

硝基苯污染底质的微生物强化修复研究

李轶^{1,2}, 胡洪营^{2*}, 于茵², 李鑫²

(1. 河海大学水文水资源与水利工程科学国家重点实验室, 南京 210098; 2. 清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 采用从污染底质中分离出的可降解硝基苯的恶臭假单胞菌, 对硝基苯污染底质的微生物强化修复进行了实验室和现场实验研究. 该细菌在未灭菌的河水中可以硝基苯为唯一碳源生长, 低温条件下(5℃), 对于 100 g 的含有 11.8 mg/kg 硝基苯的污染底质, 投加 2 mL(10^7 cells/mL)菌液可以在 4 d 完全降解底质中的硝基苯, 实现对污染底质的强化修复. 该过程中无须投加额外的氮、磷及其他的营养盐, 说明污染底质中含有足够的细菌生长所需的营养物质. 在使用河水和底质的现场实验中, 当底质和河水中的硝基苯初始浓度在 7~8 mg/kg、50~61 mg/L 之间时, 投加硝基苯降解菌可使底质和河水中硝基苯的降解时间缩短了 40 h 以上, 河水中的硝基苯先于底质中的硝基苯被细菌所降解.

关键词: 硝基苯; 污染底质; 生物修复; 恶臭假单胞菌

中图分类号: X172; X522 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)06-1632-06

Bioremediation of Nitrobenzene-polluted Sediments Using *Pseudomonas putida*

LI Yi^{1,2}, HU Hong-ying², YU Yin², LI Xin²

(1. State Key Laboratory of Hydrology-Water Resources and Hydraulic Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China; 2. ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Bioremediation of nitrobenzene-polluted sediments was studied through lab-scale and *in situ* experiments. The polluted sediments were remediated through the addition of bacterial separated from the sediments, even at a low temperature of 5℃. Nitrobenzene at a concentration of 11.8 mg/kg was biodegraded within 4 d with the addition of 2 mL cell solution (10^7 cells/mL). No extra nutrients were needed for the bioremediation process, showing that enough nutrients existed in the sediments. For the *in situ* bioremediation experiment, the initial nitrobenzene concentrations at solution and sediments were 50-61 mg/L and 7-8 mg/L respectively. The remediation process was also enhanced through cell addition. The above mentioned nitrobenzene was biodegraded within 48 h, compared with 96 h without cells presence. Nitrobenzene in solution was removed preferentially than those in sediments.

Key words: nitrobenzene; polluted sediments; bioremediation; *Pseudomonas putida*

水体底质是氮、磷、重金属、难降解有机物等多种污染物的沉积库, 其中所含的难降解有机污染物包括多氯联苯(PCBs)、多环芳烃(PAHs)以及取代苯类等物质^[1-3]. 这些难降解有机物在底质中逐渐积累, 并与水相保持一定的动态平衡, 成为长期潜在的释放源, 当环境条件发生变化时, 会再次进入上覆水体, 成为二次污染物, 对包括下游在内的水体造成威胁. 沉积在底质中的难降解有机物还会对底栖生物产生毒害作用, 破坏水生生态环境, 甚至可通过生物富集、食物链放大等过程, 进一步影响陆生生物和人类健康^[4,5]. 因此, 难降解有机物污染底质的修复是保证水体健康所迫切需要解决的重要环境问题之一^[6,7].

近年来一些学者对难降解有机物污染底质的原位生物修复进行了可行性研究. Jouanneau 等^[8]对比了微生物和植物对芘污染底质的修复效果, 指出对有机污染底质的修复而言, 微生物比植物更为有效. Brenner 等^[9]研究了一处长期遭受 PCB 污染的底质

的自然修复过程, 结果表明自然修复过程中 PCB 的扩散对水体造成显著的污染, 必须通过底质中存在的微生物来进行生物强化修复. 其他类似研究也得到了相同的结论, 即底质中存在着一定量数的可降解有机物的微生物, 通过这些微生物的作用可以强化污染底泥的修复过程^[10,11].

在前期研究中, 本课题组从硝基苯污染底质中分离出高效的硝基苯降解菌^[12], 并对该细菌的性质进行了研究. 本研究的目的是考察该细菌对硝基苯污染底质的修复作用. 污染环境的恶劣和环境微生物的竞争性抑制, 在环境生物修复过程中往往难以保持投加细菌降解污染物的效率, 本研究结果对硝基苯污染环境的实际修复具有重要意义.

收稿日期: 2007-06-12; 修订日期: 2007-07-16

基金项目: 中国博士后基金项目(20070410535); 水文水资源与水利工程科学国家重点实验室开放基金项目(2006412411)

作者简介: 李轶(1975~), 男, 博士后, 主要研究方向为污染环境的修复技术, E-mail: envly@tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

1 材料与方法

1.1 菌种及其培养

本研究所用的 *Pseudomonas putida* NB1 菌株于冬季(1 月份)从东北某条曾被硝基苯污染的河流底泥中分离纯化而得.

1.1.1 培养基

分离培养的培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.8 g/L; KH_2PO_4 1 g/L; NaCl 1 g/L; 琼脂 15 g/L; 硝基苯 0.1 g/L.

无机盐培养液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.8 g/L; KH_2PO_4 1 g/L; NaCl 1 g/L; NH_4Cl 0.1 g/L; MgSO_4 0.2 g/L.

1.1.2 菌种的富集培养与分离纯化

于冬季(1 月份)从东北某条曾被硝基苯污染的河流取底泥,将底泥和硝基苯混合后的上层清液接种到装有无机盐培养液的锥形瓶中,再将适当浓度的硝基苯溶液直接加到该锥形瓶中作为微生物生长的唯一碳源(硝基苯的初始浓度为 20 mg/L),随后放入恒温床中(35℃)培养.培养一定时间至溶液浑浊时,倒掉一半培养液换上新的含硝基苯的无机盐培养液,新溶液中的硝基苯浓度和第 1 次相同.然后在硝基苯固体培养基平板上不断分离纯化得到能降解硝基苯的纯菌株.所得菌株接种到无机盐培养液中培养一定时间后放入冰箱中在 4℃ 条件下保存.

1.1.3 降解菌的培养

将降解菌接种到无机盐培养液中,于恒温床中(35℃)静止培养,定期取样测定培养基中细胞浓度和硝基苯浓度.细菌的分离、培养以及鉴定等可参见文献[12].

1.2 实验方法

1.2.1 溶液中硝基苯降解实验

在 300 mL 锥形瓶中配制体积为 150 mL,浓度为 20 mg/L(接入菌液后的体积和浓度)的硝基苯无机盐培养液和模拟的硝基苯污染河水(直接在取得的河水中加入硝基苯),接入 1 mL(10^7 cells/mL)处于对数生长期的菌液,于恒温床中(5℃)静止培养,考察该细菌在不同培养液中的生长情况.

1.2.2 污染底质中硝基苯降解实验

底质样品特征:棕褐色,无嗅,松散,沙质,有零散卵石;硝基苯:未检出.称取 1 kg 底质,在 100 mg/L 的硝基苯溶液中浸泡,定时进行搅拌,使底质吸附一定量的硝基苯,2 h 后底质中硝基苯浓度趋于稳定,

此时将浸泡液倾出,并空干底质中的水分,分别取 100 g(湿重)底质加入 300 mL 锥形瓶中.

向锥形瓶中接入 2 mL 处于对数生长期的菌液(10^7 cells/mL)和去离子水(总体积 10 mL).随后将装有底质样品的锥形瓶放入 5℃ 恒温箱中,定时取样进行分析.分别改变培养温度和溶液的浓度,通过平行实验,研究温度、浓度和菌液投加量对硝基苯降解的影响.

细菌投加量影响实验:底质中硝基苯初始浓度在 10 ~ 15 mg/kg 之间,分别选择细菌投加量为 2、4、6 和 8 mL,考察菌体投加量对硝基苯降解的影响.

温度影响实验:底质中硝基苯初始浓度在 10 ~ 15 mg/kg 之间,在恒温培养箱中分别于 5、15、25 和 35℃ 培养.

硝基苯浓度影响实验:分别选择底质中硝基苯初始浓度在 10 ~ 45 mg/kg 之间,于 5℃ 培养箱中培养,考察不同初始浓度条件下底质中硝基苯的降解.

1.2.3 现场修复实验

(1)实验用底质和水 底质和水现场取自东北某河流受硝基苯污染河段.

(2)实验场地 在该河流岸边选择易取水取泥且不受河水涨落潮影响的位置,挖掘长 4 m、宽 2 m、深 0.4 m 的水池,均匀分成 8 个 1 m × 1 m × 0.4 m 的方格,如图 1 所示.

1	2	3	4
1	2	3	4

1. 对照实验; 2. 投加细菌; 3. 投加无机营养盐;
4. 投加细菌和无机营养盐

图 1 现场污染底质修复模拟试验

Fig.1 Diagram of *in situ* experiment

(3)实验方法 自河底取一定量的底质,清洁后去除较大的颗粒和杂质.将底质均匀置于池中,实验中底质约 10 cm 厚,与适量硝基苯溶液(100 mg/L)混合,充分搅拌,以保证硝基苯被底质吸附,向池中注入河水(泥水体积比约为 1:1).按照实验考察的影响因素分别在池中加入菌液(0.1 L)和无机营养盐(按照无机盐培养液浓度投加),定期取样测定池中底质和水中硝基苯的含量.

1.3 分析测定方法^[13,14]

底质中硝基苯的提取:称取约 2 g(湿重)的样品

于 25 mL 样品瓶中,用薄纸擦净瓶口,记录样品质量准确至 0.001 g.向上述样品瓶中加入 4 g 无水硫酸钠,充分混匀.准确移取 10.0 mL 甲基叔丁基醚于上述样品瓶中.超声振荡 5 min,将超声清洗器频率调至 70 ~ 80 Hz.在超声振荡的同时,用玻璃棒搅拌样品与溶剂混合物.将 2 mL 上述提取液转入 10 mL 离心管,在 10 000 r/min 条件下离心 5 min.取离心管中 1 mL 上清液于 2 mL 螺旋盖小瓶中(与气相色谱仪自动进样器配套),备色谱分析用.

硝基苯浓度:气相色谱法,主要仪器为 Agilent6890N 气相色谱仪(美国 Agilent),样品离心后,取上清液用甲基叔丁基醚萃取后进行分析;气相色谱条件为进样口温度 270℃,检测器 300℃,柱温 80℃(2 min)→10℃/min→160℃(5 min),进样量 3 μL;ECD 检测器.

细胞浓度:比浊法,在 550 nm 下测定,主要仪器为 UV-1200V 型分光光度计(日本岛津).

DOC:燃烧氧化-非色散红外线吸收法,主要仪器为 TOC-5000A 型总有机碳分析仪(日本岛津).

2 结果与讨论

2.1 细菌在硝基苯污染河水中的生长

污染环境的微生物修复可以利用污染环境中的土著菌、投加从土著菌中分离提纯后的细菌或者具有快速降解功能的基因工程菌.该过程中,外加降解菌的培养非常重要,实验室条件下在灭菌后的培养液中生长的细菌往往在实际修复过程中不能发挥其降解功能.本研究中从硝基苯污染底质中筛选、分离得到高效的硝基苯降解菌,并使用在污染河水中培养得到的细菌对污染底质进行修复.图 2 为该细菌在河水和灭菌培养液中的生长曲线和硝基苯降解曲线.

由图 2 可知,即使是在未灭菌的河水中,细菌也可以快速生长,但和在培养液中生长相比,此时细菌生长有一短暂的滞后期,经过 22 h 左右可将 20 mg/L 的硝基苯完全降解.降解末期溶液光密度值在 2 种情况下均在 0.07 左右.对照实验初期和末期测量的 DOC 值,溶液中 85% 左右的 DOC 被去除,表明细菌具有将硝基苯在短时间内矿化的能力.

2.2 环境因素对底质修复的影响

2.2.1 细菌投加量的影响

比较了硝基苯初始浓度相同的情况下,细菌投加量对硝基苯处理效果的影响.结果如图 3 所示.

从图 3 中可以看出,在硝基苯初始含量一致

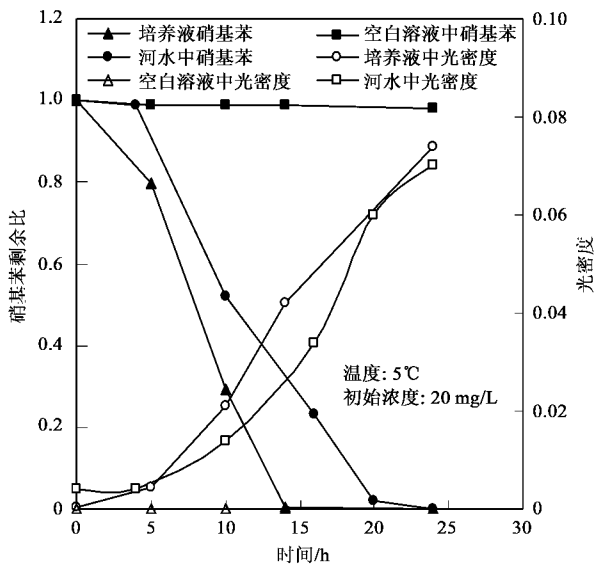


图 2 江水和培养液中硝基苯降解和微生物生长情况

Fig.2 Nitrobenzene degradation and bacterial growth

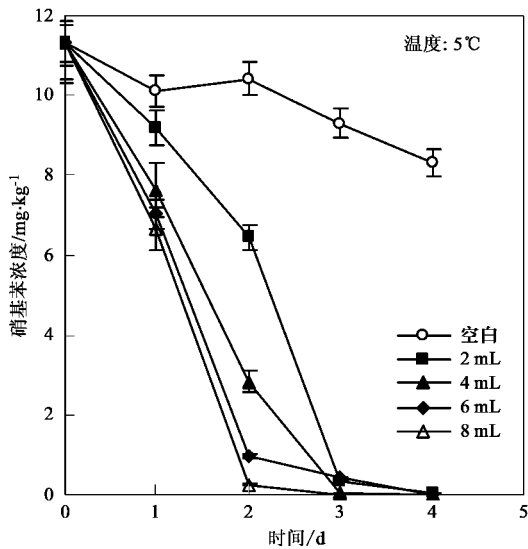


图 3 不同细菌投加量条件下硝基苯的降解情况

Fig.3 Nitrobenzene degradation with the addition of different amount of bacterial

(11.3 mg/L) 的条件下,与不投加细菌的空白样相比,细菌添加对硝基苯降解具有明显的促进作用.实验进行 4 d 后,对照样的硝基苯含量仍维持在 8 mg/L 以上,而投加细菌的各试验样中硝基苯含量均降至极低的水平(0.05 mg/L 以下).同时从图 3 能够明显看出,随细菌投加量的升高,硝基苯的降解速度加快.其中投加量最高(8 mL)的实验样在 2 d 后其硝基苯含量即降至 0.05 mg/L 以下.污染底质中含有的土著菌也可以降解一定量的硝基苯,但对于修复

过程而言,其降解速度较低,修复时时间过长,投加 2 mL 的细菌可以保证在短时间内对该浓度的污染底质的修复.

2.2.2 温度的影响

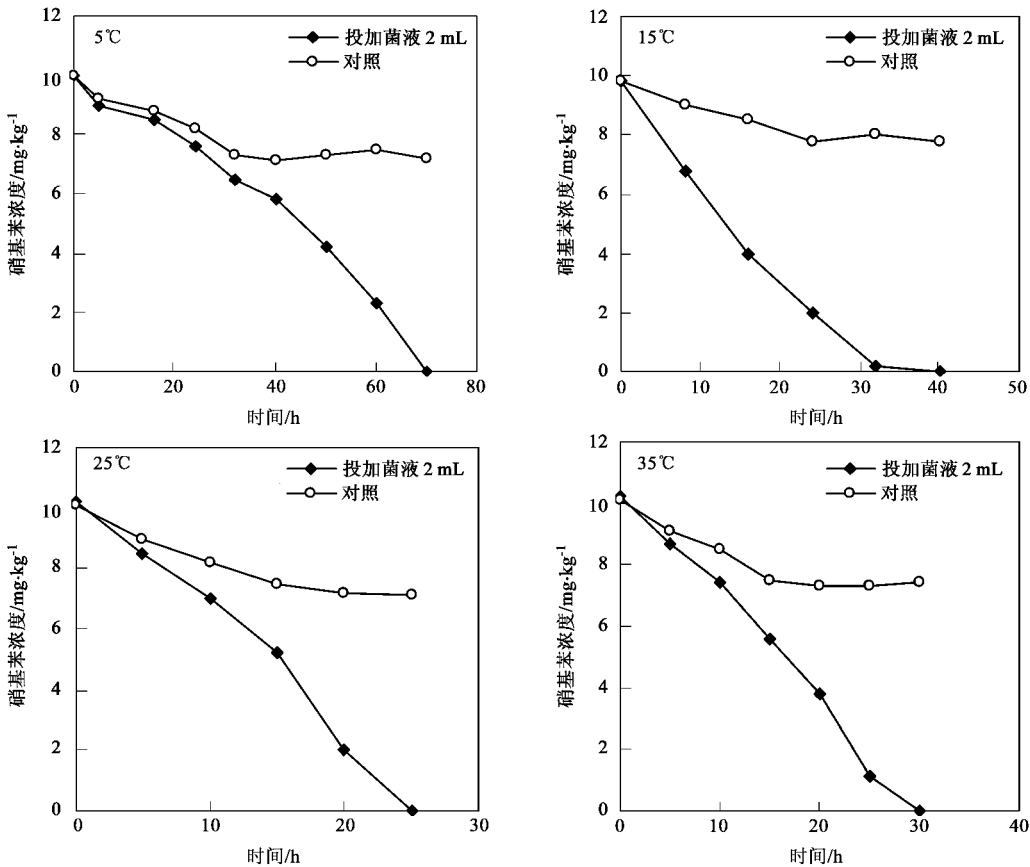


图 4 不同温度条件下硝基苯污染底质的修复

Fig.4 Nitrobenzene degradation in the sediments at different temperatures

降解速度最快.该细菌为耐冷中温菌,最适宜生长温度为 25℃左右.这和该细菌在无机培养液中降解硝基苯的情况一致^[12].

对照实验中,未投加细菌时,硝基苯的浓度也有一定的减少,减少的比例也随着温度的升高而升高,这是由于底质中也含有一定种类和数量的可降解硝基苯的微生物,但和投加细菌的实验相比,投加细菌显著的促进了硝基苯的降解.本实验所使用的细菌可以在低温到高温条件下(5 ~ 35℃)快速降解硝基苯.

2.2.3 硝基苯初始浓度的影响

培养温度为 5℃时,该细菌对不同浓度的硝基苯降解曲线和生长曲线如图 5 所示.当污染底质中的硝基苯的浓度 < 50 mg/kg 时,降解菌可以完全降解其中的硝基苯.降解过程中,未观察到明显的迟滞期,并且降解速度随着硝基苯浓度的增加而增加,从

不同温度条件下(5 ~ 35℃)降解菌的生长及其对 20 mg/L硝基苯污染底质的降解情况如图 4 所示.在所进行的 4 组实验中,污染底质中的硝基苯均被完全降解,在 25℃时,细菌对污染底质中硝基苯的

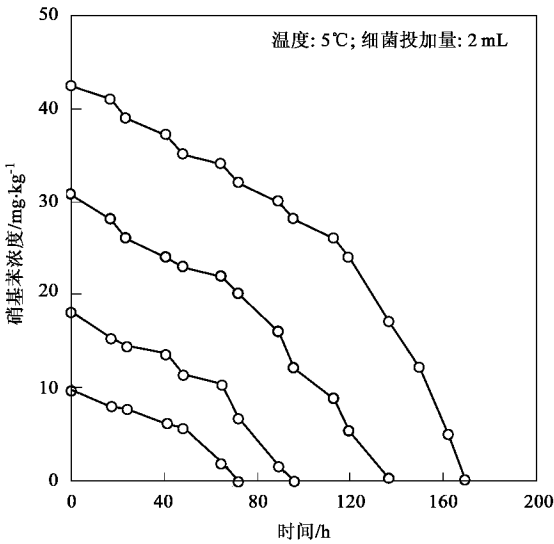


图 5 不同浓度条件下硝基苯的降解

Fig.5 Nitrobenzene degradation at different initial concentrations

0.133 $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ 逐渐增加到 0.247 $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$. 在前期研究工作中发现溶液中不同浓度的硝基苯在该细菌的作用下其降解过程表现出自抑制的现象, 即当溶液中硝基苯初始浓度 $< 160 \text{ mg/L}$ 时, 硝基苯的降解速度随着起始浓度的增加而增加, 而当初始浓度 $> 160 \text{ mg/L}$ 时, 硝基苯对细菌毒性增强, 在该实验条件下细菌不能降解溶液中的硝基苯^[12]. 相对于

溶液而言, 底质中硝基苯浓度较低, 对于细菌的毒性较小, 表现出其降解速度随硝基苯初始浓度的增加而增加, 硝基苯在该浓度范围内可以被快速地降解, 从而实现对污染底质的修复.

2.3 硝基苯污染底质现场修复实验

现场模拟修复实验过程中, 不同实验条件下底质和溶液中硝基苯的浓度变化如图 6 所示.

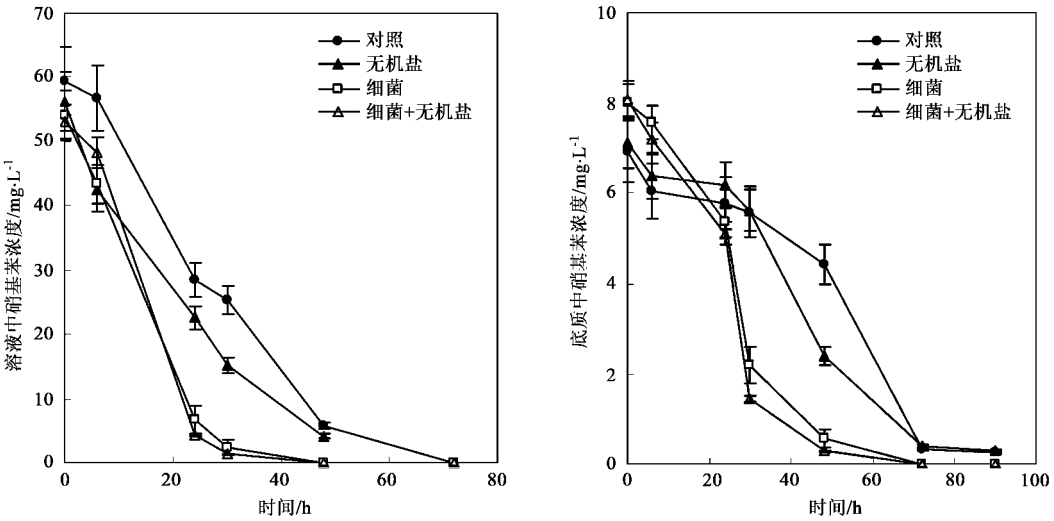


图 6 不同实验条件下底质和溶液中硝基苯的浓度随时间的变化
Fig.6 Temporal profiles of nitrobenzene in the sediments and solutions

由图 6 可知, 在模拟的污染水环境中, 底质中硝基苯初始浓度在 7 ~ 8 mg/kg , 溶液中硝基苯初始浓度在 50 ~ 61 mg/L 之间. 经过 72 h 的降解后, 所进行的 8 组实验中, 溶液和底质中的硝基苯均有大幅的去除. 在投加细菌的 4 组实验中, 溶液中的硝基苯在 24 h 即被去除了 85% 以上, 投加菌液对硝基苯的降解有明显的促进作用, 不投加菌液的实验中, 溶液中的硝基苯在 72 h 左右被去除.

实验中观察到底质中的硝基苯后于溶液中的硝基苯被去除, 在实验进行的 24 h 内, 投加菌液和未投加菌液之间未见较大的去除差异, 但从 30 h 开始可见投加菌液对底质中硝基苯的去除有着显著的强化作用, 实验 40 h 后 90% 以上的硝基苯被去除, 对照实验中底质中硝基苯在 72 h 后仍然有部分残留, 投加营养盐对硝基苯的降解无明显的促进作用.

溶液中的硝基苯在细菌的作用下被降解, 同时有部分挥发, 底质中的硝基苯则不断向溶液中释放, 同时被细菌所降解. 由于现场实验正处于夏季, 水温在 18 ~ 25℃ 之间, 部分硝基苯通过挥发等过程被去除. 另外, 环境中存在的土著微生物也在此温度下发

挥了一定的作用, 故和低温条件下的实验对比, 此时对照实验中硝基苯也有较明显的去除. 尽管如此, 通过本实验可知, 向污染后的水环境中投加一定量的细菌后, 可以有效地加快水体和底质中硝基苯的去除, 从而强化污染环境 中污染物的降解, 特别是污染底质的修复过程.

3 结论

(1) 在常温条件下, 细菌可以在污染河水中较快生长, 对于 100 g 的含有 11.8 mg/kg 硝基苯的污染底质, 投加 2 mL (10^7 cells/mL) 菌液可以在 4 d 完全降解底质中的硝基苯.

(2) 强化修复过程中, 细菌在 5 ~ 35℃ 均可快速降解底质中的硝基苯, 无须投加额外的氮、磷以及其他的营养盐, 说明本实验所用污染底质中含有足够的营养物质.

(3) 在使用河水和底质的现场模拟实验中, 当底质中硝基苯初始浓度在 7 ~ 8 mg/kg , 河水中硝基苯初始浓度在 50 ~ 61 mg/L 之间时, 投加硝基苯降解菌对硝基苯的降解有明显的促进作用, 硝基苯的降解

时间可以缩短 40 h 以上,河水中的硝基苯先于底质中的硝基苯被去除.

参考文献:

[1] 戴友芝,张选军,宋勇. 超声波/纳米铁协同降解氯代苯酚的试验[J].环境污染治理技术与设备,2005,6(11):43-48.

[2] 蒋小欣,阮晓红,邢雅囡,等. 城市重污染河道上覆水氮营养盐浓度及 DO 水平对底质氮释放的影响[J].环境科学,2007,28(1):87-92.

[3] 籍国东,倪晋仁,孙铁珩. 持久性有毒物污染底泥修复技术进展[J].生态学杂志,2004,23(4):118-121.

[4] Lyons T, Ickes J A, Majar V S, *et al.* Evaluation of Contaminant Resuspension Potential during Cap Placement at Two Dissimilar Sites [J]. Journal of Environmental Engineering-ASCE, 2006, 132 (4): 505-515.

[5] Liu C H, Jay J A, Ford T E, *et al.* Evaluation of Environmental Effects on Metal Transport from Capped Contaminated Sediment under Conditions of Submarine Groundwater Discharge[J]. Environmental Science and Technology, 2001, 35(22): 4549-4555.

[6] Simpson S L, Payer I D, Mewburn B R, *et al.* Considerations for Capping Metal-Contaminated Sediments in Dynamic Estuarine Environments[J]. Environmental Science and Technology, 2002, 36 (17): 3772-3778.

[7] Jacobs P H, Rstner U F. Concept of subaqueous capping of

contaminated sediments with active barrier systems using natural and modified zeolites[J]. Water Research, 1999, 33 (9): 2083-2087.

[8] Jouanneau Y, Willison J C, Meryer C, *et al.* Stimulation of Pyrene Mineralization in Freshwater Sediments by Bacterial and Plant Bioaugmentation[J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39 (15): 5729-5735.

[9] Brenner R, Majar V S, Ickes J A, *et al.* Long-Term Recovery of PCB-Contaminated Surface Sediments at the Sangamo-Weston/ Twelvemile Creek/Lake Hartwell Superfund Site[J]. Environmental Science and Technology, 2004, 38(8): 2328-2337.

[10] Pakdeesusuk U, Lee C M, Coats J T, *et al.* Assessment of Natural Attenuation via in Situ Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls in Sediments of the Twelve Mile Creek Arm of Lake Hartwell, SC[J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39 (4): 945-952.

[11] Tang Y J, Carpenter S, Deming J, *et al.* Controlled Release of Nitrate and Sulfate to Enhance Anaerobic Bioremediation of Phenanthrene in Marine Sediments[J]. Environmental Science and Technology, 2005, 39 (9): 3368-3373.

[12] 李轶,胡洪营,吴乾元,等. 低温硝基苯降解菌的筛选及降解特性研究[J].环境科学,2007,28(4):902-907.

[13] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社,1989.424-426.

[14] 蔡邦成,高士祥,肖琳,等. 一株硝基苯高效降解菌的筛选及其降解特性[J]. 环境科学与技术,2003,26(4):1-4.