

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017.05.2016072901

陈晶, 陈萍, 邓文, 等. 反硝化聚磷菌 B8 干粉菌剂的制备及应用[J]. 环境化学, 2017, 36(5): 1148-1155.

CHEN Jing, CHEN Ping, DENG Wen, et al. Preparation and application of denitrifying polyphosphate accumulating microorganisms B8 powders [J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(5): 1148-1155.

反硝化聚磷菌 B8 干粉菌剂的制备及应用*

陈晶^{1,2,3} 陈萍¹ 邓文¹ 周新程¹ 张文艺^{1**}

(1. 常州大学环境与安全工程学院, 常州, 213164; 2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 海洋生物与碳汇研究中心, 青岛, 266101; 3. 中国科学院大学, 北京, 100049)

摘要 为获得反硝化聚磷菌(DNPAOs)干粉菌剂,以反硝化聚磷菌 B8 液态菌剂为菌种来源,以麦麸、玉米干粉混合物作为载体,以牛肉膏蛋白胨培养基为发酵液,进行增菌培养.在麦麸、玉米干粉载体配比(W/W)为 85%:15%,投菌液量为 4 mL·g⁻¹干粉,发酵液用量为 4 mL·g⁻¹干粉的条件下制得干粉菌剂.其使用效果为:①当主要污水处理因子为硝酸盐氮时,干粉菌剂成品的最佳发酵液 pH 值为 5.5,该菌剂对化学需氧量、硝酸盐氮和总磷的去除率可达 43.26%、92.76%和 65.77%;②当主要处理因子为总磷时,则同等条件下所制得的干粉菌剂成品的最佳发酵液 pH 值为 6.5,该菌剂对化学需氧量、硝酸盐氮和总磷的去除率可达 44.41%、56.21%和 87.30%.扫描电镜显示 B8 菌株附着于菌剂载体上,吸收培养液的营养用于繁殖生长及发酵,干燥后 B8 可固定于载体上,再将其投放于待处理废水中即可发挥其菌效.

关键词 反硝化聚磷菌, 干粉菌剂, 脱氮除磷.

Preparation and application of denitrifying polyphosphate accumulating microorganisms B8 powders

CHEN Jing^{1,2,3} CHEN Ping¹ DENG Wen¹ ZHOU Xincheng¹ ZHANG Wenyi^{1**}

(1. School of Environment & Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou, 213164, China;

2. Research Center for Marine Biology and Carbon Sequestration, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266101, China;

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

Abstract: To obtain dry microbial inoculums powder of denitrifying phosphate accumulating organisms (DNPAOs), denitrifying phosphate accumulating bacterial B8 in inoculums solution was cultured in this study. The mixture of wheat bran and corn powder was used as the carrier for B8, and the beef extract peptone was employed to be the fermentation broth for bacteria B8. The dry inoculums powder of DNPAOs was successfully prepared at the wheat bran to corn powder ratio of 85:15, the inoculums solution to the carrier ratio of 4 mL·g⁻¹ and the fermentation broth to carrier ratio of 4 mL·g⁻¹. The prepared dry microbial inoculums powder was used to improve the remove efficiencies of COD, NO₃-N and total P during the treatment of wastewater. When the pollutant was NO₃-N, the optimum fermentation broth pH of dry microbial inoculums powder was 5.5, and the efficiencies of COD, NO₃-N and total P were 43.26%, 92.76% and 65.77%, respectively. When

2016年7月29日收稿(Received: July 29, 2016).

* 国家自然科学基金(41571471),江苏省和常州市科技支撑项目(BE2016653, WS201621)资助.

Supported by The National Natural Science Foundation of China (41571471), Science and Technology Project of Jiangsu Province and Changzhou City (BE2016653, WS201621).

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

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

the pollutant was total P, the optimum fermentation broth pH of dry microbial inoculums powder was 6.5, and the efficiencies of COD, $\text{NO}_3\text{-N}$ and total P were 44.41%, 56.2% and 87.30%, respectively. Scanning electron microscope images revealed that the bacterial B8 was attached to the carrier, and absorbed nutrients from the culture solution for reproduction, growth and fermentation. The bacterial B8 was immobilized at the carrier in the dry microbial inoculums powder, which would play role in improving the efficiency of wastewater treatment when put it into the wastewater. This study provided a theoretical and technical reference for the microbial inoculums preparation of denitrifying phosphorus accumulating organisms, and the further removal of nitrogen and phosphate in effluent from wastewater treatment plant.

Keywords: denitrifying poly-phosphate accumulating microorganisms (DNPAOs), bacterial powder, denitrification and dephosphorization.

近年来,污染控制型微生物菌剂开发日益受到重视^[1-5],尤其是氮、磷排放要求的提高,使得一些城市污水处理厂不断追求高效生物脱氮、除磷技术工艺,也使反硝化聚磷菌(DNPAOs)研究开发成为热点。反硝化聚磷菌是一类在厌氧环境中吸收碳源将其储藏为多聚 β 氢氧丁酸盐颗粒,同时菌体内的多聚磷酸盐(Poly-P)分解,并将磷释放到水体中的微生物;而在缺氧/好氧环境中,其以硝态氮或分子氧为电子受体超量吸磷^[6-10]。反硝化聚磷菌的新陈代谢、生长繁殖的生命过程,可使污水中的硝态氮转化成氮气,磷通过排除剩余污泥而从污水中去除。

国内外有关菌剂制备及应用等研究方兴未艾。如 Sprocati 等研制用于柴油和重金属共同污染土壤治理菌剂,从长期污染土壤内筛选出具有烃降解能力的菌株组合制成 ENEALAMOSS 菌剂,将此菌剂投加到柴油和重金属共同污染土壤内可使其内烃降解率达 75%^[1];Nalini 和 Parthasarathi 针对悬钩子沙雷菌(*Serratia rubidaea*) SNAO2 固体发酵生物控制剂产生的鼠李糖脂特征和应用进行研究,得出将 SNAO2 接种至紫荆木属的 mahua 可以有效促使其分泌鼠李糖脂来杀死植物病原菌,制得环保、廉价的生物控制剂^[2];郭建等将 15 mL 克雷伯氏菌属的氯噻磺隆降解菌 2N3(*Klebsiella jilinsis*) 菌液接种至麦麸、木屑、玉米粉、稳定剂的混合载体上(载体配比为 80:10:5:5),同时添加 10 mL 营养液后发酵 36 h,再对其进行 35 °C 烘干制得降解氯噻磺隆微生物菌剂,其氯噻磺隆降解率可达 85.3%^[11]。干粉菌剂具有减少运输成本和易于市场推广等优点,目前 DNPAOs 的微生物干粉菌剂研制尚处于实验室开发阶段,鲜见批量化生产和商品化应用报道。

本团队在前期研究中,已筛得 1 株反硝化聚磷菌(B8),并制备菌剂种子液^[12],投加到水平潜流式人工湿地,对常州市城北污水处理厂尾水强化脱氮除磷取得了较好的应用效果^[13]。由于该菌剂种子液的剂型属于液态,液态菌剂存在不便于运输、保质期短和施用工艺复杂、人工成本较高等不足。因此,本研究以 B8 为研究对象,优化干粉菌剂制备的工艺条件,即考察投菌量、载体成分组成、发酵液类型及用量和初始 pH 对干粉菌剂菌效的影响,利用扫描电子显微镜对 DNPAOs 干粉菌剂成品和空白载体进行形貌观察,并将其加入无菌人工配制废水考察总磷、硝酸盐氮和 COD 的去除效果,以期 DNPAOs 干粉菌剂制备技术提供实验数据和技术支持。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 培养基

每升 PAM 培养液:(NH_4)₂SO₄ 2.75 g, Na₂HPO₄ 3.06 g, KH₂PO₄ 3 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, CaCl₂ 0.25 g, 柠檬酸钠 4.0 g, NaCl 2.5 g, 蔗糖 0.01 g^[14]。

每升牛肉膏蛋白胨培养基:蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, pH 7.2—7.4^[15]。

每升酵母浸出汁:酵母膏 5 g。

灭菌条件:1.03×10⁵ Pa, 121 °C, 20 min。

1.2 废水水质

实验用水为人工配制废水,具体成分为:乙酸钠 300 mg、NH₄Cl 14 mg、Na₂HPO₄ 100 mg、MgSO₄

45 mg、NaCl 18 mg、CaCO₃ 40 mg、KNO₃ 250 mg、蒸馏水 1000 mL。实验用水水质如表 1 所示。

表 1 实验用水水质

Table 1 Quality of experimental water

指标 Index	COD/(mg·L ⁻¹)	TP/(mg·L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ -N/(mg·L ⁻¹)
范围 Range	101.33—186.67	9.60—18.60	3.91—5.48
平均值 Average value	152.29	11.87	5.02

1.3 B8 干粉菌剂制备方法

以 B8 种子液作为对象制备干粉菌剂,制备菌剂基本操作:取适量在 30 ℃、120 r·min⁻¹、初始 pH 6.5 条件下培育 20 h 得到的高含量 Poly-P 颗粒的 B8 种子液(活菌数为 6.25×10⁷—8.55×10⁷ cfu·mL⁻¹),再 3800 r·min⁻¹离心 16 min 后获得 B8 菌种,再用无菌生理盐水清洗 3 次,使用 20 mL 发酵液与 2 mL PAM 培养液的混合液重悬后,将其倒入用球磨机粉碎、再过筛(200 目)的 5 g 载体固体摇晃发酵 8 h (130 r·min⁻¹, 35 ℃),最后将其置于盖有 8 层纱布的培养皿内干燥(温度设为 20 ℃)至含水率低于 10%。

1.4 B8 干粉菌剂制备条件优化

每次实验前配制人工模拟废水,并且对其高压湿热灭菌,冷却后备用。用 B8 干粉菌剂在摇瓶内脱氮除磷应用,考察不同条件(投菌量、载体组成、发酵液类型和用液量、发酵液 pH)对 B8 干粉菌剂的磷和硝酸盐氮去除效果。

1.4.1 投菌量

分别取 0、10、20、30、40、50 mL 的在 30 ℃、120 r·min⁻¹、初始 pH 6.5 条件下培育 20 h 得到的高含量 Poly-P 颗粒的 B8 种子液,分别对其 3800 r·min⁻¹离心 16 min 后获得 B8 菌种,再用无菌生理盐水清洗 3 次使用 20 mL 酵母浸出汁与 2 mL PAM 培养液的混合液(pH 5.5)重悬后倒入过筛的 5 g 载体(具体组成为灭菌后的麦麸 4.25 g,玉米粉 0.75 g)进行固体摇晃发酵 8 h(130 r·min⁻¹, 35 ℃),最后将其置于盖有 8 层纱布的培养皿内干燥(温度 20 ℃)至含水率低于 10%,即制得菌剂成品,并对每个样品进行菌落计数。将 1 g 菌剂成品投入 100 mL 人工模拟废水,3 h 厌氧-12 h 缺氧处理。待投菌运行处理后取水样,再将水样离心取液,分别测定上清液中 COD_{Cr}、TP、NO₃⁻-N 含量,最后计算化学需氧量、除磷率和硝酸盐氮去除率且绘制成图。

1.4.2 载体组成

制备 B8 种子液且离心获得菌种,清洗和重悬后倒入过筛的 5 g 载体(灭菌处理后 W_{麦麸}:W_{玉米粉} 组成分别为 75%:25%、80%:20%、85%:15%、90%:10%、95%:5%、100%:0%)固体摇晃发酵 8 h,最后将其干燥(20 ℃)至含水率低于 10%,即制得菌剂成品,并对每个样品进行菌落计数。将 1 g 菌剂成品投入 100 mL 人工模拟废水中,3 h 厌氧-12 h 缺氧处理。待投菌运行处理后取水样,再将水样离心取液,分别测定上清液中 COD_{Cr}、TP、NO₃⁻-N 含量。

1.4.3 发酵液类型和用液量

制备 B8 种子液且离心获得菌种,清洗后使用 20 mL 酵母浸出汁或 5、10、15、20、25、30 mL 牛肉膏蛋白胨培养基与 2 mL PAM 培养液的混合液(pH 5.5)重悬后倒入过筛的载体固体摇晃发酵 8 h,最后将其干燥(20 ℃)至含水率低于 10%,即制得菌剂成品,并对每个样品进行菌落计数。将 1 g 菌剂成品投入 100 mL 人工模拟废水中 3 h 厌氧-12 h 缺氧处理。待投菌运行处理后取水样,再将水样离心取液,分别测定上清液中 COD_{Cr}、TP、NO₃⁻-N 含量。

1.4.4 发酵液 pH

制备 B8 种子液且离心获得菌种,清洗后使用 20 mL 牛肉膏蛋白胨培养基与 2 mL PAM 培养液的混合液(pH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)重悬后,倒入过筛的载体固体摇晃发酵 8 h,最后将其进行干燥至含水率低于 10%,即制得菌剂成品,并对每个样品进行菌落计数。将 1 g 菌剂成品投入 100 mL 人工模拟废水中 3 h 厌氧-12 h 缺氧处理。待投菌运行处理后取水样,再将水样离心取液,分别测定上清液中 COD_{Cr}、TP、NO₃⁻-N 含量。

1.5 扫描电镜样品制备方法

将过 200 目筛的菌剂成品和无菌载体均匀添加 2.5% 的戊二醛在 4 °C 下固定 3 h, 待其蒸干后即制得扫描电镜样品. 在置物盘粘上碳导电双面胶带, 将扫描电镜样品粘至胶带上, 然后在胶带边缘涂上导电银浆以连接样品与载物盘, 待银浆干燥完毕, 再进行蒸金处理后, 即可上样拍摄扫描电镜照片.

1.6 分析测定方法

(1) 水质分析方法采用《水和废水监测分析方法》(第四版)^[16], 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_3^- -N 测定采用酚二磺酸分光光度法.

(2) 干粉菌剂的活菌数测定采用 PAM 培养基平板涂布计数法.

(3) B8 干粉菌剂样品形貌观察采用扫描电镜.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 B8 干粉菌剂制备条件优化分析

2.1.1 投菌量优化分析

由图 1 及图 2 可以看出, 随接种菌液量的增加, 菌剂活菌数也随之增加. 在不接种菌液时, 无菌载体对 TP、 NO_3^- -N、COD 的吸附平均去除率分别为 9.26%、11.11%、51.84%, 这主要是由于无菌载体微粒有较大的比表面积, 有一定的吸附作用所致. 随接种菌液量的增长, 干粉菌剂对 TP、 NO_3^- -N、COD 的平均去除率也在增加, 但当接种菌液量为 20 mL 时, 平均除 TP 率达到峰值为 32.03%, 而 NO_3^- -N、COD 的平均去除率分别为 42.91% 和 64.12%. 随后干粉菌剂对 TP 平均去除率随接种菌液量增加而降低, 对 NO_3^- -N 平均去除率稳定于 39.44% 左右. B8 干粉菌剂对碳源摄取量(即 COD 去除能力)随着投菌液量的增加呈线性上升. 另外, 通过单一样本 *t* 检验分析, 得出单一条件的不同处理下的 TP 和 NO_3^- -N 平均去除率变化具有差异性 ($P < 0.05$). 结果表明, 投菌量过少会减少菌剂载体吸附的 B8 菌数量, 而投菌量过多, 则有限营养会限制和削弱 B8 干粉菌剂除磷能力, 因此针对 20 mL 酵母浸出汁与 2 mL PAM 的混合液 (pH 5.5) 混入 5 g 载体(具体组成为灭菌后的麦麸 4.25 g, 玉米粉 0.75 g) 所制得的干粉菌剂成品最佳投菌液量为 20 mL, 即投菌液量为 $4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 干粉.

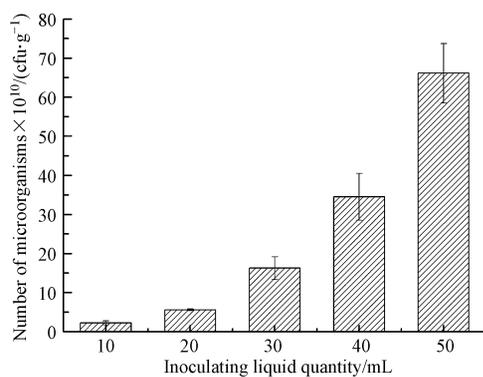


图 1 接种菌液量对菌剂活菌数的影响

Fig.1 Effects of inoculating liquid quantity on bacteria number by microorganism agent

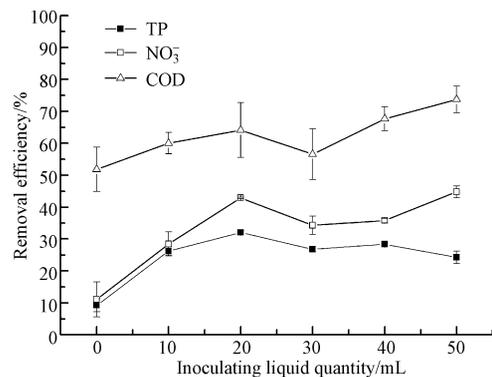


图 2 接种菌液量对菌剂除污效果的影响

Fig.2 Effects of inoculating liquid quantity on decontamination by microorganism agent

2.1.2 载体配比优化分析

由图 3 及图 4 可以看出, 随着麦麸和玉米粉载体配比的增大, 菌剂活菌数在载体配比为 85%:15% 时达到峰值; 麦麸和玉米粉的比例会影响 B8 干粉菌剂脱氮除磷的效果, 其中 TP、 NO_3^- -N 平均去除率随着麦麸成分的递增呈现先上升后下降的趋势, 而 COD 平均去除率受麦麸和玉米粉比例影响不显著. 当麦麸和玉米粉载体配比为 85%:15% 时, B8 干粉菌剂针对人工配制废水的 TP 平均去除率达到峰值 31.65%, 此时其 NO_3^- -N、COD 平均去除率分别为 35.76% 和 59.65%. 当麦麸和玉米粉载体配比为 90%:10% 时, B8 干粉菌剂针对人工配制废水 NO_3^- -N 平均去除率达到峰值 35.95%, 此时其 TP、COD 平均

去除率分别为 26.01% 和 72.97%。通过单一样本 t 检验分析, 得出单一条件不同处理下的 TP 平均去除率变化 ($P < 0.05$) 和 NO_3^- -N 平均去除率变化 ($P < 0.01$) 均具有差异性。考虑到研制 B8 干粉菌剂后续将运用于外环境中, 废水内 COD 易于被其它种属微生物吸收, 因此针对于 20 mL 投菌液量、20 mL 酵母浸出汁与 2 mL PAM 的混合液 (pH 5.5) 混入 5 g 载体所制得的干粉菌剂成品最佳载体配比为 85%:15%。

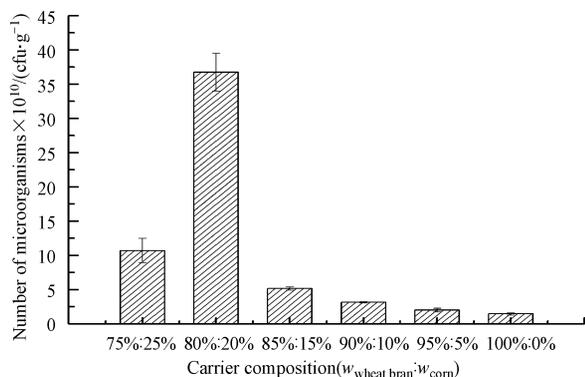


图 3 载体配比对菌剂活菌数的影响

Fig.3 Effects of carrier composition on bacteria number by microorganism agent

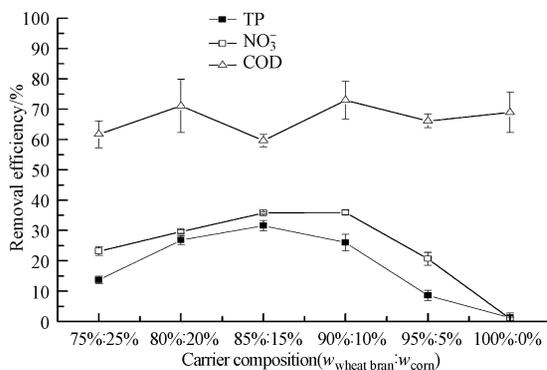


图 4 载体配比对菌剂除污效果的影响

Fig.4 Effects of carrier composition on decontamination by microorganism agent

2.1.3 发酵液类型和用量优化分析

发酵液类型对菌剂上吸附的活菌数以及其脱氮除磷效果的影响见表 2。由表 2 可知, 当发酵液由纯酵母浸出液更换为牛肉膏蛋白胨培养基后, 其对载体吸附的活菌数具有提高作用 (发酵液为酵母浸出液时, 体系活菌数为 $5.15 \times 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$; 发酵液为牛肉膏蛋白胨时, 体系活菌数为 $6.33 \times 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$), 也极大地提高了 TP 和 NO_3^- -N 去除率。虽然发酵液采用牛肉膏蛋白胨培养基后, 初始投菌时引起了 NO_3^- -N 和 COD 分别升高了 $2.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $14.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 但综合分析 B8 菌剂脱氮除磷效果, 明显可以看出选择牛肉膏蛋白胨培养基可改善 B8 发挥菌效所受的营养限制, 因而将其作为 B8 干粉菌剂发酵液更为合适。

表 2 发酵液类型对菌剂除污效果的影响

Table 2 Effects of fermentation liquid type on decontamination by microorganism agent

发酵液类型 Fermentation liquid type	TP 去除率/偏差 Removal rate of TP/Deviation	NO_3^- -N 去除率/偏差 Removal rate of NO_3^- -N/Deviation	COD 去除率/偏差 Removal rate of COD/Deviation
酵母浸出液 Yeast extract	32.78%/0.45%	31.93%/0.22%	59.14%/0.47%
牛肉膏蛋白胨 Beef extract peptone	67.51%/0.39%	94.91%/0.02%	55.22%/0.31%

发酵液液量对菌剂活菌数的影响见图 5, 发酵液液量对菌剂脱氮除磷效果影响见图 6。

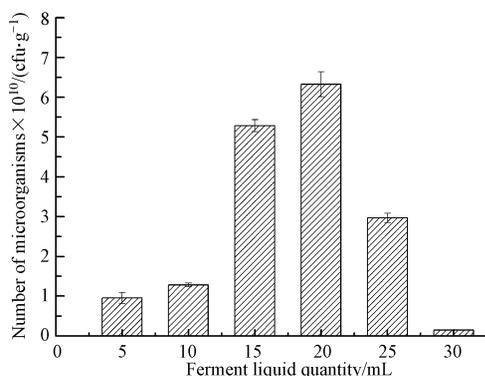


图 5 发酵液液量对菌剂活菌数的影响

Fig.5 Effects of ferment liquid quantity on bacteria number by microorganism agent

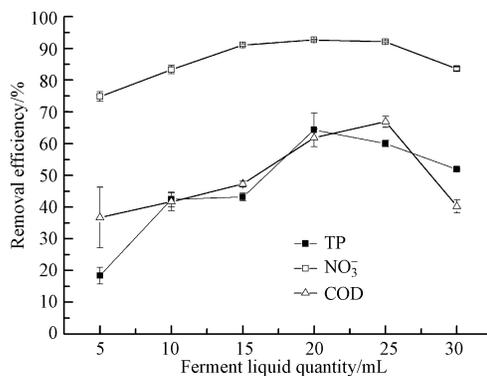


图 6 发酵液液量对菌剂除污效果的影响

Fig.6 Effects of ferment liquid quantity on decontamination by microorganism agent

当加入发酵液液量为 20 mL 时,载体吸附的菌剂活菌数达到最大值,与此同时,B8 菌剂对 TP、 NO_3^- -N 平均去除率也均达到峰值,分别为 64.30%、92.67%,而 COD 平均去除率为 61.82%。通过单一样本 *t* 检验分析,得出单一条件不同处理下的 TP 和 NO_3^- -N 平均去除率变化具有显著性差异 ($P < 0.01$)。由此可见,加入过多或过少发酵液都会影响 B8 吸附于载体上的活菌数,进而影响其脱氮除磷的菌效发挥。说明针对于 20 mL 投菌液量、牛肉膏蛋白胨培养基与 2 mL PAM 的混合液 (pH 5.5) 混入 5 g 载体 ($W_{\text{麦麸}}:W_{\text{玉米粉}}$ 为 85%:15%) 所制得的干粉菌剂成品最佳发酵液液量为 20 mL,即发酵液用量为 $4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 干粉。

2.1.4 发酵液 pH 优化分析

发酵液 pH 对菌剂活菌数的影响见图 7,发酵液 pH 对菌剂脱氮除磷效果影响见图 4。通过单一样本 *t* 检验分析,得出单一条件的不同处理下的 TP 和 NO_3^- -N 平均去除率变化具有显著性差异 (P 均小于 0.01)。当发酵液 pH 6.5 时,B8 菌剂对 TP 平均去除率达到峰值,为 87.30%,而 NO_3^- -N、COD 平均去除率分别为 56.21%、44.14%。当发酵液的 pH 值为 5.5 时,B8 菌剂对 NO_3^- -N 平均去除率达到峰值,为 92.76%,而 TP、COD 平均去除率分别为 65.77%、43.26%。而且当 pH 值为 7.0 时,干粉 B8 菌剂对 TP 的平均去除率骤然下降,与前期实验结果“B8 种子液适宜制备条件为初始 pH 6.5—7.0”略有偏差^[12],其原因在于菌剂载体会在偏酸环境中受到腐蚀,有利于 B8 菌株附着、生长从而发挥菌效,但是在过酸环境 (pH < 6.0) 内长时间的处理废水会使 DNPAOs 受酸破坏菌膜致使自溶^[17],这也就解释了“当 pH 值为 5.5 时,B8 菌剂对 NO_3^- -N 的平均去除率均达到峰值,而 TP 的平均去除率仅为 65.77%”的现象。而当 pH > 7.0 时,菌剂载体吸附的 B8 活菌数并没有显著上升,但其脱氮除磷能力却有所上升,推测偏碱环境促进磷酸盐和硝酸盐的沉淀^[18]。说明在主要处理对象为硝酸盐氮时,针对于 20 mL 投菌液量、20 mL 牛肉膏蛋白胨培养基与 2 mL PAM 的混合液混入 5 g 载体 ($W_{\text{麦麸}}:W_{\text{玉米粉}}$ 为 85%:15%) 所制得的干粉菌剂成品的最佳 pH 值为 5.5;而在主要处理对象为总磷时,则同等条件下所制得的干粉菌剂成品的最佳 pH 值为 6.5。综上所述,即当主要污水处理因子为硝酸盐氮时,干粉菌剂成品的最佳发酵液 pH 值为 5.5,该菌剂对化学需氧量、硝酸盐氮和总磷的去除率可达 43.26%、92.76% 和 65.77%;而当主要处理因子为总磷时,则同等条件下所制得的干粉菌剂成品的最佳发酵液 pH 值为 6.5,该菌剂对化学需氧量、硝酸盐氮和总磷的去除率可达 44.41%、56.21% 和 87.30%。

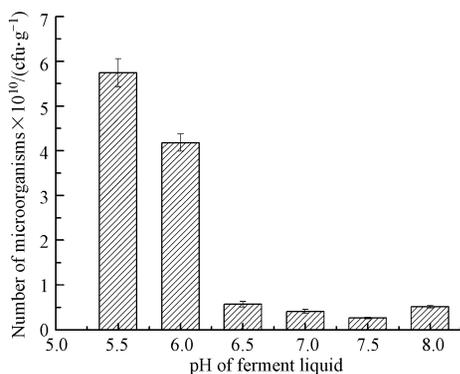


图 7 发酵液 pH 对菌剂活菌数的影响

Fig.7 Effects of pH of ferment liquid on bacteria number by microorganism agent

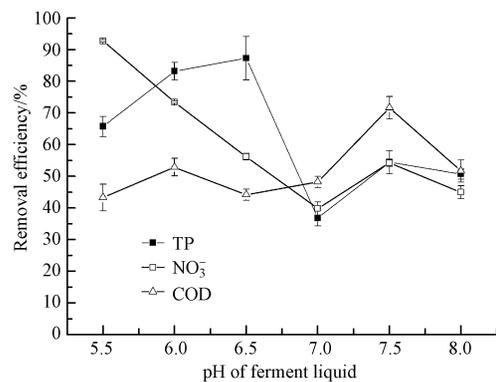


图 8 发酵液 pH 对菌剂除污效果的影响

Fig.8 Effects of pH of ferment liquid on decontamination by microorganism agent

2.2 B8 干粉菌剂扫描电镜观察

B8 干粉菌剂和空白载体 (均过 200 目筛) 放大 10000 倍后的扫描电镜见图 9。由图 9 可知,空白载体在放大 10000 倍后其载体表面较为平滑,仅黏附有少量不规则形状的颗粒物;而 B8 干粉菌剂在放大 10000 倍后的菌剂载体表面较粗糙,且其上存在有明显的杆状菌株 (即 B8);说明 B8 菌株可附着于过筛、无菌载体配比组成 85%:15% 麦麸和玉米粉的载体上,并摄取牛肉膏蛋白胨培养基与 PAM 混合液 (pH 5.5—6.5) 的营养用于繁殖生长及发酵,干燥后 B8 可固定于载体上,再将其投放于待处理废水中即可发挥其菌效。

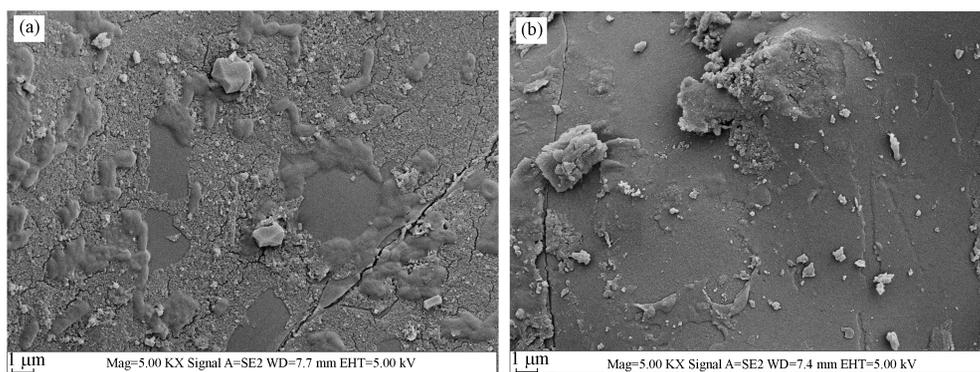


图9 B8 干粉菌剂成品(a)和空白载体(b)的扫描电镜照片

Fig.9 SEM photographs of B8 bacteria powder products (a) and sterile carrier

2.3 B8 干粉菌剂成品技术指标和成本

当制备条件为投菌液量 20 mL,载体配比 $W_{\text{麦麸}}:W_{\text{玉米粉}}$ 为 85%:15%,发酵液选用牛肉膏蛋白胨培养基且其用量 20 mL,发酵液 pH 值为 5.5—6.5 时,制得 5 g B8 干粉菌剂成品.该菌剂技术指标为:性状呈粉末状,颜色呈棕黄色,微生物含量为 $(5.7—57.4) \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$,非微生物成分为麦麸和玉米粉.根据对原料市购价格求和,得到 B8 干粉菌剂成品成本为每克 0.19 元.

通过将相等菌量的 B8 菌液和干粉菌剂分别引入序批式生物反应器(SBR),分别考察在厌氧-缺氧条件下运行的各反应器除污效果^[19].SBR 均在缺氧段对 TP 降解过程符合一阶指数衰减动力学模型,在第 71 天时,投加菌液的 SBR 吸磷动力学系数 K_p 为 1.2584,投加菌粉的 SBR 吸磷动力学系数 K_p 为 2.0379.由此可见,干粉菌剂性质和菌液相比,直接将其投入水中,B8 菌效明显得到提升.

3 结论(Conclusion)

(1)利用 1 g B8 干粉菌剂成品投入 100 mL 人工模拟废水内 3 h 厌氧-12 h 缺氧处理,得出其在同等处理条件下干粉菌剂脱氮除磷能力的高低,从而发现 B8 干粉菌剂制备参数如投菌量、载体组成、发酵液类型和用量、发酵液 pH 对 B8 干粉菌剂的除氮磷效果具有影响.B8 干粉菌剂适宜制备条件为投菌液量 $4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,载体配比 $W_{\text{麦麸}}:W_{\text{玉米粉}}$ 为 85%:15%,发酵液选用牛肉膏蛋白胨培养基且其用量 $4 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$.主要处理对象为硝酸盐氮时,干粉菌剂成品的最佳发酵液 pH 值为 5.5,上述条件下制备的菌剂对化学需氧量、硝酸盐氮和总磷的去除率可达 43.26%、92.76%和 65.77%;而在主要处理对象为总磷时,则同等条件下所制得的干粉菌剂成品的最佳发酵液 pH 值为 6.5,上述条件下制备的菌剂对化学需氧量、硝酸盐氮和总磷的去除率可达 44.41%、56.21%和 87.30%.

(2)通过 B8 干粉菌剂和未加 B8 菌种的空白载体放大 10000 倍后扫描电镜照片对比,说明 B8 菌株可附着于将过筛且灭菌后的载体配比组成(W/W)为 85%:15%的麦麸和玉米粉的载体上,并摄取牛肉膏蛋白胨培养基与 PAM 培养液的混合液(pH 5.5—6.5)的营养用于繁殖生长及发酵,干燥后 B8 可固定于载体上,再将其投放于待处理废水中即可发挥其菌效.

参考文献(References)

- [1] SPROCATI R A, ALISI C, TASSO F, et al. Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil [J]. *Process Biochemistry*, 2012,47(11):1649-1655.
- [2] NALINI S, PARTHASARATHI R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent [J]. *Bioresource Technology*, 2014,173:231-238.
- [3] 余旺,黄绍松,孙水裕,等.接种菌剂和外加能源对污泥生物干化效果的影响[J].*环境污染与防治*,2012,34(8):39-43.
YU W, HUANG S S, SUN S Y, et al. Effect of microbial inoculants and additional energy on bio-drying of dewatered sludge [J]. *Environmental Pollution & Control*,2012,34(8):39-43 (in Chinese).
- [4] TAYA C, GUIASOLA A, BAEZA A J. Assessment of a bioaugmentation strategy with polyphosphate accumulating organisms in a

- nitrification/denitrification sequencing batch reactor [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 7678-7684.
- [5] GNANAMANI A, KAVITHA V, RADHAKRISHNAN N, et al. Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 79(2): 334-339.
- [6] LIU YE, 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.
- [7] 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.
- [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): 2711-2715.
MA F, YANY F F, LI A, et al. Biological Characteristics of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms [J]. *Environmental Science*, 2011, 32(9): 2711-2715 (in Chinese).
- [9] 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, 37(7): 2869-2875.
LI 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*, 2011, 32(9): 2711-2715 (in Chinese).
- [10] TAYA C, GARLAPATI V K, GUIASOLA A, et al. The selective role of nitrite in the PAO/GAO competition [J]. *Chemosphere*, 2013, 93(4): 612-618.
- [11] 郭健, 汪佳秀, 王国林, 等. 降解氯磺隆微生物菌剂的制备及稳定性研究 [J]. *安全与环境学报*, 2012, 12(5): 34-37.
GUO J, WANG J X, WANG G L, et al. Preparation and stability study of chlorimuron-ethyl degrading bacterium composite microorganism agent [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2012, 12(5): 34-37 (in Chinese).
- [12] 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, DENG 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).
- [13] 陈晶, 张敏特, 陈萍, 等. 菌剂强化潜流湿地总氮总磷去除及功能菌特性研究 [J]. *环境化学*, 2015, 34(12): 2268-2274.
CHEN J, ZHANG M T, CHEN P, et al. Nitrogen and phosphorus removal and characteristics of functional microbes in subsurface flow wetland with microbe augmentation [J]. *Environmental Chemistry*, 2015, 34(12): 2268-2274 (in Chinese).
- [14] 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.
- [15] 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 (in Chinese).
- [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] LOPEZ C M, OEHMEN A, HOOIJMANS C M. Modeling the PAO-GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature [J]. *Water Research*, 2009, 43(2): 450-462.
- [18] 陈燕, 杨小龙, 曹郁生. 1 株高效聚磷节杆菌的分离鉴定及其聚磷特性研究 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(1): 447-450.
CHEN Y, YANG X L, CAO Y S. Study on isolation, identification and phosphate accumulating capacity of *Arthrobacter* sp. [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(1): 447-450 (in Chinese).
- [19] 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 J, ZHOU X C, CHEN P, et al. Enhanced nitrogen and phosphorus removal with addition of microbes in sequencing batch reactor and analysis of microbial species [J]. *Environmental Chemistry*, 2016, 35(10): 2183-2190 (in Chinese).