



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202301062 中图分类号 X703 文献标识码 A

王亚军, 张宏波, 司运美. 外源 C12-HSL 信号分子协同反硝化菌 FX-4 对活性污泥系统脱氮效果的影响[J]. 环境工程学报, 2023, 17(7): 2369-2379. [WANG Yajun, ZHANG Hongbo, SI Yunmei. Effect of exogenous C12-HSL signal molecule in coordination with denitrifying bacteria FX-4 on nitrogen removal in activated sludge system[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(7): 2369-2379.]

# 外源 C12-HSL 信号分子协同反硝化菌 FX-4 对活性污泥系统脱氮效果的影响

王亚军<sup>1,2,✉</sup>, 张宏波<sup>1</sup>, 司运美<sup>1</sup>

1. 兰州理工大学土木工程学院, 兰州 730050; 2. 兰州理工大学西部土木工程防灾减灾教育部工程研究中心, 兰州 730050

**摘要** 为探究外源信号分子的群体感应效应对反硝化菌 FX-4 及活性污泥系统脱氮的影响, 将外源 AHLs (酰基高丝氨酸内酯类) 的 C6-HSL 和 C12-HSL 信号分子投加至反硝化复筛培养基中, 探究 AHLs 对反硝化菌 FX-4 去除 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的影响。结果发现, 外源投加 C6-HSL 和 C12-HSL 均可有效地提高反硝化菌 FX-4 的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除性能, 增加反硝化菌 FX-4 的生物量, 且 C12-HSL 协同反硝化菌 FX-4 的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除效果最佳; 不同浓度的 C12-HSL 对反硝化菌 FX-4 的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除效果均有提升, 且 50 nmol·L<sup>-1</sup> 的 C12-HSL 可较大提升菌株 FX-4 的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除效果。将浓度为 0、5 nmol·L<sup>-1</sup>、50 nmol·L<sup>-1</sup>、200 nmol·L<sup>-1</sup>、500 nmol·L<sup>-1</sup> 和 1 000 nmol·L<sup>-1</sup> 的 C12-HSL 和反硝化菌 FX-4 同时投加至 SBR 活性污泥系统中, 考察两者协同下系统脱氮性能、信号分子浓度和微生物群落结构的变化。结果表明, 两者协同作用可对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除性能产生明显影响, 投加信号分子的实验组 R<sub>1</sub>~R<sub>6</sub> 相对于空白对照组 R<sub>0</sub> 的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 积累量减少 20~50 mg·L<sup>-1</sup>, 且 C12-HSL 投加量为 100 nmol·L<sup>-1</sup> 的反应器 R<sub>3</sub> 的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 消耗量最多, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 出水质量浓度较 R<sub>0</sub> 降低约 45 mg·L<sup>-1</sup>; 此外 C12-HSL 信号分子对 TN 去除产生正影响显著, 且 C12-HSL 投加量为 100 nmol·L<sup>-1</sup> 的反应器能更有效地提升活性污泥系统 TN 去除效能。信号分子浓度变化检测结果显示, 外源投加 C12-HSL 可以刺激系统其他 AHLs 分泌, 特别是促进系统 C4-HSL 的分泌。微生物群落结构分析结果显示, 外源投加反硝化菌 FX-4 和信号分子 C12-HSL 可显著影响活性污泥中微生物群落组成, 加快活性污泥中微生物种群演替, 使 *Thauera*、*Brevundimonas* 等脱氮相关菌属占比升高。以上结果可为信号分子作为应急手段强化活性污泥系统生物脱氮性能提供参考。

**关键词** 反硝化菌 FX-4; N-十二烷酰-L-高丝氨酸内酯; 群体感应; 脱氮

氮元素过多会导致的水体富营养化问题, 高效的氮素去除技术是当前研究热点<sup>[1-2]</sup>。然而, 生物法在处理污水时常会遇到系统不稳定和性能恶化等问题。生物强化技术成为改善污水生物处理系统运行效能有效方法<sup>[3]</sup>, 亦是研究重点<sup>[4]</sup>。TANG 等<sup>[5]</sup>发现, 向 pH 为 6.5 的系统加入 6% (质量分数) 的硝化菌后, 可显著提高系统脱氮效率, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 去除速率由 0.21 mg·(g·h)<sup>-1</sup> 增加至 mg·(g·h)<sup>-1</sup>; PATUREAU 等<sup>[6]</sup>在除磷活性污泥系统中接种好氧反硝化菌, 以实现系统在好氧阶段同时实现硝酸盐还原和磷去除; 还有研究者在 UASB 反应器中接种 *Thiopseudomonas denitrificans* X2 后发现强化系统可同时去除有机物和含氮化合物<sup>[7]</sup>。生物强化技术在实际应用中存在引入功能菌失效的潜在风

收稿日期: 2023-01-16; 录用日期: 2023-02-02

基金项目: 甘肃省科技计划资助 (20JR10RA145); 国家自然科学基金资助项目 (52160003)

第一作者: 王亚军 (1979—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, wyj79626@lut.edu.cn; ✉通信作者

险,亦可能对生物系统产生负面影响。如何使强化菌株成功定殖并高效降解污染物是亟需解决的问题,群体感应(quorum sensing, QS)的发现为生物强化技术提供了新方向,可促进引入功能菌适应环境条件并改善与其他微生物的相互作用<sup>[3,8]</sup>。酰化高丝氨酸内酯类(Acyl-homoserine lactones, AHLs)化合物是革兰氏阴性菌群体感应系统中最重要的一类信号分子,并调控许多生理特性的表达<sup>[9]</sup>。细菌可通过分泌和释放 AHLs 信号分子,来调控微生物功能并促进生物脱氮等过程<sup>[10-11]</sup>。

外源投加信号分子和群感菌是利用微生物群体感应现象强化污水生物脱氮的主要方法<sup>[12]</sup>。LI等<sup>[13]</sup>通过外源性添加 AHLs 以加速自养硝化污泥系统中硝化颗粒的形成。在众多类型的 AHLs 中,C6-HSL(N-己酰基-L-高丝氨酸内酯)和 C8-HSL(N-辛酰基-L-高丝氨酸内酯)在活性污泥工艺中占主导地位<sup>[14-17]</sup>。外源 C6-HSL 和 C8-HSL 明显提高了氮的去除效率,亦可调节 EPS 生成和微生物群落结构<sup>[13,18-21]</sup>。冯惠<sup>[22]</sup>发现 C6-HSL 和 C8-HSL 可提升氨氮去除效能;同时长链 AHLs 如 C12-HSL(N-十二烷酰-L-高丝氨酸内酯)和 C14-HSL(N-十四烷酰-L-高丝氨酸内酯)等具有更强的疏水性、耐水解性和生物黏附性,对于受基因调控的反硝化还原酶的活性也有显著影响<sup>[23]</sup>,从而对生物脱氮有较好的促进效果<sup>[24-26]</sup>。因此,外源投加群体感应信号分子协同功能菌是解决单一功能菌效果不佳的有效方法。

以反硝化菌 FX-4 为研究对象,选取信号分子 C6-HSL 和 C12-HSL,研究信号分子对反硝化菌 FX-4NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除性能的影响,以及两者协同作用下 SBR 系统脱氮性能。通过对菌株单独投加和混合投加,考察菌株的生长和作用效果,筛选出最优投加方式和浓度,随即将筛选出信号分子投入活性污泥系统,以未加信号分子组为空白对照,研究其脱氮性能的影响、实验前后信号分子浓度,并分析微生物群落优势菌群变化,以得出信号分子对生物脱氮的影响,从而为投加信号分子强化脱氮提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

1) LB 培养基:蛋白胨 10.0 g·L<sup>-1</sup>,酵母膏 5.0 g·L<sup>-1</sup>,NaCl 5.0 g·L<sup>-1</sup>,pH 7.0,121 °C 灭菌 20 min。驯化培养基:醋酸钠 3.6 g·L<sup>-1</sup>,硝酸钾 1.44 g·L<sup>-1</sup>,硫酸镁 g·L<sup>-1</sup>,磷酸氢二钾 1 g·L<sup>-1</sup>,微量元素 1 mL·L<sup>-1</sup>,氯化钠 2.5 g·L<sup>-1</sup>,pH 7.0,121 °C 灭菌 20 min。

2) 反硝化复筛培养基:乙酸钠 1.8 g·L<sup>-1</sup>,氯化钠 2.5 g·L<sup>-1</sup>,硝酸钾 0.8 g·L<sup>-1</sup>,磷酸氢二钾 1 g·L<sup>-1</sup>,硫酸镁 0.1 g·L<sup>-1</sup>,微量元素液 1 mL·L<sup>-1</sup>,pH 7.0,121 °C 灭菌 20 min。

3) 微量元素液:EDTA 50 g·L<sup>-1</sup>,硫酸锌 2.2 g·L<sup>-1</sup>,氯化钙 5.5 g·L<sup>-1</sup>,四水氯化锰 5.06 g·L<sup>-1</sup>,七水硫酸亚铁 5 g·L<sup>-1</sup>,四水钼酸铵 1.1 g·L<sup>-1</sup>,无水硫酸铜 1.5 g·L<sup>-1</sup>,六水氯化钴 1.61 g·L<sup>-1</sup>。

以上培养基的制备参考文献 [27-30]。

### 1.2 实验试剂

实验中选取的 2 种 N-酰化高丝氨酸内酯类化合物(AHLs)信号分子 C6-HSL(己酰 L-高丝氨酸内酯)和 C12-HSL(N-十二烷酰-L-高丝氨酸内酯)均购自 Sigma-aldrich。AHLs 有较好的水溶性。用纯水将其配制成 0.1 g·L<sup>-1</sup> 的标准液,加入 0.1% (体积分数)的甲酸防止 AHLs 自身降解,于-20 °C 下保存备用<sup>[31]</sup>。

### 1.3 菌株来源

实验所用反硝化菌 FX-4 为假单胞菌属的 *Pseudomonas stutzeri*,其具有良好的反硝化能力,由本课题组分离筛选。筛选过程:采用驯化培养基进行初筛,随后在反硝化复筛培养基中进行复筛,培养条件为 30 °C、150 r·min<sup>-1</sup>、接种量为 5%;对其进行生长特性、理化性质、信号分子及底物利用速率等生理生化性能的比较,选择生长代谢速率高、能大量消耗 NO<sub>3</sub>-N 的菌株参与本研

究。该过程详见参考文献 [32]。

#### 1.4 接种污泥

本研究使用的接种污泥来自兰州城市污水处理厂的回流污泥。对其进行3 d的闷曝, 期间定期加入适当营养盐, 使其微生物生长达到最优水平, 以有效适应合成污水进行后续实验。

#### 1.5 实验方法

1) 通过投加反硝化菌和信号分子影响活性污泥脱氮性能。实验初期, 接种到反应器的污泥 MLSS 约为  $3\ 210\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 将 0.4 L 污泥接种到 1.6 L 的 SBR 反应器中, 按 9 h 一个循环周期 (依次是进水 15 min、厌氧 1.5 h、曝气 5 h、缺氧 1 h、沉降 1 h 和出水 15 min) 在室温下运行。反应器进水采用的人工配水: 乙酸钠  $0.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 葡萄糖  $0.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 氯化铵  $0.2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 磷酸二氢钾  $0.025\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 硝酸钾  $0.15\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 硫酸镁  $0.025\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 氯化钠  $0.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 微量元素液  $1\ \text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2) 信号分子对反硝化菌 FX-4 反硝化性能影响。将反硝化菌 FX-4 菌悬液按 5% (质量分数) 的接种量接种到 LB 培养基中, 同时投加适量的信号分子 (C6-HSL、C12-HSL 和 C6-HSL+C12-HSL) 于 LB 培养基中。设置 4 组培养组:  $R_0$  (空白对照组)、 $R_1$  (投加 C6-HSL)、 $R_2$  (投加 C12-HSL)、 $R_3$  (投加 C6-HSL+C12-HSL)。将 LB 培养基置于  $30\ ^\circ\text{C}$ 、 $150\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  恒温振荡培养箱内培养 3 d 制成种子液。将种子液按 5% (质量分数) 的接种量接种到含有 100 mL 反硝化复筛培养基的 250 mL 锥形瓶中, 置于  $30\ ^\circ\text{C}$ 、 $150\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  恒温振荡培养箱中培养 5 d, 每隔 24 h 无菌取样, 在波长 600 nm 下测定菌体密度  $\text{OD}_{600}$ , 绘制反硝化菌 FX-4 的生长曲线, 采用紫外分光光度法测定  $\text{NO}_3^-$ -N 质量浓度并计算去除率, 筛选出效果最佳的信号分子种类。在筛选出效果最佳的信号分子后, 将反硝化菌 FX-4 菌悬液按 5% (质量分数) 的接种量接种到 LB 培养基中, 同时投加不同浓度的信号分子于 LB 培养基中, 设置 6 组培养组其信号分子投加量分别为  $0$ 、 $5\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $200\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $500\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将 LB 培养基置于  $30\ ^\circ\text{C}$ 、 $150\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  恒温振荡培养箱内培养 3 d 制成种子液。将种子液按 5% (质量分数) 的接种量接种到含有 100 mL 反硝化复筛培养基的 250 mL 锥形瓶中, 重复上述操作。测定菌体密度  $\text{OD}_{600}$  及  $\text{NO}_3^-$ -N 质量浓度并计算去除率, 筛选出效果最佳的信号分子浓度。以上每组实验设置 3 个平行实验。

3) C12-HSL 信号分子对活性污泥系统脱氮影响。向 7 组有效体积 1.6 L 的 SBR 反应器内分别接入 400 mL 污泥和 1200 mL 污水, 实验中反应器采用曝气泵头进行曝气。7 组反应器分别为:  $R_0$  (空白对照组, 未投加菌剂和信号分子)、 $R_1$  (FX-4 反硝化菌+ $0\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  C12-HSL)、 $R_2$  (FX-4 反硝化菌+ $5\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  C12-HSL)、 $R_3$  (FX-4 反硝化菌+ $50\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  C12-HSL)、 $R_4$  (FX-4 反硝化菌+ $100\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  C12-HSL)、 $R_5$  (FX-4 反硝化菌+ $200\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  C12-HSL)、 $R_6$  (FX-4 反硝化菌+ $500\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  C12-HSL)。实验初期为投菌期, 将反硝化菌 FX-4 接入反应器  $R_1\sim R_6$  中, 每 2 d 投加一次种子液, 驯化培养 12 d, 之后向反应器  $R_1\sim R_6$  投加  $0\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $200\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $500\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 AHLs 信号分子, 前 12 d 每隔 2 d 投加一次信号分子, 后 10 d 不投加, 实验运行 34 d, 每天检测 TN、 $[\text{NH}_4^+]$ -N、 $[\text{NO}_2^-]$ -N、 $[\text{NO}_3^-]$ -N 并计算各指标的去除率。

#### 1.6 检测方法

1) 常规指标的测定。实验中需要测定的常规指标有 TN、 $[\text{NH}_4^+]$ -N、 $[\text{NO}_2^-]$ -N、 $[\text{NO}_3^-]$ -N。 $[\text{NH}_4^+]$ -N 采用纳氏试剂光度法测定, TN 采用过硫酸钾氧化紫外分光光度法测定,  $[\text{NO}_3^-]$ -N 采用紫外分光光度法测定,  $[\text{NO}_2^-]$ -N 采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法 [33] 测定。

2) 信号分子的检测。活性污泥中信号分子的检测采用高效液相串联质谱法检测。活性污泥样品在  $4\ ^\circ\text{C}$  下  $9\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min, 取上清液用  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 然后用等量含有 0.5% (质量分数) 甲酸的乙酸乙酯进行萃取 3 次, 将收集得到的上层有机相用氮吹仪吹干后, 用  $100\ \mu\text{L}$  甲醇定容 [34]。预处理过后的水样采用 HPLC-MS/MS 进行检测。色谱条件如下: 反相 C18 色谱柱

(50 mm×2.1 mm, 3.5 μm; Waters Sunfire); 流动相流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 10 μL, 分析时间为 10 min。质谱条件: 采用电喷雾离子源正离子模式 (ESI<sup>+</sup>), 多反应离子检测 (MRM 模式), 毛细管电压 3.0 kV; 锥孔电压 30 V; 载气高纯氮气 (99.999%); 载气流速 180 L·h<sup>-1</sup>; 载气温度 300 °C; 碰撞气高纯氮气 (99.999%) [34-35]。

3) 群落结构分析。微生物群落结构测定采用 16SrRNA 基因高通量测序进行检测[35]。污泥样品 DNA 的提取及 PCR 扩增采用 PLFA 法[36]。以上检测及分析均由广州美格生物科技有限公司完成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 外源信号分子对菌株 FX-4 去除 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的影响

将反硝化菌 FX-4 种子液和不同种类的信号分子投加在含 100 mL 反硝化复筛培养基的锥形瓶中, 随着菌株生长, 反硝化菌 FX-4 对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除效果如图 1 所示。

在 30 °C、150 r·min<sup>-1</sup> 的恒温振荡培养下, 投加信号分子 12 h 后, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub> 和 R<sub>3</sub> 组的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除率明显提高且远高于 R<sub>0</sub>, 最大 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除率约为 94% 左右。YAN 等[37] 也证明投加信号分子与生物脱氮过程密切相关, 并且可以有效促进脱氮过程; R<sub>2</sub> 和 R<sub>3</sub> 对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除效果几乎一致, 均在 36 h 后达到最佳去除效果且效果持续稳定, 在 84 h 后开始出现下降; R<sub>1</sub> 在 60 h 去除率才达到最大值, 且对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除效果相对于 R<sub>2</sub> 稍差。

但 LI[13] 等观察到, 与其他类型的 AHLs 相比, 添加 C6-HSL 的反应器显示出最高的氨降解速率, 这说明 C6-HSL 对脱氮效果的主要影响不是体现在 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除上。以上结果表明投加信号分子可优化反硝化菌 FX-4, 使其消耗 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的性能大大提高; R<sub>2</sub> 和 R<sub>3</sub> 对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除情况相似, 并且都比 R<sub>1</sub> 优先达到 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除率最大值。这说明 C12-HSL 比 C6-HSL 起作用时间更迅速, 作用效果更稳定, 去除效果更好。因此, 可确定 C12-HSL 能较大程度提升菌株 FX-4 去除 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 能力。

随后对不同 C12-HSL 浓度梯度下的去除效果进行了分析, 结果如图 2 所示。不同浓度梯度的 C12-HSL 对反硝化菌 FX-4 的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 去除效果均有促进作用。相比于空白对照组, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除率明显提高且均大于 95%。其中, 信号分子浓度在 50 nmol·L<sup>-1</sup> 对菌株的强化效果最好, 去除率高达 98%; 5 nmol·L<sup>-1</sup> 和 200 nmol·L<sup>-1</sup> 的去除效果较为相近; 而投加浓度更高的 2 组去除效果反而没有较低投加量的效果显著。胡惠秩[31] 也发现在 AHLs 添加浓度较低时, 系统的处理效率更高, 而 AHLs 添加浓度较高时, 系统处理效果略微受到抑制。

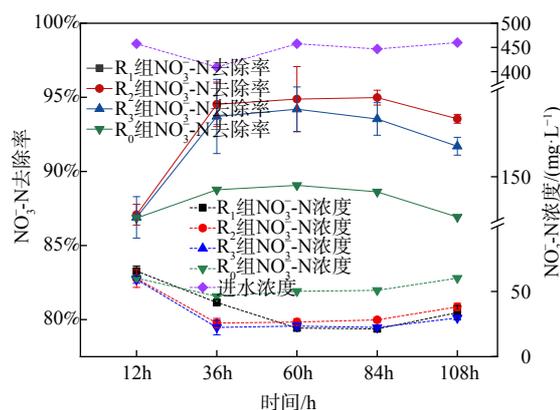


图 1 4 组 QS-FX-4 菌株培养过程中对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除效果

Fig. 1 The removal effect of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N during the culture of 4 groups of QS-FX-4 strains

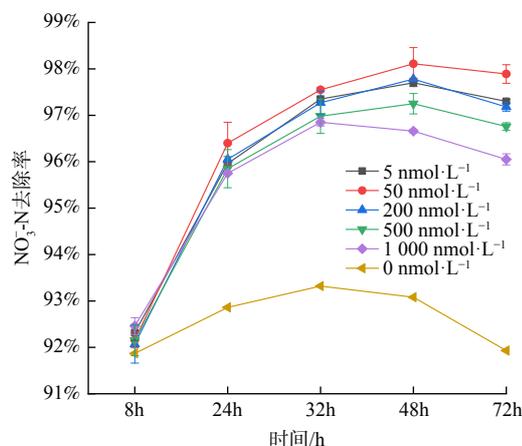


图 2 不同浓度 C12-HSL 作用下反硝化菌对 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 的去除效果

Fig. 2 Removal effect of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N by denitrifying bacteria under different concentrations of C12-HSL

## 2.2 外源信号分子对 FX-4 菌株生长曲线的影响

将反硝化菌种子液按 5% (质量分数) 接种量接种至 100 mL 反硝化复筛培养基中, 在投加不同种类的信号分子后, 菌株的生长情况及  $\text{NO}_3^-$ -N 去除效果如图 3 所示。微生物生长在 12 h 后, 信号分子开始发挥作用,  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  组反硝化菌生长情况明显优于  $R_0$  组。外源添加 AHLs 不仅可增加生物量密度, 还可提高反硝化细菌的生物活性<sup>[21]</sup>, 而本研究结果更验证了这一结论。在 36 h 时,  $R_2$  和  $R_3$  的菌群密度达到最大值,  $\text{OD}_{600}$  分别达到 0.656 和 0.663, 并且进入平稳生长阶段。随后在生长 60 h 后, 菌群密度逐渐降低。这是由于培养基中营养物质被消耗完全, 菌群生长进入衰老期;  $R_1$  组在 60 h 菌群生长密度达到最大值。结果还表明, 投加信号分子使反硝化菌 FX-4 微生物量显著上升, 在  $R_1$  组中, C6-HSL 起作用的时间较长, 几乎是  $R_2$  和  $R_3$  组 2 倍。同时, 在  $R_2$  和  $R_3$  组对比下, 二者反硝化菌生长情况及  $\text{NO}_3^-$ -N 消耗情况几乎一致, 于是经分析得出结果是 C12-HSL 对反硝化菌 FX-4 生长代谢情况影响更显著。

随后展开投加不同浓度 C12-HSL 后反硝化菌处理效果的实验, 结果如图 4 所示。当信号分子浓度为  $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 反硝化菌生长情况最好且菌群密度明显高于未投加信号分子组。同时, 当投加较高浓度 ( $200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的组生长情况弱于不投加组, 这说明投加信号分子最合适的投加浓度为  $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 且信号分子浓度过高会对反硝化菌生长有抑制作用。胡惠秩<sup>[31]</sup>也发现外源性 AHLs 浓度对系统的影响不是一种简单的线性关系, 低浓度 AHLs 促进微生物的增长, 而高浓度 AHLs 会抑制微生物生长。针对该现象, TAIT 等<sup>[38]</sup>的解释是细菌群落附近如果存在大量外来 AHLs 信号分子持续时间过长会限制细菌群落对环境变化的响应能力。

## 2.3 外源 C12-HSL 强化 SBR 脱氮的影响

取兰州市城市污水处理厂剩余污泥闷曝 3 d, 其间定期投加一定营养, 结束后分别添加到反应器中。在反应器启动运行后, 为研究反硝化菌 FX-4 协同信号分子对 SBR 反应器脱氮效果的影响, 将实验初的 0~12 d 为投菌期。每 2 d 在反应器  $R_1$ ~ $R_6$  中投加 1 次反硝化菌 FX-4 种子液, 共驯化培养 12 d。之后, 将 12~24 d 定为信号分子强化阶段, 每隔 2 d 向反应器  $R_1$ ~ $R_6$  投加 1 次不同浓度梯度的 AHLs 信号分子 (C12-HSL)。将 24~34 d 设为稳定期, 此期间系统持续稳定运行。系统的运行效果如图 5 所示。

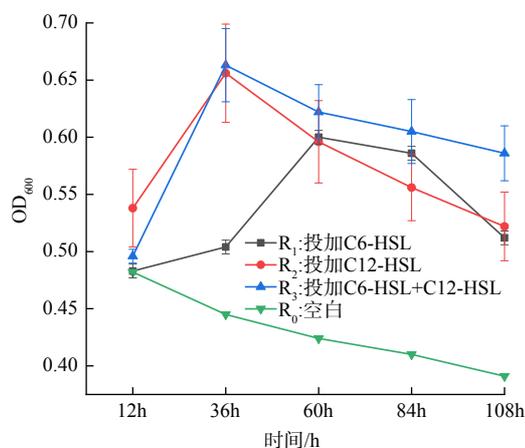


图 3 4 组 QS-FX-4 培养过程中反硝化菌生长曲线及  $[\text{NO}_3^-$ -N] 变化

Fig. 3 Growth curve of denitrifying bacteria and changes of  $\text{NO}_3^-$ -N concentration during QS-FX-4 culture

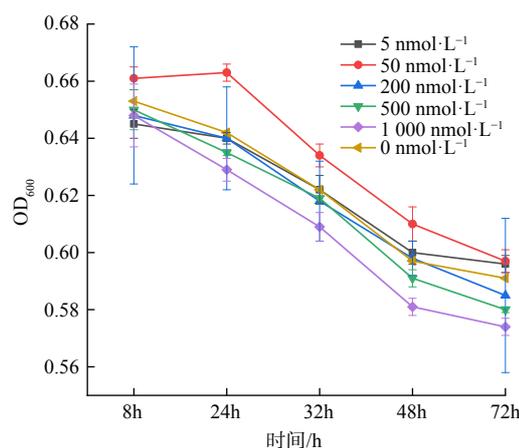


图 4 不同浓度 C12-HSL 作用下反硝化菌的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of denitrifying bacteria under different concentrations of C12-HSL

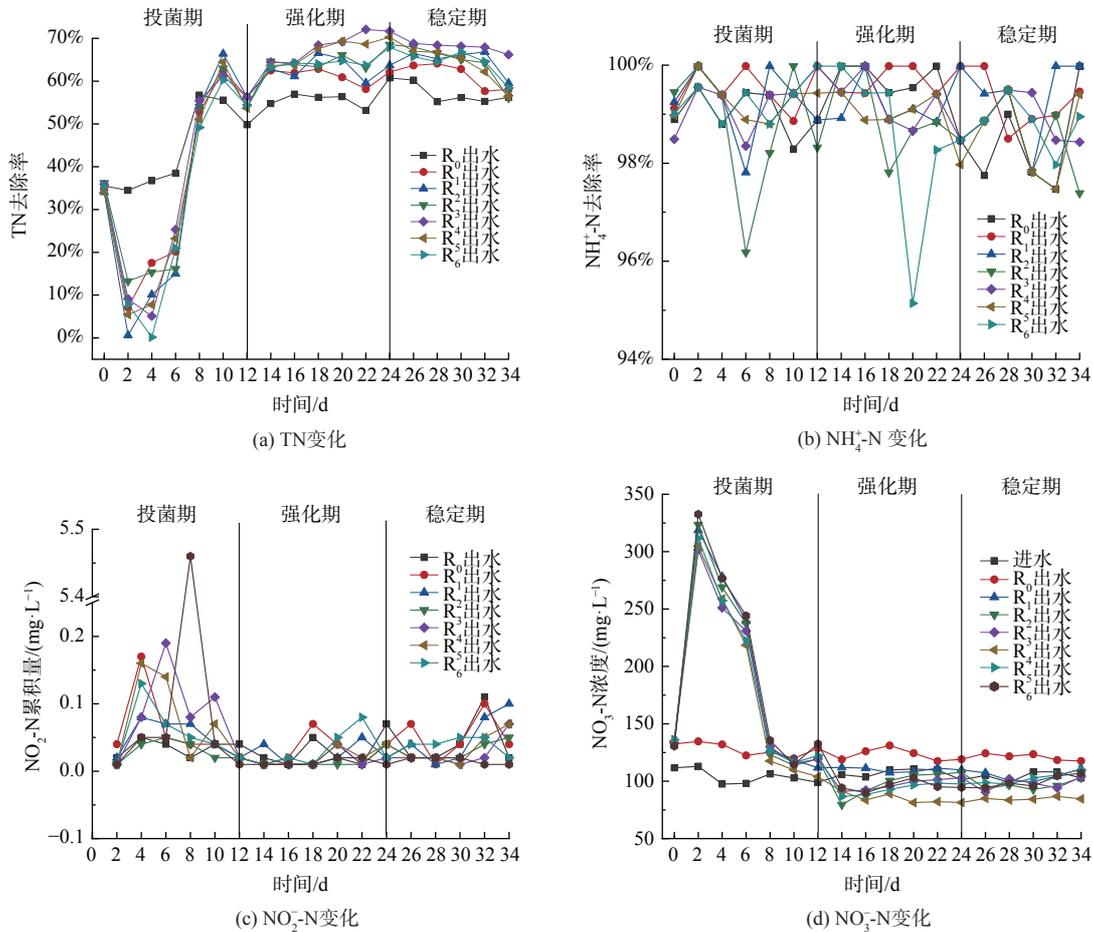


图 5 外源 C12-HSL 影响下氮素变化

Fig. 5 Changes of nitrogen under the influence of exogenous C12-HSL

在投菌期 (1~12 d),  $R_1 \sim R_6$  的 TN 去除效果较差并低于未投加菌株的  $R_0$ 。 $R_1 \sim R_6$  反应器中  $[\text{NO}_3^- \text{-N}]$  大幅增加。这可能是由于外源菌的加入, 系统竞争激烈, 同时种子液也含有菌种未代谢完的含氮有机物, 增加了系统氮负荷, 故表现出脱氮不佳现象。在强化阶段 (11~24 d), 向反应器  $R_1 \sim R_6$  中投加不同浓度信号分子, 以调控污泥中的微生物从而提升反应器脱氮性能。在投加信号分子阶段,  $R_1 \sim R_6$  组的  $[\text{NO}_3^- \text{-N}]$  并没有大幅变化, 而当反应器  $R_4$  中投加浓度  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的信号分子后,  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  去除效果优势较明显; 而  $R_1 \sim R_6$  反应器的 TN 去除率均显著提高, 这说明投加 C12-HSL 可有效提升系统的脱氮性能。其原因是外源投加 AHLs 可有效提高系统生物量同时刺激微生物自身 AHLs 的生成。衣隆强等<sup>[23]</sup> 也发现添加外源 AHLs 可提前达到能刺激 QS 机制的胞外 AHLs 浓度, 从而强化 QS 的控制功能, 与本研究结果一致。在稳定运行阶段 (24~34 d),  $R_1 \sim R_6$  的 TN 去除情况趋于稳定, 去除率为 60%~70%, 但相对于强化阶段效果略有降低。 $[\text{NO}_3^- \text{-N}]$  几乎不累积的原因可能是外源信号分子反应完毕, 故导致反硝化过程进行有所缓慢。整个运行过程中, 随着外源添加菌株和不同浓度信号分子,  $[\text{NO}_3^- \text{-N}]$  不断变化,  $R_1 \sim R_6$  呈现不同的 TN 去除效果。尽管  $R_0 \sim R_6$  反应器对 TN 的去除呈现相似的变化趋势, 但  $R_0$  的平均 TN 去除率 65.53% 与  $R_1$  组的 66.00% 对比说明,  $R_1$  的处理效果更好。这表明投加反硝化菌 FX-4 后  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  被大量消耗, 累积量减少, 从而促进了 TN 去除。同时, 当投加信号分子浓度为  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $R_4$  在运行 20 d 后呈现较好的脱氮能力, TN 去除率达 72.08% 比对照组  $R_0$  组和  $R_1$  组高出 8.93%。而信号分子投加浓度偏高的  $R_5$  和  $R_6$  组脱氮效果略差于  $R_0$  组, 这表明添加合适浓度的信号分子可增强活性污泥的脱氮效

果，但过高的信号分子浓度投加会使系统脱氮效果受到抑制。

图5(b)和(c)表明 $R_0$ ~ $R_6$ 反应器各阶段的 $\text{NH}_4\text{-N}$ 平均去除率均大于95%，且 $\text{NO}_2\text{-N}$ 几乎不存在在积累。在整个运行过程中，尽管反应器中外源投加了菌株和信号分子，但都没有影响反应器对 $\text{NH}_4\text{-N}$ 的良好去除，并且 $\text{NO}_2\text{-N}$ 累积量极少。这说明外源投加反硝化菌FX-4和信号分子不会对系统其他污染物的去除产生不利影响。

#### 2.4 外源C12-HSL对系统内信号分子组成影响

分别对反硝化菌FX-4种子液、实验开始时期原活性污泥、投菌定殖之后的 $R_1$ 及投加过信号分子脱氮效果良好的 $R_4$ 进行取样，并对其信号分子种类和浓度进行监测，反应器内信号分子的变化结果如图6所示。

反硝化菌FX-4自身分泌的信号分子有C8-HSL和C12-oxo-HSL。在原活性污泥中，信号分子浓度较小，只检测到C4-HSL。在投菌阶段，反硝化菌FX-4种子液投加到活性污泥中，活性污泥中的信号分子浓度降低，在 $R_1$ 中只检测到少量C12-oxo-HSL，C4-HSL和C8-HSL消失。分析其原因可能是反硝化菌FX-4与活性污泥中的土著菌群存在竞争关系

导致其定殖未完成，此阶段信号分子种类及浓度下降。在强化阶段，反硝化菌FX-4定殖后的污泥中继续投加信号分子C12-HSL， $R_4$ 组信号分子总量显著升高，特别是C12-HSL浓度大量增加，C8-HSL和C4-HSL又重新出现，且C4-HSL浓度明显较原活性污泥和 $R_1$ 组高。分析其原因是在外源投加了C12-HSL的同时，促进了系统内部微生物自身分泌，从而产生了大量信号分子。这说明反硝化菌FX-4定殖完成后，活性污泥系统重新达到平衡，当信号分子C12-HSL达到一定浓度后，激发活性污泥中微生物自身分泌信号分子表达，诱发了群体感应现象。结合此前实验中 $R_4$ 组较好的脱氮效果，微生物群落感受到系统分泌产生的AHLs后，促进不同功能菌群响应，从而提高脱氮效果。因此，信号分子C12-HSL不仅与脱氮效能密切相关，且投加C12-HSL还可促进反应器活性污泥内部微生物分泌大量内源信号分子。特别是C4-HSL和C8-HSL，推测这两种信号分子与系统脱氮性能的提高也存在一定关联。

#### 2.5 外源C12-HSL对系统微生物群落结构的影响

为研究外源添加信号分子C12-HSL对SBR反应器活性污泥中微生物群落结构的影响，分别对原活性污泥的 $R_0$ 组、投加反硝化菌FX-4后的 $R_1$ 组及外源投加信号分子C12-HSL的 $R_4$ 组进行高通量测序并对其微生物群落变化进行分析。

具有共享和唯一OTU的维恩图如图7所示。333个OTU中的大多数在3个样本中共享，分别占31.68% ( $R_0$ )、25.28% ( $R_1$ )和25.23% ( $R_4$ )。这说明活性污泥中微生物种群的物种丰富度和多样性在通过投菌和外源投加信号分

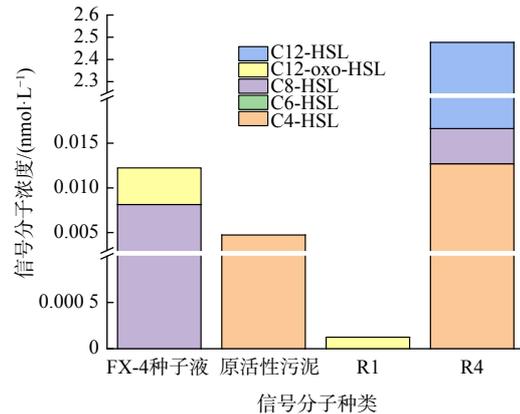


图6 反应器内信号分子种类和浓度变化

Fig. 6 Changes of species and concentrations of signal molecules in the reactor

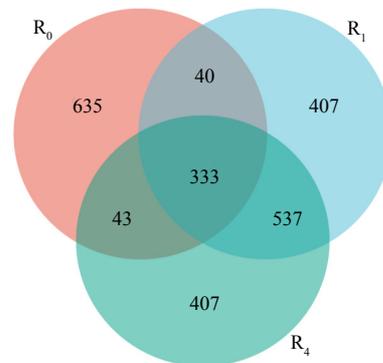


图7 微生物丰富度韦恩图

Fig. 7 The Venn diagram of microbial richness

子之后都得到了显著提高。YAN 等<sup>[37]</sup>通过研究外源投加 AHLs 对 SBR 反应器运行的影响也发现，微生物群落丰富度指数会随着 AHLs 剂量的增加而增加。

反应器 R<sub>0</sub>、R<sub>1</sub> 和 R<sub>4</sub> 的 Alpha 多样性如表 1 所示。Alpha 多样性可反映样本内微生物群落的丰富度和多样性。Observed\_species 和 Chao1 指数体现物种丰度即物种数量的多少，Shannon 和 Simpson 指数体现物种多样性。在相同物种丰度的情况下，群落中各物种具有越大的均匀度，则认为群落具有越大的多样性；Shannon 指数和 Simpson 指数值越大，则说明物种多样性越高。

表 1 各反应器微生物群落 alpha 多样性  
Table 1 Alpha diversity of microbial community in each reactor

Sample	Observed_species	Shannon	Simpson	Pielou	Chao 1	PD_whole_tree
R <sub>0</sub>	1 051	5.723 2	0.987 5	0.822 6	1 052.52	37.149 4
R <sub>1</sub>	1 317	5.212 7	0.973 4	0.725 7	1 317.51	42.890 8
R <sub>4</sub>	1 320	5.273 2	0.974 9	0.733 9	1 320.96	43.996 9

表 1 数据表明，投加反硝化菌 FX-4 和 C12-HSL 后，反应器 R<sub>1</sub> 和 R<sub>4</sub> 相对于对照组 R<sub>0</sub> Observed\_species 和 Chao1 指数显著提高，反应器 R<sub>1</sub> 和 R<sub>4</sub> 中物种丰度增加了 300 多，即外源投加菌株和 C12-HSL 使得活性污泥系统内部生物量增加。推测这是由于反硝化菌 FX-4 与污泥内微生物发生协同作用，增加了生物丰富度。经过投加反硝化菌 FX-4，R<sub>1</sub> 的 Shannon 指数和 Simpson 指数是降低的，即生物多样性是降低的。这说明在加菌定殖后污泥内形成了新的稳定生物群落结构，多样性较空白组反应器 R<sub>1</sub> 低。继续外源投加 C12-HSL 后，R<sub>1</sub> 和 R<sub>4</sub> 的 Shannon 指数和 Simpson 指数无显著差异。这亦说明活性污泥系统中微生物多样性及均匀度无显著变化。

在微生物群落中优势门和属的比较如图 8 所示，此图揭示了添加信号分子后细菌组成特征的更具体信息。

在门水平上，活性污泥中的主要优势菌为变形菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、

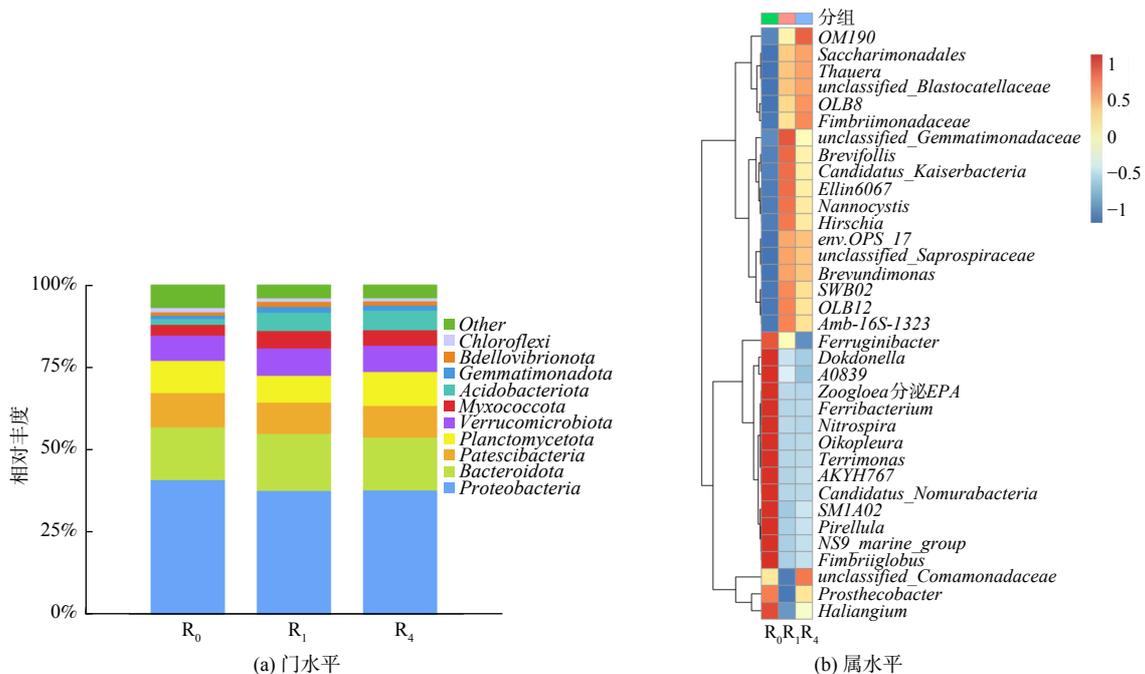


图 8 微生物群落结构在门水平和属水平的变化

Fig. 8 Changes in microbial community structure at (a) phylum level and (b) genus level

浮霉菌门 (*Planctomycetota*) 和 *Platescibacteria* 等。其中, 变形菌门 (37.65%) 和拟杆菌门 (16.02%) 是去除  $\text{NH}_4\text{-N}$  的主要菌门<sup>[39]</sup>。在浮霉菌门中存在大量厌氧氨氧化菌, 故在此前实验过程中体现了良好的  $\text{NH}_4\text{-N}$  去除效果且较少的  $\text{NO}_2\text{-N}$  累积。*Gemmatimonadota* 中大多数是好氧菌和兼性厌氧菌, 可利用硝酸盐而起到良好的反硝化作用。投加反硝化菌 FX-4 的反应器  $R_1$  相对于对照组  $R_0$  变形菌门、浮霉菌门和 *Platescibacteria* 相对丰度略有降低, 而拟杆菌门、*Verrucomicrobiota*、*Myxococcota* 和 *Acidobacteriota* 相对丰度均有增加。体现在实验中, 即反应器保持了良好的去污效果, 同时 *Gemmatimonadota* 的相对丰度上升证明反硝化菌 FX-4 在 SBR 系统定殖效果比较好, 可较好提升反硝化性能。外源投加信号分子 C12-HSL 后, 将反应器  $R_4$  和  $R_1$  进行对比, 各优势菌门变化波动较小, 但结合前面脱氮效能, 投加 C12-HSL 维持了系统有效运行且对脱氮有正向影响。

图 8 (b) 显示了属水平上优势菌群投加反硝化菌 FX-4 和外源投加信号分子 C12-HSL 后相对丰度的变化情况。与  $R_0$  相对比, 反应器  $R_1$  在投加反硝化菌 FX-4 之后多个菌种如 *Thauera*、*Brevifollis*、*OLB12*、*Saccharimonadales*、*Candidatus-Kaiserbacteria*、*Nannocystis* 等的丰度明显提高, 而 *Fimbrioglobus*、*Nitrospira*、*NS9-marine-group*、*AKYH767*、*Zoogloea*、*Ferribacterium*、*Candidatus-Nomurabacteria* 等菌株丰度会有不同程度的降低。在外源投加信号分子 C12-HSL 之后, 反应器  $R_4$  相对于对照组  $R_0$ , 优势菌属为 *OM190*、*Saccharimonadales*、*OLB12*、*Thauera*、*unclassified\_Blastocatellaceae*、*OLB8*, 其丰度分别为 4.52%、4.99%、4.97%、18.11%、2.84% 和 1.59%。

索氏菌属 (*Thauera*) 是变形菌门下的一类革兰氏阴性菌, 是一种具有硝化反硝化作用菌属, 同时与反应器内的群体感应密切相关。短波单胞菌属 (*Brevundimonas*) 是好氧或兼性厌氧菌, 可少量还原硝酸盐。同时, *Zoogloea* 属、*Thauera* 属、*Flavobacterium* 属等都是常见的可产生 EPS 的菌属, 且大多具有硝酸盐氮还原能力。亚硝酸菌属 (*Nitrosomonas*) 能将  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  转化为  $\text{NO}_2\text{-N}$ 。在反应器  $R_1$  中投加反硝化菌 FX-4 定殖之后, *Thauera*、*Brevundimonas* 等菌属与  $R_0$  较低质量分数的情况相比微生物含量提高了 10.8% 和 4.29%, 并且在定殖后的  $R_2$  反应器中外源投加 C12-HSL 后质量分数又进一步增加。这说明外源投加菌株和 C12-HSL 有利于硝化反硝化相关菌属生长, 使其成为活性污泥系统中新的优势菌属。然而, *Zoogloea* 属、*Flavobacterium* 属、*Nitrospira* 属和 *NS9-marine-group* 等菌属在  $R_1$  和  $R_2$  菌株含量都相对于  $R_0$  相对丰度显著下降了 8.21%、3.56%、1.45% 和 2.10%, 这说明投加的菌株会与原微生物群落形成竞争, 会抑制某些微生物群落生长。检测分析结果说明, 外源投加反硝化菌和 C12-HSL 对系统反硝化效能具有显著影响, 同时改变活性污泥系统中的微生物群落结构, 促进微生物种群演替。

### 3 结论

1) 投加  $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 C12-HSL 信号分子可强化反硝化菌去除  $\text{NO}_3\text{-N}$  的能力, 但较高的投加浓度会对菌株生长起抑制作用, 强化效果偏弱。2) C12-HSL 信号分子协同反硝化菌 FX-4 可优化系统对氮的去除效能, 投加  $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  C12-HSL 的反应器活性污泥系统中 TN 去除效果提升更显著, 且外源投加信号分子对反应器的  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  去除率、 $\text{NO}_2\text{-N}$  积累量、对  $\text{NO}_3\text{-N}$  积累量没有明显影响。3) 活性污泥系统中信号分子种类及含量会影响反应器的脱氮效能, 同时外源投加信号分子可刺激系统内部信号分子 C4-HSL 和 C8-HSL 的产生, 从而进一步促进脱氮过程。4) 外源投加反硝化菌 FX-4 和外源投加信号分子 C12-HSL 可显著影响活性污泥中微生物群落结构, 提高 *Thauera*、*Brevundimonas* 等脱氮相关菌属的占比。

### 参考文献

- [1] 李娜, 刘来胜, 张泽中. 2株好氧反硝化菌株的分离鉴定与脱氮特性研究[J]. 环境科学与技术, 2021, 44(6): 98-102.
- [2] 侯保连, 李安婕, 孙趣. AHLs群体感应信号分子对硝化污泥附着生长及硝化效果的影响[J]. 环境科学学报, 2015, 35(9): 2773-2779.

- [3] 王亚军, 司运美, 李彦娟. 群体感应在生物强化功能菌定殖及其降解能力增强中的作用研究进展[J]. 应用生态学报, 2022, 33(10): 2871-2880.
- [4] 滕毅. 好氧-厌氧下AHLs类群体感应信号分子对厌氧氨氧化系统影响的研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2021.
- [5] TANG H L, CHEN H. Nitrification at full-scale municipal wastewater treatment plants: Evaluation of inhibition and bioaugmentation of nitrifiers[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 190: 76-81.
- [6] PATUREAU D, HELLOIN E, RUSTRIAN E, et al. Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans*[J]. *Water research*, 2001, 35(1): 189-197.
- [7] ZHOU X L, LI J B, ZHANG J, et al. Bioaugmentation mechanism on humic acid formation during composting of food waste[J]. *The Science of the total environment*, 2022, 830: 154783-154783.
- [8] 陈瑞, 王大力, 林志芬, 等. 枯草芽孢杆菌的群体感应信号系统及其在环境领域的应用前景[J]. *安全与环境学报*, 2012, 12(6): 5-8.
- [9] HU H Z, HE J G, LIU J, et al. Biofilm activity and sludge characteristics affected by exogenous N-acyl homoserine lactones in biofilm reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 399-347.
- [10] MA H J, WANG X Z, ZHANG Y, et al. The diversity, distribution and function of N-acyl-homoserine lactone (AHL) in industrial anaerobic granular sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 116-124.
- [11] 于多. 群体感应(QS)对MBR膜污染影响分析[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2016.
- [12] 李金璞, 唐珠, 杨新萍. 纳米银对SBRs脱氮效率的影响及外源AHLs的调控作用[J]. *环境工程学报*, 2021, 15(9): 2942-2951.
- [13] LI A J, HOU B L, LI M X. Cell adhesion, ammonia removal and granulation of autotrophic nitrifying sludge facilitated by N-acyl-homoserine lactones[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 196: 550-558.
- [14] SUN Y, MEN M Q, XU B S, et al. Assessing key microbial communities determining nitrogen transformation in composting of cow manure using illumina high-throughput sequencing[J]. *Waste Management*, 2019, 92: 59-67.
- [15] SUN Y P, HE K, YIN Q D, et al. Determination of quorum-sensing signal substances in water and solid phases of activated sludge systems using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 69: 85-94.
- [16] SUN Y P, GUAN Y T, ZENG D F, et al. Metagenomics-based interpretation of AHLs-mediated quorum sensing in Anammox biofilm reactors for low-strength wastewater treatment[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 344: 42-52.
- [17] SUN Y P, GUAN Y T, WANG D, et al. Potential roles of acyl homoserine lactone based quorum sensing in sequencing batch nitrifying biofilm reactors with or without the addition of organic carbon[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 259: 136-145.
- [18] ZHANG Z W, HAN Y X, XU CY, et al. Effect of low-intensity direct current electric field on microbial nitrate removal in coal pyrolysis wastewater with low COD to nitrogen ratio[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 287: 121456.
- [19] ZHANG P, FENG B, CHEN Y P, et al. In situ characterizations for EPS-involved microprocesses in biological wastewater treatment systems[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2019, 49(11): 917-946.
- [20] ZHANG J, LI J, ZHAO B H, et al. Long-term effects of N-acyl-homoserine lactone-based quorum sensing on the characteristics of ANAMMOX granules in high-loaded reactors[J]. *Chemosphere*, 2019, 218: 632-642.
- [21] LV L Y, LI W G, ZHENG Z J, et al. Exogenous acyl-homoserine lactones adjust community structures of bacteria and methanogens to ameliorate the performance of anaerobic granular sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 354: 72-80.
- [22] 冯惠. 基于AHL的群体感应强化受微污染水中微生物去除氨氮及机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
- [23] 衣隆强, 吴英海, 刘长远, 等. 外源酰基高丝氨酸内酯强化生物膜脱氮性能的研究进展[J/OL]. 大连海洋大学学报. <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2022-044>
- [24] CHEN H, LI A, CUI C W, et al. AHL-mediated quorum sensing regulates the variations of microbial community and sludge properties of aerobic granular sludge under low organic loading[J]. *Environment International*, 2019, 130: 104946.
- [25] BUETON E O, READ H W, PELLITTERI M C, et al. Identification of acyl-homoserine lactone signal molecules produced by *Nitrosomonas europaea* strain Schmidt[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2005, 71(8): 4906-4909.
- [26] BATCHELOR S E, COOPER M, CHHABRA S R, et al. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1997, 63(6): 2281-2286.
- [27] 郭少鹏, 江兴龙, 王泽旭, 等. 高效硝化与反硝化功能菌株的分离筛选及其性能研究[J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51(6): 1520-1529.
- [28] 汤默然, 李茹莹. 异养硝化-好氧反硝化菌株的分离筛选及复配菌剂对河水的净化效果[J]. *环境科学学报*, 2021, 41(7): 2657-2663.
- [29] 惠昊, 李娟娟, 李宏, 等. 天然橡胶加工废水中异养硝化好氧反硝化菌株的筛选及其脱氮特性[J/OL]. 生物学杂志. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1081.Q.20220610.1037.002.html>.
- [30] 李海红, 佟欣宇, 宦臣臣, 等. 高效异养硝化-好氧反硝化菌株TS-1筛选及降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(4): 791-799.
- [31] 胡惠秋. 常/低温下AHLs类群体感应信号分子对SBBR系统影响的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2017.
- [32] 蔡文娟. 强化生物处理生活污水的高效混合菌群筛选及降解特性实验研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2021.
- [33] 王兆阳, 陈国耀, 姜珂, 等. 1株耐冷兼性嗜碱好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性[J]. *环境科学*, 2014, 35(6): 2341-2348.

- [34] 罗梦, 易皓, 陈静, 等. 高效液相串联质谱法检测活性污泥中N-高丝氨酸内酯[J]. *环境化学*, 2019, 38(2): 281-286.
- [35] 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.
- [36] 周莉娜, 苏润华, 马思佳, 等. 基于PLFA法分析亚硝氮、硝氮和氨氮对厌氧微生物细菌群落的影响[J]. *环境科学学报*, 2016, 36(2): 499-505.
- [37] YAN X, ZHENG S K, HUO Z M, et al. Effects of exogenous N-acyl-homoserine lactones on nutrient removal, sludge properties and microbial community structures during activated sludge process[J]. *Chemosphere*, 2020, 255: 126945.
- [38] KAREN T, LAN J, MAVIS D, et al. Disruption of quorum sensing in seawater abolishes attraction of zoospores of the green alga *Ulva* to bacterial biofilms[J]. *Environmental microbiology*, 2005, 7(2): 229-240.
- [39] 曾秋宇. 基于垂直折流式生物膜反应器的反硝化工艺[D]. 上海: 上海师范大学, 2020.
- (责任编辑: 靳炜)

## Effect of exogenous C12-HSL signal molecule in coordination with denitrifying bacteria FX-4 on nitrogen removal in activated sludge system

WANG Yajun<sup>1,2,\*</sup>, ZHANG Hongbo<sup>1</sup>, SI Yunmei<sup>1</sup>

1. School of Civil Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2. Western Engineering Research Center of Disaster Mitigation in Civil Engineering of Education, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

\*Corresponding author, E-mail: wyj79626@163.com

**Abstract** In order to explore the influence of quorum sensing effect of exogenous signal molecules on denitrifying bacteria FX-4 and denitrification of activated sludge system, C6-HSL and C12-HSL signal molecules of exogenous AHLs (acyl homoserine lactones) were added into denitrifying resieve medium to explore the effect of AHLs on denitrifying bacteria FX-4's removal of  $\text{NO}_3^-$ -N. The experimental results showed that both C6-HSL and C12-HSL could effectively improve the  $\text{NO}_3^-$ -N removal performance of denitrifying bacterium FX-4 and increase the biomass of denitrifying bacterium FX-4, and C12-HSL synergic denitrifying bacterium FX-4 had the best  $\text{NO}_3^-$ -N removal efficiency. The  $\text{NO}_3^-$ -N removal efficiency of denitrifying bacterium FX-4 was improved by different concentrations of C12-HSL, and C12-HSL of  $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  significantly improved the  $\text{NO}_3^-$ -N removal efficiency of strain FX-4. C12-HSL at concentrations of  $0, 5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}, 50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}, 200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}, 500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , and  $1\ 000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  were simultaneously added to the SBR activated sludge system, as well as the denitrification bacterium FX-4. The nitrogen removal performance, signal molecule concentration and microbial community structure of the system were investigated. The results showed that the synergistic effects of the two could significantly affect the  $\text{NO}_3^-$ -N removal performance of the reactor. The accumulation of  $\text{NO}_3^-$ -N in  $R_1$ - $R_6$  treated with signal molecules decreased by  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  compared with the control group  $R_0$ . The consumption of  $\text{NO}_3^-$ -N in  $R_3$  was the highest in the reactor with  $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  C12-HSL, and the  $\text{NO}_3^-$ -N concentration in effluent was about  $45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  lower than that of  $R_0$ . In addition, C12-HSL signal molecules had a significant positive effect on TN removal, and the TN removal efficiency of activated sludge system was improved more effectively with  $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  C12-HSL dosage. Signal molecule concentration change detection results showed that exogenous addition of C12-HSL could stimulate the secretion of other AHLs in the system, especially the secretion of C4-HSL in the system. The results of microbial community structure analysis showed that exogenous addition of denitrifiers FX-4 and signal molecule C12-HSL could significantly affect microbial community composition in activated sludge, accelerate microbial population succession in activated sludge, and increase the relative abundance of denitrification bacteria such as *Thauera* and *Brevundimonas*. This study can provide technical parameter reference for signal molecules as emergency methods to enhance biological nitrogen removal performance of activated sludge system.

**Keywords** denitrifying bacteria FX-4; N-Dodecanoyl-L-homoserine lactone; quorum sensing; denitrification