

乔琳, 王建龙. 2012. 利用 T-RFLP 解析生物强化去除吡啶过程中微生物种群动态变化[J]. 环境科学学报, 32(5): 1025-1032

Qiao L, Wang J L. 2012. The analyses of microbial community dynamics by T-RFLP during the bioaugmented removal of pyridine in SBR[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 32(5): 1025-1032

# 利用 T-RFLP 解析生物强化去除吡啶过程中微生物种群动态变化

乔琳<sup>1, 2</sup>, 王建龙<sup>1, \*</sup>

1. 清华大学核能与新能源技术研究院, 北京 100084

2. 北京未名凯拓农业生物技术有限公司, 北京 100085

收稿日期: 2011-08-13

修回日期: 2011-11-11

录用日期: 2011-11-17

**摘要:** 在接种活性污泥处理含吡啶废水的序批式反应器中, 引入吡啶降解菌 *Paracoccus* sp. KT-5 构成生物强化反应器, 研究了对吡啶的生物强化去除特性及效果, 利用末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 手段解析了微生物种群结构的动态变化. 结果表明, 投加高效降解菌株 KT-5 可以加速反应器的启动, 但随着反应器的运行, 当吡啶初始浓度增加至  $195.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以后, 生物强化反应器对吡啶降解的促进作用已不再明显; 当吡啶初始浓度在  $293.4 \sim 586.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  变化时, 起初强化反应器对吡啶的去除速率出现了波动, 尽管随后逐渐恢复, 但仍然没有表现出明显的强化作用. T-RFLP 的分析结果表明, 当吡啶初始浓度达到  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以后, 生物强化反应器中已检测不到 KT-5, 表明生物强化作用的消失可能是因为引入的高效降解菌株 KT-5 的流失造成的.

**关键词:** 吡啶; 生物降解; 生物强化; 序批式反应器; 活性污泥; T-RFLP

文章编号: 0253-2468(2012)05-1025-08

中图分类号: X703

文献标识码: A

## The analyses of microbial community dynamics by T-RFLP during the bioaugmented removal of pyridine in SBR

QIAO Lin<sup>1, 2</sup>, WANG Jianlong<sup>1, \*</sup>

1. Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084

2. Beijing Weimingkaituo Agriculture Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100085

Received 13 August 2011;

received in revised form 11 November 2011;

accepted 17 November 2011

**Abstract:** A bioaugmented reactor was developed through the introduction of *Paracoccus* sp. KT-5 into a sequencing batch reactor inoculated with activated sludge to treat pyridine-containing wastewater. The microbial community dynamics were analyzed by terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) to evaluate the bioaugmentation effect. The results showed that the introduced strain KT-5 could accelerate the start-up of the SBR, in comparison with the non-bioaugmented one. However, the enhancing effect of bioaugmentation on pyridine degradation was not significant when the initial pyridine concentration increased to  $195.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Moreover, the removal rate of pyridine was fluctuated when the initial pyridine concentration varied in the range of  $293.4 \sim 586.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The analyses of T-RFLP showed that the introduced *Paracoccus* sp. KT-5 did not exist in the bioaugmented reactor when the initial pyridine concentration reached  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , indicating that wash-out of strain KT-5 was probably responsible for the failure of bioaugmentation.

**Keywords:** pyridine; biodegradation; bioaugmentation; sequencing batch reactor; activated sludge; T-RFLP

### 1 引言 (Introduction)

吡啶及其衍生物是一类重要的含氮杂环芳烃

化合物. 吡啶作为工业溶剂和许多工业产品的生产原材料, 广泛应用于化工、染料、除草剂、杀虫剂和药物的生产. 大量的吡啶会随着工业废水 (主要为

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (No. 2006AA06Z336, 2007AA021303)

Supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (No. 2006AA06Z336, 2007AA021303)

作者简介: 乔琳 (1980—), 男, 博士研究生, E-mail: l-qiao07@mails.tsinghua.edu.cn; \* 通讯作者 (责任作者), E-mail: wangjl@tsinghua.edu.cn

**Biography:** QIAO Lin (1980—), male, Ph. D. candidate, E-mail: l-qiao07@mails.tsinghua.edu.cn; \* **Corresponding author**, E-mail: wangjl@tsinghua.edu.cn

焦化废水和农药废水)被排放到环境中,导致严重的污染问题。吡啶类污染物具有毒性和潜在的致癌性,严重危害生态环境和人类健康,因此含吡啶的工业废水必须经过有效处理后才能排放(Padoley *et al.*, 2006; Qiao *et al.*, 2010)。

目前用于处理废水中吡啶的技术主要包括物理化学法和生物法。其中,物理化学法包括光催化法(Zhao *et al.*, 2004; 王玉栋等, 2004)、利用各种材料作为吸附剂的吸附法(Ocampo-Perez *et al.*, 2010; Lataye *et al.*, 2008; Mohan *et al.*, 2004; Ardizzone *et al.*, 1998; Bludau *et al.*, 1998), 臭氧氧化法(Andreozzi *et al.*, 1991)和超声波法(张良波和魏新利, 2009)。这些方法虽然能够有效地去除水溶液中的吡啶,但是它们也有一些无法克服的缺点,包括使用高成本的化学试剂,需要先进的处理装置以及反应不完全造成的二次污染。生物法因具有处理成本低,没有二次污染等优势而成为最具吸引力的方法。国内外学者分离出一系列降解吡啶及其衍生物的微生物,例如, *Micrococcus luteus* (Sims *et al.*, 1986), *Arthrobacter crystallopoietes* (Zefirov *et al.*, 1994), *Rhodococcus opacus* (Zefirov *et al.*, 1994), *Arthrobacter* sp. R1 (O' Loughlin *et al.*, 1999), *Gordonia nitida* LE31 (Lee *et al.*, 2001), *Pseudonocardia* sp. M43 (Lee *et al.*, 2006), *Pseudomonas putida* MK1 (Kim *et al.*, 2006), *Pleurotus ostreatus* (Ren *et al.*, 2006), *Bacillus sphaericus* (Mathru *et al.*, 2008), *Shewanella putrefaciens* (Mathru *et al.*, 2008), *Thiobacillus intermediu* 4-11 (Wang *et al.*, 2008), *Flexibacter giganteus* 2-13 (Wang *et al.*, 2008), *Paracoccus* sp. BW001 (Bai *et al.*, 2008), *Shinella zoogloeoides* BC026 (Sun *et al.*, 2008), *Rhodocyclus Gelatinosus* (Song *et al.*, 2008), *Gordonia terrea* IIPN1 (Stobdan *et al.*, 2008) 和 *Streptomyces* sp. HJ02 (Li *et al.*, 2009)。

分离并研究吡啶降解菌的目的是为了将其用于实际废水处理构筑物中,用于强化对废水中高浓度吡啶的去除,增强对冲击负荷的抵抗能力,加速系统的启动过程等(徐军祥等, 2007)。生物强化技术就是向废水处理系统中投加从自然界中筛选的优势菌或通过基因工程技术产生的遗传工程菌种,以加速去除某一种或某一类有害物质的方法(Limbergen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002)。生物

强化技术已用于多种污染物的去除,例如, Wang 等(2002)利用一株喹啉降解菌 *Burkholderia pickettii* 生物强化焦化废水中喹啉的降解,结果表明生物强化对于增强工业废水中难降解化合物的去除是一个有效的策略。Boon 等(2003)将一株 3-氯苯胺降解菌 *Comamonas testosteroni* I2 gfp 接于活性污泥反应器中,发现强化菌株的投加有效地保护了反应器中的硝化细菌,加速了反应器对 3-氯苯胺负荷波动的恢复。Quan 等(2004)为改进传统活性污泥反应器对 2,4-二氯酚的去除,将具有 2,4-二氯酚降解活性的混合培养物引入传统活性污泥反应器中进行生物强化,结果表明,生物强化作用减少了 2,4-二氯酚对污泥活性的抑制,增强了系统抵抗负荷波动的能力。王艳芬等(2008)将 4 株高效苯酚降解菌投加到序批式反应器中强化降解苯酚,结果表明,随着生物强化过程的进行,污泥的沉降性能发生改善,颗粒化趋势明显,活性污泥对苯酚的降解能力、降解速率及对苯酚耐受能力均明显提高。对于含吡啶废水的生物强化处理的报道不多, Bai 等(2009)将两株分别可以降解吡啶和喹啉的纯菌株混合后引入生活污水和工业废水处理系统,以强化去除其中的吡啶和喹啉,结果表明,实际废水中的吡啶和喹啉可以被有效降解。Lodha 等(2008)利用分离的混合培养物和纯菌株强化活性污泥对吡啶的降解,同样实现了成功的强化。

课题组从受吡啶长期污染的土壤中分离到一株吡啶降解菌 *Paracoccus* sp. KT-5, 通过研究该菌降解吡啶的特性证明菌株 KT-5 是一株高效吡啶降解菌,具有实际应用的潜力(Qiao *et al.*, 2010)。本研究在接种活性污泥处理含吡啶废水的序批式反应器中,引入吡啶降解菌 *Paracoccus* sp. KT-5 构成生物强化反应器,主要目的是利用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)手段解析微生物种群结构的动态变化,以评估引入的吡啶降解菌 *Paracoccus* sp. KT-5 对活性污泥处理含吡啶废水的强化作用,同时考察反应器中引入菌株 *Paracoccus* sp. KT-5 的流失情况。由于关于利用高效降解菌强化活性污泥去除吡啶的研究较少,故本文在这方面做一些探讨,为后续吡啶强化降解的研究提供一些参考。

## 2 材料与方法 (Materials and methods)

### 2.1 菌株来源

吡啶降解菌 *Paracoccus* sp. KT-5 分离自某农药

厂污水长期浸泡的土壤,该菌的吡啶降解特性参见文献 (Qiao *et al.*, 2010)。

## 2.2 活性污泥来源

实验所用活性污泥来自某市政污水处理厂活性污泥曝气池

## 2.3 培养基

保藏培养基:普通细菌 LB 培养基;胰蛋白胨  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 酵母提取物  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , NaCl  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH = 7.2。

富集培养基:普通细菌 LB 培养基,其中添加  $978 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  吡啶。

## 2.4 反应器的运行

序批式反应器的体积为 5 L,接种活性污泥,最终的生物量都为  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。加入 *Paracoccus* sp. KT-5 降解菌的反应器为强化反应器;不投加的反应器为对照反应器。两个反应器均在  $30^\circ\text{C}$  下运行。运行方式为进水 30 min,曝气 21 h,沉淀 30 min,排水 30 min。

由于考虑到所使用的活性污泥是用于处理市政生活污水的,所以可能先前未接触过吡啶,因而反应器启动时吡啶的浓度较低确定为  $97.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,共运行 7 个周期,每个周期为 21 h。此过程作为反应器的启动和活性污泥的驯化过程。随后开始进行降解吡啶实验,吡啶浓度从  $195.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  开始,逐渐增加至  $293.4, 391.2, 586.8, 782.4, 978, 1956, 2934, 5868 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为了确定每个吡啶浓度梯度的数值,实验过程中出水的吡啶浓度基本可以实时的获得,因而可以根据已完成处理的吡啶浓度的降解情况确定下一个运行投加的吡啶浓度。其中吡啶浓度在  $293.4 \sim 978 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内时,每个浓度下反应器运行 4 个周期,每个周期为 21 h;当吡啶浓度在  $1956 \sim 2934 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,每个浓度下反应器运行 4 个周期,每个周期为 44 h;当吡啶浓度达到  $5868 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,反应器运行 4 个周期,每个周期为 143 h。整个运行过程持续约 2 个月。

废水的组成成分如下:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $0.61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , KCl  $0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 自来水配制, pH 为 7.5。

## 2.5 吡啶分析方法

在一定时间间隔收集出水样品,经  $1000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心,取上清液使用紫外分光光度计 (HITACHI, U-2800, 日本)测定吡啶浓度,测定波长为  $254 \text{ nm}$ 。

## 2.6 末端限制性片段长度多态性 (T-RFLP) 分析

### (1) DNA 的提取

两个反应器中,在运行开始以及初始吡啶浓度分别为  $293.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}, 978 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}, 2934 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}, 5868 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时反应器运行的最后一个周期结束时,收集微生物样品,用于 DNA 的提取。使用 DNA 提取试剂盒 (3 SDNA Isolation Kit V2.1, 上海申能博彩生物科技有限公司) 提取 DNA,方法按厂商说明书进行。纯菌株 KT-5 的 DNA 使用 TIANamp 细菌 DNA 提取试剂盒 (北京天根生物技术有限公司) 提取,方法按厂商说明书进行。提取的 DNA 溶于 TE 溶液后于  $-20^\circ\text{C}$  保存。

### (2) 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增和纯化

采用通用引物扩增细菌 16S rDNA。正向引物为 63F ( $5' \text{ CAGGCCTAACACATGCAAGTC } 3'$ ), 反向引物为 1404R ( $5' \text{ GGGCGGWTGTACAAGGC } 3'$ ) (Marchesi *et al.*, 1998), 其中正向引物 5' 端用 6-羧基二乙酸荧光素 (FAM) 标记。引物由上海英骏生物技术有限公司北京实验室合成。

$50 \mu\text{L}$  的 PCR 扩增反应体系: DNA (约  $50 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ , 10 倍 PCR 缓冲液 (含有  $\text{Mg}^{2+}$ )  $5 \mu\text{L}$ , dNTP ( $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $4 \mu\text{L}$ , 正反向引物 ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各  $0.5 \mu\text{L}$ , TaqDNA 聚合酶 ( $2.5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $0.5 \mu\text{L}$  (北京全式金生物科技有限公司), 补水至  $50 \mu\text{L}$ 。反应条件:  $94^\circ\text{C}$  变性 5 min; 再接  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $58^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 35 个循环; 最后  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物用 PCR 纯化试剂盒 (琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 北京天根生物技术有限公司) 回收纯化,操作方法按照说明书进行。

### (3) T-RFLP 实验

纯化后的 PCR 产物用 *AluI* (promega, 美国) 消化,反应体系  $50 \mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温浴 3 h,  $65^\circ\text{C}$  失活 15 min。酶切产物通过柱纯化的方式脱盐后,与内标 GS500 Liz 混合,  $95^\circ\text{C}$  变性 5 min, 然后立刻置于冰上 3 min。处理后的样品在 DNA 测序仪 (ABI3730XL, 美国) 中进行毛细管电泳检测 (北京诺赛基因组研究中心有限公司), 所得电泳图谱用分析软件 Genemapper 3.0 进行分析。

## 3 结果 (Results)

### 3.1 反应器的启动及污泥的驯化

反应器启动时,生物强化反应器和非强化反应器中的吡啶初始浓度均为  $97.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。整个启动

和污泥的驯化过程共经历了 7 个周期. 在运行的前 2 个周期中, 非强化反应器的出水吡啶浓度维持在较高的水平, 吡啶去除率大约为 16% 左右. 然而, 随着反应器的运行, 吡啶的去除率从第 3 个周期的 32.68%, 迅速增加到第 4 个周期的 96.51%, 在随后的 3 个周期中基本维持在 97% 左右. 而对于投加了吡啶降解菌 KT-5 的强化反应器来说, 反应器刚启动时, 吡啶的去除率就达到 90% 以上, 随着反应器的运行, 吡啶的去除率逐渐增加至 97% 以上.

### 3.2 生物强化和未强化反应器对吡啶的降解特性的比较

在两个反应器的启动和污泥的驯化后, 考察了随着吡啶浓度逐渐从  $195.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  增加至  $5868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的过程中, 生物强化作用对吡啶的去除情况. 结果表明, 当吡啶初始浓度为  $195.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 在第一个运行周期中, 未强化反应器对吡啶的去除速率为  $29.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . 但是, 在随后的 3 个周期中吡啶的去除速率很快增加至大约  $48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 并维持在该速率稳定运行; 而强化反应器在第一个周期中对吡啶的去除速率为  $39.73 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 高于非强化对照反应器. 但是, 进入第二个周期后, 吡啶去除速率也维持在大约  $48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 与未强化对照反应器几乎没有明显的差别. 随着吡啶初始浓度的继续增加, 达到  $293.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  后, 强化反应器对吡啶的去除速率出现明显的波动. 虽然在随后的 3 个运行周期中, 未强化反应器对吡啶的降解速率也出现了波动, 但其降解速率却始终要高于强化反应器. 这种情况一直维持到吡啶初始浓度提高至  $391.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $586.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 有趣的是, 当吡啶初始浓度继续增加, 从  $586.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  增加至  $782.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  后, 强化反应器对吡啶的去除速率开始恢复, 然而即使这样, 也没有高于未强化对照反应器. 这种情况一直持续到吡啶初始浓度为  $1956 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . 当吡啶初始浓度达到  $2934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 强化反应器对吡啶的平均去除速率为  $56.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 要高于未强化反应器的  $52.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 3.3 吡啶生物降解动力学分析

在实验所用的吡啶初始浓度下, 无论是未强化反应器, 还是强化反应器, 对吡啶的生物降解均符合一级动力学规律. 在两个反应器中, 当吡啶初始浓度从  $97.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  增加至  $195.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 一级反应速率常数随着吡啶浓度的增加而增加, 并且强化反应器的一级反应速率常数要高于未强化对照

反应器. 当吡啶初始浓度高于  $195.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 一级反应速率常数随着吡啶浓度的增加而降低.

### 3.4 微生物群落结构动态变化分析

为了分析反应器中微生物群落结构的变化与吡啶去除的关系, 同时为了跟踪引入的强化菌株 KT-5 在反应器中的情况, 本实验采用 T-RFLP 的方法监测反应器运行过程中微生物群落结构的变化. 图 1、图 2 给出了利用自动测序仪 ABI 3730XL 扫描

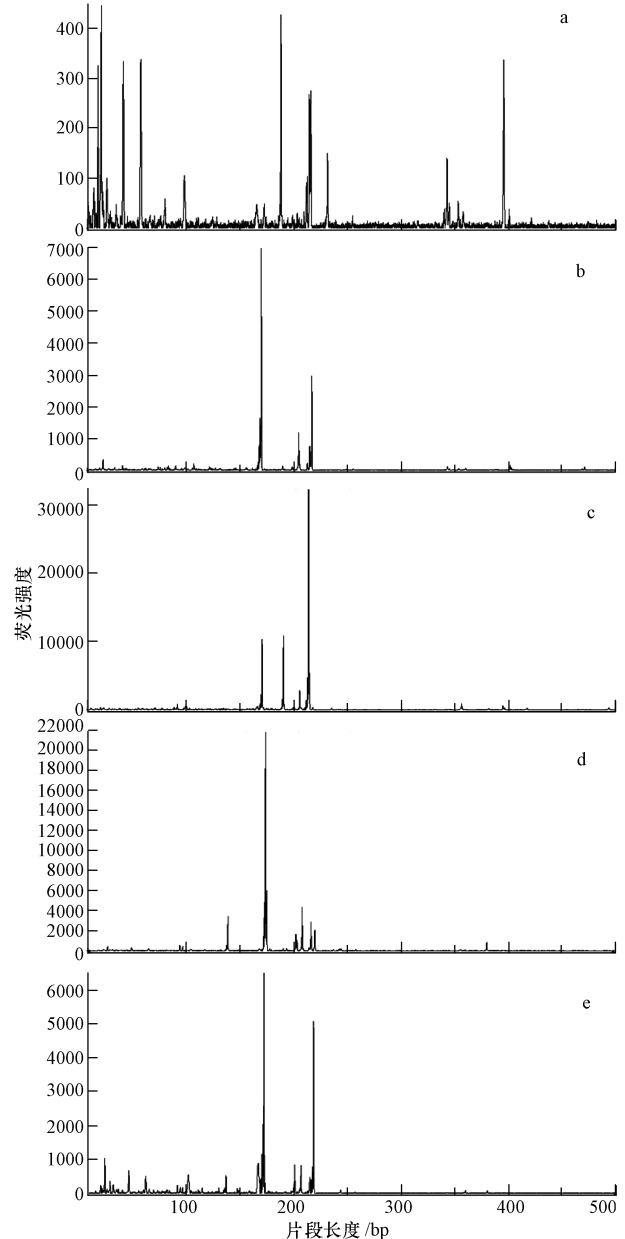


图 1 对照反应器中活性污泥的 T-RFLP 图谱 (a. 0 h 时的活性污泥; b. 吡啶初始浓度为  $293.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; c.  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; d.  $2934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; e.  $5868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Fig. 1 The profiles of T-RFLP from the activated sludge in control reactor (a. at 0 h; b. at the initial pyridine concentration of  $293.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; c.  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; d.  $2934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; e.  $5868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

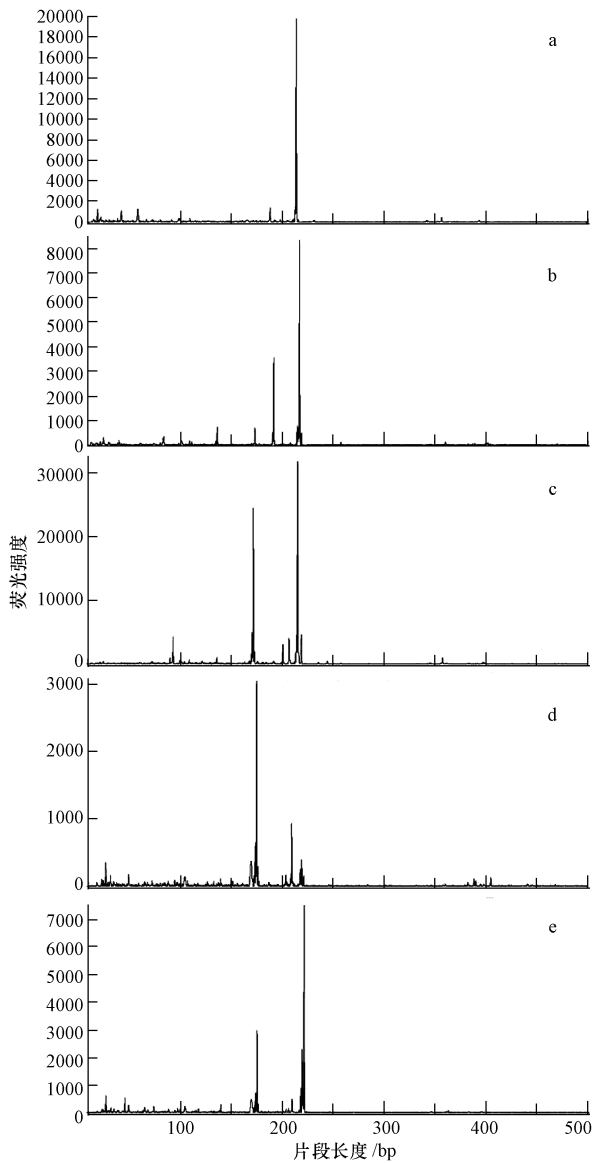


图2 生物强化反应器中微生物的 T-RFLP 图谱(a. 0 h 时微生物群体; b. 吡啶初始浓度为  $293.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; c.  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; d.  $2934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; e.  $5868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Fig. 2 The profiles of T-RFLP from microbial community in the bioaugmented reactor(a. at 0 h; b. at the initial pyridine concentration of  $293.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; c.  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; d.  $2934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; e.  $5868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

两个反应器中的细菌的 16S rDNA 的 *Alu* I 酶切图谱. 酶切图谱上每个末端限制性酶切片段代表至少 1 种类型的微生物, 峰的面积反应出该种类的相对数量. 为了确定对吡啶可能有降解功能的微生物, 取片段长度在 50 ~ 500 bp, 荧光阈值为 50 以上的峰作为研究分析对象.

图 1a 表明在初始活性污泥中共检测到 8 种优势的 TRFs, 它们的长度分别为 57、80、98、187、215、

231、341 和 394 bp. 对于未强化反应器来说, 当吡啶初始浓度为  $293.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 检测到 2 种长度分别为 168 bp 和 215 bp 的优势 TRFs(图 1b); 当吡啶初始浓度为  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 检测到 4 种长度分别为 168 bp、188 bp、203 bp 和 211 bp 的优势 TRFs(图 1c); 当吡啶初始浓度为  $2934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 检测到 6 种长度分别为 132 bp、168 bp、197 bp、203 bp、211 bp 和 215 bp 的优势 TRFs(图 1d); 当吡啶初始浓度为  $5868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 检测到 8 种长度分别为 56 bp、97 bp、132 bp、163 bp、168 bp、197 bp、203 bp 和 215 bp 的优势 TRFs(图 1e). 对于强化反应器来说, 起初由于外源吡啶降解菌 KT-5 的大量投加, 使得在 0 h 时反应器中的优势微生物主要为 TRFs 的长度为 213 bp 的菌株 KT-5(图 2a); 当吡啶初始浓度为  $293.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 检测到 2 种长度分别为 188 bp 和 213 bp 的优势 TRFs, 其中 213 bp 的 TRFs 是投加的 KT-5(图 2b); 当吡啶初始浓度为  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 检测到 6 种长度分别为 89 bp、168 bp、197 bp、203 bp、211 bp 和 215 bp 的优势 TRFs, 可以发现, 此时已检测不到 KT-5 作为优势菌的存在(图 2c); 当吡啶初始浓度为  $2934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 检测到 2 种长度分别为 168 bp 和 203 bp 的优势 TRFs(图 2d); 当吡啶初始浓度为  $5868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 检测到 4 种长度分别为 163 bp、168 bp、203 bp 和 215 bp 的优势 TRFs(图 2e).

#### 4 讨论(Discussion)

从反应器的启动过程可以看出, 对于新接种的活性污泥, 由于其中的微生物对吡啶不适应而导致启动时未强化反应器中吡啶的去除率很低; 然而, 随着反应器的运行, 活性污泥受到吡啶的驯化后开始适应吡啶, 于是出水中吡啶的去除率明显增加. 而对于强化反应器来说, 外源吡啶降解菌的投加明显强化了反应器的启动, 使反应器启动时间明显缩短, 提高了反应器对有毒物质冲击负荷的抵抗能力. 有些报道同样表明了生物强化作用可以加速反应器的启动. 例如, Dabert 等(2005)评估了生物强化作用对于实验室规模的生物除磷序批式反应器启动的影响, 发现强化反应器的启动时间比未强化反应器快了 14d. Jitnuyanont 等(2001)使用具有丁烷降解活性的微生物群体来强化地下水中 1,1,1-三氯乙烯的转化, 结果表明, 在初始运行时, 强化系统比未强化系统能够更有效地转化 1,1,1-三氯乙烯.

由于活性污泥受到吡啶的反复驯化后对吡啶的去除速率明显增加,致使强化反应器对吡啶降解的促进作用已不再明显.不仅如此,随着吡啶初始浓度的继续增加,在  $293.4 \sim 586.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围内变化时,强化反应器对吡啶的去除速率出现明显的波动,这种由于强化反应器中吡啶降解速率的波动导致生物强化作用消失,其原因还不清楚,可能是因为吡啶浓度的提高导致反应器中微生物群落发生了急剧变化,但是从 T-RFLP 的分析结果似乎并没有看出这种剧烈的变化(图 1b,图 2b),而且,此时仍然可以检测到强化菌株 KT-5 作为优势菌的存在.随着反应器继续运行,吡啶浓度继续提高,虽然强化反应器中吡啶的去除速率开始恢复,但是始终没有表现出明显的强化作用,这可以通过 T-RFLP 的分析结果加以解释,当吡啶浓度达到  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,强化反应器中已经检测不到 KT-5 的存在(图 2c),表明强化菌株 KT-5 在反应器的长期运行过程中已经流失,因为在研究 KT-5 纯培养物对吡啶降解特性的时候,KT-5 可以耐受并完全降解吡啶的浓度超过  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,所以即使浓度升高,至少在  $978 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的条件下,KT-5 不会受到抑制,也不会因为浓度升高而流失(乔琳和王建龙,2010).此时反应器中的吡啶降解活性是来自驯化的活性污泥中的优势菌种.这种外源强化菌在长期运行过程中的流失现象,是生物强化作用中经常出现的问题,也是制约生物强化实际应用的一个主要因素.例如,有研究者利用一株邻硝基苯甲醛降解菌 *Pseudomonas putida* ONBA-17,强化实验室规模的合成废水中邻硝基苯甲醛的降解.结果表明,生物强化确实加速了系统的启动,但是在长期运行下与受到驯化的未强化系统相比失去了优势,主要是由于投加的强化菌被系统中的原生动物捕食而从系统中消失,说明生物强化过程是有效而短暂的(Yu *et al.*, 2010). Park 等(2008)使用氰化物降解酵母菌和未鉴定的氰化物降解微生物混合菌体,对实际规模的焦化废水处理系统进行生物强化处理研究,结果表明,由于微生物的流失、对氰化铁的缓慢降解速率以及外加碳源的缺乏,在反应器的连续运行过程中,生物强化作用并没有体现出来.我们的研究发现,当吡啶浓度继续提高至  $5868 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,未强化反应器对吡啶的去除速率最终明显的高于强化反应器,这可能因为未强化反应器中的活性污泥微生物群体中含有吡啶降解活性的菌株,经吡啶的

长期反复驯化后,对吡啶产生了越来越高的降解活性;而对于强化反应器来说,起初由于 KT-5 的投加致使反应器中吡啶的去除主要来自于 KT-5 的活性,而活性污泥对吡啶的适应过程由于 KT-5 的保护作用显得稍微滞后一些,使得最终活性污泥中受到驯化的吡啶降解优势菌的种类和丰度不如未强化反应器高,这一点在 T-RFLP 的分析结果也可以看出来,此时在未强化反应器中检测到 8 株优势菌而在强化反应器中只检测到 4 株优势菌(图 1e,图 2e).这说明作为强化菌株投加的 KT-5 对于污泥的驯化有影响.

两种反应器对吡啶的降解均符合一级动力学,这说明外加的吡啶降解菌 KT-5 对活性污泥降解吡啶的动力学规律没有影响.我们先前的研究已经表明,纯菌株 KT-5 对吡啶的降解符合一级动力学规律(Qiao *et al.*, 2010).两个反应器在运行初期,一级速率常数随着吡啶浓度的升高而升高,表明微生物对吡啶的逐渐适应过程,同时也可以看出生物强化对反应器启动的加速作用.然而,当吡啶初始浓度高于  $195.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,一级速率常数随着吡啶浓度的升高而降低,说明两个反应器中的微生物群体一旦适应吡啶后,对吡啶的降解会受到吡啶浓度的抑制作用.但是 Wang 等(1997)在研究活性污泥降解邻苯二甲酸二正丁酯的过程时发现,虽然这一降解过程也符合一级动力学,但是当邻苯二甲酸二正丁酯的初始浓度低于  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,一级速率常数与初始浓度无关.

通过利用 T-RFLP 对未强化反应器中活性污泥微生物群落结构的动态分析表明,未强化反应器中原始活性污泥中微生物种类较丰富(图 1a).随着吡啶的加入和微生物的驯化,可以观察到有 4 种优势微生物对反应器降解吡啶起着主导作用,它们的 TRFs 分别为 168 bp、203 bp、211 bp 和 215 bp,其中 168 bp、203 bp 和 211 bp 代表的 3 种微生物是在活性污泥中本身不占优势,通过吡啶的反复驯化产生的优势微生物;而 215 bp 代表的微生物则是在活性污泥中存在的优势微生物,证明这种微生物是土著的吡啶降解优势菌.此外,TRFs 的长度分别为 132 bp 和 197 bp 的两种优势微生物,只有在吡啶初始浓度达到  $2934 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以上时才成为优势微生物,表明这两种微生物对于高浓度吡啶的降解有着主导作用.而且,随着吡啶浓度的增加,反应器中的优势菌的种类逐渐增加,表明了微生物受到吡啶驯化的

动态变化的过程.也正是这些优势菌的存在,使得原先不能有效降解吡啶的活性污泥产生了很强的吡啶降解活性.在强化反应器中,T-RFLP 分析结果表明,外源投加的 KT-5 菌株起初在反应器中占有优势,直到吡啶初始浓度达到  $293.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时仍然为优势菌,但是,当吡啶浓度为  $978 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,KT-5 已不再被检测到,说明随着反应器的运行以及吡啶浓度的增加,强化菌株 KT-5 逐渐流失而无法继续发挥强化作用,这可能也正是强化反应器启动时优于未强化反应器,但是随着持续的、长期的运行,两个反应器对吡啶的降解速率近乎一致的原因.群落分析的结果也可以解释当吡啶浓度提高至  $5868 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,强化反应器的吡啶降解速率明显的低于未强化反应器的现象.此时,未强化反应器中受到吡啶驯化而产生的优势微生物的种类明显的高于强化反应器.另外,在强化反应器中,当 KT-5 流失后同样产生了与未强化反应器一样的 4 个优势 TRFs,长度分别为 168 bp、203 bp、211 bp 和 215 bp,表明 KT-5 的投加并没有明显的影响活性污泥群落结构的组成.正如前面所说,长期运行条件下,强化反应器中受到吡啶驯化产生的优势微生物的种类不如对照反应器多的原因是由于 KT-5 的投加致使起初反应器中吡啶的去除主要来自于 KT-5 的活性,活性污泥中微生物的驯化过程直到 KT-5 从系统中流失后才开始,而此时吡啶的浓度也在提高,所以强化反应器中微生物受到驯化的过程不如对照反应器长,微生物产生的种类也就相应较少,对吡啶尤其是高浓度吡啶的去除能力较差.

## 5 结论(Conclusions)

1) 投加吡啶高效降解菌株 KT-5 可以加速反应器的启动;当吡啶初始浓度在  $293.4 \sim 586.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  变化时,强化反应器对吡啶的去除速率会出现波动.

2) 当吡啶初始浓度从  $586.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  逐渐提高到  $1956 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的过程中,生物强化作用不再明显,两个反应器对吡啶的去除速率基本一致.

3) 当吡啶初始浓度达到  $5868 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,未强化的反应器中活性污泥对吡啶的降解速率明显的高于强化反应器.

4) T-RFLP 的分析结果表明,当吡啶初始浓度低于  $293.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,投加的强化菌株 KT-5 可以作为优势菌存在于反应器中;从吡啶浓度达到  $978$

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  开始,强化菌株 KT-5 已检测不到,说明 KT-5 已经流失,生物强化作用基本消失.

## 参考文献(References):

- Andreozzi R, Insola A, Caprio V, *et al.* 1991. Ozonation of pyridine in aqueous solution: mechanistic and kinetic aspects [J]. *Water Res*, 25:655-659
- Ardizzone S, Høiland H, Lagioni C, *et al.* 1998. Pyridine and aniline adsorption from an apolar solvent: the role of the solid adsorbent [J]. *J Electroanal Chem*, 447:17-23
- Bai Y H, Sun Q H, Zhao C, *et al.* 2008. Microbial degradation and metabolic pathway of pyridine by a *Paracoccus* sp. strain BW001 [J]. *Biodegradation*, 19:915-926
- Bai Y H, Sun Q H, Zhao C, *et al.* 2009. Simultaneous biodegradation of pyridine and quinoline by two mixed bacterial strains [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82:963-973
- Bludau H, Karge H G, Niessen W, *et al.* 1998. Sorption, sorption kinetics and diffusion of pyridine in zeolites [J]. *Microporous Mesoporous Mater*, 22:297-308
- Boon N, Top E M, Verstraete W, *et al.* 2003. Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated-sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load [J]. *Appl Environ Microbiol*, 69:1511-1520
- Dabert P, Delgenès J P, Godon J J. 2005. Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66:575-588
- Jitnuyanon P, Sayavedra-Soto L A, Semprini L. 2001. Bioaugmentation of butane-utilizing microorganisms to promote cometabolism of 1,1,1-trichloroethane in groundwater microcosms [J]. *Biodegradation* 12:11-22
- Kim M K, Singleton I, Yin C R, *et al.* 2006. Influence of phenol on the biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *Pseudomonas putida* MK1 [J]. *Lett Appl Microbiol*, 42:495-500
- Lataye D H, Mishra I M, Mall I D, *et al.* 2008. Pyridine sorption from aqueous solution by rice husk ash (RHA) and granular activated carbon (GAC): parametric, kinetic, equilibrium and thermodynamic aspects [J]. *J Hazard Mater*, 154:858-870
- Lee J J, Rhee S K, Lee S T. 2001. Degradation of 3-methylpyridine and 3-ethylpyridine by *Gordonia nitida* LE31 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 67(9):4342-4345
- Lee J J, Yoon J H, Yang S Y, *et al.* 2006. Aerobic degradation of 4-methylpyridine and 4-ethylpyridine by newly isolated *Pseudonocardia* sp. strain M43 [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 254:95-100
- Li J L, Cai W J, Cai J J. 2009. The characteristics and mechanisms of pyridine biodegradation by *Streptomyces* sp. [J]. *J Hazard Mater*, 165:950-954
- Lodha B, Bhadane R, Patel B, *et al.* 2008. Biodegradation of pyridine by an isolated bacterial consortium/strain and bio-augmentation of strain into activated sludge to enhance pyridine biodegradation [J]. *Biodegradation*, 19:717-723

- Marchesi J R, Sato T, Weightman R J, *et al.* 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 64:795-799
- Mathur A K, Majumder C B, Chatterjee S, *et al.* 2008. Biodegradation of pyridine by the new bacterial isolates *S. putrefaciens* and *B. sphaericus* [J]. *J Hazard Mater*, 157:335-343
- Mohan D, Singh K P, Sinha S, *et al.* 2004. Removal of pyridine from aqueous solution using low cost activated carbons derived from agricultural waste materials [J]. *Carbon*, 42:2409-2421
- Ocampo-Perez R, Leyva-Ramos R, Alonso-Davila P, *et al.* 2010. Modeling adsorption rate of pyridine onto granular activated carbon [J]. *Chem Eng J*, 165:133-141
- O'Loughlin E J, Sims G K, Traina S J, 1999. Biodegradation of 2-methyl, 2-ethyl, and 2-hydroxypyridine by an *Arthrobacter* sp. isolated from subsurface sediment [J]. *Biodegradation*, 10:93-104
- Padoley K V, Rajvaidya A S, Subbarao T V, *et al.* 2006. Biodegradation of pyridine in a completely mixed activated sludge process [J]. *Bioresour Technol*, 97:1225-1236
- Park D H, Lee D S, Kim Y M, *et al.* 2008. Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility [J]. *Bioresour Technol*, 99:2092-2096
- Qiao L, Wang J. 2010. Microbial degradation of pyridine by *Paracoccus* sp. isolated from contaminated soil [J]. *J Hazard Mater*, 176:220-225
- 乔琳, 王建龙. 2010. 吡啉降解菌的生物降解特性 [J]. *清华大学学报(自然科学版)*, 50(6):869-872
- Qiao L, Wang J. 2010. Biodegradation characterization of a pyridine-degradation strain [J]. *J Tsinghua Univ (Sci & Tech)*, 50(6):869-872 (in Chinese)
- Quan X C, Shi H C, Liu H, *et al.* 2004. Enhancement of 2, 4-dichlorophenol degradation in conventional activated sludge systems bioaugmented with mixed special culture [J]. *Wat Res*, 38:245-253
- 任大军, 颜克亮, 刘延杰, 等. 2006. 白腐菌在固体培养基下对吡啉和吡啉的降解 [J]. *环境污染与防治*, 28(9):658-661
- Ren D J, Yan K L, Liu Y J, *et al.* 2006. Biodegradation of indole and pyridine by white rot fungi in rice straw [J]. *Environmental Pollution & Control*, 28(9):658-661 (in Chinese)
- Sims G K, Sommers L E, Konopka A. 1986. Degradation of pyridine by *Micrococcus luteus* isolated from soil [J]. *Appl Environ Microbiol*, 51(5):963-968
- 宋秀兰, 冀文侃, 张栋, 等. 2008. 固定化胶质红环菌降解吡啉的研究 [J]. *南京理工大学学报(自然科学版)*, 32(4):522-525
- Song X L, Ji W K, Zhang D, *et al.* 2008. Biodegradation of pyridine by immobilized *Rhodocyclus Gelatinosus* [J]. *Journal of Nanjing University of Science and Technology (Natural Science)*, 32(4):522-525 (in Chinese)
- Stobdan T, Sinha A, Singh R P, *et al.* 2008. Degradation of pyridine and 4-methylpyridine by *Gordonia terre* IIPN1 [J]. *Biodegradation*, 19:481-487
- 孙庆华, 柏耀辉, 赵翠, 等. 2008. *Shinella zoogloeoides* BC026 对吡啉的降解特性研究 [J]. *环境科学*, 29(10):2938-2943
- Sun Q H, Bai Y H, Zhao C, *et al.* 2008. Biodegradation of pyridine by *Shinella zoogloeoides* BC026 [J]. *Environmental Science*, 29(10):2938-2943 (in Chinese)
- Van Limbergen H, Top E M, Verstraete W. 1998. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50:16-23
- 王基成, 张秀霞, 房苗苗, 等. 2008. 两株吡啉降解菌的分离与鉴定 [J]. *生态环境*, 17(1):117-121
- Wang J C, Zhang X X, Fang M M, *et al.* 2008. Isolation and identification of two pyridine-degrading strain [J]. *Ecology and Environment*, 17(1):117-121 (in Chinese)
- Wang J, Liu P, Shi H, *et al.* 1997. Kinetics of phthalic acid ester degradation by acclimated activated sludge [J]. *Process Biochem*, 32:567-571
- Wang J, Quan X, Han L, *et al.* 2002. Kinetics of co-metabolism of quinoline and glucose by *Burkholderia pickettii* [J]. *Process Biochem*, 37:831-836
- Wang J, Quan X C, Wu L B, *et al.* 2002. Bioaugmentation as a tool to enhance the removal of refractory compound in coke plant wastewater [J]. *Process Biochem*, 38:777-781
- 王玉栋, 郝志显, 甘礼华, 等. 2004. TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub>气凝胶对吡啉的光催化降解 [J]. *应用化学*, 21(10):1002-1005
- Wang Y D, Hao Z X, Gan L H, *et al.* 2004. Photocatalytic degradation of pyridine by TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> Aerogel [J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 21(10):1002-1005 (in Chinese)
- 王艳芬, 王海磊, 刘国生, 等. 2008. 序批式反应器生物强化处理苯酚废水的研究 [J]. *环境污染与防治*, 30(5):42-46
- Wang Y F, Wang H L, Liu G S, *et al.* 2008. Bioaugmented SBR treatment of phenol wastewater [J]. *Environmental Pollution & Control*, 30(5):42-46 (in Chinese)
- 徐军祥, 杨翔华, 姚秀清, 等. 2007. 生物强化技术处理难降解有机污染物的研究进展 [J]. *化工环保*, 27(2):129-134
- Xu J X, Yang X H, Yao X Q, *et al.* 2007. Advances in bioaugmentation technology for treatment of refractory organic pollutants [J]. *Environmental Protection of Chemical Industry*, 27(2):129-134 (in Chinese)
- Yu F B, Ali S W, Guan L B, *et al.* 2010. Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities [J]. *J Hazard Mater*, 176:20-26
- Zefirov N S, Agapova S R, Terentiev P B, *et al.* 1994. Degradation of pyridine by *Arthrobacter crystallopoietes* and *Rhodococcus opacus* strains [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 118:71-74
- 张良波, 魏新利. 2009. 超声波/Fenton 试剂联用降解水中的吡啉 [J]. *环境化学*, 28(3):364-368
- Zhang L B, Wei X L. 2009. The degradation of pyridine in aqueous solution by the ultrasound/ fenton's reagent [J]. *Environmental Chemistry*, 28(3):364-368 (in Chinese)
- Zhao H, Xu S H, Zhong J B, *et al.* 2004. Kinetic study on the photocatalytic degradation of pyridine in TiO<sub>2</sub> suspension systems [J]. *Catal Today*, 93-95:857-861