

电聚合固定化介体催化强化 2,6-二硝基甲苯生物还原

王 竞*, 李丽华, 吕 红, 金若菲, 周集体, 杨凤林

(大连理工大学 教育部工业生态与环境工程重点实验室, 辽宁 大连 116024)

摘要: 难生物降解的水溶性氧化还原介体会随出水而流失,造成二次污染.采用活性炭毡(ACF)电极上电聚合吡咯单体掺杂蒽醌二磺酸盐技术制备的固定化氧化还原介体,AQDS/PPy/ACF,考察了其作为一种新型固态介体催化 2,6-二硝基甲苯(2,6-DNT)生物还原的可行性.结果表明,基体材料对聚吡咯复合材料的表面形貌特性影响很大,在铂片上形成的聚吡咯呈“菜花状”,而在 ACF 上则呈现“微球”状;AQDS/PPy/ACF 对 2,6-DNT 具有较强的生物催化活性和催化稳定性;它的加入可使 2,6-DNT 的生物还原速率提高近 4 倍,一级降解动力学常数达到 0.0345 h^{-1} ;在该反应体系中,2,6-DNT 首先被还原为中间产物 2-氨基-6-硝基甲苯(2-A-6-NT),后者再被还原为终产物 2,6-二氨基甲苯(2,6-DAT).

关键词: 固态氧化还原介体;聚吡咯;电聚合;2,6-二硝基甲苯;生物转化

中图分类号: X172 **文献标志码:** A

0 引 言

2,6-二硝基甲苯(2,6-DNT)不仅是制备燃料、颜料、药物、植物保护剂及化妆品的中间体,而且,以它为原料还可以制备聚氨酯材料,广泛用于泡沫塑料、弹性体、胶粘剂、涂料和纤维等行业^[1]. 2,6-DNT 是环境中广泛存在的硝基芳烃有机污染物,具有致突变性与可疑致癌性,被美国环境保护局列为“优控污染物”^[2]. 硝基极强的吸电子作用,使之通过氧化途径得到降解非常困难.相比之下,在厌氧条件下,2,6-DNT 却易被转化成一种在好氧条件下能被完全矿化的芳香胺.基于此,厌氧-好氧组合工艺被认为是处理 2,6-DNT 废水的最佳方案之一^[2].

在厌氧还原阶段,由电子供体(共底物)到最终电子受体(2,6-DNT)的电子传递过程通常是 2,6-DNT 完全生物降解的限速步骤^[2].近年来的研究表明,醌类化合物可作为氧化还原介体加速电子在电子供体与受体之间的传递,从而使偶氮化合物、硝基芳烃及氯代芳烃等的厌氧还原效率

得到大幅提高^[3,4].其中,蒽醌 2,6-二磺酸钠(AQDS)因其具有较高的催化活性及可被多种微生物所利用,而被广泛应用于难降解污染物的生物还原研究中.但其弊端是 AQDS 会随出水而流失,造成二次污染.因此,理想的对策是固定化 AQDS,并保持高催化活性.但迄今罕见文献报道.

van der Zee 等研究发现活性炭可被生物还原并可作为氧化还原介体,其活性基团被认为是醌/羰基.但活性炭接受电子的能力比小分子化合物 AQDS 低得多,后者是前者的 6.1 倍^[5].而且活性炭本身具有的以及氧化改性生成的醌/羰基大多位于微孔处($<2\text{ nm}$)^[6],而微生物($>0.2\text{ }\mu\text{m}$)通常难以接触到微孔,因此,其中的醌/羰基起到的催化作用有限. Guo 等曾用海藻酸钙包埋法固定非水溶性蒽醌,发现它可使几种偶氮染料脱色速率提高 1.5~2 倍^[7].但该固定化蒽醌的催化活性和稳定性有待进一步提高.

本实验室利用电聚合-掺杂技术,以 AQDS 为掺杂剂,以聚吡咯(PPy)为母体,通过选择适宜的基体材料,活性炭毡(ACF),制备一种具有良好

生物相容性的固定化氧化还原介体, AQDS/PPy/ACF^[8]. 本研究目的是考察 AQDS/PPy/ACF 用于催化强化 2,6-DNT 生物还原的可行性和催化稳定性, 并分析 2,6-DNT 的生物还原产物.

1 材料与方法

1.1 材料

吡咯单体, 纯度 99%, 购于 Aldrich 公司, 使用前要经过二次蒸馏, 以除去在空气中氧化形成的杂质; AQDS, 纯度 97%, 购于 Fluka 公司; 2,6-DNT, 分析纯, 购于 Merck-Schuchardt 公司; 2,6-DAT(分析纯)和 2-A-6-NT(分析纯)购于 Sigma-Aldrich 公司. 所有溶液在使用前充 15 min 氮气以除去溶液中的溶解氧. 粘胶基活性炭毡(ACF)购于鞍山深鑫活性炭纤维生产厂, 其表面积为 $800 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, 厚 4 mm.

无机盐培养基组成为 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) NH_4Cl , 1.0; KH_2PO_4 , 0.5; K_2HPO_4 , 0.6; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.037; pH 7.0. 生长培养基: 无机盐培养基中加 AQDS $0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、葡萄糖 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. 在 2,6-DNT 的降解实验中, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖被加入到无机盐培养基中作为电子供体.

菌源采用的是本实验室通过选择性富集所获得的 AQDS-还原菌群, 具有较高的 AQDS 还原活性. 将 AQDS-还原菌群转接至生长培养基中, 置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养箱中培养. 当达到对数生长期时在 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 弃去上清液, 用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液洗涤, 再次离心, 如此反复洗涤 3 次, 最后将离心后的菌体用磷酸盐缓冲溶液配制成浓缩菌液 (湿重 $160 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

1.2 AQDS/PPy/ACF 的制备

吡咯电化学聚合是在一个典型的三电极、有隔膜式 H 形电解槽内完成的^[9]. 工作电极为 ACF ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$); 辅助电极为铂片 ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$); 参比电极为饱和甘汞电极, 通过盐桥及鲁金毛细管与工作电极室连接. 通过恒电位/恒电流仪控制工作电极电位或电流密度. 工作电极室内填充 100 mL 0.024 mol/L AQDS 与 0.1 mol/L 吡咯单体的混合液或 0.1 mol/L Na_2SO_4 与 0.1 mol/L 吡咯单体的混合液; 辅助电极室内填充 100 mL 0.1

mol/L H_2SO_4 , 两室之间通过阳离子交换膜相连. 聚合温度保持在室温 $10 \text{ }^\circ\text{C}$. 本研究采用恒电流法制备聚吡咯复合材料, 电流密度为 $1.79 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$, 聚合时间为 3600 s . 使用蒸馏水冲洗两次制得 AQDS/PPy/ACF, 然后保存在充高纯氮的蒸馏水中备用. 对于 AQDS/PPy/Pt 的制备, 工作电极为 Pt ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$), 其他条件同上.

1.3 2,6-DNT 的生物还原

所有生物还原实验均在 135 mL 血清瓶中进行 (2 个平行样). 在厌氧培养箱中, 将浓缩菌液、葡萄糖、溶于丙酮中的 2,6-DNT 和 AQDS/PPy/ACF (1 块) 加入血清瓶中, 以无机盐培养基充满. 最终的菌体浓度达到湿重 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照实验除外), 葡萄糖浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 2,6-DNT 浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 使用橡胶塞密封瓶口, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧培养箱中静置培养. 同时以无 AQDS/PPy/ACF 或者无菌体的空白实验作为对照. 在固定的时间间隔内取样, 用以鉴定还原产物和 2,6-DNT 的浓度, 并采用拟一级动力学拟合 2,6-DNT 的生物还原速率.

1.4 AQDS/PPy/ACF 生物催化活性的稳定性

为了考察 AQDS/PPy/ACF 生物催化活性的稳定性, 进行了 6 次重复利用 AQDS/PPy/ACF 的生物还原实验, 通过比较 6 次实验中 2,6-DNT 的转化率来判断其催化活性的稳定性. 转化率计算公式如下:

$$r = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

其中 A_0 与 A_t 分别对应于初始时刻和 t 时刻 2,6-DNT 的浓度. 本研究中, t 值为 68 h.

1.5 分析方法

菌体浓度: 通过测定 660 nm 处的光密度来确定, 菌体湿重 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) = $2.8005 \text{ OD}_{660} + 0.029$ ($R^2 = 0.998$).

电化学活性: 将 AQDS/PPy/Pt 使用蒸馏水冲洗 3 次, 然后以其作为工作电极, 仍以 Pt 片为辅助电极, 饱和甘汞电极为参比, 以 0.1 mol/L NaCl 溶液为支持电解质, 使用循环伏安法对其电化学活性进行原位测试. 扫描电位区间 $-0.9 \sim 0.7 \text{ V}$, 扫描速率为 $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, 并以 Pt 裸电极及 AQDS 溶液体系做对照.

2,6-DNT 及其还原产物的定量: 采用 Agilent

6890 气相色谱(GC),配有火焰离子化检测器(FID)和 HP-5 毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm). GC 条件:进样口和检测器温度均为 300 °C,不分流进样,柱温采用程序升温.升温程序如下:初始温度 80 °C,保持 3 min 后,以 10 °C·min⁻¹ 的升温速率升至 200 °C 并保持 5 min,再以 30 °C·min⁻¹ 的升温速率升至 300 °C 并保持 5 min.载气为氮气,总流量 1.0 mL·min⁻¹.待分析样品首先经由 0.45 μm 滤膜过滤,并使用 NaOH 调节 pH 至 10,然后将 2,6-DNT 及其产物由水相萃取至乙醚溶剂中,注入 GC 进行定量分析.

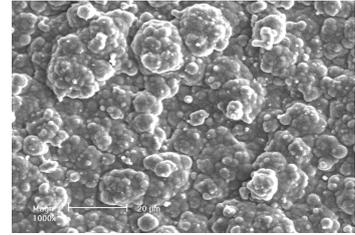
萃取至乙醚中的 2,6-DNT 还原产物的鉴定是由 Agilent 6890/5975 GC/MS 完成的,GC 条件与上同,MS 条件为电子轰击(ED)电离模式,电离能 70 eV;检测器温度 230 °C;溶剂延迟 5.0 min.

2 结果与讨论

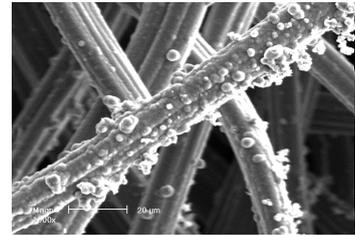
2.1 AQDS/PPy/ACF 的形貌特征

通过傅里叶变换红外光谱(FTIR)证实了 AQDS 已掺杂到 PPy/ACF 中,且元素分析表明吡咯与 AQDS 的物质的量比约为 6:1^[8].在本研究中,由不同电极基体表面形成的聚吡咯膜的扫描电镜图(图 1)可以看出,Pt 电极上形成的聚吡咯生长不均匀,具有典型的“菜花”状结构.这种表面形貌可能是由 Pt 电极上吡咯膜的形成机制所决定的^[10].吡咯开始聚合时先成核,随后沿着核的周围向二维、三维生长,从而形成了某些聚合速度较快的生长点,而这些生长点都是突起,具有较大的局部电流密度,又进一步造成了聚吡咯膜在这些生长点上的快速生长,最终形成了这种极不均匀的“菜花”状形貌.ACF 上形成的聚吡咯则呈现出“微球”状.初始时,这些聚吡咯“微球”形成错落有致的较为均匀的分布状态,这一方面归因于组成活性炭毡的碳纤维本身所形成的相互交错的空间立体结构;另一方面也是因为 ACF 表面较为粗糙,吸附性能良好,成核活性位点较多.随着聚合时间的延长,形成的聚吡咯“微球”逐渐增多,然后,这些“微球”开始相互衔接,形成致密的整体覆盖在碳纤维表面.基体材料的表面特性对吡咯的聚合过程以及聚合的难易程度具有较大的作用,从而直接影响了相应聚吡咯膜的表面形貌特

性^[11].比较上述两种基体材料上形成的聚吡咯膜可以得出,吡咯在 ACF 上更容易发生聚合,且可形成具有较大比表面积的聚吡咯复合材料.



(a) AQDS/PPy/Pt



(b) AQDS/PPy/ACF

图 1 聚吡咯膜的扫描电镜照片

Fig. 1 SEM photos of polypyrrole films

2.2 2,6-DNT 生物还原速率

为了证实 AQDS/PPy/ACF 对 2,6-DNT 的生物催化性能,考察了在有、无 AQDS/PPy/ACF 存在下,2,6-DNT 的生物还原速率,如图 2 所示.可以看出,在无菌体存在的条件下,仅有<3%的 2,6-DNT 得到降解,这表明 AQDS/PPy/ACF 对 2,6-DNT 的吸附作用可以忽略.在 Na₂SO₄/PPy/ACF 存在下,菌群对 2,6-DNT 的生物还原速率较为缓慢,与只有菌群的体系相当,说明 Na₂SO₄/PPy/ACF 对 2,6-DNT 无催化活性;而

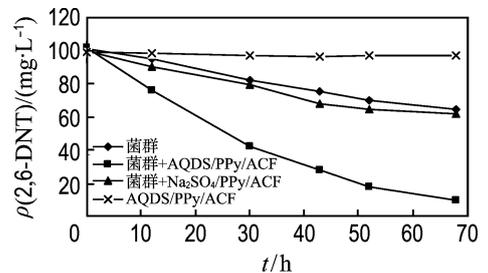


图 2 AQDS/PPy/ACF 对 2,6-DNT 生物还原的影响

Fig. 2 Biological reduction of 2,6-DNT with and without AQDS/PPy/ACF

AQDS/PPy/ACF 的加入使得菌群对 2,6-DNT 的生物还原速率得到了明显提高. 采用拟一级动力学方程对实验数据进行拟合, 得出了在有、无 AQDS/PPy/ACF 存在条件下的还原速率常数分别为 0.0345 h^{-1} 和 0.0072 h^{-1} , 前者是后者的 4.8 倍.

由图 3 可见, AQDS/PPy/Pt 的循环伏安曲线中有两对明显的氧化还原峰(两对峰的还原峰出现一定程度的叠加). 与 AQDS 溶液的循环伏安曲线相对照可知, 其中一对氧化还原峰对应的是掺杂到膜中的蒽醌-2,6-二磺酸阴离子中醌基的氧化还原峰, 而另一对氧化还原峰对应的应该是溶液中 Na^+ 的嵌入和脱出^[12]. 由此可得出, 固态 AQDS/PPy/ACF 与水溶性 AQDS 一样, 具有氧化还原活性, 在 2,6-DNT 的生物还原体系中可发挥高效催化作用, 从而使 2,6-DNT 的厌氧生物转化速率大幅提高.

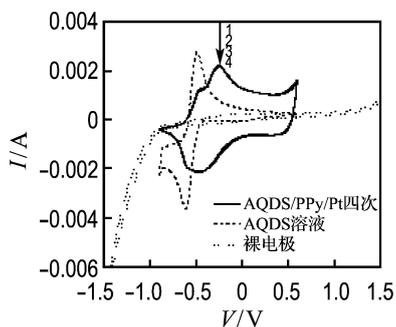
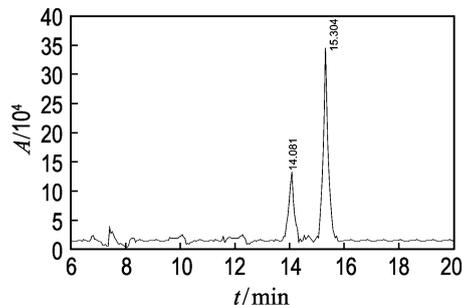


图 3 AQDS/PPy/Pt 的电化学表征

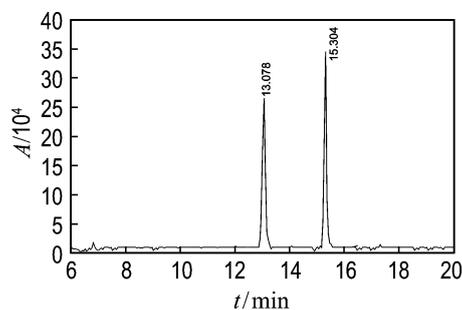
Fig. 3 Electrochemical characterization of AQDS/PPy/Pt

2.3 2,6-DNT 生物还原的产物

在厌氧生物转化体系中, 二硝基甲苯通常是先通过亚硝基硝基甲苯转化成氨硝基甲苯, 然后, 氨硝基甲苯再进一步转化成二氨基甲苯^[9]. 采用 GC/MS 对 AQDS/PPy/ACF 存在下 2,6-DNT 的生物还原产物进行了鉴定. 由图 4 可以看出, 图中共出现 3 个峰, 对应的停留时间分别为 13.078、14.081 和 15.304 min. 相应的质谱图如图 5 所示. 由质谱图可以确定对应的化合物分别为 2,6-二氨基甲苯(2,6-DAT)、2,6-二硝基甲苯(2,6-DNT)和 2-氨基-6-硝基甲苯(2-A-6-NT). 由此可见, 在 AQDS/PPy/ACF 存在下, 2,6-DNT 的生物还原过程中仅形成了一种中间产物 2-A-6-NT 和一种最终产物 2,6-DAT.



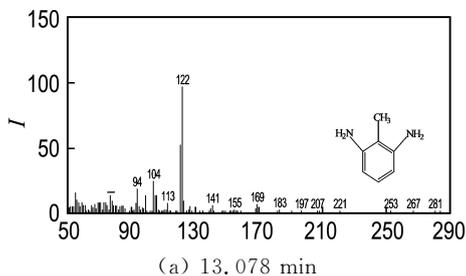
(a) 50 h



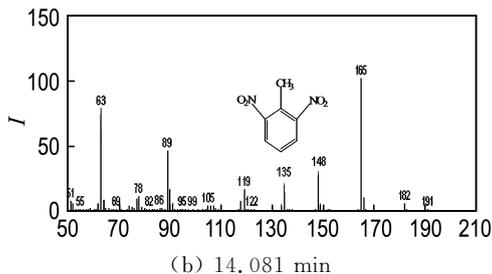
(b) 80 h

图 4 2,6-DNT 降解过程中不同时间的总离子流图

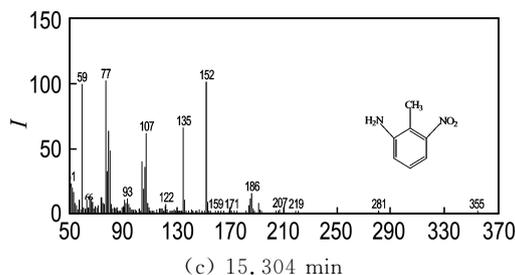
Fig. 4 Total ion chromatogram of extract from the biological reduction of 2,6-DNT



(a) 13.078 min



(b) 14.081 min



(c) 15.304 min

图 5 2,6-DNT 及其降解产物的质谱图

Fig. 5 Mass spectra of 2,6-DNT and its biodegradation products

另外,实验中对 2,6-DNT 的生物还原过程进行了详细监测(图 6).发现 2,6-DNT 的减少总是伴随着相应氨基硝基甲苯的累积.在 2,6-DNT 完全消失前,2-A-6-NT 很少被还原,这可能归因于二硝基甲苯与氨基硝基甲苯之间存在对电子共体的竞争.上述结果表明,2,6-DNT 首先被生物还原为中间产物 2-A-6-NT,后者再被还原为终产物 2,6-DAT. AQDS/PPy/ACF 作为氧化还原介体,加快了电子由葡萄糖到 2,6-DNT 的传递速度,从而使得 2,6-DNT 的生物还原速率得以提高.

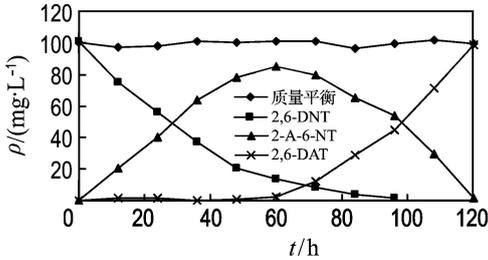


图 6 AQDS/PPy/ACF 存在下 2,6-DNT 的去除及其产物的形成

Fig. 6 Disappearance of 2,6-DNT and appearance of its transformation products in the presence of AQDS/PPy/ACF

2.4 AQDS/PPy/ACF 对 2,6-DNT 生物催化的稳定性

AQDS/PPy/ACF 重复使用过程中,2,6-DNT 的生物还原情况如图 7 所示.可以看出,在 6 次实验过程中,2,6-DNT 的转化率均在 91%左右,基本保持稳定.说明 AQDS/PPy/ACF 对

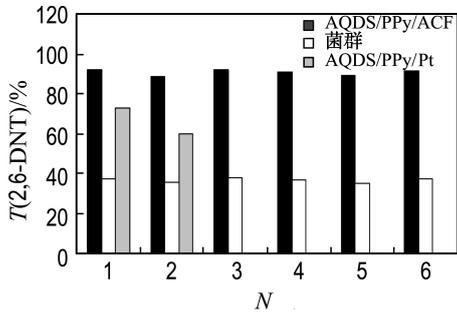


图 7 AQDS/PPy/ACF 重复使用过程中 2,6-DNT 的生物还原效率

Fig. 7 Biotransformation efficiencies of 2,6-DNT with AQDS/PPy/ACF during the successive repeated experiments

2,6-DNT 具有良好的生物催化稳定性.而对于投加 AQDS/PPy/Pt 的体系,2,6-DNT 的厌氧转化率仅为 60%~70%,而且在初始的两次实验过程中,Pt 片上沉积的聚吡咯膜已经出现溶胀和剥落现象.当第 3 次实验时,Pt 片上的聚吡咯膜就已经从基体材料上完全剥落下来.

聚吡咯复合材料的催化稳定性主要取决于对阴离子的掺杂稳定性以及聚吡咯与基体材料之间的粘附性.在对 AQDS/PPy/Pt 进行电化学表征时发现 4 次所得循环伏安曲线几乎完全重合,尤其是代表 AQDS 的氧化还原峰几乎未发生变化(图 5),这表明 AQDS 具有良好的掺杂稳定性,很难从聚吡咯膜中脱出.因此,聚吡咯膜与不同基体材料之间粘附性的差异是导致 AQDS/PPy/ACF 与 AQDS/PPy/Pt 稳定性不同的主要原因.另外,由图 1 可见,活性炭毡是由活性炭纤维以一定的空间间距相互交错组成,具有典型的三维结构,与 Pt 片相比,活性炭毡具有更大的比表面积.沉积在 ACF 表面的聚吡咯也呈现出一定的空间分布,相邻聚合物之间具有较大的空间间距,这就有利于细菌与其相互接触,使得更多的 AQDS 可被细菌所利用,从而使 AQDS/PPy/ACF 具有更高的生物催化活性.

3 结 论

(1) 基体材料对电化学聚合-掺杂技术制得聚吡咯复合材料的表面形貌特性影响很大.在铂片上形成的聚吡咯呈“菜花状”,而在 ACF 上则呈现“微球”状.

(2) AQDS/PPy/ACF 可发挥氧化还原介体的作用,有效地提高了 2,6-DNT 的生物还原速率,速率常数提高近 4 倍.

(3) AQDS/PPy/ACF 对 2,6-DNT 具有良好的生物催化稳定性.

参 考 文 献:

[1] 陈政君,曹端林,王建龙.高纯度 2,6-二硝基甲苯制备的研究进展[J].染料与染色,2006,43(2):35-38
 [2] KULKARNI M, CHAUDHARI A. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview [J]. Journal of Environmental Management, 2007, 85:496-512

- [3] FIELD J A, CERVANTES F J, VAN DER ZEE F P. Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review [J]. **Water Science and Technology**, 2000, **42**(5-6):215-222
- [4] KWON M J, FINNERAN K T. Microbially mediated biodegradation of hexahydro-1, 3, 5- trinitro-1, 3, 5- triazine by extracellular electron shuttling compounds [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, **72**:5933-5941
- [5] VAN DER ZEE F P, BISSCHOPS I A, LETTINGA G. Activated carbon as an electron acceptor and redox mediator during the anaerobic biotransformation of azo dyes [J]. **Environmental Science and Technology**, 2003, **37**:402-408
- [6] LOPEZ F, MEDINA F, PRODANOV M. Oxidation of activated carbon: application to vinegar decolorization [J]. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2003, **257**:173-178
- [7] GUO J B, ZHOU J T, WANG D, *et al.* Biocatalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salt-tolerant bacteria [J]. **Water Research**, 2007, **41**:426-432
- [8] 李丽华. 一种新型固态介体强化偶氮染料和硝基芳炔厌氧转化研究 [D]. 大连:大连理工大学, 2008
- [9] CHENG J Y, SUIDAN M T, VENOSA A D. Anaerobic biotransformation of 2, 4-dinitrotoluene with ethanol, methanol, acetic acid and hydrogen as primary substrates [J]. **Water Research**, 1998, **32**(10):2921-2930
- [10] ZHANG G Q, YANG W S, YANG F L. Electrochemical behavior and electrocatalytic activity of anthraquinonedisulphonate in solution phase and as doping species at polypyrrole modified glassy carbon electrode [J]. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 2007, **602**(2):163-171
- [11] KIM J H, LEE Y S, SHARMA A K. Polypyrrole/carbon composite electrode for high-power electrochemical capacitors [J]. **Electrochimica Acta**, 2006, **52**(4):1727-1732
- [12] JIN C, YANG F, YANG W. Electropolymerization and ion exchange properties of polypyrrole film doped by para-toluene sulfonate [J]. **Journal of Applied Polymer Science**, 2006, **101**(4):2518-2522

Enhanced biological reduction of 2,6-dinitrotoluene by catalysis of electropolymerization-immobilized redox mediators

WANG Jing*, LI Li-hua, LÜ Hong, JIN Ruo-fei, ZHOU Ji-ti, YANG Feng-lin

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The continuous dosing and discharge of water-soluble redox mediators, such as biologically recalcitrant compounds, will result in the secondary contamination. The immobilized redox mediator prepared by incorporation of anthraquinonedisulphonate (AQDS) during the electropolymerization of pyrrole monomer on active carbon felt (ACF) electrode, AQDS/PPy/ACF, was used for catalyzing anaerobic biotransformation of 2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT). The results show that the morphology of the PPy film largely depends on the surface texture of substrate materials, the PPy films depositing on Pt are characterized by a cauliflower-like structure, and those on ACF by some globular structure; AQDS/PPy/ACF exhibits good catalytic activity and stability for 2,6-DNT, the enhanced reduction rate obtained in the incubations with AQDS/PPy/ACF is about four times that of the incubations without AQDS/PPy/ACF, and the corresponding first-order reduction rate constant reaches 0.0345 h^{-1} ; 2,6-DNT is reduced to be 2,6-diaminotoluene via 2-amino-6-nitrotoluene in the system.

Key words: solid redox mediator; polypyrrole; electropolymerization; 2, 6-dinitrotoluene; biotransformation