

分批补料反应器中氧化乐果曲霉降解动力学的研究

石成春^{1,2}

(1.福州大学化学化工学院, 福建 福州 350003; 2. 福建省福州市环境科学研究所, 福建 福州 350011)

摘 要:采用分批补料培养方式,研究了葡萄糖和氧化乐果共基质体系中氧化乐果曲霉降解动力学过程。结果表明,葡萄糖浓度高有利于促进细胞生长和提高氧化乐果的降解速率; 氧化乐果浓度超过 320 mg·L⁻¹ 对曲霉生长有抑制作用; 超过 820 mg·L⁻¹,曲霉对氧化乐果的降解活性开始下降,表现出底物抑制效应。选择修正 Monod 方程底物抑制动力学通式,应用 Mathcad 数学工具对数据进行曲线拟合,得到了氧化乐果底物抑制降解动力学模型,其比降解速率为 0.001 067 h⁻¹,*k_s* 为 1 260,模型计算值和试验数据标准偏差为 0.031。

关键词:氧化乐果; 生物降解; 动力学

中图分类号:X132 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0720-04

Kinetics of Biodegradation of Omethoate by Aspergillus in Fed-Batch Reactor

SHI Cheng-chun^{1,2}

(1.Institutue of Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350003, China; 2.Institute of Environment Science of Fuzhou,Fuzhou 350011,China)

Abstract: We designed a set of Fed-Batch reactor, which could control the concentration of the substrate under a stable level.The biodegradation kinetics of omethoate by Aspergillus was studied in Fed-Batch reactor with co-substrate comprising glucose and omethoate.We studied the relationship between the concentration of glucose and growth of cell with 1 000 mg·L⁻¹ omethoate in the reactor. At the same time, the connection between the glucose and specific biodegradation of omethoate was discussed. The results show that glucose was the restrictive substrate to the growth of Aspergillus, and was the main factor to affect the biodegradation efficiency of omethoate by Aspergillus . The higher the concentration of glucose, the higher the cell mass and biodegradation rate of omethoate was. On the other hand, the relationship between the omethoate and growth of cell was studied with 5 g·L⁻¹ glucose in the reactor, in which the omethote was the sole P source.It was showed that omethoate could boost the growth of the cell after the concentration was less than 320 mg·L⁻¹.When the concentration of omethoate was over 320 mg·L⁻¹, it would inhabit the growth of Aspergillus. In the same way, we found the biodegradation activity of the cell was inhabited by larger amount of omethoate. The results showed that the specific biodegradation rate of omethoate decreased when the concentration of omethoate was over 820 mg·L⁻¹. Finally, we selected the modified Monod model to stimulate the inhabited biodegradation kinetics process of the omethoate in the reactor. The result showed that the q_m was 0.001067 h⁻¹, the k_s was 1260, with standard deviation of 0.031.

Keywords: Omethoate; biodegradation; kinetics

目前世界上常用的化学品在 8 万种以上,每年约有上千种新化学品投入市场^[1],大量人工化学合成品的出现及其品种结构的不断更新,给地球环境带来极大的生态压力。微生物是化学物质转化和降解的最重

要因素之一,利用微生物降解农药化学品,对污染环境进行生物修复,国内外均进行了大量的研究^[2]。

高毒有机磷杀虫剂占我国杀虫剂用量的 70%,氧化乐果是一种被广泛使用的有机磷杀虫剂。本研究筛选出一株以氧化乐果为唯一磷源的曲霉^[2],采用补料分批培养方式,研究葡萄糖和氧化乐果共基质体系中底物浓度对细胞生长的影响和氧化乐果降解动力学

收稿日期:2004-09-02

基金项目:福建省自然科学基金项目(D0210007)

作者简介:石成春,男,博士研究生,目前主要从事有机污染物微生物降解方面的研究。

模型。

有限公司提供。

1 试验方法

1.1 菌种的筛选

从福建省三农集团股份有限公司废水处理装置的活性污泥中筛选到一株以氧化乐果为惟一磷源的曲霉,经鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

1.2 补料分批培养^[3,4]

将曲霉孢子接入种子培养基中,预培养 36 h 后将菌体滤出,用无菌水清洗菌丝 3 次,按 0.5%接种量补料分批接入反应器中。反应器体积为 250 mL,培养液初始体积为 100 mL。经 150 r·min⁻¹ 磁力搅拌混合并曝气供氧,30 ℃恒温培养,培养过程中采用 pH 自动控制系统流加 1 mol·L⁻¹NaOH 或 HCl 进行 pH 调节,维持反应器内料液 pH 在 5~6。反应器按恒化器操作,补料时间由电磁阀控制,补料速率由手动阀门控制,按照设计的时间间隔向反应器中流加一定浓度的氧化乐果和葡萄糖培养基,通过控制流加速率和流加底物浓度,可控制生物反应器内的氧化乐果(或葡萄糖),使其浓度维持在实验设定范围内。接种反应 32 h 后反应器内底物浓度逐步趋于稳定,定期取样,测定菌体干重和葡萄糖、氧化乐果浓度,计算比降解速率。试验装置如图 1 所示。

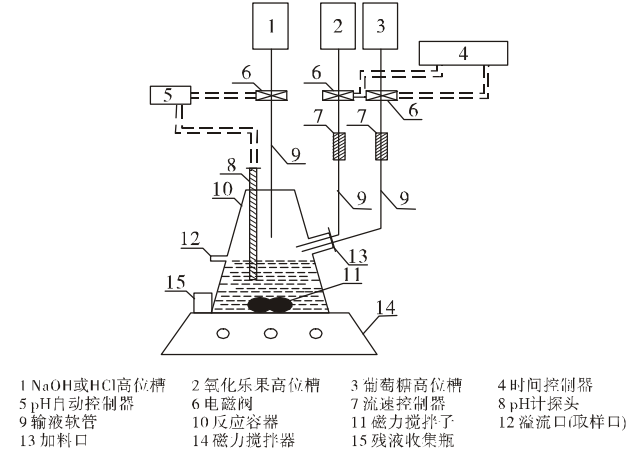


图 1 反应器示意图

Figure 1 Diagram of reactor used in the present study

1.3 培养基组成^[5]

基本培养基 g·L⁻¹: MgSO₄ 0.5, KCl 0.5, CaCl₂ 0.04, MnSO₄ 0.02, FeSO₄ 0.01, 蒸馏水 1 000, pH 6.50。

种子培养基(g·L⁻¹): 葡萄糖 10, 蛋白胨 2, 硫酸铵 1, 硫酸镁 0.5, 氯化钾 0.5, 硫酸亚铁 0.01, 氧化乐果含量按实验要求配制, pH5.50。

氧化乐果纯度为 96%, 由福建省三农集团股份

1.4 分析方法

根据化工行业标准 HG 3307-2000^[6],采用高效液相色谱法(HPLC)测定氧化乐果浓度。高效液相色谱仪 Backman,紫外检测器(220 nm),C₁₈ 色谱柱直径 4.6 mm、长度 150 mm。流动相为水:甲醇=9:1(V/V),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃。

葡萄糖浓度采用葡萄糖氧化酶试剂法测定。微生物菌体干重在过滤收集菌丝体、经 100 ℃烘干至恒重后测定。

1.5 比降解速率定义和计算方法^[7]

比降解速率定义:单位质量细胞单位时间内的底物消耗量。

计算公式:
$$q = \frac{1}{C_{\text{细胞}}} \frac{dS_{\text{底物}}}{dt}$$

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖对曲霉生长和氧化乐果降解的影响

控制反应器内氧化乐果浓度约为 1 000 mg·L⁻¹, 改变可发酵碳源葡萄糖浓度,研究葡萄糖和氧化乐果共基质体系中葡萄糖浓度对细胞生长和氧化乐果降解的影响,试验结果见图 2、3。在分批补料反应器中,微生物菌体的生长速率实际上由底物加料速率所控制^[7]。图 2 结果表明,提高葡萄糖浓度促进了曲霉细胞的生长。体系中葡萄糖浓度为 10 g·L⁻¹ 时,曲霉生长速率最快,细胞量随反应时间的延长而逐渐增大;葡萄糖浓度控制在 5 g·L⁻¹ 左右时,反应初期,曲霉细胞浓度明显增加,但 40 h 以后基本维持恒定,表明细胞生长已经接近稳态;葡萄糖浓度极低时,细胞基本上停止生长。图 3 结果表明,曲霉对氧化乐果的降解速率随葡萄糖浓度增加而提高但比降解速率却呈下降趋势。因此,葡萄糖是控制细胞生长的限制性底物,同时也是控制曲霉降解氧化乐果活性的关键性因素。可

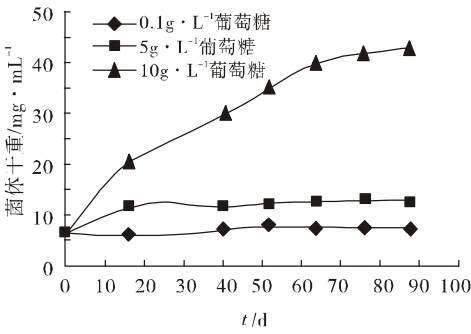


图 2 葡萄糖浓度对菌体生长的影响

Figure 2 Effects of glucose concentrations on growth of *Aspergillus*

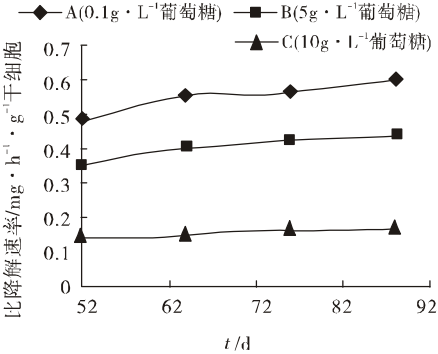


图 3 葡萄糖对氧化乐果降解的影响

Figure 3 Effects of glucose concentrations on biodegradation of omethoate

以认为可发酵碳源葡萄糖为微生物的一级基质,氧化乐果为二级基质,氧化乐果的降解通过曲霉基质共代谢作用进行^[8]。

2.2 氧化乐果浓度对曲霉生长的影响

维持反应器内葡萄糖浓度约为 5 g·L⁻¹,在氧化乐果浓度趋于恒定后,测定不同氧化乐果浓度所对应的菌体生长量如图 4 所示。在底物系统中氧化乐果作为唯一磷源,浓度较低时,随着氧化乐果浓度的增加,曲霉的生长量增大。氧化乐果浓度超过 320 mg·L⁻¹ 左右时,反应器中菌体生长量开始随浓度的增加而下降。可见,在共基质体系中,氧化乐果可作为磷源被曲霉利用,但氧化乐果浓度较高时对曲霉细胞的生长存在

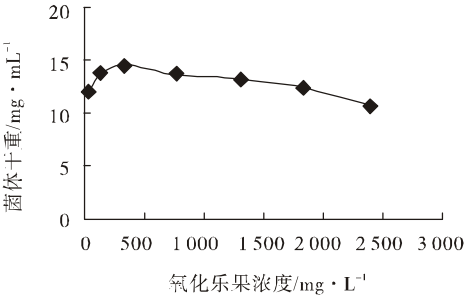


图 4 氧化乐果浓度对曲霉生长的影响

Figure 4 Effects of omethoate concentrations on growth of Aspergillus

抑制效应。

2.3 氧化乐果曲霉降解动力学的研究

2.3.1 氧化乐果浓度对比降解速率的影响

控制反应器内氧化乐果浓度分别为 40、150、

380、820、1 400、1 800、2 400 mg·L⁻¹, 葡萄糖维持在 5 mg·L⁻¹,测得不同氧化乐果浓度条件下的比降解速率见表 1。随着氧化乐果浓度逐步上升,其比降解速率先是上升,浓度超过 820 mg·L⁻¹ 后,比降解速率开始呈现下降的趋势,这表明氧化乐果浓度较高时,曲霉对氧化乐果的降解活性受到抑制。

2.3.2 氧化乐果降解动力学模型和参数的确定

上述结果表明,在葡萄糖和氧化乐果组成的共基质体系中,葡萄糖为一级基质,为细胞生长提供碳源和能源;氧化乐果为二级基质,通过基质共代谢作用降解。氧化乐果浓度较高时对曲霉生长具有抑制作用,同时也降低了曲霉对其本身的降解活性。根据 Yano 等提出的修正 Monod 类型的底物抑制动力学通式^[9,10]

$$\mu=\frac{\mu_m}{1+k_s/S+\sum (S/k_i)^j}$$

采用最小二乘法 and 拟牛顿法,应用 Mathcad 数学软件对数据进行拟合。通过数值计算和方差分析,对上述底物抑制模型进行适当修正,得到氧化乐果曲霉降解动力学模型如下:

$$q=\frac{q_m}{k_s/S+S/k_1+S^2/k_2}$$

式中:q 为氧化乐果比降解速率,10⁻⁴ g 氧化乐果·h⁻¹·g⁻¹ 干细胞 (或 10⁻⁴h⁻¹);S 为氧化乐果浓度,mg·L⁻¹;q_m 为最大降解速率;k₁、k₂ 为抑制常数。

根据表 1 中氧化乐果浓度和比降解速率的实验数据,拟合出动力学模型参数如表 2 所示。

氧化乐果降解拟合曲线和实际降解曲线如图 5 所示,二者拟合得很好,标准偏差仅 0.031。因此,上述修正后的抑制动力学模型可以很好的表达共基质体系中曲霉对氧化乐果降解的动力学过程。

3 结论

(1)在氧化乐果和葡萄糖组成的共基质体系中,葡萄糖是控制细胞生长和曲霉降解活性的关键性控制因素,葡萄糖浓度高有利于细胞的生长和增强氧化乐果的降解速率。

(2)氧化乐果浓度较高时对曲霉细胞生长具有底

表 1 氧化乐果浓度对曲霉比降解速率的影响

Table 1 Effects of ratios between omethoate concentrations and Aspergillus on degradation rate

C S/mg·L ⁻¹	40	150	380	820	1 400	1 800	2 400
q/mg·h ⁻¹ ·g ⁻¹	0.301 28	1.390 34	3.285 49	4.904 16	4.392 845	3.643 576	2.570 424

表 2 氧化乐果降解动力学模型参数

Table 2 Simulated dynamic parameters in the kinetics model for degradation of omethoate

动力学模型参数	q_m	k_s	k_I	k_2	标准方差 r^2
拟合数值	10.67	1 260	2 739	2 052 000	0.031

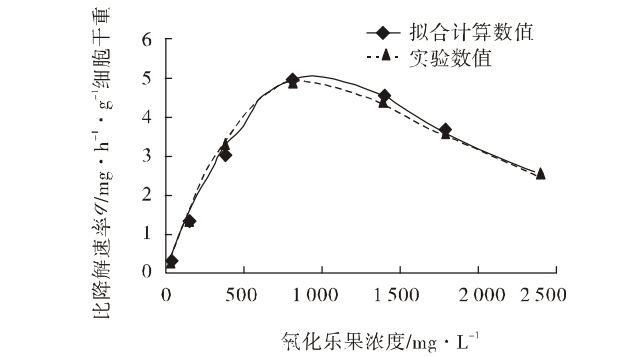


图 5 拟合曲线和实际降解曲线对比

Figure 5 Comparison of mimic curve and practical curve of biodegradations

物抑制效应。

(3)曲霉降解氧化乐果是一个底物抑制动力学过程,通过对通用底物抑制动力学模型修正,降解动力学方程为:

$$q=\frac{10.67}{1\,260/S+S/2\,739+S^2/2\,052\,000}$$

计算值和实测值之间标准偏差仅 0.031,说明此动力学模型能较好地描述曲霉在氧化乐果和葡萄糖共基质体系中对氧化乐果的降解动力学过程。

参考文献:

[1] 国家环境保护局编. 中国环境保护 21 世纪议程[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1995.101.

[2] Meng Chun, S Chngchun, et al. Study on characteristics of biocometabolic removal of omethoate by the *Aspergillus* spp[J]. *Water Research*, 2004,38:1139–1146.

[2] Forlani G, Mangiagalli A, Nielsen E, Suardi C M. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1999,31:991–997.

[3] Williamson K J, McCarty P L. Rapid measurement of monod half-velocity coefficients for bacterial kinetics[J]. *Biotech & Bioeng*, 1975, 17:915–924.

[4] 周 军,赵庆祥,等. 苯酚生物降解动力学极限浓度的测定[J]. 华东理工大学学报, 2002,28(5):515–519.

[5] 石成春,等. 氧化乐果曲霉降解特性和中间产物的研究[J]. 中国环境科学, 2004, 24(2): 180–183.

[6] 国家石油和化学工业局. 中华人民共和国化工行业标准-农药 (2000)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.

[7] 臧荣春,夏凤毅. 微生物动力学模型[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.164–172.

[8] 董春娟,吕炳南,刘淑彦. 废水厌氧生物处理中的共基质代谢和种间协同代谢[J]. 排水给水, 2002, 28(12): 30–32.

[9] Wang K W, BaLtzis B C, Lewandoski G A. Kinetics of phenol biodegradation in the presence of glucose[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996,51(1):87–94.

[10] 郭养浩. 假单胞杆菌 DM1 在二氯甲烷降解过程中的微生物动力学[J]. 生物工程学报, 1990,6(1):56–60.