

聚丙烯酰胺生物降解研究

韩昌福^{1,2}, 郑爱芳^{1,2}, 李大平^{1*}

(1. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 研究了黄孢原毛平革菌对聚丙烯酰胺(PAM)的生物降解,从葡萄糖的加入量、pH、N 浓度、 Mn^{2+} 浓度和降解时间 5 个方面考察了对 PAM 降解的影响。结果表明,黄孢原毛平革菌对聚丙烯酰胺具有特殊的酶催化降解的能力,降解率可达 50%,限氮条件($NH_4^+ = 0.2g/L$)和 Mn^{2+} 浓度($Mn^{2+} = 0.0175g/L$)是菌株产聚丙烯酰胺降解酶的最佳条件。

关键词: 聚丙烯酰胺(PAM); 生物降解; 黄孢原毛平革菌; 酶催化

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)01-0151-03

Study on biodegradation of polyacrylamide

HAN Chang-fu^{1,2}, ZHENG Ai-fang^{1,2}, LI Da-ping¹

(1. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: *Phanerochaete chrysosporium* was introduced into biodegradation of polyacrylamide(PAM), and effects of glucose amount, pH, N concentration, Mn^{2+} concentration and biodegradation time on biodegradation of PAM were studied. Results show that *Phanerochaete chrysosporium* has special abilities of enzyme catalysis biodegradation of PAM. And the removal rate of PAM is 50%. Nitrogen limitation ($NH_4^+ = 0.2g/L$) and Mn^{2+} concentration ($Mn^{2+} = 0.0175g/L$) are optima of producing PAM biodegradation enzyme.

Key words: polyacrylamide (PAM); biodegradation; *Phanerochaete chrysosporium*; enzyme catalysis

近年来,部分水解性聚丙烯酰胺(PAM)在油田采油生产中已得到大规模应用。聚合物驱油开始于 20 世纪 50 年代末,一般采用水溶性高分子的聚丙烯酰胺(PAM)通过注水井注入地下,提高原油采收率。但随着聚合物驱溶液的注入,使采出水中含有聚合物而粘度高,水中油滴及固体悬浮物的乳化稳定性强,进而导致油水分离和含油污水处理的难度加大;而且利用水驱常规污水处理工艺处理含聚污水难以达到回注原地层的水质要求,所以需要大量低矿化度的清水用来配制聚合物驱溶液,从而也使原注水-污水系统平衡被破坏。过去,一般认为聚丙烯酰胺对微生物具有毒性,有关聚丙烯酰胺的生物降解研究在国内外仅有少量的文献报道^[1~4]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所采用大庆油田聚合物驱采油用聚丙烯酰胺,分子量在 20 000 000 以上。实验废水为人工配制废水,主要成分 $CaCl_2$: 0.109g, $NaCl$: 0.070g, Na_2SO_4 : 0.072g,蒸馏水 1 000mL,凡未加说明者均为人工配制废水。

1.2 浊度法检测聚丙烯酰胺浓度

(1) 实验原理 聚丙烯酰胺在酸性溶液中与次

氯酸钠发生化学反应生产不溶性的氯酸钠,使溶液变得浑浊。在一定条件下,其浊度值与聚丙烯酰胺浓度成比例,具有线性关系。它可由分光光度计或浊度计测定。

(2) 实验仪器及试剂 755B 型分光光度计,聚丙烯酰胺,次氯酸钠,醋酸,蒸馏水。

(3) 实验方法 将一定浓度的适量聚丙烯酰胺样品移入 100mL 带塞三角瓶中,然后按照实验要求的药剂配比,加入浓度为 5mol/L 的醋酸溶液,轻轻摇匀。静止 1~2min 后按照配比加入质量浓度为 1.31% 的次氯酸钠溶液并摇匀。待沉淀反应完成后,溶液浑浊,用 755B 型分光光度计在波长为 470nm,2cm 比色皿中测其吸光度。实验采用的聚丙烯酰胺溶液浓度在 150~300mg/L 之间。当配比为 1:2:2 时,呈直线关系的聚丙烯酰胺浓度范围为 20~400mg/L,因此使用药物配比 1:2:2。

标准曲线如图 1 所示。

1.3 锰过氧化物酶活性测定方法

锰过氧化物 MnP 活性的测定,试剂 A:琥珀酸

收稿日期: 2004-12-19; 修订日期: 2005-03-28

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-SW-114)

作者简介: 韩昌福(1978~),男,硕士研究生,主要研究方向为废水生物处理。

* 通讯联系人, E-mail: lidp@cib.ac.cn

钠 60mmol/L, 乳酸钠 60mmol/L, 酚红 0.12 mmol/L, MnSO_4 0.12mmol/L, 明胶 3.6mg/mL, pH= 4.5; 试剂 B: 6mmol/L H_2O_2 溶液. 3mL 反应液包含 2.5mL 试剂 A .0.5mL 发酵液或稀释液 .50 μL 试剂 B, 于 30℃反应 2min 后加入 5mol/L 的 NaOH 100 μL , 终止反应, 测 610nm 波长下的吸光度变化. 一个酶活单位(U) 定义为每 min 氧化酚红 1 μmol 产物所需的酶量. 酚红的摩尔吸光系数 $\epsilon = 4460 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$.

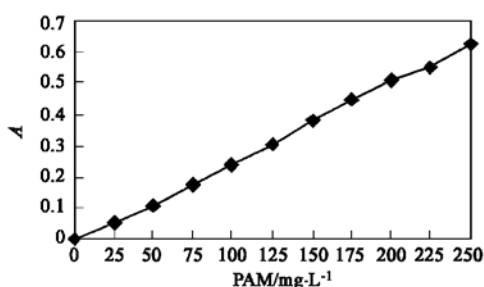


图 1 标准曲线

Fig. 1 Standard curve

1.4 降解菌的活化与驯化

基础培养基: 葡萄糖 2g/L; 酒石酸铵 0.2g/L; 苯甲醇 0.54g/L; MgSO_4 0.71g/L; KH_2PO_4 2.56 g/L; VB₁ 0.001 g/L; 邻苯二甲酸缓冲液 10mmol/L; 微量元素液 70mL; 调 pH= 6~ 6.5.

微量元素液: 胺基乙酸 0.6g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L; NaCl 1g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.56g/L; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L; HBO_3 0.01g/L; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L. 培养条件: 35℃ 150r/min 摇床培养. 菌种来源: 实验室保存黄孢原毛平革菌菌种.

(1) 菌种的活化及功能驯化 将黄孢原毛平革菌接入 50mL 三角瓶中, 加入 20mL 基础培养基, 10mL 100mg/L 水溶性聚丙烯酰胺(PAM), 35℃恒温摇床上振荡培养. 每 24h 倒出 10mL 上层清液, 然后加入 10mL 100mg/L PAM 液. 实验持续 7d 之后, 将适量菌液转移到 250mL 三角瓶中(含 50mL 基础培养基, 150mL 100mg/L PAM 液). 3d 后, 每 24h 倒出上层清液 50mL, 换入新 100mg/L PAM 液 50mL. 此过程持续时间为 21d.

(2) 降解实验 降解培养基(g/L): 酒石酸铵 0.2, 苯甲醇 0.54, MgSO_4 0.71, KH_2PO_4 2.56, VB₁ 0.001, 微量元素液 70mL, 调 pH= 6~ 6.5.

降解实验采用序批式方式. 在 250mL 三角瓶中加入 200mg/L PAM 150mL, 按照 2: 100 的体积比接种到 200mg/L 的 PAM 溶液中. 恒温 35℃培养

72h 后检测出水中聚丙烯酰胺的浓度, 数据连续采集 8 次以上.

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖加入量对降解效果的影响

在实验中, 采用 3 个平行实验, 分别加入葡萄糖的量为 0, 2, 5g/L. 从图 2 可以得出, 葡萄糖的加入量对降解效果的影响没有在降解效率上得到反映.

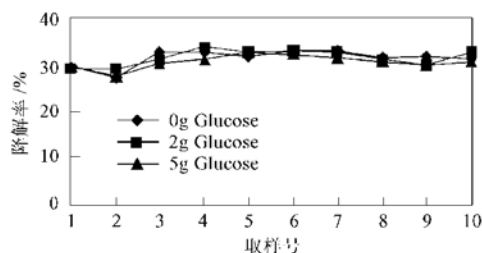


图 2 葡萄糖的加入量对 PAM 降解的影响

Fig. 2 Effect of glucose amount on degradation of PAM

2.2 pH 对降解效果的影响

在实验中, 进行了 4 个平行实验. 分别调溶液 pH 为 4, 5, 6, 7. 结果表明, 在 pH= 6 时菌种的降解能力最佳(图 3).

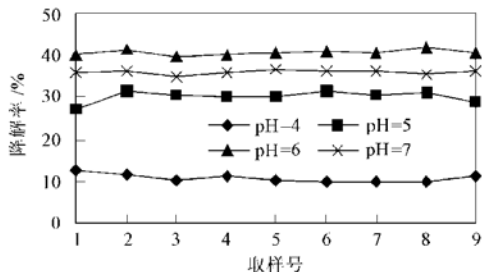
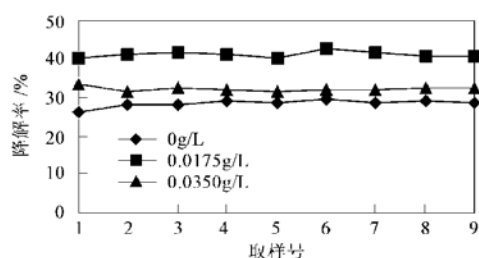


图 3 pH 对 PAM 降解的影响

Fig. 3 Effect of pH on degradation of PAM

2.3 Mn^{2+} 对降解效果的影响

在微生物生长培养阶段, Mn^{2+} 对微生物没有明显的促进作用. 在后续生物降解阶段, 在添加 Mn^{2+} 浓度为 0.0175g/L 时微生物降解能力具有相对的优势, 而未添加 Mn^{2+} 和添加 0.0350g/L Mn^{2+} 的平行实验组的生物降解能力却相对较低(图 4), 究其原因 Mn^{2+} 可以促进微生物产生催化 PAM 降解的生物酶, 产酶的和 Mn^{2+} 有着一定的量的关系^[5]. Mn^{2+} 浓度在 0.0175g/L 时, 微生物产酶活性达到了一个相对较高的水平, 而在添加了浓度为 0.0350g/L 的实验组产酶能力相反有所下降, 可能是 Mn^{2+} 在这个浓度已经抑制了 PAM 降解酶的生产. 这和有关文献^[5]指出 Mn^{2+} 对微生物产过氧化物酶具有关键作用的论断相符.

图 4 Mn^{2+} 浓度对 PAM 降解的影响Fig. 4 Effect of Mn^{2+} concentration on degradation of PAM

2.4 氮对降解效果的影响

在氮的浓度为 0.2g/L 的时候, 出现相对较高的生物降解率并且稳定在 45% 左右(图 5). 究其原因是在限氮的条件下, 菌体产生了可以催化降解聚丙烯酰胺的生物酶. 在氮浓度为 0.2g/L 时, 酶的相对产量较高. 在氮的浓度相对较高(0.3g/L)时, 氮已经对菌体不构成限制或构成不完全限制, 特种催化酶的产量已经相对下降, 表现为降解率的下降.

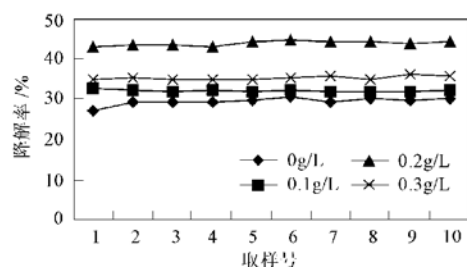


图 5 氮浓度对 PAM 降解的影响

Fig. 5 Effect of N concentration on degradation of PAM

2.5 降解时间对降解效果的影响

在未添加菌体的空白实验中, PAM 的浓度几乎没有发生变化. 从图 6 可以看出, 在降解实验中, 经过 72h 停留时间之后, 微生物降解 PAM 基本达到平衡. 平均降解效率在 50% 左右.

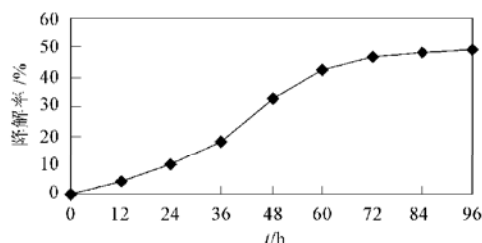


图 6 降解时间对 PAM 降解的影响

Fig. 6 Effect of degradation time on degradation of PAM

有文献指出黄孢原毛平革菌在限氮条件下, 产生可降解胺类底物的催化酶为锰过氧化物酶(MnP)^[5], 定量测定结果如图 7 所示. MnP 的活性随着 PAM 浓度的上升而逐步提高, 在低浓度 PAM

的溶液中, PAM 对微生物产生的生物抗性较低, 因此微生物只需要分泌相对少量催化酶即可降解 PAM 以满足细菌代谢需要. 当溶液中 PAM 的浓度升高时, PAM 的生物抗性因子得以加强, 微生物释放少量的催化酶已经无法满足细胞代谢的需要, 因此, 作为一个反馈, 生物酶的活性得以加强.

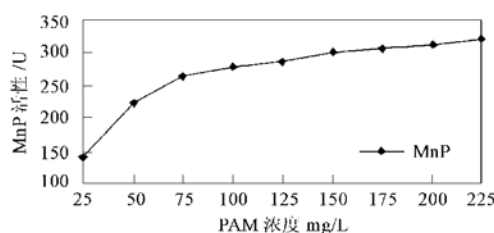


图 7 PAM 对 MnP 的影响

Fig. 7 Effect of PAM concentration on MnP

3 结论

(1) 在限氮条件($NH_4^+ = 0.2g/L$)下, 菌体产生了可以催化降解聚丙烯酰胺的生物酶, 并且, 酶的相对产量较高.

(2) Mn^{2+} 可以促进微生物产生催化 PAM 降解的生物酶, 产酶的量与 Mn^{2+} 有着一定的量的关系. $Mn^{2+} = 0.0175g/L$ 时, 微生物产酶活性达到了一个相对较高的水平.

(3) 作为一种稳定的高分子聚合材料, 聚丙烯酰胺有着极强的生物抗性, 即使是已经被降解为小分子的聚丙烯酰胺依然有着这一特征, 聚丙烯酰胺的生物降解率达到 50%.

参考文献:

- [1] Kay-shoemake L, Watwood M E, Lentz R D, et al. Polyacrylamide as an organic nitrogen source for soil microorganisms with potential effects on inorganic soil nitrogen in agricultural soil[J]. Soil Biol. Biochem., 1998, 30(8/9): 1045~1052.
- [2] Kay-shoemake J L, Watwood M E, Lentz R D, et al. Polyacrylamide as a substrate for microbial amidase in culture and soil[J]. Soil Biol. Biochem., 1998, 30(13): 1647~1654.
- [3] Kunichika N, Shinichi K. Isolation of polyacrylamide-degrading bacteria[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 80(4): 418~420.
- [4] Glenn J K, Gold M H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1985, 242(2): 329~341.
- [5] 李华钟, 章燕芳, 华兆哲, 等. 黄孢原毛平革菌选择性合成木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶[J]. 过程工程学报, 2002, 2(2): 137~141.