



## 研究报告

## 一株高效聚磷解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其除磷条件优化

刘有华 魏慧 王倩楠 皮乔木 徐思琪 安贤惠 李联泰\*

江苏海洋大学江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验室 江苏 连云港 222005

**摘要:**【背景】磷是引起水体富营养化的主要营养物质。生物除磷具有成本低、效率高且适用范围广等特点,成为近年来水处理研究领域的热点。目前虽然有一些聚磷菌被筛选获得,但它们的除磷效率不高,其除磷条件尚需优化。聚磷菌的固定化及回收利用也亟待研究。【目的】分离筛选并鉴定高效聚磷菌株,优化除磷环境条件,研究吸附材料对所筛菌株除磷的影响,为聚磷菌的开发利用提供理论依据。【方法】采用常规细菌分离筛选方法获得高效菌株,通过形态特征观察、生理生化实验和 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定;结合单因素试验、Box-Behnken Design 和响应面分析优化除磷条件;通过测定海绵、无纺布和聚氨酯泡沫对聚磷菌的吸附作用评估该材料的固定化效果。

【结果】从连云港市某磷矿厂废水中分离筛选出一株高效聚磷细菌 P49,经鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*);优化后的最佳除磷条件为 pH 6.8、温度 31 °C、装液量 30.2%,在此条件下 P49 除磷率可达 80.43%;应用聚氨酯泡沫的吸附效果优于海绵和无纺布。【结论】解淀粉芽孢杆菌 P49 具有良好的除磷效果,可为生物除磷提供微生物资源,用聚氨酯泡沫吸附可实现对该菌株的固定化和回收利用。

**关键词:** 聚磷菌, 响应面分析, 解淀粉芽孢杆菌, 吸附材料, 固定化

## Isolation, identification and phosphorus removal optimization of a phosphorus-accumulating *Bacillus amyloliquefaciens*

LIU Youhua WEI Hui WANG Qiannan PI Qiaomu XU Siqi AN Xianhui LI Liantai\*

Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Bioresources and Eco-Environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China

**Abstract:** [Background] Phosphorus is the main nutrient that causes eutrophication in water. Biological phosphorus removal has the characteristics of low cost, high efficiency and wide application range, and has become a hot spot in the field of water treatment research in recent years. Although some phosphorus-accumulating bacteria have been screened, their phosphorus removal efficiency is not high, the phosphorus removal conditions of the phosphorus-accumulating bacteria need to be optimized.

**Foundation items:** Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX19\_0990, SJCX20\_1289); Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

\*Corresponding author: E-mail: lilt@jou.edu.cn

**Received:** 16-07-2020; **Accepted:** 22-09-2020; **Published online:** 25-11-2020

**基金项目:** 江苏省研究生科研与实践创新计划(SJCX19\_0990, SJCX20\_1289); 江苏省优势学科建设工程资助项目(PAPD)

\*通信作者: E-mail: lilt@jou.edu.cn

**收稿日期:** 2020-07-16; **接受日期:** 2020-09-22; **网络首发日期:** 2020-11-25

Immobilization and recycling of the phosphorus-accumulating bacteria are urgently needed to be studied. **[Objective]** Isolation, screen and identify high-efficiency phosphorus-accumulating strains, optimize the environmental conditions for phosphorus removal, explore the impact of adsorbent materials on the phosphorus removal of the bacteria, and provide a theoretical basis for the development and utilization of phosphorus-accumulating bacteria. **[Methods]** High-efficiency strains were obtained by routine isolation and screening of bacteria, and the strains were identified through morphological observation, physiological and biochemical experiments and 16S rRNA gene sequence analysis; Combined with single-factor experiments, Box-Behnken design and response surface analysis to optimize phosphorus removal conditions; The immobilization effect of the material was evaluated by measuring the adsorption effect of sponge, non-woven fabric and polyurethane foam on phosphorus-accumulating bacteria. **[Results]** A high-efficiency phosphorous-accumulating bacterium P49 was isolated and screened from the wastewater of a phosphate mine in Lianyungang city, which was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*; The optimal conditions after optimization were pH 6.8, temperature was 31 °C, equipment the liquid volume was 30.2%. Under this condition, the phosphorus removal rate of P49 can reach 80.43%; The application effect of polyurethane foam was better than that of sponge and non-woven fabric. **[Conclusion]** *Bacillus amyloliquefaciens* P49 had a good phosphorus removal effect and provides microbial resources for biological phosphorus removal. Adsorption with polyurethane foam can achieve the immobilization and recovery of the strain.

**Keywords:** phosphorus-accumulating bacteria, response surface analysis, *Bacillus amyloliquefaciens*, adsorbent materials, immobilization

众所周知,磷是引起水体富营养化的主要营养物质<sup>[1]</sup>。研究表明,当水体中总磷浓度超过 0.02 mg/L 时会引起水体富营养化<sup>[2]</sup>,超过 0.1 mg/L 时藻类就会迅速生长<sup>[3]</sup>,打破水环境原有的生态平衡,导致水生生物大量死亡,加剧水环境污染,危害人类健康<sup>[4-6]</sup>。传统的物理化学除磷工艺效率低、技术复杂、易造成二次污染<sup>[7-8]</sup>,而生物除磷法具有成本低、工作量大、效率高且适用范围广等特点<sup>[9]</sup>。自 Fuhs 等<sup>[10]</sup>首次从活性污泥中分离得到聚磷菌以来,微生物除磷工艺就得到迅速发展<sup>[11-13]</sup>,近年来已成为水处理研究的热点。目前已有多种聚磷菌被筛选出来,主要包括不动杆菌属(*Acinetobacte* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、葡萄球菌属(*Staphylococcus* sp.)和微丝菌属(*Microthrix* sp.)等<sup>[14]</sup>。聚磷菌的发现和应用提高了生物除磷工艺的效率,推动了生物除磷的发展,但与高效除磷的要求还有一定的差距,还需筛选效率更高的菌株应用于生产。

由于聚磷菌的生长和聚磷过程受溶氧<sup>[15-16]</sup>、温度<sup>[17-18]</sup>、pH 值<sup>[19-20]</sup>、初始磷含量<sup>[21]</sup>等不同理

化因素的影响较大,考察聚磷菌在不同理化条件下的除磷特性并优化最佳除磷条件,是其在富营养化水体中有效应用的前提。仅改善聚磷菌的除磷条件后直接应用于水环境,难以保证其活性和除磷效能<sup>[22]</sup>,而解决该问题的研究报道较少。微生物的固定化可以提高聚磷菌的活性和除磷效能<sup>[23]</sup>。谢水波等<sup>[24]</sup>和庄志刚等<sup>[25]</sup>分别利用生物炭和聚乙烯醇、海藻酸盐等吸附剂固定化聚磷菌,已取得较好效果。但这些材料存在价格昂贵、小球密度要求严格、不能重复使用等问题,在除磷工艺中的应用有一定局限性。因此,寻找成本低、操作简便、可回收利用的固定化材料也是亟待解决的问题之一。

本研究从磷矿厂废水中采集样品,分离筛选具有较高除磷能力的聚磷细菌,通过研究其在不同理化因素影响下的生长及除磷特性,利用响应面分析获得最佳除磷条件;并采用不同吸附材料对该菌株进行固定化处理,然后测定其除磷能力、评价其固定化效果,以期为高效聚磷菌的开发和回收利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品和吸附材料

实验水样采自连云港市某磷矿厂废水,用于菌株分离。海绵(4 kg/m<sup>3</sup>)、无纺布(25 kg/m<sup>3</sup>)、聚氨酯泡沫(35 kg/m<sup>3</sup>)均购自本地市场。

#### 1.1.2 培养基

(1) 牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01, 琼脂 20.0 (固体培养基添加), pH 7.2。

(2) 富磷培养基(g/L)<sup>[26]</sup>: CH<sub>3</sub>COONa 1.000, MgSO<sub>4</sub> 0.082, FeSO<sub>4</sub> 0.004, CaCl<sub>2</sub> 0.060, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.200, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.074。pH 7.2。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、dNTPs 和引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。细菌微量鉴定管, 杭州百思生物技术有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株的分离、筛选和鉴定

##### (1) 菌株的分离和筛选

采用平板稀释涂布法将样品按 10<sup>-1</sup>–10<sup>-6</sup> 梯度稀释后, 将 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 和 10<sup>-6</sup> 这 3 个梯度分别涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 28 °C 培养 24 h。将平板内单菌落在 30–300 个范围且形态清晰的菌落通过连续多次三区划线进行纯化, 并接种于斜面培养基在 28 °C 培养 24 h, 然后转移至–7 °C 冰箱保存, 备用。

将分离纯化后的菌株接入牛肉膏蛋白胨液体培养基, 28 °C、180 r/min 预培养 24 h。菌液经 10 000 r/min 离心 10 min, 无菌生理盐水洗涤、离心、重悬于富磷培养基中培养 24 h。采用国标钼酸铵分光光度法<sup>[27]</sup>(GB 11893-1989)测定磷含量的变化, 挑选具有高效聚磷能力的菌株为目的菌株。

##### (2) 形态和生理生化鉴定

菌株 P49 的形态观察和生理生化鉴定根据《常

见细菌系统鉴定手册》<sup>[28]</sup>进行。

#### (3) 16S rRNA 基因序列分析

采用 SDS-碱裂解法<sup>[29]</sup>提取细菌基因组 DNA, 利用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC AG-3')和 1492R (5'-ACGGTTACCTTACCTTGTTA CGACTT-3')对分离自磷矿废水的菌株 P49 进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): 2×San Taq PCR Mix 12.5 μL, 27F (25 μmol/L) 1 μL, 1492R (25 μmol/L) 1 μL, DNA 模板(10 mmol/L) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35 次循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。将 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

所得的 16S rRNA 基因序列拼接完整后在 NCBI 中进行 BLAST 序列比对, 查找相似性较高模式菌株的 16S rRNA 基因序列, 应用 MEGA 7.0 软件<sup>[25]</sup>进行聚类分析并构建系统发育进化树。

#### 1.2.2 细菌生物量、磷含量的测定及除磷率的计算

采用光电比浊法<sup>[30]</sup>, 在波长为 600 nm 处测定菌悬液的吸光度值(*OD*<sub>600</sub>)用来表示细菌生物量。利用国标钼酸铵分光光度法<sup>[27]</sup>测定磷含量, 取 1 mL 菌液, 10 000 r/min 离心 10 min, 倾去上清液, 用无菌水洗洗涤菌体后再次离心。将得到的湿菌体细胞在 120 °C 下高温消解, 冷却后定溶, 加入抗坏血酸溶液和钼酸盐溶液充分混匀进行发色, 室温放置 15 min 后, 在 700 nm 下测定吸光度并计算菌体内磷含量。取 1 mL 菌液, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 120 °C 高温消解和发色后, 于 700 nm 波长下测定吸光度并计算上清液中的磷含量, 然后根据公式(1)计算除磷率<sup>[31]</sup>。

$$R(\%) = \frac{A_{TP} - B_{TP}}{A_{TP}} \times 100 \quad (1)$$

式中, *R* 为除磷率, *A*<sub>TP</sub> 为对照组的总磷浓度, *B*<sub>TP</sub> 为试验组上清液中的总磷浓度。

#### 1.2.3 生长曲线和聚磷曲线

调节牛肉膏蛋白胨液体培养基的 pH 值为 7.2, 装液量为 30%, 0.1 MPa 灭菌 20 min 后接种, 在

28 °C、180 r/min 培养 36 h, 每隔 2 h 取样一次, 每次取样 4 mL, 3 mL 用于测定  $OD_{600}$ , 1 mL 用于测定除磷率, 并制作生长曲线和聚磷曲线。

#### 1.2.4 聚磷菌除磷条件的优化

##### (1) 单因素试验

除分别单独设置温度(20、25、30、35 和 40 °C)、pH 值(4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 用 HCl 和 NaOH 调节)、初始磷含量(3.0、5.0、7.0 和 9.0  $\mu\text{g/mL}$ , 用  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  调节)、装液量(30%、40%、50%和 60% 的 250 mL 三角瓶)外, 其他基本条件相同: 牛肉膏蛋白胨培养基、pH 7.2、装液量 30%, 而且同上灭菌接种后, 在 28 °C、180 r/min 培养 24 h, 每个处理设置 3 次重复, 每次取样 4 mL, 3 mL 用于测定  $OD_{600}$ , 1 mL 用于测定除磷率。

##### (2) 响应面法优化

采用 Design Expert 8.0.6 对显著影响聚磷菌除磷率的 pH、温度和装液量进行编码, 以除磷率为响应值, 采用 Box-Behnken 中心组合试验设计响应面试验<sup>[32]</sup>。试验因素的设计水平及编码见表 1。

#### 1.2.5 不同吸附材料对菌株生长和除磷的影响

以海绵、无纺布、聚氨酯泡沫为吸附材料, 切割成 1  $\text{cm}^3$  的方块后 0.1 MPa 灭菌 20 min, 向装液

量为 75 mL/250 mL 三角瓶、pH 为 6.8、接种量为 1% 的富磷培养基中分别加入 0 (对照组)、2、4、6 和 8  $\text{cm}^3$  的吸附材料(即 0–8 块), 在 31 °C、180 r/min 条件下培养 24 h, 取出吸附材料, 然后吸取 4 mL 菌液测定  $OD_{600}$  和除磷率。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离、筛选及鉴定

#### 2.1.1 菌株的分离、筛选

通过分离筛选得到 6 株具有除磷效果的聚磷菌, 编号分别为 P29、P49、P59、P79、H-1 和 H-2。经过除磷测试, 发现菌株 P49 除磷率为 72.18%, 显著高于其他菌株(表 2)。

#### 2.1.2 聚磷菌 P49 的菌株鉴定

##### (1) 菌株 P49 的形态特征观察和生理生化特性

聚磷菌 P49 菌落呈圆形, 乳白色, 表面光滑, 边缘不整齐, 不透明。显微镜观察菌体呈杆状, 革兰氏阳性, 产芽孢, 无荚膜, 无鞭毛, 大小为  $(2.12 \pm 0.23) \mu\text{m} \times (0.71 \pm 0.04) \mu\text{m}$ , 见图 1。菌株 P49 的生理生化特性见表 3。

表 2 6 株聚磷菌除磷率的比较

Table 2 Comparison of phosphorus removal rate of 6 phosphorus-accumulating bacteria

菌株 Strain	除磷率 Phosphorus removal rate (%)
P29	58.79
P49	72.18
P59	60.51
P79	63.28
H-1	47.34
H-2	62.68

表 1 Box-Behnken Design 试验的因素及水平

Table 1 Factors and levels in Box-Behnken design experiment

因素 Factor	A pH	B 温度 Temperature (°C)	C 装液量 Liquid loading (%)
-1	6.0	25	30
0	7.0	30	40
1	8.0	35	50

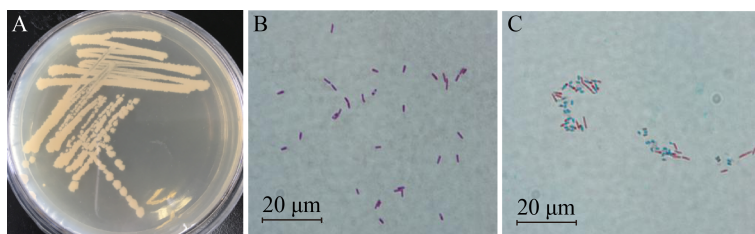


图 1 菌株 P49 形态特征观察

Figure 1 Observation of morphological characteristics of strain P49

注: A: 菌落形态; B: 革兰氏染色; C: 芽孢染色

Note: A: Colony morphology; B: Gram staining; C: Spore staining

表 3 菌株 P49 的生理生化反应结果  
Table 3 Results of physiological and biochemical reactions of strain P49

项目 Items	结果 Results
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
醋酸盐 Acetate	+
麦芽糖 Maltose	+
甘露醇 Mannitol	+
乳糖 Lactose	-
葡萄糖 Glucose	+
甘露糖 Mannose	+
阿拉伯糖 Arabinose	-
肌醇 Inositol	-
蔗糖 Sucrose	+

注：+：阳性；-：阴性  
Note: +: Positive; -: Negative

(2) 菌株 P49 的系统发育地位

以菌株 P49 基因组 DNA 为模板，利用 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增，测序得到菌株 P49 的 16S rRNA 基因序列，其大小为 1 454 bp，序列提交到 GenBank 数据库获得登录号为 MW093395。

将该序列在 NCBI 中进行 BLAST 序列比对，采用 MEGA 7.0 软件与数据库中相似性较高的模式菌株进行了系统发育进化分析，并绘制系统发育树(图 2)，结果表明，菌株 P49 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) FXH73 的亲缘关系最近，相似性达 98.8%以上。结合形态特征观察和生理生化反应结果，初步确定菌株 P49 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

2.2 聚磷菌 P49 的生长曲线和除磷曲线

菌株 P49 在 28 °C、180 r/min 条件下培养 36 h，在此过程中每 2 h 取样一次，测定其 *OD*<sub>600</sub> 和除磷率的结果如图 3 所示。由图 3 可以看出，0-4 h 为延滞期，菌体生长比较缓慢；4-20 h 为对数期，菌体生长呈指数增加；20-24 h 为稳定期，并在 22 h 时菌体生长量达到最大值；24 h 后进入衰亡期。除磷曲线基本与生长曲线同步，但 24 h 后除磷率仍然增加。从总体来看，随着培养时间的增长，生物量先上升后下降；而除磷率由于生物量的增多也随之升高，并且在生物量下降后仍能保持高效除磷。

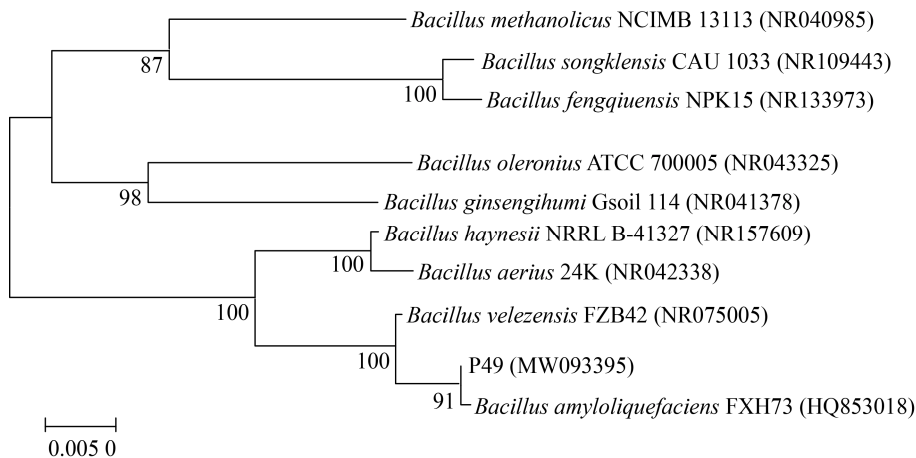


图 2 菌株 P49 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树  
Figure 2 Phylogenetics tree based on 16S rRNA gene sequence of strain P49

注：括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号；分支结点处数字为 Bootstrap 值；标尺的数据为进化距离  
Note: Numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of the strain; Numbers on the branches refer to bootstrap values; The data of the scale (0.005 0) represents sequence divergence

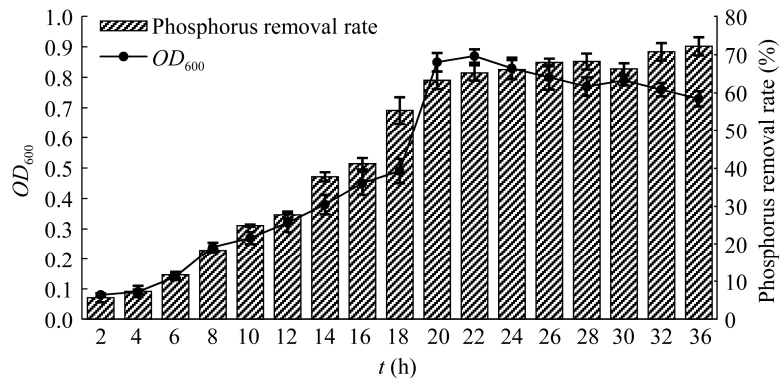


图3 P49的生长曲线和除磷曲线

Figure 3 Growth curve and phosphorus removal curve of strain P49

## 2.3 聚磷菌 P49 除磷条件的优化

### 2.3.1 单因素试验

#### (1) pH 对菌株生长量与除磷率的影响

pH 对菌株 P49 的影响见图 4。随着 pH 的升高, 菌株的生长呈先上升后下降的趋势, 并在 pH 7.0 时生长量达到最大( $P<0.05$ )。从除磷的角度来看, pH 在 6.0–8.0 时均有不错的除磷效果, 其中在 pH 7.0 时效果最佳, 与其他 pH 值相比差异达到显著水平( $P<0.05$ )。

#### (2) 初始磷含量对菌株生长量与除磷率的影响

不同起始磷含量下菌株 P49 的生长和除磷结果见图 5。从图 5 可以看出, 在 3–9  $\mu\text{g/mL}$  范围内随着初始磷含量的升高, 菌株生长量也随之显著升高, 并在 9  $\mu\text{g/mL}$  时达到最大( $P<0.05$ )。然而除磷效率与之相反, 随着初始磷含量升高, 除磷率反而

呈下降趋势。

#### (3) 温度对菌株生长量与除磷率的影响

不同温度对菌株生长量与除磷率的影响如图 6 所示, 温度对菌株生长和除磷率的影响表现一致, 二者均随温度的升高呈先上升后下降的趋势, 并在 30  $^{\circ}\text{C}$  时生物量和除磷率均达到最大( $P<0.05$ )。

#### (4) 装液量对菌株生长量与除磷率的影响

装液量对菌株生长量与除磷率的影响如图 7 所示, 菌株生物量和除磷率随着装液量的增加均呈下降趋势, 并在 30% 装液量时达到最高( $P<0.05$ )。说明装液量越少, 溶解氧越多, 有利于菌株 P49 生长和除磷。

### 2.3.2 响应面法优化及其验证

#### (1) 响应面法优化

Box-Behnken Design 试验结果见表 4, 总共

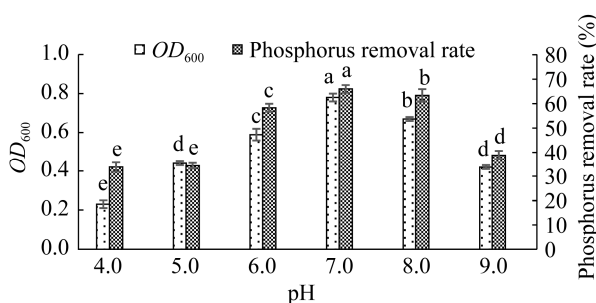


图4 pH对菌株P49的生长和除磷率的影响

Figure 4 Effect of pH on growth and phosphorus removal rate of strain P49

注: 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: The difference of small letters is significant ( $P<0.05$ )

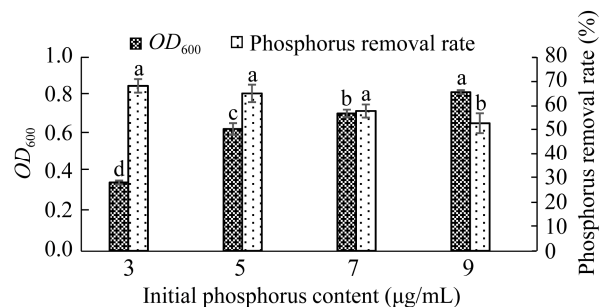


图5 初始磷含量对菌株P49的生长和除磷率的影响

Figure 5 Effect of initial phosphorus content on growth and phosphorus removal rate of strain P49

注: 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Note: The difference of small letters is significant ( $P<0.05$ )



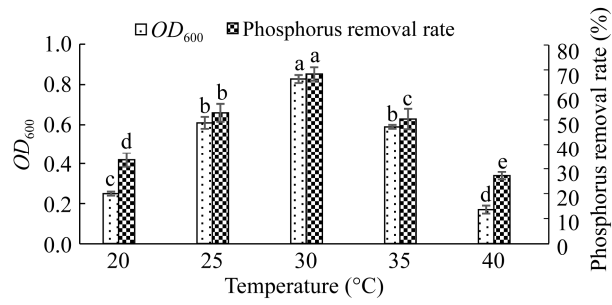


图 6 温度对菌株 P49 生长和除磷率的影响  
Figure 6 Effect of temperature on the growth and phosphorus removal rate of strain P49  
注: 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )  
Note: The difference of small letters is significant ( $P<0.05$ )

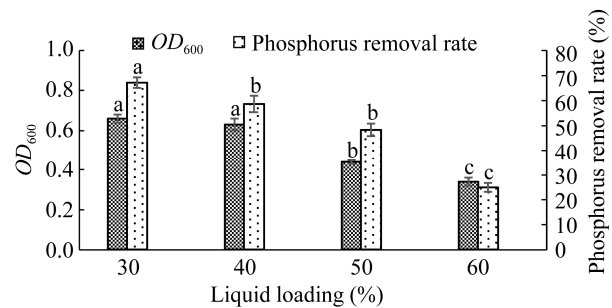


图 7 装液量对菌株 P49 的生长和除磷率的影响  
Figure 7 Effect of liquid loading on growth and phosphorus removal rate of strain P49  
注: 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )  
Note: The difference of small letters is significant ( $P<0.05$ )

表 5 回归方程的方差分析  
Table 5 Variance analysis of regression equation

方差来源	平方和	自由度	方差	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
Source of variance	Sum of square	Degrees of freedom	Variance	<i>F</i> value	<i>P</i> value	Significance
回归模型 Regression model	974.39	9	108.27	11.54	0.002 0	**
<i>A</i>	137.78	1	137.78	14.68	0.006 4	**
<i>B</i>	124.82	1	124.82	13.30	0.008 2	**
<i>C</i>	8.00	1	8.00	0.85	0.386 6	
<i>AB</i>	108.16	1	108.16	11.53	0.011 5	*
<i>AC</i>	11.56	1	11.56	1.23	0.303 7	
<i>BC</i>	29.16	1	29.16	3.11	0.121 3	
<i>A</i> <sup>2</sup>	209.87	1	209.87	22.36	0.002 1	**
<i>B</i> <sup>2</sup>	175.71	1	175.71	18.72	0.003 4	**
<i>C</i> <sup>2</sup>	112.11	1	112.11	11.95	0.010 6	*
残差 Residuals	65.69	7	9.38			
失拟项 Lack of fit	54.36	3	18.12	6.40	0.052 4	
纯误差 Pure error	11.33	4	2.83			
合计 Total	1 040.08	16				

注:  $R^2=0.936\ 8$ ,  $\text{Adj } R^2=0.855\ 6$ ,  $\text{Pred } R^2=0.146\ 7$ ; \*: 差异显著,  $P<0.05$ ; \*\*: 差异极显著,  $P<0.01$   
Note:  $R^2=0.936\ 8$ ,  $\text{Adj } R^2=0.855\ 6$ ,  $\text{Pred } R^2=0.146\ 7$ ; \*: Significant difference,  $P<0.05$ ; \*\*: Extremely significant difference,  $P<0.01$

表 4 Box-Behnken Design 试验结果  
Table 4 Results of Box-Behnken design experiments

编号	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	除磷率
No.				Phosphorus removal rate (%)
1	-1	0	-1	78.1
2	-1	-1	0	71.2
3	-1	1	0	67.2
4	-1	0	1	68.4
5	1	0	-1	63.6
6	1	-1	0	55.2
7	1	1	0	72.0
8	1	0	1	60.8
9	0	-1	-1	65.2
10	0	1	-1	69.2
11	0	-1	1	62.0
12	0	1	1	76.8
13	0	0	0	80.8
14	0	0	0	77.2
15	0	0	0	80.4
16	0	0	0	81.6
17	0	0	0	79.6

17 个试验点, 包括 12 个析因点试验和 5 个零点试验。其中零点试验重复 5 次, 用来估算误差。  
运用 Design Expert 8.0.6 软件对模型进行二次回归拟合后, 得到回归方程:  $R=79.92-4.15A+3.95B-1.00C+5.20AB+1.70AC+2.70BC-7.06A^2-6.46B^2-5.16C^2$ , 回归模型的方差分析见表 5。

如表 5 所示, 模型  $P$  值 $<0.01$ ,  $F$  值=11.54, 证明模型极为显著。在方差分析中, 模型的失拟项  $P$  值=0.052 4 $>0.05$ , 说明该模型选择较为合理。模型中  $A$ 、 $B$ 、 $A^2$ 、 $B^2$  对响应值影响极显著( $P<0.01$ ),  $AB$ 、 $C^2$  对响应值影响显著( $P<0.05$ )且  $R^2=0.936 8$ , 说明该模型拟合程度较好、误差较小, 可以使用这个模型对聚磷菌 P49 的最佳除磷条件进行分析和预测。利用回归方程、方差分析结果和 Design Expert 8.0.6 软件绘制三维响应曲面图, 结果见图 8。

响应曲面越陡, 各因素间的交互作用就越强<sup>[33]</sup>。如图 8 所示, pH、温度和装液量之间存在很强的交互作用。当各因素大小从四周逐渐趋向中心点时, 曲面图呈凸起趋势, 也就是说除磷率趋向最大化时存在最大响应值。通过 Design Expert 8.0.6 对结果进行分析, 当预测的响应值最大时, 3 个因素所对应的最佳值是 pH 6.768、温度 30.973 °C、装液量 30.160%, 在此条件下所预测的最大除磷率为 80.83%。

## (2) 实验验证及结果

为了证明拟合模型能够准确地对菌株 P49 的除磷条件进行优化, 将最佳培养条件调整为 pH 6.8、温度 31 °C、装液量 30.2%, 并在此条件下重复 3 次实验。结果显示, 平均除磷率为 80.43%, 与预测值 80.83% 拟合度良好, 无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 能够准确优化聚磷菌 P49 的除磷条件。

## 2.4 不同吸附材料对菌体吸附量与除磷率的影响

不同吸附材料对菌株吸附量的影响是通过培养后取出吸附材料并测定液体中菌体浓度来实现的, 液体中菌体存量越小, 说明吸附材料吸附的菌体越多。不同吸附材料对聚磷菌生长与磷含量的影响结果见图 9 和图 10。从图 9 可以看出, 以聚氨酯泡沫为材料吸附后培养液中的生物量显著低于以海绵和无纺布为材料时的生物量, 并表现出随材料体积的增大, 对菌株吸附量也越高。其中聚氨酯泡沫在 8 cm<sup>3</sup> 时吸附率达 95.21%。对于除磷效果而言, 以聚氨酯泡沫为吸附材料时, 其对除磷率和

生物量的影响趋势相同, 并在体积为 8 cm<sup>3</sup> 时, 水中磷含量由 2.08 µg/mL 降低到 0.45 µg/mL, 除磷率达 78.37% ( $P<0.05$ )。

## 3 讨论与结论

聚磷菌在生物除磷工艺中扮演着重要的角色, 目前已报道的聚磷菌有不动杆菌属 (*Acinetobacte* sp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.) 和微丝菌属 (*Microthrix* sp.) 等<sup>[14]</sup>。其中, 郭丽英等<sup>[34]</sup>分离到的一株不动杆菌属聚磷菌 RW 的除磷率为 79.35%; 王春丽等<sup>[35]</sup>筛选、分离得到的 2 株假单胞菌属聚磷菌 J4 与 J6 的除磷率分别为 56% 和 54%; 南亚萍等<sup>[36]</sup>分离到的金黄色葡萄球菌的除磷率为 98.2%; 高春娣等<sup>[37]</sup>研究的微丝菌 MPA223 对磷的去除率高达 98%。后 2 株菌虽然除磷率较高, 但其应用的安全性尚待验证。本实验分离筛选获得的菌株 P49, 除磷率达到 72.18%, 根据形态特征观察、生理生化反应及 16S rRNA 基因序列分析, 将该菌株初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 这在聚磷菌中未有报道。解淀粉芽孢杆菌在病原菌的抑制、动物饲料的生产以及果蔬保鲜等方面有着广泛的应用, 是较为安全的菌属之一, 但其聚磷作用尚未见报道。聚磷菌 P49 的发现增加了聚磷细菌的菌种资源, 扩大了解淀粉芽孢杆菌的功能认知范围, 为生物除磷提供了有益的微生物资源。

初始磷含量是影响聚磷菌除磷率的决定因素。为满足聚磷菌的生长需求, 环境中磷含量越高菌株生长就越好<sup>[31]</sup>。但当磷含量达到一定量时, 菌株的生长会受到抑制, 这是微生物生长受到了基质自抑制作用所导致的<sup>[38]</sup>。然而对于除磷率来说, 由于聚磷菌在除磷过程中其聚磷量逐渐达到饱和, 除磷率反而下降。靳茹<sup>[39]</sup>和安健等<sup>[21]</sup>研究结果也表明, 高浓度  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  反而会抑制聚磷菌的除磷活性。

pH 值和温度是影响细菌除磷率的重要因素。pH 值的变化会导致酶活性改变, 由此引起细胞膜电荷的变化, 从而影响聚磷菌对营养物质的吸收,



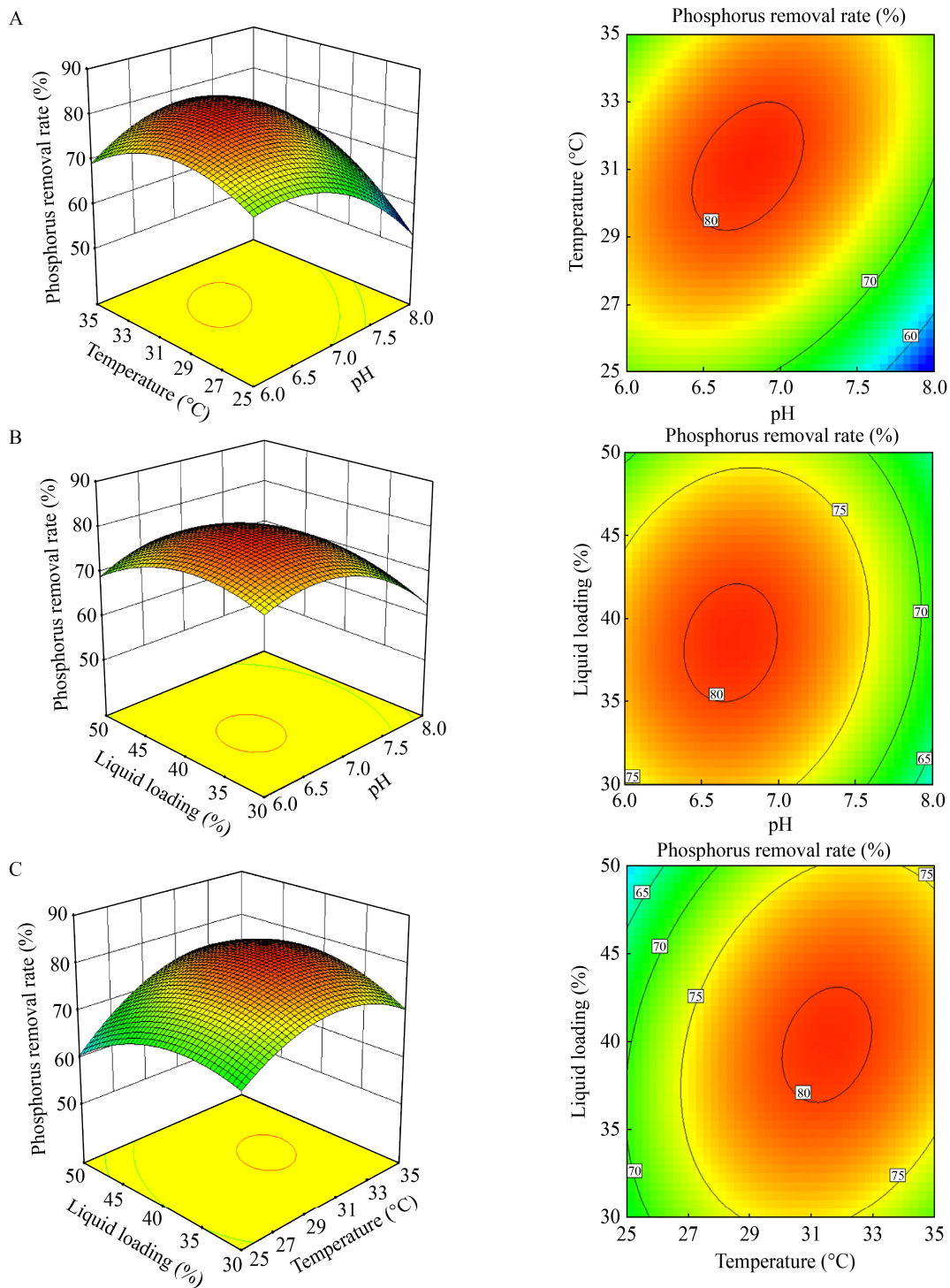


图8 pH、温度与装液量交互影响对除磷率影响的响应曲面和等高线图

Figure 8 Response surface plots and contour line of effects of the interaction between pH, temperature and liquid loading on phosphorus removal rate

注: A: pH 和温度对除磷率的交互影响; B: pH 和装液量对除磷率的交互影响; C: 温度和装液量对除磷率的交互影响

Note: A: Effect of pH and temperature interaction on phosphorus removal rate; B: Effect of pH and liquid loading interaction on phosphorus removal rate; C: Effect of temperature and liquid loading interaction on phosphorus removal rate

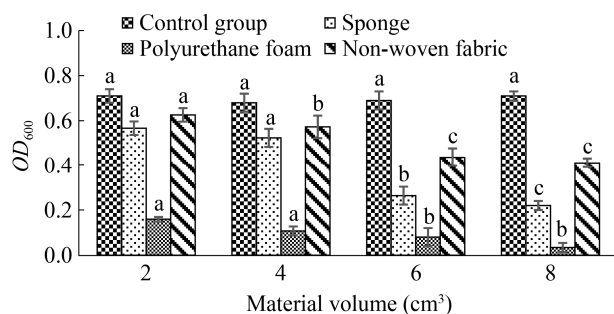


图9 不同吸附材料对菌株 P49 生长的影响

Figure 9 Effect of different adsorption materials on the growth of strain P49

注: 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: The difference of small letters is significant ( $P < 0.05$ )

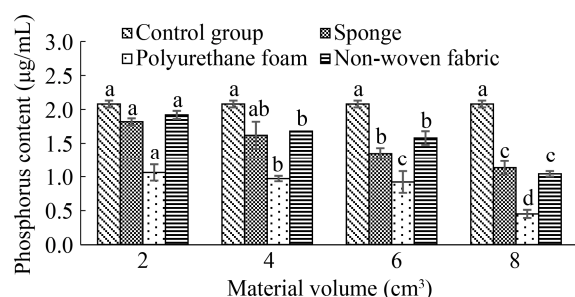


图10 不同吸附材料对磷含量的影响

Figure 10 Effect of different adsorption materials on phosphorus content

注: 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: The difference of small letters is significant ( $P < 0.05$ )

进而影响菌株代谢。有研究发现,当聚磷菌处于中性偏碱时才能有效进行除磷<sup>[40-41]</sup>。Li 等<sup>[19]</sup>认为 pH 7.25 是聚磷菌作用的一个临界值,当 pH>7.25 时,有利于聚磷菌除磷;而 pH 小于这个值时,除磷系统遭受破坏,除磷效果显著下降。本研究也有相似的结果,当 pH<7.0 时菌株 P49 除磷效率较低,而 pH>7.0 时除磷效果较好。温度方面,20–35 °C 下聚磷菌均能发挥除磷效能<sup>[18,38]</sup>,但温度过低或过高都会影响除磷工作<sup>[42]</sup>。可能是由于低温会导致菌膜凝胶,阻碍营养物质运输,从而影响菌株的生长,而高温会使菌体内蛋白质、酶和核酸发生变性、失活,导致细菌死亡。Li 等<sup>[17]</sup>研究发现,温度过低(<10 °C)会明显降低聚磷菌的生长和除磷

效率。因此,利用菌株 P49 进行除磷时可将温度调控在 30 °C。

装液量是体现溶解氧的重要指标,而溶解氧又是影响除磷效果的一个关键因素<sup>[15,43]</sup>。菌株在溶解氧较高的环境中,菌体将部分磷用于生长,而剩余的磷储存于异染颗粒中;随着溶解氧的减少,菌株只能将储存于异染颗粒的磷分解用于菌体的生长,此时菌株的生长逐渐下降<sup>[25]</sup>。然而对于除磷效率来说,有氧条件有利于除磷效率的发挥<sup>[15]</sup>。安健等<sup>[21]</sup>的研究表明,随着溶解氧浓度的增高,菌株 LY-1 的除磷活性也会不断增大,这与本研究结果一致。

优化聚磷菌除磷条件不仅可以了解聚磷菌除磷过程中的特性,还能够提高聚磷菌的除磷效率。方春玉等<sup>[22]</sup>通过响应曲面法建立了聚磷菌 P2 除磷条件的二次多项数学模型,对 6 个影响因素进行优化,证明了 pH、培养时间和初始 COD 含量的影响最大。这与本研究结果不同,本研究发现对聚磷菌 P49 的除磷效果影响最大的因素是 pH、温度和装液量。因此,聚磷菌在富营养化水环境处理中能否实现高效除磷成为解决这一系列问题的关键。

微生物的固定化有助于目标微生物的投加、回收和反复利用<sup>[23]</sup>。有研究利用一些化学试剂作为固定化材料,如聚乙烯醇和海藻酸盐等<sup>[44-45]</sup>,也有研究以生物炭等作为材料对微生物进行固定化<sup>[46-47]</sup>。本文利用成本较低、操作简便、易于回收的海绵、无纺布和聚氨酯泡沫作吸附材料,探究它们的除磷效能。海绵、无纺布和聚氨酯泡沫本身不具备除磷能力,但对微生物的负载量大、容积负荷高,是当前生物处理技术中微生物载体理想的材料。我们的研究表明,以聚氨酯泡沫作为材料时,对聚磷菌的吸附效果和除磷效果均最佳,对菌体的吸附率达 95.21%,吸附后水中磷含量能降低至 0.45 µg/mL,达到污水排放标准(<0.5 µg/mL)。这是由于聚氨酯泡沫的传质性能好、生物亲和性高、亲水性强、空间体积利用率大且易于流化,能将

微生物牢固固定于载体上提高系统生物量,从而有效缓解生物强化菌的流失<sup>[48-49]</sup>。以聚氨酯泡沫作为固定化材料能有效提升聚磷菌对磷的去除<sup>[50]</sup>,将其用于生物除磷工艺中,对富营养化水环境处理具有广阔的应用前景。

## REFERENCES

- [1] Yao Y, Shen ZL. A review on eutrophication research of coastal waters[J]. *Marine Sciences*, 2005, 29(2): 53-57 (in Chinese)  
姚云, 沈志良. 水域富营养化研究进展[J]. *海洋科学*, 2005, 29(2): 53-57
- [2] Han YH, Li M. Phyto-microremediation technology on treatment of eutrophic water[J]. *Technology of Water Treatment*, 2012, 38(3): 1-6,11 (in Chinese)  
韩永和, 李敏. 植物-微生物联合修复技术治理水体富营养化[J]. *水处理技术*, 2012, 38(3): 1-6,11
- [3] Abell JM, Özkundakci D, Hamilton DP. Nitrogen and phosphorus limitation of phytoplankton growth in new zealand lakes: implications for eutrophication control[J]. *Ecosystems*, 2010, 13(7): 966-977
- [4] Paerl HW, Xu H, McCarthy MJ, Zhu GW, Qin BQ, Li YP, Gardner WS. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): the need for a dual nutrient (N&P) management strategy[J]. *Water Research*, 2011, 45(5): 1973-1983
- [5] Ansari AA, Gill SS, Lanza GR, Rast W. Eutrophication: Causes, Consequences and Control[M]. Berlin: Springer, 2011: 143-170
- [6] Schindler DW, Carpenter SR, Chapra SC, Hecky RE, Orihel DM. Reducing phosphorus to curb lake eutrophication is a success[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(17): 8923-8929
- [7] Zhong J. Phosphorus removal design in domestic sewage treatment process[J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2018(12): 75-77 (in Chinese)  
钟进. 生活污水处理工艺中的除磷设计[J]. *绿色科技*, 2018(12): 75-77
- [8] Ru GX. Research progresses of phosphorus removal technologies of eutrophic water[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2017, 44(23): 100,114 (in Chinese)  
茹改霞. 富营养化水体除磷技术的研究进展[J]. *广东化工*, 2017, 44(23): 100,114
- [9] Tang CC, Chen HM, Liu M, Ye X. Research progress in the use of adsorption for dephosphorization[J]. *Industrial Water Treatment*, 2015, 35(7): 1-4 (in Chinese)  
唐朝春, 陈惠民, 刘名, 叶鑫. 利用吸附法除磷研究进展[J]. *工业水处理*, 2015, 35(7): 1-4
- [10] Fuhs GW, 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
- [11] Henriot O, Meunier C, Henry P, Mahillon J. Improving phosphorus removal in aerobic granular sludge processes through selective microbial management[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 211: 298-306
- [12] Xiao KK, Zhou L, He BP, Qian L, Wan S, Qu LP. Nitrogen and phosphorus removal using fluidized-carriers in a full-scale A<sup>2</sup>O biofilm system[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 115: 47-55
- [13] Barnard JL, Dunlap P, Steichen M. Rethinking the mechanisms of biological phosphorus removal[J]. *Water Environment Research*, 2017, 89(11): 2043-2054
- [14] Chang HQ, Yang XE, Pu PM. A review of microbial phosphorus removal[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(S1): 375-378 (in Chinese)  
常会庆, 杨肖娥, 濮培民. 微生物除磷研究与工艺技术的发展前景[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(S1): 375-378
- [15] Fang Q, Zhang CS, Zhang KF, Rong HW. Effect of dissolved oxygen on denitrifying phosphorus removal bacteria[J]. *China Water & Wastewater*, 2008, 24(1): 35-39 (in Chinese)  
方茜, 张朝升, 张可方, 荣宏伟. 溶解氧对反硝化聚磷菌的影响研究[J]. *中国给水排水*, 2008, 24(1): 35-39
- [16] Zhang C, Wang LC. Effect of different dissolved oxygen on denitrifying phosphorus removal in the anaerobic/aerobic/anoxic/aerobic sequencing batch reactor[J]. *Technology of Water Treatment*, 2009, 35(12): 27-30 (in Chinese)  
张超, 王罗春. 溶解氧对反硝化除磷的影响[J]. *水处理技术*, 2009, 35(12): 27-30
- [17] Li ZK, Pu PM, Hu WP, Hu CH, Chen BJ, Li B, Cheng XY, Zhang SZ, Fan YQ, Zhang WD, et al. Improvement of Taihu water quality by the technology of immobilized nitrogen cycle bacteria[J]. *Nuclear Science and Techniques*, 2002, 13(2): 115-118
- [18] Li W, Hu XM, Sun TH, Wei W, Zhang CB. Temperature impact on wastewater treatment efficiency of SBBR/BAF[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 33(12F): 230-233 (in Chinese)  
李微, 胡筱敏, 孙铁珩, 魏伟, 张传彬. 温度对 SBBR/BAF 处理污水效能影响[J]. *环境科学与技术*, 2010, 33(12F): 230-233
- [19] Li W, Zhang HY, Sun HZ, Zeng F, Gao YN, Zhu L. Influence of pH on short-cut denitrifying phosphorus removal[J]. *Water Science and Engineering*, 2018, 11(1): 17-22
- [20] Zhang SH, Huang Y, Hua YM. Denitrifying dephosphatation over nitrite: effects of nitrite concentration, organic carbon, and pH[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 3870-3875

- [21] An J, Fu GH, Ruan JM, Chen BY, Gong QB, Tang XB, Yang XL. Studies on the screening of denitrifying and phosphorus removal bacteria and its characteristics[J]. Microbiology China, 2012, 39(2): 162-171 (in Chinese)  
安健, 伏光辉, 阮记明, 陈百尧, 龚琪本, 唐兴本, 杨先乐. 反硝化除磷菌筛选及其特性研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(2): 162-171
- [22] Fang CY, Zhou J, Ming HM, Zhao XX, Chen ME, Yao X. Optimization of phosphorus removal conditions with efficient phosphorus-accumulating bacterium *P<sub>2</sub>* by response surface methodology[J]. China Brewing, 2016, 35(8): 104-109 (in Chinese)  
方春玉, 周健, 明红梅, 赵兴秀, 陈蒙恩, 姚霞. 响应面法优化高效聚磷菌 *P<sub>2</sub>* 除磷条件的研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(8): 104-109
- [23] Covarrubias SA, De-Bashan LE, Moreno M, Bashan Y. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2669-2680
- [24] Xie SB, Jiang YQ, Ding L, Xie C, Tan WF, Xiao X, Li Y, Zhou Q. Performance and mechanism of U(VI) adsorption via the phosphorus-accumulating bacteria burdened biochar[J]. Journal of Safety and Environment, 2018, 18(3): 1082-1088 (in Chinese)  
谢水波, 蒋元清, 丁蕾, 谢超, 谭文发, 肖雪, 黎媛, 周庆. 聚磷菌协同生物炭对水中 U(VI) 的去除特性及机理研究[J]. 安全与环境学报, 2018, 18(3): 1082-1088
- [25] Zhuang ZG, Han YH, Zhang WX, Zhou ZH, Chen JX, Li M. 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)  
庄志刚, 韩永和, 章文贤, 周志华, 陈佳兴, 李敏. 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
- [26] Li B, Zhao M, Li BH, Liu ZJ. Screening of strain LB4 with high capability of accumulating polyphosphate and its characteristics[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2009, 37(10): 85-87 (in Chinese)  
李博, 赵敏, 李宝赫, 刘哲君. 高效聚磷菌的筛选及除磷特性分析[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(10): 85-87
- [27] State Environmental Protection Administration of China. Monitoring and Analysis Methods for Water and Wastewater[M]. 4th ed. Beijing: China Environment Science Press, 2002: 246-248 (in Chinese)  
国家环境保护总局. 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: 246-248
- [28] Dong XZ, Cai MY. Manual for Systematic Identification of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-385 (in Chinese)  
东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370-385
- [29] Pang J, Liu ZY, Hao M, Lan H, Wu T. Comparison and optimization of methods for genomic DNA extraction from Gram positive bacteria[J]. Microbiology China, 2015, 42(12): 2482-2486 (in Chinese)  
庞建, 刘占英, 郝敏, 兰辉, 吴涛. 革兰氏阳性细菌基因组 DNA 提取方法的比较及优化[J]. 微生物学通报, 2015, 42(12): 2482-2486
- [30] Stante L, Cellamare CM, Malaspina F, Bortone G, Tilche A. Biological phosphorus removal by pure culture of *Lamprospira* spp.[J]. Water Research, 1997, 31(6): 1317-1324
- [31] Shao X. Study on the characteristics and influence factors of high-effective microbiol consortium for phosphorus removal[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui University, 2014 (in Chinese)  
邵啸. 高效聚磷菌混合菌群除磷特性与影响因素研究[D]. 合肥: 安徽大学硕士学位论文, 2014
- [32] Zhu HM, Liu WJ, Wang NS. Application of data mining in optimization of extracting technology of traditional Chinese pharmacy[J]. Computers and Applied Chemistry, 2006, 23(3): 233-236 (in Chinese)  
朱恒民, 刘文杰, 王宁生. 数据挖掘技术在优化中药提取工艺中的应用[J]. 计算机与应用化学, 2006, 23(3): 233-236
- [33] Chu LB, Wang JL. Comparison of polyurethane foam and biodegradable polymer as carriers in moving bed biofilm reactor for treating wastewater with a low C/N ratio[J]. Chemosphere, 2011, 83(1): 63-68
- [34] Guo LY, He W, Zhang YG, Liu W. Study on phosphorus removal effect of *Acinetobacter*[J]. Guangdong Chemical Industry, 2019, 46(16): 37-39 (in Chinese)  
郭丽英, 何维, 张煜光, 刘伟. 一株不动杆菌聚磷菌的除磷效果研究[J]. 广东化工, 2019, 46(16): 37-39
- [35] Wang CL, Ma F, Wang LL, Wang Q. Research on low temperature-resistant polyphosphate-accumulating organisms[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2007, 39(8): 1327-1330 (in Chinese)  
王春丽, 马放, 王立立, 王强. 耐低温聚磷菌的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2007, 39(8): 1327-1330
- [36] Nan YP, Yuan LJ, Wang Y. Characteristic and performance of phosphate accumulation by *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(4): 1028-1034 (in Chinese)  
南亚萍, 袁林江, 王洋. 金黄色葡萄球菌聚磷特性研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(4): 1028-1034
- [37] Gao CD, Wu LJ, Hao K, Li L, Yuan JP. Initiation and molecule ecology analysis of low dissolved oxygen limited

- filamentous bulking at low temperature[J]. *Journal of Beijing University of Technology*, 2011, 37(7): 1085-1089 (in Chinese)  
高春娣, 武联菊, 郝坤, 李磊, 袁金萍. 低温条件下低溶解氧污泥微膨胀的发生及分子生态学解析[J]. *北京工业大学学报*, 2011, 37(7): 1085-1089
- [38] Wang R, Zheng P, Li W, Chen H, Chen TT, Ghulam A. Identification and function test of an alkali-tolerant denitrifying bacterium[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(4): 372-378 (in Chinese)  
王茹, 郑平, 厉巍, 陈慧, 陈婷婷, Ghulam A. 耐碱反硝化菌株的分离鉴定与功能检测[J]. *微生物学报*, 2013, 53(4): 372-378
- [39] Jin R. Isolation and identification of efficiently aerobic denitrifying phosphorus removing bacteria and analysis of the factors influencing denitrification and phosphorus removal[D]. Taiyuan: Master's Thesis of Taiyuan University of Science and Technology, 2018 (in Chinese)  
靳茹. 高效好氧反硝化聚磷菌的分离鉴定及脱氮除磷影响因素分析[D]. 太原: 太原科技大学硕士学位论文, 2018
- [40] Coats ER, Brinkman CK, Lee S. Characterizing and contrasting the microbial ecology of laboratory and full-scale EBPR systems cultured on synthetic and real wastewaters[J]. *Water Research*, 2017, 108: 124-136
- [41] Zhang T, Liu Y, Fang HHP. 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
- [42] Panswad T, Doungchai A, Anotai J. Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system[J]. *Water Research*, 2003, 37(2): 409-415
- [43] Rong HW, Peng YZ, Zhang CS, Fang Q. Study on effect of aeration rate on biological phosphorus removal in sequencing batch biofilm reactor[J]. *China Water & Wastewater*, 2008, 24(5): 72-76 (in Chinese)  
荣宏伟, 彭永臻, 张朝升, 方茜. 曝气量对 SBBR 生物除磷的影响研究[J]. *中国给水排水*, 2008, 24(5): 72-76
- [44] Munjal N, Sawhney SK. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30(5): 613-619
- [45] Wu KY, Wisecarver KD. Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, 39(4): 447-449
- [46] Zhu W, Wang X, Yang LY. Removal of phosphorus from wastewater by combination of modified biochar and phosphate-accumulating organisms[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(11): 6241-6248 (in Chinese)  
朱雯, 王鑫, 杨柳燕. 改性生物炭与聚磷菌联合去除废水中的磷[J]. *环境工程学报*, 2016, 10(11): 6241-6248
- [47] Zhou LC, Li YF, Bai X, Zhao GH. Use of microorganisms immobilized on composite polyurethane foam to remove Cu(II) from aqueous solution[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 167(1/3): 1106-1113
- [48] Tan C, Ma F, Li A, Qiu S, Li JZ. Evaluating the effect of dissolved oxygen on simultaneous nitrification and denitrification in polyurethane foam contact oxidation reactors[J]. *Water Environment Research*, 2013, 85(3): 195-202
- [49] Li A, Ma F, Zhang DJ, Xing LL, Sun YL, Chen H. Pilot-scale biological treatment process of domestic wastewater under low temperature and low C/N ratio enhanced by aerobic denitrification and denitrifying phosphorus accumulation bacteria[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(8): 1917-1926 (in Chinese)  
李昂, 马放, 张栋俊, 邢路路, 孙移鹿, 陈翰. 基于好氧反硝化及反硝化聚磷菌强化的低温低碳氮比生活污水生物处理中试研究[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(8): 1917-1926
- [50] He ME, Wang W, Wu LS, Gao YT, Li SY. Study on the extraction of breviscapine from erigeron breviscapus with ultrasonic wave technology optimized by central composite design-response surface method[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2010, 33(6): 984-988 (in Chinese)  
何弥尔, 王伟, 吴立生, 高云涛, 李世月. 星点设计-效应面法优选灯盏花乙素超声提取工艺[J]. *中药材*, 2010, 33(6): 984-988