

异养脱氮菌株 *Bacillus* sp. LY 降解有毒有机污染物的研究

赵娟, 吕剑, 何义亮*, 靳强, 张文英, 何霞

(上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240)

摘要: 研究了异养脱氮菌株 *Bacillus* sp. LY 降解去除有毒有机污染物的性能. 结果表明, 菌株在同时实现有毒有机污染物去除与生物脱氮方面具有潜在优势. 以典型有毒有机污染物苯酚、邻苯二酚、环境雌激素 NP 及其前驱物 NPEOs 为唯一碳源时, 该菌株对 4 种物质的降解去除率分别达 87%、77%、96% 和 80%, 一级降解速率常数分别为 0.191、0.112、0.435、0.147 d⁻¹. 在分别以 NP 及 NPEOs 为唯一碳源的条件下, 菌株对体系中的总氮亦有一定的去除, 表现出异养脱氮能力. 这些研究结果可为开发新型高效生物脱氮联合去除有毒有机污染物工艺打下理论基础.

关键词: *Bacillus* sp. LY; 降解; 有毒有机污染物; 异养脱氮

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)12-2838-05

Biodegradation of Toxic Organic Pollutants by *Bacillus* sp. LY with Heterotrophic Nitrogen Removal Ability

ZHAO Juan, LÜ Jian, HE Yi-liang, JIN Qiang, ZHANG Wen-ying, HE Xia

(School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: *Bacillus* sp. LY, with heterotrophic nitrogen removal ability, can biodegrade many kinds of toxic organic pollutants. The study illuminates that *Bacillus* sp. LY has potential advantages on the biodegradation of toxic organic pollutants combined with heterotrophic nitrogen removal. When using typical toxic organic pollutants, such as phenol, catechol, environment estrogen NP and its precursor NPEOs, as the sole carbon source respectively, removal efficiencies of the four pollutants were 87%, 77%, 96%, 80%, and first-order biodegradation rate constants were 0.191, 0.112, 0.435, 0.147 d⁻¹ respectively. When using NP and NPEOs as the sole carbon source respectively, *Bacillus* sp. LY could remove total nitrogen to some extent, manifesting the strain's capacity of heterotrophic nitrogen removal. All these results may make contribution to the establishment of new technique of bionitrification efficiently and removal of toxic organic pollutants simultaneously.

Key words: *Bacillus* sp. LY; degradation; toxic organic pollutants; heterotrophic nitrogen removal

随着工农业的发展,大量污染物进入水环境^[1],这些污染物既包括有毒有害有机污染物,如苯酚^[2]、硝基苯^[3]、环境雌激素壬基酚(NP)^[4]及其前驱物壬基酚聚氧乙烯醚(NPEOs)^[4]、有机农药双对氯苯基三氯乙烷(DDT)^[5]等,又包括氨氮^[6]等易引发水体富营养化的物质,种类繁多,性质复杂.目前常规的生物处理工艺对有毒有害持久性有机物的处理效果不甚理想,也不能达到较好的脱氮^[7~9]效果,很难对其进行全方面地控制^[10].因此,开发可同时实现去除有毒有机污染物与脱氮的工艺具有重要意义.

国内外许多学者已对苯酚、NP 与 NPEOs 等典型有毒有机污染物的高效降解去除进行了大量的研究^[11~14],但鲜见可同时实现脱氮联合去除有毒有机污染物的研究报道.*Bacillus* sp. LY 是本实验室在研究膜生物反应器中异养硝化细菌的硝化性能时分离出的 1 株异养脱氮菌^[15],可在去除有机物的同时将氨氮转化为氮气^[16, 17].笔者在研究其异养脱氮特性时发现该菌株能以多种有毒有机物污染物为唯一碳

源进行生长.本研究对 *Bacillus* sp. LY 降解多种有毒有机污染物的能力进行了分析,旨在为开发新型高效生物脱氮联合去除有毒有机污染物工艺打下理论基础.

1 材料与方法

1.1 菌株

Bacillus sp. LY 为本实验室在研究膜生物反应器中异养硝化细菌的硝化性能时所分离出的 2 株异养硝化菌之一,属延长芽孢杆菌属,为革兰氏阳性菌.试验细菌用甘油冷冻法^[18]保存,使用前先扩繁培养,培养基组成为 1 L 溶液中含蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 10 g,NaCl 5 g,用磷酸盐缓冲液将 pH 调至 7~8.

收稿日期: 2007-01-15; 修订日期: 2007-05-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(50478019)

作者简介: 赵娟(1984~),女,硕士研究生,主要研究方向为水污染控制, E-mail: seakyjane@sjtu.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: ylhe@sjtu.edu.cn

1.2 培养基

试验所用培养基成分为每 L 溶液中含有 NH_4Cl 2.7 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.27 g, KH_2PO_4 0.35 g, 以及 Mg、Mn 等微量元素, 用磷酸盐缓冲液将 pH 调至 7~8.

1.3 *Bacillus* sp. LY 分别降解多种有毒有机污染物试验

培养基配置好后分装至锥形瓶中, 于 121℃ 下灭菌 30 min. 取处于对数生长期的实验菌液以 3 000 r/min 的转速离心 15 min, 去除上清液, 用无菌生理盐水冲洗后再离心, 反复 3 次, 最后用无菌水配成菌悬液. 向锥形瓶中分别加入此菌悬液(确保菌体浓度一致, $D_{600\text{nm}}$ 为 0.1), 再向瓶中依次加入苯酚、邻苯二酚、NPEOs 及 NP(浓度均为 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 30℃ 回旋式水浴恒温振荡器上振荡培养, 恒定转速 130 r/min. 定期取样, 加入等量甲醇, 于 600 nm 处测定光密度值. 加入甲醇的目的是为了消除难溶于水的有机物对细菌含量测定的影响^[19]; 样品经过预处理后, 测定苯酚、邻苯二酚、NPEOs 及 NP 的浓度含量, 苯酚及邻苯二酚的浓度测定采用紫外分光光度法, NPEOs 含量采用 HPLC 测定, NP 含量采用 GC-MS 测定.

相同培养条件下, 向锥形瓶中分别加入扩繁后经处理的菌悬液(控制菌体浓度 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.1), 及相应各有机污染物(浓度均为 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 于 30℃ 回旋式水浴恒温振荡器上振荡培养, 恒定转速 130 r/min. 定期取样, 加入等量甲醇, 于 600 nm 处测定光密度值, 以确定菌株在以不同有毒有机污染物为唯一碳源条件下的生长情况. 选择几种典型的有机污染物处理, 培养 30 d 时取样, 12 000 g 离心分离后取上清液, 测定 TOC 及 TN.

1.4 分析方法

光密度值的测定采用尤尼科 UV-2100 型紫外分光光度计; 总有机碳总氮的测定采用德国耶拿 TOC/TN 测定仪 N/C 3000(ChD). 苯酚与邻苯二酚含量测定采用耿玉珍等^[20]的方法. NPEOs 含量的测定参考 Lu 等^[21]的方法, 采用日本岛津高效液相色谱 HPLC-2010, 分离柱为 C1 TMS 柱(CSC-C1 column, 250 mm $\times$ 4.6 mm I.D. particle packing size 5 μm), 流动相为甲醇与水混合液(80:20, 体积比), 流速 0.8 mL/min, 检测波长 225 nm, 进样量 10 μL . 不同降解时间 NPEOs 降解率的计算参考 Liu 等^[22]的方法. NPEOs 在不同降解时间的相对浓度则通过以 NPEOs 的初

始浓度($100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 乘上该时间对应的 NPEOs 降解率计算获得. NP 含量的测定参考 Ding 等^[23]的方法, 采用日本岛津气相色谱-质谱联用仪 GCMS-QP2010NC. 分析测试条件为: DB-5 柱(30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm) 分离, 氦气为载气, 不分流模式, 进样口温度 280℃, 进样量 1 μL , EI 电离模式, 离子化温度 200℃, 程序升温条件: 初始温度 40℃, 以 10℃/min 升温至 80℃, 保持 5 min, 然后以 5℃/min 升至 290℃, 保持 2 min. 定性采用 SCAN 模式, 扫描范围为 (m/z) 50~400. 定量选用 SIM 模式, 选择离子为 135.

2 结果与讨论

在以苯环类毒性物质苯酚、邻苯二酚、环境雌激素 NP 及其前驱物 NPEOs 几种典型有毒有机污染物为唯一碳源的条件下, 本研究定期检测了这类有机物的浓度含量及 *Bacillus* sp. LY 的菌体浓度. 由图 1 可以看出, *Bacillus* sp. LY 对这 4 种有毒有机污染物均有较好的降解效果. 10 d 时, *Bacillus* sp. LY 对苯酚的降解去除率达 87%, 对邻苯二酚的降解去除率达 77%, 对 NPEOs 及 NP 降解去除率亦达 80% 和 96%. 与文献报道的高效降解菌株对以上 4 种污染物的降解去除速率^[11, 12, 14]相比, *Bacillus* sp. LY 降解有毒有机污染物的速率偏低, 这可能是由于所用菌液初始浓度较低造成的. 尽管这些菌株降解去除单一污染物的速率较快, 但鲜见可同时实现脱氮联合去除多种有毒有机污染物的菌株的报道.

Bacillus sp. LY 对 4 种典型有毒有机污染物的降解去除符合一级动力学特征, 对苯酚、邻苯二酚、NP 及 NPEOs 的降解速率常数分别为 0.191、0.112、0.435、0.147 d^{-1} (表 1). 其中, 菌株对 NP 的降解效果最佳, 具有最短的半衰期($t_{1/2}$) 和最大的去除速率. 菌株使得 4 种苯环类有毒污染物在短期内便得到了较好的降解去除, 这表明该菌株对含苯环类结构的物质可能具有较强的降解潜力, 是一株高效降解有毒有机污染物的优良菌株.

从 *Bacillus* sp. LY 以 4 种典型有毒有机污染物为唯一碳源时的生长曲线(图 2) 可以看出, *Bacillus* sp. LY 在不同的碳源条件下生长情况有所不同. 菌株在以苯酚、邻苯二酚、NP 及 NPEOs 4 种典型有毒有机污染物为唯一碳源条件下的最大比生长速率分别为 0.59、0.28、0.77、0.76 d^{-1} , 不同有机物处理间差别较大. 降解毒性弱易于降解的有机物时, 菌株生长迟滞期短, 而降解毒性强不易降解的有机物时, 则

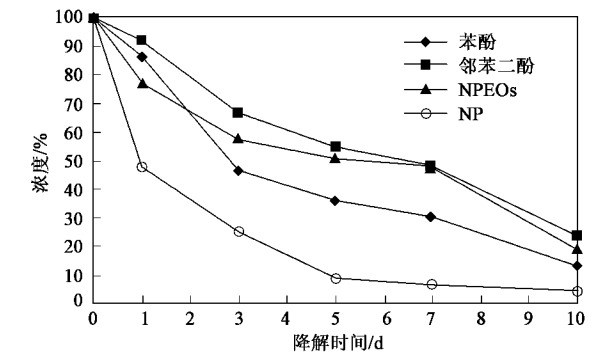


图1 分别以苯酚、邻苯二酚、NPEOs及NP为唯一碳源时各物质的降解曲线

Fig.1 Biodegradation curves of *Bacillus* sp. LY when using phenol, catechol, NPEOs and NP as the sole carbon source respectively

表1 菌株降解典型有毒有机污染物的动力学参数				
Table 1 Kinetic parameter for the biodegradation of typical toxic organic pollutants				
有毒有机污染物	最大去除速率 /mg·(L·h) ⁻¹	k/d ⁻¹	t _{1/2} /h	R ²
苯酚	0.84	0.191	87.3	0.942
邻苯二酚	0.54	0.112	148.5	0.972
NP	2.8	0.435	38.3	0.955
NPEOs	0.97	0.147	113.1	0.908

迟滞期长.菌株降解环境雌激素 NP 时, *Bacillus* sp. LY 经过较长的迟滞期后进入对数生长期,快速生长,而处理苯酚、邻苯二酚、NPEOs 时, *Bacillus* sp. LY 基本没有迟滞期,生长很迅速.对此合理的解释是菌株在降解 NP 时,需要将 NP 经过一系列转化后才能成为菌株易于利用的碳源.这也正是尽管菌株去除 NP 的速率要比其他 3 种有机物高,但以 NP 为唯一碳源处理的菌株生长却有较长迟滞期的原因.

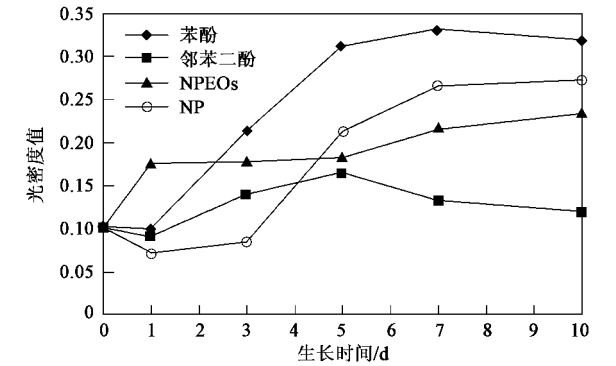


图2 分别以苯酚、邻苯二酚、NPEOs及NP为唯一碳源时 *Bacillus* sp. LY 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Bacillus* sp. LY when using phenol, catechol, NPEOs or NP as the sole carbon source respectively

为进一步研究 *Bacillus* sp. LY 对多种有毒有机污染物的降解去除能力,笔者研究了其在以多种有毒有机污染物为唯一碳源的培养基上的生长情况(表 2).结果表明, *Bacillus* sp. LY 在以多种有毒有机污染物为唯一碳源的条件下均能生长,且生长情况均较好,这说明该菌株具备降解多种有毒有机污染物的潜力,不仅能降解苯环类毒性物质苯酚、邻苯二酚、环境雌激素 NP 与其前驱物 NPEOs 等,而且能降解硝基苯、有机农药 DDT 以及饮用水中“三致”物质三氯甲烷及二氯乙酸.根据菌株在以多种不同有毒有机污染物为唯一碳源的条件下的生长效果推测,该菌株对含烷烃链类及含苯环结构的物质均有降解能力,其降解机理有待进一步研究.

表2 异养硝化菌 <i>Bacillus</i> sp. LY 在以各有机污染物为唯一碳源时的生长情况 ¹⁾		
Table 2 Growth status of <i>Bacillus</i> sp. LY in the presence of different organic pollutants respectively		
有机污染物类别	有机污染物	<i>Bacillus</i> sp. LY 的生长情况
苯环类毒性污染物	十二烷基苯磺酸钠	++
	邻苯二酚	+
	苯酚	++
	苯	+
	硝基苯	+
	4-氯硝基苯	+
环境雌激素及其前驱物类污染物	NP	++
	NP ₄ EO	++
	辛基酚聚氧乙烯醚 OP ₁₀ EO	+
	NP ₁₀ EO	++
烷烃链类物质	正壬醇	++
	正壬烷	++
有机农药类污染物	<i>o</i> , <i>p</i> '-DDT	+
	<i>p</i> , <i>p</i> '-DDT	+
“三致”物质	三氯甲烷	+++
	二氯乙酸	++

1) “+”表示该菌可在以该物质为唯一碳源的培养液中生长;“++”表示该菌在以该物质为唯一碳源的培养液中生长情况良好;“+++”表示该菌在以该物质为唯一碳源的培养液中生长情况非常好

在此基础上,选取以 5 种典型有毒有机污染物为唯一碳源的处理,研究了菌株对典型有毒有机污染物降解去除效果.以典型有机污染物苯酚、硝基苯、NP、NP₁₀EO、*p*, *p*'-DDT 为唯一碳源,各处理 TOC 去除率在 78.0% ~ 92.8% 之间(表 3),表明菌株对这些典型的有机污染物具有较好的降解效果.研究结果进一步证实了 *Bacillus* sp. LY 在降解多种有毒有机污染物方面的潜力.

在以葡萄糖为碳源,氯化铵为氮源进行 *Bacillus* sp. LY 异养脱氮性能的研究方面,本实验室已做了

表 3 以典型有机污染物为唯一碳源时 TOC 去除率/%

Table 3 Removal efficiency of TOC by *Bacillus* sp. LY in the presence of typical organic pollutant/%

典型有机污染物	TOC 去除率
苯酚	92.8
硝基苯	82.0
NP	90.6
NP ₁₀ EO	86.2
p,p'-DDT	78.0

大量的工作.研究表明 *Bacillus* sp. LY 在利用葡萄糖为碳源的同时表现出了良好的异养脱氮性能^[17].为考察 *Bacillus* sp. LY 在有毒有机污染物为唯一碳源时的异养脱氮性能,对以葡萄糖和典型环境雌激素 NP 及其前驱物 NPEOs 为唯一碳源处理的总氮浓度的变化进行了检测,研究了该菌株的异养脱氮特性.由图 3 可以看出,所有处理的 *Bacillus* sp. LY 对总氮均有一定的去除,表现了一定的异养脱氮能力.在以易降解有机物葡萄糖为碳源时,最大脱氮速率为 $1.53\text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$,而以环境雌激素 NP 及其前驱物 NPEOs 为唯一碳源时,最大脱氮速率分别降为 0.83 和 $0.96\text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$,表明虽然 NP 和 NPEOs 对菌体有毒害作用,降低了菌株的异养脱氮能力,但菌株仍能发挥一定的异养脱氮能力.因此, *Bacillus* sp. LY 在同时实现有毒有机污染物去除与生物脱氮方面具有潜在优势.

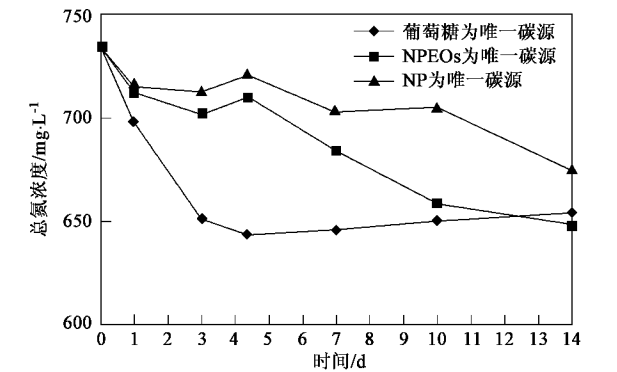


图 3 不同碳源处理时 *Bacillus* sp. LY 代谢铵态氮过程中总氮的变化

Fig.3 Changes in the concentration of total nitrogen during the metabolism of ammonia by *Bacillus* sp. LY in the presence of different organic contaminants

3 结论

Bacillus sp. LY 具有降解多种有毒有机污染物的潜力.在以典型有毒有机污染物苯酚、邻苯二酚、环境雌激素 NP 及其前驱物 NPEOs 为唯一碳源时,

该菌株对 4 种物质的降解去除率分别达 87%、77%、96% 和 80%,一级降解速率常数分别为 0.191 、 0.112 、 0.435 、 0.147 d^{-1} ,表明该菌株具有较强的降解有毒有机污染物的能力.该菌株在以环境雌激素 NP 及其前驱物 NPEOs 为唯一碳源时,表现出一定的异养脱氮能力,最大脱氮速率分别为 0.83 和 $0.96\text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$.因此该菌株在同时实现有毒有机污染物去除与生物脱氮方面具有潜在优势.

参考文献:

[1] 郑振华,周培疆,吴振斌.复合污染研究的新进展[J].应用生态学报,2001,12(3): 469~473.

[2] Palma M S A, Paiva J L, Zilli M, et al. Batch phenol removal from methyl isobutyl ketone by liquid-liquid extraction with chemical reaction[J]. Chemical Engineering and Processing, 2007, 46(8): 764~768.

[3] Chen M, Diao G W, Zhang E R. Study of inclusion complex of β -cyclodextrin and nitrobenzene [J]. Chemosphere, 2006, 63(3): 522~529.

[4] Pluemsab W, Fukazawa Y, Furuike T, et al. Cyclodextrin-linked alginate beads as supporting materials for *Sphingomonas cloacae*, a nonylphenol degrading bacteria[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(11):2076~2081.

[5] Tao S, Li B G, He X C, et al. Spatial and temporal variations and possible sources of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its metabolites in rivers in Tianjin, China[J]. Chemosphere, 2007, 68(1):10~16.

[6] 韦立峰.浅谈水体富营养化的成因及其防治[J].中国资源综合利用,2006,24(8):25~27.

[7] Carrera J, Jubany I, Carvallo L, et al. Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems [J]. Process Biochemistry, 2004, 39:115~1165.

[8] Dosta J, Gali A, Benabdallah El-Hadj T, et al. Operation and model description of a sequencing batch reactor treating reject water for biological nitrogen removal via nitrite [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(11):2065~2075.

[9] Ruiz G, Jeison D, Chamy R. Development of denitrifying and methanogenic activities in USB reactors for the treatment of wastewater: Effect of COD/N ratio[J]. Process Biochemistry, 2006, 41:1338~1342.

[10] 张亚雷,徐德强,赵建夫,等.混合菌培养与生物降解性能研究[A].见:中国化学会第六届水处理化学大会暨学术讨论会论文集[C].北京:中国化学会,2002.67~70.

[11] 龚斌,刘津,赵斌.一株高效苯酚降解菌的分离、鉴定及降解特性的研究[J].环境科学学报,2006,26(12):2008~2012.

[12] Pradhan N, Ingle A O. Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007, 60(2):103~108.

[13] Soares A, Guieysse B, Delgado O, et al. Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25:731~738.

- [14] Zhao J L, Zhang G Y, Qin Y, *et al.* Aerobic biodegradation of alkylphenol ethoxylates [J]. *Bioresource Technology*, 2006, **97** (18): 2478 ~ 2480.
- [15] Lin Y, Kong H N, He Y L, *et al.* Simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor and isolation of heterotrophic nitrifying bacterial[J]. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 2004, **40**(3): 105 ~ 114.
- [16] 何霞, 吕剑, 何义亮, 等. 异养硝化机理的研究进展[J]. *微生物学报*, 2006, **46**(5): 844 ~ 847.
- [17] 何霞, 赵彬, 吕剑, 等. 异养硝化细菌 *Bacillus* sp. LY 脱氮性能研究[J]. *环境科学*, 2007, **28**(6): 1404 ~ 1408.
- [18] 郭淑清, 田锋. 菌种的甘油冷冻保存法[J]. *山西医科大学学报*, 2000, **31**(4): 382 ~ 382.
- [19] Sato H, Shibata, A, Wang Y, *et al.* Characterization of biodegradation intermediates of non-ionic surfactants by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry 1. Bacterial biodegradation of octylphenol polyethoxylate under aerobic conditions [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2001, **74**: 69 ~ 75.
- [20] 耿玉珍, 刘葵, 刘连伟. 吸光度比值导数法同时测定苯酚, 邻苯二酚和对苯二酚[J]. *分析化学*, 1997, **25**: 1024 ~ 1026.
- [21] Lu J, Jin Q, He Y L, *et al.* Biodegradation of nonylphenol polyethoxylates under Fe (III)-reducing conditions [J]. *Chemosphere*, 2007, **69**: 1047 ~ 1054.
- [22] Liu X, Tani A, Kimbara K, *et al.* Metabolic pathway of xenoestrogenic short ethoxy chain-nonylphenol to nonylphenol by aerobic bacteria, *Ensifer* sp. strain AS08 and *Pseudomonas* sp. strain AS90[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, **72** (3): 552 ~ 559.
- [23] Ding W H, Tzing S H. Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their degradation products in river water and sewage effluent by gas chromatography-ion trap (tandem) mass spectrometry with electron impact and chemical ionization [J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, **824**: 79 ~ 90.

《环境科学》编辑部关于启用编辑信息管理系统公告

《环境科学》编辑部已经开通本刊网站并启用编辑信息管理系统(网站地址: <http://www.hjcx.ac.cn>). 该系统能实现在线投稿、在线审稿、期刊浏览检索等功能, 欢迎广大作者、读者和审稿专家使用. 目前我刊所有来稿都通过网站编辑信息管理系统进行. 作者使用编辑信息管理系统投稿时请先进行注册, 注册完毕后以作者身份登录, 按照页面上给出的提示投稿即可. 如果您在使用过程中有问题, 请及时与我刊编辑部联系.

邮政地址: 北京市海淀区双清路 18 号《环境科学》编辑部

邮 编: 100085

电 话: 010-62941102, 010-62849343

传 真: 010-62849343

E-mail: hjcx@rcees.ac.cn

网 址: www.hjcx.ac.cn

《环境科学》编辑部