

1株高效反硝化聚磷菌的生物学特性研究

马放^{1,2}, 杨菲菲², 李昂¹, 崔潇¹, 张倩³, 姜欣欣¹, 魏利¹, 张晓昕¹

(1. 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090; 2. 辽宁大学环境学院, 沈阳 110036; 3. 武汉大学土木建筑工程学院, 武汉 430072)

摘要: 采用专性培养基, 从稳定运行的 A/O/A SBR 反应器中分离得到 1 株高效的反硝化聚磷菌 Q-hrb05. 菌株 Q-hrb05 的 16S rDNA 序列登录 GenBank, 登录号为 GU214826. 分析了该菌株的胞外聚合物的成分, 探讨了 pH、温度和碳源对菌株的生长及脱氮除磷效能的影响. 结果表明, 菌株 Q-hrb05 为芽孢杆菌, 胞外聚合物以蛋白质为主, 约 $120.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 核酸 $23.05 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 多糖极少且对磷酸盐无明显吸附作用, 对磷的去除主要源于细胞内的吸收. 当 pH 值为 7, 温度为 30°C , 碳源为乙酸钠时, 最利于菌株生长, 且同步脱氮除磷效果最佳. 此时除磷率为 88%, 脱氮率为 81%.

关键词: 生物除磷; 反硝化聚磷菌; 胞外聚合物; pH; 温度; 碳源

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)09-2710-06

Biological Characteristics of Denitrifying Polyphosphate-accumulating Organisms

MA Fang^{1,2}, YANG Fei-fei², LI Ang¹, CUI Xiao¹, ZHANG Qian³, JIANG Xin-xin¹, WEI Li¹, ZHANG Xiao-xin¹

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. School of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 3. School of Civil Engineering, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: A denitrifying phosphate-accumulating organisms (DNPAOs), which was called Q-hrb05, was isolated in the special medium from the anaerobic/aerobic/anoxic SBR reactor. Strain Q-hrb05 was identified by 16SrDNA gene analysis, and the accession number of 16SrDNA gene sequence of strain Q-hrb05 in GenBank was GU214826. Effects of the different pH values, temperature, carbon source of medium on nitrogen and phosphorus removal of strain Q-hrb05 were investigated. The result showed that strain Q-hrb05 belonged to *Bacillus* sp.. Meanwhile, extracellular exopolymers of strain Q-hrb05 was based on protein, about $120.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and it had $23.05 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ nucleic acid, but little polysaccharide. There was no significant adsorption of phosphate. So phosphorus removal was mainly due to intracellular uptake. And when pH value was kept as 7, temperature was kept as 30°C , and carbon source was kept sodium acetate, the highest nitrogen and phosphorus removal efficiency was achieved. Phosphorus uptake rate was averaged at 88%, and the denitrification rate reached 81%.

Key words: biological phosphorus removal; denitrifying polyphosphate-accumulating organisms; EPS; pH; temperature; carbon source

氮和磷的超标排放是造成水体污染和富营养化的主要原因之一^[1,2]. 常规的生化处理工艺对污水中同时存在的 N、P 等营养物只能去除 10% ~ 20%, 大量含磷污水直接排入水体^[3]. 因此, 如何高效、经济的脱氮除磷已经成为水污染防治领域的热点研究方向. 生物法脱氮除磷是近年来研究的重点. 国内外学者不断致力于生物法脱氮除磷工艺的研究, 典型代表有 A/O、A²/O、UCT、五段 Bardenpho、Phostrip 等, 但是大多数污水处理厂经常单凭经验改变工艺参数, 没能从微生物生理生态学的角度来调控工艺.

目前, 在菌种的育选方面, 已经发现了多种不同类型的反硝化菌和聚磷菌^[4]. Kuba 等^[5]在研究中发现, 在厌氧/缺氧交替的运行条件下, 比较容易富集一类兼有反硝化作用和除磷作用的兼性厌氧微生物, 称为反硝化聚磷菌, 简称 DNPAOs. 认为其既能以氧气又能以硝酸盐作为电子受体, 在吸磷的同时

进行反硝化. 从而反硝化聚磷菌的出现导致了反硝化脱氮除磷理论的提出, 这也意味着有希望解决传统除磷脱氮工艺自身无法解决的矛盾, 也将改变传统污水处理工艺“以能耗能”这一事实. 本研究分析了 1 株高效的反硝化聚磷菌的生物学特性, 探讨了菌株的胞外聚合物成分及生物影响因子, 以期反硝化聚磷菌应用于工程实践提供理论依据, 为开发新型生物脱氮工艺提供技术支持.

1 材料与方法

1.1 样品来源

从实验室运行稳定的厌氧/好氧/缺氧 (A/O/

收稿日期: 2010-10-20; 修订日期: 2010-11-17

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2008ZX07202-005); 国家自然科学基金项目 (50778052); 城市水资源与水环境国家重点实验室开放课题项目 (QA200810)

作者简介: 马放 (1963 ~), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: mafang@hit.edu.cn

A) SBR 反应器中取活性污泥作为实验样品. 取样时此反应器运行状态良好, MLSS 保持在 $5\,918\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, 缺氧段结束后排泥. 实验温度保持在 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, 反应器内 pH 值保持在 7.0 ± 0.2 (通过加入 0.5 mol/L 的 HCl 或 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 来调节). 进水 COD 平均为 $250 \sim 300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 平均为 $12 \sim 15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 平均为 $65 \sim 70\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 出水 COD 平均为 $40 \sim 60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 平均为 $2 \sim 7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 平均为 $17 \sim 30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.2 培养基

反硝化培养基^[6]: 柠檬酸钠 5.0 g ; K_2HPO_4 1.0 g ; KH_2PO_4 1.0 g ; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g ; KNO_3 2.0 g ; 琼脂 20 g ; H_2O $1\,000\text{ mL}$; pH 7.2 .

缺磷培养基 ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ $12.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)^[7]: $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.23 g ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 23 mg ; NH_4Cl 152.8 mg ; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 81.12 mg ; K_2SO_4 17.83 mg ; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11 mg ; HEPES buffer 7 g ; 微量元素 2 mL ; H_2O $1\,000\text{ mL}$; pH 7.0 .

富磷培养基 ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ $24.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)^[7]: $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.23 g ; KH_2PO_4 25 mg ; NH_4Cl 305.52 mg ; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 91.26 mg ; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25.68 mg ; PIPES buffer 8.5 g ; 微量元素 2 mL ; H_2O $1\,000\text{ mL}$; pH 7.0 .

硝酸盐还原实验培养基: 牛肉膏 3 g ; 蛋白胨 5 g ; KNO_3 1 g ; H_2O $1\,000\text{ mL}$; pH 7.2 .

1.3 反硝化聚磷菌的分离与筛选

从 SBR 反应器中取 10 mL 活性污泥至装有 90 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中, 充分振荡以打碎活性污泥. 经倍比稀释, 分别在反硝化培养基上采用混匀平板法培养 $2 \sim 3\text{ d}$, 选择合适的稀释梯度 (要求平板上菌落分布均匀, 即菌落数在 $30 \sim 300$), 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, 最后接种到斜面培养基上培养保存以备.

对已分离的各菌株进行吸磷、脱氮实验、硝酸盐还原产气实验及 PHB 颗粒染色辅助检验相结合的方法进行筛选. 其中除磷率的测定方法为: 取斜面菌种, 首先在缺磷的培养基中进行预培养. 培养物在摇床上 30°C , 140 r/min 过夜培养. 将菌体细胞以 $8\,000\text{ r/min}$ 离心, 之后用无菌蒸馏水洗涤菌体细胞, 重新悬浮于富磷培养基中, 整个过程均在无菌条件下进行; 然后装入密闭容器中, 30°C 下摇床中扩大培养, 进行缺氧吸磷实验, 培养 12 h 后, 各取 10 mL 菌液离心, 取澄清的无菌上清液按钼锑抗分光光度法测

定接种后 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 含量的变化. 菌株反硝化效能的测定方法: 取斜面菌种, 在不含乙酸钠的富磷培养基中加入 KNO_3 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$ 浓度为 $82\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 缺氧状态下培养 12 h , 检测培养液中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 浓度变化. $\text{NH}_4^+\text{-N}$: 纳氏试剂光度法; $\text{NO}_3^-\text{-N}$: 麝香草酚分光光度法; $\text{NO}_2^-\text{-N}$: N -(1-萘基)-乙二胺分光光度法.

1.4 菌株生理生化鉴定

菌株生理生化特性的鉴定参照文献[8]方法进行.

1.5 16S rDNA 序列的克隆与测序

采用试剂盒法 (上海华舜生物技术有限公司) 提取菌株 DNA, 利用通用引物 BA101F/BA534R (大连宝生物公司合成) 进行 PCR^[9] 扩增. 通用引物序列为 (BA534R : $5'\text{-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'}$; BA101F : $5'\text{-TGGCGGACGGGTGAGTAA-3'}$). 反应体系及条件见文献[10, 11]. 然后进行连接转化, 最后测序 (由大连宝生物公司完成). 将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行相似性比较. 采用 Clustal X1.8 进行多序列比对, MEGA4.1 软件中的 NJ 法构建进化树.

1.6 菌株的特性研究

1.6.1 菌株胞外聚合物的测定^[12]

胞外聚合物的提取实验: 取 25 mL 的 Q-hrb05 菌液, 利用超声破碎仪, 40 W , 60 s 进行超声破碎. 再把菌液在 $20\,000\text{ r/min}$ 、 4°C 下, 离心 20 min , 收集上清液, 测定蛋白质、多糖及核酸的含量.

蛋白质浓度测定采用 Bradford 试剂盒进行蛋白质含量测定: 取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 样品, 与 $10\text{ }\mu\text{L}$ PBS 混合, 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ Bradford Reagent, 混匀, 室温放置 5 min , 用分光光度计在 595 nm 处读数. 多糖的测定采用苯酚硫酸法: 取 1.0 mL 样品, 与 1.0 mL 蒸馏水混合, 加入质量分数为 6% 的苯酚溶液 1.0 mL 及浓硫酸 5.0 mL , 静止 10 min , 摇匀, 再静止 5 min , 沸水浴加热 25 min 后, 用冷水迅速冷却 5 min , 于 490 nm 测吸光度, 以 2.0 mL 蒸馏水按同样操作显色作为空白. 核酸测定采用紫外分光光度法: 取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 样品, 与 $48\text{ }\mu\text{L}$ TE 溶液混合, 在 260 nm 处读数, 测定其紫外光吸收值 $D_{260\text{ nm}}$, 以 $50\text{ }\mu\text{L}$ TE 溶液作为空白.

1.6.2 生长曲线及脱氮除磷的影响因素

采用光电比浊法, 利用 722 型分光光度计以 D_{600} 值表示. pH 值分别设置为 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 ; 温度分别设置为 20 、 25 、 30 、 35 、 40°C ; 碳源分别设置为乙酸钠、丙酸钠、丁二酸钠、葡萄糖. 将筛选所得的 DNPAOs 活化 18 h , 在每种条件下以 10% 的接种

量接入到含有 KNO_3 (NO_3^- -N浓度为 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的富磷培养基中,恒温、摇床培养 48 h 后,测定各细菌悬浮液的 D_{600} 值及培养基中氮磷的变化.

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与筛选

以厌氧/好氧/缺氧 (A/O/A) SBR 反应器中的活性污泥为实验用泥. 该反应器是新型的脱氮除磷工艺,能够在低碳氮比条件下,同步脱氮除磷,无须投加外碳源,节省运行费用. 从反硝化培养基中分离得到 16 株菌株. 对这 16 株菌进行吸磷率实验,选出吸磷率在 80% 以上的菌株. 再辅助硝酸盐还原产气实验及 PHB (Polyphydroxybutyrate) 颗粒染色实验,选出效果最好的 1 株菌 Q-hrb05. 菌株 Q-hrb05 的 PHB 颗粒染色显示(图 1),菌体内的 PHB 颗粒非常明显. 通常聚磷菌体内 PHB 为细菌细胞内贮存能量的脂质内含物. 它分解产生能量,一部分供聚磷菌正常的生长繁殖,另一部分供其主动吸收环境中的磷合成聚磷^[13].

菌株 Q-hrb05 在富磷培养基中 ($\text{C/N/P} = 105:4:1$) 12 h 内吸磷率已达到 85% (表 1),可见 Q-hrb05 为高效的聚磷菌. 其中,菌株 Q-hrb05 先在缺磷培养

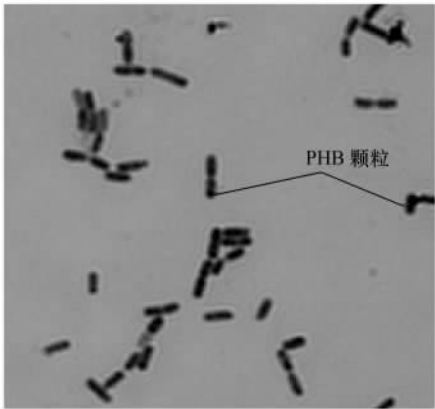


图 1 菌株 Q-hrb05 的 PHB 染色
Fig. 1 Photo of PHB staining strain Q-hrb05

基中培养,目的是先消耗细菌内的磷酸盐,然后再转接到富磷培养基中. 富磷培养基内磷酸盐浓度是缺磷培养基的 2 倍,而生活污水中磷酸盐浓度一般小于 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 低于富磷培养基浓度,可以看出菌株 Q-hrb05 除磷效能较强. 通过硝酸盐还原实验,发现菌株 Q-hrb05 具有明显的反硝化能力. 根据脱氮效能试验可知,菌株 Q-hrb05 属于反硝化菌. 经过 12 h 的缺氧培养,菌株 Q-hrb05 的脱氮效率达到 80.4%. 综上,菌株 Q-hrb05 为高效的反硝化聚磷菌.

表 1 菌株的脱氮除磷效果/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Table 1 Denitrification performance of the strain Q-hrb05/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

菌株	初始浓度				12 h 后浓度			
	$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	$\text{NH}_4^+\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	$\text{NO}_2^-\text{-N}$
Q-hrb05	24	81.31	8.13	0.5	3.6	11.79	3.41	0.15

2.2 菌株的鉴定

对菌株 Q-hrb05 分别进行形态观察和生理生化特性测定. 菌株 Q-hrb05 的原子粒照片如图 2 所示. 由图 2 可以看出,菌体为短杆状,长为 $2.0 \sim 2.2\text{ }\mu\text{m}$,宽为 $1.2\text{ }\mu\text{m}$. 经鉴定,菌株 Q-hrb05 为革兰氏阳性菌,淀粉水解,柠檬酸盐利用呈阳性;接触酶, V-P, 氧化酶,葡萄糖氧化发酵呈阴性. 初步鉴定菌株为芽孢杆菌属. 以菌株 Q-hrb05 总 DNA 为模板,经 PCR 扩增及 16S rDNA 测序,将所测菌株的 16S rDNA 序列通过 BLAST 程序与 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性比较,结果发现其与已知的芽孢杆菌属 *Bacillus cereus* (DQ423486) 的相似性达到 99%,如图 3 所示. 因此经鉴定菌株 Q-hrb05 为芽孢杆菌 *Bacillus* sp. .

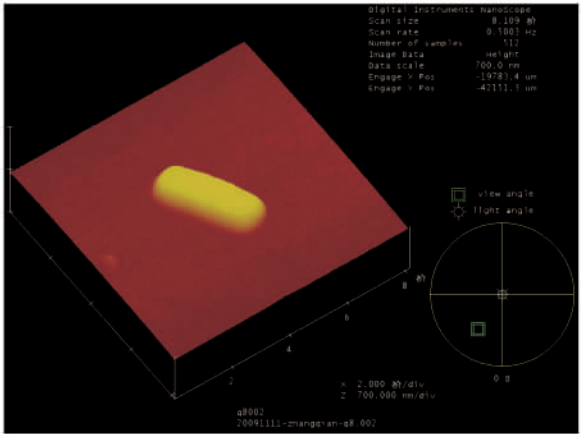


图 2 菌株 Q-hrb05 原子粒照片
Fig. 2 AMF photo of strain Q-hrb05

2.3 菌株 Q-hrb05 的特性

2.3.1 菌株 Q-hrb05 胞外聚合物成分

胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS) 是微生物聚集体的重要组成部分,且其具有

生物吸附作用. 主要包括多糖、蛋白质、核酸、脂类和腐殖酸等成分^[14]. 分析菌株的胞外聚合物成分, 探讨其是否对培养基中 PO_4^{3-} 有去除效果. 通过对菌株 Q-hrb05 胞外聚合物成分分析, 发现该菌株胞外聚合物以蛋白为主, $120.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 核酸 $23.05 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. 多糖含量非常少, 低于检测下线, 不能检测出来. 而多糖物质在生物体的沉降吸附中起重要作用^[15]. 把胞外聚合物按照 1:50 的比例投加到富磷培养基中, 发现 PO_4^{3-} 几乎没有变化, 这一结果证明, 菌株 Q-hrb05 对氮磷的去除主要靠内部的吸收, 很少源于外部胞外聚合物的吸附. 这与以往的文献结论不同^[16]. 聚磷菌胞内吸磷机制为: 当生物体内吸磷时, 菌体内聚合磷酸盐 (polyP) 增加, 而体内的 PHB 含量下降, 混合液中磷浓度下降.

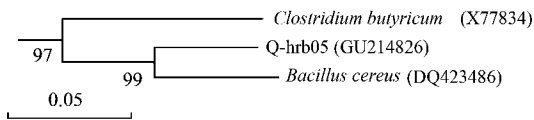


图3 Q-hrb05 同相近序列构建的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain Q-hrb05

2.3.2 pH 值对菌株 Q-hrb05 生长及脱氮除磷效能的影响

菌株 Q-hrb05 投加到含有 KNO_3 (NO_3^- -N 浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的富磷培养基中, 研究在好氧段不同条件下 (pH 值、碳源及 C/N) 对菌株同步脱氮脱氮除磷效果的影响. 由于菌株从 A/O/A SBR 反应器中分离筛选出来, 其经过厌氧/好氧/缺氧交替的运行环境, 因此菌株可利用硝态氮和氧气同时最为电子受体进行协同呼吸, 达到同步脱氮除磷的效果.

pH 值的变化对菌株脱氮除磷产生较大的影响. 原因是初始 pH 值影响细胞在培养基中的带电状态和氧化还原电位, 从而影响微生物对营养物质的吸收和酶反应. Hesselmn 等^[17] 认为 pH 直接影响乙酸运输过程中对能量的需求, 且 pH 与代谢密切相关, 直接反映生物体内聚磷和糖原的浓度. 由图 4 可以看出, 菌株 Q-hrb05 能在 pH 值为 6~9 的条件下生长, 说明此菌株对 pH 变化适应性较强, 易于在环境中生存. 在 pH 值为 7 时, 脱氮除磷效能最佳, 除磷率为 85%, 脱氮率为 80%. 当 pH 为 9 时, 除磷率依然保持在 74% 左右, 同时还发现菌悬液中有磷酸盐沉淀物出现. 因此, 此时除磷率高可能是由于磷酸盐的析出而造成的假象^[18]. 这也验证了早期结论, 即反硝化聚磷菌在兼氧段, 脱氮除磷最适宜的 pH 值

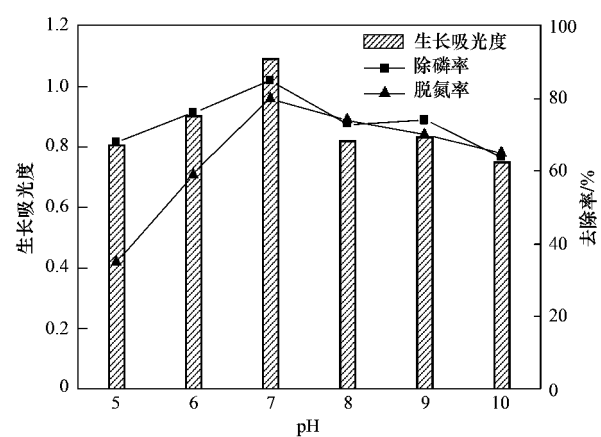


图4 pH 对菌株 Q-hrb05 的生长及脱氮除磷效能的影响
Fig. 4 Effects of pH on growth and nitrogen and phosphorus removal rate of strain Q-hrb05

为中性^[19].
2.3.3 温度对菌株 Q-hrb05 生长及脱氮除磷效能的影响

由图 5 可知, 在 20~40℃ 的温度范围内, 菌株 Q-hrb05 生长吸光度及脱氮除磷率呈简单的正态分布, 这表明菌株脱氮除磷效能与生长代谢呈正相关. 菌株 Q-hrb05 在 20~35℃ 温度范围内能良好生长, 在 30℃ 时, 脱氮除磷效果最佳, 此时除磷率为 86%, 脱氮率为 81%. 温度过高或过低都影响其对氮磷的去除效果.

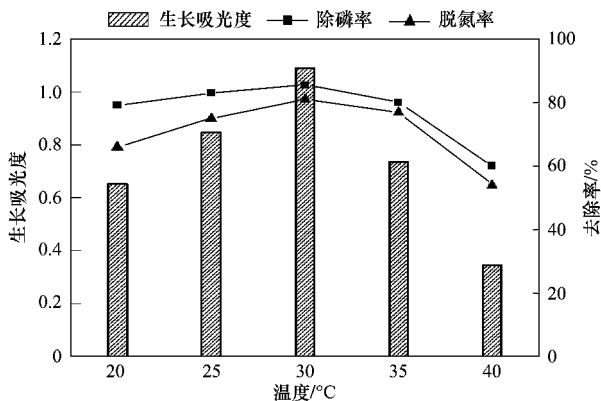


图5 温度对菌株 Q-hrb05 的生长及脱氮除磷效能的影响
Fig. 5 Effects of temperature on growth and nitrogen and phosphorus removal rate

2.3.4 不同碳源种类对菌株 Q-hrb05 生长及脱氮除磷效能的影响

早期研究表明, 一些菌种在硝酸根和氧的条件下都能吸磷, 但必须有外碳源的参与^[20]. 这些菌种在厌氧阶段能迅速吸收短链挥发性脂肪酸, 而这些

被吸收的有机物不是用来维持细胞的生长而是以 poly-p-hydrxoyaklnaoaets (PHA) 的形式贮存于生物体中. PHA 的化学结构组成主要取决于原水中有机底物的种类. 如果培养基中用乙酸盐作为碳源, PHA 以 poly-p-hydroxybutyrate (PHB) 为主; 如果用丙酸盐为碳源, 则以 poly-p-hydrxoyvalerate (PHV) 为主^[21]. 由图 6 可以看出, 当碳源为乙酸钠时, 脱氮除磷效果最佳, 除磷率为 88%, 脱氮率为 85%. 其次依次为丙酸钠, 丁二酸钠和葡萄糖. 这是由于活性污泥中细胞吸收乙酸时不依靠主动运输, 而是靠被动运输或是扩散作用, 不需要消耗能量. 从图 6 中还可以看出, 以葡萄糖为碳源时, 菌株生长及脱氮除磷效果最差, 原因可能为葡萄糖为底物时最不利于菌株 Q-hrb05 的吸收, 以致在厌氧环境下不能贮存糖原, 从而无法转化成 PHA. 这与以往实验结果相同, 当以葡萄糖为单一碳源时, 会导致除磷系统的失败^[22, 23]. 而此时以葡萄糖为碳源时, 除磷率高于脱氮率, 原因可能是由于培养基中还存有一部分溶解氧, 使初始吸磷时的电子受体是 O₂, 而不是 NO₃⁻.

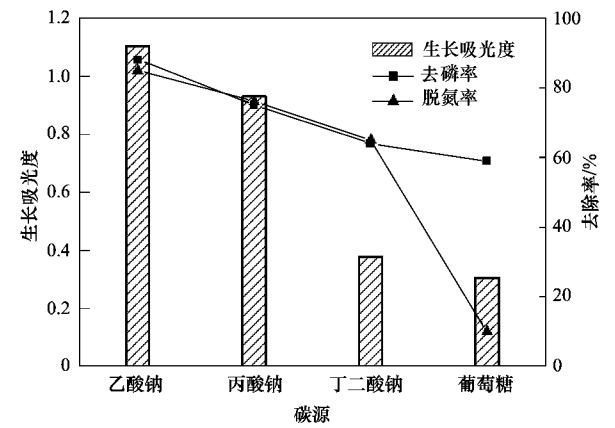


图 6 碳源对菌株 Q-hrb05 的生长及脱氮除磷效能的影响
Fig. 6 Effects of carbon source on growth and nitrogen and phosphorus removal rate of strain Q-hrb05

3 结论

(1) 通过 poly-P 染色实验、吸磷实验、硝酸盐还原产气及脱氮效能实验相结合的方法, 筛选得到 1 株高效的反硝化聚磷菌 Q-hrb05. 菌株 Q-hrb05 的 16S rDNA 基因序列 (GU214826) 与已知的芽孢杆菌属 *Bacillus cereus* (DQ423486) 的相似性最高, 达到 99%, 结合菌株 Q-hrb05 的生理生化鉴定结果, 确定其为芽孢杆菌属.

(2) 菌株 Q-hrb05 脱氮除磷效果良好, 在 12 h

吸磷率达到 85%, 脱氮率达到 81%. 该菌株胞外聚合物主要成分为蛋白, 多糖成分很少, 确定菌株 Q-hrb05 对氮磷的去除主要靠细胞内部的吸收, 很少源于胞外聚合物的黏附作用.

(3) 菌株 Q-hrb05 对 pH 值的耐受范围较广, 其脱氮除磷的最适宜 pH 值为 7. 菌株对温度的适应范围在 20 ~ 35℃ 之间, 脱氮除磷的最适宜温度为 30℃. 当碳源为乙酸钠时, 菌株的生长及脱氮除磷效能最佳. 当以葡萄糖为碳源时, 菌株除磷效果最差. 当 pH 值为 7, 温度为 30℃, 碳源为乙酸钠时, 菌株除磷率为 88%, 脱氮率为 81%.

参考文献:

[1] Gillor O, Hadas O R A, Post A F, *et al.* Phosphorus and nitrogen in a monomictic freshwater lake: employing cyanobacterial bioreporters to gain new insights into nutrient bioavailability[J]. *Freshwater Biology* 2010, **55** (6): 1182-1190.

[2] Shields Jr F D, Testa III S, Cooper C M. Nitrogen and phosphorus levels in the Yazoo River Basin, Mississippi [J]. *Ecohydrology*, 2009, **3** (2): 207-208.

[3] Lindrea K C, Seviour R J. Activated sludge-the process [J]. *Encyclo Paedia of Environmental Microbiology*, 2004, **2**(1):74-81.

[4] 王琳, 李季, 康文力, 等. 河流沉积物中反硝化细菌的分离及脱氮除磷研究 [J]. *环境科学*, 2009, **30**(1):92-95.

[5] Kuba T, Smolder G, Loosdrecht M C M, *et al.* Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor [J]. *Water Science and Technology*, 1993, **27**(5-6):241-252.

[6] 王春丽, 马放, 王强, 等. 一株耐低温反硝化聚磷菌的筛选及其特性研究 [J]. *环境工程学报*, 2007, **4**(1):21-24.

[7] Merzouki M, Delgenès J P, Bernet N, *et al.* Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria osolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors [J]. *Current Microbiology*, 1999, **38**(1):9-17.

[8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 370-398.

[9] Guan L L, Hagen K E, Tannock G W, *et al.* Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gelelectrophoresis and amplified ribosomal DNA restrictionanalysis [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(11):6750-6757.

[10] Freitag T E, Prosser J I. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(3):1359-1371.

[11] 王弘宇, 马放, 杨开, 等. 两株异养硝化细菌的氨氮去除特性 [J]. *中国环境科学*, 2009, **29**(1):47-52.

[12] 刘亚男, 薛罡, 于水利, 等. 胞外聚合物对生物除磷效果影响的研究 [J]. *中国给水排水*, 2006, **22**(1):119-123.

[13] Mejía M Á, Segura D, Espín G, *et al.* Two-stage fermentation process for alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutant

altered in poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthesis [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, **108**(1) : 55-61.

[14] 高景峰, 陈冉妮, 苏凯, 等. 同步脱氮除磷好氧颗粒污泥形成与反应机制的研究 [J]. 环境科学, 2010, **31**(4) : 1022-1029.

[15] Liao B Q, Allen D G, Droppo I G, *et al.* Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settle ability [J]. Water Research, 2001, **35**(1) : 339-350.

[16] 刘亚男, 薛罡, 于水利, 等. 胞外聚合物对生物除磷效果影响的研究 [J]. 中国给水排水, 2006, **22**(1) : 119-123.

[17] Hesselmann R P X, VonRummel R, Resnicketal S M, *et al.* Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal [J]. Water Research Performing, 2005, **34**(14) : 3487-3494.

[18] 任南琪, 陈鸣歧. pH 值对反硝化除磷的影响 [J]. 黑龙江科技学院学报, 2004, **14**(5) : 284-286.

[19] 李明, 黄民生, 谢冰. A²/O 工艺的影响因素研究 [J]. 上海化工, 2007, **32**(12) : 1-4.

[20] Barakand Y, Van Rijn J. Atypical polyphosphate accumulation by the denitriyfung bacterium *Paracoccus denitrificans* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, **66**(1) : 1209-1212.

[21] Serafim L S, Lemos P C, Levantesietal C, *et al.* Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms [J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, **51**(1) : 1-18.

[22] Cech J S, Hartman P. Glucose induced break down of enhanced biological phosphate removal [J]. Environment and Technology, 1990, **11**(1) : 651-656.

[23] Cech J S, Hartman P. Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria enhanced biological phosphate removal systems [J]. Water Research, 1993, **27**(2) : 12219-12257.