

以 Fe(Ⅲ)为电子受体的聚磷菌筛选、 鉴定及聚磷特性

任丽平^{1,2}, 张智¹, 唐贇²

(1. 重庆大学城市建设与环境工程学院, 重庆 400030; 2. 西华师范大学生命科学院, 四川南充 637002)

摘要:结合平板分离法、poly-P 和 PHB 染色以及柠檬酸铁还原实验,从污水处理厂活性污泥中分离获得一株以 Fe(Ⅲ)为电子受体厌氧聚磷的聚磷菌株 AP3,其 16S rDNA 与 *Pseudomonas mosselii* ATCCBAA-99 的同源性为 99%。菌株 AP3 于柠檬酸铁液体培养基和无铁液体培养基中厌氧避光、27 °C 静置培养,在含有 Fe(Ⅲ)的培养基中比在无 Fe(Ⅲ)的培养基中生长好;菌株 AP3 在无 Fe(Ⅲ)的培养基中,表现出典型的厌氧释磷特征,释磷量为 3.68 mg · L⁻¹;在含有 Fe(Ⅲ)的培养基中,先厌氧释磷,释磷量为 6.62 mg · L⁻¹,10 h 之后开始厌氧聚磷,聚磷量为 5.89 mg · L⁻¹。菌株 AP3 能以 Fe(Ⅲ)为电子受体,具有厌氧聚磷特征。

关键词:聚磷菌;筛选;鉴定;氧化铁;电子受体

中图分类号:X172 文献标志码:A 文章编号:1674-4764(2012)03-0146-05

Screening and Identification of Phosphate Accumulating Bacteria with Fe (Ⅲ) as Electronic Acceptor and its Effects on Phosphorus-Accumulating Characteristics

REN Liping^{1,2}, ZHANG Zhi¹, TANG Yun²

(1. College of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China;
2. College of Biological Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002, P. R. China)

Abstract: A phosphorus accumulation organism strain AP3 with Fe (Ⅲ) as electronic acceptor was screened from activated sludge through such processes as dilution-plate method, poly-P, PHB staining and ferric citrate reduction. Its 16S rDNA is identical to that of *Pseudomonas mosselii* ATCCBAA-99 at 99% level. By comparing the AP3 being cultured in ferric citrate fluid medium and the one in non-ferric fluid medium at 27 °C, it was found that ferric citrate fluid medium was beneficial for the AP3. AP3 cultured in non-ferric fluid medium showed significant anaerobic and phosphorus releasing characteristic, the phosphorus releasing amount of which was 3.68 mg · L⁻¹. AP3 cultured in ferric fluid medium was also characterized by anaerobic and phosphorus releasing property at the first stage, the phosphorus releasing amount of which was 6.62 mg · L⁻¹, which was higher than the former; And at the second stage which started from the 10h, it was characterized by anaerobic and phosphorus accumulating property, the phosphorus accumulating amount of which was 5.89 mg · L⁻¹. Fe (Ⅲ) is the electron acceptor of AP3 which shows typical anaerobic and phosphorus absorbing property.

Key words: phosphorus accumulation organism; screening; identification; iron oxides; electronic acceptor

收稿日期:2011-12-05

基金项目:国家“十一五”科技重大专项(2009ZX07315-002);中央高校基本科研业务费资助(CDJXS10210005)

作者简介:任丽平(1971-),女,副教授,博士生,主要从事资源微生物和水污染控制研究,(E-mail)xhrlph@163.com。

张智(通信作者),男,教授,博士生导师,(E-mail)zhangzhicq@126.com。

现代污水生物强化除磷法是通过聚磷菌超量摄取废水中的磷,以聚磷酸盐的形式积累于细胞内,然后作为剩余污泥排出,从而实现磷的去除。在该过程中聚磷菌起着关键的作用,目前研究表明假单胞菌属(*Pseudomonas*)是生物除磷的重要功能菌,是厌氧/好氧条件下的主要菌种之一^[1],并在试验过程中一直保持着较为稳定的优势地位^[2]。目前,仅发现其超量吸磷反应的电子受体有2类,一类是以 O_2 为电子受体,在好氧条件下完成吸磷,另一类是以 NO_3^- 、 NO_2^- 为电子受体,在缺氧条件下完成吸磷,前者称为好氧聚磷菌(APB),后者称为反硝化聚磷菌(DPB)^[3]。同时,该过程受到溶氧、有机物、pH值^[4]、厌氧时间^[5]、金属离子^[6]以及 NO_3^- 、 NO_2^- 浓度^[7]等因素的影响。目前,生物除磷仍处于发展阶段,生物除磷效果不稳定,大多数学者集中于除磷工艺的改进,而相关的机理研究还不够成熟。对聚磷机理研究的最大障碍是高活性聚磷菌的获得,至今分离、鉴定的聚磷菌仍然是极少数^[8],新的分离方法仍在不断探索中^[9]。而人们利用分子工具对污水反应器的调查结果表明污水微生物具有多样性,许多未培养微生物被发现在脱磷中扮演着重要角色^[10]。

为达到较好的除磷效果,大多数城市污水处理厂采用生物化学协同除磷工艺,充分利用生物除磷费用低、化学除磷出水磷浓度低且比较稳定的优点。用于废水除磷的化学药剂主要有铝盐、铁盐和石灰。铁盐是良好的化学同步除磷药剂,有三价铁盐和亚铁盐2种形式,人们关注了其在除磷中的作用^[11-12],并对生化联合除磷工艺中主要参数的控制指标进行了试验研究,但对其机理分析不够深入。Fe(III)还原是地球上最早的呼吸形式之一^[13],不少的微生物种类都具有以Fe(III)为电子受体的能力或潜能。迄今,研究人员已经从各种厌氧环境中分离得到了种类不同的Fe(III)还原微生物,包括活性污泥中的铁还原微生物^[14]。活性污泥中的铁还原微生物与聚磷菌有无关系、聚磷菌能否以Fe(III)为电子受体以及Fe(III)的生物化学协同除磷具体情况如何,至今未见研究报道。

微生物可培养性低的主要生态学原因是细菌共同协作的自然生存方式的崩溃、生境的极度营养化和生态位巨变等。混合培养、稀释培养和模拟自然培养等研究手段和策略,可在不同程度上解决可培养性低的问题。该实验采用稀释培养法从活性污泥中筛选、分离出以Fe(III)为电子受体的高活性聚磷菌,并对其进行生理生化特征、16S rDNA进化分析和厌氧聚磷特性研究,旨在为丰富聚磷菌种、进一步

深入研究聚磷机理和充分发挥Fe(III)的生物化学协同除磷作用以及实现高效低耗的除磷奠定基础。

1 材料

活性污泥取自某城市污水处理厂厌氧段、缺氧段、好氧段各2份,共6份。

2 方法

2.1 培养基

1)牛肉膏蛋白胨液体培养基(L^{-1}):牛肉膏5 g,蛋白胨10 g,pH7.0。

2)LB固体培养基(L^{-1}):NaCl 10 g,酵母粉5 g,蛋白胨10 g,pH7.0。

3)柠檬酸铁液体培养基(L^{-1}):柠檬酸铁3.4 g, NH_4Cl 1 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.07 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.733 g, KH_2PO_4 0.25 g,葡萄糖10 g,pH6.5—7.0。

4)无铁液体培养基(L^{-1}): NH_4Cl 1 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.07 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.733 g, KH_2PO_4 0.25 g,葡萄糖10 g,pH6.5—7.0。

2.2 菌株的分离及纯化

分别取6份活性污泥原液逐级稀释至 10^{-4} ,将稀释后的活性污泥分别加于牛肉膏蛋白胨液体培养基的培养皿中,27℃厌氧静置培养9 h,然后好氧培养15 h(即参照A/O工况驯化培养)。将扩大培养后的菌液分别涂布在LB固体培养基上,重复以上条件驯化培养1 d。挑取单菌落纯化至菌落特征一致,无异常菌落出现者,可认为是单菌落。挑取单一菌落接种到斜面培养基上保存、备用。

2.3 菌株的内聚物染色

将单一菌落分别接种于LB固体平板培养基上,27℃下厌氧培养9 h,进行PHB染色,再好氧培养15 h,进行poly-P染色。将具有双染色特征的菌株接种在甘油管中保存、备用。

2.4 具有还原Fe(III)的聚磷菌株的筛选

活化具有双染色特征的菌株,接种于充满经稀释10倍的柠檬酸铁和无铁液体培养基的试管中,厌氧避光27℃静置培养,观察培养基颜色变化。

2.5 菌株的16S rDNA分析

提取目标菌总DNA,以总DNA为模板扩增其16S rDNA。PCR反应体系(50 μ L):无菌去离子水37.5 μ L,10×Buffer 5.0 μ L, $MgCl_2$ 3 μ L,10mmol/L dNTPs 1.0 μ L,10 μ mol/L引物1(5'-CCGA AT-TCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3') 1.0 μ L,引物2(5'-CCCGGGATCCAA

GCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') 1.0 μL , Taqplus 聚合酶(5 U/ μL)0.5 μL ,模板 DNA 2 μL 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h。PCR 反应产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色后,用紫外分析仪检测。用上海生工的 UNIQ-100DNA 胶纯化试剂盒回收琼脂糖凝胶上的 PCR 产物,用 TaKaRaPMD19-T 载体试剂盒进行连接,转化 E. coli DH5 α 的感受态细胞,然后在含氨苄青霉素 Amp/IPTG/Xgal 的平板上筛选白斑,并进行菌体 PCR 初步检测,再经碱裂解法提取质粒,其产物进行电泳检测。16S rDNA 的测序由上海生工完成。用 BLAST 软件,将测定得到的 16S rDNA 全序列递交于 GenBank,并与 GenBank/EMBL/DDBJ 中的已知序列进行同源性分析。

2.6 厌氧聚磷菌株的聚磷特性研究

活化具有还原 Fe(III)的聚磷菌株,接种于充满经稀释 10 倍的柠檬酸铁液体培养基的试管中,厌氧避光 27 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养,每 5 h 测定培养基中上清液磷浓度、沉淀磷浓度、菌体含磷量、Fe(II)浓度和菌 OD 值。

测定方法参照国家环保总局颁布的标准分析方法。磷采用钼锑抗分光光度法 700 nm 测定;Fe(II)采用邻菲罗啉分光光度法 510 nm 测定;OD 值采用分光光度 600 nm 测定;聚磷菌的菌体含 P 量的测定方法为,取菌悬液以 12 000 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 $^{\circ}\text{C}$ 烘至恒重,称菌体干重。在无菌条件下,取菌液用超声波破碎菌体(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)后,再用过硫酸钾进行消解,按总磷测定方法测菌体含磷量。

3 结果与分析

3.1 菌株的筛选和分离

从 6 份样品中共分离纯化出 36 个形态不同的菌落,经 PHB 染色和 polyP 染色,具有双染色特征即含 PHB 颗粒和异染颗粒的单菌落 8 株,初步判断具有聚磷特征,分别编号为 AP3、AP4、AP5、AP7、AP8、AP9、AP10、AP11。

初选的 8 株聚磷菌经厌氧培养 3 d 后,AP3、AP7、AP11 3 个试管中的颜色变浅,见图 1a,没有编号的试管为无菌对照组;培养 7 d 后,AP3、AP7、AP11 试管中颜色完全变白,见图 1b。已知可溶性 Fe(III)到可溶性 Fe(II)的氧化还原电势(+0.77V)同 O₂ 还原为水的氧化还原电势(+0.82V)很接近,厌氧条件下,不少微生物具有利用 Fe(III)进行呼吸获能的能力。培养基颜色变白表明其中的柠檬酸铁被还原,AP3、AP7、AP11 菌株具有还原 Fe(III)的功能。

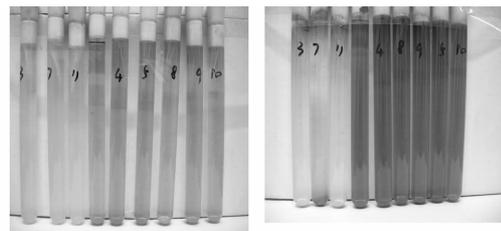


图 1 菌株 AP3 厌氧培养颜色

3.2 菌株 AP3 的 16S rDNA 鉴定

菌株 AP3 序列测定结果的基因登录号为 HM628703。在 GenBank 上用 Blast 程序对菌株进行核苷酸同源性比对,菌株 AP3 与 *Pseudomonas mosselii* ATCCBAA-99^[15] 的同源性为 99%,菌株 AP3 系统发育进化树如图 2。

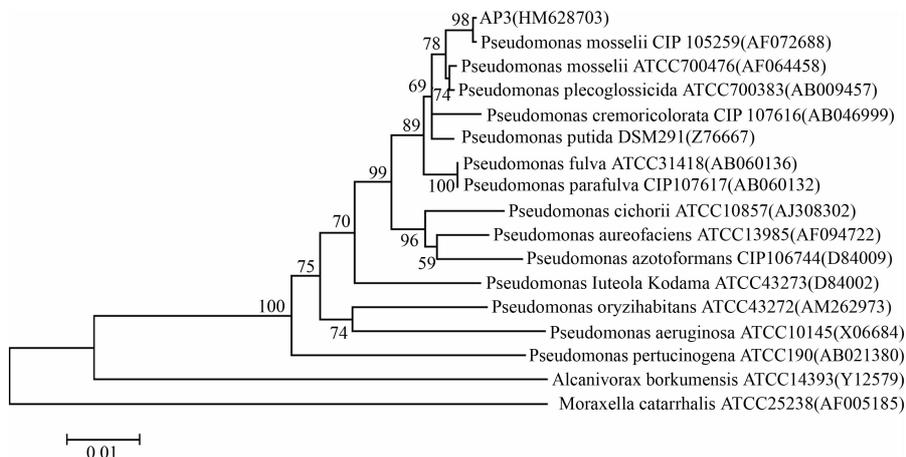


图 2 基于假单胞菌属内 16S rDNA 序列同源性构建的系统发育树

从图2中可以看到菌株AP3与菌株*Pseudomonas mosselii* ATCCBAA-99聚到一起,亲缘关系较近。根据形态观察、生理生化和16S rDNA序列比对确定菌株AP3为*Pseudomonas mosselii*。假单胞菌属是生物除磷的重要功能菌,其好氧聚磷和反硝化聚磷特征也有不少的研究报道。本实验分离假单胞菌属的聚磷菌作为研究对象,具有代表性,旨在为大规模污水处理厂的工程化应用打下良好的基础。

3.3 菌株AP3的厌氧聚磷特性

如图3,菌株AP3在有Fe(III)的培养基中比在无Fe(III)的培养基中生长好。这是由于在厌氧条件下,菌株利用Fe(III)作为呼吸链末端电子受体,氧化体内的基质,进一步转化为其生长发育和功能发挥所需的能量,从而使Fe(III)还原为Fe(II)。如图4,菌株AP3在无Fe(III)的培养基中,表现出典型的厌氧释磷特征,前5h上清液磷浓度逐渐上升,菌内磷浓度逐渐下降,释磷量为 $3.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在有Fe(III)培养基的实验中,菌株AP3先厌氧释磷,上清液磷浓度增加,菌内磷浓度下降,释磷量为 $6.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,释磷量比无Fe(III)的高;10h之后开始厌氧聚磷,上清液磷浓度下降,菌内磷浓度增加,聚磷量为 $5.89 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

如图5所示,在有菌培养基中Fe(II)浓度逐步增加,增加量为 $4.39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在无菌对照组中,Fe(II)浓度较稳定,平均为 $0.51 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此现象表明,Fe(III)作为电子受体,被菌株异化还原为Fe(II)。Fe(II)浓度经历了一个由很缓慢变化到开始明显增长的过程,这与水稻土中铁的微生物还原特征相似,这主要是因为Fe(III)成为厌氧条件下的主要电子受体以及微生物铁还原活性的恢复都需要一定时间,即Fe(III)的异化还原有一个启动期,因此Fe(II)浓度在启动期内只有微弱得增长。本实验中,启动期约10h,菌株AP3此时为厌氧释磷,磷浓度上升。10h之后Fe(III)的异化还原进入快速期,菌株AP3厌氧吸磷,上清液磷浓度下降。该实验中上清液Fe(II)浓度、菌体以及上清液磷浓度的变化规律初步证实了菌株AP3能以Fe(III)为电子受体厌氧吸磷。

两种培养基中均有磷酸盐沉淀,整个培养过程中磷酸盐沉淀略有变化,在有Fe(III)的培养基中磷酸盐沉淀比无Fe(III)的培养基中略多。

已知生物除磷过程中,厌氧释磷是好氧(或缺氧)超量聚磷的基础,释磷速度越快,整体除磷效果也越好。工程应用中厌氧参数的主要控制指标是厌氧池水力停留时间(AHRT),目前AHRT通常根据经验来确定,缺乏更深入的研究。不适当的AHRT设置往往会造生物除磷污水处理厂无法正常运

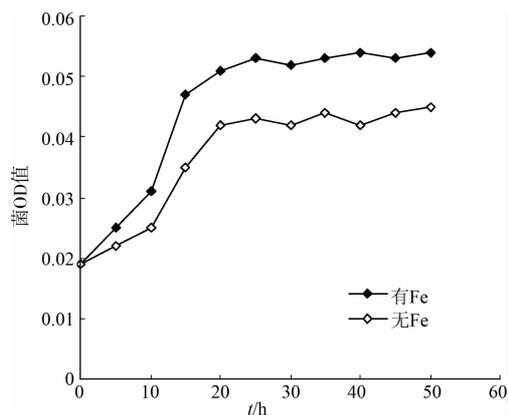


图3 菌OD值曲线

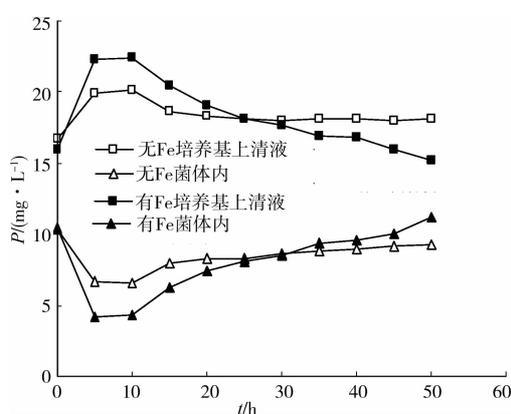


图4 培养基上清液和菌体磷浓度曲线

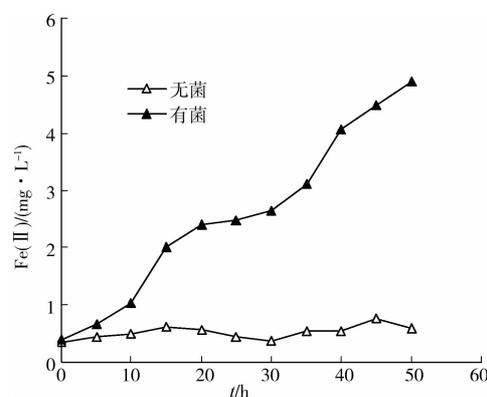


图5 培养基上清液Fe(II)浓度曲线

转,从各地实践和专家来看,仍然是不甚完美的工艺影响污水处理厂脱氮除磷效果。实验表明,Fe(III)促进聚磷菌的生长、厌氧释磷和厌氧聚磷,在厌氧条件下,既有厌氧释磷,又有厌氧吸磷。仅以经验来确定厌氧时间是不够的,建议采用释磷情况的动态监测,根据释磷情况合理分配厌氧、好氧时间,利用这类菌和Fe(III)的协同作用提高除磷脱氮效果。

生化协同除磷时,化学混凝沉淀与生物处理在同一个反应器中进行,化学试剂是否对污水生物处理系统性能产生影响成为国内外相关研究人员关心

的课题。但是,对化学絮凝药剂的投加位点,通常只粗略的研究了前置、同步、后置投加,其中同步沉淀是应用最广泛的,但缺乏对其精确投药位点的研究。因此,可以在该研究基础上更为深入的研究除磷药剂的投加方案,实现节能高效的达标除磷。目前,异化 Fe(Ⅲ)还原及其在污染治理中的作用受到关注^[16],可在该研究基础上开发含铁工业废水再利用,钢铁工业的酸洗废液是重要的 FeCl₃ 和 FeSO₄ 的来源,只要来源稳定、纯度满足要求,就可通过以废治废,大幅度降低除磷费用。

4 结 论

实验分离得到具有厌氧聚磷现象的聚磷菌,根据形态观察、生理生化和 16S rDNA 序列比对确定菌株 AP3 为 *Pseudomonas mosselii*。进一步实验发现:Fe(Ⅲ)促进菌株 AP3 的生长和厌氧释磷,菌株 AP3 能以 Fe(Ⅲ)为电子受体厌氧聚磷。

研究初步揭示了菌株 AP3 能以 Fe(Ⅲ)为电子受体厌氧聚磷的现象,为进一步深入研究生物化学协同除磷和充分利用含铁工业废水实现高效低耗的城市污水处理提供了新的理论依据。

参考文献:

- [1] 傅以钢,戴睿,刘洪波,等. 除磷工艺中含氧条件对聚磷菌种群结构影响研究[J]. 环境科学, 2008, 29(2): 475-481.
FU Yigang, DAI Rui, LIU Hongbo, et al. Influence of community structure of phosphorus removing bacteria under oxygen contain in processes for phosphorus removal [J]. Environmental Science, 2008, 29(2): 475-481.
- [2] 张斌,孙宝盛,季民,等. MBR 中微生物群落结构的演变与分析[J]. 环境科学学报, 2008, 8(11): 2192-2199.
ZHANG Bin, SUN Baosheng, JI MIN, et al. Analysis and succession of microbial community structure in a membrane bioreactor [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2008, 8(11): 2192-2199.
- [3] HU J Y, ONG S L, NG W J, et al. A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacterial by using three different types of electron acceptors [J]. Water Research, 2003, 37(14): 3463-3471.
- [4] Mullan, Mcgrath, Adamson, et al. Pilot-scale evaluation of the application of low pH-inducible polyphosphate accumulation to the biological removal of phosphate from wastewaters [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40: 296-301.
- [5] WANG Y Y, GENG J J, REN Z G, et al. Effect of anaerobic reaction time on denitrifying phosphorus removal and N₂O production [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 5674-5684.
- [6] WANG Y Y, REN Z J, JIANG F, et al. Effect of copper ion on the anaerobic and aerobic metabolism of phosphorus accumulating organisms linked to intracellular storage compounds [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(1): 313-319.
- [7] ZHOU S Q, ZHANG X J, FENG L Y. Effect of different types of electron acceptors on the anoxic phosphorus uptake activity of denitrifying phosphorus removing bacteria Purchase [J]. Biore source Technology, 2010, 101(6): 1603-1610.
- [8] Seviour R J, Mino T, Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27: 99-127.
- [9] Chaudhry V, Nautiyal C S. A high throughput method and culture medium for rapid screening of phosphate accumulating microorganisms Purchase [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8057-8062.
- [10] Carr E L, Kampfer P, Patel B K, et al. Seven Novel Species of Acinetobacter Isolated from Activated Sludge [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(4): 953-963.
- [11] Filali M Y, Auriol M, Tyagi R D, et al. Phosphorus co-precipitation in the biological treatment of slaughter house wastewater in a sequencing batch reactor [J]. Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management, 2005, 9(3): 179-192.
- [12] 王方园,盛贻林. 生物铁强化活性污泥法处理不同性质企业联片废水[J]. 工业水处理, 2006, 26(7): 86-88.
WANG Fangyuan, SHENG Yilin. Treatment of wastewater from different enterprises by biological iron strengthening activated sludge process [J]. Industrial Water Treatment, 2006, 26(7): 86-88.
- [13] Lovley D R. Dissimilatory Fe(Ⅲ)-and Mn(Ⅳ)-Reducing Prokaryotes [J]. Prokaryotes, 2006, 2: 635-658.
- [14] Nielsen J L, Juretschko S, Wagner M, et al. Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers inactivated sludge as assessed by fluorescence in situ hybridization and microautoradiography [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4629-4636.
- [15] Fouad D, Monzer H, Elisabeth S. *Pseudomonas mosselii* sp. nov. a novel species isolated from clinical specimens [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52: 363-376.
- [16] 迟光宇,陈欣,史奕,等. 土壤 Fe(Ⅲ)异化还原的环境效益[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29: 273-277.
CHI Guangyu, CHEN Xin, SHI Yi, et al. Environmental benefits of soil Fe(Ⅲ) dissimilatory reduction [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29: 273-277.