

城市污水管网中胞外聚合物的沿程变化特性

刘鹤蒙, 石 烜, 金鹏康, 王晓昌

(西安建筑科技大学 环境与市政工程学院, 陕西 西安 710055)

摘 要: 通过建立一套长度为1 200 m的城市污水管道中试系统,利用三维荧光、傅里叶红外光谱、微电极和高通量测序等方法,对管网沿程生物膜胞外聚合物(EPS)组分含量、有机物组成特征、生物膜厚度及造成沿程EPS含量变化的原因进行了研究。结果表明,EPS含量随着管网沿程距离的增加呈现先增加后逐渐降低的趋势,生物膜厚度和EPS含量变化趋势相似,且均在600~800 m范围内达到峰值,这说明在管网中EPS对生物膜厚度的增长起着重要的作用。三维荧光和傅里叶红外光谱图显示管网沿程生物膜EPS中主要有机物为类酪氨酸和类色氨酸蛋白类物质,主要官能团为酰胺基、羧基、羟基等。为进一步揭示管网沿程EPS含量变化的原因,利用高通量测序对管网沿程微生物菌群的变化进行了分析,结果表明,管网沿程EPS含量的变化,可能是由于在600~800 m范围内环境条件发生变化不再适宜厚壁菌门(*Firmicutes*)、螺旋菌门(*Spirochaetae*)和梭杆菌门(*Fusobacterium*)等菌门的生存,使得其在竞争中处于劣势地位,并逐渐消亡。由此可知,在管网600~800 m范围大量微生物的消亡和细胞自溶破裂是造成EPS含量变化的主要原因。

关键词: 城市污水管网; 胞外聚合物; 生物膜; 有机物组分; 高通量测序

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2019)05-0030-06

Variation Characteristics of Extracellular Polymeric Substances in Urban Sewer System

LIU He-meng, SHI Xuan, JIN Peng-kang, WANG Xiao-chang

(School of Environmental and Municipal Engineering, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China)

Abstract: A study was conducted through a 1 200 m pipe reactor, which was used to simulate the urban sewer system. Three-dimensional fluorescence spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, microelectrode method and high-throughput sequencing were utilized to study the extracellular polymeric substances (EPS) component content, organic matter composition characteristics, biofilm thickness and the reasons for the change of EPS content. The results showed that the EPS content increased first and then decreased with the increase of the distance along the sewage network, the change trend of the biofilm thickness was similar to that of the EPS content, and both reached the peak value in the range of 600-800 m. The EPS played an important role in the growth of biofilm thickness in sewage network. Three-dimensional fluorescence spectroscopy showed that the main organic compounds in the

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC0400701); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07313-001-01); 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2016TZC-S-19-3); 陕西省重点科技创新团队项目(2013KCT-13)

通信作者: 金鹏康 E-mail: pkjin@hotmail.com

EPS were tyrosine and tryptophan like substances. Fourier transform infrared spectroscopy showed that the main functional groups of EPS were composed of amido group, carboxyl group and hydroxyl group. In order to further reveal the reasons for the change of EPS content along the sewage network, high-throughput sequencing was used to analyze the variation of microbial flora along the sewage network. The results showed that the change of EPS content along the pipeline might be due to the change of environmental condition in the 600–800 m range of sewage network, which was no longer suitable for the survival of *Firmicutes*, *Spirochaetae* and *Fusobacterium*, and made it disadvantaged and gradually disappearing in the competition with other bacteria. Therefore, the extinction of a large number of microorganisms and the autolysis of cells are the main reasons for the change of extracellular polymeric substances (EPS) content in the 600–800 m range of the sewer system.

Key words: urban sewer system; EPS; biofilm; organic component; high-throughput sequencing

城市污水管网是城市污水系统的一个重要组成部分,在生活污水、工业废水和雨水的收集和输送过程中起着至关重要的作用。近年来城市水污染日益严重,城市污水在管网中发生的水质变化也因此越来越受到研究者的关注。Green 等人^[1]通过对一组模拟重力污水管道进行研究,发现污水经过管道输送后其有机物含量降低。随着对污水管网的进一步研究,人们发现管网中水质的变化主要是由于管壁上生物膜的存在^[2]。Ozer 等^[3]对一根长为 3 m 的污水管段进行研究,发现管网中生物膜对污水中有机物的去除起着重要的作用。Lemmer 等^[4]以下水道中的微生物菌群为研究对象,发现管网生物膜上存在多种菌种以及真核生物,且微生物的活性和菌群密度普遍较高。

胞外聚合物(EPS)是由微生物分泌的位于细胞表面或分布于细胞外环境的一种大分子聚合物,广泛存在于微生物聚集体,如生物膜、活性污泥和颗粒污泥中^[5]。EPS 主要来自粘附于管网壁的微生物,包括微生物细胞的自身代谢、自溶物以及大分子水解产物等,它既能作为抵抗外界不利环境的保护层,也能在微生物饥饿期间提供碳源和能源,有利于保证管网生物膜的完整性。目前对胞外聚合物的研究中,多以活性污泥中的胞外聚合物为研究对象,而对污水管网中生物膜胞外聚合物的研究鲜有报道。胞外聚合物对管网管壁菌胶团和生物膜的形成起着至关重要的作用,从而可能对污水厂进水水质和生化特性造成一定的影响,因此对城市污水管网中胞外聚合物特性和变化的研究具有重要的意义。

因此,笔者建立了一套长度为 1 200 m、管径为

40 mm 的城市污水管网模拟系统,通过对沿程 EPS 和生物膜进行蛋白质、多糖、DNA、三维荧光图谱、傅里叶红外光谱、微电极和微生物菌群的测定,对污水管网中沿程胞外聚合物的组分、有机物组成特征、生物膜厚度及 EPS 含量变化的原因进行了探究。

1 材料与方法

1.1 试验条件与进水水质

反应器为城市污水管段模拟反应装置^[6],以人工模拟生活污水作为原水,以葡萄糖为碳源、氯化铵为氮源、磷酸二氢钠为磷源,并加入硫酸锰、硫酸镁、硫酸亚铁、无水氯化钙等微量元素。进水在重力的作用下流入模拟系统顶部,控制流速在 0.2 m/s,水力停留时间为 2 h。在系统运行时为了避免管道沉积,设置管道坡度和充满度分别为 0.5% 和 0.6。控制反应器原水 pH 值为 7.0 ± 0.5 ,其他水质指标如表 1 所示。

表 1 模拟城市污水水质

Tab. 1 Water quality of simulated sewage

mg · L⁻¹

项 目	COD	TN	NH ₄ ⁺ - N	TP	DO
数值	340 ± 20	40 ± 5	38 ± 5	8 ± 1	0.3 ± 0.05

1.2 取样方法

该城市污水管网模拟系统连续稳定运行 6 个月,设置 6 个取样口,对应的距离分别为 200、400、600、800、1 000、1 200 m,定期采集污水,经 0.45 μm 醋酸纤维膜过滤后测定其 COD、TN、TP、DO、pH 值等常规指标。

待生物膜生长成熟后,打开取样口两端可拆卸的有机玻璃管段,用玻璃棒将粘附的生物膜从载体

上剥离并小心放置在一次性培养皿上,迅速转移到 -40°C 冰箱中保存备用。

1.3 EPS的提取

取均匀混合的生物膜混合液30 mL,在 4°C 、4 000 r/min下离心15 min,保留生物膜而弃去上清液,补充磷酸盐缓冲液(PBS)至30 mL。 60°C 水浴热提20 min后,在200 r/min下搅拌提取2 h,最后10 000 r/min离心15 min,取上清液再以相同条件离心15 min,得到的液体过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜。

1.4 分析方法

1.4.1 EPS分析

胞外聚合物的含量通过蛋白质和多糖来表征。其中,蛋白质采用改进后的Folin-酚试剂法测定,以牛血清白蛋白为标准品;多糖采用蒽酮比色法测定,以葡萄糖作为标准品;DNA利用二苯胺法测定,以小牛胸腺DNA为标准品。

1.4.2 生物膜厚度分析

利用微电极测定管网内壁沿程生物膜厚度,用氮气吹脱后的超纯水作为基液,将管壁生物膜稳定在尼龙网上使其保持静止,生物膜被微电极穿透从而分析其内部环境。

1.4.3 荧光光谱分析

三维荧光光谱分析采用的是FP6500型荧光分光光度计,测定前将样品用超纯水稀释。三维荧光光谱激发波长(Ex)为200~400 nm,发射波长(Em)为250~500 nm,扫描间隔为5 nm,扫描速度为2 000 nm/min。同时检测超纯水,作为空白对照。

1.4.4 红外光谱分析

红外光谱(FTIR)分析采用的是IR prestige-21型红外分光光度计。将提取的EPS样品置于冷冻干燥机中冻干48 h后,进行红外光谱分析,扫描光谱范围为 $4\ 000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$,扫描次数为10。根据图谱中吸收峰的位置,确定所测定样品中含有的官能团结构。

1.4.5 高通量测序分析

采用454焦磷酸测序对管网生物膜菌群的分布进行分析。高通量测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成,对每个样品进行3次PCR反应,并对3个平行样品分别进行测序。

1.4.6 常规水质指标的测定

COD、TN、TP、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 等均采用国标法测定,pH值和DO/ORP/温度分别采用便携式pH计、哈

希便携式溶氧仪进行测定。

2 结果与讨论

2.1 城市污水管网中胞外聚合物沿程变化

采用 60°C 加热提取法对管网沿程生物膜胞外聚合物进行提取,其不仅能最大程度提取EPS,同时对细胞的破坏程度也最小。EPS含量随管网距离的增加所发生的变化如图1所示。

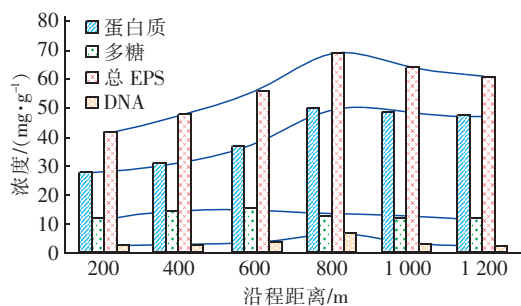


图1 EPS各组分含量在管网中的沿程变化

Fig. 1 Variation of the content of EPS components in the sewer system

由图1可以看出,EPS中蛋白质含量随着管网沿程距离的增加呈现先增加后逐渐减少的趋势,在200~800 m范围其含量从 $27.73\ \text{mg/g}$ 增至 $50.12\ \text{mg/g}$,而后保持稳定。多糖含量的沿程变化趋势与蛋白质较为相似,其含量在600 m处达到峰值为 $15.22\ \text{mg/g}$ 之后,开始随着管网沿程距离的增加而逐渐降低。随着管网沿程距离的增加,总EPS含量逐渐增高并在800 m处达到峰值为 $69.28\ \text{mg/g}$,随后其含量开始逐渐降低。对比蛋白质和多糖的含量变化可以发现蛋白质含量远高于多糖含量,且蛋白质含量在总EPS含量中占比超过70%。这与John等^[7]的研究结果一致,其研究发现,生物膜胞外聚合物中蛋白质含量远远多于多糖含量,尤其是污水处理系统和自然水体中的生物膜。生物膜胞外聚合物中多糖含量低,可能是由于胞外聚合物蛋白质中有一部分是胞外酶,这些酶对水溶性胞外多聚物(如蛋白、多糖、核酸)和不溶于水的胞外物质(如纤维素、脂质及有机颗粒等)有降解作用,从而使得这些大分子物质变成小分子产物被细胞代谢吸收^[8]。

研究表明,细菌在载体表面形成生物膜的第一步是细菌对载体的粘附,因此微生物分泌EPS所形成的粘附层对生物膜的生长具有重要的作用。当细菌粘附到载体表面之后,细菌内部基因表达发生变化,使细胞在生长的同时分泌大量的EPS,EPS再粘

结其他细菌最终形成菌胶团,导致生物膜厚度的增加^[9]。因此,EPS对于生物膜的形成和结构非常重要,且与生物膜厚度的变化关系密切。采用微电极对管网沿程生物膜厚度进行了分析,结果如图2所示。随着管网沿程距离的增长,管壁生物膜的厚度由最初的370 μm 逐渐增大,在800 m处达到最大厚度为670 μm ,随后直到管网末端生物膜厚度逐渐减小。结合图1可知生物膜厚度和EPS含量的变化趋势相似,均在800 m范围内达到峰值。EPS含量对细菌的粘附性有很大的影响,EPS含量的增加会促进细菌更易粘附到载体表面,这表明在城市污水管网中EPS对生物膜厚度的增长起着重要的作用。

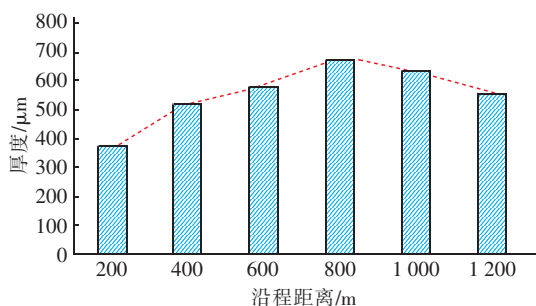


图2 管网中沿程生物膜厚度变化

Fig. 2 Changes of biofilm thickness along the sewer system

2.2 沿程EPS有机物组成特征分析

2.2.1 三维荧光光谱分析

胞外聚合物中存在大量不饱和脂肪酸,这些不饱和脂肪酸中包含了许多芳香族结构和带有荧光特性的不同官能团,其荧光特性可以了解胞外聚合物组分的种类、结构和官能团提供信息^[10]。采用三维荧光光谱对管网生物膜EPS进行进一步的分析,结果如图3所示。可以看出,城市污水管网沿程EPS中三维图谱峰出现的位置大致相同,均主要有2个图谱峰,峰A位于 $E_x/E_m = 270 \sim 275/300 \sim 305$ nm,峰B位于 $E_x/E_m = 225/305 \sim 345$ nm。有研究表明^[10],根据激发/发射波长的边界可将矩阵光谱等高线图分成不同区域,其中 $E_x < 280$ nm、 $E_m < 350$ nm区域内为芳香族蛋白质,以低分子质量物质和可生物降解的 BOD_5 为主,峰A和峰B均位于该区域内,其中峰A为类酪氨酸蛋白质峰,峰B为类色氨酸蛋白质峰。当距离为200、400、800、1 000 m时,峰A的位置分别为275/302、275/304、275/304、275/304 nm,最大荧光强度(FI)分别为4 179、4 376、4 709、4 629;峰B的位置分别为225/305、

225/306、225/306、225/342 nm,最大荧光强度分别为6 632、7 303、7 910、7 628。可知随着管网沿程距离的增加,荧光峰强度先增加后减小,在800 m处荧光峰强度达到最大,这印证了EPS组分中蛋白质含量的变化。管网中沿程荧光强度的变化和荧光峰的位置反映了随着管网沿程距离的增加,管网生物膜EPS的成分并没有发生物质上的改变,其组分和物质结构基本相同,EPS组分中芳香族蛋白质始终为主要成分,Zhu等人^[11]研究发现芳香族蛋白质在保持生物膜的稳定结构中起着至关重要的作用,因此,在管网800 m左右范围内的管网生物膜结构最为稳定。此外,类酪氨酸峰A和类色氨酸峰B随着管网沿程距离的增加均发生红移,分析原因主要是芳香环和共轭基团数量以及特定官能团如羰基、羟基和胺基的增加。

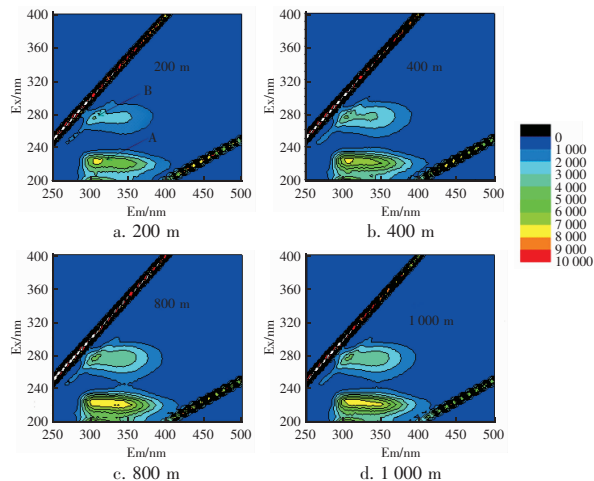


图3 管网沿程胞外聚合物的三维荧光光谱

Fig. 3 Three-dimensional fluorescence spectrum of EPS along the sewer system

2.2.2 红外光谱分析

傅里叶红外光谱(FTIR)是用于研究有机物结构,尤其是对有机物中特定官能团进行表征的重要手段。不同的有机物官能团有着特定的红外吸收波长,将分子中各基团的振动形式与红外谱图中的吸收峰进行对比,就可以对有机物的分子结构进行定性描述,因此它在对有机化合物的内部结构及性质进行测定时具有一定的可靠性。基于此,采用傅里叶红外光谱对管网沿程生物膜EPS中主要官能团进行分析。

红外谱图(见图4)中 $1\,600 \sim 1\,650 \text{ cm}^{-1}$ 附近处的吸收峰属于蛋白质二级结构,是由酰胺类化合物

中的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动和 —NH_2 弯曲振动产生的, $1\,400\sim 1\,430\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰是醇或羧酸类的 O—H 弯曲振动和羧基中 $\text{C}=\text{O}$ 对称伸缩振动引起的, $950\sim 1\,125\text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰是由碳水化合物、多糖类物质的 C—O 伸缩振动引起的,是多糖类化合物的典型吸收峰, $500\sim 900\text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰是由不饱和键产生的。从图4可以看出,管网生物膜EPS主要官能团由酰胺基、羧基、羟基等组成, $1\,600\sim 1\,650\text{ cm}^{-1}$ 范围内的峰说明有蛋白质存在, $950\sim 1\,125\text{ cm}^{-1}$ 范围内的峰说明有多糖类物质存在,即管网生物膜EPS的主要成分为蛋白质和多糖。这一结果与其他文献中所叙述的EPS主要由蛋白质和多糖组成,脂类和腐殖质含量较少这一结果相一致^[12]。管网沿程EPS红外谱图中吸收峰的产生位置大致相同,这说明沿程胞外聚合物中官能团类型相似且变化不大,随着管网沿程距离的增加, $1\,600\sim 1\,650\text{ cm}^{-1}$ 范围内的吸收峰强度出现一定的增强趋势,且在800 m处达到最大,这表明在该范围内管网EPS中酰胺类化合物含量有所增加。

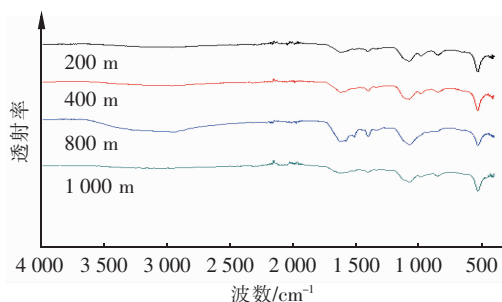


图4 管网沿程胞外聚合物的傅里叶红外光谱

Fig. 4 Fourier transform infrared spectrum of EPS along the sewer system

综合三维荧光光谱和傅里叶红外光谱分析结果可知,随着管网长度的延长则蛋白质荧光强度不断增强,酰胺类化合物含量逐渐增加,产生这一现象的原因可能是由于管网中微生物体内蛋白质随着微生物的衰亡而释放到体外。

2.3 城市污水管网微生物菌群分析

胞外聚合物是微生物通过新陈代谢作用和细胞自溶形成的附着于细胞壁外的大分子黏性有机多聚物,由上述结果可知管网中总EPS和DNA含量均在600~800 m范围内增加明显,而DNA的检出主要是由于细胞自溶破裂,这可能是由于管网中微生物菌群在该范围内发生了变化,造成部分微生物衰

亡,从而引起管网EPS的变化。因此采用高通量测序对管网沿程微生物菌群进行了分析,以期探究造成沿程EPS含量变化的主要原因。

图5所示是管网中微生物在门水平下的沿程相对丰度变化。城市污水管网中的主要菌门有变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、螺旋菌门(*Spirochaetae*)和梭杆菌门(*Fusobacterium*),且在管网0~600 m范围内其相对丰度均变化不大,相对丰度分别在48%、25%、18%、2%和1.2%左右,而在管网600 m到末端范围内各菌门相对丰度发生了较大的变化,其中变形菌门的相对丰度在600~800 m范围内显著增加,在800 m处其相对丰度达到70.78%;拟杆菌门、厚壁菌门、螺旋菌门和梭杆菌门的相对丰度均逐渐降低,其中拟杆菌门的相对丰度从600 m处的22.91%降至800 m处的11.03%,厚壁菌门的相对丰度在800 m处发生骤降,由600 m处的15.67%降至仅有1.5%,螺旋菌门和梭杆菌门的相对丰度在800 m处均降至0.5%以下。这说明,管网微生物群落在800 m左右范围内发生了变化。

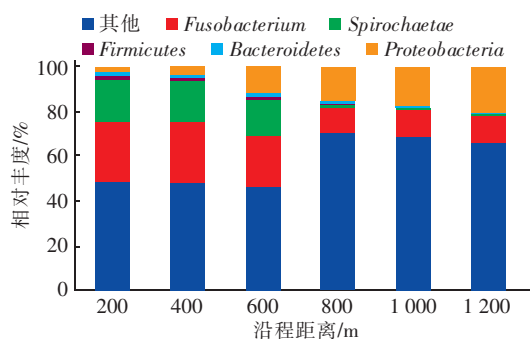


图5 管网微生物菌落沿程相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of microbial colonies along the sewer system

综上所述,管网沿程EPS含量的变化,可能是由于在管网600~800 m范围内环境条件发生变化不再适宜厚壁菌门、螺旋菌门和梭杆菌门等菌门的生存,使其在竞争中处于劣势地位,并逐渐消亡,在管网后段变形菌门成为唯一优势菌门。管壁微生物菌群随着管网沿程距离的增加而发生的菌落演替,最终造成管网中沿程菌群的变化,胞外聚合物与管壁微生物菌群关系密切。由2.2节可知,随着管网沿程距离的增加,胞外聚合物的含量和管壁生物膜厚度逐渐增高且在600~800 m范围内达到峰值,

荧光光谱中蛋白质荧光强度不断增强,红外光谱中酰胺类化合物含量逐渐增加,因此可以推断管网沿程EPS含量的变化可能是由于管网微生物菌群的变化所致,在管网600~800 m范围内,大量微生物的衰亡、细胞自溶破裂和部分菌群处于不利环境是造成EPS含量增高的主要原因。

3 结论

① 蛋白质和多糖是管网生物膜胞外聚合物的主要成分,且蛋白质含量远高于多糖含量。EPS各组分含量在管网中的沿程变化趋势均是随管网沿程距离的增加呈先增高后逐渐降低的趋势,生物膜厚度变化趋势和EPS含量变化趋势相似,均在800 m范围内达到最大值,这说明在城市污水管网中胞外聚合物对生物膜厚度的增长起着重要的作用。

② 随着管网沿程距离的增加,管网生物膜中EPS的组分并没有发生改变,主要有有机物为类酪氨酸和类色氨酸蛋白类物质。管网沿程EPS中吸收峰的产生位置大致相同,官能团类型相似,管网生物膜EPS主要官能团由酰胺基、羧基、羟基等组成。

③ 城市污水管网中主要微生物菌群由变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门等组成。菌群群落结构在管网600~800 m范围发生明显变化,厚壁菌门、螺旋菌门和梭杆菌门等菌门在竞争中处于劣势地位,并逐渐衰亡。综合分析可知,在管网600~800 m范围内大量微生物的消亡、细胞自溶破裂和部分菌群处于不利环境是造成EPS含量变化的主要原因。

参考文献:

- [1] Green M, Shelef G, Messing A. Using the sewerage system main conduits for biological treatment. Greater Tel-Aviv as a conceptual model[J]. Water Res, 1985, 19(8): 1023 - 1028.
- [2] Sharma K, Derlon N, Hu S, et al. Modeling the pH effect on sulfidogenesis in anaerobic sewer biofilm[J]. Water Res, 2014, 49(2): 175 - 185.
- [3] Ozer A, Kasirga E. Substrate removal in long sewer lines[J]. Water Sci Technol, 1995, 31(7): 213 - 218.
- [4] Lemmer H, Roth D, Schade M. Population density and enzyme activities of heterotrophic bacteria in sewer biofilms and activated sludge[J]. Water Res, 1994, 28(6): 1341 - 1346.
- [5] Pellicer-Núñez C, Domingo-Félez C, Mutlu A G, et al. Critical assessment of extracellular polymeric substances extraction methods from mixed culture biomass[J]. Water Res, 2013, 47(15): 5564 - 5574.
- [6] Jin P K, Wang B, Jiao D, et al. Characterization of microflora and transformation of organic matters in urban sewer system[J]. Water Res, 2015, 84: 112 - 119.
- [7] John A, Nielsen P. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilm[J]. Water Sci Technol, 1998, 37(1): 17 - 24.
- [8] Abbasnezhad H, Gray M, Foght J M. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 92(4): 653 - 675.
- [9] Sutherland I W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment[J]. Trends Microbiol, 2001, 9(5): 222 - 227.
- [10] Henderson R K, Baker A, Murphy K R, et al. Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: a review[J]. Water Res, 2009, 43(4): 863 - 881.
- [11] Zhu L, Qi H Y, Lü M L, et al. Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies[J]. Bioresour Technol, 2012, 124(3): 455 - 459.
- [12] More T T, Yadav J S S, Yan S, et al. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications[J]. J Environ Manage, 2014, 144: 1 - 25.



作者简介:刘鹤蒙(1993—),男,陕西西安人,硕士研究生,从事水与废水处理技术研究。

E-mail: lhm542527328@163.com

收稿日期:2018-10-12