

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2016.10.2016021502

陈晶, 周新程, 陈萍, 等. 投菌强化序批式反应器(SBR)脱氮除磷效果及微生物种属分析[J]. 环境化学, 2016, 35(10): 2183-2190

CHEN Jing, ZHOU Xincheng, CHEN Ping, et al. Enhanced nitrogen and phosphorus removal with addition of microbes in sequencing batch reactor and analysis of microbial specie[J]. Environmental Chemistry, 2016, 35(10): 2183-2190

## 投菌强化序批式反应器(SBR)脱氮除磷效果及 微生物种属分析\*

陈 晶 周新程 陈 萍 邓 文 张文艺\*\*

(常州大学环境与安全工程学院, 常州, 213164)

**摘 要** 为揭示投加具有反硝化聚磷能力的恶臭假单胞菌(B8)强化序批式反应器(SBR)除污特性和微生物种属,将 B8 菌液和干粉菌剂分别引入 SBR,构成液态型 DNPAOs-SBR 污水处理系统 A 和干粉型 DNPAOs-SBR 污水处理系统 B,以不接菌的 SBR 污水处理系统 C 为对照,分别考察了在厌氧-缺氧条件下运行的各反应器除污效果.结果表明,各 SBR(A、B、C)对 COD 去除率均达到 90% 以上;第 49—77 天时 A 系统、B 系统和 C 系统  $\text{NO}_3^-$  平均去除率分别为 61.62%、68.58% 和 26.72%;第 62—77 天时 A 系统、B 系统和 C 系统 TP 平均去除率分别为 53.66%、55.45% 和 46.61%;投菌强化系统在缺氧段对 TP 降解过程符合一阶指数衰减动力学模式,在第 71 天时, A 号吸磷动力学系数  $K_p$  为 1.2584, B 号吸磷动力学系数  $K_p$  为 2.0379;对 SBR 内活性污泥菌种 16S rDNA 测序及 GenBank BLAST, A 系统和 B 系统中占优势菌种依次是溶血不动杆菌、恶臭假单胞菌和粪产碱菌,而未投菌 C 系统占优势菌类依次是溶血不动杆菌、粪产碱菌和产碱假单胞菌,表明投加的 B8 菌在液态型 DNPAOs-SBR 污水处理系统和干粉型 DNPAOs-SBR 污水处理系统内得到生长富集,从而成为优势菌群.

**关键词** 反硝化聚磷菌, 序批式反应器, DNA 提取, 菌种鉴定, 系统发育.

## Enhanced nitrogen and phosphorus removal with addition of microbes in sequencing batch reactor and analysis of microbial specie

CHEN Jing ZHOU Xincheng CHEN Ping DENG Wen ZHANG Wenyi\*\*

(School of Environment & Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou, 213164, China)

**Abstract:** This paper aimed to investigate the performance and microbial community of denitrifying polyphosphate accumulating bacteria (*Pseudomonas putida* B8) in the sequencing batch reactor (SBR) system. B8 bacterial liquid and B8 bacteria powder were introduced into SBR respectively to construct new type DNPAOs-SBR sewage disposal systems (liquid type A and dry powder type B), with a traditional SBR (type C) as contrast. The performance of these three reactors under anaerobic-anoxic conditions was investigated. The results showed that the chemical oxygen demand (COD) removal of all SBR reactors was above 90%, while the mean removal rates of nitrate in A, B and C reactors during 49—77 days were 61.62%, 68.58% and 26.72%, respectively. In addition,

2016 年 2 月 15 日收稿(Received: February 15, 2016).

\* 国家“水体污染控制与治理”科技重大专项(2012zx07301-001), 国家自然科学基金(41571471), 常州市和武进区科技支撑项目(CE20155061, WS201521)资助.

**Supported by** The National Major Science & Technology Program for Water Pollution Control and Management(2012zx07301-001), the National Natural Science Foundation of China(41571471), Science and Technology Project of Changzhou City and Wujin District(CE20155061, WS201521).

\*\* 通讯联系人, Tel: 13915046002, E-mail: zhangwenyi888@sina.com

**Corresponding author,** Tel: 13915046002, E-mail: zhangwenyi888@sina.com

the mean removal rates of total phosphorus (TP) in A, B and C reactors during 62—77 days were 53.66%, 55.45% and 46.61%, respectively. The kinetics of TP removal under anoxic conditions in A and B reactors followed the first-order exponential decay model, with the kinetic constants 1.2584 and 2.0379 at 71 day, respectively. The polyphosphate accumulating microbial species in SBR were also analyzed, and the dominant bacteria were *Actinetobacter haemolyticus*, *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes faecalis* in the system A and B, while the dominant bacteria were *Actinetobacter haemolyticus*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas alcaligenes* in the control group. The denitrifying polyphosphate accumulating microorganism B8 put in the DNPAOs-SBR systems (A and B reactors) grew well.

**Keywords:** denitrifying polyphosphate accumulating microorganisms (DNPAOs), sequencing batch reactor (SBR), DNA extraction, strain identification, phylogeny.

反硝化聚磷菌(DNPAOs)是在厌氧环境中吸收碳源,并把它们储藏为多聚 $\beta$ 氢氧丁酸盐颗粒,同时菌体内的多聚磷酸盐分解,将磷释放到水体中.在缺氧/好氧环境中,其以硝态氮或分子氧为电子受体超量吸收水内磷的微生物<sup>[1-4]</sup>.DNPAOs是生物强化除磷(EBPR)工艺主要功能菌之一,序批式生物反应器(SBR)是能够运行EBPR的污水处理工艺,具有运行方式灵活、基建和运行管理成本低、占地面积小的优点,为我国众多中小型企业所采用.传统SBR活性污泥内因混杂有聚磷菌、反硝化细菌和硝化细菌,其相互竞争碳源,使得SBR处理系统同步脱氮除磷效率较低<sup>[5]</sup>.近年来有关SBR脱氮除磷研究主要集中于以下2个方面:(1)同步脱氮除磷SBR内DNPAOs生物学特性,即功能菌株筛选分离和微生物群落结构研究<sup>[6-8]</sup>;(2)SBR活性污泥内DNPAOs富集与驯化及其影响因素研究<sup>[5,9-13]</sup>.在DNPAOs应用方面,研究投加DNPAOs强化SBR脱氮除磷效果及其内部微生物种群报道较少.

本研究选取反硝化聚磷菌B8液体制剂和其干粉菌剂,构建了2套DNPAOs-SBR污水处理系统,同时运行不投菌的SBR污水处理系统作为对比分析,分别研究其在厌氧-缺氧环境中对废水中TP、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>和COD的去除特性、TP降解动力学及SBR内微生物种属分析,以期对SBR生物强化(Bioaugmentation)脱氮除磷工艺设计与设施运行提供参考.

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 活性污泥来源与实验用水

活性污泥:常州市马杭污水处理厂回流污泥作为实验污泥,该污水处理厂处理污水工艺为一沉+氧化沟+二沉+三沉处理,处理污水主要成分为印染废水,日处理量30万吨.

实验用水:实验污水采用人工配制废水(pH 6—9),其由常州大学环境实验楼化粪池废水,为模拟水质波动添加少量啤酒、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>与自来水混合配制,水质指标如表1所示.

表1 实验用水水质

Table 1 Quality of experimental water

指标 Index	COD	TP	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	TN
范围 Range/(mg·L <sup>-1</sup> )	420.15—971.04	5.50—14.42	1.24—1.74	0.57—1.92	1.92—2.14	3.82—5.65
平均值 Average value/(mg·L <sup>-1</sup> )	746.06	7.91	1.47	1.29	2.03	4.71

### 1.2 菌种

反硝化聚磷菌B8(恶臭假单胞菌,*Pseudomonas putida*),分离自安徽天长污水处理厂氧化沟外沟内活性污泥,该菌株已送中国普通微生物菌种保藏管理中心保藏,保藏编号为CGMCC NO.9168<sup>[14]</sup>.

### 1.3 微生物液体制剂和干粉菌剂

B8液体制剂的制备:将B8接种于pH值为6.5的液体PAM营养液<sup>[15]</sup>,培养温度为30℃、转速为

120 r·min<sup>-1</sup>条件下培育 20 h,即制得具有高 Poly-P 含量的 B8 液体制剂(活菌数为 6.25×10<sup>7</sup>—8.55×10<sup>7</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>).

B8 干粉菌剂的制备:将 20 mL 高 Poly-P 含量的 B8 菌剂种子液离心,清洗 2 次后使用 20 mL 牛肉膏蛋白胨培养基(pH 值为 6.5)重悬,投加入 5 g 灭菌载体(含麦麸 4.25 g 和玉米粉 0.75 g),再添加 2 mL PAM 营养液,放入摇床(温度为 30 ℃;转速为 120 r·min<sup>-1</sup>)固体发酵 8 h,最后使用烘箱 25 ℃将其烘干至其含水率低于 5%,即制得干粉型菌剂(活菌数为 1.75×10<sup>6</sup>—2.48×10<sup>6</sup> cfu·mg<sup>-1</sup>).

#### 1.4 污泥培养驯化与投菌

本实验设置 3 个 SBR,每个有效容积 4 L,分别编号为 A、B、C.其中 A 为液态型 DNPAOs-SBR 污水处理系统;B 为干粉型 DNPAOs-SBR 污水处理系统;C 为传统 SBR 污水处理系统(对照用),各反应器分别投加约 1 L 活性污泥.

取化粪池污水足量,滤除大颗粒物后置于集水池内,用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节污水 pH 值至 7.0—8.0 后备用.取预处理后的化粪池废水 3 L 注入 SBR 中开始进行污泥培养与驯化,且驯化过程不排泥,具体操作见表 2.污泥培养 1—2 周后,可见污泥絮体量增加,颜色呈现黄褐色,SV<sub>30</sub>、COD 去除率、TP 去除率稳定于 26%、82.87%、16.45%,表明污泥培养成功.

进水同时向 A 反应器其内投加 12 mL 液体制剂 B8;向 B 反应器其内投加 0.45 g 干粉型菌剂 B8;定期排泥使各反应器污泥停留时间维持在 15 d 左右,污泥浓度约为 2.21—4.92 g·L<sup>-1</sup>(平均 3.98 g·L<sup>-1</sup>).SBR 运行操作见表 2.

表 2 SBR 的运行模式和投菌操作

Table 2 Running mode and the practice of bacteria-throwing of SBR

编号 Serial number	运行名 称及模式 Operation name and mode	连续运 行天数 Operation days/d	1 个周期 时间 Single cycle time /h	在 1 个周期内 Single cycle						
				投菌量 Biomass/ (×10 <sup>7</sup> )/cfu	厌氧 Anaerobic/h	好氧 Aerobic/h	缺氧 Anoxia/h	缺氧 NO <sub>3</sub> -N 初始浓度 Initial concentration/ (mg·L <sup>-1</sup> )	沉淀 Precipitate/h	后曝气 Aeration/h
A、B、C	污泥培养 适应期厌 氧-好氧	1—14	7	—	2	4	—	—	1	—
A B C	第一投菌 阶段厌氧- 好氧-缺氧	15—44	9	7.50—10.26 8.40—11.90	2	4	2	10	1	—
A B C	第二投菌 阶段厌氧- 缺氧	45—77	7	7.50—10.26 8.40—11.90 —	2	—	4	10(45— 55 个循环); 5(56— 77 个循环)	0.5	0.5

SBR 运行方式:1 天运行 1 个周期,其余时间闲置. Running mode of SBR: 1 day to run a cycle, the rest of the time to spare.

#### 1.5 分析方法

水质分析方法采用《水和废水监测分析方法》(第四版)<sup>[16]</sup>,其中 COD 测定采用重铬酸钾快速密闭消解法,TP 测定采用过硫酸钾消解钼锑抗分光光度法,NO<sub>3</sub>-N 测定采用硫酸间苯二酚分光光度法.

污泥指标测定:SV<sub>30</sub>测定采用体积法,MLSS 测定采用重量法.

聚磷菌个数测定:从闲置期 SBR 中取活性污泥作为待检测泥样,采用 0.9%生理盐水进行倍比稀释至 10<sup>-4</sup>,吸取稀释样品均匀涂布至盛有聚磷菌专性 PAM 培养基上,倒置于 28 ℃恒温培养箱中培养 3 d,选取平板表面布有 30—300 个菌落的平板进行菌落计数,并且同一稀释倍数样品下做 3 个平行样.

DNA 提取及同源性分析:DNA 提取采用上海捷瑞生物工程有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型),菌种鉴定采用 16SrDNA 核苷酸编目分析.其中菌体 16SrRNA-PCR 扩增所采用引物分别为 27F 和 1492R,菌体 16SrDNA-PCR 的反应体系为 50 μL(25 μL 2X Taq Master Mix, 1 μL 27F, 1 μL 1492R, 0.5 μL DNA 模板,22.5 μL ddH<sub>2</sub>O).其反应条件为 PCR 扩增经 95 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 1 min,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,变性至延伸的过程循环 30 次,再 72 ℃最终延伸 10 min,产物

4 °C 保存,后续 PCR 样品纯化及测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 SBR(A、B、C)系统污染物去除对比分析

在第 45—77 天内,SBR(A、B、C)处理系统 COD 平均去除率分别为 94.47%、93.31% 和 94.75%。在第 49—77 天内,通过厌氧开始 5 min 和厌氧结束(即 2 h 出水)COD 浓度比较可得,A 和 B 反应器在厌氧段前后的平均 COD 去除率分别达 28.08% 和 27.29%,而 C 号达到 55.17%。可能是 C 号 SBR 内长期残留有  $\text{NO}_3^-$ ,致使其在厌氧段前后平均 COD 去除率较高,推测投加具有 B8 进入 SBR 内会免除部分非聚磷菌与反硝化聚磷菌在厌氧段对碳源的竞争<sup>[17]</sup>,同时也可抑制 SBR 内反硝化细菌生长和间接促进活性污泥内聚磷菌繁殖。在第 49—77 天内,A、B 与 C 号 SBR 的  $\text{NO}_3^-$  平均去除率分别为 61.62%、68.58% 与 26.72%。在第 62—77 天内,A、B 与 C 号 SBR 的 TP 平均去除率分别为 53.66%、55.45% 与 46.61%。在外加菌 B8 作用下,A 和 B 系统的除磷强化效果分别为 7.05% 和 8.84%。

### 2.2 投菌强化 SBR 脱氮除磷特性

#### 2.2.1 SBR 脱氮除磷过程分析

由图 1(a)、(c)、(e)可知,在运行温度 26 °C 的第 45 天内,A、B、C 系统均未表现出 DNPAOs 除污特征,其生物除磷率分别为 29.37%、31.03% 和 26.24%,由图 1(b)、(d)可知,在运行温度 26.5 °C 的第 77 天内,A、B 系统 SBR 表现出明显 DNPAOs 除污特征,其生物除磷率分别为 32.07%、35.20%,缺氧段硝态氮去除率均达到 100%,而 C 系统的生物除磷率为 16.76%,硝态氮去除率为 23.74%。第 45 天的 SBR 运行对应第一投菌阶段驯化效果,第 77 天的 SBR 运行对应第二投菌阶段驯化效果。由此判断第一投菌阶段驯化效果较差,原因可能是 4 h 持续曝气促使 B8 菌(摇床振荡培养所得)自溶进而导致 SBR 强化失败。另外,虽然强化后期 DNPAOs 在 A 号和 B 号 SBR 的活性污泥内得到引入和富集,但其并没有完全抑制反硝化细菌的生长致使其内投加的硝态氮盐并没有完全被 DNPAOs 运用除磷。因此推测未投菌的 C 系统脱氮除磷途径包含有:活性污泥吸附、同化型氮、磷物质吸收转化为细胞物质和活性污泥内源性反硝化聚磷菌脱氮除磷。而投 B8 菌强化 A 号和 B 号 SBR 脱氮除磷途径有:活性污泥和呈黏性 B8 菌壁吸附、同化脱氮除磷、内源性反硝化除磷、外源性 B8 菌株反硝化除磷和因 B8 外源菌的引入促成污泥菌群内反硝化聚磷菌繁殖正激发效应,另外在 B 系统中还存在菌剂载体吸附途径。

#### 2.2.2 投菌强化 SBR 系统缺氧除磷动力学特征

从表 3 的拟合结果可以看出,表中所列前 2 组菌剂强化典型周期的拟合决定系数  $R^2$  均可达到 0.99 以上,拟合方程可以较好描述 A 号液态型 DNPAOs-SBR 和 B 号干粉型 DNPAOs-SBR 在缺氧阶段的 TP 吸收过程,其均符合一阶指数衰减模式。从表 3 可得,在第 65 天运行时,投加液体菌剂和干粉菌剂的吸磷速率相近,其  $K_p$  分别为 1.2658 和 1.0934;在第 71 天下运行时,投加干粉菌剂吸磷速率较快,其  $K_p$  为 2.0379,投加液体菌剂吸磷速率较慢,其  $K_p$  为 1.2584,推测原因是:(1) B 系统投菌量较于 A 号稍多(5%—8%),(2) 在第 71 天时比较观察得 B 系统部分干粉菌剂载体和活性污泥的团聚,从而降低 B8 菌种流失量和提高 B 系统吸磷速率。王建芳曾报道过液态 EM 菌强化 SBR 除污效果下降主要原因是菌种流失<sup>[18]</sup>,投加干粉菌剂可以有效避免此问题。在第 77 天时,拟合方程的决定系数  $R^2$  值较小,动力学方程不能准确表征 TP 变化过程,因为在此时期水质有波动造成 TP 去除过程的指数衰减模型的拟合有效性降低。

### 2.3 投菌强化 SBR 系统微生物学特性分析

#### 2.3.1 SBR 系统细菌计数

活性污泥振荡混合液中能够生长在聚磷菌专性培养基的菌落数量见表 4,在第 66 天时投加液体菌剂和干粉菌剂的 SBR 活性污泥内聚磷菌数量相近,第 75 天时投加干粉菌剂 B 系统活性污泥内则含有更多聚磷菌,这也与上述“第 65 天时 A 系统吸磷速率  $K_p$  和 B 系统的  $K_p$  相近;第 71 天时 B 系统的  $K_p$  大于 A 系统的  $K_p$ ”的拟合结果相对应。

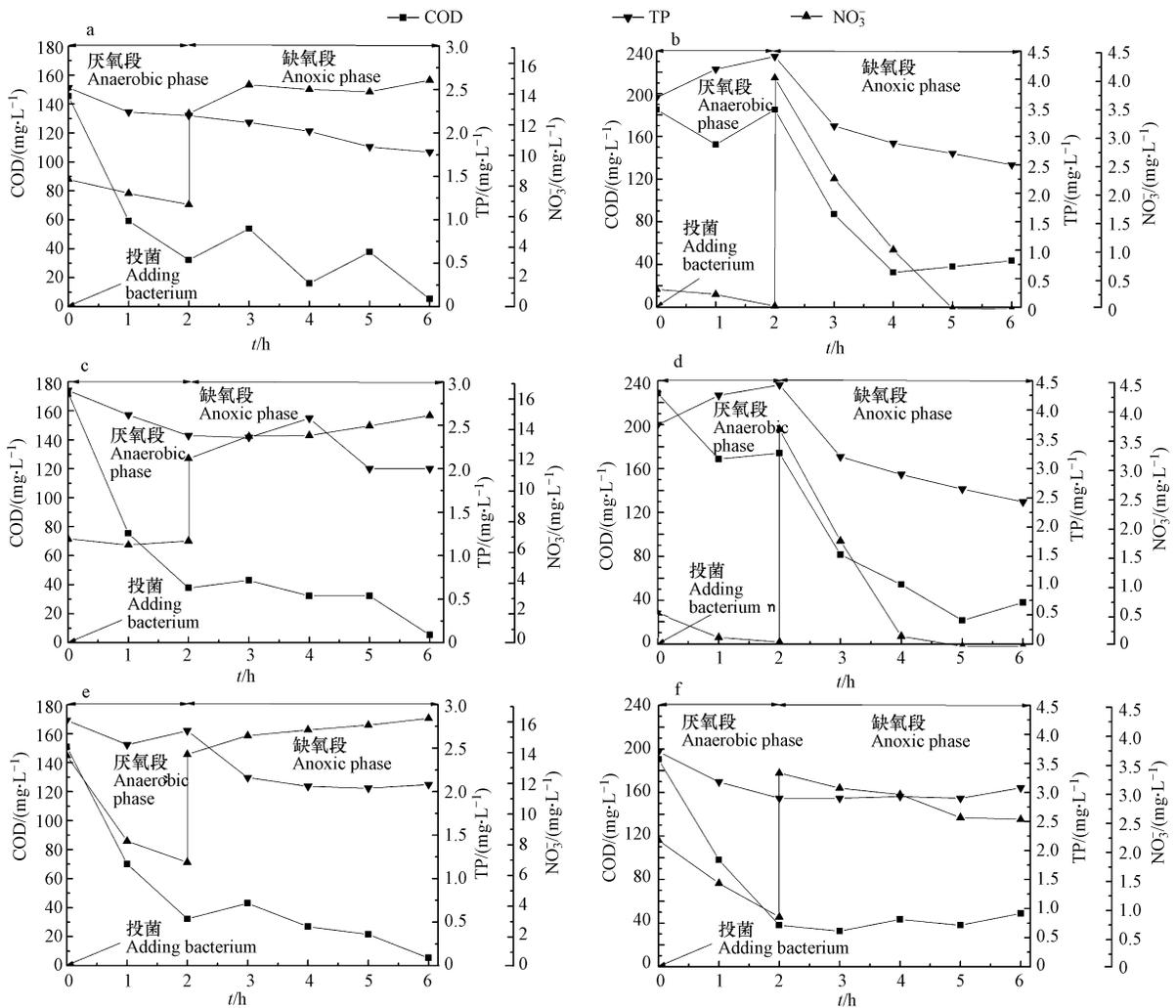


图1 投加液体型菌剂(a)、干粉型菌剂(c)及对照系统(e)在第45个周期内和投加液体型菌剂(b)、干粉型菌剂(d)及对照系统(f)在第77个周期内 COD、TP、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的浓度变化

Fig.1 Change of COD, TP and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations in the liquid agent addition (a), powder agent addition (c), control system (e); during the 45th cycle, and liquid agent addition (b), powder agent addition (d), control system (f) during the 77th cycle

表3 TP 去除过程的指数衰减动力学方程

Table 3 Data fitting of TP removal process with exponential decay equation

时间 Time/d	水温 Temperature / °C	反应器编号 Serial number	动力学方程 Kinetic equation	决定系数 Determination coefficient $R^2$	相关系数 Correlation coefficient $P$	动力学系数 Kinetic coefficient $K_p$
65	31	A	$S = 3.1270 + 1.3910e^{-1.2658(t-0.0060)}$	0.9989	0.00367	1.2658
		B	$S = 3.3882 + 1.4200e^{-1.0934(t+0.0200)}$	0.9921	0.00874	1.0934
		C	—	—	—	—
71	27	A	$S = 2.5896 + 1.6283e^{-1.2584(t+0.0098)}$	0.9964	0.00857	1.2584
		B	$S = 2.3555 + 2.6253e^{-2.0379(t+0.0050)}$	0.9951	0.01666	2.0379
		C	—	—	—	—
77	26.5	A	$S = 2.5410 + 1.8941e^{-0.9679(t+0.0259)}$	0.9664	0.02826	0.9679
		B	$S = 2.4443 + 1.9679e^{-0.8500t}$	0.9790	0.00076	0.8500
		C	—	—	—	—

$S$  为 TP 质量浓度,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $t$  为缺氧时间 (h);  $R^2$  为决定系数, 无量纲, 其值越接近 1, 表明拟合结果越好;  $P$  为相关系数, 无量纲, 当  $P \leq 0.01$ , 表明相关性显著; 样本数为 5. — 代表  $R^2$  过低, 无法拟合.  $S$  is the concentration of TP,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $t$  is the time of anoxic phase, h;  $R^2$  is non dimensional coefficient of determination, the  $R^2$ -value below 0.01 indicated that correlation was significant; sample number is 5. The symbol of “—” represents the  $R^2$ -value is too low, it also indicated that the value unable to fit.

表 4 SBR(A、B、C)系统的活性污泥内聚磷菌数量变化

Table 4 Variation of phosphorus accumulating microbepopulation in the activated sludge during operation process

天数 Days/d	反应器编号 Serial number	菌数 Biomass( $\times 10^5$ )/(cfu·mL <sup>-1</sup> )			平均菌数/偏差 Mean biomass/deviation ( $\times 10^5$ )/(cfu·mL <sup>-1</sup> )
66	A	7.60	9.40	8.70	8.57/0.91
	B	7.40	7.90	8.40	7.90/0.50
	C	0.07	0.07	0.07	0.07/0.00
75	A	10.20	8.20	9.20	9.20/1.00
	B	15.90	14.30	15.20	15.13/0.80
	C	0.34	0.31	0.29	0.31/0.03

## 2.3.2 SBR 系统优势菌分离及鉴定

挑取 SBR 活性污泥内能生长于专性聚磷菌培养基菌落经 3 次分离纯化,共筛得 6 株菌株,其均为革兰氏阴性菌,它们在 SBR 内占优势,分别编号为 SBR-A-1、SBR-A-2、SBR-B-3、SBR-B-4、SBR-C-5、SBR-C-6,并作为进一步研究对象。

对 SBR-A-1、SBR-A-2、SBR-B-3、SBR-B-4、SBR-C-5、SBR-C-6 进行 DNA 提取、PCR 扩增及测序,并将各菌株序列提交至 GenBank 中进行 BLAST,与已知有代表性进行比对,构建系统进化树,结果如图 2 所示。

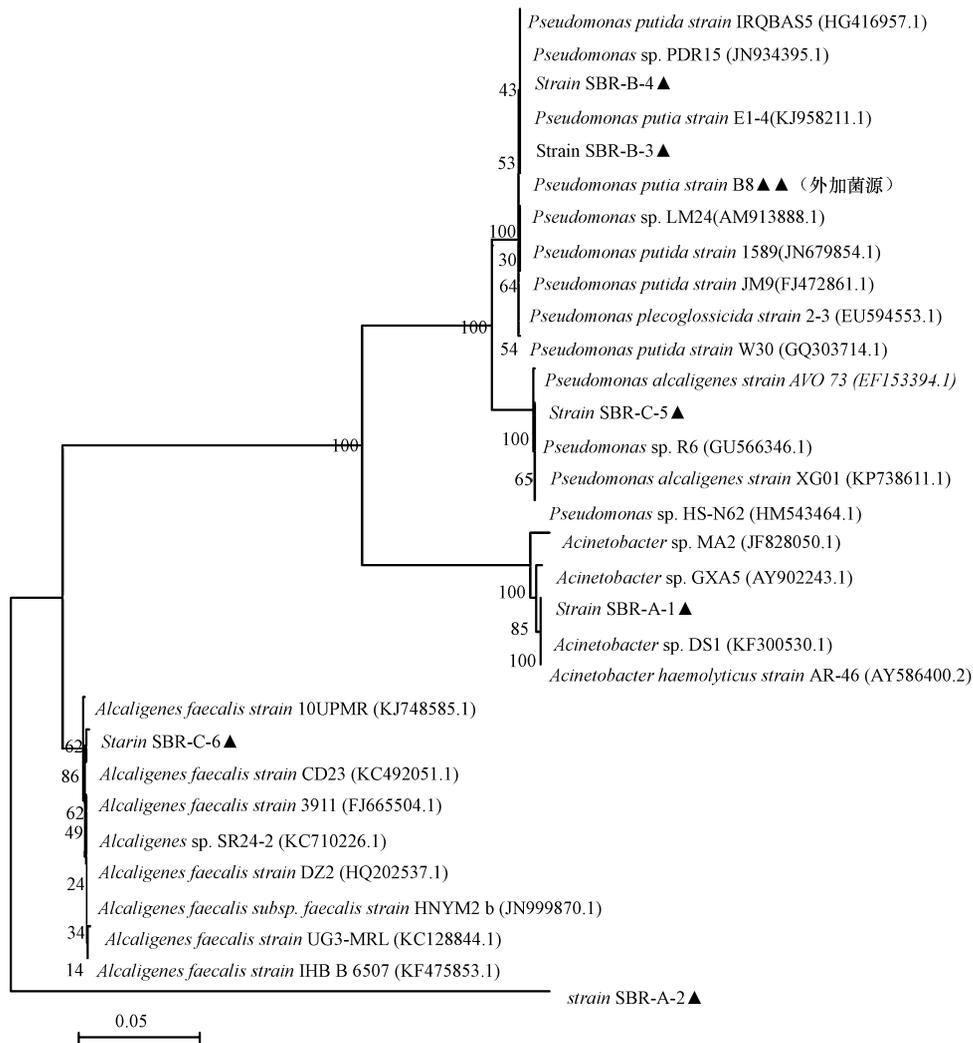


图 2 SBR 系统中 6 株优势菌的 16S rDNA 序列与 GenBank 中最相似序列的系列进化树

Fig.2 A series of 16S rDNA sequence and phylogenetic tree of 6 dominant bacteria in the SBR system and GenBank bacteria in the most similar sequence

同源性分析及系统进化表明,SBR-A-1 鉴定为溶血不动杆菌(*Actinetobacter haemolyticus*),SBR-A-2 和 SBR-C-6 均鉴定为粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*),SBR-B-3 和 SBR-B-4 均鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),SBR-C-5 鉴定为产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*),其中 SBR-B-3、SBR-B-4 与外加菌源 B8 亲缘关系较近。

根据 SBR 细菌分布情况观察,A 和 B 系统中占优势菌类依次是溶血不动杆菌、恶臭假单胞菌和粪产碱菌;作为对比的未投菌 C 系统中占优势菌类依次是溶血不动杆菌、粪产碱菌和产碱假单胞菌,且其内恶臭假单胞菌数量较少.Meltem Sarioglu 提出有着较高除磷能力的主要菌种就是不动杆菌属和假单胞菌属<sup>[9]</sup>。根据所构建的种属进化树和 C 系统活性污泥内恶臭假单胞菌数量较少,推断外源性恶臭假单胞菌 B8 投加入 A、B 系统内经过长时间驯化培养进化成为恶臭假单胞菌 SBR-B-3 和 SBR-B-4。通过遗传学角度和对应 SBR 运行水质分析证实 B8 菌可在 A 和 B 系统内生长富集并促进了典型聚磷菌—不动杆菌 SBR-A-1 的繁殖。

在外源菌 B8 与活性污泥构成污水处理系统内优势类群对整个微生物群落摄取污染物类型和生长代谢模式起关键性作用。在实验中投加外源菌 B8 相对于活性污泥初始菌群属于入侵菌种,将其引入活性污泥后使 B8 在 SBR 内得以繁殖,这促进了与 B8 核苷酸序列同源性较一致的内源菌群生长,造成投菌强化 SBR 与未投菌 SBR 除污过程不一致。小型污水处理系统中的微生物群落对入侵种并没有很强的抵抗力,这与贺纪正的研究结果不一致<sup>[19]</sup>,究其原因推测为污水处理系统中微生物群落与正常自然环境下微生物群落相比,污水处理系统中微生物群落的物种多样性程度较低,其降低微生物群落对入侵种的抵抗力。

### 3 结论(Conclusion)

(1) 将 B8 菌液和干粉菌剂分别引入 SBR,构成液态型 DNPAOs-SBR 系统 A 和干粉型 DNPAOs-SBR 系统 B,以不接菌的 SBR 系统 C 为对照,在第 45—77 天内,A、B 与 C 号 SBR 处理系统 COD 平均降解率均达 90%。第 49—77 天内,A 与 B 系统的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 平均强化去除率分别为 34.90% 和 41.86%。第 62—77 天内,A 与 B 系统的 TP 平均强化去除率分别为 7.05% 和 8.84%。DNPAOs-SBR 较于未投菌的 SBR 有更优脱氮除磷效果,第 65—71 天内指数拟合分析表明 DNPAOs-SBR 在缺氧段 TP 降解过程符合一阶指数衰减。

(2) 通过分离纯化,从 SBR 内筛得 6 株菌株,分别命名为 SBR-A-1、SBR-A-2、SBR-B-3、SBR-B-4、SBR-C-5、SBR-C-6,经过 DNA 提取、PCR 扩增、双向测序拼接和系统发育树构建,确定其种属分别为溶血不动杆菌、粪产碱菌、恶臭假单胞菌、恶臭假单胞菌、产碱假单胞菌、粪产碱菌,其中 SBR-B-3、SBR-B-4 与外加菌源 B8 亲缘关系较近。根据 SBR 细菌分布情况观察,液态型和干粉型 DNPAOs-SBR 中占优势菌类依次是溶血不动杆菌、恶臭假单胞菌和粪产碱菌;而未投菌 SBR 占优势菌类依次是溶血不动杆菌、粪产碱菌和产碱假单胞菌。投加 B8 菌在液态型 DNPAOs-SBR 和干粉型 DNPAOs-SBR 内可生长富集并促进了典型聚磷菌—不动杆菌 SBR-A-1 繁殖。本研究可为 SBR 生物强化脱氮除磷工艺设计与设施运行提供参考。

#### 参考文献(References)

- [1] LIU Y, MAITE P J, YUAN Z G. The effect of free nitrous acid on key anaerobic processes in enhanced biological phosphorus removal systems[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 130:382-389.
- [2] KAPAGIANNIDIS A G, ZAFIRIADIS I, AIVASIDIS A. Comparison between aerobic and anoxic metabolism of denitrifying-EBPR sludge: Effect of biomass poly-hydroxyalkanoates content[J]. *New Biotechnology*, 2013, 30(2):227-236.
- [3] 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):2711-2715.  
MA F, YANG F F, LI A, et al. Biological characteristics of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(9):2711-2715(in Chinese).
- [4] 刘立, 汤兵, 黄绍松, 等. 反硝化聚磷菌快速富集、培养及其荧光原位杂交技术鉴别[J]. *环境科学*, 2013, 34(7):2869-2875.  
LIU L, TANG B, HANG S S, et al. Rapid enrichment and cultivation of denitrifying phosphate-removal bacteria and its identification by fluorescence *in situ* hybridization technology[J]. *Environmental Science*, 2013, 37(7):2869-2875(in Chinese).

- [ 5 ] TSUNEDA S, OHNO T, SOEJIMA K, et al. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal using denitrifying phosphate-accumulating organisms in a sequencing batch reactor[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006,27:191-196.
- [ 6 ] TSUNEDA S, MIYAUCHI R, OHNO T, et al. Characterization of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge based on nitrite reductase gene[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005,99(4):403-407.
- [ 7 ] CARVALHO G, LEMOS C P, OEHMEN A, et al. Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure [J]. *Water Research*, 2007,41(19):4383-4396.
- [ 8 ] LIU S L, LI J Z. Accumulation and isolation of simultaneous denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in an improved sequencing batch reactor system at low temperature[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015,100:140-148.
- [ 9 ] SARIOGLU M. Biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor by using pure culture[J]. *Process Biochemistry*, 2005,40(5):1599-1603.
- [ 10 ] WANG Y Y, GUO G, WANG H, et al. Long-term impact of anaerobic reaction time on the performance and granular characteristics of granular denitrifying biological phosphorus removal systems[J]. *Water Research*, 2013,47(14):5326-5337.
- [ 11 ] MIAO Z J, ZENG W, WANG S Y, et al. Effect of temperature on anoxic metabolism of nitrites to nitrous oxide by polyphosphate accumulating organisms [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014,26(2):264-273.
- [ 12 ] WANG Y Y, ZHOU S, WANG H, et al. Comparison of endogenous metabolism during long-term anaerobic starvation of nitrite/nitrate cultivated denitrifying phosphorus removal sludges[J]. *Water Research*, 2015,68:374-386.
- [ 13 ] 潘杨, 阮文权, 黄勇, 等. 序批式活性污泥(SBR)转移工艺的除磷机制[J]. *环境化学*, 2015,34(7):1329-1334.  
PAN Y, RUAN E Q, HUANG Y, et al. Phosphorus removal mechanism of the sludge-shifting SBR process[J]. *Environmental Chemistry*, 2015,34(7):1329-1334(in Chinese).
- [ 14 ] 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.  
ZHANG W Y, CHEN J, DEN W, et al. Preparation of denitrifying phosphorus accumulating bacterial seed liquid and analysis of phosphorus removal mechanism[J]. *Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering*, 2014,36(6):99-105(in Chinese).
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] 国家环境保护总局. 水和废水检测分析方法(第4版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.  
State Environmental Protection Administration. Detection and analysis of water and wastewater (Fourth Edition) [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002(in Chinese).
- [ 17 ] ZHENG X L, SUN P D, HAN J Y, et al. Inhibitory factors affecting the process of enhanced biological phosphorus removal (EBPR)-A mini-review[J]. *Process Biochemistry*, 2014,49(12):2207-2213.
- [ 18 ] 王建芳, 赵庆良, 张雁秋, 等. 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 J F, ZHAO Q L, ZHANG Y Q, et al. 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).
- [ 19 ] 贺纪正, 李晶, 郑袁明. 土壤生态系统微生物多样性-稳定性关系的思考[J]. *生物多样性*, 2013,21(4):411-420.  
HE J Z, LI J, ZHENG Y M. Thoughts on the microbial diversity-stability relationship in soil ecosystems[J]. *Biodiversity Science*, 2013,21(4):411-420(in Chinese).