

高浓度 4-氯酚在中空纤维聚砜膜固定化细菌反应器中的共代谢降解研究

李轶^{1,2}, 雷洪萍¹

(1. 河海大学环境科学与工程学院, 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. 南京大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 悬浮生长的 *Pseudomonas putida* 菌可以苯酚为生长基质, 通过该细菌的共代谢过程将 4-氯酚降解. 当苯酚和 4-氯酚的浓度达到 120 mg/L 和 600 mg/L 时, 由于基质对细菌的抑制作用, 该共代谢过程难以进行, 细菌不能生长. 通过对细菌在中空纤维膜反应器中固定化, 细菌可以降解高浓度的四氯苯酚, 即使当苯酚和 4-氯酚浓度为 200 mg/L 和 1 000 mg/L 时, 利用此中空纤维膜固定化细菌反应器仍可在 34 h 内都能将其完全降解. 与悬浮生长降解菌不同, 由于基质在中空纤维膜中质量传递的受限, 固定化后的细菌受到中空纤维膜的保护, 从而得以生长并降解高浓度的基质.

关键词: 生物降解; 生物转化; 间隙操作; 苯酚; 膜

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)10-3007-04

Cometabolic Transformation of High Concentrations of 4-Chlorophenol in an Immobilized Cell Hollow Fiber Membrane Bioreactor

LI Yi^{1,2}, LEI Hong-ben¹

(1. Key Laboratory of Integrated Regulation and Resource Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: *Pseudomonas putida* grown suspendedly can cometabolize 4-chlorophenol (4-CP) in the presence of phenol (growth substrate). However, cometabolization process cannot be maintained due to the high toxicity of phenol and 4-CP to cells when the initial concentrations of phenol and 4-CP were 120 mg/L and 600 mg/L, respectively. Cells can degrade phenol and 4-CP at high concentrations after immobilization in hollow fiber membrane bioreactors. Even when the initial concentrations of phenol and 4-CP were 200 mg/L and 1 000 mg/L, the substrates were completely biotransformed with in 34 hours. Different from free suspension cells, immobilized cells were protected by the hollow fiber membranes due to mass transfer limitation in the membranes. The cells can grow and degraded high concentration substrates.

Key words: biodegradation; biological treatment; batch operation; phenol; membranes

氯代有机物是一种常见的能够进入生物环境的化学异型生物物质, 在农业、工业中这类物质广泛应用于除草剂、杀虫剂、除菌剂、热交换触媒、绝缘体、润滑剂^[1,2], 这些物质的大量的制造和使用, 其中所含的有机物必然引起土壤和水质污染, 甚至在某些工业废水中其浓度高达 1 000 mg/L. 这些物质毒性高、不易降解, 容易在生物体内富集, 从而对环境产生巨大影响^[2~4].

一些常见的氯化物和杀虫剂, 如氯酚、氯苯、三氯乙烯等, 常常可以通过共代谢的方式将其生物降解^[4~7], 共代谢是一种特殊的生物降解方式, 主要是指微生物的这种不能利用基质作为能源和组分元素的有机物转化作用^[8]; 共代谢也是一种重要的生物降解手段, 常常用于处理受污染的地表水、工业废水以及有毒有害物质^[9].

但是, 共代谢这种生物降解方式常常是不易控

制的, 特别是在高浓度的条件下, 基质对细菌有较强的抑制作用. 本研究通过苯酚驯化后的 *Pseudomonas putida* 菌, 运用中空纤维膜固定化细菌反应器, 在苯酚存在的条件下, 对高浓度的 4-氯酚进行降解. 将膜固定化细菌反应器与共代谢方法二者结合处理高浓度的有机废水的方法, 在国内还处于探索阶段, 对此研究甚少, 研究代谢污染物控制有重要的实际意义.

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用共代谢降解苯酚和 4-氯酚的细菌从被苯酚污染的土壤中分离得到^[10]. 初步鉴定为恶臭假

收稿日期: 2008-11-03; 修订日期: 2009-01-16

基金项目: 污染控制与资源化研究国家重点实验室开放基金项目 (PCRRF08015)

作者简介: 李轶 (1975~), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为水污染控制, E-mail: envly@hhu.edu.cn

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].

1.2 实验方法

1.2.1 细菌活化

细菌在使用前进行活化, 其方法详见文献[11], 当活化后的降解菌到达对数增长期后(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清洗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.

1.2.2 细菌固定化

对细菌进行固定化之前, 用超纯水冲洗反应器 2 h, 将 250 mL 菌液用泵送入反应器中循环 5~6 h, 随后用无菌超纯水清洗表面 0.5 h 即可用于苯酚和四氯苯酚的降解实验.

1.2.3 实验装置

本实验的流程图详见图 1, 蠕动泵直接从锥形瓶中抽取混合液[含有一定浓度苯酚(phenol)、4-氯酚(4-CP)、*P. putida*], 混合液流经中空纤维膜反应

器, 再从膜管外流过, 水流在反应器中呈 S 型流动, 最后流回锥形瓶. 整个实验过程, 混合液的流速始终控制在 6 mL/min, 体积保持在 250 mL.

实验过程如图 1 所示.

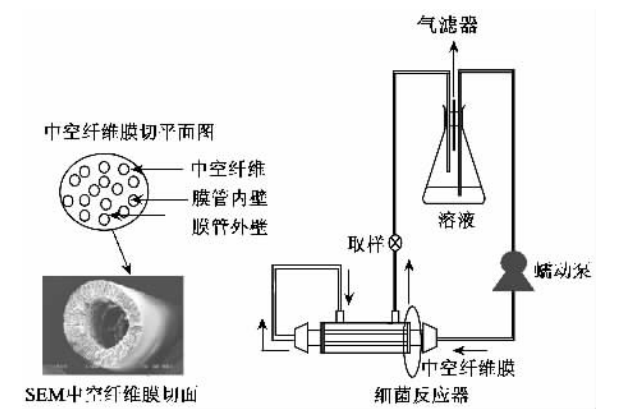


图 1 实验装置和流程示意

Fig.1 Schematic diagram of experimental setup

1.2.4 实验过程

表 1 列出所有实验, 其中实验 A 和 C 在中空纤维膜反应器中进行, 而实验 B 则利用悬浮细菌在摇瓶中进行.

表 1 实验分组详情

Table 1 Summary of experimental runs					
类别	实验编号	起始浓度/mg•L ⁻¹		浓度比例 (4-CP: phenol)	实验说明
		4-CP	phenol		
对照试验	A1	200	1 000	1:5	未固定细菌的纤维膜对苯酚和 4-氯酚去除
	A2	80	400	1:5	
	B1	40	200	1:5	悬浮细菌对不同浓度的苯酚和 4-氯酚的降解
生物降解实验	B2	80	400	1:5	
	B3	120	600	1:5	
	C1	40	200	1:5	运用中空纤维膜固定化细菌反应器降解苯酚和 4-氯酚
	C2	80	400	1:5	
	C3	120	600	1:5	
	C4	200	1 000	1:5	

1.3 分析方法

本实验从图 1 所示的位置取样, 每次取样 3 mL. 细胞浓度测定: 比浊法, 在 600 nm 下测定光密度, 主要仪器: UV-1601 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 × 光密度. 苯酚和 4-氯酚含量的测定: 取样后加入一定量的硫酸溶液停止样品中的生化反应, 用相同体积的含有 100 mg/L 邻甲基苯酚的二氯甲烷溶剂进行萃取, 随后取 1μL 萃取液用气相色谱进行分析.

2 结果与讨论

2.1 对照实验

实验 A₁ 和 A₂ 进行对照实验, 研究在未固定细菌的中空纤维膜中, 苯酚和 4-氯酚的吸附和解吸过程. 图 2 实验 A₁ 的吸附曲线表明苯酚和 4-氯酚可以部分被中空纤维膜吸附, 实验开始后前 5 h, 大约有 19%(42.4 mg/g) 的苯酚和 40%(17.8 mg/g) 的 4-氯酚被吸附, 此后, 苯酚和 4-氯酚的浓度则没有明显变化. 苯酚和 4-氯酚之所以能够被快速吸附, 主要是中空纤维膜具有较大的比表面积以及有机物质与膜之间的疏水相互作用引起的^[12]. 由解吸曲线可知, 大概有 22% 的被吸附苯酚和 38% 的 4-氯酚解吸, 此过程没有细菌生长. 在实验 A₂ 中, 得到与实验 A₁ 类似的结论, 开始反应前 5 h, 35%(31.2 mg/g) 的苯酚和

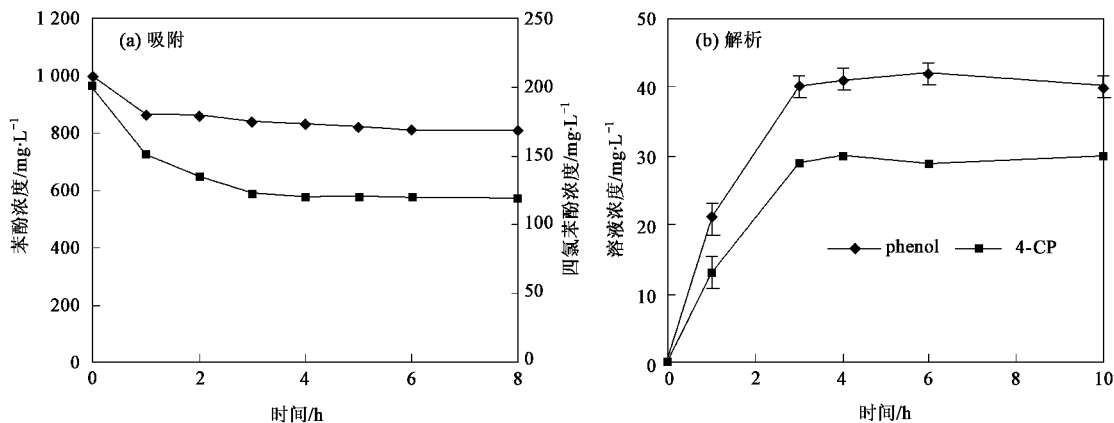


图 2 200 mg·L⁻¹ 4-氯酚和1 000 mg·L⁻¹ 苯酚吸附和解析

Fig.2 Abiotic sorption and desorption of 200 mg·L⁻¹ 4-CP and 1 000 mg·L⁻¹ phenol in hollow fibers

58%(11.2 mg/g)的 4-氯酚被吸附,同时也有 23%被吸附的苯酚和 40%的 4-氯酚解吸.

2.2 悬浮细菌对苯酚和 4-氯酚的降解

实验 B₁ ~ B₃ 利用悬浮细菌降解苯酚和 4-氯酚,此实验中,4-氯酚对苯酚的浓度比例为 1:5,图 3 描绘实验 B₁ 有机物浓度变化和细菌的生长趋势,同时发现实验 B₂ 与 B₁ 有相似的实验结果.从中可知,实验前段时间为细菌的生长滞后期,其数量和有机物的浓度没有明显的变化,此后细菌进入指数生长期,大量生长,4-氯酚和苯酚的浓度明显下降.在此过程中,苯酚的降解速率快于 4-氯酚,当苯酚的降解近乎完全时,4-氯酚开始迅速降解.

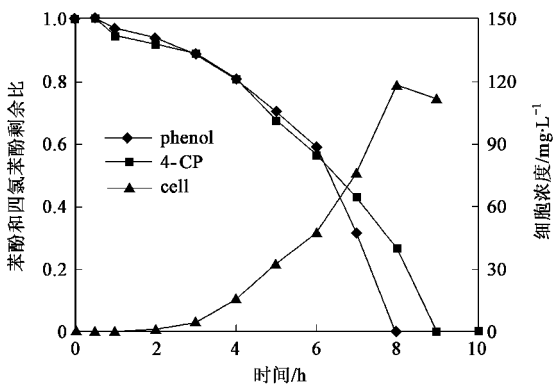


图 3 40 mg·L⁻¹ 4-氯酚和 200 mg·L⁻¹ 苯酚被悬浮细菌降解实验 B₁

Fig.3 Cell growth and substrates concentrations in free suspension cultures with 40 mg·L⁻¹ phenol and 200 mg·L⁻¹ 4-CP

从苯酚和 4-氯酚的降解曲线,可以得到两点推论:①细菌负生长曲线的开始和苯酚的消失相吻合,说明该细菌不能以 4-氯酚为生长基质进行生长,即使是在苯酚存在的条件下;② 4-氯酚的快速降解出

现在苯酚降解之后,这充分说明了浓度占优对降解过程的影响.

实验 B₃ 中,4-氯酚和苯酚的浓度分别为 120 mg/L、600 mg/L,二者比例也是 1:5,但是高浓度的 4-氯酚和苯酚具有较强的毒性,实验过程中没有细菌生长,4-氯酚和苯酚的浓度没有变化.

表 2 是实验过程的测量数据,当 4-氯酚浓度较低时(40 mg/L),微生物的生长速率(0.48 h⁻¹)同单独处理苯酚的细菌生长速率(0.5 h⁻¹)接近,4-氯酚的毒性对细菌的影响不大.然而,当 4-氯酚、苯酚的浓度分别达到 120 mg/L、600 mg/L时,毒性加强,细菌无法生长,二者不能被降解.

表 2 4-氯酚毒性对降解过程的影响

Table 2 Effect of 4-CP toxicity inhibition on phenol degradation			
参数	实验 B ₁	实验 B ₂	微生物单独降解苯酚 ^[3]
最大微生物浓度/mg·L ⁻¹	119	185	122
微生物生长速率/h ⁻¹	0.48	0.28	0.5
微生物生长系数/mg·mg ⁻¹	0.60	0.47	0.61

2.3 中空纤维固定化细菌聚砜膜对苯酚和 4-氯酚的降解

实验 C₁ ~ C₄ 利用固定化细菌膜降解苯酚和 4-氯酚,此实验中,4-氯酚对苯酚的浓度比例为 1:5.整个实验中,可以测定到 2 个不同阶段的去除速率.首先,实验前 5h,膜的吸附能力发挥重要作用,细菌有少量生长;其后,细菌经过短暂的延滞期后,迅速生长,这时固定在膜上的细菌与少量膜外悬浮细菌以恒定的速率共同降解苯酚和 4-氯酚,固定化细菌起主要作用.

图 4 是实验 C₁ 中 4-氯酚、苯酚和细菌生长量的变化趋势,苯酚在 10 h 内完全降解,4-氯酚大部分都

在前 5h 降解.与悬浮细菌降解 4-氯酚和苯酚相比,固定化细菌降解的最大生物浓度较低,大约是 47 mg/L.实验 C₂~C₄ 与 C₁ 得到的结论相近,即使 4-氯酚、苯酚浓度达到 200 mg/L、1 000 mg/L 时,二者也可以在 34 h 内完全被降解.具体实验数据详见表 3.

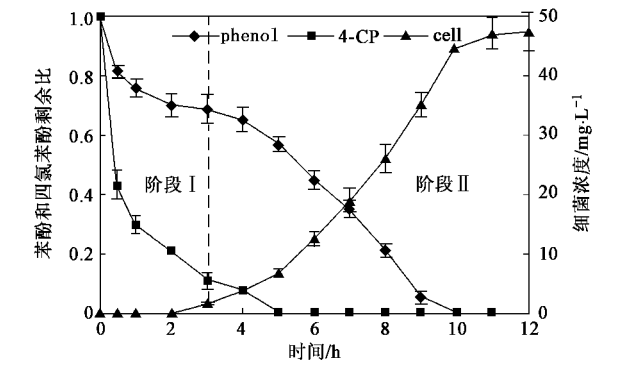


图 4 固定化微生物反应器中 40 mg·L⁻¹4-氯酚和 200 mg·L⁻¹苯酚的降解情况

Fig.4 Cell growth and substrates concentrations for immobilized cell bioreactor system with 40 mg·L⁻¹ phenol and 200 mg·L⁻¹ 4-CP

表 3 中空纤维固定化细菌反应器的生物降解能力			
Table 3 Substrates transformation and cell growth for immobilized cell bioreactor			
实验编号	苯酚降解时间/h	4-氯酚降解时间/h	最大细菌浓度/mg·L ⁻¹
C ₁	10	5	47
C ₂	16	16	35
C ₃	25	25	16
C ₄	34	34	16

中空纤维膜固定化细菌与悬浮生长细菌的降解能力对比详见表 4,固定化细菌对不同浓度条件下基质的降解速度保持一致,当有机物浓度较低时,固定化细菌的基质降解速率较慢.但是,当 4-氯酚、苯酚浓度分别达到 120 mg/L、600 mg/L 时,此时悬浮细菌不能降解基质,而固定化细菌反应器的优点开始显现,仍然以一定的速率降解基质,而且可以同时处理 4-氯酚和苯酚,而悬浮生长的细菌则须待苯酚完

表 4 中空纤维膜固定化细菌与悬浮生长细菌降解能力比较/(mg·(L·h)⁻¹)

Table 4 Comparison of substrates transformation rate by free suspension and immobilized cells/(mg·(L·h) ⁻¹)					
起始浓度/(mg·L ⁻¹)		苯酚去除速率		四氯苯酚去除速率	
4-氯酚	苯酚	悬浮细菌	固定化细菌	悬浮细菌	固定化细菌
40	200	35	21	6	2.1
80	400	33	21	6	2.5
120	600	—	21	—	2.5
200	1 000	—	21	—	2.5

全降解后,才可以降解 4-氯酚^[13].固定化细菌对高浓度的基质的降解主要得益于中空纤维膜对细菌的保护作用,使得细菌得以生长,从而降解基质.

3 结论

悬浮生长细菌可以降解一定浓度比例的苯酚和四氯苯酚,当苯酚、四氯苯酚的浓度各自达到 600 mg/L 和 120 mg/L 时,由于基质对细菌的抑制作用,此过程不能进行.本实验采用的中空纤维聚砜膜固定化细菌反应器,可以为细菌提供保护,使之不与有毒的 4-氯酚直接接触,即使四氯苯酚起始浓度高达 1 000 mg/L 时,也可以在 34 h 内将其完全降解,为高浓度的有机物降解开辟了新途径.

参考文献:

[1] 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.

[2] 翟福平, 张贱建, 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.

[3] 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.

[4] Chung, T S, Loh K C, Tay H L. Development of polysulfone membrane for bacteria immobilization to remove phenol [J]. Journal of Applied Polymer Science, 1998, 70(8): 2585-2594.

[5] Folsom B R, Chapman P J. Performance characterization of a model bioreactor for the biodegradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 [J]. Applied Environmental Microbiology, 1991, 57: 162-170.

[6] Klecka G M, Gibson D T. Inhibition of catechol 2, 3, -dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol [J]. Applied Environmental Microbiology, 1981, 41: 1159-1165.

[7] Liu W, Howell J A, Amot T C. A novel extractive membrane bioreactor for treating biorefractory organic pollutant in the presence of high concentrations of inorganic: Application to a synthetic acidic effluent containing high concentrations of chlorophenol and salt [J]. Journal of Membrane Science, 2001, 181: 127-140.

[8] Guo G L, Tseng D H, Huang S T. Cometabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas putida* in a fibrous bed bioreactor [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23: 1653-1657.

[9] Loh K C, Chung T S, Ang W F. Immobilized-cell membrane bioreactor for high-strength phenol wastewater [J]. Journal of Environmental Engineering, 2000, 126(1): 75-79.

[10] 李轶, 胡洪营. 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[J]. 环境科学, 2007, 28(9): 2112-2116.

[11] 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.

[12] Willaert R G, Baron G V, Backer Luc De. Immobilized Living Cell Systems [M]. New York: John Wiley, 1996.

[13] Wang S J, Loh K C, Chua S S. Prediction of critical cell growth behavior of *Pseudomonas putida* to maximize the cometablism of 4-chlorophenol with phenol and sodium glutamate as carbon sources [J]. Enzyme Microbiology and Technology, 2003, 32: 422-430.