



文章栏目：水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.202009015

中图分类号 X703

文献标识码 A

史文超, 桂梦瑶, 杜俊逸, 等. 典型微塑料对好氧反硝化菌群脱氮特性及反硝化相关基因的影响[J]. 环境工程学报, 2021, 15(4): 1333-1343.

SHI Wenchao, GUI Mengyao, DU Junyi, et al. Effects of typical microplastics on the denitrification characteristics and denitrification related genes of aerobic denitrifying bacteria[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(4): 1333-1343.

典型微塑料对好氧反硝化菌群脱氮特性及反硝化相关基因的影响

史文超, 桂梦瑶, 杜俊逸, 马志飞, 吴代赦*

南昌大学资源环境与化工学院, 鄱阳湖环境与资源利用教育部重点实验室, 南昌 330031

第一作者: 史文超(1996—), 女, 硕士研究生。研究方向: 水污染控制。E-mail: 1475028522@qq.com

*通信作者: 吴代赦(1972—), 男, 博士, 教授。研究方向: 环境与健康。E-mail: dswu@ncu.edu.cn

摘要 随着塑料排放问题日益严重, 造成污水处理厂中存在大量的微塑料, 而微塑料对好氧反硝化菌的影响机制尚不清楚。基于 SBR 富集筛选好氧反硝化菌群, 并深入研究了水体中典型微塑料(PS、PA)对好氧反硝化菌群的影响, 同时从菌群胞外多聚物含量、比耗氧速率、微生物群落结构变化以及反硝化基因(napA, nirS, cnorB, nosZ 基因)丰度变化等多个角度揭示了其可能的影响机制。结果表明: 典型微塑料 PS、PA 的胁迫均会对好氧反硝化菌群的脱氮性能产生抑制作用, 产生一定量亚硝酸盐氮的积累。高通量测序分析结果揭示了功能性反硝化降解微生物群落的丰度和种类变化是 SBR 脱氮性能变化的主要原因。以上研究成果可为将好氧反硝化菌应用于接纳工业废水的城镇污水处理厂中提供参考。

关键词 好氧反硝化; 脱氮特性; 工业废水; 微塑料; 群落结构

进入环境的微塑料会导致生物链破坏等一系列环境问题, 严重影响生态系统的稳定性和人类健康。微塑料(microplastics, MPs), 通常指粒径小于 5 mm 的塑料颗粒, 是近年来新兴环境污染物研究的热点对象之一^[1]。虽然现场研究中记录的 MPs 的尺寸范围相对较广, 但目前大多数实验室研究通常在较小的尺寸范围内使用纳/微塑料(N/MPs), 介于纳米和亚微米之间^[2-4]。即使在小范围内, 获得的 N/MPs 的生态毒理学数据也显示出一些差异。一般认为, 粒径越小的 N/MPs, 其生物利用度越高, 保留时间越长, 对生物群的毒性越大^[5]。

由于微纳米塑料污染是环境领域的一个新兴问题, 许多基础研究问题仍有待解决, 现有的研究大多局限于微塑料在生物体内的积累, 在河口区采集的 23% 野生海鲶和 7.9% 的石首鱼体内均检测到微塑料^[6-7]。但有关微塑料对微生物生态影响的研究还较少, 已有研究表明, 塑料在海洋环境里能作为载体供微生物附着生长, 由于塑料的疏水性, 其表面可有利于微生物生物膜的形成^[8]。MPs 影响微生物群落的结构和功能, 进而导致 MPs 的物理和化学性质的改变。NEGORO^[9]解析了由壤霉菌属 nylC 编码的尼龙寡聚物水解酶的晶体结构并证明四倍体突变体能水解多聚尼龙, 但尼

收稿日期: 2020-09-02; 录用日期: 2021-01-13

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(41907168)

龙水解酶是否能在合适的时间段内大量分解 PA 还需证明。YANG 等^[10]发现聚苯乙烯饲喂的黄粉虫幼虫粪便中 PS 长链发生解聚,证明了肠道微生物对 PS 分解起主要作用,分离出一株能以 PS 为唯一碳源的微小杆菌 *Exiguobacterium* sp.YT2,在液体培养 60 d 能降解 7.4%±0.4% 的聚苯乙烯。然而,污水处理过程中微塑料对好氧反硝化脱氮效果的研究还很少,其对好氧反硝化污泥的影响机制尚待探讨。因此,本研究以反硝化污泥作为接种源,富集筛选好氧反硝化菌群,以 60 nm 聚苯乙烯 (PS) 和 37~74 μm 聚酰胺 (PA) 作为模型微塑料污染物,旨在研究微塑料对好氧反硝化菌群脱氮特性及反硝化相关基因表达的影响,为好氧反硝化菌在污水处理厂中的应用提供理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 菌群来源和培养基

本研究所用接种污泥取自于江西省南昌市泉岭垃圾焚烧发电厂的渗滤液处理反硝化污泥。富集培养基/驯化测试培养基: CH_3COONa 3.28 g·L⁻¹、 NH_4Cl 0.38 g·L⁻¹、 KNO_3 1 g·L⁻¹、 KH_2PO_4 0.1 g·L⁻¹、 K_2HPO_4 0.168 g·L⁻¹、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g·L⁻¹、 CuSO_4 0.1 mg·L⁻¹、 CaCl_2 0.01 g·L⁻¹、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006 g·L⁻¹。去离子水溶解,碳氮比为 4, pH 为 7.0~7.5, 约含 100 mg·L⁻¹ 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 140 mg·L⁻¹ 的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。反硝化性能测试培养基: CH_3COONa 8.45 g·L⁻¹、 NH_4Cl 0.63 g·L⁻¹、 KNO_3 0.726 g·L⁻¹、 KH_2PO_4 0.18 g·L⁻¹、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g·L⁻¹、 CaCl_2 0.02 g·L⁻¹、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006 g·L⁻¹; 约含 160 mg·L⁻¹ 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 100 mg·L⁻¹ 的 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 。去离子水溶解。将所有培养基的 pH 调至 7.0~7.5, 在 121 °C 灭菌 30 min。

1.2 实验装置

反硝化污泥的富集和驯化过程在总容积为 3 L 的自制透明有机玻璃 SBR 中进行, SBR 中部配有恒速电动搅拌器,体系内部通过可调式空气泵和砂芯曝气器对反应体系进行曝气。运行周期约为 24 h, 包括瞬间进水、约 23 h 好氧反应、15 min 静置沉降、0.5 h 出水和闲置,排水比接近 100%。取样点设置在静置前。反应装置如图 1 所示。

1.3 菌群的富集和驯化

取 400 mL 反硝化污泥于 SBR 中,向其中加入 2 L 富集培养基。在转速为 150 r·min⁻¹ 的恒速电动搅拌下,打开曝气器进行富集培养。运行周期约为 24 h (好氧反应时间约 23 h)。对每个周期的出水水样进行水质分析,测定三氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$) 和 pH。分别取 200 mL 富集得到的好氧反硝化菌群样品于 3 个自制的 SBR 中,分别记为 M_0 、 M_1 、 M_2 ,各加入 1 L 驯化培养基。在每次运行周期开始前,向 M_1 和 M_2 反应器中分别加入 250 μg·L⁻¹ PS 和 250 μg·L⁻¹ PA,在 150 r·min⁻¹ 下打开曝气器进行驯化培养,运行周期与富集过程相同。对每个周期的出水水样进行水质分析比较,测定三氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$)、TOC、TN 和 pH。

1.4 比耗氧速率分析

取一定体积菌群样品,于 3 500 r·min⁻¹ 下离心 5 min,弃去上清液,剩余样品用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 缓冲液 (pH=7) 重悬,将溶解氧浓度达到饱和的模拟生活污水倒入后迅速将橡皮塞塞上,体系内保证无气泡,打开溶解氧仪,每隔 30 s 记录溶解氧的变化值,同时测定 MLSS。

1.5 胞外聚合物及溶解性微生物产物分析

对驯化周期结束后所取菌群样品采用超声提取法^[11]进行附着型胞外聚合物 (EPS) 及溶解性微

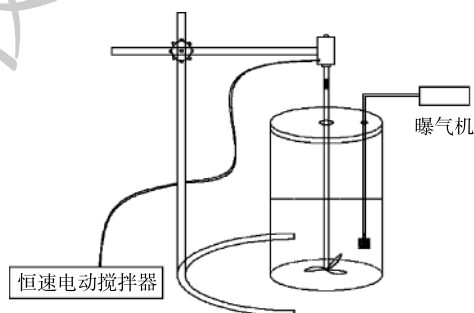


图 1 SBR 反应装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of SBR device

生物产物 (SMP) 的提取和测定。取 4 mL 菌群样品于 5 500 r·min⁻¹ 离心 20 min, 其上清液经由 0.22 μm 纤维素滤膜过滤, 过滤液即为 SMP 样品, 向剩余样品中加入 0.9% 的生理盐水至原体积后再次进行涡旋振荡, 重复此操作 2 次。将上述样品在 40 W、2 min 下冰水浴超声。再将上述样品在 8 000 r·min⁻¹ 下离心 30 min 后, 上清液采用 0.22 μm 纤维素滤膜过滤, 所得溶液即为 EPS 样品。

1.6 群落结构分析

取 1 mL 污泥或菌群样品, 采用细菌 DNA 提取试剂盒 (申能博彩, 上海) 提取细菌的基因组 DNA, 最后用 100 μL TAE 洗脱。琼脂糖凝胶电泳检测合格后, 采用高通量测序技术对提取的 DNA 样品进行微生物群落结构及多样性分析。

1.7 反转录-荧光实时定量 PCR 分析

对提取的 DNA 样品进行荧光定量 PCR 分析, 目的基因为 *napA*、*nirS*、*cnorB*、*nosZ*。引物序列^[12-15]如表 1 所示。其中 16S rRNA 的 V3 区作为内参来统一每个 PCR 管中 cDNA 总量的差异。PCR 反应体系 (20 μL) 包括 2X PCR 缓冲液 10 μL, 10 μm 的正向引物和反向引物各 0.4 μL, 2 μL 的 DNA 模板, 最后补充 7.2 μL 的 ddH₂O。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primers sequence

基因名称	引物名称	引物序列 (5'~3')
16S rRNA	F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
	R1492	TTGGYTACCTTGTACGACT
V3 region of 16S rRNA	F341	CCTACGGGAGGCAGCAG
	R518	ATTACCGCGGCTGCTGG
<i>napA</i>	<i>napA</i> Z3F	CGCGAACAAGCTGATGAAGG
	<i>napA</i> Z3R	AAGATCATCGGGATGTCGGC
<i>nirS</i>	<i>nirS</i> cd3aF	G TSAACG TSAAGGARACSGG
	<i>nirS</i> R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA
<i>cnorB</i>	<i>cnorB</i> Z1F	CGTCGGTCAGATCCTCTTCG
	<i>cnorB</i> Z1R	GCGATGATCACGTAGAGCCA
<i>nosZ</i>	<i>nosZ</i> 1527F	CGCTGTTCHTCGACAGYCA
	<i>nosZ</i> 1773R	CGCTGTTCHTCGACAGYCA

1.8 分析方法

硝酸盐氮使用紫外分光光度法^[16]检测; 氨氮使用纳氏试剂光度法^[17]检测; 亚硝酸盐氮使用 N-(1-萘)-乙二胺光度法^[18]检测; 蛋白质使用考马斯亮蓝染色法^[19]检测; 多糖使用苯酚-硫酸法^[20]检测; pH、DO 使用玻璃电极法检测; MLVSS 使用重量法检测。

2 结果与讨论

2.1 富集前后好氧反硝化性能

富集实验中 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 和 NO₂⁻-N 的浓度变化情况如图 2 所示。由图 2 可见, 接种污泥在富集之前基本无法去除模拟工业废水中的氨盐和硝酸盐, 反硝化性能受到明显的抑制。经过 120 d 的调试和富集实验, 富集菌群体系中氨氮和硝氮的去除率得到了显著提高, 而亚硝酸盐氮的积累几乎不存在。这可能是由于菌群的同化作用增强了对氨氮的去除率, 同时好氧反硝化作用可以将硝化作用产生的氧化态氮去除。此时反应器出水基本检测不到硝态氮的存在, 且能在一段时间内保

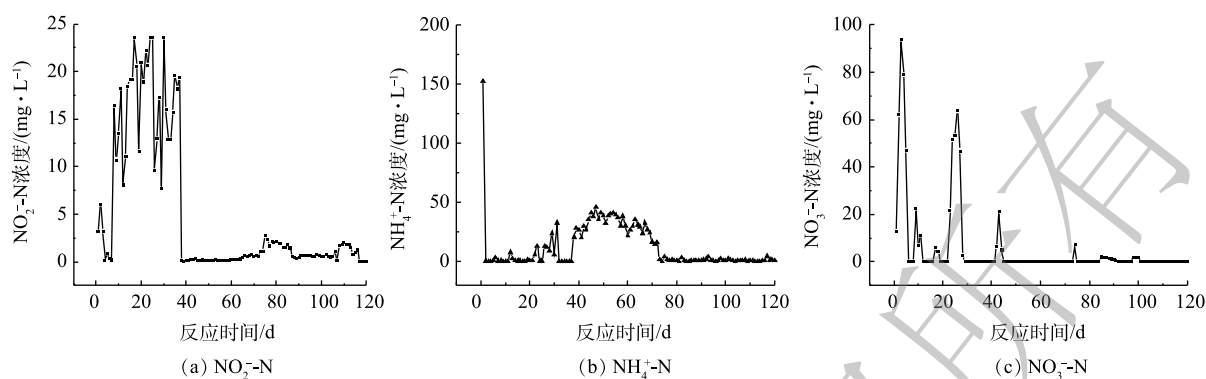


图2 富集实验NO₂-N、NH₄⁺-N、NO₃-N浓度变化

Fig. 2 Concentration variations of NO₂-N, NH₄⁺-N, NO₃-N in enrichment experiment

持稳定, 成功富集得到良好的好氧反硝化菌群, 其中发挥主要反硝化作用的是好氧反硝化细菌。

在富集结束后, 菌群脱氮性能的结果如图3所示。由图3可知, 在好氧环境下, 富集菌群表现出了良好的反硝化性能, 在24 h内将初始浓度约为100 mg·L⁻¹的氨氮几乎完全去除, 24 h时氨氮的去除率约为97.9%。菌群在8 h内便可将约为140 mg·L⁻¹的硝酸盐氮完全去除, 此时的硝氮去除率可达到100%。反应体系去除硝酸盐氮的过程中, 伴有微量亚硝酸盐氮的积累。在菌群富集后,

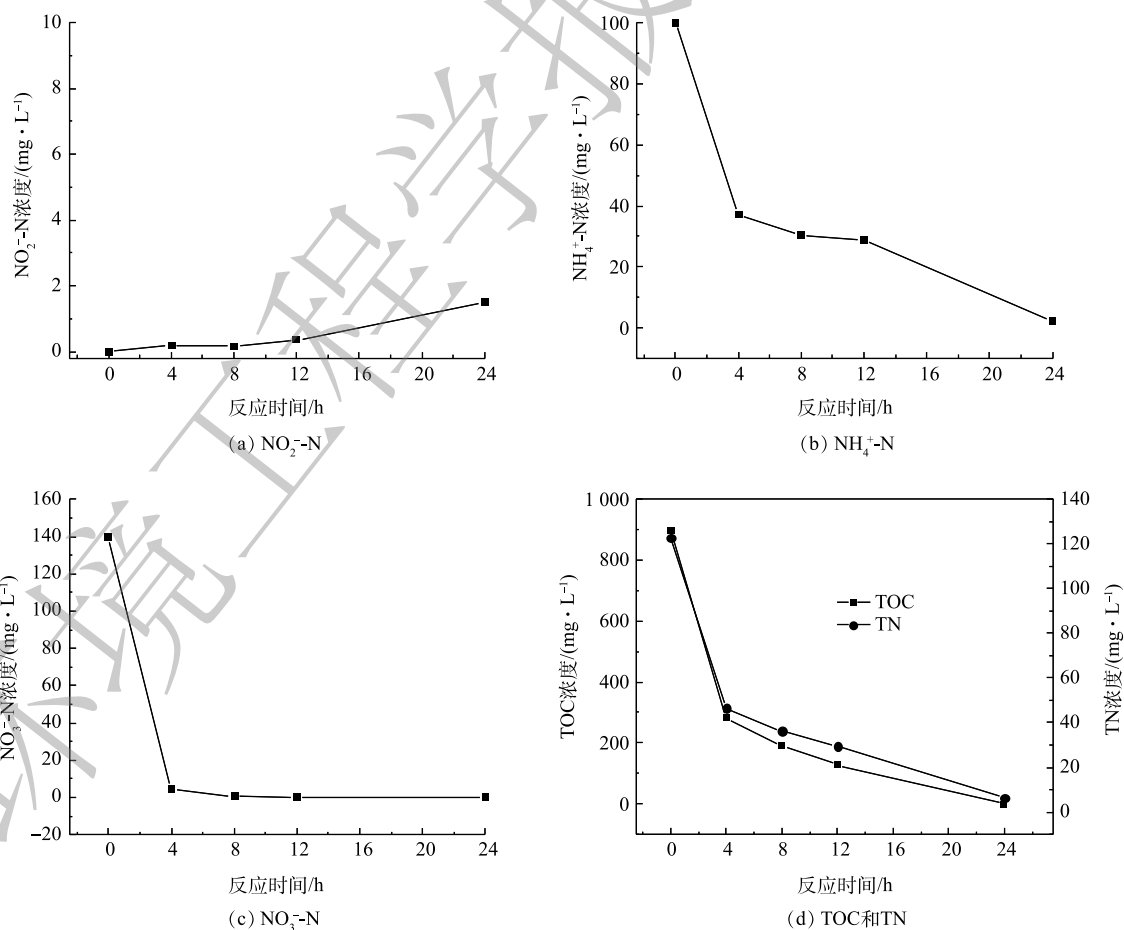


图3 富集后菌群脱氮性能变化

Fig. 3 Variations of denitrification performance after enrichment

模拟废水中的总有机碳和总氮也表现出与硝态氮同样的下降趋势, 分别降至 $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明菌群的脱氮性能良好。

2.2 菌群的驯化

1) 驯化过程中的三氮、TOC、TN 变化。驯化实验中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、TOC、TN 浓度变化情况如图 4 所示。由图 4 中可知, 空白组 M_0 的总氮、硝酸态氮的去除率均比添加了微塑料的 M_1 和 M_2 的高, PS 与 PA 对于菌群的胁迫基本不会对反应体系中氨氮的去除造成影响, 好氧反硝化菌群均可在驯化周期内将 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 完全去除。2 种微塑料对于菌群体系去除硝态氮的影响有所不同, 添加 PS 的 M_1 对于硝态氮的去除不会产生抑制作用, 而添加 PA 的 M_2 在驯化前期与 M_0 和 M_1 去除 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 的变化趋势相同, 可以将 $140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝态氮完全去除; 但在驯化后期, PA 的累积抑制了 M_2 中硝态氮的去除。2 种微塑料均会对亚硝酸盐氮的积累产生一定的促进作用, 添加 PS、PA 较空白组会产生不同程度亚硝酸盐氮的积累, PA 的促进效果更加明显。反应过程中产生亚硝酸盐氮的积累, 这可能是因为相对于硝酸盐氮还原酶, 亚硝酸盐氮还原酶受氧气的抑制程度更高, 这导致在相同好氧条件下亚硝酸盐氮去除速率小于硝酸盐氮去除速率, 从而导致反硝化过程中存在亚硝酸盐氮积累^[21-23]。由图 4 可知, 微塑料 PA 的累积基本上对于总有机碳的去除不会产生影响, 但会对总氮的去除产生抑制作用, 与其影响硝酸盐氮的趋势相同; PS 的投加对于反应体系去除总氮影响并不明显, 但添加 PA 会导致总氮的去除率降低, 约为空白组总氮去除率的 50%。以上结果也进一步证明了微塑料的累积会对好氧反硝化菌群的脱氮性能产生抑制作用。

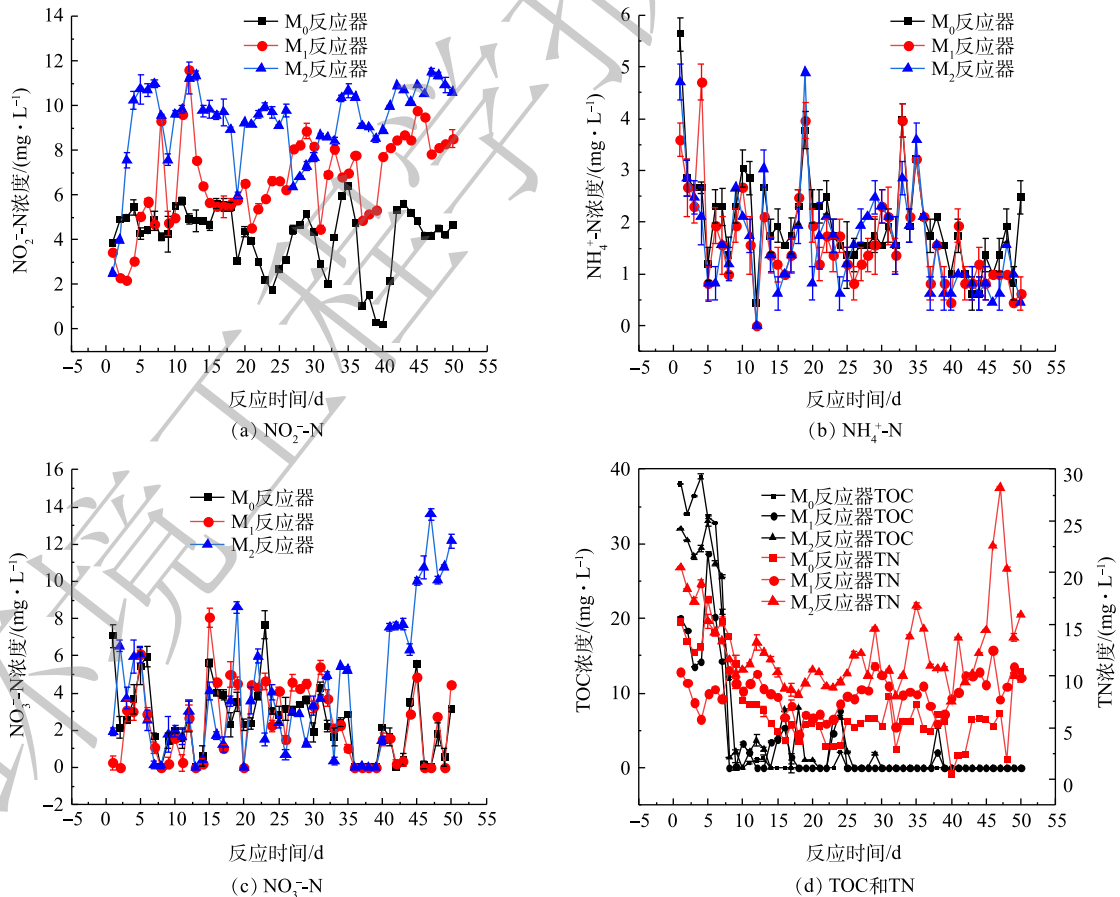


图 4 驯化实验中 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TOC、TN 浓度变化

Fig. 4 Concentrations of $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、TOC、TN versus time during the acclimation experiments

2) 微塑料对驯化后菌群脱氮性能的影响。取驯化后菌群测试其反硝化性能结果见图5。结果表明, 微塑料 PS、PA 均会对驯化后菌群的好氧反硝化性能产生一定影响。第0~9小时, 氨氮、硝氮和总氮的浓度下降趋势很明显, 总有机碳也表现出了相同的下降趋势, 期间几乎没有亚硝酸盐氮的积累, 表明发生了好氧反硝化过程。与空白组相比, 反应进行到12 h后, 污染物 PS、PA 明显造成了反应体系中亚硝酸盐氮的积累, 而不投加微塑料的空白组没有亚硝酸盐氮的积累, 反应进行到36 h时, 添加 PS 和 PA 后分别导致反应体系中亚硝酸盐氮的浓度上升至 $8.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $11.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由图5可以看出, 微塑料的长期胁迫对于好氧反硝化菌群去除氨氮和总有机碳的影响不大, 几乎可以忽略不计。PS、PA 影响驯化后的菌群去除硝酸盐氮的效果有所不同。与空白组硝氮去除率(97.9%)相比, 驯化后的菌群在 PS 累积的作用下, 12 h 可快速去除 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NO_3^- -N, 硝氮去除率约为 96.5%, 而此时在 PA 累积的作用下, 硝氮去除率仅为 56.6%。同时, 反应时间为 36 h 时, 空白组总氮浓度由 $177.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 降至 $10.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 而在 PS 和 PA 的胁迫下, TN 浓度分别降至 $13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由此可见, PA 对于好氧反硝化作用的抑制效果更加显著, 含一定浓度的微塑料(尤其是 PA) 的工业废水对好氧反硝化细菌的生物脱氮效果有较大的负面影响。

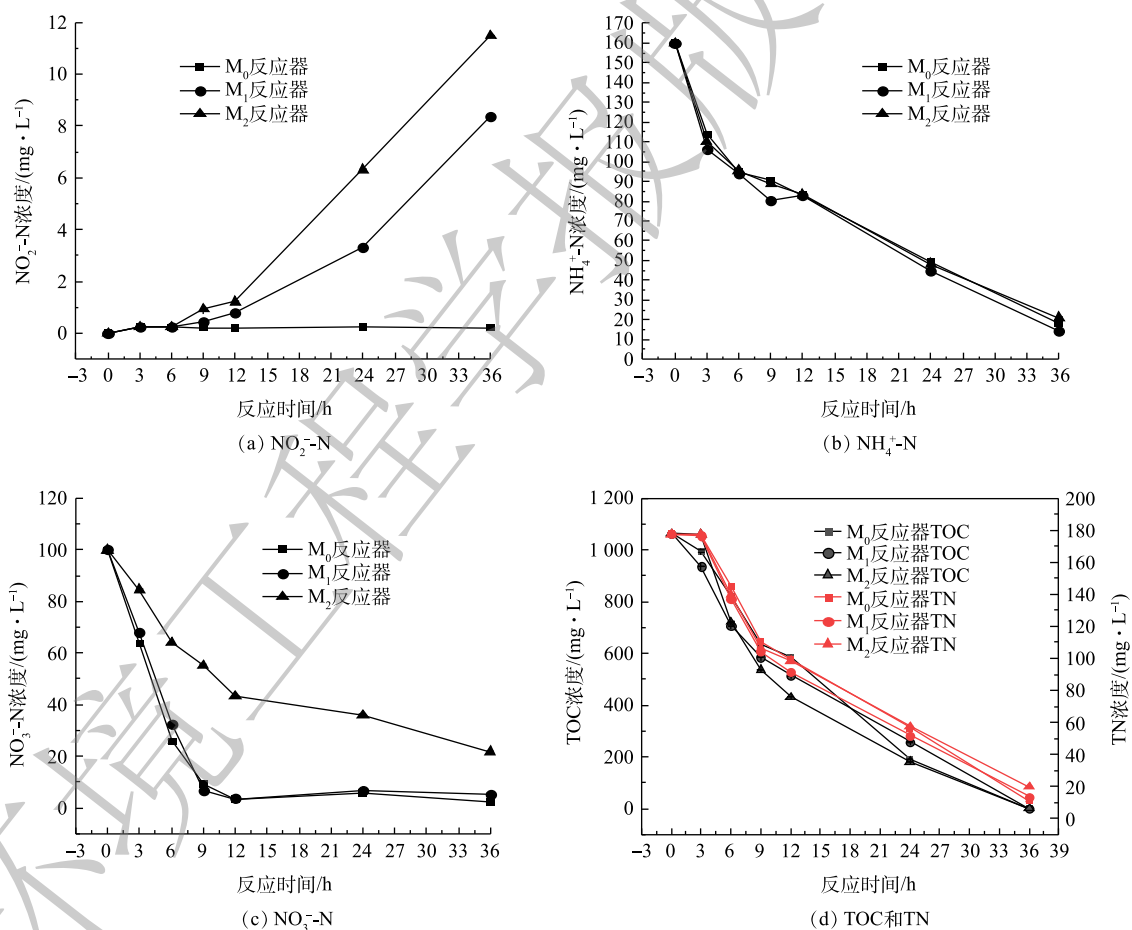


图5 驯化实验后 NO_2^- -N、 NH_4^+ -N、 NO_3^- -N、TOC、TN在36 h内浓度的变化

Fig. 5 Variations of NO_2^- -N, NH_4^+ -N, NO_3^- -N, TOC, TN over 36 h after acclimation

2.3 对污泥性能的影响

驯化期 SBR 中污泥浓度的变化如图6所示。由图6可见, 3个反应器中的污泥浓度均在50 d内呈下降的趋势, 且 M₂ 反应器的下降趋势更加明显, 这可能也是造成上文所述 M₂ 反应器出水水

质较差的原因之一。

3个SBR中驯化后污泥的比耗氧速率检测结果如图7所示,由图7可知, M_0 、 M_1 、 M_2 反应器中的SOUR分别为0.209、0.203、0.306 $\text{mg}\cdot(\text{g}\cdot\text{min})^{-1}$ 。可见,添加了PA的 M_2 的SOUR要明显高于空白实验组 M_0 与添加了PS的 M_1 。这说明微塑料PA的累积会使污泥的比耗氧速率得到提高,导致污泥的活性加大^[24]。

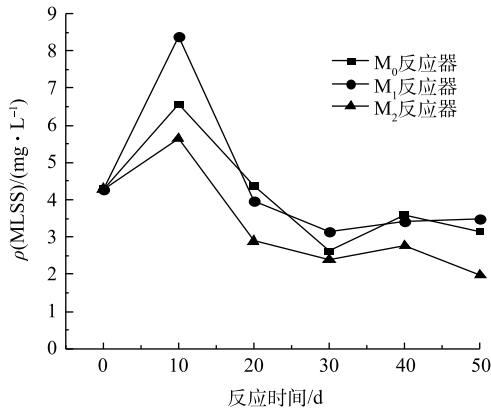


图6 污泥浓度变化

Fig. 6 Variations of sludge concentration

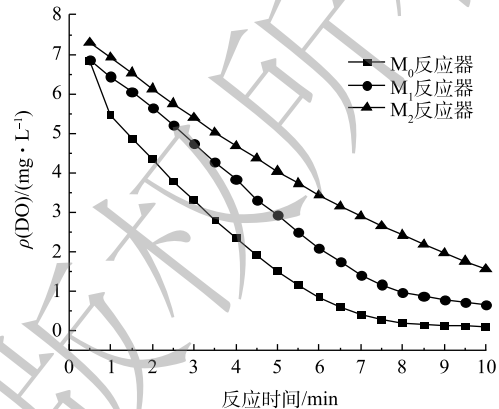


图7 SBR系统SOUR对比

Fig. 7 Comparison of systematic SOUR in SBR system

2.4 EPS及SMP分析

EPS作为PN、PS等物质的复杂混合物,在促进微生物的聚集和保护中起着重要作用,还可以保护处于恶劣环境条件下的反硝化污泥^[25]。有研究^[26]表明,EPS的含量与污泥的稳定性呈正相关,EPS含量越高说明污泥稳定性越好。对3组SBR中驯化污泥中EPS和SMP的浓度进行监测,结果见表2。如表2所示, M_1 反应器EPS和SMP中的糖类和蛋白质浓度均低于 M_0 反应器,而 M_2 反应器EPS和SMP中浓度均高于 M_0 反应器。由表2可以看出:从反应第10~50天,3组反应器的EPS中的糖类和蛋白质浓度均有所提高,其中 M_2 反应器增长趋势最为显著,这可能是 M_2 反应器出水水质较差的原因之一;3组反应器的SMP中的糖类浓度均呈现下降趋势,而蛋白质浓度则有所提高。李慧等^[27]研究发现,SMP浓度增加会恶化污泥的可滤性,从而加速膜污染。污泥的SMP含量的积累,可能会抑制污泥的代谢活性,不利于污水出水水质的改善。徐文迪等^[28]研究发现,较高的EPS浓度会恶化污泥的脱水及过滤性能。由此推断,微塑料的长期积累可能会对微生物产生毒害作用,促使污泥中的微生物产生更多的EPS和SMP,导致出水水质变差,而PA对反应器的影响要大于PS。

2.5 群落结构分析

采用16S rRNA高通量测序技术探索反应体系的微生物群落。Alpha多样性分析见表3。样品的覆盖指数均大于99%,说明测序深度足以覆盖样品中的大部分微生物,本次测序结果可以代表样品中微生物的真实情况。Chao1和ACE指数反映了微生物群落的丰富度,Shannon指数表征了微生物群落的多样性,值越高表示多样性越大。Simpson指数值越大,说明群落多样性越低。如表3所示,接种污泥的群落多样性最丰富,富集菌群与接种污泥相比较,Shannon值增大,Simpson值、

表2 SBR系统EPS及SMP浓度比较

Table 2 Comparison of EPS and SMP concentrations in SBR system

时间/d	成分	EPS/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			SMP/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		
		M_0	M_1	M_2	M_0	M_1	M_2
10	糖类	0.001 7	0	0.001 8	0.296	0.223	0.298
	蛋白质	0.232	0.175	0.289	0.235	0.175	0.268
50	糖类	0.002	0.001	0.002	0.098	0.096	0.184
	蛋白质	0.726	0.640	1.199	0.700	0.637	1.164

表3 细菌群落 α -多样性Table 3 α -diversity of microbial community

样品	OTU	Shannon指数	ACE指数	Chao1指数	覆盖率/%	Simpson指数
接种污泥	1 292	4.712 194	1 311.596	1 297.283	99.9	0.037 727
富集菌群	940	3.201 481	1 146.133	1 071.852	99.8	0.100 441
空白组	220	2.068 701	233.334 2	228.433 3	99.9	0.205 809
加PS	207	2.317 935	225.290 1	226.772 7	99.9	0.164 635
加PA	225	2.442 192	241.522 1	256.909 1	99.9	0.181 633

Chao1 和 ACE 指数减小, 表明经过数天的富集过程, 降低了 SBR 的物种丰富度, 群落多样性得到了改善。添加 PS、PA 的 Shannon 指数要大于相应的空白组, 而 Simpson 指数值低于空白组, 这说明了微塑料 PA 和 PS 的累积均会造成微生物群落多样性的提高。

图 8 是各样本菌群群落在科水平上的相对丰度变化。接种污泥中优势菌种主要为莫拉氏菌科 (*Moraxellaceae*), 还检测到大量未分类的细菌序列, 说明接种污泥中存在大量未鉴定的物种。经过一段时间的富集之后, 莫拉氏菌科的相对丰度降至 3.7%, 而红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 则由 1.3% 上升至 68.7%, 此时富集菌群的优势菌种主要为红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*)。先前的研究发现 *Rhodobacteraceae* 是一种反硝化细菌, 在氮还原中发挥重要作用^[29]。*Rhodocyclaceae* 具有反硝化功能, 据报道对废水中营养物的去除和好氧颗粒污泥的形成具有重要意义^[30-32]。优势菌种的改变可能是造成富集前后菌群反硝化性能差异的主要原因。空白组的优势种群主要为红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 和黄单胞菌科 (*Xanthomonadaceae*), 相对丰度分别为 47.6% 和 32.9%。加 PS 驯化后, 红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 和黄单胞菌科 (*Xanthomonadaceae*) 的相对丰度分别降至 27.2% 和 27.6%, 而红螺菌科 (*Rhodospirillaceae*) 则上升至 24.4%, 也成为该样本菌群的优势种群。加入 PA 驯化后, 红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 表现出了优越性, 相对丰度较高, 为 66.1%, 成为该样本菌群的主要优势种群。PS、PA 的胁迫在科水平上明显改变了细菌的群落结构。

2.6 基因丰度分析

图 9 是各样本菌群群落基因丰度的变化。由图 9 可知, 采用 PCR 技术确定了其含有 *napA*、*nirS*、*cnorB* 和 *nosZ* 等反硝化基因, 且经过富集过程, *napA* 基因的丰度得到了数量级的提高, 证实了富集菌群中含有典型的好氧反硝化细菌, 在好氧条件下能够由周质硝酸盐还原酶将硝酸盐还原为氮气, 最终达成好氧反硝化过程, 这可以解释为富集过程中微生物群落的变化促进了反硝化细菌的增殖, 以往的研究也得到了类似的结果^[33-35]。在目前研究的反硝化基因中, *napA* 基因最为丰富。由图 9 可以看出, 分别加入 PS、PA 2 种微塑料驯化后, *napA* 和 *nirS* 基因出现了协同表达的趋势, 2 种反硝化基因的表达被抑制, 其中 PA 的胁迫的影响程度较 PS 胁迫更大, 导致 2 种基因丰度发生了数量级的降低。由此可解释加入微塑料后反应体系出现了亚硝酸盐氮的积累, 同时加入 PA 的体系亚硝酸盐氮的积累更加明显。

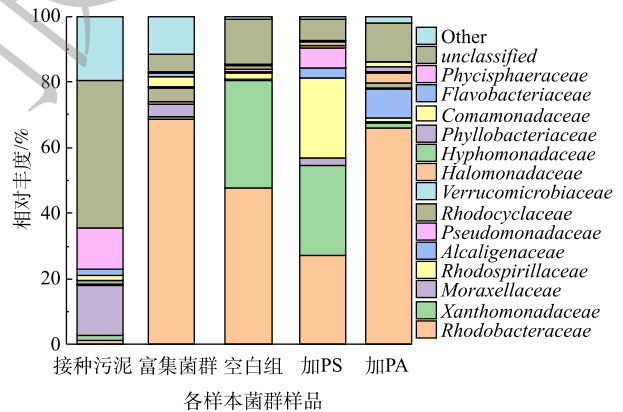


图 8 各样本菌群群落在科水平上的相对丰度

Fig. 8 Relative abundance of microbial community at the family level

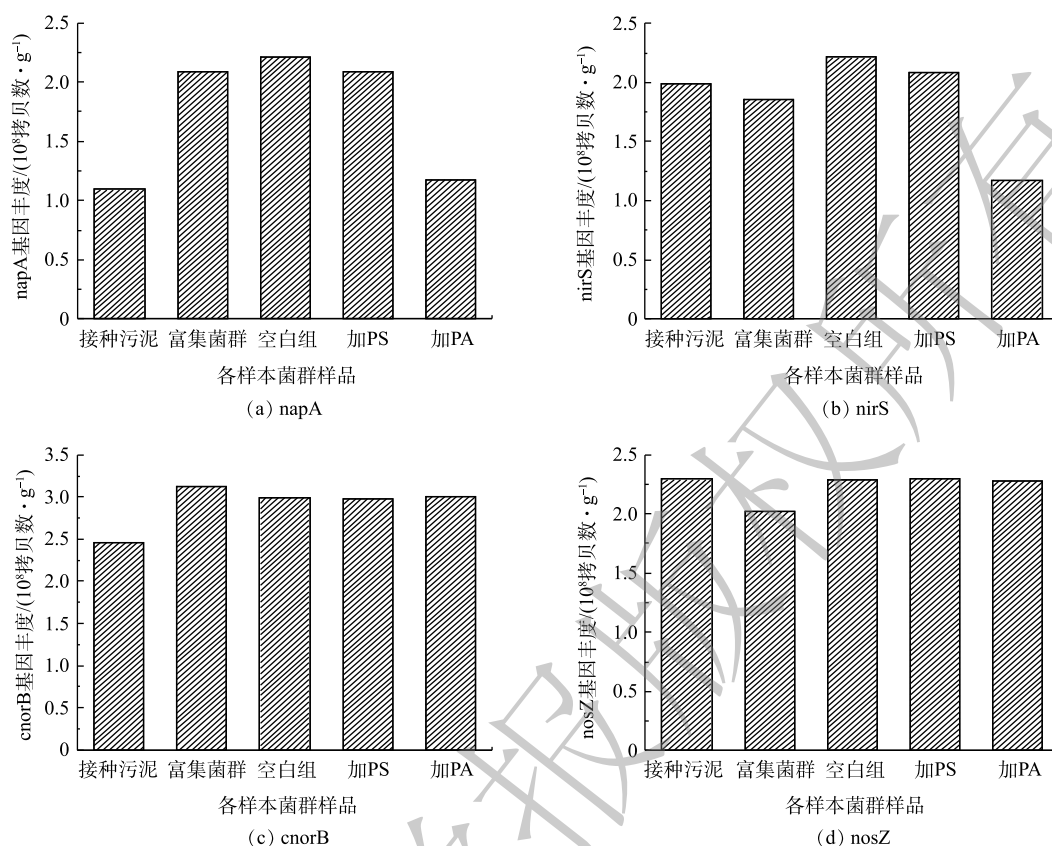


图9 各样本菌群群落基因丰度的变化

Fig. 9 Variations of the gene abundance of microbial community

3 结论

1) 典型微塑料 PS、PA 的累积均会对好氧反硝化菌群的脱氮性能产生抑制作用，产生一定量亚硝酸盐氮的积累，其中 PA 对于好氧反硝化作用的抑制效果更加显著。

2) 微塑料 PA 的累积会使污泥的比耗氧速率得到提高，导致污泥的活性加大。微塑料的长期积累可能会促使污泥中的微生物产生更多的 EPS、SMP，导致出水水质变差，其中 PA 对反应器的影响要大于 PS。

3) 微塑料 PS 和 PA 的长期胁迫均会造成微生物群落多样性的提高和 napA 和 nirS 基因丰度的降低。PS 的胁迫会改变红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 和黄单胞菌科 (*Xanthomonadaceae*) 的相对丰度，同时红螺菌科 (*Rhodospirillaceae*) 也随之成为优势种群；PA 的胁迫导致红杆菌科 (*Rhodobacteraceae*) 好氧反硝化菌群中最主要的优势种群。

参考文献

- [1] ANDRADY A L. Microplastics in the marine environment[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(8): 1596-1605.
- [2] EMILY E B, ALISTAIR B A B. Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2018, 37(11): 2776-2796.
- [3] TRIEBSKORN R, BRAUNBECK T, GRUMMT T, et al. Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 110: 375-392.
- [4] DE S, LUIS C, OLIVEIRA M, et al. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where

- should we focus our efforts in the future?[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 645: 1029-1039.
- [5] RIST S, BAUN A, HARTMANN N B. Ingestion of micro- and nanoplastics in daphnia magna - quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 228: 398-407.
- [6] DANTAS D V, BARLETTA M, COSTA M F. The seasonal and spatial patterns of ingestion of polyfilament nylon fragments by estuarine drums[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2011, 19(2): 600-606.
- [7] POSSATTO F E, BARLETTA M, COSTA M F, et al. Plastic debris ingestion by marine catfish: An unexpected fisheries impact[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(5): 1098-1102.
- [8] GOLDSTEIN M C, ROSENBERG M, CHENG L. Increased oceanic microplastic debris enhances oposition in an endemic pelagic insect[J]. *Biology Letters*, 2012, 8(5): 817-820.
- [9] NEGORO S. Biodegradation of nylon oligomers[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(4): 461-466.
- [10] YANG Y, YANG J, WU W M, et al. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(20): 12080-12086.
- [11] 龙腾锐, 李金印, 龙向宇, 等. 超声波提取活性污泥胞外聚合物的研究[J]. *环境化学*, 2008, 27(3): 310-313.
- [12] YAO J, PAN Y Q, DING M, et al. Meta-analysis shows dopamine receptor D1 gene polymorphism is associated with bipolar disorder but not with schizophrenia[J]. *Psychiatry Research*, 2013, 210(3): 1324-1325.
- [13] CORSTJENS P, MUYZER G. Phylogenetic analysis of the metal-oxidizing bacteria *leptothrix discophora* and *sphaerotilus natans* using 16S-rDNA sequencing data[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1993, 16(2): 219-223.
- [14] 徐富强, 桂梦瑶, 杜俊逸, 等. 典型工业污染物对好氧反硝化菌群脱氮性能及群落结构的影响[J]. *环境工程学报*, 2019, 13(10): 2442-2450.
- [15] THROBACK I, ENWALL K, JARVIS A, et al. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49(3): 401-417.
- [16] 国家环境保护总局. 水质硝酸盐氮的测定 紫外分光光度法(试行): HJ/T 346-2007[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007.
- [17] 国家环境保护部. 水质氨氮的测定 纳氏试剂分光光度法: HJ 535-2009[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010.
- [18] 国家环境保护局. 水质亚硝酸盐氮的测定 分光光度法: GB 7493-1987[S]. 北京: 中国标准出版社, 1987.
- [19] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. *天津化工*, 2009, 23(3): 40-42.
- [20] 姜琼, 谢好. 苯酚-硫酸法测定多糖方法的改进[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(12): 316-318.
- [21] 杨墨, 刘乾亮, 吕东伟, 等. 低温异养硝化-好氧反硝化菌筛选及其脱氮特性[J]. *中国给水排水*, 2019, 35(23): 100-104.
- [22] 何嘉欣, 黄少斌, 周少锋. 玉米叶水解液作为好氧反硝化的补充碳源分析[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(5): 2684-2691.
- [23] 张泽宇, 王建芳, 齐泽坤, 等. 不同调控策略对CANON工艺快速适应氨氮浓度提升的影响[J]. *环境工程学报*, 2019, 13(8): 2004-2014.
- [24] 孙晓莹, 张轶凡, 聂英进, 等. 活性污泥比耗氧速率的测定及其在污水处理厂的应用[J]. *天津建设科技*, 2009, 19(6): 56-59.
- [25] 朱颖楠, 王旭, 王瑾丰, 等. 外源群体感应-好氧反硝化菌强化生物膜脱氮研究[J]. *环境科学学报*, 2019, 39(10): 3225-3237.
- [26] 周晓华, 潘杨, 陈茜茜, 等. 污泥转移SBR工艺污泥膨胀及恢复过程中EPS的动态变化[J]. *环境工程学报*, 2016, 10(10): 5643-5647.
- [27] 李慧, 田禹, 苏欣颖, 等. MFC-MBR耦合系统中SMP与EPS特性的研究[J]. *中国环境科学*, 2013, 33(1): 49-55.
- [28] 徐文迪, 常沙, 明铁山, 等. 基于硫酸根自由基(SO₄²⁻·)的污泥预处理技术[J]. *环境工程学报*, 2018, 12(5): 1528-1535.
- [29] LIU X Y, SHU Z F, SUN D Z, et al. Heterotrophic nitrifiers dominate reactors treating incineration leachate with high free ammonia concentrations[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(11): 15040-15049.

- [30] TIAN M, ZHAO F Q, SHEN X, et al. The first metagenome of activated sludge from full-scale anaerobic/anoxic/oxic (A²O) nitrogen and phosphorus removal reactor using illumina sequencing[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2015, 35: 181-190.
- [31] ZHOU T, WANG L, DU Y L, et al. Rhizosphere soil bacterial community composition in soybean genotypes and feedback to soil availability[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(10): 2230-2241.
- [32] HUANG J L, WANG H H, ALAM F, et al. Granulation of halophilic sludge inoculated with estuarine sediments for saline wastewater treatment[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 682: 532-540.
- [33] 张艺冉, 李再兴, 孙悦, 等. 石家庄市春季景观水体nirS型反硝化细菌群落特征分析[J]. *环境科学*, 2019, 40(7): 3295-3303.
- [34] 姜超, 隋倩雯, 陈梅雪, 等. 实时控制序批式膜生物反应器处理养猪废水的短程硝化[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(11): 5868-5876.
- [35] 雷静, 年夫喜, 冯国栋, 等. 富营养化水体清淤后的微生物脱氮技术应用[J]. *环境工程学报*, 2016, 10(7): 3949-3955.

(责任编辑: 曲娜)

Effects of typical microplastics on the denitrification characteristics and denitrification related genes of aerobic denitrifying bacteria

SHI Wenchao, GUI Mengyao, DU Junyi, MA Zhifei, WU Daishe*

Key Laboratory of Poyang Lake Environment and Resource Utilization, Ministry of Education, School of Resources, Environmental and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China

*Corresponding author, E-mail: dswu@ncu.edu.cn

Abstract In recent years, with the increasingly serious problem of plastic discharge, there are a large number of microplastics in sewage treatment plants, and the influence mechanism of microplastics on aerobic denitrifying bacteria is still unclear. In this study, the aerobic denitrifying bacteria were screened and enriched based on SBR, and the influences of typical micro plastic(PS, PA) in water body on aerobic denitrifying bacteria were further investigated. At the same time, the possible influence mechanism was revealed from the multiple aspects of bacteria extracellular polymer content, specific oxygen uptake rate and changes in microbial community structure and denitrification genes (napA, nirS, cnorB, nosZ genes) abundance. The results showed that the stress of PS and PA could inhibit the denitrifying performance of aerobic denitrifying bacteria and cause the accumulation of a certain amount of nitrite. High-throughput sequencing revealed that the changes in the abundance and species of functional denitrifying microorganisms were the main reasons for the changes in the denitrification performance of SBR. The results provide an important theoretical basis for the application of aerobic denitrifying bacteria in urban wastewater treatment plants receiving industrial wastewater.

Keywords aerobic denitrification; denitrification characteristics; industrial wastewater; microplastics; community structure