

胞外多聚物在好氧颗粒污泥形成中的作用机制

张丽丽¹, 陈效¹, 陈建孟¹, 蔡伟民²

(1. 浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310032; 2. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240)

摘要: 在 SBR 反应器活性污泥好氧颗粒化过程中, 分析不同时期污泥 EPS 主要成分的变化、污泥表面特性的变化及二者关系. 不同时期污泥样品胞外蛋白的 SDS-PAGE 表明, 蛋白分子量条带主要分布在 $(31.0 \sim 97.4) \times 10^3$, 与种泥相比, 颗粒污泥在形成过程中增加了一些新蛋白条带, 且条带颜色逐渐变深, 定性表明蛋白种类及含量的增加. 定量测定也表明, 胞外蛋白分泌量随颗粒污泥的形成逐渐从 $49.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 增至 $148.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 多糖则无明显变化, 蛋白/多糖值也从 2.3 逐渐增至 4.9. 颗粒污泥表面疏水性比种泥约增加 1 倍, 疏水性的变化与蛋白/多糖值正相关, 相关系数为 0.969. 测得种泥与颗粒污泥表面 Zeta 电位平均值分别为 -28.5 mV 和 -13.2 mV , 颗粒污泥表面的电负性明显降低. 由蛋白质自身特性, 可推测其通过增加污泥表面相对疏水性和降低污泥表面电负性而促进好氧颗粒污泥形成的作用机制.

关键词: 胞外多聚物; 胞外蛋白; 好氧颗粒污泥; 表面特性; 机制

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)04-0795-05

Role Mechanism of Extracellular Polymeric Substances in the Formation of Aerobic Granular Sludge

ZHANG Li-li¹, CHEN Xiao¹, CHEN Jian-meng¹, CAI Wei-min²

(1. School of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China; 2. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: During the aerobic granulation of activated sludge in SBR, the changes in the key components of sludge EPS (extracellular polymeric substances) and surface characteristics, and the correlation between them were analyzed. The SDS-PAGE results of exopolymeric protein for different sludge samples indicated that the distribution of bands for protein molecular weight was in the range of $31.0 \times 10^3 \sim 97.4 \times 10^3$. Compared with seed sludge, some new protein bands increased with the aerobic granulation, and the color of the bands were enhanced, indicating the species and contents of exopolymeric protein gradually increased with the granulation. Moreover the quantitative determination indicated that the protein excreted increased from $49.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ to $148.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ with the granulation. There was no obvious increase in the polysaccharide content. The PN/PS ratio was increased from 2.3 to 4.9 accordingly. The cell hydrophobicity of aerobic granular sludge was 1 time higher than that of seed sludge. The changes in cell hydrophobicity were positively correlated with PN/PS values, and the related coefficient was 0.969. The average Zeta potential of seed sludge and granular sludge was -28.5 mV and -13.2 mV , respectively. Obviously, the surface negative charges of granular sludge decreased. From the protein characteristics, we speculate the increase in exopolymeric protein content may enhance cell relative hydrophobicity and reduce negative surface charges, thus contributing to aerobic granulation.

Key words: extracellular polymeric substances (EPS); exopolymeric protein; aerobic granular sludge; surface characteristics; mechanism

胞外多聚物(EPS)是分布于细胞表面的高分子物质, 有利于微生物细胞凝聚, 在形成与稳定生物膜和厌氧颗粒污泥中起重要作用, 是微生物聚集体的重要组成部分^[1,2]. EPS 的主要有机组分可以改变微生物细胞表面特性, 且与聚集体的构造、组成及性能均有紧密联系. 对于 EPS 的深入研究和理解可能会揭示生物处理的本质^[1].

好氧颗粒污泥具有良好的沉降性能和较高的生物量, 能克服传统活性污泥固有的问题, 已成为生物技术领域研究的新热点^[3~5]. 目前, EPS 及其主要成分对好氧颗粒污泥形成和特性的影响还鲜见报道. 在先前的研究中, 发现蛋白质是好氧絮状污泥和颗粒污泥 EPS 中最主要的成分^[6]. 近 10 年来对不同类

型污泥 EPS 分析中, 更多研究也倾向认为蛋白质是 EPS 中含量最高的成分^[7,8].

本研究应用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对好氧颗粒污泥形成过程中胞外蛋白进行定性分析, 同时监测好氧颗粒污泥形成过程污泥表面特性的变化, 研究胞外蛋白在好氧污泥形成中的重要作用, 从微生物 EPS 变化的角度揭示好氧颗粒污泥形成的本质.

收稿日期: 2006-04-08; 修订日期: 2006-06-19

作者简介: 张丽丽(1978~), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为污水生物处理技术, E-mail: Misslyli0127@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 试验污泥来源

以接种的活性污泥和序批式反应器(SBR)中好氧颗粒污泥形成过程中不同时期的污泥为研究对象,提取 EPS 并进行分析.活性污泥取来后置于 4℃ 冰箱内,在 1 d 内使用.不同时期的好氧颗粒污泥在 SBR 相同的运行周期末取样.

1.2 EPS 的提取及分析

1.2.1 样品的预处理

分别取干重(以 VSS 计)约 0.2 g 的接种絮状活性污泥和不同时期 SBR 中的好氧颗粒污泥待用.样品在 4℃、10 000 r/min(Singma 3-18K 型高速离心机)下离心 15 min,弃去上清液,重新悬浮在去离子水中.所得污泥样品置于玻璃匀浆器内 4℃ 下匀浆 5 min,使样品均一化后再悬浮在 40 mL 磷酸盐缓冲溶液中待用.

1.2.2 EPS 提取方法

根据先前研究中对 EPS 提取方法的比较和试验具体需要,选择超声 + 高速离心作为本试验 EPS 的提取方法.使用超声波粉碎机(JY92-2D),在 35 W、冰水浴中超声振荡 4 min,然后在 4℃、20 000 r/min 下离心 30 min,收集上清液,经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后待用.

1.2.3 EPS 化学成分分析

提取液中 EPS 的产量由 TOC 及蛋白质和多糖含量来表示.多糖的浓度用苯酚-硫酸法测定,以 0~50 mg/L 的葡萄糖溶液作为标准.蛋白质含量用改进的 Lowry 法测定,以 0~250 mg/L 的牛血清蛋白作为标准. TOC 采用 multiN/C3000(德国)分析仪进行测定.

1.3 污泥表面特性分析

污泥表面相对疏水性用污泥絮体对碳氢化合物的附着程度表示,按照文献[9]中的方法测定.污泥絮体表面电荷采用 Zeta 电位分析仪(Zetasizer Nano ZS, Malvern)测定.

1.4 SDS-聚丙烯酰胺电泳

采用有机溶剂沉淀法对 EPS 提取液中的蛋白质进行浓缩.取 5 mL EPS 提取液置入 10 mL 离心管内,再快速加入 5 mL 冷却在 -20℃ 下的丙酮溶液,振荡混匀低温放置 2 min,然后在 4℃、10 000 r/min 下离心 10 min,弃去冷丙酮即得到蛋白质浓缩液.

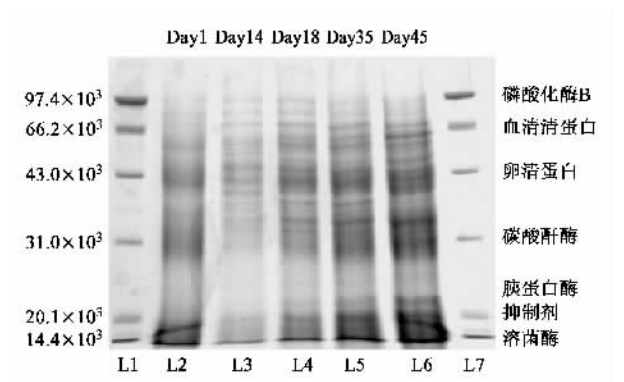
为了长期保存不同时期提取的蛋白样品,上述蛋白浓缩液置于真空冷冻干燥机(GLZ-0.2B)内,在

-40℃ 下冷冻干燥 24 h.所得固体样品移入离心管,密封后冷藏在 -80℃ 待用.对不同时期污泥样品的胞外蛋白采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析.

2 结果与讨论

2.1 好氧颗粒污泥形成过程中胞外蛋白的 SDS-PAGE

在好氧颗粒污泥形成过程中,将不同时期提取的蛋白样品一起进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果见图 1.通过与标准分子量蛋白对比,发现污泥样品胞外蛋白分子量的条带主要分布在 $31.0 \times 10^3 \sim 97.4 \times 10^3$.与接种活性污泥(L2)相比,颗粒污泥在形成过程中增加了一些新蛋白条带,且条带颜色逐渐变深(L2~L6).新蛋白条带的增加表明好氧颗粒污泥的形成丰富了胞外蛋白质种类.在相同上样量的条件下,条带颜色的变深是蛋白质含量增加的结果,定性表明好氧颗粒污泥形成过程中胞外蛋白含量的增加.



L1 和 L7 是标准分子量蛋白,L2~L6 是颗粒污泥形成过程中的胞外蛋白分子量分布

图 1 好氧颗粒污泥形成过程中不同时期 EPS 提取液中蛋白质 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.1 Comparison of SDS-PAGE from sludge samples during the formation of aerobic granules

2.2 好氧颗粒污泥形成过程 EPS 主要成分含量的变化

好氧颗粒污泥的形成是 1 个从絮状污泥到微生物聚集集体,最后发育成颗粒污泥的过程.在颗粒污泥形成过程中,EPS 分泌量及主要成分的变化如图 2 和图 3 所示.胞外蛋白的定量测定结果表明,随着污泥逐渐颗粒化,胞外蛋白的含量逐渐增加(图 2).种泥胞外蛋白含量为 $49.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;反应器运行至第 18 d,初步形成的颗粒污泥胞外蛋白含量约为反应器启

动初期的 2 倍;当污泥全部颗粒化后,测得胞外蛋白含量高达 $148.3\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. 而胞外多糖含量在好氧颗粒污泥形成过程中未表现出明显变化趋势.

图 3 表明,胞外蛋白与多糖的比值(PN/PS)在颗粒污泥形成过程中呈明显增加趋势. 种泥 PN/PS 值为 2.3,污泥全部颗粒化时,PN/PS 值增为 4.9 左右. TOC 含量可在一定程度上反映微生物分泌的 EPS 总量. 颗粒污泥形成后,测得 TOC 含量约为絮状污泥的 1.4~1.7 倍,表明颗粒污泥中 EPS 总量高于接种污泥. 事实上,早在厌氧颗粒污泥形成的研究中,不少研究者就认为 EPS 是影响厌氧颗粒污泥形成的关键因素^[7,10]. 胞外蛋白含量的明显增加,表明其在好氧颗粒污泥形成中可能具有重要作用. 有研究表明,蛋白分子比多糖更容易与金属离子通过静电作用而键合,从而成为影响微生物聚集体形成的关键因素^[1,11].

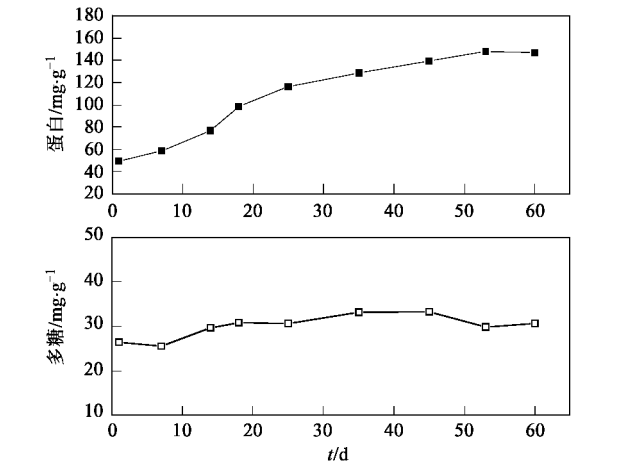


图 2 好氧颗粒污泥形成过程 EPS 中蛋白和多糖的变化
Fig.2 Changes of protein and polysaccharide in EPS during aerobic granulation

2.3 EPS 对好氧颗粒污泥表面特性的影响

污泥表面相对疏水性的变化用污泥对碳氢化合物(十六烷)的附着程度来表示. 图 4 表明,污泥逐步颗粒化过程中伴随着其表面相对疏水性的增加. 反应器启动初期,测得污泥表面疏水性约为 43.2%;颗粒污泥形成初期,疏水性增为 60.2%;当颗粒污泥大量形成后,其表面疏水性稳定在 78.2% 左右. 可见,颗粒污泥表面疏水性比接种絮状污泥约增加 1 倍. 这表明,好氧颗粒污泥的形成可能与污泥表面疏水性的增加密切相关.

Mahoney 等^[12]在厌氧颗粒污泥的研究中发现, UASB 反应器中颗粒污泥的疏水性远高于从反应器

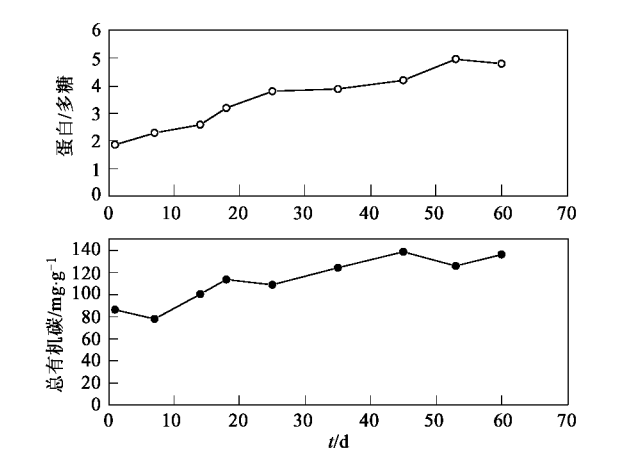


图 3 好氧颗粒污泥形成过程 EPS 中 TOC 和 PN/PS 的变化
Fig.3 Changes of TOC and PN/PS in EPS during aerobic granulation

洗脱的污泥絮体的疏水性. Liu 等^[13]在研究细胞疏水性对好氧颗粒化过程的影响中指出,污泥表面疏水性变化与 SBR 反应器中的水力选择压密切相关,从而在好氧颗粒化过程中发挥重要作用. 然而,本研究还发现好氧颗粒污泥形成过程中,污泥表面相对疏水性与 PN/PS 值密切相关,相关系数为 0.969,污泥表面疏水性随 PN/PS 值的增加而增加(图 5). 这表明,细胞表面疏水性的增加主要取决于 EPS 中蛋白质含量的增加. 事实上, Digance 等的研究已表明,污泥 EPS 中的蛋白含更多的疏水键,且在对 EPS 的化学分析中也发现,蛋白和氨基酸是 EPS 中主要的疏水成分^[11],这进一步证明 EPS 中蛋白含量的增加能促使污泥表面疏水性的提高,从而在好氧颗粒污泥的形成中具有重要作用.

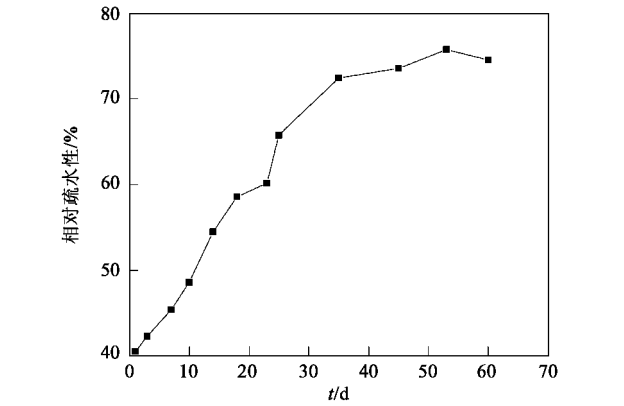


图 4 好氧颗粒污泥形成过程中表面疏水性的变化
Fig.4 Changes in relative hydrophobicity during aerobic granulation

图 6 和图 7 分别给出了接种活性污泥和好氧颗粒污泥表面 Zeta 电位分布. 由图 6 可以计算出活性

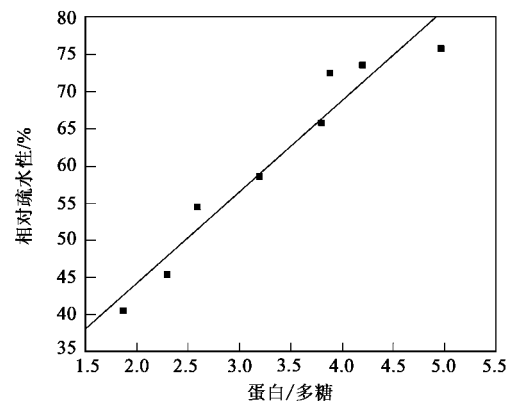


图 5 污泥表面相对疏水性与 EPS 中 PN/PS 的关系

Fig.5 Relationship between relative hydrophobicity of sludge and PN/PS ratio in EPS

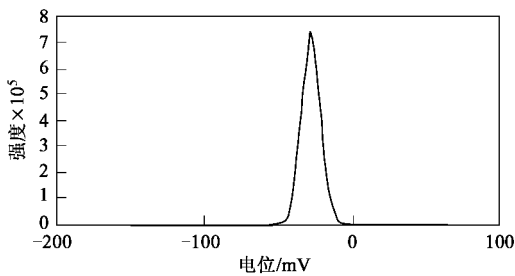


图 6 接种絮状活性污泥表面 Zeta 电位分布

Fig.6 Zeta potential distribution of seed floc sludge

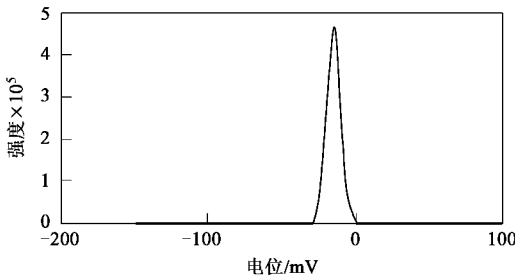


图 7 好氧颗粒污泥表面 Zeta 电位分布

Fig.7 Zeta potential distribution of aerobic granular sludge

污泥表面 Zeta 电位平均值为 -28.5 mV ，而好氧颗粒污泥形成后，其表面 Zeta 电位平均值为 -13.2 mV 。可见，颗粒污泥形成后，其表面负电荷密度降低。长期以来，表面电荷被认为在控制微生物聚集体稳定性中发挥重要作用。Rouxhet 等^[14]认为，在正常生理所需 pH 条件下培养，微生物表面带负电。按照 DLVO 理论，2 个微生物细胞间存在静电斥力，不能相互聚合。好氧颗粒污泥形成过程中，微生物分泌的胞外蛋白含量明显增加，蛋白中氨基带正电荷，能中

和一些源于羧基和磷酸根基团的负电荷，从而降低污泥表面的负电性。另外，蛋白能与金属离子键合，也可能降低细胞表面的电负性，促进微生物间的聚合作用，最终促使颗粒污泥的形成。Tsuneda 等^[15]在研究 EPS 对细胞表面动电学影响时也发现，分布于细胞表面的 EPS 能降低其表面的电荷密度，这进一步表明，EPS 中的蛋白可能通过降低细胞表面的负电性在好氧颗粒污泥形成中发挥重要作用。

3 结论

污泥样品胞外蛋白 SDS-PAGE 的结果表明，大部分蛋白分子量分布于 $31.0 \times 10^3 \sim 97.4 \times 10^3$ ，随着好氧颗粒污泥的形成，蛋白条带数量增加，颜色变深，定性表明好氧颗粒污泥形成过程中胞外蛋白含量逐渐增加。EPS 定量测定结果也表明，微生物 EPS 中蛋白分泌量随颗粒污泥的形成而逐渐增加，但多糖含量则无明显变化，PN/PS 值逐渐从接种初期的 2.3 增至污泥完全颗粒化时的 4.9。污泥表面疏水性与 PN/PS 呈正相关，也相应从 43.2% 增为 78.2%。与接种活性污泥相比，颗粒污泥表面的电负性明显降低，测得活性污泥与颗粒污泥的表面 Zeta 电位分别为 -28.5 mV 和 -13.2 mV 。胞外蛋白分泌量的增加会增加污泥表面疏水性，降低其表面的负电性。因此，可进一步推测胞外蛋白通过改变细胞表面特性而在好氧颗粒污泥形成中具有重要作用。

参考文献:

[1] Lapidou G S, Rittmann B E. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass [J]. Water Research, 2002, 36: 2711 ~ 2720.

[2] Morgan J W, Evison L M, Forster C F. The internal architecture of anaerobic sludge granules [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1991, 50: 211 ~ 226.

[3] 胡林林, 王建龙, 文湘华, 等. SBR 中厌氧颗粒污泥向好氧颗粒污泥的转化[J]. 环境科学, 2004, 25(4): 74 ~ 77.

[4] Beun J J, van Loosdrecht M C M, Heijnen J J. Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor [J]. Water Research, 2002, 36: 702 ~ 712.

[5] Yu L, Liu Q S. Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors [J]. Biotechnology Advances, 2006, 24: 115 ~ 127.

[6] 方亮, 张丽丽, 蔡伟民. 活性污泥胞外多聚物提取方法的比较[J]. 环境科学与技术, 2006, 3(29): 46 ~ 48.

[7] Schimdt J E, Ahring B K. Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 42: 457 ~ 462.

[8] McSwain B S, Irvine R L, Hausner M, *et al.* Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(2): 1051 ~ 1057.

[9] Jin B, Wilén B M, Lant P. A comprehensive insight into floc characteristics and their impact on compressibility and settleability of activated sludge [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2003, **95**: 221 ~ 234.

[10] Liu Y, Xu H L, Yang S F, *et al.* Mechanism and model for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor [J]. *Water Research*, 2003, **37**: 661 ~ 673.

[11] Digance M F, Urbain V, Rybacki D, *et al.* Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure [J]. *Water Science and Technology*, 1998, **38**: 45 ~ 53.

[12] Mahoney E M, Varangu L K, Cairns W L, *et al.* The effect of calcium on microbial aggregation during UASB reactor start-up [J]. *Water Science and Technology*, 1987, **19**: 249 ~ 260.

[13] Liu Y, Tay J H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge [J]. *Water Research*, 2002, **36**: 1653 ~ 1665.

[14] Rouxhet P G, Mozes N. Physical chemistry of the interaction between attached microorganism and their support[J]. *Water Science and Technology*, 1990, **22**: 1 ~ 16.

[15] Tsuneda S, Jung J, Hayashi H. Influence of extracellular polymers on electrokinetic properties of heterotrophic bacterial cells examined by soft particle electrophoresis theory [J]. *Colloids and Surfaces B*, 2003, **29**: 181 ~ 188.

《环境科学》征稿简则

1. 来稿报道成果要有创新性,论点明确,文字精炼,数据可靠.全文不超过 8000 字(含图、表、中英文摘要及参考文献).国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、国际合作项目或其它项目请在来稿中注明(在首页以脚注表示).作者投稿时请先登陆我刊网站(www.hjcx.ac.cn)进行注册,注册完毕后以作者身份登录,按照页面给出的提示信息投稿即可.
2. 稿件请按 GB 7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》中学术论文的规范撰写.论文各部分的排列顺序为:题目;作者姓名;作者工作单位、地址、邮政编码;中文摘要;关键词;中图分类号;英文题目;作者姓名及单位的英译名;英文摘要;关键词;正文;致谢;参考文献.
3. 论文题目应简练并准确反映论文内容,一般不超过 20 字,少用副标题.
4. 中文摘要不少于 300 字,以第三人称写.摘要内容包括研究工作的目的、方法、结果(包括主要数据)和结论,重点是结果和结论.英文摘要与中文对应,注意人称、时态和语言习惯,以便准确表达内容.
5. 前言包括国内外前人相关工作(引文即可)和本工作的目的、特点和意义等.科普知识不必赘述.
6. 文中图表应力求精简,同一内容不得用图表重复表达,要有中英文对照题目.图应大小一致,曲线粗于图框,图中所有字母、文字字号大小要统一.表用三线表.图表中术语、符号、单位等应与正文一致.
7. 计量单位使用《中华人民共和国法定计量单位》(SI).论文中物理计量单位用字母符号表示,如 mg(毫克),m(米),h(小时)等.科技名词术语用国内通用写法,作者译的新名词术语,文中第一次出现时需注明原文.
8. 文中各级标题采用 1,1.1,1.1.1 的形式,左起顶格书写,3 级以下标题可用(1),(2)……表示,后缩 2 格书写.
9. 文中外文字母、符号应标明其大小写,正斜体.生物的拉丁学名为斜体.缩略语首次出现时应给出中文全称,括号内给出英文全称和缩略语.
10. 未公开发表资料不列入参考文献,可在出现页以脚注表示.文献按文中出现的先后次序编排.常见文献书写格式为:
期刊:作者(外文也要姓列名前).论文名[J].期刊名,年,卷(期):起页~止页.
图书:作者.书名[M].出版地:出版社,年.起页~止页.
会议文集:作者.论文名[A].见(In):编者.文集名[C].出版地:出版社(单位),年.起页~止页.
学位论文:作者.论文名[D].保存地:保存单位,年份.
报告:作者.论文名[R].出版地.出版单位,出版年.
专利:专利所有者.专利题名[P].专利国别:专利号,出版日期.
11. 来稿文责自负,切勿一稿多投.编辑对来稿可作文字上和编辑技术上的修改和删节.在 3 个月内未收到本刊选用通知,可来电询问.对未刊稿件一般不退,请作者自留底稿.
12. 投稿请附作者单位详细地址,邮编,电话号码,电子邮箱等.编辑部邮政地址:北京市 2871 信箱;邮编:100085;电话:010-62941102,010-62849343;传真:010-62849343;E-mail: hjcx@rcees.ac.cn;网址:www.hjcx.ac.cn