

王啟林, 郝晓地, 曹亚莉. 2010. 聚磷菌富集实验及其内源特征探究[J]. 环境科学学报, 30(12): 2405–2413

Wang Q L, Hao X D, Cao Y L. 2010. Enriched experiment and endogenous characteristics of polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 30(12): 2405–2413

聚磷菌富集实验及其内源特征探究

王啟林, 郝晓地*, 曹亚莉

北京建筑工程学院 城市雨水系统与水环境省部共建教育部重点实验室/可持续环境生物技术研发中心 北京 100044

收稿日期: 2010-04-19 修回日期: 2010-05-11 录用日期: 2010-05-17

摘要: 通过磷酸盐释放速率 (PRR) 测定、荧光原位杂交技术 (FISH) 及 LIVE/DEAD 细胞染色技术, 分别研究了生物营养物去除 (BNR) 系统与富集聚磷菌 (PAOs) 序批式反应器 (SBR) 系统中 PAOs 在好氧环境下的衰减特征。结果表明, 当富集聚磷菌 SBR 系统进料中碳源 (三水合乙酸钠和丙酸) 是以 36 d 为一个循环周期方式投加时, 即三水合乙酸钠 24 d 和丙酸 12 d, 系统中 PAOs 富集比例可达 91%。测定与计算结果表明, 生物营养物去除 (BNR) 系统与富集聚磷菌 SBR 系统中 PAOs 衰减速率分别为 0.113 d^{-1} 和 0.181 d^{-1} , 死亡速率分别为 0.048 d^{-1} 和 0.036 d^{-1} 。这说明由细胞死亡引起的 PAOs 数量衰减在两个系统中分别占细胞总衰减的 42% (BNR) 和 20% (SBR), 而由细胞活性降低引起的活性衰减分别占细胞总衰减的 58% (BNR) 和 80% (SBR)。由此可见, PAOs 数量衰减在其细胞总衰减中只占较小一部分, 而绝大部分衰减是由活性衰减所引起。

关键词: 内源过程; 细胞衰减; 细胞死亡; 活性衰减; 磷酸盐释放速率 (PRR); 荧光原位杂交 (FISH); LIVE/DEAD 染色

文章编号: 0253-2468(2010)12-2405-09 中图分类号: X703.1 文献标识码: A

Enriched experiment and endogenous characteristics of polyphosphate-accumulating organisms (PAOs)

WANG Qilin, HAO Xiaodi*, CAO Yali

Key Laboratory of Urban Stormwater System and Water Environment, Ministry of Education/R & D Centre for Sustainable Environmental Biotechnology, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044

Received 19 April 2010; received in revised form 11 May 2010; accepted 17 May 2010

Abstract: By means of measuring maximal anaerobic phosphate release rates (PRR), analyzing 16S rRNA with fluorescence in-situ hybridization (FISH) and observing membrane integrity by live/dead staining, the aerobic decay characteristics of polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) in a biological nutrient removal (BNR) system and an enriched PAOs sequencing batch reactor (SBR) system were investigated. It was experimentally determined that a highly enriched culture of PAOs (91%) was obtained in the enriched PAO-SBR system by alternating the carbon source in the feed between sodium acetate trihydrate and propionate over a 36 d switching cycle, i. e., sodium acetate trihydrate (24 d) and propionate (12 d). The experimental results and calculations revealed that the decay rates of PAOs in the BNR and enriched PAO-SBR systems were 0.113 d^{-1} and 0.181 d^{-1} , respectively, and the death rates were 0.048 d^{-1} and 0.036 d^{-1} . In addition, the results also demonstrated that cell death contributed 42% and 20%, respectively, to the cell decay in the BNR and enriched PAO-SBR systems. In other words, the activity decay accounted for 58% and 80% of the total cell decay. For this reason, cell death was not a major factor causing the cell decay of PAOs, but activity decay was mostly responsible for this process.

Keywords: endogenous processes; cell decay; cell death; activity decay; phosphate release rate (PRR); fluorescence in-situ hybridization (FISH); LIVE/DEAD staining

1 引言 (Introduction)

内源过程是指细菌内部代谢过程以及细菌之间、细菌与高等微生物、病毒之间相互作用过程, 包

括内源呼吸、细胞维持、死亡-再生 (即隐性生长), 以及由于高等微生物捕食、病毒感染和其它因素 (如饥饿、毒性物质和自身衰亡等) 所造成的细胞衰减等 (Suttle, 1994; Lee *et al.*, 1996; van Loosdrecht

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 50678017); 北京市属高等学校人才强教-深化计划高层次人才项目 (No. PHR20100508)

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. PHR20100508)

作者简介: 王啟林 (1984—) 男, E-mail: wangqilin666@yahoo.com.cn; * 通讯作者 (责任作者) E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn

Biography: WANG Qilin (1984—), male, E-mail: wangqilin666@yahoo.com.cn; * Corresponding author E-mail: haoxiaodi@bucea.edu.cn

et al ,1999; Lopez *et al.* ,2006; Hao *et al.* ,2010) , 这些过程几乎都会对活性污泥系统造成影响. 内源过程会影响活性污泥系统微生物群落、系统处理能力、效率和稳定性. 因此 ,深入认识微生物内源过程对优化系统运行具有重要作用. 细胞衰减作为微生物内源过程的一个重要组成部分 ,由于其与系统中生物量多寡直接相关 ,因而也日益受到人们的关注.

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 (van Loosdrecht *et al.* , 1999; Manser *et al.* ,2006; Hao *et al.* ,2010) . 近年来 ,随着生物营养物去除(BNR) 工艺的应用 ,对细菌衰减速率测定 ,特别是对与营养物去除密切相关的硝化细菌(氨氧化细菌(AOB) 与亚硝酸盐氧化细菌(NOB)) 和聚磷菌(PAOs) 衰减速率的测定 ,越来越受到专家学者们的关注. 目前 ,已有许多研究人员对硝化细菌的衰减速率做过测定 (Siegrist *et al.* , 1999; Manser *et al.* , 2006; Salem *et al.* , 2006; Hao *et al.* ,2009) ,但对 PAOs 衰减速率的研究还相对较少. 虽然 Lopez 等(2006) 用实验方法测定了 PAOs 的衰减速率 ,但该研究忽略了 PAOs 的细胞死亡作用.

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调整策略应对这种不利的生存状态. 例如 ,细菌可能会调整自身代谢过程 ,降低活性以减少能量需求 ,于是 ,出现活性衰减现象(紧迫反应) (Arbrige *et al.* ,1982; Lavallee *et al.* ,2002) . 细菌也可能会启动程序化细胞死亡(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 ,并呈现出数量衰减的特征 (Yarmolinsky ,1995) . 同时 ,活性污泥系统中的高等微生物捕食、

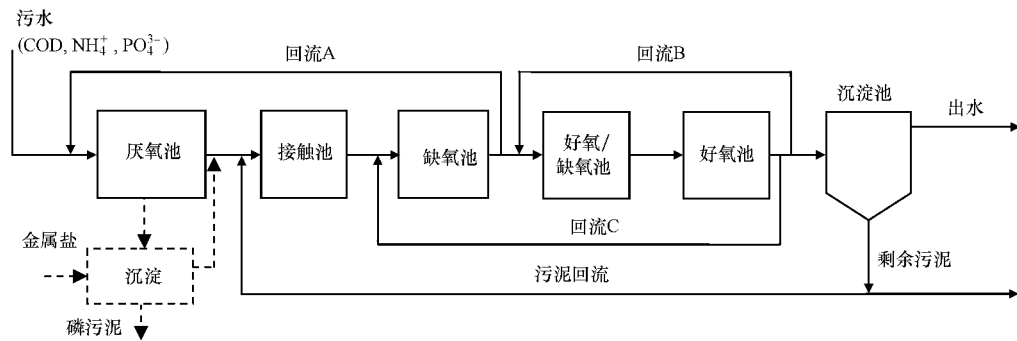
病毒感染以及其它因素(如温度、pH、毒性物质等) 也会对细菌生存和活性造成一定影响(Suttle ,1994; Lee *et al.* ,1996; van Loosdrecht *et al.* ,1999; Lopez *et al.* ,2006; Hao *et al.* ,2010) .

然而 ,细菌究竟以哪种应对策略为主 ,细菌是同时利用 ,还是顺序利用这些应对策略? 这些问题目前尚不清楚. 为了弄清这些问题 ,就必须对细菌衰减特征进行实验研究和定量分析. 对 PAOs 而言 ,首先应获得对它们的富集培养. 因此 ,本研究利用厌氧-好氧序批式反应器(SBR) 系统 ,通过控制进料中碳源的投加方式 ,对 PAOs 进行富集培养. 在获得纯度较高 PAOs 的基础上 ,依靠磷酸盐($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) 释放速率(PRR) 测定、荧光原位杂交技术(FISH) 及 LIVE/DEAD 细胞染色技术 ,对 PAOs 富集 SBR 系统中 PAOs 在好氧环境下的衰减速率进行实验测定. 同时 ,利用这一方法对实验室一小试规模生物营养物去除(BNR) 系统中 PAOs 的衰减特征进行测定 ,并计算分析上述两种系统中 PAOs 分别因细胞死亡引起之数量衰减和因细胞活性降低引起的活性衰减在细胞总衰减中所占比例. 旨在加深对活性污泥系统中 PAOs 衰减特征的认识.

2 材料和方法 (Materials and methods)

2.1 生物营养物去除(BNR) 系统

PAOs 泥样来源之一为北京建筑工程学院实验室一小试规模 BNR 系统 ,其工艺流程如图 1 所示. 该 BNR 系统由厌氧池、接触池、缺氧池、缺氧/好氧池和好氧池 5 个主要反应池组成 ,各单元体积分别为 40、6、40、120 和 120 L. 这一系统处理水量为 $420\text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ 相应水力停留时间 (HRT) 约为 18 h. 系统污泥龄(SRT) 被保持在 35 d ,在 $23\sim25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 室温下运行. 该系统在污泥接种(来自北京一市政污水处理厂) 约 60 d 后达到稳态运行 ,此时 ,混合液悬浮固体



(MLSS) 浓度为 $(3910 \pm 40) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 系统进水为研究单位学生公寓检查井真实污水, 进水主要组分如下: COD $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、TP $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、TN $52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.2 PAOs 富集 SBR 系统

PAOs 泥样另一来源为厌氧-好氧交替工作的 SBR 系统. SBR 反应器总体积 5 L, 工作体积 4 L, 工作周期 6 h, 每天运行 4 个周期. 一个运行周期分进料 (5min)、厌氧反应 (125min)、好氧反应 (158min)、排泥 (2min)、沉淀 (60min) 和排水 (10min) 6 个阶段. 在进料阶段, 反应器内搅拌叶轮开始搅拌 (搅拌速度 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$); 在泥水保持充分混合状态下 2 L 人工配水在计算机控制下由蠕动泵抽入反应器. 厌氧环境由微生物即时消耗水中溶解氧 (DO) 实现; 为防止厌氧反应过程中空气进入反应器, 反应器需进行特殊密封处理. 在好氧反应阶段, 进气阀由计算机控制自动打开曝气, 曝气量为 $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. 排泥阶段, 每个周期约排出 83 mL 混合液, 使该系统 SRT 保持在 12 d. 该系统运行时实际 HRT 为 12 h.

PAOs 富集 SBR 系统运行中所有阶段都通过水浴设备自动控温, 温度被维持在 $(22.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$. 系统内安装有 pH 和 DO 电极, 系统 pH 被控制在 7.50 ± 0.05 ; 当 pH 因混合液发生反应而变化时, 系统会根据电极感应信号在计算机控制下自动加入适量 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 和 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl, 以维持系统内基本恒定的 pH. DO 电极用于监控反应器内 DO 变化; 厌氧阶段 $\text{DO} \leq 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 好氧阶段 $\text{DO} \geq 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 系统中所有在线检测数据都由控制计算机记录、存档.

PAOs 富集 SBR 系统接种污泥来自于上述 BNR 系统 (图 1), 实验进水采用人工配水. 因为进水中铵离子 (NH_4^+) 会被氧化为亚硝酸盐 (NO_2^-) 和硝酸盐 (NO_3^-), 并由此可能破坏系统厌氧环境, 所以, 在进水中添加了硝化抑制剂 (ATU), 以抑制硝化反应的发生. 此外, 由于 K_2HPO_4 与 KH_2PO_4 会与 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 发生反应, 故进料必须分为两部分投加: 1 L 溶液 A 和 1 L 溶液 B, 具体进水组成如下. ① 溶液 A ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$): 宏量元素: $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) 1700 (0.623)、 NH_4Cl 153、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 180、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 28.5、ATU 60、蛋白胨 1.5、酵母浸膏 1.5; 微量元素: EDTA 6、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.9、 H_3BO_3 0.09、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.018、KI 0.108、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.072、 $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.072、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.09. ② 溶液 B ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$): K_2HPO_4 102、 KH_2PO_4 80. 其中, 进水

COD 为 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, P 进水浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 这就使得进水 COD:P = 20:1. 需要特别指出的是, 进料中碳源 ($\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) 以 36 d ($3 \times \text{SRT}$) 为一个循环周期方式投加 (Lu *et al.*, 2006), 即前 24 d 为 $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($2 \times \text{SRT}$), 后 12 d 为 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ($1 \times \text{SRT}$), 目的是使 PAOs 获得更好的富集. PAOs 富集 SBR 系统在污泥接种约 90 d 后达到稳态运行. 此时, MLSS 浓度为 $(2845 \pm 35) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 、挥发性脂肪酸 (VFA) 等在多个运行周期内的各自浓度变化曲线趋于一致, 预示着 PAOs 富集培养完成.

2.3 衰减实验和衰减速率测定

BNR 系统达到稳态运行后, 从系统好氧池中取 4 L 污泥于广口瓶中, 广口瓶被维持在好氧曝气状态, 曝气量、温度和 pH 与 BNR 系统好氧池运行条件一致, 使之用作一种衰减反应器.

对于 PAOs 富集 SBR 系统, 衰减实验开始后, SBR 反应器停止进料、厌氧反应、排泥、沉淀和排水等过程, 系统一直维持在好氧曝气状态, 曝气量、温度和 pH 也与系统原运行条件一致, 使之用作另外一个衰减反应器. 由于衰减反应器因蒸发会引起水分散失, 所以, 衰减实验开始后每天都要分别给上述系统补充水分, 以维持系统内混合液体积相对恒定. 对衰减反应器曝气约 6 h 后, 污泥便进入内源呼吸状态, 此时便可以开始对污泥进行衰减速率测定.

PAOs 衰减速率测定依靠衰减过程中最大 PRR 变化速率来确定, 测定装置如图 2 所示. 对 BNR 系统中 PAOs 衰减速率的测定, 在衰减实验开始 (0 d)、1 d、3 d、5 d 和 7 d, 分别从衰减反应器中取出 590 mL 泥样, 首先用清洗液对泥样进行清洗以除去泥样中的 NO_2^- 和 NO_3^- (因为 NO_2^- 和 NO_3^- 会对厌氧释磷产生影响). 清洗液的组成与 BNR 系统的

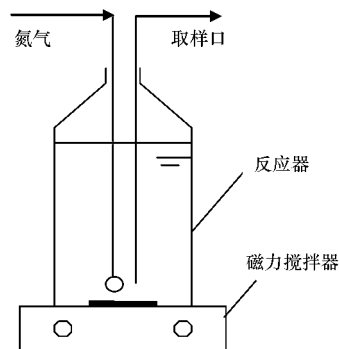


图 2 PAOs 衰减速率测定装置

Fig. 2 The device for measuring the decay rates of PAOs

进水组成类似,但没有碳源、磷源和氮源. 泥样清洗完毕后被投入图 2 所示锥形瓶(1 L) 中,然后,向锥形瓶中通入氮气(约 10 min),使锥形瓶中泥样完全处于厌氧环境. 之后,向锥形瓶中加入 10 mL 25500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶液,使锥形瓶中 COD 值瞬间达到 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (即保持与 BNR 系统进水后系统内相同的 COD). 随后,从锥形瓶中每隔 3 min 取 20 mL 泥样进行 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 测定,总共取样 6 次.

PAOs 富集 SBR 系统中 PAOs 衰减速率测定方法与 BNR 系统中 PAOs 测定方法类似,不同的是 PAOs 富集 SBR 系统泥样不需经过清洗液清洗. 这是因为 SBR 系统进水中含有 ATU,所以,其泥样中不会含有 NO_2^- 和 NO_3^- .

根据在衰减过程中测定所得 PRR,依据公式 (1) 和线性回归方法 (Lesouef *et al.*, 1992; Hao *et al.*, 2009) 即可确定出 PAOs 衰减速率.

$$b = -\ln(R_t/R_0) \times 1/t \tag{1}$$

式中 b 为 PAOs 的衰减速率 (d^{-1}), R_t 为泥样衰减后最大 PRR ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 以 P 计), R_0 为泥样衰减前最大 PRR ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 以 P 计), t 为衰减时间 (d).

本研究所采用的衰减速率测定方法是目前国内外最常用的方法 (Siegrist *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2007). 然而,本研究中衰减速率是在细菌处于 7 d 饥饿状态条件下所测定的. 显然,这与活性污泥系统中细菌实际生存条件存在着一定差异,因为实际活性污泥系统中细菌一般不可能在如此长时间内处于内源状态. 所以,本研究

所测定的衰减速率可能与实际活性污泥系统中 PAOs 原位衰减速率存在一定差异 (Vadivelu *et al.*, 2006a; 2006 b).

2.4 分析方法

MLSS 根据泥样在 105℃ 下烘干后的总残渣量进行确定 (APHA, 1995); 混合液挥发性悬浮固体浓度 (MLVSS) 则在泥样总残渣基础上,继续用 550℃ 高温分解有机物后确定 (APHA, 1995); $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 按钼锑抗分光光度法测定 (APHA, 1995); VFA 采用 5 点滴定法测定 (Moosbrugger *et al.*, 1993); 糖原 (Gly) 依据蒽酮法测定 (Jenkins *et al.*, 1993).

2.5 荧光原位杂交 (FISH) 实验

荧光原位杂交 (FISH) 技术被用于确定 BNR 系统和 PAOs 富集 SBR 系统中 PAOs 所占比例 (Amann, 1995). 首先,测试泥样用质量分数 4% 的多聚甲醛固定 2 h; 再对固定后泥样离心,并在 $1\times$ 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,用 50%、80% 和 98% 酒精分别浸泡 3 min. 将荧光标记的核苷酸探针 (表 1) 溶解于杂交缓冲液中 (组成: 0.9 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH = 7.4), 0.01% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 35% 去离子甲酰胺 (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 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH = 8.0), 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH = 7.2), 0.01% SDS 和 0.9 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) 在 48℃ 下洗脱 20 min. 最后,对每个污泥样品用荧光显微镜 (Zeiss Axioskop 40) 随机拍照并进行定量分析.

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

探针	序列	特异性	5' 标记	参考文献
EUB338-I *	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Bacteria	FITC	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338-II *	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Bacteria	FITC	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338-III *	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Bacteria	FITC	Daims <i>et al.</i> , 1999
PAO 462 *	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i>	TAMRA	Crocetti <i>et al.</i> , 2000
PAO 651 *	CCCTCTGCCAAACTCCAG	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i>	TAMRA	Crocetti <i>et al.</i> , 2000
PAO 846 *	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i>	TAMRA	Crocetti <i>et al.</i> , 2000

注: * EUBmix (EUB338-I、EUB338-II 和 EUB338-III 以体积比 1:1:1 混合), PAOmix (PAO462、PAO651 和 PAO832 以体积比 1:1:1 混合). 实验所用 FISH 探针由 Invitrogen 公司合成.

2.6 LIVE/DEAD 细胞活性实验

采用荧光染料对衰减过程中泥样染色,以确定泥样衰减过程中活细菌细胞占总细菌细胞比例的变化规律. 具体方法参见文献 (郝晓地等, 2008).

3 结果 (Results)

3.1 PAOs 富集 SBR 系统稳态运行

PAOs 富集 SBR 系统达到稳态运行后, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 、

VFA 和 Gly 浓度变化曲线如图 3 所示 ,其中 ,VFA 和 Gly 浓度以 COD 计. 图 3 结果显示 ,在厌氧阶段 ,当底物(VFA) 进入反应器后 ,立即被 PAOs 所吸收 ,PAOs 细胞内 Gly 也得到了分解; 与此同时 , $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 大量被释放 ,在厌氧阶段末期约达到 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (即

净放磷量为 $70\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) . 在好氧阶段 , $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 被过量吸收 ,Gly 也被重新合成. 这与典型 PAOs 生理、生化特征完全一致. 由此可以推断 ,PAOs 在 SBR 系统中获得了较高度度的富集.

3.2 PAOs 衰减速率

PAOs 在好氧衰减过程中活性变化趋势见图 4. 图 4 结果显示 ,PAOs 活性在整个衰减过程中呈线性平稳下降趋势. 根据线性回归方法 ,可计算出 PAOs 在 7 d 衰减时间内衰减速率(含标准差) 分别为 $(0.113 \pm 0.006)\text{ d}^{-1}$ (BNR 系统) 和 $(0.181 \pm 0.020)\text{ d}^{-1}$ (SBR 系统) . 这些数值与活性污泥 2 号模型(ASM2) (Gujer *et al.* , 1995) 和瑞士 EAWAG 生物除磷模型所推荐的缺省值 (0.2 d^{-1}) (Rieger *et al.* , 2001) 大小相当 ,也与 Lopez 等(2006) 的测定结果 (0.15 d^{-1}) 相差不大. 与 Lopez 等测定结果存在的微小差别可能是由于确定衰减速率的重要参数 PRR 在两个实验中采用了不同单位所致(本研究: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$; Lopez 等: $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,以 VSS 计) .

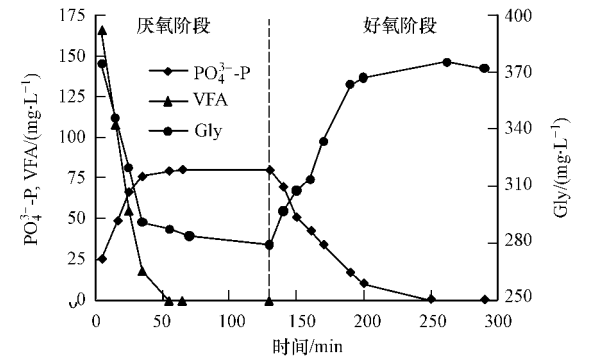


图 3 PAOs 富集 SBR 系统一个稳态运行周期内 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ 、VFA 和 Gly 浓度变化曲线

Fig. 3 Typical profiles of phosphate , VFA and glycogen for the enriched PAO-SBR system during an operational (steady state) cycle

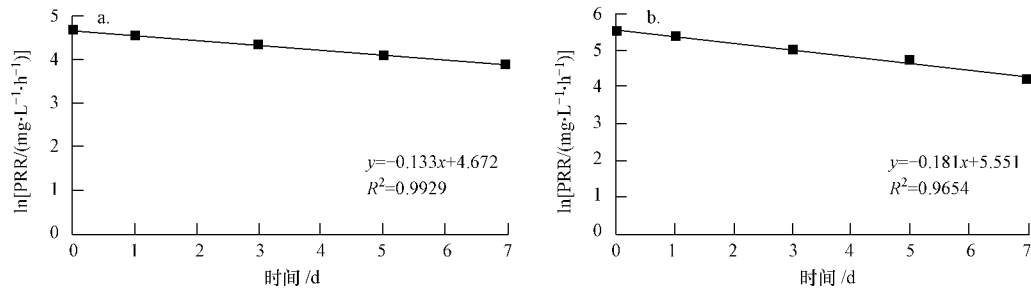


图 4 PAOs 在好氧衰减过程中的活性变化 (a. BNR 系统; b. SBR 系统)

Fig. 4 Decreasing trends in the activities of PAOs during the aerobic decay experiments (a. BNR; b. SBR)

3.3 FISH 实验结果

BNR 系统和 PAOs 富集 SBR 系统泥样 FISH 照

片见图 5. 图 5 中 FISH 图像分析结果见图 6. 根据统计学分析发现 ,在衰减过程中 PAOs 比例并没有出

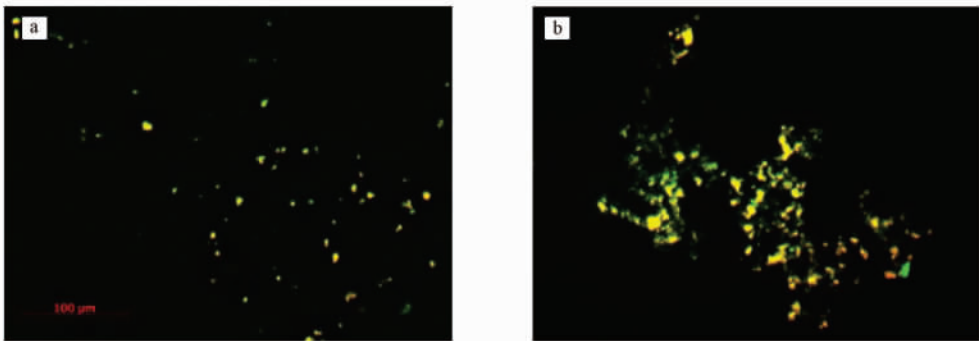


图 5 BNR 系统 (a) 和富集聚磷菌 SBR 系统 (b) 中泥样 FISH 图像(FITC 标记的探针 EUB338_{mix} 为绿色 ,用于检测所有细菌; TAMRA 标记的探针 PAOmix 为红色 ,用于检测 PAOs; 黄色为 FITC 标记的探针 EUB338_{mix} 与 TAMRA 标记的探针 PAOmix 叠加后的颜色)

Fig. 5 FISH photos for the sludge samples of BNR (a) and enriched PAO-SBR (b) systems (FITC labeled EUB_{mix} targets all the bacteria (green) , TAMRA labeled PAOmix target PAOs (red) . PAOs are visualized in yellow because of binding of probes)

现突然变化 ($p > 0.05$)。因此,基于图 6 可以计算出 PAOs 在 7 d 衰减时间内平均比例(含标准差)分别为 $60\% \pm 14\%$ (BNR 系统) 和 $91\% \pm 7\%$ (SBR 系统)。

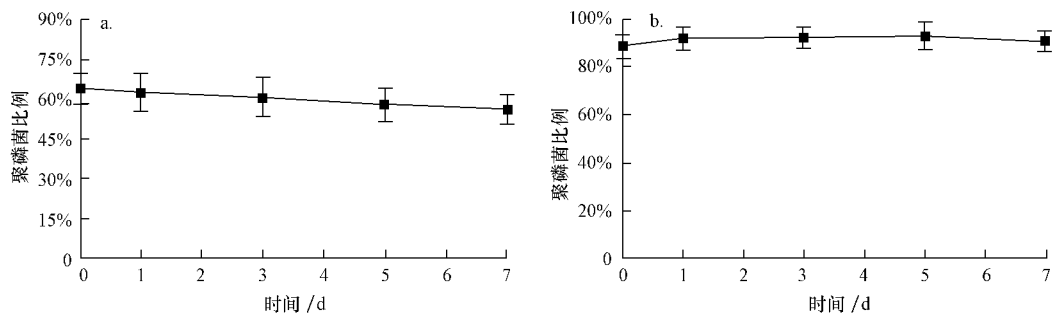


图 6 活 PAOs 占总活生物量比例(误差条代表标准差, a. BNR 系统 b. PAOs 富集 SBR 系统)

Fig. 6 Fractions of viable PAOs in total viable bacteria (the error bars indicate the standard errors , a. BNR , b. enriched PAO-SBR)

3.4 LIVE/DEAD 实验结果

BNR 系统和 PAOs 富集 SBR 系统典型泥样 LIVE/DEAD 显微图像见图 7. LIVE/DEAD 图像分析结果绘于图 8. 根据统计学分析发现,在衰减过程中两系统中活细胞比例均呈下降趋势 ($p < 0.01$)。由于系统中生物量会因细胞衰减而减少,所以,本实验对衰减过程中的 MLVSS 进行了测定。

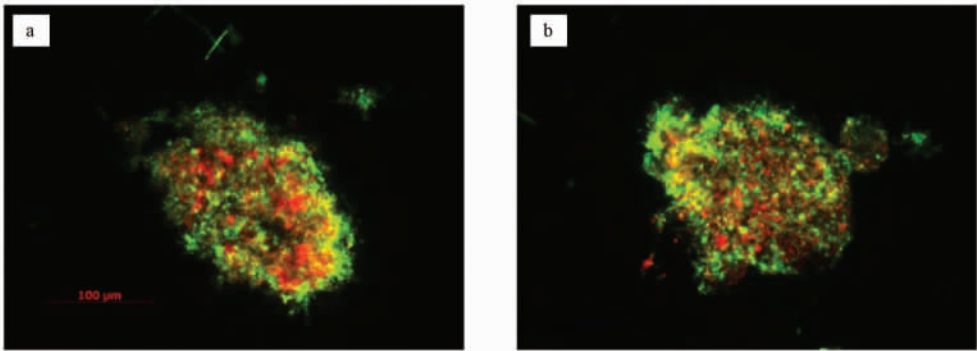


图 7 BNR 系统 (a) 和富集聚磷菌 SBR 系统 (b) 中典型泥样 LIVE/DEAD 显微图像(绿色代表活细胞,红色代表死细胞)

Fig. 7 LIVE/DEAD photos for the sludge samples of BNR (a) and enriched PAO-SBR (b) systems(Viable cells are visualized in green , dead cells are visualized in red)

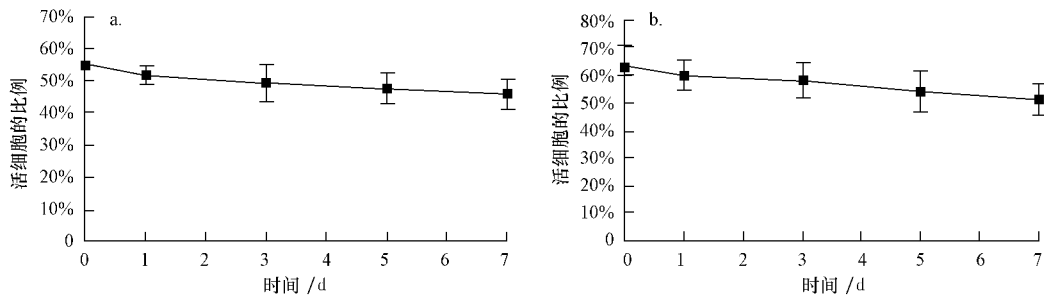


图 8 衰减过程中活细菌比例变化规律(误差条代表标准差, a. BNR 系统, b. PAOs 富集 SBR 系统)

Fig. 8 Fraction variations of viable cells during the decay experiments (the error bars indicate the standard errors , a. BNR , b. enriched PAO-SBR)

依据 MLVSS ,FISH 以及 LIVE/DEAD 测定结果,按公式(2) (Hao *et al.* , 2009),可计算出 BNR 系统和 PAOs 富集 SBR 系统中 PAOs 在衰减过程中死亡规律,结果如图 9 所示. 根据线性回归方法,可计算出 BNR 系统和 PAOs 富集 SBR 系统中 PAOs 死亡速率分别为 $(0.048 \pm 0.004) \text{ d}^{-1}$ 和 $(0.036 \pm$

0.003 d⁻¹).

$$X_A = M \times P \times L \tag{2}$$

式中 X_A 为活 PAOs 浓度 (mg·L⁻¹, 以 COD 计), M 为混合液挥发性悬浮固体, 即 MLVSS (mg·L⁻¹), P

为活 PAOs 占总活生物量的比例, 即 FISH 测定结果 L 为活细菌占总细菌的比例, 即 LIVE/DEAD 测定结果.

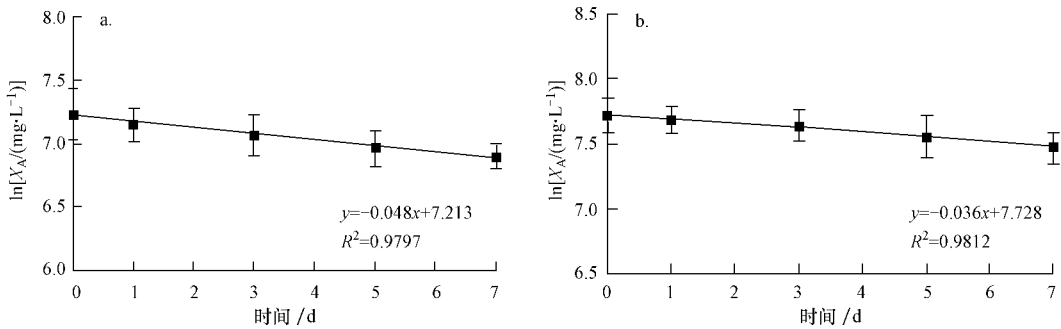


图9 PAOs 衰减过程中死亡规律(误差条代表标准差, a. BNR 系统, b. PAOs 富集 SBR 系统)

Fig. 9 Decreasing trends in the concentrations of the viable PAOs during the decay experiments (the error bars indicate the standard errors , a. BNR , b. enriched PAO-SBR)

4 讨论 (Discussion)

4.1 BNR 系统与富集聚磷菌 SBR 系统中 PAOs 衰减速率对比分析

与 PAOs 富集 SBR 系统中 PAOs 的衰减速率 ((0.181 ± 0.020) d⁻¹) 相比, BNR 系统中 PAOs 衰减速率 ((0.113 ± 0.006) d⁻¹) 显然偏低, 这可能是由于两系统运行的 SRT 不同所致(BNR 系统 SRT = 35d; SBR 系统 SRT = 12d). 长 SRT 系统可能更易选择出能适应饥饿状态的菌种(Salem *et al.* , 2006), 即应对不利环境细菌能够迅速做出紧迫反应, 从而导致衰减速率降低. 此外, PAOs 富集 SBR 系统采用实验室配水, 而 BNR 系统采用真实生活污水, 污水水质不同必然会导致两系统污水中噬菌体、病毒、原动物及后生动物数量不同, 这些因素将最终导致两个系统中 PAOs 衰减速率出现一定差异.

4.2 PAOs 数量衰减与活性衰减对比分析

根据计算确定的 PAOs 衰减速率和死亡速率, 可进一步计算出 PAOs 数量衰减(细胞死亡) 和活性衰减对细胞总衰减中的贡献, 结果如表 2 所示. 由表 2 可知, PAOs 数量衰减只占其总衰减中较小一部分, 绝大部分衰减是由活性衰减引起的. PAOs 的这一内源特征显然是由其自身代谢方式特点所致, 或者说, PAOs 在内源过程初期主要采取紧迫反应来应对不利环境条件, 程序化细胞死亡(PCD) 在内源过程初期并不是主要应对方式. 此外, PAOs 在厌氧阶段外源底物充足时能够迅速贮存外源底物, 形成胞内聚合物(如 PHA) (Matsuo *et al.* , 1992; Smolders *et al.* , 1995). 在随后好氧衰减过程中, PAOs 可以依次分解体内的 PHA、Gly 和其它细胞物质来获取用于细胞维持的能量(Lu *et al.* , 2007). 可见, 上述综合因素导致了 PAOs 在内源过程中衰减主要表现为活性的降低而不是细胞死亡.

表 2 PAOs 数量衰减与活性衰减占其细胞总衰减比例

Table 2 Calculated fractions (with standard errors) of cell death and activity decay of PAOs					
菌属	系统	数量衰减的比例	计算方法	活性衰减的比例	计算方法
PAOs	BNR	42% ± 4%	(0.048 ± 0.004) / (0.113 ± 0.006)	58% ± 4%	1 - (0.048 ± 0.004) / (0.113 ± 0.006)
	富集 PAO-SBR	20% ± 3%	(0.036 ± 0.003) / (0.181 ± 0.020)	80% ± 3%	1 - (0.036 ± 0.003) / (0.181 ± 0.020)

实验结果表明, 目前大多有关细菌衰减的研究因不能区分数量衰减和与活性衰减, 而采用一个总衰减系数表示细菌衰减的方法不够科学, 应当予以修正. 例如, 现有活性污泥数学模型将细胞衰减均

假设为由细胞死亡所引起 (Henze *et al.* , 1987; 1999; Gujer *et al.* , 1995; 1999) . 可见 ,若不对模型参数(衰减系数) 适当修正 ,势必导致模拟结果与实际情况出现一定偏差.

5 结论 (Conclusions)

- 1) 细菌衰减是微生物内源过程的一个重要组成部分 ,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. 这一认识应在污水生物处理技术的工程应用中得到足够重视.
- 2) 当 PAOs 富集 SBR 系统中 $T = (22. 0 \pm 0. 5) \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7. 50 \pm 0. 05$,进水 COD/P = 20:1 ,且进水中碳源($\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) 是以 $36\text{d} (3 \times \text{SRT})$ 为一个循环周期方式投加时 ,PAOs 可以达到 91% 的富集率.
- 3) 根据衰减过程中磷酸盐释放速率(PRR) 变化 ,计算确定的 BNR 系统和 PAOs 富集 SBR 系统中 PAOs 衰减速率分别为 $0. 113 \text{ d}^{-1}$ 和 $0. 181 \text{ d}^{-1}$.
- 4) 根据 LIVE/DEAD 细胞染色技术和 FISH 定量方法 ,确定出 BNR 系统和 PAOs 富集 SBR 系统中 PAOs 死亡速率分别为 $0. 048 \text{ d}^{-1}$ 和 $0. 036 \text{ d}^{-1}$,其数量衰减占细胞总衰减的比例分别为 42% 和 20% . PAOs 数量衰减只占其细胞总衰减的较小一部分 ,绝大部分衰减是由活性衰减引起的.

责任作者简介: 郝晓地 ,男 ,50 岁 ,获荷兰代尔夫特理工大学 (TU Delft) 博士学位 ,国际水协 (IAW) 学术期刊《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: haoxiaodi@ 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

APHA. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [M]. Washington DC , America: American Public Health Association

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

132(4) : 338—344

Crocetti G R , Hugenholtz P P , Bond P L , *et al.* 2000. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation [J]. Appl Environ Microbiol , 66(3) : 1175—1182

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

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

Hao X D , Wang Q L , Zhang X P , *et al.* 2009. Experimental evaluation of decrease in bacterial activity due to cell death and activity decay in activated sludge [J]. Water Res , 43(14) : 3604—3612

Hao X D , Wang Q L , Zhu J Y , *et al.* 2010. Microbiological endogenous processes in biological wastewater treatment systems [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology , 40 (3) : 239—265

郝晓地 , 朱景义 , 曹秀芹 , 等. 2008. 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.* 2008. Experimental determination of bacterial decay characteristics in biological wastewater treatment system [J]. Environmental Science , 29(11) : 3104—3109 (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 , London: IAWPRC

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

Jenkins D , Richard M G , Daigge G T. 1993. Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming [M]. Chelsea: Lewis Publishers

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

Lee N M , Welander T. 1996. Use of protozoa and metazoa for decreasing sludge production in aerobic wastewater treatment [J]. Biotechnol Lett , 18(4) : 429—434

Lesouef A , Payraudeau M , Rogalla F , *et al.* 1992. Optimizing nitrogen removal reactor configuration by on-site calibration of the IAWPRC activated sludge model [J]. Water Sci Technol , 25(6) : 105—123

Lopez C , Pons M N , Morgenroth E. 2006. Endogenous processes during long-term starvation in activated sludge performing enhanced biological phosphorous removal [J]. Water Res , 40 (8) : 1519—1530

Lu H , Keller J , Yuan Z , 2007. Endogenous metabolism of *Candidatus accumilibacter phosphatis* under various starvation conditions [J]. Water Res , 41(20) : 4646—4656

Lu H , Oehmen A , Virdis B , *et al.* 2006. Obtaining highly enriched

- cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* through alternating carbon sources [J]. *Water Res*, 40(20): 3838—3848
- Manser R, Gujer W, Siegrist H. 2006. Decay processes of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment systems [J]. *Water Res*, 40(12): 2416—2426
- Matsuo T, Mino T, Sato H. 1992. Metabolism of organic substances in anaerobic phase of biological phosphate uptake process [J]. *Water Sci Technol*, 25(6): 83—92
- Moosbrugger R E, Wentzel M C, Ekama G A, *et al.* 1993. A 5 pH point titration method for determining the carbonate and SCFA weak acid/bases in anaerobic systems [J]. *Water Sci Technol*, 28(2): 237—245
- Rieger L, Koch G, Kuhni M, *et al.* 2001. The EAWAG bio-P module for activated sludge model NO. 3 [J]. *Water Res*, 35(16): 3887—3903
- Salem 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 I, Koch G, *et al.* 1999. Reduction of biomass decay rate under anoxic and anaerobic conditions [J]. *Water Sci Technol*, 39(1): 129—137
- Smolders G J F, Vandermeij J, van Loosdrecht M C M, *et al.* 1995. A structured metabolic model for anaerobic and aerobic stoichiometry and kinetics of the biological phosphorus removal process [J]. *Biotechnol Bioeng*, 47(3): 277—287
- Suttle C A. 1994. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities [J]. *Microbial Ecology*, 28(2): 237—243
- Vadivelu V M, Keller J, Yuan Z G. 2006a. Stoichiometric and kinetic characterisation of *Nitrosomonas* sp. in mixed culture by decoupling the growth and energy generation processes [J]. *J Biotechnol*, 126(3): 342—356
- Vadivelu V M, Yuan Z G, Fux C, *et al.* 2006b. Stoichiometric and kinetic characterisation of *Nitrobacter* in mixed culture by decoupling the growth and energy generation processes [J]. *Biotechnol Bioeng*, 94(6): 1176—1188
- van Loosdrecht M C M, Henze M. 1999. Maintenance, endogenous respiration, lysis, decay and predation [J]. *Water Sci Technol*, 39(1): 107—117
- Yarmolinsky M B. 1995. Programmed cell death in bacterial populations [J]. *Science*, 267(5199): 836—837