

高效聚磷菌株 GM1 的分离和聚磷特性研究*

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 采用纯培养结合蓝白斑筛选法从土壤中筛选到一株高效聚磷菌, 初步鉴定为费氏柠檬酸杆菌属(*Citrobacter freundii*), 命名为 GM1。GM1 在 LB、YG 和 MOPS 培养基上均可正常生长, 其生长 pH 在 5.5 至 8.5 之间, 最适生长 pH 为 7.5。该菌在不同的培养基上最适生长温度不同, 在 LB 培养基上为 37℃, YG 和 MOPS 葡萄糖培养基上为 30℃。在好氧条件下 MOPS 培养基培养 24 h 后, GM1 菌体含磷量为 11.5%; 上清液磷浓度由 43.8 mg L⁻¹ 下降为 14.7 mg L⁻¹, 磷去除率达 69%, poly P 染色显示菌体中有异染粒。GM1 具有较强的聚磷能力。

关键词 聚磷菌分离; 筛选; 菌体含磷量; 聚磷特性

中图分类号 S154.39 文献标识码 A

水体富营养化是全球普遍存在的严重环境问题, 向水体大量输入氮、磷等营养物质是引起河流、湖泊水华和海湾等赤潮的主要原因。在所有的营养元素中磷被认为是引起水体富营养化的最关键因素^[1,2]。大量的城市污水处理厂污水中氮、磷的超标排放是引起水体富营养化的重要原因^[1]。

为此, 有关城市污水处理厂的除磷研究早在 20 世纪 60 年代初就引起了国外学者的重视。欧美国家的学者在城市污水处理厂的微生物除磷方面进行了大量的研究。研究内容主要集中在聚磷机理和工艺两大方面。目前的研究热点主要有两方面: 一是利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)和荧光原位杂交技术(FISH)等分子手段采用不依靠培养的方法研究增强生物除磷工艺 EBPR(Enhanced biological phosphorus removal)系统的微生物种群结构变化; 二是利用基因工程的方法研究与聚磷相关的基因^[1]。但迄今为止有关生物除磷机理的研究进展不快, 主要问题有: 一是对生物除磷的机理尚不清楚; 二是对究竟是哪些种群的细菌负责 EBPR 系统的聚磷功能尚不完全了解; 三是筛选到的聚磷菌较少, 而且这些聚磷菌在工艺装置中尚不能表现出厌氧放磷好氧聚磷的特点^[1-3]。究其原因主要是环境工程师和微生物学家缺少联合, 研究工作存在严重脱节所致。因此, 本文

从聚磷菌分离筛选入手, 从土壤中筛选出具有高效聚磷特性的菌株 GM1, 并研究 GM1 的聚磷特性, 旨在为生物除磷的基础研究打好基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基 (1) LB 培养基: 酵母浸膏 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、水 1 000 ml、pH 7.0~7.2。(2) YG 培养基^[3]: 酵母浸膏 1 g、葡萄糖 1 g、K₂HPO₄ 0.3 g、KH₂PO₄ 0.25 g、MgSO₄ 0.2 g、水 1 000 ml。(3) MOPS 培养基^[4]: 100 ml 的 10 × MOPS 混合物(8.372 g MOPS+ 0.717 g tricine+ 30 ml 去离子水, 10 mol L⁻¹ 的 KOH 调节 pH 至 7.4, 总体积到 44 ml, 0.01% 1 ml 新制的 FeSO₄ 溶液, 按下列顺序加溶液: 5 ml 1.9 mol L⁻¹ NH₄Cl, 1 ml 0.276 mol L⁻¹ K₂SO₄, 0.025 ml 0.02 mol L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 0.21 ml 2.5 mol L⁻¹ MgCl₂·6H₂O, 10 ml 5 mol L⁻¹ NaCl, 0.02 ml 微量元素混合液, 38.7 ml 去离子水, 葡萄糖 0.1 g), 取 50 ml 置于两个 500 ml 的三角瓶中, 向一个三角瓶中加入 0.008 7 g K₂HPO₄, 成为限磷培养基; 向另一个瓶中加入 0.173 2 g K₂HPO₄, 成为磷过量的培养基。向两种培养基中均加入 thiamine 溶液和去离子水, 分别

* 江苏省环境保护厅项目(2004007)、江苏省社会发展项目(BS2003028)资助

[†] 通讯作者

作者简介: 蔡天明(1965~), 男, 高级工程师, 在职博士生, 发表论文近 20 篇, 现主要从事生物除磷机理及与聚磷相关的基因研究。

E-mail: ctm@njau.edu.cn

收稿日期: 2004-11-22; 收到修改稿日期: 2005-03-28

用细菌滤器过滤后,分装于已灭菌的 150 ml 的三角瓶中。

1.1.2 供试土样 南京市卫岗菜园土壤(黄棕壤)。

1.2 方法

1.2.1 聚磷菌株的分离和筛选 (1) 菌种的分离:称取一定量的土样置于 150 ml 盛有蒸馏水的三角瓶中,加入若干玻璃珠,于 30℃摇床摇 5 h。吸取上清液 0.5 ml 于盛有 4.5 ml 无菌水的试管中,混匀,制成浓度梯度为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的菌悬液。从各浓度菌悬液中分别吸 0.1 ml 于 YG 平板上,每个稀释度涂布三块平板,于 30℃培养箱培养 2~3 d。从 18 块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 YG 的斜面培养基上,于 30℃培养箱培养 3 d。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^[5]:从 18 块平板中挑出形态不同的菌落,将其分别点接于限磷和磷过量的 MOPS-葡萄糖培养基,于 30℃培养 1~2 d。观测蓝白斑的生长情况。

1.2.2 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]。

1.2.3 菌体 poly-P 的鉴定 (1) 吕氏美蓝染色法^[8]:按常规方法制片;滴加吕氏美蓝染液,5 min 或更长;用水冲去染液,吸干,备油镜镜检;异染粒呈深蓝色,菌体其他部分呈浅蓝色。(2) Albert 染色法^[8]:按常规方法制片;用甲液染 5 min。倾去甲液,用乙液冲去甲液,并染 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 菌体生长曲线 (1) 好氧培养方法:在 250 ml 的锥形瓶中装 100 ml 的培养基,于 30℃的摇床中培养。(2) 生长曲线制作^[9]:按上述方法培养,每 2 h 测定 OD 值(600 nm)。(3) 不同培养基中菌体的生长量^[9]:将菌种分别接到装有 100 ml LB 培养基、YG 培养基和 MOPS 培养基的 250 ml 三角瓶中,于 30℃摇床中培养 2 d。(4) 对照菌:在进行好氧培养聚磷效果测定时,以 *E. coli* 作对照菌。

1.2.5 菌体含磷量测定 将菌株 GM1 接种在含液体培养基的试管中 30℃过夜,按 1% 的量加入两个 250 ml 的锥形瓶中,于 30℃的摇床中好氧培养,在不同的生长阶段分别测定菌体的生长量,菌体的含磷量及上清液的磷浓度。(1) 取 50 ml 菌悬液于 50 ml 的离心管中,以 12 000 r min⁻¹ 离心 5 min,用无

菌水溶解,再离心,重复 3 次得湿菌体,于 105℃烘干测菌体干重。(2) 在无菌条件下,取好氧培养到一定阶段的菌液 80 ml,12 000 r min⁻¹ 离心 5 min,用无菌水洗去菌体上的培养基,用无菌水溶解,再离心,重复 3 次得湿菌体;将菌体用无菌水溶解后,用过硫酸钾进行消解,按总磷测定方法测菌体含磷量。(3) 上清液测取好氧培养后的菌液在 12 000 r min⁻¹ 离心 5 min,取上清液按总磷的测定方法测磷浓度^[10]。

1.2.6 总磷的测定 采用钼酸铵分光光度法^[10]。

1.2.7 培养基初始 pH 值与 GM1 生长关系研究 培养基按 MOPS 培养基的配制方法配制后,在无菌操作条件下用 NaOH 或 HCl 溶液分别调节 pH 值至 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5。将 GM1 接种于装有 3 ml MOPS-葡萄糖培养基的试管中,在 30℃摇床中过夜。将培养的菌液按 1% 接种量加入上述锥形瓶中,置于 30℃的摇床中培养,每隔 2 h 测定 OD 值,每隔 4 h 测定菌体含磷量及上清液的磷浓度。

1.2.8 GM1 在不同生长时间的除磷效果研究 将 GM1 接种于装有 3 ml MOPS-葡萄糖培养基的试管中,在 30℃摇床中过夜。将培养的菌液按 1% 接种量接至 7 个装有 200 ml MOPS 培养基的 500 ml 锥形瓶中,置于 30℃的摇床中培养,每隔 4 h 取一个锥形瓶测定菌体含磷量及上清液的磷浓度。

2 结果与分析

2.1 高效聚磷菌株 GM1 的分离和鉴定

2.1.1 蓝白斑筛选与 poly-P 染色 从 18 块平板中共挑出形态不同的菌落 24 个,接种到限磷和磷过量的两种蓝白斑筛选培养基上。由表 1 可知,在限磷平板上呈蓝斑,在高磷平板上呈白斑的有 14 个菌落;高磷低磷平板上均呈白斑的有 4 个菌落;在高磷和低磷平板上均显蓝色的菌落 6 个。将两种平板上均呈蓝斑的 6 个菌落筛选出来,即为初选聚磷菌^[5],命名为 GM1、GM2、GM3、GM4、GM5、GM6。将这 6 株菌分别在 LB 和 YG 培养基上好氧培养 24 h 后,测定菌体含磷量和进行 poly-P 染色。由表 2 分析可知,好氧培养后这 6 株菌的聚磷量均明显高于对照菌株,菌体含磷量在 2.72%~11.5% 之间;GM1、GM5、GM6 菌体含磷量均高于 8%,其中菌株 GM1 菌体含磷高达 11.5% (以菌体干重计),好氧培养时菌体磷含量在 6 株菌中最高。poly-P 染色结果表明,GM1、

GM3、GM5、GM6 染色后菌体中均含 poly-P, 而 GM2 和 GM4 的菌体磷含量小于 4%, 聚磷能力相对其他 4 株菌较弱, 因此, 并不能将蓝白斑筛选时两种培养基上均呈蓝斑, 作为聚磷菌筛选的唯一依据^[5]。本研究中采用蓝白斑筛选结合好氧培养和 poly-P 染色来筛选聚磷菌。poly-P 染色结果如图 1 所示。由图

1 可以看出, GM1 吕氏美蓝染色结果菌体呈浅蓝色, 异染粒深蓝色; Albert 染色结果菌体显浅绿色, 异染粒呈黑色。本文将 GM1 选出做进一步的研究。

2.1.2 GM1 菌株的生理生化特性^[6] 该菌在不同培养基上最适生长温度不同, LB 培养基为 37℃, YG 和 MOPS- 葡萄糖培养基为 30℃(见图 2)。

表 1 蓝白斑筛选聚磷菌

Table 1 Screening Phosphorus accumulating organism (PAOs) by the blue and white spot method

培养基 Medium	蓝菌落菌号 Number of blue colony	白菌落菌号 Number of white colony
低磷的 MOPS P _i limitation	1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	2, 6, 11, 13
磷过量的 MOPS P _i excess	3, 5, 9, 15, 18, 22	1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24

表 2 6 株聚磷菌好氧培养 24 h 菌体含磷量¹⁾

Table 2 Phosphorus contained in PAOs after 24h aerobic incubation

培养基 Medium	聚磷菌 PAOs						<i>E. coli</i>
	GM1	GM2	GM3	GM4	GM5	GM6	
LB 培养基 LB medium	11.5	2.54	6.59	3.98	8.15	8.43	1.76
YG 培养基 YG medium	9.54	2.72	5.35	3.32	8.78	9.32	2.31

1) 磷含量为菌体干重含磷百分数 Phosphorus content: Percentage of phosphorus against the bacteria on a dry weight basis

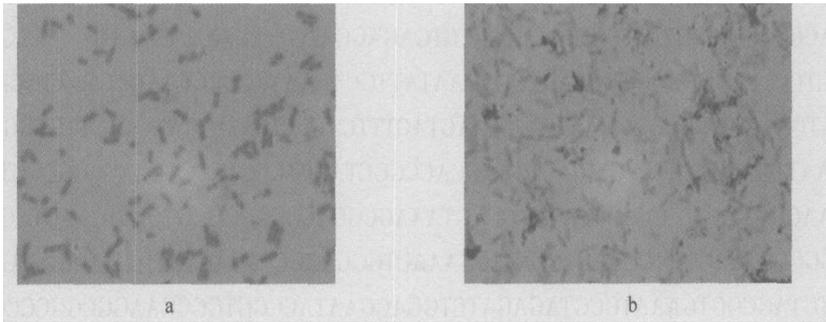


图 1 GM1 菌体的吕氏美蓝染色(a)和 Albert 染色(b)显微镜照片(×1000)

Fig. 1 A photo of GM1 strain staining with Loeffler's methylene blue (a) and Albert (b) (×1000)

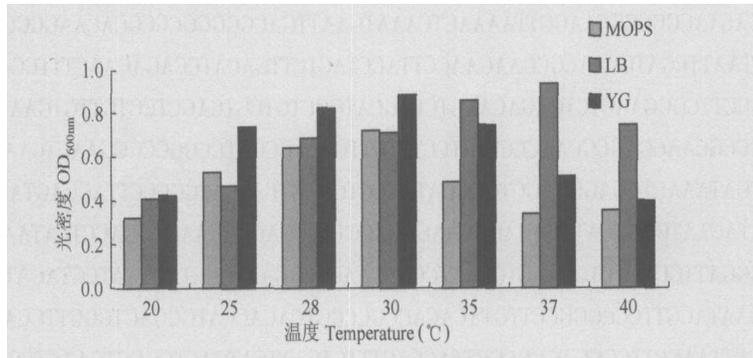


图 2 GM1 在不同温度下的生长结果

Fig. 2 Effect of temperature on GM1 growth

将该菌株在 LB 培养基上培养, 菌落半固体状, 呈圆形, 表面光滑, 边缘平整, 半透明。生理生化鉴定该菌株是革兰氏阴性菌, 能运动, 对苯丙氨酸脱氨酶反应、氧化酶反应和赖氨酸脱羧酶反应呈阴性, 对 H₂S

试验、柠檬酸盐试验、V-P 试验、甲基红试验、吲哚试验、精氨酸脱羧酶反应、L-阿拉伯糖试验以及硝酸盐还原反应呈阳性^[6] (表 3)。根据上述结果, 将 GM1 初步鉴定为费氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)^[6]。

表 3 GM1 菌株生理生化鉴定¹⁾

Table 3 Biological and chemical identification of GM1 strain

项目 Item	鉴定结果 Identify resulting	项目 Item	鉴定结果 Identify resulting
革兰氏染色 Gram staining	-	吲哚试验 Indol test	+
苯丙氨酸试验 Phenylalanine test	-	氧化酶试验 Oxidase test	-
硫化氢试验 Sulfured hydrogen test	+	硝酸盐试验 Nitrate test	+
柠檬酸试验 Citric acid test	+	精氨酸脱羧酶试验 Arginine decarboxylose test	+
V-P 试验 Voges Proskauer test	+	赖氨酸脱羧酶试验 Lysine decarboxylase test	-
甲基红试验 Methyl red test	+	L-阿拉伯糖试验 L-arabinose test	+

1) + : 阳性反应 Positive; - : 阴性反应 Negative

2.1.3 GM1 16S rDNA 序列分析及同源性比较
以 GM1 总 DNA 为模板, 利用对细菌 16S 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 (图 3)。

TGCCTGCAGGTCGACGATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATG
CAAGTTCGGGCGGTAAACCGGGAGCTTCTCCCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG
GGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCA
AAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGTAAAC
GGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCG
CGTGTATGAAGAAGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACC
ACAGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAGCACCAGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCGGAG
GGTGCAGCGTTAATCGGAATTAATCGGCGTAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCCGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCCCTGGACAA
AGACTGACGCTCAGGTGCGAAACGCTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTATGCCAGCCGTA
AACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAAGCGTGGCTTCCGAGCTAACGCTAAGTCGACCCGCC
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCCTAATCTTACATCCAGAGAACITTCAGAGATGGAT
TGGTGCCCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTG
CCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGT
AGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTGCACTCCATGAAATCGGAAATCGCTAGTAATCGTATGATCAGAATGCTA
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTA
GGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT
AAATCTCTAGAGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC

图 3 GM1 16S rDNA 核苷酸序列

Fig 3 The sequence of 16S rDNA fragments of GM1

用 BLAST 程序对 GM1 的 16S rDNA 序列和 GenBank 中已登陆的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性比较, 结果发现与已报道的费氏柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter freundii*) 16S rDNA 序列 (登陆号 AF025365) 的同源性达到 98%, 结合 GM1 的生理生化鉴定结果 (表 3), 初步鉴定其为费氏柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter freundii*)。

2.2 培养基对 GM1 菌体生长的影响

由图 4 可以看出, GM1 在三种不同的培养基上均生长良好, GM1 生长在 MOPS 培养基上时, 在 6~8 h 处于对数生长期, 8~14 h 进入稳定生长期; 在 LB 培养基上生长时 8~14 h 处于对数生长期; 在 YG 培养基上生长时, 在 10~12 h 进入对数生长期。说明 GM1 培养条件并不苛刻, 这对菌株的工程化应用有利。

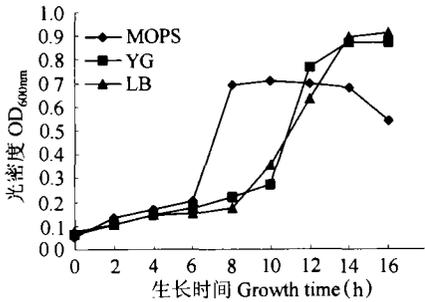


图 4 不同培养基对 GM1 生长的影响

Fig. 4 Effect of media on GM1 growth

2.3 培养基初始 pH 对 GM1 菌体生长的影响

由图 5 可知, GM1 在 LB 中 37℃ 下生长时, 培养基初始 pH 值在 6.5~8.5 之间均生长正常, 最适生长 pH 为 7.5。

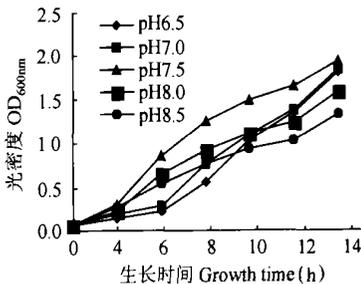


图 5 培养基初始 pH 值对 GM1 生长的影响

Fig. 5 Effect of initial pH in medium on GM1 growth

2.4 GM1 的除磷效果

从图 6 可以看出, 在培养过程中菌体磷含量持续上升, 培养 24 h 后达 11.5% (以菌体干重含磷计); 从上清液中磷的浓度看, 磷的浓度不断降低, 培

养 24 h 后, 溶液中的磷浓度最低, 为 14.7 mg L^{-1} ; 从磷的去除率看, 磷的去除率不断升高, 24 h 后为 69%, 而对照菌 *E. coli* 的菌体含磷量为 2.45%, 小于 3%^[11]。说明 GM1 具有高效聚磷能力。

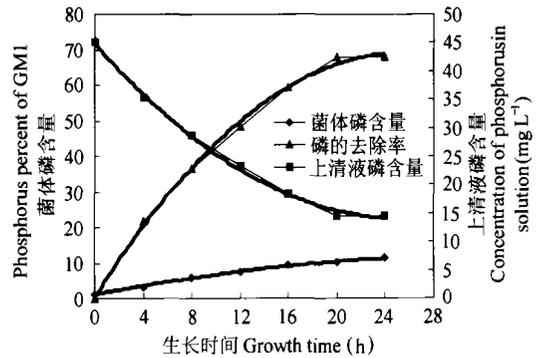


图 6 不同培养时间 GM1 的聚磷量 (接种时, 菌体磷含量为 1.59%)

Fig. 6 Phosphorus concentration of GM1 in different times

3 结论与讨论

本研究从土壤中分离出一株高效聚磷菌株 GM1, 生理生化鉴定为费氏柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter freundii*)。该菌株在 LB、YG 和 MOPS 培养基上均能正常生长, 在三种培养基上生长时最适生长温度不同, 在 YG 和 MOPS 培养基上为 30℃, 在 LB 上为 37℃, 在 pH 5.5~8.5 之间生长良好, 其最适 pH 为 7.5。GM1 在 MOPS 液体培养基中好氧培养后体内的总磷含量为 11.5%, 对溶液中磷的去除率接近 70%, 上清液磷浓度从 44.5 mg L^{-1} 降至 14.7 mg L^{-1} 。

本研究筛选的 GM1, 其聚磷能力远高于文献[5]野生菌株 MY 11 和 K3 的菌体含磷量 (MY 11 和 K3 聚集的 poly-P 分别为每毫克蛋白含 500 和 100 nmol 磷酸盐), 已接近文献[5]突变菌株 K3-6 的聚磷能力 (菌体干重含磷量 15%), 故 GM1 的 *phoU* 基因可能已经突变^[5], 所以聚磷能力很强。本研究中采用吕氏美蓝和 Albert 染色法对菌体染色时^[8], Albert 染色法较吕氏美蓝法易于观察, 在显微镜下的图像较为清晰。因此, 建议将 Albert 染色法作为 poly-P 染色方法。本文在研究聚磷效果时, 需要测定菌体干重, 本研究中采用离心后菌体烘干测干重, 所以应尽可能多培养一些菌体, 以增加干菌体重量, 减少测量误差。

本文采用文献[5]中的蓝白斑筛选法进行聚磷菌初步筛选, 其机理是根据不同菌体在高磷和限磷的 MOPS 培养基中生长时对 X-Pi (5-bromo-4-chloro-3-

indolyt phosphate) 的分解情况不同, 来筛选 *phoU* 基因已发生突变的高效聚磷菌。但聚磷菌的聚磷能力还与其在厌氧条件下的聚 PHB 的能力有关, 因此, 蓝白斑筛选时, 在高磷和低磷培养时均呈蓝斑的, 并不一定聚磷能力就强。因此, 通过 poly-P 染色来观察菌体内的异染粒, 并通过好氧培养测定其菌体含磷量, 这样可以确保筛选出高效聚磷菌, 而不需要通过诱变来提高聚磷能力^[5]。本文采用 poly-P 染色、蓝白斑筛选和好氧培养测菌体聚磷能力三种方法相结合来筛选高效聚磷菌, 这种定性与定量相结合的方法, 增加了筛选方法的科学性和准确性, 为聚磷机理的研究提供了一种有效的方法, 这对于生物除磷的研究具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] Seviour R J, Mino T, Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated 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] Morohoshi T, Onuki M, Kato J, *et al.* A Method for Screening Polyphosphate Accumulating Mutants which Remove Phosphate Efficiently from Synthetic Wastewater. Japan: Japan Science and Technology Corporation, Kawaguchi, Saitama, 2002. 95: 637~ 640
- [6] 东秀珠, 蔡妙英编著. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. Dong X Z, Cai M Y. 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] Luí sa S, Serafin A, Caterina Levantesi, *et al.* Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate accumulating microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 51: 1
- [9] 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
- [10] 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 Ammonium Molybdate Spectrophotometric Method* (In Chinese). GB/T 11893-1989
- [11] 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. 2. Li J L, Zhang W X, Yang Q R, *et al.* *Microbial Physiology* (In Chinese). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1988. 2
- [12] 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
- [13] Lu J J, Yang H, Gao L, *et al.* Spatial variation of P and N in water and sediments of Dianchi Lake, China. *Pedosphere*, 2005, 15(1): 78~ 83
- [14] Zhang M K, Ke Z X. Heavy metals, phosphorus and some other elements in urban soils of Hangzhou City, China. *Pedosphere*, 2004, 14(2): 177~ 185
- [15] 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

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF STRAIN GM1 WITH HIGH CAPABILITY OF ACCUMULATING POLY-P

Cai Tianming Guan Libo Cui Zhongli Li Shunpeng[†]

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

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

Abstract A strain of bacteria with high capability of accumulating poly-P was isolated and screened from soils by using the pure culture and blue- and white-colored screening methods. Identified as *Citrobacter freundii* and named GM1, this strain could grow normally in either LB, YG or MOPS media with pH ranging from 6.5 to 8.5. The optimal temperature and pH for its growth were 30 °C and pH 7.5, respectively. After incubation aerobically in the MOPS medium for 24 hours, the phosphorus concentration in GM1 reached 11.5% of its weight, while the concentration of phosphate in the medium declined from 43.8 to 14.7 mg L⁻¹, so the phosphate removing rate was 69%. At that time, poly-P granules could be observed in thalli by the poly-P staining method, indicating that GM1 has a high capability of accumulating phosphate.

Key words PAO Isolation; Screening; Phosphorus concentration; Accumulating phosphate characteristic