

# MUCT 工艺反硝化除磷效率与 *Candidatus Accumulibacter* 的群落演替

曾 薇, 李 超, 孟庆安, 马晨阳

(城镇污水深度处理与资源化利用技术国家工程实验室, 北京市污水脱氮除磷处理与过程控制工程技术研究中心, 北京 100124)

**摘 要:** 以处理实际生活污水的连续流 MUCT 工艺为基础, 探究了全程硝化和短程硝化状态下优势聚磷菌 *Candidatus Accumulibacter* 的群落动态与系统反硝化除磷效果之间的相互联系. 流式细胞仪定量检测结果表明, 系统中聚磷菌占全菌的比例为 22.1%, *Accumulibacter* 是处于全程硝化状态下的优势聚磷菌, 对系统中氮磷的去除起到重要作用. qPCR 定量结果表明, 短程硝化状态下的优势种 IIC 和 IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3) 以及 IIF 的增长率较快, 占总 *Accumulibacter* 比例分别为 11.53%、34.31% 和 17.97%, 其利用亚硝进行反硝化除磷的能力比其他分支强, 对系统化中亚硝的去除起到重要作用. IID 分支在反应器整个运行阶段一直处于优势地位, 是系统内氮磷去除最重要的分支. 其在全程硝化状态下占 *Accumulibacter* 分支总和的 80%, 但在短程状态下的竞争能力不如其他的 Type II 型分支.

**关键词:** 实际生活污水; 反硝化除磷; 聚磷菌; *Accumulibacter*; 实时荧光定量 PCR; 流式细胞仪

中图分类号: X 703.1

文献标志码: A

文章编号: 0254-0037(2019)12-1243-09

doi: 10.11936/bjtxb2018050003

## Efficiency of Denitrifying Phosphorus Removal and Population Dynamics of *Candidatus Accumulibacter* in MUCT

ZENG Wei, LI Chao, MENG Qing'an, MA Chenyang

(National Engineering Laboratory for Advanced Municipal Wastewater Treatment and Reuse Technology, Engineering Research Center of Beijing for Denitrifying Phosphorous Removal and Process Control, Beijing 100124, China)

**Abstract:** In this study, Modified University of Cape Town (MUCT) process was used to treat domestic sewage with low  $\rho(C)/\rho(N)$  ratio, and the relationship between population dynamics of dominant *Candidatus Accumulibacter* and efficiency of denitrifying phosphorus removal under nitrification and nitrification was studied. Flow cytometry based quantification showed that *Accumulibacter* accounting for 22.1% of total bacteria were dominant phosphate accumulating organisms (PAOs) in system under nitrification. qPCR based estimation indicated that dominant species IIC, IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3) and IIF grew fast and accounted for 11.53%, 34.31% and 17.97% of *Accumulibacter*, respectively, while their ability using nitrite to achieve denitrifying phosphorus removal were stronger than that of other clades and were important for nitrite removal in system. As the most important clade in N and P removal in system, IID was always dominant along entire operation, which accounted for 80% of *Accumulibacter* under nitrification, but not as competitive as other Type II clades under nitrification.

**Key words:** municipal wastewater; denitrifying phosphorus removal; phosphate accumulating organisms (PAOs); *Accumulibacter*; qPCR; flow cytometry

收稿日期: 2018-05-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51578016)

作者简介: 曾 薇(1974—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事污水处理与过程控制、脱氮除磷方面的研究, E-mail: zengwei@bjut.edu.cn

富含氮、磷污染物的污废水的过量排放是导致水体富营养化的主要原因<sup>[1]</sup>。因此,排放污水中含有的氮和磷如何被有效去除了亟待解决的问题。强化生物除磷工艺(enhanced biological phosphorus removal, EBPR)由于其经济高效、环保可持续的特点,现已被广泛应用于全球各地。然而到目前为止,这种经济、高效的处理工艺仍然会出现难以预测和解释的除磷效果恶化的现象。因此,有必要对除磷功能微生物的结构组成和代谢活动进行深入研究,为污水处理工艺的正常高效运行提供理论依据。在EBPR中,与磷的去除紧密相关联的微生物种群被称之为聚磷菌(polyphosphate accumulating organisms, PAOs)。这些微生物能够将水中离子态的磷酸盐储存为胞内多聚磷酸盐颗粒,同时合成自身生长繁殖所需的各种含磷物质。通过排泥的方式,去除过量吸磷的聚磷微生物,从而达到除磷的效果<sup>[2]</sup>。

虽然有研究表明,在污水处理系统中也存在具有PAOs的生理特性并具有生物除磷功能的其他菌群,比如 *Microthrix phosphovorans*<sup>[3]</sup>、*Actinobacteria*<sup>[4-5]</sup>、*Purple nonsulfur bacteria*<sup>[6]</sup>、*Tetrasphaera*<sup>[7]</sup>等,但是,有研究指出,无论是实验室规模还是生产规模的EBPR系统中,隶属于Beta-proteobacteria中的 *Rhodocyclus* Group 都是占主导地位的除磷微生物,被命名为“*Candidatus Accumulibacter phosphatis*”<sup>[8-10]</sup>。已有文献报道, *Candidatus Accumulibacter* 包含 Type I 和 Type II 两

种类型,其中 Type I 型含有 5 个分支, Type II 含有 9 个分支,共计 14 个分支菌属<sup>[11-13]</sup>。由于 *Candidatus Accumulibacter* 的菌群结构及其分支的动态变化影响着实际污水处理工艺的脱氮除磷效果,该菌属及其分支已经成为目前城市生活污水处理领域应用最广且研究最深入的一类聚磷菌。

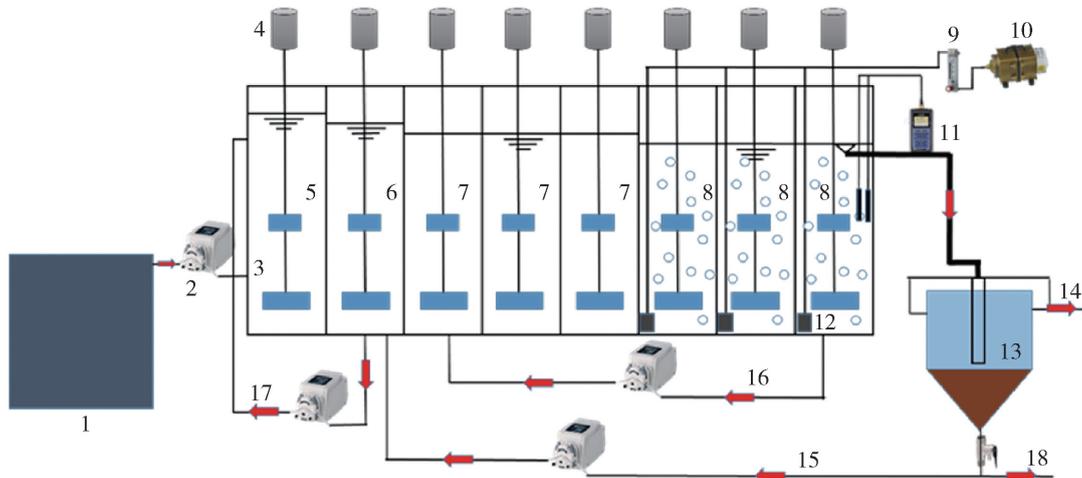
本研究旨在探讨分析在不同硝化模式下,以处理实际生活污水的 MUCT 工艺中反硝化除磷效率与优势聚磷菌 *Candidatus Accumulibacter* 的菌群动态变化之间的相互联系作为理论支撑,为实际污水处理工艺的调控运行提供理论基础,指导污水处理厂工艺的高效稳定运行。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验装置与运行

本研究所采用的连续流装置为 MUCT 工艺,反应器装置如图 1 所示。整个反应器由反应区和二沉池两部分组成,材质为有机玻璃。其中反应区有效体积为 73.92 L,通过溢流的方式,各反应区的水流入下一反应区内;二沉池有效体积为 24 L,采用中间进水周边出水的方式进行排水。反应区主要分为 5 个格室,第 1 个格室为厌氧区,第 2、3 个格室为缺氧区,第 4、5 个格室为好氧区。各反应区的体积比约为  $V_{\text{厌氧}}:V_{\text{缺氧1}}:V_{\text{缺氧2}}:V_{\text{好氧2}}=1:1:3:3$ 。

试验所用生活污水主要来自于北京工业大学家属区的生活污水,通过水泵将小区化粪池内的生活污水泵入进水水箱进行沉淀和贮存,水箱注水体



1—原水箱;2—蠕动泵;3—进水;4—电动搅拌器;5—厌氧区;6—缺氧1区;7—缺氧2区;8—好氧区;9—转子流量计;10—空气压缩机;11—DO测定仪;12—曝气头;13—二沉池;14—出水;15—污泥回流;16—硝化液回流;17—缺氧回流;18—剩余污泥。

图1 连续流 MUCT 实验装置

Fig.1 Schematic diagram of MUCT process

积为 270 L. 进水、缺氧区回流、硝化液回流和污泥回流都由蠕动泵控制. 通过搅拌器搅拌将各个格室内的泥水混合均匀. 气温降低时,通过放置在各个区室的温控加热装置将温度控制在  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ . 好氧区曝气量由连接在曝气泵的转子流量计控制,通过 DO 和 pH 测定仪(WTW 3410)测定水中的 DO 和 pH. 反应器进水首先由蠕动泵控制泵入厌氧区,二沉池回流污泥进入缺氧一区回流比为  $R_1$ ,利用缺氧区的反硝化作用来减少回流污泥中含有的硝态和亚硝态氮,降低对厌氧区释磷的影响;缺氧一区回流至厌氧区,回流比为  $R_2$ ;好氧区硝化液回流至好氧二区,回流比为  $R_3$ . 反应器沿程亚硝的积累率  $\text{NAR} = \frac{\rho(\text{NO}_2^- - \text{N})}{\rho(\text{NO}_2^- - \text{N}) + \rho(\text{NO}_3^- - \text{N})}$ ,式中  $\rho(\text{NO}_2^- - \text{N})$  为反应器

泥水混合物溶液中亚硝酸盐的质量浓度 ( $\text{mg/L}$ ),  $\rho(\text{NO}_3^- - \text{N})$  为反应器泥水混合物溶液中硝酸盐的质量浓度 ( $\text{mg/L}$ ). 通常根据该式来表征反应器中亚硝酸盐的积累率大小,从而据此判定分析反应器所处的硝化状态.

本研究中 MUCT 的运行数据来自于反应器启动运行第 20 天至第 270 天的实验数据,总共 250 天. 根据反应器不同的运行参数,将反应周期划分为 5 个阶段,以实现全程硝化向短程硝化的转变,并探究每一阶段对应的不同硝化状态下系统的反硝化除磷效率与优势聚磷菌 *Candidatus Accumulibacter* 菌群动态之间的相互联系. 具体运行方式见表 1.

表 1 MUCT 运行参数

Table 1 Experimental scheme of MUCT process treating domestic wastewater

阶段	进水流量/ ( $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ )	水力停留 时间/h	污泥 回流比 $R_1/\%$	缺氧 回流比 $R_2/\%$	硝化液 回流比 $R_3/\%$	$\rho(\text{DO})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	污泥龄/ d
I (第 20 天—第 61 天)	6.16	12	100	100	200	2	$30 \pm 5$
II (第 62 天—第 104 天)	6.16	12	100	100	250	2	$30 \pm 5$
III (第 105 天—第 151 天)	6.16	12	80	100	300	2	$30 \pm 5$
IV (第 152 天—第 206 天)	7.39	10	100	100	300	2	$30 \pm 5$
V (第 207 天—第 270 天)	7.39	10	100	100	250	2	$30 \pm 5$

## 1.2 实验用水和种泥

试验用水来自北京工业大学家属院化粪池的生活污水,属于典型的低碳氮比城市生活污水,具体水质指标见表 2.

表 2 进水水质

Table 2 Characteristics of the raw wastewater

检测项目	范围	平均值
$\rho(\text{COD})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	48.55 ~ 310.60	179.58
$\rho(\text{NH}_4^+ - \text{N})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	31.50 ~ 94.72	67.04
$\rho(\text{NO}_2^- - \text{N})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0 ~ 0.10	0.005
$\rho(\text{NO}_3^- - \text{N})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.06 ~ 0.15	0.11
$\rho(\text{TN})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	31.56 ~ 94.87	71.22
$\rho(\text{PO}_4^{3-} - \text{P})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	1.42 ~ 13.60	6.29
$\rho(\text{C})/\rho(\text{N})$	0.86 ~ 3.38	2.68
pH	7.13 ~ 7.42	7.26

艺二沉池回流污泥,属于典型的全程硝化模式下的污泥,脱氮除磷效果良好.

## 1.3 分析测定方法

### 1.3.1 常规水质测定

试验水样先经  $0.45 \mu\text{m}$  中性滤纸过滤,水样中 COD、 $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ 、MLSS、MLVSS 依据标准方法进行分析检测<sup>[14]</sup>, DO 和 pH 使用 WTW (Multi 3410, WTW, Germany) 在线检测.

### 1.3.2 流式细胞仪

取固定好的样品,冰水浴超声 6 min,超声强度为 40%,细胞浓度大约为  $1 \times 10^8/\text{mL}$ . 离心去除上清液,依次加入 50%、80%、99% 的乙醇各脱水 3 min. 将 5'端含有 Cy5 标记的探针 PAO462、PAO651 和 PAO846 (PAO846: PAO651: PAO462 体积比为 1:1:1) 用于“*Ca. Accumulibacter phosphatis*”杂交<sup>[15]</sup>. 杂交缓冲液含有 35% 甲酰胺、0.9 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 0.01% SDS. 将脱水后细胞重悬于探针杂交缓冲液中超声 1 min,  $46^\circ\text{C}$  恒温培养箱

种泥取自于北京市小红门污水处理厂 A<sup>2</sup>O 工

中杂交140 min. 离心去除上清液,加入 PBS 清洗杂交细胞 2 次,再次加入 1 mL PBS 稀释. 稀释后超声 1 min,经 10  $\mu$ m 滤膜过滤. 加入 10  $\mu$ L 100  $\times$  SYBR GREEN I 常温下对全菌 DNA 染色 15 min.

FISH/SYBR Green I 双重标记处理后的细胞,经流式细胞仪 (BD Accuri™ C6) 进行上机检测分析,上机样品检测分析前 10 000  $\times$  稀释,使每管中细胞浓度为 1  $\times$  10<sup>4</sup> ~ 1  $\times$  10<sup>5</sup>/mL; 流式数据使用 FlowJo V10 软件圈门定量分析细菌细胞.

### 1.3.3 DNA 的提取以及实时荧光定量 PCR

使用 Fast DNA SPIN kits for soil (Bio 101,

Vista, CA, USA) 试剂盒提取冻干后反应器中污泥的细菌基因组 DNA. 实时定量 PCR 用于定量全菌 16s rRNA、聚磷菌 16s rRNA 以及 *Accumulibacter* 各分支菌种 IA、IIA、IIB、IIC、IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3)、IID、IIF. 特异性引物和相关 qPCR 程序如表 3 所示. 使用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq kit 试剂盒,混合体系总体积为 25  $\mu$ L,包括 12.5  $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq buffer (2-fold), 1  $\mu$ L 正向引物 (10 mM), 1  $\mu$ L 反向引物 (10 mM), 0.5  $\mu$ L ROX Reference Dye II (50-fold), 2  $\mu$ L DNA 质粒模版和 8  $\mu$ L 无菌水.

表 3 qPCR 扩增程序及特异性引物

Table 3 Specific primer sequences and programs of qPCR in this study

引物	序列	目标基因	基因片段长度/bp	扩增程序	参考文献
1055F	ATGGCTGTCGTCAGCT	Bacterial 16S rRNA	323	95 $^{\circ}$ C 10 min; 45 cycles of 30 s of 95 $^{\circ}$ C, 60 s at 50 $^{\circ}$ C, 20 s at 72 $^{\circ}$ C	[16]
1392R	ACGGGGCGTGTGTAC				
518f	CCAGCAGCCGCGGTAAT	Acc 16S rRNA genes	351	95 $^{\circ}$ C 3 min; 35 cycles of 30 s of 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 60 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C	[17]
PAO-846r	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG				
Acc- <i>ppk1</i> -763f	GACGAAGAAGCGGTCAAG	Acc-IA	408	95 $^{\circ}$ C 3 min; 45 cycles of 30 s of 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 61 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C	[17]
Acc- <i>ppk1</i> -1170r	AACGGTCATCTTGATGGC				
Acc- <i>ppk1</i> -893f	AGTTC AATCTCACCGAGAGC	Acc-IIA	105	95 $^{\circ}$ C 3 min; 45 cycles of 30 s of 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 61 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C	[17]
Acc- <i>ppk1</i> -997r	GGA A CTTCAGGTCGTTGC				
Acc- <i>ppk1</i> -870f	GATGACCCAGTTCCTGCTCG	Acc-IIB	133	95 $^{\circ}$ C 3 min; 45 cycles of 30 s of 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 61 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C	[17]
Acc- <i>ppk1</i> -1002r	CGGCACGAACTTCAGATCG				
Acc- <i>ppk1</i> -254f	TCACCACCGACGGCAAGAC	Acc-IIC	207	95 $^{\circ}$ C 3 min; 45 cycles of 30 s of 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 66 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C	[17]
Acc- <i>ppk1</i> -460r	CCGGCATGACTTCGCGGAAG				
Acc- <i>ppk1</i> -1123f	GAACAGTCCGCCAACGACC	Acc-IIC ( <i>ppk1</i> excluding OTU NS D3)	254	95 $^{\circ}$ C 3 min; 45 cycles of 30 s of 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 63 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C	[17]
Acc- <i>ppk1</i> -1376r	ACGATCATCAGCATCTTGGC				
Acc- <i>ppk1</i> -375f	GGGTATCCGTTTCTCAAGCG	Acc-IID	148	95 $^{\circ}$ C 3 min; 45 cycles of 30 s of 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 63 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C	[17]
Acc- <i>ppk1</i> -522R	GAGGCTCTTGTTGAGTACACCG				
Acc- <i>ppk1</i> -355f	CGAACTCGGCGAAAGCGAGTA	Acc-IIF	246	95 $^{\circ}$ C 3 min; 35 cycles of 30 s of 94 $^{\circ}$ C, 45 s at 70 $^{\circ}$ C, 30 s at 72 $^{\circ}$ C	[18]
Acc- <i>ppk1</i> -600R	ATCGCCTCCGAGCAACTGTTC				

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应器运行状况

反应器运行根据参数的调整情况,分为总共 5 个阶段. 其中,第 I、II、III、V 阶段属于全程硝化状态,平均亚硝积累率较低. 第 I 阶段亚硝基本为零,属于完全硝化状态. 第 II、III 阶段末亚硝质量浓度稍有上升,属于全程硝化向短程硝化转变的过渡阶段. 第 IV 阶段平均 NAR = 75.09%,其属于短程硝化反硝化阶段. 第 V 阶段是从第 IV 阶段短程硝化向全

程硝化调整,其亚硝积累率总体偏低,好氧二区的硝氮质量浓度相对较高. 亚硝积累情况具体如图 4 所示.

第 I 阶段,进水流量为 6.16 L/h,水力停留时间 HRT 为 12 h,溶解氧 DO 质量浓度控制在 2 mg/L 左右,如图 4 所示,好氧区亚硝几乎为零,硝氮平均质量浓度为 22.14 mg/L,整个阶段属于典型的全程硝化反硝化除磷,进水中含有的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 平均质量浓度为 71 mg/L, COD 平均质量浓度为 200 mg/L 左右,属于常见的低  $\rho(C)/\rho(N)$  城镇生活污水. 从图

2 可以看出,在阶段 I 的运行过程中,厌氧区的释磷量一直处于上升状态,这表明此种状态下反应器的运行有利于提高聚磷菌的活性,且在缺氧区出水的磷基本能被有效地去除,系统的反硝化除磷效果好。图 2 中,第 I 阶段  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除率保持在 95% 以上,出水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  在 5 mg/L 以下,去除效率高。阶段 II,将硝化液回流比调整为 250%,反应器的实际水力停留时间减小,好氧区的实际水力停留时间缩短。虽然进水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  质量浓度和去除效率都有所波动,但总体  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除效率较好,厌氧区的释磷量总体呈现出升高的趋势。可以认为该阶段属于半短程阶段,并且有部分亚硝的积累,且硝氮质量浓度逐步下降,NAR 有升高的趋势。由此可以看出,经过一段时间的运行,MUCT 反应器在进水负荷波动比较大的情况下,在缺氧区依然能保持较好的脱氮除磷效率,且其抗负荷冲击能力逐步增强。阶段 III 进一步增大硝化液回流比为 300%,同时污泥回流调整为 80%,在这时段运行时间内,进水  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  质量浓度依旧比较波动,由于硝化液回流比的增大,回流硝化液中含有的溶解氧同时也使得厌氧区的溶解氧也升高,进而影响了磷的释放。如图 4 所示,由于阶段 III 释磷量下降的影响,使得好氧区硝氮质量浓度较之前升高。在后续的运行过程中,系统逐渐适应这种运行模式,硝氮质量浓度逐渐降低,亚硝质量浓度缓慢上升,NAR 逐渐也随之升高,反应器由全程硝化阶段向短程硝化阶段过渡,且系统依旧保持高效的反硝化除磷效率。

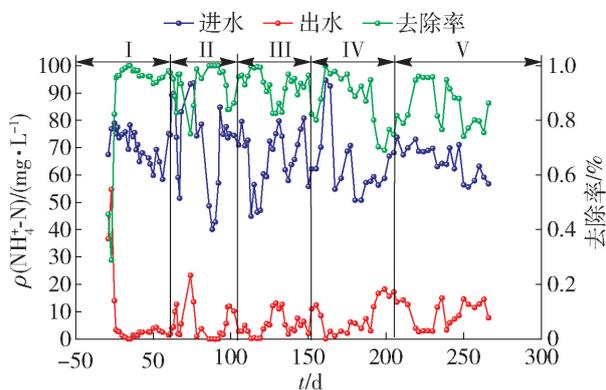


图 2 MUCT 中  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  去除情况

Fig. 2  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  removal in MUCT process

阶段 IV,进水流速调整为 7.39 L/h,好氧区的平均 NAR 达到了 75%,反应器进入了短程硝化反硝化脱氮除磷状态。如图 4 所示,在第 152 天—第 206 天期间,硝氮基本被亚硝所取代,氨氮的氧化停留在

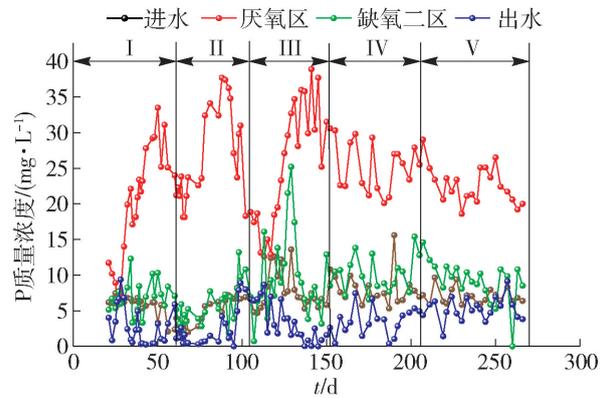


图 3 MUCT 中 P 的去除情况

Fig. 3 Phosphorus removal in MUCT process

了亚硝阶段,使得好氧区的脱氮除磷的电子受体只有亚硝。从图 3 中可以看出,厌氧磷的释放有所下降,但是基本趋于稳定,平均释磷质量浓度为 25.0 mg/L,经缺氧区的反硝化除磷作用后,磷质量浓度能降到平均 10.0 mg/L 以下,继而经好氧区吸磷以后能降到平均 3.7 mg/L 左右。在短程阶段,出水中含有的亚硝长期运行对反应器的运行效果产生了负面效果,对整体的脱氮除磷效果起到了抑制作用,在阶段 IV 末期,亚硝积累率逐渐降低,厌氧区的硝氮逐渐升高,系统由短程硝化逐渐在向全程硝化发生转变,此时处于末期的氨氮出水含量较高,去除效率不佳。在阶段 V,将回流比调整为 250%。反应器的实际水力停留时间减少,提高硝氮的积累率,有利于反应器向全程的转变。

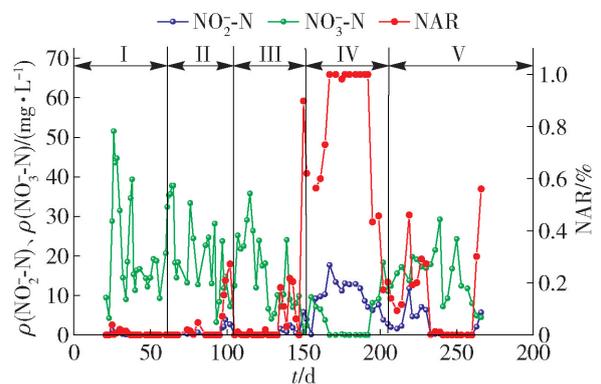


图 4 好氧区  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  和  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  的质量浓度以及亚硝积累率

Fig. 4 Variations of  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ ,  $\text{NO}_2^- - \text{N}$  concentrations and nitrite Accumulation rates in the aerobic zone

## 2.2 qPCR 与流式细胞仪对 MUCT 中聚磷菌的定量检测分析

流式细胞仪(flow cytometry)的定量结果如图 5 所示。对取自 MUCT 反应器运行第 120 天,即第 III

阶段全程硝化状态下的污泥泥样进行聚磷菌的定量分析. 通过 FISH 杂交及 SYBR GREEN I 染色对该阶段污泥样本进行标记, 并由流式细胞仪对其进行定量检测分析. 针对本实验的样品检测, 主要使用的是分析型流式细胞仪 BD Accuri™ C6, 其配置的 20 mW 488 nm 蓝色激光器用于激发 SYBR GREEN I 荧光染料. SYBR GREEN I 是一种不对称花青素染料, 其最大激发波长为  $\lambda_{\max} = 497$  nm, 最大发射波长为  $\lambda_{\max} = 520$  nm, 用于全菌双链 DNA 的检测, 以区别于背景噪音. 另外一根 14.7 mW 640 nm 红色激光器用于激发探针上标记的 Cy5. Cy5 最大激发波长为  $\lambda_{\max} = 647$  nm, 最大发射波长为  $\lambda_{\max} = 662$  nm, 用于目标菌“*Ca. Accumulibacter phosphatis*”探针杂交的标记检测.

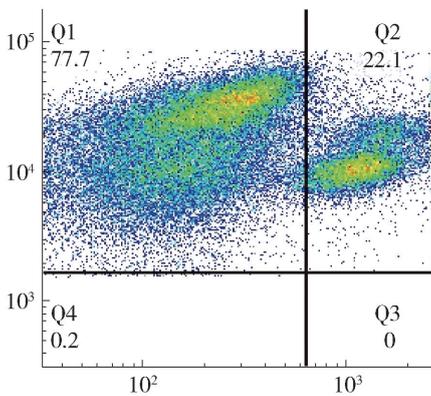


图5 流式细胞仪定量分析 PAOs

Fig. 5 Quantitative analysis of PAOs by Flow cytometry

通过选取横、纵坐标轴参数 FITC: SYBR GREEN 以及 APC-A: Cy5, 十字象限门中 Q2 区域显示双阳比例为 22.1%, 即处于全程硝化状态下的 MUCT 工艺中 PAOs 占全菌的比例为 22.1%.

图 6 给出了实时荧光定量 qPCR 的定量结果. 从图中可知, MUCT 运行第 120 天时, 单位质量污泥中含有的 *Accumulibacter* 各分支组成丰度分别为  $6.68 \times 10^6$  cells/g (IA)、 $9.67 \times 10^8$  cells/g (IIA)、 $5.14 \times 10^8$  cells/g (IIB)、 $5.28 \times 10^8$  cells/g (IIC)、 $1.74 \times 10^9$  cells/g (IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3))、 $2.07 \times 10^{10}$  cells/g (IID)、 $1.03 \times 10^9$  cells/g (IIF). 而 PAO 16S rRNA 的拷贝数为  $5.65 \times 10^{10}$  copies/g, 有研究者认为, 聚磷菌单个细胞中含有 2 拷贝的操纵子<sup>[17,19]</sup>, 据此, 将测得的 PAO 16S rRNA 的拷贝数折算为细胞浓度后为  $2.83 \times 10^{10}$  cells/g. 此外, 测得的全菌的丰度为  $8.28 \times 10^{11}$  copies/g, 由于关于单个细菌细胞体内含有的 16S rRNA 的数量

存在争议, 本研究将其具有争议的数量都考虑进去, 即得到折算后全菌的细胞丰度分别为  $2.3 \times 10^{11}$  cells/g ( $3.6$  copies/cell)<sup>[20]</sup> 和  $2.02 \times 10^{11}$  cells/g ( $4.1$  copies/cell)<sup>[17]</sup>. 从而计算得到 PAOs 的全菌含量占比分别为 12.3% 和 14.01%. 并由图 6 可知, 所有 *Accumulibacter* 分支之和占据 PAO 的比例为 90.1%, 表明 *Accumulibacter* 是反应器所有聚磷菌中的优势菌属.

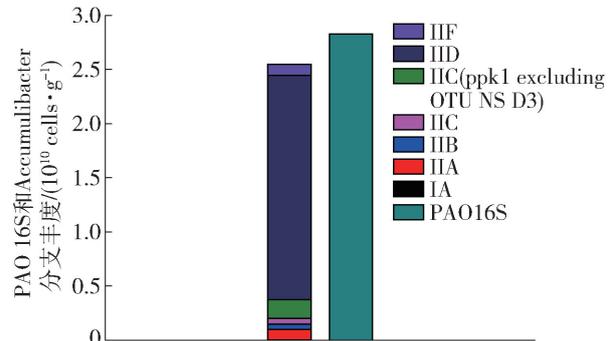


图6 qPCR 定量 *Accumulibacter* 组成及占比情况

Fig. 6 Quantification of Acc clades by qPCR

基于 qPCR 针对 MUCT 反应器中运行第 120 天泥样定量检测, 全菌中 PAOs 的定量分析占比分别为 12.3% 和 14.01%, 依赖于 Flow cytometry 技术的流式细胞仪检测结果为 22.1%. 由于流式细胞仪检测的高灵敏度, 流式定量的结果通常会高于 qPCR 的定量结果. 二者的定量结果存在一定的差异, 但依赖于流式细胞仪检测的结果的稳定性以及高灵敏度, 流式细胞检测方法依然能满足对 PAOs 定量的要求. 检测结果表明, 在该连续流反硝化除磷系统中, *Accumulibacter* 是处于全程硝化状态下的优势聚磷菌.

### 2.3 MUCT 工艺脱氮除磷性能与 *Accumulibacter* 各分支动态变化分析

本章研究内容选取了整个运行周期的前 4 个阶段的泥样进行了 DNA 的提取和实时荧光定量检测, 其中阶段 I 和阶段 III 的取样时间点均在系统处于完全的全程硝化阶段, 此时亚硝积累率 NAR 为 0. 阶段 II 的取样时间点为系统处于半短程阶段. 从图 4 可以看出, 此时存在有部分的亚硝积累率, 而亚硝积累的存在可能会对反应器中的微生物菌群的群落结构造成各种难以预测的影响结果. qPCR 定量结果如图 7 所示. 从图中可知, 单位质量污泥中 IA 分支的最高丰度是第 I 阶段的  $4.162 \times 10^7$  cells/g, 占所测得的 *Accumulibacter* 所有分支总和的 0.29%, 此后 IA 的丰度一直处于下降的状态, 其占比非常低且

处于逐渐下降的趋势,属于被淘汰的分支菌属。先前的研究认为 IA 分支具备有能利用  $\text{NO}_3^-$ -N 的能力,能以  $\text{NO}_3^-$ -N 作为电子受体进行吸磷,而  $\text{NO}_3^-$ -N 的减少不利于 IA 生存<sup>[21-22]</sup>,这与本研究中的现象是一致的。分支 IIA 的含量占整个 *Accumulibacter* 的含量并不高,在整个运行过程中,第IV阶段占比达到最高 5.59%,属于非优势菌,但其变化趋势却表现出对短程阶段的偏向性,即在第 I 和第 III 阶段,处于完全硝化阶段,比例有所降低,当处于半短程的第 II 以及短程硝化的第 IV 阶段时,其比例稍有上升,但由于其占比都低于 6%,对系统的脱氮除磷过程起不到决定性的作用。

先前有关于 *Accumulibacter* 的宏基因组学研究结果表明,分支 IIA 具有亚硝酸还原酶基因,但是不存在硝酸盐还原酶基因。而分支 IA 具备有还原硝酸盐的功能酶基因。这一研究结论很好地解释了 IIA 可以还原亚硝酸盐而不能还原硝酸盐<sup>[19]</sup>。

同样类似于 IIA 分支,另一分支 IIB 的丰度占比以及变化情况基本与 IIA 相同,占比较低,且在有无亚硝存在的情况下,丰度有所增长,最高生物量能达到  $10^9$  数量级。相比之下, IIC 以及 IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3) 两分支的变化比较明显,但变化趋势依然和 IIA、IIB 的变化趋势类似。在有亚硝存在的半短程和短程阶段, IIC 和 IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3) 的增幅量很明显,且后者的占比相较于前者要高,微生物增长量要快,体现出更强的竞争能力。这说明 IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3) 对亚硝的利用能力更强,对系统中亚硝的去除起到了重要的作用。在第 II 阶段,单位质量污泥中 IIC 和 IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3) 的丰度分别为  $5.84 \times 10^9$  cells/g 和  $2.45 \times 10^{10}$  cells/g,占比分别为 6.93% 和 29.02%。到第 IV 阶段,短程硝化模式下,二者丰度分别为  $1.60 \times 10^{10}$  cells/g 和  $4.77 \times 10^{10}$  cells/g,占比分别达到了 11.53% 和 34.31%,表现出对亚硝的

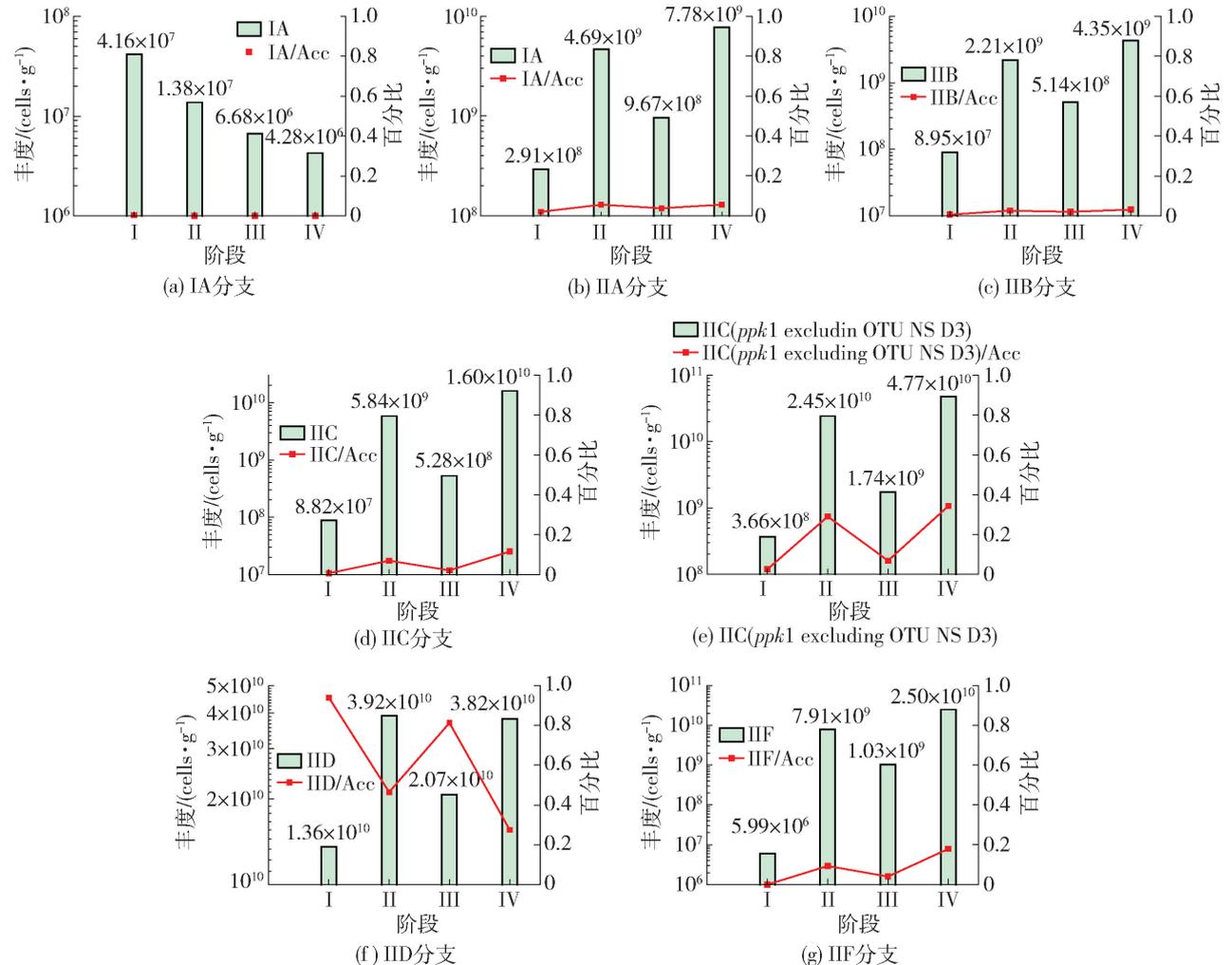


图 7 反应器沿程各阶段 *Accumulibacter* 分支的丰度变化

Fig. 7 Variations of Acc clades along the reactor in MUCT process at different experimental stages

偏好,以及更强的竞争能力,成为系统中的优势聚磷菌属,并且能有效地去除系统中的亚硝。

分支 IID 作为优势菌一直存在于系统中,且几乎是处于绝对优势的细菌,但在第 II 和第 IV 阶段对应的半短程和短程阶段,其丰度稍有下降,占所测得的 *Accumulibacter* 的比例也有所下降,从硝化阶段的绝对优势菌种变成了与其他菌种并存的优势种。由此可见,可能是由于 IID 分支对以亚硝为电子受体的利用没有其他菌种的竞争能力强,如 IIC、IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3) 和 IIF。这导致了其他分支逐渐增长,IID 分支占比降低。然而,在全程硝化阶段下,IID 分支体现出了对硝氮的利用能力比其他分支强。同时在短程阶段也表现出了对亚硝的耐受性,即自身对亚硝的利用能力的存在,只不过对亚硝的利用能力不如其他的分支菌种。分支 IIF 如同其他的 Type II 型菌种一样,表现出短程硝化亚硝存在状态下的偏向,在第 IV 阶段其丰度达到最高点  $2.50 \times 10^{10}$  cells/g,占定量的所有 *Accumulibacter* 分支总和的 17.97%,其体现出了以亚硝为电子受体的反硝化除磷能力。

### 3 结论

1) 全程硝化状态下,  $\text{NH}_4^+$ -N 去除率保持在 95% 以上,缺氧区磷能被有效地去除,系统的反硝化除磷效果良好;短程硝化状态下,厌氧区释磷量有所下降,好氧区的亚硝积累率 NAR 平均值达 75%,氨氮去除率在 90% 以上。

2) 分支 IID 在全程硝化状态下占有所有 *Accumulibacter* 分支总和的 90% 以上,是系统中的优势分支。分支 IIC 和 IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3) 以及 IIF 增长率较快,是短程状态下的优势种; IID 分支在短程状态下的占比为 27%,竞争优势不如其他分支。

3) 基于 qPCR 的检测结果表明,Type II 型 *Accumulibacter* 分支中除了 IID 外,其他分支都表现出了对存在亚硝的短程硝化模式的偏向性,即短程硝化有利于 II 型分支的富集,这表明 II 型分支对系统化中亚硝的去除起到重要作用。IIC 和 IIC (*ppk1* excluding OTU NS D3) 以及 IIF 作为短程状态下的优势菌种,其利用亚硝进行反硝化脱氮的能力比其他分支强。IID 分支作为全程状态下的优势种,对系统中硝氮的去除至关重要;短程硝化状态下 IID 分支竞争能力不如其他分支,但是作为优势种,是整个运行过程中氮磷去除最重要的分支。

### 参考文献:

- [1] LIU T K, CHEN P, CHEN H Y. Comprehensive assessment of coastal eutrophication in Taiwan and its implications for management strategy[J]. *Mar Pollut Bull*, 2015, 97(1/2): 440-450.
- [2] BARNARD J L. Biological nutrient removal without addition of chemicals[J]. *Water Research*, 1975, 9(5/6): 485-490.
- [3] NAKAMURA K, HIRAIISHI A, YOSHIMI Y, et al. *Micrococcus phosphovorans* gen-nov, sp-nov, a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated-sludge [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(1): 17-22.
- [4] HIEN T T N, VANG Q L, HANSEN A A, et al. High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2011, 76(2): 256-267.
- [5] SEVIOUR R J, KRAGELUND C, KONG Y, et al. Ecophysiology of the actinobacteria in activated sludge systems [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2008, 94(1): 21-33.
- [6] COATS E R, WATKINS D L, BRINKMAN C K, et al. Effect of anaerobic HRT on biological phosphorus removal and the enrichment of phosphorus accumulating organisms [J]. *Water Environment Research*, 2011, 83(5): 461-469.
- [7] MIELCZAREK A T, HIEN T T N, NIELSEN J L, et al. Population dynamics of bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal in Danish wastewater treatment plants [J]. *Water Research*, 2013, 47(4): 1529-1544.
- [8] HESSELMANN R, WERLEN C, HAHN D, et al. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22(3): 454-465.
- [9] KEENE N A, REUSSER S R, SCARBOROUGH M J, et al. Pilot plant demonstration of stable and efficient high rate biological nutrient removal with low dissolved oxygen conditions[J]. *Water Research*, 2017, 121: 72-85.
- [10] WELLES L, ABBAS B, SOROKIN D Y, et al. Metabolic response of "*Candidatus Accumulibacter Phosphatis*" Clade II C to changes in influent P/C ratio[J]. *Frontiers In Microbiology*, 2017, 7: 2121.
- [11] PETERSON S B, WARNECKE F, MADEJSKA J, et al. Environmental distribution and population biology of

- Candidatus Accumulibacter*, a primary agent of biological phosphorus removal [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(10): 2692-2703.
- [12] GEBREMARIAM S Y, BEUTEL M W, CHRISTIAN D, et al. Research advances and challenges in the microbiology of enhanced biological phosphorus removal-a critical review[J]. *Water Environment Research*, 2011, 83(3): 195-219.
- [13] MAO Y, GRAHAM D W, TAMAKI H, et al. Dominant and novel clades of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* in 18 globally distributed full-scale wastewater treatment plants[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11857.
- [14] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 38-47.
- [15] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(3): 1175-1182.
- [16] FERRIS M J, MUYZER G, WARD D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 340-346.
- [17] HE S, GALL D L, MCMAHON K D. “*Candidatus Accumulibacter*” population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (18): 5865-5874.
- [18] ONG Y H, CHUA A S M, FUKASHIMA T, et al. High-temperature EBPR process: the performance, analysis of PAOs and GAOs and the fine-scale population study of *Candidatus “Accumulibacter phosphatis”* [J]. *Water Research*, 2014, 64: 102-112.
- [19] GARCIA M H, IVANIVA N, KUNIN V, et al. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(10): 1263-1269.
- [20] KLAPPENBACH J A, SAXMAN P R, COLE J R, et al. Rnndb: the ribosomal RNA operon copy number database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(1): 181-184.
- [21] GUIASAOLA A, QURIE M, DEL MAR VARGAS M, et al. Failure of an enriched nitrite-DPAO population to use nitrate as an electron acceptor[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(7): 689-695.
- [22] LEAL C, AMARAL A L, COSTA M D L. Microbial-based evaluation of foaming events in full-scale wastewater treatment plants by microscopy survey and quantitative image analysis[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(15): 15638-15650.

(责任编辑 张 蕾)