

固定在活性炭聚砜中空纤维膜中的 *Pseudomonas putida* 菌对四氯苯酚的共代谢降解

李轶^{1,2}, 胡洪营²

(1. 河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 南京 210098; 2. 清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制联合国家重点实验室, 北京 100084)

摘要:以苯酚-四氯苯酚共代谢体系为对象,研究了中空纤维聚砜膜作为细菌固定化材料对该共代谢过程的强化作用.结果表明,该膜具有内、中、外 3 层的结构, *Pseudomonas putida* 菌可被固定在膜的表面和中间层;固定化后,细菌对高浓度有毒底物的忍受限度增强,从而得以持续生长,并在 29 h 内将 600 mg/L 和 120 mg/L 的苯酚和四氯苯酚完全降解.在膜的制作过程中添加了一定量的活性炭后,发现膜对苯酚和四氯苯酚的吸附能力增强,同时结构上更疏松,对四氯苯酚的降解效率得到了提高.固定在活性炭中空纤维膜中的 *Pseudomonas putida* 可以将 1 000 mg/L 和 200 mg/L 的苯酚和四氯苯酚在 51 h 内完全降解,比不加活性炭的情况缩短了 37 h,中空纤维膜可以连续多次使用,对相同浓度的四氯苯酚的降解速度保持稳定.

关键词:固定化微生物;共代谢;苯酚;四氯苯酚;生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)09-2112-05

Enhancement of Biodegradation of 4-chlorophenol During Co-metabolic Process by Immobilized-Cells of *Pseudomonas putida*

LI Yi^{1,2}, HU Hong-ying²

(1. Key Laboratory of Integrated Regulation and Resource Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, Hohai University, Nanjing 210098, China; 2. Environmental Simulation and Pollution Control State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Cometabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol was enhanced by cells immobilized in polysulfone hollow fiber membranes. Polysulfone hollow fiber membranes have three layers in structure. *Pseudomonas putida* can be immobilized in the fibers and cometabolically degrade 600 mg/L phenol and 120 mg/L 4-chlorophenol (4-cp) within 29 h. With the incorporation of activated carbon, the fibers show higher adsorption capacity and looser structure. 1 000 mg/L phenol and 200 mg/L 4-cp were biodegraded within 51 h by cells immobilized in activated carbon integrated hollow fiber membranes, while it took about 88 h without activated carbon. The immobilized cells can be used for at least four times. Immobilized cells were protected by hollow fiber membranes and transformed phenol and 4-cp continuously.

Key words: immobilized cells; co-metabolite; phenol; 4-chlorophenol; biodegradation

氯代有机物是环境中难降解的主要污染物之一,该类物质包括工业和农业中常用的化学物质,比如杀虫剂、除草剂、热交换材料、润滑剂及其中间体等^[1,2].这些物质通常有很强的毒性,难降解且易在生物体中积累^[3].一些常见的氯代有机物,比如四氯苯酚,可以通过微生物共代谢的过程而被降解.共代谢过程的一般定义是指只有在初级能源物质存在时,才能进行的有机化合物的生物降解过程^[4].

然而,共代谢过程通常是不能持续进行的,能被降解的非生长性底物一般和生长性底物含有相同的分子结构,在它们的降解过程中需要同样的酶来分解底物^[5],因此这 2 种物质之间的竞争性抑制不可避免.为了有效地利用共代谢过程来降解有机污染物,在有毒的底物和微生物之间需要构建一道壁垒^[6].微生物的固定化是一种可行的能达到上述要

求的技术,与微生物悬浮生长相比,微生物固定化技术的主要优点是提高反应器中的微生物浓度,保护微生物,缩短水力停留时间,从而提高反应器效率^[7].

微生物固定化常用的方法包括表面吸附、交联固定、包埋固定以及自身固定法^[8~11].该方法中常用的固定材料有无机和有机 2 大类,比如活性炭^[12]、硅藻土^[13]、褐藻酸珠^[14]等.本实验采用新型添加活性炭的聚砜中空纤维膜作为 *Pseudomonas putida* 菌的固定化材料,对苯酚和四氯苯酚的共代谢降解体系进行研究,以期微生物固定化技术的应用探索新的途径.

收稿日期: 2006-11-21; 修订日期: 2007-03-19

作者简介: 李轶(1975~),男,博士后,主要研究方向为污染环境的修复技术, E-mail: envly@tsinghua.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的可以共代谢降解苯酚和四氯苯酚的细菌从被苯酚污染的土壤中分离得到.初步鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*).细菌保存在琼脂培养基上,温度为4℃,细菌培养液包括无机盐类和微量盐类溶液^[11].

实验中使用的中空纤维有机膜通过湿式纺丝法制备,高分子材料为聚砜,聚砜和溶剂1-甲基-2-吡咯酮(NMP)的质量比为20%,详细的制备过程见文献[12].制备活性炭膜使用的活性炭以椰壳为原材料制成,平均粒径小于10 μm,比表面积为1 104 m²/g,空隙体积0.92 cm³/g.

1.2 实验方法

1.2.1 吸附实验

中空纤维膜对苯酚和四氯苯酚的单组分和双组分吸附实验在培养液中进行,取2 cm长的中空纤维放置于250 mL的锥形瓶中,在121℃条件下灭菌30 min.随后加入苯酚、四氯苯酚以及灭菌后的培养液于锥形瓶中,总体积为100 mL.然后锥形瓶放置于转速为120 r/min、温度为30℃的摇床上进行吸附实验直到吸附达到平衡,取样对苯酚和四氯苯酚浓度进行分析.

1.2.2 细菌的固定化

细菌在使用前进行活化,其方法详见文献[15],当活化后的降解菌到达对数增长后期(溶液从无色变成绿黄色,细菌干重浓度60 mg/L左右),10 mL悬浮液转移到离心分离管中在20 000 r/min下分离15 min.上清液被去除,试管底部黄色的菌体用蒸馏水洗迭然后再进行离心分离,整个过程重复3次.收集好的细菌被重新和培养液混合,进行下列实验.

细菌被收集后,马上进行其固定化.取9 cm长的中空纤维膜,每9个束成1捆,共4捆放入500 mL的锥形瓶中,加入混合好的微生物溶液35 mL,放置在摇床上均匀摇晃18 h,进行微生物的固定.随后,中空纤维束从溶液中取出,用无菌蒸馏水清洗表面后即可用于苯酚和四氯苯酚的降解实验.

1.2.3 降解实验

固定化菌降解苯酚和四氯苯酚的实验在同一膜载体上共进行5次,每次间隔2 h,前4次的条件一致,苯酚和四氯苯酚的浓度分别为600 mg/L和120 mg/L,以验证降解实验的稳定性,最后1次的浓度为1 000 mg/L和200 mg/L,考察高浓度条件下苯酚和四

氯苯酚的降解.实验过程中分别采用不含活性炭的聚砜中空纤维膜(PS1)和含有活性碳的聚砜中空纤维膜(PS2)作为细菌的固定化材料进行平行实验,定期取样分析底物和细菌浓度.

1.3 分析测定方法^[16]

苯酚和四氯苯酚浓度:气相色谱法,主要仪器:Aglient6890N气相色谱仪(美国Aglient),样品离心后,取上清液用四氯甲烷萃取后进行分析;气相色谱条件为:进样口温度270℃,检测器300℃,柱温100℃(2 min)→10℃/min→160℃(5 min),进样量1 μL;FID检测器.

细胞浓度:比浊法,在600 nm下测定光密度 D_{600} ,主要仪器:UV-1200V型分光光度计(日本岛津).通过下列方法换算得到质量浓度:细菌干重浓度(mg/L)=314.5× D_{600} .

2 结果与讨论

2.1 中空纤维膜的形态

实验中所采用的2种不同的中空纤维膜的SEM照片如图1所示.

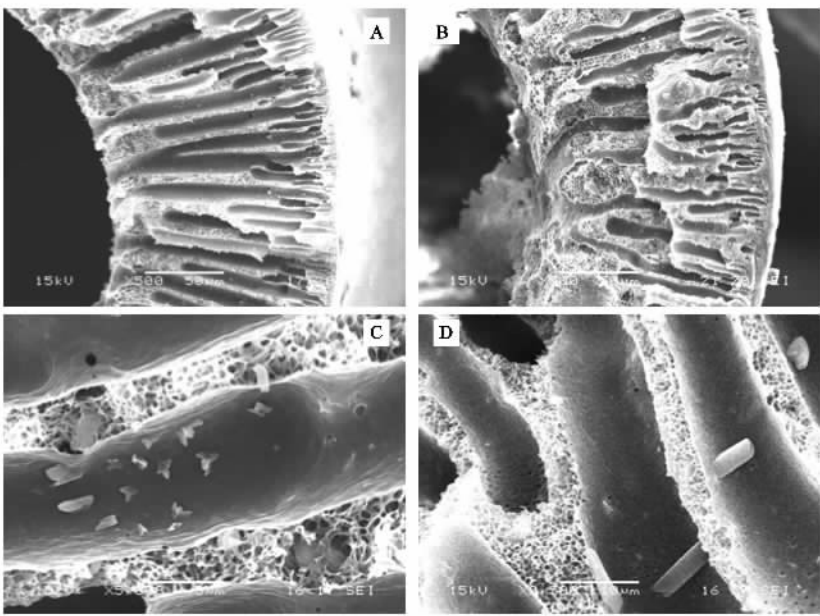
由图1可知,2种膜都呈现出3层结构,分别是致密的外表层、中间支撑层和相对疏松的内表层.膜的选择透过性主要由外表层所决定,在细菌降解有机物的过程中,外表层可以限制高浓度的苯酚和四氯苯酚的流动,从而保护在内部固定化的细菌.中间支撑层中有很多孔隙,细菌可以通过内表层停留在这些孔隙中生长并降解底物.这种结构主要是由于在膜制作过程中高分子溶液与内外不同的凝聚剂水和1-甲基-2-吡咯酮(NMP)接触后不同的反应所导致的.当高分子溶液离开纺丝头后,分别与水和NMP反应,在外表层和水接触后,高分子溶液迅速凝固,而在内表面,由于NMP是聚砜的溶剂,高分子溶液不会凝固,膜中的空隙就会从外表层开始到内表层以较大的直径结束,这样,经过短暂的反应后,就形成了图1中所示的结构.当活性炭被加入到溶液后,膜的颜色从白色变成灰色,膜的内部也更粗糙和宽松,从图1中可以清晰地看到活性炭在膜中的分布.

2.2 吸附结果

通过Freundlich吸附平衡(方程1)对苯酚和四氯苯酚的单组分和双组分在膜中的吸附过程进行描述.

$$Q_{\text{ads}} = K_{\text{ads}} c_e^{1/n}$$

(1)



A 为聚矾膜 PS1 截面(×500);B 为活性碳聚矾膜 PS2 截面(×500);C 和 D 为活性碳聚矾膜 PS2 的支撑层(×5 000)

图 1 中空纤维聚矾膜的 SEM 照片

Fig.1 SEM of the hollow fibers

式中, Q_{ads} 为单位中空纤维膜所吸附的有机物的量(mg/g), c_e 为吸附平衡时溶液中有机物的浓度(mg/L), K_{ads} 和 $1/n$ 为常数, 分别代表了膜的吸附能力和吸附的速度. 2 种膜对苯酚和四氯苯酚的 Freundlich 方程常数见表 1, 该方程可以较好地模拟吸附过程, 相关系数大于 0.95.

表 1 不同条件下 Freundlich 吸附方程参数

Table 1 Freundlich adsorption isotherm parameters for phenol and 4-cp, singly and in combination

组分	有机物	不含活性炭的膜			含有活性炭的膜		
		K_{ads}	$1/n$	R^2	K_{ads}	$1/n$	R^2
单	苯酚	3.39	0.37	0.98	7.55	0.32	0.99
	四氯苯酚	5.73	0.34	0.99	19.1	0.23	0.98
双	苯酚	2.46	0.34	0.97	4.70	0.29	0.97
	四氯苯酚	4.24	0.33	0.95	15.3	0.20	0.96

从表 1 可知, 2 种膜都对苯酚和四氯苯酚有一定的吸附能力. 其中四氯苯酚比苯酚更容易被膜所吸附, 这可能是由于四氯苯酚分子结构中所含有的极性氯基所引起的. 含有活性炭的膜对苯酚和四氯苯酚有更强的吸附能力, 在活性炭的作用下, 更多的四氯苯酚被吸附. 在双组分吸附中, 可以很清楚地看到苯酚和四氯苯酚之间的竞争性吸附, 和单组分吸附相比, K_{ads} 和 $1/n$ 都有明显的下降. 然而四氯苯酚和苯酚吸附能力的比值比单组分条件下有所提高, 从 1.72 提高到了 3.26, 这就意味着含有活性炭的膜

可以有效地降低溶液中四氯苯酚的浓度, 这样共代谢过程中苯酚和四氯苯酚之间的竞争性抑制就可以被减轻, 从而有助于细菌的生长和对这 2 种物质的降解.

2.3 苯酚和四氯苯酚的共代谢降解过程

苯酚和四氯苯酚在 2 种膜作为细菌固定化材料的体系中的降解共进行了 5 次. 实验结果表明苯酚和四氯苯酚都可以被完全降解. 图 2 是第 1 次降解实验过程中底物和细菌浓度随时间的变化图(苯酚和四氯苯酚的起始浓度分别为 600 和 120 mg/L). 苯酚在降解过程中可分为 2 个阶段, 首先是苯酚缓慢地被膜所吸附和被固定化的细菌所降解的过程, 随后苯酚主要被可以在溶液中生长的细菌快速地降解, 伴随着细菌的对数增值期. 对四氯苯酚而言, 可以观察到 3 个去除阶段, 即快速的吸附阶段、缓慢地被固定化菌降解阶段和最后地被固定化和游离态细菌的快速降解阶段.

当溶液中苯酚和四氯苯酚的浓度降低至 480 mg/L 和 60 mg/L 左右时, 可以观察到溶液吸光度增加, 说明细菌从膜中游离出来, 图 2 中所示细菌浓度为游离细菌浓度. 此时溶液中底物对细菌的抑制作用减弱, 细菌可以从膜中游离出来, 固定化和游离态 2 种形态的细菌都可以有效地降解底物. 在这个阶段中底物被快速地降解, 在底物降解的末期, 可以观察到细菌浓度也有一定的上升, 这是因为降解初期

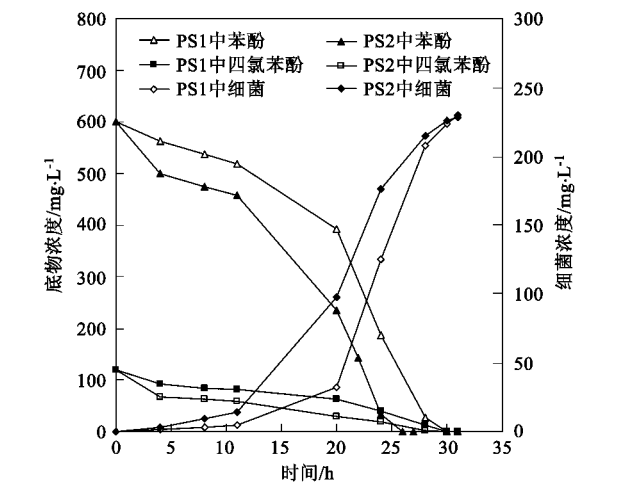


图2 降解实验过程中底物和细菌浓度随时间的变化
Fig.2 Temporal profiles of substrates and bacteria

被吸附的苯酚最终也会被细菌所利用。

表2中列出了4次有机物降解的结果。4次实验在同样的条件下连续进行以考察降解的稳定性,降解的效率没有显著的变化,而且第2、3和4次比第1次还要更好一些,以PS1为例,完全降解苯酚和四氯苯酚的时间从29 h缩短到26 h。很显然固定化的细菌可以被连续使用而不失去其活性,并且在第1次使用后膜中的细菌数量的增加可以增强降解的效果。Loh等人^[16]使用同样的细菌 *Pseudomonas putida* 报导了当四氯苯酚的浓度超过100 mg/L时,细菌不能生长,相对于游离生长的细菌而言,固定化的细菌对苯酚和四氯苯酚的降解能力得到了显著增强。

前已述及,在溶液中的底物被降解后的2 h内游离态的细菌继续生长,这是因为从膜中会解析出部分被吸附的底物,再加上代谢过程的中间产物,都可以被细菌所利用。这个过程非常重要,可以有效地通过细菌的作用将吸附在膜中的有机物降解,使膜

的吸附能力得到再生,如果在第1次降解结束后立即进行下次实验,则相同条件下降解苯酚和四氯苯酚的时间会延长到35 h左右。

表2 底物在2种膜中的降解情况对比						
Table 2 Substrates biodegradation at the two membranes						
批次	起始浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		苯酚去除时间/h		四氯苯酚去除时间/h	
	苯酚	四氯苯酚	PS1	PS2	PS1	PS2
1	600	120	29.0	26.0	29.0	26.5
2	600	120	27.0	23.0	26.0	24.5
3	600	120	26.0	24.5	27.0	24.0
4	600	120	26.0	23.0	27.0	24.0
5	1 000	200	82.0	48.0	83.0	51.0

由表2可知,添加活性炭可以有效地提高降解的效率,四氯苯酚的降解时间从27 h缩短到24 h。当初始苯酚和四氯苯酚浓度增加后,这个差别更加明显,在降解1 000 mg/L的苯酚和200 mg/L的四氯苯酚的过程中,在不含活性炭的膜中,需要82 h和83 h才能完全降解苯酚和四氯苯酚,而在碳膜中,只需要48 h和51 h。很显然在高浓度的底物降解中,碳膜可以表现出更好的效果。

在固定化系统中,为了增加细菌对底物的降解效果,有2个方面必须考虑到,一方面要降低固定化系统的传质阻力,另一方面要提高固定化菌的量。添加活性炭可以使膜结构更疏松,孔隙更大,可以容纳更多的细菌,并且提高传质的速度,另外本实验中的细菌部分固定化也可以在降解实验的后期加速有机底物的降解,提高效率。而碳膜对苯酚和四氯苯酚的选择性吸附,也有利于溶液中细菌的生长。

降解末期含有细菌的膜的照片如图3所示,同时观察到只有1种形态的细菌,说明在实验过程中没有其他的细菌在反应器中生长,降解末期细菌在膜的表面形成了较大的不均匀的块状结构,提高了反应器中生物量,有利于底物的降解。

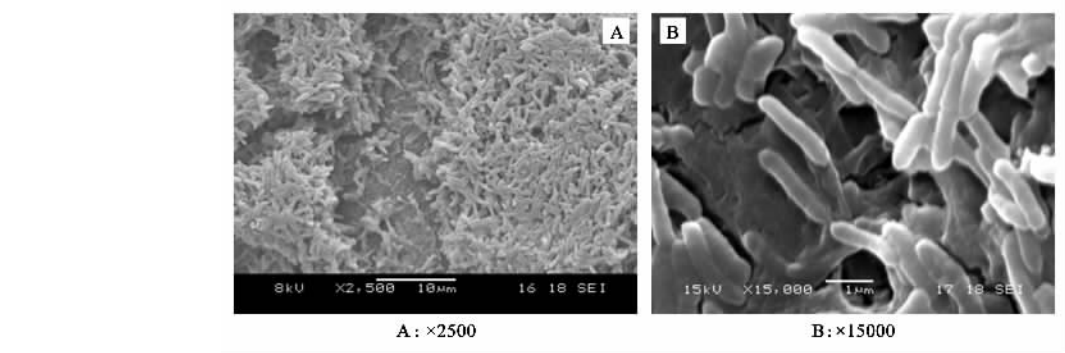


图3 降解末期膜表面细菌形态
Fig.3 SEM of bacteria after biodegradation

3 结论

活性炭中空纤维膜可用来作为 *Pseudomonas putida* 菌的固定化材料来强化苯酚和四氯苯酚的共代谢降解过程. 活性炭在膜中可以增强有机物在固定化材料的传质, 降低溶液中四氯苯酚对细菌的抑制, 并且可能提供更大的用于固定化细菌的空间, 从而强化了四氯苯酚的降解, 降解过程中, 该膜可以连续使用.

参考文献:

- [1] 戴友芝, 张选军, 宋勇. 超声波/纳米铁协同降解氯代苯酚的试验[J]. 环境污染治理技术与设备, 2005, **6**(11): 43 ~ 48.
- [2] Aranda C, Godoy F, Becerra J, *et al.* Aerobic secondary utilization of a non-growth and inhibitory substrate 2, 4, 6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Sphingopyxis*-like strain S32 [J]. Biodegradation, 2003, **14**(4): 265 ~ 274.
- [3] 瞿福平, 张晓建, 吕昕, 等. 氯代芳香化合物的生物降解性研究进展[J]. 环境科学, 1997, **18**(2): 74 ~ 78.
- [4] Alvarez-Cohen L, McCarty P L. Two-stage dispersed-growth treatment of halogenated aliphatic compounds by cometabolism[J]. Environmental Science and Technology, 1991, **25**: 1381 ~ 1387.
- [5] Wang S J, Loh K C. Facilitation of cometabolic transformation of 4-chlorophenol using glucose as an added growth substrate [J]. Biodegradation, 1999, **10**: 261 ~ 269.
- [6] Wang S J, Loh K C, Chua S S. Prediction of critical cell growth behavior of *Pseudomonas putida* to maximize the cometabolism of 4-chlorophenol with phenol and sodium glutamate as carbon sources [J]. Enzyme Microbial and Technology, 2003, **32**: 422 ~ 430.
- [7] 王新, 李培军, 巩宗强, 等. 采用固定化技术处理土壤中菲、

芘污染物[J]. 环境科学, 2002, **23**(3): 84 ~ 87.

- [8] Labana S, Pandey G, Paul D, *et al.* Pot and Field Studies on Bioremediation of p-Nitrophenol Contaminated Soil Using *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 [J]. Environmental Science and Technology, 2005, **39**(9): 3330 ~ 3337.
- [9] Shiomi N, Yamaguchi Y, Nakai H, *et al.* Degradation of cyanuric acid in soil by *Pseudomonas* sp. NRRL B-12227 using bioremediation with self-immobilization system [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, **102**(3): 206 ~ 209.
- [10] Gentili A R, Cubitto M A, Ferrero M, *et al.* Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2006, **57**(4): 222 ~ 228.
- [11] Cunningham C J, Ivshina I B, Lozinsky V I, *et al.* Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2004, **54**(2-3): 167 ~ 174.
- [12] 何延青, 刘俊良, 杨平, 等. 微生物固定化技术与载体结构的研究[J]. 环境科学, 2004, **25**(增刊): 101 ~ 104.
- [13] 李海波, 李培军, 张轶, 等. 固定化微球菌技术修复受污染地表水[J]. 中国给水排水, 2005, **21**(2): 54 ~ 59.
- [14] Juarez-Ramirez C, Ruiz-Ordaz N, Cristiani-Urbina E, *et al.* Degradation kinetics of phenol by immobilized cells of *Candida tropicalis* in a fluidized bed reactor [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, **17**: 697 ~ 705.
- [15] Loh K C, Wang S J. Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources[J]. Biodegradation, 1998, **8**: 329 ~ 338.
- [16] Chung T S, Loh K C, Tay H L. Development of polysulfone membrane for bacteria immobilization to remove phenol [J]. Applied Polymer Science, 1998, **70**: 2585 ~ 2594.