

一株耐低温反硝化聚磷菌的筛选及其特性研究

王春丽^{1,2} 马放² 王强²

(1. 哈尔滨工程大学建筑工程学院, 哈尔滨 150001;

2. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

摘要 通过吸磷试验、硝酸盐还原产气试验及异染颗粒和 PHB 颗粒染色辅助检验, 并采用模拟自然降温方式, 从稳定运行的厌氧/缺氧 SBR 反应器中分离筛选出在低温下(8℃)仍具有高效能的一株反硝化聚磷菌 H16。经鉴定, H16 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。在低温下, 探讨了 pH 值、微量元素对菌株的生长及除磷效能的影响, 结果表明, 菌株 H16 生长最适 pH 为 7~8, 除磷反应的最佳 pH 值为 7; 微量元素的缺乏对 H16 的生长和除磷效能都有一定的不良影响。同时测定了 H16 的生长曲线。

关键词 反硝化聚磷菌 低温 筛选 pH 微量元素 生长曲线

中图分类号 X703.1 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2007)04-0021-04

Screening of a low temperature-resistant denitrifying polyphosphate-accumulating organisms and its characteristics

Wang Chunli^{1,2} Ma Fang² Wang Qiang²

(1. College of Civil Engineering, Harbin Engineering University, Harbin 150001;

2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090)

Abstract A low temperature-resistant DNPAOs (H16) was screened out ultimately by phosphate uptake assay, the experiment of denitrifying nitrates to gas, inspection of metachromatic and Polyhydroxybutyrate (PHB) granule and gradually bringing down the temperature to 8℃. It's *Pseudomonas* sp. More important factors (pH and microelement) that affected H16 on growth and phosphorus removal ratio were studied. For strain growth and phosphorus removal, the optimal pH value of growth of H16 is 7~8. The optimal pH value of phosphorus removal is neutral. Effect of microelement on growth and phosphorus removal of H16 is more. Growth curves of strain were determined by absorbency at the same time.

Key words denitrifying phosphate-accumulating organisms; low temperature; screening; pH; microelement; growth curve

反硝化除磷技术是近年来同步生物脱氮除磷废水生物处理技术领域的研究热点内容之一, 其功能菌群——反硝化聚磷菌(denitrifying phosphate-accumulating organisms, DNPAOs)能在缺氧条件下, 以硝酸盐为电子受体, 同步完成反硝化(脱氮)和过量摄磷(除磷)过程^[1,2], 具有反硝化脱氮时无需碳源、摄磷时勿需曝气且排泥量少等优点^[3,4]。然而, 在冬季、寒冷地区等低温情况下, 该技术的处理效果明显下降, 这主要是因为当温度下降到 10℃ 以下时, 起主要作用的中温 DNPAOs 一般生长代谢处于抑制状态, 失去了降解能力, 此时起降解作用的是另一些 DNPAOs——耐低温 DNPAOs^[5,6]。但是, 它在正常

温度情况下要比中温 DNPAOs 少, 代谢速率慢, 靠自然选择很难形成优势菌群。因此, 人工筛选、培育耐低温优势 DNPAOs 是解决低温废水脱氮除磷问题的最佳途径。本研究采用模拟自然降温方式, 筛选出在低温下仍具有高效能的 DNPAOs, 并对其特性进行了研究, 旨在为提高寒冷地区废水脱氮除磷处理系统的净化能力和运行的稳定性提供技术支持。

基金项目:国家自然科学基金国际重大合作研究项目(50521140075)

收稿日期:2006-04-18; **修订日期:**2006-07-18

作者简介:王春丽(1974~), 女, 讲师, 硕士研究生, 主要研究方向: 水污染控制。E-mail: wangchunli@126.com

1 材料与方法

1.1 样品来源

从实验室运行稳定的厌氧/缺氧 SBR 反应器中,取富含反硝化聚磷菌的活性污泥做为实验样品。

1.2 培养基配方

(1)牛肉膏蛋白胨培养基:蛋白胨 10 g/L;牛肉膏 3 g/L;NaCl 5 g/L;琼脂 20 g/L;pH 7.2,用于反硝化聚磷菌的分离、纯化。

(2)缺磷培养基^[7]:2 g/L CH₃COONa;23 mg/L Na₂HPO₄ · 2H₂O;11 mg/L CaCl₂ · 2H₂O;152.8 mg/L NH₄Cl;81.12 mg/L MgSO₄ · 7H₂O;17.83 mg/L K₂SO₄;7 g/L HEPES 缓冲液和 2 mL 的微量元素;pH 7.2。

(3)富磷培养基^[7]:2 g/L CH₃COONa;25 mg/L K₂PO₄;305.52 mg/L NH₄Cl;91.26 mg/L MgSO₄ · 7H₂O;25.68 mg/L CaCl₂ · 2H₂O;8.5 g/L PIPES 缓冲液和 2 mL 的微量元素;pH 7.2。

(4)硝酸盐还原产气试验培养基:牛肉膏 3 g/L;蛋白胨 5 g/L;KNO₃ 1 g/L;pH 7.4。这 3 种培养基用于反硝化聚磷菌的筛选。

1.3 菌株的分离、纯化及筛选

1.3.1 菌株的分离、纯化

取 10 mL 污泥至装有 90 mL 无菌水三角瓶中,加入玻璃珠,将三角瓶放入空气振荡器中,把污泥充分摇匀打碎。打碎后的污泥经倍比稀释,在牛肉膏蛋白胨培养基上采用混均平板法和涂布平板法分离、纯化。

1.3.2 菌株初筛

选取分离、纯化后所得斜面菌种,首先在缺磷的乙酸合成培养基中进行预培养,用 1 mol/L 的氢氧化钠将 pH 值调到 7。各培养物在 30 ℃、140 r/min 的摇床上过夜培养。菌体细胞以 10 000 r/min 离心出来,之后用无菌蒸馏水洗涤、离心,重新悬浮于富磷培养基中,整个过程均在无菌操作台上进行;然后在 30 ℃摇床中进行扩大培养,培养 24 h 后,每种菌大约取 10 mL 菌液,滤纸过滤取澄清的无菌液体培养基,利用钼锑抗分光光度法测定接种后 PO₄³⁻-P 含量的变化。取摄磷率高于 50% 的菌株分别进行硝酸盐还原产气试验、异染颗粒染色和聚-β-羟丁酸(PHB)颗粒染色试验。既能过量摄磷又具有反硝化功能并有异染颗粒和 PHB 颗粒的菌株即为高效 DNPAOs^[8]。

1.3.3 菌株复筛

通过设置温度梯度的方法对各株菌进行降温驯化培养。

驯化培养过程按如下温度梯度进行:

30 ℃→25 ℃→18 ℃→11 ℃→8 ℃

都采用 10% 梯度接种的方法,即:将上一梯度上培养 48 h 的菌液取出 10% 接种于下一个温度梯度的培养基中,在恒温培养箱培养。各菌在每个温度梯度上采用上述方法分别测定培养 24 h 后的生长量、培养基中磷含量的变化。

1.4 菌株鉴定

菌株形态及生理生化特性测定参照文献[9]、[10]方法进行。

1.5 菌株的特性研究

1.5.1 生长曲线的测定

采用光电比浊法在 8 ℃下进行测定,利用 722 型分光光度计以 OD₆₀₀值表示。

1.5.2 pH 值与菌株生长关系的确定

pH 值分别设置为 4、5、6、7、8、9、10,将筛选所得的 DNPAOs 活化 18 h,每个 pH 值条件下以 10% 的接种量分别接入 5 份富磷液体培养基(成分与人工合成废水类似)中,恒温、摇床培养 48 h 后,测定各细菌悬浮液的 OD₆₀₀值。

1.5.3 微量元素的影响

微量元素溶液成分为:0.9044 g/L FeCl₃,0.15 g/L H₃BO₃,0.03 g/L CuSO₄ · 5H₂O,0.18 g/L KI,0.06 g/L MnCl₂ · 4H₂O,0.12 g/L ZnSO₄ · 7H₂O,0.15 g/L CoCl₂ · 7H₂O,0.06 g/L Na₂MoO₄ · 2H₂O,10 g/L 乙二胺四乙酸。

将在 8 ℃下培养 48 h 生长良好的各菌液以 10% 的接种量分别接种于已灭菌的含微量元素与不含微量元素的 5 份富磷液体培养基中,8 ℃恒温、摇床培养 48 h 后,测定各细菌悬浮液的 OD₆₀₀值培养基中磷含量的变化。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离、纯化及筛选

在牛肉膏蛋白胨培养基上经 3 次划线分离后得菌株 48 株,按上述初筛方法在缺、富磷液体培养基内培养后,选出摄磷率在 50% 以上的菌株,经硝酸盐还原产气试验、异染颗粒染色及 PHB 颗粒染色试验,其中菌株 H16、H19、H24、Xg 均具有反硝化能力且体内都含有 PHB 颗粒或异染颗粒,为高效反硝化

聚磷菌。

在模拟自然降温过程中,各个温度梯度下菌株生长量、培养基中磷的去除率的变化情况如图1所示。

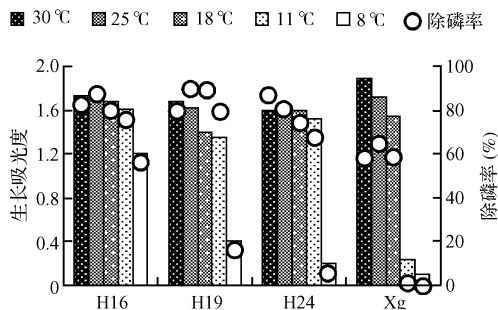


图1 在各温度梯度下菌株的生长及除磷情况

Fig.1 Variation of growth and phosphorus removal rate of strains at different temperature gradients

从图1中可见,4株DNPAOs中H16在温度从30℃降到8℃时生长量的变化不大,8℃时生长吸光度达到1.20,除磷效能虽然从最高的94%降到58%,但还是超过了50%,这表明菌株H16在低温下仍能生长且具有超量吸磷能力,是一株耐低温高效DNPAOs。

2.2 菌株的鉴定

对菌株H16进行形态观察和生理生化特性测定,透射电镜照片表明H16单个细胞为短杆状、偏端单生鞭毛,见图2;菌落形态为圆形、低凸、全缘、乳黄色、半透明、无光泽;革兰氏染色呈阴性;淀粉水解为阳性;葡萄糖氧化发酵;不产吡啶;明胶液化阳性;接触酶、氧化酶、精氨酸双水解酶均呈阳性;脲酶阴性;M.R.V.P均呈阴性;耐盐性试验阳性;经检索,鉴定菌株H16属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

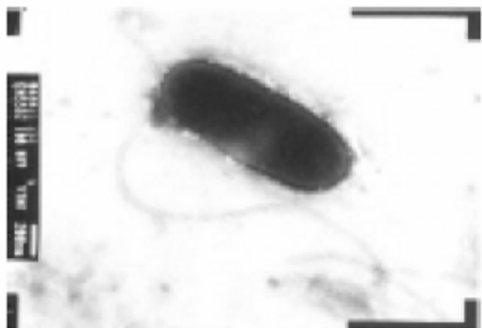


图2 菌株H16(×2万倍)

Fig.2 The photo of strain H16 (×20 k times)

2.3 菌株H16的特性

2.3.1 菌株H16的生长

由图3可见,H16的延滞期均较短,不足2h,说明用于接种的菌株都处于代谢旺盛期;H16对数生长期约为16h,18h以后进入稳定期和衰亡期。

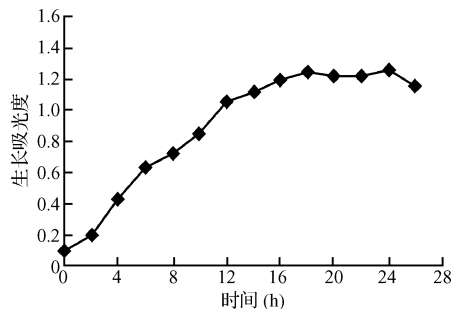


图3 菌株H16的生长

Fig.3 Growth curve of strain H16

2.3.2 pH值对菌株H16生长及除磷效能的影响

每个pH条件下取5份样品测定的平均值为实验结果,如图4所示。

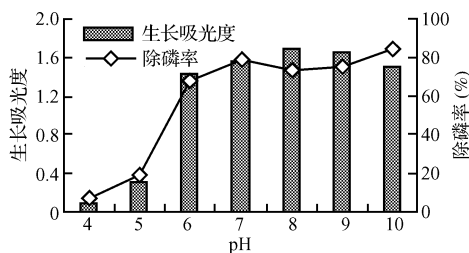


图4 pH对H16生长及除磷效能的影响

Fig.4 Effect of pH on growth and phosphorus removal rate of H16

由图4可知,在低温条件下,菌株H16能在pH 6~10的条件下生长,最适pH范围为7~8。在测定过程中,发现pH值大于8时各菌株的除磷率都有升高的趋势,但生长量却恰恰相反,是逐渐降低的,同时还发现菌悬液中有磷酸盐沉淀物出现,这说明是磷酸盐析出而造成了除磷率高的假象,据此确定菌株H16的除磷最佳pH值为7。

2.3.3 微量元素的影响

不同条件下各取5份样品的平均值为测定结果,结果如图5所示。

从图5中可知,在没有微量元素的情况下,H16生长吸光度比有微量元素的情况下降低了45%,说明微量元素的存在与否对H16的影响较大。这是

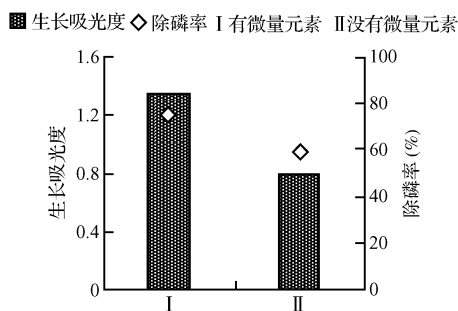


图5 微量元素对菌株生长及除磷效能的影响

Fig. 5 Effect of microelement on growth and phosphorus removal rate of strains

因为微量元素对调节微生物细胞的渗透压、pH 值、氧化还原电位方面有着一定的影响。但在没有微量元素时, H16 也都有一定的生长, 这表明 H16 在生长前期微量元素不是其生长的限制因子。

微量元素的缺乏对 H16 的除磷率有一定的不良影响。并且微量元素对其生长和除磷效能的影响并不一致, H16 在无微量元素的培养基中的除磷量与有微量元素情况下相比, 只降低了 20%, 并没有像生长量那样降低了 45%, 生长量的高低变化与除磷率大小变化之间并没有明显的对应关系, 这说明微量元素对于菌株的摄磷过程可能有影响, 但具体的机理还有待于进一步的研究。

3 结 论

(1) 通过摄磷试验、硝酸盐还原产气试验、异染颗粒染色和 PHB 颗粒染色试验并采用模拟自然降温方式, 能够筛选出在低温下仍具有除磷效能的 DNPAOs。

(2) 耐低温反硝化聚磷菌株 H16 的适宜生长的 pH 范围较宽, 但只有在中性偏碱条件下磷的去除效果最好, 除磷反应的最佳 pH 值范围较窄, 这表明 pH 值对除磷反应影响较大, 所以当 H16 在应用到实际废水处理中时, pH 值是影响处理效果的关键性因素。

(3) 微量元素的缺乏对于菌株 H16 的生长和摄磷过程具有一定影响。在用实际废水来进行菌种的驯化、富集时, 可考虑投加微量元素来加快或强化该过程。

参 考 文 献

- [1] Kuba T., Smolder G., Van Loosdrecht M. C. M., et al. Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Wat. Sci. Tech.*, **1993**, 27(5~6): 241~252
- [2] Johwan Ahn, Tomotaka Daidou, Satoshi Tsuneda, et al. Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Water Res.*, **2002**, 36: 403~412
- [3] Kuba T., Van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrify dephosphatation and denitrification in a two-sludge system. *Water Res.*, **1996**, 30(7): 1702~1710
- [4] Merzouki M., Bernet N., Delgenes J. P., et al. Biological denitrifying phosphorus removal in SBR: Effect of added nitrate concentration and sludge retention time. *Wat. Sci. Tech.*, **2001**, 43(3): 191~194
- [5] Hao X. D., Van Loosdrecht M. C. M., Meijer S. C. F., et al. Model based evaluation of two BNR process UCT and A²N. *Wat. Res.*, **35**(12): 2851~2860
- [6] Mose Rossi, Maria Ciarabella, Raffaele Cannio, et al. Extremophiles 2002. *Journal of Bacteriology*, **2003**, 185(13): 3683~3689
- [7] Mohamed Merzouki, Jean-Philippe Delgenes, Nicolas Bernet, et al. Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. *Current Microbiology*, **1999**, (38): 9~17
- [8] 罗宁, 罗固源, 吉方英, 等. 新型双泥生物反硝化除磷脱氮系统中微生物的组成. *给水排水*, **2003**, 29(8): 33~35
- [9] 东秀珠, 蔡妙应. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, **2001**. 349~399
- [10] R. E. 布南坎, N. E. 吉布斯. 伯杰氏细菌学鉴定手册 (第九版). 北京: 科学出版社, **1995**