

宋 蕾 主编

周小红 白润英 副主编

微生物降解氯苯类化合物 机理与应用

WEISHENGWU JIANGJIE LYBENLEI HUAHEWU
JILI YU YINGYONG



化学工业出版社

微生物降解羧基类化合物
机理与应用

宋 蕾 主编
周小红 白润英 副主编

微生物降解氯苯类化合物 机理与应用



化学工业出版社

全书分为7章。第1章氯苯类化合物及其危害,第2章氯苯类化合物的去除方法,第3章氯苯类化合物的微生物降解,第4章氯苯类化合物的降解基因及酶学研究,第5章一株假单胞菌中1,2,4-三氯苯降解基因的克隆,第6章微生物降解氯苯类化合物的应用,第7章研究进展及展望。

本书对高等院校和科研院所从事相关研究工作的科研人员具有较高参考价值,同时对环境工程行业从事技术开发的从业人员也具有指导作用。

图书在版编目(CIP)数据

微生物降解氯苯类化合物机理与应用/宋蕾主编. —北京:
化学工业出版社, 2015.1

ISBN 978-7-122-22322-7

I. ①微… II. ①宋… III. ①微生物降解-有机物降解-
研究 IV. ①X703

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第268678号

责任编辑:董琳

责任校对:边涛

装帧设计:关飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装订:三河市宇新装订厂

710mm×1000mm 1/16 印张11½ 字数163千字 2015年3月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:68.00元

版权所有 违者必究

前言

氯苯类化合物是一类应用广泛且易在环境中积累,给生态环境和人类健康带来极大危害的化合物。生物降解在污染物的迁移转化乃至最终消失的过程中占有重要地位,生物降解也成为去除环境中氯苯类化合物的主要方法。近几十年来,国内外学者对氯苯类化合物的生物降解进行了大量研究,取得了很多成果。本书就是在这种背景下,结合编者多年的研究成果,从微生物降解氯苯类化合物的机理及应用等方面进行了总结。

本书介绍了氯苯类化合物的结构、性质、危害及其测定方法,总结了氯苯类化合物的去除方法。从氯苯类化合物的降解机制、降解微生物、微生物降解动力学、微生物降解影响因素等方面系统介绍了氯苯类化合物的微生物降解。从分子生物学角度对氯苯类化合物的降解基因进行了详细描述,并总结了在氯苯类化合物降解过程中所涉及的关键酶。最后对氯苯类化合物污染环境的生物修复及去除不同环境中的氯苯类化合物所采取的工程措施进行了介绍。

本书实验数据翔实,分析手段丰富,对高等院校和科研院所从事相关研究工作的科研人员具有较高参考价值,同时对环境工程行业从事技术开发的从业人员也具有指导作用。

本书由宋蕾主编,周小红、白润英副主编。其中第1章由孙艳华编写,第2章由郝秀娟、白润英编写,第6章由周小红编写,其余内容由宋蕾编写。张代、邢丽参与了绘图及文稿的整理工作。

本书在编写过程中参考了一些国内外文献及相关著作，在书中难以一一注明，在此对所有作者表示诚挚的谢意。

本书的出版得到国家自然科学基金项目（项目编号 201107041）和内蒙古自治区高等学校科学研究项目（项目编号 NJZZ11071）的资助，在此表示感谢。

由于编者水平有限，书中不免有不妥之处，望广大读者批评指正。

编者

2014 年 11 月

目 录

第 1 章 氯苯类化合物及其危害 | 001

1.1 氯苯类化合物的分类及性质	002
1.1.1 概述	002
1.1.2 氯苯类化合物的分类	003
1.1.3 氯苯类化合物的性质	004
1.2 氯苯类化合物的应用及来源	008
1.2.1 应用	008
1.2.2 氯苯类化合物 (CBs) 的污染来源	013
1.2.3 氯苯类化合物的污染现状	017
1.3 氯苯类化合物的危害及控制标准	019
1.3.1 危害	019
1.3.2 环境中 CBs 的控制标准	026
1.4 氯苯类化合物 (CBs) 的测定方法	028
1.4.1 空气中氯苯类化合物的分析方法	028
1.4.2 水中氯苯类化合物的分析方法	029
1.4.3 污泥、土壤中氯苯类化合物的分析方法	032
1.4.4 其他样品中氯苯类化合物的分析方法	033

第 2 章 氯苯类化合物的去除方法 | 035

2.1 化学法	036
2.1.1 高级氧化法	036
2.1.2 化学还原法	046
2.1.3 其他方法	049

2.2	物理化学法	053
2.2.1	生物膜电极法 (BER)	053
2.2.2	超声波/金属还原法	053
2.2.3	吸附法	055
2.3	生物法	055
2.3.1	生物分解的特点与分类	055
2.3.2	有机物的好氧生物分解	056
2.3.3	有机物的厌氧生物分解	056
2.4	联合处理方法	058
2.4.1	高级氧化+生化组合	058
2.4.2	臭氧氧化与生物法联合	059
2.4.3	超声波/生物催化联用技术	059
2.4.4	生物活性炭法	060

第3章 氯苯类化合物的微生物降解 | 061

3.1	氯苯类化合物的好氧生物降解	062
3.2	氯苯类化合物的厌氧生物降解	064
3.3	氯苯类化合物的降解机制	064
3.3.1	氧化脱氯	065
3.3.2	还原脱氯	070
3.3.3	共代谢	072
3.4	降解氯苯类化合物的微生物	075
3.4.1	好氧微生物	075
3.4.2	厌氧微生物	077
3.4.3	真菌	078
3.4.4	基因工程菌	079
3.5	氯苯类化合物的微生物降解动力学	081
3.5.1	经验模式	081
3.5.2	基本模式	081
3.6	氯苯类化合物微生物降解的影响因素	086
3.6.1	温度	086

3.6.2	pH 值	087
3.7	两株假单胞菌降解 1,2,4-三氯苯的影响因素	087
3.7.1	温度	087
3.7.2	pH 值	088
3.7.3	底物浓度	089
3.7.4	底物利用范围	094

第 4 章 氯苯类化合物的降解基因及酶学研究 | 097

4.1	基因研究的发展	098
4.1.1	基因的基本概念	098
4.1.2	基因的现代概念	098
4.2	降解氯苯类化合物的功能基因	100
4.2.1	功能基因的种类	100
4.2.2	功能基因的克隆	103
4.2.3	功能基因的表达	107
4.3	生物降解与酶	108
4.3.1	微生物酶及其诱导	108
4.3.2	酶的合成调控	109
4.4	氯苯类化合物生物降解中的重要酶类	112
4.4.1	外周降解途径的代谢酶	113
4.4.2	中心降解途径的催化酶	115
4.4.3	氯苯类化合物代谢的相关酶	117

第 5 章 一株假单胞菌中 1,2,4-三氯苯降解基因的克隆 | 125

5.1	上游基因克隆	126
5.1.1	引物设计	126
5.1.2	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> J5-1 上游降解基因 序列的获得	129
5.1.3	氯苯双加氧酶 α 亚基的结构与进化分析	131
5.2	下游基因克隆	133

5.2.1	下游基因簇各基因克隆策略	133
5.2.2	1,2,4-TCB 好氧途径中下游基因簇的克隆	134

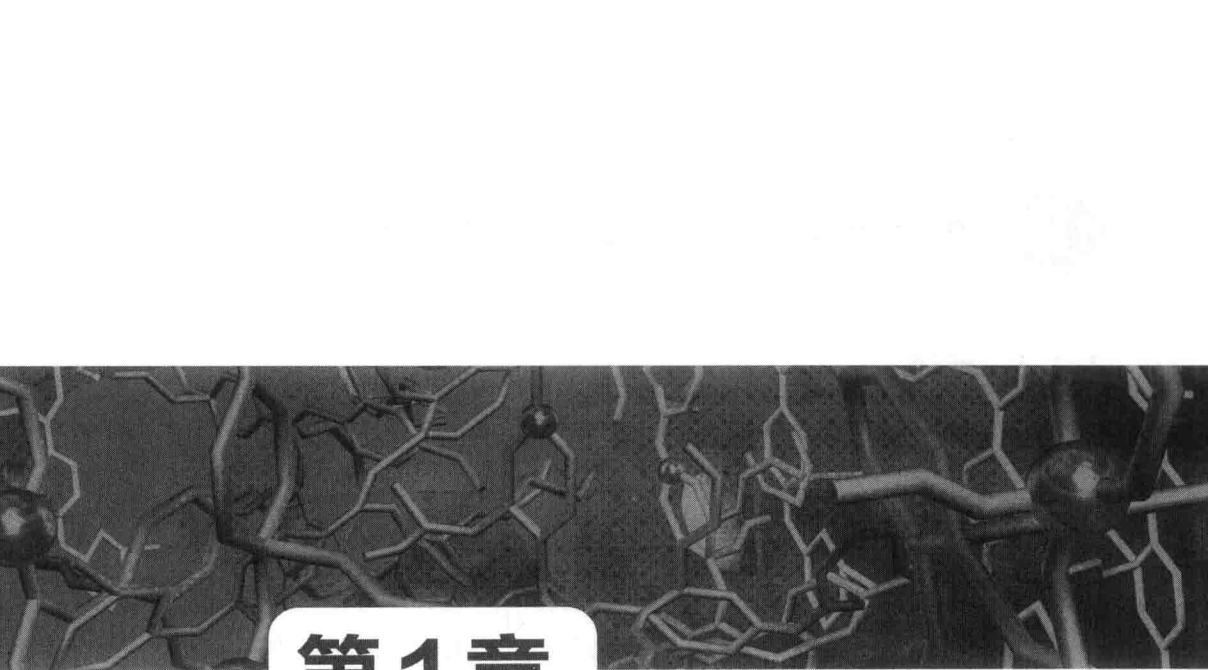
第 6 章 微生物降解氯苯类化合物的应用 | 147

6.1	氯苯类化合物污染环境的生物修复	148
6.1.1	污染环境的生物修复	148
6.1.2	生物修复的类型	151
6.1.3	生物修复的形式	153
6.2	不同环境中氯苯类化合物的去除	159
6.2.1	水中氯苯类化合物的去除	159
6.2.2	土壤中氯苯类化合物的去除	162
6.2.3	沉积物中氯苯类化合物的去除	162

第 7 章 研究进展及展望 | 163

7.1	研究进展	164
7.1.1	微生物磁效应	164
7.1.2	纳米铁技术	167
7.2	展望	170

参考文献 | 171



第1章

氯苯类化合物及其危害

1.1

氯苯类化合物的分类及性质

1.1.1 概述

随着经济发展和城市化进程的不断加快,有害污染物越来越受到关注。氯苯类化合物(Chlorobenzenes, CBs)作为有害污染物的一类,因其性质和组成决定了其在多个行业中均有广泛的应用。CBs属于卤代芳烃,氯原子取代苯环上的氢,生成氯代芳烃,即苯环上只有氯、氢原子的一类单环芳香族化合物。此类化合物属于中度挥发的有机污染物,共有12种同系物,包括一氯苯(MCB)、二氯苯(DCBs)、三氯苯(TCBs)、四氯苯(TeCBs)、五氯苯(PCB)、六氯苯(HCB)及其同分异构体。

CBs有较强的气味,理化性质很稳定,不易分解。在水中溶解度小,且溶解度与其苯环上氯取代基的个数和氯原子的相对位置有关,取代基的个数越多,在水中的溶解度就越小。虽然CBs在水中的溶解度小,但在脂类中的溶解度较大,可溶于醇、醚、苯等多种有机溶剂。除六氯苯之外,其他11种CBs均可以通过加氯来进行进一步的氯化。从CBs的分子结构中可以看出,这类有机物主要含有两种官能团:一种是苯环,可以进行亲电取代反应;另一种是卤素氯,可以对反应活性及定位产生特殊影响。CBs的分子结构与非取代的芳香化合物相比,由于引入了电负性很强的氯原子,氯原子具有强烈吸引电子,使苯环上电子云密度降低的特点,因而在好氧条件下氧化酶很难从苯环上得到电子而发生氧化反应。苯环上氯原子的数目越多,电子云密度就越低,生物氧化就越困难,可降解性就会越差。

CBs并不是自然界本身就存在的,而是人类工业革命带来的产物,是人工合成且广泛应用于工、农业生产中的一类化合物,因此在环境中的存在很普遍,且由于CBs为疏水性、非离子性化合物、高毒性、化学性质稳定、生物蓄积性强、半挥发性、持久

性、辛醇-水分配系数 K_{oc} 都大于 1×10^3 ，因此，进入环境水体后大部分被水体颗粒物吸附，沉降到水体底部，成为沉积物中吸附态有机污染物的重要部分。从 CBs 的半挥发性特点可知，CBs 能够在大气、水环境中或通过迁徙物种长距离迁移并能沉积，对人类的健康和生存环境产生严重危害，在全球的大陆、沙漠、海洋和南北极地区等都发现有 CBs 的存在。CBs 是持久性有机污染物 (Persistent Organic Pollutants, POPs) 中重要的一类，这类化合物的广泛使用导致水体中该类有机物的浓度增高，给人体健康造成严重的影响，并对生态环境构成严重的威胁。CBs 在脂类中的溶解度较大，且具有吸附性，因此被认为是亲脂化合物，当 CBs 从环境中转移到生物体内，则会更多地在脂肪组织中积累。在水体环境中，由于生物的浓缩作用，生物体内累积的 CBs 的浓度比环境水体中的浓度高得多，可达 3~6 个数量级。因此，CBs 会通过食物链富集而被逐级放大。

对于 CBs 在土壤中迁移的综合过程，如向地下水中的渗滤、向空气中的挥发和在土壤中的滞留，以及各过程同时或相互作用的研究较少。CBs 氯取代基数越多、蒸气压及水溶性越小，在土壤中滞留的相对越多。相对而言，低氯原子取代的氯苯要比其高氯原子取代物更容易进入渗透水和大气。

1.1.2 氯苯类化合物的分类

氯苯类化合物包括 12 种同系物，见表 1-1。

表 1-1 氯苯类化合物的分类

中文名		英文名	简称
一氯苯		chlorobenzene	MCB
二氯苯	1,2-二氯苯(邻二氯苯)	1,2-dichlorobenzene	1,2-DCB
	1,3-二氯苯(间二氯苯)	1,3-dichlorobenzene	1,3-DCB
	1,4-二氯苯(对二氯苯)	1,4-dichlorobenzene	1,4-DCB
三氯苯	1,2,3-三氯苯	1,2,3-trichlorobenzene	1,2,3-TCB
	1,2,4-三氯苯	1,2,4-trichlorobenzene	1,2,4-TCB
	1,3,5-三氯苯	1,3,5-trichlorobenzene	1,3,5-TCB

续表

中文名		英文名	简称
四氯苯	1,2,3,4-四氯苯	1,2,3,4-tetrachlorobenzene	1,2,3,4-TeCB
	1,2,3,5-四氯苯	1,2,3,5-tetrachlorobenzene	1,2,3,5-TeCB
	1,2,4,5-四氯苯	1,2,4,5-tetrachlorobenzene	1,2,4,5-TeCB
五氯苯		pentachlorobenzene	PCB
六氯苯		hexachlorobenzene	HCB

1.1.3 氯苯类化合物的性质

CBs 的物理和化学性质比较稳定, 并且化学稳定性较高, 不易分解, 难溶于水, 易溶于醇、醚、烷和苯等有机溶剂的性质, 气味较强烈, 会对人体的皮肤和呼吸系统产生强烈的刺激, 使人感觉极不舒服, 且对人体的肝脏、肾脏及神经中枢都有较高的毒害作用。由于 CBs 分子中碳和卤素之间连接的键长较短而且比较牢固, 使得 CBs 的分子结构比较稳定。另外, CBs 的性质还与苯环上氯原子数量及取代位置相关, 其主要物理化学参数见表 1-2。

表 1-2 氯苯类化合物的物理化学参数

序号	名称	分子式	相对分子质量	熔点 / $^{\circ}\text{C}$	沸点 / $^{\circ}\text{C}$	蒸气压 (V_p)	水中的溶解度 / (mmol/L)	相对密度	$\lg K_{ow}$	$\lg K_{law}$	$\lg H_c$
1	一氯苯	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	112.56	-45.2	1312.0	1.62E-02	3.631	1.11	3.02	0.8	0.54
2	1,2-二氯苯	$\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	147.00	-17.5	180.4	2.10E-03	0.977	1.30	3.44	1.04	0.21
3	1,3-二氯苯	$\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	147.00	-24.8	173	3.02E-03	0.832	1.29	3.49	0.86	0.41
4	1,4-二氯苯	$\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$	147.00	53.1	173.4	1.92E-03	0.525	1.25	3.44	1.04	0.30
5	1,2,3-三氯苯	$\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3$	181.45	53.5	218.5	4.00E-04	0.1148	1.69	4.11	1.01	0.22
6	1,2,4-三氯苯	$\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3$	181.45	17.2	221	4.52E-04	0.1905	1.45	3.97	1.03	0.22
7	1,3,5-三氯苯	$\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3$	181.45	63.4	208.5	7.62E-04	0.023	1.39	4.17	0.36	0.83
8	1,2,3,4-四氯苯	$\text{C}_6\text{H}_2\text{Cl}_4$	215.89	46.6	254.9	6.96E-05	0.020	1.70	4.55	0.95	-0.16

续表

序号	名称	分子式	相对分子质量	熔点 /℃	沸点 /℃	蒸气压 (V_p)	水中的溶解度 / (mmol/L)	相对密度	$\lg K_{ow}$	$\lg K_{law}$	$\lg H_c$
9	1,2,3,5-四氯苯	$C_6H_2Cl_4$	215.89	51	246	$1.38E-04$	0.016	1.86	4.59	0.60	0.20
10	1,2,4,5-四氯苯	$C_6H_2Cl_4$	215.89	138	245	$5.34E-05$	0.0028	1.73	4.60	1.30	0.00
11	五氯苯	C_6HCl_5	250.33	82-85	275-277	$4.78E-05$	0.0023	1.83	5.12	1.47	-0.15
12	六氯苯	C_6Cl_6	284.78	226	323-326	$1.14E-06$	0.00017	2.08	5.41	1.44	0.24

注：温度为 20~30℃ 下测定； V_p 为蒸气压 (atm)；密度单位为 g/cm^3 ； K_{ow} 为辛醇-水分配系数； K_{law} 为空气-水分配系数； H_c 为亨利系数 (atm/mL)。

从表 1-2 中可以看出，随着氯取代基数目的增加，其密度和饱和蒸气压 (V_p) 不断增加，亨利常数 (H_c) 变小，表明其挥发性逐渐变小。另外，其辛醇-水分配系数 (K_{ow}) 变大，溶解度变小，这表明随着氯元素的增多，CBs 水溶性减弱，脂溶性增强。

(1) 一氯苯 (MCB) 的性质

一氯苯是最简单的 CBs，于 19 世纪初首次合成。一氯苯 (C_6H_5Cl) 是人工合成的挥发性有机化合物 (VOCs) 中的一种，外观为无色或浅黄色透明液体，具有苦杏仁味，不溶于水，溶于乙醇、二硫化碳等多数有机溶剂。氯苯是一种非离子化、憎水性强、含苯环结构的极性小分子有机物，其在水中主要以分子形态存在，是容易在活性炭上吸附的挥发性有机物。

一氯苯化学性质较稳定，具有刺激性，并易燃，遇高热或与氧化剂接触，有引起燃烧爆炸的危险。由于氯苯在水中的难溶解性，使得氯苯即使在土壤和沉积物中的含量很高时，在水相中的量也会很低。氯苯在地下水中主要以溶解相和残留相存在，具有较高电负性的氯原子使苯环成为一个疏电子环，导致形成氯苯的难生物降解性，因此脱氯是 CBs 生物降解的关键。

(2) 二氯苯 (DCBs) 的性质

二氯苯有三种同分异构体分为邻二氯苯 (1,2-二氯苯)、间二氯苯 (1,3-二氯苯)、对二氯苯 (1,4-二氯苯) 三种，其中邻二氯苯和对二氯苯用量最大。

① 1,2-二氯苯 (1,2-DCB) 的性质

1,2-二氯苯在常温下为无色易挥发的重质液体,有芳香气味,不溶于水,溶于醇、醚、苯及丙酮等。临界温度 697.3K,临界压力 4.10MPa,临界体积 360mL/mol, 20℃时比热容为 1.156kJ/(kg·K),燃烧热为 -2769.7kJ/mol,闪点 67℃,自燃点 647.78℃,蒸气压 1.4mmHg (25℃),蒸气相对密度 5.05。邻二氯苯化学性质稳定。

② 1,3-二氯苯 (1,3-DCB) 的性质

1,3-二氯苯是无色、有刺激性气味的液体,具有性质稳定、高毒性、易积累、高度挥发性,在环境中能够长期滞留,对环境造成了严重的危害。

③ 1,4-二氯苯 (1,4-DCB) 的性质

1,4-二氯苯是一种人工合成的氯代芳香烃类化合物,是普通土壤和水体中典型的污染物质。1,4-二氯苯外观为白色结晶,有樟脑气味,通常被认为是非极性或者是憎水性的有机物,在水中的溶解度为 73.6mg/L,辛醇-水分配系数为 2.82×10^3 。

(3) 三氯苯 (TCBs) 性质

三氯苯有三种异构体分别是:1,2,3-三氯苯、1,2,4-三氯苯、1,3,5-三氯苯。其中,1,2,4-三氯苯用量最大,其他两种异构体国内年产量和消耗量仅为数十吨。本书主要介绍 1,2,3-TCB、1,2,4-TCB 的性质。

① 1,2,3-三氯苯 (1,2,3-TCB) 性质

1,2,3-三氯苯为典型的氯苯类化合物中的一种,具有中度挥发性,化学性质比较稳定,自然条件下较难降解,微溶于水,不溶于乙醇,易溶于乙醚、苯、石油醚、二硫化碳、卤代烃等有机溶剂。

② 1,2,4-三氯苯 (1,2,4-TCB) 性质

1,2,4-三氯苯结构对称的白色结晶,被认为是弱极性、非极性或者是憎水性的有机物,在水中的溶解度为 30.1mg/L,辛醇-水分配系数为 1.15×10^4 ,是普通土壤和水体中典型的污染物质。2002年,蔡全英等人对部分城市污泥中的 CBs 进行初步调查,结果表明各城市污泥中的 CBs 都是以个别或少数化合物为主,且分布特征不同。其中含量较多的是 1,2,4-三氯苯和六氯苯,其他化合物含量普遍较低。

1,2,4-三氯苯化学性质稳定,具有致癌、致畸、致突变的效应,

在土壤和沉积物中难被化学水解和生物降解，易造成持久性污染，因此被众多环保机构列入污染物黑名单。

1,2,4-三氯苯是人工合成的有机污染物，具有强烈持久的高生物毒性，并且会随食物链而被逐级富集。氯原子的高电负性可使苯环成为一个很难被氧化的疏电子环，所以1,2,4-三氯苯属于难生物降解的有毒、有害有机物，具有高脂溶性。虽然在水中检测到1,2,4-三氯苯浓度不高，但是通过食物链在生物体内已经被生物富集或生物放大到很高浓度。因此，对水生生物低剂量长期暴露可导致不可逆损伤。

③ 1,3,5-三氯苯 (1,3,5-TCB) 性质

1,3,5-三氯苯是有特殊气味的白色结晶体。

(4) 四氯苯 (TeCBs)

四氯苯有三种同分异构体，从外观上看1,2,3,4-四氯苯为白色结晶，1,2,3,5-四氯苯为无色结晶，1,2,4,5-四氯苯为白色薄片。四氯苯主要来源于有机合成的工业污染，对人体的皮肤、上呼吸道和黏膜有刺激作用，可以在人体内蓄积，属于疏水性有机污染物 (HOCs)，会被沉积物吸附而固定下来，在适当的条件下又会通过解吸作用释放到水体环境中，成为二次污染源，这也是造成许多受污染的河流及湖泊在环境治理中效果不明显的重要原因。

(5) 五氯苯 (PCB)

五氯苯外观为无色晶体，具有芳香味，半挥发性。五氯苯可在氧化铜催化作用下生成二噁英。二噁英为一级致癌物，有剧毒，化学结构稳定，亲脂性高，不易发生生物降解，具有很高环境滞留性，且具有致癌性、生殖毒性、免疫毒性和内分泌毒性。五氯苯是工业生产中的副产物，在农药原药和溶剂中经常以杂质的形式出现。

五氯苯这种持久性有机污染物可在许多工业过程中非故意产生，故称为非故意产生的持久性有机污染物 (UP-POPs)。它会随烟气、废渣等排放进入环境，具有高毒性，对生态环境构成严重威胁，已经成为举世关注的环境污染物。

(6) 六氯苯 (HCB)

六氯苯 (Hexachlorobenzene, C_6Cl_6 ，简称 HCB) 是苯氯化的最终产品，属于 CBs。六氯苯是内分泌干扰物的一种，即对生物体内维持自身稳定性、调节生殖发育和其他行为的荷尔蒙的产生、代谢、结