

DOI: 10.11835/j.issn.2096-6717.2021.066



开放科学(资源服务)标识码(OSID):



胞外多糖酶解对 Anammox 颗粒污泥稳定性的影响

杨帆,王帅,龙曼,赵凡,郭劲松,方芳

(重庆大学 环境与生态学院,重庆 400045)

摘要:为了研究胞外多糖对厌氧氨氧化颗粒污泥稳定性的影响及其机理,采用可酶解多糖的淀粉酶对颗粒污泥进行酶解。结果表明, α -淀粉酶处理组颗粒污泥外边缘出现溶胀,而 β -淀粉酶处理组颗粒污泥表面无明显变化,但出现破碎且稳定性明显下降。表面性质及XDLVO理论分析表明,酶解降低了颗粒污泥疏水性,增大了微生物之间的排斥力,从而影响了颗粒污泥的稳定性。傅里叶红外光谱扫描结果表明,酶解后污泥胞外聚合物疏水性官能团含量明显降低。共聚焦扫描发现, α -淀粉酶处理组颗粒污泥外缘 α -D-吡喃葡萄糖多糖含量明显下降,而 β -淀粉酶处理组 β -D-吡喃葡萄糖多糖呈碎片状分布。 α -淀粉酶处理组表明,胞外多糖的疏水性作用、通过O—H官能团与阳离子桥接或相互结合作用可以促进微生物之间的聚集。 β -淀粉酶处理组表明,胞外多糖长主链之间的缠结以及丰富的结合位点桥接形成骨架,增强了微生物之间的黏附,有利于颗粒污泥的稳定。

关键词:厌氧氨氧化;颗粒污泥;胞外多糖;酶解

中图分类号:X703 **文献标志码:**A **文章编号:**2096-6717(2022)01-0188-09

Effect of enzymatic hydrolysis of extracellular polysaccharides on the stability of Anammox granular sludge

YANG Fan, WANG Shuai, LONG Man, ZHAO Fan, GUO Jinsong, FANG Fang

(College of Environment and Ecology, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China)

Abstract: In order to study the effect and mechanism of extracellular polysaccharides on the stability of Anammox granular sludge, amylase which can enzymolyze polysaccharides was used to enzymatically hydrolyze granular sludge. The results showed that the outer edge of the granular sludge in the α -amylase treatment group swelled, while the surface of the granular sludge in the β -amylase treatment group did not change significantly, but it was broken and the stability was obviously reduced. The surface properties and XDLVO theoretical analysis showed that enzymatic hydrolysis reduced the hydrophobicity of granular sludge and increased the repulsive force between microorganisms, thereby affecting the stability of granular sludge. The results of Fourier infrared spectroscopy showed that the content of hydrophobic functional groups in extracellular polymers of sludge was significantly reduced after enzymatic hydrolysis. Confocal

收稿日期:2021-01-30

基金项目:国家自然科学基金(51878091)

作者简介:杨帆(1997-),男,主要从事污水处理技术研究,E-mail:youngfan0117@163.com。

方芳(通信作者),女,教授,博士生导师,E-mail:fangfangcq@cqu.edu.cn。

Received:2021-01-30

Foundation items:National Natural Science Foundation of China (No. 51878091)

Author brief:YANG Fan (1997-), main reseach interest: wastewater treatment technology, E-mail: youngfan0117@163.com.

FANG Fang (corresponding author), professor, doctoral supervisor, E-mail: fangfangcq@cqu.edu.cn.

scanning found that the content of α -D-glucopyranose polysaccharide at the outer edge of the granular sludge in the α -amylase treatment group was significantly decreased, while the β -D-glucopyranose polysaccharide in the β -amylase treatment group was distributed in fragments. Therefore, the α -amylase treatment group showed that the hydrophobic effect of extracellular polysaccharides, binding to each other through O—H functional groups or bridging with cations can promote the aggregation between microorganisms. The β -amylase treatment group showed that the entanglement between the long backbones of extracellular polysaccharides and the bridging of abundant binding sites to form a skeleton enhanced the adhesion between microorganisms and was beneficial to the stability of granular sludge.

Keywords: anaerobic ammonium oxidation; granular sludge; exo-polysaccharide; enzymolysis

厌氧氨氧化(Anaerobic Ammonium Oxidation, Anammox)反应是指厌氧氨氧化菌在厌氧条件下以 NO_2^- -N 为电子受体, NH_4^+ -N 为电子供体, 将 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 转化为 N_2 的过程^[1]。厌氧氨氧化工艺脱氮效率高, 且不需要额外的有机碳源, 污泥产量低。而厌氧氨氧化颗粒污泥因其结构致密, 生物量高, 可以促进固液分离、增强污泥保留能力等^[1-2], 在 Anammox 工艺中得到了广泛的应用^[3-4]。胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)是细菌分泌在胞外的高分子聚合物, 主要成分为蛋白和多糖^[5], 可以将微生物细胞黏附起来^[6-7], 是形成微生物聚集体的关键。因此, 从 EPS 的角度探究影响 Anammox 颗粒污泥稳定性的因素尤为重要。

有关颗粒污泥 EPS 的研究比较多^[8-10], 但多集中在胞外蛋白方面^[11-12]。作为 EPS 中的主要成分之一, 胞外多糖对颗粒污泥的影响日益受到重视^[13]。Sajjad 等^[14]认为胞外多糖中带负电的基团可与二价阳离子形成架桥作用, 将微生物结合在一起。Lin 等^[15]认为好氧颗粒污泥中的凝胶对其结构稳定具有重要作用, 而多糖则是 EPS 的主要凝胶成分^[16-17]。因此, 从胞外多糖的角度深入探讨影响 Anammox 颗粒污泥稳定性的原因具有重要意义。

胞外多糖对 Anammox 颗粒污泥的形成和稳定有重要作用^[18]。有学者指出, 胞外多糖通过形成聚合物来促进微生物间的黏附, 从而增强颗粒稳定性^[13]。此外, 多糖交联形成水凝胶也是维持颗粒稳定的重要因素^[16-17]。目前, 已在好氧颗粒污泥胞外聚合物中鉴定出 alginate 多糖和 granulan 多糖两种凝胶多糖^[15, 19], 它们可以在生物聚集体外形成结构凝胶, 有助于聚集体结构的稳定。胞外多糖通过氢键相连接, 促进污泥结构稳定^[20]。Adav 等^[21]研究发现, 胞外多糖可以形成网格状骨干以维持好氧颗

粒污泥的稳定性。Yuan 等^[22]认为糖是一种具有长链的聚合物, 可提供许多结合位点, 并通过链缠结来保持颗粒稳定^[23]。遗憾的是, 这些研究没有直接从多糖链结构角度对胞外多糖的功能进行更全面的认识。

笔者采用可酶解多糖的两种淀粉酶来水解 Anammox 颗粒污泥胞外多糖, 研究酶解前后颗粒污泥的稳定性, 结合颗粒污泥表面性质和 XDLVO 理论分析微生物的聚集, 探讨酶解前后污泥 EPS 的官能团组成和胞外多糖空间分布, 以期从胞外多糖的角度理解其对颗粒污泥稳定性的影响及机理。

1 材料与方法

1.1 反应器和废水性质

厌氧氨氧化颗粒污泥取自实验室长期稳定运行的厌氧氨氧化膨胀颗粒污泥床^[12]。反应器进水为人工合成废水, NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 浓度分别约为 180、190 mg/L, 总氮负荷为 2.39 kg/($\text{m}^3 \cdot \text{d}$), 进水 pH 值为 7.8~8.0, 每升水添加微量元素 1.25 mL, 其配方参考 Van de Graaf 等^[24]的研究。反应器温度控制在 $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$, 脱氮性能保持稳定, NH_4^+ -N、 NO_2^- -N 和 TN 的平均去除率分别为 94%、97% 和 87% 左右。

1.2 实验方案

多糖是由糖苷键结合形成的糖链, 为研究胞外多糖对颗粒污泥稳定性的影响及机理, 采用 α -淀粉酶和 β -淀粉酶分别水解颗粒污泥。 α -淀粉酶可随机水解 α -1,4-糖苷键, 而 β -糖苷键则从非还原末端逐次水解 α -1,4-糖苷键, 但切断至分支点的 α -1,6-糖苷键前则会停止。因此, 在 α -淀粉酶作用下, 多糖糖链被剪切成短链, 而经 β -淀粉酶水解后仅多糖支链末端被水解, 其主链并未被破坏。

将粒径均匀的 30 g 颗粒污泥均分为 3 组并分

装在 50 mL 离心管中,设置为对照组、 α -淀粉酶处理组和 β -淀粉酶处理组,实验设计如表 1 所示。添加酶解液后,将 3 组污泥在恒温振荡器中以 150 r/min, 37 °C 的条件振荡 1 h。用去离子水冲洗酶解

后的污泥,洗去残留的酶解液,以用于后续分析,对于每个酶处理组和对照组进行 3 次重复实验。实验所用淀粉酶均购于 Coolaber 公司,并按 Adav 等^[21]的实验方法配置成相应浓度的溶液。

表 1 酶解颗粒污泥的实验设计

Table 1 Experimental design of enzymatic hydrolysis of granular sludge

| 组别 | 酶解液 | pH 值 | 水解温度/°C | 目标 |
|------------------|--------------------------------------|------|---------|-------------------------------------|
| 对照组 | 25 mL PBS 缓冲液 | 7.0 | 37 | |
| α -淀粉酶处理组 | 25 mL α -淀粉酶酶解液 | 6.9 | 37 | 随机水解 α -1,4-糖苷键,长链被剪切成短链 |
| β -淀粉酶处理组 | 10 mL β -淀粉酶酶解液, 15 mL PBS 缓冲液 | 5.0 | 37 | 从非还原末端逐次水解 α -1,4-糖苷键,主链未被破坏 |

1.3 Anammox 颗粒污泥性能测试

颗粒污泥强度可以用来反映颗粒污泥酶解前后的稳定性,采用超声法测定颗粒污泥的强度^[25]。将颗粒污泥放入装有 15 mL 去离子水的 25 mL 锥形瓶中,然后将其置于 20~25 kHz、65 W 的超声浴中,以 2.5(开)~3 s(关)为周期进行超声处理。收集超声后的上清液,并用分光光度计在 600 nm 处测定吸光度,该值可代表上清液的浊度。

颗粒污泥表面疏水性采用基于正十二烷-水系统的微生物黏附烷烃试验测定^[26]。将待测污泥研磨制成细胞悬浮液,用去离子水将细胞悬浮液的 $OD_{546,0}$ 调整到约 0.3,取 4 mL 悬浮液用漩涡振荡器充分混合 2 min,随后静置沉降 15 min,测定 $OD_{546,1}$ 。另取 4 mL 悬浮液与 1 mL 正十二烷充分混合,使用漩涡振荡器充分混合 2 min,随后静置 15 min 以保证分离,此时部分细胞悬浮液被吸附到烷烃相,而取水相测定 $OD_{546,2}$ 。测试重复 3 次,采用式(1)计算相对疏水度。

$$\text{疏水度}(\%) = \frac{OD_{546,1} - OD_{546,2}}{OD_{546,0}} \times 100\% \quad (1)$$

Zeta 电位可反映污泥表面带电荷情况,将污泥充分碾磨制成悬浮液,并用 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液调整悬浮液的 OD_{546} 约为 0.1,采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(Zetasizer Nano ZS90,英国)测试,每个样品测试 3 次,取平均值。

污泥与水、甲酰胺和 1-溴萘的接触角被用于分析污泥的表面热力学特性。接触角的测定参照 Liu 等^[27]的方法。用研钵研磨污泥制备污泥悬浮液,以 0.45 μm 的醋酸纤维素膜过滤。切下一片膜,用接触角测量仪(SDC-100, Shengding, 中国)分别测定膜上污泥与水、甲酰胺和 1-溴萘的接触角。每个样

品测定 10 次,取平均值。

1.4 表面热力学和 XDLVO 理论

根据污泥与水、甲酰胺和 1-溴萘的接触角,采用热力学分析方法^[28],可计算出 Hamaker 常数 A_{BLB} ,界面吸附自由能 ΔG_{adh} 、范德华作用自由能 $\Delta G_{\text{BL}}^{\text{W}}$ 、Lewis 酸-碱水合作用自由能 $\Delta G_{\text{BL}}^{\text{B}}$ 等表面热力学计算参数,其中, ΔG_{adh} 是 $\Delta G_{\text{BL}}^{\text{W}}$ 与 $\Delta G_{\text{BL}}^{\text{B}}$ 的和。比较这些热力学参数,可以分析酶解对厌氧氨氧化颗粒污泥表面特性的影响。

根据热力学参数和 ζ 电位,可以获得以距离为变量的微生物间的相互作用总能量 W_{T} 、压缩双电层能量 W_{R} 、范德华能量 W_{A} 和酸碱相互作用能量 W_{AB} ^[28],进而可以从能量的角度解释微生物聚集的机理。 W_{T} 是 W_{R} 、 W_{A} 和 W_{AB} 的总和,具体计算过程和参数取值在文献^[29]中有详细的描述。

1.5 EPS 含量及红外光谱分析

采用碱提法提取颗粒污泥 EPS^[30]。EPS 中的胞外蛋白使用 BCA 蛋白试剂盒(Solarbio, 日本)进行测定^[31],以牛血清蛋白为参考标准。胞外多糖使用蒽酮-硫酸法测定,并以葡萄糖作为参考标准^[32]。

傅里叶红外光谱(FTIR)可以有效检测 EPS 中的官能团^[33]。将冷冻干燥的 10 mg EPS 样品与 KBr 混合制成压片,采用红外光谱仪(Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific, 美国)在 4 000~400 cm^{-1} 范围内对 EPS 样品进行红外光谱扫描。所有 FTIR 光谱均进行归一化至最大发射 1.0 后进行数据分析。

1.6 共聚焦激光扫描显微镜

共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)可以直接观察多糖的空间分布。参考 Adav 等^[21]和 Ni 等^[18]的方法,分别用 20 μL Con A(0.25 g/L)、20 μL CW

(0.3 g/L)染色胞外 α -D-吡喃葡萄糖多糖和 β -D-吡喃葡萄糖多糖。染色后将样品置于共聚焦激光扫描显微镜(TCS SP8 CSU, Leica, 德国)下观察,采用 LAS X 共聚焦软件进行数据分析,并归一化至最大发射 1.0 后进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 颗粒污泥稳定性

图 1 为酶解后 Anammox 颗粒污泥聚集体外观形态和局部显微镜图像。对照组的污泥形状规则,呈椭球状,边缘清晰,无碎片。 α -淀粉酶处理组的颗粒污泥外缘发生轻微溶胀,出现明显透光现象,但无明显破损。 β -淀粉酶处理的颗粒污泥中出现了部分小碎片,但并未发生溶胀,且在显微镜下污泥结构密实,边界清晰可见。

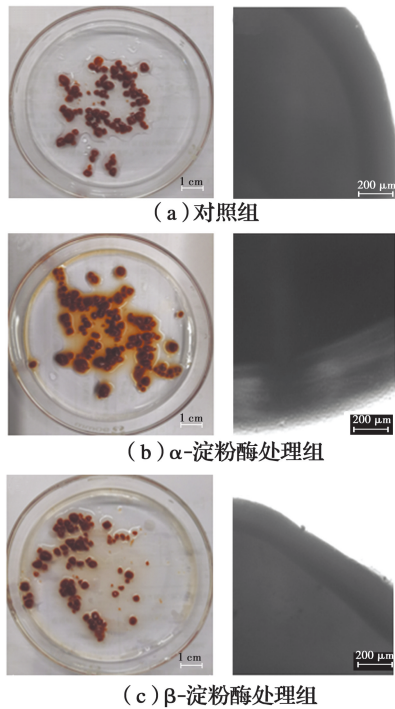


图 1 Anammox 颗粒污泥照片

Fig. 1 Photos of Anammox granular sludge

颗粒污泥结构致密,具有一定的强度。采用超声法研究多糖对污泥结构稳定性的影响,A600 吸光度的大小可代表污泥经超声处理后上清液的浊度,用于表示污泥解体程度,即间接表明颗粒污泥强度^[25],结果如图 2 所示。 β -淀粉酶处理组的颗粒污泥经超声处理后上清液在 A600 的吸光度迅速上升,表明颗粒发生了明显的解体,颗粒污泥强度明显降低。对照组和 α -淀粉酶处理组的颗粒污泥在超声处理下 A600 吸光度的变化较小。与对照组相比, α -淀粉酶水解后颗粒污泥强度基本不变,但经超声处理 20 min 后强度略有所下降。

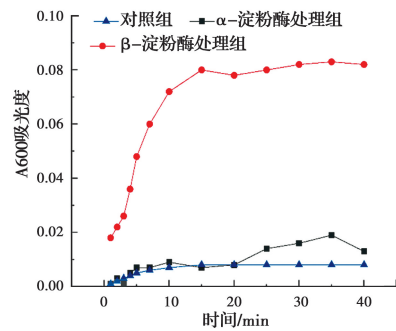


图 2 Anammox 颗粒污泥 A600 吸光度变化

Fig. 2 Anammox granular sludge intensity changes

2.2 颗粒污泥表面性质

如表 2 所示,酶解前后污泥表面 Zeta 电位相差不大,多糖水解并未改变污泥表面的电负性。与对照组相比,经 α -淀粉酶和 β -淀粉酶水解后,颗粒污泥的疏水度明显降低。接触角测定结果显示,酶处理组与纯水的接触角明显低于对照组,同样表明酶解降低了 Anammox 颗粒污泥的表面疏水性。同时,1-溴代萘是一种非极性物质,污泥与其接触角越大则表明污泥亲水性越强,即疏水性减弱。

2.3 XDLVO 理论分析

以接触角和 Zeta 电位值计算酶解前后 Anammox 颗粒污泥表面热力学参数,结果如表 3 所示。

表 2 Anammox 颗粒污泥表面性质

Table 2 Surface properties of Anammox granular sludge

| 组别 | Zeta 电位/mV | 疏水度/% | 接触角/(°) | | |
|------------------|-------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| | | | 水 | 甲酰胺 | 1-溴代萘 |
| 对照组 | -16.73±0.87 | 5.1±1.0 | 63.1±2.14 | 56.0±3.39 | 30.9±2.07 |
| α -淀粉酶处理组 | -16.77±1.03 | -3.1±0.8 | 44.4±2.14 | 48.3±3.74 | 33.8±3.24 |
| β -淀粉酶处理组 | -15.50±0.80 | 0.6±0.1 | 40.4±3.05 | 38.9±2.93 | 33.8±2.11 |

表 3 Anammox 颗粒污泥表面热力学参数

Table 3 Surface thermodynamic parameters of Anammox granular sludge

| 组别 | A_{BLB}/J | $\Delta G_{BL}^{LW}/(mJ \cdot m^{-2})$ | $\Delta G_{BL}^{AB}/(mJ \cdot m^{-2})$ | $\Delta G_{adh}/(mJ \cdot m^{-2})$ |
|------------------|------------------------|--|--|------------------------------------|
| 对照组 | 4.30×10^{-21} | -4.62 ± 0.03 | -3.71 ± 1.25 | -8.34 ± 2.04 |
| α -淀粉酶处理组 | 3.81×10^{-21} | -4.10 ± 0.10 | 33.47 ± 0.98 | 29.37 ± 1.57 |
| β -淀粉酶处理组 | 3.80×10^{-21} | -4.09 ± 0.07 | 25.33 ± 0.76 | 21.24 ± 1.11 |

ΔG_{adh} 的值可以表征微生物与水分子之间的相互作用,当 ΔG_{adh} 大于 0 时,表明微生物与水之间的结合作用强于水分子间的相互作用,微生物更倾向于与水分子结合,因此表现出亲水性作用,反之,微生物表现出疏水性作用^[34]。试验中,对照组 ΔG_{adh} 小于 0,因而微生物表现出疏水性,而经过酶解处理的样品 ΔG_{adh} 均大于 0,表现出疏水性下降。此外, Lewis 酸-碱水合作用自由能 (ΔG_{BL}^{AB}) 用于表示电子受体与电子供体之间的相互作用。通常 ΔG_{BL}^{AB} 为负表明微生物相互吸引,经酶解处理的样品 ΔG_{BL}^{AB} 为正,表明微生物之间相互排斥。两组酶解处理的样品, ΔG_{BL}^{AB} 均由负值变成正值,且具有更高的绝对值,表明酶解后微生物之间通过极性作用相互排斥。

进一步应用 XDLVO 理论分析微生物相互作用能与其间距的关系,结果如图 3 所示。淀粉酶处理的颗粒污泥的相互作用总能量 (W_T) 曲线存在能量势垒,不利于微生物之间的相互吸引和聚集,而对照组则没有明显的势垒。此外,相对于压缩双电层能量 (W_R) 和范德华能量 (W_A),酸碱相互作用能量 (W_{AB}) 具有很高的值,因而直接影响了 W_T ,并在聚集体的聚集中起关键作用。在 3 组不同样品中,对照组颗粒污泥 W_{AB} 为负,表明微生物相互吸引,经酶解处理的样品 W_{AB} 为正,表明微生物之间相互排斥。

2.4 EPS 含量及官能团组成

图 4 为 EPS 的红外光谱图。 3287 cm^{-1} 处的振动代表 O—H 的伸缩运动^[35],酶解后 EPS 中此峰值有所降低。胞外多糖中与 O—H 有关的带负电羟基和羧基可被 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等二价阳离子桥接,将细胞结合在一起,促进微生物聚集。 2883 cm^{-1} 附近的吸收峰代表烷烃有机物和多糖分子中的 C—H 振动^[36],C—H 是 EPS 中最丰富的疏水官能团,颗粒污泥被水解后 EPS 此峰值同样下降。 1636 cm^{-1} 处表示酰胺 I 区域的存在^[37], 1562 cm^{-1} 处代表了酰胺 II 区域的 C—N 和 C—H 振动^[37],代表了疏水性官能团^[38],酶解组 EPS 这些峰值都有所降低。 1050 cm^{-1} 的吸收峰归因于胞外多糖中 C—O—C 拉伸和 C—H 的平面内弯曲^[39],该峰值只在 β -淀粉酶水解

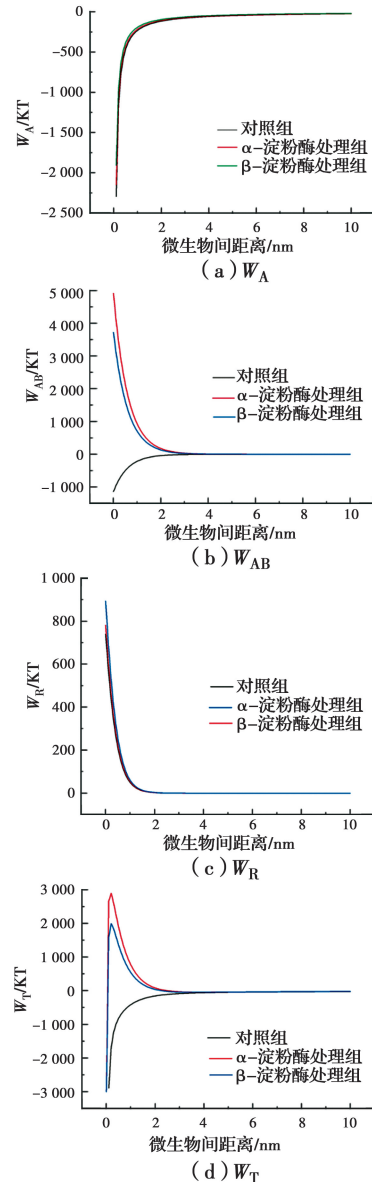


图 3 Anammox 污泥热力学曲线

Fig. 3 Thermodynamic curve of Anammox sludge

后的 EPS 中发生变化,表明 β -淀粉酶处理并未降低多糖之间的缠结,这也是颗粒污泥能维持颗粒状的原因。

2.5 胞外多糖空间分布

原位荧光染色和共聚焦激光扫描显微镜可用来观察微生物聚集体胞外多聚物的分布情况(图 5),

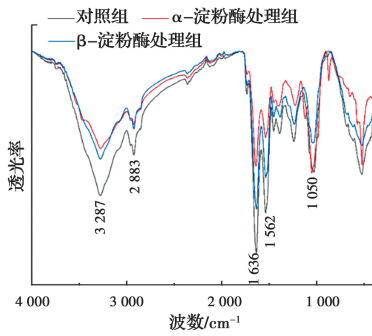


图 4 Anammox 颗粒污泥 EPS 的 FTIR 光谱

Fig. 4 FTIR spectrum of EPS of Anammox granular sludge

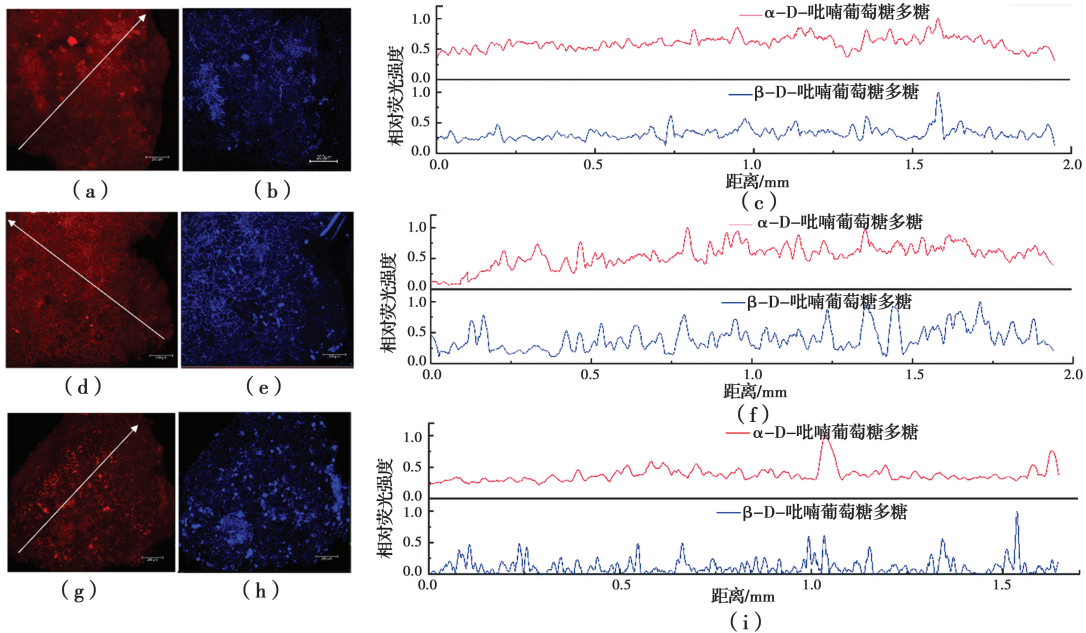


图 5 酶解前后的 CLSM 图

Fig. 5 CLSM images before and after enzymolysis

3 讨论

颗粒污泥被认为具有水凝胶的性质^[17],水凝胶可通过氢键、疏水性作用和链缠结等保持颗粒污泥的稳定^[23]。多糖是 EPS 的主要凝胶成分^[15],可以通过氢键与 Ca^{2+} 形成稳定的链间交联和桥接,形成将细胞结合在一起的“蛋盒模型”^[16]。此外,多糖是一种两亲性聚合物,可以将疏水性基团插入亲水性基团中,并通过这种有序的结构提高颗粒的稳定性。因此,采用对 Anammox 颗粒污泥进行酶解以破坏多糖的结构来探究多糖对 Anammox 颗粒污泥稳定性的影响。

颗粒污泥表面特性及热力学分析表明,胞外多糖的酶解阻碍了颗粒污泥微生物的聚集,从而影响了颗粒污泥的稳定性。疏水性作用对微生物的聚集非常重要^[34],且疏水性越强颗粒污泥越稳定^[40]。研

其中,图 5(c)、(f)、(i) 荧光强度曲线图为沿着颗粒污泥某一直线方向上的荧光强度。对照组颗粒污泥 α -D-吡喃葡萄糖多糖外侧含量低于内部,而 β -D-吡喃葡萄糖多糖则均匀分布在颗粒污泥中。经 α -淀粉酶水解后,颗粒污泥边缘处 α -D-吡喃葡萄糖多糖含量明显降低,这与颗粒污泥外缘在显微镜下出现透光现象且发生明显溶胀现象一致。经过 β -淀粉酶水解后,颗粒污泥中的 β -D-吡喃葡萄糖多糖含量明显降低,且被水解成碎片状,这可能是颗粒污泥出现了一些细小的碎片,同时颗粒稳定性发生明显下降的原因。

究中,酶解导致颗粒污泥疏水度和稳定性明显下降,基于 XDLVO 理论分析进一步表明,酶解提高了污泥聚集的能量势垒,阻碍了微生物之间的聚集^[41],从而影响了颗粒污泥内部的稳定性。因此,多糖可以在疏水性作用降低微生物聚集的排斥力,促进微生物之间的聚集,从而影响颗粒稳定性。

α -淀粉酶处理组颗粒污泥被酶解部分发生明显溶胀, β -淀粉酶处理组则出现颗粒污泥破碎且颗粒强度下降的现象,这表明多糖之间的交联结合以及链结构对维持颗粒稳定性也有着重要作用。Caudan 等^[20]对颗粒污泥进行染色以及淀粉酶水解的研究发现,多糖会在细菌群落之间交联形成水凝胶的屏障,为聚集体提供凝聚力。此外,多糖链上丰富的官能团可以提供足够的结合位点^[42],而其较长的碳主链也可以确保细胞间相互作用^[22]。 α -淀粉酶处理组颗粒污泥外缘被酶解,由于对多糖主链以及

支链的同时破坏, EPS 疏水性官能团和羟基含量明显降低, 影响了多糖之间的交联结合, 从而导致 α -淀粉酶水解后污泥外缘发生明显溶胀。而 β -淀粉酶仅破坏多糖支链末端, 因此, β -淀粉酶处理组颗粒污泥外观并无明显变化, 这表明多糖主链之间的缠结可以维持颗粒的形态稳定, 但颗粒稳定性明显下降, 说明多糖支链末端的结合位点之间的交联也有助于维持颗粒污泥稳定。因此, 多糖丰富的官能团以及长主链可通过交联结合以及链缠结等作用促进颗粒污泥的稳定性。

通过对颗粒污泥胞外多糖的酶解可以了解到多糖性质如何影响聚集体。胞外多糖的疏水性, 骨架作用以及形成水凝胶等都会影响微生物的聚集过程, 进而影响聚集体的形态。不同的反应器运行工况往往会影响到胞外多糖的性质。Yin 等^[43]研究发现, 在氮不足的情况下, AGS 的颗粒结构不规则且疏松, 而且胞外多糖的显著增加被认为是影响颗粒稳定性的原因。Liu 等^[44]研究发现, 更大的剪切力会刺激胞外多糖的产生, 并促进造粒。因而可以通过调节反应器工况以影响胞外多糖的性质, 从而影响聚集体形成、形态以及保持聚集体的稳定。

4 结论

对 Anammox 颗粒污泥进行酶解的结果表明, 多糖对颗粒污泥的稳定性有着重要作用。经 α -淀粉酶处理后, 颗粒污泥外边缘出现溶胀, 但污泥稳定性并无明显变化, 而经 β -淀粉酶处理后, 颗粒污泥表面并无变化, 但污泥出现破碎且稳定性明显下降。

对酶解前后污泥表面性质的表征发现, 酶解降低了污泥疏水性, 但未改变污泥表面电负性。XDLVO 理论的分析表明, Anammox 颗粒污泥经淀粉酶处理后, 污泥微生物聚集的能量势垒被提高, 即多糖可以促进微生物间的聚集从而促进颗粒污泥稳定性。FTIR 结果表明, 经淀粉酶水解后, 污泥 EPS 中疏水性官能团和羟基含量明显降低。共聚焦扫描显微镜发现, α -淀粉酶处理组颗粒污泥外缘 α -D-吡喃葡萄糖多糖含量明显下降, 而 β -淀粉酶处理组 β -D-吡喃葡萄糖多糖则呈碎片状分布。

α -淀粉酶处理组表明胞外多糖的疏水性作用、通过 O—H 官能团与阳离子桥接或相互结合作用可以促进微生物之间的聚集。 β -淀粉酶处理组表明胞外多糖长主链之间的缠结以及支链末端丰富的结合位点桥接形成骨架增强了微生物之间的黏附, 有利于颗粒污泥的稳定。

参考文献:

- [1] SHENG G P, YU H Q, LI X Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882-894.
- [2] 刘晓猛. 微生物聚集体的相互作用及形成机制[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2008.
LIU X M. Interactions and formation mechanisms of microbial aggregates [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2008. (in Chinese)
- [3] JETTEN M S M, WAGNER M, FUERST J, et al. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(3): 283-288.
- [4] LACKNER S, GILBERT E M, VLAEMINCK S E, et al. Full-scale partial nitrification/anammox experiences: An application survey [J]. *Water Research*, 2014, 55: 292-303.
- [5] YUAN D Q, WANG Y L. Influence of extracellular polymeric substances on rheological properties of activated sludge [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 77: 208-213.
- [6] WINGENDER J, NEU T R, FLEMMING H C. Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structure and function [M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999.
- [7] LONG G Y, ZHU P T, SHEN Y, et al. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on deposition kinetics of bacteria [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(7): 2308-2314.
- [8] FENG C J, LOTTI T, LIN Y M, et al. Extracellular polymeric substances extraction and recovery from anammox granules: Evaluation of methods and protocol development [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 374: 112-122.
- [9] LU H F, ZHENG P, JI Q X, et al. The structure, density and settlability of anammox granular sludge in high-rate reactors [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 312-317.
- [10] LOTTI T, CARRETTI E, BERTI D, et al. Hydrogels formed by anammox extracellular polymeric substances: Structural and mechanical insights [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 11633.
- [11] BOLEIJ M, PABST M, NEU T R, et al. Identification of glycoproteins isolated from extracellular polymeric substances of full-scale anammox granular sludge [J].

- Environmental Science & Technology, 2018, 52(22): 13127-13135.
- [12] FANG F, YANG M M, WANG H, et al. Effect of high salinity in wastewater on surface properties of anammox granular sludge [J]. Chemosphere, 2018, 210: 366-375.
- [13] PUNAL A, BRAUCHI S, REYES J G, et al. Dynamics of extracellular polymeric substances in UASB and EGSB reactors treating medium and low concentrated wastewaters [J]. Water Science and Technology, 2003, 48(6): 41-49.
- [14] SAJJAD M, KIM K S. Studies on the interactions of Ca^{2+} and Mg^{2+} with EPS and their role in determining the physicochemical characteristics of granular sludges in SBR system [J]. Process Biochemistry, 2015, 50(6): 966-972.
- [15] LIN Y M, DE KREUK M, VAN LOOSDRECHT M C M, et al. Characterization of alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant [J]. Water Research, 2010, 44(11): 3355-3364.
- [16] SEVIOUR T, YUAN Z G, VAN LOOSDRECHT M C M, et al. Aerobic sludge granulation: A tale of two polysaccharides [J]. Water Research, 2012, 46(15): 4803-4813.
- [17] SEVIOUR T, PIJUAN M T, NICHOLSON T, et al. Understanding the properties of aerobic sludge granules as hydrogels [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 102(5): 1483-1493.
- [18] NI S Q, SUN N, YANG H L, et al. Distribution of extracellular polymeric substances in anammox granules and their important roles during anammox granulation [J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 101: 126-133.
- [19] SEVIOUR T W, LAMBERT L K, PIJUAN M T, et al. Selectively inducing the synthesis of a key structural exopolysaccharide in aerobic granules by enriching for *Candidatus "Competibacter phosphatis"* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(6): 1297-1305.
- [20] CAUDAN C, FILALI A, SPÉRANDIO M, et al. Multiple EPS interactions involved in the cohesion and structure of aerobic granules [J]. Chemosphere, 2014, 117: 262-270.
- [21] ADAV S S, LEE D J, TAY J H. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule [J]. Water Research, 2008, 42(6/7): 1644-1650.
- [22] YUAN S J, SUN M, SHENG G P, et al. Identification of key constituents and structure of the extracellular polymeric substances excreted by *Bacillus megaterium* TF10 for their flocculation capacity [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(3): 1152-1157.
- [23] YAN Z R, ZHU Y Y, MENG H S, et al. Insights into thermodynamic mechanisms driving bisphenol A (BPA) binding to extracellular polymeric substances (EPS) of activated sludge [J]. Science of the Total Environment, 2019, 677: 502-510.
- [24] VAN DE GRAAF A A, DE BRUIJN P, ROBERTSON L A, et al. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor [J]. Microbiology, 1996, 142(8): 2187-2196.
- [25] WAN C L, ZHANG P, LEE D J, et al. Disintegration of aerobic granules: Role of second messenger cyclic di-GMP [J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 330-335.
- [26] PEMBREY R S, MARSHALL K C, SCHNEIDER R P. Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(7): 2877-2894.
- [27] LIU X M, SHENG G P, LUO H W, et al. Contribution of extracellular polymeric substances (EPS) to the sludge aggregation [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(11): 4355-4360.
- [28] VAN OSS C J. Hydrophobicity of biosurfaces-Origin, quantitative determination and interaction energies [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1995, 5(3/4): 91-110.
- [29] ZHANG A Y, WANG S, YANG M M, et al. Influence of NaCl salinity on the aggregation performance of anammox granules [J]. Journal of Water Process Engineering, 2021, 39: 101687.
- [30] LIANG Z W, LI W H, YANG S Y, et al. Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge [J]. Chemosphere, 2010, 81(5): 626-632.
- [31] RAS M, GIRBAL-NEUHAUSER E, PAUL E, et al. Protein extraction from activated sludge: An analytical approach [J]. Water Research, 2008, 42(8/9): 1867-1878.
- [32] LOEWUS F A. Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates [J]. Analytical Chemistry, 1952, 24(1): 219.

- [33] WANG J Q, NIE S P, KAN L J, et al. Comparison of structural features and antioxidant activity of polysaccharides from natural and cultured *Cordyceps sinensis* [J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 26 (1): 55-62.
- [34] HOU X L, LIU S T, ZHANG Z T. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge [J]. Water Research, 2015, 75: 51-62.
- [35] GUO X, WANG X, WANG X, et al. Composition analysis of fractions of extracellular polymeric substances from an activated sludge culture and identification of dominant forces affecting microbial aggregation [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 28391.
- [36] WANG Y X, YIN J Y, HUANG X J, et al. Structural characteristics and rheological properties of high viscous glucan from fruit body of *Dictyophora rubrovolvata* [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101: 105514.
- [37] WANG L L, WANG L F, SHI Q S, et al. Purification and molecular weight distribution of a key exopolysaccharide component of *Bacillus megaterium* TF₁₀ [J]. Journal of Environmental Sciences, 2018, 63: 9-15.
- [38] HUANG Z S, WANG Y F, JIANG L, et al. Mechanism and performance of a self-flocculating marine bacterium in saline wastewater treatment [J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 334: 732-740.
- [39] LOTTI T, CARRETTI E, BERTI D, et al. Extraction, recovery and characterization of structural extracellular polymeric substances from anammox granular sludge [J]. Journal of Environmental Management, 2019, 236: 649-656.
- [40] LIU Y, YANG S F, TAY J H, et al. Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(5): 371-379.
- [41] HERMANSSON M. The DLVO theory in microbial adhesion [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1999, 14(1-4): 105-119.
- [42] YIN C Q, MENG F G, CHEN G H. Spectroscopic characterization of extracellular polymeric substances from a mixed culture dominated by ammonia-oxidizing bacteria [J]. Water Research, 2015, 68: 740-749.
- [43] YIN Y J, SUN J, LIU F Y, et al. Effect of nitrogen deficiency on the stability of aerobic granular sludge [J]. Bioresource Technology, 2019, 275: 307-313.
- [44] LIU Y, TAY J H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge [J]. Water Research, 2002, 36(7): 1653-1665.

(编辑 黄廷)