

BTEX 厌氧降解纯菌株的筛选及降解效率影响因素研究

邓 栋, 刘 翔

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘 要:通过驯化和分离纯化方法,从被污染的土壤中筛选出 3 株厌氧降解 BTEX 的纯菌种,对地下水中苯系物(BTEX)在厌氧条件下的微生物降解进行研究。采用正交试验法对 BTEX 各个组分在不同菌种、不同电子受体和污染物不同起始浓度的条件下生物厌氧降解效率进行研究。结果表明,苯、甲苯和乙苯在以硝酸根和硫酸根为电子受体、污染物初始浓度较低条件下,降解效率可达 95%,而以 3 价铁为电子受体或者初始浓度较高时降解效率较低。二甲苯在各种条件下都可以得到有效的降解。在各个因素中,电子受体对 BTEX 降解效率的影响最大。

关键词:BTEX;厌氧生物降解;纯菌种;电子受体;正交试验

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)05-1991-06

Study on Screening the Pure Bacteria for BTEX Anaerobic Biodegradation and the Factors Influencing BTEX Biodegradation Efficiency

DENG Dong, LIU Xiang

(Department of environmental science and engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Three different types of bacteria, which are identified as *Bacillus Cereus*, *Pseudomonas Aureofaciens* and *Microbacterium Lactuin* respectively, were obtained from the BTEX contaminated soil by isolation and purification for several times. A series of three factors-three level orthogonal experiments were performed to investigate anaerobic biodegradation performance of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) including three types of bacteria; nitrate, sulfate and ferric iron reducing conditions; 20 mg·L⁻¹, 50 mg·L⁻¹ and 80 mg·L⁻¹ substrates concentration levels. The results showed that nitrate and sulfate were more favorable electron acceptors compared to ferric iron. The degradation efficiencies of benzene, toluene and ethylbenzene were higher than 95% under nitrate and sulfate reducing conditions compared to 70% under ferric iron reducing condition. Higher substrates concentration led to lower degradation efficiency for the inhibition influence. For Xylenes, the degradation efficiencies keep in a stable high level about 90% hardly influenced by other factors. According to the range analysis of the orthogonal experiment, the electron acceptor is the most sensitive factor among the three different factors. The sequence of three factors is electron acceptor>substrate concentration>types of bacterial.

Keywords: BTEX; anaerobic biodegradation; pure bacteria; electron acceptor; orthogonal experiment

石油为人类文明带来巨大利益的同时,在其生产、加工、运输和使用过程中,不可避免地也会因泄漏对环境造成严重的污染^[1,2]。土壤及地下水遭受苯系物(主要包括苯、甲苯、乙苯及二甲苯,合称为 BTEX)污染及其治理已成为水文地质学者和环境学者研究的热点问题之一^[3]。由于微生物在地下环境中的广泛存在,在许多情况下,对生物降解影响最大的环境因素

是电子受体的可获得性。电子受体不同,微生物的代谢方式也不同。烃的生物降解是一个氧化还原反应,烃失去电子被氧化,电子受体得到电子被还原。地下水中许多组分可作为电子受体,包括 O₂、NO₃⁻、Fe³⁺、Mn⁴⁺、SO₄²⁻、CO₂ 等,好氧菌只能利用 O₂ 作为电子受体。芳香烃的好氧生物降解是最快的,然而,由于 O₂ 在水中的溶解度低(8~10 mg·L⁻¹),通过人工供给 O₂ 达到清除污染物的目标是困难的。因为地下含水层通常是厌氧状态或者由于有机污染物的好氧降解使氧气迅速耗尽而很快变为厌氧状态,使污染带中的好氧微生物被厌氧微生物所替代,因此,BTEX 的厌氧生

收稿日期:2007-11-05

基金项目:国家 973 项目支持(2006CB403400)

作者简介:邓 栋(1983—),男,湖南长沙人,从事地下水苯系物污染治理研究。E-mail: dengd@mails.tsinghua.edu.cn

物降解比好氧生物降解更加可行且经济有效^[4]。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

菌种来源于山东大武水源地被苯系物污染的土壤,一共 3 处来源,详见表 1。

表 1 土壤样品概况
Table 1 General screen of soil examples

样品编号	样品出处	样品情况
1	采石场排污口土壤	原齐鲁石化排污口,现已废弃,主要为苯系物污染,取其中层土壤
2	排污沟底泥	小化工厂私挖的排污沟,污水无任何处理直接排出,主要为苯系物污染,取中层底泥
3	齐鲁石化污水厂剩余污泥	污水厂主要处理石油化工废水,取含水量 93%的活性污泥

1.2 培养基

基础培养基: NH_4Cl : $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; KH_2PO_4 : $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; MgCl_2 : $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。微量金属营养液: $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$: $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; CuCl_2 : $0.15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; H_3BO_3 : $5.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$: $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{NiCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; ZnCl_2 : $2.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。基础培养基和微量金属营养液湿热消毒,通氮气 2 h 驱氧,投加适量硫化钠除残留氧,氧化还原电位在 -150 mV 左右,处于厌氧状态。pH 调制 6.5~7.0。

1.3 方法

1.3.1 菌种的驯化与分离纯化

100 mL 厌氧瓶,加 80 mL 基础培养基、0.5 mL 微量金属营养液,1 g(过量)硝酸钠为电子受体,12 μL 苯系物(苯、甲苯和乙苯各 3 μL ,邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯各 1 μL)为单一碳源,于厌氧手套箱内接种 1 g 样品。厌氧瓶于控温 30 $^{\circ}\text{C}$ 左右的振荡器($100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)中培养,7 d 后取上清液 10 mL 转接,以后每隔 7 d 转接一次,转接 6~7 次认为已驯化。将驯化的混合菌群,在 BEXT 单一碳源的固体琼脂培养基进行划线分离。固体培养基划线后在 30 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧箱中培养 7 d,挑取优势菌落转接至液体培养基中,再利用液体培养基进行划线分离,如此循环分离 4 次,得到厌氧降解 BTEX 纯菌种 3 株。

1.3.2 降解效率影响因素的正交试验

利用已分离纯化得到的 3 株菌种,对 BTEX 各个组分在不同菌种、不同电子受体、污染物不同起始浓度的条件下生物厌氧降解效率进行研究。采用正交试验,正交试验影响因素及水平见表 2,标准 $\text{L}_9(3^4)$ 正交

试验表见表 3。按照各试验设计方案,分别对苯,甲苯,乙苯和二甲苯进行试验,共分为 4 个批次。

表 2 正交试验影响因素及水平表
Table 2 Factors level of orthogonal experiments

水平数	菌种(A)	电子受体(B)	不同起始浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (C)
1	菌 A	硝酸盐	20
2	菌 B	硫酸盐	50
3	菌 C	三价铁盐	80

表 3 正交试验表
Table 3 Orthogonal experiments

试验号	菌种(A)	电子受体(B)	污染物不同起始浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (C)
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	3
5	2	2	1
6	2	3	2
7	3	1	2
8	3	2	3
9	3	3	1

其具体试验流程如下:
20 mL 的厌氧管中加入 10 mL 液体培养基和 1 mL 微量营养液,加塞密封放入高压蒸汽锅灭菌 40 min,同时驱氧。在厌氧箱中,根据不同的初始浓度加入 BTEX 组分和 1 mL 富集菌液,密封放入 30 摄氏度恒温培养箱培养。

操作结束用气相色谱检测,结果作为初始浓度,每 3 d 检测一次,至污染物降解完全或数值不再变化时结束试验。

1.3.3 分析方法

苯、甲苯、乙苯、和二甲苯的浓度采用顶空气相色谱法,用岛津(Shimadzu)GC-14B 气相色谱分析,分离柱为 ULBON HR-1(0.25 mm $\times$ 30 m)毛细管柱,检测器为氢火焰离子化检测器;分析条件为:毛细管柱 100 $^{\circ}\text{C}$,进样室温度 150 $^{\circ}\text{C}$,检测器温度 150 $^{\circ}\text{C}$ 。

分别配制 0.01、0.05 和 0.09 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品进行精密度试验,苯、甲苯、乙苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯的相对标准偏差均小于 11.9%,平均回收率为 83%~102%。

2 结果和分析

2.1 BTEX 厌氧降解纯菌种鉴定

驯化出的 3 个混合菌群,经过分离纯化得到 3 株

纯菌种分别编号为菌 A、菌 B 和菌 C。参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》——Bergeg's Manual of Systematic Bacteriology Vol IV 的内容进行试验,鉴定。鉴定结果见表 4。

表 4 纯菌株菌种鉴定		
Table 4 Identification of pure bacterial		
菌种	菌种来源	鉴定结果
菌 A	采石场排污口土壤	致黄色单孢菌
菌 B	排污沟底泥	乳微杆菌
菌 C	齐鲁石化污水厂剩余污泥	腊状芽孢杆菌

2.2 各影响因素正交试验

2.2.1 苯在不同影响因素水平下降解情况

以苯为单一污染物,在不同菌株、不同电子受体和不同初始浓度条件下的厌氧生物降解情况,用降解效率表示,具体情况见图 1。

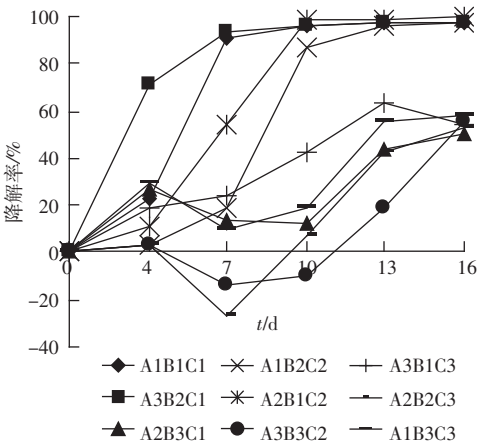


图 1 苯在不同条件下厌氧生物降解情况
Figure 1 Benzene anaerobic degradation in various conditions

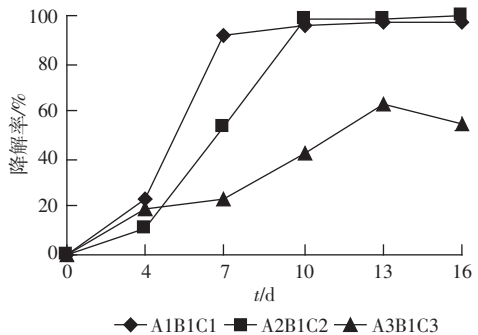


图 2 苯以硫酸根为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 2 Benzene degradation with sulfate

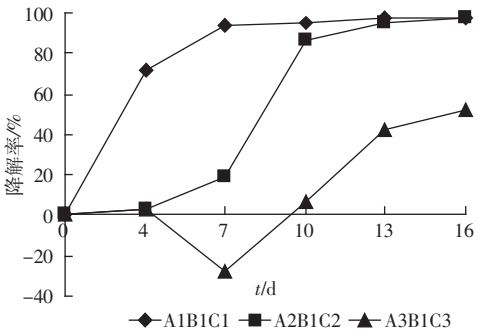


图 3 苯以硝酸根为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 3 Benzene degradation with nitrate

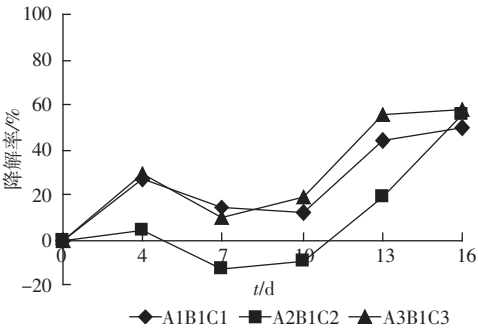


图 4 苯以 3 价铁为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 4 Benzene degradation with Fe(III)

从试验结果来看,苯在厌氧环境下进行生物降解是完全可能的。在不同的降解条件下,降解效率有着显著的差别,特别是电子受体和苯的初始浓度的影响较大。对比图 2、图 3 和图 4,3 个菌种在硫酸根和硝酸根为电子受体情况下降解效率较高,可达 95%,而以 3 价铁为电子受体时降解效率较低,在 55%左右。这与电子受体在还原过程中产生的能量大小,菌种本身特性和对电子受体利用的难易程度有关^[5]。硝酸根还原时产生的能量较大,比较容易被微生物利用。被驯化分离出来的 3 株菌种,都不能有效地利用 3 价铁作为电子受体^[6]。从图 2 和图 3 可以看出,在初始浓度较高为 80 mg·L⁻¹ 的条件下,苯的降解效率较低,在 50%左右;而初始浓度较低为 20 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 的条件下,苯的降解效率较高,可达到 95%。苯对微生物有一定毒性,苯浓度过高会抑制微生物活性,导致降解效率降低^[7]。

苯厌氧降解各个影响因素进行显著性分析,利用降解效率计算试验中各个因素的极差,极差影响与实验设计有关,在实验所选取的初始浓度的条件下,极差越大代表该因素的影响越大,具体情况见表 5。从极差分析可见,各因素对苯厌氧降解的影响大小顺序为:电子受体>起始浓度>菌种。

表 5 苯正交试验降解结果的极差分析			
Table 5 Range analysis of benzene			
试验号	因素 A	因素 B	因素 C
极差	0.13	0.33	0.23

2.2.2 甲苯在不同影响因素水平下降解情况

以甲苯为单一污染物,在不同菌株、不同电子受体和不同初始浓度条件下的厌氧生物降解情况,用降解效率表示,具体情况见图 5。

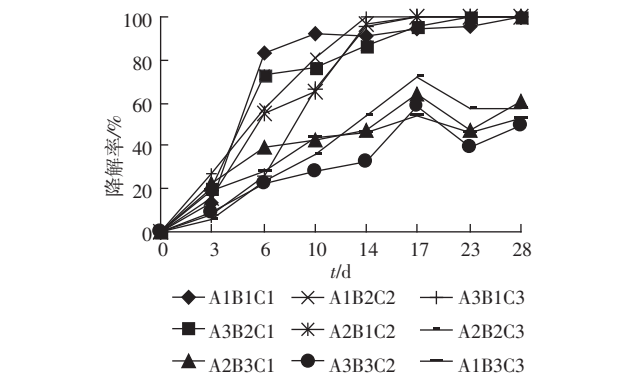


图 5 甲苯在不同条件下厌氧生物降解情况
Figure 5 Toluene anaerobic degradation in various conditions

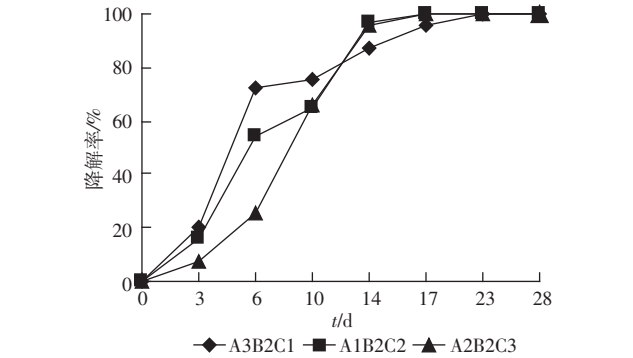


图 6 甲苯以硫酸根为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 6 Toluene degradation with sulfate

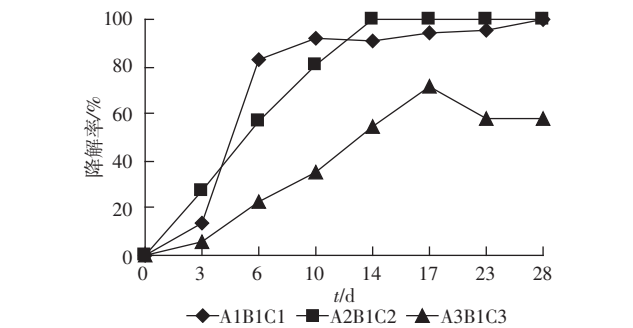


图 7 甲苯以硝酸根为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 7 Toluene degradation with nitrate

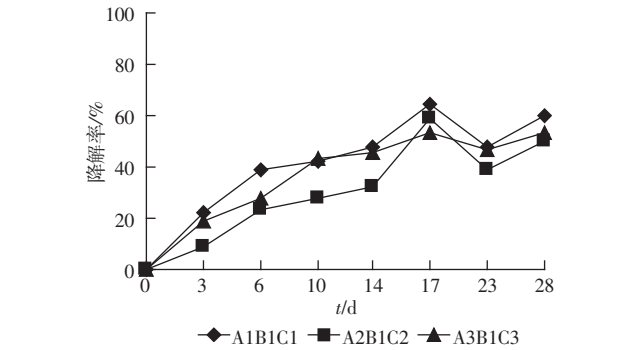


图 8 甲苯以三价铁为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 8 Toluene degradation with Fe(III)

甲苯的降解情况与苯类似,以硝酸根和硫酸根为电子受体的降解效率较高可达到 95%以上,而以 3 价铁为电子受体时的降解效率较低,只有 60%左右。甲苯的降解效率受初始浓度的影响,高浓度时的降解效率较低,中低浓度时降解效率较高。菌种对降解效率的影响效果不明显,在其他条件适宜的情况下,3 株菌种都能很好地降解甲苯。

各个因素对甲苯降解影响的极差分析可见表 6,各因素对甲苯厌氧降解的影响大小顺序为:电子受体>起始浓度>菌种。

表 6 甲苯正交试验降解结果的极差分析			
Table 6 Range analysis of toluene			
试验号	因素 A	因素 B	因素 C
极差	0.08	0.33	0.09

2.2.3 乙苯在不同影响因素水平下降解情况

以乙苯为单一污染物,在不同菌株、不同电子受体和不同初始浓度条件下的厌氧生物降解情况,用降解效率表示,具体情况见图 9。

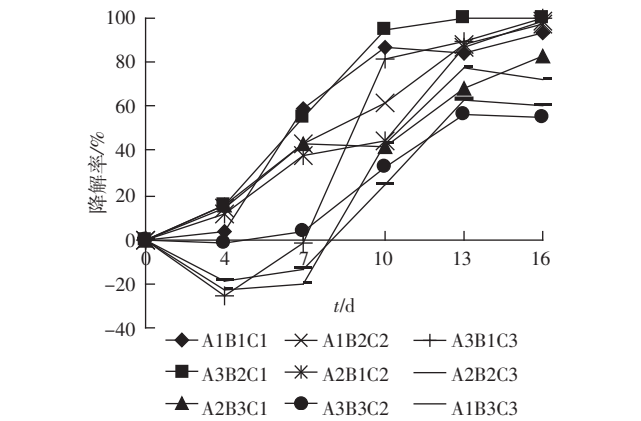


图 9 乙苯在不同条件下厌氧生物降解情况
Figure 9 Ethylbenzene anaerobic degradation in various conditions

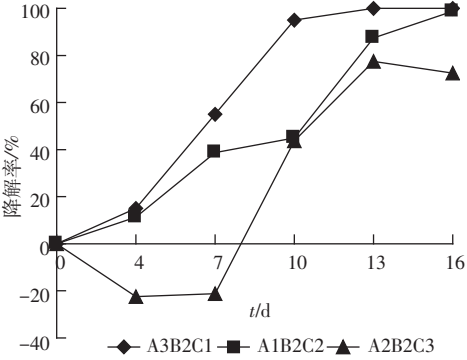


图 10 乙苯以硫酸根为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 10 Ethlybenzene degradation with sulfate

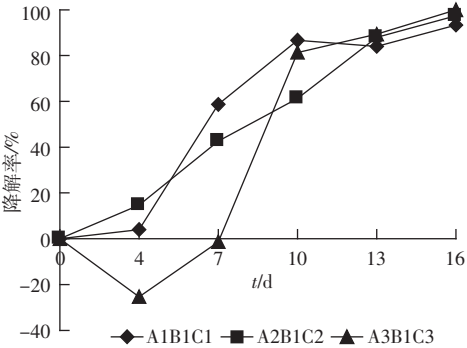


图 11 乙苯以硝酸根为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 11 Ethlybenzene degradation with nitrate

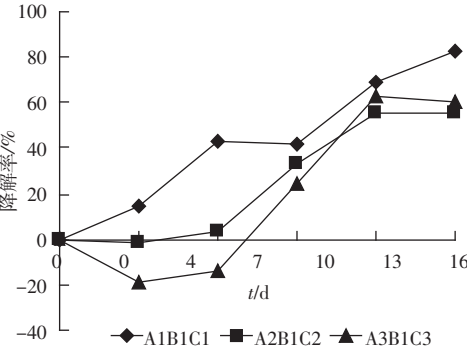


图 12 乙苯以 3 价铁为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 12 Ethlybenzene degradation with Fe(III)

乙苯的降解有着相似的规律,电子受体对降解效率影响较大,以 3 价铁为电子受体降解效率较低在 65%左右,以硝酸根和硫酸根为电子受体时降解效率较高,可达到 95%以上。乙苯的初始浓度对降解效率的影响不大,初始浓度 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的降解效率比初始浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时略低,为 80%左右。乙苯毒性较小,并且菌种对乙苯的浓度不太敏感。菌种的不同对降解效率有一定影响,但影响不大。

各个因素对乙苯降解影响的极差分析可见表 7。

表 7 乙苯正交试验降解结果的极差分析			
Table 7 Range analysis of ethlybenzene			
试验号	因素 A	因素 B	因素 C
极差	0.10	0.18	0.08

从极差分析可以看出各因素对乙苯厌氧降解的影响大小顺序为:电子受体>菌种>起始浓度。

2.2.4 二甲苯在不同影响因素水平下降解

以二甲苯为单一污染物,在不同菌株、不同电子受体和不同初始浓度条件下的厌氧生物降解情况,用降解效率表示,具体情况见图 13。

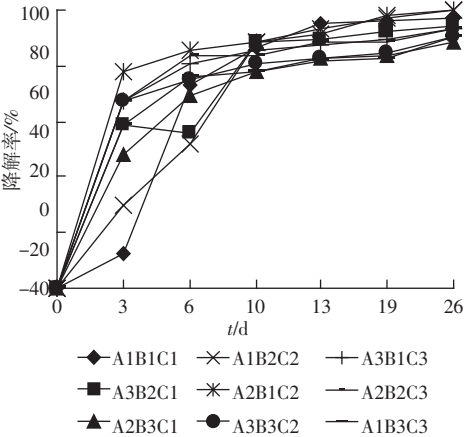


图 13 二甲苯在不同条件下厌氧生物降解情况
Figure 13 Xylenes anaerobic degradation in various conditions

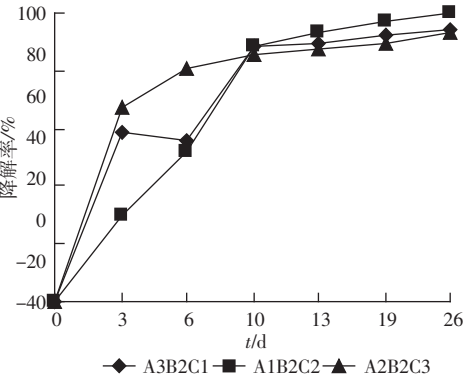


图 14 二甲苯以硫酸根为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 14 Xylenes degradation with sulfate

图中可以看出二甲苯在厌氧条件下,能够较快较容易地被微生物降解。电子受体、二甲苯的初始浓度和菌种 3 个影响因素,对二甲苯的降解效率影响不大。二甲苯在大约 6 d 的时间内完成降解,能够达到较高的降解效率,在 90%以上。因为二甲苯比较容易被微生物利用,同时二甲苯的分子结构相对而言降解过程中苯环比较容易被打开。

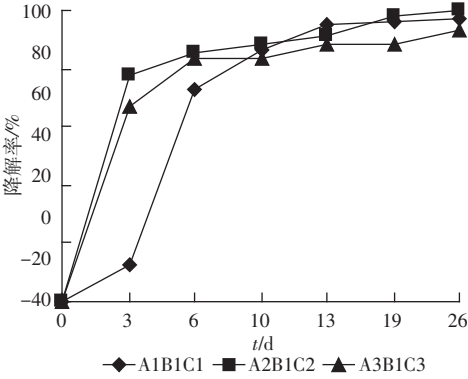


图 15 二甲苯以硝酸根为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 15 Xylenes degradation with nitrate

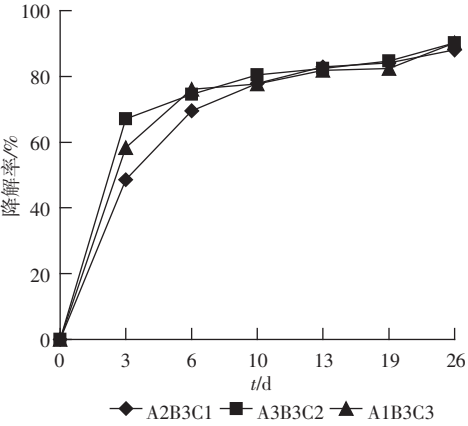


图 16 二甲苯以 3 价铁为电子受体厌氧生物降解情况
Figure 16 Xylenes degradation with Fe(III)

通过对各个因素的极差分析(见表 8)可见各个因素的极差都小于苯、甲苯和乙苯降解中的极差。各因素影响的大小顺序为:电子受体>起始浓度>菌种,但差别不大。二甲苯在不同的条件下都可以很好地被厌氧生物降解。

3 结论

(1)通过驯化和分离纯化得到 3 株 BTEX 厌氧降解菌种,验证了 3 株菌种对 BTEX 各个组分都有较好的降解能力,在条件适宜时,降解效率可以达到 95% 以上。

(2)在影响 BTEX 降解效率的各个因素中,电子

表 8 二甲苯正交试验降解结果的极差分析
Table 8 Range Analysis of Xylenes

试验号	因素 A	因素 B	因素 C
极差	0.02	0.05	0.04

受体是最为敏感的因素。以硝酸根和硫酸根为电子受体时,BTEX 各个组分都可达到较高的降解效率。以铁为电子受体时只有二甲苯可以达到较高的降解率,苯、甲苯和乙苯的降解效率较低。

(3)污染物的起始浓度对 BTEX 厌氧降解效率有一定影响。起始浓度较高时降解效率较低,起始浓度较低时降解效率较高。

(4)苯、甲苯和乙苯在以硝酸根为电子受体,低浓度时降解效率低,二甲苯在各种条件下都比较容易降解。

参考文献:

[1] 王连生. 环境健康化学[M]. 北京:科学出版社, 1994.
WANG Lian-sheng. Environmental Health Chemical [M]. Beijing:Science Press, 1994.

[2] 任 磊, 黄廷林. 土壤的石油污染 [J]. 农业环境保护, 2000, 19(6): 360-363.
REN Lei, HUANG Ting-lin. Contamination of soils by petroleum[J]. A-gro-environmental Protection, 2000, 19(6): 360-363.

[3] Coates J D, Chakraborty R, McInerney M J. Anaerobic benzene biodegradation-a new area[J]. Res Microbiol, 2002, 153:621-628

[4] Lovley D R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers[J]. J Ind Microbiol, 1997, 18:75-81.

[5] Ludvigsen L, Albrechtsen H J, Heron G B, et al. Distribution and composition of microbial populations in landfill leachate contaminated aquifer(Grindsted, Denmark)[J]. Microbial Ecol, 1999, 37:197-207.

[6] Villatoro-Monzon W R, Mesta-Howard A M, Razo-Flores E. Anaerobic biodegradation of BTEX using Mn (IV) and Fe (III) as alternative electron acceptors[J]. Water Sci Technol, 2003, 48(6):125-131.

[7] HU Zhi-feng, DOU Jun-feng, LIU Xiang, et al. Anaerobic biodegradation of benzene series compounds by mixed cultures based on optional electronic acceptors[J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19 (9):1049-1054.