

混合菌构建及其对硝基苯直接好氧生物降解

王 竞*, 王 静, 郑春莉, 周集体, 吕 红, 曲媛媛

(大连理工大学 环境与生命学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 选取本实验室分离的 3 株硝基苯高效降解菌——*Rhodotorula mucilaginosa* Z1、*Streptomyces albidoflavus* Z2 和 *Micrococcus luteus* Z3, 将其混合并进行正交实验, 得出 Z1、Z2、Z3 的最佳配比为 1:3:3, 在此基础上构建了混合菌. 与单菌相比, 混合菌能够在较为苛刻的环境条件下降解硝基苯, 并具有较宽的底物范围. 同时结合实际硝基苯工业废水特点, 考察了混合菌在高盐度下以及苯酚或苯胺和硝基苯共存时对硝基苯的降解. 结果表明: 混合菌具备较强的耐盐能力, 可在 5% 的高盐 (NaCl) 条件下有效降解硝基苯; 当苯酚或苯胺和硝基苯 (200 mg/L) 共存, 初始浓度分别为 100 和 50 mg/L 时, 混合菌对硝基苯的降解不受影响.

关键词: 硝基苯; 盐度; 苯酚; 苯胺; 好氧生物降解

中图分类号: X172 **文献标志码:** A

0 引言

硝基苯作为有机合成工业的重要原料, 用于医药、染料、塑料以及炸药的生产中^[1,2], 其广泛应用导致环境污染. 据估计每年全世界大约有 1 万吨以上的硝基苯排入环境^[3]. 2005 年 11 月中国松花江环境污染事件的主要污染物之一为硝基苯. 硝基苯危害人们的健康, 可引起高铁血红蛋白血症、溶血和肝损害^[4]. 在许多国家, 硝基苯被列入环境优先控制污染物的黑名单^[5].

硝基苯污染废水的治理方法主要有物化法和生物法. 物化法有吸附法、萃取法、臭氧氧化法、过氧化氢氧化法等. 与物化法相比, 生物法具有投资少且不易产生二次污染等优点^[6], 因此生物法已成为处理硝基苯废水较为理想的方法. 硝基苯实际废水中主要含有硝基苯、苯胺、苯酚等有机物质以及无机盐, 这些物质的存在对生物处理有明显的抑制作用^[7]. 而微生物在高盐度下以及与苯酚或苯胺共存时对硝基苯降解的研究少有报道.

本文选取本实验室保藏的 3 株硝基苯高效降解菌, 通过正交实验得出 3 株菌混合的最佳配比, 并考察混合菌的适宜降解条件、在高盐度以及与

苯酚或苯胺共存时对硝基苯的降解, 以期为其在硝基苯废水生物强化处理中的应用提供依据.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本实验室保藏的 3 株硝基苯高效降解菌 (以下简称 Z1、Z2 和 Z3, 见表 1) 均能在好氧条件下以硝基苯为唯一碳、氮源.

表 1 三株硝基苯降解菌

Tab. 1 Three strains to degrade nitrobenzene

菌株名称	GenBank 登录号	专利菌种保藏号
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Z1	DQ778627	CGMCC No. 1758
<i>Streptomyces albidoflavus</i> Z2	DQ855477	CGMCC No. 1759
<i>Micrococcus luteus</i> Z3	DQ855476	CGMCC No. 1760

1.2 培养基

无机盐培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, 柠檬酸铁 0.002 g/L, pH 7.0.

固体斜面培养基: 在无机盐培养基中加入 2% 琼脂和 100 mg/L 硝基苯.

1.3 微生物对硝基苯最大耐受浓度的测定

在无机盐培养基中,加入 2%的琼脂,以硝基苯(100~1 800 mg/L)为唯一碳、氮源铺平板,观察菌体在无机盐平板上的生长情况.

1.4 混合菌对不同碳源的利用

在无机盐培养基中,以芳香化合物(20~100 mg/L)为唯一碳源,在最佳降解条件下,考察混合菌对芳香化合物的降解情况.

1.5 混合菌在高盐度下以及与苯酚或苯胺共存时对硝基苯的降解

在无机盐培养基中,加入 2%~10% NaCl 和 200 mg/L 硝基苯,在最佳降解条件下,考察盐度对硝基苯降解的影响.

在无机盐培养基中,加入 50~200 mg/L 苯酚和 200 mg/L 硝基苯,在最佳降解条件下,考察苯酚对硝基苯降解的影响.

在无机盐培养基中,加入 25~100 mg/L 苯胺和 200 mg/L 硝基苯,在最佳降解条件下,考察苯胺对硝基苯降解的影响.

1.6 分析方法

1.6.1 总有机碳(TOC)测定 采用 TOC-5000 分析仪(Shimadzu, 日本),测量方法见文献[8].

1.6.2 硝基苯浓度测定 采用高效液相色谱(美国 Agilent 公司 Agilent 1100). 色谱条件:色谱柱,XDB-C₁₈(4.6 mm×150 mm,5 μm, Agilent 公司);流动相,V(甲醇):V(水):V(醋酸)=70:29:1;流速,0.9 mL/min;UV 检测,268 nm;柱温,20℃;进样,20 μL.

1.6.3 其他有机物浓度测定 采用 JASCOV-560 紫外-可见分光光度计测定.

2 结果与讨论

2.1 正交实验优化菌种配比

在无机盐培养基中以不同的比例加入 3 株单菌,总菌量(以干质量计)为 10 mg/L,按照正交表(表 2)安排实验,以硝基苯的比降解速率 $q(h^{-1})$ 为指标,确定 Z1、Z2、Z3 的最佳配比,每一条件下均进行 3 次重复实验,对测定结果进行统计分析.

由表 2 可知,Z1 是影响硝基苯比降解速率的最关键因素,其次为 Z3、Z2. 该实验结果与方差分析结果一致(见表 3).

可得 Z1、Z2、Z3 的最佳配比为 1:3:3.

表 2 正交实验结果

Tab. 2 Results of orthogonal experiments

试验	因素			q/h^{-1}
	Z1	Z2	Z3	
1	1	1	1	0.929
2	1	2	2	1.004
3	1	3	3	1.200
4	2	2	3	0.931
5	2	3	1	0.812
6	2	1	2	0.763
7	3	3	2	0.712
8	3	1	3	0.670
9	3	2	1	0.620
k_1	3.132	2.361	2.361	
k_2	2.505	2.556	2.478	
k_3	2.001	2.742	2.802	
优水平	1	3	3	
K_1	1.044	0.787	0.787	
K_2	0.835	0.852	0.826	
K_3	0.667	0.908	0.934	
R	0.337	0.121	0.147	
主次顺序	Z1	Z3	Z2	

表 3 正交实验方差分析

Tab. 3 Variance analysis to the orthogonal experiments

因素	df	ss	s^2	F	$F_{0.01}$
Z3	2	0.214	0.107	107.000	99.000
Z2	2	0.022	0.011	11.000	99.000
Z1	2	0.036	0.018	18.000	99.000
误差	2	0.002	0.001		
总变异		0.274			

2.2 混合菌与 3 株单菌降解特性的比较

表 4 比较了混合菌和 3 株单菌的降解特性. 与单菌相比,在硝基苯初始浓度为 200 mg/L 的条件下,混合菌可在较为苛刻的环境条件下降解硝基苯,并且混合菌对硝基苯的最大耐受浓度提高.

2.3 混合菌生长曲线

图 1 显示了硝基苯(NB)初始浓度为 200 mg/L 时,在最佳降解条件下混合菌的生长曲线(ρ_s 为菌体干质量). 由图可见,36 h 混合菌对硝基苯的降解率为 98.8%,TOC 去除率为 99.2%,表明硝基苯最终矿化为二氧化碳和水.

表 4 混合菌与 3 株单菌降解特性的比较

Tab. 4 The comparison of degrading characteristics between the consortium and pure strains

菌群	温度/℃	pH	转速/(r·min ⁻¹)	接种量/(mg·L ⁻¹)	降解时间/h	TOC 去除率/%	最大耐受浓度/(mg·L ⁻¹)
Z1	20~40	5.0~9.0	180	9	60	98.62	450
Z2	25~35	6.0~9.0	150	12	72	98.69	400
Z3	20~35	6.0~9.5	150	9	120	99.13	250
混合菌	15~40	4.0~10.0	150	10	36	99.20	1 500
混合菌 ¹⁾	30	7.0	150	10			

注:1)为最佳降解条件

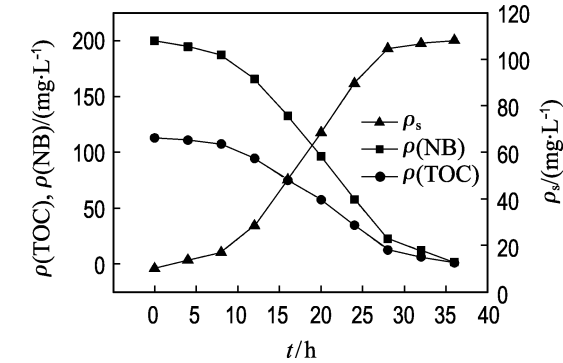


图 1 混合菌生长曲线

Fig. 1 The growth curves of the consortium

2.4 混合菌对不同碳源的利用

如表 5 所示,与单菌相比,混合菌具有更宽的

表 5 混合菌对不同碳源的利用

Tab. 5 The utilization of various carbon sources by the consortium

唯一碳源	混合菌	Z1	Z2	Z3
硝基苯	+	+	+	+
苯胺	+	—	—	—
N,N-二甲基苯胺	+	—	—	—
邻氯苯胺	+	—	—	—
氯苯	—	—	—	—
甲苯	+	—	—	—
二甲苯	+	—	—	—
邻硝基苯甲酸	+	+	—	—
对硝基苯甲酸	+	—	—	—
水杨酸	+	+	+	+
吡啶甲酸	+	+	+	—
6-羟基吡啶甲酸	+	+	+	—
3-羟基吡啶甲酸	—	—	—	—
苯酚	+	+	+	—
对苯二酚	—	—	—	—
邻氨基酚	+	—	+	—
间氨基酚	+	—	—	—
对氨基酚	+	—	—	—
萘	—	—	—	—
菲	—	—	—	—
8-羟基喹啉	—	—	—	—
四氢呋喃	+	—	—	—

注: + 表示生长; — 表示不生长

底物范围,这可能是微生物之间的相互作用使得混合菌能够利用更多的有机物质^[9,10].

2.5 初始浓度对硝基苯降解的影响

图 2 和 3 分别显示了不同初始浓度下混合菌对硝基苯的降解和生长量. 由图 2 可见,随着硝基苯初始浓度的增加,混合菌完全降解硝基苯的时间延长,当硝基苯初始浓度为 600 mg/L 时,60 h 降解率为 44.45%,延长至 120 h,几乎完全降解. 由图 3 可见,随着硝基苯初始浓度的增加,混合菌生长量增加,当初始浓度≥400 mg/L 时,混合菌

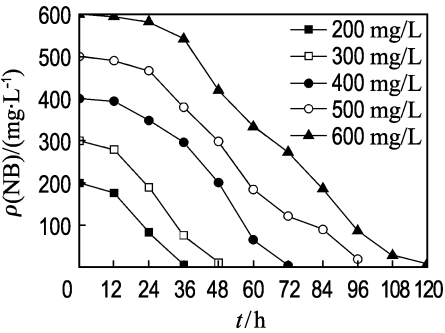


图 2 初始浓度对硝基苯降解的影响

Fig. 2 The degradation of nitrobenzene by the consortium at different initial concentrations

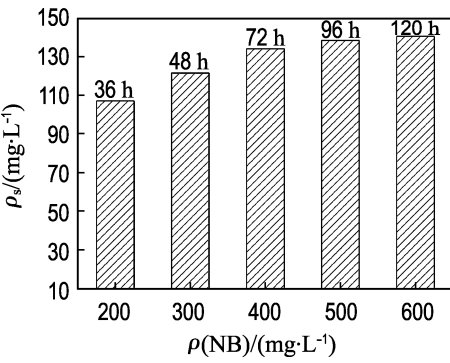


图 3 初始浓度对混合菌生长的影响

Fig. 3 The growth of the consortium at different initial concentrations

生长量增加不大,与初始浓度为 400 mg/L 时的菌量相比,当硝基苯的降解率达到 98% 时,混合菌在初始浓度为 500 和 600 mg/L 时的菌量分别增长了 3.15% 和 4.68%。

2.6 混合菌在高盐度下对硝基苯的降解

通常,盐度(一般以 NaCl 质量分数计)超过 3% 的废水难于用常规的生化法处理^[11]。图 4 显示在最佳降解条件下硝基苯初始浓度为 200 mg/L 时,盐度为 2%,混合菌对硝基苯的降解不受影响;盐度为 3% 和 5% 时,混合菌对硝基苯的降解率分别在 84 h 和 106 h 达到 97.08% 和 90.80%;当盐度为 7% 和 10% 时,硝基苯的降解率明显下降,但将降解时间均延长至 120 h,硝基苯的降解率仍可达 47.15% 和 26.55%。由此可见,混合菌具有较强的耐盐性,可在盐度≤5% 的条件下有效降解硝基苯。

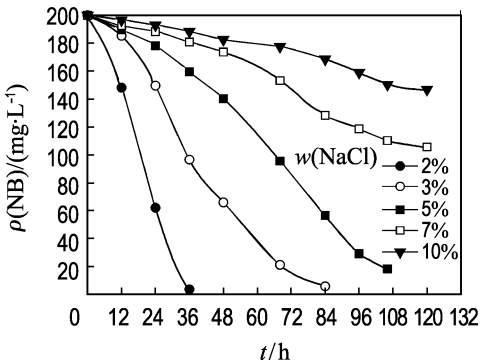


图 4 混合菌在高盐度下对硝基苯的降解

Fig. 4 The degradation of nitrobenzene by the consortium in high salinity

2.7 混合菌在苯酚或苯胺与硝基苯共存时对硝基苯的降解

图 5 和 6 分别显示了在最佳降解条件下硝基苯初始浓度为 200 mg/L 时,苯酚和苯胺存在时硝基苯的降解。当苯酚浓度 $\rho(\text{phenol}) \leq 100 \text{ mg/L}$ 时,混合菌对硝基苯的降解不受影响,当苯酚浓度为 150 mg/L 时,硝基苯的降解受到抑制,36 h 硝基苯降解率为 56.64%。当苯胺浓度 $\rho(\text{NA}) \geq 75 \text{ mg/L}$ 时,混合菌的降解活性显著下降,36 h 硝基苯降解率为 32.56%。

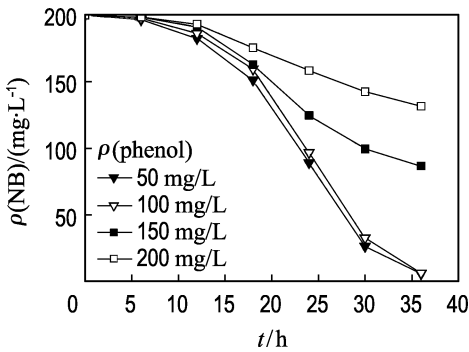


图 5 混合菌在苯酚存在下对硝基苯的降解

Fig. 5 The degradation of nitrobenzene by the consortium in the presence of phenol

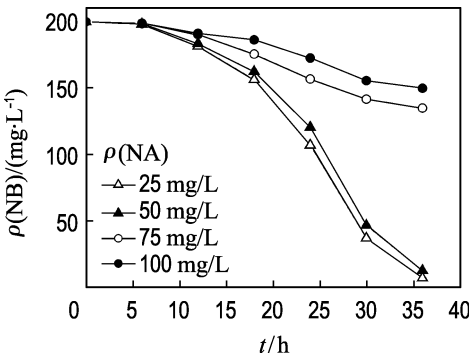


图 6 混合菌在苯胺存在下对硝基苯的降解

Fig. 6 The degradation of nitrobenzene by the consortium in the presence of aniline

3 结 论

通过正交实验得出 3 株硝基苯高效降解菌 Z1、Z2 和 Z3 混合的最佳配比为 1 : 3 : 3,在此基础上构建了混合菌。混合菌降解硝基苯的最佳降解条件为 30 ℃,pH 7.0,150 r/min,接种量(干质量)10 mg/L。与 3 株单菌相比,混合菌能够在较为苛刻的条件下降解硝基苯,并且具有较宽的底物范围。混合菌可在 5% 的高盐条件下有效降解硝基苯。当苯酚或苯胺和硝基苯(200 mg/L)共存,苯酚和苯胺的初始浓度分别为 100 mg/L 和 50 mg/L 时,混合菌对硝基苯的降解不受影响。上述实验结果表明混合菌具有较好的工业应用前景。

参考文献:

- [1] BARTHAR O Y. Removal of nitrobenzene vapors by a tricking air biofilter [J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 1997, **18**(2): 293-296
- [2] CHAUHAN A, JAIN P K. Degradation of o-nitrobenzoate via anthranilic acid(o-aminobenzoate) by *Arthrobacter protophormiae*:A plasmid-encoded new pathway [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2000, **267**(1):236-244
- [3] HAIGLER B E, SPAIN J C. Biotransformation of nitrobenzene by bacteria containing toluene degradative pathways [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1991, **57**(11):3156-3161
- [4] 刘伟卿,许国根. “松花江污染事件”的软毁伤效应[J]. 江苏环境科技, 2006, **19**(2):152-154
- [5] 李明堂,徐镜波,盛连喜. 硝基苯好氧降解细菌的筛选和降解活性研究[J]. 吉林大学学报, 2006, **28**(50):552-555
- [6] 陈 萍,邱 瑾. 国内硝基苯废水治理研究进展[J]. 贵州化工, 2004, **29**(2):30-34
- [7] 姚 方,徐天有,吕延文,等. 含硝基苯及其衍生物染料废水的处理[J]. 工业水处理, 2003, **23**(6):18-20
- [8] WU Z, WANG P. The determination and application of total organic carbon (TOC) in the environmental monitoring [J]. **Marine Environmental Science**, 1995, **14**(1):44-49
- [9] MORI Y. Characterization of a symbiotic coculture of *Clostridium thermohydrosulfuricum* YM3 and *Clostridium thermocellum* YM4 [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1990, **56**(1):37-42
- [10] MURRAY W D. Symbiotic relationship of *Bacteroides cellulosolvens* and *Clostridium soccharolyticum* in cellulose fermentation [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1986, **51**(4):710-714
- [11] WOOLARD C R, RVINE R L. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor [J]. **Elsevier Science**, 1995, **29**(4): 1159-1168

Construction of microbial consortium and its directly aerobic biodegradation of nitrobenzene

WANG Jing*, WANG Jing, ZHENG Chun-li, ZHOU Ji-ti, LÜ Hong, QU Yuan-yuan

(School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Three effective nitrobenzene degrading strains, *Rhodotorula mucilaginosa* Z1, *Streptomyces albidoflavus* Z2 and *Micrococcus luteus* Z3 were isolated and identified. A defined microbial consortium was constructed through orthogonal experiments by using Z1, Z2 and Z3. The optimal ratio of Z1 to Z2 to Z3 is 1 : 3 : 3. Compared with pure strains, the consortium can degrade nitrobenzene under severe conditions and has a wider substrates range. Considering the characteristics of actual nitrobenzene wastewater, nitrobenzene degradation was investigated by the consortium under high salinity, as well as phenol or aniline co-existence with nitrobenzene. The consortium can degrade nitrobenzene effectively in high salinity of 5% (NaCl). The degradation of nitrobenzene (200 mg/L) by the consortium is not influenced in the presence of 100 mg/L phenol or 50 mg/L aniline.

Key words: nitrobenzene; salinity; phenol; aniline; aerobic biodegradation