

利用聚乳酸作为反硝化固体碳源的研究

范振兴, 王建龙*

(清华大学核能与新能源技术研究院, 北京 100084)

摘要: 利用聚乳酸(PLA)颗粒作为反硝化的固体碳源和生物膜载体, 考察了聚乳酸作为反硝化碳源的可行性和温度对聚乳酸颗粒反硝化脱氮性能的影响, 并对聚乳酸颗粒表面进行了红外光谱分析和扫描电镜观察. 结果表明, PLA 颗粒作为反硝化固体碳源和生物膜载体进行反硝化脱氮, 接种和驯化时间较长. 在 30℃, 硝酸盐氮初始浓度为 50 mg/L 时, PLA 的平均反硝化速率为 $2.6 \times 10^{-3} \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$, 13 h 内硝酸盐氮可以完全去除. 温度对反硝化速率影响很大, 在 30~40℃ 之间反硝化速率较高, 一旦偏离适宜温度, 反硝化速率降低很快. 对 PLA 颗粒表面的红外光谱分析和扫描电镜观察证实了 PLA 作为反硝化固体碳源的可行性. PLA 颗粒表面的生物膜扫描电镜观察发现生物膜比较薄, 以球菌为主.

关键词: 反硝化; 固体碳源; 聚乳酸; 生物膜

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2009)08-2315-05

Denitrification Using Polylactic Acid as Solid Carbon Source

FAN Zhen-xing, WANG Jian-long

(Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Polylactic acid (PLA) was used as solid carbon source and biofilm support simultaneously, to investigate the applicability of PLA in the denitrification process. The effect of temperature on denitrification performance was also studied. The IR analysis and SEM observation were performed to investigate the PLA surface structure and biofilm morphology. The results showed that when the initial concentration of nitrate nitrogen was 50 mg/L and the temperature was 30℃, the average denitrification rate was $2.6 \times 10^{-3} \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{h})$ and nitrate could be completely removed within 13h. Temperature had a significant influence on the denitrification rate. The IR analysis and SEM observation of PLA surface structure confirmed the feasibility of PLA as solid carbon source. The SEM observation of biofilm showed that the biofilm was thin and mainly consisted of cocci.

Key words: denitrification; solid carbon source; polylactic acid (PLA); biofilm

地下水的硝酸盐污染已经成为重要的环境问题之一. 我国各地地下水污染中, 硝酸盐均是主要的污染指标, 并且有逐年加重的趋势^[1]. 硝酸盐在婴儿的胃里面可以还原为亚硝酸盐, 导致“高铁血红蛋白症”, 因此世界卫生组织 (WHO) 规定了饮用水中硝酸盐的浓度以硝酸根计不得高于 50 mg/L^[2]. 各种脱氮处理工艺中, 常见的生物反硝化脱氮因为采用甲醇等溶解性碳源, 使得碳氮比难以控制, 并存在投加过量的风险.

采用不溶于水的可生物降解聚合物 (BDPs) 材料作为反硝化的碳源, 并且同时作为生物膜载体, 可以解决这个难题, 比如聚己酸内酯 (PCL)^[3,4]、聚羟基丁酸酯 (PHB)^[5]、Bionolle^[5]、麦秆^[6,7]、棉花^[8]、报纸^[9]、芦苇^[10]和可降解餐盒^[11]等. 本课题组利用一种新型的淀粉基可生物降解多聚物 (PBS) 作为固体碳源, 去除地下水中硝酸盐的试验也取得了成功^[12], 并且研究了 pH 和低温对反硝化性能的影响^[13,14].

目前, BDPs 材料应用于地下水反硝化脱氮的价格较高^[15]. 聚乳酸作为可降解塑料, 具有较强的竞

争力, 应用前景广阔, 聚乳酸已有大规模生产^[16]. 因此, 本试验采用聚乳酸颗粒作为反硝化固体碳源和生物膜载体, 研究其反硝化脱氮的特性. 主要内容包括: 聚乳酸作为反硝化固体碳源的接种驯化; 聚乳酸作为反硝化固体碳源和生物膜载体的反硝化性能; 对聚乳酸被微生物利用前后的表面结构进行扫描电镜观察和红外分析; 对聚乳酸表面的生物膜形态进行扫描电镜观察.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验采用聚乳酸颗粒 (polylactic acid, PLA) 作为生物膜载体和反硝化碳源. PLA 颗粒成圆柱形, 平均高度约 3.02 mm, 截面直径大约介于 2.22~3.60 mm 之间.

试验接种期间采用的配水是在自来水中加入

收稿日期: 2008-09-08; 修订日期: 2008-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (59978020, 50508018)

作者简介: 范振兴 (1982~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为饮用水生物处理技术, E-mail: dr.fanzx@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: wangjl@tsinghua.edu.cn

NaNO₃ 和 KH₂PO₄, 硝酸氮浓度 50 mg/L, 保持 N:P=5:1, 并且加入微量元素溶液配制而成. 接种完成之后使用的配水采用相同的配法, 但是不再加入微量元素溶液. 微量元素溶液的组成为: 每 L 蒸馏水中加入 2.5 g MgSO₄·7H₂O, 1.5 g CaCl₂·2H₂O, 0.2 g FeCl₂·4H₂O, 0.55 g MnCl₂·4H₂O, 0.134 g ZnSO₄·6H₂O, 0.12 g CoCl₂·6H₂O, 0.12 g NiCl₂·6H₂O, 0.085 g CuCl₂·2H₂O, 6.2×10^{-4} g H₃BO₃, 2.4×10^{-3} g Na₂SeO₃·5H₂O, 3.3×10^{-3} g Na₂WO₄·2H₂O.

接种所用污泥取自于北京市高碑店污水处理厂曝气池.

1.2 试验装置

静态试验采用 1 000 mL 的磨口锥形瓶作为反应器, 瓶口用橡胶塞密封, 上有排气管通过橡胶管导入水中, 排除氮气的同时保持反应器内缺氧环境.

1.3 试验方法

在锥形瓶中加入适量 PLA, 实际称量为 381.6 g. 接种污泥 200 mL 并加入接种配水 600 mL. 将锥形瓶放入恒温振荡器进行搅拌. 恒温振荡器转速控制在 70 r/min, 温度控制在 30℃±1℃. 以后每天换水, 并将每批次换水量调整为 250 mL, 不再加入污泥.

接种驯化完成之后采用没有加入微量元素溶液的配水对 PLA 进行反硝化性能的测试, 保持恒温振荡器的条件不变, 每批次试验加入配水 250 mL.

1.4 分析方法与仪器

硝酸盐氮的测定^[17]: 取经过 0.45 μm 膜过滤的水样 1 mL 放入 10 mL 比色管稀释至标线, 混合均匀后在 220 nm 处测定吸光度. 比色使用 Shimadzu UV-3100 紫外分光光度计.

表面黏附着生物膜的 PLA 颗粒在进行红外分析前采用超声振荡去除. 首先用去离子水冲洗 2~3 次, 洗去表面的悬浮物, 然后将秸秆移至 20 mL 的比色管中, 加入去离子水将秸秆淹没, 盖上盖子放入超声振荡器中振荡 30 min, 然后用去离子水冲洗干净, 60℃下烘干后进行红外分析. 超声振荡器使用 SY 1200.

PLA 表面结构的红外分析采用的是衰减全反射方法, 将 PLA 颗粒直接压在晶体上, 红外光经过多次反射来读取麦秆表面的信息. 红外光谱仪使用的是 Perkin Elmer 公司的 Spectrum GX FTIR system.

扫描电镜使用 JSM-6460LV.

2 结果与讨论

2.1 PLA 接种情况

PLA 颗粒接种驯化期间采用批次试验, 每天 1 个批次, 每批次换接种配水 250 mL, 测定每批次试验中硝酸氮的初始浓度和最终浓度, 并计算硝酸氮的去除率. PLA 颗粒的接种驯化情况如图 1 所示. 可以看出, 在最初的 5 个批次, 硝酸氮浓度没有降低, 说明接种的微生物开始处于延滞期, 基本不能降解 PLA. 到第 9 个批次的时候, 硝酸氮已经开始被降解了, 不过去除率还不到 10%, 一直到第 24 个批次, 硝酸氮每个批次的去除率增长得都比较缓慢, 说明微生物处于缓慢生长期. 从第 24 个批次开始, 微生物进入了快速生长期, 到第 35 个批次, 硝酸氮每个批次的去除率从不到 25%, 上升到接近 80%, 到第 37 个批次硝酸氮去除率已经达到 100%. 此后, 每个批次内硝酸氮达到完全去除的时间越来越短, 微生物进入稳定期, 生物膜成熟, 接种驯化完成.

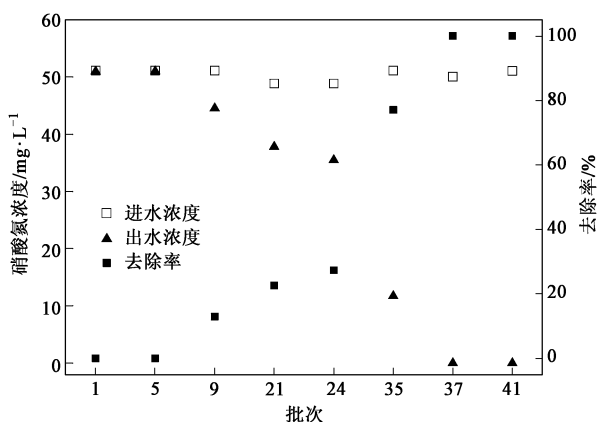


图 1 PLA 接种驯化情况

Fig.1 Inoculation condition of PLA

PLA 颗粒作为反硝化固体碳源和生物膜载体的接种驯化时间需要约 40 d, 比其他的可降解多聚物要长很多, 比如一种淀粉基的商用可生物降解颗粒是 15 d^[13], PCL 和 Bionolle 是 16 d^[5], 这是因为与 PCL 等多聚物相比, PLA 的可生物降解性要差一些. 据报道^[18], 在反硝化条件下, 接种 5 周后, PHB 和 PHBV 的质量损失 > 50%, PCL 的质量损失在 10%~50% 之间, 而 PLA 的质量损失则 < 10%, 证实了 PLA 的可生物降解性比 PCL 等要差, 接种驯化需要的时间更长.

2.2 接种完成后反硝化性能

图 2 是接种驯化完成之后 PLA 作为反硝化固体碳源和生物膜载体的反硝化性能. 可以看出, 接种驯化完成之后, 仅需 13 h, 硝酸氮就可以得到完全的去除, 平均反硝化速率 (以 PLA 计) 为 2.6×10^{-3}

0.009 8~ 0.058 mg/(g·h) 之间, 而 PCL 作为反硝化碳源的反硝化速率则在 0.030~ 0.24 mg/(g·h) 之间^[5], PLA 作为反硝化碳源的反硝化速率要比 PHB 和 PCL 等低的原因也是因为 PLA 的可生物降解性更差。虽然 PLA 作为反硝化碳源的反硝化速率比较低, 但是硝酸氮却可以在较短的时间内达到完全的去除, 不会影响到 PLA 作为反硝化固体碳源的可行性。

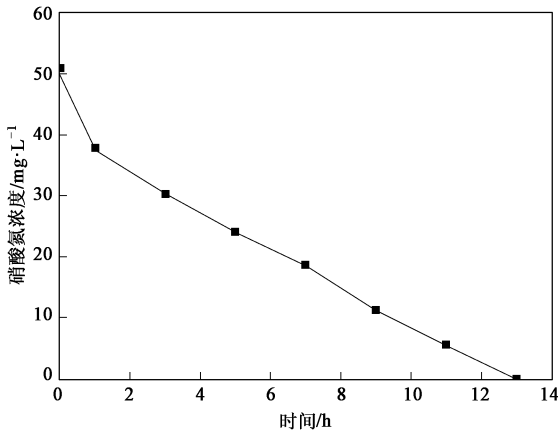


图 2 PLA 反硝化性能

Fig. 2 Denitrification performance of PLA

从图 2 还可以看出, 第 1 h 硝酸氮浓度与后面相比下降明显要多, 这是因为刚刚换过水之后生物膜的吸附作用, 使得硝酸氮浓度突然下降。1 h 后已经达到了吸附平衡, 此后的硝酸氮浓度变化受吸附作用的影响可以忽略不计(认为生物膜的吸附处于动态平衡中, 因为溶液中硝酸氮浓度在逐渐降低, 所以吸附量会逐渐下降, 会有少量的硝酸氮逐渐解吸出来, 但是因为硝酸氮浓度变化比较缓慢, 解吸的硝酸氮可以忽略), 可以认为全部是微生物的反硝化作用所致。1 h 后硝酸氮的浓度随时间变化成很好的线性, 线性拟合之后得 $R = 0.999$, 说明 PLA 作为反硝化固体碳源和生物膜载体的反硝化反应是零级反应。因为 PLA 作为反硝化微生物的固体碳源成为了限制性底物, 被微生物的胞外酶分解利用的速度恒定, 最终导致了反硝化速率的恒定, 是 PLA 作为固体碳源的反硝化成为了零级反应。

2.3 温度对 PLA 反硝化性能的影响

图 3 是 PLA 作为反硝化固体碳源和生物膜载体在各个温度下的反硝化平均速率。可以看出, 在 40℃ 下, PLA 的平均反硝化速率最高, 可以达到接近 6.4×10^{-3} mg/(g·h), 是试验中使用的常规温度 30℃ 平均反硝化速率 2.9×10^{-3} mg/(g·h) 的 2.2 倍。说明

温度对 PLA 作为反硝化固体碳源和生物膜载体的反硝化速率影响是相当大的。从图 3 中还可以看到, PLA 作为固体碳源的反硝化, 微生物对温度是相当敏感的, 在 30℃ 和 40℃ 等最佳反应温度附近, 反硝化速率比较高, 一旦反应温度有些偏离最佳反应温度, 反硝化速率迅速降低, 甚至接近 0。而 PBS 作为反硝化固体碳源时, 13℃ 下的反硝化速率仍然可以达到 30℃ 时的 32%^[12], 虽然在这种低温下硝酸氮的去除率不能达到国家标准, 但是系统仍然可以稳定运行^[14]。温度虽然对反硝化速率有相当大的影响, 但是 PLA 作为反硝化碳源时, 微生物对温度更加敏感, 这是因为碳源不同导致的微生物不同, 这点可以在后面的生物膜电镜观察照片中得到证实。

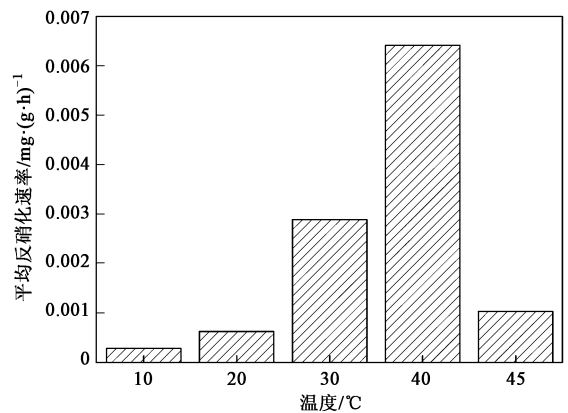


图 3 温度影响

Fig. 3 Effect of temperature on denitrification performance of PLA

2.4 麦秆表面结构红外光谱分析

图 4 是经过微生物利用和未经微生物利用的 PLA 表面的红外光谱分析结果对比。可以看出, 在波数 3 500~ 3 300 cm^{-1} 之间没有峰, 这属于羟基键的伸缩振动, 说明 PLA 颗粒聚合得非常好, 存在的羟基很少; 而 2 000 cm^{-1} 附近的噪声正是因为 PLA 颗粒是晶体的原因。与 PBS 的红外图谱在 2 925 和 2 850 cm^{-1} 附近的尖峰相比^[19], PLA 在 2 996 和 2 946 cm^{-1} 两处仅有 2 个很低的吸收峰, 而这附近的峰代表了一 CH_3 、一 CH_2 一和 CH 的 C—H 键的伸缩振动, 恰好说明了 PLA 中烷基的含量要远远低于 PBS 等多聚物, 这应该是 PLA 的生物降解性要低于 PBS 和 PCL 等多聚物的原因, 也是 PLA 颗粒作为反硝化固体碳源需要的接种驯化时间较长的原因。

从波数 1 800 cm^{-1} 开始, 一直到分析的边界 650 cm^{-1} 之间所有的吸收峰都有明显的降低, 比如 1 747 cm^{-1} 的尖峰, 1 181、1 128、1 082 和 1 043 cm^{-1} 处的尖峰群, 以及 1 454、1 359、869 和 755 cm^{-1} 这几处的吸

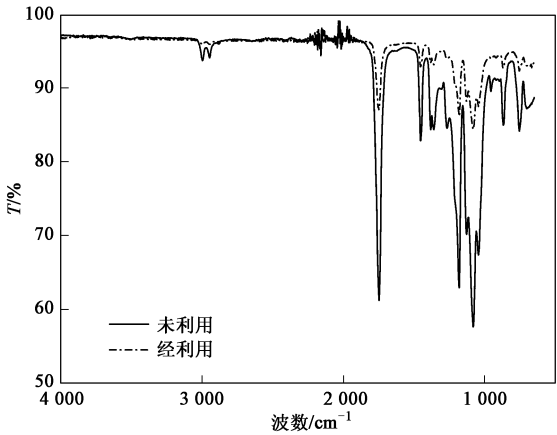


图 4 PLA 红外光谱分析
Fig. 4 IR analysis of PLA

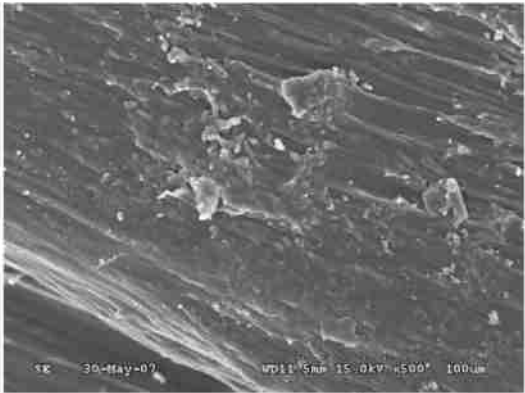
收峰, 这里面包括 CH, CH₂ 的弯曲变形振动, C—O—C和C=O的伸缩振动等特征吸收峰. 这些吸收峰的明显降低表明了 PLA 的表面被微生物降解利用, 聚乳酸的浓度降低, 证实了 PLA 可以作为反硝化微生物的碳源来进行反硝化脱氮.

2.5 PLA 颗粒表面的扫描电镜观察

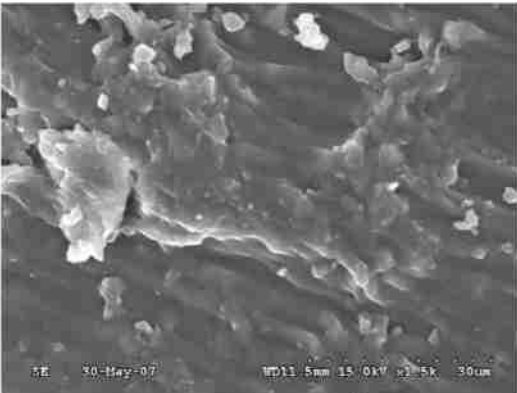
图 5 是 PLA 颗粒表面的扫描电镜照片. 从图 5

(a) 和 5(b) 中能看到 PLA 颗粒表面条状的纹理和大量粗糙的不规则的突起. 与 PBS 颗粒表面相比^[9], PLA 颗粒表面虽然有大量粗糙的不规则的突起, 但是却因为是晶体, 表面更加致密, 难以腐蚀和附着, 这应该也是 PLA 作为反硝化固体碳源接种驯化时间比 PBS、PCL 等要长的原因.

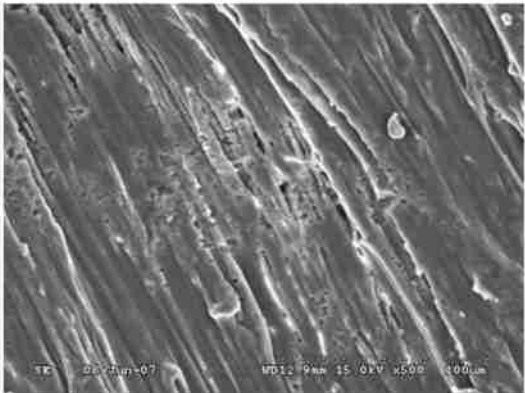
图 5(c) 和 (d) 是 PLA 颗粒被微生物利用之后, 脱去表面的生物膜之后的扫描电镜照片, 分别放大 500 倍和 1000 倍. 图 5(d) 只放大了 1000 倍的原因是如果放大 1 500 倍的话, 电子的压力太大, 可以在 PLA 表面打出孔, 所以只能放大 1 000 倍. 从图 5(c) 和 (d) 可以看出, PLA 颗粒表面粗糙的突起基本上消失, 表面变得坑洼却没有一点棱角, 正是表面整体被慢慢腐蚀的迹象, 这些现象证实了 PLA 可以作为反硝化碳源被微生物利用和作为生物膜载体以供生物膜附着. 另一方面 PLA 颗粒经过微生物利用之后, 表面的条状纹理还在, 说明了 PLA 的晶体结构并没有被损坏, 这证实了和 PCL 作为反硝化固体碳源一样的结论^[4], 即反硝化反应只在固体碳源载体表面发生. 由此可以推测, 在固体碳源差不多被完全利用之前, 多聚物载体颗粒并不会提前崩溃而使得生物膜脱落.



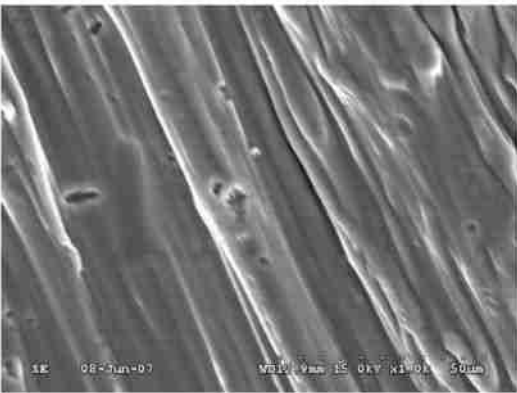
(a) 新鲜PLA (×500倍)



(b) 新鲜PLA (×1 500倍)



(c) 经利用脱膜后 PLA (×500倍)



(d) 经利用脱膜后 PLA (×1 000倍)

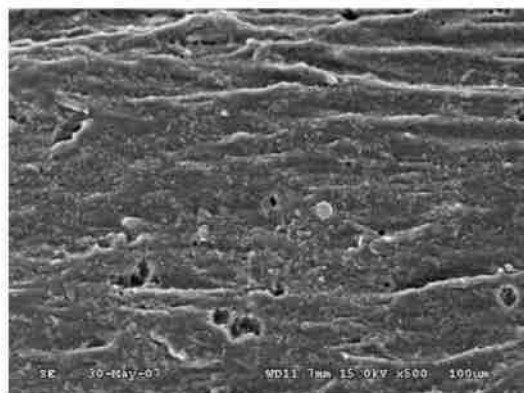
图 5 电镜观察 PLA 表面

Fig. 5 SEM photos of PLA surface

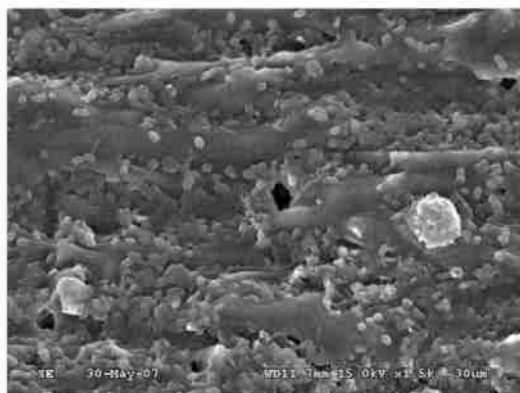
2.6 扫描电镜观察 PLA 颗粒表面生物膜

图 6 是 PLA 颗粒表面的生物膜扫描电镜照片。从图 6(a) 可以看出, PLA 颗粒表面布满了密密麻麻的微生物, 有些腐蚀较快的地方已经出现了一些小坑。从图 6(b) 可以看出, PLA 颗粒表面的微生物以

球菌为主, 没有看到弧菌, 与 PBS 作为反硝化碳源时有所不同^[13], 而且生物膜相对来说薄了很多, 应该与难于附着有关系。虽然都是反硝化反应, 但是因为碳源不同, 导致了微生物组成和生物膜厚度的不同。



(a) PLA 表面生物膜 (×500倍)



(b) PLA 表面生物膜 (×1 500倍)

图 6 电镜观察微生物形态

Fig. 6 SEM photos of biofilm

3 结论

(1) PLA 颗粒可以作为反硝化固体碳源和生物膜载体进行反硝化脱氮, 但是需要的接种和驯化时间较长。

(2) 反硝化反应为零级反应, 在 30℃ 下, 初始浓度为 50 mg/L 硝酸氮时, 平均反硝化速率为 $2.6 \times 10^{-3} \text{ mg/(g} \cdot \text{h)}$, 硝酸氮仅需 13 h 就可以完全去除。

(3) 温度对反硝化速率影响很大, 在 30℃ 和 40℃ 下反硝化速率最高, 一旦偏离适宜温度, 反硝化速率很快降低到 0 附近。

(4) 对 PLA 颗粒表面的红外光谱分析和扫描电镜观察证实了 PLA 作为反硝化固体碳源的可行性。PLA 颗粒表面的生物膜扫描电镜观察发现生物膜比较薄, 以球菌为主。

参考文献:

- [1] 国家环境保护总局. 2006 中国环境状况公报[R]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007. 27-30.
- [2] WHO. Guidelines for Drinking-Water Quality[M]. Geneva: WHO, 2006. 417-420.
- [3] Boley A, Muller W R. Denitrification with polycaprolactone as solid substrate in a laboratory-scale recirculated aquaculture system [J]. Water Sci Technol, 2005, **52**(10-11): 495-502.
- [4] Honda Y, Osawa Z. Microbial denitrification of wastewater using biodegradable polycaprolactone [J]. Polym Degrad Stab, 2002, **76**: 321-327.
- [5] Boley A, Muller W R, Haider G. Biodegradable polymers as solid substrate and biofilm carrier for denitrification in recirculated aquaculture systems [J]. Aquacultural Eng, 2000, **22**(1): 75-85.

- [6] Soares M I M, Abeliovich A. Wheat straw as substrate for water denitrification [J]. Water Res, 1998, **32**(12): 3790-3794.
- [7] Aslan S, Trkman A. Biological denitrification of drinking water using various natural organic solid substrates [J]. Water Sci Technol, 2003, **48** (11-12): 489-495.
- [8] Volokita M, Abeliovich A, Soares M I M. Denitrification of groundwater using cotton as energy source [J]. Water Sci Technol, 1996, **34**(1-2): 379-385.
- [9] Volokita M, Belkin S, Abeliovich A, *et al.* Biological denitrification of drinking water using newspaper [J]. Water Res, 1996, **30**(4): 965-971.
- [10] Ovez B, Ozgen S, Yuksel M. Biological denitrification in drinking water using Glycyrrhiza glabra and Arundo donax as the carbon source [J]. Process Biochemistry, 2006, **41**(7): 1539-1544.
- [11] 王旭明, 从二丁, 罗文龙, 等. 固体碳源用于异养反硝化去除地下水中的硝酸盐[J]. 中国科学(B 辑: 化学), 2008, **38**(9): 824-828.
- [12] 周海红, 赵璇, 王建龙. 利用可生物降解聚合物去除饮用水源水中硝酸盐[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2006, **46**(3): 32-35.
- [13] 周海红, 王建龙, 赵璇. pH 对以 PBS 为反硝化碳源和生物膜载体去除饮用水源水中硝酸盐的影响[J]. 环境科学, 2006, **27**(2): 290-293.
- [14] 范振兴, 王建龙. 低温对固体碳源填充床反硝化的影响[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2008, **48**(3): 436-439.
- [15] 周海红, 王建龙. 利用可生物降解聚合物同时作为反硝化微生物的碳源和附着载体研究[J]. 中国生物工程杂志, 2006, **26**(2): 95-98.
- [16] 沈生奇. 聚乳酸在可生物降解材料中的应用前景[J]. 四川化工与腐蚀控制, 2002, **5**(1): 38-39.
- [17] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法[M]. (第三版). 北京: 中国环境科学出版社, 1998. 260-263.
- [18] Hiraishi A, Khan S T. Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, **61**(2): 103-109.
- [19] 周海红, 王建龙, 赵璇. 反硝化生物膜对 PBS 表面形态及化学组分的影响[J]. 环境科学, 2006, **27**(12): 2507-2510.