

石化污泥对苯系化合物好氧生物降解的研究*

赵丽辉 陈梅雪 贾智萍 陆 军 王怡中 王菊思

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要 为了探讨苯系化合物的生物降解途径, 选用从石油化工污水处理场曝气池活性污泥中富集的混合菌种, 在好氧条件下, 研究了苯、甲苯、乙基苯、邻-、间-和对二甲苯的可生物降解性。当化合物的浓度为50—140 mg/L时, 6种被试验化合物均可被微生物降解, 从该混合菌种中筛选出17株可降解甲苯、乙基苯、三甲苯、邻-、间-和对二甲苯的单一菌种, 其中邻二甲苯和间二甲苯的降解率可达100%。在本实验体系下, 检出了甲苯的生物降解中间产物。

关键词 苯系化合物, 生物降解, 活性污泥。

国外有关筛选可降解苯系化合物的优势菌种和其生物降解产物及降解途径的研究, 多侧重于苯系化合物的厌氧生物降解^[1-8]。以往的研究者多选用单一菌株进行可生物降解性的研究和常用城市污水处理场的污泥做菌种。本研究选用石油化工污水处理场活性污泥(简称石化污泥)富集的混合菌种为菌源, 在好氧条件下, 研究了不同浓度的几种苯系化合物在该菌种作用下, 化合物浓度与降解率的关系; 化合物组成、结构与可生物降解性的关系; 从该混合菌种筛选出降解苯系化合物的单一菌株; 采用GC/MS的分析方法, 对该生物降解体系下甲苯的降解中间产物进行了分析, 探讨了其生物降解的途径。

1 实验

1.1 菌种采集与富集

从某石油化工污水处理场的曝气池中采集活性污泥, 取其悬浮液经24 h曝气, 取25 ml加入到200 ml液体培养基中, 在摇床(100 r/min)上, 25℃培养24 h后, 将此原始菌种用磷酸盐缓冲液清洗, 离心后, 制得菌悬液, 经适当稀释后, 即为生物降解试验用菌种。

1.2 生物降解试验

采用好氧振荡瓶法进行生物降解试验, 根据生物降解过程中化合物浓度的变化来判断生物降解的程度。

以1.1中的菌种作为菌源, 以苯、甲苯、乙基苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯为微生物的唯一碳源和能源。生物降解试验设不同浓度的实验组, 每个实验组由数10支试管组成。在装有一定浓度的化合物和无机盐营养液的分液漏斗中, 加入适量的菌种, 摇匀, 分装至具塞玻璃刻度试管(试管体积为13 ml, 内装5 ml培养液)中, 然后将试管放入空气浴振荡器中。开始计时时, 每个浓度组取出一支试管, 测定化合物的浓度, 作为本实验组的本底数据。计时后, 每隔24 h取出一支试管, 测定被试验化合物的浓度, 观察微生物对苯系化合物的降解情况。同时设空白组作对照, 空白组只加化合物和无机盐溶液, 不加菌种。

实验条件: 培养温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$; 细菌浓度 $10^6 - 10^7$ 个/ml; 无机盐营养液的配制见文献[9]。

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1996-03-20

1.3 单一菌株的驯化和筛选

将活性污泥曝气 24 h 后,用超声波振荡均匀,接种于新鲜液体培养基上,分别选用甲苯、乙基苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯和 1,3,5-三甲苯为微生物生长的唯一碳源和能源。在 250 ml 的三角瓶中加入一定量的培养基和被试化合物,在摇床上(28℃)培养,每个驯化周期结束后,将培养物以无菌操作移接至新鲜培养基中,开始下一个培养周期。移种数次后,分别以无菌操作做平板划线分离,将平板置于 28℃ 培养箱中培养,待菌落长出后,挑取单一菌落接种于牛肉膏斜面上,继续培养一段时间后,冰箱(4℃)保存。

1.4 分析方法

被试验化合物的浓度采用气相色谱法测定。样品预处理:从摇床中取出试管,放入冰箱(4℃)1h 后取出,在试管中加入一定体积的正己烷,萃取后,取有机相进行气相色谱测定。分析条件:GC-9A 气相色谱仪,装有氢火焰检测器,玻璃填充柱 2 m×3 mm(i.d.),内填 10%SE-30 固定相。检测器温度 250℃,柱温 130℃(苯和甲苯 80℃),进样口温度 250℃,高纯氮气作载气,流速为 50 ml/min。

细菌计数采用平板菌落计数法。

1.5 甲苯生物降解中间产物的分析

(1) 生物降解实验 在 100 ml 具塞三角瓶中加入 50 ml 内含无机盐营养液和微量元素的培养液以及一定浓度的甲苯。在摇床(20±1℃,转速 100 r/min)中培养,每隔 24 h 取样测定甲苯的浓度,观察甲苯的降解情况。

(2) 降解中间产物的测定 当甲苯发生降解时,将培养液过滤(0.45 μ 微孔滤膜)后,分别用乙酸酐和甲醇作为衍生化试剂对培养液进行衍生化处理,使培养液中所含的酚类化合物或有机酸类化合物转成为相应的酯类化合物,然后进行 GC/MS 测定。HP-5972 I 色谱仪/MSD 质谱联用仪(惠普公司),装有 HP-5 熔融石英毛细管柱;柱温起始温度为 40℃保持 2 min 后,以 5℃/min 升至 220℃,保持 2 min,再以 10℃/min 升至 280℃。进样口温度 220℃;电子

倍增管电压 1700 V;离子源温度 168℃;真空度 61 mtor;采用电子轰击电离源;用 Scan 模式采集质谱信息;计算机(486 IBM)检索。

2 结果与讨论

2.1 石化污泥菌种对苯系化合物的生物降解性

图 1 和图 2 分别给出了苯、甲苯、乙基苯、邻二甲苯、间二甲苯和对二甲苯 6 种化合物的浓度在 50—80 mg/L 和 110—150 mg/L 时,被混合菌种生物降解的情况。从图 1 可以看出,浓度大约为 60 mg/L 的苯、甲苯、乙基苯、间二甲苯和对二甲苯,在近 70 h 内完全降解,相比之下,邻二甲苯较为难降解,培养时间至 200 h 时,才发生降解。这些化合物虽然浓度相近,但可生物降解性差异很大。

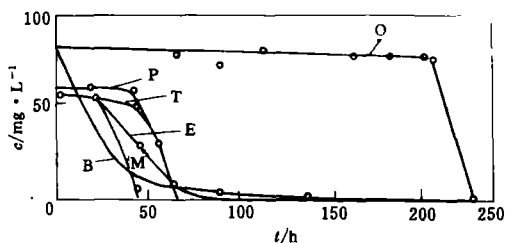


图 1 低浓度组苯系化合物的生物降解

B. 苯 O. 邻二甲苯 P. 对二甲苯
T. 甲苯 M. 间二甲苯 E. 乙基苯

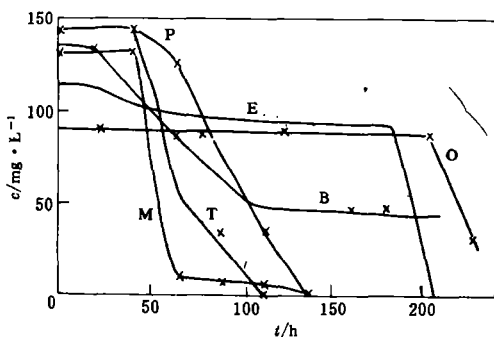


图 2 较高浓度组苯系化合物的生物降解

B. 苯 O. 邻二甲苯 P. 对二甲苯
T. 甲苯 M. 间二甲苯 E. 乙基苯

苯的浓度为 81.5 mg/L 时可在 60 h 完全降解,当浓度升至 136 mg/L 时,在 110 h 浓度降至 50 mg/L,此后至试验结束始终保持这一水

平,不再降解.当化合物的浓度升高时(见图2),甲苯、间二甲苯和对二甲苯可在100 h之内完全降解,乙基苯的滞后期为180 h,此后降解迅速,在近20 h内细菌将100 mg/L的乙基苯全部降解.邻二甲苯在220 h内浓度未发生变化,220 h后发生降解,并在此后的20—40 h内全部降解.

2.2 不同化合物的好氧生物降解性的比较

2.2.1 化合物浓度与降解率的关系

表1给出了6种试验化合物在不同浓度下的滞后期和降解率.从表1中可看出,低浓度组的各种化合物(邻二甲苯除外)所需的启动时间比较短,一般为40 h之内达到90%—100%的降解率.当浓度升高时,苯、间二甲苯的滞后期加长了2倍,甲苯和对二甲苯的滞后期未发生变化,乙基苯的浓度提高仅1倍,但滞后期却长了近1个数量级.除甲苯和邻二甲苯外,其它化合物完全降解的时间都延长了2倍,有的甚至3倍,这说明生物降解率与浓度有着密切的联系,浓度低对体系的影响小,适应时间短,降解率高;浓度高时则向不利于降解的方向转化.

表1 化合物浓度与滞后期和降解率的关系

化合物名称	浓度 /mg · L ⁻¹	滞后期 /h	降解率 /%	全部降解所需时间/h
苯	81.5	0	100	70
甲苯	57.1	40	100	42
邻二甲苯	76.8	210	100	230
间二甲苯	57.0	20	100	42
对二甲苯	60.2	40	100	66
乙基苯	57.6	20	91	70
苯	135.9	20	67	110
甲苯	144.6	40	100	42
邻二甲苯	90.0	20	100	230
间二甲苯	129.3	40	96	65
对二甲苯	142.6	40	100	138
乙基苯	114.1	180	100	205

2.2.2 降解速率

表2给出了高浓度试验组化合物与降解速率的关系.从表2看到,这6种化合物在浓度相近时,有着相似的滞后期(除邻二甲苯外),化合物全部被降解所需的时间也是相同的,但在

平均降解速率上却有着一定的差异,6种化合物可生物降解性强弱顺序为:甲苯>对二甲苯>间二甲苯>乙基苯>苯>邻二甲苯.

表2 化合物浓度与降解速率的关系

化合物名称	浓度 /mg · L ⁻¹	滞后期 /h	完全降解时间/h	滞后期后降解速率 /mg · L ⁻¹ · h ⁻¹	平均降解速率 /mg · L ⁻¹ · h ⁻¹
苯	135.9	20	>230	0.65	0.62
甲苯	144.6	40	114	1.95	1.27
邻二甲苯	90.0	220	277	0.57	0.32
间二甲苯	129.3	40	138	1.32	0.94
对二甲苯	142.6	40	138	1.46	1.03
乙基苯	114.1	40	138	1.27	0.83

2.3 化合物结构、组成与生物降解性的关系

被试验的6种苯系化合物,由于它们在苯环上取代基的链长不同,取代基所处的位置不同,表现出一定差异的可生物降解性.甲基被引入苯环后,对苯环有致活作用,使苯环变得易于进行亲电反应,因此,甲苯的降解速率比苯高2倍(见表2);乙基由于比甲基多1个碳原子,减弱了静电作用力的传递,其活性虽强于苯,但弱于甲苯.甲苯、和乙基苯和苯的平均降解速率分别为1.27、0.83和0.62 mg/L · h,它们在降解性上的差别来自于取代基对苯环亲电活性的影响.二甲苯的3个异构体,对二甲苯、间二甲苯和邻二甲苯的平均降解速率分别为1.03、0.94和0.32 mg/L · h,其降解性强弱的顺序为:对位>间位>邻位,造成这种差异的原因是化合物结构的位阻,对位取代的空间位阻最小,最易发生生物氧化反应,间位取代次之,邻位取代的空间位阻最大,最难发生生物氧化反应.

2.4 优势菌种的筛选及生物降解性

筛选出的能降解甲苯、乙基苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯和三甲苯的优势菌种数目分别为5、3、3、1和3株.由表3看出,从石化污泥中筛选出的优势菌种,以降解邻二甲苯和间二甲苯的菌株对这2个化合物的生物降解性为最好,降解率可达到100%;甲苯达到75%的降解率;

表 3 单一菌株对苯系化合物的生物降解情况

菌株 编号	化合物 名 称	原始浓度 /mg · L ⁻¹	残留浓度 /mg · L ⁻¹	降解率 /%
4-3-1	甲苯	54.9	13.7	75
BMX①	间二甲苯	34.0		100
BMX②	间二甲苯	34.0		100
BOX①	邻二甲苯	28.9		100
BOX②	邻二甲苯	28.9		100
D	对二甲苯	30.9		100
BTMB①	三甲苯	19.5	14.4	26.3
BTMB②	三甲苯	19.5	11.0	44.0

三甲苯的降解率为 26%—40%.

2.5 生物降解中间产物的鉴定及降解途径初探

对已发生甲苯降解的培养液进行衍生化处理,采用 GC/MS 法对衍生物进行分析,在该体系中检出了邻甲基酚、苯甲酸、正庚酸、正己酸和正戊酸(图 3). 图 4 给出了根据降解中间产物推测的甲苯好氧生物降解途径. 由图 4 可看出,甲苯在混合菌种的作用下,可能有 2 条降解路线:第一条是甲苯首先被氧化成邻甲基酚,该

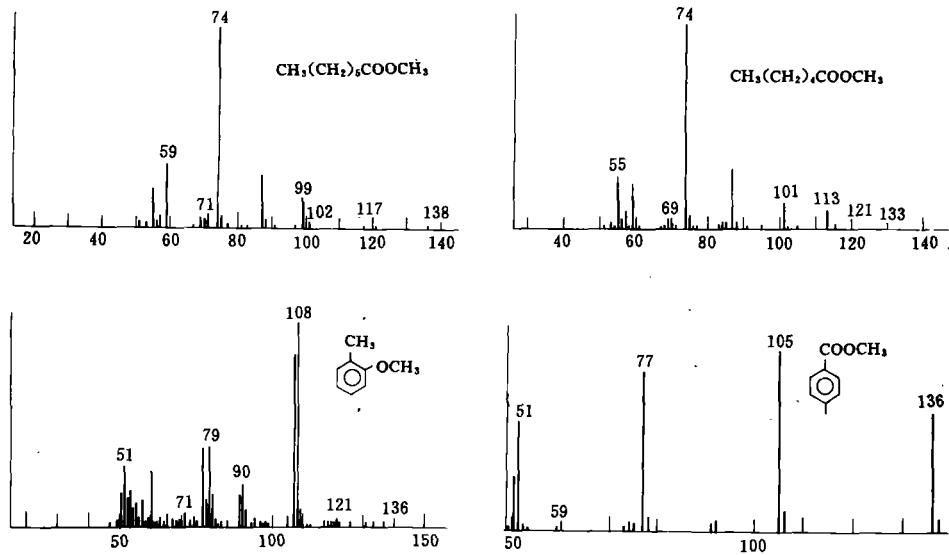


图 3 甲苯降解中间产物鉴定质谱图

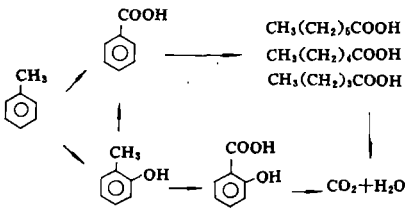


图 4 甲苯好氧生物降解途径

化合物继续氧化被转变成邻羟基苯甲酸,最后被矿化成 CO₂ 和 H₂O;另一条是甲苯先转化成苯甲酸,该化合物被微生物进一步代谢时开环生成高碳或低碳的脂肪酸,在该体系中检出了正庚酸、正己酸和正戊酸,但未检测到含 4 个碳以下的脂肪酸,这是由于低碳酸更易于矿化,而不在体系中积累所致,体系中所生成的脂肪酸

被细菌代谢,最终被矿化成 CO₂ 和 H₂O(本研究未对矿化后的产物进行测定). 甲苯在厌氧条件下的生物降解途径已有报道^[1, 4],但未见有在好氧条件下甲苯生物降解的报道. 甲苯在混合菌种体系下的好氧生物降解是一个多菌株协同作用的复杂过程,其降解中间产物和终产物的鉴定以及降解全过程的研究,有待进一步进行.

3 结论

(1) 从石油化工污水处理场活性污泥中富集的混合菌种,在 70 h 内可使浓度在 60—80 mg/L 的苯、甲苯、间二甲苯、对二甲苯和乙基苯全部降解,在 140 h 内可以将浓度在 120—140 mg/L 的间二甲苯、对二甲苯和甲苯完全降解.

(2) 6 种试验的苯系化合物中可降解性强的顺序为: 甲苯 > 对二甲苯 > 间二甲苯 > 乙基苯 > 苯 > 邻二甲苯。

(3) 在石化污泥中富集的混合菌种中筛选出降解邻二甲苯优势菌种。

(4) 从混合菌种中筛选出可降解甲苯、乙基苯、三甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯的 17 株单一菌种。

(5) 检出了甲苯生物降解中间产物; 根据中间产物推测甲苯的降解途径为: 甲苯先被氧化成苯甲酸或邻甲基酚, 然后开环生成脂肪酸, 进而被矿化成 CO_2 和 H_2O 。

参 考 文 献

- 1 Wouter A D et al. . Competition in chemostat culture between pseudomonas strains that use different pathways for the degradation of toluene. Appl. and Environ. Microbiol. , 1994, **60**: 2858—2863
- 2 Jang-Yong L et al. . Combination of the tod and the tol pathways in redesigning a etabolic route of pseudomonas putida for the mineralization of a benzene, toluene, and p-xylene mixture. Appl. and Environ. Microbiol. , 1995, **61**: 2211—2217
- 3 Patrick J E et al. . Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. Appl. and Environ. Microbiol. , 1992, **58**: 496—501
- 4 Dunja Grbic-Galic and Timothy M V. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. Appl. and Environ. Microbiol. , 1987, **53**: 254—260
- 5 Stephen R H, Guy W S et al. . Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. Environ. Sci. Technol. , 1991, **25**: 68—76
- 6 Harry R B, Martin R et al. . Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures. Appl. and Environ. Microbiol. , 1992, **58**: 3192—3195
- 7 Patrick J E et al. . Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. Appl. and Environ. Microbiol. , 1991, **57**: 450—454
- 8 Harry R B et al. . Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures. Appl. and Environ. Microbiol. , 1992, **58**: 3192—3195
- 9 赵丽辉等. 苯甲酸类化合物好氧生物降解性研究. 环境化学, 1993, **12**(3): 173—178

欢迎购阅《环境影响评价专辑》

由国家环保局环境工程评估中心组编的《环境影响评价专辑》已经以《环境科学》1996 年增刊出版。该专辑共 128 页 20 万字, 内容包括可技续发展的战略性环评、环评有效性探讨、区域环评、建设项目环评、生态环评、风险评估、费用效益分析以及完善环评制度的科学探讨和国内外经验介绍等。本专辑从即日起在评估中心和《环境科学》编辑部同时发售, 欢迎环保界同仁和对环影响评价感兴趣的读者购阅本专辑, 并欢迎提出您宝贵的意见

以利于改进工作。

购书办法: 邮购或上门购买

定价: 15 元/册(包括邮费)

购书地址与联系人: (1) 北京市 2871 信箱, 《环境科学》编辑部 万维纲

邮政编码: 100085,

电话: 62925511-2138

(2) 北京市安外大羊坊 8 号国家环保局环境工程评估中心, 路振山

邮政编码: 100012,

电 话: 64232255-268 或 278

Assessment of Critical Loads for Acid Deposition in Liuzhou Area. Xie Shaodong, Hao Jiming et al. (Dept. of Environ. Eng., Tsinghua Univ., Beijing 100084); *Chin. J. Environ. Sci.*, 17(5), 1996, pp. 1—4

In order to provide a quantitative evidence for establishing the target load, acidification processes of soils in Liuzhou area under different acid depositions levels were simulated using a revised MAGIC model on the basis of data about the physic-chemical properties of red earth, the surface water, and the background and present situation of precipitation, which were obtained by field investigations and experiments. The results showed that the soils in Liuzhou area have been already acidified and the acidification trend of the soils will become more serious with time. The upper soil layer is more sensitive to acid deposition while the bottom layer and surface water have larger buffer capacity. Critical loads of potential acidity for different red earth in this area are determined as $0.6—3.8 \text{ keq} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$, and that of sulfur deposition $0.7—3.2 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$. In order to protect 95% of soil area from acidic deposition, sulfur deposition should be cut down by 70% of the present level at least.

Key words: critical load, acid deposition, red earth.

Preparation of Polysulfone Hollow Fiber Ultrafiltration Membrane with High Permeability. Jiang Chengzhang et al. (Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023); *Chin. J. Environ. Sci.*, 17(5), 1996, pp. 5—7

A kind of originally created unique ternary additive of spinning solution and corresponding dry-jet wet-spinning membrane fabricating conditions were invented. The hollow fiber ultrafiltration membrane developed has high permeability, no defect, narrow differential pore size distribution and excellent retentivity. The membrane have double-row finger-like pore support layer structure and have skins both on the inner surface and on the outer surface, so the hollow fiber membrane can be operated under inside pressure or outside pressure. A series of hollow fiber ultrafiltration membranes with molecular weight cut-off of 10000; 30000; 50000 and 100000 respectively.

Key words: polysulfone, hollow fiber, ultrafiltration membrane, preparation.

Study on Biodegradability of Benzene Homolog Compounds by Mixed Bacteria from petrochemical Wastewater Treatment Plant. Wang Jusi, Zhao Lihui et al. (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Envi-*

ron. Sci., 17(5), 1996, pp. 8—12

This paper reported the biodegradability of benzene, toluene, ethylbenzene, o-, m- and p-xylene by mixed bacteria, which were enriched from activated sludge of petrochemical wastewater treatment plant, under aerobic condition. When the concentration of the tested compounds were 50—140 mg/L, the six tested compounds can be biodegrade. Seventeen bacteria strains were sifted from the mixed bacteria, they can biodegrade toluene, ethylbenzene, trimethylbenzene, o-, m- and p-xylene. The ratio of o- and m-xylene were 100% by sifting bacteria. The results indicated that the biodegradability of the compounds strongly depends on its chemical component and structure. At the test system, the biodegradable order of the six tested compounds was: toluene, p-xylene, m-xylene, ethylbenzene, benzene and o-xylene. The intermediates of toluene degraded were detected and was pathway for toluene degraded at aerobic condition.

Key words: biodegradability, benzene, toluene, ethylbenzene, activaty sludge, wastewater treatment.

Development of Simple and Dry Gas Desulfurization Process. Dixin Shen and Guangbin Liu. (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085); *Chin. J. Environ. Sci.*, 17(5), 1996, pp. 13—15

A simple and economical control technology of sulfur dioxide from the coal-fired boilers using activation calcium hydroxide injection has been developed. The activation calcium hydroxide as a sorbent was prepared by hydrolytic method. The specific surface area of sorbent was $41 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, while particles size distribution region 0—10 μm accounted for 24.0%, 10—20 μm for 20.1%, 20—40 μm for 29.0%, 40—60 μm for 16.6% and 60—90 μm for 10.3%. Factors influencing the reaction of sorbent with SO_2 were studied by using a sand-bed reactor in a bench-scale. Preliminary pilot scale test results showed that flow rate gas was $1000 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, the concentration of SO_2 was $1430 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ — $4290 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$, Ca/S was 1.5—1.8 and SO_2 removal was 60%—70%. The purpose was to develop a FGD technology of low capital and low operating costs to control the SO_2 emission in China.

Key words: sorbents, flue gas desulfurization, pilot scale test.

Experimental Study on Flue Gas Desulfurization with Duct Slurry Injection. Lu Yongqi and Hao Jiming (Dept. of Eviron. Eng., Tsinghua Univ., Beijing 100084), Hou Dongqi and Yu Ronghua (Harbin Power