

低温强化生物除磷反应器中微生物的竞争关系

亢 涵, 李 楠, 任南琪

(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, rnq@hit.edu.cn)

摘 要: 为了考察低温条件下聚磷菌和聚糖菌之间的竞争关系及其对反应器除磷效果的影响, 利用 FISH 技术跟踪检测了低温条件下运行的强化生物除磷(EBPR) SBR 反应器中的聚磷菌和聚糖菌. 实验结果表明 0~20 d 为调整阶段, 反应器的各项指标不稳定, 聚磷菌和聚糖菌在反应器中竞争优势地位. 从菌体数量曲线发现, 调整阶段中, 聚磷菌数量逐渐增加, 而 *Alphaproteobacteria* 数量逐渐减少, *Gammaproteobacteria* 数量低于 8.11%. 这种现象说明低温更有利于聚磷菌的生长繁殖, 使其在反应器中占据优势地位, 并淘汰聚糖菌. 50~60 d 聚磷菌快速增殖, 由于聚磷菌的数量 5 d 内只增加了 3.2%, 没有造成反应器处理效果的延迟现象.

关键词: 强化生物除磷; 荧光原位杂交; 聚磷菌; 聚糖菌; 低温

中图分类号: X703.1

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2010)06-0881-05

Competition between phosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms and the phosphate removal efficiency in EBPR reactor at low temperature

KANG Han, LI Nan, REN Nan-qi

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, rnq@hit.edu.cn)

Abstract: Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) was operated in a laboratory-scale sequencing batch reactor (SBR). Fluorescent in situ hybridization (FISH) was used to study the competition between the phosphate-accumulating organisms (PAOs) and glycogen-accumulating organisms (GAOs). The influence of competition between PAOs and GAOs on phosphate removal efficiency was discussed. The results showed that 0-20 d was an adjusting stage. COD and phosphate removal efficiencies of SBR were unstable. PAOs and GAOs competed for the predominant status in reactor. During 20-60 d, the amount of PAOs increased gradually, while the amount of *Alphaproteobacteria* decreased and *Gammaproteobacteria* contents was below 8.11% in this stage, which indicates that low temperature is beneficial to PAOs. PAOs proliferated rapidly during 50-60 d. Because the increased amount of PAOs was only 3.2% per 5 d, the phosphate removal efficiency in reactor was not delayed.

Key words: enhanced biological phosphorus removal; fluorescent in situ hybridization; phosphate-accumulating organisms; glycogen-accumulating organisms; low temperature

强化生物除磷(EBPR)技术利用微生物高效去除污水中的磷酸盐,已经广泛应用于污水处理

厂中.聚磷菌和聚糖菌是存在于强化生物除磷系统(EBPR)中的竞争菌.聚磷菌在厌氧阶段分解体内 polyP 释放能量来吸收底物合成体内的 PHAs 储备,在好氧阶段分解体内的 PHAs,释放能量吸收磷酸盐合成体内 polyP^[1].聚糖菌与聚磷菌不同之处在于,厌氧阶段分解体内糖原释放能量,用来吸收底物合成 PHAs,在好氧阶段分解体

收稿日期: 2010-03-01.

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07207-005-003).

作者简介: 亢 涵(1982—),女,博士研究生;
任南琪(1959—),男,长江学者特聘教授,中国工程院院士.

内的 PHAs 释放能量合成糖原^[2]. 为了让反应器取得更好的除磷效果, 前人研究了 EBPR 系统的影响因素. Zhang 等发现当 pH 从 7.0 降到 6.5 时, 反应器除磷能力降低^[3]. Serafim 等发现当 pH 从 7.0 增加到 8.5 时, 反应器的除磷能力增加^[4]. Oehmen 等认为丙酸比乙酸有利于提高 EBPR 系统的除磷效果, 因为聚糖菌吸收丙酸速率小于聚磷菌^[5]. Panswad 等发现, 温度从 20 °C 升到 35 °C 时厌氧释磷速率增加, 但好氧吸收速率降低, 即使在 20 °C, 反应器中仍存在大量聚糖菌^[6]. 溶解氧 (DO) 也影响聚磷菌和聚糖菌的竞争^[7].

本研究在低温下运行了强化生物除磷反应器, 利用 FISH 技术监测其中的聚磷菌和聚糖菌并将它们量化, 研究其竞争关系及其对反应器除磷效果的影响.

1 实验

1.1 实验装置与方法

试验采用有效容积为 2 L 的圆柱形有机玻璃反应器, 内径为 10 cm, 高度为 35 cm. 反应器间歇式运行, 12 h 一个周期. 0 ~ 90 min 厌氧搅拌 (其中 0 ~ 8 min 进水), 90 ~ 330 min 好氧曝气, 沉降 15 min, 出水 10 min, 闲置 5 min. 温度与 DO 用 WTW DO 测定仪监测, 控制反应器内温度在 (15 ± 2) °C. 好氧阶段溶解氧质量浓度 > 2.0 mg · L⁻¹.

1.2 实验材料

接种污泥取自哈尔滨文昌污水处理厂曝气

池, 该污水厂采用传统活性污泥法, 污泥具有良好的有机物去除效果, 除磷效率 < 30%.

实验用水采用人工配水, 进水的主要组成物质与浓度为 CH₃COONa · 3H₂O 4.69 mmol/L (COD 为 300 mg · L⁻¹), NH₄Cl 1.79 mmol/L (ρ_N = 25 mg · L⁻¹), NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.32 mmol/L (ρ_P = 10 mg · L⁻¹), 此外每升进水中含有 0.5 mL 微量元素液: EDTA 100 mg · L⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 20.6 g · L⁻¹, CaCl₂ 5.6 g · L⁻¹, MnSO₄ · H₂O 0.14 g · L⁻¹, FeSO₄ · 7H₂O 5.7 g · L⁻¹, CuCl₂ · 2H₂O 0.19 mg · L⁻¹, ZnCl₂ 0.05 g · L⁻¹, H₃BO₃ 0.05 g · L⁻¹.

1.3 取样与水质分析方法

为了考察反应器启动过程中聚磷菌的形态与数量以及与污染物处理效果的关系, 分别在反应器运行第 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 d 取样. 取样后离心分离混合液, 上清液过滤后按照《水和废水监测分析方法》(第三版) 检测 COD, PO₄³⁻ 等水质指标, 污泥部分立即固定用于 FISH 分析.

1.4 FISH 分析

1.4.1 样品的固定

污泥样品在质量分数为 4% 多聚甲醛中 4 °C 固定 2 h, 在 PBS 溶液中冲洗 2 次, 悬浮于 PBS - 乙醇 (体积比 1 : 1) 溶液中, 于 -20 °C 保存.

1.4.2 荧光探针

实验应用 16S rRNA 探针如表 1 所示.

表 1 实验应用的 16S rRNA 探针

探针	序列(5'-3')	目标菌	引用	
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Most bacteria	[8]	
EUB338mix	EUB338-II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Planctomycetes	[9]
	EUB338-III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Verrucomicrobiales	[9]
	PAO462	CCGTCATCTACWCAGGATTAAC	PAO cluster	[10]
PAOmix	PAO651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	Betaproteobacteria	[10]
	PAO846	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	Rhodocyclus sp.	[10]
	TFO_DF218	GAAGCCTTTGCCCTCAG	cluster 1 <i>Deffluicoccus</i> spp.	[11]
DFmix	TFO_DF618	GCCTCACTTGTCTAACCG	in <i>Alphaproteobacteria</i>	[11]
	DF966	GATACGACGCCATGTCAAGGG	cluster 2 <i>Deffluicoccus</i> spp.	[11]
	DF1020	CCGCCGAACCGACTCCC	in <i>Alphaproteobacteria</i>	[11]
	GAOmix	GAO Q431	TCCCCGCCTAAAGGGTT	<i>Gammaproteobacteria</i>
	GAOQ989	TTCCCCGGATGTCAAGGC	<i>Competibacter phosphatis</i>	[10]

1.4.3 原位杂交

将固定的样品置于用明胶包背的载玻片上, 风干后于体积分数分别为 50%、80%、95%、100%

的乙醇中各脱水 3 min, 风干后等待杂交. 污泥样品在 46 °C 杂交 2.5 h, 杂交液成分如下: 0.9 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 质量分数为 0.01%

SDS 体积分数为 20% (EUB388) 和体积分数为 35% (PAOmix、DFmix、GAOsmix) 去离子甲酰胺, pH 7.2. 杂交后于 48 °C 用洗液 (40 mmol/L NaCl, 质量分数为 0.01% SDS, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2) 洗 20 min, 之后用蒸馏水洗去残留洗液, 自然风干^[2]. 风干后样品用共聚焦显微镜 LSM 510 META (德国 Zeiss 公司) 观察, 并用其配套软件获得聚磷菌数量在全菌数量中所占比例.

2 结果与分析

2.1 COD 去除效果

图 1 给出了反应器 COD 去除效果. 由图可见, 在反应器运行的 60 d 中, COD 去除率平稳, 保持在 95% 左右. 大部分 COD 在厌氧阶段去除. 0 ~ 20 d 厌氧末期 COD 浓度变化较大, 20 d 之后趋于平稳.

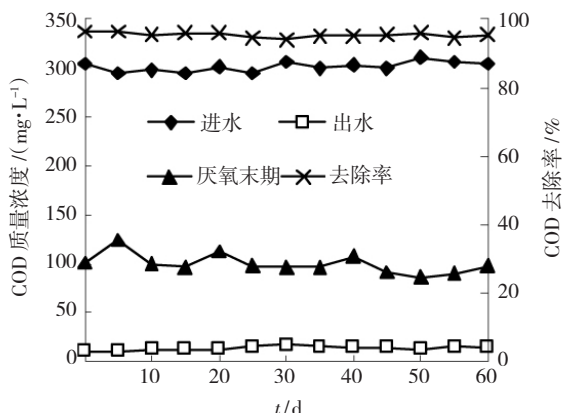


图 1 反应器 COD 的去除情况

2.2 磷酸盐去除效果

图 2 给出了低温运行的反应器中磷的去除效果. 由图可见, 初期磷酸盐去除率不稳定, 20 d 后, 出水磷浓度逐渐降低, 使磷酸盐去除率持续上升, 60 d 时达到最大值 86.89%. 初期厌氧末期磷浓度波动较大, 20 d 后逐渐增加, 45 d 时达到最大值 26.44 mg · L⁻¹. 50 d 时突然降低, 之后又再次升高.

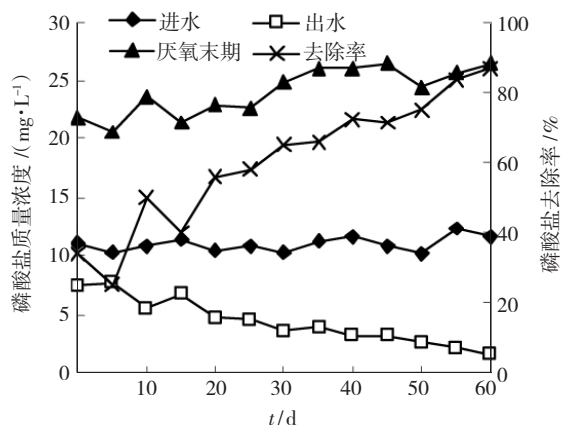
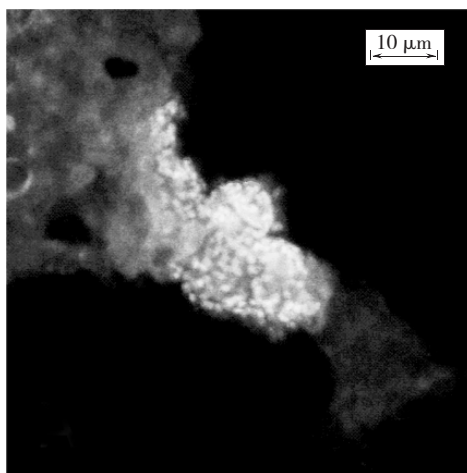


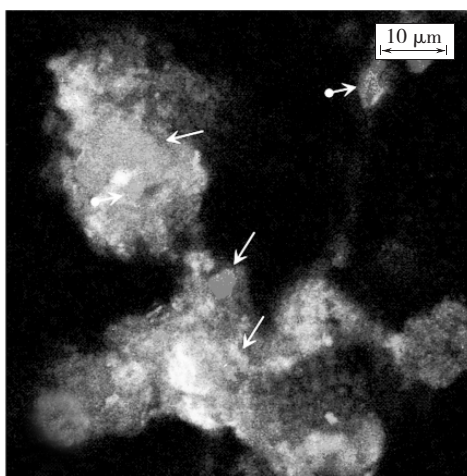
图 2 反应器磷酸盐的去除情况

2.3 FISH 原位检测反应器中聚糖菌

图 3 分别为反应器中聚磷菌和聚糖菌的双杂交 FISH 图片. 图 3 (a) 为反应器运行 50 d 时反应器中的聚磷菌 FISH 图片. 这张图片中用到的杂交探针为 FITC 染料标记的 EUB338mix 探针和 CY3 染料标记的 PAOmix 探针, 图中的黄色荧光为杂交了这两中探针的 *Rhodocyclus* sp. 绿色荧光为只杂交了 EUB338mix 探针的菌. 图 3 (b) 为反应器运行 10 d 时反应器中的聚糖菌 FISH 图片. 这张图片中用到的杂交探针为 FITC 染料标记的 EUB338mix 探针、CY3 染料标记的 PAOmix 探针和 CY5 染料标记的 DFmix 探针. 图中圆箭头标记的红色荧光为杂交了 GAOmix 探针的 *Competibacter phosphatis* (*Gamma-proteobacteria*) 标准箭头标记的蓝色荧光为杂交了 DFmix 探针的 *Deftluvicoccus* spp. (*Alphaproteobacteria*) 绿色为杂交了 EUB338mix 探针的菌.



(a) 50 d 时的聚磷菌



(b) 10 d 时的聚糖菌

图 3 反应器中聚磷菌和聚糖菌的 FISH 图片

2.4 聚糖菌含量

利用共聚焦显微镜配套软件, 可获得聚磷菌在全菌中所占的数量比例 (图 4). 由图可见, 聚磷

菌在全菌中的数量比例逐渐上升. 30 d 之前聚磷菌增长较快, 数量从 19.96% 增加到 33.13%. 30 ~ 50 d 聚磷菌数量保持在 33% 左右. 60 d 时聚磷菌数量突然增加, 达到最大值 41.49%. 0 ~ 30 d 反应器中的 *Alphaproteobacteria* 数量占全菌数量的比例由 15.76% 下降到 3.1%, 30 ~ 60 d 保持在 2.6% 左右. *Gammaproteobacteria* 数量逐渐上升, 但在全菌数量中所占比例不高, 最高为 8.11%.

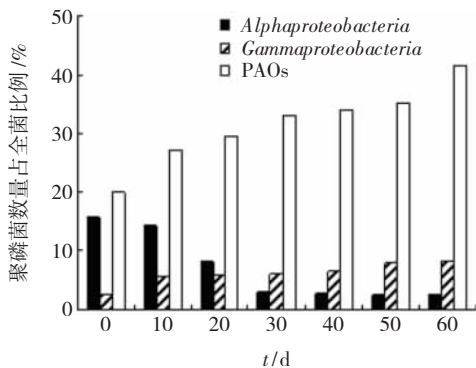


图 4 污泥中聚磷菌和聚糖菌占全菌的数量比例

3 讨论

图 4(a) 为聚磷菌 50 d 时的照片. 此时反应器的除磷率为 75%. 图中聚磷菌菌体密集成团, 菌群面积较大. 图 5 中, 此时聚磷菌占全菌的数量比例为 35.1%, 为 0 ~ 50 d 的最大值. 图 4(b) 为聚糖菌 10 d 时的照片. 图中蓝色为 *Alphaproteobacteria*, 此时反应器中 *Alphaproteobacteria* 数量较多, 占全菌数量的 14.24%, 菌体呈现明显的四聚体 (TFOs) 形态, 且在污泥中分散存在. 图中红色为 *Gammaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* 菌体为大球型, 数量较少.

聚糖菌是强化生物除磷反应器中聚磷菌的竞争菌. 由图 5 可以看出, 0 d 时 *Alphaproteobacteria* 的数量较多, 达到了 15.76%, 与聚磷菌的数量 19.96% 比较接近, *Gammaproteobacteria* 数量很少, 为 2.49%. 低温运行了 20 d 后, 聚磷菌的数量不断增加, *Alphaproteobacteria* 的数量不断降低, 而 *Gammaproteobacteria* 的数量在反应器运行期间一直保持增加, 但是占全菌数量的比例较少, 最高为 8.11%. *Alphaproteobacteria* 和 *Gammaproteobacteria* 都是聚磷菌的竞争菌, 但 *Alphaproteobacteria* 的数量却不断下降, 而 *Gammaproteobacteria* 的数量虽然较少, 但仍保持增长. 这种现象可以解释为, 低温条件下聚磷菌更易获得足够底物合成体内 PHA 用于生长繁殖; 而 *Alphaproteobacteria* 在低温下吸收底物合成 PHA 的速率降低, 导致其数量的减

少; 对于 *Gammaproteobacteria*, 一方面受到低温影响, 一方面受到聚磷菌的数量优势的制约, 其数量较少且增加缓慢. 这与 Erdal 等^[3]和 Lopez-Vazquez^[4]发现的现象相一致.

观察图 2 和 3 发现, 与 20 d 以后的数据相比, 20 d 之前反应器的各项指标均不稳定, 这时是聚磷菌占据优势地位而聚糖菌逐渐被淘汰的调整阶段. 20 ~ 50 d, 聚磷菌增长减缓, 数量保持在 33% 左右, 没有了竞争菌的干扰, 聚磷菌的除磷能力在逐渐增加. 此时 COD 去除效果稳定, 磷酸盐去除率持续上升, 厌氧末期磷浓度在 30 d 之后保持稳定, 这与聚磷菌含量曲线相一致. 这种现象说明, 聚磷菌的数量决定了厌氧末期磷释放量.

观察 50 ~ 60 d 的厌氧末期磷浓度可以发现, 50 d 时虽然聚磷菌占全菌数量的比例没变, 但厌氧磷释放减少, 50 d 后, 随着聚磷菌数量突然增加, 厌氧磷释放再次恢复, 而整个过程中, COD 去除率和厌氧末期 COD 浓度保持稳定. 这种现象可解释为聚磷菌为了繁殖积累体内的磷储备, 而减少厌氧释磷量. 亢涵等曾发现, 在反应器启动阶段, 快速增殖的新生聚磷菌不能立刻行使除磷能力, 要有一段“积累期”, 形成 PHA 和 polyP 储备^[5]. 而在本文的实验中, 聚磷菌快速增殖之后的反应器处理效果并没有滞后. 观察亢涵等的聚磷菌数量比例曲线可以发现, 聚磷菌的两个增殖阶段的菌体数量增长迅速, 比如第一增殖阶段聚磷菌占全菌数量比例在 5 d 内增加了 23.59%. 短时间内的大量增殖需要大量的 PHA 和 polyP 供给, 因此出现了反应器除磷效果延后的现象. 在本文的实验中, 50 ~ 60 d 聚磷菌占全菌数量比例在 5 d 内平均增加了 3.2%, 数量较少, 对反应器的处理效果没有造成影响.

4 结论

1) 强化生物除磷 SBR 反应器在低温下运行了 60 d. 0 ~ 20 d 反应器的各项指标不稳定, 这时反应器中的菌群结构发生变化, 聚磷菌和聚糖菌竞争优势地位. 此阶段为反应器的调整阶段, 20 d 后反应器各项指标逐渐稳定, 磷去除率增加.

2) 在低温运行的反应器中, 0 ~ 20 d, 低温更有利于聚磷菌的生长繁殖, *Alphaproteobacteria* 被淘汰. 而 *Gammaproteobacteria* 受到温度与聚磷菌的制约, 占全菌数量比例最高为 8.11%.

3) 50 ~ 60 d 聚磷菌出现了一个快速增殖阶段, 此时反应器的处理效果没有出现亢涵等所说的延迟现象. 亢涵等的实验结果中, 聚磷菌在短时间内

大量增殖,聚磷菌占全菌数量比例5 d内增加了23.59%,PHA和polyP供给不足,导致反应器处理效果延后.本文的实验中聚磷菌数量5 d内平均增加了3.2%,没有影响反应器的处理效果.

参考文献:

- [1] MINO T, LIU W T, KURISU F, *et al.* Modeling glycogen storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal processes [J]. *Water Sci Technol*, 1995, 31, 25-34.
- [2] LIU W T, MINO T, NAKAMURA K, *et al.* Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal [J]. *Water Research*, 1996, 30(1): 75-82.
- [3] ZHANG T, LIU Y, FANG H H P. Effect of pH change on the performance and microbial community of enhanced biological phosphate removal process [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 92 (2), 173-182.
- [4] SERAFIM L S, LEMOS P C, REIS M A M. Effect of pH control on EBPR stability and efficiency [J]. *Water Sci Technol*, 2002, 46 (4/5), 179-184.
- [5] 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]. *J Biotechnol*, 2006, 123 (1), 22-32.
- [6] PANSWAD T, DOUNGCHAI A, ANOTAI J. Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system [J]. *Water Res*, 2003, 37 (2), 409-415.
- [7] OEHMEN A, LEMOS P C, CARVALHO G, *et al.* Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale [J]. *Water Res*, 2007, 41 (11), 2271-2300.
- [8] AMMAN R I, BINDER B J, OLSON R J, *et al.* Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56 (6), 1919-1925.
- [9] DAIMS H, BRUHL A, AMANN R, *et al.* The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set [J]. *Syst Appl Microbiol*, 1999, 22(3), 434-444.
- [10] CROCETTI G R, HUGENHOLTZ P, BOND P L, *et al.* Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(3), 1175-1182.
- [11] WONG M T, TAN F M, NG W J, *et al.* Identification and occurrence of tetrad-forming *Alphaproteobacteria* in anaerobic-aerobic activated sludge processes [J]. *Microbiology*, 2004, 150, 3741-3748.
- [12] AMANN R I. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes [C]//AKKERMANS A D L, ELSAS J D, DE BRUIJ F J, editors. *Molecular microbial ecology manual*. London: Kluwer, 1995:1-15.
- [13] JERDAL U G, ERDAL Z K, RANDALL C W. The competition between PAOs (phosphorus accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) in EBPR (enhanced biological phosphorus removal) systems at different temperatures and the effects on system performance [J]. *Water Sci Technol*, 2003, 47 (11), 1-8.
- [14] LOPEZ-VAZQUEZ C M, OEHMEN A, HOOIJMANS C M, *et al.* Modeling the PAO-GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature [J]. *Water Research*, 2009, 43 (2), 450-462.
- [15] 亢 涵,王秀衡,李楠,等. 生物除磷系统启动期聚磷菌的 FISH 原位分析与聚磷特性 [J]. *环境科学*, 2009, 30(1): 80-84.

(编辑 杨 波)