

郝晓地, 张向萍, 曹亚莉, 等. 2009 利用分子生物等技术确定活性污泥硝化细菌的衰减特征 [J]. 环境科学学报, 29(10): 2033– 2040
Hao X D, Zhang X P, Cao Y L, *et al*. 2009 Determining the decay characteristics of nitrifying bacteria in activated sludge using molecular biological techniques[J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(10): 2033– 2040

利用分子生物等技术确定活性污泥硝化细菌的衰减特征

郝晓地^{*}, 张向萍, 曹亚莉, 王启林

北京建筑工程学院可持续环境生物技术研发中心, 北京 100044
收稿日期: 2009-02-19 修回日期: 2009-04-30 录用日期: 2009-08-12

摘要: 通过常规耗氧速率 (OUR)测定方法、荧光原位杂交技术 (FISH)和 LIVE /DEAD 细胞活性实验, 分别研究了序批式反应器 (SBR)硝化系统和生物营养物去除 (BNR)系统中硝化细菌的好氧衰减特征. 实验结果表明, SBR 硝化系统中硝化细菌在衰减过程中由细胞死亡引起的衰减分别占细胞总衰减的 33% (SRT = 10 d)和 50% (SRT = 40 d); 相应地, 由活性降低引起的衰减分别占细胞总衰减的 67% (SRT = 10 d)和 50% (SRT = 40 d). 长 SRT 可能会选择出能够更好地适应饥饿状态的硝化菌种, 使细菌能够迅速地做出紧迫反应, 从而降低其衰减速率. 在 BNR 系统中 (SRT = 15 d), 硝化细菌在衰减过程中由细胞死亡引起的衰减约占细胞总衰减的 45%, 由活性降低引起的衰减约占细胞总衰减的 55%. 两种系统中硝化细菌由细胞死亡引起的衰减比例不同是由于两种系统中不同微生物组成所致.
关键词: 活性污泥; 细胞衰减; 细胞死亡; 活性衰减; 耗氧速率 (OUR); 荧光原位杂交 (FISH); LIVE /DEAD 染色

文章编号: 0253-2468 (2009) 10-2033-08 中图分类号: X703. 1 文献标识码: A

Determining the decay characteristics of nitrifying bacteria in activated sludge using molecular biological techniques

HAO Xiaodi^{*}, ZHANG Xiangping, CAO Yali, WANG Qilin

The R & D Centre for Sustainable Environmental Biotechnology, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044
Received 19 February 2009; **received in revised form** 30 April 2009; **accepted** 12 August 2009

Abstract The aerobic decay characteristics of nitrifying bacteria in a nitrifying sequencing batch reactor (SBR) and a biological nutrient removal (BNR) system were investigated by measuring maximal oxygen uptake rates (OURs), analyzing 16S rRNA with fluorescence in-situ hybridization (FISH) and observing membrane integrity by LIVE /DEAD staining. The experimental results reveal that in the nitrifying SBR system, cell death was responsible for 33% of cell decay at SRT = 10 d and for 50% at SRT = 40 d. In other words, the activity decay contributed 67% and 50% of the total cell decay at SRT = 10 and 40 d respectively. A longer SRT should select for nitrifying bacteria better adapted to starvation conditions, and thus the selected nitrifying bacteria could quickly produce a stringent response. As a result, a reduced decay rate of the selected nitrifying bacteria is expected. In the BNR system (SRT = 15 d), the cell death was responsible for 45% of the total cell decay for nitrifying bacteria, and thus the activity decay accounted for 55% of the total cell decay. The different fractions of cell death of nitrifying bacteria in the two systems could be caused by different microbial compositions in the SBR and BNR systems.
Keywords activated sludge; cell decay; cell death; activity decay; oxygen uptake rate (OUR); fluorescence in-situ hybridization (FISH); LIVE /DEAD staining

1 引言 (Introduction)

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, 可分为由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 (Mason *et al*, 1986; van Loosdrecht

et al., 1999; Manser *et al.*, 2006). 显然, 细胞衰减直接关系到活性污泥中生物量的多寡, 对系统的稳定性以及总的处理能力有着重要影响. 近年来, 随着生物营养物去除 (Biological Nutrient Removal, BNR) 工艺的应用, 对细菌细胞衰减速率的测定, 特别是对生长速率缓慢的硝化细菌衰减速率的测定越来越受到业内人士的关注与重视 (Siegrist *et al.*, 1999; Lavallee *et al.*, 2002). 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死亡所引起的数量衰减, 并没有对数量衰减和活性衰减加以区别 (Henze *et al.*, 1987, 1999; Gujer *et al.*, 1995, 1999). 显然, 这与微生物实际情况存在一定差距, 这主要是由于传统衰减测定方法尚无法区分以上两种衰减 (Manser *et al.*, 2006).

在活性污泥系统中, 饥饿状态是引起细胞衰减的一个主要原因. 在饥饿状态下, 细菌细胞通常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, 从而出现活性衰减现象 (紧迫反应) (Ahrig *et al.*, 1982; Lavallee *et al.*, 2002). 细菌也可能会启动程序化细胞死亡 (Programmed Cell Death, PCD), 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, 呈现出数量衰减的特征 (Yamolsky, 1995). 同时, 活性污泥系统中高等微生物的捕食、病毒感染以及其它一些不利因素 (如温度、pH、毒性物质等) 也会对细菌的生存和活性造成一定的影响 (Mason *et al.*, 1986; Suttle, 1994; van Loosdrecht *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003).

但是, 细菌究竟以哪种应对策略为主, 或者细菌是同时利用、还是顺序利用这些应对策略? 这些问题目前均尚不明确. 本研究通过常规耗氧速率 (Oxygen Uptake Rate, OUR) 测定方法、荧光原位杂交技术 (Fluorescence in-situ hybridization, FISH) 以及 LIVE/DEAD 细胞活性实验, 分别研究了一序批式反应器 (Sequencing Batch Reactor, SBR) 硝化系统和一 BNR 系统中硝化细菌在好氧环境下的衰减特征, 分析了硝化细菌由细胞死亡引起的数量衰减和由活性降低引起的活性衰减在细胞总衰减中所占比例. 希望藉此研究, 进一步加深对活性污泥系统中硝化细菌细胞衰减特征的认识.

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 SBR 硝化系统

实验硝化细菌来源之一为实验室小型 SBR 硝

化系统 (发酵罐) 中微生物泥样. SBR 硝化系统运行与控制参见郝晓地等 (2008a, 2008b) 已发表文献. 本实验选择两种相差较大的污泥龄 (Sludge Retention Time, SRT = 10 和 40 d) 培养硝化污泥, 分别研究其硝化衰减特性.

2.2 BNR 系统

实验硝化细菌另一来源为实验室规模 BNR 工艺——生物/化学除磷脱氮工艺 (Biological/Chemical Phosphorus and Nitrogen Removal, BCFS) 系统中微生物泥样. BCFS 系统工艺流程以及运行控制等参见郝晓地等 (2009) 已发表论文.

2.3 衰减实验和衰减速率测定

本实验中细菌衰减速率是通过测定最大 OUR 变化来确定的. 在衰减实验开始当天及开始后 1、3、5 和 7 d, 分别从反应器中取泥样并在加入底物的条件下测定相应细菌的最大 OUR (郝晓地等, 2008a, 2008b).

硝化细菌消耗 OUR 测定分 3 个阶段进行 (图 1), 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, 测定亚硝酸盐氧化细菌 (Nitrite Oxidizing Bacteria, NOB) 最大 OUR, 此时向水封瓶中加入 3 mL $NaNO_2$ 溶液, 使其中的 NO_2^- 浓度达到 20 mg L^{-1} (以 N 计), 测得 OUR_2 . 最后, 测定氨氧化细菌 (Ammonium Oxidizing Bacteria, AOB) 最大 OUR, 此时向水封瓶中加入 3 mL NH_4Cl 溶液, 使其中的 NH_4^+ 浓度达到 100 mg L^{-1} (以 N 计), 测得 OUR_3 . 根据各阶段测定数据, 按公式 (1)、(2)、(3) 和 (4) (Salem *et al.*, 2006) 分别计算 NOB 和 AOB 的最大 OUR 和衰减速率. 其中, b 为细菌衰减速率 (d^{-1}), R_t 为泥样衰减后的最大 OUR ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), R_0 为泥样衰减前的最大 OUR ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), t_0 为衰减时间 (d).

异养系统中泥样的最大 OUR 测定较为简单: 60

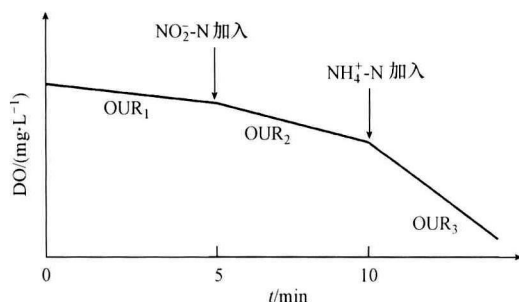


图 1 硝化细菌 OUR 测定方法

Fig. 1 Methodology for measuring OUR of nitrifying bacteria

mL泥样和 6 mL高浓度 (20 g L⁻¹)的 NaAc溶液及 1.5 mg硝化抑制剂 (allylthiourea ATU)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为 400 mg L⁻¹ (也即异养系统中进料后的 COD值). 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.

$$OUR_{\text{内源呼吸}} = OUR_1 \tag{1}$$

$$OUR_{\text{NOB, max}} = OUR_2 - OUR_1 \tag{2}$$

$$OUR_{\text{AOB, max}} = OUR_3 - OUR_2 \tag{3}$$

衰减速率
$$b = - \ln \frac{R_t}{R_0} \times \frac{1}{t_d} \tag{4}$$

2.4 荧光原位杂交 (FISH)实验

FISH用于确定 SBR硝化系统和 BNR系统中硝化细菌 (AOB、NOB) 所占比例 (Amann, 1995; Wagner *et al.*, 1996). 首先将泥样取出并用质量分

数为 4%的多聚甲醛固定 2 h, 再对固定后的泥样离心并在 1倍 PBS中重新悬浮 (重复 3次); 然后对泥样进行机械破碎, 将破碎泥样滴加在明胶包被的载破片上, 再用 50%、80%和 98%酒精分别浸泡 3 min. 将荧光标记的核苷酸探针 (见表 1)溶解于杂交缓冲液中 (组成: 0.9 mol L⁻¹ NaCl, 0.02 mol L⁻¹ Tris-HCl (pH = 7.4), 0.01% (质量分数) SDS和去离子甲酰胺 (De-ionized formamide, DFA))在 46℃下与污泥样品杂交 2 h. 杂交结束后, 采用清洗液 (组成: 0.005 mol L⁻¹ EDTA (pH = 8.0), 0.02 mol L⁻¹ Tris-HCl (pH = 7.4), 0.01% (质量分数) SDS和 NaCl)在 48℃下洗脱 30 min. 最后, 对每个污泥样品用荧光显微镜 (Zeiss Axioskop 40)随机拍摄 15组照片用于定量分析.

表 1 核苷酸探针
Table 1 16S rRNA targeted oligonucleotide probes

探针	检测目标	5'标记	DFA	NaCl/ (mol L ⁻¹)	参考文献
EUB338-I*	Bacteria	FITC	*	*	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338-II*	Bacteria	FITC	*	*	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338-III*	Bacteria	FITC	*	*	Daims <i>et al.</i> , 1999
NIT3	<i>Nitrobacter</i> sp (亚硝化杆菌属)	TAMRA	40%	0.056	Wagner <i>et al.</i> , 1996
Nitsoa662	<i>Nitrospira</i> sp (亚硝化螺菌属)	TAMRA	35%	0.08	Daims <i>et al.</i> , 2000
Nso1225	Amm onia-oxidizing β - <i>Proteobacteria</i>	TAMRA	35%	0.18	Mobarry <i>et al.</i> , 1996

注: * EUB338-I、EUB338-II和 EUB338-III使用时以 1:1:1(体积比)的比例混合 (称为 EUB_{m ix}), 其 DFA和 NaCl浓度等于与其混合的另一种探针的 DFA和 NaCl浓度.

2.5 LIVE/DEAD 细胞活性实验

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. 该试剂包含绿荧光核酸染料 SYTO[®]9和 红荧光核酸染料 PI两种荧光染料试剂, 分别标记具有完整细胞膜的活细胞和细胞膜已经破损的死细胞. 取待测泥样 1 mL于 5 mL的塑料试剂管中, 分别加入 1.5 μ L SYTO[®]9和 1.5 μ L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 (Zeiss Axioskop 40)下观测拍照 (10组), 并通过 AxioVision软件对荧光照片作面积分析 (郝晓地等, 2008a).

3 结果 (Results)

对两种系统中硝化细菌分别进行 OUR_s、FISH以及 LIVE/DEAD实验测试/鉴定, 硝化细菌衰减特征参数可根据实验结果计算得出.

3.1 SBR 系统中硝化细菌衰减

3.1.1 OUR测定结果 利用常规 OUR测定方法所测得的 NOB、AOB活性变化趋势如图 2所示. 由图 2可见, 不同 SRT下, 两种细菌在好氧饥饿状态下的衰减特征有着明显的不同. SRT= 10 d时, NOB和 AOB在整个衰减时期内其活性平缓下降, 而 SRT= 40 d时虽然 NOB的活性是均匀下降的, 但 AOB在第 1 d衰减比较明显, 之后活性才呈均匀下降趋势. 根据公式 (4)可计算出 NOB在 7d衰减期内的平均衰减速率为 0.33 d⁻¹ (SRT= 10 d)和 0.11 d⁻¹ (SRT= 40 d), AOB在 7d衰减期内的平均衰减速率

为 0.14 d^{-1} (SRT = 10 d)和 0.10 d^{-1} (SRT = 40 d).

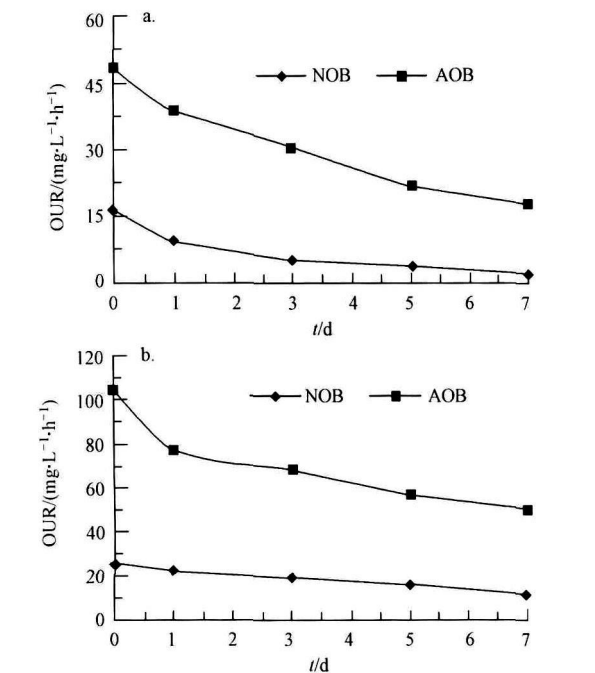


图 2 好氧衰减过程中 NOB、AOB 的 OUR 变化 (a SRT= 10 d
b SRT= 40 d)
Fig 2 OUR s of NOB and AOB during the process of aerobic decay
(a SRT= 10 d b SRT= 40 d)

3.1.2 FISH 实验结果 SBR 系统中的 FISH 测定结果如图 3 所示. 由图 3 可见, 在衰减过程中, 活硝

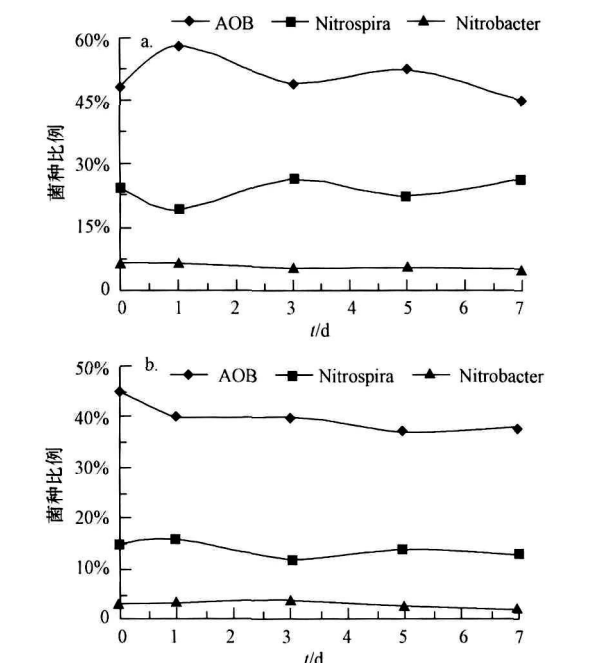


图 3 SBR 硝化系统中活硝化细菌占总活生物量比例 (a
SRT= 10 d b SRT= 40 d)
Fig 3 Fractions of viable nitrifying bacteria in the nitrifying SBR
system (a SRT= 10 d b SRT= 40 d)

化细菌占总活生物量的比例并无明显规律. 根据图 3 可计算出 NOB(*Nitrobacter* 与 *Nitrospira*)和 AOB 在 7 d 衰减期间内的平均比例, 结果如表 2 所示.

表 2 活硝化细菌占总活生物量平均比例

硝化细菌		占总活生物量的比例	
种属	类	SRT= 10 d	SRT= 40 d
NOB	<i>Nitrobacter</i> spp.	6%	3%
	<i>Nitrospira</i> spp.	24%	14%
AOB	Ammonia-oxidizing <i>β-Proteobacteria</i>	50%	40%

结合 OUR 及 FISH 结果, SBR 系统中硝化细菌的衰减速率 b 可按公式 (5) 最终确定:

$$b = (b_{AOB} \times F_{AOB} + b_{NOB} \times F_{NOB}) / F_T \quad (5)$$

式中, b_{AOB} 为 AOB 的衰减速率 (d^{-1}); F_{AOB} 为活 AOB 占总活细菌的比例; b_{NOB} 为 NOB 的衰减速率 (d^{-1}); F_{NOB} 为活 NOB 占总活细菌的比例; F_T 为活 AOB 与 NOB 占总活细菌的总比例.

SRT= 10 d

$b = (0.14 \times 50\% + 0.33 \times 30\%) / 80\% = 0.21\text{ d}^{-1}$

SRT= 40 d

$b = (0.10 \times 40\% + 0.11 \times 17\%) / 57\% = 0.10\text{ d}^{-1}$

3.1.3 LIVE / DEAD 细胞活性实验结果 LIVE / DEAD 细胞活性实验测定结果见图 4

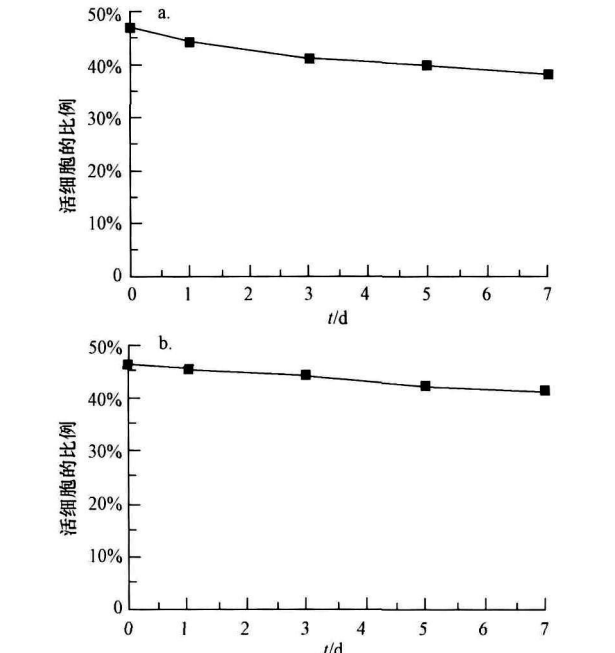


图 4 SBR 系统硝化细菌衰减过程中活细胞比例变化规律 (a
SRT= 10 d b SRT= 40 d)
Fig 4 Fractions of viable cells in the nitrifying SBR during the decay
experiment (a SRT= 10 d b SRT= 40 d)

由图 4可知, 在衰减过程中, SBR 系统中泥样的活细胞比例呈匀速下降趋势. 由于泥样中生物体总量会因细胞自溶、病毒感染以及高等微生物的捕食等而减少, 所以, 本实验对衰减过程中的污泥浓度 (MLVSS)进行了测定 (3次, 取平均值). 因为在活性污泥中高等微生物通常最多占污泥含量的 5% (Curds, 1982; Eikelboom, 1988), 所以, 在计算中, 高等微生物的浓度可以忽略不计. 因此, 结合 MLVSS FISH 以及 LIVE /DEAD 测定结果, 根据公式 (6), 可得出 SBR 系统中硝化细菌在衰减过程中的死亡规律, 结果如图 5所示.

$$X_A = M \times V \times F \tag{6}$$

式中, X_A 为活硝化细菌的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); M 为污泥浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); V 为活细菌占总细菌的比例; F 为活硝化细菌占总活生物量的比例, 即 FISH 测定结果.

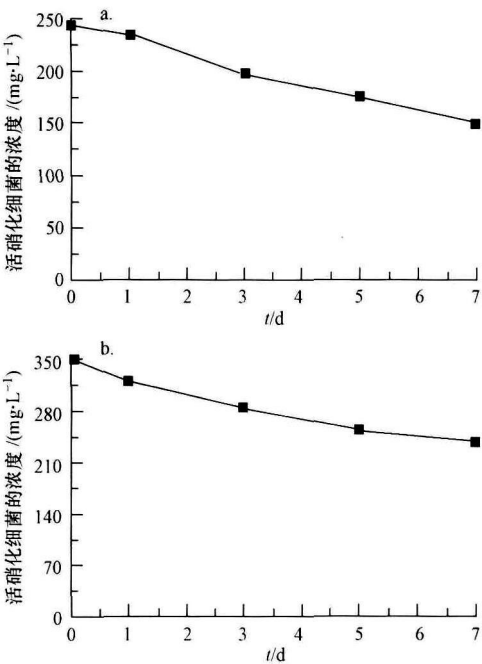


图 5 SBR系统中活硝化细菌在衰减过程中浓度变化 (a SRT= 10 d b SRT= 40 d)
Fig 5 Concentrations of viable nitrifiers in the nitrifying SBR during the decay experiment (a SRT= 10 d b SRT= 40 d)

由图 5可知, SBR 系统中硝化细菌在衰减过程中活细胞的比例也呈匀速下降的趋势. 根据公式 (4)可计算出 SBR 硝化系统中硝化细菌的死亡速率.

$$\text{SRT} = 10 \text{ d}$$

$$b_A = - \ln \frac{R_t}{R_0} \times \frac{1}{t_d} =$$
$$- \ln \frac{520 \times 38\% \times 76\%}{655 \times 47\% \times 79\%} \times \frac{1}{7} = 0.07 \text{ d}^{-1}$$
$$\text{SRT} = 40 \text{ d}$$
$$b_A = - \ln \frac{R_t}{R_0} \times \frac{1}{t_d} =$$
$$- \ln \frac{1100 \times 41\% \times 53\%}{1200 \times 46\% \times 63\%} \times \frac{1}{7} = 0.05 \text{ d}^{-1}$$

因此, 在 SRT= 10 d和 SRT= 40 d时, SBR硝化系统中硝化细菌由细胞死亡所引起的衰减分别约占细胞总衰减的 $0.07/0.21= 33\%$ 和 $0.05/0.10= 50\%$, 而由活性降低所引起的衰减约占细胞总衰减的 67% 和 50% .

3.2 BNR 系统中硝化细菌衰减

3.2.1 OUR 测定结果 利用常规 OUR 测定方法所测得的 NOB、AOB活性变化趋势如图 6所示. 根据图 6及公式 (4)可计算出 NOB和 AOB在 7d衰减期内的平均衰减速率, 分别为 0.32 d^{-1} 和 0.16 d^{-1} .

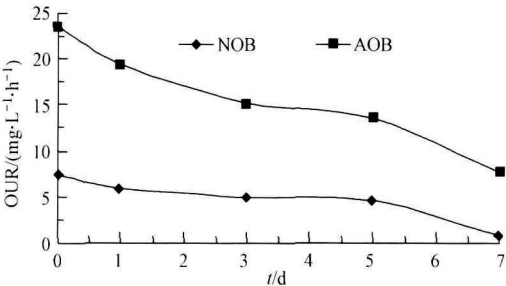


图 6 好氧衰减过程中 NOB、AOB 的 OUR 变化
Fig 6 OURs of NOB and AOB during the process of aerobic decay

3.2.2 FISH 实验结果 BNR 系统中 FISH 测定结果如图 7所示. 根据图 7, 可计算出 NOB (Nitrobacter

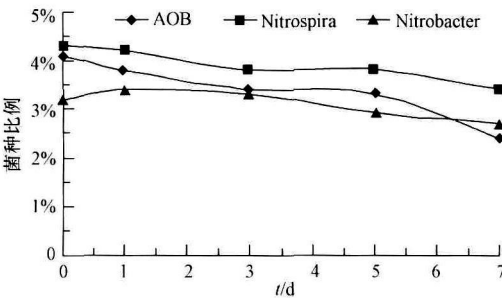


图 7 BNR系统中活硝化细菌占总活生物量比例
Fig 7 Fractions of viable nitrifying bacteria among total viable bacteria in the BNR system

与 Nitrospira) 和 AOB 在 7 d 衰减期间的平均比例, 分别为 7% (3.1% 与 3.9%) 和 3.4%。根据上述实验结果及公式 (5), 可以计算出 BCFS 系统中硝化细菌的衰减速率:

$$b = (0.32 \times 7\% + 0.16 \times 3.4\%) / 10.4\% = 0.27 \text{ d}^{-1}$$

3.2.3 LVE/DEAD 细胞活性实验结果 LVE/DEAD 细胞活性实验测定结果示于图 8。由图 8 可知, 在衰减过程中, BNR 系统中泥样的活细胞比例也呈匀速下降的趋势。与 SBR 系统相似, 结合 MLVSS/FISH 以及 LVE/DEAD 测定结果, 依据公式 (6), 可得出 BNR 系统中硝化细菌在衰减过程中的死亡规律, 结果如图 9 所示。

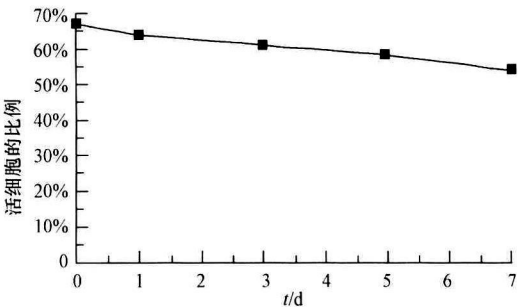


图 8 BNR 系统硝化细菌衰减过程中活细胞的比例变化规律
Fig. 8 Fractions of viable cells during decay in the BNR system

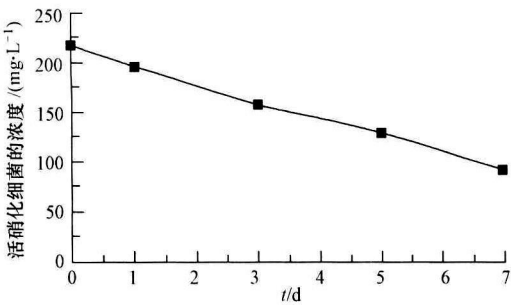


图 9 BNR 系统中活硝化细菌在衰减过程中浓度变化
Fig. 9 Concentrations of viable nitrifiers during decay in the BNR system

由图 9 可知, BNR 系统中硝化细菌在衰减过程中活细胞的比例也呈匀速下降的趋势。根据公式 (4) 可计算出 BCFS 系统中硝化细菌的死亡速率。

$$b_A = - \ln \frac{R_t}{R_0} \times \frac{1}{t_d} = - \ln \frac{2000 \times 54\% \times 9\%}{2800 \times 67\% \times 12\%} \times \frac{1}{7} = 0.12 \text{ d}^{-1}$$

因此, BCFS 系统中硝化细菌由细胞死亡所引

起的衰减约占细胞总衰减的 43% ($0.12/0.27 = 43\%$), 而由活性降低所引起的衰减约占细胞总衰减的 55%。

4 讨论 (Discussion)

4.1 SRT 对 SBR 硝化系统中硝化细菌衰减速率及异养细菌生物量的影响

由实验结果可知, SRT = 40 d 时的 NOB 和 AOB 衰减速率都小于 SRT = 10 d 时的 NOB 和 AOB 衰减速率, 这可能是因为长 SRT 会选择出能够更好地适应饥饿状态的菌种, 即细菌能够迅速地做出紧迫反应, 因而导致衰减速率较低。同时, 由表 2 可知, SRT = 40 d 时异养细菌的比例 (43%) 远高于 SRT = 10 d 时异养细菌的比例 (20%), 这是因为 SRT 较长时系统中衰减的生物量较多, 所以产生了较多的细胞自溶体, 异养细菌得以在较充足底物情况下隐形生长 (van Loosdrecht *et al.*, 1999)。

4.2 FISH 结果与模拟结果对比

由表 2 可知, SRT = 10 d 时活硝化细菌约占总活生物量的 80% (6% + 24% + 50%), 剩余 20% 为异养细菌; 而 SRT = 40 d 时活硝化细菌约占总活生物量的 57% (3% + 14% + 40%), 异养细菌约占 43%。Moussa 等 (2005) 采用数学模拟技术也对 SBR 硝化系统中的硝化细菌进行了研究, 模拟结果显示, 在 SRT = 10 d 时, SBR 硝化系统内 AOB 是系统内主要的微生物, 约占总生物量的 53%, 而 NOB 约占总生物量的 24%, 其它 21% 为异养细菌, 这与本实验研究结果非常相近。

4.3 硝化细菌死亡速率与衰减速率对比分析

通过对比 SBR 硝化系统以及 BNR 系统中硝化细菌的死亡速率和衰减速率可以看出, 硝化细菌在衰减过程中活细胞的死亡速率低于其衰减速率。这就说明硝化细菌在衰减过程中, 由细胞死亡所引起的数量衰减只占其总衰减量的一部分 ($\leq 50\%$), 而其它部分 ($\geq 50\%$) 则是由细胞活性衰减所引起。显然, 目前以 OUR 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, 这也正是目前实际应用中将上述两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的, 若不考虑模型参数 (衰减系数) 的适当修正, 势必导致模拟结果与实际情况出现一定的偏差 (Henze *et al.*, 1987, 1999; Gujer *et al.*, 1995, 1999)。

4.4 SBR 硝化系统与 BNR 系统中硝化细菌死亡衰减比例的对比分析

通过对比 BNR 系统以及与之相近 SRT 下的 SBR 硝化系统 (SRT = 10 d) 中硝化细菌死亡衰减的比例可知, BNR 系统中硝化细菌由细胞死亡引起的衰减 (45%) 远高于 SBR 硝化系统中硝化细菌由细胞死亡引起的衰减 (33%)。这可能是由于系统中微生物组成不同所致。在 BNR 系统中, 硝化细菌虽然也能通过降低细胞维持能量、酶调节及自我选择更有竞争性的种属等来应对 N 源的缺乏, 但系统中常规异养细菌 (OHOs)、聚磷细菌 (PAOs)、聚糖元细菌 (GAOs) 是生物量的主体, 它们会与硝化细菌竞争一部分由细胞自溶产生的 N 源, 其结果必然是引起与硝化细菌间的竞争, 导致硝化细菌处于竞争的劣势。而在 SBR 硝化系统中硝化细菌是生物量的主体, 细胞自溶产生的 N 源几乎都可以被硝化细菌所利用, 所以, 在 SBR 硝化系统中由细胞死亡引起的衰减与 BNR 系统相比较小。

5 结论 (Conclusions)

1) SBR 硝化系统在不同 SRT 下, 硝化细菌在好氧饥饿状态下的衰减特征有着明显的不同。对于不同的 SRT, SRT 越长, 硝化细菌的衰减速率越小。这可能是因为长 SRT 可能会选择出能够更好地适应饥饿状态的菌种, 即细菌能够迅速地做出紧迫反应, 导致其衰减速率降低。

2) SBR 硝化系统中, 在 SRT = 10 d 和 SRT = 40 d 条件下硝化细菌由细胞死亡引起的衰减分别占细胞总衰减的 33% 和 50%; 相应地, 由活性降低引起的衰减分别占细胞总衰减的 67% 和 50%。

3) SBR 硝化系统中 SRT = 40 d 时异养细菌占总活生物量的比例 (43%) 远高于 SRT = 10 d 时异养细菌占总活生物量的比例 (20%), 这是因为较长的 SRT 会产生较多的细胞自溶体, 从而使异养细菌得以在较充足底物情况下实现隐形生长。

4) BNR 系统中 (SRT = 15 d), 硝化细菌在衰减过程中由细胞死亡引起的衰减约占细胞总衰减的 45%, 而由活性降低引起的衰减约占细胞总衰减的 55%。

5) BNR 系统中硝化细菌由细胞死亡引起的衰减 (45%) 远大于与之相近 SRT 下 SBR 硝化系统 (SRT = 10 d) 中硝化细菌由细胞死亡引起的衰减 (33%)。这是因为两种系统中微生物组成不同

所致。

6) 细菌衰减可分为由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, 这一认识尚未得到污水处理技术在工程应用中的足够重视。

责任作者简介: 郝晓地, 男, 49 岁, 获荷兰代尔夫特理工大学 (TU Delft) 博士学位, 《Water Research》编委。主要研究方向: 污水处理生物脱氮除磷技术; 污水处理数学模拟技术; 可持续环境生物技术。代表性著作: 《可持续污水-废物处理技术》, 中国建筑工业出版社 2006 年 6 月出版。E-mail: haoyaod@bucea.edu.cn

参考文献 (References):

- Amann R I 1995 In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes Molecular Microbial Ecology Manual [M]. Netherland: Kluwer Academic Publishers 1—15
- Amann R I, Binder B J, Olson R J, et al 1990 Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow-cytometry for analyzing mixed microbial-populations [J]. Appl Environ Microbiol 56(6): 1919—1925
- Andrige M, Chesbro W R 1982 Very slow growth of *Bacillus polymyxa* stringent responses and maintenance energy [J]. Arch Microbiol 132(4): 338—344
- Curds C R 1982 The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes [J]. A Rev Microbiol 36: 27—46
- Daims H, Bruhl A, Amann R, et al 1999 The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set [J]. Syst Appl Microbiol 22(3): 434—444
- Daims H, Nielsen P, Nielsen J L, et al 2000 Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology [J]. Water Sci Technol 41(4-5): 85—90
- Eikelboom D H 1988 Extra toepassingsmogelijkheden voor protozoa en metazoa bij de zuivering van afvalwater [R]. TNO, Delft Nr R88/286
- Gujer W, Henze M, Mino T, et al 1995 The activated sludge model No 2: biological phosphorus removal [J]. Water Sci Technol 31(2): 1—11
- Gujer W, Henze M, Mino T, et al 1999 Activated sludge model No 3 [J]. Water Sci Technol 39(1): 183—193
- 郝晓地, 朱景义, 曹秀芹, 等. 2008a 污水生物处理系统细菌衰减特性的实验研究 [J]. 环境科学, 29(11): 3104—3109
- Hao X D, Zhu J Y, Cao X Q, et al 2008a Experimental determination of bacterial decay characteristics in biological wastewater treatment system [J]. Environmental Science 29(11): 3104—3109 (in Chinese)
- 郝晓地, 朱景义, 曹秀芹, 等. 2008b 硝化细菌 AOB 与 NOB 衰减

速率实验测定 [J]. 环境科学学报, 28(12): 2499—2502

Hao X D, Zhu J Y, Cao X Q, *et al.* 2008b. Experimental determination of the decay rate of nitrifying bacteria AOB and NOB [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 28(12): 2499—2502 (in Chinese)

郝晓地, 朱景义, 曹秀芹, 等. 2009 高等微生物活性测定方法的实验研究 [J]. 环境科学学报, 29(1): 95—101

Hao X D, Zhu J Y, Cao X Q, *et al.* 2009. Experimental evaluation of a method to determine the activity of higher microorganisms [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 29(1): 95—101 (in Chinese)

Henze M, Grady C P L, Gujer W, *et al.* 1987. Activated Sludge Model No 1 [R]. IAWPRC Scientific and Technical Report No 1, IAWPRC, London. ISBN: 1010 707X

Henze M, Guyer W, Mino T, *et al.* 1999. Activated sludge model No 2d ASM 2D [J]. *Water Sci Technol* 39(1): 165—182

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

Lee Y, Oleszkiewicz J A. 2003. Effects of predation and ORP conditions on the performance of nitrifiers in activated sludge systems [J]. *Water Res* 37(17): 4202—4210

Manser R, Gujer W, Siegrist H. 2006. Decay processes of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment systems [J]. *Water Res* 40(12): 2416—2426

Mason C A, Hamer G, Bryers J D. 1986. The death and lysis of micro-

organisms in environmental processes [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 39(4): 373—401

Mobarry B K, Wagner M, Urbain V, *et al.* 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria [J]. *Appl Environ Microbiol* 62(6): 2156—2162

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

Salin S, Moussa M S, van Loosdrecht M C M. 2006. Determination of the decay rate of nitrifying bacteria [J]. *Biotechnol Bioeng* 94 (2): 252—262

Siegrist H, Brunner J, Koch G, *et al.* 1999. Reduction of biomass decay rate under anoxic and anaerobic conditions [J]. *Water Sci Technol* 39(1): 129—137

Suttle C A. 1994. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities [J]. *Microbial Ecology* 28(2): 237—243

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

Wagner M, Rath G, Koops H P, *et al.* 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants [J]. *Water Sci Technol* 34(1—2): 237—244

Yamamoto M B. 1995. Programmed cell death in bacterial populations [J]. *Science*, 267(5199): 836—837