

doi:10.11835/j.issn.1674-4764.2014.06.017

## 反硝化聚磷菌菌剂种子液制备条件及除磷机理

张文艺, 陈晶, 邓文, 陈萍, 周新程

(常州大学环境与安全工程学院, 江苏常州 213164)

**摘要:**为获取高效反硝化聚磷菌(DNPAOs)菌剂种子液以控制水体富营养化,从安徽省天长市污水处理厂氧化沟活性污泥中分离得到1株具有高效脱氮除磷功能的恶臭假单胞菌B8(*Pseudomonas putida sp.*)。利用多聚磷酸盐颗粒(Poly-P)染色得到具有高Poly-P含量的B8菌剂种子液。其适宜的培养条件为:pH6.5~7.0,温度30~32℃,溶解氧相当于70%~88%饱和溶解氧(摇床转速120~140 r/min),培养时间15~20 h。所得的反硝化聚磷菌种子液B8具有良好的同步反硝化除磷效果,对于污水厌氧/缺氧(A/A)处理,其聚磷率、硝酸盐氮去除率分别达到89.73%和53.48%,而经厌氧/好氧(A/O)处理磷去除率最高可达94.09%。通过B8胞外聚合物(EPS)提取与磷去除实验表明其对磷酸盐去除源于B8胞内的吸收,而非胞外的生物吸附。

**关键词:**反硝化聚磷菌;菌剂;种子液;多聚磷酸盐颗粒;污水处理

**中图分类号:**X703.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-4764(2014)06-0099-07

## Preparation of Denitrifying Phosphorus Accumulating Bacterial Seed Liquid and Analysis of Phosphorus Removal Mechanism

Zhang Wenyi, Chen Jing, Deng Wen, Chen Ping, Zhou Xincheng

(School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, Jiangsu, P. R. China)

**Abstract:** In order to control the water eutrophication, microorganism agents with high capability of denitrifying phosphorus accumulation are required. A denitrifying poly-phosphate accumulating organisms (DNPAOs), B8 (*Pseudomonas putida sp.*) was isolated from activated sludge in oxidation ditch of Anhui Tianchang wastewater treatment plant. Intracellular polyphosphate granule (Poly-P) dyeing method was used to optimize the culture conditions of Poly-P-producing *Pseudomonas putida* strain B8 seed liquid. The results showed that the appropriate culture conditions were as follow: pH value and temperature ranged from 6.5 to 7.0 and 30~32 °C respectively. The saturation values of dissolved oxygen varied from 70% to 88% (when velocity was in range of 120~140 r/min), 15~20 h proved to be the cultivation time. The seed liquid produced by B8 showed high phosphorus uptake rate in the processes of anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic in wastewater (89.73% and 94.09% respectively). In the anaerobic-anoxic process, the highest nitrate removal efficiency was 53.48%. Extracellular polymeric substances (EPS) extracting method and analysis of phosphorus removal characterization revealed that phosphorus removal was mainly caused by intracellular uptake, rather than by extracellular biological adsorption.

**Key words:** denitrifying poly-phosphate accumulating microorganisms (DNPAOs); microorganism agents; bacterial seed liquid; intracellular polyphosphate granule (Poly-P); wastewater treatment

收稿日期:2014-05-19

基金项目:江苏省自然科学基金(BE2012640);“十二五”国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012zx07301-001)

作者简介:张文艺(1968-),男,博士,教授,主要从事水污染控制与生态修复研究,(E-mail)zhangwenyi@ust.hk.

反硝化聚磷菌 (denitrifying poly-phosphate accumulating microorganisms, DNPAOs) 是一类以氧为电子受体又以硝酸盐为电子受体聚磷的菌群。在厌氧环境中 DNPAOs 释放体内的多聚磷酸盐颗粒 (Poly-P) 获得能量吸收水体中的挥发性脂肪酸, 将其储存为聚羟基脂肪酸酯 (PHA); 在好氧 (缺氧) 环境中再消耗 PHA, 以氧气或硝酸盐为电子受体吸收水中的磷, 并在菌株体内再次合成 Poly-P<sup>[1]</sup>, 所以菌株体内 Poly-P 分解与合成在 DNPAOs 同步脱氮除磷中处于核心地位。针对 DNPAOs 的富集、分离和除磷特性已有大量研究, 如 Chaudhry 等<sup>[2]</sup>考察各种碳源和氮源影响, 制得一种 PAM 培养基用于筛选环境样品中的聚磷菌, Ahn 等<sup>[3]</sup>在厌氧阶段初期投加少量 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>有利于 DNPAOs 的富集, 且将电子受体由氧气转变为 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>有利于 DNPAOs 缺氧吸磷的活力。Weissbrodt 等<sup>[4]</sup>研究了在生物膜中的聚磷菌 *Accumulibacter* 和聚糖菌 *Competibacter* 富集触发因素有 pH、温度和氧化还原电位, 当 pH 大于 7.3、温度小于 20 °C 和充分好氧时会使聚磷菌成为优势菌种。而在 Lanham<sup>[5]</sup> 研究中指出从抑制聚糖菌生长来富集聚磷菌可能会降低聚磷菌的除磷效能, 其原因在于聚磷菌存在代谢系统的易变性, 聚磷菌的代谢途径分为糖酵解和三羧酸循环, 聚糖菌的存在有利于聚磷菌利用糖酵解进行代谢从而具有更高的除磷效率。

中国污水处理厂多采用氧化沟和 A<sup>2</sup>/O 工艺, 在原理上有利于聚磷菌发挥其效能, 但多数污水处理厂均不同程度存在磷去除率不高的问题, 其原因在于聚磷菌与硝化菌、聚糖菌等存在碳源竞争, 若聚磷菌在活性污泥中失去种群优势, 则活性污泥中的聚磷菌很难大量繁殖。污水处理厂为确保出水达标排放, 只得采用投加大量的化学药剂<sup>[6]</sup>, 但这又会带来成本过高和污泥量增加的问题, 最终造成运行成本过高, 尤其是采用 BOT 模式建造的污水处理厂更是苦不堪言。

目前, 对于 DNPAOs 的研究处于起步阶段, 中国已筛得大量反硝化聚磷菌的报道, 其大多研究<sup>[6-10]</sup> 将富氮磷培养基作为模拟废水, DNPAOs 接种于培养基中改变培养基的 pH、温度、溶解氧等, 得到菌株在培养基中摄取氮磷量最高时的处理条件。任世英等<sup>[7]</sup> 提出了利用  $\Delta OD_{480}$  及其形成的多聚磷酸盐菌体比例 2 项指标来描述海洋聚磷菌 (*Halomonas* YSR-3) 的除磷特性, 但在 DNPAOs 菌株 Poly-P 培育、菌剂种子液制备以及实际污水处理

应用方面的研究鲜有报道。因此, 从聚磷菌除磷机理出发, 以提高反硝化聚磷菌体内的 Poly-P 含量为目标, 从安徽省天长市污水处理厂具有较高除磷效率 (70%~80%) 活性污泥中获取的反硝化聚磷菌进行优化培养, 对菌剂发酵使用的种子液制备条件做了初步探究, 以期反硝化聚磷菌菌剂制备与发酵法批量化生产提供技术参考和理论依据。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种 以 BOT 方式运营的安徽省天长市城市污水处理厂经过近 3 a 反复培养驯化活性污泥和工艺优化, 其出水 TP 全年达到《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918—2002) 一级 A 标准。笔者以该厂采自氧化沟外沟活性污泥为菌源, 分离得到具有反硝化功能的聚磷菌 B8 (本实验室命名, 且已送中国科学院微生物研究所菌种保藏中心保藏, 保藏编号为 CGMCC NO. 9168), 通过生理生化测试和 DNA 测序鉴定为恶臭假单胞菌属 (*Pseudomonas putida*)。B8 菌株具有多聚磷酸盐颗粒和聚- $\beta$ -羟丁酸 (PHB) 颗粒, 同时又具有反硝化产气功能, 在富磷氮培养基中具有明显同步脱氮除磷性能。对 B8 平板培养 2 d 后, 观察其生长状况良好, 长成直径为 1.28 mm, 白色, 不透明, 边缘光滑, 表面凸起, 具有粘性和臭味的圆形菌落, 培养 48 h 后菌株变黄。对其进行生理生化特性测定, 革兰氏染色、乙酰甲基醇 (V. P)、甲基红 (M. R)、淀粉水解和葡萄糖发酵皆为阴性, 接触酶、明胶水解、葡萄糖氧化和产硫化氢均为阳性。

1.1.2 培养基 PAM 高磷含量聚磷菌培养基: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.75 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30.6 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.25 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.25 g/L, 柠檬酸钠 4.0 g/L, NaCl 2.5 g/L, 蔗糖 0.01 g/L, 琼脂粉 20 g/L<sup>[2]</sup>。聚磷菌种子培养液即为 PAM 中不加琼脂, 其用于菌剂种子的培养。

PAM-TBO 多聚磷酸盐颗粒染色培养液: 1 L 的聚磷菌种子培养液中加入 0.025 g 甲苯胺蓝。其作用为菌株内多聚磷酸盐颗粒含量的表征, 有目的地培育内含高含量 Poly-P 菌株<sup>[2]</sup>。

NB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 牛肉膏 3 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.2~7.4<sup>[11]</sup>。其作用为监测菌株的生长情况, 即 OD<sub>600</sub> 的测定。

灭菌条件: 1.03 × 10<sup>5</sup> Pa, 121 °C, 20 min。

## 1.2 方法

1.2.1 多聚磷酸盐颗粒染色培育方法 依据 Vasvi Chaudhry 快速鉴定聚磷菌方法<sup>[2]</sup>,将菌株接种于液体 PAM 中,设置 3 个平行样,对菌株进行不同培养条件下的培养制得反硝化聚磷菌菌剂种子液,再加入发酵菌液体积 2% 的 PAM-TBO,置于 30 °C 下静置避光染色 24 h,按同样的操作制作空白。对种子液和空白经 8 000 r/min 离心 15 min,对上清液分别在 625 nm 处测定其吸光度,以此来表征多聚磷酸盐颗粒在种子液中的含量。

$$\text{PAM-TBO 染色率}(\%) = (A_0 - A) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: $A_0$  为未接菌液在 PAM-TBO 于 625 nm 处的吸光度, $A$ ;  $A$  为接菌后菌液在 PAM-TBO 于 625 nm 处的吸光度, $A$ 。

1.2.2 种子液除磷实验 将用无菌水 4 000 r/min 离心 15 min 清洗 2~3 次后的 B8 菌剂种子液按 10% 接菌量投加至高温蒸汽灭菌后的污水(取自江苏省常州市马杭污水处理厂格栅前进水口,水质为  $\text{COD}_C$  267.2~274.4 mg/L, TP 4.0~4.5 mg/L,  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  35.0~36.5 mg/L)后,分别进行厌氧-好氧流程和厌氧-缺氧流程处理。厌氧-好氧流程和厌氧-缺氧流程具体操作为:将加了菌的水样置于密闭容器中充入氮气后,置于 30 °C 中转子 30 r/min 搅拌 4 h,此为厌氧处理;再将水样置于敞口容器中预曝气充氧后再持续搅拌 12 h(30 °C、160 r/min),相当于正常好氧状态下溶解氧的 79%~95%,此为好氧处理;缺氧处理为将水样置于敞口容器中进行间歇低速搅拌 12 h(每隔 55 min 低速 60 r/min、30 °C 搅拌 5 min)其中的溶解氧相当于正常好氧状态下溶解氧的 24%~46%<sup>[12]</sup>,两流程中的厌氧处理操作相同。处理后每隔 1 h 取水样,再将水样离心(8 000 r/min, 15 min)取上清液,分别对水样中的 TP、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$  测定来连续追踪脱氮除磷进程,同时对处理废水中的菌株生长量  $\text{OD}_{600}$  进行测定。除磷率、硝酸盐氮去除率的计算式为

$$P = (B_0 - B) / B_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: $P$  为除磷率或硝酸盐氮去除率,%; $B_0$  为水样初始的 TP 或  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度,mg/L; $B$  为处理后水样的 TP 或  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度,mg/L。

1.2.3 种子液中菌株胞外聚合物提取方法 取待处理废水 10% 的菌剂种子液进行 4 000 r/min 离心 15 min,使用无菌水清洗 2 次后,重悬至原体积后,使用超声破碎仪(40 W、60 s)进行超声破碎,再进行

冷冻离心(20 000 r/min、4 °C)20 min,收集上清液,此即含有菌株的胞外聚合物<sup>[8]</sup>。

1.2.4 分析方法 1) 菌株多聚磷酸盐颗粒 PAM-TBO 染色率(%):吸光度法,用 721 分光光度计在光密度为 625 nm 处测定 PAM-TBO 静置避光染色 24 h 后上清液的吸光度值,同时对空白样的 PAM-TBO 染色后的吸光度值进行测量,按式(1)计算<sup>[2]</sup>。

2) 水质测定方法依据国家环保总局编的《水和废水监测分析方法(第 4 版)》<sup>[13]</sup>。其中总磷采用过硫酸钾消解-钼锑分光光度法;硝酸盐氮采用酚二磺酸分光光度法。

3) 菌体生长量( $A$ ):吸光度法,用 721 分光光度计在光密度为 600 nm 处测定吸光度值<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 反硝化聚磷菌 B8 菌剂的种子液制备条件分析

2.1.1 种子液培育时间 培养时间与菌龄紧密相关,培养时间过短聚磷菌的多聚磷酸盐颗粒含量偏低,而过长的培养时间又会导致反硝化聚磷菌出现多聚磷酸盐颗粒分解的现象,所以培养时间是发挥反硝化聚磷菌除磷效能的关键因素,也是制备反硝化聚磷菌菌剂的核心因素。将 B8 菌株接入 50 mL PAM 中摇培(140 r/min、30 °C、pH 6.5)5~35 h 后,在分别接入 1 mL 的 PAM-TBO 静置避光染色 24 h 后进行聚磷菌多聚磷酸盐颗粒含量评价。由图 1 可以看出,B8 菌株 PAM-TBO 染色率是先快速上升于 47.57%,短期稳定于 56% 左右后下降,最后下降于 2.46%,这是由于在菌株培育 25 h 时有少量菌株死亡,多聚磷酸盐颗粒含量下降,其后虽又有菌株继续繁殖,但其多聚磷酸盐颗粒含量不再增加,说明菌株合成多聚磷酸盐颗粒激酶活力已大大降低,所以 B8 菌株适宜培养时间应为 15~20 h。

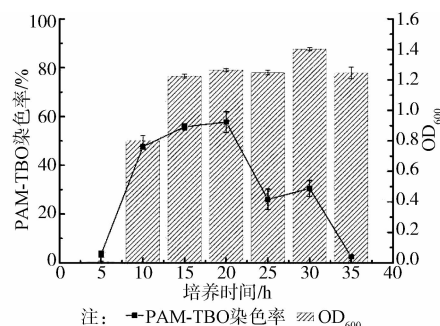


图 1 培养时间对反硝化聚磷菌 B8 生长的影响

2.1.2 种子液培育温度 在污水生物处理过程中,微生物衰减包括细胞死亡和功能性微生物活性的丧

失<sup>[14]</sup>, 过高或过低的温度都不利于反硝化聚磷菌的繁殖与其体内多聚磷酸盐颗粒的培育。将 B8 菌株接入 50 mL PAM 中摇培(140 r/min、pH 6.5)20 h 后, 再分别接入 1 mL 的 PAM-TBO 静置避光染色 24 h 后进行聚磷菌多聚磷酸盐颗粒含量评价, 其中考察培养温度范围为 20~40 °C, 其结果如图 2 所示。由该图可以看出, B8 菌株 PAM-TBO 染色率是先快速上升至 56.47%, 随后快速下降, 最后下降于 6.47%, 这是由于在菌株培育温度太低或太高, 菌株不易繁殖, 菌体内多聚磷酸盐颗粒含量也较低, 即 B8 除磷活性较低。因此, B8 菌株适宜的培养温度应为 30~32 °C。

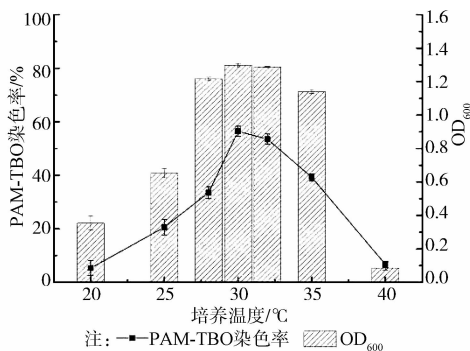


图 2 温度对反硝化聚磷菌 B8 生长的影响

2.1.3 种子液饱和和溶解氧(摇床培育转速) 摇床转速反映了培养液中溶解氧含量, 有研究表明: 当培养液为 200 mL, 在培养的 0~48 h 内, 摇床转速 100 r/min, 相当于 55%~74%饱和和溶解氧; 摇床转速 160 r/min, 相当于 79%~95%饱和和溶解氧<sup>[12]</sup>。同时, 摇床转速也会反映菌株机械承受力水平, 由于在大部分菌剂制备工艺中会采用机械搅拌来增加氧通量, 若反硝化聚磷菌的机械承受力不强则易自溶破裂, 将可能会引起菌剂除磷效能降低的结果。在该研究中将 B8 菌株接入 50 mL PAM 中摇培(培养温度 30 °C、pH 6.5)20 h 后, 在分别接入 1 mL 的 PAM-TBO 静置避光染色 24 h 后进行聚磷菌多聚磷酸盐颗粒含量评价, 其中考察摇床转速范围是 80~180 r/min, 得到实验结果。由图 3 可以看出, B8 菌株 PAM-TBO 染色率在摇床转速 80~180 r/min 范围内有一次起伏, 在 120 r/min 时 PAM-TBO 染色率最高为 64.83%。在一开始摇床转速设为 80 r/min 时, B8 菌株 PAM-TBO 染色率仅为 19.53%, 是由于摇床转速过慢导致培养液营养分布不均匀和供氧量不足使 B8 菌株多聚磷酸盐颗粒含量较低。随着摇床转速的增加, B8 菌株 PAM-TBO 染色率快速增至 64.83%。摇床转速大于 120 r/min 后, B8 菌株 PAM-TBO 染色

率平稳降至 42.15%, 这是由于摇床转速过大致使菌株间的碰撞频率增加从而减少溶解氧向菌株胞内的运输, 影响 B8 菌株的正常生长和其多聚磷酸盐颗粒的培育。所以 50 mL B8 菌液适宜摇床培养转速为 120~140 r/min, 即 70%至 88%饱和和溶解氧。

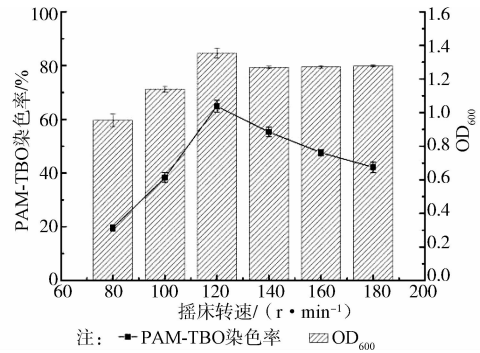


图 3 摇床转速对反硝化聚磷菌 B8 生长的影响

2.1.4 菌剂种子液培育酸碱度(pH 条件) 不同微生物均有适合其生长和发挥其特殊功能的酸碱度, 即 pH。在该研究中, 将 B8 菌株接入 50 mL PAM 中摇培(培养温度 30 °C; 摇床转速 120 r/min)20 h 后, 再分别接入 1 mL 的 PAM-TBO 静置避光染色 24 h 后进行聚磷菌多聚磷酸盐颗粒含量评价, 其中考察 pH 范围是 5.5~8.0, 得到实验结果。由图 4 可知, 随着 pH 的增加, B8 菌株 PAM-TBO 染色率快速增至 61.03%。pH 大于 6.5 后, B8 菌株 PAM-TBO 染色率缓慢降至 24.22%, 说明偏酸与偏碱都会对种子液中的 B8 菌株的繁殖和体内多聚磷酸盐颗粒的合成产生不利影响, 而 pH 对 B8 菌株体内的多聚磷酸盐颗粒合成的影响程度更大。在偏酸条件下, 虽菌体生长量较大, 但由于 Poly-P 是多聚阴离子, 较低的 pH 会促使菌体内 Poly-P 水解<sup>[15]</sup>, 所以图 4 中在 pH 小于 6.5 时的 PAM-TBO 染色率较低。由此可得 B8 菌剂种子液制备 pH 条件应为 6.5~7.0。

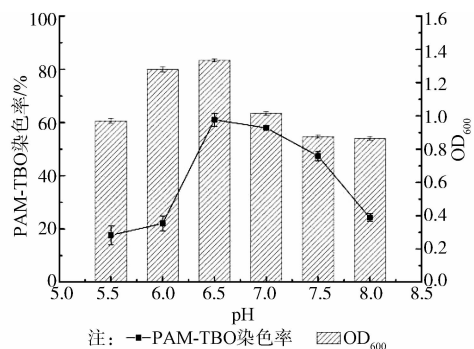


图 4 pH 对反硝化聚磷菌 B8 生长的影响



## 2.2 反硝化聚磷菌 B8 菌剂种子液除磷特性

在培养温度为 30 ℃;转速为 120 r/min;pH 6.5 条件下培育 20 h 得到高 Poly-P 含量的反硝化聚磷菌 B8 菌剂种子液,对处理废水量 10% 的反硝化聚磷菌 B8 菌剂种子液进行清洗后,再将其投加入去除杂菌后的待处理污水中,厌氧处理 4 h 再分别进行好氧和缺氧处理 12 h,其中每隔 1 h 取水样后测 TP 和  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ ,从而便于对反硝化聚磷菌 B8 菌剂种子液除磷特性进行分析。

**2.2.1 好氧聚磷特性** 由图 5 中可以看出 B8 具有聚磷菌的厌氧释磷和好氧超量吸磷的特性,进水 TP 4.40 mg/L 经 4 h 厌氧释磷为 5.80 mg/L,经 5 h 好氧处理后 TP 降为 0.26 mg/L,随后少量 B8 除磷能力下降,使水中 TP 上升至 1.22 mg/L。而在好氧除磷过程中, $\text{NO}_3^- - \text{N}$  浓度并无明显变化,其硝酸盐氮去除率在 1.32% 至 2.13% 范围内波动。在厌氧阶段聚磷菌会释磷吸收碳源形成 PHA 用于菌体储存能量,在好氧阶段会消耗 PHA 吸收处理水中的磷到菌体内形成多聚磷酸盐颗粒<sup>[16]</sup>,在 B8 处理第 13 h 有菌体死亡溶解在水中,菌体的死体增加了水中的碳源,促进了其剩下菌体的聚磷活力和繁殖能力,使处理水中的 TP 有 3 个小范围的波动,平均循环时间为 4 h,第 1 个循环的除磷效率最高,这也可间接证明聚磷菌在先厌氧再好氧条件下的聚磷率高于单纯好氧条件下的聚磷率<sup>[17]</sup>。B8 菌株可以在较短的时间内发挥高聚磷能力,且在补给少量碳源后会刺激 B8 持续发挥其聚磷能力,其聚磷率保持在 80% 左右。综上所述,所制得的反硝化聚磷菌 B8 菌剂种子液具有高效的好氧除磷能力,经厌氧 4 h 和好氧 5 h 后除磷可达 94.09%,但未见好氧反硝化现象。

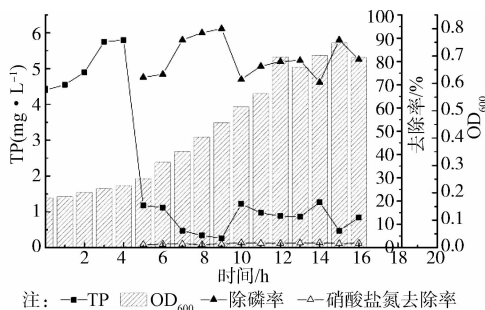


图 5 出水总磷浓度及脱氮除磷率的变化

**2.2.2 缺氧反硝化脱氮聚磷特性** 由图 6 中可以看出 B8 具有反硝化聚磷菌的厌氧释磷和缺氧超量吸磷的特性,进水 TP 4.38 mg/L 经 4 h 厌氧释磷为 5.87 mg/L,经 12 h 缺氧处理后 TP 降为 0.45 mg/L,

同时进水  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  35.94 mg/L 也降为 16.72 mg/L。在缺氧处理前 5 h 硝酸盐氮去除率与除磷率基本相近,而在此之后由于间歇搅拌使处理废水中溶解氧逐渐增高,超过了菌株繁殖所需氧量,使菌株吸收水中的磷开始繁殖,所以除磷率开始明显超过硝酸盐氮去除率,同时  $\text{OD}_{600}$  也开始上升。彭赵旭等<sup>[9]</sup>发现与水中溶氧相比, $\text{NO}_3^- - \text{N}$  作为吸磷过程电子受体时效率偏低。将缺氧除磷与好氧除磷进行对比,可以看出缺氧除磷的效率确实较低,但其具有减少曝气成本和产泥量少的优点。综上所述,所制得的反硝化聚磷菌 B8 菌剂种子液具有高效的反硝化除磷能力,经厌氧 4 h 和缺氧 12 h 后硝酸盐氮去除率可达 53.48%、除磷率可达 89.73%。

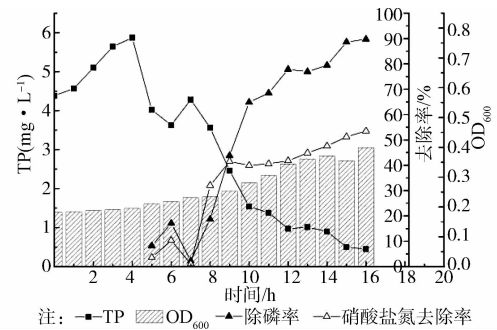


图 6 出水总磷浓度及脱氮除磷率的变化

## 2.3 反硝化聚磷菌 B8 菌剂种子液的同步脱氮、除磷机理分析

目前普遍认可“聚合磷酸盐累积微生物”(简称为聚磷菌)的摄/放磷原理,即聚磷菌先在厌氧环境中水解体内的 ATP 用于形成 ADP 和能量并分解菌株内的 Poly-P,然后以  $\text{PO}_4^{3-}$  的形式释放。同时聚磷菌利用糖酵解产物( $\text{NADH}_2$ )和能量吸收碳源储存形成 PHA(其中包括 PHB)于菌体内。继而聚磷菌在好氧环境中以  $\text{O}_2$  为电子受体氧化分解 PHB 产生能量完成繁殖代谢,同时吸收外部环境中的磷酸盐再次于体内形成 Poly-P,而菌株厌氧放磷量远大于好氧摄磷量,所以通过聚磷菌的生长代谢就可以去除外环境中的磷。而聚磷菌中又存在反硝化聚磷菌,这种菌种可以在聚磷阶段以  $\text{NO}_3^-$  为电子受体进行吸磷。

胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)是微生物聚集体重要组成部分,其具有生物吸附作用<sup>[18]</sup>,而  $\text{PO}_4^{3-}$  在碱性环境中易与菌株胞外的蛋白质、多糖形成沉淀,马放等<sup>[10]</sup>发现反硝化聚磷菌 H16、H19、H24 和 Xg 菌悬液在 pH 大于 8 时

会出现磷酸盐沉淀物。由图7和图8可以看出B8菌剂种子液有明显的厌氧释磷和好氧(缺氧)除磷的反硝化聚磷菌特征。为了深入研究B8菌的除磷机理,先在温度30℃;培养转速120 r/min;pH 6.5条件下培育20 h得到高Poly-P含量的B8菌剂种子液,对处理废水量10%的菌液EPS进行提取,再将其投加至待处理废水中,在厌氧-好氧流程和厌氧-缺氧流程处理的16 h连续跟踪检测发现处理水中的TP与NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N并无变化,由此可推测出B8菌株对磷的去除能力源于胞内的吸收,而非胞外的生物吸附,而这也符合反硝化聚磷菌的以O<sub>2</sub>或NO<sub>3</sub><sup>-</sup>为电子受体的摄/放磷原理。

### 3 结论

1)影响反硝化聚磷菌B8菌剂种子液的多聚磷酸盐颗粒含量的显著培养因素有:时间、温度、摇床转速和pH。在适宜的培养条件(时间15~20 h、温度30~32℃、溶解氧相当于70%~88%饱和溶解氧(摇床转速120~140 r/min);pH 6.5~7.0)下制得反硝化聚磷菌B8菌剂种子液中的菌株体内的Poly-P的含量较高。将在温度30℃、pH 6.5和摇床培养转速120 r/min下培养20 h后的B8菌剂种子液以1:10处理实际城市污水,经4 h厌氧5 h好氧处理除磷率达到94.09%,而经4 h厌氧12 h缺氧处理除磷率达到89.73%、硝酸盐氮去除率达到53.48%,且出水总磷均降至0.5 mg/L以下,达到《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918—2002)一级A要求。

2)用提取B8菌剂种子液中菌株胞外聚合物进行1:10处理城市污水,废水中的TP与NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N在处理过程中浓度并无变化,推测B8对磷的去除主要源于菌株胞内的Poly-P的合成,而不是胞外聚合物的生物吸附作用。此对进一步研究反硝化聚磷菌对磷的去除机理有重要的理论意义,但菌株胞内物质等生物学特征还有待于研究。

#### 参考文献:

- [1] Liu Y, Maite P J, Zhi G Y. The effect of free nitrous acid on key anaerobic processes in enhanced biological phosphorus removal systems [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 382-389.
- [2] Chaudhry V, Nautiyal C S. A high throughput method and culture medium for rapid screening of phosphate accumulating microorganisms [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 8057-8062.
- [3] Ahn J, Daidou T, Tsuneda S, et al. Selection and dominance mechanisms of denitrifying phosphate-accumulating organisms in biological phosphate removal process [J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(24): 2005-2008.
- [4] Weissbrodt D G, Schneiter G S, Fuerbringer J M, et al. Identification of trigger factors selecting for polyphosphate-and glycogen-accumulating organisms in aerobic granular sludge sequencing batch reactors [J]. *Water Research*, 2013, 47(19): 7006-7018.
- [5] Lanham A B, Oehmen A, Saunders A M, et al. Metabolic versatility in full-scale wastewater treatment plants performing enhanced biological Phosphorus removal [J]. *Water Research*, 2013, 47(19): 7032-7041.
- [6] 任丽平,张智,唐赞.以Fe(III)为电子受体的聚磷菌筛选,鉴定及聚磷特性[J].*土木工程与环境工程*, 2012, 34(3): 146-150.  
Ren L P, Zhang Z, Tang Y. Screening and identification of phosphate accumulating bacteria with Fe(III) as electronic acceptor and its effects on Phosphorus-Accumulating characteristics [J]. *Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering*, 2012, 34(3): 146-150.
- [7] 任世英,张宇红,张武昌,等.海洋聚磷菌Halomonas YSR-3的除磷特性研究[J].*高技术通讯*, 2008, 18(7): 743-747.  
Ren S Y, Zhang Y H, Zhang W C, et al. Phosphate-absorbing characterization of a marine polyphosphate-accumulating bacterium Halomonas YSR-3 [J]. *High Technology Letters*, 2008, 18(7): 743-747.
- [8] 马放,杨菲菲,李昂,等.1株高效反硝化聚磷菌的生物学特性研究[J].*环境科学*, 2011, 32(9): 2710-2715.  
Ma F, Yang F F, Li A, et al. Biological characteristics of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms [J]. *Environmental Science*, 2011, 32(9): 2710-2715.
- [9] 彭赵旭,彭永臻,刘旭亮,等.吸磷过程中电子受体峰值浓度探讨[J].*土木工程与环境工程*, 2011, 33(4): 162-166.  
Peng Z X, Peng Y Z, Liu X L, et al. Analysis of peak concentrations of electron acceptor during Phosphorus uptaken process [J]. *Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering*, 2011, 33(4): 162-166.
- [10] 马放,王春丽,王立立.高效反硝化聚磷菌的筛选及其生

- 物学特性[J]. 哈尔滨工程大学学报, 2007, 28(6): 631-635.
- Ma F, Wang C L, Wang L L. Screening of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms and their biological characteristics [J]. Journal of Harbin Engineering University, 2007, 28(6): 631-635.
- [11] 张文艺, 罗鑫, 韩有法, 等. 下向流曝气生物滤池工艺处理藻浆压滤液特性及微生物种属分析[J]. 土木建筑与环境工程, 2013, 35(5): 55-61.
- Zhang W Y, Luo X, Han Y F, et al. Biological aerated filter for algae pulp filtrate treatment and the analysis of microbial species [J]. Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering, 2013, 35(5): 55-61.
- [12] 王娟, 汪莘, 项慕飞, 等. 2株好氧反硝化菌还原能力测定及菌种鉴定[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(6): 525-528.
- Wang J, Wang P, Xiang M F, et al. Study on reducing capacity and identification of aerobic denitrifiers [J]. Journal of Environment and Health, 2008, 25(6): 525-528.
- [13] 国家环境保护总局. 水和废水检测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [14] 苗志加, 薛桂松, 翁冬晨, 等. 不同温度及厌氧/好氧运行条件对聚磷菌衰减特性的影响[J]. 土木建筑与环境工程, 2013, 35(2): 113-117.
- Miao Z J, Xu G S, Weng D C, et al. Effect of different temperature and anaerobic/aerobic conditions on the decay characteristics of PAOs [J]. Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering, 2013, 35(2): 113-117.
- [15] Lopez-Vazquez C M, Oehmen A, Hooijmans C M, et al. Modeling the PAO-GAO competition: Effects of Carbon source, pH and temperature [J]. Water Research, 2009, 43(2): 450-462.
- [16] Taya C, Garlapati V K, Guisasola A A. The selective role of nitrite in the PAO/GAO competition [J]. Chemosphere, 2013, 93(4): 612-618.
- [17] Hirota R, Kuroda A, Kato J, et al. Bacterial phosphate metabolism and its application to *Phosphorus* recovery and industrial bioprocesses [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 109(5): 423-432.
- [18] Zhang P, Chen Y P, Guo J S, et al. Adsorption behavior of tightly bound extracellular polymeric substances on model organic surfaces under different pH and cations with surface plasmon resonance [J]. Water Research, 2014, 57: 31-39.
- (编辑 胡英奎)

## 更正启事

《土木建筑与环境工程》2014年第5期第119页,《大粒径卵砾石地层盾构刀盘选型及适应性评价》一文第一作者单位“中国矿业大学 力学与建筑工程学院”应为“中国矿业大学(北京)力学与建筑工程学院”,特此更正。

《土木建筑与环境工程》编辑部