

论述与研究

DOI: 10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2022.07.001

臭氧微纳米气泡对大肠杆菌的消毒效果及灭活机制

杨童¹, 谭嘉怡¹, 王燕¹, 高俊贤¹, 王秉政¹, 张海川¹,
王硕^{1,2,3}, 李激^{1,2,3}

(1. 江南大学 环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省厌氧生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江苏高校水处理技术与材料协同创新中心, 江苏 苏州 215009)

摘要: 臭氧消毒技术具有灭活速率高、彻底,且无二次污染等优点,但在国内污水处理厂缺乏应用,且传统曝气方式下臭氧产生的气泡大,溶解性差,传质效率低。为此,将微纳米曝气技术与臭氧氧化相结合并用于污水消毒,考察了臭氧微纳米气泡的性能及对大肠杆菌的灭活机制。结果显示,臭氧微纳米气泡的溶解性更高,曝气10 min时溶解性臭氧浓度就接近8 mg/L;微纳米气泡的爆破作用与臭氧分解过程能够协同促进·OH的产生;在实际消毒效果方面,1 mg/L臭氧微纳米气泡溶液在1 min内可去除10⁶ CFU/mL以上的大肠杆菌,比臭氧微米气泡灭活浓度高10³ CFU/mL。在0.2 mg/L腐殖酸的影响下,2.5 mg/L的臭氧微纳米气泡溶液仍能灭活10⁷ CFU/mL大肠杆菌,比臭氧微米气泡灭活浓度高10² CFU/mL。流式细胞术分析结果表明,臭氧微纳米气泡能更快地将细胞破碎裂解,使酯酶彻底失活及DNA解旋。

关键词: 臭氧微纳米气泡; 臭氧微米气泡; 消毒; 大肠杆菌; 流式细胞术

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2022)07-0001-10

Disinfection Effect and Inactivation Mechanism of Ozone Micro-nano Bubbles on *Escherichia coli*

YANG Tong¹, TAN Jia-yi¹, WANG Yan¹, GAO Jun-xian¹, WANG Bing-zheng¹,
ZHANG Hai-chuan¹, WANG Shuo^{1,2,3}, LI Ji^{1,2,3}

(1. School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu University Collaborative Innovation Center of Water Treatment Technology and Material, Suzhou 215009, China)

Abstract: Among the existing traditional disinfection methods in wastewater treatment plants (WWTPs), ozone (O₃) inactivation has the advantages of rapid and complete inactivation rate without secondary pollution. Nevertheless, it is lack of application in domestic WWTPs at present, and the traditional aeration method produces large bubbles, poor solubility, and low mass transfer efficiency.

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK20210484); 中国博士后科学基金资助项目(2021M691272); 江苏省博士后科研资助计划项目(2021K5056A); 江苏高校水处理技术与材料协同创新中心预研课题(XTCXSZ2020-2); 江苏省“双创博士”项目

通信作者: 李激 E-mail: lij@jiangnan.edu.cn

Micro-nano bubbles (MNBs) technology can be integrated with ozone inactivation to further improve mass transfer efficiency and the overall performance of the disinfection. The results showed that the solubility of O_3 micro-nano bubbles (O_3 -MNBs) was higher, and the dissolved O_3 concentration was near 8 mg/L after aeration for 10 min. The explosion of MNBs and O_3 decomposition had a synergistic mechanism to promote the production of $\cdot OH$. In the experiment of actual disinfection, 1 mg/L O_3 -MNBs could inactivate above 10^6 CFU/mL *Escherichia coli* (*E. coli*) within 1 min. In addition, under the influence of 0.2 mg/L humic acid, 2.5 mg/L O_3 -MNBs could still inactivate 10^7 CFU/mL *E. coli*. The results of flow cytometry analysis implied that O_3 -MNBs could break and lyse cells faster via thoroughgoing oxidation of esterase and DNA unwinding.

Key words: ozone micro-nano bubble; ozone micron bubble; disinfection; *Escherichia coli*; flow cytometry

由 COVID-19 引发的疫情暴发后,病毒、细菌、病原虫等病原微生物的达标去除受到广泛关注。在传统污水处理流程中,消毒是唯一对病原微生物具有灭活消杀作用的处理单元。目前污水处理厂采用的消毒方式主要包括次氯酸钠($NaClO$)、臭氧(O_3)、紫外消毒。微生物在紫外消毒后存在光复活的现象,具有潜在生态风险^[1]。氯消毒过程会产生含氯副产物,引发二次污染,且其运输与储存过程中存在有效氯浓度降低等问题,并可能引发氯气中毒,给污水处理厂带来难题^[2]。

O_3 的氧化还原电位(ORP)可达 2.07 V,相较于 ClO_2 ($E^0=1.50$ V) 与 Cl_2 ($E^0=1.36$ V),其消毒作用迅速且彻底,产生消毒副产物的风险低,从 20 世纪开始在国外被广泛应用,尤其是欧洲、美国及日本^[3-4]。此外,强氧化性的 O_3 还可兼顾去除难降解微污染物等^[5-7],在消毒领域具有广阔的应用前景。理论上 O_3 在水中的溶解度可比 O_2 高 10 倍以上,但传统曝气方式下 O_3 产生气泡大,溶解性差^[8],传质效率低下,造成资源的大量浪费。

微纳米气泡(MNBs)起源于 1994 年 Parker 等^[9]对影响疏水界面间吸引力的亚微观气泡的发现,一般指直径 $<100\ \mu m$ 的微米气泡与纳米气泡^[10],具有气液界面面积大、停留时间长、界面 ζ 电位高、传质效率高、产羟基自由基($\cdot OH$, $E^0=2.80$ V)能力强等特点^[11]。微纳米气泡技术常被用于与 O_3 、 $NaClO$ 、 H_2O_2 等氧化性物质结合,已在水体修复、污水处理、气体治理、土壤修复、食品消毒、水产养殖、医疗等方面取得显著的效果^[12-14]。

吕宙^[15]将微纳米气泡曝气与传统曝气分别搭

载于 A^2O 小试装置的好氧区,前者对 COD 、 NH_4^+-N 、总磷和总氮的去除率比后者高 10% 以上,且能耗更低。周维奇等^[16]在模拟养殖塘水体中测得微气泡发生装置在 1 h 内能防止 70% 的臭氧逸散,对抗生素甲氧嘧啶和磺胺嘧啶的去除率分别为 63.95% 和 79.52%,同时能去除 26.1% 的 COD_{Mn} 。Fan 等^[17]将微纳米气泡技术与可见光光催化消毒技术耦合,发现其对污水中枯草芽孢杆菌孢子的灭活速率常数比不含微纳米气泡的处理组高 5.6 倍。但臭氧与微纳米曝气技术结合用于污水消毒的确切机制尚不清楚,研究多集中在消毒效果比较上^[18],对影响因素的探讨不够充分, O_3 消耗量与大肠杆菌灭活率对应关系的研究也非常有限,缺乏深入的机理探究。

因此,将微纳米曝气技术与臭氧消毒相耦合而形成臭氧微纳米气泡(O_3 -MNBs),考察了其在提高 O_3 溶解性和利用率、产生 $\cdot OH$ 能力、消毒效果等方面的性能优势,探究了天然有机质腐殖酸(HA)对消毒效果的影响,并通过流式细胞术分析 O_3 -MNBs 破坏细胞的作用,以进一步揭示其对大肠杆菌的灭活机制,为臭氧微纳米曝气技术用于消毒提供理论依据,同时为水处理消毒单元提供新的策略参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用菌种大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli*)购自丰晖生物。Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 、 H_3BO_3 、KI、可溶性淀粉、 H_2O_2 (30%)、HA、NaCl、琼脂、胰蛋白胨、酵母粉购自国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯。

实验与消毒体系的用水均为使用 Master-D 超纯水机制备的超纯水,电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, pH 值约为 7.0, 水温为室温(约 25°C)。

1.2 实验装置

臭氧发生器型号为 COM-AD-01-OEM, 购自鞍山安思罗斯环保有限公司, 采用风冷散热, 气源为高纯空气, 最大进气量为 100 L/h , 20°C 时最大臭氧浓度为 1000 mg/m^3 。

微纳米曝气机型号为 SCHB-II-150, 购自山东微气泡环保设备有限公司, 最小循环水量为 150 L/h , 进气量不高于 100 mL/min 。产生气泡粒径范围集中在 $40\sim 200 \text{ nm}$ 与 $0.6\sim 1 \mu\text{m}$, 平均粒径为 189.4 nm 。微孔曝气头可产生 $10 \mu\text{m}$ 以上的微米级气泡(MBs), 粒径不均一, 较大的气泡可达毫米级。曝气时微纳米曝气组与微孔曝气组控制进气量一致, 均稳定在 100 mL/min , 臭氧发生器档位设定为 50%。

微纳米曝气组实验装置见图 1。臭氧与实验用水混合进入微纳米曝气机的管路后, 按最大气液比(1:9)充分混合, 配制 $\text{O}_3\text{-MNBs}$ 母液。微孔曝气组中曝气头与臭氧发生器后的转子流量计直接相连, 接入消毒反应器中, 配制臭氧微米气泡($\text{O}_3\text{-MBs}$)母液。消毒实验中将 $\text{O}_3\text{-MNBs}$ 与 $\text{O}_3\text{-MBs}$ 母液分别梯度稀释成各 O_3 浓度的溶液。

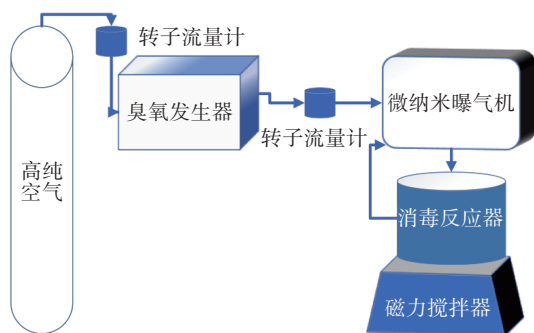


图1 微纳米曝气装置示意

Fig.1 Schematic diagram of micro-nano aeration unit

1.3 分析方法

1.3.1 臭氧浓度及 ORP 测定

臭氧浓度采用硼酸碘化钾比色法进行测定, 标准曲线的测定以 I_2 标准溶液代替 O_3 标准溶液。水体中臭氧浓度标准曲线为 $C=2.0703 \times A_{352} - 0.031$, $R^2 \approx 0.997$; 空气中臭氧的标准曲线为 $C=1.7341 \times A_{570} - 0.009$, $R^2 \approx 0.999$ 。

ORP 使用 WTW Multi 3630 IDS 多参数水质分析仪测定, 电极采用 SenTix® ORP-T 900。

1.3.2 羟基自由基测定

选取对羟基苯甲酸(4-HBA)作为 $\cdot\text{OH}$ 捕获剂^[19]。通过高效液相色谱法(HPLC)测定产物 3,4-二羟基苯甲酸(3,4-dHBA)的浓度来推算 $\cdot\text{OH}$ 的产生量。流动相为甲醇和 0.1% 磷酸缓冲液(比例为 3:7), 流速为 1 mL/min , 色谱柱温度为 35°C , 紫外检测波长为 270 nm 。该方法的检测限和定量限分别为 0.5 、 $1 \mu\text{mol/L}$, 回收率为 93%~101%, 标准偏差小于 5%。

1.3.3 大肠杆菌培养、消毒与计数

大肠杆菌的扩大培养使用 120°C 高压灭菌处理后的溶菌肉汤(LB)培养基, 培养条件为 37°C 和 170 r/min 。收集菌液时 OD_{600} 值的范围为 $1.6\sim 1.8$, 在 7000 r/min 下离心 6 min (室温), 弃掉上清液, 用已灭菌的磷酸盐缓冲溶液(PBS)重悬菌液并洗涤两次, 弃掉上清液, 再用无菌 PBS 适当稀释, 使菌液 OD_{600} 读数为 1 ± 0.1 , 以此作为实验菌液。

在消毒实验中, 将制备好的 $\text{O}_3\text{-MNBs}$ 溶液与 $\text{O}_3\text{-MBs}$ 溶液稀释至不同浓度(0.5 、 1.0 、 2.5 mg/L), 然后往 1 L 溶液中加入 10 mL 实验菌液。实验条件为 300 r/min 搅拌(室温), 实验过程中, 在 0 、 1 、 2 、 5 、 10 、 20 、 30 min 取样。取样体积为 5 mL , 取样后立即将样品转移至预先加入 $100 \mu\text{L Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液(10%)的无菌取样管内以保证消毒剂被完全淬灭。

大肠杆菌计数采用平板计数法。用无菌 PBS 作 10 倍梯度稀释后, 每个梯度取 $100 \mu\text{L}$ 稀释菌液, 平行涂布于三个 90 mm 直径的培养皿中, 培养皿内提前加入琼脂 LB 培养基并灭菌冷却凝固干燥, 37°C 下培养 24 h , 选取生长菌落数在 $30\sim 300$ 个的平板进行计数。

1.3.4 细胞完整性判定

细胞完整性采用流式细胞术进行分析。传统的钙黄绿素(Calcein)引入疏水性乙酰甲氧基甲酯(AM)基团, 能轻易穿透活细胞膜, 被活细胞内酯酶剪切后发出强绿色荧光($\lambda_{\text{Ex}}=490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=515 \text{ nm}$), 对活细胞实现荧光标记。碘化丙啶(PI)作为死细胞荧光探针, 能穿过死细胞膜的无序区域而到达细胞核, 并嵌入细胞的 DNA 双螺旋从而产生红色荧光($\lambda_{\text{Ex}}=535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=617 \text{ nm}$)。预处理步骤主要包括在 1000 r/min (室温)下离心 3 min 、用 Calcein-AM/PI

活细胞/死细胞双染试剂盒内 Assay Buffer(1X)洗涤两次后收集菌液、菌液与现配染色液按2:1混合后在37℃下孵育30 min。

2 结果与讨论

2.1 臭氧微纳米气泡的特征

各组在前10 min内按5 mg/min均匀投加 O_3 ,后30 min无曝气措施,持续搅拌,微纳米曝气与微孔曝气方式下 O_3 溶解与衰减曲线见图2。微纳米曝气方式使得 O_3 可快速溶入水中,曝气1 min时 O_3 -MNBs浓度(1.68 mg/L)约为 O_3 -MBs(0.81 mg/L)的两倍,停止曝气时 O_3 -MNBs溶解浓度为7.75 mg/L,比微孔曝气方式下 O_3 的溶解浓度高1.68 mg/L,10 min内投加的 O_3 累积损失少18.07 mg。这是由于微纳米气泡在水中留存久,逐渐缩小时比表面积不断增大,受到水的表面张力不断增强,从而使得更多的气体穿过气泡界面溶解到水中。敖卫^[20]探究了鼓泡式与电解式制备 O_3 水及其杀菌效果,曝气3 min时鼓泡式 O_3 溶解浓度接近1 mg/L,与本实验中 O_3 -MBs组结果类似,而电解式溶解臭氧不足0.1 mg/L,均远低于微纳米曝气方式溶解的 O_3 浓度。

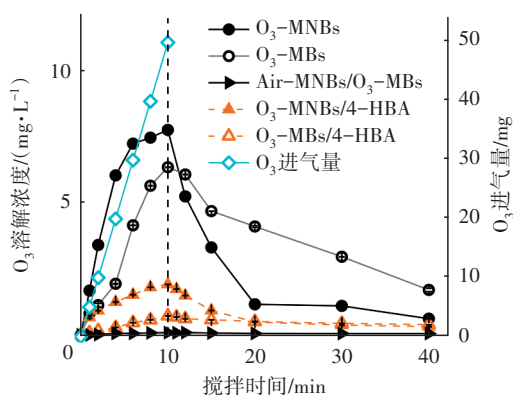


图2 两种曝气方式下 O_3 溶解与衰减曲线

Fig.2 O_3 dissolution and attenuation curve under two aeration modes

O_3 在纯水中的半衰期为8~20 min,停止曝气后,5 min内 O_3 -MNBs组的 O_3 浓度已低于 O_3 -MBs组,说明 O_3 的加速分解可能是由于微纳米气泡形式的存在。采用微纳米曝气方式通入高纯空气10 min,产生微纳米气泡后脱气1 d,再以微孔曝气方式通入 O_3 ,此时 O_3 溶解性变化如图2中Air-MNBs/ O_3 -MBs组所示,相较于无微纳米气泡存在时直接微孔曝气的 O_3 -MBs组, O_3 溶解浓度几乎为0。结果表明,已

有微纳米气泡存在时,微孔曝气方式下 O_3 的溶解速率小于 O_3 自分解的速率,进一步验证了微纳米气泡促进 O_3 分解这一猜想。微纳米气泡收缩时的自身增压特性使得在水中气体含量达到过饱和条件时,微纳米气泡仍可继续进行气体的传质过程,有助于保持高效传质。

加入过量4-HBA(7 g/L)后,溶液中 O_3 所产生的 $\cdot OH$ 立即被4-HBA捕获,同时4-HBA与其羟基化产物3,4-dHBA也会消耗部分 O_3 ,导致曝气过程中 O_3 溶解浓度不如正常溶解时高。但是 O_3 -MNBs/4-HBA组在曝气终点时的 O_3 浓度仍高于 O_3 -MBs/4-HBA组,说明此时微纳米曝气使 O_3 溶解速率仍高于分解消耗速率,其溶解性优于微孔曝气方式。

O_3 在酸性与碱性溶液中产生 $\cdot OH$ 的启动步骤不同,公式(1)简述了其通用过程^[21]。图3表明了两种曝气方式下产 $\cdot OH$ 的能力不同,微纳米气泡具有明显优势。在通入 O_3 的10 min内, O_3 -MBs组的 $\cdot OH$ 生成速率为 $7.61 \mu mol/(L \cdot min)$ ($R^2 \approx 0.997$),而 O_3 -MNBs组比其高75%,达到 $13.25 \mu mol/(L \cdot min)$ ($R^2 \approx 0.952$),最高浓度为 $108.36 \mu mol/L$ 。这一方面是由于微纳米曝气方式产生的 O_3 溶解浓度更高,另一方面可能是由于微纳米气泡逐渐缩小的过程中内部压力增加,达到极限而气泡破裂,气液界面消失的剧烈变化使得集聚的高浓度正负离子将积蓄的化学能瞬间释放,激发产生大量的 $\cdot OH$ ^[11]。

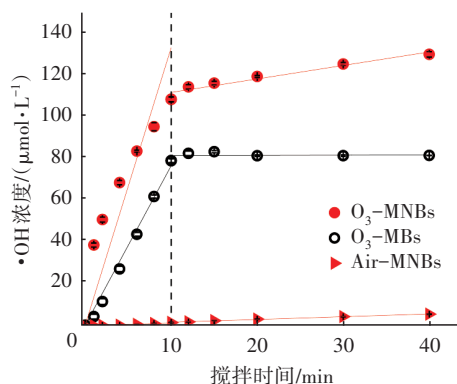


图3 两种曝气方式下产 $\cdot OH$ 浓度

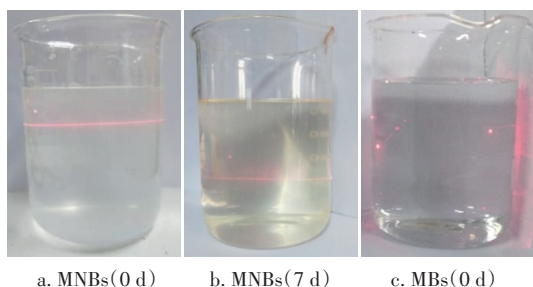
Fig.3 Concentration of produced $\cdot OH$ under two aeration modes

Air-MNBs组的结果也验证了这种假设,仅投加高纯空气时,微纳米曝气的方式使得水中仍然有 $\cdot OH$ 产生,产生速率为 $0.14 \mu mol/(L \cdot min)$ ($R^2 \approx$

0.970),证实了不依赖 O_3 分解作用,微纳米气泡也可明显产生 $\cdot OH$ 。另外, O_3 -MNBs 组生成 $\cdot OH$ 的速率约为 Air-MNBs 组与 O_3 -MBs 组之和的 1.7 倍,这说明微纳米气泡的爆破作用与 O_3 的分解反应对产生 $\cdot OH$ 具有协同机制。

曝气 10 min 后停止, O_3 -MNBs 组仍有 $\cdot OH$ 产生,产生速率为 $0.64 \mu mol/(L \cdot min)$ (拟合曲线的 $R^2 \approx 0.928$)。Air-MNBs 组中微纳米气泡的爆破也继续引发产生 $\cdot OH$,产生速率为 $0.13 \mu mol/(L \cdot min)$ (拟合曲线的 $R^2 \approx 0.992$),与其曝气时的产生速率接近,说明无外加气源时微纳米气泡爆破产生 $\cdot OH$ 作用仍较强。故基于微纳米气泡自身产自由基的特性, O_3 -MNBs 具有持久的氧化消毒能力,相比紫外消毒更有优势。

通过激光束照射的手段,利用丁达尔现象验证了 MNBs 的存在,且相比于 MBs,其在水中停留时间大幅增加,7 d 后粒径在 100 nm 以下的微纳米气泡仍含量充足,有明显的丁达尔现象(见图 4)。李恒震^[22]认为微纳米气泡的留存时间与生成方式有关,且气泡孔径越小留存越久。



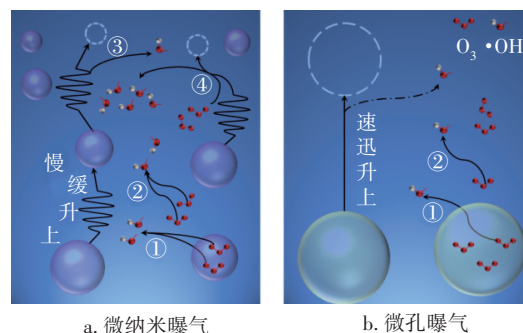
a. MNBs(0 d) b. MNBs(7 d) c. MBs(0 d)

图 4 MNBs 异于 MBs 的丁达尔现象

Fig.4 Tyndall phenomenon of existing micro-nano bubbles different from micron bubbles

综合以上对 O_3 -MNBs 的溶解性与衰减特征、产 $\cdot OH$ 能力及停留时间的探讨, O_3 -MNBs 溶液中气泡存在更丰富,溶入了更多的 O_3 但反应消耗迅速,产 $\cdot OH$ 更多,图 5 阐述了 O_3 -MNBs 溶液中存在的 4 种产 $\cdot OH$ 机制,分别为:①包裹着 O_3 分子的 MNBs 传质过程中, O_3 逸出气泡并与水反应产生 $\cdot OH$;②溶液中 O_3 分子直接与水反应,按式(1)分解产生 $\cdot OH$;③ MNBs 在水中留存时间久,溶解缩小时,内部压力增至极限而气泡破裂,气液界面消失,同时瞬间释放超高化学能,激发产生 $\cdot OH$;④ MNBs 缩小过程中吸附 O_3 分子, MNBs 的爆破作用与 O_3 的分解反应协同促进,产生大量的 $\cdot OH$ 。而 O_3 -MBs 的作用过程不

同,初始溶解性 O_3 分子相对较少,大气泡快速上升消散导致溶液中几乎没有剩余气泡,爆破作用的缺失使得仅靠机制①与②产生 $\cdot OH$ 效果微弱, O_3 反应衰减缓慢。



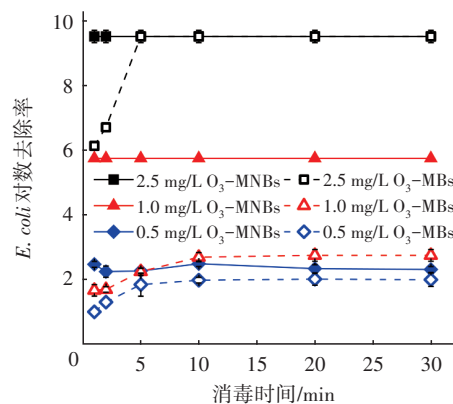
a. 微纳米曝气 b. 微孔曝气

图 5 两种气泡溶液产生 $\cdot OH$ 的机制

Fig.5 Mechanism of $\cdot OH$ production in two bubble solutions

2.2 臭氧微纳米气泡对大肠杆菌的灭活效果

为验证微纳米曝气方式下 O_3 的实际氧化作用,以 *E. coli* 为研究对象,考察了不同浓度的 O_3 -MNBs 与 O_3 -MBs 溶液中菌落数的变化,结果见图 6(a)。在浓度为 0.5 mg/L 的 O_3 溶液中, O_3 -MNBs 与 O_3 -MBs 的灭活速率差异明显,1 min 时剩余活菌数相差 10 CFU/mL, O_3 -MNBs 对 *E. coli* 的灭活响应更迅速。溶液中 O_3 浓度为 1.0 mg/L 时,两种曝气方式的消毒终点差异显著, O_3 -MNBs 可在 1 min 内杀死 10^6 CFU/mL 的 *E. coli*,实际所需时间可能更短,而 O_3 -MBs 组在 30 min 后仍有接近 10^3 CFU/mL 的活菌。 O_3 浓度为 2.5 mg/L 时两种曝气方式均可迅速灭活 10^9 CFU/mL 的高浓菌液,但 O_3 -MNBs 所需消毒时间比 O_3 -MBs 缩短至少一半,在 1 min 内即完全杀菌,灭活速率接近 O_3 -MBs 的 5 倍。



a. 对 *E. coli* 的灭活效果

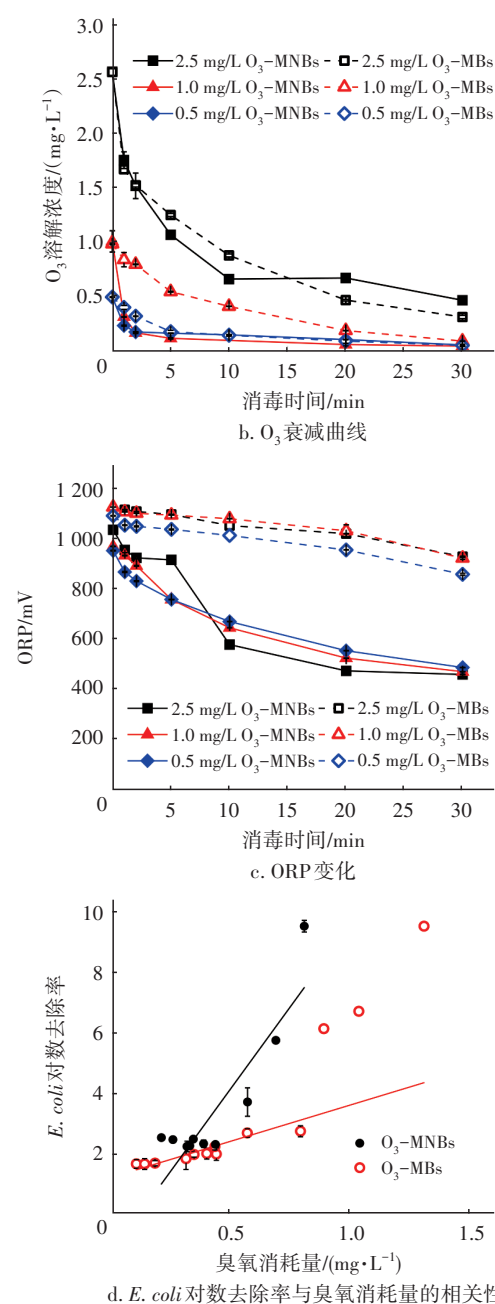


图6 不同浓度的两种 O_3 气泡溶液消毒效果对比
Fig.6 Inactivation effect of O_3 solutions with different concentrations in two bubble forms

消毒过程中 O_3 的消耗情况与ORP变化见图6(b)和(c)。相比 O_3 -MBs组, O_3 -MNBs组的 O_3 消耗更快,这是由于MNBs在收缩过程中持续增压,可使气液界面处传质效率得到持续增强,促进 O_3 分解产生 $\cdot OH$,在灭活微生物及去除有机污染物方面均效果卓越。各组 O_3 的半衰期均不超过5 min,且溶液中 O_3 浓度更低时,更快降低至0,这是由于同等初始

菌浓度下,低浓度 O_3 量已不能满足氧化细胞所需。刘满苍等^[23]提出 O_3 若应用于饮用水消毒,需要监管臭氧投加量、管道内营养素的余量及有机物的溶出等以保证出水生物稳定性。《室外给水设计标准》(GB 50013—2018)中规定用于消毒的 O_3 投加量宜为1~2 mg/L。从图6(b)可以看出当 O_3 投加量为1.0 mg/L时, O_3 -MBs与微生物充分反应后仍有明显 O_3 剩余,但从图6(a)可知此时 $E. coli$ 未被继续灭活。而如图3所示, O_3 -MNBs即使在 O_3 耗尽的情况下,也能继续显著产生 $\cdot OH$,这种强氧化性物质对保证持续消毒能力显得尤为重要。

ORP变化能明显地反映出灭活 $E. coli$ 时 O_3 -MNBs与 O_3 -MBs的 O_3 消耗速率不同。相同气泡形式下,不同浓度 O_3 溶液的ORP变化不大,但微纳米气泡组的ORP相较于微米气泡组降低明显,结合图6(a)中对 $E. coli$ 的灭活情况来看, O_3 -MBs组虽然ORP降低慢,但较高的ORP并未对应显著的持续杀菌效果,说明MBs的形式限制了 O_3 的氧化性能释放,图5解释了这一现象的原因,即 O_3 消耗慢,产生的 $\cdot OH$ 量少。

消毒过程中 $E. coli$ 菌落数变化与 O_3 的衰减并不完全呈线性关系,当活菌未被全部灭活时, O_3 仍在明显衰减却不再用于杀菌,例如1.0 mg/L与0.5 mg/L的 O_3 -MBs溶液,说明 O_3 -MBs的形式使得 O_3 消毒作用受限。而1.0 mg/L的 O_3 -MNBs溶液 O_3 衰减迅速, O_3 耗尽速率与 $E. coli$ 完全灭活的速率较一致,说明 O_3 -MNBs的形式更能充分发挥 O_3 的氧化消毒能力。0.5 mg/L的 O_3 -MNBs溶液中,消毒初期更快的杀菌响应速度也与 O_3 的高效传质消耗有关,溶液中微纳米气泡自身增压溶解收缩,爆破过程会产生 $\cdot OH$,且与 O_3 分解具有协同作用,加速了消毒进程。取灭活平衡前的 $E. coli$ 对数去除率与 O_3 消耗量进行线性拟合,结果见图6(d)。 O_3 -MNBs组的斜率为10.86($R^2 \approx 0.66$), O_3 -MBs组的斜率为2.39($R^2 \approx 0.64$),即消耗相同 O_3 时, O_3 -MNBs比 O_3 -MBs可多去除约8个数量级的 $E. coli$ 。 O_3 -MNBs灭活等量 $E. coli$ 的比耗 O_3 速率更低,显著提高了 O_3 利用率。

2.3 腐殖酸对臭氧微纳米气泡消毒效果的影响

为了模拟污水处理厂出水中存在难降解有机物时的消毒效果,通过投加天然有机质于 O_3 -MNBs与 O_3 -MBs溶液中,对消毒过程的菌落进行计数,同时监测 O_3 浓度与ORP变化,结果见图7。

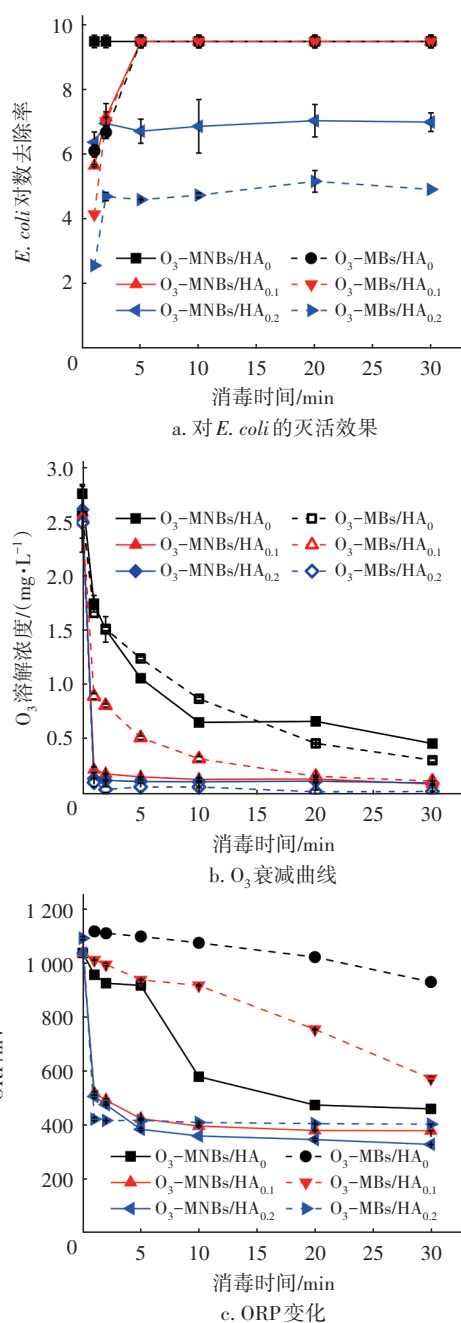


图7 加入腐殖酸后不同浓度的两种 O_3 气泡溶液消毒效果对比

Fig.7 Disinfection effect of O_3 solutions with different concentrations in two bubble forms after adding HA

不投加 HA 时, O_3 浓度为 2.5 mg/L 的两种气泡溶液均能迅速实现对大肠杆菌的 100% 杀菌, O_3 -MNBs/ HA_0 组仅需不到 1 min, O_3 -MBs/ HA_0 组则需要约 5 min。加入 HA 后, 由于部分 O_3 用于与 HA 反应, 两种气泡的杀菌效果均受到抑制。溶液中 HA 浓度为 0.1 mg/L 时, 两种气泡的杀菌效果略微受到抑

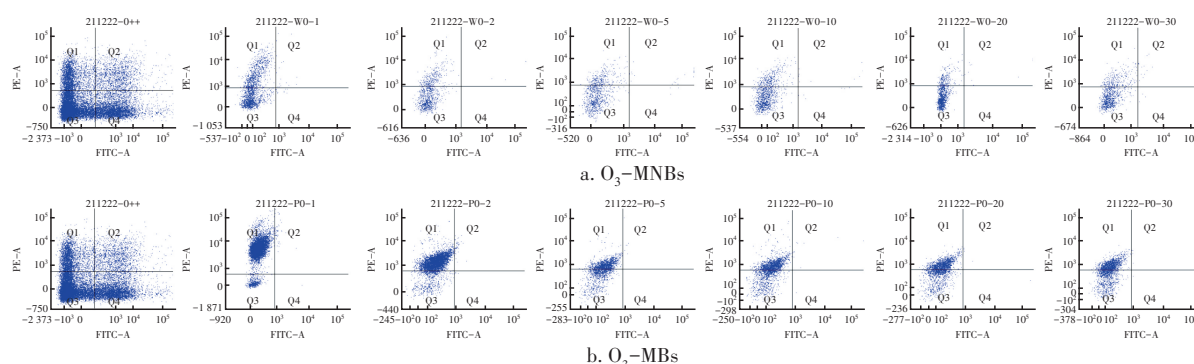
制, 但 1 min 时, O_3 -MNBs 消毒的活菌浓度比 O_3 -MBs 组更低, 差值接近 10^2 CFU/mL。加入 0.2 mg/L 的 HA 后, 对 O_3 杀菌的抑制效果更为明显, O_3 -MNBs/ $HA_{0.2}$ 组的消毒终点活菌浓度约为 10^2 CFU/mL, 大约比 O_3 -MBs/ $HA_{0.2}$ 灭活浓度高 10^2 CFU/mL, 并且 O_3 -MNBs 的灭活速率仍然更快, 1 min 与 30 min 时的去除率接近, 而 O_3 -MBs 组 1 min 内的去除率不足 O_3 -MNBs 组的一半。

O_3 衰减结果显示 O_3 -MNBs 组仍然更快, 与图 6(b) 类似。5 min 后 O_3 -MBs/ $HA_{0.1}$ 组的 O_3 衰减至 0.5 mg/L, *E. coli* 灭活率达 100%, 之后的 O_3 自然衰减变得缓慢。加入 HA 后两种 O_3 气泡溶液消毒过程中, ORP 明显降低, 见图 7(c), 说明 O_3 由于与 HA 反应而加速了消耗, 但 O_3 -MNBs 组的 ORP 仍然比 O_3 -MBs 组降低更快, 与图 6(c) 结果类似。对于臭氧微纳米气泡组而言, O_3 分子与 MNBs 的双重作用促进了 O_3 消耗, 大量 $\cdot OH$ 的存在加速了消毒反应。

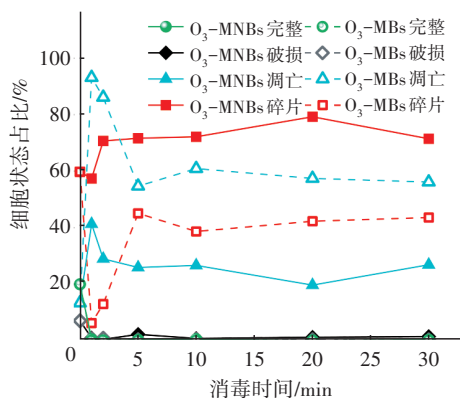
2.4 臭氧微纳米气泡的消毒机制

为进一步揭示不同气泡状态下 O_3 氧化作用的区别, 利用流式细胞仪分析了 O_3 -MNBs 与 O_3 -MBs 溶液中 *E. coli* 细胞状态在 0、1、2、5、10、20、30 min 的变化情况 (如图 8 所示)。其中, 横轴表示细胞膜上 Calcein-AM 染料的荧光强度, 纵轴为细胞核内 PI 染料的荧光强度, 每个点代表可识别的细胞颗粒, 点的密集程度反映该荧光强度对应的 *E. coli* 浓度, Q1、Q2、Q3、Q4 象限分别表征凋亡细胞 Calcein-AM (-)/PI (+)、破损细胞 Calcein-AM (+)/PI (+)、细胞碎片 Calcein-AM (-)/PI (-)、完整细胞 Calcein-AM (+)/PI (-), $Q4 \rightarrow Q2 \rightarrow Q3 \rightarrow Q1$ 表示细胞受破坏程度逐渐加深, 依次遭到细胞膜破坏、酯酶失活、DNA 裂解的过程。

O_3 -MNBs 组的荧光强度降低迅速, 1 min 时已几乎没有处于 Q2+Q4 的细胞, 呈 Calcein-AM 染色阴性, 消毒过程中 PI 染色阳性的荧光强度持续降低, 细胞主要处于 Q3 区域。当细胞从 Q3 的碎片阶段进一步被破坏时, DNA 的双螺旋完全解开, 染料 PI 也不能嵌入 DNA 中发出荧光, 故点逐渐变得稀疏, 说明可被流式细胞仪识别的细胞颗粒数变少。而 O_3 -MBs 组 PI 荧光强度减弱缓慢, 1~30 min 时平均荧光强度相差不足 1 个数量级, 大部分 *E. coli* 仍然处于 Q1 的凋亡阶段, DNA 受到破坏不显著。

图8 O_3 -MNBs与 O_3 -MBs溶液(2.5 mg/L)中 *E. coli*细胞膜完整性变化Fig.8 Changes of membrane integrity of *E. coli* cells in O_3 solutions (2.5 mg/L) of micro-nano bubbles and micron bubbles

根据细胞膜受损程度划分的细胞状态占比如图9所示。 O_3 -MNBs与 O_3 -MBs组中,细胞膜完整的和轻度受损的破损细胞均在1 min内降至几乎为0,这是由于 O_3 分子可直接起氧化作用,也可以通过产生 $\cdot OH$ 间接氧化*E. coli*,断裂碳氮键导致细胞壁解体,细胞膜遭到破坏,细胞内部结构不断解聚,进一步破裂溶解,进入酯酶失活的凋亡阶段(Q1)和双链DNA解链变性的碎片阶段(Q3),彻底消亡。

图9 O_3 -MNBs与 O_3 -MBs溶液(2.5 mg/L)中 *E. coli*细胞状态占比Fig.9 Percentage of *E. coli* cell status in O_3 solutions (2.5 mg/L) of micro-nano bubbles and micron bubbles

在1 min内 O_3 -MBs组凋亡状态细胞占比显著升高到95%以上,细胞膜大部分遭到破坏,PI轻易进入胞内,且胞内酯酶已大部分失活,不可使染料Calcein-AM发光,故图8(b)中细胞主要处于Q1象限,但图6(a)显示 O_3 -MBs的2.5 mg/L组此时仍有超过 10^3 CFU/mL的活菌,说明经 O_3 -MBs处理后酯酶已失活的部分细胞仍有生长繁殖能力,表明在 O_3 -MBs作用下酯酶虽变性但可恢复,故胞内仍可继续进行多种生化反应。而后该类细胞占比下降,并

伴随细胞碎片占比恢复升高,说明细胞受到进一步破坏,DNA双螺旋解体,故对应纵轴的PI染料荧光强度也降低。图6(a)显示5 min时活菌浓度才降至0,结合图6(b)中 O_3 衰减曲线,此过程中剩余 O_3 部分用于进一步破坏细胞膜已破损细胞,才可使*E. coli*完全失活。5 min后各细胞占比趋近平衡,图8(b)中5~30 min时PI染料的红色荧光强度仍达到约 10^2 ,说明DNA未被进一步裂解破坏,但从图6(b)中可看出此时 O_3 还在继续衰减,说明剩余 O_3 没有继续作用于*E. coli*的细胞结构,这可能是由于 O_3 -MBs的快速上升和消散, O_3 -MBs较小的比表面积不足以使 O_3 与溶液中*E. coli*充分接触,不能释放 O_3 的氧化性能, O_3 衰减主要是由于自分解。

而 O_3 -MNBs组在1 min内40%的细胞迅速裂解凋亡,酯酶失活,同时60%的细胞处于碎片状态,图8(a)显示必需活细胞内酯酶剪切才可发出绿色荧光的Calcein-AM荧光微弱,而表征死细胞DNA的PI染料其红色荧光比 O_3 -MBs组更弱,此时图6(a)显示活菌数已变为0,可能是由于微纳米气泡的形式使 O_3 对细胞膜有较强穿透力,可迅速直接作用于胞内酯酶和DNA,且在 O_3 -MNBs的强氧化作用下酯酶失活不可逆与DNA解螺旋不可恢复,使得细胞彻底失去生长和繁殖能力。在1~2 min内,已破损的细胞中DNA被进一步氧化变性,PI的平均荧光强度降低,两种荧光都着色微弱的细胞占比接近80%,图8(a)中荧光点更加稀疏, O_3 -MNBs表现出强氧化能力,细胞被 O_3 -MNBs氧化破碎的程度彻底,少量残存的PI染料结合DNA片段发出荧光,但平均荧光强度接近0。*E. coli*已被 O_3 -MNBs充分接触氧化,随后的 O_3 衰减也主要用于自分解,故图6(b)中 O_3 -MNBs、 O_3 -MBs的2.5 mg/L组的 O_3 衰减情况近似,

与 O_3 用于杀菌时 O_3 -MNBs组衰减速率更快不同。

O_3 -MNBs与 O_3 -MBs对*E. coli*的作用过程如图10所示。在 O_3 -MBs的作用下,细胞膜受损程度较轻,仅部分细胞在剩余 O_3 的作用下被继续破碎, O_3 消耗慢但对*E. coli*没有持续灭活和破坏效果,这主要是因为MBs快速溶解消散,爆破作用的缺失使得仅存的产 $\cdot OH$ 机制也很微弱,几乎没有 $\cdot OH$ 产生,仅存 O_3 分子灭活*E. coli*效果相对差,与 O_3 -MNBs组差异明显。而在 O_3 -MNBs灭活*E. coli*的过程中,气泡在水中留存时间长,MNBs与 O_3 分子存在4种产 $\cdot OH$ 的机制而具备更强的氧化消毒能力,MNBs的特殊形式保证了高效的传质过程。在 $\cdot OH$ 的强氧化作用下,细胞膜迅速破损,胞内酯酶失活,随即细胞被彻底破碎, O_3 大量消耗,*E. coli*失活。

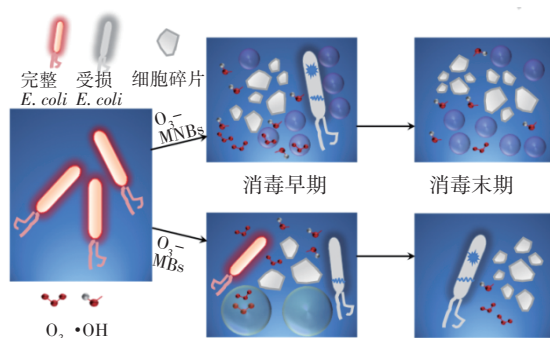


图10 两种气泡溶液对*E. coli*的灭活机制

Fig.10 Inactivation mechanism of *E. coli* in two bubble solutions

3 结论

① 微纳米曝气方式促进了 O_3 溶解,5 mg/min的进气量下,10 min时溶解浓度可达到7.75 mg/L,比微孔曝气损失 O_3 少18.07 mg。MNBs的存在形式加速了 O_3 分解,有助于提高传质效率。 O_3 分子与MNBs存在4种机制,有助于产生大量 $\cdot OH$,加强氧化作用,并具有持续消毒能力。

② O_3 -MNBs在1 mg/L时即表现出更强的消毒效果,1 min内可比 O_3 -MBs多去除 10^3 CFU/mL的*E. coli*。经拟合,消耗相同的 O_3 时, O_3 -MNBs比 O_3 -MBs可多去除约8个数量级的*E. coli*。

③ 加入0.1 mg/L HA时, O_3 -MNBs灭活 10^9 CFU/mL的*E. coli*所需时间从1 min延长至5 min;加入0.2 mg/L HA时, O_3 -MNBs在消毒终点可灭活约 10^7 CFU/mL, O_3 -MBs组约灭活 10^5 CFU/mL。难降解有机物会显著抑制 O_3 的消毒效果,但 O_3 -MNBs的

形式可缓解这种影响。

④ O_3 -MBs的氧化过程存在阶段性变化,初期的破损与凋亡细胞逐渐转变成碎片,而 O_3 -MNBs作用于*E. coli*的细胞酯酶与DNA,氧化作用更迅速和彻底,细胞更快被破碎。

参考文献:

- [1] KELLY F, EOGHAN C, NEIL R, *et al.* Bacterial inactivation, photoreactivation and dark repair post flow-through pulsed UV disinfection [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 41: 102070.
- [2] YANG L, SCHMALZ C, ZHOU J, *et al.* An insight of disinfection by-product (DBP) formation by alternative disinfectants for swimming pool disinfection under tropical conditions [J]. *Water Research*, 2016, 101 (1): 535-546.
- [3] HAUSLER R, LIECHTI P A. Applications of ozone for modern wastewater treatment [J]. *International Journal of Environmental Engineering*, 2012, 4 (3/4): 220-232.
- [4] LOEB B L. Forty years of advances in ozone technology. A review of ozone: science & engineering [J]. *Ozone Science and Engineering*, 2018, 40(1): 3-20.
- [5] 郝晓地,甘微,李季,等. 臭氧降解污水厂二级出水有机物作用与效果分析[J]. *中国给水排水*, 2021, 37 (10):1-7.
HAO Xiaodi, GAN Wei, LI Ji, *et al.* Effectiveness of ozonation on oxidizing secondary effluent organic matter (EfOM) from WWTP [J]. *China Water & Wastewater*, 2021, 37(10): 1-7(in Chinese).
- [6] 闵芮,张国珍,武福平,等. 预臭氧强化电絮凝-超滤工艺处理微污染窖水[J]. *中国给水排水*, 2021, 37 (21):41-47.
MIN Rui, ZHANG Guozhen, WU Fuping, *et al.* Pre-ozone enhanced electro-flocculation-ultrafiltration process for the treatment of micro-polluted cellar water [J]. *China Water & Wastewater*, 2021, 37(21): 41-47 (in Chinese).
- [7] BEN W W, ZHU B, YUAN X J, *et al.* Occurrence, removal and risk of organic micropollutants in wastewater treatment plants across China: comparison of wastewater treatment processes [J]. *Water Research*, 2018, 130 (1): 38-46.
- [8] 王雪娇,高翔,翟洪艳. 影响臭氧溶解浓度的关键控制参数分析[J]. *现代化工*, 2016, 36(4): 133-136.

- WANG Xuejiao, GAO Xiang, ZHAI Hongyan. Analysis of the key controlling parameters of dissolved ozone concentration[J]. Modern Chemical Industry, 2016, 36(4): 133-136(in Chinese).
- [9] PARKER J L, CLAESSEN P M, ATTARD P. Bubbles, cavities, and the long-ranged attraction between hydrophobic surfaces[J]. Journal of Chemical Physics, 1994, 98(34): 8468-8480.
- [10] TEMESGEN T, BUI T T, HAN M, *et al.* Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water treatment techniques; a review[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2017, 246: 40-51.
- [11] 陶昱明,王亦铭,丁露,等. 微纳米曝气技术在黑臭水体治理中的应用[J]. 净水技术, 2021, 40(2): 93-99.
- TAO Yuming, WANG Yiming, DING Lu, *et al.* Research and application of micro-nano aeration technology for black-odorous waterbodies treatment[J]. Water Purification Technology, 2021, 40(2): 93-99(in Chinese).
- [12] 王硕,刘蕴思,李攀. 微纳米气泡对小微水体中好氧微生物群落的影响[J]. 中国给水排水, 2020, 36(15): 29-34.
- WANG Shuo, LIU Yunsu, LI Pan. Effects of micro-nano bubble aeration on aerobic microbial community in small water body [J]. China Water & Wastewater, 2020, 36(15): 29-34 (in Chinese).
- [13] JAFRY A T, LEE C, KIM D, *et al.* Development of high concentrated slightly acidic hypochlorous acid generator for food safety [J]. Journal of Mechanical Science and Technology, 2017, 31(9): 4541-4547.
- [14] CHAYUDA J, NAREERAT K, NARUPORN R, *et al.* Ozone nanobubble treatment in freshwater effectively reduced pathogenic fish bacteria and is safe for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture, 2021, 534: 736286.
- [15] 吕宙. 微纳米气泡曝气在污水处理中的应用研究[D]. 合肥:合肥工业大学, 2014.
- LÜ Zhou. Applied Research of Micro-nano Bubble Aeration in Sewage Treatment [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2014(in Chinese).
- [16] 周维奇,张鑫. 臭氧微纳米气泡技术在含抗生素废水处理中的应用[J]. 供水技术, 2019, 13(2): 52-55.
- ZHOU Weiqi, ZHANG Xin. Treatment of antibiotic wastewater by ozone micro-nano bubble technology [J]. Water Technology, 2019, 13(2): 52-55(in Chinese).
- [17] FAN W, CUI J, LI Q, *et al.* Bactericidal efficiency and photochemical mechanisms of micro/nano bubble-enhanced visible light photocatalytic water disinfection[J]. Water Research, 2021, 203: 117531.
- [18] TSUGE H, LI P, SHIMATANI N, *et al.* Fundamental study on disinfection effect of microbubbles[J]. Kagaku Kogaku Ronbunshu, 2009, 35(5): 548-552.
- [19] 余忆玄. 羟基自由基的生成及降解磺胺嘧啶方法和机理[D]. 大连:大连海事大学, 2019.
- YU Yixuan. Mechanism and Method of Production of Hydroxyl Radicals and Fast Degradation of Sulfadiazine [D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2019 (in Chinese).
- [20] 敖卫. 不同制备方式臭氧水溶解性及其杀菌效果研究[J]. 山东化工, 2020, 49(13): 33-34, 38.
- AO Wei. Study on dissolvability of ozone water and its bactericidal effect in different preparation methods [J]. Shandong Chemical Industry, 2020, 49(13): 33-34, 38(in Chinese).
- [21] SERIDOU P, KALOGERAKIS N. Disinfection applications of ozone micro- and nanobubbles [J]. Environmental Science: Nano, 2021, 8(12): 3493-3510.
- [22] 李恒震. 微纳米气泡特性及其在地下水修复中的应用[D]. 北京:清华大学, 2014.
- LI Hengzhen. Micro-nano Bubbles Characteristics for Potential Application in Groundwater Remediation [D]. Beijing: Tsinghua University, 2014(in Chinese).
- [23] 刘满苍,刘行刚,谢薇,等. 饮用水臭氧消毒生物稳定性影响因素及其控制[J]. 中国农村水利水电, 2019(12): 115-117, 123.
- LIU Mancang, LIU Xinggang, XIE Wei, *et al.* Influencing factors and control of biological stability of ozone disinfection of drinking water [J]. China Rural Water and Hydropower, 2019(12): 115-117, 123 (in Chinese).

作者简介:杨童(1998-),女,四川广安人,硕士研究生,主要从事污水处理与资源化研究。

E-mail: yangtong@stu.jiangnan.edu.cn

收稿日期:2022-01-28

修回日期:2022-03-01

(编辑:李德强)