

强化生物除磷系统胞内聚合物测定方法优化

由 阳¹, 彭永臻^{1,2}, 王淑莹², 刘秀红¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090, youyang1979@sina.com.cn;

2. 北京工业大学 环境与能源工程学院, 北京 100124)

摘 要: 为优化强化生物除磷系统胞内 PHA、糖原以及多聚磷酸盐颗粒的测定方法, 采用色谱与化学分析相结合的方法进行研究. 其中, PHA 的测定采用气相色谱法, 糖原的测定采用稀盐酸消解加葡萄糖试剂盒法, 多聚磷酸盐采用过硫酸钾氧化和钼锑抗光度法, 经过方法优化得出 4% 酸化甲醇消解 20 h 是提高 PHA 回收量的最佳条件; 糖原在 0.6 mol/L HCl 条件下消解 5 h 提取量最大, 临床中的葡萄糖氧化酶法试剂盒可以应用到本实验中; 在 120 °C 下氧化 30 min 条件下多聚磷酸盐颗粒可以最大回收. 经过加标回收实验等对这 3 个方法进行精密度、准确度分析, 结果显示, 在这 3 个条件下的 3 种方法都具有很高的精密度或准确度, 而且简单易行, 适合实验室及生产实践中的应用.

关键词: 强化生物除磷; 聚磷; 多聚脂脂肪酸; 糖原; 聚磷菌

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2010)02-0207-05

Optimization of intracellular polymer analysis for enhanced biological phosphorous removal system

YOU Yang¹, PENG Yong-zhen^{1,2}, WANG Shu-ying², LIU Xiu-hong¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China, youyang1979@sina.com.cn; 2. College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: The combination of chromatogram and chemical analysis was adopted to optimize the methods selected to measure poly-P, glycogen and PHA intracellular polymer in EBPR system. PHA was measured by GC system, glycogen was degraded by dilute hydrochloric acid and analyzed by glucose commercial kit, and poly-P was oxidized by potassium persulfate and analyzed by molybdenum-antimony anti-spectrophotometric method. Testing of the proposed method for PHA analysis shows that 4% sulfuric acid concentration and degradation for 20 h are required for optimal PHB and PHV extraction, while 0.6 mol/L HCl and digestion for 5 h produce the highest recovery of glycogen, and the medical glucose kit can be used in this research. Oxidation for 30 min at 120 °C is recommended for the recovery of poly-P. The results of precision analysis and recovery test with standard addition of these methods show that they possess high precision and are convenient for laboratory research and practical application.

Key words: enhanced biological phosphorous removal system; poly-phosphate; polyhydroxyalkanoates; glycogen; phosphorous accumulating organisms

收稿日期: 2007-08-12.

基金项目: 国家自然科学基金海外青年学者合作项目 (50628808); 城市水资源与水环境国家重点实验室开放研究项目 (QAK200802); 北京市教委科技创新平台项目 (PXM2008_014204_050843).

作者简介: 由 阳 (1979—), 女, 博士研究生;
彭永臻 (1949—), 男, 教授, 博士生导师.

多聚脂脂肪酸 (PHA)、糖原和多聚磷酸盐 (poly-P) 是强化生物除磷系统 (EBPR) 中聚磷菌 (PAO) 体内的主要能量和物质贮存方式, 聚磷菌在厌氧条件下吸收废水中的碳源, 贮存 PHA, 分解体内的多聚磷酸盐, 把正磷酸盐释放到水体中, 释放能量, 分解糖原. 在好氧状态下, 聚磷菌分解

PHA 并释放出能量,用以细胞合成和糖原积累,大量吸收水体中的正磷酸盐,在体内贮存多聚磷酸盐颗粒^[1].可见,多聚磷酸盐是 PAO 体内磷以及能量的贮存物质;PHA 为细胞生长和糖原合成提供前体;糖原水解的过程中为脂肪酸转化成 PHA 提供还原力.因此,PHA、多聚磷酸盐以及糖原的贮存能力是直接影响系统除磷性能的关键因素.准确定量这 3 种物质对研究和评价强化生物除磷系统非常重要.

PHA 的测定分为提取和测定两步^[2-3].测定有分光光度法和气相色谱法两种,其中分光光度法的灵敏度比气相色谱法要低很多.糖原的定量方法包括把聚合物水解成葡萄糖和测定葡萄糖量两个步骤^[4].定量葡萄糖有高效液相色谱和化学分析两种方法,其中高效液相色谱灵敏度高.正磷酸盐的测定一般采用国标方法.本研究将色谱法和化学分析手段相结合,对强化生物除磷系统内的这 3 种多聚物的测定方法进行了优化,试图找到准确快捷、在实验室简单易行的测定方法.

1 实 验

1.1 PHA 的测定

PHA 是在细胞质中被一层膜物质包围的大约 0.2 到 0.5 μm 的颗粒^[5].在聚磷菌体内,细胞内贮存的 PHA 是一种典型的共聚物,这种共聚物主要由 3-羟基丁酸(3HB)和 3-羟基戊酸(3HV)单体组成,还有一少部分的 3-羟基,2-烷基丁酸(3H2MB)和 3-羟基,2-甲基戊酸(3H2MV).

本研究中 PHA 测定采用的方法^[6-7]为:从 EBPR 反应器中取得活性污泥后,按 1% (体积分数)的比例与甲醛混合以抑制污泥中微生物的活动.混合液经离心后上清液去除,然后以磷酸盐混合液清洗样品,再次离心后上清液再次去除.之后样品在 $-36\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.076 mbar 下冷冻干燥(Labconco, American)脱水 20 h.用天平(Mettler, Switzerland)称取冻干污泥 30 mg 和 PHB、PHV 标准品一起放入有胶塞并配有螺旋扣塑料帽的玻璃管中,加入 2 mL 氯仿和 2 mL 酸化甲醇酯化液(酯化液为含有 4%, 10%, 20% 硫酸的甲醇).紧紧密封盖子后放入干式恒温器(Sanyo, Japan)中,在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下消解 2, 4 或 20 h.冷却到室温后加入 1 mL 的纯水(Millipore, American),混合后剧烈震荡以去除氯仿相中的残渣.静沉 1 h 以实现相的分离,然后以移液器(Gilson, France)吸出下层的氯仿相放入另一个小瓶中,以硫酸钠干燥后,3 μL 上色谱分

析. PHB 和 PHV 的标准样品采用美国西格玛公司产品(sigma, cat NO. 81329, 403105),分别准确称取 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3.0 mg 标准样品放入消解瓶中,其他测定步骤跟污泥样品测定相同,上气相色谱分析后做得标准曲线 PHB 为: $y = 221.5290x - 95.5183$, 回归系数为 0.99915. PHV 标线为: $y = 353.5604x + 10.4038$, 回归系数为 0.99913.

气相色谱(hp 6890N, American)配备 HP IN-NOVAX 色谱柱(30 m length $\times$ 320 μm ID $\times$ 0.25 μm film),进样口温度 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$,分流比为 1:25,氮气做载气,FID 检测器工作温度为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,炉温采用程序升温, $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min,然后以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升到 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并保持 1 min.

1.2 糖原的测定

糖原是一种分支状的聚合体,它由葡萄糖单体以糖苷键连接而成.它的定量方法包括把聚合物水解成葡萄糖和测定葡萄糖量两个步骤.然而区别葡萄糖是糖原水解产生的还是其他碳水化合物水解产生的是不可能的,所以,目前大多研究都不是定量糖原,而是定量总碳水化合物.定量葡萄糖有高效液相色谱和化学分析两种方法,其中高效液相色谱灵敏度高,但是对色谱柱的选择和维护要求比较高,费用很高.

本实验中糖原测定的前几个步骤与 PHA 测定的步骤相同,污泥样品经预处理,清洗,20 h 冻干后,准确称量 30 mg 放入带胶塞和螺旋塑料盖的玻璃瓶中.然后加入 5 mL 0.4, 0.6 或 0.8 mol/L HCl,在恒温培养箱(Sanyo, Japan)中 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下消解 1, 3, 5 或 7 h,冷却后以 0.25 μm 的膜过滤.取样品 2 μL 以葡萄糖氧化酶法试剂盒(北京北化康泰临床试剂有限公司)测定样品中的葡萄糖含量.

1.3 多聚磷酸盐的测定

聚磷菌贮存在体内的多聚磷酸盐颗粒又叫做异染颗粒,它是由正磷酸盐单体以酯键结合形成的线性或环形聚合物.多聚磷酸盐的测定基本分为 3 个步骤:1)样品的干燥脱水.2)生物质消解使多聚磷酸盐颗粒转化成正磷酸盐.3)正磷酸盐的测定.

本实验先测得反应器上清液中正磷酸盐质量浓度,再使用纯水清洗污泥样品,采用冻干机干燥,准确称量 0.45 mg 后放入 250 mL 锥型瓶中,加入 100 mL 纯水和 40 mL 5% (质量分数)过硫酸钾溶液^[8],盖塞包紧后放入压力灭菌锅(Sanyo, Japan)后于 110, 120 和 $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中分别加热 20, 30,

40 min, 冷却后移至 250 mL 容量瓶中定容,取出少量以钼锑抗光度法测定正磷酸盐质量浓度. 污泥中聚磷的含量既为消解后正磷酸盐与消解前正磷酸盐浓度之差. 试剂空白和标准溶液系列也经同样的消解操作. 标准曲线为 $y = 104.59x - 0.0159$, 回归系数为 $R^2 = 0.9996$.

本实验中利用的活性污泥样品都来自于有 PAOs 富集的、以丙酸为唯一碳源的 EBPR 反应器. 富含 PHB 的污泥采自 SBR 反应器厌氧阶段末端, 富含多聚磷酸盐颗粒和糖原的污泥取自 SBR 反应器好氧阶段末端.

2 结果与讨论

2.1 PHA 的测定优化

以不同酸化甲醇体积分数提取 PHB 的提取物结果见图 1. 可以看出, PHB 的提取量受酸化甲醇体积分数影响很大, 4% 的酸化甲醇取得了最大回收量. 这个结果与很多研究是一致的^[2], 另外, 10% 和 20% 酸化甲醇的样品在大于 10 h 消解时, 提取物的量都有下降趋势, 这是由于过大的酸化甲醇体积分数引起样品中的 3HB 片段的进一步降解, 产生了另外一些更简单的有机物, 导致提取的 PHB 的量减少. 所以, 4% 的酸化甲醇体积分数是最合适的. 从图中还可以看出, 消解生物质产生 3HB 单体需要一定的反应时间, 在 2 h 时, 提取物的量很少, 而当反应时间达到 11 h 后, 提取物的量有大幅度的提高, 而 4% 酸化甲醇的样品甚至在 11 ~ 20 h 之间还有提高, 这说明足够的反应时间是必要的. 虽然 Adrian^[2] 等人认为 2 h 的反应时间就可以提取细胞内的大部分 PHB, 但是本研究经过多次重复实验表明, 只有达到充足的反应时间才能达到最大的回收量.

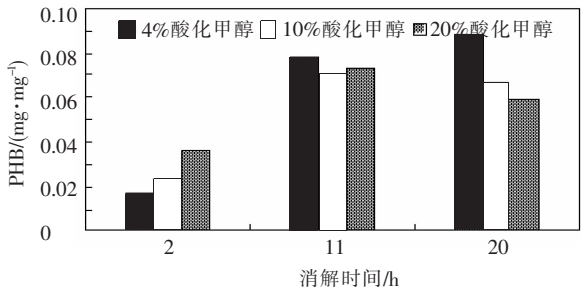


图 1 不同消解时间提取 PHB 的比较
以不同酸化甲醇体积分数提取 PHV 提取物的结果见图 2.

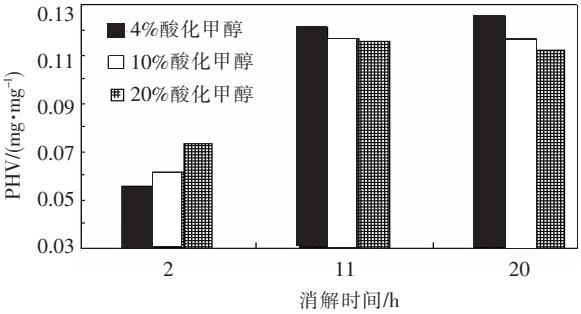


图 2 不同消解时间提取 PHV 的比较
与 PHB 相比, PHV 的提取受酸化甲醇体积分数变化的影响不大, 20% 酸化甲醇的提取物在消解大于 10 h 时, 还是会有量的减少, 这说明在这个体积分数下, PHV 也会发生降解. 4% 和 10% 酸化甲醇的样品在消解 20 h 时都能达到最大回收, 所以, 这两个体积分数比较适合提取 PHV. 同样, PHV 的消解反应需要至少 11 h 的时间.

为了检测 4% 的酸化甲醇和消解 20 h 提取 PHB、PHV 方法的准确度, 采用加标回收实验的方法进行考察. 取 5 份冻干后的污泥样品放入消解瓶后再加入 PHB 和 PHV 纯品, 进行加标回收实验, 结果见表 1.

表 1 加标回收实验结果

样品序号		冻干污泥样品质量 mg	PHA 含量 mg · μL ⁻¹	加标 PHA 量 mg · μL ⁻¹	测定 PHA 量 mg · μL ⁻¹	回收率 %
PHB	1	20	0.947 30	0.25	1.202 65	102.1
	2	22	1.042 45	0.25	1.295 60	101.3
	3	30	1.221 20	0.25	1.467 80	98.6
	4	25	0.878 20	0.50	1.381 40	100.6
	5	27	0.894 75	0.25	1.149 75	102.0
PHV	1	20	0.707 30	0.50	1.216 10	101.8
	2	22	0.821 10	0.50	1.317 95	99.4
	3	25	1.035 60	0.25	1.291 90	102.5
	4	27	1.199 60	0.25	11.442 30	97.1
	5	30	1.214 50	0.25	1.460 80	98.5

从表 1 可知, 以 4% 的酸化甲醇和消解 20 h 来提取 PHB 和 PHV, 准确度很好, 说明这一方法的测量值接近于真值, 系统误差小, 加标回收率分别为 98.6% ~ 102.1% 和 97.1% ~ 102.5%.

2.2 糖原的测定优化

样品经预处理、冻干、消解成葡萄糖后,可以通过多种方法测定葡萄糖含量.国际上 EBPR 系统糖原的测定多采用高效液相色谱法 HPLC^[9-10].本研究初始阶段试图应用配有 C18 柱(waters, American)的液相色谱(waters, American)分离葡萄糖,使用折光率检测器,0.6 mL/min,0.004 mol/L H₂SO₄ 做流动相,但经多次实验,C18 柱无法把葡萄糖和消解液中的其他物质分离开,这可能是因为消解液的离子间力太强,阻碍了葡萄糖的分离.后期实验采用氧化酶法葡萄糖试剂盒^[11]测定葡萄糖含量,在不同消解时间和盐酸浓度下糖原的提取结果见图 3.

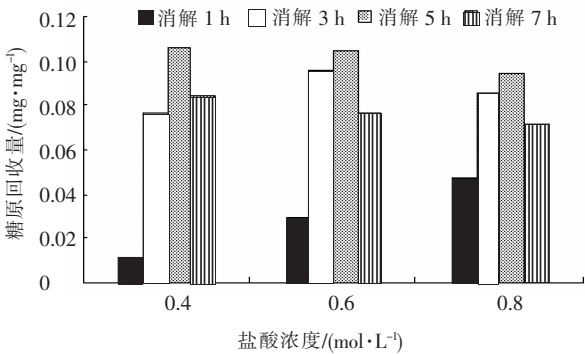


图3 不同消解时间和盐酸浓度下糖原的提取

从图3可以看出,消解时间对糖原的提取量影响很大,在相同 HCl 浓度下,不同的消解时间下提取的糖原量有很大不同,以 0.6 mol/L HCl 为例,消解时间为 1 h 回收到的糖原量为 0.028 947 mg/mg,随着消解时间不断增加,回收

到的糖原量也不断增加,到消解 5 h 时,回收量已经达到 0.105 3 mg/mg.但是继续增加消解时间并不能进一步增大回收量反而会由于样品的进一步消解导致葡萄糖回收量的减少.此外,消解 HCl 浓度对葡萄糖回收量的影响也很大,当消解时间很短时,回收量会随着 HCl 浓度的增加而增加;当消解时间为 3 或 5 h 时,回收量先增加再减少;而当消解时间为 7 h,回收量会随着 HCl 浓度的增加而减少.总体来说,以 0.6 mol/L 的盐酸消解 5 h 可以达到最大的葡萄糖回收量.

为了研究此方法的精密度,还进行了精密度实验,取 4 个污泥样品,分别平行测定 6 次,同时附空白,结果见表 2.从表 2 可知,当取样量控制在氧化酶法要求的线性范围内时所得的相对标准偏差和变异系数都比较小,说明测定值与它们的均值的差距较小,偶然误差小,因而实验结果的精密度较好.

2.3 多聚磷酸盐颗粒的测定优化

提取的聚磷酸盐颗粒的量与不同消解时间和消解温度的关系可见图 4,由图可见,聚磷酸盐颗粒的提取量受消解时间和温度影响很大,过高的消解温度(130 ℃)并不能显著提高多聚磷酸盐的提取效率,对于把磷酸盐聚合物降解成正磷酸盐这一反应来说,120 ℃ 的反应条件已经足够,而 110 ℃ 明显不能使反应充分进行.同样,足够的反应时间是必要的,20 min 不能使反应完全,反应基本是在 30 min 时达到最大回收量,40 min 是多余的,因此,120 ℃,30 min 是消解多聚磷酸盐颗粒的最佳反应条件.

表 2 精密度实验结果

样品序号	污泥样品质量/mg	测得糖原量/mg						平均值/mg	RSD/%
1	30	3.024	2.946	2.978	3.011	3.019	3.017	2.999	1.03
2	35	3.579	3.496	3.549	3.525	3.469	3.519	3.523	1.09
3	40	3.948	4.014	3.992	3.936	4.055	4.003	3.985	0.86
4	45	4.498	4.515	4.489	4.583	4.498	4.511	4.516	0.76

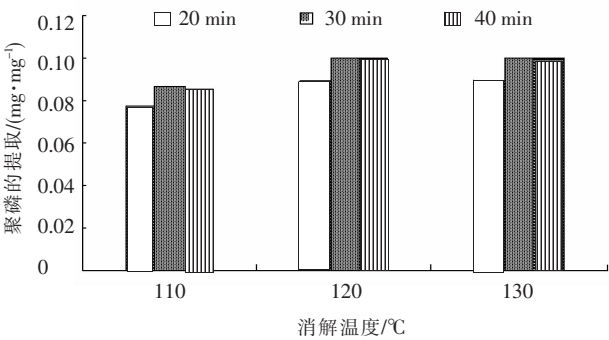


图4 不同消解时间和消解温度下聚磷的提取

为考察冻干污泥量与其相对应的多聚磷酸盐质量浓度的相关性,分别取 30 ~ 50 mg 的 10 个样品,测得多聚磷酸盐质量浓度,同与其对应的取样量进行线性回归分析,结果见表 3.

整理表 3 中的数据得出消解污泥量与消解液中 P 含量之间存在相关性,含 P 量 $y = 0.101x - 0.0426$,相关性 $R^2 = 0.994$,可见消解污泥量 x 与消解液中总 P 量 y 存在较好的相关性,本方法可行.

表 3 消解污泥量与消解液中含 P 量的分析结果

			mg		
序号	消解污泥量	消解液中 P 含量	序号	消解污泥量	消解液中 P 含量
1	30	2.976	6	41	4.018
2	32	3.157	7	43	4.279
3	34	3.426	8	45	4.549
4	36	3.586	9	47	4.669
5	39	3.992	10	50	5.013

3 结 论

1)对强化生物除磷系统胞内聚合物的测定方法进行了优化,其中 PHA 采用化学物质提取,气相色谱定量;多聚磷酸盐颗粒采用过硫酸钾氧化,抗坏血酸法测定;糖原采用稀盐酸消解,葡萄糖试剂盒法比色测定.

2) 经过方法优化和精密度、准确度分析,4% 酸化甲醇消解 20 h 是提高 PHA 回收量的最佳条件.糖原在 0.6 mol/L HCl 条件下消解 5 h 提取量最大.在 120 ℃、氧化 30 min 条件下多聚磷酸盐颗粒可以最大回收.

参考文献:

[1] MINO T, LOOSDRECHT van M C M, HEIJNEN J J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process[J]. Water Res, 1998, 32 (11): 3193 – 3207.

[2] OEHMEN A, KELLER – LEHMANN B, RAYMOND J. Optimisation of poly hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1070: 131 – 136.

[3] 陈银广,陈坚,堵国成,等.生物可降解塑料 PHB 提取的研究进展[J].化工进展,1998,1:41 – 45.

[4] OEHMEN A, ZENG R J, YUAN Zhiguo. Anaerobic metabolism of propionate by polyphosphate – accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005,91 (1):43 – 53.

[5] SUDESH K, ABE H, DOI Y. Synthesis, structure and properties of poly hydroxyalkanoates: Biological polyesters[J]. Prog Polym Sci, 2000, 25:1503 – 1555.

[6] LU Huabing, OEHMENA A, VIRDIS B. Obtaining highly enriched cultures of Candidatus Accumulibacter phosphates through alternating carbon sources[J]. Water Research,2006, 40:3838 – 3848.

[7] OEHMEN A, YUAN Zhiguo, BLACKALL L L, et al. Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 91(2): 162 – 168.

[8] 陈国梅. 钼酸铵分光光度法测定城市污泥中的总磷 [J]. 中国给水排水,2006,22(2):85 – 86.

[9] PHILIP L B, ROBERT E, MICHAEL W, et al. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999,65(9):4077 – 4084.

[10] LU Huabing, KELLER J, YUAN Zhiguo. Endogenous metabolism of Candidatus Accumulibacter phosphatis under various starvation conditions [J]. Water Research, 2007,41: 4646 – 4656.

[11] AHN J, SCHROEDER S, BEER M. Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(7): 2257 – 2270.

(编辑 刘 彤)