

厌氧消化过程中镍及其螯合物的生物可利用性研究

胡庆昊^{1,2}, 李秀芬^{3*}, 陈坚⁴, 韩照祥²

(1. 农业部能源微生物与利用重点实验室, 成都 610041; 2. 淮海工学院化学工程学院, 连云港 222005; 3. 江南大学环境与土木工程学院, 无锡 214122; 4. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

摘要:通过厌氧消化静态实验,研究了不同整合剂存在条件下,产甲烷富集培养物对微量元素镍及其螯合物的生物吸收。结果表明,整合剂的种类对厌氧消化有着一定影响。在乙酸钠浓度为 85 mmol/L, 硫化物浓度为 1 mmol/L, 消化温度为 35℃, 镍离子浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 氨三乙酸(NTA)的添加体系中甲烷产量最高, 分别比柠檬酸(CA)、乙二胺四乙酸(EDTA)添加体系高出 15% 和 9%。而当镍离子浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 氨三乙酸的添加体系中甲烷产量分别比 CA、EDTA 添加体系高出 43% 和 57%。产甲烷富集培养物对镍的生物吸收与镍的螯合物形态有着密切关系。NTA 最易促进生物吸收, EDTA 次之, 而 CA 对镍的生物吸收促进作用最小。

关键词:厌氧消化; 甲烷; 金属离子螯合剂; 镍; 生物吸收

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)02-0515-05

Bioavailability of Nickel and Its Complexes During Anaerobic Digestion

HU Qing-hao^{1,2}, LI Xiu-fen³, CHEN Jian⁴, HAN Zhao-xiang²

(1. Key Laboratory of Energy Sources Microbe and Utilization, Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China; 2. School of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. National Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The biouptake of nickel and its complexes for methanogenic enrichment in the presence of different chelators during batch methane fermentation were investigated in this paper. The results showed that the chelators had obvious effects on anaerobic digestion. At sodium acetate concentration of 85 mmol/L, sulfides concentration of 1 mmol/L, nickel concentration of 200 $\mu\text{mol/L}$ and temperature was 35℃, methane production in the NTA added system were 15% and 9% which was higher than that in CA and EDTA amended ones. While nickel concentration was 100 $\mu\text{mol/L}$, methane production in NTA added system were 43% and 57% which was higher than that in CA and EDTA amended ones. The biouptake of nickel for methanogenic enrichment related to the species of nickel complexes. NTA was the best chelator for stimulating nickel biouptake in the anaerobic reactors, and EDTA was the better one. The biouptake of Ni-CA complexes was the minimum for the methanogenic enrichment.

Key words: anaerobic digestion; methane; metal ion chelators; nickel; biouptake

微量元素在甲烷发酵过程中具有重要作用。研究表明^[1-6], 向厌氧生物反应器中添加适量的微量元素对甲烷发酵起着促进作用。产甲烷菌的细胞合成需要微量元素, 另外, 产甲烷菌的生物代谢过程中, 需要一系列的酶参与^[7], 如镍是辅酶 F₄₃₀ 的重要成分, 而辅酶 F₄₃₀ 是催化甲烷最终形成的甲基辅酶还原酶的重要组分^[8]。因此, 厌氧消化反应过程中, 产甲烷菌若不能摄入适量的微量元素, 将会导致代谢活力降低, 进而影响整个消化反应过程的进行。但长期以来, 研究多集中在微量元素的添加种类、添加方法与添加量等方面^[9-15], 很少涉及微量元素的形态与产甲烷菌的生物摄取的关系。作者前期研究表明^[16], 通过添加合适的整合剂, 可以改变微量元素的形态, 避免微量元素沉淀物在反应器中的形成, 从而促进甲烷发酵。本实验以微量元素镍为研究对

象, 通过添加不同种类的整合剂, 探索厌氧消化过程中微量元素镍的形态与其生物可利用性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 模拟废水

实验用水为人工配制的模拟废水, 其组成如表 1 所示, 微量元素配方如表 2 所示^[3]。每 L 模拟废水中加入 1 mL 微量元素溶液。

镍离子的添加设置 3 个浓度: 100、200、300

收稿日期: 2010-01-29; 修订日期: 2010-06-24

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2009652); 农业部能源微生物与利用重点实验室开放基金项目(004); 连云港市社会发展计划项目(SH0921, SH0809)

作者简介: 胡庆昊(1974~), 男, 博士, 主要研究方向为废水处理与资源化, E-mail: huqinghaohu@sina.com

* 通讯联系人, E-mail: xfli@jiangnan.edu.cn

表 1 人工模拟废水的组成

Table 1 Components of synthetic wastewater							
组成成分	CH ₃ COONa	NH ₄ Cl	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	MgCl ₂	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Na ₂ S
浓度/mmol·L ⁻¹	85	3.7	0.5	0.5	0.5	0.89	1.0

表 2 微量元素溶液的组成

Table 2 Components of the trace element solution			
酸性微量元素溶液		碱性微量元素溶液	
成分	浓度/mmol·L ⁻¹	成分	浓度/mmol·L ⁻¹
FeCl ₂ ·4H ₂ O	7.5	Na ₂ SeO ₃	0.1
ZnCl ₂	0.5	Na ₂ WO ₄	0.1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.1
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	NaOH	10
CoCl ₂ ·6H ₂ O	8.5		
H ₃ BO ₃	1.0		
HCl	50		

μmol/L. 同时分成 3 组进行实验,第 1 组,加入柠檬酸;第 2 组,加入氨三乙酸;第 3 组,加入 EDTA,根据镍离子的浓度,分别调整螯合剂的浓度(由软件 Visual MINTEQ 计算得到),使得溶液体系中自由态的镍离子浓度均为1 μmol/L.

1.2 产甲烷富集培养物

种泥取自无锡太湖啤酒厂的废水处理厌氧段,pH 为 7.2,VSS/TSS 为 0.72,获得的污泥继续在不含镍的合成培养基中富集培养,培养基成分同人工模拟废水. 转移培养 3 次,获得产甲烷富集培养物. 用去离子水洗涤 5 次. 取样采用 Stover 等^[17]的六步抽提法测其内部的镍含量作为背景值.

1.3 实验方法

厌氧消化实验:实验采用厌氧批式消化,以 125 mL 血清瓶作厌氧消化反应器. 量取一定量 VSS 为 25 g/L 驯化好的厌氧污泥及 100 mL 模拟废水置于

上述血清瓶中,反应瓶中污泥浓度保持为 5 g/L 左右,调节 pH 至 7.0,持续充 N₂ 1~2 min,以排除瓶中空气,迅速用带有出气孔的橡皮塞密封,保持血清瓶厌氧状态,摇动血清瓶使消化液混合均匀,然后置于(35 ± 1)℃ 的恒温室中进行厌氧消化. 实验装置见图 1.

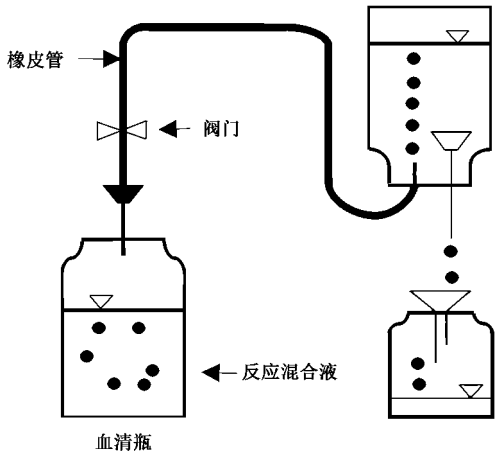


图 1 反应装置

Fig. 1 Schematic of batch experiment set-up

镍的生物吸收测定:实验进行前,所有的仪器均用 1 mol/L 硝酸溶液浸泡过夜,去离子水洗涤后再装样,进行厌氧消化. 待产气完成后,按 Stover 等^[17]的六步抽提法测定富集培养物的生物内部镍含量,扣除背景值,得到产甲烷富集培养物的镍的生物吸收量. 六步抽提测定方法见表 3.

表 3 用于厌氧污泥抽提金属元素不同形态的化学试剂及步骤

Table 3 Sequential chemical procedure used to fractionate metals in anaerobic samples			
组分	抽提试剂	抽提条件	
		振荡时间	温度/℃
可交换态	30 mL KNO ₃ , (1 mol/L, pH 7)	16 h	20
吸附态	48 mL KF (0.5 mol/L, pH = 6.5)	16 h	20
有机结合态	48 mL Na ₄ P ₂ O ₄ (0.1 mol/L)	16 h	20
碳酸盐态	48 mL EDTA (0.1 mol/L, pH = 6.5)	2 × 8 h	20
硫化物态	30 mL HNO ₃ (1 mol/L)	16 h	20
剩余的	10 mL 去离子水和 10 mL 王水 (HCl:HNO ₃ = 3:1)	26 min	微波消解

1.4 分析测定方法

产甲烷量的测定:实验过程中产生的甲烷用装有 2 mol/L NaOH 溶液的液体置换装置测定,定时

记录甲烷的累积产量,直至甲烷累积产量停止增加时,结束实验. 在此期间,为使污泥和基质充分接触,每 12 h 摇动血清瓶 1 次^[18].

金属离子浓度的测定:原子吸收分光光度法测定^[19];pH 测定:精密酸度计法;TSS、VSS 的测定参照标准方法^[19]。

2 结果与讨论

2.1 螯合物存在时添加不同镍离子浓度下的甲烷累积产量

螯合物存在时,添加不同镍离子浓度下的甲烷产量累积曲线如图 2 所示。可以看出,对于 3 种螯合物而言,当镍离子添加浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时

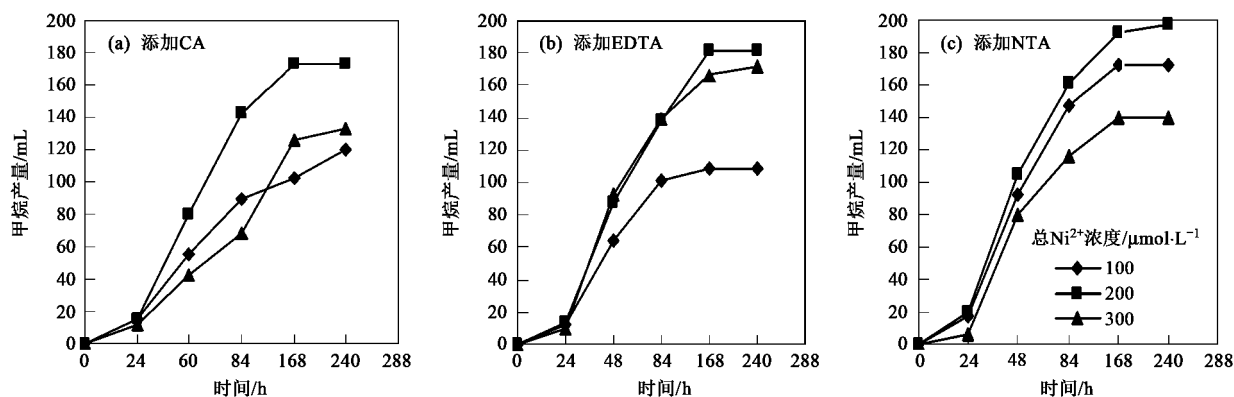
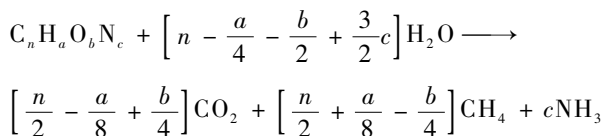


图 2 螯合物存在时不同总镍离子浓度下的甲烷产量累积曲线

Fig. 2 Methane production during the anaerobic conversion of acetate in the presence of Ni complexes

另外一方面,由图 2 可以看出,螯合剂的性能对厌氧产甲烷有着明显影响。镍离子浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,氨三乙酸的添加体系中甲烷产量最高,分别比柠檬酸、乙二胺四乙酸添加体系高出 15% 和 9%。而当镍离子浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,氨三乙酸的添加体系中甲烷产量分别比 CA、EDTA 添加体系高出 43% 和 57%。3 种螯合剂中,EDTA 不易为微生物降解,而 NTA 和 CA 本身是有机物,在厌氧消化过程中可能被微生物降解并产生甲烷。有机物完全降解产生的甲烷体积可以由下式算出^[21]:



因此,理论上,1 $\mu\text{mol/L}$ 的 NTA 完全降解可以产生 2.6 $\mu\text{mol/L}$ 的甲烷,1 $\mu\text{mol/L}$ 的 CA 完全降解可以产生 2.3 $\mu\text{mol/L}$ 的甲烷,1 $\mu\text{mol/L}$ 的 EDTA 完全降解可以产生 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的甲烷;换算成标准状态下,在 100 mL 反应体系中,当 NTA、CA 和 EDTA 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,其完全降解产生的甲烷量分别为 1.16、1.04 和 2.24 mL。因此,可以认为 NTA、CA

甲烷产量和速率均最高,以 NTA 为例,当镍离子添加浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,其甲烷最终产量为 198 mL,分别比镍离子浓度为 100、300 $\mu\text{mol/L}$ 时高出 15% 和 41%。这表明添加适量的微量元素对于促进厌氧消化十分必要。微量元素浓度过低则不能满足微生物生长与代谢需要,镍离子在其浓度过高时,是大分子物质如 RNA 和蛋白合成的潜在抑制剂^[20]。所以过高的镍离子浓度同样会干扰产甲烷菌的生长代谢,使得甲烷产率降低。

和 EDTA 降解产生的甲烷量对体系产气量的增加贡献甚微。尽管 3 种体系中镍离子的自由浓度均为 1 $\mu\text{mol/L}$,但最终甲烷产量的不同揭示了产甲烷菌对镍的生物吸收与镍的螯合物形态有着密切关系。

2.2 不同总镍离子浓度下产甲烷污泥对镍的生物吸收

图 2 表明,即使自由态镍离子浓度一样,甲烷产率及最终产量并不相同。根据自由离子活度模型理论,如果微生物对金属离子的吸收只和自由离子态相关,那么在实验中得出的镍的生物吸收量应该相同。但从图 3 可以看出,镍的生物吸收曲线明显偏离了自由离子活度模型。随着总镍离子浓度的增加,镍的生物吸收量也逐渐增加。在添加 NTA 的厌氧体系中,当镍离子浓度从 100 $\mu\text{mol/L}$ 增加到 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,虽然自由态镍离子浓度均为 1 $\mu\text{mol/L}$,但镍的生物吸收量则从 50 $\mu\text{g/g}$ 增加到 137 $\mu\text{g/g}$ 。自由离子活度模型并不适用。微生物对金属元素的汲取和生物亲和力系数以及生物转化系数有关^[22]。在具有高的生物转化系数,高的生物亲和力常数体系中,微生物会汲取它能利用的自由或者螯合态的金属,因此,微生物对微量金属元素的吸收并不完全

由自由态的金属浓度决定,而是和金属种类、溶液性质、微生物种类等等性质有关. Hudson 等^[23]认为必须的微量营养元素(其生物转化率较高)的生物吸收是由物质输运和吸收动力学所控制,而非必须的营养金属元素吸收则由热力学控制,在金属吸收的动力学受到限制的情况下,金属元素的螯合物不是降低了其生物可利用性,而是增加了金属离子吸收到生物表面的速率,因此增加了其生物可利用性.

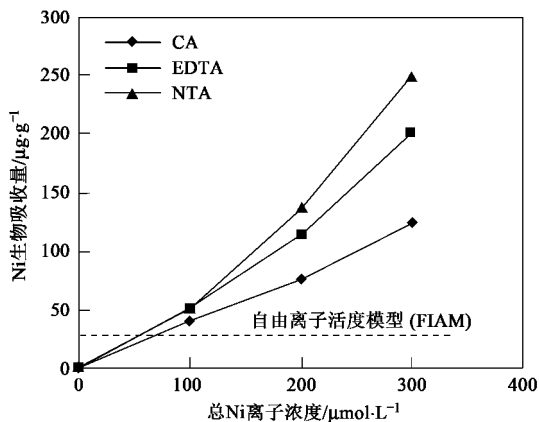
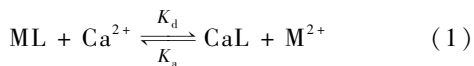


图3 不同总镍离子浓度下产甲烷污泥对镍的生物吸收

Fig. 3 Uptake of nickel by methanogenic biomass as a function of total Ni concentration in the presence of Ni complexes

2.3 镍螯合物的生物吸收机制

图3的结果还表明,即使在总镍离子浓度相同的情况下,螯合剂的性能明显影响着产甲烷菌对镍的生物吸收. 3种螯合剂中,NTA最易促进生物吸收,EDTA次之,而CA与它们相比而言,其对镍的生物吸收促进作用最小. 分析其原因,这是由于三者与镍的螯合物在溶液中分散率不同的缘故. 在溶液体系中,存在以下平衡:



式中, M : 微量金属元素; L : 螯合剂; K_d : 分散速率常数; K_a : 形成速率常数.

而 K_d 可由式(2)求得:

$$K_d = \frac{K_{CaL}}{K_{ML}} K_a \quad (2)$$

式中, K_{CaL} 、 K_{ML} 分别为 Ca 、 M 与 L 的稳定常数.

CaL 的形成与分散速率相比微量元素 Ni 、 Co 的螯合物而言是较快的,因此有^[24]:

$$K_a = K_{M-H_2O} K_{OS} \quad (3)$$

式中, K_{M-H_2O} 是金属的内层脱水速率常数 (s^{-1}); K_{OS} 为常数 [$(nmol/L)^{-1}$].

结合式(2)与式(3),可以计算出溶液中 ML 的最大分散速率 R_{diss} :

$$R_{diss} = \frac{d_{ML}}{dt} = K_d C_{ML} C_{Ca^{2+}} = \frac{K_{CaL}}{K_{ML}} K_{M-H_2O} K_{OS} C_{ML} C_{Ca^{2+}} \quad (4)$$

以总镍离子浓度 $300 \mu mol/L$ 为例, K_{Ni-H_2O} 取值^[24]: $3 \times 10^4 s^{-1}$, K_{OS} 则取值^[25]: $2 (nmol/L)^{-1}$, 根据镍离子、钙离子与不同螯合剂的稳定常数,可求得 R_{diss} , 见表4.

表4 镍与不同螯合剂形成的螯合物的最大分散速率

Table 4 Maximum dissociation rates for nickel complexes

螯合剂	镍螯合物的 稳定常数 K_{NiL}	钙螯合物的 稳定常数 K_{CaL}	R_{diss} / $nmol \cdot (L \cdot h)^{-1}$
CA	6.9	3.6	2.3×10^9
NTA	11.5	6.4	3.6×10^7
EDTA	18.6	10.7	5.6×10^4

由表4看出,镍与CA、NTA、EDTA形成的螯合物具有不同的分散速率. CA由于与镍形成的螯合物不够稳定,因此,其分散速率最大,而在厌氧反应器中,螯合剂的浓度与强度都影响着生物摄取过程. 螯合强度不足,则不能充分螯合金属离子,因此与NTA、EDTA相比,为了维持相同的螯合作用,则需要较高的螯合剂浓度;而高的螯合剂浓度会对产甲烷产生不利影响,所以CA与镍形成的螯合物,其生物吸收量并非最大. 另外螯合强度过强时,螯合物的分散速率则相对较小(如EDTA),此时,微生物主要以摄取 $Ni-EDTA$ 螯合物为主,而微生物对自由离子的吸收要优于螯合态离子^[22],所以对于螯合性能适中的NTA而言,一方面能充分螯合微量元素,另一方面镍和NTA的螯合物又有适宜的分散速率,能够及时向微生物表面输送金属离子,此时,微生物既可吸收自由态离子,又可直接吸收镍和NTA的螯合物,所以添加NTA的系统中镍的生物吸收量最大.

3 结论

(1) 螯合剂的性能对厌氧产甲烷有着明显影响. CA、NTA、EDTA 3种螯合剂中,添加NTA的反应器中甲烷产量最高.

(2) 产甲烷污泥对微量元素镍的生物吸收过程不符合自由离子活度模型,微生物对微量元素镍的吸收并不完全由自由态的金属浓度决定,微量元素镍螯合物的螯合性能与分散速率对产甲烷污泥的生物吸收有着重要影响.

参考文献:

- [1] Patidar S K, Tare V. Effect of nutrients on biomass activity in degradation of sulfate laden organics [J]. *Process Biochemistry*, 2006, **41**(2):489-495.
- [2] Zandvoort M H, Osuna M B, Geert R, *et al.* Effect of nickel deprivation on methanol degradation in a methanogenic granular sludge bioreactor [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, **29**(5):268-274.
- [3] Zandvoort M H, Geerts R, Lettinga G. Methanol degradation in granular sludge reactors at sub-optimal metal concentrations: role of iron, nickel and cobalt [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **33**(2-3):190-198.
- [4] Osuna M B, Iza J, Zandvoort M H. Essential metal depletion in an anaerobic reactor [J]. *Water Science and Technology*, 2003, **48**(6):1-8.
- [5] Sairam M, Singh L, Suryanarayana M V S. Effect of iron, nickel and cobalt on bacterial activity and dynamics during anaerobic oxidation of organic matter [J]. *Water Air and Soil Pollution*, 2000, **117**(1-4):305-312.
- [6] Gonzalez-Gil G, Kleerebezem R, Lettinga G, *et al.* Effects of nickel and cobalt on kinetics of methanol conversion by methanogenic sludge as assessed by on-line CH₄ monitoring [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, **65**(4):1789-1793.
- [7] 尹小波, 连莉文, 徐洁泉, 等. 产甲烷过程的独特酶类及生化监测方法 [J]. *中国沼气*, 1998, **16**(3):8-12.
- [8] Wolfgang G, Felix M, Evert C D, *et al.* On the mechanism of biological methane formation: structural evidence for conformational changes in methyl-coenzyme M reductase upon substrate binding [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **309**(1):315-330.
- [9] 陈朝猛, 曾光明, 张碧波, 等. 城市有机垃圾厌氧消化痕量激活剂的促进作用及产能研究 [J]. *南华大学学报(理工版)*, 2004, **18**(1):12-16.
- [10] 谢金连, 徐龙君, 吴江, 等. 痕量金属对农贸市场废弃物厌氧消化的影响 [J]. *重庆大学学报(自然科学版)*, 2007, **30**(5):23-26.
- [11] 张涵, 李文哲. 微量金属元素添加频率对牛粪厌氧发酵细菌种类的影响 [J]. *农机化研究*, 2006, **6**:25-27.
- [12] 李亚新, 杨建刚. 微量金属元素对甲烷菌激活作用的动力学研究 [J]. *中国沼气*, 2000, **18**(2):8-11.
- [13] 夏青, 任洪强, 丁丽丽, 等. 铜、铈对厌氧颗粒污泥产甲烷的 Hormesis 效应及其动力学研究 [J]. *环境科学学报*, 2007, **27**(8):1233-1237.
- [14] 夏青, 洪宇宁, 任洪强, 等. La³⁺, Ce³⁺ 对厌氧颗粒污泥在不同 VFA 底物中的产甲烷促进效应 [J]. *中国沼气*, 2007, **25**(3):3-6.
- [15] 何荣玉, 袁月祥, 闫志英, 等. 提高沼气产量的外源添加物筛选研究 [J]. *农业工程学报*, 2008, **24**(10):181-185.
- [16] Hu Q H, Li X F, Du G C, *et al.* Enhancement of methane fermentation in the presence of Ni²⁺ chelators [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, **38**(1):98-104.
- [17] Stover R C, Sommers L E, Silvera D J. Evaluation of metals in wastewater sludge [J]. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 1976, **48**(9):2165-2175.
- [18] Patidara S K, Tare V. Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2005, **96**(11):1215-1222.
- [19] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 454.
- [20] Joho M, Imada Y, Murayama T. The isolation and characterization of Ni resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbios*, 1987, **51**(208-209):183-190.
- [21] Parkin G F, Owen W F. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludge [J]. *Journal of Environmental Engineering*, 1986, **112**(5):867-920.
- [22] Herman P V L. Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes [J]. *Environmental Science and Technology*, 1999, **33**(21):3743-3748.
- [23] Hudson R J M, Morel F M M. Trace metal transport by marine microorganisms: implications of metal coordination kinetics [J]. *Deep-Sea Research I: Oceanographic Research Papers*, 1993, **40**(1):129-150.
- [24] Margerum D W, Gayley G R, Weatherburn D C, *et al.* Kinetics and mechanisms of complex formation and ligand exchange [A]. In: Martel A E (Ed). *Coordination Chemistry*, ACS Monograph [M]. Washington: American Chemical Society, 1978.
- [25] Morel F M M, Hering J G. Principles of aquatic chemistry [M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1983.