

Identification and Characterization of an Effective Phosphate Accumulating Organisms

Yan NI¹, Junzhong YANG¹, Derui ZHU², Ting HU¹, Kehan XU¹, Yi LIU¹, Deli LIU^{1*}

¹Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Science, Huazhong Normal University, Wuhan, China, 430079

²Medical College of Qinghai University, Xining, China, 810001

Email: deliliu2002@yahoo.com.cn

Abstract: There are 15 strains of phosphorus-accumulating organisms were isolated from the soil of Phosphate Fertilizer Factory in HongHu. Among them, HS-P2 is one of the efficient phosphate accumulating organisms. Metachromatic granule staining displayed that poly-P granules exist in cells, and HS-P2 can be identified to *Enterobacterspp* according to morphological identification and 16SrDNA sequence alignment results. Under the aerobic condition, the curve of phosphorus dynamic showed that HS-P2 can remove the phosphorus to the maximum of 85% in the PO_4^{3-} -P of 50mg / L medium at 48h, this study also showed that the optimal carbon source of HS-P2 is glucose, and the optimal pH is 7.0. It has a wide range of temperature for phosphorus removal of 30°C to 37°C, which indicated that HS-P2 has a strong ability in phosphorus-accumulating, and a broad prospects in practical application.

Keywords: Phosphate accumulating organisms; Identification; Phosphorus characteristics; Metachromatic granules

一株高效聚磷菌的鉴定及其特性研究

倪砚¹, 杨俊忠¹, 朱德锐², 胡廷¹, 徐可瀚¹, 刘义¹, 刘德立^{1*}

¹华中师范大学生命科学学院, 湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室 武汉 430079

²青海大学医学院 西宁 810001

Email: deliliu2002@yahoo.com.cn

摘要: 从洪湖市磷肥厂采集土样, 采用富集培养分离出 15 株聚磷菌。测定结果表明分离筛选到 3 株高效聚磷菌, 其中一株命名为 HS-P2 作为研究对象。异染颗粒染色显示菌体中有多聚磷酸盐 (poly-P) 颗粒, 根据形态鉴定及 16SrDNA 序列比对结果初步鉴定为肠杆菌属。在好氧条件下菌株 HS-P2 动态聚磷实验结果表明该菌在 PO_4^{3-} -P 含量为 50mg/L 的培养基中 48h 除磷率达到 85%; 该菌的最适碳源为葡萄糖, 最适 pH 为 7.0; 温度适应范围较广, 最适除磷温度为 30~37°C。表明该菌具有很强的聚磷能力和广阔的实际应用前景。

关键词: 聚磷菌; 鉴定; 聚磷特性; 异染颗粒

1 引言

水体中的磷 (P) 是引起富营养的主要元素, 日益突出的水环境污染问题亟需有效的方法去处理。现今处理废水中除磷的方法主要有物理、化学、生物三种方法。物理和化学方法虽然发展时间较长, 但是由于会引起二次污染, 成本高、效率低等原因抑制其发展^[1]。生物除磷具有低成本、高效率、污染少、可循环性等优势已经成为水污染治理的热点。

传统的生物除磷工艺主要有 A/O (缺氧/好氧处理工艺)^[2]、A/A/O (厌氧/缺氧/好氧脱氮除磷工艺)^[3]、A/O/A (厌氧/好氧/缺氧脱氮除磷工艺)^[4]、EBPR (强化生物除磷工艺)^[5], 而这些工艺几乎都基于 PAO (好氧聚磷菌) 的除磷能力。传统的生物除磷理论认为: PAO 在厌氧阶段分解内部的 poly-P、水解贮存的糖原, 一部分能量用于自身在厌氧环境下的生长, 其余的提供能量和还原力, 用于主动吸收外界的有机碳源, 在体内合成贮能物质 PHB (聚-β-羟基丁酸盐)。在好氧阶段 PAO 利用游离氧为电子受体氧化体内贮存的 PHB, 并利用该反应产生的能量进行过量摄磷,

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170011, 30771429); 教育部博士点基金项目(20060511002); 湖北省科技攻关计划项目(2007AA201C50, 2007AA301C26)

在体内重新合成 poly-P 和糖原, 以达到生物除磷的目的。该理论认为 PAO 达到过量摄磷目的与厌氧阶段合成 PHB 有很大关系, 可以说 PAO 在厌氧阶段合成的 PHB 越多在好氧阶段摄取的磷也就越多^[6]。有些学者在研究单级好氧条件下进行生物除磷均不能得出理想的结果, 除微生物正常生长所需的磷外, 没有过量摄磷的表现, 因此厌氧阶段的设置也就成为生物除磷工艺中必不可少的。

近年来也有不少研究者发现 PAO 不经历厌氧阶段也可以达到较好的除磷效果^[7,8], 这与传统的生物除磷理论有些差异。本文从洪湖市磷肥厂采集土样, 分离筛选到一株高效聚磷菌, 命名为 HS-P2。该研究过程中并不设置厌氧阶段, 直接曝气, 观察好氧阶段培养基中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量的变化情况, 仍能得到较好的除磷效果。这不仅为生物除磷提供了高效的菌株, 而且为生物除磷理论的发展与完善提供了理论基础。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 样品来源

聚磷菌菌株从洪湖市磷肥厂采集的土样, 经富集培养筛选分离。

2.1.2 培养基

富磷培养基: 葡萄糖 10g, CaCl_2 0.2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0g, KH_2PO_4 0.25g, 加水至 1L, pH 7.0。

无机磷液体培养基^[9]: 葡萄糖 10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, NaCl 0.3g, KCl 0.3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03g, 加入 KH_2PO_4 0.2195g 使 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量为 50mg/L, 加水至 1L。

LB 培养基: 蛋白胨 10g, NaCl 10g, 酵母膏 5g, 加水至 1L。

2.2 聚磷菌的富集与分离

称取一定量的土样置于 50ml 离心管中, 加入等量的蒸馏水, 搅拌均匀后平衡, 以 8000rpm 离心 5min, 去上清, 取一定量的土样转接到富磷的无机盐液体培养基中, 以摇瓶培养, 30℃ 培养 36 小时后, 以 1% 接种到新的摇瓶中, 重复三次摇瓶培养, 再利用涂布平板法和平板划线分离法。

2.3 菌株鉴定及染色

poly-P 染色: 取少量于无机磷液体培养基中培养 48h 的菌液进行异染颗粒染色, 染色方法为 Albert 染色法^[10]。

菌株的形态鉴定: 在固体富磷培养基上接种 HS-P2, 2 天后观察其菌落形态。菌株的分子鉴定主要步骤: 提取聚磷菌基因组 DNA, 采用 16SrDNA 通用引物, 以基因组 DNA 为模板扩增该菌的 16SrDNA, 测序结果在 NCBI-BLAST 上进行同源比对。

2.4 菌株生长情况及聚磷动态

以 2% 接种量加入装有 100ml 无机磷液体培养基的 500ml 锥形瓶中, 隔 12h 取样, 12000rpm, 离心 10min, 测上清中 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量并测定菌体在培养基中的生长情况。

2.5 环境对聚磷菌生长及聚磷能力的影响

选取 pH5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 以 2% 接种量加入各个培养基中, 每隔 12h 取样, 12000rpm, 离心 10min, 测定上清的含磷量及生长情况。

选取 15℃、20℃、25℃、30℃、37℃ 五个温度, 以 2% 接种量加入到培养基中, 定时取样, 对其 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量及生长情况进行测定。

2.6 碳源对聚磷菌生长情况及聚磷率的影响

分别以乙酸钠、甘油、葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、淀粉为试验碳源, 在 100ml 不加碳源的无机磷液体培养基中各加入不同碳源 1g, 以 2% 的接种量加入配置好的培养基中, 定时取样, 测定上清的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量及生长情况。

2.7 磷含量测定

通过钼酸铵分光光度法测定样品上清 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的含量变化, 计算其除磷率, 方法参考文献^[11]。聚磷菌生长曲线通过测定 OD_{600} 的吸光值确定。

3 结果与讨论

3.1 聚磷菌的筛选及鉴定

从洪湖市磷肥厂采集土样, 采用富集培养分离出 15 株聚磷菌。测定结果表明分离筛选到 3 株高效聚磷菌, 其中一株命名为 HS-P2 作为研究对象。菌株 HS-P2 为白色菌落, 形态呈规则圆形, 不透明, 边缘不整齐, 隆起。HS-P2 在平板上培养 2d 观察到菌落周围形成透明的溶磷圈 (图 1)。

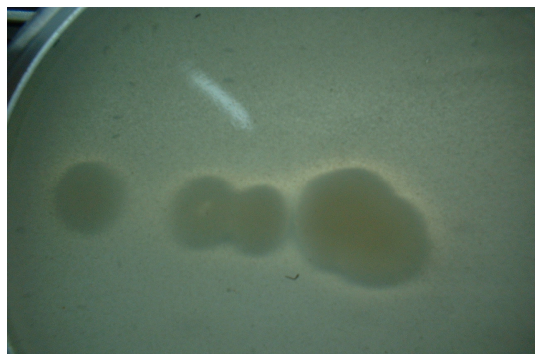


Fig1. HS-P2 colonial morphology

图 1. HS-P2 菌落形态

聚磷菌主要的体内多聚物是多磷酸盐、聚羟链烷酸和糖原质。对菌体染色,利用 1000×油镜可观测到菌体内特征性颗粒的存在。而本实验中没有设置厌氧阶段,所以异染颗粒主要是 poly-P。异染颗粒通过 Albert 染色, poly-P 呈深褐色或黑色菌体其他部分呈绿色(图 2)。

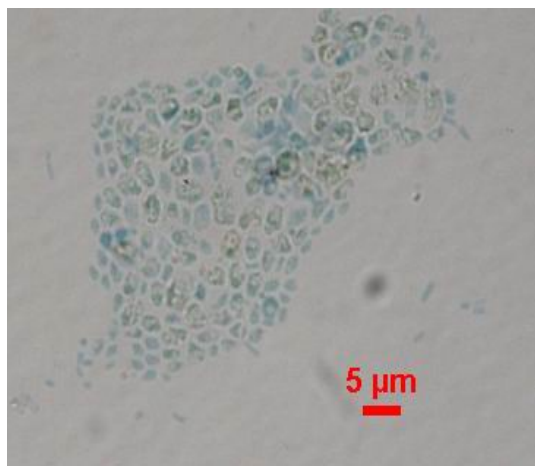


Fig2. poly-P Staining

图 2. poly-P 染色

16SrDNA 测序结果为 1500bp 左右,其结果在 NCBI-BLAST 进行比对显示与肠杆菌属同源性达 98%,根据形态鉴定和序列比对可以初步鉴定 HS-P2 为肠杆菌属。

3.2 HS-P2 聚磷动态分析

HS-P2 聚磷动态如图 3 所示,该菌在 48 小时 OD_{600} 达到最大值,聚磷率可达 83.4%,上清剩余磷含量为 9.19mg/L。48 小时后上清液中的磷含量虽有所下降但

却很少,因此可以确定 HS-P2 的最佳培养时间为 48 小时。该实验中剩余磷含量较高是由于起始磷含量设置为 50mg/L,众多研究者在设置实验时,磷含量都 $\leq 10\text{mg/L}$ ^[12]。有研究结果表明较高的磷浓度会抑制聚磷菌的生长和聚磷能力。本文中的菌株对高浓度的磷具有相对较高的耐受性,而且除磷能力较强,具有一定的应用价值。

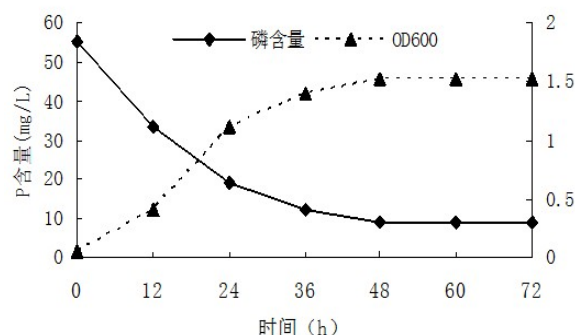


Fig 3. Phosphorus dynamics and growth curve

图 3.聚磷动态与生长曲线

3.3 pH 与温度对 HS-P2 生长及聚磷能力的影响

pH 可影响菌体盐离子平衡以及生物大分子活性,从而影响微生物生理代谢。环境过酸或过碱都会影响聚磷菌的聚磷能力^[13]。本实验中, pH 在 6.0~8.0 范围内对 HS-P2 除磷能力和生长无明显影响。其中, pH7.0 时菌生长及聚磷率均达到最大值,聚磷率为 85.1%。

温度会影响微生物细胞膜的流动性和生物大分子的活性,从而影响其生长和新陈代谢。实验表明,升高温度对聚磷菌摄磷有很大影响^[14]。聚磷菌 HS-P2 在 20~37 °C 均能正常生长,且除磷率较高。其中, 30°C 和 37°C 下的除磷率均达到 80% 以上。15°C 下, HS-P2 聚磷率下降,但仍可达到 67%。表明该聚磷菌具有较宽的作用温度范围,这在污水处理中具有较强的实用价值。

3.4 碳源对 HS-P2 生长及聚磷能力的影响

在培养基中添加不同碳源,研究聚磷菌 HS-P2 的生长及除磷率(图 4)。以葡萄糖、果糖或蔗糖作为碳源, HS-P2 生长良好,除磷率均达到 80% 以上。其中,葡萄糖为碳源时除磷率最高,达到 84.4%。乙酸钠和甘油为碳源时,菌生长与聚磷能力均有所下降,除率磷分别为 65.6% 和 74.1%。碳源为乳糖或淀粉时, HS-P2 在培养基中几乎不能生长。一般认为,聚磷菌

在厌氧阶段优先利用结构较简单的易挥发性有机物作为碳源,有很多证据表明,聚磷菌以乙酸或丙酸为碳源时除磷效果最好^[12,15]。但也有实验显示聚磷菌以葡萄糖为碳源时除磷率高^[16]。本实验结果表明,HS-P2除磷的最适碳源是葡萄糖。

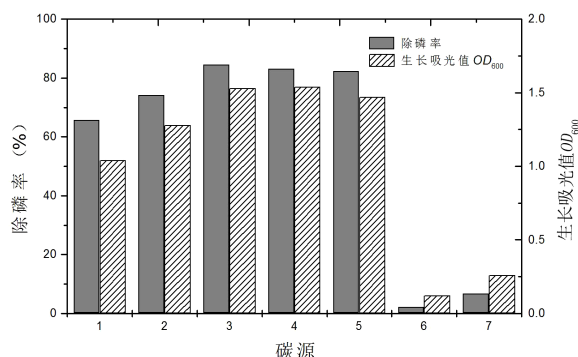


Fig4. The influence of different carbon sources to the growth and phosphorus removal capacity of strain HS-P2

1: Sodium acetate; 2: Glycerol; 3: Glucose; 4: Fructose; 5: Sucrose; 6: Lactose; 7: Starch

图 4.不同 C 源对菌株生长和除磷率的影响

1: 乙酸钠; 2: 甘油; 3: 葡萄糖; 4: 果糖; 5: 蔗糖; 6: 乳糖; 7: 淀粉

4 结论

通过富集培养分离出一株聚磷效果较高的菌株,命名为 HS-P2。根据形态特征和 16SrDNA 比对分析鉴定为肠杆菌属。该菌在高浓度 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (50mg/L)的培养基中生长良好,48h 时除磷率为 85%。对其最佳除磷条件进行了初步探究,确定了其最适碳源为葡萄糖、最适 pH 为 7.0、最适温度为 30~37℃,温度适应范围较宽,该研究结果为富营养化水体的治理提供了新的、有效的菌种资源,该菌具有的高效除磷率和耐受高浓度磷的特性,将为生物脱氮除磷技术的应用提供理论依据。

References (参考文献)

- [1] Tang GH, Hua RM, Sun ZG. Biological phosphorus removal [J]. *Journal of agro-environment science*, 2006, 25 (Supplement), P163-167 (Ch).
汤桂兰, 花日茂, 孙振均. 生物除磷的研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25 (增刊): 163 - 167.
- [2] Wu XG, Guan YT. SRT and the carbon concentration on the

anaerobic/anoxic PHB operation of SBR process [J]. *Environmental sciences*, 2005, 26(2): 126~130. (Ch).

吴光学,管运涛. SRT 及碳源浓度对厌氧/好氧交替运 SBR 工艺中 PHB 的影响 [J]. *环境科学*, 2005, 26(2): 126~130.

- [3] Kuba T, Smolders G, Vanloosdrecht MCM, et al. Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor [J]. *Wat SciTech*, 1993, 27(5-6):241~25
- [4] Koichi S, Shinya M, Satoshi O, et al. Modeling and experimental study on the anaerobic /aerobic/ anoxic process for simultaneous nitrogen and phosphorus removal: The effect of acetate addition [J]. *Process Biochemistry*, 2008 (43):605~614.
- [5] Oehmen A, Lemos PC, Carvalho G, et al. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale [J]. *WaterRes*, 2007, 41:2271~2300.
- [6] Zeng RJ, Yuan Z, Keller J. Model based analysis of anaerobic acetate uptake by a mixed culture of polyphosphate accumulating and glycogen accumulating organisms [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003,83(3):293~302.
- [7] Zhou YX, Cheng FR, Qian Y, et al. Study on the chemis- try of uptake and release of phosphate by pseudomonas sp. [J]. *ATCT SCIENTIAE CIRCUMSTANTIAE*.1994, 14(2): 212~215. (Ch)
周岳溪, 陈方荣, 钱易等. 假单胞菌摄磷和释磷条件的研究 [J]. *环境科学学报*, 1994, 14(2): 212~215.
- [8] Wang DB, Li XM, Yang Q, Zhang J, et al. Simultaneous Nitrogen and Phosphorus Removal in the Reactor of Inner Loop SBR Without Anaerobic Phase [J]. *Environmental science*, 2007, 28(3). (Ch)
王冬波, 李小明, 曾光明等. 内循环 SBR 反应器无厌氧段实现同步脱氮除磷 [J]. *环境科学*, 2007, 28(3).
- [9] Zhao XR, Lin QM, Li BG. Effect of C, N sources and C/N ratio on the solubilization of rock phosphate by some microorganisms [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2002, 8(2): 197~204. (Ch)
赵小蓉, 林启美, 李保国. C、N 源及 C/N 比对微生物溶磷的影响[J]. *植物营养与肥料学报*. 2002, 8 (2): 197~204.
- [10] Luisa SS, Paulo CL, Caterina L, et al. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate accumulating microorganisms [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 51 (2002): 1~18.
- [11] State Environmental Protection Administration. Moni-toring Analysis Method of Water and Wastewater [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2002. (Ch)
国家环保局编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国, 环境科学出版社, 2002.
- [12] Zhang SH, Huang Y, Hua YM. Denitrifying dephosphatation over nitrite: Effects of nitrite concentration, organic carbon and pH [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 3870~3875.
- [13] Wu Q, Bishop PL, Keener TC. Biological phosphate uptake and release: effect of pH and magnesium ions [J]. *Water Environ Res*. 2006, 78(2): 196~201.
- [14] Thongchai P, Apiradee D, Jin A. Effect of Temperature Shock on Activities of Phosphorus-accumulating Organisms [J]. *ScienceAsia*, 2003, 29: 365~370
- [15] Koichi S, Kazuma O, Akihiko T, et al. Effects of acetate and nitrite addition on fraction of denitrifying phosphate -accumulating organisms and nutrient removal efficiency in an-aerobic/aerobic/anoxic process [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2006, 29: 305~313.
- [16] Wang AJ, Wu LH, Ren NQ, et al. Feasibility of denitrifying phosphorus removal technique using nitrite as electron acceptor [J]. *China Environ. Sci*. 2005, 25: 515~518. (Ch)