PAFC投加量较少时, 菌种浓度亦减少;

浓度变化受各因素影响较复杂的, 如Band 7,8,9,10, 其浓度可能与PAFC投加量、pH、气水比多种因素有关, 较为复杂。

如同在第三章所讨论过的一样, 根据细菌类引物进行的DGGE图谱, 并不能

够完整准确地反映出样品中实际的微生物种群状况，而同时进行的以放线菌、酸杆菌属、 α -变形菌纲特异性引物为基础的DGGE，其图谱（图6-9）则有助于更加详尽地揭示样品中微生物种群的结构。

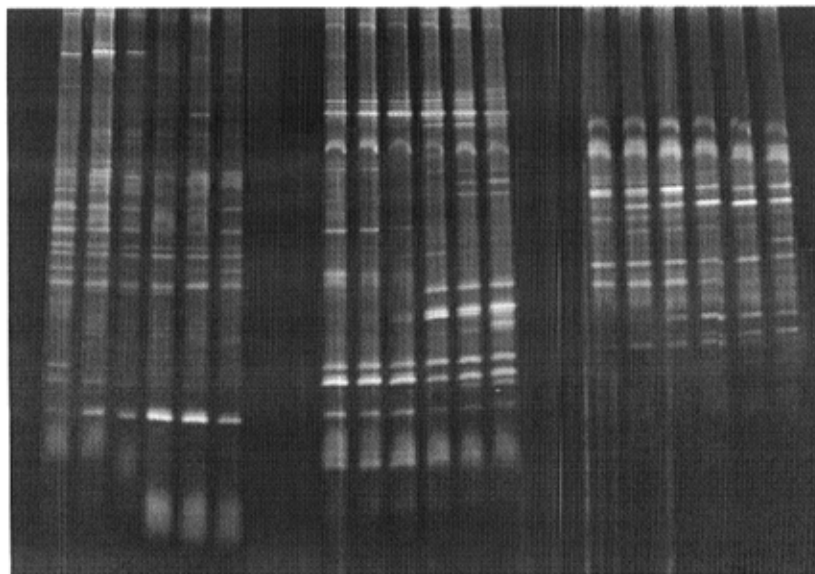


图6-9 Actinomycete、Acidobacteria、 α -proteobacteria DGGE图谱

在放线菌、酸杆菌属、 α -变形菌纲的DGGE图谱中，可以看出各类细菌都较为丰富，这同样也说明了前面进行的细菌引物DGGE图谱无法完整地反映出样品中微生物的种群结构。在这三类菌种图谱中，各类菌种都有其优势菌出现，但总体来说菌种的变化并无明显的规律可循（单一菌种的变化规律比较明显）。放线菌在图谱上部和底部出现了个别浓度变化的菌种，酸杆菌属在图谱中部有部分浓度变化的菌种，而 α -变形菌纲图谱中各个样品变化极小。

悬浮填料床反应器的一个特点是，当填料在水中充分流化时，填料上的微生物能够获得充分的溶解氧和有机养料，提高了微生物的浓度，降低了污泥负荷，同时为世代周期长的硝化细菌提供了栖息场所，为 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的硝化创造了条件。鉴于此，研究中进行了以氨氧化细菌为目的的PCR扩增，并进行了氨氧化细菌的DGGE分析（见图6-10）。

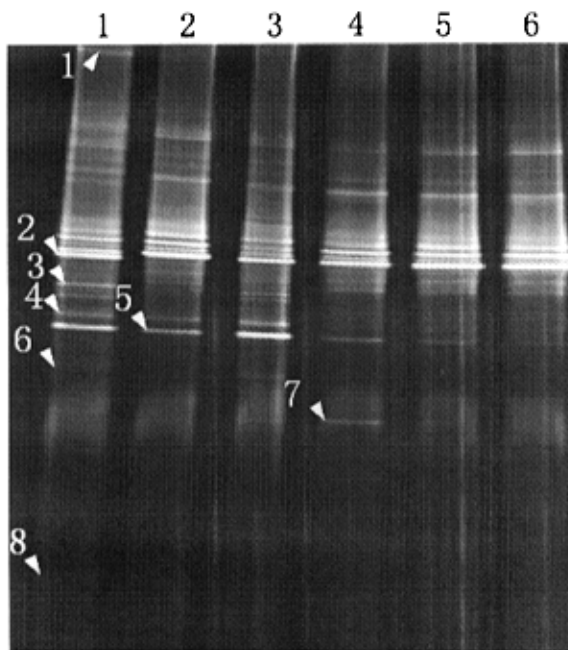


图6-10 氨氧化细菌DGGE图谱

根据图6-10的氨氧化细菌DGGE图谱，基本可以将图谱中条带分为3类：

- 1) 仅在某一样品中存在的菌种，如Band 1,3,6,7,8；
- 2) 在几个样品中存在，并且浓度成一定变化趋势的菌种，如Band 4,5；
- 3) 在所有样品中存在，且浓度基本不变化的菌种，如Band 2等。

在上述被分析的典型条带中，第一类菌种（Band 1,3,6,7,8）仅仅是在图谱中的特定位置出现，在样品中没有呈现为明显的优势菌种，可以认为是在悬浮填料床运行状况发生改变时某类细菌繁殖的结果，如Band 7所在的样品4，取样时PAFC投加量最高，pH最低，气水比最高，但这种假定仍需要做更多的研究来论证。

Band 4在sample 1,2,3中存在，并且其浓度基本维持不变，这三个样品的取样工况，PAFC投加量最低，气水比最低；Band 5在sample 1,2,3中浓度最高，在sample 4,5,6中浓度依次递减；这两种氨氧化细菌都与悬浮填料床的运行状况有关，但它们是否可以作为悬浮填料床运行的指示菌种仍需要更多的论证。

Band 2代表了在所有样品中都以优势种群形式存在的菌种，这类氨氧化细菌在图谱中存在数目比较多（图中未标示），即使在工况条件改变很多的情况下，

它们基本维持着较高的浓度,这些氨氧化细菌是悬浮填料床中完成 $\text{NH}_3\text{-N}$ 硝化作用的主体,它们的数目、浓度基本保持不变,说明在悬浮填料床中已经形成了稳定的微生物种群结构,这个微生物种群能够不受环境变化(PAFC投加量,气水比,水力停留时间等因素)的影响,具有稳定地去除 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的作用。

6.5 本章小结

从5类细菌的DGGE图谱可以看出,悬浮填料床内细菌种类较为丰富,具有稳定的微生物种群结构。这些微生物在悬浮填料床运行参数改变的情况下,有不同的适应能力,基本可以分为4类:在任何运行条件下都存活的、因悬浮填料床水力停留时间而变化的、随化学生物絮凝池中PAFC投加量变化而变化的菌种、浓度变化受各因素影响较复杂的菌种。

悬浮填料床中除含有丰富的氨氧化细菌种类外,同样含有种类丰富的放线菌、酸杆菌属、 α -变形菌纲等其他菌种,这些菌种在悬浮填料床中污染物的降解也起到了一定的作用。

悬浮填料床中存在着一类十分稳定、对氨氮的去除起到重要作用的氨氧化细菌。由于悬浮填料床结合了活性污泥法和生物膜法处理污水的特点,填料上的微生物能够获得充分的溶解氧和有机养料,提高了微生物的浓度,降低了污泥负荷,并且也为世代周期长的硝化细菌提供了栖息场所,为 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的硝化创造了条件。悬浮填料床中的氨氧化细菌在这样的条件下,维持了稳定的微生物种群结构,使得悬浮填料床能够抗冲击负荷,并且能够稳定高效的完成 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的硝化过程。

它们基本维持着较高的浓度，这些氨氧化细菌是悬浮填料床中完成 $\text{NH}_3\text{-N}$ 硝化作用的主体，它们的数目、浓度基本保持不变，说明在悬浮填料床中已经形成了稳定的微生物种群结构，这个微生物种群能够不受环境变化（PAFC投加量，气水比，水力停留时间等因素）的影响，具有稳定地去除 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的作用。

6.5 本章小结

从5类细菌的DGGE图谱可以看出，悬浮填料床内细菌种类较为丰富，具有稳定的微生物种群结构。这些微生物在悬浮填料床运行参数改变的情况下，有不同的适应能力，基本可以分为4类：在任何运行条件下都存活的、因悬浮填料床水力停留时间而变化的、随化学生物絮凝池中PAFC投加量变化而变化的菌种、浓度变化受各因素影响较复杂的菌种。

悬浮填料床中除含有丰富的氨氧化细菌种类外，同样含有种类丰富的放线菌、酸杆菌属、 α -变形菌纲等其他菌种，这些菌种在悬浮填料床中污染物的降解也起到了一定的作用。

悬浮填料床中存在着一类十分稳定、对氨氮的去除起到重要作用的氨氧化细菌。由于悬浮填料床结合了活性污泥法和生物膜法处理污水的特点，填料上的微生物能够获得充分的溶解氧和有机养料，提高了微生物的浓度，降低了污泥负荷，并且也为世代周期长的硝化细菌提供了栖息场所，为 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的硝化创造了条件。悬浮填料床中的氨氧化细菌在这样的条件下，维持了稳定的微生物种群结构，使得悬浮填料床能够抗冲击负荷，并且能够稳定高效的完成 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的硝化过程。

第七章 化学生物絮凝工艺与几种传统污水处理工艺微生物种群结构比较分析

7.1 工艺描述及取样条件

7.1.1 石洞口污水厂

上海石洞口污水处理厂位于宝山区盛桥镇长江边，原西区污水总管出口处，东侧为石洞口煤气厂，西邻罗泾煤码头，北靠长江。设计平均日污水量40万 m^3/d ，高峰污水量6.018 m^3/s ；现状污水量19~24万 m^3/d 。污水性质：分流制污水，其中工业废水约占40%，生活污水占60%，进处理厂污水水质及处理厂出水水质见表7-1。污水处理工艺流程见图7-1。

表7-1 石洞口污水处理厂进出水水质表

项目	COD(mg/l)	BOD ₅ (mg/l)	SS(mg/l)	NH ₃ -N(mg/l)	TP(mg/l)
进水	400	200	250	30	4.5
出水	≤60	≤20	≤20	≤1	≤1

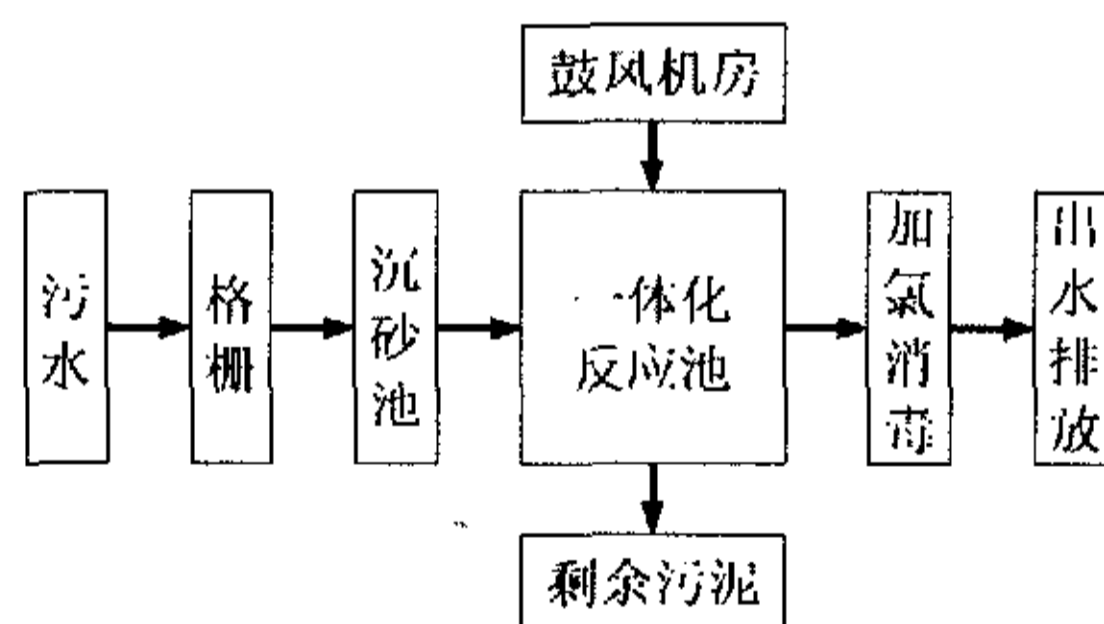


图 7-1 石洞口污水处理厂工艺流程图

污水处理主体构筑物为一体化反应池，即曝气/沉淀均在同一座水池中，生物除磷脱氮主要参数如下：污泥负荷：0.11 kg BOD/(kgMLSS·d)；污泥浓度：4 kg/m^3 ；水力停留时间：15.9 h；反硝化率：0.047 $\text{kgNO}_3^-/\text{N}/(\text{kgMLSS}\cdot\text{d})$ ；供氧量：133000 kgO_2/d ；气水比：7.3:1。沉淀部分的水力负荷：1.13 $\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ （斜板）；出水堰负荷1.24 $\text{l}/(\text{s}\cdot\text{m})$ 。

一体化反应池共4座，每座分3槽，每槽由3格矩形水池组成，每格平面尺寸35 m×35 m，有效水深6 m，每格之间有DN 1000管道连通，运行时，每3格可处理污水3.33万 m^3/d 。3格水池底部均布置曝气扩散装置，搅拌设施，两边格上部

第七章 化学生物絮凝工艺与几种传统污水处理工艺微生物种群结构比较分析

7.1 工艺描述及取样条件

7.1.1 石洞口污水厂

上海石洞口污水处理厂位于宝山区盛桥镇长江边，原西区污水总管出口处，东侧为石洞口煤气厂，西邻罗泾煤码头，北靠长江。设计平均日污水量40万 m^3/d ，高峰污水量6.018 m^3/s ；现状污水量19~24万 m^3/d 。污水性质：分流制污水，其中工业废水约占40%，生活污水占60%，进处理厂污水水质及处理厂出水水质见表7-1。污水处理工艺流程见图7-1。

表7-1 石洞口污水处理厂进出水水质表

项目	COD(mg/l)	BOD ₅ (mg/l)	SS(mg/l)	NH ₃ -N(mg/l)	TP(mg/l)
进水	400	200	250	30	4.5
出水	≤60	≤20	≤20	≤1	≤1

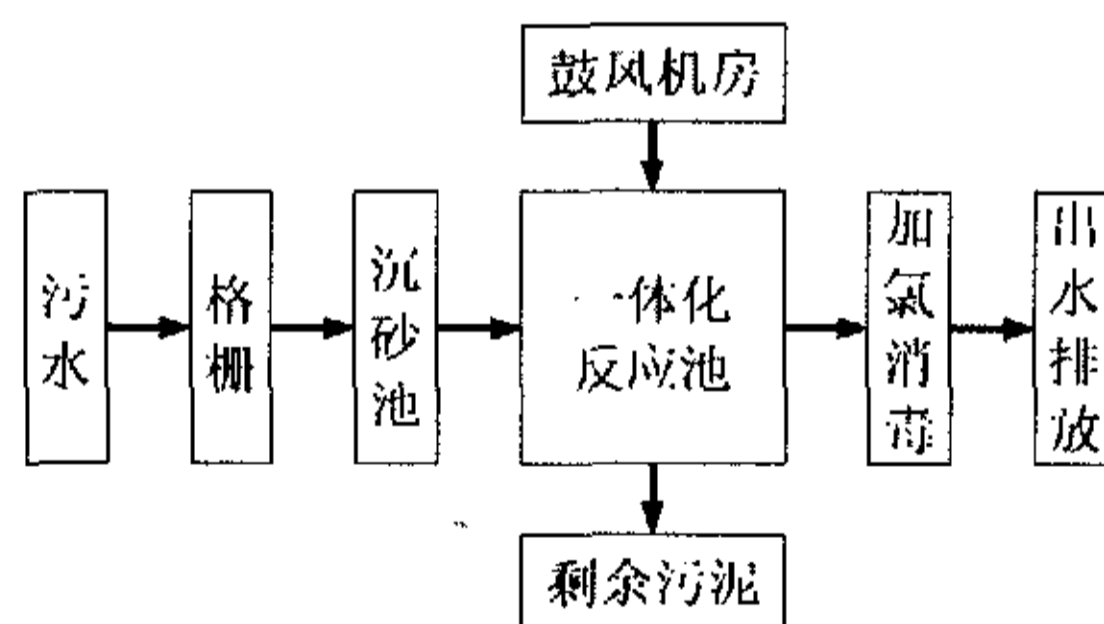


图 7-1 石洞口污水处理厂工艺流程图

污水处理主体构筑物为一体化反应池，即曝气/沉淀均在同一座水池中，生物除磷脱氮主要参数如下：污泥负荷：0.11 kg BOD/(kgMLSS·d)；污泥浓度：4 kg/m^3 ；水力停留时间：15.9 h；反硝化率：0.047 $\text{kgNO}_3^-/\text{N}/(\text{kgMLSS}\cdot\text{d})$ ；供氧量：133000 kgO_2/d ；气水比：7.3:1。沉淀部分的水力负荷：1.13 $\text{m}^3/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ （斜板）；出水堰负荷1.24 $\text{l}/(\text{s}\cdot\text{m})$ 。

一体化反应池共4座，每座分3槽，每槽由3格矩形水池组成，每格平面尺寸35 $\text{m}\times 35 \text{ m}$ ，有效水深6 m ，每格之间有DN 1000管道连通，运行时，每3格可处理污水3.33万 m^3/d 。3格水池底部均布置曝气扩散装置，搅拌设施，两边格上部

布置斜板及出水槽。若左边格进水，经中间一格至右边格，该边格作沉淀池，处理水经斜板后出水，左边格及中间格按厌氧、缺氧、好氧顺序工作。经一周期后，从右边格进水，此时左边格作沉淀池，处理后出水，这样反复运行。与已建成的三槽式氧化沟运作情况相同。

本试验中共取石洞口污水厂样品3个，分别对应一体化反应池的缺氧、好氧、厌氧三个部分，为Sample 1,2,3。

7.1.2 松江污水处理厂

上海市自来水水源80%取自黄浦江，取水口位于松江城下游9.3公里松浦大桥旁。故松江的污水治理对保护黄浦江水质和上海饮用水源，具有特别重要的意义。

松江污水处理厂一期工程于1985年投产，日处理能力27,000吨，处理工艺为常规活性污泥法。松江污水处理厂二期工程为世界银行上海环境项目的子项目。工程内容包括扩建5万吨/日污水处理设备，改造一期工程，以及城区增建管网和泵站，处理工艺均为A/O脱氮工艺。处理厂进出水水质见表7-2，污水处理工艺流程同图7-1。

表7-2 松江污水处理厂进出水水质表

项目	COD(mg/l)	BOD ₅ (mg/l)	SS(mg/l)	NH ₃ -N(mg/l)
进水	450	210	250	---
出水	≤60	≤15	≤30	≤5

处理工艺主体为曝气池，由2座52m×39m的矩形水池构成，每池分三廓道，有效水深6m，污泥负荷0.1kgBOD₅/kgMLSS·d，设计MLSS=4kg/m³，缺氧段与好氧段之比为1:3，好氧段采用微孔曝气逐减曝气，污泥回流率为200%。

本试验中共取松江污水厂样品3个，分别对应一体化反应池的缺氧、好氧、厌氧三个部分，为Sample 4,5,6。

7.1.3 曲阳污水处理厂

上海市曲阳污水处理厂污水的主要来源是生活污水，污水处理达标后排放至沙泾港河道。处理工艺为传统活性污泥法，见图7-2，进出水水质见表7-3。

布置斜板及出水槽。若左边格进水，经中间一格至右边格，该边格作沉淀池，处理水经斜板后出水，左边格及中间格按厌氧、缺氧、好氧顺序工作。经一周期后，从右边格进水，此时左边格作沉淀池，处理后出水，这样反复运行。与已建成的三槽式氧化沟运作情况相同。

本试验中共取石洞口污水厂样品3个，分别对应一体化反应池的缺氧、好氧、厌氧三个部分，为Sample 1,2,3。

7.1.2 松江污水处理厂

上海市自来水水源80%取自黄浦江，取水口位于松江城下游9.3公里松浦大桥旁。故松江的污水治理对保护黄浦江水质和上海饮用水源，具有特别重要的意义。

松江污水处理厂一期工程于1985年投产，日处理能力27,000吨，处理工艺为常规活性污泥法。松江污水处理厂二期工程为世界银行上海环境项目的子项目。工程内容包括扩建5万吨/日污水处理设备，改造一期工程，以及城区增建管网和泵站，处理工艺均为A/O脱氮工艺。处理厂进出水水质见表7-2，污水处理工艺流程同图7-1。

表7-2 松江污水处理厂进出水水质表

项目	COD(mg/l)	BOD ₅ (mg/l)	SS(mg/l)	NH ₃ -N(mg/l)
进水	450	210	250	---
出水	≤60	≤15	≤30	≤5

处理工艺主体为曝气池，由2座52m×39m的矩形水池构成，每池分三廓道，有效水深6m，污泥负荷0.1kgBOD₅/kgMLSS·d，设计MLSS=4kg/m³，缺氧段与好氧段之比为1:3，好氧段采用微孔曝气逐减曝气，污泥回流率为200%。

本试验中共取松江污水厂样品3个，分别对应一体化反应池的缺氧、好氧、厌氧三个部分，为Sample 4,5,6。

7.1.3 曲阳污水处理厂

上海市曲阳污水处理厂污水的主要来源是生活污水，污水处理达标后排放至沙泾港河道。处理工艺为传统活性污泥法，见图7-2，进出水水质见表7-3。

布置斜板及出水槽。若左边格进水，经中间一格至右边格，该边格作沉淀池，处理水经斜板后出水，左边格及中间格按厌氧、缺氧、好氧顺序工作。经一周期后，从右边格进水，此时左边格作沉淀池，处理后出水，这样反复运行。与已建成的三槽式氧化沟运作情况相同。

本试验中共取石洞口污水厂样品3个，分别对应一体化反应池的缺氧、好氧、厌氧三个部分，为Sample 1,2,3。

7.1.2 松江污水处理厂

上海市自来水水源80%取自黄浦江，取水口位于松江城下游9.3公里松浦大桥旁。故松江的污水治理对保护黄浦江水质和上海饮用水源，具有特别重要的意义。

松江污水处理厂一期工程于1985年投产，日处理能力27,000吨，处理工艺为常规活性污泥法。松江污水处理厂二期工程为世界银行上海环境项目的子项目。工程内容包括扩建5万吨/日污水处理设备，改造一期工程，以及城区增建管网和泵站，处理工艺均为A/O脱氮工艺。处理厂进出水水质见表7-2，污水处理工艺流程同图7-1。

表7-2 松江污水处理厂进出水水质表

项目	COD(mg/l)	BOD ₅ (mg/l)	SS(mg/l)	NH ₃ -N(mg/l)
进水	450	210	250	---
出水	≤60	≤15	≤30	≤5

处理工艺主体为曝气池，由2座52m×39m的矩形水池构成，每池分三廓道，有效水深6m，污泥负荷0.1kgBOD₅/kgMLSS·d，设计MLSS=4kg/m³，缺氧段与好氧段之比为1:3，好氧段采用微孔曝气逐减曝气，污泥回流率为200%。

本试验中共取松江污水厂样品3个，分别对应一体化反应池的缺氧、好氧、厌氧三个部分，为Sample 4,5,6。

7.1.3 曲阳污水处理厂

上海市曲阳污水处理厂污水的主要来源是生活污水，污水处理达标后排放至沙泾港河道。处理工艺为传统活性污泥法，见图7-2，进出水水质见表7-3。

表7-3 石洞口污水处理厂进出水水质表^[61]

项目	COD(mg/l)	BOD ₅ (mg/l)	SS(mg/l)	NH ₃ -N(mg/l)
进水	447	221	357	35
出水	38	15	24	25

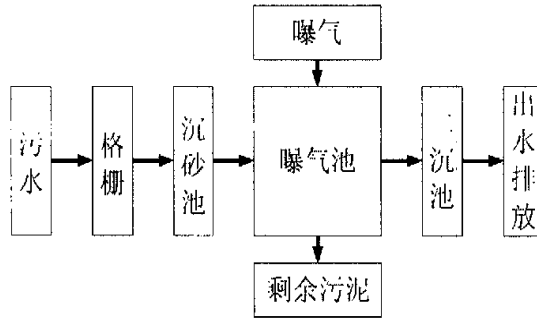


图 7-2 曲阳污水处理厂工艺流程图

本试验中共取曲阳污水厂样品3个，分别为12月8日，5月27日，4月30日，Sample 7,8,9。

7.1.4 化学生物絮凝污水处理工艺

本试验中共取化学生物絮凝处理工艺样品3个，分别为化学生物絮凝反应池的三个廊道，对应Sample 10,11,12。

7.2 活性污泥样品总DNA提取结果

从12个活性污泥样品中提取的DNA 通过1%的琼脂糖凝胶电泳检验（图7-3）。

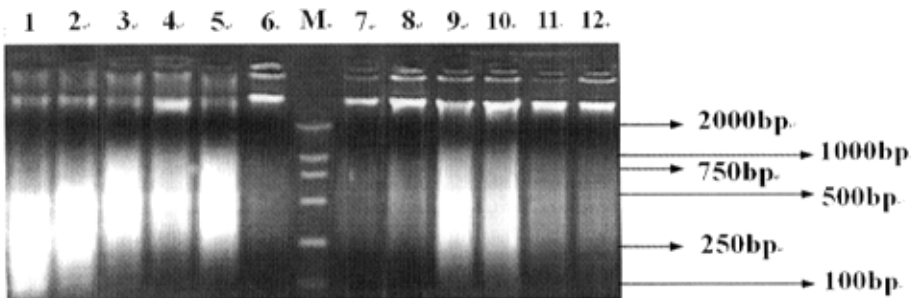


图7-3 活性污泥样品总DNA提取结果

注：图中1-12分别为sample 1-12，M: DNA Marker DL2,000

7.3 总DNA的PCR扩增结果

将提取出的DNA进行通用引物PCR扩增，结果用1%的琼脂糖凝胶电泳检测，扩增出的DNA片段大小为220-240bp，是扩增的目的片段（图7-4）。

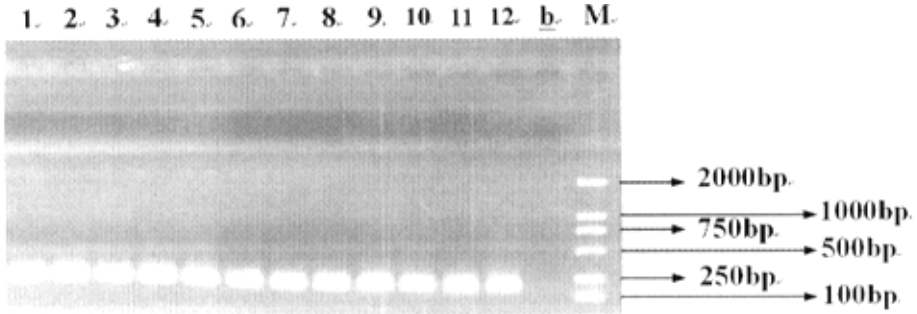


图7-4 PCR扩增结果

注：图中1-12分别为sample 1-12，M: DNA Marker DL2,000，b:blank 阴性对照空白样

7.4 变性梯度凝胶电泳分离PCR产物的结果

将四管扩增出的PCR产物进行变性梯度凝胶电泳，见图7-5。图中样品含有极为丰富的微生物种群，并且各个样品都含有较少的优势菌种（Band 1-14等）。

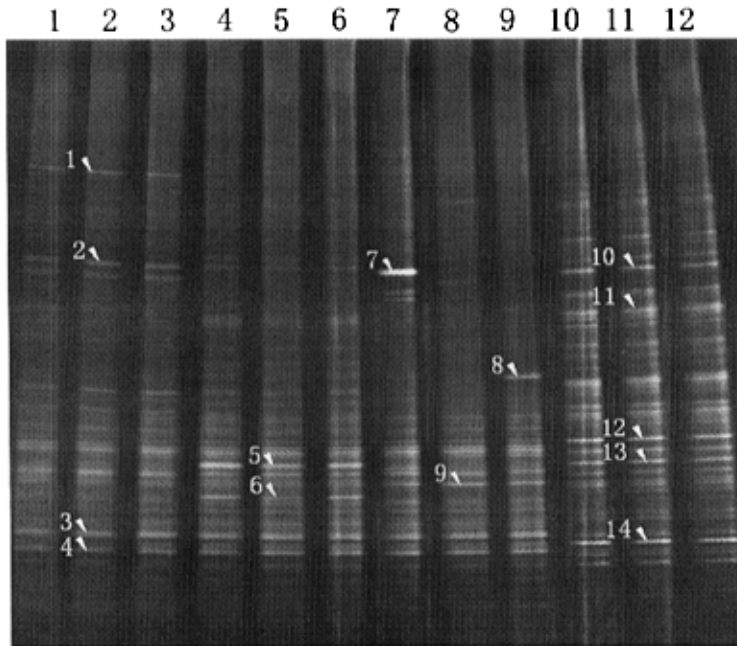


图7-5 各污水处理工艺样品DGGE图谱

石洞口污水厂的3个样品 (Sample 1,2,3) 微生物种群结构几乎完全相同, 这一点无论从图谱中条带的位置、亮度, 还是优势菌种的位置和亮度 (Band 1,2,3,4) 都可以看出。Sample 1,2,3取自一体化反应池的三个不同部位, 分别对应为脱氮工艺中的缺氧、好氧、厌氧三个部分, 但由于一体化反应池中的缺氧、好氧、厌氧工作部分区分是逐步过渡的, 并且三个工作部分在反应池运行期间是不断切换的, 反应池中活性污泥只有在其作沉淀池使用时才排出池外, 因此三个样品活性污泥中的微生物种群结构相似是能够解释的, 另外, 在DGGE图谱中, 虽然显示出了微生物种群结构的相似, 但这并不一定代表了三个样品微生物种群功能的相似。松江污水厂3个样品 (Sample 4,5,6) 的微生物种群结构也十分相似, 情况与石洞口污水厂样品相同。曲阳污水厂3个样品 (Sample 7,8,9) 为不同季节的曝气池活性污泥, 三个样品的不同DGGE图谱显示, 它们在微生物种群结构上有相似之处 (Band 9), 但也有一定的差别 (Band 7,8)。Band 7、Band 8分别是Sample 7、Sample 9的特有优势菌种, 这两个样品分别产自12月 (冬季) 和4月 (春季), 样品中条带7、8的出现应与温度的变化有密切的关系, 但关于这个判断仍需更多的工作来证明。取自化学生物絮凝池的三个样品 (Sample 10,11,12) 微生物种群结构比较相似, 在第一、二、三廊道内微生物分布比较均匀。

A/O脱氮工艺活性污泥样品 (Sample 1,2,3,4,5,6)、传统处理工艺曝气池活性污泥样品 (Sample 7,8,9)、化学生物絮凝处理工艺反应池污泥样品 (Sample 10,11,12) 的比较可以看出, 这几种城市污水处理工艺中微生物种群的多样性都相当丰富, 但是种群结构差异很大 (图7-5), 尤其是化学生物絮凝处理工艺污泥样品与其它几种工艺的差别更为明显。这说明, 在进水成分相近的城市生活污水中, 不同的处理工艺中微生物种群结构存在明显的差别。化学生物絮凝处理工艺的微生物作用与进水成分相近的其它几种出工艺中的微生物作用机理可能存在较大的差别。在12个样品中, 通过SmartView软件分析, 取自化学生物絮凝池的三个样品 (Sample 10,11,12) 包含的细菌种类最为丰富 (条带数目最多), 优势菌种亦较多 (Band 10,11,12,13,14) 说明在化学生物絮凝处理工艺的系统, 尽管污泥中的微生物的数量可能少于其它几种工艺, 但是细菌种类较多, 证明化学生物絮凝池中微生物种群多样性较高, 系统抗冲击负荷能力较强。

采自石洞口和松江污水处理厂的A/O脱氮工艺活性污泥样品 (Sample

1,2,3,4,5,6)与采自曲阳污水处理厂的传统处理工艺曝气池活性污泥样品(Sample 7,8,9)的比较可以看出,两种污水处理工艺的活性污泥样品中含有相同的菌种(Band 3,4等),并且几个样品中,都是大部分的条带都分布在DGGE图谱的下半部分,说明这两种污水处理工艺的微生物种群结构较为相近。

7.5 本章小结

在一体化反应池的缺氧、好氧、厌氧三个部分,工作职能的区分没有明显的界限,三个工作部分在反应池运行期间不断切换,反应池中活性污泥只有在其作沉淀池使用时才排出池外,因而取自石洞口、松江污水厂一体化反应池三个部位的样品,微生物种群结构几乎完全相同。

取自不同季节曝气池活性污泥的曲阳污水厂的3个样品显示了在不同季节时,温度变化引起了活性污泥微生物中一些菌种的变化,但对于整个微生物种群结构的影响却不大,说明活性污泥能够不受外界影响而保持较为稳定的结构。

化学生物絮凝处理工艺污泥样品与A/O脱氮工艺活性污泥样品、传统处理工艺曝气池活性污泥样品相比较,样品中微生物种群的多样性都相当丰富,但是种群结构差异很大。化学生物絮凝处理工艺中细菌的数量可能少于其他工艺,但其微生物种类最为丰富,与其它几种处理工艺比较,其微生物作用机理可能存在较大的差别。

1,2,3,4,5,6)与采自曲阳污水处理厂的傳統处理工艺曝气池活性污泥样品(Sample 7,8,9)的比较可以看出,两种污水处理工艺的活性污泥样品中含有相同的菌种(Band 3,4等),并且几个样品中,都是大部分的条带都分布在DGGE图谱的下半部分,说明这两种污水处理工艺的微生物种群结构较为相近。

7.5 本章小结

在一体化反应池的缺氧、好氧、厌氧三个部分,工作职能的区分没有明显的界限,三个工作部分在反应池运行期间不断切换,反应池中活性污泥只有在其作沉淀池使用时才排出池外,因而取自石洞口、松江污水厂一体化反应池三个部位的样品,微生物种群结构几乎完全相同。

取自不同季节曝气池活性污泥的曲阳污水厂的3个样品显示了在不同季节时,温度变化引起了活性污泥微生物中一些菌种的变化,但对于整个微生物种群结构的影响却不大,说明活性污泥能够不受外界影响而保持较为稳定的结构。

化学生物絮凝处理工艺污泥样品与A/O脱氮工艺活性污泥样品、传统处理工艺曝气池活性污泥样品相比较,样品中微生物种群的多样性都相当丰富,但是种群结构差异很大。化学生物絮凝处理工艺中细菌的数量可能少于其他工艺,但其微生物种类最为丰富,与其它几种处理工艺比较,其微生物作用机理可能存在较大的差别。

第八章 结论、讨论和建议

8.1 结论

针对化学生物絮凝污水处理工艺特点,利用PCR-DGGE等分子生物学方法,研究化学生物絮凝污水处理系统中的微生物种群结构。在此基础上,研究化学生物絮凝处理工艺与化学混凝工艺、传统活性污泥法二级污水处理工艺、A/O脱氮污水处理工艺的微生物种群结构的区别。本课题作为国家高技术研究发展计划(863计划)——《化学生物絮凝组合技术与设备》项目的子课题,为研究污水处理工艺的微生物种群结构提供了新方法,为化学生物絮凝污水处理工艺的优化研究提供了数据基础。通过近一年的试验研究工作,得出了以下一些主要成果和结论:

(1) 在化学生物絮凝池的污泥驯化阶段,反应器内出现了部分优势菌种,这些菌种在反应器加药运行时仍然占据优势,属于反应器中生物作用的主体。同样,有些微生物在污泥驯化过程中存在,而在反应器投加药剂运行时则遭到淘汰,说明这些菌种虽然在有氧条件下可以很好地利用污水中的污染物质进行繁殖,但不适合于化学生物絮凝反应体系。

(2) 在工艺运行条件不同时,化学生物絮凝处理工艺的微生物种群结构有一定变化,而微生物多样性指数变化较小,说明化学生物絮凝处理工艺的系统稳定性和缓冲性较好,反应池运行较为稳定;在同一工况下,化学生物絮凝池三个廊道内微生物的结构差异很小,细菌在反应器不同位置的分布相当均匀;将DGGE图谱中的典型条带测序后,通过NCBI比对可知在化学生物絮凝池污水处理系统中,存在较多的未经培养(Uncultured)菌种,PCR-DGGE方法克服了传统微生物鉴定技术的缺点,使系统中的微生物种群结构清晰地呈现出来。

(3) 化学混凝池与化学生物絮凝池相比较,二者的微生物种类都较为丰富,而化学生物絮凝池内有充分的溶解氧和一定的回流污泥使细菌得以增值,化学混凝池内的微生物则大部分来自进水,池内几乎没有生物作用;从微生物数量上比较,化学生物絮凝池内的微生物数量要远远高于化学混凝池。由于化学生物絮凝池内存在着生物作用,它对污染物的去除率要显著高于化学混凝池,这证明了化学生物絮凝处理工艺优于化学混凝处理工艺。

(4) 悬浮填料床内含有丰富的细菌种类,如细菌、放线菌、酸杆菌属、 α -变

第八章 结论、讨论和建议

8.1 结论

针对化学生物絮凝污水处理工艺特点,利用PCR-DGGE等分子生物学方法,研究化学生物絮凝污水处理系统中的微生物种群结构。在此基础上,研究化学生物絮凝处理工艺与化学混凝工艺、传统活性污泥法二级污水处理工艺、A/O脱氮污水处理工艺的微生物种群结构的区别。本课题作为国家高技术研究发展计划(863计划)——《化学生物絮凝组合技术与设备》项目的子课题,为研究污水处理工艺的微生物种群结构提供了新方法,为化学生物絮凝污水处理工艺的优化研究提供了数据基础。通过近一年的试验研究工作,得出了以下一些主要成果和结论:

(1) 在化学生物絮凝池的污泥驯化阶段,反应器内出现了部分优势菌种,这些菌种在反应器加药运行时仍然占据优势,属于反应器中生物作用的主体。同样,有些微生物在污泥驯化过程中存在,而在反应器投加药剂运行时则遭到淘汰,说明这些菌种虽然在有氧条件下可以很好地利用污水中的污染物质进行繁殖,但不适合于化学生物絮凝反应体系。

(2) 在工艺运行条件不同时,化学生物絮凝处理工艺的微生物种群结构有一定变化,而微生物多样性指数变化较小,说明化学生物絮凝处理工艺的系统稳定性和缓冲性较好,反应池运行较为稳定;在同一工况下,化学生物絮凝池三个廊道内微生物的结构差异很小,细菌在反应器不同位置的分布相当均匀;将DGGE图谱中的典型条带测序后,通过NCBI比对可知在化学生物絮凝池污水处理系统中,存在较多的未经培养(Uncultured)菌种,PCR-DGGE方法克服了传统微生物鉴定技术的缺点,使系统中的微生物种群结构清晰地呈现出来。

(3) 化学混凝池与化学生物絮凝池相比较,二者的微生物种类都较为丰富,而化学生物絮凝池内有充分的溶解氧和一定的回流污泥使细菌得以增值,化学混凝池内的微生物则大部分来自进水,池内几乎没有生物作用;从微生物数量上比较,化学生物絮凝池内的微生物数量要远远高于化学混凝池。由于化学生物絮凝池内存在着生物作用,它对污染物的去除率要显著高于化学混凝池,这证明了化学生物絮凝处理工艺优于化学混凝处理工艺。

(4) 悬浮填料床内含有丰富的细菌种类,如细菌、放线菌、酸杆菌属、 α -变

形菌纲等，但其中对悬浮填料床氨氮的去除起着重要作用的是大量的氨氧化细菌。由于悬浮填料床结合了活性污泥法和生物膜法处理污水的特点，提供了适合世代周期长的硝化细菌栖息的场所，因而悬浮填料床内的氨氧化细菌能够在系统发生变化时维持较为稳定的微生物种群结构，使得悬浮填料床能够抗击冲击负荷，稳定高效地去除氨氮。

(5) 取自 A/O 脱氮一体化反应池缺氧、好氧、厌氧三个工作部分的污泥样品分析显示，这三个部分的微生物种群结构差异较小；取自不同季节曝气池活性污泥的曲阳污水厂的三个样品显示在不同季节时，微生物种群结构受温度影响变化较小，说明活性污泥能够不受外界影响而保持较为稳定的结构。

(6) 化学生物絮凝处理工艺污泥样品与 A/O 脱氮工艺活性污泥样品、传统处理工艺曝气池活性污泥样品相比较，样品中微生物种群的多样性都相当丰富，但是种群结构差异很大。化学生物絮凝处理工艺中细菌的数量可能少于其他工艺，但其微生物种类最为丰富，与其它几种处理工艺比较，其微生物作用机理可能存在较大的差别。

(7) 通过对文献中提取总 DNA 的方法的比较分析，进行了适当的调整之后，得出了适用于化学生物絮凝及化学混凝污泥样品、悬浮填料床生物膜样品、活性污泥样品的总 DNA 提取方法。该方法采用小离心管提取样品总 DNA，可以在样品量较少的情况下，取得浓度及纯度较高的总 DNA，片段大小在 23kb 左右，提取得到的总 DNA 经适当稀释后，可以成功用于 PCR 扩增，并且该方法快速、简单、不需要专门的设备和特殊的纯化过程。

8.2 讨论和建议

在环境科学、环境工程领域涉及的样品通常成分极为复杂，微生物多样性也极为丰富，因而对这些样品的微生物分析比较困难。传统的微生物学研究手段，由于方法本身的局限性和很多微生物的不可培养性的限制，无法完整而准确反映出样品的微生物体系。近年来，利用 PCR-DGGE 分子生物学技术进行环境样品的微生物种群结构、多样性分析以及菌种鉴定，成为目前该领域研究的热点，同时这也发展成为一种结果准确、完全可行的研究方法。

本研究通过使用特异性引物套式 PCR，结合 DGGE 的方法，给出了一个化学生物絮凝反应池活性污泥细菌种群结构的轮廓。群落指纹图谱和统计工具的结

形菌纲等，但其中对悬浮填料床氨氮的去除起着重要作用的是大量的氨氧化细菌。由于悬浮填料床结合了活性污泥法和生物膜法处理污水的特点，提供了适合世代周期长的硝化细菌栖息的场所，因而悬浮填料床内的氨氧化细菌能够在系统发生变化时维持较为稳定的微生物种群结构，使得悬浮填料床能够抗击冲击负荷，稳定高效地去除氨氮。

(5) 取自 A/O 脱氮一体化反应池缺氧、好氧、厌氧三个工作部分的污泥样品分析显示，这三个部分的微生物种群结构差异较小；取自不同季节曝气池活性污泥的曲阳污水厂的三个样品显示在不同季节时，微生物种群结构受温度影响变化较小，说明活性污泥能够不受外界影响而保持较为稳定的结构。

(6) 化学生物絮凝处理工艺污泥样品与 A/O 脱氮工艺活性污泥样品、传统处理工艺曝气池活性污泥样品相比较，样品中微生物种群的多样性都相当丰富，但是种群结构差异很大。化学生物絮凝处理工艺中细菌的数量可能少于其他工艺，但其微生物种类最为丰富，与其它几种处理工艺比较，其微生物作用机理可能存在较大的差别。

(7) 通过对文献中提取总 DNA 的方法的比较分析，进行了适当的调整之后，得出了适用于化学生物絮凝及化学混凝污泥样品、悬浮填料床生物膜样品、活性污泥样品的总 DNA 提取方法。该方法采用小离心管提取样品总 DNA，可以在样品量较少的情况下，取得浓度及纯度较高的总 DNA，片段大小在 23kb 左右，提取得到的总 DNA 经适当稀释后，可以成功用于 PCR 扩增，并且该方法快速、简单、不需要专门的设备和特殊的纯化过程。

8.2 讨论和建议

在环境科学、环境工程领域涉及的样品通常成分极为复杂，微生物多样性也极为丰富，因而对这些样品的微生物分析比较困难。传统的微生物学研究手段，由于方法本身的局限性和很多微生物的不可培养性的限制，无法完整而准确反映出样品的微生物体系。近年来，利用 PCR-DGGE 分子生物学技术进行环境样品的微生物种群结构、多样性分析以及菌种鉴定，成为目前该领域研究的热点，同时这也发展成为一种结果准确、完全可行的研究方法。

本研究通过使用特异性引物套式 PCR，结合 DGGE 的方法，给出了一个化学生物絮凝反应池活性污泥细菌种群结构的轮廓。群落指纹图谱和统计工具的结

合使用可以让人清楚地知道不同活性污泥的微生物关系。对活性污泥微生态的更深入了解可以使处理工艺的控制得到改善。化学生物絮凝污水处理工艺与传统的活性污泥法相比较,由于添加了具有絮凝作用的化学药剂,活性污泥系统中微生物种群的变化必然存在,但在其活性污泥样品内同样含有极为复杂的微生物种群,仅仅根据进水类型将其分为四类细菌进行分析仍旧显得太过简单。在今后的研究中,以增加特定组的细菌数目为目的的引物设计可以使人们看到更完整的细菌种群结构。以特定 16S rRNA 引物进行的 DGGE 不仅可以比较不同的微生物种群,而且可以用于实时监测微生物种群的功能。

在本研究中,仅对 DGGE 图谱和 DNA 测序结果进行了极为简单的条带分析和生物统计分析,这远远不能满足复杂的活性污泥样品微生物种群分析的需要,因而,建议在今后的研究中,采用一些生物信息学、统计学软件进行分析,这有助于更全面系统地了解微生物种群的结构。

DGGE 方法同样存在着很多不可逾越的缺点。由于 rRNA 操纵子的多样性和异相性,一种微生物可以产生不止一条的 DGGE 条带,另一方面部分 16S rDNA 序列并非总是能够达到种群的区分,比如一个 DGGE 条带可能会代表了几种不同的 16S rDNA 序列,另外,在浓度不同的模板 DNA 的混合液中,数量少的序列常常扩增不充分,在 DGGE 图谱中就看不到相应的条带。因此,DGGE 图谱中条带的数目和密度并非十分准确地表达了微生物群落中相应种群的数目和丰度,DGGE 图谱中的条带仅仅反映了微生物群落中最为丰富的类型。在今后的研究中,序列信息的发展,引物设计的改进会使 PCR-DGGE 方法发展得更为准确。

目前的研究中,PCR-DGGE 技术还主要用于理论分析,如何将这一分析技术用于指导工程实践,将会是今后一个主要的研究方向。将 PCR-DGGE 方法与常规培养分离技术结合,同时结合分子生物学的定量分析(FISH 或实时 PCR)、原核表达等技术,将会是今后获取活性污泥微生物种群分析的更有力的工具。

参考文献

- [1] 吴志平, 夏四清, 扬殿海, 高廷耀. 化学生物絮凝工艺处理城市污水比较研究. 重庆环境科学, 2003, 25(7): 12-14
- [2] 张智, 邱维, 张国庆. 城市污水强化一级处理技术及发展趋势. 重庆环境科学, 2001, 23(1): 46-49
- [3] Timothy M. LaPara. et al. Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE. *Water Research*. 2002, 36, 638-646
- [4] K. Watanabe. et al. Molecular detection, isolation and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Envir. Microbiol.* 1998, 64, 4396-4402
- [5] Susanne Logemann. et al. Molecular microbial diversity in a nitrifying reactor system without sludge retention. *FEMS Micro. Ecology*. 1998, 27, 239-249
- [6] 李志岗, 贺冰等. 污水处理池环境细菌遗传多样性分析. 山西农业大学学报. 2001, 7, 16-19
- [7] 谢冰, 姜京顺. 铜离子冲击下活性污泥微生物多样性的分子生态学分析. 环境科学学报. 2002, 22 (6): 721-725
- [8] Hemant J. Purohit. et al. A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. *J. of Microbiol. Methods*. 2003, 52, 315-323
- [9] 高平平, 赵立平. 可用于微生物群落分子生态研究的活性污泥总DNA提取方法研究. 生态学报. 2002, 22 (11): 2015-2019
- [10] Gilliane K. et al. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Micro. Ecology*. 2000, 32, 77-85
- [11] Asim K. Bej. et al. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl. Envir. Microbiol.* 1991, 57, 3529-3534

- [12] Bourrain. et al. DNA extraction from activated sludge. *Current Microbiology*. 1999, 38(6): 315-319
- [13] J.萨姆布鲁克等. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学技术出版社. 1996, 246-300, 919-929
- [14] J.M.沃克等. 分子生物学与生物技术. 化学工业出版社. 2003, 45-68
- [15] 张彤, 方汉平. 微生物分子生态技术: 16S rRNA/DNA方法. *微生物学通报*. 2003, 30 (2): 97-101
- [16] Øveas L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Envir. Microbiol.* 1997, 63, 3367-3373
- [17] Heuer H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16SrRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Envir. Microbiol.* 1997, 63, 3233-3241
- [18] Barns,S.M. et al. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. *Appl. Envir. Microbiol.* 1999, 65, 1731-1737
- [19] Kowalchuk. et al. Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe Hybridisation. *FEMS Micro. Ecology.* 1998, 27, 339-350
- [20] Gomes, N.C.M. et al. Bacterial diversity of the rhizosphereof maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil.* 2001, 232, 167-180.
- [21] Michael Wagner. et al. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Envir. Microbiol.* 1993, 57, 1520-1525
- [22] E. Chung. et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in municipal water samples by the polymerase chain reaction. *J. of Microbiol. Methods.* 1998, 33, 171-180
- [23] Henckel, T. et al. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial

- community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 1980-1990
- [24] Carl R. Woese. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews.* 1987, 6, 221-271
- [25] P. Hugenholtz, B.M. Goebel, N.R. Pace. Minireview: Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology.* 1998, 4765-4774
- [26] 阮继生, 刘志恒等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社, 1990, 1-4
- [27] 刘志恒等. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002, 71, 142-143, 129
- [28] 尤作亮等. 城市污水强化一级处理的研究进展. *中国给水排水.* 1998, 14 (5): 28-30
- [29] 朱宝霞, 李久义等. 城市污水混凝强化一级处理的机理探讨. *给水排水.* 2001, 27 (7): 10-14
- [30] 张忠祥, 钱易等. 废水生物处理新技术. 北京: 清华大学出版社, 2004
- [31] Lefebvre E, Legube B. Coagulation-flocculation by ferric chloride of some organic compounds in aqueous solution. *Wat. Sci. Tech.* 1993, 27(11): 433-446
- [32] 周世辉, 师邵琪, 蒋展鹏等. 城市废水强化一级处理中絮凝剂的选择研究. *给水排水.* 1999, 25 (11): 14-16
- [33] 郑兴灿, 张悦, 陈立. 化学-生物联合絮凝的污水强化一级处理工艺. *中国给水排水.* 2000, 16 (7): 29-32
- [34] 夏四清, 吴志平, 杨殿海等. 上海城市污水化学生物絮凝处理的试验. *同济大学学报.* 2003, 31 (9): 1098-1101
- [35] 夏四清, 王学江, 高廷耀等. 悬浮填料浮动床石化废水处理初步研究. *环境科学.* 2000, 21 (2): 91-93
- [36] M. X. Loukidou, A. I. Zoubulis. Comparison of biological treatment process using attached-growth biomass for sanitary landfill leachate treatment. *Environmental Pollution.* 2001, 111: 273-281
- [37] 夏四清, 杨殿海, 高廷耀等. 城市污水强化一级处理工艺中的生物作用. *中国给水排水.* 2003, 19 (2): 61-63

- [38] 陈灏, 唐小树, 林洁等. 不经培养的农田土壤微生物种群构成及系统分类的初步研究. 微生物学报. 2002, 42 (4) : 478-483
- [39] Y L Tsai and B H Olson . Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Envir. Microbiol. 1991, 57, 1070-1074
- [40] Muyzer, G. etc. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 1993, 59, 695-700
- [41] G W考克斯 (蒋有绪译). 普通生态学实验手册. 北京: 科学出版社, 1979,120-124
- [42] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbio Rev*, 1995, 59: 143~169
- [43] Phillips, C.J. et al. Effects of agronomic treatments on structure and function of ammonia oxidizing communities. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66, 5410-5418
- [44] Suzuki, M. et al. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 1996, 62, 625-630.
- [45] Nubel, U. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. J. Bacteriol. 1996, 178, 5636-5643
- [46] Rainey, F.A. et al. *Clostridium paradoxum* DSM 7308(T) contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. Microbiology. 1996, 142, 2087-2095
- [47] Cilia, V. et al. Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. Mol.Biol.Evol. 1996, 13, 451-461
- [48] Vallaeys, T. et al. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. FEMS Micro. Ecology. 1997, 24, 279-285

- [49] Eichner, C.A. et al. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 102-109
- [50] Mudaly, D.D. et al. 16S rRNA in situ probing for the determination of the family level community structure implicated in enhanced biological nutrient removal. *Wat. Sci. Technol.* 2001, 43, 91-98
- [51] LaPara, T.M. et al. Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 3951-3959
- [52] Neef, A. et al. Detection of sphingomonads and in situ identification in activated sludge using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 23, 261-267
- [53] Nielsen, J.L. et al. In situ detection of cell surface hydrophobicity of probe-defined bacteria in activated sludge. *Wat. Sci. Technol.* 2001, 43, 97-103.
- [54] C.P.Leslie Grady, Jr.等. 废水生物处理(第二版). 北京:化学工业出版社. 2003, 14-18
- [55] Eikelboom D.H. Filamentous organisms observed in bulking activated sludge. *Water Research.* 1975, 9, 365-388
- [56] Sievert, S.M. et al. Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 3102-3109
- [57] Ludwig, W. et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, 153, 181-190
- [58] Radajewski, S. et al. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403, 2000, 646-649
- [59] Ballinger, S.J. et al. Molecular microbial ecology of nitrification in an activated sludge process treating refinery wastewater. *Wat. Sci. Technol.* 1998, 37, 105-108
- [60] 吴志平. 化学生物絮凝-悬浮填料床组合工艺优化研究. 2003, 82

- [61] 郭茜, 刘军, 王觉福. 上海城市污水处理现状. 中国给水排水. 1999,15 (2):
25-26

致 谢

本研究是在导师赵建人的精心指导下完成的。导师渊博的知识、丰富的经验和忘我的工作作风是我为学永远努力目标；导师治学严谨、为学谦虚、胸怀宽广和勇于开拓创新的精神将是我为人永远的楷模。值此论文完成之际，向导师表示衷心的感谢和崇高的敬意。

感谢夏四清教授给予的大力支持。在研究的选题，试验条件的建立和试验方案的确立上始终得到了夏老师全力的支持和帮助，感谢您不断的鼓励，在此表示诚挚的谢意。

在研究过程中，得到了副导师傅以钢老师的悉心帮助。在本课题的各个阶段，傅老师都倾注了大量的心血。在具体的试验安排、试验技能和试验分析中，均给予了耐心、详尽的指导。使作者能够在短时间内掌握研究所需的基本知识和技能，为试验的顺利完成提供了极其重要的保证。

感谢课题组的陈玲教授、仇雁翎讲师在本科及硕士学习期间给与的诸多指导和帮助。

本研究的部分成果是与饶应福、张志斌博士及姜剑等同学共同取得的，他们在工艺研究上对作者的支持为本研究的顺利进行提供了重要的保证，感谢他们提供的各项工艺数据。

本研究进行的过程中，生物教研室的王士芬、乐毅全、方萍等老师提供了诸多的方便和很多有益的建议，在此深表感谢。感谢师兄王峰在实验过程中提供的诸多帮助。

感谢我的父母和家人，你们多年来的理解和支持使我顺利完成求学生涯。感谢男友程炜几年来无私的帮助和奉献，你无微不至的关心爱护和鼓励永远是我前进的动力。

史 妍

2005年2月

个人简历 在读期间发表的学术论文与研究成果

个人简历:

史妍, 女, 1980年10月生。

2002年7月毕业于同济大学 环境科学与工程学院环境工程专业 获学士学位。

2002年9月入同济大学读硕士研究生。

已发表论文:

[1] 史妍, 傅以钢, 赵建夫. 16s rDNA 鉴定技术在污泥微生物种群分析中的应用.

第九届海峡两岸环境保护学术研讨会论文集, 2004, 1644-1647

[2] 夏四清, 史妍, 王峰, 傅以钢, 赵建夫. 化学生物絮凝与化学混凝污水处理

工艺的微生物种群结构比较分析. 第一届污染控制与资源化全国学术会议论文集, 2004

待发表论文:

[1] 史妍, 傅以钢, 夏四清. 化学生物絮凝污水处理工艺微生物群落结构初步分析. 应用与环境生物学报 (已接收)