

不同基质条件对生物膜细胞外聚合物组成和含量的影响

李久义 左 华 栾兆坤 朱宝霞 贾智萍

(中国科学院生态环境研究中心, 环境水化学国家重点实验室, 北京, 100085)

摘 要

对比研究了处于胶体和溶解状态的有机物对生物膜胞外聚合物组成和含量的影响。研究发现, 不同基质条件对胞外聚合物的总量、多糖和蛋白质含量产生影响, 另外, 基质条件也会对生物膜的表面结构造成一定的影响。

关键词: 生物膜, 胞外聚合物, 溶解态有机物, 胶体态有机物。

生物膜是由微生物细胞、细胞外高分子物质 (EPS) 组成, 这些高分子物质主要来源于细胞内分泌、细胞自溶和从废水中吸附得来。由于 EPS 是生物膜最主要的成分, EPS 的组成和数量会影响生物膜的很多性质, 例如空隙率、扩散性、强度、导热性、吸附性能和微生物代谢活性等。但是, 对于生物膜 EPS 的研究还很少, 对 EPS 数量和特性的了解非常有限^[1], 特别是关于废水中不同基质条件对 EPS 组成和数量的研究还没有报道。

城市污水中含有蛋白质、脂类、碳水化合物、腐殖质、核酸以及别的有机化合物, 这些有机污染物在废水中以溶解、胶体和颗粒状态存在, 而且各种状态所占的比率根据废水的来源变化很大, 但是约占 COD 30% 的有机物与胶体物质有关^[2]。

本文主要对比研究了处于胶体状态和溶解状态的有机物对生物膜 EPS 组成和数量的影响。

1 实验部分

1.1 实验装置

实验在两个完全相同的曝气生物滤池中进行, 滤池的内径为 5.5cm, 高度为 2.0m, 内部装填直径为 2—4mm 的页岩陶粒。空气和配制的废水从滤池底部进入, 空气和废水流速分别为 10 和 $0.6\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ 。配制的废水中含有氮源和有机碳源以及一些微量元素 (表 1)。两个滤池的废水除了有机碳源以外, 其它组成完全一致。在滤池 A 中以葡萄糖作为唯一的溶解性有机碳源, 而滤池 B 分别以淀粉和葡萄糖作为胶体态和溶解态有机碳源, 两种物质分别构成废水中一半的 COD。当两个滤池的运行达到稳定状态以后, 从滤池的不同高度处取出生长有生物膜的陶粒, 进行生物膜 EPS 的提取和组成测定。

表 1 实验过程中配水的组成 (用时稀释 20 倍)
Table 1 The composition of concentrated synthetic wastewater

组 分	浓度/ g·l ⁻¹		组 分	浓度/ g·l ⁻¹	
	滤池 A	滤池 B		滤池 A	滤池 B
NaHCO ₃	10	10	K ₂ HPO ₄	0.04	0.04
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.97	4.97	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.005	0.005
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.16	0.16	葡萄糖	0.50—6.00	0.25—3.00
CaCl ₂	0.02	0.02	淀粉	—	0.24—2.88
KH ₂ PO ₄	0.0015	0.0015			

1.2 EPS 的提取及组成测定^[3]

在 EPS 提取过程中, 第一步冲洗: 目的是收集粘性物质. 取约 10g 的陶粒连同 20ml 的去离子水一起放入离心试管中, 先将轻轻震荡后于 3500 r·min⁻¹ 离心 10min, 收集上清液作为粘性物; 第二步洗脱: 目的是得到囊状物质. 向冲洗完成后的离心试管中再加入 20ml 含有 0.22% 甲醛的 8.5% 的 NaCl 溶液, 用调速搅拌器于 300r·min⁻¹ 下搅拌 1min, 得到囊状物质; 第三步提取: 将洗脱的物质与细胞分离. 将经过洗脱的离心试管在室温下于 12000r·min⁻¹ 下离心 30min, 收集上清液; 第四步过滤: 得到 EPS. 将离心得到的上清液用 0.22μm 的醋酸纤维膜过滤, 以保证得到的样品中不含有细胞; 第五步透析: 去除甲醛. 由于提取过程中使用的甲醛会干扰蛋白质的测定, 因此, 所有的样品都应当利用透析的方法去除甲醛. 利用切割分子量为 8000—12000 的大孔透析膜在盛有 2L 去离子水的大烧杯中连续搅拌透析, 最佳透析时间为 5—7h.

由于 EPS 最主要的成分为蛋白质和多糖. 所以在实验过程中测定 EPS 中多糖和蛋白质的含量, 另外, 由于 DNA 的数量一般用来评价提取过程的优劣, 因此, DNA 的含量也进行了测定. 蛋白质的测定利用考马丝亮蓝法^[4], 多糖利用苯酚 硫酸比色法^[4], DNA 测定选用 DAPI 荧光比色法^[5].

用扫描电子显微镜对生物膜的表面结构进行观察, 确定不同基质条件对细胞与 EPS 相互结构的影响.

2 结果与讨论

不同基质条件对生物膜细胞外聚合物组成和含量的影响见图 1.

2.1 基质条件对 EPS 总量的影响

本文将多糖和蛋白质的数量和认为是 EPS 的总量. 从图 1 可以看到, 滤池中 EPS 的含量沿滤池高度逐渐下降, 但是在滤池达到 100cm 以后, 这种下降趋势变得很不明显, 甚至在滤池 B 中 EPS 的含量略有上升. 由于滤池底部废水中含有大量的有机物, 微生物细胞处于较高的食物/ 微生物 (F/M) 条件, 细胞合成量大. 从反应器处理性能上看, 进水中大部分有机物在滤池底部 70cm 处得到去除, 废水的总有机碳 (TOC) 沿滤池高度逐渐下降. 有研究表明, 在较高的 F/M 条件下, 微生物细胞不能够将可以得到的所

有的碳源用于细胞合成, 多余的含碳基质可以被转化成胞内储存粒子和在 EPS 中积累的胞外高分子^[6, 7]. 在低的 F/M 条件下, 储存物质的减少反映了细胞可以得到的碳源的下降. 另一方面, 在滤池的上部, 由于细胞可以得到的食物较少, 细胞内源代谢造成的细胞自溶作用较强, 这会增加 EPS 的含量. 所以, 内源代谢的增强可能是滤池上部 EPS 停止下降的一个原因.

对比两个滤池, 由于滤池 A 中以葡萄糖作为唯一的有机碳源, 葡萄糖属于小分子有机物, 可以较容易地通过 EPS 和细胞膜; 而滤池 B 选用淀粉和葡萄糖作为有机碳源, 淀粉只有被水解成较小分子才能够进入 EPS 和细胞内. 在反应器处理性能方面, 在两个滤池中, 进水有机物的 90% 都能够在滤池底部 70cm 内被去除. 也就是在这一区域内两个滤池 EPS 总量相关较大, 这就是说细胞利用较高浓度的小分子的溶解态有机物时, 产生的胞外聚合物会比利用较大分子量的胶体态有机物时产生的聚合物要多.

2.2 基质条件对多糖产生量的影响

EPS 中比率最高的物质是多糖, 但是, 也有一部分关于活性污泥和生物膜中 EPS 的研究显示, 蛋白质是胞外聚合物中主要成分^[8-10]. 这种差异可能是由于不同的研究者利用的提取方法不同造成, 目前对于 EPS 的提取并没有一种标准方法, 这就导致了不同研究者得到的结果没有可比性.

对于两个滤池来说, EPS 中多糖的含量随柱高增加而逐渐降低 (图 1), 由于多糖是 EPS 主要成分, 并且有研究显示细胞物质能量的储存多以碳水化合物形式存在, 因此, EPS 总量随滤池高度的变化可以用多糖在不同的 F/M 条件下的储存作用来解释.

2.3 基质条件对蛋白质产生量的影响

对于使用淀粉和葡萄糖作为有机碳源的滤池来说, 在反应器底部 100cm 内 EPS 中, 蛋白质的含量随滤池高度的增加逐渐降低, 而在滤池的上部, 蛋白质的含量维持在一个较低的水平, 变化不大 (图 1). 在滤池的底部, 淀粉的水解过程发生的很快, 在最开始的 40cm 处超过 90% 的淀粉被水解.

有研究报道, 分子量大于 10^6 道尔顿的高分子, 不能穿过生物膜中由 EPS 构成的框架结构^[11], 只有更小的分子才能够透过细胞膜进入细胞内部. 也有研究表明, 具有胞外水解活性的酶通常位于细胞聚集体的框架结构中^[12]. Daniellson^[13]等人报道, 生物膜 EPS 在生物膜的形成过程中, 蛋白质在生物膜附着到载体表面上起作用. 另外, 在很多关于活性污泥絮体 EPS 的研究中, 显示蛋白质在活性污泥絮体的絮凝作用中起到主要作用. 而对于利用葡萄糖的滤池来说, EPS 中蛋白质的含量随反应器高度的变化不太明显.

2.4 基质条件对 DNA 产生量的影响

生物膜 EPS 中 DNA 的含量变化很大, 同时标准偏差与平均值之间的比值也较大. DNA 构成了 EPS 总量的 1—15%, 但是从图 1 中很难建立 DNA 沿滤池高度和与基质条件之间的关系. EPS 中的 DNA 主要来自于微生物细胞的自溶作用, 在一般情况下 EPS 中 DNA 含量应当较少, 所以可以利用所提取样品中 DNA 的含量来判断提取过程中是否造成大量的细胞破碎, 将细胞内的物质引入到 EPS 中. 因此, 可以利用 DNA 的含量来评判提取方法的优劣.

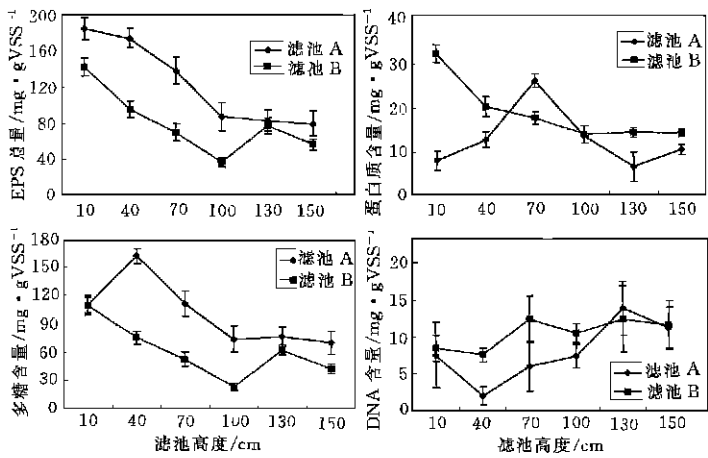


图 1 不同基质条件对生物膜胞外聚合物组成和含量的影响

Fig. 1 The effect of substrate conditions on compositions of extracellular polymeric substances in biofilms

2.5 基质条件对生物膜表面结构的影响

图 2 是从滤池底部 10cm 处取出的生物膜载体的扫描电镜照片。照片显示, 在两种生物膜中杆菌都占主要地位, 同时没有发现丝状菌的存在。通过对比可以发现, 利用葡萄糖作为有机碳源的生物膜中的微生物, 以一种相对独立和松散的形式存在; 相反, 在废水中含有胶体态大分子有机物的生物膜中的微生物, 细胞大多缠绕在以胞外聚合物形成的、紧密的网状结构中间, 在这些网状结构中间也存在着大量的沟道。从图 2 的对比, 我们认为溶解态和胶体态有机物会对生物膜中细胞与 EPS 结构造成一定的影响。

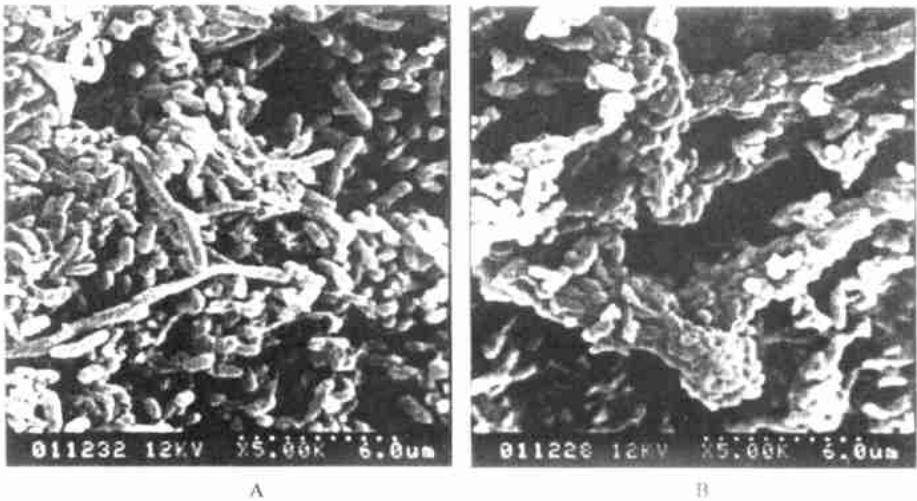


图 2 不同基质条件对滤池中生物膜表面结构的影响

Fig. 2 Surface morphological characteristics of biofilms taken from 10cm port of both filters using a scanning electron microscope. (left from filter A and right from filter B)

3 小结

- (1) 在两个滤池中, 生物膜 EPS 的含量随有机物浓度降低的过程逐渐下降.
- (2) 多糖是 EPS 中最重要的组成部分, 溶解态有机物的生物膜 EPS 中多糖的含量要高于胶体态有机物的生物膜.
- (3) 胶体态有机物的生物膜 EPS 中, 多糖的含量要高于溶解态有机物的生物膜 EPS 中蛋白质的含量, 同时蛋白质含量的变化与胶体态有机物的水解过程相一致.
- (4) EPS 中 DNA 的含量与所利用的有机碳源没有相关性.
- (5) 不同的基质条件对生物膜的表面结构产生一定的影响.

参 考 文 献

- [1] Zhang X Q, Bishop P, Spatial Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Biofilms. *J. Env. Eng.*, 2001, **127** (9): 850—856
- [2] Guellil A, Block J C, Thomas F et al., Transfer of Organic Matter between Wastewater and Activated Sludge Flocs. *Wat. Res.*, 2001, **35** 143—150
- [3] Zhang X Q, Bishop P, Kinkle B K, Comparison of Extraction Methods for Quantifying Extracellular Polymers in Biofilms. *Wat. Sci. Tech.*, 1999, **39** (7): 211—218
- [4] 李建武等, 生物化学实验原理与方法. 北京: 北京大学出版社, 1994
- [5] Brunk C F, Jones K C, James T W, Assay for Nanogram Quantities of DNA in Cellular Homogenates. *Analyt. Biochem.*, 1979, **92** 497—500
- [6] Harris R H, Mitchell R, Inhibition of the Flocculation of Bacteria by Biopolymers. *Wat. Res.*, 1975, **9** 993—999
- [7] Andreadakis A D, Physical and Chemical Properties of Activated Sludge Flocs. *Wat. Res.*, 1993, **27** 1707—1714
- [8] Liao B Q, Allen D G, Droppo I G et al., Surface Properties of Sludge and Their Role in Bioflocculation and Settability. *Wat. Res.*, 2001, **35** 399—350
- [9] Azeredo J, Lazarvo V, Oliveira R, Methods to Extract the Exopolymeric Matrix from Biofilms: a Comparative Study. *Wat. Sci. Tech.*, 1999, **39** (7): 243—250
- [10] Martir Cereceda M, Jonand F, Guiner A et al., Characterization of Extracellular Polymeric Substances in Rotating Biological Contactors and Activated Sludge Flocs. *Environ. Tech.*, 2001, **22** 951—959
- [11] Jimenez B, Noyola A, Capdeville B et al., Dextran Blue Colorant as a Reliable Tracer in Submerged Filters. *Wat. Res.*, 1998, **22** 1253—1257
- [12] Confer D R, Logan B E, Molecular Weight Distribution of Hydrolysis Products during Biodegradation of Model Macromolecules in Suspended and Biofilm Cultures. I: Bovine Serum Albumin. *Wat. Res.*, 1997, **31** 2127—2136
- [13] Dignac M F, Urbain V, Rybacki D et al., Chemical Description of Extracellular Polymers: Implication on Activated Sludge Floc Matrix. *Wat. Sci. Tech.*, 1998, **38** 45—53

2002 年 4 月 23 日收到.

EFFECTS OF SUBSTRATE CONDITIONS ON COMPOSITIONS OF EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES IN BIOFILMS

LI Jiu-yi ZUO Hua LUAN Zhao-kun ZHU Bao-xia JIA Zhi-ping

(State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085)

ABSTRACT

The effects of colloidal and soluble organic matters on the amounts and compositions of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilms were studied in bench scale biofilters. The results of experiments indicated that the amounts of carbohydrates and protein in biofilm EPS, as well as total EPS, were significantly influenced by the difference of substrate conditions. The surface properties of biofilms, observed by a scanning electron microscope, were to some extent affected by the substrate conditions.

Keywords: biofilm, extracellular polymeric substances, colloidal organic matter, soluble organic matter.