

分析与监测

测定脱氢酶活性的萃取剂选择

尹 军¹, 谭学军², 张立国², 付 瑶¹

(1. 吉林建筑工程学院 环境工程系, 吉林 长春 130021; 2. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要: 选择最佳萃取剂是提高脱氢酶活性测定结果准确性的重要步骤之一,因此在测定内源呼吸 TTC-脱氢酶活性时,选择了丙酮、乙醇、正丁醇、磷酸三丁酯、乙酸乙酯、甲苯和三氯甲烷七种萃取剂,就标准曲线、最佳萃取时间以及萃取污泥中三苯基甲酯(TF)的能力等三个方面进行了比较。综合考虑各种性能后确定丙酮为最佳萃取剂。

关键词: TTC-脱氢酶活性; 内源呼吸; 萃取剂; 标准曲线

中图分类号: X832 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2004)07-0096-03

Extractant Selection in Measuring Activity of Dehydrogenase

YIN Jun¹, TAN Xue-jun², ZHANG Li-guo², FU Yao¹

(1. Dept of Environmental Engineering, Jilin Architectural and Civil Engineering Institute, Changchun 130021, China; 2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Selection of optimal extractant was one of important measures for improving accuracy in measuring dehydrogenase activity, therefore seven kinds of extractant such as acetone, ethanol, n-butanol, tributyl phosphate, ethyl acetate, methylbenzene, and trichloromethane were selected for measuring endogenous TTC-dehydrogenase activity. Comparison was made in the regards of standard curve, the best extraction time, and extraction rate of TF from sludge. After overall consideration for all characteristics, acetone was determined to be the best extractant.

Key words: TTC-dehydrogenase; endogenous respiration; extractant; standard curve

测定 TTC-脱氢酶活性的步骤包括培养、萃取和比色等,其中萃取的目的是利用萃取剂尽可能从细胞内萃取出三苯基甲酯(TF),一般采用甲醇、乙醇、丙醇、丁醇等作为萃取剂,有人也采用甲苯、三氯甲烷、正丁醇和丙酮,萃取剂的不统一使 TTC-脱氢酶活性测定的结果很难进行横向比较。

针对于此选择了丙酮(85%)、乙醇(96%)、正

丁醇、磷酸三丁酯、乙酸乙酯、甲苯和三氯甲烷七种萃取剂,进行了内源呼吸 TTC-脱氢酶活性测定的试验研究。

1 试验装置与方法

1.1 试验装置

试验采用 SBR 反应器。反应器总容积为 10 L,采用多孔石曝气,运行条件为:①进水 COD 浓度大

约为 2 000 mg/L;②pH 值自然变化于 6.5~8.5 之间;③溶解氧浓度维持在 2.0 mg/L 以上;④污泥浓度大约为 3 000 mg/L;⑤采用温控仪和加热器将温度控制在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.2 主要试剂

0.4% TTC 溶液;Tris-HCl 缓冲液 ($\text{pH} = 8.4$);
0.36% Na_2SO_3 溶液;1 mg/mL TTC 标准溶液。

1.3 试验用水

以啤酒作为碳源加适量的自来水稀释配制成原水,投加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KH_2PO_4 作为氮源和磷源,使 $\text{BOD}_5:\text{N}:\text{P}$ 比值大致为 100:5:1,投加 NaHCO_3 调节 pH 值。

2 结果与讨论

测定 TTC-脱氢酶活性时,选择的萃取剂要满足以下条件:①制作标准曲线容易且稳定性和重现性好;②萃取时间短;③萃取污泥中 TF 的能力强。

2.1 标准曲线

① 制作标准曲线

a. 分别吸取 1 mgTTC/mL 标准溶液 1、2、3、4、5、6 mL 加于 50 mL 棕色容量瓶中,再用纯水分别稀释至 50 mL,摇匀后得到 20、40、60、80、100、120 $\mu\text{gTTC/mL}$ 的系列溶液。

b. 取 7 支带刻度具塞离心管,其中 1 支加纯水 1 mL,其他 6 支分别加入上述系列溶液 1 mL。再于每支离心管中加入 2.5 mL Tris-HCl 缓冲液、0.5 mL 0.36% 的 Na_2SO_3 溶液、0.5 mL 纯水,摇匀后,每支离心管中均加入 5 mg 连二亚硫酸钠混匀,使离心管中的 TTC 全部还原为 TF(在暗处进行)。

c. 将上述离心管置于 37°C 恒温水浴振荡器中培养 30 min,然后每支离心管中加入 0.5 mL 甲醛和 5 mL 萃取剂,在 37°C 恒温水浴振荡器中放置 10 min。上述操作均在暗处进行。

d. 将 7 支离心管于 4 000 r/min 条件下离心 5 min,然后测定吸光度(测定波长为 485 nm,比色皿光程为 1 cm)。

② 标准曲线的比较

试验得出了 7 条标准曲线并通过回归分析得到了萃取常数和回归系数(见表 1)。可见,萃取常数最大的是乙酸乙酯,而甲苯的回归系数最佳。

表 1 标准曲线的萃取常数和回归系数

Tab. 1 The extraction constants and the regression coefficients of standard curves

萃取剂	丙酮	乙酸乙酯	磷酸三丁酯	甲苯	三氯甲烷	正丁醇	乙醇
萃取常数 (k_e)	0.007 40.008	40.007	10.007	70.006 9	0.007	0.006 5	
回归系数 (r)	0.996 80.994	50.996	40.998	50.991	30.997	10.994 0	

2.2 萃取效果

① 测定步骤

采用常规的污泥内源呼吸 TTC-脱氢酶活性测定步骤,对其中有些部分做了特殊改动。

a. 取样及制备样品。用烧杯在曝气池中取出一定量的混合液,静置 30 min 后将上清液倒入另一个烧杯中。用洁净的刻度吸管吸取 2 mL 静沉污泥放入 10 mL 离心管中,然后再加入 3 mL 蒸馏水并搅拌均匀。将盛有 5 mL 污泥悬浮液的离心管置于离心机内,在 4 000 r/min 条件下离心 5 min,弃去上清液。再用 5 mL 纯水将沉淀污泥搅拌混合均匀,离心 5 min 后弃去上清液。这样反复用纯水洗涤离心处理 3 次,最后向离心管中加纯水至 5 mL(以保持原有体积)并搅拌混合均匀。

将上述 5 mL 污泥样品转移至 25 mL 比色管中,分别加入 12.5 mL Tris-HCl 缓冲液、2.5 mL 的 0.4% TTC 溶液、2.5 mL 的 0.36% Na_2SO_3 ,并搅拌均匀。然后立刻用吸管从 25 mL 试管中迅速吸出 4.5 mL 培养液于 10 mL 离心管中,并加入 1 mL 甲醛溶液以抑制酶反应,此管作为分析样品的空白对照。

b. 样品培养。将加好试剂的 25 mL 比色管置于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡器内在暗处进行培养。培养时间一般控制在 30 min 左右。当达到预定培养时间时,向 25 mL 比色管中加入 2.0 mL 甲醛溶液并混合均匀,即可中止酶反应。

c. 样品萃取。以 5 mL 为 1 份,将 25 mL 比色管中的培养液分装在 4 个 10 mL 离心管内,然后连同样品空白对照管一起离心(4 000 r/min)5 min,弃去上清液后向每支离心管中加 5 mL 萃取剂并搅拌均匀,在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下于暗处水浴振荡一定时间(根据不同的萃取剂选择不同的振荡时间)。将萃取完毕的离心管离心(4 000 r/min)5 min,其上清液即为样品显色液。

d. 测定。选择光程为 1 cm 的比色皿用 721 分

光光度计在 485 nm 处测定样品显色液的吸光度值。

e. 计算。根据所测得的吸光度值,查标准曲线找出显色液中的 TF 浓度,然后根据下式计算所测样品的脱氢酶活性:

$$DHA = \frac{A \times C}{B} \quad (1)$$

式中 DHA——污泥脱氢酶活性, $\mu\text{gTF}/(\text{mL} \cdot \text{h})$

A——标准曲线对应值, $\mu\text{gTF}/\text{mL}$

B——培养时间, h

C——比色时的稀释倍数

② 37 °C 条件下萃取时间的比较

在 37 °C 条件下将甲苯与三氯甲烷加入经离心的污泥样品中后,污泥很快完全成块地粘到试管壁上,使萃取 TF 的工作根本无法进行。其他萃取剂的试验结果如图 1 所示。

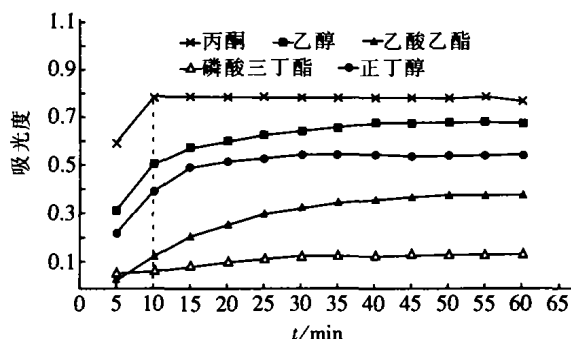


图 1 37 °C 条件下各种萃取剂的萃取时间

Fig. 1 The extraction time for different extractants at 37 °C

从图 1 可以看出,丙酮在萃取 10 min 时就已经达到了最大值,而其他的萃取剂都需要 20 min 以上,这说明丙酮在萃取时间上具有很大的优势。根据各种萃取剂萃取污泥中 TF 所达到的最大值和需要的萃取时间,再利用标准曲线可计算出常温条件下各萃取剂萃取 TF 的速度:丙酮、乙醇、乙酸乙酯、磷酸三丁酯、正丁醇分别为 10.68、2.62、0.90、0.61、2.60 $\mu\text{gTF}/(\text{mL} \cdot \text{min})$,可见丙酮的萃取速度大约是乙醇和正丁醇的 4 倍、乙酸乙酯的 12 倍、磷酸三丁酯的 17 倍。

③ 萃取能力的比较

试验结果见图 2。

从图 2 可见,五种萃取剂中丙酮得到的吸光度值最大,萃取效果最好,其次是乙醇。综合考虑标准曲线和萃取能力,丙酮仍然是常温条件下比较理想的萃取剂。

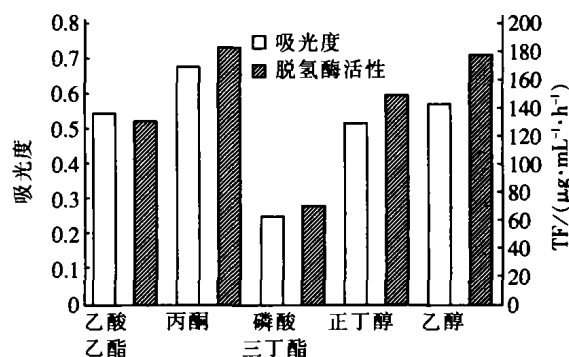


图 2 37 °C 条件下萃取剂萃取性能比较

Fig. 2 Comparison of extraction capability at 37 °C

经试验验证,即使是将磷酸三丁酯、甲苯和正丁醇的萃取温度升高到 90 °C,其萃取能力都不及丙酮在 37 °C 条件下的萃取效果。

3 结论

① 在 TTC - 脱氢酶活性测定中,制作标准曲线过程的萃取属于液 - 液萃取,萃取常数最大的是乙酸乙酯,其他依次为甲苯、丙酮、磷酸三丁酯、正丁醇、三氯甲烷和乙醇。回归系数最大的是甲苯,其他依次为正丁醇、丙酮、磷酸三丁酯、乙酸乙酯、乙醇和三氯甲烷。

② 测定实际样品中的 TTC - 脱氢酶活性时,萃取属液 - 固相萃取,丙酮的萃取时间最短 (10 min),萃取速度也最大,其萃取速度大约是乙醇和正丁醇的 4 倍、是乙酸乙酯的 12 倍、是磷酸三丁酯的 17 倍。

③ 综合标准曲线和萃取能力后确定丙酮是常温条件下比较理想的萃取剂。

参考文献:

- [1] 周春生,尹军. TTC - 脱氢酶活性检测方法的研究[J]. 环境科学学报,1996,16(4):400 - 405.
- [2] 尹军. 消化污泥脱氢酶活性检测的若干问题[J]. 中国给水排水,2000,16(10):47 - 49.
- [3] 张志杰,张维平. 环境污染生物监测与评价[M]. 北京:中国环境科学出版社,1991.
- [4] 俞毓馨,吴国庆,孟宪庭. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京:中国环境科学出版社,1990.

电话:(0431)5935055

传真:(0431)5914479

E-mail: frankytan@163.com

收稿日期:2004 - 02 - 27