

# 间甲酚降解菌 *Citrobacter farmeri* 的降解 特性及代谢途径解析\*

彭丽花<sup>1</sup> 任源<sup>1</sup> 邓留杰<sup>1</sup> 张小璇<sup>2</sup> 韦朝海<sup>1\*\*</sup>

(1 华南理工大学环境科学与工程学院, 广州, 510006; 2 华南理工大学化学与化工学院, 广州, 510640)

**摘要** 考察了在不同温度、pH值、摇床转速、氮源等环境和营养条件下, 间甲酚降解菌 *Citrobacter farmeri* 对降解速率和降解过程中反应液的 TOC 值、紫外吸收及酶活的变化. 结果表明, *Citrobacter farmeri* 降解间甲酚的最适温度为 35℃, 培养基初始 pH 值为 6.5—8.0, 摇床转速为 170 r·min<sup>-1</sup>, 无机氮比有机氮和氨态氮比硝态氮更利于 *Citrobacter farmeri* 对间甲酚的降解; 当间甲酚初始浓度低于 375mg·l<sup>-1</sup> 时, *Citrobacter farmeri* 降解间甲酚符合零级动力学方程; 间甲酚初始浓度约为 60 mg·l<sup>-1</sup> 时约 4 h 完全降解, TOC 的去除率 8 h 内可达到 77%, 之后几乎不变; *Citrobacter farmeri* 可完全降解约 600 mg·l<sup>-1</sup> 的间甲酚, 表现出高效与强耐受能力的结合. 对酶活的测定发现, 儿茶酚 1,2-双加氧酶有明显增大, 初步判断 *Citrobacter farmeri* 以邻位裂解的途径对间甲酚进行降解.

**关键词** 生物降解, 间甲酚, 代谢途径.

含酚废水的处理方法主要为物理法、化学法和生物法<sup>[1-3]</sup>, 生物法与其它方法比较具有经济、安全、处理阈值低、残留少、无二次污染等优点. 酚类化合物一般以龙胆酸(2,5-二羟基苯甲酸自 2,3 位碳链间开环)、邻位(邻苯二酚自两个带羟基的碳链之间开环)或间位(邻苯二酚自 2,3 位碳链间开环)的途径开环降解, 且以间位为主<sup>[4-7]</sup>. 本课题组在实施焦化废水处理时, 发现达标废水残余有机物中间甲酚的浓度比较高<sup>[8]</sup>, 因此, 从富含多种酚类的焦化废水处理污泥中分离得到一株以间甲酚为唯一碳源、能源生长, 且降解效率和耐受浓度都较高的菌株 *Citrobacter farmeri*.

本文在对影响降解性能的环境因素研究基础之上, 分析了降解过程反应液的 TOC 变化, 试图通过粗酶液酶活来判断开环位置, 对其降解途径进行初步解析.

## 1 实验部分

### 1.1 细菌对间甲酚的降解

培养基: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.24 g·l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.74 g·l<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.00 g·l<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2 g·l<sup>-1</sup>, NaCl 0.1 g·l<sup>-1</sup>, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.02 g·l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g·l<sup>-1</sup>.

在装有 100 ml 无机盐培养基的锥形瓶中, 以间甲酚作为唯一的碳源和能源, 将菌液(灭菌后)接入其中, 分别考察温度(25℃, 30℃, 35℃, 40℃)、pH 值(约 4, 5, 6, 7, 8)、摇床转速(0, 50, 100, 150, 200, 250 r·min<sup>-1</sup>)对间甲酚降解效率的影响. 通过添加相等总氮量的 NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 和 CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 分别考察 4 种不同氮源对间甲酚降解的影响.

将不同浓度的间甲酚加入无机盐培养基, 在最佳生长条件下定时取样, 对间甲酚进行微生物降解动力学研究, 以不添加微生物和添加灭活菌体做空白对照.

将以间甲酚为唯一碳源的培养基在无菌条件下接种, 置于 35℃, 170 r·min<sup>-1</sup> 摇床下培养, 每隔 1 h 取样, 同时测定反应液中间甲酚的剩余量和 TOC 值, 并进行 250 nm—300 nm 的紫外波长扫描.

### 1.2 酶活实验

将菌种接种到无机盐培养基中, 培养至对数期 (OD<sub>670nm</sub> 约为 0.544), 高速冷冻离心

2008 年 5 月 27 日收稿.

\* 国家 863 项目 (2006AA06Z378); 广东省重点科技攻关项目 (2007B030103011).

\*\* 通讯作者 (责任作者), E-mail: cechwei@scut.edu.cn, Tel (Fax): 020-39380588

( $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) 10 min, 菌株用冰冷的  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液 (pH7.5) 洗涤 2 次, 将洗涤后的菌体重新悬浮于同一缓冲溶液中, 在冰浴中超声破碎 20 min (每工作 15 s, 间歇 5 s, 然后反复循环); 未破碎细菌或细菌碎片在  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  下离心 10 min, 上清液即为粗酶液。

### 1.3 分析方法

间甲酚浓度用 Waters1525 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司) 进行分析, Waters 2487 双波长紫外检测器、XBridge™ 反相 RP18 柱 ( $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ), 流动相为甲醇: 水 = 80: 20, 流速为  $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测温度为  $30^\circ\text{C}$ , 波长为  $220 \text{ nm}$ ; TOC 由 TOC 仪测定. 酶反应产物用 752 紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司) 测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 环境因素的影响

图 1 为温度、反应液初始 pH 值、摇床转速和氮源等不同反应条件下对菌株降解间甲酚的影响. 从图 1(a) 和 (b) 可以看出, 降解最适宜温度为  $35^\circ\text{C}$  左右, 温度过高或过低均不利于细菌的降解; 菌株的最适 pH 值为 6.5—8.0。

摇床转速可在某种程度上反映菌种对溶解氧的需求, 如图 1(c) 所示, 在好氧条件下转速为  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ — $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时对间甲酚的降解有利, 已满足供氧需求, 转速  $>200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时可能会影响细菌对底物在降解前的吸附从而降低降解效率, 因此, 确定最适转速为  $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

氮是微生物生长必不可少的营养元素之一,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  和  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  等 4 种外加氮源对 *Citrobacter farmeri* 降解间甲酚的影响见图 1(d). 表明无机氮比有机氮 (尿素) 更有利于细菌的生长, 氨态氮比硝态氮更利于细菌的生长。

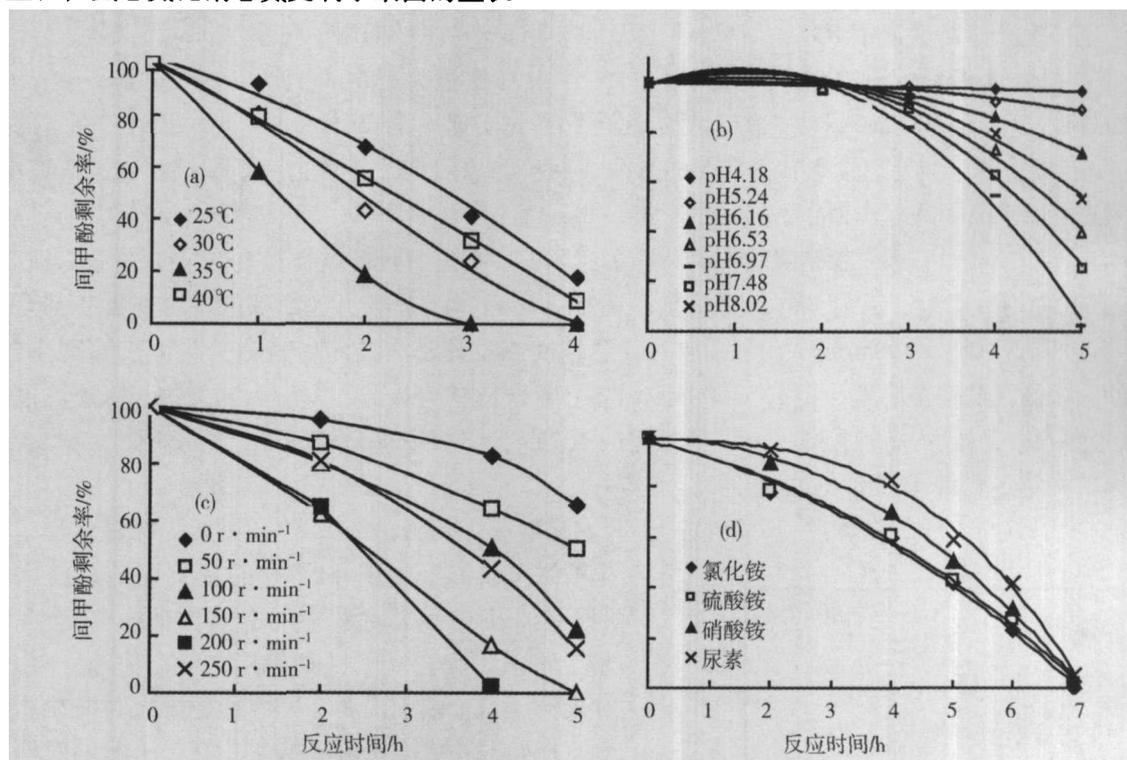


图 1 不同反应条件对间甲酚降解的影响

Fig. 1 Effect of different reaction condition on biodegradation of *m*-cresol

### 2.2 降解动力学分析

在  $35^\circ\text{C}$ , pH = 7, 摇床转速为  $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的条件下, 进行了菌株以间甲酚为唯一碳源的降解动力学研究, 空白对照表明对间甲酚没有降解作用. 间甲酚初始浓度低于  $375 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  时, 降解曲线回归后可用零级反应方程描述, 动力学方程及参数见表 1。

表 1 间甲酚降解的动力学方程

Table 1 *m*-cresol degradation kinetic equation of *Citrobacter farmeri*

间甲酚初始浓度 (约) $C_0/\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$	动力学回归方程	反应速率常数 $k_0/\text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$R^2$
65	$C = -16.57t + 65.63$	16.57	0.987
97	$C = -19.52t + 100.57$	19.52	0.984
152	$C = -25.27t + 161.62$	25.27	0.985
253	$C = -37.15t + 251.48$	37.15	0.994
317	$C = -36.27t + 333.15$	36.27	0.987
375	$C = -7.02t + 405.59$	7.02	0.971
除去适应期所需时间后			
400	$C = -9.75t + 398.13$	9.75 (3.707*)	0.914
503	$C = -13.10t + 492.87$	13.10 (3.142*)	0.987
596	$C = -7.59t + 574.71$	7.59 (2.895*)	0.952

\* 当动力学方程为线性时, 反应速率常数  $k_0$  = 平均降解速率. 括号内数值为包含适应期的平均降解速率.

从表 1 可以看出, 间甲酚浓度  $\leq 375 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  时的降解能较好地符合零级反应方程, 且其降解速率常数  $k_0$  随间甲酚浓度的升高而增加, 当初始浓度约为  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ — $300 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  时, 反应速率常数达到最大, 约为  $37 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 随后明显降低, 当浓度为  $375 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  时, 虽然降解过程仍为零级规律, 但  $k_0$  只有 7 左右, 说明过高的底物浓度在一定程度上抑制了微生物对间甲酚的降解, 但当菌种重返适宜的条件时, 其降解能力仍可完全恢复.

当底物浓度在  $375 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ — $600 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  时, 由于降解反应开始有较长的适应期, 而使总的降解速率下降 90% 以上, 一旦降解开始启动, 则会保持较高的降解速率. 以间甲酚初始浓度为  $400.44 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  为例, 完全降解经历了 108 h; 初始浓度为  $502.86 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  的间甲酚降至  $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  左右经历了约 128 h, 剩余的  $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  完全降解只用了 26 h; 初始浓度为  $596 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  时, *Citrobacter farmeri* 用了 152 h 将浓度降至  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  左右, 之后又经过 54 h 实现完全降解. 由此可以看出, 降解的启动时间对于有机物的生物处理效率有很重要的影响, 一旦开始启动, 速率会逐渐加快. 在本研究中, 若以初始浓度 10% 的降解率作为降解启动的标志,  $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $502 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  和  $596 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  的适应期分别为 68 h, 123 h 和 144 h, 在排除适应期对降解速率的影响后, 降解过程基本也呈线性关系.

当有毒底物的浓度超过了菌种的耐受浓度, 菌种无法完全降解会引起细菌的不可逆毒害甚至死亡. 本研究发现, *Citrobacter farmeri* 在不添加共代谢基质或没有其它强化措施的情况下, 对超过  $700 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  的间甲酚无法完全降解, 但它在  $600 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  范围内具有很强的降解能力, 其最高降解浓度及平均降解速率(等于  $k_0$ ) 均高于目前文献<sup>[6]</sup>所报道的  $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  及其降解速率  $11.11 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 2.3 间甲酚降解过程中 TOC 值的变化

为进一步了解间甲酚的降解过程, 测试了不同取样时间上清液的 TOC 值, 图 2 为降解过程中间

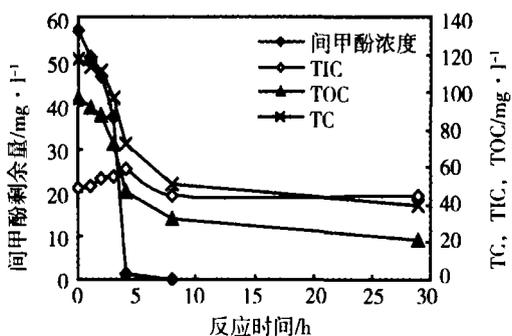


图 2 降解过程中间甲酚浓度, TC, TOC 和 TIC 的变化

Fig. 2 Variation of *m*-cresol concentration, TC, TOC and TIC during the biodegradation process

甲酚浓度, TC, TOC 和 TIC 的变化曲线. 结果表明, 在 30h 内, 上清液中间甲酚含量约由前 4h 的  $56.9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  降为 0, TC 和 TOC 也随之下降, 而 TIC 却上升, 这个现象说明在间甲酚的降解过程中, 部分有机碳转变成无机碳. 从 TIC 开始上升的时间来看, 与间甲酚的降解几乎没有滞后, 也从侧面反映其无机化速度很快. 从 TOC 的去除率来看, 经 8h 左右, TOC 由最初的  $96.9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  降至  $21.97 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , 降低了约 77%, 此后 TOC 下降缓慢, 剩余 TOC 应主要来自降解中间产物或菌体代谢过程中产生的 SMPs(soluble microbial products) 积累, TOC 在后续较长的时间内没有明显降低, 意味着间甲酚的降解

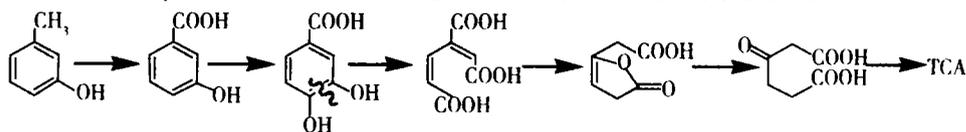
中间产物可能是较为稳定的有机物; TIC 也在第 4 小时达到最大值后开始逐渐下降, 直至基本与反应初始浓度持平, 此时上清液中 TIC 含量可能由于有机碳转化, 进一步矿化为  $\text{CO}_2$ , 两个反应碳的增加和减少平衡而维持基本不变。

#### 2.4 间甲酚降解中间产物的紫外扫描

细菌降解后反应液的紫外吸收峰高度和面积随着时间的推移逐渐减小(如图 3 所示), 间甲酚在 271.5 nm 的紫外特征吸收峰值由 1.388 降低至 0.192, 对照图 2 可知, 在约 4h 间甲酚已几乎完全降解, 而此时的紫外特征峰值仍然有 1.089, 说明间甲酚降解中间产物中也有与间甲酚类似结构的有机物, 可见在反应开始 1—5 h 的上清液扫描峰图是间甲酚和其结构类似的中间产物吸收峰的累加; 在第 6 小时特征峰消失, 说明原反应液已不含带苯环的物质, 因此, 可确定中间产物全部断链的时间在第 5—6 小时。由此可以推断, 此时反应液中的中间产物应该是以开环后的脂肪族有机物为主。

#### 2.5 间甲酚降解过程中酶反应产物的分析

图 4 为反应过程中不同波长下酶反应产物的测试结果, 从图 4 可以看出, 粗酶液降解时, 在 260nm 处吸光度出现一个相对较为明显的波动,  $A$  相差 0.085, 其它 4 个浓度几乎不变, 可以推测间甲酚降解过程中有粘糠酸生成, 间位和龙胆酸路途的产物未能检出, 即可推测邻位开环是 *Citrobacter farmeri* 降解间甲酚的主导途径: 儿茶酚 1,2-双加氧酶催化 3,4-二羟基苯甲酸, 自 3 位和 4 位碳的内部开裂, 形成  $\beta$ -羧基粘糠酸。如能进一步降解, 则可能的代谢途径如下:



由 TOC 测试和紫外扫描的结果判断, 在间甲酚降解反应“结束”时的反应液中, 存有中间产物所带来的 TOC 占总 TOC 的 25% 左右; 从邻位开环途径的推测中, 我们认为中间产物应以粘糠酸为主, 理论上它可继续氧化为 3-单氧己二酰 CoA, 然后在 3-单氧己二酰 CoA 硫解酶的催化下, 转化为乙酰丙酮酸和琥珀酰 CoA 而进入 TCA 循环, 但在本研究过程中, TIC 和 TOC 在后续过程中基本稳定, 表明进一步的转化反应可能受到了某种条件的制约, 我们认为这与细菌的生理、环境条件及剩余中间产物的性质有关。

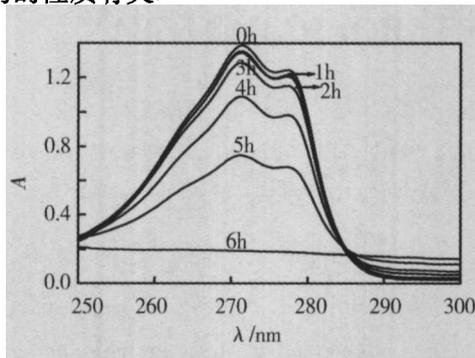


图 3 间甲酚降解过程中波长的变化

Fig. 3 UV scan spectrum of the supernatant during the biodegradation of *m*-cresol

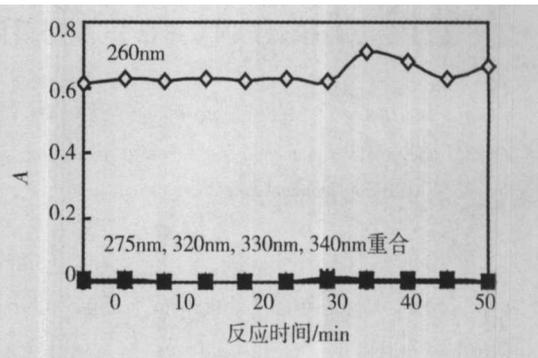


图 4 间甲酚降解过程中的酶活

Fig. 4 The enzyme activities during biodegradation of *m*-cresol

## 3 结论

(1) *Citrobacter farmeri* 菌株降解间甲酚的最佳条件为: 温度  $35^\circ\text{C}$ , pH 值 6.5—8.0, 摇床转速  $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 无机氮源的利用表现为:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  与  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的作用相近, 且都高于  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 而以上 3 种无机氮源都比  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  更有利于细菌降解间甲酚。

(2) 在最佳降解条件下, *Citrobacter farmeri* 降解浓度为  $0\text{—}375 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  间甲酚的降解过程符合零级动力学方程, 其平均降解速率在  $16.57 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ — $37.15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  之间, 初始浓度为  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  时的平均降解速率最大, 达  $37 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 此外, 该菌可完全降解约  $600 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  的间甲酚, 综合显示所分离得到的 *Citrobacter farmeri* 具有高效与强耐受能力的特征。

(3) 间甲酚降解过程中反应液的 TC 和 TOC 随着间甲酚浓度的降低而降低, 此时出现的 TIC 升高表明被降解的间甲酚无机化的速度快; 当间甲酚完全降解之后, TC 和 TOC 仍在继续下降, 此阶段为有机中间产物的无机化过程; 当无机化与无机碳组分变为  $\text{CO}_2$  离开反应液的速度平衡时, 反应液中的 TIC 维持在反应最初期的水平. 根据酶活与降解途径的关系分析可初步判断 *Citrobacter farmeri* 经过邻位途径降解间甲酚.

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Zhou G M, Fang H H, Co-Degradation of Phenol and *m*-Cresol in a UASB Reactor [J]. *Bioresource Technology*, 1997, 61 (1) : 47—52
- [ 2 ] Fialova A, Boschke E, Bley T, Rapid Monitoring of the Biodegradation of Phenol-Like Compounds by the Yeast *Candida maltosa* Using BOD Measurements [J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2004, 54 (1) : 69—76
- [ 3 ] Bergauer P, Fonteyne P A, Nolard N et al. , Biodegradation of Phenol and Phenol - Related Compounds by Psychrophilic and Cold-Tolerant Alpine Yeasts [J]. *Chemosphere*, 2005, 59 (7) : 909—918
- [ 4 ] Ali S, Fernandez-lafuente R, Cowan D A, Meta-Pathway Degradation of Phenolics by Thermophilic *Bacilli* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 23 (7-8) : 462—468
- [ 5 ] Middelhoven W J, Coenen A, Kraakman B et al. , Degradation of Some Phenols and Hydroxybenzoates by the Imperfect Ascomycetous Yeasts *Candida parapsilosis* and *Arxula adenivorans* : Evidence for an Operative Gentisate Pathway [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1992, 62 (3) : 181—187
- [ 6 ] Tallur P N, Megadi V B, Kamanavalli C et al. , Biodegradation of *p*-Cresol by *Bacillus* sp. Strain PHN 1 [J]. *Current Microbiology*, 2006, 53 (6) : 529—533
- [ 7 ] Hopper D J, Taylor D G, Pathways for the Degradation of *m*-Cresol and *p*-Cresol by *Pseudomonas putida*. [J]. *The Journal of Bacteriology*, 1975, 122 (1) : 1—6
- [ 8 ] 任源, 韦朝海, 吴超飞等, 生物流化床  $\text{A/O}^2$  工艺处理焦化废水过程中有机组分的 GC/MS 分析 [J]. *环境科学学报*, 2006, 26 (11) : 1785—1791

## DEGRADATION CHARACTERISTICS OF *m*-CRESOL BY *CITROBACTER FARMERI* AND THE ELEMENTARY STUDY OF METABOLIC PATHWAY

PENG Li-hua<sup>1</sup>   REN Yuan<sup>1</sup>   DENG Liu-jie<sup>1</sup>   ZHANG Xiao-xuan<sup>2</sup>   WEI Chao-hai<sup>1</sup>

(1) College of Environmental Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510006, China;

2) College of Chemical and Energy Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)

#### ABSTRACT

A *m*-cresol degrading bacterium named *Citrobacter farmeri*, which utilizes *m*-cresol as sole source of carbon and energy, was isolated from an aerobic activated sludge in a coke-plant wastewater biological treatment system. Some environmental and nutrition conditions for the biodegradation of *m*-cresol by *Citrobacter farmeri* such as temperatures, initial pH, shaker rotary speeds and nitrogen sources were studied. TOC, UV scans and key enzyme activities related to the ring-cleaving were measured to analyze the metabolic pathway. The optimal conditions are found to be temperature at 35°C, pH 6.5—8.0, and 170 r · min<sup>-1</sup> shaker rotary speed respectively. The effects of different nitrogen sources on biodegradation were investigated and the order was  $\text{NH}_4\text{Cl} \approx (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > \text{CO}(\text{NH}_2)_2$  which shows the inorganic nitrogen is easier to be utilized. The degradation reaction of *m*-cresol by *Citrobacter farmeri* can be described with zero order kinetic equation when the initial *m*-cresol concentration is lower than 375 mg · l<sup>-1</sup>. *m*-Cresol was degraded completely in 4 hours when the initial concentration was 60 mg · l<sup>-1</sup>, and TOC removal efficiency was 77% in 8 hours and then nearly kept constant. Catechol 1, 2-dioxygenase had obvious augmentation when detected the enzyme activity which means *Citrobacter farmeri* degrades *m*-cresol through orth-cleaving pathway.

**Keywords:** biodegradation, *m*-cresol, metabolite pathway.