

污水生物处理系统细菌衰减特征的实验研究

郝晓地, 朱景义, 曹秀芹, 曹亚莉

(北京建筑工程学院可持续环境生物技术研发中心, 北京 100044)

摘要:通过衰减速率测定实验和 LIVE/DEAD 细胞活性染色实验, 分析了污水生物处理系统中细菌在好氧环境下的衰减状态。研究发现, 细菌的衰减实质上是由生物量减少引起的数量衰减和由细胞活性降低引起的活性衰减两部分构成的。结果表明, 硝化系统细菌在衰减过程中由细胞活性降低引起的衰减约占 60%, 由细胞死亡引起的衰减约占 40%; 而在异养系统中由活性降低引起的衰减和由细胞死亡引起的衰减分别为 80% 和 20%。

关键词:污水生物处理; 细胞衰减; 细胞死亡; 活性降低; LIVE/DEAD 染色

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3104-06

Experimental Determination of Bacterial Decay Characteristics in Biological Wastewater Treatment System

HAO Xiao-di, ZHU Jing-yi, CAO Xiu-qin, CAO Ya-li

(The R & D Centre for Sustainable Environmental Biotechnology, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044, China)

Abstract: The characteristics of cell decay in biological wastewater treatment systems were investigated under aerobic condition, by measuring the decay rate and by determining the death rate with LIVE/DEAD dyeing experiments. It was found that cell decay in biological wastewater treatment systems can be actually described as two parts: decay caused by cell death and decay derived from activity decrease. The experimental results revealed that 60% of cell decay in a nitrifying system was caused by activity decrease and 40% was caused by cell death. In a heterotrophic system, however, activity decrease was responsible for 80% of cell decay, and the other cell decay for 20% was caused by cell death.

Key words: biological wastewater treatment; cell decay; cell death; activity decrease; LIVE/DEAD dyeing

在污水生物处理系统中, 细菌细胞衰减实质上可以分为由生物量减少引起的数量衰减和由细胞活性降低引起的活性衰减两部分。然而, 目前这一认识尚未得到足够重视。细菌细胞衰减过程关系到系统内生物量的多寡, 对系统稳定性以及总的处理能力有着重要影响。已有研究发现, 精确的衰减速率系数无论对污水生物处理系统设计还是优化都是非常重要的^[1, 2]。近年来, 随着污水生物处理工艺的广泛应用, 对细菌细胞衰减过程的研究也越来越受到人们的重视。系统中各类主要细菌的衰减速率系数被相继测定, 并被逐步应用到数学模型之中。总体上来说, 目前对污水生物处理系统中细菌细胞衰减研究还处于起步阶段。所谓细胞衰减, 是指那些能够引起生物体总量减少或导致生物体活性降低的过程^[3], 可分为由生物量减少(细胞死亡)而引起的数量衰减和由细胞活性降低而引起的活性衰减两部分。然而, 无论是现有数学模型还是实际工艺设计, 细胞衰减均被认为是由于细胞数量减少的结果, 并没有对数量衰减和活性衰减加以区别。显然, 这与微生物实际情况存在一定差距, 主要是由于现有衰减测定方法

尚无区分以上 2 种衰减^[4]。

在污水生物处理系统中底物匮乏饥饿状态是引起细胞衰减的一个主要原因。在饥饿状态下, 细菌细胞会通过一些策略应对这种不利的生存状态。细菌可能会调整自身代谢过程, 降低活性以减少维持能量需求, 出现活性衰减现象^[5]; 细菌也可能会启动程序化细胞死亡, 以维持部分细菌细胞的活性, 从而避免整个种群在竞争中失去优势^[6, 7], 呈现出数量衰减的特征。但是, 细菌究竟以哪种应对策略为主, 或者细菌是否同时利用、或者是顺序利用这些应对策略? 这些问题现在均尚不明确。本研究通过细菌衰减实验和 LIVE/DEAD 细胞活性实验, 从生物量减少的角度分别考察了污水生物处理系统中硝化细菌和常规异养细菌的衰减, 并根据总的衰减速率分析了由活性降低引起的细胞衰减, 以求深入认识污水生

收稿日期: 2007-12-30; 修订日期: 2008-02-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(50678017); 荷兰皇家科学院国际合作项目(03CDP008); 北京市属市管高等学校人才强教计划项目(BJE10016200611)

作者简介: 郝晓地(1960~), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为污水处理生物脱氮除磷技术、污水处理数学模拟技术和可持续环境生物技术, E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn

物处理系统中细菌细胞的衰减特征.

1 材料与方法

1.1 硝化系统

衰减实验所用硝化细菌泥样来自于实验室小型 SBR 硝化系统(图 1).SBR 反应器总体积 5 L,工作体积 4 L,HRT 为 12 h,SRT 控制为 10 d,工作周期 6 h,每天运行 4 个周期.1 个周期内分为混合、进料、反应、排泥、沉淀和排水 6 个阶段(表 1).SBR 反应器通过水浴设备控制温度,温度维持在 $(30 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$.反应器还安装了 pH 电极和 DO 电极,pH 控制在 7.3 ± 0.05 ;当 pH 因硝化反应降低时设备会自动加入适量 1 mol/L NaOH;DO 电极用于监控反应器内的 DO 变化.温度、pH、DO 等在线检测数据都通过计算机自动记录.

SBR 硝化系统接种污泥为北京某大型市政污水处理厂回流污泥.实验采用人工配水,进水中唯一

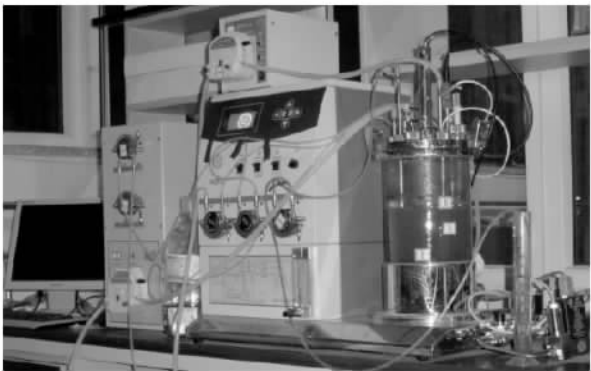


图 1 小型 SBR 硝化系统
Fig.1 Lab-scale SBR nitrifying system

的能源物质是 NH_4Cl (以 N 计),浓度为 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,负荷为 $400 \text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$.系统接种后 30 d 达到稳定状态,混合液悬浮固体(MLSS)约为 $(870 \pm 10) \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,出水悬浮固体(SS)约为 $(17 \pm 3) \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.2 异养系统

表 1 SBR 硝化系统的周期运行工况控制
Table 1 Cycling period of the SBR nitrifying system

混合	进料	反应	排泥	沉淀	排水
0~1 min	1~6 min	6~286 min	286~287 min	287~350 min	350~360 min
搅拌	搅拌、曝气	搅拌、曝气	搅拌、曝气	静置	静置

异养系统同样采用 SBR 式反应器,工作体积 100 L,每天进料 2 次,排水 1 次(50 L),水力停留时间 2 d.每天排混合液 10 L,控制 SRT 为 10 d.进料中碳源物质为 NaAc,每次 51.2 g,使系统内的 COD 达到 $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,COD 负荷为 $800 \text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$,氮源物质为 NH_4Cl (以 N 计),浓度约为 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

异养系统无控温装置,放置于室内环境,温度大约在 $23 \sim 25^{\circ}\text{C}$.通过曝气,系统内 DO 浓度维持在大于 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.系统接种污泥同样来自于北京某大型市政污水处理厂的回流污泥.污泥接种后约 20 d 系统达到稳定,此时 MLSS 为 $2\,440 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.3 衰减实验和衰减速率测定

衰减实验开始后,SBR 硝化反应器中停止混合、进料、排泥、沉淀和排水等过程,系统被控制在好氧曝气反应状态,曝气量同样为 $3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$,温度控制在 30°C 和 pH 为 7.3 ± 0.05 .对于异养系统,也停止进料、换水和排泥等过程,系统被维持在好氧曝气状态,温度为室温.在衰减过程内,每天要分别给 2 个系统适量补水,以补偿水分蒸发造成的数量损失.

本实验中细菌衰减速率测定是通过测定最大耗氧速率(OUR)的变化来确定.在衰减实验开始当天,开始后 1、3、5 和 7 d,分别从反应器中取泥样在加入

底物的条件下测定相应细菌的最大 OUR;OUR 测定在水封瓶中(300 mL)进行,测试设备为 DO 消耗速率测定仪(YSI,5100).测试之前,需对泥样合理稀释并曝气以保证充足的 DO.测试过程中,水封瓶被放置在恒温水浴箱内,对 2 类细菌分别保持恒定的 30°C 和 25°C .

硝化细菌耗 OUR 测定分 3 个阶段进行^[8](图 2),各阶段测试时间分别为 5、5 和 3 min.首先,测定内源呼吸阶段 OUR,此时不加入底物,测得 OUR_1 .然后,测定 NO_2^- 氧化细菌(NO₂B)最大 OUR,此时向水封瓶中加 3 mL NaNO_2 溶液,使其中的 NO_2^- 浓度(以 N 计)达到 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,测得耗 OUR_2 .最后,测定 NH_4^+ 氧化细菌(AOB)最大 OUR,此时向水封瓶中加 3 mL NH_4Cl 溶液,使其中的 NH_4^+ 浓度(以 N 计)达到 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,测得 OUR_3 .根据各阶段测定数据,根据公式(1)~(4)分别计算 NOB 和 AOB 的最大 OUR 和衰减速率.其中, R_1 为泥样衰减后的最大 OUR, R_0 为泥样衰减前的最大 OUR, t_d 为衰减时间(d).

内源呼吸 $\text{OUR} = \text{OUR}_1$ (1)

NOB 最大 $\text{OUR} = \text{OUR}_2 - \text{OUR}_1$ (2)

AOB 最大 $\text{OUR} = \text{OUR}_3 - \text{OUR}_2$ (3)

衰减速率 (b) = -ln(R_t/R₀) × 1/t_d (4)

异养系统中泥样的最大 OUR 测定较为简单: 60 mL 泥样和 6 mL 高浓度的 NaAc 溶液被同时加入水封瓶, 然后再加入曝气过的 25℃ 左右的清洗液, 这样水封瓶中 COD 浓度为 400 mg•L⁻¹ (也即异养系统中进料后的 COD 浓度). 随后, 水封瓶被放置在 25℃ 的恒温水浴中测定 OUR. 此时所得的 OUR 即为泥样中异养细菌的最大 OUR.

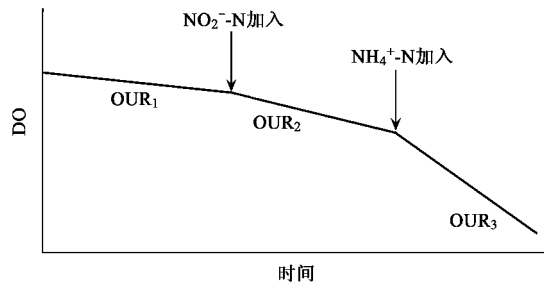


图 2 硝化细菌 OUR 测定方法
Fig.2 Methodology measuring OUR of nitrifying bacteria

1.4 LIVE/DEAD 荧光染色实验

采用荧光染料对衰减过程中的泥样染色, 以确定泥样衰减过程中活细菌细胞占总细菌细胞数量比例的变化规律. 所用荧光染料为 LIVE/DEAD[®] BacLight[™] 细菌活性试剂 (molecular probes, L-7012). 该试剂包含绿荧光核酸染料 SYTO[®] 9 和红荧光核酸染料 PI (propidium iodide) 2 种荧光染料试剂, 分别标记具有完整细胞壁的活细胞和细胞壁已经破损的死细胞.

染色实验的步骤较为简单方便^[9]. 每次取待测泥样 1 mL 于 5 mL 的塑料试剂管中, 分别加入 1.5 μL SYTO[®] 9 和 1.5 μL 的 PI 试剂, 混合均匀后于室温下暗处放置 15 min, 使染色反应完全. 然后, 用染

色泥样制作玻片, 在荧光显微镜下观测拍照 (Zeiss Axioskop 40). 所用的荧光滤光片为显微镜配套的 09 号滤光片 (激发光波长 450 ~ 490 nm, 吸收光波长 LP515 nm, 观测绿荧光) 和 15 号滤光片 (激发光波长 546 nm ± 12 nm, 吸收光波长 LP590 nm, 观测红荧光). 实验过程中使用显微镜附带的数码相机实时拍摄泥样的红绿 2 组荧光照片, 并通过 AxioVision 软件对荧光照片做灰度分析, 最后可分别得出绿荧光和红荧光的灰度值. 根据这些数值, 可以计算出绿荧光灰度值占总荧光灰度值的比例, 此即为泥样中活细菌细胞占总细菌细胞的比值.

实验中分别对衰减过程中的硝化系统泥样和异养系统泥做了 LIVE/DEAD 染色分析, 取样时间分别为衰减开始的当天, 衰减 1、3、5 和 7 d. 每个工况下拍摄荧光照片 5 组, 最终的数值为从这 5 组照片所得数值的平均值.

2 结果与讨论

2.1 硝化系统

2.1.1 细菌的衰减速率

图 3 为 NOB 和 AOB 好氧衰减过程中 OUR 的变化规律. 可以看出, NOB 在衰减开始后的 1 d 内其活性迅速下降, 超过了 50%, 而在随后 6 d 的衰减时间内其活性则平缓下降. 而 AOB 在衰减过程中其活性基本呈现匀速下降的趋势, 在各个衰减时间段内的衰减速率差异不大. 根据公式 (1) ~ (4), 可计算得出 NOB 在 1 d 的衰减速率为 0.83 d⁻¹, 2 ~ 6 d 的衰减速率为 0.27 d⁻¹, 而 7 d 的平均衰减速率为 0.35 d⁻¹, 而 AOB 在 7 d 内的平均衰减速率为 0.14 d⁻¹. 此外, 根据 OUR 测试实验, 异养细菌和高等微生物的在衰减过程中其内源呼吸速率 (即 OUR_i) 无明显变化, 因而可以认为这 2 种微生物的衰减速率基本为 0.

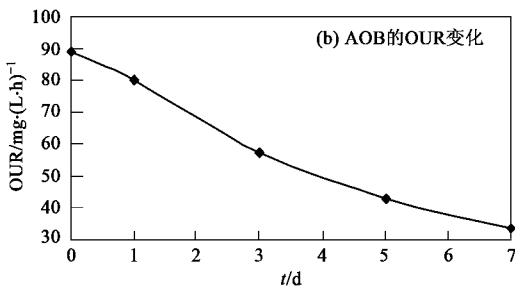
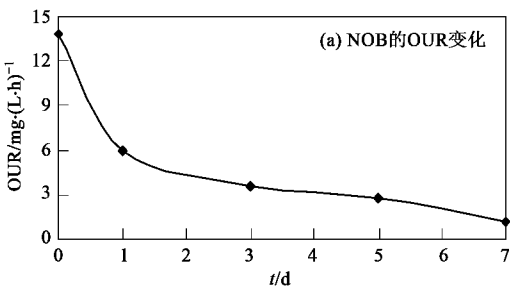


图 3 好氧衰减过程中 NOB 和 AOB 的 OUR 变化
Fig.3 OUR variation of NOB and AOB under aerobic decay

由于现有实验技术尚不能准确测定系统内各种细菌的质量分数,因而对于硝化系统内总生物量的衰减速率很难通过实验方法获得. Moussa 等^[10]通过对以氨氮为唯一进水能源底物的硝化系统进行数学模拟发现, SRT 是影响各类细菌质量分数的主要因素, 在 SRT 为 10 d 的硝化系统内 AOB 是主要微生物, 约占总生物量 50%, 而 NOB 约占总生物量 20%, 剩余 30% 为异养细菌和高等微生物. 因此, 可以粗略估算出硝化系统中总生物量的平均衰减速率(b_A):

$$b_A = 0.14 \times 50\% + 0.35 \times 20\% = 0.14 \text{ d}^{-1} \quad (5)$$

2.1.1.2 硝化系统细菌的死亡速率

图 4 所示为硝化系统泥样衰减过程中的 LIVE/DEAD 染色照片. 可以看出, 随着衰减过程的继续, 代表活细胞的绿色区域逐渐减少, 而代表死细胞的红色区域相应增加. 根据进一步的图片灰分分析, 可得如图 5 所示的活细胞比例的变化规律. 图 5 说明硝化系统泥样在衰减过程中活细胞在总细胞数量中的比例呈匀速下降的趋势, 故可认为好氧衰减过程中硝化系统泥样中的细胞死亡是匀速的, 也即由数量减少引起的衰减是匀速的. 考虑到泥样中的生物体总量会因细胞自溶以及高等微生物的捕食而减少, 本实验对衰减开始时和衰减完成后泥样的

MLVSS 进行了测定, 分别为 $760 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $655 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 根据活细胞比例的变化并结合 MLVSS 的变化, 可以分别计算出衰减开始时和衰减结束后泥样中活细胞的量: 开始时 $760 \times 41.7\% = 317 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 结束后 $655 \times 32.7\% = 214 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 根据公式(4), 此时把 R 定义为活细胞的量, 可计算出硝化系统中泥样在衰减过程中活细胞的死亡速率为:

$$b_{\text{Active A}} = -\ln \frac{214}{317} \times \frac{1}{7} = 0.056 \text{ d}^{-1} \quad (6)$$

通过对比硝化系统中活细胞的死亡速率和总细菌细胞的平均衰减速率, 可以看出, 硝化系统泥样在衰减过程中活细胞的死亡速率低于总细菌细胞的平均衰减速率. 这说明, 硝化系统泥样在好氧衰减过程中, 由数量减少引起的衰减只占其总衰减量较小的一部分 (约为 $0.056/0.14 = 40\%$), 而绝大部分 (60%) 是因细胞的活性衰减而引起的. 显然, 目前以耗氧速率或以底物分解速率为基础的测定方法并不能够区分出数量衰减和活性衰减, 这也就是目前实际应用中将 2 种衰减混为一谈的原因. 例如, 现有活性污泥数学模型将细胞衰减都假设为由细胞死亡所引起, 如果不考虑参数(衰减系数)适当校正, 势必导致模拟结果与实际情况出现一定偏差.

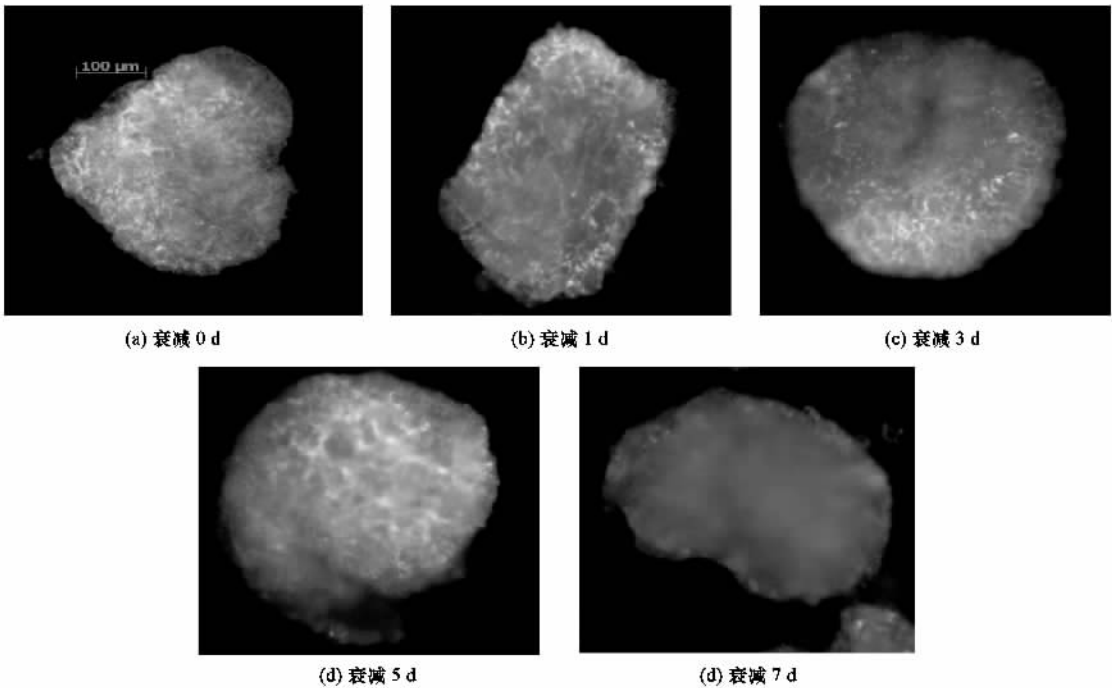


图 4 硝化系统泥样衰减过程中的 LIVE/DEAD 染色照片
Fig.4 LIVE/DEAD dyeing photos of nitrifying sludge

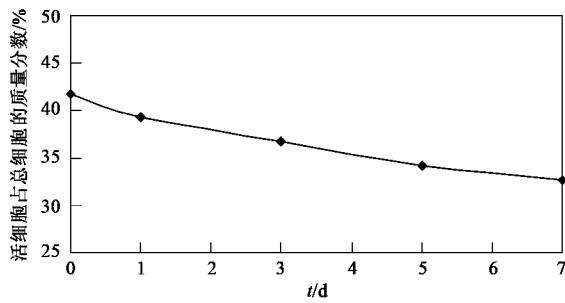


图5 硝化系统泥样衰减过程中活细胞比例的变化规律
Fig.5 Changing ratio of living cells in nitrifying sludge under aerobic decay

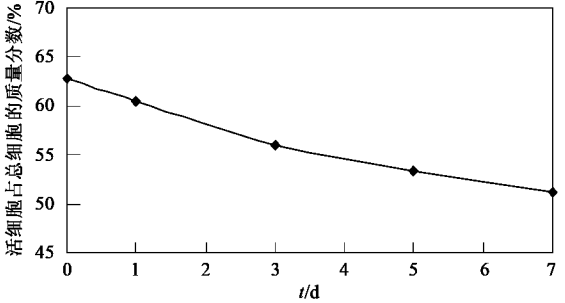


图7 异养系统泥样衰减过程中活细胞比例的变化规律
Fig.7 Changing ratio of living cells in heterotrophic sludge under aerobic decay

2.2 异养系统

图6所示为异养系统内异养细菌在衰减过程中最大OUR的变化.可以看出,异养细菌的好氧衰减也呈匀速状态,这和硝化系统中AOB的衰减规律相似.根据公式(4),可计算出异养细菌的衰减速率为:

$$b_H = -\ln \frac{56.4}{259.2} \times \frac{1}{7} = 0.22 \text{ d}^{-1} \quad (7)$$

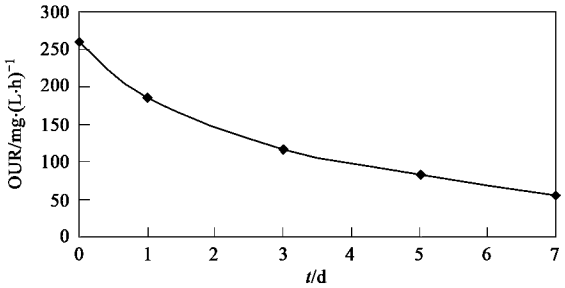


图6 好氧衰减过程中异养细菌 OUR 变化
Fig.6 OUR variation of heterotrophic organisms under aerobic decay

图7所示为通过 LIVE/DEAD 染色所得出的异养系统泥样在好氧衰减过程中活细胞比例的变化规律.可以看出,活细胞在总细胞中所占的比例也呈匀速下降的趋势.同样考虑到系统内总生物体量的变化,测得衰减开始时泥样的 $MLVSS = 2190 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而衰减结束后泥样的 $MLVSS = 1945 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 因而异养系统中活细胞的死亡率为:

$$b_{Active H} = -\ln \frac{1970 \times 0.511}{2190 \times 0.628} \times \frac{1}{7} = 0.045 \text{ d}^{-1} \quad (8)$$

这一数值与硝化系统中测得的活细胞死亡速率相差不大.但需要指出的是,与硝化系统相比,异养系统中由细胞死亡引起的衰减仅占 $0.045/0.22 = 20\%$ 左右,而硝化系统中却达到了 40% , 这一差别是非常明显的. Lavallee 等^[11] 也曾在来自市政污水处

理厂实际污泥的好氧衰减实验中发现,异养细菌的衰减很大一部分是由细胞内的酶调节(enzymatic regulation)引起的,即由细胞死亡引起的部分非常小.这可能是由异养细菌和硝化细菌自身特点的不同造成的.异养细菌在外源底物存在的条件下能够迅速贮存外源底物,形成胞内聚合物.当外源底物耗尽时,异养细菌使用胞内聚合物实现生长和细胞维持.而在长时间的饥饿条件下,异养细菌甚至能够氧化分解蛋白质、RNA 等细胞组织以提供能量避免死亡.而硝化细菌不能在细胞内贮存底物,也不能利用胞内组织,其细胞维持所需的所有能量都来自于对外源底物的分解.因此,当衰减实验开始后,异养细菌受到的冲击较小,所以其衰减可主要表现在活性的降低而不是细胞的死亡;而硝化细菌由于没有可用于产生细胞维持能量的能源底物,因而受到的冲击可能较大,其细胞死亡现象可能会大量出现.此外,也可能出现这样的情况,即异养系统内异养细菌在衰减过程中的确出现了大量的细胞死亡现象,但是由于异养细菌能够分解自身细胞的死亡自溶体,所以能够获取底物实现二次生长,即所谓的隐性生长.显然,隐性生长生成了新的活性细胞体,补偿了衰减过程中活细胞的死亡,因而在表现上会使得异养系统内活细胞的死亡比例下降. Mason 等^[12] 曾测得细菌 *Klebsiella pneumoniae* 隐性生长的产率系数 $[m(\text{COD})/m(\text{COD})]$ 为 $0.42 \sim 0.52$. 因此,在考察异养细菌的细胞衰减时,应当对异养细菌隐性生长的过程给与足够的重视.

3 结论

(1)在污水生物处理系统中,细菌细胞的衰减实质上可以分为由生物量减少(细胞死亡)引起的数量衰减和由细胞活性降低引起的活性衰减两部分.目

前,这一认识尚未得到足够重视.

(2)通过衰减速率测定实验和 LIVE/DEAD 细胞活性染色实验,测得硝化系统细菌在衰减过程中由细胞活性降低引起的衰减约占 60%,而由细胞死亡引起的衰减约占 40%.

(3)在异养系统中,由细胞活性降低引起的衰减占 80%,而由细胞死亡引起的部分仅占 20%.这可能是由于异养细菌具有贮存底物的能力,因而能够更好地适应衰减环境;也可能是由于异养细菌能够进行隐性生长,生成新的活性细胞,因而补偿了衰减过程中活性细胞的死亡.

参考文献:

[1] Dold P L, Jones R M, Bye C M. Importance and measurement of decay rate when assessing nitrification kinetics[J]. Water Sci Tech, 2005, **52**(10-11): 469-477.

[2] Salem S, Berends D H J G, van der Roest H F, *et al.* Full-scale application of the BABE® technology[J]. Water Sci Tech, 2004, **50**(7): 87-96.

[3] van Loosdrecht M C M, Henze M. Maintenance, endogenous respiration, lysis, decay and predation[J]. Water Sci Tech, 1999, **39**(1): 107-117.

[4] Manser R, Gujer W, Siegrist H. Decay processes of nitrifying

bacteria in biological wastewater treatment systems[J]. Water Res, 2006, **40**: 2416-2426.

[5] Arbrige M, Chesbro W R. Very slow growth of *Bacillus polymyxa*: stringent responses and maintenance energy [J]. Arch Microbiol, 1982, **132**: 338-344.

[6] Yarmolinsky M B. Programmed cell death in bacterial populations [J]. Science, 1995, **267**: 836-837.

[7] Lewis K. Programmed death in bacteria[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, **64**: 503-514.

[8] Moussa M S, Lubberding H J, Hooijmans C M, *et al.* Improved method for determination of ammonia and nitrite oxidation activities in mixed bacterial cultures[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, **63**: 217-221.

[9] Invitrogen Molecular Probes. LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kits. Manuals and product inserts[EB/OL]. 2004. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07007.pdf>.

[10] Moussa M S, Hooijmans C M, Lubberding H J, *et al.* Modeling nitrification, heterotrophic growth and predation in activated sludge [J]. Water Res, 2005, **39** (20): 5080-5098.

[11] Lavallee B, Lessard P, Besser C. Decay rate variability of active heterotrophic biomass[J]. Water Sci Technol, 2002, **46**(1-2): 423-430.

[12] Mason C A, Hamer G. Cryptic growth in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, **25**(6): 577-584.