

宋小敏,唐婉莹,韩士群. 除磷菌筛选及除磷效果和磷去向分析[J].江苏农业学报,2016,32(2):362-367.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.020

除磷菌筛选及除磷效果和磷去向分析

宋小敏¹, 唐婉莹¹, 韩士群²

(1.南京理工大学化工学院,江苏 南京 210094; 2.江苏省农业科学院农业资源与环境研究所,江苏 南京 210014)

摘要: 为了对微生物在除磷效果及磷的去向方面进行研究,采用蓝白斑筛选法筛选出除磷菌株 JS35,测试了菌株接种量、振荡搅拌速度、pH 值、温度等因素对该菌株生长特性的影响;通过设计正交试验,研究了菌株 JS35 对总磷(TP)、正磷酸盐的最佳去除条件和效果;同时通过分析除磷菌细胞内外的磷含量以及产磷化氢量,探讨了除磷菌的除磷机理。结果表明,最佳总磷去除条件为 TP 浓度 2.0 mg/L、pH 5.0、15 ℃,除磷率为 80.43%;正磷酸盐最佳去除条件为 TP 浓度 2.0 mg/L、pH 9.0、30 ℃,去除率为 79.61%。胞内磷含量占生物除磷总量的 72.1%,胞外磷含量占生物除磷总量的 5.5%,磷化氢气体含量占生物除磷总量的 6.8%。

关键词: 除磷菌; 除磷效果; 磷去向

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2016)02-0362-06

Effects and screening of dephosphorization bacteria on phosphorus removal and the whereabouts of phosphorus

SONG Xiao-min¹, TANG Wan-ying¹, HAN Shi-qun²

(1.Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China; 2.Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To study the dephosphorization efficiencies of bacteria and the transportation of phosphorus, a blue-white screening method was applied to pick up dephosphorization bacterium JS35 by investigating the effects of bacterium inoculum size, stirring speed, pH and temperature on the growth of the bacterium. An orthogonal experiment was conducted to identify the optimal conditions for JS35 to remove total phosphorus(TP) and orthophosphate and its effectiveness. The results showed that the removal efficiency of TP achieved 80.43% under the condition of TP concentration at 2.0 mg/L, pH value at 5.0, and 15 ℃ of working temperature, and the removal efficiency of orthophosphate reached 79.61% under the condition of TP concentration at 2.0 mg/L, pH value at 9.0, and working temperature at 30 ℃. Intracellular TP content, extracellular TP content and hydrogen phosphide gas content accounted for 72.1%, 5.5% and 6.8%, respectively, of the total biological phosphorus removal.

Key words: dephosphorization bacterium; phosphorus removal effectiveness; phosphorus whereabouts

收稿日期:2015-08-11

基金项目:国家水专项巢湖项目(2012ZX07103-005)

作者简介:宋小敏(1990-),女,江苏连云港人,硕士,主要从事富营养化水体中磷元素的研究。(E-mail) song112030427@163.com

通讯作者:韩士群,(E-mail) shqunh@126.com;唐婉莹,(E-mail) 58804212@qq.com

磷是中国绝大多数河流、湖泊或水库富营养化的限制性元素。随着水体富营养化问题的日趋严重^[1-2],如何去磷,在污水处理和富营养化水体治理过程中越来越受到重视。

目前采用的除磷方法有3种:第1是物理法,该方法除磷效果较好,但只适用于处理流量小的河水;第2是化学法,该方法除磷率较高,一般可达75%~

85%,除磷效果也比较稳定,却容易造成二次污染,不适用于大规模除磷;第3是生物法除磷,此方法效率高,运行成本低,污泥产量小,对环境副作用也小^[3-5]。生物除磷系统中除磷生物主要包括植物、动物以及微生物。除磷微生物主要为聚磷菌(PAOs),虽然目前对此类菌株的研究较多,但对其除磷的机理并未有统一的结论。通常认为PAOs能够在厌氧状态下释放磷,贮存多羟基烷酸(PHA);好氧状态下过量摄入磷,消耗PHA。微生物通过胞内磷和胞外磷2种主要途径去除磷,除此之外,研究人员还发现微生物能够以释放磷化氢气体的方式去除磷。周康群等^[6]发现一株异养型厌氧除磷菌能够产生磷化氢气体。牛晓君^[7]研究发现湖泊沉积物中微生物的数量和磷化氢的产量存在一定关系。

本试验从池塘底泥中分离、筛选除磷菌,并对其生长性能以及除磷特性进行研究,探讨除磷机制,为除磷菌大规模应用于富营养化水体治理打下基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 分离除磷菌的样品来源 江苏省农业科学院3号塘底泥。

1.1.2 培养基 富集培养基:蛋白胨10.0 g,葡萄糖1.0 g,NaCl 1.0 g,K₂HPO₄ 1.0 g,蒸馏水1 000 ml,pH7.0。YG培养基:酵母浸出物1.0 g,葡萄糖1.0 g,MgSO₄ 0.4 g,蒸馏水1 000 ml,pH值7.0。牛肉膏蛋白胨培养基:蛋白胨10 g,牛肉膏3 g,NaCl 5 g,蒸馏水1 000 ml,pH值7.0。蓝白斑筛选培养基:参照文献^{[8]~[11]}配制。限磷培养基:取25 ml蓝白斑筛选培养基、0.008 7 g K₂HPO₄和200 ml水,加入三角瓶中混匀;过磷培养基:取25 ml蓝白斑筛选培养基、0.173 0 g K₂HPO₄和200 ml水,加入三角瓶中混匀。以上液体培养基中加入18 g/L琼脂即为固体培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株分离及培养 对样品进行富集培养,稀释梯度驯化,平板涂布分离以及平板划线纯化得到纯化菌株^[12-15]。将纯化的菌株分别接种于限磷培养基和过磷培养基中,于30℃、140 r/min摇床培养48 h,进行除磷菌初筛,在限磷培养基和过磷培养基中均显蓝色的菌株为除磷菌。将初筛得到的除磷菌活化,按1%接种量接种活化液于YG液体培养基

中,30℃、140 r/min摇床培养24 h。培养得到的液体在4℃、6 000 r/min下离心10 min,取上清液测总磷(TP)的浓度,计算除磷率。

1.2.2 菌株染色试验与除磷稳定性测定 将筛选到的菌株进行革兰氏染色试验和阿尔伯特(Ablert)染色试验^[12-15]。将初筛得到的除磷菌活化,按1%接种量接种活化液于YG液体培养基中,30℃、140 r/min摇床培养。每隔24 h将培养得到的液体在4℃、6 000 r/min下离心10 min,取上清液测TP浓度,计算除磷率。连续监测7 d。

1.2.3 菌株除磷的正交试验 对废水的TP浓度(0.2 mg/L、2.0 mg/L、4.0 mg/L)、pH值(5.0、7.0、9.0)、温度(15℃、30℃、40℃)3个因素,分别设置3水平进行正交试验,采用L₉(3⁴)正交试验表。

1.2.4 总磷及正磷酸盐含量的测量 采用钼锑分光光度法测定总磷及正磷酸盐含量^[16]。

1.2.5 磷化氢的收集及其含量测定 对除磷菌菌株进行厌氧6 h、好氧18 h交替培养,培养72 h。用1% H₂O₂和3 mol/L H₂SO₄按1:1比例配制的液体作为一级吸收液,0.05 mol/L KMnO₄为二级吸收液。用碱液将吸收液的pH值调至中性,取适量的液体进行比色测定,测定方法同方法1.2.4中总磷的钼锑分光光度法一致。

1.2.6 除磷率的计算及数据处理 除磷率(R)的计算公式: $R = [(A_{TP} - B_{TP}) / A_{TP}] \times 100\%$,式中,A_{TP}表示接种前培养液中的TP浓度(mg/L),B_{TP}表示接种培养一段时间后培养基上清液中的TP浓度(mg/L)。所有数值都扣除空白对照后进行统计分析。数据均用Origin8.0和SPSS19.0软件进行处理。

2 结 果

2.1 除磷菌菌株的筛选

通过初步分离纯化和蓝白斑筛选得到目的菌株,在缺磷培养基和富磷培养基中均呈蓝色。再经除磷率重复筛选得到除磷率较高的一株菌株JS35。菌株JS35菌落呈白色、圆形、边缘平整。革兰氏染色试验结果表明,该菌株为短杆状、阴性菌。阿尔伯特染色试验结果显示,菌体呈蓝绿色,异染颗粒即多聚磷酸盐呈现黑色。

2.2 菌株JS35的生长特性

2.2.1 菌株JS35的生长曲线 由图1可见,0~4 h

为菌落的生长迟缓期,4~16 h 为对数生长期,16~32 h 为稳定期,32 h 以后为衰亡期。在对数生长期,菌株生长速率最大。菌株稳定期较长,大约 16 h,其中培养 24 h 时 OD 值最大,为 0.813。因此,选择 24 h 为该菌的最佳培养时间。

2.2.2 接种量对菌株生长的影响 接种量是指在进行菌株培养时,先前培养的菌株活化液占培养液的比例。一般而言,如果接种量少,则一定时间后菌株生长量也少。在接种量为 6% 时,菌株 JS35 培养液的 OD₆₀₀ 值达到最大,为 0.550(图 2)。所以在接下来的试验中,菌株 JS35 的接种量确定为 6%。

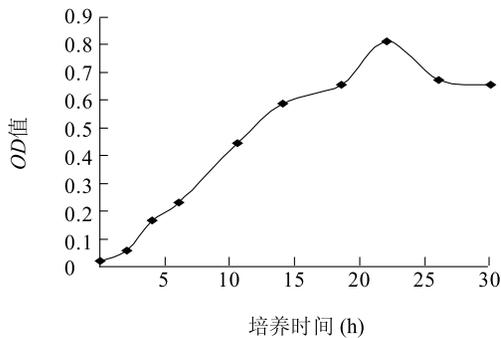


图1 菌株 JS35 的生长曲线
Fig.1 Growth curve of strain JS35

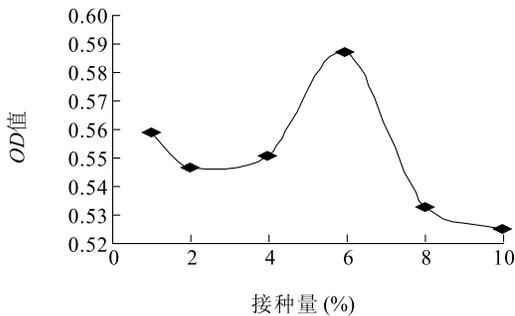


图2 接种量对菌株 JS35 生长的影响
Fig.2 Effect of inoculation size on the growth of strain JS35

2.2.3 摇床转速对菌株生长的影响 在设置的摇床转速 (50~250 r/min) 范围内,随着转速的增加,菌株 JS35 培养液 OD 值也增加(图 3),即转速的增加有利于该菌株的生长。

2.2.4 pH 值对菌株生长的影响 pH 值是微生物生长的一个重要因素。菌株 JS35 适宜的生长 pH 值范围为 5~8,偏中性。在最佳生长范围内,菌株 JS35 培养液 OD 值达 0.698 5(图 4)。

2.2.5 温度对菌株生长的影响 温度对生物的代谢具有重要影响,因为温度能够影响酶的活性,所以温度对菌株的生长有一定影响。菌株 JS35 在 20~30 ℃ 生长状况较好,高温不利于菌株 JS35 的生长(图 5)。

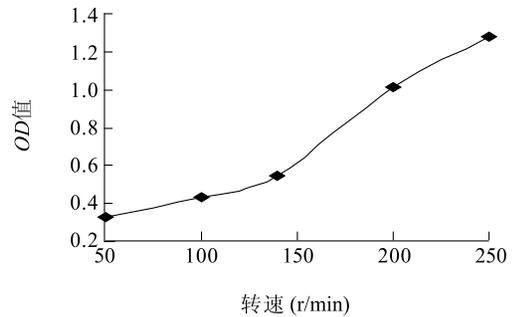


图3 转速对菌株 JS35 生长的影响
Fig.3 Effect of speed of shaker on the growth of strain JS35

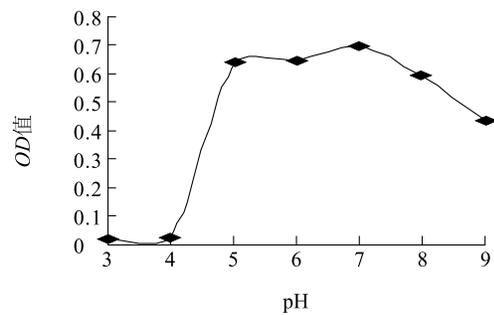


图4 pH 值对菌株 JS35 生长的影响
Fig.4 Effect of pH on the growth of strain JS35

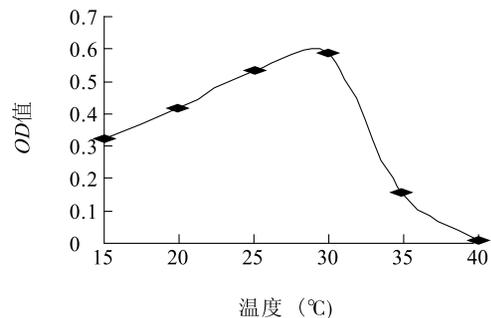


图5 温度对菌株 JS35 生长的影响
Fig.5 Effect of temperature on the growth of strain JS35

2.3 菌株 JS35 的除磷效果

2.3.1 对总磷的去除 设定总磷(TP)浓度、pH 值、温度 3 个因素条件,按 L₉(3⁴) 正交试验表的设计进行正交试验。结果(表 1)显示,在 TP 浓度较小(0.2

mg/L)时,菌株 JS35 出现释磷现象,导致水体 TP 浓度增加;在高温条件(40 ℃)下,同样出现水体 TP 浓度增加现象,表明高温不利于菌株 JS35 的生长,从而影响菌株的除磷率。在总磷去除方面,各因素存在显著差异 ($P < 0.05$),其影响水平大小依次为温度 > 总磷(TP)浓度 > pH 值。通过均值分析得到最佳试验条件为:TP 浓度 2.0 mg/L,pH 值 5.0,温度 15 ℃。

表 1 菌株 JS35 的总磷 (TP) 去除正交试验结果

Table 1 The orthogonal test for total phosphorus (TP) removal by strain JS35

试验号	TP 浓度 (mg/L)	pH 值	温度 (℃)	去除率 (%)
1	0.2	5	15	29.70
2	0.2	7	30	7.84
3	0.2	9	40	-98.59
4	2	5	30	60.26
5	2	7	40	5.01
6	2	9	15	76.21
7	4	5	40	-9.54
8	4	7	15	63.95
9	4	9	30	74.00
K1	-61.05	80.42	168.86	
K2	141.48	76.80	142.10	
K3	128.41	51.62	-103.12	
R	63.15	9.60	90.99	

在上述正交试验得到的最佳条件基础上,研究菌株 JS35 的 24 h 除磷特性。结果(图 6、图 7)显示,在 0~20 h 内,菌株除磷能力增加,水体 TP 含量下降,除磷率增加;在 20~24 h 内,菌株 JS35 的除磷率趋于稳定,除磷率为 80.43%,水体 TP 含量由 2.000 0 mg/L 下降到 0.380 7 mg/L;随着时间的增加,菌株 JS35 培养液的 OD 值增加,即菌株总量增加,除磷量也同时增加,在 24 h 时,菌株 JS35 生长 OD 值为 0.166。在 1~4 d 内菌株 JS35 的除磷率缓慢上升,在 5~8 d 内缓慢下降,最大值在第 4 d,除磷率为 94.31%,水体 TP 浓度下降到 0.097 64 mg/L(图 8)。

2.3.2 对正磷酸盐的去除 设定 TP 浓度、pH 值、温度 3 个因素条件,按 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计的正交试验研究菌株 JS35 对正磷酸盐的去除效果。结果(表 2)表明,在 pH 值 < 9 时,水体出现 $PO_4^{3-}-P$ 浓度增加现象。在 30℃ 时,菌株 JS35 具有较好的除磷能力。在

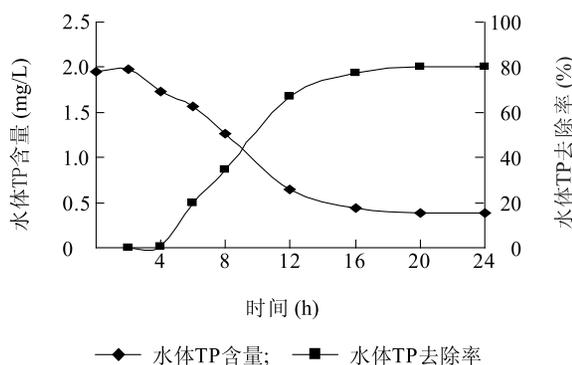


图 6 菌株 JS35 的 24 h 总磷 (TP) 去除率动态曲线

Fig.6 Total phosphorus (TP) removal by strain JS35 in 24 h

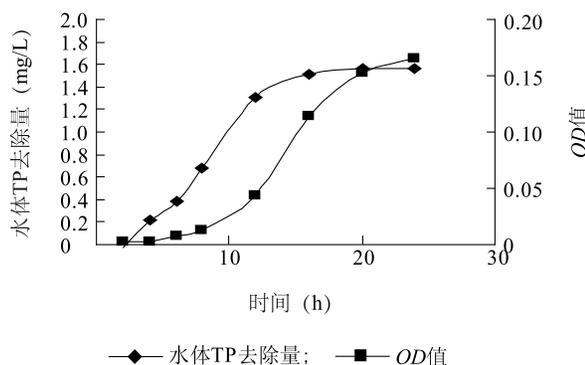


图 7 菌株 JS35 的 24 h 总磷 (TP) 去除量和 OD 值的动态曲线

Fig.7 The dynamic curve of OD value and TP removal by strain JS35 in 24 h

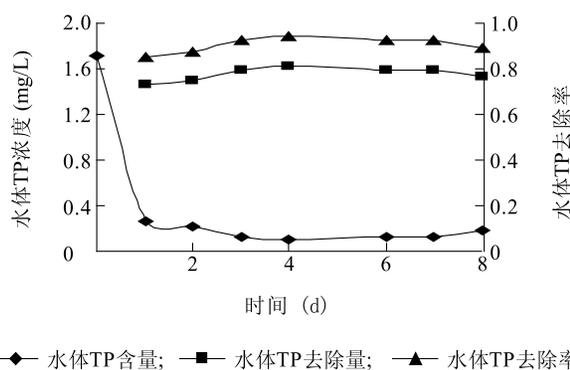


图 8 菌株 JS35 的 TP 去除稳定性

Fig.8 Stability of TP removal by strain JS35

正磷酸盐去除试验中,3 个因素间存在显著性差异 ($P < 0.05$),其影响水平大小依次为温度 > TP 浓度 > pH 值,最佳试验条件为 TP 浓度 2.0 mg/L、pH 值 9.0、温度 30 ℃。

表2 菌株 JS35 的正磷酸盐去除正交试验结果

Table 2 The orthogonal test for strain JS35 to remove orthophosphate

试验号	TP 浓度 (mg/L)	pH 值	温度 (°C)	去除率 (%)
1	0.2	5	15	-43.24
2	0.2	7	30	84.45
3	0.2	9	40	0
4	2.0	5	30	25.09
5	2.0	7	40	4.03
6	2.0	9	15	84.77
7	4.0	5	40	0.50
8	4.0	7	15	-23.93
9	4.0	9	30	77.32
K1	41.21	-17.65	17.60	
K2	113.89	64.55	186.87	
K3	53.89	162.09	4.53	
R	20.00	59.91	60.87	

在 TP 去除最佳条件下,研究菌株 JS35 的 24 h 正磷酸盐去除特性。结果(图 9、图 10)显示,在 0~12 h 水体中 PO_4^{3-} -P 浓度下降,去除率增加,菌株 JS35 的 PO_4^{3-} -P 去除量也增加。在 12~24 h 水体的 PO_4^{3-} -P 浓度变化量较小,除磷率、除磷量趋于稳定。24 h 时,菌株生长的 OD 值为 0.166,水体的 PO_4^{3-} -P 浓度为 0.339 8 mg/L, PO_4^{3-} -P 的去除率达到 79.61%。菌株 JS35 对正磷酸盐的去除有很好的稳定性,在 1~8 d,水体的 PO_4^{3-} -P 浓度下降到 0.339 8 mg/L,基本没有变化,除磷率为 79.61%(图 11)。

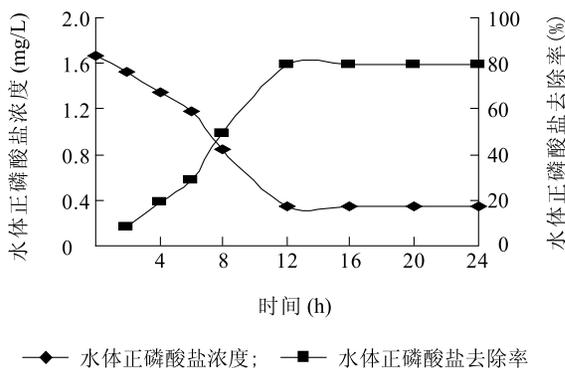


图9 菌株 JS35 对正磷酸盐的 24 h 去除率曲线
Fig.9 PO_4^{3-} -P removal curve by strain JS35 in 24 h

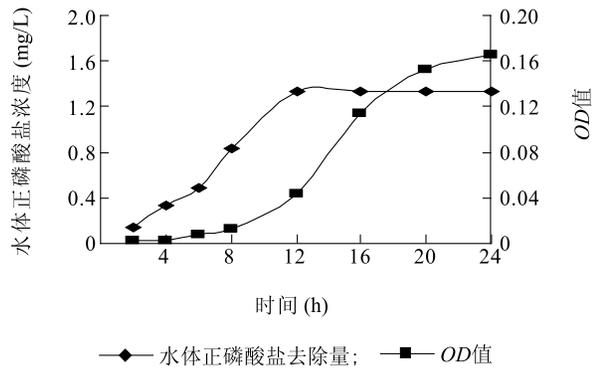


图10 菌株 JS35 对正磷酸盐的 24 h 去除量和 OD 值曲线
Fig.10 OD value curve and PO_4^{3-} -P removal by strain JS35 in 24 h

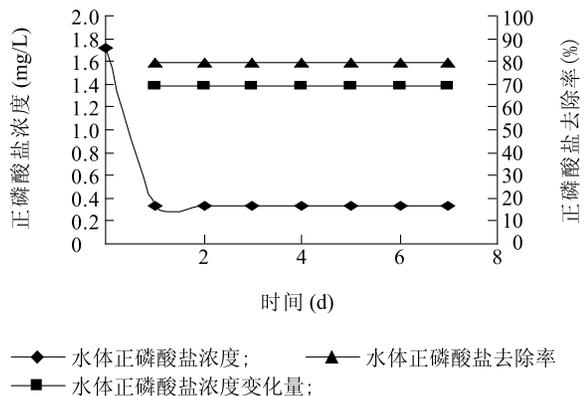


图11 菌株 JS35 对正磷酸盐的 8 d 去除稳定性
Fig.11 Stability of PO_4^{3-} -P removal by strain JS35 in 8 d

2.4 除磷菌作用下磷的去向

2.4.1 除磷菌胞外磷、胞内磷含量以及磷化氢产量

经除磷菌株 JS35 处理后,水体 TP 浓度由初始的 2.024 3 mg/L 下降至 0.470 9 mg/L。对菌株 JS35 的 3 种途径除磷量占比进行分析,结果显示,胞内磷含量占生物除磷总量的 72.1%,胞外磷含量占生物除磷总量的 5.5%,菌株 JS35 在 72 h 内产生的磷化氢气体量占生物除磷总量的 6.8%。

2.4.2 除磷菌胞内聚合物和胞外聚合物红外表征

对除磷处理后的菌株进行红外表征试验,发现菌株样品在波数 1 625.70 cm^{-1} 、1 225.27 cm^{-1} 、1 047.83 cm^{-1} 、587.56 cm^{-1} 处均有吸收峰。其中,在 1 625.70 cm^{-1} 处的吸收峰是由 P-O 的伸缩振动和弯曲振动造成的,1 225.27 cm^{-1} 处的吸收峰是 P-O 的伸缩振动吸收峰,1 047.83 cm^{-1} 处的吸收峰是磷酸

根的不对称伸缩振动造成的, 587.56 cm^{-1} 处的吸收峰是磷酸根的面式弯曲振动造成的。

对提取的胞外聚合物 (EPS) 进行 X-射线荧光光谱元素分析, 发现菌株 JS35 的 EPS 中含有 Ba 元素和 Ca 元素, Ba 元素含量为 $89.41\% \pm 0.92\%$, Ca 元素含量为 $1.09\% \pm 0.23\%$ 。

3 讨论

试验中菌株 JS35 的除磷过程在好氧状态下进行, 从总磷和正磷酸盐的去除率可知, 正磷酸盐的去除量占总磷去除量的主要部分, 因此可以推断菌株 JS35 在整个除磷过程中摄取的主要是正磷酸盐。这与陆宏鑫等^[17] 研究发现聚磷菌在好氧条件下摄取正磷酸盐的结论相似。

菌株 JS35 的胞内磷含量是菌株除磷量的主要部分。胞外磷是菌株 JS35 除磷的另一个途径。通过 X-射线荧光光谱分析, 发现提取的胞外聚合物 (EPS) 含有 Ba 元素和 Ca 元素, 而 Ba 离子能和磷酸根结合生成不溶于水的 $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ 晶体, Ca 离子能和磷酸根结合生成几乎不溶于冷水的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 。这与有研究者发现 EPS 在生物除磷工艺中可以作为磷酸盐的沉淀容器, 是生物除磷的另一重要的途径^[18] 的结论相似。

磷的胞内去除和胞外去除对于除磷起着关键的作用, 但还存在其他形式磷去除途径。本试验中有一部分磷在除磷微生物除磷过程中以磷化氢 (PH_3) 气体的形式释放。这与 Devai 等^[19] 首次在污泥生物处理工艺中发现污水中的磷在磷循环过程中一部分是以磷化氢气体的形式放出的结论吻合。但磷化氢是环境中的痕量气体, 且性质极不稳定, 易被氧化, 很难被捕捉测定到。

试验中发现, 试验条件改变导致测定结果改变, 即菌株除磷效果不稳定。在实际应用过程中, 微生物之间有着复杂的相互作用, 既有对营养物质的竞争利用, 代谢产物的抑制, 也有基于生存需要的协同作用^[20]。有资料表明, 微生物除磷并不是除磷的主要途径, 虽然除磷菌能吸收水体中的磷以多聚磷酸盐的形式贮存在细胞内, 但是微生物死亡后其自身吸收贮存的磷又重新释放到水体中, 所以需及时将除磷菌从水体中移出, 才能有效地将磷从系统中去除。

参考文献:

- [1] 刘艳杰, 李建政, 许修宏, 等. 高效低温聚磷菌的筛选及特性研究[J]. 环境科学与管理, 2012, 37(5): 36-40.
- [2] 宋玉芝, 张艳娜, 黄晓峰, 等. 湿地植物对农业面源磷污染净化作用的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 5-8.
- [3] 刘璐嘉, 陈汉新, 周明耀, 等. 江苏地区富营养化水体浮萍修复技术应用研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 320-323.
- [4] 赵海泉, 胡子金. 一株聚磷菌 GP44 的筛选、鉴定及其聚磷特性研究[J]. 土壤, 2009, 41(5): 757-763.
- [5] 杨志红, 田前进, 吴诗谣, 等. 芦竹对富营养化水体中磷及微生物的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 297-299.
- [6] 周康群, 刘 晖, 崔英德, 等. 一株新的厌氧除磷功能菌株的鉴定与活性[J]. 化工学报, 2008, 59(6): 1522-1530.
- [7] 牛晓君. 沉积物中磷化氢产生的微生物作用初步探讨[J/OL]. 中国科技论文在线, 2010, 5(5): 373-376[2015-01-15]. http://www.paper.edu.cn.
- [8] NEIDHARDT F C, BLOCH P L, SMITH D F. Culture medium for enterobacteria[J]. Bacteriol, 1974, 119: 736-747.
- [9] TOMOHIRO M, TOMOHIRO Y, JUNICHI K, et al. A method for screening polyphosphate-accumulating mutants which remove phosphate efficiently from synthetic wastewater [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 95(6): 637-640.
- [10] VASVI C, CHANDRA S N. A high throughput method and culture medium for rapid screening of phosphate accumulating microorganisms[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 8057-8062.
- [11] 焦增祥, 王 泽, 梁 文, 等. 在水动力条件下高效聚磷菌除磷特性研究[J]. 科学技术与工程, 2013, 13(8): 2307-2312.
- [12] 黄志华. 聚磷菌 D2 生长及除磷特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- [13] 张记江. 聚磷菌 PAOX 的生长特性及除磷性能研究[D]. 苏州: 苏州科技学院, 2008.
- [14] 连丽丽. 聚磷菌的筛选及其对污水的除磷特性研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2009.
- [15] 傅宏兵. 高效聚磷菌的分离及其特性研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2009.
- [16] 国家环境总局, 水和废水分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [17] 陆宏鑫, 吕伟娅, 严成银. 生态沟渠植物对农田排水氮磷的截留和去除效应[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(4): 791-795.
- [18] 周岳溪. 废水生物除磷机理及间歇式生物处理工艺的研究[D]. 北京: 清华大学, 1990.
- [19] DEVAI L, FELDOLFI L, WITTNER I, et al. Detection of phosphine: new aspects of the phosphorus cycle in the hydrosphere [J]. Nature, 1988, 333: 343-345.
- [20] 郑喜春. 脱氮除磷芽孢杆菌菌株的筛选及其应用效果[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.

(责任编辑: 张震林)