

水力停留时间和蛋白质对活性污泥毒性的影响

李佳慧, 陈秀荣, 于泽亚, 庄有军, 周天俊, 王晓晓

(华东理工大学资源与环境工程学院 国家环境保护化工过程环境风险评估与控制
重点实验室, 上海 200237)

摘要: 采用序批式活性污泥法(SBR)处理含2,4,6-三氯酚(2,4,6-TCP)的模拟废水,旨在研究水力停留时间(HRT)对污泥毒性的影响以及活性污泥分泌的蛋白质与毒性的关系。在不同HRT(8和12 h)条件下,分析活性污泥对2,4,6-TCP的去除效果及污泥毒性的变化,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术对污泥中的蛋白质进行分离,并利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF/TOF MS)对降解2,4,6-TCP的活性污泥和空白组中有显著差异的蛋白条带进行鉴定。结果表明,HRT为8 h时污泥毒性较低,且污泥毒性降到最低并趋于稳定所需的时间比12 h的提前了10 d。降解2,4,6-TCP的活性污泥与空白组相比,胞外热应激蛋白和外膜蛋白的过量表达与污泥毒性密切相关,可以增强污泥中微生物抵抗毒性物质的能力。

关键词: 污泥毒性; 2,4,6-三氯酚; 水力停留时间; 蛋白质; 序批式活性污泥法

中图分类号: TU993 **文献标识码:** C **文章编号:** 1000-4602(2018)15-0100-05

Influence of Hydraulic Retention Time and Protein on Activated Sludge Toxicity

LI Jia-hui, CHEN Xiu-rong, YU Ze-ya, ZHUANG You-jun, ZHOU Tian-jun,
WANG Xiao-xiao

(State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on
Chemical Process, School of Resources and Environmental Engineering, East China University of
Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: In order to investigate the influence of hydraulic retention time (HRT) on sludge toxicity and the relationship between proteins secretion by activated sludge and sludge toxicity, sequence batch reactor (SBR) was used for biological treatment of simulated wastewater containing 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP). Under the condition of different HRT (8 h and 12 h), the removal efficiency of 2,4,6-TCP and the variation of sludge toxicity were analyzed. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to separate proteins in activated sludge, and the significant differential protein bands in activated sludge degrading 2,4,6-TCP and blank group were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS). Results showed that sludge toxicity was lower when HRT was 8 h, and the time required for sludge toxicity reduced to the minimum and tended to be stable was 10 days earlier than that when HRT was 12 h. Compared with the blank group, overexpression of extracellular heat shock protein (HSP) and outer mem-

brane protein of the activated sludge degraded 2,4,6-TCP were closely related to the sludge toxicity, which could enhance the ability of microorganisms in activated sludge to resist toxic substances.

Key words: sludge toxicity; 2,4,6-TCP; HRT; protein; SBR

目前,随着氯酚类化合物在农药、医药、合成材料、木材防腐剂和炼油等工业生产过程中的大量使用,导致其广泛扩散到环境中,给自然环境造成了巨大危害^[1]。2,4,6-三氯酚(2,4,6-TCP)具有较高的毒性,因此如何处理含有该类物质的废水,引起了人们的关注。采用生化法,如SBR,可以较为经济有效地去除废水中的氯酚类化合物^[2]。但生化处理对污染物的去除效果在很大程度上受水力停留时间(HRT)的影响^[3]。另外,工业废水成分复杂、难降解有机物种类繁多,导致剩余污泥中积累了大量重金属和毒性有机化合物,引起了很高的环境风险,严重威胁人体健康^[4]。

笔者以2,4,6-TCP为目标污染物,研究SBR工艺处理含2,4,6-TCP废水过程中,HRT对污泥毒性的影响,并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术分析含2,4,6-TCP的试验组与空白组活性污泥中的显著表达蛋白,利用质谱法鉴定差异蛋白条带,探讨蛋白质与污泥毒性的关系。

1 材料与方法

1.1 试验方法

试验装置采用有效容积为5 L的SBR反应器。活性污泥取自华东理工大学污水处理厂的曝气池。试验用水采用模拟废水,以2,4,6-TCP和甲醇作为碳源,初始COD浓度为 (300 ± 20) mg/L,尿素、磷酸二氢钾分别作为氮源和磷源,按照COD:N:P=100:5:1(质量比)的配比培养污泥,并适当补充碱度和钙、镁、锰、铁等微量元素,控制反应器温度、pH值、污泥龄(SRT)和DO分别为 (20 ± 1) °C、 7.2 ± 0.4 、20 d和 (2.5 ± 0.5) mg/L,并使污泥的MLSS为 $(2\ 500 \pm 100)$ mg/L。经过调研,确定SBR运行过程中曝气和不曝气的时间比为1:1,不曝气时通过搅拌使污泥与废水混合均匀。试验过程中,SBR的运行时间为80 d。

HRT对污泥毒性的影响试验中,2,4,6-TCP的进水浓度为10 mg/L,设定HRT分别为8和12 h,同时设计空白组。采用SBR反应器驯化活性污泥,分析不同HRT条件下去除COD和2,4,6-TCP的效果与污泥毒性的变化。

在蛋白质的作用分析试验中,选取降解2,4,6-TCP效果较好的HRT驯化污泥,采用SDS-PAGE技术分离试验组与空白组活性污泥中的蛋白质,应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF/TOF MS)对显著表达的差异蛋白条带进行质谱鉴定,研究2,4,6-TCP降解过程中蛋白质与污泥毒性的关系。

1.2 测定项目和方法

COD:酸性重铬酸钾法,MLSS:重量法,pH值:pH计,DO:便携式DO仪。

2,4,6-TCP含量使用高效液相色谱仪测定。固定相为反相C18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇与超纯水的混合液,二者体积比为8:2,其中超纯水中含有1%的醋酸。流动相流速、测试波长、进样体积和柱温分别为1 mL/min、280 nm、10 μL和40 °C。水相中的2,4,6-TCP通过0.45 μm滤膜过滤后直接测定,泥相中的2,4,6-TCP经超声萃取后通过0.45 μm滤膜过滤后测定。

污泥毒性采用《水和废水监测分析方法》(第4版)中的明亮发光杆菌法测定。污泥毒性用相对抑光率表示,见式(1)。

$$\text{相对抑光率} = \left(1 - \frac{\text{测试管光强}}{\text{空白管光强}}\right) \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与讨论

2.1 HRT的影响

2.1.1 COD的变化

2,4,6-TCP组与空白组的出水COD见图1。

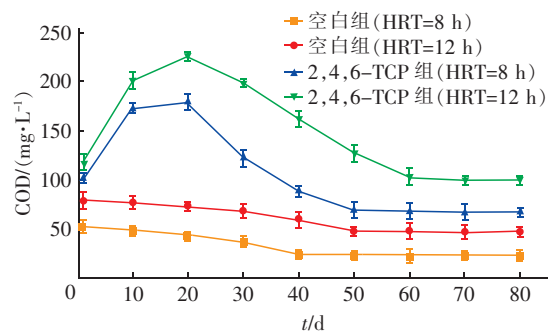


图1 HRT对出水COD的影响

Fig. 1 Effect of HRT on effluent COD

由图1可知,当HRT为8和12 h时,2,4,6-

TCP 组的出水 COD 均呈现先升高后降低再趋于稳定的变化过程,且出水 COD 的峰值均出现在第 20 天,分别为 179 和 226 mg/L。当两组 SBR 分别运行 50 和 60 d 后,出水 COD 达到稳定状态,浓度分别约为 67 和 100 mg/L。分析原因,在活性污泥驯化初期,2,4,6-TCP 的冲击作用使污泥中的微生物活性受到抑制,导致对有机物的降解能力降低,因此出水 COD 快速上升;随着驯化的进行,活性污泥进一步适应环境,形成了降解 2,4,6-TCP 的优势菌群,对有机物的降解能力也逐步提高,呈现出出水 COD 逐渐降低并趋于稳定的趋势。

空白组出水 COD 明显低于 2,4,6-TCP 组,在驯化过程中 COD 呈现缓慢降低直至稳定的趋势。当 HRT 为 8 和 12 h 时,空白组出水 COD 分别在 40 和 50 d 后达到稳定状态,平均浓度分别约为 23 和 47 mg/L。分析认为,随着驯化时间的延长,污泥中的微生物逐渐适应了环境,对有机物的降解能力慢慢提高。当 HRT 为 8 h 时,2,4,6-TCP 组和空白组的出水 COD 均低于 12 h 的。这是因为当 HRT 能够满足水中有有机物的降解时,继续延长 HRT 会造成污泥中微生物次级代谢产物的分泌及向水相中释放,导致水相中有机物含量返升。可见,设定 HRT 为 8 h 更利于活性污泥对有机物的降解。

2.1.2 对 2,4,6-TCP 的去除效果

当 HRT 为 8 和 12 h 时,SBR 系统对 2,4,6-TCP 的去除效果如图 2 所示。

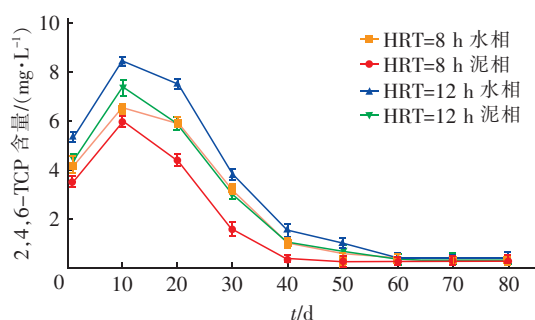


图2 HRT对2,4,6-TCP去除效果的影响

Fig. 2 Removal efficiency of 2,4,6-TCP under different HRT

由图2可知,不同HRT条件下,水相与泥相中的2,4,6-TCP含量均呈现先升高后降低直至稳定的趋势,且水相和泥相中的2,4,6-TCP含量峰值均出现在第10天,HRT为8h时,水相和泥相中的峰值含量分别为6.48和5.97 mg/L,HRT为12h时,水相和泥相中的峰值含量分别为8.42和7.35

mg/L。HRT为8和12h的SBR分别运行50和60d后,水、泥相中的2,4,6-TCP含量均降低至稳定水平,且HRT为8h时,水、泥相中的含量分别约为0.28和0.21 mg/L,水相中2,4,6-TCP去除率约为97.2%;HRT为12h时,水、泥相中的含量分别为0.36和0.29 mg/L,水相中2,4,6-TCP去除率为96.4%。分析原因,在SBR运行初期,2,4,6-TCP抑制了污泥的活性,对其去除主要以吸附为主,降解量较少,2,4,6-TCP呈现逐渐累积的趋势,因此驯化初期的2,4,6-TCP含量升高。随着2,4,6-TCP对活性污泥的持续驯化,降解2,4,6-TCP的优势菌群逐渐富集,恢复了污泥活性,对2,4,6-TCP的降解效能慢慢增强,使2,4,6-TCP的含量逐渐降低至稳定水平。

HRT为8h时,水相与泥相中的2,4,6-TCP峰值含量比HRT为12h时分别低1.94和1.38 mg/L,且2,4,6-TCP含量降至稳定水平的时间比HRT为12h时提前10d。可见,HRT为8h时可满足有机物的生物降解作用,若延长至12h,会导致活性污泥底物营养不足,致使污泥中微生物细胞的老化和凋零,从而降低对2,4,6-TCP的降解能力。

2.1.3 污泥毒性的变化

HRT对污泥毒性的影响如图3所示。

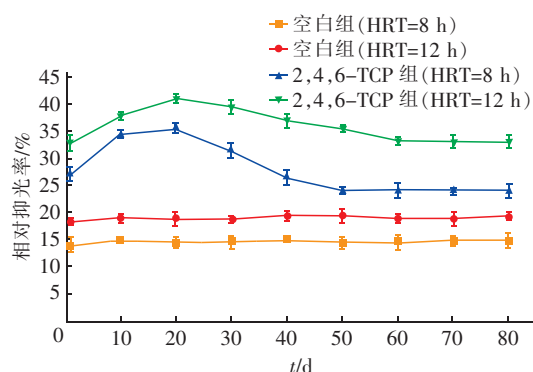


图3 HRT对污泥毒性的影响

Fig. 3 Effect of HRT on sludge toxicity

由图3可知,当HRT为8和12h时,2,4,6-TCP组的SBR中污泥毒性变化趋势基本一致,即先升高后逐渐降低并趋于稳定,且污泥毒性峰值均出现在第20天,污泥毒性分别约为35.9%和41.4%。HRT为8和12h时,2,4,6-TCP组的SBR中污泥毒性分别在50和60d达到稳定水平,此时污泥毒性分别约为24.2%和33.4%。分析认为,在活性污

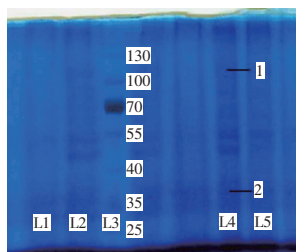
泥驯化初期,污泥中残留了较多的2,4,6-TCP,活性污泥受2,4,6-TCP冲击而产生了有毒次级代谢产物,导致了污泥毒性的增加。当SBR运行至稳定期时,活性污泥中富集了较多降解2,4,6-TCP的优势菌群,恢复了污泥活性,可有效去除2,4,6-TCP和产生的部分有毒次级代谢产物,故污泥毒性维持在稳定且较低水平。空白组的污泥毒性波动范围较小,HRT为8和12 h时,空白组的平均污泥毒性分别为14.8%和19.2%。

HRT为8 h的2,4,6-TCP组的污泥毒性明显低于HRT为12 h的,这是由于HRT为8 h可以满足2,4,6-TCP的降解,如果延长至12 h,则污泥微生物因有机底物营养不足而导致较多的细胞凋零,释放了胞内次级代谢产物,从而造成污泥毒性积累和升高的现象。此外,当HRT为12 h时,活性污泥中微生物的内源呼吸和相互竞争作用也相对较强,导致微生物分泌更多有毒次级代谢产物,致使污泥毒性升高。

2.2 蛋白质与污泥毒性的关系

2.2.1 SDS-PAGE 分析

当HRT为8 h时,2,4,6-TCP组与空白组的污泥胞外、胞内蛋白质的SDS-PAGE图谱见图4。



L1. 空白组胞外蛋白 L2. 空白组胞内蛋白 L3. 标准蛋白
L4. 2,4,6-TCP组胞外蛋白 L5. 2,4,6-TCP组胞内蛋白

图4 2,4,6-TCP组与空白组的SDS-PAGE图谱

Fig. 4 SDS-PAGE image of blank group and 2,4,6-TCP group

由图4可知,2,4,6-TCP组和空白组活性污泥显著表达的蛋白质有很大相似性,其中部分蛋白质同时存在于胞外和胞内,活性污泥中显著表达的蛋白质分子质量主要集中在25~35、40~55和100~130 ku。两组活性污泥中胞外、胞内蛋白的表达程度不同,说明2,4,6-TCP的存在影响活性污泥蛋白质的表达量。

2.2.2 差异蛋白鉴定与分析

从图4还可以看出,2,4,6-TCP组与空白组相

比,胞内蛋白表达不显著,而部分胞外蛋白的表达较为显著。本试验选取了2,4,6-TCP组过量表达的1号和2号胞外蛋白条带,采用质谱法对其进行鉴定分析,结果见表1。

表1 胞外显著差异蛋白质谱鉴定结果

Tab. 1 Identification result of significantly different extracellular protein

蛋白条带序号	蛋白质编号	蛋白质名称	分子质量/u	蛋白分数/肽段数
1	gi 675387483	热应激蛋白	70 970	85/3
2	gi 489285697	外膜蛋白	34 513	98/3

结合图4和表1可以看出,2,4,6-TCP组活性污泥与空白组相比,显著表达的1号胞外蛋白条带和2号条带分别为热应激蛋白和外膜蛋白。当微生物受到外界有机污染物胁迫时,在氧化还原过程中会诱导产生大量的氧自由基,可能会伤害质膜系统,使蛋白质变性,以及脂质过氧化和DNA损伤,因此有机污染物对细胞的蛋白质合成过程会造成较大的冲击。热应激蛋白参与正常蛋白质的合成、折叠、装配及变性蛋白的消除等过程^[5],故污泥微生物在受到有机污染物胁迫时,热应激蛋白的分泌量会显著上升,以保护细胞免于受伤。当微生物受到氯酚等冲击后,细胞表面的某些物质会发生改变,微生物也会分泌某些成分附着在细胞表面,降低细胞的通透性,故2,4,6-TCP组污泥微生物细胞膜表面的外膜蛋白在受到2,4,6-TCP冲击后会过量表达,以重新构建细胞膜的稳定性和流动性,从而增加细胞抵抗毒性物质的能力。

综上所述,降解2,4,6-TCP的活性污泥中过量表达的胞外热应激蛋白、外膜蛋白与有机污染物的降解、抵抗损伤、修复微生物活性以及消除污染物降解过程中产生的有毒物质密切相关,并增强了细胞抵抗2,4,6-TCP毒性的能力。

3 结论

① HRT为8 h时,2,4,6-TCP组和空白组SBR的出水COD、水相与泥相中2,4,6-TCP含量和污泥毒性的变化趋势均与HRT为12 h的相似,但HRT为8 h时,SBR对2,4,6-TCP的去除效果较好,污泥毒性较低,污泥毒性最高值与稳定期平均值分别比HRT为12 h的低5.5%和9.2%,且达到稳定阶段所需的时间相应提前了10 d。

② 降解2,4,6-TCP的活性污泥与空白组中

显著表达的蛋白质分子质量主要分布在 25 ~ 35、40 ~ 55 和 100 ~ 130 ku。两组活性污泥中显著表达的差异蛋白包括胞外的热应激蛋白和外膜蛋白,这两种蛋白质的分泌与污泥毒性密切相关,其在活性污泥降解 2,4,6 - TCP 过程中的过量表达,增强了细胞抵抗毒性物质的能力。

参考文献:

- [1] Lim J W, Lim P E, Seng C E, *et al.* Simultaneous 4-chlorophenol and nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactors packed with polyurethane foam cubes of various sizes[J]. *Bioresour Technol*, 2013, 129: 485 - 494.
- [2] Carucci A, Milia S, Cappai G, *et al.* A direct comparison amongst different technologies (aerobic granular sludge, SBR and MBR) for the treatment of wastewater contaminated by 4-chlorophenol[J]. *J Hazard Mater*, 2010, 177 (1/3): 1119 - 1125.
- [3] Xu J H, He S B, Wu S Q, *et al.* Effects of HRT and water temperature on nitrogen removal in autotrophic gravel filter[J]. *Chemosphere*, 2016, 147: 203 - 209.
- [4] Li X J, Zhu T, Zhang K, *et al.* Effect of the sequence ultrasonic operation on anaerobic degradation of sewage sludge[J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2016, 112: 66 - 71.

- [5] 牛丕业. 热休克蛋白 70 在紫外线致 DNA 损伤修复中的作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.

Niu Piye. Roles of Heat Shock Protein 70 in DNA Damage and Repair in A549 Cell Lines Caused by Ultraviolet C[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2006 (in Chinese).



作者简介: 李佳慧(1993 -), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 研究方向为废水生物处理技术。

E-mail: mable93@163.com

收稿日期: 2017 - 03 - 25

· 信息 ·

ISBAS®与 MBBR 的区别

江苏裕隆环保有限公司经过多年实践,对 MBBR 工艺进行优化,提出了 ISBAS®工艺,并申请了工艺专利和商标。ISBAS®工艺(Integrated Suspended Bio-film and Activated Sludge Process),即悬浮生物膜与活性污泥复合工艺,是在活性污泥法的基础上通过投加悬浮填料来增强原有活性污泥池的生化处理效果。

MBBR 是一种纯生物膜工艺,主要依靠悬浮填料上的生物膜来处理污水,无需污泥回流。在 MBBR 应用的演化过程中,尤其在国内外大型市政污水厂对原生物池的提标改造中,众多案例采用了向部分生物池(一般是好氧池)中投加悬浮填料,而仍进行污泥回流的方式,这种改造方式实质上是生物膜与活性污泥相结合的运行方式,但在 MBBR 的计算模型中,没有充分考虑到活性污泥对污水的处理作用。其通常的做法是,对以去除有机物(或硝化)为主要目的的反应器,把全部有机物去除任务(或全部硝化任务)复核到悬浮填料上。在此情况下,计算出的填料数量远大于实际需求,造成投资的浪费。而 ISBAS®工艺,实质上是重新建立了计算模型,综合考虑了碳氧化、硝化、反硝化的需求,在活性污泥处理能力的基础上,计算额外所需悬浮填料数量,因此,ISBAS®计算模型计算出的填料数量更接近于实际需求。

在 ISBAS®工艺系统中,活性污泥与生物膜存在营养竞争关系,因此对载体有更高的要求。江苏裕隆环保有限公司开发了生物亲和性和挂膜性能更好的悬浮载体,并且针对 ISBAS®的不同应用形式,对载体的研发进行了细分,开发了适合好氧池、缺氧池、厌氧池等不同功能的配方载体,达到了更好的使用效果。

(江苏裕隆环保有限公司 供稿)