

孔祥震, 郭海娟, 马放, 等. 生物絮凝剂改性菌丝球负载好氧反硝化菌 T13 强化脱氮[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(2): 377-386.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.02.011

# 生物絮凝剂改性菌丝球负载好氧反硝化菌 T13 强化脱氮

孔祥震<sup>1</sup>, 郭海娟<sup>2</sup>, 马放<sup>1</sup>, 耿明月<sup>1</sup>, 肖霄<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150090; 2. 辽宁大学环境学院, 辽宁 沈阳 110000)

**摘要:** 由黑曲霉 Y3 (*Aspergillus niger* Y3) 形成的菌丝球经过生物絮凝剂改性强化后作为生物载体固定好氧反硝化菌 T13 (*Pseudomonas* sp. T13), 对其固定前后对全氮的去除效能、菌群的活性进行研究并分析固定化对于生物强化脱氮效果的影响。结果表明, 菌丝球负载 T13 后去除全氮效能得到了明显的提高。当改性菌丝球(湿质量)与 T13 菌液( $3.5 \times 10^8$  CFU/ml)的质量体积比为 1:15 时, 去除全氮的效能最好。改性菌丝球负载 T13 后的表观图像和电镜扫描图像(SEM)显示, T13 细菌附着在改性菌丝球的表面, 且改性菌丝球载体的结构可以连续培养 45 d 后仍保持紧实结构。傅里叶红外光谱(FTIR)和三维荧光光谱(EEM)结果显示, 胞外聚合物(EPS)在改性菌丝球固定 T13 的过程中起到了关键作用。菌丝球的菌丝缠绕形成的结构提供了强有力的机械结构, 且具有较大的比表面积和良好的传质性能, 改性菌丝球可以作为良好的生物载体用于生物强化。

**关键词:** 改性菌丝球; 强化脱氮; 好氧反硝化菌; 生物载体

**中图分类号:** X52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)02-0377-10

## Enhanced nitrogen removal by biofloculant combined mycelial pellets loaded with aerobic denitrificans T13

KONG Xiang-zhen<sup>1</sup>, GUO Hai-juan<sup>2</sup>, MA Fang<sup>1</sup>, GENG Ming-yue<sup>1</sup>, XIAO Xiao<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resources and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. School of Environment, Liaoning University, Shenyang 110000, China)

**Abstract:** After modifying and strengthening of mycelial pellets formed of *Aspergillus niger* Y3 by biofloculant, the mycelial pellets were used as bio-carriers to immobilize aerobic denitrifying bacterium T13 (*Pseudomonas* sp. T13). Removing capabilities of total nitrogen (TN) and microflora activities of mycelial pellets before and after immobilizing of *Pseudomonas* sp. T13 were studied, and the influence of immobilization on the denitrification effect strengthened by biological factors was analyzed. The results showed that, the removal efficiency of mycelial pellets in removing TN was effectively improved after immobilizing of *Pseudomonas* sp. T13. The mycelial pellets showed the best effect in TN removing when the mass-volume ratio of modified mycelial pellets (wet weight) to T13 bacterial suspension ( $3.5 \times 10^8$  CFU/ml) was 1:15. Photograph and scanning electron microscope (SEM) images of modified mycelial pellets after immobilizing of *Pseudomonas* sp. T13 revealed that, the

T13 bacteria attached on the surface of mycelial pellets, and the structure of modified mycelial pellets maintained firm and intact after continuous cultivation for 45 days. Results of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and three-dimensional excitation-emission matrix (EEM) suggested that, extracellular polymer substances (EPS) played an important role in the process of immobilization of T13 by

收稿日期: 2021-08-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(52070054)

作者简介: 孔祥震(1989-), 男, 安徽宿州人, 博士研究生, 研究方向为环境微生物、生物强化技术。(E-mail) kxz\_19890510@163.com

通讯作者: 马放, (E-mail) mafang@hit.edu.cn

modified mycelial pellets. The structures formed by entangling structure of mycelial pellets provided strong mechanic structure, and had large specific surface area and fine mass transfer performance. Modified mycelial pellets can be used as good bio-carrier for biomass immobilization.

**Key words:** modified mycelial pellets; enhanced nitrogen removal; aerobic denitrifying bacterium; biomass carrier

生物强化技术在污水处理技术应用的过程中具有独特的优势,如缩短生化系统的启动周期、提高污染物的去除效率、减少剩余污泥产量等<sup>[1]</sup>。生物强化脱氮也是污水处理提标改造过程中一项重要的生物强化技术,且研究者已经在国内外进行了较为广泛的研究。生物强化脱氮技术在污水处理系统中利用具有特定脱氮功能微生物的特性,投加功能性微生物菌剂,增加其生物量并提高其功能性活性,加上调整工艺运行手段来达到改善脱氮效能的目的,提高了氮素的脱除效果,从而促进出水水质的达标排放<sup>[2]</sup>。但是在投加功能性生物菌剂时,仍会面临功能性菌种流失的问题,导致系统强化不够理想。

在生物强化技术应用的过程中,投加合适的载体使功能性微生物附着其上,得以繁殖并维持其活性是解决菌种流失的有效手段<sup>[3]</sup>。载体固定化技术不仅可以有效阻止功能菌种的流失,还使得生化系统的固液分离更加简便,从而提高生化系统的可操作性。固定化载体材料的选择是固定化技术应用的关键所在,合适的材料应当能为功能性微生物提供良好的附着性能并为微生物的生长繁殖提供适宜的场所。在以往的研究中,多种固定化材料被尝试用于脱氮细菌的固定化,如聚乙烯醇<sup>[4]</sup>、海藻酸钠<sup>[5]</sup>、聚氨酯泡沫<sup>[6]</sup>等。在有载体的情况下,功能性微生物固定在载体上的生长速率虽然没有游离状态下(未固定在载体上)的高,但是其对底物的摄取速率要明显高于游离状态<sup>[7]</sup>。目前,也有一些学者对新型生物载体(如生物质炭)展开研究,以期降低载体的成本和提高生物强化的性能<sup>[8]</sup>,新型的生物载体对环境也更加友好。

菌丝球是霉菌浸没式生长过程中在特定水力剪切力条件下自发缠绕成球形成的颗粒,其作为吸附重金属离子、染料等难降解有机物的材料已获得较为广泛的应用<sup>[9-10]</sup>。菌丝球由于其所具备的沉降速率快、易于固液分离、培养简便和对环境友好等特点,被越来越多的学者在研究中尝试用作一种新型的生物载体。Zhang等<sup>[11]</sup>将苯胺降解菌(*Acinetobacter calcoaceticus* JH-9)、化学需氧量(COD)快速降

解菌与黑曲霉 Y3 形成的菌丝球混合培养后制成的改性菌丝球颗粒用于序批式反应器(Sequencing batch reactor, SBR)运行,对苯胺的降解速率起到了一定的促进作用。Wang等<sup>[12]</sup>利用黑曲霉 Y3 形成的菌丝球将产絮菌 *Agrobacterium tumefaciens* F2 和 *Bacillus sphaericus* F6 固定后采用半连续发酵的方式持续产絮 35 个周期,直至改性菌丝球颗粒破碎。Zhao等<sup>[13]</sup>利用黑曲霉 Y3 形成的菌丝球固定产氢细菌 *Clostridium* sp. T2 进行产氢效能的研究,结果表明,经过菌丝球载体固定的产氢细菌的累积产氢量随着菌丝球载体的加入量增加而增加。此外,菌丝球作为生物载体也被广泛应用于产能微藻的培养和富集<sup>[14]</sup>,但是其作为载体在实际废水处理中的应用还需要进一步研究。

本研究将黑曲霉 Y3 形成的菌丝球作为生物载体用于固定好氧反硝化菌 T13,对其固定前后对全氮的去除效能、菌群的活性进行研究并分析固定化对于生物强化脱氮效果的影响。此外,对胞外聚合物(EPS)的变化和固定前后的扫描电镜图像(SEM)进行表征。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌丝球和好氧反硝化菌的培养

菌丝球的培养使用本课题组筛选的黑曲霉 Y3 作为菌种<sup>[15]</sup>。培养时采用孢子悬浮液作为接种液。将无菌去离子水加入长有黑曲霉 Y3 并生成了孢子的固体培养基之上,用经消毒的接种环轻轻将孢子刮下制成孢子悬浮液。将孢子悬浮液装入经灭菌的装有数粒玻璃珠的三角瓶内,加入适量的无菌去离子水使孢子悬浮液稀释到一定浓度,旋转振荡 24 h 使孢子悬浮液充分混匀分散后在 620 nm 波长下测量其吸光度  $OD_{620}$ 。使用孢子悬浮液时的接种量可用下列公式进行计算:

$$\text{孢子悬浮液接种量} = (0.25 \times 0.1\% \times \text{液体培养基体积}) / \text{孢子悬浮液吸光度}$$

菌丝球的培养采用张斯<sup>[16]</sup>的方法。菌丝球的液体培养基成分为:蔗糖 10.0 g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.0 g,

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g, 去离子水 1 000 ml。按计算后的接种量接种后,在 28 °C 140 r/min 条件下培养 48~72 h。

好氧反硝化菌 T13 的菌种由本课题组筛选<sup>[17]</sup>。菌种经发酵培养后的菌液在 8 000 r/min 条件下离心 5 min 后弃置上清液,将沉淀的菌体使用 20 mmol 的磷酸缓冲液清洗 2 次后,使用漩涡振荡器重新悬浮并充分混匀。制成的 T13 菌种悬液的含量约为  $3.5 \times 10^8$  CFU/ml。

## 1.2 生物絮凝剂的制备

生物絮凝剂的制备采用产絮细菌 F2<sup>[18]</sup>。将活化后的絮凝菌 F2 的菌液按 5% 的接种量接种到发酵培养基中发酵培养 24 h 后,按 3:1 的体积比加入无水乙醇使生物絮凝剂析出,弃去无水乙醇,将絮凝剂置入透析袋中,在去离子水中除去乙醇后冻干备用。生物絮凝剂发酵培养基的成分为葡萄糖 10.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g, NaCl 0.1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 尿素 0.5 g, 酵母膏 0.5 g, 去离子水 1 000 ml, pH 7.2~7.5, 在 112 °C、30 min 条件下灭菌。

## 1.3 改性菌丝球的制备

称取湿质量为 30 g 的菌丝球放入 200 ml、0.2 g/L 的生物絮凝剂溶液中,在磁力搅拌器 30 r/min 的搅拌转速下浸泡 12 h,使菌丝球与生物絮凝剂充分接触后捞出,与 30 ml 的 T13 菌种悬浮液混合,在 140 r/min、30 °C 下振荡培养 24 h。

## 1.4 多糖和蛋白质的提取及测定方法

多糖和蛋白质经加热后提取<sup>[19]</sup>。取 25 ml 充分混匀的样品置入离心管内,在 11 000 g、4 °C 条件下离心 15 min,弃置上清液,加入 0.01% 的 NaCl 溶液并定容至 25 ml,使用漩涡振荡器将离心的沉淀重新完全混匀。将混匀后的样品在 80 °C 水浴条件下加热 30 min,冷却至室温后再次在上述条件下离心。离心后,将上清液经 0.45 μm 膜过滤后待测。

蛋白质的测定方法采用福林酚法<sup>[20]</sup>。取 1 ml 样品与 5 ml 试剂 I 充分混合后静置 10 min,然后加入 0.5 ml 试剂 II 并立即混合,继续在室温下静置 30 min 后,使用紫外分光光度计在 500 nm 波长下测量吸光度。试剂 I 的成分为溶液 A 与溶液 B 按 50:1 的体积比混合,其中溶液 A 的成分为  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10.00 g, NaOH 2.00 g,  $\text{KNaC}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.25 g, 定容至 500 ml, 溶液 B 的成分为 0.5 g  $\text{CuSO}_4$ , 定容至 100

ml。试剂 II 为福林酚试剂。

多糖的测定方法采用苯酚-硫酸法<sup>[16]</sup>。取 1 ml 待测样品装入 10 ml 的离心管中,再加入 1 ml 去离子水和 1 ml 6% 的苯酚并摇匀,然后快速加入 5 ml 硫酸(98%,质量分数),静置 10 min 并充分混合,继续静置 20 min 并冷却至室温后,使用紫外分光光度计在波长 490 nm 处测量其吸光度。

## 1.5 脱氢酶活性的测定方法

脱氢酶活性的测定采用 TTC(2,3,5-三苯基氯化四氮唑)法<sup>[21]</sup>。取 5.0 ml 上清液样品加入 5.0 ml Tris-HCl 溶液(pH=8.4),再依次加入 5.0 ml 去离子水和 10.0 ml 4% 的 TTC 溶液。同时,在对照组中加入 0.5 ml 的甲醇。将样品组和对照组用水浴锅在 37 °C 条件下水浴加热 30 min。加热结束后,在样品组和对照组中同时加入 5.0 ml 三氯甲烷,密封后振荡 10 min,萃取反应生成的 TF(1,3,5-三苯基甲臜)。萃取结束后在 3 000 r/min 下离心 5 min,离心结束后取下层三氯甲烷溶液在波长 485 nm 下测量吸光度。在测定菌丝球载体颗粒上的脱氢酶活性时,将样品摇匀并取 5.0 ml 的悬浮液,静置沉淀后将上清液弃置,再加入去离子水并定容至相同体积,后续步骤同上。

## 1.6 傅里叶红外光谱(FTIR)样品的预处理及检测

菌丝球载体固定好氧反硝化菌 T13 前后的 FT-IR 样品预处理及测定步骤如下:将菌丝球载体样品冻干后与溴化钾(KBr)按 1:100(质量比)混合并压缩,制成样品后使用 Perkin Elmer Spectrum One B 傅里叶变换光谱仪进行光谱测量。

## 1.7 三维荧光光谱(EEM)样品的检测

三维荧光光谱使用日本 Jasco 的 FP6500 荧光光谱仪进行测量,发射波长为 220~500 nm,波长扫描间隔为 5 nm,吸收波长在 220~600 nm 内检测,步进为 1 nm。测量速率设置为 2 000 nm/min。

## 1.8 电镜扫描图像(SEM)样品的预处理及检测

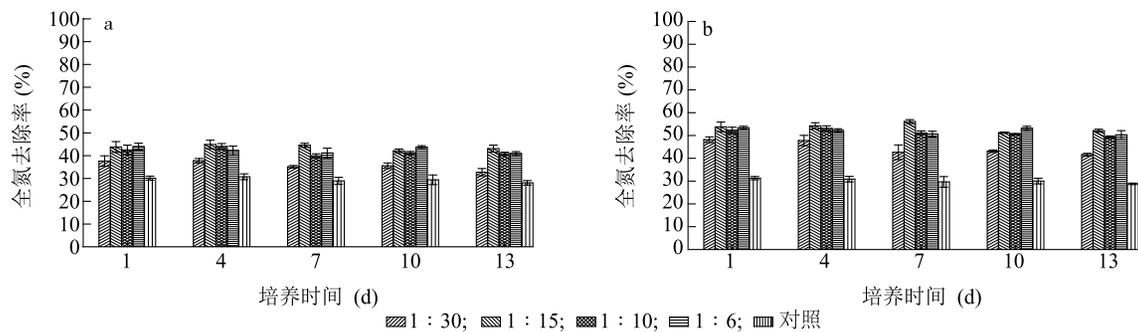
将样品置于使用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH=7.4)配制的 4% 戊二醛溶液中,在 4 °C 下浸泡 1 h,对颗粒表面的菌体进行固定,固定后使用相同的缓冲液清洗 3 次。将样品依次在 50%、70%、80% 和 90% 的乙醇溶液中浸泡 15 min 进行脱水,最后再在无乙醇中浸泡 15 min。脱水后的样品置于干燥器中保存待测。测量前,将脱水样品表面进行喷金处理再上机检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 改性菌丝球负载 T13 对全氮的去除效能

将改性菌丝球(湿质量)与 T13 菌液按 1:30、1:15、1:10、1:6 的质量体积比分别负载后进行全氮去除效能的试验,以未添加改性菌丝球的 T13 菌液为对照。并在相同负载比例下与未经生物絮凝剂强化的菌丝球负载 T13 进行全氮去除效能的对比,结果如图 1 所示。从图 1a 中可以看出,培养至 13 d 时,未经生物絮凝剂强化的菌丝球负载 T13 后

可较为明显地提升对全氮的去除效能,1:15、1:10 和 1:6 负载比例下的全氮去除率分别为 43.09%、40.90% 和 40.91%,而 T13 菌液(对照组)的全氮去除率仅为 26.09%。图 1b 中经过生物絮凝剂改性强化后的菌丝球负载 T13 后的全氮去除效能有了更为明显的提升,培养至 13 d 时,1:15、1:10 和 1:6 负载比例下的全氮去除率分别为 52.10%、49.36% 和 50.26%。其中,以 1:15 负载比例的菌丝球负载 T13 后的全氮去除率最为稳定。



a:普通菌丝球负载 T13 对全氮去除效能的影响;b:改性菌丝球负载 T13 对全氮去除效能的影响。

图 1 生物絮凝剂改性菌丝球负载 T13 对全氮的去除效能

Fig.1 Total nitrogen (TN) removal efficiency of biofloculant modified mycelial pellets loaded with T13

不同负载比例条件下生物絮凝剂改性菌丝球负载 T13 对去除全氮效能的影响如表 1 所示。由图 1 和表 1 可见,在没有菌丝球作载体的情况下,尽管加入了生物絮凝剂,但游离的 T13 菌液对全氮的去除效能与未添加生物絮凝剂的差异并不显著 ( $P > 0.05$ ),表明添加生物絮凝剂与否对 T13 游离菌去除效能没有显著影响。而在生物絮凝剂改性菌丝球

负载 T13 之后,全氮的去除效能与未经生物絮凝剂改性的菌丝球相比,差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果表明,在有生物絮凝剂改性强化的情况下,菌丝球负载 T13 去除全氮的效能有显著提高,从经济适用的角度出发,菌丝球的负载比例为 1:15 较为合适,在满足全氮去除效能提升的前提下,无需更多菌丝球载体的加入。

表 1 不同负载比例下生物絮凝剂改性菌丝球负载 T13 对去除全氮效能的影响

Table 1 Total nitrogen (TN) removal effects of biofloculant modified mycelial pellets loaded with T13 under different loading ratios

处理	对全氮的去除效能 (%)				
	对照	1:30	1:15	1:10	1:6
未改性	29.46±1.03e	35.77±2.06d	43.70±1.14bc	41.72±1.61c	42.41±1.41bc
改性	30.12±0.99e	44.66±3.07b	53.49±1.91a	51.31±1.46a	51.91±1.42a

数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

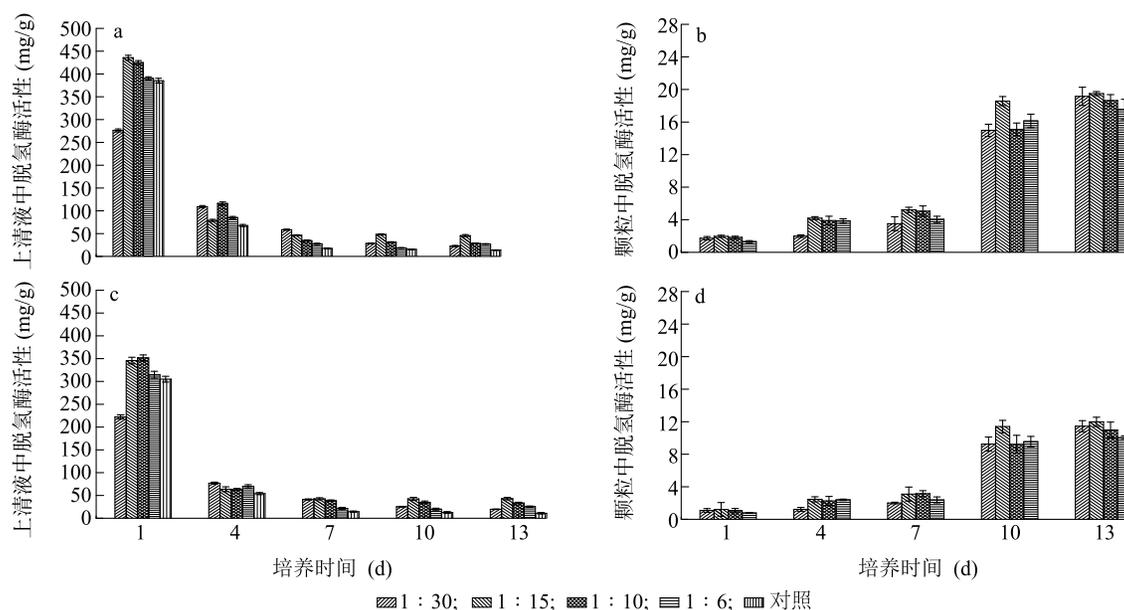
### 2.2 改性菌丝球负载 T13 的脱氢酶活性变化

由图 2 可见,经过和未经生物絮凝剂改性强化的样品中,其上清液中脱氢酶活性随着培养时间的延长呈现急剧下降的趋势,而菌丝球载体颗粒上的脱氢酶活性则表现出持续上升的趋势。在 T13 固

定后培养初期,液体培养基中存有大量的游离 T13 细菌,在每天更换 50% 培养基时,会随着弃置的液体流失部分菌体,因此上清液中的脱氢酶活性也随之降低。而颗粒上的菌量随着培养时间的延长则在不断增加,因此颗粒上的脱氢酶活性在逐渐升高。

对比图 2a、图 2c,可以看出,生物絮凝剂改性与否对菌丝球负载 T13 后上清液中的脱氢酶活性影响较小,当负载比例为 1:15 时,生物絮凝剂改性的菌丝球比未经改性的菌丝球负载 T13 后在连续培养第 13 d 时的上清液脱氢酶活性高 2.55 mg/g。而对比图 2b、图 2d 可以看出,培养第 13 d 时,负载比例为 1:15 时生物絮凝剂改性的菌丝球比未经改性的菌

丝球负载 T13 后的脱氢酶活性高了 7.51 mg/g,提高幅度约 62.3%。由于脱氢酶活性的强弱代表了 T13 活性的强弱和菌量的大小,因此这一结果证明,菌丝球的改性与否对上清液中 T13 的活性和菌量没有显著影响,而改性后的菌丝球使 T13 的固定化效果得到了较为显著的提升。



a: 生物絮凝剂改性上清液中脱氢酶活性; b: 生物絮凝剂改性菌丝球颗粒中脱氢酶活性; c: 未经生物絮凝剂改性的上清液中脱氢酶活性; d: 未经生物絮凝剂改性的菌丝球颗粒中脱氢酶活性。

图 2 生物絮凝剂改性菌丝球负载 T13 的脱氢酶活性变化

Fig.2 Changes in dehydrogenase activity of biofloculant modified mycelial pellets loaded with T13

### 2.3 改性菌丝球负载 T13 后蛋白质和多糖含量的变化趋势

由图 3 可知,蛋白质的含量在培养前 7 d 里呈现出下降的趋势,然后在后续的 6 d 内又呈现出了上升的趋势,负载比例为 1:15、1:10 和 1:6 的改性菌丝球负载 T13 后的蛋白质含量在培养第 13 d 时分别达到了 59.93 mg/g、65.23 mg/g 和 58.55 mg/g。前 7 d 的培养过程中,有部分菌体随着更换培养基时弃置的液体流失,因此蛋白质含量均降低,而在后 6 d 的培养过程中,随着固定在改性菌丝球载体上的 T13 生长繁殖,蛋白质含量升高。多糖的含量在 13 d 的培养过程中变化不是十分明显,总体呈现出较为平缓的趋势,到培养第 13 d 时除 1:15 比例下的多糖含量比培养第 1 d 升高了 3.21% 外,1:30、1:10、1:6 和对照组中的多糖

含量分别下降了 4.95%、28.81%、39.84% 和 21.85%。负载比例为 1:15 时多糖和蛋白质含量随时间变化的影响如表 2 所示,可以看出,培养至第 13 d 时,蛋白质含量相比于培养初始时有了显著降低,而多糖的含量在培养第 4~7 d 时稍有上升,至培养第 13 d 后又恢复了初始水平。这是由于作为载体核心菌丝球,其细胞壁主要组成中含有较大量的多糖<sup>[22]</sup>,且改性菌丝球负载 T13 的活性颗粒的多糖成分的主要来源是菌丝球。同时,培养过程中的培养基成分 pH 始终保持在 6.8~7.0,而制备菌丝球的黑曲霉 Y3 并不适宜在这种环境下生长<sup>[23-24]</sup>,因此,菌丝球在这样的共培养条件下仅作为生物载体且生长速率极其缓慢。另外,菌丝球载体的结构在培养过程中可能也有少许破损脱落,因此多糖的含量有少许的降低。

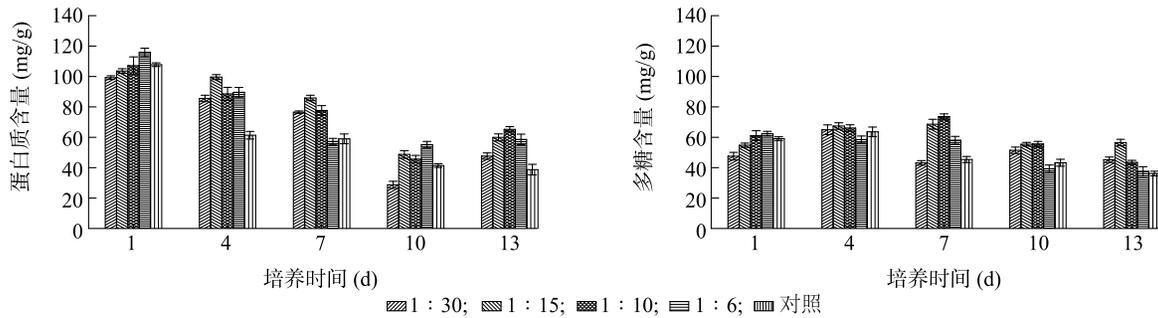


图3 改性菌丝球固定好氧反硝化菌 T13 的胞外聚合物 (EPS) 变化

Fig.3 Extracellular polymer substances (EPS) variation trends of modified mycelial pellets loaded with T13

表2 培养时间对蛋白质和多糖含量变化的影响

Table 2 Effect of culture time on content changes of protein and polysaccharide

培养时间 (d)	蛋白质含量 (mg/g)	多糖含量 (mg/g)
1	103.17±1.74a	54.71±1.43b
4	99.28±1.91a	67.42±2.12a
7	85.32±1.92b	68.37±2.95a
10	48.26±2.37d	55.39±1.26b
13	59.97±2.38c	56.53±2.25b

同一列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.4 改性菌丝球负载 T13 后傅里叶红外 (FTIR) 光谱的变化

菌丝球和改性菌丝球负载 T13 后的 FTIR 光谱如图 4 所示,识别出的主要吸收峰如表 3 所示。两者的 FTIR 光谱吸收曲线大致相似,但在改性菌丝球负载 T13 后,也有几处波数下的吸收峰发生了变化。光谱在  $3\ 320\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰较宽且深,是羟基基团中 O-H 键的伸缩振动引起的,在  $2\ 927\ \text{cm}^{-1}$  处的锐峰是 C-H 键的伸缩振动引起的。在  $1\ 154\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰在改性菌丝球负载 T13 的曲线中变得更加锐利,这是典型的多糖中 -O-C-O 基团伸缩振动引起的吸收峰,结合  $3\ 320\ \text{cm}^{-1}$  处的宽峰,可以推断出菌丝球中含有大量的多糖类物质。在  $1\ 655\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是 C=O 和 C-N (酰胺 I 带) 的伸缩振动引起的,  $1\ 540\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰则是 C-N 的伸缩振动和 N-H 的形变振动 (酰胺 II 带) 引起的,这 2 处吸收峰是蛋白质二级结构特有的 FTIR 吸收峰,并且在改性菌丝球负载 T13 的测定中吸收峰更加锐利,表明蛋白质在改性菌丝球负载 T13 的过程中起到了重要作用。  $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰是天冬氨酸特有的去质子化的羧基中 C=O 的对称振动引起

的,且该吸收峰在改性菌丝球负载 T13 时显现得更加明显,也表明蛋白质在菌丝球固定功能菌的过程中起到了作用。  $1\ 075\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰则是多糖中 C-O 的不对称伸缩振动引起的,  $866\ \text{cm}^{-1}$ 、 $541\ \text{cm}^{-1}$  和  $528\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰则表明在改性菌丝球中不饱和键数量的增加。有研究表明,羧基和胺基与细菌附着固定在固体表面时的过程有关<sup>[25-27]</sup>。

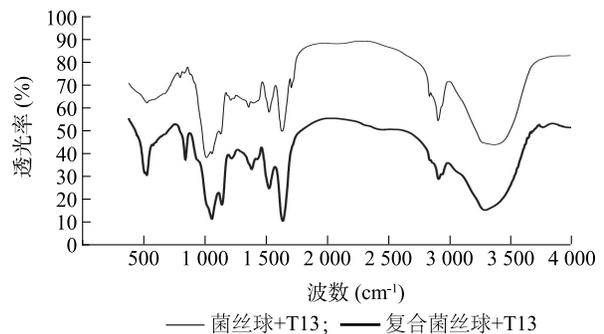


图4 改性菌丝球固定化好氧反硝化菌 T13 的傅里叶红外光谱 (FTIR)

Fig.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectrum of modified mycelial pellets loaded with T13

表3 傅里叶红外光谱 (FTIR) 的主要吸收峰

Table 3 Main absorption peaks of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

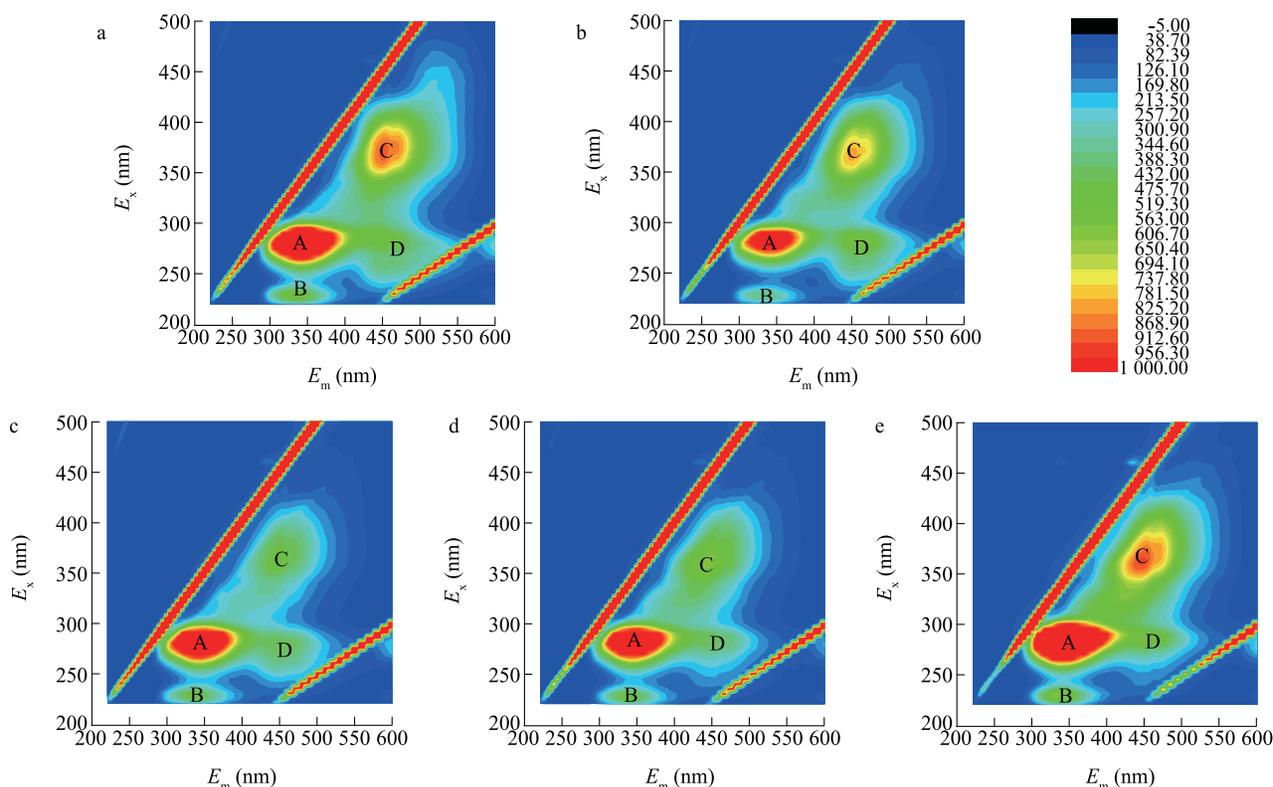
吸收峰波数 ( $\text{cm}^{-1}$ )	功能团振动类型	引起振动的化合物类型
3 320	O-H 的伸缩振动	多糖
1 154	C-O-C 的伸缩振动	多糖
1 075	C-O 的不对称伸缩振动	多糖
1 655	C=O 和 C-N (酰胺 I 带) 的伸缩振动	蛋白质
1 540	C-N 的伸缩振动和 N-H 的形变振动 (酰胺 II 带)	蛋白质
1 400	天冬氨酸去质子化的羧基中 C=O 的对称振动	蛋白质

## 2.5 改性菌丝球负载 T13 后 EEM 的变化

选择1:15负载比例条件下的改性菌丝球,取样后测定 EEM 随培养时间延长的变化,结果如图 5 所示。从图 5 中可以看出,样品的 EEM 图包括了 4 个明显的峰。第 1 个主峰是激发/发射波长 ( $E_x/E_m$ ),位于 280 nm/340~345 nm 处的 A 峰,第 2 个主峰是  $E_x/E_m$ ,位于 230 nm/330~340 nm 处的 B 峰。据报道,这 2 个峰的荧光与蛋白质类物质的存在相关,A 峰所在的位置主要和芳香类、蛋白质类物质的存在相关,B 峰位置则主要和色氨酸类、蛋白质类物质相关<sup>[28-30]</sup>,荧光的强度与物质的含量密切相关,荧光的强度越高,则峰所在位置代表的物质含量越高。A 峰和 B 峰的荧光强度在起初 7 d 的培养时间里略有减弱,在后续 7 d 的培养过程中又有明显的增强。这一结果表明,在前 7 d 里,有部分的 T13 菌体还没有固定在改性菌丝球表面,随着置换

的培养基被一起排出体系,而在后续 7 d 的培养过程中,随着固定在表面的菌体的生长繁殖,此类蛋白质类化合物的数量也有升高。

第 3 个峰是  $E_x/E_m$ ,位于 365~370 nm/450~460 nm 处的 C 峰,C 峰所在位置主要与类腐殖酸物质相关。第 4 个峰是  $E_x/E_m$ ,位于 280~285 nm/450~460 nm 处的 D 峰,主要与类富里酸物质相关<sup>[31]</sup>。对比改性菌丝球负载 T13 第 13 d 时和第 1 d 时的最大荧光强度峰的位置,可以发现 C 峰和 D 峰有较为明显的蓝移,C 峰从  $E_x/E_m = 360$  nm/466 nm 蓝移至  $E_x/E_m = 360$  nm/444 nm 处,D 峰则从  $E_x/E_m = 285$  nm/460 nm 蓝移至  $E_x/E_m = 285$  nm/455 nm 处。荧光强度最高峰的位置变化表明,EPS 中的部分物质在共培养过程中产生了变化,可能是由于 T13 的生长代谢产生了新的代谢产物。



a: 改性菌丝球负载 T13 后培养第 1 d; b: 改性菌丝球负载 T13 后培养第 4 d; c: 改性菌丝球负载 T13 后培养第 7 d; d: 改性菌丝球负载 T13 后培养第 10 d; e: 改性菌丝球负载 T13 后培养第 13 d。  $E_x$ : 激发波长;  $E_m$ : 发射波长。

图 5 改性菌丝球固定化好氧反硝化菌 T13 的三维荧光光谱 (EEM) 变化

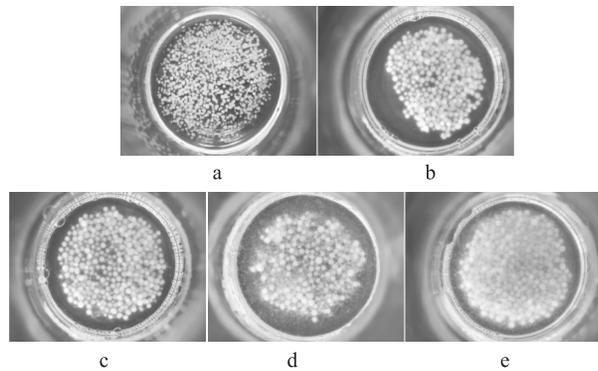
Fig.5 Excitation-emission matrix (EEM) variations of modified mycelial pellets loaded with T13

## 2.6 改性菌丝球负载好氧反硝化菌 T13 的变化及 SEM 图像

将改性菌丝球负载 T13 后连续培养 45 d,每天

取出培养瓶静置沉淀后拍摄图像。如图 6 所示,改性菌丝球负载好氧反硝化菌 T13 后的变化较为明显。图 6a 所示为培养 24 h 后的菌丝球在未经生物

絮凝剂改性时的情况,图 6b 所示为经过生物絮凝剂改性后的菌丝球负载 T13 培养第 4 d 时的情况,可见颗粒已经由白色变为浅黄色。经过 15 d 的培养后,颗粒颜色逐渐加深,且有少量浑浊出现,这是由于改性菌丝球表面的 T13 生长繁殖后,菌量变大而进入培养基中,也有少量断裂的菌丝携带附着的 T13 从菌丝球表面剥落所致。连续培养至第 45 d 时,改性菌丝球颗粒仍能保持完整的结构,颗粒直径相比于纯菌丝球有略微的增大,但颗粒的颜色已经由浅黄色变为黄褐色,且培养基中有大量的黄褐色絮体,结合 2.2 节中得出的脱氢酶活性随培养时间延长而提升,表明在改性菌丝球颗粒培养的过程中,T13 的菌量有明显的提升,不仅在改性菌丝球颗粒的表面附着生长,且进入液体培养基的游离菌体能够形成具有活性的絮体。

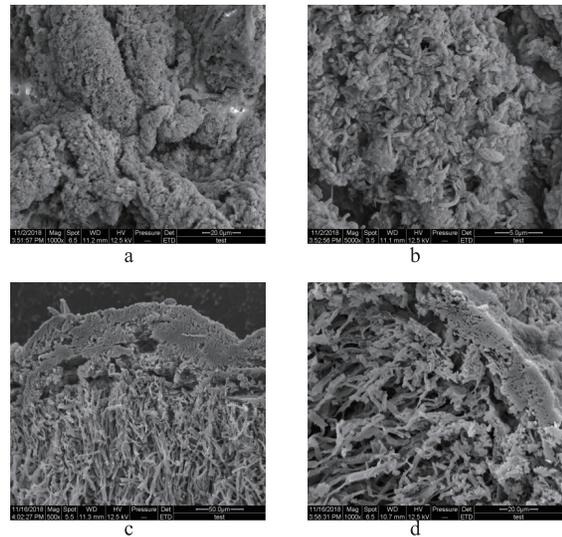


a:改性菌丝球负载 T13 后培养第 1 d;b:改性菌丝球负载 T13 后培养第 4 d;c:改性菌丝球负载 T13 后培养第 7 d;d:改性菌丝球负载 T13 后培养第 10 d;e:改性菌丝球负载 T13 后培养第 13 d。  
图 6 改性菌丝球负载 T13 的变化

Fig.6 Photograph changes of modified mycelial pellets loaded with T13

改性菌丝球负载 T13 的 SEM 图像也可以表明菌丝球固定 T13 强化后的效果。由图 7a、图 7b 可以清晰看出,改性菌丝球表面负载了大量的 T13 细菌,能够维持较为完整的颗粒状结构,横截面 SEM 图像(图 7c、图 7d)表明,改性菌丝球的内部是由菌丝缠绕在一起形成的紧密网状结构,为颗粒的整体提供了支撑,且能为改性菌丝球提供较大的比表面积和良好的传质性能,使得 T13 细菌得以在改性菌丝球表面附着生长。黑曲霉 Y3 形成的菌丝球作为生物载体也被用于固定产氢细菌<sup>[32]</sup>和产絮菌<sup>[12]</sup>以提高氢气和生物絮凝剂的产量,在这些研究中,产氢

细菌和产絮菌也成功地固定在了菌丝球的表面。



a、b:改性菌丝球表面;c:切面图像;d:内部结构。

图 7 改性菌丝球负载 T13 的电镜扫描图像(SEM)

Fig.7 Scanning electron microscope (SEM) images of modified mycelial pellets loaded with T13

### 3 讨论

菌丝球作为生物载体在以往的研究中被用于其他一些功能微生物的固定,并用于强化污染物的去除,Dong 等<sup>[33]</sup>利用黄孢原平毛茸菌 DH-1 形成的菌丝球负载光合细菌 PSB-1D,用于强化 2-氯酚的去除,发现用同时培养法形成的混合菌丝球在 7 d 内对 2-氯酚的降解率可达 89%以上。林胜红等<sup>[34]</sup>使用烟曲霉形成的菌丝球固定另一株产漆酶的荧光假单胞杆菌后处理刚果红废水,结果表明,被固定后的混合菌丝球对废水的脱色效能和染料的降解效率都有了明显提升。在本研究中,菌丝球负载 T13 对全氮的去除效能有较大的提升,在未经生物絮凝剂改性强化的情况下,当负载比例为 1:15 时,可使全氮的去除率提升约 17.00%,而经过生物絮凝剂改性强化后,全氮的去除率在相同条件下又可提升 9.01%。生物固定强化技术主要目的在于提升体系中功能微生物的生物量,提高其在系统中的活性<sup>[35]</sup>。从脱氢酶活性的变化可以看出,T13 可以在菌丝球的表面附着生长,菌丝球载体颗粒表面的脱氢酶活性在逐渐升高,而在生物絮凝剂改性强化菌丝球之后,仅培养 7 d 后,载体表面的脱氢酶活性就有明显的提高,同时去除全氮的效能相比于游离菌

也有较大改善,说明经过生物絮凝剂改性的菌丝球可以强化好氧反硝化菌 T13 的固定,增强 T13 在体系中的菌量和活性。

有研究表明,在微生物负载在载体表面的过程中,EPS 起到了重要作用。王鑫等<sup>[36]</sup>用膨胀石墨-海藻酸钙法固定石油菌 T4 的过程中发现,T4 附着在载体表面的时候会分泌大量的 EPS。田秀梅等<sup>[37]</sup>采用乙酸改性苧麻纤维为载体吸附固定石油降解菌时也发现,细菌自身产生的胞外聚合物增强了对载体材料的黏附。而在膜生物反应器的研究中也发现,通过减少 EPS 的产生可以有效预防微生物群体附着在膜的表面,有效减少膜污染的发生<sup>[38]</sup>。在本研究中,FTIR 的图谱分析结果表明,多个蛋白质或多糖中含有的基团的吸收峰在改性菌丝球负载 T13 前后产生了变化。而从 EEM 分析结果中可以看出,EPS 的含量在 13 d 的培养中经历了先降低后升高的过程,尽管在前 7 d 中被固定的 T13 菌量有少许下降,但在后续的培养过程中其菌量和活性都有所提高,这一结果表明,EPS 在改性菌丝球负载 T13 的过程中起到了关键作用,特别是蛋白质,有助于 T13 在菌丝球表面的固定。

改性菌丝球培养过程中的表观图像及 SEM 图像表明,改性菌丝球可以作为生物载体将好氧反硝化菌 T13 有效固定在其表面。经过 45 d 的培养后,改性菌丝球载体仍能保持完整、良好和紧实的结构,菌丝缠绕形成的表面提供了较大的比表面积供细菌附着,而 T13 菌体附着后也可以继续生长繁殖,且从载体表面脱离下来的菌体也能够形成具有活性的絮体,避免在固液分离的过程中被排出系统导致流失。

致谢:本项目受黑龙江省“头雁”计划项目《寒区生态环境保障理论技术》资助,特此感谢!

#### 参考文献:

- [1] 王建芳,赵庆良,林佳侃,等. 生物强化技术及其在废水污水处理中的应用[J]. 环境工程学报, 2007, 1(9): 40-45.
- [2] 陈仁杰,谢禹,荆肇乾. 污水新型生物脱氮强化技术研究进展[J]. 应用化工, 2020, 49(8): 2075-2079.
- [3] BOUABIDI Z B, EL-NAAS M H, ZHANG Z. Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2019, 17: 241-257.
- [4] 张婷月. 好氧反硝化菌的筛选及其固定化强化农村生活污水脱氮研究[D]. 上海:华东师范大学, 2020.
- [5] 熊振湖,孙翠珍,刘青春. 不同载体固定化藻菌共生系统的脱氮除磷效果[J]. 环境科学与技术, 2005, 28(1): 82-84,119.
- [6] 岳艳利. 大孔聚氨酯载体固定化微生物及其污水处理研究[J]. 兰州:兰州大学.
- [7] JIM NEZ-P REZ M V, S NCHEZ-CASTILLO P, ROMERA O, et al. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure[J]. Enzyme & Microbial Technology, 2004, 34(5): 392-398.
- [8] 李丽. 生物质炭改性及其与微生物联合脱氮除磷研究[D]. 南京:南京大学, 2015.
- [9] FU Y, VIRARAGHAVAN T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review[J]. Bioresource Technology, 2001, 79(3): 251-262.
- [10] TAŞTAN E, ERTUĞRUL S, DÖNMEZ G. Effective bioremoval of reactive dye and heavy metals by *Aspergillus versicolor*[J]. Biore-source Technology, 2010, 101(3): 870-876.
- [11] ZHANG S, LI A, CUI D, et al. Performance of enhanced biological SBR process for aniline treatment by mycelial pellet as biomass carrier[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(6): 4360-4365.
- [12] WANG J N, LI A, YANG J X, et al. Mycelial pellet as the biomass carrier for semi-continuous production of biofloculant[J]. Rsc Advances, 2013, 40(3): 18414-18423.
- [13] ZHAO L, CAO G L, WANG A J, et al. Enhanced bio-hydrogen production by immobilized *Clostridium* sp T2 on a new biological carrier[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37(1): 162-166.
- [14] MURADOV N, TAHA M, MIRANDA A F, et al. Fungal-assisted algal flocculation: application in wastewater treatment and biofuel production[J]. Biotechnol Biofuels, 2015, 8(1): 24.
- [15] 张斯. 混合菌丝球形成机理及其净化效能研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2008.
- [16] 张斯. 菌丝球生物载体的构建及其强化废水处理效能研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2011.
- [17] 王强. 磁强化好氧反硝化菌的生物脱氮机制与效能[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2010.
- [18] 王金娜. 产絮菌 *Agrobacterium tumefaciens* F2 利用混合碳源半连续发酵制备生物絮凝剂[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2014.
- [19] 孙秀玥,唐珠,杨新萍. 活性污泥胞外多聚物提取方法的比较[J]. 环境科学, 2018, 39(7): 3306-3313.
- [20] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. 福林酚试剂法测定蛋白质[J]. 食品与药品, 2011, 13(3): 147-151.
- [21] 牛志卿,刘建荣. TTC-脱氢酶活性测定法的改进[J]. 微生物学通报, 1994, 21(1): 59-61.
- [22] JOHNSTON I R. The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*[J]. Biochemical Journal, 1965, 96(3): 651-658.
- [23] GMEZ R, SCHNABEL I, GARRIDO J. Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110[J]. Enzyme Microb Technol, 1988, 10(3): 188-191.
- [24] FLACHNER B, BRUMBAUER A, RECZEY K. Stabilization of  $\beta$ -glucosidase in *Aspergillus phoenicis* QM 329 pellets[J]. Enzyme &

- Microbial Technology, 1999, 24(6): 362-367.
- [25] LIANG Z, LI W, YANG S, et al. Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge [J]. Chemosphere, 2010, 81(5): 626-632.
- [26] LEONE L, LORING J, SJ BERG S, et al. Surface characterization of the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*-an XPS study [J]. Surface & Interface Analysis, 2010, 38(4): 202-205.
- [27] PARIKH S J, JON C. ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide [J]. Langmuir, 2006, 22(20): 8492-8500.
- [28] CHEN W, WESTERHOFF P, LEENHEER J A, et al. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 37(24): 5701-5710.
- [29] SHENG G P, YU H Q. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy [J]. Water Res, 2006, 40(6): 1233-1239.
- [30] YAMASHITA Y, TANOUE E. Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids [J]. Marine Chemistry, 2003, 82(3): 255-271.
- [31] PONS M N L, BONT S, POTIER O. Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation [J]. J Biotechnol, 2004, 113(13): 211-230.
- [32] ZHAO L, CAO G L, YAO J, et al. Optimization of immobilization parameters of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 on a new carrier for enhanced hydrogen production [J]. Rsc Advances, 2012, 2(19): 7391-7395.
- [33] DONG Y, LI P, HE J, et al. Comparison of two mycelial pellets formation methods to immobilize *O*-chlorophenol degradation bacteria [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(5): 753-764.
- [34] 林胜红,田永强,潘晓梅,等. 混合菌丝球的制备以及对刚果红降解性能的研究 [J]. 工业水处理, 2018, 38(12): 39-41.
- [35] 杨宗政,许文帅,吴志国,等. 微生物固定化及其在环境污染治理中的应用研究进展 [J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 333-347.
- [36] 王鑫,王学江,卜云洁,等. 漂浮型固定化微生物去除海洋石油污染物研究 [J]. 水处理技术, 2014, 40(9): 48-51.
- [37] 田秀梅,王晓丽,彭士涛,等. 乙酸改性苧麻纤维固定化微生物的石油污染修复研究 [J]. 应用化工, 2019, 48(9): 2045-2049.
- [38] 赵畅,王文昭,徐期勇. 群体感应淬灭菌的分离及其膜污染控制性能 [J]. 环境科学, 2016, 37(12): 4720-4726.

(责任编辑:陈海霞)