

Pseudomonas putida GM6 的 *gfp* 基因标记 及在活性污泥中的定殖*

蔡天明 管莉菠 李顺鹏[†]

(南京农业大学生命科学学院微生物系, 农业部环境微生物重点开放实验室, 南京 210095)

摘要 强化生物除磷(EBPR)工艺在废水生物除磷中广为应用,但由于对 EBPR 工艺的微生物学和分子机理尚不了解,对大规模生活污水处理厂 EBPR 工艺处理效果突然恶化和运行不稳定等状况难以预测和控制。本研究利用本实验室分离鉴定的高效聚磷菌 *Pseudomonas putida* GM6,来进行投菌试验以快速恢复和强化活性污泥的除磷能力。为了解 GM6 菌株在装置中的定殖情况,首先,通过三亲结合对 *Pseudomonas putida* GM6 成功进行了 *gfp* 基因标记;其次,将标记菌株 GMIR 投至实验室规模除磷效果不好的序批式反应器(SBR)装置中,研究 GMIR 在活性污泥中的定殖情况,投菌初期,GMIR 占污泥细菌总数的 1.5%~3%;至 21 d 时,GMIR 所占比例升至 9.2%,GMIR 在活性污泥中得以定殖。与此同时,研究了投菌后 R2 的聚磷能力变化,投菌 5 d 后,磷的去除率逐渐提高,运行 21 d 时磷的去除率升至 96%,28 d 后出水浓度稳定在 0.2 mg L⁻¹左右。结果表明,*Pseudomonas putida* GM6 能快速启动强化废水生物除磷功能。这为下一步的大规模的工程化应用提供了科学依据。

关键词 *gfp*;定殖;序批式反应器(SBR);强化生物除磷(EBPR)

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

在废水生物除磷中,强化生物除磷(Enhanced biological phosphorus removal, EBPR)工艺是主流工艺,它的稳定高效运行对废水中磷的有效去除起了决定性作用。为了解 EBPR 的微生物学和分子机理,国内外许多研究者,对 EBPR 工艺的微生物学和遗传学进行了大量的研究,但因 EBPR 系统的复杂性,迄今为止对诸如究竟是哪些微生物种群是负责着 EBPR 的聚磷菌(Polyphosphate accumulating organisms, PAOs)、poly-P 形成的关键基因是什么等基本理论了解甚少^[1,2]。因此,EBPR 系统犹如一个黑箱^[3],其在运行过程中的行为具有不可预见性。在实际大规模污水处理运行中,会出人意料地出现水质不稳定和突然恶化现象,导致污水处理系统除磷效果大幅下降,出水磷浓度严重超标,而且较难恢复^[1~3]。因此,寻求快速有效的恢复 EBPR 稳定高效运行的方法在工程化应用中有着现实意义。

研究表明,利用高效菌株处理特定的污染物和强化处理效果是废水处理中行之有效的办法,但应用高效聚磷菌来快速恢复 EBPR 系统的除磷能力鲜

有报道。究其原因:一是由于高效聚磷菌很难筛选;另一方面,对于聚磷菌在污泥中的生态优势、定殖情况难以掌握。为了解高效聚磷菌株在活性污泥中的生态与生存状况等定殖情况,本研究利用本实验室分离鉴定的高效聚磷菌 GM6 进水投菌试验。通过三亲结合对 GM6 进行了 *gfp* 基因标记;在对标记菌株的稳定性、聚磷能力、接种量及接种时间进行研究的基础上,将标记菌株投加至实验室规模的磷去除效果不好的序批式反应器(Sequencing batch reactor, SBR)装置 R2 中,运用稀释平板涂布结合抗性标记研究投菌不同时间高效菌株的定殖情况;研究不同投菌时间装置 R2 的除磷效果。旨在为下一步的大规模的工程化服务。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

GM6:恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),头孢唑啉抗性,系本实验室从活性污泥中分离的一株高效聚

* 国家自然科学基金项目(30500010,50308011)资助

[†] 通讯作者:李顺鹏, E-mail: lsp@njau.edu.cn

作者简介:蔡天明(1965~),男,高级工程师,博士,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:2006-11-30;收到修改稿日期:2006-11-30

磷菌。pTRGFP-9: Amp^r, Tc^r, 将组成型 *gfp* 基因克隆至广宿主质粒 pTR102 获得的标记载体, 本实验室构建 *gfp* 标记载体, 保存在 *E. coli* DH5 中; pRK2013: mob⁺, tra⁺, Km^r, 协助质粒, 为本实验室保存, 保存在 *E. coli* HB101 中。

1.2 试验装置和方法

1.2.1 实验室 SBR 装置及运行参数 实验室 SBR 装置: 所选 SBR 装置是本实验室的除磷效果不好的装置, 已运行 12 个月, 进水磷浓度在 16 mg L⁻¹ 左右, 出水磷浓度在 10 mg L⁻¹ 左右。装置有效容积 5 L, 材质有机玻璃, 为维持厌氧状态, 将合成的废水放置一天进行预酸化。厌氧采用搅拌, 以控制 Eh 位于 -150 mV 左右; 好氧采用曝气。HRT 为 12 h, SRT 为 4 d。每个循环, 进水 10 min, 厌氧搅拌 2 h, 好氧曝气 4 h, 沉淀期 30 min, 排水 15 min, 间隔期 1 h。运行过程采用 PLC 程序控制。

1.2.2 合成废水成份 葡萄糖 0.6 g, 蛋白胨 0.1 g, 酵母粉 0.01 g, 乙酸钠 0.50 g, 氯化钠 0.05 g, 三水合磷酸氢二钾 0.09 g, 七水硫酸镁 0.40 g, 氯化铵 0.18 g, 1 L 水。

1.3 利用 *gfp* 基因标记菌株 GM6^[6~11]

1.3.1 标记菌株的构建 采用三亲接合, 将载体 pTRGFP-9、辅助质粒 pRK2013 和目的菌株 GM6 分别接入含相应抗生素的 LB 液体培养基中, 培养至对数生长期。取培养好的三种菌液各 5 ml 混合, 离心, 用无菌水洗涤 3 次。再用 LB 培养基洗涤 1 次, 去上清, 加 100 μl LB 培养基混匀。将菌悬液涂于无菌滤膜上, 滤膜置于不含抗生素的 LB 平板上, 于培养箱中 30 ℃ 培养 1 d。将滤膜上的菌体洗下, 稀释涂布于选择性平板上, 培养 1 d 挑选转移接合子并进行验证。

将 GMTR 分别接种于含有相应抗生素的 LB 平板上, 30 ℃ 下培养过夜, 于紫外灯下检测荧光。或制作菌体水片, 于荧光显微镜下观察发光情况。

1.3.2 *gfp* 质粒遗传稳定性试验^[9] 将 GMTR 分别接种于 LB 抗性平板上, 培养 12 h。然后转接于 LB 试管中, 培养 12 h。平板上转接 30 次, 试管中转接 30 次, 用荧光检测方法检测 *gfp* 基因是否能在 GMTR 中稳定遗传。

1.3.3 GMTR 生长曲线的制作^[12] 将 GM6、GMTR 和 pTRGFP-9 分别接种于含有相应抗生素(见 1.1 菌株与质粒) 50 ml 合成废水的三角瓶中, 培养过夜。然后按 6.5% 的接种量转移至 200 ml 的合成

废水中, 每隔 0.5 h 取一次样, 测 12 h 之内的 OD_{600nm} 值变化情况。

1.4 标记菌株的投菌试验

1.4.1 最佳投菌量试验 取 SBR 装置的泥水混合物 200 ml, 加入 500 ml 的锥形瓶中。向含有 200 ml LB 培养基的 500 ml 三角瓶中按 5% 的接种量接入 GMTR 菌株好氧培养, 采用平板计数法测定菌悬液的浓度为 1.2 × 10⁹ CFU ml⁻¹, 离心弃上清, 无菌水洗涤, 菌体用 200 ml 无菌水重悬, 待用。按 0.1%、0.5%、1%、2%、3%、5% 和 7.5% 的接种量(菌悬液的体积与污泥混合液的体积比), 加入含有 200 ml 的泥水混合物的三角瓶中(每个比例做两个平行), 好氧培养, 采用平板计数法结合抗性选择测定不同厌氧循环数的污泥中荧光菌数所占比例。

1.4.2 最佳接种时期的确定 好(厌)氧接种试验: 将标记菌株接种于含液体培养基的试管中 30 过夜, 按 1% 的量加入 250 ml 的锥形瓶中于 30 ℃ 的摇床中好氧培养 12 h 至对数生长期, 取 50 ml 菌悬液离心弃上清, 菌体用无菌水重悬待用。从 SBR 装置好氧工段取 950 ml 泥水混合物置于 1.5 L 有机玻璃反应器中, 加入重悬的菌悬液, 混匀, 进行好(厌)氧试验, 取好(厌)氧 10 min、20 min、30 min、40 min、1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h 的水样静置沉淀, 采用抗性平板涂布法测定上清荧光菌数。

1.5 GMTR 强化污泥除磷能力试验^[12]

1.5.1 聚磷菌在实验室 SBR 装置 R2 中的定殖 标记菌株菌体的制备: 将标记菌株进行好氧培养, 取培养至对数生长期后期的菌悬液 100 ml, 离心收集菌体。

实验装置的选定: 将 1.2 所述装置中的污泥一分为二于两个装置中 R1 和 R2 中。装置 R1 不投菌做对照; 装置 R2 进行投菌试验。

高效聚磷菌在 R2 中的定殖: 将培养好的菌体于厌氧开始前加入装置 R2 中, 与对照装置 R1 同步运行, 测定不同时间污泥中的荧光菌数和细菌总数。细菌总数的测定采用平板计数法; 荧光菌数的测定, 应结合抗性标记选择方法进行, 在平板上加入头孢唑啉(浓度为 100 μg ml⁻¹) 且应与测定细菌总数的平板为同一稀释梯度。

1.5.2 强化生物除磷试验 取不同运行时间的装置 R1 和装置 R2 的水样, 测定其上清液中总磷和 COD_{Cr} 浓度。研究装置 R2 的厌氧放磷好氧吸磷以及有机物去除的特点, 测定上清磷浓度。

1.6 分析方法

总磷的测定方法参见文献[12]。

2 结果与分析

2.1 标记菌株的构建及生长试验

GM6 的抗性试验结果表明,GM6 菌株对先锋六号、氟苯青霉素、头孢唑啉和万古霉素具有抗性,结合三亲接合中所用载体和辅助质粒的抗性分析,选

择头孢唑啉作为 GM6 菌株培养的抗生素。

载体 pTRGFP-9、辅助质粒 pRK2013 和目的菌株 GM6 通过三亲接合将 pTRGFP 转入 GM6,获得标记菌株 GMTR。经质粒酶切、荧光检测及质粒稳定性试验,GM6 已获得荧光较强且能稳定传代的 GFP 标记质粒。标记菌株的菌落荧光照片见图 1。

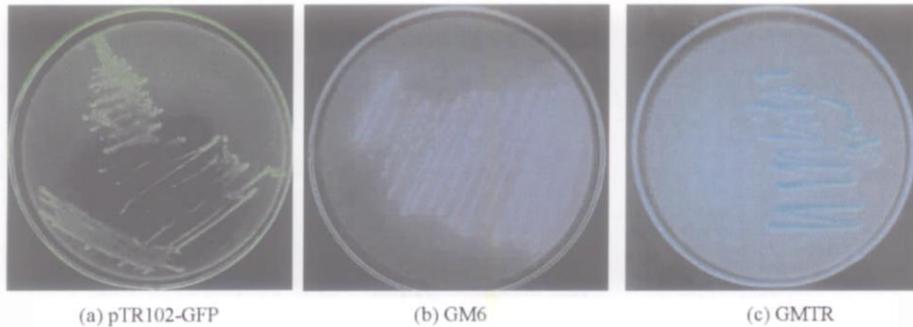


图1 GMTR 菌落在紫外灯下照片

Fig. 1 Picture of strains under UV

标记菌株 GMTR 与原始菌株 GM6 好氧培养不同时间的生长情况如图 2 所示。

培养 10 h 生长量测定结果表明,标记菌株 GMTR 与原始菌株相比在对应生长时间,生长量相近,说明含有质粒的标记菌株与原始菌株相比无生长负担。

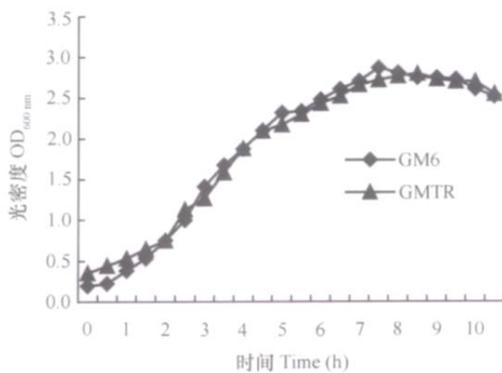


图2 菌株的好氧生长情况

Fig. 2 Strains growing under aerobic condition

2.2 GMTR的定殖结果

2.2.1 GMTR的接种量试验 合理的投菌量直接关系到利用高效聚磷菌强化生物除磷的经济和技术可行性。将好氧培养的菌体按照 0.1%、0.5%、1%、2.0%、3%、5% 和 7.5% 的接种量(菌悬液的体积与污泥混合液的体积比),加入泥水混合物的三角瓶中至终体积为 200 ml(每个比例做两个平行),好

氧培养,按不同的处理循环数(进水周期)采集泥水混合物,沉淀弃上清,采用稀释平板计数法结合抗性选择和荧光检测测定污泥中的荧光菌数的比例,详见图 3。由图 3 可知,当接种量小于 1% 时,GMTR 投菌后难以获得生长优势;当接种量达到 2% 时,在装置运行 12 个循环后,2%~7.5% 四种不同的接种比例污泥中 GMTR 的比例相差不大。因此,实际投菌时,确定比例为 2%。

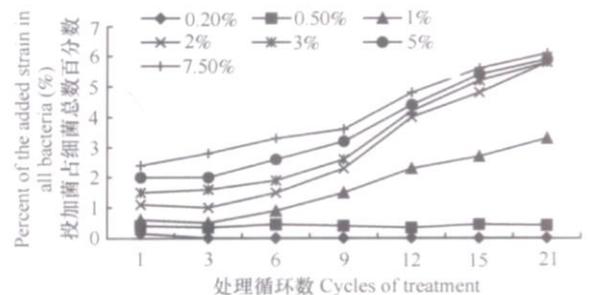


图3 不同的接种量对聚磷菌定殖的影响

Fig. 3 Effects of different inoculation rates on PAOs colonization

2.2.2 GMTR最佳投加时间 取好氧培养至对数生长后期的 GMTR 菌悬液 50 ml(浓度为 1.5×10^9 CFU ml^{-1}) 两份,分别加至两个装有 1 L 活性污泥的容器中,好氧和厌氧培养,测定运行不同时间上清液残留的 GMTR 的菌数,并计算出上清液残留 GMTR 占总投加菌数的比例,绘制上清液残留 GMTR % 随时间变化的曲线,见图 4。结果表明,厌氧 60 min 时,

上清液中的 GMTR 菌数剧烈下降,至 2 h 时,降至 28%,随后变化趋于缓慢,残余率在 20%左右变化,最低残余率为 18%。而好氧 2 h 时,上清残留率为 43%。因此,在厌氧起始时,投加高效聚磷菌可以保证投加菌株的利用率,降低菌株投加量。

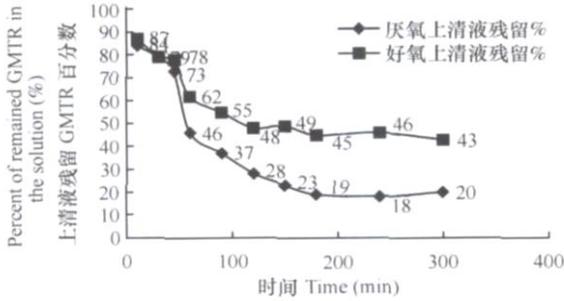


图 4 GMTR 厌好氧培养时上清液残留率

Fig. 4 The percent of remained GMTR in the solution under anaerobic and aerobic conditions

2.2.3 GMTR 投加至 SBR 装置后的定殖情况

取培养至对数生长期后期标记菌株 GMTR 100 ml (浓度为 2×10^9 CFU ml⁻¹) 菌体,在厌氧开始前投至装置 R2 中。在 R2 不同运行时间,取沉淀期的污泥采用平板涂布计数测定 GMTR (含头孢唑啉抗性) 和细菌总数,与对照 R1 比较,分析 GMTR 占细菌总数的比例,结果如图 5。

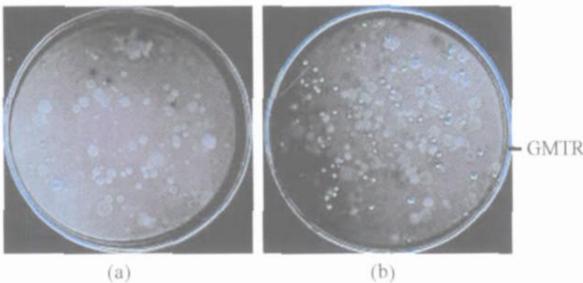


图 5 装置 R1 (a) 和 R2 (b) 中污泥平板涂布紫外灯下的照片

Fig. 5 Photos of a through spreading activated sludge to LB plates from device R1 (a) and R2 (b) under UV

由图 5 分析, R2 的污泥中检出了一定比例的 GMTR, 而对照 R1 污泥中在抗性平板上培养时未检出荧光菌。

图 6 表明, 投加 GMTR 至 R2 后, 起始 3 d, GMTR 在活性污泥中的数量变化不明显; 在投菌 7 ~ 21 d, GMTR 在污泥中的数量和比例迅速上升, R2 运行 21 d 时, GMTR 的比例升至 9.2%; 随后菌数趋于稳定, 21 d ~ 42 d 期间, GMTR 占细菌总数的比例在 9.2% ~ 9.8% 之间。上述结果表明, GMTR 投至 R2 中, 21 d

时 GMTR 的菌数已占据优势。分析原因, 装置 R2 给高效聚磷菌 GMTR 提供了一个厌氧和好氧交替的环境, 适合 GMTR 生长, 故 GMTR 处于竞争优势地位在 R2 中得到定殖。

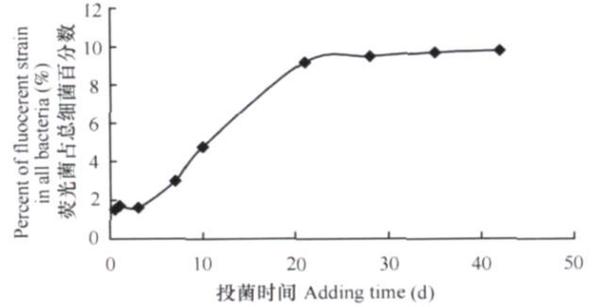


图 6 投菌不同时间活性污泥中投加菌占细菌总数比例

Fig. 6 The percent of the added strain in all bacteria from activated sludge under different adding times

2.2.4 投菌后装置 R2 出水磷浓度变化 投菌后不同运行时间进出水的总磷浓度变化, 见图 7。

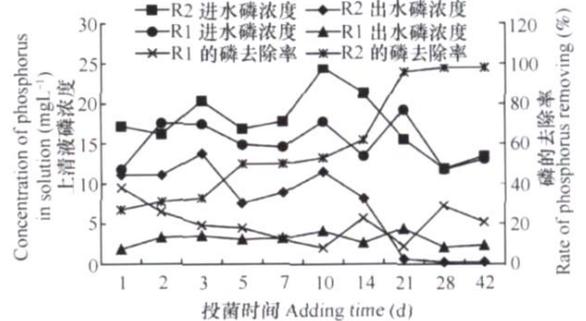


图 7 不同运行时间进出水的磷浓度变化

Fig. 7 Variation of phosphorus concentration in the influent and effluent under different running time

由图 7 可知, 反应器 R2 在投菌 5 d 后磷的去除率逐渐提高, 运行 21 d 后磷的去除率升至 96%, 28 d 后出水磷浓度稳定在 0.2 mg L^{-1} 左右, 投加 GMTR 能大幅提高除磷效果和快速强化系统的生物除磷能力。而与此相反, 没有投加菌的装置 R1, 除磷效果差, 且运行不稳定。说明投加高效聚磷菌 GMTR 可以快速强化生物除磷系统, 使恶化的生物除磷系统得以快速恢复。这为 GMTR 下一步的工程化应用提供了科学依据。

EBPR 工艺是过去几年中研究最为广泛的废水处理工艺, 由于迄今为止对 EBPR 工艺的机理尚不清楚, 加之负责 EBPR 的聚磷菌难以分离^[10], 因此对 EBPR 工艺的理解较难, 对于 EBPR 的不稳定运行和除磷效果恶化的原因难以预测和控制。对于

恶化的 EBPR 的快速恢复的研究较少^[2]。利用高效菌株降解特种污泥物和强化污水的处理效果目前已为人们广为使用,但利用高效聚菌来改进污水的生物除磷能力却鲜有报道。究其原因:一是由于高效聚磷菌很难筛选,另一方面,对于聚磷菌在污泥中的生态优势、定殖情况难以掌握。本研究是首次报道利用本实验室构建的 *gfp* 标记质粒通过三亲接合对本实验室筛选的高效聚磷菌 GM6 进行标记,结合抗性选择构建了荧光标记菌株 GMTR,投加至除磷效果不好的装置来研究其定殖情况和除磷效果。实验结果表明,标记菌株在投菌 21 d 后得以定殖,其装置 R2 的磷去除率高达 96%,出水磷浓度稳定在 0.2 mg L^{-1} 左右。这对大规模工程化应用具有指导意义。

3 结 论

1) 利用本实验室构建的载体 pTR102-GFP、辅助质粒 pRK2013 及目的菌株 GM6,通过三亲接合成功构建了 GFP 基因标记菌株 GMTR。好氧纯培养时 GM6、GMTR 在好氧培养至 24 h 时磷的去除率为 93% 和 91%,菌体磷含量为 8.1% 和 7.8%,GMTR 除磷能力与 GM6 接近。GMTR 接种量和最佳投加时间试验表明,菌株 GMTR 的投加量应为 2%,且应在进水前投菌。

2) 投菌初期装置 R2 中 GMTR 菌数变化不大;21 d 时比例升至 9.2%,21 d ~ 42 d 期间,GMTR 所占比例在 9.2% ~ 9.8% 之间,投菌 21 d 时 GMTR 获得了生长优势。

3) GMTR 的强化生物除磷研究表明,投菌 5 d 后磷的去除率逐渐提高,运行 21 d 时磷的去除率升至 96%,28 d 后出水浓度稳定在 0.2 mg L^{-1} 左右,投加 GMTR 能快速恢复和大幅提高除磷效果。

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] Mino T. Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry*, 2000, 65(3): 341 ~ 348
- [5] 罗启示,王慧,张锡辉,等. 利用 GFP 标记基因检测环境微生物. *中国给水排水*, 2004, 20: 32 ~ 34 Luo Q S, Wang H, Zhang X H, *et al.* Using GFP-tagged gene to detect microorganisms in the environment (In Chinese). *China Water & Wastewater*, 2004, 20: 32 ~ 34
- [6] 钟卫鸿,叶海仁,陈建孟,等. 应用绿色荧光蛋白基因标记细菌进行生物膜结构定量新方法. *环境科学*, 2005, 26(4): 160 ~ 164. Zhong W H, Ye H R, Chen J M, *et al.* New method for spatial structure quantification of biofilm with GFP tagged bacteria (In Chinese). *Environmental Science*, 2005, 26(4): 160 ~ 164
- [7] 田涛,王琦. 绿色荧光蛋白作为分子标记物在微生物学中的应用. *微生物学杂志*, 2004, 25(1): 68 ~ 72. Tian T, Wang Q. The application of green fluorescent protein (GFP) as molecular marker in microbiology (In Chinese). *Journal of Microbiology*, 2004, 25(1): 68 ~ 72
- [8] Leff L G, Leff A A. Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(9): 3 486 ~ 3 488
- [9] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [10] 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
- [11] Lindow S E. The use of reporter genes in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol.*, 1995, 4: 555 ~ 566
- [12] 蔡天明,管莉菠,崔中利,等. 高效聚磷菌株 GM1 的分离和聚磷特性研究. *土壤学报*, 2005, 42(4): 635 ~ 641. Cai T M, Guan L B, Cui Z L, *et al.* Isolation and characterization of strain GM1 with high capability of accumulating poly-P (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(4): 635 ~ 641

gFP GENE-LABELING AND COLONIZATION OF PSEUDOMONAS PUTIDA GM6 IN ACTIVATED SLUDGE

Cai Tianming Guan Libo 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 Although the enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process is widely applied in wastewater treatment to remove phosphorus biologically, it is difficult to predict and control its effect, which is unstable and would often decline suddenly in large-scale municipal sewage treatment plants, on account of lack of knowledge about microbiological and molecular mechanisms of the EBPR process. An experiment was carried out using *Pseudomonas putida* GM6, a strain of high-efficiency phosphorus-accumulating bacteria isolated and identified in the lab, to quickly reactivate the phosphorus removing capacity of sludge. In order to learn how GM6 colonize in the reactor, *Pseudomonas putida* GM6 was first labeled with *gfp* gene through tri-parent conjugation, and then introduced into a sequencing batch reactor (SBR) installation, low in phosphorus removing efficiency in the lab to investigate how GMTR colonize in activated sludge. The initial count of GMTR introduced into the sludge accounted for 1.5% ~ 3% of the total count of bacteria in the sludge, and rose up to 9.2% after 21 days, indicating GMTR colonized firmly in the sludge. At the same time, variation of phosphorus-accumulating capacity of R2 was studied after inoculation. It was found that phosphorus removal rate gradually increased 5 days after inoculation, and up to 96% at D 21. And phosphate concentration in the effluent lingered around 0.2 mg L⁻¹ after 28 days. The findings demonstrate that the strain of *Pseudomonas putida* GM6 is quick to initiate its biological phosphorus removing function in wastewater and may serve as scientific basis for large-scale engineering application.

Key words *gfp*; Colonization; Sequencing batch reactor(SBR); Enhanced biological phosphorus removal (EBPR)