酞酸酯好氧最终性生物降解及其动力学研究

摘要

酞酸酯(PAEs)是一类全球性的有机污染物,有一些会对生物体产生致癌 和毒性效应,本文采用改进 Sturm 方法(以降解产物 CO₂ 作为主要测试指标) 对 PAEs 的好氧最终性生物降解及其动力学特性进行了实验研究。

采用接种驯化活性污泥的方法,结果表明: PAEs 的降解速率(k_b)随着化 合物中烷基直链碳原子数目(n)增加而减小,随着烷基侧链数目的增加而降低, 半衰期(t_{1/2})则随之而增长。在 50 ~ 200 mg·L⁻¹浓度范围内, PAEs 的降解反 应较为适宜,降解速率较快,且随着浓度的增加而稳步增加。当超过 200 mg·L⁻¹ 时,降解出现明显的停滞期。易降解有机物(如葡萄糖)会提高 PAEs 的降解 能力。PAEs 的好氧降解反应符合一级生化反应动力学。

从驯化活性污泥中筛选、分离出两株优势菌种: 假单胞菌属 PS-1 和黄单胞 菌属 PS-2,研究它们降解 PAEs 的特性。通过正交试验确定了它们的最佳生长 条件,发现 pH 值是影响其生长和降解 PAEs 效果的重要因素;降解结果表明, 优势菌种降解能力明显优于驯化的混合活性菌泥;以 PAEs 为唯一碳源的混合 菌株生长的动力学方程与 Logistic 模型较好地吻合。

关键词: 优先控制污染物 酞酸酯 好氧生物降解 降解动力学

Study of Aerobic Ultimate Biodegradation of Phthalates and Their Degrading Kinetics

Abstract

Phthalates (PAEs) used widely as plasticizers are ubiquitous organic pollutants in the environment. Some of them may cause mutagenic, carcinogenic and toxic effects on living organisms. Aerobic ultimate biodegradation of several phthalates, namely, dimethyl phthalate (DMP), diethyl phthalate (DEP), di-n-butyl phthalate (DnBP), di-n-octyl phthalate (DnOP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), and their degrading kinetics have been studied with the help of modified Sturm method in the present study.

the aerobic biodegradation of phthalates.

Then, the microbial degradative characteristics of phthalates was investigated by strains *Pseudomonas sp.* PS-1, *Xanthomonas sp.* PS-2 that were separated from the activated sludge, respectively. The optimal growth conditions were determined by an orthogonal test: namely, pH 7.0, temperature 30°C, ratio of C to N = 20 : 1, phthalates concentration 300 mg·L⁻¹. The results of phthalates degradation by the two strains indicated that the preponderant strains have stronger ability than activated sludge to degrade phthalates. Logistics model successfully fitted the biomass growth curve when phthalates were used as the sole carbon source of growth of mixed strains.

Key words: priority pollutant, phthalate, aerobic biodegradation, degradation kinetics

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据 我所知,除了文中特别加以标志和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的 研究成果,也不包含为获得<u>合肥工业大学</u>或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢 意。

学位论文作者签字: 签字日期: 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解_______有肥工业大学____有关保留、使用学位论文的规定,有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘,允许论文被查阅或借阅。本人授权_____

<u>肥工业大学</u>可以将学位论文的全部或部分论文内容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

.

导师签名: 大小场机克 签字日期:2004年(月2日 学位论文者签名: 签字日期: 年 月 Ξ 学位论文作者毕业后去向: 工作单位: 电话: 通讯地址: 邮编:

致 谢

值此论文完成之际, 谨向我的导师胡献国教授、汪家权教授致以最诚 挚的感谢!

两位导师对我研究生阶段的学习及论文撰写工作自始自终都倾注了 大量的心血,对我论文的选题、修改直至定稿一直给予精心的指导,并提 出了许多宝贵的意见。不仅如此,两位导师严谨求实的科学态度,孜孜不 倦的教诲,平易谦和的学者风范和无微不至的关怀都深深地铭刻在我的心 田,令我终生难忘,受益匪浅。

两位导师严于律己, 宽以待人, 诲人不倦, 严谨治学, 对事业孜孜以 求, 求真务实, 与时俱进, 令人钦佩。所有的这些都时刻在感化着我, 激 励着我, 使我满怀信心地走向社会。他们是我以后工作和学习的楷模。

同时,研究所的焦明华所长、俞建卫、尹延国、朱元吉等老师在我课题的研究方案上提出了很多关键性的建议,田明老师在我平时的学习、生活中给了我很大的关心和帮助。资环学院水处理实验室的王美琴老师和梅万芳老师为我的课题研究提供了便利的实验条件,同时也给予很多帮助。 在此,我谨向上述的老师与单位表示衷心的谢忱!

在这里,还要感谢本所研究生胡坤宏、詹松、胡善刚、王芳、尤涛、 黄鹏和景何风等同学,以及黄川徽、梁越敢、傅文学、王开春、叶建忠、

聂磊、冯友亮、夏明生等同窗好友们,他们平时都给了我许多建议和帮助。 祝愿他们前程似锦!

感谢合肥工业大学资环学院和摩擦学研究所以及研究生院的老师们 所付出的辛勤工作。

最后, 衷心感谢我的父母、妹妹, 他们的关心和支持是我不断向前的 动力。

作者 万金培

2004年4月

符号清单

.

μ	微生物比生长速率,d ⁻¹
μ _{max} ———	微生物最大比生长速率,d ⁻¹
<i>S</i>	某一时刻的基质浓度,mg·L ⁻¹
S_0 ———	初始时刻的基质浓度,mg·L ⁻¹
$k_{,} K_{S}$ ———	基质饱和常数,mg·L ⁻¹
X	某一时刻的微生物浓度,mg·L ⁻¹
X'	生长率下降阶段末的微生物浓度,mg·L ⁻¹
<i>K</i> ₁	对数增长速度常数,d ⁻¹
<i>K</i> ₂	减速增长速度常数,d ⁻¹
K_{3, K_d}	微生物衰减常数,d ⁻¹
<i>F</i>	t时刻残存基质浓度,mg·L ⁻¹
<i>K</i> _{<i>m</i>}	基质去除速度常数,d ⁻¹
θ_c ———	细胞平均停留时间,d
U_S	基质比去除速度,d ⁻¹
v _{max}	基质最大去除速度,d ⁻¹
Se	出水基质浓度,mg·L ⁻¹
<i>k</i> _{<i>n</i>}	反应级数
К _{ОН}	二级碱性水解常数
<i>M</i> _w	分子摩尔质量,g·mol ⁻¹
<i>M_V</i>	分子体积
TSA	分子表面积
μ	偶极矩
r _v	范德华半径,Å
<i>o</i>	Hammett 电性参数
E _{LUMO} ——	分子最低空轨道
⊿ H _f	生成热,kJ·mol ⁻¹
MCI	分子连接性指数
¹ K	一阶分子连接性指数
РКа ———	电离常数
<i>Log</i> P	正辛醇 / 水分配系数的常用对数

.

.

.

绪 第一章 论

1.1 环境中的酞酸酯类有机污染物

酞酸酯(Phthalic Acid Esters, 简称 PAEs), 又称邻苯二甲酸酯, 是邻苯二 甲酸的一类重要衍生物。在工业上一般是从萘和邻二甲苯催化氧化生成邻苯二 甲酸酐,再和相应的醇,通过酯化反应而合成。酞酸酯在工业上主要用作塑料 和橡胶等化工产品的增塑剂^[1]。此外, 酞酸酯还可用作农药载体、润滑剂、驱 虫剂、化妆品、香味品和去泡剂的生产原料,在家具、汽车、电线电缆、服装 等行业也都有着广泛的应用^[2,3]。常见的一些酞酸酯类化合物如表 1.1 所示^[2]。

随着塑料工业的发展, 酞酸酯类增塑剂的产品种类和用量日益增多, 使其 进入环境中的数量也随之增加。据报道,在大气飘尘、天然水体、土壤和生物 体以及水处理设施中都发现有它们的存在。

有资料报道^[4],在玻利维亚拉巴斯空旷无人的山区,邻苯二甲酸二(2一乙 基己基) 酯 (DOP) 浓度为 17~20 ng·m⁻³, 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 为 19~ 36 ng·m⁻³。而工业城市中这些物质的含量要高得多。如在焚烧炉附近的空气中 曾测得 DOP 的浓度为 300 ng·m⁻³, DBP 为 700 ng·m⁻³。在生产人造革和聚氯乙 烯 (PVC) 膜的工厂、车间空气中, PAEs 的蒸气浓度可达 $17 \sim 66 \text{ mg·m}^{-3}$ 。我 国的北京、兰州和比利时的安特卫普等城市,从空气颗粒物中检出的 DBP 和 DOP 含量为 150~250 ng·m⁻³。

酞酸酯类化合物对环境的污染除了喷涂涂料、焚烧塑料垃圾、农用薄膜中 增塑剂的挥发等污染大气外,工业废水的排放也导致许多国家水体、污泥和土 壤受到 PAEs 污染。

地面水中 PAEs 十分稳定,不易分解,主要来自工农业废水、地表径流和 空气颗粒物沉降等。PAEs 在水中的溶解度高于有机氯代烃类。工业地区的雨水、 河水和海水中的 PAEs 含量可比多氯联苯高出 10~1000 倍。目前, 全球地面水 中 PAEs 含量一般为 10⁻⁹级,在接近工业区的水域含量较高。如美国密西西比 河河口 DOP 浓度达 0.6×10⁻⁶,苏必利尔湖湾的水样中 DOP 为 0.3×10⁻⁶。我 国太湖水中 DIBP、DOP、DnBP 的含量达 362 µg·L⁻¹,并在无锡市的饮用水中 检出微量 DnBP、DIBP、DMP^[3]。北京高碑店地区的浅井水样中也检出了 DnBP 和DOP。高碑店污灌水中的 DnBP 为 80~258 µg·L⁻¹, DOP 为 39~218 µg·L⁻¹。 在增塑剂生产厂污水中 DBP 达 4715 µg·L⁻¹, DOP 达 4239 µg·L⁻¹。北京燕山地 区3条主要河流中都不同程度地含有6种 PAEs^[5]。

土壤中的 PAEs 通常来自工业烟尘沉降、污水灌溉、堆积的塑料废品、农 田塑料薄膜等,长期受雨水浸淋对土壤局部的严重污染。如日本爱媛县表层土

-1-

壤中的 PAEs 含量为 22~780×10⁻⁹,中国北京郊区的表层土壤中的 DOP 的含量为 0.23×10⁻⁶,DBP 为 1.1×10⁻⁶,DIBP 为 0.21×10⁻⁶,北京市工业污灌区 土壤中 DBP 和 DOP 的含量分别为对照区的 50 和 73 倍^[4]。河流底质由于水中 PAEs 的沉淀,底泥的吸附和交换作用,含量可积累到相当高的程度。山西一化 工农药厂排污出口处的底泥中检出 DOP 含量高达 8 ‰。美国俄亥俄河下游底泥 中的 PAEs 为 0.88 ‰^[5]。这些 PAEs 在水质发生变化时可再释放出来,与水中含量呈动态平衡,并污染河流的底栖水生生物。

表 1.1 常见的一些酞酸酯类化合物^[2]

英文名称		 中文名称
Dimethyl Phthalate	DMP	邻苯二甲酸二甲基酯
Diethyl Phthalate	DEP	邻苯二甲酸二乙基酯
Diallyl Phthalate	DAP	邻苯二甲酸二丙烯基酯
Dipropyl Phthalate	DPP	邻苯二甲酸二丙基酯
Di-n-butyl Phthalate	DnBP	邻苯二甲酸二正丁基酯
Diisobutyl Phthalate	DIBP	邻苯二甲酸二异丁基酯
Butylbenzyl Phthalate	BBP	邻苯二甲酸丁基苯甲基酯
Butyl 2-ethylhexyl Phthalate	BOP	邻苯二甲酸丁基乙基己基酯
Dihexyl Phthalate	DHP	邻苯二甲酸二己基酯
Di-n-octyl Phthalate	DnOP	邻苯二甲酸二辛基酯
Di(2-ethylhexyl) Phthalate	DEHP	邻苯二甲酸二(2 – 二乙基己基)酯
Diisooctyl Phthalate	DIOP	邻苯二甲酸二异辛基酯
Diisononyl Phthalate	DINP	邻苯二甲酸二异壬基酯
Diisodecyl Phthalate	DIDP	邻苯二甲酸二异癸基酯
Diundecyl Phthalate	DUP	邻苯二甲酸二(十一烷基)酯
Ditridecyl Phthalate	DTDP	邻苯二甲酸二(十三烷基)酯

Table 1.1 Schedule graph of commonly used phthalates^[2]

PAEs 由于其难生物降解, 在常规的城市污水处理工艺中去除效率较低, 易 穿透污水处理系统^[6], 于是就在城市污泥中逐渐累积下来。莫测辉等^[7]人对我 国香港和内地北京、广州等共 11 个城市污泥进行研究发现, 各城市污泥中 PAEs 总含量在 10.465~114.166 mg·kg⁻¹之间, 多数在 20 mg·kg⁻¹ 左右; 分子量较低 的 DMP、DEP、DnBP 和 BBP 在所有受考察的城市污泥中均检测到。

总之,PAEs 在环境中广泛地存在,严重污染了环境,已经成为一类全球性 的重要环境有机污染物。近些年来的研究发现,一些 PAEs 具有毒性、诱导突 变、致癌等效应,表现出雌激素的活性(Estrogenic activity)或抗雄激素的作 用,被人们称为"第二个全球性 PCB 污染物"^[5]。为此,世界各国的有关部门 及科学家们已对酞酸酯这一类污染物的环境公害引起关注。中国环境监测总站 和美国环境保护署(EPA)均将该类化合物列为优先控制污染物^[8]。

1.2 酞酸酯类污染物微生物降解研究进展

研究结果表明,在酞酸酯类有机污染物的环境行为中,酞酸酯类有机污染 物的水解、光解速率非常缓慢,生物降解是酞酸酯这类有毒有机污染物在环境 中分解的主要途径^[1]。酞酸酯类有机污染物的生物降解研究始于 20 世纪 60 年 代,一些研究发现,从各种微生物栖息地分离得到的菌种对酞酸酯类有机污染 物及其中间产物均具有一定的降解作用^[2]。国内外的许多专家学者对一些 PAEs 在土壤、天然水体及沉积物和废水(活性污泥)等环境介质中的微生物降解进 行了各种相关性的研究。

一般来说, 酞酸酯类有机污染物的微生物降解研究主要包括: 接种物试验、 原水/废水试验和土壤 / 沉积物试验以及初始性生物降解试验和最终性生物降 解试验。接种物试验是从环境中分离的微生物(经过驯化的微生物和未驯化的 微生物)接种于含酞酸酯的无机盐培养基中进行酞酸酯生物降解性研究; 原水 / 废水试验和土壤 / 沉积物试验是指在摇瓶中加入酞酸酯和环境中的原水 / 废 水、土壤 / 沉积物进行酞酸酯生物降解性能研究, 用于了解在水体、土壤 沉

积物等环境中微生物对酞酸酯酯的降解能力及特性;初始性生物降解试验是用 一定的分析方法(如 GC、GC/MS、HPLC等)测定酞酸酯的含量,以酞酸酯 类化合物母体成分的消失表征酞酸酯的降解率;最终性生物降解试验是指在好 氧条件下测定二氧化碳的释放量或氧的吸收量或在厌氧条件下测定甲烷的释放 量,表征酞酸酯的降解率^[2]。

1.2.1 酞酸酯在土壤环境中的微生物降解研究

RusseiL^[9]对酞酸酯类增塑剂在土壤环境中的迁移转化作了一些研究,但未 对其降解规律进行深入的研究。陈英旭等^[10]对邻苯二甲酸二(2 - 乙基己基) 酯(DEHP)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的降解速率、降解的影响因素进行 了试验研究,并对土壤中降解 DEHP 的微生物进行了分离。刘庆余等人^[11]研究 了 DMP、DEP 和 DBP 在土柱模拟试验条件下的降解作用,其降解效果良好, 去除率达 67 %以上,在研究过程中,发现并筛选出优势菌株(NK₁₀₃),为污水 污泥在土壤中合理施用提供了科学依据。Inman 等^[12]在实验室条件下进行了接 种物试验,以考察土壤中邻苯二甲酸、邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸二丁酯 的羧基(¹⁴C 示踪原子)分解的影响因素。Madsen 等^[13]人考察了经软淤泥改性 过的土壤中原栖(土著)菌群和接种菌群对 DEHP 等一些酞酸酯的降解特性, 并研究了 DEHP 在土壤中被生物矿化过程的动力学。Johannes^[14]分别在实验室 里模拟土壤环境和室外植物-土壤系统中,研究了邻苯二甲酸酯在土壤中的微生 物降解规律,并对实验结果进行了比较。

1.2.2 酞酸酯在天然水体环境中的微生物降解研究

PAEs 在环境中的广泛存在,使得天然水体(包括浮游的和底栖的水生生物) 也不例外地受到污染。有机污染物在水体中的消失除了通过稀释、扩散等物理 自净过程之外,生物降解过程是一个重要的自净因素。因而一些学者采用室内 模拟方法对 PAEs 在天然水环境(河水、近岸海域海水)中的自然生化自净过 程进行了研究。研究直接采用天然水体来配制模拟水样,其本身已含有微生物 菌种,因而可以较实际地反映天然水体对特定的污染物的降解情况。

Walker 等^[15, 16]研究了 DBP 在海水环境和河口淡水环境中的生物降解的潜力和影响因素。Saeger 和 Tucker^[17]分别采用了紫外分光光谱、气相色谱和 CO₂ 释出法考察了邻苯二甲酸 (PA)、邻苯二甲酸单丁酯 (MOP) 和 5 种结构不同 的 PAEs 增塑剂在河水和活性污泥中的初始性和最终性生物降解性能。

这些生化降解规律的研究为建立河域、海域水质生态模型估算水域的最大 允许排污量,制定区域性排放策略和污染控制方案提供了基础数据和理论依据。 1.2.3 酞酸酯在废水环境中的微生物降解研究

前面提到过,工业废水(如增塑剂、农药等生产)的排放导致许多国家水体、污泥和土壤受到 PAEs 污染的主要原因。活性污泥的方法是废水生物处理的重要手段,在城市污水和工业废水的处理中已取得了广泛的应用。因此,国内外一些专家学者对 PAEs 在废水(活性污泥)环境中的微生物降解进行了一些相关的研究。

Sugatt 等^[18]用摇瓶 CO₂释出法研究了 14 种商用的增塑剂在驯化污泥中的 降解性能,但未对生物降解的过程进行细致的研究。Wang 等^[19]在驯化过的活 性污泥对 3 种 PAEs (DMP, DEP, DOP)的好氧降解特性进行了研究。叶常明 和田康^[20]采用鼓泡衰减法研究了 3 种 PAEs (DMP, DBP, DAP)的生物降解 动力学。

在传统废水生物处理系统中,一些具有较强活性的微生物菌属被发现可以 降解酞酸酯类化合物,主要包括好氧的、厌氧的和兼性的菌种。Wang 等^[21]从 城市污水处理厂的活性污泥中分离筛选出几株 PAEs 好氧降解优势菌种,采用 微生物细胞固定化技术将这些菌体细胞包埋于聚乙烯醇(PVA)凝胶中,在半 连续性条件下对 DnBP 进行了好氧降解研究,并与游离细胞的降解效果相比较, 发现固定化细胞具有以下几个优点:

(1) 固定化微生物处理过程易于控制;

(2) 可在无冲失高稀释率情况下实现连续处理;

(3) 它可通过较高的细胞负荷增加 PAEs 生物降解的速率;

(4) 较高的生物催化稳定性,能有效地抵制有毒化合物对细胞的侵害。 同时还采用 GC / MS 测试方法对降解中间产物进行了分离鉴定,初步研究了 DnBP 的降解途径。Nozawa 等人^[22]利用脱氮菌对 PAEs 和其他一些芳香族化合 物的厌氧降解进行了相关的研究。Ganj 等^[23]研究了 Niger 曲霉菌对 DTDP 的代 谢作用和规律。柴素芬和曾锋等人^[24]从处理石化厂废水的活性污泥中分离出 1 株荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* FS1 和处理焦化厂废水的活性污泥中 分离出 1 株铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* FS2 和 1 株短杆菌 *Brevibacterium sp*.FS3,并研究了 3 种菌株对 DEHP 的适宜降解条件,比较了其 降解特性。曾锋等人^[25]又测定了 FS1 的邻苯二甲酸酯降解酶对邻苯二甲酸二丁 酯(DnBP)的降解特性,提出了邻苯二甲酸二丁酯酶促降解的途径。

韩关根等^[6]发现一些 PAEs,如 DnBP、DnOP 等仍是城市污水主要难溶有 机物之一,在传统的活性污泥法处理出水中常被检测到。这一问题的一个解决 方案是利用特定高活性微生物来降解这些难降解有机物,问题的关键是如何在 一适宜的生化反应器系统中对微生物营养条件进行长期的监控。

1.2.4 小结

这些研究主要集中于不同 PAEs 的生物降解性能和降解途径上,而未对 PAEs 降解过程的动力学进行过系统的研究。而且,其中大多数试验研究属于初 始性生物降解研究,即用特定的分析方法(GC、GC / MS、HPLC 等)测定邻

苯二甲酸酯的含量,以邻苯二甲酸酯类化合物母体成分的消失来表征邻苯二甲酸酯的降解率。这种研究方法虽然精密度较高,但需要特殊的仪器或装置,而 且耗用大量的昂贵药品。

1.3 本课题研究的目的、意义及其主要内容

目前,国内外对有机污染物的微生物降解研究主要目的在于两个方面:一 方面,对已造成环境污染的有机污染物,主要着重于开发有效的生物技术,包 括筛选高效的微生物降解菌株,研究污染物的降解机理,探知促使有机污染物 降解的酶或酶系,以及编码这些降解酶的基因,并利用基因工程技术构建高效 的遗传工程菌株:另一方面是建立有效的评价方法或评估预测模型,预测合成 有机物的生物降解性及其在环境中的滞留和迁移转化规律,为新合成化学品的 生产、使用及向环境中排放提供立法依据,避免再度产生如"六六六"、"DDT" 的重大环境污染事件。

本文旨在系统地从酞酸酯(PAEs)类有机污染物的结构和微生物降解性能的相关性出发,模拟废水环境采用驯化培养活性菌泥(混合菌)和纯化培养菌 (优势菌株)作为接种微生物,研究 PAEs 好氧最终性生物降解行为及其动力

- 5 -

学特性。考察酞酸酯类化合物的好氧生物降解性能及共代谢作用机制;分析其 结构和生物降解性能之间的关系以及环境因素对微生物降解 PAEs 的影响;利 用相关数学模型来描述其好氧生物降解过程,并研究微生物降解 PAEs 的动力 学特性。

本课题的研究为认识一些类似的有机污染物的生物降解规律,揭示其降解 机理,预测(如 QSBR 模型)其他一些合成有机物的生物降解性能及其在环境 中的滞留和迁移转化规律,提供了实验依据和参考。这对于指导有机废物的处 理与新型环境协调型有机材料(融功能性与可降解性于一体)的合成^[3]具有重 要的意义。同时,PAEs 降解优势菌株的分离也为开发出更有效的生物工程技术 奠定一定的基础。另外,本课题所采用的 Sturm 试验方法不受硝化作用(呼吸 测试法需要考虑硝化作用的影响)和细胞吸附的影响,而且从环境污染角度来 看,有机物的分解、转化比较彻底,能反映有机污染物的生物矿化程度,因而 也是最为有意义的。

本文首先将对邻苯二甲酸酯类化合物在微生物降解性能方面所开展的一 系列研究进行综述;其次,采用改进 Sturm 试验方法,以混合培养好氧菌泥为 接种微生物,以PAEs(实验中采用 5 种酞酸酯,即 DMP、DEP、DnBP、DnOP 和 DEHP)好氧降解的最终产物—二氧化碳的生成量作为有机物生物降解性能 评价指标,建立相应的动力学模型来研究其好氧最终性降解行为及其动力学, 并考察该类有机物的结构和微生物降解性能的相关性;再次,筛选和分离出可 降解 PAEs 污染物并具有较强耐受力的特性菌株,进行降解 PAEs 的试验,研究 该菌株好氧降解 PAEs 的特性,与混合培养的 PAEs 好氧降解菌相比较,从而助 于弄清微生物降解 PAEs 类污染物的机理;最后,在对本课题的研究结果进行 分析、讨论的基础上做出总结,并对课题中存在的亟需解决的问题以及后续的 研究提出一些积极的建议。

第二章 混合培养微生物好氧降解酞酸酯的研究

2.1 引言

本文所研究的酞酸酯是一类难以被微生物降解的苯系有机化合物,广泛存 在于增塑剂生产、农药等生产所排放的化工废水中,具有毒性大、致畸性和致 癌性强等特点,目前主要是采用生物法治理含有该类污染物的废水。

实际上,所谓难生物降解也并不是说完全不能降解,是相对于易生物降解 而言的。综合来看,形成化合物难于生物降解的原因有两方面:一是由于化合 物本身的化学组成和结构,使其具有抗降解性;二是其存在的环境因素,包括 物理因素(如温度、化合物的可亲近性等)、化学因素(如pH值、化合物浓度、 氧化还原电位 ORP、协同或拮抗效应等)、生物因素(如适合微生物生长的条 件、足够的适应时间等)阻止其降解。国内外学者就是依据以上两个方面来研 究难降解有机物的生物降解性能和开发有效的生物处理技术。目前,国内外已 建立了多种评估难降解有机物的测试方法,经常使用的方法如表 2.1 所示。

表 2.1 难降解有机物的生物降解测试方法[26]

		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
分类 Classification	方法 Methods	评价 Instructions		
根据有机物路解过程中的耗	水质指标法 Water quality	比较简单,但精度不高,粗略反		
每 鲁 According to avvicen	indices method	映有机物的好氧降解性能		
consumption duiring organia	瓦勃氏呼吸仪法	较好地反映微生物好氧氧化分		
biodegradation	Warburg respirometer	解特性, 但实验水量小对结果有		
olouegradation	method	影响,且误差大		
	基质去除率法	操作简单,但在静态条件下混合		
	Substrate removal method	及充氧的效果不好		
根据微生物降解去除有机物	微生物摇床试验法	生物作用条件好, 但吸附对测定		
的效果 According to organic	Shake flasks test	有一定的影响		
compounds removal rate by	间歇式活性污泥法	试验结果可靠,但不能模拟实际		
microbial degradation	SBR activated sludge test	运行条件		
	活性污泥模型试验	结果最为可靠,但方法较为复杂		
	Activated sludge model			
根据降解产物 CO ₂ 的生成量	斯特姆测试法	系统复杂,但能较好地反映有机		
Based on CO ₂ product	Sturm test method	物无机化程度		
根据微生物的生理生化指标	方法有:ATP法,脱氢酶	测试法,细菌平板计数测试法		
Based on microbial indices	ATP method, Dehydrogenase test. Plate microbes counting te			

Table 2.1 Biodegradation test methods of refractory organic compounds^[26]

- 7 -

本实验以斯特姆(Sturm)测试法作为主要研究手段,以考察邻苯二甲酸二 甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二正丁酯(DnBP)、邻 苯二甲酸二正辛酯(DnOP)、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)等五 种增塑剂废水中的典型污染物在单一基质和共基质条件下的好氧生物降解特性 及降解动力学。

Sturm 试验方法原理^[27]是:将样品基质和细菌接种物置于烧瓶中,以 BOD 稀释水作为生物介质,用超声波振荡分散样品,通入无 CO₂(已用碱液吸收去除)的空气,用无样品的试剂作空白试验,试验在室温下进行,使用苯胺作为检验细菌接种物的参考溶液,释放出的 CO₂用氢氧化钡溶液吸收,定时用盐酸滴定进行定量分析,通过 CO₂的释放量和样品中根据碳组分计算的理论上能产生的 CO₂气体的量计算降解率,28 d 降解率大于 60 % 的样品被认为可降解。

虽然该方法是以 CO₂ 的生成量作为生物降解性测试指标,不受硝化作用(呼吸测试法需要考虑硝化作用的影响)和细胞吸附的影响,能反映有机物生物矿化的程度,但仅以 CO₂ 的最终生成率来评价其生物降解性,是不够全面的。而且,由于接种物浓度较低,使得测试时间较长。本试验研究采用改进 Sturm 试验方法,以驯化过的活性污泥作为接种物,使反应液中保持较高的悬浮菌浓度和充足的溶解氧,测试时间(周期)也有所缩减。根据静态曝气生化反应系统的特点建立合理的活性污泥反应动力学模型,不仅能反映出 PAEs 类化合物生物矿化的程度,也可较好地考察其生物降解过程的反应速率和微生物生长变化等动态特性。

2.2 实验部分

2.2.1 实验材料

本试验研究选择了几种结构具有代表性的酞酸酯(名称、产地、纯度);

DMP	北京化学试剂公司	分析纯
DEP	北京化学试剂公司	分析纯
DnBP	北京化学试剂公司	分析纯
DnOP	北京市旭东化工厂	分析纯
DEHP	上海试剂一厂	分析纯
实验所需试剂	(名称、产地、纯度)有:	
氯化铁	北京市朝阳区通惠化工厂	分析纯
硫酸镁	上海试剂四厂	分析纯
磷酸二氢钾	北京市红星化工厂	分析纯
磷酸氢二钾	北京市红星化工厂	分析纯
磷酸氢二钠	北京市红星化工厂	分析纯
氯化铵	天津耀华化工厂	化学纯

- 8 -

氯化钠	北京益利精细化学品有限公司	分析纯
硫酸锌	北京双环化学试剂厂	分析纯
硝酸钾	北京双环化学试剂厂	分析纯
葡萄糖	杭州生物制剂厂	分析纯
硫酸锰	天津耀华化工厂	分析纯

以上试剂为配制微生物培养驯化培养液所需。

氢氧化钠	开封化学试剂厂	用于吸收 CO ₂
氢氧化钡	天津耀华化工厂	用于吸收 CO ₂
盐酸	北京化工厂	用于滴定 Ba(OH)2
碳酸钠	上海试剂一厂	用于标定盐酸

以上试剂作为 CO₂ 的吸收、分析测定用,皆为分析纯。

2.2.2 接种微生物及其驯化

接种微生物是生物降解试验很重要的一个因素。其来源可归纳为以下几种 情况:

(1) 采用天然环境中的微生物,如取自江河湖泊、沼泥、土壤等,试验所用化合物浓度一般为 5~10 mg·L⁻¹。

(2)选自污水处理场的活性污泥(用于好氧降解试验)或厌氧消化池污泥, 菌种浓度为 $10^5 \sim 10^6$ 个 CFUs·mL⁻¹, 化合物浓度一般为 $1 \sim 10^3$ mg·L⁻¹。

(3)经过筛选驯化的专性菌种。这类试验是为了研究以不同化合物为基 质培养驯化的细菌对特定化合物的降解作用、降解途径和各种特定酶在每一个

环节中的作用。

本试验接种微生物的获取方式是:取合肥王小郢市政污水处理厂曝气池中 的好氧活性污泥,用蒸馏水洗净,离心分离取其上清液(因为上清液中含有从 活性污泥菌胶团中释放出来的大量游离细菌),然后加入微生物生长、繁殖所需 的营养物质(刚开始时用葡萄糖作为碳源,并添加含一些氮、磷的营养物质和 微量元素),置于3L左右的大口玻璃瓶中曝气24h,随后进行接种污泥的驯化 培养。

接种污泥的驯化过程为:先加入少量待测试的各种 PAEs 化合物,使容器中的 PAEs 浓度在 10 mg·L⁻¹,于恒温 25℃条件下培养 24 h,然后静置 30 min, 用新鲜的驯化培养基(其组分见表 2.2)代替 50%的上清液。以后每隔 24 h 增加各待测有机物的浓度,对其进行进一步的驯化,并实时地观察驯化过程中的 微生物的生长变化情况。驯育 2 周后,待所加入的 PAEs 全部降解,得到好氧 混合菌液。活性污泥的驯化过程如图 2.1 所示。

取出驯化好的污泥混合液空气曝气 24 h,使其中微生物处于内源代谢阶段, 经过离心(4000 r·min⁻¹)、电磁搅拌洗涤、浓缩,用 pH = 7.2 的磷酸盐缓冲溶液

-9-

配成浓度为9g·L⁻¹的污泥样,置4℃冰箱中保存以备用作降解试验接种物。



图 2.1 活性污泥驯化过程简图

Fig. 2.1 Schematic diagram of acclimation of activated sludge

表 2.2 接种污泥驯化培养基组分

Table2.2 The composition of seed sludge culture medium

组分 Composition	浓度 Concen.(mg·L ⁻¹)	
硫酸镁 MgSO4·7H2O	500	
氯化钙 CaCl ₂	100	
氯化铁 FeCl ₃ ·6H ₂ O	250	
硝酸钾 KNO3	500	
磷酸氢二钠 Na ₂ HPO ₄	200	
磷酸二氢钾 KH ₂ PO ₄	1000	
氯化钠 NaCl	1000	
酞酸酯 PAEs	10 ~ 100	
硫酸锌 ZnSO4・7H ₂ O	0.10 (trace level)	
硫酸锰 MnSO ₄	0.10 (trace level)	

ν.

2.2.3 主要分析仪器及方法

实验所需主要仪器: 酸(碱)式滴定管, XSP 18B 显微镜, 751 光电分光 光度计、pHB-4 笔式酸度计等。

降解产物 CO₂ 的测定:用 0.1 mol·L⁻¹的 HCl 标准溶液滴定 CO₂ 吸收瓶中的 Ba(OH)₂ 取样液来测定残液浓度,从而计算出 CO₂ 的吸收量。

细菌密度的测定^[28]:比浊法,即根据菌悬液细胞数与浑浊度成正比,与透 光度成反比的关系,利用光电分光光度计在 600 nm 波长下测定细胞悬液的光 密度(即 OD 值),绘制两者的关系曲线,然后换算,用于表示细菌在本实验条 件下相对生长量。

细菌计数^[28]:采用稀释(涂布)平板菌落计数法,

2.2.4 实验装置

实验装置如图 2.2 所示。空气经转子流量计进入前置 CO₂ 吸收瓶 (内装 10 mol·L⁻¹ NaOH 和 0.05 mol·L⁻¹ Ba(OH)₂ 溶液) 和检验瓶 (内装红色的酚酞指示液), 然后经缓冲瓶 (以稳定气流和防止碱液进入反应瓶)进入生物反应瓶, 生物降解过程中产生的二氧化碳气体被后置吸收瓶中的 0.05 mol·L⁻¹ Ba(OH)₂ 溶液吸收,并用 0.1 mol·L⁻¹ 的 HCl标准溶液滴定以测定降解生成的 CO₂ 被吸收的量。



转子流量计 (Rotor flowmeter) 2. 前置 CO₂吸收瓶 (Frontal CO₂ absorption apparatus)
 CO₂检验瓶 (Check bottle) 4. 缓冲瓶 (Buffer bottle) 5. 生化反应器 (Bioreactor)
 水浴 (homoiothermic flume) 7. 后置 CO₂吸收瓶 (Rear CO₂ absorption apparatus)
 取样管 (Sampling vessel) 整个试验系统置于暗室中 (All in darkroom)
 图 2.2 Sturm 法好氧生物降解试验装置简图

Fig.2.2 Schematic diagram of Sturm experimental apparatus for aerobic biodegradation

2.2.5 实验备用液的配制

实验采用的 3 种无机盐培养液及磷酸盐缓冲溶液的配制: ① 硫酸镁溶液:将 22.5 g 的七水硫酸镁(MgSO4·7H₂O)溶于蒸馏水中,

- 11 -

稀释至 1000 mL 并混合均匀;

② 氯化钙溶液:将 27.5 g 的无水氯化钙(CaCl₂)溶于蒸馏水中,稀释至 1000 mL 并混合均匀;

③ 氯化铁溶液: 将 0.25 g 的六水氯化铁(FeCl₃·6H₂O)溶于蒸馏水中, 然 后稀释至 1000 mL 并混合均匀;

④ 磷酸盐缓冲溶液:将 8.5g 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、21.75g 磷酸氢二钾(K₂HPO₄)、33.4g 七水磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·7H₂O)、1.7g 氯化铵(NH₄Cl)溶于约 500 mL 水中,稀释至 1000 mL 并混合均匀。此缓冲溶液的 pH 值为 7.2。
2.2.6 相同污泥负荷下的 PAEs 降解动力学试验

在本试验中,生物反应器可分为内源呼吸瓶(只加接种物,不加 PAEs,作 为对照试验进行 CO₂实验值校正)和生化降解反应瓶(接种物和 PAEs 都加入)。 为了消除 PAEs 降解过程中光降解的影响,试验皆在暗室中进行。

实验步骤:

① 实验开始时,按1L 蒸馏水加入上述 3 种无机盐营养液各 2 mL 的比例 配制试验营养液,用 0.2 mol·L⁻¹的 NaOH 和 HCl 溶液调 pH 值至 7.0±0.2。

② 水浴预热 30 min,调节其温度使之保持在 25℃。

③ 在每个降解反应器中加入配制好的营养液 400 mL,加入等量的各种受试 PAEs,使其在各生化降解反应瓶中的浓度达到 100 mg·L⁻¹(以其理论有机碳 ThOC 计,下同),随后加入 pH = 7.2 的磷酸盐缓冲溶液 5 mL。

④ 然后再加入备用的接种活性混合菌泥(总反应液的 MLSS 约为 500 mg·L⁻¹),最后装入营养液使反应器中总反应液体积达到1 L,充分摇匀溶解,测定溶液的 OD₆₀₀ 值,使反应液的悬浮菌浓度达到约 1.2 × 10⁶ CFUs·mL⁻¹;同时,设不加受试 PAEs 的内源呼吸瓶做空白对照试验。

⑤ 接通气路,通气 10 min 后接上 CO₂ 吸收瓶,调整充气泵的气体流量为 300 mL·min⁻¹,开始计时。

⑥ 每隔两天定时从后置吸收瓶中取样进行滴定分析 CO₂ 被吸收的量(即 PAEs 生物好氧降解产生的 CO₂ 的量);同时,从反应器中取反应液样进行 pH 值和微生物观察,测定 OD₆₀₀ 值以计数。

2.2.7 不同污泥负荷对 PAEs 降解的影响试验

为了考察不同污泥负荷对 PAEs 降解的影响,在每个生物反应器中接种浓度相同的活性混合菌泥 (MLSS 500 mg·L⁻¹),然后加入不同量的 DEP、DnBP 和 DnOP (初始浓度分别为 10 mg·L⁻¹、20 mg·L⁻¹、50 mg·L⁻¹、100 mg·L⁻¹、150 mg·L⁻¹、200 mg·L⁻¹、250 mg·L⁻¹、300 mg·L⁻¹)进行好氧降解试验,每个浓度 2 次重复。实验的步骤及分析测定方法同上。

- 12 -

2.2.8 与葡萄糖共基质条件下 PAEs 的降解试验

为了考察易降解有机物对难降解有机物的生物降解的作用与影响,在生物反应器中接种驯化活性混合菌泥(浓度同上)后,然后分别在不同反应器中加入 20 mg·L⁻¹葡萄糖, 20 mg·L⁻¹葡萄糖和 100 mg·L⁻¹ DEP, 20 mg·L⁻¹葡萄糖和 100 mg·L⁻¹ DnBP, 20 mg·L⁻¹葡萄糖和 100 mg·L⁻¹ DnOP 进行共基质条件下的降解试验。实验的步骤及分析测定方法同 2.2.6。

2.3 结果与讨论

2.3.1 相同污泥负荷下 PAEs 降解的动力学

(1) 酞酸酯降解动力学模型的建立

传统的生化过程动力学模型的建立是沿用了经典微生物生长动力学的研究方法。微生物生长动力学模型描述的是微生物生长和限制生长的基质浓度之间的关系,是活性污泥法数学模型的理论基础。其中最为经典的当属 Monod 模型。1942年,Monod 发现均衡生长的细菌的生长曲线与活性酶催化的生化反应曲线类似,于是他把酶促反应的米——门(Michaelis-Menten)关系式应用到 微生物生长上,于 1949 年发表了在静态反应器中经过系统研究得出的 Monod 模型^[29]:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k+S} \tag{2.1}$$

其中: μ — 微生物比生长速率(d^{-1}), μ_{max} — 微生物最大比生长速率(d^{-1}),

 $S = 基质浓度(mg\cdot L^{-1}), k = 基质饱和常数(mg\cdot L^{-1}).$

Monod 模型实质上是一个经验式,是在单一微生物对单一基质、微生物处于平衡生长状态且无毒性物质存在的条件下得出的结论。大多数实际过程并非如此,所以在应用中对适用条件的忽视常常导致 Monod 模型的失败。

针对实际情况总是多基质并存的现象,有人又提出了微生物在混合基质条件下生长的综合模型。根据微生物对同时存在的基质的利用方式,可分为以下几种模式^[30]:

(1) 微生物同时利用几种基质:

$$\mu = \mu_{\max} \prod_{i=1}^{n} \frac{C_i}{K_i + C_i}$$
(2.2)

(2) 微生物分别利用数种基质:

$$\mu = \sum_{i=i}^{n} \left[\mu_{\max} \frac{C_i}{K_i + C_i} \right]$$

(2.3)

(3) 一种基质被同时用作多种用途:

- 13 -

$$\mu = \mu_{max} \, \frac{S^{\lambda}}{K'' + S^{\lambda}} \tag{2.4}$$

其中: μ — 微生物比生长速率(d⁻¹), μ_{max} — 微生物最大比生长速率(d⁻¹), C_i — 基质 *i* 的浓度 (mg·L⁻¹); k_i — 基质 *i* 的饱和常数 (mg·L⁻¹).

微生物生长模型的不断发展推动了活性污泥数学模型研究的日趋深入。因 而,活性污泥法数学(动力学)模型也从最初简单的拟合实验数据,到采用经 典微生物生长动力学模型,进而发展到现在的根据生物处理自身的特性进行过 程分析和辨识。

活性污泥法的传统静态模型以 20 世纪 50 - 70 年代推出的 Eckenfelder、 McKinney、Lawrence - McCarty、Grau 等模型为代表,这些模型所采用的大都 是生长 -- 衰减机理^[29~32](见图 2.3)。



图 2.3 微生物生长 --- 衰减机理

Fig. 2.3 Mechanism of microbial growth and decay

Eckenfelder 模型是 W. W. Eckenfelder Jr.对间歇式试验反应器内微生物的生 长情况进行观察后于 1955 年提出的^[30]。当微生物处于生长率上升阶段时,基 质浓度高,微生物生长速度与基质浓度无关,呈零级反应:

$$\frac{dX}{dt} = K_{I}X \tag{2.5}$$

式中: $X = 微生物浓度 (mg \cdot L^{-1}), K_1 = 对数增长速度常数 (d^{-1});$

当微生物处于生长率下降阶段时,微生物生长主要受食料不足的限制,微 生物的增长与基质的降解遵循一级反应关系:

$$\frac{dX}{dt} = K_2 S \tag{2.6}$$

式中: $X = 微生物浓度 (mg·L⁻¹), K_2 = 减速增长速度常数 (d⁻¹), S = 基 质浓度 (mg·L⁻¹);$

当微生物处于内源代谢阶段时,微生物进行自身氧化:

$$\frac{d\left(X'-X\right)}{dt} = K_{3}X \tag{2.7}$$

式中: X— 微生物浓度 (mg·L⁻¹), X— 生长率下降阶段末的微生物浓度

- 14 -

(mg·L⁻¹) K₃ — 衰减常数 (d⁻¹);

R. E. McKinney 在 20 世纪 60 年代初发表了 McKinney 模型。与 Eckenfelder 模型相比, McKinney 模型忽略了微生物浓度对基质去除速度的影响,认为在 活性污泥反应器内,与微生物浓度相比,有机物属于低基质浓度,微生物处于 生长率下降阶段,代谢过程为基质浓度所控制,遵循一级反应动力学^[28]。 McKinney 模型可以表述为:

$$\frac{dF}{dt} = -K_m F \tag{2.8}$$

式中: F - t 时刻反应器中残存基质的浓度 (mg·L⁻¹), $K_m -$ 基质去除速 度常数 (d⁻¹)。

McKinney 模型还首次提出活性物质的概念,认为活性污泥中只有部分具 有活性的微生物对基质降解起作用。虽然当时还无法直接测定活性物质,但这 一概念的提出,为活性污泥模型的研究开拓了新的思路。

A. W. Lawrence 和 P. L. McCarty 于 1970 年提出的 Lawrence-McCarty 模型最先将 Monod 方程引入废水生物处理领域^[28],该模型的基本方程式为:

$$\frac{1}{\theta_c} = \gamma U_s - K_d \qquad U_s = \nu_{max} \frac{S_e}{K_s + S_e}$$
(2.9)

式中: θ_c — 细胞平均停留时间 (d), γ — 相关系数, U_s — 基质比去除 速度 (d⁻¹), K_d — 衰减常数 (d⁻¹), v_{max} — 基质最大去除速度 (d⁻¹), S_e — 出 水基质的浓度 (mg·L⁻¹), K_s — 基质饱和常数 (mg·L⁻¹)。Lawrence – McCarty

模型的突出之处是强调了细胞平均停留时间(泥龄)的重要性。

Grau 等^[32]采用间歇式活性污泥反应器测定了去除多组分基质 COD (化学 需氧量)的动力学参数,建立起一个动力学模型。这一模型考虑的因素较多,更接近于实际的处理。

间歇式活性污泥过程是完全混合系统,该系统中基质浓度(COD)随时间 变化,但在任一时刻,可以认为整个反应器内基质浓度是均匀的。Grau 提出如 下的基质去除动力学方程:

$$-\frac{dS}{dt} = k_n x \left(\frac{S}{S_0}\right)^n \tag{2.10}$$

式中: $S \longrightarrow$ 某一时刻的基质浓度,以 COD 计, mg·L⁻¹;

 S_0 ——初始时刻的基质浓度;

x—— 微生物浓度, 以 MLVSS 计, mg·L⁻¹;

k_n----- 反应级数。

由(2.10)式可知, 基质的去除速率与系统中的基质浓度 S 和微生物浓度

- 15 -

x 有关,而在实际运行的处理系统中,微生物浓度是控制在某一数值左右的,即是一个常数。Grau 实验表明,当初始微生物浓度较大时,在整个实验过程中
 x 变化较小,因此可以用微生物的初始浓度 x₀ 作为整个过程的微生物浓度,则式(2.10) 变为

-

$$-\frac{dS}{dt} = k_n x_0 \left(\frac{S}{S_0}\right)^n \tag{2.11}$$

此式表明, 基质的去除速率只是 S 的函数。这更接近于实际处理系统的运行情况。

当是零级反应时, n=0, 方程(2.11) 变为

$$-\frac{dS}{dt} = k_n x_0 \tag{2.12}$$

曲 0 → t, S₀ → S 对 (2.12) 积分得 S₀ - S = k₀ x₀ t = a t (2.13) 式中 a = k₀ x₀, 所以 k₀ = $\frac{a}{x_0}$ (2.14) 当是一级反应时, n = 1, 方程 (2.11) 变为 $-\frac{dS}{dt} = k_n x_0 \frac{S}{S_0}$ (2.15)

同上,对(2.15)积分得

.

$$ln \frac{S}{S_0} = \frac{k_l x_0}{S_0} t = bt$$

$$\vec{x} + b = k_l x_0 / S_0, \quad \text{M}$$

$$k_l = \frac{S_0 b}{x_0}$$
(2.16)
(2.17)

当是二级反应时, n=2, 方程(2.11) 变为

$$-\frac{dS}{dt} = k_n x_0 \left(\frac{S}{S_0}\right)^2 \tag{2.18}$$

$$\frac{S}{S_o} = \frac{1}{1 + \frac{k_2 \chi_o t}{S_o}},$$
 整理后得

$$\frac{S_0 t}{S_0 - S} = \frac{S_0}{k_2 x_0} + t = c + t$$
(2.19)

- 16 -

式中
$$c = \frac{S_o}{k_2 x_o}$$
, 则
 $k_2 = \frac{S_o}{c x_o}$ (2.20)

这些传统模型对实际系统和过程机理作了很大简化,所导出的稳态结果基本满足工艺设计要求,具有模型变量可直接测定、动力学参数测定及方程的求解比较方便等特点,故得以在环境工程领域内长期广泛地使用。

本文在这些研究成果的基础上,以含 PAEs 化合物的模拟废水为对象,从 理论上进一步分析和归纳,采用受试有机物微生物好氧降解的最终产物二氧化 碳的形成代替传统底物浓度的降低的方法来描述酞酸酯类污染物的微生物降解 过程的动力学,初步建立了该类化合物生物氧化的动力学模型。

本实验属于静态曝气间歇式活性污泥反应过程,类似于 Grau 的试验研究,属于完全混合系统型,可以认为反应器内各空间点的底物浓度是相同的。基质的去除速率是存在于反应器中的基质浓度的函数。

如果以 P 代表受试有机物(在本文中为 PAEs)达到完全生物降解所产生的二氧化碳(有机碳)的量,以它反映存在于生化反应器中的该有机物的浓度,并假设降解符合一级反应动力学方程,则有:

 $-\frac{dP}{dt} = k_b P \tag{2.21}$

即有机物的生物降解速度与该时尚未降解(或尚未转化为二氧化碳)的有机物的有机碳量成正比,反应速度常数为k_b,也就是说微生物的数目能迅速调

整,适应于食物的数量,其本身并不成为限制因素,而决定降解速率的因素是可供微生物利用的食物数量。

若反应开始时,全部有机物通过生物降解所能产生的二氧化碳的总量用 P_u 表示,以反映加入反应器中的有机物的初始浓度,经过时间 t 后下降为 P_t,对式(2.21)积分可得:

$$P_{t} = P_{u} \exp\left[-k_{b}(t-\lambda)\right]$$
(2.22)

式中: λ 表示停滞期时间。再以 $PCD = P_u - P_t$;表示经时间 t 后降解所产生的二氧化碳量即投入反应的有机碳量,即 PAEs 被微生物降解的量。则有:

$$PCD = P_{u} \left\{ l - exp \left[-k_{b} \left(t - \lambda \right) \right] \right\}$$
(2.23)

由式(2.23)可推算出受试有机物降解半衰期 $t_{\frac{1}{2}}$,则有:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k_b} \tag{2.24}$$

- 17 -

(2) 实验结果及模型验证

在相同接种污泥浓度条件下,对 DMP、DEP、DnBP、DnOP、DEHP 等 5 种 PAEs 在初始浓度同为 100 mg·L⁻¹时好氧最终性降解试验所测结果如表 2.3 所示。根据表中数据,绘出 PAEs 降解过程中各反应器中生成的 CO₂ 量随时间变 化图,如图 2.4 所示。

表 2.3 各 PAEs(100 mg·L⁻¹)在不同反应时间生成的二氧化碳量

反应时间	CO2 生成量 PCD (Production of Carbon Dioxide) (mmol·L ⁻¹)							
Time (d)	Inoculum	DMP	DEP	DnBP	DnOP	DEHP		
2	3.12	7.39	7.18	6.77	6.20	5.55		
4	5.48	11.24	11.01	10.52	9,90	8.30		
6	6.26	12.54	12.31	11.82	11.22	9.32		
8	6.34	12.81	12.58	12.09	11.57	10.86		
10	6.45	12.97	12.73	12.27	11.77	11.28		
12	6.53	13.07	12.84	12.37	11.91	11.41		
14	6.58	13.13	12.90	12.43	11.98	11.72		
16	6.60	13.16	12.92	12.47	12.01	11.78		
18	6.62	13.19	12.96	12.48	12.03	11.83		
20	6.63	13.20	12.98	12.50	12.05	11.84		

Table 2.3 Production of CO₂ during phthalates (100 mg \cdot L⁻¹) degrading at different days



图 2.4 初始浓度为 100 mg·L⁻¹条件下各 PAEs 的降解曲线 Fig. 2.4 Biodegradation patterns of PAEs over time at initial concentration of 100 mg·L⁻¹

- 18 -

在 PAEs 降解过程中,反应器中的微生物菌群的生长以及反应液的 pH 值 也会随之产生一些变化,试验记录的结果如表 2.4 和图 2.5 所示。

反应时间 -	细菌浓度 Bacterial concentration (×10 ⁶ CFUs·mL ⁻¹)							
Time (d)	Endogenic	DMP	DEP	DnBP	DnOP	DEHP		
	bioreactor	bioreactor	bioreactor	bioreactor	bioreactor	bioreactor		
2	2.6	6.9	6.7	5.2	4.9	4.3		
4	5.7	15.7	15.2	11.8	11.2	9.8		
6	8.6	69.8	67.7	52.8	48.7	42.5		
8	12.5	689.6	668.6	521.5	48 1.2	419.8		
10	16.2	1091.6	1058.6	825.7	761.9	665.6		
12	13.6	1885.2	1832.3	1418.7	1316.5	1152.6		
14	11.5	1120.3	1086.5	847.6	781.1	683.2		
16	7.8	1043.5	1012.6	789.5	727.5	636.5		
1 8	7.2	963.2	934.7	728.6	671.5	587.5		
20	6.5	913.8	886.7	691.2	637.6	557.2		

表 2.4 PAEs(100 mg·L⁻¹)降解过程中各反应器的细菌浓度变化

Table 2.4 Variation of Bacterial concentration in each bioreactor during phthalates degrading



图 2.5 PAEs 降解过程中各反应体系中的 pH 值随时间的变化 Fig. 2.5 Curve of variation of pH value in each bioreactor over time

- 19 -

根据表 2.3 中的实验数据,利用 Matlab 软件编写的计算程序求出式(2.23) 和(2.24)中的 K_b、P_u和 t_{1/2}三个参数,进而得到其生物降解动力学方程。参数计算结果如表 2.5 所示。

表 2.5 PAEs 降解动力学模型参数 k_b和 t_{1/2} 的分析结果

				0
化合物	动力学方程	速率常数(d ⁻¹)	半衰期(d)	复相关系数 R ²
PAEs	Kinetics equation	Rate const.k _b	Half life $t_{1/2}$	Correlat. coefficient
DMP	$PCD = 6.57 (1 - e^{-0.526 t})$	0.526	1.31	0.989
DEP	$PCD = 6.35 (1 - e^{-0.512 t})$	0.512	1.35	0.996
DnBP	$PCD = 5.87 (1 - e^{-0.487 t})$	0.487	1.42	0.991
DnOP	$PCD = 5.42 (1 - e^{-0.421 t})$	0.421	1.64	0.998
DEHP	$PCD = 5.21 \ (1 - e^{-0.315 t})$	0.315	2.20	0.875

Table 2.5 Estimation of parameters k_b and $t_{1/2}$ in PAEs biodegrading kinetics model

从表 2.5 中的动力学模型拟合结果来看, 5 种 PAEs 的降解可以用前面建立 的降解动力学方程进行描述,而且模型拟合值和实验测得值之间的相关性也较 好,除 DEHP 这种酞酸酯之外,其他 4 种酯的相关性系数 *R*² 都在 0.98 以上, 可以认为, PAEs 化合物在混合培养菌好氧作用下的最终性生物降解反应符合一 级酶生化反应动力学。

(3)分析与讨论

由图 2.4 所示的 5 种 PAEs 降解曲线可以看出, 随着时间的增长, 各反应系

统中降解所生成的二氧化碳量 PCD 值逐渐趋于一个最大值 P_u。从以上动力学 模型分析结果来看,理论上,此类化合物生物降解反应符合一级酶反应动力学。 由表 2.5 可以看出,在相同的污泥负荷下,对于具有烷基直链结构的 PAEs 化合 物,降解速率常数(k_b)的大小顺序为:邻苯二甲酸二甲基酯(DMP) > 邻 苯二甲酸二乙基酯(DEP) > 邻苯二甲酸二正丁基酯(DnBP) > 邻苯二甲酸 二辛基酯(DnOP);这是因为烷基直链碳数的增多,阻碍了微生物攻击酯基和 芳环的能力,明显地降低了 PAEs 的生物降解能力。在烷基链含碳数目相同的 情况下,具有直链结构的 DnOP 降解速率大于含支(侧)链的 DEHP,这是由 于直链的结构的 PAEs,微生物较易接近它们的碳核发生氧化降解反应,而异构 酯(DEHP)则稍难些,因而直链 PAEs 生物降解性能较好。由此可以初步推断, PAEs 分子中碳链的支化程度越大,其生物降解降解性能越差。总之,随着烷基 链含碳数的增加和分枝侧链的增加,分子体积也相应地增加,增大了分子对生 物反应的位阻效应,妨碍了酶反应活性中心与有机底物很好的结合,从而降低 了有机物(PAEs)的生物降解性能。这些都说明了 PAEs 本身的结构特性(如

- 20 -

分子量的大小及分子链的支化程度)对其生物降解性能的影响还是比较重要的。

随着 PAEs 降解反应的进行,反应器中微生物菌群的浓度也相应地发生一些变化。由表 2.4 可以看出,在反应进行到 4 d 时,各个反应体系中细菌浓度 增长很小,随后细菌浓度呈指数增长趋势,其中以 DMP 反应体系中微生物浓度增长最快,增长速度大小顺序为:DMP > DEP > DnBP > DnOP > DEHP。当反应进行到第 12d,微生物浓度增至最大,DMP 、DEP、DnBP、DnOP、DEHP 反应体系中的菌悬液浓度分别为 1885.2 ×10 ⁶ CFUs·mL⁻¹、1832.3 ×10 ⁶ CFUs·mL⁻¹、1418.7 ×10 ⁶ CFUs·mL⁻¹、1316.5 ×10 ⁶ CFUs·mL⁻¹、1832.3 ×10 ⁶ CFUs·mL⁻¹、1418.7 ×10 ⁶ CFUs·mL⁻¹、1316.5 ×10 ⁶ CFUs·mL⁻¹、1152.6 ×10 ⁶ CFUs·mL⁻¹,分别是原加入的细菌浓度的 1571 倍、1526 倍、1182 倍、1097 倍、960 倍。当反应继续进行时(14 d 以后),CO₂生成量曲线也达到一个平坦区(见图 2.4),细菌生长开始出现下降趋势,这是因为随细菌的发育成熟、PAEs 基质营养成分的减少和降解程度的提高,细菌与细菌、菌体与反应液中不溶解物质,粘合在一起,形成一些菌胶团,沉在反应器的底部。而且细菌代谢产物的积累也会对细菌产生毒害,一部分细菌自溶,也使游离细菌数目的减少。

由图 2.5 可知,在 PAEs 整个降解过程中,反应器中的反应液的 pH 值略有降低,但变化范围(7.2~5.8)不是很大。这是由于 PAEs 在悬浮微生物酯酶的作用下水解形成邻苯二甲酸单酯,再生成邻苯二甲酸和相应的醇。在好氧条件下,邻苯二甲酸在加氧酶作用生成 3,4 - 二羟基邻苯二甲酸或 4,5 - 二羟基邻苯二甲酸后,形成原儿茶酸等双酚化合物,芳香环开裂形成相应的有机酸^[2],导致反应液的 pH 值的下降。另一方面, PAEs 降解过程中生成的 CO₂ 部分地溶于反应液形成 H₂CO₃ 和 HCO₃⁻,也会使反应体系的 pH 值有所下降。

在了解了该实验条件下各 PAE 的降解速率和降解过程中微生物菌群的生 长变化以及反应体系 pH 值的变化以后,我们仍需要知道各 PAEs 最终被微生物 降解的程度,这也是研究其生物降解的一个很重要的方面。

将各 PAEs 生化降解所转化的 CO₂ 量(扣除对比空白)与初始投入反应器中的 PAEs 理论上所含有机碳含量的比值作为其生物降解度,以反应时间为横坐标,生物降解度为纵坐标,可绘出 PAEs 生物降解度曲线,如图 2.6 所示。

由图 2.6 可以看出,反应刚开始的一段时间内,各 PAEs 的降解度增加较大, 当进行到第 10 d时,DMP、DEP、DnBP、DnOP、DEHP 等 5 种 PAEs 的生物 降解度都超过了 55 %,分别为 69.86 %、78.27 %、75.40 %、63.87 %、57.98 %。 这是由于经过驯化后的混合微生物菌群已经对 PAEs 这类化合物有所适应,初 步形成了诱导酶系,加之试验前又对其进行空气曝气 24 h,使其中微生物处于 内源代谢阶段,因而具备一定的降解 PAEs 的能力。但随着反应时间的延长, PAEs 的降解程度增加的幅度逐渐变小。当反应至实验结束的第 20 d,5 种 PAEs 的降解度则分别达到 70.47 %、78.87 %、76.23 %、65.06 %、62.55 %。可以发 现,5 种 PAEs 最终生物降解度都超过了 60 %,证明在此实验条件下是可以较

- 21 -



图 2.6 相同污泥负荷下各 PAEs 的生物降解度曲线

Fig. 2.6 Biodegradation degree of PAEs under the same sludge load

综上所述,在该实验条件下,PAEs 类化合物在接种混合培养的微生物菌群 作用下的降解过程符合一级酶反应动力学,降解速率随着化合物分子量的增加 而减小,而且分子链的支化程度对其降解速率也有一定的影响。通过反应体系 中悬浮菌浓度和 pH 值以及 PAEs 生物讲解度的测定和分析,可以有助于我们更

好地考察该类化合物的好氧降解反应的动态过程。

2.3.2 酞酸酯生物降解性能 QSBR 模型的初步研究

由以上的分析与讨论可以看出, PAEs 化合物的生物降解性能与其自身化学 结构存在着较为密切的关系。可以认为, PAEs 化合物的生物降解速率控制因素 为化合物空间结构。下面着重从 PAEs 化学结构与生物降解性能相关性角度出 发,对 PAEs 进行初步的 QSBR 模型研究。首先对有机物生物降解性能 QSBR 研究原理及相关研究的进展作一下概括性的介绍, 然后将其原理和方法具体地 应用到本文研究对象 PAEs 的 QSBR 模型研究之中。

(1) 有机物生物降解性能 QSBR 研究原理简述^[33, 34]

众所周知, 生物降解是有机污染物在环境中降解的最重要途径之一, 也是 最自然的, 但有机物种类、数目繁多, 逐一地对其用复杂的系统和方法进行生 物降解性能研究既耗时又不经济, 而定量 / 定性结构 — 生物降解性能 QSBR / SBR 模型能够迅速、有效地预测有机物的生物降解性能。

将有机物的结构描述符或理化性质同其生物降解性联系起来的定量数学

- 22 -

模型统称为定量结构 —— 生物降解性关系模型,即 QSBR(Quantitative Structure Biodegradability Relationships)模型。

QSBR 模型的起源可追溯到定量构效关系 QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships)。最初, QSAR 作为定量药物设计的一个研究分支,随着 合理设计生物活性分子的需要而发展起来。目前,它已在有机化学、药理学、 毒理学等领域中的药物分子设计、筛选及毒性预测等方面发挥了重要作用。近 年来,随着许多新的合成化学品的出现以及它们的流失,随着人们对已进入环 境的污染物且尚未进入市场的新化合物的生物活性、毒性乃至环境行为的关注,QSAR 在环境研究领域也得到应用并成功地对许多化合物的生物活性、毒性等 参数进行了预测、评价和筛选。相应地,生物降解性能作为描述有机物环境行 为的一个重要参数,QSAR 在生物降解性能方而的应用也就逐渐形成一个分支: 定量结构 — 生物降解性能关系 QSBR 研究。

QSBR 主要研究的是建立有机物生物降解性能与其结构描述符的定量关系。这种定量关系的基础为线性自由能关系(Linear Free-Energy Relationship, LFER)概念。LFER 理论认为,分子结构的微小变化将导致限速步骤活化能的线性变化,进而影响到反应速率的改变。用数学式表达:

 $\log K = A_1 X_1 + A_2 X_2 + \dots + A_n X_n + C$ (2.25)

式中: K 为生物降解速率常数, A --A, 为系数, X, --X, 为有机物分子结构 描述符, C 为常数。

建立式(2.25)所示的定量关系(亦即 QSBR),需要测定或收集研究对象

尽可能多的生物降解性能数据及彼此较为独立的分子结构描述符。采用诸如回 归分析等一些数学统计方法,去除对生物降解性能影响小的参数,保留重要参 数经过统计检验,数据经过校验以后,就可用于研究对象生物降解机理分析, 定量预测研究条件下的未知有机物生物降解性能。

从QSBR 关系式的建立过程可以看出最重要的步骤是测定或收集研究对象的生物降解性能数据及选用合适的分子结构描述符。在开发和应用 QSBR 时, 所获得数据的质量及所选用分子结构描述符是否恰当,决定着预测模式的质量, 也就是说,必须获得高质量的生物降解性能数据,考虑所有可能的结构参数。 对于具体的研究对象上须从所研究物质本身的结构特点、参数与性能的相关性 等方面进行多种参数的试算、比较,最终选定相关性最大、最能反映物质特点 的参数进行 QSBR 研究。在 QSBR 研究中最困难的步骤就是化合物结构参数的 量化,建立可信、易测量或易计算的分子描述符是 QSBR 的主要环节。

对于可溶于水的有机物,这将涉及到它在微生物表面的吸附、通过细胞膜的磷脂双分子层、与酶反应活性中心部位的结合及其分子结构的改变等过程。 对于微溶于水的有机物,还涉及到有机物的溶解、水相中的扩散等过程。因此,

- 23 -

从物质本身的结构出发,影响生物降解的因素就有溶解性、分子大小、疏水性 能、电荷分布、空间排列等参数,这些参数也就构成了分子的结构描述符。按 照量子生物学的观点,影响生物降解性能的参数可分为电性参数、空间参数及 疏水性参数。

(a) 电性参数

电性参数反映物质的电荷分布情况,对生物降解过程的影响主要体现在有 机物反应中心电子云密度的高低上。目前,用于反映有机物电性参数的主要有 取代基参数、全分子参数及量子化学参数,如 Hansch 取代基常数 π、最高轨道 占有能 *E*_{HOMO}、最低空轨道能 *E*_{LUMO}、电子能 *E* 等。各电性参数从不同角度揭 示了物质的电性特点。例如,对于具有相同骨架不同取代基的一系列物质,在 选用电性参数时,通常采用取代基参数进行描述。对于需要描述物质整体电性 效应的情况,则常常采用电性全分子参数描述。量子化学参数虽然能从微观角 度更深刻、更细致地揭示分子中的电性作用,但计算十分复杂。

(b)空间参数

空间参数反映了物质分子大小、基团或原子之间的空间排列及变形情况, 影响着物质的传递过程以及与酶反应活性中心的接触。目前常用的空间参数有 体积参数、形状参数及三维参数,如摩尔体积 V_M、分子量 M_W、分子表面积 TSA、 偶极矩 μ、折射系数 n_D等。

值得提及的是,在众多空间参数中,分子拓扑结构参数是一类被广泛采用的参数它们具有简单、方便、所需参数不依赖于实验、在计算过程中不需考虑 复杂的电效应等优点自从 1947 年 Wiener 提出"径数 W"以来,QSAR 中已引

入越来越多的拓扑结构参数,并取得较大的成功。其中,尤以 Kier 的分子连接 性指数 (MCI) 影响最大,成为目前 QSAR 研究中最成功的空间拓扑结构参数。 近年来,分子连接性指数也逐渐应用于 QSBR 的研究中。

(c)疏水性参数

"疏水"概念最早由 Kauzmann 于 1959 年提出, 疏水性越强, 有机物越具 有油溶性。疏水性能的大小影响着物质在细胞膜上的吸附、积累、界面传输以 及与酶蛋白结合等过程,目前描述疏水性参数有 Hansch 推荐的正辛醇 / 水分配 系数 P、Hansch 疏水取代基常数 π_x、疏水碎片常数 f、有机物溶解度 S_{aq}。正辛 醇 / 水分配系数 P 的实验研究较多, 大量化合物的分配系数均可以从有关文献 中查到, 近年来在 QSBR 研究中多采用正辛醇 / 水分配系数的常用对数值 Log P 作为表征疏水性的参数。

一些有机物的这些参数可通过查阅文献和间接计算求得,利用这些参数构成的分子结构描述符,结合大量的已测定或收集到所研究对象的生物降解性能数据就可以进行相关的 QSBR 研究了。

人们研究 QSBR 模型开始于 19 世纪 60 年代。此后,许多学者陆续地得到

- 24 -

一大批较有意义的 QSBR 模型, 朝以预测有机物的生物降解性。表 2.6 是按时间顺序列出近十几年关于 QSBR 研究的一些有代表性的报道。

目前,该领域的研究已逐渐应用于有机物的降解动力学及降解机制的探讨 之中,这对于指导有机废物的处理与新型环境协调性有机材料的合成都具有重 要的意义。

表 2.6 近年来有关 QSBR 研究的部分文献

序号	研究涉及化合物	使用的结构描述符	参考文献	年代
No.	Compounds studied	Structural descriptor	Reference	Year
1	取代酚,邻苯二甲酸酯	Ø	35	1 980
	Substituted phenols phthalates			
2	酚衍生物 Phenol derivatives	r _v	36	1982
3	脂肪醇、邻苯二甲酸酯	Log P	37	1983
	Fatty alcohols, phthalates			
4	氯酚及相关化合物	Log P	38	1984
	Chlorophenol and correlatives			
5	取代酚,苯胺	σ	39	1985
	Substituted phenols, aniline			
6	取代苯胺 Substituted anilines	r _v	40	1985
7	部分微溶有机物	溶解速率	41	1986
	Some poorly soluble organics	Solution rate		
8	取代苯胺 Substituted anilines	r _v	42	1987
9	芳香族化合物及衍生物	σ, MCl	43	1993
	Aromatic compounds and			
	their derivatives			
10	邻苯二甲酸酯及几种多环芳	溶解速率	44	1 996
	烃 Phthalates and a few PAHs	Solution rate		
11	部分芳香族化合物	溶解度	45	1 996
	Some aromatic compounds	Solubility		
12	124 种化合物	基团参数,分子连接性指数	46	1996
	124 compounds	Group parameters, MCI		
13	酚类 Phenols	$M_{W}, \mu, E_{LUMO}, TSA, {}^{1}K, \Delta H_{f}$	34	2001
14	取代苯类	基团参数	47	2002
	Substituted benzenes			
15	取代苯酚,苯胺	M _w , M _v , PKa, Log P	48	2002
	Substituted phenols, aniline			

Table 2.6 Part of research papers on QSBR published in recent years

- 25 -

上表中相关符号所代表的意义: σ —— Hammett 电性参数; Log P —— 正 辛醇 / 水分配系数的常用对数; MCI —— 分子连接性指数; E_{LUMO} —— 分子 最低空轨道; ${}^{1}K$ —— 一阶分子连接性指数; r_{v} —— 分子范德华半径; M_{W} —— 分子摩尔质量; μ —— 偶极矩; M_{v} —— 分子体积; PKa —— 电离常数; TSA —— 分子表面积; ΔH_{f} —— 生成热。

(2) 酞酸酯的化学结构与其生物降解性能的相关性

由前面 2.3.3 小节里分析与讨论可知,在所研究的 DMP、DEP、DnBP、DnOP、 DEHP 这 5 种结构相似的 PAEs 同系物中,决定或影响降解的主要因素就是分 子的大小,以及由分子大小变化所带来的相关化学性质,如 M_w、r_v、K_{OH}等。 M_w、r_v都是描述分子大小的空间参数,能反映分子的空间阻碍效应。K_{OH} 是碱 性水解常数,是表示有机物在碱性条件下水解程度的参数,能反映该有机物的 水溶性。

关于 PAEs 的 QSBR 模型研究,前人也进行了一些相关的研究。Wolfe^[34] 从 PAEs 的水解常数与降解速率常数的相关性出发,在 K_{OH} 和 Log k_b之间建立 了如下的定量关系式:

Log $k_b = 2.1 \text{ Log } K_{OH}^{-6}$ (2.26) Boethling^[49]则研究了 PAEs 的分子摩尔质量 M_w、正辛醇 / 水分配系数的对数 Log P 和降解常数之间的相关性,建立了下面的定量关系式:

 $K' = -24.31 \log P + 394.84$ (2.27)

 $K' = -0.977 \,\mathrm{M_w} + 532.976 \tag{2.28}$

式中 Log P 是宏观疏水性参数,可反映 PAEs 化合物分子脂溶性的大小。

为了更清晰地了解 PAEs 的降解与其结构之间的关系,本文作者将直链 PAEs 降解的速率常数 (k_b) 和半衰期 ($t_{1/2}$) 与烷基链碳原子数目 (n,即酯化 合成 PAEs 的相应醇的碳原子数目 n) 进行了多项式拟合,得到如下的关系式;

 $\ln k_b = -0.6243 - 0.0181n - 0.00149n^2 \qquad r = 0.995 \qquad (2.29)$

 $t_{\frac{1}{2}} = 1.2866 + 0.0239n + 0.0025n^2 \qquad r = 0.992 \qquad (2.30)$

由以上两式可以得出:随着烷基链碳原子数(n)的增加, PAEs 降解的速 率常数(k_b)则随之降低,半衰期(t_{1/2})相应地增加。

非线性回归方程式(2.29)和(2.30)是从实验条件下获得的好氧最终性 降解速率常数与化合物分子中烷基链碳原子数之间建立的相关关系,它反映了 PAEs 类化合物的生物降解性与其结构之间的良好相关性。这与前人从化合物的 水解常数与降解速率常数之间获得的降解相关性比较,具有一致性,也具有可

- 26 -

比性,因为 PAEs 的好氧降解速率常数随分子烷基链碳原子数而变化的趋势, 与降解速率常数随 PAEs 水解常数而变化的规律是一致的。但本文所建立的关 系式更为直接,因而更具有意义。通过定量关系式(2.29)和(2.30)还能准 确计算和预测 PAEs 同系物中其余化合物的降解速率常数和半衰期。



Fig. 2.7 The logarithm of k_b in relation to the carbon number of the alkyl side chain



- 27 -

图 2.7 和 2.8 则更为直观地说明了 PAEs 的好氧生物降解性能与其化学空间 结构参数(烷基链碳原子数)之间存在着良好的相关性。以上这些为该类化合 物的定量结构与生物降解性能关系的研究提供了很好的实验依据。

2.3.3 不同污泥负荷对 PAEs 降解的影响

(1) 实验结果

受试物

在相同活性污泥浓度、不同初始浓度条件下,对 DEP、DnBP、DnOP 等 3 种 PAEs 进行的好氧降解试验结果如表 2.7~13 所示。

表 2.7 初始浓度为 10 mg·L⁻¹ 时 PAEs 降解试验结果

Table 2.7 Experimental results of phthalates degradation at initial concentration of 10 mg·L⁻¹

受试物	试物 不同反应时间 CO ₂ 生成量 (PCD at different days) (mn				nol·L ⁻¹)					
Materials	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Inoculum	3.12	5.48	6.26	6.34	6.45	6.53	6.58	6.60	6.62	6.63
DEP	3.36	5.88	6.76	6.91	7.06	7.16	7.23	7.26	7.29	7.31
DnBP	3.31	5.80	6.68	6.82	6.98	7.09	7.16	7.20	7.23	7.25
DnOP	3.22	5.68	6.53	6.66	6.82	6.94	7.02	7.08	7.12	7.14

表 2.8 初始浓度为 20 mg·L⁻¹ 时 PAEs 降解试验结果

Table 2.8 Experimental results of phthalates degradation at initial concentration of 20 mg·L⁻¹

不同反应时间 CO ₂ 生成量((PCD at different days) (mmol·L ⁻¹)
-----------------------------	---

Materials	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Inoculum	3.12	5.48	6.26	6.34	6.45	6.53	6.58	6.60	6.62	6.63
DEP	3.82	6.51	7.45	7.60	7.74	7.84	7.90	7.92	7.94	7.95
DnBP	3.72	6.39	7.33	7.49	7.64	7.74	7.80	7.83	7.85	7.86
DnOP	3.58	6.21	7.16	7.34	7.51	7.62	7.69	7.73	7.75	7.77

表 2.9 初始浓度为 50 mg·L⁻¹ 时 PAEs 降解试验结果

Table 2.9 Experimental results of phthalates degradation at initial concentration of 50 mg·L⁻¹

受试物	不同反应时间 CO2 生成量 (PCD at different days) (mmol·L ⁻¹)									
Materials	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Inoculum	3.12	5.48	6.26	6.34	6.45	6.53	6.58	6.60	6.62	6.63
DEP	5.14	8.26	9.32	9.50	9.65	9.75	9.8 0	9.82	9.84	9.85
DnBP	4.90	7.98	9.05	9.25	9.41	9.52	9.56	9.58	9.60	9.62
DnOP	4.58	7.64	8.75	8.97	9 .15	9.2 7	9.33	9.36	9.38	9.39

- 28 -

表 2.10 初始浓度为150 mg·L⁻¹ 时 PAEs 降解试验结果

Table 2.10 Experimental	results of phthalates	degradation at initial	concentration of	150 mg·L *
			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

受试物	不同反应时间 CO2 生成量 (PCD at different days) (mmol·L ⁻¹)									
Materials	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Inoculum	3.12	5.48	6.26	6.34	6.45	6.53	6.58	6.60	6.62	6.63
DEP	9.23	13.68	15.17	15.49	15.68	15.79	15.85	1 5.8 7	15.89	15.90
DnBP	8.63	12.95	14.43	14.76	14.96	15.07	15.13	15.15	15.17	15.18
DnOP	7.81	12.0	13.54	13.91	14.13	14.26	14.32	14.35	14.37	14.38

表 2.11 初始浓度为 200 mg·L⁻¹ 时 PAEs 降解试验结果

Table 2.11 Experimental results of	on the provided at the provide	al concentration of 200 mg·L [*]
------------------------------------	--	---

受试物	不同反应时间 CO2 生成量 (PCD at different days) (mmol·L ⁻¹)									
Materials	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Inoculum	3.12	5.48	6.26	6.34	6.45	6.53	6.58	6.60	6.62	6.63
DEP	11.10	16.13	17.81	18.19	18.40	18.51	18.57	18.60	18.62	18.63
DnBP	10.28	15.15	16.82	17.21	17.43	17.54	17.61	17.63	17.65	17.66
DnOP	8.87	13.50	15.16	15.59	15. 84	1 5.97	16.04	16.07	1 6.09	16.10

表 2.12 初始浓度为 250 mg·L⁻¹ 时 PAEs 降解试验结果

Table 2.12 Experimental results of phthalates degradation at initial concentration of 250 mg·L⁻¹

552	<u>`</u>	di.
- কি	TT.	427
\sim	1 M N	- V-4

不同反应时间 CO2 生成量 (PCD at different days) (mmol·L⁻¹)

Materials	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Inoculum	3.12	5.48	6.26	6.34	6.45	6.53	6.58	6.60	6.62	6.63
DEP	12.41	18.00	19.89	20.36	20.61	20.74	20.80	20.83	20.85	20.86
DnBP	10.78	16.15	18.11	18.66	18.95	19.10	19.18	19.21	19.24	19.25
DnOP	9.32	1 4.38	16.34	16.94	17.27	17.45	17.54	17.58	17.61	17.62

表 2.13 初始浓度为 300 mg·L⁻¹ 时 PAEs 降解试验结果

Table 2.13 Experimental results of phthalates at initial concentration of 300 mg·L⁻¹

受试物	不同反应时间 CO2 生成量 (PCD at different days) (mmol·L ⁻¹)									· · · · ·
Materials	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Inoculum	3.12	5.48	6.26	6.34	6.45	6.53	6.58	6.60	6.62	6.63
DEP	10.97	16.33	18.25	18.77	19.04	19.19	19.26	19.29	19.31	19.32
DnBP	10 .94	16.75	19.06	19.81	20.22	20.43	20.53	20.58	20.61	20.63
DnOP	8.06	13.31	15.78	16.85	17.54	17.96	18.21	18.34	18.43	18.48

- 29 -

根据以上试验结果,应用 2.3.1 小节里建立的降解动力学方程进行拟合分 析,所得到的结果如表 2.14 所示。

表 2.14 不同污泥负荷下 PAEs 的降解动力学分析结果

ΡΑΓς	浓度 (mg·L ⁻¹)	常数 k _b (d ⁻¹)	$t_{1/2}$ (d)	降解动力学方程	D ²
	Initial concen.	Rate constant	Half life	Kinetics equation	K
	10	0.225	3.08	$PCD = 0.68 (1 - e^{-0.225 t})$	0.967
	20	0.376	1.88	$PCD = 1.33 \ (1 - e^{-0.376 t})$	0.956
	50	0.495	1.40	$PCD = 3.23 \ (1 - e^{-0.495 t})$	0.972
DED	100	0.512	1.35	$PCD = 6.35 (1 - e^{-0.512 t})$	0.996
DEI	150	0.538	1. 29	$PCD = 9.28 (1 - e^{-0.538 t})$	0.974
	200	0.547	1.27	$PCD = 12.00 \ (1 - e^{-0.547 t})$	0.942
	250	0.529	1.31	$PCD = 14.23 (1 - e^{-0.529 t})$	0.938
	300	0.482	1.44	$PCD = 15.70 (1 - e^{-0.482 t})$	0.927
	10	0.178	3.89	$PCD = 0.64 (1 - e^{-0.178 t})$	0.972
	20	0.335	2.07	$PCD = 1.24 (1 - e^{-0.335 t})$	0.951
	50	0.453	1.53	$PCD = 2.99 (1 - e^{-0.453 t})$	0.989
DnBP	100	0.487	1.42	$PCD = 5.87 (1 - e^{-0.487 t})$	0.991
Dilbi	150	0.516	1.34	$PCD = 8.56 (1 - e^{-0.516 t})$	0.983
	200	0.523	1.32	$PCD = 11.04 (1 - e^{-0.523 t})$	0.963
	250	0.467	1.48	$PCD = 12.62 (1 - e^{-0.467 t})$	0.945
	300	0.409	1.69	$PCD = 14.01 (1 - e^{-0.268 t})$	0.938
	10	0.102	6.79	$PCD = 0.59 (1 - e^{-0.102 t})$	0.947
	20	0.257	2.69	$PCD = 1.15 (1 - e^{-0.257 t})$	0.951
	50	0.382	1.81	$PCD = 2.77 (1 - e^{-0.382 t})$	0.983
DnOP	100	0.421	1.65	$PCD = 5.42 (1 - e^{-0.421 t})$	0.998
Diloi	150	0.465	1.49	$PCD = 7.76 \ (1 - e^{-0.465 t})$	0.965
	200	0.468	1.48	$PCD = 9.48 (1 - e^{-0.468 t})$	0.947
	250	0.415	1.67	$PCD = 10.99 (1 - e^{-0.415 t})$	0.926
	300	0.268	2.59	$PCD = 11.91 (1 - e^{-0.268 t})$	0.955

Table 2.14 Estimation of PAEs biodegrading kinetics under different sludge load

由上表可以知道,对于受试有机物 PAEs,在试验的浓度范围内,其降解反应基本上符合一级酶反应动力学方程。

为了直观地描述不同污泥负荷条件下的 PAEs 的降解的情况,以 PAEs 初始浓度为横坐标,分别以其降解速率常数、最终的生物降解度为纵坐标,绘出不

- 30 -



图 2.9 初始浓度对各 PAE(s)生物降解速率的影响 Fig. 2.9 Effect of initial concentration on biodegrading rate of PAEs



图 2.10 不同初始浓度条件下各 PAE(s)的最终生物降解度曲线

Fig. 2.10 Biodegradation degree of PAEs under different initial concentrations (2) 分析与讨论

由图 2.9 和表 2.14 可知,浓度低于 50 mg·L⁻¹或高于 200 mg·L⁻¹, 微生物的

- 31 -
生长均受到抑制,降解速率随之显著下降。PAEs 一方面为微生物提供唯一的碳 源,如果浓度过低,微生物则不能获得充足的食物来源而生长会受到抑制;另 一方面,PAEs 本身具有毒性,浓度如超过一定值后,也会对微生物的生长造成 较大的危害,因而浓度过高时微生物的生长同样会受到抑制。当初始浓度很低, 低于 10 mg·L⁻¹时,PAEs 的降解速率很慢,DEP、DnBP 和 DnOP 的降解速率常 数 k_b 值分别只有 0.225 d⁻¹、0.178 d⁻¹ 和 0.102 d⁻¹;当初始浓度超过 200 mg·L⁻¹ 进行降解时,PAEs 的降解速率明显下降:DEP 降解速率常数 k_b 值从 0.547 d⁻¹ 减小到 300 mg·L⁻¹时的 0.482 d⁻¹,DnBP 和 DnOP 降低的幅度则更大,分别从 0.523 d⁻¹ 和 0.468 d⁻¹降低到 0.409 d⁻¹ 和 0.265 d⁻¹。同时,初始浓度超过 200 mg·L⁻¹ 时,它们降解过程中出现了不同程度的停滞期(如图 2.11 所示),且随着初始 浓度的增加而延长。而在 50 mg·L⁻¹增加到 200 mg·L⁻¹之间,随着 PAEs 浓度的 提高,降解速率常数却随之增加,这说明 PAEs 已逐渐可以满足微生物的生长 代谢的基质需要,降解速率比较快。



Fig. 2.11 Lag phases in relation to the carbon number of the alkyl side chain

由图 2.10 可以看到,对于 3 种受试 PAEs,当初始浓度过低时,生物降解 度都较低。在初始浓度为 10 mg·L⁻¹时,DEP、DnBP 和 DnOP 的 20 d 生物降解 度分别为 65.06 %、64.51 %、60.32 %,这表明在以 PAEs 为唯一能源的条件下, 对于经过驯化的具有较高活性的混合菌泥而言,这种低浓度 PAEs,不足以供应 细菌生长繁殖所需的有机碳源,因而其降解度必然较低。随着初始浓度的提高, 生物降解度随之增加,但浓度到达 100 mg·L⁻¹以后,3 种 PAEs 降解度又开始降 低,至 300 mg·L⁻¹时,实验测得 3 种 PAEs 的最终生物降解度分别为 62.78 %、

- 32 -

56.03 %、47.63 %。这说明随着浓度的增加, 微生物的生长繁殖所需的基质得 以满足, 因而降解能够顺利进行, 但过高浓度的 PAEs 化合物又对微生物生长 产生了抑制, 从而使得降解度降低。

同时也可看出,在高浓度情况下,3种 PAEs 的降解度下降的斜率(幅度) 也有很大差异,亦即微生物对3种 PAEs 的耐受程度不一致,其大小顺序为: DEP > DnBP > DnOP。这也从另一个方面说明了3种 PAEs 的易降解的程度, 和前面相同污泥负荷下进行的降解试验得出的结论相吻合。

综合来看,化合物 PAEs 的浓度作为影响其生物降解的一个化学因素,在 实际废水处理的研究中应该加以考虑,微生物对其高浓度的耐受力可通过进一 步驯化或纯化专性菌来逐步加强。但从相同条件下各 PAEs 实验结果的差异性 可以看出,实质上,还是 PAEs 的化学结构决定着其降解性能。

2.3.4 与葡萄糖共基质条件下 PAEs 的降解

(1)实验结果

各 PAEs 与易降解有机物葡萄糖共基质的降解试验结果如表 2.15 所示。

表 2.15 各 PAEs 与葡萄糖共基质条件下不同反应时间 CO₂ 的生成量 Table 2.15 Production of CO₂ from co-substrates of phthalates with glucose over time

时间—— Time (d)	CO ₂ 生成	CO2 生成量 PCD (Production of Carbon Dioxide) (mmol·L ⁻¹)					
	葡萄糖	DEP +葡萄糖	DnBP+葡萄糖	DnOP+葡萄糖			
	Glucose	DEP.with Glu	DnBP with Glu.	DnOP with Glu.			
2	7.41	7.38	7.35	7.30			
4	12.43	12.41	12.38	12.36			
6	14.08	14.06	14.03	14.03			
8	14.25	14.23	14.21	14.18			
10	14.26	18.48	17.94	17.35			
12	14.26	1 9.9 5	19.33	18.70			
14	14.27	20.48	19.82	19.26			
16	14.28	20.64	20.03	19.50			
18	14.28	20.72	20.10	19.64			
20	14.28	20.74	20.12	19.62			

将以上表中数据整理, 绘出不同 PAEs 与葡萄糖组成共基质条件下的降解 曲线如图 2.12 所示。

- 33 -



国 = 12 — 12 IALS 马葡萄菇大金灰茶件!的样件曲线

Table 2.12 Biodegradation patterns of co-substrates of three phthalates with glucose

(2)分析与讨论

综合比较图 2.4 和图 2.12 可知,单一碳源 PAE 与 PAE(s) 和葡萄糖组成的 混合碳源的降解模式不一致,葡萄糖与 PAEs 共基质的降解过程呈现明显的阶 段性,且3种混合基质在 0~8 d 这段时间内的降解曲线很相近。据相关文献报 道,当基质由多种碳源组成时,微生物首先利用其易于代谢的碳源^[50]。因此, 在 DEP、DnBP、DnOP 与葡萄糖组成混合碳源中,细菌首先消耗葡萄糖,然后 才代谢 DEP、DnBP、DnOP,降解出现了先后次序。同时,可从图 2.12 看出,

- 34 -

3 种 PAEs 降解易难程度也不同: DEP > DnBP > DnOP, 这与前面得到的结果相 吻合。同时还发现, 3 种 PAEs 的降解速率也有所增加, 如表 2.16 所示。DEP、 DnBP 和 DnOP 的降解速率(*k*, 值)比其在单一基质条件下的降解分别提高了 3.71 %、3.08 % 和 2.50 %。这可能是由于 PAEs 本身是难降解有机物,添加入 简单易降解有机物葡萄糖以后,形成共代谢协同作用机制,从而促进了 PAEs 的降解与转化。

表 2.16 葡萄糖存在条件下 3 种 PAEs 的降解试验结果分析

化合物	速率常数 k _b Rat	e constant (d^{-1})	$t_{1/2}$ Half life (d)	R^2
	单一基质	共基质	共基质	共 基 质
IALS	Mono-substrate	Co-substrates	Co-substrates	Co-substrates
DEP	0.512	0.531	1.30	0.993
DnBP	0.487	0.502	1.38	0.989
DnOP	0.421	0.446	1.55	0.987

Table 2.16 Analysis of experimental results of three phthalates in the presence of glucose

所谓微生物共代谢,现在一般定义为:通过初级基质提供的碳源和能源, 微生物可以部分利用原来不能利用的难降解物质。这一过程最初由 Lead better 和 Jensen 提出,并称之为共氧化(Co-oxidation),以后由 Jensen 进一步修正为 更一般化的术语"共代谢"(Cometabolism),它不但包含微生物在正常生长代 谢过程中对非生长基质的共同氧化,而且也描述了休止细胞(Resting cells)对 不可利用基质的氧化代谢^[51]。微生物的共代谢作用向微生物学家提出了一种新 的生物氧化机制问题:为什么微生物能氧化一种化合物,而又不能从中获取生 长所必需的碳源和能源?针对这一现象,许多学者提出了各种假设,但都不能 很好地解释这一现象。共代谢在难降解有机物的生物降解中具有重要的作用, 国内外一些学者曾进行过相关的研究。Verce 和 Freedman 等人^[52]采用乙烯和乙 醇作为初级基质,在好氧条件下共代谢氯乙烯(Vinyl Chloride),并研究了一株 在以乙醇为生长基质的假单胞菌在共代谢作用下降解氯乙烯的动力学。翟福平 等^[53]研究了不同方式驯化出的活性污泥对氯苯、邻二氯苯、间二氯苯、对二氯 苯、1,2,4-三氯苯等5种氯苯类优先控制污染物的好氧降解和共代谢作用。 在这里,本试验只是初步研究了易降解有机物葡萄糖在 PAEs 好氧微生物降解 中的影响和作用,结果表明 PAEs 的降解速率有所加快,但这是否属于共代谢 机制以及如何作用尚待进一步的研究。

2.4 本章小结

采用接种驯化活性污泥的方法进行了 PAEs 的好氧降解试验,结果表明:

- 35 -

PAEs 的降解速率(*k_b*)随着化合物中烷基直链碳原子数目(*n*)增加而减小,随着烷基侧链数目的增加而降低,半衰期(*t*_{1/2})则随之而增长,分别满足以下定量关系式:

 $lnk_b = -0.6243 - 0.0181n - 0.00149n^2$ $R^2 = 0.995$

 $t_{1/2} = 1.2866 + 0.0239n + 0.0025n^2$ $R^2 = 0.992$

在 50~200 mg·L⁻¹浓度范围内, PAEs 的降解反应较为适宜, 降解速率较快, 且随着浓度的增加而稳步增加。当超过 200 mg·L⁻¹时, 降解出现明显的停滞期。 而葡萄糖的加入则会提高 PAEs 的降解能力。PAEs 的微生物好氧降解反应符合 一级生化反应动力学。

- 36 -

.

第三章 纯化培养优势菌株降解酞酸酯的研究

3.1 引言

生物强化技术(Bio-enhancement),即生物增强技术(Bio-augmentaion), 产生于 20 世纪 70 年代中期,自 80 年代以来才得以广泛的研究和应用^[54]。产 生初期是因为一些废水处理厂的突发事故,如菌体大量死亡、有毒有害物质泄 露等导致废水达不到排放标准,于是直接投加高效菌种以改善出水水质,使系 统恢复正常。一般的生物治理技术对于浓度较高、易于生物解的废水去除效率 高,但当废水中含有暂时性的有毒物质,它们则会对菌种起到毒害作用,用一 般生物方法治理,降解速率较慢,菌种需要一段较长的时间来适应。而生物强 化技术恰好弥补了这一不足,投加优势菌种可迅速有效降解目标去除物。于是 国内外研究人员开始研究把这项技术用于工业废水、地表水及地下水中难降解 的有毒有害物质的治理或用于改善提高废水处理效果^[55]。生物强化技术与一般 生物治理技术相结合,在废水治理中已显示其独特的作用。

生物强化技术,就是为了提高废水处理系统的处理能力,而向该系统中投加从自然界中筛选的优势菌种或通过基因组合技术^[56]产生的高效菌种,以去除某一种或某一类有害物质的方法。它是通过向自然菌群中投加具有特殊作用的 微生物来增强生物量以强化微生物对某一特定环境或特殊污染物的反应。投入的菌种与底质之间的作用主要有:

(1) 直接作用

就是通过驯化、筛选、诱变、基因重组等技术得到1株以目标降解物质为 主要碳源和能源的微生物,向处理系统中投入一定量的该菌种,就会达到对目 标去除物去除效果的增强作用。一些微生物都能够直接降解某些特定的有毒有 害物质如表 3.1 所示。

(2) 共代谢作用

就是对于一些有毒有害物质,微生物不能以其为碳源和能源生长,但在其他基质存在下能够改变这种有害物的化学结构使其降解。如在甲烷、芳香烃、 氨、异戊二烯和丙烯为主要基质生长的一些细菌可以产生一种氧合酶,这种酶 可以共代谢三氯乙烯(TCE),但共代谢机制成功地用在生物增强系统中的例子 并不多见。

研究表明^[55],采用生物强化技术,投加经过筛选过的、对目标污染物具有 较强的降解能力的微生物,可缩短处理系统驯化微生物的时间,使系统快速地 达到较高的稳态去除效果。因而,研究某一高效菌种对某些特定有机物的降解 行为不仅可为污染物的生物处理技术提供理论依据,而且对实际水处理工程的

- 37 -

设计具有指导意义,它已成为国内外环境工作者研究的热点。

表 3.1 一些降解有机物的高效优势菌种^[54]

化合物 Compounds	高效菌种名称 Name of preponderant strains
五氯酚	Mycobacterium chlorophenolicus
Pentachlorophenol (PCP)	Comb.nov.
	Flavobacterium sp.
3- 氯苯甲酸酯	Pseudomonas pulida
Trichlorobenzene formic ester (3CB)	
三氯乙烯	Pseudomonas burkholderia cepacis G4
Trichloroethylene (TCE)	Escherichia coli
苯酚	Pseudomonas pulida ATCC 11172
Phenol	Acromobacter sp. El
	Alcaligenes sp. E2
BTEX 化合物(苯、甲苯、二甲苯等)	Phanerochaele chrysosporium
BTEX compounds (Benzene, toluene,	Pseudomonas pulida
dimethylbenzene)	
多环芳烃(萘、蒽、芘、菲等)	White—rot fungi
PAHs (naphthalene, anthracene,	Aspergillus ochraceus
pyrene, phenanthrene, etc.)	Cunninghamella elegans

Table 3.1 Some preponderant strains for degrading organic compounds^[54]

氦杂环化合物(吡啶,吲哚,喹啉等) Pseudomonas sp. Nitrogenous heterocyclic compounds Rhodococcus sp. (Pyridine, indole, quinoline etc.) Cesulfobacterium indolicum

酞酸酯是一类毒性大、致畸性和致癌性强而且难以被微生物降解的有机化 合物,广泛存在于增塑剂、农药生产所排放的化工废水中,目前主要是采用生 物法治理。因此,研究生物强化技术提高其处理效率显得十分必要。

下面将从用驯化过的活性污泥中进一步筛选、复筛、分离、纯化出能以酞 酸酯类化合物作为唯一碳源的降解高效菌株,研究了该菌株对 PAEs 的降解特 性及规律。

3.2 酞酸酯降解优势菌种的分离、筛选与纯化

3.2.1 培养基

(1) 基础无机盐(选择性)培养液:每升水中 Na₂HPO₄ 0.20g, KH₂PO₄ 1.0 g, NaCl 1.0 g, NH4NO3 0.5 g, MgSO4 • 7H2O 1.5g, CaCl2 0.1g, FeCl3 0.01 g,

- 38 -

 $MnSO_4 \cdot 7H_2O 0.2 g$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O 100 \mu g$, $CoCl_2$ 痕量, pH = 7.2。

(2)营养肉汤(富集)培养基: 牛肉膏 5.0g,蛋白胨 10.0g,NaCl 5.0g,
 蒸馏水 1000 mL, Na₂HPO₄ 0.20g, KH₂PO₄ 1.0g, pH = 7.2~7.4。如加入琼脂
 20.0g 可制备固体或半固体培养基。

(3)斜面(保存)培养基:蛋白胨 5.0g,酵母膏 5.0g,葡萄糖 1.0g, NaCl 5.0g,琼脂 20.0g, Na₂HPO₄ 0.20g,KH₂PO₄ 1.0g,蒸馏水 1000 mL, pH = 7.2 ~ 7.4。

(4)降解用液体培养基: NH₄NO₃ 0.2~1.5 g, CaCl₂ 0.2g, MgSO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 1.0 g, Na₂HPO₄ •H₂O 1.0g, PAEs(含量分别为 100 mg·L⁻¹, 150 mg·L⁻¹, 200~400 mg·L⁻¹ 等若干个不同的系列), NH₄NO₃的最佳含量及 pH 见 3.5.2。

各培养基分别采用蒸馏水按配方配好后,分装于 500 mL 三角瓶中, 塞好棉塞,用牛皮纸包好,放入高压灭菌器中于压力 15 MPa、121 ℃灭菌 20 min,自然冷却至室温,4 ℃冷藏备用。用时融化,并在无菌条件下倒入已灭菌平板中,每个平板用量约 15~20 mL。

3.2.2 主要仪器及分析方法

电热恒温培养箱,YX 280B 蒸汽消毒器,水浴振荡器(摇床),XSP 18B 显 微镜,温度计,pHB-4 笔式酸度计,751G 型光电分光光度计等。

生物量的测定[28]:

(1) 比浊(光密度)法:测定悬浮培养细胞浓度:用 751G 型分光光度计, 在波长为 600 nm 处,以蒸馏水为参比溶液,测定用蒸馏水稀释 8 倍后的菌液

浓度。

(2)重量测定法:取一定体积的细胞悬浮液,经600r/min离心分离,用 蒸馏水冲洗2~3次,再离心弃去上清液,将得到的湿细胞转移到烘烤至恒重的蒸发皿内,再放入105~110℃烘箱中,烘干2h至恒重,冷却后称重。

3.2.3 菌株分离、筛选与纯化实验

(1) 优势菌种的分离、筛选与纯化

取驯化过一段时间后的污泥混合液,倒入已灭菌的锥形瓶中,同时加入无 菌玻璃珠,振荡1~2h使菌胶团打散,之后用无菌水将上层清液稀释不同浓度, 分别接种到含 50 mg·L⁻¹邻苯二甲酸酯(DMP、DEP、DnBP、DOP、DEHP 各 为 10 mg·L⁻¹)混合均匀的无机盐选择性培养基中,30 ℃下好氧培养 7d,逐步 转接至含 100 mg·L⁻¹、200~600 mg·L⁻¹邻苯二甲酸酯的新鲜无机盐培养基中, 如此重复直至镜检时菌体、菌落形态一致。培养物作梯度稀释,用玻璃耙均匀 地涂布到以 PAEs 为唯一碳源的无机盐琼脂平板上培养,挑取单菌落,接入营 养琼脂平板(加琼脂的营养肉汤培养基)上进行多次划线分离纯化。

将纯化后得到的菌株进一步采用生长谱法,测试菌株对混合 PAEs (浓度分

- 39 -

别为 100、200、300、400、500、600、650 mg·L⁻¹)的耐受力和利用情况,定 性地初步筛选出在 PAEs 区上生长良好的菌株。

以混合 PAEs 为唯一碳源,对初步筛选到的数株 PAEs 降解菌进行通气培养, 并分析各菌株的生长量,筛选出生长速率快、生长量大的高活性菌株。接入牛 肉膏蛋白胨斜面,置于4 ℃ 冰箱保存。

(2) 菌种的观察与鉴定

对经过以上步骤得到的单一菌株的生长状况、菌落特征、个体形态特征及 某些生理生化特性进行研究,观察并记录结果,然后采用一般分类方法,将菌 种鉴定到属。

a. 群体形态研究

对上述步骤得到的纯化菌株,在无菌操作条件下,以无菌蒸馏水进行适当的稀释,吸取 0.1 mL 移放到盛有固体培养基的平板上,并用无菌玻璃耙涂布均 匀,倒置于 30 ℃恒温箱中培养至单菌落长出,对得到的单菌落分别进行外观 的大小、形态、颜色、光泽度、粘稠度、隆起形状、透明度、边缘特性、水溶 性色素、质地等方面的详细观察研究并记录结果。

b. 个体形态研究

分对纯化菌株进行革兰氏染色,在显微镜下详细观察细菌个体的革兰氏染 色特征、细菌个体大小、形态、有无鞭毛、芽孢、荚膜等,并记录结果。

c. 生理生化特征研究

考察单一的纯化菌株的培养特征(如需氧性、运动性等)及其一些生理生化(如淀粉水解、碳源利用、氮源利用、吲哚反应等等)特性。

(3) 菌悬液的制备

将 30℃下生长 24 h 的斜面纯菌种接种于装有 30 mL 活化过的富集培养基 的 250 mL 三角瓶中,在 30 ℃、220 r·min⁻¹ 的恒温摇床上振荡培养 24 h,然后 以 2000 r·min⁻¹ 离心分离 10 min 收集菌体,磷酸盐缓冲溶液(已灭菌)洗涤 3 次,再用 pH = 7.2 的磷酸盐缓冲溶液稀释,将其配成适当浓度的(细胞浓度约 为 6 × 10⁸ CFUs·mL⁻¹)的菌悬液备用。

3.3 优势菌株最适宜生长条件实验

根据细菌的特性,影响菌株生长的因素有 pH 值、温度、底物浓度、培养时间、供氧状况、细菌接种量、氮源种类和 C:N(有机碳、氮含量的配比)等。 3.3.1 培养时间对菌株生长的影响试验

取 2 种菌株菌悬液的母液各 1 mL 分别加到含有混合 PAEs 200 mg·L⁻¹、pH 7.0 的 100 mL 的选择培养基中,在 30℃ 转速 120 r·min⁻¹ 摇床上培养,每隔一 定时间取样,在 OD₆₀₀ 下测定反应液的光密度值。

- 40 -

3.3.2 供氧状况对菌株生长的影响试验

试验是以摇床培养作为好氧,静置作为微好氧,密闭作为厌氧条件进行的。 取 2 种菌株菌悬液的母液各 1 mL 分别加到含有混合 PAEs 200 mg·L⁻¹、pH 7.0 的 100 mL 的选择培养基中,在 30℃ 培养箱和摇床上培养 48 h 后,在 OD₆₀₀ 下取样测定反应液的光密度值。

3.3.3 不同氦源对菌株生长的影响试验

取2种菌株菌悬液的母液各1 mL 加入到含有不同氮源(尿素、硫酸铵、 硝酸铵和硝酸钠)的培养基中,在适宜条件(同上)下培养48h,取样测定反 应液的OD₆₀₀值。

3.3.4 接种量对菌株生长的影响试验

取 2 种菌株菌悬液的母液按接种量为 0.01 %、0.015 %、0.02 %、0.025 %、0.05 %分别加到含有混合 PAEs 200 mg·L⁻¹、pH 7.0 的 100 mL 的选择培养基中, 在 30℃ 转速 120 r·min⁻¹ 摇床上培养 48 h,在 OD₆₀₀ 下测定反应液的光密度值。 3.3.5 **菌株最适生长条件的确**定

由以上单因素影响试验可大致了解地知道这两种菌株的较为适宜的培养 方式。但由于涉及的因素较多,为了考察各因素之间的相互影响和各因素水平 变化对菌株生长的影响,确定菌株最适宜生长条件,本实验采用了正交试验法。

选择 pH 值(A)、混合温度(B)、碳氮比 C:N(C)和 PAEs 浓度(D) 作为本试验的 4 个因素,采用 L₉(3⁴)正交表,设计四因素三水平试验。按试

验方案中所列培养条件,在装有 100 mL 的无机盐培养液的 250 mL 三角瓶中, 接种量按 0.05 % (以单位体积细胞湿重 w/v 表示),对菌株进行好氧振荡培养, 测定培养 48 h 时的菌液的细胞干重 (E),并记录结果。所选取的因素水平数据 见表 3.2。

表 3.2 正交试验因素-水平表头设计

		因	素 Facto	or
水平	Α	В	С	D
Level	pH 值	温度(℃)	碳氮比	PAEs 浓度(mg·L ⁻¹)
	pH value	Tempera.	C:N	Phthalates concen.
1	5	25	2	100
2	7	30	10	200
3	9	45	20	300

Table 3.2 Factorial level design of the orthogonal experiment

根据表 3.2,将各因素、水平的具体数据内容置换 L₉(3⁴)正交表中的数字

- 41 -

编号,即得到表 3.3 (试验方案)。

表 3.3 正交试验方案 L₉(3⁴)表设计

		因	素 Factor	
水平	Α	В	С	D
Level	pH 值	温度(℃)	碳氮比	PAEs 浓度(mg·L ⁻¹)
	pH value	Tempera.	C : N	Phthalates concen.
1	5	25	2	100
2	5	30	10	200
3	5	35	20	300
4	7	25	10	300
5	7	30	20	100
6	7	35	2	200
7	9	25	20	200
8	9	30	2	300
9	9	35	10	100

Table 3.3 Program design of the orthogonal experiment in L_9 (3⁴) form

3.4 优势菌株对 PAEs 的降解性能测试

3.4.1 单一菌株对不同质量浓度的 PAEs 降解性能测试

对两 PAEs 降解优势菌株分别在适宜环境条件即 pH 值 7、温度 30℃、C:N 20、接种量 0.05%,质量浓度分别 300 mg·L⁻¹、400 mg·L⁻¹、500 mg·L⁻¹、600 mg·L⁻¹ 的混合 PAEs (DMP、DEP、DnBP、DnOP 等比例混合)进行了单一菌株降解 PAEs 性能试验。

3.4.2 混合菌株对高质量浓度的 PAEs 的降解性能测试

由于生物处理系统中一般起作用的都是混合菌种,所以研究混合菌株的降 解性能尤为重要。将2株降解菌等比例混合,并测其降解混合 PAEs(500 mg·L⁻¹) 的性能,设2个重复和参照组,试验的环境条件同上。

3.5 结果与讨论

3.5.1 酞酸酯降解优势菌株的分离、纯化及鉴定结果

(1) 菌株分离、筛选与纯化

经过分离纯化、初筛和复筛(约7周),得到能以混合 PAEs (DMP, DEP, DBP, DOP, DEHP)作为唯一碳源并生长良好的2 株耐受力较强的优势降解 菌株,暂命名为 PS-1 和 PS-2。筛选过程中采用生长谱法对菌株在不同 PAEs 浓度条件下培养 48 h 后的生长情况如表 3.4 所示。

- 42 -

表 3.4 不同 PAEs 浓度下培养 48 h 后的菌落形成情况

Table 3.4 The colony formation of purified strains cultured with PAEs for 48 hours

PAEs 浓度(mg·L ⁻¹)	100	200	200	400	500	600	650
Phthalates concen.	100	200	300	400	300	000	020
长出菌落数(个)	516	400	225	100			•
Colony formation num.	510	423	223	100	30	6	0

从表 3.4 可以看出,纯化得到的菌株在该试验条件下对 PAEs 的忍耐力为 600 mg·L⁻¹,在含 PAEs 650 mg·L⁻¹的牛肉膏蛋白胨平板上无菌落生出。

(2) 菌株的初步鉴定结果

.

以细菌分类手册的标准^[57]为根据,对分离到的两菌株 PS-1 和 PS-2 进行了 形态学和生理生化特征研究,结果分别见表 3.5、3.6。

表 3.5 两株 PAEs 降解菌的形态学特征

Table 3.5 The morphological characteristics of two	phthalates degrading strains
--	------------------------------

鉴定项目	菌株 PS-1 特征	菌株 PS-2 特征
Identification item	Characteristics of Strain PS-1	Characteristics of Strain PS-2
	菌落圆形, Φ0.5~1.0mm, 乳白色,	菌落圆形,Φ1.0~1.5mm,杏黄
菌落特征	表面光滑、湿润,低凹,透明,边	色,表面光滑、黏稠,高凸,半
Colonial	缘整齐,质地较致密。Round,	透明,边缘整齐,有少量的气生
morphology	white, smooth, clammy concave	菌丝。Round, apricot and light
morphology	surface, opaque, uniform edge and	yellowish, smooth, sticky and
	more compact texture	translucent convex surface
菌体大小	10 15 10 05	
Size of cell (µm)	1.0~1.5 × 1.8~2.5	$0.8 \sim 1.5 \times 1.6 \sim 2.0$
菌体形态	细杆状,略弯	短杆近球状
Shape of cell	Thin rod – shaped, slightly crooked	Short rod or coccoid - shaped
革兰氏染色	阴性	阳性
Gram staining	Negative	Positive
荚膜有无 Capsule	无 non – capsule	无 non – capsule
芽孢有无 Spore	无 Non – spore	无 Non – spore
鞭毛染色 Flagella	单根,极生 Subpolar monotricha	单根,极生 Subpolar monotricha

- 43 -

表 3.6 两株 PAEs 降解菌的生理生化特征

Table 3.6 Physiological and biochemical characteristics of two phthalates degrading strains

测定项目	菌株 PS-1 反应结果	菌株 PS-2 反应结果
Identification items	Reaction results of PS-1	Reaction results of PS-2
需氧性 Oxygen requirement	好氧 Aerobes	好氧 Aerobes
运动性 Mobility	阳性 Positive	阳性 Positive
淀粉水解 Starch hydrolysis	阴性 Negative	阴性 Negative
纤维素水解 Cellulose hydrolysis	阴性 Negative	阴性 Negative
果胶分解 Pectin hydrolysis	阳性 Positive	阴性 Negative
甲基红染色 Methyl red test	阴性 Negative	阴性 Negative
乙酰甲基甲醇试验 V.P. test	阳性 Positive	阴性 Negative
明胶液化试验 Gelatin liquefaction	阳性 Positive	阴性 Negative
氧化酶 Oxidase	阴性 Negative	阴性 Negative
过氧化氢酶 Catalase	阳性 Positive	阳性 Positive
硝酸盐还原 Nitrate reduction	阳性 Positive	阴性 Negative
葡萄糖产酸	阳性	阳性
Acid produced from glucose	Positive	Positive
在无氦源培养基上生长	阴性	阴性

Growth on media without nitrogen	Negative	Negative
吲哚反应 Indole test	阳性 Positive	阴性 Negative

根据常用细菌鉴定方法,初步确定菌株 PS-1 为假单胞菌属 (*Pseudomonas sp.*),菌株 PS-2 为黄单胞菌属 (*Xanthomonas sp.*)

3.5.2 酞酸酯降解优势菌株的最适生长条件

(1) 培养时间对菌株生长的影响

实验结果如图 3.1 所示。

从图中可以看出,两种菌株的生长曲线有所不同,但 PS-1、PS-2 进入稳定 期的时间均为 36 h,在稳定期,持续的时间均为 24 h。在未达到稳定期的生长 前期 PS-1 菌株的生长速率大于 PS-2 菌株,在达到稳定期后的生长后期 PS-2 的 生长速率大于 PS-1 菌株。在培养到第 48 h 时,两菌株的生长量皆达到最大, 此后逐渐衰减,进入内源阶段。

- 44 -







(2)供氧状况对菌株生长的影响

实验结果如图 3.2 所示。



图 3.2 供氧状况对菌株生长的影响

Fig. 3.2 Effect of oxygen supply on the growth of strains

从图中可以看出,振荡培养(好氧)的细菌生长明显好于静置(微好氧) 培养和密闭培养(厌氧)的细菌,说明分离的菌株生长要在好氧条件下进行,

- 45 -

因此在工程实践中应用这些菌株处理 PAEs 废水或进行 PAEs 污染的现场修复时,需要保持良好和充足的通气(曝气)条件,否则将影响菌株的生长。

(3) 不同氮源对菌株生长的影响

实验结果见图 3.3。



Fig. 3.3 Effect of different nitrogen sources on the growth of strains

从图中可以看到,两菌株的最佳氮源都是硝酸钠,PS-1 菌株的次佳氮源是 尿素,PS-2 菌株的次佳氮源是硝酸铵。在使用硫酸铵作为细菌生长的唯一氮源, 两菌株的生长量都比较小,而且此时 PS-2 菌株的生长量却比 PS-1 的小,而在 分别使用尿素、硝酸铵和硝酸钠作为唯一氮源时 PS-2 菌株的生长量都比 PS-1 的大,这说明 PS-2 菌株对不同氮源的敏感性大于 PS-1。

氦源和碳源一样都是微生物的生长繁殖不可或缺的,氦素是微生物合成细胞物质的必需营养元素,细菌能否利用不同无机氮(硝态氮或铵态氮)进行生长反应了细菌的合成能力^[27],可作为细菌的鉴别指标,如表 3.6 所进行两株 PAEs 降解菌的生理生化特征鉴定试验。这两株菌种在无氦源培养基上都不能生长就说明了这一点。不同菌种利用氦源的能力不同,所以氮源的选择也很重要。

(4) 接种量对菌株生长的影响

实验结果见图 3.4。由图可以看出,接种量增加前期,菌株的生长明显加快,但随着接种量进一步增加,菌株生长量的增加速率变缓。

- 46 -



图 3.4 不同接种量对菌株生长的影响

Fig. 3.4 Effect of inoculum amount on the growth of strains

(5) 菌株正交试验结果与讨论

测定了在正交试验设计的各种培养条件下,以混合 PAEs 为唯一碳源的两 菌株 PS-1 和 PS-2 培养 48 h 后的生长量。实验测得结果如表 3.7、3.8 所示。

表 3.7 菌株 PS-1 正交试验方案及结果

Table 3.7 Results of the orthogonal experiment of strain PS-1

试验是	A	B	С	D	E
Test No	pH 值	温度	碳氦比	PAEs 浓度(mg·L ⁻¹)	菌株生长量
	pH value	Temp.(°C)	C : N	Phthalates Concen.	Biomass (10 ⁻² g)
1	5	25	2	100	7.54
2	5	30	10	200	8.05
3	5	35	20	300	8.24
4	7	25	10	300	7.82
5	7	30	20	100	8.05
6	7	35	2	200	7.98
7	9	25	20	200	7.36
8	9	30	2	300	7.39
9	9	35	10	100	7.19
y_{i1}	23.83	22.72	22.91	22.78	
\mathcal{Y}_{i2}	23.85	23.49	23.06	23.39	
<i>Y</i> ₁₃	21.94	23.41	23.65	23.45	

- 47 -

Table 3.8 Results of the orthogonal experiment of strain PS-2						
子心中	A	В	С	D	E	
LANE 与 Test No	pH 值	温度	碳氮比	PAEs 浓度(mg·L ⁻¹)	菌株生长量	
fest no.	pH value	Temp.(℃)	C : N	Phthalates Concen.	Biomass (10 ⁻² g)	
1	5	25	2	100	7.56	
2	5	30	10	200	8.02	
3	5	35	20	300	8.27	
4	7	25	10	300	8.15	
5	7	30	20	100	8.13	
6	7	35	2	200	8.05	
7	9	25	20	200	7.43	
8	9	30	2	300	7.45	
9	9	35	10	100	7.26	
${\cal Y}_{i1}$	23.85	23.14	23.06	22.95		
${\cal Y}_{i2}$	24.33	23.60	23.43	23.50		
${\cal Y}_{i3}$	22.14	23.58	23.83	23.87		

表 3.8 菌株 PS-2 正交试验方案及结果

试验结果采用极差法分析。计算第 *i* 因素 *k* 水平所对应的试验指标之和 y_{ik} (*i*=1~4, *k*=1~3),并计算出其平均值 $\overline{y_{ik}}$,由它判断 *i* 因素的优水平。 各因素的优水平即最优组合。计算极差 R_i ,并依据 R_i 大小判断因素的主次。

表 3.9 菌株 PS-1 正交试验结果分析

	菌相	朱 细 胞	干重	Biomass			··· · · · · · · · · · · · · · · · · ·
试验因素	Ŧ	均	值	极	差	因素主次	优水平
Fyperm factor	Aver	age (10	⁻² g)	Max. Re	esidue	Factorial	
				מ		importan.	Fine level
	<i>Y</i> ₁₁	<i>Y</i> ₁₂	<i>Y</i> ₁₃	R_i		sequence	
Α	7.94	7.95	7.31	0.6	4	Α	A2
						Ļ	
В	7.57	7.83	7.80	0.20	6	В	B2
						•	
C	7.64	7.69	7.88	0.24	4	C	C3
						Ļ	
D	7.59	7.80	7.82	0.23	3	Ď	D3

Table 3.9 Analysis of results of orthogonal test of strain PS-1

- 48 -

	菌材	朱 细 胞	干重	Biomass			
计队用表	平	均	值	极	差	因素主次	优水平
风 逊 凶 东	Aver	Average $(10^{-2} g)$		Max. R	esidue	Factorial	
Experimitation	$\overline{y_{\alpha}}$	$\overline{\mathcal{Y}_{i2}}$	$\overline{y_{i3}}$	R	i	importan.	Fine level
A	7.95	8.11	7.38	0.7	/3	A	A2
			,		-	Ļ	
В	7.71	7.87	7.86	0.1	6	D	B2
С	7.69	7 .8 1	7.94	0.2	:5	↓ C	C3
D	7.65	7.83	7.96	0.3	1	↓ ▼ B	D3

表 3.10 菌株 PS-2 正交试验结果分析

Table 3.10 Analysis of results of orthogonal test of strain PS-2

表 3.9 和 3.10 分别示出了 4 个因素在 3 个水平上的 PS-1 和 PS-1 菌株的细胞干重 (Biomass) 的平均值, 极差值, 因素主次和最优试验方案。图 3.5 和 3.6 分别为试验水平与 PS-1 和 PS-2 菌株生长量的关系图。

8.2





Fig. 3.5 The relationship between factorial level and the growth of strain PS-1

- 49 -



图 3.6 菌株 PS-2 因素水平和生长量之间的关系

Fig. 3.6 The relationship between factorial level and the growth of strain PS-2

由以上正交试验结果表明, pH 值对两菌株降解 PAEs 效果的影响最大。实验因素对菌株 PS-1 的影响程度由大到小依次为: pH 值、温度、C:N、PAEs 浓度;实验最佳生长条件为: pH 值 7,温度 30℃, C:N = 20, PAEs 浓度 300 mg·L⁻¹。 实验因素对菌株 PS-2 的影响程度由大到小依次为: pH 值、PAEs 浓度、C/N、 温度;实验最佳生长条件也为: pH 值 7,温度 30℃, C:N = 20, PAEs 浓度 300 mg·L⁻¹。

mg·L⁻¹。对两菌株进行比较发现,底物浓度对菌株 PS-1 生长的影响不是很大, 对 PS-2 影响较大,而温度对菌株 PS-2 生长的影响较小,对 PS-1 影响却较大。 虽两菌株性能存在差别,但两者在此试验方案下的最适宜生长条件却基本一致。

我们知道,选择适宜的生长条件对微生物有机化合物的降解尤为重要。微 生物生长繁殖需要一定的酸碱度即 pH 值环境,H⁺ 浓度影响微生物对营养物质 的吸收和生化反应。一般细菌适于中性环境(以上筛选到的两 PAEs 降解菌株 也是如此),若超出其适应的范围,微生物生长将受到抑制或不能生长。温度对 细菌体内的降解酶活力有影响,反应液的温度过高或过低,都会降低酶的活力, 甚至使酶失活。碳氮比(C:N)一般是指用作微生物碳源的碳元素的量与用作 微生物氮源的氮元素的量的比值。碳氮比不仅影响菌体的生长,而且也影响微 生物的代谢途径,影响产物的积累^[27]。底物浓度对微生物生长的影响也是应该 关注的,这一点在前面驯化活性污泥降解试验中已详细讨论过。

3.5.3 单一菌株对不同质量浓度 PAEs 的降解性能

对两 PAEs 降解优势菌株分别在适宜环境条件即 pH 值 7、温度 30℃、C:N 20、接种量 0.05%,但不同质量浓度的 PAEs 进行了单一菌株降解 PAEs 的性能

- 50 -

试验。所得到实验结果见表 3.11 和 3.12。实验结果分析见表 3.13。

表 3.11 单一菌株 PS-1 对不同质量浓度 PAEs 降解试验结果(PCD 值) Table 3.11 Results of biodegradation of PAEs with different concentrations by strain PS-1

时间	PAEs 初始浓度(mg·L ⁻¹) Initial concentration of phthalates				
Time (d)	300	400	500	600	
2	13.70	15.58	16.76	18.22	
4	18.64	21.25	23.27	25.60	
6	20.42	23.30	25.80	28.59	
8	21.04	24.05	26.78	29.81	
10	21.27	24.32	27.16	30.30	
12	21.35	24.42	27.31	30.50	
14	21.38	24.46	27.36	30.58	

表 3.12 单一菌株 PS-2 对不同质量浓度 PAEs 降解试验结果 (PCD 值)

Table 3.12 Results of biodegradation of PAEs with different concentrations by strain PS-
--

时间	PAEs 初始浓度(mg·L ⁻¹) Initial concentration of phthalates				
Time (d)	300	400	500	600	
2	13.58	15.26	15.93	17.04	
4	18.36	20.78	22.21	24.30	
6	20.03	22.77	24.69	27.39	
8	20.62	23.49	25.67	28.71	
10	20.83	23.75	26.06	29.27	
12	20.90	23.85	26.21	29.50	
14	20.93	23.88	26.27	29.60	

表 3.13 单一菌株对 PAEs 的降解性能

PAEs 浓度	菌株 P	菌株 PS-1 Strain PS-1		S-2 Strain PS-2
$(mg \cdot L^{-1})$	速率常数	生物降解程度	速率常数	生物降解程度
PAEs concen.	$k_b ({\rm d}^{-1})$	Biodeg. degree (%)	k_b (d ⁻¹)	Biodeg. degree (%)
300	0.512	85.52	0.523	83.72
400	0.506	73.38	0.509	71.64
500	0.473	65.66	0.465	63.05
600	0.451	61.16	0.427	59.20

Table 3.13 Bidegradability of PAEs by single strain

由表 3.13 可以看出,在试验结束(历时 14 d)时,两菌株对 300 mg·L⁻¹的

- 51 -

PAEs 的降解度都达到了 83 %以上,比第 2.3.3 节中的同种浓度条件下混合培养 菌的降解能力和对 PAEs 浓度耐受力大为增强,生物降解度分别增加了 36.43 和 33.4 %。但随着 PAEs 质量浓度增加,两菌株对 PAEs 的降解度也都有所降低, 尤其是 PS-2。同时可初步判断, PS-1 的降解 PAEs 能力优于菌株 PS-2。图 3.7 和图 3.8 分别示出了单一菌株 PS-1、PS-2 对不同质量浓度 PAEs 降解曲线。





Fig. 3.7 Biodegradation patterns of PAEs with different concentrations by strain PS-1



图 3.8 单一菌株 PS-2 对不同质量浓度 PAEs 降解曲线

Fig. 3.8 Biodegradation patterns of PAEs with different concentrations by strain PS-2

- 52 -

3.5.4 混合菌株对高质量浓度 PAEs 的降解性能

(1) 混合菌株对 PAEs 降解的性能

将2株 PAEs 高效降解菌等比例混合,并测其降解 PAEs(500 mg·L⁻¹)性能,试验记录结果如表 3.14 所示。

表 3.14 混合菌株降解 PAEs 试验数据

Table 3.14 The experimental data of biodegradation of phthalates by mixed strains

时间。	1 号试验	t Test 1 [#]	2 号试验	t Test 2 [#]	平均 A	verage
Time (d)	PCD	Biomass X	PCD	Biomass X	PCD	Biomass X
	$(mmol \cdot L^{-1})$	$(mg \cdot mL^{-1})$	$(mmol \cdot L^{-1})$	$(mg \cdot mL^{-1})$	(mmol·L ⁻¹)	(mg·mL ⁻¹)
0	0.00	0.50	0.00	0.50	0.00	0.50
2	17.54	1.21	17.60	1.18	17.57	1.19
4	24.26	2.09	24.30	1.96	24.28	2.03
6	26.83	2.57	26.85	2.53	26.84	2.55
8	27.78	2.84	27.86	2.80	27.82	2.82
10	28.22	2.92	28.18	2.76	28.20	2.84
12	28.36	2.63	28.32	2.53	28.34	2.58
14	28.42	2.21	28.38	2.15	28.40	2.18

对表 3.14 中记录结果的 PCD 平均值进行分析, 如表 3.15 所示。

表 3.15 混合菌株对 PAEs 的降解性能

PAEs 浓度	单一菌株 P	S-1 Single strain PS-1	 混合菌	株 Mixed strains
$(mg \cdot L^{-1})$	速率常数	生物降解程度	速率常数	生物降解程度
PAEs concen.	k_b (d ⁻¹)	Biodeg. degree (%)	$k_b (d^{-1})$	Biodeg. degree (%)
500	0.473	65.66	0.481	68.15

Table 3.15 Biodegradability of PAEs by mixed strains

由表 3.15 可知, 混合菌株对 PAEs 的降解效果优于活性较强菌株 PS-1, 尤 其当 PAEs 质量浓度升高时, 混合菌在降解度、降解速率及抗 PAEs 毒性冲击等 方面均具优势, 综合考虑来看, 这是因为混合菌酶系含量丰富, 依靠协作机制 为对方提供生长所需的条件或消除对方代谢的障碍, 使污染物的降解更加顺利。 (2) PAEs 降解过程中的菌体生长动力学

传统的菌体生长动力学模型大多属于 Monod 模型或其修改型^[29,30],它们 仅是能较好地描述菌体的对数生长期,而对迟缓期、稳定期及衰退期则不太理 想,属于理想的、非限制性的生长模式,只对少数细菌或在较短时间内符合。

- 53 -

一般非限制条件下微生物菌群的生长可用 Malthus 生长方程 $N = N e^{\mu t}$ 来进行 分析研究。由该式可知,当 $\mu > 0$,而 $t \to \infty$ 时, $N \to \infty$ 。但在自然界和人工培 养条件下,都无法长时间提供满足无阻抑生长的条件,所以该模型在实际应用 中有很大的局限性。

实际上,将微生物接种于一个新的生长环境中,微生物群体不可能不受限 制地无限生长。这是因为环境中能被利用的养分会枯竭,生存空间受到限制, 代谢产物(特别是有毒代谢物)能够积蓄,有时还会出现缺氧,pH 值改变等其 他环境条件的变化,这些均能影响微生物的生长状况,所以必须研究限制条件 下微生物群体的生长规律,建立其相应的数学模型。这有助于了解 PAEs 降解 高效菌株的生长状况(如生长速率),对于今后将其投入实际废水生物处理系统 中并保持生长优势具有指导意义。

根据在有限环境下,生物群体的增长速率随密度增加而减少的事实,1938 年 Peart 等人推导的 Logistic 模型能较好地描述菌体生长过程动态^[58]。因而在这 里作者考虑采用 Logistic 模型来描述菌体的生长情况,其方程形式如下:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu N(t) - \beta N^2(t)$$
(3.1)

式中, t 表示时间, N(t) 是 t 时刻细菌的数目, N 表示群体密度, μ 是在一定培养条件下细菌最大比生长速率, N^2 表示 N 个细胞间彼此的抑制作用具有 N^2 的因次, β 是衰减速率常数, 随着 N 的增大, 必然会使 dN(t) / dt 出现负值, 即表明在有限环境下群体不会无限增长。

在初始条件t = 0, $N = N_0$ 时, 对式(3.1)积分, 得

$$N(t) = \mu / [\beta + (\frac{\mu}{N_0} - \beta) e^{-\mu t}]$$

$$\Leftrightarrow K = \frac{\mu}{\beta}, \ \alpha = \frac{K - N_0}{N_0}, \ \Xi \mathbb{R} \mathbb{R},$$

$$N(t) = K / (1 + \alpha e^{-\mu t})$$
(3.2)
(3.2)

式(3.3) 就是 Logistic 方程, 式中 α 为积分常数, K 表示在该条件下群体的最大密度, 又称环境容量。

从该方程的推导过程可见, $K = \mu / \beta$ 、 $\alpha = (K - N_0) / N_0$ 和 $\mu \ge \Lambda$ 参数不 是相互独立的, 而是有依赖关系的, 即 K 依赖于 μ , α 依赖于 K, 使得问题的 分析复杂化。另外, N_0 本来是已知的, 但求解时却没有充分利用上, 对求解精 度有一定影响。由(3.1)可知, μ 和 β 的物理意义很明显, μ 越大越好, β 越 小越好, 而 μ 和 β 可直接由式(3.2) 求得。

根据表 3.14 中的实验数据,将式(3.2)中的 N(t) 换作 X(t), N_0 换作 X(0), 利用 Matlab 编制的计算程序求得相应的参数值,如下表所示。

- 54 -

表 3.16 混合 PAEs 降解菌株生长动力学参数值

参数 Parameter	最大比生长速率 μ (d ⁻¹)	衰减速率常数 β
1号试验 Test 1 #	0.1793	0.0061
2 号试验 Test 2 *	0.1826	0.0072
平均值 Average	0.1809	0.0067

Table 3.16 Values of kinetic parameters for the growth of mixed strains

选取精确度 0.0001, 分别拟合 1、2 号试验及两者平均的菌株生长量曲线。



图 3.9 1号试验混合菌株生长量变化拟合曲线





Fig. 3.9 The Logistics fit of the growth curve of mixed strains in test $1^{\#}$

Fig. 3.10 The Logistics fit of the growth curve of mixed strains in test 2 #

- 55 -



图 3.11 1、2 号试验后的混合菌株平均生长量变化拟合曲线

Fig. 3.11 The Logistics fitting of the average growth of mixed strains

由以上图 3.9、3.10、3.11 可以看出,根据 1、2 号试验数据及其平均拟合的混合菌株生长量变化曲线,效果非常理想,在精确度为 0.0001 情况下, *R*² 的值分别为 0.9930、0.9916 和 0.9928。这说明在以 PAEs 为唯一碳源的条件下的混合菌株的生长变化与 Logistic 模型模拟曲线非常吻合。



图 3.12 混合菌株降解 PAEs 过程中 CO₂生成量变化曲线 Fig. 3.12 Production of carbon dioxide during phthalates degrading by mixed strains

- 56 -

图 3.12 示出了混合菌株在降解 PAEs 中的 CO2 生成量变化曲线。综合以上 四图可以看出, CO₂的生成与混合菌株生长的能量代谢呈很好的正相关性。

综上,我们有必要了解微生物好氧降解 PAEs 的代谢途径。Wang 等人^[21] 曾用固定化细胞技术对 DnBP 的好氧生物降解进行了相关的研究,采用 GC / MS 方法对 DnBP 降解过程中的分离出来代谢物进行了鉴定分析,如图 3.13 所示。



图 3.13 DnBP 降解过程中分离代谢物的质谱图^[21]

Fig.3.13 Mass spectrum of isolated metabolites from DnBP degradation system^[21]

由图 3.13 的质谱分析表明,在m/z=278 处存在一个母离子峰,这与经验 分子式 C16H22O4 很好的吻合。特征离子碎片图也表明在 m / z = 223 基本峰处和 m / z = 149 基本峰处有离子峰存在。此外, DnBP 降解过程中产生一些其他的 化合物也在实验中得到了鉴定: 邻苯二甲酸单丁酯 (Monobutyl phthalate, MOP)、邻苯二甲酸、原儿茶酸(Protocatechuic acid)等。Kurane 等^[59]人的研 究指出, DnBP 降解主要是好氧反应, 其降解历程如图 3.14 所示:



 \rightarrow \rightarrow \rightarrow CO₂ (H₂O

图 3.14 DnBP 生物降解的参考途径^[59]

Fig.3.14 Proposed pathway for the DnBP degradation^[59]

- 57 -

据相关文献^[2], 一般认为, 酞酸酯类化合物的生物降解历程如图 3.15 所示。



图 3.15 酞酸酯类化合物微生物降解的一般途径[2]

Fig.3.15 General pathway of biodegradation of phthalate acid esters^[2]

由上图可知, 酞酸酯的生物降解反应首先由微生物酯酶作用水解形成邻苯 二甲酸单酯,再生成邻苯二甲酸和相应的醇。在好氧条件下,邻苯二甲酸在加 氧酶作用生成 3,4 - 二羟基邻苯二甲酸或 4,5 - 二羟基邻苯二甲酸后,形成 原儿茶酸等双酚化合物,芳香环开裂形成相应的有机酸,进而转化成丙酮酸、 琥珀酸、延胡醇酸等进入三羧酸环,最终转化为 CO2 和 H2O。在厌氧条件下, 邻苯二甲酸酯的生物降解反应途径研究较少,但也可观察到邻苯二甲酸单酯和 邻苯二甲酸生成后,进一步降解成苯甲酸,直至 CO₂ 和 H₂O 的生成。

3.6 PAEs 实际废水处理中高效降解菌的应用

应用生物强化技术的前提是获得高效作用于目标降解物的菌种。对于那些 自然界中固有的化合物,一般都能够找到相应的降解菌种,如第三章的表 3.1 所示。但对于人类工业生产中合成的一些外生化合物(Xenbiotics),它们的结 构不易被自然界中固有微生物的降解酶系识别,需要用目标降解物来驯化、诱 导产生相应降解酶系筛选,从而获得高效降解菌种。这种方法一般需要1个月

- 58 -

甚至几个月的时间。

本文前面通过在实验室里进行一系列的驯化、筛选、分离、纯化试验,耗时7周才获得两株 PAEs 高效降解菌种: PS-1和 PS-2。如将该菌株投入到实际的 PAEs 废水的生物强化处理中,这样的做法既浪费时间,又不经济。下面就如何将 PAEs 高效降解菌更好地应用于实际废水处理进行初步的探讨。

首先,若要维持一个生物增强系统持续稳定运行稳定,要得到大量的高效 菌种。如何才能批量、快速地获得这些高效菌种呢?主要的获取方法有如下两 种^[54]:方法之一是向厂家直购,方便易得,但价格比较昂贵。多数商家生产的 生物增强剂由多达二十几种的自养、异养和兼性菌组成,欲达到的目标不同, 生物增强剂中菌的种类就有所不同。厂商生产生物增强剂主要包括驯化、筛选 和突变几个步骤,方法如图 3.17 所示:



图 3.16 生物增强剂的一般生产方法[54]

Fig. 3.16 General manufactural method of bio-augementation agents^[54]

- 59 -

另一种是自我培育,通过驯化培养得到高效菌株后,扩大培养。一般方法 是在生物增强系统外设置一个富集池(Enricher-reactor)。富集池中的物质一 般包括要降解的有害物质、降解的中间产物、引发剂和营养物质。接入高效菌 种后,在其中驯化、培养、繁殖。这种富集池一方面可以模拟实际废水为微生 物繁殖提供最优化条件,另一方面缩短了微生物在实际反应器中的适应期,因 时因地的操作,经济有效。

在获取这些高效降解菌的之后,应该要对其好氧生物降解机理有一定的探 索研究,特别是要清楚地知道优势菌将在处理系统中的作用和功能,核心问题 是所投加的优势菌能否长期在生物处理系统中保持下来并保持优势。

国内的罗国维等人^[60]自 20 年代 80 年代起,开始研究用投菌生物接触氧化 法处理各类废水,即根据不同的废水水质,在接触氧化池内投入各类优势菌以 增强废水的生物处理效果。罗国维等人采用目前国内外最新生化处理技术:投 菌水解(酸化) 一 二段生物接触氧化法一絮凝工艺,对广州制药厂高浓度洁霉 素废水进行小试、中试验证和优比,取得了良好的效果。

在中试前,他们投入好氧塔中的菌种为:气单胞菌属(Aeromonas)、红螺 菌属(Rhodospirillum)、假单胞菌属(Peseudomonas)、埃希氏菌属 (Escherichia)、芽孢杆菌属(Bacillus)。在中试后,除芽孢杆菌属外,其余菌属 均可在中试好氧生物膜检出。中试投入的芽胞杆菌属两个菌株:蜡状芽胞杆菌 (Bacillus Cereus)和枯草芽孢杆菌(Bacillus Subcilis)是经筛选能降解大分子 有机物的优良菌种,且经实验室用洁霉素废水验证。但经4个月中试运行后却 被淘汰。经研究发现,蜡状芽胞杆菌和枯草芽杆孢菌皆为革兰氏阳性菌,它们

毫不例外被废水中残留的洁霉素长时间毒害杀伤所致;另外,不同的微生物在 特定环境下存在着互生、共生、桔抗、寄生的关系,在复杂的废水环境下不适 应竞争者被淘汰。这就涉及到所投加的高效降解菌株能否长期在生物处理系统 中保持下来并保持优势的问题。

中试后检出的其它菌属:柠檬酸菌属、甲基单胞菌属、克雷伯氏菌属、发酵单胞菌属、黄单胞菌属、醋杆菌属、肠杆菌属是来源于前级缺氧出水的微生物、其它污泥或空气混入。

可见,污水中的成分在很大程度上选择占优势的微生物,使微生物群体内 部发生相应的变化,高效优势菌的优势便是在与其它微生物相竞争、相协调情 况下体现出来。

表 3.17 示出了中试后好氧生物膜上菌群的分布情况[60]。

从表 3.17 可见. 原来人工加入的优势菌仍然保持优势. 而后来混杂进入菌 只要适应环境且起降解作用也会保持一定的优势, 而一些降解作用较弱菌株应 该设法抑制。有目的地控制环境条件, 使高效菌在环境中成为优势, 从而扩大 其对污染物的降解范围。

- 60 -

表 3.17 中试后生物膜各类细菌数量及各自分布^[60]

	÷ -		
菌属名称	菌种编号	单位生物膜细菌个数	占总数比例(%)
Strain name	Serial No.	Microbes per biom. (CFU/mL)	Percentage
假单胞菌属	0 [#] 4 [#] 16 [#]	45 ~ 10 9	40
Pseudomonas	2 × 4 × 10	4.3 ^10	40
肠杆菌属	17#	2 2 × 10 ⁹	26
Enterobacter	1/	2.8×10	25
甲基单胞菌属	0 [#]	1.0 × 10.9	17
Methylomonas	9	1.9 × 10	17
气单胞菌属	12# 14#	1.2 × 10.9	10
Aeromonas	13 5 14	1.3 ×10	12
红螺菌属	10#	2 6 10 8	2.0
Rhodospirillum	10	3.0 ×10	3.2
柠檬酸菌属	11#	10,010,8	1.0
Curobacter	11	1.2 ×10	1.0
发酵单胞菌属	10 [#] 10 [#]	1.010.8	
Zymomonas	10×12	1.0 ×10 -	0.89
埃希氏菌属	1 # 3 #	C 0 - 10 7	0.55
Escherichia	1 . 3	0.0 × 10	0.53
支承にすせば			

Table 3.17 Microbial population distribution on the bio-film after pilot-scale experiment^[60]

克雷伯氏菌属

Klebsiella	15"	4.0 ×10 ′	0.35
醋酸杆菌属	Ð [#]	10,107	
Acetobacter	ð	4.0 × 10	0.35
黄单胞菌属	e# 7#	10,107	0.000
Xanthomonas	3 . /	F0×10	0.089

最后,罗国维等人^[60]所进行的工程实践证明,此法的处理较一般用活性污 泥或自然挂膜效果好,同时处理时间短,挂膜快,系统运行稳定.耐冲击,对 高浓度及难降解的有毒有机废水效果尤佳。

然而,并非所有生物增强系统都能够达到预期的目标。一些实践证明,有 些效果微乎其微,甚至是完全失败的。Lange^[61]等认为多数生物增强剂只有通 过一定时间驯化才能达到去除效果,而固有菌通过一定时间驯化后也能达到相 同目的。因此生物增强作用的效果是不明确的。Koe^[62]用生物增强研究厌氧消 化生物增强系统和对照系统效果没有明显不同。

基于以上诸多失败的例子,一些人对生物增强作用产生怀疑,更多的人开

- 61 -

始探索其失败的原因,认为主要有以下几个方面:

- ① 废水成分复杂,生物增强技术本身难以达到治理目的和要求;
- ② 废水中微生物可利用其生长的底质的浓度太低,不足以维持其生长;
- ③ 投入的菌不如系统中固有菌的竞争能力强,不能强有力地摄取有限的营 养物质;
- ④ 系统中原生动物等捕食性动物将优势菌捕食;
- ⑤ 优势菌优先利用其他易于利用的底质对目标降解物作用缓慢;
- ⑥ 废水中存在抑制性基质会对优势菌的生长和代谢产生抑制作用;
- ⑦ 投入的菌量不足以使其在菌群中占优势,或由于控制不当菌体流失;
- ⑧ 不利的环境因素如废水的 pH 值、温度、溶解氧 DO 的影响。

由上可知,生物增强技术的成功应用要综合考虑水质、水量、投菌量、营养物质、氧耗、反应器的构型、水力停留时间等诸多因素。这就需要对生物强 化系统进行优化设计。

投菌量是强化系统设计的重要参数。随着投菌量的增加,一般增强效果会提高。如 Rogerw 采用该技术处理 l-氨基茶 (1-*NA*)废水,当生物增强剂投入量分别为 1%,2%,5%,10% 及 50%时(降解 l-*NA* 菌的 *MLVSS*/固有菌的 *MLVSS*),降解速率的提高分别为 0%,33%,100%,100%,100%和 300%。但是如果菌量投入过大,成本就会升高。投菌量的确定要视废水中目标去除物的含量而定,一般在启动时采用重投菌,投菌量较大,系统稳定后,投菌量可为启动时的 1/10~1/8^[60]。

投加方式也是设计时考虑的一个重要方面。直接投加,简便易行,但菌体

易于流失或被其他微生物吞噬;采用固定化技术^[21],如用高聚物将其包埋,或 是固定在载体上,这种方法增强了菌体的竞争性,抗毒物毒性能力,有力地避 免了原生动物的捕食。

另外不同的反应器投加生物增强剂后效果不尽相同。最初人们把这种技术 较多用于悬浮污泥法,如间歇式活性污泥法,曝气塘、氧化沟等。而现在人们 尝试将其用于生物膜法,如生物流化床、填充床和升流式厌氧污泥床等,使微 生物增强菌附着在载体上,如砂砾、颗粒污泥上,减少了菌体的流失。

综上所述,生物增强技术在现代废水治理中的应用日益引起人们的兴趣与 关注。该方法可有效提高有毒有害物的去除效果,改善污泥性能,加快系统启 动,增强系统稳定性、耐负荷冲击能力等,操作简便、易于管理,不扩充现有 的水处理设施。如何提高其水处理范围和能力,生物增强无疑为人们开拓了一 条新思路。以上这些可作为 PAEs 降解优势菌株应用于实际废水生物处理系统 中时的参考和依据,而加以考虑和借鉴。

- 62 -

3.7 本章小结

从驯化活性污泥中筛选、分离出两株优势菌种: 假单胞菌属 PS-1 和黄单胞 菌属 PS-2,并研究了它们降解 PAEs 的特性。通过正交试验确定了它们的最佳 生长条件,发现 pH 值是影响其生长和降解 PAEs 效果的重要因素。pH 值的影 响比较复杂,它可能引起菌株降解酶的构象的变化,结合、催化能力的变化以 及酶反应活性部位的三维结构的变化等等。降解结果表明,优势菌种降解能力 明显优于驯化的混合活性菌泥。以 PAEs 为唯一碳源的混合菌株生长的动力学 方程与 Logistic 模型较好地吻合: $X(t) = 0.1809 / (0.0067 + 0.3551 e^{-0.1809 t})$ (精 确度为 0.0001)。在此基础上,就如何将 PAEs 高效降解菌更好地应用于实际废 水处理进行了初步的探讨。

.

- 63 -

第四章 结论与展望

4.1 结论

本文首先综述了酞酸酯 (PAEs) 类有机污染物在环境的分布、影响以及国 内外 PAEs 微生物降解性能方面的研究进展。然后,系统地从酞酸类有机污染 物的结构和微生物降解性能的相关性出发,在模拟废水环境中采用混合驯化培 养菌,研究了 PAEs 好氧最终性生物降解行为及其动力学。最后,从驯化的混 合菌群中,经过进一步筛选、分离和纯化出两株 PAEs 高效降解菌,对其降解 PAEs 的性能进行了一系列的研究。综合本文的研究,可以得到以下结论:

(1) 在静态曝气完全混合生化反应系统中, 酞酸酯类化合物在混合活性 菌泥作用下的好氧降解, 符合以降解最终产物 CO₂ 的生成量表示的一级生化反 应动力学方程。

(2) 在相同的污泥负荷下,对于具有烷基直链结构的 PAEs 化合物,其降 解速率常数(*k_b*)的大小顺序为:邻苯二甲酸二甲基酯(DMP) > 邻苯二甲 酸二乙基酯(DEP)>邻苯二甲酸二正丁基酯(DnBP) > 邻苯二甲酸二辛基 酯(DnOP),这是因为烷基直链碳数的增多,阻碍了微生物攻击酯基和芳环的 能力,明显地降低了 PAEs 的生物降解能力。

在烷基链含相同碳数的情况下,具有直链结构的 DnOP 大于含支(侧)链的 DEHP,这是由于直链的结构的 PAEs,微生物较易接近它们的碳核发生氧化

降解反应,而异构酯(DEHP)则稍难些,因而直链 PAEs 生物降解性能较好。

总之,随着烷基链含碳数的增加和分枝侧链的增加,分子体积也相应地增加,增大了分子对生物反应的位阻效应,妨碍了酶反应活性中心与有机底物很好的结合,从而降低了有机物(PAEs)的生物降解性能。

(3) PAEs 化合物的降解速率常数(k_b)和半寿期(t_{1/2})与化合物分子中的烷基链所含碳的数目(n)之间存在如下的关系式:

 $lnk_b = -0.6243 - 0.0181n - 0.00149n^2$ $R^2 = 0.995$

 $t_{1/2} = 1.2866 + 0.0239n + 0.0025n^2$ $R^2 = 0.992$

上式中, R^2 为复相关系数。

(4) 在 50~200 mg·L⁻¹浓度范围内,驯化混合活性污泥对 PAEs 的降解反 应较为适宜,降解速率较快,且随着浓度的增加而稳步增加。当超过 200 mg·L⁻¹ 时,降解出现明显的停滞期。

(5) 在与易降解物质--葡萄糖组成的混合基质降解试验中,邻苯二甲酸二乙基酯(DEP)、邻苯二甲酸二正丁基酯(DnBP)和邻苯二甲酸二辛基酯(DnOP)

- 64 -

的降解速率(k。值)比单一基质条件下分别提高了 3.71 %、3.08 % 和 2.50 %。

(6) 纯化培养得到的两株 PAEs 降解优势菌 PS-1 和 PS-2 分别鉴定为假单 胞菌属(*Pseudomonas sp.*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas sp.*);正交试验结果表 明,菌株最佳生长条件为: pH 值 7, 温度 30℃, C: N = 20, PAEs 浓度 300 mg·L⁻¹, 其中 pH 值是影响两株菌种生长的重要因素。

(7)利用两优势菌株 (PS-1 和 PS-2)分别在单一和混合条件下进行 PAEs 的降解试验,结果表明,两菌株对 300 mg·L⁻¹的 PAEs 的降解度都达到了 83 % 以上,比同种条件下的驯化混合培养的活性菌泥分别增加了 36.43 和 33.40 %。

(8) PS-1 和 PS-2 等比例混合的菌液对 PAEs 的降解效果明显优于单一条 件下菌株的降解,尤其当 PAEs 质量浓度升高时,混合菌株在降解度、降解速 率以及抗 PAEs(浓度)负荷冲击等方面均具优势。PAEs 降解过程中的混合菌 株的生长动力学方程: *X(t)* = 0.1809 / (0.0067 + 0.3551 e^{-0.1809 t}),式中,*X(t)*为 菌体生长量。该方程与 Logistics 模型能很好地吻合,其拟合的精确度为 0.0001。

4.2展望

本文中根据静态曝气生化反应系统的特点建立的以降解最终产物 CO₂ 的生成量表示的一级生化反应动力学模型,不仅很好地描述了 PAEs 的微生物好氧降解过程,而且可以为其他类似的一些有机污染物的生物降解动力学及降解机理的研究提供了参考。

酞酸酯类化合物是一类难降解的有毒有害物质,本文尽管已经分离、纯化 出了降解 PAEs 的优势菌株,但对其降解 PAEs 的过程以及降解酶学等方面仍缺 乏深入、细致的研究。例如,本文只是定性地知道 pH 值是影响两株 PAEs 降解 菌生长的重要因素,但还不清楚 pH 值对细菌的酶活性的主要影响是属于以下 情况中哪一(几)种:

(a)可以使酶的空间结构破坏,甚至引起酶活性丧失,这种失活或者可逆 或者不可逆,可逆失活是指当 pH 值适当改变后,活力完全恢复;

(b) 影响酶反应活性中心部位的催化基团的解离状态,使得底物(PAEs) 不能分解成产物;

(c)影响酶反应活性中心部位的结合基团的解离状态,使得底物(PAEs) 不能与之结合;

(d)影响底物的解离状态,使得底物(PAEs)不能和酶反应活性中心部 位结合,或者结合后不能生成产物。

此外,如果将这些高效降解专性菌种投放到实际的废水处理系统中,它们 能否良好地生长和繁殖,并对目标污染物(PAEs)保持较高的降解活性,这都 还有待于进一步的研究。

- 65 -

对于一些难降解的有毒有害有机污染物,作者认为以后的研究应该着重于 开发更加有效的生物技术,包括筛选高效的微生物降解菌株,研究污染物的降 解机理,探知促使有机污染物降解的酶或酶系,以及编码这些降解酶的基因, 并利用基因工程技术构建高效的遗传工程菌株^[56],结合传统的生物处理技术, 更好地去除这些有毒有害污染物。

此外,还要建立更为有效的有机物生物降解性能的评价方法或评估预测模型(如 QSBR),预测一些合成有机物的生物降解性及其在环境中的滞留和迁移转化规律,这对于指导有机废物的处理与新型环境协调性有机材料的合成都具有重要的意义。

- 66 -

参考文献

[1]. 叶常明. 环境中的邻苯二甲酸酯[J]. 环境科学进展, 1993, 1(2): 37~41

- [2]. 曾锋, 傅家谟, 盛国英. 邻苯二甲酸酯类有机污染物生物降解性研究进展 [J].环境科学进展, 1999, 7(4): 1~13
- [3]. 万金培, 胡献国, 汪家权. 绿色润滑剂的研究及进展. 环境技术, 1999, 26(3): 26 ~ 30
- [4]. 许征帆. 中国大百科全书《环境科学》[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 1983: 473
- [5]. 庞金梅, 池宝亮, 段亚利. 苯二甲酸酯的微生物降解与转化[J]. 环境科学, 1994, 15(3): 88 ~ 90
- [6]. 韩关根, 吴平谷, 王惠华, 等. 邻苯二甲酸酯对城镇供水的污染及现行水处 理工艺净化效果的评价[J]. 环境与健康杂志, 2001, 18(3): 155~156
- [7]. 莫测辉, 蔡全英, 吴启堂, 等. 我国城市污泥中邻苯二甲酸酯的研究[J].中 国环境科学, 2001, 21(4): 362~366
- [8]. 中国环境优先监测课题组. 环境优先污染物[M]. 北京: 中国环境科学出版 社, 1989
- [9]. Russeil D J. Chemodynamic properties partitioning and migration of phthalate esters in soil[J]. Chemosphere, 1986, 15(8): 1003 ~ 1006
- [10].陈英旭, 沈东升, 胡志强, 等. 酞酸酯类有机毒物在土壤中降解规律的研 究[J]. 环境科学学报, 1997, 17(3): 340~345
- [11].刘庆余, 李悦, 齐英. 邻苯二甲酸酯类在土柱模拟试验中的微生物降解[J]. 环境卫生工程, 1997, (4): 3~6
- [12].Inman, I C, Strachan S D, Sommer I E, Nelson D W. The decomposition of phthalate esters in soil[J]. J. Environ. Sci. Health Ser. B., 1984, 19: 245 ~ 257
- [13]. Madsen P, Thyme J, Henriksen K, et al. Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate mineralization in sludge-amended soil[J]. Environ. Sci. & Tech., 1999, 33(15): $2601 \sim 2606$
- [14]. Johannes L, Schneunert L, Korte F. Fate of bis-(2-ethylhexyl) phthalate in laboratory and outdoor soil-plant-systems[J]. J. Agric. Food Chem., 1988, 36: $210 \sim 215$
- [15]. Walker W W, Cripe C R, Corcoran E F. Potential for biodegradation of phthalic acid esters in marine region[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1984, 13: 1283 ~ 1291

- 67 -
- [16]. Walker W W, Cripe C R, Pritchard P H, et al., Dibutylphthalate degradation in esturine and freshwater sites [J]. Chemosphere, 1984, 13(12): 1283 ~ 1294
- [17]. Seager V W, Tucker N V. Biodegradation of phthalic acid esters in river water and activated sludge[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1976, 31: 29 ~ 34
- [18].Sugatt R H, O'Grady D P, Banerjee S, et al., Shake flask biodegradation of 14 commercial phthalate esters[J]. Appl. Environ. Microbiol. 1984, 47: 601 ~ 606
- [19]. Wang Jianlong, Liu Ping, and Qian Yi. Biodegradation of phthalic acid esters by acclimated activated Sludge[J]. Environ. Intern., 1996, 22(6): 737 ~ 741
- [20].叶常明, 田康.邻苯二甲酸酯类化合物生物降解动力学[J]. 环境科学学报, 1989, 9(1): 37~41
- [21]. Wang J L, Liu P, Qian Y. Biodegradation of phthalaic acid esters by immobilized microbial cells[J]. Environ. Intern. 1997, 23(6): 776~782
- [22].Nozawa T, Maruyama Y. Anaerobic metabolism of phthalate and other aromatic compounds by a denitrifying bacterium[J].. J. Bacteriol, 1988, 170: 5778 ~ 5784
- [23].Ganji S H, Karitar C S, Pujar B G. Metabolism of dimethyl terephthalate by aspergillus Niger[J]. Biodegradation. 1995,6(1): 61 ~ 66
- [24]. 曾锋, 傅家谟, 盛国英, 等. 邻苯二甲酸二丁酯的酶促降解性的研究[J].应 用与环境生物学报, 2000, 6(5): 477~482
- [25].柴素芬, 曾锋, 傅家谟, 等. DEHP 的微生物降解性研究[J].. 中山大学学报, 2000, 39(4): 57~60

[26].冀滨弘,章非娟. 难降解有机污染物的处理技术. 重庆环境科学, 1998, 20(5):36~40

[27].Scholtz, N., Bestimmung der Biologischen Abbaubar keit von Vestino IA Him Modifizierten Sturm test, ST 8994, Huls. A. G., Marl, Germany, 1994
[28].赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002

[29].顾夏声.废水生物处理数学模式(第二版)[M].北京:清华大学出版社,1993
[30].张锡辉.高等环境化学与微生物学原理及应用[M].北京:化学工业出版社, 2001

- [31].Eckenfelder W W. 水污染控制实验. 同济大学译[M]. 上海: 上海科学技术 出版社, 1980.125~152
- [32].Grau P, et al. Kinetics of multicomponent substrate removal by activated sludge[J]. Waster Res., 1975, 9(7): 637~642
- [33].瞿福平,杨义燕,冯旭东,等.定量结构一一生物降解性能(QSBR)研究原理及进展[J].中国环境科学,1999,19(1):18~21

[34].何菲, 袁星, 程香菊, 等. 酚类化合物好氧生物降解的 QSBR 研究[J].中国

- 68 -

环境科学, 2001, 21(2):152~155

- [35]. Wolfe N L. Correlation of microbial degradation rates with chemical structure[J]. Environ. Sci. Technol., 1980, 14(9): 1143 ~ 1144
- [36].Paris D F. Structure-activity relationships in microbial transformation of phenols[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1982, 44: 153
- [37]. Matsui Y. Biodegradation model of organic compounds by activated sludge. I. Non-ionic aliphatic compounds[J]. Bull. Natl. Inst. Res. Pollut. Res., 1983, 13: 135
- [38].Banerjee S. Development of general kinetic model for biodegradation and its application to chlorophenols and related compounds[J]. Environ. Sci. Technol., 1984, 18: 416
- [39].Pitter P. Correlation of microbial degradation rates with chemical structure[J]. Acta Hydrochem. Hydrobiol., 1985, 13: 453
- [40].Zeyer J. Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an orth-cleavage pathway[J]. Appl. Environ. Microbiol, 1985, 50: 447
- [41]. Thomas J M, Rate of dissolution and biodegradation of water insoluble organic compounds[J]. Water Environ. Res. 1986, 52(3): 290
- [42].Paris D F. Relationship between properties of a series of anilines and their transformation by bacteria[J]. Appl. Environ. Toxicol. Chem., 1987, 53: 911
- [43]. Okey R W. A QSBR development procedure for aromatic xenobiotic degradation by unacclimated bacteria[J]. Water Environ. Res., 1993, 65(6): 772
- [44]. Aichinger G. Application of respirometric biodegradability testing protocol to

slightly soluble organic compounds[J]. Water Environ. Res., 1996, 64(7): 890

- [45]. Alexander M. The biological degradability of aromatic compounds[J]. J. Agricultural and Food Chem., 1996, 14(4): 1131
- [46].Okey R W. A QSAR-based biodegradability model--a QSBR[J]. Water Res., 1996, 30(9): 2206
- [47].陆光华, 赵元慧, 汤洁, 等. 基团贡献法对取代苯类化合物生物降解性的 预测[J]. 环境科学学报, 2002, 22(1): 117~119
- [48].赵元慧,杨绍贵. 松花江中取代苯酚和苯胺类的生物降解性及 QSBR 研究 [J].环境科学学报, 2002, 22(1): 45~50
- [49].Boethling R S. Application of moleculartopology to quantitative structure-biodegradability relationships[J]. Environ. Toxicol. Chem. 1986, 5: 797 ~ 806
- [50].高培基,曲音波,钱新民,等.微生物生长与发酵工程[M].济南:山东大学 出版社,1990:27,31

- 69 -

- [51].沈东升,徐向阳,冯孝善. 微生物共代谢在氯代有机物生物降解中的作用 [J].环境科学,1994,15(4):84~87
- [52]. Verce M F, Freedman D L. Modeling the kinetics of vinyl chloride cometabolism by an ethane-grown Pseudomonas sp[J]. Biotech. & Bioeng., 2001, 71: 274 ~ 285
- [53]. 翟福平, 张晓健, 何苗, 等. 氯苯类有机物生物降解性及共代谢作用研究 [J].中国环境科学, 1997, 17(2): 142~145
- [54].全向春, 刘佐才, 范广裕, 等. 生物强化技术及其在废水治理中的应用[J]. 环境科学研究, 1999, 12(3): 22~27
- [55].韩力平, 王建龙, 施汉昌, 等. 生物强化技术在难降解有机物中的应用[J]. 环境科学,1999, 20(6): 100~102
- [56].杨永华, 华晓梅, 陈素玲, 等. 芳香族化合物生物降解代谢及其分子遗传 研究[J].环境科学进展, 1995, 3(6): 31~43
- [57].布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京:科学出版社, 1984
- [58].宋文臣, 王卫国, 计巧灵. 一种实用的微生物工程的建模方法[J]. 青岛化 工学院院报, 1997, 18(3): 275~279
- [59].Kurane R, et al. Induction of enzymes involved in phthalate esters metabolism in Nocardia erylhropolis and enzymatic hydrolysis of phthalate ester by commercial lipases[J]. Agric. Biol. Chem., 1980, 44: 529 ~ 532

[60].罗国维,杨丹菁,林世光.投菌生物接触氧化法处理洁霉素废水的机理研

- 究[J]. 环境科学, 1994, 15(6): 20~22, 32
- [61].Lange C R. Constraints of bioaugmentation in enhancing biological treatment process performance[C]. Waste Conf. Purdure Universit. Proc. 42 nd Ind. West Lafayette: Waste Conf. Purdue University, 1987. 275
- [62].Koe L C C, Ang F L. Bioaugmentation of anaerobic digestion with a biocatalytic addition: The bacterial nature of the biocatalytic addition[J]. Water Res., 1992, 26: 389

- 70 -