

HPLC 法定量分析水中光合细菌菌体产量

赵 微,张光明

(哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 150090 哈尔滨, gmgwen@gmail.com)

摘 要: 为了定量分析水中光合细菌(PSB)菌体产量,为光合细菌污水资源化提供方法依据,采用 HPLC 法分析 CoQ₁₀的质量,进而测得水中 PSB 的菌体产量.实验结果表明,色谱条件为:色谱柱为 SphherisorbC18 (10 cm×4.6 mm ID) 柱;甲醇与无水乙醇为流动相,体积比 9:1;流速为 1 mL/min;柱温 35 ℃;紫外检测波长 275 nm;进样量 15 μL;柱压 16.4 MPa.先用丙酮提取 5 h 后挥掉全部丙酮,再用无水乙醇溶解,这一提取方法对 CoQ₁₀的相对提取率最高.加外标检测法平均回收率为 99.13%,相对标准偏差为 0.81% ($n=5$).不同培养条件及生长时期的 PSB 内 CoQ₁₀的含量十分稳定.废水中杂质、杂菌等干扰因素均不影响 CoQ₁₀的检测结果.PSB 质量浓度为 $(Y+37.487)/25.431$ g/L,其中 Y 为峰面积($V \cdot s$).该方法简便易行,结果准确,可用于水中 PSB 菌体含量的定量分析.

关键词: HPLC; PSB; CoQ₁₀; 菌体产量; 污水资源化

中图分类号: Q936

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2011)12-0053-05

HPLC quantification of photosynthetic bacteria in water

ZHAO Wei, ZHANG Guang-ming

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology,
150090 Harbin, China, gmgwen@gmail.com)

Abstract: To test biomass of photosynthetic bacteria (PSB) in water, and to provide a way of PSB sewage reclamation, this paper adopted HPLC to analyze the concentration of CoQ₁₀ and thus obtained the concentration of PSB in water. The results show that the chromatographic condition is as follows: The chromatographic column is SphherisorbC18 (10 cm×4.6 mm ID); methanol-absolute alcohol (9:1) as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min; column temperature 35 ℃; Wave Length of UV detector 275 nm; sample size 15 μL; column pressure 16.4 MPa. By extracting 5 h with acetone, volatilizing acetone completely and dissolving it with absolute alcohol, this method may obtain the maximum relative extraction of CoQ₁₀. The average recovery ratio of external reference method is 99.13% and RSD 0.81%. The highest radiance-extraction is acetone extraction 5 h before evaporating completely and then solving in ethanol. The concentration of CoQ₁₀ in PSB in various cultural conditions and growing phases is quite stable. The impurities or microbes in wastewater do not affect the testing result. The concentration of PSB is $(Y+37.487)/25.431$ g · L⁻¹, Y is peak area ($V \cdot s$). This method is simple and accurate, and can be used for quantitative analysis of PSB in water.

Key words: HPLC; PSB; CoQ₁₀; biomass; sewage reclamation

光合细菌(Photosynthetic bacteria, PSB)是一类以光作为能源,能在光照厌氧或黑暗好氧条件下利用有机物、硫化物、氨等作为供氢体兼碳源进行光合

作用的微生物.PSB 能有效处理高浓度有机废水^[1],对淀粉、豆制品加工^[2]、啤酒厂^[3]、油脂工业等工业废水及生活污水,处理效果好,对 COD 的去除率达到 60%~95%,且 PSB 菌体本身含有丰富的营养物质和生理活性物质^[4],能够作为肥料、饲料、饵料^[5]回收利用,在处理废水的同时可实现污水资源化.然而,由于废水中各种干扰物质的存在,使得废水中 PSB

收稿日期: 2010-09-26.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(50978072).

作者简介: 赵 微(1982—),女,博士研究生;

张光明(1973—),女,教授,博士生导师.

菌体产量的准确测量存在问题。

在纯培养条件下 PSB 的定量检测方法包括显微镜直接计数法、平板计数法、紫外分光光度法与可见分光光度法、HPLC 法等。显微镜直接计数法随机性大,不能宏观、全面地反应菌体数量,在废水处理中一般不采用该方法。平板计数法计数周期长、方法复杂,在废水处理中一般也不采用该方法。紫外分光光度法与可见分光光度法受废水中杂质影响较大,尤其是受色度的影响,因此这 2 种方法不适合检测带有浊度或色度的废水。HPLC 法虽然方法简便易行、精确、不受废水中杂质影响,但不能将 PSB 作为直接检测物来分析。吴祖芳等的研究^[6]表明,PSB 中含有一种特征物质 CoQ_{10} ^[7](CoQ_{10} 又称泛醌,化学名称为 2,3-二甲氧基-5-甲基-6-癸异戊烯基-1,4-苯醌)。其在 PSB 中含量较高且相对稳定,可以用它的含量来定量表征 PSB 的菌体产量。目前 CoQ_{10} 的检测方法包括紫外分光光度法、可见分光光度法、HPLC 法等。同样由于废水中杂质的干扰,导致不能使用分光光度法分析 CoQ_{10} 的质量。可选的检测方法只有 HPLC 法,目前测定废水中 PSB 内 CoQ_{10} 质量的 HPLC 方法,国内外未见报道。因此本文研究采用 HPLC 法分析 CoQ_{10} 的含量以表征废水中 PSB 的菌体含量,排除各种干扰因素,拟建立定量分析废水中 PSB 菌体产量的方法,以期 PSB 在废水中的检验与定量分析提供科学依据。

1 试 验

1.1 材料

试验所采用的光合细菌为球形红假单胞菌(Rp. sphaeroids),购于中科院微生物研究所。试验采用活性污泥模拟废水中各杂菌,污泥取至处理生活污水 A/O 工艺的二沉池。试验废水采用浊度较大,有机物质含量较多的人工配水来模拟大豆废水。试验仪器与药品:冰箱(BCD-216ST, Haier);超声波清洗器(HS3120, BENCHTOPCLEANERS);高效液相色谱(Agilent 1200, Agilent Technologies, Inc.)。 CoQ_{10} 标准品(Sigma 公司生产);甲醇、无水乙醇、乙腈、丙酮均为色谱纯。

1.2 方法

CoQ_{10} 标准样品的制备:取 CoQ_{10} 标准样品 30 mg,加入无水乙醇 40 mL,在 50 ℃ 水浴中震荡溶解。放冷后,转移至 100 mL 容量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度摇匀,作为标准品母液,将母液分别稀释为 3.0、2.5、2.0、1.5、1.0 mg/L。所有样品均经 0.45 μm 膜过滤待用。

纯培养基中 CoQ_{10} 的提取方法:取 2.5 mL 发

酵液在 11 000 r/min 的条件下离心 10 min,分离上清和菌体。菌体用去离子水洗至中性,得到菌体细胞待用。 CoQ_{10} 的提取采用冻融辅助超声法^[8],将菌体细胞放入冰箱冷冻区冷冻 24 h 后提取溶剂。样品均经 0.45 μm 膜过滤后取上清液进行 HPLC 分析。杂质中 CoQ_{10} 的提取方法为:分别取 7 200 mg/L 的大豆废水、160 mg/L 的 PSB、7 200 mg/L 的大豆废水加 160 mg/L 的 PSB, CoQ_{10} 的提取方法同上。杂菌中 CoQ_{10} 的提取方法:取 2.5 mL 质量浓度为 10 000 mg/L 的活性污泥,在 11 000 r/min 的条件下离心 10 min,分离上清和菌体。菌体用去离子水洗至中性,得到菌体细胞, CoQ_{10} 的提取方法同上。不同培养条件 CoQ_{10} 的提取方法:将 PSB 在纯培养基中纯培养 7 d,光照-溶解氧条件分别为光照-厌氧、黑暗-好氧、自然光-微好氧。分别取不同培养条件的发酵液 2.5 mL, CoQ_{10} 的提取方法同上。不同生长时期 CoQ_{10} 的提取方法:将 PSB 在纯培养基中培养,光照-溶解氧条件为自然光-微好氧。分别在第 24、48、72、96 h 取发酵液 2.5 mL, CoQ_{10} 的提取方法同上。安静等研究^[9]表明 PSB 生长前 36 h 为延滞期,36~72 h 为生长期,从 72 h 开始进入稳定期,96 h 以后细胞进入衰亡期。加样回收率试验方法:采用外标加样回收法,取已知含量的 CoQ_{10} 样品 5 份,精密称定,分别置具塞的锥形瓶中,加同量的废水(7 200 mg/L)、PSB(160 mg/L), CoQ_{10} 的提取方法同上。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件

流动相的选择:选用的色谱柱为 Sphherisorb C18 (10 cm×4.6 mm ID) 柱,柱温 35 ℃,紫外检测波长 275 nm,进样量 15 μL 。流动相分别为甲醇和水、甲醇和乙腈、无水乙醇和水、甲醇和无水乙醇。当流动相为甲醇和水时,检测不到 CoQ_{10} 标准品。当流动相为甲醇和乙腈时,两者任意比例关系下,色谱峰或者不出峰,或者峰型不对称。当流动相为无水乙醇和水时,由于无水乙醇粘度大, CoQ_{10} 标准品的保留时间长,柱压特别高。当流动相为甲醇和无水乙醇时,色谱峰峰型对称出峰较好,因此对甲醇与无水乙醇的比例进行深入研究。分别配制甲醇与无水乙醇的体积比为 1:1、3:2、4:1、9:1 进行实验,随着流动相甲醇比例的增加 CoQ_{10} 标准品的保留时间缩短,当甲醇和无水乙醇比例为 3:2 时,在 28.773 min 出峰,当两者比例为 4:1 时,在 23.257 min 处出峰,当两者比例为

9 :1时,在 21. 183 min 处出峰.综合比较后发现,不同比例甲醇与无水乙醇为流动相时峰型都很好,出峰时间选择甲醇与无水乙醇的比例为 9 :1.

流速的选择:当流速为 0. 6 mL/min 时,CoQ₁₀ 标准品的保留时间超过 35 min,保留时间过长.当流速为 1. 5 mL/min 时,柱压过高.当流速为 1 mL/min 时,CoQ₁₀ 标准品的保留时间 21. 183 min,柱压 16. 4 MPa.综合比较,选择流速为 1 mL/min.

综合上述结果,本文提出的色谱条件:色谱柱为 SphherisorbC18 (10 cm×4. 6 mm ID) 柱;甲醇与无水乙醇(体积比 9 :1) 为流动相;流速为 1 mL/min;柱温为 35 ℃;紫外检测波长为 275 nm;进样量为 15 μL;柱压为 16. 4 MPa.在此条件下,色谱出峰快、峰型良好.采用如上确立的 HPLC 检测方法,获得 CoQ₁₀标准品谱图与标准曲线分别见图 1 与图 2,由图可见,CoQ₁₀标准品的保留时间为 21. 183 min,CoQ₁₀标准品密度与峰面积具有良好的相关性.

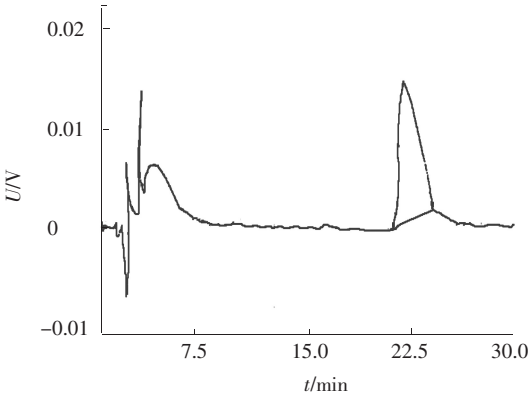


图 1 CoQ₁₀标准品 HPLC 色谱图

2. 2 提取溶剂的选择

由于 CoQ₁₀为细胞内物质,其提取效果的好

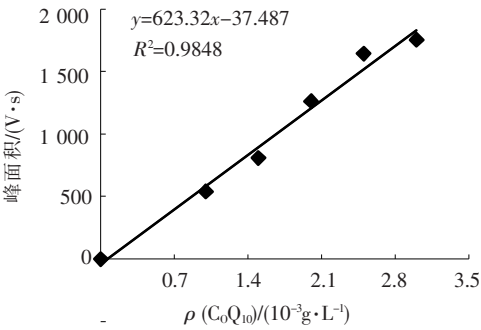


图 2 CoQ₁₀标准曲线

坏直接关系到产品的收率,许芳等研究表明采用乙醇与丙酮对 PSB 中 CoQ₁₀提取效果较好.本文对菌体细胞分别采用:1) 无水乙醇提取 5 h;2) 丙酮提取 5 h;3) 丙酮提取 5 h 后,挥发去除全部丙酮,用无水乙醇溶解.不同提取溶剂对 CoQ₁₀提取率的影响见图 3,可见,先用丙酮提取 5 h 后,挥发掉全部丙酮,再用无水乙醇溶解,这一提取方法相对提取率最高.

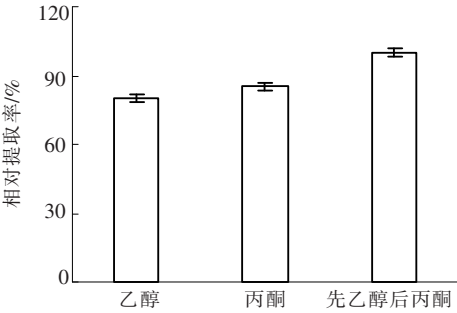


图 3 不同溶剂对 CoQ₁₀提取率的影响

2. 3 外标加样回收率及检测限实验

采用上述确立的检测方法及提取方法,并进行外标加样实验,加样回收率见表 1.平均回收率为 99. 13%,相对标准偏差为 0. 81% (n = 5).实验表明,上述方法精密度高,重复性好,可用于 CoQ₁₀的提取与检测.

表 1 加样回收率(n = 5)

样品中 CoQ ₁₀ 质量/mg	对照品中加入 CoQ ₁₀ 质量/mg	CoQ ₁₀ 总质量/mg	回收率/%
6. 40	3. 20	9. 60	99. 17
6. 40	6. 40	12. 80	99. 23
6. 40	9. 60	16. 00	99. 01
6. 40	12. 80	19. 20	99. 21
6. 40	16. 00	22. 40	99. 04

表 2 样品中 CoQ₁₀质量检测限试验可见,当 CoQ₁₀质量浓度低于 9. 6 mg/L 时,检测结果出现很大的偏差,当 CoQ₁₀质量浓度高于 22. 4 mg/L 时,由于质量浓度过高也出现很大的偏差,可重复性

差,因此对 CoQ₁₀ 质量浓度的检测限为 9. 6 ~ 22. 4 mg/L.当 CoQ₁₀质量浓度低于 3. 2 mg/L 时,应先浓缩再进行检测,当 CoQ₁₀质量浓度高于 22. 4 mg/L 时,应先稀释再进行检测.

2.4 不同培养条件与培养时期对 PSB 内 CoQ₁₀ 质量的影响

PSB 内 CoQ₁₀ 的含量是否稳定将直接关系到检测方法的可行性.PSB 培养条件光照-溶解氧组合的不同可能导致 PSB 代谢类型不同,不同代谢类型的 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量可能不同^[10].同一种微生物在不同的生长时期,由于细胞代谢活力、对不良条件的抵御能力、菌体体积的不同可能引起 CoQ₁₀ 含量不同.不同培养条件及培养时期 PSB 内 CoQ₁₀ 质量的研究见图 4 和图 5.

表 2 检测限试验

样品中 CoQ ₁₀ 质量浓度/(mg · L ⁻¹)	回收率/%
3. 20	70. 15±2. 89
9. 60	99. 17±0. 92
22. 40	99. 04±0. 84
25. 60	80. 01±2. 37

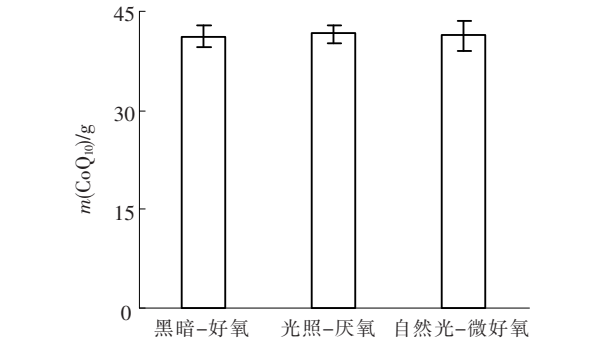


图 4 不同培养条件每克烘干后 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量

由图 4 可见,黑暗-好氧、光照-厌氧、自然光-微好氧条件下,每克烘干后 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量分别为(41. 2±1. 7)、(41. 6±1. 3)、(41. 3±2. 3) mg,不同培养条件下每克烘干后的 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量稳定.

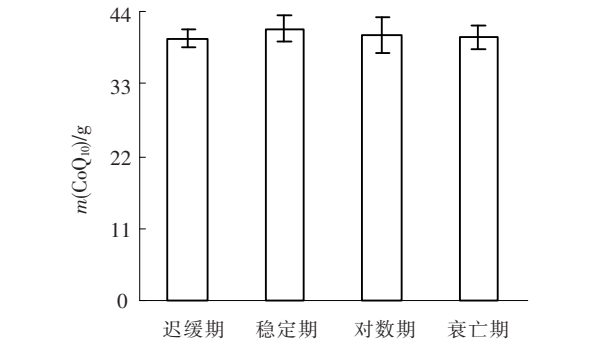


图 5 不同培养时期每克烘干后 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量

由图 5 可见,在不同培养时期迟缓期、稳定期、对数期、衰亡期每克烘干后 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量分别为(39. 8±1. 4)、(41. 4±2. 0)、(40. 3±1. 8)、(40. 1±1. 9) mg.不同培养时期每克烘干后 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量稳定.

2.5 废水中干扰因素对 PSB 内 CoQ₁₀ 质量的影响

废水中的糖类、蛋白质、脂类等杂质的存在可能干扰 CoQ₁₀ 的检测.处理污水过程中不可避免地会感染杂菌,杂菌的菌群中可能含有 PSB,因此杂菌的存在也可能干扰 CoQ₁₀ 的检测.废水中干扰因素的研究见图 6 和图 7.

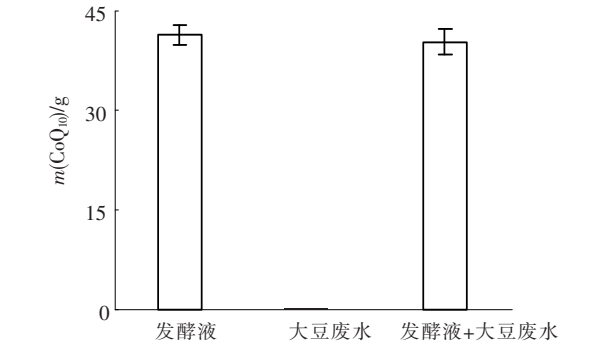


图 6 发酵液、大豆废水、发酵液+大豆废水中每克烘干后 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量

由图 6 可见,发酵液、大豆废水、发酵液+大豆废水中每克烘干后 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量分别为(41. 5±1. 5)、0、(40. 3±1. 9) mg.废水本身不含有 PSB,废水中杂质的存在不干扰 CoQ₁₀ 的检测.

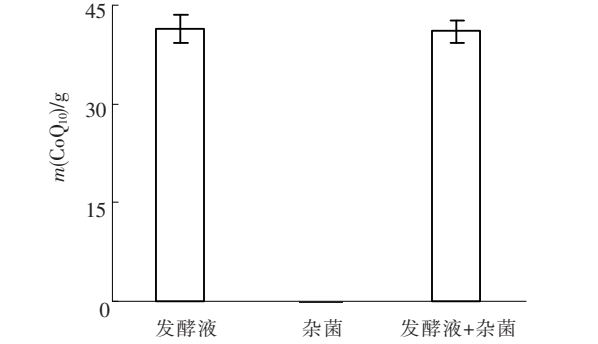


图 7 发酵液、杂菌、发酵液+杂菌中每克烘干后 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量

由图 7 可见,发酵液、杂菌、发酵液+杂菌中每克烘干后 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量分别为(41. 5±2. 1)、(61. 2±0. 01)、(41. 0±1. 7) mg.杂菌中 CoQ₁₀ 的含量十分的少,与废水中 PSB 内 CoQ₁₀ 的质量不在同一数量级上,因此杂菌的存在不干扰 CoQ₁₀ 的检测.

由图 4~7 可见,不同培养条件及培养时期的 PSB 内 CoQ₁₀ 质量分数非常稳定,废水中的杂质以及杂菌等干扰因素均不影响 CoQ₁₀ 的检测.表明本方法可用于水及废水中 CoQ₁₀ 质量的检测,从而可用于分析水及废水中 PSB 的产量.

2.6 PSB 菌体产量的换算

由图 1 可知,CoQ₁₀ 质量浓度与峰面积关系为

$$Y = 623. 32X - 37. 487.$$

其中: X 为 CoQ_{10} 的质量浓度, g/L ; Y 为峰面积, $V \cdot \text{s}$; $R^2 = 0.9848$).

CoQ_{10} 质量分数为

$$w(\text{CoQ}_{10}) = \frac{\rho(\text{CoQ}_{10})}{\rho(\text{PSB})} \times 100\%.$$

由图 4 和图 5 可知, CoQ_{10} 质量分数为 4.08%.

由式(1)、(2) 可得, 峰面积与 PSB 质量浓度的关系为

$$\rho(\text{PSB}) = \frac{Y + 37.487}{25.431}.$$

3 结 论

1) 利用 HPLC 法分析水与废水中 CoQ_{10} 的质量来定量表征 PSB 的产量, 建立了一个定量表征水及废水中 PSB 含量的方法. 提出色谱条件为: 色谱柱为 SphherisorbC18 (10 $\text{cm} \times 4.6 \text{ mm ID}$) 柱; 甲醇与无水乙醇为流动相, 体积比 9 : 1; 流速为 1 mL/min ; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 紫外检测波长 275 nm ; 进样量 15 μL ; 柱压 16.4 MPa .

2) 先用丙酮提取 5 h 后挥掉全部丙酮再用无水乙醇溶解这一提取方法对 CoQ_{10} 的相对提取率最高. 平均回收率为 99.13%, 相对标准偏差为 0.81% ($n = 5$). 不同培养条件及培养时期 PSB 内 CoQ_{10} 的含量十分稳定. 废水中杂质、杂菌等干扰因素均不影响检测结果.

3) PSB 质量浓度为 $(Y + 37.487)/25.431 \text{ g/L}$, 其中 Y 为峰面积, $V \cdot \text{s}$, 可用上述方法定量分析水中 PSB 的菌体产量.

参考文献:

[1] LIU Huiling, ZHANG Zhanfeng, LI Changling, *et al.* Effect of photosynthetic bacteria on tilapia based on water quality and disease resistance [J]. *Fishery Modernization*, 2009, 6(10):1003-1011.

[2] LIU Shuangjiang. Hydrogen production from soybean wastewater by immobilized photosynthetic Bacteria [J]. *Chinese Journal of Enviromental Science*, 1995, 1(1): 12-19.

[3] 戴晓, 张光明. 光合细菌 (Z08) 啤酒废水资源化研究 [J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2010, 42(6): 937-940.

[4] FRIGAARD N U, MARESCA J A, YUNKER C E, *et al.* Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in the green sulfur bacterium chlorobium tepidum [J]. *Journal Bacterial*, 2004, 186(16):5-10.

[5] 付保荣, 曹向宇, 冷阳, 等. 光合细菌对水产养殖水质和水生生物的影响 [J]. *生态科学*, 2008, 27(2):172-179.

[6] KEN S, MASANORI W, YOSHITO S. Applications of photosynthetic bacteria for medical fields [J]. *Journal of Bioscience*, 2005, 12(3):472-478.

[7] 吴祖芳, 翁佩芳, 陈坚. 辅酶 Q10 的功能研究进展 [J]. *宁波大学学报: 理工版*, 2001, 2(2):231-235.

[8] 许芳, 张淑荣, 张鹏. 酶解和冻融辅助超声提取光合细菌中辅酶 Q10 的研究 [J]. *化学与生物工程*, 2008, 8(2):13-18.

[9] 安静. 光源和光谱对光合产氢菌群产氢工艺影响研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.

[10] 沈萍, 陈向东. 微生物学 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.

(编辑 魏希柱)