

废水生物处理反应器出水的三维荧光光谱解析

李卫华¹, 盛国平¹, 王志刚², 陆锐¹, 刘贤伟¹, 俞汉青¹

(1. 中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026; 2. 中国科学技术大学地球和空间科学学院, 安徽合肥 230026)

摘要: 利用平行因子法结合三维荧光光谱法, 分析了废水生物处理反应器中微生物产生的四种荧光物质: 色氨酸、酪氨酸、维生素 B6 和辅酶 NADH, 在此基础上成功解析了以乙酸钠为底物的好氧生物反应器出水和高温厌氧产氢反应器的出水。试验结果表明四种荧光物质的浓度与测试结果具有很好的相关性。好氧反应器的出水中以蛋白、类富里酸物质以及类胡敏酸物质为主, 而高温厌氧反应器的出水中则富含蛋白、辅酶 NADH 和核黄素。该研究提供了一种简便、快速且不需外加试剂的监测废水生物处理反应器出水的方法。

关键词: 三维荧光; 平行因子法; 反应器; 微生物; 废水

中图分类号: O621 文献标识码: A

Analysis of EEM fluorescence spectra of effluents from bioreactors

LI Wei-hua¹, SHENG Guo-ping¹, WANG Zhi-gang², LU Rui¹, LIU Xian-wei¹, YU Han-qing¹

(1. School of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

2. School of Earth and Space Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: A combination of 3-dimensional excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectrometry and parallel factor analysis (PARAFAC) was used to identify the biological fluorophores, such as tryptophane, tyrosine, pyridoxine and NADH. Based on the experimental results, the EEM fluorescence spectra of effluents from an aerobic bioreactor and a thermophilic anaerobic H₂-producing bioreactor were decomposed. The results show that the four fluorescent substances were successfully identified and their concentration was correlated to the calculation results. The effluents from the aerobic bioreactor consisted mainly of proteins, fulvic-like and humic-like substances, while those of the thermophilic anaerobic H₂-producing bioreactor were mainly composed of proteins, nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form (NADH) and riboflavin. This work provides a simple and rapid method for monitoring effluents from biological wastewater treatment reactors without any dose of reagents.

Key words: 3-dimensional excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectra; parallel factor analysis (PARAFAC); protein; coenzyme; wastewater

收稿日期: 2008-01-22; 修回日期: 2008-04-28

基金项目: 中国高技术研究发展(863)计划(2007AA061502)资助

作者简介: 李卫华, 男, 1977年生, 博士生。研究方向: 水污染控制。E-mail: weihuali@mail.ustc.edu.cn

通讯作者: 俞汉青, 博士/教授。E-mail: hqyu@ustc.edu.cn

0 引言

生物反应器在水污染控制中扮演着最重要的角色,反应器的正常运行是保证良好处理效果的前提,对其进行实时监控显得尤为重要.传统的化学分析方法难以实时反映反应器的状态,而电化学方法又需要频繁校正.为了实现废水生物处理反应器的在线监控,需要研究和应用快捷、高灵敏度和高选择性的分析监测方法和手段.

三维荧光光谱是通过不断改变激发波长来获得的一系列荧光发射光谱,由各个激发波长下的发射光谱组合在一起就构成了一个三维的荧光光谱图.三维荧光光谱法能同时获得荧光强度随激发波长和发射波长变化的关系,对于每一种荧光物质,都有其特有的三维荧光光谱信息,具有较高的选择性.因此,三维荧光光谱技术在环境监测领域有着较广泛的应用^[1~4].以废水中各类有机物的特征荧光强度之和表示废水中荧光类有机物的综合含量,以特征荧光峰中心最大荧光强度作为表征废水中某类溶解性有机物含量的指标,以两者的比值代表不同种类有机物所占的比值,考察该比值在废水处理过程中的变化可以反映不同种类有机物的变化情况^[5].然而,室温下荧光光谱较宽,易相互重叠,仅仅靠某些波长处荧光强度变化难以得到真实可靠的信息.平行因子法是一种将三维荧光数据解析成为三线性组分的方法,它可以对其荧光基团进行解析,将重叠的荧光峰进行分离,得到荧光成分的激光光谱矩阵和发射光谱矩阵,并通过其得分矩阵对其浓度进行相对定量.倪永年等利用平行因子-同步荧光法成功测定了食品中维生素 B1、B2 和 B6^[6].李宏斌等应用平行因子法对水体中溶解有机物三维荧光光谱进行了分析^[3].王志刚等则进一步利用它对巢湖 CDOM 的空间分布及其来源进行了表征^[4].但将其用于废水处理生物反应器出水的解析尚未见报道.

在废水处理过程中,微生物会产生多种化合物,如蛋白、辅酶、色素以及腐殖酸等.这些物质在紫外或可见光的激发下,会产生出特征的荧光发射,在三维荧光光谱图上亦有其特征位置^[7].它们的种类和浓度与微生物反应过程、反应器运行状态有着密切的联系.本文在用平行因子法耦合三维荧光解析几种与微生物代谢相关的荧光物质的基础上,尝试采用该耦合方法表征生物反应器出水,以期为废水生

物处理反应器的有效监控提供新的思路,并为研究生物反应过程提供新的方法.

1 实验与研究方法

1.1 样品准备

采用了四种与生化反应相关的荧光物质,酪氨酸、色氨酸、维生素 B6 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH),分别溶于磷酸盐缓冲溶液(pH 7.15),四种荧光物质的浓度见表 1.

表 1 四种荧光物质的配制浓度

Tab. 1 The concentration of four fluorescence substances

样品	酪氨酸 /(mg · L ⁻¹)	色氨酸 /(mg · L ⁻¹)	维生素 B6 /(mg · L ⁻¹)	烟酰胺腺嘌呤 二核苷酸 /(mg · L ⁻¹)
1	0	0	0	0
2	0	0.1	0.2	5.0
3	0	0.2	0.4	10.0
4	0.8	0	0.2	10.0
5	0.8	0.1	0.4	0
6	0.8	0.2	0	5.0
7	1.6	0	0.4	5.0
8	1.6	0.1	0.2	0
9	1.6	0.2	0	10.0
10	0	0	0	5.0
11	0	0.1	0.2	0
12	0	0.2	0.4	10.0
13	0.8	0	0.2	0
14	0.8	0.1	0.4	10.0
15	0.8	0.2	0	5.0
16	1.6	0	0.4	10.0
17	1.6	0.1	0.2	5.0
18	1.6	0.2	0	0

好氧生物反应器以醋酸钠模拟废水为底物,反应器以 6 h 为一个循环,6 min 进水,341 min 曝气,10 min 沉降,3 min 排水.曝气量为 0.4 m³/h.接种污泥从合肥市王小郢污水厂曝气池中取得,接种污泥的污泥浓度为 4.2 g/L.1.0 L 的污泥加入到 4.0 L 的 SBR 反应器中,培养 30 d.合成污水中下列物质的浓度(mg/L): CH₃COONa · 3H₂O, 2 125; NH₄Cl, 100; K₂HPO₄, 22.5; CaCl₂ · H₂O, 15; MgSO₄ · 7H₂O, 12.5; FeSO₄ · 7H₂O, 10 和 1 mL 微量元素.每次排水为 2 L,水力停留时间为 12 h^[8].反应器进水完毕后开始取样,前 40 min 每 5 min 取一次样,40 min 至 80 min 每 10 min 取一次样,再后来直到 180 min 每 20 min 取一次样.样品在 12 000 r/min 下离心 5 min 后,用 0.45 μm 的滤

膜过滤,扫描滤出液的三维荧光光谱。

高温产氢反应器以蔗糖模拟废水为底物,反应器中的营养元素组成如下(mg/L):蔗糖 10 000; NH_4HCO_3 405; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 155; CaCl_2 50; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100; FeCl_2 25; NaCl 10; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5; AlCl_3 2.5; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 15; H_3BO_4 5; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5; $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5; and ZnCl_2 5. 反应器运行的温度为 55 °C,水力停留时间为 16.5 h^[9]. 反应器每天的出水水样在 12 000 r/min 下离心 5 min 后,用 0.45 μm 的滤膜过滤,滤出液用去离子水稀释 10 倍测定三维荧光。

1.2 仪器与数据处理

三维荧光光谱由 Perkin Elmer 公司 LS-55 荧光光度计获得,激发波长为 250 nm 至 400 nm 或 450 nm,发射波长为 300 nm 至 550 nm,激发光和发射光的带宽均为 10 nm,扫描速度为 1 200 nm/min. 为避免二次瑞利散射,出射光加了 290 nm 的截止滤光片. 荧光光谱减去去离子水的荧光光谱以去除拉曼散射的影响,并且将瑞利散射峰置零,将同批测定数据转为 MATLAB 中的矩阵进行计算^[10].

平行因子方法由 Bro 提出. 平行因子模型本质上是一种分解算法,又称三线性模型,它使用核心一致度检验获得最合适的组分数 f ,然后将一个由多个 EEM 数据构成的三维阵列 \mathbf{X} 分解为三个载荷矩阵 \mathbf{A} , \mathbf{B} 和 \mathbf{C} ,而且每个矩阵都具有实际的物理意义. 例如,一个三维阵列 \mathbf{X} 的组织形式为(sample × excitation × emission). 对这个模型进行三线性分解之后,得到的三个载荷矩阵 \mathbf{A} , \mathbf{B} 和 \mathbf{C} 分别为浓度值相对应的得分、激发光谱和发射光谱。

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (1)$$

其中, x_{ijk} , a_{if} , b_{jf} 和 c_{kf} 分别为矩阵 \mathbf{X} , \mathbf{A} , \mathbf{B} , \mathbf{C} 的元素; e_{ijk} 为三线性模型用于最小化模型中的残差的平方和^[11].

2 结果与讨论

2.1 配制溶液的实验结果

配制样品的三维荧光光谱图见图 1。

平行因子法能够将重叠严重的荧光基团解析开来,解析结果与配制浓度一致,荧光基团特征与文献[7]中的一致,说明解析方法的可靠性。

如图 1 所示,四种荧光基团形成的光谱相互重

叠严重,很难分辨. 通过用核心一致度诊断,得到四个组分时残差平方和降至最低,而核心一致度仍然是 100%,所以结果认为四个组分是合理的,与实际结果一致. 当使用四个主成分解析光谱矩阵 \mathbf{X} 时,可以得到 \mathbf{A} , \mathbf{B} 和 \mathbf{C} 矩阵. \mathbf{A} 是组分的得分矩阵,它与配制物质的浓度成正比. \mathbf{B} 和 \mathbf{C} 是组分的载荷矩阵,分别对应于激发光谱矩阵和发射光谱矩阵,它们相乘就得到所对应成分的三维荧光光谱矩阵,解析出的成分的荧光峰位置与文献报导的荧光物质的位置一致,如图 2 所示. 组分的得分与待分析物的浓度相关性较好,对于维生素 B6 与 NADH 而言,得分与浓度之间的相关系数均为 0.99,对色氨酸与酪氨酸而言,则分别为 0.90 和 0.93,这说明平行因子法解析可以得到待分析物的相对浓度。

如图 3 所示,经平行因子解析后,荧光强度得分的变化趋势与样品浓度的变化趋势一致. 特别是维生素 B6 与 NADH 的得分与其相应的浓度十分相近,而色氨酸与酪氨酸的得分与其浓度有所差异. 这可能是由于以下两个原因:一方面,色氨酸与酪氨酸峰位较近,两者相互影响较为严重;另一方面,酪氨酸吸收光子之后可能传递给色氨酸。

以上说明如果荧光基团之间吸收光子后不发生能量转移,那么用平行因子法解析混合物里多种荧光物质是可行的。

2.2 生物反应器实际测定结果

实际水样为好氧序批式生物反应器和高温产氢生物反应器出水,其三维荧光光谱图见图 4. 好氧反应器出水荧光峰 A, B, C 分别位于 280/340 nm, 340/410 nm 和 390/460 nm,见图 4(a). 厌氧反应器出水的荧光峰位置 A, B, C 分别位于 280/340 nm, 340/440 nm 和 430/520 nm,见图 4(b).

高温厌氧产氢反应器出水的三维荧光光谱图解析出来的三种荧光物质的三维荧光光谱如图 5(a)~(c),荧光峰位置分别为 280/340 nm, 340/440 nm 和 430/520 nm,根据其荧光峰位置与已有的文献报道比较,确定解析出来的三种荧光成分为蛋白、辅酶 NADH 和核黄素. 蛋白荧光主要归因于其蛋白中色氨酸残基的荧光,可以反映出水中蛋白浓度的变化^[12]. 辅酶 NADH 在 340 nm 的紫外光照射下会发出 460 nm 的荧光,而其氧化态 NAD^+ 不具有荧光活性^[13]. NADH 在氧化磷酸化的过程中会将电子传递给氧,自身被氧化成 NAD^+ ,同时生成 ATP. 在缺氧的状态下,这一过程受到抑制,NADH 不能

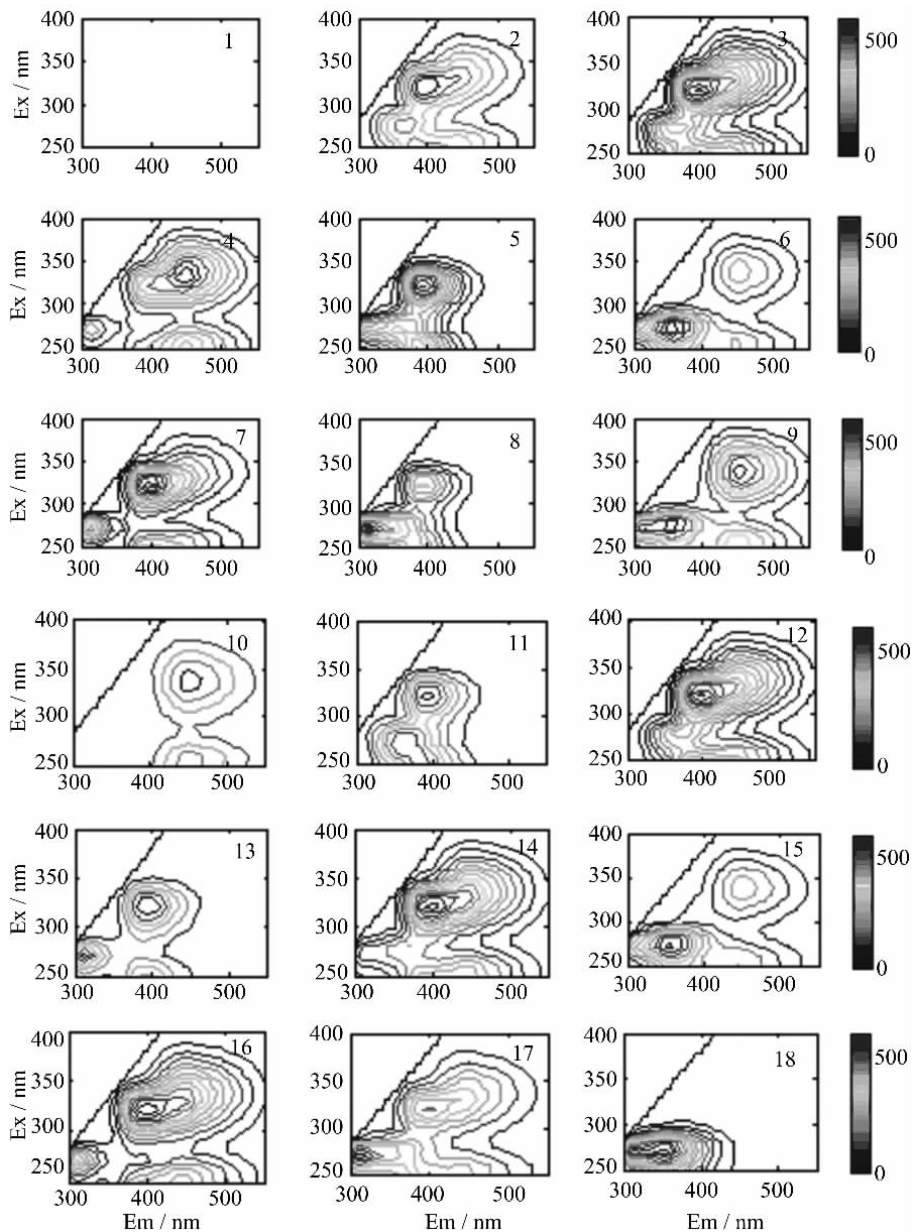


图 1 四种荧光物质组成混合溶液的三维荧光光谱图

Fig. 1 The EEM fluorescence spectra of the mixed solution composed by four analytes

够通过氧化磷酸化的作用被氧化而出现积累。因此,当反应器从好氧状态变化为厌氧状态时,NADH 荧光会出现突跃^[14],这一特征可以被用来监控生物反应器的状态变化。此外,核黄素是辅酶黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)中的荧光基团,它在 370 nm 或 430 nm 的入射光激发下可以发射出 520nm 的荧光,NADH 可以将氢传递给 FMN 或 FAD 而生成其还原型 FMNH₂ 和 FADH₂,而 FMNH₂ 或 FADH₂ 并没有荧光活性^[15]。因此,核黄素的荧光变化显示了 FMN 或

FAD 浓度的变化。这些荧光变化让我们能够洞察三羧酸循环^[15]。反应器运行的第 23 天和第 32 天,由于疏忽,未曾进水,导致蛋白和核黄素浓度突然升高,说明可以通过荧光物质浓度的变化反映反应器是否出现异常。

因此,可以通过调节水力停留时间、底物浓度和温度的变化,建立荧光物质浓度变化与反应器操作参数之间的响应关系,明确其中的生物反应过程,实现反应器的实时在线监控。

以乙酸钠为底物的好氧生物反应器出水的三维

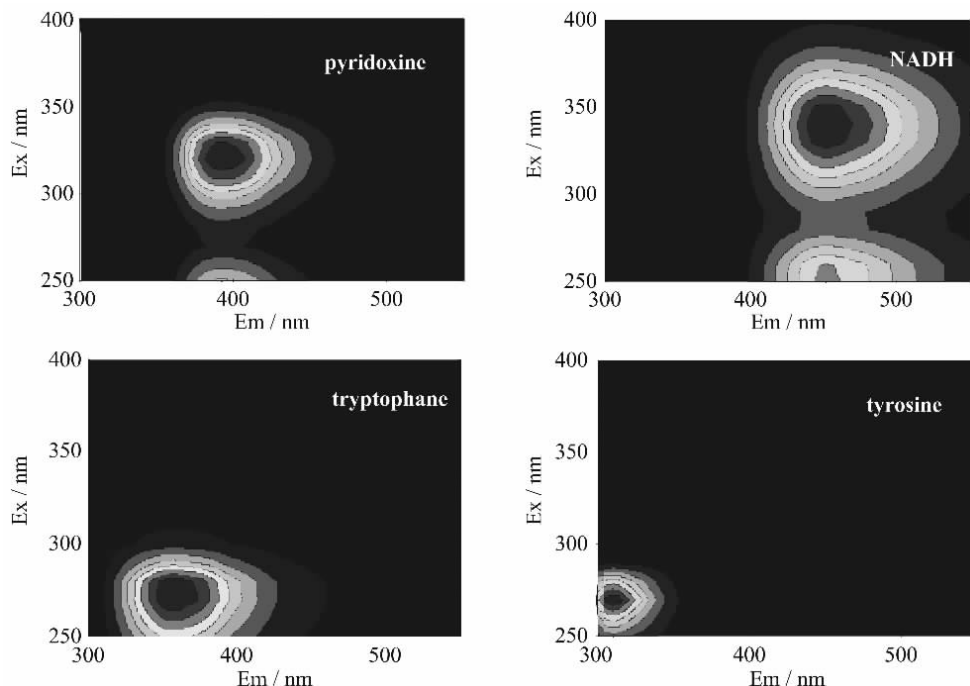


图 2 平行因子法解析后四种物质的三维荧光光谱图

Fig. 2 The EEM fluorescence spectra of four fluorophores decomposed by PARAFAC models

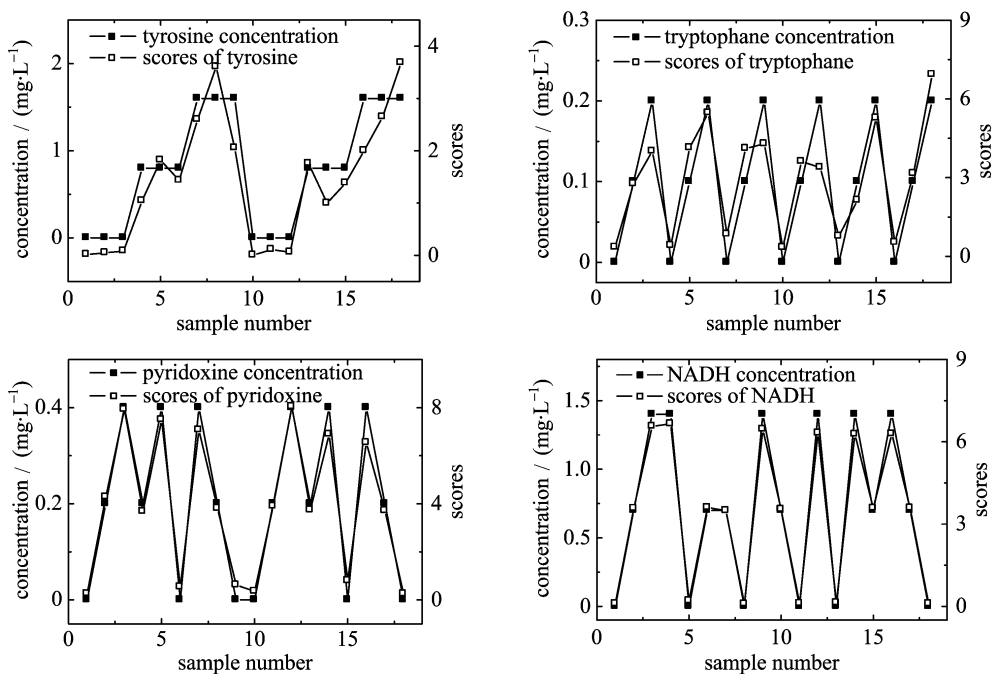


图 3 荧光物质浓度与平行因子分析法解析后的得分比较

Fig. 3 The comparison of the concentration of fluorescence substance and the scores acquired by PARAFAC models

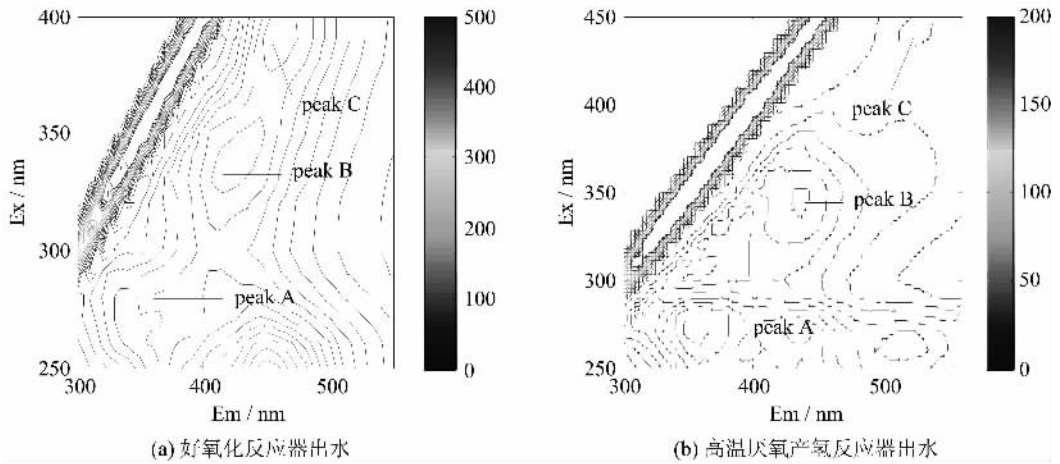


图 4 三维荧光光谱

Fig. 4 EEM fluorescence spectra

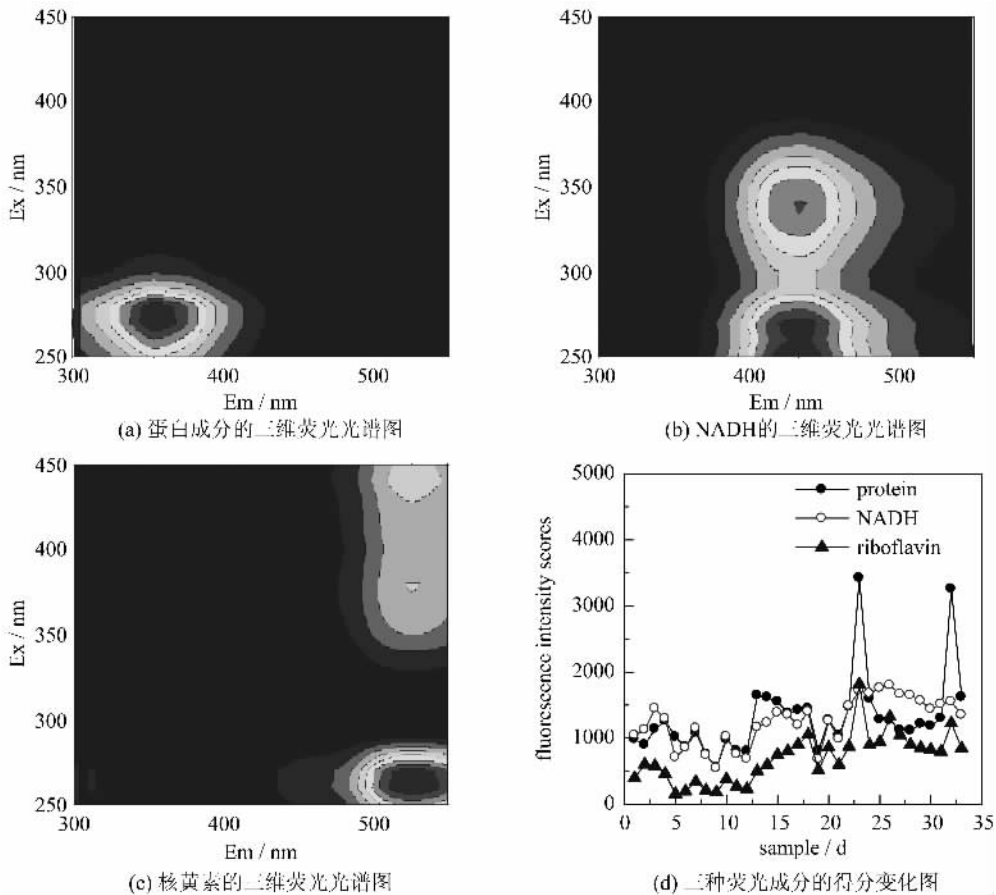


图 5 厌氧产氢反应器出水的荧光光谱图解析

Fig. 5 Analysis of the EEM fluorescence spectra of the effluents from H_2 -producing anaerobic reactor

荧光光谱图解析出的三种荧光物质的三维荧光光谱图如图 6(a)~(c), 其荧光峰分别为 280/340 nm, 340/410 nm 和 390/460 nm. 在好氧反应器中, 荧光峰位于 340/450 nm 左右的 NADH 十分弱, 被淹没

于 340/410 nm 荧光峰中^[16], 因此未能单独被解析出来.

与已有的文献报道比较^[6], 确定解析出来的三种荧光成分为蛋白质、类富里酸物质和类胡敏酸物

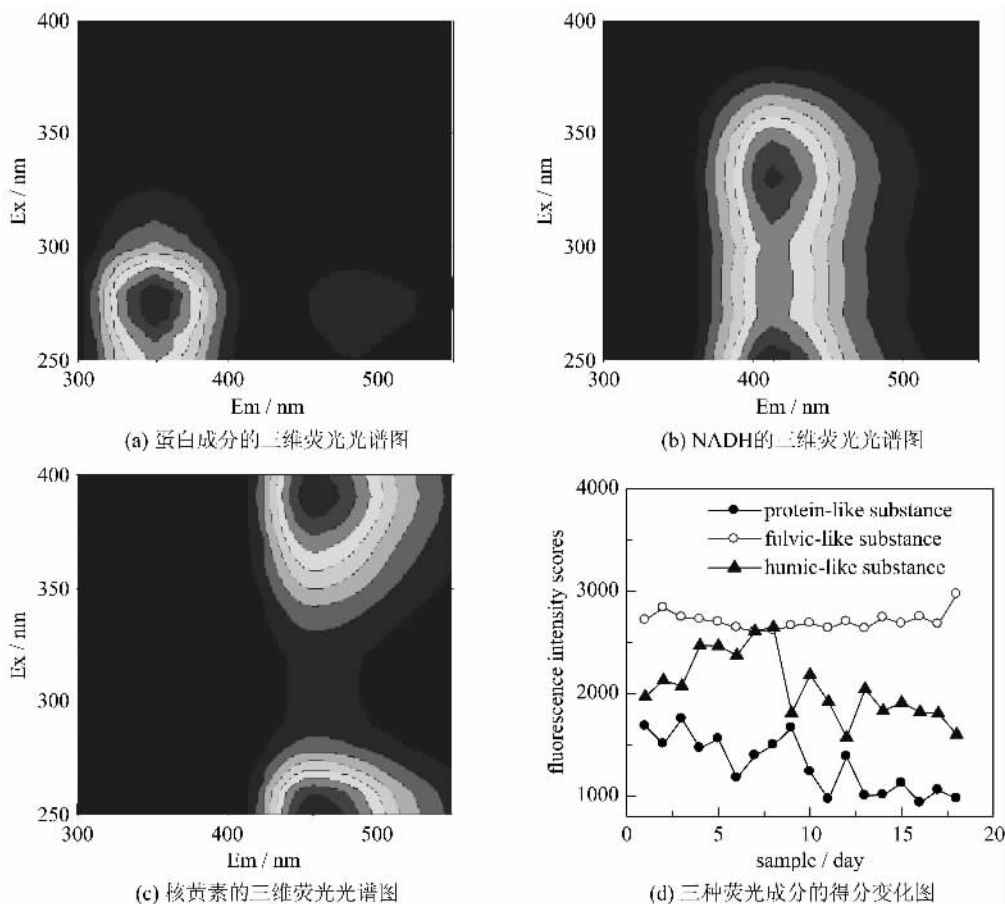


图 6 乙酸钠为底物的序批式好氧反应器出水的荧光光谱图解析

Fig. 6 Analysis of the EEM fluorescence spectra of the effluents from SBR acetate aerobic reactor

质. 该反应器进水为乙酸钠和无机盐类, 没有荧光. 因此, 荧光监测到的物质都是来源于溶解性微生物产物, 主要是一些蛋白质、辅酶和腐殖酸类物质. 蛋白质在降解周期中逐渐下降, 因为底物加入到反应器中以后, 微生物快速降解有机物, 也产生许多蛋白释放到溶液中, 后期进入内源呼吸阶段, 可能外部溶液中的蛋白质又被微生物利用. 类富里酸物质浓度基本不变, 可能主要是一些酶类, 如维生素 B6 和 NADH, 在好氧状态下其浓度基本不变. 类胡敏酸类物质先上升后下降, 可能主要由微生物衰亡所引起的. 因此, 该方法可以作为一种新的表征溶解性微生物产物的方法, 为研究好氧反应器微生物代谢变化以及与别的污染指标关系提供了新的思路.

平行因子法虽然具有以上许多优点, 但也存在一些不足, 其本质上是一种主成分分析, 只能解析出几种主要的成分, 其影响较小的物质可能不会被体现, 比如好氧过程中的 NADH 荧光, 蛋白中酪氨酸与苯丙氨酸荧光就易被掩盖, 而只能得到类

胡敏酸物质和蛋白, 若需提取这些物质的荧光信息, 可以通过三维偏最小二乘建模预测的方法来进行解析.

3 结论

根据以上研究, 我们可以得到如下结论:

(I) 平行因子法结合三维荧光光谱法能够解析混合溶液中的荧光物质, 可以获得各荧光物质的三维荧光光谱图, 荧光物质浓度与得分矩阵有很好的相关性.

(II) 平行因子法可以成功地解析反应器出水的三维荧光光谱, 好氧反应器出水以蛋白、类富里酸物质以及类胡敏酸物质为主, 而高温厌氧反应器出水中则富含蛋白、辅酶 NADH 和核黄素, 该方法可以表征反应器运行过程中的荧光物质浓度变化.

该研究提供了一种简便快速且不需外加试剂的监测废水生物处理反应器的方法, 为研究荧光物质与反应器状态之间的关系提供了新的思路.

参考文献(References)

- [1] Chen W, Westerhoff P, Leenheer J A, et al. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37:5 701-5 710.
- [2] Sheng G P, Yu H Q. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy[J]. *Water Research*, 2006, 40:1 233-1 239.
- [3] 李宏斌, 刘文清, 张玉钧, 等. 水体中溶解有机物的三维荧光光谱特征分析[J]. *大气与环境光学学报*, 2006, 11(3):216-221.
- [4] 王志刚, 刘文清, 李宏斌, 等. 三维荧光光谱法分析巢湖的 CDOM 的分布及其来源[J]. *环境科学学报*, 2006, 26(2):275-279.
- [5] 郝瑞霞, 曹可心, 邓亦文. 城市污水处理过程中有机污染物三维荧光特性的变化规律[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(6):789-792.
- [6] 倪永年, 蔡英俊. 平行因子-同步荧光法测定食品中的维生素 B1、B2 和 B6 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, 10:1 641-1 644.
- [7] Pons M N, Bonté S L, Potier O. Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterization[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 113:211-230.
- [8] Mu Y, Yu H Q. Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules. I: Physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94:980-987.
- [9] Wang J, Fang F, Yu H Q. Substrate consumption and biomass growth of *Ralstonia eutropha* at various S_0/X_0 levels in batch cultures[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98:2 599-2 604.
- [10] Bahram M, Bro R, Stedmon C, et al. Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation[J]. *Journal of Chemometrics*, 2006, 20:99-105.
- [11] Bro R PARAFAC. Tutorial and applications [J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1997, 38:149-171.
- [12] Baker A, Inverarity R. Protein-like fluorescence intensity as a possible tool for determining river water quality[J]. *Hydrological Processes*, 2004, 18:2 927-2 945.
- [13] Harrison D E F, Chance B. Fluorometric technique for monitoring changes in the level of reduced nicotinamide nucleotides in continuous culture of microorganisms [J]. *Appl Microbiol*, 1970, 19:446-449.
- [14] Farabegoli G, Hellinga C, Heijnen J J, et al. Study on the use of NADH fluorescence measurements for monitoring wastewater treatment systems[J]. *Water Research*, 2003, 37:2 732-2 738.
- [15] Marose S, Lindemann C, Scheper T. Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring [J]. *Biotechnology Progress*, 1998, 14:63-74.
- [16] Arunachalam R, Shah H K, Ju L K. Monitoring aerobic sludge digestion by online scanning fluorometry [J]. *Water Research*, 2005, 39:1 205-1 214.