

碳源类型对 AOA-SBR 系统的除磷特性和菌群组成的影响^①

吉 茸^{②***} 王少坡^{③***} 赵乐丹^{***} 郑剑锋^{***} 邱春生^{***} 孙力平^{***}

(* 天津城建大学环境与市政工程学院 天津 300384)

(** 天津市水质科学与技术重点实验室 天津 300384)

摘 要 分别以乙酸钠、丙酸钠为碳源,采用厌氧-好氧-缺氧(AOA)模式运行 SBR 反应器,考察该系统内的除磷特性和聚磷微生物菌群结构。驯化 25 天后,两系统均表现出较为稳定的除磷效果,两系统稳定期磷的去除率分别在 88% 和 97% 左右。乙酸钠系统的污泥沉降性较好,污泥增长缓慢;丙酸钠系统的污泥除磷性能较好,生长速率快,但沉降性较差。荧光原位杂交(FISH)分析表明,两系统均富集出了大量的聚磷菌 Accumilibacter,但类型上存在差异。乙酸钠系统内的 Accumilibacter 主要为 II 型,而 I 型 Accumilibacter 在丙酸钠系统内占主导地位。

关键词 聚磷菌, 厌氧-好氧-缺氧(AOA), 序批式反应器(SBR), 反硝化除磷, Accumilibacter, 荧光原位杂交(FISH)

0 引 言

Accumilibacter 菌是污水厂普遍使用的强化生物除磷(enhanced biological phosphorus, EBPR)系统中的一种典型聚磷微生物,它通过厌氧释磷和好氧(缺氧)过量吸磷的特性实现水体富营养化的控制和磷资源的回收^[1,2]。Accumilibacter 种类繁多,学者们利用 16SrRNA 基因和聚磷酸盐激酶基因(ppk1)作为遗传标记物进行检测分析^[3],结果显示 Accumilibacter 有两个主要的类型:I 型和 II 型。又将 I 型分为 IA、IB、IC、ID、IE 5 个进化枝,II 型分为 IIA – IIG 7 个进化枝^[4,5]。由于分枝众多且不能实现纯培养,关于 Accumilibacter 的特性,在某些方面仍存有争议。许多研究将适合富集 Accumilibacter 的碳源集中在乙酸和(或)丙酸之间^[6-8],使用碳源的种类不同、单一碳源或是交替碳源会富集出不同

类型的 Accumilibacter,但具体哪种碳源会富集出哪种类型的 Accumilibacter 至今仍没有定论。

从实际应用的角度来看,强化生物除磷 EBPR 系统内聚磷菌 Accumilibacter 的主要类型及其除磷特性,会影响到整个生物除磷过程,进而影响到工艺的运行性能,深入研究 Accumilibacter 的代谢特性对于优化生物除磷系统内的 Accumilibacter 种群结构,并提高生物除磷性能都是十分必要的。

序批式反应器(sequencing batch reactor, SBR)工艺是间歇式活性污泥法的典型代表,其在工艺操作和运行周期上都很简单,且节省占地面积,对于小型污水厂而言处理效率较高。2006 年 Satoshi Tsuneda 等人将聚磷菌可以利用内碳源进行反硝化吸磷和 SBR 易调控的优点相结合,提出了厌氧-好氧-缺氧(anaerobic-aerobic-anoxic, AOA)模式的 SBR 工艺,即 AOA-SBR,该工艺可以实现反硝化除磷,节约能耗^[9]。本研究拟采用两个 AOA-SBR 反应器,

① 国家自然科学基金(51678388)和天津市水质科学与技术重点实验室开放基金(TJKLAST-PT-2014-05)资助项目。
② 女,硕士生;研究方向:水污染控制;E-mail: 18722157567@163.com
③ 通讯作者,E-mail: wspfr@sina.com
(收稿日期:2016-11-25)

反应过程不添加外碳源,培养反硝化聚磷菌,以期实现“一碳两用”。分别采用乙酸钠、丙酸钠两种碳源培养聚磷菌 *Accumulibacter*, 研究两个 SBR 系统的除磷特性,分析两种碳源富集出的 *Accumulibacter* 的除磷性能,结合荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术对两系统富集出的 *Accumulibacter* 类型进行分析,旨在明确碳源种类对 *Accumulibacter* 类型及其除磷特性的影响,以期为更深入地了解 EBPR 系统提供科学支持。

1 材料与方法

1.1 反应装置与运行方式

采用两个完全相同的 SBR 反应器,有效容积 4.5L,底部进水使泥水充分混合。反应器每天运行 3 个周期,每周期 8h,其中进水 7min,厌氧搅拌 1.5h,好氧 2.5h,缺氧 2h,静置及排水 1h,其余时间闲置。排水比为 50%。采用曝气管确保曝气量均匀,用气体流量计控制好氧段 DO 在 2.0mg/L ~ 3.0mg/L。每周期缺氧末端排出泥水混合物,控制反应器内的污泥浓度 (MLSS) 在 4000mg/L 左右。反应器温度由温控装置控制在 (23 ± 1) °C。

1.2 种泥及试验水质

接种的污泥取自某污水处理厂二沉池,具有一定的脱氮除磷能力。从污水厂取回的种泥颜色为黑褐色,污泥颗粒细小,沉降性良好,污泥体积指数 (sludge volume index, SVI) 在 50ml/g 左右,起始混合液悬浮固体浓度 (mixed liquid suspended solids, MLSS) 为 4000mg/L 左右。将种泥先进行 24h 的曝气恢复其活性,然后分装入两个 SBR 反应器,乙酸钠为碳源的记为 SBR1,丙酸钠为碳源的记为 SBR2。

进水采用人工配水,分为 A 液与 B 液,两系统使用的 A 液完全相同, B 液为碳源,分别为乙酸钠和丙酸钠,具体配水水质见表 1。由于硝化过程消耗碱度,加入一定量的 NaHCO₃, 进水 pH 值控制在 7.6 ± 0.2,反应过程不调整 pH。

1.3 检测方法

常规检测项目及方法:测定所用的水样均经过

表 1 配水水质表

基质名称/分子式		投加量
A 液:	KH ₂ PO ₄	20mgP/L
	MgSO ₄	5mgMg/L
	CaCl ₂	3.6mgCa/L
	NH ₄ Cl	40mgN/L
	NaHCO ₃	285.6mgCaCO ₃ /L
微量元素		0.5ml/L
B1 液:乙酸钠 (CH ₃ COONa)		400mgCOD/L
B2 液:丙酸钠 (CH ₃ CH ₂ COONa)		400mgCOD/L

中速滤纸过滤后按照《水和废水监测分析方法》(第四版)测得^[10]。其中,PO₄³⁻-P 采用钼锑抗分光光度法;NH₄⁺-N 采用纳氏试剂分光光度法;NO₃⁻-N 采用紫外分光光度法;NO₂⁻-N 采用 N-(1-奈基)-乙二胺分光光度法;COD 根据《中华人民共和国环境保护行业标准》(HJ/T 399-2007),采用 15min 快速消解法;MLSS 采用重量法。

荧光原位杂交:本研究采用荧光原位杂交 (FISH) 方法对两系统中富集出的 *Accumulibacter* 进行鉴定,并用 Image J 计算其所占全菌的比例。FISH 的主要分析步骤为^[11]:玻片预处理,样品的取样与固定,样品和探针的杂交,杂交后处理及用荧光显微镜进行观察。所使用的探针及碱基序列见表 2。

2 结果与讨论

2.1 两系统运行效果

运行初期,每周期缺氧末端排出 100ml 混合液,控制 SRT 为 15d,间隔一天测一次 MLSS。运行至第 15d,两系统的污泥均变为黄褐色,污泥絮体变大,两系统的 MLSS 及 SVI 数值出现明显差别:SBR1 的 MLSS 及 SVI 逐渐减小,活性污泥的增长速率比较慢,在每周期都排 100ml 混合液的情况下不能达到平衡状态,污泥沉降性很好但活性不佳;而 SBR2 系统的 MLSS 在经历前 3d 的短期降低后呈现持续升高的趋势,单位污泥增长量大于排泥量,污泥增长很

快,SVI 一直呈上升趋势,至第 15d 时已达 130ml/g,污泥沉降性较差,继续增大可能会出现污泥膨胀现象。因此,在 15d 之后调整两系统每周期排出混合液的量,维持 MLSS 都在 4000mg/L 左右。继续运行

反应器至第 25d,污泥变为土黄色,絮体结构明显,SVI 值分别稳定在 75、120ml/g 左右,由此结束驯化期进入稳定期。具体的 MLSS 及 SVI 见图 1。

表 2 探针序列名称^[12-14]

所用探针名称	目标微生物	探针序列(5'-3')	标记基团	杂交液浓度
EUB338 I	大多数细菌	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	CY3	25%
EUB338-II	放线菌	GCAGCCACCCGTAGGTGT	CY3	25%
EUB338-III	疣微菌门	GCTGCCACCCGTAGGTGT	CY3	25%
Acc-I-444	进化枝 IA 类和其他的 I 类 Accumulibacter	CCCAAGCAATTTCTTCCCC	FITC	25%
Acc-II-444	进化枝 IIA、IIC、IID 和其他 II 类 Accumulibacter	CCCGTGCAATTTCTTCCCC	FITC	25%

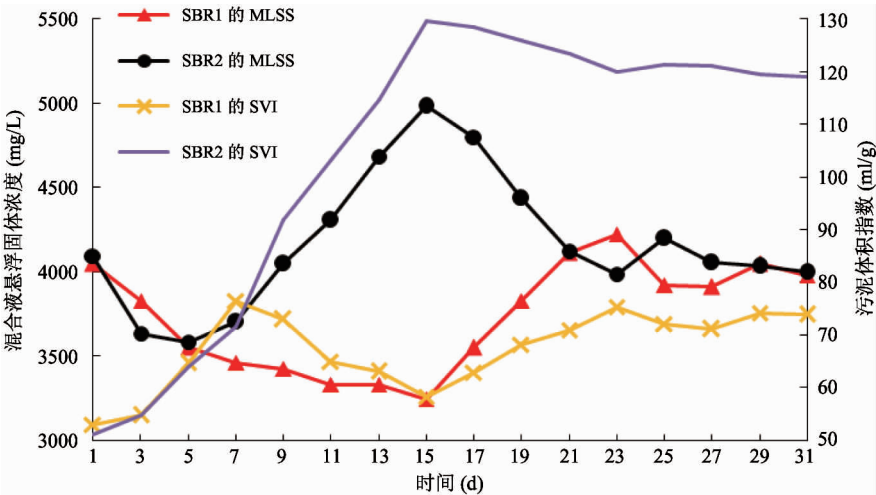


图 1 两系统污泥龄和沉降性变化

两反应器自运行第一天开始每天取水样,检测两系统出水的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 以及 COD。出水浓度及去除率见图 2。由图可知,原始污泥中含有相当数量的异养微生物,对碳源的利用速度很快,初始 COD 去除率均在 60% 以上。污泥具有一定的脱氮除磷能力, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的去除率在 40% 左右, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率在 10% 以下。初期运行阶段两系统均不稳定,但总体去除率均呈上升趋势。

驯化 15d 后两系统各项指标去除率均得到显著

提高:两系统的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 去除率均能稳定在 98% 左右,出水 COD 值均能达到 35mg/L 以下,但 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 的去除效果存在差异。SBR1 除磷效果不太稳定,出水 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度时常波动,稳定期平均 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率在 88% 左右。SBR2 除磷效果较好,且较为稳定,稳定期平均 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率达到 97% 左右,出水 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度在 0.5mg/L 以下。

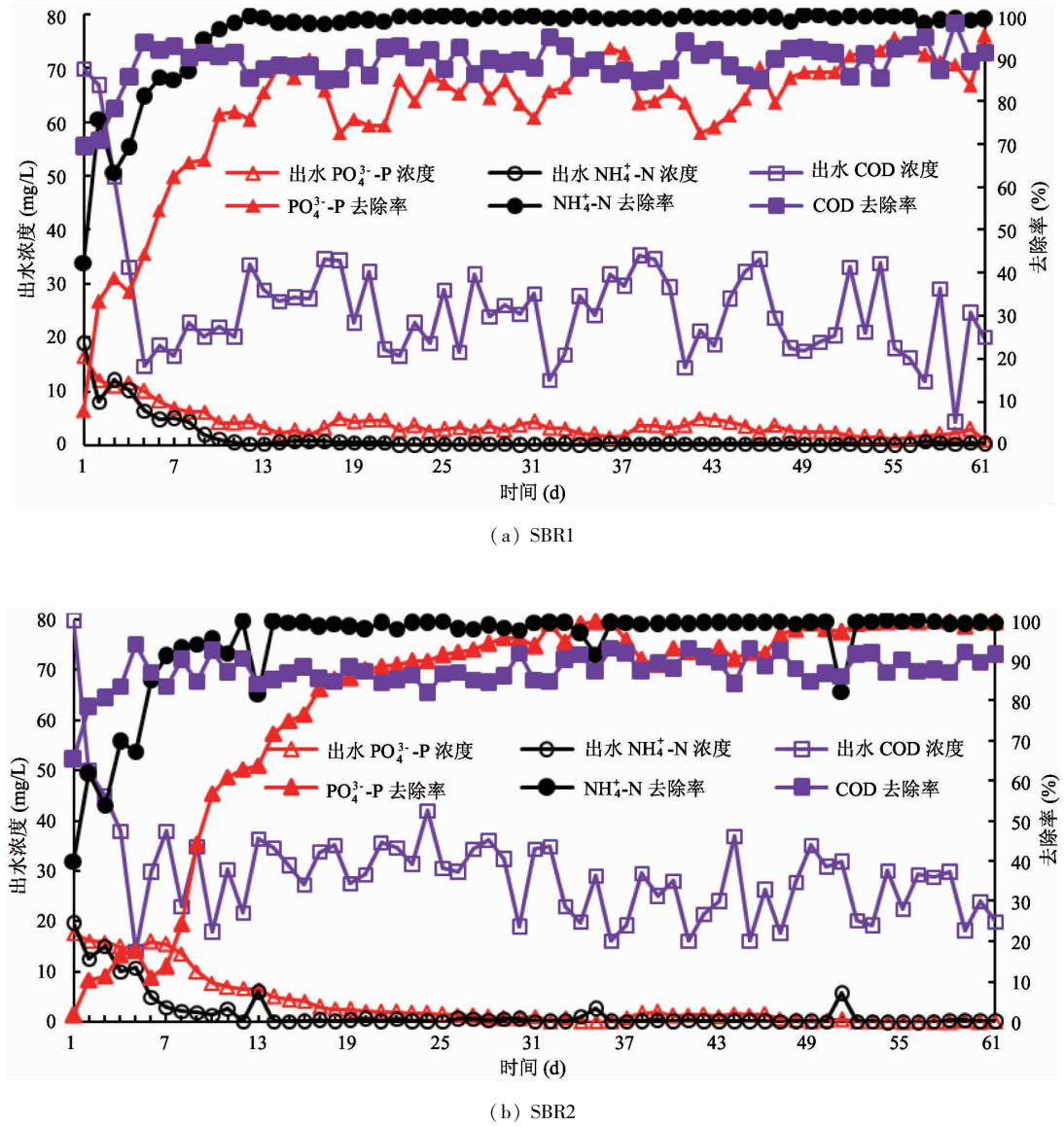


图 2 两系统运行效果

2.2 两系统沿程各段基质变化情况

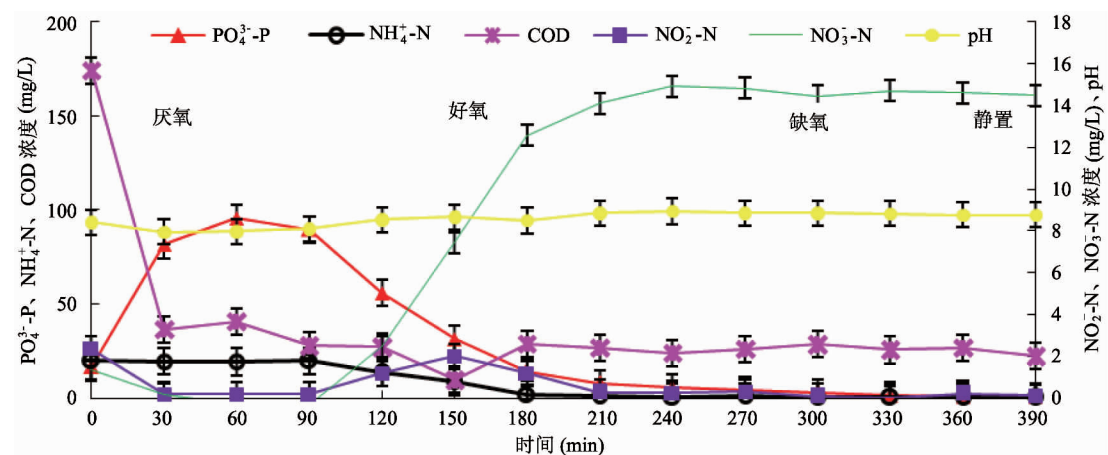
两系统进入稳定期后,每 5 天一次对周期内厌氧、好氧、缺氧各阶段系统内基质变化情况进行测定。典型周期内的具体情况见图 3。

从图 3(a)、(b) 可以看出,两个系统均能观察到厌氧阶段磷大量释放,释磷量均达到 80mg/L 左右。SBR2 的最大释磷量略高于 SBR1。监测发现,SBR1 在每周期末端会残留相当数量的 NO_3^- -N,虽然随后的静置和闲置期可以消耗一些,但仍会残留一部分进入下一周期。而 NO_3^- -N 对厌氧释磷作用有一定的抑制作用^[15],因此,影响了 SBR1 厌氧段磷的释放。

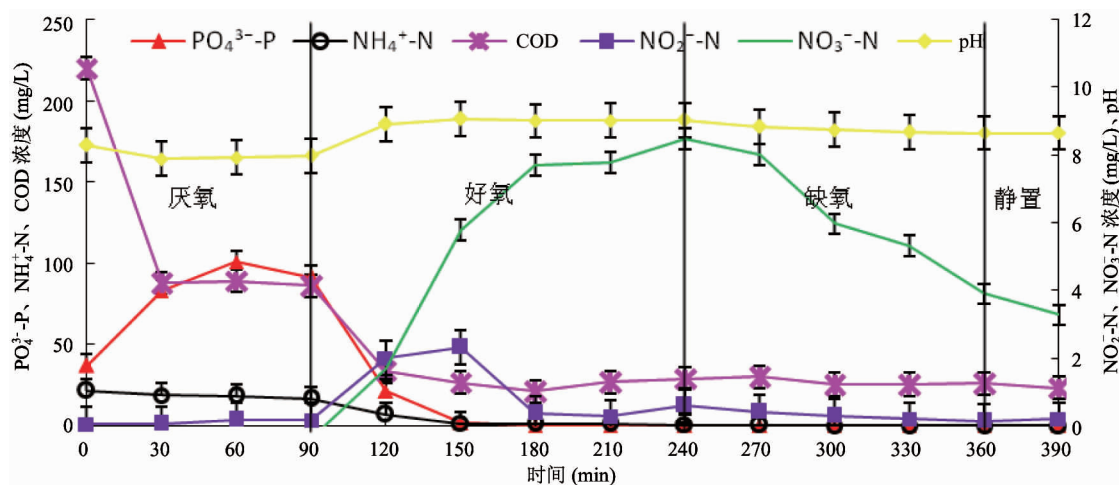
两系统均能在厌氧阶段观察到 COD 被大量消耗,厌氧开始 30min 两系统的 COD 去除率已达到 79% 和 60% 左右。经过好氧阶段,磷被大量吸收,缺氧阶段由于一定量的具有反硝化吸磷能力的聚磷菌的存在, NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 作为电子受体被消耗,磷被继续吸收。SBR1 系统中缺氧段几乎观察不到 NO_3^- -N 的降低,这或许是由于 SBR1 系统中存在的聚磷菌不能利用 NO_3^- -N 作为反硝化吸磷的电子受体。学者 Tavares P 等人曾经针对不同类型的 Accumilibacter 的反硝化吸磷特性进行过报道^[16-18]:I 型 Accumilibacter 可以利用硝酸盐为电子受体,而 II 型中的某些进化枝缺乏可以启动原核反硝化途径的

硝酸盐还原酶(nar),致使其不能利用硝酸盐。具体两系统中存在的聚磷菌是属于哪一类型的 Accumu-

libacter,需要借助分子生物学进行进一步分析确定。



(a) SBR1



(b) SBR2

图3 两系统运行周期内基质变化情况

2.3 两系统内 Accumilibacter 类型的 FISH 鉴定

进入稳定期后,两系统的 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 去除率均能达到在 90% 左右,就处理效果来看,此时两系统的聚磷菌已成为优势菌,取此时稳定期活性污泥进行 FISH 检测,分别鉴定两系统的聚磷菌所属类型及占全菌的比例。以 CY3 染料标记的全菌呈现红色, FITC 染料标记的 I 型和 II 型 Accumilibacter 呈现绿色,将测定的全菌和两种类型 Accumilibacter 的效果图分别进行合并,合并后的图片上 Accumilibacter 呈现黄色,如图 4 所示,其中:图(a)、(b)分别表示取自污水厂的接种污泥中全菌与 I 型、II 型 Accu-

mulibacter 结合后的图片;图(c)、(d)代表 SBR1 系统中全菌与 I 型、II 型 Accumilibacter 结合后的图片;图(e)、(f)则是 SBR2 系统中全菌与 I 型、II 型 Accumilibacter 结合后的图片。

根据 FISH 检测结果,经过驯化培养,两系统内的全菌数量均有明显提高。利用 Image J 软件将绿色与红色的光密度之比表示两类型 Accumilibacter 分别占全菌的比值,取 10 张图片计算平均数,得到接种污泥中 I 型 Accumilibacter 占全菌的比例约为 8.58%, II 型菌的比例约为 5.37%; SBR1 系统富集了大量的 II 型菌,占全菌的比例为 63.70% 左右, I

型菌仅为 5.55% 左右;SBR2 中则是 I 型 Accumulibacter 占主导地位,比值达到了 59.91% 左右,II 型 Accumulibacter 的比例约为 9.17%。由此表明两种不同的碳源确实富集出了不同类型的 Accumulibact-

er。这也证实了前文提及的 II 型 Accumulibacter 难以利用硝酸盐作为电子受体进行反硝化除磷的说法。

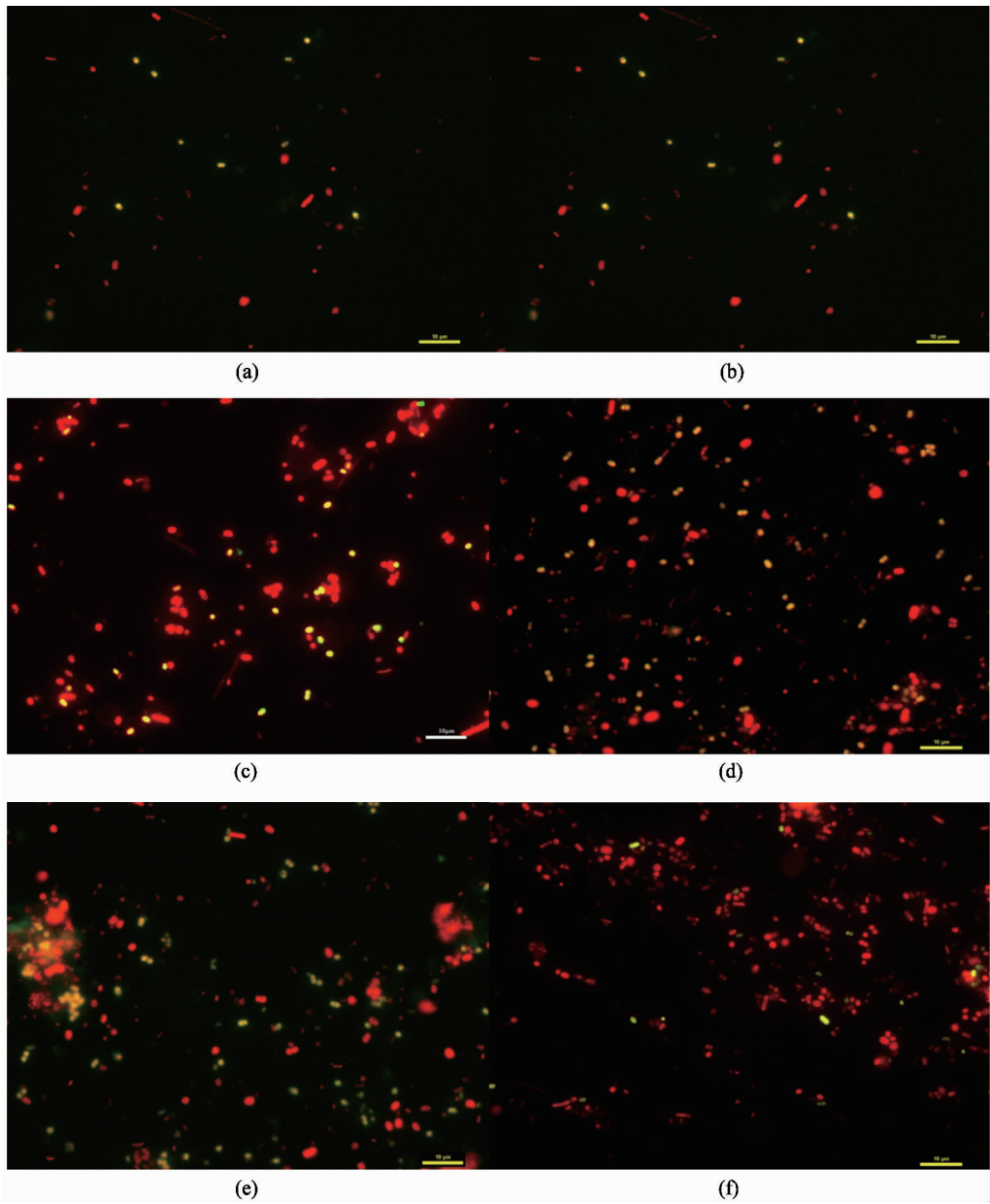


图 4 两系统活性污泥 FISH 图片(标尺均为 10μm)

3 结 论

(1)采用乙酸钠、丙酸钠为碳源,均可在 SBR 反应器内富集聚磷菌,且两种碳源所培养出的活性污

泥在沉降性和生长速率上存在差别,乙酸钠系统内污泥增长速率较慢,污泥沉降性较好。

(2)两系统均有典型的厌氧释磷、好氧和缺氧吸磷现象,但在缺氧吸磷阶段存在较明显的差别。在乙酸钠为碳源的系统内,缺氧阶段 NO_3^- -N 含量没

有明显减少,而丙酸钠为碳源的系统硝酸盐还原较明显。

(3) FISH 分析表明,采用乙酸钠为碳源富集出的 *Accumulibacter* 多为 II 型,占全菌的 63.70% 左右;丙酸钠系统内的 *Accumulibacter* 以 I 型菌为主,占全菌的 59.91% 左右;两种聚磷菌表现出不同的硝酸盐还原特性。

参考文献

- [1] Skennerton C T, Barr J J, Slater F R, et al. Expanding our view of genomic diversity in Candidatus *Accumulibacter* clades. *Environmental Microbiology*, 2015, 17 (5):1574-1585
- [2] Mao Y P, Graham D W, Tamaki H, et al. Dominant and novel clades of Candidatus *Accumulibacter phosphatis* in 18 globally distributed full-scale wastewater treatment plants. *Scientific Reports*, 2014, 5 (11857):1-10
- [3] Zeng W, Zhang J, Wang A Q, et al. Denitrifying phosphorus removal from municipal wastewater and dynamics of “Candidatus *Accumulibacter*” and denitrifying bacteria based on genes of *ppk1*, *narG*, *nirS* and *nirK*. *Bioresource Technology*, 2016, 207:322-331
- [4] He S, Bishop F I, McMahon K D. Bacterial community and “Candidatus *Accumulibacter*” population dynamics in laboratory-scale enhanced biological phosphorus removal reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (16):5479-5487
- [5] Peterson S B, Warnecke F, Madejska J, et al. Environmental distribution and population biology of the genus *accumulibacter*, a primary agent of biological phosphorus removal in activated sludge. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (10):2692-2703
- [6] 曾薇,李博晓,王向东等. MUCT 短程硝化和反硝化除磷系统中 Candidatus *Accumulibacter* 的代谢活性和菌群结构. *中国环境科学*, 2013, 33 (7):1298-1308
- [7] Vargas M, Guisasola A, Artigues A, et al. Comparison of a nitrite-based anaerobic-anoxic EBPR system with propionate or acetate as electron donors. *Process Biochemistry*, 2011, 46 (3):714-720
- [8] He S M, Mc Mahon, Katherine D. Microbiology of ‘Candidatus *Accumulibacter*’ in activated sludge. *Microbial Biotechnology*, 2011, 4 (5):603-619
- [9] Satoshi T, Takashi O, Koichi S, et al. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal using denitrifying phosphate-accumulating organisms in a sequencing batch reactor. *Biochemical Engineering*, 2006, 27 (3):191-196
- [10] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京:中国环境科学出版社, 2002. 246-281
- [11] 刘立,汤兵,黄绍松等. 反硝化聚磷菌快速富集、培养及其荧光原位杂交技术鉴别. *环境科学*, 2013, 34 (7):2869-2875
- [12] 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
- [13] Ong Y H, Chua A S M, Fukushima T, et al. High-temperature EBPR process: the performance, analysis of PAOs and GAOs and the fine-scale population study of Candidatus “*Accumulibacter phosphatis*”. *Water Research*, 2014, 64:102-112
- [14] Acevedo B, Camina C, Corona J E, et al. The metabolic versatility of PAOs as an opportunity to obtain a highly Penriched stream for further P-recovery. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 270:459-467
- [15] Neslihan S A, Nevin B H. Fate of carbon, nitrogen and phosphorus removal in a post-anoxic system treating low strength wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 108 (7):166-174
- [16] Camejo P Y, Owen B R, Martirano J, et al. Candidatus *Accumulibacter phosphatis* clades enriched under cyclic anaerobic and microaerobic conditions simultaneously use different electron acceptors. *Water Research*, 2016, 102:125-137
- [17] Kim J M, Lee H J, Lee D S, et al. Characterization of the denitrification-associated phosphorus uptake properties of “Candidatus *Accumulibacter phosphatis*” clades in sludge subjected to enhanced biological phosphorus removal. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79 (6):1969-1979
- [18] Tavares P, Pereira A S, Moura J J G, et al. Metalloenzymes of the denitrification pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2006, 100 (12):2087-2100

Effects of carbon sources on phosphorus removal characteristics of anaerobic-oxic-anoxic (AOA) -SBR systems

Ji Rong^{***}, Wang Shaopo^{***}, Zhao Ledan^{***}, Zheng Jianfeng^{***}, Qiu Chunsheng^{***}, Sun Liping^{***}

(^{*} School of Environmental and Municipal Engineering, Tianjin Chengjian University, Tianjin 300384)

(^{**} Tianjin Key Laboratory of Aquatic Science and Technology, Tianjin 300384)

Abstract

To investigate the influence of different carbon sources (acetate and propionate) on the phosphorus removal properties and the microbial community structure of polyphosphate accumulating organisms, two sequencing batch reactors (SBR) were operated under anaerobic-aerobic-anoxic (AOA) conditions. After 25 days acclimation, both of the two systems showed the stable phosphorus removal performance. During the stable phase, the phosphorus removal rates of the two systems were 88% and 97%, respectively. The sludge acclimated with acetate had a good settle ability and the slow proliferation. On the other side, the propionate system had the better phosphorus removal performance, faster growth rate, but had the poor sedimentation. Fluorescence in situ hybridization (FISH) confirmed that both of the two reactors created a great quantity of Accumulibacter. Most of Accumulibacters in acetate system were type II, and in the propionate system, the Accumulibacters were mainly type I.

Key words: polyphosphate accumulating organisms, anaerobic-oxic-anoxic (AOA), sequencing batch reactor (SBR), denitrifying phosphorus removal, Accumulibacter, fluorescence in situ hybridization (FISH)