

强化生物除磷系统中主要菌群的富集和培养^①

由 阳^{②*} 袁志国^{**} 李夕耀^{***} 彭永臻^{③*} ***

(* 哈尔滨工业大学市政环境工程学院 哈尔滨 150090)

(** Advanced Wastewater Management Centre, University of Queensland, Brisbane 4072)

(*** 北京工业大学环境与能源工程学院 北京 100022)

摘 要 以 SBR 反应器为载体,接种具有除磷功能的活性污泥后分别富集了强化生物除磷(EBPR)系统中的 2 个主要微生物种群聚磷菌(PAO)和聚糖菌(GAO)。以 P/C 和碳源种类这 2 个关键因素作为选择性条件控制富集的方向。高 P/C 下以乙酸丙酸交替富集 *Accumulibacter*;在低 P/C 下以乙酸富集 *Competibacter*,以丙酸富集 α -GAO。在适当 pH、温度、好氧段 DO、进水负荷等条件下,富集这 3 类微生物取得了成功,富集结果是 *Accumulibacter* 占 80%,系统对 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的去除率可达 98% 以上, *Competibacter* 占 90%, α -GAO 也占有非常大的比例。此外一些细节如配水灭菌、配水充分溶解等因素也能决定富集的成败。

关键词 强化生物除磷系统,聚磷菌,聚糖菌,富集,优势种群

0 引 言

聚磷菌(phosphorus accumulating organisms, PAO)和聚糖菌(glycogen accumulating organisms, GAO)是强化生物除磷(enhanced biological phosphorus removal system, EBPR)系统的主要微生物种群。强化生物除磷的本质是利用 PAO 的过量吸磷,通过排出剩余污泥从系统中去除磷^[1]。但是 EBPR 系统往往会由于 GAO 占优势而退化甚至崩溃。GAO 对于除磷没有任何贡献,却与 PAO 厌氧竞争有限的碳源。因此,分别研究 PAO 和 GAO 的生理及代谢机制非常重要,在此基础上研究者才能找到影响二者竞争的机制,建立调控种群结构的方法。

几十年来研究者以传统的纯培养的方式分离纯化到了很多株“具有除磷功能的纯菌”,人们试图以这些纯培养产物来研究 PAO 的生理特性。但是这些纯菌中的很大一部分已经被后续的研究者否定^[2-3],证明它们不是 PAO;确认余下的纯菌^[4-6]是不是 PAO 需要考察它们在不同国家和地区的不同规模的 EBPR 系统中的含量以及它们的代谢是否具有 EBPR 污泥的全部生理特征(包括醌类呼吸产物,厌

氧好氧交替过程中是否存在 PHA、糖原、多聚磷酸盐颗粒的循环等)。因此,纯培养方法获得的结果还有待于讨论。过去十年,研究者致力于采用分子生物学方法对 EBPR 的微生物种群进行分类鉴定, Bond^[7]等人发现与非 EBPR 相比,EBPR 系统中大量存在一种微生物,经鉴定为 *Rhodocyclus*, Hesselmann^[8]命名这种微生物为“*Candidatus Accumulibacter Phosphatis*”,简称为“*Accumulibacter*”。此后众多研究者^[8-13]发现 *accumulibacter* 在不同的 EBPR 系统中大量存在而且具有多聚物循环,因此 *accumulibacter* 是 PAO 得到广泛的公认。

以纯培养方法分离 GAO 的结果与 PAO 的类似,迄今为止,人们分离得到很多纯菌^[3, 14],但是它们在污泥中含量都很低,因此它们都不是 GAO。分子生物学手段的应用促进了 GAO 的鉴定。Nielsen 采用 DGGE 技术首次发现一种 GAO,它属于 *Gammaproteobacteria*,通常被称为“*Candidatus Competibacter Phosphatis*”,简称为“*Competibacter*”,这种微生物大量存在于实验室及实际污水处理厂的退化的 EBPR 污泥中^[15]。另一种 GAO 是 Beer^[16]发现的 *Alphaproteobacteria*,它们往往每四个形成一组(tetrad forming organisms, TFOs^[17, 18]),这种 TFOs 即早期研究

① 国家自然科学基金(50628808)、“十一五”国家科技支撑计划重点项目(2006BAC19B03)(Z0005186040421)和北京市教委科技创新平台项目(PXM2008_014204_050843)资助。

② 女,1979 年生,博士生;研究方向:污水生物除磷;E-mail: youyang1979@sina.com.cn

③ 联系人, E-mail: pyz@bjut.edu.cn
(收稿日期:2008-01-30)

发现的 G 细菌(G-bacteria)^[19],现在根据分类称之为 *Alphaproteobacteri*-GAO或 α -GAO。

基于目前研究现状,分别富集 *accumulibacter*、*competibacter* 和 α -GAO,以富集培养物代替纯培养物无疑是研究 PAO,GAO 生理生化研究的重要而且可以被广泛认可的途径。因此,通过富集得到高含量的目标菌尤为重要。

1 材料与方法

1.1 SBR 反应器的运行

试验采用序批式活性污泥法(SBR)反应器,SBR 反应器高 70cm,直径 20cm,总体积 14L,有效容积为 10L。由时间程序控制器及附属电子线路实现对运行的自动控制。好氧状态采用空压机曝气,以粘砂块作为微孔曝气头。厌氧状态由搅拌器搅拌,保证了厌氧时污泥处于悬浮状态。整个驯化富集过程保证恒温在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 范围内。

SBR 反应器每天运行 4 个周期,每个周期 6h,每个周期包含 2min 进水,2.5h 厌氧搅拌,3h 好氧曝气,3min 沉淀和 25min 闲置。水力停留时间大约为 8.5h。

在培养的初始阶段,本试验采用 1 个 SBR 培养驯化污泥,并配备有一个水箱和一套潜水泵装置进行进水,采用乙酸和丙酸交替为碳源富集 *accumulibacter*(每种碳源各保持两个污泥龄),所有的营养成分都在一个水箱中配备完成,并由潜水泵打进反应器,每个周期排水 7L,进水 7L,排水比为 7/10。

初始阶段富集 *accumulibacter* 失败后,根据 2.1 中分析的原因对系统进行了改造:配水改成在两个容器中进行,一个主要用来溶解 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 。另一个用来溶解化学需氧量(COD)和其它营养物质。容器全部密封,配备好后进行高温高压灭菌。进水改用蠕动泵,定期更换泵管。同时,准备另外 2 个反应器,分别用来富集 *competibacter* 和 α -GAO,这两个反应器的泥来自 *accumulibacter* 反应器的排泥,三个反应器都降低排水比为 2.5/9。

1.2 配水和接种污泥

培养这三类种群的配水采用 Adrian 的配方^[20]。配水组成见表 1,配水中含有 COD 800mg/L,根据富集目标的不同正磷酸盐为 53.3mg $\text{PO}_4^{3-}\text{-P/L}$ 或 2mg $\text{PO}_4^{3-}\text{-P/L}$,碳源采用乙酸和丙酸交替或者单独使用乙酸或丙酸。

表 1 配水成分组成

培养基 (L^{-1})		营养液 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	
NH_4Cl	0.1065g	$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.5
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.171g	H_3BO_3	0.15
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0795g	$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.03
ATU	0.0021g	KI	0.18
蛋白胨	0.048g	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.12
丙酸	0.525mL	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.06
(乙酸)	0.787mL	$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.12
营养液	0.575mL	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.15
pH	7.0	EDTA	10

初始阶段 SBR 反应器接种的污泥为北京市酒仙桥污水处理厂具有除磷功能的絮状污泥。接种量为 4L,接种污泥浓度为 7500mg/L。

1.3 分析方法

COD 采用 5B-1A 型快速测定仪; $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 采用氯化亚锡-还原分光光度法;污泥中的总磷测定采用标准方法^[21],即以过硫酸钾消解后测定正磷酸盐。

聚羟基脂肪酸(PHA)含量测定采用修正的 Bond 的方法^[7]。清洗过的污泥经离心后去除上清液,以冷冻干燥机冻干 24h 后称重,冻干的污泥放入消解管中,加入 2ml 氯仿和 2mL 酯化液(3%酸化甲醇),放入烘箱中 105°C 消解过夜,冷却后加入 1mL 蒸馏水剧烈震荡,稳定 30min 液面明显分层后取出氯仿相用气相色谱仪分析,色谱为安捷伦 6890 系统。

按照 Crocetti 等^[9]的操作方法进行 FISH 分析。采用 4% PFA, 4°C 条件下对污泥样品固定 2~3h。对固定后的污泥样品超声分散 10min 后,将样品滴加在明胶包被过的载玻片上,空气中干燥后先后浸泡于 50%、80% 和 98% 的乙醇溶液中脱水 3min。杂交缓冲液组成包括 0.9mol/L NaCl、20mmol/L Tris/HCl、1% SDS 和甲酰胺, pH7.2。将荧光标记的寡核苷酸探针溶解于杂交缓冲液中,在 46°C 下与污泥样品杂交 2h。采用的寡核苷酸探针列于表 2,杂交结束后,采用洗脱缓冲液在 48°C 下洗脱 20min。在干燥后的样品上滴加抗荧光衰减液,对每个污泥样品随机拍摄 20~25 张照片用于定量分析(IPP7.0 Software)。

多聚磷酸盐颗粒染色采用高浓度 DAPI 染色的方法。如 FISH 的前处理,活性污泥样品经固定、分散、涂片、晾干、脱水后,每个孔洞上加 $100\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI 染料 9mL,黑暗中静置 5min 后,用 Mili-Q 水冲洗干净,晾干后加抗荧光衰减剂后封片观察。

表 2 Fish 分析中采用的寡核苷酸探针

探针	FA	荧光标记检测目标	序列
EUB338	—	FTTC 几乎全部	Eubacteria
PAOmix	PA0462	35% Cy-3	Accumulibacter
	PA0651	35% Cy-3	
	PA0846	35% Cy-3	
GAOmix	GA0431	35% Cy-3	competibacter
	GA0989	35% Cy-3	

注:PAOmix 由 PA0462:PA0651:PA0846 = 1:1:1,GAOmix 由 GA0431:GA0989 = 1:1 以摩尔浓度比组成。

1.4 富集策略

本研究以 C/P 和碳源种类这两个因素作为选择性培养条件达到富集目标种群的目的,在低 C/P 下,即 COD 为 800mg/L、正磷酸盐为 53.3mgPO₄³⁻-P/L 的配水培养 *accumulibacter*,即进水 COD/P 为 15mgCOD/mgPO₄³⁻-P。由于 *competibacter* 吸收丙酸的速率要比吸收乙酸的速率慢得多,而 α -GAO 更喜欢丙酸而不喜欢乙酸^[22]。相对来说,*accumulibacter* 对乙酸和丙酸都可以吸收,而且吸收速率差不多^[23]。因此,本试验通过交替乙酸和丙酸为碳源,使反应器在以乙酸为底物时淘汰 α -GAO,在以丙酸为底物时淘汰 *competibacter*,进而使 *accumulibacter* 占优势,成为优势种群。碳源交换设计见表 3。

表 3 培养 PAO 的碳源

COD(mg·L ⁻¹)	阶段 1	阶段 2	阶段 3	阶段 4	阶段 5
丙酸	800	0	800	0	800
乙酸	0	800	0	800	0

培养 *competibacter* 时以乙酸为碳源,COD 为 800mg/L,进水中 PO₄³⁻-P 为 2mg/L。其它成分与培养 *accumulibacter* 的培养基相同。

培养 α -GAO 的碳源为丙酸,COD 为 800mg/L,进水 PO₄³⁻-P 为 2mg/L,其他成分与培养 *accumulibacter* 的培养基相同。

2 结果与讨论

2.1 培养的初始阶段

反应器内接种污水处理厂的活性污泥后以 COD 为 800mg/L,PO₄³⁻-P 为 53.3mg/L 的配水对污泥进行驯化,运行半个月后,反应器内污泥变成浅黄色。启动两个月后,反应器进入相对稳定状态,结果如图 1 和图 2 所示。

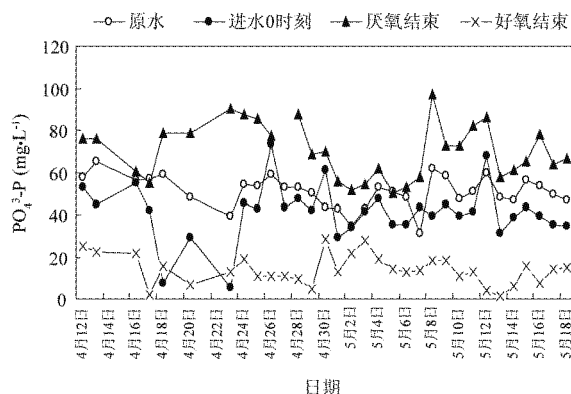


图 1 培养初始阶段 PO₄³⁻-P

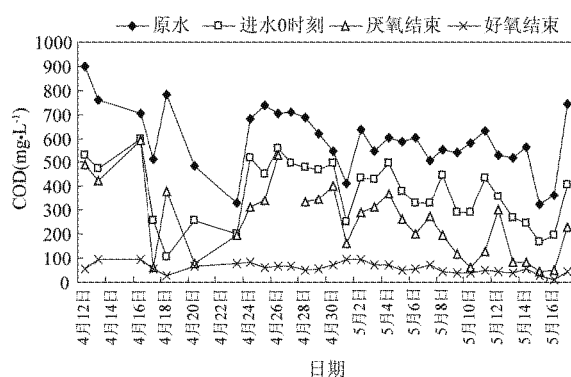


图 2 培养初始阶段 COD

由图 1,图 2 可见,培养初始阶段的两个月,反应器虽然基本进入稳定运行阶段,但是运行结果却非常不理想。首先,由图 1 可见,系统厌氧放磷和好氧吸磷的能力都不是很强,厌氧结束,系统 PO₄³⁻-P 基本在 60mg/L 左右,好氧结束,系统 PO₄³⁻-P 基本在 20mg/L 左右,出水不达标,这说明聚磷菌在系统中还没有被富集,占总菌含量较少。其次,根据文献报道,无论是 PAO 或者是 GAO 代谢的一个重要特点是厌氧段降解 COD,并储存成能量用来好氧生长。所以,一个系统中如果富集了大量的 PAO 或 GAO,首要特点是厌氧段能够降解基本上所有 COD,这样可以保证没有 COD 遗留到好氧段去,从而抑制了普

通异养菌的生长,使 PAO 或者 GAO 最可能多的生存在系统中,所以 COD 在好氧段应该不再变化。从图 2 可见,本系统在厌氧段只能降解少部分 COD,绝大部分 COD 是在好氧段被降解的,说明系统中存在大量的其他种群,他们在好氧降解 COD 大量生长,这些异养菌的存在使 PAO 或 GAO 的富集面临挑战。从 FISH 分析的结果可见,此时系统中并存 *accumulibacter*、*competibacter* 和 α -GAO 以及大量其他微生物。

综合以上结果,分析问题主要出在以下三方面:(1)水箱使用一段时间后会滋生细菌,表面会挂膜,挂膜微生物一方面会降解水箱中的 COD,另一方面会随进水进入反应器,破坏富集成果,抑制目标种群的生长。(2)配水在一个水箱中进行,许多无机物相互反应,生成沉淀,不能很好的溶解。所以进水中营养物质不足。(3)系统中 GAO 和 PAO 的含量都很少,所以厌氧降解 COD 不完全,导致好氧下大量异养菌生长。

根据分析,对试验装置进行一些调整,如 1.1 所述。更新方案的第一个星期,采用不含 COD 和 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的培养液(配方见表 1)在厌氧结束时洗泥来去除 COD,然后在好氧阶段开始前再加入相应浓度的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$,此方法用来抑制 COD 遗留到好氧段,减少普通异养菌的生长。

2.2 *Accumulibacter* 的富集

由于 GAO 是 PAO 的最主要竞争者,因此 PAO 反应器系统中排除能好氧降解 COD 的普通异养菌后的关键问题就是抑制 GAO 的生长。所以一些只对 PAO 有利而对 GAO 不利的条件被应用到系统中,碳源就是这样一个因素^[24]。本实验通过交替碳源,使反应器在以乙酸为底物时淘汰 α -GAO,在以丙酸为底物时淘汰 *competibacter*,进而使 *accumulibacter* 占优势,成为优势种群。

运行 115 天后,反应器明显呈现强化生物除磷系统的特点,如图 3,图 4 所示,随着循环数的增加,系统除磷功能不断被强化,厌氧放磷量逐步增加,最后稳定在 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 为 200mg/L 左右,好氧段大量吸磷,出水 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度基本接近 1mg/L。同时,系统具有卓越的 COD 去除能力。由图 4 可见,运行前期,系统对 COD 的去除不稳定,但是进入稳定运行后,厌氧段 COD 去除率达到 90% 以上,好氧段 COD 基本不再变化,这些都是 EBPR 系统的典型特点,说明 PAO 在系统中大量存在。

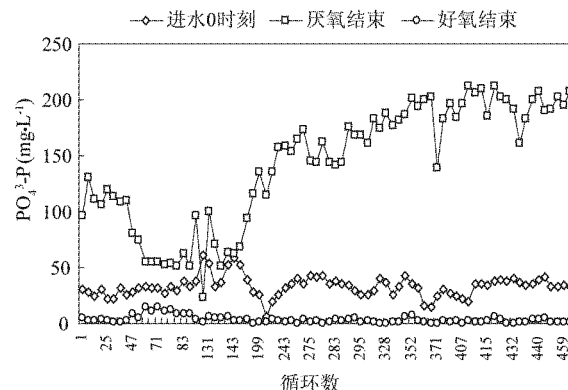


图 3 PAO 反应器的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除情况

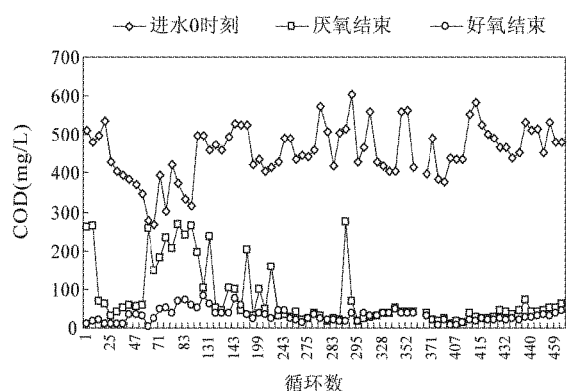


图 4 PAO 反应器的 COD 去除情况

对系统一个典型周期内的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, COD 以及 PAO 胞内聚合物如 PHB, 多聚磷酸盐颗粒含量的分析检测如图 5 所示。

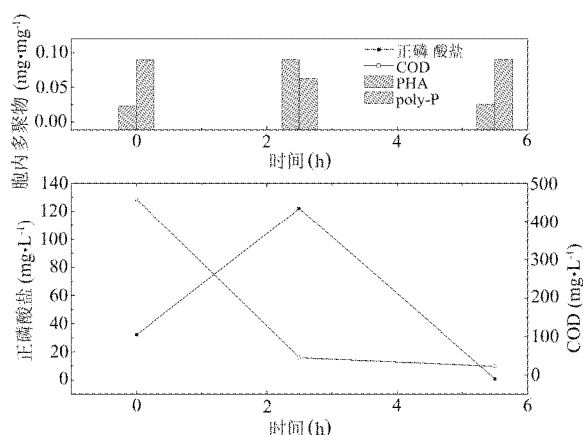


图 5 SBR 系统的典型周期的污染物去除及多聚物合成

由图 5 可见,在厌氧阶段,PAO 水解体内的多聚磷酸盐颗粒,并把正磷酸盐释放到胞外的水体中,同时利用此过程产生的能量吸收生物可降解的有机碳并且以聚 β -羟基脂肪酸 (PHAs) 的形式贮存在细胞

内。在接下来的好氧阶段,PAO 分解 PHA 产生能量以满足自身的生长,同时吸收体外的正磷酸盐,以多聚磷酸盐颗粒贮存在体内。这些污染物以及多聚物的变化充分说明此时的污泥已经具备了 PAO 富集污泥应该有的全部典型特征。

图 6 和图 7 分别是富集的 *accumulibacter* 污泥的高浓度 DAPI 染色和 FISH 照片。由图中可以看出,此时的活性污泥里面富集了大量的 *accumulibacter*, *accumulibacter* 大约可以占到总菌数的 80% 左右,富集 *accumulibacter* 取得了成功。富集的污泥可以替代纯培养,作为微生物生理生化等方面的研究的对象。对于人们认识 PAO 如何在强化生物除磷系统中成为优势种群,发挥功效有很大的帮助。

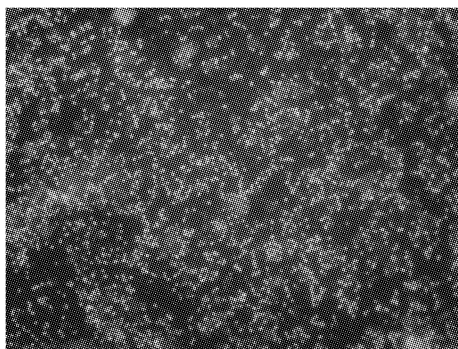


图 6 PAO 污泥的高浓度 DAPI 染色照片

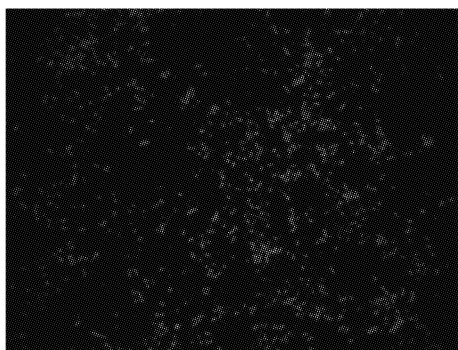


图 7 PAO 污泥的 FISH 图片

2.3 *Competibacter* 的富集

根据文献报道, *competibacter* 代谢丙酸的速度要比代谢乙酸的速度慢的多,换言之,就是 *competibacter* 比较容易代谢乙酸,所以收集足够量的 PAO 反应器排出的剩余污泥后,采用 2 号 SBR 反应器,提供其它适宜条件(pH = 7.0, 低 P/C 等),以乙酸为碳源富集 *competibacter*。经过近半个月的培养,反应器进入稳定运行,它对 COD 的去除情况见图 8。

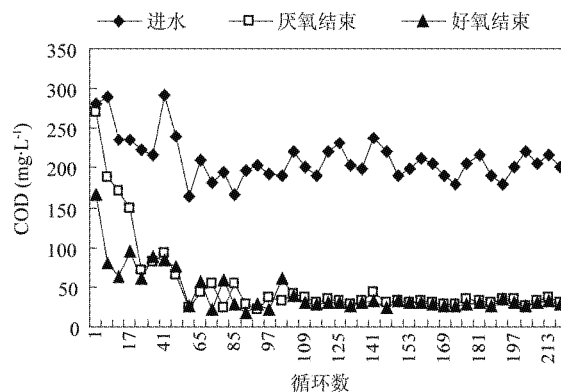


图 8 *Competibacter* SBR 对 COD 的去除

由图 8 可见,系统进入稳定运行后,对 COD 有很强的去除能力。COD 去除率可以达到近 99%,而且去除的 COD 主要在厌氧段实现,好氧段基本维持 COD 没有变化。同时对系统除磷的情况观测得知,进入稳定运行后,系统逐渐丧失了吸磷放磷能力,吸放磷量几乎为 0mg/L。配水成分中的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 只用来满足微生物的生长。这说明聚磷菌已经被逐渐淘洗出系统。而聚糖菌成为了优势种群,它们在厌氧消耗 COD,合成 PHA 等能量物质。而在好氧下又消耗 PHA,合成糖原。由于糖原代替 poly-P 成为了微生物体内的能量物质,所以系统对于除磷没有任何贡献。图 9 为富集得到的 *competibacter* 污泥照片。

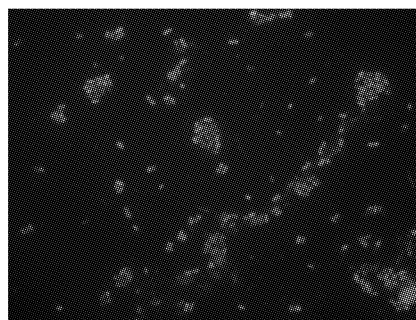


图 9 富集培养结束时 *competibacter* 的 FISH 图片

由图 9 可以看出,富集培养结束后,反应器内聚集了大量的聚糖菌 *competibacter*,它们形体比较大,呈短杆状,多数以头对头的形态出现。根据软件计数结果,此时的 *competibacter* 约占总菌数的 90% 左右。

2.4 α -GAO 的富集

本研究以丙酸为选择性碳源,在提供其它适宜条件下(pH = 7.0, 低 P/C 等)以 SBR3 反应器富集 α -GAO。经过近 2 个月后,系统去除 COD 能力稳定。

在稳定运行期间,经检测系统在厌氧条件下大量吸收丙酸,微生物分解糖原,同时合成 PHA 贮存在细胞中,在好氧条件下 COD 没有明显变化,微生物分解 PHA,合成糖原。系统的表现与富集 *competibacter* 的反应器的极为相似,此处不再赘述。然而,以显微镜观察或者荧光原位杂交观察可见 SBR3 与 SBR2 的微生物结构组成有根本的不同。在 SBR3 中大量存在的是个体较小,球状,以四联体形式存在的一类微生物,而且,每四个四联体也倾向于聚集在一起。它们与文献报道中的 α -GAO 的个体形态非常一致,同时由于这种微生物的富集 EBPR 系统表现了 GAO 反应器的显型,因此推断 α -GAO 成为了系统的优势种群,如图 10 所示。虽然本研究中没有应用 TFO-DF218 探针,但是仍然可见,这种四联体形式存在的微生物已经成为了系统中的优势种群,除了这类微生物,视野中几乎观察不到其它微生物。

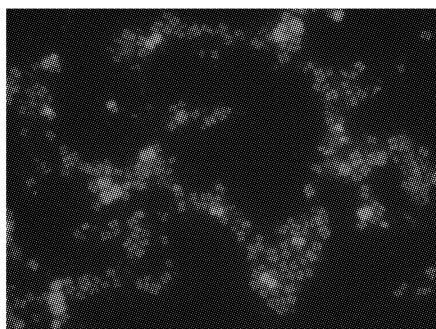


图 10 富集后的 α -GAO 的 EUB 杂交照片

3 结 论

(1)在纯培养结果不明晰的情况下可以通过富集获得大量的 PAO 或 GAO,富集产物可以替代纯培养进行试验,对于研究种群的生理,生态以及代谢有重要意义。

(2)以 P/C 和碳源种类这 2 个关键因素可以控制强化生物除磷系统富集的方向。高 P/C 下以乙酸丙酸交替富集 *accumulibacter* (PAO);在低 P/C 下以乙酸富集 *competibacter*,以丙酸富集 α -GAO。

(3)通过提供适当 pH、温度、进水负荷等条件,在相应碳源下,本研究富集三类微生物取得了成功,富集结果 *accumulibacter* 占 80%,系统对 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的去除率可达 98% 以上。*competibacter* 占 90%, α -GAO 也占有非常大的比例。

(4)一些细节决定了富集的成败,例如进水是否

经过灭菌处理。染菌后的配水会把一些异养菌带入反应器中,进而大量繁殖,导致富集时间的延长或者富集的失败。因此,不仅是配水本身,与配水接触的各反应器部件如水箱,泵管等都应该定期灭菌或消毒。此外,配水中各营养成分是否完全溶解也至关重要,没有完全溶解或者有沉淀析出的配水进入反应器后,无法满足微生物生长并代谢的营养需求,使微生物受抑制,所以这一点也可能是导致富集失败的原因。

参考文献:

- [1] Oehmen A, Lemos P C, Carvalho G, et al. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water research*, 2007, 41(11):2271-2300
- [2] Maszenan A M, Seviour R J, Patel B K C, et al. Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov and *Tetrasphaera australiensis* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 593-603
- [3] Seviour R J, Mino T, Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27 (1): 99-127
- [4] Bao L L, Li D, Li X K, et al. Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system. *Journal of environmental sciences*, 2007, 19: 391-395
- [5] Satoshi H, Wen-Tso L, Tomoyoshi S, et al. *Tetrasphaera elongate* sp. nov., a polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2002, 52: 883-887
- [6] Hui, Z, Yuji S, Satoshi H, et al. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate accumulating micro-organisms, the first cultured representative of the new bacterial phylum gemmatimonadetes phyl. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2003, 53: 1155-1163
- [7] Bond P L, Erhart R, Wagner M, et al. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 4077-4084
- [8] Hesselmann R P X, Werlen C, Hahn D, et al. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22 (3): 454-465
- [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. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (3): 1175-1182
- [10] Liu W T, Nielsen A T, Wu J H, et al. In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus re-

- moval process. *Environ Microbiol*, 2001, 3(2): 110-122
- [11] Kong Y H, Nielsen J L, Nielsen P H. Microautoradiographic study of Rhodocyclus-related Polyphosphate-accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(9): 5383-5390
- [12] Zilles J L, Peccia J, Kim M W, et al. Involvement of Rhodocyclus-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(6): 2763-2769
- [13] He S, Gu A Z, McMahon K D. The role of Rhodocyclus-like organisms in biological phosphorus removal: factors influencing population structure and activity. In: Proceedings of Water Environment Federation Technical Exhibition and Conference (WEFTEC), Washington D.C., USA, 2005
- [14] Shintani T, Liu W T, Hanada S, et al. Micropruina glyconica gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive glycogen-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int J Sys Ev Microbiol*, 2000, 50: 201-207
- [15] 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 phosphorus removal plants in Japan. *Water Research*, 2005, 39(13): 2901-2914
- [16] Beer M, Kong Y H, Seviour R J. Are some putative glycogen accumulating organisms (GAO) in anaerobic: aerobic activated sludge systems members of the alpha-Proteobacteria? *Microbiology*, 2004, 15: 2267-2275
- [17] Wong M T, Tan F M, Ng W J, et al. Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic: aerobic activated sludge processes. *Microbiology*, 2004, 150: 3741-3748
- [18] Meyer R L, Saunders A M, Blackall L L. Putative glycogen-accumulating organisms belonging to Alphaproteobacteria identified through rRNA-based stable isotope probing. *Microbiology*, 2006, 152: 419-429
- [19] Tsai C S, Liu W T. Phylogenetic and physiological diversity of tetrad-forming organisms in deteriorated biological phosphorus removal systems. *Water Science and Technology*, 2002, 46(1-2): 179-184
- [20] Oehmen A, Zeng R J, Yuan Z G, et al. Anaerobic metabolism of propionate by polyphosphate-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 91(1):43-53
- [21] 国家环境保护总局,《水和废水监测分析方法》编委会编. 水和废水监测分析方法. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002. 243-250
- [22] Oehmen A, Yuan Z G, Blackall L L, et al. Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 91(2): 162-168
- [23] Pijuan M, Saunders A M, Guisasola A, et al. Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85(1): 56-67
- [24] 刘燕, 陈银广, 郑弘等. 乙酸丙酸比例对富集聚磷菌生物除磷系统影响研究. 环境科学学报, 2006, 26(8): 1278-1283

Enrichment and culture of major organism groups in enhanced biological phosphorus removal systems

You Yang*, Yuan Zhiguo**, Li Xiyao***, Peng Yongzhen* ***

(* School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090)

(** Advanced Wastewater Management Centre, University of Queensland, Brisbane 4072)

(*** School of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022)

Abstract

This research focused on the enrichment of phosphorus accumulating organisms (PAO) and glycogen accumulating organisms (GAO) in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) systems——SBR reactors fed with activated sludge. P/C and the carbon sources were considered as two main factors to control the enrichment conditions. So high P/C and alternate acetate and propionate were supplied to PAO, low P/C and acetate were supplied to g-GAO, and low P/C and propionate were supplied to α -GAO. Under the suitable pH, temperature, DO of the aerobic phase and load of the influent, the enrichment of these three kinds of groups was achieved with the results below: *Accumulibacter* reached 80% of the total bacteria, and the efficiency of P removal was over than 98%. *Competibacter* could reach 90% of the total bacteria, and also, α -GAO was a absolutely predominant group in its reactor. Furthermore, details just like the autoclaved feed and the completely dissolved feed can affect the results of the enrichment work.

Key words: enhanced biological phosphorus removal system (EBPR), phosphorus accumulating organisms, glycogen accumulating organisms, enrichment, predominant species