

②

用核素双标记法研究厌氧生物降解途径

141-145

申立贤 刘 玫

(北京市环保所, 100037)

刘忠敏

(北京师范大学, 100875)

X172

A 采用放射性核素双标记法(即 ^{14}C 标记在对苯二甲酸(TA)的羧基上, ^3H 标记在苯环上)对TA进行标记。标记的TA与无标记的TA混合,共同作为厌氧试验的基质,通过测定甲烷和二氧化碳中 ^{14}C 和 ^3H 的变化和色-质联机分析TA的厌氧生物降解过程及主要中间产物,得出TA的厌氧降解基本途径。其主要中间产物有:苯甲酸、烷基苯、 C_4-C_{13} 的饱和烷烃, C_4-C_{12} 的烯烃,环烷烃和小分子的醛、醇、酸等。

关键词 ^{14}C ^3H 双标记 对苯二甲酸 厌氧生物降解途径

厌氧处理, 碳14, 气

放射性核素示踪技术是研究微生物对有机污染物吸附、转移、降解等变化规律的一种重要手段。由于厌氧生物降解机理及途径研究难度较大,目前只对少数几种有机物如葡萄糖、苯酚、苯甲酸等进行过单标记的厌氧生物降解途径研究^[1-3],我国目前在这方面应用双标记物还不多。由于双标记可在同一物质的不同部位作不同标记,因而更能反映物质的变化规律。我们在开发精制对苯二甲酸生产废水治理技术的厌氧生物降解途径研究中采用 ^3H 、 ^{14}C 双标记法。

1 研究的技术路线

精制对苯二甲酸生产废水中含有大量生物难降解的对苯二甲酸(TA),研究TA的厌氧降解途径对选择该废水的处理流程及工艺条件非常重要,是开发此废水处理技术的关键。为了解厌氧降解对TA的苯环开环与羧基断链的影响,探索研究复杂有机物厌氧降解的中间产物与降解途径,本研究采用核素双标记示踪技术、同步配合色-质联机等分析测试,以及放射性核素高灵敏度测量技术来判断TA厌氧降解进程,确定试验的取样时机,通过测定厌氧反应器所产气体 CH_4 、 CO_2 中的 ^{14}C 、 ^3H 的变化及厌氧污泥与水样分析,来确定中间产物与降解过程。本研究的技术路线示于图1。TA示踪剂由中国原子能科学研究院同位素研究所提供; ^3H 标记在TA的苯环上, ^{14}C 标记在TA的羧基上。将普通TA与示踪剂TA一起投入厌氧反应器内进行试验研究。

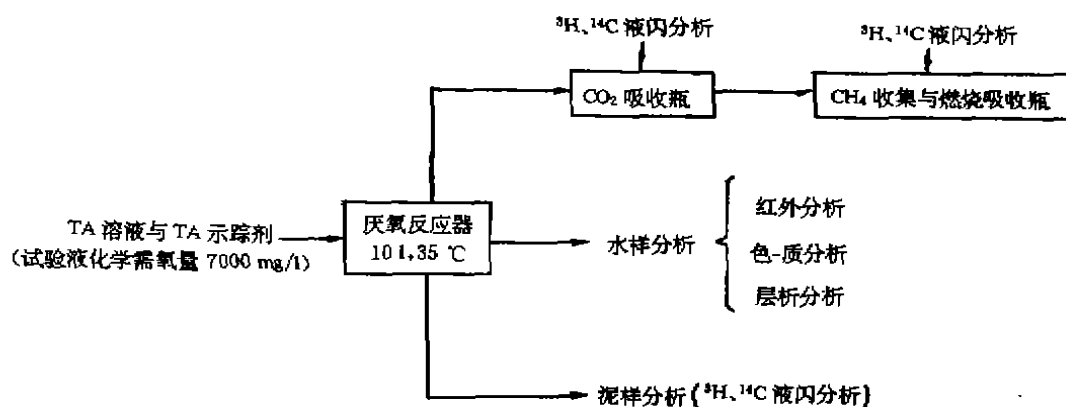


图1 TA厌氧降解分析的技术路线示意图

2 试验方法

厌氧试验采用静态培养法,密封的厌氧反应器置于恒温箱中,厌氧消化产生的气体从反应器顶部引入 CO_2 吸收瓶、 CH_4 收集(燃烧)装置,用排水计气法测量产气量,并定时取样进行各种测定。同步考察厌氧上清液和泥中放射性活度变化,收集排气管经水封后排出的气体,适时取样分析。试验装置示于图2。

2.1 厌氧试验条件

初始投配负荷 $0.11 \text{ kg (化学需氧量) / kg (污泥)}$,污泥浓度 100 g/l 左右, $\text{C}:\text{N}:\text{P}$ 为 $100:5:1$ 。示踪剂:对苯二甲酸-(羧基- ^{14}C)-(苯环 ^3H), ^3H 投加量为 $78.6 \times 10^6 \text{ Bq}$, ^{14}C 投加量为 $7.2 \times 10^6 \text{ Bq}$ 。

2.2 制样方法

CO_2 用 CARBO-SORB I 吸收液。

CH_4 测定: $\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \xrightarrow[\text{燃烧}]{>800^\circ\text{C}} \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$, 测定同 CO_2 。由于目前没有成熟的 CH_4 中 ^{14}C 、 ^3H 的测定方法,因此本研究用装有电极的三口瓶,集满气体后逐步升高电极电压,使之达到 800°C 以上,再通入 O_2 进行燃烧,将 CH_4 转化成 CO_2 与水,然后加入 CARBO-SORB I 吸收液。

2.3 核素 ^{14}C 、 ^3H 的测定条件

仪器:Beckman LS9000 液闪计数器;TPP₄ 闪烁液;能道范围: ^3H 10—317, ^{14}C 317—655。

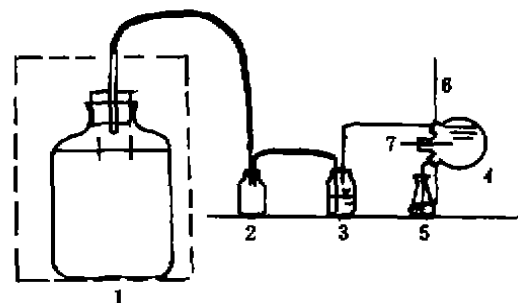


图2 试验装置示意图

- 1—厌氧反应器与恒温箱;
- 2—缓冲瓶;3— CO_2 吸收瓶;
- 4— CH_4 收集与燃烧瓶;5—集水器;
- 6—固定架;7—加热燃烧电极。

3 结果与讨论

根据对苯二甲酸的分子结构与核素的标记位置,放射性核素的释放顺序与TA的厌氧降解途径存在以下几种关系:①若 CO_2 先出现 ^{14}C ,则说明TA降解是先脱羧。②若 CH_4 先出现 ^{14}C ,则可能是TA的羧基C生成 CH_4 ,也可能是羧基C生成 CO_2 后,再与 H_2 生成 CH_4 。③若反应

开始时释放少量 ^3H ,有可能是合成示踪剂时连接 H 的位置不在苯环上而置换下来;若大量 ^3H 释放则表明苯环已开。且苯环上有4个 ^3H ,其 ^3H 的释放可能出现几个峰的情况。④ CH_4 中 ^{14}C 和 ^3H 同时出现释放高峰,则可能是苯的取代基脱羧后生成的 $^{14}\text{CO}_2$ 和 ^3H 反应形成的 CH_4 ,也可能是苯环中的某个键断裂形成。⑤反应形成的甲烷有以下四种形式: CH_4 ; $^{14}\text{CH}_4$; C^3H_4 ; $^{14}\text{C}^3\text{H}_4$ 。第一种形式液闪不能检出;第二种检出结果是 ^{14}C 计数高而 ^3H 计数低;第三种是 ^{14}C 计数低而 ^3H 计数高;只有第四种形式才可能 ^{14}C 、 ^3H 计数皆高。根据示踪剂的结构,可以认为 ^{14}C 计数高表明TA已脱羧, ^3H 计数高说明苯环已开环。

TA厌氧试验的产气过程与产气速率示于图3。在300—500 h内(从投配時計)厌氧反应处于速率高峰期。气体中 ^{14}C 主要以 CH_4 形式释放出来, ^{14}C 和 ^3H 在50—300 h之间出现释放高峰(在产气高峰之前); CO_2 中的 ^{14}C 释放高峰是与产气高峰同时出现的。气体中放射性核素的活度变化情况示于图4。

示踪测试结果表明,厌氧反应前期(50 h内)有少量 ^{14}C 和 ^3H 以气体形式释放,色-质分析证实这时的消化液中主要含苯甲酸的饱和环烷烃、烷基苯等。 ^3H 在厌氧反应第50—300 h内释放量占释放总量的95%以上,这样大的释放量表明TA的苯环已被打开。此外,从反应第50 h开始,在 CH_4 中 ^{14}C 和 ^3H 同时出现高峰,此时无论 CH_4 是如何形成的,也都说明苯环已经开环。

试验期间,色-质等仪器同步测定厌氧反应器各个时期消化液的主要产物,情况如下:①TA降解前5 d的消化液中含有较多苯系物,如二甲苯的三种同分异构体、苯甲酸、苯甲醇以及环己烷甲酸等一些饱和环烷烃。②厌氧反应第5天消化液中主要分解产物为 C_3 酸,醇类和 C_3 — C_{13} 的带支链的烷烃,还有 C_8 — C_{12} 的烯烃及烯醇。③厌氧反应第23天主要产物是 C_3 的醇,烷烃和酯类等短碳链小分子物质,而酯类以乙酸甲酯为主。

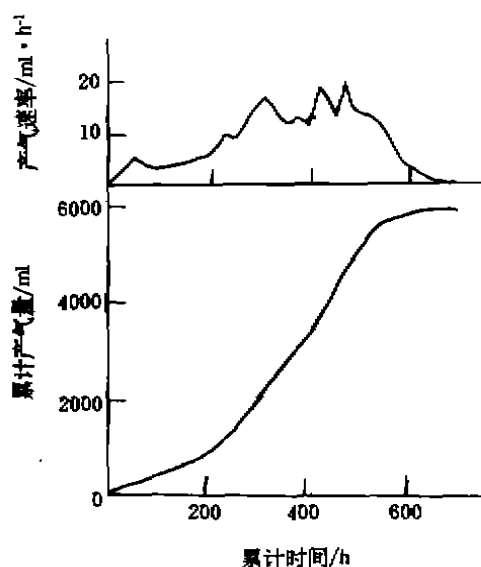


图3 厌氧产气曲线

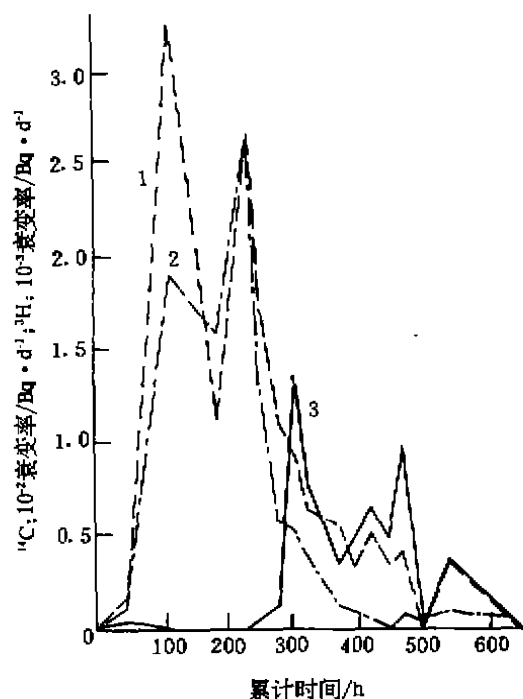


图4 气体中的核素衰变情况

1—— $^{14}\text{CH}_4$; 2—— C^3H_4 ; 3—— $^{14}\text{CO}_2$ 。

根据上述试验结果,可以认为 TA 在厌氧微生物作用下,初期分解经历了先脱羧生成苯甲酸和先还原生成烷基苯、饱和环烷烃两个过程。

对于苯甲酸的厌氧降解途径,已有许多学者提出了研究报告。特别是 D. Grbic-Galic 等人^[2,3]研究了 11 个单芳香族化合物的产甲烷过程,提出了苯甲酸在厌氧条件下比较完整的还原途径。本研究在 TA 的中间产物检出有他们提出的苯甲酸的厌氧降解的中间产物,因此认为 TA 降解过程中也存在苯甲酸按 D. Grbic-Galic 提出的降解途径,但也有不同,在反应器第 5 天后,TA 的中间产物中已很少有芳香族化合物,即说明苯环已开,以大分子氧化态的烯烃、烯醇类物、大分子还原态饱和烷烃为主,这些中间产物再分解,一部分不断被氧化生成小分子不饱和烷烃或醇、酸、酯等物,一部分不断被还原成小分子饱和烷烃和 CH_4 。到厌氧反应后期,流出水中主要为 C_3 的小分子的氧化态物质,如醇、醛、酸、酯、烯烃(以乙酸甲酯、丙醇最多)及还原态物质 C_3 的饱和烷烃(图 5)。

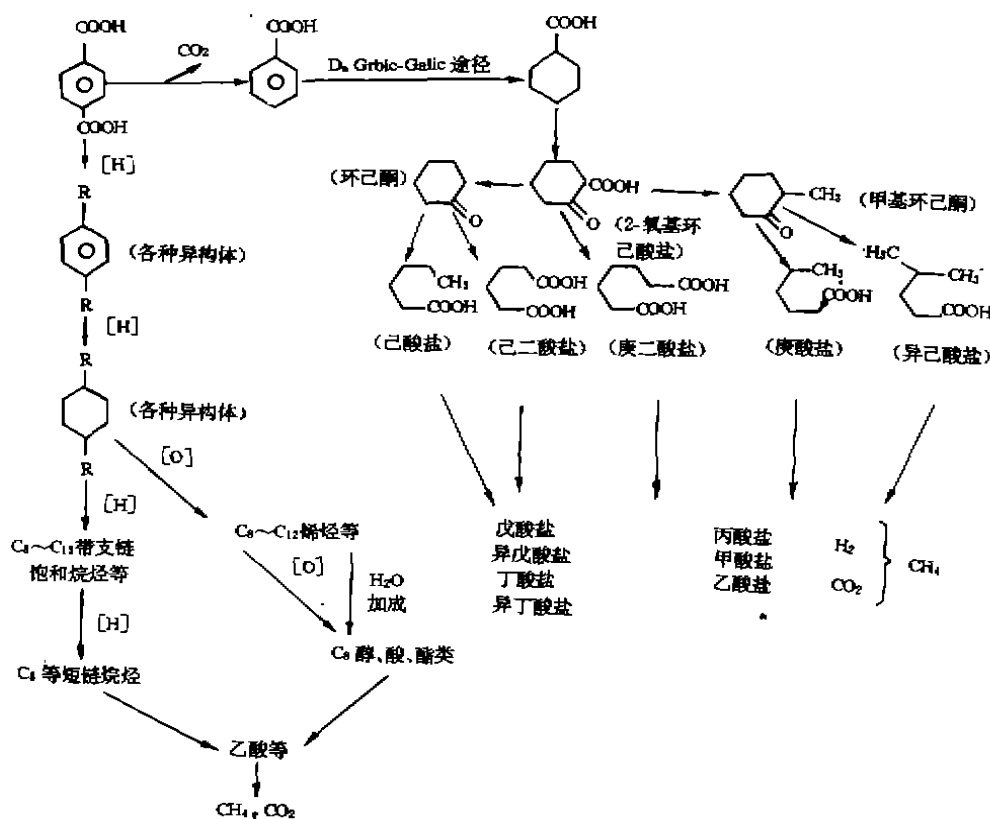


图 5 对苯二甲酸厌氧生物降解途径

4 结论

(1)通过放射性核素双标记法示踪和色-质联机等分析,可以得出 TA 的厌氧降解途径如图 5 所示。降解的主要中间产物有苯甲酸、烷基苯, $\text{C}_8\sim\text{C}_{13}$ 长链饱和烷烃, $\text{C}_8\sim\text{C}_{12}$ 烯烃, 饱和环烷烃, 以及各种小分子醇、醛、酸、酯等。

(2)试验中对 CH_4 这种低沸点难溶的气体物质,采用三口瓶集气与电极加热燃烧-吸收的

方法进行示踪分析,是一种简单易行的试验与测试方法。

(3)试验表明,采用双标记放射性示踪法,配合先进的中间产物分析手段,可以深入地研究复杂有机物的生物降解过程。

参 考 文 献

- 1 Proceedings of the Fourth International Symposium on Anaerobic Digestion Held in Guangzhou, China, on 11~15 November, 1985.
- 2 Grbic-Galic D, Young LY. Methane Fermentation of Ferulate and Benzoate: Anaerobic Degradation Pathways. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 50(2):292-297.
- 3 Rebhun M, Galil N, Narkis N. Kinetic Studies of Chemical and Biological Treatment for Renovation. *J Water Pollut Control Fed*, 1986, 57(4):324-331.

ON THE ANAEROBIC BIODEGRADATION PATHWAY OF TA BY ^{14}C and ^3H DOUBLE-LABELLING METHOD

Shen Lixian Liu Mei

(Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection, 100037)

Lin Zhongmin

(Beijing Normal University, 100875)

ABSTRACT

The mixture of ^{14}C and ^3H labelled terephthalic acid [TA-(Carbonyl- ^{14}C)-(aromaticring- ^3H)] and non-labelled TA are used as the substrate to carry out the anaerobic test. The TA biodegradation process and main intermediate products are obtained by examining the changes of the concentration of ^{14}C and ^3H in methane and carbon dioxide and the analytical results of GC/MS. The main intermediate products in the anaerobic reaction are benzoic acid, alkyl-benzenes, C_8-C_{13} saturated hydrocarbons, C_8-C_{12} olefin, cyclanes and small molecules of aldehyde, alcohol, organic acid and ester, etc. The anaerobic biodegradation pathway of TA is explained qualitatively.

Key words ^3H ^{14}C double-labelling terephthalic acid anaerobic biodegradation pathway