反硝化聚磷菌富集、筛选及其特性

贾学斌1,2,王强1,杜丛1,孙静文1,姜欣欣1,王春丽1,马 放1

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室,150090 哈尔滨, mafang@ hit. edu. cn; 2. 黑龙江大学 建筑工程学院,150080 哈尔滨)

摘 要:为进一步探讨反硝化除磷机理和提供脱氮除磷功能菌株,对 A²SBR 快速富集驯化并筛选其中反硝化聚磷菌功能菌. 采用控制 A²SBR 进水及运行方式对反硝化聚磷菌进行快速富集筛选,并将所筛菌株进行复配研究,为构建脱氮除磷菌剂奠定基础. 两段进水和提高注水比的运行方式能使反硝化聚磷菌在反应器中迅速成为优势菌. 实验分离得到效果较好的反硝化聚磷菌,通过脂肪酸鉴定其到属. 所筛菌株复配效果最好的是 b204 和 16, 吸磷率达 85.78%,脱氮率为 75.02%,相对于单菌株均表现出较好的脱氮除磷效果. 采用两段进水和高注水比运行方式对快速富集反硝化聚磷菌较为有效,适当复配方案对提高处理效果有一定效果,b204 和菌 16 组合可以作为潜在脱氮除磷菌剂生物强化菌剂.

关键词:生物除磷;富集;聚磷菌;反硝化聚磷菌

中图分类号: TU992 文献标志码: A 文章编号: 0367 - 6234(2011)02 - 0035 - 05

Study on the enrichment isolation and characteristics of denitrifying phosphorus removal bacteria

JIA Xue-bin^{1,2}, WANG Qiang¹, DU Cong¹, SUN Jing-wen¹, JIANG Xin-xin¹, WANG Chun-li¹, MA Fang¹

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China, mafang@hit.edu.cn; 2. School of Civil Engineering, Heilongjiang University, 150080 Harbin, China)

Abstract: To investigate the mechanism of denitrifying phosphorus removal and provide functional strains for nitrogen and phosphorus removal, denitrifying phosphorus removal bacteria (DPB) were enriched and isolated from A²SBR. This study made use of controlling the inflow water operation mode of A²SBR for DPB enrichment and screening. The isolated DPB were complex formulated for construction of nitrogen and phosphorus removal functional bacteria. Two-stage inflow water operating mode and high inflow water rate enabled DPB to become rapidly dominant in the reactor. Five DPB strains were isolated and identified by the microbial identification system with fatty acids. The DPB strain and phosphorus accumulating organisms or denitrobacteria were complex formulated, the results showed that the best combination was b204 and 16. Its phosphorus removal rate was 85. 78% and its denitrification efficiency was 75. 02%, better than the single strains removal rate. Experimental results also showed that DPB could become dominant populations quickly with optimum cultivation conditions and appropriate influent.

Key words: biological phosphorous removing; enrichment; phosphorus accumulating organisms; denitrifying phosphorus removal bacteria

收稿日期: 2009-08-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(50778052);城市水资源与水环境国家重点实验室(哈尔滨工业大学)开放研究项目(QA200905);黑龙江省教育厅科学技术研究(面上)

项目计划(11551370).

作者简介: 贾学斌(1971—),男,副教授;

马 放(1963一),男,教授,博士生导师.

随着我国废水排放总量的日益增加,由氮磷污染物引发的水华、赤潮已经对饮用水安全造成极大危害,因此如何有效的去除水体中氮、磷,防止水体富营养化已成为我国最主要水污染防治问题之一. 反硝化除磷工艺由于集反硝化过程与除

磷过程为一体而成为废水生物处理技术领域的研 究热点. 反硝化除磷工艺中功能菌群是反硝化聚 磷菌,由其在缺氧条件下实现了同步脱氮和除磷 的目的[1].一些学者曾经认为脱氮过程中产生的 硝酸盐和亚硝酸盐可能抑制除磷过程[2-3],但 Kuba(1994)^[4]发现反硝化除磷菌的除磷能力与 普通除磷菌相似,还能利用 NO。 作为电子受体 氧化细胞内储存的 PHB,从而去除废水中氮素, 在除磷同时进行反硝化,简化了脱氮除磷工艺. Hu J Y^[5]等人也发现亚硝态氮在较低的质量浓度 条件下,可以和氧气、硝态氮一样成为供除磷菌选 择的电子受体. 近年来,国内外学者相继对反硝化 聚磷菌的种属组成进行了研究,由于 DPB 是兼性 厌氧菌,培养条件相对复杂、操作困难且培养时间 长[6],筛选工作量大且效率低的原因,反硝化聚 磷菌纯培养物研究较少,目前获得反硝化聚磷菌 纯菌鲜见报道^[7]. 因此如何充分利用 DPB 优越性 提高生物脱氮除磷工艺的处理效率,首要解决的 问题是反硝化聚磷菌的分离以及筛选,反硝化聚 磷菌纯菌的研究具有十分重要的意义[8].

本文利用控制 A²SBR 进水及运行方式驯化普通活性污泥,实现了反硝化聚磷菌的快速富集,并从自控 SBR 脱氮除磷系统分离得典型的反硝化聚磷菌,考察了所筛菌株的生长情况,和聚磷菌、反硝化菌进行了初步复配,提供了一种快速有效的富集筛选反硝化聚磷菌方法,为反硝化除磷脱氮机理的进一步研究奠定基础.

1 试 验

1.1 反硝化聚磷菌富集装置及运行方式

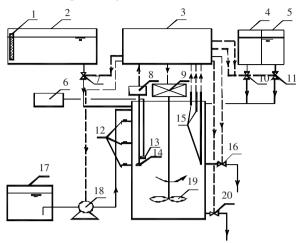
从生物脱氮除磷的机理分析来看,生物脱氮除磷工艺基本上包括厌氧、缺氧、好氧3种状态,这3个不同的工作状态可以在空间上进行分离,也可以在时间上进行分离^[9-10].本实验采用按时间顺序进行的 SBR 反应器作为富集装置.

试验采用的是两个直径 25 cm、高 50 cm 圆柱形 SBR 反应器,工作容积为 19 L. 试验装置如图 1 所示.

反硝化聚磷菌的富集采用高注水比和两段进水的运行方式降低 COD 与硝酸盐共存的可能性,强化聚磷菌的选择优势.同时在进水质量浓度一定的情况下提高污泥的营养负荷,加快细菌增殖的速度,达到快速富集 DPB 的目的.

反硝化聚磷菌的富集采用图 2 所示运行方式,反应器每天运行 3 个周期,每个周期两次进水、两次排水,注水比 0.67 (进排水体积与工作

容积之比). 在富集期间不排泥, 厌氧段开始进入只含乙酸钠 COD 为 250 mg/L 的配水; 缺氧段开始进入含 PO_4^{3-} 和 NO_3^- 的配水, 进水 P 质量浓度约为 19 mg/L, NO_3^- 质量浓度根据需要加入.



1—加热棒;2—高位水箱;3—自控装置;4—HCl 高位水箱;5—NaOH 高位水箱;6—ORP 测定仪;7—进水电磁阀;8—pH 计;9—搅拌仪;10—进 HCl 电动阀;11—进 NaOH 电动阀;12—样口;13—ORP 探头;14—pH 计探头;15—杆式液位计;16—排水电磁阀;17—KNO;水箱;18—蠕动泵;19—搅拌浆;20—排泥电动阀.

图 1 反硝化除磷 SBR 反应器装置图

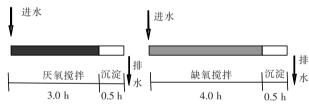


图 2 A²SBR 反硝化聚磷菌富集驯化的运行方式 1.2 反硝化聚磷菌的分离、筛选

聚磷菌是在厌氧和好氧条件下都能生存的兼性菌,稀释混合平板法分离效果要比稀释涂布平板法效果好,对于聚磷菌的分离采用稀释混合平板法比较有效^[11].在分离反硝化聚磷菌过程中,采用稀释混合平板法.

根据已有资料显示, DPB 的分离比较困难,可能需要某些生长因子才能生长. 一般在其他菌群存在时, DPB 才可能生长, 因此, 前期并未采用含磷培养基来选择富集, 初步分离采用适于大多数微生物生长繁殖的普通牛肉膏蛋白胨培养基. 缺磷培养基: 无水乙酸钠 5 g; Na₂HPO₄ · 2H₂O 0.023 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g; CaCl₂ · H₂O 0.2 g; $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g; 蒸馏水 1 000 mL; 微量元素 1 mL. 含磷培养基: 无水乙酸钠 5.0 g; KH₂PO₄ 0.125 g; MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g; CaCl₂ · H₂O 0.2 g; $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g; 蒸馏水 1 000 mL; 微量元素 1 mL (45 mg/L NO₃ - N 由 KNO₃ 提供, 根据试

验需要加入).

筛选试验以磷为检测指标,菌株在缺磷培养基中 30 ℃培养 24 h后,测量其培养后菌液 OD值,用无菌水调节 OD值一致后加入富磷培养基,定时取样测定 $PO_4^{3-} - P$ 质量浓度的变化,考察各株菌对于培养液中的吸磷效率,辅以硝酸盐还原试验、PHB 染色、Poly - P颗粒染色镜检试验,初步筛选出硝酸盐还原阳性且聚磷效果较好的菌株,测量方法参见表 1. 进一步试验是以硝氮为指标,考察 DPB 的同步脱氮除磷效能,将加有 KNO₃的富磷培养基高温灭菌后分装在密闭容器中,取 30 ℃培养 24 h后饱和菌液调节 OD值一致后加入,充氮除氧,采用磁力搅拌器进行混合,定时取样测定 $PO_4^{3-} - P$ 和 $NO_3^{-} - N$ 质量浓度的变化,测量方法见表 1. 最终得到聚磷效果稳定、高效具有反硝化功能的菌株 DPB.

表 1 水质分析项目与方法

分析项目	分析方法		
$COD/(mg \cdot L^{-1})$	重铬酸钾法		
$\rho(\mathrm{NO_3}^{-}-\mathrm{N})/(\mathrm{mg}\boldsymbol{\cdot}\mathrm{L}^{-1})$	麝香草酚光度法		
$\rho(PO_4^{3}-P)/(\text{mg}\boldsymbol{\cdot}L^{-1})$	钼锑抗分光光度法		
pH	pH 电极		
ORP	ORP 电极		
DO	溶解氧分析仪		
MLSS	重量法		

1.3 聚磷菌的复配

由于污水处理系统的复杂性,微生物的纯培养无法完全再现实际脱氮除磷系统情况,故经常出现纯培养与实际观测不一致的情况.实际的反应器是由各种微生物组成的一个生态系统,并不仅仅是依靠某一种菌单独起作用,而是需要各种功能菌相互作用共同完成系统功能.为了初步模拟反应器中微生物的相互作用对聚磷的影响,实验对经过筛选出的菌进行随机两两复配.方法如下:用无菌水调节待复配菌株菌液 OD 值一致后等比例加入含 KNO_3 的富磷培养基的密闭容器,然后置于 30 C 培养,充氮除氧,采用磁力搅拌器进行混合,定时取样测定 PO_4^{3-} -P 和 NO_3^{-} -N 质量浓度的变化,对比培养前后单株菌的脱氮除磷效率.

2 结果与分析

2.1 反硝化聚磷菌富集

在不到半个月的富集驯化期内,通过高注水 比和两段进水的特定运行方式保障反硝化除磷菌 在系统中的快速增殖.随着富集运行时间的增加, 净吸磷量总体呈上升趋势,系统的净吸磷量逐渐升高. 缺氧段去除的硝酸盐也逐渐增加(见图3、4),反应器的净吸磷增加到约4 mg/L,缺氧段去除的硝酸盐达58 mg/L,去除率达100%,系统达到明显的反硝化除磷效果.

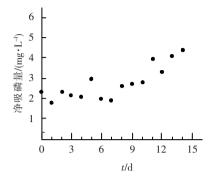


图 3 反硝化聚磷菌富集期系统净吸磷量

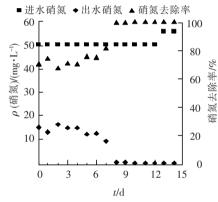


图 4 反硝化聚磷菌富集期系统硝氮去除

在富集驯化末期, A²SBR 系统趋于稳定, 将 反应器改为厌氧/缺氧/沉淀的方式运行, 监测运 行周期内反硝化除磷系统中可溶性磷质量浓度、 COD 质量浓度和硝酸盐质量浓度的去除情况(见 图 5).

在厌氧阶段,COD 质量浓度整体呈下降趋势,磷质量浓度逐渐增加,表现出明显的释磷现象,在厌氧阶段末期,体系中磷质量浓度增加到24.9 mg/L.进入缺氧阶段的第1小时内,检测到了强烈的反硝化吸磷现象,每克 MLSS 吸磷平均速率为4.89 mg/h,每克 MLSS 反硝化平均速率为6 mg/h,单位 PO₄ ³⁻ - P 可消耗的 NO₃ ⁻ - N 量为1.22 mg/mg. 经过 4.5 h 的缺氧阶段,系统中磷质量浓度和硝酸盐质量浓度分别下降到 0.47 mg/L和 3.4 mg/L,系统除磷和脱氮率高达 95%和94%,去除的碳氮比为 3.8、碳磷比为 22. 周期试验缺氧段吸磷过程硝酸盐氮的消耗量和磷的吸收量呈现了较好的线性关系,此时反应系统已经存在大量能以 NO₃ ⁻ - N 为电子受体进行吸磷的反硝化聚磷菌,DPB 成为 SBR 系统中的优势菌种.

高注水比和两段进水的特定运行方式对反硝化除 磷菌的富集驯化快速有效,可使反硝化除磷系统 在较短的时间内完成富集过程.

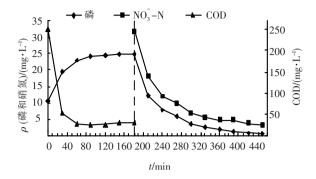


图 5 A²SBR 富集驯化末期周期试验

2.2 反硝化聚磷菌的分离、筛选

反硝化聚磷菌是将摄磷和反硝化这两个不同的生物过程在同一体内完成的一种兼性厌氧菌 $^{[12]}$. 硝酸盐还原性阳性(生物反硝化脱氮)是细菌的一种无氧呼吸形式;异染颗粒(细菌超量吸磷)是细菌的一种能量贮备形式,它们是两种并不冲突的细菌生化特性. 硝酸盐还原性为阳性且产气,菌体内含有异染颗粒或聚 $-\beta$ - 羟基丁酸颗粒,既能反硝化脱氮,又能厌氧释磷;在好氧 (O_2) 或缺氧 (NO_3^-) 状况下超量吸磷的细菌即可称为反硝化聚磷菌 $^{[13]}$. 基于此,对已分离纯化的备选菌种进行了吸磷试验、硝酸盐还原产气试验及异染颗粒和 PHB 颗粒染色辅助检验(见表 2),来实现筛选得到同步脱氮除磷效果都较好 DPB.

	表 2 筛选结果 %					%
菌株	24 h 吸磷率	48 h 吸磷率	24 h 脱氮率	48 h 脱氮率	РНВ	异染颗粒
b31	21. 93	86. 56	25. 66	54. 48	+	_
a13	18. 81	57. 93	90. 54	92. 14	-	-
b3	21. 96	58. 75	93. 57	94. 90	-	-
b11	-	63. 81	-	94. 77	-	-
a5	27. 73	78. 87	70. 26	73. 33	+	+
b3b	32. 72	85. 08	75. 41	74. 53	+	+
b9	40. 14	85. 35	80. 16	84. 96	+	+
a2	42. 30	83. 32	76. 30	78. 68	+	+
b204	67. 09	71. 06	94. 95	94. 41	+	+

2.3 反硝化聚磷菌的鉴定

利用 Shelock 脂肪酸鉴定系统,结合部分菌株生理生化试验、菌株个体形态、菌落形态观察对所筛菌株进行菌属综合鉴定,将菌株鉴定到属,结果见表 3.

早期研究认为不动杆菌属为除磷系统中典型的优势菌种,但随着研究的深入发现不动杆菌属

只是少数菌属,并不占优势,只占总量的 1% ~ 10%,而其他微生物的除磷能力更不容忽视,优势菌属为假单胞菌属(Pseudomonas)和气单胞菌属(Aerodomonas).气单胞菌属能够过量摄取废水中的磷酸盐形成聚磷酸盐胞内物质;假单胞菌属具有除磷菌的共性,即在厌氧条件下释放磷和在好氧条件下过量摄取磷,并能够累积聚磷酸盐[14-15].试验所分离鉴定的菌种涵盖不动杆菌、假单胞菌属、气单胞菌属、粘液奈瑟菌、弗氏柠檬酸杆菌,筛选结果与已有研究较为一致.

表 3 聚磷菌鉴定结果

菌株	菌属		
a5	Aeromonas – ichthiosmia		
b31	Citrobacter freundii		
b11	Neisseria – mucosa		
b204	Pseudomonas – stutzeri		

2.4 菌种复配

对经过前期筛选聚磷效果较好的菌 16、19, 有同步反硝化能力的 b11、a5、b204,反硝化率较 高的 GS 进行随机复配. 从图 6 可以看出,6 种复 配方案中 b11 × a5 、b11 × b204 、19 × GS 、 b204 × 16 的效果较好,都达到了氮、磷同步去除要求. 其 中24 h 复配效果最好的是 b204×16,吸磷率为 85.78%, 脱氮率为75.02%, 相对于b204 单菌除 磷效果 67.09%,复配后吸磷效果突出,达 85.78%,除磷效果得到显著提高,复配后脱氮效 果虽有所下降,但也维持在较高的75.02%水平, 达到了同步脱氮除磷的目的. 复配前 16 号菌虽然 除磷效果很好(94.86%),但对于脱氮却没有贡 献,而复配后在保持较高除磷效果的同时也达到 了较高的脱氮效果. 说明二者在生态关系上互补, 通过各自的代谢活动进行功能上的互补,从而实 现了同步脱氮除磷效果的提高,具有作为脱氮除 磷生物强化菌剂的潜在价值.

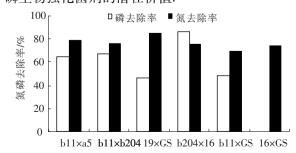


图 6 复配结果

复配方案中 16 × GS 的效果最差. 两株菌的 单株处理效果都不错,其中的 16 号菌除磷效果很 好,而好氧反硝化菌 GS 具有较高的脱氮能力. 但 菌株复配不但没能提高处理效果,复配后反而失去除磷能力,脱氮能力也有所下降.分析原因可能是 GS 菌株代谢过程产生了某种抑制物,从而使菌 16 的生长受到抑制,并导致菌 16 的最终死亡.在这个过程中 16 号菌与 GS 产生竞争,对 GS 也产生了不利影响,引起脱氮效果的下降. GS 菌株是聚磷菌 16 的抑制菌群,GS 菌对于除磷是有害的,复配并未提高处理效果.

3 结 论

- 1) 厌氧/沉淀排水/缺氧/沉淀排水和较高注水比的运行方式避免了 C、N 共存的情况,对快速富集反硝化聚磷菌十分有利,能在较短时间使反硝化聚磷菌迅速成为优势菌.
- 2) 实验以磷为检测指标,综合磷吸收试验、硝酸盐还原试验、PHB 染色、Poly P 颗粒染色的分离筛选方法,从富集驯化 A²SBR 反应器中分离得到效果较好的反硝化聚磷菌,鉴定为 a5: Aeromonas ichthiosmia; b204: Pseudomonas stutzeri; b31: Citrobacter freundii; b11: Neisseria mucosa.
- 3) b204 和菌 16 组合方案可以作为潜在脱氮除磷生物强化菌剂. b204 与聚磷菌和反硝化菌复配,复配效果最好的是 b204 和 16,吸磷率为85.78%,脱氮率为75.02%,相对于单菌株均表现出了较好的脱氮除磷效果. 复配效果最差的是聚磷菌 16 和反硝化菌 GS 组合,复配后不具有吸磷能力,脱氮率为70.09%,相对于单菌株处理能力降低,聚磷菌和反硝化菌两类菌的复配未能达到同步脱氮除磷目的.

参考文献:

- [1] WACHTMEISTER A, KUBA T, LOOSDRECHT van M C M, et al. A sludge characterization assay for aerobicand denitrifying phosphorus removing sludge [J]. Wat Res, 1997, 31(3):471-478.
- [2] JENKINS D, TANDOI V. The applied microbiology of enhanced biological phosphate removal accomplishments and needs [J]. Water Res, 1991,25:1471 – 1478.
- [3] STARKENBURG van W, RENSINK J H, RIJS G B J. Biological P - removal: state of the art in the Netherlands [J]. Water Sci Technol, 1993,27:317 - 328.
- [4] KUBA T, LOOSDRECHT van M C M, HEIJNEN J J. Effect of cyclic oxygen exposure on the activity of

- denitrifyingphosphorus removing bacteria [J]. Wat Sci Tech, 1996, 34:33 40.
- [5] HU J Y, ONG S L, NG W J, et al. A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors [J]. Wat Res, 2003,37(14):3463-3467.
- [6] AHN J, DAIDOU T, TSUNEDA S. Characterization of denitrifying phosphate – accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction – denaturing gradient gelel ectrophoresis assay[J]. Water Research, 2002, 36:403-412.
- [7] ZENG R J, YUAN Z, KELLER J. Model based analysis of anaerobic acetate up take by a mixed culture of polyphosphate accumulating and glycogen accumulating organisms [J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 83 (3): 293-302.
- [8] WANG L J, LI W, KANG L. Bioremediation of eutrophicated water by Acinetobacter Calcoaceticus [J].
 Bull Environ Contam Toxicol, 2007, 78:527 530.
- [9] AHN Y H, SPEECE R E. Elutriated acid fermentation of municipal primary sludge[J]. Wat Res, 2006, 40 (11): 2210 - 2220.
- [10] ZENG J, YUAN Z, KELLER J. Effects of solids concentration, pH and carbon addition on the production rate and composition of volatile fatty acids in prefermenters using primary sewage sludge[J]. Wat Sci Tech, 2006, 53(8): 263 269.
- [11] 王春丽,马放,王立立. 耐低温聚磷菌的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报,2007,39(18):1327-1330.
- [12] LEMAIRE R, MEYER R, TASKE A, et al. Identifying causes for N_2O accumulation in a lab scale sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal [J]. J Biotechnol, 2006, 122(1): 62 72.
- [13] 任世英,肖天. 菌体内多聚物的染色方法[J]. 海 洋科学,2005, 29(1): 59-63.
- [14] LU H, OEHMEN A, VIRDIS B, et al. Obtaining highly enriched cultures of candidatus phosphate accumulating bacteria through altering carbon sources [J]. Wat Res, 2006, 40(20): 3838 – 3848.
- [15] HE S, GU A, MCMAHON Z K D. Fine scale differences between accumulibacter like bacteria in enhanced biological phosphorus removal activated sludge [J]. Wat Sci Tech, 2006, 54(1): 111 117.

(编辑 刘 形)