

生物除磷系统启动期聚磷菌的 FISH 原位分析与聚磷特性

亢涵, 王秀衡*, 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)

摘要:应用 FISH 对以乙酸钠为碳源的强化生物除磷 (EBPR) SBR 反应器启动期的微生物进行原位分析, 考察除磷生态系统形成过程中聚磷菌种群结构、空间分布关系动态变化及其聚磷特性. 结果表明, 以异养菌为主的活性污泥经过厌氧/好氧驯化后, 聚磷菌大量富集, 在全菌中的比例由 11.5% 增加到 40.48%. 启动过程中, 生物系统内菌群竞争持续进行: 首先, 聚磷菌淘汰异养菌, 历时 5 d; 聚磷菌种群内选择过程历时 19 d; 经过优势聚磷菌群的二次增长后, 共计 34 d 完成生物除磷系统的启动. 富集过程中快速增殖的聚磷菌不能立刻行使除磷能力, 要有一段“积累期”形成一定的 PHA 和 poly-P 储备. 表现为污染物去除效率滞后于聚磷菌的增殖, 经过 4~8 d 的“积累期”后上升出现峰值. 二次增长的优势聚磷菌群也经过“积累期”后才发挥作用. FISH 图片显示, 快速增殖期的聚磷菌菌体小, 菌群结构松散. 经过“积累期”之后, 菌体不断增大, 并开始紧密聚集形成致密的团状, 此时反应器处理效率较高.

关键词:生物除磷; 聚磷菌; FISH; 积累期

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)01-0080-05

Characterization of Phosphate-Accumulating Organisms in Starting-up EBPR by FISH Analysis

KANG Han, WANG Xiu-heng, LI Nan, REN Nan-qi

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process was operated in a laboratory-scale sequencing batch reactor (SBR) for one-month fed with acetate as the carbon source. The characteristic and the microbial population structure and space distribution dynamics of phosphate-accumulating organisms (PAOs) of start-up period were analyzed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). The relationship between enrichment of PAOs and phosphorus removal was discussed. PAOs could be enriched by recirculation activated sludge containing heterotrophs through anaerobic aerobic conditions. Portion of PAOs in the sludge increase from 11.5% to 40.48%. Bacteria population competition lasted 34 days. It started from PAOs replacing heterotrophs which cost 5 days then followed by 19 days intra-specific competition of PAOs. The last step was re-increasing of PAOs predominance. Phosphorus uptake by the enriched microbial community was not observed immediately. An accumulating-phase was necessary for PHA and poly-P storage. A lag-stage of 4-8 days existed when taking the performance of the reactor into consideration. Phosphorus removal by the predominant PAOs through intra-specific competition was achieved after accumulating-phase too. The FISH picture indicated that in the quickly growing phase PAOs cells were small and community structure was loose. The latter “accumulating-phase” cells became larger and the community structure clustered densely. This stage presented by better reactor performance.

Key words: EBPR; PAOs; FISH; accumulating-phase

磷是水体富营养化的限制性因子, 排放标准日趋严格. 生物除磷工艺 (EBPR) 以其运行费用低、无二次污染等优点而广泛应用于各国污水处理厂. EBPR 利用功能微生物聚磷菌 (PAOs) 在厌氧-好氧阶段循环, 通过排出富集磷的剩余污泥实现除磷. 生物除磷工艺是较复杂的生态系统, 微生物组成和群落演替均影响其功能. 目前, 污水处理厂的调控主要靠进出水质 COD、 PO_4^{3-} -P、pH、ORP 和 DO 等参数经验值, 通常在短期调整反应, 却由于其对微生物性能潜在的副作用导致长期效果恶化, 稳定性较差. 研究表明, 系统的微生物属性甚至微生物的种或亚种都可

能受运行操作影响^[1]. 因此稳定的调控目标应该通过优化污泥的微生物种群结构和性能实现.

FISH 为主的分子生态学研究手段, 可以直接鉴定污泥微生物种类^[2], 获得污水处理生态系统种群结构、空间分布关系与动态情况, 与设计和运行参数的调控建立关系. Bond 等^[3]应用 FISH 技术比较鉴定了恶化 EBPR 反应器活性污泥和恢复的反应器活

收稿日期: 2008-01-28; 修订日期: 2008-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50508011)

作者简介: 亢涵 (1982~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为微生物生理生态学与分子生态学及生物脱氮除磷技术, E-mail: 3.7-kh@163.com

* 通讯联系人, E-mail: xiu-heng@hit.edu.cn

性污泥中的主导微生物的丰度.通过观察发现,恶化污泥中由不同于 β -1 或 β -2 *Proteobacteria* 纲的 β -亚纲微生物占主导,而在恢复污泥中发现,属于 *Proteobacteria* 纲 β -2 亚纲的微生物占主导. Ahn 等^[4]结合 FISH 与 PCR-DGGE 技术考察了 *Rhodocyclus* sp. 的菌落形态呈密集团状. Oehmen 等^[5]比较研究了 SBR 反应器中聚磷菌和聚糖菌在污泥中的群落形态及分布. Wong 等^[6]对来自 9 个污水处理厂的 13 种活性污泥样品中的菌群进行鉴定与量化. Kong 等^[7]分析 A/OSBR 反应器中原水 C/P 变化时,微生物种群组成比例的变化.

本研究应用 FISH 对强化生物除磷系统启动期的微生物进行原位分析,考察了除磷生态系统形成过程中的聚磷菌种群结构、空间分布关系、形态的动态变化,探讨与聚磷特性的关系,以期研究调控对策对种群结构和群落动态的影响提供依据.

1 材料与方法

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.实验装置如图 1 所示.反应器间歇式运行,6 h 为 1 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 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,好氧阶段 $\text{DO} > 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

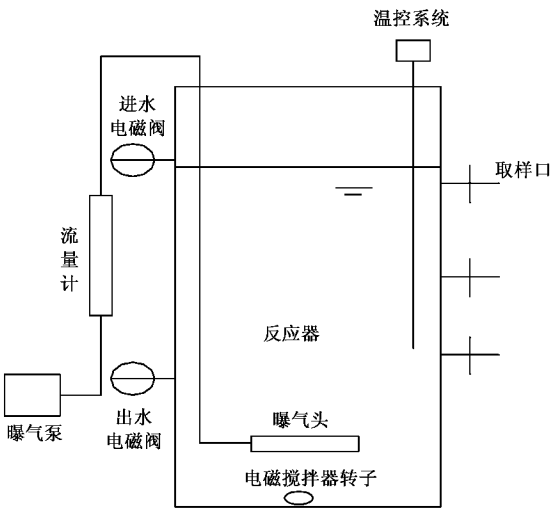


图 1 实验装置示意

Fig.1 Schematic diagram of the experimental system

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: $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $4.69 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 COD 计 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), NH_4Cl $1.79 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{N} = 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{P} = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),此外每 L 进水中含有 0.5 mL 微量元素液: EDTA $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $20.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $5.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, ZnCl_2 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, H_3BO_3 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

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、5、9、13、19、24、27、34 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、 PO_4^{3-} 、MLSS、MLVSS、SV 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 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 EUB338mix 和 PAOmix, EUB338mix 探针包括 EUB338 探针(5'-GCTGCCTCC-CGTAGGAGT-3')、EUB338-Ⅱ 探针(5'-GCAGCCACC-CGTAGGTGT-3')和 EUB338-Ⅲ 探针(5'-GCTGCCAC-CCGTAGGTGT-3'),以上均用 FITC 标记,是全菌探针^[8]. PAOmix 探针包括 PAO462 探针(5'-CCGTCAT-CTACWCAGGGTATTAAC-3')、PAO651 探针(5'-CCC-TCTGCCAAACTCCAG-3')和 PAO846 探针(5'-GTTA-GCTACGGCACTAAAAGG-3'),以上均用 CY3 标记,用来原位检测 β -*Proteobacteria* 的 *Rhodocyclus* sp. 及与其有亲缘关系的菌株^[9].

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 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: $0.9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 0.01% SDS, 20% (EUB338) 和 35% (PAO846) 去离子甲酰胺, pH 7.2. 杂交后于 48°C 用洗液($40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.01% SDS, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Tris-HCl, pH 7.2)洗 20 min,之后用蒸馏水洗去残留洗液,自然风干^[10].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在全菌中所占比例.

2 结果与分析

2.1 COD 去除效果

反应器运行 34 d,完成生物除磷启动.图 2 给出了反应器 COD 去除效果.从中可见,大部分 COD 在厌氧阶段去除,整体呈上升趋势,从 0 d 的 58.1% 增加到 27 d 的 74%,之后保持平稳.由于进水水质变化,反应器 COD 总去除率变化较大.好氧阶段 COD 去除率呈逐渐下降趋势,从 0 d 的 31% 降低到 24 d 的 7%. 24 d 之后好氧段 COD 去除率保持平稳.

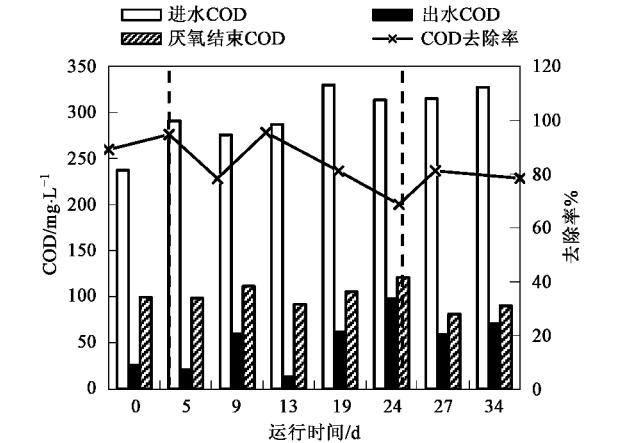


图 2 反应器 COD 的去除情况

Fig.2 COD removal performance of SBR

2.2 磷酸盐去除效果

图 3 给出了反应器在启动期污水中磷的去除效果.从中可见, 0~34 d 磷的去除率从 33.8% 增加到

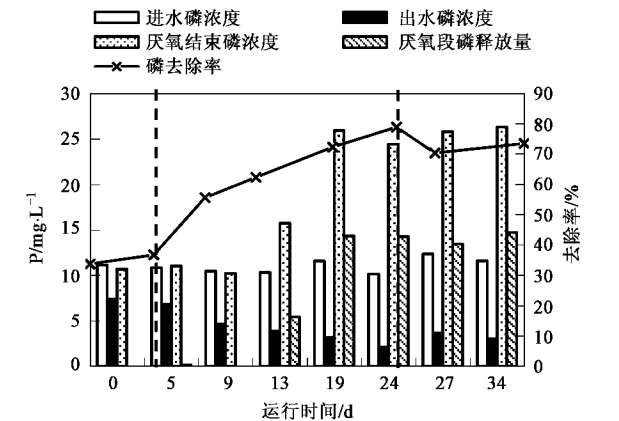


图 3 反应器磷酸盐的去除情况

Fig.3 Phosphate removal performance of SBR

73.5%, 总体呈上升趋势.磷去除率在 5~9 d 时出现一次突然上升, 24 d 达到最大值 78.9%, 24~27 d 下降 8.54%, 之后回升到 73.5%.

另外, 0~9 d 的厌氧磷释放量约为 0, 磷的去除主要在好氧段完成, 去除量 0 d 和 5 d 分别是 3.30 mg/L 和 4.17 mg/L, 到 9 d 好氧除磷量增加, 达到 5.58 mg/L.稳定的厌氧释磷 13 d 之后开始出现, 为 5.43 mg/L, 19 d 达到最高点, 之后释磷量趋于平稳, 平均在 14.2 mg/L 左右.

2.3 FISH 原位检测反应器中聚磷菌

图 4 分别为反应器运行 0、5、13、24、27、34 d 时反应器中聚磷菌的双杂交 FISH 图片. 其中显示出 FITC 染料标记的 EUB338mix 探针和 CY3 染料标记的 PAOmix 探针, 以及 *Rhodocyclus* sp. 和其他菌种.

2.4 聚磷菌含量

应用 FISH 技术的量化功能, 即共聚焦显微镜配套软件获得聚磷菌在全菌中所占比例, 见图 5. 从中可见, 曲线的整体走势呈上升趋势. 反应器中聚磷菌含量存在 2 个突然增加阶段, 0~5 d 和 24~27 d. 5~24 d 略有下降, 最高点出现在启动的 34 d, 为 41.5%.

3 讨论

由图 5 可见, 系统的接种污泥中含有少量的聚磷菌, 占全菌的 11.51%, 大部分为异养菌. 异养菌在好氧条件下代谢有机物, 表现为 COD 在好氧段去除. 但是本系统从启动开始就有大量 COD 在厌氧段去除, 超过初始时含量较少的聚磷菌正常代谢所能利用的有机物量.

经过本系统厌氧/好氧驯化, 聚磷菌的大量繁殖, 处于“增殖期”, 5 d 达到第 1 个峰值 35.1%. 由图 2 可见, 此时厌氧段 COD 利用率从 58.1% 上升到 66%, 好氧段 COD 去除率从 31% 下降到 28.7%. 比较图 3 与图 5 可知, 随着聚磷菌的大量繁殖, 直到 9 d 厌氧释磷还没有出现. 可见, 新生聚磷菌体需要先吸收一定底物形成 PHA 和糖原储备之后才能在厌氧阶段释放磷, 好氧阶段吸收磷, 即需要经过一段“积累期”, 至 9 d 才开始行使除磷能力. 王晓莲等^[11] 和尹军等^[12] 也发现了这一现象. 对聚磷菌的代谢研究结论为, 聚磷菌储备 PHA 需要有 poly-P 释放磷来提供一定能量和糖原水解提供还原力^[13]. 此阶段没有 poly-P 储备的新生菌体吸收底物的途径可以解释为, 聚磷菌的菌体之间存在菌丝连接, 新生菌体可以从附近老菌体获取能量吸收底物来形成 PHA. 试验

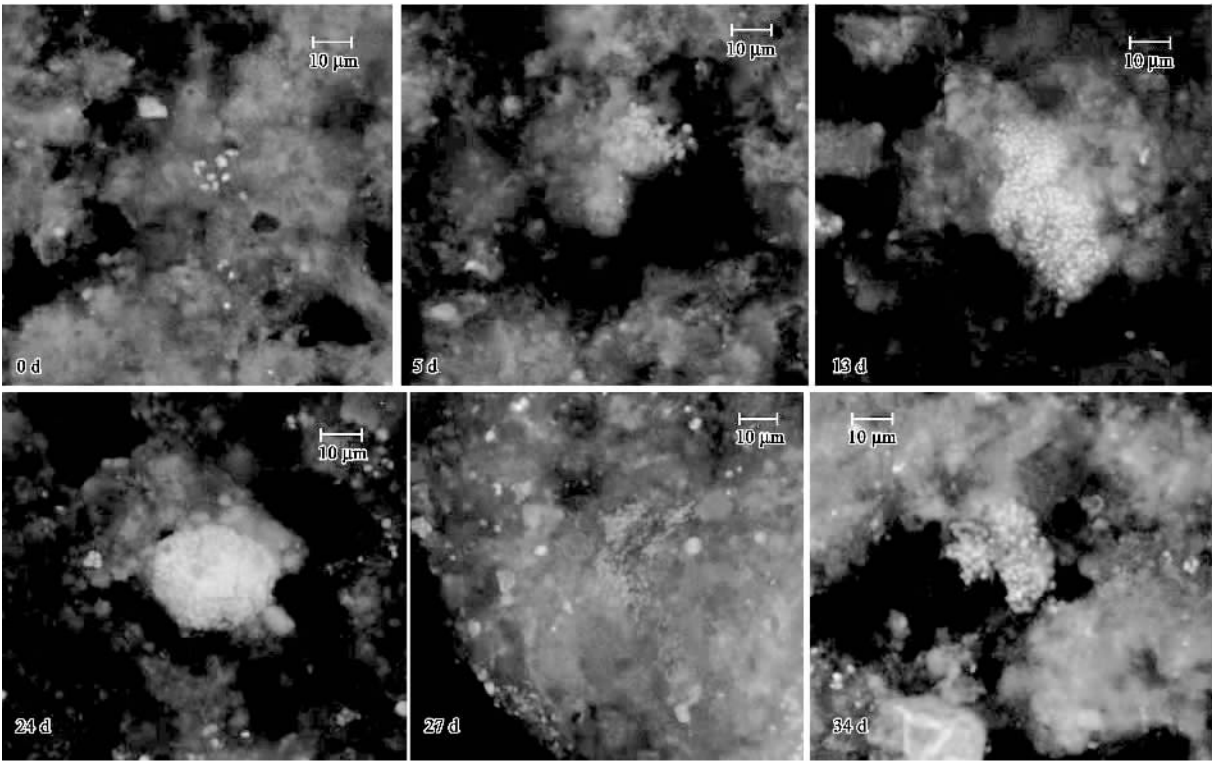


图 4 反应器启动阶段聚磷菌的 FISH 图片(标尺 = 10 μm)
Fig.4 FISH picture of PAOs in start-up stage (bar = 10 μm)

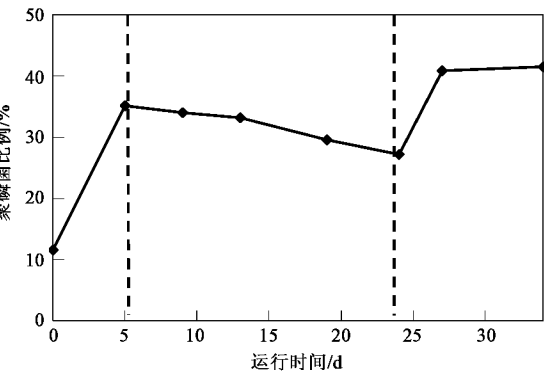


图 5 污泥中聚磷菌占全菌的比例
Fig.5 Proportion of PAOs in sludge

中,启动开始厌氧段有机物大量被利用也证明了这一点. 0~9 d 磷的去除主要在好氧段完成,去除率从 33.8% 增加到 55.6%,主要被聚磷菌利用贮存 poly-P 和菌体增殖.Zeng 等^[14] 试验表明聚磷菌 PAOs 转化为反硝化聚磷菌 DPAOs 有 5 h 的“迟滞期”,与此有类似现象.本试验中由于新生菌体的环境变化较大,因此“积累期”更长.

从 5~24 d 的聚磷菌数量缓慢降低,达到 27.15%.然而反应器磷的去除率上升,24 d 达到 78.9%.相应的厌氧段 COD 去除率基本保持稳定,

而 24 d 好氧段 COD 去除率降低到 7%.好氧段 COD 去除率降低表明异养菌等竞争菌正逐步被淘汰.从厌氧段释磷量上看,度过“积累期”的聚磷菌从 9 d 开始释磷,于 19 d 达到最高点,以后保持稳定.可见,因反应器中底物有限,污泥中存在的不同种聚磷菌竞争生态位,聚磷菌种群内部正处在一种优胜劣汰的缓慢调整状态,在这个过程中竞争力强的聚磷菌正在逐渐成为优势菌种,而那些衰老或竞争力弱的聚磷菌正在逐步被淘汰掉.

24 d 反应器中非聚磷菌基本被淘汰掉,同时经过聚磷菌种群内部竞争生存下来的优势菌种得到足够的生存空间和底物,于 24~27 d 出现了聚磷菌量的第 2 个增长期,27 d 达到 40.84%,之后稳定在 40% 以上.此阶段对应的厌氧释磷量和总除磷率却出现小幅下降,可以看到,此次繁殖之后再次出现了一段类似于初期菌量增加之后的“积累期”,即新菌不行使除磷能力.

27 d 后聚磷菌的功能增强并趋于稳定,厌氧释磷量 14.71 mg/L,去除率 73.5%.厌氧段 COD 去除率增加,保持在 72% 左右,好氧段约占 7%.

从 FISH 图片中聚磷菌的形态变化可以看出污泥中菌群竞争,并与反应器处理效果建立关系.图 4

的 0 d 和 5 d,“增殖期”聚磷菌数量少,“积累期”菌体小,且群落结构松散.此阶段反应器运行效果也比较差.度过“积累期”的聚磷菌 13 d 和 24 d 的菌体体积明显增大,并紧密聚集成团状.对应于反应器运行效果开始上升出现峰值. 27 d 菌量很大,说明菌体再次大量繁殖,但菌体体积小,进入反应器的二次“积累期”,呈现出和 5 d 相似的松散菌落形态.反应器的各项处理效率也停止增长.

4 结论

(1)由异养菌为主的活性污泥经过厌氧/好氧驯化,可以富集培养大量聚磷菌 PAOs,经过 34 d 完成生物除磷系统的启动,PAOs 在全菌中的比例由 11.5% 增加到 40.48%.启动过程中污泥内部持续进行着菌群淘汰过程,首先淘汰异养菌等非聚磷菌,使聚磷菌占主导,历时 5 d;而聚磷菌内部也存在优胜劣汰的选择过程,竞争力强的聚磷菌逐渐成为优势菌种,此过程较长,在本研究中历时 19 d;经过聚磷菌中优势菌群的二次增长完成生物除磷系统的启动.

(2)富集培养过程中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”,形成一定的 PHA 和 poly-P 储备.表现在反应器运行效果是污染物的去除效率与聚磷菌的增殖相比较有滞后性,经过“积累期”后开始上升出现峰值.本试验中聚磷菌“积累期”需要 4~8 d 左右.聚磷菌内部竞争形成的优势菌群也经过“积累期”后才发挥作用.

(3)通过 FISH 图片看出,快速增殖期的聚磷菌菌体小,菌群结构松散.经过“积累期”之后,菌体不断增大,并开始紧密聚集形成致密的团状,此时反应器处理效率较高.

参考文献:

[1] Yuan Z, Blackall L L. Sludge population optimisation: A new dimension for the control of biological wastewater treatment systems [J]. Water Research, 2002, **36**(2): 482-490.

[2] Oehmen A, Iemos 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] Bond P L, Keller J, Blackall L L. Bio-P and non-bio-P bacteria identification by a novel microbial approach[J]. Water Science and Technology, 1999, **39**(6): 13-20.

[4] Ahn J, Daidou T, Tsuneda S, *et al.* Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay [J]. Water Research, 2002, **36**(2): 403-412.

[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]. Journal of Biotechnology, 2006, **123**: 22-32.

[6] Wong M T, Mino T, Seviour R J, *et al.* *In situ* identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan [J]. Water Res, 2005, **39**: 2901-2914.

[7] Kong Y, Beer M, Rees G. Function analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (C/P) ratio [J]. Microbiology, 2002, **148**: 2299-2307.

[8] 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**: 434-444.

[9] 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.

[10] Amann R I. *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes [A]. In: Akkermans A D L, Elsas J D, de Bruij F J, editors. Molecular microbial ecology manual [C]. London: Kluwer, 1995. 1-15.

[11] 王晓莲,王淑莹,马勇,等. A_2O 工艺中反硝化除磷及过量曝气对生物除磷的影响 [J]. 化工学报, 2005, **56**(8): 1565-1570.

[12] 尹军,王晓玲,吴相会,等.低 C/N 条件下 MUCT 工艺的反硝化除磷特性 [J]. 环境科学, 2007, **28**(11): 2478-2483.

[13] Seviour R J, Mino T, Onuki M, *et al.* The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2003, **27**: 99-127.

[14] Zeng R J, Saunders A M, Yuan Z G, *et al.* Identification and Comparison of Aerobic and Denitrifying Polyphosphate-Accumulating Organisms [J]. Biotechnol Bioeng, 2003, **83**(2): 140-148.