

活性污泥中细菌对聚丙烯酰胺的生物降解研究

包木太¹, 王娜¹, 陈庆国¹, 郭省学², 李希明²

(1.海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 中国海洋大学, 山东 青岛 266100; 2.中国石化胜利油田分公司采油工艺研究院, 山东 东营 257000)

摘要:聚丙烯酰胺(Polyacrylamide, PAM)是一类重要的水溶性高分子聚合物,已广泛应用到工农业生产的各个领域和人们的日常生活中。同时,PAM 在环境中的残留、迁移和降解对环境的污染也日趋严重,尤其是降解后的单体丙烯酰胺对人类的神经系统有很大的危害。本文从胜利油田的活性污泥中筛选出 3 株聚丙烯酰胺降解菌,通过比较筛选出一株降解效果较好的菌,命名为 AS-2。根据生理生化特性分析,初步鉴定为海球菌属。采用室内培养方法,研究了 AS-2 对聚丙烯酰胺生物降解的最佳条件。结果表明,当降解时间为 5 d, pH=8, 温度为 40 ℃, 碳源为原油, 氮源为 NaNO₃, 原油和 NaNO₃ 的含量分别为 2.5, 1.4 g·L⁻¹ 时, AS-2 对聚丙烯酰胺的降解率达到 45.23%。通过对聚丙烯酰胺生物降解前后的红外谱图比较,推断出 AS-2 主要降解了聚丙烯酰胺侧链的酰胺基,将酰胺基降解为羧酸和游离的氨基。用高效液相色谱检测生化后的 PAM 溶液,未检测出单体丙烯酰胺。

关键词:聚丙烯酰胺;活性污泥;降解菌;红外光谱;高效液相色谱

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)04-0833-06

Biodegradation of Polyacrylamide by Bacteria Isolated from Sewage Sludge

BAO Mu-tai¹, WANG Na¹, CHEN Qing-guo¹, GUO Sheng-xue², LI Xi-ming²

(1.Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2.Research Institute of Oil Production Technology, Shengli Oilfield Filiale, Sinopec, Dongying 257000, China)

Abstract: Polyacrylamide (PAM) is a group of water-soluble high-molecular polymer and has been widely applied in different fields of industry, agriculture and peoples' daily life. At the same time, the remain, migration and degradation of PAM are potentially dangerous to environment. Especially, the acrylamide monomer produced from polyacrylamide degradation is harmful to nervous system of human. In this paper, three strain bacteria which degraded polyacrylamide were screened from activated sludge of Shengli Oilfield. One of the three strains, which could degrade polyacrylamide efficiently, named AS-2. According to its physiological and biochemical characteristics, AS-2 bacterium was identified as *Marinococcus Genus* sp. The optimal conditions for degradation of PAM by AS-2 were obtained as follows: the degradation time was 5 days, the initial pH value was 4, the temperature was 40 ℃, the carbon source was crude oil and its content was 2.5 g·L⁻¹, the optimal nitrogen source was NaNO₃ and its content was 1.4 g·L⁻¹. Under the above conditions, the removal ratio of PAM was 45.23%. The side chain of PAM was mainly degraded by AS-2 through analyzing the IR spectra of PAM before and after biodegradation. Amido in the side chain of PAM was degraded into carboxylic acid and free amino nitrogen. The acrylamide monomer was not detected in PAM solution after biodegradation by high performance liquid chromatography (HPLC).

Keywords: polyacrylamide; activated sludge; degradation bacteria; IR; HPLC

聚丙烯酰胺(Polyacrylamide, PAM)是丙烯酰胺及其衍生物的均聚物和共聚物的统称,为线性水溶性高分子的一种,亲水性高,能以各种百分比溶于水,不溶

于大多数有机溶剂。它是应用最广泛的水溶性高分子化合物之一,并享有“百业助剂”之称^[1],不仅已广泛应用于石油开采、水处理、纺织、造纸、制糖、选矿、医药、建材、农业等领域,而且在食品、药品以及整容等与人们日常生活和人类健康相关的领域也都有应用。

在我国,聚丙烯酰胺的消费现状为:采油工业是第一大用户,占总需求量的 80%左右,第二位是水处理,约占 9%,造纸占 5%,矿山占 2%,其他占 3%。在采油工业中,聚合物驱油 3 次采油技术已进入大面积

收稿日期:2008-07-11

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAB04B02)“油田采油综合节水技术开发”;国家自然科学基金项目(50604013)“油藏环境中采油功能微生物群落选择性激活条件研究”

作者简介:包木太(1971—),男,教授,主要从事微生物驱油理论、含油体系生物修复及海洋溢油指纹鉴别研究工作。

E-mail:mtbao@mail.ouc.edu.cn

工业化推广应用阶段^[2]。聚合物干粉年注入量已达万吨以上,预计到 2010 年,我国石油开采行业 PAM 需求量为 10~11 万 t,占总需求量的 80%左右,其规模在世界处于遥遥领先地位^[3]。伴随而来的是大量含有一定浓度及保留一定黏度的聚合物产出水,大庆油田有些采油厂采出水中 PAM 的浓度已经高达 1 000 mg·L⁻¹ 以上^[4]。含聚丙烯酰胺(PAM)污水中残留单体丙烯酰胺(AM)的毒性很大^[5],如直接排放,将在环境中逐渐积累,危害环境,然而现有工艺无法满足处理要求,需要对 PAM 降解的途径和机理进行全面深入的研究,寻找合适的处理方法。

本文从胜利油田的活性污泥中初步筛选到 3 株聚丙烯酰胺降解菌,通过探索性实验筛选出适合微生物降解聚丙烯酰胺的优化条件。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

DSHZ-300 多用途水浴恒温振荡器、SHP-150 生化培养箱、LDZX-50FAS 立式电热压力蒸汽灭菌器、YS100 显微镜、721 型分光光度计、pH 计、红外光谱仪(AVATER 360FT-IR)、高效液相色谱仪(Agilent 1100)。

1.2 培养基

基础培养基(g·L⁻¹):蛋白胨 5,牛肉膏 10,NaCl 5。去离子水 1 000 mL。

降解培养基(g·L⁻¹):聚丙烯酰胺 0.3,葡萄糖 2,NaNO₃ 1,KH₂PO₄ 1.5,K₂HPO₄ 1.5,MgSO₄ 0.5。去离子水 1 000 mL。

1.3 菌株的筛选和分离

活性污泥中许多微生物接触一段时间后才具备降解抑制物的能力,因此需对污泥进行驯化。将 100 mL 胜利油田的活性污泥加到盛有 1 000 mL 的基础培养基的烧杯中,置于(35±1)℃的恒温槽中,用鱼缸充气器进行曝气。先培养活化 3 d 后,每 72 h 更换 1 次混合液,逐步增加含聚污水的浓度(聚丙烯酰胺浓度:50~500 mg·L⁻¹),培养驯化 45 d 后进行细菌分离。

用平板划线法分离细菌,将平板置于 37℃ 的生化培养箱中培养 48 h 后,再挑取不同形态的菌落进行平板划线纯化细菌。根据菌落形态和显微镜观察结果,重复划线分离,直到得到纯细菌。然后再对筛选出的菌种进行生理生化鉴定。

1.4 分析方法

1.4.1 聚丙烯酰胺质量浓度测定

采用浊度法。生物降解率 η (%) 的表达式为:

$$\eta = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%$$

式中: C_0 表示降解前的聚丙烯酰胺含量,mg·L⁻¹; C_1 表示降解后的聚丙烯酰胺含量,mg·L⁻¹。

1.4.2 红外光谱分析

聚丙烯酰胺干粉和微生物降解产物,用光谱纯 KBr 压片后进行红外光谱分析。

1.4.3 高效液相色谱分析

色谱条件:Agilent ZORBAX XDB-C18 柱(3.0 mm×250 mm×5 μ m);流动相为 Mili-Q 水;流速为 0.4 mL·min⁻¹;紫外 196 nm 处监测;进样量为 50 μ L。此方法对丙烯酰胺的检测灵敏度为 ppb 级^[6]。

2 结果与讨论

2.1 细菌的筛选和鉴定

从胜利油田的活性污泥中筛选到 3 株聚丙烯酰胺好氧降解菌,分别命名为 AS-1、AS-2 和 AS-3。根据形态观察和生理生化鉴定,初步鉴定为:AS-1 为脂肪杆菌属,AS-2 为海球菌属,AS-3 为动性球菌属。

2.2 细菌的生长曲线测定

测定细菌生长曲线了解其生长繁殖规律,这对有效地利用和控制细菌的生长具有重要的意义。在适宜的条件下,培养细菌要经历延迟期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个阶段。

采用浊度法分别测定了 AS-1、AS-2 和 AS-3 以及混合菌在降解培养基中的生长曲线,结果见图 1。从图中可以看出,3 株菌和混合菌在前 5 h 内生长缓慢,处于生长的延迟期。5 h 后细菌浓度大大增加,开始进入细菌的生长对数期。11 h 后,细菌的生长又开始趋向平缓,这时进入了稳定期,持续一定时间后,细菌浓度开始减少,进入衰亡期。其中菌株 AS-2 的生

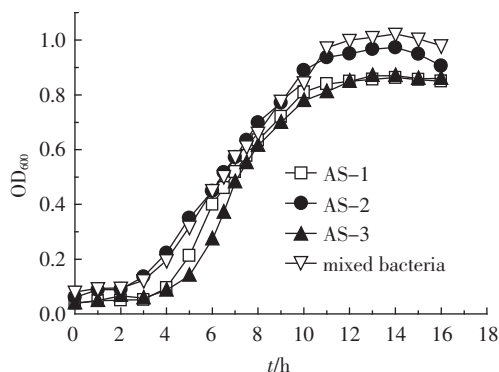


图 1 单株菌和混合菌的生长曲线

Figure 1 The growth curves of single bacterium and mixed bacteria

长较快,细菌浓度较大,是优势菌种。

2.3 单菌株和混合菌的降解能力比较

环境污染物的降解有时可通过单株细菌完成,有时也需要多株细菌间的协作来完成的。同时多株菌共存可能存在协同作用,提高单株菌对降解物的降解效果,也可能存在拮抗作用,降低单株菌对降解物的降解效果。所以,将 3 株菌正交混合后在降解培养基中培养,考察对聚丙烯酰胺的降解效果,结果见图 2。

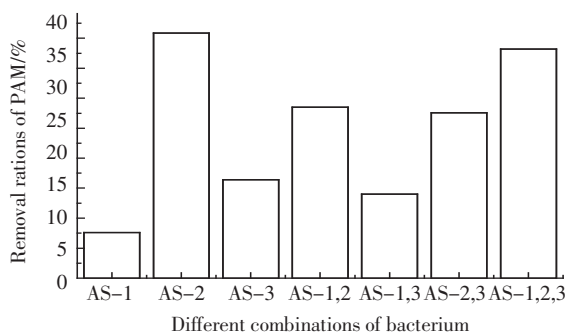


图 2 单菌株和混合菌的降解能力的比较

Figure 2 The comparison of degradation rates of single bacterium and mixed bacteria

不同菌株对聚丙烯酰胺的降解能力存在差异,菌株 AS-2 的降解效果最好,菌 AS-1 和 AS-3 对聚丙烯酰胺的降解效果不明显,并且菌 AS-1 和 AS-3 对菌 AS-2 有明显的拮抗作用。混合培养的降解效果都不如单株菌 AS-2 的降解效果。所以菌 AS-2 为降解聚丙烯酰胺的优势菌,在后续的实验中对其作深入研究。

2.4 菌 AS-2 降解聚丙烯酰胺的条件优化

2.4.1 最佳反应时间的确定

将菌 AS-2 接入 250 mL 的降解培养基中,在 37 °C, 140 r·min⁻¹ 的恒温摇床中振荡培养,间隔一定的时间测定聚丙烯酰胺的浓度。

从图 3 可以看出,在前 5 d 内,菌 AS-2 对聚丙烯酰胺的降解效果明显,在第 5 d 的时候,聚丙烯酰胺的降解率达到 40.51%。而后,随着降解时间的延长,聚丙烯酰胺降解率增长缓慢。这可能是菌 AS-2 的代谢产物所致。由于过长的降解时间不但增加处理成本,而且不利于实际应用。所以,选取菌 AS-2 降解聚丙烯酰胺的最佳时间为 5 d。

2.4.2 初始 pH 的确定

不同的微生物有其最适宜的生长 pH 值范围,同一微生物在其不同的生长阶段和不同的生理、生化过程中,也要求不同的最适宜的 pH 值。将菌 AS-2 接入降解培养基中,分别将 pH 值调为 2、3、4、5、5.5、6、

6.5、7、7.5、8、8.5、9。在 35 °C, 140 r·min⁻¹ 的恒温摇床中振荡培养 5 d 后测定聚丙烯酰胺的浓度。实验结果见图 4。

从图 4 可以看出,不同的初始 pH 值对聚丙烯酰胺的降解有较大的影响。pH 值在 7~8 之间时,聚丙烯酰胺的降解效果较好。降低或增大 pH 值,聚丙烯酰胺的降解率都减小。当 pH=8 时,聚丙烯酰胺的降解率最高,达到 33.29%。

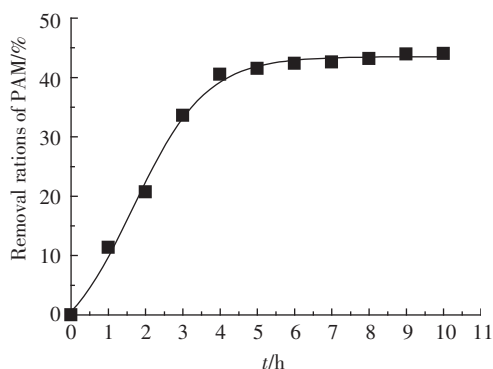


图 3 降解时间对降解率的影响

Figure 3 The effect of time on degradation rates

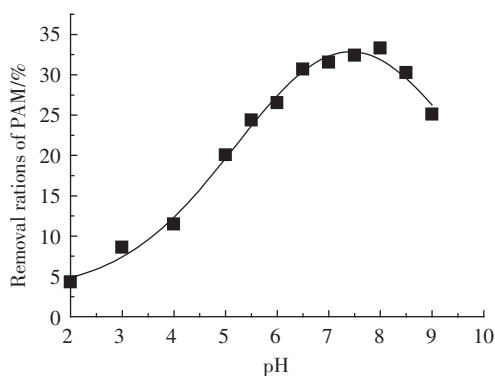


图 4 pH 值对降解率的影响

Figure 4 The effect of pH value on degradation rates

2.4.3 温度的确定

将菌 AS-2 接入降解培养基中,温度范围为 25~55 °C, pH=8, 静置培养 4 d 后测定聚丙烯酰胺的浓度。温度对聚丙烯酰胺降解率的影响见图 5。当温度为 30~45 °C 时,AS-2 对聚丙烯酰胺的降解效果较好,在 40 °C 时,聚丙烯酰胺的降解效果达到最好,降解率达到 32.25%。继续升高温度,聚丙烯酰胺的降解率大幅度下降。所以,40 °C 为最佳降解温度。

2.4.4 最佳碳源的确定

分别选取了 NaHCO₃、乙酸钠、橄榄油、可溶性淀粉、原油、葡萄糖、蔗糖为碳源,其含量均为 2 g·L⁻¹,

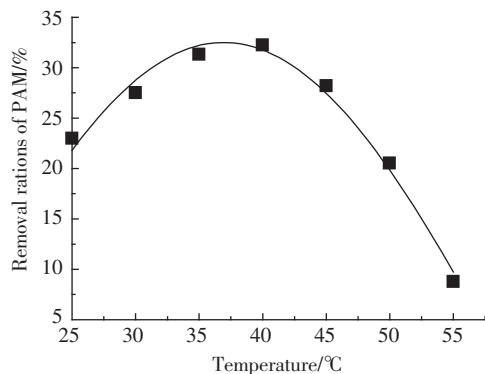


图5 温度对降解率的影响

Figure 5 The effect of temperature on degradation rates

pH 为 8, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温摇床中振荡培养 5 d 后测定聚丙烯酰胺的含量。从图 6 可以看出, 碳源为葡萄糖时, 菌 AS-2 对聚丙烯酰胺的降解效果最好, 降解率达到 40.73%, 碳源为原油时, 降解率较低, 为 29.70%。但油田的含聚污水中同时也含有原油, 所以从实际应用考虑, 选取原油为碳源。

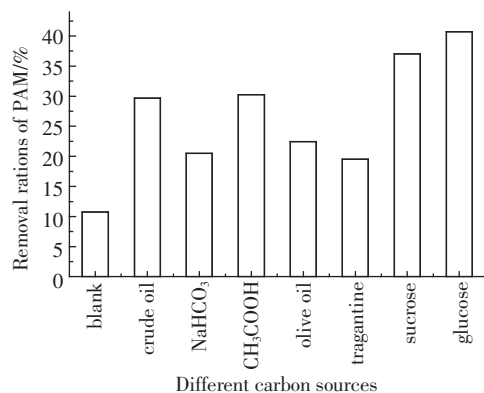


图6 碳源种类对降解率的影响

Figure 6 The effect of different carbon sourced on degradation rates

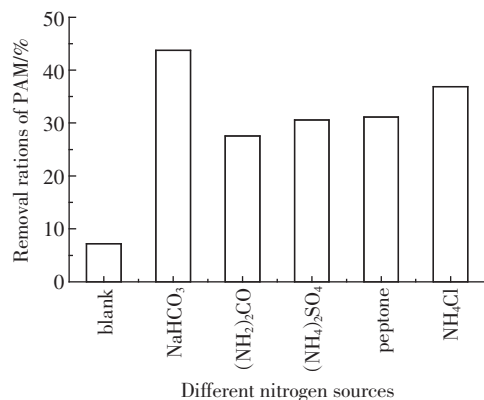


图7 氮源种类对降解率的影响

Figure 7 The effect of different nitrogen sources on degradation rates

2.4.5 最佳氮源的选择

分别选取了 NaNO_3 、尿素、硫酸铵、蛋白胨、 NH_4Cl 为碳源, 其含量均为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 为 8, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $140\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温摇床中振荡培养 5 d 后测定聚丙烯酰胺的含量。从图 7 可以看出, 氮源为 NaNO_3 时, 菌 AS-2 对聚丙烯酰胺的降解效果最好, 降解率达到 43.75%。

2.4.6 碳源、氮源含量的确定

分别考察了原油和硝酸钠含量对菌 AS-2 降解聚丙烯酰胺的影响(结果见图 8, 图 9)。实验表明, 当原油含量为 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 硝酸钠含量为 $1.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌 AS-2 对聚丙烯酰胺的降解效果最好, 分别达到了 33.83% 和 45.23%。

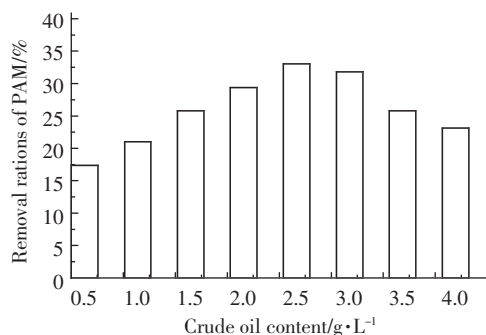


图8 碳源含量对降解率的影响

Figure 8 The effect of crude oil content on degradation rates

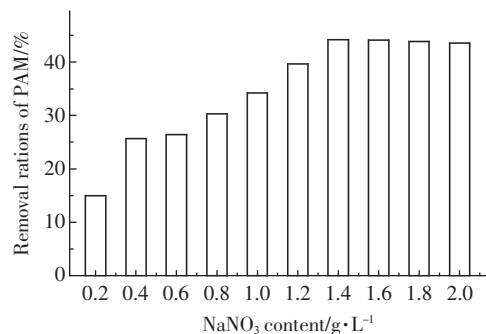


图9 氮源含量对聚丙烯酰胺的影响

Figure 9 The effect of NaNO_3 content on degradation rates

3 菌 AS-2 对聚丙烯酰胺结构的影响

分别对聚丙烯酰胺降解前后的样品进行了红外扫描(图 10、图 11)。从图中可以看出, 经过菌 AS-2 降解后的聚丙烯酰胺的红外光谱图发生了明显的变化。降解后聚丙烯酰胺的谱图中的 $3300\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 处附近 $-\text{NH}_2$ 的伸缩性振动特征吸收峰明显变弱, 说明了微生物主要降解了聚丙烯酰胺侧链上的酰胺基。根据 1364 cm^{-1} 和 920 cm^{-1} 附近出现新的吸收峰, 可

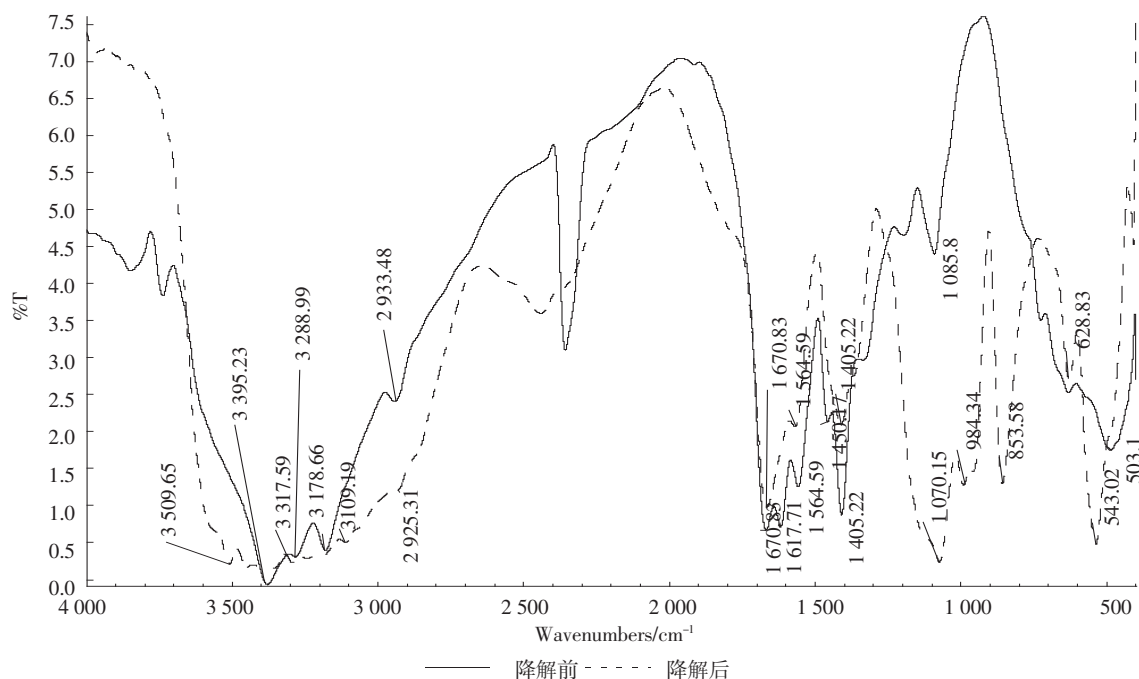


图10 微生物降解前后的聚丙烯酰胺的红外光谱

Figure 10 The IR picture of PAM before and after biodegradation

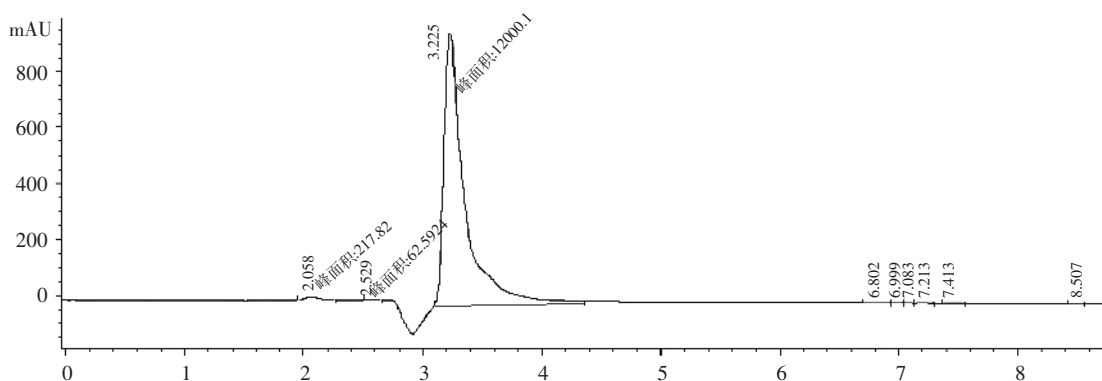


图11 丙烯酰胺标样的高效液相色谱图

Figure 11 The HPLC picture of AM standard sample

以确定体系中的羧基的存在。 1462 cm^{-1} 处的峰消失和 1082 cm^{-1} 处的峰明显变宽变强,说明氨基可能从聚丙烯酰胺侧链上脱落下来成为游离的氨基。同时, $530\sim 995\text{ cm}^{-1}$ 处出现的几个强的吸收峰代表了芳香化合物,可能是微生物的代谢产物。所以,可以推断菌AS-2主要降解了聚丙烯酰胺的侧链,把酰胺基降解成了羧酸和游离的氨基。

4 丙烯酰胺单体的测定

聚丙烯酰胺本身基本无毒,但是它的单体,丙烯酰胺(Acrylamide, AM)的毒性却很强,它是神经系统

致毒剂,对神经系统有损伤作用,中毒后表现为肌体无力和运动失调等症状^[7]。因此,在PAM的使用过程中人们非常关注是否有单体释放出来。本文用高效液相色谱法考察了生化过程中是否有丙烯酰胺单体产生(图11、图12)。

从图中可以看出,丙烯酰胺标样的保留时间为 3.227 min ,而降解后的PAM溶液的3个峰的保留时间分别为 1.902 、 2.715 、 2.929 min ,均不在丙烯酰胺出峰处。说明经生化处理后的PAM溶液中没有丙烯酰胺单体生成。用高效液相色谱检测生化后的PAM溶液,未检测出单体丙烯酰胺。

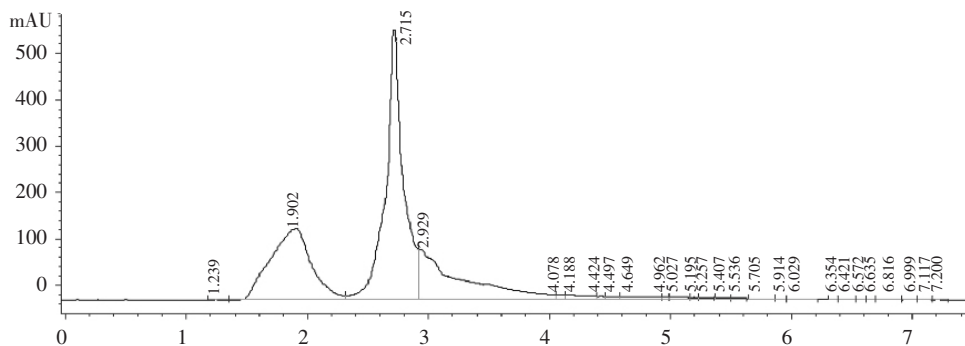


图 12 生化后 PAM 溶液的高效液相色谱图

Figure 12 The HPLC picture of PAM after biodegradation

5 结论

(1)从胜利油田的活性污泥中筛选出 3 株聚丙烯酰胺降解菌,通过比较筛选出一株降解效果较好的菌 AS-2。研究了 AS-2 对聚丙烯酰胺生物降解的最佳条件。结果表明,当降解时间为 5 d、pH=8、温度为 40℃、碳源为原油、氮源为 NaNO_3 、原油和 NaNO_3 的含量分别为 2.5、1.4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,AS-2 对聚丙烯酰胺的降解率达到 45.23%。

(2)分别对聚丙烯酰胺降解前后的样品进行了红外扫描。经过菌 AS-2 降解后的聚丙烯酰胺的红外光谱图发生了明显的变化。经过红外分析,可以推断菌 AS-2 主要降解了聚丙烯酰胺的侧链,把酰胺基降解成了羧酸和游离的氨基。结果表明,菌 AS-2 对聚丙烯酰胺具有较强的生物降解功能。用高效液相色谱检测生化后的 PAM 溶液,未检测出单体丙烯酰胺。

参考文献:

- [1] 方道斌,郭睿威. 丙烯酰胺聚合物[M]. 北京:化学工业出版社,2006.
FANG Dao-bin, GUO Rui-wei. Acrylamide polymer[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [2] 王嘉麟,邵强,闫光绪,等. Fenton 试剂氧化处理聚丙烯酰胺污水[J]. 石油化工安全环保技术, 2007, 23(2): 60-64.
WANG Jia-lin, SHAO Qiang, YAN Guang-xu, et al. Mechanism of influential factors in removing polyacrylamide from oilfield wastewater by fenton reagent[J]. *Petrochemical Safety and Environmental Protection Technology*, 2007, 23(2): 60-64.
- [3] 严瑞璋. 水溶性高分子[M]. 北京:化学工业出版社,1998:84-178.
YAN Rui-xuan. Water-soluble polymer[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1998:84-178.
- [4] 郭万奎,程杰成,廖广志. 大庆油田三次采油技术研究现状及发展方向[J]. 大庆石油地质与开发, 2002, 21(3): 1-6.
GUO Wan-kui, CHENG Jie-cheng, LIAO Guang-zhi. Present situation and direction of tertiary recovery technique in the future in Daqing Oil-field[J]. *Petroleum Geology & Oilfield Development in Daqing*, 2002, 21(3): 1-6.
- [5] Sathesh C P, Thatheyus A J. Biodegradation of acrylamide employing free and immobilized cells of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, 60: 69-73.
- [6] Caulfield M J, Hao X J, Qiao G G, et al. Degradation on polyacrylamides. Part I. linear polyacrylamide[J]. *Polymer*, 2003, 44: 1331-1337.
- [7] 丁茂柏. 科学评估丙烯酰胺危害[J]. 中国职业医学, 2007, 34(1): 61-64.
DING Mao-bo. Scientific evaluation on the hazards of acrylamide[J]. *Chin Occup Med*, 2007, 34(1): 61-64.