

毕贞,钱萌萌,袁艺娜,等.GAOs丰度变化对聚磷生物膜系统的影响——磷富集性能及代谢特征为例[J].中国环境科学,2025,45(3):1601-1611.

Bi Z, Qian M M, Yuan Y N, et al. The effects of GAOs abundance to the systematic phosphorus enrichment performance and the metabolic characteristics in phosphorus-accumulating biofilm [J]. China Environmental Science, 2025,45(3):1601-1611.

GAOs 丰度变化对聚磷生物膜系统的影响

——磷富集性能及代谢特征为例

毕贞^{1*},钱萌萌¹,袁艺娜¹,王雪玲¹,宋歌¹,黄勇^{1,2} (1.苏州科技大学环境科学与工程学院,江苏苏州 215009; 2.苏州科技大学,城市生活污水资源化利用技术国家地方联合工程实验室,江苏苏州 215009)

摘要: 在厌氧/好氧交替运行的序批式反应器中,以氧化沟活性污泥为接种污泥进行聚磷生物膜的富集培养,通过考察生物膜中聚糖微生物(GAOs)丰度变化对系统磷富集性能以及微生物群落代谢特征的影响,解析 GAOs 在生物膜磷富集系统中的潜在功能.结果表明,在聚磷生物膜的富集培养过程中,GAOs 成为优势菌,但并未对生物膜系统的磷去除与富集效果产生不利影响.由于聚磷微生物(PAOs)单个细胞的 PHA 代谢活性和 poly-P 代谢活性均显著增强,使得生物膜群落整体以聚磷代谢模式(PAM)为主导.GAOs 作为系统中的优势菌属,可能通过 EMP 代谢途径获取合成 PHA 所需的还原力(NADH),为 PAOs 在好氧条件下吸磷提供充足的能量储备,从而激发无机磷转运系统(*pst*)、poly-P 合成代谢基因(*ppk*)的表达上调,使生物膜系统表现出良好的磷去除与富集能力,且 GAOs(*Candidatus Competibacter*)作为潜在的反硝化功能菌使得生物膜磷富集系统具备同步好氧脱氮能力.

关键词: 污水磷富集; 聚磷生物膜; 聚糖菌; *Candidatus Competibacter*; 代谢特征

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2025)03-1601-11

Effects of GAOs abundance to the systematic phosphorus enrichment performance and the metabolic characteristics in phosphorus-accumulating biofilm. BI Zhen^{1*}, QIAN Meng-meng¹, YUAN Yi-na¹, WANG Xue-ling¹, SONG Ge¹, HUANG Yong^{1,2} (1.School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China; 2.National and Local Joint Engineering Laboratory for Municipal Sewage Resource Utilization Technology, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China). *China Environmental Science*, 2025,45(3): 1601~1611

Abstract: In a sequencing batch reactor with alternating anaerobic/aerobic operation, activated sludge from an oxidation ditch was used as the inoculated sludge for culturing poly-phosphate biofilm enrichment. The potential functions of GAOs in the biofilm phosphorus enrichment system were investigated by examining the effects of the changes in the abundance of glycogen-accumulating organisms (GAOs) in the biofilm on the phosphorus enrichment performance and the metabolic characteristics of the microbial community. The results showed that GAOs became the dominant organisms in the enrichment culture of phosphorus-accumulating biofilm, but they did not adversely affect the phosphorus removal and enrichment of the biofilm system. Due to the significant increase of PHA metabolic activity and poly-P metabolic activity in individual cells of phosphorus-accumulating organisms (PAOs), the biofilm community as a whole was dominated by the phosphorus accumulating metabolism (PAM). GAOs as a dominant bacterial genus in the system, might obtain the reducing power (NADH) required for synthesizing PHA through EMP metabolism, which could provide sufficient energy reserve for the absorption of phosphorus by the PAOs in aerobic conditions, and thus stimulate the phosphorus removal and enrichment effect in the biofilm system. The inorganic phosphorus transport system (*pst*) and poly-P synthesizing genes (*ppk*) were up-regulated, so that the biofilm system showed good phosphorus removal and enrichment ability, and the GAOs (*Candidatus Competibacter*), as a potential denitrifying bacterium, could synchronize with the aerobic denitrification in the biofilm phosphorus-enrichment system.

Key words: phosphorus enrichment from sewage; phosphorus-accumulating biofilm; glycogen accumulating organism (GAOs); *Candidatus Competibacter*; metabolic characteristics

基于活性污泥法的强化生物除磷(EBPR)工艺是当前污水处理厂普遍采用的磷富集技术,其通过对剩余污泥进行浓缩、发酵、脱水实现磷富集,但该技术存在磷富集率低、碳源消耗高、工艺复杂、污泥产量高等不足^[1],增加了城市污水富集磷过程中

的能量消耗.近年来,生物膜法磷富集技术得到迅速发展^[2-3],其技术原理为:在生物膜序批式反应器

收稿日期: 2024-08-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51938010)

* 责任作者, 副教授, bizhen@mail.usts.edu.cn

(BSBR)中,附着在填料上的聚磷菌(PAOs)在好氧环境下吸收污水中的正磷酸盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$),并将其在胞内转化成聚磷酸盐(poly-P)储存,处理后的污水被排出系统;在厌氧环境下,向 BSBR 系统中充入富集液,生物膜内的 poly-P 分解并释放出 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$,将富集液排出系统并储存;经过多次好氧/厌氧交替运行,富集液被重复用于厌氧段接纳生物膜释放的磷,由此同步实现污水中磷的去除与富集。

不论是 EBPR 除磷系统亦或是生物膜磷富集系统,其运行效果不仅受温度、溶解氧浓度、pH 值和磷负荷等环境因素影响^[4-7],同时还与微生物群落中 PAOs/GAOs 种属、PAOs/GAOs 丰度等生物因素密切相关^[8-9]。目前最广为人知的 PAOs 菌属为 *Ca. Accumulibacter*^[10],其他如 *Rhodocyclaceae*^[11]、*Thiothrix*^[12]、*Saprosiraceae*^[13]等也被报道具有聚磷菌的能力,而常见的聚糖菌(GAOs)包括 *Ca. Competibacter*、*Defluviococcus*、*Contendobacter*^[14]等。GAOs 与 PAOs 在除磷系统中共同存在,其在代谢机制上存在差异,GAOs 不参与磷酸盐的循环,与 PAOs 存在碳源的竞争^[15]。在除磷效果良好的 EBPR 系统中,PAOs 占比通常>10%,而 GAOs 丰度<5%^[16-18]。因此,通常认为,在适宜的环境条件下,维持 PAOs 在微生物群落中的数量优势、抑制 GAOs 的过度生长是磷富集系统实现良好除磷效果的必要条件。基于此,磷富集系统的常规运行条件为:以乙酸/丙酸为碳源、温度 $\leq 25^\circ\text{C}$ 、好氧/厌氧水力停留时间为 1.5:2,溶解氧为 2~3mg/L,以抑制 GAOs 的过度生长^[3]。

然而在许多性能良好的生物膜磷富集系统中,微生物群落中 GAOs 的相对丰度可超过 20%,相比之下,PAOs 的相对丰度不足 10%^[19-20],这可能与生物膜磷富集系统运行条件有关:与 EBPR 系统的运行

条件相比,生物膜系统为好氧段需要更高的溶解氧浓度(4~6mg/L)^[2,20-21];同时由于微生物呈附着态生长,生物膜系统可以维持更长的污泥龄^[22]。在 GAOs 相对丰度占优势的情况下,上述生物膜系统总磷去除率依然可稳定在 90%以上,磷富集浓度超过 80mg/L。这一现象对传统认知中 GAOs 在生物除磷系统中所扮演的“负面角色”提出了质疑。随着对 GAOs 代谢机理认识的不断深入,研究者发现部分 GAOs(如 *Micropruina* 等)可利用复杂有机物的发酵产物(如氨基酸)进行代谢,因此这类发酵型聚糖微生物(FGAOs)的存在反而可以为 PAOs 提供小分子碳源,有利于复杂碳源条件下 PAOs 的磷代谢^[23]。此外,研究者还发现部分 GAOs 能够以 NO_3^- 或 NO_2^- 为电子受体,使 NO_3^- 或 NO_2^- 还原为 N_2 ,在厌氧和缺氧交替条件下与反硝化聚磷菌(DPAOs)协同实现反硝化和磷富集的耦合,即这类反硝化型聚糖微生物(DGAOs)的存在有利于磷的富集^[24-25]。简言之,GAOs 的富集并不一定会导致系统除磷性能的下降,GAOs 丰度对生物膜系统磷去除与富集效果的影响尚不明确。

基于此,本研究以 EBPR 系统的活性污泥作为接种污泥,在厌氧/好氧交替条件下通过调控水力停留时间(HRT)、进水 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 浓度、合成废水与富集液体积交换比(VER)等参数富集具有良好磷去除与富集性能的生物膜,分析聚磷生物膜富集过程中 GAOs 丰度变化对系统磷去除/富集效果以及生物膜群落代谢特征的影响,从而探究 GAOs 在生物膜磷富集系统中的作用。

1 材料与方法

1.1 接种污泥与模拟污水

表 1 模拟污水组分浓度及反应器运行主要参数

Table 1 Concentration of simulated effluent components and main parameters of reactor operation

阶段		污水组分浓度(mg/L)					HRT (厌氧处理+好氧处理)(h)	VER
		厌氧段			好氧段			
		NaAc(以 COD 计)	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$	$\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$	$\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$	$\text{NH}_4^+ - \text{N}$		
挂膜阶段	P1	300	15	—	30	15	4+4	—
	P2							
富集阶段	P3	200	10	5	—	10	2+4	1.5:1
	P4			5				
	P5			8				

用于聚磷生物膜培养的接种污泥取自苏州某

污水处理厂的氧化沟系统(污泥 SS 为 5200mg/L,其

中 PAOs 占比 10.55%,GAOs 占比 3.3%),将 1L 接种污泥投入主反应器用于生物膜培养.实验所用的模拟污水参照城市污水中各营养物组分和浓度配制,主要成分包括:CH₃COONa(NaAc)、KH₂PO₄、NH₄Cl 以及功能微生物生长所需的微量元素^[26],在不同运行阶段各组分浓度如表 1 所示.

1.2 生物膜反应装置及其运行

实验装置由主反应器(有效工作容积为 5L,内有 Kaldnes® K2 聚乙烯悬浮填料,填充比为 40%)、污水罐(50L)、富集罐(5L)组成,配备定时器用于控制主反应器的进水泵、出水泵、曝气泵和搅拌机,实验装置如图 1 所示.

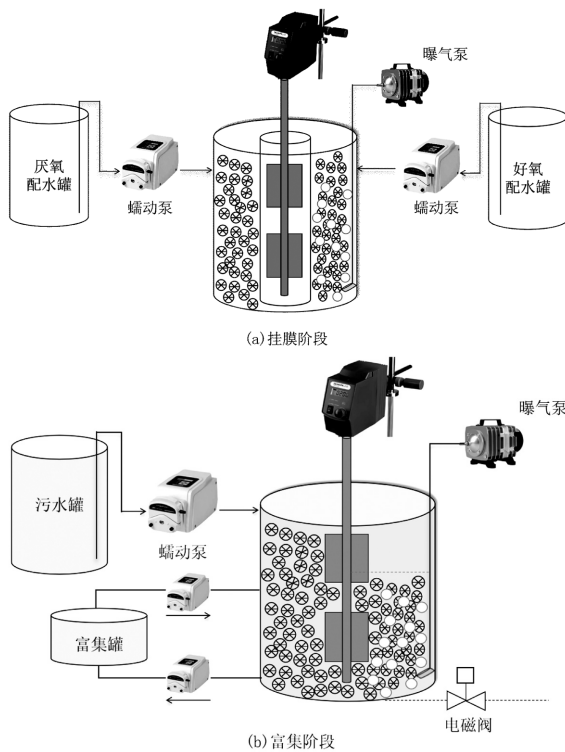


图 1 各阶段实验装置示意

Table 1 Diagram of experimental equipment at each stage

$$P_{rel}/HAC_{upt} = \frac{(\text{1个厌氧周期内释放的磷 (mg) / 磷的相对分子质量})}{(\text{1个厌氧周期内消耗乙酸钠的量 / 乙酸钠的相对分子质量}) \times 2} \quad (4)$$

式中: P_{rel} 表示磷释放量,mmol; HAC_{upt} 表示 COD(以乙酸钠计)消耗量,mmol.

$$NRE(\%) = (\text{NH}_4^+ - N_{an,inf} - \text{NH}_4^+ - N_{ae,eff}) / \text{NH}_4^+ - N_{ae,eff} \quad (5)$$

$$CRE(\%) = (\text{COD}_{an,inf} - \text{COD}_{ae,eff}) / \text{COD}_{ae,eff} \quad (6)$$

式中:NRE 表示氨氮去除率; $\text{NH}_4^+ - N_{an,inf}$ 表示厌氧进水氨氮浓度,mg/L; $\text{NH}_4^+ - N_{ae,eff}$ 表示好氧出水氨氮浓

反应器运行分为挂膜阶段和富集阶段,挂膜阶段(0~46d)以形成具有良好除磷性能的生物膜为主要目标,反应器在厌氧、好氧交替条件下连续运行,厌氧处理和好氧处理后的模拟污水全部排出系统.待生物膜形成后,反应器运行转入富集模式,具体步骤为:(1)将模拟污水(5L)泵入主反应器;(2)生物膜经过厌氧处理完成释磷;(3)将部分污水(体积以 V_R 计)排入富集罐储存;(4)剩余污水(体积以 V_S 计)经过好氧处理后排出反应器;(5)将模拟污水(体积 V_S)和富集液(体积 V_R)泵入主反应器(定义 $V_S : V_R$ 为换水比 VER),重复步骤 2~4;经过多次厌氧/好氧交替处理后,富集液中磷浓度逐渐提高并达到峰值,至此一个富集周期完成,取出全部富集液,由步骤 1 开始新的富集周期.运行期间,主反应器 pH 值控制在 7.5~7.6,好氧阶段溶解氧控制在 5~6mg/L,温度不做控制,随室温在 17~21℃ 之间变化.

1.3 常规水质分析方法

每天选取一个完整的厌氧、好氧周期进行水样测定,在进行分析之前,所有水样均经 0.45μm 滤纸过滤.COD 采用重铬酸钾快速消解法测定, $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}$ 、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 等按照国际标准方法进行测定^[27].好氧期间的磷吸收量(PUA)、厌氧期间的磷释放量(PRA)和磷去除率(PRE)依据以下公式进行计算:

$$PRA(\text{mg/L}) = \text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{enrich} - \text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{an,inf} \quad (1)$$

$$PUA(\text{mg/L}) = \text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{ae,inf} - \text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{ae,eff} \quad (2)$$

$$PRE(\%) = (\text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{an,inf} - \text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{ae,eff}) / \text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{ae,eff} \quad (3)$$

式中: $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{an,inf}$ 表示厌氧阶段初期磷浓度,mg/L; $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{enrich}$ 表示富集液磷浓度,mg/L; $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{ae,inf}$ 表示好氧初期磷浓度,mg/L(富集阶段 $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{enrich} = \text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{ae,inf}$); $\text{PO}_4^{3-} - \text{P}_{ae,eff}$ 表示好氧出水磷浓度,mg/L.

度,mg/L;CRE 表示 COD 去除率; $\text{COD}_{an,inf}$ 表示厌氧进水 COD 浓度,mg/L; $\text{COD}_{ae,eff}$ 表示好氧出水 COD 浓度,mg/L.

1.4 多聚物分析方法

生物膜样品经冷冻干燥后可进行多聚物的测定:磷形态利用 ^{31}P -NMR 技术测定^[28];聚羟基脂肪酸(PHA)样品用氯仿分散萃取法制备,然后进行气

相色谱-质谱分析^[29];糖原(Gly)采用硫酸-苯酚法测定^[30].

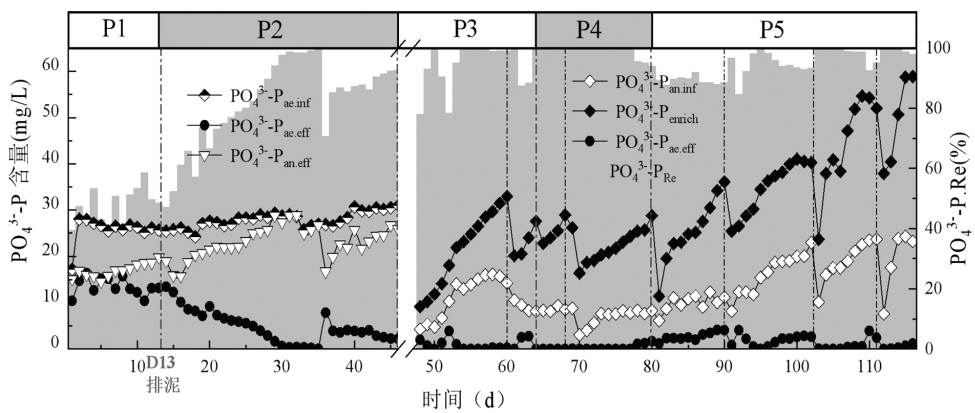
1.5 微生物群落组成与基因分析方法

在第0d和第116d分别采集接种污泥和生物膜样品,在1500r/min下离心5min,去除上清液后置于-80℃冰箱中保存待测定,后送至美吉公司(上海)进行高通量测序分析.其中,PCR扩增采用细菌16S rRNA的V3-V4区通用引物(338F-806R),F端和R端序列分别为ACTCCTACGGGAGGCAGCAG、GGACTACHVGGGTWTCTAAT.

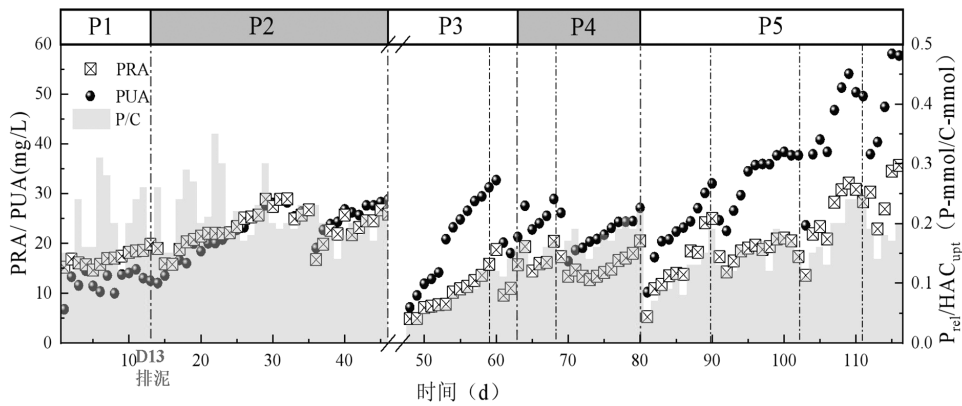
PICRUSt是用来预测菌群代谢功能的工具,基于标记基因序列可预测功能丰度,预测通常是基于16S rRNA基因测序数据进行^[31].利用获得的16S rRNA基因测序数据与KEGG数据库进行比对,进行相关功能基因(包括*actP*、*ackA*、*pta*、*acs*、*pst*、*pit*、*ppk1*、*ppx*、*nir*、*nor*和*nos*等)的分析.

2 结果与讨论

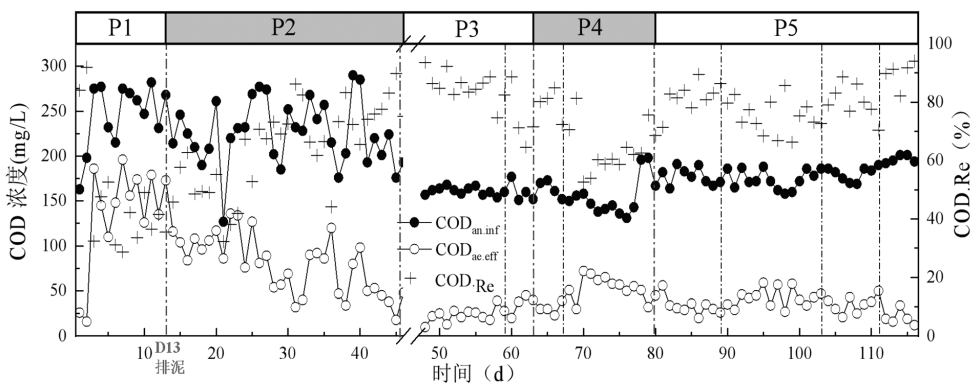
2.1 聚磷生物膜富集培养过程中碳、氮、磷去除效果



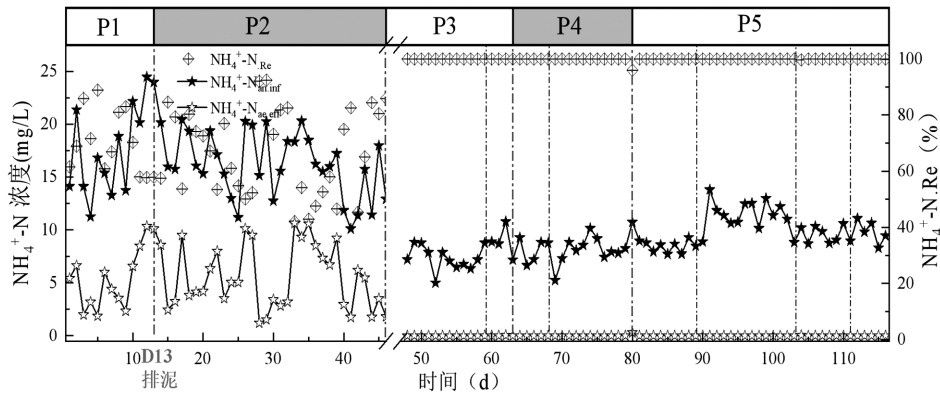
(a) 不同运行阶段进出水磷的浓度变化



(b) 不同运行阶段进出水PRA/PUA变化



(c) 不同运行阶段进出水碳的浓度变化



(d) 不同运行阶段进出水氨氮的浓度变化

图 2 BSBR 系统不同阶段的处理性能

Fig.2 Processing performance of the BSBR system at different stages

自第 0d 开始,主反应器厌氧进水 COD 浓度为 300mg/L,好氧进水 $PO_4^{3-}-P$ 浓度为 30mg/L,此阶段为生物膜挂膜阶段.至第 11d,反应器的除磷效果显著提升,PRE 由初始的 39.53%快速上升至 58.65% (D11),但自第 13d 开始,系统 PRE 与 COD 消耗量开始下降,此时分别对主反应器内的悬浮污泥和生物膜填料进行吸、释磷性能的批次实验,并与反应器整体性能进行对比,结果显示:就吸、释磷性能和碳源利用能力而言,生物膜填料>泥、膜混合系统>悬浮污泥(图 3),这意味着生物膜已经成功富集于载体上,而且具有良好的吸、释磷能力,可以进行排泥操作.排泥后,生物膜系统的碳、氮、磷去除效果均有显著提升,至第 46d,系统平均 PRE 达到 91.93%, P_{rel}/HAC_{upt} 为 0.21P-mmol/C-mmol. P_{rel}/HAC_{upt} 是表征磷富集过程中有机碳利用效率的重要指标^[32],其值越高意味着消耗单位质量的碳源所释放的磷越多,即生物膜磷富集性能良好.同时生物膜对有机碳和氨氮的去除效果良好,CRE 和 NRE 均高于 80%,表明生物膜培养已完成.

此后,生物膜系统进入富集模式,对模拟污水 ($PO_4^{3-}-P$ 浓度为 5mg/L、 NH_4^+-N 浓度为 10mg/L、厌氧进水 COD 浓度为 5mg/L)进行磷富集试验.该阶段的 PUA 和 PRA 分别最高可达 18.005 和 24.44mg/L,而 $PO_4^{3-}-P_{Ana}$ 仅为 26.135mg/L,NRE 和 CRE 相应可达到 100%和 66.67%,系统平均 P_{rel}/HAC_{upt} 仅为 0.09P-mmol/C-mmol,碳源的利用不足是该阶段磷富集效果不理想的可能原因,因此自第 65d 开始将系统厌氧/好氧 HRT 由 2h/4h 分别延长至 3h/5h,随后系统 COD 消耗量有所提升,CRE 提升至 82.54%,系统平均 P_{rel}/HAC_{upt} 也相应地提升至

0.17P-mmol/C-mmol,富集液磷浓度提升至 32.96mg/L.相关文献指出^[22,33],碳源的有效利用是影响系统实现有效磷富集的重要因素,碳源浓度过低不利于系统运行.因此,利用低碳城市污水进行磷富集是具有挑战的.

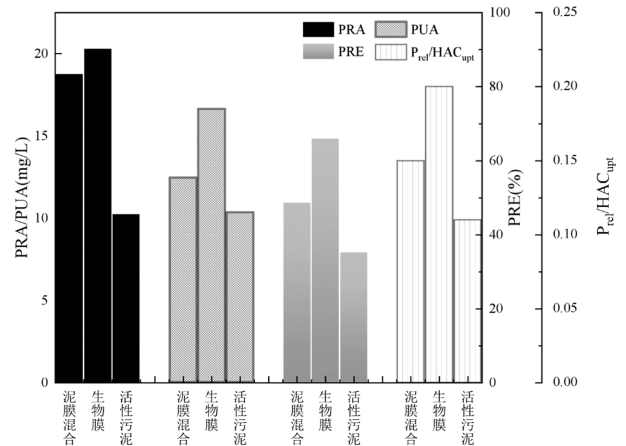


图 3 第 13d 系统性能对比

Fig.3 Performance comparison of batch experiment on D13

为了进一步考察生物膜系统的磷富集效果,自第 80d 开始,将模拟污水中的 $PO_4^{3-}-P$ 浓度从 5mg/L 提高至 8mg/L.如图 2 所示,进水磷浓度的提高对系统总氮去除效果未产生影响,NRE 始终稳定在 100%.但是,生物膜的吸、释磷能力以及碳源利用率均随着进水磷浓度的提高有所提升,在经过 4 个富集周期后,PRA 和 PUA 最终升高至 35.665,57.725mg/L,CRE 提升至 89.53%,系统平均 P_{rel}/HAC_{upt} 提升至 0.2,表明生物膜释磷时的碳源利用效率进一步提高,富集液磷浓度($PO_4^{3-}-P_{enrich}$)逐渐升高至 58.89mg/L,系

统的磷富集能力增强,可满足化学结晶法进行磷回收的浓度要求^[34].研究表明,进水磷浓度也是影响系统磷富集效果的重要因素^[15,35],进水磷浓度越低越不利于系统磷富集,其原因可能在于:较低的进水磷浓度影响细胞内聚磷水平,微生物聚磷代谢(PAM)受到抑制,转为聚糖代谢模式(GAM),进而影响磷的有效富集.近年来,随着工艺技术的发展,城市污水中磷浓度逐渐下降,利用城市污水实现磷高效富集受到挑战.

2.2 聚磷生物膜富集过程中微生物群落结构的变化

接种污泥与成熟生物膜的微生物群落结构在门水平上的差异如图 4(a)所示.在接种污泥中,优势菌门主要为变形菌门(Proteobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、类杆菌门(Bacteroidota)和放线菌门(Actinobacteriota).随着生物膜的形成及其磷富集性能的不断提升,系统中的优势菌门类别未发生改变,但各菌门的丰度有较大变化.Proteobacteria 丰度提升最为显著,由接种污泥中的 21.5%提升至 49.72%.

在现有研究中,EBPR 系统中的大多数 PAOs 和 GAOs 被认为属于 Proteobacteria^[36-37],Proteobacteria 丰度的提升有利于系统磷去除效果的增强^[38].此外,群落中 Bacteroidota 和 Chloroflexi 的丰度在生物膜富集过程中的比例变化明显.有研究认为 Bacteroidota 和 Chloroflexi 参与脱氮过程: Bacteroidota 和 Chloroflexi 是 DPAO 的主要来源^[39],其可利用 NO₃⁻或 NO₂⁻为电子受体进行反硝化脱氮作用,且 Chloroflexi^[40]能够降解有机化合物并改善氮去除.因此,上述微生物在生物膜形成过程中得以富集可能是系统表现出良好脱氮性能重要原因.

表 2 测序深度等相关信息

Table 2 Sequencing depth and other relevant information

各项参数	具体信息
Amplified Region	338F_806R
Sequence	241667
coverage	>99.9%
登录号	PRJNA1165929

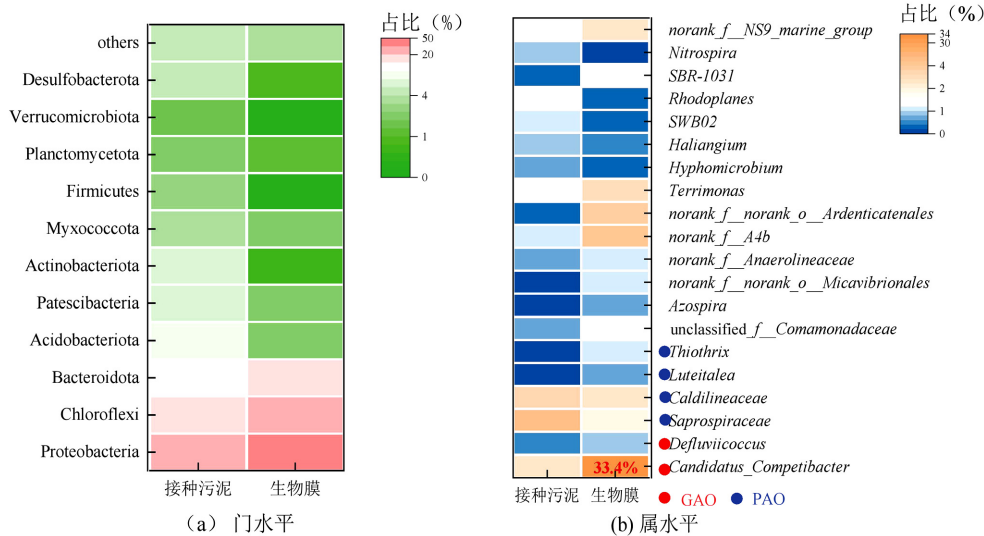


图 4 微生物种群分布

Fig.4 Microbial population distribution

从属水平可以清晰地看出(图 4(b)),接种污泥与生物膜中的 PAOs 主要由 Saprospiraceae 和 Thiiothrix 组成,GAOs 主要由 Candidatus Competibacter 和 Defluviococcus 组成.在生物膜形成及其磷富集性能不断提升的过程中,PAOs 的总体丰度出现下降,由 10.55%(接种污泥)降至 8.55%(生物膜),而 GAOs 的总体丰度却显著提高至 34.4%,其中 Candidatus Competibacter 的丰度变化最为显著,由 2.7%(接种

污泥)提升至 33.4%(生物膜),Defluviococcus 的丰度略有增加(0.6%→1%).结合最近研究报告数据:Chen^[19]在 DO=6mg/L,模拟污水 PO₄³⁻-P 浓度为 10mg/L 的条件下实现磷富集系统的稳定运行,在高 GAOs 占比(48.24%)的生物膜系统中实现了高效磷回收(富集液最高可达 235mg/L);Song 等^[41]在 DO=6mg/L,进水 C/P=32mgCOD/mgP 的 A/O-SBR 系统中存在高 GAOs 占比(40.98%),同时实现了磷的高效

富集与去除(PRE>80%),与本系统条件对比,可推断高 DO 是本系统存在高占比 GAOs 的原因,且高 DO 条件形成的高 GAOs 占比条件对磷富集系统性可能存在一定的促进作用.

2.3 GAOs 富集过程中多聚物代谢的变化

聚磷(poly-P)、PHA 和糖原(Gly)是 PAOs 代谢的 3 种基本聚合物^[19].在好氧条件下,PAOs 将 PHA 降解为 Gly,产生的能量用于吸收水中的正磷酸盐

(ortho-P)并将其在胞内转化成聚磷(poly-P)储存;在厌氧条件下,poly-P 将作为能源物质被分解成 ortho-P 并释放到胞外,这一过程产生的能量用于摄入水中的有机碳,并合成 PHA^[42].GAOs 的代谢特征与 PAOs 接近,但是以 Gly 作为能源物质,不参与 poly-P 的合成.因此,生物膜形成过程中上述多聚物含量的变化可以用于分析 PAOs 与 GAOs 代谢活性的变化.

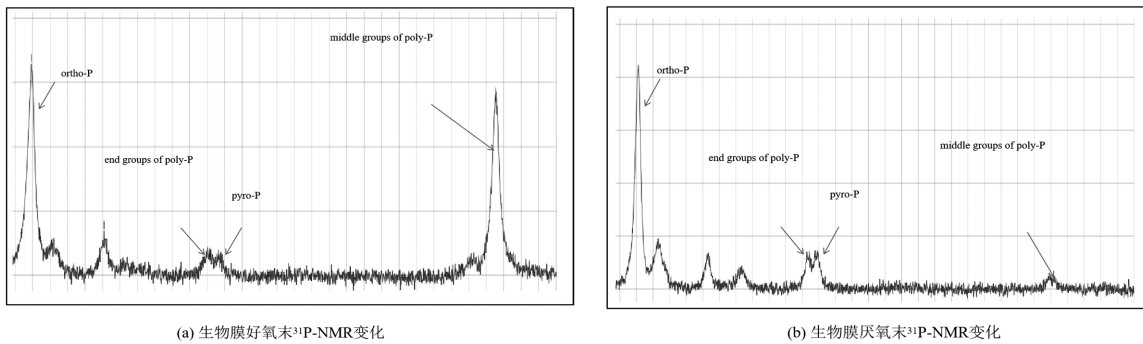


图 5 ³¹P-NMR 图谱示例

Fig.5 Example of ³¹P-NMR spectrogram

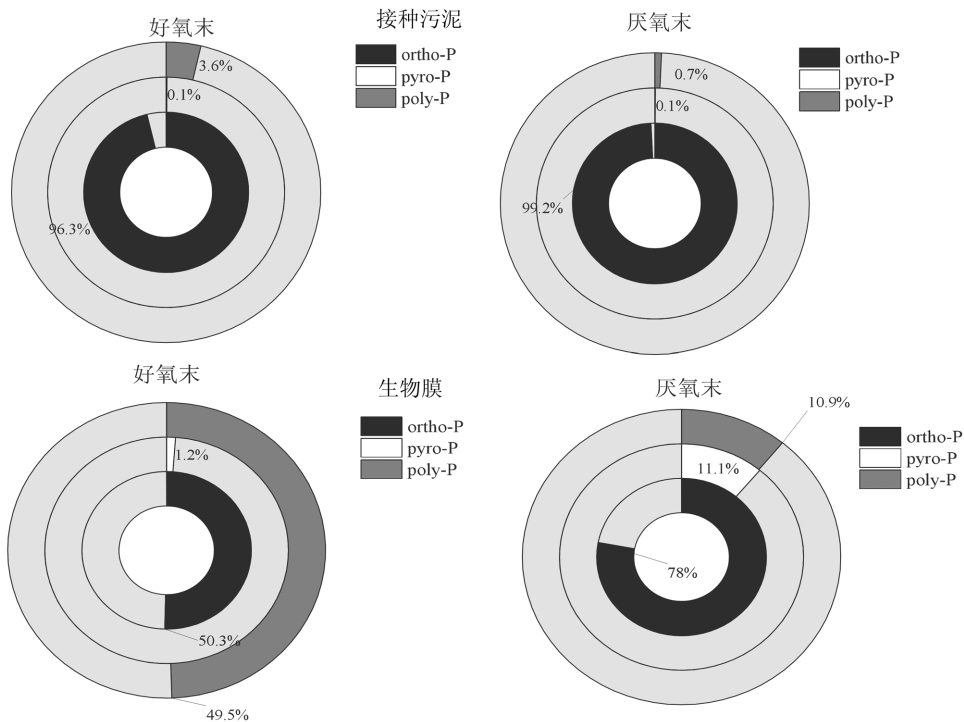


图 6 不同阶段下各样品不同形态磷占比情况

Fig.6 The proportion of phosphorus in different forms of samples at different stages

通过 ³¹P-NMR 谱图分析可知,接种污泥与生物膜样品中磷的存在形态为:正磷(ortho-P)、焦磷(pyro-P)和聚磷(poly-P)(图 5).对比样品各阶段磷形

态比例分析(图 6)可知:在好氧末期,生物膜中 poly-P 的相对占比较接种污泥有显著提升(3.6%→49.5%),且经厌氧分解,生物膜样品中被分解的 poly-P 占比

提升,poly-P 的大量合成在一定程度上有利于促进 PHA 的快速分解和 ATP 的产生^[32].因此,本系统在高占比 GAOs 条件下,聚磷生物膜依旧可以合成大量的 poly-P 促进磷的富集,PAOs 群落丰度降低的情况下,生物膜内 Poly-P 的相对合成量并没有降低,可能原因在于单个 PAOs 的磷代谢能力提高,这是系统磷富集性能不断提升的原因.

理论认为 GAOs 的代谢不参与磷的释放与吸收,因此磷的释放与 VFA 的吸收比(P/VFA)可用来表示 PAOs 和 GAOs 的相对丰度^[43].本研究富集培养的生物膜中 P/VFA 为 0.31,其低于 PAO 模型的典型值(0.42~0.50),这表明系统处于 PAOs 与 GAOs 共存状态.据报道,系统中 PHA 和 Gly 的转化与 PAOs 和

GAOs 的代谢活性有关,生物膜中 Gly 的消耗/合成量达到 1.06/0.54mmol-C,PHA 的合成/消耗量达到 1.41/1.49mmol-C,其消耗与合成量较接种污泥均显著增加.结合各代谢计量参数模型值对比分析^[44-47](表 3),本研究富集培养的生物膜中厌氧糖原水解与 VFA 摄取的比值(Gly/VFA)为 0.32,与 PAOs 模型值(0.29~0.50)相当,远低于 GAOs 模型值(0.29~1.12);本研究富集培养的生物膜中厌氧 PHA 合成与 VFA 吸收比(PHA/VFA)为 0.85,其值接近 PAOs 理论模型的预测,这表明本系统在高占比 GAOs 条件下仍以 PAOs 代谢主导参与,PAOs 代谢能力强于 GAOs,PAOs 与 GAOs 的相对丰度不能直接影响系统内的代谢.

表 3 化学计量比对磷系统性能的影响比较

Table 3 Comparison of Stoichiometric Ratios of on the performance of phosphorus systems

研究 方向	研究模型/系统	厌氧段			好氧段		参考 文献
		P/VFA	Gly/VFA	PHA/VFA	P/PHA	Gly/PHA	
PAOs 研究	Lab-scale PAO culture	0.22-0.64	0.29-0.96	1.36-1.47	--	--	[46]
	PAO model	0.42	0.33	1.22		--	[45]
	PAO model-TCA cycle pathway	0.75	0.00	0.89	0.41	0.42	[47]
	PAO model-glycolysis pathway	0.50	0.50	1.33	0.41	0.42	[47]
GAOs 研究	Lab-scale GAO culture	0	1.12	1.86	--	0.9	[44]
	GAO model	0	1.12	1.85	0.00	0.65	[44]
本研究	接种污泥	0.22	0.04	0.1	1.12	0.36	--
	生物膜	0.31	0.32	0.85	0.56	0.71	

2.4 生物膜磷富集系统内代谢基因的变化

对接种污泥和生物膜的微生物样本进行 PICRUSt 分析,并利用 KEGG 数据库注释功能基因,可得到代谢途径网络图和基因变化图.如图 7 所示,碳代谢主要包括乙酸代谢(吸收和利用)、糖原代谢、PHA 代谢(包括 PHB 和 PHV)、三羧酸循环(TCA);磷代谢主要包括磷酸盐跨膜转运和 poly-P 代谢(磷酸盐的吸收与释放);氮代谢主要包括反硝化脱氮,各阶段功能基因的表达与丰度可以反映出该代谢过程的强度.

2.4.1 碳代谢

PAOs 与 GAOs 均会参与碳源的消耗分解,碳源代谢是功能微生物参与的最为重要的代谢过程,其主要包括乙酸代谢、糖原代谢、PHA 代谢(包括 PHB 和 PHV)、三羧酸循环(TCA).HAc 由 *actP* 运送到细胞内,然后由 *ackA*、*pta* 和 *acs* 降解成 acetate-CoA^[48].如图 7 所示,HAc 代谢关键基因(*actP*、*pta* 和 *acs*)丰度显著上升并保持高表达,系统

中转运和降解 HAc 的能力都得到了提高.糖原代谢与 PHA 代谢可为系统提供能量,其代谢能力与系统磷富集性能存在相关性,HAc 利用三羧酸循环(TCA)或糖原降解产生的还原力(NADH)转化为 PHA(包括 PHB、PHV),合成 PHA 的还原力 70%来自糖原降解,其余由 TCA 循环提供^[49].目前已知的糖原代谢途径包括 Embden-Meyerhof-Parnas(EMP)途径和 Entner-Doudoroff (ED)途径,Hou 等^[48]研究分析表明:EMP 和 ED 途径共存产生 ATP,为系统提供 HAC 转运和其他反应所需的能量.图 7 数据表明,*pfk* 基因(EMP 途径)表达明显高于 *edd*、*eda* 基因(ED 途径),即糖原代谢途径以 EMP 途径为主,且该途径在生物膜形成过程中被加强.Sabba 等^[50]的研究指出,EMP 代谢活性的增强在一定程度上有利于合成 PHA 还原力的提升,促进 PHA 的合成,与生物膜中 PHB 合成的功能基因(*phaA*、*phaB*、*phaC*),PHV 合成的功能基因(*ACAT*、*atoB*)丰度提升一致.因此,系统中可

利用的能量充足,进而有利于系统的稳定运行。

2.4.2 磷代谢 在好氧阶段, P_i 可通过低亲和力无机磷转运系统(Pit)和高亲和力磷酸盐 ABC 转运系统(Pst).如图 7 所示,系统中 *pst* 关键功能基因呈现高表达,促进了 P_i 的转运,这可能与本系统下的高磷负荷相关.此外,poly-P 代谢中的 *ppk*、*ppx* 基因的高效表达与磷代谢功能密切相关:好氧阶段在 *ppk* 的作用下,通过 PHA 分解产生 ATP 并催化 poly-P 的转化;厌氧阶段 poly-P 在 *ppx* 作用下水解,同时产生 ATP 以促进 HAc 的转运和糖原的合成.传统理论认为磷代谢仅是 PAOs 参与的代谢过程,而 GAOs 未参与其中,而随着研究的深入,有研究者指出:GAOs 与 poly-P 代谢相关功能基因(*ppk*、*ppx*)存在优势贡献^[48,51],即高 GAOs 占比的生物膜系统对除磷可能存在一定的积极作用,且由上述碳代谢分析可知,高 GAOs 占比的生物膜系统中 EMP 代谢活性的增强有利于促进 PHA 的合成,进而有利于 poly-P 代谢.综上所述,高 GAOs 富集的生物膜在一定程度上可

促进 *ppk*、*ppx* 的高效表达并促进 poly-P 代谢。

2.4.3 氮代谢 参与氮代谢的关键功能基因包括硝酸还原酶(*nar*)、亚硝酸还原酶(*nir*)、一氧化氮还原酶(*nor*)和一氧化二氮还原酶(*nos*),其基因丰度的提升有利于菌属共同作用实现反硝化氮代谢^[52],如图 7 所示,反硝化代谢途径各关键功能基因表达均有所提升,其中以 NO 还原为 N_2O 途径和 NO_3^- 还原为 NO_2^- 途径尤为突出, NO_3^- 还原为 NO_2^- 途径主要由硝酸还原酶(包括 *narG* 和 *narH*)基因编码作用,硝酸还原酶在反硝化脱氮过程中发挥主要作用.如图 7 所示,*nar* 基因呈现高表达,其丰度的有效提升证明系统反硝化途径的增强.随着聚磷生物膜的富集培养,*Candidatus Competibacter* 占比得到大量提升,且 *Candidatus Competibacter* 存在分支属于 DGAOs^[53],具有反硝化能力的 DGAOs 可利用 NO_3^- 或 NO_2^- 为电子受体,在 *nar*、*nor*、*nir* 等关键功能基因的作用下进行反硝化脱氮作用,使系统具备高效的同步好氧脱氮能力。

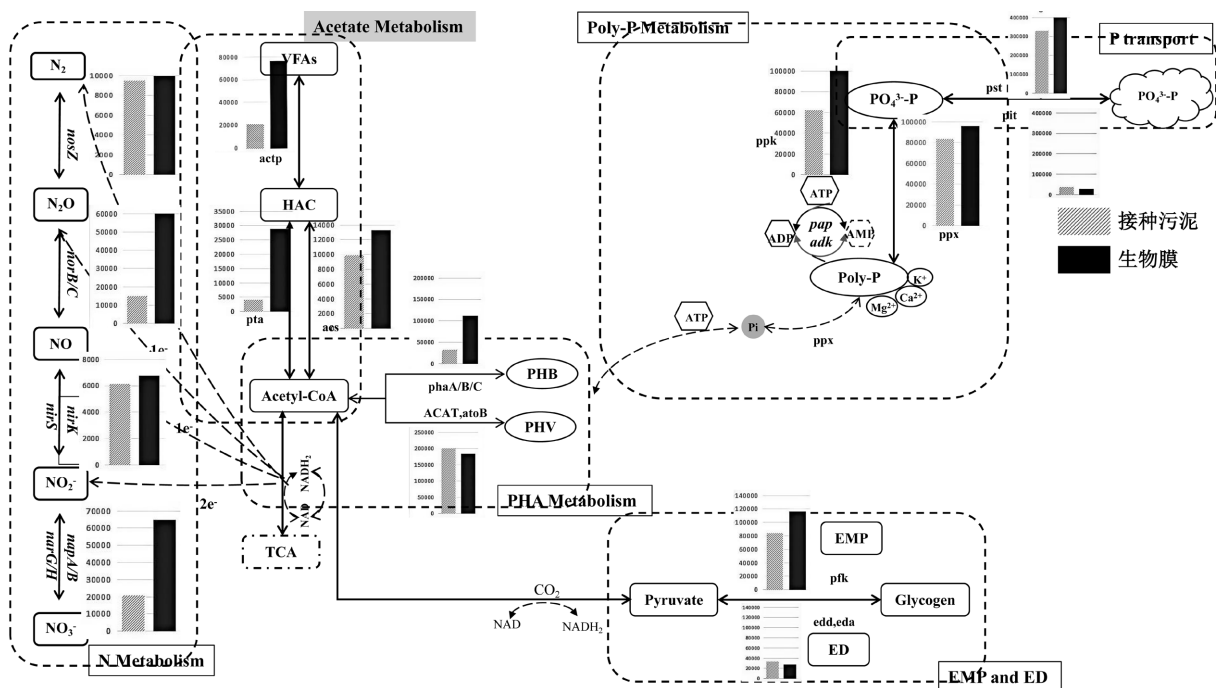


图 7 代谢途径网络与关键功能基因变化

Fig.7 Metabolic pathway network with key functional gene changes

3 结论

3.1 在 $\text{DO}=6\text{mg/L}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}=8\text{mg/L}$ 的条件下快速富集聚磷生物膜的过程中,GAOs 丰度的提高显著优

于 PAOs,最终成为生物膜群落中的优势菌;但这并未对生物膜系统的磷去除与富集效果产生不利影响,系统总磷平均去除率达到 99.2%,富集液浓度达到 58.89mg/L。

3.2 在 GAOs 成为优势菌的过程中,PAOs 单个细胞的 PHA 代谢活性和 poly-P 代谢活性均显著增强,使得生物膜群落以聚磷代谢模式(PAM)为主导,因此高丰度的 GAOs 并不一定会导致生物膜系统向聚糖代谢模式(GAM)转变。

3.3 GAOs 可能通过 EMP 代谢途径获取合成 PHA 所需的还原力(NADH),为 PAOs 在好氧条件下吸磷提供充足的能量储备,从而激发无机磷转运系统(*pst*)、poly-P 合成代谢基因(*ppk*)的表达上调,使生物膜系统表现出良好的磷去除与富集能力。

3.4 与接种污泥相比,生物膜的反硝化代谢途径表达增强,其中以 NO 还原为 N₂O 途径和 NO₃⁻还原为 NO₂⁻途径尤为突出,GAOs(*Candidatus Competibacter*) 作为潜在的反硝化功能菌使得生物膜磷富集系统具备同步好氧脱氮能力。

参考文献:

- [1] Desmidt, Evelyn, Zhang Y, et al. Global phosphorus scarcity and full-scale P-recovery techniques: a review [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2015,45.4:336-384.
- [2] Bi Z, Liu Y, Rutoh W C, et al. Influence of operation sequences on phosphorus recovery by polyphosphate-accumulating organisms biofilm: Performance, kinetics and metabolic response [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2024,61:105356.
- [3] 毕贞,张胜,付豪,等.氨氮浓度对生物膜磷富集效果的影响 [J]. *中国环境科学*, 2023,43(7):3447-3453.
Bi Z, Zhang S, Fu H, et al. Effect of ammonia nitrogen concentration on the phosphorus enrichment effect of biofilm [J]. *China Environmental Science*, 2023,43(7):3447-3453.
- [4] Coats ER, Deyo B, Brower N, et al. Effects of anaerobic HRT and VFA loading on the kinetics and stoichiometry of enhanced biological phosphorus removal [J]. *Water Environment Research*, 2021,93.9:1608-1618.
- [5] Izadi P, Andalib M. Anaerobic zone functionality, design and configurations for a sustainable EBPR process: A critical review [J]. *Science of the Total Environment*, 2023,870:162018.
- [6] Izadi P, Izadi P, Eldyasti A. Understanding microbial shift of enhanced biological phosphorus removal process (EBPR) under different dissolved oxygen (DO) concentrations and hydraulic retention time (HRTs) [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021,166:107833.
- [7] Izadi P, Izadi P, Eldyasti A. A review of biochemical diversity and metabolic modeling of EBPR process under specific environmental conditions and carbon source availability [J]. *Journal of Environmental Management*, 2021,288:112362.
- [8] Wang L. The metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs) and glycogen accumulating organisms (GAOs) in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) system under the tropical climate. 2021 [J].
- [9] 武静.聚磷生物膜富集培养及吸-释磷性能强化 [D]. 苏州:苏州科技大学, 2022.
Wu J. Enhancement of phosphorus-absorbing and releasing properties of polyphosphate biofilm [D]. Suzhou: Suzhou University of Science and Technology, 2022.
- [10] Santos J M, Martins A, Barreto S, et al. Long-term simulation of a full-scale EBPR plant with a novel metabolic-ASM model and its use as a diagnostic tool [J]. *Water Research*, 2020,187:116398.
- [11] Wang Z, Li W, Li H, et al. Phylogenomics of Rhodocyclales and its distribution in wastewater treatment systems [J]. *Scientific reports*, 2020,10.1:3883.
- [12] Mardanov A V, Gruzdev EV, Smolyakov DD, et al. Genomic and metabolic insights into two novel Thiothrix species from enhanced biological phosphorus removal systems [J]. *Microorganisms*, 2020,8.12:2030.
- [13] Kondrotaite Z, Valk LC, Petriglieri F, et al. Diversity and ecophysiology of the genus OLB8 and other abundant uncultured Saprospiraceae genera in global wastewater treatment systems [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022,13:917553.
- [14] 张小玲,张萌,陈紫薇,等.内碳源短程反硝化启动及 EPD-ANAMMOX 耦合工艺性能 [J]. *中国环境科学*, 2022,42(2):601-611.
Zhang X, Zhang M, Chen Z, et al. Initiation of short-range denitrification with internal carbon source and performance of coupled EPD-ANAMMOX process [J]. *China Environmental Science*, 2022, 42(2):601-611.
- [15] 李璐,邵鸿渝,黄继会,等.聚磷菌发生代谢迁移的环境因子及机理分析 [J]. *中国环境科学*, 2024,44(5):2642-2651.
Li L, Shao H, Huang J, et al. Analysis of the environmental factors and mechanism of metabolic transport of phosphorus-colonizing bacteria [J]. *China Environmental Science*, 2024,44(5):2642-2651.
- [16] Bi Z, Wu J, Huang Y, et al. Influence of dissolved oxygen on phosphorus removal by polyphosphate-accumulating organisms biofilm: Performance and metabolic response [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2023,199:109048.
- [17] Nittami T, Mukai M, Uematsu K, et al. Effects of different carbon sources on enhanced biological phosphorus removal and "Candidatus Accumulibacter" community composition under continuous aerobic condition [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2017,101:8607-8619.
- [18] Welles L, Abbas B, Sorokin DY, 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.
- [19] Chen Y, Li L, Zhang Y, et al. Phosphorus absorption and release in biofilm sequencing batch reactor: The combined action of cells and extracellular polymeric substances and the characteristics of polymer metabolism [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2022,49:102979.
- [20] Zhang H, Bi Z, Pan Y, et al. Enhanced phosphorus storage in suspended biofilm by increasing dissolved oxygen [J]. *Science of the Total Environment*, 2020,722:137876.
- [21] 毕贞,付豪,王雪玲,等.复杂碳源对生物膜系统磷富集及微生物群落的影响 [J]. *中国环境科学*, 2024,44(11):6096-6104.
Bi Z, Fu H, Wang X, et al. Effects of complex carbon sources on phosphorus enrichment and microbial communities in biofilm systems [J]. *China Environmental Science*, 2024,44(11):6096-6104.
- [22] 李璐,张玥,邵鸿渝,等.侧流与主流磷回收工艺对比及调控因子分析 [J]. *中国环境科学*, 2024,44(1):103-113.
Li L, Zhang Y, Shao H, et al. Comparison of sidestream and mainstream phosphorus recovery processes and analysis of regulatory factors [J]. *China Environmental Science*, 2024,44(1):103-113.
- [23] Zhang X, Zhao B, An Q, et al. The influence of different nitrate concentrations on aerobic sludge granulation and the role of extracellular polymeric substances [J]. *Journal of Environmental Management*, 2023,348:119226.
- [24] 李冬,解一博,高飞雁,等.调控内生正磷酸盐强化好氧颗粒污泥脱氮除磷 [J]. *中国环境科学*, 2023,43(10):5139-5147.

- Li D, Xie Y, Gao F, et al. Regulation of endogenous orthophosphate to enhance nitrogen and phosphorus removal by aerobic granular sludge [J]. *China Environmental Science*, 2023,43(10):5139–5147.
- [25] 王晓霞,王淑莹,赵 骥,等.SPNEP-PR 系统内 PAOs-GAOs 的竞争关系及其氮磷去除特性 [J]. *中国环境科学*, 2018,38(2):551–559.
Wang X, Wang S, Zhao Z, et al. Competitive relationship between PAOs-GAOs and their nitrogen and phosphorus removal characteristics within SPNEP-PR system [J]. *China Environmental Science*, 2018,38(2):551–559.
- [26] Apha. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed [R]. American Public Health Association, 2012, Washington, DC.
- [27] Oehmen A, Yuan Z, Blackall L L, et al. Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms [J]. *Biotechnology and bioengineering*, 2005,91.2:162–168.
- [28] Yang W, Shan J, Pan Y, et al. A new strategy for obtaining highly concentrated phosphorus recovery solution in biofilm phosphorus recovery process [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2022,112:366–375.
- [29] 陈 淞,苑 泉,姜雨晴,等.不同补料方式对好氧颗粒污泥合成 PHA 的影响 [J]. *中国环境科学*, 2024,44(3):1286–1295.
Chen S, Yuan Q, Lou Y, et al. Effects of different dosing methods on the synthesis of PHA by aerobic granular sludge [J]. *China Environmental Science*, 2024,44(3):1286–1295.
- [30] 王 琪,李 冬,李鹏垚,等.厌氧/缺氧时间对好氧颗粒污泥同步硝化内源反硝化和除磷的影响 [J]. *中国环境科学*, 2022,42(9):4199–4206.
Wang Q, Li D, Li P, et al. Effects of anaerobic/anoxic time on endogenous denitrification and phosphorus removal by synchronized nitrification of aerobic granular sludge [J]. *China Environmental Science*, 2022,42(9):4199–4206.
- [31] 杨文焕,邓子威,徐 岩,等.光合细菌对活性污泥微生物群落结构及功能的影响 [J]. *中国环境科学*, 2024,44(3):1314–1323.
Yang W, Dang Z, Xu Y, et al. Effects of photosynthetic bacteria on the structure and function of activated sludge microbial community [J]. *China Environmental Science*, 2024,44(3):1314–1323.
- [32] Long X Y, Tang R, Wang T, et al. Characteristics of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process under the combined actions of intracellular and extracellular polyphosphate [J]. *Chemosphere*, 2021,279:130912.
- [33] Wang S, Li Z, Wang D, et al. Performance and population structure of two carbon sources granular enhanced biological phosphorus removal systems at low temperature [J]. *Bioresource Technology*, 2020,300:122683.
- [34] Carrillo V, Castillo R, Magri A, et al. Phosphorus recovery from domestic wastewater: A review of the institutional framework [J]. *Journal of Environmental Management*, 2024,351:119812.
- [35] Zhang C, Guisasola A, Baeza J A. A review on the integration of mainstream P-recovery strategies with enhanced biological phosphorus removal [J]. *Water Research*, 2022,212:118102.
- [36] 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.
- [37] Yuan J, Deng X, Xie X, et al. Blind spots of universal primers and specific FISH probes for functional microbe and community characterization in EBPR systems [J]. *ISME communications*, 2024, 4.1:ycae011.
- [38] Jia L, Cheng X, Fang L, et al. Nitrogen removal in improved subsurface wastewater infiltration system: Mechanism, microbial indicators and the limitation of phosphorus [J]. *Journal of Environmental Management*, 2023,335:117456.
- [39] Yan L, Liu S, Liu Q, et al. Improved performance of simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an oxygen-limited SBR by alternating the DO [J]. *Bioresource Technology*, 2019,275:153–162.
- [40] Li L, Dong Y, Qian G, et al. Performance and microbial community analysis of bio-electrocoagulation on simultaneous nitrification and denitrification in submerged membrane bioreactor at limited dissolved oxygen [J]. *Bioresource Technology*, 2018,258:168–176.
- [41] Song X, Yu D, Qiu Y, et al. Unexpected phosphorous removal in a Candidatus_Competibacter and Deffluviococcus dominated reactor [J]. *Bioresource Technology*, 2022,345:126540.
- [42] Ni M, Chen Y, Pan Y, et al. Study on community structure and metabolic mechanism of dominant polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) and glycogen-accumulating organisms (GAOs) in suspended biofilm based on phosphate recovery [J]. *Science of The Total Environment*, 2022,815:152678.
- [43] Kang D, Yuan Z, Li G, et al. Toward Integrating EBPR and the Short-Cut Nitrogen Removal Process in a One-Stage System for Treating High-Strength Wastewater [J]. *Environmental Science & Technology*, 2023,57.35:13247–13257.
- [44] Petriglieri F, Singleton CM, Gomez MP, et al. Dechloromonas: to be or not to be a PAO? That is the question! [C]//8th IWA Expert Meeting on Microbial Ecology and Water Engineering, Hiroshima, Japan, 2019.
- [45] Mclroy SJ, Albertsen M, Andresen EK, et al. Candidatus Competibacter-lineage genomes retrieved from metagenomes reveal functional metabolic diversity [J]. *The ISME Journal*, 2014,8.3:613–624.
- [46] Nguyen HTT, Le VQ, Hansen AA, 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.
- [47] Nielsen PH, Mclroy SJ, Albertsen M, et al. Re-evaluating the microbiology of the enhanced biological phosphorus removal process [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019,57:111–118.
- [48] Hou R, Yuan R, Chen R, et al. Metagenomic analysis of denitrifying phosphorus removal in SBR system: comparison of nitrate and nitrite as electron acceptors [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022,446:137225.
- [49] Ren T, Chi Y, Wang Y, et al. Diversified metabolism makes novel Thauera strain highly competitive in low carbon wastewater treatment [J]. *Water Research*, 2021,206:117742.
- [50] Sabba F, Farmer MK, Jia Z, et al. Impact of operational strategies on a sidestream enhanced biological phosphorus removal (S2EBPR) reactor in a carbon limited wastewater plant [J]. *Science of The Total Environment*, 2023,857:159280.
- [51] Zheng Q, Zhang M, Zhang T, et al. Insights from metagenomic, metatranscriptomic, and molecular ecological network analyses into the effects of chromium nanoparticles on activated sludge system [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2020,14:1–11.
- [52] 安格尔.基于宏基因组的反硝化除磷系统微生物多样性及功能研究 [D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2023.
Anger. Macrogenome-based study on microbial diversity and function of denitrification and phosphorus removal system [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2023.
- [53] Chen B, Li Y, Luo Z, et al. Formation and granulation mechanism of granular sludge dominated by denitrifying glycogen-accumulating organisms [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023,474,145638.
- 作者简介:** 毕 贞(1986-),女,江苏苏州人,副教授,博士,研究方向为污水处理与资源化利用技术.发表论文 20 余篇.bizhen@mail.usts.edu.cn.