

碳源对反硝化聚磷菌(RC11)磷酸盐代谢的影响

郑宗林^{1,2}, 叶金明³, 刘波¹, 杨先乐^{4*}, 周兴华¹, 向泉¹

(1. 西南大学(荣昌校区)鱼类繁殖与健康养殖中心, 重庆 402460;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,

农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 扬州水产生产技术指导站, 江苏 扬州 225000;

4. 上海海洋大学农业部渔业动植物病原库, 上海 201306)

摘要:反硝化聚磷微生物由于具有同时脱氮和除磷的特点,能够最大程度的减少碳源需求,为解决生物脱氮除磷工艺的碳源竞争矛盾提供了新的思路和方法。以纯培养方式探讨了外源性碳源、硝酸盐对反硝化聚磷菌(RC11)磷酸盐代谢活动的影响。结果表明,好氧培养时,菌株RC11在外源碳源存在时发生了超量吸磷现象;缺氧培养时,菌株RC11可以利用硝酸盐而非亚硝酸盐作为电子受体进行反硝化聚磷。无外加碳源时,菌株RC11经历厌氧阶段后初期可以利用硝酸盐氧化到亚硝酸盐的过程中产生的能量进行摄磷;但当亚硝酸盐的积累达到高峰时,进入以亚硝酸盐为电子受体的反硝化阶段,由于亚硝酸盐氮不能作为氧分子的替代物进行反硝化除磷,菌株RC11实际上处于一个厌氧环境,会引发释磷;在厌氧条件下菌株RC11具有利用硝酸盐作为电子受体进行反硝化除磷的功能。

关键词:碳源;反硝化聚磷菌;磷酸盐代谢

中图分类号: Q 936; S 917

文献标识码: A

养殖污水处理再利用已是水产养殖业必须面临的事实。目前我国已有的养殖废水处理技术的研究,但考虑的重点是去除有机物及氨氮转化为硝酸盐,硝酸盐的毒性虽比氨氮低,但过度积累同样会影响水生动物的生长。当前对养殖废水处理还没有考虑氮磷的去除,只是形式上的转化。生物反硝化除磷技术因为同时具有去除有机物、氮和磷的优点而被广泛应用于生活污水的处理并取得了良好效益。生物反硝化除磷技术的本质是根据微生物的生理代谢特点为其创造适合的生长环境来达到废水处理的目的。按照理想的除磷理论,碳源(电子供体)和氧化剂(电子受体)不能同时存在,否则会影响脱氮和除磷效果^[1]。在这种理论的指导下,水处理工艺都是按照厌氧-缺氧-好氧或者厌氧-好氧的运行来实现生物的脱氮除磷,并且认为聚 β -羟基丁酸(PHB)在实现生

物除磷过程中起着关键作用,PHB的合成量直接决定了生物除磷效率的高低^[2]。业界也认为缺氧段硝酸盐的存在可能直接导致生物除磷的失败^[3-5],因为在缺氧条件下,常规的反硝化微生物可更快利用水体有机物进行反硝化作用,抑制了聚磷菌合成PHB,导致好氧聚磷菌在厌氧段(严格上是缺氧环境)的无效释磷;好氧段缺乏碳源,无法获得过量吸磷的能量来源,致使生物除磷系统失败。后来研究人员又发现^[6],在一些脱氮工艺中存在反硝化除磷现象,即硝酸盐可以作为电子受体,它的存在可能更有利于简化生物脱氮除磷工艺,并被认为是一种可持续发展工艺。但关于聚磷微生物是否可以利用外源性碳源超量吸磷未见研究报道。本试验研究了外源性碳源对生物脱氮除磷的影响,以期水产养殖的水质处理提供新的思路。

收稿日期:2010-02-21 修回日期:2010-09-26

资助项目:农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放基金项目(BZ2009-11);西南大学基本科研业务费专项基金项目(XDJK2009C168)

通讯作者:杨先乐, E-mail: xlyang@shou.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

菌株 RC11 由重庆市荣昌县梅石坝渔场的池塘底泥中分离获得,经选择性富集培养和平板划线纯化,进行硝酸盐还原试验、多聚磷酸盐和聚 β -羟基丁酸累积试验筛选出菌体内有 PHB 和 Poly-P 积累的菌株 RC11,利用细菌自动分析鉴定仪等方法对其进行种属鉴定,菌株 RC11 隶属于假单胞菌属。

1.2 试验仪器

生物显微镜(OLYMPUS IX70),紫外分光光度计(THERMO SPECTRONIC HELIOS- γ),纯水器(LABCONCO 9000602),烘箱(SANYO MOV-112F)、高压蒸汽灭菌锅(SANYO MLS-3780),石英双重纯水蒸馏器(上海申生 1810D),台式离心机(太仓华美 TGLL-18K),超净工作台(上海淀山湖 SDJ-OS)。电子天平(METTLER TOLENDO AB104-N),磁力搅拌器。

1.3 培养基^[7]

牛肉膏蛋白胨固体培养基(g/L):牛肉膏 3;蛋白胨 10;蒸馏水 1 000 mL;琼脂 10;pH 7.0。

富磷肉汤培养基(g/L):牛肉膏 3;蛋白胨 10;磷酸二氢钾 0.5;蒸馏水 1 000 mL;pH 7.0。

合成废水培养基(g/L):(NH₄)₂SO₄ 0.1;Na₂S₂O₃ 0.1;MgSO₄·7H₂O,0.2;NaAc·3H₂O,0.8;KH₂PO₄,0.06;微量元素溶液 1 mL。

硝酸盐培养基(g/L):除 KNO₃ 0.15 外,其余成分含量同合成废水。

无外加碳源时,菌株 RC11 的磷酸盐代谢特性测定,要将合成废水培养基中的 NaAc·3H₂O 去除。

1.4 试剂

二苯胺试剂:二苯胺 0.5 g 溶于 100 mL 硫酸中,用 20 mL 蒸馏水稀释。

格里斯氏试剂:甲液是将对氨基苯磺酸 0.5 g 溶于 150 mL 醋酸(10%);乙液是将 α -萘胺 0.1 g 溶于 20 mL 蒸馏水,然后加入稀醋酸(10%)150 mL。

苏丹黑 B 试剂:甲液是将苏丹黑 B 0.3 g 溶于 100 mL 醇(70%),用力振荡,过夜过滤;乙液是二甲苯;丙液是 0.5% 番红水溶液。

阿尔培氏试剂:甲液是将甲苯胺兰 0.15 g,孔

雀石绿 0.2 g 溶解于 2 mL 95% 乙醇中,再加入蒸馏水 100 mL 及 1 mL 乙酸,放置 24 h 过滤;乙液是将碘化钾 3 g 溶于 10 mL 蒸馏水中,再加碘 2 g,待完全溶解后加蒸馏水至 300 mL。

萘瑟氏试剂:甲液是将美兰 1 g 溶于 95% 乙醇 2 mL 加冰乙酸 5 mL 蒸馏水 95 mL,混匀过滤;乙液是将俾斯麦褐 0.2 g 溶于 100 mL,100 °C 蒸馏水中。

1.5 分析项目及检测方法

PHB:苏丹黑 B 染色法;细菌浓度:干燥恒重法;磷酸盐浓度:钼锑抗分光光度法;NO₃-N 浓度:酚二磺酸分光光度法;Poly-P:阿尔培氏法和萘瑟氏法;NO₂-N 浓度:N-(1-萘胺)-乙二胺光度法。

1.6 试验方法

标准曲线制定 (1) 硝酸盐标准曲线的制定^[8],是在一组 50 mL 比色管中,用分度吸管分别加入硝酸盐氮标准使用液 0、0.10、0.30、0.50、0.70、1.00、5.00、10.00 mL(含硝酸盐氮 0、0.001、0.003、0.005、0.007、0.010、0.030、0.050、0.070、0.100 mg),加水至约 40 mL,加 3 mL 氨水使成碱性,稀释至标线,混匀。在波长 410 nm 处,以水为参比,以 10 mm 0.01~0.10 mg 比色皿测量吸光度。由测得的吸光度值减去零浓度管的吸光度值,分别绘制不同比色皿光程长的吸光度对硝酸盐氮含量(mg)的校准曲线。

(2) 亚硝酸盐标准曲线的制定。配制方法同前,但于波长 540 nm 处,用光程长 10 mm 的比色皿,以水为参比,测量吸光度。

(3) 磷酸盐标准曲线的制定。配制方法同前,但于 700 nm 波长处,以零浓度溶液为参比,测量吸光度。

预培养 取菌株 RC11 斜面菌苔两环接种至 50 mL 肉膏蛋白胨液体培养基中活化 6 h 后转接到 150 mL 富磷肉汤,摇床培养(30 °C,150 r/min)24 h 后,菌悬液于 10 °C,5 000 r/min 条件下离心 5 min,去上清液,沉淀用无菌生理盐水洗涤两次后用少量灭菌生理盐水配成菌悬液备用。

外源性碳源对菌株 RC11 磷酸盐代谢的影响^[9] (1) 取预培养 24 h 的菌悬液 6 mL 加入到 150 mL 富磷肉汤中,摇床培养(30 °C,150 r/min)36 h,按时取样分析培养基中磷酸盐浓度及不同时间点的单位体积的菌体干重,计算不同时

间点细菌体内磷酸盐占菌体干重的比例。

(2) 以氧为电子受体时的磷酸盐代谢特性:取菌悬液加入到 150 mL 合成废水培养基中,置摇床振荡培养 6 h,定时取样分析培养基中磷酸盐浓度变化,并对菌体进行 poly-P 染色。

(3) 以硝酸盐作为电子受体时的磷酸盐代谢特性:取菌悬液接种至合成废水中,同时添加固体硝酸钾,使培养基的硝酸盐氮浓度达到 20 mg/L 左右,以液体石蜡油封闭培养基液面,并用胶塞密闭瓶口进行缺氧反应。定时取样分析培养基中磷酸盐及亚硝酸盐浓度变化,并对菌体进行 poly-P 染色。

无外加碳源时菌株 RC11 的磷酸盐代谢特性

(1) 以氧作为电子受体时的磷酸盐代谢特性:取预培养好的菌悬液接种至 2 瓶 250 mL 经除氧处理后的合成废水中,密封瓶塞,厌氧反应 3 h 后,进行充气培养,溶解氧浓度 > 4 mg/L,培养时间为 6 h,定时取样分析培养基中磷酸盐浓度变化,并对菌体进行 poly-P 染色。

(2) 以硝酸盐作为电子受体时的磷酸盐代谢特性:取预培养好的菌悬液接种至 2 瓶 250 mL 经除氧处理后的合成废水中,密封瓶口,厌氧反应 3 h 后,迅速添加固体硝酸钾,使其浓度达到 20 mg/L 左右,进入缺氧反应阶段,定时间取样测定培养基中亚硝酸盐和磷酸盐浓度,并对菌体进行 poly-P 染色。

2 结果与分析

2.1 标准曲线测定

磷酸盐测定的标准曲线为 $Y = 96.196X$, $R^2 = 0.9993$;硝酸盐测定的标准曲线为 $Y = 14.937X$, $R^2 = 0.9985$;亚硝酸盐氮测定的标准曲线为 $Y = 0.1177X$, $R^2 = 0.9992$ 。各曲线的相关性均良好。

2.2 外源性碳源对菌株 RC11 磷酸盐代谢的影响

菌株 RC11 在富磷肉汤培养基中好氧培养 36 h,菌体干重从 25 mg/L 增加到 700 mg/L,培养基中的磷酸盐浓度由试验开始时的 295 mg/L 下降到试验结束时的 253 mg/L,磷酸盐占菌体干重比例随培养时间的增加呈逐渐上升,最大值出现在培养时间为 24 h 时(图 1),此时干菌体内的磷酸盐含量达 7%,而一般细菌体内磷酸盐含量为 1%~3%^[10],结合菌体内的多聚磷酸盐染色结果(图 2,图 3),提示菌株 RC11 在外源碳源存在时在好氧培养过程中时发生了超量吸磷现象。

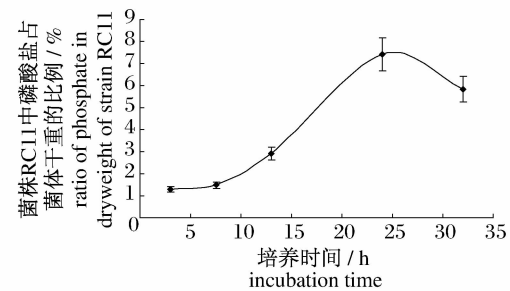


图 1 菌株 RC11 中磷酸盐占菌体干重的比例随培养时间的变化

Fig. 1 The ratio of phosphate in dry weight of strain RC11 at different incubation time

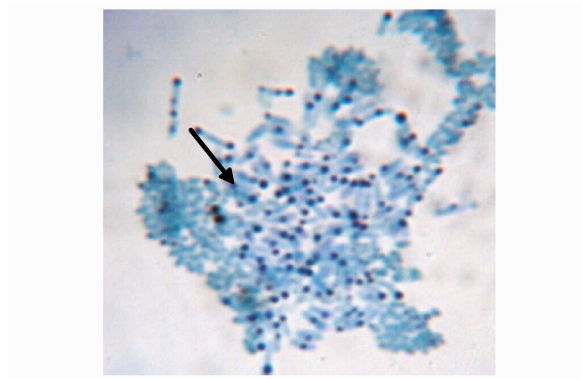


图 2 菌株 RC11 内多聚磷酸盐颗粒 × 1 000 倍

富磷肉汤培养基中好氧培养 36 h,阿尔培氏法,箭头所指为多聚磷酸颗粒。

Fig. 2 The 1 000 times photo of poly-P in strain RC11 In phosphorus-rich broth medium with aerobic 36 h, Albert's Reagent, arrow indicates poly-P.

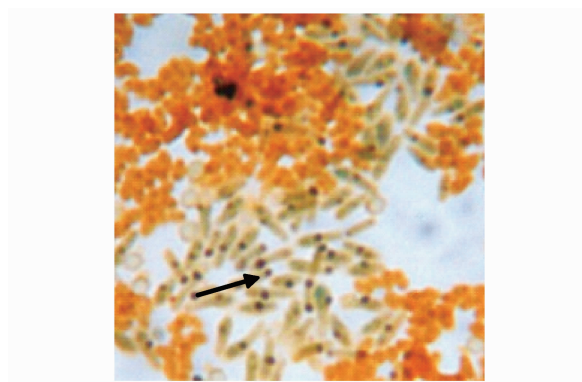


图 3 菌株 RC11 内多聚磷酸盐颗粒 × 1 000 倍

富磷肉汤培养基中好氧培养 36 h,奈瑟氏法,箭头所指为多聚磷酸颗粒。

Fig. 3 The 1 000 times photo of poly-P in strain RC11 In phosphorus-rich broth medium with aerobic 36 h, Nessler's Reagent, arrow indicates poly-P.

合成废水培养基接种菌株 RC11 好氧培养

8 h, 培养基中磷酸盐的浓度显著降低(图4), 磷酸盐浓度从24.34 mg/L降至10.48 mg/L, 即有13.86 mg/L磷酸盐从合成废水转移到了细菌内。

缺氧反应的整个反应周期可以分为两阶段, 第一阶段为硝酸盐转化为亚硝酸盐阶段, 发生在反应前5 h, 主要表现为硝酸盐氮浓度的下降伴随

着磷酸盐浓度的下降以及亚硝酸盐氮的积累, 亚硝酸盐氮由0 mg/L上升到20.61 mg/L, 磷酸盐则由24.53 mg/L减少为18.56 mg/L, 下降了5.97 mg/L, 与同期进行的好氧组比较, 其磷酸盐减少量仅为其的60%; 第二阶段为亚硝酸盐转化为氮气, 培养基中磷酸盐浓度略为上升。

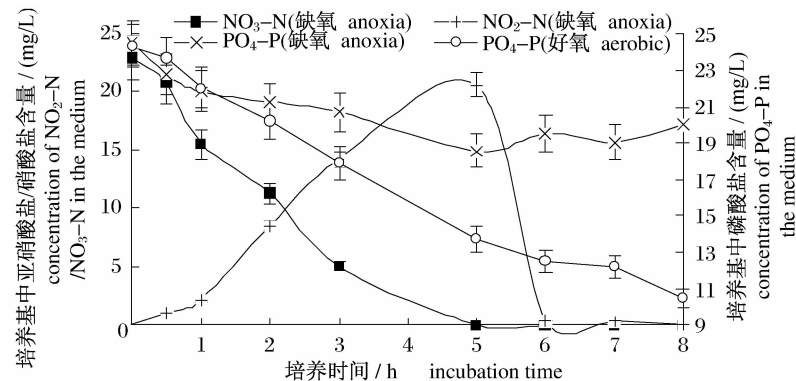


图4 缺氧/好氧培养时菌株 RC11 培养基中亚硝酸盐/磷酸盐含量的变化情况(外加碳源)

Fig. 4 Changes in nitrite and phosphate concentration in the medium during aerobic or anoxic incubation of strain RC11 with the presence of external carbon source

2.3 无外加碳源时菌株 RC11 磷酸盐代谢特性

图5是菌株 RC11 在经历厌氧阶段后的磷酸盐代谢情况。培养基中硝酸盐浓度在前2 h 迅速从20 mg/L降为近0 mg/L, 磷酸盐浓度也随之下降。随后数小时, 随着硝酸盐浓度的下降, 磷酸盐浓度却呈现上升趋势; 试验结束时, 培养基中磷酸

盐含量又回到试验开始时的浓度。

同期进行的好氧培养组, 菌株在经历厌氧释磷阶段后, 在整个反应过程中培养基中的磷酸盐含量呈直线下降趋势, 至试验结束时, 培养基中的磷酸盐浓度只有开始时的近9%, 即培养基中90%的磷酸盐转移到了菌株 RC11 细胞内。

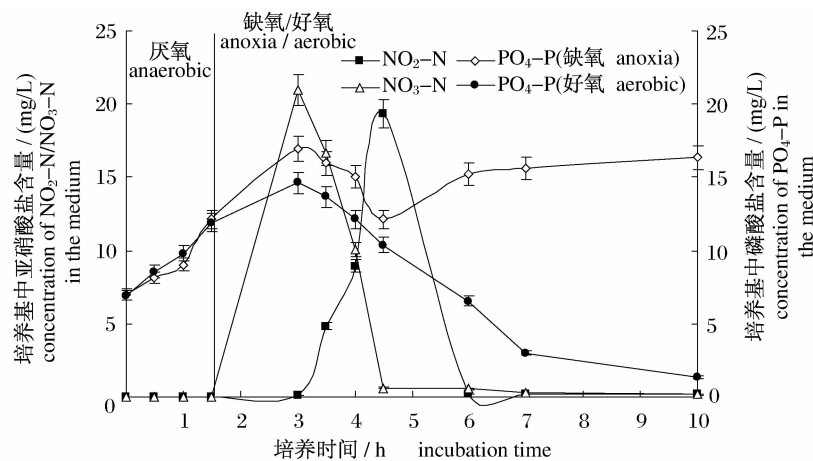


图5 菌株 RC11 培养基中硝酸盐和亚硝酸盐/磷酸盐含量变化(无外加碳源, 厌氧—缺氧—好氧培养)

Fig. 5 Changes in nitrate and nitrite /phosphate concentration in the medium during anaerobic-aerobic and anaerobic-anoxic incubation of strain RC11 with no external carbon source

3 讨论

能量是生物进行一切生命代谢活动的基础。反硝化是微生物适应缺氧环境的结果, 缺氧环境

迫使微生物改变在好氧条件下的能量生成途径, 即在电子传递链的终端利用硝酸盐或亚硝酸盐取代了分子氧作为电子受体, 产生能量供生物各种代谢活动提供能量^[10]; 生物体内的多聚磷酸盐是

一种能量储存库,将多余的能量以高能磷酸键的形式储存在体内,以供机体在特殊时期利用。由此可见,生物聚磷与生物反硝化其实是生物的不同生理活动过程,两者之间并没有直接的冲突^[11],一般的微生物在能量过剩时具有储存能量的能力,但是不同微生物储存能量所采取的方式不一样。有的微生物以糖原颗粒的形式将能量储存,有些微生物则在碳源充足而氮源不足时将能量以 PHB 的形式储存在菌体内^[12],而相当部分微生物则采用多聚磷酸盐的形式储存多余能量,这就是所谓的生物聚磷。从理论上讲,当能量过剩,并且微生物具有合成多聚磷酸盐的代谢途径的条件下,就可以发生过量摄磷行为。至于利用外源碳源还是菌体内的碳源如 PHB,可能并不是生物是否过量摄磷的关键所在。

不同培养条件下的反硝化试验表明,菌株 RC11 具有利用硝酸盐作为电子受体进行反硝化除磷的功能。但在高浓度的亚硝酸盐存在时,细菌虽然可以将亚硝酸盐还原为氮气,但不能与聚磷作用相偶联。尤其值得注意的是,细菌 RC11 在有硝酸盐和乙酸钠同时存在的条件,也发生了磷酸盐的下降,这与目前大多数的研究结果相矛盾^[13-15],原因有待进一步研究。

从试验结果分析,这两种条件下,菌株 RC11 菌体内都积累了多聚磷酸盐颗粒。经过富磷培养后的菌株 RC11 其菌体内的磷酸盐含量达到其菌体干重的 7%,而一般的细菌其体内的磷酸盐含量只占菌体干重的 1.5% ~ 2.0%^[16],这与 Suresh^[17]等的结果差别较大,通过对生物除磷系统中的假单胞菌的纯培养,发现这种细菌能够积累磷酸盐,其含量达到细胞干重的 31%; Deinema^[18]及 Buchan^[19]的研究也发现能够过量摄磷的不动杆菌体内磷酸盐含量也高达其细胞干重的 20% 左右。

关于聚磷菌能够利用外源性碳源进行过量摄磷的研究已有报道^[19-22],国内学者在进行聚磷菌磷酸盐代谢机理研究时,也是采用外源性碳源,而不是内源性碳如 PHB 等^[22-23]。在污水除磷的工程当中,研究人员要实现生物除磷,活性污泥必须经过厌氧阶段以合成 PHB,且 PHB 的合成量决定了聚磷微生物的最终除磷效果,并据此提出了目前公认的生物除磷生化模型。但活性污泥需要经厌氧-好氧交替环境的运行方可实现生物除磷,这与

活性污泥复杂的微生物组成密切相关,只有通过这种交替环境变化,才能使聚磷菌在竞争中取得优势,因为在聚磷菌体内有大量的多聚磷酸盐,可在厌氧条件下提供能量供机体进行新陈代谢,并具有合成 PHB 的代谢途径,能够将环境中的小分子有机酸转变成 PHB,以便在缺乏碳源的好氧环境下作为电子供体之用。其它微生物由于菌体内没有多聚磷酸盐,在厌氧环境不能提供能合成 PHB 的能量来源,在后续的好氧段有机物含量很低时,由于无碳源可用而被逐渐淘汰。这种厌氧-好氧交替运行的方法,其实质就是一种选择性的微生物培养方法。单一的好氧活性污泥法不能达到较高的生物除磷效果,可能是众多的好氧微生物共存消耗了大量的有机物质,使聚磷微生物没有足够的能量来实现超量吸磷而成为普通的好氧微生物。因此,要实现生物超量吸磷,微生物具备合成多聚磷酸盐的代谢途径是决定性因素,而厌氧-好氧交替运行的环境条件只是为聚磷微生物创造了一个有利环境而已。细菌合成 PHB 的能力可能只是微生物实现超量吸磷的非必要条件。也有研究者认为聚磷菌能否合成聚磷与基质类型有关^[23],在好氧条件下,向培养基中添加乙酸盐也能诱导聚磷菌释磷。这与本试验的结果不一致,造成这种差异的原因可能是研究对象不一致,前者以活性污泥为研究对象,后者则是利用纯种菌株进行试验。

早期的研究认为硝酸盐在厌氧段的存在能够影响微生物过量吸磷^[24-26],因为缺氧环境易于富集反硝化细菌,反硝化细菌能够优先利用环境中有机物进行反硝化而导致聚磷菌在缺氧段得不到足够的碳源用于后续好氧段的超量吸磷。但反硝化聚磷微生物的发现,使人们对生物除磷有了新的认识,并提出了与好氧聚磷类似的聚磷机理。本文也对筛选自池塘底泥的一株反硝化细菌进行了磷酸盐代谢特性的验证性试验。分别考察了其在同时存在硝酸盐和乙酸钠的培养基 A 及按厌氧-缺氧方式运行时的磷酸盐代谢特性。发现该菌株能够利用硝酸盐进行反硝化聚磷,但在高浓度的亚硝酸盐存在时,细菌非但不能吸磷反而释磷,这与前人研究结果一致^[27]。细菌 RC11 在硝酸盐和有机物同时存在的条件下,也一定程度表现出了吸磷现象,而对照反硝化细菌在硝酸盐和有机物共存的培养基中的磷酸盐浓度基本没有变化,说明菌株 RC11 能够利用外源性碳直接反硝化聚磷,这与目

前公认的反硝化聚磷机理也不一致。虽然国外学者曾报道过脱氮副球菌在有外源性碳源存在的条件下可以实现反硝化聚磷^[28]。但有关菌株 RC11 是否具有聚磷特性还需作进一步的研究。

在本项目的研发过程和论文撰写过程中,得到美国建明工业(珠海)有限公司李正博士的帮助,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 林燕,杨永哲. 硝酸盐浓度及缺氧好氧时段对反硝化聚磷诱导过程的影响[J]. 给水排水,2003,29(4):36-39.
- [2] Sorm R, Bortonc G. Phosphate uptake under anoxic conditions and fixed-film nitrification in nutrient removal activated sludge system [J]. Water Res, 1996,3(7):1573-1584.
- [3] Comeau Y, Hall K J, Oldham W K. Indirect polyphosphate quantification in activated sludge[J]. Water Pollut Res Canada,1990,25:161-174.
- [4] Kuba T, Murnleitner E, van Loosdrecht M C M, et al. A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms [J]. Biotechnol Bioeng,1996,52:685-695.
- [5] Shin H S, Jun H B, Park H S. Simultaneous removal of phosphorus and nitrogen in sequencing batch reactor[J]. Biodegradation,1992,3:105-111.
- [6] Ng W J, Ong S L, Hu J Y. Denitrifying phosphorus removal by anaerobic/anoxic sequencing batch reactor[J]. Water Sci Tech,2001,43(3):139-446.
- [7] 李振林. 微生物学及检验技术[M]. 广州:广东科技出版社,1996.
- [8] 魏复盛, 国家环境保护总局,水和废水检测分析方法编委会. 水和废水检测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,2002.
- [9] 周岳溪,钱易,顾夏声. 假单胞菌磷代谢特性的研究[J]. 环境科学,1991,13(5):41-43.
- [10] 沈萍. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
- [11] 罗宁,罗固源,许晚毅. 从细菌的生化特性看生物脱氮与生物除磷的关系[J]. 重庆环境,2003,5:45-51.
- [12] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社,2001.
- [13] Merzouki M, Beme N. Biological denitrifying phosphorus removal in SBR: Effect of added nitrate concentration and sludge retention time [J]. Water Sci Tech,2001,43(3):191-194.
- [14] 李勇智,彭永臻,王淑滢. 厌氧/缺氧 SBR 反硝化除磷效能的研究[J]. 环境污染治理技术与设备,2003,4(6):9-12.
- [15] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [16] Barnard J L, Stevens G M, Leslie P L. Design strategies for nutrient removal plants[J]. Water Sci Tech,1985,17(11/12):233-242.
- [17] 李军,杨秀山,彭永臻. 微生物与水处理工程[M]. 北京:化学工业出版社,2002.
- [18] Deinema M H, Habets L H A, Scholten J, et al. The accumulation of polyphosphate in *Acinetobacter* spp. [J]. FEMS Microbiol Letters,1980,9:275-279
- [19] Buchan L. Possible biological mechanism of phosphorus removal [J]. Water Sci Tech,1983,15(1):87-103
- [20] 习淑琪,吴迪. 固定化污泥除磷的初步研究[J]. 污染防治技术,1999,12(4):233-235.
- [21] Kaltwasser H, Vogt G, Schlegel H G. Polyphosphatesynthese wathrend der nitrat-atmung von micrococcus denitrification stamm 11 Arch [J]. Mikrobiol,1961,44:259-265.
- [22] 周岳溪,陈方荣. 假单胞菌摄磷和释磷条件的研究[J]. 环境科学学报,1994,14(2):312-315.
- [23] 周康群. 反硝化聚磷一体化设备中的聚磷菌[J]. 环境污染与防治,2002,24(3):132-135.
- [24] Meinhold J, Filipe C D M, Daigger G T, et al. Characterization of the denitrifying fraction of phosphate accumulating organisms in biological phosphate removal [J]. Water Sci Tech,1999,39(1):31-42.
- [25] Jenkins D, Tandoi V. The applied microbiology of enhanced biological phosphate removal accomplishments and needs [J]. Water Res,1991,25(12):1471-1478.
- [26] Van S W, Rensink J H, Rijs G B J. Biological P-removal; state of the art in the Netherlands [J]. Water Sci Tech,1993,27(2):317-28.
- [27] Kerrn-Jespersen J P, Henze M, Strube R. Biological phosphorus release and uptake under alternating anaerobic and anoxic conditions in a fixed-film reactor [J]. Water Res,1994,28(5):1253-1255.
- [28] Yoram B, Jaap V R. A typical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (3):1209-1212.

Influence of carbon source on phosphate metabolism characteristics of denitrifying phosphate-accumulating organisms RC11

ZHENG Zong-lin^{1,2}, YE Jin-ming³, LIU Bo¹, YANG Xian-le^{4*}, ZHOU Xing-hua¹, XIANG Xiao¹

(1. Fisheries Breeding and Healthy Cultivation Research Centre, South-West University, Chongqing 402460, China;

2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Yangzhou Fishery Technology Entending Station, Yangzhou 225000, China;

4. Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Because of the trait of denitrifying and phosphate-accumulating simultaneously, the requirement of carbon resources for denitrifying phosphate-accumulating organism (DPAO) will be minimized, which may provide a new routine to resolve the problem of lacking carbon resource. The discovery attracts many researchers' attention. In this paper, a simple method of isolation for DPAO has been established. One pure denitrifying phosphate-accumulating organism (RC11) from pond sediment has been adopted, and the influences of external carbon resource and nitrate on the pure strain RC11 were studied. The results indicated that the strain RC11 could acquire energy from oxidizing external carbon resource using oxygen as electron acceptor directly to produce polyphosphate, but in anaerobic stage, the strain RC11 could not use nitrite as the electron acceptor to carry out denitrifying phosphorus uptake. With no external carbon resource, the strain RC11 could acquire energy from oxidizing PHB using nitrate as electron acceptor to produce polyphosphate, but phosphate will be released from cell in high concentration of nitrite because nitrite nitrogen could not be the electron acceptor to replace molecule oxygen; the strain RC11 could use nitrate as electron acceptor to produce polyphosphate in anaerobic stage.

Key words: carbon source; denitrifying polyphosphate-accumulating organisms; phosphate metabolism

Corresponding author: YANG Xian-le. E-mail: xlyang@shou.edu.cn