

活性污泥胞外聚合物提取条件的优化

唐金花^{1,2}, 许国仁¹, 萧静¹, Ludovico Spinoso³, 李圭白¹

(1. 哈尔滨工业大学, 黑龙江哈尔滨 150001; 2. 黑龙江东方学院, 黑龙江哈尔滨 150001; 3. 巴里技术大学, 意大利塔兰托 74100)

摘要 目的 探索活性污泥胞外聚合物(EPS)提取的最佳条件。方法 比较研究了5种方法(H_2SO_4 法、甲醛-NaOH法、搅拌法、热提法和NaOH法)对活性污泥EPS的提取效果,同时确定了最适提取方法的最优提取条件。结果 5种提取方法中NaOH法因其提取的DNA含量较少,提取时间较短而比较适宜。以NaOH法提取EPS,在pH为11,提取时间为10 min,搅拌速度在80~120 r/min下提取效率最高。结论 确定EPS的最适提取条件可为其研究提供理论基础。

关键词 活性污泥; 胞外聚合物; 提取

中图分类号 X703 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2012)06-03505-03

Optimization of Extraction Condition of Extracellular Polymeric Substances from Activated Sludge

TANG Jin-hua et al (1. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150001)

Abstract [Objective] To explore the optimal extraction conditions of extracellular polymeric substances (EPS) from activated sludge.

[Method] The efficiency of five methods (H_2SO_4 , formaldehyde-NaOH, mixing, heating and NaOH) on the extraction of EPS was investigated comparatively. The optimal extraction conditions of the most suitable method were determined. [Result] NaOH method is the most effective in extracting EPS as DNA was less and the extraction time was shorter. The optimal extraction condition was pH of 11, extraction time of 10 minutes and agitation speed of 80–120 r/min. [Conclusion] The determined optimal extraction condition provided theoretical basis for EPS study.

Key words Activated sludge; Extracellular polymeric substances (EPS); Extraction

活性污泥胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)是活性污泥细胞外的高分子聚合物,来源于细胞的分泌溶解、大分子水解以及废水中吸附的有机物^[1],主要由多糖、蛋白质、核酸、腐殖质及脂质等组成,其中作为主要组分的糖类和蛋白质目前研究最广。EPS是除细胞和水分以外的第三大类活性污泥组成物质^[2],且属于阻碍污泥高效减容和资源利用的关键物质,因此,它是优化废水生物处理工艺、控制剩余活性污泥污染、促进剩余活性污泥资源利用的重要研究对象之一^[3-4]。由于目前采用的EPS提取方法多种多样,且不同研究人员由于研究目的、研究方向及研究手段的不同而采取不同的提取方法,因此各研究所得结果也不尽相同。目前常见的物理提取方法有高速离心、超声波和热提取等,化学方法有NaOH提取、EDTA提取、阳离子交换树脂提取、甲醛提取、戊二醛提取以及一些不同化学试剂的组合提取等。为进一步明确提取方法的特点和对EPS组成的影响,笔者考察了5种方法(H_2SO_4 法、甲醛-NaOH法、搅拌法、热提法和NaOH法)对活性污泥EPS的提取效果,同时对比分析了各提取方法的特点和对EPS组分(糖和蛋白质)的影响,以期对EPS研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 试验污泥取自哈尔滨文昌污水处理厂曝气池。在实验室条件下采用间歇曝气培养,试验用水取自哈尔滨工业大学二校区生活小区污水,污泥浓度为2~4 g/L。

1.2 方法

1.2.1 EPS提取液的选择。取污泥样品50 ml,在4 000 r/min下离心5 min,弃上清。称取湿泥5 g,分别加入去离子水、0.9% NaCl和缓冲溶液(含2 mmol/L Na_3PO_4 、4 mmol/L NaH_2PO_4 、9 mmol/L NaCl和1 mmol/L KCl, pH 7.0)恢复体积至50 ml,再将此样品在7 300 r/min(6 000 g)下离心5 min,弃上清,以此洗去聚合物中的粘液。再次用去离子水、0.9% NaCl和缓冲溶液定容至50 ml,按照下述NaOH法对EPS进行提取。

1.2.2 EPS的提取方法筛选。

(1) H_2SO_4 法:加入8%的 H_2SO_4 溶液50 ml,用磁力搅拌器在300 r/min下搅拌1 h,再在7 300 r/min下离心10 min,过0.45 μm 滤膜待用。

(2) 甲醛-NaOH法:加入甲醛0.15 ml,搅拌30 min后加入0.04%氢氧化钠50 ml,用磁力搅拌器在300 r/min下搅拌1 h。于7 300 r/min下离心10 min,过0.45 μm 滤膜待用。

(3) 搅拌法:加入0.9% NaCl溶液50 ml,用磁力搅拌器高速搅拌1 min。于7 300 r/min下离心10 min,过0.45 μm 滤膜待用。

(4) 热提法:加入0.9% NaCl溶液50 ml,放入80℃水浴中提取30 min,在7 300 r/min下离心10 min,过0.45 μm 滤膜待用。

(5) NaOH法:加入0.9% NaCl溶液50 ml,用1 mol/L NaOH将pH调至11,再慢速搅拌10 min,7 300 r/min下离心10 min,过0.45 μm 滤膜待用。

(6) 对照法:加入去离子水50 ml,用磁力搅拌器在300 r/min下搅拌1 h,再在7 300 r/min下离心10 min,过0.45 μm 滤膜待用。

基金项目 国家“863”重点项目(2009AA064704);国家自然科学基金重点项目(51038003);教育部新世纪优秀人才计划(NCET-08-161)。

作者简介 唐金花(1981-),女,吉林舒兰人,讲师,博士研究生,从事水处理研究,E-mail: hit102tjh@yahoo.cn。

收稿日期 2011-11-15

1.2.3 EPS 组分分析方法。EPS 提取量以 DNA、多糖和蛋白质含量之和来表征,提取方法对污泥细胞的破坏程度以核酸含量来表征。多糖采用蒽酮法测定,以葡萄糖作为标准品^[8];蛋白质采用 Lowry 法测定,以牛血清蛋白为标准品^[9];DNA 采用紫外吸收法测定^[10],测定溶液在 260 nm 的吸光度, DNA 浓度(mg/L) 的计算公式为 $\rho_{\text{DNA}} = A_{260} / 0.020$ 。

2 结果与分析

2.1 不同提取液对 EPS 提取的比较分析 对于 EPS 提取过程所用的提取液,有的文献报导选用蒸馏水或去离子水^[8],有的选用低浓度 NaCl 溶液^[9],有的则选用缓冲溶液^[10]。选用的提取液不同,对 EPS 各组分提取结果也不尽相同。文中分别采用去离子水、0.9% NaCl 和缓冲溶液作为提取液,三者对 EPS 各组分提取效果见图 1。

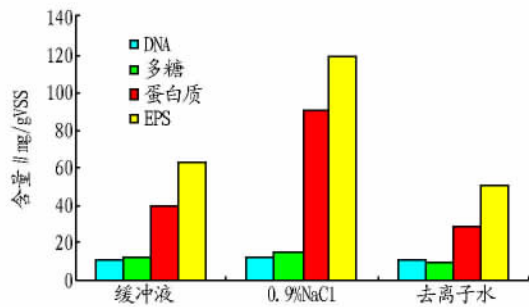


图1 不同提取液对 EPS 提取效果的影响

从图 1 可见,不同提取液对 EPS 各组分提取效果影响很大。其中 0.9% NaCl 溶液所提取的 EPS 总量高达 117.3 mg/g VSS,而缓冲溶液及去离子水所提取 EPS 的量分别为 63.4 和 51.2 mg/g VSS,仅为 0.9% NaCl 溶液所提取的 54.0% 和 43.6%。同样,0.9% NaCl 溶液所提取的蛋白质质量也远高于另外 2 种提取液。对于多糖的提取,0.9% NaCl 溶液虽然也比缓冲液及去离子水的提取效率高,但并不十分明显。EPS 中 DNA 的主要来源是破裂的细胞,因此常用 DNA 作为判断胞内物质破坏程度的指标^[10]。图 1 中 0.9% NaCl 溶液、缓冲溶液及去离子水所提取的 DNA 量分别为 12.8、10.9 和 11.4 mg/g VSS,分别占所提取 EPS 总量的 10.9%、17.2% 和 22.3%,可见虽然 0.9% NaCl 溶液提取的 DNA 含量略高,但所占 EPS 总量的百分率最低。综合上述结果,选用 0.9% NaCl 溶液作为 EPS 的提取液。

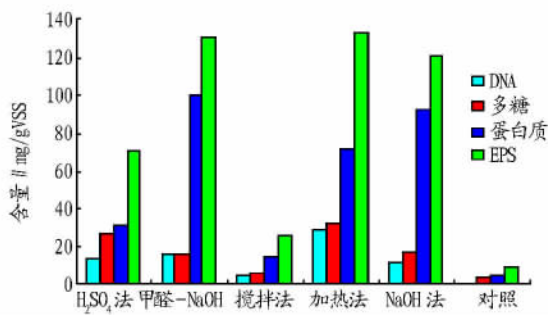


图2 不同提取方法对 EPS 提取效果的影响

2.2 不同提取方法对 EPS 提取的比较分析 由图 2 可知,

对照方法的提取产量最低,提出的 EPS 总量仅为 8.5 mg/g VSS,同时该方法所提取的 DNA 含量也最低,为 0.7 mg/g VSS。虽然该方法提取效率低,与 EPS 中 DNA 的实际含量可能相差甚远,但由于其提取步骤温和,无大量细胞自溶现象发生,结果能较好地反映污泥中 EPS 的相对组成,可作为细胞自溶程度的评价依据。其余方法提取出的 DNA 比例都高于对照值,这可能是由于提取过程中对细胞造成了或多或少的损坏。在这 5 种提取方法中,热提法所提取的 EPS 总量最高,其次为甲醛-NaOH 法,再次为 NaOH 法,H₂SO₄ 法提取效率较低,而搅拌法最低。比较几种提取方法所提取的 DNA 含量可以看出,尽管搅拌法所提取的 DNA 最少,效果较为温和,但其对多糖、蛋白质及 EPS 总量的提取效率均为最低。而热提法所提取的多糖及 EPS 总量在 5 种方法中均为最高,但其提取的 DNA 含量也为最高,达到了 28.6 mg/g VSS,可见此方法造成的细胞自溶较为严重。甲醛-NaOH 法和 NaOH 法对 EPS 均有较高的提取率,这是因为 NaOH 会导致溶液 pH 增加,从而加强 EPS 酸性基团的分离和带负电荷 EPS 分子之间的排斥,因此增加了 EPS 在水中的溶解性,易于提取更多的 EPS^[10]。相比较而言,甲醛-NaOH 法较 NaOH 法提取的 EPS 总量略高,同时所提取的 DNA 也较 NaOH 法提取的略高,说明其提取过程对细胞造成的损害也略高于 NaOH 法。另外,从提取方法可见,甲醛-NaOH 法是首先加入甲醛,搅拌 30 min 后加入 NaOH 再搅拌 1 h,而 NaOH 法则只需用 NaOH 将 pH 调至 11,再慢速搅拌 10 min 即可,在提取时间上远优于甲醛-NaOH 法,因此该试验 EPS 的提取选用 NaOH 法。

2.3 NaOH 法提取条件下不同影响因素对 EPS 及各组分的影响

2.3.1 不同 pH 对 EPS 及各组分的影响。调节污泥的 pH 值分别为 7、8、9、10、11、12,以 NaOH 法在 80 r/min 下搅拌 10 min 对 EPS 进行提取。

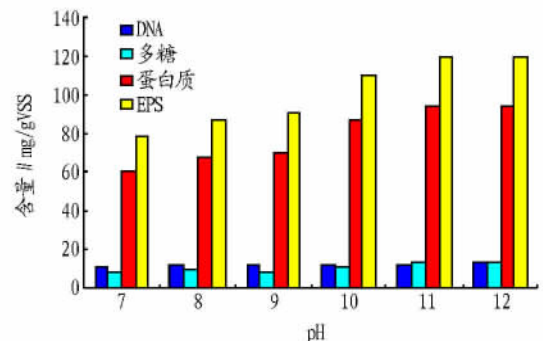


图3 不同 pH 对 EPS 提取效果的影响

从图 3 可以看出,随着 pH 增加,EPS 的提取效率逐渐增加。当 pH=7 时,EPS 的提取效率最低,仅为 79 mg/g VSS,其中多糖为 8.2 mg/g VSS,蛋白质为 60.5 mg/g VSS, DNA 为 10.3 mg/g VSS,与 pH=11 时的提取量 119.1 mg/g VSS 相比,下降了 33.7%,其中多糖下降了 37.9%,蛋白质下降了 35.8%,DNA 下降了 11.2%; pH=8、pH=9 和 pH=10 时,EPS 的提取效率较 pH=11 时分别下降了 30.0%、24.3% 和 8.1%。pH=12 时 EPS 提取效率为 119.4 mg/g VSS,与 pH=

11 时相差不多,其中多糖为 12.8 mg/g VSS,蛋白质为 94 mg/g VSS, DNA 为 12.6 mg/g VSS。

总体来看,pH 值极大地影响着 EPS 的组分。随着 pH 值的升高,多糖和蛋白质的浓度均上升,EPS 的提取效率呈上升趋势。分析认为,该趋势可能导致 EPS 中带负电的功能基团(如氨基酸、羧基、磷酸基等)浓度升高,从而使 EPS 表面负电荷增多,最终影响污泥特性。

2.3.2 不同提取时间对 EPS 及各组分的影响。调节 pH 值为 11,以 NaOH 法在 80 r/min 下对 EPS 进行提取,不同提取时间对 EPS 提取效果的影响见图 4。

从图 4 可以看出,提取的前 10 min 内多糖及蛋白质含量均增长较快,此后多糖和蛋白质含量逐渐趋于稳定,而 DNA 含量则随着提取时间增加而略微上升。因此确定 10 min 为

最佳提取时间,在此条件下 EPS 的提取效率为 117.1 mg/g VSS,其中多糖、蛋白质和 DNA 的提取量分别为 14.5、90.5 和 12.1 mg/g VSS。

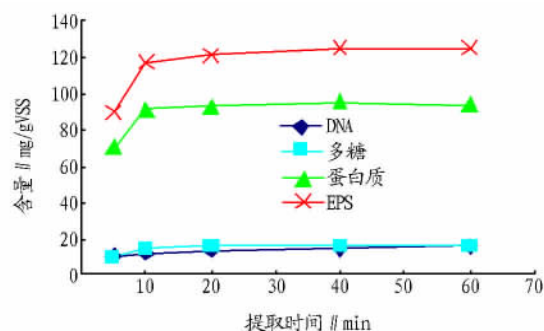
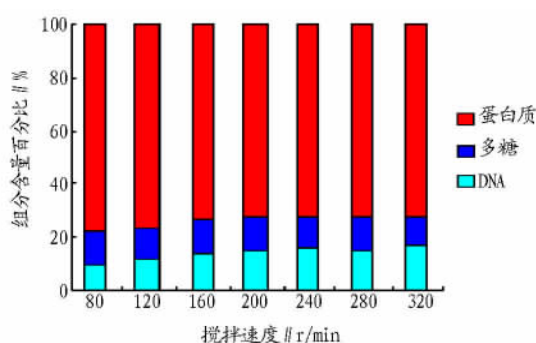
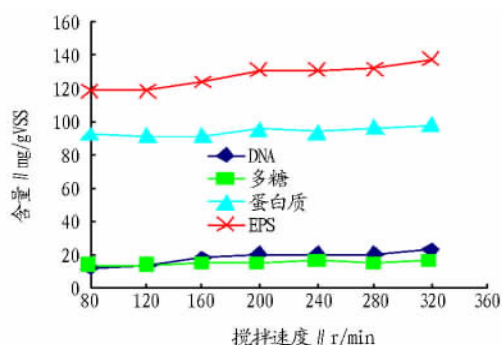


图 4 不同提取时间对 EPS 提取效果的影响



注: a. 搅拌速度对 EPS 及各组分含量的影响; b. 搅拌速度对各组分所占总 EPS 总量比例的影响。

图 5 不同搅拌速度对 EPS 提取效果的影响

2.3.3 不同搅拌速度对 EPS 及各组分的影响。调节 pH 值为 11,以 NaOH 法在不同速度下搅拌 10 min 对 EPS 进行提取,搅拌速度对 EPS 提取效果的影响见图 5。

由图 5a 可见,随着搅拌速度的增加,EPS 的提取效率有所增加,其中多糖和蛋白质含量有所波动,但整体呈略微上涨趋势。相比于 80 r/min 下 EPS 总量的 117.4 mg/g VSS,在 320 r/min 下 EPS 总量为 137 mg/g VSS,上升了 14.3%。其中多糖含量为 16 mg/g VSS,上升了 15%,蛋白质含量为 98 mg/g VSS,上升了 6.1%。而 DNA 含量则达到 23 mg/g VSS,上升了 48.7%。图 5b 则更清楚地呈现出搅拌速度对 EPS 各组分所占比例的影响,其中 DNA 所占比例随着搅拌速度的增加而明显增加,在 80 r/min 下占总 EPS 的 10.1%,在 120 r/min 下占 11.2%,在 160 r/min 下占 14.2%,而到 300 r/min 时则占到总 EPS 的 16.8%。

评价分离提取方法对细胞的损害程度通常以 EPS 中蛋白质或 DNA 的相对含量作为检验标准。从图 5 可见,虽然随着搅拌速度的增加 EPS 的提取效率略微有所增加,但其中 DNA 含量的增加更为明显,表明较高的转速对细胞的破坏程度也较大,因此选用低于 120 r/min 的搅拌速度更适于 NaOH 法提取 EPS。

3 结论与讨论

(1) 不同的提取液对 EPS 提取效果影响显著,0.9% NaCl 溶液所提取的 EPS 总量高达 117.3 mg/g VSS,而缓冲溶液及

去离子水所提取的 EPS 量仅为 0.9% NaCl 溶液所提取的 54.0% 和 43.6%;同时 0.9% NaCl 溶液提取的 DNA 所占 EPS 总量的百分率为三者中最低。

(2) 比较 5 种提取方法对 EPS 总量及各种组分提取效率可见,NaOH 法因其提取的 DNA 含量较少,提取时间较短而较为适宜。

(3) 以 NaOH 法提取 EPS,随着 pH 值的升高,多糖和蛋白质的浓度均上升,EPS 的提取效率呈上升趋势。提取作用主要发生在前 10 min,在此时间内多糖及蛋白质含量增长均较快,此后逐渐趋于稳定。搅拌速度对 EPS 组分中 DNA 的提取影响更大,在 120 r/min 下所提取的 DNA 占总 EPS 的 11.2%,而到 320 r/min 时则占总 EPS 的 16.8%,这表明较高的搅拌速度对细胞的破坏程度较大,因此低于 120 r/min 的搅拌速度更适于 NaOH 法提取 EPS。

参考文献

- MORGAN J N, FORSTER C F, EVISON L. A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges [J]. Water Res, 1990, 24(6): 743-750.
- FROLUND B, PALMGREN R, KEIDING K, et al. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater [J]. Water Res, 1994, 28(2): 251-261.
- CLOETE T E, OOSTHUIZEN D J. The role of extracellular exopolymers in the removal of phosphorus from activated sludge [J]. Wat Res, 2001, 35: 3595-3598.
- 郑蕾, 田禹, 孙德智, 等. 活性污泥胞外聚合物提取方法研究 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, 11(7): 32-34.

(下转第 3535 页)

4 植物群落对湿地水环境净化效果的影响因素分析

湿地水生植物研究表明,恢复沉水植物可以快速改善水质,但是,影响沉水植物生长的因子很多,风浪、沉积物、光照和透明度、温度、氧化还原环境、营养盐和鱼的牧食等都会对沉水植物产生影响,从而最终影响植物群落对湿地水环境的净化效果。

温度。温度是影响沉水植物繁殖体发芽和幼苗生长的重要因素。季高华等^[1]发现苦草种子在水温 18~22℃ 时,经 4~5 d 开始发芽,约 15 d,出苗率可达 98% 以上,温度为 20℃ 时,发芽率达到最高。苏胜齐等^[13]研究表明水温为 10~35℃ 时,菹草顶枝光合作用净产氧量、毛产氧量都与温度呈曲线相关,20℃ 附近菹草光合作用产氧量最高,其适宜的生长温度为 15~25℃。

光照。湖泊中决定沉水植物能否生长的关键是水体的光照条件,光合作用是沉水植物最重要的代谢活动。以太湖五里湖为例^[13],2002 年对全湖进行了疏浚,平均水深达到 2.1 cm,离岸 5~25 m 处的水深已达 1.6~2.1 m,几乎都在透光层以下,沉水植物无法生存。

藻类和沉水植物之间的竞争。富营养化的湖泊中,藻类暂居优势,如果将沉水植物直接栽种下去,对沉水植物非常不利。绝大多数藻类漂浮在沉水植物的上层,它们比沉水植物更易获得光照。由于藻类对光线的吸收和散射,会使得湖泊的透光层变得很浅,从而降低光合作用影响沉水植物生长。

营养盐浓度。目前报道出现蓝藻水华的湖泊,其营养盐浓度范围大致相近,即 TN 在 1~10(20) mg/L,TP 在 0.01~0.1(0.2) mg/L^[14]。用氮磷比可以判断其中起限制作用的营养元素。如果一个湖泊的营养盐浓度在该范围以外,蓝藻水华就很难发生。根据我国湖泊和美国 Okeechobee 湖资料,确定了控制藻类暴发的总磷阈值为 0.035 mg/L,总氮阈值为 0.350 mg/L(滇池)和 1.050 mg/L(太湖)^[14]。

沉积物。沉积物不但提供沉水植物的附着基质,还供应沉水植物生长发育所需的大量元素,其理化性质对沉水植物有不可忽视的影响^[13]。随着沉积物深度增加,沉积理化性质对沉水植物的生长影响逐渐减弱。沉水植物繁殖体基本分布在沉积物的表层,为满足植物体营养需求和植株固定,根系不断向下发展,但表层沉积物对沉水植物早期的萌发和生长起决定作用。

水位。湖泊水位变动是影响湖泊生态系统长期状态变化的最主要因素^[14]。湖泊水位变动的影响可涵盖从植物个体到种群和群落分布这一连续过程,但其影响因物种而异,主要表现为 2 方面:①直接影响,表现在对水生生物生长及

对种群间竞争关系的影响;②间接影响,由于水位变化导致了水体中的物化条件,如透明度、浊度、盐度、pH、悬浮与沉降以及 DO 等发生变化,对那些以水生植被为食的生物产生了影响,进而间接地减小或增大了水生植被啃食的压力,改变了水生植被的时空分布。

5 结论

水生植被在洪泽湖湿地水质保护及恢复中有十分重要的作用。其对洪泽湖湿地水环境中 TN、TP、COD、Chla 的去除作用和对 SD 含量变化影响较明显,水生植物之间的竞争可以抑制藻类的生长,减轻水体的富营养化情况。

水生植被对湖泊湿地水环境的净化效果受多种因素影响,如湖水温度、湖泊水位、沉积物、光照、湖泊营养盐浓度以及湖泊中藻类繁殖程度。但该研究未就影响因子对水生植被净化效果的影响程度作定量分析,该工作有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] SCHEFFER M. Ecology of Shallow Lakes [M]. London: Chapman and Hall, 1998: 259~286.
- [2] 吴建强,阮晓红,王雪. 人工湿地中水生植物的作用和选择 [J]. 水资源保护, 2005, 21(1): 1~6.
- [3] 李文朝. 五里湖营养化过程中生物及生态环境的演变 [J]. 湖泊科学, 1996, 8(1): 37~45.
- [4] 连光华,张圣照. 伊乐藻等水生高等植物的快速营养繁殖技术和栽培方法 [J]. 湖泊科学, 1996, 8(1): 11~17.
- [5] KOSZ M. Valuing riverside wetlands: the case of the "Donau-Auen" national park [J]. Ecological Economics, 1996, 16(2): 109~127.
- [6] 俞子文,孙文浩,郭克勤,等. 几种高等水生植物的克隆效应 [J]. 水生生物学报, 1992, 16(1): 1~7.
- [7] 唐述虞,吴博成,宋正达,等. 金属矿酸性废水的湿地生态工程处理研究 [J]. 中国环境科学, 1993, 13(5): 356~360.
- [8] 陈开宁,包先明,史龙新,等. 太湖五里湖生态重建示范工程——大型围隔试验 [J]. 湖泊科学, 2006, 18(2): 139~149.
- [9] 国家水产部长江水产研究所等. 洪泽湖渔业自然资源综合调查报告 [J]. 1960.
- [10] 洪泽湖渔业史编写组. 洪泽湖渔业史 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1990.
- [11] 季高华,李燕,王丽卿. 光照对苦草种子发芽和生长的影响 [J]. 科学通报, 2006(7): 43~44.
- [12] 苏胜齐,沈鑫绿,唐洪玉,等. 温度光照和 pH 对菹草光合作用的影响 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(6): 532~537.
- [13] CHEN K N, BAO C H, ZHOU W P. Ecological restoration in eutrophic Lake Wuli: a large enclosure experiment [J]. Ecological Engineering, 2009, 35: 1646~1655.
- [14] 秦伯强. 长江中下游浅水湖泊富营养化发生机制与控制途径初探 [J]. 湖泊科学, 2002, 14(3): 193~202.
- [15] 濮民,李正魁,王国祥. 提高水体净化能力控制湖泊富营养化 [J]. 生态学报, 2005, 25(10): 2757~2763.
- [16] 秦伯强. 湖泊生态恢复的基本原理与实现 [J]. 生态学报, 2007, 27(11): 4848~4859.
- [17] NÉGES T, NÉGES P. The effect of extreme water level decrease on hydrochemistry and phytoplankton in a shallow eutrophic lake [J]. Hydrobiologia, 1999, 409: 277~283.
- [18] 黄兴,孙宝盛,吕英. MBR 中活性污泥胞外聚合物的物理提取方法研究 [J]. 中国给水排水, 2009, 25(5): 80~84.
- [19] 葛利云,王红武,马鲁,等. 胞外聚合物物理法提取过程的优化 [J]. 环境化学, 2006, 25(6): 722~725.
- [20] 邹小玲,许柯,丁丽丽,等. 不同状态下的同一污泥胞外聚合物提取方法研究 [J]. 环境工程学报, 2010, 4(2): 436~440.
- [21] FROLUND B, PALMGREN R, KEIDING K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin [J]. Water Res, 1996, 30(8): 1749~1758.
- [22] RAUNKJAR K, HVIETED J T, NIELSEN P H. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater [J]. Water Res, 1994, 28(2): 251~261.
- [23] 李如亮,王延枝,张楚富,等. 生物化学实验 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1998.

(上接第 3507 页)