

基于氧微电极的生物膜内异养菌衰减系数的原位测定

邱玉琴, 周小红, 施汉昌*

(清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 以分离式氧微电极作为测试工具, 在优化了电极结构的基础上, 对内源呼吸状态的生物膜内部的溶解氧分布进行了准确测定, 通过生物膜内扩散-反应过程的分析, 拟合获得了生物膜内异养菌的衰减系数. 结果表明, 经过结构优化后, 氧微电极的信号波动范围由优化前的 (1.64 ± 0.25) nA 降低到优化后的 (1.53 ± 0.06) nA, 波动抑制比为 19.41 dB, 输出信号的稳定性增强. 用原位测定方法获得的生物膜内异养菌在处于内源呼吸状态时的呼吸速率为 $2.979 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$, 衰减系数为 0.0059 h^{-1} .

关键词: 生物膜; 衰减系数; 氧微电极; 内源呼吸

中图分类号: X83; X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)11-3110-04

In-situ Determination of Endogenous Decay Rate of Heterotrophic Biofilm by Microelectrodes

QIU Yu-qin, ZHOU Xiao-hong, SHI Han-chang

(State Key Joint Laboratory of Environmental Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: A separated oxygen microelectrode was constructed, based on the improved structure, to determine the oxygen distribution in biofilm at an endogenous state. Based on the diffusion-reaction model, the endogenous decay rate was evaluated by curve-fitting with the measured oxygen profiles. The results showed that the fluctuation range of output signal of oxygen microelectrode was reduced from (1.64 ± 0.25) nA to (1.53 ± 0.06) nA, the signal became stable with the fluctuation rejection ratio of 19.41 dB after the structural optimization. The endogenous respiration rate and the endogenous decay rate of heterotrophic biofilm were evaluated to be $2.979 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1}$ and 0.0059 h^{-1} .

Key words: biofilm; decay rate; oxygen microelectrode; endogenous respiration

在微生物生长过程中, 当外界的基质浓度不足以提供其生长所需时, 微生物就处于内源呼吸阶段. 在该阶段, 微生物的自身氧化速率常数称为衰减系数^[1]. 微生物的衰减系数对于污泥产率和需氧量预测起着重要作用. 研究者多采用呼吸速率法来获得悬浮生长的活性污泥系统的衰减系数^[2]. 但是, 由于生物膜复杂, 各相异性的内部结构及传质限制, 所报道的计算生物膜衰减系数的方法较少. 许多研究人员采用活性污泥的衰减系数直接替代生物膜衰减系数^[3,4], 或者将生物膜破碎等同于悬浮生长体系后, 用呼吸速率法获取微生物的衰减系数^[5,6]. 但这 2 种方法都不能体现出附着生长的微生物体系与悬浮生长体系的差异, 从而不能真实地反映出生物膜的衰减系数.

近年来微电极技术发展迅速, 已经成为环境领域重要的研究工具, 其中, 氧微电极的应用最为成熟. 20 世纪 60 年代末, Bungay 等^[7]已经将氧微电极应用于滴滤池中生物膜的传质和反应的研究. 近年来, Bishop 等^[8]进一步将氧微电极应用到生物膜内分层结构和反应机制的研究中, 使氧微电极在生物膜内的应用更加成熟.

本研究的主要目的是建立一种新的获得生物膜衰减系数的方法. 实验采用氧微电极原位测定处于内源呼吸状态的生物膜内的氧分布情况, 结合扩散-反应方程拟合获得微生物的衰减系数. 原位测定结果能够更真实地描述附着生长型微生物的衰减过程, 对优化生物膜模型具有十分重要的意义.

1 材料与方法

1.1 生物膜的培养条件

研究中采用间歇式反应器培养生物膜. 反应器为 500 mL 的玻璃烧杯, 采用磨砂曝气头连接小型曝气机曝气. 接种污泥来自小试规模的氧化沟反应器. 生长生物膜的载体采用表面打磨的有机玻璃平板 (3 cm × 3 cm). 进水为清华大学校内生活污水, 每半天换水 1 次.

1.2 微电极原位测试系统的搭建

收稿日期: 2007-11-08; 修订日期: 2007-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50478009); 国家重点基础研究发展规划国际合作项目 (2005CB724901); 国家教育部博士点基金项目 (20040003040)

作者简介: 邱玉琴 (1984 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境电化学.

* 通讯联系人, E-mail: hanchang@mail. tsinghua. edu. cn

对生物膜衰减系数进行原位测定需要搭建原位测试系统.测试系统的详细介绍见文献[9].系统主要由三维电动微动平台(WN103TA100M,北京微纳光科仪器有限公司)、氧微电极、双通道皮安计(PA2000,Unisense,丹麦)、微型测量槽(60 mm × 60 mm × 10 mm)、数据采集卡(UA303,北京优采)和 PC 机组成.当接种平板上的生物膜生长到一定厚度后,将其取出固定在微型测量槽中待测.氧微电极固定在三维电动平台的夹具上,在电动平台的精确控制下以 50 μm 步长沿着垂直生物膜方向深入到膜内部进行检测,检测得到的电流信号通过皮安计显示出读数,并同时通过数据采集卡传输到计算机上进行实时显示.

1.3 氧微电极的结构优化

在原位测试系统中,氧微电极是最重要的检测工具,其信号稳定性直接决定了研究结果的可靠程度.现在使用比较多的是带有保护阴极的 Clark 微电极,但是它制作复杂,所以本研究选用制作过程简单的分离式氧微电极.分离式微电极的制作方法见文献[10].与 Clark 微电极相比较,分离式微电极的信号稳定性比较差,因此,本研究对分离式微电极进行结构优化.Jensen 等^[11]提出将硝酸盐微电极插入直径稍大的巴斯德吸管中,间隙内灌注 KCl 溶液,并插入银/氯化银丝,银丝接地能起到屏蔽作用,从而提高硝酸盐微电极的信号稳定性.本研究采用类似的方法,将分离式氧微电极套在一根巴斯德管内,用黏合剂(AB 胶,哥俩好)将电极尖端和巴斯德管尖端粘合在一起,然后在巴斯德管内注入饱和 KCl 溶液,并插入银/氯化银丝.在信号检测时,将银-氯化银丝接地.对比 10 根氧微电极在结构优化前后的信号差异,评价结构优化的意义.

1.4 生物膜内异养菌衰减系数的测定和计算

当生物膜培养至厚度为 1 mm 左右时,将挂好生物膜的平板固定在微型测量槽内,在测量槽内灌注清水,溶解氧浓度保持在 3~4 mg/L 之间,添加 5 mg/L 的硫脲来抑制硝化反应^[12].生物膜在这种条件下放置一定时间,用原位测试系统对生物膜内的氧浓度分布进行检测.当生物膜处于内源呼吸状态后,每隔 2 h 检测生物膜内的溶解氧浓度的分布情况,得到不同时间氧浓度随生物膜深度的变化曲线.

用稳态条件下的扩散方程建立氧浓度分布与内源呼吸速率的关系式,如公式(1)所示:

$$D_{\text{eff}} \frac{d^2 c}{dz^2} = \text{OUR}_{\text{in}} \quad (1)$$

积分可获得:

$$c = \frac{1}{D_{\text{eff}}} \left(\frac{1}{2} \text{OUR}_{\text{in}} z^2 + Az + B \right) \quad (2)$$

式中, c 是氧浓度(mg/L); D_{eff} 是氧在生物膜内的有效扩散系数(mm²/h); z 为生物膜深度(mm); OUR_{in} 为生物膜内源呼吸速率(mg/h, 以 O₂ 计).

根据文献[13]可知内源呼吸速率与衰减系数的关系:

$$\text{OUR}_{\text{in}} = \text{MLVSS} \times K_d \times e^{-K_d t} \quad (3)$$

式中, K_d 为微生物衰减系数(h⁻¹); t 为时间(h).

2 结果与讨论

2.1 氧微电极的优化结果讨论

测试 10 根氧微电极在结构优化前后的性能,统计结果表明,在检测的 5 min 时间内,氧微电极在结构优化后的信号明显比优化前的信号稳定.以第 4 号氧微电极为例,如图 1 所示,优化前的信号均值及波动范围为(1.64 ± 0.25) nA,优化后的信号均值及波动范围为(1.53 ± 0.06) nA.

定义经验公式信号波动抑制比为:

$$\text{NRR} = 20 \log \left(\frac{\text{Var}(S_0)}{\text{Var}(S_p)} \right) \quad (4)$$

其中 $\text{Var}(S_0)$ 是优化前信号的方差, $\text{Var}(S_p)$ 是优化后信号的方差.经过电极结构优化后的信号波动抑制比为 19.41 dB,表明优化效果良好.

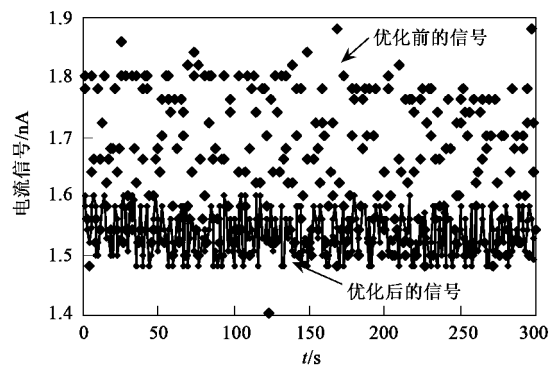


图 1 氧微电极结构优化前后的信号比较

Fig.1 Comparison of oxygen microelectrode signals without and with the shielded pipette

2.2 生物膜内异养菌衰减系数的计算和讨论

图 2 为不同放置时间所检测到的生物膜内氧分布情况.从中可知,生物膜在自来水中放置 24 h 后,氧浓度沿着生物膜深度方向下降速度较快,在深度为 0.7 mm 时,生物膜中的氧浓度已经 < 1 mg/L.虽

然外界主体溶液没有为生物膜提供有机物质,推测这种现象是由于吸附在生物膜内部的有机物质还没有完全消耗,因此,微生物还没有达到内源呼吸状态.4 h后,再次检测生物膜中的氧分布,如图 2(28 h)所示,溶解氧浓度在生物膜内部的分布呈缓慢下降趋势,下降速度较 4 h 之前明显减缓.再经过 2 h 后,检测结果如图 2(30 h)所示,氧浓度分布曲线和 2 h 前的基本相似.Ekama 等^[13]指出处于内源呼吸阶段的微生物耗氧速率是基本恒定的,不会随外界基质的变化而变化.因此,在图 2(28 h)的检测时刻,生物膜中的微生物可以认为已处于内源呼吸状态.

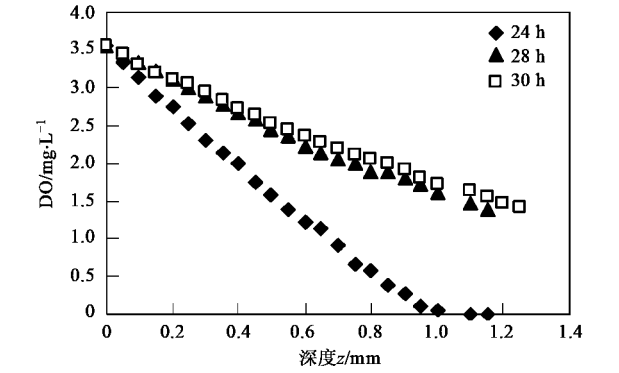


图 2 生物膜内的氧浓度分布曲线
Fig.2 Oxygen distribution in biofilms

以第 2 次检测时间,即放置 28 h 的时刻作为微生物处于内源呼吸状态的零点,间隔 2 h(放置 30 h)、4 h(放置 32 h)和 6 h(放置 34 h)分别测量生物膜内的氧浓度分布曲线,检测结果如图 3 所示.在图 3 中,32 h 和 34 h 时,生物膜在同一深度的溶解氧浓度分布比 28 h 和 30 h 的稍低,可能是由于细胞衰减,融胞等过程导致可降解的基质浓度增大.这种现象在活性污泥的衰减过程中也有报道^[13].

根据公式(2)对检测得到的氧分布曲线进行拟合计算,其中, D_{eff} 取 $3.78 \text{ mm}^2/\text{h}$ ^[14].计算结果如表 1

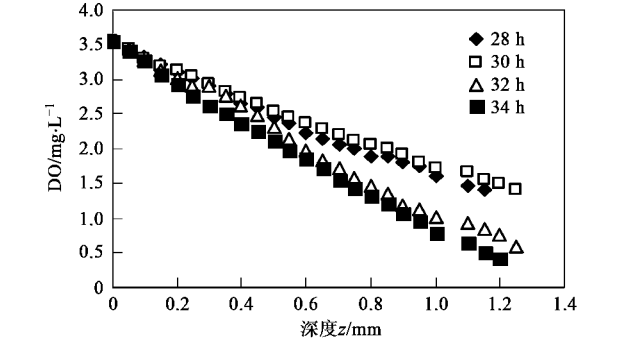


图 3 生物膜内的氧浓度分布曲线
Fig.3 Oxygen distribution in biofilms

表 1 生物膜内源呼吸速率的拟合结果(以 O_2 计)
Table 1 Calculation of biofilm endogenous decay rate(calculated by O_2)

t/h	$\frac{\text{OUR}_{\text{in}}}{2D_{\text{eff}}}/\text{mg}\cdot\text{mm}^{-2}$	$\text{OUR}_{\text{in}}/\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$
0	0.402 4	3.042 144
2	0.394 5	2.982 42
4	0.391 7	2.961 252
6	0.387 8	2.931 768

所示.

由表 1 可知,在假设的内源呼吸零点以后,随着时间的增加,生物膜内源呼吸速率缓慢下降,以 O_2 计,用原位测试系统检测计算得到的生物膜内源呼吸速率在 6 h 内的平均值为 $2.979 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$.根据公式(3),以 t 为横坐标, $\ln\text{OUR}_{\text{in}}$ 为纵坐标,如图 4 所示,拟合获得生物膜异养微生物衰减系数为 $0.005 9 \text{ h}^{-1}$.

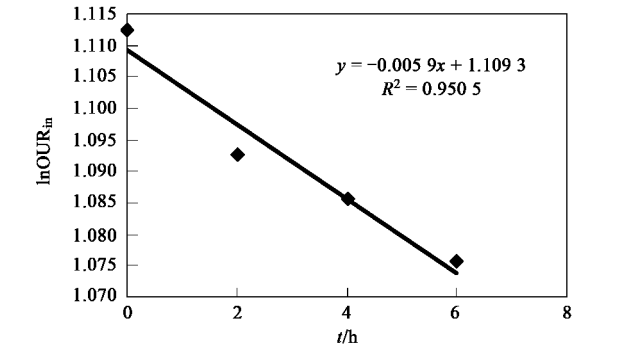


图 4 $\ln\text{OUR}_{\text{in}}$ 和衰减时间的关系
Fig.4 Relationship between $\ln\text{OUR}_{\text{in}}$ and the endogenous respiration time

IWA 推荐的悬浮生长系统的异氧微生物衰减系数的典型值为 0.01 h^{-1} ^[15].Rittmann 等^[16]以活性污泥作为研究对象获得的衰减系数为 $0.010 6 \text{ h}^{-1}$,Jih 等^[17]将破坏后的生物膜作为研究对象,获得的衰减系数为 $0.011 2 \text{ h}^{-1}$.与这些值相比较,采用原位测定方法获得的生物膜衰减系数的值要相对小一些.其可能的原因是:以悬浮态微生物系统作为研究对象时,基质和氧的传质限制可以忽略不计,提供给微生物的基质和氧相对比较充足,这样微生物的衰减速度会比较快,因此衰减系数也较大.而原位测定方法是基于附着生长的生物膜结构基础上衰减系数进行的原位测定,由于生物膜的传质阻力,在生物膜深层的溶解氧浓度不够充分,从而使微生物衰减过程较缓慢,衰减系数也相应较小.Avcioğlu 等^[18]的研究中也发现,在较低溶解氧浓度条件下,微生物的衰减系数也相应降低.因此,基于生物膜结构基础上的原位

测定方法能够更加准确地反映生物膜的特性.

3 结论

本研究建立起一种新的获得生物膜内微生物衰减系数的方法,用该方法能够深入到生物膜内部对微生物的衰减系数进行原位测定.研究结果获得的生物膜内源呼吸速率为 2.979 mg/h ,微生物衰减系数为 0.0059 h^{-1} ,检测结果比较真实地反映了生物膜的衰减过程.

参考文献:

- [1] 顾夏声,李献文,竺建荣.水处理微生物学[M].北京:中国建筑工业出版社,1997.42-43.
- [2] Drtl M. Kinetic constants of nitrification[J]. Water Research, 1993, **27**(1): 35-39.
- [3] Satoshi T, Joseph A. Dynamic modeling and simulation of a three-phase fluidized bed batch process for wastewater treatment[J]. Process Biochemistry, 2002, **38**: 599-604.
- [4] Rittmann B E, McCarty P L. Evaluation of steady-state-biofilm kinetics[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1980, **12**: 2359-2373.
- [5] Zeng H, Zhang T C. Evaluation of kinetic parameters of a sulfur-limestone autotrophic denitrification biofilm process [J]. Water Research, 2005, **39**: 4941-4952.
- [6] Riefler R G, Smets B F. Comparison of a type curve and a least-squared errors method to estimate biofilm kinetic parameters[J]. Water Research, 2003, **37**: 3279-3285.
- [7] Bungay H R, Sanders W M. Microelectrode determination of oxygen profiles in microbial slime systems[J]. Environ Sci Technol, 1969, **3** (12): 1297-1298.
- [8] Bishop P L. Biofilm structure and kinetic[J]. Water Science and Technology, 1997, **36**(1): 287-294.
- [9] 吴盈禧,蔡强,周小红,等.基于溶解氧微电极的动态膜特性的在线研究方法[J].环境科学,2005, **26**(2): 113-117.
- [10] 周小红,施汉昌.采用微电极测定溶解氧有效扩散系数的研究[J].环境科学,2007, **28**(3): 598-602.
- [11] Jensen K, Revsbech N P, Mielson L P. Microscale distribution of nitrification activity in sediment determined with a shielded microsensor for nitrate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, **59**(10): 3287-3296.
- [12] 王建龙,吴立波,齐星,等.用氧吸收速率 OUR 表征活性污泥硝化活性的研究[J].环境科学学报,1999, **19**(3): 225-229.
- [13] Ekama G A, Doid P L, Marais G V R. Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth rate of heterotrophs in activated sludge systems[J]. Water Science and Technology, 1986, **18**(6): 91-114.
- [14] Philip S, Stewart. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in Biofilm[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, **59**(3): 261-272.
- [15] 国际水协废水生物处理设计与运行数学模型课题组 著,张亚雷,李咏梅 译.活性污泥数学模型[M].上海:同济大学出版社,2002.
- [16] Rittmann B E, McCarty P L. Evaluation of steady-state biofilm kinetics[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1980, **22**: 2359-2373.
- [17] Jih C G, Huang J S. Effect of biofilm thickness distribution on substrate-inhibited kinetics[J]. Water Research, 1994, **28**(4): 967-973.
- [18] Avcioglu E, Orhon D, Sozen S. A new method for the assessment of heterotrophic endogenous respiration rate under aerobic and anoxic conditions[J]. Water Science and Technology, 1998, **38**(8-9): 95-103.