



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202102064

中图分类号 TU992

文献标识码 A

蔡丽云, 薛星韬, 袁扬, 等. 光生物反应器中活性污泥和藻类的共培养及微生物群落分析[J]. 环境工程学报, 2021, 15(7): 2502-2511.

CAI Liyun, XUE Xingtao, YUAN Yang, et al. Co-culture of activated sludge and algae in a photobioreactor and analysis of microbial community[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(7): 2502-2511.

光生物反应器中活性污泥和藻类的共培养及微生物群落分析

蔡丽云*, 薛星韬, 袁扬, 王静雯, 夏敬丹, 孙仁悦, 赖铭海, 司马谨, 陈洪润

厦门大学嘉庚学院环境科学与工程学院, 河口生态安全与水环境健康福建省高校重点实验室, 漳州 363105

第一作者: 蔡丽云(1986—), 女, 硕士, 副教授。研究方向: 水污染控制工程。E-mail: 576759695@qq.com

*通信作者

摘要 利用污水处理厂好氧池活性污泥和来自二沉池壁的藻类构成菌藻生物反应器用以处理实际生活废水, 探讨了不同泥藻接种比对废水处理效果的影响, 并分析了稳定运行后的微生物群落组成。结果表明: 泥/藻质量比为 1:0.75 的混合系统对污染物质 (COD、TN 和 TP) 的去除效率最高; 当 HRT 为 2 d 时, 按泥/藻质量比为 1:0.75 接种的光生物反应器 (初始 TSS 为 $1.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 在搅拌和太阳光照射的条件下, 对 NH_4^+-N 的去除率可达 99.7%, 对 PO_4^{3-} 的去除率约为 70%。利用高通量测序技术对运行 42 d 后反应器内 (SRT 为 15 d) 的细菌群落进行分析发现, 优势细菌为厚壁菌门的微小杆菌属 (*Exiguobacterium*), 蓝菌门的光合产氧蓝细菌属 (*Cyanobium*) 和变形菌门 α -变形菌纲的不产氧光合好氧异养固氮红杆菌属 (*Rhodobacter*), 其相对丰度分别为 23.32%、15.23% 和 5.77%。同时, 反应器内还存在氧化亚硝酸盐的硝化螺旋菌 (*Nitrospira*), 以及除磷的不动杆菌 (*Acinetobacter*) 和能进行好氧反硝化的副球菌 (*Paracoccus*), 其相对丰度分别为 1.19%、0.58% 和 0.35%。

关键词 菌藻生物反应器; 泥/藻质量比; 生活污水; 细菌群落组成

菌藻共培养系统利用菌藻之间的共生关系来低成本地进行污水处理和产油脂藻类的生产近年来受到了越来越多的关注^[1-3]。能进行光合作用的微藻或蓝细菌在有光和 CO_2 的情况下将营养物质吸收到它们的生物体中, 产生 O_2 , 供异养细菌用于氧化废水中的有机物质。异养细菌产生的 CO_2 可以被微藻和蓝细菌吸收利用。这样不仅可以减少污水处理时的能源消耗和 CO_2 的排放, 也更有利于污染物质 N、P 的回收。在共培养系统中, 不同的接种量、操作条件、废水组成和反应器配置等因素对污染物去除和生物量的生长有一定的影响^[4]。废水中污染物质组分和菌藻接种量对废水处理效果的影响已在多项研究中^[5-6]得到报道。JI 等^[5]研究发现, 当小球藻与地衣芽孢杆菌质量比为 1:3 时, 干细胞质量和叶绿素 a 累积均达到最高值, 第 10 天时, 体系分别去除了 86.55%、80.28% 和 88.95% 的溶解性 COD、总磷和总氮。与单一微藻系统相比, 添加细菌后的共培养体系对 COD、总氮和总磷的去除效率分别提高了 22.1%、20% 和 8.1%^[6]。

然而, 微藻与细菌共培养体系在生物量收获方面仍无法克服固有的障碍。收获生物质的传统

收稿日期: 2021-02-09; 录用日期: 2021-04-23

基金项目: 漳州市自然科学基金资助项目 (ZZ2018J25); 厦门大学嘉庚学院 2019-2020 学年大学生创新创业项目 (317; 318)

技术是混凝和离心分离,这些传统技术的效率不高,但运行成本却很高。添加活性污泥可以解决微藻沉降和生物质收获的缺点,与微藻相比,活性污泥具有更好的沉降能力,对COD的去除率也比单一或单独几种细菌高^[7]。因此,一些研究将微藻与活性污泥相结合,形成泥藻共培养体系^[1,4,8-9]。NGUYEN等^[1]认为,在3:1(小球藻:活性污泥)的比例下,总生物产量和COD去除率最高,微藻在生物同化脱氮过程中起主导作用,而活性污泥则是提高COD去除率的主要因素。SU等^[8]发现,当泥藻接种比为1:5时,对N和P的去除率最高(分别为91.0%和93.5%),同时藻类对COD去除率没有影响。在另一项研究中,活性污泥和小球藻的最佳比例为1:2,此时对城市污水处理的效率最高^[9]。之所以前期研究得出的最佳泥藻比各不相同,可能是因为废水组成和微藻种类的差异。NGUYEN等^[1]研究的是高负荷浓度(COD 500 mg·L⁻¹、NH₄⁺-N 200 mg·L⁻¹和总磷 45 mg·L⁻¹)的人工合成废水和悬浮小球藻/泥系统;SU等^[8]研究的是实际生活废水(COD 380 mg·L⁻¹、总氮 50 mg·L⁻¹和PO₄³⁻ 8 mg·L⁻¹)和混合微藻/泥系统,而MUJTABA等^[9]研究的是低浓度的合成废水(COD 60 mg·L⁻¹、NH₄⁺-N 50 mg·L⁻¹和总磷 1.3 mg·L⁻¹)和固定化小球藻/污泥系统。因此,较少有研究利用混合藻类和活性污泥处理实际废水^[2,8],也鲜有研究涉及多种微生物(菌藻)在处理实际废水的微型生态系统中的作用^[2]。

混合微藻(光合细菌和藻类)可直接在污水厂二沉池池壁获得,其获得成本和难度比单一微藻要低得多;活性污泥中存在的多种细菌有些可促进藻类生长,如产生藻类所需的CO₂和维生素,有些却可能会抑制藻类生长^[10]。有研究结果^[11]表明,光合细菌营养价值高、净化水质能力强,且具有增强动物抗病力的功能。光合微生物与其他异养微生物混菌共培养是近年来的研究热点,该体系弥补了光合微生物纯培养时易染菌、不稳定等缺陷,在污水处理、土壤改善、生物降解有害物质、生产高附加值产物方面拥有广阔的应用前景^[12]。但是,这些混菌聚生体的应用仍旧存在一定的困难。比如,如何发现适应生物工程应用的混菌体系是当前需要解决的问题^[12]。

实际废水比人工合成废水含有更复杂的成分,因此,采用混合泥藻系统处理实际生活废水,获得的优势混菌体系可适应工程应用。基于以上原因,本研究将混合微藻和好氧池活性污泥接种至光生物反应器中共培养来处理实际生活废水,在序批式运行方式下考察了泥藻对实际生活废水中碳和营养物质的去除能力,并利用高通量测序技术分析了稳定后系统中的优势微生物组成,以及他们之间的协同作用。

1 材料与方法

1.1 菌藻来源和实际生活废水

本实验采用的活性污泥取自漳州市开发区生活污水处理厂好氧池,混合藻类则取自该水厂的二沉池出水堰壁。取回的活性污泥和混合藻类分别静置2 h后去掉上清液,剩下的混合液分别作为菌、藻接种物。藻接种液中主要的藻类型在显微镜下观察为丝状微藻-蓝藻门鞘丝藻属,也有一些硅藻、栅藻等微藻。

实际生活废水取自该污水处理厂的沉砂池上清液,将其作为处理对象和营养物来源。实验期间废水水质指标为:化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)为(265±9) mg·L⁻¹, NH₄⁺-N为(27±1.6) mg·L⁻¹, PO₄³⁻为(1.8±0.3) mg·L⁻¹,总磷(total phosphorus, TP)为(4±0.5) mg·L⁻¹,总氮(total nitrogen, TN)为(34±2.2) mg·L⁻¹, pH为7.5±0.7,总悬浮固体(total suspended solids, TSS)为(12±1.5) mg·L⁻¹。

1.2 实验装置和实验方法

1) 接种比实验。接种比实验在室内,在由有机玻璃(深度20 cm,直径10 cm,有效容积1.5 L)制成的6组敞口光生物反应器中进行。初始接种的藻液TSS质量浓度为16.7 g·L⁻¹。初始接种的活性污泥TSS为质量浓度9.8 g·L⁻¹。按照SU等^[8]的接种比,6个反应器分别投加600、548、479、

400、260、0 mL 的藻液和 0、90、200、330、570、600 mL 的活性污泥，得到只投加藻类、10:1、4:1、2:1、0.75:1 (w:w) 和只投加污泥的藻泥比。然后将 0.35 L 预处理后的实际生活污水 (经过格栅、除砂、初沉处理) 加入到生物反应器中，考察菌藻对碳和营养物的去除率。各组反应器投加的污泥量和藻种量见表 1。利用太阳光，从上部和侧面进行照射。为了防止泥藻沉降，各反应器采用磁力搅拌，搅拌速度为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，每天从早上 8 点开始搅拌 12 h，后静置 12 h，取静置后的上清液待测。实验装置示意图见图 1。

2) 序批式运行实验。根据接种比实验确定的最佳藻泥接种比，接种混合藻类和活性污泥至 1.5 L 有机玻璃制成的敞口光生物反应器中，在室内进行序批式运行培养，即：反应器内混合液每天通过磁力搅拌 23h，搅拌转速为 $(225 \pm 20) \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，以防止菌藻沉淀，后静置 1 h，最后用实际生活污水换掉上清液。第 1~30 天，每天换水 400 mL，混合液总有效体积为 1 L，因此，水力停留时间 (hydraulic retention time, HRT) 为 2.5 d；第 30~55 天，每天换水 500 mL，HRT 为 2 d，同时利用太阳光在白天从上表面和侧面进行照射，一天中光照强度在中午 13 点左右达到最大值，侧面光强约 $65\ 500 \sim 25\ 000 \text{ lx}$ 。实验期间室内最高气温为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ，最低气温为 $14 \text{ }^\circ\text{C}$ ，平均气温为 $22 \text{ }^\circ\text{C}$ 。每 3 d 从反应器内取出 200 mL 菌藻混合液测叶绿素含量和生物量，污泥龄 (sludge retention time, SRT) 为 15 d。每天上午 10:00~11:00 测反应器中 pH 和 DO 值，然后取静置 1 h 后上清液经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后测 TOC、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 PO_4^{3-} 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 等。

1.3 分析方法

TOC 和 TIC 采用 TOC 仪进行测量 (TOC-L CPH, 岛津)；pH 采用台式酸度计 (PHS-3E, 雷磁)；DO 浓度采用便携溶氧仪 (YSI 550A-12, 维赛) 测定；光照强度采用照度计 (TES-1330A, 泰仕) 进行测量；TSS 采用重量法测定；COD 采用重铬酸钾法测定；TN 采用碱性过硫酸钾氧化法测定；TP 采用碱性过硫酸钾氧化法测定； $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 采用纳氏试剂法测定；可溶性磷酸盐 (PO_4^{3-}) 采用钼锑抗分光光度法测定； $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法^[13] 测定。

1.4 DNA 抽提和 PCR 扩增

取反应器运行至第 42 天时的混合均匀后的菌藻混合液 50 mL，用 $0.22 \mu\text{m}$ 醋酸纤维滤膜过滤后，再取滤膜上样品经真空冻干后碾碎提取 DNA，DNA 的提取采用 FastDNA@SPIN Kit for Soil (Qiagen, CA, USA) 试剂盒。用 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对细菌 16S rRNA V3~V4 区进行 PCR 扩增，扩增程序为： $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min，27 个循环 ($95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s， $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s， $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s)，最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。用 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 引物对真菌 ITS 区进行 PCR 扩增，扩增程序为： $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min，35 个循环 ($95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s， $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s， $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s)，最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 仪为 GeneAmp@9700 型 (美国 ABI 公司)，扩增体系为 $20 \mu\text{L}$ ：

表 1 各组接种污泥量和藻种量

Table 1 Biomass of inoculated sludge and algae added in each group

组号	投加藻类质量/g	投加污泥质量/g	总质量/g	藻泥质量比
1	6.66	3.33	10.0	2:1
2	8.0	2.0	10.0	4:1
3	0	10.0	10.0	0:1
4	9.1	0.9	10.0	10:1
5	4.3	5.7	10.0	0.75:1
6	10.0	0	10.0	1:0

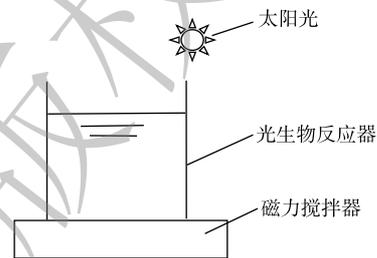


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experimental device

4 μL 5 \times FastPfu 缓冲液, 2 μL 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, 0.8 μL 引物 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 0.4 μL FastPfu 聚合酶; 10 ng DNA 模板。

1.5 Illumina Miseq 测序和数据处理

使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 DNA 凝胶提取试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测。利用 QuantiFluorTM-ST (Promega, USA) 进行检测定量。利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序。使用 Uparse 软件 (版本号 7.0.1090, <http://drive5.com/uparse/>), 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类。利用 RDP classifier (版本号 2.11, <http://rdp.cme.msu.edu/>) 对每条序列进行物种分类注释, 比对 16S_bacteria Silva 数据库 (版本号 132, <http://www.arb-silva.de/>), 设置比对阈值为 70%。

2 结果与讨论

2.1 菌藻投加比对出水水质的影响

按不同接种比 (表 1) 接种的各组的出水水质如图 2 所示。由图 2 可知, 在藻泥质量比为 0.75:1 的 5 号出水中 COD、TN 和 TP 的质量浓度最低, 而只添加活性污泥的 3 号次之。3 号的污泥质量浓度比 5 号高, 这说明投加一定量的藻类的菌藻共生系统比纯污泥系统对污染物的处理效果要好。但添加藻类较多的 1 号和 2 号出水 COD 较 5 号高, 纯污泥的 3 号也是如此。大部分研究表明, 藻类不能去除 COD。SERENA 等^[14]认为, 小球藻接种对 COD 去除率没有显著影响。GARC 等^[15]也报道了类似的结果, 他们发现微藻并不影响猪场废水中有机碳的总去除率。由于微藻不能去除有机物, 因此, 有机物的去除主要应该是细菌作用的结果。但添加污泥最多的 3 号出水 COD 也比 5 号

高。这可能是因为, 纯污泥系统在只搅拌的情况下, 溶解氧不足, 细菌对有机物的去除能力较弱。而添加一定微藻后, 藻类产生的 O_2 可促使细菌吸收降解有机物。对藻泥质量比为 10:1 的 4 号和纯藻类的 6 号来说, 其接种的藻类量比其他 4 组均要多, 其出水 COD、TN 和 TP 质量浓度也均比其他组高得多, 说明过高的藻质量浓度可能不利于营养物质的去除。这可能是因为, 大量的藻在反应器内, 遮挡减弱了太阳光强, 反应器内部光照强度不足, 藻类的光合作用受到抑制; 同时, 由于细菌数量少, 产生的 CO_2 有限, 只从空气中获得的 CO_2 供应不足, 从而影响了藻类对营养物质的吸收^[16]。由此可见, 在菌藻反应器中, 考虑污染物去除率, 泥和藻的量应该有一个最佳配比。在该配比下, 活性污泥中的异养细菌能够充分降解有机物, 产生的 CO_2 能供给藻类光合作用, 而藻类光合作用不被限制, 产生的 O_2 能供给异养细菌, 从而两者协同取得较好的有机物和营养物质去除率。在本实验中, 在藻泥为 0.75:1(w:w) 的反应器 (5 号) 中, 菌藻协同作用效果较好, 对 COD、TN 和 TP 的去除效率分别达到了 87.5%、81.1% 和 39.4%。

2.2 序批式运行实验时显微镜下的菌藻形态变化

按 0.75:1 的接种比, 接种 0.48 g 藻种和 0.64 g 污泥至 1.5 L 的光生物反应器中, TSS 质量浓度为 1.12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 按 1.2 节的运行条件进行为期 55 d 的序批式共培养。在显微镜下进行定性观察发现,

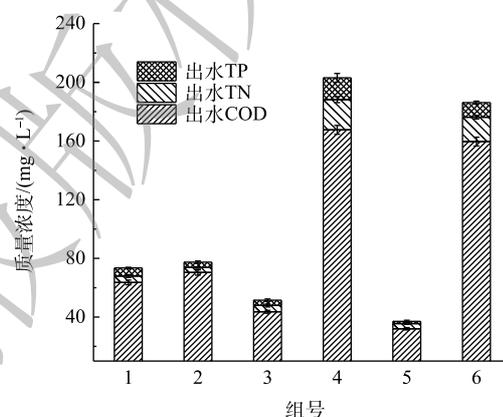


图 2 不同接种比的反应器 COD、TN 和 TP 出水质量浓度的变化

Fig. 2 Effluent concentrations of COD, TN and TP in the reactors with different inoculation ratios of algae to activated sludge

在培养开始时,污泥絮体较分散,且菌藻直接是分离状态(图3(a)),接种的微藻具有多样性(栅藻、丝状绿色蓝藻、单细胞绿藻和硅藻等)。之前研究^[17]也发现,小球藻等单细胞微藻絮凝能力低,沉降能力差。因此,反应器中的不可沉淀微生物(如单细胞微藻)随出水会逐渐离开反应器,这产生了一种选择性竞争压力,有利于絮凝微藻和细菌的生长,并促进密集聚集物的形成。经过30 d的培养,反应器中形成了絮凝体(图3(b)),由图3(b)中可知,丝状的微藻是絮凝体的骨架,其中细菌、硅藻和栅藻等被诱捕。GARC等^[15]也证实了在废水处理中会形成多种微藻-细菌的絮凝体。细胞外聚合物质的不断富集可能是絮凝形成的原因^[14]。在培养30 d后,反应器内絮体的沉降性较好,出水TSS质量浓度较低,约为0.1~0.2 mg·L⁻¹。

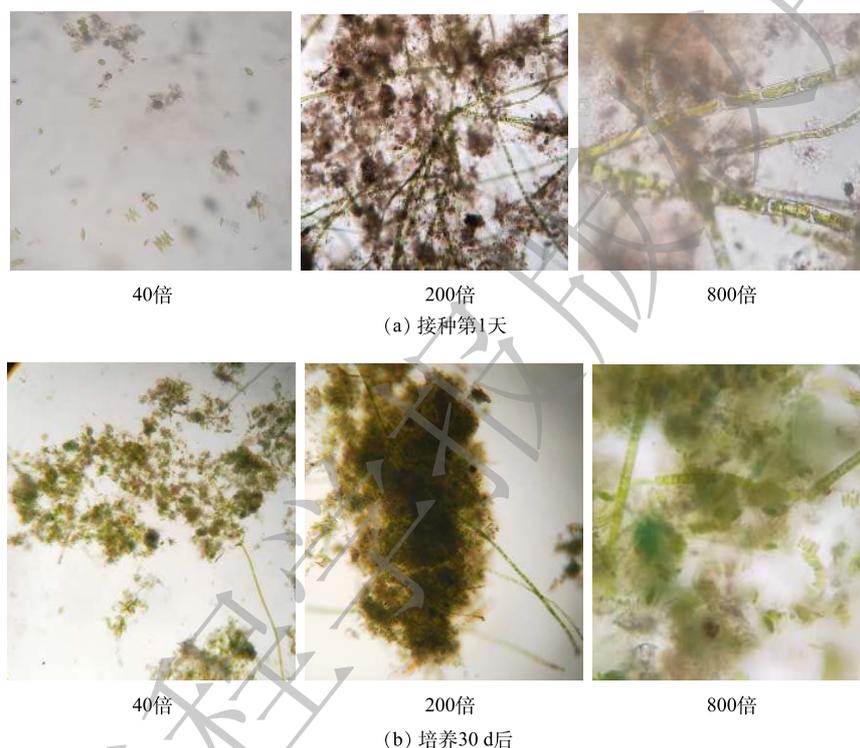


图3 序批式运行时显微镜下的菌藻形态变化

Fig. 3 Evolution of the algal-bacteria consortia form during co-culture sequential batch experiment

2.3 序批式运行实验时的污染物去除效果

按0.75:1(藻:泥)接种的光生物反应器(TSS质量浓度为1.12 g·L⁻¹),按1.2节运行条件运行时的进出水TOC和TIC质量浓度见图4(a),出水NH₄⁺-N、PO₄³⁻质量浓度以及去除率见图4(b),反应器中NO₂⁻-N质量浓度、每天上午10:00—11:00的pH和DO质量浓度见图4(c)。

在图4(a)中,第17天时,出水TIC质量浓度远远低于进水。藻类光合作用消耗TIC,说明初始阶段藻类的光合作用较强,生长较迅速,反应器内DO的质量浓度因此快速上升(白天10:00—11:00时可达到9~10 mg·L⁻¹,图4(c))。系统在第23天后由于细菌的作用,出水TOC质量浓度低于20 mg·L⁻¹,出水TIC质量浓度略有上升,说明细菌降解有机物的活性在增强,产生了更多的TIC。在第35天时,进水TOC质量浓度为59.06 mg·L⁻¹,出水TOC质量浓度为19.13 mg·L⁻¹,系统对TOC的去除率为67.6%。从整个阶段来看,出水TIC质量浓度在后期为6.5 mg·L⁻¹,说明藻类活性一直较强。

由图4(b)可以看出,菌藻共生体系在第20天后,对NH₄⁺-N的去除率可高达96%~99.7%,且出水NO₂⁻-N的质量浓度一直较低(0~0.2 mg·L⁻¹,图4(c))。在反应器中,按N形态随时间的演变可分

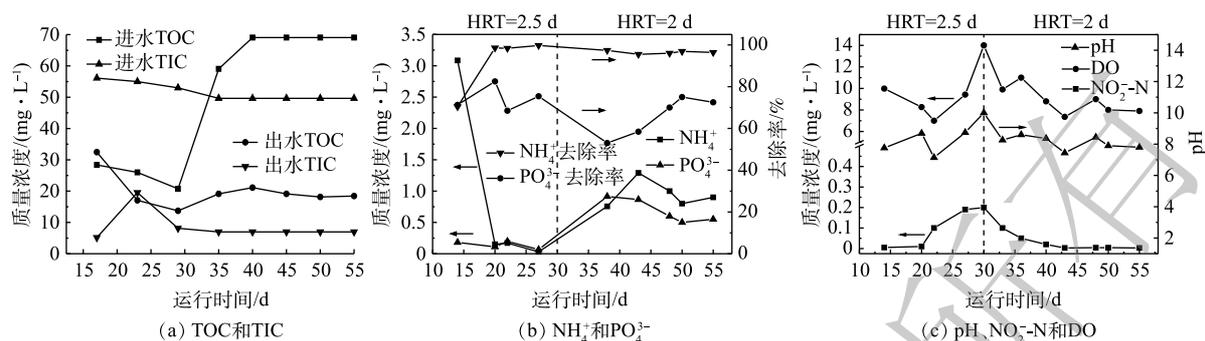


图4 出水水质随运行时间的变化

Fig. 4 Nutrients removal in the co-culture reactor with time

为三个阶段：启动阶段；部分硝化作用，形成亚硝酸盐的暂时积累阶段；达到稳态后的完全硝化作用阶段。藻类在光合作用下会提供硝化细菌所需的氧气(白天光照下DO质量浓度可达 $8\sim 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，图3(b))。在启动阶段，由于微藻的生长去除了一部分 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ，细菌硝化可能扮演一个次要角色^[17]，随后，细菌的硝化作用逐渐加强。由图4(b)、图4(c)可以看出，在40 d后，出水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的质量浓度很低，说明在反应器内实现了完全硝化。在第30天时，因加大进水量(HRT由2.5 d变成2 d)，且由于季节和气候的变化(进入12月中旬)，反应器的pH值有所回落，此时反应器对 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除率变化不大(约90%~100%)，而对 PO_4^{3-} 的去除率有所下降(由70%降至50%)，这说明系统中P过量。CHEVALIER等^[18]的研究结果表明，菌藻共同培养时对N和P的最大摄取比例为30:1。而本实验所用的实际生活污水的N:P为(13~17):1，因此，在没有发生化学沉淀的情况下(pH>9时P会发生化学沉淀)，N是限制性因素，而P会过量。pH下降会导致化学除磷停止，同时，降低HRT后，系统则不能及时去除过多的P。KATAM等^[2]发现，在HRT为10 d时，菌藻悬浮系统对磷去除率最高(80%)。由此可见，HRT会影响系统对磷的去除率，增加HRT能增加除磷效果，但前提是需要有充足的N量。40 d后反应器对 PO_4^{3-} 的去除率逐渐上升，由50%升高到75%左右，这应该是随着菌藻生物量的增加和pH下降至8以下时，细菌和藻类对营养物质去除率增加的结果。根据胡子全^[19]的研究结果，除磷菌的最适pH为7~8。同时，低pH也会促进微藻的光合作用^[20]。

由图4(c)可以看出，白天10:00—11:00时反应器内pH基本维持在7.5~8.9，这对维持硝化细菌的活性起到了重要作用(硝化细菌适应pH为7.5~9.0^[21])。有研究结果^[22]表明，在用于废水处理的高效藻类塘(HRAP)中，由于微藻对 CO_2 的过量吸收导致pH上升到10~11。HRAP内产生的生物质通常包括微藻(60%~80%，质量分数)、细菌(20%~30%，质量分数)和其他有机物(5%~10%，质量分数)^[23]。SU等^[8]的研究结果也证实，用于处理生活废水的纯藻类系统的pH很容易维持在9以上。但在本实验中pH大多情况下维持在9以下，这可能要归功于接种细菌的作用以及废水中的有机物。好氧细菌能够氧化有机物，产生 CO_2 ，使得pH缓慢下降。当藻类生长所需的 CO_2 和细菌产生的 CO_2 达到平衡时，系统内的pH可保持稳定在一个均有利于两者生长的值，从而维持系统的稳定性。在HRAP或光生物反应器中，一般要通入 CO_2 来保持较低的pH。而采用废水培养菌藻的光生物反应器中，通过控制HRT和接种比，可以利用细菌降解有机物产生的 CO_2 来维持适宜的pH。

2.4 微生物群落组成分析

对样品OTUs代表序列进行物种注释，并将样品的有效序列划分到不同的分类水平(从门到属)。样品中相对丰度>0.5%的细菌门和真菌门如图5(a)和图5(c)所示，相对丰度>1%的细菌属和真菌属如图5(b)和图5(d)所示。由图5(a)可知，变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和蓝菌门(*Cyanobacteria*)为反应器内的优势细菌门，绿弯菌门(*Chloroflexi*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、

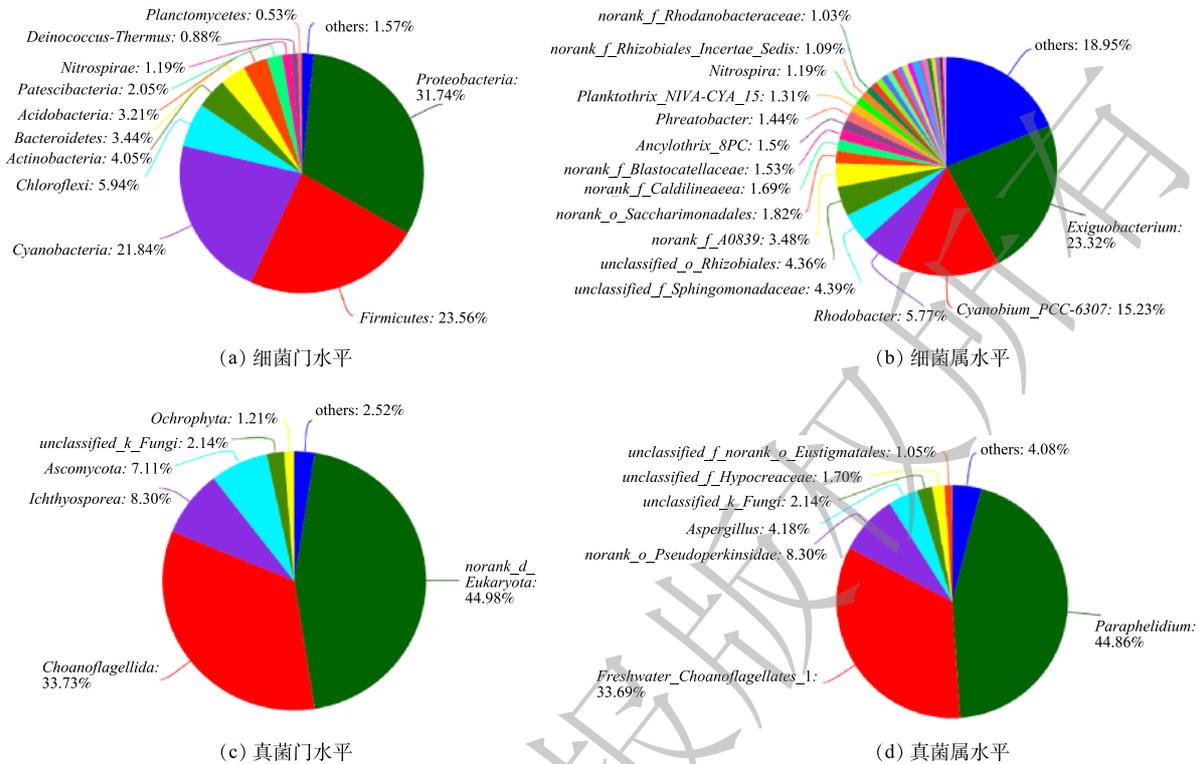


图 5 微生物群落饼图

Fig. 5 Community analysis pieplot

硝化螺旋菌门 (*Nitrospira*) 为相对优势菌门。由系统进化树可知绿弯菌门和硝化螺旋菌门是相近的分类单元, 绿弯菌门中的某些细菌在硝化过程与反硝化过程中起到重要作用, 硝化螺旋菌门中的菌属是主要的亚硝酸盐氧化菌。由图 5(b) 可知, 厚壁菌门的微小杆菌属 (*Exiguobacterium*) 是反应器内的第 1 大优势细菌属, 蓝细菌门的蓝菌属 (*Cyanobium*) 是产氧光合细菌, 为第 2 大优势菌属。

由图 5(b) 可知, 好氧细菌 *Exiguobacterium* 和蓝细菌 *Cyanobium* 具有比其他菌属更明显的丰度优势, 因此, 它们之间很可能会相互促进、协同共生, 且可能会抑制其他菌属的生长。相关研究结果^[24] 也表明, *Exiguobacterium* 可通过分解有机物产生 CO_2 和分泌次代谢产物, 促进 *Cyanobium* 的生长和延长其稳定期, 而 *Cyanobium* 可通过光合作用产生 O_2 , 提供给 *Exiguobacterium* 等好氧微生物。DUCAT 等^[25] 也发现, 在混菌培养条件下每毫升菌液中蓝细菌数量是单菌培养下的 2~3 倍, 说明某些异养细菌会促进蓝细菌的生长, 但有关这种促进作用的具体机理仍处于探究阶段。蓝细菌进行光合作用会产生活性氧, 其在系统中大量积累会抑制蓝细菌的生长。LI 等^[26] 在研究蓝细菌 *S.elongatus* PCC7942 和黏红酵母细菌 *Rhodotorula glutinis* 组成的人工混菌体系时发现, *R.glutinis* 的存在可有效清除体系内的活性氧从而解除蓝细菌的生长抑制。BERNSTEIN 等^[27] 解析了蓝细菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 与红色亚栖杆菌 *Meiothermus ruber* A 之间的相互作用关系, 认为 *T.elongatus* BP-1 可以为 *M.ruber* A 提供有机碳、氧气和还原氮, 并且由于异养菌的存在, 蓝细菌生物量的积累增加; 同时蓝细菌可通过调节关键代谢基因(光合作用、碳吸收、维生素合成和活性氧物质清除的核心基因) 的表达来适应异养菌的存在。

属于 α -变形菌纲的红杆菌属 (*Rhodobacter*) 为第 3 大优势菌属, 为不产氧光合好氧异养固氮菌, 在以有机物为碳源和 N 为氮源时生长良好, 其光合能力为它们在营养物竞争时提供了优势, 因此, 其具有较高的丰度。硝化螺旋菌门的硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 可氧化亚硝酸盐成硝酸盐, 其相对丰度为 1.19%, 其存在避免了亚硝酸盐的积累。 γ -变形菌纲的 *Acinetobacter* 菌属具有除磷功

能, 其相对丰度为 0.58%。 α -变形菌纲的好氧反硝化菌-副球菌属 (*Paracoccus*) 的相对丰度为 0.35%。

由图 5(d) 可知, *Paraphelidium* 是第 1 大优势真菌属, 属于藻类的吞噬营养性寄生生物, 即可以依附于藻类进行营养性寄生^[28]。领鞭毛门淡水领鞭虫 *Freshwater_Choanoflagellates* 是第 2 大优势真菌属, 作为单细胞滤食生物, 是细菌的重要捕食者^[29]。除了蓝藻(蓝细菌)之外, 褐藻 (*Ochrophyta*) 为第 2 大优势微藻 (图 5(c)), 其中的真眼点藻目藻属 (*unclassified_Eustigmatales*) 和羽纹硅藻属 (*Pinnularia*) 为优势藻属, 二者的相对丰度之和为 1.21%。

3 结论

1) 当 HRT 为 2 d 时, 按 1:0.75(泥/藻质量比) 接种培养的菌藻光生物反应器 (初始 TSS 质量浓度为 $1.12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 在太阳光照和仅搅拌的条件下, 对生活污水中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除率可达 99.7%, 对 PO_4^{3-} 的去除率约为 70%, 且没有发生 NO_2 的积累。

2) 反应器内可形成以丝状光合细菌在颗粒结构中占主导地位的沉降性能良好的絮凝体。

3) 处理实际生活污水的菌藻光生物反应器内优势菌属为厚壁菌门的好氧异养微小杆菌 (*Exiguobacterium*)、蓝细菌门的产氧光合细菌 (*Cyanobium*)、变形菌门 α -变形菌纲的不产氧光合好氧异养固氮红杆菌 (*Rhodobacter*), 其相对丰度分别为 23.32%、15.23% 和 5.77%。

参 考 文 献

- [1] NGUYEN T T D, NGUYEN T T, BINH Q A, et al. Co-culture of microalgae-activated sludge for wastewater treatment and biomass production: Exploring their role under different inoculation ratios[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 314: 123754.
- [2] KATAM K, BHATTACHARY A D. Simultaneous treatment of domestic wastewater and bio-lipid synthesis using immobilized and suspended cultures of microalgae and activated sludge[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2019, 69: 295-303.
- [3] LEONG W H, LIM J W, LAM M K, et al. Co-cultivation of activated sludge and microalgae for the simultaneous enhancements of nitrogen-rich wastewater bioremediation and lipid production[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2018, 87: 216-224.
- [4] ZHU S, QIN L, FENG P, et al. Treatment of low C/N ratio wastewater and biomass production using co-culture of *Chlorella vulgaris* and activated sludge in a batch photobioreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 274: 313-320.
- [5] JI X, JIANG M, ZHANG J, et al. The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 44-50.
- [6] HUO S, KONG M, ZHU F, et al. Co-culture of *Chlorella* and wastewater-born bacteria in vinegar production wastewater: Enhancement of nutrients removal and influence of algal biomass generation[J]. *Algal Research*, 2020, 45: 101744.
- [7] GUTZEIT G, LORCH D, WEBER A, et al. Biofloculent algal-bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment[J]. *Water Science and Technology*, 2005, 52: 9-18.
- [8] SU Y, 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] MUJTABA G, LEE K. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended

- activated sludge[J]. *Water Research*, 2017, 120: 174-184.
- [10] 王金霞. 溶藻细菌S7溶藻特性、机理及影响因素的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2012.
- [11] 李彦芹, 阚振荣, 穆淑梅, 等. 光合细菌研究进展. 河北大学学报(自然科学版)[J], 2005, 25(5): 554-560.
- [12] 张丽, 宋馨宇, 陈磊, 等. 光合微生物混菌体系的应用和研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(4): 652-665.
- [13] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [14] SERENA P, PAOLA F, FRANCESCO B, et al. How inoculation affects the development and the performances of microalgal-bacterial consortia treating real municipal wastewater[J]. *Journal of Environmental Management*, 2020, 263: 110427.
- [15] GARC A D, POSADA S E, BLANCO S, et al. Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 248: 120-126.
- [16] DONNA L S, CLIVE H W, MATTHEW H T, et al. Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 184: 222-229.
- [17] BARROS A I, GONALVES A L, SIMOES M, et al. Harvesting techniques applied to microalgae: A review[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2015, 41: 1489-1500.
- [18] CHEVALIER P, NOÛE J. Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and phosphate removal from wastewaters[J]. *Biotechnology Letters*, 1985, 7(6): 395-400.
- [19] 胡子全. 好氧聚磷菌的分离、鉴定及其聚磷特性的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- [20] SUTHERLAND D L, HOWARD-WILLIAMS C, TURNBULL M H, et al. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal[J]. *Water Research*, 2015, 70: 9-26.
- [21] 王新为, 孔庆鑫, 金敏, 等. pH值与曝气对硝化细菌硝化作用的影响[J]. *解放军预防医学杂志*, 2003, 21(5): 319-322.
- [22] RUPERT C, DONNA S, HELENA C. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24(3): 329-337.
- [23] SUTHERLAND D L, HOWARD-WILLIAMS C, TURNBULL M H, et al. Seasonal variation in light utilization, biomass production and nutrient removal by wastewater microalgae in a full-scale high-rate algal pond[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2013, 26(3): 1317-1329.
- [24] 邹万生, 罗玉双, 刘良国, 等. 1株微小杆菌对4种蓝藻的生长影响[J]. *生态与农村环境学报*, 2013, 29(5): 612-617.
- [25] DUCAT D C, AVELAR-RIVAS J A, WAY J C, et al. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(8): 2660-2668.
- [26] LI T T, LI C T, BUTLER K, et al. Mimicking lichens: Incorporation of yeast strains together with sucrose-secreting cyanobacteria improves survival, growth, ROS removal and lipid production in a stable mutualistic co-culture production platform[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 55.
- [27] BERNSTEIN H C, MC CLURE R S, THIEL V, et al. Indirect interspecies regulation: transcriptional and physiological responses of a cyanobacterium to heterotrophic partnership[J]. *mSystems*, 2017, 2(2): e00181-16.

[28] SERGEY A K, GUIFR T, MOREIRA D, et al. Molecular phylogeny of *paraphelidium lecheri* sp. nov. (*Aphelida*, *Opisthosporidia*)[J]. *Eukaryotic Microbiology*, 2017, 64(5): 573-578.

[29] BOENIGK J. The *Choanoflagellates*: Evolution, biology and ecology[J]. *Marine Biology Research*, 2015, 11(10): 1118-1119.
(责任编辑: 曲娜)

Co-culture of activated sludge and algae in a photobioreactor and analysis of microbial community

CAI Liyun*, XUE Xingtao, YUAN Yang, WANG Jingwen, XIA Jingdan, SUN Renyue, LAI Minghai, SIMA Jin, CHEN Hongrun

Fujian Key University Laboratory of Estuarine Ecological Security and Environmental Health, School of Environmental Science and Engineering of Xiamen University TanKah Kee College, Zhangzhou 363105, China

*Corresponding author, E-mail: 576759695@qq.com

Abstract Biotreatment of real domestic sewage by algae and bacteria in a sequencing batch mode using a photobioreactor was investigated. The algae from the wall of the secondary sedimentation tank, and the activated sludge from the aeration tank of the same municipal wastewater treatment plant, were inoculated into the photobioreactor as the algae-bacteria inoculum. The effect of sludge and algae inoculation ratios on sewage treatment was discussed and the composition of microbial community during the stable operation was analyzed. The intermittent experiments showed that, when the mass ratio of sludge to algae was 1:0.75, the highest removal efficiencies of COD, TN and TP occurred. In the photobioreactor inoculated with sludge-algae mass ratio of 1:0.75, under the conditions of the initial TSS of $1.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the hydraulic retention time of 2 days, as well as sunlight irradiation and stirring, the removal efficiencies of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and PO_4^{3-} could reach 99.7% and 70%, respectively. Using high-throughput sequencing technologies to analyze the bacterial and fungal community composition in the photobioreactor with a SRT of 15 days after 42-day running, it was found that the predominant bacterial genus were *Exiguobacterium* in the Phylum Firmicutes, *Cyanobium* in the Phylum Cyanobacteria, and *Rhodobacter* in the Class Alphaproteobacteria, their relative abundances were 23.32%, 15.23% and 5.77%, respectively. At the same time, *Nitrospira* for nitrite oxidization, *Acinetobacter* for phosphorus removal and *Paracoccus* for aerobic denitrification, were also observed in the reactor, with the relative abundances of 1.19%, 0.58% and 0.35%, respectively.

Keywords sludge-algae photobioreactor; mass inoculation ratio of sludge to algae; domestic sewage; bacterial community