

DOI: 10.11835/j.issn.2096-6717.2022.063



开放科学(资源服务)标识码OSID:



3株高效除磷细菌的分离鉴定及磷去除途径分析

王雨¹, 金鹏康^{1,2}, 任童¹, 石焯², 金鑫²

(1. 西安建筑科技大学环境与市政工程学院, 西安 710055; 2. 西安交通大学人居环境与建筑工程学院, 西安 710049)

摘要:从稳定运行的厌氧/好氧/缺氧序批式反应器(A/O/A-SBR)中筛选分离得到3株高效除磷细菌,通过形态观察、生理生化试验及16S rRNA基因序列分析进行物种分析,确定3株细菌分别为不动杆菌属(*Acinetobacter*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)和肠杆菌属(*Enterobacter*),NCBI保存登录号分别为OL519151、OL519152、OL519153。以pH值、温度及碳源种类作为影响因子,分析细菌生长特性和除磷率,同时分析无机磷和有机磷在细菌胞内、溶解性微生物产物(SMP)及胞外聚合物(EPS)中的分布转化规律。结果表明:在最佳环境条件下,*Acinetobacter* sp. PK01、*Klebsiella* sp. PK02和*Enterobacter* sp. PK03菌株的最高除磷率分别达到89.4%、85.43%和76.95%。其中,*Acinetobacter*对环境中的磷的去除主要依靠吸收胞外无机磷,并以多聚磷酸盐的形式储存于体内,该途径去除了基质中54.93%的磷;*Klebsiella*对环境中的磷的去除主要依靠EPS合成和吸附作用,该途径去除了基质中47.18%的磷;*Enterobacter*主要依靠多聚磷酸盐和EPS的合成作用,去除了基质中48.32%的磷。

关键词:除磷菌;不动杆菌;克雷伯菌;肠杆菌;磷转化分布

中图分类号:X703.1;X172

文献标志码:A

文章编号:2096-6717(2023)03-0196-09

Isolation and identification of three high efficiency polyphosphate-accumulating organism and analysis of phosphorus removal routines

WANG Yu¹, JIN Pengkang^{1,2}, REN Tong¹, SHI Xuan², JIN Xin²

(1. School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, P. R. China; 2. School of Human Settlements and Civil Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, P. R. China)

Abstract: In the present study, three strains of high-efficiency phosphorus removal bacteria were screened and isolated from a stable anaerobic/aerobic/anoxic sequencing batch reactor (A/O/A-SBR). The species were

收稿日期:2022-02-25

基金项目:国家自然科学基金(52070151、51708443);国家重点研发计划(2019YFB2103000);陕西省重点研发计划(2021ZDLSF05-06、2019ZDLNY01-08);陕西省科技创新引领计划(2020CGXNG-021)

作者简介:王雨(1997-),女,主要从事污水微生物处理研究,E-mail:876510091@qq.com。

金鹏康(通信作者),男,教授,博士生导师,E-mail:pkjin@hotmail.com。

Received:2022-02-25

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 52070151, 51708443); National Key R&D Program (No. 2019YFB2103000); Shanxi Provincial Key R&D Program (No. 2021ZDLSF05-06, 2019ZDLNY01-08); Shanxi Provincial Science and Technology Innovation Leading Program (No. 2020CGXNG-021)

Author brief: WANG Yu (1997-), main research interest: sewage microbial treatment, E-mail: 876510091@qq.com.

JIN Pengkang (corresponding author), professor, doctoral supervisor, E-mail: pkjin@hotmail.com.

identified by morphological observation, physiological and biochemical tests and 16S rRNA sequence analysis. The three strains of bacteria were identified as *Acinetobacter*, *Klebsiella* and *Enterobacter*. The NCBI preservation accession numbers were OL519151, OL519152 and OL519153, respectively. The effects of pH value, temperature and the carbon source on cell grow and phosphorus removal were explored. Meanwhile, the distribution and transformation of inorganic phosphorus and organic phosphorus in bacterial cells, soluble microbial products (SMP) and extracellular polymers (EPS) were also investigated. The results show that the highest phosphorus removal efficiency of *Acinetobacter* sp. PK01, *Klebsiella* sp. PK02 and *Enterobacter* sp. PK03 were 89.4%, 85.43% and 76.95%, respectively, based on the optimal condition. The removal of phosphorus from the environment by *Acinetobacter* mainly relied on the absorption of extracellular inorganic phosphorus and stored in the body as polyphosphate, removing 54.93% of phosphorus from the matrix. The removal of phosphorus by *Klebsiella* mainly relied on EPS synthesis and adsorption. This route removed 47.18% of phosphorus from the matrix. *Enterobacter* removed 48.32% of phosphorus, which mainly depend on the synthesis of polyphosphate and EPS.

Keywords: polyphosphate-accumulating organisms; *Acinetobacter*; *Klebsiella*; *Enterobacter*; transformation and distribution of phosphorus

现代污水生物除磷法是利用聚磷菌超量摄取磷酸盐,并以多聚磷酸盐的形式储存在其体内,通过排放剩余污泥以实现磷的去除^[1]。在Greenburg等1955年首次提出活性污泥法除磷之后,1975年Fuhs等^[2]系统性提出了聚磷菌(PAOs)的厌氧释磷-好氧过度摄取磷酸盐生物机制。自此,强化生物除磷(EBPR)工艺的研究得到迅速发展,例如,现有的A/O^[3]、AA/O^[4]、UCT^[5]、Bardenpho^[6]及Phostrip等工艺^[7]。*Candidatus Accumulimonas*和*Candidatus Accumulibacter*一直被认为是污水处理系统中典型的PAOs^[8],Wu等^[9]对23个国家269个污水处理厂活性污泥样本的微生物群落进行了分析,上述两种细菌都被认定为活性污泥微生物群落28个核心物种之一。然而,随着分子生物学研究的进步,研究者已经从活性污泥中筛选得到了多种具有除磷功能的微生物,包括*Acinetobacter*^[10]、*Pseudomonas*^[11]、*Alcaligenes*^[7]、*Tetrasphaera*^[12]等,说明以往的研究可能忽视了其他微生物在活性污泥中对磷的去除作用。

鉴于此,笔者从实验室活性污泥中筛选出3株具备高效除磷能力的细菌,考察环境因素对菌株除磷能力的影响,并对其除磷过程中磷的转化分布规律进行全面分析。

1 试验材料与方法

1.1 样品来源

取稳定运行的实验室厌氧/好氧/缺氧反应器(A/O/A-SBR)中的活性污泥作为样品。反应器

SRT控制在16~20 d,DO<1.0 mg/L,MLSS保持在(3 120±200)mg/L,反应器温度控制在26℃。试验用水为人工配制的模拟生活污水,无水乙酸钠作为碳源,氯化铵作为氮源,磷酸二氢钾作为磷源,维持主要水质指标COD为175 mg/L,TN为50 mg/L,TP为6 mg/L。稳定期出水COD平均为29.06 mg/L,TN为14.32 mg/L,TP为0.27 mg/L。详细运行情况见文献[13]。

1.2 培养基

Luria broth(LB)培养基(L):酵母提取物5 g,胰蛋白胨10 g,NaCl 5 g,pH值为7.0~7.2,固态培养基加20 g琼脂粉^[14]。

富集培养基(L):CH₃COONa 5.0 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,CaCl₂ 0.2 g,(NH₄)₂SO₄ 2.0 g,KH₂PO₄ 8.77~87.74 mg,微量元素1 mL,pH值为7.2~7.4。

筛选培养基(L):牛肉膏3 g,蛋白胨10 g,NaCl 5 g,KH₂PO₄ 65.81 mg,琼脂20 g,pH值为7.2~7.4^[15]。

缺磷培养基(L):CH₃COONa 3.23 g,NH₄Cl 152.80 mg,MgSO₄·7H₂O 81.12 mg,K₂SO₄ 17.83 mg,CaCl₂·2H₂O 11 mg,PIPES缓冲液7 g,微量元素1 mL,pH值为7.2~7.4。

富磷培养基(L):CH₃COONa 3.23 g,NH₄Cl 305.52 mg,MgSO₄·7H₂O 91.26 mg,KH₂PO₄ 87.74 mg,CaCl₂·2H₂O 25.68 mg,PIPES缓冲液8.5 g,微量元素1 mL,pH值为7.2~7.4^[16]。

微量元素(L):CuCl₂·2H₂O 35 mg,NiCl₂·

6H₂O 36 mg, MgSO₄·7H₂O 5 000 mg, FeCl₂·4H₂O 6 000 mg, CoCl₂·4H₂O 880 mg, H₃BO₃ 100 mg, ZnSO₄·7H₂O 100 mg 和 MnCl₂·4H₂O 500 mg^[13]。

1.3 菌种富集与筛选

1.3.1 菌种富集驯化 从 A/O/A-SBR 中取 10 mL 活性污泥转移至装有 90 mL 超纯水和玻璃珠的锥形瓶中,充分振荡以打碎活性污泥。以 8 000 r/min 离心 5 min 后弃掉上清液,用超纯水水洗 3 次。处理后的样品转入装有 100 mL 富集培养基的锥形瓶中,在 30 ℃ 下以 150 r/min 振荡培养。每 12 h 取 10 mL 菌悬液转入新的装有 90 mL 富集培养基的锥形瓶中,培养基磷梯度变化为 2、5、8、10、15、20 mg/L (以 P 浓度计)。

1.3.2 菌种筛选与纯化 取 1 mL 富集培养基中的菌悬液,采用稀释涂布法分别在筛选培养基上培养 3~5 d,挑取形态清晰的单菌落纯化,直至菌落特征一致,无异常菌落出现,最后划线接种至 LB 固体培养基中保存备用。

对各菌株进行除磷率分析:挑取菌种接种至 50 mL LB 培养基中过夜培养,以 8 000 r/min 离心后用超纯水洗涤 3 次,重悬菌种并置于 50 mL 缺磷培养基中预培养,即 30 ℃、150 r/min 培养 12 h。收集菌液在 8 000 r/min 离心后用超纯水洗涤 3 次,重悬菌种并按照 5% 接种至 50 mL 富磷培养基中,在 30 ℃、150 r/min 条件下培养。整个过程在无菌条件下进行,每 2 h 取 2 mL 样品先测定 OD₆₀₀,经过 0.45 μm 滤膜过滤后用于后续磷分析,试验重复 3 次。

1.4 菌株生长特性

1.4.1 菌株的生理生化特性 菌株生理生化特性的鉴定方法参考文献[17]。

1.4.2 菌株生长的环境条件 菌种预培养后按照 5% 接种至 50 mL 富磷培养基中,控制培养条件:pH 值(5、6、7、8、9),温度(20、25、30、35、40 ℃),碳源(乙酸钠、丙酸钠、琥珀酸钠、柠檬酸钠和葡萄糖)。每 4 h 取 2 mL 样品先测定 OD₆₀₀,经过 0.45 μm 滤膜过滤后用于后续磷分析,试验重复 3 次。

1.5 16S rRNA 基因序列的克隆与分析

选取目标菌种,使用 TSINGKE 细菌 DNA 提取试剂盒提取菌株总 DNA,利用细菌菌种鉴定通用引物 27F/1492 R 进行 PCR 扩增,通用引物序列为(27F:5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。提取测序过程全部交由北京擎科生物科技有限公司完成。

测序结果提交至 GenBank,并进行 BLAST 比对,采用 Clustal X 进行多序列比对,使用 MEGA4.1 软件中的 NJ 法构建系统发育树。

1.6 菌株的磷去除途径分析

菌种预培养后按照 5% 接种至 50 mL 富磷培养基中,设置平行培养基共 24 个,pH 值控制在 7.0~7.2,温度控制在 30 ℃,碳源采用乙酸钠。取样:将 50 mL 培养液转移至无菌离心管中,在 4 ℃ 下以 10 000 r/min 离心 10 min,提取上清液测定 COD、乙酸、无机磷(IP)及总磷(TP)。其中,TP 与 IP 浓度差值代表 OP 浓度,IP 浓度代表基质(培养基固定成分)中的 P 浓度(C_{BS-IP}),OP 浓度代表 SMP 中的 P 浓度(C_{SMP-OP})。剩余底物利用 0.01 mol/L NaCl 重悬至 50 mL 后在 60 ℃ 水浴加热 20 min,在 4 ℃ 以 10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液测定 COD 来表征 EPS 的量,并测定 IP 和 TP。这里的 IP 浓度代表 EPS 中 IP 浓度(C_{EPS-IP}),OP 浓度代表 EPS 中 OP 浓度(C_{EPS-OP})。离心底物利用 0.01 mol/L NaCl 重悬至 10 mL 后以 120 W 在超声破碎仪中破碎 10 min,取 1 mL 收集液用于测定 IP 和 TP。这里的 IP 浓度代表细菌胞内 IP 浓度(C_{IN-IP}),OP 浓度代表细菌胞内 OP 浓度(C_{IN-OP})。根据浓度计算培养基中各部分 P 质量变化,各部分 P 质量与培养基中 TP 质量的比值代表了不同途径下的除磷率,从而分析细菌培养过程中 P 的转化分布。培养基中 TP 质量计算式为

$$M_{TP} = M_{BS-IP} + M_{SMP-OP} + M_{EPS-IP} + M_{EPS-OP} + M_{IN-IP} + M_{IN-OP}$$

式中:M_{TP}为培养基中总磷质量;M_{BS-IP}为培养基基质中无机磷质量;M_{SMP-OP}为培养基 SMP 中有机磷质量;M_{EPS-IP}为培养基 EPS 中无机磷质量;M_{EPS-OP}为培养基 EPS 中有机磷质量;M_{IN-IP}为培养基细菌胞内无机磷质量;M_{IN-OP}为培养基细菌胞内有机磷质量。

剩余收集液过 0.45 μm 滤膜后测定细菌干重。上述取样测定过程每 4 h 进行一次,试验重复 3 次。

1.7 分析方法

常规分析采用国标法,IP 分析采用钼锑抗光度法,TP 分析采用过硫酸钾消解钼锑抗光度法,通过 TP 与 IP 的差值测定 OP 的含量^[18-19]。根据之前的研究,COD 被用作表示 SMP 和 EPS 总量的单位,其中 SMP 的量为水体中总 COD 减去乙酸钠的 COD 当量^[13, 20],COD 分析采用快速密闭催化消解分光光度法^[18],乙酸钠通过 HPLC(Japan)和 Aminex HPX-87H 色谱柱进行定量^[21]。利用 Excel 完成 OD₆₀₀ 和除

磷率之间的相关性分析。

2 试验结果与讨论

2.1 菌株的筛选

从筛选培养基中分离得到 6 株不同形态的细菌,分别以 1~6 标记,对这 6 株细菌进行吸磷试验。先将 6 株菌种置于缺磷培养基中进行预培养,目的是先消耗细菌体内的磷酸盐,然后再转接到富磷培养基中,富磷培养基中的磷浓度达到了 20 mg/L 左右(一般生活污水中磷浓度小于 10 mg/L)。所有细菌的除磷率及 OD_{600} 如图 1 所示,可以看出,5 号菌株的除磷率最高,16 h 内除磷率已经达到了 78.89%,24 h 后除磷率达到了 88.22%。其次是 2 号和 6 号,24 h 的除磷率都达到了 75% 以上。

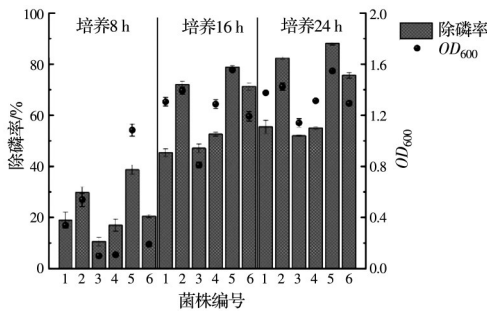


图 1 菌株 1~6 的除磷率和 OD_{600}
 Fig. 1 Phosphorous removal rate and OD_{600} of strains 1-6

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株的生理生化特性 选取除磷率最高的 3 株细菌,分别为 2、5、6 号,根据除磷率分别命名 5 号为 PK01,2 号为 PK02,6 号为 PK03,并对 3 株菌种进行生理生化分析,如表 1 所示。

2.2.2 16S rRNA 基因测序分析 菌株 PK01、PK02 和 PK03 的 16S rRNA 基因扩增片段长分别 1357、1451、1532 bp。通过在 GenBank 中进行 Blast 对比,菌株 PK01 与 *Acinetobacter tandoii* (KU877626.1) 同源性达到了 99%,PK02 与 *Klebsiella pneumoniae* (MN989349.1) 同源性达到了 99%,PK03 与 *Enterobacter cloacae* (KJ541760.1) 同源性达到了 99%。*Acinetobacter*、*Klebsiella* 和 *Enterobacter* 同属于 γ -变形菌纲,但 *Acinetobacter* 属于莫拉菌科,一直被认为是聚磷菌的主要菌属^[22],然而 *Klebsiella* 和 *Enterobacter* 属于肠杆菌科,有关聚磷功能的研究鲜有报道。通过下载与各菌株同源

表 1 细菌 PK01, PK02, PK03 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain PK01, PK02 and PK03

项目	PK01	PK02	PK03
菌落形状	圆形扁平	圆形突起	圆形小突起
菌落颜色	黄色	乳白色	淡黄色
菌落透明度	半透明	半透明	半透明
菌落表面	光滑	光滑	光滑
菌落黏度	较黏	较黏	较黏
细胞形态	杆状	杆状	杆状
氧化酶试验	+	-	-
甲基红试验	+	-	+
V-P 试验	+	+	+
明胶液化试验	+	-	-
柠檬酸盐利用试验	+	+	+
糖发酵试验	+	+	+
硝酸盐还原试验	+	+	+
吲哚试验	+	-	-
淀粉水解试验	-	-	-
产硫化氢试验	+	-	-

性较高的 16S rRNA 基因序列进行 CluserW 聚类分析,使用 MEGA4.0 构建系统发育树,如图 2 所示。根据生理生化分析和 16S rRNA 基因序列比对结果,将 3 株细菌分别命名为 *Acinetobacter* sp. PK01、*Klebsiella* sp. PK02 和 *Enterobacter* sp. PK03。

2.3 菌株除磷环境条件

2.3.1 pH 值对 3 株细菌生长及除磷率的影响 初始 pH 值会影响细胞在培养基中的氧化还原电位和带电状态,从而影响微生物对营养物质的吸收和酶促反应,因此,pH 值的变化会对菌株的除磷效果产生影响^[16]。由图 3 可以看出,菌株 PK01、PK02 和 PK03 都能够在 pH 值为 7~9 的条件下生长,并且具有较好的除磷效果,除磷率与 OD_{600} 的相关系数 R^2 分别为 0.924 3、0.939 2 和 0.966 3,表明 3 种细菌可以较好地适应中性和碱性环境,同时表明,其磷去除效能与生长代谢显著相关。许多研究表明,在有氧吸磷过程中,低 pH 值会抑制磷的吸收、PHA 的利用和生物量的增长,表明较高的 pH 值更有利于 PAOs 的除磷效果^[23-24]。在 pH 值为 7 时,PK01 和 PK03 的平均除磷率分别达到 88.23% 和 75.69%,PK02 的平均除磷率达到了 82.45%,然而,当 pH 值为 8 时,PK02 展示出了更好的磷去除效果,去除率达到了 85.43%。同时,在 pH 值为 6 时 PK01 平均除磷率也达到了 81.56%,说明 PK01 对 pH 值变化的适应性更强。

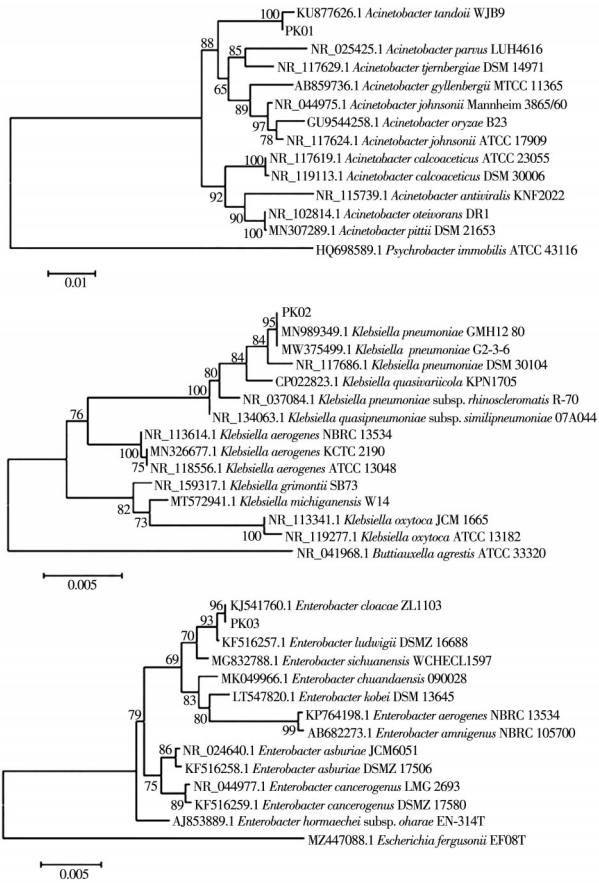


图 2 3 株细菌的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic trees of three strains

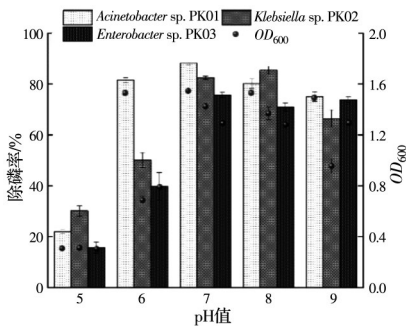


图 3 pH 值对 3 株细菌生长及除磷率的影响

Fig. 3 Effects of pH value on growth and phosphorus removal rate of three strains

2.3.2 温度对 3 株细菌生长及除磷率的影响 生物除磷系统受温度影响十分明显,之前有研究分析了夏季(26.7±1.4)℃、秋季(19.7±2.0)℃和冬季(16.4±0.7)℃ EBPR 系统生物除磷性能的变化,结果表明,随着温度降低,常规 PAOs 的丰度和系统磷去除性能显著提升^[25]。然而,由图 4 可以看出,3 株细菌在 20~40℃ 的除磷率变化基本都呈现出正态分布的规律,在 25℃ 时,PK01 和 PK03 的除磷率达到最高,分别为 89.4% 和 76.95%;在 30℃ 时,

PK02 的除磷率达到最高(82.45%)。PK01 和 PK03 的 OD_{600} 在 20~40℃ 的变化范围较小,分别保持在 1.355~1.553 和 1.293~1.0407,表明在该温度变化范围内 PK01 和 PK03 可以稳定生长。PK02 的生长受温度影响较大, OD_{600} 在 30℃ 达到最高(1.425),在 20℃ 和 40℃ 分别仅达到 0.8853 和 0.713,3 株细菌除磷率与 OD_{600} 的相关系数 R^2 分别达到 0.8952、0.979 和 0.8017,表明温度影响 3 株细菌的生长代谢,从而改变了其除磷率。

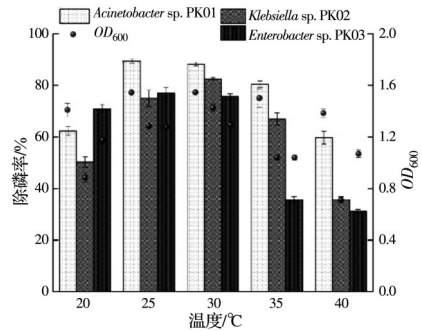


图 4 温度对 3 株细菌生长及除磷率的影响

Fig. 4 Effects of temperature on growth and phosphorus removal rate of three strains

2.3.3 碳源对 3 株细菌生长及除磷率的影响 碳是微生物生长代谢最重要的营养物质,不同类型的碳源组成成分及分解速率并不相同,从而影响聚磷菌的活性。利用乙酸钠、丙酸钠、琥珀酸钠、柠檬酸钠和葡萄糖考察不同碳源对 3 株细菌除磷率的影响。由图 5 可以看出,乙酸钠和丙酸钠都可以作为 3 株除磷细菌的优质碳源,3 株菌的除磷率都达到了 70%,甚至 80% 以上。琥珀酸钠只能被 PK01 和 PK02 有效利用,除磷率分别为 84.21% 和 63.10%。以柠檬酸钠和葡萄糖作为碳源时,PK03 也表现出较好的除磷率,分别达到了 59.75% 和 77.13%。

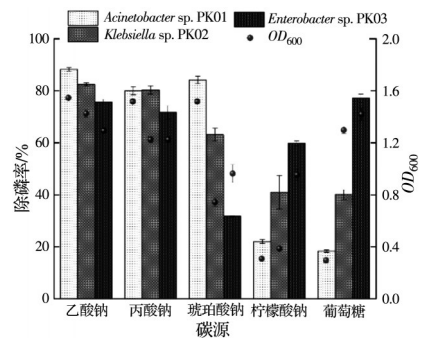


图 5 碳源对 3 株细菌生长及除磷率的影响

Fig. 5 Effects of carbon source on growth and phosphorus removal rate of three strains

2.4 菌株的磷转化途径

2.4.1 菌体、SMP及EPS的产量 通过好氧除磷试验测定分析了3株细菌的磷转化分布过程,图6显示了3株细菌的菌体干重、SMP和EPS浓度的变化。PK01的细菌干重在12 h达到6.05 mg后趋于平稳,PK03的积累速率较为缓慢,但在24 h后仍达到了6.73 mg,PK02表现出更高的积累量,在24 h达到了9.22 mg,说明PK02在同一环境下对外界基质的利用似乎更偏向于细胞合成。3株细菌SMP和EPS的产量变化表现出了相似的增长趋势,24 h时PK01、PK02和PK03的SMP分别达到了34.38、30.8、34.33 mg COD/L,EPS分别达到了81.15、128.84、88.67 mg COD/L。有研究表明,在碳源不足的情况下,EPS会部分水解转化为SMP,而在碳源充足的条件下EPS和SMP浓度持续升高并趋于稳定,且EPS浓度始终高于SMP^[13, 26]。3株细菌EPS的产量自始至终要高于SMP,可能与培养基营养物质充足有关。同时可以发现,PK02的干重和EPS产量要高于PK01和PK03,这也说明PK02将外界基质用于自身合成和代谢的效率要高于其他菌株,符合 *Klebsiella* 菌属共有的特征,其一直以生物膜形成能力而闻名^[27],且该菌属合成分泌EPS的特性与其糖类和高合成代谢相关^[28]。

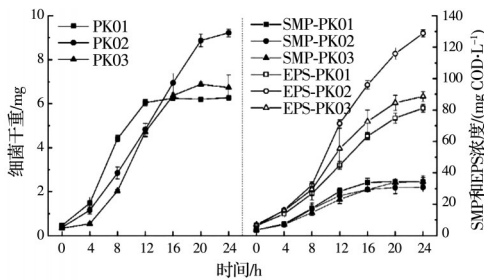


图6 3株细菌的菌体干重、SMP和EPS产量

Fig. 6 Biomass, SMP and EPS production of three strains

2.4.2 磷转化分布 通过测定菌体和环境中的总磷(TP)与无机磷(IP),将培养基中的磷分成培养基中溶解性无机磷(BS-IP)、培养基中溶解性有机磷即SMP中的有机磷(SMP-OP)、细菌胞内无机磷(IN-IP)、细菌胞内有机磷(IN-OP)、EPS中无机磷(EPS-IP)和EPS中有机磷(EPS-OP),24 h磷转化分布如图7~图9所示。在50 mL反应体系中,3株细菌的初始BS-IP分别为0.963 5、0.963 5、0.977 8 mg,分别占体系的98.94%、98.97%、98.49%。

PK01的磷转化分布如图7所示,24 h后BS-IP

总量降低到0.095 5 mg,SMP-OP总量达到了0.018 3 mg,培养基中的总磷大量减少,仅占整个反应体系的11.59%。IN-IP和IN-OP分别增长到0.539 7、0.145 8 mg,胞内无机磷和有机磷分别占整个反应体系的54.93%和14.84%,说明PK01将胞外无机磷吸收到胞内,一部分用于细胞合成代谢,大部分IP作为多聚磷酸盐存在于体内,一般菌体含磷量只有菌体干重的2%,而聚磷菌在增殖过程中可以大量吸收溶解态正磷酸盐,在胞内积累多聚磷酸盐,使磷积累达到细胞干重的6%~8%^[29],而PK01胞内总磷的质量占据细胞干重的11.33%,证明其具有更高效的聚磷能力。EPS-IP和EPS-OP分别增加到0.092、0.091 1 mg,仅占据了反应体系的9.37%和9.27%。

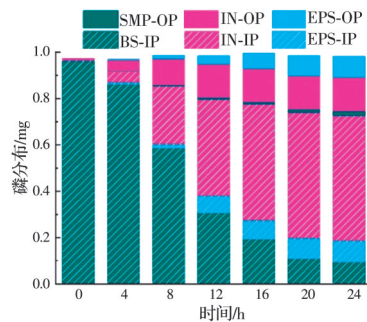


图7 *Acinetobacter* sp. PK01的磷转化分布

Fig. 7 Phosphorus transformation and distribution of *Acinetobacter* sp. PK01

PK02的磷转化分布如图8所示,24 h后BS-IP总量降低到0.145 3 mg,SMP-OP总量达到了0.024 mg,培养基中的TP仅占据整个反应体系的17.16%,虽然基质中的无机磷大量降低,但PK02的胞内磷却远远低于PK01。其中,IN-IP和IN-OP分别达到了0.165 9、0.186 1 mg,占据整个反应体系的16.81%和18.86%,说明与PK01相比,PK02体内无法过量积累多聚磷酸盐,胞内TP的质量仅占据细胞干重的3.82%。EPS-IP和EPS-OP分别达到了0.292 9、0.172 6 mg,说明EPS对水体中IP的吸附作用去除了反应体系中29.68%的磷,EPS对水体TP的去除率为47.18%。近年来大量研究表明,EPS参与了生物除磷过程,明确了EPS具有一定的储磷功能,其不仅含有以细菌细胞分泌物或代谢产物形式存在的OP,同时也含有以高价阳离子沉淀物或络合物形式存在的IP^[30]。而 *Klebsiella* 菌属EPS高产、高絮凝活性的特点有利于其对IP的

吸附作用,因此,PK02的磷去除途径可能更多地依靠EPS的合成及其吸附作用。

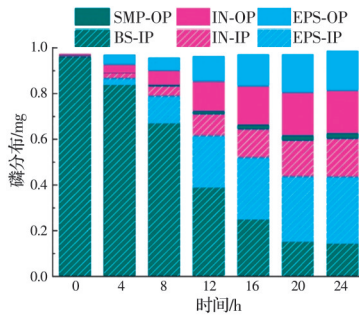


图8 *Klebsiella sp. PK02*的磷转化分布

Fig. 8 Phosphorus transformation and distribution of *Klebsiella sp. PK02*

PK03的磷转化分布如图9所示,24 h后BS-IP总量降低到0.136 5 mg, SMP-OP总量达到了0.101 4 mg,培养基中的TP占据整个反应体系的24.11%,基质中的IP残余量和PK02接近,但SMP中的OP超过了PK02的4倍,且SMP-OP的增长在12 h后尤为明显,说明在对数期生长过程中,即繁殖代谢最旺盛期间,PK03利用了大量的IP合成OP,如磷脂、核酸和活性酶等。而IN-IP和IN-OP分别达到了0.214 4、0.157 7 mg,占整个反应体系的21.73%和15.98%,胞内TP的质量占据了细胞干重的5.53%。EPS-IP和EPS-OP分别达到了0.114 3、0.262 3 mg,说明EPS对于环境中磷去除贡献了38.17%。

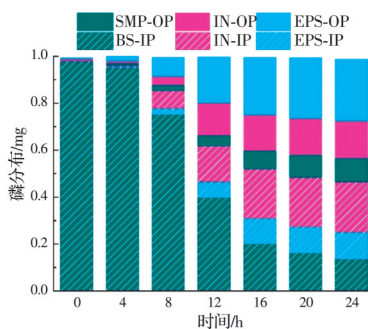


图9 *Enterobacter sp. PK03*的磷转化分布

Fig. 9 Phosphorus transformation and distribution of *Enterobacter sp. PK03*

3 结论

1)从活性污泥中筛选出3株高效除磷细菌PK01、PK02和PK03,通过形态观察、生理生化试验及16S rRNA基因序列分析进行物种鉴定,将3株细

菌命名为 *Acinetobacter sp. PK01*、*Klebsiella sp. PK02* 和 *Enterobacter sp. PK03*,登录号分别为OL519151、OL519152、OL519153。

2) *Acinetobacter sp. PK01*在pH值为6~9和温度为25~35℃时都表现出较好的除磷效果,在pH值为7、温度为25℃时除磷率达到了89.4%; *Klebsiella sp. PK02*和 *Enterobacter sp. PK03*更偏向于在中性偏碱性环境下除磷,在pH值为8、温度为30℃时, *Klebsiella sp. PK02*除磷率达到了85.43%; *Enterobacter sp. PK03*更适应20~30℃的环境,在pH值为7且温度为25℃时,其除磷率达到了76.95%。3株细菌在乙酸钠和丙酸钠作碳源时都表现出较好的除磷率, *Acinetobacter sp. PK01*和 *Enterobacter sp. PK03*分别以琥珀酸钠和葡萄糖为碳源时也表现出较好的除磷效果。

3) *Acinetobacter sp. PK01*对环境中磷的去除主要依靠吸收胞外无机磷存储于体内,24 h后IN-IP占环境总磷的54.93%; *Klebsiella sp. PK02*对环境中磷的去除主要依靠EPS合成和吸附作用,24 h后EPS-IP和EPS-OP占环境总磷的47.18%; *Enterobacter sp. PK03*的EPS-IP和EPS-OP共达到环境总磷的38.17%,而SMP-OP和IN-OP都高于前两种菌。

参考文献

- [1] 邓荣森,郎建,王涛,等.城市污水生物除磷脱氮机理研究探讨[J].重庆建筑大学学报,2002,24(3):106-111. DENG R S, LANG J, WANG T, et al. A study on mechanism of biological denitrification and phosphorus removal for urban wastewater [J]. Journal of Chongqing Jianzhu University, 2002, 24(3): 106-111. (in Chinese)
- [2] FUHS G W, CHEN M. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater [J]. Microbial Ecology, 1975, 2 (2): 119-138.
- [3] 王楠,蔡曼莎,李亚静,等.运行条件对强化生物除磷颗粒污泥系统性能及微生物群落的影响[J].土木与环境工程学报(中英文),2021,43(4):202-210. WANG N, CAI M S, LI Y J, et al. Effect of operation conditions on the performance and microbial community of an enhanced biological phosphorus removal granular sludge system [J]. Journal of Civil and Environmental Engineering, 2021, 43(4): 202-210. (in Chinese)
- [4] 汪昆平,邓荣森,李伟民,等.氧化沟脱氮除磷强化途径[J].重庆建筑大学学报,2006,28(6):79-83. WANG K P, DENG R S, LI W M, et al. Approach to the enhancement of removal of phosphorus and nitrogen

- in oxidation ditch [J]. Journal of Chongqing Jianzhu University, 2006, 28(6): 79-83. (in Chinese)
- [5] 张园, 罗固源, 许晓毅, 等. UCT工艺进水COD浓度与C/N对除磷效果的影响[J]. 环境科学, 2010, 31(8): 1846-1850.
- ZHANG Y, LUO G Y, XU X Y, et al. Effect of the influent COD and C/N ratio on phosphorus removal of UCT system [J]. Environmental Science, 2010, 31(8): 1846-1850. (in Chinese)
- [6] ALMOMANI F, BOHSALE R R. Optimizing nutrient removal of moving bed biofilm reactor process using response surface methodology [J]. Bioresource Technology, 2020, 305: 123059.
- [7] 庄志刚, 韩永和, 章文贤, 等. 高效聚磷菌 *Alcaligenes* sp. ED-12 菌株的分离鉴定及其除磷特性[J]. 环境科学学报, 2014, 34(3): 678-687.
- ZHUANG Z G, HAN Y H, ZHANG W X, et al. Isolation, identification and phosphorus-removal characterization of bacteria *Alcaligenes* sp. strain ED-12 for phosphorus-accumulation [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2014, 34(3): 678-687. (in Chinese)
- [8] FAN Z W, ZENG W, WANG B G, et al. Transcriptional responses of *Candidatus Accumilibacter* clades to environmental dynamics in enhanced biological phosphorus removal [J]. Bioresource Technology, 2020, 306: 123108.
- [9] WU L W, NING D L, ZHANG B, et al. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants [J]. Nature Microbiology, 2019, 4(7): 1183-1195.
- [10] 吴云, 范丙全, 隋新华, 等. 适应非胁迫的高效聚磷菌筛选及聚磷特性研究[J]. 环境科学, 2008, 29(11): 3172-3178.
- WU Y, FAN B Q, SUI X H, et al. Screening of two phenanthrene-utilizing and high-effective phosphorus-accumulating bacteria and their effects on phosphorus-accumulating characteristics [J]. Environmental Science, 2008, 29(11): 3172-3178. (in Chinese)
- [11] 张文艺, 陈晶, 邓文, 等. 反硝化聚磷菌菌剂种子液制备条件及除磷机理[J]. 土木建筑与环境工程, 2014, 36(6): 99-105.
- ZHANG W Y, CHEN J, DENG W, et al. Preparation of denitrifying phosphorus accumulating bacterial seed liquid and analysis of phosphorus removal mechanism [J]. Journal of Civil, Architectural & Environmental Engineering, 2014, 36(6): 99-105. (in Chinese)
- [12] CLOSE K, MARQUES R, CARVALHO V C F, et al. The storage compounds associated with *Tetrasphaera* PAO metabolism and the relationship between diversity and P removal [J]. Water Research, 2021, 204: 117621.
- [13] REN T, CHI Y L, WANG Y, et al. Diversified metabolism makes novel *Thauera* strain highly competitive in low carbon wastewater treatment [J]. Water Research, 2021, 206: 117742.
- [14] 张娟, 方祥位, 刘汉龙, 等. 石油污染土中微生物的分离鉴定及降解特性[J]. 土木与环境工程学报(中英文), 2020, 42(1): 144-152.
- ZHANG J, FANG X W, LIU H L, et al. Isolation, identification and degradation characteristics of microorganisms in petroleum contaminated soil [J]. Journal of Civil and Environmental Engineering, 2020, 42(1): 144-152. (in Chinese)
- [15] 陈亚松, 金文标, 闫韞, 等. 高效聚磷菌的筛选及其应用[J]. 净水技术, 2011, 30(2): 19-22.
- CHEN Y S, JIN W B, YAN Y, et al. Screening and application of high efficient phosphate-accumulating organisms (PAOs) [J]. Water Purification Technology, 2011, 30(2): 19-22. (in Chinese)
- [16] 马放, 杨菲菲, 李昂, 等. 1株高效反硝化聚磷菌的生物学特性研究[J]. 环境科学, 2011, 32(9): 2710-2715.
- MA F, YANG F F, LI A, et al. Biological characteristics of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms [J]. Environmental Science, 2011, 32(9): 2710-2715. (in Chinese)
- [17] 蔡天明, 陈立伟, 吴守中, 等. 1株脱氮除磷菌的筛选及其特性研究[J]. 环境科学, 2010, 31(10): 2487-2492.
- CAI T M, CHEN L W, WU S Z, et al. Selection of denitrifying phosphorus-removing bacteria and its characteristic [J]. Environmental Science, 2010, 31(10): 2487-2492. (in Chinese)
- [18] 欧阳彤, 涂保华, 李乔, 等. 多级AO+潜流湿地对生活污水中的EDCs及常规污染物的去除试验研究[J]. 土木与环境工程学报(中英文), 2020, 42(3): 156-164.
- OUYANG T, TU B H, LI Q, et al. Experimental study on the removal of EDCs and conventional pollutants indomestic sewage by multi-stage AO + subsurface flow constructed wetland [J]. Journal of Civil and Environmental Engineering, 2020, 42(3): 156-164. (in Chinese)
- [19] 翟俊, 李岳. 微曝气强化人工湿地处理生活污水试验研究[J]. 土木与环境工程学报(中英文), 2020, 42(6): 178-184.
- ZHAI J, LI Y. The effects of domestic wastewater treatment by micro-aerated hybrid constructed wetland [J]. Journal of Civil and Environmental Engineering, 2020, 42(6): 178-184. (in Chinese)
- [20] ZHOU Y, NGUYEN B T, ZHOU C, et al. The distribution of phosphorus and its transformations during

- batch growth of *Synechocystis* [J]. *Water Research*, 2017, 122: 355-362.
- [21] RODGERS M, WU G X. Production of polyhydroxybutyrate by activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(3): 1049-1053.
- [22] LI H K, ZHONG Y M, HUANG H, et al. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal by interactions between phosphate accumulating organisms (PAOs) and denitrifying phosphate accumulating organisms (DPAOs) in a sequencing batch reactor [J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 744: 140852.
- [23] WANG D B, ZHENG W, LIAO D X, et al. Effect of initial pH control on biological phosphorus removal induced by the aerobic/extended-idle regime [J]. *Chemosphere*, 2013, 90(8): 2279-2287.
- [24] ZHANG T, LIU Y, FANG H H P. Effect of pH change on the performance and microbial community of enhanced biological phosphate removal process [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 92(2): 173-182.
- [25] YUAN C S, WANG B, PENG Y Z, et al. Simultaneous enhanced biological phosphorus removal and semi-nitritation (EBPR-SN) followed by anammox process treating municipal wastewater at seasonal temperatures: From summer to winter [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 757: 144048.
- [26] LASPIDOU C S, RITTMANN B E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass [J]. *Water Research*, 2002, 36(11): 2711-2720.
- [27] DIXON M, FLINT S, PALMER J, et al. Analysis of culturable and non-culturable bacteria and their potential to form biofilms in a primary treated dairy wastewater system [J]. *Environmental Technology*, 2018, 39(17): 2185-2192.
- [28] YANG J X, WEI W, PI S S, et al. Competitive adsorption of heavy metals by extracellular polymeric substances extracted from *Klebsiella* sp. J1 [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 196: 533-539.
- [29] 李雅婷. 氮磷同化海洋菌-藻共生系统的建立及其在含盐污水处理中的研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- LI Y T. Establishment of nitrogen-phosphorus assimilation marine bacterial-algal mutualistic system and its application in saline sewage treatment [D]. Jinan: Shandong University, 2018. (in Chinese)
- [30] ZHANG H L, FANG W, WANG Y P, et al. Phosphorus removal in an enhanced biological phosphorus removal process: Roles of extracellular polymeric substances [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(20): 11482-11489.

(编辑 黄廷)