

VOC 增溶菌的发酵培养及增溶作用研究*

王国惠, 许亚楠

(中山大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 选择苯和甲苯作为 VOCs 代表成分, 以增溶活性和乳化率作为指标, 研究增溶微生物的发酵条件、BST 产生规律及增溶效果等。结果表明, 成功驯化产 BST 的增溶微生物。其最适发酵条件是: 碳源质量浓度 1.0 g/L, 初始 pH 值 6.95~7.05, 温度范围 26~32 °C。增溶菌具有明显的产 BST 规律: 在 0~36 h 内持续快速增加, 36 h 时, 产生量最大。发酵液对苯和甲苯具有良好的增溶效果, 分别是纯培养基的 2.7 倍和 30 倍。苯与 BST 所形成的乳滴为水包油, 易溶于水, 有利于 VOCs 的生物降解。产 BST 的细菌大都是 G⁻ 短杆菌。

关键词: VOCs; 生物增溶; 苯; 甲苯

中图分类号: X512 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2015)05-0085-05

The Fermentation Culture of VOCs Solubilization Microorganisms and Its Solubilization

WANG Guohui, XU Yanan

(School of Environmental Sciences and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: To improve the water-solubility and biodegradability of VOCs, VOCs solubilization microorganisms were domesticated to make its produce biosurfactant to make VOC solubilize. Benzene and toluene were selected as representative composition, such as solubilization activity and emulsifying rate as index, the fermentation conditions, production regularity and solubilization effect of microorganisms of VOCs solubilization etc were studied. The result showed that the solubilization microorganisms that produce BST were successfully domesticated. The optimum fermentation conditions for the production of BST was that the best carbon source concentration was 1.0 g/L and the optimal initial pH value was in the range of 6.95~7.05 and the optimum temperature range was in the range of 26~32 °C. The solubilization bacteria had an obvious regularity for production of BST. The BST continue to increased rapidly during the fermentation of 0~36 h, and arrived at a maximum yield at 36 h. The fermentation liquid had good effect on the solubilization of benzene and xylene. The fermentation liquid had good effect on the solubilization of benzene and xylene. They were 2.7 times and 30 times of the pure medium, respectively. The emulsion droplets formed by benzene and BST were as an oil in water and it is soluble in water. This was more favorable for the biodegradation of VOCs. The bacteria producing BST were mostly gram negative bacilli. The BST was initially identified as a polysaccharide. The content of BST in the fermentation broth was about 60 g/L.

Key words: VOCs; biosolubilization; benzene; toluene

* 收稿日期: 2015-07-20

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2013B020600005); 广东省教育部产学研结合资助项目(2012B091100318); 广州市科技计划资助项目(2014J4100093); 广州市 2013 年污染防治新技术、新工艺开发资助项目

作者简介: 王国惠(1962 年生), 女; 研究方向: 废气生物治理; E-mail: 1761424972@qq.com

VOCs 因排放量大、种类多、毒性强已成为全球关注的焦点^[1]。目前已鉴定的 VOCs 达 300 多种, 最常见的是苯、甲苯、二甲苯、三氯甲烷等。苯已被世界卫生组织列为强致癌物^[2]。VOCs 处理方法很多, 包括冷凝法、吸收法、吸附法和膜分离法、催化燃烧法、等离子体法、光催化氧化法及生物法等^[3-8]。目前应用较多是吸附法、催化燃烧法和生物法。前两种方法成本高, 给治理企业带来了很大负担。生物法操作简单、成本低、无二次污染备受青睐^[9-12]。然而, 由于 VOCs 水溶性差, 导致其可生化性偏低, 故限制了该技术的应用^[13]。

提高 VOCs 可生化性的重要途径就是对其增溶。表面活性剂对 VOCs 具有良好的增溶作用。利用表面活性剂提高疏水性有机污染物的溶解性已有展开, 但大多利用的是化学表面活性剂。而化学表面活性剂具有毒性且难降解, 易引起二次污染。生物表面活性剂 (简称 BST) 不仅具有良好的表面活性和乳化性能^[14], 且具无毒、易于生物降解等独特优势, 使其在 VOCs 生物治理方面具有广阔的应用前景。

本研究针对 VOCs 水溶性差影响其生物降解问题, 驯化 VOCs 增溶微生物, 使其产 BST。利用 BST 使 VOCs 增溶。本研究选择苯和甲苯作为 VOC 的代表进行实验。

为了满足实际工程的需要, 直接用发酵液对 VOC 进行增溶, 不仅降低生产成本, 且发酵液完成增溶后还将为下一步降解微生物带来营养。本研究建立一个完全开放式的自然发酵体系, 可为 BST 的大批量生产提供技术支持。通过本研究, 有望突破 VOC 困难溶于水而影响其生物降解这一瓶颈, 为 VOCs 的高效生物处理提供科学依据。

1 实验材料

1.1 主要仪器

摇床 (SUKUN SKY - 211, 上海苏坤)、干燥箱 (DHG - 9240A, 上海申贤)、电子天平 (FA2204, 上海安亭)、灭菌器 (LS - B50L)、培养箱 (SGSP - 02 黄石恒丰)、超净台 (SW - CJ - 1D, 苏州净化)、水浴锅 (HH - 4)、离心机 (TDZ5 - WS, 长沙平凡)、pH 计 (DELTA 320)、气泵、流量计及液相色谱仪 (日本岛津) 等。

1.2 主要试剂

苯 (分析纯, 广州化学试剂厂)、甲苯 (分析纯, 广州化学试剂厂)、苏丹红 III (分析纯, 广州化学试剂厂)、甲醇 (色谱纯, 广州化学试剂

厂)。

1.3 培养基

硫酸铵 5 g/L, 废石油 20 g/L, 葡萄糖 1.0 g/L, 氯化钾 1.0 g/L, 磷酸氢二钾 1.5 g/L, pH 7 ~ 7.5, 自来水 1 L。

1.4 种源样品

样品来自某污水处理池。

2 实验方法

2.1 增溶菌的驯化

2.1.1 摇床驯化 在无菌条件下, 于 500 mL 三角瓶中加入 200 mL 灭菌培养基, 污泥按一定比例接入, 摇床驯化。

2.1.2 扩大培养 于 2.5 L 用纱布封口的广口瓶中加入 1.5 L 发酵培养基, 高压灭菌。在无菌条件下, 按一定比例转接驯化种液, 曝气培养。按同样方法, 进行多次转接。逐渐由无菌接种变为自然接种, 再过渡到完全开放式自然培养。设对照组。

2.2 增溶活性指标及测定方法

实验时先用液态苯及液态甲苯进行验证。

2.2.1 增溶能力及测定方法 取一直径为 9 cm 平皿, 加入 20 mL 去离子水, 然后在水面上缓慢滴加 2 mL 染色苯或染色甲苯, 待形成稳定薄膜后, 在薄膜中心滴加 1 mL 离心后的发酵液。发酵液若能增加苯或染色甲苯在水中的“溶解”, 便形成一圆圈, 即增溶圈。测量增溶圈直径。每组设 3 个平行, 取其平均值。染色苯和染色甲苯是苯和甲苯分别用苏丹红 III 染色而成的。

2.2.2 乳化能力及测定方法 苯或甲苯与发酵液按一定比例作用, 若发酵液中有 BST 的产生, 则二者即可形成乳化层。乳化能力以乳化百分率 (EI) 衡量。乳化百分率的计算

$$EI = \frac{H_{em}}{H_{oi}} \times 100\%$$

其中, H_{em} 为乳化层高度, cm; H_{oi} 为苯层高度, cm。

2.3 乳化液乳化性质的鉴别

乳状液两类型^[15]: 一类是水包油型 (O/W); 另一类是油包水型 (W/O)。为了提高鉴别的准确性, 分别用亲油性染料 (苏丹红 III) 和亲水性染料 (沙黄和结晶紫) 对乳状液进行染色。用苏丹红 III 染色的乳状液若整体为红色, 则为 W/O 型; 若仅乳滴为红色, 则为 W/O 型。用沙黄或结晶紫染色的乳状液若整体为红色或紫色, 则为 O/W 型; 若仅乳滴为红色或紫色, 则为 W/O 型。

2.4 增溶实验

2.4.1 增溶实验方法 实验系统由气泵、吸收瓶、气体混合瓶、流量计及增溶瓶等通过胶管连接而成。增溶瓶有两个。一个装发酵液,为增溶实验瓶;另一个装空白培养基,为对照瓶。

实验所用苯及甲苯为气态苯及甲苯。气态苯及甲苯采用吹脱法配制。气泵将空气分别鼓入装有液态二苯的吸收瓶和气体混合瓶。通入吸收瓶中的空气将气态二苯载入混合瓶,与空气按一定比例充分混合后分别被送入增溶瓶和对照瓶中。混合气体的流量由流量计控制,保证通入增溶瓶的流量(16 L/h)相等。连续6 h后停止通气,静止6 h,共持续12 h,取样,每1 h取样一次。

2.4.2 增溶率的测定 增溶率的测定采用高效液相色谱法测定“溶解”态苯的浓度。具体方法如下:

(1) 色谱条件。流动相甲醇水溶液,配比为 $V(\text{甲醇})/V(\text{水})=80/20$, 检测器 SPD-20AV、色谱柱 SHIMADZU VP-ODS C18、流速 0.8 mL/min、柱温 40 °C、检测波长 260 nm。

(2) 增溶率 (IS) 的计算。增溶率 (IS) 为苯及甲苯在发酵液中的最大“溶解度”(S_f)与苯及甲苯在空白发酵培养基中的“溶解度”(S_c)之差与 S_c 的比值,为无量纲量。气态苯与甲苯增溶率的计算公式为

$$IS = \frac{S_f - S_c}{S_c}$$

其中, S_f 与 S_c 的单位为 g/L。

实验所测得的溶解度为气态苯及甲苯的表观溶解度。因此,用表观溶解度计算所得到的增溶率为表观增溶率。实验中用表观增溶率来衡量发酵液中 BST 对气态苯的增溶效果。

通气过程中定时测定发酵液对气态苯及甲苯的“溶解量”及停止通气后发酵液中苯及甲苯的溶解量。以时间为横坐标,以发酵液中“溶解”态苯及甲苯的含量为纵坐标,绘制溶解量随时间的变化曲线,确定发酵液对苯与甲苯的增溶稳定性。

3 结果与分析

3.1 摇床驯化结果

3.1.1 葡萄糖质量浓度对驯化效果的影响 设葡萄糖质量浓度为 0、0.5、1.5 和 2.0 g/L,其他条件不变,通过增溶能力和乳化能力,确定最佳葡萄糖质量浓度,结果见图 1。

由图 1 可知,当 ρ (葡萄糖)为 0 g/L 时,增溶直径和乳化率都为 0,说明发酵液没有 BST 的产

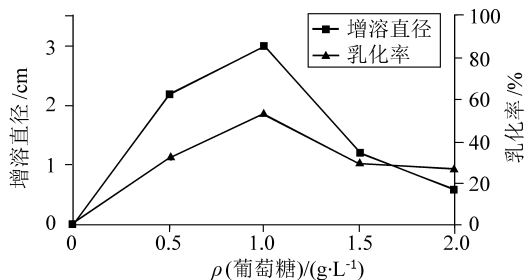


图 1 碳源浓度对驯化效果的影响

Fig. 1 Effect of concentration of carbon source on acclimation effect

生。当 ρ (葡萄糖)分别为 0.5、1.5 和 2.0 g/L 时,发酵液都有 BST 的产生,但含量都偏低。当 ρ (葡萄糖)为 1.0 g/L 时,增溶直径和乳化率都最大,即发酵液中 BST 含量最高。因此,发酵液最佳葡萄糖质量浓度确定为 1.0 g/L。

以上结果表明, BST 的产生需要一定糖类物质。废石油是碳源,但不是唯一碳源,还需糖类碳源的帮助。废石油起到的可能是刺激或诱导作用,在被微生物利用的同时,刺激其产 BST。

3.1.3 初始 pH 值对驯化效果的影响 取葡萄糖质量浓度为 1.0 g/L,将初始 pH 值设为 6.65、6.75、6.85、6.95、7.05、7.15、7.25 和 7.35,通过测定发酵液的增溶能力和乳化能力,确定最佳初始 pH。结果见图 2。

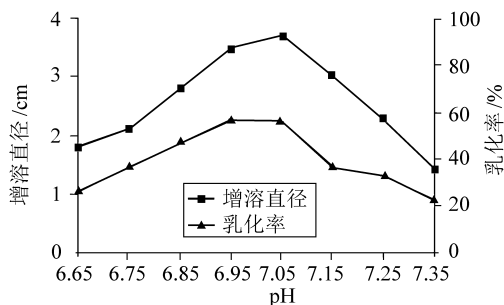


图 2 初始 pH 值对驯化效果的影响

Fig. 2 Effect of different initial pH on acclimation effect

由图 2 可知,初始 pH 值在 6.95~7.05 之间时,发酵液的增溶直径和乳化率都相对比较高。高于或低于此范围,增溶直径和乳化率都将减小。由此确定,发酵最佳初始 pH 值在 6.95~7.05 之间。

3.1.3 温度对驯化效果的影响 在最适碳源浓度、最适初始 pH 值条件下,将摇床温度分别设 20、22、24、26、28、30、32、34 和 36 °C,通过测定发酵液的增溶能力和乳化能力,确定其最佳驯化温度。结果见图 3。

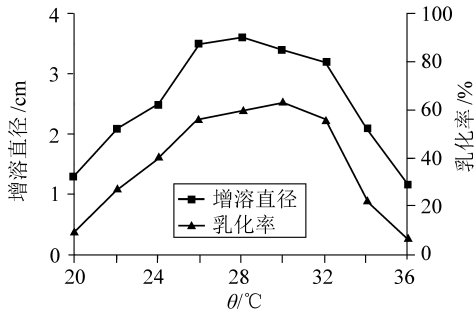


图3 温度对驯化效果的影响

Fig. 3 Effect of temperature on acclimation effect

由3可知, 驯化温度在26~32℃时, BST释放量最大, 高于或低于此范围, 增溶直径和乳化率都将减小。故确定发酵最佳温度范围为26~32℃。

3.2 扩大培养结果

3.2.1 BST产生规律 通过测定发酵液对苯和甲苯的增溶活性, 得到BST产生随时间的变化规律(图4)。

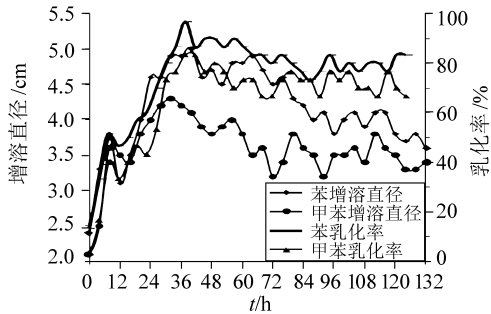


图4 BST产生曲线

Fig. 4 Release curves of BST

由图4可见, 接种12h内, 发酵液对苯和甲苯的增溶活性明显增加。这说明增溶菌对新环境有较强的适应能力。自接种至36h, 发酵液对两种苯的增溶与乳化一直呈快速增加的趋势, 36h后缓慢下降。BST产生规律的研究对实际生产具有重要指导意义, 可依据该规律, 确定发酵周期。

3.2.2 发酵液增溶效果

(1) 发酵液对苯的增溶效果。通过前面的实验, 已证明BST对液态苯及甲苯有优良的增溶及乳化能力, 但实际生产时, 被处理的VOCs成分为气态形式。为了进一步证明BST对VOCs的增溶作用, 即提高气态苯类在水相中的“溶解度”, 对其进行了增溶实验。结果见图5。

由图5可知, 连续通气1h后, 苯在发酵液中的“溶解”量约为1.67g/L; 苯在空白培养基的

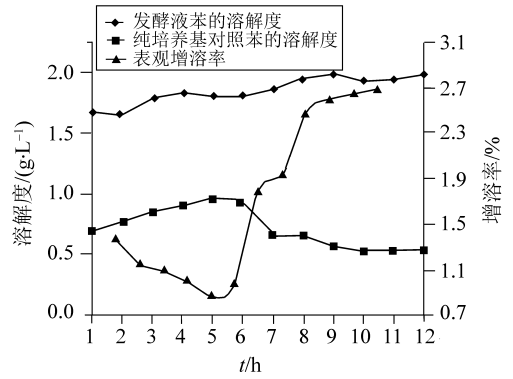


图5 气态苯增溶曲线

Fig. 5 Solubilization curves of gaseous benzene

质量浓度只有0.7g/L。此后继续通气, 两种溶液中苯的含量都在增加。通气4~6h, 发酵液中苯的质量浓度基本稳定, 达2.0g/L。6h后停止通气时, 空白培养基中苯的质量浓度仅为0.9g/L, 而发酵液中苯的质量浓度一直在1.8g/L以上。在随后的6h中, 空白培养基中的苯一直在减少, 平均挥发速率约为 $0.064 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 而发酵液中苯的质量浓度维持在约2g/L。

由此可见, 在通气过程中, 发酵液对苯有明显的“溶解”效果, 且较稳定。发酵液的表观溶解度达空白培养基的2.7倍。可见BST对气态苯具有良好而稳定的增溶效果。

(2) 发酵液对甲苯的增溶效果(图6)。从图6可见, 甲苯在纯培养基中的表观溶解度只有 $0.0047 \sim 0.0070 \text{ g/L}$ 。但在发酵液中, 甲苯的质量浓度在通气开始时为0.11g/L, 表观增溶量是空白培养基的9倍。随着甲苯气体的持续通入, 其在发酵液中的量不断增加。通气0~3h时, 发酵液对甲苯的表观增溶率达空白培养液的27倍。随着时间的延长, 空白培养基中的甲苯持续挥发, 发酵液中甲苯含量比较稳定, 说明BST能与甲苯稳定地结合在一起。在12h时, 发酵液的表观增溶量为

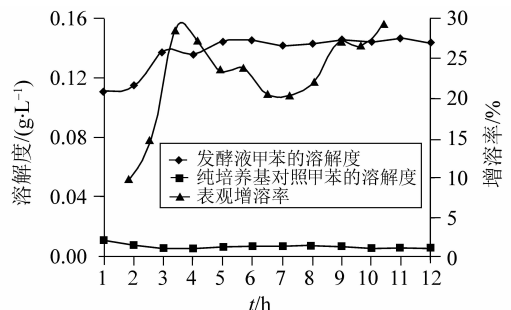


图6 气态甲苯增溶曲线

Fig. 6 Solubilization curves of gaseous toluene

空白培养基的 30 倍。可见发酵液对气态甲苯也具有理想的增溶效果。

3.3 乳化类型鉴定

发酵液与苯和甲苯的乳化类型鉴定结果是:用苏丹红Ⅲ染色时,整体未被染色,染料与分散相不能互溶,而乳滴被染为红色。初步判定乳化层为 O/W 型。用沙黄和结晶紫染色时,整体分别被染成了红色和紫色,进一步证明乳化层为 O/W 型。

水包油的“壳”外层亲水,故可与水相混。本实验中苯与 BST 所形成的乳滴为水包油,故易溶于水。这对苯类及其 VOCs 的生物降解是极为有利的。

3.4 增溶菌的初步鉴定结果

出于生产应用的考虑,本研究所驯化的增溶菌非单一纯种。通过革兰氏染色与显微观察,大都为革兰氏阴性短杆菌。相关内容将进一步研究。

4 结 论

成功驯化获得了产 BST 的微生物,确定了产 BST 的最适条件。BST 具有明显的产生规律,约 36 h 时产生量最大。驯化所得到的 BST 对苯与甲苯都具有良好的增溶效果,发酵液对苯的表现“溶解度”为空白培养基的 2.7 倍。在 12 h 时,发酵液对甲苯的表现增溶量为空白培养基的 30 倍。苯和甲苯与 BST 所形成的乳滴为水包油,易溶于水,这有利于苯类及其 VOCs 的生物降解。产 BST 的细菌大都是 G⁻ 短杆菌。

参考文献:

- [1] 曲茉莉. 大气中 VOCs 的污染现状及治理技术研究进展[J]. 环境科学与管理,2012, 37(6):102-104.
- [2] LEBRERO R, ESTRADA J M, MUÑOZ ET AL R. Deterioration of organic packing materials commonly used in air biofiltration: Effect of VOC-packing interactions [J]. Journal of Environmental Management,2014,92(1):93-100.
- [3] 杨平平. 碳纤维工业废气的处理技术[J]. 山西冶金, 2011,34(6):4-6,12.
- [4] 王治民,孙建薇. 关于 VOC 废气处理技术的相关思考[J]. 能源与节能,2014(5):97-99.
- [5] JOACHIM H, ANTHONY M B. Thermal plasma waste treatment[J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2008,41(5):53001.
- [6] SHAHIDI S, GHORANNEVISS M. Sterilization of cotton fabrics using plasma treatment[J]. Plasma Sci Technol, 2013,15(10):1031-1033.
- [7] KUBO W, TATSUMA T. Mechanisms of photocatalytic remote oxidation[J]. Journal of the American Chemical Society,2006,128(50):16034-16035.
- [8] MAITRA U, NAIDU B S, GOVINDARAJ A, et al. Importance of trivalency and the e(g)(1) configuration in the photocatalytic oxidation of water by Mn and Co oxides [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013,110(29):11704-11707.
- [9] SLIVINSKI C T, MALLMANN E, DE ARA ÚJO J M, et al. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent [J]. Process Biochemistry, 2012,47(12):1848-1855.
- [10] HENKEL M, MÜLLER M M, KÜGLER J H, et al. Rhannolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhannolipid production [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(8):1207-1219.
- [11] WADEKAR S, KALE S, LALI A, et al. Sophorolipid production by *starmerella bombicola* (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012, 89(6):1029-1039.
- [12] BARTACEK J, KENNES C, LENS P N L. Biotechniques for air pollution control (biotechniques 2009) [J]. Reviews in Environmental Science and Biotechnology,2009,8(4):321-323.
- [13] 刘佳,杨竹慧,李坚. BST 在疏水性 VOCs 生物降解中的应用潜力[J]. 中国科技论文,2014,9(3):355-359.
- [14] 赵东维. BST 产生菌对石油的降解及对石油烃的增溶作用研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2013.
- [15] 王霞,潘成松,陈军,等. O/W 型稠油乳状液的静态稳定性评价[J]. 钻采工艺,2009,32(6):46-48.