

蒋涛,孙培德,金均. 2012. 系列混合碳源条件下颗粒化 EBPR 系统菌群结构变化规律研究[J]. 环境科学学报,32(11):2763-2769

Jiang T, Sun P D, Jin J. 2012. A study of microbial diversity of granule-based enhanced biological phosphorus removal systems cultivated with ratiometric propionate and acetate as mixed carbon sources [J]. Acta Scientiae Circumstantiae,32(11):2763-2769

系列混合碳源条件下颗粒化 EBPR 系统菌群结构变化规律研究

蒋涛^{1,2}, 孙培德^{1,*}, 金均²

1. 浙江工商大学环境科学与工程学院, 杭州 310012

2. 浙江省环境保护科学设计研究院, 杭州 310007

收稿日期:2012-01-10

修回日期:2012-02-09

录用日期:2012-03-05

摘要:在 SBR 反应器中接种富含聚磷菌的活性污泥,采用一系列不同丙酸/乙酸比例混合的碳源进行 EBPR 系统污泥的颗粒化培养,并考察了颗粒化进程中的系统菌群结构变化,以及不同混合碳源条件对系统功能菌种竞争的影响。结果表明,污泥颗粒化过程对 EBPR 系统菌群结构产生了较大的筛选作用。原本在系统中占优势的一类 Uncultured bacterium 被迅速淘汰;Uncultured *Rhodocyclaceae* bacterium、部分 *Candidatus Competibacter phosphatis*、部分 Denitrifying bacterium、*Acinetobacter* 及部分 Uncultured *alpha proteobacterium* 分别逐渐被淘汰。在各个成熟的颗粒化 EBPR 系统中,除磷微生物主要为 Uncultured *Chlorobi* bacterium 与 Uncultured *alpha proteobacterium*。不同混合碳源条件培养的颗粒化 EBPR 系统菌群结构差异主要表现为 *Candidatus Competibacter phosphatis*(聚糖菌)与 Uncultured *Chlorobi* bacterium(聚磷菌)菌群数量的不同。混合碳源中乙酸比例的提高可造成颗粒化 EBPR 系统中 *Candidatus Competibacter phosphatis* 的增长,使系统的除磷效率下降。而碳源中丙酸比例相对较高的条件有利于 Uncultured *Chlorobi* bacterium 增长,从而有助于颗粒化 EBPR 系统维持较好的除磷效率。

关键词:强化生物除磷;颗粒污泥;菌群结构;混合碳源;丙酸;乙酸

文章编号:0253-2468(2012)11-2763-07

中图分类号:X171

文献标识码:A

A study of microbial diversity of granule-based enhanced biological phosphorus removal systems cultivated with ratiometric propionate and acetate as mixed carbon sources

JIANG Tao^{1,2}, SUN Peide^{1,*}, JIN Jun²

1. School of Environmental Science and Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012

2. Environmental Science Research and Design Institute of Zhejiang Province, Hangzhou 310007

Received 10 January 2012;

received in revised form 9 February 2012;

accepted 5 March 2012

Abstract: A series of mixed carbon sources with different ratios of propionate and acetate was applied in granule-based enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge in SBR reactor. Microbial diversity change during the granular process and functional bacteria competition under different carbon sources were studied. Significant microbial diversity change in EBPR system was exhibited during granulation. Uncultured bacteria previously dominated in the system disappeared rapidly, while uncultured *rhodocyclaceae* bacterium and portions of *candidatus competibacter phosphatis*, denitrifying bacterium, *acinetobacter* and uncultured *alpha proteobacterium* were gradually washed out. Uncultured *chlorobi* bacterium and uncultured *alpha proteobacterium* were the primary phosphorus removal bacteria in developed granular EBPR system. The change of bacteria population of *candidatus competibacter phosphatis* and uncultured *chlorobi* bacterium was evidenced as a result of microbial diversity under different ratios of mixed carbon sources. The population of *candidatus competibacter phosphatis* increased monotonically with acetate concentration, decreasing the system phosphorus removal efficiency. Meanwhile, the population of uncultured *chlorobi* bacterium had a positive correlation with propionate concentration, which maintained good phosphorus removal efficiency of the EBPR system.

Keywords: enhanced biological phosphorus removal (EBPR); granular sludge; microbial diversity; mixed carbon sources; propionate; acetate

基金项目: 浙江省重大科技专项(No. 2010C03003)

Supported by the Special Project of Major Science and Technology of Zhejiang Province (No. 2010C03003)

作者简介: 蒋涛(1986—),男,E-mail: taosjunior@gmail.com; * 通讯作者(责任作者),E-mail: pdsun@126.com

Biography: JIANG Tao (1986—), male, E-mail: taosjunior@gmail.com; * **Corresponding author**, E-mail: pdsun@126.com

1 引言(Introduction)

在废水处理工艺的某些特定条件下,活性污泥中的微生物会通过自身固定化作用聚合形成微生物颗粒(Su *et al.*, 2005). 与普通污泥相比,这些颗粒化的污泥往往具有结构致密、沉降性能好、生物浓度高、抗冲击负荷能力强等特点(Wang *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2003),从而在废水处理中显示了许多优势. 自 20 世纪 80 年代发现颗粒污泥以来,污泥颗粒化技术被不断开发运用于多种废水生物处理工艺中,以去除各种难降解有机物、重金属及氮磷等物质(Adav *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2004).

强化生物除磷(Enhanced biological phosphorus removal, EBPR)作为目前最经济且环境友好的除磷工艺,已经广泛应用于废水处理领域. 近年来,国内外众多研究表明,将污泥颗粒化技术与 EBPR 系统工艺结合能有效提高其运行稳定性及可靠性(Wu *et al.*, 2010; 由阳等, 2008; Dulekgurgen *et al.*, 2003). 如 Wu 等(2010)以模拟废水成功培养了聚磷生物颗粒,稳定运行 300 多 d,平均除磷效率达到 94.3%;由阳等(2008)培养富含聚磷菌的好氧颗粒污泥对 COD 的去除率可达 95% 以上,磷去除率可达 100%. 目前,EBPR 系统的颗粒化培养已成为废水生物除磷的研究热点(Ahn *et al.*, 2009). 在颗粒化 EBPR 系统中,废水中的有机物及氮磷等主要由存在于除磷颗粒污泥中的各种微生物菌群去除(Zhang *et al.*, 2011). 因此,探明 EBPR 系统污泥颗粒化过程中的微生物菌群变化对于颗粒化 EBPR 系统工艺优化十分重要,且除磷颗粒污泥中的优势菌群种类及数量变化与系统除磷效率的关系也有待进一步考察.

在大多数实际运行的废水生物除磷系统中,复杂的底物碳源往往会经过水解作用而转化为乙酸或丙酸,从而形成以乙酸与丙酸为主的混合碳源条件(Oehmen *et al.*, 2007). 因此,本文在课题组前期研究的基础上,基于一系列不同丙酸/乙酸比例混合的碳源条件进行 EBPR 系统污泥的颗粒化培养,运用变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)等现代分子生物学技术研究系列混合碳源条件下各 EBPR 系统颗粒化进程中的菌群结构变化,以及不同混合碳源条件对系统功能菌种竞争的影响. 以期更好地理解颗粒化 EBPR 系

统处理运行结果,并为其工艺优化提供一定的理论指导.

2 材料与方法(Materials and methods)

2.1 试验装置与材料

试验装置采用 5 套相同的有机玻璃制 SBR 反应器,有效容积为 10 L. 试验接种污泥采用富含聚磷菌的高效除磷污泥. 试验模拟废水采用人工合成,分为合成废水 I 与 II 两种. 其中,合成废水 I 每 L 含:0.52 mL 丙酸($\text{COD} = 800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),0.229 g NH_4Cl ,0.088 g KH_2PO_4 ,0.147 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$,0.185 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.022 g CaCl_2 ,1.5 mg 蛋白胨,1.5 mg 酵母粉,1.2 mg 丙烯基硫脲(ATU),0.6 mL 微量元素液(Smolders *et al.*, 1994). 合成废水 II 每 L 含:1.043 g 无水乙酸钠($\text{COD} = 800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),不含丙酸,此外成分与合成废水 I 相同. 反应器进水由不同体积比例的合成废水 I 与合成废水 II 混合而成. 混合后,各 SBR 碳源组成及丙酸所占比例(以 COD 计)如表 1 所示. 进水后各反应器初始状态 COD 均为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ 为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,即各反应器 COD/N/P 均为 20/1.5/1.

表 1 各 SBR 碳源组成及丙酸所占比例(以 COD 计)

Table 1 Composition of main carbon sources and their concentrations in different SBR systems

SBR	丙酸 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	乙酸 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	丙酸占 总碳源比例
1 [#]	0	800	0
2 [#]	200	600	25%
3 [#]	400	400	50%
4 [#]	600	200	75%
5 [#]	800	0	100%

2.2 运行条件及参数

试验运行的 5 套反应器同步启动. 各反应器内除碳源配比条件不同外,其余运行参数设定都保持一致. 每周按进水(10 min)、厌氧搅拌(2.5 h)、好氧曝气(3 h)、沉淀(15 min)、排水(5 min)的顺序连续运行 6 h,每天运行 4 个周期. 每周进水体积为 2.5 L,以控制系统水力停留时间(hydraulic retention time, HRT)为 24 h. 控制系统污泥浓度(mixed liquor suspended solids, MLSS)为 $2500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 运行过程中控制各反应器内温度为 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 为 7.5~8.0, DO 为 $6 \sim 7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3 采样提取及分析

2.3.1 基因组 DNA 提取 分别于试验运行初期(接种污泥)、中期(30 d)及末期(90 d)从各反应器中采集适量活性污泥样品,并及时提取基因组 DNA 保存,以用于系统微生物菌群结构分析. 基因组 DNA 提取采用 3S 柱离心式环境样品 DNA 抽提试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司).

2.3.2 PCR-DGGE 分析 采用引物 968F-GC 和 1392R 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,循环 30 次后 72 ℃ 延伸 10 min. 扩增产物经纯化后进一步采用 DGGE 技术进行分离,方法参考文献(徐少娟等, 2011). 变性梯度为 40% ~ 60%;电泳条件为:电压 200 V,温度 60 ℃,时间 4.5 h. 电泳后凝胶用 SYB Green I 染色,于紫外灯下观察拍照.

2.3.3 16S rDNA 克隆及测序 将含目的 DNA 条带的 DGGE 凝胶块进行割胶回收获得 16S rDNA 片段,并采用热击法(Heat-shock)进行克隆转化. 所用载体为 pGEM-T Easy Vector (Promega),感受态细胞为 *Escherichia coli* JM109 (TaKaTa),方法参考文献(方治国等, 2011). 采用引物 SP6 和 T7 对阳性克隆子进行 PCR 扩增:94 ℃ 预变性 8 min;94 ℃ 变性 50 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 120 s,循环 35 次后 72 ℃ 延伸 10 min. 扩增产物经纯化后送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序.

3 结果(Results)

3.1 颗粒生长及除磷效率变化

试验运行 90 d,各反应器内活性污泥都实现了颗粒化转化,并维持稳定. 不同混合碳源条件培养的 EBPR 系统颗粒粒径生长具有明显差异. 系统碳源中丙酸所占比例与成熟颗粒粒径之间呈线性关系,0、25%、50%、75% 和 100% 丙酸碳源的反应器内形成的成熟颗粒体积平均粒径分别为 550.64、599.41、642.38、680.99 和 745.08 μm . 在相同的磷酸盐处理负荷(10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右)下,不同碳源条件培养的颗粒化 EBPR 系统除磷效率之间产生了显著性差异. 当碳源中丙酸所占比例分别为 0、25%、50%、75% 和 100% 时,系统平均净除磷能力分别为 0.78、2.29、2.96、3.23 和 3.77 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (以 MLSS 计);系统平均除磷效率分别为 31.5%、56.5%、77.4%、85.9% 和 97.0%. 详细内容可见文献(蒋涛等, 2012).

3.2 DGGE 图谱及相似性分析

图 1 为各反应器不同阶段污泥样品的 16S rDNA DGGE 图谱,其中,泳道 L0 为接种污泥样品, L1 ~ L5 分别为 100%、75%、50%、25%、0% 丙酸碳源系统运行 30 d 样品, L6 ~ L10 分别为 100%、75%、50%、25%、0% 丙酸碳源系统运行 90 d 样品. 从图中可以看到,泳道 L0 中共检测到 22 个条带,说明试验运行初期系统接种污泥中的微生物菌群结构比较丰富. 一般来说, DGGE 图谱中条带亮度信号的强弱在一定程度上反应了该类菌种在系统中数量的多少. 显然,泳道 L0 中条带 2 ~ 4、10、14 及 18 对应的亮度信号要强于其余条带,说明这些条带代表的菌种在试验初期的系统中占优势.

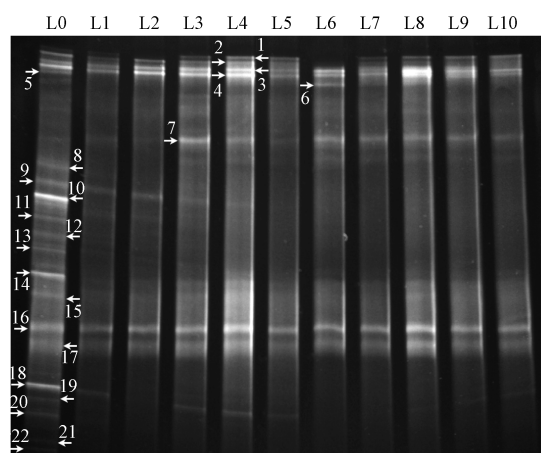


图 1 各反应器不同阶段污泥样品的 16S rDNA DGGE 图谱
Fig. 1 DGGE profiles of 16S rDNA from different sludge samples

相比泳道 L0,泳道 L1 ~ L10 中检测到的图谱条带数量则明显减少. 用 Quantity One (BIO-RAD 公司)软件对 DGGE 图谱中的 11 个泳道进行相似性分析,并以戴斯系数(Dice coefficient)法计算各泳道的相似系数,结果如表 2 所示. 从表 2 中可知,泳道 L1 ~ L5 与泳道 L0 的相似性都低于 50%,说明各系统微生物菌群结构都发生了显著改变. 此时各系统内污泥颗粒已基本形成,正处于颗粒快速生长阶段. 可见,污泥颗粒化过程对 EBPR 系统微生物菌群结构有着非常重要的影响,试验处理运行 30 d 已对系统微生物菌群产生了较大的筛选作用. 从泳道 L6 ~ L10 与泳道 L0 图谱的相似性可知,试验末期各系统微生物菌群结构与初始状态的相似性已进一步降至 40% 左右.

表 2 各反应器不同阶段细菌种群相似系数

Table 2 Comparability index of bacterial population of different samples

Lane	L0	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
L0	100.0%	48.5%	43.0%	47.6%	41.4%	43.5%	39.7%	36.8%	39.5%	38.5%	41.8%
L1	48.5%	100.0%	80.3%	55.4%	41.4%	69.9%	54.6%	66.0%	72.6%	70.6%	65.0%
L2	43.0%	80.3%	100.0%	55.5%	41.3%	68.7%	61.3%	72.3%	75.7%	71.5%	67.5%
L3	47.6%	55.4%	55.5%	100.0%	80.8%	63.7%	52.7%	58.0%	60.2%	59.7%	64.1%
L4	41.4%	41.4%	41.3%	80.8%	100.0%	48.5%	41.3%	42.4%	46.2%	44.0%	52.5%
L5	43.5%	69.9%	68.7%	63.7%	48.5%	100.0%	78.3%	86.4%	79.9%	83.6%	80.9%
L6	39.7%	54.6%	61.3%	52.7%	41.3%	78.3%	100.0%	81.9%	75.8%	78.3%	68.8%
L7	36.8%	66.0%	72.3%	58.0%	42.4%	86.4%	81.9%	100.0%	90.0%	91.8%	81.8%
L8	39.5%	72.6%	75.7%	60.2%	46.2%	79.9%	75.8%	90.0%	100.0%	94.7%	86.8%
L9	38.5%	70.6%	71.5%	59.7%	44.0%	83.6%	78.3%	91.8%	94.7%	100.0%	84.2%
L10	41.8%	65.0%	67.5%	64.1%	52.5%	80.9%	68.8%	81.8%	86.8%	84.2%	100.0%

3.3 16S rDNA 测序与序列分析

对 DGGE 图谱中各泳道出现的含目的 DNA 的条带进行割胶回收,获得 22 个代表性条带(对应图 1 中数字 1~22).将各条带中回收获得的 16S rDNA

片段(450 bp 左右)进行 PCR 扩增后纯化、克隆,挑取阳性克隆子进行测序.测得的序列在 NCBI 核酸数据库中比对,结果如表 3 所示.

表 3 16S rDNA 片段测序比对结果

Table 3 Nearest Genbank relatives of amplified 16S rDNA gene sequences excised from DGGE gels

条带	查询号	序列长/bp	最相似菌及其查询号	相似性
1	JQ713531	444	<i>Candidatus Competibacter phosphatis</i> clone SBRT50 (AY172150)	99%
2	JQ713532	445	<i>Acinetobacter</i> sp. KSL5401 -042 (GQ497289)	95%
3	JQ713533	441	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i> clone EBPR9 (AF255630)	99%
4	JQ713534	447	Uncultured <i>Chlorobi</i> bacterium (CU466694)	91%
5	JQ713535	449	Uncultured bacterium (FM201098)	98%
6	JQ713536	442	Uncultured <i>Chlorobi</i> bacterium (CU466693)	98%
7	JQ713537	446	Uncultured <i>Chlorobi</i> bacterium (CU466692)	99%
8	JQ713538	443	Uncultured bacterium clone N1512_36 (EU104207)	95%
9	JQ713539	446	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i> clone EBPR11 (AF255640)	99%
10	JQ713540	446	Uncultured bacterium clone C8 (FJ356024)	99%
11	JQ713541	444	Uncultured <i>Rhodocyclaceae</i> bacterium partial (AM268364)	95%
12	JQ713542	445	Denitrifying bacterium enrichment culture clone NOA_1_H10 (FJ802203)	100%
13	JQ713543	445	Denitrifying bacterium enrichment culture clone NOB_2_F10 (FJ802261)	100%
14	JQ713544	444	Uncultured bacterium clone G6 (FJ356050)	100%
15	JQ713545	444	Uncultured bacterium clone G105 (FJ356055)	99%
16	JQ713546	456	Uncultured bacterium clone KIST-JJY151 (FJ232676)	99%
17	JQ713547	445	Denitrifying bacterium enrichment culture clone NOB_2_E9 (FJ802252)	99%
18	JQ713548	444	<i>Candidatus Competibacter phosphatis</i> clone SBRT1 (AY172146)	99%
19	JQ713549	445	Denitrifying bacterium enrichment culture clone NOA_1_B10 (FJ802197)	99%
20	JQ713550	443	<i>Candidatus Competibacter phosphatis</i> clone F007_D12 (AY962318)	95%
21	JQ713551	448	<i>Candidatus Competibacter phosphatis</i> clone SBRT109 (AY172160)	97%
22	JQ713552	445	Denitrifying bacterium enrichment culture clone NOB_2_H11 (FJ802270)	100%

由表 3 可见,所有测序条带与数据库中公开序列比对的相似性都很高,大部分条带序列与最相似

菌种的相似性可达 98% 以上.其中,条带 1、18、20 及 21 所代表的菌种与 *Candidatus Competibacter*

phosphatis 最相似。众所周知, *Candidatus Competibacter phosphatis* 是最典型的聚糖菌之一 (Crocetti *et al.*, 2002)。条带 2 代表的菌种与 *Acinetobacter* sp. (不动杆菌属) 最相似, 而 *Acinetobacter* 是最早被鉴定且认为具有除磷能力的微生物 (Fuhs *et al.*, 1975)。条带 3 和 9 代表的菌种与一类 *Uncultured alpha proteobacterium* (α -变形菌纲) 最相似, 该类菌种是从具有聚磷能力的微生物菌群中分离出来的, 很可能属于聚磷菌 (Liu *et al.*, 2001)。条带 4、6 及 7 代表的菌种与 *Uncultured Chlorobi bacterium* 最相似, 为一类常出现于污水处理厂缺氧池中的不可培养细菌。根据最近的一些研究报道 (吴昌永等, 2010; 徐少娟等, 2011; 方治国等, 2011), *Uncultured Chlorobi bacterium* 可能为一种聚磷菌。条带 10、14 及 15 代表的菌种与一类发现于实际运行的大型 EBPR 厂活性污泥中的不可培养细菌最相似, 很可能具有除磷能力。特别注意到的是, 条带 11 代表的菌种属于 *Rhodocyclaceae* (红环菌科), 而目前唯一确定的聚磷菌 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 则与红环菌科下的红环菌属密切相关 (Hesselmann *et al.*, 1999), 因此, 推测条带 11 代表的菌种可能与 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 具有一定的亲缘关系, 可能为聚磷菌的一种。此外, 本试验系统微生物群落中也存在一些可能具有反硝化能力的菌种, 如条带 12、13、17、19 及 22。

4 讨论 (Discussion)

4.1 颗粒化进程对系统群落结构的筛选作用

从 DGGE 图谱中可以看出, 污泥颗粒化过程对 EBPR 系统群落结构具有较大的筛选作用。条带 2 ~ 4、10、14 及 18 对应的菌种在试验初期的系统中占优势。结合表 3 中的测序比对结果可知, 这些优势条带中除条带 18 代表的菌种为聚糖菌外, 其余多为聚磷菌, 主要包括 *Acinetobacter*、*Uncultured alpha proteobacterium*、*Uncultured Chlorobi bacterium*、*Uncultured bacterium* 及 *Uncultured Rhodocyclaceae bacterium*。

试验运行 30 d 后, 各反应器内污泥颗粒化已基本形成。比较泳道 L1 ~ L5 与泳道 L0 图谱条带信号的差异, 不难发现条带 10 与条带 14 两个优势条带的信号已然在各系统中消失, 说明聚磷菌 *Uncultured bacterium* 在系统污泥颗粒化过程中被迅

速淘汰。此外, 条带 8、11 ~ 13、15、19 ~ 22 等对应的菌种也分别被颗粒化系统淘汰。而条带 2、3、4 等代表的菌种 *Acinetobacter*、*Uncultured alpha proteobacterium*、*Uncultured Chlorobi bacterium* 等在各系统中仍占优势。

随着试验进一步运行, 各系统内污泥颗粒逐渐成熟, 最终稳定。此时各试验处理系统微生物菌群结构也相对稳定。分别比较泳道 L6 ~ L10 与泳道 L1 ~ L5 图谱差异, 可以发现条带 7 信号普遍增强, 而条带 2 及条带 9 等则在各系统中消失。可见, 随着各系统污泥颗粒化程度的进一步提高, *Uncultured Chlorobi bacterium* 在各试验系统中都得到了一定程度的增长, 而 *Acinetobacter* 及部分 *Uncultured alpha proteobacterium* 则最终被淘汰。于是, 在各个成熟的颗粒化 EBPR 系统中, 除磷微生物主要为 *Uncultured Chlorobi bacterium* 与 *Uncultured alpha proteobacterium*。

此外, 注意到各试验系统初期、中期及末期对应的泳道图谱中条带 16 与条带 17 的亮度信号几乎没有变化, 说明污泥颗粒化过程对这两类菌种 (*Uncultured bacterium* 与 *Denitrifying bacterium*) 没有太大影响, 既未被淘汰也未得到增长。

从整体上看, 本试验研究中 EBPR 系统微生物菌群种类随着污泥颗粒化进程逐渐减少, 且在 5 个不同混合碳源条件培养的颗粒化 EBPR 系统中都存在一致的现象, 即成熟的颗粒化 EBPR 系统相比传统的非颗粒化 EBPR 系统, 微生物菌群结构更单一。这与 Zhang 等 (2010) 的研究结果并不一致, 根据 Zhang 等 (2010) 的报道, 在厌氧-好氧 EBPR 系统的污泥颗粒化过程中, 随着污泥颗粒的形成与生长, 系统微生物菌群多样性逐渐增加; 再随污泥颗粒进一步增大后, 有部分菌群消失或减少。两者研究具有类似的试验条件, 但得到了两种明显不同的试验结果。目前, 污泥颗粒化过程对 EBPR 系统微生物菌群生长的影响机制尚未完全清晰。不过可以肯定的是, 随着 EBPR 系统污泥的颗粒化转化, 微生物菌群结构将被改变。污泥颗粒化过程对 EBPR 系统微生物菌群结构具有较大的筛选作用。

4.2 系列混合碳源条件下的功能菌种竞争机制

由表 2 可知, 泳道 L6 ~ L10 相互之间的相似性可达 68.8% ~ 94.7%, 表明以不同丙酸/乙酸比例混合的碳源条件培养颗粒化 EBPR 系统, 能获得整体类似的微生物菌群结构。从图 1 可以看出, 在试验末期各个运行稳定的颗粒化 EBPR 系统中, 主要有

条带 1、3、4、6、7、16、17 及 18 等对应的菌种适应生存. 由表 3 可知, 这些适应了颗粒化 EBPR 系统而生长的菌种主要包括 *Candidatus Competibacter phosphatis*、Uncultured *alpha proteobacterium*、Uncultured *Chlorobi bacterium*、Uncultured bacterium 及 Denitrifying bacterium.

进一步分析试验末期各成熟颗粒化 EBPR 系统的 DGGE 图谱, 仍可发现一定的差异性. 比较泳道 L6 ~ L10 之间的异同, 注意到条带 16 与条带 17 的信号在所有系统中几乎相同, 说明不同的混合碳源条件对 Uncultured bacterium 与 Denitrifying bacterium 的生长也没有太大影响. 条带 3、4 与 7 的信号在各泳道中都较亮, 说明 Uncultured *alpha proteobacterium* 及部分 Uncultured *Chlorobi bacterium* 在各个颗粒化 EBPR 系统中都能得到较好的生长. 于是发现, 不同混合碳源条件培养的颗粒化 EBPR 系统菌群结构差异集中表现在条带 1、6 及 18 等信号亮度的变化, 即 *Candidatus Competibacter phosphatis* (聚糖菌) 与 Uncultured *Chlorobi bacterium* (聚磷菌) 菌群数量的不同.

泳道 L6 中条带 1 与条带 18 两个条带已经完全消失, 而在泳道 L7 ~ L10 中条带 1 与条带 18 条带都依然存在. 已知泳道 L6 ~ L10 对应的系统碳源条件 (以 COD 计) 分别为 100% 丙酸、75% 丙酸 + 25% 乙酸、50% 丙酸 + 50% 乙酸、25% 丙酸 + 75% 乙酸、100% 乙酸; 而条带 1 与条带 18 代表的菌种都为 *Candidatus Competibacter phosphatis*. 因而可知, 当试验系统碳源中丙酸所占比例为 100% (不存在乙酸) 时, *Candidatus Competibacter phosphatis* 被淘汰; 而当试验系统碳源中丙酸所占比例低于 100% (存在乙酸) 时, *Candidatus Competibacter phosphatis* 能在系统中生长. 在传统 EBPR 系统研究中, 已发现当丙酸作为单一碳源时, 能有效抑制 *Candidatus Competibacter phosphatis* 的生长 (Pijuan *et al.*, 2004a; 2004b; Oehmen *et al.*, 2005; 2006). 这主要是因为相比丙酸, *Candidatus Competibacter phosphatis* 更适于以乙酸为碳源条件, 其摄取消耗丙酸的速率占摄取消耗乙酸速率的比例很小 ($< 5\%$, Oehmen *et al.*, 2004). 不仅如此, Zhang 等 (2010) 以乙酸为碳源进行 EBPR 系统污泥颗粒化培养, 试验进行 157 d, 系统中 *Candidatus Competibacter phosphatis* 菌群数量明显增多. 继而比较泳道 L7 ~ L10 图谱, 不难发现条带 1 亮度信号随系统碳源中乙酸比例提高而增强,

并且条带 18 也表现出同样的现象. 可见, 系统碳源中乙酸比例的提高 (丙酸比例降低), 造成了聚糖菌 *Candidatus Competibacter phosphatis* 的增长.

根据各试验系统除磷特性结果, 100%、75%、50%、25%、0% 丙酸碳源系统平均除磷效率分别为 97.0%、85.9%、77.4%、56.5%、31.5%. 因而分析, 提高混合碳源中的乙酸比例, 降低丙酸比例, 可造成颗粒化 EBPR 系统中聚糖菌 *Candidatus Competibacter phosphatis* 的增长, 使系统除磷效率下降.

此外注意到, 当系统碳源中丙酸所占比例 $\geq 50\%$ 时, 条带 6 的信号明显增强 (见泳道 L6、L7 及 L8). 而当系统碳源中丙酸所占比例 $< 50\%$ 时, 则并未发现此现象 (泳道 L9 及 L10). 已知条带 6 对应的菌种 Uncultured *Chlorobi bacterium* 为试验系统中的主要除磷微生物之一. 因而分析, 碳源中丙酸所占比例相对较高的条件有利于 Uncultured *Chlorobi bacterium* 增长, 从而有助于颗粒化 EBPR 系统维持相对较好的除磷效率.

5 结论 (Conclusions)

1) 初始非颗粒化 EBPR 系统中, 除聚糖菌 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 外, 优势菌群主要为多种除磷微生物, 如 *Acinetobacter*、Uncultured *alpha proteobacterium*、Uncultured *Chlorobi bacterium*、Uncultured bacterium 及 Uncultured *Rhodocyclaceae bacterium* 等.

2) 污泥颗粒化过程对 EBPR 系统菌群结构产生较大筛选作用, Uncultured *Chlorobi bacterium* 得到了一定程度的增长, 而 Uncultured bacterium、Uncultured *Rhodocyclaceae bacterium*、*Acinetobacter* 及部分 Uncultured *alpha proteobacterium* 等菌群分别逐渐被淘汰. 成熟颗粒化 EBPR 系统相比非颗粒化系统菌群结构更单一, 其中, 除磷微生物主要为 Uncultured *Chlorobi bacterium* 与 Uncultured *alpha proteobacterium*.

3) 不同混合碳源条件培养的颗粒化 EBPR 系统菌群结构差异主要表现为 *Candidatus Competibacter phosphatis* (聚糖菌) 与 Uncultured *Chlorobi bacterium* (聚磷菌) 菌群数量的不同. 混合碳源中乙酸所占比例提高可造成颗粒化 EBPR 系统中 *Candidatus Competibacter phosphatis* 的增长, 使系统除磷效率下降. 而碳源中丙酸所占比例相对较高的条件有利于

Uncultured *Chlorobi* bacterium 增长,从而有助于颗粒化 EBPR 系统维持较好的除磷效率。

责任作者简介: 孙培德(1957—),男,工学博士,硕士生导师,教授,主要研究方向:城镇污水生物处理理论及优化控制技术,环境安全系统数值模拟及优化控制技术。E-mail: pdsun@126.com。

参考文献(References):

- Adav S S, Lee D J, Show K Y, *et al.* 2008. Aerobic granular sludge: Recent advances [J]. *Biotechnology Advances*, 26(5):411-423
- Ahn J, McIlroy S, Schroeder S, *et al.* 2009. Biomass granulation in an aerobic; anaerobic-enhanced biological phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with varying pH [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(7): 885-893
- Crocetti G R, Banfield J F, Keller J, *et al.* 2002. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes [J]. *Microbiology*, 148(11): 3353-3364
- Dulekgurgen E, Ovez S, Artan N, *et al.* 2003. Enhanced biological phosphate removal by granular sludge in a sequencing batch reactor [J]. *Biotechnology Letters*, 25(9): 687-693
- 方治国,孙培德,钟晓,等. 2011. 强化生物除磷系统微生物群落结构对水温变化响应的试验研究[J]. *环境科学学报*, 31(5): 941-947
- Fang Z G, Sun P D, Zhong X, *et al.* 2011. Effect of water temperature on the microbial community in an enhanced biological phosphorus removal system [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 31(5):941-947 (in Chinese)
- Fuhs G W, Chen M. 1975. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater [J]. *Microbial Ecology*, 2(2): 119-138
- Hesseltmann R P X, Werlen C, Hahn D, *et al.* 1999. Enrichment phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(3): 454-465
- Jiang H L, Tay J H, Maszenan A M, *et al.* 2006. Enhanced phenol biodegradation and aerobic granulation by two coaggregating bacterial strains [J]. *Environmental Science and Technology*, 40(19): 6137-6142
- 蒋涛,孙培德,徐少娟. 2012. 系列混合碳源在 EBPR 系统颗粒化进程中的影响研究[J]. *环境科学*, 33(7): 2451-2457
- Jiang T, Sun P D, Xu S J. 2012. Effect of mixed carbon sources in the granulation process of EBPR system [J]. *Environmental Science*, 33(7): 2451-2457
- Liu Q S, Tay J H, Liu Y. 2003. Substrate concentration-independent aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor [J]. *Environmental Technology*, 24(10): 1235-1242
- Liu W T, Nielsen A T, Wu J H, *et al.* 2001. In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate- accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process [J]. *Environmental Microbiology*, 3(2): 110-122
- Liu Y, Tay J H. 2004. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment [J]. *Biotechnology Advances*, 22(7): 533-563
- Oehmen A, Yuan Z G, Blackall L L, *et al.* 2004. Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms [J]. *Water Science Technology*, 50(10): 139-144
- Oehmen A, Zeng R J, Yuan Z G, *et al.* 2005. Anaerobic metabolism of propionate by polyphosphate-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(1): 43-53
- Oehmen A, Saunders A M, Vives M T, *et al.* 2006. Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources [J]. *Journal of Biotechnology*, 123(1): 22-32
- Oehmen A, Lemos P C, Carvalho G, *et al.* 2007. Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale [J]. *Water Research*, 41: 2271-2300
- Pijuan M, Saunders A M, Guisasaola A, *et al.* 2004a. Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source [J]. *Biotechnology Bioengineering*, 85(1): 56-67
- Pijuan M, Baeza J A, Casas C, *et al.* 2004b. Response of an EBPR population developed in an SBR with propionate to different carbon sources [J]. *Water Science and Technology*, 50(10): 131-138
- Smolders G J F, Vandermeij J, Vanloosdrecht M C M, *et al.* 1994. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process-stoichiometry and pH influence [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(6): 461-470
- Su K Z, Yu H Q. 2005. Formation and characterization of aerobic granules in a sequencing batch reactor treating soybean-processing wastewater [J]. *Environmental Science Technology*, 39: 2818-2827
- Wang S G, Liu X W, Gong W X, *et al.* 2007. Aerobic granulation with brewery wastewater in a sequencing batch reactor [J]. *Bioresource Technology*, 98(11): 2142-2147
- Wu C Y, Peng Y Z, Wang S Y, *et al.* 2010. Enhanced biological phosphorus removal by granular sludge: From macro to micro scale [J]. *Water Research*, 44(3): 807-814
- 吴昌永,彭永臻,王淑莹,等. 2010. 强化反硝化除磷对 A²O 工艺微生物种群变化的影响[J]. *化工学报*, 61(1): 186-191
- Wu C Y, Peng Y Z, Wang S Y, *et al.* 2010. Effect of enhancing denitrifying phosphorus removal on microbial population variation in A²O process [J]. *CIESC Journal*, 61(1): 186-191 (in Chinese)
- 徐少娟,蒋涛,殷峻,等. 2011. 进水氨氮浓度对强化生物除磷(EBPR)系统除磷特性及微生物群落结构的影响[J]. *环境科学学报*, 31(4):745-751
- Xu S J, Jiang T, Yin J, *et al.* 2011. Effects of influent ammonia concentration on phosphorus removal and the microbial community in an EBPR system [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 31(4): 745-751 (in Chinese)
- 由阳,彭轶,袁志国,等. 2008. 富含聚磷菌的好氧颗粒污泥的培养与特性[J]. *环境科学*, 29(8): 2242-2248
- You Y, Peng Y, Yuan Z G, *et al.* 2008. Cultivation and characteristic of aerobic granular sludge enriched by phosphorus accumulating organisms [J]. *Environmental Science*, 29(8): 2242-2248 (in Chinese)
- Zhang B, Ji M, Qiu Z G, *et al.* 2011. Microbial population dynamics during sludge granulation in an anaerobic-aerobic biological phosphorus removal system [J]. *Bioresource Technology*, 102(3): 2474-2480