

The Role and Mechanism of Humic Acid in Inhibiting the Anaerobic Production of Sulfate by Sulfate Reducing Bacteria

Binbin Ma¹, Min Wu^{1*}, Zhiyuan Wang², Gongxia Li², Liuzhu Zhao², Shiyang Chen³

¹State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai

²Shanghai Municipal Engineering Design and Research Institute (Group) Co., Ltd., Shanghai

³Tongji Architectural Design (Group) Co., Ltd., Shanghai

Email: 365922443@qq.com, *minwu@tongji.edu.cn

Received: Dec. 1st, 2019; accepted: Dec. 19th, 2019; published: Dec. 26th, 2019

Abstract

The HA was added to sludge containing a large amount of SRB and reacted under anaerobic conditions. The results showed that HA strongly inhibited the production of H₂S and sulfides by SRB. The effect is that 80 to 200 mg/L of HA has an inhibitory effect on H₂S production of more than 80% and an inhibitory effect on sulfide production of more than 50%. HA can promote the use of SRB for electron donors. The total utilization of SRB for 200 mg/L HA for electron donors is 97.88%, which is 20.62% higher than that for SRB without HA. The addition of AQDS shake flask experiments indirectly verified that dosing HA disrupted the SRB-reduced SO₄²⁻ electron transport system and became the ultimate electron acceptor for SRB metabolism. HA has a significant inhibitory effect on two key enzymes in the metabolism of SRB: APS reductase and sulfite reductase, with inhibitory effects of 44.59% and 42.53%, respectively.

Keywords

Humic Acid, Sulfate-Reducing Bacteria, Hydrogen Sulfide, Electron Transport System, Microorganism, Enzyme Activity

腐殖酸对硫酸盐还原菌厌氧还原硫酸盐的抑制效果及其机理研究

马彬彬¹, 吴敏^{1*}, 王致远², 李恭霞², 赵刘柱², 陈世阳³

¹同济大学, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海

*通讯作者。

文章引用: 马彬彬, 吴敏, 王致远, 李恭霞, 赵刘柱, 陈世阳. 腐殖酸对硫酸盐还原菌厌氧还原硫酸盐的抑制效果及其机理研究[J]. 水污染及处理, 2020, 8(1): 24-30. DOI: 10.12677/wpt.2020.81004

²上海市政工程设计研究总院(集团)有限公司, 上海

³同济大学建筑设计研究院(集团)有限公司, 上海

Email: 365922443@qq.com, *minwu@tongji.edu.cn

收稿日期: 2019年12月1日; 录用日期: 2019年12月19日; 发布日期: 2019年12月26日

摘要

在含大量SRB的污泥中投加HA, 在厌氧条件下进行摇瓶反应, 结果表明: HA对SRB产生H₂S和硫化物有强烈的抑制效果, 80~200 mg/L的HA在对产生H₂S的抑制效果超过80%, 对硫化物的产生抑制效果超过50%; HA能够促进SRB对电子供体的利用, 投加200 mg/L HA的SRB对电子供体的总利用率为97.88%, 相比未投加HA的SRB提高了20.62%; 投加AQDS的摇瓶实验间接验证了投加HA扰乱了SRB还原SO₄²⁻的电子传递体系, 并成为SRB代谢的最终电子受体; HA对SRB代谢过程中的两种关键酶APS还原酶和SO₃²⁻还原酶都有显著的抑制作用, 其抑制效果分别为44.59%和42.53%。

关键词

腐殖酸, 硫酸盐还原菌, 硫化氢, 电子传递体系, 微生物, 酶活性

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

城市污水处理厂在完成污水处理的同时, 也会产生大量恶臭气体, 其主要成分是含硫化合物和含氮化合物。其中, 含硫化合物中的硫化氢(H₂S)被认为是污水处理厂所产生的最为普遍且影响最大的恶臭物质。H₂S 不仅会影响周边环境的质量, 而且会严重威胁周边居民身心健康, H₂S 还会对污水管道和处理设备产生腐蚀, 缩短其使用寿命, 影响污水处理厂的正常生产活动[1]。

目前污水处理厂常用末端处理来控制恶臭气体, 但存在显著缺陷: 增设恶臭气体收集、处理系统会增加污水处理厂建设和运营的费用, 并且加盖封闭会给处理构筑物内相关设备的运行、保养和维修带来不便, 甚至会造成设备腐蚀问题[1]。

综上所述, 污水处理厂现行末端除臭技术存在着显著缺陷。因此, 迫切需要研究开发城市污水处理厂H₂S恶臭气体的原位控制技术。据研究, 葱醌及葱醌衍生物和腐殖酸模式物等腐殖质类物质均对硫酸盐还原菌(SRB)生长有抑制作用[3] [4]。鉴于此, 本文利用一种水中的天然有机物——腐殖酸(HA)抑制SRB的生长代谢以减少H₂S气体的产生量, 研究HA对SRB厌氧产生H₂S的抑制效果, 揭示腐殖酸对SRB厌氧产生H₂S的抑制机理, 为城市污水处理厂恶臭气体H₂S的控制提供一种新思路。

2. 材料与方法

2.1. 试验所用材料

2.1.1. 试验所用污泥及其培养方法

试验所用活性污泥取自上海市某污水处理厂二沉池。将污泥用自来水反复冲洗, 去除里面粗大固体颗粒,

然后将处理后的污泥倒入血清瓶密封保存于4℃冰箱中,2 h后将上层清液倾倒,得到经重力沉降的污泥备用。

在1 L的培养瓶中加入上述备用污泥、0.192 g 乙酸钠、0.15 g 葡萄糖以及培养液(表1),并加培养液使混合液体积为1 L,使每个培养瓶中的COD浓度、pH和硫酸盐(SO_4^{2-})浓度分别为3000 mg/L、7和600 mg/L,然后持续通入氮气约5 min,以维持氧化还原电位(ORP)在-300 mV左右。将瓶口用橡胶塞密封后放入转速为150 rpm、温度为35℃的恒温摇床中持续培养。每隔24 h静置20 min后倒掉上清液,补充适量乙酸钠、葡萄糖和硫酸盐,重新加入培养液使混合液体积为1 L。重复以上操作,直至培养瓶中的污泥全变为黑色,连续监测气态 H_2S 产量稳定达到800 ppm以上,认为SRB驯化完成。

Table 1. Components and contents of culture medium

表 1. 培养液组分及含量

	组分	浓度(mg/L)	组分	浓度(mg/L)
基本元素	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	750	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	400
	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	250	Na_2SO_4	88.75
微量元素	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.015
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	H_3BO_3	0.09
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.06	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.006
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.009	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.009
	$\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.009	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.015

2.1.2. 试验用水及腐殖酸

试验用水为人工模拟废水,其中各物质组分浓度见表2。

试验所用腐殖酸(HA)购置于上海麦克林生化科技有限公司,HA中黄腐酸(FA)含量 $\geq 90\%$,分子式为 $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_6$,相对分子质量为227.17,CAS号为1415-93-6。

Table 2. Components and contents of experimental water

表 2. 实验用水组分及含量

组分	浓度(mg/L)	组分	浓度(mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	76
NH_4Cl	59	KCl	36
Na_2SO_4	88.75	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.015
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.03	H_3BO_3	0.09
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.06	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.006
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.009	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.009
$\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.009	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.015

2.2. 试验方案

本试验为序批次式试验。在500 mL血清瓶中加入葡萄糖和乙酸钠混合电子供体,控制污泥浓度即MLSS在5000 mg/L为,控制腐殖酸浓度梯度为0,40,80,120,160和200 mg/L,加人工配水至400 mL刻度线,加入电子供体后混合液的COD应控制在150 mg/L。持续通入 N_2 ,直至混合液的ORP降至-150 mV以下。将瓶口用橡胶塞密封后放入转速为150 rpm、温度为35℃的恒温摇床中培养,投加各浓度HA的反应器分别培养12,24,36,48和60 h,到达预定培养时间后,取出培养瓶,先测定 H_2S 气体浓度,然后将培养瓶迅速转移至厌氧箱中,取样品上清液经0.45 μm 滤膜,滤液用于总硫化物,总有机碳(TOC)

的测定；取样品底泥进行酶活力的测定。

2.3. 测定方法

H₂S 气体浓度通过 ADSK-4 硫化氢气体浓度检测仪测定；总硫化物的测定使用哈希 DR2800 便携式分光光度计测定；TOC 采用岛津 TOC 仪测定；亚硫酸盐酶活力及腺嘌呤磷酸硫酸盐(APS)还原酶酶活力的测定采用 Ostrowski 和高艳的方法[5] [6]。

3. 结果与讨论

3.1. HA 对 SRB 还原 SO₄²⁻ 的抑制效果

SRB 在厌氧条件下会将 SO₄²⁻ 还原并产生 H₂S 以及硫化物,根据图 1 和图 2,投加了 HA 的反应器中,释放出的 H₂S 气体以及水中产生的总硫化物都有了大幅度的减少,这表明 HA 对 SRB 还原 SO₄²⁻ 有极强的抑制作用。除 40 mg/L HA 外,其余浓度的 HA 在反应 60 h 时对 H₂S 气体产生的抑制效果均在 80%以上,200 mg/L HA 的抑制效果更是达到了 93.14%。40 mg/L HA 对总硫化物的产生抑制效果为 44.67%,其余浓度 HA 的抑制效果相差不大,均在 50%以上。

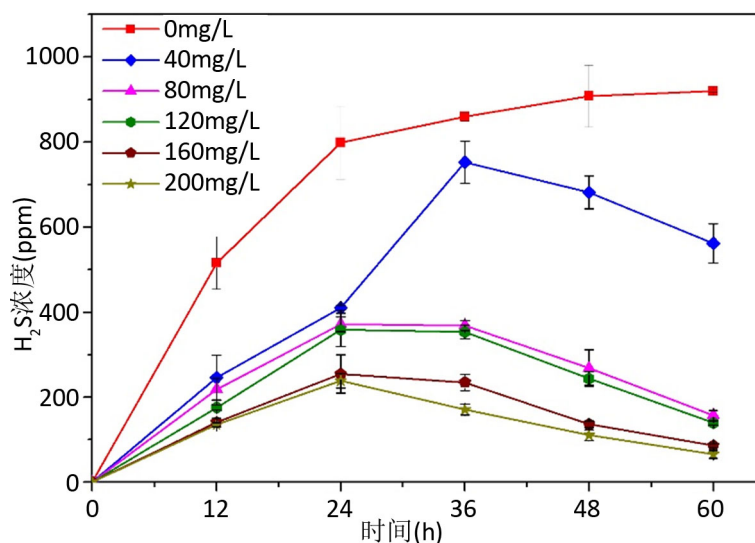


Figure 1. H₂S gas concentration in the reactor under different concentrations of HA

图 1. 不同浓度 HA 下反应器产生 H₂S 气体浓度

3.2. HA 对 SRB 电子传递体系的影响

据 Bradley [7]研究,HA 可作为最终电子受体参与微生物厌氧降解有机物。如图 3 所示,投加 HA 后,水中有机物均比未投加 HA 消耗更快,HA 能够促进 SRB 对电子供体的利用。且 HA 的浓度越高,SRB 对电子供体的总利用率越高。投加 200 mg/L HA 的 SRB 在反应 60 h 时对电子供体的总利用率为 97.88%,相比未投加 HA 的 SRB 提高了 20.62%。但是此时 SRB 经还原 SO₄²⁻ 产生的 H₂S 和总硫化物浓度大幅度降低,说明因 SRB 降解有机物而产生的大量电子有可能经 SRB 流向了 HA。且通过将 HA 的模式物蒽醌-2,6-二磺酸盐(antraquinone-2,6-disulfonate, AQDS)加入 SRB 污泥中进行反应发现, AQDS 随着反应的进行不断得电子被转化为 AH₂QDS,在 SRB 代谢过程中 AQDS 起到了最终电子受体的作用,间接证明了 HA 因充当最终电子受体,分流了 SRB 降解有机物产生的电子,扰乱了其电子传递体系,抑制 SRB 厌氧还原 SO₄²⁻ 为 S²⁻,从而使产生的 H₂S 气体和总硫化物浓度下降。

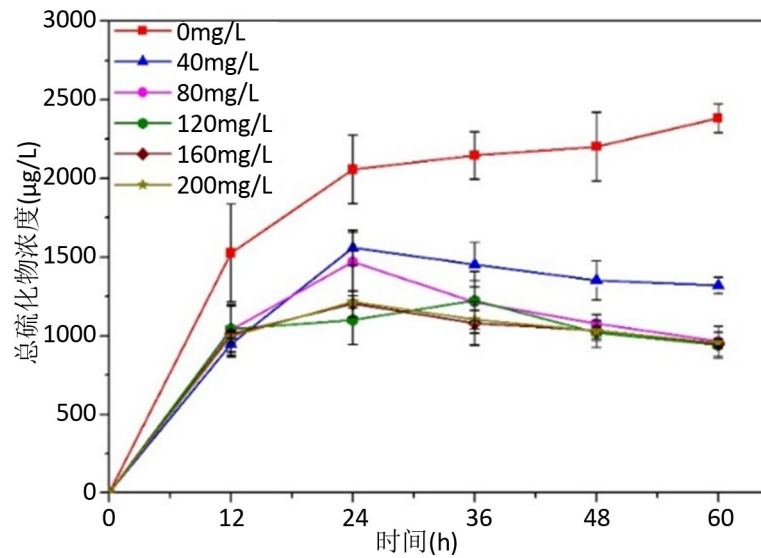


Figure 2. Total sulfide concentration in the reactor under different concentrations of HA

图 2. 不同浓度 HA 下反应器产生总硫化物浓度

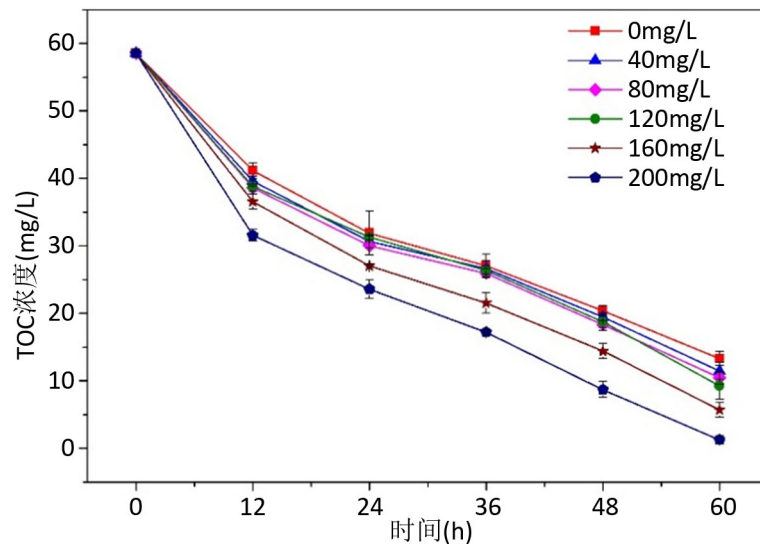


Figure 3. Utilization of electron donors when HA was added at different concentrations

图 3. 投加不同浓度 HA 时电子供体的利用情况

3.3. HA 对 SRB 代谢过程中关键酶活性的抑制作用

根据现有文献, SRB 在还原 SO_4^{2-} 的过程中电子传递发生在腺嘌呤磷酰硫酸盐(APS)的还原和亚硫酸盐(SO_3^{2-})的还原, 故 APS 还原酶和 SO_3^{2-} 还原酶是 SRB 代谢过程中的关键酶[8] [9]。SRB 反应起始时因清洗和离心作用导致酶活性降低, 随反应进行其酶活力逐渐增加, 如图 4、图 5, 投加不同浓度的 HA 后, APS 还原酶及 SO_3^{2-} 还原酶的活性显著降低, 呈现先降低后增加再减小的趋势; 投加 HA 的浓度越高, 对 APS 还原酶及 SO_3^{2-} 还原酶的抑制效果越好。投加了 HA 的反应器中 APS 还原酶及 SO_3^{2-} 还原酶在 12 h 时其酶活性最低, 表明 HA 的存在打乱了 SRB 的电子传递, SRB 初始降解的有机物产生的大部分电子均被分流至 HA, 整个 SO_4^{2-} 的还原过程受到影响; 随着有机物的不断被降解, 产生的电子总量逐渐增加, 除

分流至 HA 外, SRB 也能获取部分电子, 产生 H_2S 和硫化物。

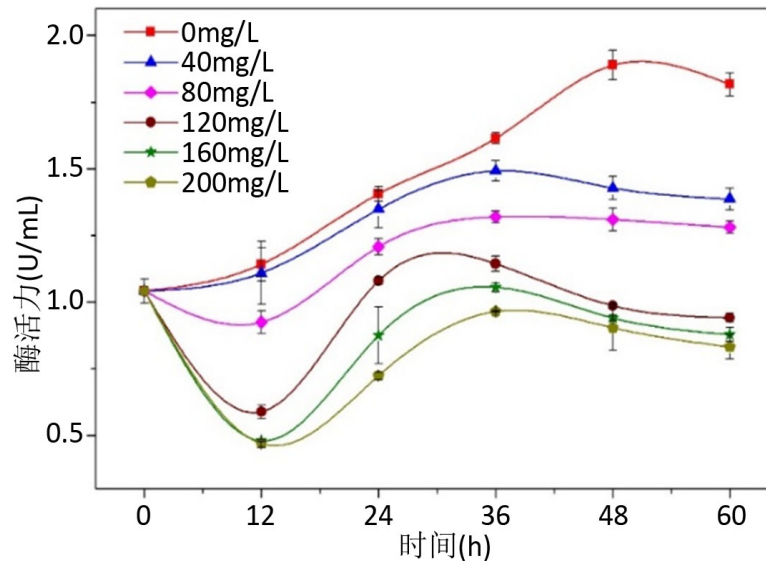


Figure 4. Effect of HA at different concentrations on APS reductase enzyme activity of SRB

图 4. 不同浓度 HA 对 SRB 的 APS 还原酶酶活力的影响

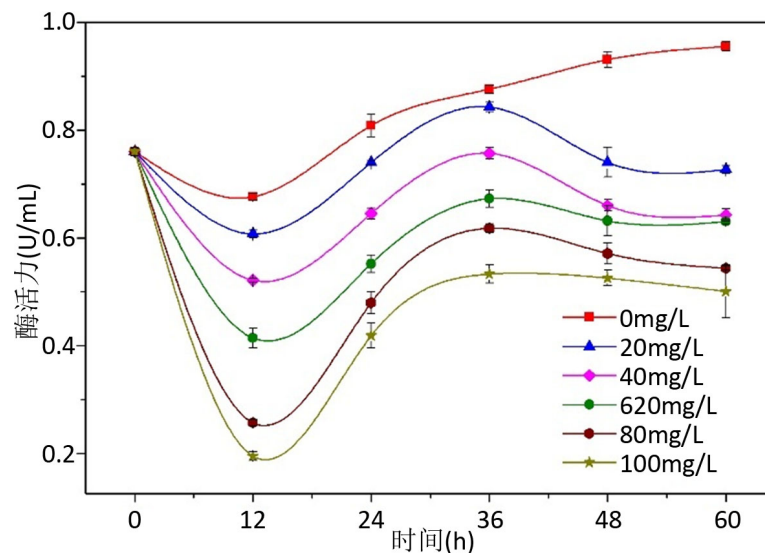


Figure 5. Effect of HA at different concentrations on SO_3^{2-} reductase enzyme activity of SRB

图 5. 不同浓度 HA 对 SRB 的 SO_3^{2-} 还原酶酶活力的影响

4. 结论

1) HA 能够显著抑制 SRB 还原 SO_4^{2-} , 投加 80~200 mg/L 浓度的 HA 对 H_2S 的抑制效果达到 80% 以上, 40 mg/L HA 对总硫化物的产生抑制效果为 44.67%, 其余浓度 HA 的抑制效果相差不大, 均在 50% 以上。

2) HA 能够促进 SRB 对电子供体的利用, HA 浓度越高, 促进效果越好, 投加 200 mg/L HA 的 SRB 对电子供体的总利用率为 97.88%, 相比未投加 HA 的 SRB 提高了 20.62%。HA 扰乱了 SRB 还原 SO_4^{2-} 的

电子传递体系,并最终称谓 SRB 代谢的最终电子受体。

3) HA 对 SRB 代谢过程中的两张关键酶 SO_3^{2-} 还原酶和 APS 还原酶都有显著的抑制作用,HA 的浓度越高,抑制作用越强烈。

参考文献

- [1] 胡文平, 杜元龙. 硫化氢气体的危害性及其检测方法[J]. 材料保护, 1996(12): 17-18.
- [2] 刘华平, 李田, 段小平. 污水管道的硫化氢腐蚀及其控制[J]. 市政技术, 2004, 22(5): 282-4.
- [3] Cooling, F.I., Maloney, C.L., Nagel, E., *et al.* (1996) Inhibition of Sulfate Respiration by 1,8-Dihydroxyanthraquinone and Other Anthraquinone Derivatives. *Applied & Environmental Microbiology*, **62**, 2999.
- [4] Wang, X., Cheng, X., Ren, Y., *et al.* (2016) Humic Analog AQDS Can Act as a Selective Inhibitor to Enable Anoxygenic Photosynthetic Bacteria to Outcompete Sulfate-Reducing Bacteria under Microaerobic Conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **91**, 2103-2110. <https://doi.org/10.1002/jctb.4808>
- [5] 高艳. 硫酸盐还原菌合成纳米硫化镉的研究[D]: [硕士学位论文]. 太原: 中北大学, 2015.
- [6] Kim, B.G., Divakaran, S., Brown, C.L. and Ostrowski, A.C. (2001) Comparative digestive Enzyme Ontogeny in Two Marine Larval Fishes: Pacific Threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and Bluefin Trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiology & Biochemistry*, **24**, 225-241. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00407.x>
- [7] Bradley, P.M., Chapelle, F.H. and Lovley, D.R. (1998) Humic Acids as Electron Acceptors for Anaerobic Microbial Oxidation of Vinyl Chloride and Dichloroethene. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3102-3105.
- [8] 刘晓华. 硫酸盐还原菌亚硫酸盐还原酶的初步研究[D]: [硕士学位论文]. 成都: 四川大学, 2006.
- [9] 宋超, 郑春丽, 王建英. 微生物硫酸盐的同化途径及其与重金属抗性的关系[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(11): 6368-6370.