

李晶, 饶婷, 李巍, 等. 2011. 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* LY1) 共代谢降解苯酚和 4-氯苯酚系统的降解动力学研究[J]. 环境科学学报, 31(10): 2109-2116
Li J, Rao T, Li W, et al. 2011. Kinetic study on cometabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by *Pseudomonas putida* LY1 [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 31(10): 2109-2116

恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* LY1) 共代谢降解苯酚和 4-氯苯酚系统的降解动力学研究

李晶^{1,2}, 饶婷¹, 李巍¹, 李轶^{1,*}

1. 河海大学环境学院, 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. 泰州市环境科学研究所, 泰州 225300

收稿日期: 2010-12-03 修回日期: 2011-01-20 录用日期: 2011-01-21

摘要: 对恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* LY1) 共代谢降解苯酚和 4-氯苯酚(4-CP) 系统进行了降解实验和动力学研究. 结果表明, 恶臭假单胞菌可以有效地降解苯酚, 苯酚浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时细菌生长速度最快. 4-氯苯酚浓度的增加会对细菌产生一定的抑制作用. 同时, 用改进的 Haldane 方程模拟恶臭假单胞菌 LY1 单独降解苯酚的过程, 并根据实验数据利用 MATLAB 软件求出了方程参数值为: 最大比降解速率 $R_m = 0.113 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 饱和常数 $K_s = 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑制常数 $K_p = 126.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 在此基础上修正改进的 Haldane 方程用以模拟恶臭假单胞菌共代谢降解苯酚和 4-氯苯酚, 利用 MATLAB 软件并结合 6 组共代谢降解实验(PC1 ~ PC2, PC5 ~ PC8) 数据解出未知参数 K_1, μ_1, K_2, μ_2 , 发现参数改进的 Haldane 方程经过修正后能很好地模拟恶臭假单胞菌共代谢降解苯酚和 4-氯苯酚的过程. 该模型为污水中难降解有机物的生物降解提供了理论参考.

关键词: 共代谢降解; 4-氯苯酚; 苯酚; 动力学; 恶臭假单胞菌

文章编号: 0253-2468(2011)10-2109-08 中图分类号: X172 文献标识码: A

Kinetic study on cometabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by *Pseudomonas putida* LY1

LI Jing^{1,2}, RAO Ting¹, LI Wei¹, LI Yi^{1,*}

1. Key Laboratory of Integrated Regulation and Resource Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098

2. Taizhou Institute of Environmental Science, Taizhou 225300

Received 3 December 2010; received in revised form 20 January 2011 accepted 21 January 2011

Abstract: Degradation of phenol and 4-chlorophenol by *Pseudomonas putida* LY1 was studied. It was found that phenol can be effectively degraded by the bacteria with an optimum phenol concentration at $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Inhibition of the bacteria increased with the 4-chlorophenol concentration. A modified Haldane equation was used to study the biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* LY1. The equation parameters calculated using MATLAB software were as follows: $R_m = 0.113 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $K_s = 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $K_p = 126.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The modified Haldane equation was also used to simulate the cometabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by *Pseudomonas putida* LY1. The cometabolic degradation model can simulate the process of cometabolic degradation very well. The model provides a theoretical and technical reference for the biodegradation of chlorinated refractory organic pollutants in wastewater treatment plants.

Keywords: cometabolic degradation; 4-chlorophenol; phenol; kinetics; *Pseudomonas putida* LY1

1 引言(Introduction)

随着工农业生产和科学技术的快速发展, 人工

合成有机物的品种和数量日益增多. 这些有机物一方面对提高人类生活水平做出了很大贡献, 但同时由于绝大部分有机物通常难以甚至不能被环境中

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51009050)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 51009050)

作者简介: 李晶(1984—), 女, E-mail: lijing841017@hhu.edu.cn; * 通讯作者(责任作者), E-mail: envly@hhu.edu.cn

Biography: LI Jing(1984—), female, E-mail: lijing841017@hhu.edu.cn; * Corresponding author, E-mail: envly@hhu.edu.cn

的土著微生物所降解 (Arutchelvan *et al.*, 2005), 从而对环境造成一定程度的污染. 其中, 氯代苯酚就是一类在生产和生活中广泛应用并被大量排放到水体中的难降解有机污染物, 氯代苯酚一旦进入生态环境中, 就会在水体、土壤和底质中长期停留, 并在食物链中不断积累、富集, 从而对生物体产生毒性 (Li *et al.*, 2006). 因此, 加强对有机物特别是难降解有机物的控制和去除方法的研究, 减少其对生态环境的污染具有十分重要的意义.

研究发现, 很多微生物可以共代谢降解有机物, 如 Wahman 等 (2006) 发现硝化混合菌群能共代谢降解 4 种低浓度的三卤代甲烷; Ziaogova 等 (2007) 利用恶臭假单胞菌和木糖葡萄球菌对 1,2-二氯苯的共代谢过程进行了研究; Wang 等 (2001) 和 Li 等 (2007) 发现恶臭假单胞菌经苯酚驯化后能共代谢降解 4-氯苯酚 (4-CP). 上述研究表明, 微生物的共代谢降解是包括氯代苯酚在内的难降解有机污染物降解的重要途径, 对于一定的污染水体, 可以通过强化、刺激微生物生长的方法来实现对难降解有机物的有效去除. 然而, 目前这方面的研究主要集中在细菌的培养和对污染物的降解实验过程等方面, 缺少关于细菌生长和污染物降解动力学模型的研究, 且未能实现对实验过程中的优化和放大设计, 影响了其应用进程.

因此, 本文通过系统研究恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* LY1 共代谢降解苯酚和 4-氯苯酚的过程, 探寻生长基质和非生长基质在共代谢过程中相互影响的规律, 阐明共代谢模式的主要影响因素, 推测基质共代谢的可能途径, 构建共代谢降解动力学模型, 从而发展和丰富微生物共代谢降解氯代有机物的理论及其动力学的相关内容. 同时, 该研究可为污水处理中难降解氯代有机物的微生物降解提供理论参考和支撑, 对于保护水环境和人类健康具有十分重要的理论和现实意义.

2 材料与方 法 (Materials and methods)

2.1 材 料

2.1.1 培养基 培养基为苯酚无机盐培养液, 通过在无机盐溶液中添加 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯酚配置而成. 无机盐溶液的组成为 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): Na_2HPO_4 3.8, KH_2PO_4 1.0, NaCl 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, NH_4Cl 0.1 (Li *et al.*, 2006).

2.1.2 降解菌来源 实验所用菌株为恶臭假单胞

菌 *Pseudomonas putida*, 该菌株从某长期被酚类污染的水体底质中分离得到, 其生理生化特性及其分子生物学鉴定详见文献 (Li *et al.*, 2007). 恶臭假单胞菌可以以苯酚为唯一碳源进行生长并降解苯酚, 但对 4-CP 只能通过共代谢途径降解.

2.1.3 降解菌的培养 将菌株接种到装有 250 mL 无机盐溶液的锥形瓶中, 加入一定量的苯酚溶液作为微生物生长的唯一碳源和能源, 使得瓶中的苯酚浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 调节瓶中溶液 pH 值为 7.1 ± 0.2 . 设置恒温振荡器的参数: 温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 振荡速率为 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (下同), 然后将菌株培养液放入 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床中培养. 定期观察锥形瓶中溶液颜色的变化, 当瓶中溶液培养至无色浑浊时, 倒掉一半培养液并换上新鲜的含苯酚的无机盐溶液, 此时的苯酚浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 不断重复该过程并加倍提高苯酚的浓度, 最终得到实验中所用的恶臭假单胞菌. 所有的实验材料 (除微生物和苯酚外) 均应在 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 下消毒 20min 备用. 以上操作详见文献 (Arutchelvan *et al.*, 2005).

2.2 试验方法

2.2.1 苯酚降解试验方案 称取 10 g 苯酚并加入 $0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, 用去离子水定容至 1L 制成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯酚储存液备用, 称取 1 g 4-CP 并加入 $0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, 用去离子水定容至 1 L 制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4-CP 储存液备用.

配制苯酚浓度为 $0 \sim 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 110, 200, 310$ 和 $380 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的无机盐溶液, 初始 pH 调至 $7.1 \sim 7.3$, 分别接入 5 mL 处于对数增长期的菌液 (所用培养基为 2.1.1 节所示苯酚培养基, 培养约 8 h 后到达对数增长期, 此时的菌体浓度为 $10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$); 然后放入恒温振荡器中培养, 保持恒温振荡器的温度和振荡速率分别为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 定期取样测定苯酚浓度和细菌浓度. 通过平行试验, 研究不同浓度条件下苯酚的降解过程.

2.2.2 共代谢降解试验方案 配制苯酚和 4-CP 浓度分别为 $0 \sim 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $13 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无机盐溶液, 用氢氧化钠或盐酸调节培养基 pH 为 $7.1 \sim 7.3$, 分别投加 5 mL 处于对数增长期的菌液后放入恒温振荡器中培养, 保持恒温振荡器的温度和振荡速率分别为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 定期取样测定细菌浓度、苯酚和 4-CP 浓度. 通过平行试验, 研究不同浓度条件下 4-CP 的降解过程.

2.3 分析方法

2.3.1 微生物浓度测定方法 定期取 5 mL 水样用于细菌浓度分析, pH 值采用 pH 计(Orion 3 Star, USA)测定, 采用紫外分光光度计 UV-7504 测定 600nm 波长处的光密度(OD_{600}), 细菌浓度 C_{cell} ($mg \cdot L^{-1}$) 的计算公式为: $C_{cell} = 314.5 \times OD_{600}$ (Li *et al.*, 2006).

2.3.2 苯酚和 4-CP 测定方法 苯酚浓度采用外标法测定, 主要仪器为 Trace GC2000 气相色谱仪(Thermo Scientific, USA). 首先取 5 mL 水样, 用硫酸酸化至 pH 值为 2 以阻止生物反应的进行, 并将酸化后的水样在 $3800 r \cdot min^{-1}$ 下离心 15 min; 然后用 5 mL 二氯甲烷萃取水样 20 min, 静置 20 min 后加入无水硫酸钠脱水, 取出有机相过滤; 最后取 1 μL 萃取液用于气相色谱分析. 检测器为火焰离子化检测器(FID), 载气为氮气, 流速为 $1.0 mL \cdot min^{-1}$; 空气、氢气和尾吹流速分别为 350、35 和 $30 mL \cdot min^{-1}$. 进样口和检测器温度分别为 $220 \text{ }^\circ C$ 和 $280 \text{ }^\circ C$; 样品分

流比为 20:1 柱温的升温程序为: $100 \text{ }^\circ C$ 保留 1 min, 以 $10 \text{ }^\circ C \cdot min^{-1}$ 的速度升温至 $160 \text{ }^\circ C$, 保留 1 min, 毛细管柱为 DB-5 ($30 m \times 0.25 mm \times 0.25 \mu m$) (Li *et al.*, 2006). 4-CP 浓度测定方法同苯酚.

3 结果(Results)

3.1 单独降解苯酚动力学模型

利用恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* LY1) 对不同浓度的苯酚进行单独降解苯酚实验, 相关数据如表 1 所示. 由表 1 可知, 随着苯酚初始浓度的增加, 苯酚的降解速率大致呈现上升的趋势. 细菌的比增长速率(μ) 和细菌产率(Y) 的变化趋势一致, 均为先增加后减小, 变化范围分别在 $0.040 \sim 0.122 h^{-1}$ 和 $0.136 \sim 0.765 mg \cdot mg^{-1}$ (以每 mg 苯酚中的 SS 计) 之间, 当苯酚浓度为 $50 mg \cdot L^{-1}$ 时 μ 和 Y 均达到了最大值. 可见, 浓度为 $50 mg \cdot L^{-1}$ 的苯酚最有利于恶臭假单胞菌的生长.

表 1 细菌生长和苯酚降解的相关参数

Table 1 Bacterial growth and related parameters of phenol degradation

初始苯酚浓度 ($mg \cdot L^{-1}$)	迟滞期 /h	细菌最高浓度 ($mg \cdot L^{-1}$)	苯酚降解速率 ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	μ/h^{-1}	细菌产率 Y ($mg \cdot mg^{-1}$)
20	0	13.2	1.26	0.090	0.474
30	0	19.5	1.70	0.112	0.556
40	0	23.9	1.51	0.117	0.695
50	0	25.8	1.87	0.122	0.765
60	0	28.9	2.15	0.117	0.462
70	0	33.0	2.43	0.103	0.437
90	<10	34.6	2.08	0.101	0.348
110	<10	38.1	2.52	0.098	0.226
200	<10	41.2	4.19	0.089	0.190
310	<16	44.0	5.55	0.067	0.139
380	<25	52.8	4.27	0.040	0.136

为深入了解恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* LY1) 对苯酚的降解过程, 本研究采用动力学方程来模拟降解过程. 常用 Haldane 方程来模拟中低浓度的苯酚降解过程, 研究发现, Haldane 方程并不能很好地模拟微生物降解高浓度基质的过程 (Ma *et al.*, 2009; Allsop *et al.*, 1993). Wang 等 (2009) 在综合考虑高浓度基质的毒性抑制及生物的衰亡系数等因素的基础上, 提出了经过改进的 Haldane 方程 (1).

$$R_{ph} = -\frac{dS_1}{Xdt} = \frac{R_m S_1}{K_s + S_1 + \frac{(S_{10} - S_1)^2}{K_p}} \quad (1)$$

式中 R_{ph} 为苯酚的比降解速率 ($mg \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$), S_{10} 为苯酚的初始浓度 ($mg \cdot L^{-1}$), S_1 为降解 t 时刻的苯酚浓度 ($mg \cdot L^{-1}$), X 为降解 t 时刻微生物的浓度 ($mg \cdot L^{-1}$), R_m 为苯酚的最大比降解速率 ($mg \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$), K_s 为饱和常数 ($mg \cdot L^{-1}$), K_p 为中间代谢产物抑制常数 ($mg \cdot L^{-1}$).

采用两组苯酚降解实验数据 (初始苯酚浓度分别为 70 和 $380 mg \cdot L^{-1}$) 求解公式 (1) 中的各个参数值, 其余各组实验用来验证模型. 利用 MATLAB 软件求出的方程参数值如下: $R_m = 0.113 mg \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$, $K_s = 3.5 mg \cdot L^{-1}$, $K_p = 126.6 mg \cdot L^{-1}$, 则苯酚降解动力学方程为:

$$R_{ph} = -\frac{dS_1}{Xdt} = \frac{0.113S_1}{3.5 + S_1 + \frac{(S_{10} - S_1)^2}{126.6}} \quad (2)$$

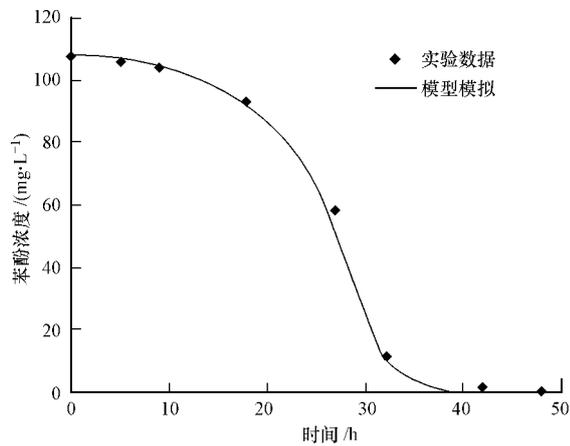


图1 苯酚单独降解试验结果和模拟结果比较(苯酚浓度 $110 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig. 1 Results of phenol biodegradation and simulation results (Phenol concentration $110 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

表2 微生物生长和苯酚/4-CP 共代谢

Table 2 Bacterial growth and the metabolic biodegradation of phenol and 4-chlorophenol

实验	初始苯酚浓度 /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	初始4-CP 浓度 /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	最终4-CP 浓度 /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	迟滞期 /h	苯酚去除 时间 ^a /h	4-CP 去除 时间 ^a /h	细菌浓度 ^a /($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
PC1	16.39	13.08	0.287	<8	34	34	10.38
PC2	45.27	13.70	0.007	<8	38	34	14.47
PC3	97.70	13.92	0.006	<13	58	58	27.36
PC4	219.00	17.69	0.016	<13	90.5	82	45.29
PC5	48.79	38.79	0.145	<26	66	66	15.73
PC6	97.72	40.07	0.054	<34	82	82	27.68
PC7	204.40	36.24	0.007	<54	122	122	46.55
PC8	407.00	43.57	0.013	<139	242	242	71.08

注: a. 当苯酚浓度降为零时所对应的降解时间和细菌浓度.

为了探讨共代谢过程中苯酚和4-CP间的降解行为关系,本文比较了苯酚单独存在和苯酚/4-CP共代谢两种情况下, $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯酚的降解及微生物的生长情况,结果见图2.从图2可知, $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯酚在添加了 $36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的4-CP后,降解时间由45 h延长至115 h,苯酚的平均降解速率从 $4.19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 减少到 $1.765 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,说明4-CP的存在对苯酚的降解产生了抑制作用;细菌增长至最大浓度所需的时间也由45 h延长至140 h,迟滞期明显延长,细菌的比增长速率由 0.0886 h^{-1} 降低至 0.0295 h^{-1} ,可见4-CP对微生物的生长具有毒害作用.

通过已确立的模型模拟不同浓度苯酚的降解曲线(除了初始苯酚浓度为70和 $380 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 两组实验外),发现 R^2 均高于0.90.由图1可知,改进的Haldane模型能较好地模拟本次实验,表明该模型考虑了苯酚降解中间代谢产物的抑制作用,可以用于模拟水处理中酚类有机物的生物降解过程.

3.2 苯酚和4-氯苯酚共代谢降解过程

在苯酚/4-CP共代谢的试验结果(表2)中,比较试验PC1~PC4和PC5~PC8,发现随着初始苯酚浓度的增加,微生物浓度也在显著增加,这是由于微生物的生长提供唯一的碳来自苯酚.比较PC2和PC5、PC3和PC6、PC4和PC7三组数据发现,在苯酚浓度几乎不变的情况下,4-CP浓度的增加会导致迟滞期和去除时间的延长,而微生物浓度几乎没什么变化,说明在实验开始阶段4-CP浓度的增加会抑制微生物的生长和基质的降解.

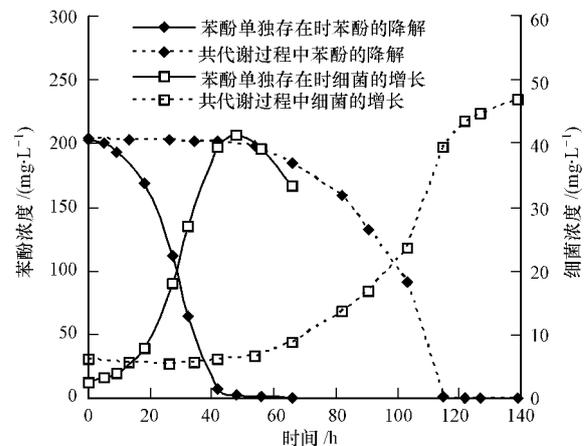


图2 4-CP对苯酚降解和微生物生长的影响

Fig. 2 Influence of degradation of 4-CP and microbial growth

3.3 苯酚和 4-氯苯酚共代谢降解动力模型

3.3.1 共代谢降解模型的构建 在共代谢降解的过程中 4-CP 的存在对微生物的生长和苯酚的降解有抑制作用,为深入分析该影响过程,采用动力学方程来进行模拟.

考虑 4-CP 的存在对微生物生长和苯酚的降解产生的影响,对改进的 Haldane 方程作一定的修正来反映共代谢中苯酚的降解过程. 假设非生长基质可以通过因子 $[1 + \frac{Z_i^{n_i}}{K_i}]$ (Z_i 为常数) 影响 R_m 和 K_s 的值,因子 $i = (1, 2)$, 当 $i = 1$ 时 $Z_1 = S_2$, Z_1 影响 R_m 的值; 当 $i = 2$ 时 $Z_2 = S_2/S_1$, Z_2 影响 K_s 的值 (S_1 和 S_2 分别表示苯酚和 4-CP 浓度). 将因子 $[1 + \frac{Z_i^{n_i}}{K_i}]$ 代入公式 (1) 得到公式 (3).

$$R_{ph} = -\frac{dS_1}{Xdt} = \frac{\frac{R_m}{[1 + \frac{Z_1^{n_1}}{K_1}]} S_1}{K_s [1 + \frac{Z_2^{n_2}}{K_2}] + S_1 + \frac{(S_{10} - S_1)^2}{K_p}} \quad (3)$$

关于 4-CP 的转化,有研究认为,非生长基质的转化是利用生长基质氧化所产生的电子和/或利用微生物衰减所提供的电子(Saéz *et al.*, 1993). 因此,非生长基质的转化速率应当与生长基质消耗速率和/或微生物的衰减速率存在一定的比例关系,具体如公式 (4) 所示.

$$\frac{dS_2}{dt} = \alpha \frac{dS_1}{dt} - \beta bX \quad (4)$$

$$-\frac{dS_1}{dt} = \frac{\frac{R_m}{[1 + \frac{[S_{20} - \alpha(S_{10} - S_1)]^{n_1}}{K_1}]} [X_0 + Y_s(S_{10} - S_1)] S_1}{K_s [1 + \frac{[(S_{20} - \alpha(S_{10} - S_1))/S_1]^{n_2}}{K_2}] + S_1 + \frac{(S_{10} - S_1)^2}{K_p}} \quad (10)$$

将公式 (5) 和公式 (10) 相结合,得到共代谢过

程中 4-CP 的转化速率为:

$$\frac{dS_2}{dt} = \alpha \frac{dS_1}{dt} \quad (5)$$

$$S_2 = \alpha S_1 + C \quad (6)$$

根据 Roels (1983) 提出的共代谢降解中 4-CP 存在时关于细菌产率的公式:

$$\frac{dX}{dt} = Y_s \left(-\frac{dS_1}{dt} \right) - bX \quad (7)$$

细菌内源衰减系数 b 为 0.002 h^{-1} (Wang *et al.*, 2003), 而一般情况下, $Y_s \left(-\frac{dS_1}{dt} \right)$ 值比 bX 大得多, 因此, 公式 (7) 可以写成公式 (8), 由公式 (8) 进一步可得公式 (9).

$$\frac{dX}{dt} = Y_s \left(-\frac{dS_1}{dt} \right) \quad (8)$$

$$X = X_0 + Y_s(S_{10} - S_1) = -Y_s S_1 + C \quad (9)$$

式中, Y_s 为 4-CP 存在下的细菌产率 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), X_0 为菌体初始浓度 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

将公式 (4) 和 (9) 代入公式 (3) 中, 得到共代谢过程中苯酚的降解速率公式为:

$$-\frac{dS_2}{dt} = \alpha \frac{\frac{R_m}{[1 + \frac{[S_{20} - \alpha(S_{10} - S_1)]^{n_1}}{K_1}]} [X_0 + Y_s(S_{10} - S_1)] S_1}{K_s [1 + \frac{[(S_{20} - \alpha(S_{10} - S_1))/S_1]^{n_2}}{K_2}] + S_1 + \frac{(S_{10} - S_1)^2}{K_p}} \quad (11)$$

3.3.2 参数的求解及模型的验证 公式 (10) 中包含 9 个参数 (R_m 、 K_s 、 K_p 、 Y_s 、 α 、 K_1 、 n_1 、 K_2 、 n_2), 下面

分别求解.

参数 Y_s : 公式 (9) 中的 Y_s 即为所求的 4-CP 存在

下的细菌产率,由于在苯酚降解的过程中,细菌达到最大值时,苯酚浓度降为零,因此 X 取 X_{\max} , S 取零.公式(9)转化为:

$$Y_s = \frac{X_{\max} - X_0}{S_0} = \frac{\Delta X}{S_0} \quad (12)$$

根据上式可以计算出4-CP存在下的细菌产率,结果见表3.分析表3可知:① Y_s 和初始4-CP浓度无

关,因此,在共代谢降解实验中细菌产率可以被当作是常数,取均值 $0.222 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$;②4-CP存在时细菌平均产率($0.222 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)比苯酚单独存在时细菌平均产率低45%,说明4-CP存在对微生物的生长存在着明显的抑制和毒害作用,故在模拟苯酚/4-CP共代谢模型时应采用 $Y_s = 0.222 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$.

表3 共代谢过程中微生物的产率值

Table 3 Microbial yield in the microbial cometabolism process

实验	初始苯酚浓度 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	初始4-CP浓度 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	初始4-CP/苯酚浓度	ΔX /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Y_s /($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)
PC1	16.39	13.08	0.798	5.661	0.345
PC2	45.27	13.70	0.303	11.322	0.250
PC3	97.70	13.92	0.142	20.757	0.222
PC4	219.00	17.69	0.081	38.998	0.184
PC5	48.79	38.79	0.795	9.750	0.258
PC6	97.72	40.07	0.410	21.701	0.235
PC7	204.40	36.24	0.177	42.143	0.206
PC8	407.00	43.57	0.107	65.416	0.161
Y_s 平均值					0.222

参数 α :根据公式(6),当苯酚和4-CP初始浓度分别为 $97.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $13.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,将4-CP浓度对苯酚浓度作图,斜率即为 α 值(图3),其余浓度下的 α 值可以通过相似的方法得到.从图3和表4可知,4-CP浓度和苯酚浓度呈线性关系, R^2 均高于0.97.这种线性关系也清楚地表明,4-CP转化速率和苯酚降解速率呈现一定的比例关系.分析表4可知:① α 值和初始苯酚和4-CP浓度无关;② α 的平均值为 $0.353 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$,标准差和变异系数分别为 $0.245 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和69.5%,变异系数很大,说明 α 值不是一个恒定的常数.在共代谢模型的参数计算中,由于 α 值变异系数较大,因此,应采用实际计算的值,而不采用平均值.

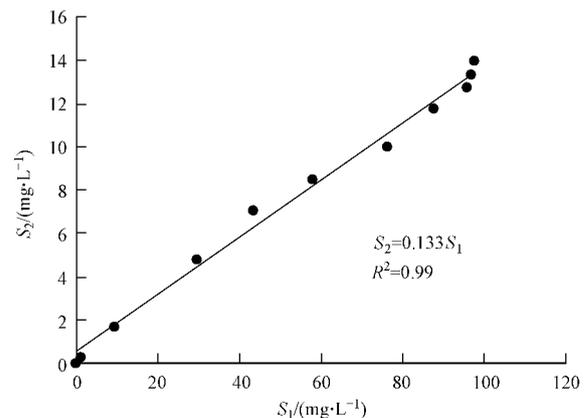


图3 参数 α 预测结果(初始苯酚/4-CP浓度比大约为100:15)

Fig. 3 Prediction parameter α (initial phenol / 4-CP concentration ratio was about 100:15)

表4 共代谢过程中参数 α 预测值

Table 4 Predicted values of parameter α in the microbial cometabolism process

实验	S_1 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	S_2 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Y_s /($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)	W /($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)	α /($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)	R^2
PC1	16.39	13.08	0.345	5.620	0.726	0.99
PC2	45.27	13.70	0.250	0.799	0.320	0.99
PC3	97.70	13.92	0.213	0.302	0.133	0.99
PC4	219.00	17.69	0.178	0.145	0.111	0.97
PC5	48.79	38.79	0.200	1.579	0.703	0.97
PC6	97.72	40.07	0.222	0.915	0.391	0.99
PC7	204.40	36.24	0.206	0.364	0.309	0.97
PC8	407.00	43.57	0.161	0.178	0.134	0.99
α 平均值					0.353	

注: W 为生长基质转化率.

其余参数的求解: 参数 R_m 、 K_s 和 K_p 可由公式 (2) 得到: $R_m = 0.113 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $K_s = 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $K_p = 126.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 其余 4 个参数 (K_1 、 n_1 、 K_2 、 n_2) 采用 6 组共代谢降解实验 (PC1 ~ PC2, PC5

~ PC8) 数据求解, 实验数据 (PC3 ~ PC4) 用来验证模型. 利用 MATLAB 软件求出的方程参数值 (表 5).

表 5 共代谢模型中各参数值

Table 5 Parameters in the microbial cometabolism process

实验	K_1 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	n_1	K'_1 /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	K_2 /($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)	n_2	K'_2 /($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)	R^2
PC1	48.6	1	48.6	9446	2.5	38.9	0.92
PC2	78.2	1	78.2	$+\infty$	2.5	$+\infty$	0.93
PC3	61.4	1	61.4	$+\infty$	2.5	$+\infty$	0.92
PC4	101.7	1	101.7	67435	2.5	85.42	0.96
PC5	45.9	1	45.9	$+\infty$	2.5	$+\infty$	0.92
PC6	70.1	1	70.1	25981	2.5	58.33	0.90
PC7	50.6	1	50.6	$+\infty$	2.5	$+\infty$	0.95
PC8	69.3	1	69.3	148620	2.5	117.2	0.93

注: $K'_1 = K_1^{(1/n_1)}$, $K'_2 = K_2^{(1/n_2)}$. K'_1 表示在特定的 4-CP 浓度下, 当苯酚浓度相同时, 共代谢过程中苯酚的比消耗速率是苯酚单独降解实验中的 1/2; K'_2 表示在特定的 4-CP 和苯酚浓度比例 (S_2/S_1) 下, 共代谢过程中苯酚的最大比消耗速率达到 1/2 时的浓度是苯酚单独降解实验中的 2 倍.

验证: 公式 (11) 中的各参数值见表 5, 其中 α 的值见表 4. 通过已确立的共代谢模型 (公式 (10) 和公式 (11)) 模拟共代谢降解实验 (PC3 ~ PC4) 中苯酚和 4-CP 的降解曲线, R^2 均高于 0.90. 由图 4 可以看出, 模型数据和实验数据吻合较好, 说明改进的 Haldane 模型经过修正后能很好地模拟共代谢降解实验的数据.

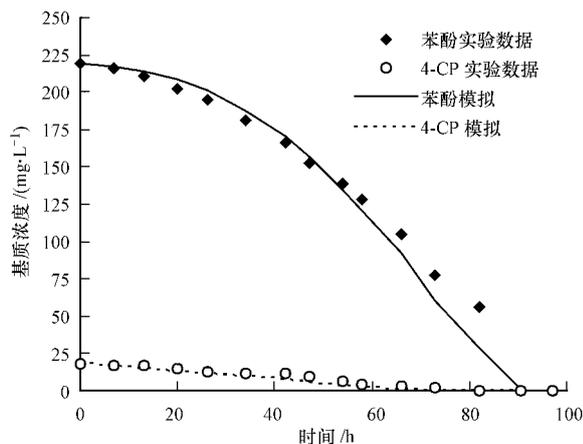


图 4 共代谢实验数据和模型的比较 (初始苯酚/4-CP 浓度比分别为 200:15)

Fig. 4 Results of cometabolic biodegradation and simulation results (The initial phenol / 4-CP concentration ratio was about 200:15)

通过对表 5 中的数据进行分析可知: ①由于 K_1

是正值, 且远远小于无穷大, 即 4-CP 的存在使得 R_m 变小, 所以 4-CP 对苯酚降解存在抑制作用 (实验 PC1 ~ PC8); ②可决系数 R^2 均高于 0.90, 说明实验数据与模型预测吻合较好; ③实验 PC1 ~ PC8 中 4-CP 均被完全去除. 该现象可以通过表 5 中的参数值加以解释: K_2 接近无穷大, K_s 几乎不变, 即主要的影响因子是 R_m .

4 结论 (Conclusions)

本文利用从污染底泥中分离出来的 *Pseudomonas putida* LY1 对苯酚和 4-CP 共代谢降解体系进行了研究, 发现高浓度苯酚对恶臭假单胞菌 LY1 的生长和苯酚降解产生抑制作用. 经过改进的 Haldane 方程能够很好地模拟苯酚降解实验过程, 参数分别为 $R_m = 0.113 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $K_s = 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $K_p = 126.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 在共代谢降解的过程中 4-CP 的存在对微生物的生长和苯酚的降解产生抑制作用, 改进的 Haldane 模型经过修正后能很好地模拟该共代谢降解过程, 为该类废水处理和污染环境修复提供了理论依据.

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

参考文献 (References):

Allsop P J, Chisti Y, Moo-Young M, et al. 1993. Dynamics of phenol

- degradation by *Pseudomonas putida* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 41: 572-580
- Arutchelvan V, Kanakasabai V, Nagarajan S, et al. 2005. Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater [J]. *Journal of Hazardous Materials*, B 127: 238-243
- 马溪平, 艾娇, 徐成斌, 等. 2009. 耐低温苯酚降解菌的降解动力学研究[J]. *环境保护科学*, 35(5): 18-21
- Ma X P, Ai J, Xu C B, et al. 2009. Study on kinetics of phenol biodegradation by low temperature-resistance Strain [J]. *Environmental Protection Science*, 35(5): 18-21 (in Chinese)
- Li Y, Loh K C. 2006. Activated carbon impregnated polysulfone hollow fiber membrane for cell immobilization and cometabolic biotransformation of 4-chlorophenol in the presence of phenol [J]. *Journal of Membrane Science*, 276: 81-90
- 李轶, 胡洪营, 吴乾元, 等. 2007. 低温硝基苯降解菌的筛选及降解特性研究[J]. *环境科学*, 28(4): 902-907
- Li Y, Hu H Y, Wu Q Y, et al. 2007. Isolation of a bacterial strain capable of nitrobenzene-degradation at low temperature and the biodegradation characteristics [J]. *Environment Science*, 28(4): 902-907 (in Chinese)
- Li Y, Li J, Wang C, et al. 2010. Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1 [J]. *Bioresource Technology*, 101: 6740-6744
- Roels J A. 1983. *Energetics and Kinetics in Biotechnology* [M]. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press
- Saéz P B, Rittmann B E. 1991. Biodegradation kinetics of 4-chlorophenol, an inhibitory co-metabolite [J]. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 63: 838-847
- Saéz P B, Rittmann B E. 1993. Biodegradation kinetics of a mixture containing a primary substrate (phenol) and inhibitory co-metabolite (4-chlorophenol) [J]. *Biodegradation*, 4: 3-21
- Wang S J. 2000. Kinetics of cometabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence of a conventional carbon source [D]. Singapore: The National University of Singapore
- Wang S J, Loh K C. 2001. Biotransformation kinetics of *Pseudomonas putida* for cometabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence of sodium glutamate [J]. *Biodegradation*, 12: 189-199
- Wang S J, Loh K C, Chua S S. 2003. 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 and Microbial Technology*, 32: 422-430
- Wahman D G, Henry A E, Katz L E, et al. 2006. Cometabolism of trihalomethanes by mixed culture nitrifiers [J]. *Water Research*, 40: 3349-3358
- Ziagova M, Liakopoulou-Kyriakides M. 2007. Comparison of cometabolic degradation of 1,2-dichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. and *Staphylococcus xylosus* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1244-1250