

doi:10.3963/j.issn.1671-4431.2013.02.025

## 反硝化除磷菌胞外聚合物的提取及除磷研究

张倩<sup>1</sup>,李孟<sup>1</sup>,王弘宇<sup>2</sup>,杨开<sup>2</sup>,章彩霞<sup>1</sup>,张超<sup>1</sup>,朱晓云<sup>1</sup>

(1. 武汉理工大学土木工程与建筑学院,武汉 430070;2. 武汉大学土木建筑工程学院,武汉 430072)

**摘要:** 采用4种方法对反硝化除磷菌 ZQN4 的胞外聚合物进行了提取试验研究。结果表明,试验中超声波法是一种较好的提取方法。好氧条件下,菌株 ZQN4 的胞外聚合物中蛋白质含量最高,约占总量的 80%。ZQN4 对磷的去除率约为 89.4%,其中有约 88% 聚集在菌体内,另外约 12% 聚集在胞外聚合物中,且大部分以  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  的形式存在,表明胞外聚合物对除磷也有一定的贡献。

**关键词:** 反硝化除磷菌; 胞外聚合物; 提取方法; 磷吸附

中图分类号: X 506

文献标识码: A

文章编号:1671-4431(2013)02-0130-04

### Extraction of Extracellular Polymeric Substances (EPS) from Denitrifying Polyphosphate-accumulating Organism (DPAO) and Its Action on Phosphorus Removal

ZHANG Qian<sup>1</sup>, LI Meng<sup>1</sup>, WANG Hong-yu<sup>2</sup>, YANG Kai<sup>2</sup>, ZHANG Cai-xia<sup>1</sup>,  
ZHANG Chao<sup>1</sup>, ZHU Xiao-yun<sup>1</sup>

(1. School of Civil Engineering and Architecture, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China;  
2. School of Civil Engineering, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Four extraction methods were adopted to investigate the extraction efficiency of extracellular polymeric substances (EPS) from the denitrifying polyphosphate-accumulating organism (DPAO) strain ZQN4 under aerobic condition. Experimental results indicate that protein, amounting to about 80% of total EPS content, was the major component in EPS of strain ZQN4. Ultrasonic method was effective in strain ZQN4 EPS extraction. The removal of phosphorus by strain ZQN4 under aerobic condition was approximately 89.4%, in which about 88% of the reduced phosphorus in the substrate was absorbed by strain ZQN4, while 12% of it was stored in the EPS, indicating the contribution of strain ZQN4 to phosphorus removal. Moreover, the most of reduced phosphorus existed in the form of  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ .

**Key words:** denitrifying polyphosphate-accumulating organism; extracellular polymeric substances; extraction methods; phosphorus removal

反硝化除磷菌(DPAO, denitrifying polyphosphate-accumulating organism)能利用  $\text{O}_2$  或  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  作为电子受体在好氧或缺氧条件下进行吸磷。由于 DPAO 能够做到一碳(胞内 PHA)两用(吸磷和反硝化),与传统脱氮除磷工艺相比,节省 50% 的 COD 消耗量、30% 的曝气量以及减少 50% 的污泥产量<sup>[1]</sup>。因此,将 DPAO 应用于低 C/N 生活污水的同步脱氮除磷中将具有非常大的优势。

胞外聚合物(EPS, extracellular polymeric substance)由于其在菌体外所处的特殊位置以及特定的化学组成,使 EPS 成为影响细菌特性的重要因素之一<sup>[2]</sup>。EPS 对富营养元素(如磷等)的环境生物化学效应,主

收稿日期:2012-11-16.

基金项目:国家自然科学基金(51208397,51008239);中国博士后科学基金(2011M501254)和武汉理工大学国家级大学生创新创业训练计划(20121049706009).

作者简介:张倩(1983-),女,博士后. E-mail:qianzhang@whut.edu.cn

要是指由微生物所分泌的EPS与富营养元素发生的包括配位、吸附、吸收和凝絮等在内的生物、化学和物理的反应,以及由此反应过程所引起的富营养元素的迁移转化、分配、扩散和埋藏等状态的改变<sup>[3]</sup>。EPS对水体中富营养元素的影响还反映了环境生物化学的循环和生物系统耦合的重要方面,是控制和调节水体与生物之间物质输送和交换的重要途径,具有非常重要的研究价值。

但是,EPS的提取效率在很大程度上受提取方法的影响。针对不同培养条件,不同菌株选择一种合适的提取方法非常重要。因此,选用4种提取方法,进行对比试验,试图找出一种简单、有效地提取好氧条件下反硝化除磷菌EPS的方法,同时对EPS在废水生物除磷中的作用机理进行研究,以探讨和完善生物除磷机理。

## 1 试验

### 1.1 菌株来源

试验所用菌株ZQN4是实验室保存的高效反硝化除磷菌。菌株ZQN4能利用 $O_2$ 和 $NO_3^-$ -N作为电子受体进行反硝化吸磷,经16S rRNA技术鉴定其属于*Bacillus sp*(NCBI登陆序列号:GU384234)。将菌株ZQN4在富磷培养基( $8\text{ mg}\cdot\text{P/L}$ )<sup>[4]</sup>中好氧富集培养24 h( $140\text{ r/min}$ , $30\text{ }^\circ\text{C}$ )后的菌液作为种子液待用。

### 1.2 菌株的反硝化除磷效果

以SBR反应器稳定运行的条件为参考,取种子液100 mL,离心( $8\ 000\text{ g}$ , $8\text{ min}$ ),用无菌蒸馏水洗涤,再次离心后投加到不含乙酸钠的富磷培养基中,加入 $KNO_3$ ,使培养基中 $NO_3^-$ -N含量为 $30\text{ mg/L}$ ,装入密闭容器中,充氮气以除氧,摇床( $140\text{ r/min}$ , $30\text{ }^\circ\text{C}$ )中反应180 min,期间每隔30 min取样,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后测培养液中 $NO_3^-$ -N和 $PO_4^{3-}$ -P含量。

### 1.3 EPS提取方法

采用4种方法提取菌株ZQN4的EPS,各方法具体操作如下:1)超声波法<sup>[5-6]</sup> 取50 mL种子液40 W超声2 min,然后离心( $20\ 000\text{ g}$ , $4\text{ }^\circ\text{C}$ , $20\text{ min}$ ),将其上清液再离心( $10\ 000\text{ g}$ , $4\text{ }^\circ\text{C}$ , $15\text{ min}$ ),上清液即为EPS,保存在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中待测。2)醇析法<sup>[7]</sup> 取50 mL种子液离心( $2\ 694\text{ g}$ , $4\text{ }^\circ\text{C}$ , $30\text{ min}$ )。向沉淀中加入50 mL去离子水,搅拌过夜,离心,EPS释放到上清液中。加入3倍体积乙醇(95%乙醇和5%甲醇)溶液于冰箱过夜,离心收集沉淀,重溶于50 mL去离子水中。乙醇沉淀步骤重复2次。3)硫酸法和甲醛-NaOH法 提取方法的详细步骤按照文献[8]进行。试验中不考虑提取时间变化对结果的影响,因此将提取时间固定为1 h<sup>[8-9]</sup>。

为比较4种不同提取方法的有效性,在搅拌过程中都采用相同的搅拌速率 $300\text{ r/min}$ 。

### 1.4 EPS成分测定

1)蛋白质 采用上海生工改良Bradford蛋白质定量检测试剂盒。2)多糖<sup>[10-11]</sup> 采用3,5-二硝基水杨酸法(DNS,3,5-dinitrosalicylic acid)测定多糖含量。3)核酸 采用紫外吸收法测DNA含量。在紫外分光光度计上测定260 nm处的吸光度,DNA浓度(mg/L)的计算公式<sup>[12]</sup>为 $\rho_{\text{DNA}}=A_{260\text{ nm}}/0.020$ 。

### 1.5 EPS对磷的去除

将菌株ZQN4在富磷培养基中好氧培养24 h后,测定细菌干重(DW,dry weight content),然后经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,检测滤液中总磷(TP)和 $PO_4^{3-}$ -P浓度。同时,提取菌株ZQN4的EPS,测定EPS中TP和 $PO_4^{3-}$ -P含量浓度。

### 1.6 化学分析方法

DW取富集培养后的菌液100 mL, $8\ 000\text{ g}$ , $8\text{ min}$ 离心,无菌蒸馏水洗涤3次,弃上清液后在 $105\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干2 h,烘干前后重量差除以菌液体积100 mL,即为DW(g/L)。TP, $PO_4^{3-}$ -P和 $NO_3^-$ -N含量按照标准方法<sup>[13]</sup>进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株ZQN4的反硝化除磷效果

菌株ZQN4在缺氧状态下的反硝化吸磷结果如图1所示。由图1可以看出,在初始 $NO_3^-$ -N浓度 $30\text{ mg/L}$ , $PO_4^{3-}$ -P浓度为 $8\text{ mg/L}$ 条件下,经180 min缺氧反应后,培养液中剩余 $NO_3^-$ -N浓度为 $3.04\text{ mg/L}$ , $PO_4^{3-}$ -P浓度为 $2.63\text{ mg/L}$ ,即菌株ZQN4缺氧吸磷量为 $5.37\text{ mg/L}$ ,反硝化量为 $26.96\text{ mg/L}$ ,

说明菌株 ZQN4 存在明显的同步反硝化吸磷现象。

## 2.2 4种EPS提取方法的比较

采用4种方法提取的EPS成分如表1所示,各成分所占比例如图2所示。可以看出,菌株ZQN4的EPS中蛋白质的含量最高,占总量的80%左右,其次为DNA和多糖。EPS的提取效率很大程度上取决于提取方法的选择,试验中4种提取方法测得的EPS各成分含量差别很大。其中蛋白质浓度顺序为:超声波法>甲醛-NaOH法>醇析法>硫酸法;多糖浓度顺序为:醇析法>硫酸法>甲醛-NaOH法>超声波法;DNA含量顺序为:硫酸法>醇析法>甲醛-NaOH法>超声波法。这与以往对于纯培养活性污泥的研究结果有所不同,Sutherland<sup>[14]</sup>认为多糖是EPS中含量最高的物质。但也有研究发现在污水处理厂的活性污泥EPS中蛋白质含量最高<sup>[15]</sup>。

表1 4种方法提取的EPS成分比较

EPS成分	超声波法	甲醛-NaOH法	硫酸法	醇析法
蛋白质/DW/(mg·g <sup>-1</sup> )	304.20	265.80	243.50	251.60
多糖/DW/(mg·g <sup>-1</sup> )	9.47	10.60	11.20	11.80
DNA/DW/(mg·g <sup>-1</sup> )	46.32	55.39	65.66	60.27
DNA/多糖	4.89	5.23	5.86	5.11

DW:菌体干重。

试验中,超声波法对菌株ZQN4的EPS提取总量最高,其次为甲醛-NaOH法和醇析法。在4种提取方法中,超声波法提取的蛋白质含量最高,而核酸和多糖含量相对最少,说明超声波法——这种物理方法可以有效地使EPS从细胞表面脱落,同时减少了细胞的破裂和溶解。可以认为超声波法提取的EPS比较完全,对细胞的破坏程度较小,是一种有效的提取反硝化除磷菌EPS的方法。

其次,甲醛-NaOH法和醇析法对胞外蛋白的提取仅次于超声波法。这两种方法提取的多糖含量都多于超声波法提取的EPS中多糖的含量,说明甲醛-NaOH法和醇析法在提取菌株EPS的过程中对细胞造成了或多或少的损坏,使得胞内部分的物质外流。

硫酸法提取的EPS中蛋白质含量最低,但DNA和多糖含量却较高。提取的DNA含量占提取量的20.5%,超出了正常范围,说明在提取菌株EPS过程中,化学作用使细胞遭到了较大破坏,致使胞内多糖和DNA外流,提取效果较差。

水、蛋白质、核酸和脂类是细胞质和细胞核的主要成分。糖类作为营养碳源贮备只占很小的比例,所以细胞破碎后会有大量的核酸放出而仅有少许糖类溶于提取液中,从而造成核酸和多糖比值升高。破碎程度越大,比值越高<sup>[16]</sup>。由表1可以看出,4种方法提取的EPS成分中,DNA/多糖比值最低的是超声波法,说明超声波法对细胞的破坏程度较小。采用硫酸法提取的DNA/多糖比值最高,说明细胞的破碎程度较大。

另外,EPS化学成分的不同和细胞壁也有着密切的关系。比如革兰氏阴性菌,是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EPS中占主要成分。而本试验中所用的菌株ZQN4属于革兰氏阳性菌,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,从而造成多糖含量少,以蛋白质和核酸为主<sup>[15]</sup>。

鉴于以上分析,可以认为超声波法提取的EPS比较完全,对细胞的破坏程度较小,是一种较好的提取反硝化除磷菌EPS的方法。

## 2.3 EPS对磷的去除作用

将菌株ZQN4在富磷培养基中好氧培养24h后,测定DW,然后经0.22 μm微孔滤膜过滤,得到滤液。同时,采用超声波法提取菌株ZQN4的EPS,测定滤液和EPS中的TP和PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P含量浓度,各种溶液中的磷含量如表2所示。

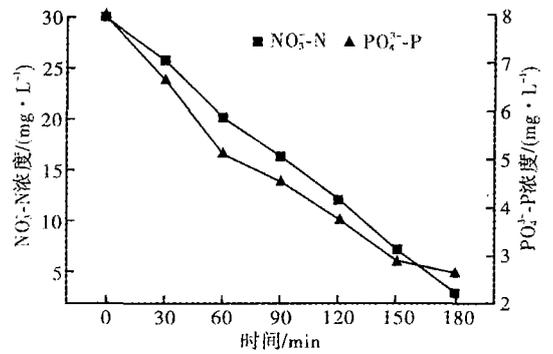


图1 ZQN4缺氧反硝化吸磷

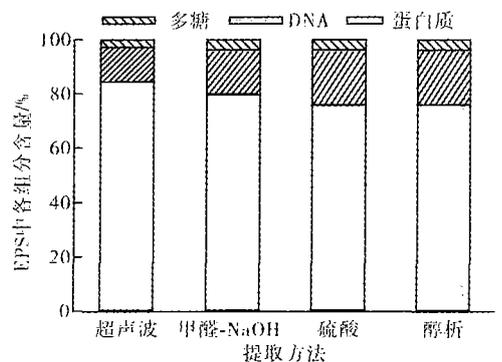


图2 4种方法提取的EPS成分比例

表2 各种溶液中的磷含量

参数	富磷培养基	滤液	EPS
TP/(mg·L <sup>-1</sup> )	8.87	0.94	0.98
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P/(mg·L <sup>-1</sup> )	8.00	0.82	0.83

根据表2数据计算可知,菌株 ZQN4 对磷的去除率为 89.4%,其中有 87.7%的磷被菌株吸收,有 12.3%的磷聚集在 EPS 中,且大部分以  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  的形式存在。有分析认为<sup>[16]</sup>,在好氧条件下, EPS 中的某些氨基酸、糖类基团,以及 EPS 中吸附的原水中的钙、铁、镁等金属离子,可以通过离子交换和吸附等方式与基质中的  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  离子形成某些特定的化合物和络合物,从而聚集贮存于 EPS 中。张志超等<sup>[17]</sup>采用甲醛-NaOH 法提取具有除磷能力的活性污泥 EPS,表明其 EPS 中主要含的是聚磷。他们认为, EPS 中含磷不仅是依靠吸附磷酸盐或生物聚磷过程磷酸盐的滞留,而且 EPS 本身可能也参与了生物聚磷过程。

EPS 去除富营养元素的作用机理存在很大差异,但在去除这些元素的过程中 EPS 所表现的行为方式基本上都是通过其自身所特有的胶体带电性、疏松性和生物活性这 3 种方式来实现的。综上所述可知,菌株的 EPS 对除磷有一定贡献,主要通过化学、物化和生化作用,将基质中部分磷聚集于 EPS 中。

### 3 结 论

a. 反硝化除磷菌 ZQN4 在缺氧状态下存在明显的同步反硝化吸磷现象。

b. EPS 的提取效率很大程度上取决于提取方法的选择。试验中,超声波法是一种较好的提取反硝化除磷菌 EPS 的方法,菌株 ZQN4 的 EPS 中蛋白质的含量最高,其次为 DNA 和多糖。

c. EPS 对除磷有一定的贡献。好氧条件下,菌株 ZQN4 对磷的去除率为 89.4%左右,其中有 88%左右聚集在 ZQN4 菌体内,另外 12%左右的磷聚集在 EPS 中,且大部分以  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  的形式存在。

### 参 考 文 献

- [1] Kuba T, Loosdrecht M C M V, Heijnen J J. Phosphorus and Nitrogen Removal with Minimal COD Requirement by Integration of Denitrifying Dephosphatation and Nitrification in a Two-sludge System[J]. Water Research, 1996, 30(7): 1702-1710.
- [2] Houghton J I, Stephenson T. Effect of Influent Organic Content on Digested Sludge Extracellular Polymer Content and Dewaterability[J]. Water Research, 2002, 36(14): 3620-3628.
- [3] 康福星, 龙健, 王倩, 等. 微生物胞外聚合物对水体重金属和富营养元素的环境生化效应研究展望[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(1): 129-134.
- [4] Merzouki M, Delgene S J, Bernet N, et al. Polyphosphate-accumulating and Denitrifying Bacteria Isolated from Anaerobic-anoxic and Anaerobic-aerobic Sequencing Batch Reactors[J]. Current Microbiology, 1999, 38(1): 9-17.
- [5] Guibaud G, Comte S, Bordas F, et al. Comparison of the Complexation Potential of Extracellular Polymeric Substances (EPS), Extracted from Activated Sludges and Produced by Pure Bacteria Strains, for Cadmium, Lead and Nickel[J]. Chemosphere, 2005, 59(5): 629-638.
- [6] Guibaud G, Bordas F, Saada A, et al. Effect of pH on Cadmium and Lead Binding by Extracellular Polymeric Substances (EPS) Extracted from Environmental Bacterial Strains[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 63(1): 48-54.
- [7] Zhang S, Xu C, Santschi P H. Chemical Composition and  $^{234}\text{Th}$  (IV) Binding of Extracellular Polymeric Substances (EPS) Produced by the Marine Diatom *Ampthora sp*[J]. Marine Chemistry, 2008, 112(1-2): 81-92.
- [8] Frølund B, Palmgren R, Keiding K, et al. Extraction of Extracellular Polymers from Activated Sludge Using a Cation Exchange Resin[J]. Water Research, 1996, 30(8): 1749-1758.
- [9] Fang H H P, Jia X S. Extraction of Extracellular Polymer from Anaerobic Sludges[J]. Biotechnology Techniques, 1996, 10(11): 803-808.
- [10] 尹银嘉, 魏士超, 马宝瑕. 3,5-二硝基水杨酸法测二味康口服液中多糖的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(7): 414-416.
- [11] 薛丰, 程远, 孙成均. 3,5-二硝基水杨酸光度法测定甘薯中淀粉多糖[J]. 现代预防医学, 2010, 37(5): 900-902.
- [12] 罗曦, 雷中方, 张振亚, 等. 好氧/厌氧污泥胞外聚合物(EPS)的提取方法研究[J]. 环境科学学报, 2005, 25(12): 1624-1629.
- [13] 国家环境保护局. 水和废水检测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [14] Sutherland I W. Microbial Exopolysaccharides-structural Subtleties and Their Consequences[J]. Pure and Applied Chemistry, 1997, 69(9): 1911-1917.
- [15] Dignac 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(8-9): 45-53.
- [16] 王竞, 陶颖, 周集体, 等. 细菌胞外高聚物对水中六价铬的生物吸附特性[J]. 水处理技术, 2001, 27(3): 145-147.
- [17] 张志超, 黄霞, 杨海军, 等. 生物除磷污泥胞外多聚物含磷形态的核磁共振分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(2): 536-539.