

文章编号:1000-582X(2007)010-0130-04

H₂O₂ 对生物法治理石油烃类污染物的影响

霍丹群¹, 姚伟静¹, 肖灵玲¹, 侯长军²

(重庆大学1. 生物工程学院; 2. 化学化工学院, 重庆 400030)

摘要 针对钻井泥浆中的石油烃类污染物, 利用实验室分离筛选出的高效石油烃降解菌株, 深入研究 H₂O₂ 对石油烃生物降解的影响。研究表明: H₂O₂ 的适宜一次加入浓度为 200 mg/L, 菌株生长处于停滞期和对数期时, 每 8hr 和 2hr 向含油泥浆中加入 H₂O₂ 为最佳, 加入 H₂O₂ 的钻井泥浆中, 石油类污染物的降解率从 38.1% 提高到 83.1%。H₂O₂ 的深度氧化和供氧的双重作用对泥浆中石油烃类污染物的生物降解起到明显促进作用。

关键词 H₂O₂; 石油烃; 生物降解

中图分类号 X506

文献标志码: A

随着石油天然气勘探行业的不断发展, 油气田废弃泥浆已成为石油天然气工业的主要污染源。对于钻井废水及废泥浆中石油烃类污染物如何处理, 一直是困扰石油工业的难题。微生物治理技术由于生产费用低、不产生二次污染而被视为一项具有广阔发展前景的高新技术^[1]。而利用微生物对石油烃类污染物进行治理时, 由于石油烃类化合物的水不溶性, 限制了活性微生物与底物的作用, 使烃类污染物的生物降解速度缓慢, 治理过程延续的时间较长。

针对上述问题, 研究采用氧化技术与生物治理技术相结合, 以 H₂O₂ 作为氧化剂, 研究了 H₂O₂ 对生物法治理钻井泥浆中石油烃类污染物的影响。为工业上加速微生物处理钻井泥浆中石油烃类污染提供良好的实践依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1) 钻井泥浆

钻井泥浆来源于川东钻探公司钻井废泥浆, 石油烃含量为 800 - 1 300 mg/L, 121 °C 高压蒸汽灭菌后使用。

2) 实验菌株

实验所用菌株是实验室采自含油污染土壤, 通过分离纯化、诱变得到的菌株^[1]具有高效降解石油烃性

能的好氧菌株 YY-12。

3) 主要实验试剂及仪器

a. 主要试剂: K₂HPO₄, NH₄Cl, Na₂SO₄, CaCl₂, MgSO₄ 均为分析纯, H₂O₂ 为化学纯。

b. 主要仪器: PHS-25 型 pH 计, HZQ-X100 型振荡培养箱, HQ10 型溶氧仪。

1.2 方法

1.2.1 H₂O₂ 对 YY-12 的毒性实验方法

在平行 2 组, 装有 100 mL 浓度分别为 0、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L H₂O₂ 的 250 mL 三角瓶中, 分别接入 10% 停滞期(培养 4 h)YY-12 菌液 和对数期(培养 20 h)YY-12 菌液。培养 4 h 后, 采用平板菌落计数法^[2] 对各培养液中的活菌体进行计数并计算存活率。

存活率(%) = (培养前活菌数 - 培养后活菌数) × 100% / 培养前活菌数

1.2.2 过氧化氢酶(CAT)活力的测定方法

CAT 活力测定^[3] 用紫外分光光度法, 取 0.1% H₂O₂ 的磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH = 7.0) 2.9 mL, 置 30 °C 下, 保温 30 min, 立即放入 752 型分光光度计, 加入稀释酶液 0.1 mL, 在 240 nm 波长处测定该混合体系在 1 min 内光吸收值的变化。蛋白质浓度用 Bradford 的方法测定, 以牛血清白蛋白作标准, 每 mg 蛋白在 1 min 中内使 H₂O₂ 在 240 nm 处吸光值减少

收稿日期: 2007-07-11

作者简介: 霍丹群(1965-), 女, 重庆大学教授, 主要从事环境污染治理方面的研究。姚伟静(联系人), 女, 重庆大学硕士研究生 (Tel) 13637914407 (E-mail) 6519331@163.com。

0.001 个单位的酶量定义为一个 CAT 酶活单位 ($U \cdot mg^{-1}$ 蛋白质)。

1.2.3 H_2O_2 的测定方法

吸取待测试液 5 mL 于锥形瓶中,加入蒸馏水 50 mL。再用移液管加入 6 mol/L 的 H_2SO_4 溶液 2 mL 摇匀。用 0.002 94 mol/L 的 $KMnO_4$ 溶液滴定至粉红色,记录消耗的体积数 V ,计算 H_2O_2 量。计算公式为:

$$H_2O_2(\text{mg/L}) = 0.00294 \times V \times 3400 = 10V$$

当待测液悬浮物多和有菌体时,先进行离心再测定。

1.2.4 pH 值的测定方法

在 3 种条件下(未加 H_2O_2 、加入 H_2O_2 、振荡供氧),分别取 55 mL 石油烃含量为 800–1300 mg/L 的灭菌后的废泥浆,接种 20 mL YY-12 菌液,添加 25 mL 非碳培养基,在转速为 150 r/min,温度为 32 °C 的条件下,处理 96 h,用 pH 计每 12 h 测一次 pH 值。

1.2.5 石油烃含量测定方法^[4]

石油醚做萃取剂,将萃取液在 3000 r/min,10 °C 下离心 10 min。稀释定容后采用 WFZ752 型紫外分光光度计,以石油醚为参比,检测波长 228 nm,测定萃取液吸光度,根据回归方程计算石油烃含量。回归方程如下:

$$Y = 0.0341X + 0.0024 \quad (\text{适用范围为浓度}(0 - 100) \text{mg/L 的萃取液})$$

$$X - \text{油浓度}(\text{mg/L}) \quad Y - \text{吸光度}$$

2 结果与讨论

2.1 H_2O_2 的适宜一次加入量

2.1.1 不同浓度 H_2O_2 对 YY-12 的毒性实验

H_2O_2 是强氧化剂,其浓度过高将会对微生物产生杀灭作用。因此,在考查 H_2O_2 对烃类污染物的微生物降解促进作用之前,应首先确定其适宜的加入量,以避免 H_2O_2 的加入量过大而影响微生物的正常生长^[5]。

如图 1 所示为菌株 YY-12 在不同过氧化氢浓度下的存活曲线。当 H_2O_2 浓度小于 200 mg/L 时,对停滞期(菌体生长 0–4 h)和对数期(菌体生长 4–28 h)的菌体活细胞数影响很小;当 H_2O_2 浓度大于 200 mg/L 时,菌体活细胞数量呈现明显下降趋势,且对数生长期的菌体细胞的存活率明显大于停滞期。因为当 H_2O_2 浓度低于 200 mg/L 时,对细胞的破坏主要是生理毒性作用和氧化蛋白质的活性基团,而对细胞膜的破坏很小;当 H_2O_2 浓度高于 200 mg/L 时,其对菌体细胞的毒性作用增强,菌体细胞膜易被破坏^[6]。且停滞期菌体细胞还未生长,高浓度的 H_2O_2 会杀灭菌体细胞,使活细胞数量减少;对数期的菌体生长速率

大,同时具有更强的 H_2O_2 耐受能力^[7]。

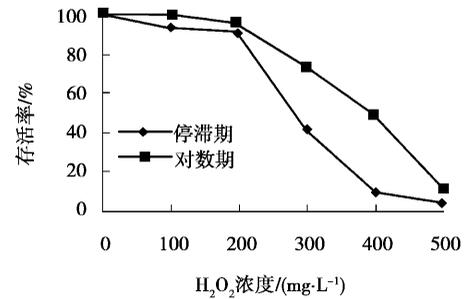


图 1 H_2O_2 浓度对细胞存活率的影响

2.1.2 不同浓度 H_2O_2 对 YY-12 过氧化氢酶活性影响

过氧化氢酶(CAT)是过氧化酶体系中的重要酶类之一,也是众多氧活性物质清除剂的一种,它可将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,从而清除 H_2O_2 对细胞的毒性作用。由于研究体系中 H_2O_2 浓度较高,过氧化氢酶作为 H_2O_2 的清除剂,起到催化 H_2O_2 分解、加速其深度氧化的作用。

如图 2 所示:当 H_2O_2 浓度较小时过氧化氢酶活性随 H_2O_2 浓度增大而增大,当 H_2O_2 浓度为 272 mg/L 时活性最高,而后活性下降。这是因为少量的 H_2O_2 可以作为酶的激活剂,在一定条件下能够加速酶的反应,但超过一定量就会成为抑制剂,不利于细胞生长甚至杀死细胞^[8]。

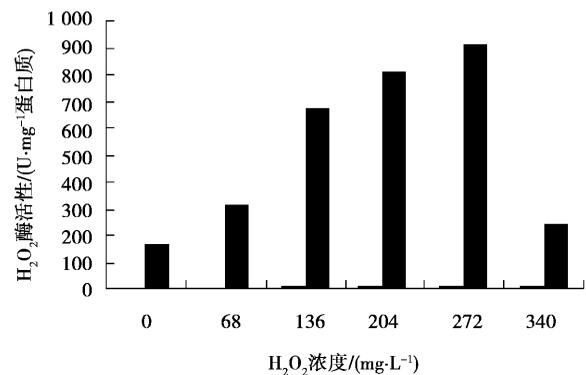


图 2 不同 H_2O_2 浓度下过氧化氢酶活性

通过不同浓度 H_2O_2 对 YY-12 菌株毒性实验、及对过氧化氢酶活性影响实验结果可知,当 H_2O_2 浓度为 200 mg/L 时,其对菌体细胞毒性较小,此时过氧化氢酶活性较高,对 H_2O_2 可能产生的毒性具有清除作用。因此选择 H_2O_2 的适宜一次加入浓度为 200 mg/L。

2.2 接入菌株 YY-12 时 H_2O_2 消耗情况

图 3 4 可以看出, H_2O_2 刚加入体系中时其消耗较慢,这是因为细胞内的酶系对 H_2O_2 有一个适应期。在 2 个生长期的体系中分别在 8 h、2 h 时体系中的 H_2O_2 基本被菌体消耗完。由于停滞期时菌体细胞不生长,且对外界不良条件反应敏感,而对数期的菌体细

胞生长迅速,且酶系活跃,代谢旺盛,细胞耗氧量大,因此,为了更好地利用 H_2O_2 的深度氧化作用,当菌体细胞生长处于停滞期和对数期时分别每 8 h 和 2 h 向泥浆中加入一次 H_2O_2 较为适宜。

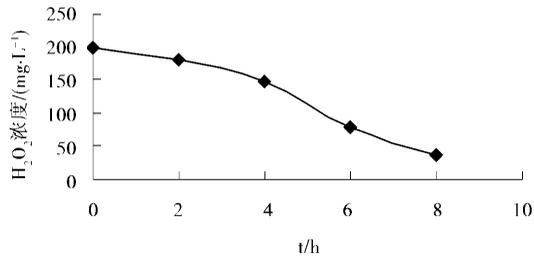


图3 停滞期泥浆中 H_2O_2 浓度变化

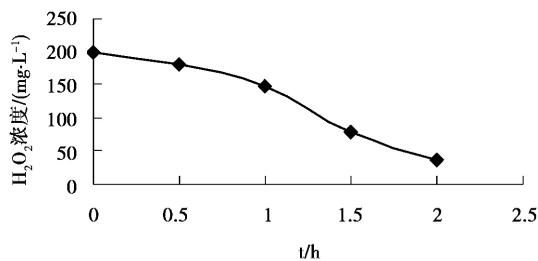


图4 对数期泥浆中 H_2O_2 浓度变化

2.3 H_2O_2 对泥浆中石油烃生物降解效果的影响

2.3.1 H_2O_2 对泥浆中 YY-12 活菌数的影响

图5中可以看出,加入 200 mg/L H_2O_2 的泥浆中菌体从第 24 h 时开始生长,较未加入 H_2O_2 的泥浆中菌株提前了 12 h,且在 36 h 后活菌数的增长十分迅速进入了快速繁殖的生长对数期。没有加入 H_2O_2 的体系中,由于泥浆表层具有一定的复氧性,活菌数也有所增长,但是生长缓慢并没有出现活菌数高速增长阶段。在 96 h 加入 H_2O_2 的泥浆中的活菌数与振荡供氧 72 h 时最大活菌数相近。

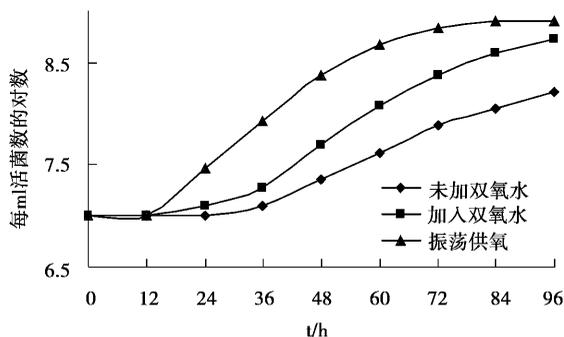


图5 泥浆中活菌数随时间的变化

这是因为微生物总是利用溶于水中的氧化剂作为电子受体,空气饱和的水中氧浓度仅为 8-10 mg/L,而加纯氧饱和的水中氧浓度也只有 40-50 mg/L,这样的浓度对于高需氧量的好氧生物菌群来说往往是不够的。直接投加 H_2O_2 可以有效增大水中电子受体浓

度,加快生物代谢过程。利用 H_2O_2 作为氧源是行之有效的,其深度氧化作用有助于菌体细胞的生长^[9]。

2.3.2 H_2O_2 对泥浆 pH 值的影响

从图6可以看出,在降解的初期泥浆体系中的 pH 值因为中间产物脂肪酸的积累都有一个下降的过程,而后 pH 值又逐步上升。其 pH 值上升的原因是因为积累的中间产物脂肪酸随着 β -氧化的进行而被进一步氧化降解^[10]。体系中生理碱性物质的存在也是 pH 上升的原因之一。没有加入 H_2O_2 的体系中 pH 值在整个过程中变化幅度较大,尤其在 36 h 后快速上升;振荡供氧的体系中由于整个降解过程较快,因此, pH 的下降与上升都比其他 2 个泥浆体系早。整个降解过程中未加入 H_2O_2 泥浆中 pH 的变化幅度为 1.64,而加入了 H_2O_2 的泥浆中 pH 变化幅度小仅为 0.45,泥浆体系 pH 值上升幅度减小,这与 H_2O_2 的弱酸性有关。实验说明 H_2O_2 对体系中的 pH 有一定的稳定作用,更有利于微生物对石油烃的降解。这与魏德洲等研究的《 H_2O_2 在石油污染土壤微生物治理过程中的作用》中结论具有一致性^[11]。

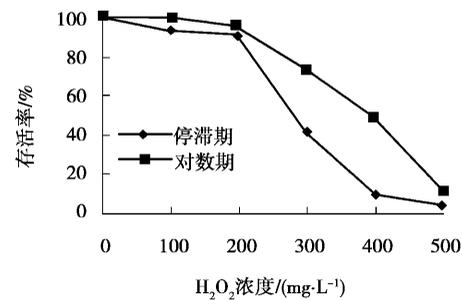


图6 H_2O_2 对泥浆 pH 值的影响

2.3.3 H_2O_2 对泥浆中石油烃降解的影响

从图7可以看出,在降解开始 36 h 内,未加 H_2O_2 和加入 H_2O_2 2 个降解体系中的石油烃降解率差别不大,此后石油烃降解率出现了明显的差别,这种差别随着降解的进行逐渐增大。在 96 h 时,加入了 H_2O_2 降解泥浆中的石油烃的含量由 1300 mg/L 下降到了 226.98 mg/L,降解率为 83.1%;而没有加入 H_2O_2 的泥浆中的石油烃含量由 1300 mg/L 降到 831.39 mg/L,降解率仅为 38.1%。

H_2O_2 对石油烃降解的促进作用首先是因为过氧化氢的直接氧化作用。烃类物质与氧反应的吉布斯自由能表示,碳氢化合物的氧化反应因 $\Delta S_G < 0$,从热力学的角度讲是可以进行的。因此,由于强氧化剂 H_2O_2 的加入,必然导致部分烃类污染物发生氧化降解^[12];另一方面,加入 H_2O_2 能够及时补充泥浆中的溶解氧,为微生物的生长繁殖和烃类污染物的降解过程提供充足的电子受体,同时也能够稳定泥浆的 pH 值,从而大

幅度提高微生物的活性及其对烃类污染物的降解能力。研究充分证明 H_2O_2 的直接氧化作用与深度氧化作用结合有助于石油烃降解。

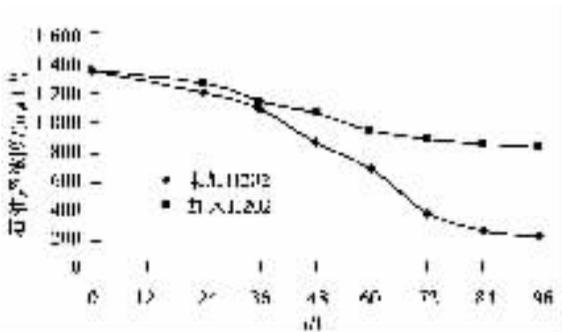


图7 H_2O_2 对泥浆中石油烃降解的影响

3 结 论

1) 在石油烃类污染物生物降解体系中, H_2O_2 一次适宜加入浓度为 200 mg/L, 此时 H_2O_2 对 YY-12 菌株毒性较小、过氧化氢酶活性较高。

2) 当生长处于停滞期和对数期时分别每 8 h 和 2 h 向泥浆中加入一次 H_2O_2 较为适宜。

3) H_2O_2 的深度氧化作用有助于菌体细胞的生长, 同时还能够稳定生物降解体系的 pH 值。

4) 在 96 h 时, 加入 H_2O_2 的钻井泥浆中石油类污染物的降解率从 38.1% 提高到 83.1%, H_2O_2 的加入对泥浆中石油烃的生物降解起到明显促进作用。

参考文献:

- [1] ROWLAND A P. Effects of beach sand properties, temperature and rainfall on the degradation rates of oil in buried oil/beach sand mixtures[J]. Environ Pollut, 2000, 109(1): 109-118.
- [2] 李华. 平板菌落计数的改进方法[J]. 生物学通报, 2006, 41(1): 51-53.
- [3] 黄卓烈, 苏婷, 巫光宏, 等. 甲醇对酵母过氧化氢酶活性的影响机理研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12): 103-105.
- [4] 肖灵铃, 霍丹群, 秦力, 等. 微生物法处理钻井废水中的石油污染物[J]. 工业水处理, 2006, 26(4): 59-61.
- [5] 叶淑红, 丁鸣, 马达, 等. 微生物修复辽东湾油污染湿地研究[J]. 环境科学, 2005, 26(5): 143-146.
- [6] TWINEY M J AND TRICK C G. Possible physiological mechanisms for production of hydrogen peroxide by the ichthyotoxic flagellate *Heterosigma akashiwo*[J]. Plankton Res. 2000, 22: 1961-1975.
- [7] A. L. TARASOV, I. A. BORZENKOV, E. I. MILEKHINA, et al. Utilization of H_2O_2 as the oxygen source by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Rhodococcus*[J]. Microbiology, 2004, 75(4): 31-35.
- [8] 董正臻, 董振芳, 丁德文, 等. 过氧化氢对两种海洋微藻的毒性效应研究[J]. 海洋科学进展, 2004, 22(3): 320-326.
- [9] 陈玉成. 污染环境生物修复工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 117-118.
- [10] MCKEE, K. L. AND MENDELSSOHN, I. A. A review of the methods and ecological consequences of substrate aeration for the enhancement of oil bioremediation in wetlands[J]. Marine Spill Response Corporation, 1994, 94(4): 35.
- [11] 魏德洲, 秦煜民. H_2O_2 在石油污染土壤微生物治理过程中的作用[J]. 中国环境科学, 1997, 17: 429-431.
- [12] JIAO PENG, HUANG YINGMING, LI SHULIANG, et al. Effects and mechanisms of H_2O_2 on production of dicarboxylic acid[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 75(4): 456-462.

Effect of H_2O_2 in the Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Pollutant

HUO Dan-qun^a, YAO Wei-jing^a, HOU Chang-jun^b

(a. College of Bioengineering ;

b. College of Chemistry and Chemical Engineering , Chongqing University , Chongqing 400030 , China)

Abstract The high efficient strain was separated and filtrated from the soil contaminated by petroleum hydrocarbon. The authors, we focus on the effect of H_2O_2 in the bioremediation of petroleum hydrocarbon pollutant. The results show that the optimal concentration of H_2O_2 was 200 mg/L at one time. At the lag phase of the strain, H_2O_2 was added in per eight hour, and at logarithmic phase, H_2O_2 was added in per two hour. Biodegradation rate of petroleum hydrocarbon was increased from 38.1% to 83.1%. The bioremediation of petroleum hydrocarbon pollutant is remarkably by double effects of deep oxidation and oxygen supply of H_2O_2 .

Key words : H_2O_2 ; petroleum hydrocarbon ; biodegradation

(编辑 侯湘)