

# 硝酸盐还原条件下 $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物 联合体系降解 2,4,6-三氯酚

高宝钗 戴友芝\* 胡克伟 王辉 贾明畅

(湘潭大学环境工程系 湖南 湘潭 411105)

**摘要:** 本文采用间歇试验, 对硝酸盐还原条件下  $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物联合体系降解 2,4,6-三氯酚 (2,4,6-TCP) 进行了研究。考察了不同硝酸盐浓度下, 体系中 pH、硝酸盐浓度以及硝酸盐还原活性的变化情况。结果表明: 当 2,4,6-TCP 初始浓度为 20 mg/L 时, 硝酸盐对  $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物联合体系降解 2,4,6-三氯酚具有明显的抑制作用; 且随着硝酸盐浓度的升高, 2,4,6-TCP 的去除率降低, 硝酸盐还原活性升高; 体系先发生硝酸盐还原再进行 2,4,6-TCP 还原脱氯。

**关键词:** 2,4,6-三氯酚,  $\text{Fe}^0$ , 硝酸盐还原, 厌氧微生物

## Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by Integrated Microbial- $\text{Fe}^0$ Treatment System Under Nitrate-reducing Conditions

GAO Bao-Chai DAI You-Zhi\* HU Ke-Wei WANG Hui JIA Ming-Chang

(Department of Environmental Engineering, Xiangtan University, Xiangtan, Hunan 411105, China)

**Abstract:** In this paper, a batch laboratory test was conducted to study the degradation of 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) using an integrated microbial- $\text{Fe}^0$  treatment system under nitrate-reducing conditions. The changes of pH, nitrate concentration, nitrate-reducing activity were detected under different nitrate concentrations. Results showed that the degradation of 2,4,6-trichlorophenol at an initial concentration of 20 mg/L was significantly inhibited under nitrate-reducing conditions. And 2,4,6-trichlorophenol removal efficiency declined and nitrate-reducing activity raised with the increase of initial nitrate concentration. Nitrate is reduced in this system followed by the reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol.

**Keywords:** 2,4,6-Trichlorophenol,  $\text{Fe}^0$ , Nitrate-reducing, Anaerobic microbe

2,4,6-TCP 在工业上用途广泛, 可用于生产染料中间体、杀真菌剂、除草剂和木材防腐剂等, 也用作聚酯纤维的溶剂。由于 2,4,6-TCP 在进入环境后对生态环境和人体健康构成严重威胁, 许多国家将

2,4,6-TCP 列入“优先控制污染物”黑名单<sup>[1-2]</sup>。处理含 2,4,6-TCP 的生产废水和修复被其污染的土壤和地下水逐渐受到各国研究人员的关注。

在厌氧条件下氯酚可作为电子受体还原脱氯为

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20977072); 国家“十一五”湘江水专项(No. 2009ZX07212-001-03)

\* 通讯作者: ✉ daiyouzhi202@163.com

收稿日期: 2009-07-26; 接受日期: 2009-10-15

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

更易生物降解的单氯酚或苯酚<sup>[3-4]</sup>,但由于其毒性较强,单独微生物处理效果较差。厌氧微生物与零价铁的联合作用可有效提高氯酚的降解效率<sup>[5-6]</sup>。国内外研究学者针对不同电子受体对氯酚厌氧生物降解的影响进行了较多的研究,但大多数学者都只是在产甲烷环境下进行,而在实际环境中硝酸盐的污染已成为较普遍的环境问题<sup>[7]</sup>。硝酸盐作为电子受体具有溶解度高、氧化还原电位高(仅略低于以氧作为电子受体)等特点,工业废水及生活污水中硝酸盐的存在可能对氯酚的生物降解产生影响。目前利用微生物在硝酸盐还原条件下降解氯代有机物的研究较多<sup>[8-9]</sup>,而针对 $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物体系硝酸盐还原条件下氯代有机物的降解研究报道还较少。本文选取葡萄糖为共代谢基质,研究硝酸盐还原条件下 $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物联合体系降解 2,4,6-TCP,具有一定的理论意义和现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 接种微生物

以湖南岳阳造纸厂废水处理 IC 反应器的厌氧污泥为接种微生物,葡萄糖为共基质,经 2,4,6-TCP 连续驯化 2 月后得到降解 2,4,6-TCP 的混合菌,即为试验所用厌氧微生物(原污泥总悬浮物 TSS = 6.883 g/L,挥发性悬浮物 VSS = 5.78 g/L)。

### 1.2 试验方法

本试验采用摇瓶试验,反应在 500 mL 医用血清瓶中进行,还原铁粉按其用量在反应初始与模拟废水一并加入。试验用水水质为(mg/L):  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  500,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  270,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  350,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  530,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  75,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  100, 酵母膏 500; 添加 1 mL 微量元素营养液,组成为(g/L):  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  0.05,  $\text{ZnCl}_2$  0.05,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.03,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.05,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5;  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液(g/L) 1.0; 2,4,6-TCP 按 20 mg/L 的浓度加入。采用 1:3 的 HCl 和 0.01 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 至 7.5,反应瓶氮气吹脱后橡皮塞密封,置于  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  的恒温摇床中进行培养。用注射器从瓶口橡皮塞处定时取样分析 2,4,6-TCP 浓度、pH 值、 $\text{NO}_3^-$ -N 浓度、 $\text{NO}_2^-$ -N 浓度和 COD 值。通过单位时间单位质量微生物降解的硝酸根的量来表征硝酸盐的还原活性(NRA)<sup>[10]</sup>,具体如下:  $\text{NRA} = C_N / (C_{\text{MLSS}} \cdot t)$  式中, NRA 为硝酸还原活

性, mg/(g·h);  $C_N$  为微生物降解的  $\text{NO}_3^-$ -N 的量, mg/L;  $C_{\text{MLSS}}$  为 MLSS, g/L;  $t$  为反应时间, h。

### 1.3 分析项目及方法

2,4,6-TCP 采用高效液相色谱(L-2100, 日本 HITACHI 公司)分析,分离柱为 150 mm × 4.6 mm Allsphere ODS-25U 反相柱,流动相: 2%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$  = 30:70 (V/V), 流速 1.0 mL/min, 检测器为可变紫外检测器,检测波长为 290 nm, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。pH 值测定采用 Thermo Orion 4-Star 型 pH 测定仪;  $\text{NO}_3^-$ -N 与  $\text{NO}_2^-$ -N 浓度分别采用酚二磺酸光度和 N-(1-萘基)-乙二胺光度法测定; COD 值的测定采用重铬酸钾法; TSS 与 VSS 采用滤纸快干标准称量法测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 硝酸盐还原条件下 $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物体系降解 2,4,6-TCP 的效果

在微生物接种量为 289.0 mgVSS/L 的反应瓶中,初始 pH 7.5,  $\text{Fe}^0$  投加量为 1 g/L,  $\text{NO}_3^-$  投加量分别为 5 mmol/L、10 mmol/L 与 20 mmol/L,并以不添加  $\text{NO}_3^-$  为对照样,考察不同硝酸盐还原条件对 2,4,6-TCP 降解的影响。

不同硝酸盐还原条件下  $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物对 2,4,6-TCP 的降解效果如图 1 所示。由图 1 可知,硝酸盐明显抑制了 2,4,6-TCP 的降解,增加了体系降解的延迟期。对照样的延迟期为 100 h,而硝酸盐体系的延迟期达到 228 h。随着硝酸盐浓度的升高,2,4,6-TCP 的去除率逐渐降低。反应时间 282 h 时,  $\text{NO}_3^-$  投加量分别为 5、10 与 20 mmol/L 的体系中 2,4,6-TCP 仍残余 6.84%、32.89% 与 54.24%。表明该实验体系中反硝化细菌(DNB)的生长会减缓 2,4,6-TCP 还原脱氯进程。此外,反应初期 2,4,6-TCP 浓度在急速下降后有回升现象,推测此时以吸附作用为主,并存在解析现象,随着反应的进行同时存在吸附脱附作用和生物降解作用。通过高效液相色谱分析 2,4,6-TCP 脱氯产物(图表未提供),发现在不添加硝酸盐和只添加 5 mmol/L 硝酸盐的体系中检测到 2,4-DCP 与 4-MCP,并出现 4-MCP 积累现象。

### 2.2 硝酸盐还原条件下 $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物体系 pH 的变化

不同体系 pH 随时间的变化如图 2 所示。由图 2 可知,加入硝酸盐可提高体系的 pH,且随着硝酸盐

投加浓度的升高而 pH 升高; 不添加硝酸盐体系反应过程 pH 变化不大。 $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物体系中  $\text{Fe}^0$  腐蚀产生的  $\text{OH}^-$  可有效平衡葡萄糖发酵产生的有机酸, 提高 pH, 使体系 pH 达到脱氯菌适宜生长的条件。然而硝酸盐体系 pH 变化较大, 体系 pH 都经过一个先下降后上升最后趋于稳定的过程。这可能是因为开始阶段, 硝酸盐对代谢葡萄糖的细菌有抑制作用, 使之几乎停留在产酸阶段(产生的有机酸较多), 而反硝化菌尚处于适应期, 因此, 在这一短时间内(36 h)有机酸不能被  $\text{Fe}^0$  腐蚀产生的  $\text{OH}^-$  平衡, 使体系 pH 下降; 随后进入反硝化菌为主的代谢过程, 产生碱度, 使体系 pH 升高; 硝酸盐浓度越高, 反硝化细菌代谢产生的碱度越多, 体系 pH 越高。添加 20 mmol/L 硝酸盐的体系 pH 维持在 9.0 左右, pH 过高引起的过碱性会显著降低微生物的活性, 不利于目标物的降解, 这可能也是造成硝酸盐存在条件下 2,4,6-TCP 去除率低的原因。

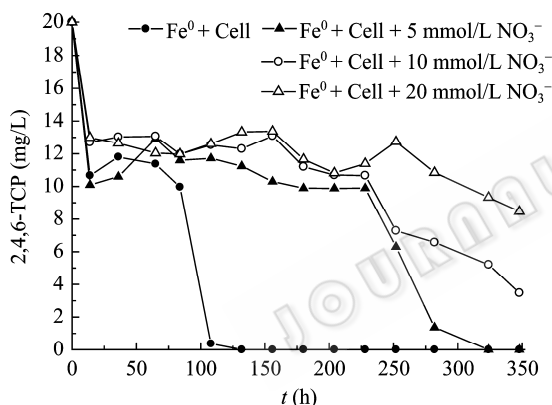


图1 硝酸盐还原条件下 2,4,6-TCP 的降解

Fig. 1 The degradation of 2,4,6-TCP under nitrate-reducing conditions

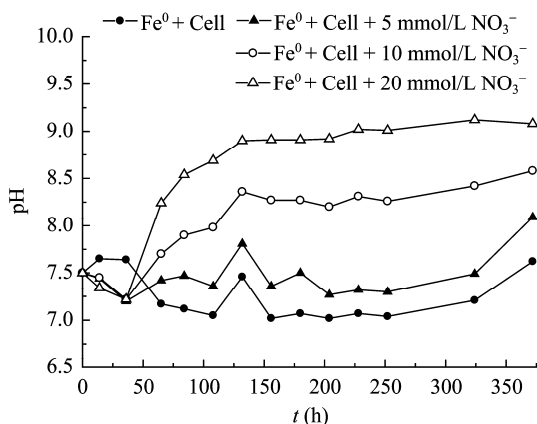


图2 硝酸盐还原条件下 pH 值的变化

Fig. 2 Changes of pH under nitrate-reducing conditions

### 2.3 硝酸盐还原条件下 $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物体系硝酸盐、亚硝酸盐浓度及 COD 值的变化

实验过程中硝酸盐与亚硝酸盐浓度随时间的变化如图 3 和图 4 所示。由图 3 可知, 随着反应的进行, 硝酸盐浓度逐渐降低, 并且在初始阶段下降速度比较快, 而到后期下降速度变平缓。为了进一步考察  $\text{Fe}^0$  对硝酸盐去除效果的影响, 实验设置了不加铁粉的对比如, 实验结果如图 3 所示。由图可知, 反应时间为 36 h 时,  $\text{NO}_3^-$  投加量分别为 5、10 与 20 mmol/L 时, 未添加  $\text{Fe}^0$  的体系中硝酸盐的去除率分别为 82.2%、87.7%与 83.6%, 而添加  $\text{Fe}^0$  的体系中硝酸盐的去除率分别为 85.0%、90.0%与 84.8%, 表明  $\text{Fe}^0$  对硝酸盐去除率影响不大。这是因为  $\text{Fe}^0$  在碱性条件下很难还原硝酸盐, 这一实验结果与 Seunghye 等<sup>[11]</sup>研究  $\text{Fe}^0$  在不同 pH 值条件下还原硝酸盐所得到的规律是一致的。Huang 等<sup>[12]</sup>的研究也表明,  $\text{Fe}^0$  在酸性条件下能快速还原硝酸盐, 而在碱性条件下反应很慢, 甚至不反应。因此, 在碱性条件下硝酸盐的去除主要是微生物作用。从图 4 可以看出, 体系中亚硝酸盐的浓度先上升后下降, 最后趋于稳定。亚硝酸盐是微生物还原硝酸盐的产物之一, 但生成的亚硝酸盐浓度较低, 不到硝酸盐浓度的 3%, 表明  $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物体系能进一步还原亚硝酸盐。反应过程中  $\text{Fe}^{2+}$  离子可能对硝酸盐的去除有影响。Ottley 等<sup>[13]</sup>的研究表明, 在 pH 值为 7.0–8.5 且在  $\text{Cu}(\text{II})$  存在的情况下,  $\text{Fe}^{2+}$  对硝酸盐有一定的脱除效果。

在反硝化过程中, 硝酸盐的还原活性反映了系统反硝化能力的大小。不同硝酸盐初始浓度下, 硝酸盐还原活性 NRA (5 mmol/L) = 2.377 mg/(g·h); NRA (10 mmol/L) = 4.740 mg/(g·h); NRA (20 mmol/L) = 9.212 mg/(g·h)。随着硝酸盐浓度的升高, 硝酸盐还原活性逐渐升高。

实验过程中 COD 随时间的变化如图 5 所示。由图可知, 不同体系消耗 COD 的速度不同。硝酸盐体系由于先进行反硝化, 反硝化细菌利用葡萄糖作为碳源和能源进行反硝化, 消耗体系中的 COD。硝酸盐浓度越高, 反硝化细菌活性越高, 代谢消耗的 COD 值越多, 因此 COD 下降的越快。添加 10 mmol/L 与 20 mmol/L 硝酸盐的体系, 2,4,6-TCP 去除率低有可能是反应后期体系中葡萄糖含量少, 还原脱氯菌缺乏足够的碳源和能源。

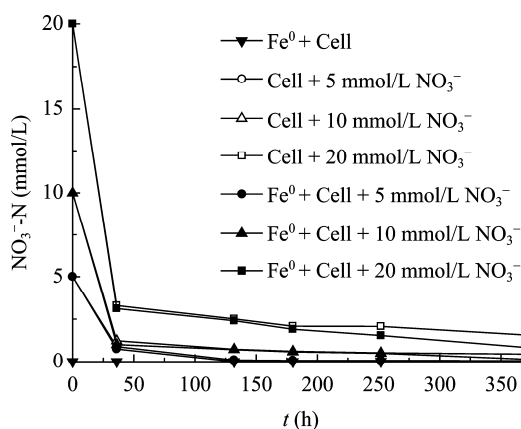


图3 硝酸盐还原条件下硝酸盐浓度的变化

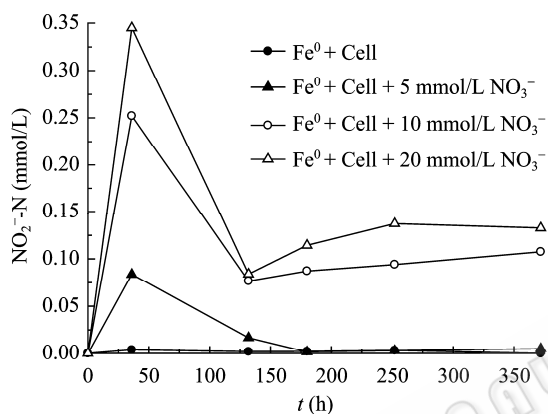
Fig. 3 Changes of  $\text{NO}_3^-$ -N concentration under nitrate-reducing conditions

图4 硝酸盐还原条件下亚硝酸盐浓度的变化

Fig. 4 Changes of  $\text{NO}_2^-$ -N concentration under nitrate-reducing conditions

## 2.4 硝酸盐对 2,4,6-TCP 还原脱氯影响机制研究

以硝酸盐投加量为 5 mmol/L 体系为例, 考察硝酸盐对  $\text{Fe}^0$ /厌氧微生物体系降解 2,4,6-TCP 的影响。硝酸盐还原产物  $\text{NO}_2^-$  与 2,4,6-TCP 还原脱氯产物 2,4-DCP 随时间的变化如图 6 所示。由图 6 可知, 未投加硝酸盐的体系在 84 h 检测到 2,4-DCP, 而投加硝酸盐(5 mmol/L)的体系到 228 h 才检测 2,4-DCP。硝酸盐的加入显著抑制了 2,4,6-TCP 的还原脱氯。0~36 h 阶段硝酸盐代替 2,4,6-TCP 作为电子受体, 因此只出现硝酸盐代谢产物  $\text{NO}_2^-$ , 并未发现 2,4,6-TCP 降解产物 2,4-DCP, 体系先发生硝酸盐还原再进行还原脱氯。根据公式  $\text{C}_6\text{H}_3\text{OCl}_3 + 4.4 \text{NO}_3^- + 1.4 \text{H}^+ \rightarrow 6 \text{CO}_2 + 2.2 \text{N}_2 + 3 \text{Cl}^- + 2.2 \text{H}_2\text{O}$ <sup>[8]</sup>, 当 2,4,6-TCP 用于反硝化时, 硝酸盐与 2,4,6-TCP 理论摩尔质量比(N/TCP)为 4.4 而实验结果 N/TCP 为 49.4,

远高于理论 N/TCP 比值, 因此硝酸盐的去除主要依靠微生物作用进行反硝化, 而 2,4,6-TCP 不参与硝酸盐还原。硝酸盐抑制 2,4,6-TCP 还原脱氯的可能原因是当有硝酸盐存在时, 硝酸盐还原过程竞争体系中的电子, 使电子流传递偏向硝酸盐还原<sup>[8]</sup>。

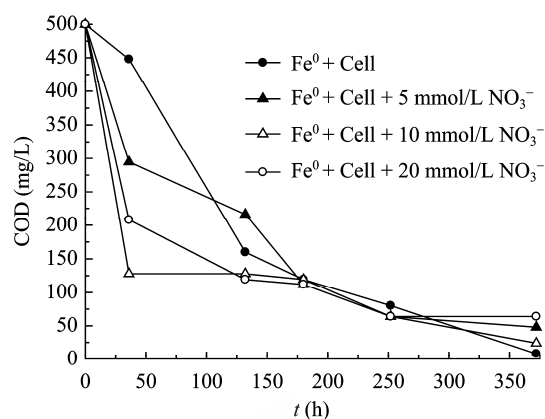


图5 硝酸盐还原条件下 COD 值的变化

Fig. 5 Changes of COD under nitrate-reducing conditions

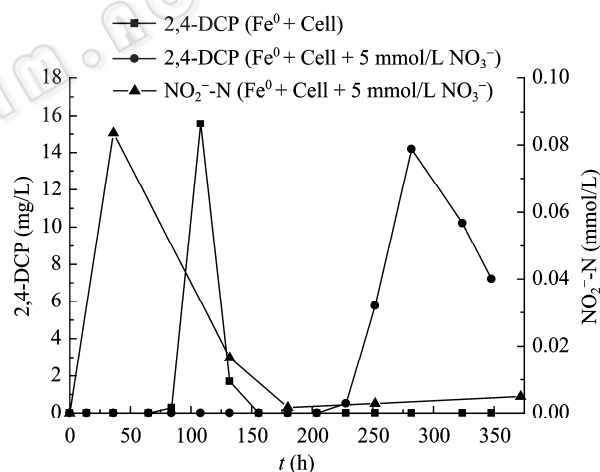


图6 硝酸盐还原条件下产物浓度的变化

Fig. 6 Changes of products under nitrate-reducing conditions

## 3 结论

(1) 硝酸盐还原显著抑制了 2,4,6-TCP 的还原脱氯, 硝酸盐还原活性随着硝酸盐浓度的升高而升高。加入 5 mmol/L 硝酸盐时, 2,4,6-TCP 降解产物为 2,4-DCP 和 4-MCP 等低氯酚, 并出现 4-MCP 积累现象。

(2) 实验体系中 2,4,6-TCP 还原脱氯菌不是一种反硝化细菌, 当同时存在 2,4,6-TCP 与硝酸盐时, 体系先进行硝酸盐还原, 然后才进行氯酚的还原脱

氯。反硝化细菌的存在会抑制 2,4,6-TCP 还原脱氯菌的活性。究其原因可能有 4 方面: 1) 当有硝酸盐存在时, 其电子流传递偏向硝酸盐还原, 硝酸盐代替 2,4,6-TCP 作为电子受体, 对 2,4,6-TCP 还原脱氯过程产生抑制作用; 2) 硝酸盐反硝化过程中产生碱度, 提高体系中的 pH; 3) 反硝化细菌与还原脱氯菌竞争葡萄糖和 H<sub>2</sub> 等基质, 降低还原脱氯速率; 4) 脱氯过程与氧化还原电位有关, 硝酸盐存在导致氧化还原电位升高, 不利于微生物还原脱氯。

## 参 考 文 献

- [1] Marianna C. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *Science of the Total Environment*, 2004(322): 21–39.
- [2] Takeuchi R, Suwa Y, Yamagishi T, *et al.* Anaerobic transformation of chlorophenols in methanogenic sludge unexposed to chlorophenols. *Chemosphere*, 2000(41): 1457–1462.
- [3] Choi JH, Kim YH, Choi SJ. Reductive dechlorination and biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol using sequential permeable reactive barriers: Laboratory studies. *Chemosphere*, 2007(67): 1551–1557.
- [4] Naoko Y, Yukina Y, Yuko H, *et al.* Polyphasic characterization of a PCP-to-phenol dechlorinating microbial community enriched from paddy soil. *Science of the Total Environment*, 2007(381): 233–242.
- [5] 程婷, 戴友芝, 刘智勇, 等. 零价铁对 2,4-二氯酚生物还原脱氯的影响研究. *微生物学通报*, 2008, **35**(3): 332–335.
- [6] 程婷, 戴友芝, 史雷, 等. pH 值对“Fe<sup>0</sup>-厌氧微生物”降解 2,4-二氯酚的影响. *环境化学*, 2008, **27**(6): 716–720.
- [7] 陈建耀, 王亚, 张洪波, 等. 地下水硝酸盐污染研究综述. *地理科学进展*, 2006, **25**(1): 34–44.
- [8] Chang CC, Tseng SK, Chang CC, *et al.* Degradation of 2-chlorophenol via a hydrogenotrophic biofilm under different reductive conditions. *Chemosphere*, 2004(56): 989–997.
- [9] Bae HS, Yamagishi T, Suwa Y. An anaerobic continuous-flow fixed-bed reactor sustaining a 3-chlorobenzoate degrading denitrifying population utilizing versatile electron donors and acceptors. *Chemosphere*, 2004(55): 93–100.
- [10] Sanchez M, Mosquera-Corral A, Mendez R, *et al.* Simple methods for the determination of the denitrifying activity of sludges. *Bioresource Technology*, 2000(75): 1–6.
- [11] Seunghee C, Howard ML, Jeehyeong K. Nitrate reduction by zero-valent iron under different pH regimes. *Applied Geochemistry*, 2004(19): 335–342.
- [12] Huang CP, Wang HW, Chiu PC. Nitrate reduction by metallic iron. *Water Research*, 1998, **32**(8): 2257–2264.
- [13] Ottley CJ, Davison W, Edmunds WM. Chemical catalysis of nitrate reduction by iron(II). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1997, **61**(9): 1819–1828.

稿件书写规范

## 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名 (包括亚种、变种) 用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。