

排水管道沉积物中胞外聚合物的提取及检测方法研究

陈珂莉^{1,2}, 李朋^{1,2}, 金伟^{1,2}, 李怀正^{1,2}, 吴俊^{1,2}, 王灵华³, 项云生⁴

(1. 同济大学 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092; 2. 上海污染控制与生态安全研究院, 上海 200092; 3. 巢湖市住房和城乡建设局, 安徽 巢湖 238001; 4. 巢湖市城镇建设投资有限公司, 安徽 巢湖 238001)

摘要: 排水管道沉积物中的微生物及其分泌物 EPS 对管网淤积问题具有一定的影响。为此, 考察并筛选了排水管道沉积物中 EPS 的提取及检测方法, 并验证了所选方法的可行性。结果表明, 苯酚-浓硫酸法测定多糖浓度的最佳反应条件是先加 5% 苯酚再加浓硫酸, 然后 90 °C 水浴加热 15 min; 加热法能在有效保护细胞结构的同时, 获得较高的 EPS 提取效率, 是一种较为温和且有效的沉积物 EPS 提取方法。加热法所提取 EPS 的三维荧光图谱及其含量能够反映管道沉积物的抗冲刷特性, 因此所提出的 EPS 提取及检测方法具有可行性。

关键词: 排水管道; 沉积物; 胞外聚合物; 提取方法; 组成特性

中图分类号: TU992.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2018)07-0032-05

Extraction and Detection Method of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Sediment of Sewage System

CHEN Ke-li^{1,2}, LI Peng^{1,2}, JIN Wei^{1,2}, LI Huai-zheng^{1,2}, WU Jun^{1,2}, WANG Ling-hua³, XIANG Yun-sheng⁴

(1. Key Laboratory of Yangtze River Water Environment <Ministry of Education>, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Shanghai Institute of Pollution Control and Ecological Security, Shanghai 200092, China; 3. Chaohu City Housing and Urban Construction Bureau, Chaohu 238001, China; 4. Chaohu City Urban Construction Investment Co. Ltd., Chaohu 238001, China)

Abstract: The biofilm which is in the pipeline, and its extracellular polymeric substances (EPS) have a great influence on the sedimentation problem of sewage system. This paper took an evaluation of the extraction efficiency and detection methods of EPS from sediment, and verified the feasibility of selected method. The results showed the phenol-sulfuric acid order, heating at 90 °C for 15 minutes was the best detection condition. The three-dimensional fluorescence spectrum and the concentration of EPS extracted by heating method can reflect the anti-erosion characteristics of pipeline sediments. Therefore, heating method is feasible.

Key words: sewage system; sediment; extracellular polymeric substances (EPS); extraction method; composition characteristic

城市化进程的加快以及城市排水系统设计的不合理、运行管理的不完善等,使该系统的一些问题逐渐凸显出来,例如排水管道淤积等。排水管道沉积物不仅降低了排水容量、增加了水流阻力,而且微生物的生化反应还产生了管道恶臭^[1]、腐蚀等问题,沉积物中的某些污染物甚至会威胁受纳水体^[2]。

排水管道水质及来源复杂,且存在管道混接、地下水入渗等问题。据调查研究发现,合流管道、雨水管道沉积物具有有机物含量高、微生物活性强的特点。有机物及微生物作用的影响使得排水管道沉积物的被冲刷特性不再简单地类似于无机泥沙的启动与输移。尤其是作为微生物重要组成部分的胞外聚合物(EPS),对排水管道的淤积及冲刷具有重要影响。EPS的主要成分为多糖、蛋白质、核酸、脂肪、胞外DNA等^[3],呈烂泥状或凝胶状,具有粘性和吸附性。因此,EPS发挥着聚集微生物、捕集悬浮有机物以及保护微生物膜不受恶劣环境条件(如剪切力等)影响的作用^[4,5],进而决定了排水管道沉积物的粘性及其抗冲刷特性。

目前,国内外对EPS的研究主要集中于颗粒污泥、污泥絮体等方面,其来源大多是城市污水厂的活性污泥、厌氧发酵罐污泥、颗粒污泥等,而这些均与管道沉积物差别较大。针对此种情况,笔者以上海市排水系统中的沉积物为基础,研究其EPS的提取及检测方法,为后期研究EPS对排水管道沉积物水力冲刷特性的影响提供基础。

1 材料与方法

1.1 采样点及采样方法

根据对上海市部分排水管道中沉积物性质的调研结果,选择位于杨浦区靖宇东路(水丰路—敦化路)管径为DN1 200的雨水管道(沉积物1)及位于长宁区伊犁路(虹桥路—红宝石路)管径为DN1 650的雨水管道(沉积物2)作为采样点,由管道清淤工作人员协助采样,样品的基本特性见表1。

表1 沉积物样品基本特性

Tab.1 Basic characteristics of sediment samples

项 目	含水率/ %	有机物 含量/%	粒径分布/ μm		
			D_{10}	D_{50}	D_{90}
沉积物1	24.58	3.33	7.04	91.9	538
沉积物2	67.14	7.56	6.78	49.15	379

注: D_{10} 、 D_{50} 、 D_{90} 表示样品累计粒度分布数分别达到10%、50%、90%时所对应的粒径。

1.2 试验方法

1.2.1 EPS的提取方法

EPS可分为溶解型(Soluble EPS)和结合型(Bound EPS)两大类,后者还包括松散结合EPS(LB-EPS)和紧密结合EPS(TB-EPS)两种,其中溶解型EPS可通过离心方式得到,结合型EPS的提取方法包括超声波、加热、甲醛加氢氧化钠、EDTA、离子交换等。笔者在比较了相关方法的优势、局限及适用性后^[6],最终选取超声波法、加热法、甲醛加氢氧化钠三种方法及其不同条件进行试验,并建立对照,具体操作过程如图1所示。

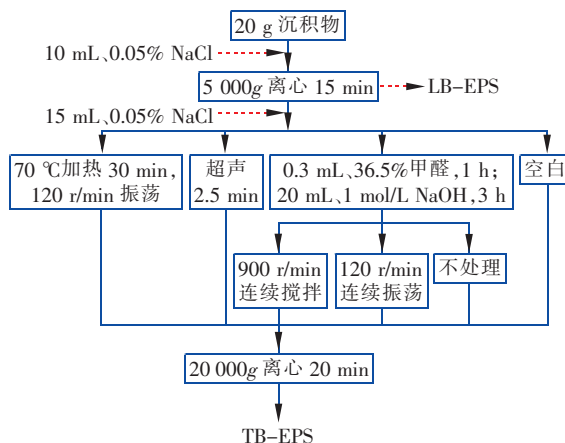


图1 EPS提取流程

Fig.1 Extraction process of EPS

1.2.2 EPS的检测方法

EPS组分包括多糖、蛋白质、胞外DNA等,研究中EPS用各组分含量之和表示。经上述方法提取后得到的EPS用0.45 μm 滤膜处理,而后测各组分含量。其中,蛋白质检测采用Lowry法的BCA蛋白试剂盒(C503051),由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,以牛血清白蛋白为标准样品;多糖检测采用苯酚-浓硫酸法,以葡萄糖溶液为标准液;DNA检测采用二苯胺比色法,以脱氧核糖核酸为标准液。

关于使用苯酚-浓硫酸法检测多糖的反应条件在文献中并不统一,其检测结果受苯酚和浓硫酸投加顺序、加热温度、反应时间等^[7]的影响。为此参考相关文献报道设计试验,以获取适于管道沉积物EPS中多糖检测的最佳试验条件。具体测试条件见表2,每组试验设三个平行,以平均值计。标准样品为0.1 mg/mL葡萄糖溶液(葡萄糖105℃烘干至恒质量),分别取0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,加蒸馏水稀释至2 mL,按相应顺序加入1.2 mL苯酚、5 mL

浓硫酸,混匀,水浴加热,之后用冷水浴迅速冷却,分别测量 490 nm 下的吸光度,绘制对应标准曲线。

表2 多糖检测试验条件

Tab.2 Testing condition of polysaccharides

项目	试剂顺序	加热温度/℃	加热时间/min
1 [#]	浓硫酸-5% 苯酚	90	5
2 [#]	浓硫酸-5% 苯酚	90	15
3 [#]	5% 苯酚-浓硫酸	90	15
4 [#]	5% 苯酚-浓硫酸	40	15
5 [#]	5% 苯酚-浓硫酸	40	30

1.2.3 EPS 的提取及检测方法验证

利用已经确定的管道沉积物 EPS 提取及检测方法,提取并检测其 EPS 含量。分别通过三维荧光光谱数据及 EPS 含量与样品剪切力的对应情况确定提取及检测方法的准确性。其中,三维荧光(3D-EEMs)检测以 Milli-Q 纯水为空白,使用 1 cm 荧光池在同步扫描模式下进行分析,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm,激发波长(Ex)为 250~450 nm,发射波长(Em)为 300~550 nm,扫描间隔均为 5 nm,扫描速度为 1 200 nm/min,峰强度最大量程为 1 000 A. U.,采用 Origin9.0 绘制等高线图;剪切力用英国 Partrac 公司的粘结力仪(CSM)测定。

2 结果与讨论

2.1 多糖最佳反应条件

不同反应条件下葡萄糖的检测标线如图 2 所示。在加热温度为 90 ℃ 时,对比图 2(a)中 1[#]~3[#] 曲线,发现加热时间为 5 min 时的吸光度明显低于加热时间为 15 min 的,说明 5 min 反应时间下反应不彻底,因此在 90 ℃ 时反应时间取值为 15 min。对比 2[#]和 3[#]两条曲线,发现 2[#]曲线的 R^2 值较低,可能由于先加浓硫酸时发生了氧化反应,影响吸光度的测量结果,因此选择苯酚-浓硫酸的投加顺序。故在加热温度为 90 ℃ 时,选择先加 5% 苯酚后加浓硫酸的药剂滴加顺序,且加热时间取 15 min。

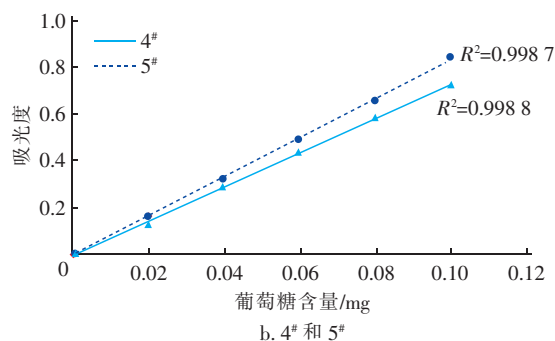
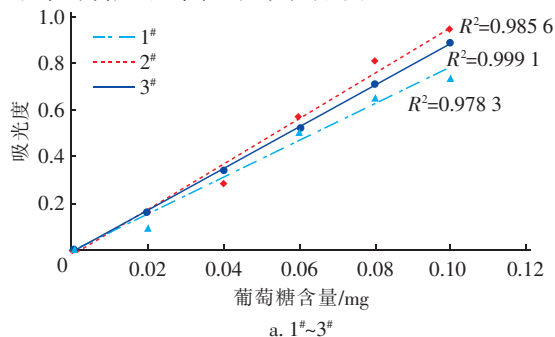


图2 不同反应条件下葡萄糖检测标线

Fig.2 Standard curve of glucose detection under different reaction conditions

在加热温度为 40 ℃ 时,不同加热时间下两条标准曲线的 R^2 值都较高。但是加热 30 min 时的吸光度更高,因此选择加热温度为 40 ℃,加热 30 min,先加 5% 苯酚后加浓硫酸顺序。

针对上述两种不同温度下获得的较优条件,对两个实际样品 EPS 中的多糖含量进行检测,结果如表 3 所示。可以发现结果相差不大,90 ℃ 加热 15 min 相对略高。因此可认为两种方法均可,但考虑到用于后续测试的准确性,选择标准曲线相关性 R^2 值较大的方法,即先加 5% 苯酚再加浓硫酸,于 90 ℃ 水浴中加热 15 min 的检测条件。

表3 不同反应条件下对实际样品中多糖含量的检测结果

Tab.3 Polysaccharide content in actual sample under different reaction conditions $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{VSS}$

项目	40 ℃ + 30 min	90 ℃ + 15 min
沉积物 1	1.341	1.384
沉积物 2	0.553	0.568

2.2 EPS 的提取方法对比

不同提取方法提取的 EPS 各组分含量结果见图 3。从总量及各组分含量来看,各方法均遵循:甲醛+氢氧化钠+搅拌法>甲醛+氢氧化钠+振荡法>甲醛+氢氧化钠法>加热法>超声波法>对照法,这与已报道的活性污泥中 EPS 提取研究结果一致^[8-10]。经甲醛和氢氧化钠处理后提取的蛋白质含量明显高于其他方法,且经过 900 r/min 搅拌的又远高于振荡和未搅拌或振荡处理的。同时,这三种方法提取的 DNA 浓度较其他方法要高,至少在 3 倍以上。因此,甲醛和氢氧化钠提取 EPS 的效率比其他方法高的可能原因是其引起了细胞破裂,造成胞内物质释放。而且该法的提取液呈棕色,干扰后续的检测^[11,12]。综合考虑,加热法的提取效率较

高,对微生物细胞破坏较小,对后续检测影响较小,建议使用加热法作为排水管道沉积物 EPS 的提取方法。

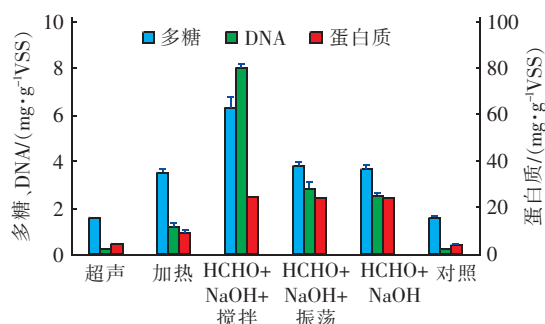


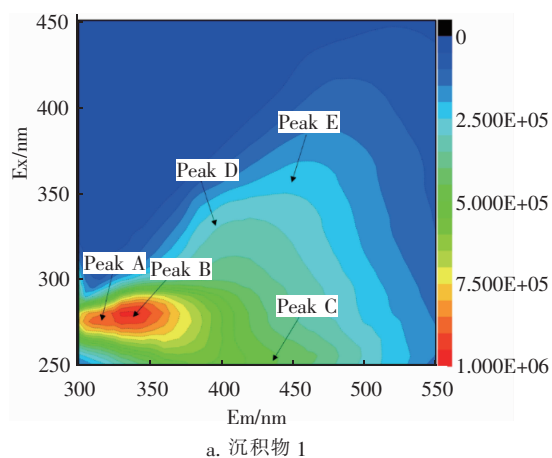
图3 不同方法提取的 EPS 含量结果

Fig. 3 EPS content extracted by different methods

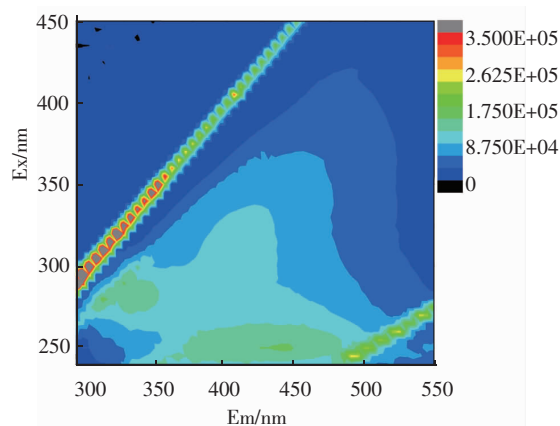
2.3 EPS 的检测及提取方法验证

2.3.1 EPS 提取方法验证

利用加热法提取两种管道沉积物中的 EPS 并用三维荧光法进行分析,结果如图 4 所示。



a. 沉积物 1



b. 沉积物 2

图4 排水管道沉积物 EPS 的三维荧光图谱

Fig. 4 Three-dimensional fluorescence spectra of EPS in sediment of drainage pipes

排水管道沉积物 EPS 主要存在 5 个峰:①峰 A, $E_x/E_m = 275/310$ nm, 类酪氨酸峰;②峰 B, $E_x/E_m = 275/340$ nm, 类色氨酸峰;③峰 C, $E_x/E_m = 200 \sim 250/380 \sim 440$ nm, 类富里酸峰;④峰 D, $E_x/E_m = 310 \sim 340/350 \sim 450$ nm, 类腐殖酸峰;⑤峰 E, $E_x/E_m = 340 \sim 370/420 \sim 450$ nm, 疏水性酸峰^[13]。从峰荧光强度来看,沉积物 1 的峰 A 和峰 B 荧光强度要明显高于沉积物 2,说明其 EPS 中酪氨酸和色氨酸含量相对较高。相关文献表明,酪氨酸和色氨酸类物质可促进细胞聚集、增强颗粒的稳定性^[9],故沉积物 1 的抗冲刷剪切力强度应该大于沉积物 2。经测定两沉积物的抗冲刷剪切力强度分别为 4.17、2.74 N/m²,与推测结果一致,故可认为所选用的管道沉积物 EPS 的提取方法具有可行性。

2.3.2 EPS 检测方法验证

利用已经确定的检测方法,检测使用加热法从管道沉积物中提取的 EPS 含量。对于沉积物 1,其多糖、蛋白质及 EPS 总量分别为 1.384、2.633、4.017 mg/gVSS,多糖/EPS 为 34.5%;对于沉积物 2,其多糖、蛋白质及 EPS 总量分别为 0.568、29.525、30.093 mg/gVSS,多糖/EPS 为 1.89%。

EPS 中的多糖具有吸附作用^[14],对沉积物中颗粒的聚集产生重要影响,故多糖在 EPS 中的占比可直接反映出沉积物的抗冲刷特性。多糖占比越高,其抗冲刷性能越强。根据 EPS 含量的测定结果可以推断出沉积物 1 的抗剪切力大于沉积物 2,与实际检测结果一致,故所选择的 EPS 检测方法是可行的。

3 结论

① 苯酚-浓硫酸法测定管道沉积物 EPS 中多糖含量的最佳反应条件是:先加 5% 苯酚后加浓硫酸,在 90 °C 水浴中加热 15 min。

② 从 EPS 提取总量及各组分含量来看,各方法均遵循甲醛+氢氧化钠+搅拌法>甲醛+氢氧化钠+振荡法>甲醛+氢氧化钠法>加热法>超声波法>对照,但经甲醛和氢氧化钠处理后沉积物细胞破裂较多,影响后续检测结果,因而选择加热法作为沉积物 EPS 的提取方法。

③ 利用加热法提取 EPS 的三维荧光图谱及其含量检测结果推断对应管道沉积物的抗冲刷特性,其结果与实际检测结果一致,故所提出的管道沉积物 EPS 的提取及检测方法具有可行性。

参考文献:

- [1] Muynck W D, Belie N D, Verstraete W. Effectiveness of admixtures, surface treatments and antimicrobial compounds against biogenic sulfuric acid corrosion of concrete[J]. *Cement & Concrete Composites*, 2009, 31(3):163-170.
- [2] Banasiak R, Verhoeven R, De Sutter R, *et al.* The erosion behaviour of biologically active sewer sediment deposits: Observations from a laboratory study[J]. *Water Res*, 2005, 39(20):5221-5231.
- [3] Sheng G, Yu H, Li X. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review[J]. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(6):882-894.
- [4] Bridier A, Briandet R, Thomas V, *et al.* Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review[J]. *Biofouling*, 2011, 27(9):1017-1032.
- [5] Simoes L C, Azevedo N, Pacheco A, *et al.* Drinking water biofilm assessment of total and culturable bacteria under different operating conditions[J]. *Biofouling*, 2006, 22(2):91-99.
- [6] Hong L, Fang H H P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges[J]. *J Biotechnol*, 2002, 95(3):249-256.
- [7] Masuko T, Minami A, Iwasaki N, *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format[J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 339(1):69-72.
- [8] Yu G H, He P J, Shao L M, *et al.* Enzyme activities in activated sludge flocs[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 77(3):605-612.
- [9] 王琰, 钱飞跃, 王建芳, 等. 亚硝化颗粒污泥中 EPS 提取方法与组成特性的比较研究[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(11):3515-3521.
Wang Yan, Qian Feiyue, Wang Jianfang, *et al.* Comparative study on extraction methods and composition of extracellular polymeric substances (EPS) in granular nitrification sludge [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(11):3515-3521 (in Chinese).
- [10] 周俊, 周立祥, 黄焕忠. 污泥胞外聚合物的提取方法及其对污泥脱水性能的影响[J]. *环境科学*, 2013, 34(7):2752-2757.
Zhou Jun, Zhou Lixiang, Huang Huanzhong. Optimization of extracellular polymeric substance extraction method and its role in the dewaterability of sludge[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(7):2752-2757 (in Chinese).
- [11] 张子健, 吴伟伟, 王建龙. 甲醛与 NaOH 用量对污泥 EPS 中蛋白质和多糖测定的影响[J]. *清华大学学报: 自然科学版*, 2009, 49(9):1534-1537.
Zhang Zijian, Wu Weiwei, Wang Jianlong. Influence of formaldehyde and NaOH on the analysis of proteins and polysaccharides in sludge EPS[J]. *Journal of Tsinghua University: Science & Technology*, 2009, 49(9):1534-1537 (in Chinese).
- [12] 高景峰, 郭建秋, 陈冉妮, 等. 三维荧光光谱结合化学分析评价胞外多聚物的提取方法[J]. *环境化学*, 2008, 27(5):662-668.
Gao Jingfeng, Guo Jianqiu, Chen Ranni, *et al.* Comparison of the efficiency of five extracellular polymeric substances (EPS) extraction methods using three dimensional extraction and emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy together with chemical analysis[J]. *Environmental Chemistry*, 2008, 27(5):662-668 (in Chinese).
- [13] Luo J, Hao T, Wei L, *et al.* Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge[J]. *Water Res*, 2014, 62:127-135.
- [14] Neu T R, Lawrence J R. *Advanced Techniques for In Situ Analysis of the Biofilm Matrix (Structure, Composition, Dynamics) by Means of Laser Scanning Microscopy [M]*. New York: Springer, 2014.



作者简介:陈珂莉(1992-),女,浙江杭州人,硕士研究生,主要从事管道沉积物中微生物的影响研究。

E-mail:klchen1992@163.com

收稿日期:2018-01-17