



文章栏目: 水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.202008172

中图分类号 X703.1

文献标识码 A

刘前进, 刘立凡. 胞外聚合物中蛋白质对好氧污泥颗粒化的影响[J]. 环境工程学报, 2021, 15(3): 929-938.

LIU Qianjin, LIU Lifan. Effect of protein in extracellular polymeric substance on aerobic sludge granulation[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(3): 929-938.

## 胞外聚合物中蛋白质对好氧污泥颗粒化的影响

刘前进, 刘立凡\*

广东工业大学土木与交通工程学院, 广州 510006

第一作者: 刘前进 (1995—), 男, 硕士研究生。研究方向: 好氧颗粒污泥的培养。E-mail: 2115705783@qq.com

\*通信作者: 刘立凡 (1972—), 女, 硕士, 副教授。研究方向: 生物处理理论与技术。E-mail: lifan\_liu@126.com

**摘要** 为确定胞外聚合物 (EPS) 中蛋白质 (PN) 对好氧颗粒污泥 (AGS) 形成的影响, 研究了好氧污泥颗粒化过程, 污泥 EPS 变化规律及其与污泥表面特性的相关性, 分析了 AGS 和接种污泥 EPS 组分和相关官能团的差异并确定了 EPS 分布情况。结果表明, 在好氧污泥颗粒化期间, EPS 中 PN 含量由  $13.98 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  增加到  $41.86 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 多糖 (PS) 含量维持在  $15.88 \sim 26.74 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , PN 与 PS 的比值 (PN/PS) 由 0.88 增加到 1.57。PN 含量与污泥 Zeta 电位和污泥表面疏水性 (RH) 分别呈负相关和正相关, 所对应的相关系数 ( $r$ ) 分别为 0.950 和 0.934。与接种污泥相比, AGS 的 EPS 中代表酪氨酸和色氨酸类蛋白质的荧光强度增强, 并且出现芳香族蛋白和富里酸类物质以及含有 N—H 官能团的蛋白质。因此, 在好氧污泥颗粒化过程中, EPS 中 PN 种类和含量均有所增加, 污泥 Zeta 电位降低, RH 升高, 对微生物相互聚集形成 AGS 具有促进作用。

**关键词** 蛋白质; 好氧颗粒污泥; 胞外聚合物; 多糖; 颗粒化

好氧颗粒污泥 (aerobic granular sludge, AGS) 是微生物细胞在一定选择压下自凝聚形成的一种规则而紧密的颗粒状污泥<sup>[1]</sup>。与普通活性污泥相比, AGS 具有结构紧密、沉降性优良、微生物量高、同步脱氮除磷、耐有机负荷等优点<sup>[2-3]</sup>, AGS 形成机制日益成为污水处理领域的研究热点。污泥中的胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 是微生物在一定环境条件下分泌的高分子物质, 其主要成分是蛋白质 (protein, PN) 和多糖 (polysaccharides, PS), 还有少量的腐殖酸、脂质、核酸以及富里酸类物质<sup>[4]</sup>。EPS 作为细胞菌胶团的重要组分, 其含量变化可改变微生物细胞表面特性, 影响细胞间的相互凝聚能力<sup>[5]</sup>, 促进 AGS 形成和维持其颗粒状立体结构<sup>[6]</sup>, 对好氧污泥颗粒化具有重要作用。

目前, 有关 AGS 的 EPS 成分的研究结果具有较大差异。OLIVERIRA 等<sup>[7]</sup>认为, 在好氧污泥颗粒化过程中 PN 是 EPS 的主要成分, 而 LIN 等<sup>[8]</sup>则发现 EPS 中 PS 含量最高。TAY 等<sup>[9]</sup>认为, EPS 中的 PS 可提高微生物细胞间的凝聚力, 具有强化 AGS 结构稳定性的功能。WANG 等<sup>[10]</sup>和 ADAV 等<sup>[11]</sup>也证明 PS 作为 AGS 的核心并构成内部骨架以支撑整个颗粒状立体结构。但 LIU 等<sup>[12]</sup>和 MCSWAIN 等<sup>[13]</sup>认为 PN 是 AGS 的核心, CHEN 等<sup>[14]</sup>亦发现 PN 是维持 AGS 结构稳定的关键物质。因此, 在 EPS 对好氧污泥颗粒化的影响方面仍存在分歧。

本研究考察了污泥 EPS 中 PN 含量和污泥表面特性的相关性, 采用三维荧光光谱 (three-

dimensional fluorescence spectrum, 3D-EEM) 和傅里叶变换红外光谱 (fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 等技术对接种污泥和 AGS EPS 组分和官能团进行了比较, 明确了接种污泥和好氧颗粒污泥中 EPS 组成成分的差异, 同时使用激光扫描共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 确定 AGS EPS 的分布情况, 进一步了解 EPS 中 PN 对好氧污泥颗粒化的影响, 以为 AGS 形成的机理研究及其技术发展提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 接种污泥和实验用水

实验所用的接种污泥取自广州市猎德污水处理厂四期二沉池的回流污泥, 接种污泥的理化特性为: 接种污泥为絮状, 污泥浓度为  $7\ 588\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 污泥沉降比为 84%, 污泥容积指数为  $110.7\ \text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , 污泥沉降速度为  $12.36\ \text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ 。接种前淘洗掉污泥中的杂质, 并对其进行曝气 24 h。接种污泥的体积为 3.7 L, 约占序批式反应器 (sequencing batch reactor, SBR) 有效容积的 1/2。

实验用水采用人工配制的模拟废水, 以  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  和  $\text{CH}_3\text{COONa}$  为混合碳源,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  为磷源, 用  $\text{NaHCO}_3$  调节进水 pH 至 7.5 左右, 并向进水中添加  $1\ \text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$  的微量元素溶液。人工配置的模拟废水水质组成如表 1 所示。

### 1.2 实验装置及其运行方式

1) 实验装置。在 SBR 中培养 AGS, 反应器主体为有机玻璃制成的圆柱体, 其内径为 9.8 cm, 总高度为 100 cm, 有效高度为 98 cm, 有效高径比为 10, 反应器有效容积为 7.39 L。装置如图 1 所示。

2) 运行方式。在好氧污泥颗粒化过程中, SBR 运行过程包括进水、曝气、沉淀、排水和闲置 5 个阶段, 运行周期为 6 h, 包括进水 4 min, 曝气 338~351 min, 沉淀 2~15 min, 排水 1 min, 闲置 2 min。反应器液体表面上升气速为  $0.86\sim 4.64\ \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , 进水有机物浓度 (以 COD 计) 为  $800\sim 1\ 800\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 容积交换率为 50%, 通过水浴加热使 SBR 温度维持在  $25\ ^\circ\text{C}$ 。采用调控 COD、表面上升气速和污泥沉降时间以培养 AGS。SBR 运行的具体参数见表 2。

### 1.3 分析方法

1) 常规指标分析。采用热提取法<sup>[15]</sup>提取 EPS, EPS 含量由 PN 和 PS 总含量表示; PS 含量采用苯酚-硫酸法<sup>[16]</sup>测定; PN 含量采用 BCA(bicinchoninic acid) 分光光度法<sup>[17]</sup>测定, 其中 EPS、PN 和

表 1 模拟废水水质组成

Table 1 Water quality of simulated wastewater

成分	质量浓度/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	成分	质量浓度/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	500~1 200	$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	500
$\text{CH}_3\text{COONa}$	300~600	$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{NH}_4\text{Cl}$	40~90	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	120
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	8~18	$\text{ZnCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	120
$[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2]_2$	100	$\text{H}_3\text{BO}_3$	150
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30	KI	30
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	60
EDTA	20	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	150

注: 表 1 右列成分为微量元素溶液组成。

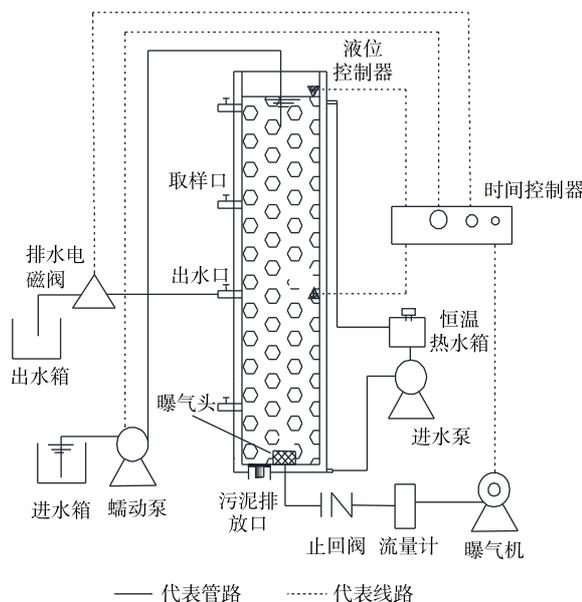


图 1 SBR 装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of SBR

表2 SBR运行参数

Table 2 Operating parameters of SBR

运行时间/d	进水/min	曝气/min	沉淀/min	排水/min	闲置/min	表面上升气速/(cm·s <sup>-1</sup> )	COD/(mg·L <sup>-1</sup> )
1~13	4	338	15	1	2	0.86	800
14~28	4	341	12	1	2	1.25	1 000
29~43	4	343	10	1	2	1.86	1 200
44~57	4	345	8	1	2	2.65	1 600
58~75	4	348	5	1	2	3.87	1 600
76~110	4	351	2	1	2	4.64	1 800

PS含量均以MLSS计；污泥Zeta电位采用Zeta电位分析仪(Zetasizer Nano ZS, Malvern)测定。

颗粒污泥表面相对疏水性(relative hydrophobicity, Rh)。RH的具体测定过程如下：取泥水混合液10 mL，用pH为7的三羟基甲基氨基甲烷缓冲液清洗2次；置于冰水浴中，用超声波细胞破碎仪(JY92-IIN, SCIENTZ)在48 W条件下超声2 min；将超声后的悬浮液与10 mL正十六烷在分液漏斗中混合、摇匀5 min；静置30 min后测定相关污泥浓度，污泥浓度采用国家标准方法<sup>[18]</sup>进行测定。RH<sup>[19]</sup>根据式(1)进行计算。

$$RH = \left(1 - \frac{Q_1}{Q_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中： $Q_0$ 为原污泥浓度，mg·L<sup>-1</sup>； $Q_1$ 为分液后水相中的污泥浓度，mg·L<sup>-1</sup>。

2) 3D-EEM分析。采用荧光光谱仪(FluoroMax-4, HORIBA Jobin Yvon)对EPS进行分析。激发波长(excitation wavelength, Ex)和发射波长(emission wavelength, Em)分别为220~400 nm和290~500 nm，增量均为5 nm，激发和发射狭缝宽度为3.6 nm，扫描速度为1 200 nm·min<sup>-1</sup>，响应时间为0.1 s。采用origin 8.0软件进行数据处理。

3) FTIR分析。采用傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet IS50, Thermofisher)对EPS溶液进行官能团测定。操作过程如下：将提取的EPS溶液置于-80℃的冷冻干燥机(Virtis 4K, VIRTIS)内冷冻干燥至无水；将干燥后的EPS和溴化钾以质量比为1:100的比例研磨并混合均匀，混合粉末压片成型后用红外光谱仪以分辨率为4 cm<sup>-1</sup>，扫描次数为32次，在4 000~500 cm<sup>-1</sup>内进行扫描，用origin 8.0软件进行数据处理。

4) 荧光染色和CLSM分析。用荧光染料对AGS进行染色，以观察AGS样品中PN、PS、活细胞和死细胞的分布，选用的荧光染料<sup>[20-21]</sup>如表3所示。染色后的AGS样品使用激光共聚焦显微镜(LSM 800 with Airyscan, Carl Zeiss)进行观察。

表3 荧光染料

Table 3 Fluorescent dye

荧光染料	Em/nm	Ex/nm	标记目标	染色时间/min
异硫氰酸荧光素	488	500~550	PN	60
刀豆蛋白A	543	550~600	PS	30
碘化丙啶	535	615	死细胞	30
4',6-二脒基-2-苯基吲哚	346	454	活细胞	10

## 2 结果和讨论

### 2.1 AGS形成过程

污泥在SBR不同运行阶段的外观变化如图2所示。接种污泥为灰褐色、絮状，结构松散。当SBR运行到第30天时出现少量细小的污泥颗粒，但絮状污泥占主体；在第50天，初期AGS形成，粒径较小。随着SBR持续运行，沉降性能较差的颗粒状污泥进一步被筛选出反应器，第70天

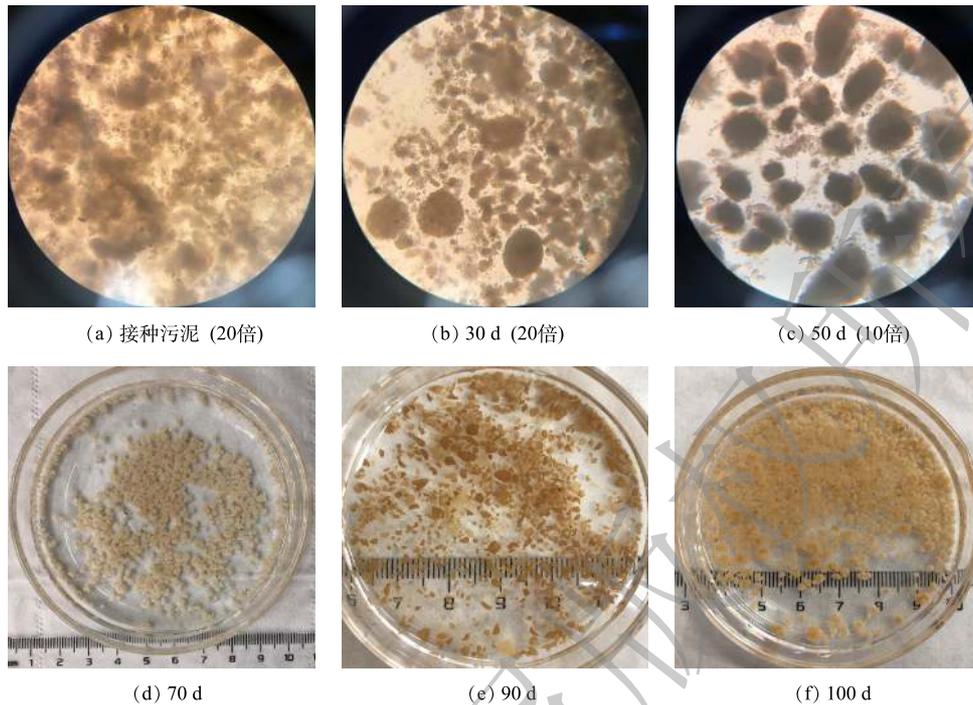


图2 污泥外观随时间的变化

Fig. 2 Change of sludge appearance with time

时 AGS 呈淡黄色, 表面有一层绒毛, 颗粒粒径主要集中在 1.0~1.5 mm。第 110 天时 AGS 培养成功, 其外观为橙黄色, 表面光滑, 整体呈球状或椭球状的立体结构, 颗粒粒径集中分布在 1.43~2.26 mm。

## 2.2 EPS、PN 和 PS 含量以及 PN/PS 变化

好氧污泥颗粒化过程中 EPS、PN 和 PS 含量以及 PN/PS 变化情况如图 3 所示, 接种污泥的 EPS、PN 和 PS 含量分别为 29.86、13.98、15.88  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , PN/PS 为 0.88。在 SBR 运行初期, EPS、PN 和 PS 含量均逐渐增加, PS 含量略高于 PN 含量, 这是因为污泥中的微生物在选择压的刺激下需分泌大量 PS 来维持正常的生命活动<sup>[22]</sup>。随后因选择压加强, 干扰了微生物细胞间的信息交流和信号分子传递, 打破了污泥中微生物生理活动的平衡, 导致微生物新陈代谢活动受到抑制, 因此, EPS、PN 和 PS 含量从第 45 天起均呈下降趋势, PN/PS 出现明显波动。从第 65 天起, 可能是因为 SBR 中有大量细小颗粒污泥, 微生物量较大且活性较高; 另一方面, 因为 SBR 长期运行, 污泥中的部分微生物细胞自溶, 所以 EPS 中的 PN 和 PS 含量增加。但微生物的代谢活动可消耗 EPS 中的 PS, 而 PS 含量的增加可能与其消耗近似处于平衡状态, 所以 PN/PS 值随着 PN 含量的增加而增大<sup>[23]</sup>。第 110 天时 AGS 培养成功, AGS 的 EPS、PN 和 PS 的含量分别为 68.60、41.86 和 26.74  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , PN/PS 为 1.57, 约是 SBR 启动时的 2 倍。在整个好氧污泥颗粒化过程中, EPS 和 PN 含量及 PN/PS 变化整体均呈增大趋势, 而 PS 维持在 15.88~26.74  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 说明 AGS 中 EPS 成分以 PN 占主导, 这与 CHEN 等<sup>[20]</sup> 研究结

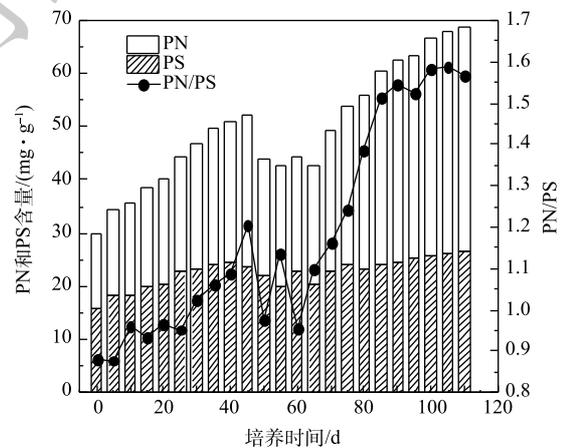


图3 EPS、PN 和 PS 含量以及 PN/PS 随时间的变化

Fig. 3 Changes of EPS, PN, PS contents and PN/PS with time

果一致。在整个好氧污泥颗粒化过程中, EPS 和 PN 含量及 PN/PS 变化整体均呈增大趋势, 而 PS 维持在 15.88~26.74  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 说明 AGS 中 EPS 成分以 PN 占主导, 这与 CHEN 等<sup>[20]</sup> 研究结

果一致。

### 2.3 PN含量和污泥Zeta电位的相关性

污泥Zeta电位变化及PN含量与Zeta电位之间的关系如图4所示。由图4(a)可知，接种污泥的Zeta电位为 $-27.64\text{ mV}$ ，在SBR运行前30 d内，因接种污泥要适应新的环境，其生长状态不稳定，所以污泥Zeta电位有一定波动。随后污泥Zeta电位开始下降，在第100天，污泥Zeta电位下降到 $-18.27\text{ mV}$ 。在第110天时AGS培养成功，其Zeta电位为 $-18.31\text{ mV}$ 。如图4(b)所示，PN含量和污泥Zeta电位呈负相关，相关系数( $r$ )为0.950。由于PN可与水中的金属离子发生离子键作用，压缩双电层，降低污泥Zeta电位<sup>[24]</sup>。此外，PN中带有正电荷的氨基类物质能够中和部分羟基和磷酸根基团中的负电荷，进一步降低污泥Zeta电位<sup>[25]</sup>。因此，污泥Zeta电位的降低可促进微生物间的相互凝聚，最终形成AGS。在本次实验过程中，PN含量基本处于增加趋势，而污泥Zeta电位趋于下降趋势，这说明EPS中PN含量增加，污泥Zeta电位降低。

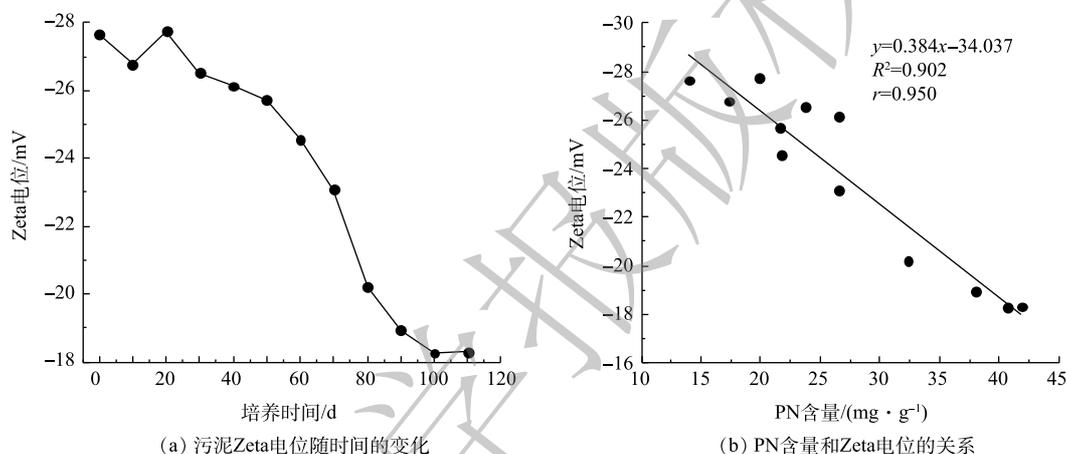


图4 污泥Zeta电位变化及PN含量与Zeta电位的关系

Fig. 4 Change of Zeta potential of sludge and the relationship between PN content and Zeta potential

### 2.4 PN含量和RH的相关性

RH变化及PN含量与RH之间的关系如图5所示。在好氧污泥颗粒化过程中，RH整体呈增加趋势。接种污泥的RH为27.27%，在SBR运行初期，RH基本呈缓慢增加趋势，在第70天RH达

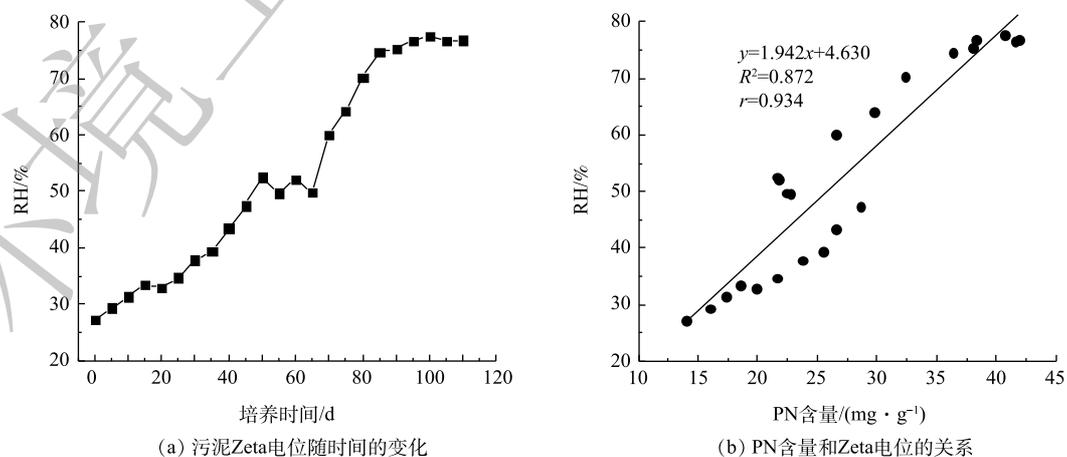


图5 RH变化及PN含量与RH的关系

Fig. 5 Change of RH and the relationship between PN content and RH

到 60.01%。随后因为初期 AGS 大量形成, 反应器中絮状污泥被颗粒状污泥代替, 所以 RH 开始显著增加, 在第 100 天时 RH 为 77.58%。随着 AGS 逐渐成熟稳定, 第 110 天时 AGS 的 RH 为 76.80%, 约是接种污泥的 2.8 倍(图 5(a))。LIU 等<sup>[26]</sup>发现 RH 和 SBR 运行期间的选择压密切相关, 因此, 其在好氧污泥颗粒化过程中具有重要作用。同样, DIGANCE 等<sup>[27]</sup>的研究表明, 污泥 EPS 中的 PN 是污泥的主要疏水成分。在本实验中发现 PN 含量变化与 RH 变化存在密切关系, 如图 5(b) 所示。PN 含量和 RH 呈正相关关系,  $r$  为 0.934。此外, 张丽丽等<sup>[28]</sup>发现 AGS 的 PN 含量与 RH 密切相关, 污泥 RH 随 PN 含量的增加而增大。结合 2.3 节的结果可知, 在好氧污泥颗粒化过程中, PN 含量增加, 污泥 Zeta 电位降低且 RH 升高, 有利于微生物细胞间的相互聚集, 促进 AGS 形成。

## 2.5 EPS 的 3D-EEM 图谱分析

采用 3D-EEM 技术对接种污泥和 AGS 的 EPS 组分进行比较。接种污泥和 AGS 的 EPS 的 3D-EEM 如图 6 所示。接种污泥和 AGS 的 EPS 的 3D-EEM 中均出现荧光峰 A(Ex: 270~285 nm, Em: 295~320 nm)、荧光峰 B(Ex: 270~295 nm, Em: 325~390 nm) 和荧光峰 C(Ex: 310~380 nm, Em: 400~470 nm), 其中荧光峰 A 和荧光峰 B 分别代表酪氨酸和色氨酸类蛋白质, 均属于溶解性微生物代谢产物, 酪氨酸类蛋白质是 AGS 形成的重要成分, 可促进絮状污泥颗粒化<sup>[29-30]</sup>; 而色氨酸类蛋白质为疏水性物质, 其与 EPS 中芳环氨基酸结构共同作用, 可提高 AGS 结构稳定性<sup>[31]</sup>。AGS 中 EPS 的荧光峰 A 和荧光峰 B 的荧光强度明显高于接种污泥, 这表明在好氧污泥颗粒化过程中, 污泥 EPS 中酪氨酸和色氨酸类蛋白质含量有所增加。AGS 的 EPS 的 3D-EEM 出现 2 个新荧光峰: 即代表芳香族蛋白类物质的荧光峰 D(Ex: 220~230 nm, Em: 290~310 nm) 和代表富里酸类物质的荧光峰 E(Ex: 220~240 nm, Em: 400~470 nm), 而芳香族蛋白类物质的存在有利于 AGS 的形成<sup>[28]</sup>。

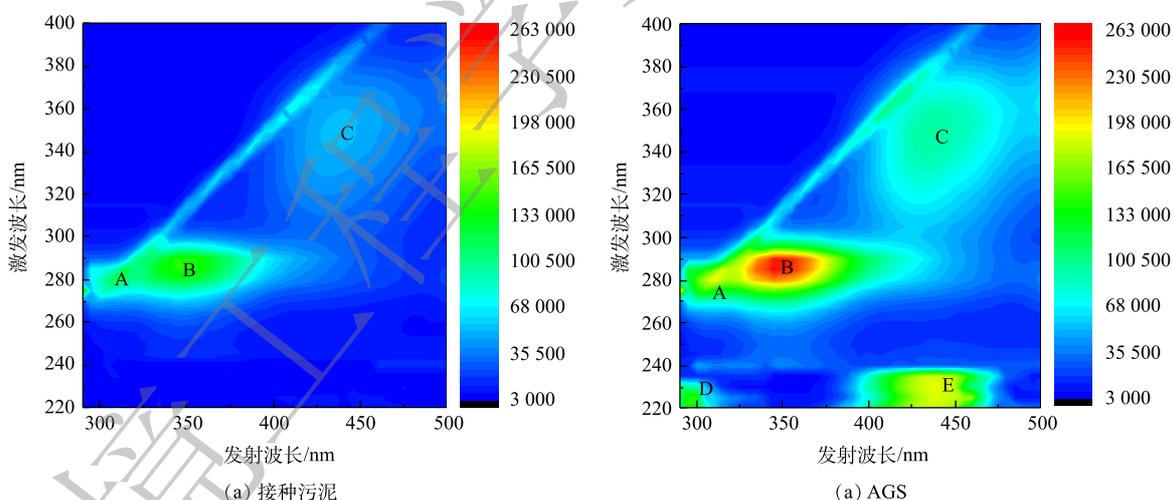


图 6 EPS 的 3D-EEM 图谱

Fig. 6 3D-EEM spectra of EPS

## 2.6 EPS 的 FT-IR 分析

为了确定接种污泥和 AGS 的 EPS 官能团的差异, 在  $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$  内进行了 EPS 的 FT-IR 分析, 结果如图 7 所示。 $1650\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  吸收峰是由蛋白质二级结构(酰胺 I)中的 C=O 拉伸振动引起的  $\beta$ -折叠和  $\alpha$ -螺旋,  $1550\text{ cm}^{-1}$  吸收峰是由酰胺 II 中的 N-H 弯曲产生<sup>[32-33]</sup>。AGS EPS 在  $1650\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  和  $1550\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰面积分别为 133.87、52.51(见表 4)。有研究<sup>[34-35]</sup>发现, 酰胺 I 中的蛋白质二级结构具有促进微生物絮凝, 加快推进好氧污泥颗粒化进程的作用, 而从接种污泥提取的 EPS 中未出现相似的吸收峰。

接种污泥和 AGS 的 EPS 分别在  $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 410\ \text{cm}^{-1}$  处出现与 C=O 对称拉伸有关的吸收峰 [36]。接种污泥的 EPS 中存在与 PN(酰胺 III) 有关的 C—N 拉伸所产生的  $1\ 260\ \text{cm}^{-1}$  吸收峰, 吸收峰面积为 36.43(见表 3), 而从 AGS 中提取的 EPS 中并未出现类似吸收峰。因 PS 中 C—O 伸缩震动和 C—OH 变形震动造成在  $1\ 140\ \text{cm}^{-1}$  和  $1\ 100\ \text{cm}^{-1}$  处出现吸收峰, 2 处吸收峰面积分别为 85.89 和 108.65(见表 4), 表明好氧污泥颗粒化过程中 PS 含量没有明显变化, 这与 PS 含量测定结果(图 3)相一致。

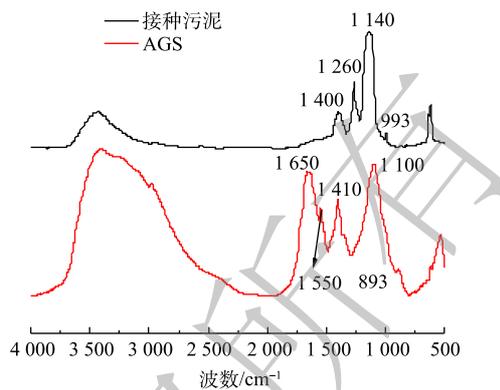


图 7 EPS 的 FT-IR

Fig. 7 FT-IR spectra of EPS

表 4 EPS 中各类物质吸收峰面积

Table 4 Absorption peak area of various substances in EPS

EPS来源	PN			PS ( $1\ 140\sim 1\ 100\ \text{cm}^{-1}$ )	核酸 ( $993\sim 893\ \text{cm}^{-1}$ )
	酰胺 I ( $1\ 650\sim 1\ 660\ \text{cm}^{-1}$ )	酰胺 II ( $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ )	酰胺 III ( $1\ 260\ \text{cm}^{-1}$ )		
接种污泥	—	—	36.43	85.89	3.93
AGS	133.87	52.51	—	108.65	7.10

### 2.7 EPS 的 CLSM 分析

为确定 AGS EPS 分布情况, 采用 CLSM 对 AGS EPS 分布进行了研究。如图 8 所示, AGS 表面附着 PN(绿色区域) 和 PS(蓝色区域)。EPS 分布在 AGS 外表层, 从而将微生物细胞包裹在 EPS 中。一方面, EPS 在 AGS 表面形成保护层, 在一定程度上可用来抵御环境恶化以及有毒物质对微生物

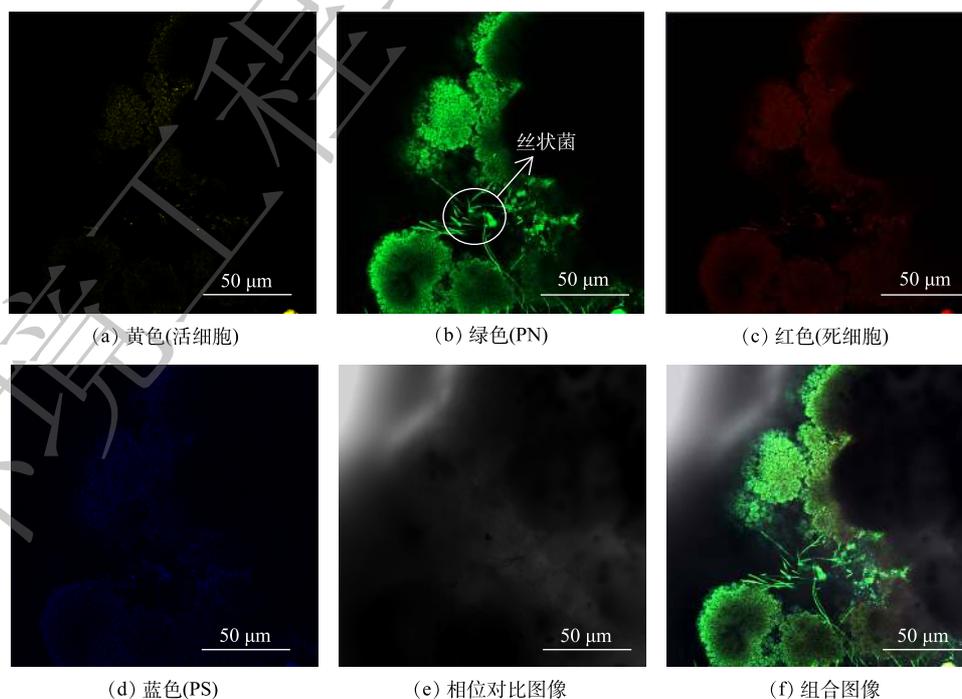


图 8 AGS 表面的 CLSM 图像

Fig. 8 CLSM images of AGS surface

细胞的危害;另一方面,在营养物质匮乏时,微生物将EPS作为新的能源物质来维持自身的生命活动。AGS表面的PS为高分子粘性物质,可以作为细胞间的连接基质,与丝状菌嵌合形成交叉的网状骨架结构(图8(b)),为微生物细胞与其他微小颗粒间形成架桥。在外界选择压的改变下,附着在AGS表面的PN改变细胞表面的特性,进一步促进微生物细胞间以及微生物与污泥微粒间的相互凝聚并形成微生物聚集体,最终形成好氧颗粒污泥。由图8(b)和图8(d)发现,绿色区域面积大于蓝色区域面积,表明AGS EPS中PN含量高于PS含量,与图3中的结果相符合。

### 3 结论

1) 在好氧污泥颗粒化过程中, EPS中PN含量增加明显,由接种污泥的 $13.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 增加到AGS的 $41.86 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , PS含量维持在 $15.88\sim 26.74 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , PN/PS整体呈增大趋势,由0.88增加到1.57,表明AGS EPS成分以PN为主导。

2) PN含量和污泥Zeta电位、RH分别呈负相关和正相关, $r$ 分别为0.950、0.934。PN含量增加,污泥Zeta电位降低,污泥RH升高,有利于微生物细胞间的相互聚集,可促进好氧污泥颗粒化。

3) EPS中代表酪氨酸和色氨酸类蛋白质的荧光强度增强,AGS EPS中出现芳香族蛋白和富里酸类物质以及含有N—H官能团的蛋白质,为好氧污泥颗粒化奠定了物质基础。

4) EPS分布在AGS表层并包裹微生物细胞。

### 参考文献

- [1] KHAN M Z, MONDAL P K, SABIR S. Aerobic granulation for wastewater bioremediation: A review[J]. Canadian Journal of Chemical Engineering, 2013, 91(6): 1045-1058.
- [2] KONG Q, NGO H H, SHU L, et al. Enhancement of aerobic granulation by zero-valent iron in sequencing batch airlift reactor[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 279: 511-517.
- [3] PRONK M, BASSIN J P, DE KREUK M K, et al. Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(3): 1339-1348.
- [4] DING Z J, BOURVEN I, GUIBAUD G, et al. Role of extracellular polymeric substances (EPS) production in bioaggregation: Application to wastewater treatment[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(23): 9883-9905.
- [5] WANG Z P, LIU L L, YAO J, et al. Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors[J]. Chemosphere, 2006, 63(10): 1728-1735.
- [6] JIANG B, LIU Y. Roles of ATP-dependent N-acylhomoserine lactones (AHLs) and extracellular polymeric substances (EPSs) in aerobic granulation[J]. Chemosphere, 2012, 88(9): 1058-1064.
- [7] OLIVEIRA A S, AMORIM C L, RAMOS M A, et al. Variability in the composition of extracellular polymeric substances from a full-scale aerobic granular sludge reactor treating urban wastewater[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2020, 8(5): 104156.
- [8] LIN Y M, DE KREUK M, VAN LOOSDRECHT M C M, et al. Characterization of alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant[J]. Water Research, 2010, 44(11): 3355-3364.
- [9] TAY J H, LIU Q S, LIU Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules[J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(3): 222-226.
- [10] WANG Z W, LIU Y, TAY J H. Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69(4): 469-473.
- [11] ADAV S S, LEE D J, SHOW K Y, et al. Aerobic granular sludge: Recent advances[J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(5):

411-423.

- [12] LIU H, FANG H H P. Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 80(7): 806-811.
- [13] MCSWAIN B S, IRVINE R L, HAUSNER M, et al. Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2): 1051-1057.
- [14] CHEN M Y, LEE D J, TAY J H. Distribution of extracellular polymeric substances in aerobic granules[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2007, 73(6): 1463-1469.
- [15] 张云霞, 季民, 李超, 等. 好氧颗粒污泥胞外聚合物(EPS)的生化性研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(11): 3124-3127.
- [16] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances[J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(5): 250-256.
- [17] WALKER J M. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1994, 32: 5-8.
- [18] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [19] 张兰河, 李军, 郭静波, 等. EPS对活性污泥絮凝沉降性能与表面性质的影响[J]. *化工学报*, 2012, 63(6): 1865-1871.
- [20] CHEN M Y, LEE D J, TAY J H, et al. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(2): 467-474.
- [21] HAO T W, LUO J H, WEI L, et al. Physicochemical and biological characterization of long-term operated sulfate reducing granular sludge in the SANI® process[J]. *Water Research*, 2015, 71: 74-84.
- [22] DURMAZ B, SANIN F D. Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge[J]. *Water Science and Technology*, 2001, 44(10): 221-229.
- [23] 王浩宇, 苏本生, 黄丹, 等. 好氧污泥颗粒化过程中Zeta电位与EPS的变化特性[J]. *环境科学*, 2012, 33(5): 1614-1620.
- [24] SHENG G P, YU H Q, LI X Y. Extracellular polymeric substances(EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882-894.
- [25] 蔡春光, 刘军深, 蔡伟民. 胞外多聚物在好氧颗粒化中的作用机理[J]. *中国环境科学*, 2004, 24(5): 623-626.
- [26] LIU Y, TAY J H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge[J]. *Water Research*, 2002, 36(7): 1653-1665.
- [27] DIGANCE 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: 45-53.
- [28] 张丽丽, 陈效, 陈建孟, 等. 胞外多聚物在好氧颗粒污泥形成中的作用机制[J]. *环境科学*, 2007, 28(4): 4795-4799.
- [29] WHITELEY C G, LEE D J. Bacterial diguanylate cyclases: Structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(1): 124-141.
- [30] DONG J J, ZHANG Z M, YU Z D, et al. Evolution and functional analysis of extracellular polymeric substances during the granulation of aerobic sludge used to treat p-chloroaniline wastewater[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 330: 596-604.
- [31] 吴志高. 胞外聚合物(EPS)对污泥沉降性能的影响及其在生物除磷中的作用研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2006.
- [32] SCHMITT J, FLEMMING H C. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1998, 41(1): 1-11.
- [33] BEECH I, HANJAGSIT L, KALAJI M, et al. Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 in continuous culture[J]. *Microbiology*, 1999, 145(6): 1491-1497.
- [34] DZWOLAK W, KATO M, TANIGUCHI Y. Fourier transform infrared spectroscopy in high-pressure studies on proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2002, 1595(1/2): 131-144.

- [35] BARTH A, ZSCHERP C. What vibrations tell us about proteins[J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 2002, 35(4): 369-430.
- [36] BADIREDDY A R, KORPOL B R, CHANKARAMAN S, et al. Spectroscopic characterization of extracellular polymeric substances from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*: Suppression using sub-inhibitory concentrations of bismuth thiols[J]. Biomacromolecules, 2008, 9(11): 3079-3089.

(责任编辑: 曲娜)

## Effect of protein in extracellular polymeric substance on aerobic sludge granulation

LIU Qianjin, LIU Lifan\*

School of Civil and Transportation Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

\*Corresponding author, E-mail: lifan\_liu@126.com

**Abstract** In order to determine the effect of protein (PN) in extracellular polymeric substances (EPS) on the formation of aerobic granular sludge (AGS), the variation of EPS in aerobic sludge granulation process and its correlation with sludge surface characteristics were studied. The differences of EPS components and related functional groups were analyzed between AGS and inoculated sludge, and the distribution of EPS was determined. The results showed that the PN content increased from  $13.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  to  $41.86 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , the polysaccharides (PS) content maintained at  $15.88\sim 26.74 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , and the PN/PS ratio (PN/PS) increased from 0.88 to 1.57 during the aerobic sludge granulation. The PN content was negatively correlated with Zeta potential and positively correlated with sludge surface hydrophobicity (RH), with correlation coefficients ( $r$ ) of 0.902 and 0.872, respectively. Compared with inoculated sludge, the fluorescence intensity of protein representing tyrosine and tryptophan in EPS of AGS increased, and aromatic protein, fulvic acid substance and protein with N—H functional group appeared. Therefore, in the process of aerobic sludge granulation, both the type and content of PN in EPS increased, Zeta potential decreased and RH increased, which promoted the formation of AGS through aggregation of microbes.

**Keywords** protein; aerobic granular sludge; extracellular polymeric substances; polysaccharides; granulation