

活性污泥体系中聚糖菌的富集与鉴定

李安安¹ 李勇智^{1*} 祝贵兵² 彭永臻³

(1. 北京工商大学化学与环境工程学院, 北京 100037;

2. 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085;

3. 北京工业大学环境与能源工程学院, 北京 100022)

摘要 活性污泥体系中,聚糖菌(GAOs)在厌氧环境下与聚磷菌(PAOs)形成对底物的竞争关系,对聚糖菌的研究对于优化生物除磷工艺有重要意义。以葡萄糖为唯一碳源,在磷限制条件下,利用特殊运行方式对活性污泥进行驯化培养出了稳定的聚糖菌颗粒污泥,厌氧阶段磷释放量与有机物吸收量浓度(mg/L)比从7.4%下降为0.25%。从培养好的活性污泥反应器中分离获得2株聚糖菌,经菌落PCR和16S rRNA序列分析确定了所得聚糖菌菌株G1和菌株G2分别是枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和解鸟氨酸克雷伯氏菌(*Klebsiella omithinolytica*)。

关键词 活性污泥 聚糖菌 富集 16S rRNA

中图分类号 X172 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2009)05-0927-05

Enrichment and identification of glycogen accumulating organisms in activated sludge system

Li Anan¹ Li Yongzhi¹ Zhu Guibing² Peng Yongzhen³

(1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037;

2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085;

3. College of Environment and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022)

Abstract In activated sludge system, phosphorus accumulating organisms (PAOs) compete with glycogen accumulating organisms (GAOs) in anaerobic environment. Research on glycogen accumulating organisms has important significance on the optimization of biological phosphorus removal process. Stable glycogen accumulating organisms granules were cultivated by acclimating sludge in special operating mode under phosphorus limitation with glucose as the only carbon source. After purification, glycogen accumulating organisms strains EU294410 and EU294412 were determined respectively to be *Bacillus subtilis* and *Klebsiella omithinolytica* by means of colony PCR and 16S rRNA gene sequence analysis.

Key words activated sludge; glycogen accumulating organisms (GAOs); enrichment; 16S rRNA

水体富营养化已经成为我国可持续发展所面临的重要环境问题之一,而氮、磷是产生水体富营养化的主要因素。目前较经济有效的除磷方法便是基于聚磷菌(phosphorus accumulating organisms, PAOs)过量吸磷作用的强化生物除磷方法(enhanced biological phosphate removal, EBPR)^[1,2]。在EBPR系统中除聚磷菌外,还有另外一类微生物——聚糖菌(glycogen accumulating organisms, GAOs)^[3],也可在厌氧环境中吸收碳源并合成聚羟基链烷酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHAs)储藏在细胞内,但不释放磷,在好氧条件下分解PHAs合成糖原而不聚积磷,对于除磷没有贡献。这2种微生物因在厌氧条件下利用不同的胞内储藏能源而被加以区别,聚磷菌吸收碳源合成PHAs的能量主要来自胞内聚磷的水

解,而聚糖菌依靠水解胞内的碳水化合物获得能量,该能量供聚糖菌在厌氧环境下生存并可用来吸收细胞外的碳源在细胞内生物合成PHAs。在实际应用过程中,EBPR工艺经常出现除磷效果不稳定的现象^[4,5],近年来的研究表明,导致上述现象的主要原因之一就是聚糖菌与聚磷菌在厌氧环境下形成对底物的竞争关系,由于强化生物除磷系统中厌氧阶段

基金项目:北京市教委科技发展计划项目(KM200610011004)

收稿日期:2008-10-16; 修订日期:2008-11-06

作者简介:李安安(1985~),女,硕士研究生,主要从事污水生物处理及环境生物技术方面的研究工作。

E-mail: lianan1985119@126.com

碳源有限,当 GAOs 吸收的碳源增多时,可供 PAOs 利用的碳源数量就减少,整个强化生物除磷系统除磷效率受到影响。

因此,对污泥体系中聚糖菌的生长进行观察和研究,以确定聚糖菌的生长条件对于提高生物除磷稳定性有重要的意义。Liu 等^[6]发现,如果用葡萄糖作外碳源,容易引发聚糖菌与聚磷菌的竞争,实际进水中葡萄糖的存在经常引起聚糖菌的增殖。Sato 等^[5]研究表明,如果好氧段进水中的氨基酸或蛋白质含量过低,聚磷菌的生长速率就会减慢,从而聚糖菌占优势。Filipe 等^[7]认为,不恰当的 pH 值调控会引起聚糖菌的增殖。Oehmen 等^[8]以丙酸为碳源研究表明,当 pH 值为 7 时,除磷系统存在聚糖菌,但当 pH 值由 7 提高到 8 后数周后,聚糖菌的数量或活性降低。Liu 等^[6]发现在 P/C 为 2 100,进水磷浓度很低的条件下,系统的除磷功能丧失,聚糖菌成为优势菌。

本文采用特殊的厌氧好氧运行工艺,以葡萄糖作为唯一碳源,在磷限制条件下培养聚糖菌成为优势菌种,并对污泥的有机物吸收、胞内储存物进行系统研究,并通过菌落 PCR 和 16S rRNA 序列分析了聚糖菌的种群特性和种类。

1 实验材料与方法

1.1 实验装置

实验采用序批式反应器 (sequencing batch reactor, SBR),反应器由圆柱型有机玻璃制成,总容积为 20 L,有效容积为 16 L,在反应器壁的垂直方向每隔 10 cm 设置一个取样口 (取样和排水作用)。采用人工进水,重力排水,厌氧阶段采用电动搅拌机搅拌使活性污泥处于悬浮状态,好氧阶段采用鼓风机曝气,以粘砂块作为微孔曝气头。

反应器在富集培养阶段采用特殊的厌氧好氧运行方式,如图 1 所示,每个循环周期为 6 h,包括 3 h 厌氧搅拌,2 个 0.5 h 沉淀排水和 2 h 好氧曝气。该运行方式的特点在于在厌氧阶段结束后,并未像传统 SBR 运行方式那样进行曝气,而是进行沉淀排水,之后再加入含磷 1 mg/L,不含 COD 的模拟废水,曝气进行好氧阶段,对聚糖菌进行选择 and 富集。该运行方式的目的是限制系统中聚磷菌的生长,为选择和富集聚糖菌创造出理想的环境,提高聚糖菌在活性污泥体系中的数量和活性。

1.2 实验用水

本实验采用人工配制的模拟废水。用葡萄糖作为唯一碳源,加微量磷元素造成磷限制条件。模拟合成废水的 COD 浓度可以通过葡萄糖的投加量进

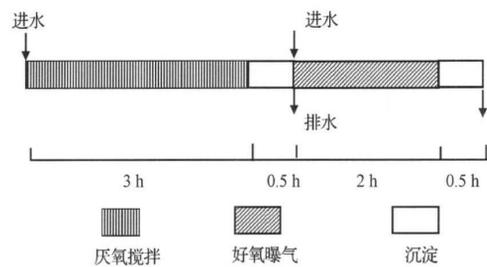


图 1 厌氧好氧 SBR 运行方式

Fig 1 Anaerobic-aerobic SBR operation mode

行控制,每升模拟合成废水加入 0.5 mL 微量元素营养液,以满足微生物生长过程对微量元素的需要。模拟合成废水成分和微量元素营养液的组成如表 1 所示。

表 1 试验模拟废水成分及微量元素组成

Table 1 Content of simulated wastewater

基质种类	浓度	微量元素	浓度
葡萄糖 (mg COD/L)	300 ~ 900	FeCl ₃ (mg/L)	1.5
K ₂ HPO ₄ (mg P/L)	1	CuSO ₄ (mg/L)	0.03
NH ₄ Cl (mg N/L)	68.6	KI (mg/L)	0.18
MgSO ₄ (mg/L)	45	MnCl ₂ (mg/L)	0.12
NaHCO ₃	适量	ZnSO ₄ (mg/L)	0.12
微量元素 (mL/L)	0.5	CoCl ₂ (mg/L)	0.15

1.3 分析方法

COD、磷酸盐和 DO 分别采用 5B-1 型 COD 快速测定仪,氯化亚锡还原分光光度法和 Oxi330 型 DO 检测仪进行测定;采用污泥体积指数测定法确定 SVI 用分区划线分离法进行菌种的纯化分离。细胞染色采用革兰氏染色法和苏丹黑染色法,并用显微镜进行观察。微生物测序采用菌落 PCR 和 16S rRNA 序列分析。

PHAs 采用气相色谱仪 (GC) 测定^[9]。20 mL 混合液离心后去除上清液,所得泥饼冷冻干燥 24 h 后称重,冻干的污泥放入消解管中,加入 2 mL 氯仿和 2 mL 酸化甲醇 (6% 体积百分数的硫酸),放入烘箱中 100 °C 消解过夜,冷却后加入 1 mL 蒸馏水剧烈震荡,等液面明显分层后取出下层用气相色谱仪分析 (色谱仪 Techcomp GC7890, 色谱柱 DB-1, 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm)。聚羟基丁酸酯 (polyhydroxybutyrate, PHB) 是 PHAs 中发现最早、研究最广泛的一种。污泥中 PHB 含量根据下式计算:

$$\text{PHB} (\%) = \text{PHB} / \text{冻干的污泥量} \times 100 (\text{mg/mg}) \quad (1)$$

2 结果与讨论

2.1 污泥特性

接种污泥取自小红门污水处理厂,污泥呈灰褐色絮状,结构松散,污泥沉降性能一般,污泥指数 SVI 为 120 mL/g,反应器初始污泥浓度约为 3.5 g/L,经过 GAOs 富集驯化后污泥产生了颗粒化,颜色也变为黄褐色,污泥沉降性良好,SVI 为 40 mL/g。

为观测接种污泥除磷效率及体系中聚磷菌与聚糖菌数量关系,污泥驯化前先采用传统的强化生物除磷运行方式,反应器中 COD 及磷浓度的变化如图 2 所示。初始 COD 和磷浓度分别为 236 mg/L 和 6.5 mg/L,在厌氧前半小时 COD 迅速降为 178 mg/L,整个周期结束后 COD 约 80 mg/L,同时厌氧段磷被不断释放,厌氧末磷浓度为 12 mg/L,好氧段磷被超量吸收,整个周期磷净吸收量约有 5 mg/L。可见由污水处理厂取回的接种污泥本身是含有聚磷菌的,且已具有正常的 EBPR 性能,在厌氧好氧交替运行的环境下具有较好的厌氧释磷和好氧吸磷功能。厌氧阶段磷释放量与有机物的吸收量的浓度 (mg/L) 比值可以从一个侧面反应 PAOs 在活性污泥体系中数量,在该运行条件下为 7.4%,说明有机物快速吸收所需的能量来自于胞内聚磷的水解,有机物主要是被体系中聚磷菌利用,PAOs 数量在此活性污泥体系中的相对比例高于其他菌种。

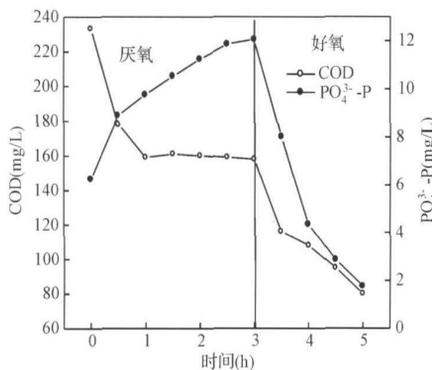


图 2 接种污泥的生物除磷性能

Fig 2 Biological phosphorus removal performance of inoculation of sludge

2.2 磷限制条件下厌氧阶段有机物吸收特性

在对接种污泥的生物除磷性能了解之后,我们按图 1 所示的运行方式开始对污泥进行驯化,以期达到对 GAOs 的选择与富集。通过葡萄糖的投加,控制模拟合成废水的初始 COD 值约为 300 mg/L,严格控制磷的浓度为 1~2 mg/L 之间。如图 3 所示,经过 20 d 的驯化,在厌氧阶段,有机物吸收量相

对驯化前明显增加,厌氧前 1 h COD 都处于迅速下降阶段,降了约 90 mg/L,整个厌氧阶段有机物吸收量约为 130 mg/L。而伴随着有机物的快速吸收,SBR 反应器内没有明显的磷释放现象,厌氧末磷释放总量约为 0.3 mg/L,此时厌氧阶段磷释放量与有机物的吸收量的浓度 (mg/L) 比值为 0.25%,较驯化前的 7.4% 大幅度减少,说明有机物快速吸收所需的能量已经并非来自于胞内聚磷的水解,而是来自至于胞内另一种存储物——糖原。因为在磷限制条件下,聚磷菌胞内的聚磷得不到充分的积累,进而影响聚磷菌吸收有机物和合成 PHAs,而在本系统中有机物还是不断被吸收,可以认为本系统中微生物的主导代谢模式已转变为在厌氧阶段利用胞内糖原酵解产生的能量及还原力吸收有机物并以 PHAs 形式存储在细胞体内。这意味着在不利的生存环境中活性污泥中聚磷菌所占的比例在逐渐减少,转而成为聚糖菌数量在逐步增多,成为活性污泥中的优势主导微生物。

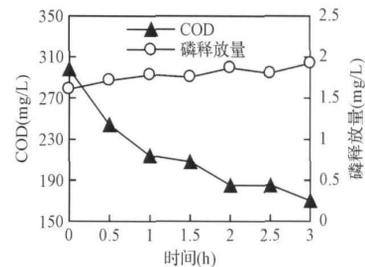


图 3 厌氧阶段有机物吸收量与磷酸盐量释放关系

Fig 3 Relationship between organic substances absorption and phosphate release in anaerobic phase

2.3 好氧阶段初始 COD 值对有机物吸收的影响

好氧条件下,微生物将储存的 PHAs 分解,释放出大量能量用于生长、繁殖和糖原合成,由此当厌氧阶段进水 COD 浓度越大,有机物吸收的量越多继而微生物体内积累 PHAs 的量越多,则越有利于好氧阶段的生长进度。本实验中,不断提高进水 COD 值以期进一步富集 GAOs,增加活性生物量,但在驯化过程中发现,当进水 COD 浓度增大到一定程度后,有机物的吸收量变得很不稳定,甚至有下降的趋势。

驯化期连续几个周期有机物吸收情况如图 4 所示,发现随着厌氧进水 COD 值不断提高,有机物吸收量并没有相应提高,并且厌氧阶段 COD 变化值呈现下降的趋势。类似的现象在 Serafim 等^[10]的实验中也出现过,他们认为高浓度的碳源会抑制 PHB 的代谢,从而影响微生物的活性。本实验进一步发现 COD 吸收率是随着好氧阶段进水 COD 值的增大而

下降,我们推测好氧阶段过高的初始有机物浓度可能会对 GAOs 吸收有机物产生抑制作用,因为实验中随着进水 COD 值的升高,厌氧结束通过一次换水进入好氧阶段时反应器内仍有较高 COD 值,大约有 100~300 mg/L,对聚糖菌生长可能造成影响。所以针对上述情况,我们进一步改进厌氧好氧运行方式,一方面维持厌氧初始较高的 COD 浓度,另一方面在厌氧结束沉淀排水后,继续加入清水再沉淀排水,经过如此几次淘洗以达到降低好氧阶段 COD 浓度的目的,控制好氧阶段 COD 浓度约 20 mg/L,观测到有机物的吸收量得到大幅提高。如图 5 所示,厌氧阶段 COD 变化值不断升高,由最初的 149 mg/L 增加到 300 mg/L,GAOs 的活性得到不断增强。

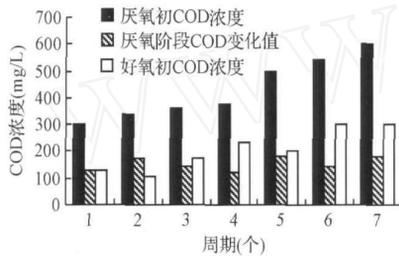


图4 运行方式改进前有机物吸收情况

Fig. 4 Absorption of organic substances before improvement of operating mode

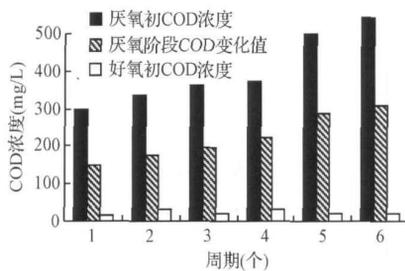


图5 运行方式改进后有机物吸收情况

Fig. 5 Absorption of organic substances after improvement of operating mode

分析产生上述现象的可能性有两点:首先,水体中的异氧菌在厌氧条件下生长受到抑制,但一旦处于好氧条件下,活力又得到充分恢复,通过充足的溶解氧和氨氮生长繁殖,从而与 GAOs 产生竞争关系,导致 GAOs 的生长减少,以导致下个周期开始后,GAOs 的代谢能力降低,这便体现在 COD 的吸收能力的弱化。其次,当 GAOs 本身处在一个极低 COD 值的环境中,没有外界有机物可以提供能量供其生长,GAOs 只能消耗自身储存的 PHAs 来提供能量,曝气会让 GAOs 处于饥饿状态,让其在随后的厌氧阶段吸收更多葡萄糖,合成更多的 PHAs。

2.4 GAOs 的分离、鉴定及胞内聚合物特性

污泥驯化完成后进行菌种的分离,选择普通的牛肉膏蛋白胨液体培养基用于细菌的富集与分离。从运行状况良好时的反应器中取污泥于灭菌的培养皿中,待琼脂培养基凝固后,于 30℃ 培养 48 h,即有菌落出现。用接种针挑取单个菌落,在琼脂培养基表面连续划线培养,选择那些形态不一样的菌落,重复几次后便可形成单独孤立的菌落,因而获得 2 株纯培养菌株 G1 和菌株 G2,其 PCR 扩增的电泳图谱如图 6 所示,2 株菌的条带在 1 000~2 000 bp 之间,约为 1 500 bp。由测序结果可知:G1 的序列长度为 1 477 bp, G2 的为 1 448 bp。经 16S rRNA 同源性比较可知, G1 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 亲缘关系最为接近,相似性达 99%, G2 与解鸟氨酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella omithinolytica*) 亲缘关系最为接近,相似性达 99%,最终根据《常见细菌系统鉴定手册》将 G1、G2 分别鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和解鸟氨酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella omithinolytica*)。并在 Genebank 库中输入序列,申请登录号分别为: EU294410 和 EU294412。

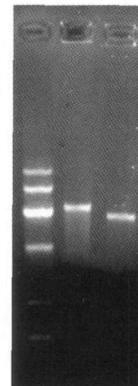


图6 G1、G2 PCR 扩增的电泳图谱

Fig. 6 PCR amplified electrophoresis picture of G1 and G2

对 2 株聚糖菌菌株进行革兰氏染色后通过显微镜观察到微生物细胞多为杆状或棒状(如图 7a 所示),而其他研究者也曾以葡萄糖为基质,采用 SBR 处理工艺富集 GAOs,并对系统中的微生物进行研究,发现存在着大量的革兰氏阳性和革兰氏阴性球状菌,并通常成四分体排列。Liu 等^[6]研究也表明,GAOs 与 PAOs 的形态学区别在于,GAOs Neisser 染色呈阴性,细胞常 2 个或 4 个聚集在一起(如图 7b 所示),并在厌氧基质吸收前无细胞内微粒。

同时对厌氧结束后的菌株进行苏丹黑染色显



(a)实验所得聚糖菌菌株染色图

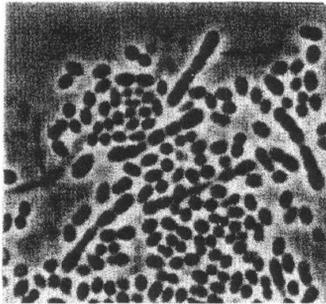
(b)Liu等^[10]实验所得聚糖菌菌株染色图

图 7 聚糖菌染色

Fig 7 Staining of glycogen-accumulating organisms

示, 2 种菌株均能看到明显的聚羟基烷酸酯颗粒。通过气相色谱检测到微生物胞内 PHAs 中的聚羟基丁酸 (PHB) 的含量约为 21.4%, 聚羟基戊酸 (PHV) 的含量约为 3.4%。表明在以葡萄糖为惟一碳源, 磷限制条件下富集得到的 GAOs 胞内 PHAs 主要以 PHB 与 PHV 的形式存在, 与之前的研究结果一致^[11]。

3 结 论

本文采用厌氧好氧 SBR 系统, 在以葡萄糖为惟一碳源严格限制磷浓度的条件下成功抑制了聚磷菌的生长而使聚糖菌得以富集, 并形成一定粒径的颗粒污泥。通过实验研究发现, 利用清水淘洗后降低好氧阶段进水 COD 浓度值对污泥的增加即 GAOs 的富集是有帮助的。从运行良好的聚糖菌体系中分离出了 2 株形态均为短杆状纯种菌株经 16S rRNA 基因序列测序测得分别为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和解鸟氨酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella omithinolytica*)。实验结果表明, 在以葡萄糖为惟一碳源富集到的 GAOs 合成的储存多聚物主要组分为 PHB 和 PHV。本实验下一步将借助分子生物学、酶学等手段进一步研究驯化过程中聚磷菌和聚糖菌的变化规律, 解析其竞争关系, 拟达到研究的深入和完善。

参 考 文 献

- [1] Fuhs G W., Chen M. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater *Microb Ecol*, **1975**, 2: 119 ~ 138
- [2] Seviour R. J., Mino T., Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems *FEMSMicrobiol Rev*, **2003**, 27: 99 ~ 127
- [3] Mino T., Liu W-T, Kurisu F., *et al* Modeling glycogen storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal process *Wat Sci Tech*, **1995**, 31 (2): 25 ~ 34
- [4] Saunders A. M., Oehmen A., Blackall L. L., *et al* The effect of GAOs on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR plants *Wat Sci Tech*, **2003**, 47 (11): 37 ~ 43
- [5] Saoh H. Deterioration of enhanced biological phosphate removal by the domination of microorganisms without polyphosphate accumulating *Wat Sci Tech*, **1994**, 30 (6): 203 ~ 211
- [6] Liu W-T, Mino T., Nakamura K., *et al* Internal energy-based competition polyphosphate and glycogen accumulating bacteria in biological phosphorus removal reactors-effect of P/C feeding ratio *Wat Res*, **1997**, 31 (6): 1430 ~ 1438
- [7] Filipe C. D. M., Daigger G T., C. P. Leslie Grady Jr pH as a key factor in the competition between glycogen accumulating organisms and phosphorus accumulating organisms *Water Environment Research*, **2001**, 73 (2): 223 ~ 232
- [8] Oehmen A., Yuan Z., Blackall L., *et al* Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms *Biotechnology and Bioengineering*, **2005**, 91 (2): 162 ~ 168
- [9] Bond P. L., Erhart R., Wagner M., *et al* Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and non-efficient biological phosphorus removal activated sludge systems *Applied and Environmental Microbiology*, **1999**, 65 (9): 4077 ~ 4084
- [10] Serafin L. S., Lemos P. C., Oliveria R., *et al* Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions *Biotechnol Bioeng*, **2004**, 87: 145 ~ 160
- [11] Liu W. T. Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal *Water Res*, **1996**, 30: 75 ~ 82