

曹亚莉, 郝晓地, 王启林, 等. 2009 一种测定活性污泥中高等微生物活性的方法 [J]. 环境科学学报, 29(7): 1395-1399

Cao Y L, Hao X D, Wang Q L, et al. 2009. An effective method of measuring the activity of higher microorganisms in activated sludge [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(7): 1395-1399

一种测定活性污泥中高等微生物活性的方法

曹亚莉, 郝晓地*, 王启林, 张向萍

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: 2008-11-21 录用日期: 2009-05-14

摘要: 采用机械破碎方式灭活活性污泥中高等微生物, 并通过测定破碎前后泥样耗氧速率 (OUR) 之差别间接计算高等微生物的活性作用. 实验结果表明, 以分散机破碎活性污泥, 高等微生物均可被有效地破碎灭活, 且再培养 138h 后不再恢复. 与此同时, 对酵母菌破碎实验显示, 机械破碎并未对其数量、形态以及活性产生太大影响, 这表明机械破碎亦不会对个体尺寸比酵母菌更小的细菌构成任何影响. 为使破碎前后活性污泥絮凝体形态基本一致, 将破碎后的泥样经离心处理, 以尽可能使絮凝体恢复如初 (以 SV 衡量). 通过比较破碎前后泥样的 OUR 并计算可知, 高等微生物活性相对于活性污泥总活性约占 12% ~ 14%.

关键词: 活性污泥; 絮凝体; 细菌; 高等微生物; 活性; 机械破碎; 酵母菌; 耗氧速率

文章编号: 0253-2468(2009)07-1395-05 中图分类号: X172 文献标识码: A

An effective method of measuring the activity of higher microorganisms in activated sludge

CAO Yali HAO Xiaodi*, WANG Qilin ZHANG Xiangping

The Research & Development Centre of Sustainable Environmental Biotechnology, Beijing University of Civil Engineering and Architecture Beijing 100044

Received 21 November 2008; accepted 14 May 2009

Abstract A mechanical disruption method was experimentally applied to kill higher microorganisms in activated sludge; the activity of higher microorganisms could be indirectly calculated on the basis of the difference of oxygen uptake ratios (OURs) before and after disruption. The experiments indicated that a disperser could effectively break up and kill higher microorganisms and that they did not revive after enrichment for 138 h. As a control, yeasts were also disrupted by the disperser to show that their numbers, morphology and activity were not mechanically affected, which implies that bacteria smaller than yeasts would not be mechanically affected either. To assure an almost identical morphology of flocs before and after disruption, the sludge after disruption was centrifuged to approach the same sludge volume index as before treatment. The activity of higher organisms could be calculated by measuring and comparing the OUR values of sludge samples before and after disruption, and was determined to be 12% ~ 14% in this study.

Keywords activated sludge; flocs; bacteria; higher microorganisms; activity; mechanical shattering; yeasts; OUR

1 引言 (Introduction)

污水生物处理凭借低耗、高效的突出优点被广泛应用于污水处理中, 而以活性污泥法为代表的污水处理工艺在生物处理方面占据着相当的份额. 尽管如此, 目前的活性污泥处理系统并非至臻完善, 仍存在许多需要通过提高对微生物微观机理的认识而逐渐改进的技术细节. 例如, 存在对活性污泥

中高等微生物 (包括原生动物和后生动物) 的角色与作用机制认识模糊或者仍缺乏微观知识的问题 (van Loosdrecht *et al.*, 1999; Keller *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 1986). 迄今为止, 有关活性污泥系统中高等微生物捕食过程的代谢机制尚不明确, 且仍无行之有效的方用于测定高等微生物的捕食代谢作用. 虽然已有研究人员采用一些化学物质 (如 NaCl, Cycloheximide 和 Nystatin) 来抑制系统中的高

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 50678017); 北京市属市管高等学校人才强教计划项目 (No. BJE10016200611)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 50678017) and the Funding Project for Academic Human Resources Development in Institutions of Higher Learning under the Jurisdiction of Beijing Municipality (No. BJE10016200611)

作者简介: 曹亚莉 (1978-), 女, 讲师, E-mail: caoyali@bucea.edu.cn * 通讯作者 (责任作者), E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn

Biography: CAO Yali (1978-), female lecturer, E-mail: caoyali@bucea.edu.cn * Corresponding author, E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn

等微生物,并在对比实验中获得有关捕食作用的定量信息 (Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003; Salvad *et al.*, 2001). 但是,这些抑制剂在抑制高等微生物方面并不是完全有效的,因为其仅能对高等微生物中的某些种类起作用,被抑制的高等微生物随着时间推移活性会逐渐恢复,且活性污泥中某些细菌活性也会同时受到抑制 (Moussa *et al.*, 2003; 2005; Salem *et al.*, 2006),这样势必会影响定量测定高等微生物活性的准确性. 还有一些研究人员通过向泥样中加入某些特定种类高等微生物的方法来测定捕食速率 (Liang *et al.*, 2006),但所加入的高等微生物主要是一些后生动物,并不能代表活性污泥系统内量大、较为常见的原生动物 (Curds, 1982; Eikeboom, 1988; Madoni, 1993; 1994),因而,所测得的捕食速率并不能代表污水生物处理系统中的真实捕食速率.

总体而言,研究人员在对高等微生物捕食代谢过程研究方面大都采取抑制其活性的思路,通过对被抑制系统与非抑制系统耗氧速率(或内源呼吸速率)之间的差别来间接计算出高等微生物的活性作用 (Salvad *et al.*, 2001; Moussa *et al.*, 2005). 由于仅仅是抑制而非完全与细菌分离,所以针对具有较长污泥龄 (SRT)特征的活性污泥系统而言,被抑制的高等微生物系统再培养时间还未达到所应用的 SRT时部分高等微生物活性已得到恢复,以至于这种方法在研究高等微生物活性方面存在相当大的误差. 这就促使人们进一步思考从活性污泥中隔离或灭活高等微生物的有效方法,以尽可能消除高等微生物对活性污泥系统产生的计算误差影响.

因此,本研究尝试采用机械破碎法来灭活活性污泥中的高等微生物,通过对活性污泥泥样采用分散机处理,在保证机械破碎强度不至于影响到细菌存活,并可使破碎后菌胶团细菌和活性污泥絮体恢复如初的情况下,以期通过机械破碎方式将高等微生物灭活. 同时,实验对机械破碎法能否有效灭活高等微生物,是否会影响到细菌活性以及高等微生物活性能否准确测定等问题进行有效验证,旨在探讨机械破碎法灭活活性污泥中的高等微生物的可能性与可行性.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 试验材料

实验用活性污泥取自实验室中试规模活性污

泥系统;实验用酵母菌来自安琪⁵高活性干酵母粉.

合成污水配方: CH_3COONa 34.56 g, NH_4Cl 6.88 g, KH_2PO_4 0.79 g, 2.16~2.34 mL 微量元素 (EDTA $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $1.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, H_3BO_3 $0.15\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0.03\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, KI $0.18\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0.12\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $0.06\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.12\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0.15\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 纯水 1500 mL.

酵母培养基配方: 葡萄糖 0.2 g, 酵母浸膏 0.5 g, KClO_4 36 g, NaAc 1.64 g, 纯水 200 mL.

上述培养基配制完成后,进行高压蒸汽灭菌并在冰箱 4℃下保存备用.

2.2 实验仪器

分散机 (KA⁵ T18basic)、离心机 (SIGMA 3K15)、溶解氧测定仪 (YSI 5100)、血球计数板 (XB-K-25)、多功能显微镜 (ZEISS Axioskop40)、高压灭菌器 (SANYO MLS-3780).

2.3 实验方法与过程

2.3.1 分散机破碎高等微生物 取 250 mL 活性污泥放入烧杯,并将其置于恒温水浴内,以避免分散机在破碎过程中产生的热量对活性污泥造成升温影响. 将分散机刀头伸入活性污泥液中,以 $24000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速旋转,至 60 min 高等微生物完全去除时停止破碎.

对原泥、破碎后泥样在显微镜下观察,并计数高等微生物,主要种类有钟虫、轮虫、游泳型纤毛虫等. 每个样品平行计数 6 次,取平均值求得高等微生物数量,最后计算出高等微生物经破碎后从活性污泥中的灭活率.

2.3.2 破碎对细菌的影响 在活性污泥中,菌胶团细菌占主导地位,数量最多. 细菌个体大小通常仅为 $0.5\sim 5\mu\text{m}$,在分散机对活性污泥的破碎过程中,细菌是否会像高等微生物一样被破碎、灭活? 目前尚无行之有效的方法可以直接证明. 对此,实验选择酵母菌来间接证明破碎是否对菌胶团细菌具有影响,因为所选用的酵母菌的个体大小为 $6\mu\text{m}\times(7\sim 8)\mu\text{m}$,尺寸介于细菌与高等微生物 ($100\sim 300\mu\text{m}$)之间. 如果分散机对酵母菌没有产生破碎影响,这表明比酵母菌个体还小的细菌也同样不会受到破碎的威胁.

取 2 g 干酵母粉溶于 1000 mL 水中配制成酵母菌原液,将酵母菌原液放入三角锥形瓶中,用封口膜密封好瓶口,常温曝气 2d 使其进入内源呼吸阶段后

进行实验. 酵母菌采用血细胞计数板观察和计数, 对破碎前后酵母菌进行计数. 为计数需要, 将酵母液均稀释 5 倍, 在显微镜下计数并观察酵母菌形态变化. 25×16 规格计数板酵母菌细胞数计算公式为:

$$A = \frac{B}{80} \times 40 \times 10000 \times C \quad (1)$$

式中, A 酵母菌细胞数 ($\text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$), B 为 80 个小格内酵母细胞数, C 为菌液稀释倍数.

使用溶解氧测定仪测定含菌溶液 DO 变化. 分别从处于内源阶段的酵母菌原液和破碎后酵母菌液中各取 60 mL, 用已曝气 2 h 的纯水将其稀释到 290 mL 后, 倒入 DO 测试瓶, 并将瓶子放入水浴锅中, 恒温在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 以避免由温度变化给实验带来的影响. 将 DO 探头插入测试瓶内, 并用胶条密封好探头与瓶口接口处, DO 测定仪与电脑连接, 每隔 15 s 在线记录溶解氧、温度等数据. 待 2~3 min DO 变化趋于 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明进入内源呼吸阶段, 此时, 迅速向溶液中加入 10 mL 酵母培养基, 观察并记录 DO 变化值. 最后, 按公式 (2) 求得最大耗氧速率 (K_{OUR}).

$$K_{\text{OUR}} = \frac{[\text{DO}_1] - [\text{DO}_2]}{X \cdot (t_2 - t_1)} \quad (2)$$

式中, $[\text{DO}_1]$ 、 $[\text{DO}_2]$ 分别为 t_1 、 t_2 时刻的溶解氧浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); X 为生物固体浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), (以 MLVSS 计).

2.3.3 破碎后活性污泥絮体恢复 将破碎后活性污泥装入离心管中, 以 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 3 min

后取出, 静置 30 min, 使絮体得以快速絮凝. 用玻璃棒轻轻搅起已沉聚活性污泥, 均匀后移入一个大烧杯内, 通过测定污泥容积指数 (SVI) 值与原泥样比较絮凝体恢复状态. 如果两者 SVI 相近, 则可认为破碎后的污泥絮凝体状态基本恢复. 这样, 可以保证所破碎污泥在与原泥样絮体状态几乎一致的情况下测定 OUR, 以消除不同状态絮体因 O_2 扩散阻力不同造成的 OUR 上的差别. 对原泥样与破碎泥样 DO 测定与酵母菌相同, 只是所加培养基变为合成污水.

对两种污泥絮体也可按直径 (d) 大小进行评价, 分为大 ($d > 500 \mu\text{m}$)、中 ($150 \mu\text{m} < d < 500 \mu\text{m}$)、小 ($d < 150 \mu\text{m}$) 3 种粒径予以描述 (马厚悦, 2005), 粒径在显微镜下观察并测量.

3 结果 (Results)

3.1 活性污泥中原、后生动物破碎灭活率

破碎前后原泥样中高等微生物如图 1 所示. 由图 1 可知, 破碎前原泥样中有高等微生物存在, 原泥样中平均高等微生物数量为 $5050 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$; 破碎后活性污泥松散, 破碎 1 h 后显微镜下已找不到任何高等微生物, 说明机械破碎法对活性污泥中高等微生物一次性灭活率达 100%. 对破碎后的泥样加入和不加入人工污水分别培养 138 h 后再次显微镜观察, 均未发现高等微生物. 由此可见, 机械破碎对活性污泥中高等微生物可以完全灭活, 且去除后高等微生物经再培养后不再重新出现.

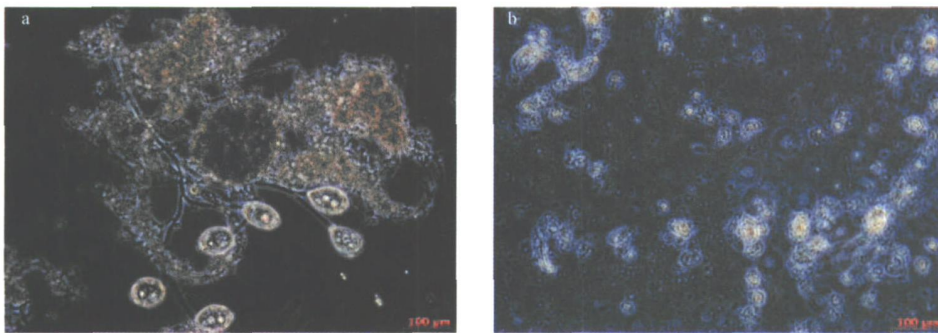


图 1 活性污泥破碎前后高等微生物图片 (a 破碎前, b 破碎后) (放大倍数 10×10)

Fig 1 Higher microorganisms in activated sludge before and after disruption (magnification 10×10)

3.2 破碎对菌胶团细菌的影响

3.2.1 破碎对酵母菌数量的影响 对破碎前后酵母菌分别平行取样 3 次计数, 求平均值. 破碎前酵母菌数量为 $4.44 \times 10^7 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 破碎后酵母菌数量仍然为 $4.44 \times 10^7 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$, 破碎前后酵母菌损失率为 0

这表明机械破碎对酵母菌数量没有任何影响.

破碎前后酵母菌形态显微照片如图 2 所示. 比较破碎前后酵母菌形态, 并没有发现破碎后的酵母菌在形态上有任何变化, 仍呈酵母菌典型形态, 外观完整而无破损现象.

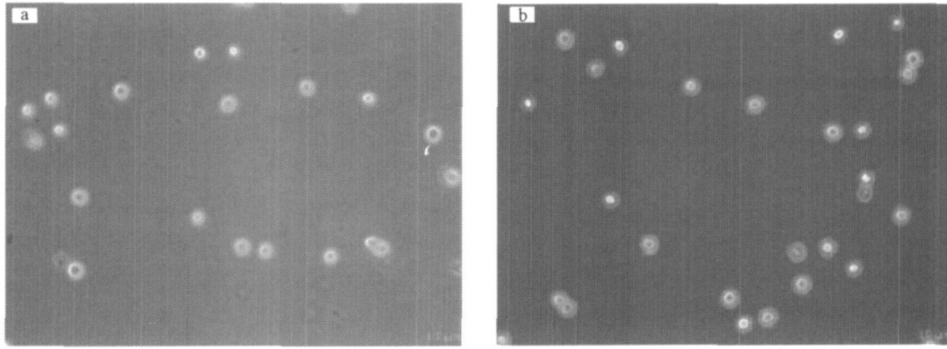


图 2 破碎前后酵母菌形态 (a 破碎前, b 破碎后) (放大倍数 40× 10)
 Fig 2 Shapes of yeasts before and after disruption(magnification 40× 10)

对破碎前后酵母 DO 测定显示, 根据公式 (3) 计算破碎前后酵母耗氧速率增量 (ΔK_{OUR}).

$$\Delta K_{OUR} = \frac{K_{OUR, 破碎酵母} - K_{OUR, 原酵母}}{K_{OUR, 原酵母}} \times 100\% = 0.26\% \quad (3)$$

结果表明, 破碎对酵母菌的代谢活性基本没有影响. 破碎对酵母菌个数、形态, 还是代谢活性 (OUR) 几乎没有任何影响, 这表明机械破碎用于比酵母菌形态更小的细菌时, 也不会影响到细菌的个数、形态和活性.

3.3 破碎对活性污泥絮体影响

原泥样与离心恢复后泥样的 SVI 结果如图 3 所示. 由图 3 可知, 原泥样 SVI 值介于 $80 \sim 100 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间, 污泥状态良好; 离心恢复后污泥 SVI 值基本恢复到原泥样相同数值. 这就为通过测试比较破碎前后污泥 OUR, 并间接得出高等微生物的活性 (OUR) 形成了几乎相同的絮凝体结构条件, 从而尽可能地避免了因破碎使絮体处于分散状态, 进而使 O_2 的扩散阻力变小而导致的 OUR 增高现象的发生.

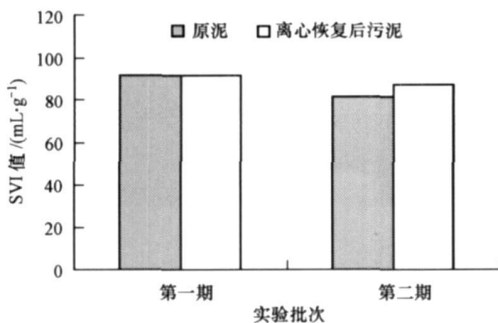


图 3 原泥样与离心恢复后泥样 SVI 值比较
 Fig 3 SVI of the original sludge and the centrifuged sludge

对破碎前絮体粒径的显微测量结果 (图 4) 表明, 离心恢复后污泥中大絮体数量明显减少, 中、小

絮体相应增多. 破碎前后原泥样及离心恢复后絮体形态大小的显微照片如图 5 所示.

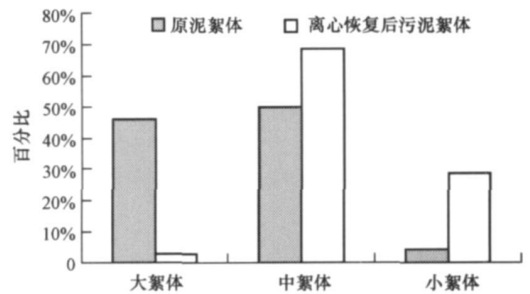


图 4 原泥样与离心恢复后泥样不同尺寸絮体占总絮体个数百分比
 Fig. 4 Ratios of different flocs in the original sludge and the centrifuged sludge

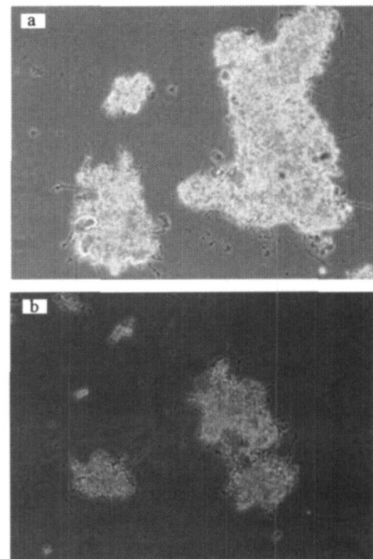


图 5 原泥样及离心恢复后污泥絮体形态大小 (a. 原泥样, b. 破碎、离心恢复后泥样) (放大倍数 10× 10)
 Fig. 5 Flocs in the original sludge and the centrifuged sludge (a. the original sludge, b. the centrifuged sludge) (magnification 10× 10)

3.3.3 高等微生物相对活性计算 共进行两批次实验探知破碎对活性污泥活性的影响,两批次试验泥样分别取自不同时间、不同工况下实验室同一活性污泥系统。通过测定两批次实验原泥样、破碎后泥样、离心恢复后泥样的 OUR 来判定破碎对活性污泥活性的影响(表 1)。表 1 数据表明,尽管两批次实验原泥样起始时 OUR 不同,但破碎后泥样的 OUR 均显著降低,经离心恢复絮体后泥样的 OUR 又略有降低。破碎后泥样 OUR 的显著降低是消除高等微生物影响后的必然现象。离心恢复絮体后泥样较刚破碎后泥样 OUR 略有降低表明,絮体处于分散状态时 O₂ 的扩散阻力要较絮状时小,因此表现出刚破碎的泥样 OUR 略高。这正是为什么要通过离心来恢复泥样絮体状态的原因,主要目的是尽可能消除不同絮体状态对 OUR 测定的影响。

表 1 两批次实验测得的各种状态下泥样 OUR

Table 1 OUR measured under two different conditions

实验批次	mg g ⁻¹ h ⁻¹ (以 SS 计)		
	原泥样	破碎后泥样	离心恢复后泥样
第一期	8.085	7.237	7.082
第二期	6.168	5.324	5.300

根据表 1 所示的 OUR 数值,根据公式(4)可以计算出高等微生物活性相对值。

$$r = \frac{K_{OUR原泥样} - K_{OUR破碎并离心恢复泥样}}{K_{OUR原泥样}} \quad (4)$$

图 6 显示了原、后生动物活性相对值,表明 2 次泥样的高等微生物活性相对值介于 12% ~ 14%。

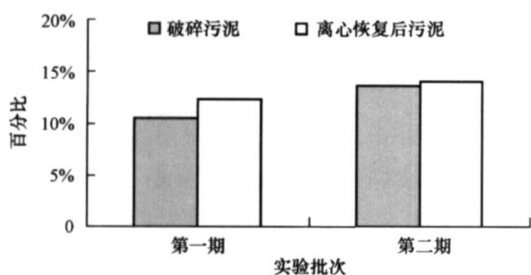


图 6 破碎污泥样与离心恢复后泥样高等微生物活性相对值

Fig. 6 Relative activity of higher microorganisms in the disrupted sludge and the centrifuged sludge

4 结论 (Conclusions)

1) 机械破碎法可以达到破碎、灭活活性污泥中高等微生物的目的。2) 对酵母菌破碎实验表明,破碎酵母菌数量、形态以及活性几乎没有影响。由此可知,破碎对个体尺寸更小的细菌来说更不应具有

任何数量和活性上的影响。3) 为避免因破碎造成的絮体分散,进而导致 O₂ 扩散阻力变低而出现 OUR 测定数值可能偏高的问题,可通过离心法恢复破碎污泥的分散状态,使泥样尽可能恢复到正常絮体状后再测得 OUR。通过比较破碎前后泥样的 OUR,可以间接地计算出高等微生物相对活性值。本实验泥样破碎前后 OUR 计算结果表明,高等微生物活性相对于活性污泥总活性约占 12% ~ 14%。

责任作者简介:郝晓地(1960—),男,荷兰代尔夫特理工大学(TU Delft)博士,《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。E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn

参考文献 (References):

- Curds C R. 1982. The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes [J]. *A Rev Microbiol* 36: 27—46
- Eikelboom D H. 1988. Extra toepassingsmogelijkheden voor protozoa en metazoa bij de zuivering van afvalwater [R]. Na R88/286 The Netherlands TNO Delft 1—16
- Keller J Yuan Z Blackall L. 2002. Integrating process engineering and microbiology tools to advance activated sludge wastewater treatment research and development [J]. *Rev in Environ Sci and Biotechnol* 1: 83—97
- Lee N M, Welander T. 1994. Influence of predators on nitrification in aerobic biofilm processes [J]. *Water Sci Technol* 29: 355—363
- 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
- Liang P, Huang X, Qian Y, et al. 2006. Determination and comparison of sludge reduction rates caused by microfauna's predation [J]. *Bioresour Technol* 97: 854—861
- 马厚悦,赵树明,张风山,等. 2005 活性污泥的显微镜观察 [J]. *纸和造纸*, 4: 49—52
- Ma H Y, Zhao S M, Zhang F S, et al. 2005. Observation on the activated sludge with microscope [J]. *Paper and Paper Making* 4: 49—52 (in Chinese)
- Madoni P. 1993. Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works [J]. *Water Res* 27: 1485—1491
- Madoni P. 1994. A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis [J]. *Water Res* 28: 67—75
- Mason C A, Hamer G, Bryers J D. 1986. The death and lysis of microorganisms in environmental processes [J]. *FEMS Microbiol Rev* 39: 373—401
- Moussa M S, Lubberding H J, Hooijmans C M, et al. 2003. Improved method for determination of ammonia and nitrite oxidation activities in mixed bacterial cultures [J]. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 217—221
- Moussa M S, Lubberding H J, Hooijmans C M, et al. 2005. Modelling nitrification, heterotrophic growth and predation in activated sludge [J]. *Water Res* 39(20): 5080—5098
- Salm S, Moussa M S, van Loosdrecht M C M. 2006. Determination of the decay rate of nitrifying bacteria [J]. *Biotech and Bioeng* 94: 253—262
- Salvad H, Mas M, Mendez S, et al. 2001. Effects of shock loads of salt on protozoan communities of activated sludge [J]. *Acta Protozool* 40: 177—185
- van Loosdrecht M C M, Henze M. 1999. Maintenance, endogenous respiration, lysis, decay and predation [J]. *Water Sci Tech*, 39 (1): 107—117