

简报

文章编号: 0253-2468(2000)-03-0379-03

中图分类号: X172

文献标识码: A

固定化及游离态皮氏伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pickettii*) 降解喹啉的试验研究^{*}

韩力平, 王建龙, 刘 恒, 施汉昌, 钱 易 (清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 从处理焦化废水的 A²/O 工艺曝气池中筛选、分离得到一株能利用喹啉作为唯一碳源、氮源和能源的细菌, 经鉴定为皮氏伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pickettii*) 革兰氏染色阴性, 杆状。采用 PVA-硼酸-纱布复合载体法包埋固定了该菌, 用电镜观察研究了该菌在固定化载体中的分布及形态。固定化细胞降解动力学试验表明, 喹啉的降解符合零级反应。比较了固定化细胞与游离态细胞降解喹啉的特性, 实验结果表明, 游离态细胞利用喹啉的速率较快。

关键词: 固定化细胞; 喹啉; 生物降解; 降解动力学

Quinoline biodegradation by immobilized and free cells of *Burkholderia pickettii*

HAN Liping, WANG Jianlong, LIU Heng, SHI Hanchang, QIAN Yi (State key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: A gram negative rod-shaped aerobe identified as *Burkholderia pickettii*, which can use quinoline as the sole carbon, nitrogen and energy source, was isolated from the aeration tank of A²/O process for coke-plant wastewater treatment. An innovative immobilization procedure called PVA-H₃BO₃-gauze method was used for preparing immobilized cells. The carrier structure and distribution of microbial cells in the carrier were investigated by electronic microscope. Kinetic study showed that quinoline biodegradation by immobilized cells conformed to zero-order reaction model. It was demonstrated that quinoline biodegradation by free cells was more quickly than by immobilized cells.

Key words: immobilized cells, quinoline, biodegradation, kinetics

喹啉作为溶剂和原料在化工、医药等行业用途很广, 每年都有大量喹啉进入环境。同时, 在一些石化行业及木材加工业产生的废水中也含有大量喹啉, 它被认为是一种难降解有机化合物, 在活性污泥法等生物处理构筑物中很难被去除^[1]。由于喹啉的水溶性及扩散性比较好, 在自然界中它的生物降解及转化已引起人们的关注。

细胞固定化技术用于废水处理已展现了广阔的前景^[2], 由于它本身具有细胞密度高, 耐毒害能力强, 可重复利用等优点, 许多研究者用它来处理一些难降解有机化合物, 并得到了很好的结果^[3]。近年来, 各种不同的载体被开发出来用于制作固定化细胞^[4], 其中利用 PVA (Polyvinyl Alcohol) 与硼酸交联作为载体的固定化细胞技术被越来越多的人采用, 这是因为这种固定化方法成本低, 易操作, 加工出来的固定化细胞机械强度高, 可长期使用^[5]。本研究在筛选、分离得到喹啉降解菌的基础上, 采用一种改进的 PVA-硼酸法细胞固定化技术, 即 PVA-硼酸-纱布复合载体法来将细胞固定化并用于降解喹啉。

收稿日期: 1999-07-20; 修订日期: 2000-01-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 29637010)

作者简介: 韩力平 (1972—), 男, 博士研究生

1 材料和方法

1.1 菌种及固定化方法

实验中采用的喹啉降解菌-皮氏伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pickettii*) 从本实验室正常运行的处理焦化废水的 A²/O 工艺曝气池污泥中筛选、分离得到,它是一株杆状的革兰氏阴性菌,可以利用喹啉作为唯一碳源、氮源和能源生长.

接种该菌到肉汤培养基中放大培养,约 3 天后离心收集菌体制成一定浓度的菌悬液. 6 g PVA 溶于 25 mL 无菌水,并与 30 mL 菌液充分混合后涂于一块 25 cm ×30 cm 的长方形双层纱布上,厚约 1 mm 左右,然后浸入 300mL 饱和硼酸溶液中,放入冰箱中过夜保存. 第二天取出后用生理盐水冲洗两遍,去除未交联的 PVA,然后用剪刀剪成 0.5 cm ×0.5 cm 的小方块,其形态可以形象地称为“小三明治”.

1.2 喹啉降解实验

表 1 无机盐培养基组成(g/L)
Table 1 Composition of MSM medium

Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ ·7H ₂ O	FeSO ₄ ·7H ₂ O	CaCl ₂	MnSO ₄ ·7H ₂ O
4.26	2.65	0.2	0.01	0.02	0.002

喹啉降解实验在恒温振荡培养箱中进行,实验条件为 30 °C,180 r/min. 将不同量的喹啉加入三角瓶内无菌的无机盐培养基中形成一定的浓度,接种一

定量的游离态细胞和固定化细胞进行降解试验,不同时间取少量样品用于喹啉浓度测定. 无机盐培养基组成见表 1,每个三角瓶中游离态细胞接种量为 1 ×10⁸ 个/mL 培养基,固定化细胞中含菌量与游离态细胞相同.

1.3 分析方法

样品经过离心、过滤后用 HPLC(HP5050,美国)测定喹啉浓度,色谱柱为 HP 公司的 Zorbax C¹⁸ 反相柱,流动相为甲醇:水 = 60:40 (V/V),流速 1 mL/min,测定波长为 275 nm.

2 结果与讨论

2.1 固定化细胞形态及特点

采用 PVA-硼酸-纱布法固定化筛选得到的皮氏伯克霍尔德氏菌操作简便,得到的固定化细胞纱布片强度高、不粘附、密度适中. 利用扫描电镜观察了固定化细胞的形态及在载体中的分布情况. 图 1 显示了固定化细胞纱布片横截面上纱布的棉纤维与 PVA 之间相互交联的情况,可以看出,PVA 与硼酸作用形成的多孔载体与纱布棉纤维一起构成了支承固定化细胞的骨架. 图 2 进一步揭示了菌体在多孔载体中的分布情况,杆状的

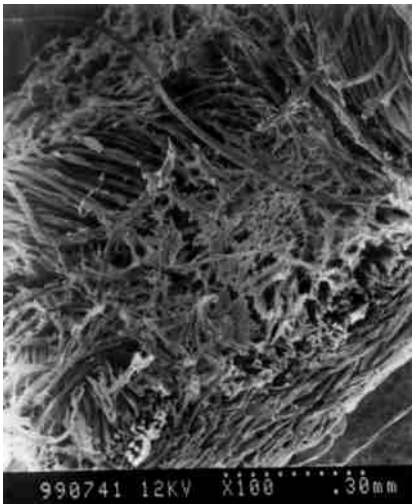


图 1 固定化细胞载体结构

Fig.1 Backbone of immobilized cells

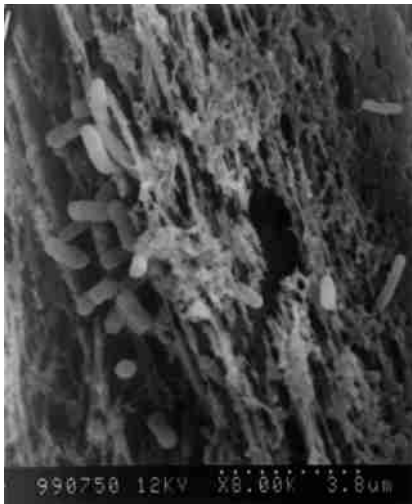


图 2 固定化细胞内菌体分布

Fig.2 Distribution of immobilized cells

皮氏伯克霍尔德氏菌均匀地分布于 PVA 与纱布棉纤维组成的复合载体中,载体的多孔结构有利于底物和代谢产物的扩散,使菌体降解活性得到发挥.

喹啉初始浓度分别为 50,100,300 和 500 mg/L 时,固定化细胞对喹啉的降解情况见图 3.在这几个浓度下不含菌体细胞的固定化载体对照组对喹啉几乎没有降解作用.降解曲线回归后可以

$C = -kt + b$ (1)

其中: C 为喹啉浓度,mg/L; t 为时间,h; k, b 为常数.

表 2 列出了不同初始浓度的喹啉的降解动力学方程.可以看出,不同初始浓度的喹啉降解遵循零级反应动力学.反应速率常数随喹啉浓度升高而增加,但当达到一定浓度,如 500 mg/L 时,反应速率常数又有所减小,说明喹啉初始浓度对反应速率有一定影响,底物浓度太高时会有一定抑制作用,使降解速率变慢.

表 2 喹啉降解动力学方程

Table 2 Kinetics of quinoline biodegradation

喹啉初始浓度,mg/L	动力学方程	速率常数 k, h^{-1}	相关系数 P
50	$C = -3.1293t + 57.52$	3.1293	0.9065
100	$C = -5.0689t + 125.73$	5.0689	0.9428
300	$C = -12.519t + 336.16$	12.519	0.9896
500	$C = -5.6766t + 495.22$	5.6766	0.9466

2.3 固定化细胞与游离态细胞降解喹啉的对比实验

为了对比固定化细胞与游离态细胞对喹啉的降解效果,选取 3 个不同喹啉初始浓度进行喹啉降解实验,实验结果见图 4.由图可见,3 个浓度下,游离态细胞对喹啉的降解速率都要快于固定化细胞,这是由于与游离态细胞相比固定化细胞的传质、传氧受到了一定限制,影响了固定化细胞利用喹啉的速率.但由于固定化细胞具有耐毒性好,抗冲击负荷能力强,可长期重复利用等明显优点,将其用于反应器规模的喹啉废水的处理或结合生物强化技术来修复受喹啉污染的土壤有很大潜力,这些实验正在进行当中.

3 结论

- (1) PVA-硼酸-纱布法是一种简便可行的细胞固定化方法,制成的固定化细胞机械强度高,不粘附,没有溶出现象.
- (2) 固定化皮氏伯克霍尔德氏菌降解喹啉符合零级反应动力学.
- (3) 游离态细胞对喹啉的去除速率优于固定化细胞.

参考文献

[1] Zhang M, Tay J H, et al. Coke plant wastewater treatment by fixed biofilm system for COD and NH₃-N removal[J]. Wat Res, 1998, 32(2): 519—527

[2] Cassidy M B, Lee H, Trevors J T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review[J]. J Ind Microbiol, 1996, 16(1): 79—101

[3] Lee S T, et al. Biodegradation of pyridine by freely suspended and immobilized *pimelobacter* sp[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 41(30): 652—657

[4] Wang Jianlong, et al. Immobilization of microbial cells using polyvinyl alcohol (PVA)-polyacrylamide gels[J]. Biotechnol Techniques, 1995, 9(3): 203—208

[5] Wang Jianlong et al. Biodegradation of phthalic acid esters by immobilized microbial cells[J]. Environ Int, 1997, 23(6): 775—782

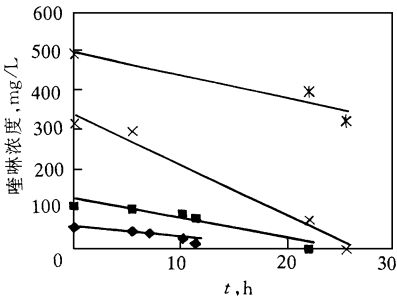


图 3 固定化细胞降解喹啉动力学

Fig. 3 Quinoline biodegradation by immobilized cells

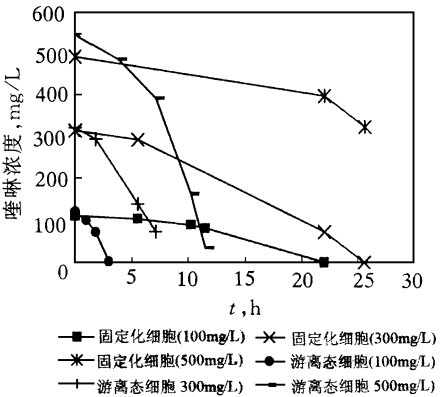


图 4 固定化细胞和游离态细胞对喹啉的降解

Fig. 4 Quinoline biodegradation by immobilized and free cells