

纳米铁系双金属-微生物体系去除地下水 NO_3^- -N 研究

夏宏彩¹ 金朝晖^{1,2*} 李铁龙^{1,2} 张娜¹ 李宁¹

(1. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071; 2. 环境污染过程与基准教育部重点实验室(南开大学), 天津 300071)

摘要 采用不同液相还原法制备纳米 Fe^0 、 Fe/Ni 和 Fe/Cu 粒子, 将其与反硝化细菌混合应用于地下水 NO_3^- -N 去除研究。考察3种体系对 NO_3^- -N 去除速率的影响, 并对其脱氮产物及 RNA 水平上纳米铁系双金属对反硝化细菌的毒性效应进行了分析和讨论。结果表明, 9 d 内纳米 Fe^0 体系可完全将 NO_3^- -N 去除, 过程中伴随 NO_2^- -N 先升高后降低的生成趋势, NH_4^+ -N 生成 52%; 纳米 Fe/Ni 体系脱氮速率最快, 6 d 内可将 NO_3^- -N 完全去除, 几乎未检测到 NO_2^- -N 的生成, 而 NH_4^+ -N 的转化率高达 69%; 纳米 Fe/Cu 体系 7 d 内可将 NO_3^- -N 去除完全, NH_4^+ -N 的生成率降低, 仅 39%, 但是出现 33% NO_2^- -N 积累。从反应前后反硝化细菌总 RNA 浓度变化看, 3 种纳米粒子对反硝化细菌的毒性大小为纳米 Fe/Ni > 纳米 Fe/Cu > 纳米 Fe^0 。

关键词 NO_3^- -N 纳米 Fe^0 纳米 Fe/Ni 纳米 Fe/Cu 反硝化细菌

中图分类号 X523 **文献标识码** A **文章编号** 1673-9108(2012)01-0026-05

Reducing nitrate in groundwater by bimetallic nanoparticles integrated with denitrifying bacteria

Xia Hongcai¹ Jin Zhaohui^{1,2} Li Tielong^{1,2} Zhang Na¹ Li Ning¹

(1. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria (Nankai University), Ministry of Education, Tianjin 300071, China)

Abstract In this study, nano-scale Fe^0 , Fe/Ni and Fe/Cu synthesized with different liquid-phase reduction methods, were studied integrated with denitrifying bacteria to remove nitrate from groundwater. Batch experiments were carried out to examine the removal rate of nitrate and the products of the denitrification in these three systems. Also, the total RNA content of bacteria were studied to evaluate the toxicity of bimetallic nanoparticles to the integrated bacteria. The results showed that almost 100% removal of nitrate was reached within 9 days in the Fe^0 nanoparticles system with nitrite transitory accumulation, and the ratio of ammonium to TN was 52%. The Fe/Ni nanoparticles system significantly enhanced the rate of nitrate reduction, removing almostly nitrate within a period of 6 days, hardly detecting the product of nitrite, while the ammonium of the final products was high to 69%. Nano-scale Fe/Cu system took 7 days to complete 100% removal of nitrate, producing less ammonium, only 39%, but there was 33% nitrite remained in the system. Experimental results also showed that the toxicity of these three types of nanoparticles to denitrifying bacteria should be in the sequence: nano-scale Fe/Ni > nano-scale Fe/Cu > nano-scale Fe^0 .

Key words nitrate; nano-scale Fe^0 ; nano-scale Fe/Ni ; nano-scale Fe/Cu ; denitrifying bacteria

随着工农业的迅速发展, 水体中硝酸盐氮的污染已经成为全世界关注的环境问题之一。因此, 开展水体中硝酸盐氮修复技术的研究越来越受到关注。

大量文献报道^[1-7], 生物反硝化技术可以很好地用于地下水中硝酸盐氮的修复。生物反硝化分为自养型和异养型。生物反硝化中异养微生物对于有

机物的依赖限制了异养反硝化技术在地下水修复中

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40971254); 青年科学基金资助项目(20907023)

收稿日期:2010-05-08; **修订日期:**2010-11-04

作者简介:夏宏彩(1985~), 女, 硕士研究生, 主要从事环境污染与修复方面的研究工作。E-mail: hongcai1104@126.com

* 通讯联系人, E-mail: jinzh@nankai.edu.cn

的应用,而自养微生物在反硝化过程中又缺乏足够的电子供体还原硝酸盐。针对以上问题,利用纳米铁水中腐蚀产氢作为电子供体促进生物降解,构建纳米铁与微生物体系修复地下水污染物,已成为环境科学研究热点^[8-10]。这种体系使得硝酸盐氮可转化为无害氮气,同时解决脱氮产物中氨氮比例过高和生物反硝化缺少电子供体两方面的缺陷。另外,据国外文献报道^[11,12]显示,在纳米铁表面镀上适当比例的另一种还原电位高的金属(如 Ni、Pd 和 Cu 等),形成二元金属体系,可以增加铁表面的活性吸附点,同时也可增加纳米零价铁在空气中的稳定性。Liou 等^[13]研究发现,二元金属体系的引入不仅可以提高纳米零价铁的脱氮反应活性,而且可以改变硝酸盐氮还原产物的组成分布,减少有毒副产物的产生。因此,在纳米铁-反硝化细菌体系中引入第 2 种金属元素,有可能会提高脱氮反应的速率,以及进一步降低脱氮产物中氨氮的比例。然而,关于纳米铁系双金属材料与反硝化细菌体系修复地下水硝酸盐氮污染的研究至今仍是空白。

基于此,根据实验室前期工作结果^[14],本实验选用 Fe/Ni、Fe/Cu 2 种纳米双金属(Ni 和 Cu 的负载量约为 5%)与反硝化细菌构成体系用于地下水硝酸盐氮污染修复研究,考察了其脱氮反应速率、脱氮产物组成及 RNA 水平上纳米铁系双金属材料对反硝化细菌的毒性效应。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

试剂:七水合硫酸亚铁、硼氢化钾、聚乙二醇-4000(PEG-4000)、六水合硫酸镍、五水合硫酸铜、无水乙醇,均为分析纯;真养产碱杆菌购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(北京);总 RNA 提取试剂盒(北京普博欣生物科技有限责任公司)。

仪器:Cary 50 型紫外可见分光光度计(Varian);250-D 恒温培养箱(江苏省常州国华电器有限公司);JJ-1 数显电动搅拌器;320-S pH 计(梅特勒-托利多有限公司);THZ-82B 气浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂);台式高速离心机 RJ-TGL-16-II(无锡市瑞江分析仪器有限公司)。

1.2 实验部分

1.2.1 纳米 Fe^0 粒子的制备

采用 Wang 等^[15]提出的液相还原法,在氩气保护下,用 KHB_4 还原 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 制取纳米 Fe^0 ,反

应结束后,产物先用脱氧去离子水洗涤 3 次,再用脱氧无水乙醇洗涤 3 次。

1.2.2 纳米 Fe/Ni 粒子的制备

采用同步液相还原法,在氩气保护下,在醇-水体系中,以 PEG 为分散剂,用 KHB_4 还原 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 制取纳米 Fe/Ni 双金属粒子,反应结束后,产物用脱氧去离子水和无水乙醇洗涤。

1.2.3 纳米 Fe/Cu 粒子的制备

采用分步液相还原法制备 Fe/Cu 双金属纳米粒子。首先,在氩气保护下,用 KHB_4 还原 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 制取纳米 Fe^0 ,然后将脱氧后的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶液导入洗涤后的纳米 Fe^0 粒子中,继续搅拌反应 0.5 h,反应结束后产物用脱氧去离子水和无水乙醇洗涤。

1.3 脱硝实验

本实验采用摇瓶实验,反应在体积为 175 mL 的血浆瓶中进行。其中加入培养液 10 mL(培养液成分为:15.000 g/L NaHCO_3 , 3.036 g/L NaNO_3 , 0.975 g/L KH_2PO_4 以及 10 mL 微量元素溶液,微量元素组分为^[16]: 0.52 mg/L ZnCl_2 , 1.90 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.00 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.24 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.29 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.36 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.30 mg/L H_3BO_3)、菌液 25 mL(真养产碱杆菌, OD_{420} 为 0.0033 ± 0.0002),并用去离子水稀释至 100 mL,此时反应液 NO_3^- -N 初始浓度为 50 mg/L,用 1 mol/L HCl 调节溶液 pH = 7。然后将新制纳米 Fe^0 0.0560 g、纳米 Fe/Ni 0.0588 g 和纳米 Fe/Cu 0.0588 g 分别导入反应液中,用聚四氟乙烯胶塞密封,置于气浴恒温振荡器上反应,温度控制在 30℃,转速 150 r/min。定期取样,分析反应物 NO_3^- -N 及产物 NO_2^- -N 和 NH_4^+ -N 含量及反硝化细菌总 RNA 浓度变化。样品总 RNA 提取采用北京普博欣生物科技有限责任公司 RNA 提取试剂盒提取,整个提取过程严格按照普博欣试剂盒的操作步骤进行,每个样品均采用 3 次平行样品对照。为保证数据的准确性,所有实验均需做平行实验。

1.4 分析方法

NO_3^- -N: 紫外分光光度法; NO_2^- -N: N-(1-萘基)-乙二胺光度法; NH_4^+ -N: 纳氏试剂光度法^[17]。样品总 RNA 浓度和纯度 (A_{260}/A_{280}): 紫外分光光度法。

2 结果与讨论

2.1 纳米粒子的表征

纳米粒子形貌观察采用 PHILIPS EM400ST 型透射电镜,其 TEM 照片如图 1 所示。由图 1 可知,采用不同液相还原法制得的纳米铁系粒子均为粒径 80 nm 左右的黑色球状粒子,且颗粒呈现不同程度的团聚现象。

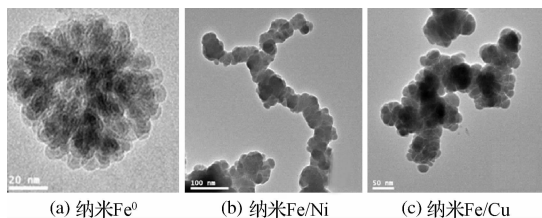


图 1 纳米粒子的电镜图

Fig. 1 TEM microphotographs of nanoparticles

2.2 3 种体系去除 NO_3^- -N 效果比较

由图 2 可知,空白对照组 8 d 内将 NO_3^- -N 仅降解了 16%,而纳米 Fe^0 、纳米 Fe/Cu 和纳米 Fe/Ni 3 种体系分别可在 9、7 和 6 d 内将 NO_3^- -N 完全去除。

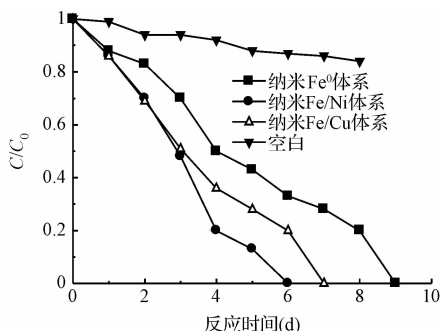


图 2 3 种体系去除 NO_3^- -N 的速率比较

Fig. 2 Comparison of nitrate removal rate of three systems

空白对照组由于没有额外的电子供体加进体系中,所以反硝化作用难以进行。而双金属纳米 Fe^0 体系较纳米 Fe^0 体系脱氮反应速率均有明显提高。这是由于 Ni、Cu 的加入增加了颗粒表面的活性反应位点,从而增加了 Fe^0 与水和 NO_3^- -N 的接触机会^[14]。另外发现,前 4 天,纳米 Fe^0 、 Fe/Cu 和 Fe/Ni 体系脱氮速率较快,4 d 后三体系脱氮速率均有所下降。这是由于 NO_3^- -N 的去除过程中会伴随着铁氧化物和氢氧化物的生成,造成铁材料表面钝化,使得铁材料与 NO_3^- -N 的有效接触受到阻碍从而降低反应速率,另外,铁材料纳米粒子在反应过程中会发

生团聚,使反应活性降低,因而随着反应进行,反应速率下降。还发现,前 3 天纳米 Fe/Ni 体系和纳米 Fe/Cu 体系反应速率相当,但随着反应的进行,纳米 Fe/Ni 体系脱氮速率明显高于纳米 Fe/Cu 体系。这是由于反应初期,反硝化细菌进入新环境,需一定时间来适应环境,此阶段,反硝化细菌的生长处于停滞状态,活性很低,而此时却是铁量最多、比表面积最大、反应速率最快的阶段,因此,脱氮反应以化学降解为主。但是随着反应的进行,铁不断被消耗,而反硝化细菌此时也适应环境,开始发挥反硝化作用。所以此阶段脱氮反应以生物反硝化作用为主^[18]。纳米 Fe/Cu 对反硝化细菌的毒害作用较纳米 Fe/Ni 小,因此后期纳米 Fe/Cu 体系反硝化作用强于纳米 Fe/Ni 体系。

2.3 3 种体系脱氮产物生成情况

在仅有反硝化细菌存在条件下, NO_3^- -N 大都被转化为 N_2 ,其他副产物很难检出。由图 3 和图 4 可以看出纳米 Fe^0 体系中 NO_2^- -N 呈先升高后降低的趋势,最大生成率达 21.5%,而 NH_4^+ -N 开始不断增加,达到一定阶段后,处于稳定状态,生成率达 52%。纳米 Fe/Ni 体系中, NO_2^- -N 几乎未被检出,但是 NH_4^+ -N 生成却表现出逐渐增加趋势,高达 69%。纳米 Fe/Cu 体系,反应中 NO_2^- -N 含量不断增加,反应结束后 NO_2^- -N 依然有约 33% 的残留,而 NH_4^+ -N 呈先增加后稳定的生成趋势,生成量仅 39%。

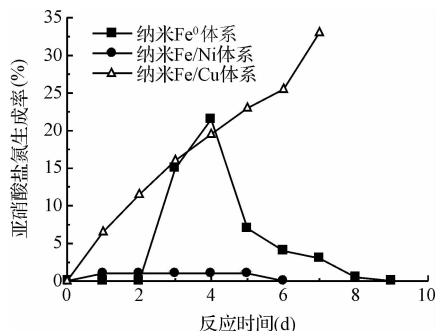


图 3 脱氮过程中 NO_2^- -N 的生成

Fig. 3 Generation of nitrite in denitrification process

根据本实验室前期研究结果^[14],Ni 的加入可同时催化纳米 Fe^0 对于 NO_3^- -N 和 NO_2^- -N 的还原反应,整个脱氮过程中不会出现 NO_2^- -N 的积累。而且不同于裸露的纳米 Fe^0 -反硝化细菌体系中的 NH_4^+ -N 生成趋势,在纳米 Fe/Ni -反硝化细菌体系中,

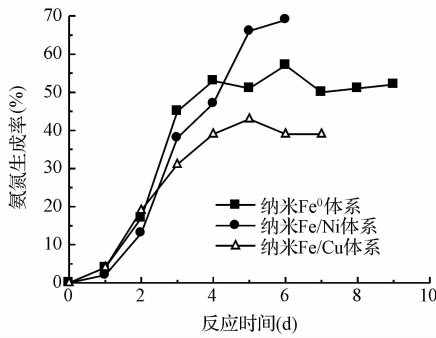
图 4 脱氮过程中 NH_4^+ -N 的生成

Fig.4 Generation of ammonium in denitrification process

NH_4^+ -N 的浓度并未发现先增加后稳定的规律,而是表现出单调增加的规律。这说明 Ni 的加入仅仅是催化了纳米 Fe^0 的化学还原作用,使得体系中的 NO_3^- -N 迅速地向 NH_4^+ -N 转化。因此,虽然 Ni 的引入提高了纳米 Fe^0 -反硝化细菌体系的脱氮速率,但是增加了脱氮产物的毒性。

与 Ni 催化特性不同,Cu 的加入明显增加了对 NO_2^- -N 的选择性^[13,19]。因此,在纳米 Fe/Cu 体系中, NO_2^- -N 具有较快的生成速率;另一方面,纳米 Fe/Cu 表面对 NO_2^- -N 吸附能力相对较差,因此由 NO_2^- -N 转化为 NH_4^+ -N 的反应进行得比较缓慢^[15]。也就是说,Cu 的加入改变了纳米 Fe^0 还原 NO_3^- -N 的产物选择性,使纳米 Fe^0 的脱氮产物停留在 NO_2^- -N 阶段,而不是更进一步地向 NH_4^+ -N 转化。

2.4 不同纳米粒子对反硝化细菌总 RNA 浓度的影响

由图 5 可知,空白对照组反硝化细菌总 RNA 浓度 8 d 内仅降低了 28%,而纳米 Fe^0 体系、纳米 Fe/Ni 体系和纳米 Fe/Cu 体系中反硝化细菌总 RNA 浓度分别降低了 40%、93% 和 50%。由此可知,3 种纳米粒子对反硝化细菌均存在一定程度毒害作用。

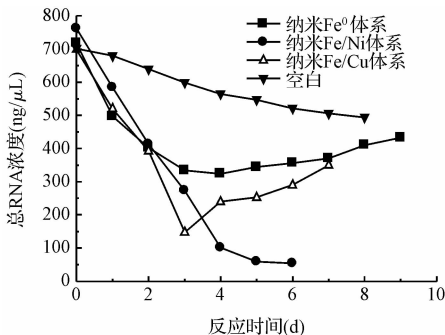


图 5 体系中反硝化细菌总 RNA 浓度的变化

Fig.5 Change of total RNA concentration

空白对照组反硝化细菌在无外加碳源和能源的情况下,细胞活性降低,主要通过自身内源呼吸维持生命活动。而纳米 Fe^0 、Fe/Ni 和 Fe/Cu 等粒子会直接穿透生物膜进入组织或细胞,对反硝化细菌产生毒性,这与 Nel 等^[20]的报道一致。反应开始反硝化细菌总 RNA 浓度明显下降,随着反应的进行反硝化细菌总 RNA 浓度呈下降减缓或开始上升趋势。这是由于反应初期正是纳米 Fe^0 、Fe/Ni 和 Fe/Cu 量最多、比表面积大、活性最高,对微生物产生不利影响最大时段。随着反应的进行,这 3 种纳米铁粒子均会出现不同程度氧化腐蚀或颗粒间聚集生成粒径较大氧化物,使得其比表面积减小,从而对微生物的毒性降低;另外,发现第二金属的引入也增大了纳米 Fe^0 对反硝化细菌的毒害作用,可能来自以下原因:首先,Ni、Cu 的加入使得 NH_4^+ -N 和 NO_2^- -N 的含量分别增加,这些脱氮产物使得反应体系毒性增大,不利于细菌生长;其次,重金属 Ni、Cu 本身对反硝化细菌就有可能产生毒性。

3 结论

(1) 纳米铁系双金属粒子-反硝化细菌体系在无氧、室温、振荡条件下,即可与 NO_3^- -N 完全反应;其中纳米 Fe/Ni 粒子-反硝化细菌体系的脱氮速率优于纳米 Fe^0 和 Fe/Cu 粒子-反硝化细菌体系。

(2) 纳米 Fe/Cu-反硝化细菌体系与纳米 Fe/Ni-反硝化细菌体系脱氮产物毒性增大。纳米 Fe/Cu-反硝化细菌体系反应过程中出现了 33% 的 NO_2^- -N 积累,纳米 Fe/Ni-反硝化细菌体系反应过程中 NH_4^+ -N 生成量增大,约 69%。

(3) 从总 RNA 水平上看,纳米铁系双金属粒子对反硝化细菌的毒害作用较裸露纳米 Fe^0 粒子大。这说明 Ni、Cu 等二元金属的引入可以增大纳米 Fe^0 对反硝化细菌的毒害作用。最终比较结果显示,它们的毒性大小顺序为:纳米 Fe/Ni 粒子 > 纳米 Fe/Cu 粒子 > 纳米 Fe^0 。

参考文献

- [1] Kesseru P., Kiss I., Bihari Z., et al. Biological denitrification in a continuous-flow pilot bioreactor containing immobilized pseudomonas butanovora cells. *Bioresource Technology*, **2003**, 87(1): 75-80
- [2] Mansell B. O., Schroeder E. D. Hydrogenotrophic denitrification in a microporous membrane bioreactor. *Water Re-*

- search, **2002**, 36(19): 4683-4690
- [3] Lee K. C. , Rittmann B. E. Effects of pH and precipitation on autohydrogenotrophic denitrification using the hollow-fiber membrane-biofilm reactor. *Water Research*, **2003**, 37(7): 1551-1556
- [4] Haugen K. S. , Semmens M. J. , Novak P. J. A novel in situ technology for the treatment of nitrate contaminated groundwater. *Water Research*, **2002**, 36(14): 3497-3506
- [5] Wakida F. T. , Lerner D. N. Non-agricultural sources of groundwater nitrate: A review and case study. *Water Research*, **2005**, 39(1): 3-16
- [6] Campos J. L. , Carvalho S. , Portela R. , et al. Kinetics of denitrification using sulphur compounds: Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds. *Bioresource Technology*, **2008**, 99(5): 1293-1299
- [7] Smith R. L. , Buckwalter S. P. , Repert D. A. , et al. Small-scale hydrogen-oxidizing-denitrifying bioreactor for treatment of nitrate-contaminated drinking water. *Water Research*, **2005**, 39(10): 2014-2023
- [8] Agrawal A. , Tratnyek P. G. Reduction of nitro aromatic compounds by zero-valent iron metal. *Science of the Total Environment*, **1996**, 30(1): 153-160
- [9] Siantar D. P. , Schreier C. G. , Chou C. S. , et al. Treatment of 2-dibromo-3-chloropropane and nitrate-contaminated water with zero-valent iron or hydrogen/palladium catalysts. *Water Research*, **1996**, 30(10): 2315-2321
- [10] Shin K. H. , Cha D. K. Microbial reduction of nitrate in the presence of nanoscale zero-valent iron. *Chemosphere*, **2008**, 72(2): 257-262
- [11] Feng J. , Lim T. T. Iron-mediated reduction rates and pathways of halogenated methanes with nanoscale Pd/Fe: Analysis of linear free energy relationship. *Chemosphere*, **2007**, 66(9): 1765-1774
- [12] Zhang W. H. , Quan X. , Wang J. X. , et al. Rapid and complete dechlorination of PCP in aqueous solution using Ni-Fe nanoparticles under assistance of ultrasound. *Chemosphere*, **2006**, 65(1): 58-64
- [13] Liou Y. H. , Lo S. L. , Lin C. J. , et al. Chemical reduction of an unbuffered nitrate solution using catalyzed and uncatalyzed nanoscale iron particles. *Journal of Hazardous Materials*, **2005**, 127(1-3): 102-110
- [14] 孙丽莉. 铁系复合材料的制备及去除地下水中硝酸盐氮的研究. 天津:南开大学硕士学位论文, **2008**
Sun L. L. Preparation of Fe⁰ compound materials and their application in groundwater nitrate removal. Tianjin: Master Dissertation of Nankai University, **2008** (in Chinese)
- [15] Wang W. , Jin Z. H. , Li T. L. , et al. Preparation of spherical iron nanoclusters in ethanol-water solution for nitrate removal. *Chemosphere*, **2006**, 65(8): 1396-1404
- [16] Till B. A. , Weathers L. J. , Alvarez P. J. Fe(0)-supported autotrophic denitrification. *Environmental Science & Technology*, **1998**, 32(5): 634-639
- [17] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法(第4版). 北京: 中国环境科学出版社, **2002**. 258-285
- [18] Yi An. , Li T. L. , Jin Z. H. , et al. Decreasing ammonium generation using hydrogenotrophic bacteria in the process of nitrate reduction by nanoscale zero-valent iron. *Science of the Total Environment*, **2009**, 407(21): 5465-5470
- [19] Zhang W. X. Nanoscale iron particles for environmental remediation: On overview. *Journal of Nanoparticle Research*, **2003**, 5(3): 323-332
- [20] Nel A. , Xia T. , Madler L. , et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, **2006**, 311(5761): 622-627