

# 一株聚磷菌GP44的筛选、鉴定及其聚磷特性研究<sup>①</sup>

赵海泉, 胡子全

(安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

**摘要:** 采用纯培养结合蓝白斑筛选法从巢湖和南淝河底泥中分离筛选出能聚磷(P)的11株解P细菌, 好氧培养时菌体吸P能力测定结果表明, GP44的菌体含P量达到11.92%, 具有较高的聚P能力, 对其初步鉴定为鉴定菌株GP44属肠杆菌科中的克雷伯氏菌属土生克雷伯氏菌(*K.terrigena*)。GP44在废水合成培养基上最佳聚P温度30℃、初始pH为7.5、最佳装液量为120 ml/250 ml和最适C源是葡萄糖, Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>和Fe<sup>3+</sup>有利于菌株GP44的生物除P。

**关键词:** 聚磷菌; 筛选; 鉴定; 聚磷特性

**中图分类号:** X172

磷(P)是水体产生富营养化的主要营养物质, 水体一旦富营养化, 即使切断外界N、P营养元素也难以自净恢复。目前, 国内外污水除P技术主要有物理法、化学法和生物法3类。物理法除P效果较好, 但其只适合处理流量较小, 含P量较高的工业废水, 成本又过高, 技术复杂, 因而无法得到普遍的应用<sup>[1]</sup>。化学法对P的去除率较高, 一般可达75%~85%, 处理效果稳定, 污泥在处理和处置过程中不会重新释放P。但是在化学方法处理过程中使用的化学试剂常会引起二次污染, 且污泥产量大, 远远不能满足现在大规模控P现实情况<sup>[2]</sup>。生物法是利用微生物的生理活动实现除P, 其处理效率高, 运行成本较低, 污泥产量较小, 减少污泥膨化, 对环境造成的副作用较小。

由于藻类除P和大型水生植物普遍应用也存在一定的困难, 因此目前国内外的研究学者把目光集中在微生物除P的研究中。但是大多数研究学者主要研究微生物的除P工艺的改进和创新, 而对聚磷菌聚P机理研究进展比较缓慢。对聚P机理研究的最大障碍是聚磷菌筛选的较少, 分离纯化培养较为困难, 而且筛选的聚磷菌稳定性较差, 且纯化分离的菌种不能在聚P工艺中表现好氧聚P和厌氧释P的聚P特性<sup>[3]</sup>。因此从聚磷菌内部代谢规律和影响聚磷菌聚P能力的外在因素两方面加强聚磷菌聚P机理的研究是非常重要的, 为提高生物除P效率提供依据。

本实验是通过从巢湖闸的底泥中分离、筛选到高效聚P能力的聚磷菌GP44, 对其进行生理生化鉴定

并对其聚P特性进行了初步的研究, 为以后深入研究其解P机理以及通过生物技术提高其聚P能力奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

2006年5月中旬, 使用自制的底泥采样器从巢湖闸和南淝河采样。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基** (1) 富集培养基: 选择牛肉膏蛋白胨液体培养基用于细菌的富集, 为了使聚磷菌在培养基中形成生长优势以便于分离, 在培养基中加入20 mg/L的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>[4]</sup>。

(2) YG培养基<sup>[5]</sup>: 酵母浸膏1 g、葡萄糖1 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g, MgSO<sub>4</sub> 0.2 g, pH 7.2~7.4, 水1000 ml。

(3) 葡萄糖-MOPS固体培养基<sup>[6]</sup>: ①100 ml的10×MOPS混合物(8.372 g MOPS + 0.717 g Tricine + 30 ml去离子水, 10 mol/L的KOH调节pH至7.4, 总体积到44 ml, 加入0.01% 1 ml新制的FeSO<sub>4</sub>溶液, 按下列顺序加溶液: 5 ml 1.9 mol/L NH<sub>4</sub>Cl, 1 ml 0.276 mol/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.025 ml 0.02 mol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.21 ml 2.5 mol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 ml 5 mol/L NaCl, 0.02 ml微量元素混合液, 38.7 ml去离子水), 葡萄糖0.1 g。各取50 ml葡萄糖-MOPS培养基置于2个500 ml的三角瓶中, 向一个三角瓶中加入0.0087 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和

①基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目(2006KJ214B)资助。

作者简介: 赵海泉(1958—), 男, 安徽六安人, 硕士, 副教授, 主要从事微生物生理研究工作。E-mail: swjs12@ahau.edu.cn

X-P<sub>i</sub> (50 μg/ml) 成为限 P 培养基; 向另一个瓶中加入 0.1732 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 X-P<sub>i</sub> (50 μg/ml) 成为 P 过量培养基。向 2 种培养基中均加入 VB<sub>1</sub> 溶液 0.1ml 和无菌水 150 ml, 分别用细菌滤器过滤灭菌, 分装于已灭菌的 250 ml 三角瓶中。②取 500 ml 的三角瓶 2 个, 分别加入去离子水 300 ml 和琼脂 10 g, 在 121℃ 灭菌 30 min, 将灭菌后的琼脂培养基冷却至 50℃, 然后将过滤灭菌好的 MOPS 混合物倒入, 倒平板。

(4) 废水合成培养基<sup>[7]</sup>: 葡萄糖 0.3 g, 蛋白胨 0.1 g, 酵母粉 0.01 g, CH<sub>3</sub>COONa 0.15 g, NaCl 0.05 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 g, MgSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.18 g, 水 1000 ml。

(5) 牛肉膏培养基: 用于菌种保藏、活化。

1.2.2 聚磷菌的分离及纯化 (1) 菌种分离: 分别称取 5 g 底泥置于已灭菌的装有 150 ml 牛肉膏蛋白胨液体培养基的三角瓶中, 加入若干玻璃珠, 于 30℃, 120 r/min 摇床振荡培养 5 天。吸取 5 ml 培养液于盛有 45 ml 无菌水的三角瓶中, 混匀, 制成浓度梯度为 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 的菌悬液。从各浓度菌悬液中分别吸 0.1 ml 于 YG 平板上, 每个稀释度涂布 3 块平板, 于 30℃ 培养箱培养 2~3 天。从平板中挑出形态不同的菌落, 在 YG 固体培养基的平板上进行划线纯化, 然后再转接到牛肉膏的斜面培养基上, 于 30℃ 培养箱培养 2 天。将所有的斜面试管取出, 放于 4℃ 冰箱保藏。

(2) 蓝白斑筛选方法<sup>[7]</sup>: 将形态不同的菌株分别点接于限 P 和 P 过量的 MOPS-葡萄糖培养基, 于 30℃ 培养 1~2 天。观测蓝白斑的生长情况。

1.2.3 聚磷菌的内聚物染色 将在限 P 和 P 过量的葡萄糖-MOPS 培养基上都产生蓝斑的菌株接种到废水合成固体培养基上, 30℃ 下厌氧培养 2 天, 进行 PHB 染色, 再好氧培养 2 天, 进行 poly-P 染色。

(1) PHB 染色<sup>[8]</sup>。苏丹黑染色法: 用甲液染色 10 min, 用水冲洗甲液, 用滤纸将水吸干, 用二甲苯冲洗涂片至无色素洗脱, 再用乙液复染 1~2 min, 水洗, 吸干, 备油镜镜检。类脂粒呈蓝黑色, 菌体呈红色。

(2) poly-P 染色<sup>[9]</sup>。Albert 染色法: 按常规方法制片, 用甲液染色 5 min, 倾去甲液, 用乙液冲洗去甲液, 并染色 1 min, 水洗, 吸干, 备油镜镜检。异染粒呈黑色, 菌体其他部分呈绿色。

1.2.4 聚磷菌的菌体含 P 量的测定<sup>[8]</sup> 将选定的菌株分别接种于 7 支废水合成培养基试管中 (5 ml 培养液), 30℃, 厌氧培养 6 h, 以 12000 r/min 离心

10 min, 收集菌体, 转接到两个装有 100 ml 培养液的 250 ml 锥形瓶中, 30℃, 120 r/min 振荡培养 24 h, 测定菌体的含 P 量。①取 50 ml 菌悬液于 50 ml 的离心管中, 以 12000 r/min 离心 10 min, 用无菌水溶解, 再离心, 重复 3 次得湿菌体, 于 105℃ 烘至恒重, 称菌体干重。②在无菌条件下, 取菌液 25 ml 用超声波破碎菌体 (破碎条件: 输出功率为 200 W, 工作时间 4 s, 间隔时间 4 s, 共破碎 180 次)<sup>[10]</sup>后, 再用过硫酸钾进行消解, 按总 P 测定方法测菌体含 P 量<sup>[11]</sup>。

1.2.5 菌株 GP44 的聚 P 特性研究 (1) 菌体制备。将新鲜 GP44 菌种接种于装有 180 ml 废水合成液体培养基的 250 ml 的三角瓶中, 30℃ 厌氧培养 6 h, 使用灭菌的离心管, 以 12000 r/min 离心 10 min, 得到菌体。

(2) 不同培养温度对菌株 GP44 聚 P 特性的影响。以废水合成液体培养基为基础, 按体积比 5% 的比例, 取出 5 ml 培养液, 离心的菌体, 将 GP44 的菌体转移到 100 ml 培养基的 250 ml 三角瓶内, 置于 4℃、10℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃ 摇床上培养, 转速 120 r/min, 培养 24 h, 测定菌株的生长量 (用 OD 值表示) 和培养上清液的 P 含量。

(3) 不同溶氧量对菌株 GP44 聚 P 特性的影响。以废水合成液体培养基为基础, 按体积比 5% 的比例, 取出 1.5、2.5、4.0、6.0、7.5、9.0 和 10.5 ml 培养液, 离心的菌体, 将 GP44 的菌体转移到 250 ml 摇瓶中分别装 30、50、80、120、150、180 和 210 ml 培养液中, 置于转速 120 r/min, 30℃ 摇床培养 24 h, 测定菌株细胞生长量和培养上清液的 P 含量。

(4) 培养基的不同初始 pH 对菌株 GP44 聚 P 特性的影响。以废水合成液体培养基为基础, 利用酸碱调节 YG 培养基 pH 值至 4.5~11.0。以 0.5 为梯度设置各个 pH 点, 灭菌; 按体积比 5% 的比例, 取出 5 ml 培养液, 离心的菌体, 将 GP44 的菌体转移到 100 ml 培养基的 250 ml 三角瓶内, 置于转速 120 r/min, 30℃ 摇床培养 24 h, 测定菌株生长量和培养上清液 P 含量。

(5) 不同 C 源对菌株 GP44 聚 P 特性的影响。以不含葡萄糖的 YG 液体培养基为基础, 分别加入 1% 的乙酸钠、葡萄糖、乳糖、可溶性淀粉、蔗糖、麦芽糖、乙醇 (过虑灭菌) 作为发酵培养基中的唯一 C 源。按体积比 5% 的比例, 取出 5 ml 培养液, 离心的菌体, 将 GP44 的菌体转移到 100 ml 培养基的 250 ml 三角瓶内, 置于转速 120 r/min, 30℃ 摇床培养 24 h, 测定菌

株生长量和培养上清液 P 含量。

(6) 不同金属离子对菌株GP44 聚 P 特性的影响。以废水合成液体培养基为基础，分别按 0.1% 浓度加入NaCl、CaCl<sub>2</sub>、AlCl<sub>3</sub>、CoCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>、CuSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、MnSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、CH<sub>3</sub>COONa、CH<sub>3</sub>COOK、CH<sub>3</sub>COOCa、CH<sub>3</sub>COOPb。按体积比 5% 的比例，取出 5 ml培养液，离心的菌体，将GP44 的菌体转移到 100 ml培养基的 250 ml三角瓶内，置于转速 120 r/min，30℃ 摇床培养 24 h，测定菌株生长量和培养上清液 P 含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 高效聚磷菌株的筛选和分离

采集巢湖和南淝河污染严重的底泥，进行富集培养 5 天，经多次划线，分离纯化出 66 个形态不同的菌落。选择生长旺盛的 30 株细菌分别点种到限 P 和过 P 的葡萄糖-MOPS 培养基上，30℃ 恒温培养 2 天，观察蓝白斑出现情况如表 1 所示。在限 P 培养基上呈蓝斑和过 P 培养基上呈白斑菌株有 9 株，在 2 种培养基上均呈白斑有 10 株，在 2 种培养基上均呈蓝斑有 11 株。2 种培养基上均呈蓝斑的菌株即为初筛聚磷菌，分别命名为 GP1、GP2、GP10、GP12、GP15、GP16、GP19-1、GP36、GP38、GP44、GP61。

表 1 蓝白斑筛选聚磷菌

Table 1 Screening phosphorus accumulating organism by blue and white spot method

培养基	蓝斑菌株号	白斑菌株号
过 P 的葡萄糖-MOPS	1,2,10, 12, 15, 16,19-1, 36, 38, 44,61	6,6-1,9, 11, 18,25, 26,30,33, 35, 42,47,52,55, 56, 62,65,60,65
限 P 的葡萄糖-MOPS	1, 2, 6-1, 10, 11,12, 15, 16, 18, 19-1, 26, 35, 36, 38, 42, 44, 47, 56, 61, 62	6,9,25,30,33,52,55, 60,65, 65

### 2.2 聚磷菌的内聚物染色

研究表明，在过 P 和限 P 的葡萄糖-MOPS 培养基上都产生蓝斑，是检测所筛细菌中是否含有多聚磷酸激酶，菌株的聚 P 能力还与厌氧培养合成 PHB 的能力和好氧培养合成 polyP 能力及菌体含 P 量有

关。所以要通过厌氧好氧培养来检测 PHB 和 polyP 合成情况及对菌体含 P 量进行测定。PHB 染色结果如图 2a，菌体呈粉红色，类脂粒呈蓝黑色；polyP 染色结果如图 2b，菌体呈绿色，多聚磷酸盐呈黑色。

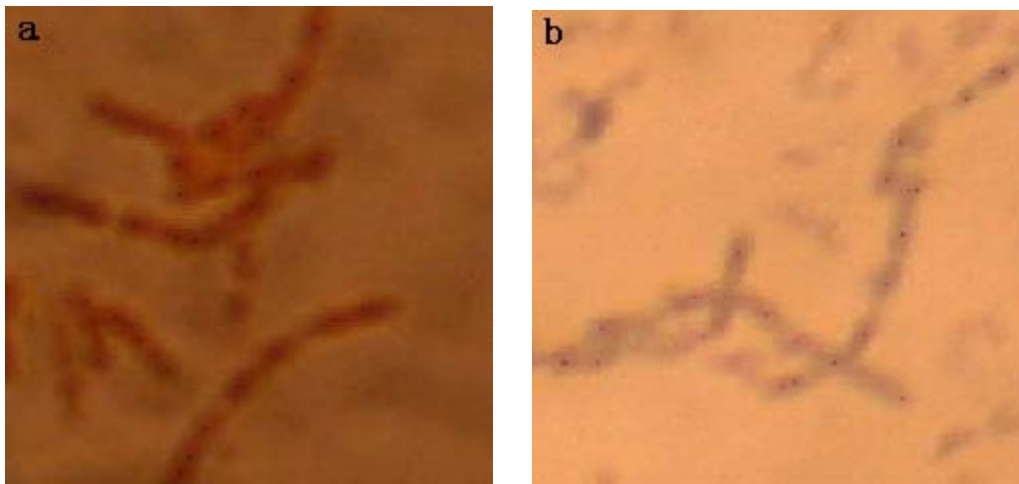


图1 聚磷菌内聚物的染色 (a: PHB, b: polyP)

Fig. 1 Result of dying inclusion of phosphate accumulating bacterial( a: PHB, b:polyP )

观察所知，菌株 GP1、GP2、GP15、GP16、GP19-1、GP36、GP44 均含有 PHB 和 polyP，菌株 GP10、GP30

和 GP61 体内没有 PHB，菌株 GP12、GP30 和 GP61 体内没有 polyP。

### 2.3 聚磷菌菌体含 P 量测定

将经过厌氧与好氧培养都能观察到 PHB 和 polyP 的 7 株细菌进行含 P 量的测定, 筛选出聚 P 能力较高的菌株, 测定结果如表 2。由表 2 可知, 7 株聚磷菌的菌体含 P 量均明显高于对照菌株, 菌体含 P 量在

3.21%~11.92%之间, 菌株 GP1、GP2、GP36 与 GP44 的菌体含 P 量超过了 6%, 其中菌株 GP44 的菌体含 P 量高达 11.92%, 在这 7 株细菌中最高, 菌株 GP15 的含 P 量最低。本研究将菌株 GP44 作为进一步的研究对象。

表 2 聚磷菌的菌体含 P 量测定  
Table 2 Phosphorus contents in PAO

菌号	GP1	GP2	GP15	GP16	GP19-1	GP36	GP44	大肠杆菌(对照)
含 P 量(%)	10.41	7.54	3.21	4.16	5.65	6.97	11.92	2.24

### 2.4 菌株 GP44 的生理生化鉴定

菌株 GP44 在废水合成培养基上培养, 菌落特征为圆形, 表面光滑, 边缘平整, 不透明, 湿润, 有臭味, 卵黄色, 早期颜色较浅, 后期颜色加深。显微镜下观察菌体呈链杆状(单个, 双个, 短链), 无鞭毛, 有荚膜, 大小为  $0.75 \mu\text{m} \times 2.25 \mu\text{m}$ , 革兰氏阴性。菌株 GP44 的生理生化试验鉴定结果如表 3 所示: 对接触酶试验、甲基红试验、V-P 试验、淀粉水解试验、乳糖发酵试验、L-鼠李糖发酵试验、葡萄糖发酵试验、硝酸盐还原试验、脲酶试验、赖氨酸脱羧酶试验及柠檬酸盐试验反应呈阳性, 对氧化酶试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、吲哚试验、明胶液化试验、硫化氢试验、运动性试验及鸟氨酸脱羧酶试验反应呈阴性。根据菌株的菌落特征和菌体形态特征及其生理生化反应特征分析, 初步鉴定菌株 GP44 属肠杆菌科中的克雷伯氏菌属土生克雷伯氏菌 (*K. terrigena*) [8,12]。

### 2.5 菌株 GP44 的聚 P 特性研究

**2.5.1 不同培养温度对 GP44 生长与聚 P 效果的影响**  
温度主要通过微生物细胞膜的流动性和生物大分子的活性影响微生物的新陈代谢。新陈代谢是一系列极其复杂的生物化学反应, 这种反应需要在一定的温度范围内进行。因此, 对于某一种特定的微生物, 只能在一定的范围内生长, 温度的下限和上限分别称为该微生物的最低和最高生长温度。当低于或高于最低或最高生长温度时, 微生物停止生长甚至死亡。

从图 2 可以看出, 菌株 GP44 在  $10 \sim 40^\circ\text{C}$  下均能生长, 且在  $20 \sim 35^\circ\text{C}$  生长情况较好, 最佳生长温度为  $25^\circ\text{C}$ ; 在温度为  $20 \sim 35^\circ\text{C}$  下除 P 效果都比较好, 在  $10^\circ\text{C}$  以下与  $40^\circ\text{C}$  以上, 除 P 的效果较差。  $30^\circ\text{C}$  时除 P 效果最佳。总体来讲, 菌株 GP44 在  $20 \sim 35^\circ\text{C}$  状

态比较好。

表 3 菌株 GP44 的生理生化特性

Table 3 Biological and chemical identification of GP44

鉴定项目	鉴定结果
氧化酶试验	-
接触酶试验	+
苯丙氨酸脱氨酶试验	-
V-P 试验	+
吲哚试验	-
淀粉水解试验	+
明胶液化试验	-
硫化氢试验	-
乳糖发酵试验	+
硝酸盐还原试验	+
L-鼠李糖发酵试验	+
运动性试验	-
葡萄糖发酵试验	产酸产气
脲酶试验	+
赖氨酸脱羧酶试验	+
柠檬酸盐试验	+
甲基红试验	+
鸟氨酸脱羧酶试验	-

注: “+”为阳性“-”为阴性

**2.5.2 不同溶氧量对 GP44 的聚 P 效果的影响**  
研究表明, 溶液中的溶氧量对聚磷菌的除 P 效果影响较大。通过改变三角瓶中培养基的装量, 进行供氧状况对菌株 GP44 的生长量和除 P 效果的试验, 确定其合适的通气条件并进一步确认其与供氧的关系, 结果如图 3 所示。

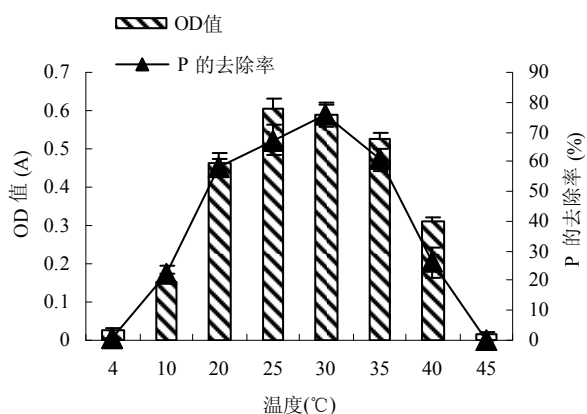


图 2 不同培养温度对菌株 GP44 的生长和除 P 的影响  
Fig. 2 Effects of different temperatures on growth and P accumulation of strain GP44

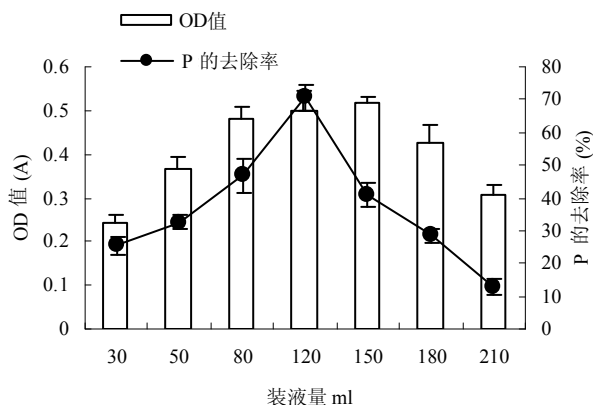


图 3 不同溶氧量对菌株 GP44 的生长和除 P 的影响  
Fig. 3 Effects of different aerations on growth and P accumulation of strain GP44

由图 3 可知，装液量为 150 ml 时，生长量达到最大，装液量为 30 ml 时，生长量最小，装液量对菌株 GP44 的生长影响较小。从除 P 效果来看，装液量为 120 ml 时，P 的去除率最大为 70.56%，当装液量 > 150 ml 或 < 80 ml 时，P 的去除率明显降低。在实际应用中，在厌氧阶段，氧气含量会影响有机质分解成有机酸，妨碍了聚磷菌在体内合成 PHB，同时，氧气也会加快有机质的降解。在好氧阶段，氧气作为电子受体降解 PHB 释放大量的能量来满足其过量摄 P<sup>[13]</sup>。

**2.5.3 培养基的不同初始 pH 对 GP44 的聚 P 效果的影响** 微生物生长的 pH 范围大多数是在 pH 5 ~ 9 之间，不同种类的微生物均有其最适 pH 要求，因此，对聚磷菌生长中的 pH 控制非常重要。pH 不仅对细胞发生直接影响，也对细胞产生不同的间接影响。它通过影响培养基中营养物质的离子化程度，从而影响微生物

对营养物的吸收，以及影响代谢反应中酶的活性<sup>[14]</sup>。

由图 4 可以看出，菌株 GP44 在 pH 6.0 ~ 8.5 均生长正常，当初始 pH < 5.5 或 > 9.5 时，菌体生长较慢，甚至不能生长，最适生长的 pH 值为 7.5。从除 P 的效果来看，初始 pH 在 6.0 ~ 8.5 时除 P 效果比较好，在 pH = 7.5 时除 P 效果最佳，培养上清液的 P 含量从 10.34 mg/L 降至 2.86 mg/L，当初始 pH < 6.5 或 > 8.0 时，P 的去除率明显下降。郑弘等<sup>[15]</sup>研究表明，聚磷菌在序批式反应器中的培养液起始 pH = 7.6 比 pH = 6.8 可以获得更好的除 P 效果。

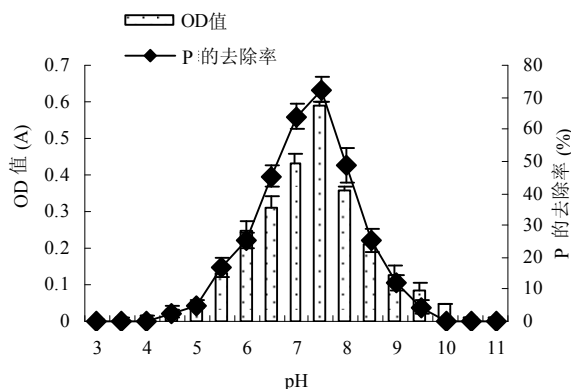
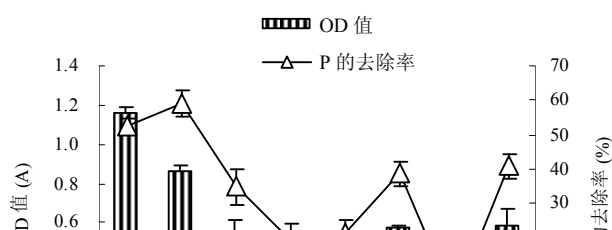


图 4 不同初始 pH 对菌株 GP44 的生长和除 P 的影响  
Fig. 4 Effects of different initial pH values on growth and P accumulation of strain GP44

**2.5.4 不同 C 源对 GP44 的聚 P 效果的影响** C 源时异养微生物进行新陈代谢的重要影响因素。C 源的种类和结构对生物除 P 工艺中微生物有着重要调节作用，研究表明，不同 C 源对聚磷菌的生长和除 P 的效果影响比较明显。

由图 5 可知，不同 C 源对菌株 GP44 的生长和除 P 效果的差异比较显著。各 C 源对菌株 GP44 的生长影响的顺序：乙酸钠 > 葡萄糖 > 蔗糖 > 麦芽糖 > 乙醇 > 可溶性淀粉 > 木糖，乙酸钠最有利于菌株 GP44 的生长，木糖最不利于菌株 GP44 的生长。从除 P 效果来看，以葡萄糖为 C 源时菌株 GP44 的除 P 效果较好，培养液 P 的去除率为 59.12%，各 C 源的除 P 效果次序是：葡萄糖 > 乙酸钠 > 乙醇 > 麦芽糖 > 蔗糖 > 乳糖 > 可溶性淀粉 > 木糖。乙酸钠作为唯一 C 源时除 P 效果差于葡萄糖，主要原因是乙酸钠中乙酸根作为 C 源被利用之后，溶液中 Na<sup>+</sup> 游离出来使得培养液中的 pH 值升高，影响了聚磷菌对 P 的吸收<sup>[16]</sup>。也有研究报道称，丙酸钠作为 C 源，



C 源

图 5 不同 C 源对菌株 GP44 的生长和除 P 的影响

Fig.5 Effects of different carbon sources on growth and P accumulation of strain GP44

### 2.5.6 不同金属离子对 GP44 的聚 P 效果的影响

金属离子对于微生物维持其生理功能是十分重要的。它不仅参与了细胞内许多分子结构的组成,还作为重要的生理调节物质对胞体渗透压的维持、pH 值的稳定、酶的激活等进行调节。但是一些金属离子与生物体内的一些大分子结合,会对生物体产生毒性,使生物体内大分子失活,进而影响生物体的新陈代谢。污水中存在大量的金属离子,这些金属离子对聚磷菌的除 P 效果有着不同程度的影响。

从图 6 可知,  $Mg^{2+}$ 、 $K^+$  能够明显促进菌株 GP44 的生长,  $Al^{3+}$ 、 $Na^+$  和  $Ca^{2+}$  对菌株 GP44 的生长有一定的抑制作用。而金属离子  $Co^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  和  $Pb^{2+}$  对菌株的生长有着明显的抑制作用。从除 P 的效果来看,  $Mg^{2+}$ 、 $K^+$  和  $Fe^{3+}$  促进菌株 GP44 超量吸 P,  $Al^{3+}$ 、 $Na^+$  和  $Ca^{2+}$  对菌株 GP44 的除 P 效果影响不大,  $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  对菌株 GP44 除 P 效果有着明显的抑制作用,其中  $Mn^{2+}$  对菌株抑制作用较大。关于金属离子对生物除 P 的研究报道较少,任世英等<sup>[18]</sup>的研究表明,磷酸铁能够促进聚磷菌超量吸 P。谢曙光<sup>[19]</sup>通过对重金属离子对生物除 P 影响的研究,发现  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  和  $Pb^{2+}$  在不同程度上对生物除 P 有一定的抑制作用。

## 3 结论

通过蓝白斑实验、菌体内聚物的染色检验及菌体含 P 量测定,从巢湖闸的污泥中分离筛选出一株具有高效聚 P 能力的菌株 GP44。经鉴定为土生克雷伯氏菌。

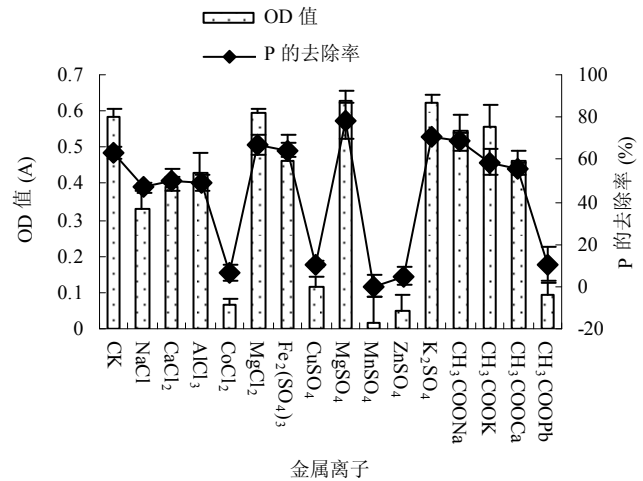


图 6 不同金属离子对菌株 GP44 的生长和除 P 的影响

Fig.6 Effects of different metal ions on growth and P accumulation of strain GP44

同时对菌株的最佳除 P 条件进行初步的研究,确定了最佳除 P 温度 30℃、最适 pH 为 7.5、最佳装液量为 120 ml、最适 C 源为葡萄糖,金属离子  $Mg^{2+}$ 、 $K^+$  对菌株 GP44 的除 P 有一定促进作用,而  $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  对菌株 GP44 的除 P 有一定抑制作用。

### 参考文献:

- [1] 王弘宇, 杨开, 贾文辉, 庄仲辉. 废水生物除磷技术及其研究进展. 环境技术, 2002(2): 38-42
- [2] 王平. 含磷废水处理技术的研究. 中国环境保护优秀论文集, 2005: 1092-1097
- [3] Muyima NYO, Momha MNB, Cloete TE. Biological methods for the treatment of wastewater // Cloete TE. Muyima NYO. Microbial Community Analysis: The Key to the Design of Biological Wastewater Treatment Systems. London: International Association on Water Quality, 1997
- [4] 刘亚男, 于水利, 薛罡, 赵方波, 郭思远. 聚磷菌 PAO1-1 的筛选及除磷特性. 中国给水排水, 2005, 21(10): 13-17
- [5] Fuhs GW, Chen M. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. Microb. Ecol., 1975, 2: 119-138
- [6] Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF. Culture medium for enterobacteria. J. Bacterial, 1974, 119: 736-74
- [7] Morohoshi T, Yamashita T, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kuroda A. A method for screening polyphosphate-accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater. Japan: Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Saitama, 2003, 95(6): 637-640
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001

- [9] Lindrea KC, Smdour EM, Seviour RJ, Blackll LL, Soddell JA. Practical methods for the exmrtination and characterization of activated sludge. Boston: Kluwer Academic Publishing, 1999, 257-293
- [10] 林启美, 赵海英, 赵小蓉. 4株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性. 微生物学通报. 2002, 29(6): 24-28
- [11] 国家环境保护总局编. 水和废水监测分析方法. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002, 243-247
- [12] R.E. 布坎南, N.E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册. 8版. 北京: 科学出版社. 1984
- [13] 田淑媛, 王景峰, 杨睿, 郎铁柱, 杨秀文. 厌氧下的 PHB 和聚磷酸盐及其生化机理研究. 中国给水排水, 2000, 16: 7-9
- [14] 汤桂兰, 花日茂, 孙振钧, 王建. 高效聚磷菌的诱变选育及特性研究. 激光生物学报, 2006, 15(4): 413-417
- [15] 郑弘, 陈银广, 杨殿海, 刘燕, 顾国维. 污水起始pH值对序批式反应器(SBR)中增强生物除磷过程的影响研究. 环境科学, 2007, 28(3): 512-516
- [16] 任源, 韦朝海. 不同碳源的生物除磷效率及合成PHAs结构分析. 中国给水排水, 2006, 22 (增刊): 326-332
- [17] Oehmen A, Saunders AM, Vives MT, Yuan Z, Keller J. Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon source. Journal of Biotechnology, 2006, 123 (1): 22-32
- [18] 任世英, 王子峰, 肖天. 一株海洋聚磷菌YSR-3的分离与鉴定. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 437-443
- [19] 谢曙光. 重金属对生物除磷影响的研究. 西安: 西安理工大学, 1999

## Screening and Identification of Phosphate Accumulating Bacterial Strain GP44 and Its Characterization

ZHAO Hai-quan, HU Zi-quan

(School of Life Sciences, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

**Abstract :** Eleven kinds of bacteria with high capability of accumulating poly-P were isolated and screened from the bottom muds of Chaohu Lake and South Feihe River by using the pure culture and blue and white colored screening methods. Their phosphate accumulating capacities were investigated aerobically in synthesized sewage medium. The results showed that the total phosphorus in the GP44 cells was 11.92%, indicating a higher level of phosphorus accumulation, and it was identified as *K.terrigena*. GP44 grew in synthesized sewage medium with the optimal phosphate accumulating temperature, initial pH value, aeration ration and carbon source was 30°C, 7.5, 120 ml/250 ml and glucose respectively, and  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  and  $Fe^{3+}$  could promote GP44 to accumulate phosphorus.

**Key words :** Phosphate accumulating bacterial, Screening, Identification, Accumulating phosphate characteristic