

非离子表面活性剂 Tween20 对菲生物降解的影响

杨建刚¹, 刘翔¹, 余刚¹, 龙涛¹, 余鹏², 刘铮²

(1. 清华大学环境科学与工程系, 北京 100084, E-mail: yang00@mails.tsinghua.edu.cn; 2. 清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要:以菲(PHE)为典型多环芳烃(PAHs), 利用 PAHs 优势降解菌, 研究了非离子表面活性剂 Tween20(TW20)对 PAHs 类疏水性有机物生物降解过程的影响。结果表明, TW20 对 PHE 具有较好的增溶效果; TW20 具有很好的生物降解性; 不同浓度的 TW20 存在情况下, 降解菌对 PHE 都有很好的去除效果。TW20 可以用于 PAHs 污染的生物修复。

关键词:菲; TW20; 多环芳烃; 生物降解; 非离子表面活性剂

中图分类号: X131 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)01-0053-04

The Influence on the Biodegradation of Phenanthrene by Nonionic Surfactant, Tween20

YANG Jian-gang¹, LIU Xiang¹, YU Gang¹, LONG Tao¹, SHE Peng², LIU Zheng²

(1. Dept. of Environmental Sciences and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China E-mail: yang00@mails.tsinghua.edu.cn; 2. Dept. of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 10084, China)

Abstract: The objective of this study was to quantify the bioavailability of phenanthrene solubilized in surfactants by a mixed phenanthrene-degrading culture isolated from the petroleum contaminated soils. A nonionic surfactant, Tween20, was used. The effects of Tween20 on the microbial degradation of phenanthrene were evaluated depending on the rotary flasks experiments. The results showed that the concentrations of Tween20 above the critical micelle concentration (CMC) could increase the solubility of phenanthrene on great extent and were not toxic to the phenanthrene-degrading bacteria, and that the presence of surfactant micelles did not inhibit the biodegradation of phenanthrene. Phenanthrene solubilized in the micelles of Tween20 in liquid media was bioavailable and degradable by the mixed culture of bacteria.

Key words: phenanthrene; Tween20; PAHs; biodegradation; nonionic surfactant

疏水性有机物 (Hydrophobic Organic Compounds, HOCs) 是一类重要的环境污染物, 由于具有强烈的憎水性和极低的水溶解度, HOCs 进入环境后, 会被吸附到土壤颗粒表面或沉积到底泥中, 向环境中缓慢释放, 限制了它们的生物降解进程, 增加了生物修复技术应用的难度, 对土壤和地下水造成了长期的污染, 因此 HOCs 污染土壤的修复是世界范围内的环境难题^[1~4, 6]。

多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 是一类典型的 HOCs, 由于具有特殊而稳定的环状结构, PAHs 难以生物降解, 再加上其毒性、致癌性和致突变性, 它们在环境中呈不断累积的趋势^[3], 近年来已经受到越来越多的重视。美国环保局 (USEPA) 已将 16 种不带支链的 PAHs 确定为优先污染物^[3]。

表面活性剂是一类同时具有亲水基团和疏水基团的化合物。在水溶液中会形成胶束。胶束是由水溶性基团包裹非水溶性基团的核心构成的表面活性剂分子团, HOCs 可以通过溶解在表面活性剂胶束中

而增加他们在水相中的溶解度, 提高他们的生物利用率, 添加表面活性剂已经被认为是一种有效的去除 HOCs 污染的环境修复方法^[3~5, 9], 但表面活性剂的添加, 也会同时对环境造成二次污染, 同时溶解于表面活性剂胶束中的 HOCs 是否可被微生物利用, 目前众说纷纭。国外对表面活性剂在 HOCs 溶解和生物降解性方面已进行了广泛的研究, 并取得了丰硕成果^[6~11], Soeder^[12]研究两种天然表面活性剂——皂角苷和卵磷脂对 PAHs 生物降解的影响。结果表明在足够高浓度下, 2 种表面活性剂都能充分溶解 PAHs, 而且卵磷脂使微生物对 PAHs (菲, 荧蒹) 的降解增加了 2 倍。但皂角苷没有提高 PAHs 的生物可利用性, 相反的在 2.5 mg/L 的浓度下, 明显延迟了微生物的生长。但在我国, 这方面研究还较少。表面活性剂的加入是少数的用于解决受限制的 PAHs 生物有效性难题的技术方法之一。表面活性

收稿日期: 2003-01-16; 修订日期: 2003-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50178040)

作者简介: 杨建刚 (1975~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为污染土壤修复。

剂作为一种用于污染土壤生物清洁的手段,有发展的前景^[1].

本文选用典型非离子表面活性剂 Tween20 (TW20) 和菲 (Phenanthrene, PHE), 研究了生物修复过程中投加表面活性剂对 PAHs 生物降解效果的影响. 为表面活性剂在 HOCs 生物修复中的应用提供了依据, 对保护环境和污染治理均有十分重要的理论和实践意义.

1 材料与方法

1.1 试剂

PHE, 98% 纯度, 定购于比利时 Acros 公司;

TW20, 分析纯, 定购于 Sigma 公司;

其它试剂均为分析纯或色谱纯.

1.2 PHE 测定

水样用正己烷萃取, HPLC (岛津 LC-10AD) 检测 PHE 浓度, 色谱条件为: Aichrom ODS 柱 ($5\mu\text{m}$, $\phi 4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$), 柱温 40°C , 流动相为甲醇: 水 (85:15), 流速 $1.0\text{mL}/\text{min}$, 紫外检测器 (LC-10AV) 于 254nm 波长测定.

经测定, 正己烷对溶液中 PAHs 萃取的回收率为 $80.29\% \sim 105.51\%$, 相对标准偏差为 7.75% , 均在误差允许范围内.

1.3 PAHs 降解菌

试验中选用的 PAHs 降解菌为本实验室从石油污染土壤中富集培养得到的混合菌种. 经测试, 该菌种对萘、菲、石蜡、柴油等烃类化合物都具有较强的降解能力.

1.4 实验方法

(1) TW20 对 PHE 的增溶作用 于 10mL 具塞刻度试管中配制不同浓度 ($100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $2000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 TW20 溶液, 分别加入过量的 PHE 晶体, 超声水浴中溶解 2h , 超声过程中通过换水保持水温恒定, 然后恒温 ($30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) 静置 12h , 取 1.5mL 上清液, $10000\text{r}/\text{min}$ 离心 20min 以分离未溶解的菲固体, 抽取离心后液体 1mL , 用 1mL 正己烷萃取后, HPLC 测定正己烷相中 PHE 的浓度.

(2) TW20 生物降解性试验 用瓦氏呼吸仪对 TW20 的生物降解性进行了评价. 降解菌液采用 PAHs 降解菌混合菌液, 瓦氏呼吸瓶中 TW20 浓度分别为 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 反应温度为 30°C .

(3) 不同浓度的 PHE 降解实验 配制 5 瓶各

250mL 含 $1000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TW20 的无机液体营养液, 向其中分别加入不同量的含 $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PHE 的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 使反应瓶中 PHE 浓度分别为 $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $8\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 然后分别加入 5mL PAHs 降解菌液, 其中最后一瓶溶液中不加入 PAHs 降解菌液, 而加入 $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaN_3 溶液 5mL 作为抑菌剂. 30°C 恒温摇床中进行反应, 定时取样, 测定其中 PHE 浓度.

(4) 不同 TW20 浓度对 PHE 生物降解的影响

配制 4 瓶各 250mL 含不同浓度 TW20 ($0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1000\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的无机液体营养液, 向其中分别加入少量含 $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PHE 的 DMSO 溶液, 使反应瓶中 PHE 浓度为 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 然后分别加入 5mL PAHs 降解菌液, 其中最后一瓶溶液中不加入 PAHs 降解菌液, 而加入 $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaN_3 溶液 5mL 作为抑菌剂. 30°C 恒温摇床中进行反应, 定时取样, 测定其中 PHE 浓度.

2 结果和讨论

2.1 PHE 在 TW20 溶液中的溶解特性

TW20 是一种亲水亲油平衡值 (HLB) 高达 16.7 的非离子型表面活性剂, 常用作难溶性物质的增溶剂^[7]. 图 1 所示为 PHE 在不同浓度 TW20 水溶液中的溶解度. 由图 1 中可看出, 当 TW20 的浓度高于其临界胶束浓度 (CMC) $60\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时^[7], PHE 的溶解度随 TW20 浓度的增加线性上升, 其原因是水溶液中 TW20 分子可聚集成大量具有亲油性内

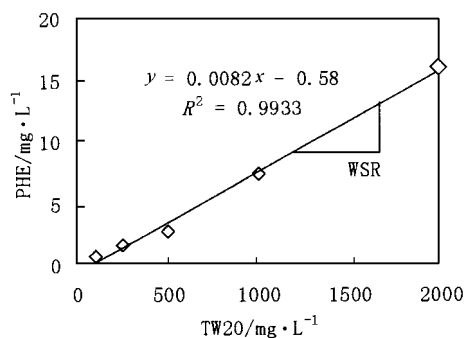


图 1 TW20 对 PHE 溶解度的影响

Fig.1 Influence of Tween20 on the solubility of phenanthrene

环境的微胶团, 使 PHE 溶解在其中^[8], 非离子表面活性剂 TW20 对 PHE 固体有很好的增溶效果. PHE 是一种几乎不溶于水的固体, 在水溶液中的饱和溶解度仅为 $1.3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而在 $2000\text{mg}/\text{L}$ TW20 溶液中, PHE 的饱和溶解度可以达到 $16.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 增加

了 12.9 倍. PHE 在溶液中浓度的增加可以增加生物修复过程中降解菌与污染物的接触机会, 提高降解菌对 PHE 等不溶于水的污染物的降解效果.

PHE 在非离子表面活性剂溶液中胶束相及水相中的分配特性, 可引入质量溶解率(WSR)和胶束-水分分配系数(K_m)进行讨论^[7,8].

WSR 定义为多环芳烃溶解度与表面活性剂浓度(大于 CMC)线性函数关系的斜率:

$$WSR = \frac{C - C_{CMC}}{c_{suf} - CMC} \quad (1)$$

式(1)中, C 为表面活性剂浓度为 c_{suf} 时 PAHs 的溶解度; C_{CMC} 为表面活性剂浓度为 CMC 时 PAHs 的溶解度.

胶束-水分分配系数 K_m 为 PAHs 胶束相质量分数与其水相质量分数之比:

$$K_m = \frac{WSR}{(1 + WSR) C_{CMC} V_w} \quad (2)$$

式(2)中, V_w 为水的质量体积.

由图 1 及式(1)、(2)确定实验中 PHE 在表面活性剂 TW20 溶液中的 $WSR = 0.0082$, $K_m = 0.01$

2.2 TW20 的生物降解性

从图 2 中可以看到, TW20 具有较好的生物降解性, 不同浓度的 TW20 可以在较短时间(20h)内被生物降解.

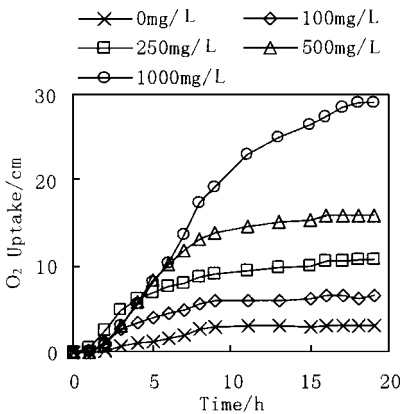


图 2 TW20 的瓦氏呼吸仪生物降解曲线

Fig. 2 The biodegradation of TW20 in Warburg respirometer

比较 TW20 浓度与瓦氏呼吸仪生物降解最终耗氧量的关系可以看到, 不同浓度的 TW20 最终耗氧量与 TW20 浓度呈现很好的线性相关关系(图 3), 说明高浓度的 TW20 对其生物降解性没有影响. TW20 用于生物修复过程后, 不会对 PAHs 降解菌产生抑制作用, 同时不会对环境造成二次污染.

2.3 PAHs 降解菌对不同浓度 PHE 的降解效果

在 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TW20 存在下, 考察了 PHE 的生物降解性. 由于 TW20 的增溶作用, 溶液中加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PHE 固体后, 摇瓶中 TW20 仍保持表观上的透明溶液.

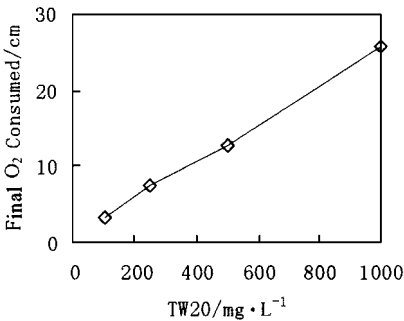


图 3 TW20 浓度与瓦氏呼吸仪生物降解最终耗氧量的相关关系

Fig. 3 The relationship between the concentration of TW20 and final O_2 consumption

从图 4 中可以看到, 降解菌对不同浓度的 PHE 都有较好的降解效果, 经过一段时间的适应期后, 降解菌能在很短的时间内(25h)将摇瓶溶液中的 PHE 完全降解, 降解速率基本上不受 PHE 浓度的影响.

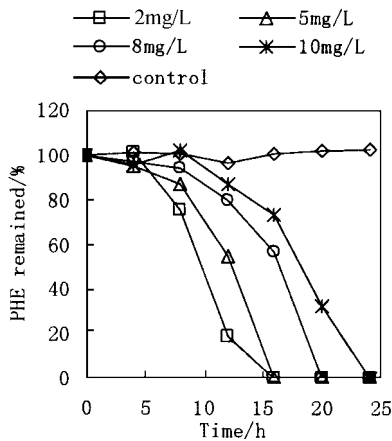


图 4 不同浓度 PHE 的生物降解曲线

Fig. 4 The biodegradation of phenanthrene in different concentration at the presence of 1000 mg/L Tween20

较高的 PHE 浓度增加了 PAHs 降解菌对 PHE 的适应期, 其原因认为是加入的降解菌液处于休眠状态, 需要对难降解物 PHE 进行一段时间的适应, 待恢复较高活性后才开始对 PHE 快速降解.

2.4 不同 TW20 浓度对 PHE 降解效果的影响

如图 5 所示, 溶液中不同浓度 TW20 的存在,

并没有对 PHE 生物降解速率造成影响,溶液中的 PHE 都在较短时间内(25h) 被彻底生物降解,溶液中 PHE 降解速率基本相同.

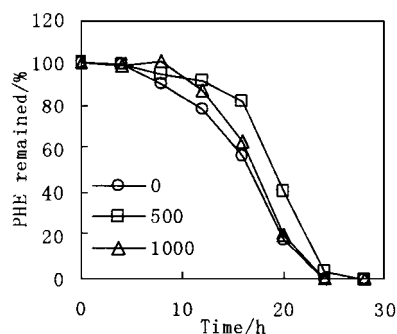


图 5 不同 TW20 浓度对 PHE 生物降解的影响

Fig.5 The Effect of different concentration of Tween20 on the biodegradation of phenanthrene

3 小结

(1) 筛选得到的降解菌,对典型 PHE 有很好的降解效果.

(2) TW20 对 PHE 有很好的增溶效果,可以用于生物修复过程中增加 PHE 及其它非水溶性有机污染物的溶解度,提高生物修复的效率.

(3) TW20 生物降解性较好,用于生物修复过程后,不会对环境造成二次污染.

(4) TW20 的存在,不会对 PHE 生物降解效率造成影响.

本文的试验结果表明,在表面活性剂增溶强化的生物修复过程中,由于表面活性剂可以增加疏水性有机污染物的溶解度,同时自身又可以生物降解,不会对环境造成二次污染,因此可以利用表面活性

剂提高疏水性有机污染物的生物修复效率.

参考文献:

- [1] 沈德中. 污染环境的生物修复[M]. 北京:化学工业出版社, 2002.12~15.
- [2] 张春桂,等. 污染土壤生物恢复技术[J]. 生态学杂志,1997, 16(4): 52~58.
- [3] 丁克强,等. 多环芳烃污染土壤的生物修复[J]. 土壤,2001,4: 169~178.
- [4] 宋玉芳,等. 表面活性剂 TW80 对土壤中多环芳烃生物降解的影响[J]. 应用生态学报,1999,10(2):230~232.
- [5] In S Kim. Enhanced Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Nonionic Surfactants in Soil Slurry[J]. Appl. Geochem,2001,16:1419~1428.
- [6] Zhongbao Liu. Biodegradation of Naphthalene in Aqueous Nonionic Surfactant Systems[J]. Appl. Environ. Microbio.,1995, 61:145~151.
- [7] Li J L,Chen B H. Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants[J]. Chemical Engineering Science, 2002,57:2825~2835.
- [8] Daniel J,Luning Prak, Parmely H Pritchard. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in micellar nonionic surfactant solutions[J]. Wat. Res.,2002,36:3463~3472.
- [9] Garon D. Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorine[J]. Chemosphere,2002,47:303~309.
- [10] Mulligan C N, R N Yong, B F Gibbs. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil:a review[J]. Engineering Geology, 2001,60:371~380.
- [11] Ming C C, Ching R H, Hung Y S. Effects of surfactants on extraction of phenanthrene in spiked sand[J]. Chemosphere,2000, 41:1295~1300.
- [12] Soeder C J, Papaderos A, Kleespies M. Influence of phytogetic surfactants (quillaya saponin and soya lecithin) on bio-elimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1996,44:654~659.