

碳源调控下除磷/蓄磷生物滤池的生物膜特性分析

王凤蕊 张顺 田晴* 谢学辉

(东华大学 环境科学与工程学院 上海 201620)

摘要: 【目的】分析厌氧/好氧交替生物滤池(AABF)在生物除磷与蓄磷过程中,采用碳源调控(定期补充进水碳源)诱导蓄磷菌群充分释磷-排磷的运行方式对滤池微生物特性的影响。

【方法】通过多聚物染色、扫描电镜(SEM)以及限制性酶切多态性分析法(RFLP),对比了碳源调控前后 AABF 长期运行生物膜内菌群形态、组成特征及变化。【结果】AABF 在实施碳源调控期间滤池生物膜内部分微生物形态主要由杆状演变为丝状;细菌种类大幅减少,碳源调控过程中生物膜内优势菌 β -Proteobacteria 的比例由 56.9%提高至 72.5%。实施碳源调控后,细菌的组成与形态变化明显。【结论】定期补充进水碳源(诱导释磷/收割磷的运行方式),同时控制碳源投量,能够引起生物膜微生物形态发生较大变化,优势菌比例迅速提高。研究结果对于通过过程调控,提高除磷工艺的设计具有重要的意义。

关键词: 生物除磷/蓄磷, 生物滤池, 补充碳源, 强化磷释放, 微生物群落

Biofilm characteristics of an anaerobic/aerobic biofilter varied with carbon source regulation

WANG Feng-Rui ZHANG Shun TIAN Qing* XIE Xue-Hui

(College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: 【Objective】The effect of carbon source regulation (cyclic carbon source addition) to induce PAOs' extensive P-release on characteristics of the microbial in a continuous

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20906011); 留学回国人员科研启动基金项目(No. 11W11329); 上海市自然科学基金项目(No. 102R1401200); 中央高校东华大学基本科研业务费专项资金(No. 11D11308)

*通讯作者: Tel: 86-21-67792539; 信箱: tq2004@dhu.edu.cn

收稿日期: 2013-01-06; 接受日期: 2013-04-17

anaerobic/aerobic alternating biological filter (AABF) operated for phosphorus (P) removal and accumulation was investigated. **[Methods]** Intracellular storage polymer dyeing, scanning electron microscopy (SEM) and restriction enzyme analysis technology of polymorphism (RFLP) were employed to characterize the changes of microbial communities in biofilm before and after the terminal carbon source regulation in the AABF's long-term operation. **[Results]** During carbon source regulation period, the amount of big coccus and cocco-bacillus microbes decreased and the filamentous microbes increased instead in AABF after carbon source regulation; bacterial diversity reduced greatly, the predominance of β -proteobacteria increasing from 56.9% to 72.5%. **[Conclusion]** Terminal carbon source addition (induce P-release/P-recovery of operation) with corresponding dosage regulation could cause great changes in microbial morphologies and the dominate bacteria ratio increased rapidly. The results of the study provide informative reference on improving the efficiency of biological phosphorus removal system with process control.

Keywords: Biological phosphorus removal/accumulation, Biofilter, Carbon source addition, Enhanced phosphorus release, Microbial community

含磷废水的排放不仅引起水体富营养化,同时会导致磷资源的浪费,从低磷废水中直接回收磷费用高且效率低,因此需通过生物法富集废水中的磷,以此提高磷回收系统的效率、并减少二次污染。开发废水强化生物除磷(EBPR)-磷回收的联用技术多基于活性污泥法的 EBPR 系统。然而,悬浮污泥系统存在的污泥膨胀、大量废弃污泥的后续处置等问题都严重制约了 EBPR-磷回收联用技术的发展;生物膜法具有微生物固着生长、可避免污泥膨胀以及剩余污泥量少等优点^[1],利用附着生长的生物膜法强化生物除磷(EBPR)工艺能够有效避免活性污泥 EBPR 的各项弊端。然而,目前关于生物膜系统 EBPR 的研究仅限于反应器性能、处理效果的优化等方面,针对生物膜法除磷/蓄磷-磷回收联用工艺的开发,以及相关报道很有限。

聚磷菌群(Phosphate-accumulating organisms, PAOs)是生物除磷工艺的关键,是一类可以超出其生理需要地从外部摄取磷以聚合磷酸盐(Poly-P, poly-Phosphate)的形式贮存在细胞体内的菌群。Fuhs 和 Chen 于 1975 年最先提出 *Acinetobacter*

种在 EBPR 工艺发挥着重要的作用^[2]。后续的研究认为 β -Proteobacteria 纲的 *Rhodocyclus* 属^[3-5]以及 γ -Proteobacteria 纲的某些菌属^[5]是主要除磷功能菌。目前已发现并分离出 60 多种具有过量聚磷能力的细菌和真菌,报道过包括 *Arthrobacter*^[6]、*Pseudomonas*^[7]和 *Acinetobacter*^[8]属等细菌。

易降解碳源的数量往往制约着 PAOs 的富集,且有限的碳源还可能被聚糖菌(Glycogen-accumulating organisms, GAOs)吸收,在厌氧环境下吸收碳源用于合成 PHB,而在好氧环境下却不能合成 Poly-P^[9-10],从而制约着 EBPR 的除磷效率,甚至造成系统崩溃,因此碳源的数量、种类以及供给方式都有可能影响到 PAOs 的生长及其与 GAOs 的竞争关系。现有文献主要集中在温度、pH、碳源种类等因素对 PAOs 及其与 GAOs 生存关系的影响^[9,12-13],而通过定期补充进水碳源(碳源调控)刺激系统内 PAOs 充分释磷方式对生物除磷系统内 PAOs 的组成及其形态等特征的影响尚未有报道。

限制性酶切片段长度多态性分析(RFLP)不

依赖微生物培养,能够经济、有效地分析传统的微生物技术难以鉴别的微生物种群,提供生物多态性信息,是目前使用较广泛的分子生物学手段。本研究在连续式厌氧/好氧交替生物滤池(AABF)反应器中,采用定期补充进水碳源(碳源调控)诱导蓄磷菌群充分释磷后排磷的运行方式进行生物除磷与蓄磷,为了解该过程中可能产生的微生物种群特征变化,利用多聚物染色、扫描电镜(SEM)以及限制性酶切多态性分析法,观察、分析碳源调控前后生物滤池内微生物特性的变化,以便进一步理解碳源调控的运行方式对生物膜法 EBPR 工艺的影响。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:实验中所采用的主要试剂和仪器见表 1。

1.1.2 样品: AABF 系统运行一段时间后,生物膜磷含量达到一定水平时,采用高 COD 短时进

水厌氧激发生物滤柱内生物膜释磷,收集厌氧释磷液作为磷回收液(以便后续结合化学磷结晶法回收磷)。

定期取样分析生物膜样品内的磷含量,用以间接反映生物膜内具有富集磷功能的 PAOs 在生物膜内的含量。生物膜样品从滤池不同高度的生物膜采样口采集,采用振荡剪切法剥落石英砂表面附着生长的生物膜制成生物膜悬浮液进行分析。此外,收集滤池反冲洗生物膜样品于-20 ℃保存,以备 RFLP 检测。

1.2 方法

1.2.1 反应器运行:研究中所用生物膜样品取自一个实验规模的除磷/蓄磷的交替式厌氧/好氧生物滤池(AABF),滤池填料为粒径 2 mm-4 mm 的石英砂,其装填高度为 115 cm,总填充量为 3.75 kg (干重)。生物滤池进水为模拟市政污水,其配方如下(mg/L): NaH₂PO₄ 80, CaCl₂ 20, NH₄Cl 47, KCl 4, CH₃COONa 272, MgSO₄ 9.21, NaHCO₃ 50, FeCl₃ 2。AABF 系统生物滤池的有效容积为 8 L,

表 1 主要试剂和仪器		
Table 1 Main experimental reagents and equipments		
试剂或仪器	型号	厂家
Reagents and equipments	Specifications	Manufacturers
DNA 提取试剂盒	D5625-01	OMEGA
DNA extraction kit		
DNA 回收试剂盒	DP209-02	天根生化科技(北京)有限公司
DNA purification kit		
PCR 体系	—	上海生工生物工程技术服务股份有限公司
PCR system		
PGEM-T 链接体系	—	Promega
PGEM-T system		
双内切酶	—	Fermentas
Restriction enzyme		
梯度 PCR 仪	T-Gradient Thermoblock	Biometra, Germany
Gradient PCR instrument		
紫外透射仪	ZF-90 型	上海顾村电光仪器厂
UV transilluminator		
稳压电泳仪	DYY-12	北京六一仪器厂
Voltage electrophoresis apparatus		
UV 凝胶成像分析系统	UVP, BIORAD XR	英国 UVi 公司, 美国 Bio-Rad
UV gel imaging analysis system		

生物滤池运行初期的孔隙率为 28.9%, 厌氧/好氧交替循环周期为 8 h, 其中厌氧段 3 h、好氧段 5 h, 为连续进水、间歇出水型生物滤池(其中好氧段采用 2 h 内循环)。其中厌氧进水时间、好氧排水时间均为 3 h。废水在生物滤池的平均水力停留时间(Hydraulic retention time, HRT)为 2 h; 生物滤池两次反冲洗的间隔为 30 d。

1.2.2 生物膜特征分析: 生物膜样品经强酸消解后, 采用钼锑抗分光光度法测定生物膜含磷量。

采用化学染色(苏丹黑染色和孔雀绿染色)来研究 AABF 系统中生物膜内 PAOs 体内多聚物的形成以及微生物细胞形态。经苏丹黑染色后, PHB 颗粒呈蓝黑色, 细胞质等呈红色; 经孔雀绿染色后, 异染粒 Poly-P 呈黑色, 细胞质等呈绿色。此外, 采用扫描电子显微镜用于分析生物膜样品中的微生物形态。其样品制作过程如下, 室温下以生理盐水清洗生物膜样品 3–5 次; 将清洗过的样品浸入 2.5%戊二醛, 于 4 °C 放置 2–5 h; 以 20%、50%、70%、80%、90%、100%乙醇梯度脱水 20 min; 冷冻干燥 24 h; 进行铂金喷镀。

1.2.3 限制性酶切多态性分析(RFLP): 提取生物膜样品总 DNA 并采用通用引物 1492R 和 27F 进行 16S rRNA PCR 扩增。PCR 产物以 0.8%琼脂糖凝胶进行电泳并纯化。将纯化后的新鲜 16S rRNA-PCR 产物连接入 PGEM-T 载体, 将连接了目的片段的 T 载体转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基中培养 12–16 h, 挑选单克隆子, 以通用引物 SP6 和 T7 为引物对进行 SP6-PCR 扩增, 扩增体系与 16S rRNA-PCR 体系基本相同, 将引物 1492R 和 27F 替换为 SP6 和 T7 引物对, 扩增程序一致。选用限制性内切酶 *Rsa* I 和 *Msp* I 于 37 °C 水浴中 3 h 消化 DNA, 然后以 3%琼脂糖凝胶进行电泳获得酶切图谱。

2 结果与讨论

2.1 AABF 系统运行条件与运行状况

系统按照 1.2.1 中所描述运行, 系统高效稳定运行进行生物蓄磷 180 d 后, 增加进水 COD 浓度在 800–1 600 mg/L 间, 激发装置内 PAOs 充分释磷, 厌氧释磷液磷浓度达 104–200 mg/L, 说明高进水 COD 激发微生物释磷效果显著。在此期间, AABF 系统出水效果较好, 磷去除率达 78.9%–90.5%, 出水磷浓度为 0.5–3.8 mg/L, 如图 1 所示。厌氧段释磷液浓度由第 178 天的 38.84 mg/L 增大至第 246 天的 57.74 mg/L, 说明此磷回收方式可以增强 AABF 系统内微生物的吸磷与释磷能力。与普通废水处理的好氧生物系统微生物细胞含磷量(0.02–0.03 g/g 细胞干重, 即 2%–3%)相比, 尽管 AABF 系统不断排出富磷液, 即系统通过此方式排磷, 系统中生物膜含微生物细胞干重含磷率仍能保持在 3.7% (厌氧)–6.2% (好氧), 表明此 AABF 系统中 PAOs 占据优势, 同时也表明这种运行模式没有造成 AABF 处理效果的恶化。

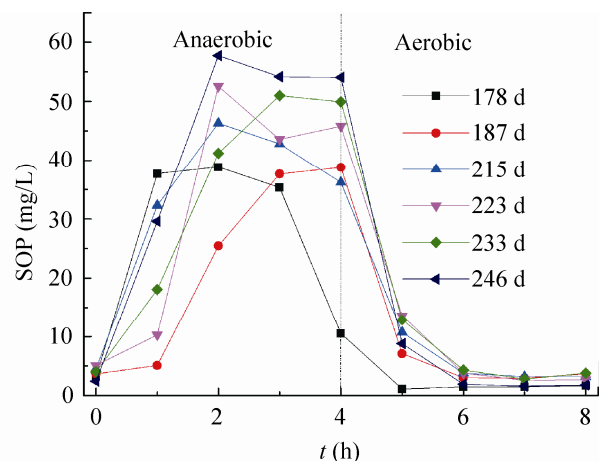


图 1 进行磷收割期间 AABF 系统磷浓度

Fig. 1 Variation of SOP levels in the AABF over a 68-day period (178th day to 246th day)

2.2 生物膜特征分析

2.2.1 生物膜内多聚物的合成及菌群形态: 反应器在厌氧/好氧交替环境下运行, 在厌氧阶段, 反应器生物膜内的 PAOs 可以分解体内 Poly-P, 吸收废水中的易降解碳源合成胞内储能物质 PHAs; 在好氧阶段, PAOs 将会吸收溶液中的磷酸盐以合成 Poly-P。观察 AABF 实施碳源调控过程中生物膜内的多聚物含量及分布变化, 结果如图 2 所示。图 2A 中显示杆菌、丝状菌以及一些球状菌体内含有大量蓝黑色 PHB 颗粒。异染粒 Poly-P 经孔雀绿染色呈黑色, 其数量与形态可以间接指示生物膜内的 PAOs 的数量与分

布, 如图 2B、D 中的部分球菌、短杆菌呈现出菌体内含有 Poly-P, 因此判定生物膜内 PAOs 主要为短杆状或小球状。比较图 2A 与 2B 可发现部分大的球菌体内不含 Poly-P, 但却能够在厌氧条件下合成 PHB (如图 2A 中部分直径较大的球菌含有蓝黑色颗粒), 因此可推断这些大球菌可能为 GAOs。图 2A 与图 2C 中, 有少量长丝状菌, 进行 PHB 染色时, 其菌丝呈现蓝黑色, 但进行 Poly-P 染色时其菌丝呈现绿色, 有文献指出一些球菌和杆菌在某些环境中能相互连接而形成丝状菌^[14], 目前还不能确定这些丝状细菌是否为球杆状 PAOs 连接所形成的丝状 PAOs。

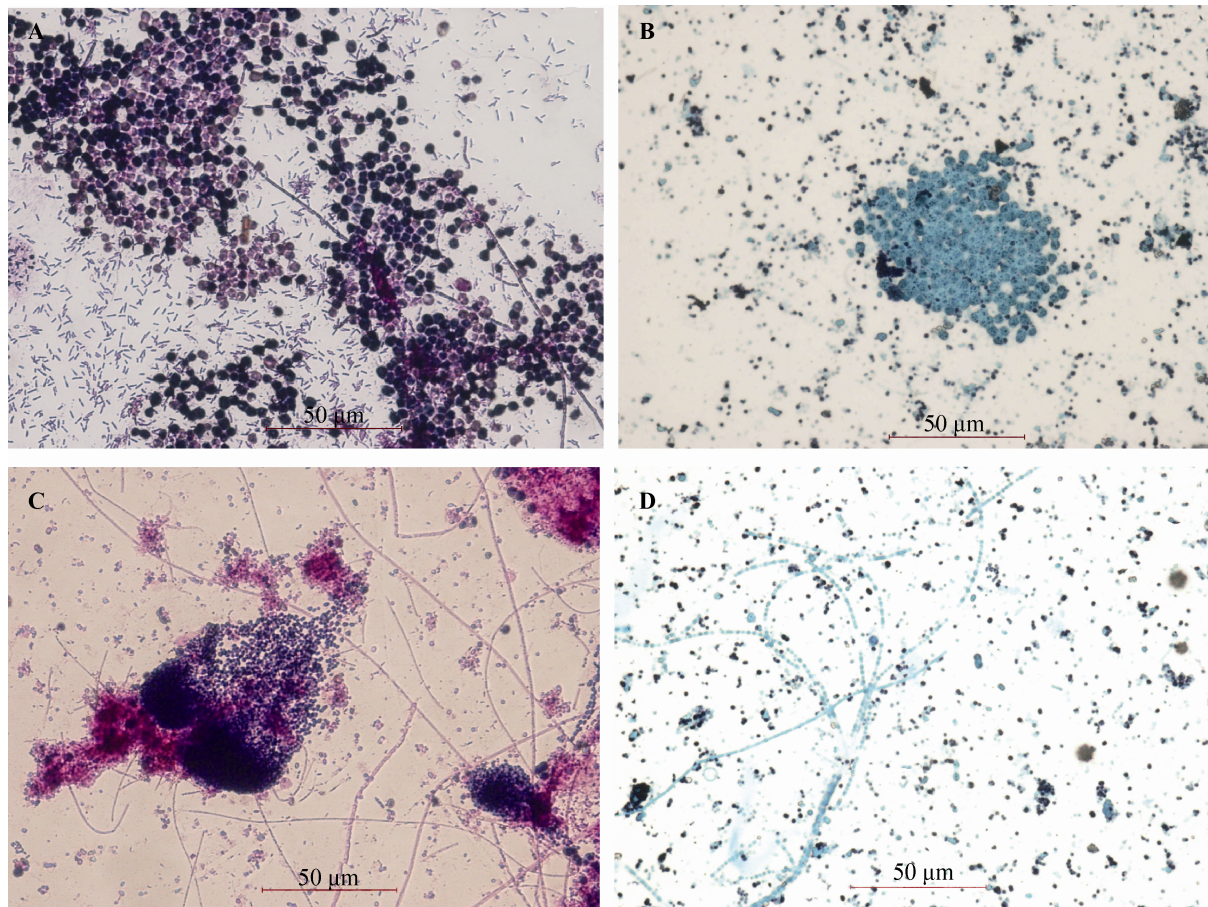


图 2 生物膜样品 PHB 和 Poly-P 染色效果

Fig. 2 PHB/poly-P staining of biomass samples

注: A, C 分别为碳源调控初期和中期生物膜样品中 PHB; B, D 分别为碳源调控初期和中期生物膜样品中 Poly-P 染色效果。

Note: A, C: PHB staining of biomass samples in early and middle carbon source regulation respectively; B, D: Poly-P staining of biomass samples in early and middle carbon source regulation respectively.

2.2.2 生物群落形态的变化: 对碳源调控过程中, 观察 AABF 在不同运行时间, 生物膜样品内微生物群落形态的变化, 结果如图 3 所示。AABF 采取碳源调控前, 生物膜主要由短杆菌组成, 如图 3A 所示。而碳源调控过程中, 生物膜内出现了直径较大的球菌, 如图 3B 与 3C 所示, 特别是图 3C 中大的球菌与丝状细菌增多, 说明受高浓度进水 COD 的诱发作用, 碳源调控会对生物膜内微生物形态产生影响, 造成生物膜内出现大量球菌、长丝状菌。有文献指出潜在的 PAOs 主要为球菌、短杆菌、四联球菌, GAOs 则多为直径较大的球菌^[15-16], 碳源过量时 GAOs 将会大量增殖, 因此初步判断大的球菌可能为聚糖菌(GAOs)。有文献研究指出, 当外界环境中碳源充足时, 球衣细菌属以单个的球杆菌形式存在, 而环境中碳源不足时则单个的球杆菌彼此相互连接形成丝状^[14], 生物膜内丝状菌大量出现的主要原

因可能是 GAOs 的大量增殖及其对碳源的竞争吸收。为限制上述疑似 GAOs 类细菌, 将碳源扩增过程中进水 COD 由 1 600 mg/L 降低至 800 mg/L, 生物膜内大球菌的数量则大量减少, 如图 3D 所示。

2.3 生物膜微生物群落的组成

为了进一步分析碳源调控对 AABF 中微生物种类的影响, 需要采用分子生物学手段对生物膜组成进行鉴定。通过 RFLP 技术对生物膜总基因片段的扩增, 使用特定的内切酶消化扩增产物再通过常规电泳分离, 使不同长度的片段停留在不同的位置, 可形成生物膜微生物群落的限制性片段长度多态性指纹图谱来展示组成生物膜的微生物群落结构^[17]。分别对 AABF 系统运行第 180 天和 235 天的生物膜样品 BFR1 和 BFR2, 采用 RFLP 鉴定微生物组成及其群落结构。样品 BFR1 和 BFR2 的 RFLP 酶切电泳图见图 4、5。

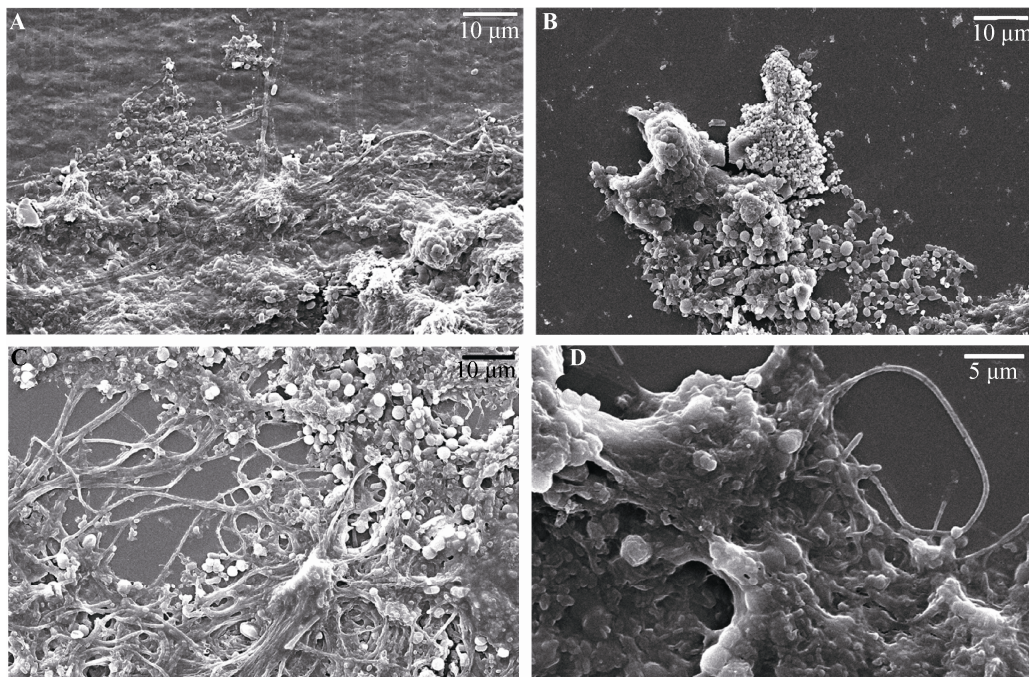


图 3 AABF 系统运行期间生物膜样品的 SEM 照片

Fig. 3 SEM images of biomass samples during AABF's operation

注: A、B、C、D 分别为 AABF 系统运行第 178、207、224、234 天的生物膜样品 SEM 照片。

Note: A, B, C and D is SEM image of biomass sampled on the 178th, 207th, 224th and 234th day in AABF's operation respectively.

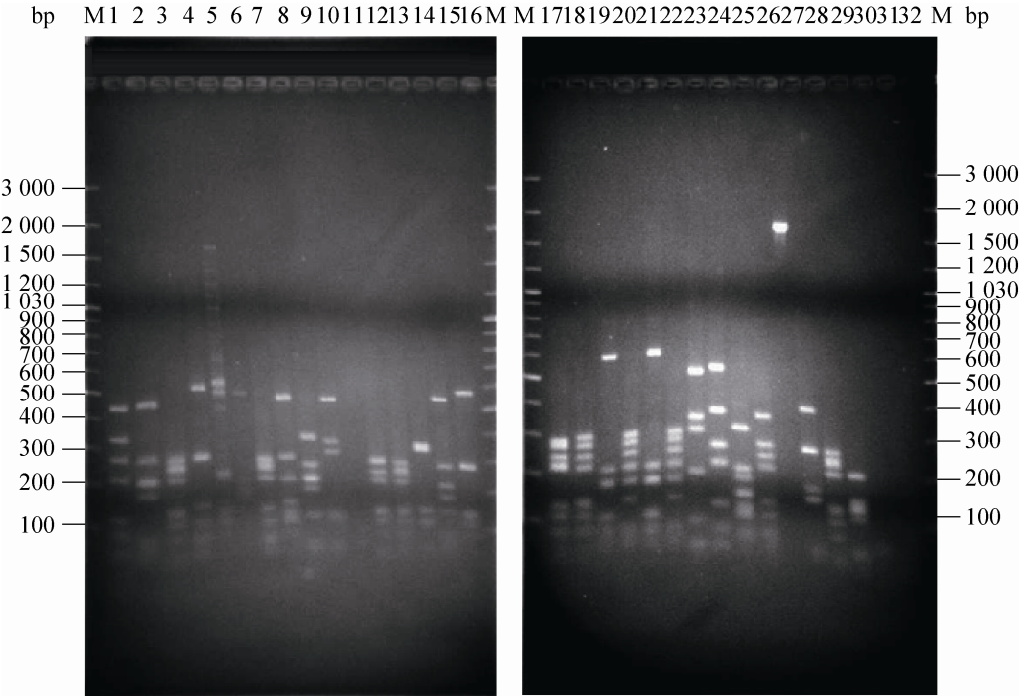


图 4 样品 BFR1 酶切电泳图

Fig. 4 Enzyme electrophoretogram of biomass sample BFR1

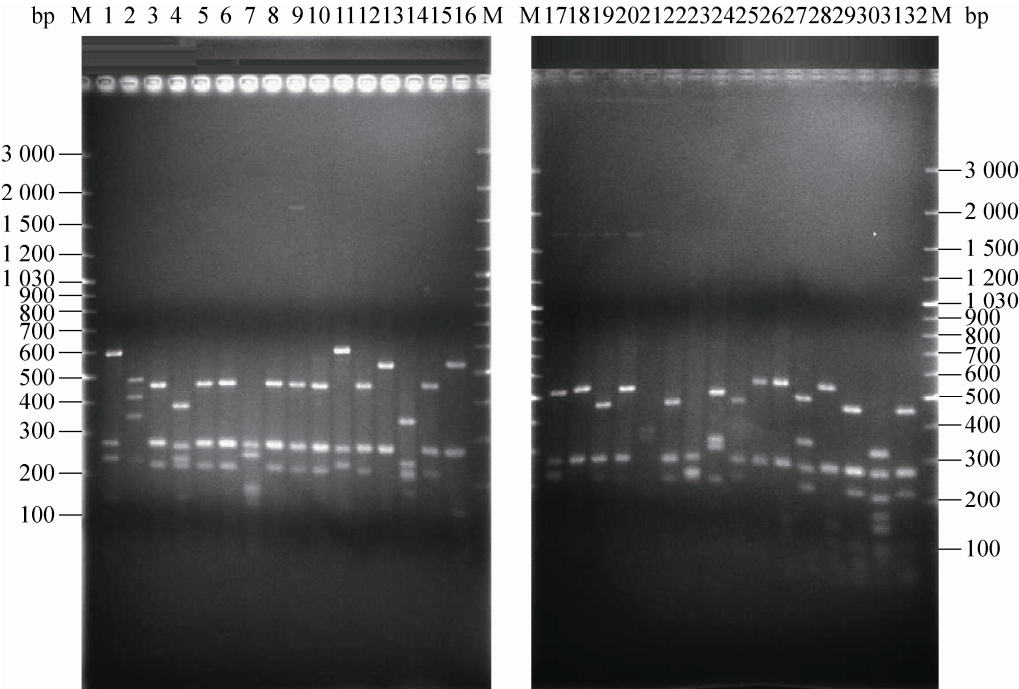


图 5 样品 BFR2 酶切电泳图

Fig. 5 Enzyme electrophoretogram of biomass sample BFR2

BFR1 和 BFR2 分别为碳源调控前, 以及碳源调控过程中期的生物膜样品。为鉴定生物膜样品 BFR1 和 BFR2 中的微生物菌群, 对其 16S rRNA 基因库进行了分析, 比较高的库容(BFR1 为 0.85, BFR2 为 0.96)说明所挑选克隆子数目足以反映整个样点微生物群落的多样性及其分布, 能够代表样品整个微生物群落水平。结果见表 2-4。

由表 2 可知, 在样品 BFR1 中, 微生物种群丰度高, 共有 36 个菌属, 主要归属为 9 大菌纲, 优势菌属 *Sterolibacterium*、*Propionivibrio* 为 β -Proteobacteria 纲菌群, *Lysobacter* 为 γ -Proteobacteria 纲菌群。表 4 的数据表明, β -Proteobacteria 纲占总克隆子数的 56.9%, 为绝对优势菌群, 在样品 BFR2 中, 细菌种类较少, 共

有 17 个菌属, 分属于 7 菌纲。由表 3 可知, *Simplicispira*、*Sterolibacterium*、*Leptothrix*、*Methylocaldum*、*Pseudomonas* 占有较大比例, 为优势菌属, 其中 *Simplicispira*、*Sterolibacterium*、*Leptothrix* 为 β -Proteobacteria 纲菌群, *Methylocaldum*、*Pseudomonas* 为 γ -Proteobacteria 纲菌群, β -Proteobacteria 纲和 γ -Proteobacteria 纲分别占克隆子总数的 72.5%与 19.3%。其中 β -Proteobacteria 纲为绝对优势菌群, 占 72.5%的相对丰度。

生物膜样品 BFR2 与 BFR1 (表 4)的 RFLP 分析相比, 绝对优势菌群同为变形菌门的 Beta 纲。 β -Proteobacteria 纲、 γ -Proteobacteria 纲所占总克隆子比例由 56.92%、15.42%增大至 72.53%、19.31%。说明随着碳源调控与磷收割的进行,

表 2 生物膜样品 BFR1 中主要菌属的分布情况 Table 2 The proportion of the first 10 th clone's genus in the sample BFR1 community (%)										
Sample	Ste	Pro	Lys	Un3	Met	Sim	Un2	Den	Def	Ter
BFR1	23.94	5.85	5.85	5.32	4.26	4.26	4.26	3.19	3.19	3.19

Note: Ste: *Sterolibacterium*; Pro: *Propionivibrio*; Lys: *Lysobacter*; Un3: Unkown3; Met: *Methylocaldum*; Sim: *Simplicispira*; Un2: Unkown2; Den: *Denitratisoma*; Def: *Defluviicoccus*; Ter: *Terrimonas*.

表 3 生物膜样品 BFR2 中主要菌属的分布情况 Table 3 The proportion of the first 10 th clone's genus in the sample BFR2 community (%)										
Sample	Sim	Ste	Lep	Met	Pse2	Mit	Pir	Acin	Lys	Pol
BFR2	35.19	15.45	12.02	8.15	7.30	6.01	3.86	2.15	1.72	1.72

Note: Sim: *Simplicispira*; Ste: *Sterolibacterium*; Lep: *Leptothrix*; Met: *Methylocaldum*; Pse2: *Pseudomonas*; Mit: *Mitsuaria*; Pir: *Pirellula*; Acin: *Acinetobacter*; Lys: *Lysobacter*; Pol: *Polyangiaceae*.

表 4 生物膜样品 BFR1 和 BFR2 中各菌纲的分布情况 Table 4 The proportion of clone's class in the sample BFR1 and BFR2 community (%)										
Sample	β -Pro	γ -Pro	α -Pro	δ -Pro	Sph	Fla	Pla	Pro	Bac	Clo
BFR1	56.91	15.43	13.83	5.85	4.26	1.60	1.06	0.53	0.53	ND
BFR2	72.53	19.31	0.86	1.72	ND	ND	3.86	ND	0.43	1.29

Note: ND: Not detect; β -Pro: Betaproteobacteria; γ -Pro: Gammaproteobacteria; α -Pro: Alphaproteobacteria; δ -Pro: Deltaproteobacteria; Sph: Sphingobacteriia; Fla: Flavobacteriia; Pla: Planctomycetia; Pro: Prolixibacter; Bac: Bacteroidia; Clo: Clostridia.

β -Proteobacteria 纲和 γ -Proteobacteria 纲的相对丰度提高, 有研究提出 β -Proteobacteria 和 γ -Proteobacteria 纲是潜在 PAOs^[4,16,18]。仅有少量文献表明 α -Proteobacteria 或者 δ -Proteobacteria 是潜在 PAOs 的论证, 而 Michael Beer 证实 α -Proteobacteria 纲的 *Sphingomonas* 属为潜在 GAOs^[19]。生物膜样品 BFR2 与 BFR1 的 RFLP 结果说明碳源扩增会带来 AABF 系统微生物群落结构组成的改变, 可将生物膜内优势菌群 β -Proteobacteria 纲的丰度在 55 d 内由 56.9% 提高至 72.5%。

由 2.2.1 运行效果可知, 碳源调控的运行方式能够引起细菌群落结构的改变, 但并未影响出水质量, 且随时间推移, 厌氧段达到最大释磷溶度所用时间缩短, 厌氧释磷浓度逐渐增大反映了菌群吸磷释磷能力的提高, 说明所选用磷收割方式可能提高了 PAOs 在生物膜中微生物群落所占比例。由 2.2.2 中 SEM 图知, 生物膜中微生物形态有显著变化, 但 RFLP 分析表明, 绝对优势菌群保持一致。

3 结论

(1) AABF 系统有明显的蓄磷特征, 对生物膜收割磷后, 生物膜含磷量仍可达 3.7%–6.2% (干重), 与普通活性污泥系统中活性污泥含磷量为 2%–3% 相比, AABF 系统能够培养富含 PAOs 的生物膜;

(2) 采用碳源调控方式激发微生物充分释磷, 并不会影响反应器的正常运行。碳源调控激发释磷期间系统除磷效果仍能保持在较高水平; 然而碳源扩增会带来 AABF 系统微生物群落结构组成的改变, 可将生物膜内优势菌群 β -Proteobacteria 纲的丰度在 55 d 内由 56.9% 提高至 72.5%;

(3) 在 AABF 系统蓄磷以及采取碳源扩增方式激发释磷过程中, 系统生物膜内菌群形态发生

变化, 出现了较多丝状菌, 经染色分析初步判断丝状细菌为 PAOs;

(4) 适当地碳源调控能够减弱 GAOs 的繁殖, 增强 PAOs 的竞争能力。

参考文献

- [1] Slater FR, Johnson CR, Blackall LL, et al. Monitoring associations between clade-level variation, overall community structure and ecosystem function in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) systems using terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)[J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 4908–4923.
- [2] Fuhs GW, Chen M. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater[J]. *Microbial Ecology*, 1975(2): 119–138.
- [3] Crocetti GR, Hugenholtz P, Bond PL, et al. Identification of poly-Phosphate-accumulating organism and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(3): 1175–1182.
- [4] Liu WT, Nielsen AT, Wu JH, et al. *In situ* identification of poly-Phosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process[J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(2): 110–122.
- [5] Sboda M, Obosumi T, Udaka S. Screening for high phosphorus accumulating bacteria[J]. *Agricultural Biology and Chemistry*, 1980, 44: 319–324.
- [6] Sresb N, Warburg R, Timmerman M, et al. New strategies for the isolation of microorganisms responsible for phosphorus accumulations[J]. *Water Science Technology*, 1985(17): 43–56.
- [7] Beacham AM, Seviar RJ, Lindrea KC. Poly-Phosphate accumulating abilities of *Acinetobacter* isolates from a biological nutrient removal pilot plant[J]. *Water Reseach*, 1992, 26(1): 121–122.
- [8] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems[J]. *Current Opinion Biotechnology*, 2002, 13(3): 218–27.

- [9] Vargas MZ, Yuan MP. Effect of long-term starvation conditions on polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms[J]. Bioresource Technology, 2013(127): 126–131.
- [10] Liu WT, Mino T, Nakamura K, et al. Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal[J]. Water Research, 1996, 30(1): 75–82.
- [11] Oehmen A, Lemos PC, Carvalho G, et al. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale[J]. Water Research, 2007, 41(11): 2271–2300.
- [12] Carlos M, Lopez-Vazquez, Adrian Oehmenb, et al. Modeling the PAO-GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature[J]. Water Research, 2009, 43(2): 450–462.
- [13] Winkler MKH, Bassin JP, 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.
- [14] Suzuki T, Kanagawa T, Kamagata Y. Identification of a gene essential for sheathed structure formation in *Sphaerotilus natans*, a filamentous sheathed bacterium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(1): 365–371.
- [15] Kim JM, Lee HJ, Lee DS, et al. Identification of a novel subgroup of uncultured gammaproteobacterial glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal sludge[J]. Microbiology, 2011(157): 2287–2296.
- [16] Seviour RJ, Mino T, Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems[J]. FEMS Microbiology, 2003, 27(1): 99–127.
- [17] Schütte UME, Abdo Z, Bent SJ, et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(3): 365–380.
- [18] Lina CK, Katayama Y, Hosomi M. The characteristics of the bacterial community structure and population dynamics for phosphorus removal in SBR activated sludge processes[J]. Water Research, 2003, 37(12): 2944–2952.
- [19] Beer M, Kong YH, Seviour RJ. Are some putative glycogen accumulating organisms (GAO) in anaerobic : aerobic activated sludge systems members of the α -Proteobacteria?[J]. Microbiology, 2004(150): 2267–2275.