

# 饮用水生物预处理生物活性评价方法探讨<sup>\*</sup>

尹 军 谭学军 王雪峰 王建辉

(吉林建筑工程学院 市政与环境工程学院, 长春 130021)

**摘要:** 饮用水生物预处理过程中, 生物膜上存活的活性生物量是有机污染物去除的基础. 利用合适的微生物活性检测方法, 及时、准确地评价出活性生物量的生物活性, 可以为系统的运行与监控提供很大的帮助. 论述了各种生物膜活性评价方法的检测机理, 分析了这些评价方法存在的优缺点, 探讨了它们在饮用水生物预处理工艺中应用的可行性. 同时, 也介绍了利用生物活性参数来表征饮用水生物预处理系统的生物活性的研究状况.

**关键词:** 生物预处理; 脱氢酶活性; 三磷酸腺苷; 氧摄取速率; 活菌菌数; 脱氧核糖核酸

**中图分类号:** X 703

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-1288(2006)01-0001-05

随着经济的发展和人民生活水平的提高, 人们对城市供水行业的要求已不局限于水量的满足上, 对水质的要求正在逐年提高; 另一方面, 很多城市饮用水源的污染程度却日渐加剧, 水质日趋恶化. 面对这种情况, 传统的饮用水处理工艺(混凝—沉淀—过滤—消毒)已不能满足人们不断提高的水质要求. 因此, 采取何种方法来提高自来水管网的供水水质, 改善城市居民的生活条件, 成为水处理工作者面临的严重问题<sup>[1]</sup>.

饮用水的生物预处理由于具有经济、高效等特点, 近来在国内外受到普遍关注. 该方法是指在传统的饮用水处理工艺之前增设一套生物处理装置, 藉此去除一些可以生物降解的有机物、 $\text{NH}_3\text{-N}$  和亚硝酸盐, 同时, 去除氯化消毒副产物的前驱物. 饮用水生物预处理系统内微生物活性的高低直接关系到污染物的去除效果. 保持微生物长期处在较高的活性水平, 可大大提高系统的处理效果. 因此, 选择合适的饮用水生物预处理的生物活性评价方法就显得尤为重要.

笔者在对国内外污水处理中经常采用的多种生物活性评价方法, 如脱氢酶活性(DHA, Dehydrogenase Activity)法、三磷酸腺苷(ATP, Adenosine Triphosphate)含量法、氧摄取速率(OUR, Oxygen Uptake Rate)法、活菌菌数(ABN, Active Bacteria Number)法、脱氧核糖核酸(DNA, Deoxyribonucleic Acid)含量法等进行分析的基础上, 就其在饮用水生物预处理系统中应用的可行性进行探讨.

## 1 饮用水生物预处理的生物活性检测方法探讨

目前, 国内外已进行研究并投入使用的生物预处理方法较多, 其中, 较有代表性的方法主要是生物滤池、生物接触氧化法和生物流化床等. 这些方法都属于生物附着型的生物膜法工艺. 理想的生物膜应该是薄的、稳定的, 而且要具有一定的活性. 生物膜活性是系统成功运行与控制的重要参数, 生物膜特性的好坏也直接关系到系统的处理效果. 测定和分析生物膜的生物活性的主要目的, 是利用生化手段来测定某些特殊酶的活性或微生物新陈代谢特殊产物的含量, 区分“活性生物膜”与“非活性生物膜”的作用, 考察反应器的不同位置及不同过程生物膜活性的变化, 以此来评价系统的处理效果. 为达到这一目的, 研究和开发简单、快速、灵敏、准确和重现性好的生物活性评价方法是非常重要的.

### 1.1 脱氢酶活性(DHA)法

有机污染物的降解过程包含很多酶类的参与, 正是由于这些酶的相互协调、相互作用的结果, 有机物的无机化才得以实现. 脱氢酶在这一过程中, 不但占有相当的比重, 而且扮演着重要的角色. 脱氢酶能使有机底

收稿日期: 2005-10-24.

作者简介: 尹 军(1954~), 男, 吉林省吉林市人, 教授, 博士生导师.

<sup>\*</sup> 吉林省重大科技发展计划项目(20040405-1).

物的氢(电子)活化,进而通过电子传递体系将活化的氢(电子)转移给最终的电子受体( $O_2$ ,  $NO_3^-$  或  $SO_4^{2-}$  等). 电子在呼吸链上传递的速率直接反映出脱氢酶活性的大小.

测定脱氢酶活性的基本原理,是通过外加某种氧化还原染料作为人工受氢体(也称为人工电子受体),使其从呼吸链上接受电子后被还原,并产生颜色的变化,然后,通过分光光度法测定还原产物所产生的光密度,以此定量地反映脱氢酶活性的大小. 呼吸链传递电子的速率越快,还原产物所产生的光密度越大,脱氢酶活性也越大. 外加的人工电子受体的氧化还原电位要比天然电子受体的氧化还原电位低,所以,它可以在天然电子受体之前从呼吸链上接受电子.

脱氢酶活性是一种非常灵敏、简单的测定微生物活性的方法. 脱氢酶活性测定过程中不需要生物膜的剥离,所以能保持生物膜的完整性. 常用的人工受氢体主要包括 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC, 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium chloride)和磺硝基四氮唑[INT, 2-(piodophenyl) 3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazolium Chloride]. 这两种氧化还原染料由于具有的官能团不同,在电子亲和力上表现出了一定的差异性,在呼吸链上接受电子的能力也不同. 因此,在利用这两种人工氢受体来检测实际样品的脱氢酶活性时,测定方法及适用的微生物生理生化过程会存在部分差异,具体见表 1.

表 1 TTC 和 INT-脱氢酶活性检测方法比较

| 参数               | TTC               | INT                             |
|------------------|-------------------|---------------------------------|
| 氧化态染料            | 无色粉末状             | 浅黄色粉末状                          |
| 还原态染料            | 细胞内、不溶于水的红色晶体     | 细胞内、不溶于水的紫色晶体                   |
| 对氧的敏感性           | 敏感,遇氧颜色容易丢失,实验需除氧 | 不敏感,实验不需除氧                      |
| $E^{\circ}$ (mV) | +490              | +90                             |
| 电子亲和力            | 弱                 | 强                               |
| 培养温度( )          | 37                | 37                              |
| 适用性              | 好氧呼吸              | 1. 好氧呼吸、硝化过程;2. 无氧呼吸(反硝化、反硫化过程) |

由表 1 可见, TTC 与 INT 的最大差异就是自身的氧化还原电位不同, TTC 的氧化还原电位(+490 mV)相对较高,这使它与氧竞争电子的能力要弱一些<sup>[2]</sup>. 因此,在利用 TTC 检测微生物的脱氢酶活性时,需包含除氧步骤,目的是避免氧对测定结果的干扰. 而 INT 的最大优势是氧化还原电位(+90 mV)较低,从而避免了氧气对分析测定的干扰. 由于具有这一特点,近年来,利用 INT 表征微生物活性的方法受到越来越多地注意<sup>[3-4]</sup>. 图 1 中,虚线为 TTC 和 INT 从氧化呼吸链上可能接受电子的部位.

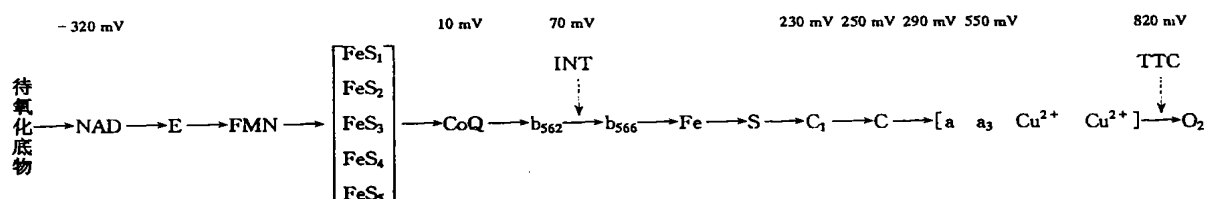


图 1 TTC 和 INT 从微生物呼吸链上接受电子的部位

INT 分析方法的另外一个优点是既可以测定好氧呼吸的活性,也可以测定无氧呼吸的活性,这也是由于 INT 自身的氧化还原电位较低缘故. 这个特点使 INT 分析方法可以用来表征生物脱氮体系的活性.

目前,我国很多饮用水水源硝酸盐含量都存在超标情况,这种趋势还将随着农业上氮肥施用量的增加,城乡污水排放量的加大不断加剧. 为使饮用水硝酸盐含量达标,生物反硝化脱氮法已得到广泛地研究与应用<sup>[5]</sup>. 另外,作为生物预处理的曝气生物反应器,尽管主要去除目标是有机污染物及氨氮等,且原水有机碳含量低,水中溶解氧充足,反硝化作用一般不会进行,但由于填料表面布满生物膜,内层可能由于传质不良而形成缺氧区,故存在局部反硝化的可能<sup>[6]</sup>. 因此,如果能通过合适的手段,利用 INT 实验来表征出饮用水生物脱氮法和生物预处理系统的生物膜上反硝化细菌的生物活性,将会为研究生物预处理的生物膜构成及污染物的去除机理提供重要的实验依据.

近来, Rodriguez 等人介绍了一种新的测定脱氢酶活性的人工电子受体—CTC (5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium Chloride). CTC 是一种荧光染料,被电子传递体系还原后会形成 CTC-formazan,在紫外光下 CTC-

formazan 会发出红色的荧光.利用 CTC 可以直接计数呼吸细菌的数目. Schaule 和 Pierzo 等人后来扩大了该技术的应用范围.他们利用这一技术来迅速地探测、定位和定量饮用水和污水处理系统中悬浮或固着型活细菌的数量.与其它传统的微生物技术比较,该技术的主要优点是简单和快速<sup>[7]</sup>.

### 1.2 三磷酸腺苷(ATP)法

ATP 作为生物能源在整个微生物代谢过程中扮演着重要角色. ATP 是活性生物的基本构成物质,它参与微生物的新陈代谢活动,并随着细胞的死亡而消失.微生物利用环境所提供的底物,通过异化作用产生能量(ATP).在同化过程中,微生物利用这些 ATP 合成新的细胞物质.细胞中 ATP 水平反映了微生物的代谢水平. ATP 在微生物体内的含量依赖于微生物的生理学状态、生物量的增长速率,以及底物的消耗速率等.

早在 1963 年和 1996 年,Strange 等人和 Holm-hansen 与 Booth 就已经研究出利用 ATP 含量来表征生物活性的方法<sup>[8-9]</sup>.目前测定 ATP 的方法很多,主要分为直接测定法及间接测定法两种.直接测定法主要有:荧光素-荧光素酶法和紫外吸收定量薄层层析法.间接测定法主要有电磁共振测磷法和比色测磷法,基本上都是通过测定细胞内含磷量后再折算为 ATP 的.

通过测定 ATP 含量,可以很好地反映出生物膜的生物活性,而且,还可以反映不同生物处理过程的活性.但测定 ATP 含量的弊端是测定方法太烦琐、耗时太长.测定生物膜的 ATP 含量方法的另外一个弊端是测定过程中需要将生物膜从填料上剥离,这很容易造成生物膜结构破坏,使细胞发生溶解或损坏作用.关于生物膜的剥离技术,很多人都认为是生物膜活性分析成功与否的限制步骤.因此,在实际的饮用水生物预处理系统的生物活性检测中,由于受到客观条件的制约,该方法推广起来还有一定的难度.

### 1.3 氧摄取速率(OUR)法

微生物的氧摄取速率是研究好氧生物过程中的重要参数之一.在微生物物质与能量代谢过程中,氧是电子受体,氧摄取速率直接反映了微生物代谢速率.在生物处理领域,经常利用微生物的氧摄取速率来研究微生物增长动力学、底物利用动力学等.从一般意义上讲,氧摄取速率可反映好氧生物过程中的各方面信息.

氧摄取速率作为生物活性参数的主要弱点是只能用来测定微生物好氧呼吸过程的生物活性,而不能应用在无氧呼吸过程中.氧摄取速率也不能区分初级代谢和次级代谢的差别,它的灵敏性和重现性也差.因此,利用氧摄取速率来表征生物膜的生物活性还存在一定的局限.

### 1.4 活菌菌数(ABN)法

活菌菌数是描绘生物膜特性的重要参数.生物预处理反应器内能够有效去除水中有机污染物的决定因素是填料生物膜上生长着一定数量的活细菌.具体的活菌数量与反应器的运行状况及处理效果存在着一定的相关性.检测生物膜的活菌菌数的方法包括平板菌落计数法、液体稀释法和滤膜过滤计数法等.

活菌菌数法的主要缺点是操作繁琐、占用空间大、耗用时间长,这给研究工作带来诸多不便.

### 1.5 脱氧核糖核酸(DNA)含量法

DNA 是组成细胞的重要大分子之一,是构成生物的主要物质基础.在细胞的增殖过程中,DNA 最重要的作用是直接参与生物遗传信息的传递过程,是遗传的物质基础. DNA 的合成与生物量的增殖速率呈正比关系,测定 DNA 的含量可以反映出微生物的活性生物量.

DNA 主要集中在细胞核内,要想测定 DNA 含量,第一步必须将细胞破碎,然后从细胞物质中提取出 DNA 进行分析.测定 DNA 含量的方法之一是分光光度法,该方法要先经过萃取和纯化.各种荧光分析法也已被发展,这些方法是利用外加的化合物与萃取后的 DNA 反应生成荧光的复合体. DNA 方法的主要缺点是纯化过程太复杂,而且,受一些外界条件的干扰,测定过程中还需要一些高尖端的仪器,测试时间也长.因此,尽管测定 DNA 含量可准确地反映出生物活性的大小,但由于开展该方法存在太多的困难,从而,限制了其在饮用水生物预处理领域的应用.

## 2 饮用水生物预处理生物活性的研究

### 2.1 TTC - 脱氢酶活性在生物陶粒反应器内的分布

陶粒柱生物预处理反应器内 TTC - 脱氢酶活性沿水流呈现出一定的活性梯度,即进水处 TTC - 脱氢酶

活性最大,出口处最小.各层陶粒之间的相对生化活性比例约为上层 中层 下层 = 50 13 1.据此可推断,反应器对原水中有有机污染物的生物降解作用主要发生在陶粒柱的中上部.因此,可通过检测生物陶粒反应器内的 TTC - 脱氢酶活性的分布,推断反应器不同部位对有机物的生物降解性能及作用.

在将生物陶粒上附着的生物膜通过物理方法轻轻剥离后,分别测定残留在陶粒上和从陶粒上脱落的生物量的脱氢酶活性.结果发现,与陶粒结合紧密的固着形式生物量的生化活性明显高于非固着形式生物量的生物活性,表明反应器内能够有效去除水中微量有机污染物的微生物,主要以固着形式存在于生物陶粒载体表面的生物膜中.

## 2.2 生物陶粒 TTC - 脱氢酶活性与 ABN 的相关性

饮用水生物预处理反应器对有机污染物的生物降解效能总是与反应器内生物量密切相关,可以用活菌菌数(ABN)的测定定量地描述反应器内有效生物量,也可以利用 TTC - 脱氢酶活性间接地测定反应器内的有效生物量及其生化活性.其实,上述两个参数所描述的是反应器内生物过程的两个侧面,TTC - 脱氢酶活性反映了生物过程的呼吸作用,而 ABN 则是反映了细菌同化作用的结果,两者通过物质代谢和能量代谢相统一.如果在反应器正常运行期间,同时测定脱氢酶活性和 ABN,就能发现两者之间存在明显的相关性.

在研究饮用水低温生物陶粒反应器内 TTC - 脱氢酶活性与 ABN 之间的关系时,发现生物陶粒脱氢酶活性与 ABN 的对数之间具有良好的相关性( $r = 0.8493$ ,  $n = 25$ ).其原因是脱氢酶的催化作用主要发生在活性微生物细胞内,它们的生化活性与反应器中活细菌数目的对数呈正比例关系.因为只有活细胞才能够再生脱氢酶的辅酶( $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$ ),也只有活细胞才能有效地吸收转运基质,并把基质脱掉的电子转移给最终电子受体(TTC),进而使 TTC 的还原产物(TF)更多地形成.相关分析表明,TTC - 脱氢酶活性可被用来研究和描述生物反应器对水中有有机污染物的净化效果或作为生产运行监控的有效生化活性参数.

## 2.3 利用 TTC - 脱氢酶活性表征反冲洗对生物膜活性的影响

陶粒柱生物反应器在长时间的连续运行后,陶粒表面生物膜会不断生长更新,并产生脱落的生物絮体,生物膜表面和陶粒之间截留的脱落生物絮体以及生物膜对水中溶解物质的絮凝作用,可使生物陶粒之间的空隙变小,反应器的水头损失增大,最终会使反应器完全阻塞,并影响正常运行.因此,每隔一定的时间,就要对反应器进行一次反冲洗.

在反冲洗完成后,测定结果表明,反应器不同部位生物陶粒的 TTC - 脱氢酶活性剩余率各不相同,上层陶粒脱氢酶活性剩余率为 93.99%,而中层和下层分别为 85.32% 和 72.27%.这说明,越靠近反冲洗进水的部位,生物活性损失越大.但反洗后也发现,尽管反冲洗会造成反应器生物活性的部分损失,COD 和  $\text{BOD}_5$  的去除效果却没有明显的变化.这可能是反洗前反应器内微生物的内源代谢作用或脱落的生物絮体使出水造成了部分的再污染问题<sup>[10]</sup>.

## 3 结语

与污水相比,饮用水源水中含有的有机污染物浓度相对较低,生物预处理反应器中微生物长期处于贫营养环境,因此,其生物载体上的生物量相对较少,生物活性也相对较低,这为准确评价反应器的生物活性增加了困难.

从上述所介绍的活性分析手段来看,所获取的参数均属于微生物生理学参数,它们从不同生理生化角度反映了微生物的生物活性.

DNA 和 ATP 含量法是从活细胞中含有的成分角度反映生物膜内的活性生物量的,尽管它们能够准确地反映出生物活性,但存在的最大问题是测定方法繁琐,需要昂贵的设备,从而限制了它们在实际工艺过程的应用.

ABN 法是通过分离方法直接测定生物膜中含有的活菌菌数,并以此来反映生物活性,这种方法虽然也可准确地表征出生物膜的生物活性,但从该方法的分离和计数步骤就可看出,其测定操作过程相当复杂,要求工作人员应具有一定的专业素质,否则在实际工程推广应用中会有一定的困难.

OUR 和 DHA 都与微生物的呼吸过程相联,均是通过测定活性微生物的呼吸活性来间接反映生物膜生

化活性的,这两个参数的测定方法都比较简单,而且,也可以较灵敏地反映出生物活性的大小.但这里应该注意的是,OUR 和 TTC - 脱氢酶活性并不能应用于无氧呼吸过程,即不能用于反映生物脱氮系统的生化活性.

只有 INT-脱氢酶活性的应用范围最广,无论是反映好氧呼吸还是无氧呼吸活性都可应用.

因此,笔者认为,最适合于反映饮用水生物预处理的生物活性的参数应该是 INT-脱氢酶活性,但从目前的研究现状看,这方面的研究尚属空白,有待今后深入研究.

## 参 考 文 献

- [1] 周大佐. 污染水源水的生物预处理 [J]. 上海环境科学,1997,16(4):23 - 25.
- [2] Chung Y. C. and Neethling J. B. Microbial activity measurements for anaerobic sludge digestion [J]. J. Wat. Pollut. Control Fed., 1989, 61: 343 - 349.
- [3] Awong J., Bitton G. and Koopman B. ATP, oxygen uptake rate and INT - dehydrogenase activity of actinomycete foams [J]. Wat. Res., 1985, 19: 917 - 921.
- [4] Blenkinsopp S. A. and Lock M. A. The measurement of electron transport system activity in river biofilms [J]. Wat. Res., 1990, 24: 441 - 445.
- [5] 朱南文,高廷耀,周增炎. 饮用水生物脱氮技术现状 [J]. 水处理技术,1999,25(4):214 - 219.
- [6] 任智勇,齐岩松,李 然. 饮用水生物预处理除氮技术 [J]. 城市环境与城市生态,2002,15(3):54 - 56.
- [7] Lazarova V. and Manem J. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment [J]. Wat. Res., 1995, 29: 2227 - 2245.
- [8] Strange R. E., Wade H. E. and Dark F. A. Effect of starvation on adenosine triphosphate concentration in aerobacter aerogenes [J]. Nature, 1963, 4888: 55 - 57.
- [9] Holm - Hansen O. and Booth C. R. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance [J]. Limnol. Oceanogr., 1966, 11: 510 - 519.
- [10] 周春生,李永秋,余毓馨,王占生. 饮用水低温生物预处理生化活性研究 [J]. 应用与环境生物学报,1995,1(2):160 - 167.

## Biological Activity Estimation Methods in Drinking Water Biological Pretreatment

YIN Jun, TAN Xue-jun, WANG Xue-feng, WANG Jian-hui

(School of Municipal & Environmental Engineering, Jilin Architectural and Civil Engineering Institute, Changchun 130021)

**Abstract:** The removal efficiency of organic pollutant mainly depends on the active biomass of biofilm in the biological pretreatment of drinking water. The accurate determination of biological activity is beneficial to treatment system operation and control. This paper expatiated the mechanisms of several biological activity determination methods, analyzed their advantages and disadvantages, and discussed the feasibility that these analytical methods were applied to drinking water biological pretreatment system. Some research results about the biological activity determination of drinking water biological pretreatment were also introduced.

**Keywords:** biological pretreatment; dehydrogenase activity; ATP; oxygen uptake rate; active bacteria number; DNA