

## 假单胞杆菌DM1在二氯甲烷降解 过程中的微生物动力学

郭 养 浩

(福州大学轻工系发酵工程教研室, 福州)

采用半连续培养技术研究了假单胞杆菌 (*Pseudomonas*) DM1 在二氯甲烷降解过程中的微生物动力学。高浓度底物二氯甲烷和高浓度产物氯化物对DM1的生长和底物的消耗具有严重的抑制效应。反应的最佳浓度条件是:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1.2mmol/L, 氯化物 < 100mmol/L。当二氯甲烷或氯化物浓度高于其极限浓度时, 细菌失活并自溶,  $\mu \leq 0$ 。对于具有严重底物抑制的发酵过程, 特别是以有毒化合物为唯一碳源的生物降解过程, 本文提出一个新的动力学模型。由两项组成, 第一项反映了传统的Monod类型的可逆络合机理, 第二项表示有毒物质对生物体代谢作用的不可逆抑制效应。该模型比其他传统模型能更好地描述二氯甲烷的生物降解过程。

**关键词** 假单胞菌;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  生物降解; 底物抑制; 产物抑制; 不可逆抑制效应

自然界中的微生物能够降解种类广泛的有机化合物。某些特殊细菌甚至在有毒化合物为唯一碳源和能源的情况下, 可有效地利用、降解和矿化该有毒物质。微生物的这一生物催化活性已被广泛应用于环境污染净化工程中。

一碳和二碳的卤化烷烃在许多工业过程中是重要的有机溶剂和中间产物。其中二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 被美国环境保护局列为重要的污染物之一<sup>[1]</sup>。用活性污泥或土壤微生物混合培养的方法进行短碳链卤化烷烃生物降解的研究曾有不少报道<sup>[2,3]</sup>。许多纯种优势菌得到分离富集, 对其降解卤化烃的能力也进行了测定<sup>[4-6]</sup>。*Pseudomonas* DM1 的生长在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  浓度高于 5mmol/L 时受到抑制<sup>[6]</sup>。Galli, R. 等用固定化的 *Hyphomicrobium* DM2 成功地进行流化床连续降解二氯甲烷的实验, 实验表明, 高浓度盐类抑制了生物降解能力<sup>[7]</sup>; Galli, R. 还提出了一个脱卤反应的反应机理<sup>[8,9]</sup>。

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的生物降解过程是个兼有严重底物抑制和产物抑制的过程。本工作选用对  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  有较强降解能力的假单胞杆菌 DM1, 在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  为唯一碳源和能源条件下, 探讨底物浓度和产物浓度对菌体生长及其脱卤能力的影响, 并建立一合适的数学模型来描述这一复杂的生物降解过程。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 反应介质

反应介质中含有 (每升): 2.13g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.36g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.0mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.4mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.2mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5.3mg  $\text{CaCl}_2$  和微量钴、钼、硼元素。

本文于1988年10月20日收到。

本工作在西柏林工业技术大学完成, 得到 J. Star nick 教授的指导, 特此致谢。

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  为唯一碳源和能源, 连续培养和半连续培养的进料浓度分别为 40—50mmol/L和150mmol/L。

### (二) 反应器系统

考虑到  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的挥发性, 为保证反应精度, 采用密闭的反应系统。反应器工作容积 500ml。反应介质上方气相中的氧由氧气钢瓶 (99.9%纯度) 供给。反应过程中溶液的溶氧浓度为 25—30mg/L。pH 为  $7.0 \pm 0.1$ 。反应温度为  $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 。

### (三) 分析方法

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  浓度用带氢焰离子检测器的气相色谱仪 (Perkin-Elmer 900) 分析。异丙醇为内标。分析样品为 5 $\mu\text{l}$  时,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  可检测浓度为 0.01mmol/L。溶液中氯离子浓度用电位滴定法测定 (Potentiograph E436, Metrohm, Herisau)。细胞浓度用浊度法测定 550nm 时的光密度而得 (Spectral photometer PMQ2, Carl Zeiss, FRG)。细胞干重于真空、 $80^\circ\text{C}$  干燥 3h 后测定。

### (四) 数据处理方法

实验数据与数学模型的拟合采用最小二乘法。非线性最小二乘法采用改进的高斯牛顿法<sup>[10]</sup>和优化单纯形法<sup>[11]</sup>计算。分批操作过程的数学模拟用龙格-库得法求解微分方程组。

## 结果与讨论

### (一) 半连续培养

每批半连续培养的反应介质中底物  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的初始浓度不同。接种物直接由另一连续培养过程提供。一摩尔  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  被降解可产生二摩尔的 HCl。当调节 pH 的 NaOH 溶液中含有 300mmol/L NaOH 和 150mmol/L  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 即  $\text{NaOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 2:1$  (摩尔比) 时, 补充的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  量大

致等于已消耗量。因此, 在半连续培养全过程中, 培养介质中初始  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  浓度可保持稳定。比如,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  初始浓度为 1.18mmol/L 时, 随反应的进行, 细胞浓度  $X$  和产物浓度  $P$  按指数型增大, 然而底物浓度为  $1.18 \pm 0.06\text{mmol/L}$ , 几乎保持恒定。

每批半连续操作可认为是恒容过程 ( $\Delta V < 10\text{ml}$ )。反应产物氯化物的累积 ( $\Delta P < 20\text{mmol/L}$ ) 对反应速率的影响可忽略不计。半连续操作可视为微分反应器的操作过程, 使得在恒定底物浓度条件下测定动力学参数成为可能。

### (二) 底物抑制效应

各批  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  浓度不同的半连续培养过程的实验数据列于图 1 中。除  $S = 23.5\text{mmol/L}$  外, 各批实验的  $\lg X-t$  曲线在接种 3h 后均呈直线状。从直线斜率可计算出不同底物浓度时 DM1 的比生长速率  $\mu$ 。当  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  浓度等于  $23.5\text{mmol/L}$  时, 曲线斜率从正值逐渐变为负值, 接种 8h 之后,  $\mu$  为常数。

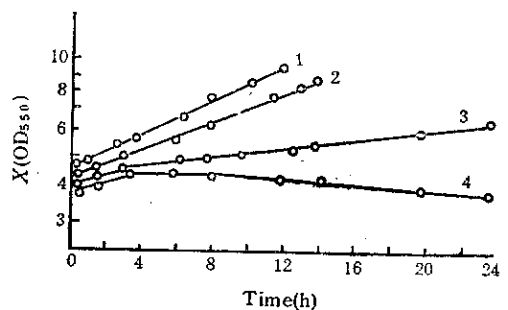


图 1 半连续培养过程中 DM1 菌株的生长曲线  
Fig.1 Growth of strain DM1 in fed-batch cultures  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  浓度  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  concentration (mmol/L);

1. 1.18, 2. 5.0, 3. 13.7, 4. 23.5

图 2 表明底物浓度对 DM1 菌株的  $\mu$  有显著影响。  $S < 1.2\text{mmol/L}$  时,  $\mu$  随  $S$  的增加迅速增大, 在低浓度底物区, 底物浓度的增加激发了微生物的代谢作用。  $S =$

1.2mmol/L 时,  $\mu$  的实验观察值达到最高点 ( $0.078\text{h}^{-1}$ )。底物浓度进一步增加, 其生长抑制作用越来越显著,  $\mu$  随底物浓度的增加几乎是线性地下降。存在一底物浓度的极限值 (约 20mmol/L)。高于该极限值时, 微生物的死亡速率高于生长速率, 此时, 表现比生长速率为负值。

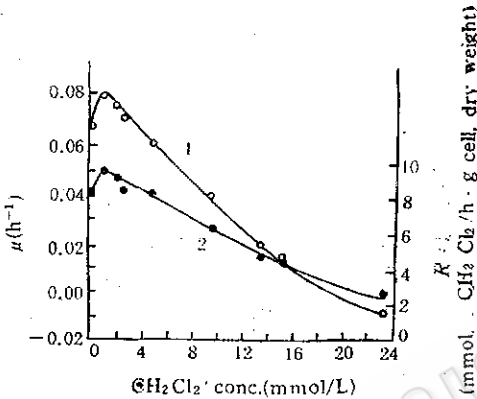


图 2 比生长速率( $\mu$ )和比底物消耗速率( $R$ )与  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  浓度的关系

Fig. 2 Dependence of specific growth rate ( $\mu$ ) and specific substrate consumption rate ( $R$ ) on the  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  concentrations

1.  $\mu$  2.  $R$

底物的比消耗速率 ( $R$ ) 和微生物比生长速率 ( $\mu$ ) 随底物浓度的增大有着同样的变化规律。最大  $R$  值对应于  $\mu$  的最高点。最大的  $R$  实验测定值为  $9.8\text{mmol/h}\cdot\text{g}$  细胞 (干重)。细胞得率常数  $Y_G$  的计算值为  $12.0\text{—}14.0\text{mg}$  细胞 (干重) /  $\text{mmol}\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 细胞维持常数  $m$ , 为  $2.5\text{—}3.6\text{mmol}\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{h}\cdot\text{g}$  细胞 (干重)。  $\mu$  变化较大时,  $Y_G$  和  $m$  的计算值表现出差异。

### (三) 底物抑制的动力学模型

关于高浓度底物抑制的动力学模型已有不少研究报道<sup>[12,13]</sup>。大多数模型基于一假设, 即酶分子与过量底物分子多

重可逆络合形成多种不活泼的酶-底物络合物。Yano等提出一经修正的 Monod 类型的底物抑制动力学通式<sup>[14]</sup>:

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_s/S + \Sigma(S/K_i)} \quad (1)$$

假设关键酶和过量底物分子形成二元 (或三元) 的不活泼络合物, 则可推导出模型函数  $S1$  (或  $S2$ )。

$$S1: \mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + S^2/K_i}$$

$$S2: \mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + S^2/K_i + S^3/K_k}$$

上述模型中的  $\mu$  在数学上是一条趋于零的渐近线, 并且永远保持正值, 这与实验数据有着显著的差别。本实验观察到的  $\mu$  随底物浓度增大迅速地线性下降, 当底物浓度超过极限浓度时, 变为负值。在高浓度有毒化合物为唯一碳源和能源的情况下, 微生物的降解活性受到严重抑制, 微生物死亡并自溶的研究已有不少报道<sup>[15]</sup>。尽管传统的经修正的 Monod 类型的底物抑制模型已被许多实验证实, 但对于高浓度底物的强抑制过程, 特别是在对微生物有害物质的生物降解过程表现出较大的差异。为此, 提出一个新的动力学模型  $S3$ , 该模型包括两项: 前一项代表关键酶分子与过量底物分子可逆络合后表现出的活性, 后一项表示有毒化学物质对微生物活性不可逆的损害作用。

$$S3: \mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + S^2/K_i} - \frac{K_1 e^{k_2 S}}{K_3 + e^{k_2 S}}$$

上述三个数学模型用于拟合实验数据。模型中待定动力学参数的计算值列于表1中。 $F_{o,b,i}$  是  $\mu$  的实验测定值与模型估计值的偏差的平方和。模型  $S_3$  的  $F_{o,b,i}$  最小, 比模型  $S_2$  的  $F_{o,b,i}$  要小一个数量级。这表明, 模型  $S_3$  是最好的可选用模型。令

表 1 底物抑制模型中动力学参数的计算结果  
Table 1 Estimated parameters in the substrate inhibition models

Models	$\mu_m$	$K_s$	$K_i$	$K_2$	$K(i)$	$F_{obi}^*$
S1	0.128	0.105	2.96			0.00107
S2	0.081	0.027	5186	55.95		0.000485
S3	0.092	0.042	9.50		**	0.000012

\*  $F_{obi} = \sum(\mu_{obi} - \mu_{est})^2$

\*\*  $K_1 = 0.0376, K_2 = 0.428, K_3 = 375.2$

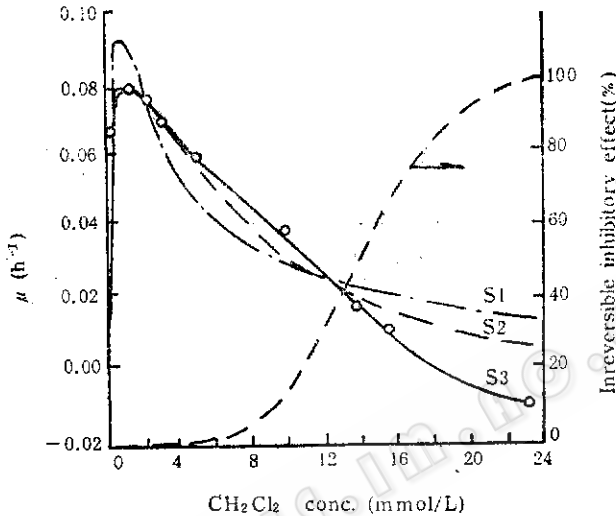


图 3 底物抑制数学模型的模拟曲线和实验数据(O)

Fig.3 Simulated curves of various kinetic models and experimental data(O) of the substrate inhibition

人感兴趣的是, 模型S2和S3中的  $\mu_m$  与  $K_s$  的计算值相当接近。

图3为各数学模型的  $\mu$ -S 模拟曲线和实验数据。模型S1的模拟曲线与实验数据相差较大。模型S2比模型S1有较大的改进, 在相当一段的底物浓度区域 ( $S < 14 \text{ mmol/L}$ ), 可较好地与实验数据吻合, 并且接近最佳模型S3, 但在更高的底物浓度区, 模型S2的偏差增大。可以设想, 进一步扩展方程(1)中的  $j$  值, 即生成更多元的不活泼络合物, 模型曲线将会更趋于实验值。然而, 这种假设关键酶的可逆络合为发酵反应的唯一控制步骤的机理是不理想的, 并且也难以解释全部实验数据。活细胞的代谢过程是一个极为复杂的过程, 这给建立微生物生命过程的非

结构式模型 (unstructured model) 带来困难。在高浓度有毒物质的生物降解过程中, 生命过程中的某个基元步骤可能受到阻遏, 微生物的正常代谢可能受到某种永久性损害。模型S3在整个底物浓度的实验范围内 (不但在底物浓度较低的激发区, 而且在底物浓度较高的抑制区, 特别是在接近和超过极限浓度时), 都能很好地和实验数据吻合。这似乎表明存在两种毒性效应: (1) 关键酶分子 (如脱卤酶) 与过量底物分子的可逆络合抑制作用, (2) 微生物体的生命功能受到某种不可逆的毒害作用。模型S3中的参数  $K_1, K_2$  和  $K_3$  取决于微生物的代谢途径和底物的毒性。DM1菌株的  $\mu$  因  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  抑制受到的不可逆损失与底物浓度的关系示于图3中。整个

曲线呈S形, 这和通常毒物对有机体的毒性效应是一致的。

#### (四) 产物抑制

采用半连续培养技术, 在恒定底物浓度 (2.1mmol/L) 条件下, 考察了不同浓度氯化物对微生物生长速率的影响。NaCl和KCl作为氯化物的代表预先加入反应介质中。

$\mu$  与氯化物浓度  $P$  的依赖关系示于图 4。 $P$  小于 100mmol/L 时,  $\mu$  未受到显著影响。 $P$  更大时, 产物抑制效应迅速增大。与底物抑制相同, 同样存在一氯化物的极限浓度 (约 500mmol/L), 此时  $\mu = 0$ 。实验表明, 氯化钠和氯化钾没有显著区别, 氯化物的抑制作用可能主要是由氯离子引起的。

表 2 产物抑制的动力学模型  
Table 2 Kinetic models of product inhibition

模型 Models	模型函数 Model functions	参数 Parameters	$F_{obj}$
P1	$\mu = \mu(s) \cdot e^{-K \{P\}}$	$K = 0.00165$	0.000725
P2	$\mu = \mu(s) \cdot (1 - \frac{P}{P^*})^n$	$n = 0.399$ $P^* = 490$	0.000071
P3	$\mu = \mu(s) - r(p)^n$	$n = 1.919$ $r = 0.00000041$	0.000051

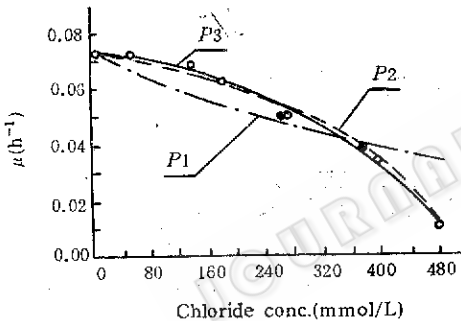


图 4 产物抑制数学模型的模拟曲线和实验数据  
Fig. 4 Simulated curves of kinetic models and experimental data of the product inhibition:  $CH_2Cl_2$  浓度  $CH_2Cl_2$  conc. 2.1 mmol/L  
实验数据 Experimental data: ○ NaCl, • KCl

表 2 中的 3 个数学模型用于拟合图 4 所示的产物抑制的实验数据。模型 P1 和 P2 分别由 Aiba<sup>[16]</sup> 和 Levenspiel<sup>[17]</sup> 提出。模型 P3 是根据乙醇发酵过程中产物抑制的模型<sup>[16]</sup> 改写的。各模型中的  $\mu(S)$  表示  $\mu$  与  $S$  的函数关系。各待定参数和偏差平方和  $F_{obj}$  的计算值也列于表 2 中。各模型的模拟曲线见图 4。表 2 和图 4 表明, 在底物浓度 2.1mmol/L 时, 模型 P2 和 P3 都可较好地描述产物抑制过程的动力学行为, 模型 P2 和模型 P3 的  $F_{obj}$  处于同一数量级。

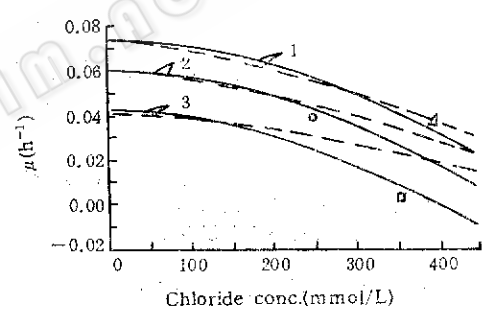


图 5 不同底物浓度时模型 P2 和 P3 的模拟曲线和实验数据

Fig. 5 Simulated curves of model P2 and P3 at different  $CH_2Cl_2$  concentrations and the experimental data

--- model P2, — model P3

1,  $S = 2.2$  mmol/L, 2,  $S = 5.0$  mmol/L,

3,  $S = 8.8$  mmol/L

△:  $S = 2.2$  mmol/L,  $P = 380$  mmol/L

○:  $S = 5.0$  mmol/L,  $P = 250$  mmol/L

□:  $S = 8.8$  mmol/L,  $P = 360$  mmol/L

研究高浓度底物和高浓度产物的协同抑制作用有助于进一步对模型 P2 和 P3 进行鉴别。 $\mu(S)$  函数采用模型 S3 时的计算机模拟曲线见图 5。在较低的底物浓度 ( $S < 2.2$  mmol/L) 或较低的产物浓度 ( $Cl^- < 200$  mmol/L) 范围内, 二者之间的区别很小。然而当底物和产物浓度同时

都较高时,模型 P3 的模拟曲线比模型 P2 下降得快。图示表明,实验数据更接近 P3 的模拟曲线。由模型 S3 和 P3 组合的模型函数可在物料浓度的整个实验范围内,较好地描述  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  的生物降解过程中底物抑制和产物抑制的协同效应。

### (五) 分批培养

一组有代表性的分批培养的实验数据用于验证下述模型函数:

$$\mu = \left[ \frac{0.092S}{0.042 + S + S^2/9.5} - \frac{0.0376e^{0.428S}}{375 + e^{0.428S}} \right] - 0.00000041P^{1.919} \quad (2)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{Y_G dt} + m_s X \quad (4)$$

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{2dS}{dt} \quad (5)$$

底物浓度  $S$ , 菌体浓度  $X$  和产物浓度  $P$  的计算机模拟曲线示于图 6。在全过程中计算值令人满意地与实验值相吻合。上述模型函数(方程 2—5)可用于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  生物降解过程的过程控制和设计,并且对于其他具有严重抑制行为的微生物反应过程也可借鉴。

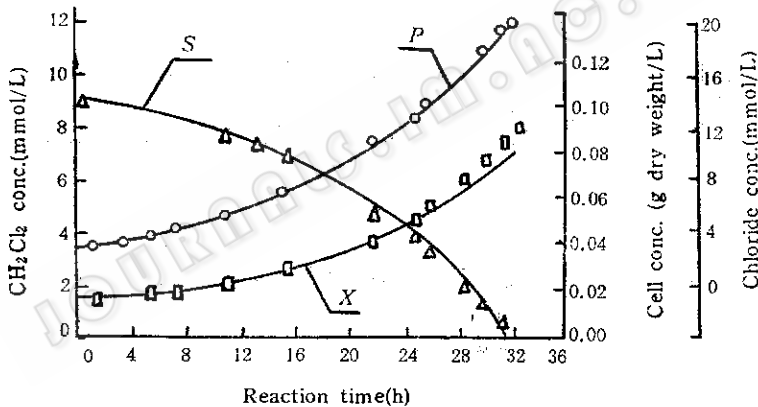


图 6 总动力学模型的计算机模拟和分批培养的实验数据

Fig. 6 Computer simulation of overall kinetic models and experimental data in the batch culture  
 $Y_G = 13.0 \text{ mg cell (dry weight) / mmol CH}_2\text{Cl}_2$   
 $m_s = 3.55 \text{ mmol CH}_2\text{Cl}_2 / \text{h} \cdot \text{g cell (dry weight)}$

### 符号说明

- S 底物浓度, mmol/L
- P 产物(氯化物)浓度, mmol/L
- X 细胞浓度, 550nm时的光密度
- $\mu$  细菌的比生长速率,  $\text{h}^{-1}$
- $\mu_m$  最大的比生长速率,  $\text{h}^{-1}$
- R 底物比消耗速率,  $\text{mmol CH}_2\text{Cl}_2 / \text{h} \cdot \text{g cell, dry weight}$
- $K_s$  M-M方程中米氏常数, mmol/L
- $Y_G$  细胞得率系数,  $\text{mg 细胞(干重) / mmol CH}_2\text{Cl}_2$
- $m_s$  细胞维持常数,  $\text{mmol CH}_2\text{Cl}_2 / \text{h} \cdot \text{g 细胞(干重)}$
- $F_{obj}$ : 模型计算值与实验数据偏差的平方和

## 参 考 文 献

- [1] Silva, S.J.; *Civil. Eng.*, 51:76, 1981.  
 [2] Casto, C.E.; *Sci. Technol.*, 2:779, 1988.  
 [3] Klecka, G.M.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:701, 1982.  
 [4] Laura, T. Lapot-polasko et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:825, 1984.  
 [5] Doris, K.S. et al.; *J. Bacteriology*, May, 676, 1985.  
 [6] Walter, B. et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:950, 1980.  
 [7] Gälli, R. et al.; *Consev. & Recycl.*, 8:91, 1985.  
 [8] Gälli, R. et al.; *Experimentia*, 38:1378, 1982.  
 [9] Stycki, G. et al.; *Arch. Microbiol.*, 130:366, 1981.  
 [10] 江体乾: 化工数据处理, 化学工业出版社, 北京, 1984.  
 [11] 薛嘉庆: 最优化原理与方法, 冶金工业出版社, 北京, 1982.  
 [12] Edwards, V. H.; *Biotechnol. & Bioeng.*, 12:679, 1970.  
 [13] Moser, A.; *Biotechnol.*, 2:264, 1983.  
 [14] Yano, T. et al.; *Biotechnol. & Bioeng.*, 11:139, 1969.  
 [15] 合叶修一等: 生物化学工程——反应动力学, 胡章助等译, 化学工业出版社, 北京, p.194, 1984.  
 [16] Aiba, S.; *J. Ferment. Technol.*, 47:790, 1969.  
 [17] Levenspiel, O.; *Biotechnol. & Bioeng.*, 22:1671, 1980.

## MICROBIAL KINETICS OF *PSEUDOMONAS* SP. STRAIN DM1 DURING DICHLOROMETHANE BIODEGRADATION

Guo Yanghao

(Department of Light Industry, Fuzhou University, Fuzhou)

The microbial kinetics of *Pseudomonas* sp. strain DM1 during dichloromethane biodegradation was studied by means of fed-batch culture technique. The growth of the bacteria and the consumption of the substrate were inhibited severely by the substrate  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and the product chloride at high concentrations. The optimal concentrations for reaction were  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1.2mmol/L and chloride <100 mmol/L. When the concentrations of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and/or chloride were higher than their restricted values, the bacteria would die and autolyse,  $\mu \leq 0$ . A modified kinetic model was proposed and can fit the experimental data, and is better than other traditional models. It consists of two terms, the first is due to the reversible Monod-type complexion mechanism and the second is regard as an irreversible inhibition effect of toxic compounds on the microbial metabolism.

### Key words

*Pseudomonas*;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  degradation; substrate inhibition; product inhibition; irreversible inhibitory effect