DOI:10.11921/j.issn.2095-8382.20210112

不同碳源调控辅酶Ⅰ对聚磷菌胞内多聚物代谢的影响

李丽[1，2]，张华[1，2]，张文超[1，2]

（1.安徽建筑大学环境与能源工程学院，安徽 合肥 230601；
2.水污染控制与废水资源化安徽省重点实验室，安徽 合肥 230601）

摘 要：辅酶 Ⅰ 是聚磷菌胞内物质代谢的关键酶，研究不同碳源调控辅酶 Ⅰ 对聚磷菌胞内 PHB、poly-P、糖原代谢的影响对强化生物除磷具有重要的意义。研究结果表明，以乙酸钠为碳源对胞内辅酶 Ⅰ 进行调控时，胞内 NAD^+（氧化型辅酶 Ⅰ）、NADH（还原型辅酶 Ⅰ）平均含量分别为 3.547 μmol/g、3.255 μmol/g，以葡萄糖为碳源对胞内辅酶 Ⅰ 进行调控时，胞内 NAD^+、NADH 平均含量分别为 1.592 μmol/g、1.495 μmol/g，说明以乙酸钠为碳源对胞内辅酶 Ⅰ 的调控效果更好。不同碳源调控胞内辅酶 Ⅰ 对聚磷菌胞内多聚物代谢影响的研究结果表明，乙酸钠为碳源进行调控辅酶 Ⅰ 时，胞内 PHB 和 poly-P 的合成量更高，聚磷菌除磷效率更好，因此，以乙酸钠为碳源调控聚磷菌胞内辅酶 Ⅰ 时有助于提高胞内多聚物的代谢能力。说明通过不同碳源调控聚磷菌胞内 NADH 的含量可以提高生物除磷的效果，为强化生物除磷效率提供一种新思想。

关键词：碳源；辅酶 Ⅰ；PHB；poly-P；糖原

中图分类号：X703.1 **文献标识码：**A **文章编号：**2095-8382（2021）01-068-05

Effects of Coenzyme Ⅰ on Intracellular Polymer Metabolism of Phosphate Accumulating Organisms

LI Li[1，2]，ZHANG Hua[1，2]，ZHANG Wenchao[1，2]

（1.School of Environment and Energy Engineering，Anhui Jianzhu University，Anhui Hefei，230601，China；
2.Key Laboratory of Anhui Province of Water Pollution Control and Wastewater Resuse，Anhui Hefei，230601，China）

Abstract：During the biological phosphorus removal，coenzyme I is the key enzyme for the intracellular polymer metabolism of phosphate accumulating organisms. Therefore，it is important to study the effects of coenzyme on the metabolism of PHB，poly-P and glycogen of phosphate accumulating organisms. In this study，different carbon were used to regulate the coenzyme of the phosphate accumulating organisms，and then the metabolism of the intracellular polymers was further studied. The results showed that，when sodium acetate was used as the carbon of the phosphate accumulating organisms，the average contents of NAD^+（oxidized coenzyme I）and NADH（reduced coenzyme I）were respectively 3.547 μmol/g and 3.255 μmol/g. However，when glucose was used as the carbon of the phosphate accumulating organisms，the average contents of NAD^+ and NADH were 1.592 μmol/g and 1.495 μmol/g respectively. The research indicated that，when sodium acetate was used as the carbon of the phosphate accumulating organisms，there was a better regulated effect on coenzyme I. The metabolisms of the intracellular polymers indicated that，when sodium acetate was used as the carbon to regulate coenzyme I，the synthesis of the intracellular PHB and poly-P were higher. The higher the synthesis of the intracellular PHB and poly-P were，the better the phosphorus removal efficiency was. Therefore，when sodium acetate was used as carbon to regulate the intracellular coenzyme I，it was helpful to improve the metabolic capacity of intracellular polymers. The results

收稿日期：2020-08-02

基金项目：安徽省自然科学研究面上项目（1808085MB34）；安徽省高校省级自然科学研究项目重大项目（KJ2019ZD52）；安徽建筑大学引进人才及博士启动基金项目（2018QD20）

作者简介：李丽（1995-），女，硕士生，研究方向：水处理理论与技术。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

showed that the biological phosphorus removal may be improved by regulating the intracellular coenzyme I of phosphate accumulating organism. This study provides a new idea for enhancing biological phosphorus removal.

Key words：carbon source；coenzyme I；PHB；poly-P；glycogen

辅酶 I 是最重要的脱氢酶的辅酶[1]，是生物氧化过程中氢和电子的携带者，是所有物质能量代谢所必需的辅酶，它包括 NAD^+（氧化型辅酶 I）和 NADH（还原型辅酶 I）[2]。生物除磷的厌氧阶段，微生物经过三羧酸循环和糖酵解途径分解脱氢传递给 NAD^+ 合成 NADH[3]。NADH 是聚磷菌厌氧阶段实现 PHB（聚－β－羟基丁酸）合成的关键推动力，在生物除磷过程中发挥着重要的作用[4]。因此，厌氧阶段充足的 NADH 对聚磷菌胞内 PHB 合成乃至生物除磷系统的除磷效果具有重要的影响。

碳源作为生物除磷过程中聚磷菌重要的影响因素，对聚磷菌胞内 NADH 的代谢途径具有重要影响[5]。Pereira 研究表明，聚磷菌以乙酸钠为碳源时，乙酸钠经乙酰化转化为乙酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 经三羧酸循环生成还原力 NADH，同时聚磷菌胞内糖原通过糖酵解途径产生 NADH 和丙酮酸，一部分丙酮酸转化成乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环并再次生成 NADH[6]。葡萄糖为碳源时，葡萄糖先转化为 6- 磷酸葡萄糖，一部分 6- 磷酸葡萄糖转化为糖原，糖原经过 EMP（糖酵解）途径和 ED（2-酮 -3- 脱氧 -6- 磷酸葡萄糖酸）途径生成 NADH，一部分 6- 磷酸葡萄糖直接经过 EMP 或 ED 途径生成 NADH[7]。

在污水生物除磷过程中，乙酸钠和葡萄糖因无毒无害、价格便宜，且分子结构简单，易被微生物分解吸收利用，通常被作为传统的外加碳源[8-9]。然而，不同的碳源对生物除磷过程中聚磷菌的生长代谢产生不同的影响，胞内辅酶 I 对聚磷菌的胞内物质的代谢发挥着重要的作用，但关于不同碳源对聚磷菌胞内 NAD^+ 和 NADH 水平的影响及其对聚磷菌胞内多聚物代谢的影响的研究较少。

因此，该研究通过厌氧 / 好氧交替的平板迭代培养法进行聚磷菌菌株的分离筛选，并通过高通量测序法鉴别聚磷菌类别。然后以乙酸钠和葡萄糖分别调控聚磷菌胞内 NAD^+、NADH 含量，研究不同碳源调控聚磷菌胞内 NAD^+、NADH 含量后胞内 PHB、poly-P（多聚磷酸盐）、糖原代谢的变化，进一步分析聚磷菌胞内 NAD^+、NADH 含量对胞内 PHB、poly-P、糖原代谢的影响，揭示不同碳源调控辅酶 I 对聚磷菌胞内 PHB、poly-P、糖原代谢的影响，为强化生物除磷提供一种新思路。

1　材料和方法

1.1　菌株来源

采集合肥市某污水处理厂中的活性污泥，然后采用序批式活性污泥反应器进行聚磷菌的富集，通过厌氧 / 好氧交替的平板迭代培养法分离筛选获得聚磷菌菌株[10]，再通过高通量测序法鉴别聚磷菌类别。

1.2　培养基

LB 培养基：胰化蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 5 g/L、pH 7.0-7.2。乙酸钠为碳源的含磷培养基：乙酸钠 0.5 g/L、牛肉膏 0.22 g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 g/L、磷酸二氢钾 10 mg/L、氯化铵 0.2 g/L。葡萄糖为碳源的含磷培养基：葡萄糖 0.5 g/L、牛肉膏 0.22 g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 g/L、磷酸二氢钾 10 mg/L、氯化铵 0.2 g/L。

1.3　试验运行方式

用 1 升 LB 培养基作为初始培养基，接种菌株在 30 ℃、140 r/min 条件下进行初始培养 24 h，再分别将接种菌液以 10% 的接种量接种于 1 L 的乙酸钠、葡萄糖为碳源的含磷培养基的锥形瓶中。将两只锥形瓶放入恒温摇床中 30 ℃、140 r/min 振荡培养 12 h，使菌株得到繁殖生长。然后厌氧 / 好氧交替培养，厌氧阶段在厌氧培养箱 30 ℃厌氧静置培养 1 h，好氧阶段在恒温摇床中 140 r/min、30 ℃振荡好氧培养 3 h。检测聚磷菌在不同阶段胞内 NAD^+、NADH、PHB、糖原、poly-P 含量。

1.4　分析指标及检测方法

聚磷菌胞内 NAD^+ 和 NADH 含量采用辅酶 I 检测试剂盒测定，该试剂盒采用酶循环法并利用分光光度法测定微生物胞内 NAD^+ 和 NADH 含量；

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

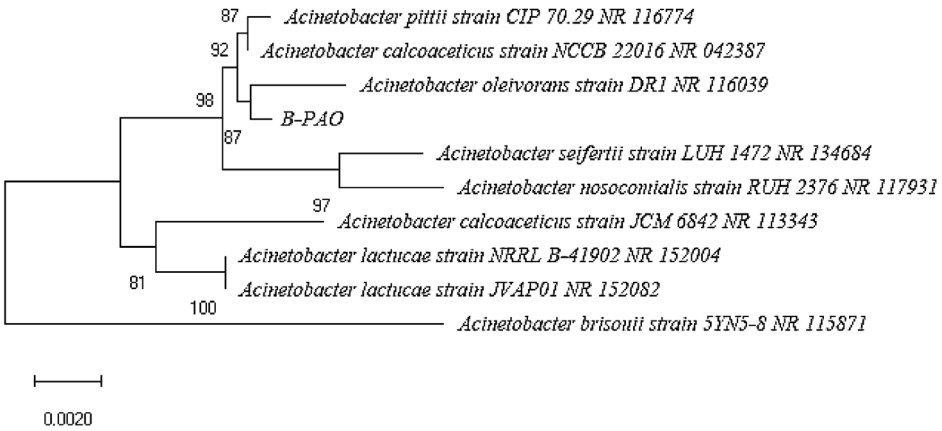

图 1　基于 16S rDNA 基因序列构建的 B–PAO 系统发育树

PHB 含量采用浓硫酸消解法测定；poly–P 含量采用过硫酸钾消解法测定；糖原含量采用蒽酮－硫酸比色法测定。

2　结果与讨论

2.1　聚磷菌的鉴定

采用高通量测序法对聚磷菌进行 16S rDNA 测序，将获得的序列在 NCBI Genbank 中使用 Nucleotide Blast 程序进行序列比对。再用 MEGA7.0 软件的 Alignment 程序，选用 ClustalW 法进行多序列比对分析，然后采用近邻法构建系统发育树如图 1 所示，鉴定该菌株为 Acinetobacter oleivorans，并将其命名为 B–PAO。

2.2　不同碳源对聚磷菌胞内 NAD^+ 和 NADH 含量的影响

以乙酸钠和葡萄糖分别为碳源时，聚磷菌胞内 NAD^+、NADH 含量如图 2 所示。由图 2 可知，以乙酸钠为碳源时，聚磷菌胞内 NAD^+、NADH 含量均高于以葡萄糖为碳源时的含量。乙酸钠为碳源时，胞内 NAD^+ 和 NADH 平均含量分别为 3.547 μmol/g 和 3.255 μmol/g；葡萄糖为碳源时，胞内 NAD^+ 和 NADH 平均含量分别为 1.592 μmol/g 和 1.495 μmol/g。碳源不同，聚磷菌胞内 NADH 代谢模型不同[6–7]。因此，不同碳源产生的胞内 NAD^+ 和 NADH 量不同，故可通过碳源来调控聚磷菌胞内 NAD^+ 和 NADH 含量实现高效生物除磷。

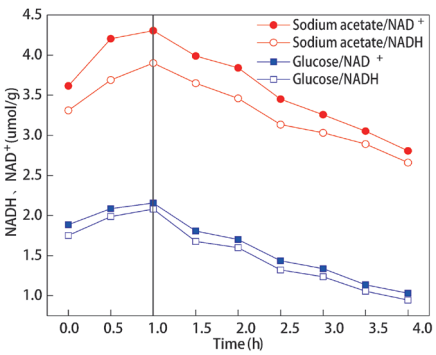

图 2　聚磷菌胞内 NAD^+、NADH 含量变化

2.3　不同碳源调控辅酶 I 对聚磷菌胞内 PHB 含量影响

乙酸钠和葡萄糖分别调控辅酶 I 后，聚磷菌胞内 PHB 含量的变化如图 3 所示，PHB 合成、分解速率如图 4、图 5 所示。乙酸钠和葡萄糖分别为碳源时，聚磷菌胞内 PHB 的合成量分别为 7.072 mg/g、2.670 mg/g，合成速率分别为 7.072 mg/(g·h)、2.670 mg/(g·h)。好氧阶段聚磷菌胞内 PHB 的分解量分别为 7.071 mg/g、2.565 mg/g，分解速率分别为 2.357 mg/(g·h)、0.855 mg/(g·h)。乙酸钠为碳源时，聚磷菌胞内 PHB 的合成量、分解量相对以葡萄糖为碳源时更高。乙酸钠为碳源调控聚磷菌代谢时，聚磷菌胞内 NAD^+ 和 NADH 含量更高，越高的NADH为胞内PHB的合成提供更高的推动力[11]。因此，以乙酸钠为碳源时，厌氧阶段胞内 PHB 合成量及合成速率更高，好氧阶段胞内 PHB 的分解量及分解速率更高。

2.4　不同碳源调控辅酶 I 对聚磷菌胞内 poly–P 含量影响

不同碳源调控辅酶 I 后，聚磷菌胞内 poly–P 含量的变化如图 6 所示，poly–P 合成、水解速率如图 7、图 8 所示。乙酸钠和葡萄糖分别为碳源时，厌氧阶

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

段聚磷菌胞内 poly–P 的水解量分别为 1.509 mg/g 和 1.282 mg/g，水解速率分别为 1.509 mg/（g·h）、1.282 mg/（g·h）；好氧阶段聚磷菌胞内 poly–P 的合成量分别为 1.561 mg/g 和 1.304 mg/g，合成速率分为 0.520 mg/（g·h）、0.435 mg/（g·h）。以乙酸钠为碳源时，聚磷菌胞内 poly–P 的水解量、合成量更高。

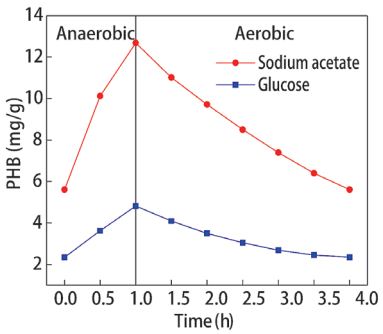

图 3　胞内 PHB 含量变化

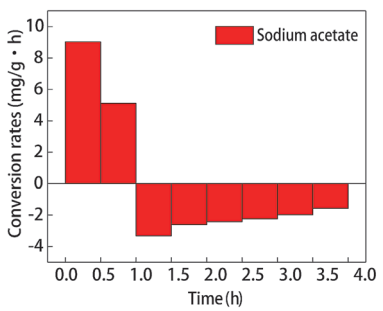

图 4　乙酸钠为碳源胞内 PHB 合成、分解速率

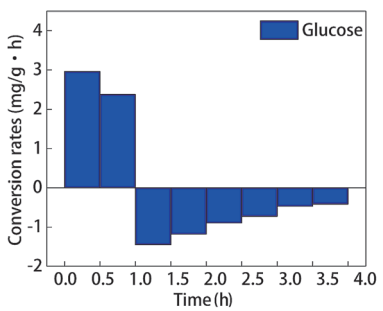

图 5　葡萄糖为碳源胞内 PHB 合成、分解速率

好氧阶段胞内 poly–P 的合成量与胞内 PHB 水解量紧密相关。当以乙酸钠为碳源调控聚磷菌胞内 NAD^+ 和 NADH 时，厌氧阶段胞内 PHB 的大量合成需要更多的胞内 poly–P 水解提供能量，好氧阶段胞内 PHB 的大量分解，为胞内 poly–P 合成提供更多能量。因此，乙酸钠为碳源时聚磷菌胞内 poly–P 的合成量、分解量更高。

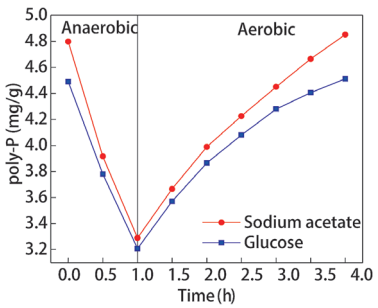

图 6　胞内 poly–P 含量变化

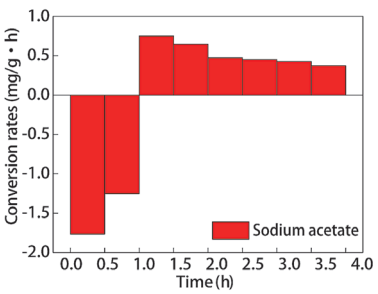

图 7　乙酸钠为碳源胞内 poly–P 合成、分解速率

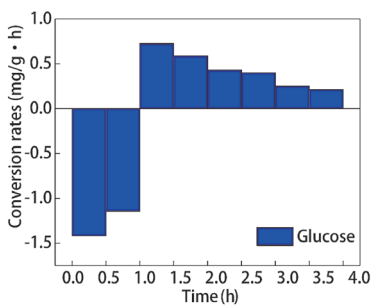

图 8　葡萄糖为碳源胞内 poly–P 合成、分解速率

2.5　不同碳源调控辅酶 I 对聚磷菌胞内糖原含量影响

不同碳源调控辅酶 I 后，聚磷菌胞内糖原含量变化如图 9 所示，糖原合成、降解速率如图 10、图 11 所示。乙酸钠和葡萄糖分别为碳源时，厌氧阶段聚磷菌胞内糖原的降解量分别为 2.833 mg/g 和 3.134 mg/g，降解速率分别为 2.833 mg/（g·h）、3.134 mg/（g·h）；好氧阶段聚磷菌胞内糖原的合成量分别为 2.843 mg/g 和 3.266 mg/g，合成速率分别为 0.946 mg/（g·h）、1.089 mg/（g·h）。以葡萄糖为碳源时，聚磷菌胞内糖原的降解量、合成量更高。

乙酸钠和葡萄糖为碳源时聚磷菌在好氧阶段均产生了大量 ATP，但是以葡萄糖为碳源时，ATP 除了供给微生物的生长，还可通过磷酸葡萄糖形成

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

糖原[12]。因此，以葡萄糖为碳源时，虽然聚磷菌胞内 NAD^+ 和 NADH 含量偏低，但聚磷菌胞内糖原的降解量、合成量更高。

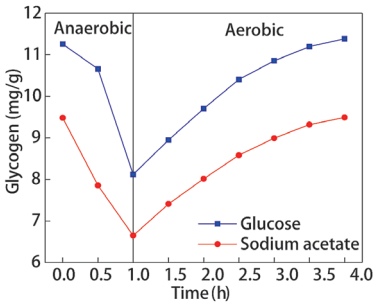

图 9 胞内糖原变化

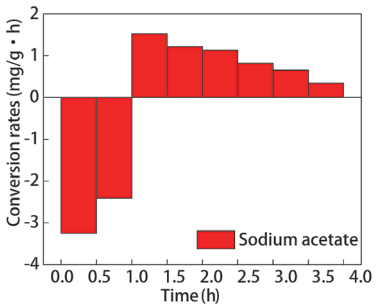

图 10 乙酸钠为碳源胞内糖原合成、分解速率

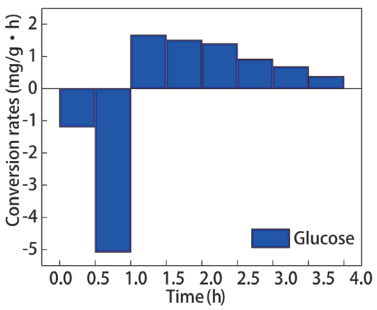

图 11 葡萄糖为碳源胞内糖原合成、分解速率

3 结论

采用乙酸钠和葡萄糖分别作为碳源调控聚磷菌胞内辅酶 I 的含量，结果表明，乙酸钠为碳源时，聚磷菌胞内 NAD^+ 和 NADH 含量较高，而以葡萄糖为碳源时，聚磷菌胞内 NAD^+ 和 NADH 含量则较低。因此，以乙酸钠为碳源时，厌氧阶段聚磷菌胞内 PHB 合成量、poly-P 分解量和好氧阶段聚磷菌胞内 PHB 分解量、poly-P 合成量均更高。因此，乙酸钠为碳源调控聚磷菌胞内辅酶 I 的含量更有利于聚磷菌胞内多聚物的代谢，生物除磷更好。该研究通过碳源调控聚磷菌胞内辅酶 I 的含量从而提高生物除磷的效率，为强化污水生物除磷提供了新思路。

参考文献：

[1] Wang J Z，Yang C L，Chen X，et al.A high effective NADH-ferricyanide dehydrogenase coupled with laccase for NAD^+ regeneration[J].Biotechnology Letters，2016，38(8)：1315-1320.

[2] Creanga C，El Murr N.Development of new disposable NADH biosensors based on NADH oxidase[J].Journal of Electroanalytical Chemistry，2011，656(1/2)：179-184.

[3] Zhou Y，Pijuan M T，Oehmen A，et al.The source of reducing power in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs) - a mini-review[J].Water Science and Technology，2010，61(7)：1653-1662.

[4] 徐立杰，郭春艳，彭永臻，等．强化生物除磷系统的微生物学及生化特性研究进展[J]. 应用与环境生物学报，2011，17(3)：427-434.

[5] 邱春生，聂海伦，孙力平，等．不同碳源条件下聚磷菌代谢特性[J]. 环境工程学报，2014，8(6)：2191-2197.

[6] Pereira H，Lemos P C，Reis M A M，et al.Model for carbon metabolism in biological phosphorus removal processes based on in vivo 13C-NMR labelling experiments[J].Water Research，1996，30(9)：2128-2138.

[7] Wang N D，Peng J，Hill G.Biochemical model of glucose induced enhanced biological phosphorus removal under anaerobic condition[J].Water Research，2002，36(1)：49-58.

[8] 张源野，王爽．生物脱氮除磷外加碳源技术探讨[J]. 吉林建筑大学学报，2017，34(1)：53-55.

[9] 罗阳，张学洪，张华，等．不同碳源对 SBR 系统生物强化除磷的影响[J]. 桂林理工大学学报，2010，30(4)：595-598.

[10] 张华，马涛，李丽，等．生物除磷工艺中高效聚磷菌的快速筛选和鉴定[J]. 安徽建筑大学学报，2020，28(1)：69-72.

[11] Li J J，Li Y K，Cui Z Y，et al.Enhancement of succinate yield by manipulating NADH/NAD^+ ratio and ATP generation[J].Applied Microbiology and Biotechnology，2017，101(8)：3153-3161.

[12] 王冬波，李小明，杨麒，等．碳源对 SBR 单级好氧工艺中微生物摄磷能力的影响及其机理研究[J]. 中国科学(B 辑)，2009(6)：560-568.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net