

Citrobacter sp. CK3 对活性红 KN-3B 的 脱色反应动力学研究

赖正^{1,2} 熊小京^{1,2*} 郑天凌³ 林光辉⁴ 张章堂⁵

(1. 厦门大学深圳研究院, 深圳 518057; 2. 厦门大学环境与生态学院, 厦门 361005; 3. 厦门大学生命科学院, 厦门 361005; 4. 清华大学全球变化研究院, 北京 100084; 5. 台湾宜兰大学环境科学与工程系, 台湾 260)

摘要 采用脱色菌 *Citrobacter* sp. CK3, 以活性红 KN-3B 染料为处理对象, 在厌氧批式反应条件下, 系统考察了 pH 值、温度和染料浓度对脱色反应速度的影响; 通过动力学模拟及反应过程中染料的 UV-Vis 扫描图分析, 探讨了脱色反应机理。结果表明: *Citrobacter* sp. CK3 对活性红 KN-3B 的脱色反应的适宜 pH 为 7~9; 脱色反应速度在温度为 32℃ 时达到最大。染料初浓度从 57 mg/L 逐渐增大到 458 mg/L 时脱色率逐渐降低。脱色过程中染料的偶氮键发生断裂, 脱色反应符合二级反应动力学。

关键词 *Citrobacter* sp. CK3 活性红 R180 脱色反应 动力学模拟

中图分类号 X703.1 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2012)08-2892-05

Kinetics study on decolorization of Reactive Red KN-3B by *Citrobacter* sp. CK3

Lai Zheng^{1,2} Xiong Xiaojing^{1,2*} Zheng Tianling³ Lin Guanghui⁴ Zhang Zhangtang⁵

(1. Shenzhen Institute, Xiamen University, Shenzhen 518057, China; 2. College of the Environmental and Ecological, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 4. Institute for Global Change Studies, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 5. Department of Environmental and Engineering, Yilan University, Taiwan 260, China)

Abstract The kinetic modeling and mechanism with which *Citrobacter* sp. CK3 removed the textile dye, C. I. Reactive Red 180, from aqueous solution was investigated using different parameters, such as initial dye concentration, pH and temperature. In anaerobic batch experiments, the decolorization efficiency decreased with increase in initial dye concentration. The high decolorization rate was observed at pH of 7~9 and temperature of 32℃. The decolorization followed a second order kinetic model. The UV-Vis spectra analysis revealed that the decolorization process was azo bond cleaved reaction.

Key words *Citrobacter* sp. CK3; C. I. Reactive Red 180; decolorization reaction; kinetics modeling

染料工业用偶氮染料是含有单个或多个偶氮键 (R1—N=N—R2) 及磺酸基团的芳香化合物, 它具有较好的水溶性和化学稳定性, 且不易被生物降解^[1]。含偶氮染料的印染废水处理多采用化学混凝与生物处理的组合工艺, 然而实际运行结果发现, 用该工艺的处理设施存在着出水中偶氮染料的残留较高问题。因此, 对偶氮染料的高效降解菌株的获得及其脱色特性的研究已成为环保领域的热点^[2]。研究发现, 某些细菌、真菌、酵母菌和放线菌对偶氮染料显示出较好的降解效果^[3-5]; 偶氮染料中偶氮键是染料降解菌在厌氧条件下使之断开, 转化成易被好氧微生物降解的有机物^[6]; 菌株的属性、染料的结构与浓度、环境 pH 与温度等因素均会

影响偶氮键断裂这一脱色反应的进程^[7]。

本研究拟采用从厌氧污泥中分离的 *Citrobacter* sp. CK3, 以活性红 KN-3B 为代表性偶氮染料, 在批式、厌氧培养条件下, 通过系统考察 pH、温度和染料浓度对脱色反应速度的影响, 并通过动力学模拟, 以及对反应过程中染料的 UV-Vis 扫描图分析, 揭示该脱色菌对偶氮染料的降解动力学特性。

基金项目: 深圳市科技计划项目深港创新应用研发专题资助(08Lh-04); 福建省科技计划项目资助(2009Y0048)

收稿日期: 2011-04-05; 修订日期: 2011-05-18

作者简介: 赖正(1987~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 环境生物技术。E-mail: 331340718@qq.com

* 通讯联系人, E-mail: xiongxy@xmu.edu.cn

1 实验材料及方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

Citrobacter sp. CK3 (又称: CK3 柯氏柠檬酸杆菌) 取自厦门大学生命科学学院环境与应用微生物研究所。该菌株是从处理印染废水的活性污泥中分离得到的高效脱色菌,对多种偶氮活性染料具有广谱的脱色作用。

1.1.2 染料

为工业级活性红偶氮染料,主要染料成分为 C. I. Reactive Red 180 (又称: 活性红 KN-3B),其分子结构如图 1 所示。

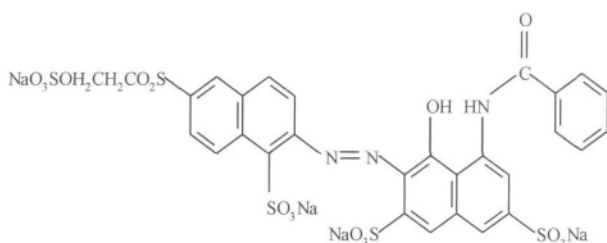


图 1 活性红 KN-3B 的分子结构

Fig. 1 Chemical structure of C. I. Reactive Red 180

1.1.3 培养基

(1) LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L、NaCl 10 g/L 染料 50 mg/L。

(2) 染料培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 31.7 g/L、 KH_2PO_4 3 g/L、 NH_4Cl 0.5 g/L、NaCl 0.5 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L、 MgSO_4 0.12 g/L、维生素 B₁ 0.15 mg/L、葡萄糖 8 g/L、染料 50 mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 染料废水的配制

染料废水由自来水人工配制,其组成为: KH_2PO_4 3 g/L、 NH_4Cl 0.5 g/L、NaCl 0.5 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L、 MgSO_4 0.12 g/L、葡萄糖 4 g/L、一定量的染料,用 HCl 和 NaOH 溶液调节 pH。

1.2.2 操作方法

将冻存的菌种转接于 LB 液体培养基中,在 37℃ 下恒温静置培养过夜,培养基由清澈变浑浊,完成活化。将活化后的菌液以 10% 的接种量转接至染料培养基中,使用体积为 1 L 的磨口瓶密封培养以保证厌氧操作,在 32℃ 下恒温静置培养,待 3 d 后染料颜色基本脱去即完成扩大培养。

向 300 mL 锥形瓶中加入 20 mL 扩大培养后的

菌液和 200 mL 的染料废水,用铝箔纸将锥形瓶封口,放入恒温摇床,在 50 r/min 下振荡反应,每隔一定时间取样,并分析染料的浓度值。

实验要求在厌氧环境条件下操作,恒温培养箱设定低速振荡,实验开始时可用少量氮气将锥形瓶中残留空气吹脱,使 DO 接近于 0。

染料废水 pH、反应温度和染料初浓度对脱色性能影响实验的条件为:

(1) pH 影响: 染料初浓度为 50 mg/L,反应温度为 32℃;

(2) 温度影响: 染料初浓度为 62 mg/L, pH 为 7;

(3) 染料初浓度影响: pH 为 7,反应温度为 32℃。

1.2.3 分析方法

将 500 mg/L 的染料溶液稀释至一定浓度后,在 543 nm 处测定其吸光度,绘制吸光度-浓度曲线,即染料的标准曲线。水样经 5 000 r/min 离心 20 min,用瑞利 UV-9200 紫外可见分光光度计,在染料特征波长处测定吸光值,由染料的标准曲线推算出水样中的染料浓度。

1.2.4 模拟数据分析

均方误差:

$$\text{MSE} = \sqrt{\sum (C_{A \text{ exp}} - C_{A \text{ cal}})^2 / N} \quad (1)$$

相对误差:

$$\Delta Q(\%) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N | [C_{A \text{ cal}} - C_{A \text{ exp}}] / C_{A \text{ exp}} | \times 100\% \quad (2)$$

式中: $C_{A \text{ cal}}$ 与 $C_{A \text{ exp}}$ 分别代表的用动力学模型算出的染料浓度和实测染料浓度。

2 结果与讨论

2.1 pH 对脱色反应速度的影响

图 2 反映出不同 pH 条件下的染料浓度时间变化。可以看出,当 pH 为 3.0 时,染料浓度基本上不随反应时间而变化;当 pH 分别为 5.0、7.0 和 9.0 时,染料浓度从 10 h 至 45 h 之间呈不同程度的减小趋势,之后分别稳定于 32、22 和 12 mg/L 左右(脱色率分别为 38%、56% 和 76%);可知在 pH 为 7.0 和 9.0 时,即中性和弱碱性条件下脱色菌 CK3 对活性红 KN-3B 显示出较好的脱色效果,最适 pH 为 9.0。与之相对照,当 pH 增大到 11.0 时,在反应开始后较长的时间内染料浓度几乎不下降,从 30 h 至 45 h 之间迅速下降至稳定值的 16 mg/L 左右(脱色率为 65%);可见在较强碱性条件下,虽然脱色菌 CK3 的

反应活性在初期受到了暂时的抑制,但在反应后期则对抑制产生耐受性,脱色活性迅速上升。从图3的pH值与脱色反应速度的关系中可以看出,当将pH从3.0逐渐提高到9.0时,脱色反应速度呈直线上升趋势,在pH为9.0时达到最大的0.84 mg/(L·h)。

Oh Y. K. 等^[2]考察了pH对*Citrobacter amalonaticus* Y19对偶氮黑B染料的脱色性能的影响,发现最适pH为6.0~9.0。Chen等^[6]研究了*Aeromonas hydrophila*在降解RBN红时pH对脱色性能影响,发现最适pH为6.0~10.0。低pH引起脱色性能低下的原因可能是较低的pH会降低染料分子进入细胞膜的扩散速度^[7,8]。

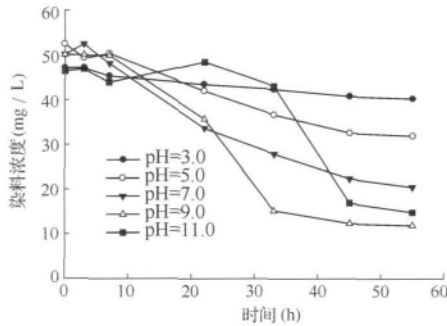


图2 不同pH条件下的染料浓度随时间变化
Fig. 2 Change of dye concentration at various pH with time

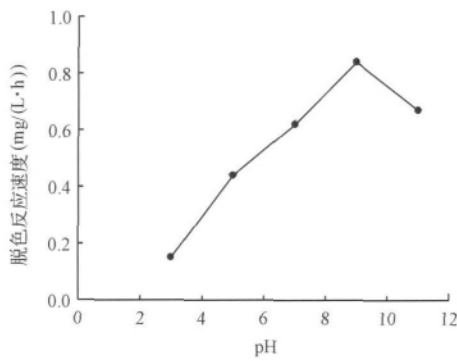


图3 pH与脱色反应速度的关系
Fig. 3 Relationship between pH and decolorization rate

2.2 温度对脱色反应速度的影响

图4反映出各反应温度条件下的染料浓度时间变化。可以看出,反应温度为22℃时,随着反应时间推移,染料浓度呈较为缓慢的降低趋势,脱色菌的活性处于较低水平;当反应温度分别为27℃和32℃时,染料浓度在7h到27h之间呈不同程度的下降,之后分别稳定在42 mg/L和13 mg/L左右(脱色率

分别为32%和79%);当温度增大到42℃时,在反应开始的7h内脱色反应速度几乎为零,但之后能以较高的反应速度使染料浓度迅速降至最低的21 mg/L左右(脱色率为66%),可知脱色菌虽然对较高温度产生暂时的不适应,但这种影响很快消失。Chang等^[9]发现,较高温度下容易引起脱色菌的细胞失活及其偶氮还原酶活性抑制。

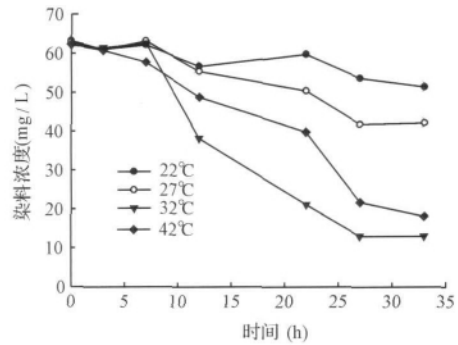


图4 不同温度条件下的染料浓度时间变化
Fig. 4 Change of dye concentration at various temperatures with time

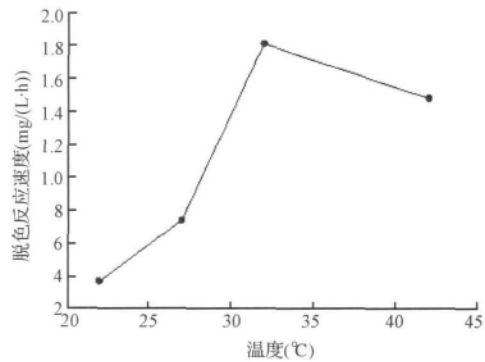


图5 温度与脱色反应速度的关系
Fig. 5 Relationship between temperature and decolorization rate

从图5的温度与脱色反应速度的关系中发现,脱色反应速度在温度从22℃增大至32℃时明显提高,达到最大的1.81 mg/(L·h),在42℃时仍能够维持在1.48 mg/(L·h)。由于实际的印染废水即使经冷却处理仍有可能在40℃左右,可以推断,脱色菌CK3能够适应这个水温,显示较高的脱色性能。

2.3 染料浓度对脱色反应速度的影响

图6反映出染料初浓度值大小对脱色效果的影响。可以看出,当染料初浓度分别为57、106和203 mg/L时,染料浓度的时间变化趋势相近,在前22h中下降较为显著,分别降至21、65和141 mg/L,之

后缓慢下降至稳定值的 16、41 和 100 mg/L, 此时的脱色率分别为 72%、62% 和 51%。而当染料初浓度增大到 293 mg/L 和 458 mg/L 时, 在整个反应时间内, 染料浓度分别逐渐减小到稳定值的 102 mg/L 和 280 mg/L, 脱色率分别为 66% 和 44%。

2.4 脱色反应动力学模型

认为该生物脱色反应体系具有均相反应特征, 假定能够分别用一级和二均相反应动力学模型表达时, 其反应速度方程为:

$$-r_A = kc_A \quad (3)$$

$$-r_A = kc_A^2 \quad (4)$$

分别对 (1) 和 (2) 式积分可得到如下浓度与时间的关系式:

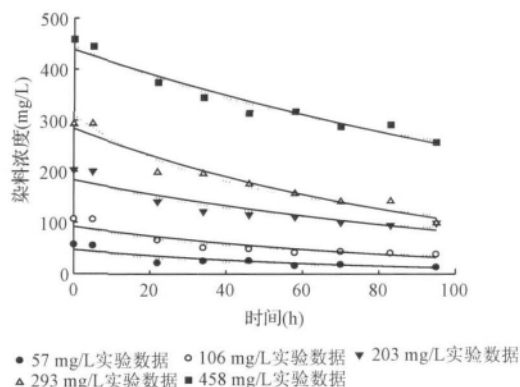
$$C_A = C_{A0} \cdot e^{-kt} \quad (5)$$

$$\frac{1}{C_A} = \frac{1}{C_{A0}} + kt \quad (6)$$

式中: $-r_A$ 为反应速度 (mg/(L·h)) k 为反应速度常数 c_A 为染料浓度 (mg/L) t 为反应时间 (h)。

通过用式 (5) 和式 (6) 分别对实验数据进行模拟, 关联出的反应速度常数 k 值、相关系数 R^2 , 方差 MSE 和偏差 ΔQ 如表 1 所示, 由 2 个模型算出的浓度值如图 6 所示。由表 1 可知, 一级反应与二级反应动力学模型的 R^2 值分别为 0.801~0.945 和 0.86~0.96, 浓度为 57 mg/L 的 R^2 值最低; 在本实验染料浓度范围内, 二级动力学的 MSE 值均低于一级动力学, 仅当染料浓度为 293 mg/L 时二级动力学的 ΔQ 值略大于一级动力学, 而其他浓度下的二级动力学的 ΔQ 值均低于一级动力学, 由此推断, *Citrobacter* sp. CK3 对性红 KN-3B 的降解反应比较符合二级动力学模型。IsIk 等^[10] 研究发现, 脱色菌对 Reactive Black5 染料的降解符合一级反应方程, 而对 Direct

Brown2 的降解则符合二级反应方程, 其反应速度常数 k 值为 $1.7 \times 10^{-5} \sim 4.2 \times 10^{-4}$, 与本研究的 k 值范围 ($1.65 \times 10^{-5} \sim 5.83 \times 10^{-4}$) 基本取得一致。由此可见, 脱色菌对偶氮染料的降解动力学特性与染料的分子结构密切相关。



图中: 点线和实线分别表示采用一级与二级动力学方程对 5 个浓度时间变化实验数据的拟合曲线。

图 6 染料初浓度值对脱色效果的影响

Fig. 6 Effect of initial dye concentration on decolorization efficiency

2.5 脱色反应机理分析

图 7 分别给出反应前、反应 2 h 和 23 h 时的染料全波长扫描图 (曲线标记: a, b, c)。曲线 a 分别在可见光区的 543 nm 和 300 nm 处有 2 个特征峰, 说明染料分子中含有萘环。Fang 等^[4] 指出, 染料降解产物在 250 nm 处显示波峰可认为它的结构含有苯环。反应 2 h 后 (见曲线 b), 可见光区 300 nm 的峰值下降和紫外区 250 nm 出现新的峰值, 说明偶氮键的断开生成了带有苯环的物质。反应 23 h 后 (见曲线 c), 发现在 350~600 nm 范围内的 2 个特征峰消失, 该结果证实了偶氮键的断开与萘环的解体;

表 1 动力学模拟结果与模型参数

Table 1 Kinetic modeling results and parameters

	浓度 (mg/L)				
	57	106	203	293	458
一级反应					
k (h^{-1})	1.4×10^{-2}	1.10×10^{-2}	8.03×10^{-3}	1.00×10^{-2}	5.67×10^{-3}
R^2	0.801	0.846	0.869	0.942	0.945
MSE	7.39	10.064	14.142	14.766	15.136
ΔQ (%)	19.21	13.64	8.76	6.08	3.76
二级反应					
k (L/(mg·h))	5.83×10^{-4}	1.83×10^{-4}	5.98×10^{-5}	5.84×10^{-5}	1.65×10^{-5}
R^2	0.86	0.909	0.916	0.904	0.96
MSE	6.393	9.058	12.215	13.301	11.796
ΔQ (%)	15.28	9.86	6.73	6.75	3.11

300 nm 的峰值减弱和 250 nm 的峰值升高表明,含有带苯环的代谢产物量在增大。由此推测, *Citrobacter* sp. CK3 对活性红 KN-3B 的脱色反应过程中偶氮键被断开,生成含有苯环的产物。

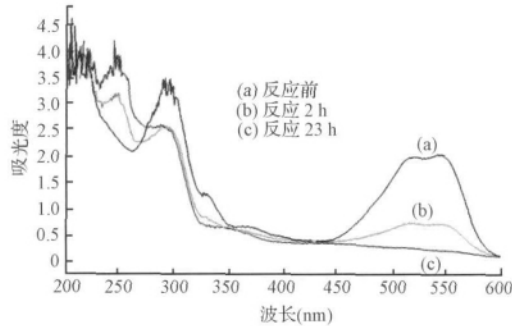


图7 反应前、反应 2 h 和 23 h 的染料 UV-Vis 扫描图

Fig. 7 UV-Vis spectra record of dye wastewater before and after decolorization of 2 h and 23 h

3 结论

Citrobacter sp. CK3 对活性红 KN-3B 的脱色反应的适宜 pH 为 7~9; 脱色反应速度在温度为 32°C 时达到最大的 1.81 mg/(L·h)。染料浓度在 57~458 mg/L 范围内逐渐增大时,脱色率从 72% 逐渐降到 44%。脱色反应过程中染料的偶氮键断裂生成含有苯环的物质,该分解反应具有二级反应动力学特征。

参考文献

- [1] Khehra M. S., Saini H. S., Sharma D. K., et al. Bio-degradation of azo dye C. I. Acid red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor. *Dyes and Pigments*, **2006**, 70 (1): 1-7
- [2] Oh Y. K., Seol E. H., Park S., et al. Decolorization of synthetic dyes by *Citrobacter amalonaticus* Y19. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **2011**, 42(3): 492-497
- [3] Asad S., Amoozegar M. A., Pourbabaee A. A., et al. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource Technology* **2007**, 98(11): 2082-2088
- [4] Fang H., Hu W. R., Li Y. Z. Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4BS. *Water Research*, **2004**, 38(16): 3596-3604
- [5] Wang H., Zheng X. W., Su J. Q., et al. Biological decolorization of the reactive dyes reactive black 5 by a novel isolated bacterial strain *enterobacter* sp. EC3. *Journal of Hazardous Materials* **2009**, 171(1-3): 654-659
- [6] Chen K. C., Wu J. Y., Liou D. J., et al. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology* **2003**, 101(1): 57-68
- [7] Chang J. S., Chou Y. P., Chen S. Y., et al. Decolorization of azo dyes with immobilized *pseudomonas luteola*. *Process Biochemistry*, **2001**, 36(8-9): 757-763
- [8] Saratale R. G., Saratale G. D., Chang J. S., et al. Eco-friendly decolorization and degradation of reactive green 19A using *micrococcus glutamicus* NCIM-2168. *Bioresour. Technology*, **2009**, 100(17): 3897-3905
- [9] Chang J. S., Chou C., Lin Y. C., et al. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Research*, **2001**, 35(12): 2841-2850
- [10] Isik M., Sponza D. T. A batch kinetic study on decolorization and inhibition of reactive black 5 and direct brown 2 in an anaerobic mixed culture. *Chemosphere*, **2004**, 55 (1): 119-128