

间氟苯酚的好氧生物降解性及降解途径研究

张超杰, 周琪, 陈玲, 袁园, 余慧

(同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化国家重点实验室, 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092)

摘要: 利用活性污泥法考察了间氟苯酚的好氧生物降解性. 结果表明, 100 mg/L 间氟苯酚经 16 h 降解, 溶液中基本检测不到间氟苯酚, 有机氟原子几乎全部降解为无机氟离子. 间氟苯酚可以用作微生物生长的唯一碳源和能源, 活性污泥中的微生物可以有效地降解间氟苯酚. 利用高效液相色谱和色质联机技术研究了间氟苯酚的好氧生物降解途径, 研究表明间氟苯酚首先羟基化生成中间产物氟邻苯二酚, 羟基化中间产物通过邻位途径裂解开环, 然后环化脱氟.

关键词: 间氟苯酚; 好氧生物降解性; 邻位环断裂; 脱氟

中图分类号: X703 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)09-1841-05

Biodegradability and Degradation Mechanism of 3-Fluorophenol by the Activated Sludge

ZHANG Chaojie, ZHOU Qi, CHEN Ling, YUAN Yuan, YU Hui

(Key Laboratory for Changjiang River Aquatic Environmental Study of Education Ministry, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: An acclimated activated sludge was examined for its ability to degrade 3-fluorophenol in aerobic batch cultures. The result indicated that the organism degrades up to 100 mg/L 3-fluorophenol completely with approximately 100% fluoride anion release within 16 h. 3-Fluorophenol can serve as the sole carbon source and energy source for the organism. The acclimated activated sludge can degrade 3-fluorophenol effectively. The degradation mechanism study reveal that the initial step in the aerobic biodegradation of 3-fluorophenol is its transformation to fluorocatechol. Following transformation of the fluorophenol to fluorocatechol, ring cleavage by catechol 1, 2-dioxygenase proceeds via an *ortho*-cleavage pathway, then defluorination occurs.

Key words: 3-fluorophenol; aerobic biodegradation; *ortho*-cleavage pathway; defluorination

由于优良的抗热和耐酸碱性, 氟代有机物广泛应用于有机化工产品的合成^[1], 其中氟苯酚是重要的化工原料、有机中间体, 主要用于合成精细化工产品^[2]如农药、医药、染料、感光材料、香料、液晶等. 氟苯酚在生产使用的过程中不可避免造成环境累积, 危害人类健康^[3], 其生物降解性研究将有助于开发治理氟苯酚环境污染的有效技术. 国外曾有用纯菌种降解氟苯酚的研究^[4], 但由于纯菌种培养和储存较难, 很难用于含氟苯酚废水治理. 本文详细研究了含氟苯酚废水的好氧生物降解性能, 提出利用活性污泥法降解含氟苯酚废水技术, 为该类废水处理提供借鉴. 利用色谱技术分析了氟苯酚好氧生物降解过程中的中间产物, 推测了其降解途径.

1 材料与方法

1.1 化学试剂

乙酸乙酯(分析纯, 上海化学试剂公司)、3-氟邻苯二酚(纯度 99.99%, 美国 Sigma 公司)、邻氟苯酚、间氟苯酚、对氟苯酚(纯度 99.99%, 上海解氏化学试剂公司)、乙腈(纯度 HPLC 级, 德国 Merck 公

司) Millr-Q Plus 高纯水(Simplicity 型纯水机, 美国 Millipore 公司).

1.2 污泥驯化

本实验中所用污泥采用活性污泥法进行驯化, 共有 3 套有机玻璃制成的装置, 可同时进行 3 种污泥的驯化, 每套生物反应器有效容积 4 L. 进水采用蠕动泵供给, 曝气采用微孔曝气机, 供气量可调, 保证混合反应器溶解氧为 2.5 mg/L 左右. 驯化装置放置于恒温室, 温度 20~25 °C.

接种污泥取自曲阳污水净化厂二沉池回流污泥, 沉淀弃去上清液, 污泥驯化采用自然驯化的方法, 驯化成功后备用. 试验用水采用人工配水, 氟苯酚是配水中唯一的有机物, 目的在于研究氟苯酚能否作为碳源和能源供微生物生长和代谢. 配水中加氯化铵和磷酸盐使 $m(C):m(N):m(P)$ 为

收稿日期: 2005-10-19; 修订日期: 2005-12-14

基金项目: 上海市科委重点研究项目(05JC14059, 05DZ22330); 污染控制与资源化研究国家重点实验室青年教师自然科学基金研究预研基金项目(PCRRYSF06001)

作者简介: 张超杰(1975~), 女, 博士, 主要研究方向为环境分析及有机污染物环境行为研究, E-mail: myrazh@mail.tongji.edu.cn

100:5:1, 添加氯化钙、硫酸亚铁、硫酸镁和硫酸锰等以满足微生物微量元素的需要。

1.3 酶分析

粗酶液的提取 用 0.03 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH7.6)洗涤浓缩后的污泥, 将洗涤后的污泥浸没在冰浴中, 用超声波在 200W 功率下破碎 5min, 20 000 r/min 高速离心后的上清液即为粗酶液, 用于双加氧酶的测定。

儿茶酚 1, 2-双加氧酶分析 试管中加入 10 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH8.0) 3.5 mL 重蒸水 0.5 mL 100 mmol/L 硫醇和 0.5 mL 粗酶液、0.5 mL 3-氟邻苯二酚, 混匀。将混合液置于 30℃ 恒温水浴中避光孵育。每隔 1 min 检测 260 nm 的吸收值变化。

儿茶酚 2, 3-双加氧酶分析 试管中加入 10 mL 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH7.5) 3.0 mL 重蒸水和 1 mL 粗酶液、1 mL 3-氟邻苯二酚, 混匀。将混合液置于 30℃ 恒温水浴中避光孵育。每隔 1 min 检测 375 nm 的吸收值变化。

1.4 分析方法

美国 HP5971 型 GC/MS 仪, 色谱柱 DB-5 石英毛细管柱(30m × 0.25mm × 0.25μm), 柱温 100℃ 保持 3min 后, 以 10℃/min 的速率升至 280℃ 并保持 5min, 气化室温度 250℃。载气为氦气, 流量 1.0 mL/min。电离电压 70eV, 电子轰击离子源, 离子源温度 200℃。进样量 0.5μL。

高效液相色谱系统为 HP-1050(美国 HP 公司), 配二极管阵列检测器(DAD), 色谱柱为 KR100-5 C18 柱(250mm × 4.6mm), 流动相为乙腈/水(洗脱梯度: 0~5min, 15% 乙腈, 5~20min, 30% 乙腈, 20~30min, 70% 乙腈), 流速 1 mL/min, 进样量 20μL, 柱温为室温, 检测波长为 220nm。以标准物质的保留时间与峰扫描光谱定性, 外标法以峰面积定量。氟离子测定采用标准氟电极法。

1.5 实验步骤

配制间氟苯酚初始浓度为 100 mg/L, 污泥浓度 3g/L, 置于摇床中恒温反应, 温度 25℃, 转速 150 r/min, 做 3 个平行样。同时做 2 个空白样品: 1 个投加氟苯酚但不接种活性污泥, 另外 1 个接种活性污泥但不投加氟苯酚。每隔 0.5h 取样以备分析测试。水样用 0.45μm 的微孔滤膜过滤水样后用高效液相分析, 将剩余水样转移到离心管中, 在 6 000 r/min 下离心 10min。上清液用 1mol/L 的 HCl 调节样品的 pH 值至 2 左右。取调好 pH 值的水样 30mL 倒入梨形分

液漏斗中, 加入一定量乙酸乙酯, 充分振荡数 min 进行萃取, 静置待其分层。水相 3 次萃取, 最后合并有机相以保证萃取效果。将萃取后的有机相用无水硫酸钠干燥, 将去除硫酸钠后的乙酸乙酯转移至干净的锥形瓶中, 用高纯氮吹干液体。然后加入 1mL 乙酸乙酯清洗瓶壁, 清洗液即为准备好的色质样品。

2 结果与讨论

2.1 间氟苯酚的生物降解性

间氟苯酚好氧生物降解曲线如图 1 所示。由图 1 可知 100 mg/L 间氟苯酚经 16h 降解, 溶液中基本检测不到间氟苯酚, 有机氟原子几乎全部降解为无机氟离子。活性污泥中的微生物可以有效地降解间氟苯酚。国内外学者曾分离得到纯菌种用于卤代苯酚的生物降解^[4,5], 但其降解效果均差于活性污泥, 且活性污泥较纯菌种易获得, 因此用活性污泥降解间氟苯酚是可行的。

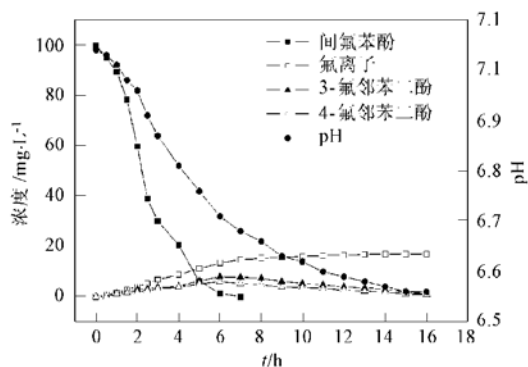


图 1 活性污泥对间氟苯酚的好氧生物降解

Fig. 1 Biodegradation of 3-fluorophenol by the acclimated activated sludge

2.2 间氟苯酚羟基化过程

图 2 为 100 mg/L 间氟苯酚好氧生物降解不同降解时间的 GC-MS 分析图。图中 4.95min 和 6.33min 的 2 个峰通过标准物质的保留时间和质谱图分析为间氟苯酚和 3-氟邻苯二酚。8.80min 的峰通过质谱图判断为 4-氟邻苯二酚。由图 2 可以看出随着好氧生物降解反应的进行, 间氟苯酚浓度逐渐降低, 3-氟邻苯二酚和 4-氟邻苯二酚逐渐升高, 从另一方面说明 3-氟邻苯二酚和 4-氟邻苯二酚确是间氟苯酚降解的羟基化产物。

图 3 为 100 mg/L 间氟苯酚好氧生物降解 4h 的高效液相分析图。通过标准物质的保留时间和光谱图分别判断保留时间为 13.370min、14.327min 和 18.133min 的 3 个峰是 3-氟邻苯二酚、4-氟邻苯二

酚和间氟苯酚. 高效液相色谱分析得出了与 GC-MS 分析相同的实验结果. 通过液相色谱分析同样可证明间氟苯酚好氧生物降解的羟基化中间产物分别是 3-氟邻苯二酚和 4-氟邻苯二酚.

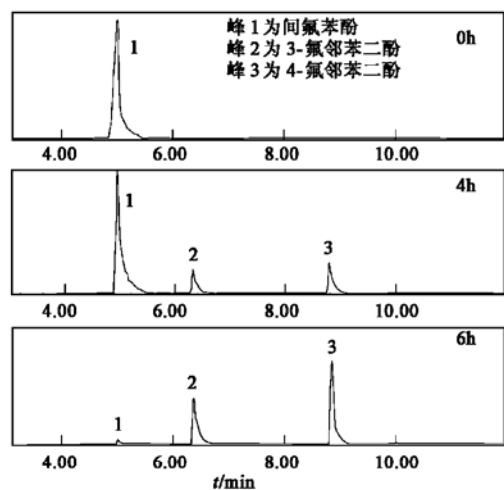


图 2 100 mg/L 间氟苯酚好氧生物降解的 GC-MS 分析
Fig. 2 GC-MS total ion chromatogram of metabolites of 100 mg/L 3-fluorophenol biodegraded by the acclimated activated sludge at different time

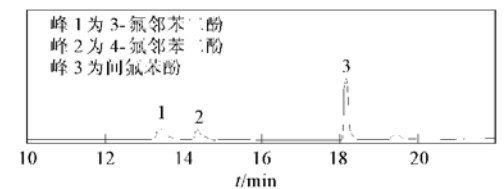


图 3 100 mg/L 间氟苯酚好氧生物降解 4h 的液相色谱分析
Fig. 3 Liquid chromatogram of metabolites of 100 mg/L 3-fluorophenol biodegraded by the acclimated activated sludge at 4h

由 GC/MS 和高效液相色谱可知, 氟苯酚好氧生物降解的中间产物主要为氟邻苯二酚, 而没有观察到邻苯二酚累积. 这可能是因为氟原子具有强烈的吸电子性, 使得苯环上的电子云密度降低, 氧化酶很难从苯环上获得电子, 在好氧条件下羟基取代氟而直接被生物降解脱氟的可能性很小. 氟苯酚好氧生物降解是首先羟基化生成易环裂的氟邻苯二酚, 脱氟是在氟邻苯二酚环裂形成非芳香类的中间产物而削弱 C—F 键后进行.

2.3 不同 pH 条件下氟苯酚好氧生物降解的羟基化中间产物

通过 GC/MS 和高效液相色谱分析, 在 pH 6.0

~ 7.5 实验范围, 随着 pH 值升高, 氟苯酚的好氧生物降解速率降低, 生成氟苯酚的羟基化产物减少. pH 值改变了氟苯酚的电性特征, pH 值升高, 氟苯酚前线最高占据轨道能量 E_{HOMO} 升高(间氟苯酚、间氟苯酚阴离子的 E_{HOMO} 分别是 - 9.34 eV、- 3.05 eV), 按照前线轨道理论, 生物氧化降解速率应该增加, 与实验结果不相符. 另一方面, pH 值改变, 除了影响微生物的活性还可能改变氟苯酚某些性质. 氟苯酚是一种有机弱酸, 溶液为碱性时, 部分离解为 H^+ 和氟苯酚阴离子, 而与活性污泥表面所带的负电荷之间产生斥力, 接触微生物的有机物量减少, 使降解速率下降. 实验结果表明与电性参数相比, 氟苯酚好氧生物降解过程中溶解吸附起到了主要作用, 与文献[6]结论相符.

在碱性条件, 氟苯酚的降解产物呈现褐色, 这与二酚的特性相符, 也从另一侧面说明了在氟苯酚好氧生物降解的过程中产生了氟邻苯二酚, 即有羟基化产物累积, 证明了 2.2 的分析结果. 在不同 pH 条件下, 观察间氟苯酚好氧生物降解的羟基化中间产物, 其结果如表 1 所示.

表 1 不同 pH 值条件下 100 mg/L 间氟苯酚好氧生物降解 6h 的中间产物

Table 1 Intermediate products of 100 mg/L 3-fluorophenol biodegraded by the acclimated activated sludge for 6h at different pH value			
pH	3-氟邻苯二酚 (峰面积)	4-氟邻苯二酚 (峰面积)	3-氟邻苯二酚/ 4-氟邻苯二酚
6.0	945.142	557.034	1.697
6.5	707.141	243.348	2.906
7.0	690.113	87.231	7.911
7.5	487.551	没检出	/

由表 1 可以看出: 在实验的 pH 范围内随着 pH 升高, 中间产物 3-氟邻苯二酚与 4-氟邻苯二酚的比值逐渐增加, pH 增加到 7.5 时已没有检测到中间产物 4-氟邻苯二酚. 中间产物 3-氟邻苯二酚和 4-氟邻苯二酚分别是间氟苯酚 C_2 和 C_6 在加氧酶作用下羟基化形成的. 反应中心的电子云密度越大, 反应的几率越大. 间氟苯酚阴离子的 C_2/C_6 电子云密度比 (0.9565) 大于间氟苯酚的 C_2/C_6 电子云密度比 (0.1364), 因此随着溶液碱性化 C_2 位较 C_6 位反应几率增大, 其产物的比值(3-氟邻苯二酚/4-氟邻苯二酚)也相应增大.

2.4 氟苯酚环裂解途经

在 GC-MS 中只观察到 3-氟邻苯二酚和 4-氟邻

苯二酚 2 种中间产物, 它们进一步降解的中间产物没有捕捉到, 这可能是由于中间产物 3-氟邻苯二酚和 4-氟邻苯二酚累积浓度低, 其开环裂解的进一步中间产物浓度更低, 未检测到的缘故. 邻苯二酚好氧生物降解的羟基化中间产物可通过邻位裂解或间位裂解 2 种途径进一步降解^[7,8], 为进一步研究间氟苯酚好氧生物降解过程, 设计如下实验.

考虑到特定的活性污泥中含有固定的酶系, 不管有机物的浓度高低, 其降解途径是一致的. 为深入研究间氟苯酚的降解机理, 同样用 3 g/L 间氟苯酚驯化的活性污泥降解 128 mg/L 3-氟邻苯二酚, 简化间氟苯酚生物降解途径, 让生化反应从 3-氟邻苯二酚开始, 并人为地提高中间产物 3-氟邻苯二酚浓度, 探讨 3-氟邻苯二酚和 4-氟邻苯二酚的环裂解的途径.

将 128 mg/L 3-氟邻苯二酚降解产物三甲基硅烷化得到如图 4 所示的色谱图. 通过质谱判断图中峰 3 和峰 4 为 3-氟邻苯二酚邻位开环产物(2-氟粘康酸的顺反异构体), 峰 2 是 2-氟粘康酸环化脱氟后的产物. 从以上分析可知间氟苯酚羟基化的产物是通过邻位开环降解. 文献[9]通过¹⁹F NMR 也捕捉到了氟邻苯二酚邻位开环的中间产物氟粘康酸, 从另一侧面证明了该结论的正确性.

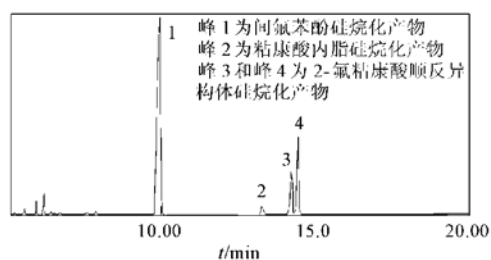


图 4 128 mg/L 3-氟邻苯二酚好氧生物降解 8h 的 GC-MS 分析

Fig. 4 GC-MS total ion chromatogram of metabolites of 128 mg/L 3-fluorocatechol biodegraded by the acclimated activated sludge at 8h

按照儿茶酚 2, 3-双加氧酶(间位开环的关键酶)测试方法, 375nm 未有明显的增加, 说明间氟苯酚的活性污泥中不含有儿茶酚 2, 3-双加氧酶, 从而排除间氟苯酚好氧生物降解是间位降解的历程, 从另一侧面说明是邻位降解历程. 儿茶酚 1, 2-双加氧酶催化 3-氟邻苯二酚羟基内部开裂, 形成氟代粘康酸. 这一结论与 GC-MS 的实验结果相符.

通过色谱分析间氟苯酚好氧生物降解的历程如图 5 下所示.

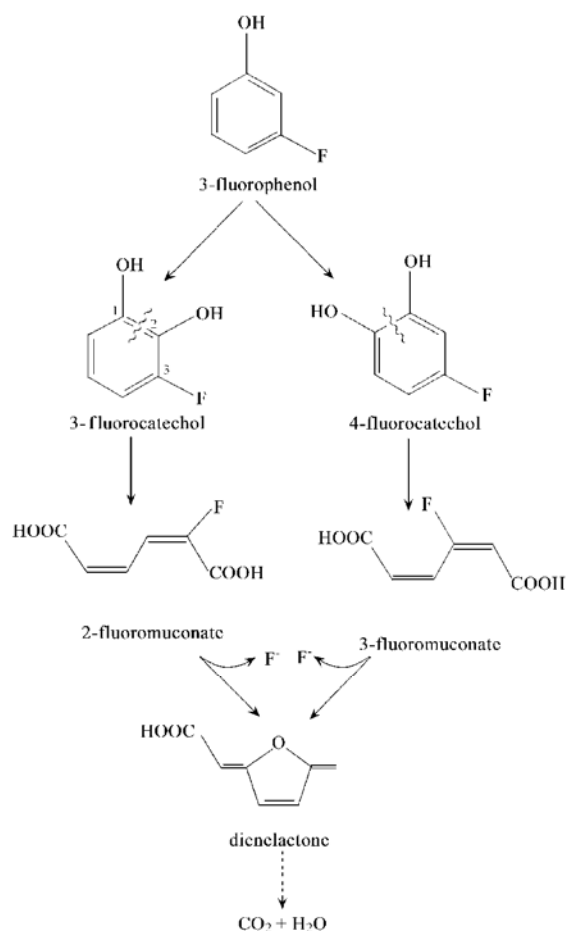


图 5 间氟苯酚好氧生物降解历程

Fig. 5 Proposed degradation pathway of 3-fluorophenol by the acclimated activated sludge

3 结论

(1) 间氟苯酚好氧生物降解性较好, 可以作为唯一碳源和能源被微生物利用, 活性污泥中的微生物可有效降解间氟苯酚.

(2) 色谱分析结果表明间氟苯酚首先羟基化生成氟邻苯二酚, 羟基化中间产物通过邻位途径裂解开环, 然后环化脱氟.

参考文献:

- [1] Edwards P N. Uses of fluorine in chemotherapy[A]. In: Banks R E, Smart B. Organofluorine Chemistry [C]. New York: Principles and Commercial Applications Plenum Press, 1994. 501~ 542.
- [2] 王丽华, 杨宇, 谷晓丽. 对氟苯酚的合成研究[J]. 辽宁化工, 2002, 31(5): 196~ 197.
- [3] Key B D, Howell R D, Criddle C S. Fluorinated organics in the biosphere[J]. Environmental Science and Technology, 1997, 31(9): 2445~ 2454.

- [4] Brooks S J, Doyle E M, Hewage C, *et al.* Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F 6 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, **64**(4): 486~ 492.
- [5] Denizli A , Cihangir N , Tüzmen N , *et al.* Removal of chlorophenols from aquatic systems using the dried and dead fungus *Pleurotus sajor caju* [J]. *Bioresource Technology*, 2005, **96**(1): 59~ 62.
- [6] 张超杰,周琪,孙晓宇. 氟苯酚好氧生物降解性能的研究[J]. 复旦大学学报, 2004, **43**(6): 1102~ 1106.
- [7] Sung B H, Lee L M, Bae K Y, *et al.* Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301 [J]. *Biodegradation*, 1996, **7**(6): 463~ 469.
- [8] Farrell A. Monochlorophenol degradation by *Pseudomonas putida* CP1 and mixed microbial population [D]. Dublin: Dublin City University. 2000. 20~ 23.
- [9] Boersma M G, Solyanikova I P, Berkel W V, *et al.* ^{19}F NMR metabolomics for the elucidation of microbial degradation pathway of fluorophenols [J]. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **26**: 22~ 34.

《环境科学》征稿简则

1. 来稿报道成果要有创新性,论点明确,文字精炼,数据可靠.全文不超过 8000 字(含图、表、中英文摘要及参考文献).国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、国际合作项目或其它项目请在来稿中注明(在首页以脚注表示).

2. 稿件请按 GB 7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》中学术论文的规范撰写.论文各部分的排列顺序为:题目;作者姓名;作者工作单位、地址、邮政编码;中文摘要;关键词;中图分类号;英文题目;作者姓名及单位的英译名;英文摘要;关键词;正文;致谢;参考文献.

3. 论文题目应简练并准确反映论文内容,一般不超过 20 字,少用副标题.

4. 中文摘要不少于 300 字,以第三人称写.摘要内容包括研究工作的目的、方法、结果(包括主要数据)和结论,重点是结果和结论.英文摘要与中文对应,注意人称、时态和语言习惯,以便准确表达内容.

5. 前言包括国内外前人相关工作(引文即可)和本工作的目的、特点和意义等.科普知识不必赘述.

6. 文中图表应力求精简,同一内容不得用图表重复表达,要有中英文对照题目.图应大小一致,曲线粗于图框,图中所有字母、文字字号大小要统一.表用三线表.图表中术语、符号、单位等应与正文一致.

7. 计量单位使用《中华人民共和国法定计量单位》(SI).论文中物理计量单位用字母符号表示,如 mg(毫克),m(米),h(小时)等.科技名词术语用国内通用写法,作者译的新名词术语,文中第一次出现时需注明原文.

8. 文中各级标题采用 1, 1.1, 1.1.1 的形式,左起顶格书写,3 级以下标题可用(1), (2) ……表示,后缩 2 格书写.

9. 文中外文字母、符号应标明其大小写,正斜体.生物的拉丁学名为斜体.缩略语首次出现时应给出中文全称,括号内给出英文全称和缩略语.

10. 未公开发表资料不列入参考文献,可在出现页以脚注表示.文献按文中出现的先后次序编排.常见文献书写格式为:

期刊:作者(外文也要姓列名前).论文名[J].期刊名,年,卷(期):起页~止页.

图书:作者.书名[M].出版地:出版社,年.起页~止页.

会议文集:作者.论文名[A].见(In):编者.文集名[C].出版地:出版社(单位),年.起页~止页.

学位论文:作者.论文名[D].保存地:保存单位,年份.

报告:作者.论文名[R].出版地.出版单位,出版年.

专利:专利所有者.专利题名[P].专利国别:专利号,出版日期.

11. 来稿文责自负,切勿一稿多投.编辑对来稿可作文字上和编辑技术上的修改和删节.在 3 个月内未收到本刊选用通知,可来电询问.对未刊稿件一般不退,请作者自留底稿.

12. 投稿请附作者单位详细地址,邮编,电话号码,电子邮箱等.编辑部邮政地址:北京市 2871 信箱;邮编:100085;电话:010-62941102, 010-62849343;传真:010-62849343;E-mail: hjkx@rcees.ac.cn;网址:www.hjkx.ac.cn