

# 外电流对生物膜空隙率和分形维数分布的影响

曹宏斌<sup>1, 2</sup>, 姜斌<sup>1</sup>, 李鑫钢<sup>1</sup>, 余国琮<sup>1</sup>, 张懿<sup>2</sup>, 钟方丽<sup>3</sup> (1. 天津大学化学工程学院化学工程研究所, 天津 300072; 2. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100080; 3. 吉林化学工程学院, 吉林市)

摘要: 采用微切片结合图象分析技术研究外电流 ( $\leq 25 \text{ A/m}^2$ ) 对自养、异养/自养生物膜空隙率和分形维数的影响。结果表明, 当没有电流作用时, 自养、异养/自养生物膜的空隙率分别由最外层的大约 92 % 和 96 % 减少到最内层的 54 % 左右; 分形维数分别由 1.1 和 1.05 逐渐增大到最内层的 1.4 左右。随着通过反应器的电流密度增大, 2 种生物膜的最外层空隙率均略有下降, 分形维数略有增大, 而在生物膜内层, 空隙率和分形维数受电流影响均不太明显。

关键词: 外电流; 生物膜; 空隙率; 分形维数

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2003)04-04-0085

## Influence of External Electric Current on the Spatial Distributions of Porosity and Fractional Dimension of Biofilms

Cao Hongbin<sup>1, 2</sup>, Jiang Bin<sup>1</sup>, Li Xingang<sup>1</sup>, Yu Guocong<sup>1</sup>, Zhang Yi<sup>2</sup>, Zhong Fangli<sup>3</sup> (1. School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 3. Jilin Chemical Engineering and Technology Institute, E-mail: hbciao@home.ipe.ac.cn)

**Abstract:** The spatial distributions of porosity and fractional dimension of autotrophic and heterotrophic/autotrophic biofilms applied by direct current in the range of  $0 \sim 25 \text{ A/m}^2$  were investigated by using the micro-slicing technique and image analysis. The results showed that the porosities of the autotrophic and heterotrophic/autotrophic biofilms respectively decreased from ca. 92 % and 96 % in the top layer to ca. 54 % in the bottom layer while the fractional dimensions increased from 1.1 and 1.05 in the top layer to 1.4 in the bottom layer in the absence of current. The increase in the current density decreased the porosities and increased the fractional dimensions in the top layers. In the deeper layers, the current had insignificant influence on the porosity and fractional dimension.

**Keywords:** external electric current; biofilm; porosity; fractional dimension

电生物技术起源于 20 世纪 90 年代初, 它的基本思想是在生化反应的同时进行微电解, 以同时去除反应体系中的杂质或提供微生物代谢用的基质(比如氢)<sup>[1, 2]</sup>。由于电生物技术在废水处理、土壤修复和微生物发酵中具有处理成本低、效率高和二次污染低的特点, 所以越来越受到人们的关注<sup>[1~4]</sup>。硝化生物膜是一种主要由亚硝化细菌、硝化细菌和异养菌等构成的复合生物膜<sup>[5, 6]</sup>。由于其能够同时去除废水中的氨氮和有机污染物, 所以在实际过程中应用非常广泛。一些研究发现, 生物膜的内部结构直接影响到生物膜的传质性能和膜内微生物活性<sup>[7]</sup>。但是到目前为止, 还没有关于外电流对生

物膜内部结构影响的研究报道。本文将以空隙率和分形维数作为表征生物膜结构特征的参数, 研究电流密度对这些参数的影响。

### 1 生物膜空隙率和分形维数的确定

#### 1.1 空隙率 $\varepsilon$ 的计算

到目前为止, 大部分文献所报道的测量生物膜样品空隙率的方法都是基于生物膜的干密度<sup>[8]</sup>。然而实际过程中, 尤其当生物膜样品量非常少时, 生物膜的干密度很难确定, 所以用这种

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29976030); 教育部骨干教师资助项目

作者简介: 曹宏斌(1971~), 男, 博士, 副研究员, 主要从事生物环境工程方面的研究。

收稿日期: 2002-07-31; 修订日期: 2002-11-04

方法测得的结果一般很难准确反映生物膜的实际空隙率.本文介绍一种测量生物膜空隙率的新方法——微切片结合图象分析法.

首先作以下假设:生物膜中所有菌落的空间结构从生物膜表面到内部都不发生突变,即如果用微切片机在生物膜中任何一点切得一个与载体面平行的微生物膜片(厚度在  $10\mu\text{m}$  以下),那么该切片中所有菌落都可以近似认为是柱状结构.其实许多研究都表明,上述假设比较反映生物膜的内部结构<sup>[7]</sup>.

多孔固体空隙率的原始定义为:  $\varepsilon = \frac{V_p}{V_{\text{tot}}}$  (1)

式中,  $V_{\text{tot}}$ ,  $V_p$  分别表示生物膜的总体积和其中的空隙体积,  $\text{m}^3$ .既然每一个微切片样品中的菌落都呈柱状结构,那么上式等价于:

$$\varepsilon = 1 - \frac{S_{\text{cell}}}{S_{\text{tot}}} \quad (2)$$

式中,  $S_{\text{tot}}$ ,  $S_{\text{cell}}$  分别表示切片总面积和其中所有菌落截面积之和,  $\text{m}^2$ .

本文采用的测量生物膜样品空隙率的原理就是基于式(2).该方法具体步骤:

在低温条件下,把生物膜样品从内到外均匀切成  $5\mu\text{m}$  厚的薄片,然后用 2.5% 的美蓝溶液把切片染色,并放到 1000 倍的显微镜下观察,同时用 CCD 图象采集系统把切片图象保存成  $512 \times 512 \times 8\text{bit}$  的数字灰度图象.该图象的每个象素的灰度值从 0 到 255 不等,灰度值越高,表示该点输出的图象越白.为了处理方便,可以根据背景的光亮程度人为设定一个阈值,当某象素点的灰度值大于或等于该值时,规定该点显示白色,表现为生物膜中的空隙,如果该象素点的灰度值小于该值时,规定该点显示黑色,为生物膜中的菌落.

由式(2)可见,如果统计出一定面积样品的 bmp 图象中白色的象素点数与总象素点的个数之比,即可得到该样品的空隙率.

## 1.2 生物膜的分形研究

生物膜是由微生物在载体表面增殖后形成的多孔介质.虽表面上生物膜没有规则的形状,但其内部具有一定的统计自相似性<sup>[9]</sup>,所以利

用分形结构分析来定量描述它的一些性质对人们深入了解生物膜的本质特征非常重要.考虑到分形维数是分形研究中最基本、最重要的方面,所以本文重点研究电流对生物膜分形维数的影响.考虑到生物膜的特殊性质,本文采用图象分析法估算生物膜内不同位置的面积分形维数.

图 1 是一个假想的生物膜切片图,其中黑

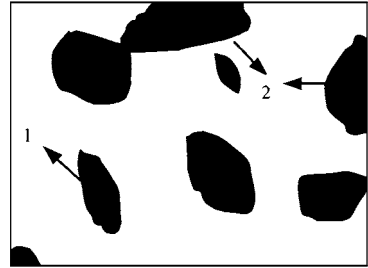


图 1 生物膜切片的概念图

Fig. 1 Conceptual image of a biofilms section

色部分为菌落,而白色部分为空隙.如果该生物膜具有分形性质,那么每一个菌落的面积  $S$  和最大直径  $d_{\text{max}}$  在统计意义上应该有下面关系<sup>[10]</sup>:

$$d_{\text{max}} \propto S^{D_p/2} \quad (3)$$

式中,  $D_p$  即为生物膜的面积分形维数.在实际过程中,大部分被研究对象的最大直径  $d_{\text{max}}$  很难确定.所以上式并没有多大实际意义.但人们发现,虽然最大直径很难得到,但研究对象的周长  $P$  还是比较容易计算的.大量实验发现,如果用周长代替(3)式中的  $d_{\text{max}}$ ,并不会改变分形维数的值,所以(3)式可改写成<sup>[11]</sup>:

$$P = AS^{D_p/2} \quad (4)$$

式(4)两边取对数,得

$$\lg(P) = C + \frac{D_p}{2} \lg(S) \quad (5)$$

由上式可知,  $\lg(S)$  和  $\lg(P)$  成线性关系.所以把大量实验测得的同一类样品的  $\lg(S)$  和  $\lg(P)$  作图,计算斜率就可以得到分形维数  $D_p$ .

为了减少误差,计算生物膜分形维数前,应首先判断视野中每个菌落的位置.这些菌落可分成 2 种情况:①整个菌落位于中间(图中 1).处理这种图象时,首先判断该象素点的前、后、正上和正下 4 个象素点的颜色,如果全为黑色,

那么该点记为菌落的内部点,如果其中有一个是白色,那么该点计为边界.②菌落的一部分位于视野的一个边上或一个角上(图中2).由于这类菌落只有一部分位于视野中,所以在处理时,均不予考虑.

## 2 实验方案

### 2.1 实验装置与流程

图2是培养生物膜的实验装置简图.装置的主体部分为自行研制的一长方体有机玻璃槽(210 mm × 300 mm × 400 mm).2个不锈钢电极板(200 mm × 250 mm)分别被固定在距离两侧20 mm处.附着生物膜的填料的比表面积为 $250 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ,材质是聚丙烯,型号为TUPAC2#型.实验时,废水由实验槽的顶部均匀流入槽中,空气从底部经微孔可变布气器均匀分布到槽内.电源为自制的可调压直流电源,调压范围0 ~ 50 V,最大电流1 A.

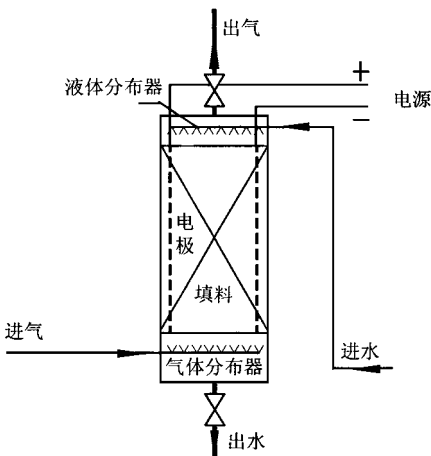


图2 实验流程简图

Fig.2 A schematic diagram of the experimental system

### 2.2 实验方法

实验共使用2种培养基分别培养自养(硝化)生物膜和异养/自养生物膜.每种培养基的组成:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 377 mg/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L;  $\text{ZnCl}_2$ , 0.05 mg/L;  $\text{MgSO}_4$ , 10 mg/L;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.4 mg/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 200 mg/L.葡萄糖浓度根据C/N=0和2的关系确定.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 的量根据实验装置内溶液的pH值确定(当C/N=0时, pH为7.3 ~ 7.8;当C/N=2时, pH=7.0 ± 0.2),实验前,在

反应器中进行预挂膜.待填料表面生物膜长到 $20 \mu\text{m}$ 左右时,根据实验要求让一定密度的电流通过反应器,直到出水的COD和 $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 浓度均达到稳定.在整个实验过程中,反应器内的工艺参数均控制: DO  $1.6 \pm 0.5 \text{ mg/L}$ ,  $t$  ( $30 \pm 1$ )  $^\circ\text{C}$ ,  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ 的水力负荷  $632 \text{ g} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ .

培养好的生物膜用低温微切片机(CMI800型, Leica公司)在 $-5^\circ\text{C}$ 下进行切片,每个切片控制在 $5 \mu\text{m}$ 厚.完成切片后,首先把总切片层数乘以 $5 \mu\text{m}$ 即可得本次使用的生物膜的总厚度,然后从不同深度各取1片切片研究空隙率和分形性质,最后在不同深度分别各取5片切片测量5片的平均密度和平均比表面积.

### 3 实验结果

为定量了解外电流对生物膜内部结构的影响,密度等于 $0.0 \text{ A/m}^2$ 、 $10.0 \text{ A/m}^2$ 和 $25.0 \text{ A/m}^2$ 的直流电通过C/N等于0和2的生物膜反应器,待出水稳定10d后,取各种电流密度条件下的自养和异养/自养生物膜,低温微切片后分析不同深度生物膜的空隙率和分形维数.

#### 3.1 外电流作用下生物膜内空隙率的分布

图3反映了电流对生物膜内空隙率分布的影响.由图3可见,当没有电流作用时,自养、异养/自养生物膜内的空隙率变化趋势基本相同,即从生物膜表层到内部,空隙率在不断减少.以自养生物膜为例,其最外层的空隙率高达92%,而到最内层时,仅有54%.与自养生物膜相比,异养/自养生物膜的内层空隙率基本相同,但其最外层的空隙率要高于前者,达到96%.当有外加直流电通过反应器中时,生物膜内空隙率的变化趋势与没有电流作用前基本相同,只是具体走势发生了微小的变化,主要表现为,与没有电流作用时相比,生物膜最外层空隙率略有下降,但在生物膜内部,空隙率受电流影响比较小.由图3还不难发现,随着外加电流密度增大,2种生物膜表层的空隙率均减少得越多.

#### 3.2 外电流对生物膜内分形维数分布的影响

图4描述了不同电流密度作用下,自养、异养/自养生物膜内分形维数的分布情况.由图4可见,无论有无电流作用,生物膜的分形维数均

是由表层向内部逐步增大.比较 2 种生物膜内分形维数分布不难发现,在生物膜的内部,分形维数几乎不受电流、生物膜组成的影响,一直维持在 1.4 左右.与内层不同,生物膜表层的分形

维数不仅受到电流的影响,而且与生物膜的组成有关.图 4 表明,当没有电流作用时,自养生物膜表层的分形维数达到 1.1,大于异养/自养生物膜的 1.05.当有外电流作用时,2 种生物膜

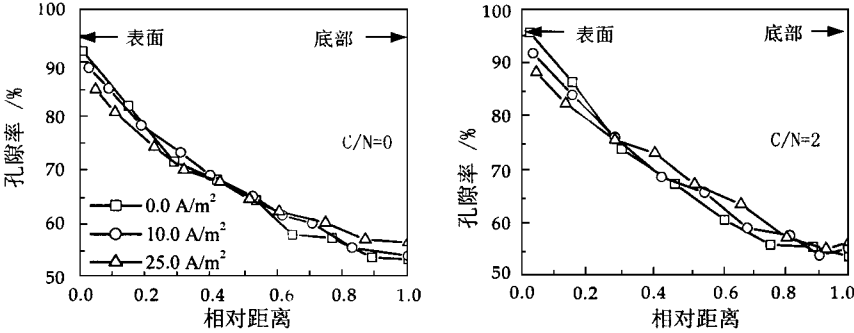


图 3 不同电流作用下的生物膜内空隙率分布

g.3 Distribution of porosity within biofilms under various current

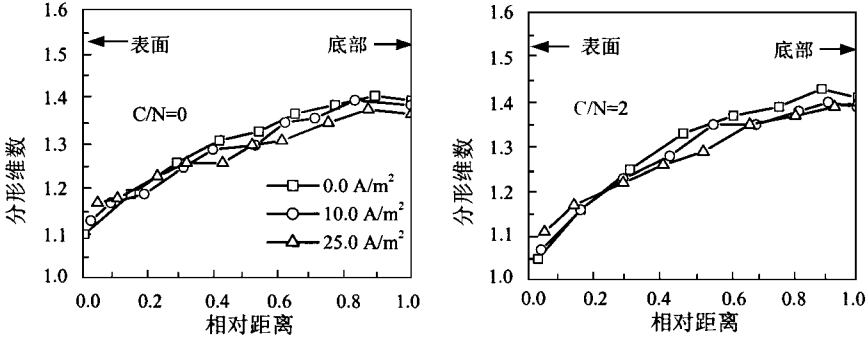


图 4 不同强度电流作用下的生物膜分形维数分布

Fig.4 Distribution of fractional dimension within biofilms under various current

表层的分形维数均有所增大.

4 结论

(1) 当没有电流作用时,自养、异养/自养生物膜的空隙率从表层向内层逐步减少,分别由表层的大约 92 %和 96 %逐步减少到最内层的 54 %左右;而分形维数则分别由表层的 1.1 和 1.05 逐步增大,到最内层时达到 1.4.

(2) 随着通过反应器的电流密度增大,自养、异养/自养生物膜表层的空隙率将略有减少;分形维数略有增大.

参考文献:

1 Jackman SA, Giacomo M, Sharman A et al. The effects of direct electric current on the viability and metabolism of acidophilic bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 24(1): 316 ~ 324.

2 Sakakibara Y, Kuroda M. Electric prompting and control of denitrification. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 42: 535 ~ 537.

3 Li XG, Cao HB, Wu JC, Yu KT. Inhibition of the metabolism of nitrifying bacteria by direct electric current. *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 705 ~ 709.

4 Islam S, Suidan MT. Electrolytic denitrifications: long term performance and effect of current intensity. *Water Research*, 1998, 32: 528 ~ 536.

5 Leslie Grady CP, Daigger GT, Lim HC. *Biological wastewater treatment*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999.

6 Wanner O, Gujer W. A multispecies biofilm model. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986, 28: 314 ~ 328.

7 de Beer D, Stoodley P, Frank R, Lewandowski Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 43: 1131 ~ 1138.

8 Fan LS, Ramos RL, Wisecarver KD, Zehner BJ. Diffusion of phenol through a biofilm grown on activated carbon particles in a draft-tube three-phase fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35: 279 ~ 286.

9 Lewandowski Z, Webb D, Hamilton M, Harkin G. Quantifying biofilm structure. *Water Science and Technology*, 1999, 39: 71 ~ 76.

10 Li D, Ganczarezyk J. Fractional geometry of particle aggregates generated in water and wastewater treatment processes. *Environmental Science and Technology*, 1989, 23: 1385 ~ 1389.

11 张济中. 分形. 北京:清华大学出版社, 1995.