

采用固定化技术处理土壤中菲、芘污染物

王新^{1,2}, 李培军¹, 巩宗强¹, 曲向荣², 王兵² (1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; 2. 沈阳工业大学理学院, 沈阳 110023)

摘要:采用动胶杆菌(*Zoogloea* sp.)固定化技术包埋来降解土壤中菲、芘污染物,在不同接种量、不同系列浓度下,对降解效果进行了测定.结果表明:5%的接种量最为合理,在168h时,固定化细菌对菲、芘的降解率达84.89%和76.94%;而在相同条件下土著菌降解仅达到27.85%和19.65%,因此动胶杆菌(*Zoogloea* sp.)具有更好的降解能力.另外,还用电镜观察研究了动胶杆菌在载体中的分布形态,表明了固定化细菌降解土壤中菲、芘具有较优势.

关键词:固定化;降解;污染土壤;菲;芘

中图分类号:X171.5 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2002)03-04-0084

The Degradation of Phenanthrene and Pyrene Contaminated Soil with Immobilized Technique

Wang Xin^{1,2}, Li Peijun¹, Gong Zongqiang¹, Qu Xiangrong², Wang Bin² (1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015, China; 2. School of Science, Shenyang University of Technology, Shenyang 110023, China)

Abstract: The phenanthrene and pyrene contaminated soil was degraded by immobilized+imbedding the selected *Zoogloea* sp. The degradation rate was determined under various amounts of inoculation and concentration, and the result showed that there was the best degradation rate at 5%. After 168h, the degradation rate of immobilized *Zoogloea* sp. to phenanthrene and pyrene was 84.89% and 76.94% respectively. While, the degradation rate of the native bacterium was only 27.85% and 19.65% at the same condition. So the *Zoogloea* sp. had the better degradation ability. And, *Zoogloea* sp. distributing shape in immobilized carrier was studied with electric scan photo, it inferred that immobilized bacterium had the better degradation rate.

Key words: immobilized; degradation; contaminated soil; phenanthrene; pyrene

菲、芘为多环芳烃(PAHs)三环、四环代表物.多环芳烃化合物是石油、煤炭等化石燃料燃烧过程及能源转化过程的副产物^[1],对人体具有潜在的危害性^[2],对生物体产生遗传毒性,土壤成为多环芳烃的重要载体之一,因此,开展对土壤中多环芳烃化合物的降解具有一定的实际意义.

目前,固定化技术被广泛的应用于废水处理^[3,4],它具有菌体密度高,耐毒能力强,可重复使用等优点^[5],受到越来越多国内外学者的关注.近年来,各种不同的载体被开发出来用于制作固定化微生物,其中利用聚乙烯醇(PVA)与硼酸交联作为载体的固定化技术被广泛应用,其成本低,易操作,固定化载体机械强度高,

可长期使用.本实验通过大量的文献检索,在多种载体择优的基础上,将固定化微生物用于降解土壤中有机污染物.

1 材料与方法

1.1 供试土壤

采自辽宁省盘锦市兴隆台小洼稻田土,土壤的理化性质见表1.

1.2 供试菌株及载体制备

一株动胶杆菌(*Zoogloea* sp.)由本实验室从石油污染土壤中分离出来,经多种菌株筛选后选用.

基金项目:中国科学院知识创新项目(KZCX2-401);国家自然科学基金资助项目(29977021)

作者简介:王新(1973~),女,理学硕士.

收稿日期:2001-04-01;修订日期:2001-07-18

表 1 供试土壤的理化性质/ %

Table 1 The physical and chemical characteristic of the soil

土层/cm	pH	有机质	TN	TP	TK
0~20	7.33	2.12	0.117	0.038	0.687

采用廉价的 PVA-硼酸复合载体固定化包埋供试菌株,制成 $d = 3.5 \text{ mm}$ 的固定化小球,增殖后备用.

1.3 泥浆降解培养基($\rho/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

酵母膏 3, NH_4NO_3 1, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, KCl 0.2,加水定容至 1 L, pH 7.8,量取 150 mL 后加入到装有 50g 土含 $100\mu\text{g}/\text{g}$ 菲芘污染物的 500 mL 三角瓶内, $1.01325 \times 10^5 \text{ Pa}$, 灭菌 30 min.

模拟污染土壤的处理方法是在前一夜投放污染物,吸附一夜后,次日灭菌.

1.4 主要的化学试剂和仪器

菲纯度为 90.6%,芘纯度为 97%,二者均为德国 Fluka 公司产品.

惠普 1091-II 高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器(DAD);超声波水浴箱;离心机;恒温摇床.

1.5 土壤样品的处理及菲、芘的分析测定方法

(1) 土壤样品的采集和处理 将采集的土样装入玻璃离心管内,经离心后,放入冷冻干燥器中进行冷冻干燥,干燥后的土样研磨过 1 mm 的筛,再将过筛后的土样装入事先准备好的小纸袋,一同放入冰柜内备用.

(2) 土壤样品中菲、芘的分析测定方法 称取 1g 冷冻备用的土壤样品,置于 100 mL 的玻璃离心管中,再加入 20 mL 的二氯甲烷萃取液后,用磨口玻璃盖将离心管对号盖好,然后将其放在超声水浴振荡器中连续振荡 2h,在振荡过程中平均每 0.5h 换 1 次水以保持超声水浴箱中水的温度不高于 40°C . 超声水浴后的离心管平衡后放入离心机中以 $3500\text{r}/\text{min}$ 离心 5 min,将离心后的上清液记下容积后取出 1 mL 用氮气吹干,再用甲醇定容至 1 mL 过液相色谱专用薄膜后,移入液相色谱进样瓶中待测^[6].

1.6 固定化细菌降解土壤中菲、芘的实验设计

水土比为 3:1, 30°C 下摇床转速为 $120\text{r}/\text{min}$, pH 值为 $7 \sim 7.8$.

(1) 不同接种量的固定化微生物对菲、芘的降解 采用的不同接种量为 5%、10%、15%、20%、25%.

(2) 固定化细菌对不同系列浓度菲、芘的降解 系列浓度依次为 $200\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{g}$ 和 $10\mu\text{g}/\text{g}$.

(3) 固定化细菌在自然土壤中(即含土著菌)对菲、芘的降解 以土著菌及加入游离的优势菌对 $100\mu\text{g}/\text{g}$ 菲、芘的降解作为对照,与加入的固定化细菌对自然土壤中菲、芘的降解进行比较.

2 结果和讨论

2.1 不同接种量的固定化细菌对菲、芘的降解

如图 1、图 2 所示,不同接种量的固定化细菌对菲、芘的降解,在最初的时间里,接种量与降解率明显成正比.当菲降解率达到 80% 以上,芘降解率达到 70% 以上时,接种量大的优势不再明显.也就是说,要想在极短的时间里取得较好的降解效果,就要加大固定化细菌的接种量.但在实际应用中考虑到成本的问题,5% 的接种量是比较适宜的,同时它的降解效果也比较理想,在 128h 时对菲的降解达 87.05%,明显高于对照(即未接菌).

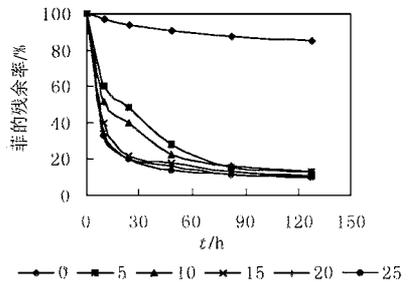


图 1 不同接种量的固定化细菌对菲的降解

Fig.1 The degradation of PHE by different inoculate quantity immobilized bacterium

2.2 固定化细菌对不同系列浓度菲、芘的降解

如图 3(固定化细菌对菲的降解)所示,在最初的 50h 内,固定化细菌对 4 个不同系列浓度菲的降解速率基本相同,当超过 50h 时,固定

化细菌对高浓度菲的降解速率依旧,对低浓度菲降解速率减弱.这说明要想提高对低浓度菲的降解率,必须加长降解时间或另提供其他降解条件.

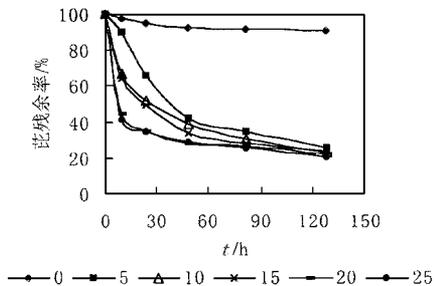


图 2 不同接种量的固定化细菌对芘的降解

Fig.2 The degradation of PYR by different inoculate quantity immobilized bacterium

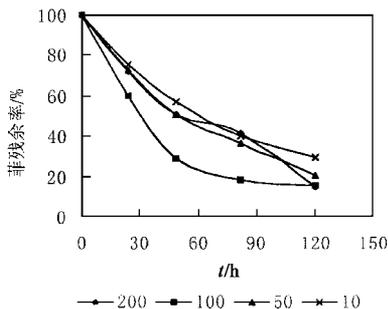


图 3 固定化细菌对不同系列浓度菲的降解

Fig.3 The degradation of different concentration of PHE by immobilized bacterium

如图 4(固定化细菌对芘的降解)所示,固定化细菌在 120h 时对不同系列浓度芘降解率排序依次为: 73.35%、60.64%、54.07% 和 41.35%, 对应的浓度为 100μg/g、50μg/g、10μg/g 和 200μg/g,高浓度芘和低浓度芘的降解效率最低,这是由于固定化微生物对高浓度的芘在最初的降解阶段需要较长的适应时间,而低浓度芘在后来不能为微生物提供足够的碳源.

综上所述,要想提高低浓度菲和低浓度芘的降解效率,就要适当延长它们的降解时间或提供其他的降解条件.

2.3 固定化细菌在自然土壤中对菲、芘的降解

如图 5、图 6 所示,固定化细菌在自然土壤中对菲、芘的降解效果非常理想,明显地高于 2 个对照菌,这说明在有土著菌的情况下,固定化细菌能够占有绝对的优势,为将来的实际应用提供了一定的理论依据.

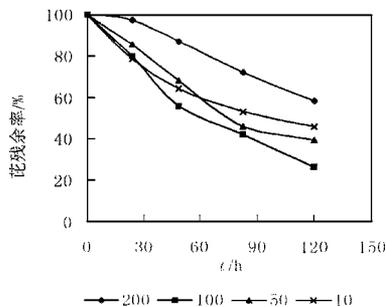


图 4 固定化细菌对不同系列浓度芘的降解

Fig.4 The degradation of different concentration of PYR by immobilized bacterium

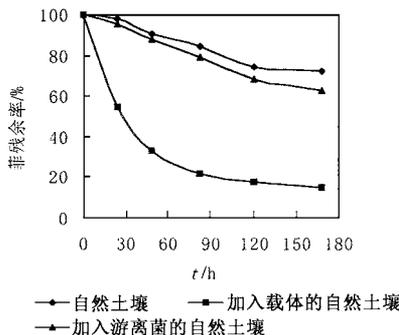


图 5 固定化细菌在自然土壤中对菲的降解

Fig.5 The degradation of PHE by immobilized bacterium in natural soil

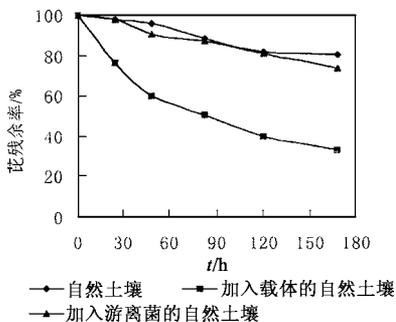


图 6 固定化细菌在自然土壤中对芘的降解

Fig.6 The degradation of PYR by immobilized bacterium in natural soil

固定化细菌在 168h 时,对菲、芘的降解率分别达到 84.89% 和 76.94%,对照菌对菲和芘的降解率达到 27.85% 和 19.65%、37.32% 和 26.32%。

2.4 固定化细菌内部形态分析及参数测定

利用扫描电镜观察固定化细菌在载体内部的分布情况,图 7 显示了固定化细菌在载体中的均匀分布及形成的高密度菌群。为了进一步说明问题,分别测定了固定化静止细胞(即未经增殖细胞)及增殖后的细胞数目,未经增殖的细胞数目为 $2.42 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,增殖后细胞数目为 $1.86 \times 10^{10} \text{ mL}^{-1}$,增加了约 2 个数量级。

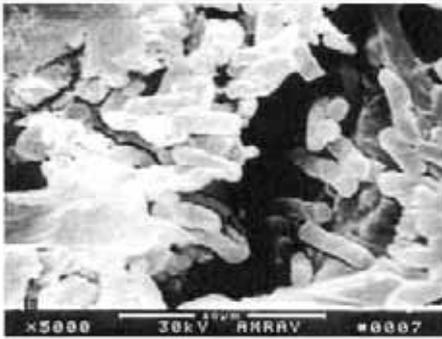


图 7 固定化细菌内部扫描电镜照片

Fig.7 Electric scan photo on the inside parts of immobilized bacterium

3 结论

(1) 固定化细菌对菲、芘的降解效率随接种量的加大而提高,当降解率达到约 50% 时,不同接种量之间的差异不再明显。因此,考虑到成本问题,5% 的接种量不仅成本低,而且效果好。

(2) 固定化微生物对不同系列浓度菲、芘

的降解,在一定的浓度范围内,都具有较好的降解效果。菲的降解要比芘更容易一些。

(3) 固定化微生物在含有土著菌的自然土壤中,对污染物的降解占有绝对的优势,降解效果要明显好于土著菌。这为固定化微生物降解土壤有机污染物的实际应用提供了一定的理论科学依据。

(4) 固定化微生物降解土壤中有机污染物,具有游离细胞无法比拟的优点:固定化细胞由于被包埋在载体内,可以免受外界有毒物质浓度过高而对细胞造成的突然伤害;载体本身的环境有利于内部细胞的增殖,达到一个较高的菌体浓度,而固定化状态又不至于造成菌体流失,这样固定化细胞在降解土壤中的有毒物质时,显示出降解速度快、降解效率高的特性。

参考文献:

- 1 Abdul A S, Gibson T L. Equilibrium batch experiments with six polycyclic aromatic hydrocarbons and two aquifer materials [J]. Hazardous Wastes & Hazardous Materials, 1986, 3(2) : 125 ~ 137.
- 2 Edwards N T. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment- A Review [J]. J. Environ. Qual., 1983, 12(4) : 427 ~ 441.
- 3 Wang Jianlong et al. Immobilization of microbial cells using polyvinyl alcohol (PVA)- polyacrylamide gels [J]. Biotechnol. Techniques, 1995, 9(3) : 203 ~ 208.
- 4 Wang Jianlong et al. Immobilization of microorganisms using carrageenan gels coated with chitosan and application to biodegradation of 4-chlorophenol [J]. J. Environ. Sci., 1997, 9(3) : 283 ~ 287.
- 5 韩力平, 王建龙等. 固定化细胞流化床反应器处理难降解有机物喹啉的试验研究 [J]. 环境科学, 2001, 22(1) : 78 ~ 80.
- 6 宋玉芳, 区自清, 孙铁珩. 土壤、植物中多环芳烃 (PAHs) 分析方法研究 [J]. 应用生态学报, 1995, 6(1) : 92 ~ 96.