

EBPR 工艺污泥中聚磷菌多样性与除磷潜力评价方法

郑少奎, 罗焯潜

北京师范大学环境学院, 水沙科学教育部重点实验室/水环境模拟国家重点实验室, 北京 100875

摘要: 自 1970 年代研究者发现聚磷菌(polyphosphate accumulating organism, PAO)并提出经典的强化生物除磷(enhanced biological phosphorus removal, EBPR)工艺“厌氧释磷-好氧摄磷”机理以来, 随着 EBPR 系统中 PAO 新菌株的不断发现和生理生化特征研究的不断深入, 研究者们对 EBPR 机理的认识一直在不断更新. 及时总结几十年来 EBPR 机理研究进展、基于活性污泥中 PAO 菌株信息全面归纳 PAO 多样性特征、以此为依据客观评价目前活性污泥中 PAO 除磷潜力评价方法的不足并展望未来重点研究方向, 对于推动 EBPR 工艺优化升级而言将具有非常重要的理论与实际意义. 本文全面调研了 1980—2021 年国际期刊相关文献, 结果发现: 传统 EBPR 机理中厌氧内碳源合成、厌氧释磷意义等受到了较多质疑, 反硝化聚磷新机理已获得广泛认同; 活性污泥中 PAO 具有异常丰富的多样性, 包含 *Acinetobacter*(29%)、*Pseudomonas*(15%)、*Tetrasphaera*(4%)、*Alcaligenes*(4%) 属等 42 个菌属, 部分 PAO 具有反硝化聚磷和异养硝化能力; 在目前主流的活性污泥 PAO 除磷潜力评价方法中, 荧光原位杂交和定量 PCR 技术只以 *Accumulibacter* 或 *Acinetobacter* 属 PAO 为检测对象, 高通量测序和变性梯度凝胶电泳技术基于片面的 PAO 多样性信息作为分析依据, 在此基础上 PAO 丰度所反映的 PAO 除磷潜力的准确性尚存在疑问, 未来需要加强面向活性污泥 PAO 多样性的探针或特异性引物的研发; 与传统方法相比, EDTA 法胞内多聚磷酸盐颗粒含量检测技术较为先进, 但需要以 PAO 和非 PAO 菌株为参照深入阐明检测结果的边界.

关键词: 强化生物除磷; 多聚磷酸盐激酶; 聚磷菌; 反硝化聚磷菌; 除磷潜力

中图分类号: X703.1

文章编号: 1001-6929(2022)00-00-00

文献标志码: A

DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2022.06.04

PAO Phylogenetic Diversity in Activated Sludge and Its Contribution to Phosphorus Removal by EBPR Systems

ZHENG Shaokui, LUO Xiaojie

School of Environment, MOE Key Laboratory of Water and Sediment Sciences/State Key Lab of Water Environment Simulation, Beijing Normal University, Beijing, 100875, China

Abstract: Since the discovery of polyphosphate accumulating organisms (PAOs) and the proposal of a classical mechanism for enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process combining anaerobic phosphorus release with aerobic phosphorus uptake in the 1970s, various PAO strains have been successfully isolated from EBPR systems worldwide. Many studies have investigated their physiological–biochemical characteristics and the development of EBPR mechanism. Now is the time for an overall summary of the recent findings regarding the EBPR mechanism, the PAO phylogenetic diversity in activated sludge, and the accuracy of the methods for evaluating the PAO contribution to phosphorus removal by EBPR systems. Based on a review of about 1000 international papers published from 1980–2021 in the ISI Web of Science (Thomson Reuters), we found the following. First, studies have questioned the anaerobic internal carbon source synthesis and anaerobic phosphorus release characteristics in the classic EBPR mechanism, while the denitrifying phosphorus removal mechanism has been fully developed. Second, PAOs in EBPR systems have marked phylogenetic diversity (42 genera), and include *Acinetobacter* (29%), *Pseudomonas* (15%), *Tetrasphaera* (4%), *Alcaligenes* (4%) and etc. Therefore, all studies of PAOs in EBPR systems should cover their phylogenetic diversity, rather than only *Acinetobacter* and *Accumulibacter* targeted in most previous EBPR studies. Some PAOs are also denitrifying phosphate accumulating bacteria or heterotrophic nitrifying bacteria. Third, methods of detecting PAO abundance, including fluorescence in situ hybridization, quantitative PCR, high throughput sequencing and denaturing gradient gel electrophoresis, failed to cover all PAO

phylogenetic diversity due to the lack of information on PAO phylogenetic diversity in activated sludge, which often makes their results doubtful. Under these conditions, it is necessary to develop universal primers targeting all PAOs and to evaluate their specificity and universality. The EDTA method is more advanced than traditional intracellular polyphosphate detection methods; however, its accuracy needs verification when both PAO and non-PAO strains are tested by this method.

Keywords: enhanced biological phosphorus removal (EBPR); polyphosphate kinase (PPK); polyphosphate accumulating organism (PAO); denitrifying phosphate accumulating organism (DPAO); phosphorus removal potential

收稿日期: 2022-02-26 修订日期: 2022-05-23

作者简介: 郑少奎(1973-), 男, 湖北咸宁人, 教授/博导, 主要从事水和废水处理技术研究, zsk@bnu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.51878050, 22176015)

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.51878050, 22176015)

地表水体富营养化会造成藻华现象、打破水环境生态平衡, 氮和磷浓度过高是藻华现象的诱因, 其中磷是主要限制因子^[1-2]. 污水处理厂是地表水体磷污染控制的关键节点, 在不同除磷技术中, 强化生物除磷(enhanced biological phosphorus removal, EBPR)工艺因为经济性、可持续性等优点在全世界污水处理厂得到了广泛应用^[3-5]. EBPR 工艺特指在厌氧-好氧交替运行条件下活性污泥中某些能够“超量吸磷”的微生物将水相中 PO_4^{3-} 吸收并以胞内多聚磷酸盐颗粒(polyphosphate, Poly-P)形式转移到污泥相中, 最终通过排泥实现污水除磷的工艺目标^[1]. 早在 1975 年, Fuhs 等^[6]注意到不动杆菌属(*Acinetobacter*)细菌占优势的生活污水处理工艺存在超量吸磷现象, 该“超量吸磷”微生物被命名为聚磷菌(polyphosphate accumulating organism, PAO), 在很长时间内 *Acinetobacter* 属被认为是 EBPR 工艺优化研究的目标 PAO^[7]. 1976 年 Barnard 等^[8]首次提出了经典的 PAO“厌氧释磷-好氧摄磷”机理, 并获得了广泛认同. 1999 年 Hesselmann 等将一株原 *Rhodocyclus* 属 PAO 重新命名为“*Candidatus accumulibacter phosphatis*”^[9], 后续调查表明实验室 EBPR 系统中 *Accumulibacter* 属普遍存在超量吸磷现象^[10], 世界上许多国家不同工艺污水处理厂该属均具有较高的丰度(占细菌总数的 4%~22%)^[11-12], 至此 *Accumulibacter* 属取代 *Acinetobacter* 属成为近二十年来 EBPR 工艺优化研究的目标 PAO.

在此期间, 随着越来越多 PAO 新菌株被分离出来和 PAO 生理生化研究的不断深入, 尤其是反硝化聚磷现象的发现, 为充实、完善 EBPR 机理提供了丰富的理论基础. 在非 PAO 菌占优势、非 PAO 菌具有初步除磷能力的活性污泥中, 准确识别、评价所有 PAO(而不仅仅是此前研究聚焦的 *Accumulibacter* 属和 *Acinetobacter* 属 PAO)的除磷潜力是阐明 EBPR 系统运行机理、针对性地开展 EBPR 工艺参数优化升级研究的关键, 而准确评价所有 PAO 除磷潜力的前提是必须阐明活性污泥中 PAO 多样性特征(当前研究主要以分子生态学手段开展除磷潜力评价, 见第 3 节). 本文采用“Phosphorus removal”、“Polyphosphate-accumulating organisms”和“Phosphate-accumulating organisms”作为关键词, 在 Web of Science 数据库内检索了 1980—2021 年来在国际期刊上发表的 >1 000 篇生物除磷相关文献, 据此综述了几十年来 EBPR 机理变迁, 基于 EBPR 系统中分离得到的全部 PAO 菌株信息归纳总结了 PAO 多样性特征(相关中文论文数量较少, 未作为主要数据来源), 以此为依据客观评价了当前活性污泥 PAO 除磷潜力评价方法的不足并展望了未来重点研究方向, 这些研究结果对于推动 EBPR 工艺优化升级而言具有非常重要的理论与实际意义.

1 EBPR 机理变迁

在传统 EBPR 机理中, PAO 在厌氧条件下将胞内多聚磷酸盐颗粒(polyphosphate, Poly-P)分解为 PO_4^{3-} 后释放到水中, 利用糖原以及 Poly-P 分解产生的能量, 吸收挥发性脂肪酸(volatile fatty acid, VFA)(以乙酸

为代表)并以聚- β -羟基烷酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)这种内碳源物质形式储存在细胞内; 在好氧条件下, PAO 以分子氧(O_2)作为电子受体氧化储存的 PHA 获得能量, 用来吸收水中 PO_4^{3-} 并将其转化为胞内 Poly-P, 同时完成生物质生长和糖原合成^[13], 具体生化途径如图 1 所示.

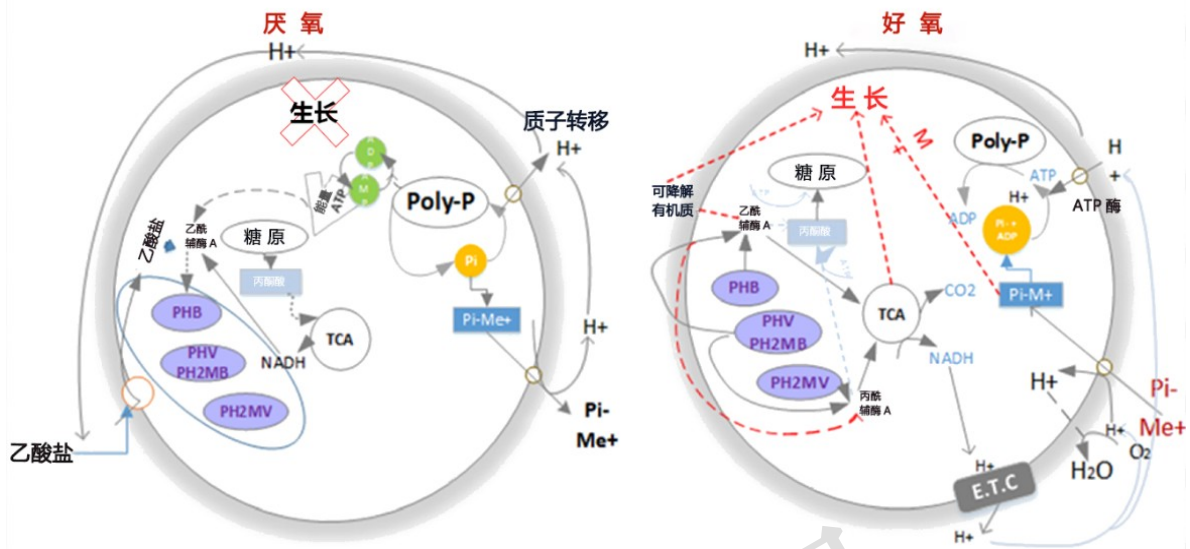


图 1 传统强化生物除磷工艺生化代谢途径^[14]

Fig.1 Biochemical metabolic pathway of traditional EBPR process^[14]

随着 PAO 生理生化研究的不断深入, 传统 EBPR 机理近年来受到了较多质疑. 例如, 作为 EBPR 工艺优化研究的目标 PAO 属, 多个 *Acinetobacter* 属菌株生理生化特征研究表明其在厌氧条件下并没有吸收乙酸合成 PHA, 不符合传统 EBPR 代谢模型^[15]; 1985 年 Ohtake 等^[16]在好氧-厌氧-好氧交替培养试验中发现, *Acinetobacter calcoaceticus* Strain IAM 12087^T在厌氧环境下并没有显著吸收乙酸, 同时厌氧环境并不能激发这种 PAO 在好氧环境下的聚磷能力; Daly 等^[17]发现, 无厌氧预培养时 *Pseudomonas* sp. PHR6 在好氧下培养 48 h 后即出现显著的生物聚磷现象; Yadav 等^[18]将 12 种 PAO 直接投加到好氧连续搅拌釜式反应器后观察到了显著的生物聚磷现象.

反硝化聚磷现象的发现丰富了 EBPR 机理的内涵. 1988 年, Vlekke 等^[19]发现, 单独使用 NO_3^- 作为唯一电子受体同样可以诱导生物聚磷现象的发生(即某些反硝化细菌具备生物聚磷能力). 随后很多研究均证实了该现象的普遍存在: 一些 PAO 除了可以在好氧条件下过量摄磷以外, 还可以在缺氧(DO 浓度小于 0.5 mg/L)状态下利用 NO_3^- 或 NO_2^- 作为电子受体氧化细胞内储存的 PHA, 同时完成过量摄磷, 该过程被称为反硝化聚磷, 相关微生物被称为反硝化聚磷菌(denitrifying phosphate accumulating organism, DPAO)^[20]. 研究者提出的厌氧-缺氧除磷的具体生化途径如图 2 所示, 厌氧段 DPAO 的生化代谢途径与 PAO 相同; 在缺氧段, DPAO 利用 NO_3^-/NO_2^- 代替 O_2 作为电子受体氧化 PHA 获得能量, 完成 PO_4^{3-} 吸收和 Poly-P 合成、细胞生长、合成糖原等反应, 也就是在缺氧段同时实现了反硝化脱氮和聚磷^[21]. 在这个过程中, PHA 不仅为 PO_4^{3-} 吸收和 Poly-P 合成提供能量, 同时还为反硝化反应提供碳源^[22], 实现了一碳两用^[23], 与传统生物脱氮除磷工艺(如 A^2O 工艺)相比, 可节省 50%左右碳源、30%供氧量、同时减少 50%污泥产量^[24].

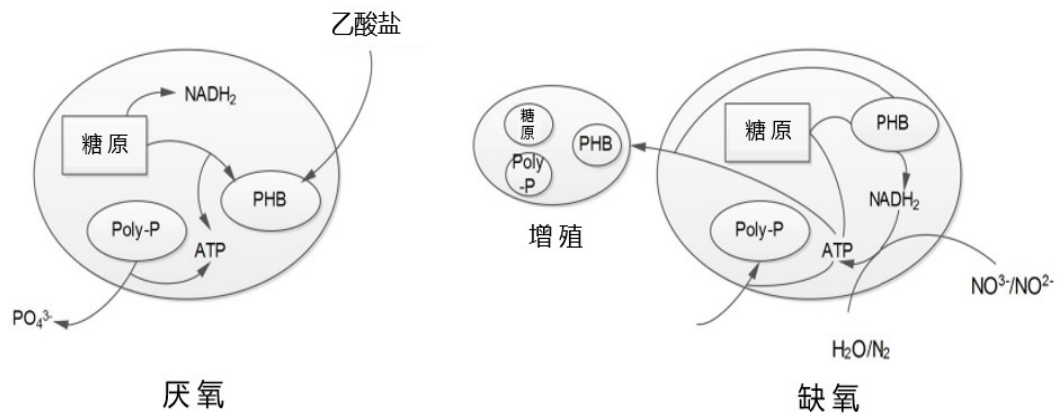


图2 反硝化除磷生化代谢途径^[25]

Fig.2 Biochemical metabolic pathway of denitrifying phosphorus removal process^[25]

2 基于 PAO 分离菌株信息的 EBPR 系统活性污泥 PAO 多样性特征

据统计，目前从不同污水 EBPR 系统活性污泥中共分离出 142 株 PAO 菌株(包括 70 株 DPAO)，其信息整理后如图 3 所示. 由图 3 可见，活性污泥中 PAO 广泛分布于变形菌门、放线菌门、厚壁菌门以及芽单胞菌门，并以变形菌门为主(82%)，系统发育差异极大，具有异常丰富的多样性. 这些 PAO 共分属于 42 个菌属，其中 *Acinetobacter* 属 PAO 占比最高(29%)(也是最早发现的 PAO 属)，其次为 *Pseudomonas*(15%)、*Tetrasphaera*(4%)、*Alcaligenes*(4%)属. 尽管近 20 年来 EBPR 系统优化研究聚焦于 *Accumulibacter* 属，但统计结果中 *Accumulibacter* 属 PAO 较少，这可能与该属 PAO 难以分离培养^[26]有关. 在上述 PAO 属中，*Acinetobacter* 属中还包含了最多(27%)的 DPAO，全部 PAO 菌株中共有 83 株已定种.

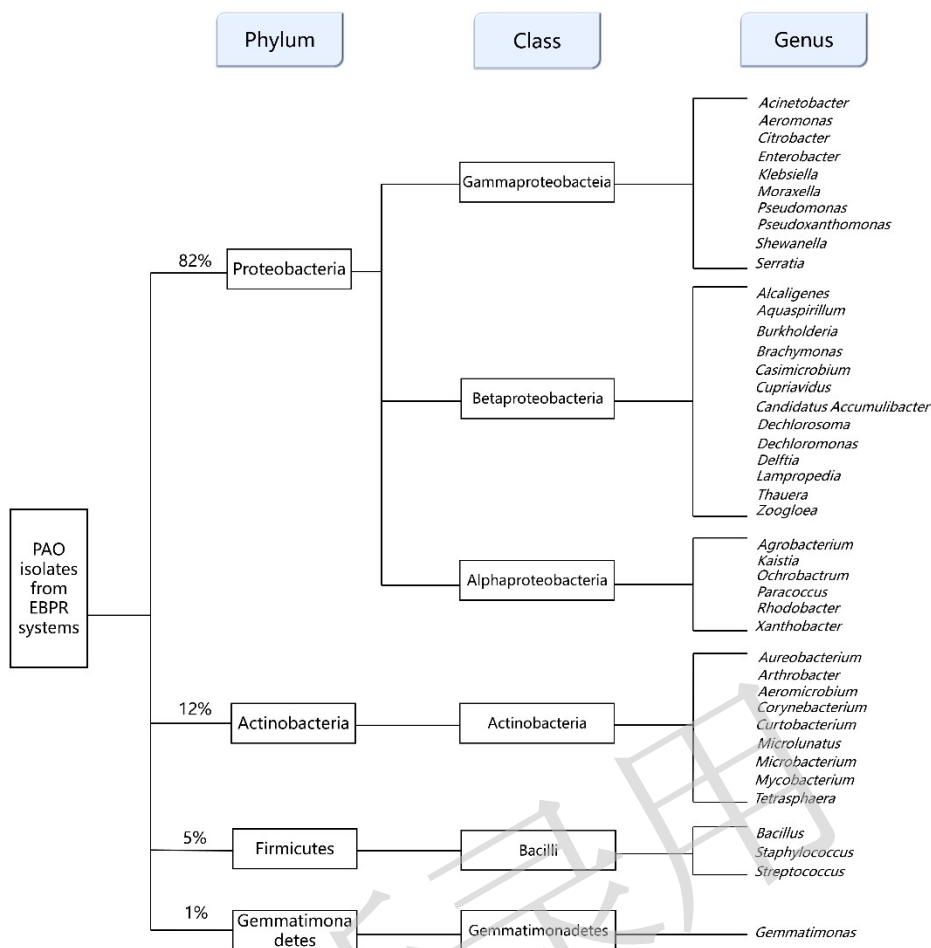


图3 强化生物除磷系统中分离得到的PAO菌株

Fig.3 PAO isolates from EBPR systems

2.1 变形菌门(Proteobacteria)

目前从EBPR工艺活性污泥中分离得到的变形菌门PAO分属于 α 变形菌纲(10%)、 β 变形菌纲(23%)和 γ 变形菌纲(67%)等3个菌纲。其中， α 变形菌纲PAO分属于2个菌目5个菌科*Agrobacterium*、*Paracoccus*、*Rhodobacter*等6个菌属，其中*Paracoccus*属PAO占比最高，达到33%； β 变形菌纲PAO分属于3个菌目8个菌科*Alcaligenes*、*Dechloromonas*、*Delftia*等13个菌属，其中*Alcaligenes*属和*Brachymonas*属PAO占比最多(19%)； γ 变形菌纲PAO分属于5个菌目7个菌科*Acinetobacter*、*Pseudomonas*、*Pseudoxanthomonas*等10个菌属，其中*Acinetobacter*属PAO占比最多(54%)。 α 变形菌纲已定种PAO共5种(该文中亚种或变种归入同一种，下同)，包括(受论文篇幅所限未提供相关引文，根据菌名可检索到相关文献，下同)*Agrobacterium radiobacter*、*Agrobacterium tumefaciens**、*Ochrobactrum anthropi**、*Paracoccus denitrificans**和*Rhodobacter sphaeroides*(*指该株PAO同时也是DPAO，下同)。 β 变形菌纲已定种PAO共8种，包括*Alcaligenes denitrificans*、*Aquaspirillum dispar**、*Burkholderia cepacia**、*Casimicrobium huifangae*、*Dechloromonas aromatica*、*Delftia acidovorans**、*Delftia lacustris**和*Delftia tsuruhatensis**。 γ 变形菌纲已定种PAO共25种，包括*Acinetobacter bouvetii**、*Acinetobacter calcoaceticus*、*Acinetobacter johnsonii*、*Acinetobacter junii**、*Acinetobacter lwoffii*、*Acinetobacter oryzae**、*Acinetobacter tandooii**、*Aeromonas*

*hydrophila**、*Aeromonas media**、*Aeromonas salmonicida**、*Citrobacter portucalensis**、*Enterobacter cloacae**、*Moraxella lacunata*、*Klebsiella oxytoca**、*Pseudomonas aeruginosa**、*Pseudomonas fluorescens**、*Pseudomonas mendocina*、*Pseudomonas pseudoalcaligenes**、*Pseudomonas putida**、*Pseudomonas putrefaciens*、*Pseudomonas simiae**、*Pseudomonas stutzeri**、*Pseudoxanthomonas mexicana**、*Serratia marcescens* 和 *Shewanella putrefaciens**。

2.2 放线菌门(Actinobacteria)

目前从 EBPR 工艺活性污泥中分离得到的放线菌门 PAO 分属于 3 个菌目 7 个菌科 *Tetrasphaera*、*Microlunatus*、*Aureobacterium* 等 9 个菌属，其中 *Tetrasphaera* 属 PAO 占比最多(29%)。已定种 PAO 共 6 种，即 *Aureobacterium saperdae*、*Corynebacterium variabile*、*Microlunatus phosphovorus*、*Tetrasphaera australiensis*、*Tetrasphaera elongata* 和 *Tetrasphaera japonica*。

2.3 厚壁菌门(Firmicutes)

目前从 EBPR 工艺活性污泥中分离得到的厚壁菌门 PAO 分属于 1 个菌纲 2 个菌目 3 个菌科 *Bacillus*、*Staphylococcus* 和 *Streptococcus* 等 3 个菌属，其中 *Bacillus* 属 PAO 占比最多(50%)。已定种 PAO 有 4 种，即 *Bacillus cereus**、*Bacillus subtilis**、*Staphylococcus aureus* 和 *Staphylococcus auricularis*。

2.4 芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)

目前从 EBPR 工艺活性污泥中分离得到的芽单胞菌门 PAO 仅有 1 株，即 *Gemmatimonadetes* 纲 *Gemmatimonadales* 目 *Gemmatimonadaceae* 科 *Gemmatimonas* 属 *Gemmatimonas aurantiaca*。将上述 PAO 菌株信息与生物脱氮系统异养硝化菌株信息^[27]对比，发现许多 PAO 被报道同时具备异养硝化能力，也就是异养硝化聚磷菌，包括 *Acinetobacter junii*、*Acinetobacter johnsonii*、*Acinetobacter calcoaceticus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas stutzeri*、*Pseudomonas fluorescens*、*Alcaligenes denitrificans*、*Klebsiella oxytoca*、*Paracoccus denitrificans*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Aeromonas salmonicida* 和 *Enterobacter cloacae*。

3 EBPR 工艺活性污泥 PAO 除磷潜力评价方法

EBPR 工艺中活性污泥除磷能力主要通过 PAO 超量吸磷作用来实现，而非 PAO 菌因巨大的数量优势其生长过程也能够提供一定的除磷能力，在这种情况下准确识别、评价活性污泥 PAO 除磷潜力将是推动 EBPR 工艺优化升级的关键。调研结果表明，目前绝大多数研究分别根据活性污泥中 PAO 丰度、胞内 Poly-P 含量、PAO 代谢活性的差异来评价活性污泥 PAO 除磷潜力，这三种方式占目前相关研究的比例分别为 76%、13%和 11%。其中，PAO 丰度、胞内 Poly-P 含量是活性污泥 PAO 生物聚磷作用的直接体现，PAO 丰度越高或胞内 Poly-P 含量越高，活性污泥 PAO 除磷潜力就越大，PAO 对 EBPR 工艺除磷效果的贡献就越大。相比之下，活性污泥 PAO 代谢活性(如好氧吸磷速率、厌氧释磷速率^[28-29]、碳源吸收速率、PHA 利用速率^[30]、ATP 或 NADPH 产生量^[6]等)则是活性污泥 PAO 除磷潜力的间接反映。此外，笔者以“metagenome、polyphosphate”与“metabonomics、polyphosphate”作为摘要及关键词在 web of science 数据库内合并检索，共得到 11 篇不同领域文献，表明宏基因组学与代谢组学在 PAO 功能与性能分析中虽有所应用，但研究较少。因此，本文重点综述 EBPR 系统活性污泥 PAO 丰度、胞内 Poly-P 含量检测方法的研究现状。

3.1 PAO 丰度检测方法

调研表明，活性污泥 PAO 丰度检测主要依托荧光原位杂交(*fluorescence in situ hybridization*, FISH)、高通量测序或变性梯度凝胶电泳、定量 PCR 等分子生态学检测手段，相关研究分别占文献总数的 67%、20%和 13%。

准确的 FISH 检测结果取决于特异性探针的全面性和特异性。2000 年 Crocetti 等设计了针对 *Accumulibacter* 16S rRNA 不同靶向序列位点的 PAO462 探针、PAO651 探针和 PAO846 探针^[10]，是采用 FISH 法检测污泥 PAO 丰度时应用最广泛的 3 种特异性探针，更常见的做法是将上述三种探针等量混合制成作 PAO_{MIX} 探针以提高 *Accumulibacter* 丰度检测的准确性^[31-34]，而其他 PAO 探针的研究与使用则较为少见(见表 1)。例如，Li 等^[31]采用 PAO_{MIX} 探针检测了缺氧-好氧 SBR 反应器中 *Accumulibacter* 丰度，视野中大多数细菌被标记上了荧光，据此认为污泥中 *Accumulibacter* 具有较高丰度。然而，鉴于 EBPR 系统活性污泥中 PAO 具有丰富的遗传多样性，当上述探针仅定量 *Accumulibacter* 属而不能覆盖全部 PAO 属时将严重影响探针的全面性，导致检测得到的 PAO 丰度结果存在低估的可能性。

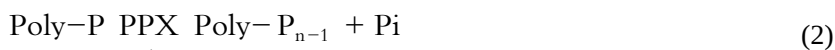
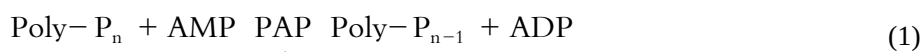
表 1 EBPR 系统活性污泥 PAO 丰度检测常用探针及序列

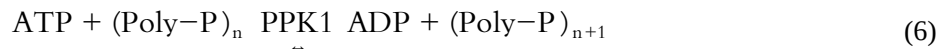
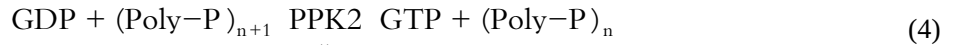
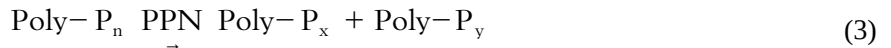
Table 1 Common probes and sequences labeling PAO in EBPR systems

探针	探针序列(5' → 3')	靶向微生物
PAO462	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	<i>Candidatus accumulibacter</i>
PAO651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	<i>Candidatus accumulibacter</i>
PAO846	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	<i>Candidatus accumulibacter</i>
PAO _{MIX}	PAO462、PAO651、PAO846 等量混合物	<i>Candidatus accumulibacter</i>

以高通量测序或变性梯度凝胶电泳技术为手段的活性污泥 PAO 丰度检测方法通常基于 PAO 所在属的丰度来推测活性污泥中 PAO 总丰度。例如，Islam 等^[35]采用高通量测序技术在侧向流缺氧-好氧-厌氧处理系统中发现了 *Candidatus accumulibacter*、*Tetrasphaera*、*Rhodocyclus* 和 *Dechloromonas* 等属，比较这些属的丰度水平后认为 PAO 以 γ 与 β 变形菌纲为主。Dong 等^[36]采用高通量技术在处理城市污水的厌氧-好氧-缺氧 SBR 反应器中检测到 *Candidatus accumulibacter*、*Bacillus* 以及 *Pseudomonas* 等属，根据各属丰度变化情况推测添加三氯苯氧氯酚导致 PAO 丰度下降。然而，这种基于 PAO 所在属的丰度来推测活性污泥中 PAO 总丰度的研究结果存在较大的不确定性。例如，研究表明 *Acinetobacter junii* 是一种 PAO^[37]而同属的 *Acinetobacter seohaensis* 却不能完成超量聚 P 过程^[38]，在这种情况下，以这两株菌所在属的丰度作为该属 PAO 丰度时其结果存在高估的可能性。另外，由该文总结的 EBPR 系统活性污泥 PAO 多样性结果可以看出，几乎所有依托高通量测序或变性梯度凝胶电泳技术结果总结 PAO 总丰度时所参考的 PAO 属类型严重不足，在这种情况下得到的活性污泥 PAO 总丰度结果还存在低估的可能性。

酶是 PAO 生物聚磷反应的物质基础，包括多聚磷酸盐激酶(PPK)、磷酸转移酶(PAP)、外切聚磷酸酶(PPX)和内切聚磷酸酶(PPN)在内的多种酶共同参与并调控了胞内 Poly-P 的合成和分解代谢^[39]，其中 PPK 酶可细分为 PPK1、PPK2、PPK3 和 PPK4 酶(PPK4 存在于真菌中^[40]，该文不作为重点)等 4 种类型^[41]。其中，PAP [以 Poly-P 作供体，将腺嘌呤核糖核苷酸(AMP)转化为二磷酸腺苷(ADP)^[42]，见式(1)]、PPX [释放 Poly-P 链末端的磷酸基团，同时释放出能量^[43]，见式(2)]、PPN [催化长链 Poly-P 逐步裂解生成大量的短链 Poly-P^[44]，见式(3)]、PPK2 [以 Poly-P 作为磷酸基团供体将二磷酸鸟苷(GDP)合成三磷酸鸟苷(GTP)^[45]，见式(4)]、PPK3 [以 Poly-P 作为磷酸基团供体将二磷酸胞苷(CDP)转化为三磷酸胞苷(CTP)^[46]，见式(5)] 均参与 Poly-P 降解反应。只有 PPK1 是胞内 Poly-P 合成的关键酶，它催化三磷酸腺苷(ATP)末端的磷酸基团可逆地转移到长链 Poly-P 上，形成长度更长的正磷酸盐线状或环状多聚物^[47]，如式(6)所示。





式中，ARP(F)为球状肌动蛋白，ARP(G)为丝状肌动蛋白。

表2 活性污泥PAO的ppk1基因常用引物及序列

Table 2 Common amplification primer pairs and sequences targeting ppk1 gene

目的基因	引物	序列(5' ~ 3')	扩增长度/bp
Acc ¹ -ppk1	ACCppk1-254F	TCACCACCGACGGCAAGAC	1 123
	ACCppk1-1376R	ACGA TCA TCAGCATCTTGCC	
Acc-I-ppk1	Acc-ppk1-763f	GACGAAGAAGCGGTCAAG	408
	Acc-ppk1-1170r	AACGGTCATCTTGATGGC	
Acc-IIA-ppk1	Acc-ppk1-893f	AGTTCAATCTCACCGAGAGC	105
	Acc-ppk1-997r	GGAACTTCAGGTCGTTGC	
Acc-IIB-ppk1	Acc-ppk1-870f	GATGACCCAGTTCCTGCTCG	133
	Acc-ppk1-1002r	CGGCACGAACTTCAGATCG	
Acc-IIC-ppk1	Acc-ppk1-254f	TCACCACCGACGGCAAGAC	207
	Acc-ppk1-460r	CCGGCATGACTTCGCGGAAG	
Acc-IID-ppk1	Acc-ppk1-375f	GGGTATCCGTTTCCTCAAGCG	148
	Acc-ppk1-522r	GAGGCTCTTGTTGAGTACACGC	
Most ppk1	NLDE	CGTATGAATTTTCTTGGTATTTATTGTACTAATCTNGAYG	1 300
	TGNY	ARTTYT ²⁾ GTCGAGCAGTTTTTGCATGAWARTTNCNGT ²⁾	

<hr/>			
homologs			
Most	ppk1_FW	AAYYTIGAYGARTTYTTYATGGT ²⁾	
ppk1			1 100
homologs	ppk1_RW	TTIKYITSYTCRTCRAAICKIGC ²⁾	
<hr/>			

注: 1)表示 *Accumulibacter*; 2)表示氨基酸序列.

PPK 酶由 *ppk* 功能基因编码, 根据 PPK 酶分型 *ppk* 基因同样可分为 *ppk1*、*ppk2*、*ppk3* 及 *ppk4* 共 4 种类型, 针对这些功能基因设计特异性、通用性引物是开展定量 PCR 检测 PAO 丰度的基础. 早在 20 世纪 90 年代, 研究者们分别克隆和分析 *Klebsiella* sp.^[48]、*Pseudomonas* sp.^[49]和 *Acinetobacter* sp.^[50]等细菌的 *ppk* 基因. 在 web of science 上分别以 “*ppk1*”、“*ppk2*”、“*ppk3*”以及 “*ppk4*”进行标题、摘要和关键词的合并检索, 笔者检索到的截止 2021 年文章数量分别为 154、92、8 和 4 篇, 表明关注点主要聚焦在 *ppk1* 基因上同时超过 80% 的 *ppk1* 引物应用仅仅针对 *Accumulibacter* 属 *ppk1* 基因, 被用来研究 EBPR 系统 *Accumulibacter* 属的群落结构和种群动态(如 *Accumulibacter* 各进化枝的丰度和类型)^[35,51], 相比而言, 针对所有 PAO 的 *ppk1* 基因的通用性、特异性引物则较为少见(见表 2). 这些针对 *Accumulibacter* 属 *ppk1* 基因的特异性引物将该属细菌划分为 I 型和 II 型, I 型又分为 IA、IB、IC、ID 和 IE 支系, II 型则包括 IIA、IIB、IIC、IID、IIE、95IIF、IIG、IIH 和 II-I, 共 14 个进化枝^[52]. 其中, 引物对 ACC*ppk1*-254F 与 ACC*ppk1*-1376R 由 McMahan 等于 2007 年设计, 它能扩增出 1123 bp 基因片段^[53], 而 He 等^[54]于 2007 年针对 ACC-I、ACC-IIA、ACC-IIB、ACC-IIC 以及 ACC-IID 等进化枝分别设计的引物对成为目前研究与应用最多的引物对. 如 Zeng 等^[51]利用引物对 ACC*ppk1*-254F 和 ACC*ppk1*-1376R 调查了 3 个污水处理厂活性污泥中 “*Candidatus accumulibacter*”的群落结构, 结果显示, *Candidatus accumulibacter* 在 A²O 系统中占全部微生物的 26%, 且冬季丰度显著高于夏季; 进一步采用 *Accumulibacter* 各进化枝引物对调查发现所有系统中 Acc-II 型占据显著优势, 丰度达到 2.59×10^9 cells/g mlss, 占 *Accumulibacter* 总量的 87.3%. 然而, 如前所述, 活性污泥中 PAO 具有丰富的遗传多样性, 在此情况下, 仅仅以 *Accumulibacter* 属为研究对象存在不全面的问题.

与 *Accumulibacter* 属 *ppk1* 基因引物设计与应用现状相比, 针对活性污泥中 PAO 多样性设计的 *ppk1* 基因通用引物的研究工作相对较少, 影响力也不足. 2002 年 McMahan 等基于 12 个 PPK1 酶的氨基酸序列开展了 *ppk1* 基因通用引物的设计, 这对引物被命名为 NLDE 和 TGNY, 它能够扩增长度约为 1 300 bp 的 *ppk1* 片段^[55], 在不同城市污水处理厂的活性污泥样品检测中只获得了少数几种 PAO 基因信息^[56]. 2009 年 Mehlig 等^[56] 根据 NCBI 中 *Ralstonia eutropha* (AAZ65185)、*Neisseria meningitidis* (CAB83848)、*Acinetobacter* sp. (CAA86935)、*Propionibacterium acnes* (YP_055056)、*Nocardia farcinica* (BAD59057)和 *Brucella abortus* (YP_221494)的 PPK1 酶氨基酸序列设计了引物对 *ppk1*——FW 和 *ppk1*——RW, 该引物对可扩增出长度约为 1 100 bp 的基因片段, 相较于 NLDE 和 TGNY 引物对能够检测到更多的 *ppk1* 序列. 由该文调研结果可以看出, 这两种引物设计时并未全面覆盖活性污泥 PAO 多样性, 其特异性和通用性均尚待验证. 然而, 除此之外, 尚未见到其他 *ppk1* 基因通用引物的研究. 因此, 以 EBPR 系统活性污泥 PAO 多样性为依据开展以 *ppk1* 基因的新通用引物设计研究具有十分重要的理论与实际意义.

3.2 胞内 Poly-P 含量检测方法

某些特定的染色剂, 如 4'-二氨基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)^[57]、奈氏试剂(neisser)^[58]、亚甲基蓝(methylene blue)^[59]、盐酸四环素^[60]等, 能够与胞内 Poly-P 发生选择性反应, 从而可以直接观测到染色后的胞内 Poly-P. 由于染色法简便易行, 通常被用于胞内 Poly-P 的定性分析, 其中 DAPI 应用最为广泛, 其结

果可作为定量结果的参考. 其他研究者采用电子能量损失谱与核磁共振技术分析细胞超微结构细节与元素组成信息也观察到了 Poly-P 颗粒^[61], 但应用较少.

调研表明, 以非 PAO 为主的活性污泥中磷含量一般为污泥干重的 1.5%~2%^[62], 而 EBPR 系统中污泥磷含量可以达到污泥干重的 4%~8%, 在某些情况下甚至可以达到 10%~15%^[10]. 污泥磷含量可以一定程度上反映出系统的吸磷能力, 但是并不能直接反映 PAO 对除磷的贡献. 相比之下, 测定胞内 Poly-P 含量能够直接反映 PAO 在 EBPR 系统除磷效果上的贡献. 传统的 Poly-P 含量分析检测手段包括萃取-正-磷分析法^[63]、提取纯化方法^[64]、拉曼光谱^[65]、X 射线^[66]、凝胶电泳^[67]、蛋白质亲和力^[68]以及 Poly-P 消耗法^[69]等. 然而, 这些传统分析方法通常需要复杂的提取和预处理过程, 效率不高; 加之强酸在消化过程中的使用, 使得所有形态的磷都可以转化为正 PO_4^{3-} , 导致 Poly-P 含量被高估. Feng 等^[70]发现, pH 8 时添加 1% EDTA 获得了最高的 PO_4^{3-} 释放量, Poly-P 含量测定具有简单、高效、准确等优点, 是目前较为先进的胞内 Poly-P 定量检测方法, 但该方法以活性污泥作为研究对象, 未区分 PAO 和非 PAO 的相关特征, 其准确性和适用性还有待评价.

4 结论与展望

a) EBPR 新机理. 目前还需要持续开展 PAO 新菌株的生理生化研究, 探讨更多 PAO 菌株的厌氧内碳源合成特征、厌氧释磷意义、反硝化聚磷能力等菌株特征, 为 EBPR 机理提供更充分、更全面的基础数据. 另外, 在解决 PAO 除磷潜力评价方法准确性的基础上, 需要加强以工艺试验为基础的 EBPR 机理的验证研究, 包括反硝化除磷、厌氧释磷的必要性等内容, 并形成相应的操作规程.

b) PAO 通用引物设计与评价. 应基于 EBPR 系统 PAO 丰富的系统发育多样性开展目前 PAO 通用引物的通用性和特异性评价工作, 探讨目前 PAO 通用引物对已发现的 42 个菌属 83 株已定种 PAO 菌株的检测效果以验证其通用性, 并在必要条件开展 PAO 新通用引物的设计和评价, 为准确评价 EBPR 系统中活性污泥 PAO 除磷潜力提供有效的检测手段.

c) 胞内 Poly-P 含量 EDTA 检测方法校准. 应以非 PAO 菌株为对照(不是活性污泥), 采用 EDTA 定量检测方法检测 PAO 菌株在摄磷过程中无 Poly-P 颗粒、有 Poly-P 颗粒但无法染色观察、清楚观察到 Poly-P 颗粒等临界条件下胞内 Poly-P 含量和 TP 含量, 为该检测方法提供可供参考的边界数据.

参考文献

- [1] GEBREMARIAM S Y, BEUTEL M W, CHRISTIAN D, et al. Research advances and challenges in the microbiology of enhanced biological phosphorus removal: a critical review[J]. *Water Environment Research*, 2011, 83(3): 195-219.
- [2] 赵海霞, 宋永会, 钱锋, 等. 污泥中磷和氮的厌氧溶出及其改性赤泥晶种结晶法回收工艺[J]. *环境工程技术学报*, 2012, 2(6): 473-479.
ZHAO H X, SONG Y H, QIAN F, et al. Process of Phosphorus and Nitrogen Dissolution from Sludge by Anaerobic Digestion and Their Recovery by Modified Red Mud Seeded Crystallization[J]. *Journal of Environmental Engineering Technology*, 2012, 2(6): 473-749.
- [3] NIELSEN P H, MCILROY S J, ALBERTSEN M, et al. Re-evaluating the microbiology of the enhanced biological phosphorus removal process[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 57: 111-118.
- [4] 高兴华, 周北海, 徐九华, 等. 模拟光伏曝气 SBR 除磷性能及其聚磷菌群落结构[J]. *环境科学研究*, 2015, 28(12): 1908-1916.
GAO X, ZHOU B H, XU J H, et al. Phosphorous removal performance and polyphosphate-accumulating organism community structure in a simulated PV aeration SBR[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2015, 28(12): 1908-1916.
- [5] 夏雪, 邵明非, 吕小梅, 等. 不同碳源驯化除磷污泥的除磷效果及菌群结构分析[J]. *环境科学研究*, 2014, 27(8): 936-942.
XIA X, SHAO M F, LYU X M, et al. Phosphorus removal performance and bacterial community structure of denitrifying phosphorus removal sludge operated with different carbon sources[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2014, 27(8): 936-

- [6] FUHS G W, CHEN M. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater[J]. *Microbial Ecology*, 1975, 2(2): 119-138.
- [7] BARK K, SPONNER A, KAMPFER P, et al. Differences in polyphosphate accumulation and phosphate adsorption by acinetobacter-isolates from waste-water producing polyphosphate-amp phosphotransferase[J]. *Water Research*, 1992, 26(10): 1379-1388.
- [8] TSAI Y P, TZENG H F, LIN J W, et al. Verification of enzymes deterioration due to Cu(II) presence in an enhanced biological phosphorus removal system[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(5): 602-607.
- [9] HESSELMANN R P X, WERLEN C, HAHN D, et al. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22(3): 454-465.
- [10] CROCETTI G R, HUGENHOLTZ P, BOND P L, et al. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(3): 1175-1182.
- [11] KONG Y H, NIELSEN J L, NIELSEN P H. Microautoradiographic study of Rhodocyclus-related polyphosphate accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5383-5390.
- [12] WONG M T, MINO T, SEVIOUR R J, et al. *In situ* identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan[J]. *Water Research*, 2005, 39(13): 2901-2914.
- [13] OEHMEN A, LEMOS P C, CARVALHO G, et al. Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale[J]. *Water Research*, 2007, 41(11): 2271-2300.
- [14] IZADI P, IZADI P, ELDYASTI A. Design, operation and technology configurations for enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process: A review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, 2020, 19(3): 561-593.
- [15] SEVIOUR R J, MINO T, ONUKI M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(1): 99-127.
- [16] OHTAKE H, TAKAHASHI K, TSUZUKI Y, et al. Uptake and release of phosphate by a pure culture of *Acinetobacter-calcoaceticus*[J]. *Water Research*, 1985, 19(12): 1587-1594.
- [17] DALY I, JELLALI S, MEHRI I, et al. Phosphorus and ammonium removal characteristics from aqueous solutions by a newly isolated plant growth-promoting bacterium[J]. *Environmental Technology*, 2020, 41(20): 2603-2617.
- [18] YADAV D, PRUTHI V, KUMAR P. Enhanced biological phosphorus removal in aerated stirred tank reactor using aerobic bacterial consortium[J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2016, 13: 61-69.
- [19] VLEKKE G, COMEAU Y, OLDHAM W K. Biological phosphate removal from waste-water with oxygen or nitrate in sequencing batch reactors[J]. *Environmental Technology Letters*, 1988, 9(8): 791-796.
- [20] KUBA T, SMOLDERS G, VANLOOSDRECHT M C M, et al. Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor[J]. *Water Science and Technology*, 1993, 27(5-6): 241-252.
- [21] ZENG W, LI B, YANG Y, et al. Impact of nitrite on aerobic phosphorus uptake by poly-phosphate accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal sludges[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014, 37(2): 277-287.
- [22] MARTIN H G, IVANOVA N, KUNIN V, et al. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(10): 1263-1269.
- [23] 邹华, 阮文权, 陈坚. 硝酸盐作为生物除磷电子受体的研究[J]. *环境科学研究*, 2002, (3): 38-41.
ZOU H, RUAN W Q, CHEN J. Study of Using Nitrate as Electron Acceptor in Biological Phosphorus Removal[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2002, (3): 38-41.
- [24] KUBA T, VANLOOSDRECHT M C M, HEIJNEN J J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system[J]. *Water Research*, 1996, 30(7): 1702-1710.
- [25] LI W, SUN H Z, WEI W, et al. Study on denitrifying dephosphatation process, influence factors and mechanism[C]. England: Iop

Publishing Ltd,2017.

- [26] DOROFEEV A G,NIKOLAEV Y A,MARDANOV A V,et al.Role of phosphate-accumulating bacteria in biological phosphorus removal from wastewater[J].Applied Biochemistry and Microbiology,2020,56(1):1-14.
- [27] DUAN S,ZHANG Y,ZHENG S.Heterotrophic nitrifying bacteria in wastewater biological nitrogen removal systems:A review[J].Critical Reviews in Environmental Science and Technology,2021:1-37.
- [28] LIU H,ZHOU X,DING W Q,et al.Do microplastics affect biological wastewater treatment performance? Implications from bacterial activity experiments[J].ACS Sustainable Chemistry & Engineering,2019,7(24):20097-20101.
- [29] WONG P Y,CHENG K Y,KAKSONEN A H,et al.A novel post denitrification configuration for phosphorus recovery using polyphosphate accumulating organisms[J].Water Research,2013,47(17):6488-6495.
- [30] SUN Y,PENG Y,ZHANG J,et al.Effect of endogenous metabolisms on survival and activities of denitrifying phosphorus removal sludge under various starvation conditions[J].Bioresource Technology,2020,315:123839.
- [31] LI C,LIU S,MA T,et al.Simultaneous nitrification,denitrification and phosphorus removal in a sequencing batch reactor (SBR) under low temperature[J].Chemosphere,2019,229:132-141.
- [32] SEMERCI N,HASLC N B.Fate of carbon,nitrogen and phosphorus removal in a post-anoxic system treating low strength wastewater[J].International Biodeterioration & Biodegradation,2016,108:166-174.
- [33] ACEVEDO B,CAMINA C,CORONA J E,et al.The metabolic versatility of PAOs as an opportunity to obtain a highly P-enriched stream for further P-recovery[J].Chemical Engineering Journal,2015,270:459-467.
- [34] KALLISTOVA A Y,PIMENOV N V,KOZLOV M N,et al.Microbial composition of the activated sludge of Moscow wastewater treatment plants[J].Microbiology,2014,83(5):699-708.
- [35] ISLAM M S,ZHANG Y Y,DONG S M,et al.Dynamics of microbial community structure and nutrient removal from an innovative side-stream enhanced biological phosphorus removal process[J].Journal of Environmental Management,2017,198:300-307.
- [36] DONG X Q,HE Y Z,PENG X X,et al.Triclosan in contact with activated sludge and its impact on phosphate removal and microbial community[J].Bioresource Technology,2021,319:124134.
- [37] BENAMMAR L,MENASRIA T,AYACHI A,et al.Phosphate removal using aerobic bacterial consortium and pure cultures isolated from activated sludge[J].Process Safety and Environmental Protection,2015,95:237-246.
- [38] ZHAO Y,HUANG J,ZHAO H,et al.Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates[J].Bioresource Technology,2013,143:439-446.
- [39] BROWN M R W,KORNBERG A.The long and short of it-polyphosphate,PPK and bacterial survival[J].Trends in Biochemical Sciences,2008,33(6):284-290.
- [40] HOTHORN M,NEUMANN H,LENHERR E D,et al.Catalytic core of a membrane-associated eukaryotic polyphosphate polymerase[J].Science,2009,324(5926):513-516.
- [41] ACHBERGEROVA L,NAHALKA J.Polyphosphate-an ancient energy source and active metabolic regulator[J].Microbial Cell Factories,2011,10:63.
- [42] KORNBERG A.Inorganic polyphosphate toward making a forgotten polymer unforgettable[J].Journal of Bacteriology,1995,177(3):491-496.
- [43] ALBI T,SERRANO A.Two exopolyphosphatases with distinct molecular architectures and substrate specificities from the thermophilic green-sulfur bacterium Chlorobium tepidum TLS[J].Microbiology-SGM,2014,160:2067-2078.
- [44] 魏峥,聂琰晖,刘乐庭,等.多聚磷酸盐在原核和真核生物中的研究进展[J].生理科学进展,2009,40:197-202.
WEI Z,NIE Y H,LIU L T,et al.Progress in functional polyphosphate in prokaryotic and eukaryotic living organisms[J].Progress in Physiological Sciences,2009,40:197-202.
- [45] ZHANG H Y,ISHIGE K,KORNBERG A.A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2002,99(26):16678-16683.
- [46] NAHALKA J,PATOPRSTY V.Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK3) [J].Organic & Biomolecular Chemistry,2009,7(9):1778-1780.

- [47] SHI T, GE Y, ZHAO N, et al. Polyphosphate kinase of *Lysinibacillus sphaericus* and its effects on accumulation of polyphosphate and bacterial growth[J]. *Microbiological Research*, 2015, 172:41-47.
- [48] KATO J, YAMAMOTO T, YAMADA K, et al. Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (ppk) of *Klebsiella-aerogenes*[J]. *Gene*, 1993, 137(2):237-242.
- [49] ZAGO A, CHUGANI S, CHAKRABARTY A M. Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5):2065-2071.
- [50] GEISSDORFER W, RATAJCZAK G, HILLEN W. Transcription of ppk from *Acinetobacter* sp. strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(3):896-901.
- [51] ZENG W, ZHANG L, FAN P, et al. Community structures and population dynamics of "Candidatus Accumulibacter" in activated sludges of wastewater treatment plants using ppk1 as phylogenetic marker[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 67:237-248.
- [52] MAO Y, GRAHAM D W, TAMAKI H, et al. Dominant and novel clades of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* in 18 globally distributed full-scale wastewater treatment plants[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:11857.
- [53] MCMAHON K D, YILMAZ S, HE S, et al. Polyphosphate kinase genes from full-scale activated sludge plants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(1):167-173.
- [54] HE S, GALL D L, MCMAHON K D. "Candidatus Accumulibacter" population structure in enhanced biological phosphorus removal Sludges as revealed by polyphosphate kinase genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(18):5865-5874.
- [55] MCMAHON K D, DOJKA M A, PACE N R, et al. Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10):4971-4978.
- [56] MEHLIG L, LUDWIG F, ESCHENHAGEN M, et al. Development of new primer systems for the detection of the polyphosphate kinase gene in activated sludge[C]. Singapore: World Scientific Publ Co, Pte Ltd, 2009.
- [57] GU A Z, SAUNDERS A, NEETHLING J B, et al. Functionally relevant microorganisms to enhanced biological phosphorus removal performance at full-scale wastewater treatment plants in the United States[J]. *Water Environment Research*, 2008, 80(8):688-698.
- [58] HRENOVIC J, IVANKOVIC T, TIBLJAS D. The effect of mineral carrier composition on phosphate-accumulating bacteria immobilization[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 166(2-3):1377-1382.
- [59] MONTOYA T, BORRAS L, AGUADO D, et al. Detection and prevention of enhanced biological phosphorus removal deterioration caused by Zoogloea over abundance[J]. *Environmental Technology*, 2008, 29(1):35-42.
- [60] XU S N, BERNARDS M, HU Z Q. Evaluation of anaerobic/anoxic/oxic (A²/O) and reverse A²/O processes in biological nutrient removal[J]. *Water Environment Research*, 2014, 86(11):2186-2193.
- [61] GOLECKI J R, HEINRICH U R. Ultrastructural and electron spectroscopic analyses of cyanobacteria and bacteria[J]. *Journal of Microscopy-Oxford*, 1991, 162:147-154.
- [62] BLACKALL L L, CROCKETTI G, SAUNDERS A M, et al. A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2002, 81(1-4):681-691.
- [63] ARAVIND J, SARANYA T, KANMANI P. Optimizing the production of polyphosphate from *Acinetobacter townieri*[J]. *Global Journal of Environmental Science and Management-Gjesm*, 2015, 1(1):63-70.
- [64] BRU S, JIMENEZ J, CANADELL D, et al. Improvement of biochemical methods of polyP quantification[J]. *Microbial Cell*, 2017, 4(1):6-15.
- [65] MAJED N, MATTHAUS C, DIEM M, et al. Evaluation of intracellular polyphosphate dynamics in enhanced biological phosphorus removal process using Raman Microscopy[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(14):5436-5442.
- [66] HUPFER M, GLOSS S, SCHMIEDER P, et al. Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments[J]. *International Review of Hydrobiology*, 2008, 93(1):1-30.
- [67] CLARK J E, WOOD H G. Preparation of standards and determination of sizes of long-chain polyphosphates by gel-

electrophoresis[J].Analytical Biochemistry,1987,161(2):280-290.

- [68] SAITO K,OHTOMO R,KUGA-UETAKE Y,et al.Direct labeling of polyphosphate at the ultrastructural level in *Saccharomyces cerevisiae* by using the affinity of the polyphosphate binding domain of *Escherichia coli* exopolyphosphatase[J].Applied and Environmental Microbiology,2005,71(10):5692-5701.
- [69] ACEVEDO B,OEHMEN A,CARVALHO G,et al.Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage[J].Water Research,2012,46(6):1889-1900.
- [70] FENG C J,WELLES L,ZHANG X D,et al.Stress-induced assays for polyphosphate quantification by uncoupling acetic acid uptake and anaerobic phosphorus release[J].Water Research,2020,169:115228.

最新录用