

聚磷菌在不同碳源下的反硝化研究

李夕耀¹, 王淑莹¹, 郭春艳¹, 马勇¹, 袁志国², 彭永臻^{1*}

(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. Advanced Wastewater Management Centre, The University of Queensland, Brisbane 4072, Australia)

摘要: 利用 SBR 系统对聚磷菌进行了培养, 并通过荧光原位杂交手段检测了系统中聚磷菌 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 的富集程度。聚磷菌也是一种普通异养菌, 为了研究它的反硝化能力, 排除了聚磷菌的正常释磷和吸磷过程, 仅考察在不同碳源下反硝化性能。结果表明, 乙酸和 PHB 都能成为聚磷菌反硝化的电子供体。当以乙酸为外在单一碳源时, 其反硝化速率和 PHB 生成速率与起始硝酸盐浓度无关, 但是当起始状态硝酸盐浓度越高时, 消耗单位乙酸生成的 PHB 和硝酸盐还原量越小。以 PHB 为内在碳源和能源时, 聚磷菌的反硝化速率呈现对于基质(硝酸盐)的零级动力学反应, 比反硝化速率为 $0.973\ 3\ \text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 此外 PHB 平均比消耗速率为(以 PHB 计) $2.462\ 6\ \text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。

关键词: 强化生物除磷; 聚磷菌; 反硝化; 电子供体

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)10-2958-05

Capacity of Denitrification by Polyphosphate Accumulating Organism at Different Electron Donors

LI Xi-yao¹, WANG Shu-ying¹, GUO Chun-yan¹, MA Yong¹, YUAN Zhi-guo², PENG Yong-zhen¹

(1. Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environment Recovery Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 2. Advanced Wastewater Management Centre, The University of Queensland, Brisbane 4072, Australia)

Abstract: SBR reactor was performed to incubate polyphosphate accumulating organism (PAO), and it was checked out of the system by fluorescence *in situ* hybridization. As PAO is a kind of ordinary heterotrophic bacteria, it was excluded the ability of phosphate release and uptake and it was considered only the capacity of denitrification of the target biomass. The results indicated that acetate and PHB can be the electron donors of PAO to denitrify. When fed with acetate, the denitrifying rate and PHB producing rate were independent of initial nitrate concentration. However, served as more nitrate in the reactor, it would be less PHB produced and fewer nitrate reducing when using same amount of acetate. In view of PHB stored as an internal carbon and energy source, it presented as a reaction of zero-order to the substrate by PAO to denitrify, such as nitrate, besides, the specific denitrifying rate was $0.973\ 3\ \text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ and the specific PHB consuming rate was $2.462\ 6\ \text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$.

Key words: enhanced biological phosphorus removal; polyphosphate accumulating organism(PAO); denitrification; electron donor

好氧聚磷菌和反硝化聚磷菌都能在厌氧条件下吸收外在的挥发性脂肪酸转化为胞内聚合物 PHA, 不同的是在其后的吸磷过程中电子受体在消耗还原力 NADH_2 的过程中所需的 ATP 量上有差异。*Candidatus Accumulibacter phosphatis* 是目前已经探明的能在好氧和缺氧条件下进行过量吸磷的聚磷菌种类, 且在 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 的机制代谢研究中, 对其厌氧/好氧/缺氧的化学计量学模型和动力学模型^[1~6] 已经进行了深入研究。

由于分子生物学检测手段在污水处理研究的应用和发展, *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 除了在实验室研究中被培养, 同时也在不同的污水强化除磷系统中检测到^[7]。不同的水质环境将影响 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 的代谢方式。Zeng 等^[8] 对电子受体突然转化和长期运行中对 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 吸收磷酸盐的影

响进行了深入探讨。在不同的碳源下, 由于生成的 PHA 不同, 反硝化聚磷菌所用的内在碳源也稍有差异。在不同污水处理过程中, 聚磷菌在各种生物处理流程中也能起到反硝化菌的作用, 但是鲜见学者对此进行研究, 未能阐明聚磷菌对磷酸盐缺乏环境中单纯反硝化的影响。

本实验基于聚磷菌为一种普通异养菌, 考察了在乙酸和内源 PHB 为碳源条件下, 聚磷菌 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 的反硝化能力。

收稿日期: 2008-11-08; 修订日期: 2009-02-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(50808004, 50628808); “十一五”国家重大科技专项课题(2008ZX07317-007-105); 北京高校人才强教计划高层次人才资助项目(PHR20090502)

作者简介: 李夕耀(1984~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为强化生物除磷系统中聚磷菌和聚糖菌的代谢, E-mail: siyalee@emails.bjut.edu.cn

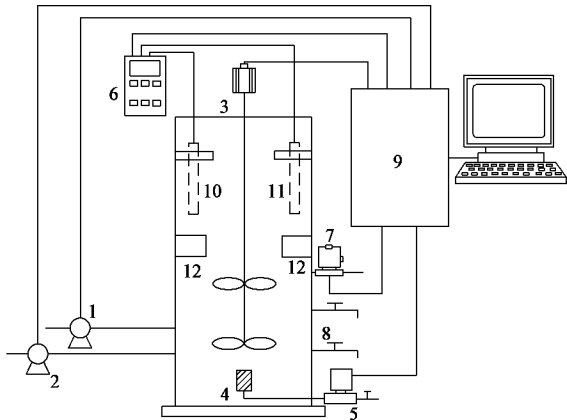
* 通讯联系人, E-mail: pyz@bjut.edu.cn

1 材料与方法

1.1 反应装置

采用 SBR 反应器(如图 1 所示)作为母反应器,有效容积为 8 L,排水比为 1/4,在厌氧好氧交替条件下对聚磷菌(*Candidatus Accumulibacter phosphatis*)进行富集培养.每天运行 4 个周期,一个周期为 6 h.其中,进水 6 min,厌氧搅拌 140 min,好氧 160 min,剩余时间用于沉淀、排水和闲置.

试验污泥为本实验室原强化生物除磷系统中的污泥,其他运行参数如下:污泥浓度维持在 $(3\,000 \pm 200)$ mg/L,污泥平均停留时间 SRT 约 8 d,反应过程 pH 值控制在 7.0~8.0,好氧时由电磁阀开关控制 DO 为 2.0 mg/L.



1. A 液泵; 2. B 液泵; 3. 搅拌器; 4. 曝气头; 5. 电磁阀;
6. WTW 340i 测定仪; 7. 电动阀(排水); 8. 取样口;
9. PLC 控制箱(连接电脑控制); 10. pH 探头;
11. DO 探头; 12. 探头挡板

图 1 反应器示意

Fig.1 Schematic diagram of the SBR reactor

1.2 母反应器试验水质

本试验采用人工配水,进水分两部分,由蠕动泵定时流入反应器,准确控制进水体积.进水 A 液每周期 300 mL,为碳源和其他微量营养元素,其中碳源交替使用丙酸和乙酸钠,交替时间大约为 1~2 个污泥龄,以不断排除聚糖菌.为防止 A 液中含有微生物导致进水 COD 不稳定,A 液需高压灭菌.B 液每周期 1 700 mL,提供磷酸盐.

每升 A 液组成为:氯化铵 1.02 g,蛋白胨 0.01 g,酵母膏 0.01 g,七水硫酸镁 1.20 g,二水氯化钙 0.19 g,ATU(硝化抑制剂)7.94 mg,微量金属元素溶液 4.00 mL,无水乙酸钠 6.83 g(或丙酸 3.53 mL).每升 B 液组成为:磷酸氢二钾 132 mg,磷酸二氢钾 103

mg^[9].
微量金属元素溶液中每升含有 1.5 g FeCl₃·6H₂O, 0.15 g H₃BO₃, 0.03 g CuSO₄·5H₂O, 0.18 g KI, 0.12 g MnCl₂·4H₂O, 0.06 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.12 g ZnSO₄·7H₂O, 0.15 g CoCl₂·6H₂O 和 10 g 乙二胺四乙酸(EDTA).

A 液和 B 液混合进水中 COD 为 800 mg/L,磷酸盐(以 P 计)为 40 mg/L, C/P = 20:1.

1.3 检测方法

实验所用常规检测方法见表 1.

表 1 本试验的检测项目

Table 1 Analysis methods of the experiment	
分析项目	分析方法
COD	重铬酸钾法
TOC	德国耶拿 TOC/TN multi 3100
PO ₄ ³⁻ -P	钼锑抗分光光度法
DO	WTW 340i 溶解氧测定仪
PHA	安捷伦 GC 6890N
NH ₄ ⁺ -N	纳氏试剂分光光度法
NO ₃ ⁻ -N	麝香草酚分光光度法
NO ₂ ⁻ -N	N-(1-萘基)-乙二胺光度法
pH	WTW 340i 型酸度计

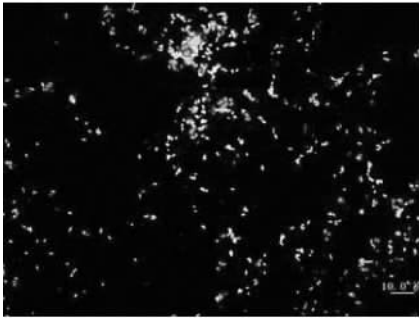
鉴于荧光原位杂交技术(FISH)在国内污水处理微生物检测中的应用,本试验也采取探针杂交来检测聚磷菌富集的程度.PAO₄₆₂、PAO₆₅₁和 PAO₈₄₆混合成 PAO_{MIX},采用 CY3 标记;EUB₃₃₈、EUB₃₃₈-II 和 EUB₃₃₈-III 分装成 EUB_{MIX},用 FITC 标记^[10].图片采用 OLYMPUS BX61 和 DP71 数字成像系统采集,计数采用 IMAGE-PRO PLUS 分析测定.

2 结果与分析

2.1 好氧聚磷菌的富集培养

SBR 母反应器用于富集 *Candidatus Accumulibacter phosphatis*,运行超过 2 a.每组静态试验前,用 FISH 测定污泥中的聚磷菌比例,>70% 以上的污泥用于批次试验(母反应器的聚磷菌含量最高超过 85%).长期检测中,当以乙酸为碳源时,母反应器厌氧结束磷酸盐为 (110 ± 20) mg/L.好氧阶段,母反应器中的污泥能利用氧气为电子受体过量吸收磷酸盐,母反应器的除磷效果一直稳定在 0.5 mg/L 以下,出水的磷去除率持续在 99% 以上.Lu 等^[9]和由阳等^[11]认为碳源在乙酸钠和丙酸之间的转化能使系统能不断排除聚糖菌,增加聚磷菌的比例.本试验母反应器的运行结果同样表明,聚磷菌成为优势

菌后,在碳源转化中可以不断提高比例.



所用碳源为乙酸,标尺为 10 μm

图 2 母反应器污泥的荧光原位杂交图

Fig.2 Composition of FISH images of the sludge

2.2 静态试验与结果

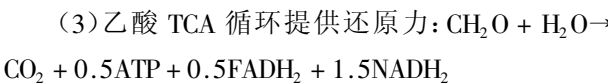
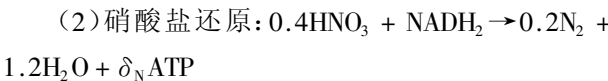
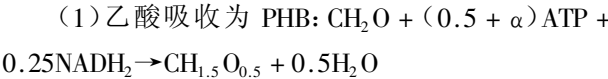
生物脱氮过程中,电子供体通常来源:①废水中可生物降解的溶解性有机物;②内源代谢过程中产生的可生物降解的溶解性有机物;③外源物质如甲醇或醋酸盐等.对于聚磷菌 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 而言,外源的电子供体一般需要选择挥发性脂肪酸,例如乙酸和丙酸,它不能代谢甲醇和乙醇.在实际污水处理中反硝化投加的碳源一般为甲醇和乙醇,但是在本试验中,由于污泥种群结构单一,没有能将醇类转化为 VFA 的菌,所以对于聚磷菌本身而言,只存在 2 种电子供体:VFA 和内源物质.

2.2.1 好氧聚磷菌利用乙酸反硝化

为了排除好氧聚磷菌利用乙酸放磷的反应过程

和糖原可能作为反硝化的碳源,母反应器厌氧结束后用不含碳源的营养液清洗污泥,使得静态试验反应器中不含有磷酸盐,污泥中糖原含量较少.之后曝气 20 h,使得细胞内的 PHB 被细胞利用,静态试验起始状态的 PHB 也较小.批次试验起始 COD 为 100 mg/L,硝态氮分别为 5、10、15 mg/L,整个过程 pH 恒定在 7.0 ± 0.1 ,温度为 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$,MLSS 为 1.6 g/L.

在本静态试验中好氧 PAO 能够进行如下反应.



式中, $\alpha = 0.16 \times \text{pH}_{\text{out}} - 0.7985$,表示乙酸由主动运输通过聚磷菌细胞膜所需要消耗的 ATP,由于本静态实验的 pH 为 7.0 ± 0.1 ,取为 0.3215^[12].另取 $\delta_N = 0.9$,表示在缺氧条件下消耗单位 NADH_2 所产生的 ATP 量^[5].

从图 3 可见,在不同硝酸盐浓度下,反应器中硝酸盐的变化曲线是平行的.在整个反应过程中,3 个反应器的比反硝化速率分别为 0.100 9、0.109 6、0.088 6 mmol/(g·h).从 PHB 和 TOC 的变化曲线中可以看出,硝酸盐浓度越高,消耗的乙酸也越多,但是合成的 PHB 却越少.在整个试验过程中,反应器中无亚硝酸盐的积累.

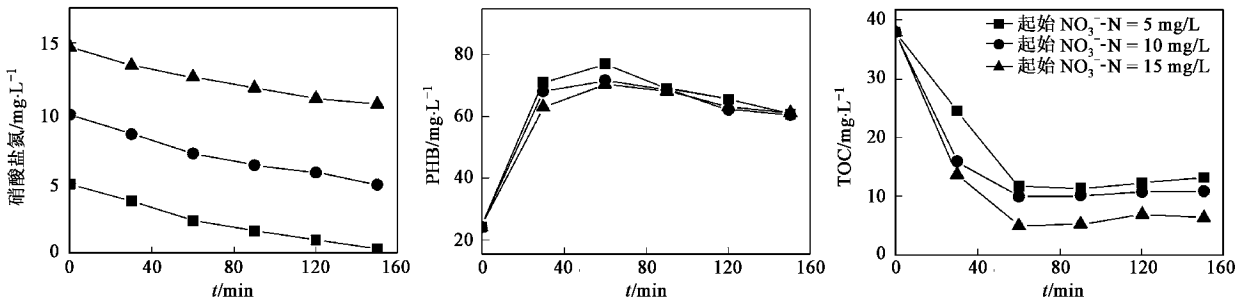


图 3 好氧聚磷菌利用乙酸反硝化静态试验变化情况

Fig.3 Changes of PAOs using acetate under different concentrations of nitrate

由表 2 可以看出,起始硝酸盐浓度对好氧聚磷菌的反硝化过程中乙酸的不同代谢途径有影响.虽然不同反应器中的比反硝化速率和 PHB 比增长速率相近,但是 TOC 比消耗速率(乙酸的消耗速率)与起始硝酸盐浓度有一定的关系.进一步计算发现,当起始硝酸盐浓度越高时,消耗单位乙酸将生成的

PHB 越少,同时反硝化的量也减少.由设想的反应方程,那么得到的结果必然是产生了更多的 CO_2 .

在通常假设的代谢模型中^[10],聚磷菌吸收乙酸时,ATP 大部分来自胞内多聚磷酸盐的水解,小部分来自糖原的降解.而糖原的主要作用是提供了还原力合成 PHB.由上述假设的模型可知,在本试验中,

聚磷菌产生 ATP 的途径有所变化.乙酸吸收的 ATP 主要来自硝酸盐的还原和 TCA 循环,而还原力主要是由 TCA 循环提供的.根据试验结果,可以推断,由

于硝酸盐浓度的不同,促进了 TCA 循环反应,使得产生的 ATP 用于乙酸的吸收.

2.2.2 PHB 作为好氧聚磷菌的碳源反硝化

表 2 聚磷菌利用乙酸反硝化时物质转化¹⁾

Table 2 Chemical transformation of PAOs using acetate to denitrify					
起始 NO ₃ ⁻ -N /mg·L ⁻¹	比反硝化速率 /mg·(g·h) ⁻¹	PHB 比增长速率 /mg·(g·h) ⁻¹	TOC 比消耗速率 /mg·(g·h) ⁻¹	PHB/HAC (摩尔比)	HNO ₃ /HAC (摩尔比)
5	1.413	11.246	6.026	1.041 6	0.201 0
10	1.535	11.186	8.326	0.749 9	0.158 0
15	1.240	11.392	9.860	0.644 9	0.107 8

1)PHB/HAC、HNO₃/HAC 中 PHB、HAC 以 C 计,HNO₃ 以 N 计

PHB 作为一种细胞体内的碳源和能源物质,在好氧聚磷菌生长代谢中有着重要作用.正常运行的周期中,厌氧下乙酸吸收后会转化为 PHB,而后在好氧或者缺氧条件下 PHB 用于吸收磷酸盐合成聚磷,同时维持其他生理活动. *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 由好氧短期转化为缺氧的过程中,当胞外不存在外在碳源时,理论上也能利用 PHB 将硝酸盐还原.

静态试验在母反应器中厌氧结束之后进行.污泥在母反应器中进行清洗,除去放磷作用释放的磷酸盐,之后分装至静态试验反应器中.全程控制 pH 为 7.0±0.1,温度为(26±1)℃,MLSS 为 3.0 g/L.污泥在母反应器中体内已经富含含有 PHB,作为静态试

验的碳源.

当起始硝酸盐氮浓度为 10 mg/L 时,4 h 后基本反硝化结束,图 4 中起始浓度为 10 mg/L 的 PHB 曲线在 4 h 后趋于平缓,略有下降,原因可能在于 PAO 利用仅有的碳源维持生命活动.当反应器中硝酸盐一直存在时,硝酸盐浓度的不同与反硝化速率无关.在不同的静态试验反应器中当硝酸盐还原完成前 PHB 含量接近,无明显差异.

从表 3 可以看出,在不同梯度的硝酸盐浓度下,平均比反硝化速率为 0.973 3 mg/(g·h),SD = 0.58%,PHB 平均比消耗速率(以 PHB 计)为 2.462 6 mg/(g·h),SD = 2.51%.试验结果表明,聚磷菌在没有磷酸盐存在的环境中能利用 PHB 只进行反硝化

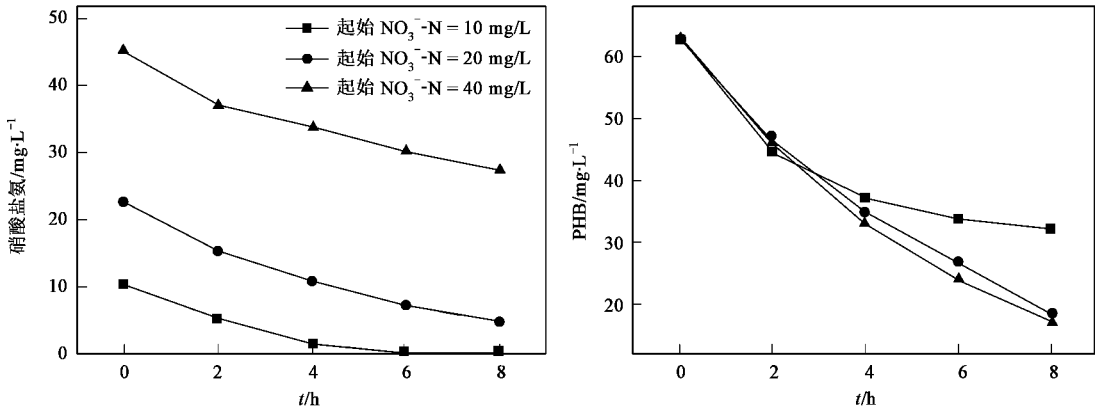


图 4 聚磷菌利用 PHB 反硝化静态试验变化情况

Fig. 4 Changes of PAOs using PHB under different initial concentrations of nitrate

表 3 聚磷菌利用 PHB 反硝化时化合物转化速率¹⁾

Table 3 Chemical transformation of PAOs using PHB to denitrify			
起始 NO ₃ ⁻ -N /mg·L ⁻¹	比反硝化速率 /mg·(g·h) ⁻¹	PHB 比消耗速率/ mg·(g·h) ⁻¹	HNO ₃ /PHB (摩尔比)
10	0.969 1	2.479 6	0.600 2
20	0.981 6	2.427 1	0.621 1
40	0.969 4	2.481 0	0.600 0

1)HNO₃/PHB 中 PHB 以 C 计,HNO₃ 以 N 计

和维持生命活动.

很多研究者发现反硝化过程在表观上呈现零级动力学,反硝化速率只与反硝化菌的活性和数量有关.聚磷菌利用 PHB 反硝化的过程由于温度、pH 适宜,且碳源也在试验期间没有限制反硝化,所以本试验过程中,聚磷菌利用 PHB 单独进行反硝化的速率对于硝酸盐也呈现零级反应.

3 结论

(1) 在不同碳源下, 即有乙酸或者内源 PHB 存在时, 聚磷菌和普通异养菌一样在没有磷酸盐释放和吸收情况下能够利用碳源进行反硝化.

(2) 当给静态试验反应器中提供乙酸为外在单一碳源时, 乙酸不是全部用于反硝化, 聚磷菌将利用部分乙酸合成 PHB. 不同的硝酸盐起始浓度对反硝化速率和 PHB 比生成速率没有影响. 而乙酸的消耗速率与起始硝酸盐浓度有关, 瞬时投加的硝酸盐浓度越高, 聚磷菌消耗乙酸的速率越快, 但消耗单位乙酸将合成较少的 PHB, 且硝酸盐还原量也较少.

(3) PHB 存在时, 聚磷菌利用其作为内在碳源, 其反硝化速率较乙酸为碳源时慢, 但环境中硝酸盐浓度对反硝化速率无影响. 整个过程反硝化速率呈现对于基质(NO_3^- -N)的零级动力学反应, 比反硝化速率为 $0.973\ 3\ \text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$. 同时, 不同起始硝酸盐浓度下, PHB 平均比消耗速率(以 PHB 计)为 $2.462\ 6\ \text{mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$, $\text{SD} = 2.51\ %$.

参考文献:

[1] Smolders G J F, Vandermeij J, Vanloosdrecht M C M, *et al.* Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process—stoichiometry and pH influence [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **43**(6): 461-470.

[2] 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.

[3] Henze M, Gujer W, Mino T, *et al.* Activated sludge model NO₂D, ASM2D [J]. *Water Sci Technol*, 1999, **39**(1): 165-182.

[4] 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.

[5] Mumleitner E, Kuba T, Vanloosdrecht M C M, *et al.* An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **54**(5): 434-450.

[6] Hu Z, Wentzel M C, Ekama G A. Modeling biological nutrient removal activated sludge systems—a review [J]. *Water Res*, 2003, **37**: 3430-3444.

[7] He S, Gu A Z, McMahon K D. Progress toward understanding the distribution of Accumulibacter among full-scale enhanced biological phosphorus removal system [J]. *Microb Ecol*, 2008, **55**(2): 229-236.

[8] 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.

[9] Lu H, Oehmen A, Virdisa B, *et al.* Obtaining highly enriched cultures of Candidatus Accumulibacter phosphates through alternating carbon sources [J]. *Water Res*, 2006, **40**: 3838-3848.

[10] 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**: 2271-2300.

[11] 由阳, 彭轶, 袁志国, 等. 富含聚磷菌的好氧颗粒污泥的培养与特性[J]. *环境科学*, 2008, **29**(8): 2242-2248.

[12] Filipe C D M, Daigger G T, Grady C P L. Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **76**(1): 32-43.