



表征发酵产氢活性污泥效能的碘硝基四唑紫-比脱氢酶活性及其检测

李建政,王 硕,郑国臣,蒋 凡

哈尔滨工业大学;城市水资源与水环境国家重点实验室,哈尔滨 150090

摘要 目前,评价有机废水发酵法生物制氢系统产氢效能的指标,一般采用挥发性悬浮固体 (MLVSS) 与总悬浮固体 (MLSS) 的比值 (MLVSS/MLSS)、MLVSS 的比产气 (氢) 速率及 COD 去除率等参数,但均存在不同程度的缺陷。为寻求评价发酵制氢活性污泥系统产氢效能的合理指标,以脱氢酶检测的碘硝基四唑紫 (INT) 法为基础,以发酵产氢系统的絮状活性污泥为样品,确立并优化了 INT-比脱氢酶活性的检测与计算方法,并对比脱氢酶活性与发酵制氢系统的产氢效能进行了相关性分析。结果表明,INT-比脱氢酶活性检测的适宜条件是:在容积为 10 mL 的离心管中,先后加入一定浓度的污泥样品 0.3 mL、19.8 mmol/L INT 溶液 1 mL、pH 5 乙酸钠缓冲剂 1.5 mL、45℃ 暗处振荡反应 30 min;反应终止剂选用 98% 的浓硫酸,萃取溶剂为无水乙醇,438 nm 测定吸光度;检测污泥样品 (MLVSS, 挥发性悬浮固体) 浓度可以在 3.5~12.5 g/L 范围内选定。絮状发酵产氢活性污泥的 INT-比脱氢酶活性与比产氢速率非常高度相关,可以客观准确地反映厌氧生物制氢系统污泥的产氢活性。

关键词 生物制氢;发酵;厌氧活性污泥;脱氢酶;碘硝基四唑紫

中图分类号 X382

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)15-0104-05

Detection of Specific Dehydrogenase Activity for Evaluating the Hydrogen-producing Activity of Flocs in Anaerobic Fermentation Process

LI Jianzheng, WANG Shuo, ZHENG Guochen, JIANG Fan

State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment; Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China

Abstract The ratio between Mixed Liquor Volatile Suspended Solid (MLVSS) and Mixed Liquor Suspended Solid (MLSS), the specific hydrogen producing rate by MLVSS and the COD removal rate are normally used to evaluate the hydrogen-production efficiency of anaerobic activated sludge in fermentation processes, but they suffer from some drawbacks. In order to evaluate the hydrogen-production efficiency of anaerobic activated sludge in fermentation processes, a detection method using iodinitrotetrazoliumchloride (INT) is proposed and optimized for

detecting the specific dehydrogenase activity in the flocs. The correlation between dehydrogenase activity and the specific hydrogen production rate of the activated sludge is analyzed. The results show that the optimal conditions for detecting INT-dehydrogenase activity are as follows. A 2.8 mL reaction system, including 0.3 mL sludge sample with a mixed liquor volatile suspended solids of 3.5 ~ 12.5 g/L, 1 mL 19.8 μmol/L INT and 1.5 mL sodium acetate buffer with a pH of 5, is put in dark for 30 min under 45℃ with oscillation. Concentrated sulfuric acid of 98% is used as the reaction termination agent, while the anhydrous ethanol is used as the extraction solvent. The absorbance is measured at 438 nm. The dehydrogenase activity of the activated sludge is very highly correlated with its specific hydrogen production rate, excellently reflecting the hydrogen-producing activity.

Keywords bio-hydrogen; fermentation; anaerobic activated sludge; dehydrogenase; iodinitrotetrazoliumchloride

0 引言

对于以厌氧活性污泥为基础的有机废水发酵法生物制氢系统,目前多用混合液中的挥发性悬浮固体 (Mixed Liquor Volatile Suspended Solids, MLVSS) 与总悬浮固体 (Mixed Liquor Suspended Solids, MLSS) 的比值 (MLVSS/MLSS)、活性污泥 (MLVSS) 的比产气 (氢) 速率 (L/(g·d))、COD 去除率 (%)

收稿日期: 2009-06-22

基金项目: 中国高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2006AA05Z109); 哈尔滨市科技创新人才研究专项 (2009RFXXS004)

作者简介: 李建政, 教授, 研究方向为城市水资源与水环境, 电子信箱: ljz6677@163.com

等参数表征发酵产氢污泥的活性^[1-2]。由于 MLVSS 中不仅包含了活性微生物细胞,同时也包含了无活性的,甚至是死亡的微生物残体及吸附的非挥发性有机物,以 MLVSS/MLSS 为指标将会高估污泥的生物活性^[3],而以比产气(氢)速率为标准则会低估污泥的生物活性^[4]。在发酵生物制氢系统中,由于高分子有机物在发酵微生物菌群作用下转化成了低分子的有机挥发酸(VFAs)及醇类(同时释放 H₂ 和 CO₂),即便是在底物转化率较高的情况下,其 COD 去除率也是十分有限的,且会因发酵末端产物的变化而表现出很大的波动性,有时甚至出现负去除率的情况。因而,以 COD 去除率作为系统微生物活性的衡量指标也不够科学^[5-6]。脱氢酶是微生物活性细胞分泌的一种有机大分子,其存在水平可以客观反映废水生物处理系统中活性污泥的生物活性^[7-9]。目前,脱氢酶活性(DHA)测定的常用方法有氯化三苯基四氮唑(TTC)法和碘硝基四氮唑紫(iodonitrotetrazoliumchloride,INT)法^[10-11]。TTC 的氧化还原电位(ORP)为+490 mV,而 INT 的 ORP 为+90 mV,因此 INT 对电子的亲合力要大于 TTC^[12-13]。在厌氧生物处理系统中,底物的降解转化是在较低的 ORP 环境中进行,此时用 INT 作为电子受体来检测 DHA,其效果可能更为显著。尽管采用 INT 法检测 DHA 并用于表征废水处理系统中污泥活性的研究已有报道^[14],由于影响 INT 法检测效果的因素较多^[15],欲以其作为表征产酸发酵系统污泥活性的指标,必须进行针对性的修正和优化。

本研究以有机废水发酵法生物制氢系统的絮状厌氧活性污泥为对象,对影响 DHA 检测的 INT 浓度、pH 值、萃取剂、终止剂、反应时间和温度等因素进行了实验与分析,以确定最佳检测条件,明晰与厌氧活性污泥比产氢速率的相关性,以期为发酵生物制氢系统微生物活性的客观及时监测提供科学方法,指导反应器的启动和运行。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

活性污泥样品取自本实验室的厌氧折流板反应器(ABR)生物制氢系统^[16],呈絮状,采集过程采用氮气保护。无水乙醇、三氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷、甲苯、乙醚、丙酮和终止剂甲醛、乙醇、三氯乙酸、98%浓硫酸等萃取剂,均为分析纯化学试剂;由美国 Searchbio 公司提供的 INT 标准样品(质量分数为 99%),制成质量分数为 1%(1.98 mol/L)的储备液备用;缓冲液邻苯二甲酸氢钾溶液(pH 4)、乙酸钠溶液(pH 5)、磷酸二氢钾与磷酸氢二钠混合液(pH 6、7)、Tris-HCl 缓冲液(pH 8、8.5)和四硼酸钠溶液(pH 9),根据文献^[17]进行配置。

萃取液吸光度使用 752 型紫外光栅分光光度计(山东高密彩虹分析仪器有限公司)测定,选用光程 1 cm、高度 5 cm 的玻璃比色皿。其他主要设备包括:THZ-82 型水浴振荡器(金坛市亿通电子有限公司)、FAN2004 型电子天平(Hangping)、SPX1508 型生化培养箱(天津市泰斯特仪器有限公司)和 TGL-16G-B 台式离心机(湖南星科科学仪器有限公司)等。

1.2 分析项目及其检测方法

pH 值、MLVSS 等常规分析项目,均采用国家标准方法测定^[18]。在探讨各种因素对 DHA 检测的影响时,采用单因素多水平实验法,即在基础操作条件下,只改变所考查因素的水平,其他因素及其水平不变。基础操作方法为:向 10 mL 的离心管中依次加入 0.3 mL 的污泥样品(每升含 2.7 g MLVSS)、1.5 mL 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.4)和 1 mL 的 0.1% INT 溶液,迅速放在 37℃的水浴振荡器内,暗处振荡反应 30 min,然后加入 1 mL 的 37%甲醛以终止酶反应;将终止反应后的样品在 5 000 r/min 下离心 5 min,弃上清液,加入 5 mL 丙酮,混合搅拌均匀,在 37℃下暗处振荡 10 min 以萃取反应产物碘硝基四氮唑甲簪(INF,红色);在 5 000 r/min 下再离心 5 min,并在 485 nm 处测定萃取液吸光度^[19]。比脱氢酶活性通过下式计算:

$$UI = \frac{AV}{KWt} \quad (1)$$

式中,UI 为污泥样品的 INT-比脱氢酶活性(μmol/(g·min)),A 为最适波长处的萃取液吸光度,V 为萃取剂体积(mL),K 为 INT-A 标准曲线的斜率,W 为污泥样品 MLVSS 干重(mg),t 为暗培养时间(min)。INT-A 标准曲线将在确定最优条件后制作,并由其求得系数 K。

2 结果与讨论

2.1 DHA 测定条件的优化

2.1.1 萃取液吸光度检测的波长

在基础操作的基础上,在波长 420~500 nm 范围内考查了分光光度计发射波长对酶促反应产物萃取液吸光度的影响^[19]。结果表明,在波长为 438 nm 处,INF 萃取液(丙酮)具有最大 A 值,为 0.64。后续实验将采用这一波长检测 INF 萃取液的吸光度。

2.1.2 操作条件的优化

在基础操作条件下,首先对影响 INT-比脱氢酶活性测定的 INT 浓度、暗反应时间、反应温度和不同缓冲剂等进行了试验(表 1)。结果表明,①在 INT 溶液的浓度从 0.01%(19.8 mmol/L)逐渐增加到 0.1%(198 mmol/L)时,萃取液的 A 值从 0.18 大幅提高到 0.51;当 INT 浓度继续逐步增加到 0.8%时,A 的增加值只有 0.17,增加趋势不再显著。②当酶反应时间从 10 min 增加到 30 min 时,反应产物萃取液 A 值从 0.14 提升到了 0.25,反应时间继续增加时,A 值的增加不再明显。③根据目前报道的发酵生物制氢研究常采用的发酵温度范围^[20-21],在进行 DHA 测定中,当温度从 25℃逐步提高到 45℃时,所测反应产物萃取液 A 值从 0.20 增加到了 0.37(表 1);温度继续升高时,A 值则表现出下降趋势。④在不改变缓冲液加入量(1.5 mL)的前提下,采用 pH 5 的乙酸钠溶液作为缓冲剂时,反应产物萃取液的 A 值最大,为 0.58;而在其他缓冲剂条件下,测得的 A 值均偏低,处于低于 0.28 的水平。

以上试验结果表明,INT-比脱氢酶活性测定的 INT 浓

参考文献 (References)

- [1] Yang H, Jiang Z, Shi S, *et al.* INT-dehydrogenase activity test for assessing anaerobic biodegradability of organic compounds [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, 53: 416-421.
- [2] Liwarska-Bizukojc E, Ledakowicz S. Estimation of viable biomass in aerobic biodegradation processes of organic fraction of municipal solid waste (MSW)[J]. *Journal of Biotechnology*, 2003, 101(1): 165-172.
- [3] Caravelli A, Giannuzzi L, Zaritzky N. Effect of chlorine on filamentous microorganisms present in activated sludge as evaluated by respirometry and INT-dehydrogenase activity [J]. *Water Research*, 2004 (38): 2395-2405.
- [4] Ying X, Wang Y, Hamid R, *et al.* Purification and characterization of an iron -containing alcohol dehydrogenase in extremely thermophilic bacterium *Thermotoga hypogea*[J]. *Arch Microbiol*, 2007, 187: 499-510.
- [5] 李建政, 任南琪, 秦智, 等. 产酸相反应器快速启动和乙醇型发酵菌群驯化[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2002, 34(5): 591-594.
Li Jianzheng, Ren Nanqi, Qin Zhi, *et al.* *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2002, 34(5): 591-594.
- [6] Ren N, Li J, Li B, *et al.* Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot -scale bioreactor system [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, 31: 2147-2157.
- [7] 尹军, 谭学军, 张立国, 等. 测定脱氢酶活性的萃取剂选择 [J]. 中国给水排水, 2004, 20(7): 96-98.
Yin Jun, Tan Xuejun, Zhang Liguang. *China Water & Waste Water*, 2004, 20(7): 96-98.
- [8] Marino D, González E M, Frendo P, *et al.* NADPH recycling systems in oxidative stressed pea nodules: A key role for the NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase[J]. *Planta*, 2007, 225: 413-421.
- [9] Fonseca A C, Summers R S, Hernandez M T. Comparative measurements of microbial activity in drinking water biofilters [J]. *Water Research*, 2001, 5(16): 3817-3824.
- [10] 尹军, 谭学军, 任南琪. 用 TTC 与 INT 电子传递体系活性表征重金属对污泥活性的影响[J]. 环境科学, 2005, 26(1): 56-62.
Yin Jun, Tan Xuejun, Ren Nanqi. *Environment Science*, 2005, 26(1): 56-62.
- [11] 谭学军, 尹军, 王建辉. OUR 和 INT-ETS 表征污泥活性的比较[J]. 中国给水排水, 2005, 21(7): 43-46.
Tan Xuejun, Yin Jun, Wang Jianhui. *China Water & Waste Water*, 2005, 21(7): 43-46.
- [12] 谭学军, 唐利, 何小娟. 用 INT-ETS 活性表征污泥生物活性的可行性研究[J]. 净水技术, 2008, 27(3): 39-43.
Tan Xuejun, Tan Li, He Xiaojuan. *Water Purification Technology*, 2008, 27(3): 39-43.
- [13] Xie J, Hu W, Pei H. Detection of amount and activity of living algae in fresh water by dehydrogenase activity (DHA)[J]. *Environ Monit Assess*, 2008, 146: 473-478.
- [14] 宋铁红, 赵勇胜, 崔玉波, 等. 厌氧折流板反应器中酸化菌活性研究 [J]. 吉林大学学报: 工学版, 2006, 36(3): 429-432.
Song Tiehong, Zhao Yongsheng, Cui Yubo, *et al.* *Journal of Jilin University: Engineering and Technology Edition*, 2006, 36(3): 429-432.
- [15] 李佳忠, 王春明, 袁金铎, 等. 一种大肠杆菌胆碱脱氢酶活性的测定方法[J]. 山东科学, 2006, 19(2): 32-35.
Li Jiazhong, Wang Chunming, Yuan Jinduo, *et al.* *Shandong Science*, 2006, 36(3): 429-432.
- [16] Li Jianzheng, Li Baikun, Zhu Gefu, *et al.* Hydrogen Production from diluted molasses by fermentative mixed microbe flora culture in an Anaerobic Baffled Reactor (ABR)[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007, 28(6): 3274-3283.
- [17] Rodgers J, Linda L. 分子生物学实验参考手册-基本数据、试剂配制及其相关方法[M]. 赵宗江, 张玉祥, 张春月, 等译. 北京: 化学工业出版社, 2005.
Rodgers J, Linda L. Laboratory reference: A handbook of recipes, reagents, and other reference tools for use at the bench [M]. Zhao Zongjiang, Zhang Yuxiang, Zhang Chunyue, *et al.* trans. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [18] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 27-30.
Editorial Board of Environment Protection Bureau of China. Monitoring and determination methods for water and wastewater[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 27-30.
- [19] Obbard J P. Measurement of dehydrogenase activity using 2 -p -iodophenyl-3 -p-nitrophenyl-5 -phenyltetrazolium chloride (INT) in the presence of copper[J]. *Biol Fertil Soils*, 2001, 33: 328-330.
- [20] 郑志永, 姚善泾. 比色法测定大肠杆菌呼吸链脱氢酶活性[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2005, 39(3): 433-436.
Zheng Zhiyong, Yao Shanjing. *Journal of Zhejiang University: Engineering Science Edition*, 2005, 39(3): 433-436.
- [21] Vijayaraghavan K, Ahmad D, Soning C. Bio-hydrogen generation from mixed fruit peelwaste using anaerobic contact filter [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2007, 32: 4754-4760.
- [22] 尹军, 赵纯广, 张立国, 等. 中温两相厌氧消化工艺处理混合污泥的效能[J]. 中国给水排水, 2008, 24(5): 1-5.
Yin Jun, Zhao Chunguang, Zhang Liguang, *et al.* *China Water & Waste Water*, 2008, 24(5): 1-5.

(责任编辑 王芷)

《科技导报》“科技工作者建议”征稿

“科技工作者建议”栏目专门刊登科技工作者近期提出的、与科学技术相关的工作意见和建议。科技建议应着眼于科技研究、发展、应用、政策等领域的实际问题,要求有明确、具体的内容,方法上尽量具有可操作性。文字应简洁明了,非特别重大的建议以 500 字左右为宜,特别重要的建议不超过 2 200 字。请注明建议人姓名、单位。欢迎国内外科技工作者及各级科协、学会投稿。栏目责任编辑:宁方刚;投稿邮箱:nfg@cast.org.cn。