

双液相系统中疏水化合物的微生物降解^{*}

李力^{1,2} 于波¹ 许平^{1**}

(1 山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100 2 山东大学环境科学与工程学院 济南 250100)

摘要 双液相系统是由水相与不互溶非水相组成的多相系统,在微生物降解疏水化合物时,双液相系统有助于克服污染物可生物利用性障碍,提高污染物的生物降解速率。文中介绍了双液相系统促进微生物降解的机制,微生物吸收底物的方式,以及底物与有机溶剂双重抑制作用存在时微生物的生长模型等方面的研究进展。

关键词 双液相系统(TLPS) 非水相液体(NAPL) 疏水化合物 微生物降解 可生物利用性

生物技术领域的迅猛发展使环境中污染物的微生物降解具有了巨大的潜力,然而越来越多的来自野外及实验室的研究结果表明,环境中污染物的微生物降解潜力会受到限制,环境中存在着不易被微生物降解的物质^[1-4]。Alexander^[5]在跟踪考察环境中的某些污染物,例如杀虫剂类的微生物降解过程的研究后,提出了这些污染物在环境中存在一段时间之后,其可生物利用性趋于衰退,不易被微生物降解。其中某些化合物转移至微生物不能进入的土壤基质中,最终减轻了对生物的毒害,例如 DDT;但有的化合物毒性会长期存在,例如多氯联苯。因此在环境污染物的生物修复过程中,微生物降解速率及修复时间是与该化合物最终能否被有效降解密切相关的,而在此过程中使用能加速微生物降解作用的反应系统是十分必要的。由于双液相系统对疏水化合物的微生物降解过程有显著促进作用,近些年来一直是国际上环境与生物技术领域中的 1 个研究热点。

1 双液相系统

双液相系统(Two-Liquid-Phase System, TLPS)是由水相与不互溶的非水相液相(Non-aqueous Phase Liquid, NAPL)组成,其中 NAPL 的量应超过其在水相中的溶解饱和值^[6]。实际上 TLPS 中至少包括 4 相:疏水相、水相、气相、细胞^[7]。以生物法处理疏

水有毒化合物时,NAPL 被添加入反应器中,作为非极性化合物的良好溶剂,形成疏水化合物的贮藏库,该化合物在水相中的浓度取决于化合物在非水相、水相的分配及由降解微生物参与的平衡的结果。

TLPS 可以是人为设计构建的反应系统,也可以是环境中自身存在的。环境中某些污染物是以 NAPL 或是溶于 NAPL 的方式出现的,例如油田、炼油厂释放到环境中的多环芳烃类(PAHs)通常是与 NAPL 一起存在的^[8,9];而四氯乙烯(PCE)、三氯乙烯(TCE)通常以非水相液体区带形式存在于污染水区^[10];地下水的浅水层存在着挥发性有机物(VOC)组成的 NAPL 带,例如甲基叔丁基醚,芳香烃类等石油衍生化合物^[11]。

2 非水相液体

NAPL 是 TLPS 中的重要组成部分,对于人为设计的 TLPS, NAPL 的选择通常要考虑 4 个因素^[12]:首先, NAPL 作为 1 种有机溶剂,对微生物的毒性要尽可能得小。许多有机溶剂由于对细胞膜的结构有破坏作用,从而影响膜的生理功能^[13],有机溶剂的毒害作用与其极性有关,若以辛醇-水分配系数($\log P_{ow}$)表示极性,则 $\log P_{ow}$ 在 1 ~ 5 之间对细胞的毒性最大^[14]。所以对 NAPL 的选择通常选择 $\log P_{ow} > 5$ 的有机溶剂。其次, NAPL 对污染物的溶解度应足够大。有机溶剂的高溶解性能可节约溶剂用量,并能保证 TLPS 对污染物的高容纳量。再次,有机溶剂与水的互溶性的选择。提高有机溶剂与水的互溶性,会促进疏水化合物在水相的溶解,产生

收稿日期:2004-06-21 修回日期:2005-01-13

^{*} 国家自然科学基金资助项目(20377026),国家“十五”攻关资助项目(2001BA707B01)

^{**} 通讯作者,电子信箱:pingxu@sdu.edu.cn

所谓“共溶解”效应;另外有机溶剂与水的互溶性较高,易导致两相界面发生乳化现象,虽然乳化现象本身有利于生物降解过程,但却给取样分析过程带来不便;有时由于乳化层中化合物的浓度较高,即使水相中污染物浓度低于使微生物中毒的剂量,也会使聚集在两相界面的微生物的生理活性受到抑制,即产生相毒性^[6]。为了避免相毒性,在处理高浓度的有毒化合物时,通常要考虑选择与水相互溶性低的有机溶剂。最后,NAPL的可生物降解性。一般当污染物本身可被微生物用作生长基质时,所选择的有机溶剂就应是不能被微生物降解的,以避免构成底物竞争关系,影响污染物的降解效率。但有时当污染物自身不能支持微生物的生长,NAPL也可作为生长基质加入,通过共代谢作用完成污染物的生物降解^[15]。对于非人工构建的 TLPS,考察 NAPL 的类型及特征同样有助于分析污染物降解的微生物过程。

3 TLPS 中促进微生物降解作用的机制

较多的研究表明,环境中污染物的生物转化速率,不仅与生物反应动力学因素有关,更重要的是决定于控制污染物可生物利用性的理化因子^[16-18]。TLPS 的使用有助于克服疏水有毒化合物的生物可利用性障碍。归纳 TLPS 中疏水化合物的降解过程,TLPS 对其生物降解的促进作用有以下几种机制。

3.1 NAPL 作为污染物的贮存库,改善传质速率,提高水相浓度

某些污染物,例如 PAHs,通常以存在于 NAPL 中的形式释放于环境中,生物仅可利用其溶解于水相的部分^[18-20],微生物对于 PAHs 的降解速率决定于其溶解于水的速率^[21-23],NAPL 的理化特征显著影响细菌的降解速率^[24, 25]。Kose^[26]使用柴油、原油作为 NAPL,研究了 PAHs 的降解,发现其微生物降解速率受 PAHs 溶于水的速率的影响,也受 PAHs 在 NAPL 中的溶解速率的影响,另外,NAPL 的粘度是影响降解速率的一个重要因素^[26]。

环境中的 PCE、TCE 形成 NAPL 带,Cope 等^[27]研究了脱氯细菌对 NAPL 带中的 PCE 的降解过程,阐明了 NAPL 的存在对于提高传质速率的作用。PCE 经微生物作用之后被脱氯还原为 TCE、顺-二氯乙烯、乙烯基氯化物,这些物质在水相中的溶解度均高于 PCE,使由 NAPL 到水相的传质速率得到

提高。这些化合物又可以再分配回至 NAPL,导致 NAPL 中物质的组成和总乙烯浓度变化。

3.2 某些细菌分泌表面活性物质或使疏水化合物增溶的物质

表面活性物质的分泌,可减少表面张力,促进乳化作用的形成,导致两相界面积增大,加快传质速率,提高污染物在水相的浓度^[19-29]。Osswald 等^[30]在研究苯乙烯生物降解时,发现微生物本身的活动就可以增加该化合物在 TLPS 中的分配,在去除微生物加入化学合成的表面活性剂之后,可以获得同等的效果,由此推断微生物分泌了类似于表面活性剂类的物质。

3.3 NAPL 作为生长基质,通过共代谢,促进污染物降解

Kanally 等^[15]分别将柴油及其高温馏份加入苯并[α]芘降解体系,使得降解速率大大提高,降解促进作用与 NAPL 的种类选择有关,分析原因发现 NAPL 作为微生物可利用的生长底物,以共代谢方式促进了污染物的降解。

3.4 NAPL 控制污染物溶于水相的浓度,解除污染物对微生物的毒性

某些化合物对生物有毒性,这类化合物只有在低于一定浓度值时,才会被微生物所利用,例如酚类化合物,NAPL 作为毒性化合物的库通过控制化合物连续、缓慢的释放,使化合物的浓度维持在非抑制水平^[31, 32]。

4 TLPS 中微生物吸收底物的方式

在 TLPS 中微生物吸收底物的方式有 2 种,一种是微生物从水相中吸收溶解态的底物,降解速率受传质速率限制,有的微生物可分泌表面活性剂和其他胞外表面活性物质使胶团增溶或产生乳化现象来提高传质速率^[19-29]。另一种方式是微生物通过细胞表面特殊结构如菌毛、荚膜,吸附于两相界面直接吸收底物,如果直接吸收速率足够高,生物降解速率就不受传质速率的限制^[33, 34]。这种直接吸收机制在研究某些低水溶性化合物的降解中得到证明,例如烷烃的降解^[35],而吸收水相溶解态化合物的方式由于疏水化合物溶解浓度太低,得到的关注也相对较少;对于溶解较迅速的化合物,如苯,Mukherji^[36]认为水相溶解后发生的微生物降解占主导地位,虽然在两相界面上也聚集形成生物膜,但生物膜并不直接吸收底物,反而抑制了传质及生物

降解速率。

据报道,大多数情况下,芳香烃的生物转化需要该化合物溶于水相^[18-20],虽然有报道认为微生物可以直接利用溶于 NAPL 中的芳香烃^[33, 34]。如果微生物仅利用溶于水相的芳香烃,则溶于 NAPL 中的污染物的降解就会受到由 NAPL 向水相转移速率的限制^[21-23];另一方面,有时微生物降解溶于 NAPL 的芳香烃的速率要比污染物在无生物存在下由 NAPL 向水相转移的速率快得多^[34],对于这种现象目前有 3 种可能的解释:(1)细菌生长在 NAPL-水相两相界面,可直接从 NAPL 利用化合物,而污染物不需要必须溶于水相^[33, 34];(2)细菌或细菌代谢副产物(表面活性剂、增溶剂)增加了污染物由 NAPL 向水相的分配^[19-29];(3)微生物的活动提高了两相界面污染物的浓度,加速了污染物的溶解速率^[34]。但 Seagren^[16]在研究 NAPL 中甲苯的降解行为时也发现,由于 NAPL 相中甲苯的浓度较高,产生相毒性,因此通过生物降解而促进甲苯溶解的作用减弱了。

5 TLPS 中微生物的生长模型与动力学分析

Monod 方程可用于描述污染物生物降解过程中微生物生长速率与底物浓度之间的关系,Andrew 模型适用于当存在底物对微生物的抑制作用时微生物的降解过程,这种抑制作用的作用机制是底物对酶的毒害作用;在 NAPL 中抑制作用不仅包括有毒底物对酶的抑制作用,还包括有机溶剂对膜的通透性的破坏及其他细胞功能的受阻,有机溶剂的作用甚至有可能导致微生物的降解活性全部丧失。Alagappan 等在 Andrew 底物抑制模型的基础上,比较了描述微生物不连续生长的 Wayman & Tseng 模型与描述连续生长的 Luong 模型,提出适用于反映 NAPL 中污染物降解的微生物生长模型^[37]:

$$\begin{aligned}\mu &= \frac{\hat{\mu} \cdot s}{k_s + s + s^2/k_1} & s \leq s_0 \\ \mu &= \frac{\hat{\mu} \cdot s}{k_s + s + s^2/k_1} - i(s - s_0) & s_0 < s < s_1 \\ \mu &= 0 & s \geq s_1\end{aligned}$$

其中: k_1 为抑制参数; i 为抑制程度的增加速率; s_0 为浓度阈值,即微生物活性被完全抑制时的底物浓度。其它参数意义同 Monod 方程: k_s 为半饱和常数; μ 为微生物比增长速率; $\hat{\mu}$ 为最大比增

长速率; s 为底物浓度。该模型能较好地模拟 NAPL 存在时,尤其是微生物活性受到底物与有机溶剂双重毒害作用时微生物的生长过程。

在油水两相中烷基二苯并噻吩(DBT)的降解动力学参数 V_{\max} 与 K_m 有较大差异。随着取代基的增大,微生物对 4,6-二甲基 DBT、4,6-二乙基 DBT、4,6-二并基 DBT、4,6-二丁基 DBT 的脱硫活力下降,这个变化趋势与 V_{\max} 的减小、 K_m 的增大趋势一致。脱硫反应与底物的疏水性及有机溶剂的种类有关^[38]。

在双液相系统中酶的活力受某些因素的影响,例如水相中离子的种类与浓度^[29],水相所占的比例^[40],在设计疏水化合物的降解体系时可以从中获得启发。

6 展 望

化石燃料及人工合成化合物的大量使用造成了严重的环境污染,严重危害了人类的生存健康。生物法处理这些污染物具有专一性强,操作条件温和,不易存在二次污染的优点而受到重视。但是许多环境污染物都较难溶于水,造成生物可利用性降低,生物降解速度减慢,甚至不能被降解。在此过程中使用加速微生物降解作用的反应系统是十分必要的,双液相系统是促进疏水污染物高效生物降解的一个有效手段。本课题组多年从事微生物降解环境污染物物的相关研究,尤其是含 S、N 杂原子的杂环化合物的降解工作。化石燃料中的含氮化合物是环境污染物之一,某些含氮化合物对生物具有致癌性,也是造成酸雨的原因之一,咔唑是其中的代表,咔唑具有较低的水溶性,不易被一般的微生物摄入利用。课题组筛选得到一株咔唑降解菌 *Pseudomonas* sp. XLDN4-9,利用双液相系统大大提高了其咔唑的降解速度,实验证实 10% (v/v) 甲苯或 50% (v/v) 对二甲苯或 50% (v/v) 环己烷存在时都能够促进咔唑的降解^[41],说明非水相的存在可以提高咔唑的生物可利用性,双液相系统的开发利用有很大的潜力。随着我们对双液相系统认识的加深,双液相系统必将成为生物转化和生物降解环境污染物的有力工具。

参考文献

- [1] Bosma T N P, Middeldorp P J M, Schraa G, et al. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. Environ

- Sci Technol, 1997, 31: 248 ~ 252
- [2] Head I M. Bioremediation: Towards a credible technology. Microbiology, 1998, 144: 599 ~ 608
- [3] Alexander M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. Environ Sci Technol, 2000, 34: 4259 ~ 4262
- [4] Beck A J, Wilson S C, Alcock R E, et al. Kinetic constraints on the loss of organic chemicals from contaminated soil: implications for soil-quality limits. Environ Sci Technol, 1995, 25: 1 ~ 43
- [5] Alexander M. How toxic are toxic chemicals in soil. Environ Sci Technol, 1995, 29: 2713 ~ 2716
- [6] Deziel E, Comeau Y, Villemur R. Two-liquid-phase bioreactor for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. Biodegradation, 1999, 10: 219 ~ 233
- [7] Van der Meer A B, Beenackers A A C M, Burghard R, et al. Gas/liquid mass-transfer in a four-phase fermentor: effects of organic phase hold-up and surfactant concentration. Chem Engng Sci, 1992, 47: 2369 ~ 2374
- [8] Luthy R C, Dzombak D A, Peters C A, et al. Remediation tar contaminated soils at manufactured gas plant site. Environ Sci Technol, 1994, 28: 266 ~ 276
- [9] Labare M P, Alexander M. Enhanced mineralization of organic compounds in nonaqueous-phase liquids. Environ Toxicol Chem, 1995, 14: 257 ~ 265
- [10] Adamson D T, Medade J M, Hughes J B. Inoculation of a DNAPL source zone to initiate reductive dechlorination of PCE. Environ Sci Technol, 2003, 37: 2525 ~ 2533
- [11] Pasteris G, Werner D, Kaufmann K, et al. Vapor phase transport and biodegradation of volatile fuel compounds in the unsaturated zone: a large scale lysimeter experiment. Environ Sci Technol, 2002, 36: 30 ~ 39
- [12] Daugulis A. Partitioning bioreactors. Curr Opin Biotechnol, 1997, 8: 169 ~ 174
- [13] Sikkema J, de Bont J A M, Poolman B. Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J Biol Chem, 1994, 269: 8022 ~ 8028
- [14] Sikkema J, de Bont J A M, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev, 1995, 59: 201 ~ 222
- [15] Kanaly R A, Bartha R, Watanabe K, et al. Enhanced mineralization of benzo [a] pyrene in the presence of nonaqueous phase liquids. Environ Toxicol Chem, 2001, 20: 498 ~ 501
- [16] Seagren E A, Rittmann B E, Valocchi A. Bioenhancement of NAPL pool dissolution: experimental evaluation. J Contam Hydrol, 2002, 55: 57 ~ 85
- [17] Mukherji S, Weber Jr W J. Mass transfer effects on microbial uptake of naphthalene from complex NAPLs. Biotechnol Bioeng, 1998, 60: 750 ~ 760
- [18] Volkering F, Breure A M, Sterkenburg A, et al. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Appl Microbiol biotechnol, 1992, 36: 548 ~ 552
- [19] Thomas J M, Yordy J R, Amador J A, et al. Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. Appl Environ Microbiol, 1986, 52: 290 ~ 296
- [20] Stucki G, Alexander M. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. Appl Environ Microbiol, 1987, 53: 292 ~ 297
- [21] Harms H, Zehnder A J B. Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 27 ~ 33
- [22] Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele J P. Substrates availability in phenanthrene biodegradation: transfer mechanism and influence on metabolism. Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 43: 952 ~ 960
- [23] Ghoshal S, Ramaswami A, Luthy R G. Biodegradation of naphthalene from coal tar and heptamethylnonane in mixed batch systems. Environ Sci Technol, 1996, 30: 1282 ~ 1291
- [24] Jimenez I Y, Bartha R. Solvent-augmented mineralization of pyrene by a mycobacterium sp. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 2311 ~ 2316
- [25] Morrison, D E, Alexander M. Biodegradation of non-aqueous-phase liquids affects the mineralization of phenanthrene in soil because of microbial competition. Environ Toxicol Chem, 1997, 16: 1561 ~ 1567
- [26] Kose T, Mukai T, Takimoto K, et al. Effect of non-aqueous phase liquid on biodegradation of PAHs in spilled oil on tidal flat. Water Research, 2003, 37: 1729 ~ 1736
- [27] Cope N, Hughes J B. Biologically-enhanced removal of PCE from NAPL source zones. Environ Sci Technol, 2001, 35: 2014 ~ 2021
- [28] Koch A K, Kappeli O, Flechter A, et al. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J Bacteriol, 1991, 173: 4212 ~ 4219
- [29] Rosenberg E. Microbial surfactants. Crit Rev Biotechnol, 1988, 3: 109 ~ 132
- [30] Osswald P, Baveye P, Block J C. Bacterial influence on partitioning rate during the biodegradation of styrene in a biphasic aqueous-organic system. Biodegradation, 1996, 7: 297 ~ 302
- [31] Collins L D, Daugulis A J. Use of two phase partitioning bioreactors for the biodegradation of phenol. Biotechnol Tech, 1996, 10: 643 ~ 648
- [32] Collins L D, Daugulis A J. Biodegradation of phenol at high initial concentrations in two-phase partitioning batch and fed-batch bioreactors. Biotechnol Bioeng, 1997, 55: 155 ~ 162
- [33] Guerin W F, Boyd S A. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. Appl Environ Microbiol, 1992, 58: 1142 ~ 1152
- [34] Ortega Calvo J, Alexander M. Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 2643 ~ 2646
- [35] Nakahara T, Erickson L E, Gutierrez J R. Characteristics of hydrocarbon uptake in cultures with two liquid phases. Biotechnol Bioeng, 1977, 19: 9 ~ 25

- [36] Mukherji S, Peters C A, Weber Jr W J. Mass transfer of polynuclear aromatic hydrocarbons from complex DNAPL mixtures. *Environ Sci Technol*, 1997, 31: 416 ~ 423
- [37] Alagappan G, Cowan R M. Biokinetic models for representing the complete inhibition of microbial activity at high substrate concentrations. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 75: 392 ~ 405
- [38] Okada H, Nomura N, Nakahara T, et al. Analyses of microbial desulfurization reaction of alkylated dibenzothiophenes dissolved in oil phase. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83: 489 ~ 497
- [39] Eckstein M, Villela Filho M, Liese A, et al. Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction. *Chem Commun (Camb)*, 2004, 9: 1084 ~ 1085
- [40] Halling P J. What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004, 359: 1287 ~ 1296
- [41] Li L, Xu P, Blankespoor H D. Degradation of carbazole in the presence of non-aqueous phase liquids by *Pseudomonas* sp. *Biotech Lett*, 2004, 26: 581 ~ 584

Biodegradation of Hydrophobic Compound in Two-Liquid-Phase System

LI Li^{1,2} YU Bo¹ XU Ping¹

(1 State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University Jinan 250100, China)

(2 School of Environmental Science and Engineering, Shandong University Jinan 250100, China)

Abstract Two-liquid-phase system (TLPS) consists of an aqueous phase and a water-immiscible liquid phase. TLPS has the potential to resolve the limitation of bioavailability of hydrophobic compound, and enhance biodegradation of the contaminant. In this paper, the microbial mechanisms involved in TLPS, and those modes of uptaking hydrophobic compound by microorganism were reviewed. Biokinetic models for representing the inhibition of microbial activity when high concentrations of hydrophobic chemicals and nonaqueous liquid phase were present, was introduced.

Key words Two-liquid-phase system Nonaqueous phase liquid Hydrophobic compound Biodegradation Bioavailability