

doi:10.3969/j.issn.1674-4764.2013.02.018

不同温度及厌氧/好氧运行条件对聚磷菌 衰减特性的影响

苗志加, 薛桂松, 翁冬晨, 曹贵华, 彭永臻

(北京工业大学 北京市水质科学与水环境恢复重点实验室, 北京 100124)

摘要:以富含 90%±2% 纯度聚磷菌(PAOs)的强化生物除磷系统(EBPR)为研究对象,考察了 10℃ 厌氧、10℃ 好氧、20℃ 厌氧、20℃ 好氧 4 种运行条件下 PAOs 的衰减特征。结果表明:温度越高对应衰减速率越快,4 个系统在 1~9 d 里衰减速率的平均值分别为:10℃ 厌氧:0.053/d;10℃ 好氧:0.050/d;20℃ 厌氧:0.072/d;20℃ 好氧:0.145/d。其中 4 个系统由于细胞死亡引起的活性衰减速率分别为:10℃ 厌氧:0.019/d;10℃ 好氧:0.017/d;20℃ 厌氧:0.019/d;20℃ 好氧:0.03/d,占总活性衰减的比例分别为:35.8%、34%、26.4%、20.7%。在 9 d 饥饿衰减期间,污泥中所含 PHA 与糖原的量总体呈下降趋势。相同温度下,糖原在厌氧衰减过程中降解速率大于好氧;在同样的厌氧、好氧衰减条件下,温度越高糖原降解速率越快。

关键词:聚磷菌;强化生物除磷;衰减速率;LIVE/DEAD 染色;聚羟基烷酸;糖原

中图分类号:X703.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-4764(2013)02-0113-05

Effect of Different Temperature and Anaerobic/Aerobic Conditions on the Decay Characteristics of PAOs

Miao Zhijia, Xue Guisong, Weng Dongchen, Cao Guihua, PENG Yongzhen

(Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environmental Recovery Engineering,
Beijing University of Technology, Beijing 100124, P. R. China)

Abstract:In order to analyze the effect of different temperatures on PAOs decay, a lab-scale EBPR culture with PAOs over 90%±2% of the entire bacterial was used under different conditions (10℃ anaerobic, 10℃ aerobic, 20℃ anaerobic, 20℃ aerobic). The results show that the decay rate increases with the increase of temperature; the average rate during 1~9 days is (respectively: 10℃ anaerobic, 10℃ aerobic, 20℃ anaerobic, 20℃ aerobic) 0.053/d, 0.50/d, 0.072/d, and 0.145/d; the cell death rate is 0.019/d, 0.017/d, 0.019/d, and 0.03/d, which accounts for 35.8%, 34%, 26.4%, and 20.7% of the decay rate, respectively. The concentration of PHA and glycogen decreases during the decay period. And Glycogen degrades quickly in anaerobic conditions than in aerobic conditions under the same temperature. The glycogen degrade rate is higher with the increase of temperature under the same anaerobic and aerobic conditions.

Key words:PAOs; EBPR; decay rate; LIVE/DEAD staining; PHA; glycogen

强化生物除磷技术(Enhanced Biological Phosphorus Removal,简称 EBPR)已成为生物除磷的重

要途径,日益受到学者们的关注。EBPR 是以富集的聚磷菌(PAOs)在厌氧条件下吸收 VFA 用于细

收稿日期:2012-07-12

基金项目:北京市科技计划(D121100000112001);2012 北京市教委科技创新平台项目

作者简介:苗志加(1984-),男,博士生,主要从事污水脱氮除磷研究,(E-mail)miaozhijia@emails.bjut.edu.cn。

彭永臻(通信作者),男,教授,博士生导师,(E-mail)pyz@bjut.edu.cn。

胞内合成 PHA 并且释放磷,好氧条件下分解 PHA 提供能量同时过量吸磷,通过排泥达到除磷的目的^[1]。EBPR 的设计大多是以 ASM2 号模型为基础,PAOs 衰减速率作为模型中最重要的参数之一,获得其准确的数值对建立完善、实用的数学模型具有重要意义,同时对 EBPR 生物处理过程的设计和运行管理、控制策略也具有借鉴意义^[2-4]。水温的变化对于微生物衰减速率有重要的影响^[5],在实际污水处理厂运行过程中主要面临的问题也是季节温差变化较大,尤其是中国北方大部分地区水温波动较大。目前对于 EBPR 系统衰减特征的研究主要是环境温度恒定在 20℃ 左右, Lu 等^[6]采用 PAOs 纯度达到 85% 的 EBPR 系统为研究对象,考察了 22℃ 条件下 PAOs 在厌氧、缺氧、好氧的衰减过程, Hao 等^[7]考察了同样是恒定环境温度在 22±0.5℃ 的条件下 PAOs 和聚糖菌(GAOs)好氧条件下的衰减特征,而目前对于低温下 PAOs 的衰减特征的研究未见报道。所以本文采用已运行 340 d 的 EBPR 系统内种泥,考察不同温度对 PAOs 在厌氧和好氧条件下的衰减特性,并结合现代分子生物学的手段鉴定分析细胞死亡引起的数量衰减所占比例^[8]。

1 材料与方法

1.1 衰减速率试验装置及运行方式

衰减速率试验在 3 L 抽滤瓶中进行,取已富集 PAOs 浓度达到 90% 以上的 EBPR 系统内好氧结束时刻的种泥,持续曝气 5 h 后平均分装在 4 个小反应器内,加入不含碳源的配水定容为 2 L,采用磁力搅拌器进行搅拌,其转速为 100 r·min⁻¹。1[#]、2[#] 反应器放置在 10℃ 恒温培养箱,3[#]、4[#] 放置在 20℃ 恒温培养箱。1[#]、3[#] 为厌氧条件,试验过程中曝氮气以保证厌氧环境。2[#]、4[#] 为好氧条件,控制空气流量为 0.1 m³/h 保证溶解氧在 2.0 以上。

4 个反应器分别在第 0、0.5、1、3、5、7、9 d 取 250 mL 泥水混合物,6 000 转离心 5 min,用配水清洗 2 遍离心后放入 500 mL 锥形瓶中,加入 0.127 5 g 乙酸钠(200 mgCOD),配水补足 500 mL,厌氧搅拌 1 h,测定期间的磷释放速率。在运行的 9 d 内每天取泥样,测污泥浓度、PHA、糖原的变化。

1.2 试验水质

配水配方如下^[9]:NH₄Cl 1.02 g·L⁻¹,MgSO₄·7H₂O 1.20 g·L⁻¹,CaCl₂·2 H₂O 0.19 g·L⁻¹,ATU(硝化抑制剂) 7.94 mg·L⁻¹,微量元素溶液 4 ml·L⁻¹,其中微量金属元素成分为:FeCl₃·6H₂O 1.5 g·L⁻¹,H₃BO₃ 0.15 g·L⁻¹,CuSO₄·

5H₂O 0.03 g·L⁻¹,KI 0.18 g·L⁻¹,MnCl₂·4H₂O 0.12 g·L⁻¹,Na₂MoO₄·2H₂O 0.06 g·L⁻¹,ZnSO₄·7H₂O 0.12 g·L⁻¹,CoCl₂·6H₂O 0.15 g·L⁻¹,乙二胺四乙酸(EDTA) 10 g·L⁻¹。4 个反应器内加入 Tris-buffer 使系统维持 pH 值稳定在 7.5 左右。

1.3 试验种泥

试验种泥采用已乙酸/丙酸交替运行 340 d 的 EBPR 系统内污泥,通过荧光原位杂交(FISH)结果分析,其 PAOs 的纯度高达 90%±2,污泥龄(SRT):10 d。

1.4 LIVE/DEAD 活死细胞鉴定

1.4.1 常规检测方法 实验所用常规检测方法见水和废水监测分析方法(第 4 版)^[10]。PHA 及其组分采用气相色谱法^[11];VFA 采用气相色谱法。

1.4.2 LIVE/DEAD 活死细胞鉴定 采用 LIVE/DEAD[®] BacLight[™](molecular probes,L-7012)试剂盒测定第 0、0.5、1、3、5、7、9 d 的泥样中活死细胞的变化情况。该试剂包括绿荧光核酸染料 SYTO[®]9 和红色荧光染料 PI(propidium iodide)2 中荧光染料,与待测样品孕育一定时间后,具有完整细胞壁的活细胞显绿色,细胞壁已经破损的的死细胞显红色。

染色步骤对试剂盒的方法进行了优化,每次取待测泥样 15 mL,去离子水清洗 1 遍后离心后倒去上清液,采用 0.85% 的 NaCl 浸泡 1 h,期间隔 10 min 上下颠倒一次。取 1 mL 经预处理的泥样与 2 mL 离心管内,分别加入 0.5 μL 的 SYTO[®]9 和 0.5 μL 的 PI 染料,混合均匀后在暗处放置 15 min,期间上下混匀 2~3 次。取 10 μL 已染色的泥样制作玻片,在荧光显微镜下观测拍照 30 组照片。同一视野内照红绿两组荧光照片,通过 AxioVision 软件对照片做灰度分析并结合 IPP 软件的计数分析,得出绿色和红色荧光所占的比例,即活死细胞所占的比例。

1.5 衰减速率的计算

对 0、0.5、1、3、5、7、9 d 的磷释放速率的对数值做线性回归分析,计算公式如下: R_0 为未衰减初始时刻磷释放速率, R_t 为衰减后某一时刻磷释放速率, t_d 为衰减时间^[12]。细胞活性衰减通过对 0、0.5、1、3、5、7、9 d 死细胞比例进行回归线性计算,得到其衰减数值^[6]。

$$b = -\ln \frac{R_c}{R_0} \times \frac{1}{t_d}$$

2 试验结果与讨论

2.1 不同温度对 PAOs 厌氧好氧衰减速率的影响

图 1 为 4 个反应器在不同温度下厌氧衰减和好氧衰减过程中磷释放速率的变化。可以看出在衰减

开始后的1 d内4个系统其活性没有下降反而都略有上升,在其后的8 d里活性平缓下降,此实验现象未见报道。分析可能的原因是本研究所用种泥中含有少量颗粒化污泥,在衰减初始的第1 d内这部分颗粒化污泥自溶,不仅提供了少量碳源基质也使颗粒内PAOs溶出,使得系统中PAOs的相对活性增加;也有可能是种泥细胞内存储的能源底物还没有完全消耗掉,第1 d内并没有造成实际意义上的衰减。

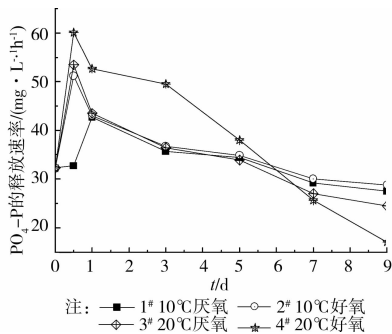
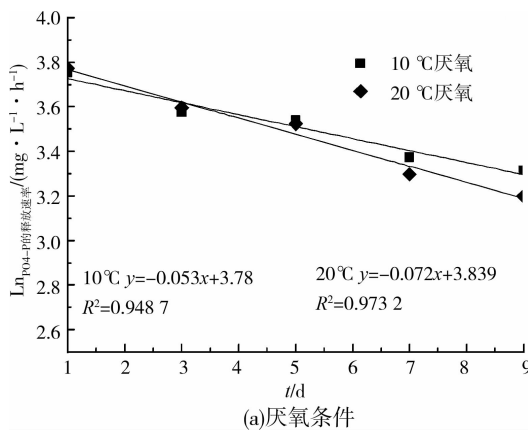


图1 不同温度条件下PAOs的衰减速率变化

设定第1 d为初始 R_0 ,对1~9 d内4个系统释



磷速率的对数值做线性回归,结果如图2所示,得到期间10°C厌氧、10°C好氧、20°C厌氧、20°C好氧对应PAOs的平均衰减速率分别为:0.053、0.050、0.072、0.145/d。HAO等^[6]在22°C±2的好氧条件下,测得7 d内PAOs的平均衰减速率为0.113/d,与本试验结果比较,这个数值低于本试验中20°C好氧所得衰减速率,这可能是由于他们所用种泥的SRT为12 d,略高于本实验中的10 d,长SRT条件下运行的系统可能会培养出更耐饥饿的菌种^[13]。由图1可以看出从第5 d开始20°C条件下的2个系统衰减速率开始迅速下降,通过式(1)计算,5~9 d内20°C厌氧、20°C好氧对应PAOs的平均衰减速率分别为:0.081、0.199/d,见表1。而在此期间10°C条件下衰减速率并无明显变化且好氧与厌氧衰减速率具有相似的数值。由此可以看出不同温度对PAOs在厌氧和好氧的衰减代谢有重要影响,温度越高衰减速率越快。低温条件(10°C)下好氧衰减速率与厌氧衰减速率差别不大,常温(20°C)条件下好氧衰减速率大于厌氧衰减速率。

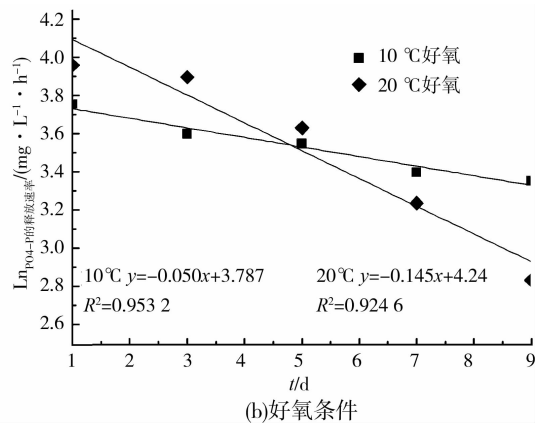


图2 不同条件衰减过程中衰减速率对数值的变化

2.2 不同温度下PAOs厌氧好氧细胞活性鉴定

在污水生物处理过程中,微生物的衰减包括细胞的死亡和功能性微生物活性的丧失,然而在大多数数学模型和文献报道中,细胞衰减被单一的认为是细胞死亡引起的数量衰减,对于细胞活性衰减并没有特意区分^[3,14],试验研究中利用LIVE/DEAD试剂盒鉴定0~9 d内死活细胞数量的变化,通过软件分析得到活细胞所占比例,结果如图3所示。通过线性回归分析得出,PAOs在不同温度好氧与厌氧条件下的衰减速率。

由图3可知,温度对微生物生理代谢有直接的影响,温度越高微生物代谢活性越快,同时在饥饿衰减的条件下,污泥中有一部分细胞会发生自溶并产

生少量外源底物^[15],PAOs可以利用这一部分底物合成细胞内贮存底物,维持活性或二次生长。温度越高细胞自溶数量越多,细胞死亡所占衰减速率的比例越低,计算结果见表1。在不同温度厌氧条件下的2个系统细胞活性衰减速率一致,都为0.019/d,不同温度好氧条件下PAOs细胞活性衰减速率数值对比比较明显,10°C与20°C的温度下其数值分别为:0.017、0.30/d。由此可得出好氧条件下PAOs的细胞活性衰减随温度升高而加快,但是厌氧条件下10°C与20°C没有变化。通过计算可得10°C厌氧、10°C好氧、20°C厌氧、20°C好氧4个系统内细胞死亡所占的衰减比例分别为:35.8%、34%、26.4%、20.7%。

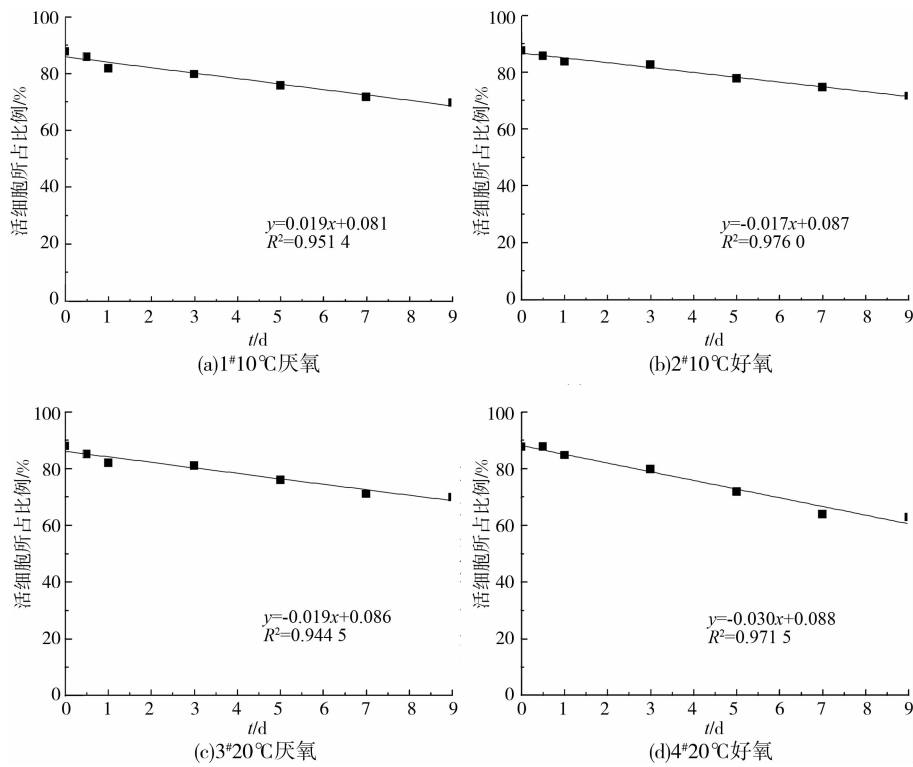


图 3 不同条件衰减过程中活细胞所占比例变化

表 1 不同条件下 PAOs 的衰减速率

运行条件	衰减速率/d		细胞活性 衰减速率/d 所占比例/%	
	1~9	5~9	0~9	0~9
10℃厌氧	0.053	0.557 0	0.019	35.8
10℃好氧	0.050	0.479 0	0.017	34.0
20℃厌氧	0.072	0.081 2	0.019	26.4
20℃好氧	0.145	0.199 0	0.030	20.7

2.3 不同温度下 PAOs 内碳源代谢变化

聚羟基酸(PHA)和糖原作为 PAOs 细胞内贮存的能源物质,在饥饿状态下对细胞的衰减起着重要的作用,图 4、图 5 显示 4 个系统 PHA 与糖原的变化情况。由图 4 可知,1# (10℃厌氧)与 3# (20℃厌氧)系统 PHA 浓度在第 0~2 d 的变化趋势相似,均迅速降低;10℃条件下第 7 d 出现的最小值:1.094 mg PHA/g VSS,20℃条件下第 2 d 出现最小值:1.24 mg PHA/g VSS,本实验结果得到的最低 PHA 含量与 Temmink 等^[16]在低碳源负荷下得到 1.55 mg PHA/g VSS 的数值接近。1# (10℃厌氧)系统 2~9 d 内维持在最小值略有波动,而 3# (20℃厌氧)系统在 2~9 d 里其数值不下降反而升高,在第 6 d 达到了 9.778 mg PHA/g VSS,分析原因可能是在与 10℃相比 20℃厌氧衰减过程中,细胞自溶的量更大,给 PAOs 提供了外碳源从而合成细

胞内的 PHA。而 Lopez 等^[17]的研究结果表明,在 20±2℃下 PAOs 厌氧衰减过程中 PHA 含量在第 1 d 就达到最小值:5.2 mg PHA/g VSS,7 d 内并无明显变化,这与 1# 系统内变化趋势相似,而与 3# 系统差异较大。这可能与污泥性质与驯化过程不同有关,本试验采用乙酸/丙酸交替运行,已富集到纯度达 90%±2 聚磷菌,而 Lopez 采用乙酸为单一碳源富集的 PAOs 纯度较低,菌群结构更加复杂。

好氧条件下,2# 与 4# 系统在起始衰减阶段由于 PHA 可以被氧化提供能量,在 0.5 d 内其含量便迅速降低,如图 4 所示。10℃条件下衰减,PAOs 中 PHA 含量略高于 20℃条件下的数值,其 1~9 d 的平均值分别为:1.97 mg PHA/g VSS,0.43 mg PHA/g VSS。

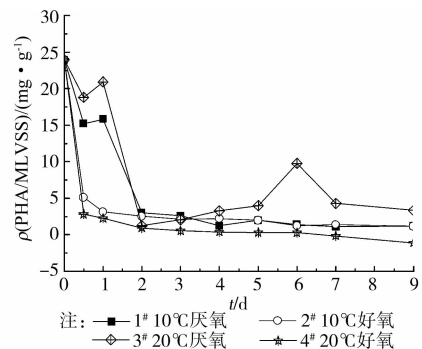


图 4 不同条件衰减过程中 PHA 变化情况的

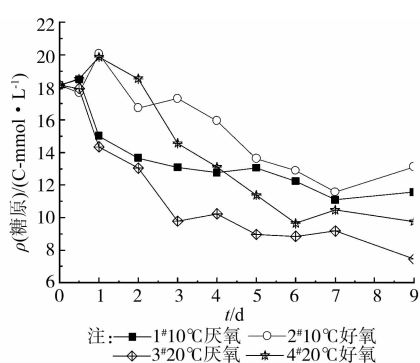


图5 不同条件衰减过程中糖原变化情况

衰减过程中糖原的变化如图5所示。在0~1 d不同温度条件下,厌氧衰减过程中糖原浓度降低,好氧衰减过程中糖原浓度升高,4个反应器内糖原的变化符合典型的PAOs代谢模型^[18];厌氧条件下糖原被分解为丙酮酸同时供还原力生成PHA,浓度下降;好氧条件下一部分PHA重新转化为糖原,浓度升高。Lu等^[6]研究结果表明,PAOs在20±2℃下厌氧衰减,在0~2 d内细胞生长代谢所需的ATP由糖原与聚磷颗粒一起提供,而在2~8 d期间主要是聚磷颗粒产生ATP,糖原浓度浮动较小。然而本实验在1~9 d期间,4个系统内糖原浓度均呈下降趋势,且下降幅度较大,这与Lu等研究结果差异较大。分析原因可能是,种泥起始状态中所含糖原浓度不同,本实验所用种泥中糖原浓度含量更高,在饥饿条件下糖原作为能源物质分解用来提供细胞代谢的能量。在整个衰减试验过程中:同样温度下,糖原的厌氧降解速率大于好氧降解速率;在厌氧、好氧的衰减过程中,温度越高糖原降解速率越快。

3 结论

1) 考察了在10、20℃条件下PAOs厌氧、好氧衰减速率,结果表明温度越高衰减速率越明显。在初始阶段由于种泥中一部分颗粒污泥破碎,4个系统在衰减1 d后释磷活性反而升高,在1~9 d里释磷速率逐渐下降,其平均值分别为:1#(10℃厌氧):0.053/d;2#(10℃好氧):0.050/d;3#(20℃厌氧):0.072/d;4#(20℃好氧):0.145/d。

2) 通过LIVE/DEAD试剂盒鉴定0~9 d衰减期内细胞的活性,测得4个衰减系统内由细胞死亡所引起衰减速率为:10℃厌氧:0.019/d;10℃好氧:0.017/d;20℃厌氧:0.019/d;20℃好氧:0.03/d,温度越高细胞死亡引起的活性衰减占总活性衰减比例越低,其比例分别为:35.8%、34%、26.4%、20.7%。

3) 在10、20℃温度条件下的厌氧、好氧衰减的

4个系统中,细胞内所贮存的PHA与糖原被分解用来提供能量,在9 d衰减过程中其浓度总体均呈现下降趋势。相同温度下,糖原在厌氧衰减过程中降解速率大于好氧;在同样的厌氧、好氧衰减条件下,温度越高糖原降解速率越快。

参考文献:

- [1] Barat R, Montoya T, Seco A. Modelling biological and chemically induced precipitation of calcium phosphate in enhanced biological phosphorus removal systems [J]. *Water Research*, 2011, 45(12): 3744-3752.
- [2] Zhang T, Zhang D J, Li Z L. Evaluating the structural identifiability of the parameters of the EBPR sub-model in ASM 2 d by the differential algebra method [J]. *Water Research*, 2010, 44(9): 2815-2822.
- [3] Oehmen A, Carvalho G, Lopez V. Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms [J]. *Water Research*, 2010, 44(17): 4992-5004.
- [4] Trutnau M, Petzold M, Mehlig L. Using a carbon-based ASM3 EAWAG Bio-P for modelling the enhanced biological phosphorus removal in anaerobic/aerobic activated sludge systems [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34(3): 287-295.
- [5] Hao X D, Wang Q L, Cao Y L. Evaluating sludge minimization caused by predation and viral infection based on the extended activated sludge model No. 2 d [J]. *Water Research*, 2011, 45(16): 5130-5140.
- [6] Lu H B, Keller J, Yuan Z G. Endogenous metabolism of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* under various starvation conditions [J]. *Water Research*, 2007, 41(20): 4646-4656.
- [7] Hao X D, Wang Q L, Cao Y L. Experimental evaluation of decrease in the activities of polyphosphate/glycogen-accumulating organisms due to cell death and activity decay in activated sludge [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 106(3): 399-407.
- [8] Hao X D, Wang Q L, Zhang X P. Experimental evaluation of decrease in bacterial activity due to cell death and activity decay in activated sludge [J]. *Water Research*, 2009, 43(14): 3604-3612.
- [9] Lu H B, Oehmen A, Virdis B, et al. Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* through alternating carbon sources [J]. *Water Research*, 2006, 40(20): 3838-3848.
- [10] 国家环境保护局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 252-354. (下转第123页)

- nutrient ratio and hydraulic retention time (HRT) on simultaneous phosphorus and nitrogen removal in a two-sludge sequencing batch reactor process [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100: 3506-3512.
- [11] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [12] Yang S, Yang F L. Nitrogen removal via short-cut simultaneous nitrification and denitrification in an intermittently aerated moving bed membrane bioreactor [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 195: 318-323.
- [13] Rahimi Y, Torabian A, Mehrdadi N, et al. NOx monitoring of a simultaneous nitrifying-denitrifying (SND) activated sludge plant at different oxidation reduction potentials [J]. *Water Research*, 2007, 41: 397-405.
- [14] Hocaoglu S M, Insel G, Cokgor E U, et al. Effect of sludge age on simultaneous nitrification and denitrification in membrane bioreactor [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 6665-6672.
- [15] Liu Y C, Shi H C, Xia L, et al. Study of operational conditions of simultaneous nitrification and denitrification in a Carrousel oxidation ditch for domestic wastewater treatment [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 901-906.
- [16] Li Y Z, He Y L, Ohandja D G, et al. Simultaneous nitrification-denitrification achieved by an innovative internal-loop airlift MBR: Comparative study [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 5867-5872.
- [17] Wan C L, Yang X, Lee D J, et al. Aerobic denitrification by novel wasolated strain using $\text{NO}_2^- - \text{N}$ as nitrogen source [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102: 7244-7248.

(编辑 胡英奎)

(上接第 117 页)

- [11] Oehmen A, Keller L B, Zeng R J, et al. Optimisation of poly-beta-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1070 (1/2): 131-136.
- [12] Lesouef A, Payraydeau M, Rogalla F, et al. Optimizing nitrogen removal reactor configuration by on-site calibration of the IAWPRC activated sludge model [J]. *Water Science and Technology*, 1992, 25(6): 105-123.
- [13] Siegrist H, Brunner I, Koch G. Reduction of biomass decay rate under anoxic and anaerobic conditions [J]. *Water Science and Technology*, 1999, 39(1): 129-137.
- [14] Gujer W, Henze M, Mino T. Activated sludge model No. 3 [J]. *Water Science and Technology*, 1999, 39 (1): 183-193.
- [15] Lavallee B, Lessard P, Besser C. Decay rate variability of active heterotrophic biomass [J]. *Water Science and Technology*, 2002, 46(1/2): 423-430.
- [16] Temmink H, Petersen B, Isaacs S. Recovery of biological phosphorus removal after periods of low organic loading [J]. *Water Science and Technology*, 1996, 34(1/2): 1-8.
- [17] Lopez C, Pons M N, Morgenroth E. Endogenous processes during long-term starvation in activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal [J]. *Water Research*, 2006, 40(8): 1519-1530.
- [18] Lopez C M, Oehmen A, Hooijmans C M. Modeling the PAO-GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature [J]. *Water Research*, 2009, 43(2): 450-462.

(编辑 王秀玲)