

硝基苯降解菌生长特性及其降解活性*

李湛江² 韦朝海^{* 1} 任源¹ 梁世中²

(1. 华南理工大学化工学院 2. 华南理工大学食品与生物工程学院,

广州 510641, E-mail: cechwei@scut.edu.cn)

摘要 从一些下水道底泥中筛选分离、驯化得到2株厌氧降解硝基苯高效菌吉氏拟杆菌(*Bacteroides distasonis*)和屎拟杆菌(*Bacteroides merdae*),能与葡萄糖共代谢还原硝基苯.实验确定了吉氏拟杆菌和屎拟杆菌的最适生长条件为:温度28~35; pH6.5~7.2; NaCl浓度为0.4%~0.5%.该菌最大降解硝基苯的速率为95mg/(L·d),1g葡萄糖能共代谢还原200mg~260mg硝基苯.并对硝基苯厌氧还原成苯胺作出了定性和定量描述,提出了厌氧-好氧联合处理硝基苯废水的技术路线.

关键词 硝基苯废水,厌氧降解,共基质.

Growth Characteristics and Activities of Nitrobenzene Anaerobic Biodegradation Strains*

Li Zhanjiang² Wei Chaohai¹ Ren Yuan¹ Liang Shizhong²

(1. College of Chem. Eng., South China University of Technology, Guangzhou 510641, China E-mail: cechwei@scut.edu.cn)

2. College of Food and Biological Eng., South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract Two obligate effective anaerobic strains *Bacteroides distasonis* and *Bacteroides merdae* which can highly reduce nitrobenzene into aniline by co-metabolism with glucose were obtained by enriching, screening and acclimatizing the strains in active sludge got from a pharmaceutical factory. The growing conditions are optimized as follows: pH6.5~7.5, 28~35, and NaCl concentration of 0.4%~0.5%. The maximum degradation rate of nitrobenzene is 95mg·(L·d)⁻¹, referring to 200mg~260mg of nitrobenzene per gram of glucose. The quantitative and qualitative descriptions concerning with the reduction of nitrobenzene into aniline under anaerobic condition are also presented. In addition, a new anaerobic-aerobic process which aims at treating nitrobenzene-containing wastewater is put forward in this paper.

Keywords nitrobenzene-containing wastewater, anaerobic degradation, co-substrate.

硝基苯被列入各国优先控制的污染物^[1,2], 公认的硝基苯降解途径主要有3种^[3], 2种好氧途径和1种厌氧途径.好氧处理中,苯环上硝基极大的电负性使之氧化非常困难,加上硝基苯挥发性很强,极易造成二次污染.另外,好氧处理易产生一种毒性更大的、几乎不能降解的终产物(dead-end product)γ-吡啶甲酸^[4].厌氧处理可克服上述缺点,但人们对该途径的认识还不是很清楚.硝基苯毒性比苯胺大50倍,而且苯胺容易好氧降解为无害物质^[5,6].基于上述原因,本研究通过长期厌氧驯化,筛选分离到2株高效还原菌,可与低浓度葡萄糖共基质条

件下将硝基苯还原成苯胺,然后通过有效途径的组合将硝基苯类化合物加以处理.

1 材料与装置

(1) 试验装置 250ml烧瓶带橡皮塞,橡皮塞用石蜡浸透密封.一根玻璃管深入底部,另一根略低于瓶塞.玻璃管上带有旋塞.培养开始前充氮气2min,随即关上旋塞,确保厌氧环境.

* 国家自然科学基金资助项目(Project Supported by the National Natural Science Foundation of China): 29407051及广东省自然科学基金资助项目(940758)

* * 通讯联系人

李湛江:男,27岁,硕士研究生

收稿日期:1998-10-28

(2) 菌种来源 广州某化学试剂厂和某制药厂下水道底泥.

(3) 培养基 富集驯化培养基: 葡萄糖 0.1% ~ 0.4%; 蛋白胨 0.05%; 硝基苯 30 ~ 385mg/L; NaCl 0.5%; MgSO₄ 0.05%; K₂HPO₄ 0.5%; KH₂PO₄ 0.3%; pH 6.8 ~ 7.2.

平板分离保藏培养基: 酵母膏 1%; 蛋白胨 2%; 谷氨酸钠 0.4%; 巯基乙酸钠 0.1%; pH 7.2; 121 蒸汽灭菌 20min 备用.

(4) 分析项目和方法 COD 值: 重铬酸钾法^[5].
硝基苯和苯胺浓度: 萘乙二胺偶氮光度法^[5].
葡萄糖浓度: 3,5-二硝基水杨酸比色法^[6].
光密度 OD 值: 722 分光光度计(λ510nm).

(5) 工业废水性质 取广东某氯霉素生产厂的实际废水进行试验研究, 其水质如表 1 所示.

表 1 实际废水性质

指标	COD _{Cr} /mg · L ⁻¹	BOD ₅ /mg · L ⁻¹	硝基苯及其衍生物/mg · L ⁻¹	氯化钠/%	氯化铵/%	氯化氢/%	溴化铵/%	pH
原始值	2000 ~ 4000	600 ~ 1200	300 ~ 600	4	10	1	9	3 ~ 6

2 研究内容与方法

2.1 菌种的富集、驯化

取下水道底泥 10ml, 无菌水 90ml, 加入 250ml 的烧瓶(内装玻璃珠). 振荡烧瓶 15min, 静止澄清后, 取上清液 10ml 加入富集培养基, 置 32 恒温厌氧培养. 每 5d 为一周期进行驯化, 定期提高硝基苯浓度, 并降低葡萄糖浓度. 每一周期完毕后测定菌液光密度 OD 值、硝基苯浓度、苯胺浓度、COD 值及 pH 值. 以硝基苯转化率为目标, 通过培养液中各成分的变化来摸索该菌的最佳培养条件.

2.2 高效菌的生长条件试验

(1) 温度 取前述富集培养基(其中葡萄糖浓度 1.0g/L, 初始硝基苯浓度 100mg/L) 加入相同的菌液量, 改变温度分别为: 5、10、25、30、35、40 , 置恒温箱中厌氧培养, 24h 测 OD 值, 确定最佳生长温度.

(2) pH 取(1)中培养基加入相同菌量, 改变 pH 分别为: 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 在 30 恒温箱厌氧培养, 24h 测 OD 值, 确定最佳生长 pH 值.

(3) 盐浓度 取(1)中培养基加入相同菌量, 改变盐浓度分别为: 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7% , 调 pH 7.0, 置

30 恒温箱厌氧培养, 24h 测 OD 值确定最佳生长盐浓度.

2.3 硝基苯降解试验

在人工配制不同浓度(200 ~ 400mg/L) 的硝基苯废水中, 加入不同浓度的葡萄糖, 置 32 恒温箱厌氧培养, 第 4d 测硝基苯的去除率, 每隔 12h 测培养液 OD 值、硝基苯和苯胺浓度、pH 值、COD 值, 分析它们之间的相关性, 摸索硝基苯厌氧降解的规律.

3 结果与讨论

3.1 微生物分离驯化及其菌落特征

经过 20 多个周期的驯化, 菌种耐受硝基苯的能力不断增强, 达 400mg/L 以上. 当硝基苯浓度为 250 ~ 380mg/L 时, 日平均去除率达 91mg/(L · d), 5d 去除率达 97% 以上, 驯化过程中监测到苯胺, 且随时间延长苯胺的量增多. 经平板涂布分离得到 2 株高效菌(A 菌和 B 菌). 其菌落特征如表 2 所示. 经鉴定, A 菌为吉氏拟杆菌(*Bacteroides distasonis*), B 菌为屎拟杆菌(*Bacteroides merdae*) .

3.2 高效菌的生长条件

(1) 温度 将 A 菌和 B 菌分别在不同温度条件下培养 24h, 测定菌体生长量(以光密度 OD 值表示), 结果如图 1 所示. 可见, 2 株

表 2 A 菌和 B 菌的菌落特征

菌别	质地	直径/mm	形态	干湿	高度	透明度	颜色	边缘
A 菌	乳脂状 粘稠	1~6	圆形	湿润	凸起	不透明	乳白色	整齐
B 菌	絮状致密	2~5	圆形	湿润	微凸	半透明	浅黄色	整齐

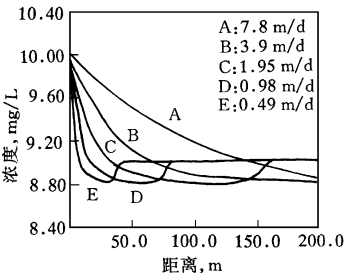


图 1 温度对 OD 值的影响

菌均在 28~35 生长最好, 低于 25 时菌生长缓慢, 10 以下几乎不生长, 高于 40 时菌的生长受到抑制.

(2)pH 将 A 菌和 B 菌分别在不同 pH (5~11) 条件下培养 24h, 测定菌体的生长量, 结果见图 2. A 菌和 B 菌生长最适 pH 为 6.5~7.2. 中性培养基对菌的生长较为有利.

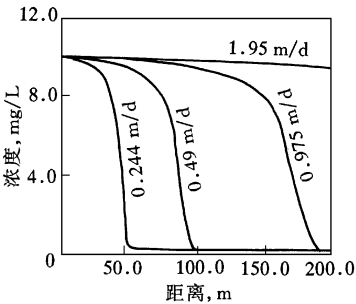


图 2 pH 对 OD 值的影响

(3)盐浓度 将 A 菌和 B 菌置不同 NaCl 浓度培养 24h, 测定菌体生长量, 结果如图 3 所示. 可见, A 菌在盐浓度约为 0.4% 时生长最好, 而 B 菌生长最适盐浓度为 0.5% 左右.

(4) 硝基苯毒性效应 据文献报道^[9], 硝基苯厌氧处理过程中, 当浓度低于 200mg/L 时其 72h 去除率为 85.5%. 而在本研究中, 将 A 菌和 B 菌用不同硝基苯浓度作为抑制剂,

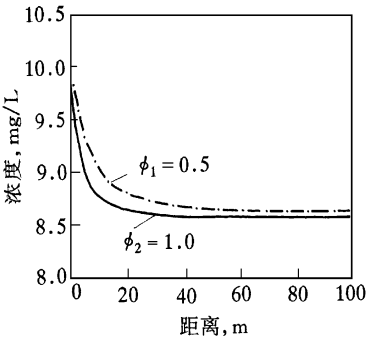


图 3 盐浓度对 OD 值的影响

发现当废水中硝基苯浓度低于 350mg/L 时反应 72h 其去除率达 97.6%; 当废水中硝基苯浓度在 350~450mg/L 时反应 72h, 去除率则降为 80.0%, 都高于已报道的数据, 证明所得到的菌种为高效菌且抗毒性能力强; 当硝基苯浓度高于 450mg/L 时对厌氧菌有毒性作用, 使去除率下降. 因此, 控制废水中硝基苯浓度低于 450mg/L 对其厌氧处理较为有利.

3.3 硝基苯降解试验

(1) 葡萄糖与硝基苯相关性 在人工配制的 2 组浓度硝基苯废水中加入相同的接种菌液和相同的无机盐浓度, 各加入不同浓度的葡萄糖, 置恒温培养箱中 32 厌氧培养, 第 4d 测硝基苯的去除率, 结果如图 4 所示. 当培养液中不加入葡萄糖时, 则硝基苯浓度没有变化, 说明所驯化的 2 株厌氧菌不能以硝基苯为唯一碳源和能源. 随着葡萄糖浓度的增加, 硝基苯的去除率也随之增加. 当葡萄糖浓度高于 2.0g/L 时, 硝基苯的去除率均达 99.0% 以上. 分析发现 1g 葡萄糖能共代谢还原 200~260mg 的硝基苯, 因硝基苯初始浓度和菌种的不同而异. 由此表明硝基苯的厌氧降解是一个次生代谢(即共代谢)过程, 维持这一代谢所必需的酶来自于初级基质葡萄糖的利用, 作为

次级基质硝基苯的利用只能在初级基质消耗时发生. 为了尽可能充分利用初级基质而达到较高的去除率, 应该选择维持适当的葡萄糖浓度. 有关影响硝基苯共代谢降解速率及次级基质利用速率的因素及其定量化有待进一步深入研究.

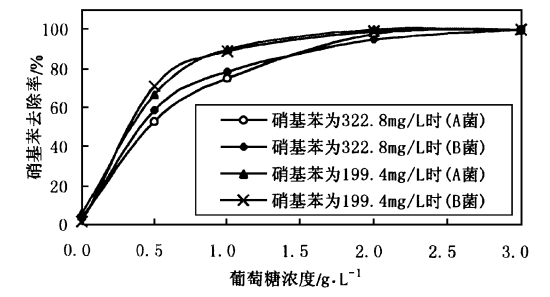


图4 葡萄糖对硝基苯的去除率的影响

(2) 降解过程中 OD 值、硝基苯和苯胺的相关性 选择 B 菌以 1.6g/L 的葡萄糖作为生长基质, 385.3mg/L 的硝基苯为共代谢基质, 32 厌氧培养, 每 12h 取样测定, 结果如图 5 所示. 由图 5 可知, 菌体的生长在前 12h 为迟滞期, 硝基苯和菌体浓度没有明显变化. 对数生长期出现在 12~24h, 这段时期 OD 值增长较快, 硝基苯下降了 130mg/L, 而苯胺生成了 95mg/L. 稳定期为 24~48h, 这段时间 OD 值变化不大, 而硝基苯迅速下降了 170mg/L, 苯胺生成 110mg/L. 其后菌体开始衰亡, OD 值迅速下降, 硝基苯和苯胺浓度变化不大. 静态摇瓶培养的局限性在于终产物抑制酶促反应得不到解除, 随着初级基质的耗尽导致菌体内源呼吸, 随后衰老死亡便使次级基质得不到降解. 因此, 在厌氧反应器的设计中, 如何延长对数生长期和平衡期, 在废水中连续化供入恰当比例的生长基质和共代谢基质, 成为工程上的重要设计因素. 将图 5 整个过程的硝基苯和苯胺的毫克数换算成毫摩尔数时, 2 者的总毫摩尔数基本持平, 可见苯胺在厌氧环境中基本不被降解. 另外, 静态培养中厌氧菌增值速率较低, 在动态反应器工艺中需进一步改进.

(3) 降解过程中 COD 和 pH 的变化 图 5 实验同时测定的 COD 值(离心菌体后测得

值) 随时间的变化曲线如图 6 所示. 可见, COD 值表现为前期下降, 后期稳定. 原因是葡萄糖被消耗转变成菌体且厌氧降解过程中释放出 CO₂、甲烷等气体. 说明这个降解过程强烈依赖于葡萄糖. 而随着糖的大部分被消耗, 体系中主要表现为硝基苯还原为苯胺的降解过程, 使 COD 值呈现平衡状态. 因为苯胺和硝基苯对 COD 的贡献较为接近. 而 pH 值表现为随时间的延长略为升高, 可以理解为偏碱性的苯胺浓度增大所致.

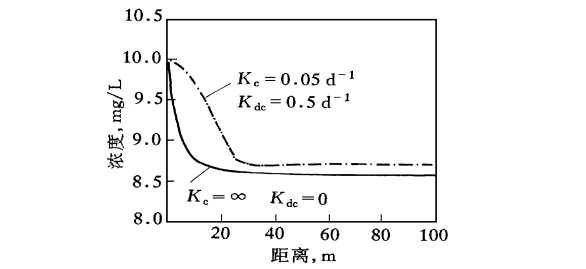


图5 降解过程 OD-NB-苯胺-时间相关性

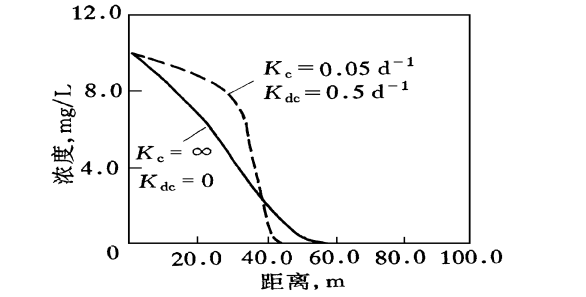


图6 降解过程 COD 值、pH 变化曲线

(4) 实际废水的降解 将前述 2 种高效厌氧菌分别接种于富集培养液内, 培养 24h, 镜检菌体生长正常后混合接入 2L 厌氧填充床(活性碳 砂粒为 1:1 混装)内, 进行挂膜运行. 经 20d 连续流加营养基质培育后, 载体上形成厚度约为 20μm 的生物膜. 挂膜时进水中加入适当浓度的硝基苯, 从 50mg/L 缓慢增加至 100mg/L, 既使微生物始终处于硝基苯溶液的环境中, 又能形成生物膜. 挂膜完成后向厌氧填充床中连续流加稀释后的实际废水(将表 1 的废水稀释 10 倍)进行驯化. 驯化时不断提升含硝基苯废水浓度, 即不断降低废水的稀

释倍数. 经 15d 后, 当稀释倍数为 2 倍时, 硝基苯去除率已达 80% 以上, 即可转入正常运行. 正常运行时向填充床连续流加含 1.0g/L 葡

萄糖的实际废水(处理前调 pH 至 6.5), 控制停留时间 20h, 平均水温为室温 28℃. 维持连续稳定的操作工艺运行 2 个月后, 取 1 星期的

表 3 实际废水初步处理结果/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

平均进水浓度			平均出水浓度			平均去除率/ %	
硝基苯	葡萄糖	COD _{Cr}	硝基苯	苯胺	COD _{Cr}	硝基苯	COD _{Cr}
385.4	1000	4737.7	15.3	261.2	3045.8	96.0	35.7

统计结果如表 3 所示.

从处理过程看, 厌氧菌对实际废水具有较好的适应性. 厌氧反应器的出水进入好氧反应器, 然后将苯胺在专性好氧菌^[5]的作用下实现无害化处理. 由于填充床各种条件还不完善(如温度较低等), 厌氧处理 COD 去除率不理想, 需在好氧处理中弥补. 以上实验表明, 采用厌氧过程降解硝基苯为苯胺是彻底矿化硝基苯的一条有效途径, 为厌氧-好氧联合工艺处理硝基苯工业废水提供了技术基础.

4 结论

(1) *Bacteroides distasonis* 和 *Bacteroides merdae* 能在较低浓度的葡萄糖共基质条件下将高浓度的硝基苯还原成易好氧降解的苯胺类化合物.

(2) 2 株高效菌的生长条件分别为: 温度 28 ~ 35℃; pH 6.5 ~ 7.2; *Bacteroides distasonis* 菌 NaCl 0.4%, *Bacteroides merdae* 菌 NaCl 0.5%; 厌氧处理适宜的硝基苯浓度为低于 450mg/L, 浓度过高则表现出毒性效应.

(3) 降解过程中 1g 葡萄糖能共代谢还原 200 ~ 260mg 硝基苯, 最大降解速率达到 95mg/(L · d). 2 株高效菌能较好地降解氯霉

素生产厂排出的含硝基苯实际废水, 克服了硝基苯的毒性.

参 考 文 献

1 Keith L H and Telliard W A. Priority pollutants. I. A perspective view. Environ. Sci. Technol., 1979, **13**(4): 416 ~ 423

2 Howard P H. Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals, Vol. I. Large production and priority pollutants. Chelsea, Mich: Lewis Publishers Inc., 1989. 315 ~ 316

3 Olaf W H and Hans-Joachim. Biodegradation of nitrobenzene by a sequential anaerobic process. Biodegradation, 1993, **4**: 187 ~ 194

4 Shirley F Nishino and Jim C Spain. Degradation of Nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudocaligenes*. Appl. Environ. Microbiol., 1993, **59**(8): 2520 ~ 2525

5 韦朝海, 任源等. *Ochrobactrum anthtropi* 对苯胺的降解特性. 环境科学, 1998, **19**(5): 22 ~ 24

6 任源, 吴超飞等. 苯胺分解菌的驯化筛选研究. 环境科学研究, 1998, **11**(4): 3 ~ 5

7 国家环保局等编. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 353 ~ 356 和 424 ~ 426

8 俞毓馨. 环境工程微生物检验手册. 北京: 中国环境科学出版社, 1990. 161 ~ 162

9 孙加飞, 王宝贞等. 厌氧条件下硝基苯降解的可行性研究. 重庆环境科学, 1992, **14**(6): 13 ~ 15