恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) GM6 的聚磷特性研究 *

蔡天明　管莉菠　崔中利　李顺鹏†
(南京农业大学生命科学学院微生物系 ,南京农业大学农业部环境微生物重点开放实验室 ,南京　210095)

摘　要　从城市污水处理厂好氧池活性污泥中分离获得一株高效聚磷菌株 GM6 ,经生理生化和 16 S rDNA初步鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) 。GM6 生长 pH 在 5. 5 至 8. 5 之间 ,最适生长 pH 为 6. 5 ;当 pH 值为 7. 0 时 ,聚磷能力最强 ,pH 值小于 5. 5 或大于 7. 5 时 ,除磷能力明显下降。通气量试验表明 ,装液量对 GM6 的生长影响较小 ;装液量为 100 ml 时 ,磷的去除效果最好 ,当装液量大于 150 ml 时磷的去除效果变差。GM6 的最适生长温度为 27 ℃,当温度小于 5 ℃或大于 37 ℃时生长较慢 ;当温度为 20 ℃其除磷效果最好 ,温度大于 33 ℃或小于 5 ℃时 ,除磷效果明显变差。好氧条件下 GM6 在合成废水、MOPS 培养基、LB 及 YG 培养基中培养时磷的绝对去除量分别为 9. 87、12. 1、87. 3 和 67. 1 mg L^{-1} ,磷的去除率分别为 96. 6 %、85 %、71. 6 % 和 63 % ,磷的绝对去除量和去除率远高于 *E. coli* 。好氧培养时菌体吸磷能力测定结果表明 , GM6 在合成废水、MOPS、LB 及 YG 培养基中培养 24 h 的菌体干重含磷量在 6. 80 %～9. 32 %之间 ,而对照菌体含磷量在 0. 98 %～2. 31 %之间 ,聚磷菌的聚磷效果远高于对照菌。用序批式反应器对 GM6 进行厌氧好氧纯培养时 ,厌氧末的上清液磷浓度为 16. 8 mg L^{-1} ,COD_{Cr}为 230 mg L^{-1} ,放磷速率为 4. 5 mg L^{-1} h^{-1} ;好氧末的上清液磷浓度为 2. 56 mg L^{-1} ,COD_{Cr}为 40 mg L^{-1} ,好氧吸磷速率为 2. 73 mg L^{-1} h^{-1} ,菌株 GM6 表现出了明显的好氧吸磷、厌氧放磷现象 ,具有聚磷菌的典型特征。

关键词　聚磷菌 ;合成废水 ;鉴定 ;SBR ;厌氧放磷 ;好氧吸磷
中图分类号　S154. 39　　**文献标识码**　A

水体富营养化是全球十大环境问题之一。氮磷尤其是磷的输入是引起水体富营养化的关键因素[1,2]。为解决磷污染所带来的危害 ,在污水进入水体前进行有效处理 ,降低排放污水的磷浓度十分必要。目前大规模污水处理厂常用的废水除磷方法主要是生化除磷法 ,其中生物强化除磷法(Enhanced Biological Phosphorus Removal , EBPR) 因具有污泥产生量少、不使用化学物质和运行经济等特征为世界各国所广泛应用[2]。EBPR 的机理是通过厌氧和好氧交替运行使得聚磷菌在厌氧条件下分解 poly-P(多聚磷酸盐) 同时聚集 PHB (聚-β-羟基丁酸) ,在好氧条件下分解 PHB 聚集 poly-P ,从而使菌体内含有超量的磷 ,随污泥排放而达到除磷的目的[3]。

在 EBPR 系统中聚磷菌(Polyphosphate Accumulating Organisms , PAOs) 在磷的去除中起着重要的作用。最早从 EBPR 系统中分离出 PAOs 的是不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)[1]。迄今为止 ,人们仅分离到 *Microlunatus phosphovorus*、*Lampropedia* spp. 和假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.) 等为数不多的聚磷菌[1] ,它们在纯培养时也很少能表现出厌氧释磷聚 PHB、好氧分解 PHB 聚 poly-P 的典型聚磷菌的特征 ,而利用不依赖培养的分子生物学方法已经了解有多种微生物在 EBPR 中起作用 ,其种群结构的变化与 EBPR 的稳定除磷关系密切[4]。为此 ,加大聚磷菌株的筛选力度 ,对聚磷菌的聚磷特性进行研究 ,可以为大规模的 EBPR 系统的高效稳定除磷研究奠定基础。本研究以本实验室从 EBPR 好氧池活性污泥中分离获得的一株高效聚磷菌株为对象 ,在对其进行生理生化和 16 S rDNA 鉴定的基础上 ,对其生物学特性尤其是聚磷特性进行了深入研究 ,旨在为在大规模污水处理厂的工程化应用打下良好的基础。

* 江苏省社会发展项目(BS2003028) 、江苏省环境保护厅项目(2004007) 资助
† 通讯作者 , E-mail : lsp @njau. edu. cn
作者简介 :蔡天明(1965～) ,男 ,高级工程师 ,在职博士生 ,发表论文 20 多篇 ,现主要从事生物除磷及与聚磷相关的基因的研究。E-mail : ctm @njau. edu. cn
收稿日期 :2005 - 06 - 20 ;收到修改稿日期 :2005 - 09 - 28

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基 (1) LB 培养基[4]。(2) MOPS 培养基。(3) YG 培养基[5]。(4) 合成废水配方:葡萄糖 0.3 g、蛋白胨 0.1 g、酵母粉 0.01 g、CH_3COONa 0.15 g、NaCl 0.05 g、K_2HPO_4 0.05 g、$MgSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.15 g、NH_4Cl 0.18 g、H_2O 1 000 ml[5]。

1.1.2 菌株 GM6 系从城市生活污水处理厂好氧池活性污泥中分离,并经蓝白斑筛选和好氧试验证实具有高效聚磷能力[5]。

1.1.3 SBR 装置 反应器材质为有机玻璃,有效容积为 2 L,好氧采用自动曝气装置曝气(流量为 4 L min^{-1}),厌氧持续通氮气(2～3 L min^{-1})维持装置中的氧化还原电位在 - 100 mV 左右。

1.2 方法

1.2.1 菌株的鉴定 (1) 菌株的生理生化鉴定:根据《常见细菌系统鉴定手册》和《一般细菌常用鉴定方法》进行鉴定[6,7]。(2) 菌株的 16 S rDNA 全序列克隆和序列测定与比较:按《分子克隆实验指南(第三版)》[8]进行。阳性克隆送上海博亚生物公司测序,对 16 S rDNA 的测序结果进行比对和同源性分析[8,9]。

1.2.2 菌体 poly-P 和 PHB 染色 (1) poly-P 染色[10]:Albert 染色法,异染粒呈黑色,菌体其他部分呈绿色。(2) PHB 染色[10]:苏丹黑染色法,类脂粒呈蓝黑色,菌体呈红色。

1.2.3 上清液磷浓度测定及菌体磷含量[12]

1.2.4 总磷的测定 按文献[12]进行。

1.2.5 培养基初始 pH 值与 GM6 的生长及上清液磷去除率的关系[12] 培养基为合成废水,在无菌操作条件下用 NaOH 或 HCl 溶液来调节 pH 值,GM6 的接种量为 1 %,于 28 ℃的摇床中培养,10 h 时测定 OD 值,同时测定上清液磷浓度[13]。

1.2.6 厌氧好氧连续培养时的除磷效果 利用实验室 SBR(Sequencing Batch Reactor)装置做好氧和厌氧培养试验,验证 GM6 在合成废水中厌氧培养 2 h 再好氧培养 4 h 后磷和 COD_{Cr} 的浓度变化情况。菌体制备:将 GM6 菌体接至 8 支 LB 培养基的试管中(3 ml 培养液),分别转接于 200 ml 的 LB 培养基中,在 30 ℃的摇床中培养 8 h,离心收集菌体,转接至含有 2 L 合成废水的 SBR 装置中。厌氧培养 2 h(通 N_2,流量为 3 L min^{-1})并采用磁力搅拌器搅拌,好氧培养(自动曝气装置)4 h。分别在不同时间采泥样进行 poly-P 和 PHB 染色,并采集上清液和菌悬液分析不同时间的上清液磷浓度、菌体磷含量,同时测定 PHB 和上清液 COD_{Cr}[14,15]。

2 结果与分析

2.1 GM6 的生理生化特性及 16 S rDNA 鉴定

该菌株在 LB 培养基上生长时,菌落呈半固体状,圆形,表面光滑,边缘平整,半透明;电镜下,菌体形态为长杆状,有数根极毛,菌体照片见图 1。生理生化鉴定为革兰氏阴性菌,能运动,对苯丙氨酸脱氨酶反应、H_2S 试验、柠檬酸盐试验、V-P 试验、甲基红试验呈阴性,对吲哚试验、精氨酸脱羧酶反应、氧化酶反应以及硝酸盐还原反应呈阳性[5]。

以 GM6 总 DNA 为模板,利用细菌 16 S rDNA 特异的引物进行 PCR 扩增,得到长约 1.5 kb 的 PCR 扩增产物,将该产物直接进行序列测定,基因登录号为 DQ133506。用 BLAST 程序对 GM6 的 16 S rDNA 序列和 GenBank 中已登陆的 16 S rDNA 序列进行核苷酸同源性比较,结果发现与已报导的恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)16 S rDNA 序列(登录号 AY391278.1)的同源性达到 99 %,结合生理生化和 API 系统的鉴定结果,将菌株 GM6 初步鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。

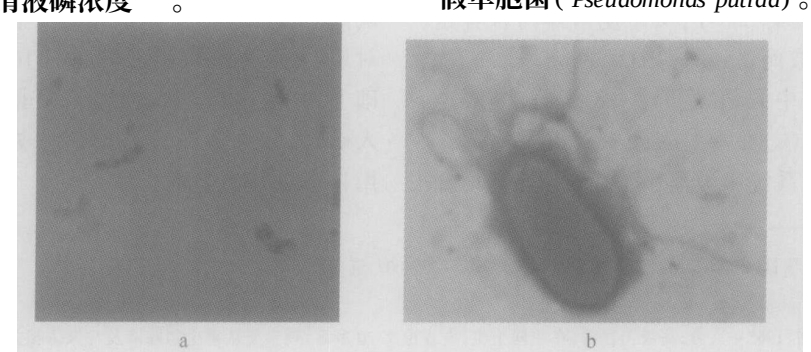

图 1 菌体生长照片(a)(×1 000)和电镜照片(b)(29 ×1 000)

Fig. 1 Electronic graph of strain GM6

2.2　培养基初始 pH 对 GM6 除磷能力的影响

由图 2 可知,GM6 在合成废水中 28 ℃下生长时,培养基初始 pH 值在 6.0～8.0 之间均长正常,最适生长 pH 为 6.5。当初始 pH 值大于 8.0 或小于 5.0 时,菌体生长较慢,生长量明显减小。当培养基的起始 pH 值为 7.0,GM6 聚磷能力最强,此时上清液磷浓度由 10.5 mg L^{-1}降为 2.3 mg L^{-1},去除率较高。当初始 pH 值小于 5.5 或大于 7.5 时,除磷能力下降。

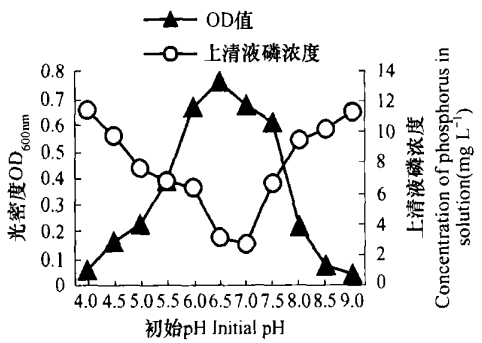

图 2　初始 pH 对 GM6 除磷能力的影响

Fig. 2　Effect of initial pH on P removing capability of strain GM6

2.3　装液量对 GM6 除磷能力的影响

将 GM6 接种于装有不同体积合成废水的三角瓶中,培养 10 h,测定其生长量和上清磷浓度。由图 3 可知,当装液量为 80 ml 时,生长最好;当装液量为 200 ml 时,生长较慢;总的说来,装液量对 GM6 的生长影响较小。从除磷效果看,装液量为 100 ml 时,磷的去除效果最好,当装液量大于 150 ml 时磷的去除效变差。

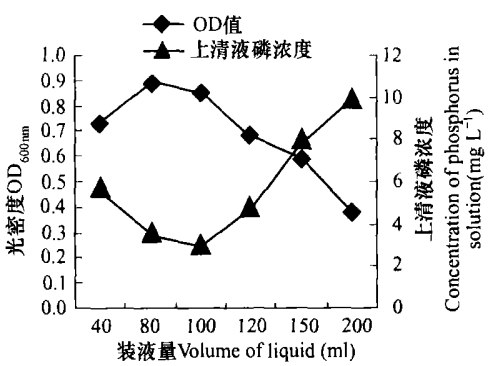

图 3　通气量对 GM6 除磷能力的影响

Fig. 3　Effect of aeration on P removing capability of strain GM6

2.4　温度对 GM6 除磷能力的影响

将 GM6 接种于装有 100 ml 合成废水的三角瓶中,于不同的温度下培养 10 h,测定其生长量及上清磷浓度。图 4 表明,GM6 的最适生长温度为 27 ℃,当温度小于 5 ℃或大于 37 ℃时生长较慢。其除磷最适温度为 20 ℃,当温度大于 33 ℃或小于 5 ℃时,除磷效果明显变差。

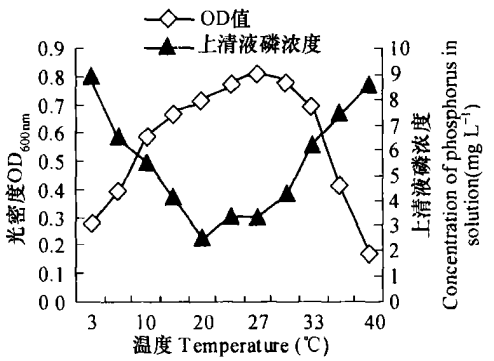

图 4　温度对 GM6 除磷能力的影响

Fig. 4　Effect of temperature on GM6 P removing capability

2.5　GM6 在不同培养基中生长时好氧吸磷情况

GM6 在合成废水、MOPS 培养基、LB 培养基及 YG 培养基中生长时不同培养时间上清液磷浓度变化如图 5a 至图 5d 所示。

对照菌 *E. coli* 在合成废水、MOPS 培养基、LB 培养基及 YG 培养基中好氧培养时磷的绝对去除量分别为 3.15、1.9、24.5、19.9 mg L^{-1},去除率分别为 30.8 %、13.6 %、20 %、18.6 %。而菌体 GM6 在合成废水、MOPS 培养基、LB 培养基及 YG 培养基中好氧培养时磷的绝对去除量分别为 9.87、12.1、87.3 和 67.1 mg L^{-1};在合成废水和 MOPS 培养基中磷的去除率较高分别为 96.6 %和 85 %,在高磷培养基 LB 培养基及 YG 培养基中生长时磷的去除率分别为 71.6 %和 63 %,磷的绝对去除量和去除率均远高于对照菌。

另外,对菌株 GM6 和 *E. coli* 在四种培养基中好氧培养 24 h 的菌体含磷量的测定结果如表 1。表 1 表明,对照菌 *E. coli* 的菌体含磷量在四种培养基中的测定结果在 0.98 %～2.31 %之间,而菌株 GM6 在合成废水、MOPS 培养基、LB 培养基及 YG 培养基中培养 24 h 后的菌体干重含磷量分别达 6.80 %、7.89 %、8.43 %和 9.32 %,聚磷菌的聚磷效果远高于对照菌,聚磷能力远高于文献[5]野生菌株 MY 11 和 K3 的菌体含磷量,接近文献[5]突变菌株 K3-6 的聚磷能力[5]。

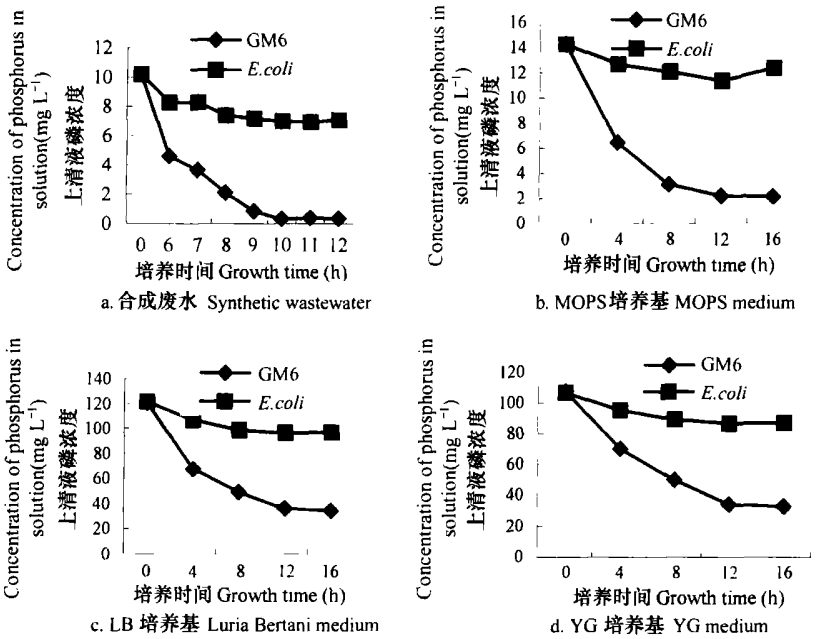

图 5 GM6 在不同培养基中生长时上清液磷浓度变化

Fig. 5 Phosporus concentration of different media at different incubation times

表 1 菌株 GM6 好氧培养 24 h 后的菌体含磷量[1)]

Table 1 Phosphorus content of strain GM6 after 24-hour aerobic incubation

菌株 Strain	培养基 Medium			
	合成废水 Synthetic wastewater	MOPS 培养基 MOPS medium	LB 培养基 Luria Bertani medium	YG 培养基 YG medium
GM6	6.80	7.89	8.43	9.32
E. coli	0.98	1.06	1.76	2.31

1) 菌体含磷量为菌体干重含磷百分数 Phosphorus content: phosphorus vs bacteria on a dry weight basis in percentage

2.6 SBR 装置中 GM6 厌氧好氧连续培养时磷和有机物的变化

2.6.1 poly-P 和 PHB 的变化 GM6 在用实验室 SBR 装置培养时(培养基为合成废水),在厌氧末和好氧末分别采集菌体进行 poly-P 和 PHB 染色,显微镜下观察 poly-P 和 PHB 颗粒的变化情况,见图 6 和图 7。由图可以看出,厌氧培养 2 h,菌体中 poly-P 颗粒较好氧培养 4 h 少,菌体中 PHB 颗粒较好氧培养 4h 多,表现出了典型的 PAOs的特征。

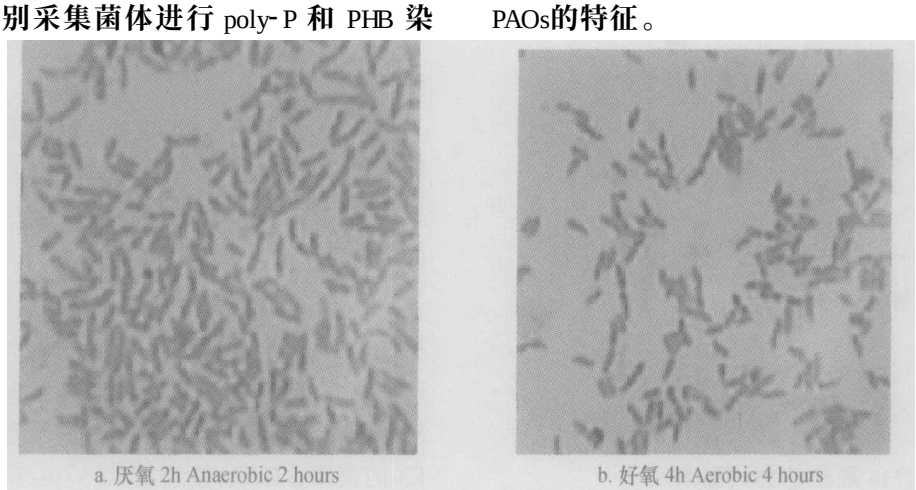

图 6 SBR 装置中菌体 poly-P 的变化(×1 000)

Fig. 6 Polyphosphate granules in a seqencing batch reactor under anaerobic conditions (a) and under aerobic conditions (b) (×1 000)

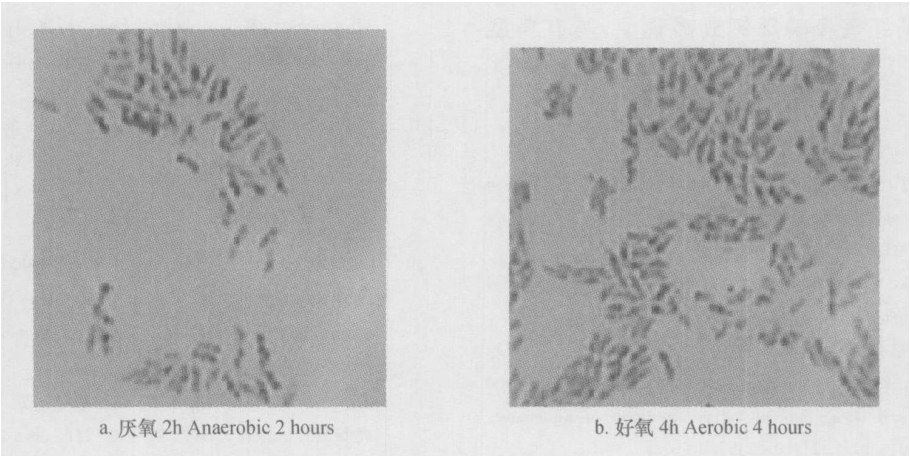

图 7　SBR 装置中菌体厌氧和好氧培养时 PHB 的变化(×1 000)

Fig. 7　Poly 3-hydoxy alkanoic acids granules in a seqencing batch reactor under anaerobic conditions (a) and under aerobic conditions (b) (×1 000)

2.6.2　上清液磷和 COD_{Cr} 的变化　在对 SBR 装置中菌体 poly-P 和 PHB 变化进行观察的同时,为了解 GM6 是否具有聚磷菌好氧吸磷、厌氧放磷的特性及对有机物的去除情况,对菌体在好氧厌氧连续培养 4 h 过程中的上清液磷浓度和 COD_{Cr} 的变化进行了分析(图 8)。结果表明,厌氧放磷达 9 mg L^{-1},好氧吸磷为 14.24 mg L^{-1};厌氧末 COD_{Cr} 降低了 230 mg L^{-1},至好氧结束时,COD_{Cr} 降至 40 mg L^{-1},磷和有机物去除效果明显。好氧 4 h 上清液磷浓度为 2.56 mg L^{-1},原因是装置仅运行了一个循环。根据大量文献报道,欲形成一个稳定而强化的生物质除磷系统需好氧厌氧连续交替运行。本实验主要是想验证菌体好氧和厌氧的聚磷特性,从厌氧和好氧 6 h 的运行情况看,磷的去除效率较高[1,2]。

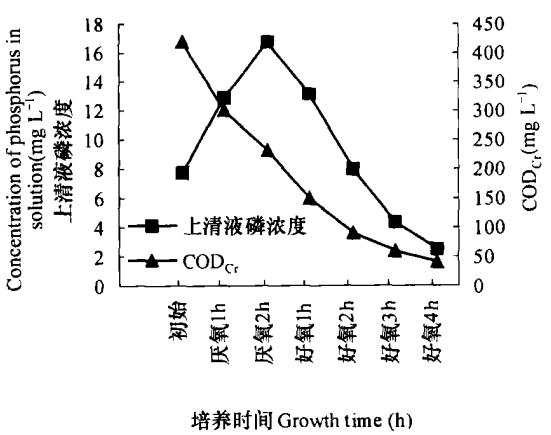

图 8　GM6 在厌氧和好氧培养时磷和有机物的变化

Fig. 8　Variation of phosphate and COD with GM6 incubated under anaerobic conditions and under aerobic conditions

3　结　论

1) GM6 初步鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。其最适生长 pH 为 6.5;当 pH 值为 7.0 时,聚磷能力最强,pH 值小于 5.5 或大于 7.5 时,除磷能力明显下降。通气量试验表明,装液量对 GM6 的生长影响较小;装液量为 100 ml 时,GM6 聚磷能力最强,当装液量大于 150 ml 时其聚磷能力变差。GM6 最适生长温度为 27 ℃,温度小于 5 ℃或大于 37 ℃时其生长较慢;当温度为 20 ℃其聚磷能力最强,温度大于 33 ℃或小于 5 ℃时,其聚磷能力明显变差。

2) GM6 在合成废水、MOPS 培养基、YG 培养基及 LB 培养基中好氧培养时具有很强的除磷能力,上清液磷去除率达 63 %～96 %,其对合成废水磷的去除率达 96 %,这对 GM6 的工程化应用十分有益。

3) 在合成废水、MOPS 培养基、LB 培养基及 YG 培养基中培养 24 h 后对照 *E. coli* 的菌体干重含磷量在 0.98 %至 2.31 %之间;而菌体 GM6 的菌体干重含磷量分别为 6.80 %、7.89 %、8.43 %和 9.32 %,聚磷菌 GM6 的聚磷效果远高于对照菌,好氧聚磷能力较强。

4) 用 SBR 装置对 GM6 进行厌氧好氧连续纯培养时,厌氧末的上清液磷浓度为 16.8 mg L^{-1},COD_{Cr} 为 230 mg L^{-1},厌氧放磷速率为 9.0 mg L^{-1} h^{-1};好氧末的上清液磷浓度为 2.56 mg L^{-1},COD 为 40 mg L^{-1},好氧吸磷速率为 14.24 mg L^{-1} h^{-1}。菌株

GM6 表现出了好氧吸磷厌氧放磷现象,具有典型 PAO 的特征。

参 考 文 献

[1] Seviour R J, Mino T, Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal inactivated sludge systems. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27:99～127

[2] Toerien D F, Gerber A, Lotter L H, *et al*. Enhanced biological phosphorus removal in activated sludge. Adv. Microb. Ecol., 1990, 11:173～230

[3] Fuhs G W, Chen M. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. Microb. Ecol., 1975, 2:119～138

[4] Neidhardt F C, Bloch P L, Smith D F. Culture medium for enterobacteria. J. Bacterial., 1974, 119:736～747

[5] Tomohiro M, Tomohiro Y, Junichi K, *et al*. A method for screening polyphosphate accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater. J. Bioscience and Bioengineering, 2003, 95:637～640

[6] 东秀珠, 蔡妙英, 等编著. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. Dong X Z, Cai M Y, *et al*. eds. Manual for System Identification of Common Bacteria (In Chinese). Beijing: Science Press, 2001

[7] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 114～115, 125～127. The Group of Bacteria Classification of the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Common Methods of Determinative Bacteriology (In Chinese). Beijing: Science Press, 1978. 114～115, 125～127

[8] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Mannual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

[9] 刘智, 李顺鹏. 甲基对硫磷降解菌 DLL-1 的诱变育种. 土壤学报, 2003, 40(2):293～300. Liu Z, Li S P. Mutation breeding of methyl parathion degrading strain DLL-1 (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(2):293～300

[10] Lui'sa S, Serafim A, Caterina L, *et al*. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. Journal of Microbiological Methods, 2002, 51:1

[11] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物学实验(第三版). 北京: 高等教育出版社, 1999. 97～99, 221. Shen P, Fan X R, Li G W, *et al*. Experiment of Microbiology (In Chinese). 3rd Ed. Beijing: High Education Press, 1999. 97～99, 221

[12] 中华人民共和国国家标准. 水质总磷的测定. 钼酸铵分光光度法. GB/T 11893-1989. National Standards of P. R. China. Water Quality-Determination of Total Phosphorus-Amomnium Molybdate Spectrophotometric Method (In Chinese). GB/T 11893-1989

[13] 李季伦, 张伟心, 杨启瑞, 等. 微生物生理学. 北京: 北京农业大学出版社, 1988. 3. Li J L, Zhang W X, Yang Q R, *et al*. Microbial Physiology (In Chinese). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1988. 3

[14] Zhang N M, Yu Y, Hong B, *et al*. Factors influencing runoff P losses from farmlands of the Dianchi Lake Watershed in Yunnan, China. Pedosphere, 2004, 14(2):259～262

CHARACTERIZATION OF PSEUDOMONAS PUTIDA GM6 WITH HIGH CAPABILITY OF ACCUMULATING POLY-P

Cai Tianming　Guan Libo　Cui Zhongli　Li Shunpeng†

(Department of Microbiology , College of Life Sciences , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment , Ministry of Agriculture , Nanjing 210095 , China)

Abstract A bacterial strain GM6 with high capability of accumulating poly-P was isolated from aerobic activated sludge in a municipal sewage treatment plant and identified as *Pseudomonas putida*. This strain could grow in conditions with pH ranging from 5.5 to 8.5 and the most favorably in solution being 6.5 in pH. But its capability of accumulating poly-P peaked when pH was at 7.0. When pH was either below 5.5 or above 7.5 , this capability descended distinctly. Aeration tests showed that volume of liquid did not influence much growth of GM6. But when the volume was 100 million , its P removing effect was the best and while the volume is over 150 ml , the effect became less. The optimal temperature for its growth was 27 ℃. When the temperature was either lower than 5 ℃or higher than 37 ℃, it grew slowly and its P removing effect was poor. The optimal temperature for its phosphorus removal was 20 ℃. After GM6 incubation in synthesized sewage , LB , YG and MOPS medium for 24 hours , phosphate concentration in the liquid media declined sharply , showing a phosphate removal rate ranging from 63 % to 96.6 % , which were significantly higher than that of *E. coli*. Its phosphate accumulating capacity was also investigated aerobically in media LB , YG , MOPS and synthetic wastewater. The results show that the total phosphorus in the GM6 cells harvested from four media was in the range of 6.80 %～9.32 % while that in the *E. coli* cells was in the range of 0.98 %～2.31 % , indicating the former had a higher level of phosphorus accumulation. Strain DM6 showed the characteristics of a typical phosphate accumulating organism as it displayed apparent phosphorus accumulation and release in a SBR process. Its phosphate release and accumulation rate was 4.5 mg L^{-1} h^{-1} at the end of anaerobic stage and 2.73 mg L^{-1} h^{-1} at the end of subsequent aerobic stage , respectively.

Key words PAOs ; Synthetic wastewater ; Identification ; SBR ; Biologicl phosphate release ; Biologic phosphate accumulation