

强化生物除磷系统主要微生物及其代谢机理研究进展^{*}

孙 雪 朱为静 王 亮 吴伟祥^{**}

(浙江大学环境与资源学院, 杭州 310058)

摘要 强化生物除磷(enhanced biological phosphorus removal, EBPR)工艺在废水除磷处理中应用广泛。主要功能微生物及其代谢机理的研究是有效调控EBPR工艺稳定运行与效能提升的基础。本文选取EBPR系统中最主要的两类微生物(聚磷菌和聚糖菌),从底物吸收机制、糖酵解途径、TCA途径的贡献以及聚磷菌和聚糖菌的代谢相似性等方面对这些微生物的代谢机理进行综述,评价了分子生物学技术在研究EBPR系统微生物学及其代谢机理方面的应用现状,在此基础上对EBPR系统今后的研究方向进行了展望。

关键词 强化生物除磷 聚磷菌 聚糖菌 代谢机理

文章编号 1001-9332(2014)03-0892-11 **中图分类号** X172, X52 **文献标识码** A

Review on the main microorganisms and their metabolic mechanisms in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) systems. SUN Xue, ZHU Wei-jing, WANG Liang, WU Wei-xiang (College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2014, 25(3): 892–902.

Abstract: Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process is applied widely for removing phosphorus from wastewater. Studies on functional microorganisms and their metabolic mechanisms are fundamental to effective regulation for stable operation and performance improvement of EBPR process. Two main types of microorganisms in EBPR systems, polyphosphate accumulating organisms (PAOs) and glycogen accumulating organisms (GAOs) were selected to summarize their metabolic mechanisms such as substrate uptake mechanisms, glycogen degradation pathways, extent of TCA cycle involvement and metabolic similarity between PAOs and GAOs. Application of molecular biology techniques in microbiology and metabolic mechanisms involved in the EBPR system was evaluated. Potential future research areas for the EBPR system and process optimization were also proposed.

Key words: EBPR; PAOs; GAOs; metabolic mechanisms.

含磷废水的大量排放是造成水体富营养化的重要原因之一。近年来,随着水体富营养化现象的加剧,我国对废水排放的磷含量控制越来越重视,各类污水排放标准中处理出水总磷浓度有逐年降低的趋势。这一方面为我国水环境保护提供了有力保障,另一方面也对污水除磷技术提出了更高的要求。在污水除磷处理工艺方面,强化生物除磷(enhanced biological phosphorus removal, EBPR)工艺通过厌氧段和好氧段的交替运行,在活性污泥系统中能够富集

一类聚磷微生物,通过好氧段末端排泥达到污水除磷的目的。EBPR工艺具有处理费用低、可持续运行等优点,在世界范围内被广泛接受并应用。

为了EBPR工艺的稳定运行和除磷能力更加高效,近30年来环境工程工作者都致力于EBPR系统微生物及其机理的研究与应用。现代分子生物学技术的迅速发展及其在环境工程微生物领域的应用促进了人们对EBPR系统内微生物机理方面的深入探究。目前针对广泛存在于EBPR系统中的聚磷微生物(polyphosphate accumulating organisms, PAOs)开展的研究最多,但EBPR系统环境复杂,微生物种类多样,同时存在能够与PAOs竞争有机物的聚糖微

* 公益性行业(农业)科研专项(201303091)和国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07101012 和 2008ZX07101-006)资助。

** 通讯作者. E-mail: weixiang@zju.edu.cn

2013-06-02 收稿, 2013-12-19 接受。

生物(glycogen accumulating organisms, GAOs). 它们与 PAOs 在表观代谢特征上具有很多相似性, 容易引起除磷效率降低系统恶化。目前关于这两类 EBPR 系统最主要的微生物的研究在鉴定及代谢机理方面尚存在部分争议。因此本文从 PAOs 和 GAOs 的菌种鉴定、底物吸收机制、糖酵解途径、TCA 途径的贡献以及 PAOs 与 GAOs 的代谢相似性等方面, 对 EBPR 系统主要微生物及其代谢机理的研究进展进行总结与探讨, 以期为 EBPR 工艺运行条件的优化提供参考。

1 EBPR 系统内的聚磷菌与聚糖菌

EBPR 系统是一个多种类型微生物混居的场所, 多年来世界各地的研究者对其中发挥重要作用的微生物进行了不懈的探索。随着现代分子生物学技术的快速发展, 人们对 EBPR 系统内主要功能微生物种群及其特性研究取得了许多新的进展。

1.1 聚磷微生物

聚磷微生物(PAOs)也称聚磷菌, 是指具有以下代谢特征的微生物(图 1)^[1]: 在厌氧(anaerobic phase)条件下, 细胞吸收挥发性脂肪酸(volatile fatty acids, VFAs), 并将其转化为胞内聚合物 PHA, 同时分解胞内的糖原(glycogen), 水解原有的聚磷(poly-P), 产生的无机磷(Pi)被释放至胞外环境; 在好氧或缺氧(aerobic or anoxic phase)条件下, 细胞将 O₂或硝态氮(亚硝态氮)作为最终电子受体, 氧化胞内储存的 PHA, 产生 CO₂和 H₂O(或 N₂)释放到胞外环境, 同时从外部环境吸收超过自身生理代谢需求量的无机磷(即过量吸磷), 在胞内重新合成聚磷和糖原, 通过这样的循环过程, 细胞获得新物质和能量得以生长并繁殖新细胞^[2]。这些代谢特征与 EBPR 系统表现出的整体性质吻合, 亦符合很多活性污泥微生物典型代谢模型, 例如 ASM2D、TUD、UCTPHO

等^[2]。研究发现, 具有这种代谢特征的微生物由多种特殊的微生物种群组成。

1.1.1 符合典型代谢模型的 PAOs 1995 年 Bond 等^[3]通过对比具有除磷功能和不具有除磷功能的活性污泥微生物群落结构, 采用 16S rRNA 克隆文库技术分析, 首次发现近似于 Betaproteobacteria 第二亚纲的红环菌属(*Rhodococcus*)的细菌在具有除磷功能的活性污泥微生物数量上占据较大比例。在具有良好除磷性能的污泥中采用 FISH 技术结合化学染色的方法观察该菌种在污泥中的分布情况, 印证了这一发现^[4-5]。这种细菌在系统发育地位上与红环菌相近, 两者最大的不同在于前者不进行光合作用, Hesselmann 等^[6]将其命名为“*Candidatus Accumulibacter phosphatis*”, 常略写为 *Accumulibacter*。*Accumulibacter* 是目前废水生物处理领域广泛认可的 PAOs, 也是研究最多的一种 PAOs。

有研究者根据这种 PAOs 的特异性设计了几种不同的 FISH 探针(表 1), 用于检测 PAOs 在活性污泥中的存在状况。相对于总细菌数量, *Accumulibacter* 在许多实验室规模 EBPR 系统内均能够达到很高的丰度(55%~95%)^[7]。实验室规模富集的 *Accumulibacter* 表现出良好的除磷性能和 PAOs 的典型代谢特征。鉴于污水处理厂内水源的水质类型差异较大, 受不同工艺运行条件和构筑物内复杂环境因素等影响, 在具有生物除磷能力的污水处理厂构筑物中 *Accumulibacter* 占到总细菌数量的 4%~22%^[8-9]。澳大利亚的研究人员通过调查 6 所 EBPR 污水厂发现, 工艺的除磷效率和污泥中 *Accumulibacter* 所占的数量比例呈正相关关系, 并通过甲基蓝和苏丹黑等化学染色法验证了 *Accumulibacter* 胞内聚磷和 PHA 的循环过程, 且除 *Accumulibacter* 外没有发现其他的聚磷微生物^[10]。Kong 等^[11]通过 FISH-MAR 技术研究了丹麦的 3 座 EBPR 污水处理厂污泥中

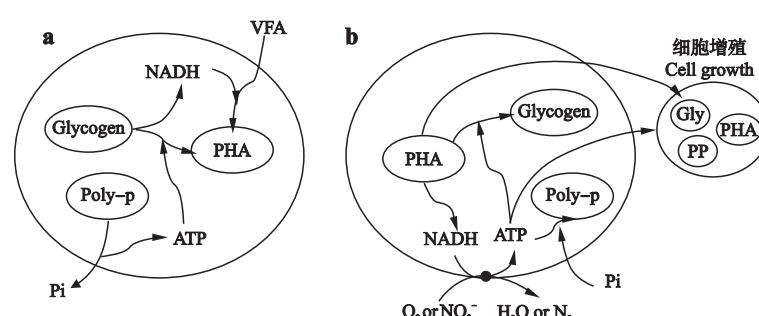


图 1 PAOs 细胞代谢机理^[1]

Fig. 1 Metabolic metabolisms of PAOs cells^[1].

a) 厌氧段 Anaerobic phase; b) 好氧或缺氧段 Aerobic or anoxic phase.

表 1 EBPR 系统中检测 PAOs、GAOs 常用的 FISH 探针

Table 1 Probes used for FISH detection of PAOs and GAOs involved in EBPR systems

探针 Probe	碱基序列 5'-3' Sequence 5'-3'	特异性 Specificity	参考文献 Reference
PAO462	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	<i>Rhodococcus tenuis</i> 亚类	[5]
PAO651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	多数 <i>Accumulibacter</i>	[5]
PAO846	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	<i>Rhodococcus tenuis</i> 亚类	[5]
PAO462b	CCGTCATCTRCWCAGGGTATTAAC	多数 <i>Accumulibacter</i>	[8]
PAO846b	GTTAGCTACGGYACTAAAAGG	多数 <i>Accumulibacter</i>	[8]
Acc-I-444	CCCAAGCAATTCTTCCCC	Accumulibacter clade IA 和其他 Type I clades	[12]
Acc-II-444	CCCGTGCAATTCTTCCCC	Accumulibacter clade IIA, IIC, IID 和其他部分 Type II clades	[12]
GB	CGATCCTCTAGCCCCACT	Competibacter-GB 类的细菌	[13]
GB_G1	TTCCCCGGATGTCAAGGC	部分 Competibacter	[13]
GB_G2	TTCCCCAGATGTCAAGGC	部分 Competibacter	[13]
GB_1~2	GGCTGACTGACCCATCC	部分 Competibacter	[13]
GB_2	GGCATCGCTGCCCTCGTT	部分 Competibacter	[13]
GB_3	CCACTCAAGTCCAGCCGT	部分 Competibacter	[13]
GB_4	GGCTCCTTGCAGCACCGT	部分 Competibacter	[13]
GB_5	CTAGGCAGCGAACGCC	部分 Competibacter	[13]
GB_6	GGTTCCCTTGCAGCACCTC	部分 Competibacter	[13]
GB_7	CATCTCTGGACATTCCCC	部分 Competibacter	[13]
GAOQ431	TCCCCGGCTAAAGGGCTT	部分 Competibacter	[14]
GAOQ989	TTCCCCGGATGTCAAGGC	部分 Competibacter	[14]
TFO_DF218	GAAGCCTTGCCTCTCAG	与 <i>Defluviicoccus</i> 相近的细菌 主要为 cluster 1	[15]
TFO_DF618	GCCTCACTTGTCTAACCG	与 <i>Defluviicoccus</i> 相近的细菌 主要为 cluster 1	[15]
DF988	GATACGACGCCCATGTCAAGGG	与 <i>Defluviicoccus</i> 相近的细菌 主要为 cluster 2	[16]
DF1020	CCGGCCGAACCGACTCCC	与 <i>Defluviicoccus</i> 相近的细菌 主要为 cluster 2	[16]

Accumulibacter 的代谢特征,结果发现均符合除磷生化模型中对 PAOs 代谢特征的描述与定义。

聚磷代谢是 PAOs 的关键代谢程序。聚磷激酶 (polyphosphate kinase, PPK) 被认为是聚磷合成过程中最重要的酶。*ppk* 基因 (*ppk* genes) 被认为是编码聚磷合成反应酶的功能基因,已有研究应用于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、脑膜炎双球菌 (*Neisseria meningitidis*)、不动杆菌 (*Acinetobacter* spp.) 等菌种^[17]。McMahon 等^[18]首次将 PCR 和 mRNA 斑点杂交技术结合 *ppk* 基因及其表达产物应用于以 *Accumulibacter* 为主导的 EBPR 系统。相比于 16S rRNA 片段, *ppk* 基因在分辨 *Accumulibacter* 种群系统发育结构方面发挥的作用更为显著。经 *ppk1*-PCR 扩增试验发现, *Accumulibacter* 由 Type I 和 Type II 两个进化分支构成^[19](常用探针见表 1),其中每个分支至少包含 5 种子进化分枝 (Type I 包含 I A ~ I E, Type II 包含 II A ~ II G)^[20]。影响 *Accumulibacter* 种群多样性分布的关键因素是菌种所在栖息地的环境特征,而非地理隔离因素^[20],因此环境条件对 *Accumulibacter* 不同菌株的数量分布起着决定性作用。

1.1.2 反硝化聚磷菌 废水生物处理工艺过程中人

们希望借助同一菌种达到脱氮除磷双重功能。在缺氧环境中,部分 PAOs 能够利用硝态氮(或亚硝态氮)作为最终电子受体氧化胞内储存的 PHA 进行反硝化吸磷等生命活动^[11,21]。由于电子受体不同,分解等量的 PHA 所释放的能量存在明显的差别,相比以分子氧为电子受体的生化反应,以硝态氮为电子受体的生化反应产生的能量为 70% ~ 80%,磷酸盐吸收量为 40% ~ 60%^[22]。尽管反硝化除磷的产能效率和吸磷效率较好除磷偏低,但反硝化聚磷菌 (denitrifying PAOs, DPAOs) 能够将反硝化和吸磷两个代谢过程同时进行,节省碳源和曝气量,且剩余污泥产量低^[23],DPAOs 因此成为研究热点。

投加不同的电子受体,EBPR 系统内的微生物群落结构就会产生显著性差异^[24]。因此,有关 PAOs 和 DPAOs 之间的分类关系一直存在争议。产生争议的主要原因有 3 方面:1) 对 PAOs 和 DPAOs 的定义均从工程学的角度出发,对具有特定功能微生物的界定,缺少从微生物学角度的考察与评估;2) 早期的研究手段较为有限,采用的试验方法多是从侧面间接地反映 PAOs 的反硝化功能及其水平,缺少直观的证据;3) EBPR 系统内微生物组成复杂,应用不同的研究方法可能会针对不同的目标微生物,当目

标微生物的系统发育地位尚不明确时,各研究者得出的结论都指向工程学定义的 PAOs,从而各种研究结论之间不可避免地会产生矛盾和分歧,因而难以得出统一的观点。尽管现代分子生物学方法的运用便于人们探知 PAOs 和 DPAOs 的种群数量变化,但是仍然无法清晰辨别两者之间的从属地位及分类关系,原因仍在于 PAOs 的微生物组成和系统发育体系有待完善。

已有学者针对 *Accumulibacter* 开展了试验探索。Kong 等^[11]采用 MAR-FISH 技术观察到 *Accumulibacter* 能够利用氧气、硝态氮和亚硝态氮 3 种电子受体。Carvalho 等^[25]首次观察到 *Accumulibacter* 种群存在杆状和球状两种基本细胞形态。杆状菌能够直接利用硝态氮作为电子受体,球状菌不能利用硝态氮,可能利用亚硝态氮作为电子受体。一些学者通过富集试验染色观察结合相关生化数据和 FISH 分析,得到以下推论:*Accumulibacter* 种群具有不同程度的反硝化功能,Type I 能够从硝氮的水平进行反硝化,而 Type II 能够从亚硝氮的水平进行反硝化^[12,26-27]。Martín 等^[28]从基因水平印证了 Type II A 不能够直接从硝氮水平进行反硝化,能够将亚硝态氮转化为氮气,但不排除这种可能:EBPR 系统中存在其他菌种能够将硝氮转化为亚硝氮,*Accumulibacter* 利用积累的亚硝态氮进行反硝化。*Accumulibacter* 每一进化分支(包括子进化分支)的反硝化功能仍有待通过 DNA 序列或功能基因的表达产物得到确认。以上研究结果表明,反硝化功能及其利用的电子受体种类能够作为鉴定菌种的标准之一。此外,如 1.1 中所述的 PAOs 定义实际上涵盖了 DPAOs,DPAOs 是属于 PAOs 的一类,在概念上不应与 PAOs 并列。为了区分 PAOs 的不同类型,有文献将仅能利用氧气不能利用硝态氮和亚硝态氮的 PAOs 称为 non-PAOs^[29],或根据利用电子受体的不同,将 DPAOs 细分为 P_O、P_{ON} 和 P_{ONn}^[30]。这种根据 PAOs 的反硝化功能特点加以区分的称呼更为严谨。

1.2 聚糖微生物

聚糖微生物(glycogen accumulating organisms, GAOs),也称聚糖菌,易存在于除磷效果恶化的 EBPR 系统中,其代谢特征与 PAOs 类似,也具有厌氧/好氧的循环,但两者存在明显差异:GAOs 缺少释磷/吸磷的循环过程,不具备除磷能力,但 GAOs 亦是将 VFAs 作为主要碳源,因此能够在工艺的厌氧段与 PAOs 产生竞争^[31]。GAOs 的定义除了建立在其代谢特征基础上,还需能够与 PAOs 参与竞争。

目前研究最为广泛的 GAOs 是“*Candidatus Competibacter phosphatis*”和一种发育地位与 *Defluviicoccus vanus* 相近的细菌(包括 *Defluviicoccus vanus*),检测这两类 GAOs 的常用探针在表 1 中列出。在正常的污水处理厂规模的 EBPR 系统中数量最多时能够分别占总细菌数量的 12% 和 9%^[10,32],在由 GAOs 占据竞争优势的 EBPR 系统内,所占比例会相应增加,但两种微生物各自的数量比例不等。“*Candidatus Competibacter phosphatis*”^[13-14]常缩略为 Competibacter,属于 Gammaproteobacteria 纲^[33],包括至少 7 个不同的进化分支 GB1 ~ GB7^[13]。其中,GB1、GB4 和 GB5 仅能从硝态氮水平进行反硝化,GB6 能够利用硝态氮和亚硝态氮,而 GB3 和 GB7 不具有反硝化功能^[32,34]。与 *Defluviicoccus vanus* 相近的细菌常略写为 *Defluviicoccus*^[32],属于 Alphaproteobacteria 纲^[15],由 Cluster I ~ Cluster IV 4 个进化分支组成。其中 Cluster I 能够从硝态氮的水平进行反硝化,而 Cluster II 不具备反硝化功能^[35],Cluster III 和 Cluster IV 的反硝化功能尚未见报道。Competibacter 和 *Defluviicoccus* 之间的区别在于两者对不同的碳源具有不同程度的亲和性,Competibacter 吸收乙酸的速率较快,*Defluviicoccus* 对丙酸的吸收速率更快^[36],因此采用乙酸/丙酸交替作为碳源有利于 PAOs 在种群竞争中取得优势^[37]。

2 EBPR 系统主要微生物代谢机理

废水生物除磷工艺实质上是生物反应过程,PAOs 是除磷生物反应的主体。细胞内的代谢途径和生化反应构成了分子尺度上的生物除磷工艺。因此 PAOs 的代谢机理一直是废水生物处理领域的研究重点。

2.1 底物吸收机制

生物反应是酶促反应,绝大多数酶位于细胞内,营养物质只有进入细胞才能参与代谢。细胞内电子传递的结果是在细胞内积累 OH⁻,在细胞外积累 H⁺,由此产生跨膜 pH 梯度和跨膜电位,形成质子运动势(proton motive force, PMF),使膜处于蓄能的状态。

Mino 等^[38]在 1987 年首先提出 PAOs 通过主动运输的方式吸收乙酸,所需能量来自聚磷水解。1994 年 Smolders 等^[39]提出假设:在偏碱性的环境中,PAOs 吸收乙酸需要消耗更多的能量;当 pH 升高时,乙酸的吸收速率可能会下降。然而,试验结果却显示 pH 值的改变没有影响 PAOs 的乙酸吸收速

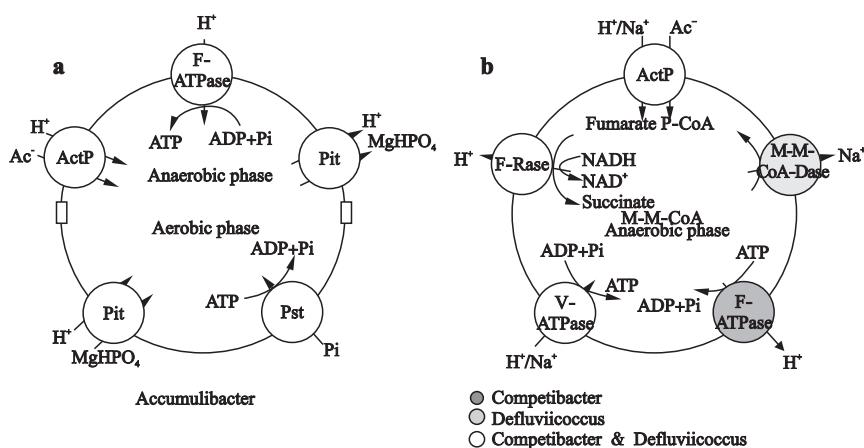


图 2 PAOs(a) 和 GAOs(b) 的底物吸收机制

Fig. 2 Substrate uptake mechanisms in PAOs (a) and GAOs (b)^[42-43].

率^[40], 释磷速率却随着 pH 值的上升有所增加。Smolders 等^[39]推测释磷过程帮助 PAOs 维持了细胞内 pH 和 PMF 的平衡, 即当外界 pH 升高时, 更多的聚磷被水解, 产生更多的能量用来维持细胞膜上的 PMF, 从而保证了细胞吸收乙酸的速率不受 pH 改变的影响。2001 年 Filipe 等^[40]通过研究 pH 对 PAOs 和 GAOs 的影响发现, 当厌氧条件下 pH 增加时, 与 GAOs 大量消耗糖原相比, 吸收 VFAs 引起 PAOs 释放更多的磷, 但是并不影响糖原的消耗量。在此基础上相继有学者采用选择性抑制剂 (CCCP、DCCD、缬氨霉素和尼日利亚菌素等) 对 *Accumulibacter*、*Competibacter* 和 *Defluviicoccus* 的底物吸收机制 (图 2) 开展试验研究。结果发现主动运输需要透酶和代谢能, 乙酸透酶 (ActP) 是参与乙酸吸收过程的透酶^[41]。*Accumulibacter* 和 *Competibacter* 吸收乙酸的过程均是由 PMF 推动的, 而产生 PMF 的来源, 两者存在差异:*Accumulibacter* 水解聚磷后通过专门的运输系统 Pit 释放无机磷 (Pi) 产生 PMF (图 2a); *Competibacter* 则是通过 F 型 ATP 酶催化 ATP 分解同时向胞外输出质子产生 PMF (图 2b), 所需 ATP 来自于糖酵解和还原性三羧酸循环 (reductive TCA) 两个过程中的底物水平磷酸化^[42]。

Accumulibacter 细胞膜上运输无机磷的专门系统包含两种:Pit 和 Pst。Pit 对 Pi 的亲和性较低, Pst 对 Pi 的亲和性较高^[28]。两套亲和程度不同的运输系统是 PAOs 自身调节吸磷能力的一种体现。如图 2a, 厌氧条件下 Pit 系统同向输出质子和无机磷, 产生 PMF 用于乙酸吸收, 通过 F 型 ATP 酶进行质子输入生成 ATP 保存能量^[43]; 在好氧段初始, 外界无机磷浓度高, PAOs 通过 Pit 系统吸收磷, 在好氧段

末尾, 外界无机磷浓度降低, PAOs 通过 Pst 系统吸收磷^[28]。*Competibacter* 和 *Defluviicoccus* 吸收乙酸由延胡索酸还原酶 (fumarate reductase, 图 2b 中 F-Rase) 系统产生 PMF, 乙酸透酶同向输入乙酸和质子/ Na^+ , V 型 ATP 酶输入质子/ Na^+ 同时催化合能 ATP 储存能量。*Competibacter* 通过 F 型 ATP 酶催化 ATP 分解同时向胞外输出质子, 而 *Defluviicoccus* 通过甲基丙二酰辅酶 A (Methyl-malonyl-CoA decarboxylase, 图 2b 中 M-M-CoA-Dase) 脱碳产生钠电位^[43]。*Accumulibacter* 用于乙酸吸收的 PMF 通过质子和无机磷输出产生, *Competibacter* 则通过 F 型 ATP 酶和延胡索酸还原酶的联合反应向胞外输出质子产生 PMF, 而 *Defluviicoccus* 的 PMF 产生除了来自延胡索酸还原酶在细胞膜上的质子输出过程, 还来自甲基丙二酰辅酶 A 脱碳反应中的钠离子排出过程。相比 GAOs 依赖质子输出和钠电位产生 PMF, PAOs 利用专门的无机磷运输系统, 能够在一定程度上抵抗或缓解外界环境变化(例如 pH 值改变)带来的冲击, 因此在有限范围内适当提高 pH 值将有助于 PAOs 在 EBPR 系统中占据竞争优势。

2.2 糖酵解途径

糖原 (glycogen) 是 PAOs 和 GAOs 细胞内最主要的储能物质之一。糖原的代谢是 PAOs 和 GAOs 细胞内重要的物质和能量代谢过程。糖原的无氧分解代谢又称糖酵解 (glycolysis), 是 EBPR 系统微生物厌氧代谢机理的研究重点。目前在废水生物除磷领域内关于糖酵解途径存在两种观点:EMP 途径 (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) 和 ED 途径 (Entner-Doudoroff pathway)。两种途径产生还原力 NADH 的能力相当, 但从产能效率言, ED 途径只有 EMP 途径

的 2/3^[44].

Mino 等^[38]提出 PAOs 在厌氧条件下通过 EMP 途径将糖原转化为丙酮酸的代谢模型。基于¹³C 标记的 NMR 技术试验结果结合化学计量学显示 ED 途径是主要的糖原降解途径^[44-45]。Erdal^[46]在不同运行温度(5 和 20 ℃)的 EBPR 系统中均检测到了 EMP 途径的关键酶——磷酸果糖激酶,没有检测出葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,这种酶是 ED 途径和戊糖磷酸途径共有的酶。宏基因组分析技术发现 *Accumulibacter Type II A* 包含 EMP 途径所有的基因信息,而并未发现 ED 途径相关的基因信息^[28],这表明至少 *Accumulibacter Type II A* 分支的 PAOs 只能够利用 EMP 途径进行糖原分解代谢。Wexler 等^[47]采用基于蛋白质组学和放射性标记的分析方法发现,EMP 途径相关酶在 20 ℃以 Type I 以及 Type I 和 Type II A ~ D *Accumulibacter* 为主的两个 SBR 反应器污泥中都存在。这些看似矛盾的结果反映出 *Accumulibacter* 不同菌株之间可能存在代谢能力差异,也可能一些菌株具备采用两种途径代谢能力。

由于糖原是 GAOs 的唯一能源,糖原的降解途径对 GAOs 的新陈代谢产生更加深远的影响。Filipe 等^[48]提出 *Competibacter* 经过 EMP 途径分解糖原,因为 ED 途径中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶在 *Competibacter* 的富集培养物中没有显示活性。然而 Lemos 等^[49]采用¹³C 标记的乙酸进行 NMR 分析试验,发现 *Competibacter* 和 *Defluviicoccus* 的混合富集培养物通过 ED 途径降解糖原。目前 GAOs 的乙酸或丙酸代谢模型多数是基于 EMP 途径^[31,48,50]。GAOs 厌氧代谢的糖原降解率与 PHA 生成率通常与 EMP 代谢模型的理论预测值保持一致^[36,51]。然而, Lopez-Vazquez 等^[52]发现, *Competibacter* 富集物在厌氧条件下存在更高的糖原利用率和 PHA 生成率,这些代谢特征符合 ED 代谢模型。值得注意的是,Lemos 试验和 Lopez-Vazquez 试验均是在 30 ℃进行的,也许温度能够解释这些研究结果的差异:1) GAOs 同时拥有 EMP 和 ED 的代谢能力,它们依赖温度调控糖原分解途径;2) *Competibacter* 或 *Defluviicoccus* 的每一进化分支只能利用 EMP 或 ED 单一途径,而温度可以影响不同进化分支的种群数量,对不同的 GAOs 菌株具有一定的选择性^[53]。Bengtsson 等^[54-55]在 30 ℃条件下对 *Competibacter* 富集物进行试验观察,其结果更接近 EMP 代谢模型的预测,且 Bengtsson 试验条件类似于 Lopez-Vazquez 试验。这个结果支持了第二种假设,至少部分 *Competibacter* 的菌株

具有 EMP 或 ED 的选择性。

这个依赖温度的选择性模型切换还可以用来解释在高温条件下 GAOs 比 PAOs 更具备竞争优势的现象。但以上推测引出另一个问题,即在高温环境中,产能效率较低的 GAOs 菌株如何能够占据竞争优势。一种解释是利用 ED 途径的 GAOs 能够将细胞内 PHA 的厌氧储存量最大化,而 PHA 是好氧段或缺氧段唯一的碳源和能源,这意味着在接下来的好氧段这类 GAOs 菌株的生物量和糖原生成量以最大幅度增加^[53]。由于 GAOs 类似于其他的化能异养型细菌,趋向于在较高温度下显示出更高的增长率,这类 GAOs 在厌氧时最大化乙酸吸收率并在好氧时最大化繁殖增长率很可能是一种竞争优势。因此选择较低的温度运行 EBPR 工艺将会有利于 PAOs 在同 GAOs 竞争中取得优势地位。然而,以上假设是否真正成立需要进一步深入研究予以确定。

2.3 TCA 途径的贡献

如前所述,糖酵解不仅提供 ATP 还能为电子传递链提供 NADH。因此糖酵解是厌氧阶段电子传递链上还原力的来源这一观点已被广泛接受^[56]。然而近年来一些试验发现三羧酸循环(TCA)参与提供还原力。Zhou 等^[57]发现,当糖原含量有限时,以 *Accumulibacter* 为主的富集物能够水解更多的聚磷来满足 ATP 的需求量;当糖原完全消耗时,TCA 用来作为还原力的唯一来源,这个过程的化学计量学符合 Comeau-Wentzel 模型^[58-59]。Mino 等^[38]指出,当糖原含量不是限制因子时,TCA 循环不提供还原力。然而,Zhou 等^[57]估算出即使在没有糖原限制的条件下,TCA 仍贡献出大约 25% 的 NADH。这一结果与 Pereira 等^[60]的修正模型吻合。Schuler 和 Jenkins^[61-62]从文献研究中分析厌氧化学计量学时也注意到仅依赖糖酵解并不能够满足厌氧段 NADH 的需求量。通过质谱技术蛋白质组学研究,Wexler 等^[47]发现 *Accumulibacter Type I* 的富集物在厌氧段缺少 TCA 活性,然而另一种 *Accumulibacter Type I* 和 *Type II A ~ D* 的混合富集物却显示出 TCA 活性。这个结果表明,至少一些 *Accumulibacter Type II* 菌株能够在厌氧段通过 TCA 途径产生还原力,这种代谢能力可以为这些菌株提供比 Type I 更大的竞争优势,特别是在糖原含量有限的情况下。此外,TCA 的分支途径也参与了 GAOs 的代谢过程。Lemos 等^[49]发现在 *Competibacter* 和 *Defluviicoccus* 混合培养物中 TCA 途径参与厌氧段 NADH 的生成。可以推测,即使在不包含 GAOs 的 PAOs 系统中,关于还原

力的来源,一些 PAOs 菌株可能主要依赖糖原代谢,另一些 PAOs 菌株更多地依赖 TCA 循环。具体依赖哪种代谢途径则取决于细胞个体水平上储存的糖原含量。未来的研究工作应当阐明这个生化机制,并考虑 TCA 循环在 PAOs 和 GAOs 细胞内的活性。

2.4 PAOs 和 GAOs 的代谢相似性

尽管 GAOs 常出现在除磷效果恶化的 EBPR 系统中,但并不能就此说明 EBPR 系统的除磷效率大幅降低的原因是 GAOs 取代 PAOs 成为优势种群的结果。Schuler 和 Jenkins^[61]曾提出假设:在特殊条件下,以 PAOs 为主的富集培养物会呈现 GAOs 的代谢模式。一些学者针对这一疑问进行了试验研究。Erdal 等^[63]通过批次试验发现,糖原不仅能够作为合成 PHA 过程中电子传递链上还原力的来源,而且当 PAOs 细胞内的聚磷大量消耗时,糖原可以作为一种“应急能源”,特别是在温度高于 20 ℃ 的条件下。由此推测,当 EBPR 系统在较高温度的环境中运行时,PAOs 倾向于采用代谢糖原的途径来进行生命活动,PAOs 细胞内将储存更多的糖原,同时减少无机磷的吸收量,EBPR 系统的除磷效率因此大幅下降。Zhou 等^[64]采用≥80% 的 Accumulibacter 富集培养物在聚磷含量有限时监测厌氧条件下 PAOs 的乙酸利用情况,观察到当 PAOs 不再释磷时依然继续吸收乙酸合成 PHB 和 PHV,糖原的分解成为该阶段细胞代谢的主要能量来源,并且化学计量学分析发现 PAOs 的乙酸吸收量、PHA 的合成量以及糖原的分解量都与 GAOs 的代谢模型^[45,65-67]一致。Acevedo 等^[68]研究了 Accumulibacter 富集培养物在不同聚磷水平时的代谢状况,结果发现,当聚磷含量高时,PAOs 通过聚磷水解获得 ATP,通过糖原分解获得 NADH 和部分 ATP;当聚磷含量低时,PAOs 不断吸收乙酸却不释放无机磷,糖原被大量消耗用于产能,用来填补由于聚磷水解缺少引起的能量失衡,在合成的 PHA 中 PHV 的含量有所增加。Acevedo 等^[68]将 PAOs 的代谢特征称为 PAM (polyphosphate-accumulating metabolism), GAOs 的代谢特征称为 GAM(glycogen-accumulating metabolism)。当聚磷水平逐渐下降时,PAOs 的表观代谢特征由 PAM 转换为 GAM;当聚磷水平恢复时,GAM 转换为 PAM。此外,在 PAM/GAM 转换过程中运用 FISH 探针观察到 Accumulibacter Type I 数量减少而 Type II 数量增加,可以推测 PAOs 胞内聚磷水平和类似 GAOs 的代谢模式影响着不同类型 PAOs 的种群分布数量^[68]。关于 PAM/GAM 的转换争议目前尚无定论,但其中涉及的生化反应、代

谢途径和不同类型的 PAOs、GAOs 种群数量变化的影响因素等方面,值得开展广泛深入的研究。

3 EBPR 系统微生物及其代谢机理研究方法与技术

前文中已经描述过现代分子生物学技术在研究 EBPR 系统微生物及其代谢机理方面发挥着极其重要的作用。目前使用最为普遍的是基于 16S rDNA 或 rRNA (例如 FISH) 或功能基因 (*ppk*) (例如 q-PCR) 等能够显示微生物种群系统发育状况的分子生物学方法。系统发育信息和微生物的表现特征相结合可以对 EBPR 系统 PAOs 和 GAOs 微生物及其功能进行比较和分析。

许多分子生物学方法都是定性而非定量的,但是能够帮助阐明微生物特殊的代谢性能。化学染色法与 FISH 技术结合有助于说明 EBPR 微生物种群结构和功能,已经被广泛应用于 PAOs 或 GAOs 在厌氧/好氧条件下胞内聚合物的检测^[5,14-16]。Günther 等^[69]曾联合化学染色、血细胞计数和细胞分选 3 种方法测定 EBPR 系统内聚磷细胞数量百分比。近年来 Raman 光谱法被用于细胞个体水平的聚合物含量测定,分析厌氧/好氧循环条件下 PAOs 和 GAOs 的胞内聚合物的动态变化^[70-72]。FISH 结合底物标记法(放射性或稳定同位素标记底物)、MAR-FISH 技术、nano-SIMS 技术以及 Raman-FISH 等技术^[73-74]纷纷被应用于 EBPR 系统微生物及其功能的分析研究。这些方法的运用不仅可以观察系统中的微生物变化,而且还能分析标记化合物在细胞个体水平上的吸收状况。此外,选择性酶抑制剂的使用在揭示代谢途径中的特定步骤,特别是底物吸收方面发挥了显著的作用^[42-43]。然而采用这种方法应当谨慎,因为当一种途径受到抑制时,可能导致 PAOs 或 GAOs 利用其他未知的途径进行代谢^[75]。

近年来,研究者通过运用“omics”技术,例如宏基因组学(genomics) 和蛋白质组学(proteomics) 在 EBPR 系统微生物及其代谢机理研究方面取得了一些突破性的进展。Accumulibacter Type II A 富集物基因组信息分析结果^[28,76]从基因水平验证了 EBPR 代谢模型中的大部分假设。尽管如此,宏基因组学多数用于阐明某一种微生物的代谢潜力,尚不能提供任何与基因表达信息有关的证据。而转录物组学(transcriptomics) 和蛋白质组学的结合能够探测和鉴定 mRNA 与蛋白质,因而能够较好地反映出 EBPR 系统微生物在厌氧/好氧条件下的特征变

表 2 EBPR 系统微生物及其代谢机理研究中应用的分子生物学技术

Table 2 Molecular biology techniques applied in the studies on microbial mechanisms in EBPR systems^[53]

技术手段 Technique	作用对象 Target	作用 Function	局限性 Limitations
q-FISH	rRNA	确定微生物种群的数量	不能反映功能/活性
q-PCR	功能基因(<i>ppk</i>)	确定微生物种群的数量	不能反映实际活性
化学染色 Chemical staining	Poly-P/PHA	检测 PAOs 或 GAOs 细胞	不能细胞计数; 不能与动力学相结合
Raman 光谱 Raman spectroscopy	Poly-P/PHA/Gly	确定储存聚合物的数量	与传统模型相结合尚存在困难
MAR-FISH/nano-SIMS/Raman-FISH	标记的底物/rRNA	将系统发育和功能建立关联; 明确底物的吸收	缺少定量, 限于底物吸收研究
代谢抑制剂/选择性化学药剂 Metabolic inhibition/selective chemicals	酶活性	明确生化途径	可能促进非目标微生物的代谢
宏基因组学 Genomics	基因组 DNA	阐明某一类微生物的遗传特性	缺少关于基因信息的表达和活性
蛋白质组学 Proteomics	蛋白质	鉴定蛋白质的合成	合成的蛋白可能被抑制/条件改变时蛋白的合成可能被推迟

化^[47,77]. 值得注意的是, 基因转录并不意味着翻译的必然发生, 在操作条件改变的情况下, 原本需要表达的酶可以被选择性抑制剂阻碍其合成过程, 或当外界条件变换时(例如由厌氧到好氧), 细胞内蛋白质的合成可能会推迟. 因此通过“omics”技术获得的分子生物信息应当与其他的试验手段相配合, 才具有足够的说服力.

4 研究展望

废水除磷是保护水环境避免水体富营养化的重要保证. EBPR 工艺作为最经济有效且被广泛采用的废水除磷处理方法, 其是否能够长期高效稳定的运行, 将对环境中的水体产生巨大而深远的影响.

PAOs 的吸磷能力是 EBPR 工艺的核心内容. 关于 PAOs 的种群多样性及其代谢机理, 尽管目前已取得了众多的研究成果, 但针对具有不同功能的 PAOs 种群的分类和菌种鉴定等方面还存在争议和未知领域, 因此仍然需要对 EBPR 系统功能微生物进行深层次的分析, 包括系统发育地位的鉴定与划分, 以及各功能微生物间的系统发育关系. 在代谢机理方面, 功能微生物的代谢多样性和特异性尚需进一步探讨. 在以上研究的基础上, 才能试图揭示 EBPR 系统内的这些微生物在不同环境条件下的代谢模式转换规律和种群数量变化规律, 这对于 EBPR 工艺的稳定运行与效能提升意义重大. 现代分子生物学技术的应用将会对 EBPR 系统功能微生物及其代谢机理的研究起到积极的推动作用^[78-79].

参考文献

- [1] Van Loosdrecht M, Hooijmans C, Brdjanovic D, et al. Biological phosphate removal processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, **48**: 289-296
- [2] Hauduc H, Rieger L, Oehmen A, et al. Critical review

of activated sludge modeling: State of process knowledge, modeling concepts, and limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, **110**: 24-46

- [3] Bond PL, Hugenholtz P, Keller J, et al. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**: 1910-1916
- [4] Bond PL, 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**: 4077-4084
- [5] Crocetti GR, Hugenholtz P, Bond PL, et al. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 1175-1182
- [6] Hesselmann RP, Werlen C, Hahn D, et al. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, **22**: 454-465
- [7] Lu H, Oehmen A, Virdis B, et al. Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphates* through alternating carbon sources. *Water Research*, 2006, **40**: 3838-3848
- [8] Zilles JL, Peccia J, Kim MW, et al. Involvement of *Rhodococcus*-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 2763-2769
- [9] Oehmen A, Lemos PC, Carvalho G, et al. Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Research*, 2007, **41**: 2271-2300
- [10] Saunders AM, Oehmen A, Blackall LL, et al. The effect of GAOs on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR plants. *Water Science and Technology*, 2003, **47**: 37-43
- [11] Kong Y, Nielsen JL, Nielsen PH. Microautoradiographic study of *Rhodococcus*-related polyphosphate-accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and Environmental Microbiology*,

- 2004, **70**: 5383–5390
- [12] Flowers JJ, He S, Yilmaz S, et al. Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different ‘Candidatus Accumulibacter’ clades. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, **1**: 583–588
- [13] Kong Y, Ong SL, Ng WJ, et al. Diversity and distribution of a deeply branched novel proteobacterial group found in anaerobic-aerobic activated sludge processes. *Environmental Microbiology*, 2002, **4**: 753–757
- [14] Crocetti GR, Banfield JF, Keller J, et al. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology*, 2002, **148**: 3353–3364
- [15] Wong MT, Tan FM, Ng WJ, et al. Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic-aerobic activated sludge processes. *Microbiology*, 2004, **150**: 3741–3748
- [16] Meyer RL, Saunders AM, Blackall LL. Putative glycogen-accumulating organisms belonging to the Alphaproteobacteria identified through rRNA-based stable isotope probing. *Microbiology*, 2006, **152**: 419–429
- [17] Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 1999, **68**: 89–125
- [18] McMahon KD, Dojka MA, Pace NR, et al. Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**: 4971–4978
- [19] He S, Gall DL, McMahon KD. “Candidatus Accumulibacter” population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**: 5865–5874
- [20] Peterson SB, Warnecke F, Madejska J, et al. Environmental distribution and population biology of *Candidatus Accumulibacter*, a primary agent of biological phosphorus removal. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**: 2692–2703
- [21] Zeng RJ, Lemaire R, Yuan Z, et al. Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, **84**: 170–178
- [22] Ekama GA, Wentzel MC. Denitrification kinetics in biological N and P removal activated sludge systems treating municipal wastewaters. *Water Science and Technology*, 1999, **39**: 69–77
- [23] Kuba T, Van Loosdrecht M, Heijnen J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. *Water Research*, 1996, **30**: 1702–1710
- [24] Lee N, Nielsen PH, Aspegren H, et al. Long-term population dynamics and *in situ* physiology in activated sludge systems with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen removal. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, **26**: 211–227
- [25] Carvalho G, Lemos PC, Oehmen A, et al. Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure. *Water Research*, 2007, **41**: 4383–4396
- [26] Oehmen A, Carvalho G, Freitas F, et al. Assessing the abundance and activity of denitrifying polyphosphate accumulating organisms through molecular and chemical techniques. *Water Science and Technology*, 2010, **61**: 2061–2068
- [27] Guisasola A, Quirie M, Vargas MDM, et al. Failure of an enriched nitrite-DPAO population to use nitrate as an electron acceptor. *Process Biochemistry*, 2009, **44**: 689–695
- [28] Martín HG, Ivanova N, Kunin V, et al. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature Biotechnology*, 2006, **24**: 1263–1269
- [29] Oehmen A, Lopez-Vazquez C, Carvalho G, et al. Modelling the population dynamics and metabolic diversity of organisms relevant in anaerobic/anoxic/aerobic enhanced biological phosphorus removal processes. *Water Research*, 2010, **44**: 4473–4486
- [30] Hu J, Ong S, Ng W, et al. A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Research*, 2003, **37**: 3463–3471
- [31] Zeng RJ, van Loosdrecht M, Yuan Z, et al. Metabolic model for glycogen-accumulating organisms in anaerobic/aerobic activated sludge systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, **81**: 92–105
- [32] Burow LC, Kong Y, Nielsen JL, et al. Abundance and ecophysiology of *Defluvicrococcus* spp., glycogen-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology*, 2007, **153**: 178–185
- [33] Nielsen AT, Liu WT, Filipe C, et al. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**: 1251–1258
- [34] Kong Y, Xia Y, Nielsen JL, et al. Ecophysiology of a group of uncultured Gammaproteobacterial glycogen: Accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology*, 2006, **8**: 479–489
- [35] Wang X, Zeng RJ, Dai Y, et al. The denitrification capability of cluster 1 *Defluvicrococcus vanus*-related glycogen-accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, **99**: 1329–1336
- [36] Dai Y, Yuan Z, Wang X, et al. Anaerobic metabolism of *Defluvicrococcus vanus* related glycogen accumulating organisms (GAOs) with acetate and propionate as carbon sources. *Water Research*, 2007, **41**: 1885–1896
- [37] Oehmen A, Yuan Z, Blackall LL, et al. Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, **91**: 162–168
- [38] Mino T, Arun V, Tsuzuki Y, et al. Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological

- phosphorus removal process// Ramadori R, ed. Biological Phosphate Removal from Wastewaters: Advances in water pollution control, Oxford: Pergamon Press, 1987: 27–38
- [39] Smolders G, Van der Meij J, Van Loosdrecht M, et al. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, **43**: 461–470
- [40] Filipe CD, Daigger GT, Grady Jr CL. pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms. *Water Environment Research*, 2001, **73**: 223–232
- [41] Gimenez R, Nuñez MF, Badia J, et al. The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2003, **185**: 6448–6455
- [42] Saunders AM, Mabbett AN, McEwan AG, et al. Proton motive force generation from stored polymers for the uptake of acetate under anaerobic conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, **274**: 245–251
- [43] Burow LC, Mabbett AN, McEwan AG, et al. Bioenergetic models for acetate and phosphate transport in bacteria important in enhanced biological phosphorus removal. *Environmental Microbiology*, 2008, **10**: 87–98
- [44] Maurer M, Gujer W, Hany R, et al. Intracellular carbon flow in phosphorus accumulating organisms from activated sludge systems. *Water Research*, 1997, **31**: 907–917
- [45] Hesselmann R, Von Rummell R, Resnick SM, et al. Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal. *Water Research*, 2000, **34**: 3487–3494
- [46] Erdal Z. The Biochemistry of Enhanced Biological Phosphorus Removal: Role of Glycogen in Biological Phosphorus Removal and the Impact of the Operating Conditions on the Involvement of Glycogen. PhD Thesis. Blacksburg, Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University, 2002
- [47] Wexler M, Richardson DJ, Bond PL. Radiolabelled proteomics to determine differential functioning of *Accumulibacter* during the anaerobic and aerobic phases of a bioreactor operating for enhanced biological phosphorus removal. *Environmental Microbiology*, 2009, **11**: 3029–3044
- [48] Filipe CD, Daigger GT, Grady C. A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: Stoichiometry, kinetics, and the effect of pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, **76**: 17–31
- [49] Lemos PC, Dai Y, Yuan Z, et al. Elucidation of metabolic pathways in glycogen-accumulating organisms with *in vivo* ¹³C nuclear magnetic resonance. *Environmental microbiology*, 2007, **9**: 2694–2706
- [50] Oehmen A, Zeng RJ, Saunders AM, et al. Anaerobic and aerobic metabolism of glycogen-accumulating organisms selected with propionate as the sole carbon source. *Microbiology*, 2006, **152**: 2767–2778
- [51] Zeng RJ, Yuan Z, Keller J. Enrichment of denitrifying glycogen-accumulating organisms in anaerobic/anoxic activated sludge system. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, **81**: 397–404
- [52] Lopez-Vazquez CM, Hooijmans CM, Brdjanovic D, et al. Temperature effects on glycogen accumulating organisms. *Water Research*, 2009, **43**: 2852–2864
- [53] Oehmen A, Carvalho G, Lopez-Vazquez C, et al. Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Research*, 2010, **44**: 4992–5004
- [54] Bengtsson S, Werker A, Christensson M, et al. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, 2008, **99**: 509–516
- [55] Bengtsson S. The utilization of glycogen accumulating organisms for mixed culture production of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, **104**: 698–708
- [56] Zhou Y, Pijuan M, Oehmen A, et al. The source of reducing power in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs): A mini-review. *Water Science and Technology*, 2010, **61**: 1653
- [57] Zhou Y, Pijuan M, Zeng RJ, et al. Involvement of the TCA cycle in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs). *Water Research*, 2009, **43**: 1330–1340
- [58] Comeau Y, Hall K, Hancock R, et al. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*, 1986, **20**: 1511–1521
- [59] Wentzel M, Lötter L, Loewenthal R, et al. Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal: A biochemical model. *Water SA*, 1986, **12**: 209–224
- [60] Pereira H, Lemos PC, Reis MA, et al. Model for carbon metabolism in biological phosphorus removal processes based on *in vivo* ¹³C-NMR labelling experiments. *Water Research*, 1996, **30**: 2128–2138
- [61] Schuler AJ, Jenkins D. Enhanced biological phosphorus removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents. Part I: Experimental results and comparison with metabolic models. *Water Environment Research*, 2003, **75**: 485–498
- [62] Schuler AJ, Jenkins D. Enhanced biological phosphorus removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents. Part III: Anaerobic sources of reducing equivalents. *Water Environment Research*, 2003, **75**: 512–522
- [63] Erdal UG, Erdal ZK, Daigger GT, et al. Is it PAO-GAO competition or metabolic shift in EBPR system? Evidence from an experimental study. *Water Science and Technology*, 2008, **58**: 1329–1334
- [64] Zhou Y, Pijuan M, Zeng RJ, et al. Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)? *Water Research*, 2008, **42**: 2361–2368

- [65] Zeng RJ, Yuan Z, Keller J. Model-based analysis of anaerobic acetate uptake by a mixed culture of polyphosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, **83**: 293–302
- [66] Yagci N, Artan N, Çokgör EU, et al. Metabolic model for acetate uptake by a mixed culture of phosphate- and glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, **84**: 359–373
- [67] Smolders G, Klop J, Van Loosdrecht M, et al. A metabolic model of the biological phosphorus removal process. I. Effect of the sludge retention time. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, **48**: 222–233
- [68] Acevedo B, Oehmen A, Carvalho G, et al. Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage. *Water Research*, 2012, **46**: 1889–1900
- [69] Günther S, Trutnau M, Kleinsteuber S, et al. Dynamics of polyphosphate-accumulating bacteria in wastewater treatment plant microbial communities detected via DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) and tetracycline labeling. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**: 2111–2121
- [70] Majed N, Chernenko T, Diem M, et al. Identification of functionally relevant populations in enhanced biological phosphorus removal processes based on intracellular polymers profiles and insights into the metabolic diversity and heterogeneity. *Environmental Science & Technology*, 2012, **46**: 5010–5017
- [71] Bucci V, Majed N, Hellweger FL, et al. Heterogeneity of intracellular polymer storage states in enhanced biological phosphorus removal (EBPR): Observation and modeling. *Environmental Science & Technology*, 2012, **46**: 3244–3252
- [72] Majed N, Gu AZ. Application of Raman microscopy for simultaneous and quantitative evaluation of multiple intracellular polymers dynamics functionally relevant to enhanced biological phosphorus removal processes. *Environmental Science & Technology*, 2010, **44**: 8601–8608
- [73] Neufeld JD, Wagner M, Murrell JC. Who eats what, where and when? Isotope-labelling experiments are coming of age. *The ISME Journal*, 2007, **1**: 103–110
- [74] Wagner M. Single-cell ecophysiology of microbes as revealed by Raman microspectroscopy or secondary ion mass spectrometry imaging. *Annual Review of Microbiology*, 2009, **63**: 411–429
- [75] Eprintsev A, Klimova M, Falaleeva M, et al. Regulation of carbon flows in the tricarboxylic acid cycle-glyoxylate bypass system in *Rhodopseudomonas palustris* under different growth conditions. *Microbiology*, 2008, **77**: 132–136
- [76] Albertsen M, Hansen LBS, Saunders AM, et al. A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal. *The ISME Journal*, 2011, **6**: 1094–1106
- [77] Wilmes P, Andersson AF, Lefsrud MG, et al. Community proteogenomics highlights microbial strain-variant protein expression within activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *The ISME Journal*, 2008, **2**: 853–864
- [78] Qiao Z-W (乔志伟), Hong J-P (洪坚平), Xie Y-H (谢英荷), et al. Screening, identification and phosphate-solubilizing characteristics of *Rahnella* sp. phosphate-solubilizing bacteria in calcareous soil. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2013, **24**(8): 2294–2300 (in Chinese)
- [79] Liu J (刘瑾), Yang J-J (杨建军), Liang X-Q (梁新强), et al. Applications of synchrotron-based X-ray absorption near-edge structure spectroscopy in identifying solid state phosphorus speciation: A review. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2011, **22**(10): 2757–2764 (in Chinese)

作者简介 孙雪,女,1985年生,博士研究生。主要从事废水生物处理研究。E-mail: natalia_sun@163.com

责任编辑 肖红
