

Effect of Alkalinity Changes on Performance of Sulfidogenic Bioreactor and Microbial Community

Xinwei Li¹, Yangguo Zhao^{1,*}, Juncai Wang¹, Ru Liu¹, Jian Zhang¹, Aijie Wang²

¹Key Laboratory of Marine Environment and Ecology (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266100, China

²State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

*Email: yg.zhao@yahoo.com.cn

Abstract: To reveal the role of alkalinity in sulfate-reduction, the effect of influent alkalinity changes on sulfate reducing efficiency was elucidated, and the characteristics of sulfidogenic microbial community under fluctuating alkalinity was investigated in the anaerobic baffled reactor (ABR) by using chemical monitoring and molecular biotechnology. The results indicated that sulfate reducing efficiency increased from 40% to 70%, further to 95% when the influent alkalinity was improved from 500 mg/L, to 1000 mg/L and further to 2000 mg/L. Meanwhile, the structure of microbial communities presented a remarkable change with the alkalinity improvement, and some sulfate-reducing related bacteria were enriched. However, the alkalinity recovering to 1000 mg/L changed few bands of stable microbial community. It shows that sulfate reduction favored the higher alkalinity to some extent; the minor fluctuation in environmental factors is difficult to change the stable microbial community in a short time.

Keywords: alkalinity; sulfate reducing bacteria (SRB); denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

碱度对硫酸盐还原效率及微生物群落动态的影响

李新伟¹, 赵阳国^{1,*}, 王俊彩¹, 刘 茹¹, 张 健¹, 王爱杰²

¹中国海洋大学 海洋环境与生态教育部重点实验室, 青岛 266100

²哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090

*Email: yg.zhao@yahoo.com.cn

摘 要: 为阐明碱度在硫酸盐还原过程中的重要作用, 应用常规监测和分子生物学技术相结合探讨进水碱度改变时, 厌氧折流板反应器 (ABR) 的处理效能和相应的微生物群落的响应特征。反应器在进水碱度从 500 mg/L 提高至 1000 mg/L 和 2000 mg/L 时, 硫酸盐的去除率也由 40% 提高到 70% 和 95%。进水中碱度的提高引起了微生物群落的明显波动, 同硫酸盐还原相关的微生物类群得以富集, 而再次降低碱度却较难改变稳定的微生物群落模式。该研究表明一定范围内高碱度有利于硫酸盐还原过程, 环境因子的较小变化较难在短时间内改变稳定的微生物群落结构。

关键词: 碱度; 硫酸盐还原菌; 变性梯度凝胶电泳

1 引言

高浓度有机废水的处理多采用厌氧技术, 但是当废水中含有高浓度硫酸盐时, 会给废水处理带来很大困难, 即由于硫酸盐还原过程的介入, 使厌氧降解过程出现了产甲烷菌 (MPB) 与硫酸盐还原菌 (SRB) 之间对底物的竞争以及硫酸盐还原产物对 MPB 和 SRB 毒性抑制等问题^[1]。基于此, 应用两相厌氧工艺中的产

酸相对硫酸盐进行预去除的策略得到广泛认同。

碳硫比、硫氮比、硫酸盐负荷、水力停留时间和碳源种类等环境因子都能够影响产酸硫酸盐还原效率, 国内外学者对这些生态因子在硫酸盐还原过程中的作用也进行了较为深入的探讨^[2,3]。然而, 碱度作为直接影响系统 pH, 从而保持系统稳定性的关键环境生态因子, 却很少有研究报道。在硫酸盐还原过程中, 碱度可以及时缓冲产酸菌产生的挥发酸 (VFA), 并降低 CO₂ 的产生和溶解对 pH 值的影响, 维持体系所需

资助项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (200804231030); 国家自然科学基金 (40801193), 国家科技支撑计划 (2006BAD04A09)

pH 值。硫酸盐还原体系中与酸碱平衡有关的共轭酸碱对主要有： $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$ ， $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ ， $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ ， $\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$ ， HAc/Ac^- 等。随着反应体系 pH 值的不同，这些共轭酸碱对在各种形态间的分布也会发生变化^[4]。

本研究应用厌氧折流板反应器(ABR)，探讨调节进水碱度过程中，硫酸盐还原效率的变化情况，同时应用分子生物学方法解析微生物群落对碱度变化的响应，研究结果可为 SRB 生态学理论提供有益补充，也可为硫酸盐废水处理工艺的改进和革新提供参考。

2 材料与方法

2.1 试验设计

试验采用厌氧折流板反应器，装置分为五个格室，总体积24 L，有效容积21 L。模拟废水成分中COD为4000 mg/L(乳酸和/或乙酸)， SO_4^{2-} 为2000 mg/L，另加少量 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 以补充氮磷，pH 7.0~7.5，水力停留时间(HRT) 24 h，运行温度 $35\pm 1^\circ\text{C}$ 。根据进水碱度不同，试验分为五个阶段，第一阶段为反应器启动阶段，不调节进水碱度，进水碱度约为500 mg/L，历时46 d；第二阶段进水碱度通过投加 NaHCO_3 调节至1000 mg/L左右，历时32 d；第三个阶段为从第79 d至124 d，将进水碱度提升到2000 mg/L；第四阶段是从第125 d至135 d，又将碱度降到1000 mg/L；最后一阶段是从第136 d开始，将碱度提高至2000 mg/L。反应器运行过程中，根据文献^[4]的方法，对进出水中的VFA、硫酸盐浓度、碱度和pH值、硫化物浓度及氧化还原电位(ORP)进行检测。

2.2 微生物群落分析

定期于反应器第3格室中部吸取活性污泥，采用土壤DNA提取试剂盒(Mobio, USA)提取微生物总DNA。PCR扩增采用细菌16S rRNA基因通用引物BA341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 BA534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG -3')，引物BA534R 5'端带有40 bp GC夹，根据文献^[5]对PCR产物进行DGGE分析。

DGGE图谱数字化后，对DGGE图谱中各泳道微生物进行Shannon-Weiner多样性指数(H')分析， H' 通过公式 $H' = -\sum P_i \ln P_i$ 计算，其中 P_i 是泳道中条带的相对信号强度；采用SPSS软件(SPSS Inc., Chicago IL)以Ward's方法对各泳道群落进行聚类分析，并与反应器运行状态相结合，解析群落变化与反应器功能的关系。

DGGE图中条带按文献^[5]方法回收并克隆测序。序列通过RDP(<http://rdp.cme.msu.edu/>)中的Seq Match程序进行分类，然后以Blast在线工具检索最相近序列。

3 结果与讨论

3.1 碱度变化对硫酸盐去除效率的影响

试验中的碱度主要为 NaHCO_3 碱度，可缓冲体系pH值的变化，从而维持体系相对稳定，并为功能微生物提供良好的生存环境，提高硫酸盐去除率。从图1可见，在ABR运行的第一阶段，进水中未加 NaHCO_3 调节碱度，进水碱度很低的情况下，出水pH为6.5左右，但波动很大。由文献^[2]可知，当系统内pH维持在6.0左右时，反应体系主要是 Ac^- (挥发酸，以 Ac^- 表示)碱度，体系对于酸的缓冲能力减弱，反应器呈现酸化的趋势。

由图1可见，反应器在前46 d内进水碱度维持在500 mg/L左右，体系的去除率在40%，而且波动较大。从第47 d开始，加入 NaHCO_3 进行调节进水碱度，使其维持在1000 mg/L，其去除率逐渐提高至75%，此时，出水pH上升至7.0以上，且出水碱度也随之升高至2500 mg/L。 NaHCO_3 为强碱弱酸盐，当体系中 H^+ 增加时， HCO_3^- 可以与其反应，缓冲pH变化。从第78 d开始，将进水碱度调整为2000 mg/L，硫酸盐的去除率提高到90%。文献表明^[6]，在反应器启动初期，当不调节进水碱度时，进水在产酸菌的作用下，产生大量酸性末端产物，导致pH值下降，在低pH下，硫化物易生成 H_2S ，由于中性的 H_2S 更容易进入细胞体内，故能够抑制甚至杀死SRB。所以在启动期，SRB对 H_2S 的毒性耐受力较差，最终将导致SRB生长和繁殖能力降低，硫酸盐去除率下降。而在高pH下，体系中主要以 HS^- 形式存在，降低了对SRB的毒性，从而使硫酸盐的去除率有所提高。

SRB获取能量的主要途径主要是硫酸盐异化还原过程，该过程须在较低的氧化还原电位下才能进行，文献^[6]指出，要维持硫酸盐去除率在80%以上，ORP必须低于-320 mV。ORP受系统内pH值的直接影响，从图1可以看出，当系统内pH在6.2~6.8之间时，ORP维持在-320 mV左右；当投加碱度后，系统出水pH值逐步上升，系统内ORP不断降低，最终维持在-420 mV左右。可见，pH值与ORP呈负相关。

在反应器的启动期，进水的碱度大约为500 mg/L，末端产物为乙酸和丙酸。当碱度提高为1000 mg/L时，液相末端产物组分中乙酸占据绝对优势，挥发酸总量

上升到3500 mg/L。当碱度继续提高到2000 mg/L时,液相末端产物总量降低,乙酸含量降低至1500 mg/L,但依然占据主导地位。此时VFA降低,可能是在反应器后几个格室中,逐步形成了产甲烷环境,产甲烷菌利用了前几格室产生的VFA,从而使VFA总量减少。可见在低碱度下运行时,反应器产酸发酵能力会逐步降低,而碱度提高能增强反应器产酸功能,并影响着发酵类型。

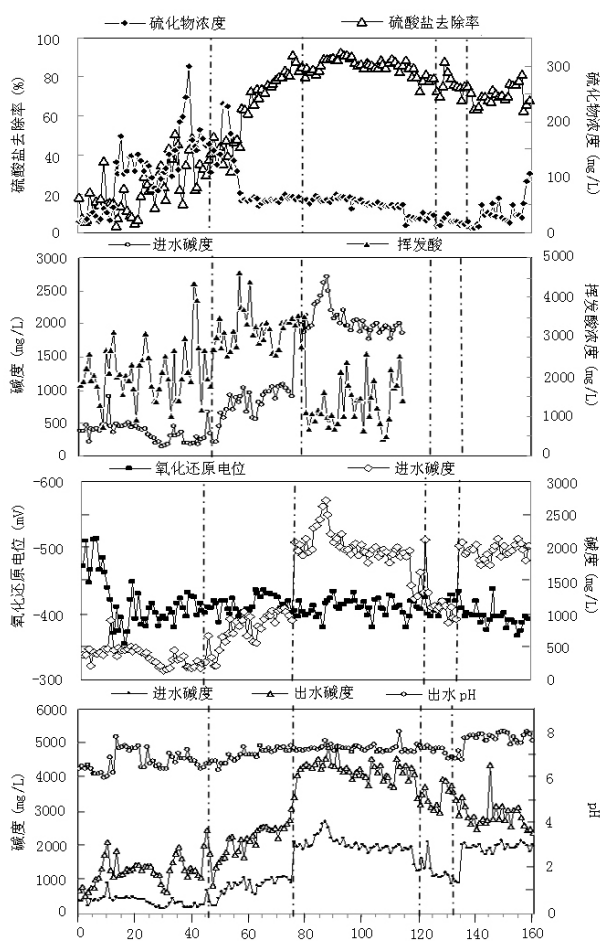


Figure 1. Performance of the sulfidogenic reactor (ABR) under different concentrations of influent alkalinity condition
图1 反应器运行效率及状态监测

3.2 碱度调节对微生物群落结构的影响

微生物群落的变化对反应器的去除效率有很大影响。分别在反应器运行的不同时期(第0 d, 10 d, 18 d, 29 d, 36 d, 43 d, 53 d, 63 d, 77 d, 85 d, 103 d, 111

d, 120 d, 136 d)获取泥样,得到微生物群落DGGE图谱(图2)及其聚类分析(图未给)。对DGGE图谱中的主要条带进行克隆测序分析,结果如表1所示。

根据 DGGE 图谱及其聚类结果,每个阶段内的微生物群落间的相似性较高,而相邻阶段间的微生物群落表现出逐渐过渡的群落演替趋势。

在第一次提高进水碱度至 1000 mg/L 后(53 d),微生物群落多样性有所增加,Shannon-Weiner 多样性指数由 2.91 上升至 3.16,条带 A8, A9 和 A10 得以富集。测序表明它们分别与 *Desulfomicrobium baculatum*, *Candidatus ubique* 和 *Desulfomicrobium macestii* 相似性较高。*Candidatus ubique* 在硫酸盐废水处理中不常见,这说明提高进水碱度改变了反应器内原有环境,使得微生物多样性得以提高。

对 DGGE 图谱中各群落(泳道)进行 Shannon-Weiner 多样性分析可以定量描述不同阶段微生物种类及数量。多样性指数(H')可以评价一个微生物群落内物种的丰富性以及微生物数量的多少。由图 2 可以看出,反应器运行第一阶段,即前 50 d,微生物多样性指数为 2.62~2.94,说明在该阶段微生物的物种比较丰富,反应器运行良好,可以支撑更多种类的微生物生存。在反应器运行 46 d 以后, DNA 条带有明显变化,微生物多样性指数提高至 3 以上,表明微生物多样性增加,可能是由于进水中碱度的增加使原来未处于优势种群的菌落,得以迅速生长繁殖,进而提高了生物多样性。在第三阶段,当碱度提高至 2000 mg/L 时,生物多样性指数变化不大。

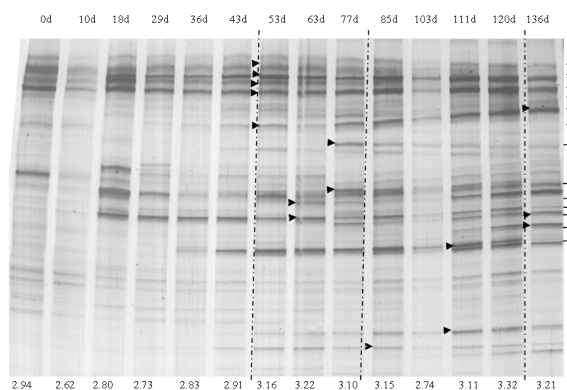


Figure 2. DGGE profiles of microbial communities

图2 反应器中微生物群落的 DGGE 图谱

图上标 0-136d 为取泥时间;右边 A1-A15 为测序条带;各泳道下边数字 2.73-3.32 为生物多样性指数

3.3 特异类群对进水碱度变化的响应

由图2可见,发现常驻种群条带(A1, A2, A3和A4)在反应器的启动和运行过程中仅数量上有些变化,当碱度剧烈变化时,这些条带波动幅度较小。测序表明它们分别与*Alkaliflexus imshenetskii*, *Thauera terpenica*, *Sulfuricurvum kujiense*和*Desulfomicrobium norvegicum*等菌株相似性较大。这些菌均为厌氧微生物,存在于各种厌氧环境中,部分种属能够利用广泛的底物发酵产酸。根据文献^[7],在硫酸盐代谢过程中,反应器中微生物可分为两大类群,即产酸菌和SRB。产酸菌负责将大分子底物(蔗糖/果糖等)分解为SRB可利用的底物乙酸,乙醇,氢气,甲醇,甲酸等,可见这些常驻菌群对硫酸盐还原过程具有重要意义,通过产酸菌和SRB的种间协作,形成良好的底物食物链关系,维持微生物代谢的较佳环境。

第一阶段初期生物多样性比较丰富,但随着反

应器的运行,生物多样性指数呈降低趋势,部分微生物条带逐渐消亡,如条带A6和A7,这可能与革兰氏阴性菌对碱度较为敏感有关^[6]。而条带A10和A13所指示的种群开始富集。

第二阶段碱度提高至1000 mg/L的过程中,*Veillonella* sp. S101, *Acinetobacter soli*, *Desulfomicrobium baculatum*, *Spirochaeta* sp. Buddy得以富集;继而提高至2000 mg/L时, *Desulfomicrobium macestii* 得以富集,同时*Veillonella* sp. S101, *Acinetobacter soli*, *Desulfomicrobium baculatum*和*Spirochaeta* sp. Buddy所指示的条带浓度继续加强。

Desulfomicrobium baculatum 和 *Desulfomicrobium macestii* 为不完全氧化型SRB^[8], 主要利用乙醇和H₂为电子供体还原硫酸盐,生长环境酸碱度范围较宽,最适宜范围为pH6.0~6.5,是该反应器中硫酸盐去除率的主要贡献者。

Table 1. The Most Similar Sequences of DGGE Bands by BLAST and SeqMatch

表 1 通过 BLASTn 和 SeqMatch 进行的相似性检索结果

条带	序列长度	相似菌; GenBank 登录号	相似性 (%)	所属门类
A1	189	<i>Alkaliflexus imshenetskii</i> ; AJ784993	93%	CFB bacteria
A2	194	<i>Thauera terpenica</i> ; AJ005817	97%	β-proteobacteria
A3	161	<i>Sulfuricurvum kujiense</i> ; AB053951	99%	ε-proteobacteria
A4	192	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i> ; AJ277897	92%	δ-proteobacteria
A5	195	<i>Veillonella</i> sp. S101; FJ374768	99%	Firmicutes
A6	195	<i>Acinetobacter soli</i> ; EU290155	98%	γ-proteobacteria
A7	169	TM7 phylum sp. oral taxon 348; GQ422738	90%	Bacteria
A8	195	<i>Desulfomicrobium baculatum</i> ; AJ277894	97%	δ-proteobacteria
A9	161	<i>Candidatus Pelagibacter ubique</i> ; AF510191	100%	α-proteobacteria
A10	195	<i>Desulfomicrobium macestii</i> ; AJ237604	95%	δ-proteobacteria
A11	169	<i>Clostridium</i> sp. L15; AY337519	96%	Firmicutes
A12	194	<i>Desulfomicrobium baculatum</i> ; AJ277896	95%	δ-proteobacteria
A13	194	<i>Desulfovibrio</i> sp. H1; FJ225426	95%	δ-proteobacteria
A14	179	<i>Spirochaeta</i> sp. Buddy; AF357916	100%	Spirochaetes
A15	195	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i> ; AJ277897	97%	δ-proteobacteria

4 结论

进水碱度变化会明显影响硫酸盐的去除率。在没有加入NaHCO₃调节碱度的情况下,反应器的去除率为45%左右,当碱度提高至2000 mg/L后,去除率提高到90%。

低碱度下,反应器内的产酸菌代谢产物降低了系统的pH值,抑制了某些菌种的生长代谢,如*Veillonella* sp. S101和*Acinetobacter soli*。在硫酸盐还原过程中,一些常住菌如*Alkaliflexus imshenetskii*, *Thauera terpenica*, *Sulfuricurvum kujiense*和*Desulfomicrobium norvegicum*等发挥重要的作用。

References (参考文献)

- [1] Hu Mingcheng, Long Tengru. A study of the substrate competition between sulfate reducing and methane producing or acetogenic bacteria [J], *Journal of Guilin University of Electronic Technology*, 2006, 26(5):390-394.
胡明成, 龙腾锐. 含硫酸盐废水厌氧处理过程中底物的竞争[J], *桂林电子科技大学学报*, 2006, 26(5): 390-394.
- [2] Wang Aijie, Ren Nanqi. Effect of key factors on sulfate reduction in an acidogenic sulfate-reducing reactor [J], *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2002, 34(4):18-26.
王爱杰, 任南琪. 产酸脱硫反应器中影响硫酸盐还原的关键因素研究[J], *哈尔滨工业大学学报*, 2002, 34(4):18-26.
- [3] Muyzer G, Stams A J. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria [J], *Nature reviews. Microbiology*, 2008, 6(6):441-454.
- [4] APHA, Standard Methods for the Examination of Water and

- Wastewater[M]. 20th Ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA. 1998.
- [5] Zhao Y Ren N, Wang A, Contributions of fermentative acidogenic bacteria and sulfate-reducing bacteria to lactate degradation and sulfate reduction[J], *Chemosphere*, 2008, 72:233-242.
- [6] Zhen Weidong, Ren Nanqi, Li Jianzheng. Effect of pH, ALK and ORP on removal rate of sulfate in acidogenic sulfate-reducing bioreactor[J], *Journal of Heilongjiang Commercial College (Natural Sciences Edition)*, 2003,19(2):174-177.
- 甄卫东, 任南琪. pH 值、碱度对产酸硫酸硫酸盐还原反应器硫酸盐去除率的影响. 哈尔滨商业大学学报, 2003,19(2): 174-177.
- [7] Maree J P, Strydom W F. Biological Sulphate Removal in an Upflow Packed Bed Reactor, *Water Research*, 1985, 19(9): 1101-1106
- [8] Barton L L, Sulfate-Reducing Bacteria [M]. New York: Plenum Press, 1995.