

# ZnO 纳米颗粒暴露下 EPS 对污泥细胞的保护作用

张 凯, 夏星星, 孙 欣, 李 媛, 张佳奇, 赵雅然, 孙建升  
(中国市政工程华北设计研究总院有限公司, 天津 300381)

**摘 要:** ZnO 纳米颗粒(ZnO NPs)对膜生物反应器(MBR)中的活性污泥具有一定的毒害作用,而胞外聚合物(EPS)在这一过程中的保护作用机理尚不明确,为此进行了相关研究。试验结果显示,暴露在 ZnO NPs 条件下,含有 EPS 的污泥的活性氧清除酶活性高于去除了 EPS 的污泥,这表明 EPS 具有保护污泥活性、减少活性氧产生的作用。分析原因可能是 EPS 使 ZnO NPs 的 Zeta 电位由正值变为负值,从而减少了 ZnO NPs 与污泥细胞的接触。将 EPS 分为大分子和小分子组分,发现小分子 EPS 与 ZnO NPs 混合后 Zeta 电位更低,石英晶体微天平(QCMD)试验中 ZnO NPs 在污泥细胞表面的吸附量更少,说明小分子 EPS 对污泥细胞的保护作用强于大分子 EPS。

**关键词:** ZnO 纳米颗粒; 活性污泥; 胞外聚合物; 膜生物反应器; 保护机理; 吸附  
**中图分类号:** TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2019)11-0040-05

## Protective Mechanism of EPS for Activated Sludge in MBR under Exposure of ZnO Nanoparticles

ZHANG Kai, XIA Xing-xing, SUN Xin, LI Yuan, ZHANG Jia-qi,  
ZHAO Ya-ran, SUN Jian-sheng

(North China Municipal Engineering Design & Research Institute Co. Ltd., Tianjin 300381, China)

**Abstract:** It is known that ZnO nanoparticles (ZnO NPs) are toxic to the sludge in the membrane bioreactor (MBR). However, the protective mechanism of extracellular polymeric substances (EPS) during this process is not clear. Therefore, the protective mechanism of EPS with different molecular weight under exposure of ZnO NPs was investigated. The results showed that the activity of enzymes capable of eliminating the reactive oxygen in the sludge containing EPS was higher than that of sludge containing no EPS, which indicated that EPS had the function of protecting sludge and reducing the production of reactive oxygen. It might be concluded that EPS changed the Zeta potential of ZnO NPs from positive to negative, which reduced the contact between ZnO NPs and sludge cells. EPS was divided into two groups, namely high molecular weight EPS and low molecular weight EPS. Further study showed that the Zeta potential of ZnO NPs mixed with low molecular weight EPS was lower than that of ZnO NPs mixed with high molecular weight EPS. Correspondingly, the adsorption capacity of the former mixture on cells was lower than that of the later mixture according to quartz crystal microbalance with dissipation (QCMD) test, which indicated that the protection effect of low molecular weight EPS was higher than that of high molecular weight EPS.

**Key words:** ZnO nanoparticle; activated sludge; extracellular polymeric substance; membrane bioreactor; protective mechanism; adsorption

随着纳米技术的不断发展,纳米颗粒得到了越来越广泛的应用。但是,纳米颗粒可能通过污(废)水的排放汇集于城市污水处理厂,从而对生物处理系统中的活性污泥产生一定的毒害作用。ZnO 纳米颗粒(ZnO NPs)是目前广受关注的金属氧化物纳米颗粒之一。有研究显示,当 ZnO NPs 浓度高于 10 mg/L 时,可抑制序批式反应器(SBR)中活性污泥的硝化性能,并导致亚硝化菌相对丰度大幅度减小<sup>[1]</sup>。此外,ZnO NPs 对 SBR 中活性污泥的沉降性能、呼吸速率、有机物降解速率等均有显著的不利影响。相比传统活性污泥法和 SBR 工艺,膜生物反应器(MBR)可以通过膜截留达到更高的纳米颗粒去除效率,但是相应地也会导致污泥吸附更多的纳米颗粒,对系统运行产生一定的风险。在 MBR 中,胞外聚合物(EPS)一方面与膜污染有着密切关系,另一方面也具有保护污泥细胞、抵抗环境压力的作用。对 MBR 的研究显示,ZnO NPs 不仅会导致有机物、氮和磷的去除效果恶化,而且会诱发污泥产生大量的溶解性 EPS 和附着型 EPS,从而引发严重的膜污染问题<sup>[2-3]</sup>。但与此同时,EPS 中的色氨酸类物质以及羟基、羧基、氨基等可以与纳米颗粒发生作用,蛋白质二级结构也会发生变化,从而起到对污泥细胞的保护作用<sup>[3-4]</sup>。纳米颗粒可能影响呼吸链关键酶,造成强氧化性的活性氧(ROS)含量累积升高,从而破坏污泥细胞结构,因此笔者首先考察了 EPS 对 ROS 清除酶,即过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)的保护作用。其次,EPS 的分子质量往往呈现双峰分布,分子质量 > 10 ku 和 < 10 ku 的组分各约占 50%<sup>[5]</sup>。不同分子质量组分可能具有不同的物理化学性质,目前尚无文献关注在 ZnO NPs 与活性污泥接触过程中不同分子质量 EPS 的保护作用。因此,笔者进一步利用高灵敏的石英晶体微天平(QCMD)测试了不同分子质量 EPS 对 ZnO NPs 的吸附作用,从而全面阐释了 EPS 对污泥细胞的保护作用机理。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验设计

污泥样品取自以生活污水作为进水的长期运行的 MBR 好氧区,离心去除上清液后洗涤 2 次备用。ZnO NPs 购自 Sigma - Aldrich 公司,贮备液浓度为 1.7 g/L,使用时稀释至所需浓度并超声分散。

在考察 ZnO NPs 和 EPS 对 MBR 中活性污泥呼

吸作用的影响时,将污泥的 MLVSS 浓度调至 9 g/L,设置 A1 ~ A4 组。A1 组为原始污泥样品;A2 组污泥中加入 ZnO NPs 使其浓度为 10 mg/L;A3 组污泥去除 EPS 后加入 ZnO NPs 使其浓度为 10 mg/L;A4 组污泥去除 EPS 后,将 EPS 与 10 mg/L 的 ZnO NPs 混合,并重新加入到去除了 EPS 的污泥中。分别测试 A1 ~ A4 组样品的 CAT 和 SOD 活性。

在考察不同分子质量 EPS 对污泥细胞的保护作用时,将 ZnO NPs 浓度调至 10 mg/L,设置 B1 ~ B4 组。其中,B1 组为 ZnO NPs;B2 组为 ZnO NPs 与 TOC 浓度为 40 mg/L 的 EPS 混合;B3 组为 ZnO NPs 与 TOC 浓度为 40 mg/L、分子质量 > 10 ku 的 EPS 混合;B4 组为 ZnO NPs 与 TOC 浓度为 40 mg/L、分子质量 < 10 ku 的 EPS 混合。分别测试 B1 ~ B4 组的 Zeta 电位和 QCMD 吸附性能。

### 1.2 EPS 的提取和不同分子质量组分的分离方法

EPS 采用以 0.5% 的 NaCl 为缓冲溶液的低功率超声方法提取,详见文献[6]。提取后的 EPS 装入截留分子质量为 10 ku 的透析袋中,将透析袋浸入 0.5% 的 NaCl 溶液中静置 24 h,袋内为分子质量 > 10 ku 的组分,袋外为分子质量 < 10 ku 的组分。使用 0.5% 的 NaCl 溶液将上述 3 种样品的 TOC 浓度调节至 40 mg/L 备用。

### 1.3 测试方法

#### 1.3.1 SOD 和 CAT 活性测试

A1 ~ A4 组污泥样品细胞经高功率超声破壁后,分别使用 SOD 测试盒和 CAT 测试盒(南京建成科技有限公司)测试 SOD 和 CAT 活性。

#### 1.3.2 QCMD 测试

试验使用 Q - sense E4 型 QCMD,在其流动池内安装有高灵敏的石英晶体芯片,通过检测芯片振动的频率变化( $\Delta f$ )和耗散因子变化( $\Delta D$ )可以计算出芯片表面吸附层的质量和粘弹性等数值。在本试验中,去离子水以 150  $\mu$ L/min 的流速进入流动池,待基线稳定后通入 0.5% 的 NaCl 溶液 10 min,然后通入去除了 EPS 的污泥细胞 20 min 作为吸附基层,再通入 0.5% 的 NaCl 溶液 20 min 以去除未吸附固定的细胞,然后分别通入 B1 ~ B4 样品以测试其在污泥细胞基层的吸附能力,最后再依次通入 0.5% 的 NaCl 溶液和去离子水,记录全过程的  $\Delta f$  和  $\Delta D$  值。本研究数据为 3 倍频记录结果,其他倍频记录结果具有相似趋势,不再进行讨论。

### 1.3.3 其他测试

样品的 Zeta 电位使用 Zetasizer Nano ZS 90 仪器进行测试;EPS 样品的 TOC 浓度使用 TOC - LCPH 仪器进行测试。

## 2 结果与讨论

### 2.1 EPS 对 MBR 中活性污泥的保护作用

#### 2.1.1 ROS 的产生机理

根据经典的微生物代谢理论,在好氧条件下,有机物的代谢过程分为三羧酸循环和氧化磷酸化 2 个阶段。在氧化磷酸化阶段,三羧酸循环的产物 NADH 等通过膜蛋白等电子传递系统将电子传递给  $O_2$ ,同时形成大量的三磷酸腺苷(ATP)为细胞供能。如图 1 所示,该过程为单电子还原反应,即  $O_2$  每一步骤只能获得 1 个电子,因此会产生  $\cdot OH$ 、 $H_2O_2$  和超氧负离子( $O_2^{\cdot -}$ )等中间产物,这些物质都具有很强的氧化活性,因此被统称为 ROS<sup>[7]</sup>。在正常的生物细胞内,SOD 可以清除  $O_2^{\cdot -}$ 、生成  $H_2O_2$ ,而 CAT 将  $H_2O_2$  进一步分解成  $H_2O$  和  $O_2$ ,从而形成细胞内 ROS 的防御机制。纳米颗粒可能破坏这一防御机制,造成胞内 ROS 过量累积,从而破坏胞内组分、影响细胞的功能。

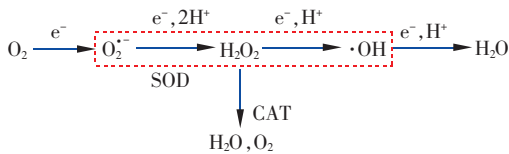


图1 ROS 生成和清除机理示意

Fig. 1 Diagram of ROS production and mitigation process

#### 2.1.2 EPS 对 SOD 和 CAT 活性的影响

为了明晰 ZnO NPs 与活性污泥接触过程中 ROS 的生成和消除过程,本研究测试了 SOD 活性和 CAT 活性。图 2 显示了 A1 ~ A4 组的 SOD 活性,其中以 A1 组原始活性污泥的 SOD 活性作为基准即 100%。可以看出,当污泥与 ZnO NPs 接触后,A2 组的 SOD 活性上升到 190%,这表明 ZnO NPs 可能会诱发污泥细胞产生大量的  $O_2^{\cdot -}$ ,因此细胞 SOD 活性增强以抵抗  $O_2^{\cdot -}$  的影响<sup>[8]</sup>。由 A3 组可知,当污泥去除 EPS 后 SOD 活性相比于 A2 组有所降低,表明 EPS 的存在可以保护酶的活性<sup>[9]</sup>,减少 ZnO NPs 对 SOD 的损伤。A4 组显示,提取的 EPS 与 ZnO NPs 混合后再次加入无 EPS 的污泥中时,SOD 活性低于 A2 组,说明原位存在的 EPS 对 SOD 的保护作用更

强,提取后的 EPS 对 SOD 的保护作用不明显。这可能是因为原位 EPS 不仅可以削弱外界环境刺激,同时也具有维持污泥絮体结构等作用<sup>[10]</sup>,提取后其保护功能减弱。

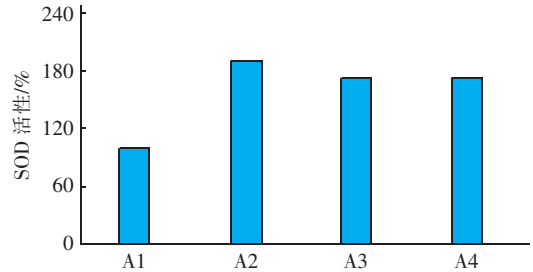


图2 A1 ~ A4 组样品的 SOD 活性

Fig. 2 SOD activity of the samples of A1, A2, A3 and A4

图 3 显示了 A1 ~ A4 组的 CAT 活性,其中以 A1 组原始 MBR 污泥的 CAT 活性作为基准即 100%。对比 A1 和 A2 组可知,污泥与 ZnO NPs 接触后 CAT 活性略有上升。结合图 2 的结果,这可能是因为 SOD 活性大幅上升,清除了大部分的  $O_2^{\cdot -}$ ,使得  $H_2O_2$  含量维持在较为正常的水平,因此 CAT 活性仅增加了 3%。由 A3 组的数据可知,去除 EPS 后 CAT 活性下降至 44%,这同样反映了 EPS 具有保护污泥细胞的作用。去除 EPS 后 ZnO NPs 更易扩散进入细胞内,影响胞内酶的活性<sup>[11]</sup>。值得注意的是,A4 组的 SOD 活性高于 A3 组但仍低于 A2 组,这表明提取的 EPS 可以在一定程度上吸附 ZnO NPs,减少其对污泥细胞的毒害作用,但是如前文所述,原位 EPS 的保护作用比提取的 EPS 更强。

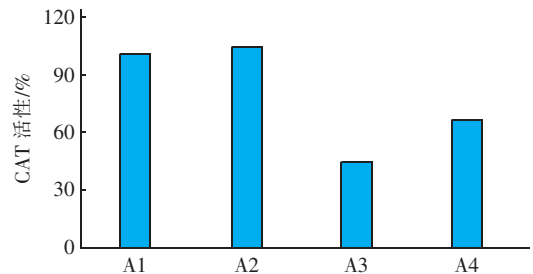


图3 A1 ~ A4 组样品的 CAT 活性

Fig. 3 CAT activity of the samples of A1, A2, A3 and A4

## 2.2 不同分子质量 EPS 对 ZnO NPs 的吸附作用

### 2.2.1 Zeta 电位

ZnO NPs 在污泥细胞表面的吸附过程受到两者 Zeta 电位的影响,因此本研究测试了 B1 ~ B4 组样品的 Zeta 电位。结果表明,B1 组 ZnO NPs 的 Zeta

电位为  $(26.7 \pm 0.3)$  mV, 由于带正电因此很容易吸附在带负电的活性污泥细胞表面。B2 组 ZnO NPs 与 EPS 混合后 Zeta 电位降低至  $(-18.6 \pm 2.0)$  mV, 这是因为 EPS 带负电<sup>[12]</sup>, 与 ZnO NPs 混合后可以中和正电荷, 并使混合物呈现负电; 根据静电场理论, 同种电荷互斥可减少 ZnO NPs 与污泥细胞的吸附。B3 和 B4 组样品的 Zeta 电位分别为  $(-8.6 \pm 5.8)$ 、 $(-19.1 \pm 1.1)$  mV, 反映出不同分子质量 EPS 对 ZnO NPs 电位的影响, B4 组小分子 EPS 使 ZnO NPs 的 Zeta 电位下降幅度较大, 而 B3 组大分子 EPS 使 ZnO NPs 的 Zeta 电位下降幅度较小, 推测小分子 EPS 吸附 ZnO NPs 后与细胞的静电斥力更大, 具有更强的保护作用, 下文将通过 QCMD 对此进行深入研究。

### 2.2.2 QCMD 试验

为了探究不同分子质量 EPS 对 ZnO NPs 的吸附作用, 采用 QCMD 对 B1 ~ B4 组样品在无 EPS 的污泥细胞表面的吸附过程进行研究, 结果见图 4。

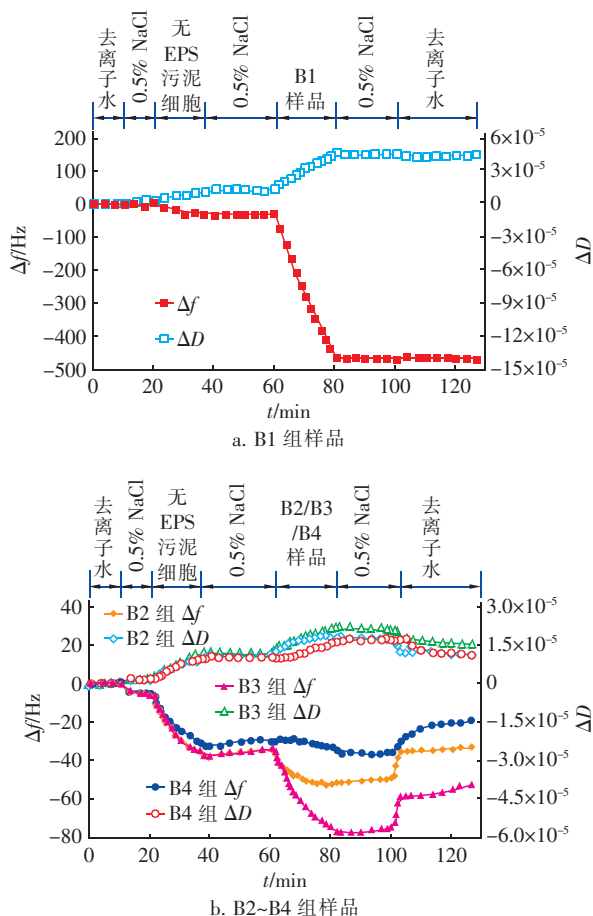


图 4 QCMD 测试结果中  $\Delta f$  和  $\Delta D$  的变化情况

Fig. 4 Changing trend of  $\Delta f$  and  $\Delta D$  in the QCMD test

图 4(a) 中, 在芯片上吸附无 EPS 污泥细胞作为基层, 当与 ZnO NPs 接触 20 min 时  $\Delta f$  值急剧下降至约 -468 Hz。根据 Sauerbrey 公式,  $\Delta f$  的绝对值与吸附质量呈正相关<sup>[13]</sup>, 这说明 ZnO NPs 直接与污泥细胞接触时可以大量吸附在污泥细胞表面, 进而影响细胞活性。由图 4(b) 的 B2 组  $\Delta f$  值可以看出, 当 ZnO NPs 与 EPS 混合后, 与污泥细胞基层接触 20 min 时  $\Delta f$  值仅降至约 -52 Hz, 吸附量远小于 B1 组。结合图 2、图 3 以及 Zeta 电位数据, 可以认为 EPS 与 ZnO NPs 混合后改变了 ZnO NPs 的表面特性, 在污泥细胞表面的吸附量减少, 从而起到了保护作用。比较图 4(b) 中 B3 和 B4 组的  $\Delta f$  值, 可以发现 B4 组的吸附量较低。这是由于小分子 EPS 与 ZnO NPs 混合后 Zeta 电位更低, 不易接触到污泥细胞, 因此吸附量低于 B3 组, 同时也说明小分子 EPS 的保护作用更强。

$\Delta D$  反映的是芯片停止振动后, 波在吸附层内传递过程中能量的损失, 因此  $\Delta D/\Delta f$  值可以用来表征吸附层的粘弹性<sup>[13]</sup>。根据图 4(b) 中 B2 ~ B4 组样品吸附阶段的  $\Delta D$  和  $\Delta f$  数据, 线性拟合  $\Delta D/\Delta f$  值, 如图 5 所示。可以看出, B4 组的  $\Delta D/\Delta f$  绝对值最大, B3 组的  $\Delta D/\Delta f$  绝对值最小, 说明小分子 EPS 与 ZnO NPs 混合后形成的吸附层粘弹性较强。从而推测小分子 EPS 对 ZnO NPs 的扩散阻力较大, 使其不易接触到污泥细胞, 保护作用更强。

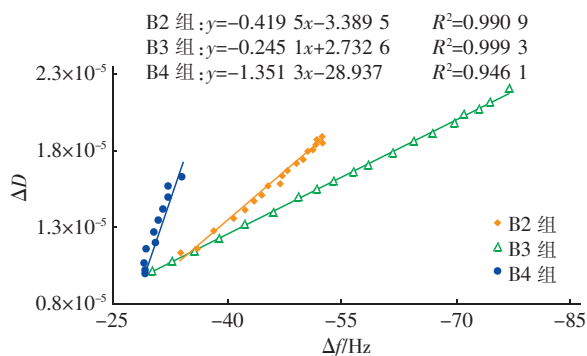


图 5 B2 ~ B4 组样品的  $\Delta D/\Delta f$  值

Fig. 5  $\Delta D/\Delta f$  value of B2, B3 and B4 samples

### 3 结论

MBR 中的活性污泥与 ZnO NPs 接触后, 有 EPS 的污泥的 SOD 和 CAT 酶活性高于无 EPS 的污泥, 这表明 EPS 对污泥活性具有保护作用。其原因可能是 EPS 可以使 ZnO NPs 的 Zeta 电位变为负值, 减少了 ZnO NPs 与污泥细胞的接触。将 EPS 分为大



分子和小分子组分后,发现小分子 EPS 与 ZnO NPs 混合后 Zeta 电位更低,QCMD 试验中 ZnO NPs 在污泥细胞基表面的吸附量更少,说明小分子 EPS 对污泥细胞的保护作用强于大分子 EPS。

### 参考文献:

- [1] 李维,石先阳. 氧化锌纳米颗粒对 SBR 中活性污泥脱氮性能及硝化细菌丰度的影响[J]. 环境工程学报, 2017,11(8):4549-4558.  
Li Wei, Shi Xianyang. Effects of ZnO nanoparticles on nitrogen removal performance and nitrifying bacteria abundance of activated sludge in SBR [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2017, 11(8): 4549-4558 (in Chinese).
- [2] Tan M, Qiu G, Ting Y P. Effects of ZnO nanoparticles on wastewater treatment and their removal behavior in a membrane bioreactor[J]. Bioresour Technol, 2015, 185: 125-133.
- [3] Zhao J, Liu S, Liu N, et al. Accelerated productions and physicochemical characterizations of different extracellular polymeric substances from *Chlorella vulgaris* with nano-ZnO[J]. Sci Total Environ, 2019, 658: 582-589.
- [4] Feng L J, Wang J J, Liu S C, et al. Role of extracellular polymeric substances in the acute inhibition of activated sludge by polystyrene nanoparticles[J]. Environ Pollut, 2018, 238: 859-865.
- [5] Duan L, Tian Z, Song Y, et al. Influence of solids retention time on membrane fouling; characterization of extracellular polymeric substances and soluble microbial products[J]. Biofouling, 2015, 31(2): 181-191.
- [6] Han X, Wang Z, Zhu C, et al. Effect of ultrasonic power density on extracting loosely bound and tightly bound extracellular polymeric substances [J]. Desalination, 2013, 329: 35-40.
- [7] 燕国梁. 活性氧胁迫下 *Bacillus* sp. F26 以过氧化氢酶合成为特征的应激响应[D]. 无锡: 江南大学, 2006.  
Yan Guoliang. Response of *Bacillus* sp. F26 to Reactive Oxygen Species Stress Characterized by Catalase Synthesis [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006 (in Chinese).
- [8] Wu D, Shen Y, Ding A, et al. Effects of nanoscale zero-valent iron particles on biological nitrogen and phosphorus removal and microorganisms in activated sludge[J]. J Hazard Mater, 2013, 262: 649-655.
- [9] Kang F, Alvarez P J, Zhu D. Microbial extracellular polymeric substances reduce  $\text{Ag}^+$  to silver nanoparticles and antagonize bactericidal activity [J]. Environ Sci Technol, 2014, 48(1): 316-322.
- [10] Lin H, Ye C, Lu L, et al. Characterization of extracellular polymeric substances in the biofilms of typical bacteria by the sulfur K-edge XANES spectroscopy [J]. J Environ Sci, 2014, 26(8): 1763-1768.
- [11] Maurer L L, Meyer J N. A systematic review of evidence for silver nanoparticle-induced mitochondrial toxicity [J]. Environ Sci Nano, 2016, 3: 311-322.
- [12] 刘强, 刘喜坤, 耿德强, 等. 污泥龄对 HMBR 中 LB-EPS 及膜污染的影响[J]. 水处理技术, 2018, 44(8): 99-102.  
Liu Qiang, Liu Xikun, Geng Deqiang, et al. Effects of SRT on LB-EPS and membrane fouling in a HMBR [J]. Technology of Water Treatment, 2018, 44(8): 99-102 (in Chinese).
- [13] Gutman J, Walker S L, Freger V, et al. Bacterial attachment and viscoelasticity: Physicochemical and motility effects analyzed using quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) [J]. Environ Sci Technol, 2013, 47(1): 398-404.



作者简介: 张凯 (1968 - ), 男, 湖北赤壁人, 本科, 高级工程师, 主要从事城市给排水、污水处理、海绵城市、水环境的规划、设计与研究工作。

E-mail: zk-zhang@163.com

收稿日期: 2019-03-15