

废水中苯胺的好氧共代谢降解实验研究

李 剑

谢春娟

(上海大学环境与化学工程学院环境污染与健康研究所, 上海 200072) (兰州交通大学环境与市政工程学院, 兰州 730070)

摘 要 微生物共代谢是废水中难降解性有机物生物降解的重要方式。比较了在以苯胺溶液作为惟一碳源与能源和有共代谢底物存在下苯胺的降解过程。结果表明, 共代谢显著地提高了苯胺的降解率, 在 32 ℃ 恒温条件下、利用葡萄糖作生长基质、且与苯胺的质量比为 1:6、72 h 后, 苯胺的降解率最高可达 75.6%。再加入蛋白胨做氮源后, 苯胺的降解率可提高到 82.9%, COD 的去除率达 55.4%。

关键词 苯胺 好氧共代谢 碳源 氮源 生物降解

中图分类号 X703 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2007)06-0051-05

Study on aerobic co-metabolism biodegradation of aniline in wastewater

Li Jian

(Research Institute of Environment Pollution and Health, School of Environmental and Chemical Engineering,
Shanghai University, Shanghai 200072)

Xie Chunjuan

(College of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070)

Abstract The microorganism co-metabolism is an important mode of biodegradation that can metabolize the difficult-to-degrade organic matters in wastewater. This study compared the degradation process of aniline as sole source of carbon and energy and co-metabolism degradation process of aniline. The experimental result reveals that the degradation ratio of aniline can be enhanced markedly in the co-metabolism processes. The degradation rate of aniline can reach at 75.6% after 72 hours under the following conditions: constant temperature of 32 ℃, using glucose as growth matrix, and its mass proportion with aniline is 1:6. After using peptone as the source of nitrogen, the degradation rate of aniline and the removal rate of COD reach 82.9% and 55.4% respectively.

Key words aniline; aerobic co-metabolism; source of carbon; source of nitrogen; biodegradation

苯胺是一类广泛存在于环境中的难生物降解的有机污染物。它具有长期残留性、生物蓄积性、致癌性等特点, 被美国 EPA 列为优先控制的 129 种污染物之一^[1]。目前, 对苯胺的去除主要采用物化法, 而用生物法高度净化苯胺方面的研究还鲜有报道。

微生物共代谢是利用微生物降解难降解有机物的一种重要方式, 现指原本不能或不易被代谢的物质在外界提供碳源和能源的情况下被代谢的现象^[2]。其中外界提供的碳源物质称为第一基质, 也叫生长基质, 用于给微生物细胞活动提供能量。被共代谢的物质称为第二基质, 即目标污染物, 不用于微生物细胞的生长, 也不能为微生物细胞活动提供能量。这一现象最早由 Leadbetter 和 Foster 于 1959 年提出, 他们在研究中发现, 甲烷产生菌 *P. methanica* 能够将乙烷氧化成乙醇、乙醛而不能利用乙烷作

为生长基质的现象, 并将这一现象称为共氧化^[3]。本文主要以苯胺为第二基质, 研究了不同碳源和实验条件下, 微生物共代谢在好氧条件下对其降解情况, 并初步探讨了氮源对共代谢去除苯胺的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本试验菌群来源于: 兰州交通大学某花卉培养基地内肥沃土壤、兰州交通大学后果园中的肥沃土壤和兰州交通大学化工学院某实验室的活性污泥。实验对 3 种菌群样品采用平行实验, 对 3 种样品编号依次为 A、B、C。

收稿日期: 2006-08-13; 修订日期: 2006-11-06

作者简介: 李剑(1980~), 男, 博士研究生, 主要从事环境有机污染物监测研究。E-mail: lijian_666@126.com

供试废水来源:采用实验室配制的模拟苯胺废水并加入了少量无机营养物质,其中苯胺浓度为 20 mg/L, NaCl 和 KH_2PO_4 浓度为 0.5 mg/L, 用 NaOH 调节 pH 至 6.0。

实验主要仪器:THZ-82 恒温振荡器、HH. S21-6 电热恒温水浴锅、UV-7500 型紫外分光光度计、VIS-723G 可见分光光度计、80-1 离心沉淀机。

1.2 研究方法

1.2.1 菌群驯化

以苯胺为惟一碳源和能源的培养,具体做法为:取 250 mL 三角瓶,向内投入 1 g(湿重)新鲜的菌群样品,用蒸馏水稀释至 100 mL 后加入少量的模拟苯胺废水, pH 调至 6.0, 放入恒温振荡器中培养, 培养温度:30 ℃, 摇床转速:130 r/min, 培养时间:3 d。而后补足损失掉的水分,加大苯胺废水的投加量,如此反复驯化 1~2 个月,直到瓶内生长出较多的微生物以及三角瓶苯胺的累计降解率提高不大为止。

共代谢降解,即加入易降解的有机物做生长基质,以苯胺为目标污染物。具体做法为:选出驯化好的菌群培养液吸取分别 2 mL 加入到已知浓度苯胺溶液的三角瓶中,同时加入不同的碳源物质后恒温振荡培养 3 d。期间检测微生物的生长量与苯胺的去除率。

1.2.2 测定方法

微生物的生长量测定^[5]:采用在 660 nm 处测量它的光密度($\text{OD}_{660\text{ nm}}$)值(表示菌群的生长量)。

苯胺的测定:取降解后的培养液 2 mL 放入 3000 r/min 的 80-1 离心沉淀机中离心 30 min 后取上清液,调节 pH 至 6.0 后于 UV-7500 型紫外分光光度计 230 nm^[4]处测定其吸光度值,推算出苯胺去除率。

2 结果与讨论

2.1 菌群的驯化及生长情况

菌群的驯化:本实验对 3 种菌群样品进行同时驯化,以苯胺为唯一碳源和能源。培养每 3 d 补充水分一次并相应增加浓度为 20 mg/L 的苯胺溶液的投加量(苯胺初始投加量为 0.4 mL,而后每次增加 0.2 mL),其他实验条件:pH 6.0, 培养温度 30 ℃, 摇床转速 130 r/min,驯化结果如图 1 所示。

由图 1 可以看出,对于样品 A、B 驯化过程较为相似,在 1 个月后,对苯胺的累计去除率达到较稳定状态,且去除率较低。样品 C 在一开始(10 d 内)对

苯胺的去除率较 A、B 的低,但它在 27 d 左右即达到

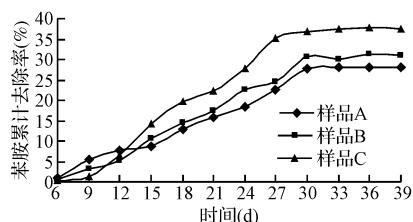


图 1 菌群驯化实验

Fig. 1 Experiment on acclimation of microorganism

相对稳定的状态而且对苯胺的去除率累计去除率较高,三角瓶内较为浑浊。不管从微生物的生长量和对苯胺的去除率来看,样品 C 均比样品 A、B 好,故后续实验均以样品 C 为研究对象,驯化好的样品 C (36 d 后)培养液暂时称为 WN-12。

WN-12 生长曲线的绘制:取 WN-12 培养液 2 mL 放入相应的苯胺溶液中,30 ℃、130 r/min 恒温振荡培养,时间为横坐标,每 6 h 取样一次,测量它的 OD 值(表示 WN-12 的生长量)及苯胺的去除率,做纵坐标。实验结果如图 2 所示。

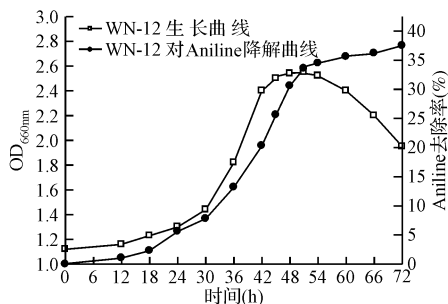


图 2 WN-12 生长曲线及其对苯胺的降解

Fig. 2 Growth curves and biodegradation of aniline by WN-12

我们都知道微生物的生长大致分为 4 个阶段:适应期、对数生长期、静止期和衰老期。由图 2 可以看出 WN-12 对苯胺溶液的适应期较长达 30 h,此时苯胺的去除率也很低,都在 10% 以下。此后进入对数生长期 30~42 h,在此期间苯胺的降解速率也大大提高,降解率达到 30% 左右,这正好与微生物的迅速繁殖相吻合。静止期和衰老期都较短,在此期间,苯胺的去除率也有所提高但幅度不大。由此可知在以苯胺为惟一碳源和能源的环境中,WN-12 对它降解的速率最高的时间段为对数生长期 30~42 h。

2.2 外加不同碳源对 WN-12 共代谢降解苯胺的影响

取 WN-12 培养液 2 mL 分别放入 5 个装有 100 mL 浓度为 20 mg/L 的模拟苯胺废水的三角瓶中,同时加入 4 种配置好浓度为 20 mg/L 的碳源物资溶液后恒温振荡培养 3 d 后,吸取培养液 2 mL 加入到新的苯胺和碳源溶液中,如此反复 3~6 次直到富集产生出较多的既能代谢转化生长基质又能代谢转化目标污染物的非专一性的关键酶为止,其控制方法为:测试培养液中苯胺是否能在短期内有较明显的降解。本实验期富集共 5 次达到了较好的去除效果,期间每 6 h 测定一次苯胺浓度,算出去除率。实验条件如表 1 所示,实验结果如图 3 所示。

表 1 不同碳源共代谢实验

Table 1 Experiment of co-metabolism with different sources of carbon

编号	1	2	3	4	5
碳源种类	淀粉	蔗糖	果糖	葡萄糖	苯胺对照
投加量 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	
其他条件:培养温度:30 ℃,摇床转速:130 r/min, pH:6.0					

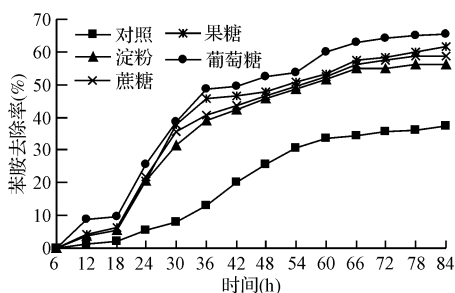


图 3 不同 C 源共代谢实验

Fig. 3 Effects of different sources of carbon on co-metabolism

由图 3 可知,加入不同碳源对 WN-12 的共代谢作用虽然有不同,但总的来说对苯胺的降解率较以苯胺为惟一碳源和能源的降解率有明显的提高。就 WN-12 的共代谢降解苯胺来说,葡萄糖作为生长基质效果最好,其次为果糖、蔗糖、淀粉。这可能与它们的物质结构有关,淀粉为多糖结构,蔗糖为双糖结构,而葡萄糖和果糖都是单糖结构。在作为生长基质时,单糖容易被较少的酶分解,从而容易被微生物利用,而多糖和双糖结构相对复杂,则需要更多的酶合作才能彻底分解和被微生物利用,这也可能是在培养初期 0~18 h 内,在葡萄糖作为碳源的培养液

中苯胺的降解率最高的原因了。

由图 2 分析可知:以苯胺为惟一碳源和能源时,WN-12 对它降解的最佳时间为生长期的 30~42 h 内,而由图 3 可以看出,加入共代谢生长基质后,其对苯胺的降解最佳时间已提前到 18~36 h,这可能是由于加入共代谢生长基质为微生物提供了较充足的碳源和能源,使其得以大量增殖,并使得分解苯胺的关键酶保持了较高的活性,故在共代谢早期对苯胺的去除率就达到了较高的水平,这大大节省了处理时间,从而节约了处理成本。

共代谢过程中的关键酶在生长基质的诱导下产生,它缺乏专一性,为生长基质和目标污染物所共有,所以竞争是不可避免的^[2]。过高比例的生长基质或目标污染物的存在都会影响整个共代谢的进行,故作者以葡萄糖作为生长基质,研究了与苯胺不同质量比例下的共代谢,其主要实验条件:培养温度 30 ℃,培养时间 72 h,摇床转速 130 r/min, pH 6.0 (注:配制不同比例时每个三角瓶中培养液的模拟苯胺废水浓度保持不变),实验结果如图 4 所示。

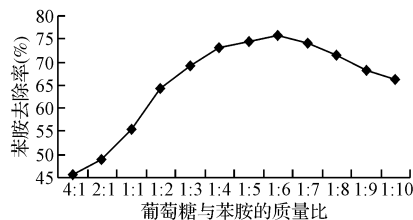


图 4 不同比例葡萄糖共代谢实验

Fig. 4 Effects of different proportions of glucose on co-metabolism

结果表明:不同葡萄糖与苯胺质量比对微生物共代谢去除苯胺的效果不同。由图 4 可知,过多或过少的生长基质都会降低苯胺的去除效果,当它们的比例接近 1:6 时,苯胺的去除率最高,达到 75.6%。这是由于当生长基质过多时,苯胺对关键酶的争夺处于劣势,当生长基质过少时,又满足不了大量微生物生长的需要,诱导不出大量有活性的关键酶。当比例接近 1:6 时,生长基质和目标污染物对关键酶的分享达到最为合理,既满足了微生物生长的需要,又能最大限度地降解目标污染物。故葡萄糖共代谢降解苯胺中,葡萄糖与苯胺最佳质量比约为 1:6。

2.3 温度对 WN-12 共代谢降解苯胺的影响

为了考察温度对 WN-12 共代谢降解苯胺的影

响,我们将其置于不同温度的水浴中恒温培养,以葡萄糖为外加碳源,其具体实验条件见表2,实验结果如图5所示。

表2 不同温度下的共代谢实验
Table 2 Experiment of co-metabolism
at different temperatures

编号	培养温度(℃)	培养时间(h)	葡萄糖与苯胺质量比
1	20	72	1:6
2	24	72	1:6
3	26	72	1:6
4	28	72	1:6
5	30	72	1:6
6	32	72	1:6
7	34	72	1:6
8	36	72	1:6
9	38	72	1:6
10	40	72	1:6
11	45	72	1:6
12	50	72	1:6

由图5可知,当温度在20~50℃变化时,WN-12共代谢对苯胺降解率有很大的变化,当温度继续提高或降低时,苯胺降解率迅速下降。这可能是因为在过低的温度下微生物代谢活动减弱甚至停止繁殖,分解苯胺的关键酶活性浓度不够或活性极低,不利于苯胺的降解;而当温度过高时,组成关键酶的蛋白质遭到破坏或凝固,严重干扰了微生物新陈代谢,甚至导致微生物死亡。而最佳的培养温度接近驯化培养时的温度,由图5可以看出为32℃。

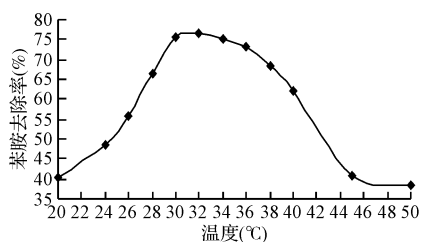


图5 温度对共代谢效果的影响

Fig.5 Effects of different temperatures on co-metabolism

2.4 外加蛋白胨氮源对 WN-12 共代谢降解苯胺的影响

凡是能供微生物细胞生长和代谢的氮素营养物质,称为氮源。在微生物细胞组成中,氮是不可缺乏的,各种酶及核酸,蛋白质的产生均需要氮元素,因为它是构成蛋白质和核酸的主要部分,它对微生物的生长发育有重要的作用。本实验为了研究氮源对

WN-12 共代谢降解苯胺的影响,选用了实验室常见的蛋白胨做氮源,并配置成20 mg/L溶液备用。采用恒温振荡培养72 h,其实验条件按最佳条件进行,实验结果如图6,图7所示。

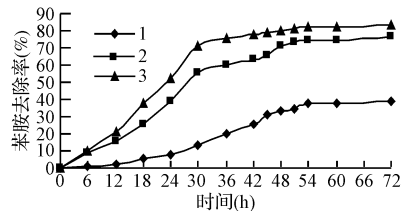


图6 蛋白胨对 WN-12 共代谢降解苯胺的影响

Fig.6 Effect of peptone on co-metabolism
degradation of aniline by WN-12

图6中,1、2、3分别代表只加蛋白胨和模拟苯胺废水、葡萄糖和模拟苯胺废水及葡萄糖、模拟苯胺废水和蛋白胨。从图6中可以看出1的效果最差,这是由于氮源虽然对微生物的生长发育有重要的作用,但它主要是合成氨基酸、嘌呤和核苷及一些微生物素,一般不提供能量,WN-12只能利用环境中惟一的碳源苯胺维持生命活动,所以不如2中的共代谢降解效果好。3的效果最好,说明了共代谢不仅需要加入生长基质提供碳源,而且还需要一定的氮源。加入蛋白胨做氮源后,WN-12共代谢对苯胺降解率进一步提高,而且在培养初期(30 h内),对苯胺的降解率就已达到较高水平。

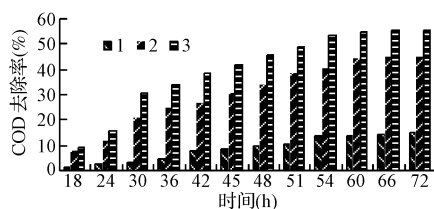


图7 苯胺废水的 COD 去除

Fig.7 Removal of COD in aniline wastewater

由图7可以看出,苯胺废水 COD 的去除规律大致和图6中苯胺的去除率规律相同,但总体去除率不高(最高55.4%),与苯胺最高去除率82.9%相差甚远。由于实验所用苯胺废水是实验室人工配制,只加入少量无机物质,没有加入其他有机化合物,故可以推断,加入蛋白胨做氮源对 WN-12 共代谢降解苯胺有一定的帮助,但对苯胺的降解并不彻底,中间可能生成其他一些更小有机产物,导致 COD 的降解

率并不高。

3 结 论

(1)在以苯胺为惟一碳源和能源的环境中,WN-12 对它降解率较低,72 h 的降解率为 37.5%,其降解速率最高的时间段为对数生长期 30~42 h。

(2)加入外加碳源淀粉、蔗糖、果糖、葡萄糖做碳源后,苯胺的降解的降解率有了明显提高,表现出了 WN-12 共代谢降解苯胺的优越性及广泛性。其中葡萄糖做碳源的共代谢降解苯胺效果最好,72 h 的降解率超过 65%。

(3)共代谢过程要求生长基质与目标污染物保持合适的质量比例,本实验确定葡萄糖与苯胺的最佳质量比为 1:6,经优化后 WN-12 共代谢降解苯胺的去除率可达 75.6%。

(4)温度对 WN-12 共代谢降解苯胺影响较大,过高和过低温度都不利于共代谢作用,其最适合的温度为 32℃。

(5)外加蛋白胨做氮源后,WN-12 共代谢对苯胺降解率进一步提高,而且在培养初期(30 h 内),

对苯胺的降解率就已达到较高水平。72 h 的降解率为 82.9%,但其 COD 的去除率为 55.4%,表明对苯胺的降解并不彻底,中间可能生成其他一些更小有机产物。

参 考 文 献

- [1] Keith L. H., Telliard W. A. Priority pollutants I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.*, **1979**, 13: 416 ~ 423
- [2] Janke D., Fritsche W. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *J. Basic. Microbiol.*, **1985**, 25: 603 ~ 619
- [3] Leadbetter E. R., Foster J. W. Oxidation products formed from gaseous alkane by the bacterium *Pseudomonas methanica*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, 82: 491 ~ 492
- [4] Lyons C. D., Katz S., Bartha R. Mechanisms and pathways of aniline elimination from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1984**, 48(3): 491 ~ 496
- [5] 王家玲. 环境微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, **1986**. 100 ~ 126