

## 2,4,6-三氯酚的共基质降解机理

牛玉晶, 阎宁, 王文兵, 张永明\*

(上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

**摘要:** 分别利用经过驯化的葡萄糖降解菌和2,4,6-三氯酚(TCP)降解菌,通过添加易生物降解的有机物(葡萄糖、苯甲酸、苯酚)作为共基质,对TCP进行好氧生物降解,以考察其降解机理.当利用葡萄糖降解菌降解TCP时,在没有共基质存在时,微生物经历51h的适应期之后,才能生长,与此同时可利用TCP作为唯一碳源而使其降解.当有共基质存在时,TCP几乎没有降解.而当利用TCP降解菌降解TCP时,在没有共基质的条件下,只需43h的适应期可使TCP得到降解.实验结果表明:由于在没有共基质存在的条件下,葡萄糖降解菌和TCP降解菌均能利用TCP作为唯一碳源得到生长,并使TCP同时得到降解.因此在有共基质条件下,使TCP的降解效率提高的机理为次级利用,而非共代谢.

**关键词:** 2,4,6-三氯酚; 共基质; 次级利用; 共代谢

**中图分类号:** X 131.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2012)06-0598-06

### 0 前言

氯酚类化合物是许多工业环节(如造纸、印染、纺织等)的中间产物,随着工业的发展,氯酚类化合物的使用越来越广泛,自然水环境中不断有检测出氯酚类化合物的报道<sup>[1]</sup>,甚至在城市自来水中也有发现<sup>[2]</sup>.近年来,科学研究还发现,很多氯酚类化合物具有类似激素的功能,在对人体造成的伤害中,其引起的遗传性疾病和癌症备受关注<sup>[3]</sup>.由于氯酚类化合物具有致癌、致畸、致突变效应,已被许多国家列入“优先控制污染物”黑名单<sup>[4]</sup>.随着此类物质在农药、医药、造纸、防腐剂生产及燃料、涂料工业的广泛应用,带来了严重的环境问题<sup>[5]</sup>.如何治理环境中所存在的该类化合物是人类面对的一大挑战.

目前治理氯酚类污染物有物理、化学和生物等多种处理方法.其中生物法具有经济、无二次污染等特点引起更多的重视.利用微生物的代谢作用处理含大量难降解有机物组分的废水技术与其他方法相比具有明显的技术和经济竞争力<sup>[6]</sup>.但氯代酚类化合物对许多微生物具有较强的抑制性甚至毒害作用,通常在环境中难以被微生物降解,也不易彻底被矿化<sup>[7]</sup>,是一类难降解有机物.因此许多研究人员试图通过共基质方法来实现对氯酚类化合物的高效快速降解.李轶等分别利用中空纤维聚砜膜固定化细菌反应器,以苯酚为生长基质将4-氯酚降解<sup>[8]</sup>;安森等研究了不同基质存在下的2,4-二氯酚的生物降解,发现投加苯酚或4-氯代酚能明显促进复合菌对2,4-二氯酚的降解<sup>[9]</sup>;李剑等比较了以苯胺作为唯一碳源与能源和有易降解基质存在下苯胺的降解过程,结果表明添加易降解基质显著地提高了

收稿日期: 2012-11-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(50978164);高等学校博士学科点专项科研基金项目(20113127110002);上海市基础研究重点项目(11JC1409100)

作者简介: 牛玉晶(1988-),女,上海师范大学生命与环境科学学院硕士研究生;张永明(1958-),男,上海师范大学生命与环境科学学院教授,博士生导师.

\* 通信作者

苯胺的降解率<sup>[10]</sup>。对于难降解有机物的生物降解, 通过添加易降解的有机物作为共基质进行生物降解, 均能提高其生物降解的效率。但对于通过共基质促使难降解有机物降解速率提高机理的研究还比较少见。目前较多看法是微生物在共基质条件下, 通过共代谢 (Co-metabolism) 作用而实现的。所谓共代谢是指: 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。在这一过程中, 微生物只有依赖初级基质的消耗而生长, 产生具有降解不可利用碳源和能源物质的能力<sup>[11]</sup>。即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。

但在某些情况下, 有些有机物虽然可以被微生物所利用, 但由于浓度较低, 不足以支持微生物的生长, 导致有机物的降解速率很慢。而通过加入易降解有机物作为共基质, 则难降解有机物通过次级利用 (Secondary Utilization) 而加速其降解<sup>[12]</sup>。所谓次级利用是指微生物在初级底物的存在下对次级底物的利用。其中初级底物为容易生物降解的物质, 用来提供能量以维持微生物的生长, 次级底物虽然是不容易被微生物降解的物质, 但在一定条件下, 仍可维持微生物的自身代谢。例如 Aranda 等人利用 *Sphingopyxis chilensis* S37 降解 2,4,6-三氯酚 (TCP) 时, 通过加入葡萄糖作为共基质, 导致 TCP 降解效率提高, 被认为是次级利用的结果<sup>[13]</sup>。本文作者曾通过添加苯酚作为共基质以提高 TCP 的降解速率和矿化度<sup>[14]</sup>, 被认为是通过次级利用的机理实现的。以往对共基质代谢过程中大多数都将其归为共代谢的范畴。本研究则试图通过添加易生物降解基质 (葡萄糖、苯甲酸、苯酚), 分别利用驯化的葡萄糖降解菌和 TCP 降解菌, 比较 TCP 在共基质条件下的降解规律, 以研究共基质作用机理, 为相关难降解有机物的去除提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 溶液的配制

实验所用的试剂 TCP 购自 A Johnson Matthey Company, 葡萄糖、苯甲酸、苯酚等均为分析纯; 甲醇、乙腈为色谱纯, 购自于上海国药集团。

### 1.2 葡萄糖降解菌和 TCP 降解菌的驯化培养

污泥取自上海龙华水质净化厂的二沉池的回流污泥。驯化之前, 首先用自来水清洗污泥, 方法是将 600 mL 污泥倒入 2 L 量筒中, 再加入 1400 mL 自来水, 待污泥自由沉淀 30 min 后将上清液倒掉, 重复此步骤 5 次。由于 TCP 属于难以生物降解的有机物, 为考查其可生物降解性, 分别采用一般污泥和经过 TCP 驯化后的污泥对其进行降解以比较其在不同污泥条件下的去除规律。

一般污泥采用葡萄糖进行驯化, 此时将 100 mg/L 的葡萄糖溶液和无机盐加入到污泥中在好氧条件下进行驯化, 无机盐配方为: 硫酸铵 0.1 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、磷酸氢二钠 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L。驯化期间每天换水 1 次, 经过 1 周的驯化, 当葡萄糖的 COD 去除率在 24 h 内达到 100% 时则认为驯化完成。

在采用 TCP 驯化污泥时, 首先将 50 mg/L 苯酚溶液和无机盐加入到污泥中进行好氧驯化, 无机盐配方为: 硫酸铵 0.1 g/L、磷酸二氢钾 0.5 g/L、磷酸氢二钠 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、酵母浸膏 0.02 g/L。驯化过程中, 苯酚溶液浓度逐步提高到 200 mg/L, 驯化过程中每天换水 1 次。2 周后, 待苯酚去除率在 24 h 内的去除率达到 100% 后, 加入浓度为 5 mg/L 的 TCP 进行驯化, 随后 2,4,6-TCP 的浓度逐步增加到 50 mg/L, 与此同时苯酚浓度从 200 mg/L 逐步减少到 50 mg/L。这期间, 同样每天换水 1 次。经过 30 d 的培养, 当苯酚和 TCP 在 24 h 内的去除率均达到 100% 时, 便得到可同时降解苯酚和 TCP 的活性污泥。

在分别得到葡萄糖和 TCP 降解污泥后, 将污泥用滤纸过滤, 取其上清液 100 mL 分别移入 2 个

250 mL锥形瓶中,再分别加入浓度为1 g/L的葡萄糖溶液10 mL和浓度为200 mg/L的TCP溶液10 mL,微量元素营养液0.11 mL,然后置于摇床中在35℃和150 r/min条件下继续培养3 d,培养期间,每天分别加入浓度为10 g/L的葡萄糖溶液1 mL和500 mg/L的TCP溶液4 mL.待葡萄糖和TCP降解完全,将此菌液置于离心机中在20000 r/min条件下离心5 min,去其上清液,再用去离子水洗涤2次,从而得到降解葡萄糖和TCP高浓度浓缩菌液.

微量元素营养液的配方为NiCl $\cdot$ 6H $_2$ O 0.024 g/L,CoCl $_2$  $\cdot$ 6H $_2$ O 0.19 g/L,CuSO $_4$  $\cdot$ 5H $_2$ O ZnSO $_4$  $\cdot$ 7H $_2$ O 0.15 g/L,H $_3$ BO $_3$  0.006 g/L,Na $_2$ MoO $_4$  $\cdot$ 2H $_2$ O 0.024 g/L.

### 1.3 TCP的降解

分别用上述得到的葡萄糖降解菌液和TCP降解菌液,通过添加易生物降解基质(葡萄糖、苯甲酸、苯酚),采用恒温间歇好氧降解TCP.

第一组采用葡萄糖降解菌降解TCP,分别在编号为A、B、C、D的250 mL锥形瓶中加入浓度为20 mg/L的TCP溶液约150 mL,随后在编号为B、C、D锥形瓶中分别加入浓度均为200 mg/L的葡萄糖、苯甲酸、苯酚,再按照COD:N:P=100:5:1的比例补加氮、磷等无机营养元素(氯化铵19.19 g/L、磷酸氢二钾7.4 g/L、磷酸二氢钾4.4 g/L)、微量元素0.15 mL和磷酸盐缓冲溶液(磷酸二氢钾8.5 g/L、磷酸氢二钾21.75 g/L、七水合磷酸氢二钠33.4 g/L、氯化铵1.7 g/L).将上述锥形瓶置于摇床中,在转速为150 rpm和35℃条件下进行微生物的培养及TCP的降解,期间每间隔一段时间取样测定TCP浓度、OD值.

第二组实验采用TCP降解菌降解TCP,该组实验与第一组一样,只是用TCP降解菌替换葡萄糖降解菌.

### 1.4 分析方法

TCP、苯酚、苯甲酸的分析用美国产的型号为Agilent 1100的高效液相色谱测试;色谱柱ZORBAX-ODS 4.6 $\times$ 150 mm;分析TCP及苯甲酸时流动相为甲醇水溶液,体积比为甲醇:水=80:20;分析苯酚时流动相为乙腈水溶液,体积比为乙腈:水=80:20,流动速率均为1 mL/min.通过测量COD来分析葡萄糖的变化情况,COD分析采用重铬酸钾氧化法<sup>[15-16]</sup>.OD采用紫外-可见光分光光度计SHIMADZU UV-2550(波长为600 nm)测定.

## 2 结果与讨论

### 2.1 利用葡萄糖降解菌降解TCP

图1所示为采用葡萄糖降解菌对TCP进行降解时,微生物的生长情况.从图1中可以看出,当溶液中加入葡萄糖作为TCP降解的共基质时,经过大约6 h后,微生物即进入了对数生长期,而加入苯甲酸和苯酚时,微生物经过大约24 h后才进入对数生长期.而单独以TCP为微生物生长基质时,由于未加入任何共基质有机物,微生物直到51 h后,才略微有些生长.图2所示是与图1所对应的TCP降解情况.从图2可以看出,当溶液中加入共基质有机物后,虽然微生物生长量多,但相应地,TCP的降解率非常低.这说明,此时微生物主要以加入的共基质有机物为碳源或能源.与此同时,葡萄糖、苯甲酸和苯酚分别在24、43和45 h完全降解(图2中未标出).在此条件下,相比共基质,TCP较难被利用.

而未加入共基质有机物时,微生物经过约51 h的适应后,微生物开始略有增加,相应地微生物量在56 h时达到最大值,此时TCP迅速降解.这表明TCP在没有加入任何外来基质时,仍可以被微生物作为碳源而得到利用.

比较是否加入共基质有机物对 TCP 的降解规律可以得知, 在加入了易生物降解基质后, 微生物首先利用初级基质来维持自身生长而非 TCP 这种次级基质, 当没有易降解的初级基质时, 葡萄糖降解菌经过一段时间的适应后, 便以难降解的 TCP 作为唯一碳源维持其生长, 同时使 TCP 得到降解。

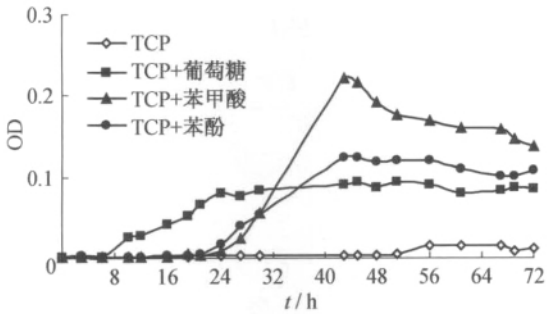


图1 葡萄糖降解菌在不同基质条件下的生长曲线

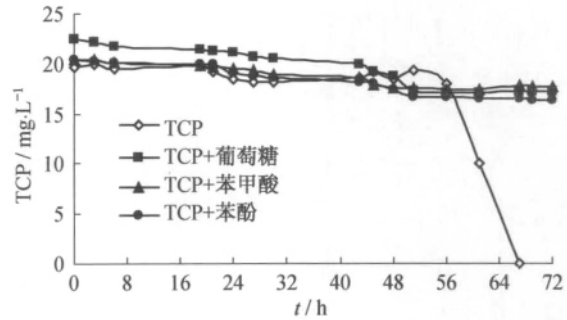


图2 在不同基质条件下利用葡萄糖降解菌降解 TCP 的情况

### 2.2 利用 TCP 降解菌降解 TCP

图3所示是 TCP 降解菌在不同培养基中的生长曲线. 从图3中可以看出, 当加入了苯甲酸和苯酚作为共基质时, 微生物经过 6 h 的适应, 便进入到对数生长期, 而此时以葡萄糖为共基质时, 则要经过 20 h 的适应才进入对数生长期. 比较图1后可以认为, 不同的微生物具有不同的适应期. 与此同时, 未加入共基质而单独以 TCP 为唯一碳源, 微生物经过约 30 h 后, 才开始略微有些增长.

图4所示是与图3所对应的 TCP 降解情况, 比较图3和图4可以看出, 当微生物生长进入对数生长期之后, TCP 开始降解. 其中以苯甲酸作为共基质时, TCP 降解得最快, 随后是葡萄糖和苯酚. 而未加入任何共基质有机物时, 以 TCP 为唯一碳源时, 即使微生物生长量非常少, 但经过约 43 h 后, TCP 也得到完全降解. 加入 200 mg/L 的葡萄糖、苯甲酸、苯酚后所贡献的 COD 分别为 213、393、476 mg/L. 从实验结果可以看出并非碳源浓度高就能导致 TCP 的降解速率快, 这表明不同基质是导致 TCP 降解速率快慢的主要因素. 本实验结果中加入苯甲酸后, TCP 的降解速率提高最快, 而葡萄糖和苯酚次之. 这是因为在此菌液条件下微生物对苯甲酸适应期最短, 其次为葡萄糖和苯酚.

这一结果说明当苯甲酸、葡萄糖和苯酚等有机物加入 TCP 溶液, 并且其浓度远大于 TCP 时, 它们被微生物作为初级基质, 而 TCP 作为次级基质得到利用. 因此在此条件下, 微生物是通过次级利用的机理, 而非共代谢的机理使 TCP 得到有效的去除的.

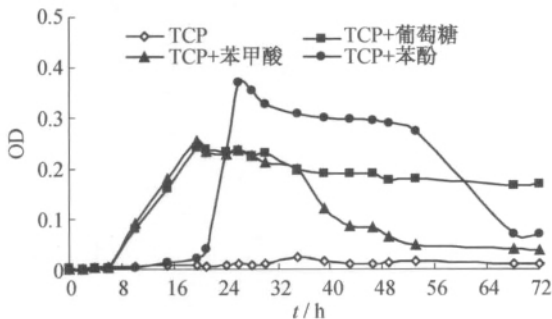


图3 TCP 降解菌在不同基质条件下的生长曲线

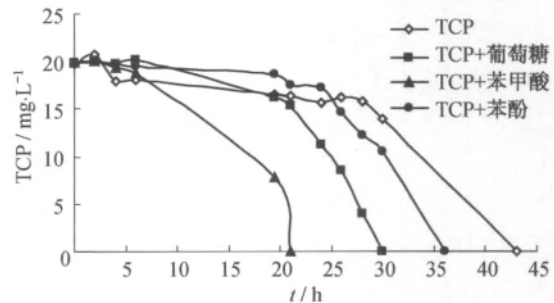


图4 在不同基质条件下利用 TCP 降解菌降解 TCP 的情况

### 3 结 论

利用葡萄糖降解菌降解 TCP 时,在有易降解的有机物作为共基质时,微生物优先将易降解的共基质作为初级基质利用而较快生长,经过 72 h 的培养,TCP 在此情况下降解量非常少.而当没有共基质存在时,微生物则经历较长的适应期之后,才能生长,但仍能将 TCP 作为唯一能源而利用.在此情况下,经过 67 h 后,TCP 被完全降解.

当利用 TCP 降解菌降解 TCP 时,微生物虽然也优先利用易降解的共基质作为初级基质而较快生长,但与此同时,TCP 得到降解.在没有共基质存在条件下,TCP 的降解时间相比采用葡萄糖降解菌时大大缩短.

由于在没有共基质存在条件下,采用葡萄糖降解菌和 TCP 降解菌均能利用 TCP 为唯一碳源而得到生长,并使 TCP 得到有效降解.因此在 TCP 降解过程中,加入易降解的有机碳源作为共基质时,TCP 的降解机理是通过次级利用而实现的,而非共代谢.通过实验证明,加入易降解的葡萄糖、苯甲酸和苯酚作为共基质,通过次级利用可以大大提高 TCP 的降解速率.

### 参考文献:

- [1] SAHINKAYA E ,DILEK F B. Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge-Evaluation of biokinetic coefficients [J]. Environmental Research 2005 99(2):243-252.
- [2] CONTRERAS S ,RODRÍGUEZ M ,MOMANI F A ,et al. Contribution of the ozonation pre-treatment to the biodegradation of aqueous solutions of 2,4-dichlorophenol [J]. Water Research 2003 37(13):3164-3171.
- [3] 王晓东,张光辉,顾平等. 水体中氯酚类污染物的生物降解性研究进展 [J]. 中国给水排水 2008 24(16):17-21.
- [4] HAN J ,DEMING R L ,TAO F M. Theoretical study of molecular structures and properties of the complete series of chlorophenols [J]. The Journal of Physical Chemistry 2004 108(38):7736-7743.
- [5] ARMENANTE P M ,KAFKEWITZ D ,LEWANDOWSKI A ,et al. Anaerobic-aerobic treatment of halogenated phenolic compounds [J]. Water Research 1999 33(3):681-692.
- [6] JANSSEN B D ,KONING D W. Development and application of bacterial cultures for the removal of chlorinated aliphatics [J]. Water Science and Technology 1995 31(1):237-247.
- [7] 柯永洲,张明,胡翔等. 苯酚厌氧降解的研究及应用 [J]. 工业水处理 2007 27(2):9-12.
- [8] 李轶,雷洪彝. 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 [J]. 环境科学 2009 30(10):3008-3010.
- [9] 安淼,周琪,李晖等. 2,4-二氯代酚的共代谢降解研究 [J]. 中国给水排水 2005 21(12):53-55.
- [10] 李剑,谢春娟. 废水中苯胺的好氧共代谢降解实验研究 [J]. 环境工程学报 2007 1(6):51-55.
- [11] 孙文杰,刘勇弟. 微生物共代谢作用的研究进展 [J]. 安阳师范学院学报 2003 5(2):23-25.
- [12] 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.
- [13] ZHANG Y ,SUN X ,CHEN L ,et al. Integrated photocatalytic-biological reactor for accelerated 2,4,6-trichlorophenol degradation and mineralization [J]. Biodegradation 2012 23(1):189-198.
- [14] 张永明,阎宁,孙霞等. 借助于次级利用促进 2,4,6-TCP 的降解与矿化 [J]. 上海师范大学学报:自然科学版,

2011, 40(4): 331-335.

[15] 魏复盛. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.

[16] American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition USA [M]. Washington DC: American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 2001.

## Mechanism of 2,4,6-trichlorophenol degradation by means of co-substrates

NIU Yujing, YAN Ning, WANG Wenbing, ZHANG Yongming\*

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

**Abstract:** Domesticated glucose and 2,4,6-trichlorophenol (TCP) degrading bacteria were respectively used for aerobic biodegradation of TCP by adding readily biodegradable organic matters (glucose, benzoic acid and phenol) as co-substrates to investigate the mechanism of TCP degradation. Glucose degrading bacteria didn't grow until 51 hours of adaptation period in absence of co-substrates, during which TCP could be degraded by the bacteria as sole carbon source. However, TCP was little degraded in presence of co-substrates. While TCP degrading bacteria were used for aerobic biodegradation of TCP, it only took about 43 hours of adaptation period for the bacteria to remove TCP in absence of co-substrates. Experimental results indicated that both glucose and TCP degrading bacteria could utilize TCP as sole carbon source to grow, and TCP was also effectively degraded simultaneously. So TCP removal rate was accelerated in presence of co-substrates due to secondary utilization instead of co-metabolism.

**Key words:** 2,4,6-trichlorophenol; co-substrate; secondary utilization; co-metabolism

(责任编辑: 郁慧)