

研究报告

反硝化除磷戈登氏菌属的富集及其菌剂制备

李微^{*1}, 王宇琦¹, 侯云鹤¹, 王贺¹, 陈一鸣¹, 高明杰², 祝雷³

1 沈阳建筑大学, 辽宁 沈阳 110015

2 辽宁省城乡建设规划设计院有限责任公司, 辽宁 沈阳 110015

3 沈阳环境科学研究院, 辽宁 沈阳 110015

李微, 王宇琦, 侯云鹤, 王贺, 陈一鸣, 高明杰, 祝雷. 反硝化除磷戈登氏菌属的富集及其菌剂制备[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2022-2036

Li Wei, Wang Yuqi, Hou Yunhe, Wang He, Chen Yiming, Gao Mingjie, Zhu Lei. Enrichment and agent preparation of *Gordonia* for denitrifying phosphorus removal[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2022-2036

摘要:【背景】投加微生物菌剂是强化生物处理效能的重要手段, 反硝化是污水脱氮除磷的关键步骤, 但目前对于反硝化微生物菌剂相关的研究报道较少。【目的】驯化高效反硝化聚磷菌菌剂, 并对系统进行生物强化。【方法】采用两阶段法快速富集反硝化聚磷菌, 筛选高效脱氮除磷功能菌株 NC1-1 并进行鉴定, 以 NC1-1 为菌种来源制备干粉菌剂, 研究菌剂强化 A²SBR 系统污水处理效果。【结果】历经 36 d 后反硝化聚磷菌富集成功, 菌株 NC1-1 经鉴定属于戈登氏菌属, 其脱氮除磷率分别为 89.46%和 91.68%。麦麸、玉米粉配比为 85%:15%、NC1-1 投菌量为 20 mL、发酵液用量 20 mL 的条件下成功制得干粉菌剂, 干粉菌剂最佳投加量为 10%的 A²SBR 系统总磷(total phosphorus, TP)和 NO₃⁻-N 去除率比未投加菌剂的 A²SBR 系统提高 12.06%和 11.52%。【结论】菌剂 NC1-1 的投加使 A²SBR 系统的污染物去除效能进一步提高, 研究结果为进一步研究反硝化聚磷菌菌剂提供了理论依据。

关键词: 反硝化聚磷菌; A²SBR; 戈登氏菌属; 干粉菌剂

基金项目: 辽宁省教育厅自然科学基金(lnqn202010); 辽宁省科技厅自然科学基金(2019ZD0671)

Supported by: Natural Science Foundation of Education Department of Liaoning Province (lnqn202010); Natural Science Foundation of Department of Science and Technology of Liaoning Province (2019ZD0671)

***Corresponding author:** E-mail: liweilengjinyue@163.com

Received: 2021-10-09; **Accepted:** 2021-12-06; **Published online:** 2022-01-07

Enrichment and agent preparation of *Gordonia* for denitrifying phosphorus removal

LI Wei^{*1}, WANG Yuqi¹, HOU Yunhe¹, WANG He¹, CHEN Yiming¹, GAO Mingjie², ZHU Lei³

1 Shenyang Jianzhu University, Shenyang 110015, Liaoning, China

2 Liaoning Urban and Rural Construction Planning and Design Institute Company Limited, Shenyang 110015, Liaoning, China

3 Shenyang Academy of Environmental Sciences, Shenyang 110015, Liaoning, China

Abstract: [Background] Adding microbial inoculum is an important means to enhance the efficiency of biological treatment, and denitrification is a key step in nitrogen and phosphorus removal from wastewater. However, there are few reports on denitrifying microbial agents. [Objective] To acclimate efficient denitrifying phosphorus accumulating organism (DPAO), make the denitrifying agent, and enhance the agent performance. [Methods] The DPAO was rapidly enriched by two-phase method, and strain NC1-1 with high-efficiency nitrogen and phosphorus removal was screened out and identified. The bacterial powder was prepared with NC1-1 strain, and the effect of the powder on wastewater treatment in A²SBR system was studied. [Results] DPAO was enriched successfully after 36 days. Strain NC1-1 was identified as *Gordonia*, with the nitrogen and phosphorus removal rates of 89.46% and 91.68%, respectively. The bacterial powder was successfully prepared with the wheat bran-to-corn flour ratio of 85%:15%, NC1-1 inoculum volume of 20 mL, and fermentation broth volume of 20 mL. The removal rates of total phosphorus (TP) and NO₃⁻-N in the A²SBR system supplemented with the bacterial powder at a dosage of 10% were 12.06% and 11.52%, respectively, higher than those in the A²SBR system without the bacterial powder. [Conclusion] The adding of NC1-1 enhanced the pollutant removal efficiency of A²SBR system. The research outcome provides a theoretical basis for the further study of DPAO agent.

Keywords: denitrifying phosphorus accumulating organism; A²SBR; *Gordonia*; bacterial powder

氮、磷等营养物质过量排放至水体中引起“水华”和“赤潮”等现象,造成水体富营养化,导致水质恶化,所以国内外对污水处理中氮、磷的排放标准不断提高,也使得兼具脱氮、除磷特性的反硝化聚磷菌(denitrifying phosphorus accumulating organism, DPAO)成为研究热点之一^[1-3]。反硝化脱氮除磷技术解决了传统生物脱氮除磷过程中固有的问题,具有一碳两用、磷氮去除效果好、污泥产量低和能耗低等优点^[4]。为进一步强化生物处理效能,可以将微生物制成干粉菌剂应用于实际工程中,微生物菌剂具

有能耗低、见效快、针对性强、操作简单等特点^[5]。钟华将植物原趋磁性微生物负载于沙状矿物石粉上生成净化菌剂,解决了微生物菌剂投入污水中易被冲走、运行成本高等问题^[6],为微生物菌剂的广泛应用奠定了基础。

王建芳等使用有效微生物强化序批式反应器(sequencing batch reactor, SBR),有效地提高了反应器的除污效果^[7]。杜聪等用由乳酸菌和丝状菌等菌种合成的微生物菌剂对黑臭水体化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)、总氮(total nitrogen, TN)和氨氮(ammonium

nitrogen, $\text{NH}_4^+\text{-N}$) 的去除率分别为 87.37%、90.70% 和 95.24%^[8]。尤新新等通过富集内源性土著微生物制得微生物菌剂 WKM, 其对猪场粪污水 COD 和氨氮的去除率达到了 94.8% 和 61.8%^[9]。陈晶等制备了反硝化聚磷菌的干粉菌剂, 其对 COD、硝态氮(nitrate nitrogen, $\text{NO}_3^-\text{-N}$) 和总磷(total phosphorus, TP) 的去除率分别为 43.26%、92.76% 和 65.77%^[10], 虽然其对硝态氮去除率较好, 但对化学需氧量及总磷去除效果不佳。尽管目前对于微生物菌剂已有广泛的研究, 但对于以反硝化聚磷菌为主体的微生物菌剂鲜见生产和应用, 目前研究开发较少。

本研究对 DPAO 进行富集, 依据脱氮除磷试验筛选得到一株高效同步脱氮除磷的反硝化聚磷菌, 并制备干粉菌剂, 研究干粉菌剂强化

A^2SBR 系统污水处理效能, 以期利用功能微生物强化生物处理效能提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 反硝化聚磷菌的富集方法

试验采用圆柱形 SBR 反应器, 其有效容积为 12 L、内径和高度分别为 140 mm 和 850 mm, SBR 装置图见图 1。反硝化聚磷菌的富集分两个阶段进行, 第一阶段为厌氧/好氧段, 富集传统聚磷菌(phosphorus accumulating organism, PAO), 运行 16 d, 运行周期设计为瞬时进水、厌氧 2 h、好氧 2 h、沉淀 30 min、排水; 第二阶段是厌氧/缺氧段, 在厌氧结束端滴加硝态氮作为电子受体驯化 DPAO, 运行 20 d, 运行周

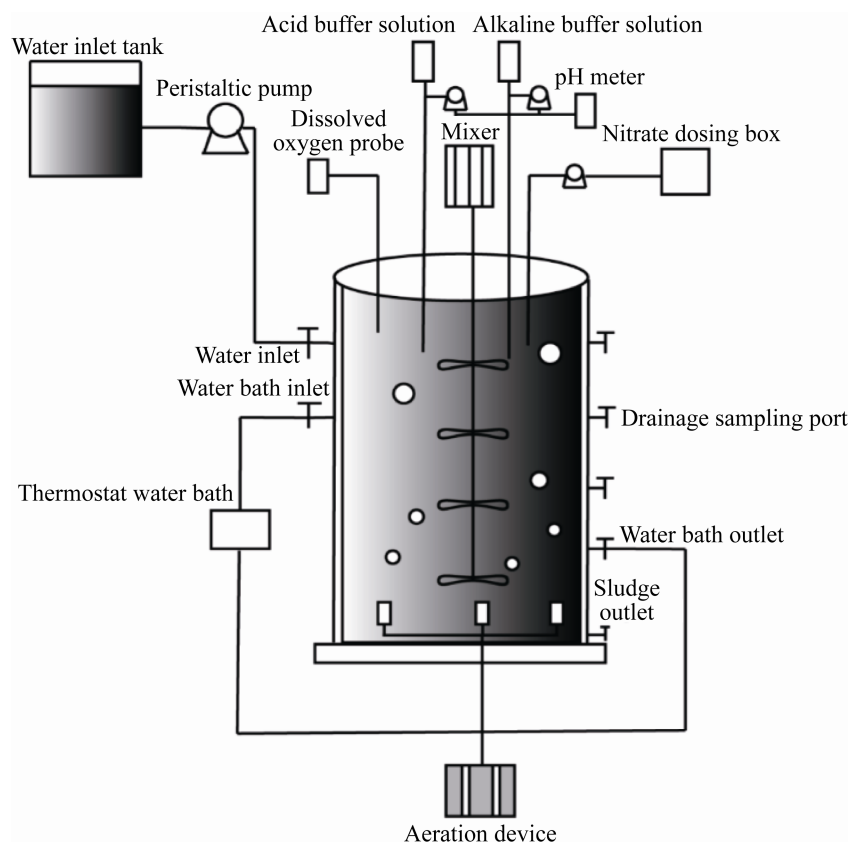


图 1 SBR 装置图

Figure 1 SBR set-up diagram.

期为瞬时进水、厌氧 2 h、缺氧 2.5 h、沉淀 30 min、排水。反应器每天运行 3 个周期, 每个周期循环运行 5.0–5.5 h。

富集过程中, 利用气体流量计控制好氧阶段曝气泵气量, 采用溶解氧仪测定系统的溶解氧(dissolved oxygen, DO)值, 厌氧阶段 DO 值为 0.5 mg/L 以下, 好氧阶段 DO 值为 2.0–5.0 mg/L, pH 在线监测仪协同微量蠕动泵添加酸碱溶液将 pH 值控制在 7.5–8.0, 混合液悬浮固体浓度(mixed liquid suspended solids, MLSS)为 2 800–3 300 mg/L, 污泥停留时间(sludge retention time, SRT)为 15 d。

1.2 实验用水

实验所用废水是由 300 mg CH_3COONa 、14 mg NH_4Cl 、100 mg KH_2PO_4 、40 mg CaCl_2 、45 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 000 mL 蒸馏水和微量元素配制而成的人工合成废水, 试验用水的 COD、TP 及 NO_3^- -N 范围分别为 170.02–220.00、5.06–10.20、8.04–12.27 mg/L。活性污泥取自辽宁省抚顺市采用 A^2/O 工艺的污水处理厂二沉池, 呈灰黑色, 絮体状, 污泥沉降性能良好, 污泥体积指数(sludge volume index, SVI)为 80–90 mg/L。

1.3 菌株的分离和筛选

1.3.1 培养基

反硝化培养基: 取 5 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 g KNO_3 、1 g KH_2PO_4 、1 g K_2HPO_4 、0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、15 g 琼脂、1 000 mL 无菌水混合, 调节 pH 7.3, 分装至 250 mL 锥形瓶中, 于 108 kPa 灭菌 20 min 后存 4 °C 冷藏备用。

限磷培养基: 取 3.32 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、152.76 mg NH_4Cl 、22.98 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、81.12 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、17.83 mg K_2SO_4 、11.00 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2 mL 微量元素、1 000 mL 无菌水混合, 调节 pH 7.0, 分装至 250 mL 锥形瓶中, 于 108 kPa 灭菌 20 min 后存 4 °C 冷藏备用。

富磷培养基: 取 3.32 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、305.52 mg NH_4Cl 、25.68 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、35.11 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、91.26 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2 mL 微量元素、1 000 mL 无菌水混合, 分装至 250 mL 锥形瓶中, 于 108 kPa 灭菌 20 min 后存 4 °C 冷藏备用。

富氮富磷培养基: 取 3.32 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、305.52 mg NH_4Cl 、35.11 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、91.26 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、25.68 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、300.00 mg KNO_3 、2 mL 微量元素、1 000 mL 无菌水混合, 分装至 250 mL 锥形瓶中, 于 108 kPa 灭菌 20 min 后存 4 °C 冷藏备用。

硝酸盐还原培养基: 取 2.42 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 g KNO_3 、20 g 蛋白胨、1 g 葡萄糖、1 g 琼脂、1 000 mL 无菌水混合, 调节 pH 7.4, 分装至 250 mL 锥形瓶中, 于 108 kPa 灭菌 20 min 后存 4 °C 冰箱中冷藏备用。

1.3.2 菌株的分离和筛选

取 10 mL 富集后缺氧结束端的污泥混合液与无菌蒸馏水配制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度梯度的菌悬液, 各浓度梯度分别取 0.2 mL 菌悬液接种于反硝化培养基中, 在厌氧条件下进行涂布培养, 从中挑取菌落数较少的培养基进行平板划线直至得到单一菌落^[11]。本试验从 2 个培养基上共分离出 14 株菌, 命名为 NC1–NC1-13。

根据参考文献[12–14]确定了菌株筛选的步骤。选取上述得到的单一菌落接种于限磷培养基中, 在 30 °C、150 r/min 条件下振荡培养 24 h 后, 于 4 000 r/min 条件下离心 10 min, 将菌株重悬于富磷培养基中培养 24 h, 筛选出具有吸磷特性的菌株, 将具有吸磷特性的菌株接种于硝酸盐还原培养基中 30 °C、150 r/min 培养, 观察是否有气泡产生, 取培养液置于比色盘中, 加入格里斯试剂, 能产生气体且为反硝化还原阳

性的菌株为反硝化聚磷菌。本试验分离的 14 株菌中有 8 株菌(NC1-NC1-7)为反硝化聚磷菌。

将筛选出的反硝化聚磷菌接种于限磷培养基中使菌体充分释磷,然后投入已知氮磷浓度的富氮富磷培养基中,在 30 °C、150 r/min 条件下培养 24 h,在 24 h 时测定上清液中的磷酸盐和硝态氮浓度,以筛选出高效菌株。

1.4 菌株鉴定

通过 16S rRNA 基因分析结合形态学和生理生化分析对菌株进行鉴定。采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTCACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, *rTaq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 无菌去离子水 18.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。将扩增产物与 GenBank 中已有的 16S rRNA 基因序列比对,选择相似性较高的菌株构建发育树^[15-16]。生理生化分析方法参照《常见细菌系统鉴定手册》进行^[17]。

1.5 干粉菌剂的制备方法

1.5.1 培养液

PAM 培养液: 取 4.00 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 、0.25 g $CaCl_2$ 、3.06 g Na_2HPO_4 、2.50 g $NaCl$ 、3.00 g KH_2PO_4 、2.75 g $(NH_4)_2SO_4$ 、0.25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.01 g 蔗糖、1 000 mL 无菌水混合,分装至 250 mL 锥形瓶中,于 108 kPa 灭菌 20 min 后存 4 °C 冷藏备用。

牛肉膏蛋白胨培养液: 取 5 g $NaCl$ 、3 g 牛肉膏、10 g 蛋白胨、20 g 琼脂、1 000 mL 无菌水混合加热至完全溶解,调节 pH 7.2,分装至 250 mL 锥形瓶中,于 108 kPa 灭菌 20 min 后存 4 °C 冷藏备用。

1.5.2 干粉菌剂的制备

以菌株 NC1-1 为对象制备干粉菌剂,将菌株 NC1-1 接种至反硝化培养基,常温下 150 r/min 培养 20 h 获得种子液,取适量种子液以 4 000 r/min 离心 10 min 获得菌株 NC1-1,重复 3 次。加入 20 mL 发酵液(牛肉膏蛋白胨培养液)和 2 mL PAM 培养液的混合液使菌株重悬,倒入经灭菌(108 kPa 间歇灭菌 2 次)、粉碎的 5 g 载体(麦麸 4.25 g、玉米粉 0.75 g)中,在 35 °C、120 r/min 条件下振荡发酵 8 h,置于培养皿上干燥至含水率低于 10%时制成干粉菌剂。

1.6 不同条件对微生物菌剂的影响

不同的载体配比、投菌量、发酵液用量和发酵液 pH 均对菌剂的去除效果有影响,表 1 为微生物菌剂制备的影响因素及其反应条件,以探寻微生物菌剂的最优制备条件。

1.7 菌剂除磷性能测定方法

设置 5 个有效容积为 4 L 的静态反应装置,编号为 1-5,其运行模式为厌氧-缺氧,运行 30 d,运行周期为瞬时进水、厌氧 2 h、缺氧 2.5 h、沉淀 30 min、排水,每天运行 2 个周期。向 5 个静态反应装置中投入不同量的菌剂 NC1-1、相同体积的活性污泥和人工配制污水,其中泥水体积比为 1:3,菌剂投加量分别为 0%、5%、10%、15%、20% (占污泥质量百分数),控制 MLSS 在 2 800-3 300 mg/L 之间,SRT 为 15 d,定时测量系统中的 COD、TP、 NO_3^- -N 浓度。

1.8 主要仪器及检测方法

COD 采用快速密闭催化消解法,TP 采用钼锑抗分光光度法, NO_3^- -N 采用紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)检测;pH 采用 pH 计(上海雷磁仪器厂)检测;温度采用恒温水浴锅(金坛市金成国胜试验仪器厂)控制;溶解氧采用便携式溶解氧仪(厦门仪迈环保科技有限公司)测定。

表 1 微生物菌剂制备影响因素
Table 1 Factors affecting the preparation of microbial agent

影响因素	反应条件
Influence factor	Reaction condition
载体配比 Carrier ratio	麦麸与玉米粉的质量比为 75%:25%、80%:20%、85%:15%、90%:10%、95%:5%、100%:0%，在适宜的温度下制备微生物剂 The mass ratio of wheat bran to corn flour was 75%:25%, 80%:20%, 85%:15%, 90%:10%, 95%:5%, 100%:0% and then the bacterial agent was prepared at a suitable temperature
投菌量 Biomass	投菌量为 0、10、20、30、40 或 50 mL 时加入 20 mL 牛肉膏蛋白胨培养基和 2 mL PAM 培养液，然后在适宜的温度下制备菌剂 When the dosage was 0 mL, 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL or 50 mL, adding 20 mL beef extract-peptone medium and 2ml PAM culture solution, then the bacterial agent was prepared at a suitable temperature
发酵液用量 Amount of fermentation broth	以 5、10、15、20、25 或 30 mL 的牛肉膏蛋白胨和 2 mL PAM 培养液制作最佳培养基,然后在合适的温度下制备微生物剂 Prepared the optimal medium with 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL or 30 mL beef extract-peptone medium and 2 mL PAM culture solution, then the bacterial agent was prepared at a suitable temperature
发酵液 pH 值 pH of fermentation broth	培养基中发酵液的初始 pH 为 6.5、7.0、7.5、8.0、9.0，然后在适宜的温度下制备菌剂 The initial pH of the fermentation broth in the medium was 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 9.0 and then the bacterial agent was prepared at a suitable temperature

2 结果与分析

2.1 反硝化聚磷菌的富集

在厌氧条件下，DPAO 通过分解细胞内多聚磷酸盐(polyphosphate, poly-P)使其以无机磷酸盐的形式释放出去而获得质子驱动力，促使乙酸等挥发性脂肪酸通过主动运输的方式进入体内，乙酸等挥发性脂肪酸以聚-β-羟丁酸(poly-β-hydroxybutyrate, PHB)形式储存在细胞内，PHB 的合成需要能量和还原力，能量通过 poly-P 水解所形成的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)来提供，还原力通过糖原的降解来提供。缺氧时，DPAO 利用硝态氮/亚硝态氮为电子受体,通过氧化厌氧时储存在胞内的 PHB 产生能量来维持菌株的生命活动，为了使氧化 PHB 时产生的质子驱动力趋于稳定，DPAO 会过量摄取环境中的无机磷酸盐以 poly-P 的形式储存于体内，同时将硝酸根或亚硝酸根还原，从而实现同步脱氮除磷。本试验通过两阶段法对 DPAO 进行富集，结果如图 2

所示。

1-11 d 平均进水 COD 浓度为 217.34 mg/L，厌氧出水 and 好氧出水 COD 浓度持续下降,COD 去除率由 70.16%上升至 82.62%。第 12 天开始进水有机物浓度降低，这是因为厌氧结束后剩余大量的外碳源会进入到缺氧阶段，致使异养反硝化细菌大量繁殖,与 DPAO 争夺电子受体，抑制 DPAO 缺氧吸磷反应，因此，减少碳源投加量使厌氧结束时 COD 浓度保持在 30 mg/L 左右。由厌氧/好氧转变为厌氧/缺氧对 COD 的去除并未产生影响，12-36 d COD 去除率先上升然后保持平稳，平均 COD 去除率为 87.46%，具有良好的有机物降解性能。

1-16 d 平均进水 TP 浓度为 11 mg/L，厌氧出水 TP 浓度持续上升，这主要是由于厌氧时 PAO 分解细胞内的聚磷和糖原产生能量，并且吸收污水中易降解的有机物将其转化为 PHB 储存在细胞内，此过程中因聚磷降解以磷酸盐的形式释放到污水中，致使上清液中 TP 含量上升，这也解释了 COD 在厌氧过程中被大量去

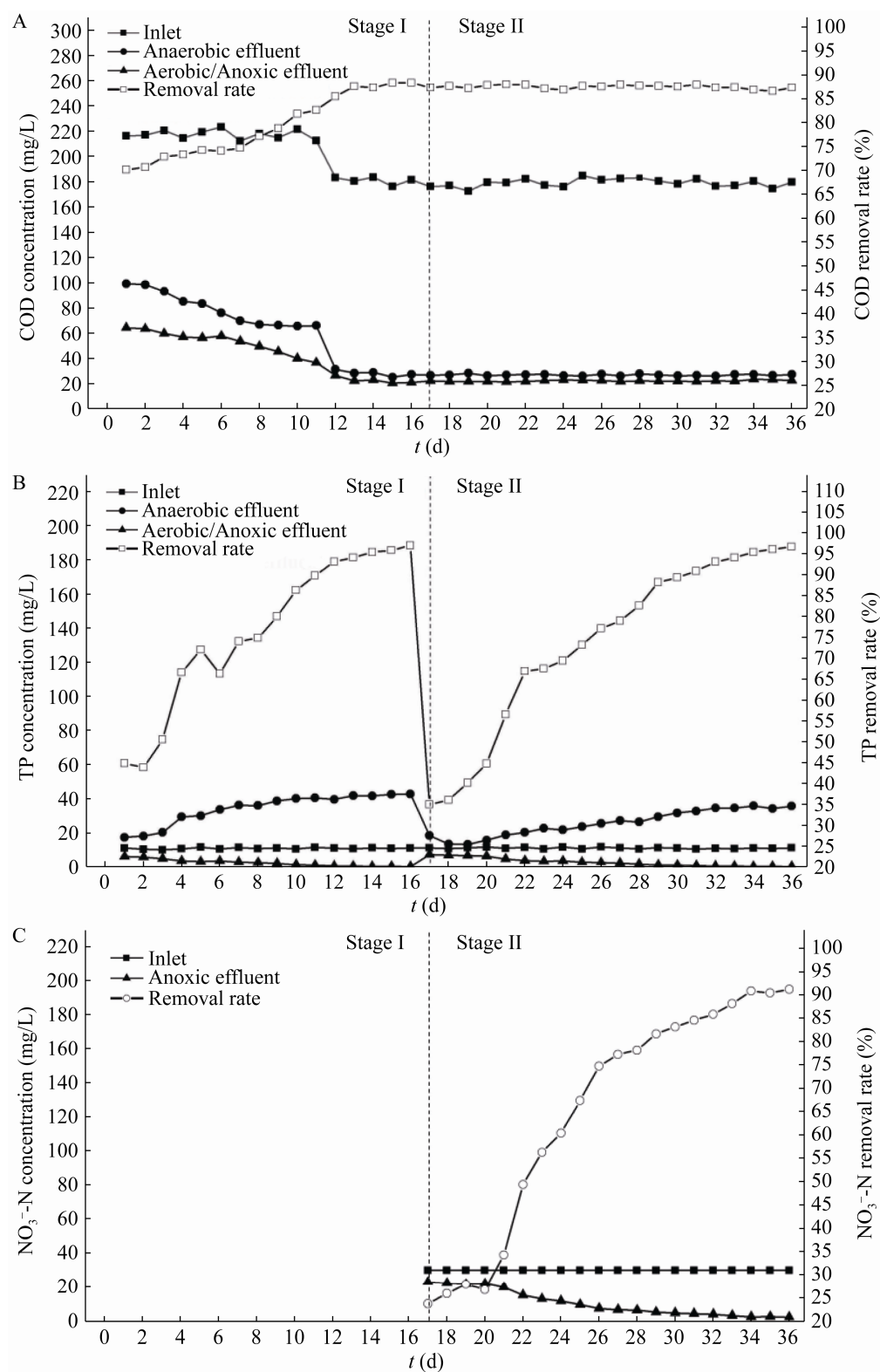


图 2 COD (A)和 TP (B)、NO₃⁻-N (C)的浓度变化及去除率

Figure 2 Concentration change and removal rate of COD (A), TP (B) and NO₃⁻-N (C).

除的原因^[18-19]。好氧出水 TP 浓度稳定下降, 原因是 PAO 消耗 PHB 生成 ATP, 产生的 ATP 一部分用于自身生命活动, 一部分用于吸收磷。反应器好氧结束时 TP 浓度为 0.33 mg/L, TP 去除率由 44.90% 上升至 97.05%, 具有稳定的除磷效果, 此时 PAO 已经成为优势菌种, 可进行第二阶段 DPAO 的富集。

17–36 d 进水 TP 浓度与第一阶段相差不大, 厌氧出水 TP 浓度先下降后上升, 缺氧出水 TP 浓度持续下降, 这是因为在缺氧时 DPAO 利用厌氧时储存在细菌内的 PHB 为碳源和电子供体、以 NO_3^- -N 为电子受体进行无氧呼吸产生能量以供细菌过量吸磷, 吸收的磷以聚磷的形式储存于菌体内。TP 去除率在第 17 天时急剧下降, 因为反应器内从第 17 天开始由厌氧/好氧转变为厌氧/缺氧驯化 DPAO, 第 17 天时聚磷菌因环境变化受到抑制, 而 DPAO 此时没有时间进行大量繁殖, 导致磷去除效果变差; 随着驯化的进行, DPAO 逐渐成为系统中的优势菌种, TP 去除率持续上升, 这也解释了厌氧出水 TP

浓度先下降后上升的现象, 与 Wang 等^[20]和 Li 等^[21]的研究结果一致。此阶段每天向 SBR 反应器内加入 30 mg/L 的硝态氮, 缺氧出水硝态氮浓度持续下降, 去除率持续上升, 36 d 反应结束时, TP 和 NO_3^- -N 去除率分别达到 96.72% 和 91.20%, 此时 DPAO 已成为优势菌种富集成功。

2.2 菌株的筛选

于成功启动的 SBR 反应器中筛选出 8 株脱氮除磷菌株, 其吸释磷试验结果如图 3 所示。限磷培养基的初始 TP 浓度为 2.28 mg/L, 24 h 后 8 株菌都有明显的释磷效果, 其中 NC1-1 的释磷率最高, 达到了 158.33%。富氮、富磷培养基的初始 TP 和 NO_3^- -N 浓度分别为 8.63 mg/L 和 34.26 mg/L, 24 h 反应结束时, 8 株菌对 TP 去除率为 NC1-1>NC1-7>NC1>NC1-2>NC1-4>NC1-5>NC1-6>NC1-3, 其中 NC1-1 对 TP 的去除效果最佳, 除磷率为 89.46%, NO_3^- -N 去除率变化趋势为 NC1-1>NC1>NC1-2>NC1-7>NC1-4>NC1-5>NC1-6>NC1-3, 其中 NC1-1 脱氮效果明显优于其他菌株, 脱氮率为 91.68%。

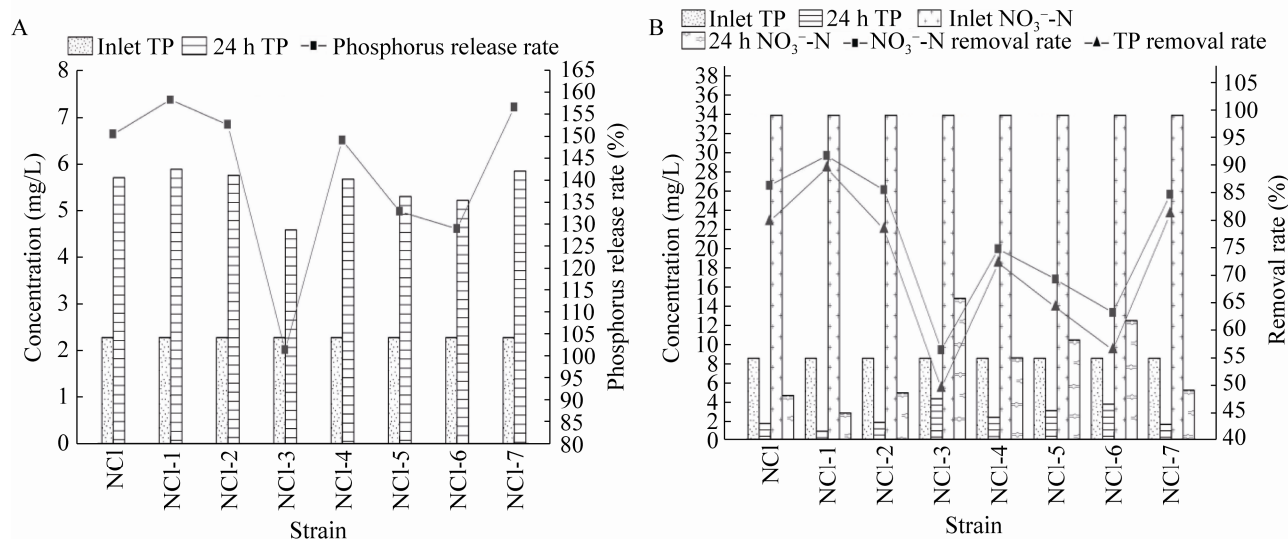


图 3 菌株 NC1-1 吸释磷效果 A: 释磷; B: 吸磷

Figure 3 Phosphorus absorption and release effect of strain NC1-1. A: Phosphorus release; B: Phosphorus uptake.

菌株 NC1-1 的脱氮除磷效率最佳, 因此选择 NC1-1 为研究对象制成菌剂。

2.3 菌株鉴定

以菌株基因组 DNA 为模板, 经 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和测序, 将所得测序结果用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行比对分析, 构建的系统发育树见图 4^[22], NC1-1 与 *Gordonia alkanivorans* CC-JG39 (AY864338.1) 的相似性达到了 99.71%。该菌菌落呈短杆状, 橘红色, 不透明, 表面光滑微凸, 无芽孢, 为革兰氏阳性菌, 接触酶、甲基红试验、吡啶试验、硝酸盐及亚硝酸盐还原均为阳性, 氧化酶、V-P 测定、明胶水解均为阴性, 结合分子生物学鉴定及形态学和生理生化分析, 鉴定菌株 NC1-1 为戈登氏菌属。

2.4 菌剂制备

不同的载体配比、投菌量、发酵液用量和发酵液 pH 值对菌剂去除效果的影响见图 5。麦麸和玉米粉通过影响物料的疏松度进而影响菌剂的去除效果。由图 5A 可知, 菌剂的脱氮除磷效率随麦麸在载体中所占质量分数的增多呈先上升后下降趋势, 当麦麸和玉米粉的配比为 85%:15% 时菌剂对 TP 和 NO_3^- -N 的去除率最高, 分别是 87.62% 和 90.35%, 之后随着麦麸在载体中所占质量分数的不断上升, 菌剂的脱氮除磷效率不断下降, 在麦麸和玉米粉的配比为 100:0 时降至最低。实验结果与陈晶等^[10]相似, 当麦麸和玉米粉配比为 85%:15% 时, 其所制的 B8 干粉菌剂对 TP 去除率达到峰值, 对 NO_3^- -N 去除率较峰值仅相差 0.19%。

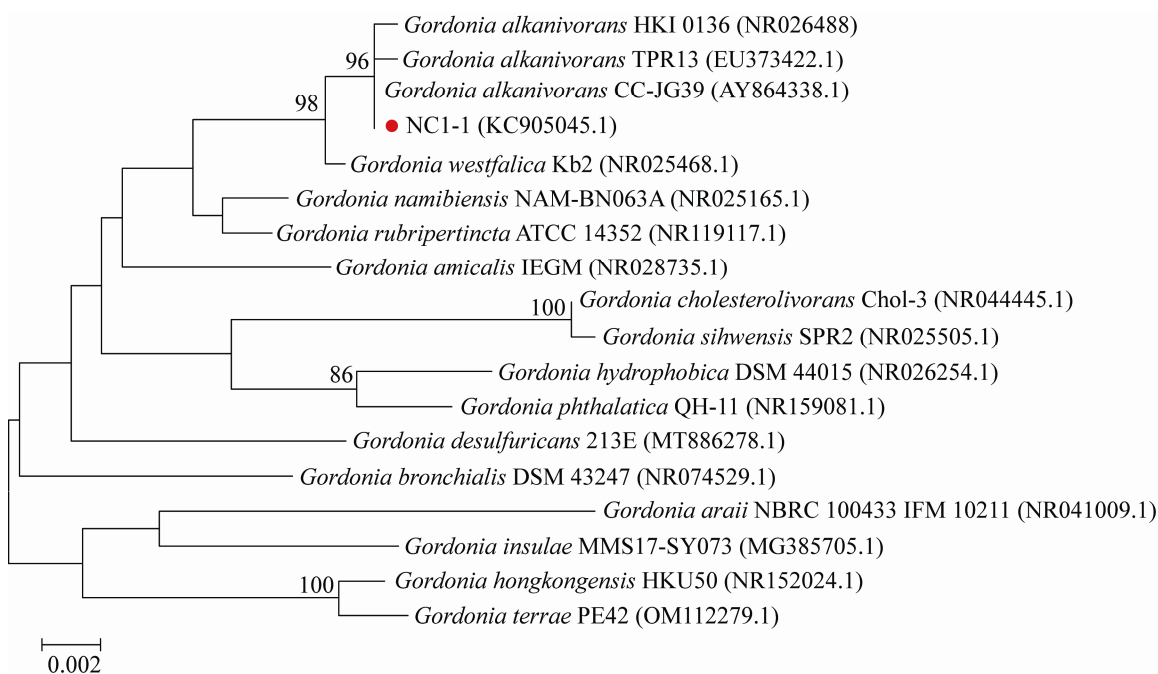


图 4 菌株 NC1-1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率; 标尺刻度代表 0.2% 的序列差异

Figure 4 Phylogenetic trees of strain NC1-1 based on 16S rRNA gene sequence. The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees. The scale bar means 0.2% sequence difference.

通过投加发酵液为微生物的生长提供碳源、氮源, 碳源可为大多数 DPAO 的生长繁殖、代谢提供能量, 是构成微生物细胞的碳素骨架^[23]。如图 5B 所示, 菌剂对 TP 和 NO_3^- -N 的去除率随着加入的发酵液的增多先上升后下降, 当发酵液用量为 5 mL 时, TP 和 NO_3^- -N 的去除率分别仅为 46.73% 和 51.66%, 这是因为

发酵液过少时能作为菌株营养物质的就少, 菌株生长繁殖缓慢, 进而影响菌株的降解效果, 适当地提高发酵液用量可以提高菌株在载体上的生长繁殖能力, 有助于菌株对 TP 和 NO_3^- -N 的去除。当发酵液用量为 20 mL 时 TP 和 NO_3^- -N 的去除率最高, 分别为 88.41% 和 91.26%, 之后菌剂的脱氮除磷效率随发酵液用量的增多

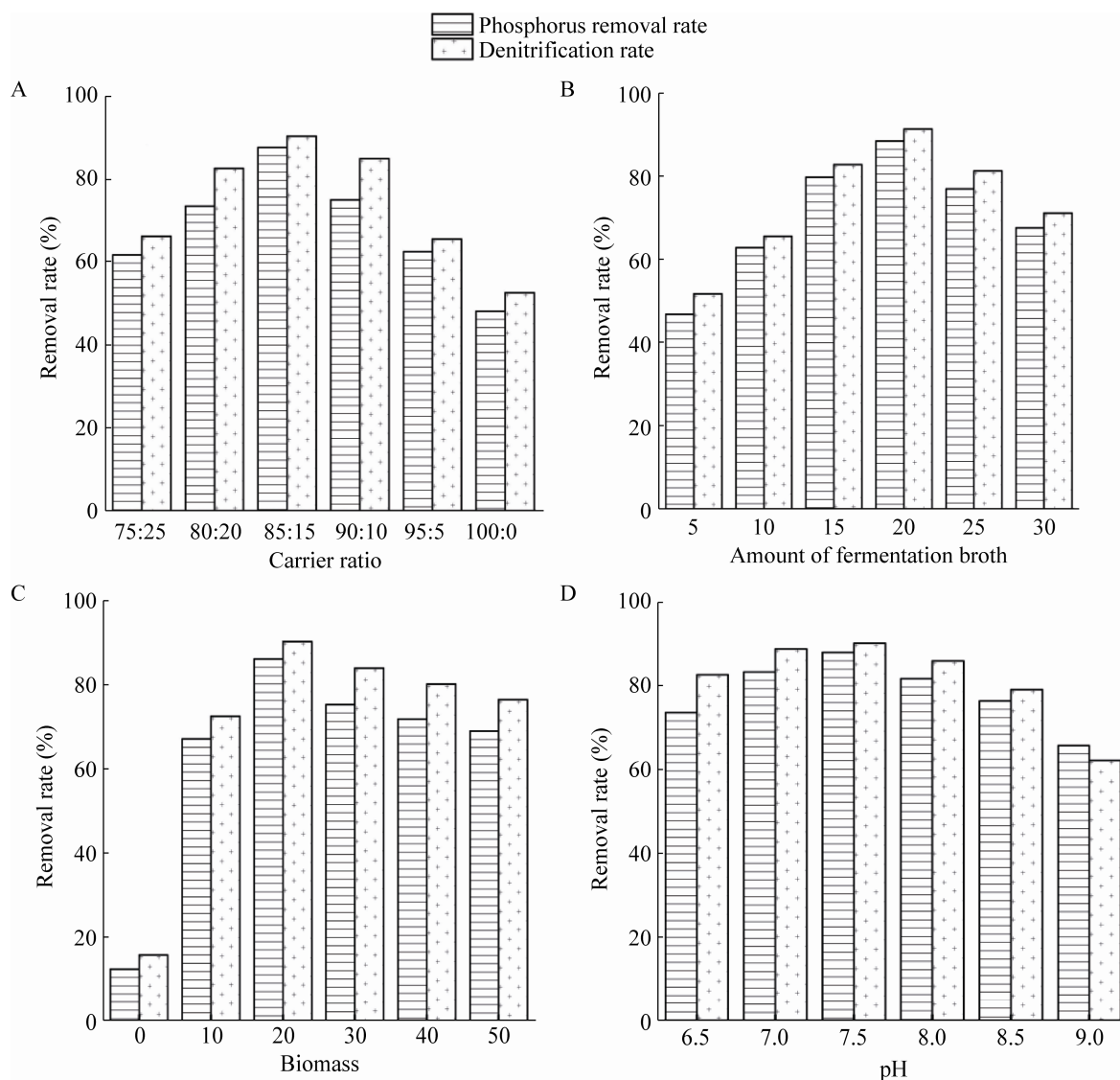


图 5 菌剂制备影响因素 A: 载体配比; B: 发酵液用量; C: 投菌量; D: 发酵液 pH

Figure 5 Influencing factors of bacterial preparation. A: Carrier ratio; B: Amount of fermentation broth; C: Biomass; D: pH of fermentation broth.

而下降。过多的发酵液用量不仅使菌剂处理效果下降,还会增加成本,不利于微生物菌剂工业化。

由图 5C 可知,不接种菌液时,无菌载体对 TP 和 NO_3^- -N 也有一定的去除率,这是由于无菌载体具有较大的表面积,本身具有的一定吸附能力可去除一部分 TP 和 NO_3^- -N。随着投菌量的增长,干粉菌剂的脱氮除磷效率不断增加,在投菌量为 20 mL 时达到最高,TP 和 NO_3^- -N 的去除率分别为 86.08%和 90.25%,之后干粉菌剂的脱氮除磷效率随着投菌量的增加而降低。菌剂的脱氮除磷效率先上升后降低的原因是投菌量过少时载体吸附的菌量数也会减少,影响去除效果,而投菌量过多时有限的载体会限制干粉菌剂的脱氮除磷效率,同时会造成不必要的浪费。

通过观察制作菌剂过程加入发酵液的 pH 值对菌剂处理效果的影响来确定制作菌剂的最佳 pH。由图 5D 可知 pH 值范围为 6.5–9.0,这是因为若菌剂长时间存在于过酸的环境,会出现 DPAO 体内酶的活性降低、细胞结构被酸性环境破坏的现象,进而影响脱氮除磷效率。以前的研究也表明了菌株在酸性或过碱的环境下会失去脱氮除磷特性,pH 值在 6.5–8.0 时会使磷释放和吸收明显增加^[24-25],因此将 pH 值控制在 6.5–9.0。菌剂的脱氮除磷效率随着 pH 值的增大先上升后下降,在 pH 7.5 时达到最高,菌剂的脱氮除磷效率分别为 90.17%和 87.94%,当 pH 值为 9.0 时,TP 和 NO_3^- -N 的去除率降至最低,分别由 87.94%和 90.17%降至 65.76%和 62.21%。pH 可以影响微生物对营养物质的可获取程度及胞外有害物质的毒性大小。靳茹^[26]和蒋轶锋等^[27]的研究也表明,pH 为中性偏碱时 DPAO 不仅有最高的脱氮除磷率,还具有最优的生长速率,有利于一定程度上增加载体中菌

量数。

NC1-1 干粉菌剂最适宜的制备条件为麦麸:玉米粉为 85%:15%,投菌量 20 mL,发酵液用量 20 mL,发酵液 pH 7.5。在上述条件下制备的干粉菌剂的脱氮除磷效率都保持在 85%以上。

2.5 菌剂反硝化除磷性能

菌剂投加量为 0%、5%、10%、15%、20% (占污泥质量百分数)的静态反应瓶污水处理效果见图 6。30 d 反应结束时,5 种菌剂投加量对 COD 的去除率相差不大,均在 94%左右,这是因为反应器中除反硝化聚磷菌外还存在其他异养菌,污水中存在的碳源刚好被系统中异养菌所消耗,所以投加菌剂后对 COD 的去除效果并未明显提升。

未投加菌剂系统的脱氮除磷率为 83.52%和 88.48%,这是因为未投加菌剂系统中原始污泥具有一定的脱氮除磷能力,菌剂投加量为 10% (占污泥质量百分数)的静态反应瓶中 TP 和 NO_3^- -N 的去除率分别达到了 95.58%和 100%,较未投加菌剂的系统分别提高了 12.06%和 11.52%,继续投加菌剂至 15%和 20%发现对 TP 和 NO_3^- -N 的去除率无明显提升,其原因在于系统中无更多的 N、P 营养基质可被微生物利用。综上所述,反硝化聚磷菌剂的投加可使系统中功能菌群占据优势地位,有效提高了系统中氮、磷的去除效能,本着节约成本、便于微生物菌剂工业化的原则投加 10% (占污泥质量百分数)菌剂最佳。

3 讨论与结论

近年来对于污水中氮、磷的排放标准不断提高,氮磷污染是水污染防治的主要问题,水体中氮、磷含量超标会导致水体富营养化,使水体中生物多样性降低,引起水质恶化。 A^2SBR 反硝化除磷系统是一种有效、可行的生物除磷

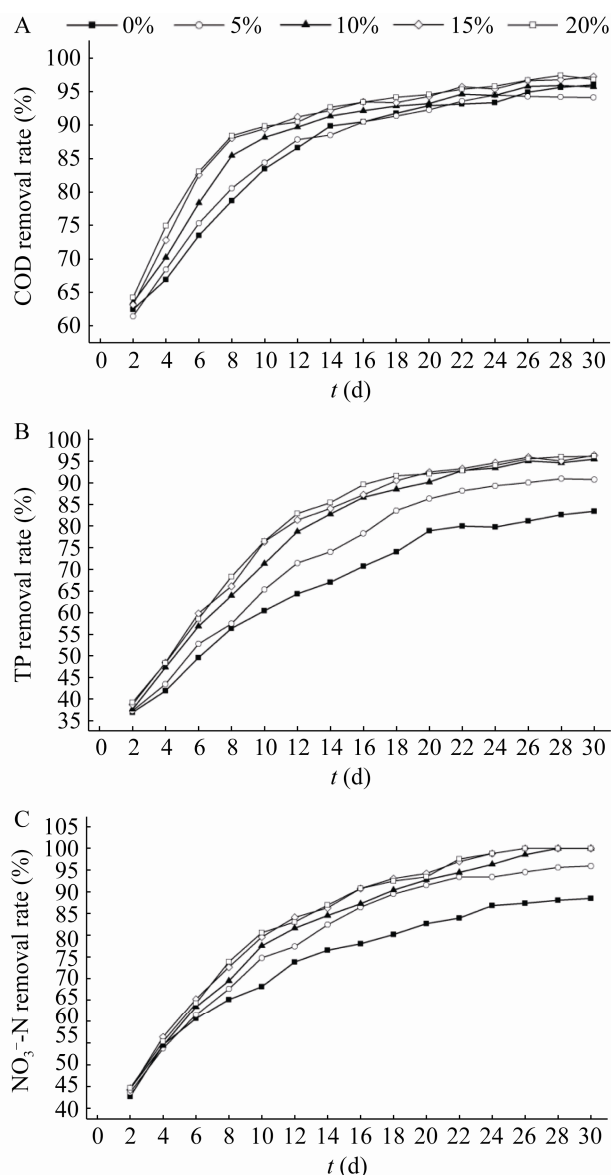


图 6 菌剂投加量对于 COD (A)、TP (B)及 NO_3^- -N (C)的去除影响

Figure 6 Effect of agent dosage on COD (A), TP (B) and NO_3^- -N (C) removal.

工艺, 而投加微生物菌剂是增强生物处理效能的一种重要手段。为提高系统脱氮除磷效率, 进一步减少氮磷污染, 本试验采用两阶段法富集 DPAO, 分离筛选得到一株高效脱氮除磷菌株, 并制成反硝化聚磷菌剂, 通过试验证明菌剂 NC1-1 能提高 A²SBR 系统脱氮除磷能力。

我们从富集后缺氧结束端的污泥混合液中筛选出 14 株菌, 其中有 8 株菌(NC1-NC1-7)为反硝化聚磷菌, 通过对菌株吸释磷效能进行测定, 筛选出一株高效脱氮除磷菌株 NC1-1, 其脱氮除磷率分别为 89.46%和 91.68%。李澳等分离筛选出一株反硝化聚磷菌 N14, 其脱氮除磷效率分别是 84.7%和 88.5%^[28]。菌株 N14 的除磷率与菌株 NC1-1 相近、脱氮率较 NC1-1 低。由此可见, 菌株 NC1-1 有较为良好的脱氮除磷效率。

经鉴定菌株 NC1-1 为戈登氏菌属。目前报道的戈登氏菌属菌株多用于脱硫。詹晓等从被石油污染的土样中分离得到一株戈登氏菌属的菌株——戈登氏菌 JDZX13 (KP993297)用于石油脱硫^[29]。严佳丽等从南湖中筛选得到菌株 HS-NH1, 经鉴定为戈登氏菌属, 该菌株可用于降解污水中的邻苯二甲酸酯类化合物^[30]。由此可见, 戈登氏菌属在微生物修复环境污染中有较大的应用价值, 然而对于戈登氏菌属菌株用于降解污水中氮磷的研究报道较少。Guo 等发现, 系统内不同类型的 DPAO 对 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的亲合力不同^[31], 而之前用于污水脱氮除磷的反硝化聚磷菌多为芽孢杆菌属、莫拉氏菌属及假单胞菌属^[32]。下一步研究中, 我们将属于戈登氏菌属的反硝化聚磷菌株 NC1-1 制成反硝化聚磷菌剂, 并对其应用价值进行评估。

本研究考察了发酵液用量、投菌量、载体配比和发酵液 pH 等因素对菌剂脱氮除磷效率的影响, 结果表明, 在发酵液用量 20 mL、投菌量 20 mL、载体配比 W_{麦麸}:W_{玉米粉} 为 85%:15% 和发酵液 pH 7.5 时为最优菌剂制备条件。当不投加菌剂时, 系统脱氮除磷率分别为 83.52%和 88.48%, 投加 10% (占污泥质量百分数)菌剂时, 其对 TP 及 NO_3^- -N 的去除率分别为 95.58%和 100%, 较未投加菌剂的系统分别增加了 12.06%

和 11.52%。未投加菌剂时,系统通过活性污泥中的微生物对氮、磷进行去除,投加反硝化聚磷菌剂能使系统更快启动,并且强化了反硝化聚磷菌在系统中的优势地位,提高了系统脱氮除磷性能。这与李昂等结论一致,他们通过生物强化,使系统中功能菌处于优势地位,改善对污水中污染物的去除能力^[33],说明通过生物强化可使系统具有更好的处理效果。因此,向 A²SBR 系统中投加菌剂 NC1-1 为利用功能微生物强化生物处理效能提供了理论依据,具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] 王凯军, 贾立敏. 城市污水生物处理新技术开发与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001
Wang KJ, Jia LM. Development and Application of New Technology of Urban Sewage Biological Treatment[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001 (in Chinese)
- [2] Zafiriadis I, Ntougias S, Nikolaidis C, Kapagiannidis AG, Aivasidis A. Denitrifying polyphosphate accumulating organisms population and nitrite reductase gene diversity shift in a DEPHANOX-type activated sludge system fed with municipal wastewater[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 111(2): 185-192
- [3] Yang S, Yang FL, Fu ZM, Wang T, Lei RB. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal by a novel sequencing batch moving bed membrane bioreactor for wastewater treatment[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 175(1/3): 551-557
- [4] 李燕. 污水处理脱氮除磷工艺的研究进展[J]. 中国资源综合利用, 2020, 38(6): 105-107
Li Y. Research progress of nitrogen and phosphorus removal processes in wastewater treatment[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2020, 38(6): 105-107 (in Chinese)
- [5] 唐伟, 张远, 王书平, 丁森, 钱昶. 微生物菌剂在水体修复中的应用进展[J]. 环境工程技术学报, 2019, 9(2): 151-158
Tang W, Zhang Y, Wang SP, Ding S, Qian C. Application progress of microbial agents in water remediation[J]. Journal of Environmental Engineering Technology, 2019, 9(2): 151-158 (in Chinese)
- [6] 钟华. 微生物水质净化菌剂的制备方法: 中国, CN201410114190.X[P]. 2014-05-28
Zhong H. Preparation method of microbial water purification agent: China, CN201410114190.X[P]. 2014-05-28 (in Chinese)
- [7] 王建芳, 赵庆良, 张雁秋. 投加有效微生物强化 SBR 和 SBBR 除污效果的研究[J]. 中国给水排水, 2007, 23(9): 56-59, 63
Wang JF, Zhao QL, Zhang YQ. Study on enhanced contaminant removal efficiency by adding effective microorganisms into SBR and SBBR[J]. China Water & Wastewater, 2007, 23(9): 56-59, 63 (in Chinese)
- [8] 杜聪, 冯胜, 张毅敏, 高月香, 杨飞, 朱月明, 赵东华, 石泽敏. 微生物菌剂对黑臭水体水质改善及生物多样性修复效果研究[J]. 环境工程, 2018, 36(8): 1-7
Du C, Feng S, Zhang YM, Gao YX, Yang F, Zhu YM, Zhao DH, Shi ZM. Study on the improvement of water quality and biological diversity of black and odorous water by microbial inoculants[J]. Environmental Engineering, 2018, 36(8): 1-7 (in Chinese)
- [9] 尤新新, 王晟, 都林娜. 一种内源性复合微生物菌剂的特性及其固定化对猪场粪污水的处理效果[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2021, 47(1): 98-106
You XX, Wang S, Du LN. Characteristics of an endogenous compound microbial inoculant and its immobilization effect on wastewater treatment from pig feedlots[J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences, 2021, 47(1): 98-106 (in Chinese)
- [10] 陈晶, 陈萍, 邓文, 周新程, 张文艺. 反硝化聚磷菌 B8 干粉菌剂的制备及应用[J]. 环境化学, 2017, 36(5): 1148-1155
Chen J, Chen P, Deng W, Zhou XC, Zhang WY. Preparation and application of denitrifying polyphosphate accumulating microorganisms B8 powders[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(5): 1148-1155 (in Chinese)
- [11] 谢蔚鹏, 褚文珂, 陈敏. 反硝化聚磷菌的筛选及多样性分析[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2018, 17(6): 597-601
Xie WP, Chu WK, Chen M. Diversity analysis and screening of denitrifying phosphate-accumulating organisms[J]. Journal of Hangzhou Normal University: Natural Science Edition, 2018, 17(6): 597-601 (in Chinese)
- [12] 王春雷. 反硝化聚磷菌的筛选驯化及其脱氮除磷的效能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学硕士学位论文, 2020

- Wang CL. Domestication and screening of denitrifying phosphate accumulating bacteria and its efficiency of nitrogen and phosphorus removal[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin University of Commerce, 2020 (in Chinese)
- [13] 吴晓娜, 王助贫, 谢恩, 任梦丽, 刘婷婷, 郑蕾, 丁爱中. 一株反硝化聚磷菌筛选及其接种量对脱氮除磷效应的影响[J]. 环境工程学报, 2018, 12(2): 544-551
- Wu XN, Wang ZP, Xie E, Ren ML, Liu TT, Zheng L, Ding AZ. Screening of one strain of denitrifying phosphorus accumulation bacteria (DPAB) and inhibitions effects of nitrogen-phosphorus removal[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2018, 12(2): 544-551 (in Chinese)
- [14] 刘旭. 不同温度条件下生活污水中聚磷菌筛选鉴定及特性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学硕士学位论文, 2019
- Liu X. Screening, identification and characterization of phosphorus-accumulating bacteria in domestic sewage under different temperature conditions[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Normal University, 2019 (in Chinese)
- [15] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703
- [16] 冯纪龙, 陈晓明, 刘紫薇, 罗锋. 一株厌氧反硝化细菌的分离鉴定与砷耐受功能研究[J]. 安全与环境工程, 2021, 28(4): 95-101, 109
- Feng JL, Chen XM, Liu ZW, Luo F. Isolation, identification and functional study of an arsenic-resistant anaerobic denitrifying bacterium[J]. Safety and Environmental Engineering, 2021, 28(4): 95-101, 109 (in Chinese)
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- Dong XZ, Cai MY. Handbook for Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [18] Liu H, Sun YF, Jia XS, Li J, Zhou KQ, Qu XD, Tao XQ, Chen Y. Identification and metabolic mechanism of non-fermentative short-cut denitrifying phosphorus-removing bacteria[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2013, 21(3): 332-340
- [19] Li DP, Huang Y. Phosphorus uptake by suspended sediments from a heavy eutrophic and standing water system in Suzhou, China[J]. Ecological Engineering, 2013, 60: 29-36
- [20] Wang Q, Ma F, Wei L, Jang X, Zhang XQ. Screen and characteristics of a denitrifying phosphorus-removal bacteria[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136: S690-S691
- [21] Li W, Zhu XY, Hou YH, Wang YQ, Chen YM, Wang H. The treatment of high-concentration garlic processing wastewater by UASB-SBR[J]. Environmental technology, 2021: 21-25
- [22] 郭超, 尹辉, 范奎, 陈张娜, 李燕敏. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及脱氮特性研究[J]. 安全与环境工程, 2020, 27(4): 41-47
- Guo C, Yin H, Fan K, Chen ZN, Li YM. Isolation, identification and nitrogen removal characteristics of aerobic denitrifying bacteria[J]. Safety and Environmental Engineering, 2020, 27(4): 41-47 (in Chinese)
- [23] Cabezas A, Pallasch M, Schönfelder I, Gelbrecht J, Zak D. Carbon, nitrogen, and phosphorus accumulation in novel ecosystems: shallow lakes in degraded Fen areas[J]. Ecological Engineering, 2014, 66: 63-71
- [24] 陈磊. 反硝化聚磷菌培养驯化分离方法及菌种特性的研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2008
- Chen L. Study on isolation and characteristic of denitrifying phosphate accumulating bacteria[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2008 (in Chinese)
- [25] Li W, Gao M, Zeng F, Liu N, Zhu X, Zhang C. Effect of pH and SRT on denitrifying phosphorus removal in A2N sequencing batch reactor process[J]. Applied Ecology and Environmental Research, 2019, 17(3): 5737-5751
- [26] 靳茹. 高效好氧反硝化聚磷菌的分离鉴定及脱氮除磷影响因素分析[D]. 太原: 太原科技大学硕士学位论文, 2018
- Jin R. Isolation and identification of efficiently aerobic denitrifying phosphorus removing bacteria and analysis of the factors influencing denitrification and phosphorus removal[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of Science and Technology, 2018 (in Chinese)
- [27] 蒋铁锋, 王志彬. 用 pH 值强化以 NO_2^- 为电子受体的反硝化除磷效能[J]. 中国给水排水, 2019, 35(15): 117-121
- Jiang YF, Wang ZB. Utilization of pH to enhance denitrifying dephosphatation with nitrite as electron acceptor[J]. China Water & Wastewater, 2019, 35(15): 117-121 (in Chinese)
- [28] 李澳, 胡月, 孙玲, 孟娜, 于楠楠. 一株反硝化聚磷菌的筛选与特性研究[J]. 广州化工, 2020, 48(12):

- 63-66, 69
- Li A, Hu Y, Sun L, Meng N, Yu NN. Screening and characterization of a denitrifying phosphorus accumulating organisms[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2020, 48(12): 63-66, 69 (in Chinese)
- [29] 詹晓, 冯守帅, 张玲, 黄兴, 唐嘉鼎, 吴泉钱, 杨海麟. 一株 Cx-DBT 脱硫菌的筛选及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1171-1180
- Zhan X, Feng SS, Zhang L, Huang X, Tang JD, Wu QQ, Yang HL. Isolation of a Cx-DBT desulfurizing strain and optimization of its fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1171-1180 (in Chinese)
- [30] 严佳丽, 陈湖星, 杨杨, 张凯, 王丽, 熊丽, 耿辉, 刘德立. 一株高效 DEHP 降解菌的分离、鉴定及其降解特性[J]. 微生物学通报, 2014, 41(8): 1532-1540
- Yan JL, Chen HX, Yang Y, Zhang K, Wang L, Xiong L, Geng H, Liu DL. Isolation and characterization of a highly efficient DEHP-degrading bacterium[J]. Microbiology China, 2014, 41(8): 1532-1540 (in Chinese)
- [31] Guo Y, Zeng W, Li N, Peng YZ. Effect of electron acceptor on community structures of denitrifying polyphosphate accumulating organisms in anaerobic-anoxic-oxic (A^2O) process using DNA based stable-isotope probing (DNA-SIP)[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 334: 2039-2049
- [32] 郑于蓝, 吴义锋, 李淑萍. 反硝化除磷污泥系统驯化及其性能影响因素研究综述[J]. 净水技术, 2021, 40(3): 9-22, 32
- Zheng YL, Wu YF, Li SP. Research overview of sludge system acclimation for denitrifying phosphorus removal and influencing factors of the performance[J]. Water Purification Technology, 2021, 40(3): 9-22, 32 (in Chinese)
- [33] 李昂, 马放, 张栋俊, 邢路路, 孙移鹿, 陈翰. 基于好氧反硝化及反硝化聚磷菌强化的低温低碳氮比生活污水生物处理中试研究[J]. 微生物学通报, 2019, 46(8): 1917-1926
- Li A, Ma F, Zhang DJ, Xing LL, Sun YL, Chen H. Pilot-scale biological treatment process of domestic wastewater under low temperature and low C/N ratio enhanced by aerobic denitrification and denitrifying phosphorus accumulation bacteria[J]. Microbiology China, 2019, 46(8): 1917-1926 (in Chinese)