

基于不同基质的强化生物除磷系统中 生化反应机理研究进展*

张 胜^{1,2} 竺建荣^{1#} 刘鸿亮¹

(1. 北京师范大学环境学院, 北京 100875; 2. 大同市环境保护局, 山西 大同 037006)

摘要 阐述了3种不同基质(乙酸盐、丙酸盐和葡萄糖)在强化生物除磷系统中的生化模型反应机理。重点介绍了聚磷菌(PAOs)、聚糖菌(GAOs)和产乳酸菌在厌氧/好氧条件下对能量及还原力(NADH_2)的利用方式;聚-羟基链烷酸盐(PHA)的合成方式及存在形式,糖原、乳酸(L型)的代谢途径等。虽然控制基质条件可以实现稳定的强化生物除磷效果,但目前的生化模型并不能完全解释所有的代谢过程,今后要在分离纯种的PAOs及相关生化代谢过程中酶的活动等方面进行深入研究。

关键词 强化生物除磷 聚磷菌 聚糖菌 产乳酸菌 生化模型

Research progress in biochemical reaction mechanism for enhanced biological phosphorus removal using different carbon sources Zhang Sheng^{1,2}, Zhu Jianrong¹, Liu Hongliang¹. (1. School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875; 2. Datong Environmental Protection Bureau, Datong Shanxi 037006)

Abstract: The mechanisms of biochemical reactions involved in the enhanced biological phosphorus removal (EBPR), using three different substrates (acetate, propionate and glucose) as the carbon source, were presented focusing on: the energy and reducing power of phosphate accumulating organisms (PAOs), glycogen accumulating organisms (GAOs) and lactic acid producing organisms (LPOs) under anaerobic and aerobic conditions, formation and composition of PHA, metabolic pathways of glycogen and lactic acid (L-type). Although stable and good EBPR performance may result by proper control of the substrate conditions, the present metabolism models can not represent all biochemical processes equally as well. Further research in pure culture of PAOs and relative activity of enzyme in the biochemical metabolism were recommended.

Keywords: Enhanced biological phosphorus removal Phosphate accumulating organisms Glycogen accumulating organisms Lactic acid producing organisms Biochemical model

强化生物除磷(EBPR)工艺是在厌氧/好氧(缺氧)的运行方式下,聚磷菌(PAOs)在厌氧阶段释放磷,在好氧(缺氧)条件下超量吸收磷,通过系统排泥而达到除磷的目的。EBPR是废水除磷过程中普遍采取的工艺,对EBPR工艺稳定除磷的机理研究是目前许多学者及工程技术人员研究的热点。目前已经证实,在PAOs代谢过程中不同基质的影响程度有很大不同,一般认为以短链脂肪酸(SCFAs)为基质时在EBPR过程中能够取得理想的除磷效果。PAOs 3种储存物多聚磷酸盐(简称聚磷)、糖原和聚-羟基链烷酸盐(PHA)之间的相互转化对除磷起着非常重要的作用,其中PHA的主要成分有聚-羟基丁酸盐(PHB)、聚-羟基戊酸盐(PHV)、聚-羟基-2-甲基丁酸盐(PH2MB)和聚-羟基-2-甲基戊酸盐(PH2MV)。在厌氧阶段,PAOs吸收SCFAs转化为PHA,为聚磷的水解和糖原的酵解提供

能量(ATP),并为糖原的酵解提供还原力(NADH_2);在好氧阶段,PHA降解使糖原得到补充并促进吸磷。并且已经证实,聚糖菌(GAOs)在厌氧条件下,可以利用SCFAs储存PHA,但不释放磷,在好氧条件下分解PHA补充糖原却不吸收磷,GAOs不仅不能去除磷,相反与PAOs竞争基质(碳源)而不利于磷的去除。因此,围绕不同基质发生生化反应时对ATP及 NADH_2 的需求,研究者根据生化反应计量学及反应动力学原理等建立了PAOs与GAOs的代谢模型。

1 以乙酸盐为基质的代谢模型

以乙酸盐为基质的PAOs经典的代谢模型有COMEAU-WENTZAL代谢模型、MINO代谢模型及其修正模型。此后,有一些新的研究成果,如KORTSTEE等^[1]利用¹³C-NMR技术进行实验,提

第一作者:张 胜,男,1969年生,博士研究生,高级工程师,研究方向为水污染控制与治理工程。# 通讯作者。

*国家“863”计划项目(No. 2006AA06Z318)。

出了 PAOs 中的糖原代谢途径,证实糖原经过不完全的柠檬酸循环途径提供 $NADH_2$ 用于 PHA 的合成;LOUIE 等^[2]根据 GC/MS 对 PHA 的新陈代谢实验观测分析的结果,提出了 PHA 合成与乙醛酸代谢途径及三羧酸(TCA)循环密切相关;MINO^[3]认为 PAOs 吸收外部乙酸盐基质是通过丙酸-琥珀酸代谢途径形成丙酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A,内部糖原则是通过糖酵解途径形成以上两种辅酶 A。

1.1 GAOs 厌氧代谢模型

GAOs 厌氧代谢模型首先由 FILIPE 等^{[4]18}提出,到目前为止对其(见图 1(a))研究较深^{[5]、[6]92}。其基本过程是:乙酸盐被吸收进入细胞内,然后被活化为乙酰辅酶 A,这两个过程需消耗 ATP;糖原经 Embden-Meyerhof-Panass(EMP)途径糖酵解成丙酮酸,同时生成 ATP;一部分丙酮酸经过氧化脱羧作用生成乙酰辅酶 A、 CO_2 和 $NADH_2$,另一部分通过丙酸-琥珀酸代谢途径转化为丙酰辅酶 A,这一过程需要消耗 $NADH_2$;两分子的乙酰辅酶 A 通过硫解酶的作用形成乙酰乙酰辅酶 A,再被还原酶还原为 3-羟基丁酸辅酶 A,最后经过多聚酶聚合成 PHB,需消耗 1 分子的 $NADH_2$ 。1 分子的乙酰辅酶 A 和 1 分子的丙酰辅酶 A 被还原为 1 分子的 3-羟基丁酸辅酶 A,再经过多聚酶聚合成 PHV 单体,消耗 1 分子的 $NADH_2$,最后合成 PHV。FILIPE 等^{[4]27}发现随着反应器内溶液 pH 的升高,GAOs 在吸收乙酸盐时消耗的 ATP 增大,吸收速率降低,并且 GAOs 消耗的糖原量也增大,PHA 量积累增大,其中 PHV 的比例增加,因此厌氧阶段较高的 pH 对 GAOs 生长不利,对 PAOs 生长则有利。

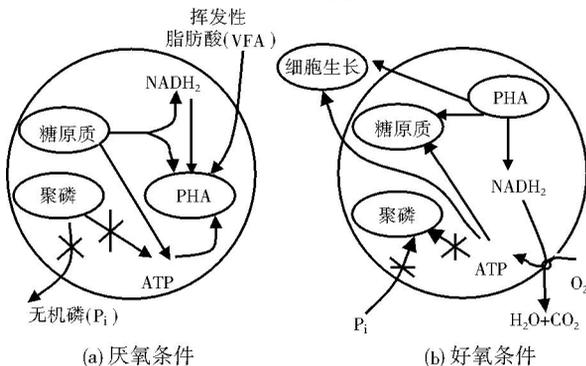


图 1 厌氧/好氧条件下 PAOs(无 x)及 GAOs(有 x)代谢模型简图

Fig. 1 The adsorption kinetics of DMP over the soil samples

1.2 GAOs 好氧代谢模型

ZENG 等^{[6]93}对 GAOs 好氧条件下的代谢进行了研究,提出了好氧代谢模型(见图 1(b))。在好氧条件下,GAOs 氧化在厌氧段储存的 PHA,获得的

ATP 用于细胞内糖原的恢复和细胞自身生长,过程包括: PHA 的分解代谢。PHA 分解为乙酰辅酶 A 和丙酰辅酶 A,乙酰辅酶 A 通过 TCA 循环转化成 CO_2 ,丙酰辅酶 A 先是转化成丙酮酸,后通过脱羧作用生成乙酰辅酶 A,再通过 TCA 循环转化成 CO_2 ; 糖原的形成。两分子的乙酰辅酶 A 通过乙醛酸循环形成 1 分子的草酰乙酸(生物合成的起始物),再经糖异生作用合成糖原。丙酰辅酶 A 通过丙酮酸盐或草酰乙酸代谢途径形成磷酸烯醇丙酮酸盐(PEP),经糖异生作用生成糖原; GAOs 的生长。GAOs 利用乙酰辅酶 A 时,合成 1 mol 生物量(以碳计)会产生 0.27 mol CO_2 ,消耗 1.7 mol ATP; GAOs 利用丙酰辅酶 A 时,首先要通过逆琥珀酸-丙酮酸代谢途径转化成琥珀酸盐,产生 0.46 mol CO_2 ,消耗 1.38 mol ATP,然后经合成代谢合成新的微生物,促使 GAOs 生长; 氧化磷酸化。PHA 代谢产生的 $NADH_2$,在氧化磷酸化作用过程中转化为 ATP; 细胞维持过程。该过程需消耗代谢过程中所产生的 ATP。

2 以丙酸盐为基质的代谢模型

与乙酸盐相比,丙酸盐能使 PAOs 在代谢过程中处于优势地位,在 PAOs 与 GAOs 竞争中提供基质选择压^[7],使 GAOs 失去竞争优势,丙酸盐在 EBPR 工艺中是优质的碳源,这些结果在很多的实验中得到验证^[8-10]。

2.1 PAOs 厌氧代谢模型

OEHMEN 等^[11]提出丙酸盐为基质的 PAOs 厌氧代谢模式: 丙酸盐的吸收及转化形成丙酰辅酶 A。丙酸盐首先被吸收进入细胞内,然后活化为丙酰辅酶 A,这两个步骤需要消耗 ATP; 聚磷的水解和正磷酸盐的释放。每摩尔的聚磷经水解后产生 1 mol ATP; 糖原降解为乙酰辅酶 A。糖原通过 Entner-Doudoroff (ED) 途径产生丙酮酸、乙酰辅酶 A 和 CO_2 ,并伴随 ATP 及 $NADH_2$ 的产生。ATP 的一部分用于丙酸盐的吸收和转化,产生的 $NADH_2$ 用来维持细胞内氧化还原平衡; PHA 的形成。首先是乙酰辅酶 A 及丙酰辅酶 A 的活化,每摩尔以上两种辅酶 A 活化时各需 0.5 mol $NADH_2$,通过选择绑定模式合成 PHA,主要成分为 PHV 和 PH2MV,最终达到 ATP、质量和 $NADH_2$ 的平衡。

LEMOS 等^[12]利用 ^{13}C -NMR 技术研究以丙酸盐为基质的 EBPR 工艺代谢途径,研究结果表明,除了 OEHMEN 等提出的基本生化反应外,还存在丙

酰辅酶 A 向乙酰辅酶 A 转化的反应过程,合成 PHA 中 PHV 占 74.2%、PH2MV 占 16.9%、PH2MB 占 8.6%、PHB 占 0.3% (均以质量分数计,下同)。

2.2 GAOs 厌氧代谢模型

最近,OEHMEN 等^[13]提出了以丙酸盐为基质的 GAOs 厌氧代谢模型。厌氧条件下,以丙酸盐为基质与以乙酸盐为基质时的 GAOs 厌氧代谢方式相似,但糖原通过 ED 途径降解,PHA 形成时乙酰辅酶 A 与丙酰辅酶 A 通过自由聚合的模式形成,以此代谢模型为基础的实验测定的 PHA 组分中,PHV 占 42.67%、PH2MV 占 54.00%、PHB 占 3.33%。

3 以葡萄糖为基质的代谢模型

过去人们认为 PAOs 一般不能直接利用糖基质,甚至认为对生物除磷有害,原因是糖基质条件下有利于 GAOs 的生长。但到目前为止,不少研究者却能以葡萄糖为基质,控制 EBPR 工艺稳定运行,达到生物除磷的目的^{[14][2160],[15][49],[16]},并根据实验结果提出了糖基质条件下的 PAOs 代谢模型。

JEON 等^{[14][2168]}利用¹³C-NMR 技术对生化代谢过程进行实验研究,结果表明,在厌氧条件下,葡萄糖被吸收进入细胞内,细胞内糖原浓度迅速升高,需要消耗 ATP,其来源于糖原经过 EMP 途径的糖酵解过程,厌氧代谢过程经丙酮酸大约消耗 1/3 的葡萄糖用于乳酸的生成,并消耗 NADH₂,其余大部分经乳酸菌聚合生成乳酸盐多聚物(LPOS),细胞利用乳酸的产生获得 ATP,积累糖原,糖原的小部分经转化合成 PHA。乳酸(L 型)被 PAOs 在细胞内吸收转化为丙酮酸,此过程中产生 NADH₂,一部分丙酮酸转化为乙酰辅酶 A,产生 NADH₂,另一部分丙酮酸经琥珀酸-丙酸代谢途径转化为甲基丙二酰辅酶 A,然后转化为丙酰辅酶 A,此过程消耗 ATP,并消耗 NADH₂,ATP 来源于 PAOs 内聚磷的水解,然后以上两种辅酶 A 合成 PHA (PHV 占 60.05%)。

在好氧阶段,分解产生 ATP 及 NADH₂,用于细胞的生长及维持,糖原的含量基本保持不变。

JEON 等^[17]用扫描电子显微镜(SEM)及发射电子显微镜(TEM)观测稳定的以葡萄糖为基质的 EBPR 工艺,发现八角立方体状(直径约 0.7 μm)的乳酸细菌占多数,不含聚磷颗粒及糖原内含物,而 PAOs(直径约 1.2 μm)细胞内含有聚磷颗粒和糖原内含物。

WANG 等^{[15][54]}报道在厌氧条件下,葡萄糖被快速吸收,糖原含量增大并形成积累,消耗的 ATP 来源于聚磷的水解,糖原经 ED 途径产生 ATP 及 NADH₂,之后用于 PHA 的形成,厌氧过程伴随着乳酸的生成,pH 下降,PHA 中以 PHV 为主(PHV 占 83%),与 JEON 等研究结果不同的是 PAOs 细胞在好氧段时糖原含量升高,得到有效补充。WANG 等总结长期实验观察的结果,提出了 EBPR 工艺稳定性控制策略:延长厌氧反应时间,可以减少和限制糖原在细菌细胞中的含量,使反应利用糖原所释放的 ATP 减少,满足细胞维持需求的同时尽可能多地利用聚磷水解提供的 ATP,促使厌氧释放磷量增大,而初始基质为高浓度葡萄糖时能促使厌氧段 PHA 的积累,有利于 PAOs 在好氧段增大吸磷量。

4 厌氧条件下不同基质代谢过程的化学计量学比较

从以上代谢模型及表 1 可以得出:3 种基质在被利用过程中糖原降解与 PHA 合成在化学计量上有很大的不同,糖原通过糖酵解途径(EMP 或 ED)产生 ATP 和 NADH₂,代谢途径不同所产生的 ATP 及 NADH₂ 不同,PHA 中的组分在合成时通过自由组合或选择绑定的模式消耗不同量的 NADH₂,合成 4 种主要组分中的几种(见表 1)来维持细胞内氧化还原平衡,因此糖原及 PHA 具有调节 PAOs 与 GAOs 内部 NADH₂ 平衡的重要作用;在利用基质时,GAOs 对细胞内糖原的利用比 PAOs 更高,这说明 PAOs 在利用基质时消耗的 ATP 与

表 1 厌氧条件下 3 种不同基质 PAOs 与 GAOs 中糖原的降解及 PHA 组分的对比

Table 1 Sugar reduction and PHA composition for anaerobic metabolism of PAOs and GAOs using three different substrates as the sole source of carbon

代谢模型	糖原利用比 ¹⁾	糖酵解途径	PHB/ %	PHV/ %	PH2MV/ %	PH2MB/ %	参考文献
乙酸盐 PAOs 模型	0.5	EMP/ ED	100	0	0	0	[18]
乙酸盐 GAOs 模型	1.1	EMP	73	25	2	0	[6]
丙酸盐 PAOs 模型	0.3	ED	0	46	54	0	[11]
丙酸盐 GAOs 模型	0.7	ED	3.33	42.67	54.00	0	[13]
葡萄糖 PAOs 模型	0.3	EMP	23.35	60.05	10.21	6.39	[14]
葡萄糖 PAOs 模型	0.4 ²⁾	ED	17	83	0	0	[15]

注:1)为糖原消耗量与基质消耗量的摩尔比(以碳计);2)为平均值。

NADH₂ 比 GAOs 少,通过控制环境条件(如 pH)可以使 PAOs 在竞争基质中具有一定优势,通过基质选择压促使 PAOs 占据优势,维持 EBPR 工艺的稳定运行。

5 结 语

了解不同基质条件下的生化反应机理,对于有效控制生物除磷具有十分重要的科学价值。但以上基质代谢模型即使在利用同一基质时,对 EBPR 工艺代谢途径的解释并不完全相同,现有的生化代谢模型本身并不能解释所有的代谢过程,如以葡萄糖为基质运行稳定的 EBPR 工艺,有时微生物在厌氧阶段消化基质时既不水解聚磷又不转化糖原储存的 PHA,且在实际污水中 SCFAs 不以单一形式存在,而是以几种形式混合存在。今后在研究上,一方面要分离出纯种的 PAOs,另一方面要运用现代分子生物学技术研究 EBPR 工艺中微生物的群落结构及其代谢过程中酶的活动,实现对其代谢过程中基因的调控,最终全面掌握 PAOs 的生化代谢方式。

参考文献

[1] KORTSTEE G J J, APPELDOORN K J, BONTING C F C, et al. Recent developments in the biochemistry and ecology of enhanced biological phosphorus removal[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2000, 65(3): 332-340.

[2] LOUIE T M, MAH T J, OLDHAM W, et al. Use of metabolic inhibitors and gas chromatography/ mass spectrometry to study poly-hydroxyalkanoates metabolism involving cryptic nutrients in enhanced biological phosphorus removal systems[J]. *Water Res.*, 2000, 34(8): 1507-1514.

[3] MINO T. Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment process for enhanced biological phosphate removal[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2000, 65(3): 341-348.

[4] FILIPE C D M, DAIGGER G T, LESLIE GRADY J C P. A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 76(1).

[5] YAGCI A, ARTAN N, COKGOR E U, et al. Metabolic model for acetate uptake by a mixed culture of phosphate and glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 84(3): 359-373.

[6] ZENG R J, VAN LOOSDRECHT M M, YUAN Z, et al. Metabolic model for glycogen-accumulating organisms in anaerobic/aerobic activated sludge systems[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 81(1).

[7] OEHMEN A, SAUNDERS A M, VIVES M T, et al. Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources[J]. *J. Biotechnol.*, 2006, 123: 22-32.

[8] PIJUAN M, SAUNDERS A M, GUIASOLA A, et al. Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 85(1): 56-67.

[9] CHEN Y, RANDALL A A, MCCUE T. The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid[J]. *Wat. Res.*, 2004, 38: 27-36.

[10] OEHMEN A, YUAN Z, BLACKALL J J, et al. Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 91(2): 162-168.

[11] OEHMEN A, ZENG R J, YUAN Z, et al. Anaerobic metabolism of propionate by polyphosphate-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 91(1): 43-53.

[12] LEMOS P C, SERAFIM L S, SANTOS M M, et al. Metabolic pathway for propionate utilization by phosphorus-accumulating organisms in activated sludge: ¹³C labeling and in vivo nuclear magnetic resonance [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 69(1): 241-251.

[13] OEHMEN A, SAUNDERS A M, BLACKALL J J, et al. Anaerobic and aerobic metabolism of glycogen-accumulating organisms selected with propionate as the sole carbon source [J]. *Microbiology*, 2006, 152(9): 2767-2778.

[14] JEON C O, PARK J M. Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor supplied with glucose as a sole carbon source[J]. *Wat. Res.*, 2000, 34(7).

[15] WANG N, PENG J, HILL G. Biochemical model of glucose induced enhanced biological phosphorus removal under anaerobic condition[J]. *Wat. Res.*, 2006, 36.

[16] CARUCCI A, LNDREA K, MAJONE M, et al. Different mechanisms for the anaerobic storage of organic substrates and their effect on enhanced biological phosphate removal (EBPR) [J]. *Wat. Sci. Tech.*, 1999, 39(6): 21-28.

[17] JEON C O, LEE D S, PARK J M. Morphological characteristics of microbial sludge performing enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor fed with glucose as sole carbon source[J]. *Wat. Sci. Tech.*, 2000, 141(12): 79-84.

[18] SMOLDERS G J F, VANDER 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]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 43(6): 461-470.

责任编辑:陈泽军 (修改稿收到日期:2007-03-27)

(上接第 529 页)

[2] 谢梦芹,牛冬杰,赵由才. 废水污泥中铬、铁分离研究[J]. *黑龙江科技学院学报*, 2003, 13(4): 9-12.

[3] 胡明成. 制革工业污泥中 Cr³⁺ 的回收实验[J]. *工业用水与废水*, 2003, 34(2): 40-42.

[4] 成思危, 丁翼, 杨春荣. 铬盐生产工艺[M]. 北京: 化学工业出版社, 1988: 56.

[5] DURLAK S, BISWAS P, SHIJ. Equilibrium analysis of the affect of temperature, moisture and sodium content on heavy metal emissions from municipal solid waste incinerators[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 1997, 56(1/2): 1-20.

[6] 白英彬, 王仲英, 任希棠. 从铬不锈钢废渣中提取和富集铬的研究[J]. *山西化工*, 1999, 19(3): 9-13.

[7] 国家环境保护局科技标准司. 电镀污泥及铬渣资源化实用技术指南[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1997.

责任编辑:赵多 (修改稿收到日期:2006-08-14)