



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202009049

中图分类号 X703

文献标识码 A

杨艳平, 赵辰, 张纯纯, 等. 聚糖菌快速富集方法的建立及群落特性分析[J]. 环境工程学报, 2021, 15(5): 1792-1802.

YANG Yanping, ZHAO Chen, ZHANG Chunchun, et al. Rapid enrichment of glycogen accumulating organisms and analysis of community characteristics[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(5): 1792-1802.

聚糖菌快速富集方法的建立及群落特性分析

杨艳平^{1,2}, 赵辰², 张纯纯^{1,2}, 王尚², 张朝晖¹, 高超², 曹卓松², 王景峰^{2,*}

1. 天津工业大学环境科学与工程学院, 天津 300387

2. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050

第一作者: 杨艳平 (1995—), 女, 硕士研究生。研究方向: 环境工程微生物。E-mail: y18822036007@126.com

*通信作者: 王景峰 (1974—), 男, 博士, 研究员。研究方向: 污水生物处理理论与技术。E-mail: wangjingfeng0116@163.com

摘要 为研究聚糖菌 (GAOs) 模型的群落结构及糖原相关功能基因的表达变化, 通过厌氧末排水及磷限制条件的双重策略, 建立快速、稳定的聚糖菌模型。应用宏基因组学技术测定了 GAOs 体系菌群结构的动态变化, 并分析在驯化过程中糖原代谢通路关键功能基因的调节作用。结果表明, 经过 40 d 左右的驯化, 反应器呈现出典型的 GAOs 代谢模式, 厌氧利用糖原吸收乙酸合成 PHA, 好氧消耗 PHA 补充糖原。稳定期的厌氧期糖原降解/VFA 吸收、PHA 合成/VFA 吸收的值分别为 1.036、2.468, 与 GAOs 的化学计量学模型接近。宏基因组学结果显示, 反应器中包含 *Candidatus Contendobacter*、*Candidatus Competibacter* 和 *Candidatus Propionivibrio aalborgensis* 3 类 GAOs, 分别占细菌总数的 7.13%、1.86% 和 0.20%, 稳定期 GAOs 丰度增长为接种污泥的 10.4 倍左右。驯化过程对反应器内的糖原合成酶 (glgA) 和 1, 4- α -葡聚糖分支酶 (GBE1, glgB) 等糖原代谢相关基因丰度有明显影响, 且系统中同时存在糖酵解途径 (glycolytic pathway) 和 ED 途径 (Entner-Doudoroff pathway)。以上结果从微观结构揭示了 GAOs 的富集过程菌群结构及糖原相关功能基因的作用, 可为完善 GAOs 的代谢机理提供参考。

关键词 聚糖菌 (GAOs); 厌氧末排水; 糖原代谢; 宏基因组学

聚糖菌 (glycogen accumulating organisms, GAOs) 是强化生物除磷 (enhanced biological phosphorus removal, EBPR) 系统中一类重要的功能微生物, 基于它们的好氧阶段合成糖原的特征, MINO 等^[1] 将其命名为 GAOs。聚磷菌 (polyphosphate accumulating organisms, PAOs) 是 EBPR 系统参与除磷的主要功能微生物。很多报道指出, GAOs 在低磷等特定条件下会在 EBPR 系统中大量增殖, 造成除磷效果的恶化^[2-3]。有研究表明, GAOs 与 PAOs 竞争进水有机质, 但不参与磷酸盐的去除, 从而造成 EBPR 系统性能的恶化^[4-5]。GAOs 对于实际 EBPR 系统的影响尚处于模糊阶段, 而在正常运行的 EBPR 污水厂中可同时监测到 GAOs 和 PAOs, 因此, 有研究者认为适量的 GAO 可能是有效进行 EBPR 的好迹象。寻求 GAOs 快速富集的手段不仅可以完善聚糖菌功能基因及代谢机理的研究, 同时可为 GAOs 的开发利用提供依据。

GAOs 对于碳源利用的特殊性为高 C/P 有机废水的处理提供了新的思路和理论支撑。近年来, 由于 GAOs 在有机废水中可以较高效率生产聚 β -羟基烷酸酯 (poly- β -hydroxyalkanoates, PHAs)^[6-7],

收稿日期: 2020-09-07; 录用日期: 2021-01-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (51678565); 后勤科研重大项目 (AWS18J004); 天津市自然科学基金资助项目 (19JCYBJC23800)

并在反硝化过程中发挥重要作用，故受到了广泛关注^[8]。因此，稳定聚糖菌模型的建立方法是后续 GAOs 研究的必要条件。目前，富集 GAOs 的方法主要有使用低 P/C 配水及梯度降低进水磷酸盐的浓度^[9]。这 2 种构建 GAOs 体系的方式也存在一定弊端：一是驯化时间相对较长；二是有可能 GAOs 的富集比例达不到预期，影响后续实验内容^[10]。因此，建立一种快速高效富集 GAOs 的方式对于 GAOs 功能特性的研究十分重要。由于微生物群落结构的组成对于活性污泥体系处理废水具有重要意义，更丰富的群落结构可增强系统抗冲击负荷能力，确保出水的水质指标达标，特定菌群的存在也可能与系统功能菌群存在相互作用，同样也会影响活性污泥的处理效果，所以 GAOs 富集过程的群落组成进行分析是必要的。

本研究通过厌氧末排水及限制进水磷酸盐浓度的策略，在序批式反应器 (sequencing batch reactor, SBR) 中快速高效地富集了 GAOs，通过宏基因组方法，分析了驯化过程中的群落演替特征、糖原代谢相关基因丰度变化，并进一步验证了该策略的可行性和有效性。

1 材料及方法

1.1 实验装置与运行方式

采用厌氧-好氧交替运行的 SBR 工艺，反应器有效容积为 11 L，径高比为 1/4，体积交换率约为 68%。采用进水-厌氧搅拌-沉降排水-好氧曝气-闲置的特殊运行方式，以 6 h 为一个完整周期，每天运行 4 个周期。每个周期包含厌氧搅拌 1.5 h，好氧曝气 4 h，沉降时间随着运行实际状况从 40 min 逐渐调整至 15 min。由可编程控制器 PLC 控制全周期的运行，采用潜水泵控制进水，电动搅拌器控制搅拌速率，好氧时微孔曝气头输送空气。

1.2 接种污泥及进水水质

接种污泥来自天津市津沽污水处理厂二沉池，为回流污泥。接种时呈黑色细砂状，过筛 (筛孔 0.25 mm) 后接种至上述反应器。由人工配水模拟实际废水，水中各种成分的质量浓度如下：反应器进水以乙酸钠为唯一进水碳源，维持在 400~440 mg·L⁻¹；以氯化铵为氮源，N-NH₄Cl 控制在 40 mg·L⁻¹；以磷酸二氢钾为磷源，P-KH₂PO₄ 控制在 5 mg·L⁻¹ 左右；其他营养盐有 MgSO₄·7H₂O 50 mg·L⁻¹、KCl 20 mg·L⁻¹、CaCl₂ 20 mg·L⁻¹、FeSO₄·7H₂O 0.1 mg·L⁻¹、CuSO₄·5H₂O 0.1 mg·L⁻¹、MnSO₄ 0.1 mg·L⁻¹。

1.3 取样频率及分析方法

根据实际运行状况，选取了第 4、16、20、39、43 天共 5 个时间点进行完整单周期指标的测定。测定了厌氧运行过程中第 0、5、15、30、60、90 分钟及好氧运行过程中第 60、120、180、240 分钟的水样指标及胞内储存物指标。

乙酸钠采用高效液相色谱法^[11]测定，正磷酸盐采用钼酸铵分光光度法测定，污泥浓度 (MLSS) 采用称量法^[12]测定，污泥沉降比 SV₃₀ 采用国标法测定，PHA 采用气相色谱法^[13]测定，胞内糖原的测定通过先去除 EPS 再用热碱裂解和乙醇提取，最后用硫酸-蒽酮法^[14]测定。

扫描电镜样品预处理：取 0.5 mL 厌氧末污泥混合液于离心管中，1 500 r·min⁻¹，4 ℃ 离心 30 min，弃上清，加入 5~10 倍体积的 2.5% 戊二醛固定 24 h 左右，4 ℃ 条件下储存并避光。用磷酸缓冲液洗 3 次，弃上清；乙醇溶液梯度脱水，分别用 30%、50%、70%、80%、90%、95% 的乙醇依次脱水 10~15 min，最后用无水乙醇脱水 2 次，每次 10~15 min，弃上清，转移到 1.5 mL 离心管中，放置到真空冷冻干燥机干燥 12 h 以上。

1.4 高通量测序及数据分析

测序样本选择每个取样周期的厌氧 90 min，每次取样量 5 mL，连续 3 个周期取样，记为 3 个平行的生物学重复样本，作为 GAOs 体系物种丰度鉴定的样本。测序的污泥样本放入超低温冰箱

(-80 ℃) 暂存。测序工作委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

测序流程可以概括为样本 DNA 提取和检测、文库构建和检测、测序和质控、信息学分析。经检测合格的文库采用 Illumina PE150 完成测序工作。测序获得的原始数据 (raw data) 去除接头信息, 低质量碱基和未测出的碱基等干扰数据, 获取用于后续分析的有效数据 (clean data)。使用 MEGAHIT 组装软件进行组装分析 (assembly analysis), 完成后进行基因丰度分析、物种注释等信息学分析。通过 DIAMOND 软件将 genes 与各功能数据库中的细菌、真菌、古菌和病毒序列进行比对。比对结果经过过滤后获得该序列的物种信息。采用 MetaGeneMark 对各样本的 Scaffigs (≥ 500 bp) 进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 预测, 去除冗余结果后进行功能基因聚类分析。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 17.0 软件进行数据处理, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义的差异。利用方差分析对实验中的标准曲线进行统计学推断, 确定其准确性。单个周期的功能基因分析采用时间为单一影响因子的单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 SBR 快速启动及运行特性

自污泥接种后, 通过 43 d 左右的驯化, 反应器的乙酸盐、正磷酸盐、胞内糖原、PHA 等指标单周期变化稳定, 表现为典型的 GAOs 代谢特征。反应器驯化初期和基本稳定时的单周期运行情况如图 1 所示。驯化初期活性污泥浓度 (MLSS) 约为 $3\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, SV_{30} 为 $(31\pm 2)\%$, SVI 为 $(110\pm 3)\ \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$, COD 去除率低, 相比于糖原代谢, 磷酸盐代谢更加明显。运行第 4 天, 厌氧期磷酸盐释放量仅为 $1.658\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (见图 1(a))。由此可见, 接种污泥中存在部分 PAOs, 但接种污泥中 PAOs 的比例较低或者其活性受到了进水中低浓度磷酸盐的限制; 厌氧结束后, 大部分正磷酸盐随出水排出, 微生物可利用的磷酸盐迅速降低。故在好氧 1 h 后, 反应器中的磷酸盐就已经被基本消耗完。反应器厌氧释放磷好氧吸磷的特性符合 PAOs 的典型特征。厌氧前 5 min 对乙酸的消耗最快, 15 min 后趋于稳定, 厌氧期乙酸盐的去除率仅为 42%。厌氧期磷酸盐的迅速释放和乙酸的迅速吸收并不同步, 主要可能有两方面原因: 一是接种污泥中 PAOs 并不占优势, 乙酸的吸收主要由其他菌种完成; 二是上一周期末反应器内残留的硝态氮可能在厌氧初期发生了反硝化作用, 反应器中的反硝化细菌在缺氧条件下利用乙酸盐作为电子供体, 硝酸盐氮为电子受体, 生成了氮气, 造成了乙酸的迅速消耗。而对于胞内糖原来说变化并不显著, 未表现出 GAOs 所具有的典型厌氧消耗糖原、好氧糖原合成的特征。由此可见, GAOs 或者说聚糖代谢的模式在驯化初期并不占主导。乙酸为有机质时, PHB 和 PHV 为主要 PHA 产物^[15]。本研究中 PH_2MV 的含量极低, 故以 PHB 和 PHV 之和为 PHA 进行讨论, 驯化初期 PHB 基本维持在 $0.06\sim 0.07\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

稳定期时, 污泥浓度为约 $4\ 700\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 厌氧乙酸盐去除率可达 100% (见图 1(b)~(c))。该稳态期厌氧末乙酸盐的吸收速率有明显提升, 可达到 $2.45\ \text{mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{min})^{-1}$ 。反应器整体的胞内糖原含量在驯化约 43 d 后有了较大程度的增加, 从 $0.06\sim 0.07\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到 $0.8\sim 0.13\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 糖原表现为厌氧消耗好氧合成, 为典型的 GAOs 代谢特征。PHA 的变化也验证了 GAOs 代谢的特征, 厌氧乙酸吸收的同时 PHB 迅速增多, 厌氧前 30 min 的 PHB 合成速率是 PHV 合成速率的 5 倍左右, 且厌氧末 PHB 占 PHA 的 80.68%。这种对于 PHB 的偏好性与乙酸为单碳源有直接关系^[16]。厌氧期磷酸盐的释放量 (以 P 计) 仅为 $0.399\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 由此可见, 以聚磷分解供能的代谢途径已受到明显抑制。对稳定期单周期厌氧的胞内储存物与液相中有机物的转换进行计算, 并与典型的 PAOs、GAOs 等模型进行对比后的结果如表 1 所示。考虑到进水初期水质的不均匀性等原因, 故该指标的计算以 5 min 为起点; 在厌氧 60 min 后可检测到部分乙酸盐, 但 90 min 时已无法测到, 故以厌氧 60 min

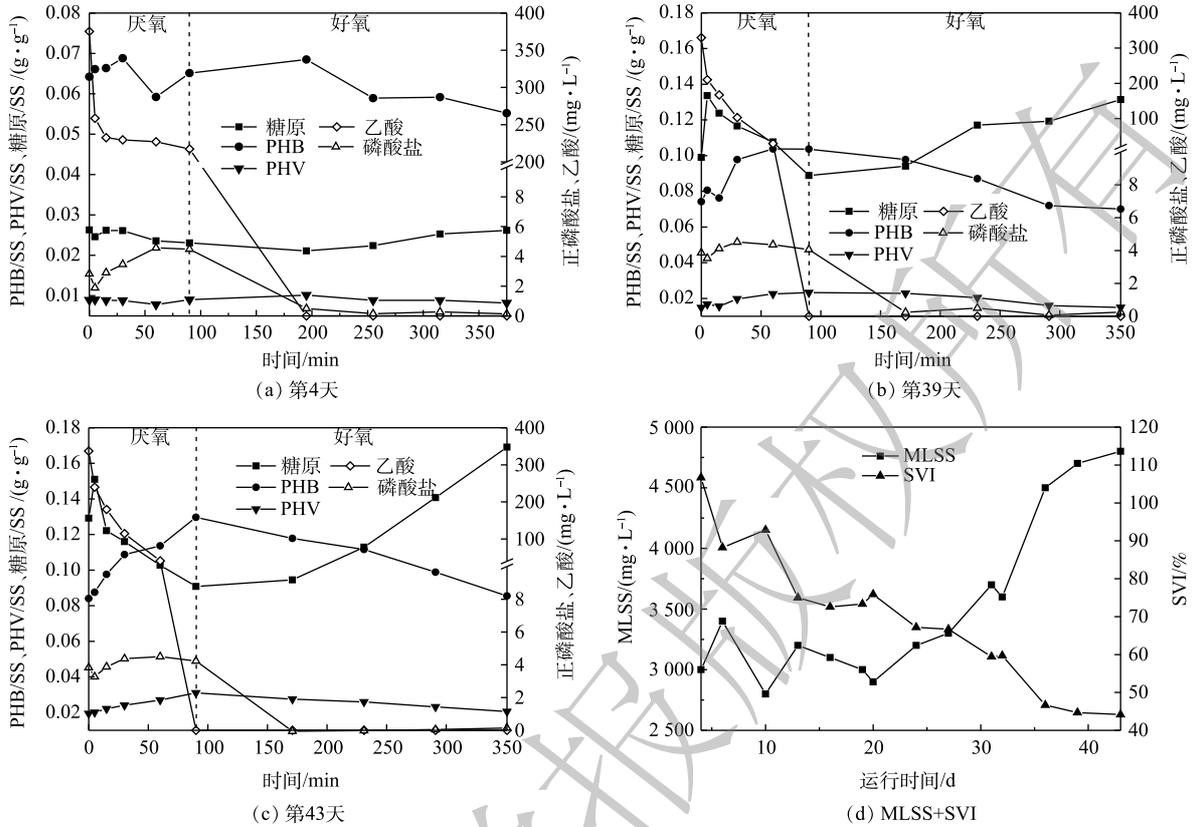


图 1 反应器驯化中正磷酸盐、乙酸钠、胞内糖原和 PHA 的单周期变化图及驯化期间 MLSS 和 SVI 变化
 Fig. 1 Single-cycle changes of orthophosphate, sodium acetate, intracellular glycogen and PHA during acclimation and changes of MLSS and SVI during acclimation

为计算终点。这样可保证在这 55 min 里 GAOs 的胞内合成和胞外有机物吸收是同时进行的，从而便于准确反映 GAOs 的代谢特征。与已报道的 GAOs、PAOs 及 PAO-GAM 模型进行对比，本研究中厌氧磷酸盐释放/VFA 吸收、糖原降解/VFA 吸收、PHA(包含 PHB 和 PHV)合成/VFA 吸收的结果更符合 GAOs 模型或者是糖原积累代谢 (glycogen accumulating metabolism, GAM) 的代谢模式。

2.2 聚糖菌体系群落结构分析

为进一步验证 GAOs 在体系中的富集，通过宏基因组方法分析了驯化过程中微生物群落结构的变化。在门水平上 (见图 2)，GAOs 和 PAOs 所在的变形菌门 (*Proteobacteria*) 一直保持丰度最高 (大于 50%)，其次分别是拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、硝化螺旋菌门 (*Nitrospirae*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、*Candidatus Saccharibacteria*、疣微菌门 (*Verrucomicrobia*)、*Candidatus Peregrinibacteria*、浮霉菌门 (*Planctomycetes*) 等。在驯化过程中变形菌门丰度相对稳定，维持在 50.44%~56.36%。

表 1 本研究中的厌氧生化转化指标与 PAOs 和 GAOs 模型的比较

Table 1 Comparison of the anaerobic biochemical transformations indicators from this paper with the metabolic models for acetate uptake by PAOs and GAOs

模型类型	P/VFA	Gly/VFA	PHB/VFA	PHV/VFA	PHA/VFA
PAO模型 ^[17]	0.50	0.50	1.33	0.00	1.33
GAO模型 ^[18]	0.00	1.12	1.36	0.46	1.85
PAO-GAM ^[19]	0.08	1.08	1.74	0.28	2.02
本研究(43 d)	0.003	1.036	1.950	0.518	2.468

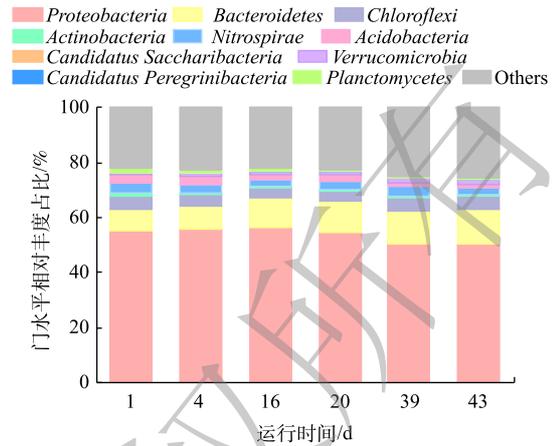
注：P/VFA 为厌氧磷酸盐释放(以 P 计)与厌氧 VFA 吸收(以 C 计)的摩尔比；Gly/VFA 为厌氧糖原消耗(以 C 计)与厌氧 VFA 吸收(以 C 计)的摩尔比；PHB/VFA 为厌氧 PHB 合成(以 C 计)与厌氧 VFA 吸收(以 C 计)的摩尔比；PHV/VFA 为厌氧 PHV 合成(以 C 计)与厌氧 VFA 吸收(以 C 计)的摩尔比；PHA/VFA 为厌氧 PHA 合成(以 C 计)与厌氧 VFA 吸收(以 C 计)的摩尔比。

变形菌门是细菌中最为广泛的门，又分成5个纲。其中，PAOs和GAOs主要存在于 α 、 β 、 γ 这3个分支中。该分类下也包含了大量与固氮相关的菌，与生态系统中多种元素的循环密不可分。

拟杆菌门主要包含3大类细菌，广泛存在于人和动物肠道、海洋等自然环境中，多数情况下对人体无害。在本实验活性污泥中亦检测到较高比例的这类细菌，其相对丰度逐渐提高，增加了57.53%。绿弯菌门和硝化螺旋菌门的丰度分别增加了7.51%和29.27%。硝化螺旋菌门的明显增加可能跟铵盐作为进水氮源有关。在门水平上说，在整个驯化期间物种丰富度及占比没有显著变化。

在属水平上对驯化中的微生物群落组成进行了分析(见图3)。Thauera(陶厄氏菌属)在接种初期占主导地位，其次包含Candidatus Contendobacter(Ca. Contendobacter)、Nitrospira(硝化螺旋菌属)、Dechloromonas(脱氯单胞菌属)、Candidatus Accumulibacter(Ca. Accumulibacter)、Zoogloea、Candidatus Competibacter(Ca. Competibacter)等菌属。其中，Nitrospira是主要的硝化功能菌属，Ca. Accumulibacter是主要的聚磷菌。由此可见，SBR系统中微生物的生物多样性丰富，为污水生物处理奠定了良好基础。

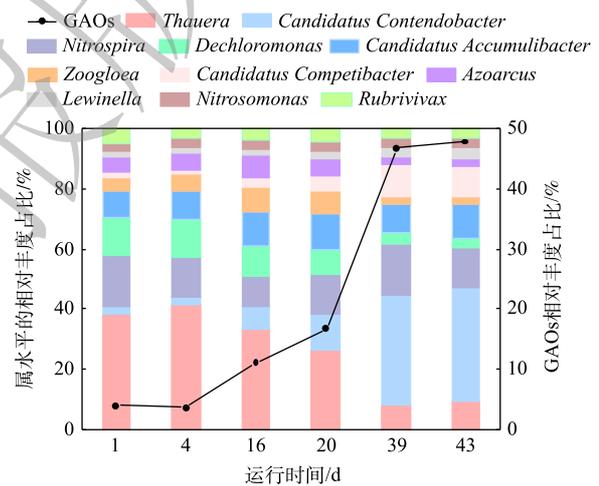
随着驯化的进行，反应器中相对丰度最高的属由陶厄氏菌属(Thauera)转变为Ca. Contendobacter。Ca. Competibacter的相对丰度也有明显提高。目前，已有报道的GAOs可以分为3类：第1类组成了Competibacteraceae科的大部分；第2类是一类发育地位与Dechloromonas相近的细菌(简称Dechloromonas);第3类是“Candidatus Propionivibrio aalborgensis”(Ca. P. aalborgensis)。从系统发育角度看，Ca. Contendobacter、Ca. Competibacter都属于Competibacteraceae科。Ca. Contendobacter是MCILROY等^[20]近年来在实验室规模的反应器中，利用宏基因组技术发现的一类新GAO。系统发育表明其归属于Competibacter-lineage的亚群5。Ca. Competibacter是研究最多，也是最常见的一类GAO，为反硝化聚糖菌研究中的主要对象。GAOs与PAOs间关系的研究也大多是在该菌主导的体系中进行^[21-22]。此外，实验中监测到了微量Ca. P. aalborgensis，该菌占丙酸弧菌属(Propionivibrio)的90%左右，在驯化期间占比从总菌种的0.1%增加到了0.2%。它是近年来EBPR系统中新发现的GAO，与Ca. Accumulibacter有密切的亲缘关系，属于 β 变形菌纲。组学数据表明它们具备GAOs特有的糖原及PHA代谢的功能基因^[23]，已被广泛用于GAOs的判别中^[24-28]。运行43d后，Ca. Contendobacter和Ca. Competibacter在系统中的



注:以3个平行样本的平均值作为作图数据来源。

图2 驯化期间门水平相对丰度分布变化

Fig. 2 Variation of relative abundance distribution of gate level during acclimation



注:取3个平行样本的平均值作为数据来源。

图3 驯化期间属水平主要物种(>0.5%)相对丰度分布及驯化期间总GAOs的相对丰度变化

Fig. 3 Distribution of relative abundance of main species (>0.5%) at genus level during domestication and relative abundance changes of total GAOs during domestication

相对丰度分别增加至 37.79% 和 10.03%，总 GAOs 增加了 9.38 倍。因此，该运行模式不仅可以高效快速富集 GAOs，还可以富集多种 GAOs。

本研究中，GAOs 成为优势种群有以下原因：一是由于乙酸盐作进水单碳源，而 GAOs 更偏好于乙酸作为碳源^[29-30]；二是由于磷酸盐的限制，在进水中磷酸盐浓度较低，厌氧末排水的运行方式去除了液相中大部分磷酸盐，进入好氧曝气阶段后，PAOs 可利用的磷酸盐极少，抑制了磷酸盐的吸收和聚磷的胞内合成，从而限制了 PAOs 的增殖；而 GAOs 可以充分调动胞内糖原和 PHA 为其生命活动供能，在系统中迅速增殖，并最终在群落中占主导地位。PAOs 在该运行方式下未发生明显增殖，但并未完全消失，在磷酸盐受限的情况下依然可以保持活性。分析其原因，可能是部分 PAOs 调用胞内糖原进行 GAM 代谢造成^[9,31]。

Simpson's diversity 和 Shannon-Wiener 是 2 个用来反映样本中微生物多样性的指数，此处用于反映各样本的物种多样性随着富集过程的变化^[32]。前者数值越小，表明样品物种多样性越高；后者则相反，数值越大，表明群落物种多样性越高。按照已有的计算公式^[32] 计算 GAOs 体系在不同驯化阶段的多样性指数。由 Simpson 和 Shannon 指数在驯化过程中的结果(见 表 2)可知，随着 GAOs 富集过程的持续进行，体系中物种多样性呈现先升高后降低、最终逐渐稳定的趋势。这与富集过程的变化是一致的，接种污泥接触新的人工合成废水后微生物群落多样性又有了一定程度的提高。由于实验的运行条件更有利于 GAOs 等微生物的生长，导致系统中生物多样性逐渐降低，并最终趋于稳定。

表 2 GAOs 富集过程中属水平群落多样性的变化

Table 2 Changes of genus-level community diversity during the enrichment of GAOs

多样性指数	第1天	第4天	第16天	第20天	第39天	第43天
Simpson's diversity	0.990 3	0.988 6	0.991 4	0.993 5	0.992 7	0.993 0
Shannon-Wiener	0.204 0	0.219 7	0.193 9	0.161 3	0.065 5	0.069 6

为深入了解 GAOs 体系中微生物群落的形态，用扫描电镜对驯化前后的群落进行了高分辨率的形态学观察(见 图 4)。驯化前期(图 4(a)~(b))活性污泥呈现松散的絮状结构，大量胞外聚合物

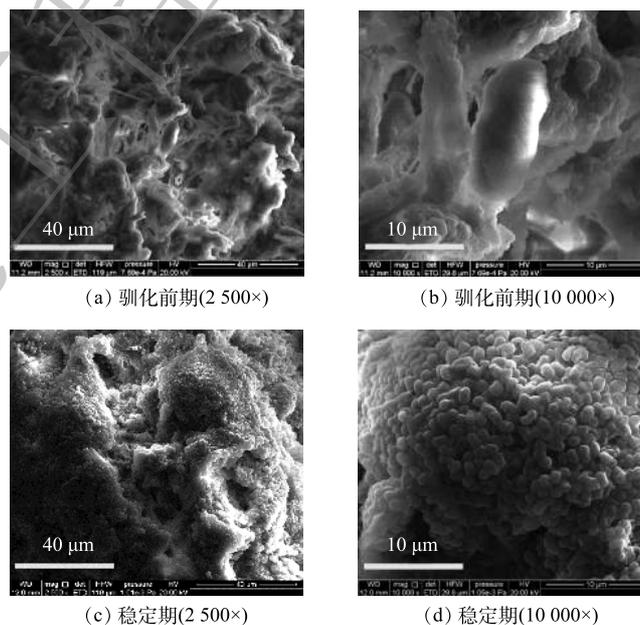


图 4 反应器驯化前后的扫描电镜图

Fig. 4 Scanning electron microscope images of the reactor before and after acclimation

(extracellular polymeric substances, EPS)的存在影响了单个菌的形态观察。驯化后,菌群形态变化明显,此时菌群分布紧密,有明显的小颗粒状态(图4(c)~(d))。本系统以球菌为主,短杆菌次之(图4(b));此外,图4(d)中球菌趋于两两并列,类似杆菌的形态。由于GAOs为系统优势菌群,电镜中的球菌很可能就是GAOs。电镜照片中丝状菌很少,证明污泥沉降性能好,无明显的污泥膨胀现象,微生物之间的团聚主要依靠胞外聚合物的作用。

2.3 糖原代谢功能基因分析

GAOs是依据其在厌氧好氧交替系统中利用糖原的功能而定义的,胞内糖原是GAOs在系统中增殖的先决条件。对系统中糖原代谢相关的功能基因变化进行了统计和分析(见图5和图6),主要包含糖原的分解合成以及糖原供能过程,糖酵解途径(embden-meyerhof-parnas pathway, EMP)和2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸(entner-doudoroff, ED)途径分别以各自的特征性酶展开讨论。柱状图反映了在驯化期间6个时间节点的特征酶基因的变化趋势,所有的值都以接种污泥进行归一化处理,柱状图的纵坐标表示驯化过程中某特定基因相对于接种污泥的增减程度,纵坐标数值大于1表示该基因随着驯化逐渐增强,反之逐渐减弱。

糖原合成过程中的酶主要包含3种,即葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶(glgC)、糖原合成酶(glgA)和1,4- α -葡聚糖分支酶(GBE1, glgB),统计学分析表明驯化对(GBE1, glgB)的影响最为显著($P=0.01$)。随着驯化的进行,(GBE1, glgB)的功能基因丰度逐渐升高,在20 d达到最高,这与糖原的测定结果一致。统计学结果还表明,驯化对glgA有显著影响($P=0.049$),其变化与(GBE1, glgB)一致,但驯化过程对glgC无显著影响($P=0.068$)。糖原分解过程主要涉及糖原磷酸化酶(PYG, glgP),统计学分析表明,(PYG, glgP)对驯化过程有显著性响应($P=0.012$)。

葡萄糖的供能过程主要包括EMP途径和ED途径。葡萄糖激酶(glk)和果糖磷酸激酶(PFK, pfkA)催化的反应是EMP途径的限速步骤,驯化期间其变化趋势相似。前期随着反应器的运行glk和(PFK, pfkA)的相对丰度都呈现上升趋势,第20天左右达到峰值,然后趋于稳定。KDPG醛缩酶(eda)是ED途径的特征酶,因此,该基因的存在及表达对于了解GAOs糖代谢途径具有重要参考意义。柱状图表明,在驯化过程中eda的基因丰度呈先升高后稳定的趋势。统计学分析显示,glk、(PFK, pfkA)和eda的相对丰度变化受驯化过程的显著影响($P=0.019$, $P=0.011$, $P=0.003$)。

GAOs对于EMP和ED途径的选择一直是研究热点。由于1 mol葡萄糖单位的糖原经EMP和ED途径各净得3 mol和1 mol的ATP,因此,2个途径的选择会直接影响到GAOs的产能水平,进而影响到其有机物的吸收及生长增殖等。有研究表明,*Ca. Contenbacter*不含ED途径相关功能基因^[20],而有的*Ca. Competibacter*同时包含EMP和ED两种途径,因此,本实验中eda丰度的上调与*Ca. Competibacter*的增殖相关。

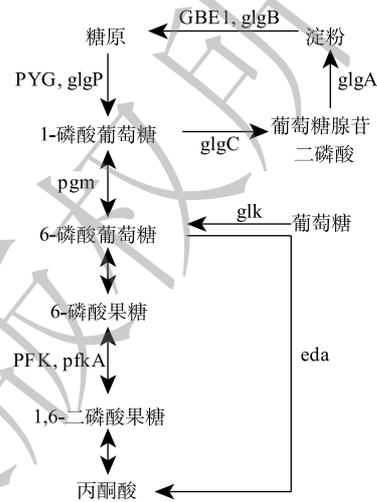
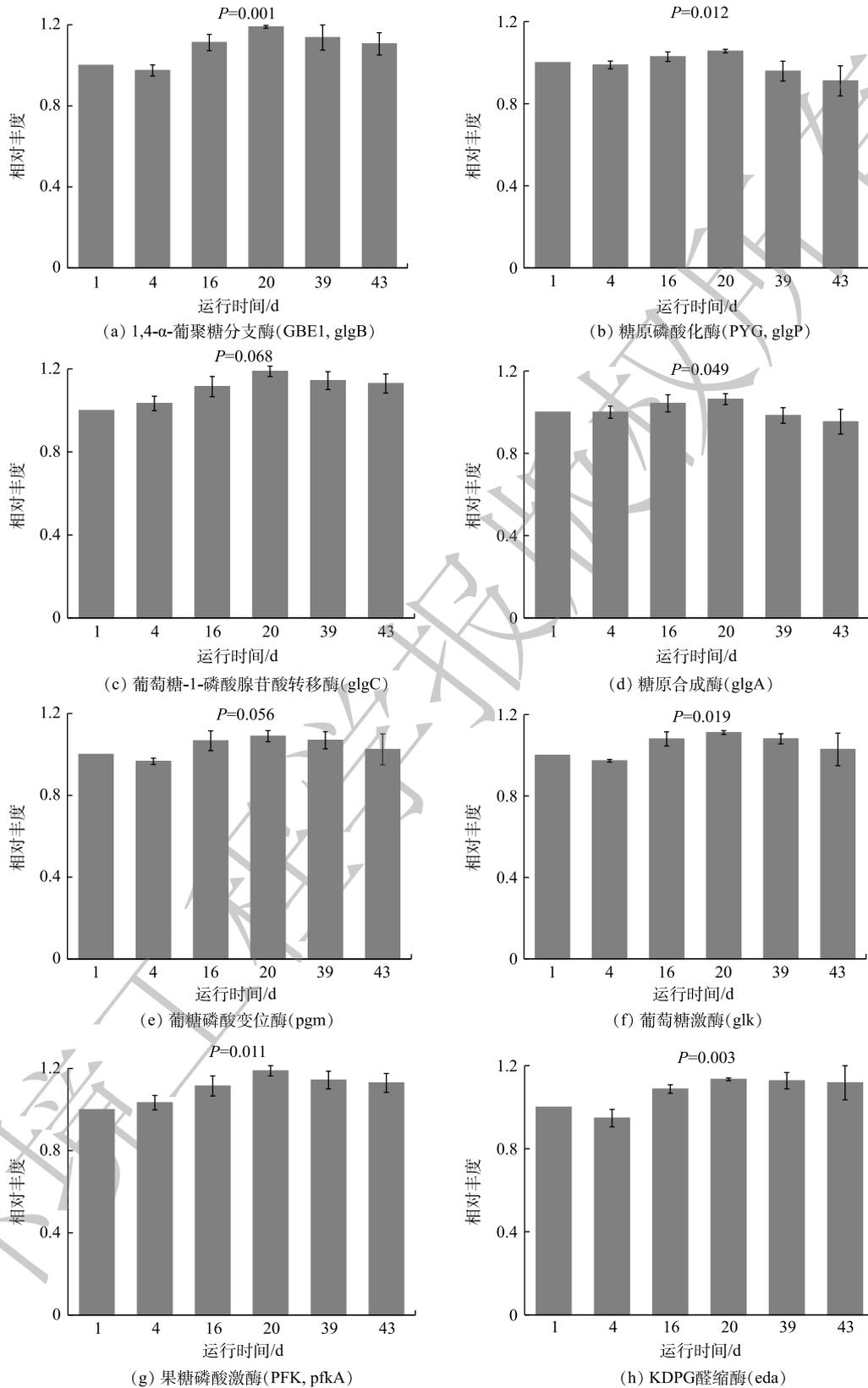


图5 聚糖菌反应器中糖原代谢通路

Fig. 5 Glycogen metabolism pathway in GAOs reactor



注：相对丰度是以接种污泥进行归一化处理后的结果。

图 6 驯化过程中糖原代谢主要基因的相对丰度变化

Fig. 6 Changes in relative abundance of major genes in glycogen metabolism during domestication

3 结论

1) 在厌氧好氧交替运行的 SBR 反应器中, 利用厌氧末排水及进水磷酸盐限制的策略快速富集到了 GAOs, 反应器呈现 GAOs 典型代谢模式。厌氧消耗糖原合成 PHA, 好氧利用 PHA 补充糖原。实验中厌氧 VFA 利用、糖原消耗及 PHA 合成的化学计量学与典型的 GAOs 模型有较高一致性。

2) 宏基因组测序的结果表明, GAOs 在系统中快速富集。从属水平来说, *Ca. Contendobacter*、*Candidatus Competibacter* 两类 GAOs 在体系中占主导地位, 各占总菌群的 7.01% 和 1.86%, 且在该运行条件驯化过程中增殖速度较快。

3) 在驯化过程中, 糖原合成酶 (glgA) 和 1,4- α -葡聚糖分支酶 (GBE1, glgB) 等糖原代谢相关的标志性基因相对丰度随 GAOs 丰度增加而增加。因此, 这 2 个酶可作为系统中聚糖菌富集的标志物, 用以判断 GAOs 富集的程度; 此外, 检测到的 *eda* 基因及变化表明, 实验驯化的 GAOs 中同时存在 EMP 和 ED 途径进行供能。

参考文献

- [1] MINO T, LIU W T, KURISU F, et al. Modelling glycogen storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal processes[J]. *Water Science & Technology*, 1995, 31(2): 25-34.
- [2] GUO G, WU D, HAO T, et al. Functional bacteria and process metabolism of the denitrifying sulfur conversion-associated enhanced biological phosphorus removal (DS-EBPR) system: An investigation by operating the system from deterioration to restoration[J]. *Water Research*, 2016, 95: 289-299.
- [3] LAW Y, KIRKEGAARD R H, COKRO A A, et al. Integrative microbial community analysis reveals full-scale enhanced biological phosphorus removal under tropical conditions[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 25719.
- [4] MCILROY S J, ONETTO C A, MCILROY B, et al. Genomic and in situ analyses reveal the *Micropruina* spp. as abundant fermentative glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1004.
- [5] SHEN N, ZHOU Y. Enhanced biological phosphorus removal with different carbon sources[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(11): 4735-4745.
- [6] PISCO A R, BENGTTSSON S, WERKER A, et al. Community structure evolution and enrichment of glycogen-accumulating organisms producing polyhydroxyalkanoates from fermented molasses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(14): 4676-4686.
- [7] BENGTTSSON S, WERKER A, CHRISTENSSON M, et al. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater[J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(3): 509-516.
- [8] JI J, PENG Y, MAI W, et al. Achieving advanced nitrogen removal from low C/N wastewater by combining endogenous partial denitrification with anammox in mainstream treatment[J]. *Bioresour Technol*, 2018, 270: 570-579.
- [9] MENG Q, ZENG W, WANG B, et al. New insights in the competition of polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms under glycogen accumulating metabolism with trace Poly-P using flow cytometry[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 385: 123915.
- [10] WELLES L, LOPEZVAZQUEZ C M, HOOIJMANS C M, et al. Prevalence of '*Candidatus Accumilibacter phosphatis*' type II under phosphate limiting conditions[J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 44.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中丙酸钠、丙酸钙的测定: GB 5009.120-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

- [12] 国家环境保护总局. 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.
- [13] OEHMEN A, KELLER L B, ZENG R J, et al. Optimisation of poly- β -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1070(1/2): 131-136.
- [14] 王景峰, 王暄, 季民, 等. 聚糖菌颗粒污泥基于胞内储存物质的同步硝化反硝化[J]. *环境科学*, 2006, 27(3): 473-477.
- [15] ZHANG M, WANG Y, FAN Y, et al. Bioaugmentation of low C/N ratio wastewater: Effect of acetate and propionate on nutrient removal, substrate transformation, and microbial community behavior[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 306: 122465.
- [16] JIANG Y, CHEN Y. The effects of the ratio of propionate to acetate on the transformation and composition of polyhydroxyalkanoates with enriched cultures of glycogen-accumulating organisms[J]. *Environmental Technology*, 2009, 30(3): 241-249.
- [17] SMOLDERS G J, MEIJ J V D, VAN LOOSDRECHT M C M, et al. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 43(6): 461-470.
- [18] ZENG R, YUAN Z, VAN LOOSDRECHT M C M, et al. Proposed modifications to metabolic model for glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 80(3): 277-279.
- [19] 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.
- [20] MCILROY S J, ALBERTSEN M, ANDRESEN E K, et al. ‘*Candidatus Competibacter*’-lineage genomes retrieved from metagenomes reveal functional metabolic diversity[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(3): 613-624.
- [21] RUBIO-RINCON F J, LOPEZ-VAZQUEZ C M, WELLES L, et al. Cooperation between *Candidatus Competibacter* and *Candidatus Accumulibacter* clade I, in denitrification and phosphate removal processes[J]. *Water Research*, 2017, 120: 156-164.
- [22] CARLOS M, LOPEZ-VAZQUEZ, CHRISTINE M, et al. Temperature effects on glycogen accumulating organisms[J]. *Water Research*, 2009, 43(11): 2852-2864.
- [23] MADSEN A, MCILROY S J, MIKKEL S B, et al. “*Candidatus Propionivibrio aalborgensis*”: A novel glycogen accumulating organism abundant in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1033.
- [24] LIU M, YAO B, CONG S, et al. Optimization of wastewater phosphorus removal in winter temperatures using an anaerobic-critical aerobic strategy in a pilot-scale sequencing batch reactor[J]. *Water*, 2019, 12(1): 110.
- [25] ONNISHAYDEN A, SRINIVASAN V, TOOKER N B, et al. Survey of full-scale sidestream enhanced biological phosphorus removal (S2EBPR) systems and comparison with conventional EBPRs in North America: Process stability, kinetics, and microbial populations[J]. *Water Environment Research*, 2020, 92(3): 403-417.
- [26] SELVARAJAN R, SIBANDA T, VENKATACHALAM S, et al. Industrial wastewaters harbor a unique diversity of bacterial communities revealed by high-throughput amplicon analysis[J]. *Annals of Microbiology*, 2018, 68(7): 445-458.
- [27] CARVALHO V C, FREITAS E B, SILVA P J, et al. The impact of operational strategies on the performance of a photo-EBPR system[J]. *Water Research*, 2018, 129: 190-198.
- [28] CARVALHO V C, FREITAS E B, FRADINHO J C, et al. The effect of seed sludge on the selection of a photo-EBPR system[J]. *New Biotechnology*, 2019, 49: 112-119.
- [29] TU Y J, SCHULER A J. Low acetate concentrations favor polyphosphate-accumulating organisms over glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal from wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(8): 3816-3824.
- [30] 王少坡, 李柱, 赵乐丹, 等. 长期低聚磷条件对AO-SBR系统Accumulibacter代谢特性的影响[J]. *环境科学*, 2019, 40(5):

337-344.

[31] ACEVEDO B, BORRAS L, OEHMEN A, et al. Modelling the metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms[J]. *Water Research*, 2014, 65: 235-244.

[32] 樊龙江, 吴三玲, 邱杰, 等. 生物信息学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2017: 309-310.

(责任编辑: 靳炜)

Rapid enrichment of glycogen accumulating organisms and analysis of community characteristics

YANG Yanping^{1,2}, ZHAO Chen², ZHANG Chunchun^{1,2}, WANG Shang², ZHANG Zhaohui¹, GAO Chao², CAO Zhuosong², WANG Jingfeng^{2,*}

1. School of Environmental Science and Engineering, Tiangong University, Tianjin 300387, China

2. Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medicine, Chinese Academy of Military Science, Tianjin 300050, China

*Corresponding author, E-mail: wangjingfeng0116@163.com

Abstract A fast and stable model of glycogen accumulating organisms (GAOs) was established to study the community structure of GAOs model and the changes in the expression of glycogen-related functional genes by the dual strategies of anaerobic drainage and phosphorus restriction. The dynamic changes of bacterial community structure of GAOs system were determined by metagenomics. The regulation of key functional genes of glycogen metabolism pathway in the cultivable process was analyzed. Results showed that after about 40 days of domestication, the reactor showed stable metabolic characteristics of GAOs, whereby glycogen was consumed to absorb acetate to synthesize PHA in the anaerobic period and PHA was consumed to supplement glycogen in the aerobic period. The values of glycogen degradation/VFA absorption and PHA synthesis/VFA absorption in stable anaerobic phase were 1.036 and 2.468 respectively, which were close to the stoichiometric model of GAOs. The metagenomic results showed that *Candidatus Contendobacter*, *Candidatus Competibacter* and "*Candidatus Propionivibrio aalborgensis*" in the reactor accounted for about 7.13%, 1.86% and 0.20% of the total bacteria, respectively, and the GAOs abundance in the stable period was about 10.4 times that of initial sludge. The process had a significant effect on the abundance of glycogen metabolism-related genes such as glycogen synthetase (glgA) and 1, 4- α -glucan branching enzyme (GBE1, glgB) in the reactor, and there were both glycolysis pathway and ED pathway in the system. The microbial community structure and the function genes of glycogen-related function in the enrichment process of GAOs were revealed from the microstructure, which provided reference for improving the theory of metabolic mechanism of GAOs.

Keywords glycogen accumulating organisms (GAOs); drainage after anaerobic; Glycogen metabolism; Macrogenomics