

一株好氧除磷菌 P10 的筛选及除磷条件的优化研究

仲小敏¹, 堵国成^{*2}, 陈 坚²

(1. 江南大学 环境与土木工程学院, 江苏无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 从性能稳定的实验室规模 A/O 反应器沉淀池剩余污泥中分离出一株除磷性能较强的菌株 P10, 该菌最适生长初始 pH 和除磷初始 pH 分别为 6.5 和 6.0; 最适培养温度和除磷温度均为 30 ℃; 铁离子、锰离子及铜离子对菌体生长起促进作用, 铁离子、锰离子对除磷也起促进作用, 其中铁离子作用最好, 可以提高菌浓 8.1%, 提高除磷量 46.0%; 菌体对磷酸氢二钾状态存在的磷去除效果最好, 为 11.23 mg/(g·h)。

关键词: 生物除磷; 除磷菌; 除磷量

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)07—0773—05

Screening of an Aerobic Phosphorus Removal Bacteria P10 and Condition Optimization of Phosphorus Removal

ZHONG Xiao-min¹, DU Guo-cheng^{*2}, CHEN Jian²

(1. School of Environmental Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A bacterial strain P10 with better phosphorus removal performance was isolated from the excess sludge in a sedimentation basin of a laboratory scale A/O reactor with stable performance. The optimum pH of growth and initial phosphorus removal for the bacterium are 6.5 and 6.0, respectively. The optimum temperature for cell growth and phosphorus removal are at 30 ℃. Ferrous, manganese and copper ions can stimulate bacterial growth. Moreover, ferrous and manganese ions also promote the phosphorus removal. The addition of ferrous ions could increase the cell concentration by 8.1% and the phosphorus removal amount by 46.0%. The highest removal rate could be reached (up to 11.23 mg/(g·h)) with the phosphorus in form of dipotassium hydrogen phosphate.

Keywords: biological phosphorus removal, phosphorus removal bacteria, phosphorus uptake

随着人口增长, 城市化高速发展, 人类活动产生的生活废水、工业废水及农业废水等加快了水体

中碳氮磷含量的增加^[1-2], 氮磷作为水体富营养化的重要因素之一^[3-4], 其控制及减排成为水污染防治工

收稿日期: 2012-10-19

通讯作者: 堵国成 (1965—), 男, 江苏常州人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程研究。E-mail: gdcu@jiangnan.edu.cn

作的重点。近年来污水生物除磷技术一直在不断更新^[5-7],国内外对除磷菌的筛选及性能研究也在不断取得进展。有部分研究者对假单胞菌和恶臭假单胞菌在好氧条件下吸磷和厌氧条件下释磷的除磷特性进行了初步研究^[8-11]。作者对筛选的好氧除磷菌 P10 进行研究,优化其生长及除磷条件,为除磷微生物制剂化的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种来源 从江南大学环境工程实验室性能稳定的实验室规模 A/O 反应器沉淀池中的剩余污泥在牛肉膏蛋白胨培养基上划线分离出的,经蓝白斑筛选法初筛并在好氧除磷能力检测实验中具有良好除磷能力的菌株 P10。

1.1.2 培养基

1)牛肉膏蛋白胨(每升)^[10]:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,KH₂PO₄ 0.02 g,水 1 000 mL,pH 7.2~7.4。

2) 葡萄糖-MOPS^[7]。

3) 扩培培养基(每升)^[9]:乙酸钠 5 g,NH₄Cl 2 g,KH₂PO₄ 0.25 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,CaCl₂ 0.2 g,pH 7.0~7.2。

4)模拟污水(每升)^[9]:乙酸钠 925 mg,蛋白胨 0.1 g,酵母膏 0.01 g,NaCl 0.05 g,KH₂PO₄ 65.5 mg,MgCl₂·7H₂O 153.7 mg,CaCl₂ 25 mg,pH 7.0~7.2。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株鉴定 菌株的 16S rRNA 部分列克隆及测序 将克隆序列送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,将 16S rRNA 的测序结果进行比对和同源性分析。

1.2.2 磷的测定 钼锑抗分光光度法(GB 11893-1989)。

1.2.3 扩大培养 200 μL 菌体接种于 50 mL 扩培培养基,在 30 ℃,200 r/min 条件下摇床培养 20 h 后接种于合成废水测定合成废水中培养前后磷含量。

1.2.4 除磷能力检测 将 6 mg 菌体接种于 100 mL 合成废水(接种量 5%),在 30 ℃,200 r/min 条件下摇床培养 8 h 后测定合成废水中培养前后磷含量。

2 结果与讨论

2.1 除磷菌的筛选与鉴定

经过 10 次富集、8 次分离纯化,蓝白斑固体培

养基初筛好氧除磷能力检测后,从污泥中筛选到一株除磷能力强的细菌,编号 P10。在牛肉膏蛋白胨固体培养基平板上培养 48 h,菌落为米白色、圆形、不透明、表面光滑,凸出。其电镜照片(扫描照片,放大 24 000 倍)见图 1。提取基因组序列因经 PCR 扩增后克隆测序,将得到的 16S rRNA 进行比对及同源性分析,经鉴定,为 *Pseudomonas putida*。

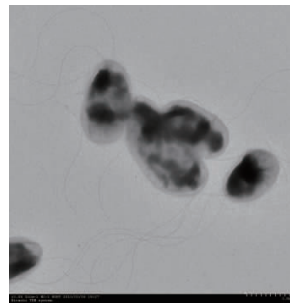


图 1 *Pseudomonas putida* P10 的电镜形态特征

Fig. 1 Transmission electronic micrograph of strain *Pseudomonas putida* P10

2.2 *Pseudomonas putida* P10 生长条件优化

2.2.1 不同碳源对 *Pseudomonas putida* P10 菌体生长和除磷能力的影响 选择柠檬酸钠、蔗糖、麦芽糖等 11 种常用碳源作为扩培培养基,将 *Pseudomonas putida* P10 接入扩培培养基中培养 20 h,测定其菌浓及 pH,并检测扩培后的菌体在合成废水中的除磷能力,见图 2。当作为唯一碳源时菌浓最高($A_{600\text{ nm}}$ 为 3.55),其余 10 种则生长浓度较低,甲酸钠作为唯一碳源时扩培效果最差。扩培结束时,生长较好的以柠檬酸钠碳源的发酵液呈碱性,pH 值为 9.31,在合成废水中磷含量下降 5.28 mg/L,平均除磷速率是 11 mg/(g·h),为最大值;其余发酵液 pH 值均低于 7,且接入合成废水后除磷能力较低。实验显示,柠檬酸钠有利于菌体的生长和后续的除磷,该实验结果与胡子全等人^[13]研究认为不同碳源对菌体的生长和除磷效果有明显影响的观点是一致的。

2.2.2 不同初始 pH 对 *Pseudomonas putida* P10 生长和除磷能力的影响 将扩培培养基调整为不同 pH 值,接入 *Pseudomonas putida* P10 培养 20 h,测定其菌浓及 pH,并检测扩培后的菌体在合成废水中的除磷能力。由图 3 可以看出初始 pH 值对扩培有较大影响,当初始 pH 值在 6-8 时,发酵液菌浓较高且相当,在此区间内初始 pH 值对扩培影响不大,初始

pH 为 6.5 时发酵液菌浓最高($A_{600\text{ nm}}$ 为 3.44);当初始 pH 值小于 6 或大于 8 时,扩培后发酵液菌浓较低。发酵液 pH 都有不同程度的上升。在合成废水中检测,当初始 pH 值在 6~8 时,磷去除量相当;初始 pH 为 6 时,在合成废水中磷含量下降到 5.34 mg/L(即平均除磷速率为 11.13 mg/(g·h));当初始 pH 值小于 6 或大于 8 时,除磷效果不佳。胡子全^[13]和吴丽红等人^[14]的研究亦认为适合的 pH 环境有利于菌体的生长和除磷。

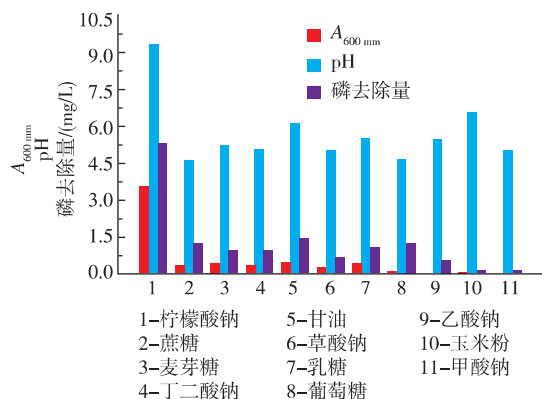


图 2 碳源对 *Pseudomonas putida* P10 生长和除磷能力的影响

Fig. 2 Effect of different carbon sources on cell growth and phosphate removal

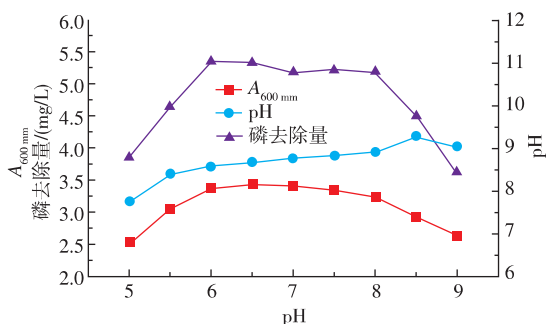


图 3 不同初始 pH 对 *Pseudomonas putida* P10 生长和除磷能力的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on cell growth of *Pseudomonas putida* P10 and phosphate removal

2.2.3 不同培养温度对 *Pseudomonas putida* P10 生长和除磷能力的影响 将菌体接入扩培培养基,在不同温度下培养 20 h,测定其菌浓及 pH,并检测扩培后的菌体在合成废水中的除磷能力,结果见图 4。温度在 30 ℃左右扩培效果较好,温度在 31 ℃时,菌浓最高($A_{600\text{ nm}}$ 为 3.55);这一实验结果与李博等人^[10]研究的结果一致。温度低于 25 ℃时对菌体生长不

利,发酵液菌浓较低。温度对发酵液最终 pH 值影响不明显,均在 8.09 左右。在合成废水中检测菌体细胞的除磷能力,除磷量均在 5.19~5.28 mg/L 之间,最高值是扩培温度 31 ℃时 5.28 mg/L(即平均除磷速率为 11 mg/(g·h))。

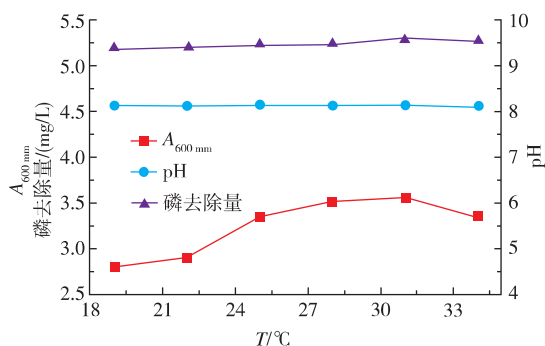


图 4 不同培养温度对 *Pseudomonas putida* P10 生长和除磷能力的影响

Fig. 4 Effect of different temperatures on cell growth of *Pseudomonas putida* P10 and phosphate removal

2.2.4 不同金属离子对 *Pseudomonas putida* P10 生长和除磷能力的影响 将菌体接入添加有不同金属离子的扩培培养基,培养 20 h 后测定其菌浓及 pH,并检测扩培后的菌体在合成废水中的除磷能力。由图 5 可以看出铁离子、锰离子及铜离子对菌体生长有促进作用,其中铁离子效果最为明显,菌浓提高 8.1%(对照 $A_{600\text{ nm}}$ 为 3.54)。其余金属离子的单独添加对菌体生长未起到明显的促进作用,有的甚至抑制菌体生长。当加入全部微量金属离子后,发酵液菌浓较 CK 提高了 11.2%。培养结束后发酵液 pH 值无明显差别,均在 8.05~8.20 之间。在合成废水中检测菌体细胞的除磷能力,含铁离子培养基培养的菌体细胞和添加全部金属离子培养的菌体细胞对除磷能力的影响均不明显。此结果与李博等人^[10]研究结果一致。

2.3 *Pseudomonas putida* P10 除磷条件优化

2.3.1 不同初始 pH 对除磷效率的影响 将 *Pseudomonas putida* P10 接入不同 pH 值合成废水中,检测其除磷效率。由图 6 可以看出当初始 pH 值小于 6 或大于 8 时,除磷效果明显低于初始 pH 值在 6~8;初始 pH 为 6 时,在合成废水中磷含量下降到 5.51 mg/L(即平均除磷速率为 11.48 mg/(g·h)),除磷效果最佳;pH 值在 6.5~8.0 时除磷效果相近。较适合除磷的 pH 值范围与先进行扩培后再在合成

废水中进行除磷的条件相似(图3)。培养后 pH 和菌浓(OD_{600})变化趋势相似,初始 pH 小于 6 时,培养后 pH 和菌浓均低于平均水平;初始 pH 大于等于 6,培养后的 pH 及菌浓没有明显差别,均在 8.1 和 0.6 左右。

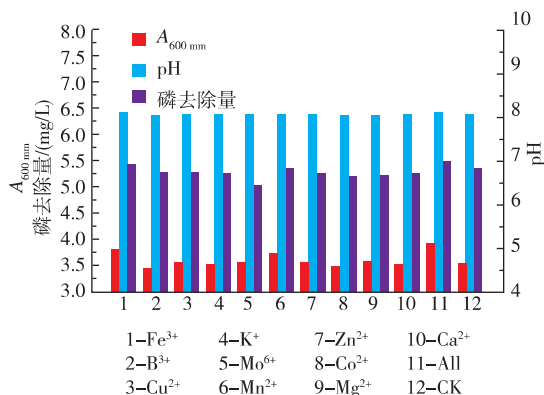


图 5 不同金属离子对 *Pseudomonas putida* P10 生长和除磷能力的影响

Fig. 5 Effect of different metal ions on cell growth of *Pseudomonas putida* P10 and phosphate removal

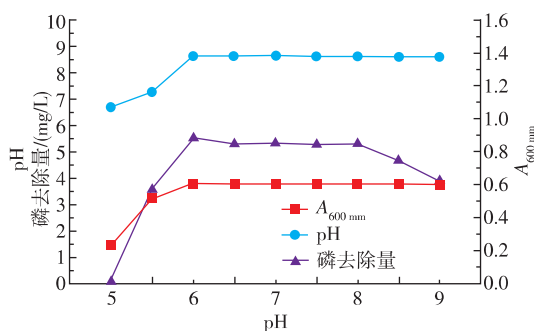


图 6 不同初始 pH 对除磷的影响

Fig. 6 Effect of pH on the efficiency of phosphorus removal by *Pseudomonas putida* P10

2.3.2 不同温度对除磷效率的影响 将菌体接入合成废水,在不同温度下培养 20 h,测定其菌浓、pH 及含磷量,由图 7 可以看出,在温度 31 °C 培养,除磷量最大,为 5.14 mg/L (即平均除磷速率为 10.07 mg/(g·h)),在温度 28 °C 培养,除磷量为 5.07 mg/L (即平均除磷速率为 10.56 mg/(g·h)),可见除磷的最适温度在 30 °C 左右,温度过高和过低均不利于磷的去除。随着温度的升高,合成废水中菌浓和 pH 值也随之略有升高。菌体生长和除磷状况随温度变化趋势较一致。

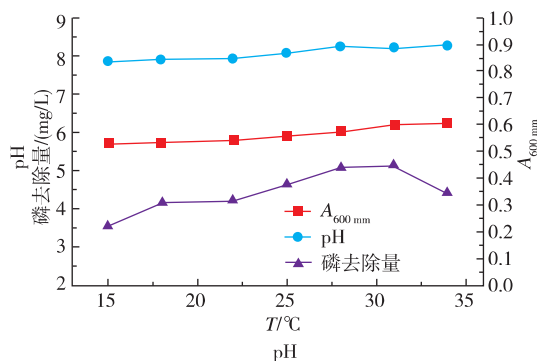


图 7 不同温度对除磷的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the efficiency of phosphorus removal by *Pseudomonas putida* P10

2.3.3 金属离子对除磷效率的影响 将菌体接入添加有不同金属离子的合成废水中,培养 8 h 后测定其菌浓、pH 及含磷量。由图 8 可以看出部分铁离子和锰离子对除磷有促进作用,其中铁离子效果最优,除磷量增加 46.0% (CK 对照组的除磷量 3.63 mg/L,即平均除磷速率为 7.56 mg/(g·h));添加锰离子除磷量增加 11.1%。其余金属离子单独对菌体除磷未起到促进作用,甚至起抑制作用。当加入全部微量金属离子后,除磷量增加 68.9%。培养结束合成废水 pH 值无明显差别,均在 8.07~8.23 之间。在合成废水中菌浓差别不大, $A_{600\text{nm}}$ 在 0.47~0.56 之间。

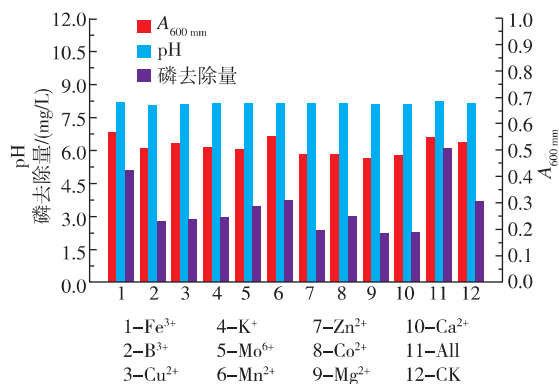


图 8 金属离子对除磷的影响

Fig. 8 Effect of metal ion on the efficiency of phosphorus removal by *Pseudomonas putida* P10

2.3.4 菌体对不同磷源的去除效率 合成废水中加入不同种类的磷源以检测菌对磷的去除效果。图 9 显示,菌对钾盐的去除效果比钠盐好,且对磷酸氢二钾中磷的去除效果最好(除磷量 5.39 mg/L,即平均除磷速率为 11.23 mg/(g·h))。

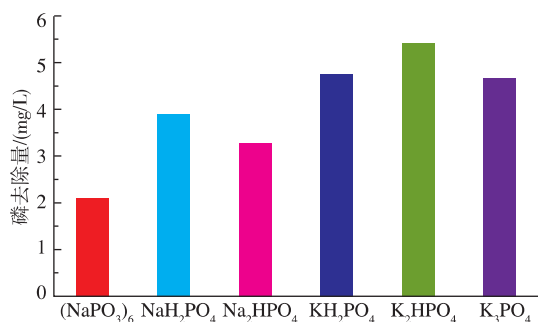


图9 菌体对不同磷源的去除效果

Fig. 9 Effect of different phosphorus on the efficiency of phosphorus removal by *Pseudomonas putida* P10

3 结 语

1) 从江南大学环境工程实验室性能稳定的实

验室规模 A/O 反应器沉淀池中的剩余污泥中分离出一株除磷性能较强的菌株 *Pseudomonas putida* P10。

2) *Pseudomonas putida* P10 的最适生长 pH 和除磷初始 pH 分别为 6.5 和 6.0; 最适温度培养温度和除磷温度为 30 ℃; 铁离子、锰离子及铜离子对菌体生长起促进作用, 铁离子、锰离子对除磷也起促进作用, 其中铁离子作用最明显, 可以提高菌浓 8.1%, 提高除磷量 46.0%;

3) *Pseudomonas putida* P10 对不同的磷源去除效果相差较大, 菌体对以磷酸氢二钾状态存在的磷去除效果最好, 平均除磷速率达到为 11.23 mg/(g·h)。

参考文献:

- [1] Levine S N, Lini A, Ostrofsky M L, et al. The eutrophication of Lake Champlain's northeastern arm: Insights from paleolimnological analyses[J]. *Journal of Great Lakes Research*, 2012, 38(1): 35-48.
- [2] Pauer J J, Anstead A M, Melendez W, et al. Revisiting the great lakes water quality agreement phosphorus targets and predicting the trophic status of lake michigan[J]. *Journal of Great Lakes Research*, 2011, 1(37): 26-32.
- [3] WANG Hai-jun, WANG Hong-zhu. Mitigation of lake eutrophication: Loosen nitrogen control and focus on phosphorus abatement [J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 10(19): 1445-1451.
- [4] Otu K M, Ramlal P, Wilkinson P, et al. Paleolimnological evidence of the effects of recent cultural eutrophication during the last 200 years in lake malawi[J]. *East Africa Journal of Great Lakes Research*, 2011, 1(37): 61-74.
- [5] 王荣斌, 李军, 张宁, 等. 污水除磷技术研究进展[J]. 环境工程, 2007, 25(1): 84-88.
WANG Rong-bin, LI Jun, ZHANG Nin, et al. Wastewater biological dephosphorization technology research progress [J]. *Environmental Engineering*, 2007, 25(1): 84-88. (in Chinese)
- [6] 刘燕, 陈银广, 周琪, 等. 强化生物除磷系统中生化机理研究进展[J]. 水处理技术, 2006, 32(5): 1-4.
LIU Yan, CHEN Yin-guan, ZHOU Qi, et al. Progress in researches on biochemical mechanism of the enhanced biological phosphate removal process[J]. *Technology of Water Treatment*, 2006, 32(5): 1-4. (in Chinese)
- [7] 邹华, 阮文权, 陈坚. 反硝化除磷工艺研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2): 71-75.
ZOU Hua, RUAN Wen-quan, CHEN Jian. Study of denitrifying dephosphatation process [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(2): 71-75. (in Chinese)
- [8] Morohoshi T, Yamashita T, Kato J, et al. A method for screening remove polyphosphate-accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(6): 637-640.
- [9] 李博, 赵敏, 李宝赫. 高效聚磷菌的筛选及除磷特性分析[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(10): 85-87.
LI Bo, ZHAO Min, LI Bao-he, et al. Screening of strain LB4 with high capability of accumulating polyphosphate and its characteristics[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2009, 37(10): 85-87. (in Chinese)
- [10] 蔡天明, 管莉莎, 崔中利, 等. 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) GM6 的聚磷特性研究[J]. 土壤学报, 2006, 43(1): 117-123.
CAI Tian-ming, GUAN Li-bo, CUI Zhong-li, et al. Characterization of *Pseudomonas putida* GM6 with high capability of accumulating poly-P[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(1): 117-123. (in Chinese)
- [11] 汤桂兰, 花日茂, 孙振均, 等. 生物除磷的研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(z1): 163-167.
TANG Gui-lan, HUA Ri-mao, SUN Zhen-jun. Biological removal of phosphorus in sediments[J]. *Journal of Agro-environment Science*, 2006, 25(z1): 163-167. (in Chinese)