

pH 对增强生物除磷系统酶活性的影响

张超, 陈银广, 刘燕

(同济大学污染控制与资源化国家重点实验室, 上海 200092)

摘要 通过比较不同 pH 值下增强生物除磷系统中关键酶活性的变化规律, 研究了酶活性与聚磷菌污泥产率系数及可溶性正磷酸盐(SOP)的关系. 结果表明, 在 pH = 6.4 ~ 7.6 范围内, 脱氢酶、腺苷酸激酶和聚磷酸盐激酶的活性随着 pH 的增加而线性增加, 酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的活性不受 pH 的影响. 聚磷菌的产率系数与脱氢酶活性、厌氧释磷速率与腺苷酸激酶活性、好氧吸磷速率与聚磷酸盐激酶活性分别呈线性关系. 表明较高的 pH 有利于聚磷菌的生长和提高聚磷菌的活性, 从而提高了除磷效率.

关键词 酶活性; pH 值; 增强生物除磷

中图分类号 Q55; X703; O629

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)09-1797-04

增强生物除磷(EBPR)作为污水除磷的一种工艺, 是应用厌氧/好氧交替运行的环境, 使聚磷菌(PAO)选择性生长, 从而成为系统中的优势菌群. 在厌氧阶段, 聚磷菌通过分解体内的聚磷提供所需要的大部分能量, 同时降解糖原提供另一部分能量和还原力, 从污水中吸收有机物, 例如挥发性脂肪酸(VFA), 合成聚羟基烷酸(PHA)贮存于体内, 并向细胞外释放磷; 在好氧阶段, 厌氧合成的 PHA 被降解并合成糖原, 同时过量摄取污水中的磷并合成聚磷酸盐. 运行良好的 EBPR 系统, 聚磷菌好氧吸收的磷超过厌氧释放的磷, 通过排泥可达到除磷的目的.

上述除磷过程的实质是利用微生物所产生的多种酶催化一系列生物氧化还原反应. 其中, 脱氢酶参与微生物体内氧化-还原反应的全过程, 其活性反映了活性微生物量及其对有机物的代谢能力. 此外, 目前已知的与除磷过程有关的酶还有腺苷酸激酶、磷酸酶和聚磷酸盐激酶^[1~4]. 腺苷酸激酶与生物除磷过程中厌氧聚磷降解和三磷酸腺苷(ATP)合成有关; 磷酸酶催化聚磷酸盐终端磷的水解; 聚磷酸盐激酶与聚磷合成有关, 它将 ATP 中的磷转催化移到聚磷酸盐链, 是合成聚磷酸盐的关键酶. 研究表明^[4,5], pH 值是影响除磷效率的关键因素之一: 在一定范围内提高 pH 值可提高除磷效果. 虽然人们对 pH 值影响聚磷菌代谢计量学有了一定认识, 但关于 pH 值如何影响 EBPR 酶系统的活性尚未见报道, 它的研究对深入认识聚磷菌生化调节机理具有指导作用. 因此, 本文对不同 pH 值下 PAO 富集的 EBPR 系统的几种关键酶的活性进行了研究, 并探讨了这些酶对聚磷微生物生长和代谢的影响.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

气相色谱仪(HP-4890); 冷冻干燥机(北京博医, FD-1); 高速离心机(上海飞鸽, GL-20G-II); 超声细胞破碎仪(美国 Branson, S-250D); 紫外分光光度计(日本岛津, UV2450).

所用试剂均来自上海国药集团(分析纯)或 Sigma 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 SBR 反应器 PAO 的富集培养方法参见文献[5]. 不同 pH 值长期驯化对生物除磷系统影响研究在 4 个 SBR 反应器中进行, 温度(21 ± 1) °C. SBR 有效容积为 3.50 L, 进水量 2.75 L. 每昼夜运行 3

收稿日期: 2007-12-04.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 50408039)、国家“八六三”计划(批准号: 2007AA06Z326)和教育部博士学科点基金(批准号: 20060247006)资助.

联系人简介: 陈银广, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事污水生物处理与污泥资源化的研究. E-mail: yg2chen@yahoo.com

个周期, 每周期 8 h, 其中厌氧 2 h, 好氧 3 h, 其余 3 h 为沉淀、排水和闲置时间. 混合液挥发性悬浮固体(VSS)约 2000 mg/L, 污泥龄约为 10 d. 厌氧阶段开始时, 将各反应器内 pH 值分别调节为 6.4, 6.8, 7.2 和 7.6, 相应的反应器编号为 SBR1 ~ SBR4. 进水采用乙酸/丙酸作为混合碳源(摩尔比为 1:10); 厌氧开始时反应器化学需氧量为 200 mg/L, 磷质量浓度为 20 mg/L, 其它营养物质与文献[5]相同.

1.2.2 磷和 PHA 的测定 溶解性正磷酸盐采用钼锑抗分光光度法测定; PHA 用气相色谱仪测定^[5].

1.2.3 酶的测定 将酶提取纯化^[6]后, 测定脱氢酶(DH)活性^[7]; 酸性/碱性磷酸酶活性测定按 Goel 等^[8]的方法进行; 腺苷酸激酶(ADK)活性测定依据 van Groenestijn 等^[9]的方法进行; 聚磷酸盐激酶(PPK)活性测定按照 Mullan 等^[10]的方法进行.

1.2.4 微生物产率系数的测定 试验通过 SBR 反应器 3 h 不排泥来测定生物生长量. 由于微生物的生长主要发生在好氧阶段, 因此, 好氧阶段的微生物生长量可视为一个厌氧-好氧周期内的微生物生长量^[11, 12]. 在好氧阶段, 微生物降解体内的 PHA 用于生长, 其产率系数 Y_{PAO} 由下式计算^[13]:

$$\Delta X_{\text{Biomass}}/\Delta t = Y_{\text{PAO}} \cdot \Delta X_{\text{PHA}}/\Delta t \quad (1)$$

式中, $\Delta X_{\text{Biomass}}$ 和 ΔX_{PHA} 分别为 Δt 时间内聚磷微生物和 PHA 的变化量, 单位为 mg/L; Y_{PAO} 为聚磷微生物的产率系数, 单位为 mg/mg.

2 结果与讨论

2.1 pH 对 EBPR 磷代谢及微生物生长的影响

表 1 为不同 pH 值下一个周期内溶解性正磷酸盐(SOP)变化和微生物生长情况. 由表 1 可知, 随着 pH 值的升高, 厌氧释磷量和好氧吸磷量都逐渐增加, 释磷速率和吸磷速率也在增加. Yagci 等^[14]比较了不同条件下 EBPR 中吸收单位 VFA 时的厌氧释磷量, 认为在具有较高 SOP-释放/VFA-吸收的 EBPR 系统中, 聚磷菌的含量也增大. 由于 4 个反应器的进水量完全相同, 而较高的 pH 对应较高的释磷量, 因此在 pH = 7.6 时聚磷菌的含量最高. 与厌氧释磷相比, SOP 的好氧吸收增加得更快, 所以 SOP 的去除率由 59.53% 增加到 95.27%. 随着 pH 值升高, Y_{PAO} 由 0.47 mg/mg 增加到 0.94 mg/mg, 表明 pH 值升高有利于 EBPR 中聚磷微生物的生长.

Table 1 Typical transformations and yield coefficient of PAO-sludge in EBPR

pH	SOP anaerobic release/aerobic uptake/(mg P · g ⁻¹ VSS)	SOP release/uptake rate ^a /(mg P · g ⁻¹ VSS · min ⁻¹)	SOP removal efficiency(%)	ΔVSS^b /(mg · L ⁻¹ · cycle)	Y_{PAO} /(mg · mg ⁻¹)
6.4	28.17/35.25	0.424/0.507	59.53	71.02	0.47
6.8	41.58/50.75	0.754/0.705	78.22	71.31	0.59
7.2	48.37/59.18	1.054/0.851	85.89	81.03	0.82
7.6	49.72/61.50	1.259/1.020	95.27	92.34	0.94

a. Average SOP release(or uptake) rate in the initial 30(or 40) min of anaerobic(or aerobic) phase; b. VSS: volatile suspended solids; ΔVSS : the VSS increased in one cycle per liter.

2.2 进水 pH 对聚磷微生物酶活性的影响

2.2.1 脱氢酶 脱氢酶能使被氧化的有机物氢原子活化并传递给特定的受氢体, 因而 DH 活性反映了活性微生物的量及其对有机物的代谢能力. 不同 pH 条件下, DH 活性在一个周期内的变化趋势相同, 这里仅以 pH = 7.2 为例说明 DH 活性在一个厌氧-好氧周期内的变化. 由图 1 可知, DH 活性在厌氧过程没有明显变化, 这可能是由于厌氧阶段不存在最终电子受体, 因此 DH 活性基本不变. 在好氧阶段, DH 活性随着时间延长而降低, 并且好氧阶段活性低于厌氧阶段. Goel 等^[8]研究发现, DH 活性在厌氧阶段比在好氧阶段高 40%~60%; Trevors 等^[15]对土壤的 DH 活性进行研究, 也发现厌氧阶段的活性大于好氧阶段.

好氧末脱氢酶活性可以反映微生物细胞的合成能力. 由图 1 可知, 随着 pH 值升高, 好氧阶段末期 DH 活性增加, 表明细胞合成能力增强, 这与 Y_{PAO} 随着 pH 值升高而增加的结论一致. 将 DH 活性与 Y_{PAO} 拟合后发现(表 2), Y_{PAO} 随着 DH 活性的增加而线性增加. 这说明, 较高的 pH 有利于聚磷菌的生长代谢, 从而提高了除磷效率. 同时也反映了高 pH 下, EBPR 除磷效率的提高是由于聚磷微生物的富

集, 这进一步说明在一定 pH 范围内, 高 pH 时除磷效率的改善主要是微生物作用而不是化学作用^[5].

Table 2 Relationships between enzyme activity and Y_{PAO} (or SOP)

X (Enzyme activity)	Y	Relationships
Dehydrogenase/[$\mu\text{g TF} \cdot (\text{mg}^{-1} \text{VSS} \cdot \text{h}^{-1})$]	$Y_{PAO}/(\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1})$	$Y = 0.159X - 0.277 (R^2 = 0.9039)$
Adenylate kinase/[$\text{U} \cdot (\text{mg}^{-1} \text{VSS} \cdot \text{h}^{-1})$]	SOP release rate[$\text{mg SOP}/(\text{g VSS min})$]	$Y = 0.367X - 0.971 (R^2 = 0.9812)$
Polyphosphate kinase(absorbency)	SOP uptake rate[$\text{mg SOP}/(\text{g VSS min})$]	$Y = 3.488X - 0.923 (R^2 = 0.9996)$

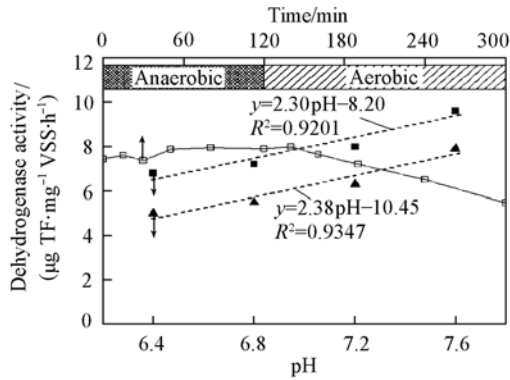


Fig. 1 Effect of pH on dehydrogenase activity

□ Dehydrogenase activity at pH 7.2; ■ the initial aerobic dehydrogenase activity at different pHs; ▲ the final aerobic dehydrogenase activity at different pHs;

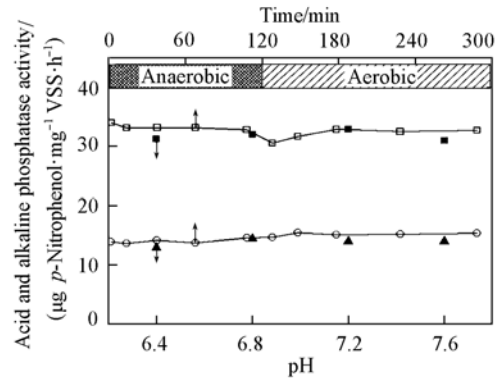


Fig. 2 Effect of pH on acid and alkaline phosphatase activity

□ Acid phosphatase activity at pH 7.2; ○ alkaline phosphatase activity at pH 7.2; ■ acid phosphatase activity at different pHs; ▲ alkaline phosphatase activity at different pHs.

2.2.2 酸性磷酸酶和碱性磷酸酶 酸性和碱性磷酸酶能够催化磷酸单酯的水解和无机磷酸释放, 在聚磷降解过程中起作用. 在不同 pH 值条件下, 酸性/碱性磷酸酶活性的变化见图 2. 由图 2 可知, pH = 7.2 时酸性/碱性磷酸酶活性在一个厌氧-好氧周期内似乎不受厌氧和好氧条件的影响, 酸性磷酸酶活性波动小于 4%, 碱性磷酸酶活性波动小于 6%, 且磷酸酶活性基本不受 pH 的影响. 随着 pH 升高, SOP 释放增加, 而磷酸酶活性不发生改变, 因此, 磷酸酶可能不是导致不同 pH 下释磷差异的关键酶.

2.2.3 腺苷酸激酶 ADK 和一磷酸腺苷 (AMP)-磷酸转移酶反应生成二磷酸腺苷 (ADP), 从而生成 ATP, 提供微生物代谢所需能量. 这是聚磷厌氧水解的关键反应. 在不同 pH 条件下 ADK 的变化如图 3 所示. 在整个厌氧-好氧周期内, ADK 活性不受厌氧和好氧条件的影响, 变化波动小于 3.5%.

随着 pH 值的升高, ADK 活性线性增加 (图 3). 由于 ADK 活性与 AMP-磷酸转移酶共同作用降解聚磷, 因此, ADK 活性增加可能导致聚磷代谢能力增强, 释磷速率增加 (表 2). van Groenestijn 等^[9,16] 对不同污水处理厂的活性污泥的研究发现, ADK 活性与除磷效率有很好的相关性. Appeldoorn 等^[17] 也发现, 较高的 ADK 活性与较快的污泥厌氧释磷速率相联系. 在不同 pH 长期驯化的生物除磷系统中,

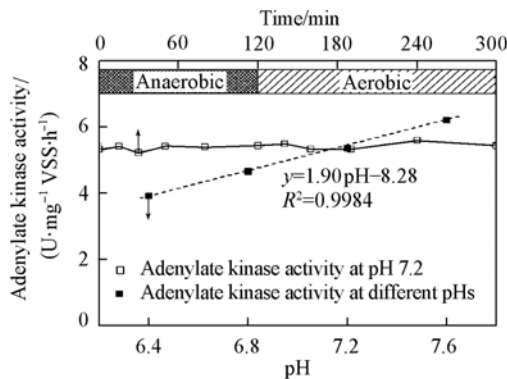


Fig. 3 Effect of pH on adenylate kinase activity

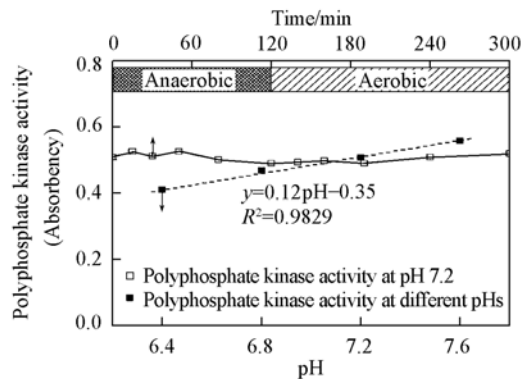


Fig. 4 Effect of pH on polyphosphate kinase activity

SOP 释放、SOP 吸收、SOP 去除率及 ADK 活性都随着 pH 值的升高而增加, SOP 的转化与 ADK 活性表现为一致的变化趋势, 这表明较高的 ADK 活性导致较高的除磷效率。

2.2.4 聚磷酸盐激酶 越来越多的研究表明^[4], PPK 在聚磷菌的好氧阶段起着关键作用, 溶液中的溶解性磷酸盐在 PPK 的作用下生成聚磷酸盐并储存在细胞体内, 因而 PPK 活性能反映聚磷菌的活性。由图 4 可知, PPK 活性不受厌氧或好氧环境的影响。这是因为在聚磷代谢过程中, 鸟嘌呤核苷五磷酸盐(pppGpp)被水解到四磷酸盐(ppGpp), 不影响聚磷酸盐激酶的活性^[18]。随着 pH 值的升高, PPK 活性增加, EBPR 的吸磷速率也线性增加。这表明聚磷菌的活性也在增加, 除磷能力增强。由上面的结果可知, 随着 pH 值升高, SOP 吸收量和吸收速率都增加, 与 PPK 活性表现为一致的变化趋势。

参 考 文 献

- [1] Akiyama M. , Crooke E. , Kornberg A. . J. Biol. Chem. [J], 1992, **267**(31): 22556—22561
- [2] Crooke E. , Akiyama M. , Rao N. N. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J], 1994, **269**(9): 6290—6295
- [3] Kumble K. D. , Ahn K. , Kornberg A. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA [J], 1996, **93**(25): 14391—14395
- [4] Oehmen A. , Lemos P. C. , Carvalho G. , *et al.* . Water Res. [J], 2007, **41**(11): 2271—2300
- [5] Zhang C. , Chen Y. , Liu Y. . Chemosphere [J], 2007, **69**(11): 1713—1721
- [6] McGrath J. W. , Quinn J. P. . Appl. Environ. Microbiol. [J], 2000, **66**(9): 4068—4073
- [7] ZHU Nan-Wen(朱南文), MIN Hang(闽航), CHEN Mei-Ci(陈美慈), *et al.* . China Biogas(中国沼气) [J], 1996, **14**(2): 3—5
- [8] Goel R. , Mino T. , Satoh H. , *et al.* . Water Res. [J], 1998, **32**(7): 2081—2088
- [9] van Groenestijn J. W. , Bentvelsen M. M. , Deinema M. H. , *et al.* . Appl. Environ. Microbiol. [J], 1989, **55**(1): 219—223
- [10] Mullan A. , Quinn J. P. , McGrath J. W. . Anal. Biochem. [J], 2002, **308**(2): 294—299
- [11] Smolders G. J. F. , van der Meij J. , van Loosdrecht M. C. C. , *et al.* . Biotechnol. Bioeng. [J], 1994, **44**(7): 837—848
- [12] Smolders G. J. F. , van der Meij J. , van Loosdrecht M. C. M. , *et al.* . Biotechnol. Bioeng. [J], 1995, **47**(3): 277—287
- [13] Petersen B. , Temmink H. , Henze M. , *et al.* . Water Res. [J], 1998, **32**(1): 91—100
- [14] Yagci N. , Artan N. , Cokgor U. , *et al.* . Biotechnol. Bioeng. [J], 2003, **84**(3): 359—373
- [15] Trevors J. T. . Plant and Soil [J], 1984, **77**(2/3): 285—293
- [16] van Groenestijn J. W. , Deinema M. H. . Proc. IAWPRC Spec. Conf. , Rome, Italy [C], 1987: 1—6
- [17] Appeldoorn K. J. , Deinema M. H. . Proc. IAWPRC Spec. Conf. , Rome, Italy [C], 1987: 309—311
- [18] Kornberg A. , Rao N. N. , Ault-Riché D. . Annu. Rev. Biochem. [J], 1999, **68**: 89—125

Effect of pH on Enzyme Activity of Enhanced Biological Phosphorus Removal System

ZHANG Chao, CHEN Yin-Guang*, LIU Yan

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract Enzyme plays an important role in enhanced biological phosphorus removal (EBPR); however, little attention was paid on this issue in the literature. Based on the investigations of the activities of some key enzymes related to EBPR, the relationships between enzyme activity and phosphorus-accumulating organisms (PAO) sludge yield coefficient, and between enzyme activity and soluble ortho-phosphorus were studied. In the range of pH 6.4—7.6, the results showed that the activity of dehydrogenase, adenylate kinase and polyphosphate kinase increased linearly with pH, while acid- and alkaline-phosphatase activity were not influenced by pH. It is found that a linear relationship was shown between PAO sludge yield coefficient and dehydrogenase activity, anaerobic phosphorus release rate and adenylate kinase activity, and aerobic phosphorus uptake rate and polyphosphate kinase activity, respectively. The results indicate that a higher pH was beneficial to the growth and the activity of PAO, which led to an improved phosphorus removal performance.

Keywords Enzyme activity; pH value; Enhanced biological phosphorus removal (Ed.: H, J, Z)