

A + OSA 污泥减量工艺的微生物生态特性

贾丽 郭劲松* 高旭 范莹 翟小敏

(重庆大学城市建设与环境工程学院, 重庆 400045)

摘要 采用 16S rDNA 序列与 PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) 分析技术相结合的方法,研究了 A + OSA (the anoxic + oxic-settling-anaerobic) 污泥减量工艺在不同工况下的减量效果及其微生物生态特性。结果显示,在自然条件下,A + OSA 工艺可有效减少剩余污泥 27% 左右。分子生物研究表明,解耦联池的插入可以明显改变系统微生物的群落结构,且随着解耦联池水力停留时间的延长,系统中部分微生物被“淘洗”,微生物丰富度和多样性指数均有所降低。相似性分析表明,参照系统和 A + OSA 工艺分属于 2 个不同的集群,但在 A + OSA 工艺内部各反应池样品间具有较高的相似性,且各反应池在 HRT 为 5.16 h 和 7.14 h 时,表现为显著相似。通过上述研究可为该工艺优化及调控提供理论指导。

关键词 OSA 工艺 剩余污泥减量 微生物群落结构 PCR-DGGE

中图分类号 X703 **文献标识码** A **文章编号** 1673-9108(2012)06-2049-06

Microecology of an anoxic + oxic-settling-anaerobic sludge reduction process

Jia Li Guo Jingsong Gao Xu Fan Ying Zhai Xiaomin

(Faculty of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

Abstract The microbial community structure and biodiversity in an anoxic + oxic-settling-anaerobic (A + OSA) process were studied by polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) based on 16S rDNA sequence. The activated sludge samples were collected from different reaction tanks under operation conditions, and the minimization of excess sludge production of the A + OSA process was investigated. The experimental results demonstrated that the A + OSA process can reduce excess sludge by 27%. The DGGE profiles showed that the microbial communities were affected by the insertion of the uncoupling tank. Moreover, the richness index and the Shannon's index of diversity decreased with increasing the hydraulic retention time (HRT) in the uncoupling tank. The similarity analysis revealed that the samples from the reference belonged to one cluster and the samples from the A + OSA process belonged to the other. Additionally, the bacterial communities found in samples from the A + OSA operated under different conditions were statistically similar amongst themselves, especially for the samples at the HRT of 5.16 h and 7.14 h. This study will provide scientific guidance for process optimization and application.

Key words oxic-settling-anaerobic (OSA); sludge reduction; microbial community structure; PCR-DGGE

污水生物处理过程中产生大量的剩余污泥,其处理处置所需的费用可占整个污水处理厂投资和运行费用的 25% ~ 65%。随着经济的发展和人们环保意识的增强,城市污水处理量增加,处理效率提高,导致剩余污泥将成倍的增加。目前在世界范围内,剩余污泥已经成为限制城市污水处理厂的一个瓶颈^[1,2]。在过去的几十年里,国内外学者针对这一问题进行了大量研究^[3-6]。其中好氧-沉淀-缺氧(或厌氧)工艺(oxic-settling-anaerobic, OSA)具有减量效果明显、工艺简单、能耗低的优点,在实际工程

应用中具有广阔的前景。

微生物在好氧和缺氧(或厌氧)环境之间的转换可促使生物的解耦联代谢,基于该理论, Chudoba

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50508046);重庆大学研究生创新基金(CDJXS10210001)

收稿日期:2011-02-21; **修订日期:**2011-07-21

作者简介:贾丽(1980~),女,博士研究生,主要研究方向:废水生物处理理论与技术。E-mail: janetj@163.com

* 通讯联系人, E-mail: guo0768@cqu.edu.cn

等^[7]提出了 OSA 污泥减量工艺。其实质是在传统活性污泥工艺的污泥回流过程中增加一个厌氧反应器。随后基于该理论,学者研究了不同反应器的污泥减量效果,如 MBR^[8]、SBR^[9]、Cannibal 工艺^[10]等。到目前为止,由于国内外致力于 OSA 工艺的研究者不多,研究条件不同,对 OSA 工艺的运行参数、污泥产率、污水处理效果等的研究结果不尽一致。且对 OSA 工艺的研究,多是采用人为降低解耦联池 ORP 水平等强化措施的基础上获得明显的污泥减量效果。而这些强化措施无疑会增加能耗,还可能影响系统稳定运行。课题组前期研究表明^[11],解耦联池在不施加任何强化措施下,A + OSA 工艺可以有效地减少剩余污泥,且该工艺污泥减量是解耦联池污泥衰减与 AO 主体反应区污泥产生率变化共同作用的结果。从研究现状看,OSA 工艺的减量机理并未定论。有关 A + OSA 工艺减量机理仍需进一步探索。

剩余污泥绝大部分由微生物菌体组成,主要是在废水处理过程中产生,其特征是由生物处理工艺中微生物的种群结构及代谢特征决定的。因此,从微观分子生物学角度分析工艺条件对系统微生物特性的影响,以期揭示该工艺污泥减量机理,从而为该工艺优化控制及工程化提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验装置及运行条件

A + OSA 组合工艺与参比工艺(见图1)的主体采用一体化建设,其形式和大小相同。主体部分由缺氧区、好氧区和沉淀区3部分组成,其中,缺氧区水力停留时间为1.92 h,有效容积3.92 L,总容积为4 L;好氧区水力停留时间为5.76 h,有效容积11.75 L,总容积为12 L。在缺氧区内设置搅拌器,以保证污泥处于悬浮状态。好氧区底部设有曝气管和潜水泵,通过潜水泵的运行使好氧区的污水、污泥充分混合。A + OSA 组合工艺与参比工艺相比在污泥回流的过程中多出了解耦联池,其最大容积为25 L。实验中根据需要调节进水口位置从而调节有效容积,改变回流污泥在解耦联池的停留时间(HRT)。污泥在解耦联池中的停留时间分别为7.14、5.56和3 h。

2套装置的污水进水量均为34 mL/min,污泥回流比为100%,硝化液回流比为200%。主体反应区(即缺氧区和好氧区)MLSS控制在2 000~3 000

mg/L,缺氧区溶解氧控制在0.1~0.4 mg/L,好氧区溶解氧控制在2.5~3.5 mg/L。通过调节进入解耦联池的泥量,从而保证其厌氧的环境。

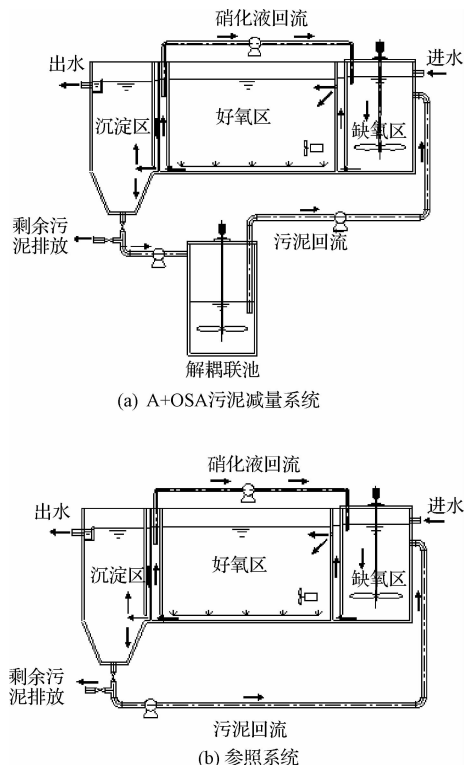


图1 A + OSA 污泥减量系统及参照系统

Fig. 1 A + OSA excess reduction system and the reference system

实验采用人工配水,进水水质分别为 COD 338~443 mg/L, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 49~58 mg/L, TN 48~62 mg/L, TP 8 mg/L。进水经过 A + OSA 组合工艺处理,出水水质可达到一级 B 标。

1.2 微生物群落结构分析

(1) 样品的准备及 DNA 提取

在减量系统排泥稳定、出水水质稳定后,继续维持运行一段时间,分别取不同工况下各个反应器的污泥,离心后 -20°C 保存。DNA 提取采用上海申能博彩环境样品 DNA 提取试剂盒,具体方法详见文献^[12]。

(2) PCR-DGGE 分析

总细菌的扩增采用 V3 区通用引物进行扩增^[13]。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖电泳检测。取上述 PCR 产物各 30 μL ,在 DcodeTM Universal Mutation Detection System (U. S. A, Bio-Rad Co.) 进行电泳分析。变性梯度胶配置为 8% (w/v) 聚丙烯酰胺(丙烯酰胺:双丙烯酰胺 = 37.5:1, w/w)。其中细菌的变性梯度范围为 30%

~55% (100% 的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺);运行条件为:在 $1 \times \text{TAE}$ 电泳缓冲液中,60℃ 条件下,200 V 运行 10 min,然后 100 V 运行 13 h,电泳完成后,用 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴化乙锭染色 20 min,再用去离子水漂洗 2 次,然后在 BIO-RAD Versa Doc IMAGING SYSTEM 系统内观察电泳结果并照相。

(3) 数据处理

使用 Quantity One-1-D 软件分析 DGGE 分离图像。因为 DGGE 分离条带的亮度与 DNA 含量呈正比,所以用每个条带的亮度值与该列所有条带平均亮度值的比值,计算微生物群落 Shannon 多样性指数(H)^[14],公式为 $H = - \sum P_i \lg P_i$;根据条带的存在与否,将 DGGE 凝胶图像转化为二维矩阵,随后采用 PAST 软件计算 Raup and Crick's 相似性指数^[15]。

表 1 A + OSA 工艺及其参照系统剩余污泥累积排放量及污泥减量效果

Table 1 Cumulative excess sludge and the sludge reduction of the A + OSA process and its reference

工况	累计天时间 (d)	参照系统		减量系统		剩余污泥 减少量(g/d)	剩余污泥 减量率(%)
		累计排泥量(g)	污泥产率(g/d)	累计排泥量(g)	污泥产率(g/d)		
HRT = 3 h	55	128.89	2.34	111.71	2.03	0.30	13
HRT = 5.16 h	56	174.28	3.11	127.96	2.29	0.84	27
HRT = 7.14 h	34	100.24	2.94	78.83	2.32	0.64	21

2.2 反应器的微生物的 DGGE 图谱

PCR-DGGE 技术在研究自然界微生物群落遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性,越来越广泛应用于微生物群落结构变化及微生物多样性方面的研究^[18]。根据 DGGE 原理,理论上迁移到同一位置的条带序列相同,那么不同的条带代表不同的物种。因此,在 DGGE 图谱中,条带越多,说明细菌种群越丰富;条带信号越强,表示该条带代表的相应细菌越多。

参照系统及减量系统在不同工况下样品 16S rDNA V3 区 PCR 产物的 DGGE 图谱如图 2 所示。其中,1、2 分别为参照系统的缺氧池和好氧池污泥样品;解耦联池 HRT 分别在 3、5.16 和 7.14 h 时,A + OSA 系统好氧池的污泥样品分别用 3、4、5 表示,缺氧池的样品分别表示为 6、7、8,解耦联的污泥样品则依次用 9、10、11 表示。

由图 2 可知,参照系统和减量系统中均存在丰富的微生物类群。同时也可以看出,与参照系统相比,A + OSA 污泥减量系统中微生物群落结构发生了很大的变化。DGGE 图谱显示:有些条带自始至

2 结果和分析

2.1 A + OSA 工艺污泥减量能力分析

在每个工况下两系统均运行至减量系统排泥稳定、出水水质稳定后,继续维持运行至少一个污泥龄。当减量系统污泥停留池水位达到要求且好氧区污泥浓度超 2 g/L 时,开始排出剩余污泥,并开始累计各反应器每次排出的剩余污泥量,结果见表 1。从表 1 可以看出,解耦联池的引入可以有效的减少剩余污泥产量,且解耦联池的 HRT 不同,A + OSA 工艺污泥减量效果亦不同。解耦联池的 HRT 是控制该工艺污泥减量效果的重要参数,最佳 HRT 为 5.16 h,可减少剩余污泥 27% 左右,低于文献报道的 40% ~ 58%^[7,16,17],这主要是由于本研究解耦联池未采取人工强化措施,ORP 水平较高,而较低的 ORP 有利于污泥的减量化^[16]。

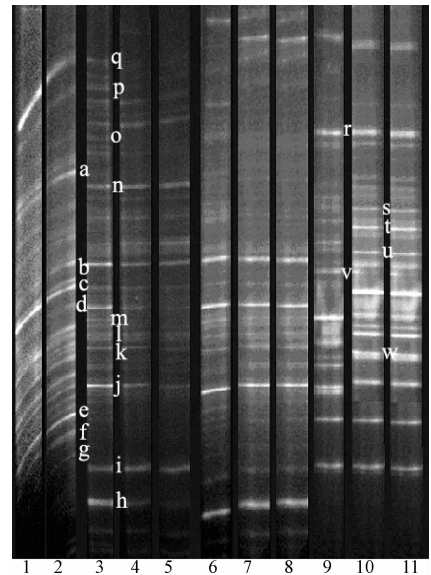


图 2 A + OSA 工艺及其参照系统 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profile of samples from the reference and the A + OSAs

终存在(如条带 b、c、d、k、l、m 等),说明这类群为系统的常驻菌群;在引入解耦联池后,有些条带消失

(如条带 a、e、f、g 等),说明该菌不能适应贫富交替的环境。

在 A + OSA 减量系统中,由于各反应池的环境条件不同,不同反应池微生物存在差异,其中解耦联池尤为明显,如条带 h、p 等消失,而条带 r、s、t、u、v、w 等出现并变为优势。这表现为微生物对环境条件的选择作用,和主体反应区相比,解耦联池细菌为厌氧菌或兼性菌。同时由于解耦联池 HRT 不同,各反应池微生物亦存在差异,其中 HRT 在 3 h 时差异明显,但解耦联池 HRT 对系统生态特性的影响还有待进一步研究。

2.3 不同样品微生物多样性分析

根据电泳图谱中每条条带的信息,各样品中的细菌 Shannon 多样性指数(H)、丰富度(S)等指标进行综合分析,结果见表 2。

不同样品的丰富度及多样性指数有所不同,解耦联池 HRT 越长,A + OSA 减量系统的微生物的丰富度及多样性指数越低。其中解耦联池在 HRT 为 3 h 丰富度及多样性指数最大,分别为 33、3.18,高于参照系统好氧池(30、3.104),但在 HRT 为 5.16 h 和 7.14 h 时,丰富度和多样性指数均低于参照系统。A + OSA 污泥减量系统缺氧区表现为相同的趋势。这可能是因为:解耦联池污泥衰减回流到主体反应区,增加了减量系统主体反应区底物的多样性,使得微生物多样性增加;但和参照系统相比,解耦联池的引入使得 A + OSA 工艺泥龄较长,而泥龄对系统内微生物有重要的影响作用,如果微生物在反应器中被排除的速度大于其生长的速度,那么它在反应器中将被淘汰。

在 A + OSA 减量系统中,好氧池多样性丰富度指数及多样性指数最高,缺氧池次之,解耦联池最低。这是由于解耦联池为厌氧状态,污泥浓度高,底物贫乏,微生物处于饥饿状态,不能适应该环境的微生物逐步被“淘洗”,微生物群落结构变得简单。

表 2 A + OSA 工艺及其参照系统污泥样品多样性指数(H)及丰富度指数(R)及丰富度

Fig. 2 Shannon index (H) and the richness (R) of samples from A + OSA process and its reference

工况条件	好氧池		缺氧池		解耦联池	
	S	H	S	H	S	H
A + OSA						
HRT = 3 h	33	3.184	31	2.966	31	3.011
减量						
HRT = 5.56 h	28	3.079	28	2.987	27	2.968
系统						
HRT = 7.14 h	26	3.029	27	2.986	26	2.965
参照系统						
好氧池	30	3.104	29	3.008	—	—

2.4 不同样品间的相似性分析

通过计算群落相似性系数可以得到群落之间细菌种类差异的信息。DGGE 图谱用基于概率的 Raup and Crick 相似性指数(S_R)分析,它可以比较参照系统和减量系统群落结构是否显著相似或不同。其中, $S_R < 0.05$ 表示差异显著, $S_R > 0.95$ 表示显著相似, $0.05 < S_R < 0.95$ 表示不大于期望值。DGGE 图谱各样品之间的相似性指数的聚类结果,如图 3 所示。

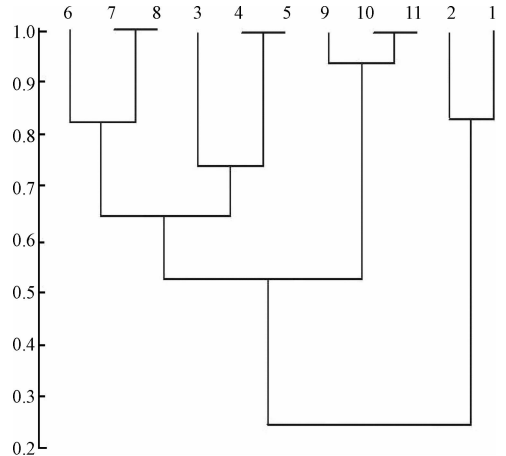


图 3 A + OSA 工艺及其参照系统污泥样品的聚类分析

Fig. 3 Clustering analysis of samples from A + OSA process and its reference

参照系统与减量系统样品间的差异性较大,分属于两个不同的集群。这主要是由于解耦联池是厌氧的环境,不能适应好氧/厌氧交替的微生物被“淘洗”,在 A + OSA 减量工艺内部形成稳定的适应其环境的微生物群落。参照系统不同反应池间相似度更高,A + OSA 减量工艺亦是如此,这主要是由于在连续流工艺中污泥在各个反应器中交替运行,使得很多微生物适应缺氧、厌氧、好氧的微环境,能在不同反应池中共存,主要微生物群落基本不变。与工况为 HRT = 3 h 相比,减量工艺各反应池在解耦联

池 HRT 为 5.16 h、7.14 h 时,表现为显著相似。这可能是由于解耦联池在 HRT 为 3 h,污泥衰减的微生物并未大量增殖。

3 讨 论

目前,大家普遍已经认可 OSA 工艺的污泥减量效能,但工艺污泥减量的机理并未定论。国外对其机理已有较为系统的研究,但是存在很多不同的观点。最早,Chudoba 等^[7]提出能量解耦联是 OSA 工艺污泥减量的原因。而后等 Chen 等^[8]否认了能量解耦联及慢速生长微生物在 OSA 工艺中的作用,同时指出污泥衰减是其主要的原因。近年来,Novak 等^[10]提出胞外聚合物金属络合物离解理论。王建芳等^[17]研究认为由于微生物维持代谢、内源代谢增加引起的污泥衰减和慢速生长微生物是 OSA 工艺污泥减量的主要原因,其中大约 2/3 的污泥减量是由污泥衰减引起的,慢速生长微生物对 OSA 工艺污泥减量的贡献为 23% 左右;10% 左右污泥减量是由能量解耦联机制引起的。OSA 工艺形式多变,每一种形式随运行条件不同,其机理也可能不同;不同情况下,OSA 污泥减量化的产生可能是多种机理共同作用的结果。从本研究看,在 HRT 为 3 h 时,主体反应区低污泥产率及污泥衰减是其减量的原因。这种污泥低产率可能是由于能量解耦联造成的。解耦联池 HRT 的越长,污泥衰减作用越明显,主体反应区能量解耦联作用弱化,而有机负荷增加或许是主体反应区污泥产率增加的首要原因。

从理论上讲,工艺条件的改变将影响反应器优势种群的更替。Chen 等^[20]通过 DAPI 和 CTC 染色技术发现,OSA 系统中单位 MLSS 的总细菌数比照系统多约 40% ~ 50%。但是参照系统活性细菌的数量却是 OSA 系统的 4 倍。王建芳等^[17]指出 OSA 工艺微生物种群多样性比 CAS 工艺更加丰富,增加有机负荷和废水水质复杂化都会使微生物种群多样性增加,但优势微生物群落基本不受影响。从本研究来看,解耦联池的引入可以改变微生物群落结构特征,但是有机负荷增加,微生物种群多样性反而降低。这是由于王建芳等^[17]研究中有有机负荷是通过提高改变进水条件实现的,而本文中解耦联池的污泥衰减回流至主体反应区是造成有机负荷改变的原因。

尽管 DGGE 指纹图谱能够直观反映参照系统及污泥减量系统微生物群落结构的变化,但并不

能直接说明其种类组成,需要对 DGGE 条带进行切胶回收测序。在此基础上,分析这些优势菌群在 A + OSA 减量工艺中的功能和作用及其代谢特性,以便为该工艺应用于实践提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Murray A., Horvath A., Nelson K. L. Hybrid life-cycle environmental and cost inventory of sewage sludge treatment and end-use scenarios: A case study from China. *Environ. Sci. Technol.*, **2008**,42(9):3163-3169
- [2] Di Iaconi C., De Sanctis M., Rossetti S., et al. SBBGR technology for minimizing excess sludge production in biological processes. *Water Res.*, **2010**,44(6):1825-1832
- [3] Yasui H., Nakamura K., Sakuma S., et al. A full-scale operation of a novel activated sludge process without excess sludge production. *Water Sci. Technol.*, **1996**, 34(3-4): 395-404
- [4] Ahn K. H., Park K. Y., Maeng S. K., et al. Ozonation of wastewater sludge for reduction and recycling. *Water Sci. Technol.*, **2002**,46(10):71-77
- [5] Wei Y. S., van Houten R. T., Borger A. R., et al. Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment. *Water Res.*, **2003**,37(18):4453-4467
- [6] Kwon Y. T., Lee C. W., Yun H. Development of vermicast from sludge and powdered oyster shell. *J. Clean Prod.*, **2009**,17(7):708-711
- [7] Chudoba P., Chudoba J., Capdeville B. The aspect of energetic uncoupling of microbial growth in the activated sludge process: OSA system. *Water Sci. Technol.*, **1992**, 26(9-11):2477-2480
- [8] Chen G. H., An K. J., Saby S., et al. Possible cause of excess sludge reduction in anoxic-settling-anaerobic activated sludge process (OSA process). *Water Res.*, **2003**,37(16):3855-3866
- [9] Datta T., Liu Y. J., Goel R. Evaluation of simultaneous nutrient removal and sludge reduction using laboratory scale sequencing batch reactors. *Chemosphere*, **2009**,76(5): 697-705
- [10] Novak J. T., Chon D. H., Curtis B. A., et al. Biological solids reduction using Cannibal process. *Water Environ. Res.*, **2007**,79(12):2380-2386
- [11] 高旭, 卢艳华, 郭劲松. A + OSA 活性污泥工艺剩余污泥减量特性研究. *环境科学*, **2009**,30(5):1475-1480
Gao Xu, Lu Yanhua, Guo Jingsong. Characterization of excess sludge reduction in anoxic-oxic-settling-anaerobic activated sludge process. *Environmental Science*, **2009**,30(5):1475-1480 (in Chinese)

- [12] 秦宇,郭劲松,方芳,等. 溶解氧及曝停比对单级自养脱氮系统微生物群落结构的影响. 环境科学, **2009**, 30(2):493-498
Qin Yu, Guo Jingsong, Fang Fang, et al. Effect of DO and aeration/non-aeration ratio on the microbial community structure in one-step SBBR completely autotrophic nitrogen removal process. *Environmental Science*, **2009**, 30(2):493-498 (in Chinese)
- [13] Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1993**, 59(3):695-700
- [14] Vivas A., Moreno B., Garcia-Rodriguez S., et al. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresour. Technol.*, **2009**, 100(3):1319-1326
- [15] Rowan A. K., Snape J. R., Fearnside D., et al. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *Fems. Microbiol. Ecol.*, **2003**, 43(2):195-206
- [16] Saby S., Djafer M., Chen G. H. Effect of low ORP in anoxic sludge zone on excess sludge production in oxic-settling-anoxic activated sludge process. *Water Res.*, **2003**, 37(1):11-20
- [17] 王建芳,金文标,赵庆良,等. 好氧-沉淀-厌氧工艺处理效能及抗冲击负荷研究. 环境科学, **2007**, 28(11):2488-2493
Wang Jianfang, Jin Wenbiao, Zhao Qingliang, et al. Performance of treating wastewater and anti-shockloading in oxic-settling-anoxic (OSA) process for minimization of excess sludge. *Environmental Science*, **2007**, 28(11):2488-2493 (in Chinese)
- [18] Dar S. A., Kuenen J. G., Muyzer G. Nested PCR-denaturing gradient del electro-phoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, 71(5):2325-2330
- [19] 金文标,王建芳,赵庆良,等. 好氧-沉淀-厌氧工艺剩余污泥减量性能和机理研究. 环境科学, **2008**, 29(3):726-732
Jin Wenbiao, Wang Jianfang, Zhao Qingliang, et al. Performance and mechanism of excess sludge reduction in an OSA (oxic-settling-anaerobic) process. *Environmental Science*, **2008**, 29(3):102-107 (in Chinese)
- [20] Chen G. H., Saby S., Djafer M., et al. New approaches to minimize excess sludge in activated sludge systems. *Water Sci. Technol.*, **2001**, 44(10):203-208