

污水处理厂中聚磷微生物 *Tetrasphaera* 和 *Accumulibacter* 的相对丰度及影响因素

孙月^{1,2}, 吴敏^{1,2*}

¹同济大学环境科学与工程学院, 长江水环境教育部重点实验室, 上海

²同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海

Email: sunyue@tongji.edu.cn, *minw@tongji.edu.cn

收稿日期: 2021年3月5日; 录用日期: 2021年4月5日; 发布日期: 2021年4月13日

摘要

在污水的除磷工艺中, 强化生物除磷(EBPR)是最主要的方法之一。一直以来, *Accumulibacter* 菌属(A菌)作为EBPR工艺最主要的聚磷菌(PAOs)已被广泛接受, 也能较好地适应EBPR污水厂的现实情况。但同时, *Tetrasphaera* 菌属作为一种新型聚磷菌, 也在世界各地被逐渐发现, 它在某些特定环境下的丰度甚至远高于A菌, 值得进一步探究。本研究选取了上海地区3座不同处理模式的市政污水处理厂进行研究, 采用高通量测序技术对它们活性污泥中的微生物群落特征进行了解析。结果表明, 不同污水处理厂在微生物物种组成上具有相似性, 但一致性并不高。这三家污水厂的活性污泥中, A菌的相对丰度为7.4%~10.3%, T菌的相对丰度为1.4%~3.8%, T菌的丰度远远小于A菌丰度。进水组分中的氨基酸含量与T菌丰度的相关性较高。

关键词

强化生物除磷(EBPR), *Tetrasphaera*, *Accumulibacter*, 微生物, 群落结构

Relative Abundance of *Tetrasphaera* and *Accumulibacter* and Its Influencing Factors in Waste Water Treatment Plants

Yue Sun^{1,2}, Min Wu^{1,2*}

¹Key Laboratory of Yangtze Water Environment for Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai

²State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai

*通讯作者。

文章引用: 孙月, 吴敏. 污水处理厂中聚磷微生物 *Tetrasphaera* 和 *Accumulibacter* 的相对丰度及影响因素[J]. 水污染及处理, 2021, 9(2): 64-74. DOI: 10.12677/wpt.2021.92008

Email: sunyue@tongji.edu.cn, *minw@tongji.edu.cn

Received: Mar. 5th, 2021; accepted: Apr. 5th, 2021; published: Apr. 13th, 2021

Abstract

Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) is one of the most important methods in phosphorus removal process. For a long time, *Accumulibacter* has been widely accepted as the major group of polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) in EBPR process, and can adapt to the reality of EBPR wastewater treatment plants (WWTPs). Meanwhile, a group of bacteria named *Tetrasphaera* with polyphosphate accumulating capability has been gradually found all over the world, and also observed in a larger abundance than *Accumulibacter* in some WWTPs, which is worthy of further study. In this study, three municipal wastewater treatment plants with different treatment modes in Shanghai were selected to analyze the characteristics of microbial community in the returned activated sludge by high-throughput sequencing technology. The results showed that the microbial species composition of different wastewater treatment plants was similar, but the consistency was not high. In the activated sludge of the three sewage plants, the relative abundance of *Accumulibacter* is 7.4%~10.3%, and that of *Tetrasphaera* is 1.4%~3.8%, which is far less than *Accumulibacter*. There was a high correlation between the amino acid content of influent components and the abundance of *Tetrasphaera*.

Keywords

Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR), *Tetrasphaera*, *Accumulibacter*, Microorganisms, Community Structure

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着我国经济的发展,生活污水和工业废水的排出量不断增加,氮磷和有机物的不断泄入,致使湖泊、水库等水体日趋恶化,而磷在水体中的浓度超标是造成水体富营养化最主要的因素之一,当地面水体中总磷含量达到 0.015 mg/L 时就足以引起水体的富营养化现象。在污水处理厂中,强化生物除磷工艺(Enhanced biological phosphorus removal, EBPR)是一种高效、经济和环境可持续发展的除磷方法[1],也是目前应用最广的污水除磷工艺。

Ca. Accumulibacter (A 菌)是目前最广为人知的聚磷菌,在厌氧条件下,A 菌吸收污水中的挥发性脂肪酸(VFAs)并转化为聚羟基烷酸(PHA)储存在胞内,同时将胞内多聚磷酸盐(poly-P)降解所释放的磷转运至胞外;好氧条件下,A 菌利用 PHA 分解代谢过程中所产生的能量超量吸磷[2],最终通过排放富磷剩余污泥实现污水除磷或磷回收[3]。

最近有国外文献报道,在不同国家和地区的污水厂 EBPR 中的聚磷微生物除了 A 菌之外,*Tetrasphaera* (T 菌)也被持续发现且大量存在,其丰度可以高达 35%,甚至超过 A 菌[4]。Nielsen 等人对 20 多家丹麦污水处理厂进行了几年的全面调查,运用了荧光原位杂交(FISH)和 16S rRNA 基因扩增测序技术,结果清楚地表明,尽管 A 菌较为常见(平均丰度为 0.5%),但放线菌属 T 菌的丰度通常更高。他们随后又对 12 个国家(覆

盖 5 大洲)的 32 个全规模 EBPR 工厂进行了调查, 结果表明, 全球大多数污水处理厂都有更丰富的 T 菌, 这表明 T 菌在大型 EBPR 污水厂中可能发挥着重要作用[5]。Kong 等人的研究表明, T 菌属具有厌氧吸收氨基酸后的好氧吸磷能力, 也是聚磷菌的一种[6]。与 A 菌相比, 尽管没有在胞内储存 PHA, T 菌也能很好地吸收氨基酸和/或葡萄糖等复杂的有机分子[7]。此外, 在厌氧条件下, 部分 T 菌能够通过发酵产生 VFAs, 从而为 EBPR 系统的 A 菌提供额外的 VFAs 优质碳源[8] [9]。但目前, 国内关于 T 菌的研究还较少。

污水处理厂的处理性能常常与其系统内的微生物群落结构密切相关[10] [11]。水环境因素, 如温度、进水水质、厌氧条件等会对各处理单元的运行效果产生影响。其中, 温度有可能影响活性污泥培养驯化的效果和启动周期的长短[12], 进水水质则意味着微生物的可利用的易于降解的碳源含量的多少, 对于脱氮除磷意义重大。认识污水处理系统微生物群落可以帮助我们更深入地认识污水生物处理的本质, 从而指导优化系统。然而微生物往往个体微小、数量庞大、多样性丰富、可培养性低, 用传统的培养方法对微生物群落开展研究十分困难[13]。近年来, 随着科技的发展, 高通量测序技术逐渐被应用到微生物群落变化的研究中, 可以为相关研究提供很多信息[14]。

考虑到 T 菌不但可以直接利用进水中的葡萄糖、氨基酸等大分子有机物质作为碳源除磷, 同时它的发酵能力也能利用污水中复杂的有机物产生更多的 VFAs 供 A 菌使用, 两者可以形成协同效应, 更高效地利用污水中的有机碳源。针对国内污水厂普遍存在的碳源不足的情况, 了解进水有机碳源组分对 A 菌和 T 菌丰度的影响, 将减少优质碳源的添加, 有利于提高 EBPR 的除磷效能。因此, 我们选取了上海三家不同方位的污水处理厂, 记录其进水来源(生活污水和工业废水的比例)、工艺流程(A2/O、A/O、氧化沟、二级生化等)、相关运行参数(温度、pH、进水出水各项指标等), 同时采集进水、出水以及活性污泥, 测定进水的碳源组成, 并利用高通量测序技术分析活性污泥中的微生物种群结构, 尤其是聚磷菌 T 菌和 A 菌的相对丰度。最后将各种环境因素与聚磷菌种类和丰度进行比较分析, 探讨这些因素与 A 菌、T 菌相对丰度的相关性。

2. 材料与方法

2.1. 样品采集与理化分析

A、B、C 为上海市的 3 座市政污水处理厂, 分布在上海市的东北部、西南部和西北部区域, 样品采集时间为 12 月(冬季), 采样点在每座污水处理厂的集水井、浓缩回流污泥池和二沉池, 每点取 2L 污水或污泥用于化验分析。采样污水厂的具体信息见表 1。

使用多参数水质仪(WTW, 德国)现场测定常规水质指标, 包括温度(T)、pH 值、溶解氧和氧化还原电位(ORP), 混合液悬浮固体浓度(mixed liquor suspended solid, MLSS)以及混合液挥发性悬浮固体浓度(mixed liquid volatile suspended solids, MLVSS)使用马弗炉燃烧减重法测量, 使用快速消解分光光度法(HACH, 美国)测定化学需氧量(COD), 使用过硫酸钾 - 钼锑抗分光光度法测量总磷(TP), 使用纳氏试剂光度法测量氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$), 使用总有机碳分析仪(Shimadzu, 日本)测量总有机碳(TOC)和总氮(TN), 使用修正后的 Lowry 方法测定蛋白质含量, 使用蒽酮试剂法测定多糖含量, 使用气相色谱法(Agilent, 美国)测定挥发性脂肪酸(VFAs)含量, 使用氨基酸分析仪(HITACHI, 日本)测量氨基酸含量。最后对所有的因素进行方差分析。

Table 1. Treatment technology and sampling information of WWTPs

表 1. 污水处理厂处理工艺及采样信息

水厂名称	采样月份	采样水温/°C	处理工艺	布置形式	污水来源	处理规模/ $\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$
A	12	20.8	A/A/O	敞开式	22%的工业污水 + 78%的生活污水	10×10^5
B	12	17.7	A/A/O	敞开式	20%的工业污水 + 80%的生活污水	1.8×10^5
C	12	16.9	A/A/O	全地下式	100%的生活污水	1.8×10^4

2.2. 样品预处理及高通量测序

将采集的活性污泥样品取 50 mL 离心后得到固态污泥, 从污泥中提取样品总 DNA 后, 采用引物对 V3~V4 区 341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')和 805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')通过 Illumina MiSeq 测序平台完成样品细菌 16S rDNA 高通量测序。

2.3. 数据分析

将测量得出的数据进行处理, 通过标签序列(barcode)区分样品序列, 并对各样本序列做质量控制(Quality control, QC), 去除非特异性扩增序列及嵌合体。然后进行操作分类单元(OTU)聚类分析, 将多条序列根据其序列之间的距离来对它们进行聚类, 后根据序列之间的相似性作为阈值分成 OTU。在 OTU 聚类结果的基础上, 获取每一个 OTU 聚类中的代表性序列, 根据各样本在 OTU 的分布情况绘制韦恩图。Alpha 多样性分析则用来衡量样本物种多样性, 计算 ACE 指数、Chao 指数、Shannon 指数、Simpson 指数和 Coverage(覆盖度)等物种多样性指数。将序列进行物种分类, 对每个样本和每个物种单元分类进行序列丰度计算构建样本和物种分类单元序列丰度矩阵。分别按照门(phylum)、纲(class)和属(genus)水平为分类单位, 统计该分类单位下优势单元所占相对丰度, 绘制相对丰度分布图。

3. 结果与讨论

3.1. 活性污泥中细菌群落的 α 多样性分析

本研究对上海市 3 座污水处理厂的活性污泥样本进行了高通量测序分析, 并根据各样本在 OTU 的分布情况绘制了韦恩图, 见图 1。其中, A 厂样本的活性污泥有效序列数和 OTU 数量均为最低, C 厂最高, 构建 OTUs 并且获得注释信息的 Tags 数目从 29,712~37,224, OTUs 平均有 4622 个, 其中 A 厂特有 OTUs 有 3100 个, B 厂特有 OTUs 有 3183 个, C 厂特有 OTUs 有 3593 个, 三厂共有 OTUs 为 628 个, 说明各污水厂在微生物物种组成上具有相似性, 但一致性并不高。

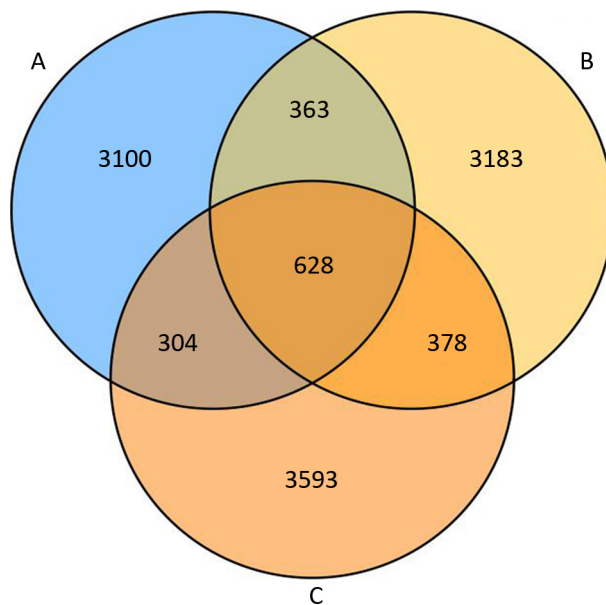


Figure 1. Venn diagram of OTU samples

图 1. OTU 样本分布韦恩图

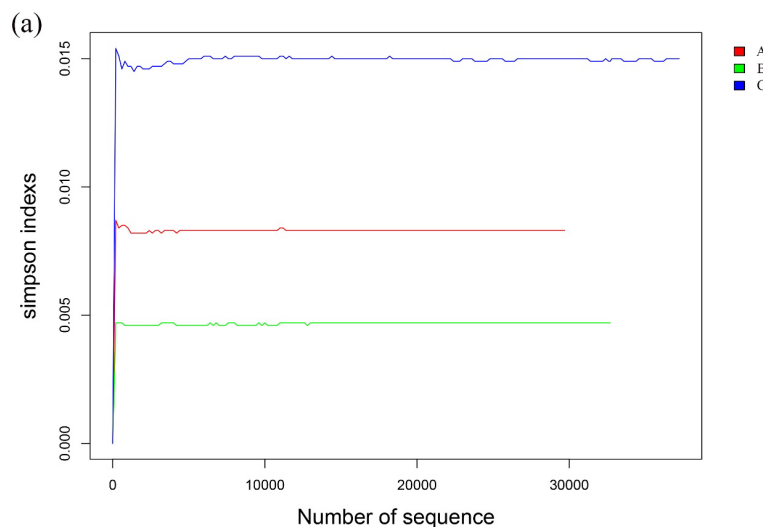
为了验证测序量是否能够反映样品中微生物群落的多样性, 根据 97%相似度的 OTU 分类学水平, 利

用 *mothur* 计算不同随机抽样下的多样性指数, 三家污水处理厂活性污泥中细菌群落的 α 多样性指数数据见表 2。ACE 指数可以用来估计群落中含有的 OTU 数目, 默认将序列量 10 以下的 OTU 都计算在内。ACE 指数越大, 表明群落的丰富度越高。Chao1 指数也被用来估计群落中物体总数, 由 Chao [15] 最早提出, Chao1 指数越大, OUT 数目越多, 说明该样本的物种数目较多。如表 2 所示, 3 家污水厂中, C 厂的 ACE 指数和 Chao1 指数均为最高, 因此 C 厂的群落物种总数也较多。Coverage 是指各样品克隆文库的覆盖率, 该数值越高, 则样品中序列被测出的概率越高。由表 2 可知, 所有样本的 Coverage 指数均大于 0.98, 表明测序深度足够, 结果可靠。

Table 2. The α diversity of activated sludge samples from different WWTPs
表 2. 不同污水厂活性污泥的 α 多样性指数

水厂名称	ACE_index	Chao1_index	Coverage	Shannon_index	Simpson
A	32359	18414	0.98	6.31	0.0086
B	27474	16111	0.99	6.57	0.0049
C	34422	19161	0.98	6.08	0.0156

Simpson 指数是用来估算样品中微生物的多样性指数之一, 由 Simpson [16] 提出, 常用来描述生态学中某个区域的生物多样性, 该指数越高, 代表群落多样性越低。但如果样品的物种丰富度相同, 物种分布越均匀, 则多样性越高。Shannon 指数 [17] 对群落丰富度和均匀度进行了综合考量, 该指数越高, 表明群落的多样性越高, 物种分布越均匀。图 2 中随着样本读取数的增加, 观察到的 Shannon 指数曲线趋向平坦, 表明测序数据量足够大, 能够反映样本中绝大多数的微生物多样性信息。从图 2 中可以看出 C 厂的 Simpson 指数最高, 而 Shannon 指数最低, 两者的数据相互对应, 说明 C 厂的群落丰富度最高, 但群落多样性较低, 这可能是由于该厂的污水来源比较单一, 都是生活污水。工业废水中重金属等有毒物质含量较高, 会抑制微生物活性, 影响微生物生长。生活污水比工业污水更利于微生物的降解利用, 因此它的群落总量较高, 微生物生长状况良好, 但物种种类则不如工业污水多。另外, 也有可能因为 C 厂是全地下式水厂的暗环境, 有研究表明暗环境会影响微生物群落多样性和物种组成 [18]。Rank-abundance 曲线可以同时解释样品多样性的两个方面, 即样品所含物种的丰富程度和均匀程度。物种的丰富程度由曲线在横轴上的长度来反映, 曲线越宽, 表示物种的组成越丰富; 物种组成的均匀程度由曲线的形状来反映, 曲线越平坦, 表示物种组成的均匀程度越高。由图 3 的 Rank-abundance 曲线可知, 三家污水厂的物种组成都比较丰富且均匀。



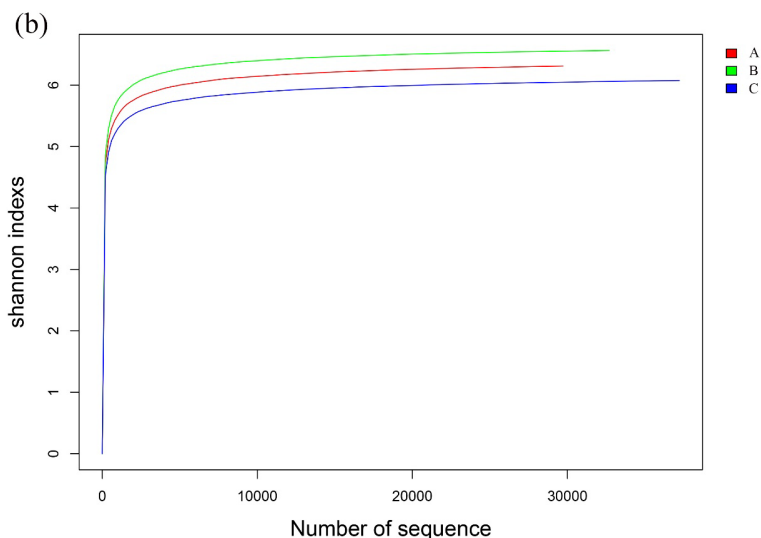


Figure 2. Simpson index (a) and Shannon index (b) of different WWTPs
图 2. 不同污水厂的 Simpson 指数(a)和 Shannon 指数(b)

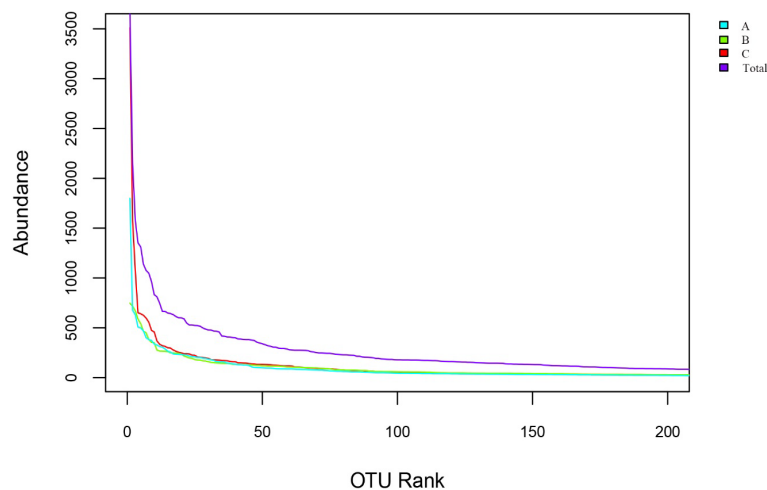


Figure 3. Curve: Rank-Abundance of different WWTPs
图 3. 不同污水厂的 Rank-Abundance 曲线图

3.2. 活性污泥中聚磷菌群落结构分析

Hiraishi 等人利用非培养技术研究发现, β -变形菌纲(*β -proteobacteria*)和放线菌纲(*Actinobacteria group*) 在 EBPR 系统中含量丰富[19]。因此本研究从门、纲两个水平对 3 座污水处理厂活性污泥的 OTU 所属的物种信息进行分析, 从而揭示其菌落组成特征。在门水平下, 活性污泥中细菌群落结构见图 4。从图 4 中可以看出, 三家污水厂的主要优势菌门有: 变形菌门(*Proteobacteria*)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)等, 此结果与许多通过高通量测序分析活性污泥中微生物群落的研究相似[20]。其中 *Proteobacteria* 为最优势菌门, 它也是是污水处理过程最主要的细菌类群[21]。A 菌属于变形杆菌门, 其在 3 座污水厂的比例分别占 40.28%, 35.73%和 41.78%。*Planctomycetes* 在 B 厂的含量较高, 占 17.89%, 迄今发现具有厌氧氨氧化(*Anammox*)功能的细菌全部来自浮霉菌门[22]。*Bacteroidetes* 和 *Chloroflexi* 也是三家污水处理厂中重要的优势菌门, 普遍存在于污水处理厂生物池并参与有机物的降解[23]。*Firmicutes*

是碱性厌氧发酵系统中的普适菌种[24], 被认为与厌氧水解和酸化密切相关[25], 可以代谢很多底物, 包括蛋白、脂类、纤维素、糖和氨基酸等。另外可以发现, 三家水厂中的 *Actinobacteria* 都占有一定比例, T 菌属于放线菌门, 在 3 座污水处理厂中的比例分别为 3.67%, 3.17%和 5.82%。从门水平来看, C 厂的变形杆菌门和放线菌门的数量均为最多, A 厂次之, B 厂最少。

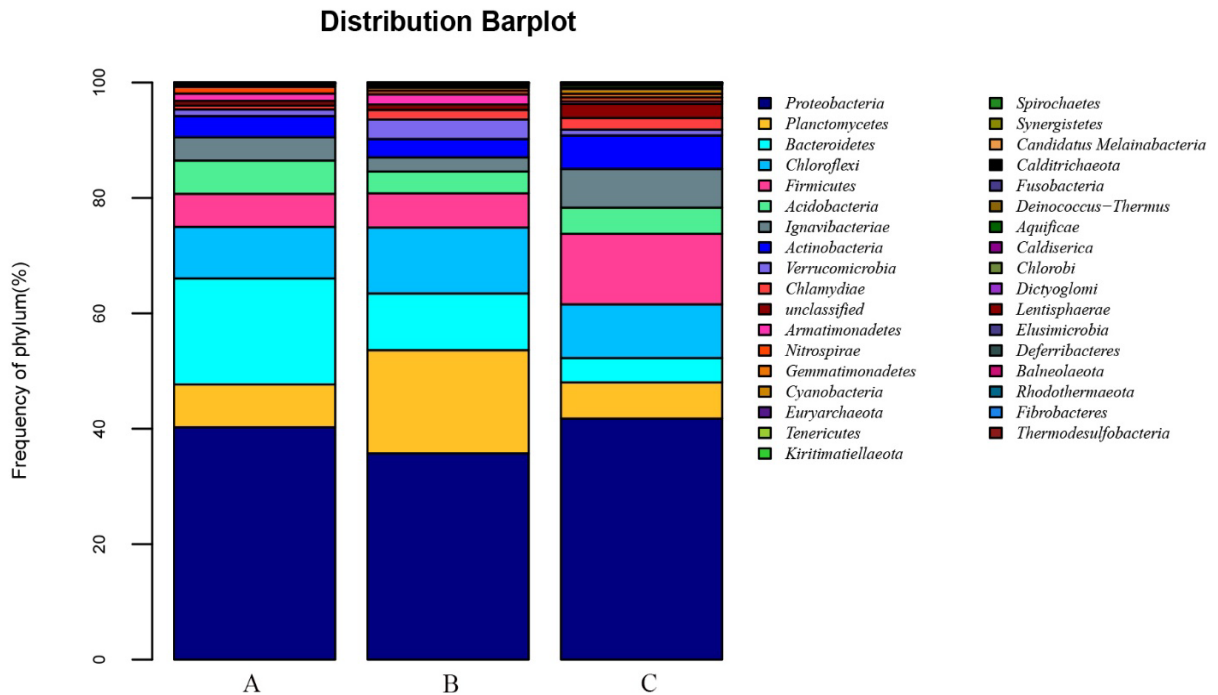


Figure 4. Microbial composition analysis (phylum level) of different WWTPs
图 4. 不同污水厂的物种组成分析(门水平)

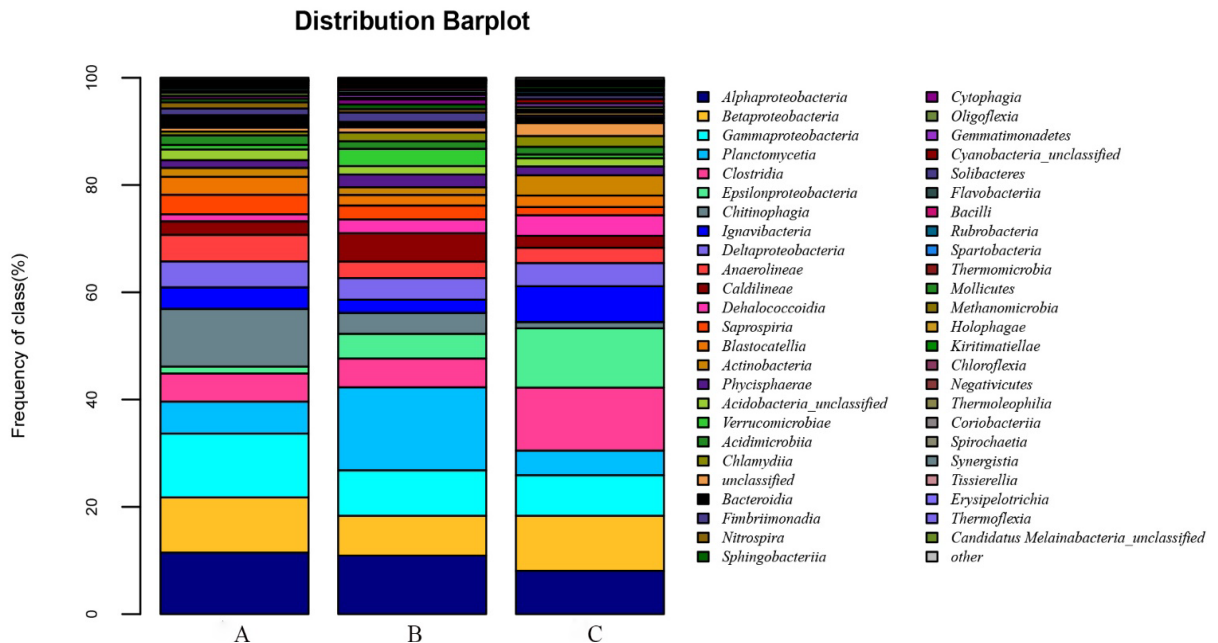


Figure 5. Microbial composition analysis (class level) of different WWTPs
图 5. 不同污水厂的物种组成分析(纲水平)

在纲水平下, 活性污泥中细菌群落结构见图 5。 α -变形杆菌(*α -proteobacteria*), β -变形杆菌和 γ -变形杆菌(*γ -proteobacteria*)均为三家污水厂中的主要优势菌纲。Kong 等人[26]在对群落结构鉴定的时候发现聚糖菌(GAOs)主要是 α -、 γ -变形杆菌。进一步的研究发现, 随着反应器中磷含量的变化, 微生物的结构也会发生改变, 当 P/C 从 1:10 降为 1:50, EBPR 系统恶化, β -变形杆菌的数量由 80% 降为 40%, 而 α -、 γ -变形杆菌随之增加[27]。A 厂的 α -、 γ -变形杆菌数量分别为 11.46% 和 11.89%; B 厂分别为 10.91% 和 8.47%; C 厂分别为 8.05% 和 7.56%。A 菌属于 β -变形杆菌, 在三家污水处理厂中的比例分别为 10.3%, 7.42% 和 10.28%。由此可知, C 厂的聚糖菌含量较少, 而聚磷菌含量相对较高。B 厂这两种菌的含量都较低。同时, T 菌属于放线菌纲(*Actinobacteria*), 它的相对丰度在三家污水厂中分别为 1.66%, 1.43% 和 3.79%, C 厂的 T 菌含量约为 A、B 两厂的两倍。

3.3. 活性污泥中聚磷菌相对丰度与进水组分的相关性

采样当天污水处理厂进出水水质及其他指标见表 3, 每个污水厂的污染物都达到了国家一级 A 排放标准。其中, A 厂进水的 COD 最高, 约为 B 厂、C 厂的 2 倍, 这表明 A 厂的碳源含量相对比较丰富, 这可能是由于 A 厂的处理水量较多以及来源比较广泛。

Table 3. Water quality of different WWTPs

表 3. 不同污水厂的进出水水质

水厂名称	进水/mg·L ⁻¹				出水/mg·L ⁻¹				去除率/%			
	COD	NH ₄ ⁺ -N	TN	TP	COD	NH ₄ ⁺ -N	TN	TP	COD	NH ₄ ⁺ -N	TN	TP
A	480	29.6	34.5	5.1	33	0.4	7.2	0.2	93	99	79	96
B	242	18.5	23.6	3.5	11	0.3	5.8	0.2	95	98	75	96
C	264	22.3	29.2	3.1	12	0.4	6.2	0.2	95	98	79	93

Mielczarek 等对丹麦污水处理厂 EBPR 工艺中微生物种群与进水水质进行了连续监测分析, 研究发现, T 菌丰度大小与进水的工业废水占比成正相关, 进水中工业废水比例越大, T 菌丰度越高[28]。Kong 等调查了丹麦 10 座污水处理厂, 其中在处理工业废水为主的污水厂中 T 菌平均丰度为 17%~35%, 而在处理生活污水为主的污水厂中 T 菌丰度仅为 3%~16%, 这说明进水组分对两种聚磷菌 T 菌和 A 菌丰度具有很大影响[6]。Nielsen 等人的研究表明, 典型的废水中含有 25%~35% 的蛋白质和 15%~25% 的多糖[5]。国内某污水处理厂进水有机物组成显示[29], 总糖、蛋白质和油脂的平均含量分别占到进水总 COD 的 8.93%、41.33% 和 8.53%。蛋白质和糖类占了总 COD 的半数之多, 而 VFA 的含量很少。本研究对 3 家污水处理厂的进水组分进行了测量, 结果为各组分占总 COD 的比例, 结果如表 4 所示。

Table 4. Influent composition in different WWTPs and relative abundance of PAOs

表 4. 不同污水厂的进水组分及聚磷菌丰度

水厂名称	蛋白质	多糖	VFAs	水解氨基酸	游离氨基酸	A 菌丰度	T 菌丰度
A	24%	14%	6%	1.36%	0.38%	10.30%	1.66%
B	30%	22%	5%	1.38%	0.37%	7.42%	1.43%
C	26%	18%	10%	2.12%	0.45%	10.28%	3.79%

由表 4 可以看出, 这三家污水处理常中的进水组分中, 蛋白质含量在 24%~30%, 多糖含量为 14%~22%, VFAs 含量为 5%~8%, 水解氨基酸含量为 1.36%~1.38%, 游离氨基酸含量为 0.37%~0.45%, 与前面的研

究结果基本吻合。文献中指出, T 菌可以直接利用葡萄糖、蛋白质、氨基酸等大分子有机物进行生物除磷代谢[30]。从上述结果也可以发现, C 厂的水解氨基酸含量和游离氨基酸含量均高于 A、B 两厂, 同时, C 厂的 T 菌丰度也高于另外两厂, 我们根据方差分析的结果也认为进水组分中的氨基酸含量与 T 菌丰度相关性较高。C 厂主要以生活污水为主, 进水中的易降解的 VFAs 含量较高, 而 A、B 两厂的进水中约有 20% 的工业废水, VFAs 含量相对较低。同时, T 菌具有发酵能力, 在厌氧条件下, 能够通过发酵葡萄糖和氨基酸产生 VFAs, 为 A 菌厌氧释磷提供碳源增量[8]。因此, C 厂较高的 VFAs 也有可能是由 T 菌将蛋白质、葡萄糖等物质发酵形成的。

4. 结论

1) 活性污泥的细菌群落 α 多样性分析表明, 以生活污水为主要进水来源的污水厂的细菌群落丰富度最高, 但群落多样性较低, 这可能是由于工业废水中重金属等有毒物质含量较高, 会抑制微生物活性, 影响微生物生长。

2) 活性污泥的细菌群落结构分析表明, 三家污水厂的活性污泥中普遍存在 A 菌和 T 菌, 其中 A 菌的相对丰度为 7.4%~10.3%, T 菌的相对丰度为 1.4%~3.8%, T 菌的丰度远远小于 A 菌丰度, 这可能与当地的气温以及运行条件有关。

3) 污水厂进水组分中, 蛋白质占 24%~30%, 多糖占 14%~22%, VFAs 占 5%~8%, 水解氨基酸占 1.36~1.38%, 游离氨基酸占 0.37%~0.45%, 进水组分中的氨基酸含量与 T 菌丰度相关性较高, 这也与 T 菌经常利用的碳源特性有关。C 厂中较高的 VFAs 除了进水中本身含量较高外, 也有可能是由 T 菌将蛋白质、葡萄糖等物质发酵形成的。

参考文献

- [1] Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L., *et al.* (2007) Advances in Enhanced Biological Phosphorus Removal: From Micro to Macro Scale. *Water Research*, **41**, 2271-2300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.030>
- [2] Varga, E., Hauduc, H., Barnard, J., Dunlap, P., Jimenez, J., Menniti, A., *et al.* (2018) Recent Advances in Bio-P Modelling—A New Approach Verified by Full-Scale Observations. *Water Science and Technology*, **78**, 2119-2130. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.490>
- [3] Marques, R., Santos, J., Hien, N., Carvalho, G., Noronha, J.P., Nielsen, P.H., *et al.* (2017) Metabolism and Ecological Niche of *Tetrasphaera* and *Ca. Accumulibacter* in Enhanced Biological Phosphorus Removal. *Water Research*, **122**, 159-171. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.072>
- [4] Stokholm-Bjerregaard, M., McIlroy, S.J., Nierychlo, M., Karst, S.M., Albertsen, M. and Nielsen, P.H. (2017) A Critical Assessment of the Microorganisms Proposed to be Important to Enhanced Biological Phosphorus Removal in Full-Scale Wastewater Treatment Systems. *Frontiers in Microbiology*, **8**, Article No. 718. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00718>
- [5] Nielsen, P.H., McIlroy, S.J., Albertsen, M. and Nierychlo, M. (2019) Re-Evaluating the Microbiology of the Enhanced Biological Phosphorus Removal Process. *Current Opinion in Biotechnology*, **57**, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.03.008>
- [6] Kong, Y.H., Nielsen, J.L. and Nielsen, P.H. (2005) Identity and Ecophysiology of Uncultured Actinobacterial Polyphosphate-Accumulating Organisms in Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4076-4085. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4076-4085.2005>
- [7] Kristiansen, R., Hien Thi Thu, N., Saunders, A.M., Nielsen, J.L., Wimmer, R., Le, V.Q., *et al.* (2013) A Metabolic Model for Members of the Genus *Tetrasphaera* Involved in Enhanced Biological Phosphorus Removal. *The ISME Journal*, **7**, 543-554. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.136>
- [8] Herbst, F.-A., Dueholm, M.S., Wimmer, R. and Nielsen, P.H. (2019) The Proteome of *Tetrasphaera elongata* Is Adapted to Changing Conditions in Wastewater Treatment Plants. *Proteomes*, **7**, Article No. 16. <https://doi.org/10.3390/proteomes7020016>
- [9] Hien Thi Thu, N., Kristiansen, R., Vestergaard, M., Wimmer, R. and Nielsen, P.H. (2015) Intracellular Accumulation

- of Glycine in Polyphosphate-Accumulating Organisms in Activated Sludge, a Novel Storage Mechanism under Dynamic Anaerobic-Aerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 4809-4818.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01012-15>
- [10] Chen, Y., Lan, S., Wang, L., Dong, S., Zhou, H., Tan, Z., *et al.* (2017) A Review: Driving Factors and Regulation Strategies of Microbial Community Structure and Dynamics in Wastewater Treatment Systems. *Chemosphere*, **174**, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.129>
- [11] Shu, D., He, Y., Yue, H. and Wang, Q. (2016) Metagenomic and Quantitative Insights into Microbial Communities and Functional Genes of Nitrogen and Iron Cycling in Twelve Wastewater Treatment Systems. *Chemical Engineering Journal*, **290**, 21-30. <https://doi.org/10.1016/j.ccej.2016.01.024>
- [12] 吴成强, 杨金翠, 杨敏, 吕文洲. 运行温度对活性污泥特性的影响[J]. 中国给水排水, 2003, 19(9): 5-7.
- [13] Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic Identification and *in-Situ* Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**, 143-169.
<https://doi.org/10.1128/MR.59.1.143-169.1995>
- [14] Ju, F., Guo, F., Ye, L., Xia, Y. and Zhang, T. (2014) Multivariables Analysis on Seasonal Microbial Variations of Activated Sludge from a Full-Scale Wastewater Treatment Plant over 4 Years. *Environmental Microbiology Reports*, **6**, 80-89. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12110>
- [15] Chao, A., Ma, M.C. and Yang, M.C.K. (1993) Stopping Rules and Estimation for Recapture Debugging with Unequal Failure Rates. *Biometrika*, **80**, 193-201. <https://doi.org/10.1093/biomet/80.1.193>
- [16] Simpson, E.H. (1949) Measurement of Diversity. *Nature*, **163**, 688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- [17] Shannon, C.E. (1948) A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, **27**, 379-423.
<https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- [18] 叶佳松. 光暗环境下活性污泥的生长衰减与污染物去除研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 武汉科技大学, 2018.
- [19] Hiraishi, A., Ueda, Y. and Ishihara, J. (1998) Quinone Profiling of Bacterial Communities in Natural and Synthetic Sewage Activated Sludge for Enhanced Phosphate Removal. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 992-998.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.3.992-998.1998>
- [20] Ma, S.-J., Ding, L.-L., Huang, H., Geng, J.-J., Xu, K., Zhang, Y., *et al.* (2016) Effects of DO Levels on Surface Force, Cell Membrane Properties and Microbial Community Dynamics of Activated Sludge. *Bioresour. Technol.*, **214**, 645-652. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.132>
- [21] 贺赞, 李魁晓, 王佳伟, 王慰, 樊鹏超, 陈行行, 王军静. 不同季节城市污水处理厂微生物群落特性[J]. 环境科学, 2021, 42(3): 1488-1495.
- [22] Ye, L., Shao, M.-F., Zhang, T., Tong, A.H.Y. and Lok, S. (2011) Analysis of the Bacterial Community in a Laboratory-Scale Nitrification Reactor and a Wastewater Treatment Plant by 454-Pyrosequencing. *Water Research*, **45**, 4390-4398.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.028>
- [23] Narihiro, T., Terada, T., Kikuchi, K., Iguchi, A., Ikeda, M., Yamauchi, T., *et al.* (2009) Comparative Analysis of Bacterial and Archaeal Communities in Methanogenic Sludge Granules from Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactors Treating Various Food-Processing, High-Strength Organic Wastewaters. *Microbes and Environments*, **24**, 88-96.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME08561>
- [24] Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czek, M. and Michel, G. (2011) Environmental and Gut *Bacteroidetes*: The Food Connection. *Frontiers in Microbiology*, **2**, Article No. 93. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>
- [25] Zhang, D., Chen, Y., Zhao, Y. and Zhu, X. (2010) New Sludge Pretreatment Method to Improve Methane Production in Waste Activated Sludge Digestion. *Environmental Science & Technology*, **44**, 4802-4808.
<https://doi.org/10.1021/es1000209>
- [26] Kong, Y.H., Beer, M., Seviour, R.J., Lindrea, K.C. and Rees, G.N. (2001) Structure and Functional Analysis of the Microbial Community in an Aerobic: Anaerobic Sequencing Batch Reactor (SBR) with No Phosphorus Removal. *Systematic and Applied Microbiology*, **24**, 597-609. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00075>
- [27] Bertin, L., Bettini, C., Zanaroli, G., Fraraccio, S., Negroni, A. and Fava, F. (2012) Acclimation of an Anaerobic Consortium Capable of Effective Biomethanization of Mechanically-Sorted Organic Fraction of Municipal Solid Waste through a Semi-Continuous Enrichment Procedure. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **87**, 1312-1319.
<https://doi.org/10.1002/jctb.3809>
- [28] Mielczarek, A.T., Hien Thi Thu, N., Nielsen, J.L. and Nielsen, P.H. (2013) Population Dynamics of Bacteria Involved in Enhanced Biological Phosphorus removal in Danish Wastewater Treatment Plants. *Water Research*, **47**, 1529-1544.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.003>
- [29] 魏静婉. 龙王嘴污水处理厂进水碳源细分及其在中试系统中的迁移转化[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 武汉理工大学, 2012.

- [30] Fernando, E.Y., McLlroy, S.J., Nierychlo, M., Herbst, F.-A., Petriglieri, F., Schmid, M.C., *et al.* (2019) Resolving the Individual Contribution of Key Microbial Populations to Enhanced Biological Phosphorus Removal with Raman-FISH. *The ISME Journal*, **13**, 1933-1946. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0399-7>