

文章栏目:水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.201808042 中图分类号 X832 文献标识码 A

黄晓遇, 谭炳琰, 李淳峰, 等. 柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱荧光测定生物脱氮反应器中痕量信号分子 AI-2 [J]. 环境工程学报, 2019, 13(1): 109-115.

HUANG Xiaoyu, TAN Bingyan, LI Chunfeng, et al. Detection of AI-2 signal molecules of quorum sensing in biological nitrogen removal processes by pre-column derivatization-solid phase extraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detector[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2019, 13(1): 109-115.

柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱荧光测定生物脱氮反应器中痕量信号分子 AI-2

黄晓遇¹, 谭炳琰¹, 李淳峰¹, 陈雨佳¹, 韦童¹, 荣宏伟^{1,2}, 储昭瑞^{1,2,*}

1. 广州大学土木工程学院, 广州 510006

2. 广东省水质安全及污染控制工程技术研究中心, 广州 510006

第一作者: 黄晓遇(1996—), 男, 本科生。研究方向: 生物脱氮。E-mail: 2765570340@qq.com

*通信作者: 储昭瑞(1987—), 男, 博士, 讲师。研究方向: 水处理理论与技术。E-mail: zrchu@gzhu.edu.cn

摘要 为揭示污水生物脱氮工艺中污泥菌群间的群体感应作用, 建立了柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱荧光检测法(HPLC-FLD)定量检测介导细菌种间群体感应信号分子 AI-2 的方法。取反应器的泥水混合液, 经 0.45 μm 滤膜过滤后, 用氨基磺酸掩蔽亚硝酸盐干扰, 并与 2,3-二氨基萘(DAN)发生衍生化反应, 衍生化产物用 C18 固相萃取柱进行固相萃取, 经氮吹浓缩后上机分析。采用 C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)进行分离, 乙腈与水(含 0.1% 甲酸)作为流动相进行梯度洗脱, 使用荧光检测器(激发和发射波长分别为 271 nm 和 503 nm)进行检测。结果表明, 该检测方法在 1~200 ng·mL⁻¹ 范围内呈现出了良好的线性关系, 检出限为 1 ng·mL⁻¹, 回收率为 55.08%~59.25%, 相对标准误差为 2.98%~10.41%。该方法适用于杂质干扰多的痕量信号分子 AI-2 定量分析, 可为生物脱氮工艺中信号分子 AI-2 介导群体感应研究提供有效的分析方法。

关键词 生物脱氮; 群体感应; 信号分子 AI-2; 高效液相色谱荧光检测法(HPLC-FLD)

群体感应(quorum sensing, QS)是指细菌之间能够分泌自诱导物(autoinducer)作为化学信号分子, 实现细菌种内及种间交流^[1]。通过感应周边信号分子浓度, 细菌可以感知周边细菌密度, 从而诱导特定基因的表达, 并触发一系列生物群体行为, 如生物膜的形成、致病基因的表达、生物发光等^[2-3]。目前, 群体感应系统中细菌分泌的信号分子主要有 3 类: 革兰氏阴性菌分泌的高丝氨酸内酯类(acyl-homoserine lactones, AHLs); 革兰氏阳性菌分泌的寡肽类(autoinducer peptide, AIP); 细菌种间分泌的第 2 类自诱导物(autoinducer-2, AI-2)^[4]。TAN 等^[5]在好氧颗粒污泥系统内检测到信号分子 AHLs 的存在, 并指出微生物群体感应与好氧颗粒污泥的形成有关; DE 等^[6]在 OLAND 反应器(一体式亚硝化-厌氧氨氧化反应器)中证实了信号分子 AHLs 的存在; XIONG 等^[7]的研究表明, 信号分子 AI-2 对好氧颗粒污泥的颗粒化具有促进作用。有研究表明, AI-2 介导的群体感应广泛存在于革兰氏阳性和阴性细菌中, 被认为是微生物群体感应的通用语言^[8]。因此, 对 AI-2 介导的群体感应系统的研究显得十分必要。

收稿日期: 2018-08-07; 录用日期: 2018-11-04

基金项目: 广州大学大学生创新训练项目(201711078014); 广东省教育厅青年创新人才项目(2016KQNCX121)

有研究^[9]显示,在污水生物处理工艺中,微生物菌群间存在AI-2介导的群体感应现象,比如生物膜(颗粒污泥)的形成、处理效果的迅速提升等。但由于实际水样中AI-2浓度极低,且杂质干扰较多,对实际水样中AI-2浓度进行定量检测有一定的难度,制约了污水生物处理工艺中AI-2介导群体感应的研究。

目前,对AI-2定量检测的方法主要有4类。第1类是哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)生物发光法^[11]。该方法最为常用,但只能对AI-2进行定性检测,不能用于定量检测,且检测结果容易受pH、葡萄糖及硼的干扰^[12-13]。第2类是基于AI-2与受体蛋白结合后荧光检测法。该方法需要提纯和标记受体蛋白,步骤复杂、耗时且价格昂贵^[14]。第3类是将4,5-二羟基-2,3-戊二酮(4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD)与1,2-苯二胺(1,2-phenylenediamine)或其衍生物进行反应,利用HPLC-MS/MS或GC-MS对其形成相应的喹啉进行检测。该方法操作复杂,且需要配备价格昂贵的HPLC-MS/MS大型仪器设备^[15-16]。第4类是SONG等^[17]报道的将4,5-二羟基-2,3-戊二酮(4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD)与2,3-二氨基萘(DAN)发生衍生化反应,生成具有特征激发和发射波长的荧光物质,利用HPLC-FLD对该衍生化产物进行检测,该方法具有操作简单、价格低廉、灵敏精准、检出限低、线性定量分析范围较宽的优点,但该方法对实际样品中AI-2检测的适用性还有待进一步研究。

本研究在SONG等^[17]报道方法的基础上,优化建立了柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱荧光检测法,实现了对生物脱氮工艺中痕量AI-2的定量检测,为探究AI-2介导的群体感应系统在污水生物脱氮菌群中的调控作用提供了有效的分析方法。

1 材料与方 法

1.1 实验原料

DPD溶液($4.47 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)购自Omm Scientific公司(Texas, USA),用超纯水溶解,配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准储备液,置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用, $1\sim 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的DPD使用液由标准储备液经稀释后获得。2,3-二氨基萘(DAN, 麦克林公司)用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶解,配制成 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DAN溶液,经 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。氨基磺酸、甲酸、乙腈(色谱纯)购自Sigma-Aldrich公司。氨基磺酸用超纯水溶解,配制成 $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的掩蔽液,于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.2 实验装置

高效液相色谱仪(HPLC-FLD, Agilent 1260, 安捷伦);全自动固相萃取仪(Fotector-02HT, 睿科);全自动氮吹浓缩仪(N1-50, 屹尧)。

1.3 衍生化

取 200 mL 实验室生物脱氮反应器(分别为 5 L UASB反应器、 1 L UASB反应器、SBR及IFAS反应器)水样,经 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,加入 1.2 mL 盐酸($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),调节pH至3以下。加入 6.5 mL 氨基磺酸($80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),摇匀反应 10 min 。再将 1.25 mL DAN溶液($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)加入至上述水样中,振荡摇匀,并置于 $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 40 min 。

1.4 固相萃取

依次采用 6 mL 甲醇和 6 mL 超纯水对C18固相萃取柱进行活化与平衡,控制滤速为 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。随后加入前述衍生化水样,控制滤速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。采用 6 mL 甲醇(5%, 体积比)进行冲洗,控制滤速为 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;干燥 2 min ,加入 5 mL 乙腈进行洗脱,控制滤速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。利用氮吹仪在 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下将洗脱液浓缩至 0.5 mL 以下,加入 0.5 mL 超纯水,并用乙腈定容至 1 mL ,转移至色谱进样瓶,用于高效液相色谱分析。

1.5 色谱条件

高效液相色谱采用配备荧光检测器的Agilent 1260,色谱柱为Eclipse XDB-C18($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$),柱温 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相使用含有 0.1% 甲酸和乙腈,流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;梯度洗脱程序见表1。进样量

为 20 μL ; 荧光检测器的激发和发射波长分别设定为 271 nm 和 503 nm。

1.6 胞外聚合物(EPS)的测定

污泥中胞外聚合物(EPS)的提取采用 NaOH 法^[18]。提取得到的 EPS 总量以总有机碳(TOC)表征, 采用 TOC 分析仪(TOC-L, 岛津)测定。

2 结果与讨论

2.1 衍生化反应优化

采用 HPLC-FLD 检测方法对 DPD 标准液($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)及实验室生物脱氮反应器水样进行了分析, 结果如图 1 所示。对于 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ DPD 标准液, 其与 DAN 衍生化产物的信号峰不明显, 且 DAN 峰溢出检测器的检测范围, 导致 DAN 峰不完整。这是由于检测样品中 DPD 浓度较低, 使得衍生化后体系中还存在着大量未参与衍生化反应的 DAN。另外, 在实际水样中, 信号峰和 DAN 峰强度均较低, 而保留时间 11.8 min 出现强干扰峰, 由于 NO_2^- 的存在, 与衍生剂 DAN 反应生成荧光物质(NAT), 干扰了正常的衍生化反应(化学反应式如式(1)所示)。因此, AI-2 HPLC-FLD 检测方法不适用于干扰杂质多、浓度低的实际样品分析, 需要进行优化。

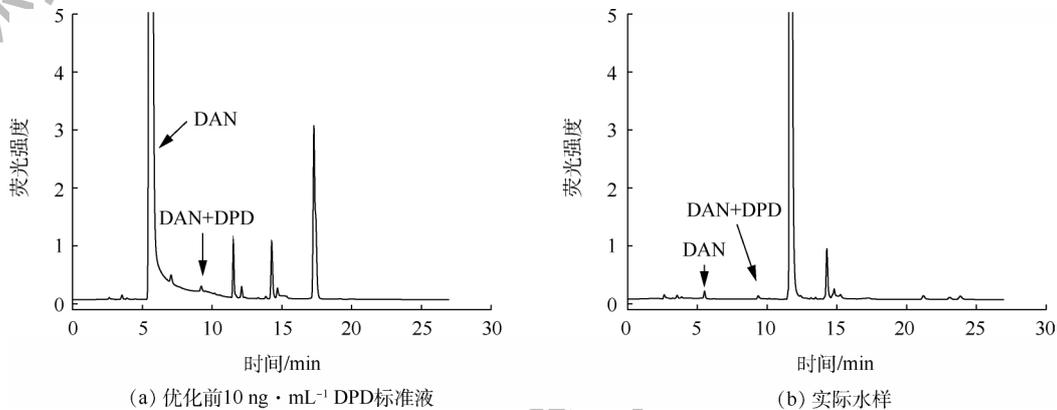
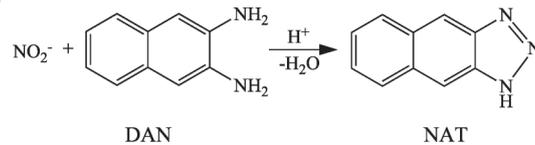


图1 优化前 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ DPD 标准液和实际水样的色谱图

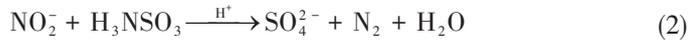
Fig.1 Chromatogram of $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ DPD standard liquid before optimizing and water sample

针对剩余衍生剂 DAN 过多造成 DAN 峰不完整的情况, 对 DPD 与 DAN 衍生化反应进行了优化, 将 $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DPD 标准溶液分别与 4 个不同浓度(100 、 50 、 25 、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 DAN 溶液进行衍生化反应, 结果如图 2 所示。S1 和 S2 样品中 DAN 峰依旧过强, 表明 DPD 与 DAN 的反应比例过小; 而 S4 样品中 DAN 的峰面积过小, 无法保证体系中的 DPD 能完全反应; S3 样品的结果最理想。因此, S3 样品中 DPD 与 DAN 的反应比例, 即浓度比 1:50, 为衍生化反应的最佳比例。

2.2 掩蔽剂及其用量的确定

针对实际水样中 NO_2^- 的干扰, 需要在衍生化反应之前, 对 NO_2^- 进行掩蔽。本实验选用氨基磺酸作为 NO_2^- 的掩蔽剂(化学反应式如式(2)所示), 并对掩蔽剂的加入量进行了优化。将 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DPD 标准

溶液与 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NO}_2^-$ 溶液混合作为水样, 分别与4个不同浓度 ($0, 2, 10, 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的氨基磺酸溶液发生掩蔽反应, 再与 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DAN 溶液进行衍生化反应。对不同浓度掩蔽剂下, DAN 及 DPD 衍生化产物峰面积的大小进行比较。



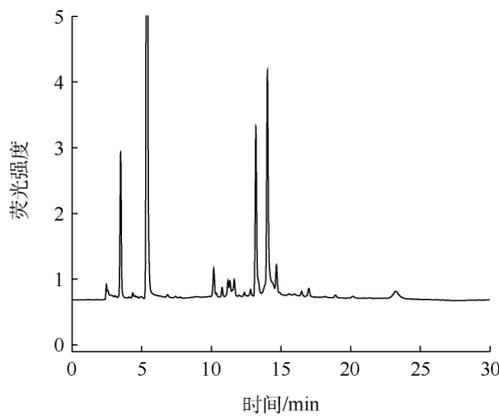
如图3所示, Y1样品(氨基磺酸的加入量为 $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的色谱图只在 11 min 左右出现了一个峰, 表明水样在未对 NO_2^- 进行掩蔽的情况下, 所有的 DAN 都与 NO_2^- 发生了反应。而在加入掩蔽剂对 NO_2^- 进行掩蔽的情况下, Y2、Y3、Y4样品的色谱图在 5 min 及 8 min 前后均出现了峰形完整的峰, 表明 Y2、Y3、Y4 样品体系中 NO_2^- 的干扰得到了掩蔽。相较于 Y2 样品, Y3 样品检测出的亚硝酸盐与 DAN 的反应产物的量更少, Y4 与 Y3 样品检测出的亚硝酸盐与 DAN 的反应产物的量相差不大, 但 Y3 样品中所加入的掩蔽剂的量更少。综上所述, Y3 样品中氨基磺酸的用量 ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 最佳, 起到的掩蔽效果最好。

2.3 固相萃取与色谱条件优化

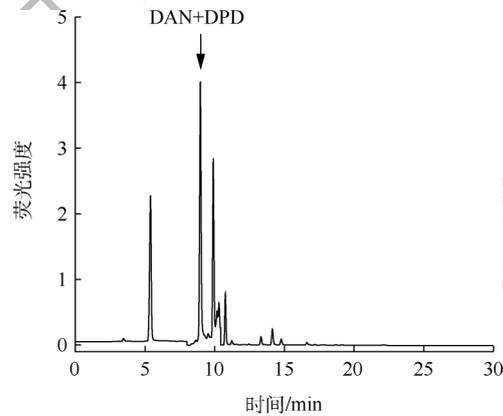
经过上述优化, 能够对 AI-2 浓度高于 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品进行定量分析, 但对于浓度低于 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品仍不能有效检出。因此, 需要对衍生化后水样进行固相萃取富集浓缩, 提高检测的灵敏度。对于富集过程中某些干扰物, 如腐殖酸的杂峰干扰, 可通过调整液相色谱仪的 PMT 增益值予以消除(图4)。经过固相萃取和色谱条件优化后, 本方法能够准确测定实际水样中痕量 AI-2 浓度。

2.4 线性关系与检出限

配制6个浓度梯度 ($0, 1, 10, 50, 100, 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 DPD 标准溶液进行衍生化反应和上机分析。以信号峰(保留时间为 9 min)峰面积为横坐标, DPD 浓度为纵坐标, 绘制标准曲线(如图5所示)。结果表明, 在 $1 \sim 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 浓度与其对应的信



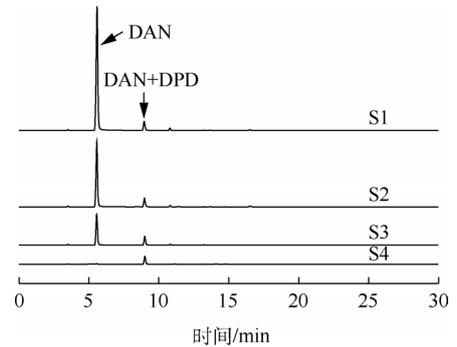
(a) 色谱条件优化前



(b) 色谱条件优化后

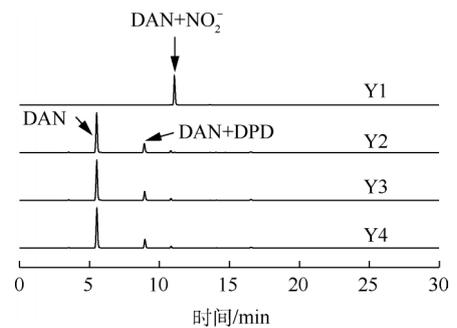
图4 固相萃取与色谱条件优化后色谱图

Fig.4 Chromatogram of samples after SPE and operating conditions optimization



注: S1、S2、S3、S4 中 DPD 浓度均为 $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, DAN 浓度分别为 $100, 50, 25, 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

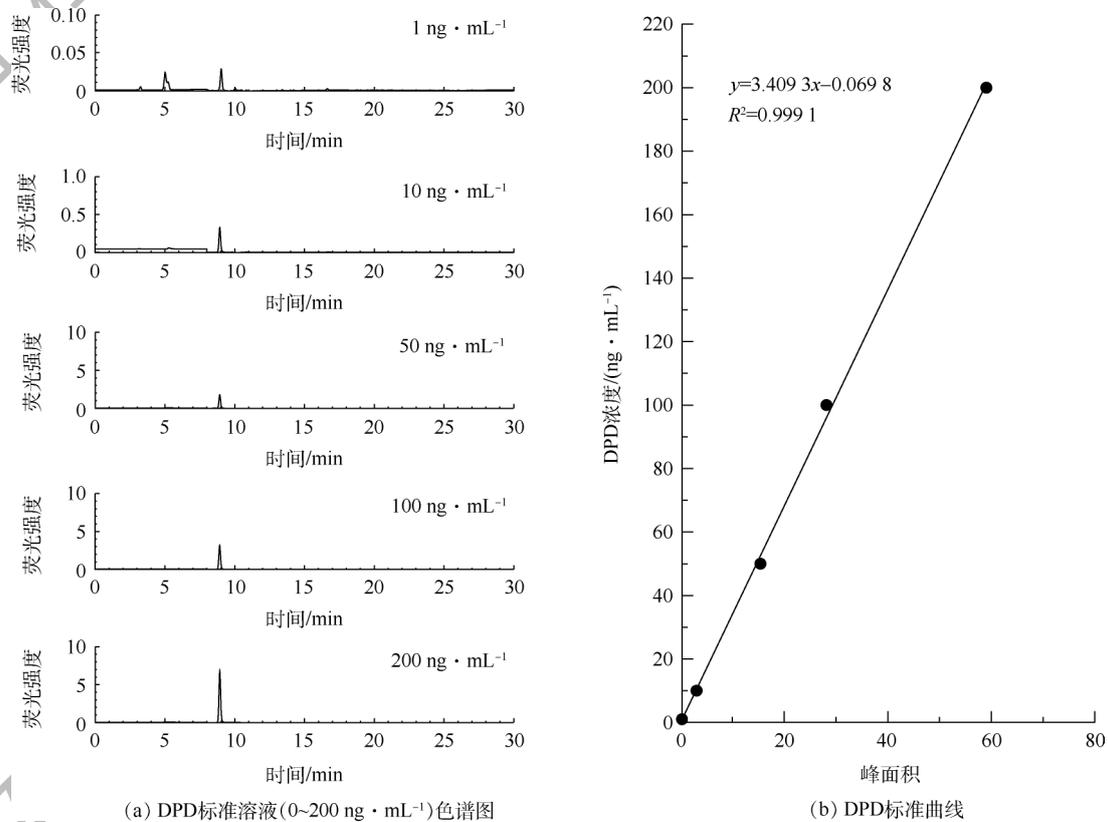
图2 不同 DPD 与 DAN 反应比例的色谱图
Fig.2 Chromatogram of DPD reacted with different proportion of DAN



注: Y1、Y2、Y3、Y4 中掩蔽剂氨基磺酸的加入量分别为 $0, 2, 10, 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

图3 不同掩蔽剂加入量的色谱图
Fig.3 Chromatogram of sample with different masking agent addition

号峰峰面积有较好的线性关系, 回归系数 $R^2=0.9991$, 检出限为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



(a) DPD标准溶液(0~200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)色谱图

(b) DPD标准曲线

图5 DPD标准溶液(0~200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)色谱图与DPD标准曲线

Fig.5 Chromatogram of DPD standard solution(0~200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)and standard curve of DPD

2.5 方法的准确度和精密度

为了确定本方法的准确度和精密度, 分别向纯水和实际水样(厌氧氨氧化反应器出水)中添加0.1、0.5、 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的DPD标准溶液, 对低、中、高3个加标水平进行平行测量3次, 并根据峰面积计算回收率, 如表2所示。可以看出, 信号分子AI-2的平均加标回收率为55.08%~59.25%, 相对标准偏差为2.98%~10.41%, 表明该方法的准确度及精密度较高, 测试结果较可靠。

表2 加标回收率与相对标准偏差

Table 2 Recovery and relative standard deviation

加标样品	加标 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液		加标 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液		加标 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液	
	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
纯水	64.33	2.32	67.28	4.09	65.16	2.97
实际水样	55.08	5.74	59.25	10.41	56.96	2.98

2.6 生物脱氮工艺中AI-2分析

利用前述所建立的柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱荧光检测法对稳定运行的4个生物脱氮反应器(5 L的UASB反应器、1 L的UASB反应器、SBR及IFAS反应器)中的信号分子AI-2的浓度进行了检测, 结果如图6所示。4个反应器的出水中均含有不同浓度的信号分子AI-2, 且颗粒污泥中信号分子AI-2的浓度($0.97 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)要明显高于絮体污泥($0.15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。由此表明, 信号分子AI-2介导的群体感应系统广泛存在于生物脱氮工艺中, 且AI-2浓度与反应器中污泥的形态有关。信号分子AI-2能够促进菌群

之间的交流,分泌胞外聚合物(EPS),促使细菌细胞吸附聚集生长,进而促进污泥颗粒化。

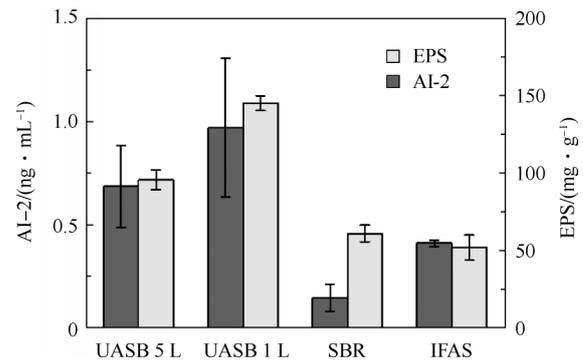
3 结论

1) 建立了测定实际水样中痕量信号分子 AI-2 的柱前衍生-固相萃取-高效液相色谱荧光检测法。通过对检测条件的优化,能够避免 NO_2^- 对方法的干扰,实现准确高效地对实际水样中痕量 AI-2 进行定量检测。

2) 利用该方法对稳定运行的 4 个生物脱氮反应器出水中的 AI-2 浓度进行了检测,证明了生物脱氮工艺中信号分子 AI-2 介导的群体感应系统的存在,为今后污水生物处理工艺中 AI-2 介导群体感应的研究提供了有效分析方法。

参考文献

- [1] MILLER M B, BASSLER B L. Quorum sensing in bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2001, 55(1): 165-199.
- [2] 叶姜瑜, 谭旋, 吕冰, 等. 细菌群体感应现象及其在控制膜生物污染中的应用[J]. 环境工程, 2013, 31(S1): 196-199.
- [3] 李松亚, 费学宁, 焦秀梅, 等. 废水处理中群体感应调控行为研究进展[J]. 应用生态学报, 2018, 29(3): 1015-1022.
- [4] 温晓芳, 黄俊生. 细菌的群体感应及其信号分子[J]. 华南热带农业大学学报, 2005, 11(1): 31-35.
- [5] TAN C H, KOH K S, XIE C, et al. The role of quorum sensing signalling in EPS production and the assembly of a sludge community into aerobic granules[J]. ISME Journal, 2014, 8(6): 1186-1197.
- [6] DE C H, DEFOIRDT T, VANHAECKE L, et al. Long-chain acylhomoserine lactones increase the anoxic ammonium oxidation rate in an OLAND biofilm[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2011, 90(4): 1511-1519.
- [7] XIONG Y, LIU Y. Essential roles of eDNA and AI-2 in aerobic granulation in sequencing batch reactors operated at different settling times[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2012, 93(6): 2645-2651.
- [8] CHEN X, SCHAUDER S, POTIER N, et al. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron [J]. Nature, 2002, 415(6871): 545-549.
- [9] XIONG Y, LIU Y. Essential roles of eDNA and AI-2 in aerobic granulation in sequencing batch reactors operated at different settling times[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2012, 93(6): 2645-2651.
- [10] TAN C H, KOH K S, XIE C, et al. The role of quorum sensing signalling in EPS production and the assembly of a sludge community into aerobic granules[J]. ISME Journal, 2014, 8(6): 1186-1197.
- [11] VILCHEZ R, LEMME A, THIEL V, et al. Analysing traces of autoinducer-2 requires standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 387(2): 489-496.
- [12] 燕彩玲, 李博, 顾悦, 等. 信号分子 AI-2 的检测方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1333-1338.
- [13] BASSLER B L, GREENBERG E P, STEVENS A M. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(12): 4043-4045.
- [14] ZHU J G, PEI D H. A LuxP-based fluorescent sensor for bacterial autoinducer II[J]. ACS Chemical Biology, 2008, 3(2):



注: UASB5 L、UASB1 L、SBR、IFAS 分别表示 5 L UASB 反应器、1 L UASB 反应器、SBR 及 IFAS 反应器。

图6 不同生物脱氮反应器中信号分子 AI-2 及胞外聚合物(EPS)浓度

Fig.6 Concentration of AI-2 and EPS in different types of biological reactors

110-119.

- [15] CAMPAGNA S R, GOODING J R, MAY A L. Direct quantitation of the quorum sensing signal, autoinducer-2, in clinically relevant samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(15): 6374-6381.
- [16] THIEL V, VILCHEZ R, SZTAJER H, et al. Identification, quantification, and determination of the absolute configuration of the bacterial quorum-sensing signal autoinducer-2 by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *ChemBioChem*, 2010, 10(3): 479-485.
- [17] SONG X N, QIU H B, XIAO X, et al. Determination of autoinducer-2 in biological samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using pre-column derivatization[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1361: 162-168.
- [18] 单瑶瑶, 邱秀文, 周桂香, 等. 活性污泥胞外聚合物提取方法比较研究[J]. *九江学院学报(自然科学版)*, 2016, 33(4): 5-8. (本文编辑: 金曙光, 郑晓梅, 张利田)

Detection of AI-2 signal molecules of quorum sensing in biological nitrogen removal processes by pre-column derivatization-solid phase extraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detector

HUANG Xiaoyu¹, TAN Bingyan¹, LI Chunfeng¹, CHEN Yujia¹, WEI Tong¹, RONG Hongwei^{1,2},
CHU Zhaorui^{1,2,*}

1. School of Civil Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Engineering Research Center for Water Quality Safety and Pollution Control, Guangzhou 510006, China

* Corresponding author, E-mail: zrchu@gzhu.edu.cn

Abstract To reveal the mechanism of quorum sensing in biological nitrogen removal processes, a method using pre-column derivatization, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD) was established for quantitation of AI-2 signal molecules. The samples collected from the reactor and filtered through 0.45 μm filter membrane, then were reacted with amino-sulfonic acid to mask nitrite and derived with 2,3-diaminonaphthalene(DAN). The derived products were extracted and concentrated by solid phase extraction (SPE), and then determined by HPLC (C18 column, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) with fluorescence detector (excitation wavelength and emission wavelength were 271 nm and 503 nm, respectively). Gradient elution was carried out by acetonitrile and water (containing 0.1% formic acid) as mobile phases. The results presented an excellent linearity with the concentration ranging from 1 to 200 ng \cdot mL⁻¹, and the detection limits were 1 ng \cdot mL⁻¹. The recovery ratio of sample ranged from 55.08% to 59.25%, with the relative standard deviations of 2.98% to 10.41%, respectively. This method provided an effective analytical method for quantitation of trace signal molecule AI-2 in biological nitrogen removal processes.

Keywords biological nitrogen removal; quorum sensing; autoinducer-2; high-performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD)