



研究报告

菌藻共生系统对序批式反应器处理养猪废水脱氮除磷效果及微生物群落结构的影响

于少鹏^{*1} 刘嘉¹ 周彬² 丛东来¹ 杜丛^{*3}

1 哈尔滨学院地理与旅游学院 黑龙江省寒区湿地生态与环境研究重点实验室 哈尔滨市湿地研究院
黑龙江 哈尔滨 150086

2 黑龙江省国土空间规划研究院 黑龙江 哈尔滨 150090

3 中国环境科学研究院 水生态环境研究所 环境基准与风险评估国家重点实验室 北京 100012

摘要:【背景】养猪废水作为高浓度有机废水,是导致我国农业面源污染的主要因素之一。目前采用菌藻共生系统处理养猪废水越来越受到关注,与传统序批式反应器(Sequencing Batch Reactor, SBR)相比,藻辅助 SBR 具有提高脱氮除磷效果、增加污泥活性和降低能源消耗的特点。【目的】针对 SBR 中菌藻共生系统对养猪废水脱氮除磷效能的影响,比较分析菌藻共生系统与常规 SBR 系统中污泥特性及微生物群落结构特征差异。【方法】在室温条件下分别平行运行 SBR+微藻(R1)和作为对照系统不添加微藻的 SBR (R2)。监测 R1 和 R2 系统废水处理效果,污泥的粒径、沉降性和代谢产物等污泥特性。利用变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)技术分析 R1 和 R2 系统中的微生物种类和分布。【结果】与对照 R2 反应器相比, R1 的化学需氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)去除率提高了 5.1%, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 提高了 20.3%, 总氮(Total Nitrogen, TN)提高了 19.4%, 总磷(Total Phosphorus, TP)提高了 23.9%。进一步对反应器中的污泥特性进行分析发现,与 R2 相比, R1 的胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)平均含量提高 3.7%, 可溶性微生物产物(Soluble Microbial Product, SMP)平均增加了 38.5%。同时 R1 的污泥粒径较 R2 提高了 14.8%, 污泥体积指数(Sludge Volume Index, SVI)值较 R2 降低了 11.7%, 污泥的好氧呼吸速率(Specific Oxygen Uptake Rate, SOUR)较 R2 提高了 64.8%, 而且稳定的菌藻共生系统的形成进一步减少反应器出水中的悬浮固体浓度,表明藻类的添加对 R1 污泥特性具有改良作用【结论】R1 反应器形成的菌藻共生体系可进一步优化微生物群落结构,其中放线菌纲(*Actinobacteria*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)和 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)为 R1 反应器的主要菌群,对养猪废水的处理起到重要作用。R1 反应器中的藻类主要为链带藻属(*Desmodesmus*)和尖带藻属(*Acutodesmus*),对养猪废水的脱氮除磷起到重要作用。

关键词: 序批式反应器, 脱氮除磷, 菌藻共生系统, 微生物群落结构

Foundation items: Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (LH2019E071); Harbin University of Young Doctoral Research Start-Up Fund (HUHF2019107); National Natural Science Foundation of China (51808518)

***Corresponding authors:** YU Shaopeng: Tel: 86-451-86623372; E-mail: wetlands1972@126.com
DU Cong: Tel: 86-10-86283805; E-mail: ducongducong@126.com

Received: 06-11-2020; **Accepted:** 07-02-2021; **Published online:** 19-03-2021

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(LH2019E071); 哈尔滨学院青年博士科研启动基金(HUHF2019107); 国家自然科学基金(51808518)

***通信作者:** 于少鹏: Tel: 0451-86623372; E-mail: wetlands1972@126.com

杜丛: Tel: 010-86283805; E-mail: ducongducong@126.com

收稿日期: 2020-11-06; **接受日期:** 2021-02-07; **网络首发日期:** 2021-03-19

Nitrogen and phosphorus removal of sequencing batch reactor with algae treating piggery wastewater and microbial community structure

YU Shaopeng^{*1} LIU Jia¹ ZHOU Bin² CONG Donglai¹ DU Cong^{*3}

1 School of Geography and Tourism, Harbin University, Key Laboratory of Cold Region Wetland Ecology and Environment of Heilongjiang Province, Harbin Wetland Research Institute, Harbin, Heilongjiang 150086, China

2 Heilongjiang Research Institute of Territory's Spatial Planning, Harbin, Heilongjiang 150090, China

3 State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Institute of Water Ecology and Environment, Beijing 100012, China

Abstract: [Background] As high concentration organic wastewater, piggery wastewater was one of the main factors that lead to area-source pollution of agriculture in China. At present, an increasing number of researchers focused on piggery wastewater treatment with bacteria-algae symbiotic system. Compared with the traditional sequencing batch reactor (SBR), the algal-assisted SBR showed better performance in nitrogen and phosphorus removal, sludge activity improvement and energy consumption reduction. [Objective] Aiming at the influence of algal-bacterial symbiosis system on the nitrogen and phosphorus removal, the distinction on sludge characteristics and microbial community structure were analyzed between the algal-bacterial symbiosis system and the conventional SBR. [Methods] The algal-assisted SBR (R1) and the conventional SBR (R2) were operated in parallel at room temperature to study the performance of piggery wastewater treatment. The sludge characteristics were also observed, such as sludge particle size, sludge settleability and microbial metabolites. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to analyze the microbial community structure in R1 and R2 systems. [Results] Compared to the R2, chemical oxygen demand (COD), $\text{NH}_4^+\text{-N}$, total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP) were increased by 5.1%, 20.3%, 19.4% and 23.9%. The average values of extracellular polymeric substances (EPS) and soluble microbial product (SMP) in the R1 were 3.7% and 38.5% higher than that in the R2, respectively. Compared to that of R2, the sludge particle size of R1 was increased by 14.8%, due to the adhesion of algal to the sludge. In addition, the SVI value of R1 was 11.7% less than that of R2, indicating a poor settleability of sludge in the R1. The sludge specific oxygen uptake rate (SOUR) of R1 was 64.8% higher than that of R2. The formation of stable bacteria algae symbiosis system further reduced the concentration of suspended solids in the effluent of the R1, which further indicated that the addition of algae could improve the characteristics of R1 sludge. [Conclusion] *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* as the dominant species in the R1 played an important role in the piggery wastewater treatment. The major *Chlorophyta* were *Desmodesmus* and *Acutodesmus* which had a significant effect on nitrogen and phosphorus removal.

Keywords: sequencing batch reactor, nitrogen and phosphorus removal, bacteria-algae symbiotic system, microbial community structure

养猪废水属于高浓度有机废水，氮磷含量高，是我国农业面源污染的主要因素之一^[1]。目前，采用菌藻共生系统处理养猪废水越来越受到关注^[2]。研究表明，与传统序批式反应器 (Sequencing Batch Reactor, SBR) 相比，藻辅助 SBR 处理生活污水具有提高脱氮除磷效果、增加污泥活性和降低能源消耗的特点^[3]。然而关于藻对 SBR 处理养猪废水的影响研究较少。随着菌藻

共生体系的形成，藻对污泥特性的影响程度增高，如污泥粒径、污泥黏度和好氧呼吸速率等；研究表明微生物群落结构对生物反应器的废水处理效果发挥了重要作用，废水处理过程中，微生物种群不断变化并最终形成去除污染物的优势功能种群，此时废水处理效果最佳^[4-5]。为研究菌藻共生系统对 SBR 处理养猪废水的影响，本文比较分析了 SBR+藻和不接种藻的 SBR 这 2 个不同工艺

条件下, 污泥特性及微生物群落结构特征, 探索了废水脱氮除磷效果、污泥特性与菌藻群落结构之间的关系; 进一步探讨了菌藻共生体系引起废水处理效果提高的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

养猪废水取自阿城某养猪场初沉池, 经过滤去除颗粒杂质备用。SBR 接种污泥取自哈尔滨太平污水处理厂二沉池, 采用养猪废水驯化污泥, 化学需氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)和 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率分别为 70%和 80%时污泥驯化结束, 混合液悬浮固体(Mixed Liquid Suspended Solids, MLSS)质量浓度控制在 6 000–7 000 mg/L。藻取自阿城某养猪场周边静水塘, 利用未经消毒的用于绿藻培养的 BG11 培养基^[6]富集藻, 经鉴定实验用藻主要为绿藻门(*Chlorophyta*)的链带藻属(*Desmodesmus*)。随着藻生物量的增长, 养猪废水逐渐加入到培养基中, 实验通过养猪废水培养富集藻类至叶绿素 a 浓度达到 1 100 mg/m³时完成藻的驯化培养。反应器进水为实际养猪废水, 其水质特征如表 1 所示。养猪废水属于高浓度有机废水, 氮磷含量较高, 其中 C/N 比为 2.4:1。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

通用型土壤基因组 DNA 提取试剂盒, 哈尔滨市青蛙生物科技有限责任公司; COD、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、总氮(Total Nitrogen, TN)及总磷(Total Phosphorus, TP)监测专用耗材试剂, 北京连华永兴科技发展有限公司。紫外可见智能型多参数水质测定仪、消解仪, 北京连华永兴科技发展有限公司; 紫外分光

光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; 电泳仪、凝胶成像分析系统, Bio-Rad 公司; PCR 扩增仪, Applied Biosystems 公司; 激光粒径分析仪, Malvern公司; 便携式溶解氧仪, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.3 反应器装置及运行

R1 和 R2 反应器装置如图 1 所示, SBR 的池壁材质为透明有机玻璃, 便于观察反应状态。R1 和 R2 有效容积均为 4 L, 高 20 cm, 直径 18.5 cm。反应器内部装置曝气条、温控器和 pH 计, 调控反应器运行条件。

同时平行运行 R1 和 R2 工艺, 在室温条件下 (24±2 °C)启动阶段运行周期为 6 h: 进水 30 min、曝气 4 h、沉降 1 h、排水 30 min, 体积交换率控制在 50%, 曝气率控制在 0.04 m³空气/h^[7], 反应器溶解氧(Dissolved Oxygen, DO)浓度如表 2 所示。此外, 稳定运行阶段反应器的水力停留时间

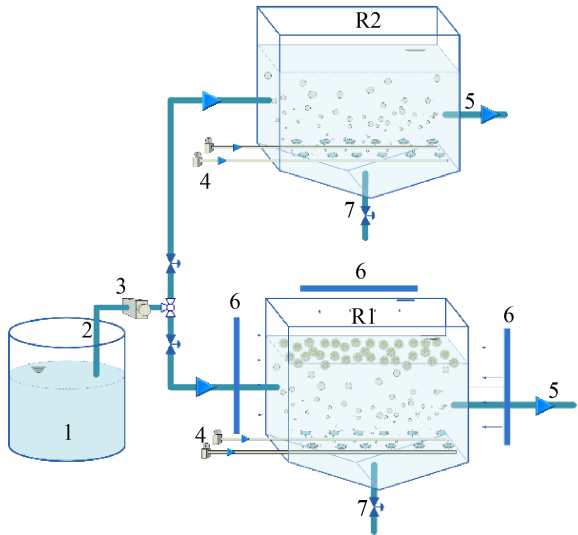


图 1 R1 和 R2 实验装置
Figure 1 R1 and R2 experimental apparatus

注: 1: 养猪废水; 2: 进水管; 3: 蠕动泵; 4: 曝气泵; 5: 出水管; 6: 光源; 7: 排泥管
Note: 1: Piggery wastewater; 2: Influent pipe; 3: Peristaltic pump; 4: Air compressor; 5: Effluent pipe; 6: Light source; 7: Sludge discharging pipe

表 1 养猪废水主要成分及其含量
Table 1 Compositions and contents of the raw piggery wastewater

成分 Compositions	浓度 Concentration (mg/L)
COD	4 870.4±37.9
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	2 017.5±21.3
TN	2 092.8±17.6
TP	123.6±20.5

表 2 R1 和 R2 运行参数

Table 2 Parameters of the R1 and R2

运行参数 Parameters	R1	R2
SRT (d)	20	20
HRT (d)	3	3
Temperature (°C)	24±2	24±2
pH	7.5±0.2	7.1±0.2
DO (mg/L)	4.2±0.3	2.2±0.2

(Hydraulic Retention Time, HRT)和污泥停留时间(Sludge Retention Time, SRT)分别为 3 d 和 20 d, 藻和污泥的体积比为 1:4^[8]。R2 反应器外壁用锡箔纸包裹置于黑暗环境条件下, R1 每天 7:00 至 19:00 由反应器外部线性灯(50 cm, 荧光灯)照射 12 h, 而非阳光照射, 光强度约为 6 000 lx^[7]。

1.4 检测分析方法

1.4.1 废水常规测试项目及方法

每 3 d 从 R1 和 R2 反应器的进出水取样 10 mL, 经 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤。根据国家标准方法^[9], 检测过滤后水样中 COD、NH₄⁺-N、TN 和 TP 等水质指标。

1.4.2 污泥特性分析方法

取 R1 和 R2 反应器中混合污泥样品, 用蒸馏水按照 1:1 比例稀释于 100 mL 量筒中, 沉淀 30 min 后读取沉淀污泥体积, 计算污泥体积指数(Sludge Volume Index, SVI)值。将 50 mL 污泥混合样 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液利用 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤, 过滤后的溶液即为 SMP; 将离心后的沉淀污泥进一步用蒸馏水定容至 50 mL, 混匀后于 80 °C 水浴 30 min, 水浴后的样品进一步在 5 000 r/min 条件下离心 5 min, 取上清液经 0.45 μm 醋酸纤维滤膜过滤, 所得到的滤液用于 EPS 分析^[10]。利用激光粒度分析仪测定污泥絮体粒径, 用粒径均匀性指数表示。采用重量法测定并计算反应器中 MLSS 和混合液挥发性悬浮固体(Mixed Liquid Volatile Suspended Solids, MLVSS)浓度^[9], 利用 SOUR 表征反应器中微生物活性^[11]。在反应器运行 100 d 结束时, 对 R1 和 R2 进行

3 次 SOUR 检测。利用公式(1)计算 SOUR:

$$\text{SOUR} = (\text{DO}_0 - \text{DO}_t) / (t \times \text{MLVSS}) \quad (1)$$

1.4.3 藻生物量测定

采用叶绿素 a (Chlorophyll a, Chl-a)的浓度用于表征藻生物量增长情况^[12], 利用丙酮提取污泥和藻混合液中的 Chl-a。分别从反应器中采集 20 mL 污泥混合样, 分析污泥和藻的特性。首先, 样品 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。然后将残留固体用 90%的丙酮溶液添加 0.05 g CaCO₃ 混合至 20 mL, 利用涡旋振荡器将混合后的溶液充分振荡 1 min, 置于 4 °C 避光保存 24 h。最后, 将混合液 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液中 Chl-a 含量即为 Chl-a 浓度。

利用紫外分光光度法, 在 4 个波长(750、663、645 和 630 nm)下测定 Chl-a 浓度^[12-13]。90%的丙酮溶液为对照, 利用公式(2)计算 Chl-a 浓度(mg/m³):

$$c = [11.64 \times (OD_{663} - OD_{750}) - 2.16 \times (OD_{645} - OD_{750}) + 0.10 \times (OD_{663} - OD_{750})] V_1 / V_\sigma \quad (2)$$

式中的 OD 是相应波长的吸收率, V₁ 为丙酮提取物的体积(mL), V 为每个样品的体积(L), σ 是比色杯的光路(cm)。

1.4.4 微生物群落结构分析

变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)技术已经广泛用于环境样品微生物种群结构的研究中。本文采用 DGGE 技术分析 R1 和 R2 中微生物群落结构特征。基于通用型土壤基因组 DNA 提取试剂盒的提取方法如下: (1) 将活性污泥沉淀样品加入到研磨管中, 混匀; (2) 加入试剂盒中的 Q1 溶液 60 μL, 上下颠倒混匀; (3) 把研磨管固定到涡旋仪适配器上, 最大转速涡旋连续振荡 10 min; (4) 室温 13 000 r/min 离心 1 min; (5) 转移上清至一个干净的收集管中(1.5 mL); (6) 加入 200 μL 溶液 Q2 到上清中, 上下颠倒混匀, 4 °C 孵育 5 min; (7) 室温 13 000 r/min 离心 1 min, 转移上清到新的

收集管中; (8) 加入 200 μL 溶液 Q3 到上清中, 上下颠倒混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 室温 13 000 r/min 离心 1 min, 转移上清(不超过 900 μL)到新的收集管中, 加入 Q4 溶液 1 200 μL 到上清中, 上下颠倒混匀, 加载 710 μL 上清到吸附柱中, 13 000 r/min 离心 1 min, 弃去滤液, 继续加载上清到吸附柱中, 重复至过滤完所有上清; (9) 加 500 μL 溶液 Q5 到离心柱中, 13 000 r/min 离心 1 min, 弃去滤液。重复操作一次, 吸附柱放回到收集管中, 13 000 r/min 离心 3 min, 转移离心柱到超净台上, 晾干; (10) 离心柱小心转入到新的收集管中, 加入 100 μL 溶液 Q6, 13 000 r/min 离心 1 min。弃去离心柱, 收集管中的 DNA 可用于下游实验。细菌 PCR 引物对为 338F (5'-FACTCCTACGGGAGGCAGC-3')和 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), GC 夹-CG CCGCCGCGCGCGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG; 真核 PCR 引物对为 euk-R (5'-GACTACGACGGTATCTRATCTCTTCG-3')和 euk-F (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGCAAGTCTGGTGCCAG-3')。PCR 反应体系 (50 μL): 10 \times Buffer 5 μL , dNTP Mix (2.5 mmol/L) 5 μL , 引物(20 pmol/L)各 1 μL , *ExTaq* DNA 酶 (0.025 U/ μL) 0.25 μL , 基因组 DNA 0.5 μL , ddH₂O 补足 50 μL 。细菌 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。真核 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 66 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物的纯化采用柱式胶回收试剂盒进行切胶回收目的片段, 并电泳检测。DGGE 群落分析, 采用基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行分离。DGGE 中特异条带的回收、克隆、测序及比较分析将特异条带和有代表的条带切下回收条带, 回收单链 DNA。取回收的 DNA 为模板, 用相同的引物(不带 GC 夹), 采用同前体系和 PCR 程序进行扩增、测序。

2 结果与讨论

2.1 工艺废水处理效果比较

R1 和 R2 的出水 COD 平均浓度分别为 541.8 \pm 88.6、783.0 \pm 63.2 mg/L, R1 的 COD 平均去除率较 R2 高 5.1% (图 2A); NH₄⁺-N 平均浓度分别为 394.9 \pm 68.8、868.7 \pm 54.7 mg/L, R1 的 NH₄⁺-N 去除率较 R2 高 20.3% (图 2B); TN 平均浓度分别为 1 433.4 \pm 76.7、1 927.8 \pm 44.4 mg/L, R1 的 TN 去除率较 R2 高 19.4% (图 2C); TP 平均浓度分别为 63.2 \pm 10.1、92.1 \pm 4.9 mg/L, R1 的 TP 去除率较 R2 高 23.9% (图 2D)。结果表明藻可强化养猪废水的氮磷去除, 提高反应器的废水处理效果。在光照条件下, 氮磷等营养物质可同时被藻类吸收所消除^[14]。同时, 污泥絮体倾向于吸附藻类生物量, 形成协同生物絮凝体^[15], 从而降低反应器出水中悬浮固体浓度提高废水处理效果。

研究表明 R1 的 DO 浓度为 4.2 mg/L, 较 R2 提高了 0.9 倍。氨氧化菌(Ammonium Oxidizing Bacteria, AOB)属于慢生菌, 对环境因子敏感, 其生长繁殖需要较高的 DO 浓度和 SRT^[16]。藻类通过光合作用吸收细菌矿化过程中所产生的 CO₂, 同时释放 O₂ 供细菌利用, 增加了 R1 的 DO 浓度, 从而提高了 NH₄⁺-N 的去除率。同时, 藻光合作用过程中吸收消耗氮磷等营养物^[17], 从而导致 R1 的 TN 和 TP 去除率分别较 R2 高 19.4%和 23.9%。

2.2 污泥特性分析

R1 和 R2 运行 100 d 过程中, 分别监测 2 个反应器的 EPS 和 SMP 变化, 如图 3 所示。研究发现反应器稳定运行过程中, R1 的 EPS 和 SMP 含量较 R2 高。R1 和 R2 的 EPS 含量分别平均为 72.8 \pm 10.9 mg/g-MLVSS 和 70.2 \pm 5.4 mg/g-MLVSS; R1 和 R2 的 SMP 含量分别平均为 0.18 \pm 0.04 mg/L 和 0.13 \pm 0.01 mg/L。EPS 作为微生物代谢产物主要体现微生物活性, 即活性越大, 微生物分泌的 EPS 越多^[11]。结果表明 R1 的 EPS 平均含量较 R2 高 3.7%, 通过对比发现 R1 反应器中活性污泥的

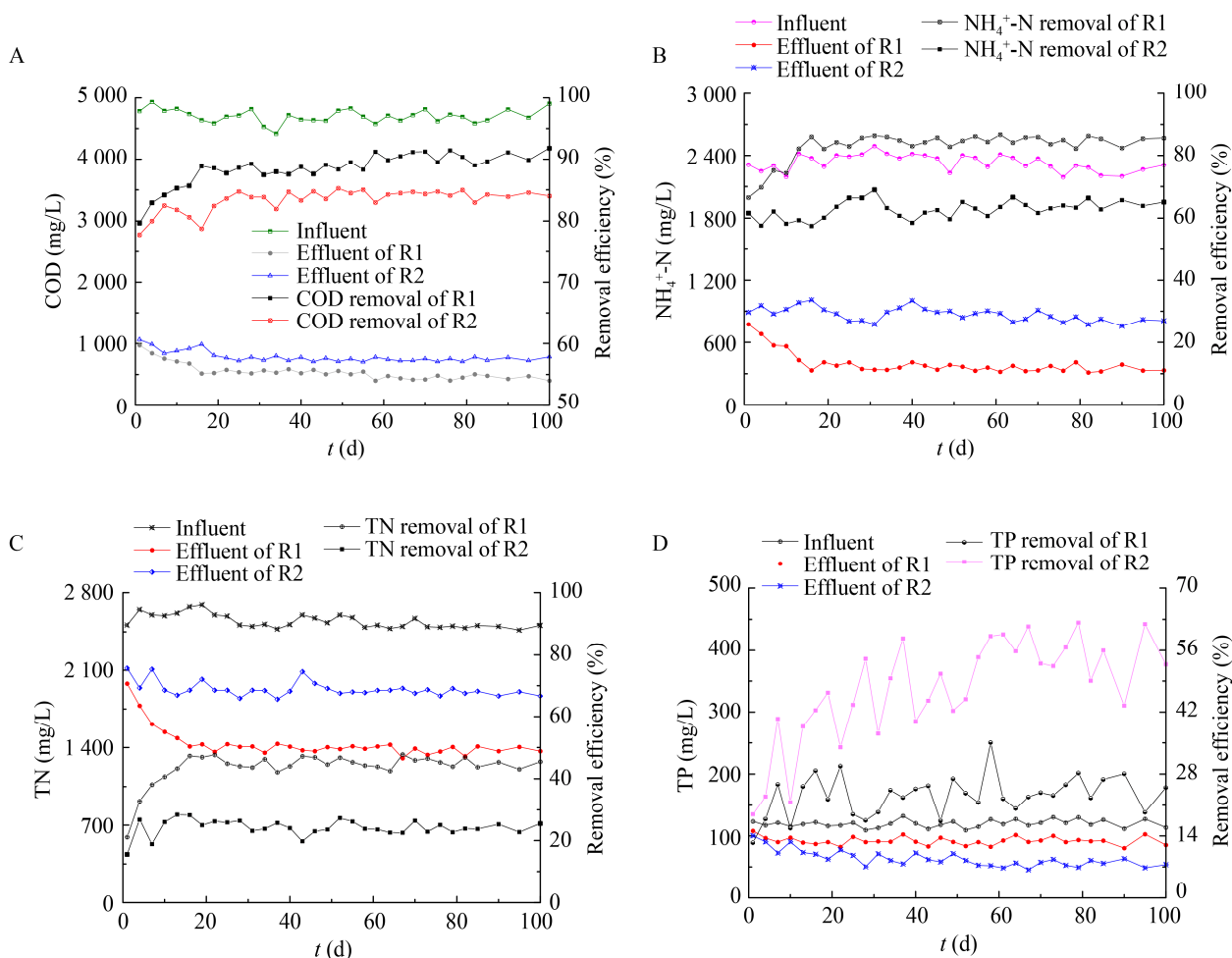


图2 R1和R2的废水处理效果

Figure 2 The wastewater treatment effect of R1 and R2

注: A: COD 处理效果; B: NH₄⁺-N 处理效果; C: TN 处理效果; D: TP 处理效果

Note: A: COD treatment effect; B: NH₄⁺-N treatment effect; C: TN treatment effect; D: TP treatment effect

SOUR 较 R2 提高了 64.8%，进一步研究证实藻类的添加可有效促进微生物活性，从而提高 EPS 的含量。藻通过光合作用提高了反应器的 DO 浓度，使 R1 的 DO 浓度较 R2 增加了 0.9 倍，为好氧细菌的繁殖代谢提供充足的 O₂，从而促进了微生物的活性。EPS 主要由松散结合的 EPS 和紧密结合的 EPS 组成，其中松散结合 EPS 的黏附力使藻类与污泥有效结合^[3]，形成菌藻共生系统，实现污泥与藻类的同步运动。同时，藻类在光照条件下，由于趋光性受光源的引力作用而向光照强度

较大的区域运动^[18]。以上 2 种相反作用力可导致 EPS 结构更加松散，从而更易受水体剪切力的影响而脱落，增加反应器的 SMP 浓度。因此，R1 反应器的 SMP 平均浓度较 R2 增加了 38.5%。

此外，研究表明 R1 和 R2 反应器的污泥粒径分别为 261.4±7.9 μm 和 227.7±6.3 μm，即 R1 的污泥粒径较 R2 提高 14.8%，R1 污泥的 SVI 值较 R2 降低了 11.7% (表 3)。研究发现松散 EPS 具有流变特点，对污泥的絮凝和污泥形态具有明显作用，松散 EPS 的增加可导致污泥结构松散，粒度增

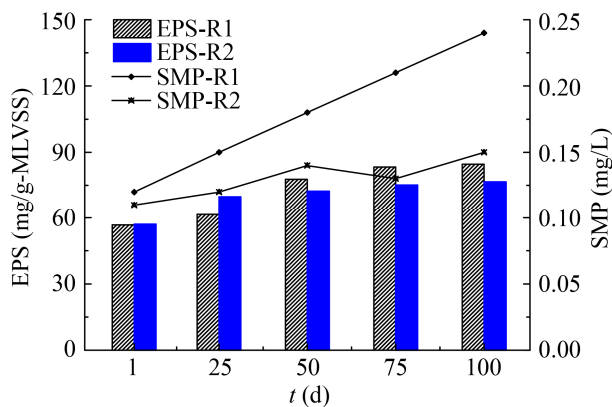


图3 R1和R2的EPS和SMP变化

Figure 3 Changes in EPS and SMP of R1 and R2

表3 污泥特性分析

Table 3 The sludge characteristics of the R1 and R2

污泥特性	R1	R2
Sludge characteristics		
Particle size (μm)	261.4 \pm 7.9	227.7 \pm 6.3
SVI (mL/g)	89.4 \pm 4.6	101.3 \pm 5.1
SOUR (mg-O ₂ /(h·g-MLVSS))	17.8	10.8

加,降低污泥絮体的沉降性^[19],因此R1污泥的沉降性较R2差。

通过对R1的出水和污泥中Chl-a含量变化情况的研究发现(图4),出水中的Chl-a浓度由反应器运行初始时的平均378.9 g/m³迅速减少,反应器运行至100 d时,Chl-a浓度为平均18.2 g/m³;污泥混合液相中的Chl-a浓度从初始时的平均3 187.8 g/m³迅速减少,反应器运行至25 d后稳定在1 908.7 \pm 55.6 g/m³。研究表明细菌分泌的EPS可使藻类与污泥黏附结合,逐渐形成稳定的菌藻共生系统,从而减少反应器出水中的悬浮固体浓度。

2.3 微生物群落结构变化

R1反应器的核心组成主要是活性污泥中的细菌和藻类,R2反应器的核心组成主要是活性污泥中的细菌。污水处理过程中,微生物的群落结构决定了反应器的功能和污水处理效果。反应器运行结束时,即第100天,分别对R1和R2反应器内的污泥混合液取样,分析其微生物群落结构特征,结果见图5A。根据图5A中DGGE图谱的条

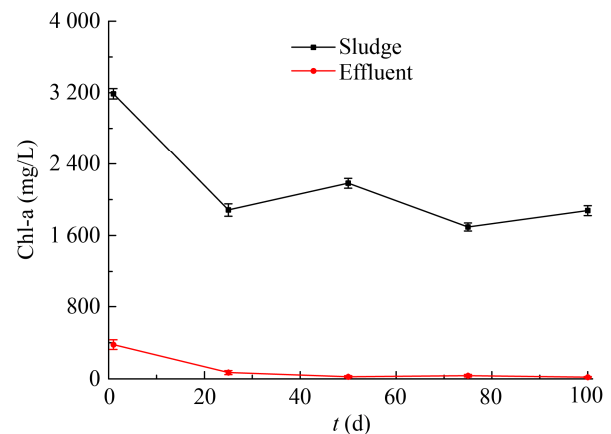


图4 R1的出水和污泥中Chl-a浓度变化

Figure 4 Changes of Chl-a concentration in the effluent and sludge of R1

带分布模式发现,R1的菌群结构与R2明显不同,这可能是由于R1反应器中藻类作用的结果。

R1的群落结构主要由条带1、3、5-6、8-13、15、18、22-23、27、29、30所代表的菌群构成,R2的群落结构主要由条带1、2、4-17、19-30所代表的菌群构成,R2菌群的多样性较R1高。研究表明藻类生长可重塑微生物菌群的多样性,改变反应器本身的菌群结构^[20]。微生物群落结构随其周围生态环境的变化而演替,环境不同,微生物群落结构也不相同,不同种群有其自身所适应的生态位,因此R1的菌群结构与R2存在明显差异。进一步对DGGE图谱中的主要条带进行测序分析(表4),在细菌分类的纲水平上,R1的主要菌群为:放线菌纲(*Actinobacteria*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)和 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*),R2的主要菌群为放线菌纲(*Actinobacteria*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)、 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)、 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)和拟杆菌纲(*Bacteroidetes*)。因此,在细菌分类的纲水平上,R1反应器中的菌群丰度较R2低。研究表明拟杆菌纲(*Bacteroidetes*)是厌氧菌^[21],由于其特殊的代谢功能,因而可以忍受生物反应器中

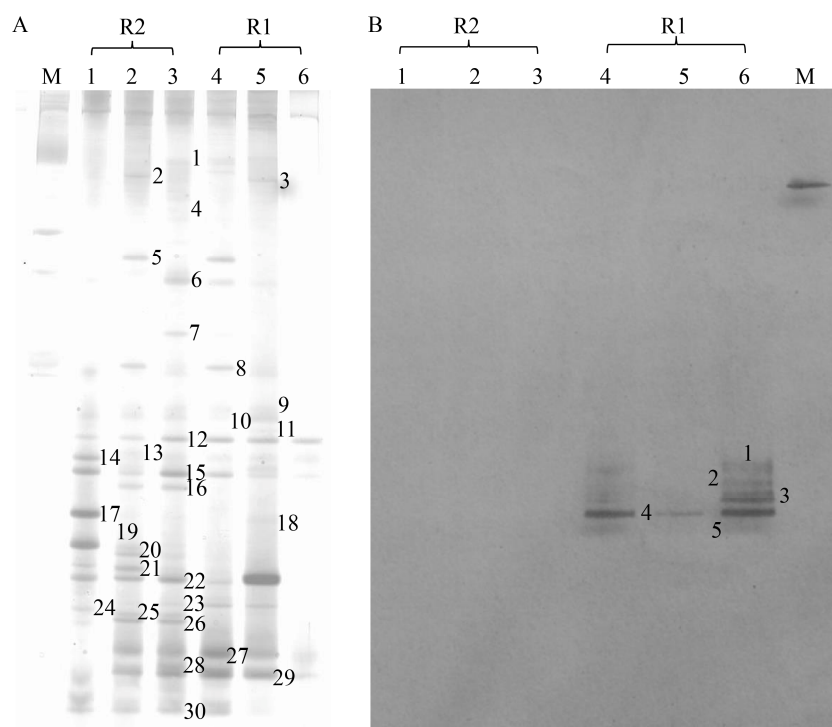


图5 R1和R2的细菌和绿藻群落结构

Figure 5 The bacteria and green algae community structure of R1 and R2

注: A: R1和R2菌群结构; B: R1和R2绿藻生物群落结构

Note: A: Microbial community structure of R1 and R2; B: Algal community structure of R1 and R2

的异常条件^[22]。R2反应器中检测到拟杆菌纲(*Bacteroidetes*)说明其反应器内部氧传质不均匀,存在厌氧区。拟杆菌纲(*Bacteroidetes*)作为功能菌,可分泌水解酶降解有机物^[23],从而进一步促进R2反应器厌氧条件下水解大分子有机物,提高COD去除效率。R1反应器废水处理过程中,藻类的添加进一步提高了R1反应器的DO浓度,使R1的DO浓度较R2提高了0.9倍,而没有检测到厌氧拟杆菌纲(*Bacteroidetes*)的存在也进一步表明R1反应器内氧传质均匀。

放线菌纲(*Actinobacteria*)具有絮凝作用^[24],对R1反应器形成菌藻共生体系起到积极的促进作用。研究发现,R1中存在放线菌纲(*Actinobacteria*),包括红球菌(*Rhodococcus*)、微杆菌(*Microbacterium*)和链霉菌属(*Streptomyces*)的6个不同菌属,而R2中存在放线菌纲(*Actinobacteria*),包括红球菌(*Rhodococcus*)、微

杆菌(*Microbacterium*)和链霉菌属(*Streptomyces*)的9个不同菌属。R1反应器中,由于藻的添加,菌藻共生体系的形成,有效减少了放线菌纲(*Actinobacteria*)的多样性。研究表明活性污泥系统中,放线菌纲(*Actinobacteria*)主要参与生物除磷,导致污泥膨胀和起泡问题^[25]。R1反应器中放线菌纲(*Actinobacteria*)多样性的降低可进一步减少污泥膨胀和起泡问题的出现。

α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)对有机碳的去除起着重要的积极作用^[26]。R1反应器中 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)包括:苯基杆菌(*Phenylobacterium*)和阿菲波菌(*Afipia*)的5个不同菌属,R2反应器中 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)包括:苯基杆菌(*Phenylobacterium*)、螯台球菌(*Chelatococcus*)和双头菌(*Labrys*)的6个不同菌属。实验结果表明,藻类的添加减少了R1反应器的 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)的多样性。 α -变

表 4 16S rRNA 基因序列比对结果
Table 4 Results of the 16S rRNA gene sequences alignment

Band	Description	GenBank accession No.	The most similar GenBank No.	Similarity (%)	Class
1	<i>Rhodococcus koreensis</i>	MW559123	LN867191	100	<i>Actinobacteria</i>
2	<i>Microbacterium</i>	MW559124	MT533961	95.00	<i>Actinobacteria</i>
3	<i>Microbacterium foliorum</i>	MW559125	MF664177	100	<i>Actinobacteria</i>
4	<i>Pseudomonas</i> sp.	MW559126	MT556436	98.54	<i>Gammaproteobacteria</i>
5	<i>Streptomyces</i> sp.	MW559127	KY214222	98.33	<i>Actinobacteria</i>
6	<i>Microbacterium</i> sp.	MW559128	MT397182	98.88	<i>Actinobacteria</i>
7	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MW559129	MN698979	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
8	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	MW559130	MT533897	99.44	<i>Actinobacteria</i>
9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MW559131	LC217386	99.03	<i>Gammaproteobacteria</i>
10	<i>Phenylobacterium</i>	MW559132	MN813835	99.43	<i>Alphaproteobacteria</i>
11	<i>Phenylobacterium aquaticum</i>	MW559133	MH321064	99.43	<i>Alphaproteobacteria</i>
12	<i>Pseudomonas cedrina</i>	MW559134	MN173422	100	<i>Gammaproteobacteria</i>
13	Uncultured <i>Microbacterium</i> sp.	MW559135	LC053129	98.84	<i>Actinobacteria</i>
14	<i>Methylophilus</i> sp.	MW559136	MH447392	98.54	<i>Betaproteobacteria</i>
15	<i>Phenylobacterium</i> sp.	MW559137	LC378769	99.43	<i>Alphaproteobacteria</i>
16	Uncultured <i>Flavobacterium</i> sp.	MW559138	KC886746	96.41	<i>Bacteroidetes</i>
17	<i>Afipia</i> sp. HS25-MRL	MW559139	KX128939	98.28	<i>Alphaproteobacteria</i>
18	<i>Delftia</i> sp.	MW559140	MT197047	100	<i>Betaproteobacteria</i>
19	<i>Labrys</i> sp.	MW559141	MT337403	98.86	<i>Alphaproteobacteria</i>
20	<i>Chelatococcus composti</i>	MW559142	MN596015	98.29	<i>Alphaproteobacteria</i>
21	<i>Phenylobacterium</i> sp.	MW559143	KX711548	100	<i>Alphaproteobacteria</i>
22	<i>Enterobacter asburiae</i>	MW559144	KY660468	99.03	<i>Gammaproteobacteria</i>
23	<i>Microbacterium foliorum</i>	MW559145	MF664177	100	<i>Actinobacteria</i>
24	<i>Microbacterium oxydans</i>	MW559146	MK942422	98.89	<i>Actinobacteria</i>
25	<i>Microbacterium maritipicum</i>	MW559147	MT409539	99.44	<i>Actinobacteria</i>
26	<i>Rhodococcus</i> sp.	MW559148	MH688784	98.89	<i>Actinobacteria</i>
27	<i>Microbacterium</i> sp.	MW559149	MT397197	98.89	<i>Actinobacteria</i>
28	<i>Rhodococcus</i> sp. TJ-13	MW559150	EU049202	99.45	<i>Actinobacteria</i>
29	<i>Rhodococcus</i> sp.	MW559151	MT588482	98.88	<i>Actinobacteria</i>
30	<i>Microbacterium paludicola</i>	MW559152	KP125969	98.89	<i>Actinobacteria</i>

形菌纲(*Alphaproteobacteria*)可进行多种代谢反应,如光合作用、固氮、氨氧化和甲基营养化^[27]。 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)的苯基杆菌属(*Phenylobacterium*)对复杂有机物质的降解起到积极有效的作用^[28]。结果表明,R1和R2反应器中的 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)主要为苯基杆菌属(*Phenylobacterium*),对养猪废水中复杂有机物的有效降解起到重要作用。

β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)是废水生物处

理过程中数量最多的原核生物^[29],其中的菌群主要涉及 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的转化。R1和R2反应器中分别检测到 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)的戴尔福特菌属(*Delftia*)和嗜甲基菌属(*Methylophilus*)。反应器中 β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)相关菌群的存在可促进养猪废水中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除。

γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)可分泌EPS^[30],有利于污泥絮体的形成从而促进反应器污泥的沉降性,提高出水水质。研究结果表明,R1反

表 5 18S rRNA 基因序列比对结果

Table 5 Results of the 18S rRNA gene sequences alignment

Band	Description	GenBank accession No.	GenBank No.	Similarity (%)	Phylum
1	<i>Desmodesmus armatus</i>	MW570772	MN879270	100	<i>Chlorophyta</i>
2	<i>Desmodesmus armatus</i>	MW570773	MN817678	99.28	<i>Chlorophyta</i>
3	<i>Desmodesmus communis</i>	MW570774	KY448333	99.03	<i>Chlorophyta</i>
4	<i>Acutodesmus deserticola</i>	MW570775	KX495014	99.32	<i>Chlorophyta</i>
5	<i>Desmodesmus</i> sp.	MW570776	LC505545	98.56	<i>Chlorophyta</i>

反应器中检测到 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)的假单胞菌(*Pseudomonas*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)的 3 个菌属种群, 而 R2 反应器中存在 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)的假单胞菌(*Pseudomonas*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)的 5 个菌属, 表明 R1 反应器中藻类的添加减少了菌群的多样性。

本文进一步检测了 R1 和 R2 反应器中藻类微生物的群落结构(图 5B, 表 5)。结果表明 R1 反应器中存在比较丰富的藻类微生物, 而 R2 反应器中没有检测到藻类微生物。R1 反应器的藻类微生物主要为链带藻属(*Desmodesmus*)和尖带藻属(*Acutodesmus*), 都属于绿藻门(*Chlorophyta*)。

研究发现链带藻属(*Desmodesmus*)对磷和金属离子具有较强的吸附能力, 其中磷的去除率达到 94%–100%^[31]。尖带藻属(*Acutodesmus*)不仅可快速脱氮除磷, 而且对光强度、CO₂、温度和 pH 等条件具有较强的耐受能力, 尤其是其在 pH 5.0–10.0 范围内仍显示良好的生长状况^[32]。养猪废水处理过程中, 曝气可导致反应器内的 pH 从 7.2 升高至 7.8 适于尖带藻属(*Acutodesmus*)生长。

3 结论

(1) R1 反应器形成的菌藻共生体系可有效地去除养猪废水中的 COD、NH₄⁺-N、TN 和 TP。与对照 R2 反应器相比, R1 的 COD 去除率提高了 5.1%; NH₄⁺-N 除率提高了 20.3%; TN 较 R2 提高了 19.4%; TP 较 R2 提高了 23.9%。

(2) 与 R2 相比, R1 的平均 EPS 含量提高 3.7%, SMP 平均增加了 38.5%。同时, R1 的污泥

粒径较 R2 增加了 14.8%, 污泥的 SVI 值较 R2 降低了 11.7%, 污泥的 SOUR 较 R2 提高了 64.8%, 且稳定的菌藻共生系统的形成, 进一步减少反应器出水中的悬浮固体浓度, 表明藻类的添加对 R1 污泥特性的改良。

(3) R1 反应器形成的菌藻共生体系可进一步优化微生物群落结构, 其中放线菌纲(*Actinobacteria*)、 α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)和 γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)为 R1 反应器的主要菌群, 对养猪废水处理起到重要作用。

(4) R1 反应器的藻类群落主要为绿藻门(*Chlorophyta*), 包括: 链带藻属(*Desmodesmus*)和尖带藻属(*Acutodesmus*), 对养猪废水的脱氮除磷起到重要作用。

REFERENCES

- [1] Liu XY, Zhang Q, Wu H, Chen W, Sheng XH, Nian HM, Xiao PY, Zhao TT. Study on treatment of raw swine wastewater by enhanced 3D-RBC with HN-AD bacteria and its microbial characteristics[J]. China Environmental Science, 2019, 39(9): 3848-3856 (in Chinese)
刘向阳, 张千, 吴恒, 陈旺, 盛小红, 念海明, 肖芃颖, 赵天涛. HN-AD 菌强化 3D-RBC 处理养猪废水及微生物特性研究[J]. 中国环境科学, 2019, 39(9): 3848-3856
- [2] Yang XM. Research on the treatment of digested piggery wastewater by bacteria strengthening microalgae biological system[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2018 (in Chinese)
杨翔梅. 细菌强化微藻生物系统对养猪废水厌氧消化液的处理研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2018
- [3] Tang CC, Zuo W, Tian Y, Sun N, Wang ZW, Zhang J. Effect of aeration rate on performance and stability of algal-bacterial symbiosis system to treat domestic

- wastewater in sequencing batch reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 222: 156-164
- [4] Ding XW, Wei D, Guo WS, Wang B, Meng ZJ, Feng R, Du B, Wei Q. Biological denitrification in an anoxic sequencing batch biofilm reactor: performance evaluation, nitrous oxide emission and microbial community[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 285: 121359
- [5] Zhang WL, Zhang Q, Li M, Wang HY, Li Y, Peng HJ, Feng JP. Microbial community and function evaluation in the start-up period of bioaugmented SBR fed with aniline wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 319: 124148
- [6] Rippka R, Herdman H. *Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria: Catalogue and Taxonomic Handbook. I. Catalogue of Strains*[M]. Paris: Institut Pasteur, 1992
- [7] Tang CC, Tian Y, Liang H, Zuo W, Wang ZW, Zhang J, He ZW. Enhanced nitrogen and phosphorus removal from domestic wastewater via algae-assisted sequencing batch biofilm reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 185-190
- [8] Su YY, Mennerich A, Urban B. Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: influence of algae and sludge inoculation ratios[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 105: 67-73
- [9] China Environmental Protection Bureau. *Standard methods for examination of water and wastewater*[S]. Chinese Environmental Science Press, 2002
- [10] Tian Y, Li ZP, Lu YB. Changes in characteristics of soluble microbial products and extracellular polymeric substances in membrane bioreactor coupled with worm reactor: relation to membrane fouling[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 122: 62-69
- [11] Huang WL, Li B, Zhang C, Zhang ZY, Lei ZF, Lu BW, Zhou BB. Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 187-192
- [12] Lee CS, Lee SA, Ko SR, Oh HM, Ahn CY. Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater[J]. *Water Research*, 2015, 68: 680-691
- [13] Lorenzen CJ. Determination of chlorophyll and pheo-pigments: spectrophotometric equations[J]. *Limnology and Oceanography*, 1967, 12(2): 343-346
- [14] Huo SH, Kong M, Zhu FF, Qian JY, Huang DM, Chen P, Ruan R. Co-culture of *Chlorella* and wastewater-borne bacteria in vinegar production wastewater: enhancement of nutrients removal and influence of algal biomass generation[J]. *Algal Research*, 2020, 45: 101744
- [15] Wang JX, Lei ZF, Wei YJ, Wang Q, Tian CX, Shimizu K, Zhang ZY, Adachi Y, Lee DJ. Behavior of algal-bacterial granular sludge in a novel closed photo-sequencing batch reactor under no external O₂ supply[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 318: 124190
- [16] Zhou XY, Liu XH, Huang ST, Cui B, Liu ZB, Yang Q. Total inorganic nitrogen removal during the partial/complete nitrification for treating domestic wastewater: Removal pathways and main influencing factors[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 256: 285-294
- [17] Galès A, Bonnafous A, Carré C, Jauzein V, Lanouguère E, Le Floch E, Pinoit J, De Poullain C, Roques C, Sialve B, et al. Importance of ecological interactions during wastewater treatment using high rate algal ponds under different temperate climates[J]. *Algal Research*, 2019, 40: 101508
- [18] Govorunova EG, Sineshchekov OA. *Express detection of water pollutants by photoelectric recording from algal cell suspensions*[A]//*Bioassays*[M]. Amsterdam: Elsevier, 2018: 289-308
- [19] Zhou X, Jin WB, Wang L, Ding WQ, Chen C, Xu XJ, Tu RJ, Han SF, Feng XC, Lee DJ. Improving primary sludge dewaterability by oxidative conditioning process with ferrous ion-activated peroxymonosulfate[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2020, 37(9): 1498-1506
- [20] He QL, Chen L, Zhang SJ, Chen RF, Wang HY, Zhang W, Song JY. Natural sunlight induced rapid formation of water-born algal-bacterial granules in an aerobic bacterial granular photo-sequencing batch reactor[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359: 222-230
- [21] Ma WW, Han YX, Ma WC, Han HJ, Zhu H, Xu CY, Li K, Wang DX. Enhanced nitrogen removal from coal gasification wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) in an oxygen-limited aeration sequencing batch biofilm reactor[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244: 84-91
- [22] Liu MT, Li QL, Sun HH, Jia SY, He XW, Li M, Zhang XX, Ye L. Impact of salinity on antibiotic resistance genes in wastewater treatment bioreactors[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 338: 557-563
- [23] Liang JH, Wang QH, Yoza BA, Li QX, Ke M, Chen CM. Degradation of guar in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor: impacts of salinity on performance robustness, granulation and microbial community[J]. *Chemosphere*, 2019, 232: 327-336
- [24] Agunbiade M, Pohl C, Ashafa A. A review of the application of bioflocualnts in wastewater treatment[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2016, 25(4): 1381-1389
- [25] Seviour RJ, Kragelund C, Kong YH, Eales K, Nielsen JL, Nielsen PH. *Ecophysiology of the Actinobacteria in*

- activated sludge systems[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2008, 94(1): 21-33
- [26] Tang P, Li JL, Li T, Tian L, Sun Y, Xie WC, He QP, Chang HQ, Tiraferri A, Liu BC. Efficient integrated module of gravity driven membrane filtration, solar aeration and GAC adsorption for pretreatment of shale gas wastewater[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 405: 124166
- [27] Zhang X, Zhao BW, Meng J, Zhou AJ, Yue XP, Niu YK, Cui Y. Efficiency, granulation, and bacterial populations related to pollutant removal in an upflow microaerobic sludge reactor treating wastewater with low COD/TN ratio[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270: 147-155
- [28] Nosek D, Cydzik-Kwiatkowska A. Microbial structure and energy generation in microbial fuel cells powered with waste anaerobic digestate[J]. *Energies*, 2020, 13(18): 4712
- [29] Felföldi T, Fikó RD, Mentés A, Kovács E, Máthé I, Schumann P, Tóth E. *Quisquiliibacterium transsilvanicum* gen. nov., sp. nov., a novel betaproteobacterium isolated from a waste-treating bioreactor[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(11): 4742-4746
- [30] Zheng Y, Zhou Z, Cheng C, Wang ZW, Pang HJ, Jiang LY, Jiang LM. Effects of packing carriers and ultrasonication on membrane fouling and sludge properties of anaerobic side-stream reactor coupled membrane reactors for sludge reduction[J]. *Journal of Membrane Science*, 2019, 581: 312-320
- [31] Rugnini L, Costa G, Congestri R, Antonaroli S, Sanità di Toppi L, Bruno L. Phosphorus and metal removal combined with lipid production by the green microalga *Desmodesmus* sp.: an integrated approach[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 125: 45-51
- [32] Varshney P, Sohoni S, Wangikar PP, Beardall J. Effect of high CO₂ concentrations on the growth and macromolecular composition of a heat- and high-light-tolerant microalga[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(5): 2631-2640