活性污泥法驯化一株好氧反硝化细菌*

杨 达[1] 赵婉宁[1] 陈 越[1] 程有鹏[1] 蓝惠霞[1,2**]

(1. 青岛科技大学环境与安全工程学院,山东 青岛 266042;
2. 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室,福建 莆田 351100)

摘要:为了驯化废水中的好氧反硝化细菌,本研究以柠檬酸为碳源,采用活性污泥法,通过 3 个阶段驯化废水中的好氧反硝化菌群,并逐步提高废水中硝酸根(NO_3^-)质量浓度,富集好氧反硝化细菌. 监测驯化过程中出水的 pH、重铬酸盐需氧量(COD_{Cr})去除率、硝酸盐氮(NO_3^--N)去除率和污泥理化指标,并采用四区划线法和 16SrRNA 测序技术筛选并鉴定优势菌群. 在 3 个阶段驯化过程的中,出水溶液酸碱度分别为 pH 7.0 ~ 6.7、pH 7.1 ~ 6.9 和 pH 7.1 ~ 6.87;COD_{Cr}的最大去除率分别为 82.6%、89.7% 和 92.3%;NO_3^--N 最大去除率分别为 82.5%、91.9% 和 59.1%. 污泥各项指标显示,驯化后污泥沉降性能和絮凝效果增强,出水浊度降低. 16SrRNA 测序技术显示最终得到的优势菌为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),属好氧反硝化菌.

关键词:活性污泥法;驯化;恶臭假单胞菌;好氧反硝化菌

中图分类号:X703 **DOI**:10. 19789/j. 1004-9398. 2020. 06. 006

0 引 言

脱氮是生活废水处理的重要目标[1-2],而异养硝化-好氧反硝化菌的发现为生物脱氮技术提供了新的研究方向. Robertson 和 Kuenen[3] 最早提出好氧反硝化细菌的存在,近年来,随着对好氧反硝化的进一步研究,在好氧条件下存在多种具有脱氮能力的菌株. 目前已经有 20 多个属的好氧反硝化菌株被分离出来[4],如肠杆菌属(*Enterobacter Hormaeche and Edwards*)、副球菌(*Paracoccus Davis*)、产碱杆菌(*Alcaligenes Castellani&Chalmers*)、陶厄氏菌属(*Thauera*)[5] 和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)等均能起到脱氮效果. 其中恶臭假单胞菌属于异养菌[6-7],在有氧条件下以有机物为电子供体,以氧气(O_2)、硝酸根(NO_3^-)、亚硝酸根(NO_2^-)为电子受体,还原产生氮气(N_2),从而起到脱氮作用.

胞菌的脱氮能力是研究者关注的热点. 张国宁等[8] 从好氧反硝化活性污泥系统分离纯化得到 1 株恶臭假单胞菌,研究显示高重铬酸盐需氧量(COD_{Cr})/总氮(TN)能够反映脱氮效果,从而验证了有机物的电子供体作用;赵晓宇等[9] 的研究显示从自然界水体中获得的恶臭假单胞菌株还可制成微生物强化菌剂,用于去除水中有机物,起到净水效果;张文艺等[10] 研究证实从氧化沟活性污泥中分离得到可以同步高效脱氮除磷的恶臭假单胞菌,在厌氧/缺氧(A/A)处理中,硝酸盐氮(NO_3^--N)去除率可达 53.5%.

好氧反硝化菌的存在使得好氧硝化和反硝化在同一构筑物中的实现成为可能[11-14]. 相对于厌氧微生物生长繁殖缓慢,对废水处理周期长等缺陷,好氧反硝化菌具有生长繁殖速度快、脱氮效率高等优点,对废水具有更好的脱氮效果,利用好氧反硝化菌可在有氧条件下将 NO_3^- 和 NO_2^- 还原为 N_2 和一氧化二氮(N_2O)等气态产物[15-16]. 目前,有关好氧反硝化菌的研究极大推动了生物脱氮的研究进展,受到国内外学者的广泛关注.

在传统工艺处理废水过程中,通常存在工艺流程相对复杂、占地面积大、碳源投加量大且硝化过程产生酸、反硝化过程产生碱等缺点,从而导致反硝化效率低. 为了弥补传统处理工艺中缺氧反硝化的不足[17],本研究以柠檬酸为碳源,采用活性污泥法,通过 3 个阶段驯化废水中的好氧反硝化菌群[18],逐步提高废水中 NO_3^- 质量浓度,以达到富集好氧反硝化细菌的目的.

收稿日期:2019-03-16

* 福建省新型污染物生态毒理效应与控制重点实验室开放经费资助课题(PY18002);青岛科技大学校级大学生创新创业训练计划项目(201810426226)

** 通信作者:lanhuixia@ 163. com

1 实验部分

1.1 实验试剂

分析纯无水碳酸钠($NaCO_3$)、对氨基苯磺酰胺和硫酸银(Ag_2SO_4)购自天津博迪化工股份有限公司;分析纯氢氧化钠(NaOH)购自天津市科密欧化学试剂有限公司;分析纯硝酸钠($NaNO_3$)、硫酸汞($HgSO_4$)和分析纯盐酸 N-(1-萘)-乙二胺购自天津市北联精细化学品开发有限公司;分析纯柠檬酸购自天津市恒兴化学试剂制造有限公司;分析纯硫酸铵[$(NH_4)_2SO_4$]购自国药集团化学试剂有限公司;分析纯浓硫酸(H_2SO_4)购自烟台远东精细化工有限公司;分析纯重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)和蛋白胨购自天津市鼎盛鑫化工有限公司;定量滤纸购自杭州富阳特种纸业有限公司;牛肉膏购自北京奥博星生物技术有限责任公司.

1.2 实验仪器

采用中国佑科仪器有限公司生产的 PHS-3C 型 pH 计测量溶液 pH;采用美国 HACH 公司生产的 DRB100 型化学需氧量(COD)快速消解仪和 DR1010 型 COD 测定仪进行 COD_{Cr} 测定;采用上海民桥精密科学仪器有限公司生产的 06672 型的电子天平称质量;采用上海市新亚净化器件厂生产的0.22 μm 的微孔滤膜过滤出水;采用上海一恒有限公司 LRH-150 生化培养箱培养微生物.

1.3 污泥驯化

以柠檬酸作为碳源,$(NH_4)_2SO_4$ 为氮源进行驯化实验. 在 1 L 的废水中加入 80.1 mg 柠檬酸、17.1 mg KH_2PO_4、16.5 mg $(NH_4)_2SO_4$,使溶液中碳(C)、氮(N)和磷(P)元素的物质的量(n)比为 n_C:n_N:n_P = 100∶5∶1. 此时溶液 COD_{Cr} 质量浓度为 300 mg/L,加固体 NaOH 调溶液酸碱度至 pH 7.

污泥驯化分为 3 个阶段. 第 1 阶段,加入 2.0 mg $NaNO_3$ 使体系中 NO_3^- 质量浓度为 20 mg/L,驯化时间为第 1 ~ 6 天;第 2 阶段,加入 4.0 mg $NaNO_3$,使体系中 NO_3^- 质量浓度为 40 mg/L,驯化时间为第 7 ~ 18 天;第 3 阶段,加入 7.0 mg $NaNO_3$,使体系中 NO_3^- 质量浓度为 70 mg/L,驯化时间为第 19 ~ 30 天. 实验重复进行 30 次.

1.4 出水指标测量

(1)溶液酸碱度测量. 每天固定时间取 10 mL 的出水测量溶液 pH.

(2)COD_{Cr} 去除率测量. 抽取 20 mL 的进出水,使用 0.22 μm 的滤膜过滤 2 ~ 3 次,直至溶液过滤澄清备用. 取 80.0 mg $HgSO_4$ 置于消解管中,加入 3 mL 消解液和 2 mL 上述水样后摇匀,采用 COD_{Cr} 快速消解仪在 165 ℃下消解 2 h,冷却后测定 COD_{Cr} 去除率.

(3)NO_3^--N 去除率测量. 采用紫外分光光度法测量溶液中 NO_3^- 的质量浓度. 测量不同质量浓度(1 ~ 4 mg/L)NO_3^- 标准溶液在 220 和 275 nm 波长处的吸光度(A_{220} 和 A_{275}),根据计算公式:溶液吸光度($A_{校}$) = $A_{220} - 2A_{275}$,绘制 $A_{校}$ 和 NO_3^--N 质量浓度校准曲线. 每天固定时间取 20 mL 进水、出水测量溶液,计算 $A_{校}$,从校准曲线上查得相应的 NO_3^--N 含量,从而计算实际样品中 NO_3^- 质量浓度,再乘以相应的稀释倍数,可计算得到溶液 NO_3^--N 的质量浓度,计算可得进水、出水中 NO_3^--N 去除率.

1.5 污泥指标测量

根据《城镇污水处理厂污泥泥质:GB/T 24188—2009》[19]的方法进行污泥指标测量,测定第 2 和 3 个阶段驯化结束后污泥指标参数.

(1)混合液悬浮固体量 ρ(MLSS)测量. 将 4 个定量滤纸在 103 ~ 105 ℃ 的烘箱中烘干 2.0 h,在干燥器内冷却 0.5 h 后称质量(m_0). 使用干燥后的定量滤纸分别过滤 100 mL 水样. 过滤后,将滤纸放入 103 ~ 105 ℃的烘箱中烘干 2.0 h,在干燥器内冷却 0.5 h 后再次称质量(m_1). 则该水样的 ρ(MLSS) = $(m_1 - m_0)/V$,其中 V 为样品的体积,V = 100 mL.

(2)30 min 污泥沉降比 $\varphi(SV_{30})$ 测量. 取 100 mL 搅拌均匀的污泥水放于量筒中,静置 30 min 后,读取污泥的体积(V_1),计算污泥体积比,即得到 $\varphi(SV_{30}) = V_1/100$.

(3)污泥体积指数(sludge volume index,I_{SV})测量. $I_{SV} = \varphi(SV_{30})/\rho(MLSS)$.

(4)胞外多糖质量分数 w(PS)测量. 采用苯酚硫酸法测定样品中的 PS[20],测定不同质量浓度(10 ~ 100 mg/L)甘露糖标准溶液在 490 nm 波长处的光密度值(OD),绘制 OD 与 w(PS)质量分数标准曲线. 每天固定时间取 5 mL 的出水测量溶液的 OD,根据标准曲线计算实际 w(PS).

1.6 菌种筛选与鉴定

采用四区划线法进行菌种分离,对分离纯化后的优势菌进行筛选. 用玻璃棒将驯化后稳定的好氧活性污泥搅匀,接种环经高温灭菌冷却至室温后,用接种环蘸取少量好氧活性污泥,接种于牛肉膏蛋

白胨培养基,置于 30 ℃恒温培养箱中培养 48 h. 采用 16SrRNA 技术进行鉴定获得的菌株.

1.7　数据处理

所有数据以平均值表示. 采用 origin 软件进行数据处理和曲线制作.

2　结　果

2.1　出水指标情况

溶液吸光度和 NO_3^--N 质量浓度标准曲线为 $y = 0.176\ 0x + 0.016\ 6$, $R^2 = 0.995\ 8$. 3 个驯化阶段出水溶液的 pH、COD_{Cr}和 NO_3^--N 去除率的变化曲线如图 1 所示. 可知,3 个驯化阶段中,出水溶液 pH 基本稳定,而 COD_{Cr}和 NO_3^--N 的去除率都呈现一定随时间的增长而规律变化的趋势. 驯化后出水溶液 pH 在 7 左右波动,其中 3 个阶段出水酸碱度分别为 pH 7.0 ~ 6.7、pH 7.1 ~ 6.9 和 pH 7.1 ~ 6.8;COD_{Cr}去除率分别为 34.1% ~ 82.0%、43.4% ~ 89.7% 和 31.5% ~ 92.3%,对应最大去除率分别为 82.6%、89.7% 和 92.3%;NO_3^--N 去除率分别为 31.9% ~ 82.5%、31.8% ~ 91.9% 和 33.9% ~ 59.1%,对应最大去除率分别为 82.5%、91.9% 和 59.1%.

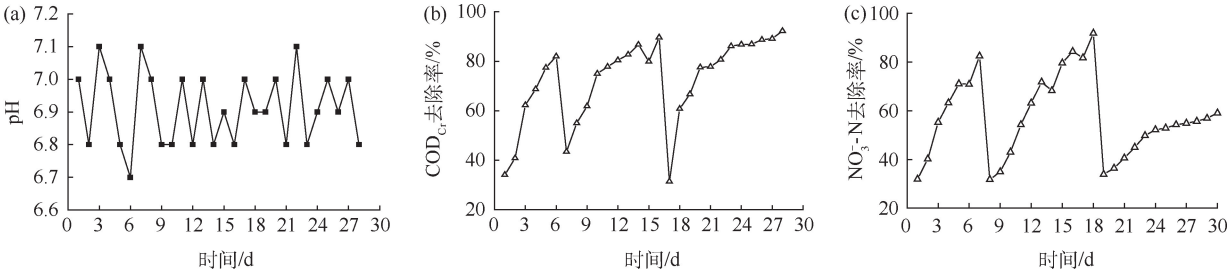


图 1　3 个驯化阶段出水指标的变化曲线

(a) pH;(b) COD_{Cr}去除率;(c) NO_3^--N 去除率

注:第 1 ~ 6 天为第 1 阶段;第 7 ~ 18 天为第 2 阶段;第 19 ~ 30 天为第 3 阶段.

2.2　污泥指标测定

OD 与 w(PS)标准曲线为 $y = 0.003\ 4x - 0.030\ 1$, $R^2 = 0.993\ 6$. 第 2 个阶段驯化结束后,ρ(MLSS) = 4.53 g/L, φ(SV_{30}) = 25.2%, I_{SV} = 55.6 mL/g, w(PS) = 25 mg/g;第 3 个阶段驯化结束后,ρ(MLSS) = 4.70 g/L, φ(SV_{30}) = 23.8%, I_{SV} = 50.6 mL/g, w(PS) = 44 mg/g.

2.3　菌种的筛选与鉴定

经菌种筛选,本研究最终获得 1 株优势菌,该优势菌菌落偏小、半透明呈米白色,近圆形且边缘不整齐. 经鉴定,并与国家生物信息中心的序列数据库进行核苷酸序列比对[21],为好氧反硝化菌的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),匹配指数为 100%.

3　讨　论

在废水处理过程中,由于 NO_3^--N 的去除,废水溶液的 pH 会呈现升高的趋势,而本实验过程中,出水 pH 相对进水 pH 变化不大,这是因为废水中的异养好氧菌分解柠檬酸时会产生小分子有机酸[22-23],从而与好氧反硝化过程中产生的碱中和,使出水溶液酸碱度围绕在 pH 7 左右波动.

在 3 个阶段驯化过程中,每个阶段 COD_{Cr}和 NO_3^--N 去除率均呈现逐渐升高并趋于稳定的变化趋势. 当前一个阶段驯化结束进入下一阶段时,由于溶液的 NO_3^- 质量浓度突然提高,COD_{Cr}和 NO_3^--N 去除率显著下降,这是因为 NO_3^- 质量浓度突然增加,一部分微生物由于不适应高质量浓度 NO_3^- 环境而死亡或处于休眠状态[24],致使 COD_{Cr}和 NO_3^--N 去除率显著降低. 连续培养数天后,不适应高质量浓度的 NO_3^- 环境的微生物逐渐死亡,而存活的微生物在适应了高质量浓度的 NO_3^- 环境后,开始增殖,此时溶液的 COD_{Cr}和 NO_3^--N 去除率开始上升. 随着连续驯化的进行,能够适应更高质量浓度 NO_3^- 环境的异养好氧菌和好氧反硝化菌成为污泥系统中的优势菌种,其对废水中有机物的利用也相应增强,COD_{Cr}的去除率也逐渐升高. 结果显示第 3 个阶段驯化结束后,COD_{Cr}最大去除率显著高于前 2 个阶段,而 NO_3^--N 去除率明显低于前 2 个阶段. 这是因为这个阶段 NO_3^- 的质量浓度太高,而实验过程中没有及时补充碳源,造成碳源含量相对较低,碳源的不足限制了好氧反硝化细菌的正常生理代谢[25],进

而导致 NO_3^--N 去除率低于前 2 个阶段.

第 2 和 3 个阶段驯化结束后,ρ(MLSS)变化很小,说明污泥活性变化不大,这是因为第 3 个阶段中碳源与 NO_3^- 的质量浓度不匹配,导致微生物的正常生理代谢与增长繁殖受限,造成污泥 ρ(MLSS)变化不大.第 2 和 3 个阶段驯化结束后,第 3 个阶段驯化结束后测定得到的 $\varphi(SV_{30})$ 和 I_{SV} 值,与第 2 个阶段相比,在一定程度上降低,表明随着驯化过程的不断进行,污泥沉降性能增强,出水浊度降低.与第 2 个阶段驯化结束相比,第 3 个阶段驯化结束后 w(PS)值增加到 1.8 倍,这表明连续驯化使 PS 含量升高.PS 类物质多数含有羟基(—OH)和羧基(—COOH)基团,能提升污泥的亲水性;PS 会将环境中的营养成分富集,通过胞外酶降解成小分子后吸收到细胞内,还可以抵御杀菌剂和有毒物质对细胞的危害[26-27];PS 的增加有利于细菌富集、吸收营养成分,有利于胶菌团相互凝聚在一起,调节生物膜表面的黏附,防止环境中的有害物质对细菌的破坏.

与其他研究不同,本研究经过 3 个阶段的连续驯化后,只得到 1 株菌株,说明连续驯化有助于进行单一菌株筛选.这可能是因为经过长期驯化,适合驯化环境的微生物被筛选出来,并且不断生长繁殖,使恶臭假单胞菌成为其中的优势菌属.

4 结束语

本研究以柠檬酸为碳源,经连续驯化活性污泥后,富集得到 1 株好氧反硝化细菌,且整个驯化过程中 COD_{Cr} 和 NO_3^--N 最大去除率可达 92.3% 和 91.9%.然而与 COD_{Cr} 最大去除率相对应的实验阶段,对应 NO_3^--N 的最大去除率仅 59.1%,这是因为第 3 个阶段中碳源与 NO_3^- 的质量浓度不匹配,导致微生物的正常生理代谢与增长繁殖受限,导致 NO_3^--N 的最大去除率受限.因此在下一步的实验中,本研究将优化连续驯化阶段污泥中的碳源,以得到更高的 COD_{Cr} 和 NO_3^--N 最大去除率与提升污泥品质.

参 考 文 献

[1] IORHEMEN O T, HAMZA R A, TAY J H, et al. Membrane bioreactor (MBR) technology for wastewater treatment and reclamation: membrane fouling[J]. Membranes, 2016, 6(2): 33.

[2] 杨小龙, 李文明, 陈燕, 等. 一株好氧反硝化菌的分离鉴定及其除氮特性[J]. 微生物学报, 2011, 51(8): 1062-1070.

[3] ROBERTSON L A, KUENEN J G. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium [J]. Microbiology, 1983, 129: 2847-2855.

[4] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 等. 好氧反硝化菌株的鉴定及其反硝化特性研究[J]. 环境科学, 2007, 28(7): 1548-1552.

[5] 汪银龙, 冯民权, 董向前. 汾河下游水体 nirS 型反硝化细菌群落组成与无机氮关系[J]. 环境科学, 2019, 40(8): 3596-3603.

[6] 蔡天明, 管莉菠, 崔中利, 等. 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)GM6 的聚磷特性研究[J]. 土壤学报, 2006, 43(1): 117-123.

[7] 王晓玉. 一株恶臭假单胞菌代谢芳香化合物产物及机理研究[D]. 济南:山东大学, 2009.

[8] 张国宁, 吴世晗, 蔡广潞, 等. 一株恶臭假单胞菌 AD-1 的好氧反硝化及产酶特性研究[J]. 价值工程, 2011, 30(14): 313-315.

[9] 赵晓宇, 王佳龙, 袁海峰, 等. 恶臭假单胞菌对松花江饮用水净化能力的测定[J]. 国土与自然资源研究, 2015(2): 55-57.

[10] 张文艺,陈晶,邓文,等. 反硝化聚磷菌菌剂种子液制备条件及除磷机理[J]. 土木建筑与环境工程, 2014, 36(6): 99-105.

[11] ZHAO B, CHENG D Y, TAN P, et al. Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal[J]. Bioresource Technology, 2017, 250: 564-573.

[12] FU G, YU T, HUANGSHEN L, et al. The influence of complex fermentation broth on denitrification of saline sewage in constructed wetlands by heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacterial communities[J]. Bioresource Technology, 2018, 250: 290.

[13] ROBERTSON G P, TIEDJE J M. Nitrous oxide sources in aerobic soils: nitrification, denitrification and other biological processes[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1987, 19(2): 187-193.

[14] 魏荷芬, 王田野, 张宏才, 等. 一株多重耐受性高效反硝化细菌的分离鉴定及特性[J]. 环境工程学报, 2016, 10(12): 7367 – 7374.
[15] 王薇, 蔡祖聪, 钟文辉, 等. 好氧反硝化菌的研究进展[J]. 应用生态学报, 2007(11): 2618 – 2625.
[16] CONG L, JIAN Z, SHUANG L, et al. Nitrous oxide generation in denitrifying phosphorus removal process: main causes and control measures[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20(8): 5353 – 5360.
[17] 张倩倩. 柴油生物脱硫菌的筛选及应用研究[D]. 北京:首都师范大学, 2006.
[18] TAKAYA N, CATALANSAKAIRI M A, SAKAGUCHI Y, et al. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3152 – 3157.
[19] 国家标准化管理委员会, 国家质量监督检验检疫总局. 城镇污水处理厂污泥泥质:GB/T 24188—2009[S]. 北京: 中国标准出版社,2010.
[20] 张敬东, 高顺明, 徐金兰, 等. SBR 法处理柠檬酸废水 pH 变化规律研究[J]. 工业水处理, 2003, 23(5): 26 – 28.
[21] 欧阳平. 生物信息数据库与序列分析[J]. 生物学通报, 2007, 42(1): 28 – 29.
[22] 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[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 77 – 81.
[23] AL-NOZAILY F, ALAERTS G, VEENSTRA S. Performance of duckweed-covered sewage lagoons: I. oxygen balance and COD removal[J]. Water Research, 2000, 34(10): 2727 – 2733.
[24] 魏巍, 黄廷林, 苏俊峰, 等. 1 株贫营养好氧反硝化菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. 生态环境学报, 2010, 19(9): 2166 – 2171.
[25] 陈咄圳, 王立刚, 王迎春, 等. 异养硝化-好氧反硝化菌的筛选及脱氮性能的实验研究[J]. 环境科学, 2009, 30(12): 3614 – 3618.
[26] CHANG J J, WU S Q, DAI Y R, et al. Nitrogen removal from nitrate-laden wastewater by integrated vertical-flow constructed wetland systems[J]. Ecological Engineering, 2013, 58(10): 192 – 201.
[27] 刘静, 王君, 白新宇, 等. 一株高温产粘菌株的筛选及其产胞外聚合物分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(2): 152 – 156.

Domestication of an Aerobic Denitrifying Bacteria by Activated Sludge Method

YANG Da[1]　ZHAO Wanning[1]　CHEN Yue[1]　CHENG Youpeng[1]　LAN Huixia[1,2]

(1. College of Environment and Safety Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao Shandong　266042;
2. Fujian Provincial Key Laboratory of Ecology-Toxicological Effects & Control for Emerging Contaminants, Putian Fujian　351100)

Abstract: In order to acclimate the denitrifying bacteria in wastewater, citric acid was used as the carbon source in this study, the aerobic denitrifying bacteria in the wastewater were acclimated in three stages by the activated sludge method, and the concentration of nitrate (NO_3^-) in the wastewater was gradually increased to enrich the aerobic denitrifying bacteria. The pH of effluent, removal rate of dichromate oxygen demand (COD_{Cr}) and nitrogen of nitrate (NO_3^--N), and physical and chemical indexes of sludge were monitored. The dominant bacterial communities were screened and identified by the method of four-division line and 16SrRNA sequencing. In three stages of acclimation, the pH value of the effluent solution was pH 7.0 – 6.7, pH 7.1 – 6.9 and pH 7.1 – 6.87 respectively; the maximum removal rates of COD_{Cr} were 82.6%, 89.7% and 92.3% respectively, and the maximum removal rates of NO_3^--N were 82.5%, 91.9% and 59.1% respectively. Each index of sludge showed that after acclimation, the settling performance and flocculation effect of sludge increased, and the turbidity of effluent decreased. 16SrRNA sequencing technology showed that the dominant bacteria were *Pseudomonas putida*, which belonged to aerobic denitrification bacteria.

Keywords: activated sludge method; domestication; *Pseudomonas putida*; aerobic denitrifying bacteria