

生物除磷污泥胞外多聚物含磷形态的核磁共振分析

张志超¹, 黄霞^{1*}, 杨海军², 肖康¹, 罗小², 沙恒¹, 陈奕名¹

1. 清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084

2. 清华大学化学系, 北京 100084

摘要 利用³¹P-NMR研究了生物除磷污泥胞外多聚物(EPS)的含磷形态,并对检测方法中的影响因素进行了分析。研究发现,测定的三种污泥EPS中磷的形态有五种,磷酸盐、磷单脂、DNA磷、聚磷末端、焦磷酸盐和聚磷。具有除磷能力的A/A/O和A/A/O-MBR污泥其EPS中主要含的是聚磷,证明了EPS中含磷不仅是依靠吸附磷酸盐或生物聚磷过程磷酸盐的滞留,而且EPS本身可能也参与了生物聚磷过程。同时实验证明,EPS提取过程会对EPS含磷形态产生影响,但提取时间在1h内时影响较小;EPS在储存前需要进行中和,从而避免储存过程不同磷形态之间的转化。EPS含磷形态的³¹P-NMR测定过程中,EPS样品的pH值对峰的分离和各峰化学位移的稳定性有较大影响,需要控制样品pH>13.0以确保测定过程的准确性。

关键词 胞外多聚物;核磁共振磷谱;生物除磷;磷形态

中图分类号: O434.1 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)02-0536-04

引言

污水中的氮和磷是引起水体富营养化的主要物质,其中磷元素被认为是最主要的限制因素^[1]。由于生物方法除磷不会导致大量化学沉淀、便于磷的回收利用,因此在污水处理过程中得到了广泛关注。但是现有对生物除磷机理的研究,主要集中在对污泥絮体整体的除磷特点、或者聚磷微生物种群特性的研究上,而对于组成污泥絮体大部分结构的胞外多聚物研究较少^[2]。而研究生物除磷污泥的胞外多聚物(extracellular polymeric substances,简称EPS)含磷形态是进一步研究胞外多聚物在生物除磷过程中作用的关键。

利用核磁共振磷谱(³¹P-NMR)对磷形态进行分析和定量在土壤、底泥等环境样品的分析中已得到了应用,如Khoshmanesh^[3],Reitzel等^[4]利用核磁共振分析底泥中磷的形态变化;Lehmann等^[5]利用核磁共振分析土壤中磷的形态及迁移规律。但据作者所知还没有利用³¹P-NMR对于提取的生物污泥胞外多聚物含磷形态研究的相关报道。

本文的主要目的是利用³¹P-NMR方法考察三种污泥的EPS中磷的形态及相关比例,从而进一步探讨在生物除磷过程中EPS的作用。同时考察了EPS提取、储存过程以及测定前的pH值调节对测定的影响。

1 材料和方法

1.1 试验样品

使用了三种好氧污泥样品,两种污泥取自具备除磷能力的工艺,分别为厌氧/缺氧/好氧工艺(A/A/O)和厌氧/缺氧/好氧结合膜-生物反应器工艺(A/A/O-MBR)工艺,另外一种污泥取自不具备除磷能力的普通活性污泥工艺(CAS)作为对照。CAS工艺对总磷的平均去除率为5.3%,A/A/O工艺和A/A/O-MBR工艺对总磷的平均去除率在85.0%以上。

1.2 实验仪器及测定方法

胞外多聚物的提取采用甲醛-NaOH法^[6]。其中为尽量避免可能出现的聚磷的降解,NaOH的提取时间缩短到1h,根据文献报道1h内EPS的提取可基本完成^[7]。

磷形态的核磁共振磷谱测定。首先对提取的EPS样品进行HCl(1 mol·L⁻¹)中和,然后将EPS样品在-50℃下真空冷冻干燥48h,之后在-20℃下保持12h。在测定过程中,将EPS样品溶于1 mL的D₂O中,加入0.05 mL的NaOH(1 mol·L⁻¹)使pH值>13,从而实现化学位移不受pH值的影响。

核磁共振波谱仪为日本电子公司(JOEL)的JNM-ECA-600型谱仪,其³¹P的共振频率为242.95 MHz,使用5 mm

收稿日期: 2007-10-12, 修订日期: 2008-01-18

基金项目: 国家杰出青年基金项目(50725827)资助

作者简介: 张志超, 1979年生, 清华大学环境科学与工程系博士研究生

e-mail: zzc99@mails.tsinghua.edu.cn

*通讯联系人 e-mail: xhuang@tsinghua.edu.cn

的探头,测定温度为 25 °C,脉冲序列采用标准的单脉冲,90 脉冲宽度为 10.4 μ s,驰豫时间为 2 s,样品的旋转速度为 15 Hz。测试时间从 2~12 h,根据 S/N > 3 来选择合适的测试时间。

2 结果与讨论

2.1 EPS 的含磷形态分析

如图 1 所示,根据文献^[8]对不同磷形态峰的鉴定方法,测定的三种污泥 EPS 中的磷的形态共包括五种,自左向右分别是:磷酸盐(orthoP)、磷单脂(monoP)、DNA 磷、聚磷末端(End polyP)、焦磷酸盐(pyroP)和聚磷中部(Middle polyP),其中聚磷末端磷(End polyP)和聚磷中部磷(Middle polyP)的总和是聚磷(polyP)。EPS 中不同形态磷的比例见表 1。

磷酸盐的表征峰为单峰,位置在 δ 5~5.5。一般认为磷酸盐是通过吸附或者与金属离子结合的形式存在于 EPS

中^[9]。磷酸盐在 CAS 污泥 EPS 中占 58.97%,是 CAS 污泥 EPS 含磷的主要形态,但在具有除磷能力的 A/A/O 和 A/A/O-MBR 污泥 EPS 中含量较少。

磷单脂一般认为是来源于细胞壁,其表征峰为单峰,位置在 δ 0~4.0。而 DNA 的表征峰也为单峰,在 δ 5~0.5。一般认为 EPS 中的少量磷单脂和 DNA 是细胞代谢过程中死细胞在 EPS 中停留造成的,这与污泥所处的状态有关。而在本实验中,三种污泥 EPS 样品中磷单脂和 DNA 或者检出量比较少,或者低于检测限,因此在计算中忽略不计。

焦磷酸盐存在于所有的样品中,其表征峰为单峰,位置在 δ -3.5~-4.5。在三种污泥中均有一定比例的存在,且三种样品之间差异不大。部分的焦磷酸盐可能是来源于在 EPS 提取过程中聚磷在 NaOH 中的水解^[10]。但是焦磷在 EPS 中的形成和变化还需要进一步的研究证实。

聚磷包括了聚磷末端和聚磷中部,其中聚磷末端的表征峰为一簇峰,包含 7 个以上峰,其位置在 δ -17.5~-20.5,而聚磷中部的峰也为簇峰,包含 2~3 个峰,其位置紧靠焦磷酸盐峰的左边在 δ -3.0~-4.0。这进一步证实了 EPS 中含有聚磷的事实^[9,11]。在两种具有除磷能力的污泥 EPS 中聚磷均占 EPS 含磷的 50%以上,同时部分聚磷以聚磷中部为主,说明在具有除磷能力的污泥 EPS 中聚磷是主要的成分,且聚磷链比较长。相比之下,CAS 污泥 EPS 中聚磷的含量较低,且大部分为聚磷末端,说明 CAS 污泥中存在少量聚磷,聚磷链较短。

通过以上分析认为,相比于没有除磷能力的 CAS 污泥来看,具有除磷能力的 A/A/O 和 A/A/O-MBR 污泥其 EPS 中主要含有的是聚磷,证明了 EPS 中含磷不仅是依靠吸附磷酸盐或者生物聚磷过程磷酸盐在 EPS 中的滞留,而且 EPS 中可能本身就存在生物聚磷过程,从而造成了 EPS 污泥中聚磷的积累。

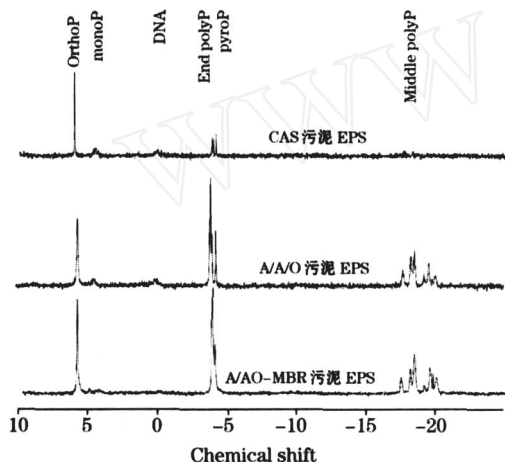


Fig 1 Typical ^{31}P NMR spectra from the investigated EPS of three sludge samples

Table 1 Relative composition of the identified P forms in three EPS samples

磷形态	CAS 污泥 EPS	A/A/O 污泥 EPS	A/A/O-MBR 污泥 EPS
Orthophosphate/ %	58.97 $\pm$ 1.21	17.85 $\pm$ 1.49	17.89 $\pm$ 1.21
Pyrophosphate/ %	23.38 $\pm$ 1.31	29.39 $\pm$ 2.02	27.29 $\pm$ 2.39
End groups of Polyphosphate/ %	14.98 $\pm$ 0.97	7.45 $\pm$ 0.35	8.08 $\pm$ 0.24
Middle groups of Polyphosphate/ %	2.67 $\pm$ 2.75	45.31 $\pm$ 2.22	46.74 $\pm$ 1.43

Note: The values reported are the average of three samples, given with one standard deviation (σ)

2.2 EPS 的提取与保存过程对 ^{31}P NMR测定的影响

不同形态的磷之间普遍存在着相互转化^[12],因此为了保证提取的 EPS 中各种形态磷的相对含量和原位 EPS 的情况保持一致,必须对样品的提取和保存过程进行研究,以避免可能发生的不同形态磷相互之间的转化。图 2a, b, c 显示从 A/A/O-MBR 污泥提取的 EPS 在 NaOH 溶液中的降解情况。试验通过在 EPS 提取液(0.5 mL)中加入 NaOH(0.05 mL, 1 mol $\cdot$ L⁻¹),分别放置 0, 1 和 24 h 来模拟 EPS 的提取过程(pH > 13.0)下 EPS 中各种形态磷的转化情景。其中 orthoP 的变化比较小,从 0 h 的 17.1%,到 1 h 之后的 16.7%和 24 h 之后的 16.7%。在此过程中 orthoP 几乎没有太大变

化。相对而言,聚磷中部和末端的含量变化比较大,聚磷中部持续下降从 44.7%到 43.2%再到 39.2%;而聚磷末端相反地持续上升,从 31.0%到 31.6%再到 33.4%。另外从图中可见聚磷中部的峰中,化学位移较大的峰有明显的减弱,而化学位移较小的反而增强。这说明在 NaOH 的作用下聚磷链被打断。而从聚磷整体来看在 NaOH 的作用下聚磷含量是在逐渐减少,从 0 h 的 75.7%到 1 h 的 74.8%再到 24 h 的 72.6%。而焦磷则有所增加,从 7.2%到 8.5%再到 10.7%。由于整个过程中 orthoP 基本没有变化,因此认为在 NaOH 的作用下下部分的聚磷转化为焦磷,而不会转化为磷酸盐。

对比图 2a 和图 2d 可见,在水中 EPS 的稳定性比较高,

24 h 放置前后 EPS 中的各形态磷几乎没有变化。磷酸盐从 17.1 % 变为 17.8 %, 焦磷从 7.2 % 变为 7.1 %, 聚磷从 75.7 % 到 75.1 %。

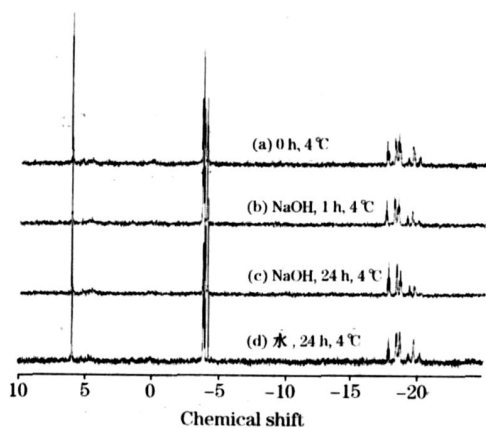


Fig 2 Impacts of NaOH and H₂O solution on phosphorus transformation in the EPS extracted from the A/A/O-MBR sludge

经过上述分析可以认为, EPS 提取过程会对磷形态有一定影响,但在 1h 内的影响较小;在对提取后的 EPS 储存时,需要提前进行中和后再保存,以最大程度避免 EPS 中不同磷形态之间的转化。

2.3 pH 值调节对 ³¹P-NMR 测定的影响

在测定过程中发现,磷谱的化学位移受样品 pH 值的影响较大^[13]。对调节 pH 7.0 和 pH 13.0 的同一 EPS 样品进行 ³¹P-NMR 分析,结果如图 3 所示。

pH 13.0 时各种形态磷的峰清晰,且分辨率较高;而 pH 7.0 时相应化学位移的峰出现重叠,不仅无法准确识别相应的磷形态的代表峰,而且测定结果的真实性也大大受到影响。因此在测定 EPS 含磷形态前需要加入 NaOH 调节 pH 值达到 13.0 以上。

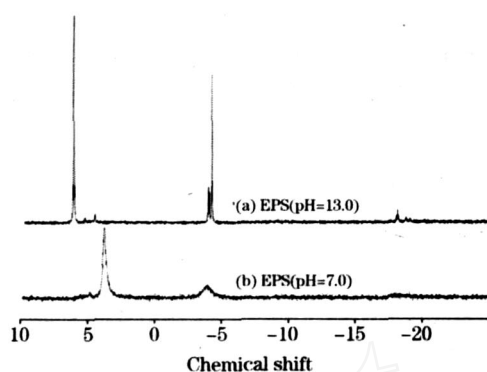


Fig 3 ³¹P-NMR spectra from the same EPS sample with pH 7.0 and 13.0

3 结 论

(1) 测定的三种污泥 EPS 中有五种磷的形态,磷酸盐(ortho P)、磷单脂(mono P)、DNA 磷、聚磷末端(End poly P)、焦磷酸盐(pyro P)和聚磷中部(poly P),其中聚磷末端磷(End poly P)和聚磷中部磷(Middle poly P)的总和是聚磷(poly P)。

(2) 具有除磷能力的 A/A/O 和 A/A/O-MBR 污泥其 EPS 中主要含有的是聚磷,证明 EPS 中含磷不仅是依靠吸附磷酸盐或者生物聚磷过程磷酸盐在 EPS 中的滞留,而且 EPS 中可能本身就存在生物聚磷过程,从而造成了 EPS 污泥中聚磷的积累。

(3) 提取过程会对 EPS 含磷的形态有一定影响,但在 1h 内的影响较小;在对提取后的 EPS 储存时,需要提前进行中和再保存,以最大程度避免 EPS 中不同磷形态之间的转化。

(4) EPS 含磷形态的 ³¹P-NMR 测定过程中,样品 pH 值对峰的分离和各峰化学位移的稳定性有较大影响,为了保证测定的准确性,需要调节 EPS 样品的 pH > 13.0。

参 考 文 献

- [1] Yoon T I, Lee H S, Kim C G. Journal of Membrane Science, 2004, 242(1-2): 5.
- [2] Fuhs G W, Chen Min. Microbial Ecology, 1975, 2: 119.
- [3] Khoshmanesh A, Hart B T, Duncan A, et al. Water Research, 2002, 36(3): 774.
- [4] Reitzel K, Ahlgren J, DeBrabandere H, et al. Biogeochemistry, 2007, 82(1): 15.
- [5] Lehmann J, Lan Z D, Hyland C, et al. Environmental Science & Technology, 2005, 39(17): 6672.
- [6] Liu H, Fang H H P. Journal of Biotechnology, 2002, 95(3): 249.
- [7] Fang H H P, Jia X S. Biotechnology Techniques, 1996, 10(11): 803.
- [8] Ahlgren J, Reitzel K, Danielsson R, et al. Water Research, 2006, 40(20): 3705.
- [9] Hill W E, Benefield L D, Jing S R. Water Research, 1989, 23(9): 1177.
- [10] Hupfer M, Gachter R. Limnology and Oceanography, 1995, 40(3): 610.
- [11] Jing S R, Benefield L D, Hill W E. Water Research, 1992, 26(2): 213.
- [12] Turner B L, Mahieu N, Condron L M. Soil Science Society of America Journal, 2003, 67(2): 497.
- [13] Cade-Menun B J, Navaratnam J A, Walbridge M R. Environmental Science & Technology, 2006, 40(24): 7874.

Study on P Forms in Extracellular Polymeric Substances in Enhanced Biological Phosphorus Removal Sludge by ^{31}P -NMR Spectroscopy

ZHANG Zhi-chao¹, HUANG Xia^{1*}, YANG Hai-jun², XIAO Kang¹, LUO Xiao², SHA Heng¹, CHEN Yi-ming¹

1. ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract The present paper investigated phosphorus forms in the extracellular polymeric substances (EPS) using ^{31}P -NMR spectroscopy, and analyzed the influential parameters for this method. The results showed that in the three investigated EPS samples five P forms were identified, including orthophosphate, orthophosphate monoesters, DNA, pyrophosphate and polyphosphate. And in the EPS extracted from A/A/O sludge and A/A/O-MBR sludge polyphosphate was the main phosphorus form. This indicated that P is contained in the EPS not only owing to the adsorption of orthophosphate, but also because EPS acting like the bacteria cells contributes to enhanced biological phosphorus removal. Furthermore the transformation of P forms in the EPS during the EPS extraction was found but limited within 1 h. It was found that with the NaOH solution added the polyphosphate in the EPS would partly convert to pyrophosphate but not go further to orthophosphate, while with pure water added P forms in the EPS were very stable. This means that after neutralization, the transformation of phosphorus forms could be avoided. Since the measurement of ^{31}P -NMR spectroscopy was very sensitive to pH, which could affect the chemical shift of the peaks and cause peaks overlapping, the pH of EPS sample must be raised to 13.0 before the measurement.

Keywords ^{31}P -NMR spectroscopy; Extracellular polymeric substances; Biological phosphorus removal; Phosphorus form

(Received Oct. 12, 2007; accepted Jan. 18, 2008)

* Corresponding author