

硫自养微生物降解水中低浓度高氯酸盐的研究

——反应器效能及微生物种群空间分布

刘永德¹,王依依¹,万东锦^{1*},肖书虎² (1.河南工业大学化学化工与环境学院,河南 郑州 450001; 2.环境基准与风险评估国家重点实验室,中国环境科学研究院,北京 100012)

摘要: 考察了升流式硫自养固定床反应器对水中低浓度高氯酸盐[(468.74±6.80) μg/L]的降解效能及相关机制,并利用高通量测序技术对反应器内微生物种群空间分布特性展开分析.研究发现,当 HRT 为 4.00~0.75h 时,高氯酸盐去除率达到 97%以上,降解符合 1/2 级反应动力学模型,1/2K_{1/2v} 为 39.59 [μg^{1/2}/(L^{1/2}·h)].随着 HRT 由 4.00h 缩短至 0.75h,出水 SO₄²⁻增量由 173.37mg/L 减小至 90.07mg/L,由歧化反应产生的硫酸根占 90.75%~93.91%,硫酸化反应与高氯酸盐的降解同步进行,同时,该反应也是碱度过量消耗的主要因素,导致出水 pH 值降低.测序结果表明,随着高度的增加,反应器内菌群 α 多样性降低.变形门(*Proteobacteria*)和绿菌门(*Chlorobi*)构成了反应体系的优势菌群.菌属 *Chlorobaculum* 为歧化反应菌属,是反应器内优势菌属.

关键词: 高氯酸盐; 硫自养; 动力学; 硫酸化反应; 高通量测序; 群落结构

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2017)08-3142-09

Bio-reduction of perchlorate with low concentration in water by sulfur packed reactor and microbial community spacial distribution analysis. LIU Yong-de¹, WANG Yi-yi¹, WAN Dong-jin^{1*}, XIAO Shu-hu² (1.School of Chemical Engineering and Environment, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China; 2.State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China). *China Environmental Science*, 2017,37(8): 3142~3150

Abstract: Removal of perchlorate with low concentration [(468.74±6.80)μg/L] in water was investigated by an up-flow sulfur autotrophic reduction reactor. And bacterial community spatial distribution was analyzed by High-throughput sequencing method. The reactor could be operated at a hydraulic retention time (HRT) ranging in 4.00 ~ 0.75h with a remarkable removal efficiency greater than 97%. 1/2-order kinetics model fit the experimental data well; and 1/2K_{1/2v} was 39.59 [μg^{1/2}/(L^{1/2}·h)]. When HRT shortened from 4.00h to 0.75h, the generated SO₄²⁻ decreased from 173.37 to 90.07mg/L. Sulfur (S) disproportionation was accompanied with perchlorate reduction; the proportion of SO₄²⁻ generated by S-disproportionation was in range of 90.75%~93.91%. Meanwhile, S-disproportionation was the main reason for excess consumption of alkalinity, thus leading to pH decreases in effluent. The sequencing results showed that the α-biodiversity was decreased along the height of reactor. The *Proteobacteria* and *Chlorobi* was observed as the major bacteria, and the *Chlorobaculum* was the dominant bacteria associated with S-disproportionation.

Key words: perchlorate; sulfur autotrophic; kinetics; S-disproportionation; High-throughput sequencing; bacterial community

高氯酸盐是一类非挥发性,易溶于水的物质,由于其性质稳定且难被土壤及矿物吸附,一旦进入环境就会随地表及地下水迁移扩散.多年来,高氯酸盐被广泛使用于烟火制造、火箭助推剂、军工、纺织、电镀、皮革等领域的工业生产中^[1].中国作为烟花制造及消费的大国,存在着高氯酸盐污染水体的风险.高氯酸盐对人体的危害主要

表现在抑制甲状腺对碘化物的吸收,干扰甲状腺正常功能,引发成人新陈代谢失调及阻碍儿童正

收稿日期: 2016-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51208179,20277134);郑州市重大科技专项(141PZDZX045);天津市水质科学与技术重点实验室开放研究基金资助项目(TJKLAST-ZD-2016-03)

* 责任作者,副教授, dongjinwan@yeah.net

常生长发育等方面^[2]。美国环保局(EPA)已经把 ClO_4^- 列入饮用水候补污染物清单,2005 年美国 EPA 发布的毒理学评价草案中,规定人体参考剂量为 $0.7\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重,等同于饮用水中浓度为 $24.5\mu\text{g}/\text{L}$ ^[3]。

由于高氯酸盐在水溶液中呈现惰性,常规的给水处理技术如混凝、沉淀、过滤等单元均不能对其有效去除^[4]。而生物法是指微生物在缺氧或厌氧的条件下利用高氯酸盐作为电子受体,在电子供体的作用下将其转化为氯离子,该过程实现了高氯酸盐的形态转化,易实现工程应用,具有诸多优势^[5]。根据所需电子供体的不同,生物还原高氯酸盐分为异养和自养还原。异养还原需要加入有机物作为电子供体,有二次污染的风险。自养还原高氯酸盐所需电子供体主要包括氢气、硫磺、零价铁等无机物,因其过程友好,细菌增殖缓慢,具有独特优势^[6]。单质硫磺不溶于水,可直接作为微生物载体,与氢气、零价铁相比,价廉易得,逐渐受到研究者青睐。硫自养还原高氯酸盐理论方程式如下:



近年来,一些学者通过序批式研究证实了硫自养还原高氯酸盐可行性并观察到硫歧化反应^[7],对硫自养反应的操作条件进行了初步优化^[8],并采用 PCR-DGGE 技术对硫自养微生物开展分子生物学研究^[9]。在连续流实验方面,研究表明,当水力停留时间为 13h 时,硫自养固定床生物反应器可以将 $4\sim 8\text{mg}/\text{L}$ 的高氯酸盐降低至 $0.05\text{mg}/\text{L}$ 以下^[10]。在本课题组前期研究中,发现该反应器在 HRT 为 1h 的条件下对高浓度高氯酸盐($21.07\sim 22.40\text{mg}/\text{L}$)的去除率可达 99%以上^[11]。

尽管近些年的研究已取得一定的进展,但许多研究中高氯酸盐初始浓度设置过高(mg/L 级),结合实际污染情况,研究低浓度水平(ppb 级)的污染十分必要。此外,对于硫自养固定床反应器来说,一些机制尚不清晰,比如:高氯酸盐的降解动力学特征,动态反应过程中硫酸盐的产生趋势,硫歧化反应的规律等问题仍需进一步明确。与此同时,在分子生物学领域,新的技术和方法也发生着巨大变革,高通量测序技术又称为下一代测序技术,在

分析复杂菌群方面具有强大的优势^[12],通过测定大量 DNA 序列,可以同时给出定性和定量结果,其是对于丰度较低($0.01\%\sim 0.1\%$)的菌落,该技术仍具有较强的识别能力,已成功应用于活性污泥^[13]、膜生物反应器^[14]等复杂环境微生物群落结构及其变化的研究中。

本研究以硫自养固定床反应器为研究对象,进一步完善反应器对水中低浓度高氯酸盐的降解效能及机理研究,明确高氯酸盐的降解动力学特征,硫酸盐的产生趋势及硫歧化反应的规律,并结合反应器工况,利用高通量测序技术对反应器内微生物种群空间分布特性展开分析,为硫自养固定床反应器在降解高氯酸盐污染的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验装置建立及启动

硫自养反应器由内径为 5cm,总高 50cm 的有机玻璃柱制成。反应器保持密闭,外部设水浴夹套,维持温度恒定($27\pm 2^\circ\text{C}$),内装填粒径为 2.5~3.5mm 的硫磺颗粒(购自燕山石化),装填高度为 40cm,空隙率 32%,总有效体积为 0.250L。距反应器底部 10、20 及 30cm 高度处分别设置 3 个取样口,取样口内径为 1cm,长 5cm,用于水样及生物样品采集。底部设置承托层均匀布水,水流方向自下而上,溢流水,出水管直径为 1cm,长 5cm。模拟受污水采用静置过夜的自来水(郑州高新供水)加 NaClO_4 (468.74 ± 6.80) $\mu\text{g}/\text{L}$ 、 $20\text{mg}/\text{L}$ NaHCO_3 和 $5\text{mg}/\text{L}$ 的 KH_2PO_4 (以上药剂均为分析纯)配制而成。其他水质指标分别为:TOC $3.78\sim 4.12\text{mg}/\text{L}$; Cl^- $108.06\sim 128.50\text{mg}/\text{L}$; SO_4^{2-} $73.35\sim 96.81\text{mg}/\text{L}$; $\text{NO}_3^- - \text{N}$ $1.06\sim 1.77\text{mg}/\text{L}$ 。由于硫自养填充床中硫氧化菌可以直接实现缺氧状态^[15],因此原水并未吹脱溶解氧,由蠕动泵(BT-100-2J,保定兰格)将模拟受污水由原水桶泵入反应器。

采用郑州市五龙口污水处理厂氧化沟缺氧段活性污泥浸泡硫磺 48h 接种(接种量约 10g MLVSS),而后将硫磺装柱开展连续流实验。

1.2 实验方案

本实验连续运行反应器 80d,保持水力停留

时间(HRT)分别为 4.0、2.0、1.0、0.75h,每个 HRT 条件下,反应器稳定运行 20d.定时测定进出水各离子浓度、pH 及碱度等指标.待出水各离子浓度维持恒定(偏差小于 5%)时,认为其达到稳态运行.在 HRT 分别为 1.0 和 0.75h,反应器稳态运行时,于 3 个取样口分别取样,测定各离子浓度沿程变化,确定反应动力学及硫酸化反应发生趋势.在 HRT 为 0.75h,系统稳态运行情况下,分别收集 3 个取样口的生物样品,用于高通量测序技术分析微生物种群结构及空间分布特征.

1.3 分析与测定

本实验中所有水样分析前均采用 0.20 μm 水系微孔滤膜过滤.样品中 ClO_4^- 和 SO_4^{2-} 浓度采用美国热电 ICS-600 离子色谱仪分析测定,色谱条件:色谱柱型号 AS-16,保护柱型号 AG-16,淋洗液 KOH 25mmol/L,淋洗液流速 1.0mL/min,柱温 30℃,每个样品分析时间 30min.采用 10 和 500 μL 定量环, SO_4^{2-} 和 ClO_4^- 最低检出限分别为 0.2mg/L 和 10 $\mu\text{g/L}$. S^{2-} 采用亚甲蓝光度法^[16]测定, NO_3^- 采用紫外分光光度法^[16]测定, NO_2^- 采用 1-萘基乙二胺光度法^[16]测定,分光光度计型号为北京普析 TU-1900.进出水 pH、ORP 值采用美国 HACHQ30D 多参数水质分析仪测定.TOC 采用日本岛津 TOC-LCPN 测定.

在 HRT 为 0.75h,反应器稳态运行时,分别取自反应器底部(高度 10cm)、中部(高度 20cm)及上部(高度 30cm)的 3 个生物样品 DNA 的提取及扩增采用已有方法^[17].扩增后的 DNA 样本被送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序平台为 Illumina Miseq 2×300.高质量序列去除前后引物以及标签后,利用 Mothur 软件对得到的全部序列进行比对,去除引物、嵌合体 and 长度小于 200bp 的序列,并在 97% 的相似性水平上计算序列遗传距离,该矩阵用于确定 OTUs.同时基于物种丰富度的分析,使用 Mothur 软件计算 Alpha 多样性指数中的丰富度(Chao1 指数、Ace 指数)、多样性指数(Simpson 指数和 Shannon-Wiener 多样性指数)和覆盖度(Coverage).此外,利用 SILVA 数据库进行 16S rDNA 基因系列比对,确定序列对应微生物的分类学地位.利用

UniFrac 程序基于 UniFrac 距离对 3 个生物样品进行加权的主坐标分析(Principal coordinate analysis,PCoA)和 3D 可视分析.

2 结果与讨论

2.1 反应器对高氯酸盐的处理效果及其动力学分析

反应器运行期间进出水 ClO_4^- 浓度变化如图 1(a)所示,可以看出,经活性污泥接种后,保持 HRT 为 4.0h,反应器表现出很好的适应能力,挂膜十分迅速,对于进水(468.74±6.80) $\mu\text{g/L}$ 的 ClO_4^- ,出水 ClO_4^- 浓度于第 4d 降低至 10 $\mu\text{g/L}$ 以下,之后运行至第 80d,始终保持较高的去除率(>97%),即使逐渐调整水力停留时间由 4.00h 缩短至 0.75h,出水 ClO_4^- 浓度没有出现反弹情况,表明反应器具有较强的抗冲击能力.

在 HRT 分别为 1.0 和 0.75h,反应器稳态运行时,于 3 个不同高度的取样口分别取样,测定 ClO_4^- 离子浓度沿程变化,结果如图 1(b)所示.虽然硫自养固定床还原高氯酸盐的动力学相关研究较少,但围绕硫自养固定床去除硝酸盐动力学,学界已开展了大量理论及实践研究.许多研究已经证实,硫自养固定床反应器可以采用主体零级及 1/2 级反应动力学速率方程来描述基质去除的动力学过程^[18-19].

2.1.1 主体零级反应动力学 假定单质硫作为底物供应充分,且基质向生物膜内的扩散没有传质限制,有:

$$C = C_0 - K_{ov}T \quad (2)$$

2.1.2 1/2 级反应动力学 当主体溶液中基质浓度不高,生物膜生长较为成熟,基质向生物膜内的扩散受传质的限制,不能穿过整个生物膜时,有:

$$C = (C_0^{1/2} - 1/2K_{1/2v}T)^2 \quad (3)$$

式中: C_0 为进水 ClO_4^- 浓度, $\mu\text{g/L}$; C 为接触时间为 T 时出水的 ClO_4^- 浓度, $\mu\text{g/L}$; K_{ov} [$\mu\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$] 和 $1/2K_{1/2v}$ [$\mu\text{g}^{1/2}/(\text{L}^{1/2} \cdot \text{h})$] 分别为零级和 1/2 级反应速率常数; T 为接触时间 h.

本研究采取上述两模型拟合 ClO_4^- 的去除实验数据,结果列于表 1.可以看出,与零级动力学相比,1/2 级动力学模型拟合具有较高的相关系数,

模型计算出的初始浓度 C_{0cal} 与实验值 C_{0EXP} 非常接近,表明本反应器中,生物膜已经生长成熟, ClO_4^- 由溶液主体透过生物膜向硫磺颗粒表面的扩散成为限制性步骤.根据 1/2 级动力学模型,当

$1/2K_{1/2v}$ 为 $39.59[\mu g^{1/2}/(L^{1/2} \cdot h)]$ 时,完全去除 $(468.74 \pm 6.80) \mu g/L$ 的高氯酸盐,需要至少 0.546h 的接触时间,当接触时间过短时,高氯酸盐将不能被完全去除.

表 1 动力学模型拟合的相关参数
Table 1 Kinetics fitting parameters

C_{0EXP} ($\mu g/L$)	零级动力学模型			1/2 级动力学模型		
	C_{0cal} ($\mu g/L$)	K_{0v} [$\mu g/(L \cdot h)$]	R^2	C_{0cal} ($\mu g/L$)	$1/2K_{1/2v}$ [$\mu g^{1/2}/(L^{1/2} \cdot h)$]	R^2
468.74 $\pm$ 6.80	392.06	780.47	0.8812	465.76	39.59	0.9910

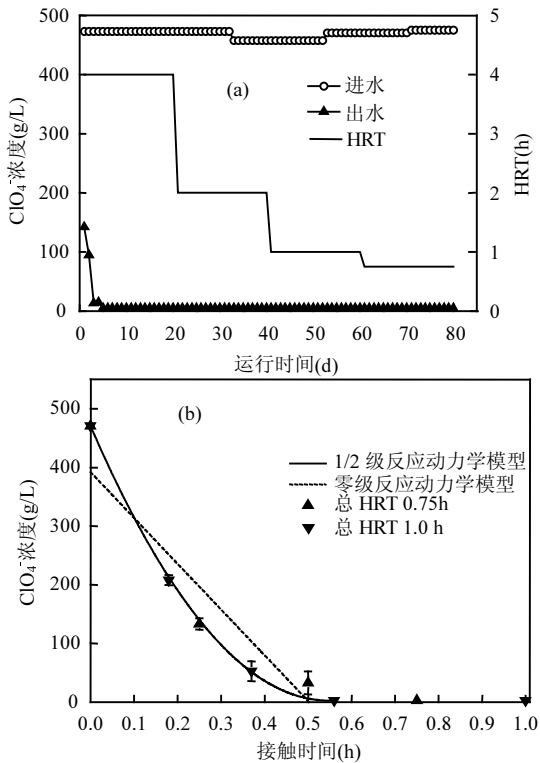
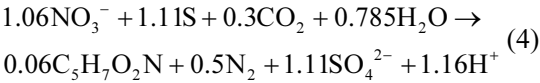


图 1 (a)反应器运行期间进出水高氯酸盐浓度变化;(b)反应动力学及其拟合

Fig.1 (a) Perchlorate concentration of influent and effluent during operation times; (b) kinetics fitting

需要指出的是,由于配水中同时含有低浓度的硝酸盐($1.06 \sim 1.77 mg-N/L$, 饮用水标准为 $10 mg-N/L$),在本反应器中,也同时进行着硝酸盐的硫自养还原反应,具体方程为^[18]:



测定进出水硝酸盐氮及亚硝酸盐氮,结果表明,在反应器运行期间,出水硝酸盐及亚硝酸盐氮均低于检出限,动力学研究显示,硝酸盐及亚硝酸盐在最低的取样口(高度为 10cm,对应接触时间为 0.190h)已检测不出,这表明,低浓度的硝酸盐共存对高氯酸盐的降解基本不产生抑制作用.

2.2 硫酸根的产生趋势及硫歧化反应特征

硫酸根的产生是硫自养生物还原工艺中需要关注的重要方面.本研究在 HRT 为 1.0h,反应器稳态运行时,于 3 个不同高度的取样口分别取样,测定 SO_4^{2-} 及 S^{2-} 离子浓度沿程变化,结果如图 2(a)所示.可以看出,随着接触时间从 0.25h 延长至 1.0h, SO_4^{2-} 浓度呈现持续增加的态势,产生量从 $74.59 mg/L$ 增加至 $136.06 mg/L$.产生的 SO_4^{2-} 浓度来源主要包括 3 方面:高氯酸盐还原、硝酸盐还原和硫歧化反应.硫歧化反应理论方程为:



为衡量各反应产生的 SO_4^{2-} 浓度的份额,分别按照如下 3 式分别计算各反应所产生的 SO_4^{2-} 占总 SO_4^{2-} 增量的百分比,并将分析结果列于图 2(a):

高氯酸盐还原产生硫酸根占比:

$$R_{ClO_4^-} = \frac{(C_{ClO_4^- \text{ 进水}} - C_{ClO_4^- \text{ 取样口}}) \times 1.29}{C_{SO_4^{2-} \text{ 取样口}} - C_{SO_4^{2-} \text{ 进水}}} \times 100\% \quad (6)$$

硝酸盐还原产生硫酸根占比:

$$R_{NO_3^- - N} = \frac{(C_{NO_3^- - N \text{ 进水}} - C_{NO_3^- - N \text{ 取样口}}) \times 7.18}{C_{SO_4^{2-} \text{ 取样口}} - C_{SO_4^{2-} \text{ 进水}}} \times 100\% \quad (7)$$

硫歧化反应产生硫酸根占比:

$$R_{S \text{ 歧化}} = 100\% - R_{\text{ClO}_4^-} - R_{\text{NO}_3^- - \text{N}} \quad (8)$$

其中,各离子浓度单位均为 mg/L ,式(6)式(7)中,系数 1.29 和 7.18 分别由式(1)和式(4)确定。

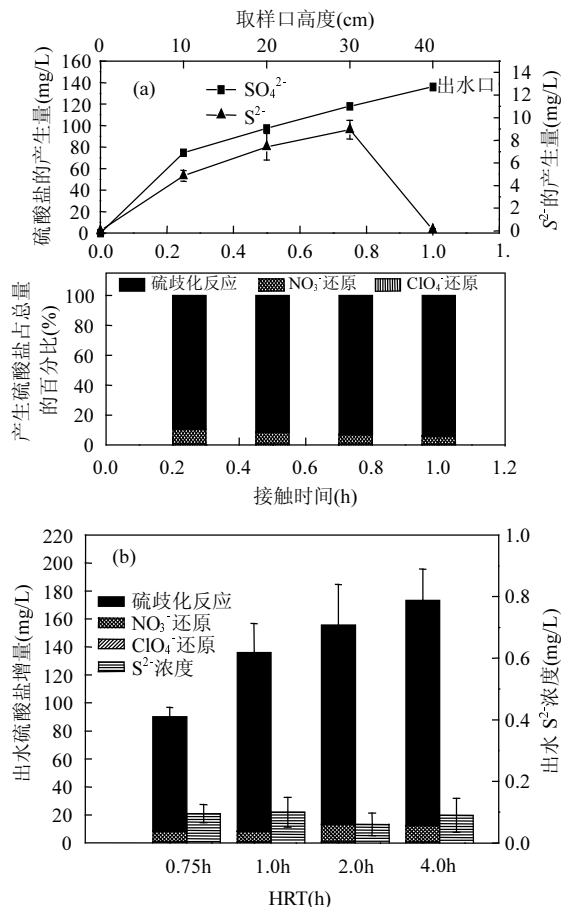


图2 (a) HRT 为 1h 时反应器内 SO_4^{2-} 及 S^{2-} 沿程变化情况 & SO_4^{2-} 增量分析; (b) 不同 HRT 条件下反应器出水 SO_4^{2-} 增量、份额分配及 S^{2-} 浓度变化

Fig.2 (a) Sulfate and sulfide generation as a function of reaction time at HRT = 1.0h; (b) sulfate and sulfide concentration in effluent as a function of HRT

可以看出,由于进水高氯酸盐与硝酸盐浓度均为低浓度,硫自养还原二者产生的 SO_4^{2-} 占比很低,硫歧化反应则在一开始就非常显著,当接触时间为 0.25h 时(第一个取样口), $R_{S \text{ 歧化}}$ 达到 89.11%(对应 SO_4^{2-} 净增量为 66.47 mg/L),随着接触时间的延长,硫歧化反应所产生的 SO_4^{2-} 进一步增多,至 1h 时,硫歧化反应所产生的 SO_4^{2-} 达到

127.78 mg/L , $R_{S \text{ 歧化}}$ 高达 93.91%,即增加的 SO_4^{2-} 中有 93.91% 是由歧化反应引起。在硫自养反硝化过程中,多数学者认为, SO_4^{2-} 的产生与硝酸盐的去除呈一次正比关系,并未观测到过量 SO_4^{2-} 产生^[18-19]。而硫自养还原高氯酸盐过程则呈现显著不同趋势,2007 年 Ju 等^[7]通过序批式实验表明,硫歧化反应主要在高氯酸盐完全去除之后发生。而本研究表明,在硫自养固定床反应器中,硫歧化反应与高氯酸盐的降解同步进行,并未在高氯酸完全去除后进行,而且歧化反应产生的硫酸根在反应刚开始(接触时间 0.25h 时)占比就十分显著 ($R_{S \text{ 歧化}}$ 为 89.11%)。

S^{2-} 离子是歧化反应的另一主要产物,其浓度在反应器中呈现先增大再减少的趋势,通过监测反应期内各位置 ORP 值,发现反应器底部和中部 ORP 分别为 -138 和 -235 mV,而在出水口处升高至 +35 mV,因此推测 S^{2-} 在出水口处浓度降低的原因是本反应器出水口与大气相通,空气中的氧气对 S^{2-} 有氧化作用,导致 S^{2-} 离子浓度在出水口降低。

不同 HRT 条件下,反应器出水 SO_4^{2-} 增量、份额分配及 S^{2-} 浓度变化如图 2(b) 所示,随着 HRT 的延长,出水 SO_4^{2-} 增量呈逐渐增加的趋势,当 HRT 由 0.75h 延长至 4.00h,总 SO_4^{2-} 增量由 90.07 mg/L 增加至 173.37 mg/L (对应 $R_{S \text{ 歧化}}$ 为 90.75%~93.91%),出水 S^{2-} 离子浓度保持在较低水平。由 $R_{S \text{ 歧化}}$ 均大于 90% 可以推测,歧化反应是导致 SO_4^{2-} 过量增加的主要原因。因此,为控制过量硫酸盐的生成,在保证去除率的前提下,适当缩短 HRT 可以避免生成过量 SO_4^{2-} 。

2.3 进出水 pH 值及碱度消耗情况

硫自养还原过程会消耗溶液碱度,引起溶液 pH 值的下降,监测进出水 pH 值及碱度情况,如图 3 所示。可以看出,在反应器整个运行周期中(80d),反应器出水 pH 值始终低于进水。当 HRT 为 4.00~1.0h 时,总的碱度消耗约为 240~280 mg/L (以 CaCO_3 计),出水 pH 值比进水低约 0.5~1.0。当 HRT 缩短至 0.75h 时,反应体系消耗碱度有所下降,约为 180 mg/L (以 CaCO_3 计),出水 pH 有所上升,比进水低约 0.4。

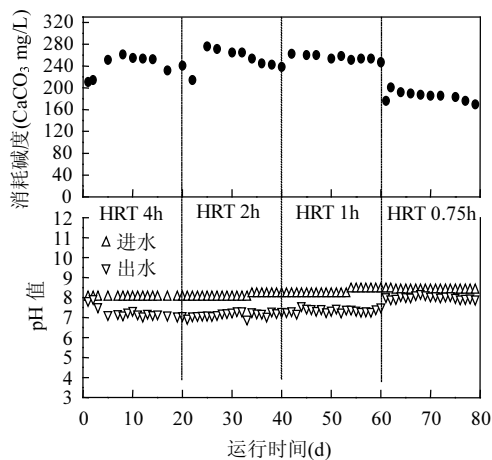


图3 反应器运行过程中进出水 pH 值及碱度消耗情况
Fig.3 pH variation of influent and effluent and alknity consumption during operation time

反应体系中碱度的消耗主要来源于 3 方面,

高氯酸盐的还原,硝酸盐的还原和硫歧化反应.根据污染物浓度,结合反应方程(1)和(4),计算出硫自养还原污染物的理论碱度消耗量为 4.77~7.55mg/L.而实际碱度消耗远大于该值,表明硫歧化反应成为碱度消耗的主要因素,缩短 HRT,硫歧化反应发生的程度减弱,导致碱度消耗的下降.

2.4 微生物种群空间分布分析

2.4.1 微生物 α 多样性分析 α 多样性反映了一个生态系统中群落物种丰富度,也被称为生境内多样性,是研究群落组成及结构的重要内容,它的测度方法有多种,包括丰富度指数(Richness)、香浓指数(Shannon)、Chao 1、ACE 指数等.其中,丰富度指数(Richness)用于衡量单个样品中物种种类个数,实际通过操作分类单元(OTU)的个数来计算,香农指数(Shannon)衡量群落的异质性;ACE、Chao1 指数主要表示微生物种群丰度^[13,17].

表 2 样品 α 多样性相关的各项指标
Table 2 α biodiversity of the samples

样品	序列数量			丰富度 OTUs 数量	Shannon 指数	ACE 指数	Chao 1 指数	覆盖度 (%)
	原始	有效	标准					
底部	56732	51734	51000	5955.6	5.75	22557.4	15024.4	92.94
中部	56024	52468	51000	5313.6	5.13	19973.9	13111.8	93.84
上部	57158	55270	51000	3910.0	3.93	14035.8	9208.3	95.93

采用 Miseq 2×300 测序平台对反应器不同位置的微生物群落结构进行分析,样品 α 多样性相关的各项指标列于表 2 中.可以看出,3 个样品测试的原始序列均超过 56000 条,经过质控后,有效序列均超过 51734 条,为便于比较,统一为 51000 条,该条件下,3 个样品的测序覆盖度 Coverage,即最终得到的测序结果占整个基因组的比例,分别达到 92.94%,93.84%和 95.93%,表明测序覆盖度已基本反映样本的真实情况,样本中没有被测出的物种概率较低.随着高度的增加,反应器内菌群 α 多样性的各指标,如丰富度指数(Richness)、香浓指数(Shannon)、Chao 1、ACE 指数均呈现逐渐减小的趋势,表明反应器底部细菌群落 α 多样性最高,由下至上,细菌群落 α 多样性逐渐降低.

本反应器水流方向为自下而上,结合动力学

分析,可以推测,反应器底部进行的反应主要包括污染物的硫自养降解以及硫歧化反应,对应细菌群落 α 多样性较高,而到反应器中部及上部时,随着污染物逐渐降解完全,反应器内开展的反应逐渐演替为硫歧化反应,反应类型变得单一,导致细菌群落 α 多样性降低.

2.4.2 微生物 β 多样性分析 β 多样性分析主要用来度量多组样品之间的差别,本研究采用加权重的计算方式,计算不仅评估样本间物种的差异,而且加入了物种丰度作为权重.采用 PCoA(主成分分析 Principal co-ordinates analysis)方法分析反应器不同位置 3 个样品的 β 多样性.计算 UniFrac 距离结果如图 4(a)所示,将分析结果以可视化 3D 图形式展现,如图 4(b)所示.

可以看出,反应器底部和中部的样品呈现较高的相似度,相似度达到 91.05%,而反应器上部

的样品与底部和中部的样品相比,相似度较低(约为 74.65%).该结果表明,反应器内不同位置发生的反应不同,对应 3 个样品 β 多样性呈现差异性.结合动力学分析结果,当 HRT 为 0.75h 时,除了硫歧化反应之外,反应器底部和中部仍在进行着污染物的还原反应,对应高氯酸盐去除率分别为 55.81% 和 88.81%,两位置发生的反应类似,因此两样品表现出较高的相似度.而在反应器上部,高氯酸盐低于检出限 $10\mu\text{g/L}$,其去除率已达到 98% 以上,污染物的降解反应已进行的比较彻底,此时该位置主要发生硫歧化反应,因此,该位置细菌种群与底部及中部样品相比,相似度较低.

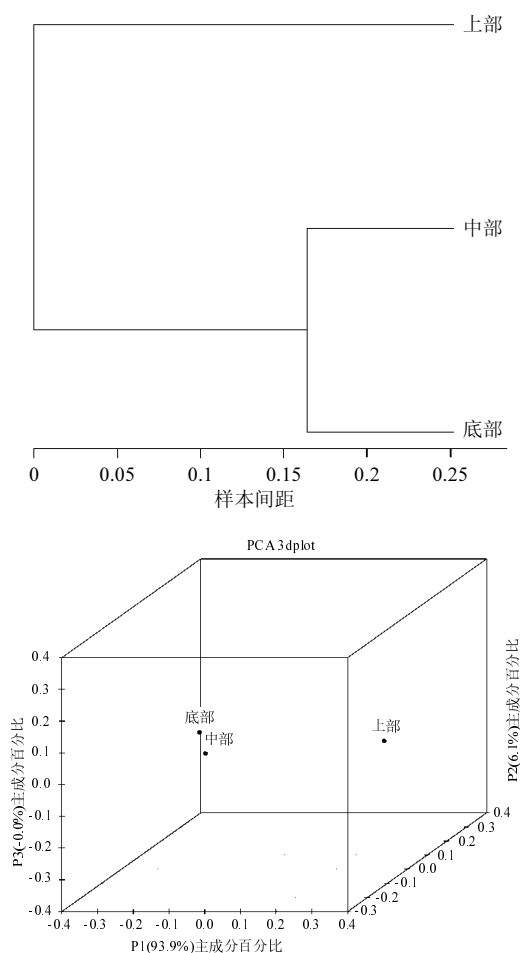


图 4 反应器不同位置菌群 PCoA 分析(a) UniFrac 距离, (b) 3D 视图

Fig.4 PCoA analyses of samples from different parts of reactor (a) UniFrac distance, (b) 3D graphic

2.4.3 特征种群分析 环境微生物通常以群落的形式存在,其结构特征描述了微生物群落成员的种类、丰度、以及演替情况.反应器内不同位置微生物群落结构的构成对于维护反应器功能非常关键.研究本反应器内群落结构的分布对于认识硫自养反应微生物生态学机理、优化操作条件、提升反应装置的效能具有重要作用.为进一步了解反应器内不同位置微生物群落结构,对其进行了不同分类水平的统计分析,分别在门(Phylum)和属(Genus)的水平上对各样品中菌群结构开展分析,结果如图 5 所示.

门水平上的群落结构分析显示,变形门(Proteobacteria)和绿菌门(Chlorobi)构成了反应体系的优势菌群,变形门(Proteobacteria)菌群丰度沿反应器内高度的增加呈减少趋势,而绿菌门(Chlorobi)呈增加趋势.变形门(Proteobacteria)是细菌中最大的一门,也是活性污泥中常见的优势菌门^[13,17].绿菌门(Chlorobi)细菌主要利用硫化物、硫单质作为电子供体,氧化产物为硫酸盐.

属(Genus)水平上的分析结果能提供更深入更全面的菌落结构信息.菌属 *Chlorobaculum* 为反应器内优势菌属,沿反应器内高度的增加呈持续增大的趋势,在反应器底部、中部和上部的丰度分别为 33.07%、50.39% 和 82.69%.2011 年 Rodrigue 等研究发现绿硫菌 *Chlorobaculum tepidum* 可以氧化硫化物和硫单质,生成终产物硫酸盐^[20].结合硫歧化反应的发生趋势(图 2),在反应器底部歧化反应已经十分显著,产生了过量的硫酸盐,沿着反应器高度的增加,接触时间延长,歧化反应愈加显著,与 *Chlorobaculum* 菌属丰度趋势相一致,因此,判断 *Chlorobaculum* 菌属为歧化反应菌属.

菌属 *Sulfurmonas* 丰度在反应器底部为 1.51%,至反应器中部下降至 0.24%,反应器上部为 0.14%.根据已有报道,菌属 *Sulfurmonas* 为硫自养反硝化细菌^[21],鉴于高氯酸盐和硝酸盐性质类似,许多细菌都能对二者去除^[10],可以推测菌属 *Sulfurmonas* 在本反应器中为高氯酸盐及硝酸盐硫自养还原菌.由于硫歧化反应始终伴随着污染物的降解,在反应器底部即进行得十分充分,成为

反应器内发生的主要反应,同时,污染物浓度较低,污染物的降解仅主要在反应器底部和中部进行,导致菌属 *Sulfurmonas* 丰度不高.其余菌属如 *Rhodopseudomonas*、*Acidithiobacillus*、*Desulfocapsa* 和 *Ignavibacterium* 等丰度均在较低水平,功能仍有待进一步研究.

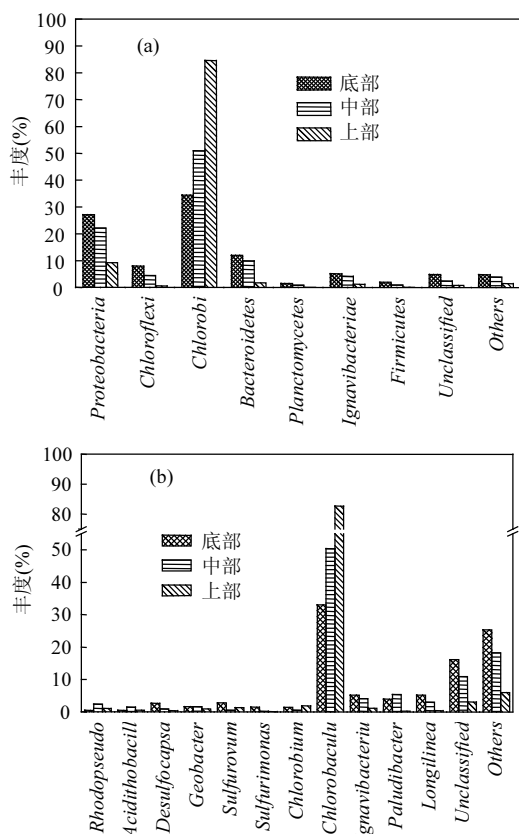


图5 (a)门和(b)属水平上各样品群落结构分析(丰度小于1.0%均归类于 Others)

Fig.5 Taxonomic classification of the bacterial communities at (a) phylum and (b) genus level. Making up less than 1% of total composition in all sample were classified as "others"

3 结论:

3.1 升流式硫自养固定床反应器对水中的低浓度高氯酸盐[(468.74±6.80) μg/L]具有较好的降解效果,逐渐调整水力停留时间由 4.0h 缩短至 0.75h,反应器稳态运行时,去除率较高(>97%),高氯酸盐降解符合 1/2 级反应动力学模型,高氯

酸盐由溶液主体向生物膜内的扩散为主要限速步骤.

3.2 硫歧化反应与高氯酸盐的降解同步进行,歧化反应产生的硫酸根占比十分显著,为控制过量硫酸盐的生成,在保证去除率的前提下,适当缩短 HRT 可以避免生成过量硫酸盐.同时,硫歧化反应是碱度过量消耗的主要因素,碱度消耗高于理论值,造成出水 pH 值的降低.

3.3 反应期内微生物群落结构空间分布呈现规律性,反应器底部细菌群落 α 多样性最高,由下至上,细菌群落 α 多样性逐渐降低;β 多样性分析结果表明反应器底部和中部样品表现出较高的相似度,达到 91.05%,而反应器上部样品与之相比,相似度较低(约为 74.65%).

3.4 菌群组成结构分析结果表明,*Sulfurmonas* 为硫自养还原菌,*Chlorobaculum* 菌属为歧化反应菌属.

参考文献:

- [1] Urbansky E T. Perchlorate chemistry: Implication for analysis and remediation [J]. Bioremediation Journal, 1998,2(2):81-95.
- [2] Charnley G. Perchlorate: Overview of risks and regulation [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008,46:2307-2315.
- [3] Tieman M. Perchlorate contamination of drinking water: Regulatory issue and legislative actions [R]. CRS Repo ~ for Congress, Order Code RS21961, Updated April 4, 2007.
- [4] Logan B E. Assessing the outlook for perchlorate remediation [J]. Environmental Science & Technology, 2001,35(23):482-487.
- [5] Bardiya N, Bae J H. Dissimilatory perchlorate reduction: A review [J]. Microbiological Research, 2011,166:237-254.
- [6] Ju X, Sierra-Alvarez R, Field J A, et al. Microbial perchlorate reduction with elemental sulfur and other inorganic electron donors [J]. Chemosphere, 2008,71(1):114-122.
- [7] Ju, X, Field J A, Sierra-Alvarez R, et al. Chemolithotrophic perchlorate reduction linked to the oxidation of elemental sulfur [J]. Biotechnol. Bioeng., 2007,96(6):1073-1082.
- [8] 谢 杰,杨志泉,陈 兵,等.硫自养菌降解还原高氯酸盐的优化控制研究 [J]. 水处理技术, 2012,6(6):32-35.
- [9] 任 云,高孟春,王子超,等.硫自养高氯酸盐还原菌和反硝化菌的培养和驯化 [J]. 应用与环境生物学报, 2014,20(3):414-419.
- [10] Sahu, A K, Conneely T, Nüsslein K R, et al. Biological Perchlorate Reduction in Packed Bed Reactors Using Elemental Sulfur [J]. Environmental Science & Technology, 2009,43:4466-4471.

- [11] 万东锦,刘永德,樊 荣,等.硫自养填充床生物反应器去除水中的高氯酸盐 [J]. 环境工程学报, 2015,9(11):213-218.
- [12] 王绍祥,杨洲祥,孙 真,等.高通量测序技术在水环境微生物群落多样性中的应用 [J]. 化学通报, 77(3):196-203.
- [13] Zhang T, Shao M F, Ye L, et al. 454pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants [J]. ISME Journal, 2011,6:1137-1147.
- [14] Ontiveros-Valencia A, Tang Y, Zhao H P, et al. Pyrosequencing analysis yields comprehensive assessment of microbial communities in pilot-scale two-stage membrane biofilm reactors [J]. Environmental Science & Technology, 2014,48:7511-7518.
- [15] Boles A R, Conneely T, McKeever R, et al. Performance of a pilot-scale packed bed reactor for perchlorate reduction using a sulfur oxidizing bacterial consortium [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012,109(3):637-646.
- [16] 国家环保总局《水和废水分析监测方法》编委会.水和废水分析监测方法 [M]. 4 版.北京:中国环境科学出版社, 2009.
- [17] Wan D, Liu Y, Niu Z, et al. Perchlorate reduction by hydrogen autotrophic bacteria and microbial community analysis using high-throughput sequencing [J]. Biodegradation, 2016,27:47-57.
- [18] Konenig A, Liu L H. Kinetic model of autotrophic denitrification in sulfur packed-bed reactors [J]. Water Research, 2001,35(8): 1969-1978.
- [19] Moon H S, Ahn K H, Lee S, Nam K, et al. Use of autotrophic sulfur-oxidizers to remove nitrate from bank filtrate in a permeable reactive barrier system [J]. Environmental Pollution, 2004,129(3):499-507.
- [20] Rodriguez J, Hiras J, Hanson T E. Sulfite oxidation in chlorobaculum tepidum [J]. Frontiers in Microbiology, 2011,2: 112.
- [21] Zhang M, Zhang T, Shao M F, et al. Autotrophic denitrification in nitrate-induced marine sediment remediation and Sulfurimonas denitrificans-like bacteria [J]. Chemosphere, 2009,76(5):677-682.

作者简介: 刘永德(1973-),男,河南漯河人,工学博士,副教授,主要从事环境生物技术和固废资源化研究工作.发表论文 20 余篇.