

甲醇为共代谢基质时四氯乙烯的厌氧生物降解

李惠娣, 杨琦, 尚海涛

(中国地质大学水资源与环境学院, 北京 100083)

摘要: 四氯乙烯(PCE)在厌氧条件下通过还原脱氯发生生物降解. 本文研究以甲醇作为共代谢基质时 PCE 的降解情况. 结果表明: 在微生物的作用下 PCE 还原脱氯为 TCE 和 DCEs, 可能有 VC 和乙烯. 因此, DCEs、VC 和乙烯可能是 PCE 降解的终产物. PCE、TCE 的降解和 TCE 的生成都符合准一级动力学. PCE 和 TCE 的反应速率常数 K 分别为 0.8991 d^{-1} 和 0.068 d^{-1} ; 半衰期分别为 0.77d 和 10.19d, TCE 的生成速率常数为 0.1333 d^{-1} . 表明 PCE 的脱氯速度大于 TCE, 而 TCE 的生成速率大于降解速率, 所以在整个实验期间都有 TCE 存在.

关键词: 共代谢基质; 四氯乙烯; 厌氧条件; 生物降解

中图分类号: X783 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)03-0084-05

Anaerobic Biodegradation of Tetrachloroethylene with Methanol as Co-metabolism Substrate

LI Huì-di, YANG Qi, SHANG Hāi-tao

(School of Water Resources and Environment, China University of Geosciences, Beijing 100083, China)

Abstract: Tetrachloroethylene (PCE) is biodegraded by reductive dechlorination in anaerobic condition. PCE degradation by methanol as co-metabolism substrate was studied. Results show that PCE was dechlorinated reductively to DCEs and TCE, probable VC and ethene. DCEs, VC and ethene are probably end products. It also shows that PCE, TCE degradation and TCE production fit in first order kinetics. Reaction rate constants for PCE and TCE were 0.8991 d^{-1} and 0.068 d^{-1} respectively. Half-life were 0.77d and 10.19d respectively. TCE production rate constant was 0.1333 d^{-1} . Rate constants show that PCE is degraded more rapidly than TCE. Production rate of TCE is higher than degradation rate of TCE, so TCE exists through the experiment.

Key words: co-metabolism substrate; tetrachloroethylene; anaerobic condition; biodegradation

PCE 是一种氯代溶剂, 可广泛用于干洗和脱脂等行业^[1], 也是一种“三致”物质, 它被美国 EPA 列为优先控制污染物之一^[2]. PCE 的不合理处置和泄漏使其成为地下水中常见的有机污染物之一^[1]. 常见的 PCE 去除方法有物理、化学和生物法. 物理方法只能将 PCE 从一个地方转移到另外的地方, 不能从环境中将它根本去除^[3]; 化学方法虽然处理效率高, 但费用也较高^[4]; 生物法操作简单、易行, 处理费用低廉愈来愈受到人们的关注. 许多研究资料表明^[5,6]: PCE 在好氧条件下很难发生生物降解, 但在厌氧条件下通过还原脱氯发生生物降解; 而且在 PCE 为唯一碳源时不发生降解^[7]或以较慢速度降解^[8], 因此现在研究最多的是在共代谢条件下 PCE 的生物降解. 国外许多研究资料表明^[9~11]: 多种物质做为共代谢基质时, 以甲醇为共代谢基质时 PCE 的降解速率较高, 而且在一些情况下还能降解为乙烯等不含氯的产物^[3]. 因此本实验选用甲醇做为共代谢基质, 研究 PCE 的降解情况, 以期对 PCE 的降解有一个较清楚的认识并为 PCE 的降解研究提供科学依据.

1 方法和材料

1.1 实验材料和仪器

(1) 化学物质 被水饱和的 PCE 储备液, 液体 PCE 来自于北京益利精细化学品的分析纯. 其它的化学物质都是化学纯.

(2) 培养基的组成 无机盐培养基的组成(g/L): NH_4Cl , 0.32; KH_2PO_4 , 0.063; CaCl_2 , 0.063; Na_2CO_3 , 0.1316; 微量元素培养基的组成(mg/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5000; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6000; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1036.88; H_3BO_3 , 100; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50; $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 879.47; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5000; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 640; 甲醇(mL/L): 0.77.

(3) 实验仪器 HP6890 气相色谱仪、HP7694 自动进样器、恒温水浴箱、带橡胶塞的抽滤瓶和集

收稿日期: 2003-05-20; 修订日期: 2003-07-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40102027)

作者简介: 李惠娣(1974 ~), 女, 博士生, 主要从事水资源及环境工程方面的研究.

气瓶。

(4)仪器条件 进样口温度,160℃;色谱柱柱流量,1.0 mL/min;炉温,70℃;保留时间,10 min;检测器,ECD;温度,300℃;顶空部分:瓶区,50℃;Loop:60℃;传输线,70℃;瓶平衡时间,10 min;注射时间,1.00 min;振摇时间,5 min;载气流量,约 30 mL/min^[12]。此方法的检出限为 0.05 μg/L。

1.2 实验方法

(1)厌氧污泥的驯化 培养好的厌氧污泥最初并不一定能降解 PCE 或不能以较高速率降解 PCE,在这种情况下就要对培养好的厌氧污泥进行驯化,使其以较高速率对目标污染物进行降解。驯化实质上是在一定的选择压力下,污泥中能利用目标污染物的微生物得到定向富集,而不能利用目标污染物的微生物则在群体中逐渐消失的过程,同时由于污泥是多种微生物的共生群,不同种类的微生物之间可以发生基因交换,这样可以同时培养出能降解其还原脱氯产物的细菌,使 PCE 发生完全矿化,使其

对环境的危害减到最小。

(2)厌氧污泥的驯化方法 本次实验的驯化采用间歇方式进行。取 400 mL 培养好的厌氧污泥于 700 mL 的抽滤瓶中,然后加入 250 mL 的上述无机盐培养液,同时按每 L 无机盐中 0.5 mL 的量加入微量元素,然后将溶于甲醇的 PCE 加入培养瓶中,迅速盖好塞子进行驯化,实验装置如图 1。实验过程中驯化进程安排如表 1。

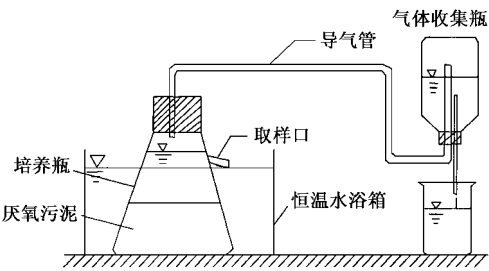


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram for testing

表 1 甲醇为共代谢基质时污泥驯化的进程安排

Table 1 Methanol as co-metabolism substrate arrange of sludge acclimation

驯化时间	第 0 天	第 5 天	第 12 天	第 20 天	第 30 天	第 37 天	第 44 天
每次所加 PCE 的量/ mg·L ⁻¹	1	1	1	3	3	3	3

(3) PCE 的降解实验 实验时先加入无机盐培养液,然后加入一定量的 PCE 储备液,让其稳定 20 min 后测量上清液中的氯代烃含量。每隔一定时间测量上清液中的 PCE 及其降解产物。每次取样时从培养瓶侧面的旁通管中取液相样 0.4 mL,然后加入到 HP 顶空瓶中,迅速用聚四氟乙烯膜封盖,用气相色谱测量 PCE 及其降解产物。

2 实验结果与讨论

2.1 污泥的驯化

根据实验时的进程安排,每次进水在停留一定的时间后分析其出水中氯代烃的含量,测试分析结果如图 2。

图 2 为去除率随驯化时间的变化,驯化时每次重新加入 PCE 之前,测量其出水中 PCE 的浓度,当出水中 PCE 的去除达 90% 以上时,即可继续加入 PCE,当这一浓度的出水中 PCE 的去除率在经过几次驯化达到稳定时,就可以继续加入下一个浓度的 PCE。如此反复,直至达到驯化想要的浓度。

图 3 为相应驯化过程中 PCE 的降解产物。从图 3 中可以看出,驯化开始的第 12 天即有 TCE 生成,

第 20 天有 DCEs 生成,说明污泥中的微生物很快适应了低浓度的 PCE 而使其发生降解。从降解产物 (TCE、DCEs) 不断增加可知,微生物适应 PCE 后降解速率逐渐增加,而且微生物也逐渐适应了 TCE 而使其发生降解并转化成 DCEs。

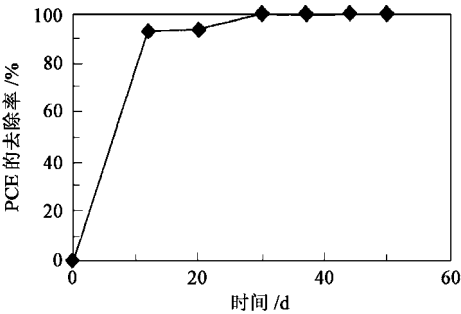


图 2 驯化过程中液相 PCE 的去除率

Fig. 2 PCE removal efficiency during acclimation

2.2 PCE 的降解实验

2.2.1 降解过程曲线

实验前加入一定量被水饱和的 PCE 储备液,迅速盖上橡胶塞,让其稳定 20 min,然后取样测量液相

中 PCE 的浓度.每隔一定时间测量液相 PCE 及其降解产物的浓度,结果如图 4.

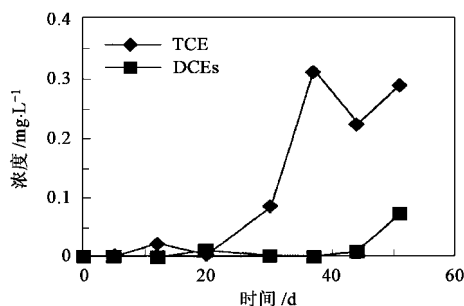


图 3 驯化过程中 PCE 的降解产物

Fig. 3 Degradation products of PCE during acclimation

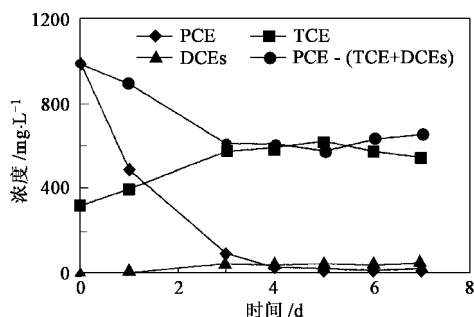


图 4 实验过程中液相 PCE 降解产物及与初始 PCE 的关系

Fig. 4 Relation on liquid PCE, degradation products and initial PCE

从图 4 可以看出,加入 PCE 20 min 后取样进行测量时,有 TCE 生成,说明实验开始时反应速度较快,PCE 的降解和 TCE 的生成没有滞后.实验进行到第 3 天时,PCE 的去除已达 95%,到实验结束时 PCE 的去除率已达 98%以上,生成的 TCE 从实验开始就逐渐增加,在实验第 3 天即有 DCEs 的生成,在实验的最后 2 天,由于生成的 DCEs 稍微有所增加,使 TCE 的量有所下降,由于在整个过程中生成的 DCEs 量都较少,所以 TCE 的下降不明显.

从 PCE 的降解产物看,PCE 的去除属于还原脱氯,即有一个氢原子取代一个氯原子.这与许多研究结果是一致的^[3,5,13].从本研究所检测到的还原脱氯产物看,DCEs 为 PCE 降解的最终产物,与 Young^[5]的研究结果一致.在以前的研究资料中,一般 cDCE 相对于其它 2 种同分异构体而言出现得较多^[13,14],3 种同分异构体同时出现时,cDCE 的含量较多^[5,7,13],说明 cDCE 是主要的降解产物.由于本研究测试分析时没有区分这 3 种同分异构体,因此实验中还不知道哪种同分异构体占主要地位.在微生物的作用下,DCEs 有可能转化为 VC 和乙烯,这在国外已有许多报道^[3,15,16].从图 4 也可看到,初始

PCE 与 (TCE + DCEs) 的差与液相中 PCE 的量不重合,其中的差值部分有可能转化成其它的降解产物 VC 和乙烯;同时从摩尔数的变化看,初始加入 PCE 的摩尔数为 $5.47 \mu\text{mol}$,生成的 TCE 和 DCEs 的摩尔数之和为 $2.99 \mu\text{mol}$,那么其它的有可能转化成 VC 或乙烯,由于在实验中没有检测这 2 种降解产物,因此不知哪种物质是终产物,但由于 DCEs 的量变化不大,所以 DCEs 有可能是 PCE 降解的终产物.许多资料表明:VC 转化成乙烯的速率相对于其它的氯乙烯的转化速度要慢,有时 VC 的转化比 PCE 转化成 TCE 的速率要小几个数量级^[17].因此 VC 的转化是 PCE 转化成乙烯的限速步骤^[6,17,18].在本实验中由于没有分析 VC 和乙烯,因此不知道是否有 VC 和乙烯的生成,但从生成的 TCE 转化较少,生成少量的 DCEs 来看,很可能也会出现限速步骤,因此在这方面还有待于进一步深入研究.

2.2.2 PCE 的降解与产气量和甲醇消耗之间的关系

由于 PCE 的降解是共代谢过程,因此在 PCE 的降解过程中要消耗共代谢基质(甲醇),此外在消耗甲醇的同时还要产生气体,气体可能包括甲烷、氢气、二氧化碳,还可能会产生 VC 和乙烯等气体.在整个 PCE 的降解过程中,液相中 PCE 的量与甲醇的消耗和产气量之间的关系如图 5.

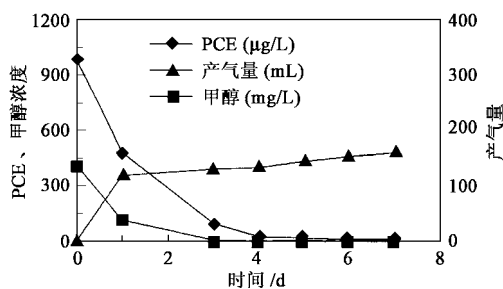


图 5 PCE 的去除与甲醇消耗和产气量之间的关系

Fig. 5 Relation on PCE removal, methanol consumption and produce gas

从图 5 可以看到:在实验的第 3 天,PCE 已去除大部分,此时的产气量和甲醇的消耗都达到最大,此后产气量增加平缓,甲醇几乎全部消耗.从产气量和甲醇的消耗也可以说明 PCE 的去除大部分发生在实验开始时,这与本实验测量的液相 PCE 的量是一致的.由此,在后面的几天 PCE 去除平缓可能是由于加入的甲醇已被消耗的缘故.从本实验而言,这不是主要的因素.因为大部分甲醇消耗的同时有大部分 PCE(95%)已经去除.在 Thomas^[18]的实验中,降

解 $3.5 \mu\text{mol/L}$ 的 PCE 加入 $320 \mu\text{mol/L}$ 甲醇, 与本实验降解 $8.4 \mu\text{mol/L}$ 需要 609.8 mg/L 相比少了近 25 倍, 本实验所加的甲醇也远大于 Federico Auler-tar 的实验中^[3]加入的甲醇量, 可能是本实验中所使用的污泥中含有较容易利用甲醇的微生物所致。

2.2.3 降解动力学

在 PCE 的降解过程中, 根据所测得的液相 PCE 和 TCE 做 $\ln(c/c_{\max})-t$ 图(图 6~8), PCE 的回归结果为 $c = 1395.6e^{-0.8991t}$ ($n = 7$, $R^2 = 0.9833$)。反应的速率常数 K 为 0.8991 d^{-1} , 其半衰期 $t_{1/2} = \ln 2 / K = 0.77 \text{ d}$, 在整个实验过程中 PCE 的平均去除速率大约为 $6.20 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{d})$ 。在实验过程中, 开始时即有 TCE 的生成, 生成 TCE 的浓度与 TCE 的最大浓度之比的 $\ln$ 值与 t 之间的关系如图 7。它反映了 PCE 降解时生成 TCE 的速率, 回归结果为 $c = 338.96e^{0.1333t}$ ($n = 5$, $R^2 = 0.9219$), 反应生成 TCE 的速率常数 0.1333 d^{-1} 。图 8 是在实验过程中 TCE 降解时 $\ln(c/c_{\max})-t$ 的关系及回归结果, 回归结果为 $c = 607.1e^{-0.068t}$ ($n = 3$, $R^2 = 0.9791$), 反应速率常数为 0.068 d^{-1} , $t_{1/2} = \ln 2 / K = 10.19 \text{ d}$ 。从回归结果可以看出, PCE、TCE 的去除和 TCE 的生成都符

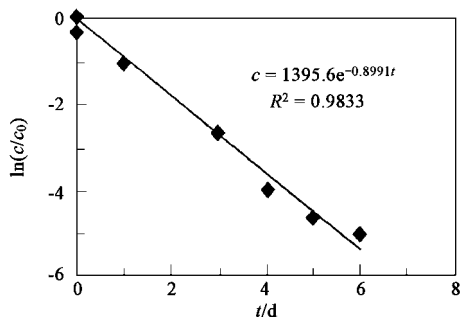


图 6 PCE 的 $\ln(c/c_0)-t$ 回归曲线

Fig. 6 Regression curve of $\ln(c/c_0)$ and t on PCE

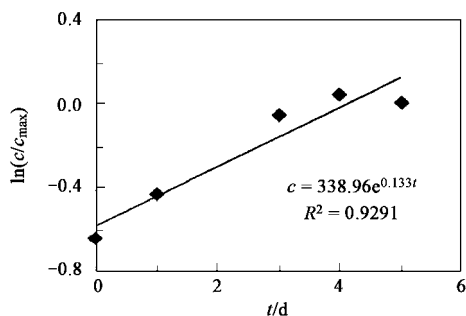


图 7 生成 TCE 时的 $\ln(c/c_{\max})-t$ 回归曲线

Fig. 7 Regression curve of $\ln(c/c_{\max})$ and t during TCE produce

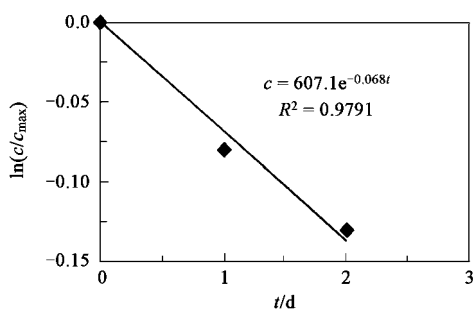


图 8 降解 TCE 时 $\ln(c/c_{\max})-t$ 回归曲线

Fig. 8 Regression curve of $\ln(c/c_{\max})$ and t during TCE degradation

合准一级动力学, 而 PCE 的反应速率常数要比 TCE 的反应速率常数大一个数量级, 这与 Valter Tando^[17]等人的结果一致。而 TCE 的生成速率比降解速率大几乎 2 倍, 表明 TCE 的生成量大于降解量, 因此在整个实验过程中观察到了 TCE 的存在。PCE 的半衰期还不足 1 d, 而 TCE 的半衰期为 10 d, 表明实验中 TCE 的存在时间比 PCE 要长。Valter Tando^[17]等人用厌氧富集培养基, 甲醇做为共代谢基质研究 PCE 的降解时, 最大降解速率为 $(4.6 \pm 0.4) \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{d})$ 。本文的结果与上述结果相比要小许多, 也比 Prakash 等人^[14]所得到 $14.28 \text{ mg}/(\text{g} \cdot \text{d})$ 的结果小许多。原因很可能是因为国外学者都用比较纯的培养基或接种能降解 PCE 的菌种, 而本实验中使用的未经纯化包含多种菌种的污泥, 使污泥中对 PCE 起作用的微生物菌种浓度较低所致。因此在后面的研究中还需对污泥进行进一步的纯化, 以期达到 PCE 更高的去除速率。

3 结论

(1) 根据对厌氧污泥的驯化可知, 厌氧污泥很快适应 PCE 使其发生降解。

(2) 通过降解产物可知, PCE 是通过还原脱氯发生降解的。

(3) 甲醇为共代谢基质时, PCE 降解的最终产物可能为 DCEs、VC 或乙烯。

(4) 以甲醇为共代谢基质时 PCE 和生成的 TCE 的降解都符合准一级动力学, 速率常数 K 分别为 0.8991 d^{-1} 和 0.068 d^{-1} , 半衰期分别为 0.77 d 和 10.19 d 。

(5) TCE 的生成速率比去除速率大 2 倍左右。

参考文献:

- [1] Babu Z Fathepure, Stephen A Boyd. Dependence of Tetrachloroethylene Dechlorination on Methanogenic Substrate Con-

- sumption by *Methanosarcina* sp. Strain DCM[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, **154**(12):2976 ~ 2980.
- [2] 沈德钟. 污染环境的生物修复[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 6 ~ 7.
- [3] Federico Aulenta, Mauro Majone, Paolo Verbo, *et al.* Complete Dechlorination of Tetrachloroethene to Ethene in Presence of Methanogenesis and Acetogenesis by an Anaerobic Sediment Microcosm[J]. Biodegradation, 2002, **13**:411 ~ 24.
- [4] Ndon U J, Randall A A, Khouri T Z. Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene by Soil Sulfate-Reducing Microbes under Various Electron Donor Conditions[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2000, **160**:329 ~ 336.
- [5] Young C Chang, Masahiro Hatsu, Kweon Jung, *et al.* Degradation of a Variety of Halogenated Aliphatic Compounds by an Anaerobic Mixed Culture[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, **186**(4):410 ~ 412.
- [6] Thomas D Distefano. The Effect of Tetrachloroethene on Biological Dechlorination of Vinyl Chloride: Potential Implication for Natural Bioattenuation[J]. Wat. Res., 1999, **33**(7):1688 ~ 1694.
- [7] Kao C M, Chen S C, Wang J Y, *et al.* Remediation of PCE-contaminated aquifer by an in situ two-layer Biobarrier: Laboratory batch and Column Studies[J]. Water Research, 2003, **37**:27 ~ 38.
- [8] Chang Y C, Okeke B C, Hatsu M, *et al.* In vitro Dehalogenation of Tetrachloroethene(PCE) by cell-free Extracts of *Clostridium bifermentans* DPH-1[J]. Bioresource Technology, 2001, **78**:141 ~ 147.
- [9] Davix L Freedman, James M Gossett. Biological Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene to Ethylene under Methanogenic Conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, **21**:2144 ~ 2151.
- [10] Mansour Isalou, Brent E Sleep. Biodegradation of High Concentrations of Tetrachloroethene in a Continuous Flow Column System[J]. Environ. Sci. Technol., 1998, **32**:3579 ~ 3585.
- [11] Gao Jianwei, Rodney S Skeen, Brians Hooker, *et al.* Effects of Several Electron Donors on Tetrachloroethylene Dechlorination in Anaerobic Soil Microcosms[J]. Wat. Res., 1997, **31**(10):2479 ~ 2486.
- [12] 刘菲, 汤鸣皋, 何小娟, 等. 零价铁降解水中氯代烃的实验研究. 地球科学——中国地质大学学报[J], 2002, **27**(2):186 ~ 188.
- [13] 吴唯民, Hickey J Nye R F, Bhatnagar L. 利用厌氧颗粒污泥处理氯代有毒有机物[J]. 应用与环境生物学报, 1995, **1**(1):50 ~ 60.
- [14] Prakash S M, Gupta S K. Biodegradation of Tetrachloroethylene in Upflow Anaerobic Sludge[J]. Bioresource Technology, 2000, **72**:47 ~ 54.
- [15] Xavier Maymón-Gatell, Valter Tandoi, Gossett James M, *et al.* Characterization of an H_2 -Utilizing Enrichment Culture That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Vinyl Chloride and Ethene in the Absence of Methanogenesis and Acetogenesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **64**(11):3298 ~ 3933.
- [16] Thomas D Distefano, James M Gossett, Stephen N Zinder. Hydrogen as an Electron Donor for Dechlorination of Tetrachloroethene by Anaerobic Mixed Culture[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, **158**(11):3622 ~ 3629.
- [17] Valter Tandoi, Tomas D Distefano, Patrick A Bowser, *et al.* Reductive Dehalogenation of Chlorinated Ethenes and Halogenated Ethanes by a High-Rate Anaerobic Enrichment Culture[J]. Environ. Sci. Technol., 1994, **28**:973 ~ 979.
- [18] Thomas D Distefano, James M Gossett, Stephen H Zinder. Reductive Dechlorination of High Concentrations of Tetrachloroethene to Ethene by an Anaerobic Enrichment Culture in the Absence of Methanogenesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, **57**(8):2287 ~ 2292.