

# 生物降解

- 生物降解

是有机污染物在环境中的一类重要转化过程，该过程几乎影响所有有机物在环境中的归趋。和一般的化学和光化学反应一样，这些生物化学过程使有机化学品的结构改变，并最终从环境中去除。

- 主要目标

表征有机污染物通过生物降解消失的速率。

# 生物降解与矿化

- 有机物的生物降解并不一定是指这些化合物被完全矿化。
- 矿化：可以定义为有机化合物完全转化为C,H,O,N的稳定无机形式等;而由生物引起的有机污染物任何结构上的变化，都被看作生物降解。矿化通常需要几个连续的生物转化过程。

# 微生物的一些重要概念

- (1)初级生物降解:在生物学上引起母体化合物结构变化，并改变分子的完整性。
- (2)最终生物降解:使有机物向无机物的生物转化，以及化学品在正常代谢过程中的生物降解。
- (3)可接受的生物降解:在生物降解过程中可除去化学品的毒性及人们不希望的特性。

# 微生物相互作用及微生物生态学

- 自然界中的微生物包括各种细菌、原生生物和真菌，它们几乎无处不在。其中**担负生物降解的主要是异养细菌**(包括放线菌、某些自然细菌)和**真菌**(包括担子菌、酵母菌和某些原生动物)。
- 在特定的环境中，往往只有一小部分微生物的代谢是活跃的。不同的环境条件会影响特定物种的组合。因为许多有机体都具有相似的生物学途径和本领，就有机物的生物转化来说，**环境因素**的差异可能并不很重要，但是，某些环境因素，如氧气的存在与否，对生活在该区域的微生物代谢能力有极其重要的影响。
- 例如，许多烃类在好氧条件下的生物降解是众所周知的，但在缺氧条件下，这些化合物存在的时间通常要持久得多。由于温度、pH、氧气浓度等因素影响微生物群落的组成、生长速率和酶含量，这些环境条件不仅能影响由微生物参与的转化速率，有时还能成为这些反应能否进行的控制因素。

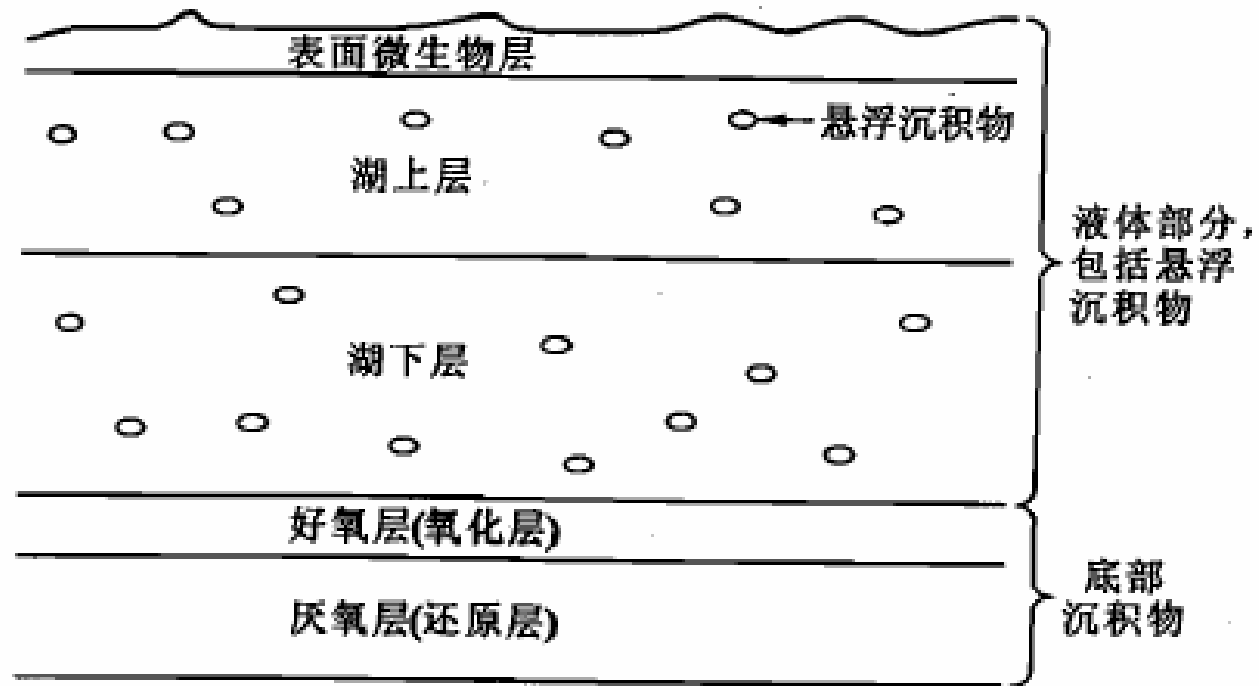


图 7-1 微生物在一般新鲜水体中的栖息地  
(引自 Lyman 等, 1982)

不同栖息地的微生物生长特性和群落组成不同

# 土壤中的微生物

- 土壤与大多数水系不一样，它不是始终如一和持续不变的环境。微生物群体主要栖息于土壤的顶层(大约14 cm的地表，见表7—2)。因为这里的营养丰富，可利用的氧气多。植物的根基部分生活着高密度的微生物，由于根系腐烂后的物质含有有机质，为微生物的生长提供了足够的营养(图7—2)

表 7-2 微生物沿土壤垂直带的分布

| 深度/cm   | 土壤中生物个数/( $10^5$ 个·g <sup>-1</sup> ) | 占总生物体的比例/% |
|---------|--------------------------------------|------------|
| 3~8     | 119.7                                | 79         |
| 20~25   | 24.8                                 | 16         |
| 35~40   | 6.3                                  | 4          |
| 65~75   | 0.22                                 | <1         |
| 135~145 | 0.04                                 | <1         |

注:本表引自 Lyman 等,1982。

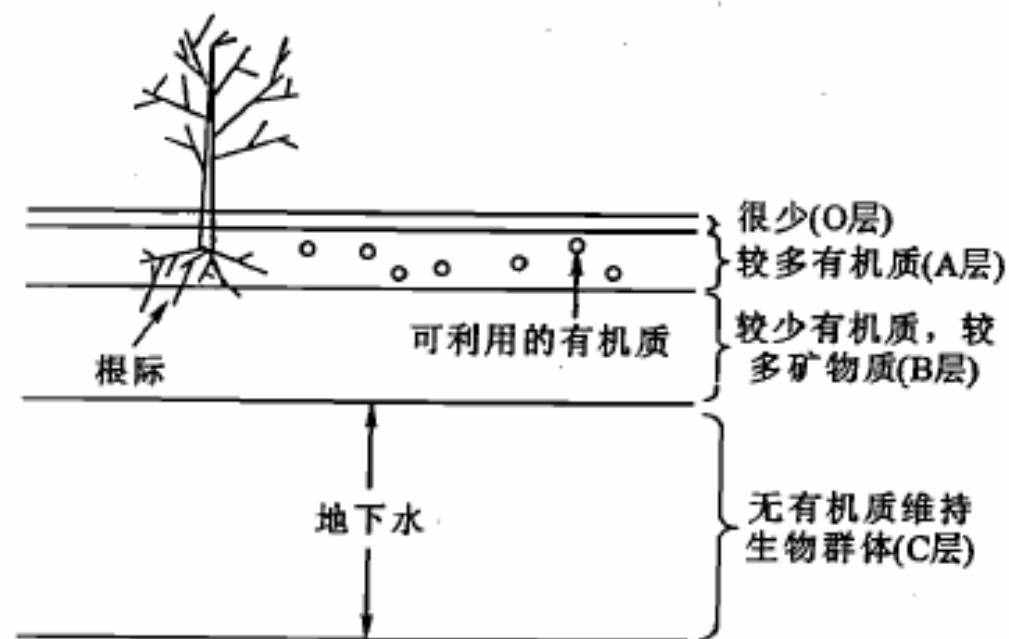


图 7-2 土壤中微生物的栖息分布

(引自 Lyman 等,1982)

# 微生物的协同作用

- 当考虑污染物在有多种微生物共存的环境中发生生物转化时，另一个重要方面是不同的微生物能否形成互惠的联合体。人们早就认识到某些特定的转化过程可能需要不同物种间的“协同作用”来完成。
- 如，3-氯苯甲酸根的生物降解需要3种细菌的协同作用：第一种微生物从芳环上移去氯原子；第二种细菌继续降解苯甲酸根，第二种微生物产生的氢气被第一种微生物利用，并被其他微生物用来将 $\text{CO}_2$ 转化为甲烷；最后另一种微生物将利用醋酸根并释放出甲烷。由于后续生物的作用防止了中间产物（苯甲酸根、 $\text{H}_2$ 、醋酸根）的积累，由第一种微生物去除氯的过程可以不断进行。
- 这个例子说明，如果某种特定的微生物不存在或不活跃而不能及时清除生物降解的中间产物，则整个生物降解过程就可能停止。



# 微生物生态

- 多种微生物之间的这种相互联系、相互依存关系构成微生物生态。
- 当有机污染物进入环境后，可为微生物提供新的营养来源(C,N,S来源)或毒害危险，有理由推测微生物及其群落会改变其结构以对付它们环境中不常见的化合物。对微生物生态学的研究，将会大大促进我们对自然环境中有机污染物生物降解的了解。

# 酶 学

众所周知，细菌细胞内发生的大多数反应是由酶催化的。酶是一种特殊的蛋白质，它们通过与基质的互相作用使决定生物转化速率的活化能降低。酶可使反应的活化能降低几十千焦每摩尔，从而使转化速率加快 $10^9$ 倍以上。

酶的作用方式是由于与基质形成复合物，或使反应物处于相互有利的环境中，使基质易于互相作用；另外，酶含有极性或带电荷的结构单元，可以改变与之结合的反应物的电子云密度，从而使键的断裂能垒降低，并促进新键的形成。

# 控制微生物酶工具类型的原则

- 第一，由于微生物在进化中能利用氨基酸、糖、脂肪酸等化合物及相应的蛋白质、碳水化合物和脂肪等，我们可以推测酶中很多都具有对这类化合物进行合成(反代谢)和降解(分解代谢)的能力。

# 酶并不具备完全的基质选择能力

- 第二，酶并不具备完全的基质选择能力。酶虽然是用来结合和催化特定化合物的，但也能与结构相似的化合物结合或诱导其反应。
- 酶的这种不完全选择性说明，具有部分结构与常见基质类似的化合物也能发生生物转化。因此，结构与天然有机物相似的有机污染物也能发生不同程度的生物降解，这就是**共代谢现象**的一部分原因。在共代谢过程中，非目标化合物可以被本来是用来转化其他基质的酶系统所降解。

# 相对非选择性的酶存在

- 第三，微生物中似乎总有一些相对非选择性的酶存在，以便用于进攻和利用不希望的和不要的化合物。
- 大部分细菌的策略通常是保持一个初始氧化步骤，将那些有毒的化学信号转化为极性更大的物质，这样转化后的产物就能适于通常的代谢途径，或因其水溶性增加，可以返回到环境中去。这一原则提示，即使在环境中不常见的有机物，有时微生物也能通过这种相对非选择性酶的作用使其慢慢降解。

# 可诱导的酶

- 微生物中并不是从遗传学上能产生的所有酶都一直存在，有些酶是微生物为应对一种新的刺激(如环境中一种新化合物的引入)而产生的，这些酶被称为是可诱导的。由于这类酶的作用，我们会观察到微生物对新化合物有一段无明显活性的时间，或称为停滞期。



# 导致停滞期的其它因素

- (1)已经存在的有效酶被“抑制，”(即变为无效)，必须经过一段时间或改变一些条件才能使其活化;
- (2)对有些细菌，可能需要一段时间使其增殖到一定的数量;
- (3)需要一定时间使微生物变异以便能够产生新的或更有效的酶来进行生物转化;
- (4)可能需要质粒(DNA)的转移使现有的微生物扩展或结合适当的酶手段;
- (5)可能只是由于特定的微生物种群需要迁移到目标环境中或已存在的胞囊或孢子需要萌发。
- 这些现象使我们难以预测一种化学品在特定的环境条件下需要多长时间才能发生生物降解。

# 生物降解的原理

- 几乎所有的生物降解反应都可以归结为氧化性的、还原性的、水解性的或综合性的。每一种反应都涉及特定的酶。



# 微生物引发的水解

- 微生物用来引发有机污染物转化的第一个重要途径就是水解反应。
- 这种反应可以在任何环境条件下进行，而且能够催化这种降解反应的酶都是固有酶(即总是存在)，尽管它们的活性水平是可调节的。
- 从原理上看，微生物水解转化有机物的过程属于亲核取代反应
- 与相应的非生物水解反应相似，这种生物化学转变会产生乙醇。

# 微生物水解反应的特点

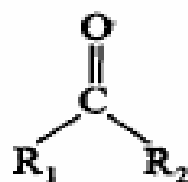
- 微生物水解反应速率一般要比非生物水解反应快得多，因为生物体内的pH和天然水体中的pH范围并没有明显差别，微生物利用酶来促进有机物的水解反应。通常微生物的酶促水解反应可通过下述途径：
- 首先，有机物在酶促反应中要利用强亲核剂来引发初始的进攻；
- 其次，将可水解部分和吸电子取代基结合来加强进攻，这和我们在酸催化或者是金属催化水解反应中所见到的相似；
- 此外，酶将反应物保持在相互最有利的位置，从而减少对反应不利的变化，加快反应的速度。与非酶促反应相比，这些影响的组合会大大加速生物体中酶促反应的进程。

# 生物氧化反应

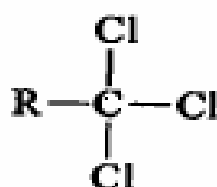
- 微生物降解有机化合物的第二个途径是使用氧的亲电子特性来氧化有机化合物。在环境中大多数的有机化合物不能直接被 $O_2$ 氧化，微生物必须使氧转变成比较活泼的氧化剂，通常，这一过程由含金属的酶(例如加氧酶)和像NAD(P) H这样的辅酶进行。如果 $O_2$ 的两个氧原子都被转化，那么这种酶被称作双加氧酶.相反的，单加氧酶仅能分离出一个氧原子。形成的生物氧化剂通过从有机物中最易得到电子的部位吸引电子来攻击有机分子，这些部位通常是芳环  $\pi$  电子和C = C键

# 生物还原反应

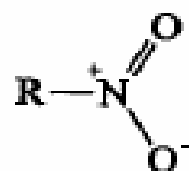
第三种引发有机化合物生物降解的反应是还原反应。还原反应是将电子转移到有机化合物的特定部位,微生物的还原转化涉及的化学结构和非生物还原反应相似,其结构上的特点是由吸电子杂原子形成被氧化的中心原子:



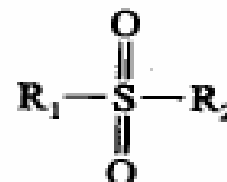
C(+II)



C(+III)



N(+III)



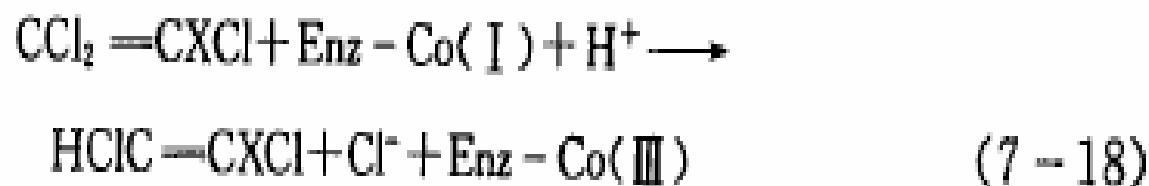
S(+II)

由于受进攻的杂原子的吸电子特性,当电子被加到中心原子后,被氧化的C、N、S原子都能够受到亲核进攻,这是化合物能够发生微生物降解的重要原则。

# 氯代烯烃的生物还原

然而,长期观察表明多卤化合物以微生物为媒介的还原反应是能够发生的,最近也有关于乙烯基和芳基卤化物还原反应的研究报告。在这些研究中发现过渡金属辅酶(例如还原性 Fe、Co、Ni)能够将这些化学物质还原脱卤。

在研究多氯乙烯时发现含钴酶能够利用还原反应使这些化合物脱卤:

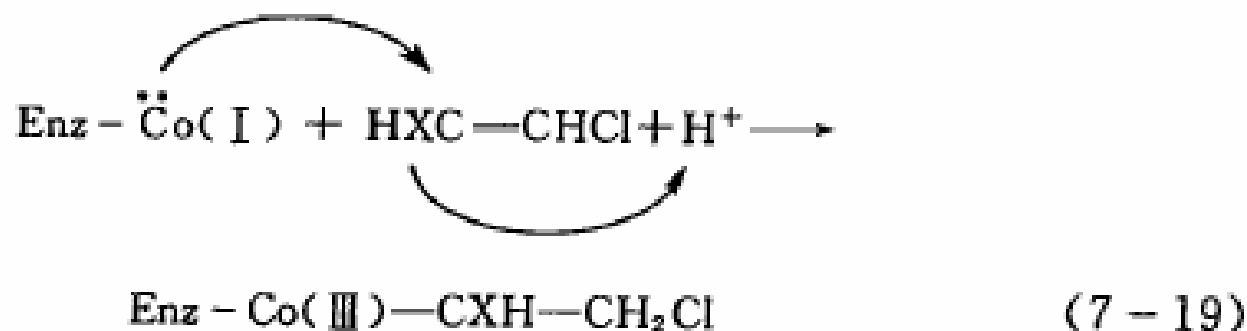


# 氯代烯烃的还原的生物过程

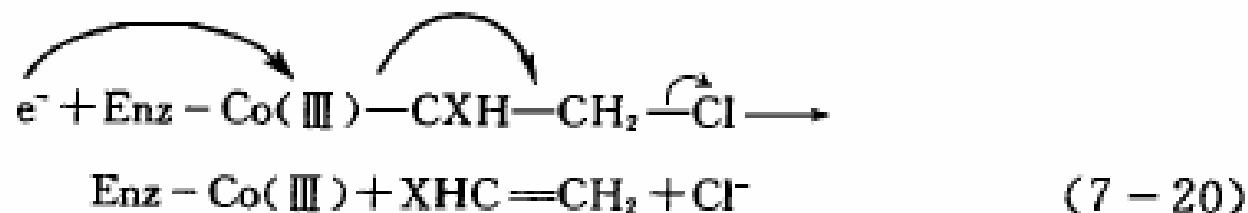
这里  $X = H, F$  或  $Cl$ 。除一个例外,迄今的研究发现能够催化这类烯烃碳生物还原反应的酶都含有一个含钴辅酶,即一种类似于铁卟啉的含钴环状体系。对一种特殊的含钴辅酶,钴胺素或维生素  $B_{12}$  的研究表明,当钴被还原成  $+1$  价并同时存在一个大约为  $-350\text{ mV}$  的氧化还原电位时,还原反应就很容易进行。产生的“超级-还原性-含钴辅酶”既是一种很强的亲核试剂,也能够把单个的电子转移到四氯或三氯乙烯等化合物的卤素结构中。自由基阴离子产物释放出卤素( $Cl^-$ ),留下一个寿命很短的乙烯自由基,这一自由基很快就被还原,很可能是由于附近的  $Co(II)$  的作用。通过质子化作用,结合在化合物上的一个卤素基团被氢所取代,酶也回到原来的  $Co(III)$  形式,直到还原成  $Co(I)$  形式才能开始下一次循环。三氯乙烯在这种作用下的重要产物已被证明是顺式和反式二氯乙烷(和 1,1-二氯乙烷相对),这是由于最初的电子还原反应都是进攻含卤原子较多的碳原子。

# 氯代烯烃的降解过程2

显然,对含较少卤素的化合物,如二氯乙烯和氯乙烯,这种机理就变成对双键的加成反应:



加成产物随后被还原分解,产生卤素和带有 Co(II)形式的酶:



# 氯代烯烃的降解过程2

- 通过这种加成机理产生的顺式和反式二氯乙烯要比能够产生它们的四氯或三氯乙烯的转化过程慢，同时也要比由他们形成的氯乙烯的转化慢。
- 因此，在含有这些污染物的厌氧环境中微生物还原四氯或三氯乙烯时，上述的这些二氯乙烯类化合物就会累积。在超级一还原性一含钴辅酶作用下，1,1-二氯乙烯的还原反应很容易形成毒性很高的物质氯乙烯。
- 令人惊奇的是，一些微生物能够把卤代化合物作为最终的电子接受体，这是由于该类微生物能够利用像四氯乙烯这样的化合物代替 $O_2$ 、硝酸根、硫酸根维持“生存”。



# 微生物的生长:Monod种群生长动力学

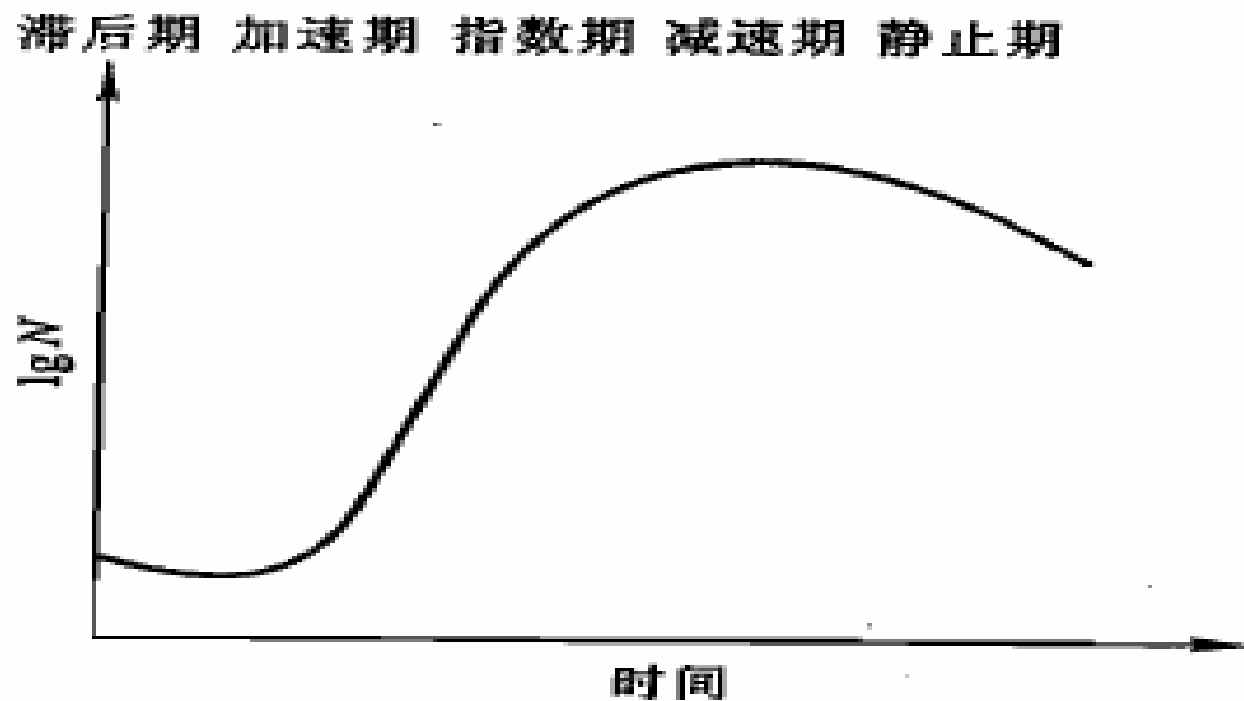


图 7-3 微生物生长繁殖阶段示意图  
(引自张锡辉, 2001)

# 微生物生长过程1

- 在自然环境中，微生物在营养处于均匀平衡的条件下的典型生长曲线如图7—3所示。初始阶段，微生物需要适应新的生长条件和环境，调整相应的生长机制，为生长做好准备。这一阶段称为生长“滞后期”。在此期间，细胞内的基因开始转录，DNA转录产生mRNA,mRNA启动各种活性酶的合成。微生物一旦适应了新的环境，其生长就进入“加速期”，加速期的微生物主要是协调各个部位的功能，优化自身，以发挥最高生长潜力。在生长达到最大生长速率时，微生物生长进入“指数期”。在指数生长期，细胞的生长将只取决于细胞的遗传基因特性。细胞一般以二分裂方式生长繁殖，因此要求细胞各种成分的快速合成彼此相匹配。指数生长期又称为“平衡生长期”，在这个时期，细胞内mRNA浓度变化并不大。

# 微生物生长过程1

- 指数生长期的生长速率称为最大比生长速率  $\mu_{\max}$ 。随着营养物质逐渐被消耗，或者毒性中间产物逐渐积累，微生物生长速率逐渐下降，微生物生长进入“减速期”。当微生物的生长速率等于其死亡速率时，微生物进入“静止期”。在此期间，先是微生物细胞内部消耗储存的营养，继而牺牲部分细胞组分以维持生存，细胞数量基本不变。当细胞内的营养和组分消耗完后，部分细胞就出现死亡、破裂，溶出的物质被其他细胞利用以维持种群的生存，微生物进入“死亡期”。此时，细胞数量开始减少，生物量开始下降。实际上，当进入营养缺乏的状态后，微生物细胞会自行阻断DNA合成和转录，以防止细胞进一步分裂繁殖。
- 有些微生物将以特殊的形式生存下来，但是细胞尺寸缩小，可能从正常的1  $\mu\text{m}$  缩小至0.1  $\mu\text{m}$  左右，而且细胞内的代谢活动基本停止，以维持达数年之久。但是基因保持完整，这种状态可以维持达数年之久。

我们先讨论微生物生长量由基质限制时细胞数目随时间的变化关系。对应于一种新的生长机会,微生物进入指数生长阶段可用如下方程描述:

$$d[B]/dt = \mu \cdot [B] \quad \text{或} \quad [B]_t = [B]_0 \cdot e^{\mu t} \quad (7-30)$$

式中:[B]——细胞量,个 $\cdot$ L $^{-1}$ ;

$\mu$ ——特定增长率,h $^{-1}$ 。

因此  $\ln[B]$  直接和  $t$  成比例关系:

$$\ln[B]_{t_2} = \ln[B]_{t_1} + \mu \cdot (t_2 - t_1) \quad (7-31)$$

换句话说,在指数增长期,微生物量将会在  $t = (\ln 2)/\mu$  的时间间隔内成倍地增长。

Monod 认识到微生物种群的生长速率和支持它生长的关键物质(或几种物质)的浓度有关。更多的“食物”意味着更快的增长,最终达到一个特定的点,这时就达到了最大生长速率  $\mu_{\max}$ 。在这一点上,一些其他的因素开始成为限制因子,Monod 从数学上将微生物数量增长和限制生长的物质浓度用相对应的表达式描述:

$$\mu = \mu_{\max} [i] / (K_{im} + [i]) \quad (7-32)$$

式中:  $\mu_{\max}$ ——最大比增长速率(例如  $\text{h}^{-1}$ ),它对应于有过量的限制性化

合物存在的情况;

$[i]$ ——限制生长的化学物质浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;

$K_{im}$ ——Monod 常数,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,它只与细胞本身及其生长介质的成分有关,而与生长介质的浓度无关,其大小等同于当生长量达到最大生长量的一半时,化学品的浓度,也称为半饱和常数。

Monod 方程的基本形式是由单一基质支持微生物生长推出的。实际上,由多种有机基质为单个微生物种提供碳和能量同样是可能的。如果这些基质全部由相同的酶处理,并在同一个代谢转化步骤中相互竞争,则整个物种的生长可以反映众多基质的共同作用。在这种情况下,微生物种群的整个生长过程反映了所有基质的利用情况。由于所有的基质都争夺相同的酶,所以在 Monod 表达式的分母中化学品浓度需由每种化合物的因子修正:

$$\mu_{\text{tot}} = \sum_{i=1}^n \mu_i \quad (7-33)$$

$$\mu_i = \frac{\mu_{i\text{max}} [i]}{K_{iM} + \sum_{j=1}^n \frac{K_{iM}}{K_{jM} [j]}} \quad (7-34)$$

式中:  $\mu_{i\text{max}}$ —— $i$  作为限制因素时最大生长率;

$K_{iM}$ ——基质  $i$  的半饱和系数;

$K_{jM}$ ——每种竞争基质  $j$ , 包括  $i$  的半饱和系数。

整个微生物生长率有可能因使用多种化合物而得到提高,从而也可提高所考察的单个基质的去除速率。

# 模型适用条件

- 一般而言，该模型是针对单一微生物，但是，也被用于混合微生物组成的系统。对于复合微生物系统，必须假定各种微生物之间的比例在生长过程中保持不变:当然，这种情况并不普遍。即使在营养非常丰富的培养基中，微生物的生长仍将迅速消耗营养，最终导致某些营养元素短缺，从而限制微生物生长。许多研究表明最大比生长率和半饱和常数随着细胞的代谢状况而不断变化。最大比生长率与半饱和常数有着内在的关系，其中一个参数变化时，另一个也有相应不同程度的变化。这些参数的变化可能与微生物生长的历史、细胞的生理、基质的变化和环境条件的变化等有关。
- 在用Monod模型处理污染物质降解与微生物生长的关系时，为了衡量限制性化学品浓度的变化，我们需要把微生物生长和化合物浓度改变联系起来。这可以通过确认降解一定量的化学物质得到微生物量的增长比例来获得。

# 模型适用条件

- 以Monod方程为基础的污染物质降解动力学模型原则上需要满足以下3个条件:
- (1)微生物以单一污染物质作为基质;
- (2)微生物处于平衡生长状态;
- (3)在降解和生长过程中没有毒性存在。



# 模型失败的原因

- 显然，大多数实际微生物处理系统和自然环境中微生物过程并不符合这样的条件。
- 首先，实际过程中多种污染物质同时存在，而且污染物质在降解过程中产生的中间产物也作为基质而得到再利用。
- 其次，微生物在实际过程中往往不能够得到平衡的生长，此时微生物的活性与微生物的数量并不成比例，微生物数量高并不代表微生物的活性一定高。
- 尤其在快速生长过程中，细胞内的各种组分并不是以平衡的形式协调生长，这种不平衡导致模型的失败。

# 微生物降解速率常数的测定

- 影响降解速率测定的因素包括实验方法和测定技术，如实验中所用化学品的浓度，示踪化合物的标记位置，微生物的来源、浓度以及适应时间，化学品在土壤或沉积物上的吸附以及环境温度和pH等都影响降解速率，当然分析方法的灵敏度也是一个重要因素。
- 微生物的生物量可以用标度盘准确测定，而监测化合物消失的最准确方法莫过于 $^{14}\text{C}$ 示踪法，因为它快速、灵敏，不易受干扰。

# 取代芳烃的生物降解

在发生好氧生物降解时,除分子氧被活化外,有机物也能被活化,这种活化不一定产生电子的得失,而是在催化活性中心负电场力的作用下,芳环中心的大  $\pi$  键向一个方向偏移,和活性中心靠近的一面芳环上电子云密度降低,而另一面电子云密度升高,这就给活性氧的亲电进攻或带负电荷氧的亲核进攻创造了更有利的条件。

微生物降解取代芳烃一般包括 5 个步骤:芳烃分子转化为容易利用的羧酸,然后再被转化为细胞蛋白质或转化为二氧化碳和水。苯的典型好氧降解途径如下:

