

好氧反硝化菌的筛选及其脱氮除磷性质的研究

于大禹* 郭 威 张金榜 张 贺 杨 鹏

(东北电力大学 应用化学与生物工程系 吉林 吉林 132012)

摘 要: 利用富集培养基, 从用生活污水驯化后的活性污泥中筛选得到一株具有好氧反硝化兼具除磷功能的细菌。通过形态学及生理生化指标鉴定其为假单胞菌属。利用此好氧反硝化菌处理模拟废水及生活废水, 通过监测总氮、无机磷及 COD_{Cr} 变化确定在 C/N 摩尔比为 3:1、接种量为 10%、pH 6.8、30°C 条件下处理 2 d, 该菌株脱氮、除磷及去除有机物的效果最佳, 活性污泥经此好氧反硝化菌强化后, 对生活废水的处理能力得到明显提升。

关键词: 好氧反硝化菌, 假单胞菌属, 脱氮除磷, COD_{Cr}, 最佳条件

Isolation of an Aerobic Denitrifying Bacterial Strain and Its Characterization in Nitrogen and Phosphorus Removal

YU Da-Yu* GUO Wei ZHANG Jin-Bang ZHANG He YANG Peng

(Department of Applied Chemistry and Biological Engineering, Northeast Dianli University, Jilin, Jilin 132012, China)

Abstract: Utilizing the enrichment substrate, an aerobic denitrifying bacterial strain with the capability of phosphorus removal was screened from the activated sludge which had been domesticated by actual living sewage. By the morphological observing and identification of the physiological and biochemical indexes, the strain was identified to belong to *Pseudomonas*. The aerobic denitrifying bacterial strain was applied to deal with the simulated and actual living wastewater. By inspecting the changes of total nitrogen, inorganic phosphorus and COD_{Cr} in the wastewater, it was ascertained that the optimal wastewater treatment conditions of the bacterial strain were C/N= 3, inoculated ratio= 10%, pH 6.8, 30°C, treatment time= 2 d. After the activated sludge was strengthened by the aerobic denitrifying bacterial strain, its treatment capability for actual living sewage was improved, evidently.

Keywords: Aerobic denitrifying bacteria, *Pseudomonas*, Nitrogen and phosphorus removal, COD_{Cr}, Optimal conditions

据国家环保总局 2002 年中国环境状况公报, 我国主要湖泊氮、磷污染较重, 因此而导致的富营养化问题突出^[1]。前不久发生的太湖蓝藻事件正是水体富营养化问题日趋严重的表现。更快更好地解决

水体富营养化问题已成为亟待解决的环境问题之一, 也是目前研究的热点。

国内外关于废水脱氮除磷的相关报道很多^[2], 但一般都是利用活性污泥法进行处理。活性污泥工

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 973 计划项目(No. 2007CB206904); 中国电机工程学会电力青年科技创新项目(No. 2008-5); 东北电力大学博士科研启动基金项目(No. BSJXM-200612)

* 通讯作者: Tel: 86-432-5562109; 信箱: yudy@mail.nedu.edu.cn

收稿日期: 2008-10-29; 接受日期: 2008-12-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

艺虽反应速度快且彻底，但造价高，管理不够方便，且产污泥量大，二次污染严重。而利用筛选到的某些高效菌株直接或强化污泥对特定废水进行处理能够在一定程度上弥补上述活性污泥工艺的不足，例如武汉市利用细菌治理湖水水体富营养化问题，已初见成效。

本研究利用好氧反硝化作用的独特优势^[3]，从用生活废水驯化后的活性污泥中分离筛选出一株好氧反硝化兼具除磷及去除COD_{Cr}功能的假单胞菌，对该菌株去除模拟废水和生活废水中氮、磷及有机物的最佳条件进行了研究，并对经该菌株强化前后活性污泥的废水处理能力进行了比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 污泥来源：本实验室在 A2/O 工艺的好氧段驯化好的活性污泥。

1.1.2 废水来源：取自东北电力大学西侧宿舍区生活废水。其中，总氮含量约为 28 mg/L~32 mg/L；COD_{Cr} 含量约为 320 mg/L~342 mg/L；无机磷含量约为 0.18 mg/L~0.2 mg/L，用 NaOH 和 HCl 调节废水 pH 值。

1.1.3 培养基^[4]：BTB(溴百里酚蓝)培养基^[5]：琼脂 20 g/L；KNO₃ 1 g/L；KH₂PO₄ 1 g/L；FeCl₂·6H₂O 0.5 g/L；CaCl₂·7H₂O 0.2 g/L；MgSO₄·7H₂O 1 g/L；琥珀酸钠 8.5 g/L；BTB(1%溶于酒精) 1 mL，用 1 mol/L NaOH调节pH 7.0~7.3；LB液体培养基：KNO₃ 1 g/L；KH₂PO₄ 1 g/L；FeCl₂·6H₂O 0.5 g/L；CaCl₂·7H₂O 0.2 g/L；MgSO₄·7H₂O 1 g/L；琥珀酸钠 8.5 g/L；模拟废水：KNO₃ 0.6 g/L；KH₂PO₄ 1 g/L；MgSO₄·7H₂O 1 g/L；琥珀酸钠 2.4 g/L。灭菌条件：1.03 × 10⁵ Pa，20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离筛选^[4]：采用梯度稀释及涂布法将泥水混合液均匀涂布于BTB培养基，30℃恒温培养 2 d后，挑取周围培养基出现蓝色的单菌落作为

初筛菌。将初筛菌接入装有 LB 培养基的试管中，30℃、160 r/min 液体培养。培养 12 h 后，以 10%的接种量接种到 50 mL 模拟废水中，30℃、160 r/min 振荡驯化培养。

1.2.2 菌株的鉴定：1) 形态观察。观察菌落形态，并将菌株进行革兰氏染色及芽孢染色；2) 生理生化指标鉴定。依据《常见细菌系统鉴定手册》^[6]及《伯杰氏鉴定细菌手册》进行。

1.2.3 分析检测项目及方法^[7]：参照《水和废水监测分析方法》(第四版)，总氮：过硫酸钾氧化紫外分光光度法；硝酸盐氮：酚二磺酸法；亚硝酸盐氮：N-(1-萘基)-乙二胺光度法；无机磷：钼锑分光光度法；COD_{Cr}：重铬酸钾法。

1.2.4 好氧反硝化菌对模拟废水和生活废水的处理：将 1.2.1 中获得的好氧反硝化菌的菌悬液以一定比例的接菌量接入到模拟废水或生活废水中，在选定pH值和温度下，160 r/min摇床培养 1 d~3 d，监测总氮、无机磷及COD_{Cr}的变化。正交实验结果分析表中，K1、K2、K3 分别表示各因素取 1、2、3 水平时相应的试验结果之和。为了比较各因素不同水平的好坏，引入k值。表中k₁、k₂、k₃分别表示各因素相应水平的平均值。极差R表示数据离散程度^[8]。

1.2.5 好氧反硝化菌对活性污泥的强化处理：将好氧反硝化菌与其来源活性污泥以 1 : 1 的体积比混合，在 30℃ 恒温培养箱中驯化一定时间，即得菌强化污泥。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选及鉴定

将通过富集培养筛选得到的菌株进行革兰氏染色、芽孢染色以及生理生化指标鉴定，结果显示，该菌株为革兰氏阴性细菌，无芽孢，生理生化指标鉴定结果如表 1 所示。

由以上染色及生理生化指标鉴定结果得到的菌株特征与假单胞菌属相符^[6]，因此初步鉴定该菌株

表 1 菌株的生理生化特征							
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain							
指标	酒石酸钾盐	甲基红	V-P	明胶液化	氧化酶	接触酶	耐盐性和需盐性
Indexes	Potassium tartrate salt	Methyl red	Vopes-prokauer test	Gelatin liquidized	Oxidase	Catalase	Salt need
结果	—	—	—	—	+	+	2% need
Results	—	—	—	—	+	+	5% needless

为革兰氏阴性、短杆假单胞菌属。

2.2 好氧反硝化菌处理模拟废水的研究

2.2.1 菌株的好气性及脱氮、除磷、去除有机物特性：将筛选得到的好氧反硝化菌接种到模拟废水中，通过监测通气、密封条件下溶解氧量、总氮、硝酸盐氮、亚硝酸盐氮、无机磷及 COD_{Cr} 的变化来确定该菌株的好气性以及脱氮、除磷、去除有机物的性能。结果如表 2 所示。

表 2 菌株的好气性及脱氮、除磷、去除 COD _{Cr} 效果						
Table 2 Aerobic characteristic, denitrification, dephosphorization and COD _{Cr} removal of strain						
检测项目 Detected items	通气 Aerated			密封 Airproof		
	1 d	2 d	3 d	1 d	2 d	3 d
Dissolved oxygen	5.8	9.8	9.8	5.8	5.0	3.8
TN removal rate	22.47	70.79	69.66	33.33	42.53	43.9
NO ₃ ⁻ removal rate	29.51	52.48	52.11	21.99	38.78	32.41
NO ₂ ⁻ increase amount	2.95	1.55	1.181	2.9	3.075	2.25
Inorganic phosphorus removal rate	20	23.1	21.4	19.9	14.2	7.8
COD _{Cr} removal rate	96.31	95.54	95.96	93.35	97.02	96.32

由表 2 可以清晰看出，通气及密封 2 种条件下各种监测指标变化趋势相同。从总氮及硝酸盐氮的去除率看，除反应第 1 天，均是通气条件明显好于密封条件；在 2 种条件下，总氮及硝酸盐氮浓度均随反应时间的延长而降低，这说明该菌以硝酸盐氮为电子受体，诱导了硝酸盐还原酶的表达，由硝酸盐还原酶引起的总氮及硝酸盐氮降解率在起始阶段不断增加^[9]；但随着反应时间的延长，硝酸盐还原酶的耐受时间过长，且体系中底物量不断减少，产物量不断增加，改变了反应平衡的方向，导致反应后期的总氮及硝酸盐氮的降解速率出现下降趋势^[10]。此外，在反应起始阶段，亚硝酸盐氮出现了积累情况，这在生物脱氮研究中经常被观察到^[11]。对这种现象目前有 2 种解释，一种认为与亚硝酸盐相比，硝酸盐作为电子受体时基质释放的能量较高，因此，微生物优先利用硝酸盐作为反硝化作用的电子受体；另一种认为硝酸盐还原酶的合成要早于亚硝酸盐还原酶，因此亚硝酸盐的降解要晚于硝酸盐。反应后期，亚硝酸盐氮含量积累情况得到缓解，这种情况在通气条件表现的更为明显。

好氧反硝化菌在脱氮的同时，兼具一定的除磷功能。微生物是通过摄取无机磷的方式达到除磷的目的，由表 2 可以看出，在通气条件下，菌株对无机磷的去除率在迅速增长之后趋于稳定，但在密封条件下，菌株在处理第 2 天对无机磷的去除率即出现急剧下降，说明菌株在摄取无机磷后又迅速将其释放回体系中，这表明，通气条件更利于该菌株对无

机磷的摄取。从 COD_{Cr} 去除率可以看出，通气与密封条件对菌株去除有机物的效果几乎没有影响。

综上所述，该菌株为好气型菌株，具有脱氮、除磷及去除有机物的能力，为好氧反硝化菌。

2.2.2 碳源、氮源、C/N 及磷酸盐对好氧反硝化菌的影响：碳源、氮源、磷酸盐的加入量及 C/N 摩尔比是影响菌株对废水处理效果的重要因素。在 pH 值为 6.8、温度为 30℃ 条件下，设计正交实验，利用好氧反硝化菌处理含不同浓度丁二酸钠、硝酸钾及磷酸二氢钾的模拟废水 2 d，通过监测 COD_{Cr}、总氮及无机磷去除率选出最佳碳源、氮源、磷酸盐加入量及最佳碳氮比，结果如表 3~5 所示。

表 3 碳源、氮源、磷酸盐加入量及最佳 C/N 正交实验因素水平表			
Table 3 Factors and levels in orthogonal experiment of carbon source, nitrogen source, phosphate and C/N			
水平 Levels	因素 Factors		
	A：丁二酸钠 Sodium succinate (g/L)	B：硝酸钾 Potassium nitrate (g/L)	C：磷酸二氢钾 Potassium dihydrogen phosphate (g/L)
1	0.8	0.2	0.3
2	2.4	0.6	1.0
3	7.2	1.8	3.0

由正交实验结果分析表可以看出：丁二酸钠因素对无机磷及 COD_{Cr} 去除率影响较大，极差分别为 17.54 和 22.61；而硝酸钾因素对总氮去除率的影响较大，极差为 10.45。分别从总氮、无机磷及 COD_{Cr} 去除率中 3 个极差比较来看，三因素对 3 个指标的

表 4 碳源、氮源、磷酸盐加入量及最佳 C/N 正交实验结果分析
Table 4 Results of orthogonal experiment of carbon source, nitrogen source, phosphate and C/N

序号 Number	因素组合 Factors combination			CODcr 去除率 CODcr removal rate (%)	总氮去除率 TN removal rate (%)	无机磷去除率 Inorganic phosphorus removal rate (%)
	A	B	C			
1	1	1	1	100	71.91	40.55
2	1	2	2	98.14	71.57	41.42
3	1	3	3	98.64	58.44	35.78
4	2	1	3	95.37	65.1	26.89
5	2	2	2	95.37	79.41	35.41
6	2	3	1	38.23	66.67	2.82
7	3	1	2	90.73	75.36	33.44
8	3	2	3	93.51	75.66	17.26
9	3	3	1	98.15	70.2	40.98

表 5 碳源、氮源、磷酸盐加入量及最佳 C/N 正交实验结果分析
Table 5 Results analysis of orthogonal experiment of carbon source, nitrogen source, phosphate and C/N

COD _{Cr} 去除率				总氮去除率				无机磷去除率			
COD _{Cr} removal rate (%)				TN removal rate (%)				Inorganic phosphorus removal rate (%)			
K1	296.78	286.1	236.38	K1	201.92	212.37	208.78	K1	117.75	100.88	84.35
K2	228.97	287.02	284.24	K2	211.18	226.64	226.34	K2	65.12	94.09	110.27
K3	282.39	235.02	287.52	K3	221.22	195.31	199.2	K3	91.68	79.58	79.93
k ₁	98.93	95.37	78.79	k ₁	67.31	70.79	69.59	k ₁	39.25	33.63	28.12
k ₂	76.32	95.67	94.75	k ₂	70.39	75.55	75.45	k ₂	21.71	31.36	36.76
k ₃	94.13	78.34	95.84	k ₃	73.74	65.1	66.4	k ₃	30.56	26.53	26.64
R	22.61	17.33	17.05	R	6.43	10.45	9.05	R	17.54	7.1	10.12

影响主次顺序为 A>B>C, 即丁二酸钠的加入量对菌株处理模拟废水效果的影响最大, 硝酸钾次之, 磷酸二氢钾的影响最小; A2B3C1 的无机磷去除率仅为 2.82%, 原因可能是在丁二酸钠加入量为 2.4 g/L, 硝酸钾加入量为 1.8 g/L 的条件下, 此时的 C/N 不利菌株对无机磷的去除。综合 CODcr、总氮及无机磷去除率, 根据因素指标关系确定各因素的最优组合为 A2B2C2, 即丁二酸钠加入量为 2.4 g/L, 硝酸钾加入量为 0.6 g/L, 磷酸二氢钾加入量

为 1 g/L, C/N 摩尔比为 3:1, 此时总氮去除率为 79.41%, CODcr 去除率为 95.37%, 无机磷去除率为 35.41%。

2.2.3 接菌量对好氧反硝化菌处理废水效果的影响: 不同接菌量也会对菌株处理废水的效果产生影响。为确定好氧反硝化菌处理废水的最佳接菌量, 分别向模拟废水中加入最终浓度 2.5%、5%、10%和 20%的菌悬液, 在 pH 值为 6.8、温度为 30℃ 条件下处理 3 d, 实验结果如图 1 所示。

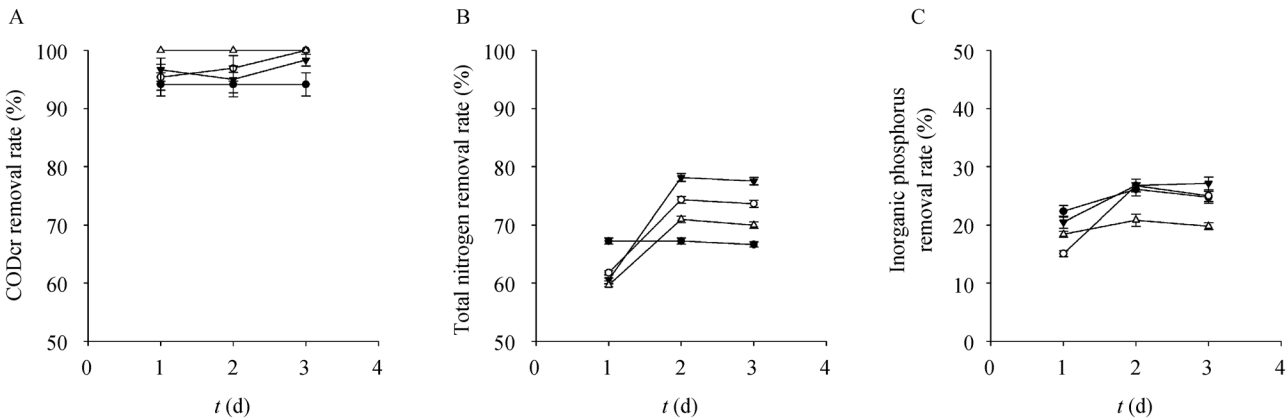


图 1 不同接菌量对菌株去除有机物、脱氮、除磷效果的影响

Fig. 1 Effects of bacteria rate on denitrification, dephosphorization and CODcr removal

Note: ●: 2.5% of bacteria; ○: 5% of bacteria; ▼: 10% of bacteria; △: 20% of bacteria. All data are expressed as $\bar{x} \pm S$ ($n=3$).

从图中可以看出,不同接菌量对 COD_{Cr} 去除率影响不大,2.5%接菌量与 10%接菌量无机磷去除效果相当,但前者总氮的去除效果不如后者。综合考虑实验操作难易程度、用菌量及处理模拟废水效果等方面的因素,选择 10%接菌量作为好氧反硝化菌处理废水的最佳接菌量。

2.3 好氧反硝化菌处理生活废水的研究

上述实验确定的好氧反硝化菌处理模拟废水的最佳条件,为将该菌株应用于处理实际生活废水奠定了基础。以菌株处理模拟废水的最佳条件为基础,设计出 pH 值、温度、时间的三因素三水平的正交实验,以此选择出菌株处理生活废水的最佳条件,结果如表 6~8 所示。

由正交实验结果分析表可以看出:时间因素对总氮、无机磷及 COD_{Cr} 去除率影响较大,极差分别为 36.49、11.66 和 30.1; 温度因素对总氮及 COD_{Cr} 去除率的影响次之,极差分别为 26.72 和 13.72; 综

合总氮、COD_{Cr} 及无机磷去除率中 3 个极差比较来看,三因素对 3 个指标的影响主次顺序为 C>B>A,即时间因素对好氧反硝化菌处理生活废水影响最大,温度因素次之,pH 值因素影响最小。由于总氮去除率是反映好氧反硝化菌处理废水效果的主要指标,因此根据因素指标关系确定各因素的最优组合为 A2B2C2,即 pH 值为 6.8,温度为 30℃,在反应第 2 天时,好氧反硝化菌对生活废水的处理效果最好,

表 6 菌株处理生活废水最佳条件正交实验因素水平表
Table 6 Factors and levels in orthogonal experiment of optimal treatment conditions of strain for actual living wastewater

水平 Levels	因素 Factors		
	A : pH 值	B : 温度(°C)	C : 时间(d)
1	5.8	25	1
2	6.8	30	2
3	7.8	35	3

表 7 菌株处理生活废水最佳条件正交实验结果
Table 7 Results of orthogonal experiment of optimal treatment conditions of strain for actual living wastewater

序号 Number	因素组合 Factors combination			COD _{Cr} 去除率 COD _{Cr} removal rate (%)	总氮去除率 TN removal rate (%)	无机磷去除率 Inorganic phosphorus removal rate (%)
	A	B	C			
1	1	1	1	37.5	20.48	14
2	1	2	2	71.43	66.2	21.74
3	1	3	3	77.78	45.59	22.52
4	2	1	3	82.5	48.9	7.83
5	2	2	2	80	68.09	17.13
6	2	3	1	35.71	48.6	8.72
7	3	1	2	76.76	55.66	20.41
8	3	2	3	73.6	51.45	10.44
9	3	3	1	70.37	11.41	1.57

表 8 菌株处理生活废水最佳条件正交实验结果分析
Table 8 Results analysis of orthogonal experiment of optimal treatment conditions of strain for actual living wastewater

COD _{Cr} 去除率 COD _{Cr} removal rate (%)				总氮去除率 TN removal rate (%)				无机磷去除率 Inorganic phosphorus removal rate (%)			
K1	186.71	196.76	143.58	K1	132.27	125.04	80.49	K1	58.26	42.24	24.29
K2	198.21	225.03	228.19	K2	165.59	185.74	189.95	K2	33.68	49.31	59.28
K3	220.73	183.86	233.88	K3	118.52	105.6	145.94	K3	32.42	32.81	40.79
k ₁	62.24	65.59	47.86	k ₁	44.09	41.68	26.83	k ₁	19.42	14.08	8.10
k ₂	66.07	75.01	76.06	k ₂	55.20	61.92	63.32	k ₂	11.23	16.44	19.76
k ₃	73.58	61.29	77.96	k ₃	39.51	35.2	48.65	k ₃	10.81	10.94	13.60
R	11.34	13.72	30.1	R	15.69	26.72	36.49	R	8.61	5.5	11.66

此时总氮去除率为 68.09%, COD_{Cr} 去除率为 80%, 无机磷去除率为 17.13%。

2.4 好氧反硝化菌的强化作用对活性污泥处理生活污水能力的影响

为了在废水处理过程中, 提高活性污泥的处理效果、减少污泥的用量, 也为了检测筛选到的好氧反硝化菌在实际工况下应用的效果, 用好氧反硝化菌对经生活污水驯化后的活性污泥进行了强化处

理。分别利用活性污泥及菌强化污泥处理生活废水, 比较 COD_{Cr}、总氮及无机磷的去除率, 结果如图 2 所示。

菌强化污泥是由纯种好氧反硝化菌与其来源活性污泥按一定比例混合制得, 好氧反硝化菌的加入确立或强化了其在活性污泥中的优势菌地位, 因此, 菌强化污泥对 COD_{Cr}、总氮及无机磷的去除效果均明显好于活性污泥本身。

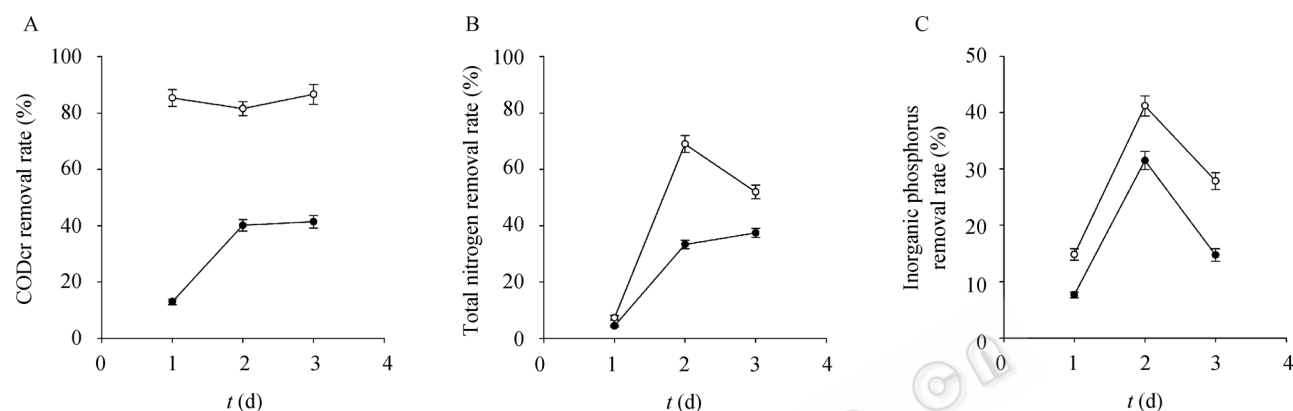


图 2 活性污泥及菌强化污泥对生活废水去除有机物、脱氮、除磷的效果

Fig. 2 Effects of activated sludge and strengthened sludge by bacteria on COD_{Cr} removal, denitrification and dephosphorization

Note: ●: activated sludge; ○: strengthened sludge by bacteria. All data are expressed as $\bar{x} \pm S$ ($n=3$).

在反应初期, 加入到活性污泥中的菌株尚未适应污泥的环境, 因此其脱氮除磷的效果只是略好于活性污泥; 但随着反应的进行, 加入的好氧反硝化菌逐渐适应了污泥环境, 加速了对总氮及无机磷的去除, 并逐渐达到去除率最高值, 远好于活性污泥对废水的处理效果。随着反应时间的进一步延长, 供好氧反硝化菌生长的营养成分逐渐被消耗, 其脱氮除磷的效果有所下降, 但仍好于活性污泥的处理效果。

综合以上 COD_{Cr}、总氮及无机磷去除率来看, 活性污泥经好氧反硝化菌强化后, 其废水处理效果明显得到提高, 显示好氧反硝化菌及其强化的活性污泥在废水处理领域具有巨大的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] 孔庆鑫, 李君文, 王新为, 等. 一种新的好氧反硝化菌筛选方法的建立及新菌株的发现. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2): 222-225.
- [2] Comean Y. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Wat Res*, 1986, 20(12): 1511-1521.
- [3] 李 平, 张 山, 刘德立. 细菌好氧反硝化研究进展. 微生物学杂志, 2005, 25(1): 60-64.
- [4] 项慕飞, 汪 苹, 李秀婷, 等. 废水脱氮系统中好氧反硝化菌的筛选与鉴定. 食品科技, 2006, 7: 153-156.
- [5] Takaya N, Maria Antonina BCS, Yasushi S, *et al.* Aerobic denitrification bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *App and Envir Microbio*, 2003, 69(6): 3152-3157.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.62-65.
- [7] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2003, pp.201-271.
- [8] 关春龙, 刘国勤. SiCp/ Al 基复合材料制备工艺的正交优化设计. 粉末冶金工业, 2007, 17(2): 26-29.
- [9] 于爱茸, 李 尤, 俞吉安. 一株耐氧反硝化细菌的筛选及脱氮特性研究. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 77-81.
- [10] 邓立鸣. 反硝化聚磷的生物除磷脱氮. 国外建材科技, 2006, 27(3): 94-97.
- [11] 张小玲, 张卫东, 张 玲, 等. 好氧反硝化菌的选育及其初步应用. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1556-1561.