

· 综 述 ·

聚磷菌胞内多聚物的分析检测方法

李夕耀¹, 彭永臻^{1,2}, 王淑莹¹, 郭春艳¹, 袁志国³

(1. 北京工业大学北京市水质科学与水环境恢复工程重点实验室, 北京 100124; 2. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 3. 澳大利亚昆士兰大学高级废水研究中心, 澳大利亚 布里斯班 4072)

摘要: PHA、糖原和多聚偏磷酸盐这三种多聚物在聚磷菌 (PAOs) 体内的代谢和生长有着很重要的作用, 它们同时也影响污水处理强化生物除磷系统的处理效果, 因此需要对胞内聚合物进行分析测定。本文介绍了监测 PHA、糖原和多聚偏磷酸盐的常用定量和定性方法, 以及部分方法的提取手段、预处理过程、测定原理以及注意事项。

关键词: 强化生物除磷; 聚磷菌; 聚羟基烷酸; 糖原; 多聚偏磷酸盐

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1001-3644 (2009) 02-0106-06

Analytical Method for Intracellular Polymers of Polyphosphate Accumulating Organisms

LI Xi-yao¹, PENG Yong-zhen^{1,2}, WANG Shu-ying¹, GUO Chun-yan¹, YUAN Zhi-guo³

(1. Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science & Water Environment Recovery Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 2. School of Municipal & Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 3. Advanced Wastewater Management Centre, The University of Queensland, Brisbane 4172, Australia)

Abstract: Three intracellular polymers, poly- β -hydroxyalkanoate (PHA), glycogen and poly-metaphosphate, in the polyphosphate accumulating organisms (PAOs) play a very important role in vivo metabolism and growth, which also affect the treatment effect of the enhanced biological phosphorus removal systems. Therefore it is necessary to analyze the intracellular polymers. This paper introduced the conventional methods to qualitatively and quantitatively determine PHA, glycogen and poly-metaphosphate as well as their extractions, pretreatment, the determination principles and matters need attention.

Keywords: Enhanced biological phosphorus removal; polyphosphate accumulating organisms; poly- β -hydroxyalkanoate; Glycogen; poly-metaphosphate

1 引 言

水体富营养化与氮磷的含量密切相关, 一般认为总氮含量大于 0.2mg/L 或总磷达到 0.02mg/L 时, 水体将富营养化, 藻类会大量繁殖, 造成水质恶化。由于氮、磷均是产生水体富营养化的主要因素, 所以污水处理工艺中的脱氮除磷技术就成为防治水体富营养化的关键因素。除磷的方法主要有物

理法、化学法和生物法三大类。其中物理法由于成本太高、技术复杂而很少被应用; 化学法去除效率高, 但污泥产率很大; 生物法是最为经济有效和常用的方法。

生物法可以通过两种途径来实现生物除磷: 一种是仅仅依靠微生物在其自身生长过程中需要磷, 从而达到除磷的目的, 但这种方法很难去除掉更多的磷。另外一种方法则是通过控制反应器中的反应条件使得微生物能够聚集过量的超过其自身生长所需要的并且以多聚磷酸盐颗粒 (Polyphosphate, Poly-P) 的形式在体内储存的磷, 具有此类除磷特征的工艺被称为强化生物除磷 (Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR) 工艺, 而“过量摄磷”正是 EBPR 工艺的核心机理。这类微生物被称为聚磷菌 (Polyphosphate accumulating organisms,

收稿日期: 2008-10-13

基金项目: 国家自然科学基金 - 海外青年学者合作研究基金项目 (50628808); 北京市教委科技创新平台项目 (PXM2008-014204-050843); 北京市科技计划项目 (D07050601500000)。

作者简介: 李夕耀 (1984 -), 女, 湖南长沙人, 北京工业大学环境工程专业 2006 级在读硕士研究生, 研究方向为污水生物处理, 水污染控制工程, 强化生物除磷系统中聚磷菌和聚糖菌的代谢研究。

PAOs)。

与聚磷菌新陈代谢密切相关的胞内多聚物有三种：聚羟基烷酸（Poly-β-hydroxyalkanoate, PHA）、糖原（Glycogen）和多聚偏磷酸盐（Polyphosphate, Poly-P）。聚磷菌在厌氧条件下分解体内多聚偏磷酸盐和糖原，产生能量，吸收细胞外的挥发性脂肪酸（例如乙酸、丙酸等）。同时多聚磷酸盐水解成的正磷酸盐释放至体外，造成厌氧释磷。糖原降解也提供还原力用于合成聚羟基烷酸（Poly-β-

hydroxyalkanoate, PHA）。好氧或缺氧时，聚磷菌利用在厌氧时积累在体内的 PHA，过量吸收水中的正磷酸盐转化为聚磷颗粒，累积在细胞中，其他能量使得聚磷菌生长繁殖和糖原恢复^[1]。由下表可知三种胞内聚合物在不同条件下的变化趋势及其作用。EBPR 系统效果的好坏与聚磷菌体内的多聚物密切相关，它们在 PAOs 内的变化对其正常代谢有着重要作用。

表 聚磷菌中多聚物的变化和作用
Tab. Changes and roles of polymers in PAOs

多聚物名称	厌氧段		好氧 / 缺氧段	
	变化趋势	作用	变化趋势	作用
聚羟基烷酸	增加		减少	提供碳源和能源来合成糖原和细菌的生长繁殖
糖原	减少	产生 ATP 和还原力，合成 PHA	增加	
多聚偏磷酸盐	减少	为厌氧下聚磷菌吸收 VFA、合成 PHA 提供能量	增加	去除水中磷酸盐

在 PAOs 代谢的研究中，由于胞内多聚物的重要性和模型预测的需要，常常对 PHA、糖原和多聚偏磷酸盐进行分析和测定，但采用的方法各不相同。本文总结了聚磷菌胞内多聚物的常用定量和定性监测方法，介绍了一些方法的预处理步骤和测定过程中的注意事项。旨在根据不同的测定目的和要求，结合各种方法的优缺点及实验室实际情况，供研究者参考。

2 聚磷菌胞内多聚物的分析测定

2.1 PHA 的分析测定

聚羟基烷酸是一种可生物降解的聚合物，通常由于一些营养元素的缺乏而在微生物体内成为碳源和能源物质。近年来，应用污水处理中活性污泥来合成 PHA 成为研究热点，不同污水成分和微生物种类，得到的 PHA 成分和含量是有差异的。

聚磷菌在厌氧时合成的 PHA 是典型的二元多聚物，具体组分由碳源的性质和浓度决定。当碳源为乙酸时，PAOs 将在厌氧段积累大量的聚 β 羟基丁酸盐（PHB）。若丙酸为底物中唯一碳源时，PAOs 将吸收丙酸转化为聚 3 羟基戊酸盐（PHV）和聚 3 羟基-2 甲基戊酸盐（PH2MV）^[2]。

测定 PHA 的方法有很多种，例如重量法和染色法是比较早期的分析 PHA 的方法。重量法测定时需要的活性污泥量大，这种方法目前没有研究继

续使用。染色法常用于快速检测系统污泥中是否存在 PHA 的合成和分解。之后很多仪器分析法开始应用在 PHA 的定量和结构的分析上，例如液相色谱法、气相色谱法、气质联用、核磁共振、傅立叶红外光谱分析等等^[3]。在污水的 EBPR 的研究中，聚磷菌代谢中的 PHA 最常用的定量测定方法为气相色谱法和紫外分光光度法，这两种方法都需要提取胞内的 PHA。

目前主要的提取方法有四种^[4~6]：1、有机溶剂萃取法。普遍应用的是氯代烃（如三氯甲烷、二氯甲烷等）和丙酮等。在 EBPR 研究中，提取 PAOs 体内 PHA 的方法普遍采用的是将酸化甲醇（将硫酸溶于甲醇中，并含有苯甲酸钠作为内标物质）和氯仿溶剂加入到一定量的冻干污泥中（通常为 30mg 干泥或者将 10mL 已知污泥浓度的混合液冷冻干燥），加热消解细胞，使 PHA 溶于消解液中。冷却后用水清洗并萃取甲醇，使得 PHA 留在氯仿相中。2、化学试剂法。林东恩等人^[7]用改进的氨水法提取污泥中的 PHB，试验结果表明，这种方法较氯仿提取来说能够减小对环境的污染。但是这种方法在 EBPR 系统中很少应用，原因在于氨水法在提取率上偏低，不适合聚磷菌模型预测与拟合试验。郑裕东等人^[8]在考察活性污泥生物合成的 PHA 的结构表征时，采用的提取方法是次氯酸钠提取、氯仿固定。可见，氨水法和次氯酸法是化学试剂法中最常用的。除此之外，表面活性剂也能

成功破胞提取 PHA。3、机械破碎法。例如高压匀浆法可以成功破坏细胞壁,使微生物体内 PHA 释放出来。此法通常与化学试剂法一同使用。4、酶法。通过专一性酶除去破碎细胞后的核酸、脂类和蛋白质等,提高提取后 PHA 的纯度。

2.1.1 气相色谱法

PHA 的气相色谱法首先需要对菌体进行有机溶剂萃取,预处理之后吸取含有污泥中 PHA 的氯仿相注入气相色谱,由峰面积得到所含的 PHA 质量^[9]。

气相色谱采用 FD 检测器,常用氮气作为载气,也有文献用氦气作为载气来测定 PHA^[10]。炉温采用程序升温,根据不同的机型和色谱柱调整最佳色谱条件,将 PHA 的各组分区别开。出峰的顺序为 PHB、PHV、PH2MV,其他的 PHA 组分由于在聚磷菌体内很少成为代谢产物,所以不需考虑。例如,图 1 为 PHB-co-PHV (SIGMA-ALDRICH) 标样与内标物质的气相色谱谱图。笔者采用的气相系统是安捷伦 6890N,色谱柱为 DB-1 柱,进样口温度 200,氮气做载气,FD 检测器工作温度为 250。炉温采用程序升温,首先在 80 保持 2min,然后以 8 /min 的速度升到 160,并保持 2min。如图所示,PHB 的保留时间约为 2.840min,PHV 的出峰为 3.820min,内标物约在 5.885min 时出现峰值。气相色谱法测定聚磷菌中的 PHA 最大的优点在于能够将 PHA 的不同组分测定分别表示,且精确度较高。缺点是仪器设备贵重,而且预处理的时间长也较麻烦。

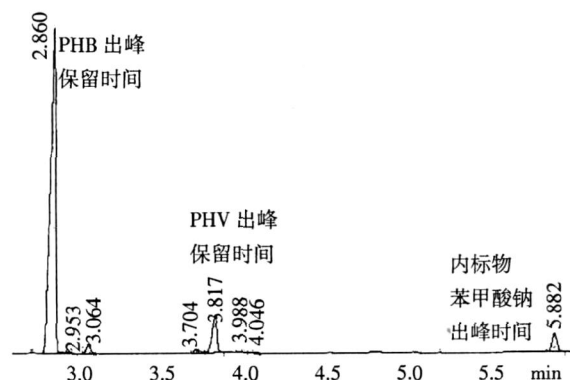


图 1 测定 PHA 的出峰图

Fig. 1 Analysis of PHA with GC

2.1.2 分光光度法

同气相色谱法,紫外分光光度法测定首先也采用如前所述的有机溶剂萃取法。之后在溶有 PHA

的氯仿中直接加入浓硫酸(或者先将氯仿蒸发后再加入浓硫酸),然后在 100 下加热 10min,混合液中将生成巴豆酸,冷却后用紫外分光光度计在 235 nm 下测定其吸光度。同时做不加污泥的空白试验和标准品试验,然后根据回归曲线得到 PHA 的含量^[11~13]。

紫外分光光度法的应用远远不如气相色谱法,缺点在于精确度不够,标准曲线的线性回归率常远远偏离 1,测定污泥样品时加标回收率也常偏离 100%。其次,在测定时,氯仿的蒸发最好需要特殊装置对其回收,否则污染环境。再者,这种手法不能确定 PHA 的组成成分,若聚磷菌的底物确定为单一底物时,常采用这种方法。而当聚磷菌为混合碳源时,并不能将 PHB 或者 PHV/PH2MV 一定量,只能知道 PHA 的总量。

2.1.3 化学染色

用化学染色法能直观简便地得知 PAOs 体内 PHA 的变化。对聚 β 羟基丁酸国内多采用苏丹黑 (Sudan black) 染色法。田淑媛等人^[14]在研究其活性污泥工艺流程中,大量采用此染色法,他们认为直接染色简单快速,便于生物除磷系统的日常监测,而不需要复杂的过程和类似气象色谱等仪器。

如图 2 所示,笔者用苏丹黑染色法检测生活污水为底物的强化生物除磷系统中的污泥,污泥取样的时间为厌氧 2h 后。具体方法是在涂片固定后,用 3g/L 的苏丹黑乙醇溶液染色 10min 后用水和二甲基苯冲去多余的苏丹黑,再用 5g/L 的番红水溶液复染 1 到 2min,最后水洗吸干后镜检。因为苏丹黑在脂类中的溶解度比在染料中的高,所以染色后 PHB 呈现黑色,菌体由于复染呈现红色或粉红色。但是苏丹黑由于也能与其他脂类物质结合,所以用苏丹黑染色 PHB 的特异性一般。

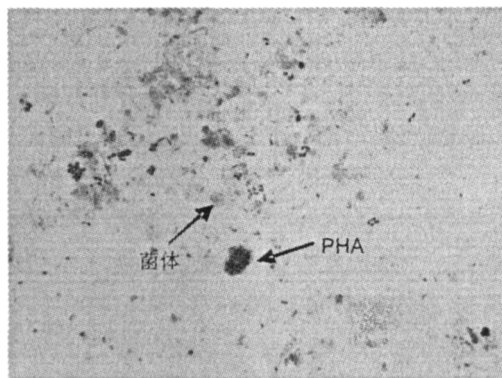


图 2 苏丹黑染色图

Fig. 2 Staining of anaerobic sludge with Sudan black

对于聚羟基烷酸的染色,也可采用尼罗蓝(Nile blue)染色法。早在1982年, Ostle等人就用尼罗蓝染色 PHB,结果表明在460nm的激发波长下, PHB将发荧光,糖原和多聚磷酸盐都不会被染上,他们认为 Nile Blue染色比苏丹黑更具有特异性。进行尼罗蓝染色后 PHA颗粒将发荧光,若与DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindol)染色结合,即可知具有 PHA的菌体占全菌的百分含量^[15]。当菌体内的 PHA含量越高,其染色后的荧光越明显。Levantesi等人^[16]在实验室的小型生物除磷反应器中的污泥中,应用了尼罗蓝染色结合荧光原位杂交(Fluorescence In situ Hybridization, FISH)的方法,在大量试验中,证实了在厌氧段中聚磷菌能大量富集 PHA颗粒于体内。

2.2 糖原的分析测定

糖原是由葡萄糖通过化学键而聚合在一起的多聚物。在厌氧时,聚磷菌体内的糖原能通过ED途径分解产生还原力,使得PAO吸收的VFA转化生成PHA。在好氧阶段,PHA除了为吸磷提供能源、为生长繁殖提供碳源以外,它还将重新合成糖原。

糖原的定量方法包括把聚合物水解和测定葡萄糖两个步骤。然而区别这些聚合物、其他存在的碳水化合物和葡萄糖是不可能的,所以,大多数现有的关于活性污泥的研究都不是定量糖原,而是定量总碳水化合物。

PAOs的糖原测定常采用液相色谱法,蒽酮法和氧化酶法。除此之外,葡萄糖的测定还可以应用斐林法、碘量法、旋光法、半胱氨酸-硫酸法等^[17-19]。

2.2.1 液相色谱法

高效液相色谱法测定糖原的预处理与测定PHA气相色谱法时的第一个步骤一样,需要冻干污泥。之后在定量的干污泥中加入稀盐酸(通常是0.6mol/L)在密封的玻璃管中100℃消解5个小时左右,冷却后离心,采用0.45微米膜过滤后的滤液20~200μL注入色谱分析葡萄糖含量。流动相一般使用浓度很小的硫酸。检测器采用折光率检测器,也可采用紫外吸收检测器或荧光检测器。

液相色谱法的应用较广泛,特别是在国外。J Keller等人对聚磷菌进的系列研究中,富集培养了PAOs^[20],在此基础上提出了聚磷菌的厌氧丙酸代谢模型^[21],此外,他们还讨论了聚磷菌和聚糖菌竞争影响因素^[22,23],以及反硝化聚磷菌的特性^[24]等。在这些试验过程中,他们大多采用了液相色谱

法。由于预处理中需要加入稀盐酸,所以消解液的离子键力很大,需要对消解液用酸性氧化铝的填料进行固相提取,导致预处理的成本增加。

2.2.2 蒽酮法

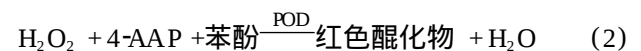
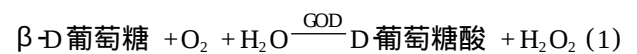
糖类在强酸(如硫酸)的作用下会生成糖醛,在冷水浴或冰水浴的污泥样品中加入蒽酮试剂,混合冷却后,移至沸水浴中加热10min后迅速冷却。在此过程中,蒽酮可与糖醛起反应,反应后混合液呈蓝绿色,其深浅与糖的浓度成正比,可在620nm用分光光度计测得其吸光度,通过葡萄糖标准样品的曲线可得知糖原的浓度。

顾国维、陈银广等人^[25,26]在研究强化生物除磷系统中多采用蒽酮法测定糖原。此法不需要将污泥冻干,节省了稀盐酸消解污泥的时间。但是,蒽酮显色剂不稳定,需要保存在冰箱中,最好是现配现用。同时,糖原在测定过程的冷却和加热时间与蒽酮的氧化还原作用密切相关,所以在实验中需要准确控制时间和反应温度的一致性,以保证结果的准确性。

2.2.3 氧化酶试剂法

在EBPR系统中,除了液相色谱法和蒽酮法的应用,研究者也较常用氧化酶法测定糖原。Carvalho等人^[27]在研究反硝化除磷过程中,使用此法对系统中糖原分析。Filipe等人^[28]在不同pH值条件下PAOs的动力学和化学计量学厌氧模型研究中,测定糖原使用的是SIGMA公司的葡萄糖酶试剂盒。Levantesi等人^[16]消解细胞后,也是用葡萄糖试剂盒对糖原进行测定。

氧化酶试剂的测定原理可用下式表示:



上式中, GOD为葡萄糖氧化酶; POD为过氧化物酶, 4-AAP为4-氨基安替吡啉。生成红色的醌类化合物颜色的深浅与葡萄糖含量成正比,可以在505nm下测定其吸光度,然后在葡萄糖的工作曲线上得到浓度值。由此原理衍生出来的酶-荧光法、酶-发光法、酶-电极法也能应用在EBPR系统的糖原测定中。它的缺点在于,预处理的过程同液相色谱一样,需要冻干污泥和稀盐酸消解细胞,结果的表达和测量上却达不到液相色谱那样精准。

2.3 多聚偏磷酸盐的分析测定

多聚偏磷酸盐在EBPR系统中起到碳源和磷源的作用,它是由正磷酸盐单体以酯键结合形成的线

性或环形聚合物。由于它对某些染料有特殊反应,产生与所用染料不同的颜色,因此得名异染颗粒。聚磷菌正是由于体内有多聚磷酸盐的存在,才表现出过量吸磷的现象。

在河流湖泊底泥中,多聚偏磷酸盐的测定一般是通过 ^{32}P 核磁共振、软X射线荧光光谱技术、酶解等方法来实现^[29]。其中 ^{32}P 核磁共振常用于早期的聚磷菌内的多聚磷酸盐的结构分析。Pereira等人^[30]采用核磁共振的研究结果表明,聚磷菌内的多聚磷酸盐是由钾镁和蛋白质等物质构成。所以目前EBPR研究中,人为配水投加了大量的钾盐和镁盐,使得PAOs在合成多聚偏磷酸盐时有丰富的营养元素。

对于聚磷菌多聚磷酸盐的定量测定,通常先将其转化为正磷酸盐,然后用标准方法测定正磷酸盐的含量。测定时可用高氯酸或者硝酸在高温高压下消解细胞。豆俊峰等人^[12]在研究厌氧释磷的动力学时,污泥在120℃下烘干,然后用高氯酸振荡提取胞内的聚磷,然后通过浓硫酸转化为正磷酸盐,最后用钼锑抗分光光度法测定。正磷酸盐的测定方法可以参见标准水质检测方法和采用离子色谱测定。笔者认为,若是需要同时测定PHA、糖原和多聚偏磷酸盐时,用冷冻干燥法将污泥干燥是比较可取的方法。

染色法在多聚磷酸盐的分析中应用很广,如Kong等人^[31]在实际污水处理系统中采用奈瑟氏染色活性污泥,由染色结果分辨出其中的PAOs,并在此基础上分析聚磷菌的形态特征。奈瑟氏染色的结果是多聚磷酸盐颗粒呈紫黑色,菌体为黄棕色。

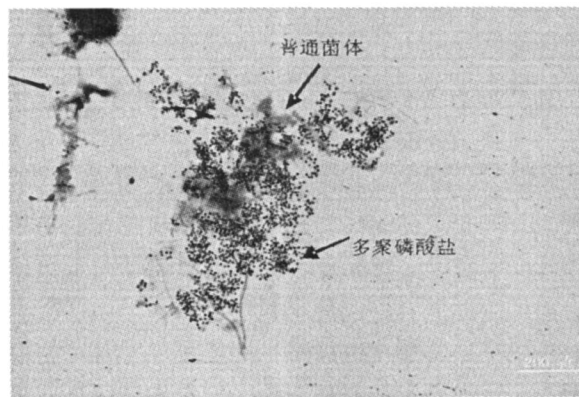


图3 甲苯胺蓝染色图

Fig.3 Staining of aerobic sludge with toluidine blue

注:笔者以乙酸钠和丙酸交替碳源下富集聚磷菌,此污泥用于多聚磷酸盐染色,取泥时间为好氧结束。

而笔者则使用甲苯胺蓝对异染颗粒染色(如图3所示),反应的甲液中含有甲苯胺蓝染料、乙醇、冰醋酸和孔雀绿。乙液采用的碘和碘化钾的混合水溶液。涂片后用甲液染色5min,复染用乙液。特征染色的结果是异染颗粒呈黑色,其他部分呈暗绿或浅绿色。蔡天明等人^[32]也运用此法于高效聚磷菌株的生理生化鉴定和聚磷特性研究。

Liu等人^[33]在研究生物除磷过程中多聚磷酸盐的变化趋势时,使用的是DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindol)染色。高浓度(如50~100mg/L)的DAPI染色10分钟左右或者用低浓度(如1~3mg/L)的DAPI染色1h,菌体将在荧光汞灯紫外激发模块下发灰白色光,多聚磷酸盐颗粒将呈现亮黄色光,且这种亮黄的荧光不容易衰减^[34]。用DAPI染色聚磷能与荧光原位杂交等方法结合,以进一步探明聚磷菌的分子生物学特性。

3 结语

纵观EBPR系统聚磷菌体内多聚物的各种测定方法,一类是定性说明,大多采用染色法。例如,用苏丹黑或尼尔蓝染色PHA,多聚磷酸盐可采用奈瑟氏染色法、甲苯胺蓝染色法和DAPI染色法。另一类是定量测定,这类方法的前处理通常步骤较繁琐,如PHA的气相色谱法、糖原的液相色谱法等方法。

PHA、糖原和多聚磷酸盐这三种多聚物在聚磷菌体内的代谢和生长有着很重要的作用,由于环境的变化,它们在细胞中处于频繁的变化中。在建立不同条件下PAOs的生化模型和动力学模型时,需要对三种胞内聚合物分析测定,以揭示EBPR系统的变化规律与胞内聚合物之间的相互关系。PAOs胞内聚合物的常用检测手段预处理和测定程序中,每一种方法适用范围和目的不同。未来测定方法将集中在如何简化预处理步骤和开发新的测定方法,以深入考察胞内聚合物的其他特性,如分子结构与排列等。

参考文献:

- [1] 彭永臻,刘智波,MINO T.污水强化生物除磷的生化模型研究进展[J].中国给水排水,2006,22(6):1-5
- [2] Oehmen A, Lenos P C, Carvalho G, et al. Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale[J]. Water Research, 2007, 41: 2271-2300.
- [3] 魏大巧,陈国强.聚羟基脂肪酸酯的鉴定及检测方法研究进

- 展[J]. 云南化工, 2007, 34(4): 83-86
- [4] 沈忠耀,尹进,李红旗. 从微生物细胞中分离提取 PHB 的方法的综述[J]. 化工时刊, 1997, 11(5): 40-45
- [5] 苏涛,石海平. 微生物合成的聚羟基链烷酸在细胞内的积聚及提取[J]. 高分子材料科学与工程, 1999, 15(1): 173-175
- [6] 杨青,贺青. 聚羟基烷酸(PHA)的回收方法[J]. 工业微生物, 1999, 29(2): 43-47
- [7] 林东恩,高振忠,张逸伟,等. 改进的氨水法提取活性污泥中聚-3-羟基丁酸酯的试验[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2003, 24(3): 93-94
- [8] 郑裕东,钟青华,马文石,等. 用活性污泥生物合成聚羟基链烷酸酯的结构表征[J]. 高等学校化学学报, 2000, 21(6): 991-993
- [9] Oehmen A, Lehmann B K, Zeng R J, et al Optimization of poly- β -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1070: 131-136
- [10] Ballistreri A, Giuffrida M, Guglielmino S P P, et al Biosynthesis and structural characterization of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas aeruginosa* from fatty acids[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2001, 29: 107-114
- [11] 王景峰,王暄,季民,等. 聚糖菌颗粒污泥基于胞内储存物质的同步硝化反硝化[J]. 环境科学, 2006, 27(3): 473-477
- [12] 豆俊峰,罗固源,刘翔. 生物除磷过程厌氧释磷的代谢机理及其动力学分析[J]. 环境科学学报, 2005, 25(9): 1164-1169
- [13] 林东恩,张逸传,郭世骚,等. 活性污泥好氧/厌氧合成聚-3-羟基丁酸酯[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2002, 30(9): 100-104
- [14] 田淑媛,李征,王景峰. 厌氧/好氧交替工艺生物除磷及活性污泥特殊染色[J]. 工业用水与废水, 2001, 32(1): 13-15
- [15] Kawaharasaki M. In situ identification of polyphosphate accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration[J]. Water Research, 1999, 33(1): 257-265
- [16] Levantesi C, Serafini L S, Crocetti G R, et al Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor[J]. Environmental Microbiology, 2002, 10(4): 559-569
- [17] 占达东,黎瑞珍,李开鸿. 糖的检测[J]. 琼州大学学报, 2003, 10(5): 27-29
- [18] 周娟,陈滋青,胡军. 葡萄糖测定方法的比较研究[J]. 工业微生物, 1999, 29(4): 34-36
- [19] 周亚樵,林培华. 定量测定葡萄糖方法的研究[J]. 理化检验-化学分册, 2000, 36(9): 415-417
- [20] Lu H, Oehmen A, Virdisa B, Keller J, et al Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphatus* through alternating carbon sources[J]. Water Research, 2006, 40: 3838-3848
- [21] Oehmen A, Zeng R J, Yuan Z, et al Anaerobic metabolism of propionate by polyphosphate-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems[J]. Biotechnology Bioengineering, 2005, 91(1): 43-53
- [22] Oehmen A, Saunders A M, Vives M T, et al Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 123: 22-32
- [23] Oehmen A, Vives M T, Lu H, et al The effect of pH on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms[J]. Water Research, 2005, 39: 3727-3737
- [24] Zeng R J, Saunders A M, Yuan Z, et al Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms[J]. Biotechnology Bioengineering, 2003, 83(2): 140-148
- [25] 郑弘,陈银广,杨殿海,等. 污水起始 pH 值对序批式反应器(SBR)中增强生物除磷过程的影响研究[J]. 环境科学, 2007, 28(3): 512-516
- [26] Chen Y, Chen Y S, Xu Q, et al Comparison between acclimated and unacclimated biomass affecting anaerobic-aerobic transformations in the biological removal of phosphorus[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 723-732
- [27] Carvalho G, Lemos P C, Oehmen A, et al Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure[J]. Water Research, 2007, 41: 4383-4396
- [28] Filipe C D M, Daigger G T, Grady J C P L. Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs[J]. Biotechnology Bioengineering, 2001, 76(1): 32-43
- [29] Hupfer M, Gloss S, Schmieder P, et al Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments[J]. International Review of Hydrobiology, 2008, 93(1): 1-30
- [30] Pereira H, Lemos P C, Reis M A M, et al Model for carbon metabolism in biological phosphorus removal processes based on in vivo C-13-NMR labeling experiments[J]. Water Research, 1996, 30(9): 2128-2138
- [31] Kong Y, Nielsen J L, Nielsen P H. Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 6: 4076-4085
- [32] 蔡天明,管莉莎,崔中利,等. 高效聚磷菌株 GM1 的分离和聚磷特性研究[J]. 土壤学报, 2005, 42(14): 635-641
- [33] Liu W T, Nielsen A T, Wu J H, et al In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(2): 110-122
- [34] 任世英,肖天. 聚磷菌体内多聚物的染色方法[J]. 海洋科学, 2005, 29(1): 59-63