

碳源对 EBPR 代谢过程及微生物特性的影响

吴昌永¹, 彭永臻^{1,2*}, 万春黎¹, 李晓玲¹, 袁志国³

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090; 2. 北京工业大学北京市水质工程与水环境恢复工程重点实验室, 北京 100124; 3. Advanced Wastewater Management Centre, The University of Queensland, Brisbane 4072, Australia)

摘要: 采用 SBR 反应器, 研究了乙酸和丙酸分别作为唯一进水碳源时对 EBPR 过程物质转化及代表性微生物变化特性的影响, 并对不同碳源可能导致不同的微生物代谢过程进行了讨论. SBR 的运行模式为: 厌氧 2 h, 好氧 5 h, 每天运行 3 个周期, 乙酸和丙酸进水的 COD 均为 300 mg/L, 系统先用乙酸作为碳源运行 60 d, 随后以丙酸作为碳源运行 60 d. 结果表明, 在采用乙酸作为碳源时, 厌氧结束放磷和消耗 COD 的比值为 0.35, 生成的 PHA 中以 PHB 为主, 占 92.6%, PHV 只占到 7.4%, 没有 PH2MV 生成. 在采用丙酸作为碳源时, 厌氧结束放磷和消耗 COD 的比值稍低, 为 0.27, 生成的 PHA 中 PHV 占 35.8%, PHB 和 PH2MV 分别占 10.2% 和 54.0%. 2 种碳源条件下系统都具有良好的 EBPR 效能, 出水 PO_4^{3-} -P 均在检出限以下. 对不同阶段的污泥进行 DGGE 分析表明, 系统中的微生物发生了变化; 扫描电镜图片和 PHA 染色结果分析表明, 在乙酸作为碳源时, 系统中的 PAOs 以球形形式存在, 而在丙酸作为碳源时, 系统中的 PAOs 以杆菌形式存在. 不同碳源培养出了不同类型的 PAOs, 两者代谢途径不同, 但都具有较好的 EBPR 效能.

关键词: 强化生物除磷; 乙酸; 丙酸; 变性梯度凝胶电泳; 扫描电镜

中图分类号: X703.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2009)07-1990-05

Influence of Carbon Source on EBPR Metabolism and Microorganism Communities

WU Chang-yong¹, PENG Yong-zhen^{1,2}, WAN Chun-li¹, LI Xiao-ling¹, YUAN Zhi-guo³

(1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 2. Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 3. Advanced Wastewater Management Centre, The University of Queensland, Brisbane 4072, Australia)

Abstract: A SBR was used in this study for investigating the influence of carbon source on EBPR metabolism and microorganism communities when feeding with acetate and propionate. The SBR was operated with a cycle time of 8 h and each cycle consisted of 4 min feeding, 2 h anaerobic period, 5 h aerobic period, 35 min setting, 15 min decanting and 6 min waiting. The COD of influent was kept at 300 mg/L during the experiment. Acetate and propionate were used as the sole carbon source for operation of 60 days, respectively. The phosphorus release/COD consumption in the end of anaerobic phase were 0.35 and 0.27 when acetate and propionate were used as the carbon source, respectively. The PHA composition was different when different carbon source was dosed. PHB accounted for 92.6% in the end of anaerobic phase but the value for PHV was only 7.4% when acetate was selected as the carbon source. No PH2MV was detected during this process. The compositions of PHA were PHB (10.2%), PHV (35.8%) and PH2MV (54.0%) in the end of anaerobic cycle when propionate was used as the sole carbon source. There was variation of microorganism communities during this process for the results of DGGE combined with SEM micrographs and PHA staining. Coccus morphotype PAOs were accumulated in acetate-fed phase and rod morphotype PAOs were accumulated in propionate-fed stage. Different PAOs were accumulated and the metabolic pathways were different when different carbon sources were used, but good EBPR could be achieved during all these conditions.

Key words: enhanced biological phosphorus removal; acetic acid; propionic acid; DGGE; SEM

磷(P)是引起水体富营养化最主要的营养元素, 它能刺激一些藻类和其他光合微生物的生长, 因而污水除磷对控制水体富营养化至关重要^[1]. 强化生物除磷工艺(EBPR)是目前采用最广泛的污水除磷工艺, 它的原理是在活性污泥中富集一部分聚磷微生物(PAOs), 该类微生物在厌氧条件下吸收污水中的小分子有机物(主要是 VFA)并储存为胞内聚合物 PHA, 在好氧条件下氧化 PHA 并超出其生理需要

过量吸磷, 通过排放高含磷污泥从而达到从污水中将磷去除的目的^[2].

收稿日期: 2008-08-17; 修订日期: 2008-10-26

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); 北京市教委科研基地、科技创新平台项目(PXM2008_014204_050843); 城市水资源与水环境国家重点实验室开放研究项目(QAK200802)

作者简介: 吴昌永(1980~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为污水脱氮除磷及其优化控制, E-mail: hit_changyong@163.com

* 通讯联系人, E-mail: pyz@bjut.edu.cn

人们对聚磷菌及其代谢过程进行了大量的研究^[3,4],并建立了一些相关的代谢模型^[5,6].由于在EBPR系统中存在PAOs和GAOs的竞争^[7],Pijuan等^[8]的研究发现丙酸作为碳源时能使得PAOs具有竞争优势,从而使得系统具有更稳定的除磷功能.Chen等^[9]采用SBR进行研究发现,提高EBPR系统中进水中丙酸/乙酸的比例,短时间对除磷不利,可长时间运行能显著提高系统的除磷率.随后Yagci等^[10]的研究发现,和乙酸相比,丙酸是EBPR系统中更为合适的碳源,能够提高系统的除磷效率,提高进水丙酸的比例,厌氧段生成的PHA的成分主要是PHV和PH2MV.刘燕等^[11]的研究表明进水丙酸/乙酸比例及驯化影响聚磷微生物的PHB/PHV转化量,进而影响对磷的吸收/释放和除磷效果,磷的吸收和释放主要受PHB转化的影响,但磷的去除率却主要依赖于PHV的合成与降解.

上述研究偏向碳源对代谢过程及除磷效率的影响,对微生物方面的研究较少.本研究采用一个SBR反应器,先后采用乙酸和丙酸作为唯一碳源运行,详细考察了不同碳源下代谢过程的差异及微生物特性的变化.

1 材料与方法

1.1 试验装置和运行工况

试验采用SBR反应器.反应器的有效容积为4 L,进水体积3 L,相应的HRT为10.7 h.反应器每天运行3个周期,每个周期8 h,具体为:进水4 min,厌氧2 h,好氧5 h,沉淀35 min,排水15 min,闲置6 min.每天在一个周期的好氧末排泥200 mL,相应的SRT为20 d.好氧过程中DO充足,好氧结束前反应器中DO浓度在7.35 mg/L左右.整个反应过程中不控制pH,在厌氧过程中pH从7.5降低到7.2左右,好氧过程中从7.2上升到8.5左右.反应器的温度通过温控装置控制在 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

1.2 试验用水和分析测试方法

试验采用人工配水运行,初始污泥取自哈尔滨某城市污水处理厂,该厂污泥的除磷效果较好.人工配水的配方为(每L自来水):乙酸钠0.51 g或丙酸钠0.26 g(使得进水后COD为300 mg/L)、 NH_4Cl 0.057 g($\text{NH}_4^+-\text{N}=15\text{ mg/L}$,刚好满足微生物生理需要)、 KH_2PO_4 0.038 g($\text{TP}=8.5\text{ mg/L}$)、 MgSO_4 0.03 g、 CaCl_2 0.015 g、 NaHCO_3 0.45 g.同时在配水中投加微量元素浓缩液,浓缩液的成分同文献^[12]中的配方,浓缩液的投加量为1 mL/L污水,最后通过1 mol/L的

HCl调整进水的pH为7.0.

COD、 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、 $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ 和MLSS等的测定均采用国家环保总局颁布的方法进行^[13],水样经定量滤纸过滤后测定.pH和DO采用德国WTW-340i便携式在线测定仪.

PHA的测定参照文献^[14]中的方法进行并做了少许改进,采用高纯 H_2 作为载气,气相色谱为Agilent 6890N,HP-5色谱柱.PHA这里指的是PHB、PHV和PH2MV的加和.糖原的测定采用蒽酮比色法^[15],乙酸和丙酸采用气相色谱测定,型号为HP5890D,方法同文献^[16].

采用上海华舜生物公司的细菌DNA试剂盒对污泥中的DNA进行提取,采用通用引物BSF8/20和BSR518对提取的DNA进行PCR扩增,PCR条件为 94°C 8 min, 94°C 40 s, 55°C 40 s, 72°C 40 s, 72°C 10 min,中间循环30次,将获得的PCR产物进行变性梯度凝胶电泳,丙烯酰胺胶的浓度为8%,变性剂的梯度为30%~60%,电泳条件为80 V电泳16 h,电泳结束后采用银染的方法进行染色得到DGGE图谱^[17].

扫描电镜采用HITACHI S-4700拍摄,污泥胞内PHA染色采用苏丹黑染色法^[18].

2 结果与分析

2.1 不同碳源下的除磷特性及差异

图1是采用不同碳源稳定时期的磷酸盐变化曲线.可以看出,乙酸作为碳源时厌氧结束时的放磷浓度较高,在进水COD同为300 mg/L的情况下,乙酸作为碳源时厌氧末 $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ 浓度可达100 mg/L,而丙酸作为碳源时只能到80 mg/L左右.比较可知,在采用乙酸作为碳源时,厌氧结束放磷和消耗COD的比值为0.35,而在采用丙酸作为碳源时,厌氧结束放磷和消耗COD的比值0.27.但不同碳源对除磷效率的影响不大,好氧结束时 $\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$ 均在检出限以下.乙酸为碳源时吸磷速率也稍快,为 $0.86\text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{min})$,而采用丙酸为碳源时该值为 $0.65\text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{min})$.从图1可以看出,好氧阶段的DO是充足的,不是反应的限制步骤,在曝气后期DO稳定在7.35 mg/L左右.

2.2 碳源对PHA组成及含量的影响

图2和图3分别是乙酸和丙酸作为碳源时一个周期内PHA的组成及含量变化.可以看出,在乙酸作为唯一碳源时,厌氧段生成的PHA成分主要是PHB,在厌氧末120 min时,污泥中PHB的含量为102.01 mg/g,而PHV的含量仅为10.23 mg/g,没有

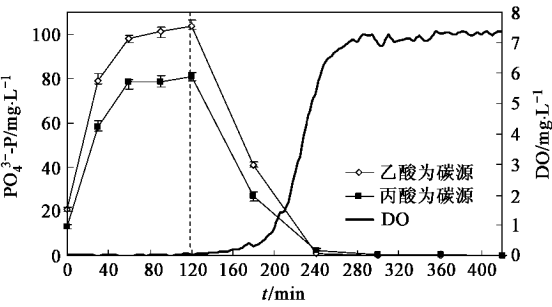


图 1 乙酸和丙酸作为碳源时一个周期磷酸盐的变化
Fig.1 Variations of $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ during an anaerobic/aerobic cycle on acetate and propionate fed conditions

PH2MV 的生成.在随后的好氧过程中 PHB 降解用于吸磷,对除磷起了主要作用.当丙酸作为唯一碳源的时候厌氧生成的 PHA 成分比较复杂,厌氧末 120 min 的时候,污泥中 PHB 含量为 8.03 mg/g, PHV 含量为 28.36 mg/g,而 PH2MV 的含量为 42.80 mg/g.在随后的好氧过程中,PHB 的含量一直保持稳定,对除磷几乎没有贡献.PHV 和 PH2MV 是好氧阶段除磷的内碳源.

2.3 不同碳源条件下污泥 DGGE 结果

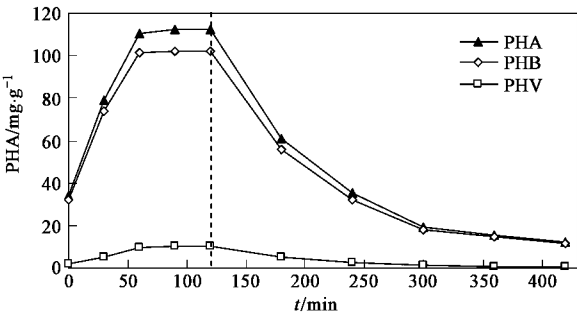


图 2 乙酸作为碳源时一个周期 PHA 的变化
Fig.2 Variations of PHA during an anaerobic/aerobic cycle on acetate-fed conditions

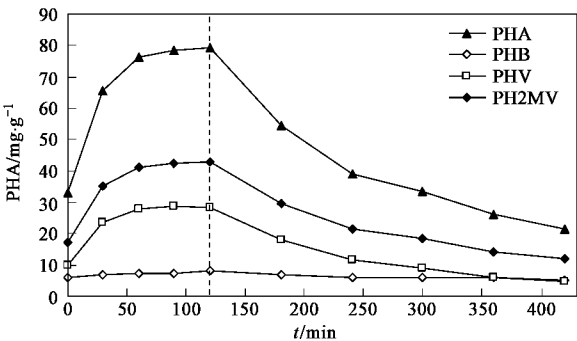


图 3 丙酸作为碳源时一个周期 PHA 的变化
Fig.3 Variations of PHA during an anaerobic/aerobic cycle on propionate-fed conditions

图 4 是不同时期不同碳源下污泥的 DGGE 结果.其中 1 为原污泥,2 和 3 为乙酸作为碳源时的条带,时间分别为运行第 30 d 和第 60 d.其中 2 由于 PCR 扩增产物的关系导致没有条带.随后的条带 4 ~ 8 为丙酸作为碳源时的条带,每隔 12 d 取一次生物样.由于条件的关系,本研究中并未进行 DNA 测序.但从图 4 也可以清晰地看到系统在不同碳源条件下不同运行时期微生物的变化关系.a、b 和 c 这 3 种菌自始至终都存在,可能是系统中的常驻菌群.当碳源更换为丙酸后,4 是第 12 d 的样品,因为运行时间还不足一个污泥龄,可以看出和乙酸为碳源时较为相似,随着系统的运行,e、h 和 i 这 3 种微生物在丙酸系统中消失,但同时 g 在系统中生成并得到强化,同时还有 m,成为丙酸系统中有别于乙酸系统的优势菌种.

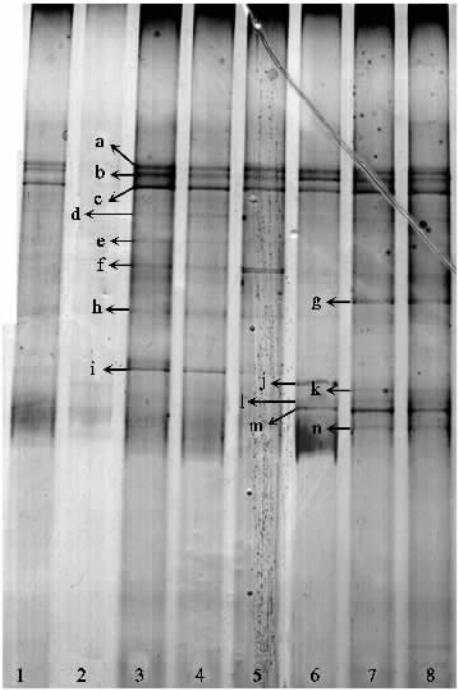


图 4 不同碳源不同时期的 DGGE 电泳结果
Fig.4 DGGE profiles of 16S rRNA fragments obtained from acetate and propionate fed sludge of different stages

2.4 不同碳源条件下污泥细胞形态差异

图 5 为乙酸和丙酸作为碳源稳定运行时污泥的扫描电镜照片.可以看出,在乙酸作为碳源的时候系统中以球菌为主,而当丙酸作为碳源的时候,系统中出现了大量的杆菌.图 6 是对丙酸培养稳定期厌氧末污泥苏丹黑染色的结果.苏丹黑可将 PAO 胞内形成的 PHA 染成黑色,而菌体呈现复染的紫红色.可以看出,系统中被染成黑色的多是杆状的微生物,且

PHA 大多分布在杆菌的两端.结合图 5B 分析可知,系统中的杆菌应该是 PAO,即丙酸培养除了杆状的 PAO.可惜的是在乙酸运行稳定期没有进行苏丹黑染色,但同样可以推测在乙酸作为碳源的时候系统

中的 PAO 以球菌的形式存在.这和 Martin 等^[19]的研究结果有些相似,即采用不同碳源时可能培养出不同类型的 PAO.这一结果也和上面 DGGE 的结果相互对应.

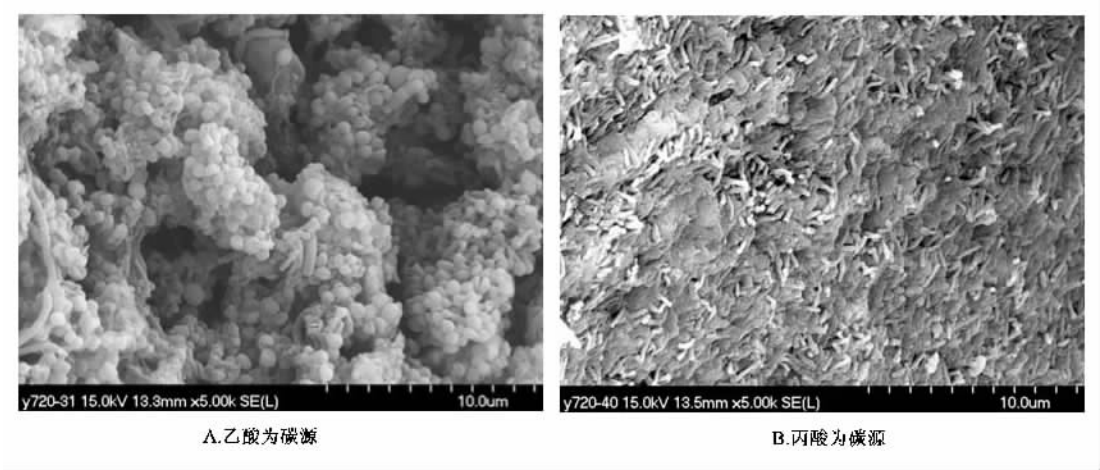


图 5 不同碳源下污泥的扫描电镜照片
Fig.5 SEM micrographs of sludge

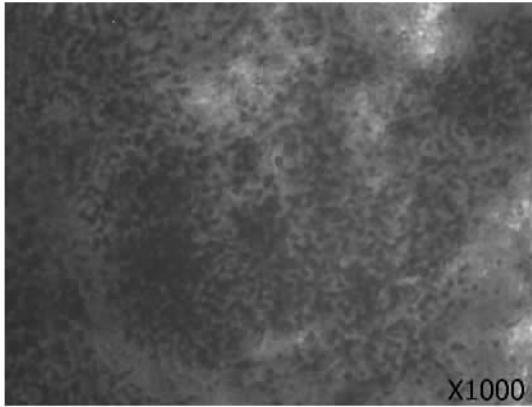


图 6 丙酸污泥的苏丹黑染色显微照片
Fig.6 Sudan black staining of propionate-fed sludge

3 讨论

3.1 碳源对生成 PHA 的影响

PHA 的生成和差异可通过 PAO 的生化代谢途径来分析.乙酸和丙酸被 PAOs 吸收至胞内后会转变成乙酰 CoA 和丙酰 CoA,PHA 的构成则由 PAOs 随意或选择性的通过乙酰 CoA 和丙酰 CoA 的缩合形成^[20],具体如下:2 分子乙酰 CoA 缩合成 PHB;1 分子乙酰 CoA 和 1 分子丙酰 CoA 缩合成 PHV;2 分子丙酰 CoA 缩合成 PH2MV.

在采用乙酸作为碳源的时候,绝大部分的乙酸

被 PAOs 吸收至细胞内转变成乙酰 CoA,乙酰 CoA 自身缩合成 PHB,因而 PHB 的生成量很大.采用丙酸作为碳源的时候由于产生的丙酰 CoA 的量要大大多于乙酰 CoA,根据选择性缩合理论,乙酰 CoA 优先会和丙酰 CoA 缩合,从而形成 PHV,余下的丙酰 CoA 会自身缩合成 PH2MV,因而 PHB 的生成量会较少.但是在本研究中丙酸作为碳源的时候污泥中 PHB 的含量一直非常稳定,在好氧阶段也没有被氧化进行过量吸磷,在其他研究中未出现类似的报道.而且在本研究中还发现选择性缩合理论和试验结果也不太符合,乙酰 CoA 并没有优先和丙酰 CoA 缩合,反而是丙酰 CoA 的自身缩合起了很大作用,PH2MV 的生成量更大.

3.2 碳源对 EBPR 系统微生物的影响

Martin 等^[19]对 EBPR 系统中微生物的酶及代谢途径进行了详细的研究,结果发现不同的碳源可能导致 PAOs 在亚种上存在差异,而且可能有着不同的代谢途径.本研究也发现,乙酸和丙酸可能会导致系统中不同形态 PAOs 存在,即乙酸系统中 PAOs 以球菌的形式存在,丙酸系统中 PAOs 以杆菌的形式存在,2 种类型 PAOs 的代谢途径不同.DGGE 结果也表明,不同碳源条件下系统中的微生物种群的确发生了变化.限于条件,本研究没有对此进行更进一步的研究.近期 Carvalho 等^[21]的研究也发现,不同碳源

可能会导致反硝化除磷系统中 DPAOs 的不同.

4 结论

(1)采用乙酸和丙酸分别作为唯一碳源运行厌氧/好氧 EBPR 系统各 60d,在进水 COD 同为 300 mg/L的情况下,乙酸作为碳源时厌氧末放磷浓度较丙酸时高,厌氧结束放磷和消耗 COD 的比值分别为 0.35 和 0.27. 2 种碳源下系统均表现出了良好的除磷功能.

(2)乙酸作为唯一碳源时 EBPR 系统厌氧末生成的 PHA 中主要是 PHB,占 92.6%,PHV 仅占 7.4%,无 PH2MV 生成.丙酸作为唯一碳源时厌氧末生成的 PHA 中 PHV 占 35.8%,PHB 和 PH2MV 分别占 10.2%和 54.0%,在随后的好氧过程中 PHB 几乎无变化,对除磷没有贡献.

(3) DGGE 结果表明采用不同碳源时系统中的微生物发生了变化.扫描电镜结合 PHA 的苏丹黑染色结果表明,乙酸为碳源时系统中富集了球状的 PAOs,而丙酸作为碳源时杆状的 PAOs 在系统中得到了富集,尽管代谢途径不同,但两类 PAOs 均表现出了良好的生物除磷性能.

参考文献:

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

[2] Mulkerrins D, Dobson A D W, Collieran E. Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters [J]. Environment International, 2004, **30**: 249-259.

[3] Petersen B, Temmink H, Henze M, *et al.* Phosphate uptake kinetics in relation to PHB under aerobic conditions [J]. Water Res, 1998, **32**(1): 91-100.

[4] Randall A A, Liu Y. Polyhydroxyalkanoates form potentially a key aspect of aerobic phosphorus uptake in enhanced biological phosphorus removal [J]. Water Res, 2002, **36**: 3473-3478.

[5] Smolders G J F, Vandermeij J, Vanloosdrecht M C M, *et al.* A structured metabolic model for anaerobic and aerobic stoichiometry and kinetics of the biological phosphorus removal process [J]. Biotechnol Bioeng, 1995, **47**(3): 277-287.

[6] Oehmen A, Zeng R J, Saunders A M, *et al.* Anaerobic and aerobic metabolism of glycogen accumulating organisms selected with propionate as the sole carbon source [J]. Microbiology, 2006, **152** (9): 2767-2778.

[7] Thomas M, Wright P, Blackall L L, *et al.* Optimisation of Noosa BNR plant to improve performance and reduce operating costs [J]. Water Sci Technol, 2003, **47**(12): 141-148.

[8] Pijuan M, Baeza J A, Casas C, *et al.* Response of an EBPR population developed in an SBR with propionate to different carbon sources [J]. Water Sci Technol, 2004, **50**(10): 131-138.

[9] Chen Y, Randall A A, McCue T. The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid [J]. Water Res, 2004, **38**: 27-36.

[10] Yagci N, Cokgor E U, Artan N, *et al.* The effect of substrate on the composition of polyhydroxyalkanoates in enhanced biological phosphorus removal [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2007, **82**: 295-303.

[11] 刘燕, 行智强, 陈银广, 等. 聚羟基烷酸转化对强化生物除磷影响研究[J]. 环境科学, 2006, **27**(6): 1103-1106.

[12] Saito T, Brdjanovic D, van Loosdrecht M C M. Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms [J]. Water Res, 2004, **38**: 3760-3768.

[13] 国家环保总局. 水和废水监测分析方法 [M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[14] Tong J, Chen Y. Enhanced Biological Phosphorus Removal Driven by Short-Chain Fatty Acids Produced from Waste Activated Sludge Alkaline Fermentation [J]. Environ Sci Technol, 2007, **41**: 7126-7130.

[15] Jenkins D, Richard M G, Daigger G T. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming [M]. (Second Ed). Lewis Publishers, Florida, 1993.

[16] Yuan H, Chen Y, Zhang H, *et al.* Improved Bioproduction of Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) from Excess Sludge under Alkaline conditions [J]. Environ Sci Technol, 2006, **40**: 2025-2029.

[17] Freitag T E, Prosser J. Community Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria within Anoxic Marine Sediments [J]. Appl Environ Microb, 2003, **69**(3): 1359-1371.

[18] 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.

[19] Martin H G, Ivanova N, Kunin V, *et al.* Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities [J]. Nat Biotechnol, 2006, **24**(10): 1263-1269.

[20] Lemos P C, Serafim L S, Santos M M, *et al.* Metabolic pathway for propionate utilization by phosphorus-accumulating organisms in activated sludge: C-13 labeling and in vivo nuclear magnetic resonance [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, **69**(1): 241-251.

[21] Carvalho G, Lemos P C, Oehmen A, *et al.* Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure [J]. Water Res, 2007, **41**(9): 4383-4396.