

# 选择性抑制技术测定活性污泥细菌、真菌活性分布的适用性分析

李志华,刘芳,郭强,谭周权,吴杰,张婷,王晓昌

(西安建筑科技大学环境与市政工程学院,西北水资源与环境生态教育部重点实验室,西安 710055)

**摘要:**以葡萄糖为唯一碳源,采用放线菌酮和硫酸链霉素作为真菌、细菌抗生素以抑制其活性,以基质诱导耗氧速率为考察指标,以好氧污泥、土壤污泥以及厌氧污泥为研究对象,对选择性抑制技术测定活性污泥中细菌、真菌分布的适用性进行了系统评估。随抗生素的投加,好氧污泥和土壤污泥的耗氧速率减小,厌氧污泥的耗氧速率反而增大,此方法对厌氧污泥不适用。当放线菌酮为 1 mg/g、硫酸链霉素为 2 mg/g 时,抗生素对好氧污泥的抑制功效即  $D$  值为 1,但并不能通过改变投药量使土壤污泥  $D$  值接近于 1,说明所用抗生素对好氧污泥活性具有选择性抑制作用,而对土壤污泥活性抑制不具选择性。结果表明,选择性抑制技术能够用于测定好氧活性污泥中细菌和真菌的数量分布,但也存在着抗生素抑制作用失效、不完全抑制和实验结果精确度不高等问题,因此需要在抗生素选择、微生物活性指标选择等方面进行更深入的研究。

**关键词:**耗氧速率;微生物活性;选择性抑制技术;细菌真菌活性分布

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)07-1561-05

## Feasibility of Antibiotic Selective Inhibition Method Applied for Measuring Bacterial and Fungal Activities Distribution in Activated Sludge

LI Zhi-hua, LIU Fang, GUO Qiang, TAN Zhou-quan, WU Jie, ZHANG Ting, WANG Xiao-chang

(Key Laboratory of Northwest Water Resources, Environment and Ecology, Ministry of Education, School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

**Abstract:** The study evaluated the selective inhibition method for measuring the fungal and bacterial distribution in the activated sludge, using glucose as sole carbon source, and cycloheximide and streptomycin as bactericide and fungicide, respectively, substrate-induced oxygen uptake rate (OUR) as bioactivity index. Three samples were examined, i. e., aerobic sludge in a wastewater treatment plant, soils and anaerobic sludge. As selective microbial biocides were applied, the OUR of aerobic and soils sludge reduced, whereas the OUR of anaerobic sludge was stimulated. When 1 mg/g cycloheximide and 2 mg/g streptomycin were applied, the inhibition index  $D$  of aerobic sludge was approximately 1; however, the values of  $D$  for soils were greater than 1 at all the dosages of bactericide or fungicide applied in this study. These results suggested that the antibiotics used in this study could selectively inhibit aerobic sludge and partially inhibit the soils. It was found that the selective inhibition method was suitable for aerobic sludge analysis, but encountered problems for the other samples, e. g., failure inhibition effect of antibiotic, partial inhibition and low accuracy. Further studies are therefore needed in the selection of antibiotic and microbial activity parameter.

**Key words:** oxygen uptake rate (OUR); biological activity; selective inhibition method; bacterial and fungal activity distribution

在当前污水处理领域中,活性污泥法是应用最为广泛的技术之一。活性污泥中的细菌和真菌在废水的生物处理中起着重要作用,其中细菌是污水净化的主要承担者,但真菌也具有分解碳水化合物、脂肪、蛋白质及其他含氮化合物的功能。真菌还能用于处理特异性废水或污染物,例如在含有木质素等难降解有机废水、农药废水、含油废水、军工业废水、造纸废水、染料废水处理及生化污泥处理后上清液的脱色等方面,真菌都发挥着其独特的降解作用<sup>[1]</sup>。但真菌若大量异常增殖会引发污泥膨胀现象,丝状菌的异常繁殖是污泥膨胀的主要诱因之一<sup>[2]</sup>。因此,了解活性污泥中细菌、真菌的分布具有重要的实际意义。

测定活性污泥中微生物生物量的方法有传统的平板培养法和分子生物学方法。这 2 种方法在实际应用时都存在许多不足,一方面,活性污泥中生存的主要微生物群落不一定都能用培养的方法分析;另一方面,分子生物学方法得出的是总生物量,不仅包括活菌数也包括死菌数,不能检测分辨微生物的活

收稿日期:2009-09-04;修订日期:2009-11-27

基金项目:国家自然科学基金项目(50708089);陕西省教育厅专项科研计划项目(08JK325);陕西高校省级重点实验室科研计划项目(09JS027);陕西省自然科学基金项目(2009JQ7002);教育部留学回国人员科研启动基金项目(教外司留[2008]890号);长江学者和创新团队发展计划项目(PCSIRT\_JRT0853)

作者简介:李志华(1976~),男,博士,副教授,主要研究方向为废水生物处理技术与理论,E-mail:lizhihua@gmail.com

性<sup>[3,4]</sup>。而对于活性污泥处理工艺而言,微生物的活性比生物量更具有实际意义,活性污泥的生物活性代表了活性污泥中微生物的生长状态和对底物的降解能力,直接反映微生物状态的微观参数有三磷酸腺苷(ATP)、脱氢酶活性、脱氧核糖核酸及耗氧速率(OUR)等<sup>[5]</sup>。由于耗氧速率的检测装置和检测方法较为简单方便,是目前普遍用于描述生物活性的方法,因此,本实验采用测定耗氧速率来评价污泥微生物的代谢活性。

Anderson等<sup>[6,7]</sup>提出的选择性呼吸抑制技术一般用于测定土壤细菌、真菌的生物量,即向土壤中加入易分解的有机物,如葡萄糖,则微生物的呼吸量在极短时间内迅速增加,并可维持近2~8 h没有变化,这时的呼吸量与土壤原有的微生物生物量之间存在直线关系,又称为基质诱导呼吸量,可作为土壤生物生物量的指标。如果在加入基质的同时,向土壤中加入细菌或真菌抗生素,基质诱导呼吸就会受到选择性的抑制,使土壤中细菌和真菌的生物量被分别测量出来。放线菌酮仅抑制含有80S RNA细胞的蛋白质合成,真核细胞中含有80S RNA,所以放线菌酮对真菌、藻类及原生动物起作用。一般活性污泥中藻类和原生动物的生物量较少,在此实验中忽略不计。硫酸链霉素抑制含有70S RNA和80S RNA细胞的蛋白质合成,原核生物细胞中仅有70S RNA,所以链霉素不仅对细菌起作用,而且对真菌也起作用<sup>[8~13]</sup>。在运用基质诱导呼吸技术检测土壤微生物量时,有研究发现在一定的用量范围,放线菌酮只抑制真菌的生长,对细菌和放线菌的生长没有影响<sup>[7,8,14]</sup>;而链霉素只抑制细菌和放线菌的生长,对真菌的生长没有影响。

国内外许多学者已成功地运用选择性抑制技术检测得到各种土壤细菌和真菌的分布<sup>[15~17]</sup>,而将此方法运用到水环境中,检测水环境中细菌和真菌分布却鲜有报道。为此,本研究将活性污泥耗氧速率的检测方法和选择性抑制技术结合起来,采用细菌、真菌抗生素作为抑制细菌、真菌的手段,选择不同类型的活性污泥作为对象,进行了系统的实验,旨在评估选择性基质诱导耗氧速率抑制技术对于研究水环境(活性污泥)中细菌和真菌分布的适用性,并针对该技术存在的缺陷提出改进措施。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

分别取3种供试材料:1号污泥取自西安市某

污水处理厂二沉池回流污泥,该污水厂采用的是A/A/O工艺即好氧污泥。2号污泥即土壤污泥,取自大树下落叶覆盖的0~10 cm土层土壤,采集的湿土立即过2 mm筛,去掉大部分的植物残体和可见的土壤动物,筛后土壤用纯水浸泡,调节湿度与活性污泥相近,再过2~3次2 mm筛,得到类似活性污泥的混合均匀的土壤污泥。3号污泥取自实验室SBR真菌驯化厌氧反应器即厌氧污泥,接种污泥为污水厂活性污泥与落叶覆盖土壤浸泡上清液,一周期12 h,进水5 min,搅拌10.5 h,沉淀55 min,出水30 min,搅拌速度45 r/min。3种污泥取样后立即分析。

本实验以葡萄糖为唯一碳源,以放线菌酮和硫酸链霉素分别作为真菌和细菌抗生素,其中葡萄糖充氧至饱和。葡萄糖、放线菌酮和硫酸链霉素浓度分别为2 000、1 000和5 000 mg/L。

### 1.2 选择性基质诱导 OUR 的测定

用量筒取一定体积的活性污泥倒入装有搅拌棒的BOD测定瓶中,分别加入葡萄糖、葡萄糖+硫酸链霉素、葡萄糖+放线菌酮。将BOD测定瓶置于20℃恒温水浴中,开动电磁搅拌器,待稳定后读数并记录溶氧值,每隔1 min读数1次。待溶解氧(DO)降至1 mg/L时停止测定,整个测定过程控制在10~30 min。仅加入葡萄糖测得的耗氧速率为常规耗氧速率,代表活性污泥中总微生物的代谢活性,用A表示;加入葡萄糖和硫酸链霉素测得的是真菌基质诱导耗氧速率,代表真菌的数量分布,用F表示;加入葡萄糖和放线菌酮测得的是细菌基质诱导耗氧速率,代表细菌数量分布,用B表示。根据所测得的A、F及B值,按照下式计算抗生素的抑制功效<sup>[15,18]</sup>:

$$D = \frac{\text{真菌耗氧速率 } F + \text{细菌耗氧速率 } B}{\text{常规耗氧速率 } A}$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 抗生素对污泥耗氧速率的选择抑制作用

图1显示了3种污泥的耗氧速率随抗生素加入的变化情况。可以看出,抗生素对好氧污泥和土壤污泥都产生了一定的抑制作用,耗氧速率随抗生素的加入而减小[图1(a)、1(b)],但对厌氧污泥却产生了刺激效应,其耗氧速率反而比常规耗氧速率高[图1(c)]。原因可能在于,本实验在测试过程中采用了充满饱和溶解氧的基质进而改变了其原来的厌氧环境,因此OUR测试技术无法准确表征其微生物活性,选择性耗氧速率抑制技术不适用于厌氧污泥。

可考虑用三磷酸腺苷(ATP)、脱氢酶活性、脱氧核糖核酸代替耗氧速率作为污泥活性指标,如可将选择性抑制技术与脱氢酶活性结合来确定厌氧污泥中细菌和真菌的分布。

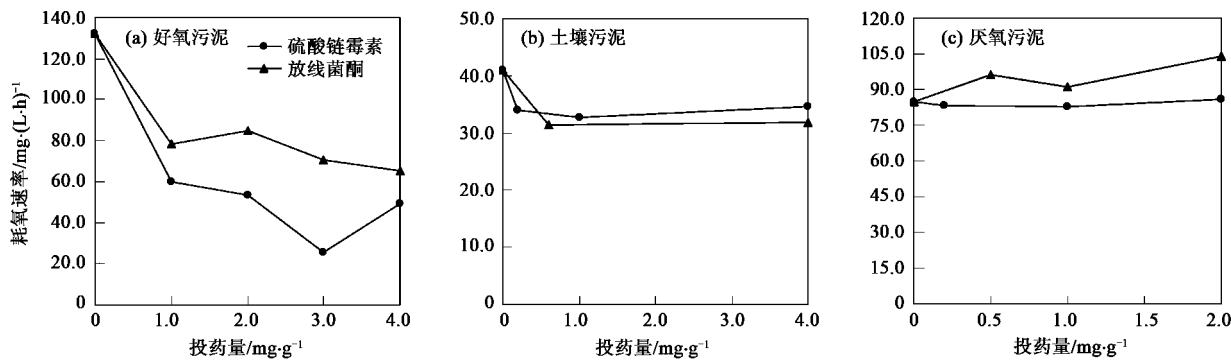


图 1 3 种污泥抗生素加入量与基质诱导耗氧速率的关系  
Fig.1 Relationship between antibiotic addition and substrate-induced OUR for three kinds of sludge

不同抗生素剂量条件下的  $D$  值和真菌/细菌值 ( $F/B$ ) 如表 1、表 2 所示,其中抗生素的投加量以每 g 污泥中所投加的抗生素质量计。 $D$  表示抗生素对污泥活性的抑制功效, $D = 1$  说明抗生素对污泥中细菌、真菌耗氧速率具有选择性抑制作用,能很好地将污泥中真菌、细菌活性区分开; $1 < D < 2$  说明抗生素对污泥中细菌、真菌耗氧速率只产生部分抑制,真菌和细菌活性部分重叠;而  $D < 1$  说明抗生素对真菌或细菌耗氧速率的抑制作用不具有选择性<sup>[16,18]</sup>。好氧污泥  $D$  值的变化范围为 0.69 ~ 1.10,平均值为 0.92(表 1),表明抗生素对好氧污泥真菌、细菌活性具有选择性抑制作用,而土壤污泥  $D$  值平均为 1.6 > 1(表 2),表明对  $F/B$  测试值有贡献的微生物种群出现了叠加,抗生素对本实验所采用的土壤污泥只产生部分抑制。另外,从表 1、表 2 也可看出,硫酸链霉素和放线菌酮不同的投加量组合对同一污泥会得出不同的  $F/B$  值。以好氧污泥为例,分析  $D$  与  $F/B$  值之间的关系,如图 2 所示, $D$  值一定时, $F/B$  可有不同的取值,但两者之间具有良好的相关性,即  $D$  值相近时其  $F/B$  值亦相近。因此,虽然运用选择性耗氧速率抑制技术得出的结果精确度不高,但还是可用于估计活性污泥中真菌与细菌的分布,具有一定的应用价值。

该方法在应用时首先应通过  $D$  值确定其选择抑制的功效,如能通过改变投药量使  $D \approx 1$ ,说明方法适用(如本实验中的好氧污泥)。当  $1 < D < 2$  时(土壤污泥),说明抗生素只对部分真菌、细菌产生抑制作用。此时,方法是否适用取决于其微生物种群结构是否满足对抗生素敏感的细菌/真菌值与不敏感部分细菌/真菌值相同这一假设条件<sup>[6,7]</sup>,若满

表 1 真菌和细菌生物量比例的测定(好氧污泥)

Table 1 Measurement of ratios of fungal and bacterial biomass for aerobic sludge

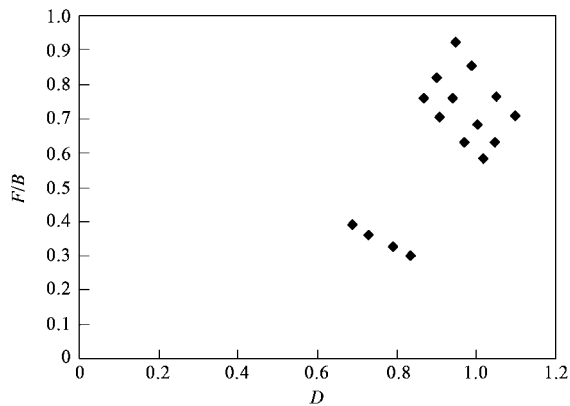
放线菌酮投加量 /mg · g <sup>-1</sup>	硫酸链霉素投加量 /mg · g <sup>-1</sup>	$D$	$F/B$
1.0	1.0	1.05	0.77
1.0	2.0	1.00	0.68
1.0	3.0	0.79	0.33
1.0	4.0	0.97	0.63
2.0	1.0	1.10	0.71
2.0	2.0	1.05	0.63
2.0	3.0	0.83	0.30
2.0	4.0	1.02	0.58
3.0	1.0	0.99	0.85
3.0	2.0	0.94	0.76
3.0	3.0	0.73	0.36
3.0	4.0	0.91	0.70
4.0	1.0	0.95	0.92
4.0	2.0	0.90	0.82
4.0	3.0	0.69	0.39
4.0	4.0	0.87	0.76

表 2 真菌和细菌生物量比例的测定(土壤污泥)

Table 2 Measurement of ratios of fungal and bacterial biomass for soil sludge

硫酸链霉素投加量 /mg · g <sup>-1</sup>	放线菌酮投加量 /mg · g <sup>-1</sup>	$D$	$F/B$
0.6	0.2	1.60	0.92
0.6	1.0	1.56	0.96
0.6	2.0	1.59	0.94
0.6	4.0	1.61	0.91
4.0	0.2	1.61	0.94
4.0	1.0	1.58	0.98
4.0	2.0	1.60	0.95
4.0	4.0	1.62	0.92

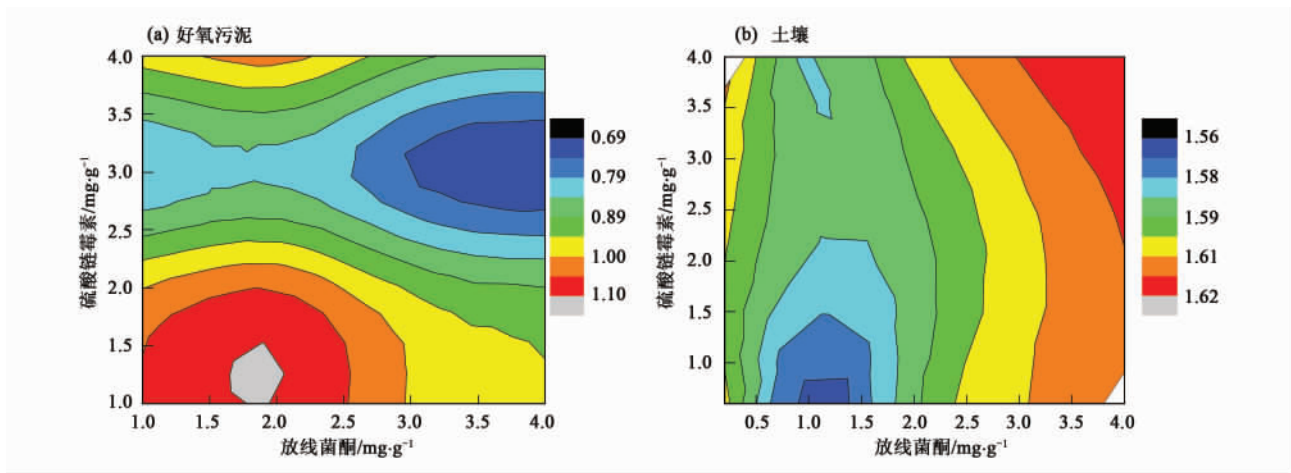
足,则得出的  $F/B$  值具代表性。但目前尚没有证明这一假设是否满足的有力途径,因此,对于产生部分

图2  $F/B$  值与  $D$  之间的关系 (好氧污泥)Fig. 2 Relationship between  $F/B$  and  $D$  for aerobic sludge

抑制作用的污泥,此方法只能作为参考,需要结合其他方法如直接镜检、细胞成分分析等,以检查结果的准确性<sup>[18]</sup>,或考虑采用其他检测微生物分布的方法。

## 2.2 抗生素类型及其剂量对污泥耗氧速率的抑制作用

图3描述了硫酸链霉素和放线菌酮及其投加量对  $D$  值的影响。可以看出,不同的抗生素对  $D$  值的影响方式不一样,且抗生素剂量不同会得出不同的  $D$  值。放线菌酮剂量对好氧污泥  $D$  值几乎没有影响[图3(a)],在整个投药量范围内(1~4 mg/g)都能使其值接近于1,但对土壤污泥  $D$  值影响较大[图3

图3 抗生素加入量与  $D$  值之间的关系Fig. 3 Relationship between antibiotic dosages and  $D$ 

(b)],不同投加量产生不同  $D$  值。而硫酸链霉素剂量对土壤污泥  $D$  值影响较小[图3(b)],反而对好氧污泥影响较大[图3(a)]。可根据抗生素加入量与  $D$  之间的关系,判断抗生素的适用性。如图3(a),虽然硫酸链霉素对好氧污泥  $D$  值影响较大,但能通过改变其投加量使  $D \approx 1$ ,说明硫酸链霉素同放线菌酮一样也适用于实验采用的好氧污泥。但对于土壤污泥,如图3(b),放线菌酮在整个投药范围内都不能使其  $D$  值达到1,说明放线菌酮对实验采用的土壤污泥不适用,此时可考虑采用其他抗生素代替放线菌酮作为真菌抑制剂。常用的真菌抑制剂还有克菌丹等,常用的细菌抑制剂还有氯霉素、青霉素、四环素和卡那霉素等<sup>[18~20]</sup>。

在确定方法的适用性之后,还需根据  $D$  值找到最佳投药量<sup>[17,18]</sup>。在运用选择性呼吸抑制技术测定土壤真菌、细菌分布时,Anderson等<sup>[7]</sup>认为分别加药抑制率与混合加药抑制率相当时的投药量为最佳投

药量,而West<sup>[14]</sup>认为无论抑制作用是否具有选择性,抗生素的抑制率达到最大时测得的细菌、真菌比值最为准确。根据本实验情况, $1 < D < 2$ 产生的是部分抑制,得出  $F/B$  值可能并不能代表全部微生物中真菌、细菌分布; $D < 1$ 时,抗生素产生非选择性抑制;只有当  $D = 1$ 时,抗生素既不会对污泥中真菌、细菌活性产生非选择性抑制,同时真菌、细菌活性又不会重叠,得出的  $F/B$  值能比较准确地反映污泥中真菌与细菌的分布,因此采用  $D = 1$ 时的投药量为最佳投药量。如表1所示,好氧污泥  $D = 1$ 时的投药量为:放线菌酮 1 mg/g,硫酸链霉素 2 mg/g,即为最佳投药量,此时  $F/B$  值为 0.68,说明城市污水厂好氧污泥中细菌是污泥活性主体。

## 3 结论

(1) 选择性耗氧速率抑制技术能够用于检测活性污泥中细菌和真菌的数量分布,具有一定的实际

应用价值,但在运用时会遇到如抗生素抑制作用失效、不完全抑制等问题,且得出的结果精确度不高,只能用于估计同种活性污泥中真菌、细菌分布,而不能用来检测微生物种群结构的微小变化,需同时结合其他方法,以检查结果的准确性。

(2) 根据  $D$  值判断抗生素的抑制功效及确定最佳投药量,如果能通过改变投药量使  $D = 1$ ,说明方法适用,且以  $D = 1$  时的投药量为最佳投药量计算  $F/B$  值。如果通过改变投药量不能使  $D = 1$ ,则说明抗生素不适用,可考虑使用硫酸链霉素、放线菌酮之外的细菌、真菌抗生素。如可用克菌丹等代替放线菌酮作为真菌抗生素,用青霉素、氯霉素、四环素等代替硫酸链霉素作为细菌抗生素。另外,对于厌氧污泥,抗生素的抑制作用可能失效,此时可考虑选用耗氧速率之外的活性指标,如将选择性抑制技术与脱氢酶活性、三磷酸腺苷(ATP)或脱氧核糖核酸结合来确定活性污泥中细菌和真菌分布。

#### 参考文献:

- [1] 安世杰,黄民生. 真菌与废水处理[J]. 净水技术,2003,22(1):5-8.
- [2] Martins A M P, Pagilla K, Heijnen J J, *et al.* Filamentous bulking sludge—a critical review[J]. Water Research, 2004, 38(4):793–817.
- [3] Paterson I D, Downie D A, Hill M P. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control[J]. Biological Control, 2009, 48(1):84-91.
- [4] 彭永臻,高守有. 分子生物学技术在污水处理微生物检测中的应用[J]. 环境科学学报, 2005, 25(9):1143-1147.
- [5] 李亚新. 活性污泥法理论与技术[M]. 北京:中国建筑工业出版社, 2006. 8-9.
- [6] Anderson J P E, Domsch K H. Quantification of bacterial and fungal contributions to soil respiration[J]. Arch Microbiol, 1973, 93: 113-127.
- [7] Anderson J P E, Domsch K H. Measurement of bacterial and fungal contributions to respiration of selected agricultural and forest soils[J]. Can J Microbiol, 1975, 21:314-322.
- [8] 林启美. 选择性呼吸抑制技术在土壤细菌和真菌生物量测定中的应用[J]. 生态学报, 1999, 19(6): 921-926.
- [9] Gartiser S, Urich E, Alexy R, *et al.* Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes [J]. Chemosphere, 2007, 66(10): 1839-1848.
- [10] Raubuch M, Campos A, Joergensen R G. Impact of cycloheximide addition on adenylates in soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(2):222-228.
- [11] Priya M, Haridas A, Manilal V B. Involvement of protozoa in anaerobic wastewater treatment process [J]. Water Research, 2007, 41(20): 4639-4645.
- [12] Rafie-Kolpin M, Essenberg R C, Wyckoff J H. Identification and comparison of macrophage-Induced proteins and proteins induced under various stress conditions in *Brucella abortus* [J]. American Society for Microbiology, 1996, 64(12):5274-5283.
- [13] Feeney D S. Impact of fungal and bacterial biocides on microbial induced water repellency in arable soil [J]. Geoderma, 2006, 135:72-80.
- [14] West A W. Improvement of the selective respiratory inhibition technique to measure eukaryote: prokaryote ratios in soils [J]. Journal of Microbiological Methods, 1986, 5(34):125-138.
- [15] Beare M H. A substrate-induced respiration (SIR) method for measurement of fungal and bacterial biomass on plant residues [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1990, 22(5):585-594.
- [16] Johnson C, Vigil M F, Dostader K G, *et al.* Measuring bacterial and fungal substrate-induced respiration in dry soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1996, 28(45): 427-432.
- [17] Velvis H. Evaluation of the selective respiratory inhibition method for measuring the ratio of fungal: bacterial activity in acid agricultural soils [J]. Biology and Fertility of Soils, 1997, 25(4): 354-360.
- [18] Nakamoto T, Wakahara S. Development of substrate induced respiration (SIR) method combined with Selective Inhibition for estimating fungal and bacterial biomass in humic andosols [J]. Plant Production Science, 2004, 7(1): 70-76.
- [19] Joergensen R G, Wichern F. Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(12): 2977-2991.
- [20] Schmidt I K, Ruess L, Baath E, *et al.* Long-term manipulation of the microbes and microfauna of two subarctic heaths by addition of fungicide, bactericide, carbon and fertilizer [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(5):707-720.