

水回用指南 再生水生物稳定性评价

编制说明

《水回用指南 再生水生物稳定性评价》标准编制组

二零二一年十月

项目名称：2020 年中国环境科学学会标准（第二批）

承担单位：清华大学

项目联系人：高 强 010-62246242

编制组负责人：胡 洪 营 010-62794005

编制组联系人：巫 寅 虎 010-62797265

目次

1 工作简况.....	4
1.1 任务来源.....	4
1.2 标准编制目的和意义.....	4
1.3 标准工作过程.....	6
1.3.1 工作基础.....	6
1.3.2 工作过程.....	7
2 标准编制依据和原则.....	9
3 标准主要内容.....	10
3.1 评价原则.....	10
3.2 生物稳定性评价指标.....	11
3.3 生物可同化有机碳评价方法.....	14
3.4 生物稳定性评价结果复核.....	18
4 标准实施案例.....	18
4.1 细菌平板计数 AOC 测定法应用案例.....	18
4.2 细菌 ATP 荧光强度 AOC 测定法应用案例.....	22
5 标准实施建议.....	25
参考文献.....	26

1 工作简况

1.1 任务来源

本标准由中国环境科学学会提出并归口，2020 年申请立项，被列入中国环境科学学会 2020 年第二批标准编制计划（中环学办字[2020] 166 号）正式批准立项，由清华大学等单位起草。

1.2 标准编制目的和意义

我国面临严重的水资源短缺问题。我国的淡水资源总量约为 28,000 亿 m^3 ，占全球水资源的 6%，而人均占有量仅为 2,200 m^3 ，是联合国列出的 13 个严重缺水的国家之一。水资源时空分布不均匀、水污染严重、人口急剧增加、经济发展对水资源的需求不断增大等诸多因素都是造成我国水资源短缺的重要原因。目前，我国约 2/3 的城市处于缺水状态，而将近 20% 的城市属于严重缺水城市。尤其是对于北京这样的超大城市，水资源已经成为社会和发展的限制因素。

解决城市水资源短缺的主要途径包括节约用水、雨水收集、海水淡化、远距离水资源调配和污水再生利用等。其中，对城市生活污水进行再生利用是一条成本低、见效快的有效途径。污水再生利用技术可行、潜力巨大，同时能够减少污水排放量、减轻水环境污染，具有显著的经济、社会和环境效益，是目前国内外解决城市缺水问题的重要措施。《“十四五”城镇污水处理及资源化利用发展规划》中明确指出推动再生水利用是我国本阶段的主要任务之一，到 2025 年底，城市和县城的再生水利用率进一步提高。全国地级及以上缺水城市再生水利用率应达到 25% 以上，京津冀地区达到 35% 以上，黄河流域中下游地级及以上缺水城市力争达到 30%。

再生水水质的安全稳定对于再生水利用至关重要。随着污水再生处理技术的日益成熟，再生水在农业灌溉、工业用水、城市杂用、景观用水等多种途径都有利用，经过地表水体的生态储存或回灌地下的再生水甚至可能成为间接饮用水源。目前，关于再生水水质安全性的关注和研究较多，然而再生水生物稳定性尚未引起足够的重视。处理后的再生水在储存、输配与利用的过程中仍会发生微生物生长现象，引发潜在生物风险等问题。

再生水生物稳定性已成为限制再生水安全高效利用的重要因素。首先，微生物生长是导致再生水水质劣化的主要原因，可导致水的色度、嗅味、浊度等感官指标的升高。同时微生物可附着在管壁以生物膜形式生长，造成管壁腐蚀、管道堵塞等问题。在工业循环冷却水、农业灌溉等回用系统中，微生物的大量滋生可造成管道系统的堵塞，从而引发生产安全问题。此外，如果病原微生物大量生长，在城市杂用、景观利用等存在人体暴露的再生水利用方式中，健康风险也是不容忽视的重要问题。因此，科学、合理地表征再生水的水质生物稳定性，评价不同处理工艺对再生水水质生物稳定性的影响，对保障再生水利用的水质生物安全和降低再生水利用的生物风险是非常必要的。

再生水生物稳定性评价标准的制定、颁布和实施能够规范再生水生物稳定性的评价方法，对再生水生产流程优化、确保水质安全具有重要意义。然而，目前我国在水处理领域尚无针对水质生物稳定性评价的国家标准和团体标准。本标准将以建立再生水生物稳定性评价方法为目标，确立范式以定性定量评价再生水的生物稳定性变化。本标准的制定和实施，将规范化再生水生物稳定性评价方法，对保障再生水的安全利用、推动再生水领域标准的完善具有积极的现实意义。

1.3 标准工作过程

1.3.1 工作基础

从 2008 年至今，本标准编制组研究团队（以下简称“编制组”）一直致力于与再生水生物稳定性相关的研究。在此期间，本研究组成员采用生物可同化碳（AOC）作为再生水生物稳定性的评价指标，开发出两种测定再生水生物稳定性的方法：（1）利用从再生水中分离出的 3 种测试菌种，建立细菌培养以测定再生水生物可同化碳的方法，快速、稳定地反映再生水的生物稳定性；（2）以二级出水中的土著微生物培养物作为接种物，利用三磷酸腺苷（ATP）荧光与细菌生长和生物可同化碳都具有高度相关性的特征，采用 ATP 荧光法代替平板计数法，直接测定 ATP 的含量，实现更快速、稳定地测定再生水的生物稳定性。

利用开发出的测定方法，本标准编制组以北京再生水厂为调查对象，考察了我国再生水的水质生物稳定性状况，发现二级生物处理出水的 AOC 水平低于 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，但不同水厂的二级出水具有明显的差异。再生水厂深度处理工艺出水的 AOC 水平明显高于二级出水，其平均值达到 $1100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

此外，考察不同深度处理工艺对再生水生物稳定性的影响。发现臭氧氧化工艺可导致再生水的 AOC 水平明显升高，臭氧氧化后 AOC 水平的平均增长率约为 300%。混凝沉淀过滤也可造成再生水 AOC 水平一定程度的升高，混凝处理后超过一半水样的 AOC 水平升高了 100% 以上。超滤、反渗透等膜过滤技术对控制再生水中的微生物生长潜能具有较好的效果。以上结果表明，经过深度处理后，虽然再生水的 COD、TN、TP、色度、嗅味等常规水质指标有所提升，但是水质生物稳定性可能发生显著劣化，不利于再生水储存、输配与利用过

程中的生物风险控制。在上述研究的基础上，共发表学术论文 7 篇（SCI 论文 5 篇），获发明专利 1 项（一种测定再生水生物稳定性的方法. 2013 .发明专利, 专利号: ZL 2012 1 0072764.2.)

通过以上研究工作和科研成果的积累，编制组充分掌握了再生水生物稳定性的测定方法，并且广泛了解我国再生水的水质生物稳定性变化特征，为本标准的制定打下了坚实的基础。

针对本标准的制定，采取了如下工作步骤：

（1）材料收集：为了完成制定再生水生物稳定性评价标准的工作，标准起草组收集了与再生水相关的国际标准、国家标准和团体标准等，并进行与再生水水质稳定性相关的文献调研。

（2）素材整理：对收集汇总的资料进行充分的分析、整理和提炼，结合我国再生水利用过程中的水质变化特征，从再生水生产与利用过程中的水质安全保障为目的出发，制定了本标准的编制思路，形成编制大纲。

（3）草案编制：标准起草组多次召开课题组研讨会和专家咨询会进行集中讨论，合理调整编制的标准大纲，丰富本标准的内容，形成了标准草案。

1.3.2 工作过程

标准起草组经过内部多次研讨和专家论证，形成了目前的征求意见稿及其编制说明。

（1）标准编制启动

2020 年 1 月，确定由清华大学等为主要起草单位，并成立来自高校、科研机构和企业相关专家组成的标准起草组。

（2）标准编制

2020年1月~2020年6月，标准起草组收集与再生水相关的国际标准、国家标准和团体标准等，并进行与再生水水质稳定性相关的文献调研，并集中学习了《城市污水再生利用 分类(GB/T 18919-2002)》、《城市污水再生利用 城市杂用水水质(GB/T 18920-2002)》、《城市污水再生利用 景观环境用水水质(GB/T 18921-2002)》、《城市污水再生利用 工业用水水质(GB/T 18923-2005)》、《城市污水再生利用 地下水回灌水质(GB/T 19772-2005)》、《水回用指南：再生水分级与标识(T/CSES 07—2020)》、《城市污水再生利用 水回用定义(ISO 20670-2018)》和《城市污水再生利用 水回用安全评价指南 评价参数和方法(ISO 20671-2018)》等相关国际、国家和团体标准。经过资料分析和提炼，理顺了标准制定的方向和思路，形成标准编制大纲。

(3) 标准草稿

2020年1月~2020年6月，标准起草组多次召开课题组研讨会和专家咨询会进行集中讨论，合理调整编制的标准大纲，丰富本标准的内容，形成标准草稿。

(4) 标准立项

2020年6月：标准起草组向中国环境科学学会提交制修订立项申请书。

2020年7月：由中国环境科学学会组织了立项审查会议，并顺利通过立项。

2020年12月：经中国环境科学学会审议进行立项公示。

2021年1月：中国环境科学学会正式立项。

(5) 标准征求意见稿

2021年3月—8月：标准编制组召开线上线下工作研讨会，通过多次修改和内部讨论，形成《水回用指南 再生水生物稳定性评价》（征求意见稿）。

2 标准编制依据和原则

本标准按照《中国环境科学学会标准管理办法（试行）》的要求和规定，确定标准的组成要素。

在标准制定过程中遵循了以下几个原则：

- （1）科学性和规范性；
- （2）保证标准的先进性和实用性；
- （3）与国际现行的节水政策、产业政策等相结合；
- （4）尽量与相关的标准、法规接轨；
- （5）充分考虑我国污水再生利用技术发展水平、再生水行业产业升级和发展方式转变，符合再生水行业规范化发展需求。

国内目前尚无已经发布的针对水质生物稳定性评价的国家标准、地方标准、团体标准或测定指南等。为了完成标准制定工作，编制组收集并学习了《城市污水再生利用 分类（GB/T 18919-2002）》、《城市污水再生利用 城市杂用水水质（GB/T 18920-2002）》、《城市污水再生利用 景观环境用水水质（GB/T 18921-2002）》、《城市污水再生利用 工业用水水质（GB/T 18923-2005）》、《城市污水再生利用 地下水回灌水质（GB/T 19772-2005）》等相关国家标准和《水回用指南：再生水分级与标识（T/CSES 07—2020）》等团体标准。

3 标准主要内容

3.1 评价原则

再生水的利用途径多种多样，主要包括生态环境利用、工业利用、市政杂用、农业灌溉等。再生水生物稳定性评价应考虑水回用的不同需求和利用途径，并结合我国经济社会发展现状。虽然不同的利用途径对水质的要求各不相同，但各个利用途径都对再生水的生物稳定性有一定的要求。

生态环境利用过程中，如果无法有效保障再生水的生物稳定性，微生物的过量繁殖生长可能会导致再生水补充水体的色度、臭味发生劣化，水体的感官愉悦度显著降低；工业利用过程中，微生物的过度生长繁殖可能会导致管道的生物腐蚀等问题；市政杂用过程中，微生物的生长可能会导致储存显著的水质劣化，导致再生水水质无法满足用户需求；农业灌溉过程中，微生物生长可能会导致生物堵塞等问题。

制定的再生水生物稳定性评价方法宜通俗易懂、简便可行，并遵循以下原则：

（1）保护环境和公众健康

标准的制定需以国家环境保护方针、政策、法律、法规及有关规章为依据，以保护环境和公众健康为首要原则，不能以牺牲环境为代价，更不能危害公众健康。

（2）满足不同需求

再生水生物稳定性的评价指标需针对水回用的需求和用途制定，满足评价结果的准确性和可信度。

（3）定性定量评价相结合

再生水生物稳定性的定性评价过程相对简单，但缺乏量化指标则不利于全面评价再生水的生物稳定性，因此对再生水生物稳定性的评价宜采用定性和定量相结合的方式。

（4）与技术水平和经济能力相适应

标准的制定和实施与社会现状密切相关，在制定标准时需综合考虑技术和经济的可行性和合理性，结合我国的社会现状，权衡多方面利弊。

3.2 生物稳定性评价指标

自水质生物稳定性的概念提出以来，众多研究者对水质生物稳定性的表征方法开展了大量研究工作。迄今为止，用于表征水质生物稳定性的水质指标主要包括基于有机碳含量分析的可同化有机碳（assimilable organic carbon, AOC）和生物可降解溶解性有机碳（biodegradable dissolved organic carbon, BDOC）、基于磷浓度分析的生物可利用磷（microbially available phosphorus, MAP）、基于微生物生长分析的细菌生长潜力（bacterial growth potential, BGP）和生物膜生成速率（biofilm formation rate, BFR）三大类（图 1）。



图 1 水质生物稳定性的表征指标

(1) 基于有机碳含量分析的指标

在多数水质条件下，水中限制异养微生物生长的关键营养元素是有机碳 (Funamizu *et al.*, 1998)。因此，目前在相关研究中最常被用来表征水质生物稳定性的水质指标是基于有机碳浓度分析的 AOC 和 BDOC。

BDOC 表征的是水中容易被异养微生物利用的溶解性有机碳，包括微生物同化作用合成细胞体和异化呼吸作用转化为二氧化碳这两部分共同消耗的有机碳。AOC 表征的是水中容易被异养微生物利用于合成细胞体、进行繁殖生长的那部分有机物，理论上是 BDOC 的一部分 (图 2)。但这里需要指明的是，AOC 是通过测定水中微生物的生长情况来评价的，表征的是水样中微生物的最大生长潜力。由于水中有机物对微生物生长的影响是很复杂的，除了可以支持促进微生物的生长外，还有可能抑制微生物的生长 (Chudoba, 1985; Ross *et al.*, 1998; Ichihashi *et al.*, 2006)，因此，AOC 这个指标反映了水中有机物对微生物生长的综合影响结果，而不能简单地理解为代表了水中某一类或某一部分的有机物。相对于 BDOC，对 AOC 有贡献的往往是分子量更小的有机物质，更容易被微生物降解利用。

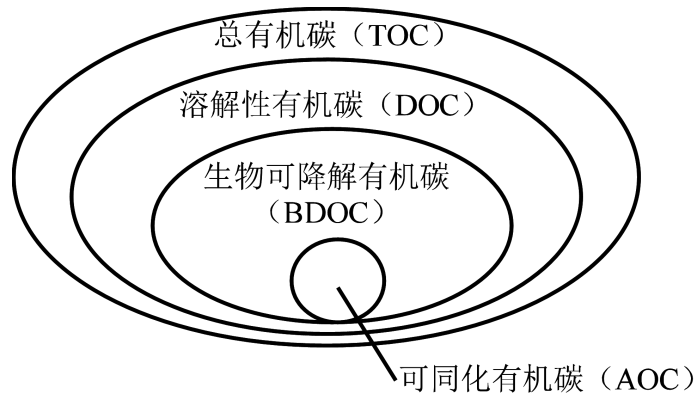


图2 水中各有机碳指标之间的关系 (刘文君, 1999)

(2) 基于磷含量分析的指标

在饮用水的研究中, Miettinen 等 (1996) 发现在芬兰等北欧地区, 饮用水中限制微生物生长的关键元素不一定是有机碳, 也可能是磷。后来, 借鉴 AOC 测定方法的思路, 研究者们提出了 MAP 的测定方法 (Lehtola *et al.*, 1999)。此方法适用于表征有机物含量较高而磷对微生物生长起到限制作用的水样的水质生物稳定性。

(3) 基于微生物生长分析的指标

除了通过测定水中限制微生物生长的关键元素以外, 也有研究者采用直接测定微生物生长情况的方法来表征水质生物稳定性。BGP 的测定是通过向待测水样中接种同源菌种, 在一定条件下进行培养, 以水中的细菌生长浓度来表示在该水样水质条件下支持细菌生长的潜力。这种方法操作简单, 由于接种的是同源混合微生物, 包含了营养物质及种群间的作用等多方面因素的影响, 可更真实的反映待测水样的生物稳定性状况。但是, 由于 BGP 对于不同水源或同一水源不同时期的水样测定时使用的接种细菌都不相同, 不同水样之间的结果可比性较差, 对水质在时间和空间变化上其生物稳定性的研究缺乏连续性。

BFR 是使待测水样持续流过一个圆柱形玻璃管, 通过测定玻璃

（或其他材料）表面生物膜的生产速率来表示待测水样的生物稳定性（van der Kooij, 2000）。该方法操作起来较复杂，但适用于测定营养物质浓度较低，甚至 AOC 不容易被检出的水样的生物稳定性。

以上简要概述了目前用来表征水质生物稳定性的主要指标。由于 AOC 是指有机物中被转化成细胞物质的那部分，其水平高低与微生物在水中的生长繁殖密切相关，决定着待测水样中微生物生长的潜力（van der Kooij, 1992; 李爽 等, 2003）。已有研究表明，相比于 BDOC 等指标，AOC 与管网输配系统中微生物的再生长情况相关性更好（LeChevallier *et al.*, 1996; Volk and LeChevallier, 1999; Escobar *et al.*, 2001; Weinrich *et al.*, 2010）。

因此，AOC 也是目前国际上最被普遍接受、应用最广泛的水质生物稳定性的评价指标。综上所述，本标准推荐选用 AOC 作为再生水生物稳定性的评价指标。

3.3 生物可同化有机碳评价方法

（1）AOC 测定的基本原理

AOC 的测定方法最早是于 1982 年由荷兰的 van der Kooij 教授提出的，用于评价饮用水中的水质生物稳定性（van der Kooij *et al.*, 1982）。AOC 测定方法的基本原理是将模式细菌接种于待测水样中，在适宜的环境条件下进行培养，然后测定细菌生长到稳定期时的最大细胞浓度，利用由标准物质溶液测得的细胞产率系数，将细胞浓度转化为标准物质的当量浓度，从而得到待测水样中的 AOC 浓度值。

（2）测试菌种选择

AOC 测定方法中测试菌种的选取是最关键的因素。van der Kooij 等人（1982）在最早提出的 AOC 测定方法中选用了在饮用水和天然水体环境中普遍存在的荧光假单胞菌的一个菌株 *Pseudomonas fluorescens* P17（以下简称 P17）。然而，在后续的研究中，研究者们发现 P17 对草酸类、醛类等有机物质的利用效果不好，而这些物质大量存在于臭氧氧化处理后的水样中，因此由 P17 测定的 AOC 值不能准确反映这类水样的水质生物稳定性。基于这种情况，一株螺旋菌 *Spirillum* sp. NOX（以下简称 NOX）又被选作测试菌种补充到饮用水的 AOC 测定方法中（van der Kooij, 1990）。在测定一个水样的 AOC 时，采用先后接种法，即先接种 P17 培养至稳定期测定其最大生长浓度，然后将水样灭菌后再接种 NOX，同样培养至稳定期测定其最大生长浓度，分别计算两个测试菌种测得的 AOC 值，二者之和即为待测水样的最终结果。

饮用水属于贫营养水体，有机物浓度水平低。再生水与饮用水的水质条件差异较大，有机物的浓度水平和物质组成都明显不同。饮用水中的有机物主要为天然有机物质（natural organic matter, NOM），而再生水中的有机物除 NOM 外还包括二级生物处理中微生物代谢产生的大量溶解性微生物产物（soluble microbial product, SMP）以及一些原污水中的难生物降解物质（Barker and Stuckey, 1999; Shon *et al.*, 2006）。饮用水 AOC 测

试菌种 P17 和 NOX 在再生水环境中的生长可能并不如再生水中的土著微生物。因此，如果仍采用 P17 和 NOX 作为测试菌种来测定再生水的 AOC 水平，结果可能会低估再生水中的微生物最大生长潜能，从而不能准确评价其水质生物稳定性。

由于不同再生水的水质差别也非常大，很难用单一的菌种来评价各种各样的再生水。因此，有必要从再生水土著微生物中筛选出一系列的测试菌种用来测定再生水的 AOC 水平。适用于再生水的 AOC 测试菌种应满足以下几方面条件：①可利用的碳源种类较广，再生水中各类不同的有机物都可以支持其生长；②可以在相对较大的有机物浓度范围生长；③便于检测计数，对于应用普遍的平板计数法来说，菌落形成的速度较快且菌落形态清晰。

赵欣等人（2013）从再生水环境中筛选分离出 3 株测试菌种 *Stenotrophomonas* sp. ZJ2（简称为 ZJ2）、*Pseudomonas saponiphila* G3（简称为 G3）和 *Enterobacter* sp. G6（简称为 G6）。相比于 P17 和 NOX, ZJ2 和 G3 可以更好地利用聚合物和糖类有机物，G6 可以更好地利用胺类和糖类有机物，5 个菌种对醇类和氨基酸类物质的利用情况比较接近。由于再生水中的大分子有机物如多糖、蛋白等的浓度较饮用水更高（Shon *et al.*, 2006），因此选用 ZJ2、G3 和 G6 作为再生水测试菌种更能有效评价再生水的 AOC 水平。

除了从再生水土著微生物中筛选分离测试菌种外，还可直接以再生水的土著微生物为培养物用于 AOC 测定。研究发现，土

著微生物培养物可以在不同水质的再生水中生长，与纯试验菌株相比，可以提供更准确的再生水 AOC 测定结果 (Li et al., 2017)。土著微生物培养的完整性保证了基质碳的充分利用，这是土著微生物培养相对于筛选纯菌的优势。

(3) AOC 测定方法推荐

基于上述研究成果，本标准给出了两种推荐的 AOC 测定方法，即细菌平板计数 AOC 测定法和细菌 ATP 荧光强度 AOC 测定法。两种方法均使用再生水中的土著细菌对 AOC 进行测定，而不再采用饮用水 AOC 测定细菌 P17 和 NOX。

其中，细菌平板计数 AOC 测定法使用从再生水水样中筛选分离出的纯菌株进行测定。其优势在于获得适宜再生水水质的菌株后（例如前文所述的菌株 ZJ2、G3 和 G6），即可用于不同水样的 AOC 水平测定，便于比较不同类型的再生水水样的 AOC 水平差异。但是，由于不同水样中最适宜生长的菌种各不相同，该方法有可能会低估某些水样的 AOC 水平。此外，由于需要对纯菌进行平板计数，测定过程耗时较长，通常需要 5-7 天。

细菌 ATP 荧光强度 AOC 测定法使用再生水水样中的土著混菌进行测定。对于不同的再生水水样，需要按照规定准备相应的测试接种液，前期准备工作相比直接使用纯菌的细菌平板计数 AOC 测定法更复杂。但是，土著细菌能更好地反应该类型水样中微生物的最大生长潜力，并且由于使用 ATP 荧光强度作为微生物量的表征手段，无需平板计数，因此测定过程一般仅需 3-5

天。

上述两种方法各具优势和缺点，具体测定步骤均在标准文件中进行了详细阐述。在工程实践或研究中需要测定再生水生物稳定性时，可结合实际情况及具体需求，选择更适宜的方法。

3.4 生物稳定性评价结果复核

完成再生水生物稳定性评价后，需针对生物稳定性评价结果开展深入分析，考虑以下三个方面：

(1) 评价方法的选择是否合理，评价试验的过程是否符合评价方法的操作要求；

(2) 评价过程是否存在偶然性，评价结果是否准确、全面；

(3) 基于评价结果提出的建议及改善方案能否实现再生水水质的基本稳定。

4 标准实施案例

4.1 细菌平板计数 AOC 测定法应用案例

4.1.1 菌种筛选

测定菌种为从再生水中筛选分离的 *Stenotrophomonas* sp. ZJ2、*Pseudomonas saponiphila* G3 和 *Enterobacter* sp. G6，并置于-80℃条件下储存。

4.1.2 无碳容器瓶准备

准备带有磨砂玻璃盖的 50ml 硅酸盐瓶，用自来水清洗容器和瓶

盖，然后用超纯水冲洗 3 次。将清洗后的硅酸盐瓶装满 0.1 N 的 HCl 溶液，在超声仪中处理 2 h 后再用超纯水冲洗 3 次。随后将硅酸盐瓶干燥，并盖上锡纸，置于马弗炉中 550°C 加热 6 h 以氧化剩余的碳。

4.1.3 准备接种液

菌种首先在室温下于营养肉汤中振荡培养 1 d，然后将离心得到的菌体接种于乙酸钠溶液（乙酸碳浓度为 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）中，避光静置培养 7 d 左右，直至溶液中的有机碳被完全利用，得到该菌种的接种液。接种液的细菌浓度采用平板计数法进行测定。接种液密封保存于 4 °C 冰箱中，一般可使用 2-3 个月。细菌的代谢活性明显下降时需重新准备接种液。

4.1.4 水样检测

水样在测定 AOC 之前先经孔径 0.2 μm 的尼龙滤膜过滤，去除水中的悬浮颗粒物和微生物细胞。如果水样的 pH 过低或过高，根据需要将水样 pH 调至中性。然后将水样分装于 50 mL 具塞锥形瓶中，每瓶加 30 mL 水样，每个测试菌种设 3 个平行样。将分装好的水样进行巴氏灭菌，时间为 20-30 min。

向已灭菌并冷却的水样中接种测试菌种，根据接种液的细菌浓度计算所需的接种液体积，使接种后水样中测试菌种的浓度约为 $10^4 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将接种后的水样放入 25 °C 培养箱中避光静置培养 3-5 d。待测试菌种生长到稳定期后，采用平板计数法测定水样中测试菌种的最大生长浓度。

4.1.5 确定产率系数

对于不同的测试菌种，单位有机碳浓度可支持其生长的细胞浓度是不同的，因此要分别测定不同菌种各自的产率系数。

在测定产率系数前，首先配制乙酸碳浓度为 $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酸钠储备液和空白对照溶液，其中空白对照溶液的成分如表 1 所示，所有溶液均使用不含有机碳的高纯水进行配制，并在 $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 下高温湿热灭菌 20 min 。

表 1 空白对照溶液的成分

成分	浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
K_2HPO_4	7.0
KH_2PO_4	3.0
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0
NaCl	0.1
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.8×10^{-3}
pH: 7.2 ± 0.2	

用空白对照溶液和乙酸钠储备液配制乙酸碳浓度分别为 0、10、100、1000、5000、8000、10000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液。按照步骤 (4.1.4) 中的方法接种和培养，测定某测试菌种在不同浓度标准溶液中的最大生长浓度。以标准溶液的乙酸碳浓度为横坐标，相应溶液中测试菌种的最大生长浓度为纵坐标，绘制出标准曲线，标准曲线的斜率即为该测试菌种的产率系数。

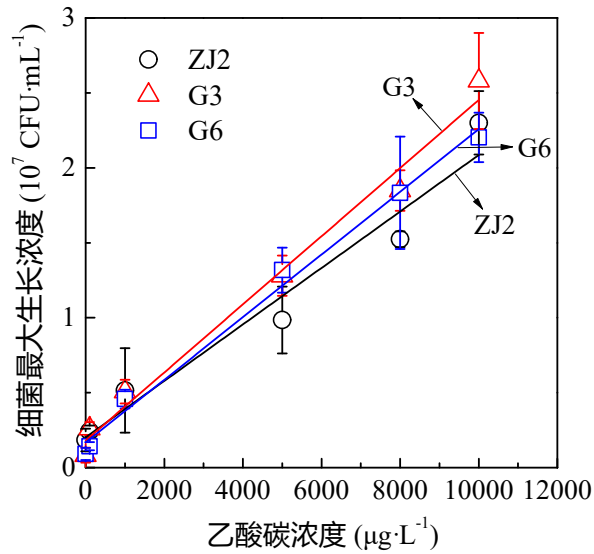


图 3 测试菌种最大生长浓度的标准曲线

从标准曲线图 3 可以看出，3 个测试菌种 ZJ2、G3 和 G6 的产率系数比较接近，通过计算标准曲线的斜率可以得到它们的产率系数分别为 1.91×10^6 、 2.29×10^6 、 2.11×10^6 $\text{CFU} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ 。

4.1.6 AOC 结果计算

测定某再生水厂生产的再生水的 AOC 浓度，该水厂的处理工艺流程为“ $\text{A}^2\text{O} \rightarrow$ 微滤 \rightarrow 反渗透”。通过步骤（4.1.4）中测得的该水样中测试菌种的最大生长浓度减去空白对照溶液中该测试菌种的最大生长浓度，再除以步骤（4.1.5）中测得的该菌种的产率系数求得 AOC 浓度，如图 4 所示

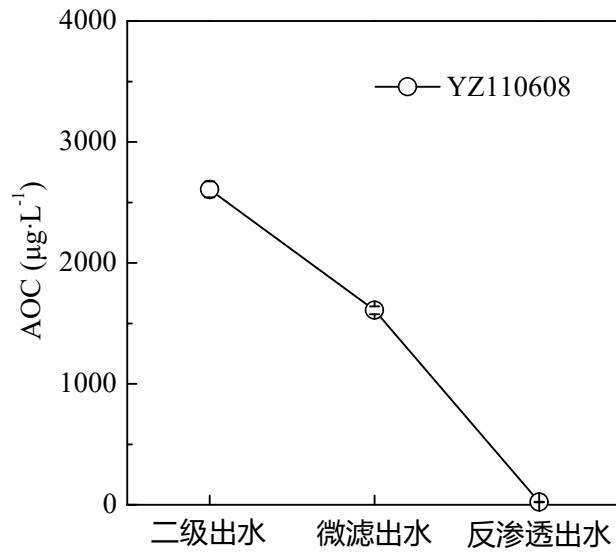


图4 YZ厂深度处理过程中AOC水平的变化

YZ厂的二级出水AOC浓度为 $2720\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，微滤出水AOC浓度为 $1650\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，反渗透产水中AOC浓度接近 $0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4.2 细菌ATP荧光强度AOC测定法应用案例

4.2.1 无碳容器瓶准备

准备带有磨砂玻璃盖的50 mL硅酸盐瓶，用自来水清洗容器和瓶盖，然后用超纯水冲洗3次。将清洗后的硅酸盐瓶装满0.1 N的HCl溶液，在超声仪中处理2 h后再用超纯水冲洗3次。随后将硅酸盐瓶干燥，并盖上锡纸，置于马弗炉中 550°C 加热6 h以氧化剩余的碳。

4.2.2 乙酸碳标准溶液配制

配制50、100、20、500、1000、2000和4000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的乙酸碳溶液，并在 121°C 条件下灭菌20min。

4.2.3 准备接种液

将二级处理的出水过 0.2 μm 的滤膜，去除水中的悬浮颗粒。然后将 100 μL 未过滤的二级处理后的出水混合 40 ml 过滤后的溶液加入到无碳瓶中，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养 10 d，培养后的溶液随后在 10000 rpm 的条件下离心 10 分钟。将上清液倒掉后，沉积物用无菌生理盐水复悬浮，然后 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 4 d，以去除体系中多余的有机碳。制备好的微生物储备液可以在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存 1 个月以上。

4.2.4 建立 AOC（乙酸碳）浓度和 ATP 荧光强度标准曲线

取样后，立即将待测水样用 0.2 μm 无碳滤膜过滤。在可同化碳测定前，需用 0.1M 的 HCl 和 0.1M 的 NaOH 溶液调节水样的 pH 至 7.0 \pm 0.2。取适量由同一个再生水厂在 4 个不同时期生产的再生水制备的接种液与乙酸碳溶液分别混合，混合后保证微生物的密度为每毫升 10⁴ 个。将混合后的溶液加入到无碳玻璃瓶中，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养 3d，之后测定 ATP 荧光强度。ATP 荧光强度采用 BacTiter-Glo™ 微生物细胞活性检测试剂盒和高灵敏度光子计数光度计测定。根据实验结果，建立 AOC（乙酸碳）与荧光强度的标准曲线（图 5）。

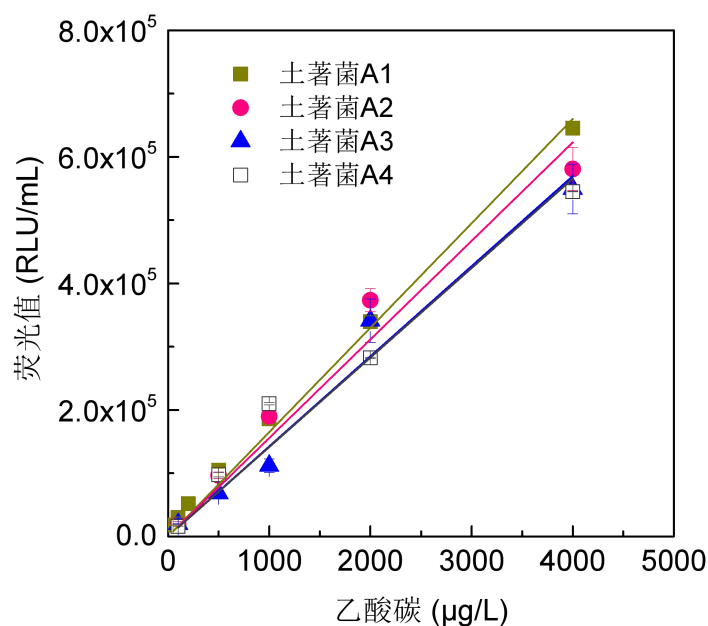


图5 AOC（乙酸碳）与 ATP 荧光强度标准曲线

乙酸碳的 ATP 产率系数分别为 1.65 、 1.56 、 1.42 和 1.41×10^5 $\text{RLU} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ （乙酸碳），均值为 1.5×10^5 $\text{RLU} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ （乙酸碳）。

4.2.5 水样 AOC 检测

测定某再生水厂中不同工艺产生的再生水经 UV/H₂O₂ 协同处理后 AOC 的变化，再生水分别为 A²O+MBR 工艺出水（样品 A，DOC=2.7 mg/L）和 A²O 工艺出水（样品 B，DOC=8.3 mg/L），紫外剂量为 0-5000 mJ/cm² 的，H₂O₂ 浓度为 10 mg/L。经过处理后的样品 A 和样品 B 水样用 0.2 μm 无碳滤膜过滤，然后用 0.1M 的 HCl 和 0.1M 的 NaOH 溶液调节水样的 pH 至 7.0±0.2。取适量接种液分别与经过处理的水样 A 和水样 B 混合，混合后保证微生物的密度为每毫升 10⁴ 个。将混合的溶液分别加入到无碳玻璃瓶中，在 25°C 的条件下培养 3d，之后测定 ATP 荧光强度。ATP 荧光强度采用 BacTiter-Gl™ 微生物细胞活性检测试剂盒和高灵敏度光子计数光度计测定。根据测定的 ATP 荧光强

度以及 A.2.4 建立的标准曲线，计算 AOC 的浓度。

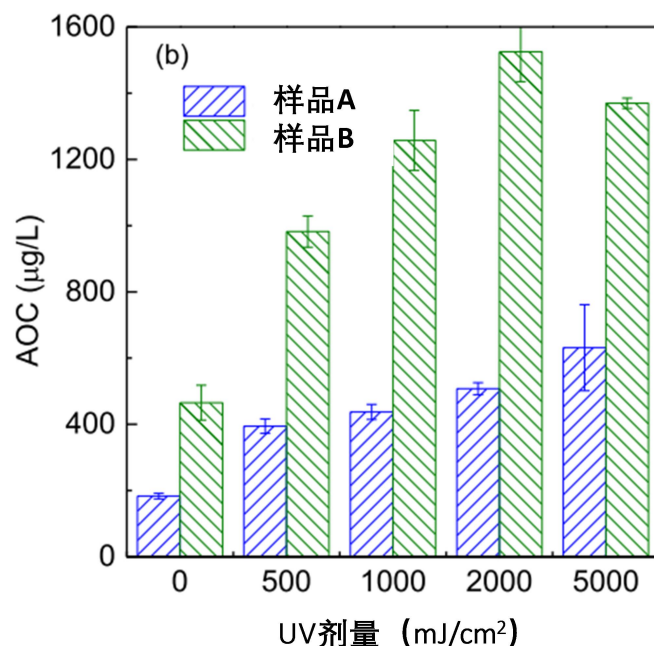


图 6 不同 UV 剂量下水样 AOC 浓度的变化

如图 6 所示，样品 A 和样品 B 的 AOC 浓度均随着紫外剂量增加而增大，且两个样品的最大 AOC 浓度大约是初始浓度的 3.3 倍。结果显示，该方法较好地揭示再生水中 AOC 的含量及其在处理过程中的变化。

5 标准实施建议

在本标准发布后，拟通过由中国环境科学学会水处理与回用专业委员会主办的“全国水处理与循环利用学术会议”、“水与发展纵论”公益性学术论坛以及相关企业培训会等途径进行广泛宣贯。

计划与再生水生产企业和再生水利用企业合作，利用该标准评价不同工艺生产的再生水的生物稳定性，为再生水的安全高效生产与利

用提供支撑和指导。目标合作企业包括：北京排水集团有限公司、北控水务集团有限公司、北京亦庄水务有限公司等。

本标准为首次制订，随着污水再生利用行业的快速发展和相关新技术的快速进步，本标准中的再生水生物稳定性评价方法与规程也可能会随之发生变化。因此，建议在本标准实施过程中，继续广泛听取和收集各方面的意见与建议，并根据实际应用情况，对本标准进行不断地修订与完善，使其实用性和可操作性与时俱进，为科学、规范开展再生水生物稳定性评价提供依据和指导。

参考文献

- Barker DJ, Stuckey DC. A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. *Water Research*, 1999, 33: 3063-3082.
- Chudoba J. Inhibitory effect of refractory organic compounds produced by activated sludge microorganisms on microbial activity and flocculation. *Water Research*, 1985, 19: 197-200.
- Escobar IC, Randall AA, Taylor JS. Bacterial growth in distribution systems: effect of assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35: 3442-3447.
- Funamizu N, Kanno M, Takakuwa T. Measurement of bacterial growth potential in a reclaimed water. In: *Water, Sanitation and Health: Resolving conflicts between drinking water demands and pressures from society's waste*. Bad Elster, Germany, 1998.
- Ross N, Deschenes L, Bureau J, Clement B, Comeau Y, Samson R. Ecotoxicological assessment and effects of physicochemical factors on biofilm development in groundwater conditions. *Environmental Science & Technology*, 1998, 32: 1105-1111.

- Ichihashi O, Satoh H, Mino T. Effect of soluble microbial products on microbial metabolisms related to nutrient removal. *Water Research*, 2006, 40: 1627-1633.
- LeChevallier MW, Welch NJ, Smith DB. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 2201-2211.
- Lehtola MJ, Miettinen IT, Vartiainen T, Martikainen PJ. A new sensitive bioassay for determination of microbially available phosphorus in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 2032-2034.
- Li G Q, Yu T, Wu Q Y, Lu Y, Hu H Y. Development of an atp luminescence-based method for assimilable organic carbon determination in reclaimed water. *Water Research*, 2017, 123, 345-352.
- Miettinen IT, Vartiainen T, Martikainen PJ. Contamination of drinking water. *Nature*, 1996, 381: 654-655.
- Shon HK, Vigneswaran S, Snyder SA. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater: constituents, effects, and treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2006, 36: 327-374.
- van der Kooij D, Visser A, Hijnen WAM. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *American Water Works Association Journal*, 1982, 74: 540-545.
- van der Kooij D. Assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. In: *Drinking water microbiology*. Springer-Verlag, New York, USA, 1990.
- van der Kooij D. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. *American Water Works Association Journal*, 1992, 84: 57-65.
- van der Kooij D. Biological stability: a multidimensional quality aspect of treated water. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2000, 123: 25-34.
- Volk CJ, LeChevallier MW. Impacts of the reduction of nutrient levels on bacterial water quality in distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 4957-4966.
- Weinrich LA, Jjemba PK, Giraldo E, LeChevallier MW. Implications of organic carbon in the deterioration of water quality in reclaimed water distribution

systems. *Water Research*, 2010, 44: 5367-5375.

Zhao X, Hongying H U, Liu S, Jiang F, Shi X, Mingtang L I, Xueqiao Xu. Improvement of the assimilable organic carbon (AOC) analytical method for reclaimed water. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2013, 7: 483-491.

李爽, 张晓建, 范晓军, 刘慧敏, 汪皓, 叶慧娟. 以 AOC 评价管网水中异养菌的生长潜力. *中国给水排水*, 2003, 19(1): 46-49.