

文章编号: 1007- 2985(2005) 01- 0037- 03

生物膜活性测定中 TTC- 脱氢酶活性测定法的改进^{*}

李 今^{1,2,3}, 吴振斌¹, 贺 锋¹

(1. 中国科学院水生生物研究所淡水生态和生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 湖北师范学院生物系, 湖北 黄石 435002)

摘 要: 对生物膜活性测定中氯化三苯基四氮唑(TTC) - 脱氢酶活性测定法进行了改进, 解决了标准曲线制作稳定性差的问题, 对测定中的诸多影响因素进行比较分析, 确定了改进后的脱氢酶活性测定的最佳条件. 结果表明, 以甲苯作为萃取剂的液-液分层明显, 提取效果好, 操作简便. 以硫化钠代替连二亚硫酸钠作还原剂, 效果较好, 显色稳定不褪色. 反应的适宜 pH 值为 8.6, 适宜温度为 38 ℃. 同时确定了生物膜的最佳培养反应时间为 6 h.

关键词: 生物膜; TTC; 脱氢酶活性; 标准曲线

中图分类号: Q55

文献标识码: B

生物膜在水环境中广泛存在, 具有很大的表面积, 有非常强的氧化能力, 可大量吸附废水中呈多种状态的有机物, 并通过生物膜的吸附、吸收及生物代谢作用而降解去除^[1], 以此为基础的生物膜反应器在污水处理中被广泛应用.

在生物膜的活性测定中, 脱氢酶活性测定法是重要的方法. 在废水生物处理中, 由于它可以反映处理体系中活性微生物量及其对有机物的降解活性, 因而成为一项考察生物膜的重要指标. 测定脱氢酶的方法很多, 目前较为常用的是氯化三苯基四氮唑(TTC)法, 该法主要选用无色的 TTC 作为受体, 受氢后生成红色的三苯基甲(TF). 在以往的文献中, 一直存在着标准曲线制作稳定性差, 反映不了真实的 TF 生成量, 以及提取溶剂的不理想, 不同文献中测试条件差异较大等问题^[2]. 笔者在前人工作的基础上, 从萃取剂、缓冲溶液、还原剂的选择、pH 值、吸收波长的选择、温度和显色时间等多方面进行了优选比较, 为 TTC- 脱氢酶活性测定方法的完善提供依据.

1 材料与方 法

1.1 生物膜样品制备

取 10 g 生物膜, 用蒸馏水润洗 2 次, 置于锥形瓶中, 用玻璃珠剧烈摇动将生物膜打碎, 用生理盐水 20 mL 稀释, 用玻棒搅动, 使成悬液, 备用.

1.2 主要仪器和试剂

(1) 氯化三苯基四氮唑(TTC) - 葡萄糖标准溶液: TTC 分析纯 0.1 g 与葡萄糖 1 g 共溶于 100 mL 蒸馏水中, 棕色试剂瓶保存. (2) 甲苯(分析纯); 三氯甲烷(分析纯). (3) 三羟甲基氨基甲烷(Tris) - HCl 缓冲溶液, pH 值为 8.6. (4) 其它: 硫化钠, 连二亚硫酸钠.

1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线的制作 在分液漏斗中依次注入 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL 浓度为 1 g/L TTC- 葡萄糖标准溶液, 2 mL Tris- HCl 缓冲溶液及 1 mL 10% Na₂S 新配溶液, 摇匀; 待溶液充分显色后, 准确加入甲苯溶液 5 mL, 振荡, 完全提取 TF. 放置片刻; 待溶液分层后, 移至 1 cm 比色皿中稳定 2 min. 取有机溶液层用 752 紫外分光光度计在波长 485 nm 处, 测对应的吸光度(A)值, 对脱氢酶活

* 收稿日期: 2004- 12- 11

基金项目: 国家“十五”重大科技专项资助项目(2002AA601021); 湖北省教育厅重点资助项目(2002A00010)

作者简介: 李今(1968-), 男, 湖南省衡阳市人, 湖北师范学院生物系副教授, 博士, 主要从事环境微生物研究.

性作图,以试剂空白作对照,绘制标准曲线。

1.3.2 生物膜脱氢酶活性测定 取生物膜制备液 2 mL 于带塞试管中,依次加入 Tris-HCl 缓冲液、0.1 mol/L 葡萄糖液、0.5% TTC 各 2 mL,置入 37 ± 1 °C 恒温箱中培养 6 h 后取出,加 2 滴浓硫酸终止反应,准确加入 5 mL 甲苯,振摇,在 4 000 rpm 下离心 5 min,取有机溶剂层比色。在上述条件下,将 1 h 产生 $1 \mu\text{g}$ TF 的量为 1 个酶活力单位。

2 结果与讨论

2.1 萃取剂的选择

脱氢酶与 TTC 反应生成 TF,TF 颜色越深表明脱氢酶的活性越高。因而 TF 的萃取是关键。首先对不同文献^[2-5]中分别采用的几种萃取剂,丙酮、甲醇、三氯甲烷和甲苯进行了筛选,按照脱氢酶活性测定方法,反应完毕后,进行提取,离心,比色。结果表明(表 1):在同等条件下,丙酮作萃取剂溶液发生浑浊,显色不稳定;三氯甲烷和甲苯作萃取剂,液-液分层好,显色稳定,吸光度(A)值大;甲苯和三氯甲烷作为提取溶剂较好,但三氯甲烷比重比水大,提取离心后,其位置介于生物膜与水层之间,操作起来不便;甲苯则比重较小,上浮能力强,且有抑制脱氢酶活性的作用,是较为理想的提取溶剂。

表 1 不同萃取剂的吸光度值

项目	丙酮	甲醇	三氯甲烷	甲苯
状态	不分层	不分层	下分层	上分层
吸光度值	溶液浑浊	0.923	1.362	1.359

2.2 缓冲溶液的选择

将 4 种缓冲溶液的 pH 均调至 8.6,其它过程按 1.3.2 方法。结果显示(表 2),从反应液的吸光度值看,Tris-HCl 缓冲溶液体系的最高;从反应后体系的 pH 值看,Tris-HCl 缓冲溶液体系的 pH 变化最小,pH 值的稳定性直接关系到反应的灵敏度和吸光度值的大小,Tris-HCl 缓冲溶液表现出较大的缓冲容量,是适宜的选择。

表 2 加入不同缓冲溶液的反应液吸光度值

项目	Tris-HCl	广泛	硼砂-硼酸	巴比妥-HCl
吸光度值	0.532	0.296	0.352	0.366
反应后 pH 值	8.5	7.1	7.5	7.6

2.3 标准曲线制作中 TTC 还原剂的选择, pH 值、吸收波长的选择

在不同 pH 值条件下进行反应,发现脱氢酶反应的 pH 值适应范围为 7~9。根据文献[5-6],设定 pH 值为 7.4 和 pH 值为 8.6 作进一步比较。结果显示(表 3),以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 为还原剂时,pH 值为 8.6 平均吸光度值较 pH 值为 7.4 的高出 50.5%;以 Na_2S 为还原剂时,pH 值 8.6 的平均吸光度值较 pH 值为 7.4 高出 75.6%。因此,pH 值为 8.6 为反应适宜的 pH 值。

表 3 不同还原剂、pH 值和吸收波长条件下的吸光度值

Tris-HCl 缓冲溶液 pH 值	TTC/ g L^{-1}	吸收波长/ nm	吸光度值	
			$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	Na_2S
7.4	0.02	492	0.167	0.183
		485	0.175	0.182
	0.10	492	0.419	0.927
		485	0.417	0.931
8.6	0.02	492	0.285	0.431
		485	0.280	0.434
	0.10	492	0.565	1.059
		485	0.570	1.062

在不同文献报道中^[3-7], 吸收波长的选择有 492 nm 和 485 nm 这 2 种, 表 3 结果显示, 在各组合条件下 A492 和 A485 两者吸光度值差异在 0.5% ~ 1% 左右, 因而 492 nm 或 485 nm 均可作为检测波长。

分别以 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 和 Na_2S 作为还原剂, 测试其不同条件下的酶活力. 结果显示(表 3), 以 Na_2S 作为还原剂时的平均吸光度值较 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 平均高出 67.3%. 在 TTC 标准曲线制作时, 采用的还原剂多为连二亚硫酸钠^[3-7], 将标准 TTC 还原为 TF. 在 TTC 工作液的处理中, 加入连二亚硫酸钠后, 溶液立即呈现红色, 但溶液色度随后逐渐减褪, 显色极不稳定. 这可能是 TTC 被还原成 TF 时, TF 共轭双键被过剩的连二亚硫酸钠破坏, 造成反应液中 TF 量下降. 以 Na_2S 作还原剂的处理, 经 30 min 显色完全后, 色度稳定, 并可保持 6 h 吸光度值稳定. 因此, 以硫化钠代替连二亚硫酸钠作还原剂, 效果较好。

2.4 温度对酶活性的影响

将样品分别置于 38 °C、30 °C 和 25 °C 等不同温度条件下, 按 1.3.2 步骤, 反应 6 h, 测其酶活力. 结果发现: 在 38 °C 才出现明显红色, 而 30 °C 和 25 °C 基本无色. 表明生物膜脱氢酶的活性测定的适宜温度为 38 °C。

2.5 显色时间对酶活性的影响

在酶活性的测定中, 较短的培养时间可避免因底物浓度下降, 产物的形成以及酶本身的变性所带来的不良影响. 但培养时间过短则反应生成的被检测物质的量太少, 给定量检测造成困难, 因此应选择适当的培养时间. 在本实验设置的条件下, 每隔 1 h 取样测定酶活, 结果表明(如图 1), 在波长为 485 nm 的光照射下, 在一定时间内, 反应时间越长, 反应液中 TF 的量越大, 吸光度值也越高. 但随着时间的延长, 反应速率(A/h)趋于平缓. 对生物膜而言, 培养时间以 6 h 为佳, 此时显色程度便于检出, 反应速率也较大. 不过, 不同生物膜由于所组成的微生物种群及形成时间和其它条件的差异, 反应的适宜时间也会有些差异。

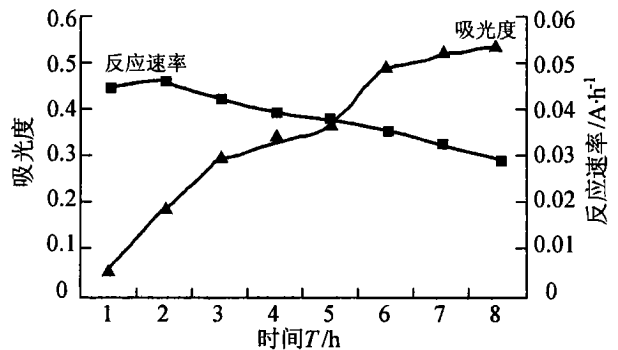


图 1 不同反应时间生物膜的脱氢酶活性

参考文献:

- [1] HEADLEY J V, MORRIS M, TYRELL W R, et al. Rates of Sorption and Partition of Contaminants in River Biofilm [J]. Environ Sci. Tech., 1998, 32(24): 3 968- 3 973.
- [2] BERGMAYER H V, HENRY W R. Methods of Enzymatic Analysis [M]. New York: Academic Press, 1984.
- [3] 俞琬馨, 吴国庆, 孟宪庭. 环境工程微生物检验手册 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990.
- [4] 郑士民, 颜望明, 钱新民, 等. 自养微生物 [M]. 北京: 科学出版社, 1983.
- [5] 朱南文, 闵航, 陈美慈, 等. 脱氢酶活性测定方法的探讨 [J]. 中国沼气, 1996, 16(2): 3- 6.
- [6] 牛志卿, 刘建荣, 吴国庆. 脱氢酶活性测定法 [J]. 微生物学通报, 1994, 21(1): 59- 63.
- [7] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册 [M]. 北京, 农业出版社, 1986.

Improvement of Determination on TTC- Dehydrogenase Activity in Biofilms

LI Jin^{1,2,3}, WU Zhen-bin¹, HE Feng¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039; 3. Biology Department, Hubei Normal University, Huangshi 435002, Hubei China)

Abstract: The method of 3, 5, 5- triphenyltetrazolium (TTC) determining biofilms activity was improved, and the problem that the standard curve of determination on TTC- dehydrogenase activity can't be made conveniently and stably was resolved. The factors which influence the determination were studied. The results showed that sodium sulfide as reducer, toluene as TF organic extractant, Tris- HCl as buffer solution, pH 8.6 and 38 °C were the best condition on the developed method, and the optimum reaction time to cultivate biofilms is 6 h.

Key words: biofilms; TTC; dehydrogenase activity; standard curve