

反硝化条件下苯生物降解的微环境研究

李东艳 钟佐桑 孔 惠 刘 菲 王艳玲

(中国地质大学水资源与环境工程系, 北京 100083)

摘要: 探讨了厌氧微环境中苯的生物降解. 接种物来自北京郊区的稻田土. 结果表明, 在富集培养和转移培养微环境中, 苯和甲苯的降解与硝酸盐还原作用同时发生. 甲苯比苯更易降解, 甲苯的存在促进了苯的降解. 这是一例反硝化条件下苯能被生物降解的研究.

关键词: 生物降解; 反硝化作用; 苯; 微环境.

中图分类号: P641.73

文献标识码: A

文章编号: 1000-2383(2000)05-0493-05

作者简介: 李东艳, 女, 讲师, 1971 年生, 2000 年毕业于中国地质大学(北京), 获博士学位, 现在焦作工学院从事水污染控制的科研和教学工作.

燃料泄漏是引起地下水污染的主要原因之一. 汽油或柴油中的苯、甲苯、乙苯和二甲苯(简称 BTEX), 因其溶解度高、毒性大而成为治理工作的焦点. 20 世纪 80 年代初至今, 世界各地的科研人员, 特别是在美国和加拿大, 开展了大量有关利用生物降解作用去除地下水系统中的有机污染物的研究. 最初, 研究的重点是好氧条件下的生物降解. 实验室和野外的实验都证明, 好氧条件下微生物可以降解 BTEX^[1,2]. 由于氧易消耗, 不易补充, 地下水污染区多处于微氧或厌氧状态, 近年来的研究重点已转向厌氧条件下 BTEX 生物降解的研究. 研究证明硝酸盐还原、铁还原^[3,4]、硫酸盐还原^[5,6]和产甲烷作用^[7,8]条件下 BTEX 都能被生物降解. 但是反硝化条件下苯是否被降解仍是一个有争议的问题, 有的认为苯不降解^[9~11], 而有的认为苯能降解^[12~14].

美国 EPA 1996 年 10 月颁布的“饮用水标准与健康建议”中仅有两种有充足流行病学证据的人类致癌物, 其中一种是苯, 另一种是氯乙烯, 因此, 苯能否被降解成为地下水生物恢复技术成功与否的关键. 对比厌氧条件下的几种反应, 利用反硝化作用的生物降解技术最具实际意义. 因为(1)反硝化菌为兼性厌氧菌, 不要求严格的厌氧环境;(2)反硝化反应产能高, 仅次于以氧作为电子受体的氧化还原反应;(3)硝酸盐易溶, 把它作为添加电子受体时成本低.

为进一步研究反硝化条件下苯的生物降解, 作者进行了一系列的室内微环境实验. 选定 BTEX 中溶解度、毒性均较大的苯为主要基质, 甲苯为对照基质, 进行厌氧条件下的微环境实验. 探讨苯的可降解性, 以及电子受体浓度、基质浓度、与其他基质共存等因素对苯降解的影响.

1 材料与方法

1.1 接种土壤与地下水

接种土壤取自北京郊区龙王堂村的稻田, 耕作层下 20 cm. 考虑作物生长时土壤长期处于淹水状态, 可能有兼性反硝化菌存在. 地下水取自中国地质大学(北京)一自备井.

1.2 试剂

实验所用苯、甲苯、硝酸钠和硫酸钠均为北京益利精细化学品的分析纯产品.

1.3 实验设计

本实验的目的是评价厌氧反硝化条件下苯是否能被微生物降解; 基质质量浓度、电子受体质量浓度、易降解基质共存等因素对苯生物降解的影响. 基于以上考虑, 分三批进行了 14 组微环境实验, 每组微环境包括 3 个平行样, 具体参数见表 1.

第一批包括 7 组微环境, 分别对应方案的 1~7. 以第 1 组为基础, 改变其他参数, 进行因素对比. 其中第 2 组为生物对照, 加叠氮化钠灭菌, 反映无菌

表 1 微环境组成
Table 1 Constitution of microcosms

方案	m_s/g	V_w/mL	$\rho(\text{苯})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{甲苯})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{NO}_3^-)/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho(\text{SO}_4^{2-})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$n(\text{NaMoO}_4)/\text{mmol}$	$\rho(\text{NaNO}_3)/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
1	20	50	43.93		400			
2	20	50	43.93		400	400		500
3	20	50	43.93	43.35	400			
4	20	50	43.93		400	400		
5	20	50	43.93		400	400	20	
6	20	50	43.93	43.35	400	400		
7	0	60	43.93		400	400		
8	20	50	43.93		100			
9	20	50	43.93		0			
3-1	20	50	58.58		0			
3-2	20	50	58.58		100			
3-3	20	50	14.64		0			
3-4	10 mL 转移基液	50	43.93		200			
3-5	10 mL 转移基液	50	43.93	43.35	500			

注:表中 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 的质量浓度为添加的量,未包括地下水及土壤中的 NO_3^- 和 SO_4^{2-} ; m_s , 土质量; V_w , 水体积。

条件下微环境中非生物作用对苯的影响;第 7 组为化学对照组,不添加土壤,反映未接种条件下化学作用和微生物作用对苯的影响。第 3 和第 6 组添加甲苯,评价甲苯存在对苯降解的影响。第 5 组添加钼酸钠(抑制硫酸盐还原作用),与第 4 和第 1 组对比,评价硫酸根对苯降解的影响。

第二批微环境实验在重复第一批 1~7 组实验的基础上,增加了方案 8 和 9,与第 1 组对比,评价苯质量浓度一定时,电子受体质量浓度不同对苯降解的影响。

第三批微环境实验包括 5 组,分别对应方案 3-1~3-5。3-1 和 3-3 与第二批的第 9 组对比,3-2 和第二批的第 8 组对比,评价电子受体质量浓度相同,苯质量浓度不同对苯降解的影响。3-4 和 3-5 为两组转移培养实验,进一步验证反硝化条件下苯的生物降解。

1.4 微环境建造

(1)实验前将液体培养基(井水)和厌氧箱用高纯氮气充气驱氧 60 h 以上。厌氧箱中的气体通常为氮气、氢气和二氧化碳混合气体(80 : 10 : 10)。本次实验受条件限制,厌氧箱中的气体为高纯氮气。(2)将土样均匀混合,分别称取 20 g 土装入微环境瓶,在厌氧箱中曝气(氮气)2 d。微环境瓶为北京玻璃仪器厂定做的 120 mL 小口玻璃瓶。(3)按设计方案添加电子受体,分装地下水入各微环境瓶。用封盖器将带铝壳及聚四氟乙烯膜的丁基橡胶盖封口。以上操

作在厌氧箱内完成。(4)为操作方便,将微环境瓶从厌氧箱中取出,用惠普 10 μL 微量进样器,按设计方案向微环境中添加苯和甲苯。(5)微环境平置、避光保存于 20 $^{\circ}\text{C}$ 的生化培养箱中。

2 分析测试

2.1 苯与甲苯

苯和甲苯用 Hewlett Packard 6890+ 气相色谱仪分析。采用手动进样方式,用 10 μL 的注射器取 5 μL 的微环境顶空样品。使用火焰离子化检测器(FID),测试条件为:HP-5 毛细管柱(30.0 m $\times$ 320 $\mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$),检测器温度 250 $^{\circ}\text{C}$;进样口温度 200 $^{\circ}\text{C}$,分流模式,分流比 10 : 1;采用恒流程序升温模式,柱流速 1.0 mL/min,起始炉温 70 $^{\circ}\text{C}$,进样后保持 1.5 min,然后以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的梯度升至 150 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min;载气为氮气,流速 30 mL/min。

根据亨利定律,密闭的微环境内溶液中苯和甲苯的含量决定了顶空气体中苯和甲苯的含量。实验中测定顶空气体的苯和甲苯的峰面积,其变化直接反映了水相中苯和甲苯质量浓度的变化。连续监测同一微环境中有机物质量浓度的变化,避免了分批实验中各平行微环境起始状态及变化过程不一致的问题。

分析的相对标准偏差低于 5%。由于是常压大小进样量分析,使得检出限偏高(峰面积 0.5,相当

于水中苯 0.35 mg/L,甲苯 0.3 mg/L),但可以满足本实验的要求.若需降低检出限,增加进样量即可.文献中多采用 500 μ L 的注射器取 300 μ L 的微环境顶空样品的方法,这样检出限可降至 5.8 μ g/L (苯),5 μ g/L (甲苯).

2.2 硝酸根与硫酸根

硝酸根与硫酸根用 Dionex-120 离子色谱仪分析.测试条件为:CDM-3 型电导池, IonPac AS14 分析柱(250 mm $\times$ 4 mm), IonPac AG14 保护柱(50 mm $\times$ 4 mm);淋洗液为 Na₂CO₃-NaHCO₃ (4.375 mmol:1.25 mmol),流速 1.17 mL/min;定量管体积 5 μ L.用注射器自微环境中抽取 2 mL 水样,先用定量滤纸过滤,再通过滤膜进样.

3 结果与讨论

3.1 反硝化条件下苯的生物降解

由于对苯和甲苯生物降解的滞后期估计错误,第一批微环境第二次分析时,除第 2 和第 7 两个对照组外,其他各微环境中苯和甲苯已很低或检不出,初步说明厌氧条件下苯和甲苯能被迅速降解(结果未列出).在此基础上进行的第二批微环境实验(结果见图 1 中的 2-1~2-9,分别以 B 和 T 表示苯和甲苯),进一步验证了反硝化条件下苯和甲苯能被微生物降解.苯全部被降解的时间除第 3 组与第 6 组为 7 d 外,其他组均在 7 d 以上,第 13 天实验结束时第 1、第 8 和第 9 组个别微环境中还有 4 mg/L 左右的苯未被降解.

总的来说,微环境实验中苯降解的滞后期短,降解速率快,可能是因为稻田在水稻生长期处于淹水状态,并且受施肥的影响,硝酸根的含量较高,反硝化菌已被驯化.在微环境中微生物很快适应了含苯和甲苯的环境,可以将苯作为碳源和能源.

3.2 甲苯存在对苯降解的影响

关于其他基质存在时 BTEX 化合物的生物降解,有许多不同的说法. Arin 于 1989 年发现,好氧条件下甲苯或邻一二甲苯的存在促进苯的降解;但甲苯、邻一二甲苯、苯三者共存时,苯的降解却受到抑制,未报道甲苯、邻一二甲苯的降解情况.许多研究者认为在含水层系统中,甲苯比苯易降解,但 Davis 和 Verheul 的研究得出了相反的结论(据文献[15]).

如图 1 所示,第二批第 3 和第 6 组及第三批第 5 组与其他组的对比表明,甲苯比苯易降解,不存在

滞后期(第一次分析时甲苯浓度已降低,按标准曲线,甲苯的起始峰面积平均值为 70),甲苯的存在促进了苯的降解.第二批第 3 和第 6 组中各微环境苯的滞后期均为 2 d;而其他微环境中苯的滞后期为 3~4 d.

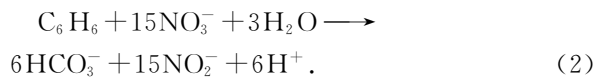
3.3 转移培养实验

第三批微环境实验的 3~4 和 3~5 组为转移培养实验,转移基液分别来自第二批的第 1 和第 3 组,结果如图 1 所示.转移培养微环境中苯和甲苯都不存在滞后期,原因是反硝化菌已被驯化.苯和甲苯未被全部消耗不是因为硝酸根含量不足,最可能的原因是未进行土壤接种,缺乏细菌生长的微量营养物质.

3.4 生物降解的电子受体及其与基质的比例

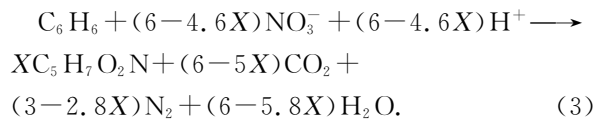
分析微环境实验始末硝酸根和硫酸根的含量,可算得实验过程中硝酸根的消耗量(结果见表 2).因硫酸根质量浓度变化甚微,数据未列出.第二批第 5 组添加了钼酸钠,抑制硫酸盐还原作用的进行,与第 4 组的结果无明显差别,说明实验条件下 SO₄²⁻未被当作电子受体.据此,可以认为苯降解过程中是以硝酸根为电子受体的.

已有的资料还不足以进行物料衡算.反硝化条件下的生物降解反应中,硝酸根是被还原成 NO₂⁻还是 N₂,是决定电子受体与有机基质比例的一个因素.不考虑细胞生长时,硝酸根被还原的反应式为:



(1)式中电子受体与基质(苯,简记为 B)之比 $m(NO_3^-)/m(B)$ (质量)为 4.77,硝酸根被还原成 NO₂⁻时 $m(NO_3^-)/m(B)$ 为 11.92.

考虑细胞生长时,细菌利用苯中的碳的数量不同,反应式就不同.设微生物合成细胞利用苯中 X 个碳,其反应的通式为:



目前,还没有有效的方法来确定反应式中的 X 值. X 值不同,相应地电子受体与有机基质之比也就不同.比如 X 为 0.2 时, $m(NO_3^-)/m(B)$ 为 4.04; X 为 0.6 时, $m(NO_3^-)/m(B)$ 为 2.57.本次微环境实验中,硝酸根与苯的消耗量之比为 2~3,与其他研究者的实验结果相比,此值偏低^[13].微生物的生长繁殖是一个复杂的代谢过程,目前对此问题的研

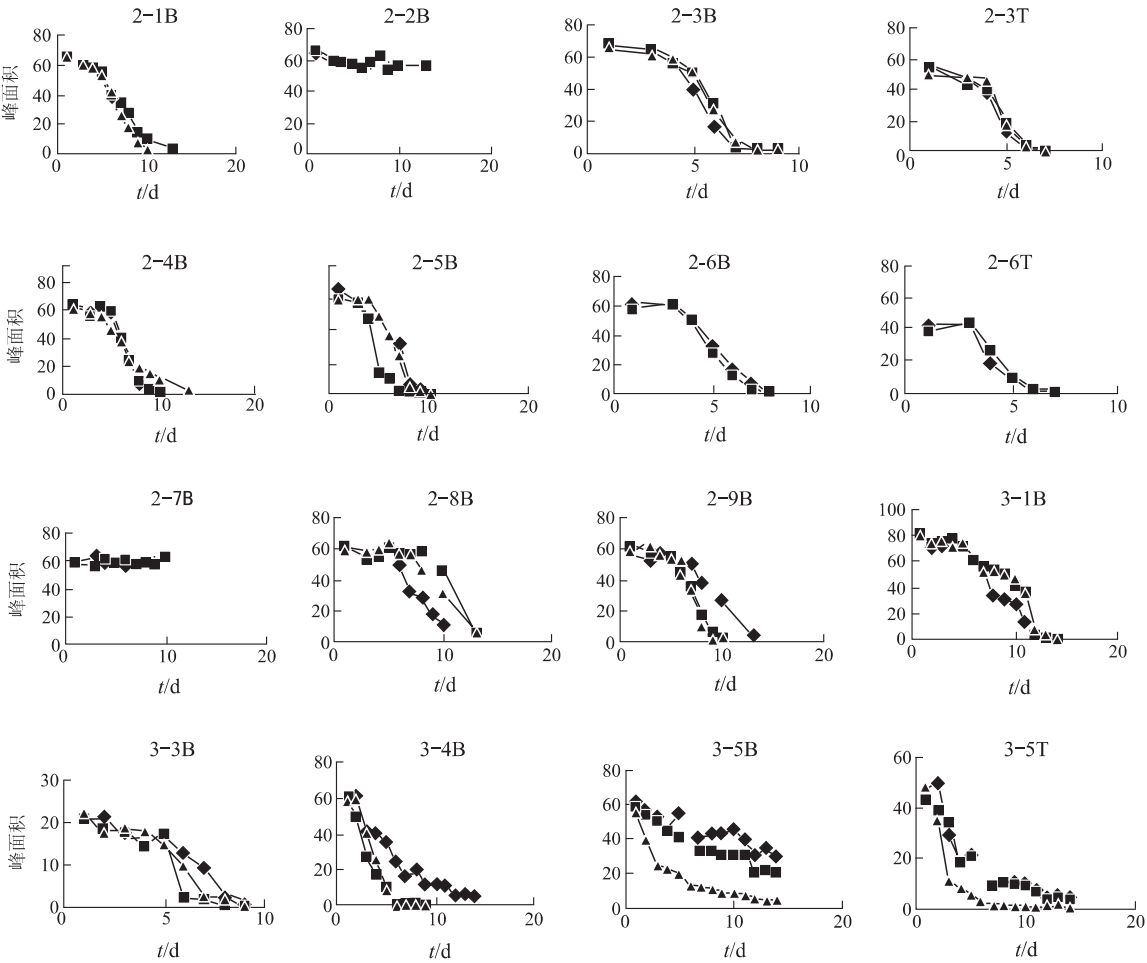


图 1 微环境中苯和甲苯的降解

Fig. 1 Benzene and toluene degradation in microcosms

2—1B. 第二批实验方案 1 苯的降解; 2—6T. 第二批实验方案 6 甲苯的降解

表 2 微环境中硝酸根的消耗量

Table 2 Reduction of nitrate in microcosms

	mg/L							
	1	2	3	4	5	6	7	8
第二批	118.00	0.00	174.90	116.00	124.50	173.00	44.49	133.10
第三批	94.41	122.90	78.57	39.49	74.47			93.65

究还很不成熟,有待于进行深入的研 究.利用反硝化作用就地治理地下水有机污染时,准确估计降解污 染物所需的电子受体量尤为重要.因为,硝酸根的量 不足,会影响生物降解速率;而添加过量的硝酸根, 又会导致地下水的氮污染.

基于以上分析,认为在富集培养和转移培养微 环境中,苯和甲苯的降解与硝酸盐还原作用同时发 生.甲苯比苯更易降解,甲苯的存在促进了苯的降 解.富集培养中,甲苯不存在滞后期,苯的滞后期为 3 ~4 d;转移培养微环境中,甲苯和苯的降解都不存在

滞后期.本研究表明反硝化条件下苯能被生物降解, 为反硝化条件下治理地下水有机污染补充了依据.

参考文献:

[1] Wilson J T, McNabb J F, Wilson B H, et al. Biotrans-
formation of selected organic pollutants in ground water
[J]. Dev Ind Microbiol, 1983, 24: 225~23.
[2] Song H G, Bartha R. Bioremediation potential of terres-
trial fuel spills [J]. Applied Environ Microbiol, 1990,
56: 652~656.
[3] Lovley D R, Woodward J C, Chapelle F H. Rapid anae-

- robic benzene oxidation with a variety of chelated Fe (III) forms [J]. *Applied Environ Microbiol*, 1996, 62: 288~291.
- [4] Anderson R T, Rooney-Varga J N, Gaw C V, et al. Anaerobic benzene oxidation in the Fe (III) reduction zone of petroleum-contaminated aquifers [J]. *Environ Sci Technol*, 1988, 32: 1222~1229.
- [5] Edwards E A, Grbic-Galic D. Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions [J]. *Applied Environ Microbiol*, 1992, 58: 2663~2666.
- [6] Weiner J M, Lovley D R. Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidizing enrichment [J]. *Applied Environ Microbiol*, 1998, 64: 775~778.
- [7] Edwards E A, Grbic-Galic D. Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium [J]. *Applied Environ Microbiol*, 1994, 60: 313~322.
- [8] Weiner J M, Lovley D R. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer [J]. *Applied Environ Microbiol*, 1998, 64: 1937~1939.
- [9] Kuhn E P, Zeyer J, Eicher P, et al. Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns [J]. *Applied Environ Microbiol*, 1988, 54: 490~496.
- [10] Lovley D R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, 18: 75~81.
- [11] Alvarez P J J, Vogel T M. Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous microorganisms under nitrate reducing conditions [J]. *Wat Sci Technol*, 1995, 31: 15~28.
- [12] Major D W, Mayfield C L, Barker J F. Biotransformation of benzene by denitrification in aquifer sand [J]. *Ground Water*, 1988, 26: 8~14.
- [13] Burland S M, Edwards E A. Anaerobic benzene biodegradation linked nitrate reduction [J]. *Applied Environ Microbiol*, 1999, 65: 529~533.
- [14] 吴玉成, 钟佐荣, 张建立. 反硝化条件下微生物降解地下水中的苯和甲苯[J]. *中国环境科学*, 1999, 19: 505~509.
- [15] Alvarez P J J, Timothy M V. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries [J]. *Applied Environ Microbiol*, 1991, 57: 2981~2985.

MICROCOSM STUDY OF BENZENE DEGRADATION ON NITRATE REDUCING CONDITIONS

Li Dongyan Zhong Zuoshen Kong Hui Liu Fei Wang Yanling

(Department of Water Resources and Environmental Engineering, China University of Geosciences, Beijing 100083, China)

Abstract: This paper discusses the biodegradation of benzene in anaerobic microcosms. The incubators were from the suburban rice soil. The results indicate that benzene and toluene degradation occurred concomitantly with nitrate reduction in enrichment and transfer cultures. Toluene was degraded more readily than benzene, and benzene degradation was enhanced by the presence of toluene. This is an instance of benzene degradation on nitrate reducing conditions.

Key words: biodegradation; nitrate reduction; benzene; microcosm.

甘肃永靖县盐锅峡早白垩世恐龙足迹的新发现

李大庆¹ 杜远生² 龚淑云²

(1. 甘肃省地勘局地勘院古生物中心, 兰州 730050; 2. 中国地质大学地球科学学院, 武汉 430074)

恐龙活动的遗迹(足迹等)和遗物(恐龙蛋和粪化石等)与恐龙骨骼一样是恐龙活动的直接证据, 被认为是恐龙化石系列的珍品. 由于我国陆相中生界发育, 保存的恐龙骨骼、遗迹、遗物化石丰富, 因此恐龙骨骼及其遗迹化石的研究在世界上占有重要的地位, 取得了丰硕的研究成果. 我国恐龙足迹化石研究始于 1929 年, T. De. Chardin 等^[1]首次报道了陕西神木发现的恐龙足迹化石. 之后, 杨钟健(Young)^[2~5]先后对四川广元、陕西铜川、河北滦平、云南西双版纳等地的恐龙足迹进行了研究; 赵资奎^[6]研究了河南内乡的恐龙蛋和恐龙足迹. 20 世纪 90 年代以来, You 等^[7]研究了河北滦平的恐龙足迹

甘肃兰州、永靖一带白垩纪陆相地层广泛分布, 其和日格等^[14]曾经报道李长安等在兰州市红古区发现 8 个三趾型的恐龙足迹. 今年初, 笔者在永靖县盐锅峡镇老虎口一带发现了恐龙足迹化石, 经初步发掘发现 3 大类 5 组 40 多个恐龙脚印化石(见图 1a). 第 1 类足迹(第 1 组)呈椭圆型, 见有明显的趾印痕迹(见图 1b). 其后脚脚印最大达 110 cm×85 cm, 前脚脚印 80 cm×67 cm. 第 2 类(第 2 组)足迹后脚脚印呈截锥状, 70 cm×60 cm 大小, 前脚脚印为半圆状, 49 cm×40 cm 大小. 这两类脚印深 10~25 cm 不等. 第 3 类足迹(第 3~5 组)为三趾型, Ⅲ趾 22~24 cm, 不同组的脚印 Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ趾之间的夹

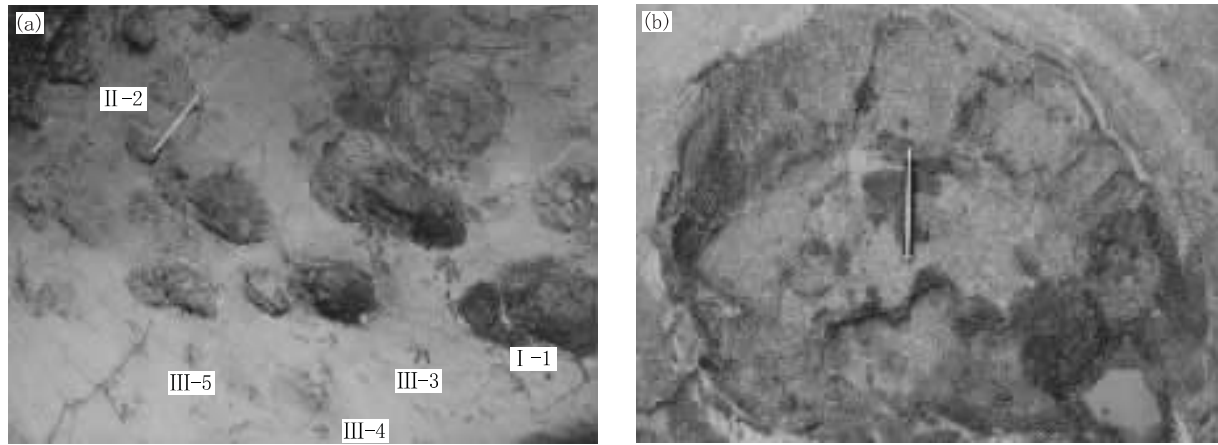


图 1 甘肃永靖县早白垩世恐龙足迹化石

Fig. 1 Dinosaur footprint of Early Cretaceous in Yongjin County, Gansu Province

a. 恐龙足迹: I—1. 第 1 类第 1 组足迹; II—2. 第 2 类第 2 组足迹; III—3, III—4, III—5. 第 3 类第 3, 4, 5 组足迹; 图中直尺长 1.0 m. b. 第 1 类足迹前脚脚趾痕, 图中钢笔长 13 cm

化石; 韩兆宽等^[8]总结了四川盆地的恐龙足印化石; 余心起等^[9]研究了安徽黄山地区的恐龙足迹. Young^[10]、Zhen 等^[11, 12]、汪筱林^[13]先后对中国的恐龙足迹进行了系统总结.

角 30°~55°不等. 除此之外, 还发现有恐龙行进中尾巴拖地的痕迹, 以及 10 cm×10 cm 的圆形凹痕, 可能为恐龙的粪化石. 该足迹化石组合无论从化石的类别、还是脚印的规模都是罕见的.

足迹化石产出于下白垩统河口群, 含恐龙足迹 (下转 525 页)