氯苯类化合物的生物降解

甘平 ,樊耀波 ,王敏健(中国科学院生态环境研究中心 ,北京 100085)

摘要 :经过 2 个月的驯化 ,从某染料厂和某毛纺厂活性污泥中分离出能够生长于 1 ,4- 二氯苯 、1 ,2 ,4- 三氯苯和六氯苯的 4 种微生物 .通过测定该混合菌降解氯苯类化合物过程中的累积好氧量 ,微生物生长曲线及降解产物 Cl^- 的释放 ,证明在好氧条件下该混合菌能够以 1 ,4- 二氯苯和 1 ,2 ,4- 三氯苯为唯一碳源和能源 ,降解产物 Cl^- 浓度的变化与微生物生长周期有关 .通过好氧振荡瓶培养法测得 3 种氯苯的生物降解顺序为 :1 ,4- 二氯苯[356. 7μg/ (L• d)] > 1 ,2 , 4- 三氯苯[110 .4μg/ (L• d)] > 六氯苯[~ 6μg/ (L• d)] ,说明氯取代数越多 ,氯苯类化合物越难被好氧降解 .

关键词 :氯苯类化合物 ;1 ,4- 二氯苯 ;1 ,2 ,4- 三氯苯 ;六氯苯 ;生物降解
中图分类号 : X172 文献标识码 : A 文章编号 :0250-3301 (2001) 03-04-0093

Experiment of Biodegradation of Chlorobenzenes

Gan Ping , Fan Yaobo , Wang Minjian (Research Center for Eco-Environmental Sciences , Chinese Acadamy of Sciences , Beijing 10085)

Abstract : Four strains of microorganisms which were able to grow at the presence of 1 ,4- dichlorobenzene 1 ,2 ,4- trichlorobenzene and hexachlorobenzene were isolated from the sludge collected from two different sites after incubating about 2 months . During the growth of the mixed microorganisims on chlorobenzenes , the accumulating consumption of oxygen , the microbial population curve and the concentration of released Cl^- were investigated . The result showed that the mixed microorganisms were able to utilize 1 ,4- dichlorobenzen and 1 ,2 ,4- trichlorobenzene as sole carbon source and energy source . The concentration of released Cl^- may depend strongly on the activity of the living cells . The order in which the chlorobenzenes were readily degraded was 1 ,4- dichlorobenzenez[356 .7μg/ (L• d)] > 1 ,2 ,4- trichlorobenzene[110 .4μg/ (L• d)] > hexachlorobenzene[~ 6μg/ (L• d)] .The number of the substituted chlorine on the chlorobenzenes directly resulted in the resistance to biodegradation .

Keywords : chlorobenzenes ; 1 ,4- dichlorobenzene ; 1 ,2 ,4- trichlorobenzene ; hexachlorobenzene ; biodegradation

氯苯类化合物属中度挥发的有机污染物 ,难以被微生物降解 ,给定量研究氯苯类化合物的生物降解带来一定困难 .目前 ,国内外对氯苯类化合物降解研究主要集中于通过酶活性分析法定性探讨生物降解途径[1~7] .在作定量研究时 ,也绕过对目标化合物的直接测定 ,而通过测定非特性参数 ,如累积好氧量[8~9]等来表征氯苯类化合物的生物降解 ,本研究首先从污水处理厂的活性污泥中驯化出能够以氯苯类化合物为生长基质的混合菌种 ,并从不同角度研究了氯苯类化合物的生物降解 .还通过直接测定目标化合物的减少来定量表征其生物降解性 .

1 试验材料和方法

1.1 菌种的驯化

将北京染料厂二沉池回流污泥和清河毛纺厂气浮池污泥混合 ,曝气 24 小时 ,静置 .滤去上清液 ,取下一层浓稠污泥 5 ml 接种至已灭菌的含有 50 ml 无碳培养基和 5 ml 酵母膏的 250 ml 磨口三角瓶中 ,再加入一定量的用丙酮助溶的 1 , 4- 二氯苯 ,1 ,2 ,4- 三氯苯和六氯苯为驯化物 ,加塞并用封口膜密封 ,置于摇床 30 ℃振荡 ,频率为 150r/ min ,每 3d 进行一次转移接种 ,并逐渐增加培养基中氯苯类的浓度 ,直至最终浓度达到 20 mg/l ,酵母膏的用量也逐渐减至 0 .每个浓度做 2 个转移接种 ,每次接种均做不加菌种的

基金项目 :国家自然科学基金资助项目(29677027) ;环境模拟与污染控制国家重点联合实验室开放基金支持项目
作者简介 :甘平(1974 ~) ,硕士研究生 ,主要研究方向为有机污染物的降解和迁移 .
收稿日期 :2000-07-04

对照.

无碳培养基(L): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 7g, KH_2PO_4 2g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5mg, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 2.5mg, $Ca(H_2PO_4)_2$ 14mg, $FeSO_4$ 0.13mg, pH = 7.

1.2 平板划线分离和涂布分离

将最后一轮驯化的培养液用涂布法接种于琼脂平板,30 ℃恒温培养,出现不同菌落再进行划线分离,直至分离出单一菌落时,分别挑入斜面,4 ℃冰箱中保存.

平板培养基(L):牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 20g, pH = 7.0.

1.3 菌种的活化和菌悬液的制备

分别挑取斜面上的菌落少许,混合接种于灭菌后的活化培养基中,于 30 ℃下摇床培养 48h.活化后的菌液转移至离心管中,以 4000r/min 离心 10min,倾去上清液,再用磷酸盐缓冲溶液清洗 3 次,最后使菌体悬浮于缓冲液中制成菌悬液.

活化培养基(L):牛肉膏 5g,蛋白胨 10g, NaCl 5g, pH = 7.0.

磷酸盐缓冲溶液:(A)称取 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.56g 溶于 50ml 蒸馏水中;(B)称取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 7.16g 溶于 100ml 蒸馏水中;在(B)中加入约 13.64ml 的(A).

1.4 水中氯苯类生物降解的累积好氧量测定

用于记录生物降解过程中累积耗氧量的 BODtrak 仪有压力敏感探头,能够全过程记录培养期间氧气的消耗.在 473ml 螺口瓶中分别加入 400ml 无碳培养基,20ml 菌悬液,再各自加入唯一碳源 1,4-二氯苯,1,2,4-三氯苯和六氯苯,使其浓度分别为 1,4-二氯苯 20.0mg/L,1,2,4-三氯苯 19.2mg/L,六氯苯 0.95mg/L,并做不加碳源的微生物内源呼吸累积好氧量以作对照,30 ℃下培养 7d.

1.5 微生物生长曲线及氯离子浓度的测定

采用好氧振荡瓶培养,用吸光度值表征微生物的生长量,用降解过程中脱除的 Cl^- 浓度变化来表征化合物的降解.实验条件温度 30 ℃,反应瓶容积 150ml,反应液体积 36ml,1,4-二氯苯浓度 5mg/L,摇床转速 150r/min.开始实验后每隔 24h 取出一个培养样品以供测定.采用 722 光栅分光光度计来测定培养液的吸光度,波长 $\lambda = 580nm$(培养液在此波长处有最大吸收值).Cl^- 浓度测定用日立 655A-52 型离子色谱仪,测定前将样品经 0.5μm 的微孔滤膜过滤.

1.6 目标化合物浓度的测定

采用好氧振荡瓶培养法,分别研究 1,4-二氯苯、1,2,4-三氯苯和六氯苯的生物降解,以目标化合物的减少来表征降解浓度.试验条件为:温度 30 ℃,反应瓶容积 250ml,反应液体积 57ml,摇床转速 150r/min,试验周期 18d;化合物浓度 1,4-二氯苯 8.2mg/L,1,2,4-三氯苯 8.64mg/L,六氯苯 0.883mg/L.

水中氯苯类的测定采用液-液萃取,净化后用 HP4890 毛细管气相色谱法测定化合物浓度.采用电子捕获检测器,毛细管内径 0.25mm,柱长 30m,进样器温度 250 ℃,检测器温度 300 ℃,加热区初温 80 ℃,保持 2min 后,以 10 ℃/min 的速率升到 210 ℃,再以 15 ℃/min 升到 230 ℃,保持 5min,使柱中高沸点物质流出.

2 结果与讨论

2.1 菌种的驯化

(1)微生物生长的判断 为了避免挥发,菌种的驯化和培养是在封闭体系中进行的,为了保证充足的氧气,采用大体积小液量的体系,上层空间的氧量足以维持培养周期内微生物所需.每一个驯化周期结束时将培养物以无菌操作移接至新鲜培养基中,进入下一个培养周期.微生物生长的判断采用目测法和 pH 值比较法,即观察培养液是否出现可见的白色絮状浑浊,而且当将少量培养物接种到含有同样浓度的同种化合物的新鲜培养基上时,这种浑浊又会重新出现,而空白对照反应瓶中却不出现这种可恢复的浑浊现象.另外,接种前后培养基的 pH 值有所下降,这是因为微生物生长后产生酸性代谢产物所致.这些都能够证明微生物的生

长.

(2) 菌种鉴定　经过对从某染料厂和某毛纺厂的活性污泥的筛选驯化最终分离出 4 株菌种,它们能够生存于含有氯苯类的培养基中.在牛肉膏琼脂平板上,各自的菌落特征分别为:1 号菌斑圆形,表面光滑,半透明,乳白色,经检验是革兰氏阴性球菌;2 号菌圆形,表面光滑,土黄色,半透明,经检验是革兰氏阴性球菌;3 号菌白色,表面粗糙,圆形,经检验是革兰氏阴性球菌;4 号菌圆形,光滑,半透明,浅粉色,经检验是格兰氏阳性球菌.

(3) 人工驯化的理论解释　氯苯类化合物通常被认为是环境外来化合物,由于自然界中的微生物缺乏相应的降解酶,所以难以被微生物利用.但是利用微生物的遗传变异特性经过人工驯化,在氯苯类化合物的诱导下,有些微生物通过变种或形成诱导酶,逐步改变自身以适应环境,产生降解或部分降解氯苯类化合物的能力,从中获取生长所需要的碳源和能源,逐渐形成优势菌种.

2.2　单一基质降解的累积耗氧量

微生物的耗氧量是反应氯苯类化合物生物降解性的一个重要指标.本研究分别以 1,4-二氯苯、1,2,4-三氯苯和六氯苯为唯一碳源和能源,测定微生物的积累好氧量,并作了不加目标化合物的微生物内源呼吸好氧量作为对照.结果如图 1 所示.

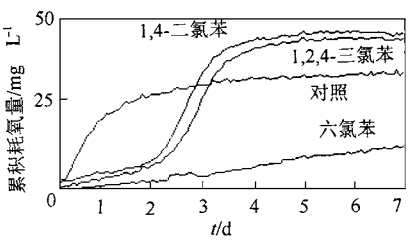

图 1　不同氯苯类化合物的累积耗氧量曲线

Fig. 1　Accumulating consumption oxygen of chlorobenzenes

从图 1 可以看出:

(1) 1,4-二氯苯、1,2,4-三氯苯的累积耗氧量曲线均高于不加碳源的微生物内源呼吸线,说明经过驯化的混合菌能以 1,4-二氯苯和 1,2,3-三氯苯为唯一碳源和能源.但微生物利用二氯苯的耗氧量明显高于三氯苯,说明二氯苯生物降解性强于三氯苯.这是因为氯取代基有很强的电负性,能强烈吸引电子,使苯环成为一个疏电子环,亲电的氧化酶很难从苯环上获得电子而发生氧化反应,在有氧条件下不易为微生物所利用.氯取代数越多,苯环上的电子云密度越低,越难被氧化.另外氯苯类化合物的水溶性随着氯取代数的增多而减小,1,4-二氯苯溶解度为 4.79×10^{-4} mol/L,1,2,4-三氯苯溶解度为 1.07×10^{-4} mol/L,溶解度的减小也将影响其生物降解性,使其变小.

(2) 六氯苯累积耗氧量曲线低于对照的微生物内源呼吸线,说明在饱合溶解度状态下,六氯苯对所驯化的微生物有抑制作用,是一类化学性质极其稳定的化合物,另外六氯苯水溶性极低,也不易为微生物摄取.

(3) 1,4-二氯苯、1,2,4-三氯苯的累积耗氧量曲线均有明显的迟滞期,可能因为以多基质驯化的菌种在单一基质条件下,需要一定时间的适应,经过几代变异后才能生成催化该单一基质的酶或酶系.另一个原因是在转移接种过程中斜面培养基不含氯苯类化合物,缺乏相应的选择压力,使其降解能力部分丧失,在投加特定氯苯后还需要一定时间的适应性驯化.

2.3　微生物的生长和 Cl^- 的释放

微生物在对氯苯类化合物的降解过程中获得生长所需的碳源和能源,并不断增殖;而降解过程伴随着脱氯作用.通过测定微生物的生长曲线和氯离子浓度的变化来了解氯苯类的生物降解与微生物生长之间的关系.结果见图 2.

由图 2 可以看出微生物的繁殖经历 4 个时期:迟滞期、对数期、平台期和衰老期:

(1) 迟滞期(第 0 ~ 2d)　将菌悬液接种到含有目标污染物的新鲜培养基时,开始一段时间内微生物并不繁殖,细胞数目几乎不增长,因此吸光度值没有明显变化;此时细胞有较强生理活性,微生物体积增长很快,其能量来自于目标污染物的不断降解,因此体系中代谢产物氯离子浓度有所增加.

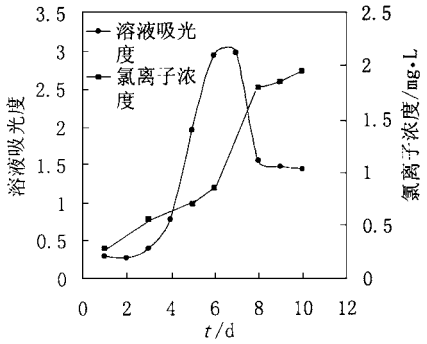

图 2 微生物的生长和氯离子的释放

Fig. 2 Grouwth of microorganisms and Cl^- release

(2) 对数期(第 2 ~ 6d) 这一时期体系的吸光度值和氯离子浓度均以较大速度增加.这是因为此时菌体分裂最快,菌体健壮、代谢旺盛.菌数以几何级数增加,所以称对数期.在此时期,氯苯类化合物降解较快.

(3) 稳定期(第 6 ~ 7d) 这一时期菌体生长速率逐渐下降,同时菌体死亡速度不断上升,当菌体增加的数量和死亡的数量几乎相等时则进入稳定期,此时吸光度值变化相对稳定;由于新陈代谢继续进行,随着代谢产物的积累,Cl^- 浓度仍不断增加,但增加速率放慢.稳定期的出现是由于培养基内营养物质的减少和有毒代谢产物(如氯代儿茶酚)的积累.

(4)衰老期(8 ~10d) 在此时期体系吸光度值不断减小,因为菌体死亡速率大量增加,超过菌体繁殖速率,微生物总数逐渐减少;由于菌体生理活性不断下降,新陈代谢速率放慢,Cl^- 浓度将会以一个极低的速率增加,并趋向一个平衡值.

2.4 通过目标化合物浓度变化表征水中氯苯类化合物的生物降解

氯苯类化合物亲脂性较强,而亲水性较弱,用液-液萃取法定量测定水中痕量氯苯类化合物有较大的浓缩倍数,其回收率大于 65 %.通过 2 轮水中氯苯类生物降解的好氧摇瓶实验,发现在 30 ℃下 1,4-二氯苯、1,2,4-三氯苯的降解速率分别为 356.7μg/(L·d)、110.4μg/(L·d)和 ~ 6μg/(L·d)。同样说明氯原子的引入是造成氯代芳香化合物难以生物降解的主要原因.随着氯取代数的增加,其生物降解性逐渐降低.

3 结论

(1) 以 1,4-二氯苯、1,2,4-三氯苯和六氯苯为混合基质,经过 2 个月的驯化,从某染料厂和某毛纺厂的混合污泥中分离出 4 种微生物.

(2) 微生物的累积耗氧量曲线表明,驯化后的微生物能分别以 1,4-二氯苯和 1,2,4-三氯苯为唯一碳源和能源,但六氯苯抑制微生物的呼吸.

(3) 以 1,4-二氯苯为生长基质时,微生物的生长经历迟滞期、对数期、稳定期和衰老期.体系中氯离子浓度与微生物代谢活性有关.

(4) 氯苯类化合物降解的难易顺序为 1,4-二氯苯[356.7μg/(L·d)] > 1,2,4-三氯苯[110.4μg/(L·d)] > 六氯苯[~ 6μg/(L·d)],六氯苯在培养周期内几乎不降解.说明氯原子的引入是氯苯类难以生物降解的原因,氯取代数越多,越难被微生物氧化.

参考文献:

1 Spain J C, Nishino S F. Degradation of 1,4-Dichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. Applied and Environmental Microbiology, 1987, **53**(5): 1010 ~ 1019.

2 Spless E, Sommer C, Gorisch H. Degradation of 1,4-Dichlorobenzene by *Xanthobacter flavus* 14pl. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61**:3884 ~ 3888.

3 Sander P, Wittich R M, Fortnagel P, Wilkes H, Francke W. Degradation of 1,2,4-Trichloro and 1,2,4,5-Tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* Strains. Applied and Envronmental Microbiology, 1991, **57**(5):1430 ~ 1440.

4 Potrawfke T, Timmis K N, Wittich R M. Degradation of 1,2,3,4-Tetrachlorobenzene by *Pseudomonas chlororaphis* RW71. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**(10):2574 ~ 2552.

5 Middeldorp, PJM De-Wolf et al. Enrichment and properties of a 1,2,4-trichlorobenzene-dechlorinating methanogenic microbial consortium. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63**(4):1225 ~ 1229.

6 Middeldorp, PJM De-Wolf et al. Enrichment and properties of a 1,2,4-trichlorobenzene-dechlorinating methanogenic microbial consortium. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63**(4):1225 ~ 1229.

7 Potrawfke Th Timmis, KN Wittich R-M. Degradation of 1,2,3,4-tetrachlorobenzene by Pseudomonas chlororaphis RW71. Applied and Environmental Microbiology, 1998, **64**(10):3798 ~ 3806.

8 瞿福平等.氯苯类有机物生物降解性及共代谢作用研究.中国环境科学,1997,**17**(2):142 ~ 144.

9 瞿福平,张晓健,何苗,顾夏声.氯苯类同系物共基质条件下相互作用研究.环境科学,1998,**19**(4):52 ~ 55.

10 瞿福平,张晓健,何苗,顾夏声.氯苯驯化活性污泥对同类有机物的好氧降解性比较研究.环境科学,1997,**18**(4):21 ~ 24.