

论述与研究

DOI: 10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2023.19.001

## 地塞米松胁迫下好氧颗粒污泥微观响应特征

冯莹<sup>1</sup>, 陈宁<sup>1</sup>, 张欣<sup>1</sup>, 马翠<sup>1</sup>, 刘崇<sup>2</sup>, 沈斐<sup>3</sup>,  
王硕<sup>1,4</sup>, 李激<sup>1,4</sup>

(1. 江南大学环境与土木工程学院 江苏省厌氧生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122;  
2. 民政部环境监测中心站 民政部一零一研究所, 北京 100070; 3. 江苏无锡环境监测  
中心 仪器分析实验室, 江苏 无锡 214121; 4. 江苏高校水处理技术与材料协同创新  
中心, 江苏 苏州 215009)

**摘要:** 研究了地塞米松胁迫条件下不同粒径好氧颗粒污泥(AGS)的物化特性和微观变化,并结合胞外聚合物(EPS)和蛋白质组学进一步解析 AGS 对地塞米松的微观响应机制。结果表明, AGS 对 COD、总氮和总磷的去除率稳定升高至 88.3%、80.8% 和 76.1%, 地塞米松的去除率也升高至 55.2%。TB-EPS 层的蛋白质和多糖含量均较高, SMP-EPS 层及 LB-EPS 层含量较低, 0.6~0.8 mm 粒径范围的 AGS 中脯氨酸(Pro)相对丰度最高, 说明此粒径的 AGS 能够更好地抵御地塞米松的胁迫, 从而有利于 AGS 粒径稳定增大。色氨酸类蛋白质在 0.6~0.8 mm 的 AGS 中相对丰度较高, 说明其耐药性较好。此外, 粒径为 0.6~0.8 mm 和 0.8~1 mm 的 AGS 中  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠结构占比相对较高, 证明 AGS 稳定性相对较好。AGS 内部发挥关键作用的 KEGG 通路为代谢途径, 包括能量代谢、氨基酸代谢以及脂质代谢等。差异蛋白数量最多的 AGS 组别为大于 2 mm 和小于 0.6 mm 的 AGS, 说明粒径的差异越大, 其内部优势微生物种群的差异也越大, 相应的蛋白功能也存在明显差异。1~2 mm 和 0.8~1 mm 的 AGS 蛋白质组学特征相差较小, 但 AGS 内部代谢途径以及蛋白功能差别明显, 结合 PCA 分析推测 0.8~1 mm 的 AGS 内部正经历关键的微生物种群演替。

**关键词:** 好氧颗粒污泥; 地塞米松; 胞外聚合物; 蛋白质组学; 微观响应

**中图分类号:** TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2023)19-0001-10

## Microscopic Response Characteristics of Aerobic Granular Sludge under Dexamethasone Stress

FENG Xuan<sup>1</sup>, CHEN Ning<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1</sup>, MA Cui<sup>1</sup>, LIU Chong<sup>2</sup>, SHEN Fei<sup>3</sup>,  
WANG Shuo<sup>1,4</sup>, LI Ji<sup>1,4</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. 101 Institute of the Ministry of Civil Affairs, Environmental Monitoring Center Station of the Ministry of Civil Affairs, Beijing 100070, China; 3. Laboratory of Instrumental Analysis, Jiangsu Wuxi Environmental Monitoring Center,

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(118011000000160004); 江苏省政策引导类计划(国际科技合作/港澳台科技合作)专项资金资助项目(BZ2021030)

通信作者: 王硕 E-mail: shuowang@jiangnan.edu.cn

Wuxi 214121, China; 4. Jiangsu University Collaborative Innovation Center of Water Treatment Technology and Material, Suzhou 215009, China)

**Abstract:** The physicochemical properties and microscopic changes of AGS with different particle sizes under dexamethasone stress were investigated, and the microscopic response mechanism of AGS to dexamethasone was further analyzed based on EPS and proteomics. The experimental results showed that the removal of COD, total nitrogen and total phosphorus by AGS steadily increased to 88.3%, 80.8% and 76.1%, and dexamethasone removal increased up to 55.2%. The protein and polysaccharide contents of TB-EPS were higher, while the contents in SMP-EPS and LB-EPS were relatively lower. The relative abundance of proline (Pro) in AGS with the particle size of 0.6–0.8 mm was the highest, indicating that AGS with this particle size could better resist the stress of dexamethasone, which was conducive to the stable increase of AGS particle size. Tryptophan-like protein was relatively abundant in 0.6–0.8 mm AGS, implying that the dexamethasone resistance was good. In addition, the  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structures of proteins accounted for relatively high proportion in AGS with sizes of 0.6–0.8 mm and 0.8–1 mm, suggesting the relative stability of AGS. Through the analysis of KEGG pathway, metabolic pathway played a crucial role in AGS, including energy metabolism, amino acid metabolism and lipid metabolism. The AGS with the most differential proteins were those with the size greater than 2 mm and less than 0.6 mm, indicating that the greater the difference in particle size, the greater the difference in the internal dominant microbial population, and the corresponding protein functions also presented significant differences. Furthermore, in AGS of 1–2 mm and 0.8–1 mm, the difference in proteomic characteristics was small, however, the differences in internal metabolic pathways and protein functions were significant. On the basis of PCA analysis, it was speculated that 0.8–1 mm of AGS was undergoing critical microbial population succession.

**Key words:** aerobic granular sludge; dexamethasone; extracellular polymeric substances; proteomics; microscopic response

自2020年初新型冠状病毒肆虐至今引发了全球性危机,随着新型冠状病毒肺炎病例激增,人们在对疫苗进行研发的同时,也将视线转向了特效药<sup>[1]</sup>。2020年6月16日,世卫组织对涉及新冠肺炎药物的最新研究结果显示,地塞米松(DEXA)是针对新冠肺炎重症患者的有效药物,6 mg地塞米松可以将新冠肺炎患者的死亡率降低1/3。地塞米松属于糖皮质类固醇激素,具有调节脊椎动物能量代谢、免疫功能、应激反应等一系列的关键生理作用,其自身具有成本低、性能安全、可用性广等优点。近年来,国内外多篇报道在水体中发现了地塞米松类药物污染<sup>[2]</sup>,结合疫情时代背景,来自医院、家庭和制药厂含地塞米松的废水势必会越来越多地排放至生态系统中,对环境和人体造成潜在危害。

目前全世界已有七十余座采用好氧颗粒污泥(AGS)工艺的污水处理厂,而近三年好氧颗粒污泥

污水处理厂数量增加较快,好氧颗粒污泥技术正蓬勃发展。好氧颗粒污泥在生物保留率、沉降性能以及耐冲击负荷能力方面具有明显优势<sup>[3-4]</sup>。与活性污泥法和生物膜法对比,好氧颗粒污泥的主要优势集中体现在经济性、易操作性和可持续发展层面,因而具有广阔的应用前景。

AGS在抗生素和激素类药物胁迫下的理化特性研究表明:雌激素会使AGS颗粒表面粗糙度降低,孔隙率减少,同时也会影响内部菌群结构<sup>[5]</sup>;不同浓度的磺胺嘧啶并不会影响AGS颗粒化过程,并且药物浓度越高,形成的颗粒粒径越大<sup>[6]</sup>;双酚A会影响AGS中胞外聚合物(EPS)的多糖和蛋白质结构及含量,同时还会使颗粒粒径变小<sup>[7]</sup>。而对于环境中降解糖皮质激素的行为研究还处于起步阶段,现阶段采用的方法为好氧生物降解法与好氧/厌氧结合法<sup>[8-9]</sup>。目前普遍认为生物转化和污泥吸附是去

除污水中糖皮质激素类污染物的主要机制<sup>[10]</sup>。

粒径作为 AGS 由絮状污泥至颗粒态形成过程中最为直观且显著的变化,除了反映宏观结构之外还可以体现微观性质,作为研究宏观和微观的桥梁,对该特征进行分析可以进一步掌握 AGS 内部微生物细胞黏附情况及富集程度。为此,以不同粒径的成熟 AGS 为研究对象,通过分析地塞米松胁迫条件下 AGS 的物化特性和微观特征,并结合 AGS 中发挥关键性作用的两个因素:EPS 和蛋白质组学分析,深入探究 AGS 粒径变化的调控因子,进一步解析 AGS 对地塞米松胁迫下的微观响应机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验装置及配水

实验采用序批式反应器(SBR),高为 1 m,内径为 0.08 m,有效容积近 4 L,曝气装置处于底部。运行周期为 6 h,每日运行 4 个周期,通过定时器控制周期内各个阶段的启动和停止。其中,进水为 30 min,曝气时间由 187 min 逐渐增加到 198 min,沉降时间由 15 min 逐渐降低到 4 min,目的在于筛选沉降性能良好的污泥。污泥龄为 20 d,排水比为 60%。

接种污泥取自某污水处理厂 A<sup>2</sup>/O 工艺的好氧池,接种体积为 2 L。初始污泥的 MLSS 为 4.5 g/L,SVI<sub>30</sub> 为 91 mL/g。实验采用人工模拟废水(见表 1),碳源采用混合碳源,并投加适量的微量元素溶液:FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O、KI、MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、ZnCl<sub>2</sub>、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 浓度分别为 1.5、0.15、0.03、0.03、0.12、0.058、0.15、0.06 mg/L。水中地塞米松浓度始终保持在 20 μg/L,该浓度为目前在环境中所能检测到的较高浓度。

表 1 进水水质

Tab.1 The quality of influent mg·L<sup>-1</sup>

种类	浓度	种类	浓度
CH <sub>3</sub> COONa	465.2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	37.41
丙酸钠	1 172	MgSO <sub>4</sub>	97
NH <sub>4</sub> Cl	152.8	CaCl <sub>2</sub>	75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	29.25	EDTA	10

## 1.2 分析测试方法

### 1.2.1 常规指标分析方法

COD、TN、TP、MLSS 和 MLVSS 等指标均参照《水和废水监测分析方法》(第 4 版)测定。

### 1.2.2 地塞米松浓度测试

地塞米松定量分析采用 Aquity 超高效液相色谱

仪连接配置 TurboV 离子源的三重四极杆液质联用仪<sup>[11]</sup>。UPLC 的色谱柱为 C18 柱,色谱柱前配置了在线过滤器。流动相 A 为纯水(内含 0.1% 甲酸),流动相 B 为乙腈(内含 0.1% 甲酸),液相流速为 200 μL/min。进样量约 20 μL,柱温保持在 30 ℃左右。

### 1.2.3 EPS 提取及测定

EPS 采用 NaOH 法提取,将 AGS 在 20 kHz 和 40 W 条件下超声 30 s,在 4 ℃ 和 2 000g 转速下离心 15 min,离心后的上清液使用 0.45 μm 玻璃纤维滤膜过滤得到溶解型胞外聚合物(SMP-EPS);将剩余污泥稀释至原体积,加入甲酰胺恒温振荡 1 h,在 4 ℃ 和 5 000g 条件下离心 15 min,将离心后的上清液采用 0.45 μm 的玻璃纤维滤膜过滤,所得为松散附着型 EPS(LB-EPS);再将污泥稀释至原体积,加入 4 mL、1 mol/L 的 NaOH 后在恒温摇床上振荡 3 h,在 4 ℃ 和 10 000g 的转速下高速离心 15 min,收集上清液即为紧密结合型 EPS(TB-EPS)。蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法测定,多糖浓度采用硫酸-蒽酮法测定。

### 1.2.4 激光共聚焦显微镜分析

采用激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)结合荧光染色对 AGS 中的蛋白质、多糖以及总细胞的分布进行观察。

### 1.2.5 三维荧光测试

采用日立 F7000 荧光分光光度计对 EPS 含量进行分析,分析前确保 EPS 的 TOC < 10 mg/L。设置增量为 10 nm,激发波长(λ<sub>Ex</sub>)为 200 ~ 500 nm,发射波长(λ<sub>Em</sub>)为 200 ~ 550 nm。使用荧光区域积分法对数据进行分析。

### 1.2.6 红外光谱测试

采用 Nicoletis 50 红外光谱仪对各组样品的蛋白质二级结构进行分析。于 -80 ℃ 下冰冻样品,再进行冷冻干燥,探测波数设置为 600 ~ 4 000 cm<sup>-1</sup>。使用 OMNIC 8.2 对傅里叶红外数据进行分析,采用 PeakFit v4.12 对数据进行蛋白质二级结构解析,首先需要对样品谱图进行基线校正,选取酰胺 I 带的谱带范围,采用五点 Savitsk Golay 函数进行平滑,然后进行傅里叶去卷积,最后将处理得到的谱图进行分峰拟合。

## 2 结果与讨论

### 2.1 污染物去除性能

随着培养时间的增长,AGS 对污染物的去除能

力逐渐增强(见图1)。其中对COD的去除效果最为明显,从初始到第75天稳定期时,去除率从72.8%提升至88.3%;TN去除率从刚培养的56.9%提升至稳定期的80.8%,提升幅度最大,但去除性能仍弱于常规条件下的AGS;TP去除率由初始的54.8%提升至73.1%。推测地塞米松在AGS形成初期对反应器内微生物造成了负面影响,微生物进行内部种群演替,筛选出适应地塞米松胁迫的微生物。进水中的地塞米松浓度始终保持在20  $\mu\text{g/L}$ 左右,随着运行时间延长,AGS对其去除率由最初16.8%升至55.2%,最终浓度可以降至10  $\mu\text{g/L}$ 以下,说明AGS对该药物具有一定去除效果。在91 d的运行中,AGS对常规污染物的去除效能逐渐提升,说明AGS内部微生物经过“筛选”后,除了适应性提高,对药物的耐受能力也得到进一步提升。

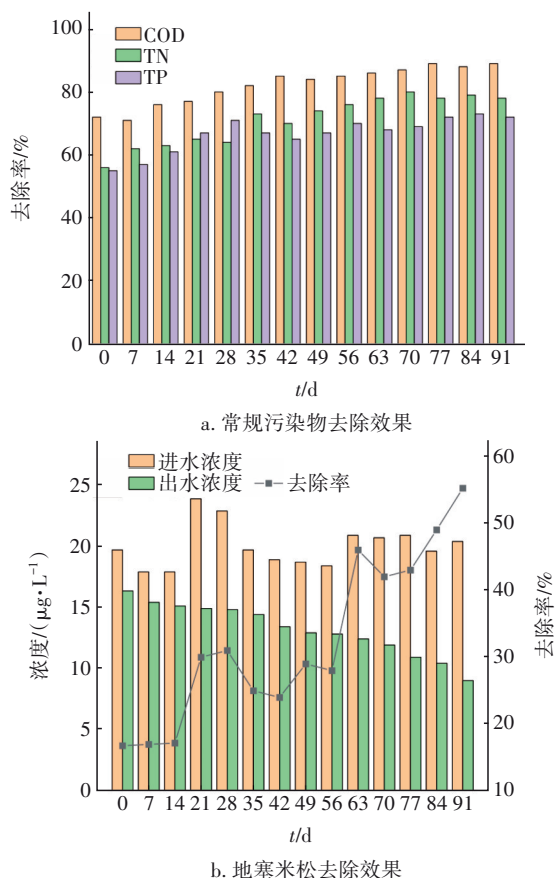


图1 AGS颗粒化过程中污染物去除特性

Fig.1 Pollutants removal characteristics during AGS granulation

## 2.2 不同粒径AGS中EPS的特性变化

### 2.2.1 胞外聚合物组分和含量变化

按照组分和结合程度可以将EPS分为SMP-

EPS、LB-EPS和TB-EPS。不同粒径成熟AGS的EPS组分含量见表2,不同粒径AGS中TB-EPS的蛋白质和多糖含量都占据突出地位,SMP-EPS及LB-EPS中二者含量都很低。对不同粒径AGS中各层蛋白质进行分析可知,粒径 $>2$  mm的AGS中含量最多,其次是0.6~0.8 mm的AGS,小于0.6、0.8~1、1~2 mm的AGS中蛋白质含量较为接近。通过对比5组不同粒径AGS的多糖含量可以发现,粒径 $>2$  mm的AGS中含量依旧最多,其次是小于0.6 mm的AGS,含量最低的是1~2 mm的AGS。不同粒径AGS中,蛋白质含量随着粒径的增大波动较小,而多糖含量随着粒径增大波动较大,PN/PS在不同粒径AGS中也呈现一定范围内的波动状态,该比值影响着污泥的表面电荷<sup>[12]</sup>,与AGS稳定性相关,各组AGS中该值为1.3左右,稳定性相对较弱。相比常规条件下培养的AGS,投加地塞米松后所培养的AGS中PS含量更高,地塞米松作为糖皮质激素会对糖代谢过程造成一定影响,推测在AGS培养过程中,多糖的分泌也受到该药物的影响。

表2 不同粒径AGS中EPS的含量对比

Tab.2 Comparison of EPS contents in AGS with different particle sizes

粒径/mm	TB-EPS/%		LB-EPS/%		SMP-EPS/%	
	PN	PS	PN	PS	PN	PS
$<0.6$	43.36	47.66	3.79	0.82	3.46	0.91
0.6~0.8	52.59	39.82	3.08	0.79	2.62	1.10
0.8~1	50.23	45.17	1.51	0.23	2.16	0.71
1~2	53.72	39.95	2.30	0.41	2.5	1.13
$>2$	51.84	40.72	3.25	0.19	3.34	0.67

注: 各粒径AGS的总EPS含量分别为177.87、176.11、165.79、150.29、304.98 mg/g。

### 2.2.2 胞外聚合物中氨基酸分析

氨基酸作为蛋白质的基本构成单位,其特性和含量间接影响AGS的最终构成。图2展示了不同粒径AGS中氨基酸的丰度变化,氨基酸含量总体变化趋势与蛋白质相似。脯氨酸(Pro)、天冬氨酸(Asp)和缬氨酸(Val)相对丰度占比较大,Asp在不同粒径AGS中的相对丰度维持在20%左右,在大于2 mm的AGS中含量更高,作为EPS的重要组成成分,在AGS内发挥维持结构稳定的作用。Val和Pro为疏水性,二者含量的增加可以增强EPS的疏水性,有利于增大粒径。在外界不利环境胁迫下,Pro具有稳



定生物大分子、保护蛋白质完整性以及增强各种酶活性的作用,同时该物质还有渗透调节的功能<sup>[13]</sup>。因此,推测该物质可以在地塞米松胁迫条件下维持AGS的结构稳定。Pro在0.6~0.8 mm的AGS中相对丰度最高,间接说明该组样品能够更好地抵御地塞米松胁迫,从而有利于粒径稳定增大。

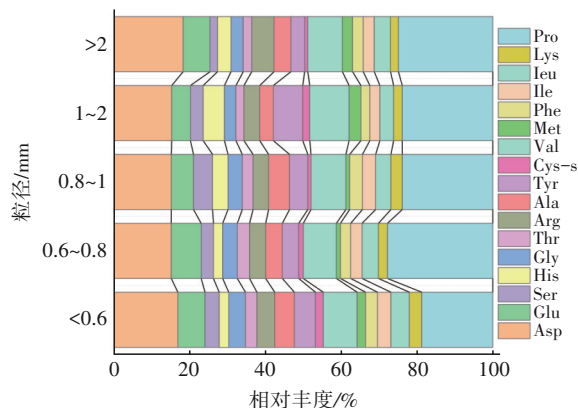


图2 不同粒径AGS的EPS中氨基酸丰度变化

Fig.2 Variations of amino acid abundance in EPS with different particle sizes of AGS

## 2.3 光谱分析

### 2.3.1 三维荧光光谱分析

三维荧光光谱作为一种光谱指纹技术,在水质监测、化学成分分析等领域得到了广泛应用,可以定性和定量地识别AGS中具有荧光强度的物质。根据不同激发/发射波长将有机物的荧光区域划分为5个部分即区域I~V,分别表示酪氨酸类蛋白质、色氨酸类蛋白质、富里酸类物质、溶解性微生物代谢产物和腐殖酸类物质。通过该方法对5个样品的EPS进行分析后发现,样品之间的最大差异体现在各组分的含量不同。其中TB-EPS荧光强度表现最为明显,SMP-EPS和LB-EPS相对较弱。

通过对不同样品EPS荧光区域进行积分(见图3)可知,SMP-EPS和LB-EPS主要蛋白为酪氨酸类和色氨酸类,并且5组组分的荧光强度在这两种EPS中呈相似的变化趋势,也间接说明在SMP-EPS和LB-EPS中物质交换相较于TB-EPS更频繁。通过对TB-EPS进行观察可知,该层中酪氨酸类蛋白质的含量占比明显减少,溶解性微生物代谢产物的含量占比升高。溶解性微生物代谢产物的产生与外界不利环境的刺激、微生物的死亡速度加快以及微生物的生长代谢等因素有关<sup>[14]</sup>,因此可推测地塞米松对TB-EPS层存在刺激作用。

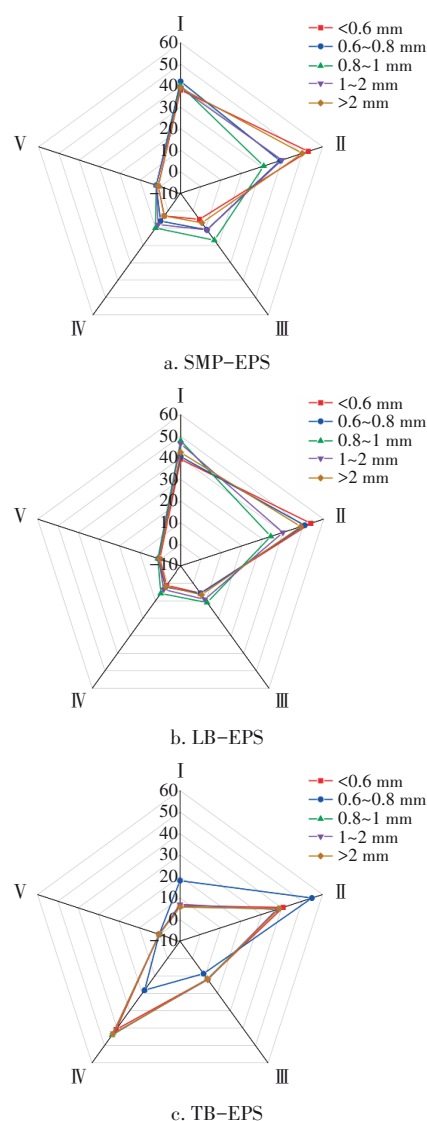


图3 不同粒径AGS分层EPS荧光区域积分

Fig.3 Integration of fluorescence region in EPS with different particle sizes of AGS

色氨酸可以调控相关蛋白质的合成途径从而抑制蛋白质的降解<sup>[15]</sup>,而该类物质在TB-EPS层始终含量相对稳定,这可能与AGS保持结构稳定密切相关。溶解性微生物代谢产物包括能量代谢产物、氨基酸以及多糖等物质,前述分析显示地塞米松会刺激AGS分泌多糖,推测TB-EPS层的溶解性微生物代谢产物的增加是由于多糖含量的增加及酪氨酸类蛋白质分解。研究表明,大量溶解性微生物代谢产物会对污泥活性产生负面影响<sup>[16]</sup>。从图3可知,0.6~0.8 mm的AGS中SMP占比较少,且色氨酸类蛋白质的相对丰度较高,这也间接说明该粒径范围内的AGS稳定性和耐药性均较好。

### 2.3.2 傅里叶红外光谱分析

蛋白质功能的实现关键在于蛋白质本身复杂的空间结构。蛋白质的二级结构由 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 折叠、 $\beta$ 转角等特定的构象组成,其中 $\alpha$ 螺旋出峰范围为 $1\ 660\sim 1\ 650\text{ cm}^{-1}$ , $\beta$ 折叠出峰范围为 $1\ 640\sim 1\ 610\text{ cm}^{-1}$ , $\beta$ 转角出峰范围为 $1\ 695\sim 1\ 660\text{ cm}^{-1}$ ,无规则卷曲出峰范围为 $1\ 650\sim 1\ 640\text{ cm}^{-1}$ [17],这些结构由蛋白质中的多肽主链骨架原子沿一定的轴盘旋或折叠而成[18]。二级结构中不同氨基酸出现的频率及倾向会导致其占比不同,而二级结构的占比不同也会对AGS的结构和功能造成影响。通过二阶导数谱结合去卷积和曲线拟合等处理方法,可以定量求出蛋白质的二级结构分布,结果见图4。

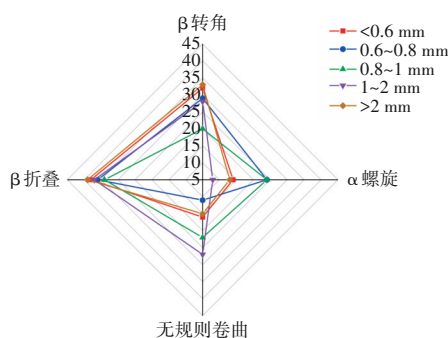


图4 不同粒径AGS蛋白质二级结构占比

Fig.4 Secondary structure distribution of AGS proteins with different particle sizes

由图4可知,不同粒径的AGS中四种二级结构均存在,不同之处在于分布占比。 $\beta$ 折叠在5组AGS中均占比最大,它作为AGS中三维结构的重要组成部分,通过自身的扭转和折叠,暴露出更多的疏水基团,加强了AGS表面疏水性能,有助于污泥聚集。 $\alpha$ 螺旋在 $0.6\sim 0.8$ 、 $0.8\sim 1\text{ mm}$ 这两组粒径的AGS中占比较高,分别为24.1%、24.5%,该结构为规则的蛋白质二级结构,且该结构具有一定刚性,可以发挥维持AGS内部蛋白质骨架稳定的作用,与 $\beta$ 折叠性质一致。 $\beta$ 转角在 $<0.6$ 和 $>2\text{ mm}$ 的AGS中占比较大,分别为31.9%、32%,在 $0.8\sim 1\text{ mm}$ 的AGS中占比较小(19.9%),该结构属于非重复性结构,在 $\beta$ 转角中第一个残基的C=O与第四个残基的N—H氢键键合,形成紧密的环,使该结构更稳定,有利于提高蛋白质的柔韧性[19]。无规则卷曲在 $1\sim 2\text{ mm}$ 的AGS中占比相对较高(27.4%),该结构的柔性构象可以改变肽链走向,连接相对刚性的结构。有研究

表明,当 $\alpha$ 螺旋占比低、 $\beta$ 折叠和无规则卷曲含量高时,蛋白质分子结构相对松散,会使分子内部疏水部位暴露造成表面强疏水性[20]。不同粒径AGS中 $\alpha$ 螺旋/( $\beta$ 折叠+无规则卷曲)比值分别为0.27、0.50、0.44、0.17和0.27,表明粒径为 $1\sim 2\text{ mm}$ 的AGS内部蛋白质疏水性能较好,有利于粒径的进一步增大以及微生物的进一步聚集。而 $0.6\sim 0.8$ 、 $0.8\sim 1\text{ mm}$ 的AGS中 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠占比相对较高,疏水基团暴露较多,蛋白质刚性更强,说明这两组AGS内部更加稳定。

### 2.4 不同粒径成熟AGS的PCA主成分分析

蛋白质是生命活动的直接体现者。当细胞状态改变或细胞受到外界刺激时,细胞中蛋白表达量也会发生变化,这种变化其实是为了适应外界环境的改变。蛋白质组学是系统分析基因组表达蛋白的有力分子工具,是揭示蛋白质在不同环境胁迫下动态响应的最佳策略之一。通过研究AGS蛋白质水平,有助于推断微生物的代谢途径,同时也为AGS蛋白质水平研究提供可靠的实验数据基础。

PCA主成分分析可以有效识别数据中最“主要”的元素和结构,通过分析不同样品物种、蛋白、COG和KEGG代谢功能等组分,运用特征值分解方法,将多组数据的差异反映在二维坐标图上,坐标轴取能够最大反映方差值的两个特征值。结果表明,不同样品中微生物群体间均有差异,粒径 $<0.6$ 、 $0.6\sim 0.8$ 、 $1\sim 2$ 、 $>2\text{ mm}$ 的间距相对较近,AGS组成较为相似,粒径为 $0.8\sim 1\text{ mm}$ 的AGS与其他几组样品的功能差异最大,表明该条件下的AGS性质的特殊性。此外,该粒径AGS内部结构更加稳定,结合蛋白质组学内容可推测,该粒径范围内的AGS内部可能正经历着种群筛选替换过程,变化较为剧烈,因此与其他粒径AGS的差异较大。

### 2.5 蛋白质组及代谢通路分析

对鉴定到的2 458种蛋白进行COG数据库比对。COG是由NCBI创建并维护的蛋白数据库,其根据细菌、藻类和真核生物完整基因组的编码蛋白系统进化关系而分类构建。通过比对可以将某个蛋白序列注释到某一个COG中,每一簇COG由直系同源序列构成,从而可以推测该序列的功能。功能分别为A:RNA加工和修饰,B:染色质结构和动力学,C:能源生产和转换,D:细胞周期控制、细胞分裂、染色体分割,E:氨基酸转运和代谢,F:核苷酸转

运和代谢,G:碳水化合物的运输和代谢,H:辅酶转运和代谢,I:脂质运输和代谢,J:翻译、核糖体结构和生物转化,K:转录,L:复制、重组和修复,M:细胞壁/细胞膜/包膜生物发生,N:细胞运动,O:翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣蛋白,P:无机离子的运输和代谢,Q:次级代谢物的生物合成、运输和分解代谢,R:一般功能预测,S:未知功能,T:信号转导机制,U:胞内运输、分泌和囊泡运输,V:防御机制,W:细胞外结构,Y:核结构,以及Z:细胞骨架。比对结果显示,注释蛋白数为1 939个,共得到23个功能分类(如图5所示),其中大多数鉴定蛋白参与的功能分类主要包括能量生产和转换(335),氨基酸转运和代谢(274),翻译、核糖体结构和生物转化(284),脂质运输和代谢(133),以及翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣蛋白(124)。

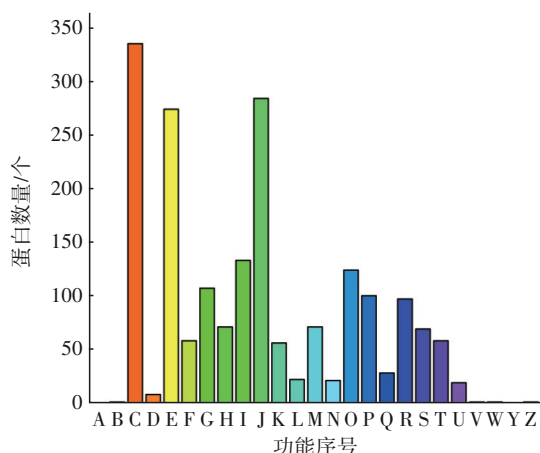


图5 COG功能注释

Fig.5 COG function notes

KEGG数据库中丰富的通路信息将有助于从系统水平了解基因的生物功能,如代谢途径、遗传信息传递以及细胞过程等一系列复杂的生物功能。根据KEGG层级(KEGG BRITE)数据库,如图6所示,brite A中细胞过程功能蛋白有241个,环境信息处理功能蛋白有364个,遗传信息处理功能蛋白有317个,人类疾病功能蛋白有320个,代谢功能蛋白有2 828个,有机系统功能蛋白有252个。其中代谢分类下的蛋白占大多数(65.4%),其中参与能量代谢功能的蛋白占390个、参与碳水化合物代谢功能的蛋白占520个、参与氨基酸代谢功能的蛋白占371个。Chen等<sup>[21]</sup>发现,使用地塞米松的样品中最常见的COG功能簇为功能预测、能量生产和转化以及氨

基酸运输和代谢,将单基因映射到KEGG通路数据库中,发现大多数注释基因参与代谢途径,与本文实验结果一致。AGS作为对新型污染物具有较好去除性能的生物处理方式之一,在地塞米松胁迫下依旧可以发挥较好的污染物去除能力,同时也表现出颗粒粒径增大、内部保持稳定等良好特性。结合文献推测,AGS内部发挥关键作用的KEGG通路为代谢途径,其中包括能量代谢、氨基酸代谢以及脂质代谢等。

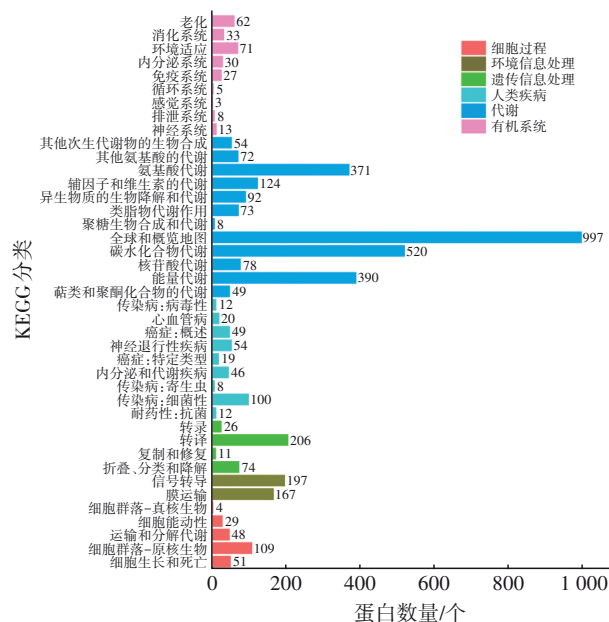


图6 KEGG注释统计

Fig.6 KEGG annotation statistical chart

代谢被归类成不同的代谢途径,以最大限度地获取能量或减少能量的使用。氨基酸是由氮、碳、氢和氧以及可变侧链组成的有机化合物,氨基酸代谢对于AGS生命活动过程提供能源至关重要;碳水化合物是共价连接到蛋白质(糖蛋白)或脂质(糖脂)上的葡萄糖的修饰形式,参与细胞重要功能,并作为细胞膜的组成部分。地塞米松作为一种合成的抗炎和免疫抑制剂糖皮质激素药物,已广泛用于治疗异常免疫反应和炎症。长期使用地塞米松会导致一些不良反应,虽机制尚不明确,但会使能量代谢和氧化过程受到影响而发生改变<sup>[22]</sup>。地塞米松的存在可能有助于部分微生物脂质代谢的激活<sup>[23-24]</sup>;糖皮质激素会影响以下三条代谢途径:甘油磷脂代谢、嘌呤代谢和谷胱甘肽代谢<sup>[25]</sup>,推测地塞米松作为该类药物之一,也会影响AGS内部相关代



谢通路。

## 2.6 差异蛋白分析

表3为不同样本组之间差异蛋白的数量统计

(蛋白总数为2 278个)。使用R语言中t.test函数计算样本间差异显著性 $p$ 值,显著差异表达蛋白的筛选标准为: $p < 0.05$  & ( $FC < 0.50$  或  $FC > 2.00$ )。

表3 差异蛋白统计表

Tab.3 Statistical of differential proteins

名称 (A vs B)	均有定量	差异蛋白数	上调蛋白数 (均有定量)	下调蛋白数 (均有定量)	只在A组样 本中定量	只在B组样 本中定量	两组中均 无定量值
0.6 ~ 0.8 mm vs <0.6 mm	2 068	340	190	150	91	73	46
0.8 ~ 1 mm vs <0.6 mm	2 053	479	254	225	94	88	43
0.8 ~ 1 mm vs 0.6 ~ 0.8 mm	2 080	238	91	147	67	79	52
1 ~ 2 mm vs <0.6 mm	2 038	306	170	136	83	103	54
1 ~ 2 mm vs 0.6 ~ 0.8 mm	2 048	268	102	166	73	111	46
1 ~ 2 mm vs 0.8 ~ 1 mm	2 035	297	146	151	86	112	45
> 2 mm vs <0.6 mm	2 041	511	286	225	105	100	32
> 2 mm vs 0.6 ~ 0.8 mm	2 062	281	137	144	84	97	35
> 2 mm vs 0.8 ~ 1 mm	2 056	209	96	113	90	91	41
> 2 mm vs 1 ~ 2 mm	2 031	345	169	176	115	90	42

由表3可知,差异蛋白数量最多的AGS组别为“>2 mm vs <0.6 mm”,差异蛋白数量为511个,其中上调286个、下调225个。地塞米松会激活部分微生物的脂质代谢,脂质代谢通路中的脂肪酸生物合成通路(Fatty acid biosynthesis)属于上调状态,其中参与该通路的上调蛋白分别为:AMP结合结构域蛋白质(AMP-binding domain-containing protein)、乙酰辅酶A羧化酶羧基转移酶亚基 $\beta$ (Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta)、丙二酰辅酶A酰基载体蛋白转酰酶(Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase),乙酰辅酶A羧化酶羧基转移酶亚基 $\beta$ 参与脂肪酸生物合成步骤<sup>[26]</sup>。由此可推测,脂质代谢在AGS内部也得到激活,且该对比组也说明AGS粒径的差异越大,内部微生物所发生的变化也越大,蛋白具有的功能差异也越明显。

由主成分分析可知,1 ~ 2 mm组与0.8 ~ 1 mm组的AGS差异最大,对其进行差异蛋白分析可知,差异蛋白数量为297个,其中上调146个、下调151个。结合前文,糖皮质激素会影响甘油磷脂代谢、嘌呤代谢和谷胱甘肽代谢,该对比组KEGG通路中甘油磷脂代谢通路属于上调状态,其中乙醛脱氢酶家族蛋白(Aldehyde dehydrogenase family protein)在该通路中属于上调蛋白,该家族蛋白广泛参与多种代谢途径<sup>[27]</sup>;嘌呤代谢通路属于上调状态,其中磷酸核糖甲酰甘氨酸胺合酶(Phosphoribosylformylglycinamide synthase)、核苷二磷酸激酶(Nucleoside

diphosphate kinase)、含PfkB结构域蛋白质(PfkB domain-containing protein)均为上调蛋白;谷胱甘肽代谢通路也属于上调状态,其中异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate dehydrogenase, IDH)在该通路中属于上调蛋白,异柠檬酸脱羧酶是三羧酸循环中的一种可逆酶<sup>[28]</sup>。尽管在AGS粒径上二者相差较小,但是在AGS内部代谢途径以及蛋白层面差别较明显,由此推测地塞米松胁迫条件下,在该范围AGS粒径增长过程中,AGS内部经历着比较关键的微生物种群筛选过程,才会呈现出主成分分析差异过大的现象。

## 3 结论

① 地塞米松胁迫下的AGS对COD的去除率从72.8%提升至88.3%,对地塞米松的去除率也从最初16.8%升至55.2%,并且最终药物浓度可以降至10  $\mu\text{g/L}$ 以下。在地塞米松胁迫下,AGS由培养初期到中后期经历了药物对颗粒内部的微生物物种“筛选”,经过适应期后,AGS的性能和耐药性都得到了提升。

② 在不同粒径AGS中,TB-EPS层的蛋白质和多糖含量均在总EPS中占据突出地位。大于2 mm的AGS中蛋白质含量最多,同时该粒径范围内的AGS多糖含量依旧最多。各组AGS中PN/PS值在1.3左右,稳定性相对较弱,在AGS形成过程中受到地塞米松药物的刺激作用。脯氨酸(Pro)、天冬氨酸(Asp)和缬氨酸(Val)在氨基酸中相对丰度占比较大,其分别可以发挥维持结构稳定、增大EPS疏水性



的作用。脯氨酸在 0.6~0.8 mm 粒径范围的相对丰度最高,间接说明在此粒径下 AGS 能够更好地抵御地塞米松胁迫,有利于粒径稳定增大。

③ TB-EPS 层的荧光强度表现最为明显, SMP-EPS 层和 LB-EPS 层表现相对较弱。TB-EPS 层中酪氨酸类蛋白质的含量占比明显减少,推测地塞米松刺激 AGS 内部分泌多糖,间接导致该类蛋白分解。色氨酸类蛋白质在 0.6~0.8 mm 的 AGS 中相对丰度较高,说明该粒径范围内的 AGS 稳定性较强,耐药性较好。不同粒径 AGS 内部均存在  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、 $\beta$  转角以及无规则卷曲四类蛋白质二级结构,不同之处在于 0.6~0.8、0.8~1 mm 这两组的 AGS 中  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠占比相对较高,说明这两组 AGS 内部蛋白质结构刚性较强,稳定性相对更好。

④ 粒径为 0.6~0.8、0.8~1、>2 mm 这三组 AGS 样品组成较为相似,粒径为 0.8~1 mm 的 AGS 与其他几组样品的功能间差异最大。AGS 内部发挥关键作用的 KEGG 通路为代谢途径,其中包括能量代谢、氨基酸代谢以及脂质代谢等。通过对差异蛋白进行分析显示,差异蛋白数量最多的 AGS 组别为“>2 mm vs <0.6 mm”,说明在 AGS 粒径的差异越大,内部微生物所发生的变化越大,蛋白具有的功能差异就越明显。

#### 参考文献:

- [1] 侯云鹤,董紫君,宋洪星,等. 水源水中 8 种治疗新冠的抗病毒药物的同步检测[J]. 中国给水排水, 2022, 38(22): 130-134.  
HOU Yunhe, DONG Zijun, SONG Hongxing, *et al.* Simultaneous detection of eight antiviral drugs for treatment of COVID-19 in source water [J]. China Water & Wastewater, 2022, 38 (22) : 130-134 (in Chinese).
- [2] ARVANITI O S, LOANNIDI A A, POLITI A, *et al.* Dexamethasone degradation in aqueous medium by a thermally activated persulfate system: kinetics and transformation products [J]. Journal of Water Process Engineering, 2022, 49: 103134.
- [3] LONG B, XUAN X, YANG C, *et al.* Stability of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor enhanced by granular particle size control [J]. Chemosphere, 2019, 225: 460-469.
- [4] PRONK M, DE KREUK M K, DE BRUIN B, *et al.*

Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment [J]. Water Research, 2015, 84: 207-217.

- [5] 胡淼. 好氧颗粒污泥去除典型雌激素的过程特性研究[D]. 杭州:浙江大学, 2016.  
HU Miao. Study on Process Characteristics of Typical Estrogen Removal by Aerobic Granular Sludge [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016 (in Chinese).
- [6] 万小平. 环境相关浓度磺胺嘧啶对好氧颗粒污泥的影响及其去除机制[D]. 济南:山东大学, 2018.  
WAN Xiaoping. Effect of Sulfadiazine with Environmentally Relevant Concentration on Aerobic Granular Sludge and Its Removal Mechanism [D]. Jinan: Shandong University, 2018 (in Chinese).
- [7] LI K, WEI D, ZHANG G, *et al.* Toxicity of bisphenol A to aerobic granular sludge in sequencing batch reactors [J]. Journal of Molecular Liquids, 2015, 209: 284-288.
- [8] BOLONG N, ISMAIL A, SALIM M, *et al.* A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal [J]. Desalination, 2009, 239 (1/3): 229-246.
- [9] MARGOT J, ROSSI L, BARRY D, *et al.* A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants [J]. Water, 2015, 2(5): 457-487.
- [10] YANG Y, KIM K, KWON E, *et al.* Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: a review [J]. Science of the Total Environment, 2017, 596/597: 303-320.
- [11] 葛峰,谭丽超,单正军,等. 污水中 18 种类固醇激素化合物的痕量分析[J]. 分析测试学报, 2011, 30 (11): 1295-1300.  
GE Feng, TAN Lichao, SHAN Zhengjun, *et al.* Trace analysis of 18 steroid hormone compounds in sewage [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2011, 30(11): 1295-1300 (in Chinese).
- [12] 曾妮. 污水处理厂微生物群落结构及胞外聚合物组分分析[D]. 重庆:重庆大学, 2015.  
ZENG Ni. Analysis of Microbial Community Structure and Extracellular Polymer Composition in Sewage Treatment Plant [D]. Chongqing: Chongqing University, 2015 (in Chinese).
- [13] CHEN S, DONG B, DIA X, *et al.* Effects of thermal hydrolysis on the metabolism of amino acids in sewage sludge in anaerobic digestion [J]. Waste Management,

- 2019, 88: 309–318.
- [14] FURUKAWA K, TAKAHASHI Y. Effect of complexation with humic substances on diffusion of metal ions in water[J]. *Chemosphere*, 2008, 73(8): 1272–1278.
- [15] 魏宗友, 潘晓花. 色氨酸对蛋白质代谢的影响及调控机制[J]. *中国饲料*, 2012(16): 9–13.  
WEI Zongyou, PAN Xiaohua. Effect of tryptophan on metabolism of protein and its regulatory mechanism [J]. *China Feed*, 2012(16): 9–13 (in Chinese).
- [16] 范吉. 包含溶解性微生物产物形成与降解及同时贮存与生长机理的新活性污泥数学模型建立与模拟研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.  
FAN Ji. Establishment and Simulation of New Activated Sludge Mathematical Model Including Formation and Degradation of Dissolved Microbial Products and Simultaneous Storage and Growth Mechanism [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).
- [17] 高铮亚. 水溶液中蛋白质二级结构红外分析方法的建立及cAMP受体蛋白构象研究[D]. 上海: 复旦大学, 2012.  
GAO Zhengya. Establishment of Infrared Analysis Method for Secondary Structure of Protein in Aqueous Solution and Conformation Study of cAMP Receptor Protein [D]. Shanghai: Fudan University, 2012 (in Chinese).
- [18] WANG S, HUANG X, LIU L, *et al.* Understanding the mechanism in aggregation ability between aerobic and anammox granular sludge from the perspective of exopolysaccharides [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2020, 38: 101629.
- [19] 赵永会, 冯俊霞, 秦婷, 等. 面粉中蛋白质二级结构的红外光谱研究[J]. *光散射学报*, 2015, 27(1): 82–86.  
ZHAO Yonghui, FENG Junxia, QIN Ting, *et al.* Study on the secondary structure of protein in flour by infrared spectroscopy[J]. *The Journal of Light Scattering*, 2015, 27(1): 82–86 (in Chinese).
- [20] HOU X, LIU S, ZHANG Z. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge[J]. *Water Research*, 2015, 75: 51–62.
- [21] CHEN Q, HUA C, NIU L, *et al.* Exploring differentially expressed genes related to metabolism by RNA-Seq in goat liver after dexamethasone treatment [J]. *Gene*, 2018, 659: 175–182.
- [22] BUZZATTO A Z, MALKAWI A, SABI E M, *et al.* Tissue lipidomic alterations induced by prolonged dexamethasone treatment [J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(3): 1558–1570.
- [23] MURRAY A, THARMALINGAM S, NGUYEN P, *et al.* Untargeted metabolomics reveals sex-specific differences in lipid metabolism of adult rats exposed to dexamethasone in utero [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 20342.
- [24] FLIS D J, BIALOBRODZKA E G, RODZIEWICZ-FLIS E A, *et al.* The effect of long-lasting swimming on rats skeletal muscles energy metabolism after nine days of dexamethasone treatment [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(2): 748–755.
- [25] THARMALINGAM S, KHURANA S, MURRAY A, *et al.* Whole transcriptome analysis of adrenal glands from prenatal glucocorticoid programmed hypertensive rodents [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 18755.
- [26] ATHAPPILLY F K, HENDRICKSON W A. Structure of the biotinyl domain of acetyl-coenzyme A carboxylase determined by MAD phasing [J]. *Structure*, 1995, 3(12): 1407–1409.
- [27] RIVEROS-ROSAS H, JULIAN-SANCHEZ A, MORENO-HAGECSIEB G, *et al.* Aldehyde dehydrogenase diversity in bacteria of the *Pseudomonas* genus [J]. *Chemico-biological Interactions*, 2019, 304: 83–87.
- [28] ANAND K B, SHAMBHU Y. The glutathione cycle: glutathione metabolism beyond the gamma-glutamyl cycle [J]. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 70(7): 585–592.

作者简介: 冯萱(1997–), 女, 山东曲阜人, 硕士研究生, 主要研究方向为好氧颗粒污泥。

E-mail: clarefeng\_9712@163.com

收稿日期: 2022-11-24

修回日期: 2022-12-27

(编辑: 李德强)