



文章栏目：水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.201809138

中图分类号 X523

文献标识码 A

唐诗月, 王晴, 杨森焱, 等. 共代谢基质强化微生物修复四氯乙烯污染地下水[J]. 环境工程学报, 2019, 13(8): 1893-1902.  
TANG Shiyue, WANG Qing, YANG Miaoyan, et al. Co-substrates enhanced bioremediation of groundwater contaminated by tetrachloroethylene[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2019, 13(8): 1893-1902.

## 共代谢基质强化微生物修复四氯乙烯污染地下水

唐诗月<sup>1,2</sup>, 王晴<sup>1</sup>, 杨森焱<sup>1,2</sup>, 宋昕<sup>1,\*</sup>, 虞磊<sup>3</sup>

1. 中国科学院南京土壤研究所, 土壤环境与污染修复重点实验室, 南京 210008

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 南京林业大学生物与环境学院, 南京 210037

第一作者: 唐诗月(1995—), 女, 硕士研究生。研究方向: 土壤和地下水污染修复技术。E-mail: [sytang@issas.ac.cn](mailto:sytang@issas.ac.cn)

\*通信作者: 宋昕(1974—), 女, 博士, 研究员。研究方向: 土壤和地下水原位修复技术。E-mail: [xsong@issas.ac.cn](mailto:xsong@issas.ac.cn)

**摘要** 针对微生物修复地下水中四氯乙烯(tetrachloroethylene, PCE)周期长的问题, 通过添加共代谢基质强化微生物修复技术以提高修复速率。以某污水处理厂的厌氧活性污泥为菌种来源, 采用振荡培养法进行PCE高效降解菌群的驯化和筛选, 对微生物降解PCE的温度、初始pH和PCE初始浓度3种影响因素进行了条件优化; 使用甲醇、乙醇、葡萄糖、酵母浸膏以及乳酸钠作为共代谢基质, 研究了不同共代谢基质条件下微生物群落对PCE的降解规律, 并建立了反应动力学模型。结果表明: 在种水平上, 梭状芽孢杆菌 *Clostridium* sp. FCB45 是优势菌种; PCE初始浓度为  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH在中性, 温度为  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 共代谢基质为酵母浸膏时, 微生物群落的降解效果最好, PCE降解率可高达96.75%, 降解速率常数最高可达  $0.327 \text{ d}^{-1}$ ; 添加共代谢基质强化的微生物降解过程全部符合一级反应动力学模型。添加共代谢基质的微生物实验结果表明, 添加共代谢基质可以有效缩短微生物修复周期, 对污染地下水的原位生物修复具有一定的参考价值。

**关键词** 四氯乙烯; 微生物修复; 共代谢基质; 污染地下水

随着工农业的迅速发展, 氯代烃类有机物作为生产原料和溶剂被人类广泛地应用在工业生产、农药、干洗和医疗等行业<sup>[1]</sup>, 造成了一系列环境问题。氯代烃类在环境中随着雨水、径流等渗透到土壤中<sup>[2]</sup>, 被土壤吸附一部分后渗漏到地下水含水层, 导致地下水污染<sup>[3]</sup>, 其中地下水中四氯乙烯、三氯乙烯及四氯化碳等污染尤为普遍<sup>[4-6]</sup>。本研究选取一种典型氯代烃PCE作为研究对象, 该物质是在常温下易挥发、非易燃的重质非水溶相液体(dense non-aqueous phase liquids, DNAPLs), 化学性质稳定, 且有很强的生物毒性和潜在的生物累积性, 并具有刺激性、致敏性、致突变性、致畸性、致癌性等特性, 已被较多国家列为优先控制污染物<sup>[7]</sup>。一旦PCE通过各种途径进入地下环境, 会下渗到地下水深层, 严重污染地下水资源, 对生态环境和人体健康产生极大的危害<sup>[8]</sup>。1999年北京市地下水有机污染调查结果表明, 北京地区有2处氯代烃污染区域面积超过  $10 \text{ km}^2$ , 主要污染物为TCE和PCE, 最高浓度分别为  $487.6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $63.74 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其中PCE的检出率较高<sup>[9]</sup>。为了保护生态环境及促进可持续发展, 地下水中氯代烃污染问题亟待解决, 地下水水质保护和污

收稿日期: 2018-09-21; 录用日期: 2019-03-27

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金资助项目(BK20161094); 中国科学院土壤研究所“135”计划和前沿项目(ISSASIP1657); 江苏省社会研发项目(BE2017779)

染修复刻不容缓<sup>[10]</sup>。

考虑到微生物修复技术具有易于原位修复、处理成本低、无二次污染且可以实现无害化等优点,故进一步研究微生物群落对PCE的降解非常必要<sup>[11]</sup>。近年来,国内外研究人员对氯代烃的生物降解进行了大量探索和研究<sup>[12-19]</sup>。在厌氧条件下,氯代烯烃可以作为某些细菌的终端电子受体,通过厌氧微生物作用发生还原脱氯,生成次级产物,最终达到无害化的修复目的,而加入一些有机质进行共代谢可以提高其降解速率<sup>[12-14]</sup>。有研究<sup>[15]</sup>发现,将厌氧细菌Y51株和好氧性混合株*P. pseudocaligenes* KF<sub>707</sub>-D<sub>3</sub>株综合运用可以将难生物降解的PCE完全分解。实际上,单一的厌氧菌或好氧菌很难彻底快速降解PCE<sup>[16]</sup>。迄今为止,仅发现*Dehalococcoides mccartyi*属的菌株能使PCE完全脱氯<sup>[17]</sup>,且该属菌株对碳源要求较高,一般需要醋酸盐作为碳源<sup>[18]</sup>,生长条件较为苛刻。然而,多种常见微生物如脱硫单胞菌,硫磺菌等可以协同合作将PCE还原脱氯<sup>[19]</sup>。

目前,对微生物修复氯代烃的研究主要集中在单一好氧菌株以及厌氧菌株的运用。因此,有必要研究地下水环境中微生物群落降解氯代烃的特性,从而进一步探索提高氯代烃生物降解速率的可行方法。尽管有很多学者研究某类共代谢基质条件下微生物菌株是否能够成功脱氯,但很少有学者针对微生物群落在不同共代谢基质条件下的脱氯能力开展相关研究<sup>[20]</sup>。因此,根据现阶段氯代烃修复的研究经验,本研究选取一种典型氯代烃PCE,旨在评估模拟地下水环境下降解菌群的共代谢脱氯能力。本研究采用振荡培养法<sup>[21]</sup>来筛选并鉴定出PCE优势降解菌群,对环境因素开展实验并对其进行了条件优化,探索了不同共代谢基质条件下PCE降解的规律,建立了反应动力学模型,比较了不同共代谢基质条件下微生物的脱氯能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验原料

四氯乙烯( $C_2Cl_4$ )和甲醇( $CH_3OH$ )为色谱纯,酵母浸膏和维生素 $B_{12}$ 为生物试剂,乙醇( $CH_3CH_2OH$ )、三水合磷酸氢二钾( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ )、七水合硫酸亚铁( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )、一水合磷酸二氢钠( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ )、氯化铵( $NH_4Cl$ )、七水合硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )、七水合硫酸锰( $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ )、七水合硫酸锌( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )、乳酸钠( $dL-C_3H_5O_3Na$ )、葡萄糖( $C_6H_{12}O_6$ )、六水合氯化钴( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )、一水合次氨基三乙酸三钠( $N(CH_2CO_2Na)_3 \cdot H_2O$ )均为分析纯。

### 1.2 实验装置

实验过程中使用的仪器设备:恒温振荡箱(MQL-621R,上海旻泉仪器有限公司)、厌氧培养箱(YQX-II型,上海新苗医疗器械制造有限公司)、立式压力蒸汽灭菌锅(YM30型,上海三申医疗器械有限公司)、紫外可见分光光度计(TU-1810,北京普析通用仪器有限责任公司)、氮吹仪器(ANPEL DC12,上海安谱实验科技股份有限公司)、气相色谱仪(Agilent7820A,安捷伦科技有限公司)、Illumina Mi Seq平台(微基生物科技(上海)有限公司)。驯化实验采用厌氧瓶密封操作,实验装置见图1,可定期使用注射器采样。

### 1.3 实验方法

PCE降解菌群的驯化筛选。以南京某污水处理厂的厌氧活性污泥为菌种来源,采用图1的实验装置对厌氧活性污泥进行驯化培养,整个实验操作过程在厌氧培养箱中完成。实验配制无机盐培养基来模拟地下水<sup>[22]</sup>,其组成成分为: $K_2HPO_4$ ·

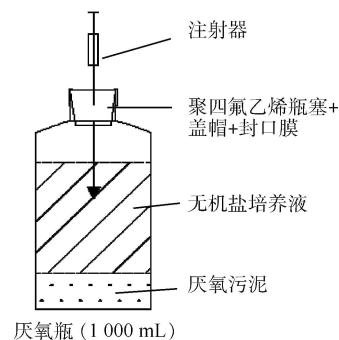


图1 驯化实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experimental device for culture enrichment

$3\text{H}_2\text{O}$  1.05  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  0.25  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.49  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Na})_3\cdot\text{H}_2\text{O}$  0.03  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{dl-C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$  0.112  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.74  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.74  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、维生素  $\text{B}_{12}$  0.05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [23]。PCE 降解菌群的驯化采用梯度驯化法[24]，按 PCE 浓度由低到高进行，先将 200 mL 活性污泥接种到 700 mL 除氧灭菌后的无机盐培养基中(除非特殊说明，pH 均在 6.80~7.25)，随后采用聚四氟乙烯瓶塞和铝卷曲盖密封血清瓶，并采用无菌注射器加入 PCE 溶液。PCE 溶液浓度初次设定为 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，然后放置于 30  $^\circ\text{C}$ 、转速为 30  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  的恒温振荡培养箱中进行培养驯化 7 d，之后更新培养基并将浓度依次递增至 1、2、3、4、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [22]，每个阶段均培养 7 d。

**PCE 降解特性研究。**将 100 mL 无机盐培养基置于血清瓶中，所有培养基在使用前均利用氮气吹扫 30 min，然后用高压灭菌锅在 121  $^\circ\text{C}$  下灭菌 30 min，最后放入厌氧培养箱中冷却备用。将经过梯度驯化后获得的菌液按 5% 投加量接入含有 100 mL 无机盐培养基的血清瓶中，随后采用特氟隆表面橡胶隔膜(美国安捷伦公司)和铝卷曲盖密封血清瓶，PCE 初始投加量设定为 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，随后置于 30  $^\circ\text{C}$ 、30  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下恒温振荡器中培养。实验过程中每隔 24 h 采样 1 次，测定培养基中残留 PCE 的浓度以及吸光度，分析驯化所得菌群的 PCE 降解特性及菌群生长曲线。

**环境因素对微生物群落降解 PCE 的影响。**在保持与降解特性实验相应条件不变的前提下，分别研究不同温度(10、20、30  $^\circ\text{C}$ )、不同 pH(6、7、8)、不同 PCE 初始浓度(0.5、1、1.5、2、2.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 等条件对菌群降解 PCE 的影响。在相同的实验条件下，不接种菌液作对照，每组实验重复做 3 个平行样，取平均值。每隔 24 h 采样 1 次，测定培养基中残留 PCE 的浓度，采样结束后使用硅胶填缝密封盖上留下的针孔以防止 PCE 挥发。

**不同共代谢基质对微生物群落降解 PCE 的影响。**为了探索各种共代谢基质对降解菌群性能的影响，将培养所得菌液按 5% 接种量加入 100 mL 的无机盐培养液，PCE 初始投加量设定为 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，再分别加入甲醇、乙醇、葡萄糖、酵母浸膏、乳酸钠[25]。其中，葡萄糖以及酵母浸膏浓度为 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、甲醇浓度为 0.6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、乙醇浓度为 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、乳酸钠浓度为 0.77  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [26]。在 30  $^\circ\text{C}$ 、30  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下振荡培养，每 24 h 采样检测，并利用实验结果建立动力学模型。

## 1.4 分析方法

实验中 PCE 浓度采用顶空气相色谱仪[27](Agilent 7820A, 美国 Agilent 公司)及 DB-624 色谱柱测量。

实验中菌群浓度采用分光光度法[25]测定，取适量实验样品放入 1 cm 的比色皿中，利用紫外分光光度计测量其在 600 nm 处的吸光度( $A_{600}$ )。

实验中 PCE 降解菌群群落结构分析采用 16S rDNA[28]来分析，按照柱式细菌基因组抽提试剂盒的使用操作说明，对混合培养体的菌液中的 DNA 进行提取[29]，将纯化后的样品利用 Illumina Mi Seq 平台进行高通量测序。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌群对 PCE 降解特性研究

驯化期后 PCE 降解曲线及菌群生长曲线见图 2。由图 2(a)可知，PCE 能得到高效降解并且去除率已明显高于 90%。由图 2(b)可知：降解初期(0~2 d)，菌群在 PCE 存在条件下能以较快速度生长；随着采样时间的推移，中期(2~4 d)达到静止期，OD 值缓慢下降；后期(4~5 d)，由于 PCE 含量不足，菌群活性被抑制，OD 值下降较快。筛选得到的菌群能够高效降解 PCE，可以进行菌种鉴定以及环境因素影响实验。

### 2.2 PCE 降解菌群的结构组成

种水平下的样本群落结构组成分布见图 3，菌种鉴定结果表明 PCE 的降解菌群群落结构复杂

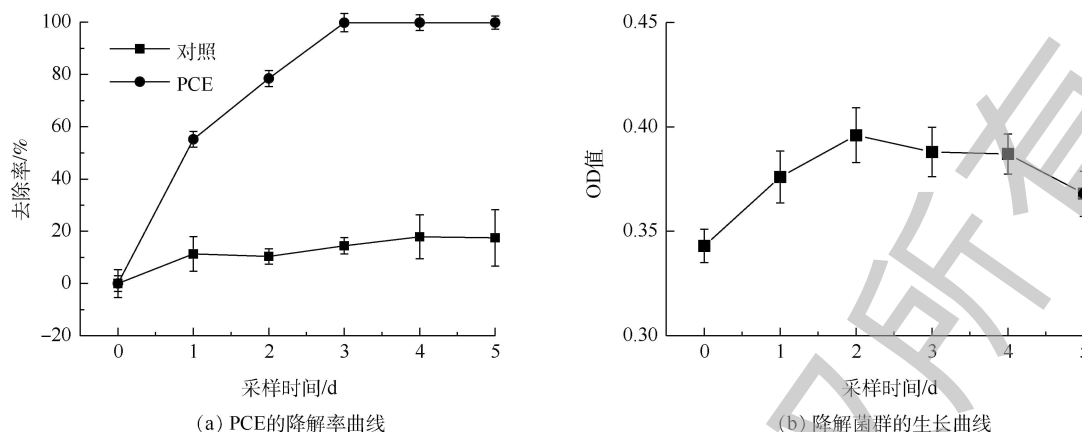


图2 PCE的降解率曲线以及降解菌群的生长曲线

Fig. 2 PCE degradation efficiency and the growth curve of acclimated microbial consortium

多样。该菌群中共有16个高于0.50%的种,分别为 *Clostridium* sp. FCB45、*Methylophilic bacterium* RS-X3、*Rhodocyclales bacterium* TP139、*Bacterium* B3C1-6、*Clostridium* sp. 6-44、*Desulfovibrio* sp. Mlhm、*Sinorhodobacter ferrireducens*、*Veillonellaceae bacterium* 6-15、*Bacteroidetes bacterium* 4F6B、*Geobacter lovleyi*、*Treponema* sp. HM、*Paracoccus kocurii*、*Thermomarinilinea lacunifontana*、*Riemerella* sp. Lo3、*Chlorobi bacterium feline oral taxon* 101及 *Rhizobium selenitireducens*。其中,梭状芽孢杆菌(*Clostridium* sp. FCB45)含量最高,占总量的44.49%,成为优势菌种。这一结果证实了DAVID<sup>[12]</sup>在微生物生态研究中推测 *Clostridium* 属这种活性较高的梭状菌可以成为降解PCE的潜在微生物的结论。然而,因为这是由普通污水厂的厌氧污泥驯化而来的,故与LOFFLER等<sup>[30]</sup>在被PCE长期污染的沉积物中所观察到的 *Desulfuromonas*和 *Dehalococcoides* 是PCE的优势降解菌有所不同。*Methylophilic bacterium* RS-X3含量为17.34%,作为甲基营养菌不仅可以在氯化甲烷上生长<sup>[31]</sup>,并且其被证实含有脱氯酶基因<sup>[32]</sup>,因此,可推测在本研究中 *Methylophilic bacterium* RS-X3可以促进PCE的生物降解。而占总量7.39%的 *Rhodocyclales bacterium* TP139作为能够利用多种有机化合物生长的多功能细菌的代表<sup>[33]</sup>,首次在本研究PCE降解菌群中被发现并检测到。

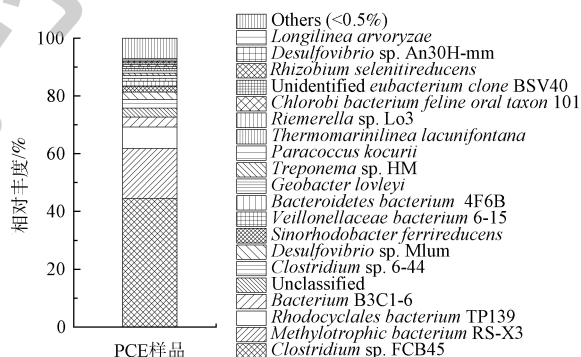


图3 种水平下的菌群群落结构组成

Fig. 3 Composition of acclimated microbial consortium at species level

有研究表明,脱硫弧菌属(*Desulfovibrio* sp. Mlhm)可以参与几种氯代污染物的脱氯和硫酸盐还原,包括1,2-二氯乙烷<sup>[34]</sup>、1-三氯乙烷<sup>[35]</sup>和氯仿<sup>[36]</sup>, *Treponema*属(*Treponema* sp. HM)能够通过添加醋酸盐将五氯苯酚脱氯成氢气、二氧化碳和甲酸盐<sup>[37]</sup>, *Bacteroides*属(*Bacteroidetes bacterium* 4F6B)可降解甲基叔丁基醚<sup>[38]</sup>, *Sinorhodobacter ferrireducens*能利用肌醇、L-丙氨酸、4-羟基苯甲酸和L-脯氨酸作为碳源<sup>[39]</sup>, *Thermomarinilinea*属(*Thermomarinilinea lacunifontana*)能在多种有机物存在时生长(包括明胶、甲壳素、谷氨酸等)<sup>[40]</sup>。这些菌株也在该菌群中被检测到,其含量分别为2.61%、0.85%、0.97%、1.99%和0.80%,其中 *Desulfovibrio*、*Treponema*属为潜在PCE降解菌。

### 2.3 环境因素对降解的影响

环境因素对PCE降解效果的影响见图4。由图4(a)可知温度对PCE降解率的影响不显著。数

据显示 3 个温度梯度下去除率均高于 80%，表明该菌群整体代谢活性较高，具有较宽的温度生态幅，适应不同温度的环境能力较强。在实验初期 (0~3 d)，菌群在 10 °C 以及 20 °C 下对 PCE 的降解速率相比 30 °C 较慢；在后期 (4 d 后)，菌群在 10 °C 和 20 °C 时对 PCE 的降解率与其在 30 °C 下的降解率相当。ZHANG 等<sup>[41]</sup>也得出 TCE 去除率随温度的升高 (从 20 °C 上升到 30 °C) 而增加的类似结论。SHARMA 等<sup>[42]</sup>认为，低温下微生物需要更多的时间来矿化疏水性物质。因此，生物反应与化学反应都会减慢速率，而较高的温度会导致生物降解增加。一般地下水的平均温度约为 15 °C (我国西北地区冬季地下水水温仍处于 10 °C 左右)<sup>[43-45]</sup>，可以达到该菌群生长的适宜温度范围。

由图 4(b) 可知：菌群在降解 PCE 的过程中受非极端 pH 的影响不显著。在初始 pH 6~8 时，PCE 的降解速率随着初始 pH 的变化呈现出一定的波动性，但在总体上体系中的微生物群落均能够实现 PCE 的有效降解。初始 pH 7.0 为 PCE 降解的最适值，因为弱酸以及弱碱性的条件不会对降解菌群活性产生抑制，所以在非极端 pH 的地下水环境中，此菌群也可以发挥作用。

由图 4(c) 可知：菌群在降解 PCE 的过程中受 PCE 初始浓度的影响不显著，但其降解速率存在一定波动性。在此 PCE 初始投加范围内，该菌群活性没有受到明显抑制，此浓度下的 PCE 毒性没有破坏菌群体内的酶、核酸以及 DNA 等的结构，所以菌群能正常进行新陈代谢，但当 PCE 初始浓度过低时，与酶结合的底物浓度偏低，会使微生物的活性降低，从而导致 PCE 降解速率下降<sup>[46]</sup>。

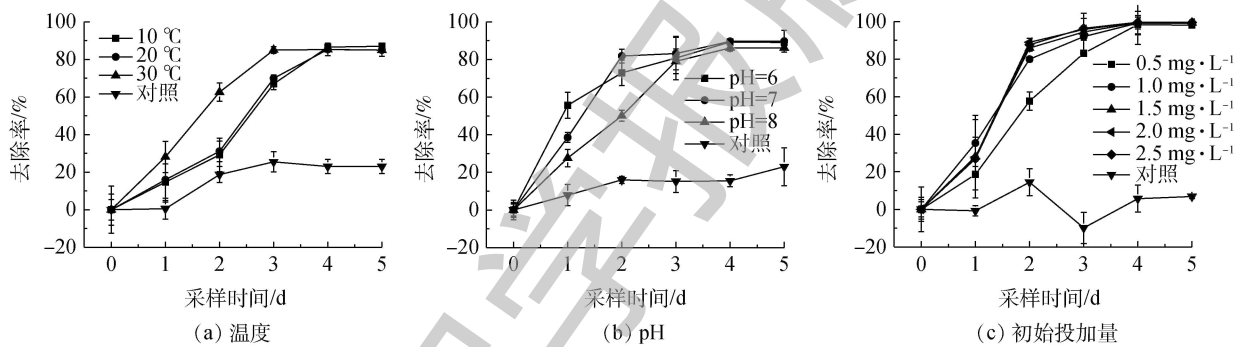


图 4 环境因素对 PCE 降解率的影响

Fig. 4 Effect of environmental factors on degradation efficiency of PCE

#### 2.4 不同共代谢基质对降解的影响

不同共代谢基质对 PCE 降解效果的影响见图 5，其中，酵母浸膏作为共代谢基质时降解效果最好。为了比较不同共代谢基质对微生物脱氯能力的影响，需要建立动力学模型进行比较。一般情况下，反应的动力学方程见式 (1)，对应一级动力学模型<sup>[47]</sup>见式 (2)。

$$dc/dt = -kc^p \quad (1)$$

$$c = c_0 e^{-k(t-t_0)} \quad (2)$$

式中： $c$  为 PCE 浓度， $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ； $p$  为反应级数； $k$  为反应速率常数， $\text{d}^{-1}$ ； $t$  为反应时间， $\text{d}$ ； $c_0$  为初始 PCE 浓度， $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ； $t_0$  为初始反应时间， $\text{d}$ 。

PCE 反应动力学模型见图 6，根据一级反应动力学拟合方程得到的相关参数见表 1。由图 6 和表 1 可知，共代谢基质强化的微生物降解过程全部符合一级反应动力学， $R^2$  均在 0.928 以上，

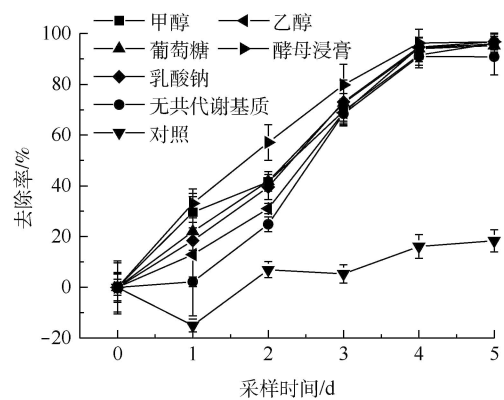


图 5 不同共代谢基质情况下降解菌群对 PCE 的降解率

Fig. 5 PCE Degradation efficiency by acclimated microbial consortium using different co-substrates

除无共代谢对照组只有 0.884 外, 整体拟合效果较好。根据表 1 进一步可得出, 添加了酵母浸膏后实验的半衰期比不添加共代谢基质时减少了 0.838 d, 并且降解反应速率常数由  $0.327 \text{ d}^{-1}$  降至  $0.098 \text{ d}^{-1}$ , 其他共代谢基质 (除乙醇外) 添加后降解反应速率常数均有提高。上述结果表明, 这些共代谢基质的添加均提高了菌群的降解速率。添加不同共代谢基质后的 PCE 降解反应速率常数有以下关系: 酵母浸膏 > 葡萄糖 ≈ 甲醇 > 乳酸钠 > 无共代谢基质 > 乙醇。以酵母浸膏为共代谢基质时, 降解反应速率常数最大为  $0.327 \text{ d}^{-1}$ , 半衰期为 1.571 d, 大于其他共代谢基质, 所以在此实验条件下, 酵母浸膏为最佳的共代谢基质。这可能是因为酵母浸膏含有丰富的维生素、各种氨基酸及核酸降解物等, 可以作为促进微生物生长的氮素营养源<sup>[22]</sup>。乙醇作为共代谢基质时四氯乙烯的降解反应速率常数最小, 还小于没有共代谢条件下的降解速率, 这可能是因为乙醇对该菌群产生了活性抑制。

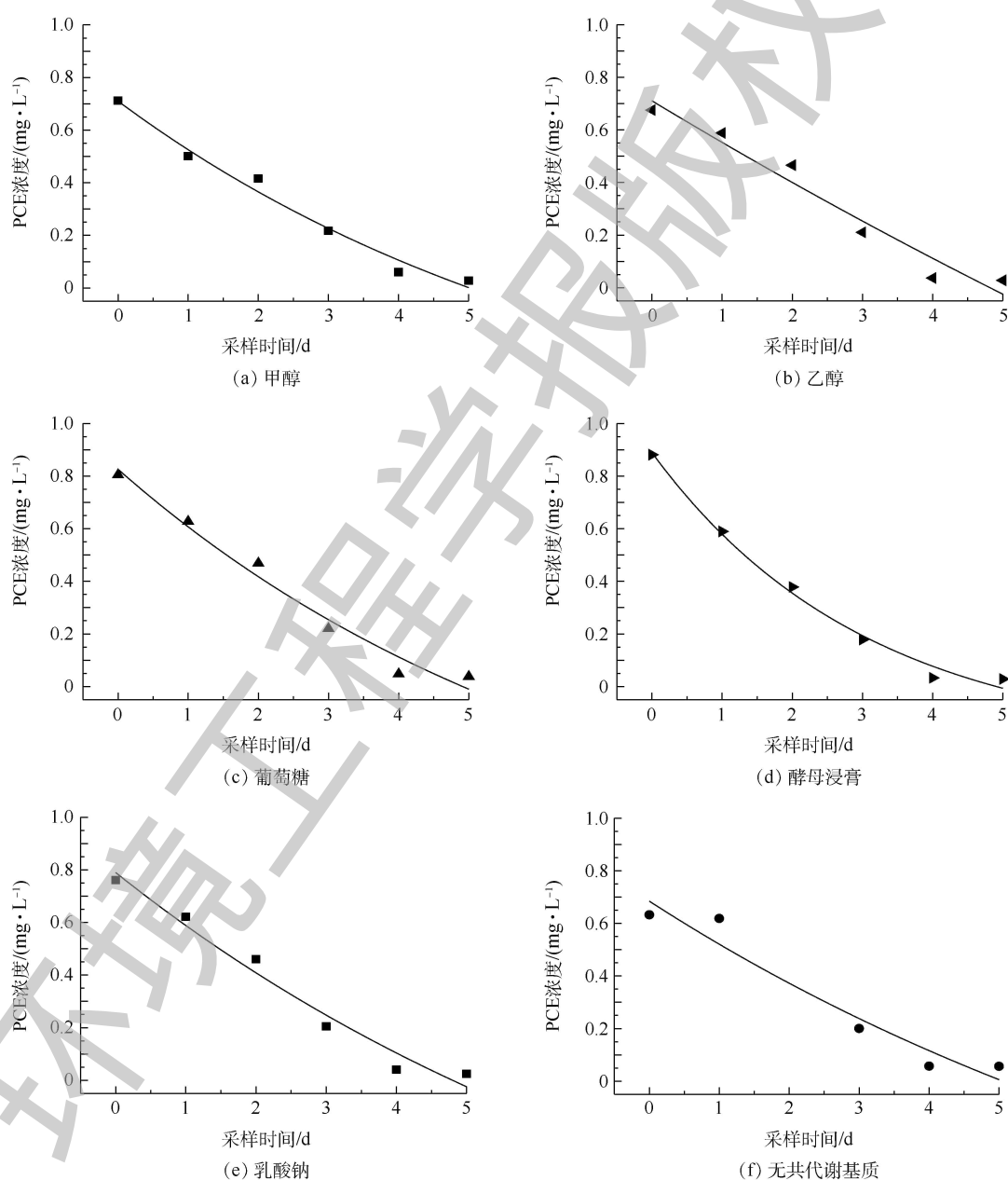


图 6 不同共代谢基质情况下 PCE 的反应动力学模型

Fig. 6 Kinetic models for PCE degradation using different co-substrates

表 1 不同共代谢基质对应的 PCE 的反应动力学模型方程及相关参数

Table 1 Reaction kinetics equations and parameters of PCE degradation using different co-substrates

共代谢基质	动力学模型	$R^2$	反应速率常数 $k/d^{-1}$	半衰期 $t_{1/2}/d$
甲醇	$c = 1.39e^{-\frac{t}{7.02}} - 0.682$	0.972	0.142	1.665
乙醇	$c = 4.38e^{-\frac{t}{27.23}} - 3.67$	0.928	0.037	2.296
葡萄糖	$c = 1.62e^{-\frac{t}{6.875}} - 0.792$	0.963	0.145	2.095
酵母浸膏	$c = 1.11e^{-\frac{t}{3.055}} - 0.223$	0.988	0.327	1.571
乳酸钠	$c = 1.895e^{-\frac{t}{8.906}} - 1.106$	0.955	0.112	2.161
无共代谢基质	$c = 1.746e^{-\frac{t}{10.155}} - 1.061$	0.884	0.098	2.409

乙醇因其特殊的理化性质，会对简单节杆菌中的细胞色素酶等产生抑制作用，使降解菌的降解效率降低<sup>[48]</sup>，乙醇还会改变乳酸杆菌细胞膜的通透性从而影响菌体的代谢活力<sup>[49]</sup>。因此，可推断同为革兰氏阳性<sup>[50]</sup>菌的 *Clostridium* sp. FCB45(优势菌种) 会出现相似的活性抑制，从而影响 PCE 降解速率。

### 3 结论

1) 利用梯度驯化法获得可将 PCE 高效降解的菌群，此菌群可以在 PCE 长期选择压力下生存繁殖。菌种鉴定结果显示：在种水平上，梭状芽孢杆菌 *Clostridium* sp. FCB45 含量最高，成为群落中的优势菌种。该群落多样性高，组成复杂，群落稳定性高，易于管理。

2) 当温度为 30 ℃、pH 为中性、PCE 初始浓度为 1 mg·L<sup>-1</sup> 和共代谢基质为酵母浸膏时，PCE 降解效率最高可达 96.75%。此群落可以在不同环境条件下 (pH、温度等) 表现出较高的降解率，该微生物群落有较宽的生态幅，在非极端环境条件下该群落均能发挥作用。

3) 添加共代谢基质强化的微生物实验结果表明，反应模型均符合一级反应动力学，拟合度良好，降解反应速率常数由大到小顺序依次是：酵母浸膏>葡萄糖~甲醇>乳酸钠>无共代谢基质>乙醇。该菌群在利用酵母浸膏作为共代谢基质时，降解速率常数最大可达 0.327 d<sup>-1</sup>。本研究中酵母浸膏最大程度地提高了四氯乙烯的降解速率。

### 参 考 文 献

- [1] VOGEL M, NIJENHUIS I, LLOYD J, et al. Combined chemical and microbiological degradation of tetrachloroethene during the application of carbo-iron at a contaminated field site[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 628-629: 1027-1036.
- [2] 曹红. 污染场地有机污染物迁移转化规律及其含水层系统天然净化能力研究[D]. 济南: 山东科技大学, 2010.
- [3] 马长文. 地下水中四氯乙烯迁移归宿与修复技术研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2007.
- [4] SATO C, YAO J. Simultaneous and sequential photolysis of TCE and PCE[J]. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, 2006, 132(1): 32-41.
- [5] 方生, 陈秀玲. 地下水开发引起的环境问题与治理[J]. *南水北调与水利科技*, 2001, 23(1): 8-11.
- [6] 吕倩, 魏洁云. 中国地下水污染现状及治理[J]. *生态经济*, 2016, 32(10): 10-13.
- [7] LUO Y S, HSIEH N H, SOLDATOW V Y, et al. Comparative analysis of metabolism of trichloroethylene and tetrachloroethylene among mouse tissues and strains[J]. *Toxicology*, 2018, 409: 33-43.
- [8] MAHALINGAIAH S, WINTER M R, ASCHENGRAU A. Association of prenatal and early life exposure to tetrachloroethylene (PCE) with polycystic ovary syndrome and other reproductive disorders in the cape cod health study: A

- retrospective cohort study[J]. *Reproductive Toxicology*, 2016, 65: 87-94.
- [9] 杨钦明. 四氯乙烯污染地下水的厌氧-好氧型生物反应格栅修复技术研究[D]. 天津: 天津大学, 2017.
- [10] 周友亚, 颜增光, 周光辉, 等. 制定场地土壤风险评价筛选值中关注污染物的预筛选方法[J]. *环境工程技术学报*, 2011, 1(3): 264-269.
- [11] WU M, LUO Q, LIU S, et al. Screening ornamental plants to identify potential Cd hyperaccumulators for bioremediation[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 162: 35-41.
- [12] DAVID M M, CECILLON S, WARNE B M, et al. Microbial ecology of chlorinated solvent biodegradation[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(12): 4835-4850.
- [13] 宋震宇, 杨伟, 王文茜, 等. 氯代烃污染地下水修复技术研究进展[J]. *环境科学与管理*, 2014, 39(4): 95-99.
- [14] CHANG C H, YANG H Y, HUNG J M, et al. Simulation of combined anaerobic/aerobic bioremediation of tetrachloroethylene in groundwater by a column system[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 117: 150-157.
- [15] 米生权, 魏涛. 四氯乙烯污染现状及处理方法的研究进展[J]. *海峡预防医学杂志*, 2006, 12(3): 21-23.
- [16] 马长文, 作彦卿, 孙承兴. 受氯代烃类污染的地下水环境修复研究进展[J]. *环境保护科学*, 2007, 33(3): 23-25.
- [17] LEE J, LEE T K. Development and characterization of PCE-to-ethene dechlorinating microcosms with contaminated river sediment[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(1): 120-129.
- [18] DING C, ALVAREZ C L, HE J. Growth of *Dehalococcoides mccartyi* species in an autotrophic consortium producing limited acetate[J]. *Biodegradation*, 2018, 29(5): 487-498.
- [19] MATTURRO B, FRASCADORE E, ROSSETTI S. High-throughput sequencing revealed novel *Dehalococcoidia* in dechlorinating microbial enrichments from PCB-contaminated marine sediments[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(11): 134.
- [20] 李焯. 不同厌氧环境中四氯乙烯生物降解研究[D]. 北京: 中国地质大学, 2006.
- [21] GULLOTTA F, DI M A, COLETTA M, et al. Co metabolism, sensing, and signaling[J]. *Biofactors*, 2012, 38(1): 1-13.
- [22] 史敬华. 不同基质共代谢降解地下水中四氯乙烯的研究[D]. 北京: 中国地质大学, 2006.
- [23] HATZINGER P B, STREGER S H, BEGLEY J F. Enhancing aerobic biodegradation of 1,2-dibromoethane in groundwater using ethane or propane and inorganic nutrients[J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2015, 172: 61-70.
- [24] 范平, 宋天顺, 覃彪, 等. 不同驯化方式对以苯酚为基质的微生物燃料电池产电性能的影响[J]. *环境工程学报*, 2012, 6(11): 3867-3872.
- [25] 袁芳. 2,4-二硝基甲苯的微生物共代谢降解研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2012.
- [26] 夏至. 纳米钨/铁/PVDF-g-(聚)丙烯酸催化还原剂制备及其脱氯性能研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.
- [27] LI C, TANG L, PENG J, et al. Determination of trichloroethylene and tetrachloroethylene in Li river sediments by headspace gas chromatography[J]. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2017, 29(5): 44-46.
- [28] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RVABIN T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [29] MAO Y P, XIA Y, ZHANG T. Characterization of *Thauera*-dominated hydrogen-oxidizing autotrophic denitrifying microbial



- communities by using high-throughput sequencing[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 703-710.
- [30] LOFFLER F E, SUN Q, LI J, et al. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1369-1374.
- [31] 晁红军, 宋修鹏, 孙继华, 等. 甲基营养菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(11): 1727-1737.
- [32] CHAIGNAUD P, MAUCOURT B, WEIMAN M, et al. Genomic and transcriptomic analysis of growth-supporting dehalogenation of chlorinated methanes in *Methylobacterium*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8(9): 1600.
- [33] KITTICHOTIRAT W, GOOD N M, HALL R, et al. Genome sequence of *Methyloversatilis universalis* FAM5(T), a methylotrophic representative of the order *Rhodocyclales*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(17): 4541-4542.
- [34] ZEMB O, LEE M, LOW A, et al. Reactive iron barriers: A niche enabling microbial dehalorespiration of 1,2-dichloroethane[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(1): 319-325.
- [35] GROSTERN A, EDWARDS E A. A 1,1,1-trichloroethane-degrading anaerobic mixed microbial culture enhances biotransformation of mixtures of chlorinated ethenes and ethanes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(12): 7849-7856.
- [36] ZHANG H, ZIV-EL M, RITTMANN B E, et al. Effect of dechlorination and sulfate reduction on the microbial community structure in denitrifying membrane-biofilm reactors[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(13): 5159-5164.
- [37] TONG H, CHEN M, LI F, et al. Changes in the microbial community during repeated anaerobic microbial dechlorination of pentachlorophenol[J]. *Biodegradation*, 2017, 28(2/3): 219-230.
- [38] PRUDEN A, SUIDAN M T, VENOSA A D, et al. Biodegradation of methyl tert-butyl ether under various substrate conditions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(21): 4235-4241.
- [39] YANG G, CHEN M, ZHOU S, et al. *Sinorhodobacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov., a non-phototrophic iron-reducing bacterium closely related to phototrophic *Rhodobacter* species[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2013, 104(5): 715-724.
- [40] NUNOURA T, HIRAI M, MIYAZAKI M, et al. Isolation and characterization of a thermophilic, obligately anaerobic and heterotrophic marine *Chloroflexi* bacterium from a *Chloroflexi*-dominated microbial community associated with a Japanese shallow hydrothermal system, and proposal for *Thermomarinilinea lacunofontalis* gen. nov., sp. nov.[J]. *Microbes and Environments*, 2013, 28(2): 228-235.
- [41] ZHANG Y, HU M, LI P, et al. Trichloroethylene removal and bacterial variations in the up-flow anaerobic sludge blanket reactor in response to temperature shifts[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(14): 6091-6102.
- [42] SHARMA P, SCHIEWER S. Assessment of crude oil biodegradation in arctic seashore sediments: Effects of temperature, salinity, and crude oil concentration[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(15): 14881-14888.
- [43] 隋淑梅, 尹志刚, 姜利国, 等. 考虑地下水温度的土壤吸附氮动力学行为研究[J]. *水资源与水工程学报*, 2016, 27(3): 217-220.
- [44] 黄景锐. 西安市浅层地温场分布特征及其变化分析[D]. 西安: 长安大学, 2013.
- [45] 李志红. 银川平原浅层地温场和水化学特征及其影响因素研究[D]. 北京: 中国地质大学, 2014.
- [46] 周群英, 王士芬. 环境工程微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.

- [47] 陶亚奇, 蒋卓睿, 陈雪. 类Fenton试剂处理苯酚废水的影响因素及动力学研究[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(4): 126-129.
- [48] 宁静. 乙醇条件下简单节杆菌细胞性质的变化及其对物质跨细胞运输的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2013.
- [49] 朱敏. 乙醇胁迫对乳酸杆菌代谢活力及膜结构的影响[D]. 石河子: 石河子大学, 2015.
- [50] LEGARTH J H O F. Antibacterial composition or antibacterial ingredient useful for treating, alleviating and/or preventing growth of gram-positive bacteria including *Clostridium* bacteria or *Streptococcus* bacteria, comprises a seaweed material: WO2017186927-A1[P]. 2017-11-02.

(本文编辑: 金曙光, 曲娜, 郑晓梅)

## Co-substrates enhanced bioremediation of groundwater contaminated by tetrachloroethylene

TANG Shiyue<sup>1,2</sup>, WANG Qing<sup>1</sup>, YANG Miaoyan<sup>1,2</sup>, SONG Xin<sup>1,\*</sup>, YU Lei<sup>3</sup>

1. Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

\*Corresponding author, E-mail: xsong@issas.ac.cn

**Abstract** Aiming at the long remediation timeframe associated with bioremediation of tetrachloroethylene (PCE)-contaminated groundwater, the addition of co-substrates has been explored to improve the biodegradation rate and reduce the remediation duration. In this study, an acclimated microbial consortium for PCE biodegradation was enriched by the shaking cultivation method with a microbial source from anaerobic sludge collected from a wastewater treatment plant. PCE degradation efficiency was determined and the impacts of different environmental factors such as temperature, initial pH and initial concentration of tetrachloroethylene were optimized. In addition, the enhanced biodegradation efficiencies of PCE using different co-substrates, including methanol, ethanol, glucose, yeast extract and sodium lactate, were investigated, and the corresponding biodegradation kinetic models were also developed. Experimental results showed that *Clostridium* sp. FCB45 played a significant role in PCE biodegradation. The best PCE biodegradation effect occurred with the efficiency up to 96.75% at PCE initial concentration of 1 mg·L<sup>-1</sup>, neutral pH, 30 °C, and co-substrate of yeast extract, and the highest biodegradation rate constant was 0.327 d<sup>-1</sup>. The enhanced biodegradation using different co-substrates can all be described by the first-order reaction kinetics. It was concluded that the addition of co-substrates can effectively shorten the remediation timeframe, which provides a theoretical and experimental basis for in situ enhanced bioremediation of PCE-contaminated groundwater.

**Keywords** tetrachloroethylene (PCE); bioremediation; co-substrates; contaminated groundwater