

厌氧污泥胞外多聚物的提取、测定法选择

刘志杰 谢 华 俞毓馨 陆正禹

(清华大学环境工程系, 北京 100084)

摘要 选用 6 种方法, 对 4 种不同性状的厌氧污泥的胞外多聚物(ECP)进行提取试验。此外, 采用 2 种方法测定提取液中多糖浓度, 还测定核酸浓度以检查细胞的破坏程度。通过对比, 认为硫酸法提取的 ECP 较完全, 对细胞的破坏作用小, 而苯酚-硫酸法较适于测定提取液中的多糖含量。文中还对厌氧污泥 ECP 的含量、成分作了分析和探讨。

关键词 厌氧污泥, 胞外多聚物, 提取法, 硫酸提取法。

胞外多聚物(ECP)是指细菌在一定的环境条件下分泌于细胞体外的一些高分子有机物。由于在菌体外所处的特殊位置及其特定的化学组成, 使 ECP 成为影响细菌表面特性的重要因素。

ECP 的研究最早应用于好氧活性污泥中。到目前为止, 研究厌氧污泥的 ECP 的报道较少, 当 ECP 促成厌氧颗粒污泥形成的假设提出后, 这方面的研究才逐渐增多。钉红染色^[1]、热沉淀^[3]等方法被用于提取厌氧污泥的 ECP, 但这些方法对各种因素的影响非常敏感, 特别是当厌氧污泥含有较多杂质时, 数据的重复性更差^[12]。为了确切

知道 ECP 在厌氧污泥颗粒化过程中的作用, 本研究选用 6 种提取和 2 种测定 ECP 的方法, 进行对比试验, 试图找出一种能有效地提取及测定厌氧污泥 ECP 的方法。

1 试验方法和材料

1.1 试验方案

一种有效的提取方法应能较完全地提取出 ECP, 并对细菌细胞的破坏较小, 以防止胞内物质增加 ECP 的测定值, 按表 1 方案试验。

1.2 污泥样品

表 1 试验方案

项目	提取 ECP		测定糖类含量	测定核酸含量
方法	①蒸馏水提取法	②硫酸提取法	①苯酚-硫酸法	紫外吸收法
	③氢氧化钠提取法	④EDTA 提取法	②萘酚-硫酸法	
	⑤沸苯提取法	⑥煮沸法		
目的	选择一种有效方法		确定提取方法提取 ECP 的完全程度	确定提取方法对细胞的破坏程度

表 2 污泥样品特性

泥样编号	来源	性状	基质类型	基质浓度(mgCOD/L)	反应器温度(℃)
1	生产性 UASB	絮状	啤酒废水	1500—3000	22—34
2	生产性 UASB	絮状和颗粒	啤酒废水	1500—3000	22—34
3	小试 UASB	颗粒	生活污水	150—600	7—20
4	中试 UASB	颗粒	啤酒废水	1500—3000	24—26

选择 4 种厌氧污泥提取、测定 ECP(表 2), 它们的性状、颗粒化程度、基质类型、基质浓度和温度都不尽相同, 具有较广泛的代表性。

1.3 污泥样品的预处理

取摇匀后污泥样品约 20ml 于离心管中, 用 3000r/min 转速离心 5min, 弃去上清液; 加入约 20ml 0.9% 生理盐水按上述方法洗涤; 重新加入

约 20ml 生理盐水, 摇匀后用玻璃匀浆器匀浆, 使污泥颗粒破碎。匀浆后污泥, 用移液管移取 1.00ml 于 10.0ml 具塞玻璃试管中用于提取 ECP; 另取 10.00ml 于蒸发皿中, 用重量法测 VSS 值。

1.4 胞外多聚物的提取

(1)蒸馏水提取法 往已加入污泥的玻璃试管中加入 9.00ml 蒸馏水,摇匀后置于摇床上振荡 3h,提取液于 4000r/min,离心 5min,取上清液待测。

(2)硫酸提取法^[7] 加入 8%硫酸溶液 9.00ml 于具塞试管中,置于摇床上振荡 1h, 4000r/min 离心 5min,取上清液待测。

(3)EDTA 提取法^[4] 加入 2%EDTA 二钠盐 9.00ml,摇匀后置于 4℃冰箱中冷藏,每隔 20min 取出摇匀,3h 后 4000r/min 离心 5min,取上清液待测。

(4)沸苯提取法^[10] 加苯到 10ml 左右,振荡,在沸水浴中将苯蒸干,后加入沸水到 10.0ml 刻度,15min 后于 4000r/min 离心 5min,取上清液待测。

(5)氢氧化钠提取法^[9] 加入 1% NaOH 溶液 9.00ml,置于摇床上振荡 1h,4000r/min 离心 5min,取上清液待测。

(6)蒸煮法^[1] 加蒸馏水 9.00ml,置于 0.8 MPa、温度 120℃湿式高压灭菌釜中处理 1h,趁热于 4000r/min 离心 5min,取上清液待测。

以上各种方法除沸苯法在苯蒸干时试管不加塞外,提取时均应加塞。

1.5 ECP 中多糖和核酸的测定

(1)ECP 中多糖的测定选用苯酚-硫酸法^[13]和蒽酮-硫酸法^[13]。以分析纯葡萄糖为标准样品,制作标准曲线。取上清液 1.00ml 按操作步骤处理后,在岛津 UV-250 光吸收测定仪上于 480nm(苯酚-硫酸法)或 625nm(蒽酮-硫酸法)测吸光度,以标准曲线计算多糖浓度 c_1 (μg/ml); 10.00ml 污泥测出的 VSS 值为 m (g),转换成单位 VSS 所含多糖数值:

$$c_2(\text{mg/gVSS}) = \frac{c_1}{10m}$$

(2)核酸含量的测定用紫外吸收法^[14]。DNA 和 RNA 都有吸收紫外光的性质,它们的吸收高峰在 260nm 波长处。在岛津 UV-250 光吸收测定仪上于 260nm 波长下测定样品的吸光度,吸光度偏高则进行稀释,采用下式计算:

$$\text{浓度}(\text{mg/gVSS}) = \frac{\text{ABS}(260)}{0.022} \times \text{稀释倍数}$$

其中,ABS(260)为 260nm 波长下的吸光度值。

2 试验结果

测定结果列于表 3,表 3 中浓度值和相对标准偏差分别为 6 次平行试验的平均值和相对标准偏差。

比较 2 种多糖的测定方法,可以看出苯酚-硫酸法测得的数值相对标准偏差比较小,而蒽酮-硫酸法比较大,特别是絮状污泥(泥样 1、2)相对标准偏差大都在 15%以上,说明前一种方法比后者数据的重复性更好。当样品中多糖浓度低时,苯酚-硫酸法测得的值要高一些,这是合理的,因为苯酚-硫酸试剂可与游离的寡糖、多糖中的己糖、戊糖、糖醛酸(或甲苯衍生物)起显色反应;而蒽酮-硫酸试剂对各种己糖、6-脱氧核糖显色深,对戊糖、氨基己糖、糖醛酸等显色弱^[13]。ECP 的成分比较复杂,不仅有己糖,还含有戊糖、糖醛酸等^[8],所以蒽酮-硫酸法测得的值偏低。但是样品中多糖浓度高时,情况正好相反。这时由于细胞过多破碎,胞内大量的蛋白质、核酸进入样品液,而其中的色氨酸等氨基酸会对蒽酮-硫酸试剂的显色反应产生一定干扰^[13],从而使测得的多糖值偏高 25%—60%。因此,选择苯酚-硫酸法来测定样品液的多糖有更多的优点。

4 种泥样的 6 种提取方法测得多糖的浓度顺序为:NaOH 提取法>蒸煮法>沸苯法>EDTA 法>硫酸法>蒸馏水法;测得的核酸含量顺序为:EDTA 法>NaOH 法>蒸煮法>沸苯法>硫酸法>蒸馏水法。其相对大小可用图 1、2 表示。需要指出,EDTA 或由其形成的络合物可能在 260nm 紫外光有较大的吸光度,使得核酸值偏差很大。

比较 6 种提取方法,NaOH 法和蒸煮法提取的 ECP 比较多,但相应测出的核酸值也很大,说明细胞破坏得较为严重,测得的多糖不仅有胞外成分,细胞内的多糖也占很大比例,结果很不可靠。沸苯提取法测得的核酸浓度比蒸馏水法大

表 3 测定结果

泥样 编号	提取方法	苯酚-硫酸法		蒽酮-硫酸法		紫外吸收法	
		多糖值 (mg/gVSS)	相对标准偏差 (%)	多糖值 (mg/gVSS)	相对标准偏差 (%)	核酸值 (mg/gVSS)	相对标准偏差 (%)
1	蒸馏水	5.49	43.5	3.95	93.8	8.62	11.7
	硫酸	12.99	6.5	12.13	25.3	20.20	10.8
	EDTA	20.92	15.7	18.76	24.1	204.7	5.9
	沸苯	19.89	15.9	27.62	32.1	33.5	19.0
	NaOH	28.75	8.8	40.82	10.7	72.22	10.7
	煮沸	35.47	13.1	62.48	21.8	99.74	25.6
2	蒸馏水	6.19	39.6	3.60	61.7	11.80	9.3
	硫酸	15.82	20.6	22.90	13.4	29.90	18.5
	EDTA	18.05	13.9	19.22	22.7	142.35	7.9
	沸苯	24.74	17.6	33.16	17.7	55.71	6.4
	NaOH	31.73	20.4	40.44	14.7	86.50	15.0
	煮沸	24.54	11.2	23.94	15.6	74.26	11.9
3	蒸馏水	8.18	8.5	7.25	9.9	14.18	4.6
	硫酸	21.01	8.0	17.22	8.5	33.28	8.2
	EDTA	19.30	3.9	27.19	6.0	154.7	15.1
	沸苯	28.33	2.3	22.85	8.2	64.37	8.2
	NaOH	53.09	5.7	40.82	6.4	130.73	5.0
	煮沸	42.24	7.1	59.24	8.7	71.66	8.9
4	蒸馏水	19.73	13.3	14.22	18.4	43.71	20.9
	硫酸	34.68	4.9	47.30	1.9	73.56	8.6
	EDTA	30.59	10.1	40.07	9.2	250.00	8.2
	沸苯	38.58	16.7	66.39	8.4	95.05	11.8
	NaOH	61.02	6.2	88.70	9.8	117.74	8.7
	煮沸	48.16	11.8	81.22	15.7	75.4	14.6

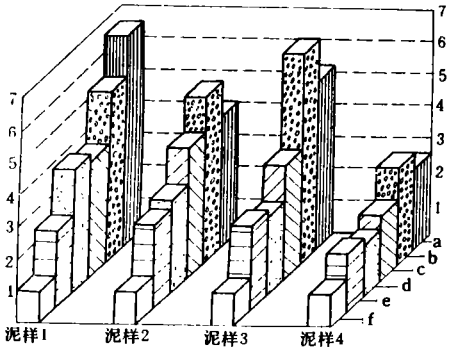


图 1 多糖相对值
a. 煮沸法 b. NaOH 法 c. 沸苯法
d. EDTA 法 e. H₂SO₄ f. 蒸馏水法

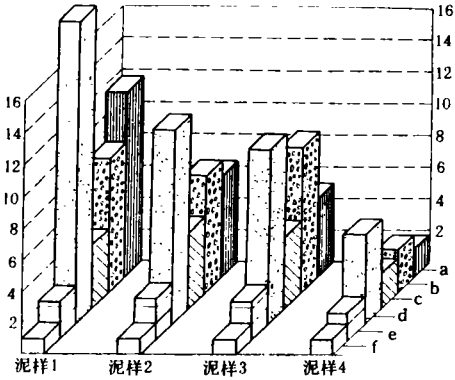


图 2 核酸相对值
a. 煮沸法 b. NaOH 法 c. 沸苯法
d. EDTA 法 e. H₂SO₄ f. 蒸馏水法

2—3 倍,说明仍有大批细胞被破坏。比较起来,蒸馏水提取 ECP,测得的核酸值及多糖值均最小,数据的波动性很大,相对标准偏差达 40%,可能是蒸馏水不能较完全地提取 ECP。虽然这种方法对细胞的破坏性最小,但还是很少有人用它

来提取 ECP^[5]。
用 EDTA 法测得的核酸浓度特别大,往往要稀释才能测出。但据报道,此法对细胞的破坏较小^[3],可能是 EDTA 与污泥中的金属离子形成络

合物,在 260nm 波长做紫外吸收有较高干扰的结果。

用硫酸提取 ECP 测得的多糖与核酸浓度与蒸馏水提取法相比,均高 1—2 倍,说明两者提取物的组分是相似的,对细胞的破坏都较小。

蛋白质和核酸都是 ECP 的成分^[2],提取液中核酸浓度的升高可能是 ECP 提取得多,也可能由于细胞的胞内物质破碎而渗出。如果是前者,那么对于同一种污泥核酸和多糖浓度的比值应该是变的。表 4 中列出 3 种污泥 ECP 中核酸和多糖的比值。蒸馏水和硫酸提取法具有十分相近的比值,而其余 3 种方法显然比值增大。

表 4 提取液中核酸和多糖的比值

泥样 编号	提取法				
	蒸馏水法	硫酸法	沸苯法	NaOH 法	蒸煮法
1	1.57	1.56	1.68	2.51	2.81
2	1.90	1.93	2.25	2.73	3.02
3	1.73	1.58	2.27	2.46	1.70

如果这种假设是成立的,以上结果就比较容易解释:细胞质和细胞核主要成分是水、蛋白质、核酸、脂类,细胞质内的某些主要结构,如核糖体、质粒等也主要是由蛋白质和核酸组成,糖类作为营养碳源贮备只占很小的比例^[15],所以细胞破碎后有大量的核酸放出而仅有少许糖类溶于提取液,因而造成核酸和多糖比值升高,破碎程度越大,比值越高。

鉴于以上分析,可以认为硫酸提取法提取的 ECP 比较完全,对细胞的破坏程度较小,是一种较好的提取厌氧污泥胞外多聚物的方法。

3 分析和讨论

厌氧污泥和好氧活性污泥 ECP 提取相比有 2 点明显不同:①Brown 和 Lester 认为对活性污泥很有效的提取方法是蒸煮法^[1],而这种方法对厌氧细菌却有较强的破坏作用;②粗略估算一下,本试验絮状厌氧污泥 ECP 含量不会超过 50mg ECP/g SS (以蛋白质:多糖 = 1.5 : 1^[3], VSS/SS = 0.7 估算),小于活性污泥的数值(70—90mg ECP/g SS)^[3]。

ECP 由细胞内合成,分泌后粘附在细胞壁外部,故其提取方法和细胞壁结构有很大关系。一种类脂载体分子(十一异戊二烯磷酸酯)和肽聚糖的合成有密切关系,这种载体能把合成肽聚糖的前体物运出细胞膜,并且释放出多糖。而产甲烷菌细胞内恰恰缺少这种载体分子^[3],所以和活性污泥中大多数原核微生物不同,产甲烷菌的细胞壁中不含有肽聚糖,而是由多肽球囊或蛋白外鞘构成细胞壁^[15]。蒸煮这种剧烈的处理使产甲烷菌的细胞壁承受不住,而活性污泥菌体含有较致密肽聚糖的细胞壁却能保存完好。所以提取厌氧污泥的 ECP 应采用更温和的方法。

同样,ECP 的化学成分的不同也和细胞壁关系密切。好氧活性污泥中的细菌多数是革兰氏阴性菌^[6],由内壁层和外壁层构成的复杂细胞壁,致使蛋白质、核酸等大分子物质难以通过,造成胞外多糖在 ECP 中占主要成分。产甲烷菌细胞壁结构松散,允许蛋白质、核酸分泌于胞外,由于缺少类脂载体,不能分泌大量的多糖,所以造成 ECP 含量少,且以蛋白质、核酸为主要成分。

参考文献

- 1 Brown M J and J N Lester. Wat. Res. . 1979,13:817
- 2 Goodwin J A S and C F Forster. Wat. Res. . 1985,19:527
- 3 Morgan J W et al. . Wat. Res. . 1990,24:743
- 4 Nishikawa S and M Kuriyama. Wat. Res. . 1968,2:811
- 5 Novak J T and B E Haugan. Jour. Wat. Pollut. Control Fed. . 1981,53:1420
- 6 Pike E B and E G Carrington. Wat. Pollut. Control. 1972,71:583
- 7 Sandford P A and H E Conrad. Biochemistry. 1966,5:1508
- 8 Steiner A E et al. . Appl. Environ. Microbiol. . 1982,43:1151
- 9 Tezuka Y. J. Wat. Pollut. Control Fed. . 1973,45:531
- 10 Wallen L L and E N Davis. Wat. Sci. Tech. . 1972,6:161
- 11 刘双江. 升流式厌氧污泥层反应器内颗粒污泥形成过程中的微生物学研究. 清华大学博士论文,1990:89—93
- 12 周琪. 升流式厌氧污泥层反应器处理生活污水工艺和机理研究. 清华大学博士论文,1993:77—80
- 13 (日)微生物研究法讨论会. 微生物学实验法. 北京:科学技术出版社,1981:199—200
- 14 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京:人民教育出版社,1981:218—219
- 15 武汉大学、复旦大学生物系. 微生物学. 北京:高等教育出版社,1987:12—53

Experiment-based Evaluation of the Materials for Removal of Fluorides from Drinking Water. Qu Changling et al. (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(4), 1994, pp. 19—22

The optimum conditions for polyaluminum species, CF-1 and PC85-3 to remove fluorides from drinking water, such as pH value, ageing and agitation, were compared in detail and activated alumina, bone carbon and UR-3700 chelate resin were tested for their equilibrium capacity of fluoride removal, the effect of water hardness, etc. The results show that polyaluminum species, CF-1 and PC85-3 removed the excessive fluorides from drinking water to an acceptable level for drinking use but had limited applications. Activated alumina and bone carbon were more effective filters for removing fluorides from drinking water. The optimum pH values for the fluoride removal by polyaluminum species were 6—7. The efficiency of fluoride removal was the same at water temperatures ranged from 10—30 °C. The stirring time of 1—3 min and agitation time of 10—15 min were satisfactory for fluoride removal from drinking water. The equilibrium capacity of fluoride removal for activated alumina was 0.89—1.75 mg/g. The efficiency of fluoride removal was related to pH, concentration of fluoride, salinity and hardness. **Key words:** fluoride removal, polyaluminum, activated alumina, bone carbon, drinking water.

Selection of the Methods for Extraction and Determination of Extracellular Polymers from Anaerobic Sludge. Liu Zhijie et al. (Dept. of Environ. Eng., Tsinghua University, Beijing 100084); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(4), 1994, pp. 23—26

Extracellular polymers (ECPs) were extracted from 4 kinds of anaerobic sludge by using 6 different ECPs extracting processes, i. e., sulfuric acid process, sodium hydroxide process, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) process, boiling benzene process, distilled water process and steaming process, which have been used to extract ECPs from activated sludge. The concentrations of polysaccharides in the extracts were determined by both the phenol-sulfuric acid method and the anthrone-sulfuric acid method, and the concentrations of nucleic acid were also measured to examine the degree of cells damaged. The results show that the sulfuric acid process can extract more ECPs from anaerobic sludges, with a less degree of damage to cells, than other processes. The phenol-sulfuric acid method was found more suitable to measure the concentration of polysaccharide. The level and composition of ECPs in anaerobic sludges were also discussed.

Key words: anaerobic sludge, extracellular polymer, extraction method, sulfuric acid process for ECP

Levels of Mercury in Soil and Their Geographical Distribution in Tibet. Zhang Xiaoping et al. (Changchun Institute of Geography, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130021); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(4), 1994, pp. 27—30

205 Samples of soil were taken from different sites in Tibet and analysed for their levels of mercury in soil. The data obtained were processed by using a method for mathematical programming statistics on a microcomputer and making some related computations. The results show that the average level of mercury in soils from Tibet was 0.021 mg/kg and significantly lower than the average national level of 0.04 mg/kg. The level of mercury in soil was distributed in Tibet with a total trend of gradually decreasing from the southeast to the northwest that was consistent with the direction of changes in the zonal successions of vegetation and soil in Tibet. The level of mercury was closely related to the basic attributes of soil and mercury tends to be concentrated up to the organic matter and glutinous grains of soil.

Key words: mercury, soil, Tibet.

Study on the Treatment of Dye-stuff Wastewater with an Anaerobic/Aerobic Process. Zhu Jianrong et al. (Dept. of Environ. Eng., Tsinghua University, Beijing 100084); *Chin. J. Environ. Sci.*, 15(4), 1994, pp. 31—34

The results were reported from a study on the treatment of dye-stuff wastewater by using an anaerobic/aerobic process, wherein the anaerobic stage was carried out in a UASB reactor and the aerobic stage was using a conventional activated sludge process. The results show that with a raw dye-stuff wastewater of 1150—1300 mg COD/L and 500 fold colourity (a colour scale meant by the number of dilution times leading to a colour that seems to be the colour of tap water) under the condition of HRT 6—10 h at the anaerobic stage, the COD removal was more than 60% and the colourity was reduced to 50—100 folds. If followed by an additional 6 h aeration treatment, the total COD removal was up to 85%—90% and the colourity was further reduced to about 20 folds. The spectrometric analyses of influent and effluent revealed that the decolouration of dye-stuff wastewater mainly took place at the anaerobic stage and was achieved through biological degradation. It was concluded that the anaerobic/aerobic process was a cost-effective way to treat a dye-stuff wastewater and was of a great value of practical application.

Key words: dye-stuff wastewater, UASB reactor, activated sludge process, COD removal, decolouration.

Study on the Total Mercury and Methyl Mercury Contaminations in Fish from the Songhuajiang