

强化生物除磷系统的微生物种群及其表征技术*

王海燕** 周岳溪 蒋进元

(中国环境科学研究院水污染控制技术研究室 北京 100012)

摘要: 详细介绍了强化生物除磷系统 (enhanced biological phosphate removal, 简称 EBPR) 中的微生物种群及其表征技术, 提出了研究 EBPR 中微生物种群及其表征技术的发展方向。

关键词: 强化生物除磷系统 (EBPR), 微生物种群, 表征技术, 分子生物技术

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0118-05

Microbial Populations and Community Structure Characterization Technologies of the Enhanced Biological Phosphate Removal System

WANG Hai-Yan ZHOU Yue-Xi JIANG Jin-Yuan

(Department of Water Pollution Control Technology, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012)

Abstract: The microbial populations and community structure characterization technologies of the enhanced biological phosphate removal system were reviewed comprehensively in this paper, and their future research directions were outlined.

Key words: Enhanced biological phosphate removal system (EBPR), Microbial populations, Characterization technologies, Molecular biological technology

1 EBPR 简介

磷是引发水体富营养化的控制因素, 随着全球富营养化程度的加剧, 污水除磷成为研究的热点。强化生物除磷系统 EBPR 是结合厌氧/好氧循环, 通过控制污泥停留时间 (SRT) 等工艺条件富集聚磷菌 (Polyphosphate-accumulating organisms, PAOs) 以从污水中除磷的工艺。厌氧时, PAOs 利用细胞内磷酸盐聚合物 (聚磷) 水解产生的能量将碳氢化合物 (聚羟基烷酯-PHA 或细胞糖类) 转化为聚- β -羟基丁酯 (PHB), 同时释放磷; 好氧时, PAOs 氧化 PHB 为生长提供碳源和能量, 同时过量摄取磷以合成聚磷; 通过排放污泥实现磷的去除^[1]。EBPR 相比其它除磷工艺费用低、效果好, 在污水除磷中发挥日益重要的作用。

2 EBPR 中的微生物种群

EBPR 中的微生物种群受环境因素如基质、电子受体和碳磷比 (C/P) 等影响, 主要分为 PAOs 和非聚磷菌 (非 PAOs) 两大类, 它们之间竞争碳源。PAOs 多呈球形, 非 PAOs 为聚糖原菌 (glycogen accumulating organisms, GAOs), 多呈四分染色体球

* 国家高技术研究发展计划项目 (863 项目) (No. 2002AA601320B)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2002AA601320B)

** 联系人 Tel: 010-84915322, Email: wanghy@craes.org.cn

收稿日期: 2004-05-12; 修回日期: 2004-06-29

状^[1]。对 EBPR 微生物种群进行研究,掌握关键 PAOs 的特征并改善其生长,能够实现系统的高效除磷。

2.1 PAOs EBPR 中存在多种 PAOs。传统分离培养研究表明 PAOs 有革兰氏阳性菌如不动杆菌 (*Actinobacteria*) 和聚磷小月菌 (*Microthrix phosphovorans*), 革兰氏阴性菌如假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等, 传统分离技术中因缺乏简单的除磷表现型 (phenotype) 方法, 假定的 PAOs 分离受到限制, 但随着分子生物技术应用, 表明 EBPR 中同时存在种属和分类学上不同的多种 PAOs 菌群, 域细菌的主要门至少包括 30 种不同的种型^[2]。EBPR 常见的 PAOs 菌群有: 类 *Rhodocyclus* 菌 (红环菌)、Proteobacteria 纲的 β 、 α 、 γ 亚纲、含高 (G + C) DNA 的革兰氏阳性菌 (GPBHG); 此外还有 *Microthrix* spp.、*Acinetobacter* spp.、属 Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides 分支的 Cytophaga-Flavobacterium (CF) 亚纲^[3]; 类 *Tetrasphaera* 的棒状菌、属 HGC 类 *Candidatus Nostocoidia limicola* 的丝状菌^[3,4]; β -Proteobacteria 球杆菌群 ‘*Candidatus Accumulibacter phosphatis*’ PAOs, 属 α -Proteobacteria 而不属 *Amaricoccus* spp. 的类 ‘G’ 细菌的 Tetrad-forming organisms (TFOs)、反硝化聚磷菌 (denitrifying phosphate-accumulating organisms, DNPAOs)、*Lampropedia* spp. 等, 并不断发现新 PAOs。一些研究者认为类 *Rhodocyclus* 菌是 EBPR 中的优势 PAOs, 也有人认为 Proteobacteria β 亚纲为优势 PAOs, 还有研究表明 Proteobacteria α 亚纲、GPBHG、*Tetrasphaera* spp.、丙酸杆菌 (*Propionibacter*) 等也为优势 PAOs^[3,4]。

2.1.1 *Acinetobacter* spp.: 1975 年 Fuhs 等首次从除磷污泥中分离出属 Proteobacteria γ 亚纲的 *Acinetobacter* spp., 并认为可能是主要的 PAOs。由于其在 EBPR 中广泛存在并易于分离, 随后一段时期对 EBPR 微生物学的研究主要集中在该种属并不断发现其新成员, 常以 *A. johnsonii* 210A 为代表研究聚磷代谢机理。但分子生物学技术研究却表明, *Acinetobacter* spp. 可能不是 EBPR 中的优势菌^[1,3]。

2.1.2 *Microthrix phosphovorans*: *M. phosphovorans* 是可从 EBPR 中分离培养的另一种 PAOs, 是球状革兰氏阳性化能异养菌, 严格以氧气作为电子受体, 主要的生物醌是甲基萘醌类 MK-9 (H₄), 不属于高 G + C 菌群, 它有非常高的磷释放及摄取率—3.34 和 1.56 mmol/ (g 细胞 · h), 但其不是 EBPR 中的优势菌群^[5]。

2.1.3 *Rhodocyclus* 相关菌群: 分子生物学方法对 EBPR 研究表明, *Rhodocyclus* 相关菌是 EBPR 中的优势 PAOs, 属 Proteobacteria β 亚纲。通过构建 16S rDNA 基因片段文库, 发现来自不同 EBPR 污泥的 16S rDNA 片段与 *Rhodocyclus* 相关菌有高度相似性, 所有被检的 EBPR 中均出现 *Rhodocyclus* 相关菌并发挥主要除磷作用^[6]。无论脱氮与否, EBPR 中都存在大量的 *Rhodocyclus* 相关菌, 其含量随工艺类型有所变化。近期大量研究均表明 *Rhodocyclus* 相关菌是良好运行 EBPR 中的优势 PAOs。

2.1.4 DNPAOs: DNPAOs 属 PAOs 的一种, 具有同时脱氮除磷功能。PAOs 在厌氧/好氧 SBR 中被富集, DNPAOs 在厌氧/缺氧 SBR 中被富集, 研究表明这两种 EBPR 中占优势的 PAOs 和 DNPAOs 是同一种微生物^[7]。无硝化作用的 EBPR 和具有硝化反硝化作用的 Phoredox-EBPR 中的微生物组成差别甚小, 也说明 DNPAOs 和 PAOs 属于同一种微生物。部分研究认为, 在脱氮 EBPR 中的 *Rhodocyclus* 相关菌及 GAOs 中可能存在反硝化菌。常规 EBPR 厌氧阶段硝酸盐的产生会抑制磷的去除, 但 DNPAOs 却能利用同一碳源来处理硝酸盐和磷酸盐, 达到同时脱氮除磷目的。

2.1.5 酵母菌型 PAOs: Melasniemi H 等在去除营养盐的 UCT 活性污泥中发现有葡萄状的 PAOs 菌群, 其在污水处理的除磷系统中常优势存在; 此类 PAOs 为体型较大的均一菌群, 用抗菌素、抗酵母菌素和溶菌酶等对其研究发现其具有酵母菌的特点, 推测可能是酵母菌的孢子群^[8]。在厌氧/缺氧 SBR 除磷研究中也发现类似的椭圆形 PAOs。酵母状 PAOs 对细菌型 PAOs 是一种新挑战。

2.1.6 好氧 PAOs 新种属: 针对 PAOs 生长缓慢的特点, 结合慢速反应器构型, 采用延长低营养介质下培养期的分离方法, 从厌氧/好氧 SBR-EBPR 中分离得到的 T-27^T 菌株是革兰氏阴性、棒状的好氧菌, 为 BD 或 KS-B 属细菌门的分支, 含有环境 16S rDNA 克隆序列, 此新种属为 *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov. 是 Gemmatimonadetes 门中第一个被分离的菌株^[9]。

2.2 非 PAOs 非 PAOs 在运行良好的 EBPR 中数量较少, 但在衰退的 EBPR 中常优势存在, 其不积累聚磷, 但能积累 PHA。多数研究认为, 在 EBPR 中的 GAOs 即为非 PAOs。研究表明 EBPR 中的“G 细菌”就是 GAOs, “G 细菌”是四分体、片状和群状的球菌, 种属较多。GAOs 和 PAOs 都能在厌氧条件下摄取挥发性脂肪酸 (VFA) 并在好氧条件下利用细胞内的 PHA 进行生长, 它们之间的竞争机理可用数学模型来解释^[10]。GAOs 的最小化有利于 EBPR 中 VFA 的利用, 也有研究认为 GAOs 在长 SRT (≥ 20 天) 下和 PAOs 竞争。由于 PAOs 是嗜寒性微生物而 GAOs 不是, 所以较低温度下 PAOs 量增加, EBPR 的除磷效果增强。Saunders 等的最新研究发现某些 GAOs 例如 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* 同时也是 PAOs。

3 EBPR 微生物种群研究常用表征技术

3.1 生物化学法 生物化学法中常用的是生物标记物 (biomarker) 法, 其通过细胞特有的脂肪酸、呼吸醌等“环境样品信号”在分类学上用来表征、区分和鉴定细菌属、种、株等^[11,12]。作为生物标记物法的简单细胞染色技术 DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride) 能够初步快速区分 PAOs 和非 PAOs, 对 EBPR 研究起到了很大的推动作用^[11]。细胞脂肪酸组成可用来鉴定微生物种群的变化。通过比较 PAOs 和 GAOs 脂肪酸组成及其动力学, 可以研究除磷工艺中两类菌对基质的竞争机理, 对其代谢机理具有重要意义^[11]。呼吸醌是原生质膜的组成成分, 作为微生物分类的依据具有简单性和重现性的优点。EBPR 中均含有泛醌 (Q) 和甲基萘醌 (MK), Q/MK 摩尔比为 1:0.455 ~ 1:0.981, 不同 EBPR 的 Q/MK 存在一定的差异性^[12]。

3.2 分子生物学技术 微生物纯分离培养方法只对环境样品中“可计数的、可培养的”的细菌 (占细菌总数的 1% ~ 10%) 提供信息, 难以提供微生物群落结构和空间分布方面的信息, 不利于迅速判断环境变化。但近几年出现的分子生物学技术则克服了上述缺点, 研究 EBPR 微生物种群常用的分子生物技术如下。

3.2.1 rRNA 为目标的 FISH: rRNA 为目标的 FISH (fluorescent in situ hybridization, 荧光原位杂交) 由 DeLong 等 1989 年引入微生物界, 是用荧光标记的 rRNA 为目标的 DNA 寡聚物探针去探测未损伤的微生物群落, 探针与感受态固定细胞内互补的 DNA/RNA 序列结合发出荧光, 从而得到微生物空间分布, 能够对复杂环境样品中的细菌进行原位鉴定; 用 16S rRNA 为目标的 FISH 可有效评估所有 EBPR 中的微生物群落结构^[3]。当多个荧光探针补充于同一 16S rRNA 的不同区时, 荧光会附加性增强。随着得到的

16S rRNA 片段增加, rRNA 为目标的 FISH 技术得到了广泛应用, 并开发出了探针设计软件。

3.2.2 聚合酶链反应 (PCR) 及其相关技术: PCR 是一种能将特定 DNA 序列扩增数百万倍的酶促反应, 其扩增产物可以通过琼脂糖凝胶电泳来检验和纯化, 也能用来克隆、转化和测序。特定 DNA 序列的微小变化, 能提供相关微生物群落在结构和多样性方面的信息, 因此采用 PCR 及其相关技术, 能够分离和鉴别核苷酸序列差别较小的 PCR 扩增产物。

(1) PCR-DGGE: 变性梯度凝胶电泳 (denaturalization-gradient gel electrophoresis, DGGE) 是利用 DNA 序列在聚丙烯酰胺变性梯度凝胶中迁移速度发生改变而得以分辨, 仅有单个碱基变化的 DNA 片断也能被 DGGE 分辨。分析 PCR 扩增基因的点突变可用来探索微生物的复杂性。将 DGGE 和 PCR 扩增的 16S rRNA 基因片段联合, 可以定义不同温度区的微生物分布^[13]。用 DGGE 对 16S rRNA 基因译码的 PCR 扩增的同长片段进行分离, 可对未表征群落的基因多样性进行了解。曾用 PCR-DGGE 表征了 EBPR 不同电子受体条件下培养的 DNPAOs, 揭示了依赖不同电子受体的微生物群落结构的变化, 对 DGGE 带上切离的序列进行分析可确定微生物的种属关系。

(2) 限制性片断长度多态性 (RFLP): 限制性片断长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 技术是用特异性引物对混合微生物群体的 DNA 提取物进行 PCR 扩增, 然后用适当的限制性内切酶对扩增产物进行消化, 消化产生的限制性片断通过电泳用溴化乙锭染色, 在紫外灯下观察分析 DNA 的多态性, 该方法能表征 EBPR 复杂微生物群落结构的多样性^[14]。用译码 16S rRNA 的终端限制性片断长度多态性 (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 可以比较不同生态系统微生物的结构和分布, 并量化微生物的多样性, 能表征复杂的微生物群落如活性污泥系统等。

(3) 随机扩增多态性 DNA 技术 (RAPD): randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 是用长度约 10 bp 的随机 DNA 序列为引物, 通过 PCR 扩增得到目的基因组特异性 DNA 片断“指纹”, 由此研究微生物的群落结构。RAPD 在推测群落多样性时效果稍差, 但在比较不同阶段种群变化时有重要作用; 在研究 EBPR 微生物群落结构时有一定应用, 曾用 RAPD 表征从 EBPR 中分离出的 *Acinetobacter*。

(4) 16S rDNA 测序: DNA 直接测序无需经过分离培养, 大大增加了人们检测和鉴定环境混合微生物的能力, 因此成为检测微生物群落的常用方法之一。测序通常检测 16S rDNA, 有时也测定 23S rDNA, 测序能够准确判定活性污泥菌落中的微生物。16S rDNA 克隆库分析表明 EBPR 中有很高程度的种属多样性^[15]。

3.3 多手段相结合的表征技术 在研究 EBPR 的微生物群落结构时, 往往是将生物化学和分子生物学等多种表征技术结合起来。如通过对 16S rRNA 为目标的荧光寡核苷酸探针标记的细菌进行流动血细胞计数, 可区分混合微生物种群中目标性和非目标性细菌。比较性 rRNA 序列分析、rRNA 为目标的 FISH 和共聚焦激光光散射结合, 能确定 EBPR 微生物群落的种属、丰度、和相对空间分布。DAPI 对细胞内聚磷染色, 因此可结合 DAPI、PHA 染色和 FISH 来确定细菌积累聚磷和 PHA 的特征^[4]。RFLP 和流动血细胞计数相结合能表征 EBPR 的 PAOs, 将 DAPI 染色的 PAOs 用流动血细胞计数法进行分类, 并提取分类菌染色体 DNA, 建立 16S rDNA 克隆文库并用 PCR 扩增后进行 RFLP

分析,可确定 EBPR 的群落结构^[14]。采用多手段相结合的表征技术,能全方位表征 EBPR 内的微生物群落结构。如将 PCR-扩增的 16S rDNA 的 DGGE、生物配谱图、16S rRNA 为目标的 FISH 技术联合表征 EBPR 中的 PAOs, DGGE 凝胶表明优势 DNA 片段和 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (β -Proteobacteria) 菌密切相关,配谱图和 FISH 表明该菌占优势,DAPI 染色观察也支持该菌为反应器主要 PAOs,各种方法之间起到了相互补充和验证的作用。

4 EBPR 微生物研究展望

随着分子生物学等表征技术的进步,对 EBPR 中微生物的研究也不断发展,未来 EBPR 中微生物的研究将主要集中在以下方面:(1) 深入研究具有同步脱氮除磷功效的 DNPAOs,对其微生物生态学的研究有助于开发污水脱氮除磷新工艺。(2) 目前类 *Rhodocyclus* 菌群被认为是 EBPR 混合菌群中的优势 PAOs,其代谢机理和微生物学特点仍需进一步深入研究。对 EBPR 中酵母型 PAOs 需做进一步研究,对 PAOs 的分类研究具有重要意义。(3) 对优势 PAOs、DNPAOs 的接种应用及相关生物酶等进行研究,探索上述菌种的保存和快速培养方法,应更好地应用于实践。分子生物技术的应用要与 EBPR 厌氧和好氧序批实验同时进行,藉此检查被评估 PAOs 的相似性,并深入研究 PAOs 的分离方法。(4) 以分子生物学技术为主,辅以生物化学方法,采用多手段结合表征技术是今后研究 EBPR 微生物的趋势。建立高效的 PAOs 定量和定性表征方法是研究 EBPR 微生物的关键。

参考文献

- [1] Blackall L L, Crocetti G R, Saunders A M, *et al.* *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, **81** (1-4): 681 ~ 691.
- [2] Bond P, Erhart E, Wagner M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 4077 ~ 4084.
- [3] Mudaly D D, Atkinson B W, Bux F. *Water Sci Technol*, 2001, **43** (1): 91 ~ 98.
- [4] Liu W T, Nielsen A T, Wu J H, *et al.* *Environ Microbiol*, 2001, **3** (2): 110 ~ 122.
- [5] Lee T J, Kawaharasaki M, Matsumura M, *et al.* *Environ Technol*, 2002, **23** (7): 747 ~ 755.
- [6] Zilles J L, Peccia J, Kim M W, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (6): 2763 ~ 2769.
- [7] Zeng R J, Saunders A M, Yuan Z, *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 2003, **83** (2): 140 ~ 148.
- [8] Hannes M, Anne H. *Microbiology*, 2000, **146**: 701 ~ 707.
- [9] Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S, *et al.* *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 1155 ~ 1163.
- [10] Zeng R J, Yuan Z, Keller J. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **83** (3): 293 ~ 302.
- [11] Wang J C, Park J K, Whang L M. *Water Environ Res*, 2001, **73** (6): 704 ~ 710.
- [12] Hiraishi A, Ueda Y, Ishihara J. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64** (3): 992 ~ 998.
- [13] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (2): 340 ~ 346.
- [14] Kawaharasaki M, Manome A, Kanagawa T, *et al.* *Water Sci Technol*, 2002, **46** (1 ~ 2): 139 ~ 144.
- [15] Bond, P L, Hugenholtz P, Keller J, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1910 ~ 1916.