

高效复合菌降解氯代苯胺类化合物的特性研究

周燕洁, 陆光华

(河海大学环境科学与工程学院, 江苏 南京 210098)

摘要 对某工业污水处理厂曝气池中活性污泥进行了分离和驯化, 得到了能以氯代苯胺类化合物为碳源的高效复合菌群。通过好氧摇瓶实验, 研究了复合菌群对氯代苯胺类化合物的生物降解特性, 并对 3 种单氯代苯胺进行了生物降解动力学分析。结果表明: 复合菌群的 pH 值适应范围很广, 但当 pH 值降至 2.5 时, 氯代苯胺类化合物的生物降解受到明显抑制。降低化合物的初始质量浓度、增加微生物量及添加苯胺生长基质等, 能提高复合菌对氯代苯胺类化合物的去除率。生物降解速率因氯化苯胺中氯原子取代位置不同而不同。

关键词 复合菌群; 氯代苯胺; 生物降解; 动力学分析

中图分类号 X172 **文献标识码** A **文章编号** 1000-198X(2006)04-0357-04

氯代芳烃及其衍生物是化工、医药、制革、电子等行业广泛应用的化工原料、有机合成中间体和有机溶剂, 大多数可在环境中高度持留, 其中有多种被美国 EPA 列为优先监测污染物^[1]。这类化合物不仅对水生生物能产生很强的毒性, 易于在生物体内富集和累积, 而且通过自然水体中的微生物降解作用很难消除其影响^[2-3]。国内外已对氯代苯胺类有机物的生物降解特性进行了研究, 得到了一些此类化合物的降解菌^[4-6], 而对复合菌降解氯代苯胺的研究还很少。为此, 笔者对某工业污水处理厂曝气池中的活性污泥进行了驯化和分离, 得到了能够以氯代苯胺为碳源的复合菌群, 并对 3 种单氯代苯胺的生物降解动力学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 目标化合物

邻氯苯胺, 间氯苯胺, 对氯苯胺。

1.1.2 污泥样品

污泥样品取自南京扬子石化净水一车间曝气池出口处, 污泥质量浓度为 5 ~ 10 g/L。

1.1.3 培养基及缓冲溶液

培养基参考文献 [7] 的方法进行配制, 缓冲溶液参考文献 [8] 的方法进行配制。

1.2 方法

1.2.1 原始菌的活化与富集

取 200 mL 污泥并将其放入 1 000 mL 的烧杯中, 同时加入 200 mL 蒸馏水, 曝气 24 h 后静置。取 10 mL 污泥上清液并将其加入 90 mL 的灭菌液体培养基中, 置恒温摇床(温度 30℃, 频率 150 r/min)培养 48 h。

1.2.2 菌悬液的制备

首先将富集后的菌液放入离心机(频率 4 000 r/min)离心 10 min, 然后倾去上清液, 再用缓冲溶液清洗两三次, 使菌体悬浮于缓冲溶液。制成的菌悬液细菌总数约为 1×10^8 个/mL。

1.2.3 氯代苯胺降解菌的驯化

采用添加苯胺和邻氯苯胺的选择性好氧摇瓶培养方法^[9]驯化可降解氯代苯胺的复合菌群。

在 250 mL 已灭菌的锥形瓶中加入 10 mL 菌悬液、90 mL 灭菌选择培养基和一定量的苯胺储备液, 使苯胺初始质量浓度达到 10 mg/L, 置恒温摇床(温度 30℃, 频率 150 r/min)培养, 5 d 转移接种 1 次, 并逐渐增加驯化

物的质量浓度.驯化4轮后,苯胺和邻氯苯胺的质量浓度均达到20 mg/L.取10 mL此驯化液接种至90 mL灭菌无碳源培养基中,加入一定量的苯胺和邻氯苯胺溶液,使其质量浓度达到5 mg/L,在上述条件下继续驯化4轮.将最后一轮的驯化液作为后续实验的接种液.经细菌总数测定,接种液的细菌总数平均为 7.8×10^6 个/mL.在降解实验开始前对此接种液进行高效液相色谱分析,以确保无苯胺和邻氯苯胺残留.

1.2.4 复合菌群对氯代苯胺的生物降解实验

采用好氧摇瓶培养法研究复合菌群对氯代苯胺的生物降解特性.取一系列已灭菌的250 mL锥形瓶,分别加入一定量灭菌无碳源培养基、接种液及氯代苯胺溶液,置恒温摇床(温度30℃,转速150 r/min)培养14 d.同时做无菌空白对照实验,样品和对照均做一组平行实验.

氯代苯胺质量浓度用Waters1525型高效液相色谱仪测定.实验中所选流动相为 $V(\text{甲醇})/V(\text{水})=70/30$,流量为1.0 mL/min,分析波长为249 nm,柱温为40℃,进样量为25 μL .

2 结果与讨论

2.1 氯代苯胺在不同条件下的降解特性

2.1.1 有机物初始质量浓度的影响

为了研究不同初始质量浓度下氯代苯胺的降解特性,在90 mL无碳源培养基中加入10 mL接种液和一定量的邻氯苯胺储备液后进行了生物降解实验,实验结果如图1所示.

由图1可知,邻氯苯胺的最终降解率随着邻氯苯胺初始质量浓度的增加而逐渐降低,14 d时的降解率分别为69.8%,58.3%,37.5%,同时,达到平衡状态的时间也逐渐延长.这说明,邻氯苯胺初始质量浓度对复合菌降解邻氯苯胺的效果有较大影响.从毒理学角度看,氯代苯胺类化合物能与微生物机体内的亲核成分(如蛋白质、酶等)发生亲电作用,从而会破坏机体的正常新陈代谢过程^[10].因此,随着溶液中邻氯苯胺质量浓度的增加,更多的邻氯苯胺分子将穿过生物膜进入微生物体内,并与机体靶位发生强烈的不可逆键合,从而会大大增强邻氯苯胺的毒性,使一些微生物的代谢受到抑制,甚至停止.

2.1.2 微生物量的影响

为了研究微生物量对邻氯苯胺去除率的影响,在一定量的灭菌无碳源培养基中分别加入10 mL,20 mL,40 mL,60 mL的接种液和邻氯苯胺储备液(邻氯苯胺初始质量浓度为10 mg/L)后进行了生物降解实验,实验结果如图2所示.

由图2可知,增加溶液中的微生物量,邻氯苯胺的去除率会有所提高.这说明,环境中的微生物量对氯代苯胺类化合物的降解效果有直接影响,有效菌的数量越多,所催生出的可降解氯代苯胺的酶或酶系就越多,并最终导致被降解的氯代苯胺量越大.因此,提高溶液中的微生物量,有助于提高氯代苯胺的生物降解效果.

2.1.3 添加生长基质的影响

为了研究添加苯胺对邻氯苯胺生物降解的影响,在90 mL的无碳源培养基中加入10 mL的接种液和一定量的邻氯苯胺和苯胺溶液后进行了生物降解实验,实验结果如图3所示.

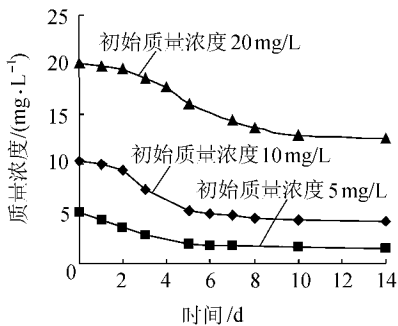


图1 不同初始质量浓度下邻氯苯胺的降解曲线
Fig.1 Biodegradation curves of 2-chloroaniline at different initial concentrations

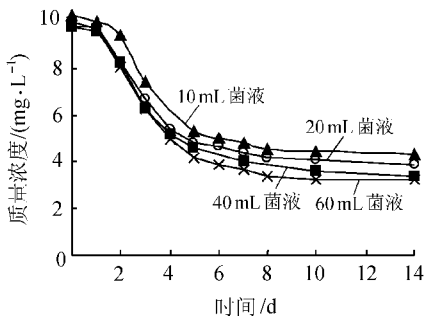


图2 不同加菌量条件下邻氯苯胺的降解曲线
Fig.2 Biodegradation curves of 2-chloroaniline at different quantities of bacteria

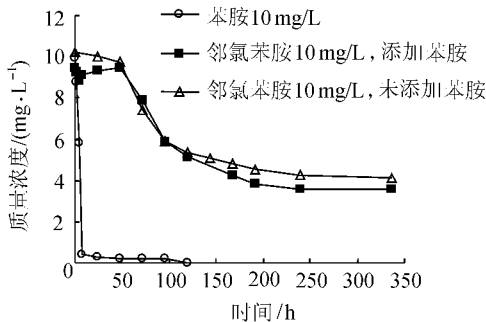


图3 苯胺存在条件下邻氯苯胺的降解曲线
Fig.3 Biodegradation curves of 2-chloroaniline with phenol added

由图 3 可知,未添加苯胺时,初始质量浓度为 10 mg/L 的邻氯苯胺的最终去除率为 58.3%,而当苯胺存在时,邻氯苯胺的降解出现了迟滞期,但邻氯苯胺的最终去除率有了提高,达到 62.7%。这说明,添加苯胺有助于邻氯苯胺的生物降解,共代谢作用明显。Tongpim 等^[11]认为,微生物对共代谢中的毒性反应具有自我恢复功能,既可以提高生长基质的质量浓度或降低目标污染物的质量浓度,又可以恢复微生物的活性。有关研究表明,添加底物类似物能刺激降解菌的生长或提高其降解活性。由于复合菌通过降解易降解的苯胺,自身的数量及活性得到提高,所以有效地提高了对邻氯苯胺的降解效果。

2.1.4 水体 pH 值的影响

为了研究 pH 值对邻氯苯胺降解的影响,在 90 mL 灭菌无碳源培养基、10 mL 接种液及一定量的邻氯苯胺储备液(邻氯苯胺初始质量浓度为 10 mg/L)中加入酸或碱,将 pH 值分别调节至 2.5、5.5、7.5、9.5 后进行了降解实验,实验结果如图 4 所示。

由图 4 可知:当 pH = 2.5 时,邻氯苯胺的降解受到明显抑制,甚至停止;而当 pH = 5.5~9.5 时,复合菌对邻氯苯胺均有明显的降解作用,pH = 7.5 时降解效果最佳。其原因是,驯化过程中选定的 pH 值均为 7.5 左右,复合菌群已适应在中性条件下生长,过高或过低的 pH 值均会使微生物对外界环境产生再适应的过程。从毒理学角度看,当 pH = 5.5~9.5 时,邻氯苯胺大部分以分子态形式存在,这种状态使其更易溶入细胞,导致邻氯苯胺降解;而随着溶液中氢离子质量浓度的增加,生物膜内外存在的氢离子质量浓度梯度遭到破坏,膜上线粒体中 ATP 的合成受阻,使携带质子的邻氯苯胺更易透过生物膜,并与机体靶位发生强烈的不可逆键合,从而大大增强邻氯苯胺的毒性,并抑制复合菌对邻氯苯胺的降解作用^[12]。

2.2 3 种单氯代苯胺的生物降解动力学分析

为了分析单氯代苯胺的生物降解动力学特性,在 90 mL 的无碳源培养基中加入 10 mL 的接种液和一定量的单氯代苯胺储备液(邻、间、对氯苯胺的初始质量浓度分别为 10 mg/L、10 mg/L、5 mg/L)后进行了降解实验,并采用线性回归分析方法对实验结果(图 5)进行了处理,得到了反应动力学方程及半衰期,如表 1 所示。

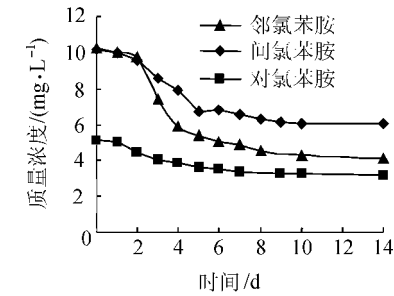


图 5 氯代苯胺化合物的生物降解曲线
Fig.5 Biodegradation curves of chloroanilines

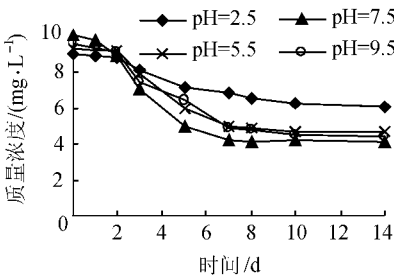


图 4 不同 pH 值条件下
邻氯苯胺的降解曲线
Fig.4 Biodegradation curves of
2-chloroaniline at different pH values

表 1 氯代苯胺的生物降解动力学方程				
Table 1 Dynamic equation for biodegradation of chloroanilines				
化合物	反应动力学方程	速率常数 k/d^{-1}	半衰期 $t_{1/2}/d$	相关系数
邻氯苯胺	$\ln[\rho/(mg \cdot L^{-1})] = -0.10X(t/d) + 2.32$	0.102	6.7	0.91
间氯苯胺	$\ln[\rho/(mg \cdot L^{-1})] = -0.058X(t/d) + 2.32$	0.058	12.0	0.94
对氯苯胺	$\ln[\rho/(mg \cdot L^{-1})] = -0.055X(t/d) + 1.63$	0.055	12.6	0.92

注: t 为反应时间; ρ 为 t 瞬时有机物的残留质量浓度。

3 结 论

- a. 通过对工业污水处理厂曝气池中活性污泥的分离和驯化,得到了能以氯代苯胺类化合物作为碳源的高效复合菌群。
- b. 复合菌群对氯代苯胺类化合物的降解率随化合物初始质量浓度的提高而降低,随微生物量的增加而增加;当 $pH \approx 7.5$ 时,降解效果最佳;当 $pH = 2.5$ 时,微生物的降解受到抑制;添加生长基质苯胺有助于提高氯代苯胺类化合物的生物降解效果。
- c. 氯原子取代位置的不同对氯代苯胺类化合物的生物降解速率有较大影响。通过对复合菌群降解氯代苯胺类化合物反应过程的分析,得到了 3 种化合物的最终去除率、降解速率常数以及半衰期。邻氯苯胺的最终去除率达到 60%,明显高于间氯苯胺和对氯苯胺的最终去除率。

参考文献:

- [1] 郎佩珍, 龙凤山, 袁星, 等. 松花江中游(哨口—松花江村段)水中有毒有机物污染研究[J]. 环境科学进展, 1993, 1(6): 47-55.
- [2] LU Guang-hua, ZHAO Yuan-hui, YANG Shao-gui, et al. Quantitative structure-biodegradability relationships of substituted benzenes and their biodegradability in river water[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2002, 69(1): 111-116.
- [3] LU Guang-hua, YUAN Xing, WANG Chao. Quantitative structure-toxicity relationships for substituted aromatic compounds to *Vibrio fischeri*[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2003, 70(4): 832-838.
- [4] ZEYER J, KEAMEY P C. Microbial degradation of *para*-chloroaniline as sole carbon and nitrogen source[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1982, 17: 213-215.
- [5] MICHAEL L, CHRISTEL H. Degradation of aniline and monochlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains[J]. Archives of Microbiology, 1990, 155: 56-61.
- [6] BOON N, TOP E M, GORIS J, et al. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 7: 2906-2913.
- [7] 周群英, 高廷耀. 环境工程微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 329-331.
- [8] 甘平, 樊耀波, 王敏健. 氯苯类化合物的生物降解[J]. 环境科学, 2001, 22(3): 93-96.
- [9] CRIPE C R, WALKER W W. A shake-flask test for estimation of biodegradability of toxic organic substances in the aquatic environment[J]. Ecotoxicology and Environment Safety, 1987, 14: 239-251.
- [10] VEITH G D, MEKENYAN O G. A QSAR approach for estimating the aquatic toxicity of soft electrophiles[J]. Quantitative Structure-Activity Relationships, 1993, 12: 349-356.
- [11] TONGPIM S, MICHAEL A P. Co-metabolic oxidation of phenanthrene to phenanthrene trans-9,10-dihydrodiol by *Mycobacterium* strain S1 growing on anthracene in the presence of phenanthrene[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1999, 54: 369-376.
- [12] 于瑞莲, 赵元慧, 袁星. 取代苯胺和苯酚类化合物对大型蚤的毒性及 pH 值对其毒性的影响[J]. 环境化学, 1998, 17(5): 451-455.

Degradation of chloroanilines by dominant mixed bacteria

ZHOU Yan-jie, LU Guang-hua

(College of Environmental Science and Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract Dominant mixed bacteria with chloroanilines used as carbon source was obtained by domestication and isolation of activated sludge in the aeration tank at an industrial wastewater treatment plant. The properties of biodegradation of chloroanilines with dominant mixed bacteria were studied by shake-flask test, and a dynamic analysis was performed of biodegradation of three kinds of chloroanilines. Some conclusions are drawn as follows: mixed bacteria are suitable for a wide range of pH value, but the biodegradation of chloroanilines will be restrained when the pH value is below 2.5; the decrease of the initial concentration of chloroanilines, the increase of bacterium concentration and adding of the growth matrix can improve the removal rate of chloroanilines; the rates of biodegradation are different with different sub-positions of chlorine atoms in chloroanilines.

Key words mixed bacteria; chloroaniline; biodegradation; dynamic analysis