

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

曾 薇,李博晓,王向东,白鑫龙,彭永臻* (北京工业大学环境与能源工程学院,北京 100124)

摘要: 采用实现亚硝酸盐硝化的 MUCT 工艺处理低 C/N 实际生活污水,在短程硝化的基础上实现反硝化除磷.研究短程硝化建立与破坏过程中,亚硝酸盐积累率的变化对系统除磷性能及 *Candidatus Accumulibacter* 菌群结构的影响.结果表明:MUCT 除磷以反硝化除磷为主,平均反硝化除磷率高达 88%.磷去除率与亚硝酸盐积累率具有很好的正相关性.短程硝化阶段磷的平均去除率比全程硝化阶段高 30%以上,证明了亚硝酸盐更适合作为低 C/N 比污水反硝化除磷的电子受体.以多聚磷酸盐激酶基因(*ppk1*)作为遗传标记,采用实时荧光定量 PCR 方法考察不同亚硝酸盐积累率下 *Accumulibacter* 的丰度、各主要进化分支的菌群结构和相对丰度.当系统处于全程硝化状态时,存在少量以硝酸盐为电子受体的 Acc-I 型反硝化聚磷菌,低于总 *Accumulibacter* 的 5%;当系统进入短程硝化状态后,Acc-I 逐渐消失.运行期间以亚硝酸盐作为电子受体进行反硝化除磷的 Acc-IIID 始终是优势聚磷菌,达到总 *Accumulibacter* 的 92%以上,甚至接近 100%,保证了亚硝酸盐型反硝化除磷的稳定运行,亚硝酸盐浓度是影响其丰度变化的重要因素.

关键词: 实际生活污水; 短程硝化; 反硝化除磷; 实时荧光定量 PCR(QPCR); 多聚磷酸盐激酶基因(*ppk1*)

中图分类号: X703.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2013)07-1298-11

***Candidatus Accumulibacter* metabolic activity and population structure in MUCT process treating domestic wastewater with nitrification and denitrifying phosphorus removal.** ZENG Wei, LI Bo-xiao, WANG Xiang-dong, BAI Xin-long, PENG Yong-zhen* (College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China). *China Environmental Science*, 2013,33(7): 1298~1308

Abstract: Nitritation and denitrifying phosphorus (P) removal was achieved in Modified University of Cape Town (MUCT) process treating domestic wastewater with a low C/N ratio. The effect of nitrite accumulation on performance of phosphorus removal and population structure of "*Candidatus Accumulibacter*" was investigated during nitritation establishment and destruction. Results indicated that P removal was mainly completed by denitrifying P removal of about 88%. The P removal efficiency had a clear correlation with the nitrite accumulation rate. Under nitritation, the P removal was 30% higher than that under complete nitrification, suggesting that nitrite was appropriate to be used as electron acceptor for denitrifying P removal when treating low C/N wastewater. Real time quantitative PCR assays were carried out using poly-P kinase 1 (*ppk1*) as phylogenetic marker to characterize the abundance of total *Accumulibacter* and the relative distributions and abundances of the *Accumulibacter* clades. Under complete nitrification, a very few Acc-I clade below 5% in total *Accumulibacter* was present using nitrate as electron acceptor. When the reactor transformed into nitritation, Acc-I clade gradually disappeared. The Acc-IIID clade using nitrite as electron acceptor for denitrifying P removal was always the dominant *Accumulibacter* throughout the operational period, with above 92% on average in total *Accumulibacter*, even up to nearly 100%, which led to stable performance of denitrifying P removal using nitrite as electron acceptor. The nitrite concentrations significantly affected the abundances of Acc-IIID clade.

Key words: real domestic wastewater; nitritation; denitrifying phosphorus removal; real time quantitative PCR (QPCR); poly-P kinase gene 1 (*ppk1*)

对于低 C/N 实际城市生活污水,碳源不足往往成为脱氮与除磷的限制因素.反硝化除磷菌(DPAOs)能够利用 NO_3^- 或 NO_2^- 代替 O_2 作为电子受体^[1-3],与传统生物除磷相比,反硝化除磷工艺

收稿日期: 2012-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51278007);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0891)

* 责任作者, 教授, pyz@bjut.edu.cn

能够实现氮磷同时去除^[1,4]及实现“一碳两用”,不但节约了碳源、曝气量,同时减少了剩余污泥产量^[5-6].短程脱氮是将硝化反应控制在亚硝化阶段,即氨氧化细菌(AOB)将 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 氧化为 $\text{NO}_2^-\text{-N}$, 获得稳定的亚硝酸盐积累,然后反硝化菌将 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 还原为 N_2 ^[7].与传统生物脱氮相比,短程脱氮在理论上减少了 25% 的硝化需氧量,40% 反硝化碳源,50% 的污泥产量和反硝化池容积,是一种经济高效的生物脱氮技术^[8-9].而在短程硝化的基础上实现反硝化除磷,将进一步降低碳源需求和曝气耗能,更适用于低 C/N 污水的处理.

由于反硝化聚磷菌能够利用 NO_3^- 或 NO_2^- 作为电子受体进行反硝化除磷,因此电子受体类型对 DPAOs 菌群结构和代谢活性产生重要影响.研究表明^[10-11],不同电子供体富集的 DPAOs 反硝化能力不同.但相关研究都是人工配水系统,且都认为丙酸盐更有利于反硝化聚磷菌的富集.目前还未见关于实际生活污水中电子受体类型变化对 DPAOs 的代谢活性和菌群结构影响的报道.本研究以处理实际生活污水的 MUCT 反应器为研究对象,VFAs 种类和浓度水平更符合生产实际,而且反硝化除磷的电子受体为实际生活污水短程硝化和全程硝化的产物,也更符合实际工程的运行状况.

已有研究表明无论是实验室规模还是生产规模的 EBPR 系统中,*Candidatus Accumulibacter* 都是占主导地位的除磷微生物^[12].研究者针对“*Accumulibacter*”菌群的 16S rRNA 设计不同的探针,来区分它的两种菌群类型(Type I 和 Type II),并对不同富集系统中 *Accumulibacter* 的反硝化能力进行了研究^[10,13-14].这些研究均采用荧光原位杂交技术(FISH)对菌群进行定量,只能简单的区分两种菌群类型(Type I 和 Type II)或者其中 IA 和 IIA 分支的反硝化能力.而且大多只关注了硝酸盐作为电子受体时 *Accumulibacter* 菌群的动态响应,其他分支对 NO_3^- 的选择是否具有特异性仍然未知^[15].对于亚硝酸盐作为电子受体的研究多集中在亚硝酸盐对聚磷菌好氧和缺氧吸磷的抑制方面^[16-21],鲜有研究关注不同分支利用 NO_2^- 作为电子受体进行反硝化除磷的性能.

16S rRNA 是广泛采用的基因标记物,但由于 16S rRNA 的高度保守性使其无法区分 *Accumulibacter* 的各进化分支.聚合磷酸盐激酶(PPK1)是 PAOs 细胞内催化合成 poly-P 的关键酶,而 *ppk1* 是编码合成这种酶的功能基因,*ppk1* 的表达过程直接影响 PAOs 的代谢活性和吸磷效果.*Accumulibacter* 细胞内的 *ppk1* 是单拷贝基因,其进化速度是 16S rRNA 的 5 倍^[22],是研究 *Accumulibacter* 各进化分支的很好的基因标记物.针对“*Accumulibacter*”的 *ppk1* 设计特异性引物,研究者又将“*Accumulibacter*”的两个菌群(Type I 和 Type II)进一步划分为不同的分支(I A-E 和 II A-G)^[23-24],这为更清楚的揭示“*Accumulibacter*”不同分支的反硝化能力奠定了基础.已有关于 *ppk1* 作为聚磷菌基因标记物的研究都是针对不同的人工配水实验室规模反应器或污水厂的个别污泥样品的调查研究,而针对某一实际污水短程硝化和反硝化除磷系统的长期动态研究则未见相关报道.

为了区分“*Accumulibacter*”不同的进化分支对电子受体的动态响应,本研究以实现亚硝酸盐型硝化的 MUCT 反硝化除磷系统为研究对象,考察短程硝化建立与破坏过程中电子受体类型与比例的变化对“*Accumulibacter*”代谢活性的影响.同时以 *ppk1* 作为遗传标记,考察了该过程中“*Accumulibacter*”的种群结构变化,包括种群的丰度变化和各进化支的结构变化,为处理实际城市污水的连续流系统实现短程硝化和反硝化除磷提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验装置

MUCT 工艺试验装置如图 1 所示.反应区域由合建式的主反应区和 1 个二沉池组成,主反应区体积 70L.试验期间主反应区分为 7 个格室,其中第 1 格室为厌氧区,第 2 格室为缺氧 1 区,第 3、4 格室为缺氧 2 区,第 5、6、7 格室为好氧区.厌氧区、缺氧 1 区、缺氧 2 区 and 好氧区体积比为 1:1:2:3.在上述 4 个反应区采用电动搅拌器使泥水充分混合.好氧反应区底部采用微孔曝气供氧.

二沉池体积 24L,采用中间进水周边出水的辐流式二沉池.

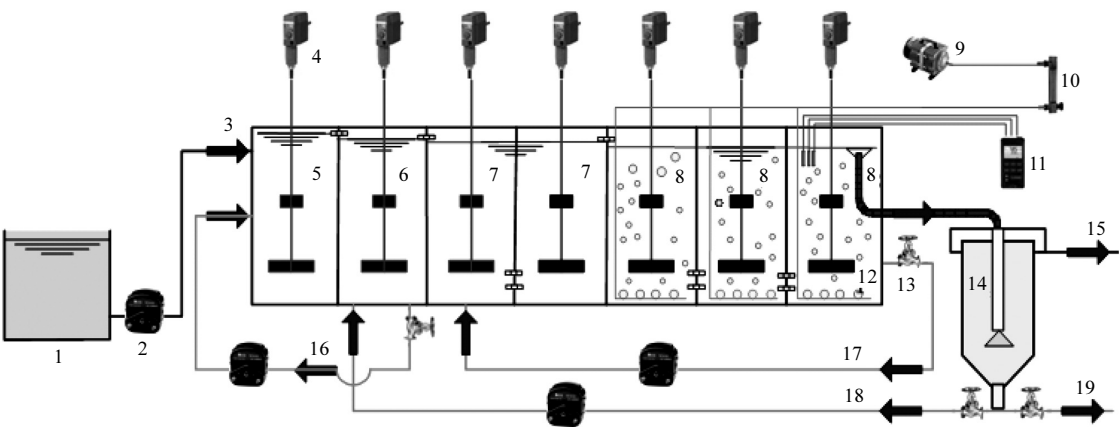


图1 MUCT 工艺实验装置示意

Fig.1 Schematic diagram of MUCT process

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.空气压缩机 10.转子流量计 11.DO 测定仪 12.曝气头 13.止回阀 14.二沉池 15.出水 16.缺氧回流 17.硝化液回流 18.污泥回流 19.剩余污泥

试验用生活污水全部进入厌氧区.二沉池污泥回流至缺氧1区,其回流比为 R_1 ;缺氧1区混合液回流至厌氧区,其回流比为 R_2 ;好氧区最后一个格室的硝化混合液回流至缺氧2区第一格室,其回流比为 R_3 .试验期间进水,回流污泥,两个内循环的流量调节均由蠕动泵控制.

1.2 试验用水和污泥

试验用水取自某生活小区化粪池的实际生活污水,各项水质指标见表1.从表1中可以看出,试验所采用的生活污水平均C/N值仅为2.4,为典型的低C/N比的城市生活污水.接种污泥取自北京市某城市污水处理厂A²O二沉池回流污泥,属

全程硝化污泥,硝化性能良好.

1.3 水质分析测定方法

水样经0.45μm中性滤纸过滤后按标准方法分析测定COD、 PO_4^{3-} -P、 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N、 NO_3^- -N浓度^[25].DO和pH值的检测采用德国WTW-Multi-340i便携式在线测定仪进行测定.为方便数据分析定义亚硝态氮积累率NAR,如式(1).

$$NAR = \frac{C(NO_2^-)}{C(NO_2^-) + C(NO_3^-)} \tag{1}$$

式中: $C(NO_2^-)$ 和 $C(NO_3^-)$ 指的是好氧区最后一个格室出水的 NO_2^- -N和 NO_3^- -N浓度.

表1 原水水质

Table 1 Characteristics of the raw wastewater

水质指标	范围	平均值	水质指标	范围	平均值
COD(mg/L)	88.8~310.4	193.9	NO_2^- -N (mg/L)	0~0.1	0.004
NH_4^+ -N (mg/L)	51.8~96.3	65.7	NO_3^- -N(mg/L)	0.05~1.3	0.59
PO_4^{3-} -P(mg/L)	2.1~8.3	5.6	C/N	0.86~3.38	2.40
pH 值	7.13~7.42	7.31	C/P	33.12~46.06	37.34

1.4 实时荧光定量PCR(QPCR)

QPCR的操作根据文献[23]中所述方法进行,根据实际情况对文献中的方法进行了修正.首先以ppk1基因作为靶基因,建立了“Candidatus

Accumulibacter”的5个主要进化分支的标准曲线.然后对不同运行阶段提取的活性污泥中的“Candidatus Accumulibacter”进行了定量分析.标准曲线的建立主要分为以下几个主要步骤:样

品准备、DNA 提取、PCR 扩增、克隆转化、质粒提取、建立标准曲线。

样品准备:本实验采用的标准品来源均为 MUCT 反应器,污泥样品从 MUCT 工艺好氧区最后一个格室同时提取 3 份 2ml 活性污泥样品,并测定该格室 MLSS。用 1×PBS 清洗污泥样品 2 次,14000×g 离心 2min,去除上清液,然后加 0.5mL 冰乙醇和 0.5mL 1×PBS,置于-20℃保存。污泥取样点为系统运行的第 43,82,119,131,160,234, 255,302,339d。

总 DNA 提取、克隆转化及质粒提取均按试剂盒说明操作。采用的试剂盒分别为 DNA 提取 (Fast DNA Spin kit for soil,MP,USA)、切胶纯化 (Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver.2.0,TaKaRa,Japan)、载体连接(pGM-T 连接试剂盒,天根生化科技有限公司,北京)和质粒提取 (MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.3.0, TaKaRa,Japan)。

PCR 扩增:采用特异性引物对 “*Candidatus Accumulibacter*” 主要的 5 个分支(I、IIA、IIB、IIC 和 IID)的 *ppk1* 片段以及聚磷菌和全菌的 16S rRNA 进行 PCR 扩增^[23]。反应采用 Promega 公司的常规 PCR 试剂盒(GoTaq GreenMaster Mix, American)。25uL 的扩增体系包括 12.5uL 的 MasterMix,1uL 正向引物,1uL 反向引物,1-2uL DNA,最后用 ddH₂O 补足至 25uL。扩增程序包括一个最初的 95℃变性 10min,然后 25~35 个循环(95℃ 40s,T℃ 1min,72℃ 2min),最后 72℃延伸 5min。将获得的 PCR 产物经琼

脂糖凝胶电泳检测,均为单一的目的条带。

标准曲线的建立:用 NanoDrop ND-1000 (Thermo, American)分光光度计测定回收质粒的浓度。将纯化后的质粒以 10 倍的浓度梯度稀释用作 QPCR 标准品。反应在 Mx3005P 实时定量 PCR 扩增仪(Agilent Technologies,American)上进行,采用 25uL 反应体系(Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix,Agilent Technologies, American)。扩增程序(分支 Acc-IID 除外)为:最初的 95℃变性 3min,然后 30~55 个循环(94℃ 30s,T℃ 45s),最后 72℃延伸 30s。复性温度与常规 PCR 复性温度相同。由于 SYBR Green 染料与双链 DNA 的结合是非特异性的,所以引物二聚体等非特异性扩增产物产生的荧光信号会干扰目的基因的定量。熔融曲线分析表明,除分支 Acc-IID 外,所有分支的扩增都是阳性扩增,未受到非特异性扩增的影响。为了消除引物二聚体对 Acc-IID 目标产物实时定量结果的影响,在通用的 3 步法的延伸步骤之后,增加一个短暂的恒温 and 荧光检测步骤(84℃,5s),使这个步骤的温度高于引物二聚体的熔解温度,但低于目标产物的熔解温度,定量结果表明,4 步法有效地消除了引物二聚体的影响^[26]。

1.5 MUCT 运行方案

本研究的 MUCT 反应器运行数据取自第 43d 至第 411d,共 369d 的运行数据。根据工艺运行参数和系统运行状态的不同划分为 11 个阶段,如表 2 所示。

表 2 MUCT 工艺处理实际生活污水不同阶段的运行参数
Table 2 Experimental scheme of MUCT process treating domestic wastewater

试验阶段	进水流量(L/h)	总 HRT(h)	污泥回流比 R ₁ (%)	缺氧回流比 R ₂ (%)	硝化液回流比 R ₃ (%)	温度(℃)	DO(mg/L)	SRT(d)
I(43~57d)	6.67	10.5	100	100	300	23~28	0.5	25±5
II(58~86d)	8.75	8	100	120	300	23~28	0.5	25±5
III(87~121d)	8.75	8	80	120	300	23~28	0.5	25±5
IV(122~151d)	11.67	6	80	120	300	18~23	0.5	25±5
V(152~180d)	8.75	8	80	120	300	18~23	0.5	25±5
VI(181~219d)	11.67	6	100	120	250	28±2	0.5	25±5
VII(220~238d)	10.49	6.67	100	120	250	28±2	0.5	25±5
VIII(239~278d)	10	7	100	120	250	28±2	0.5	40±5
IX(279~318d)	11.67	6	100	120	250	28±2	0.5	40±5
X(319~372d)	12.72	5.5	100	120	250	28±2	0.75	40±5
XI(373~411d)	14	5	100	120	250	28±2	1.0	40±5

2 结果与讨论

2.1 MUCT 工艺硝化类型的变化

MUCT 反应器运行期间好氧区的 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 浓度及亚硝酸盐积累率(NAR)的变化情况如图 2 所示.反应器在低溶解氧($\text{DO}=0.5\text{mg/L}$)运行的基础上,阶段 II 将水力停留时间(HRT)由 10.5h 缩短到 8h,NAR 逐渐提高.阶段 III 时建立了短程硝化,平均 NAR 约为 60%,维持运行 35d.之后由于季节变化导致水温下降至 $18\sim 23\text{ }^\circ\text{C}$,NAR 开始下降,即使将 HRT 进一步缩短为 6h,仍然无法恢复,阶段 V 时已进入全程硝化状态.从阶段 VI 开始由于水温的提高,同时缩短 HRT 为 6~7h,并在低 DO 下运行,NAR 再一次升高,进入

短程硝化状态.阶段 VII、VIII、IX 和 X 维持了稳定的短程硝化,共 153d,平均 NAR 达到 95%.

MUCT 工艺对磷的去除效果以及反硝化除磷率如图 3 所示,平均反硝化除磷率达到 88%,说明系统中的磷主要通过反硝化除磷的方式在缺氧区去除.以 DO 作为电子受体的好氧吸磷对“*Candidatus Accumulibacter*”代谢活性和菌群结构的影响可忽略不计.由于上述运行期间硝化类型的变化,导致回流至缺氧区的反硝化除磷的电子受体的不同,即短程硝化期间主要以 NO_2^- 作为电子受体,全程硝化期间主要以 NO_3^- 作为电子受体.因此,本研究重点考察硝化类型变化导致的电子受体类型(NO_2^- 或 NO_3^-) 的转变对“*Candidatus Accumulibacter*”产生的影响.

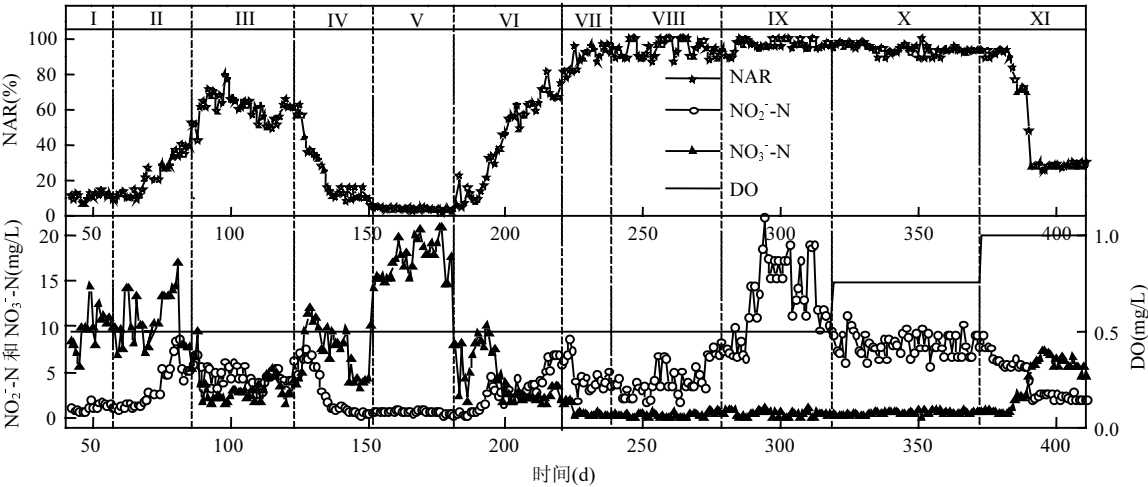


图 2 好氧区的 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 浓度及亚硝酸盐积累率(NAR)的变化

Fig.2 Variations of NO_2^- -N, NO_3^- -N concentrations and nitrite accumulation rates in the aerobic zone

2.2 MUCT 工艺反硝化除磷特性

如图 3(a)所示,无论是全程硝化还是短程硝化,运行期间反硝化除磷率平均达到 88%,基本不受硝化类型转变的影响.这主要是由 MUCT 工艺的结构形式决定的.原水直接进入反应器厌氧区,PAOs 可以充分吸收原水中的 VFA 进行厌氧释磷并合成 PHA.充分释磷后的混合液随后进入缺氧区,缺氧区存在一定浓度的 NO_2^- 或 NO_3^- ,且碳源不足,为反硝化除磷提供了良好的条件.

如图 3(b)所示,各阶段 MUCT 工艺对磷的平均去除率分别为:46.4%、52.9%、87.8%、82.1%、58.8%、82.1%、86.7%、95.3%、94.7%、97%、94.7%.磷的平均去除率与各个阶段亚硝酸盐积累率呈现良好的正相关性.第 III 阶段短程硝化期间磷的平均去除率比第 I 阶段全程硝化期提高约 42%,第 VII-X 阶段短程硝化期磷的平均去除率比第 V 阶段全程硝化期提高约 30%~40%.2 次短程的建立与破坏都证明了在低 C/N 条件下短程硝化更有利于磷的去除.分析产生这种现象的

原因可能有两点:第Ⅲ、Ⅶ-Ⅹ阶段,反应器以短程硝化为主,除磷主要通过以 NO_2^- 为电子受体的反硝化除磷完成.在反硝化过程中,较 NO_3^- 电子受体而言,以 NO_2^- 为电子受体的反硝化除磷需要的碳源更少^[27].因此在原水碳源不足的情况下,以 NO_2^- 为电子受体的反硝化除磷对有限碳源的利用率更高,短程硝化更有利于磷的去除.此外,系统中 *Candidatus Accumulibacter* 菌群对不同电子受体(NO_3^- 或 NO_2^-)的选择性利用也可能导致不同硝化状态下磷去除效果的变化.

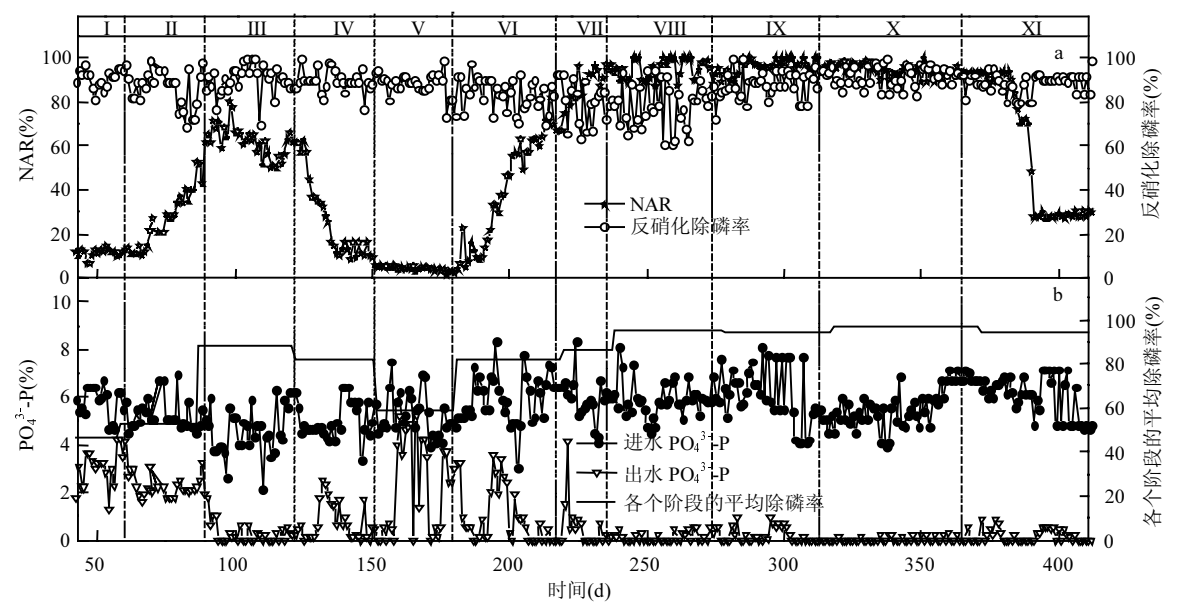
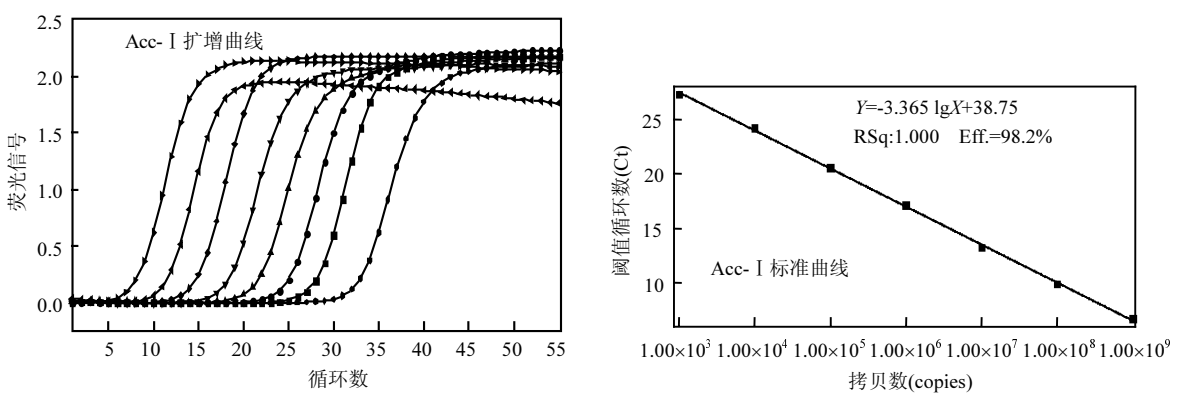


图3 MUCT 工艺对磷的去除
Fig.3 Phosphorus removal in MUCT process

2.3 亚硝酸盐积累率对“*Candidatus Accumulibacter*”种群变化的影响

2.3.1 实时荧光定量PCR标准曲线 由图4可知,所有扩增曲线的效率都在90%到105%之间,相关系数均

大于0.99,特异性和扩增效率都符合精确定量的要求.聚磷菌16S rRNA定量分析结果与5个进化分支定量结果的总和相近,证明本研究中聚磷菌的类型即为定量的5个 *Candidatus Accumulibacter* 进化分支.



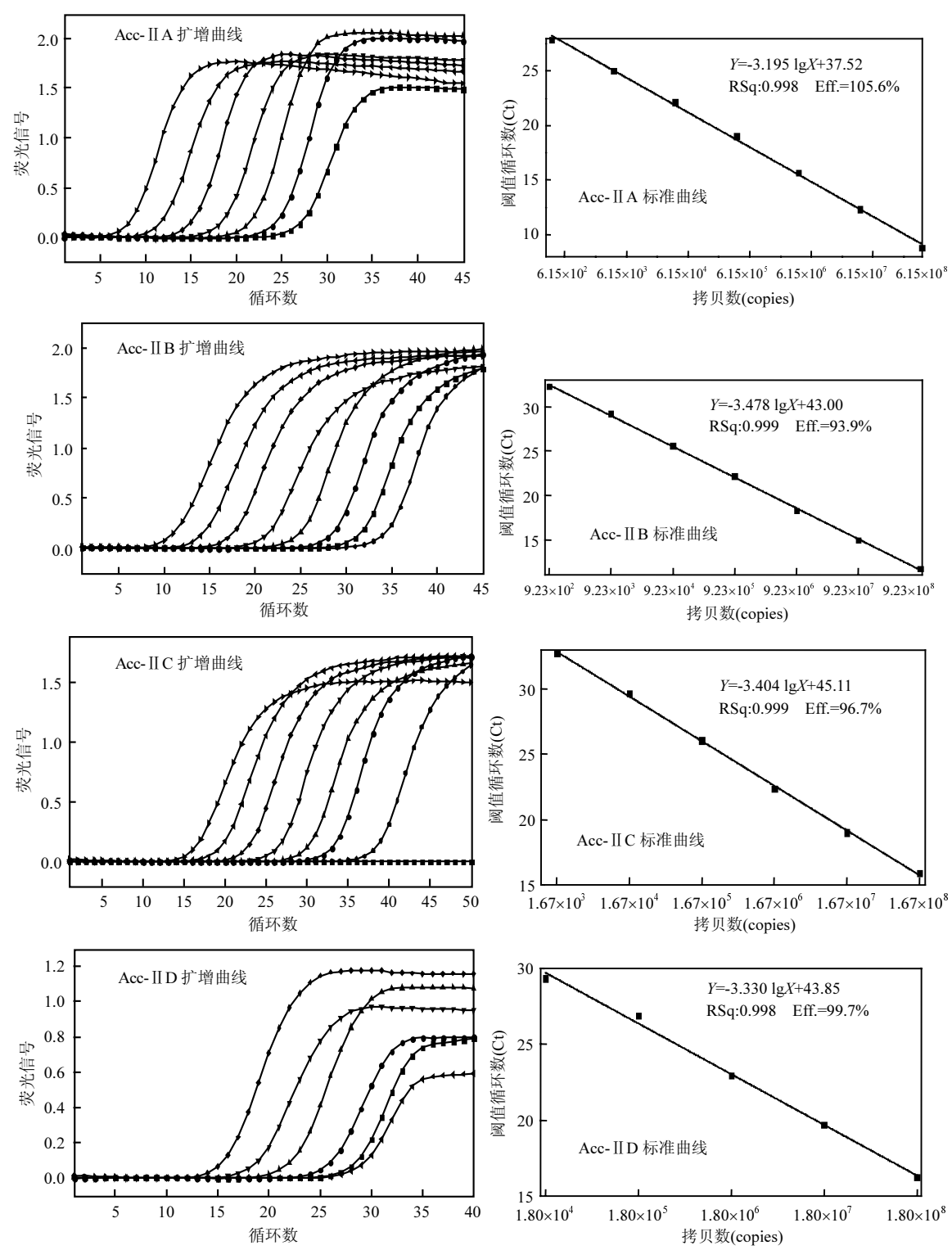


图4 *Candidatus Accumulibacter* 主要进化分支实时定量 PCR 扩增曲线和标准曲线

Fig.4 The amplification plot and the standard curve of each clade of *Candidatus Accumulibacter* using real-time quantitative PCR

2.3.2 *Candidatus Accumulibacter* 菌群变化 图 5 出示了不同亚硝酸盐积累率及磷去除率条件下 *Candidatus Accumulibacter* 占全菌的比例.将 *Candidatus Accumulibacter* 占全菌的比例定义为 P_{ATB} .由图 5 可以看出,磷的去除率与 NAR 正相关,*Candidatus Accumulibacter* 占全菌的比例与亚硝态氮浓度呈现良好的正相关,指示 *Accumulibacter* 可能主要以 NO_2^- 作为电子受体.在全程硝化时期(阶段 I 和阶段 V), NO_2^- -N 浓度小于 1mg/L ,NAR 低于 10%, P_{ATB} 很低,除磷效果也比较差.例如,阶段 V 的第 160d 时,除磷效率只有 22%.阶段 V 之后,随着亚硝态氮浓度的增加,硝态氮浓度逐渐减少至小于 1mg/L ,亚硝酸盐积累率高于 90%,此时 P_{ATB} 随着亚硝酸盐浓度的增加而增加,伴随着磷去除率的升高.阶段 VIII 的 255d,*Candidatus Accumulibacter* 占全菌的比例上升为 3.02%.当硝态氮和亚硝态氮同时存在(阶段 II、III、IV)时, P_{ATB} 的大小与除磷效果的变化趋势相反,却与亚硝态氮浓度变化趋势相同值得注意的是,整个实验阶段,磷酸盐的去除率与 NAR 的大小正相关.在平均 NAR 高于 94%的阶段 VII、VIII、IX、X,磷的平均去除率高达 96.5%,且不受 P_{ATB} 变化的影响.所以推测在本研究中, NO_2^- -N 浓度大小决定聚磷菌的丰度 P_{ATB} ,但 NAR 大小却决定聚磷菌的活性.分析原因, P_{ATB} 的大小变化

主要取决于占主导地位的聚磷菌分支更倾向于利用哪种电子受体,即系统中 NO_3^- 或 NO_2^- 浓度变化对利用该电子受体的聚磷菌分支的数量的影响.而对于聚磷菌的生物活性而言,低 C/N 实际生活污水中碳源的缺乏与否才是决定除磷效果好坏的关键.如前所述,系统中磷的去除主要通过反硝化除磷.在短程硝化建立的过程中,随着 NAR 的升高, NO_2^- 成为主要的电子受体.在低 C/N 下,以 NO_2^- 为电子受体的反硝化除磷能够提高原水碳源的利用率,有助于强化 *Accumulibacter* 活性,进而提高磷的去除率.但是亚硝酸盐浓度并不是越高越好,在平均 NAR 大于 94%的阶段 VII、VIII、IX 和 X,分别从第 234,255,302,339d 取泥,4d 的亚硝酸盐浓度分别为 $4.16, 6.84, 17.3, 8.60\text{mg/L}$.从第 234d 到 255d, P_{ATB} 随着亚硝态氮浓度的增加而增加,PAO 的浓度从 $1.0\times 10^7\text{copies}/(\text{g MLSS})$ 上升到 $1.4\times 10^7\text{copies}/(\text{g MLSS})$.但到阶段 IX 的第 302d,亚硝酸浓度高达 17.3mg/L ,对 *Accumulibacter* 产生了严重抑制, P_{ATB} 下降为 1.04%,较 255d 下降了 67%.当亚硝酸盐降低为 8.60mg/L 时(阶段 X 第 339d), P_{ATB} 又有所恢复.由此可见,本研究中亚硝酸盐更适合做 *Candidatus Accumulibacter* 除磷的电子受体,聚磷菌随亚硝态氮浓度的增加而增加,但过高的亚硝酸盐又对 *Candidatus Accumulibacter* 产生强烈的毒害作用.

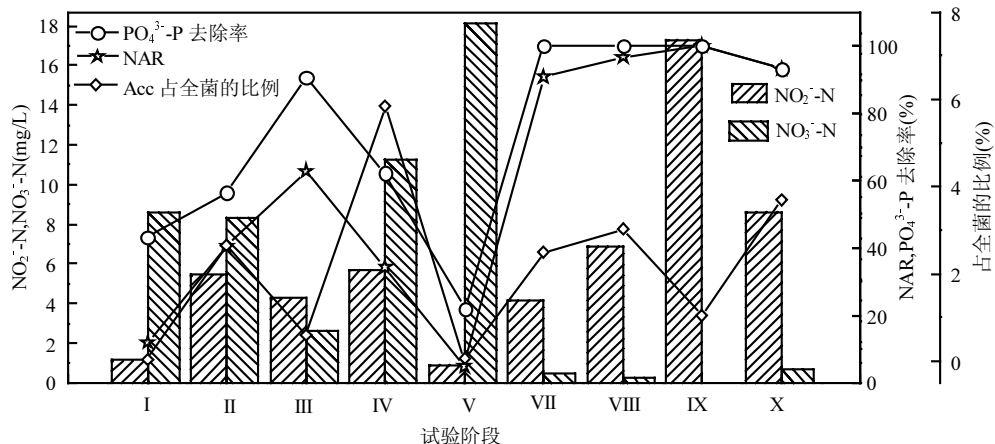


图 5 不同的磷去除率及亚硝酸盐积累率的条件下 Acc 占全菌的比例

Fig.5 Proportion of Acc within total bacteria under different P removal efficiencies and nitrite accumulation rates

由表 3 可知,阶段 V(160d)时硝态氮浓度最大,亚硝态氮浓度几乎为零,此时 Acc- I 占 Acc 的比例达到最大(5.08%).此后,Acc- I 比例随硝酸盐浓度的减少而减少.阶段 VI(234d)之后,硝态氮浓度逐渐低于 1mg/L,Acc- I 型比例进一步降低,到阶段 IX 几乎消失.同时发现,Acc- I 对亚硝酸盐特别敏感,当亚硝酸盐存在时,很小比例的亚

硝变化就会引起 Acc- I 型比例的剧烈波动(见阶段 I、II、III、IV).由此可以推测,Acc- I 是以硝酸盐为电子受体进行反硝化吸磷,这与之前的研究结果是一致的^[10,14],亚硝酸盐的存在不利于 Acc- I 的生存.表 3 的结果也表明本研究中的聚磷菌以 Acc-IID 型为主,达到总 *Candidatus Accumulibacter* 的 92%以上.

表 3 *Candidatus Accumulibacter* 中各进化分支的比例
Table 3 Relative distribution of indicated clade in *Candidatus Accumulibacter*

样品	各个分支占 <i>Candidatus Accumulibacter</i> 的比例变化(%)					NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	NO ₃ ⁻ -N (mg/L)
	I	IIA	IIB	IIC	IID		
阶段 I(42d)	2.98	1.90	0.58	0.04	94.50	1.13	8.29
阶段 II(82d)	0.14	0.27	0.02	0.25	99.32	5.44	8.00
阶段 III(119d)	2.00	2.28	0.68	0.02	95.02	4.25	2.52
阶段 IV(131d)	0.02	0.06	0.00	0.04	99.88	5.67	10.85
阶段 V(160d)	5.08	1.54	0.38	0.03	92.97	0.91	17.44
阶段 VI(234d)	0.34	0.44	0.25	0.29	98.68	4.16	0.42
阶段 VII(255d)	0.21	0.98	0.45	0.89	97.47	6.84	0.24
阶段 VIII(302d)	0.05	0.36	0.07	0.09	99.43	17.31	0
阶段 IX(339d)	0.03	0.10	0.08	0.17	99.62	8.60	0.64

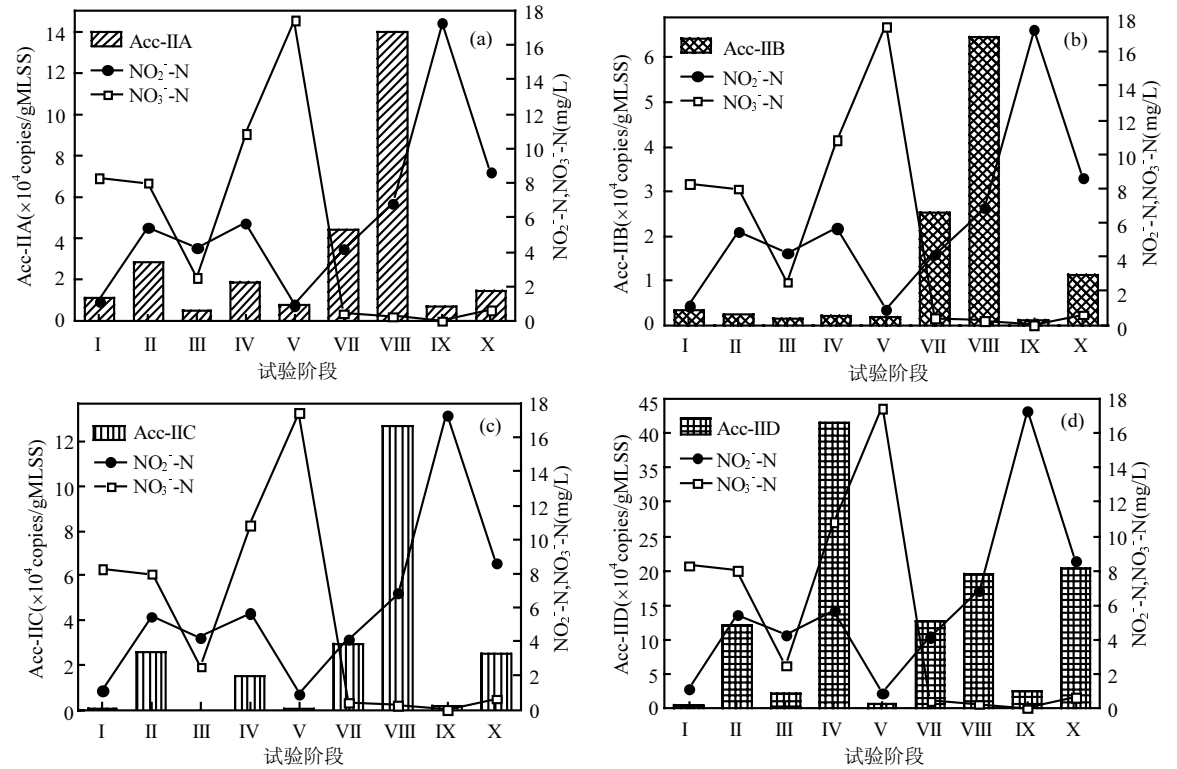


图 6 Type II 型 *Candidatus Accumulibacter* 各进化分支丰度变化

Fig.6 Variations of *Acc* clade proportion

从图 6 中可以看出,各个进化分支的丰度随着硝态氮和亚硝态氮的浓度变化呈现出一定的规律性。

宏基因组学研究结果表明,分支 II A 不具备硝酸盐还原酶,但是具有亚硝酸盐还原酶,解释了其不能还原硝酸盐但可以还原亚硝酸盐的原因^[28]。如图 6(a)所示,Acc-II A 丰度与亚硝酸盐的浓度变化呈良好的正相关,并对硝酸盐氮不敏感。在亚硝酸盐氮浓度最高(17.31mg/L)的第 302d,分支 Acc-I、Acc-II B、Acc-II C 几乎消失。虽然高达 17.3mg/L 的亚硝酸盐也对该分支产生了抑制,使其数量大幅减少,但较其他分支而言,该分支下降幅度最小,说明 Acc-II A 有更高的亚硝酸盐耐受力。如图 6(b)所示,当硝酸盐存在时,Acc-II B 丰度极低。在几乎只有亚硝酸存在时,Acc-II B 菌群丰度随亚硝酸盐浓度的增加而增加。因此,Acc-II B 主要以亚硝酸盐为电子受体,且对硝酸盐敏感,硝酸盐的存在不利于 Acc-II B 的生存。图 6(c)显示,Acc-II C 与亚硝酸盐的变化趋势正相关,故推测 Acc-II C 以亚硝酸盐作为电子受体。如图 6(d)和表 4 所示,本研究中 Acc-II D 比例最大,占全部聚磷菌的 92%以上。如前所述,除磷率与 NAR 呈良好的正相关,而且从图 6(d)中可知,Acc-II D 的丰度与 NO_2^- -N 浓度变化趋势一致。所以 Acc-II D 以 NO_2^- 为电子受体,是本研究中起决定作用的除磷微生物。由于本研究中的 MUCT 工艺长期处于短程硝化状态,高浓度的亚硝酸盐积累使以 NO_2^- 为电子受体的 Acc-II D 成为优势聚磷菌,保证了亚硝酸盐型反硝化除磷的稳定运行。这也是实际生活污水处理系统中 Acc-II D 作为优势反硝化聚磷菌的首次报导。此外,Acc-II D 作为优势聚磷菌也是导致全程硝化状态时系统除磷效果差的因素之一。

各个分支的丰度变化均表明,高浓度的亚硝酸盐(17mg/L)对所有分支都产生了强烈的抑制作用。

3 结论

3.1 通过控制 DO 浓度和水力停留时间能够在 MUCT 处理实际生活污水的系统中实现短程硝

化和亚硝酸盐型反硝化除磷,平均反硝化除磷率达到 88%。亚硝酸盐积累是影响除磷效果的关键因素,磷去除率与亚硝酸盐积累率具有很好的正相关性,短程硝化期间磷的去除效果明显优于全程硝化期间。

3.2 以多聚磷酸盐激酶基因(*ppkI*)作为遗传标记,采用实时荧光定量 PCR 方法能够揭示不同硝化状态下 *Accumulibacter* 各主要进化分支的菌群结构和丰度变化。

3.3 以亚硝酸盐作为电子受体进行反硝化除磷的 Acc-II D 始终是系统中的优势聚磷菌,是亚硝酸盐型反硝化除磷稳定运行以及短程硝化状态下除磷效果优于全程硝化的重要因素。全程硝化时存在少量以硝酸盐作为电子受体进行反硝化除磷的 Acc-I 型聚磷菌,并在系统进入短程硝化后逐渐消失。

参考文献:

- [1] Guisasaola, A, Qurie M, Vargas M D, et al. Failure of an enriched nitrite-DPAO population to use nitrate as an electron acceptor [J]. Process Biochem., 2009,44:689-695.
- [2] Merzouki M, Bernet N, Delgenes J P, et al. Effect of prefermentation on denitrifying phosphorus removal in slaughterhouse wastewater [J]. Bioresource Technology, 2005, (96):1317-1322.
- [3] Kishida N, Kim J, Tsuneda S, et al. Anaerobic/oxic/anoxic granular sludge process as an effective nutrient removal process utilizing denitrifying polyphosphate-accumulating organisms [J]. Water Research, 2006,(40):2303-2310.
- [4] Kuba T, Smolders G, Vanloosdrecht M C M, et al. Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor [J]. Water Science & Technology, 1993,27(5-6):241-252.
- [5] Wang Y Y, Peng Y Z, Li T W, et al. Phosphorus removal under anoxic conditions in a continuous flow A2N two-sludge process [J]. Water Sci. Technol., 2004,50:37-44.
- [6] Kuba T, VanLoosdrecht M C M, Heijnen J J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system [J]. Water Research, 1996,30(7):1702-1710.
- [7] Jenicek P, Svehla P, Zabranska J, et al. Factors affecting nitrogen removal by nitrification/denitrification [J]. Water Science and Technology, 2004,49(5/6):73-79.
- [8] Zhu G B, Peng Y Z, Li B K, et al. Biological removal of nitrogen

- from wastewater [J]. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2008,192: 159-195.
- [9] Fux C, Velten S, Carozzi V, et al. Efficient and stable nitrification and denitrification of ammonium-rich sludge dewatering liquor using an SBR with continuous loading [J]. *Water Research*, 2006, 40(14):2765-2775.
- [10] Carvalho G, Lemos P C, Oehmen, et al. Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure [J]. *Water Research*, 2007,41(19):4383-4396.
- [11] Vargas M, Guisasola A, Artigues A, et al. Comparison of a nitrite-based anaerobic - anoxic EBPR system with propionate or acetate as electron donors [J]. *Process Biochemistry*, 2011,46: 714-720.
- [12] Oehmen A, Lemos P C, Carvalho G, et al. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale [J]. *Water Research*, 2007,41(11):2271-2300.
- [13] 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]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000,66(3):1175-1182.
- [14] Flowers J J, He S, Carvalho G, et al. Ecological Differentiation of *Accumulibacter* in EBPR reactors [J]. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2008,17:31-42.
- [15] Adrian Oehmen, Gilda Carvalho, Filomena Freitas, et al. Assessing the abundance and activity of denitrifying polyphosphate accumulating organisms through molecular and chemical techniques [J]. *Water Science and Technology*, 2010, 61(8):2061-2068.
- [16] Meinhold J, Arnold E, Isaacs S. Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge [J]. *Water Research*, 1999,33:1871-1879.
- [17] Saito T, Brdjanovic D, van Loosdrecht M C M. Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms [J]. *Water Research*, 2004,38:3760-3768.
- [18] Saito T, Takahashi K, Yoshida Y, et al. Unstable nitrite inhibition of phosphate uptake caused by aerobic nitrite denitrification of phosphate accumulating organisms [J]. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2007,16:1-16.
- [19] Yoshida Y, Takahashi K, Saito T, et al. Denitrifying activity of phosphate accumulating organisms induced by nitrite exposure under aerobic conditions [J]. *Water Science and Technology*, 2005,53(6):21-27.
- [20] Sin G, Niville K, Bachis G, et al. Nitrite effect on the phosphorus uptake activity of phosphate accumulating organisms (PAO) in pilot-scale SBR and MBR reactors [J]. *Water SA*, 2008,34(2): 249-260.
- [21] Zhou Y, Pijuan M, Yuan Z. Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2007,98:903-912.
- [22] Kunin V, He S, Warnecke F, et al. A bacterial metapopulation adapts locally to phage predation despite global dispersal [J]. *Genome Res.*, 2008,18:293-297.
- [23] 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]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007,73(18):5865-5874.
- [24] 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]. *Environ. Microbiol.*, 2008,10(10):2692-2703.
- [25] 国家环境保护总局.水和废水监测分析方法 [M]. 3 版.北京:中国环境科学出版社, 2002:252-266.
- [26] 张驰宇,张高红,杨 敏,等.四步法消除 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 中引物二聚体的影响 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004,20(3):387-392.
- [27] Metcalf, Eddy. *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*, 4th ed [M]. New York: McGraw- Hill Higher Education, 2003.
- [28] Martin H G, Ivanova N, Kunin V, et al. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities [J]. *Nature Biotechnol.*, 2006,24(10):1263-1269.

作者简介: 曾 薇(1974-),女,黑龙江省哈尔滨人,教授,博士,主要从事污水生物处理研究,发表论文 70 余篇。