

王 俊,郭明哲,尤俊豪,等.高海拔温度变化对活性污泥中磷去除及相关代谢途径的影响 [J]. 中国环境科学, 2023,43(5):2364~2372

Wang J, Guo M Z, You J H, et al. Effects of temperature changes at high altitude on phosphorus removal and related metabolic pathways in activated sludge [J]. China Environmental Science, 2023,43(5):2364~2372

高海拔温度变化对活性污泥中磷去除及相关代谢途径的影响

王 俊¹,郭明哲¹,尤俊豪¹,宗永臣^{1*},傅椿惠¹,张东艳^{1,2} (1.西藏农牧学院水利土木工程学院,西藏 林芝 860000; 2.华中科技大学,煤燃烧国家重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘要: 基于高原生境下 A^2O 工艺,探讨不同温度条件下厌氧、缺氧和好氧 3 个反应器的除磷性能,讨论了优势聚磷酸盐累积生物(PAOs)和糖原累积生物(GAOs)以及相关代谢途径中基因对温度变化的响应情况.结果表明,在 20℃时磷去除效果最佳(82.99%~88.39%),但低于平原地区同工艺研究下的除磷性能.通过分析优势微生物 PAOs 和 GAOs 群落结构发现,GAOs 不具竞争优势,不随温度的升高而增强,在 10℃时存在污泥膨胀和在 25℃时不利于 PAOs 生长的环境条件下,不动杆菌属(*Acinetobacter*)(PAO)、脱氯单胞菌属(*Dechloromonas*)和氢嗜胞菌属(*Hydrogenophaga*)(反硝化 PAOs)在缺氧反应器中相对丰度较高,对缺氧反应器中的磷去除率的提高具有一定的贡献.此外,研究确定了糖酵解(EMP)是葡萄糖代谢的主要途径.多羟基戊酸盐(PHV)的主要合成途径是 Propionyl-CoA.厌氧和好氧反应器所需 ATP 均主要来源于三羧酸循环(TCA cycle)途径.

关键词: 高原生境; 除磷性能; 优势 PAOs; GAOs; 相关代谢途径

中图分类号: X703.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2023)05-2364-09

Effects of temperature changes at high altitude on phosphorus removal and related metabolic pathways in activated sludge.

WANG Jun¹, GUO Ming-zhe¹, YOU Jun-hao¹, ZONG Yong-chen^{1*}, FU Chun-hui¹, ZHANG Dong-yan^{1,2} (1. Water Conservancy Project & Civil Engineering College, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China; 2. State Key Laboratory of Coal Combustion, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China). *China Environmental Science*, 2023,43(5): 2364~2372

Abstract: The A^2O process in highland habitats was used in this paper to investigate the phosphorus removal performance of anaerobic, anoxic and aerobic reactors under different temperature conditions, including the response of dominant polyphosphate accumulating organisms (PAOs) and glycogen accumulating organisms (GAOs) and related metabolic pathways to temperature changes. The results show that the best phosphorus removal performance (82.99%~88.39%) was achieved at 20℃, but lower than that of the same process in the plains; and GAOs did not have competitive advantage and did not increase with an increase in temperature. The relative abundance of *Acinetobacter* (PAO), *Dechloromonas* and *Hydrogenophaga* (denitrifying PAOs) was higher in the anoxic reactor under the environmental conditions of sludge swelling at 10℃ and unfavorable growth of PAOs at 25℃, which could be attributed to the improvement of phosphorus removal in the anoxic reactor. In addition, glycolysis (EMP) was identified as the main pathway of glucose metabolism. Evidently, the main synthetic pathway of polyhydroxyvalerate (PHV) was Propionyl-CoA; and the ATP required for both anaerobic and aerobic reactors came mainly from the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) pathway.

Key words: plateau habitat; phosphorus removal performance; dominant PAOs; GAOs; related metabolic pathways

中国西藏林芝地区(平均海拔 3000m)具有低气压(67.24kPa)、低氧分压(14.09kPa)^[1]、低水温(1~14℃)^[2]、紫外线辐射强度高(924~1036W/m²)^[3]等独特的环境因素.污水的温度对活性污泥的生物性质、化学性质及物理性质有直接影响,进而影响微生物群落结构及除磷效果.由于独特的高原环境因素,目前该地区城市污水除磷的效果不尽人意^[4-5].在高原环境因素下探究温度变化对除磷效果、磷代谢相关微生物结构及关键基因的影响具有重要意义.

基于厌氧-缺氧-好氧反应器(A^2O)工艺系统进

行脱氮除磷,深入研究磷代谢途径及关键基因在高原环境下受温度变化的影响.除磷的有效途径是通过磷代谢实现的,这一过程是由聚磷酸盐累积生物(PAOs)介导的^[6].值得注意的是,PAOs 对碳源的吸收与反硝化菌相比,竞争力不足.因此,可以说 A^2O 工艺中前置厌氧反应器是专门为 PAOs 厌氧释磷设置的,

收稿日期: 2022-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51868069);煤炭燃烧国家重点实验室基础项目(FSKLCCA2012)

* 责任作者, 教授, zyc_2001@sohu.com

促使聚磷菌能够充分释放磷,从而在后置好氧反应器中有效吸收磷元素,储存为细胞体内的聚磷酸盐^[6],达到提高除磷效率的目的.除了反硝化菌与 PAOs 具有竞争关系外,糖原累积生物(GAOs)也与 PAOs 存在碳源竞争关系^[7],但该竞争关系受温度的影响显著.已有研究报道,温度的变化会迫使 PAOs 参与不同的磷代谢途径^[8],随着温度的降低,PAOs 比 GAOs 更具有竞争力^[9-10],致使 PAOs 含量增加,有利于磷的去除.

不同温度条件下,PAOs 与 GAOs 之间的竞争不仅体现在菌属相对丰度上的宏观变化,也体现在糖酵解途径(EMP)、2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸(ED)途径、磷酸戊糖循环、三羧酸循环(TCA cycle)途径、聚羟基链烷酸盐(PHA)合成和能量流等代谢途径上基因的微观变化.在 Ni 等^[11]的研究报道中,EMP 和 ED 途径被确定是 PAOs 的糖原降解途径,是生物膜序批式反应器(BSBR)糖酵解所需还原力的来源.此外,ED 途径也在少数 GAOs 中被确定,EMP 途径几乎在所有 GAOs 中被确定^[12].

此研究旨在探究除磷性能、优势 PAOs 和 GAOs 对温度变化的响应情况,相关糖原代谢、细胞内储存聚合物和能量代谢相关的途径和基因以及磷代谢机制在厌氧和好氧反应器之间的差异性.研究结果为高原生境下除磷性能提供关于温度控制有价值的信息,从而促进高原新型污水处理除磷系统的开发和应用.

1 材料与方法

1.1 A²O 工艺试验步骤

在西藏林芝高原地区进行中试规模的 A²O 工艺试验研究,探究温度变化对活性污泥生物 PAOs 除磷性能的影响及磷代谢相关微生物群落结构的响应关系.反应器由厌氧反应器(7L)、缺氧反应器(7L)、好氧反应器(17.5L)和沉淀容器构成.厌氧反应器和缺氧反应器配置搅拌装置和温度控制器,转速为 50r/min,好氧反应器底部配置曝气装置和温度控制器.

本研究使用的活性污泥是西藏林芝市农牧学院化粪池污水(平均海拔 3000m)连续曝气培养 45d 得到的.生物量 SV₃₀ 和 MLSS 分别为(22±3)%和 2215~2978mg/L.通过调节温度控制仪(PY-SM5)来

实现4种不同温度水平(10, 15, 20 和 25℃),每种温度水平运行 240h,间隔 72h,并依次按 25, 20, 15 和 10℃ 顺序进行试验,共运行了 1032h.厌氧、缺氧和好氧 3 个反应器的水力停留时间(HRT)分别为 4.67, 4.67 和 11.66h,则整个工艺系统的 HRT 为 21h.好氧反应器的溶解氧(DO)控制为 2.55~3.24mg/L.硝化液回流比为 200%,污泥回流比为 50%,均采用蠕动泵连续回流.污泥龄(SRT)为 10d.进水 pH 值为 8.11~8.61.

1.2 测定和分析方法

1.2.1 常规指标 化学需氧量(COD)浓度采用重铬酸钾法测定,总磷(TP)浓度采用分光光度法测定,DO 和 pH 值采用 HACH 多功能检测仪(HQ40d Field Case Cat NO. 58258-00)检测.MLSS 则按照标准方法测定^[13].

1.2.2 DNA 提取和 16S rRNA 基因测序 将本试验研究中获取的 12 个样本(-80℃环境中)委托给中国上海美吉生物技术有限公司检测(<http://www.majorbio.com>).测序实验首先使用 Fast DNA Spin Kit (Fast DNA Spin Kit for Soil, MP, USA)^[14]抽提样本 DNA,再利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测.然后采用 PCR 仪(ABI GeneAmp® 9700 型)使用引物 338F (5'-ACTCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')在 16S rRNA 基因的可变区(V3-V4)进行 PCR 扩增.将同一样本中的 3 个重复 PCR 扩增产物混合后,使用 2%琼脂糖凝胶电泳检测.参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司)进行检测定量,之后按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合.通过 PCR 将 Illumina 官方接头序列添加至目标区域外端,使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)切胶回收 PCR 产物,再使用 Tris-HCl 缓冲液洗脱和 2%琼脂糖电泳检测.在 NaOH 变性后,可获得单链 DNA 片段,将其片段一端与互补引物碱基固定在芯片上,合成目标待测 DNA 片段,在变性和退火后,形成“bridge”.加入 DNA 聚合酶和 dNTP,用激光扫描反应板表面,读取模板序列聚合上去的核苷酸种类.最后将“荧光基团”和“终止基团”化学切割,恢复 3'端粘性,继续聚合第二个核苷酸,循环往复,统计每一轮获得的模板 DNA 片段序列,则 Illumina MiSeq 测序结束.

1.3 基因表达程度的判定

为了了解相关代谢途径(磷酸戊糖途(M00004)、EMP(M00001)、ED 途径(M00008)、Ethylmalonyl 途径(M00373)、Propanoyl-CoA 代谢(M00741)、PHA 合成途径(包含在 map00630 中)、TCA 循环(M00009)、糖醛酸循环(M00012)和磷代谢(包含在 map00190 中))中参与的所有基因在厌氧和好氧环境中的差异,对参与的所有基因进行了鉴定,并以绝对丰度展示出来,其目的是为了更直观地判别他们的表达程度.本研究没有对基因数据进行统计处理,直接展示了基因的绝对丰度,其目的不仅更直观地了解基因的表度程度,而且清楚地看到厌氧和好氧环境及不同温度之间的细微变化.因本研究展示了相关代谢途径中的所有基因,所以将具有相同功能基因的绝对丰度进行叠加,并视为一个整体基因,判别这一功能下的基因表达水平.因此,基因绝对丰度 0~5000 为低表达水平,5000~40000 为一般表达水平,40000~ ∞ 为高度表达水平.

1.4 数据分析与处理

本研究中的所有数据统计分析均使用 Origin 2021 和 SPSS Statistics 24.为了更直观地分析 3 个反应器的磷去除率,运用 Origin 2021 进行绘图.运用 SPSS Statistics 24 中的 T 检验评估基因表达水平在厌氧和好氧环境下的差异是否具有统计学意义,若 $P < 0.05$,则被认为两组数据间具有显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 不同温度下的除磷性能

如图 1 所示,在 4 个温度条件下,20℃时的磷去除率最好(82.99%~88.39%),且较稳定,其次是 15℃(70.98%~87.32%),10℃(48.36%~65.40%)以及 25℃(43.40%~62.31%).已有研究者在平原地区(平均海拔 140m)探究温度变化(10~24℃)对 A^2O 工艺脱氮除磷性能的影响,结果显示磷去除率为 95%~96.5%^[15],均高于本试验在 20℃时的最佳去除率.此外,本研究除了 25℃,其他温度条件下的磷去除率与 COD 消耗量变化趋势(图 1a)一致,可能是在 25℃时 GAOs 或脱氮细菌对 COD 的消耗增加.

厌氧、缺氧和好氧 3 个反应器对磷的去除率各不相同(图 1c),在 4 个温度条件下,厌氧反应器由于释磷作用,对磷的去除率为负数,对磷去除率最大的是好氧反应器,其次是缺氧反应器.可以发现,厌氧释

放的磷越多,好氧吸收的磷就越多,提高磷的去除率.在 20℃条件下,厌氧释磷和好氧吸磷都是最高的,其次是 15℃.在 10 和 25℃条件下,厌氧释磷和好氧吸磷并不理想,但缺氧反应器的去除率都提高了,可能是缺氧反硝化聚磷增强.上述结果与金羽^[15]在平原地区进行相同工艺和工况下的研究不完全一致,其研究表明在(18±1)℃厌氧释磷和好氧吸磷最佳,其次是(14±1)℃.但缺氧反应器的磷去除率随温度下降(24~10℃)而逐渐降低.

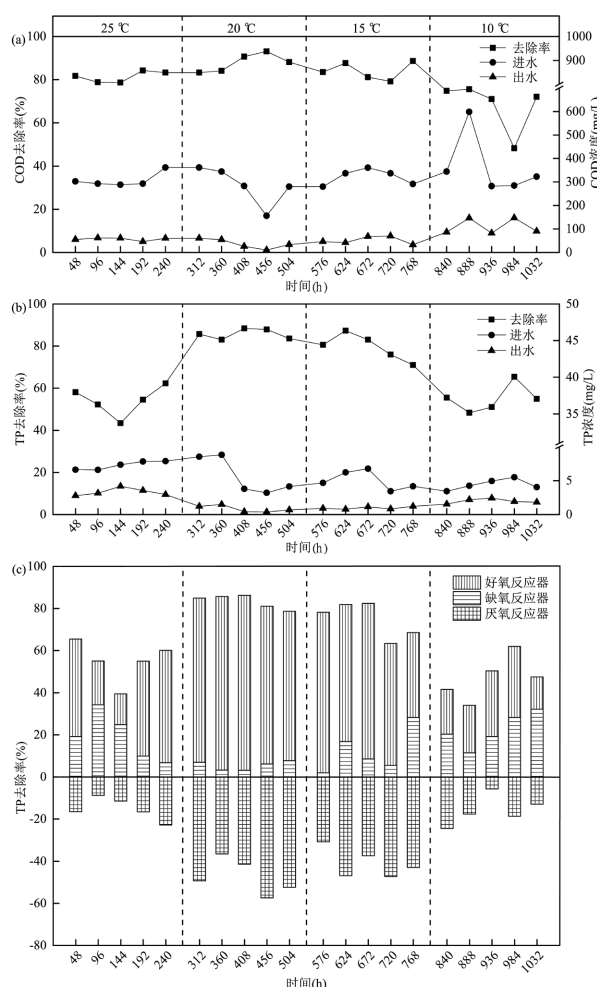


图1 COD和磷在不同温度下的去除率以及厌氧、缺氧和好氧反应器对磷的去除率

Fig.1 COD and phosphorus removal rates at different temperatures and phosphorus removal rates in anaerobic, anoxic and aerobic reactors

2.2 优势菌属 PAOs 与 GAOs

如表 1 所示,优势 PAOs(硫发菌属(*Thiothrix*),不动杆菌(*Acinetobacter*),陶厄氏菌属(*Thauera*),脱氯单胞菌(*Dechloromonas*),氢嗜胞菌属

(*Hydrogenophaga*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、动胶菌(*Zoogloea*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、*Caldilineaceae_norank*、*Saprospiraceae_norank*、*Anaerolineaceae_norank*丰度总和在 10, 15, 20 和 25℃条件下分别为 44.526%, 16.423%, 10.843%和 6.633%。不难发现,PAOs 受温度的影响显著($P<0.05$),相对丰度随温度降低而显著增加,符合温度对 PAOs 的一般影响规律^[11]。而优势 GAOs(*Candidatus_Competibacter*、*Defluviicoccus*、

Propionivibrio)在 4 个温度条件下,相对丰度总和极低(0.078%~0.184%)。由此可以得出,在 4 个温度条件下,PAOs 的竞争优势远大于 GAOs(3 个反应器亦是如此)(表 1)。已有研究表明,高温(>24℃)可以促进 GAOs 的生长并对除磷效果有抑制作用^[9,33],但与本试验研究不太一致,尽管在 25℃,GAOs 丰度并没有增加反而降低了一些,几乎没有竞争力。上述结果表明,在本处理工艺系统中,PAOs 与 GAOs 之间的竞争力非常微弱。

表 1 属水平上优势 PAOs 和 GAOs 在不同温度下不同反应器中的相对丰度(%)
Table 1 Relative abundance of dominant PAOs and GAOs at the genus level in different reactors at different temperatures(%)

优势菌属	厌氧反应器				缺氧反应器				好氧反应器			
	10℃	15℃	20℃	25℃	10℃	15℃	20℃	25℃	10℃	15℃	20℃	25℃
硫发菌属(<i>Thiothrix</i>) ^[16-18]	37.78	10.78	0.71	0.03	41.50	8.29	0.61	0.07	17.94	3.95	0.13	0.03
不动杆菌属(<i>Acinetobacter</i>) ^[19-20]	5.49	1.86	0.78	3.69	4.66	1.24	1.65	2.82	6.33	1.06	0.66	1.60
陶厄氏菌属(<i>Thauera</i>) ^[21]	1.36	0.056	0.028	0.046	1.25	0.022	0.02	0.023	1.46	0.007	0.04	0.037
脱氯单胞菌(<i>Dechloromonas</i>) ^[22]	0.68	6.06	1.97	1.50	0.67	2.23	0.75	0.67	0.49	1.02	0.35	0.70
氢嗜胞菌属(<i>Hydrogenophaga</i>) ^[23]	2.40	4.39	15.67	2.71	2.42	1.65	3.44	0.84	1.81	0.41	1.04	0.55
黄杆菌属(<i>Flavobacterium</i>) ^[24]	0.48	0.04	0.02	0.22	0.39	0.03	0.02	0.21	0.56	0.06	0.006	0.20
动胶菌(<i>Zoogloea</i>) ^[25]	0.041	0.26	0.18	0.16	0.05	0.06	0.03	0.10	0.017	0.012	0.009	0.11
盐单胞菌属(<i>Halomonas</i>) ^[25]	0.53	0.54	0.28	0.09	0.49	0.49	0.29	0.08	0.74	0.48	0.21	0.06
假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>) ^[26]	0.18	0.016	0.0025	0.0054	0.196	0.015	0.0072	0.0056	0.078	0.014	0	0.0049
<i>Caldilineaceae_norank</i> ^[11]	0.103	0.62	1.11	0.58	0.088	1.18	1.15	1.48	0.18	1.417	2.08	0.96
<i>Saprospiraceae_norank</i> ^[27-28]	0.26	0.063	0.084	0.092	0.20	0.086	0.079	0.098	0.56	0.29	0.24	0.10
<i>Anaerolineaceae_norank</i> ^[29]	0.34	0.036	0.11	0.097	0.12	0.04	0.043	0.073	0.56	0.023	0.05	0.056
<i>Candidatus_Competibacter</i> ^[30]	0.019	0.038	0.033	0.016	0.0063	0.088	0.014	0.0056	0.0315	0.0047	0.0064	0.0049
GAOs <i>Defluviicoccus</i> ^[31]	0	0.0426	0.0431	0.0297	0	0.051	0.122	0.076	0.0024	0.106	0.126	0.076
<i>Propionivibrio</i> ^[32]	0.072	0.103	0.051	0.046	0.057	0.071	0.022	0.020	0.049	0.049	0.021	0.017
优势菌属总和	10℃				15℃				20℃			
PAOs	44.526				16.423				10.843			
GAOs	0.078				0.184				0.147			

在本研究中,*Thiothrix* 是一种关键 PAO,该菌属利用混合营养代谢达到除磷的目的^[17]。不难发现 *Thiothrix* 在 25, 20 和 15℃条件下的相对丰度变化符合一般 PAOs 随温度变化的规律,但在 10℃条件下的相对丰度显著增加(厌氧、缺氧和好氧反应器中分别为 37.78%, 41.50%和 17.94%),显著高于 He 等^[34]专门研究污泥膨胀时 *Thiothrix* 的丰度(10.001%)。很显然在此温度条件下由 *Thiothrix* 引起了污泥膨胀,导致磷去除率的降低。在以前的研究中,氮、磷和易生物降解 COD(rbcOD)的比例不平衡^[35]以及低温(<14℃)^[36]有利于 *Thiothrix* 物种的过度生长。但此前也已有研究表明,*Microthrix parvicella* 是 Wang 等^[37]

研究污泥膨胀时的优势丝状菌。*Microthrix parvicella* 可以在没有 *Candidatus Accumulibacter* 的情况下充当 PAO,所以除磷性能不受污泥膨胀的影响。他们的研究与本试验研究相似,不存在 *Candidatus Accumulibacter* 的环境下,*Thiothrix* 既是优势丝状菌又是 PAO。

Acinetobacter、*Thauera*、*Flavobacterium*、*Pseudomonas*、*Saprospiraceae_norank*、*Anaerolineaceae_norank* 在 10℃条件下相对丰度不降低反而上升,且达到最高值。表明这些优势 PAOs 不受污泥膨胀的影响或影响较小。污泥膨胀会导致其他生物量的严重损失,降低 COD 的去除率^[35]。但他们的相对丰度与

磷和 COD 的去除率不一致,呈负相关(表 1 和图 1a、b).而 *Dechloromonas*、*Hydrogenophaga*、*Zoogloea*、*Caldilineaceae_norank* 的相对丰度与磷和 COD 的去除率相一致,呈正相关(表 1 和图 1a、b),表明是本研究主要的 PAOs.关于 *Acinetobacter* 的研究则只是 PAO,功能单一^[38],其丰度变化与缺氧反应器磷去除率相一致,呈正相关(表 1 和图 1c),表明在 10 和 25℃ 时对缺氧反应器中的磷去除率的提高起到一定的作用.此外,*Dechloromonas* 和 *Hydrogenophaga* 是另外 2 种关键 PAOs.目前已有许多研究指明 *Dechloromonas* 属中既有 PAOs 又有 GAOs^[22,39-40],并且还具有反硝化作用^[41-42],被称为反硝化 PAO.关于 *Hydrogenophaga* 的研究表明也是一种反硝化 PAO^[43].在 10℃ 时污泥膨胀和 25℃ 时不利于 PAOs 生长的环境条件下,*Dechloromonas* 和 *Hydrogenophaga* 反硝化 PAOs 在缺氧反应器中相对丰度较高,与缺氧反应器中磷去除率趋势相一致,表明也对缺氧反应器中磷去除率的提高起到一定的作用.

2.3 相关代谢途径

本研究中缺氧反应器对磷的去除效率较差,而厌氧反应器释磷和好氧反应器吸磷是提高除磷效率的关键.厌氧反应器能够充分释磷的前提是 PAOs 所需的碳源足够多,利用细胞内聚磷酸盐的水解和 EMP 产生的能量用来吸收挥发性脂肪酸(VFAs)并积累储存细胞内聚合物 PHA.好氧反应器吸磷是利用氧化储存的 PHA 来产生能量,用于合成聚磷酸盐和糖原^[44].然而,竞争性 GAOs 与 PAOs 具有相似的代谢途径^[45],通过降解糖原促进厌氧碳吸收并以 PHA 的形式储存,随后在有氧阶段消耗 PHA 为糖原合成和生长提供能量^[46-47],但不促进磷的去除.因此,应注重讨论厌氧反应器和好氧反应器在聚磷酸盐合成与水解、糖原合成与降解以及 PHA 合成等方面相关代谢途径之间的差异性.

2.3.1 EMP、ED 和磷酸戊糖途径 糖原可以通过两个代谢过程为摄取乙酸盐提供能量支持,即:糖原先被分解为葡萄糖,再被完全氧化分解^[12].但截止目前为止,存在争议的是 GAOs 是否通过 EMP 或 ED 两个代谢途径利用葡萄糖进行生命活动^[12].本研究结果确定了在 EMP 和 ED 代谢途径中的相关基因,从基因绝对丰度判断是否为高度表达.在 EMP 途径的相关基因中(图 2b),关键基因 *glk* 不仅在好氧反应

器与厌氧反应器之间差异显著,而且受温度变化影响也显著($P < 0.05$).值得注意的是,在好氧反应器中,EMP 途径中除了参与 Fructose-6P 转化为 Fructose-1,6P2 的 *pfkA*、*pfkB* 和 *pfkC* 3 个基因外,各阶段相关基因丰度之和均在 20℃ 最高,且高度表达(>40000).在厌氧反应器中,*pfkA*、*pfkB* 和 *pfkC*,以及 *PK* 4 个基因丰度在 10℃ 最高,其他基因丰度之和均在 15℃ 最高,高度表达(>40000).另外参与 Glycerate-3P 转化为 Glycerate-2P 过程的基因 *gpmB*、*PGAM*、*gpmI* 和 *apgM* 平均绝对丰度(83905)在 EMP 途径中最高,表明在葡萄糖代谢途径中高度表达.

ED 途径(图 2c)和磷酸戊糖途径(图 2a)中的完整代谢通路存在于本处理工艺中,参与 ED 途径(图 2c)的相关基因(*eda*、*edd*、*PGLS*、*pgl*、*azf*、*G6PD*)均是一般表达(<40000),其中 *eda* 是 ED 途径中的关键基因.参与磷酸戊糖途径(图 2a)的相关基因(*E2.2.1.1*、*E2.2.1.2*、*rpe*、*rpiB*、*rpiA*、*PGD*、*PGLS*、*pgl*、*azf*、*G6PD*)中,*E2.2.1.1* 和 *rpe* 是该途径中的关键基因,高度活跃(>40000),但其他基因均一般表达(<40000).此外,在好氧反应器中,各阶段对应的基因丰度之和均在 20℃ 最高,表达最佳.在 ED 途径(图 2c)和磷酸戊糖途径(图 2a)中大部分基因绝对丰度低于 EMP 途径中的基因,表明 EMP 途径是葡萄糖代谢的主要途径.综上所述,在本研究中 EMP 途径是葡萄糖代谢的主要途径,其次是磷酸戊糖途径和 ED 途径,并且在 EMP 途径中,基因最佳表达温度主要是 20℃ 和 15℃.这结果与 COD 去除率的趋势相一致,表明 PAOs 通过 EMP 途径利用葡萄糖促进厌氧碳吸收.

2.3.2 PHA 合成途径 PHA 包括聚 β -羟基丁酸盐(PHB)和聚羟基戊酸盐(PHV),PHA 在厌氧环境下合成,在有氧环境下被消耗用于提供糖原合成所需的能量^[12].已有研究表明,PHB 是 PHA 合成的主要产品之一^[48].图 2 展示了合成 PHB(图 2e)和 PHV(图 2d)的代谢途径,其中 PHV 的合成包含两种途径,一种途径依次通过基因 *croR*、*ccr*、*ecm*、*mcd*、*mch*、*mcl* 将 3-Hydroxybutanoyl-CoA 转化为 Propionyl-CoA,即:Ethylmalonyl 途径.则另一种途径是通过基因 (*MUT/mcmA1/mcmA2* 和 *PCCB/PCCA/bccA/accD6/pccB*)将 TCA 循环中的中间产物 Succinyl-CoA 转化为 Propionyl-CoA,即:Propionyl coenzyme A (CoA)途径.关于 PHB 的合成途径与 PHV 不同,它通过基因

phaC 将 3-Hydroxybutanoyl-CoA 转化为 Poly- β -hydroxybutyrate.但上述 PHA 合成途径与 Yang 等^[49]

的研究不同,他研究表明底物很容易通过 EMP 途径和 ED 途径分别转化为 PHV 和 PHB.

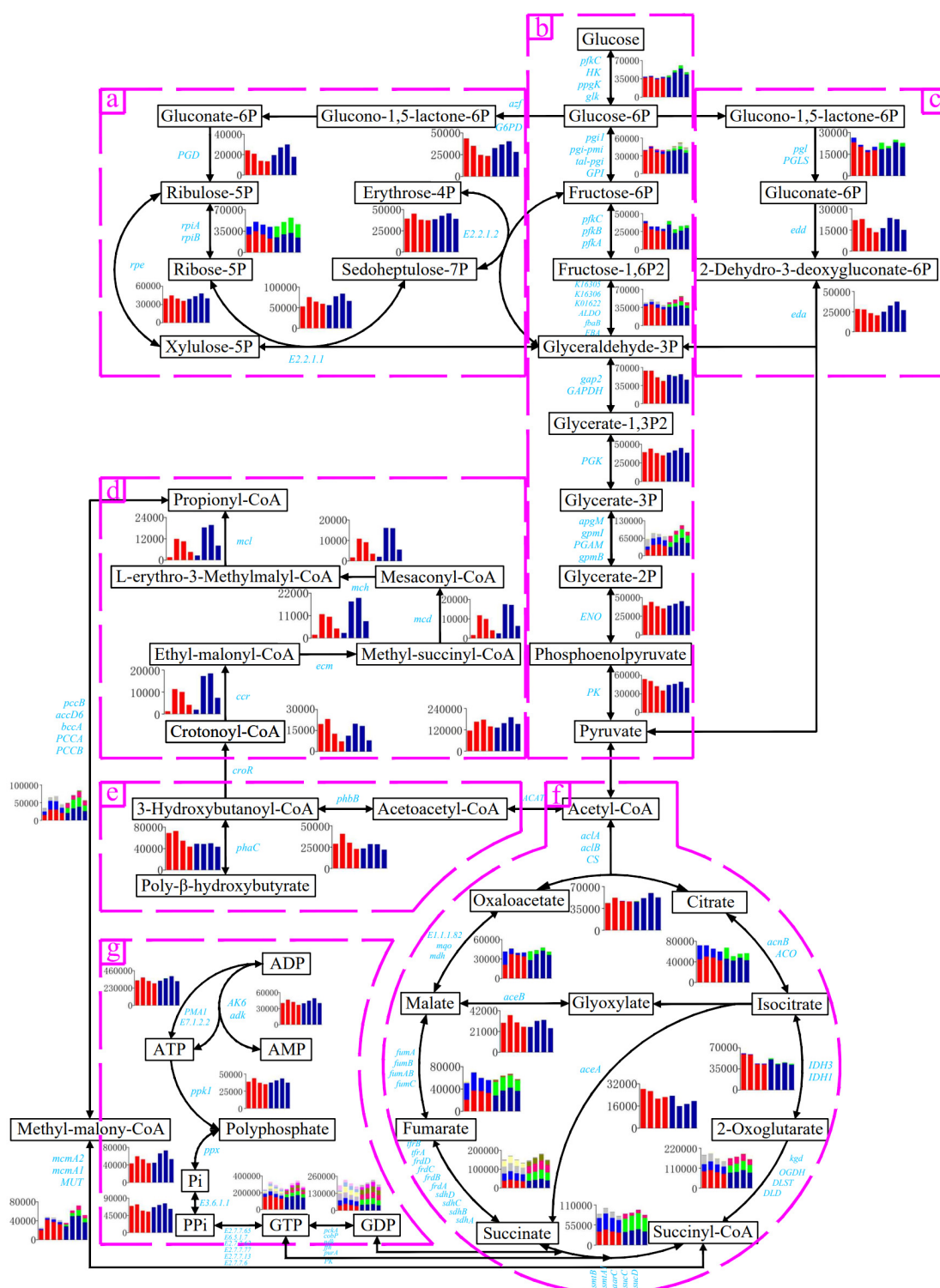


图2 与 PAOs 和 GAOs 相关的代谢途径及基因表达

Fig.2 Metabolic pathways and gene expression associated with PAOs and GAOs

堆积柱状图的横轴依次为厌氧反应器 10, 15, 20, 25℃和 好氧反应器 10, 15, 20, 25℃条件下的样本点.纵轴表示为基因和酶的绝对丰度.堆积柱状图中左右两边不同颜色只为区分厌氧反应和好氧反应器,颜色叠加表示基因和酶的绝对丰度叠加.该代谢模型由 PICRUSt2 功能预测结合 KEGG 数据库构建. a: 磷酸戊糖途径(M00004). b: 糖酵解途径(EMP 途径)(M00001). c:Entner-Doudoroff(ED)途径(M00008). d: Ethylmalonyl 途径(M00373)和 Propanoyl-CoA 代谢(M00741). e: PHB 合成途径(包含在 map00630 中). f: TCA 循环(M00009)和糖醛酸循环(M00012). g: 磷代谢(包含在 map00190 中)

在 Ethylmalonyl 途径中, *ccr*、*ecm*、*mcd*、*mch*、*mcl* 受温度影响显著($P < 0.05$), 在厌氧反应器和好氧反应器中丰度均在 10℃ 最低, 其次 25℃, 且低度表达 (< 5000), 但在 15 和 20℃ 时, 各基因丰度显著增加, 且好氧反应器高于厌氧反应器, 表明此温度激活了 Ethylmalonyl 途径中各基因的表达, 但仍不是高度表达 (< 40000) (图 2d). 而在 Propionyl-CoA 途径中, 基因丰度显著高于 Ethylmalonyl 途径中的基因, 则可以认定 PHV 的主要合成途径是 Propionyl-CoA 途径, 且在好氧反应器中的基因最佳表达温度为 20℃, 与吸磷效率最佳一致. 在 PHB 合成途径中, 仅 *ACAT* 表现出稳定性 ($P > 0.05$), 且高度表达 (> 40000), *phaC* 在厌氧和好氧反应器中均高度表达 (> 40000), 在好氧反应器中几乎不受温度的影响, 但在厌氧反应器中受温度影响显著, 且高于好氧反应器 (图 2e), 表明 *phaC* 在 PHB 合成途径中发挥关键作用^[50].

2.3.3 TCA 循环和糖醛酸循环途径 TCA 循环途径和糖醛酸循环途径可以提供生命活动所需的 ATP 和还原力 (图 2f). 在以前的研究中, TCA 循环途径可以提供 NADH 和 ATP 来支持 GAOs 中的 PHA 的合成、葡萄糖代谢和乙酸盐的运输^[51-52]. 还有研究表明糖醛酸循环途径和 TCA 循环途径两个途径的表达能力在完全 GAOs 系统中在有氧和厌氧环境下有所不同. 若在好氧环境中, TCA 循环途径提供主要的 ATP 和还原力^[53], 若在厌氧环境下, 糖醛酸循环途径是 ATP 的主要来源^[12].

本研究发现, 参与糖醛酸循环途径的关键基因 *aceA* 和 *aceB* 一般表达 (< 40000), 且厌氧反应器和好氧反应器并无显著差异 ($P > 0.05$), 表明在厌氧和好氧环境下, 糖醛酸循环途径是 ATP 的次要来源. 而在整个 TCA 循环途径中 (图 2f), 参与各阶段物质转化的基因丰度之和均高于 40000, 高度表达. 特别是参与 2-Oxoglutarate $\rightarrow$ Succinyl-CoA $\leftrightarrow$ Succinate $\leftrightarrow$ Fumarate 转化的基因 (*DLD*、*DLST*、*OGDH*、*kgd*、*sucD*、*sucC*、*aarC*、*smtA1*、*smtB*、*sdhA*、*sdhB*、*sdhC*、*sdhD*、*frdA*、*frdB*、*frdC*、*frdD*、*tfrA*、*tfrB*) 丰度之和显著高于该循环途径中的其他阶段物质转化的基因丰度之和 (> 40000), 表明上述基因在 TCA 循环途径中高度活跃. 并且在 TCA 循环途径中, 厌氧反应器和好氧反应器也无显著差异 ($P > 0.05$), 表明整个 TCA 循环途径均在厌氧和好氧环境下提供

主要的 ATP. 值得注意的是, *sdhA*、*sdhB*、*sdhC*、*sdhD*、*frdA*、*frdB*、*frdC*、*frdD*、*tfrA*、*tfrB* 的高度表达可能是受到糖醛酸循环途径的影响. 此外, *sucD*、*sucC*、*aarC*、*smtA1*、*smtB* 也高度表达, 可能除了受到糖醛酸循环途径的影响外, 还受到磷代谢的影响. 上述结果与完全 GAOs 系统中的 ATP 的来源途径不同^[12], 导致这一结果的原因可能是本试验处理系统环境不同, 属于不完全 GAOs 系统. 在 GAOs 与 PAOs 共存且竞争的环境下, 影响糖醛酸循环途径和 TCA 循环途径在厌氧或好氧环境下提供 ATP 和还原力.

2.3.4 磷代谢途径 磷代谢途径 (图 2g) 影响了 TCA 循环途径 (图 2f), 因为 ATP/GTP 和 ADP/GDP 可以作为 Succinate 和 Succinyl-CoA 相互转化的底物或产物. 本研究图 2g 展示了 ATP、ADP、AMP、polyphosphate、GTP 和 GDP 相互转化所参与的基因. 由于 GTP 和 GDP 相互转化所需的基因 (*PK*、*purA*、*ffh*、*ndk*、*cobP*、*pckA*) 以及 PPi 合成 GTP 所需的酶 (E2.7.7.6、E2.7.7.13、E2.7.7.77、E2.7.7.62、E6.5.1.7、E2.7.7.65) 种类较多, 只展示了丰度排名前 6 的基因. ATP 与 ADP 之间通过 E7.1.2.2 和 *PM1* 相互转化, 但主要是酶 E7.1.2.2 的高度表达 (> 40000), *PM1* 表达极低 (< 600). 此外, ATP 和 AMP 可以作为底物生成 ADP, 通过基因 *adk* 和 *AK6* 表达, 但主要是 *adk* 的高度表达 (> 40000).

目前关于磷代谢相关基因的研究最多的是 *ppx*、*ppk1* 和 *ppk2*^[54]. *ppx* 可以将聚磷酸盐水解生成 Pi. *ppk1* 只能以 ATP 的末端磷酸为底物合成聚磷酸盐. 关于 *ppk2* 的功能比较齐全, 可以使用无机聚磷酸盐作为供体, 将 GDP 转化为 GTP. 另外还可以使用 GTP 合成聚磷酸盐, 但在这个催化路径中, 该基因的活性极低. 研究结果发现, 关于 *ppx* 和 *ppk1* 的活性在本处理工艺系统中较高, 高度表达 (> 40000) (图 2g), 与 PHA 的合成基因表达趋势一致 (图 2d、e), 并且在厌氧反应器和好氧反应器中并无显著差异 ($p > 0.05$). 关于 *ppk2* 很遗憾, 本试验研究并没有发现 *ppk2* 的踪迹, 但发现了其他具有与 *ppk2* 相同功能的基因间接参与 GTP 的合成.

3 结论

3.1 厌氧、缺氧和好氧 3 个反应器对磷的去除率各不相同, 在 20℃ 条件下的除磷效率最高 (82.99%~

88.39%),在 25℃ 条件下的除磷效率最差(43.40%~62.31%),低于平原地区同工艺研究下的除磷性能。

3.2 优势 PAOs 受温度的影响显著,但 GAOs 不受温度的影响,PAOs 竞争力显著强于 GAOs. *Acinetobacter* (PAO)、*Dechloromonas* 和 *Hydrogenophaga* (反硝化 PAOs)在 10℃ 时存在污泥膨胀和 25℃ 时不利于 PAOs 生长的环境条件下丰度相对较高,对缺氧反应器中的磷去除率的提高具有一定的贡献。

3.3 EMP 途径是葡萄糖代谢的主要途径,其次是磷酸戊糖途径和 ED 途径.确定 PHV 的主要合成途径是 Propionyl-CoA,其次是 Ethylmalonyl.此外,15 和 20℃ 条件可以显著增强 Ethylmalonyl 途径中 *ccr*、*ecm*、*mcd*、*mch* 和 *mcl* 的表达.TCA 循环途径是厌氧和好氧环境下所需 ATP 的主要来源,而糖醛酸循环途径是 ATP 的次要来源。

参考文献:

- [1] Zong Y C, Hao K Y, Li Y W, et al. Nitrogen and phosphorous removal of pilot-scale anaerobic-anoxic-aerobic process under plateau environmental factors [J]. Applied Ecology and Environmental Research, 2019,17(5):12213-12226.
- [2] Zong Y, Li Y, Hao K, et al. Influence of transient change of water temperature on pilot-scale anaerobic-anoxic-oxic process under plateau environmental factors [J]. Applied Ecology and Environmental Research, 2019,17(5):12191-12202.
- [3] 陈相宇,郝凯越,张 宁,等.林芝市太阳辐射强度的分析 [J]. 低碳世界, 2020,10(9):195-196.
Chen X Y, Hao K Y, Zhang N, et al. Analysis of solar radiation intensity in Linzhi City [J]. Low Carbon World, 2020,10(9):195-196.
- [4] Zong Y, Hao K, Lu G, et al. Characteristics of the colony structure of A²O processes under different ultraviolet conditions in plateau areas [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022,29(45):67941-67952.
- [5] 郝凯越,李远威,宗永臣,等.高原生境下 A²O 工艺对污水处理的微生物机制 [J]. 中国环境科学, 2021,41(5):2240-2251.
Hao K Y, Li Y W, Zong Y C, et al. Microbial mechanism of A²O process for wastewater treatment in plateau habitat [J]. China Environmental Science, 2021,41(5):2240-2251.
- [6] Chen L, Chen H, Hu Z, et al. Carbon uptake bioenergetics of PAOs and GAOs in full-scale enhanced biological phosphorus removal systems [J]. Water Research, 2022,216(3):118258.
- [7] 潘 婷,张 淼,范亚骏,等.基于碳源优化的反硝化除磷及微生物特性 [J]. 中国环境科学, 2020,40(7):2901-2908.
Pan T, Zhang M, Fan Y J, et al. Denitrifying phosphorus removal and microbial characteristics based on the optimization of carbon sources [J]. China Environmental Science, 2020,40(7):2901-2908.
- [8] Erdal U G, Erdal Z K, Randall C W. The competition between PAOs (phosphorus accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) in EBPR (enhanced biological phosphorus removal) systems at different temperatures and the effects on system performance [J]. Water Science and Technology, 2003,47(11):1-8.
- [9] 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"* [J]. Water Research, 2014,64:102-112.
- [10] Lopez-Vazquez C M, Oehmen A, Hooijmans C M, et al. Modeling the PAO-GAO competition: effects of carbon source, pH and temperature [J]. Water Research, 2009,43(2):450-462.
- [11] Ni M, Pan Y, Chen Y, et al. Effects of seasonal temperature variations on phosphorus removal, recovery, and key metabolic pathways in the suspended biofilm [J]. Biochemical Engineering Journal, 2021,176:108187.
- [12] Zhao B, Yang Y, Zhao C, et al. Exploration of the metabolic flexibility of glycogen accumulating organisms through metatranscriptome analysis and metabolic characterization [J]. Journal of Environmental Sciences, 2023,126:234-248.
- [13] Rice E W, Baird R B, Eaton A D. Standard methods for the examination of water and wastewater [M]. Washington: American public health association, 2012.
- [14] Guan R, Yuan H, Wachemo A C, et al. Effect of narrow feeding regimes on anaerobic digestion performance and microbial community structure of rice straw in continuously stirred tank reactors [J]. Energy & Fuels, 2018,32(11):11587-11594.
- [15] 金 羽.温度对 A²/O 系统的影响特征及脱氮除磷强化技术研究 [D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2013.
Jin Y. Effect of temperature on the performance of an A²/O process and enhancement of nitrogen and phosphorus removal [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2013.
- [16] Rey-Martínez N, Badia-Fabregat M, Guisasaola A, et al. Glutamate as sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal [J]. Science of the Total Environment, 2019,657:1398-1408.
- [17] Rubio-Rincón F J, Welles L, Lopez-Vazquez C M, et al. Long-term effects of sulphide on the enhanced biological removal of phosphorus: the symbiotic role of *Thiothrix caldifontis* [J]. Water Research, 2017,116:53-64.
- [18] Tian Y, Chen H, Chen L, et al. Glycine adversely affects enhanced biological phosphorus removal [J]. Water Research, 2022,209:117894.
- [19] Kim H, Pagilla K R. Competitive growth of *Nocardia* and *Acinetobacter* under anaerobic/aerobic batch operation [J]. Water Research, 2000,34(10):2667-2674.
- [20] Li H, Zhong Y, Huang H, et al. Simultaneous nitrogen and phosphorus removal by interactions between phosphate accumulating organisms (PAOs) and denitrifying phosphate accumulating organisms (DPAOs) in a sequencing batch reactor [J]. Science of the Total Environment, 2020,744:140852.
- [21] Zhao Y G, Guo X, She Z, et al. Nitrogen and phosphorus removal enhanced by side stream system and functional microbial communities in an anaerobic/anoxic/oxic process [J]. Environmental Engineering Science, 2017,34(8):599-606.
- [22] Petriglieri F, Singleton C, Peces M, et al. "*Candidatus Dechloromonas phosphoritropha*" and "*Ca. D. phosphorivorans*", novel polyphosphate accumulating organisms abundant in wastewater treatment systems [J]. The ISME journal, 2021,15(12):3605-3614.
- [23] Zhao Z M, Zhang X, Wang Z F, et al. Enhancing the pollutant removal performance and biological mechanisms by adding ferrous ions into aquaculture wastewater in constructed wetland [J]. Bioresource Technology, 2019,293:122003.
- [24] Azad S A, Chin F S, Lal M T B M. Efficacy of purple non sulphur bacterium *Rhodobacter sphaeroides* strain UMSFW1 in the utilization of palm oil mill effluent [J]. Journal of Geoscience and Environment Protection, 2019,7(10):1-12.
- [25] Liu M, Yao B, Cong S, et al. Optimization of wastewater phosphorus

- removal in winter temperatures using an anaerobic–critical aerobic strategy in a pilot-scale sequencing batch reactor [J]. *Water*, 2019, 12(1):110.
- [26] Wang D, Li X, Yang Q, et al. Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process [J]. *Bioresource Technology*, 2008,99(13):5466–5473.
- [27] Ahn Y, Choi J. Bacterial communities and antibiotic resistance communities in a full-scale hospital wastewater treatment plant by high-throughput pyrosequencing [J]. *Water*, 2016,8(12):580.
- [28] Zhu K Z, Xu X H. Study on the start-up of modified UCT-A/MBR process [J]. *Environmental Science & Technology (China)*, 2019,42(8):189–208.
- [29] Zhang C, Xu X, Zhao K, et al. Novel MBR-based main stream biological nutrient removal process: high performance and microbial community [J]. *Biodegradation*, 2018,29(1):11–22.
- [30] McIlroy S J, Albertsen M, Andresen E K, et al. ‘Candidatus Competibacter’-lineage genomes retrieved from metagenomes reveal functional metabolic diversity [J]. *The ISME journal*, 2014,8(3):613–624.
- [31] McIlroy S J, Nittami T, Seviour E M, et al. Filamentous members of cluster III Defluviicoccus have the in situ phenotype expected of a glycogen-accumulating organism in activated sludge [J]. *FEMS microbiology ecology*, 2010,74(1):248–256.
- [32] Albertsen M, McIlroy S J, Stokholm-Bjerregaard M, et al. “Candidatus Propionivibrio aalborgensis”: a novel glycogen accumulating organism abundant in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016,7:1033.
- [33] Winkler M K H, Bassin J P, Kleerebezem R, et al. Selective sludge removal in a segregated aerobic granular biomass system as a strategy to control PAO–GAO competition at high temperatures [J]. *Water Research*, 2011,45(11):3291–3299.
- [34] He Q, Zhang J, Gao S, et al. A comprehensive comparison between non-bulking and bulking aerobic granular sludge in microbial communities [J]. *Bioresource Technology*, 2019,294:122151.
- [35] Henriot O, Meunier C, Henry P, et al. Filamentous bulking caused by *Thiothrix* species is efficiently controlled in full-scale wastewater treatment plants by implementing a sludge densification strategy [J]. *Scientific Reports*, 2017,7(1):1–10.
- [36] 高春娣,张 娜,韩 徽,等. 低温下丝状菌膨胀污泥的微生物多样性 [J]. *环境科学*, 2020,41(7):3373–3383.
- Gao C D, Zhang N, Han H, et al. Microbial diversity of filamentous sludge bulking at low temperature [J]. *China Environmental Science*, 2020,41(7):3373–3383.
- [37] Wang J, Qi R, Liu M, et al. The potential role of ‘Candidatus *Microthrix parvicella*’ in phosphorus removal during sludge bulking in two full-scale enhanced biological phosphorus removal plants [J]. *Water Science and Technology*, 2014,70(2):367–375.
- [38] Merzouki M, Delgenes J P, Bernet N, et al. Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic–anoxic and anaerobic–aerobic sequencing batch reactors [J]. *Current Microbiology*, 1999,38(1):9–17.
- [39] Qiu G, Law Y, Zuniga-Montanez R, et al. Global warming readiness: Feasibility of enhanced biological phosphorus removal at 35°C [J]. *Water Research*, 2022,216:118301.
- [40] Ahn J, Schroeder S, Beer M, et al. Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007,73(7):2257–2270.
- [41] McIlroy S J, Starnawska A, Starnawski P, et al. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems [J]. *Environmental Microbiology*, 2016,18(1):50–64.
- [42] 范亚骏,张 森,季俊杰,等. A²/O–BCO 系统中碳源类型对反硝化除磷及菌群结构的影响 [J]. *中国环境科学*, 2022,42(1):172–182.
- Fan Y J, Zhang M, Ji J J, et al. Effect of carbon source types on denitrifying phosphorus removal and microbial community in the A²/O–BCO process [J]. *China Environmental Science*, 2022,42(1):172–182.
- [43] Gan H M, Shahir S, Ibrahim Z, et al. Biodegradation of 4-aminobenzenesulfonate by *Ralstonia* sp. PBA and *Hydrogenophaga* sp. PBC isolated from textile wastewater treatment plant [J]. *Chemosphere*, 2011,82(4):507–513.
- [44] Meng Q, Zeng W, Wang B, et al. New insights in the competition of polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms under glycogen accumulating metabolism with trace Poly-P using flow cytometry [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020,385:123915.
- [45] 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.
- [46] Mino T, Van Loosdrecht M C M, Heijnen J J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process [J]. *Water Research*, 1998,32(11):3193–3207.
- [47] Smolders G J F, Van der Meij J, Van Loosdrecht M C M, et al. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994,43(6):461–470.
- [48] Zhang M, Wang Y, Fan Y, et al. Bioaugmentation of low C/N ratio wastewater: Effect of acetate and propionate on nutrient removal, substrate transformation, and microbial community behavior [J]. *Bioresource Technology*, 2020,306:122465.
- [49] Yang C C, Lu M S, Dao K C, et al. Comparison of the influences of cadmium toxicity to phosphate removal in activated sludge separately fed by glucose and acetic acid as carbon sources [J]. *Water*, 2020, 12(4):1205.
- [50] Koch M, Doello S, Gutekunst K, et al. PHB is produced from glycogen turn-over during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019,20(8):1942.
- [51] Wang Y, Cai J, Lan J, et al. Biosynthesis of poly (hydroxybutyrate–hydroxyvalerate) from the acclimated activated sludge and microbial characterization in this process [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 148:61–69.
- [52] Zhou Y, Pijuan M, Oehmen A, et al. The source of reducing power in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs)—a mini-review [J]. *Water Science and Technology*, 2010,61(7):1653–1662.
- [53] Oehmen A, Carvalho G, Lopez-Vazquez C M, et al. Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms [J]. *Water Research*, 2010,44(17):4992–5004.
- [54] Mao Y, Yu K, Xia Y, et al. Genome reconstruction and gene expression of “Candidatus *Accumulibacter phosphatis*” Clade IB performing biological phosphorus removal [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014,48(17):10363–10371.

作者简介: 王 俊(1998–),男,安徽合肥人,西藏农牧学院硕士研究生,主要从事城市污水处理研究.发表论文 10 余篇.wj_3nlzxx@163.com.