

聚- β -羟基烷酸薄膜的好氧和厌氧降解*

高海军 陈 坚 吴玉娟 堵国成 伦世仪

(无锡轻工大学生物工程学院环境生物技术研究室, 无锡 214036)

摘要 对聚 β -羟基丁酸(PHB)及 β -羟基丁酸与 β -羟基戊酸的共聚物(PHBV)薄膜和粉膜在好氧污泥和厌氧污泥中的生物降解性进行了研究,并对其降解机制作了初步探讨.结果表明:污泥中的微生物可以利用 PHB(V)作为唯一碳源生长繁殖;PHB 的降解能力比 PHBV 的高;不同 pH、温度对污泥中微生物降解 PHB(V)的能力有着不同的影响;制品形态,特别是添加量,与降解率有很大关系,添加量越大降解率越高.

关键词 聚 β -羟基丁酸, β -羟基戊酸, 共聚物, 污泥, 生物降解性.

对于聚 β -羟基烷酸(Poly- β -Hydroxyalkanoates, PHAs)的生物降解性,已有许多人针对某些微生物通过分离和提取这些微生物产生的胞外降解酶来进行研究(如巨大芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)和深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)^[1], 粪产碱杆菌(*A.faecalis*)^[2], 假单胞菌(*Pseudomonas lemoignei*)^[3]等),并对降解机制作了探讨,但 PHAs 在混合微生物菌群中的生物降解性的报道甚少.本研究采用 PHB、PHBV 薄膜和粉末,分别考察了这些不同形态的 PHB 和 PHBV 制品在好氧和厌氧微生物中的生物降解情况,初步探讨了一些环境条件对其降解的影响.研究结果将有助于开展对 PHAs 制品生物降解性的评价工作,从而促进进一步开展生物可降解塑料的研究与应用.

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1) PHAs 来源 PHB, PHBV(HB HV=93.1 6.9), 采用 *Alcaligenes eutrophus* 发酵生产,已有另文报道^[6].

(2) 好氧污泥中微生物培养基(mg/L)

FeCl₃ · 6H₂O 2.3

K₂HPO₄ 1600 CaCl₂ · 2H₂O 25

KH₂PO₄ 400 MgSO₄ · 7H₂O 200

葡萄糖 3000 NH₄NO₃ 500

(3) 厌氧污泥中微生物培养基(mg/L)

NH₄Cl 100

葡萄糖 1000- 5000 (NH₄)₂SO₄ 100

酵母膏 100 NaHCO₃ 1650

KH₂PO₄ 100

1.2 实验方法

(1) PHAs 膜的制备 采用溶剂挥发法:将从菌体中提取出的 PHAs, 加氯仿溶解, 倾倒入表面皿中, 水平放置. 在室温下自然吹干成膜后, 放置 15d, 使聚体结晶平衡.

(2) 残膜量的测定 用无菌水将膜反复冲洗干净, 置于 80 °C 干燥箱内干燥 4h 后取出, 冷却至室温, 称重.

(3) 好氧污泥中微生物对 PHAs 降解实验 取好氧污泥悬浮液 20ml, 过滤后置于三角瓶中, 加入 6- 10 颗玻璃珠, 振荡. 然后取 1ml 悬浮液于 250ml 三角瓶中, 加入培养基 35ml 及 PHAs 膜, 摇瓶培养, 摇床转速 200r/min, 控制温度 30 °C.

(4) 厌氧污泥降解实验 取厌氧污泥 100ml, 过滤后加入三角瓶中, 同时加入培养基 100ml 及 PHB 粉末, 控制 NH₄⁺ 浓度在 0.4%, 调节 pH, 控制温度 30 °C 和 40 °C, 密闭培养.

(5) NH₄⁺ 浓度的测定 采用改良的 Berth-

* 国家自然科学基金资助项目
收稿日期: 1997-01-07

elot 法测定^[5].

(6) 厌气污泥的 TS、VSS 的测定 标准测定法^[6].

(7) PHB(V) 的含量的测定 气相色谱法^[7].

(8) PHB 厌氧降解产物检测 采用色谱-质谱联用技术(GC-MS).

(9) 菌量的测定 采用光密度法, 波长为 580nm.

2 结果与讨论

2.1 好氧污泥中微生物对 PHAs 膜的生物降解

2.1.1 环境条件对 PHAs 膜降解能力的影响

好氧污泥取自无锡第二制药厂废水活性污泥中. 进行降解实验前首先对污泥进行了驯化, 即采用逐步在培养基中用 PHAs 代替葡萄糖, 对污泥进行了 2 周的培养.

(1) PHB 膜与 PHBV 膜降解性 PHB 与 PHBV 的分子构象和物理性质都存在着差异. 本试验对 PHB 膜和 PHBV 膜在好氧污泥微生物作用下的降解情况进行了考察比较. 结果如图 1 所示. 从图 1 中可以看出, PHB 的降解率比 PHBV 快, 并且随着降解时间的延长, 两者降解率的差异越来越大. Kita K. 和 Saito T.^[12, 13] 认为长侧链的重复单元增加了 PHAs 的疏水性, 抑制或阻碍了微生物在聚体表面的生长, 这可能是导致 PHBV 的降解速度比 PHB 慢的主要原因.

(2) 不同 pH 值下 PHA 降解性 将 PHAs 薄膜投入从好氧污泥中得到的微生物悬浮液中, 控制不同的 pH 值, 考察 PHB 膜的失重情况, 结果如图 2 所示.

由图 2 可以看出, pH7 的情况下, PHAs 膜的失重率比 pH8 时要快. 可以推测好氧污泥中可降解 PHAs 的微生物多以中性生长条件为佳, 所分泌的降解酶在这种条件下的活力较强. 但这并不能认为这种条件对所有能降解 PHAs 的微生物都较合适, 如 *Pseudomonas lemoignei*^[3, 8]、*Zoogloea ramigera* I-16-M^[9]、

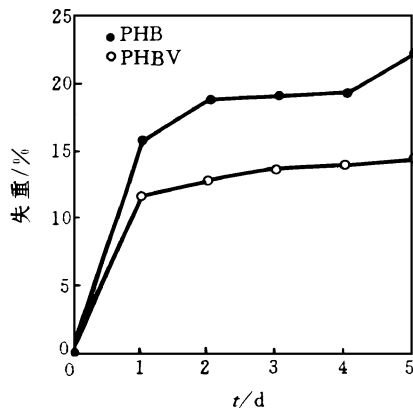


图 1 好氧污泥中 PHBV 与 PHB 膜的降解性比较

A. faecalis^[12] 所分泌的胞外降解酶的最适 pH 都为 8.0. 实际上, 好氧污泥中菌体对 PHB 的降解是混合菌群协同作用的结果.

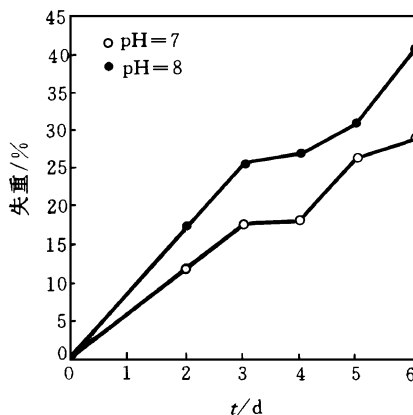


图 2 不同 pH 下好氧污泥中微生物对 PHB 膜的降解

2.1.2 微生物利用 PHB 的生长

PHB 膜的分解过程就是菌体对其利用、自身生长的过程. 本试验通过测定加入 PHB 膜的菌体悬浮液的吸光度 (OD_{580}) 对应于膜的失重情况, 对培养液中菌体浓度的变化进行了考察, 结果如图 3 所示. 由图 3 可以看出, PHB 膜重量减少的同时悬浮液的 OD 值迅速增加, 这说明菌体利用 PHB 作为碳源进行生长.

2.2 厌氧污泥中的微生物对 PHB 粉末的生物降解

通过测定污泥悬浮液中投加的 PHB 的变化, 来考察其中的微生物对 PHB 的利用情况.

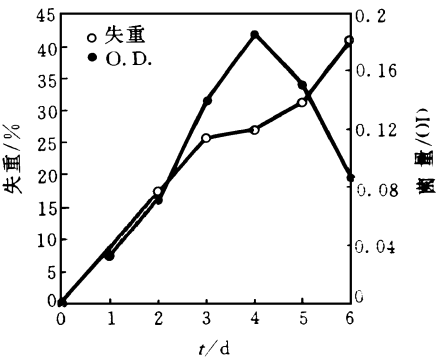


图3 膜的失重率与菌量的关系

但由于在营养不平衡,特别是氮源贫乏情况下,菌体可以在胞内积累 PHAs. 本实验首先研究了 NH_4^+ 浓度对细胞重新积累 PHB 和生长繁殖的影响,在此基础上进行了以下的研究. 经多次实验验证,当 NH_4^+ 浓度在 4g/L 时,细胞内不积累 PHB.

2.2.1 不同 pH 值对 PHB 粉末降解率的影响

将 PHB 粉末直接加入厌氧污泥的微生物悬浮液中,调节培养液的 pH 值分别为 pH5、pH7.5,考察不同 pH 下 PHB 粉末的降解情况,结果如图 4 所示.

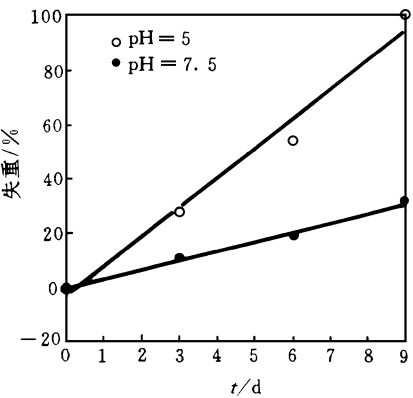


图4 不同 pH 下 PHB 的降解性比较

从图 4 可以看出,酸性条件时,PHB 粉末的降解速度比碱性条件下的快得多,pH5 时 9d 后 PHB 几乎完全降解,而后者同样的时间只降解了 25% 左右. 考虑到一般有机废物的厌氧降解过程中有 2 大类群微生物参与,即产酸和产甲烷菌,在 pH5 的条件下,产酸菌将占绝对优势,而在 pH7.5 左右时,产酸菌和产甲烷菌将

共同作用. 相对说来,对于高分子的复杂有机物,产酸菌将其降解成有机酸类物质的速度要较产酸菌和产甲烷菌协同作用将有机物降解为甲烷的速度快得多. 笔者认为,这就是低 pH 下 PHB 粉末更易降解的原因所在.

用色谱-质谱联用技术对 PHB 降解过程的中间产物进行分析,未发现有羟基丁酸等产物. 由此说明厌氧污泥对 PHB 降解的过程以从聚体分解成单体为限速步骤,而单体羟基丁酸可以迅速被细胞利用. Buswill K.^[10] 等在污泥降解 PHAs 产甲烷的试验中也发现类似的情况. 在对其它生物聚体如纤维素的降解研究中有同样的结果.

2.2.2 不同温度对 PHB 粉末降解性的影响

将厌氧降解的温度分别控制在 30、40,考察对 PHB 粉末降解的影响,结果如图 5 所示. 从图 5 可以看出,当温度较高时,其降解速度也较快. 这说明污泥中降解 PHB 的微生物与降解有机物常见的微生物相同,在较高的温度下有较高的活力.

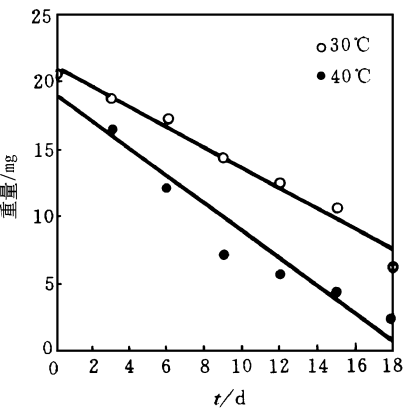


图5 不同温度下 PHB 降解性比较

2.2.3 厌氧污泥中微生物利用 PHB 的情况

总固体(TS)与挥发性固体(VSS)是污泥中 2 项基础指标,它们可以表征污泥中固形物浓度和菌体浓度. 本实验对直接添加 PHB 前和添加后 20d 的污泥的 TS 和 VSS 进行了测定,结果如图 6 所示.

图 6 为 3 个不同初始污泥量的实验情况. 由图 6 可以看出,在不同的试验组中,PHB 降

解后,污泥的TS、VSS均上升,而空白试验中污泥的菌体量基本不变.这是因为空白对照的污泥中,由于没有加PHB和其它碳源,菌体量

基本没有变化,而在添加了PHB的污泥中,微生物利用PHB作为碳源生长,使得菌体量明显增加.



图6 降解PHB前后厌氧污泥中TS、VSS变化

2.2.4 厌氧污泥中添加不同PHB量的情况

由于PHB是不溶解于水的,因此微生物对PHAs制品的降解同其形态就有相当的关系.本试验通过在厌氧污泥中添加不同量的PHB,来考察污泥对不同形态PHAs制品的降解情况.

表1 污泥中添加不同PHB量的降解速度

添加量 /mg·ml ⁻¹	30 /mg·ml ⁻¹ ·d ⁻¹		40 /mg·ml ⁻¹ ·d ⁻¹	
	pH5	pH7.5	pH5	pH7.5
0.65	0.0050	0.0032	0.0087	0.0061
6.7	0.36	0.23	0.50	0.33

表1列出不同起始浓度时,几种条件下9d内PHB粉末的平均降解速度.从表1可以看出,起始添加量越高降解速度也越快. Urmene-ta J.等^[12]在湖水的PHAs降解试验中也发现,降解速度同PHB的添加量成正比关系.可以推测微生物对PHAs制品的降解是从表面开始的,通过在其表面将其降解成单体后再加以吸收利用,因此添加量越大,其制品降解率也将越高.笔者在土壤和水中用薄膜进行的研究也得出相同的结论(另文发表).

参 考 文 献

- 1 Merrick J M, Doudoroff M. J. Bacterial. , 1964, **88**: 60- 71
- 2 Fukui T, Narikawa T and Miwa K. Biochem. Biophys. Acta. 1988, **952**: 164
- 3 Chowdhury A A. Arch. Microbiol. , 1963, **47**: 167
- 4 高海军, 堵国成, 陈坚等. 第七届全国生物化工学术会议论文集. 北京: 化学工业出版社, 1996: 245- 249
- 5 Steinbuchel A and Schlegel H G. Appl. Microbiol. Biotechnol. , 1989, **31**: 168- 175
- 6 编写组. 沼气发酵分析(第一版). 北京: 北京科技出版社, 1984: 17- 22
- 7 Riis V and Mai W J. Chromatography, 1988, **445**: 285- 289
- 8 Nakayama K, Saito T and Fukui T. Biochemica et Biophys- ica Acta. , 1985, **827**: 63- 72
- 9 Tanaka Y, Saito T and Fukui T. Eur. J. Biochem. , 1981, **118**: 177- 182
- 10 Buswill K, Fedorak P M and Page W J. Appl. Environ. Microbiol. , 1992, **58**: 1398- 1401
- 11 Gujer W and Zehnder A J B. Water Sci. Technol. , 1983, **15**: 127- 167
- 12 Kita K, Ishimaru K, Teraoka M et al. . Appl. Environ. Mi- crobiol. , 1995, **61**: 1727- 1730
- 13 Saito T, Suzuki K, Yamamoto J. J. Bacterial. , 1989, **17**: 184- 189
- 14 Urmeneta J, Mas- castella J and Guerrero R. Appl. Envi- ron. Microbiol. , 1995, **61**: 2046- 2048

Kinetics of Photocatalytic Oxidation of Phenol on TiO_2 . Hu Chun, Wang Yizhong, Tang Hongxiao (State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085): *Chin. J. Environ. Sci.*, **18**(4), 1997, pp. 1—4

The kinetics of the photodegradation of phenol were studied in TiO_2 aqueous suspensions under mercury lamp irradiation. The effects of initial concentration (c_0) of phenol, oxygen partial pressure (P_{O_2}), light intensity (I), the amount of catalyst and calcination temperature of catalyst on photodegradation of phenol have been investigated. The characteristics of photocatalytic oxidation of phenol were verified, the reaction apparently proceeded according to the first-order kinetics with the apparent rate constant dependencing on c_0 , P_{O_2} , I and $[\text{TiO}_2]$. Photocatalytic activity can be improved by suitable calcination. The experimental results indicates that the oxygen partial pressure, light intensity and dose of catalysts were important parameters in the degradation process. A chemical kinetic equation was proposed, which could be in agreement with experimental results.

Key words: photocatalytic, kinetics, phenol, TiO_2 , photocatalytic oxidation.

Research on Basic Theory of Determining Critical Loads for Acid Deposition with Steady-state Mass Balance Method. Xie Shaodong, Hao Jiming, Zhou Zhongping (Dept. of Environ. Eng., Tsinghua Univ., Beijing 100084): *Chin. J. Environ. Sci.*, **18**(4), 1997, pp. 5—9

Some basic conceptions were clearly stated in the theory of determining critical loads for acid deposition. Basic formula to calculate critical loads for acid deposition was obtained by establishing steady-state mass balance equation for alkalinity production in leaching solu-

tion. From this basic formula, mathematical expressions to calculate critical loads for acidity, potential acidity, sulfur deposition and nitrogen deposition were derived. The methods of calculating critical alkalinity leaching by means of critical chemical values that will not cause harmful effects on a selected indicator organism were also studied. Therefore, a complete and systematic theory for steady-state mass balance method was presented in the paper.

Key words: acid deposition, critical load, ecosystem, soil, steady-state mass balance method.

Water-Particulate Distribution Coefficient of Heavy Metal and Application in Sediment Quality Criteria in China River. Huo Wenyi and Chen Jingsheng. (Dept. of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871): *Chin. J. Environ. Sci.*, **18**(4), 1997, pp. 10—13

Water-particulate distribution coefficient of heavy metal was calculated in natural condition (both physical and chemical) in China rivers. Due to difference of grain size composition, distribution coefficient of heavy metal in the Changjiang (Yangtze River) is greater than it in the Huanghe (Yellow River). For the Changjiang, that distribution coefficient estuary is greater than it in Wuhan station mainly reflects effect of ion intensity. Based on preceding data, sediment quality criteria was proposed in the study.

Key words: water-particulate distribution coefficient, heavy metal, sediment quality criteria, Yangtze River, Yellow River.

The Application of Bacterial Luminescent Biosensor in Rapid Determination of Acute Toxicity of Pollutants. Huang Zheng et al. (Institute of Environ. Medicine, Tongji Medical Univ. Wuhan 430030): *Chin. J. Environ. Sci.*, **18**(4), 1997, pp. 14—16