

# 土壤微生物对苯乙烯的降解

叶定一 曹幼琴

(南京大学)

## 摘 要

本文用实验室模拟的方法研究了苯乙烯在江苏常州大通河灌区水田、旱地中的微生物降解。

实验表明, 30°C 条件下苯乙烯在上述两种农田中均能被土壤微生物降解, 其降解动力学均符合一级反应方程。在统计学基础上对二者的降解速率常数进行了比较, 经检验, 确有差异, 旱地中微生物降解速率常数约为水田中的 6.7 倍。

与三种氯代苯共存时, 苯乙烯在水田中的微生物降解速率常数约为单独存在时的 1.5 倍。

作者用土壤环流的方法从供试土壤中分离、鉴定了 4 株以苯乙烯为唯一碳源的细菌, 经试验, 均具降解苯乙烯能力。进一步确证了土壤微生物可以降解苯乙烯。

苯乙烯为有毒化学物质。含苯乙烯的工业废水排放后, 其中的苯乙烯在环境中的归宿主要是土壤。苯乙烯对光、热及其他化学因子稳定, 在环境中不会自行分解, 也不易化学降解, 故进入土壤后, 微生物降解与否, 速率如何, 是其在环境中停留期长短的主要因素。因此, 研究土壤微生物对苯乙烯的降解, 有助于弄清苯乙烯在土壤中的迁移转化规律, 以便改进含苯乙烯的工业废水排放并挖掘土壤的净化潜力。

Sielicki<sup>[10]</sup> 等 1978 年用实验室模拟的方法研究过苯乙烯在 California 旱地土壤中的微生物降解, 并进行了混合菌降解苯乙烯实验。至于苯乙烯在水田土壤中的微生物降解, 以及纯培养微生物对苯乙烯的降解, 尚未见报道过。

本文报道用实验室模拟的方法试验苯乙烯在水田、旱地土壤中的微生物降解, 以及从该土壤中分离的纯培养微生物对苯乙烯的降解。

## 一、材料和方法

### (一) 供试土壤

取自江苏常州市郊大通河灌区的黄泥土<sup>1)</sup>。土壤有机质 2.25%; 全氮 0.129%; 全磷 0.143% 砂粒 14.7%; 粉粒 47.1%; 粘粒 38.2%; pH 6.5。

### (二) 降解实验

1. 土壤降解 水田<sup>[9]</sup>: 土样风干后过 1 毫米筛, 称 10 克土于 18×150 毫米试管。对照组 20 磅 1 小时灭菌, 连续 3 天。无菌操作加入 8 毫克/毫升的苯乙烯-丙酮溶液 1 毫升, 加样后土壤中苯乙烯浓

1) 土壤理化数据承南京大学赵培道老师提供。

度为 800 ppm (含苯乙烯、氯苯、对-二氯苯、间-二氯苯等各组份均为 800 ppm)。待丙酮挥发后将土样彻底混匀,加无菌水 10 毫升, 30°C 黑暗条件下培养。定期取样,每次实验、对照各 3 个重复。

旱地: 10 克土壤置于 100 毫升锥形瓶,调节土壤水份约为 30%,其他均与水田试样相同。

2. 纯菌降解 用土壤环流<sup>[4]</sup>的方法筛选到以苯乙烯为唯一碳源的细菌后反复划线纯化。接种纯菌至种子培养基(肉汁胨培养基<sup>[11]</sup>)扩大培养,离心取对数期菌, pH 7.2 磷酸缓冲液洗涤两次,制成  $8 \times 10^7$  个/毫升的菌悬液。

500 毫升具塞锥形瓶,内装 45 毫升芳香烃分解细菌培养基<sup>[4]</sup>,实验组每瓶加 4 毫升菌悬液,对照组每瓶加 4 毫升 pH 7.2 磷酸缓冲液。加入 2.5 毫克/毫升的苯乙烯-丙酮溶液 1 毫升,加样后瓶中苯乙烯浓度为 50 ppm。待丙酮挥发后加磨口塞,外复牛皮纸,30°C 黑暗条件下置往复式摇床振荡培养。频率 120 次/分,振幅 65 毫米。定期取样,每次实验、对照各 3 个重复。

### (三) 苯乙烯的检测方法

土壤降解试样: 用 10 毫升蒸馏水将渍水土壤转移到 100 毫升具塞锥形瓶内。旱地试样则直接加少许蒸馏水使成糊状。用吸管加入 20 毫升乙醇-石油醚溶液振荡提取,取有机相若干供测试。

纯菌降解试样: 每瓶加 10 毫升石油醚,振荡提取,取有机相若干供测试。

苯乙烯含量测定及残留率计算: 气相色谱法测定残留量。苯乙烯含量以峰高计算。每个试样测 2—3 次,取均值为该试样峰高,以 3 个重复试样的峰高均值为实验(对照)组苯乙烯峰高。

$$\text{残留率} = \frac{\text{实验组苯乙烯峰高}}{\text{对照组苯乙烯峰高}} \times 100\%$$

$$\text{去除率} = 1 - \text{残留率}。$$

## 二、实验结果和讨论

### (一) 单一苯乙烯组份在土壤中的微生物降解

苯乙烯在实验室模拟的水田、旱地土壤中微生物降解结果见图 1。

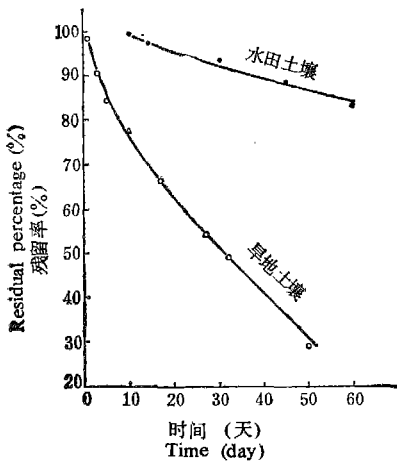


图 1 土壤微生物对苯乙烯的降解(30°C, 为:

除苯乙烯外,土壤中无其他化合物)

Fig. 1 Degradation of styrene by soil microbes(30°C, styrene as a sole pollutant)

根据文献报道<sup>[7-9]</sup>,有机污染物在土壤中的降解速率符合一级反应动力学方程

$$-\frac{dc}{dt} = kc,$$

故试用一级反应方程拟合。

将实验数据代入方程进行曲线的直线化回归,回归结果:  $r_{\text{水田土壤}} = -0.998^{**} (\alpha_3^{0.01} = 0.959)$ , 相关指数<sup>[2]</sup>  $R^2 = 0.997$ ;  $r_{\text{旱地土壤}} = -0.996^{**} (\alpha_6^{0.01} = 0.834)$ , 相关指数  $R^2 = 0.992$ 。苯乙烯在两种农田土壤中的微生物降解速率均符合一级反应动力学方程。于是有以下结果:

水田及旱地土壤中微生物降解速率常数分别为:

$$k_{\text{水}} = 3.46 \times 10^{-3} (1/\text{天});$$

$$k_{\text{旱}} = 2.33 \times 10^{-2} (1/\text{天})。$$

$$\text{半衰期分别为: } t_{1/2(\text{水})} = \frac{\ln 1/2 - \ln 1.03}{-k_{\text{水}}} \approx 209 \text{ 天;}$$

$$t_{1/2(\text{旱})} = \frac{\ln 1/2 - \ln 0.99}{-k_{\text{旱}}} \approx 29 \text{ 天。}$$

30°C 时, 水田、旱地中土壤微生物对苯乙烯降解的动力学回归方程分别为:  $\hat{c}_{\text{水}} = 1.03c_0e^{-3.46 \times 10^{-3}t}$ ;  $\hat{c}_{\text{旱}} = 0.99c_0e^{-2.33 \times 10^{-2}t}$ 。

由于两种降解实验除土壤水份不同外, 其他条件完全相同, 因此可将两者进行比较。首先用两条回归直线的比较<sup>[2]</sup>法对两种农田中的降解速率常数  $k_{\text{水}}$  和  $k_{\text{旱}}$  进行显著性检验, 以确定二者差异是确系土壤水份不同引起, 还是仅仅由于抽样误差所致。

检验结果:  $t = 18.983^{**}$  ( $df = 9$ ,  $t_9^{0.01} = 3.250$ ), 差异非常显著。表明两种水份状况下土壤微生物降解苯乙烯的速率常数确有差别。

水田、旱地中苯乙烯降解速率常数及半衰期比较:

$$\frac{k_{\text{旱}}}{k_{\text{水}}} = \frac{2.33 \times 10^{-2}}{3.46 \times 10^{-3}} \approx 6.7; \quad t_{1/2(\text{水})} - t_{1/2(\text{旱})} = 209 - 29 \approx 180 \text{ 天。}$$

即苯乙烯在旱地中的微生物降解速率约为水田中的 6.7 倍, 半衰期缩短约半年。

Sielicki<sup>[10]</sup> 等通过质谱分析, 认为苯乙烯在土壤中是通过氧化途径被微生物降解的, 即苯乙烯先氧化为苯乙酸, 再按苯乙酸的降解途径分解。

从我们的实验结果看, 苯乙烯在旱地中的降解速率比在水田中快得多 (图 1)。估计这是好氧菌作用下苯乙烯经历了氧化过程所致。渍水后, 土壤中氧的更新减慢。随着氧化降解的进行以及好氧菌的生命活动, 土壤内的氧逐渐耗至厌氧水平, 土壤环境中的反应也逐渐由氧化过程变为还原过程。此外, 厌氧条件下好氧菌的生命活动受抑制, 其菌数也因此减少, 以上原因导致苯乙烯降解速率减慢直至停止。

## (二) 苯乙烯与三种氯代苯共存时, 在土壤中的微生物降解

为了考察土壤中同时存在其他化合物时, 微生物对苯乙烯的降解, 还模拟试验了与氯苯、对-二氯苯、间-二氯苯共存时, 苯乙烯在水田土壤中的微生物降解。所有实验条件与土壤中仅有苯乙烯一种组分的降解实验一样, 实验结果见图 2。

由于苯乙烯不可能是三种氯代苯降解的中间产物, 因此图中实验结果反映了苯乙烯的降解过程, 可对其进行动力学讨论。

将实验数据代入一级反应方程进行曲线的直线化回归, 回归结果:  $r_{\text{四种组分}} = -0.985^{**}$  ( $\alpha_3^{0.01} = 0.959$ ), 相关指数  $R^2 = 0.972$ , 符合一级反应动力学方程。于是有以下结果:

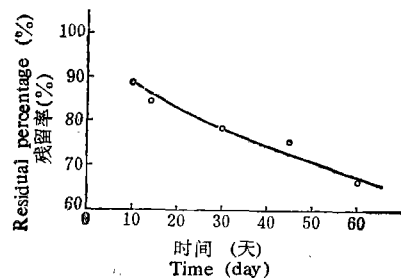


图 2 苯乙烯与三种氯代苯共存时, 在水田土壤中的微生物降解(30°C)

Fig. 2 Microbial degradation of styrene coexisted with three kinds of chlorinated benzene (30°C, in submerged soil)

降解速率常数  $k_{\text{四种组份}} = 5.16 \times 10^{-3} (1/\text{天})$ 。半衰期:  $t_{1/2(\text{四种})} = \frac{\ln 1/2 - \ln 0.92}{-k_{\text{四种组份}}} \approx 118$  天。降解回归方程:  $\hat{c}_{\text{四种组份}} = 0.92 c_0 e^{-5.16 \times 10^{-3} t}$

将单一组份以及三种氯代苯共存时,苯乙烯在水田土壤中的微生物降解进行比较:首先仍然用“两条回归直线的比较”法对两种情况下的降解速率常数  $k_{\text{四种组份}}$ 、 $k_{\text{单一}}$  进行显著性检验。

检验结果:  $t = 3.226^*$  ( $t_{0.05} = 2.447$ ), 差异显著。表明二者确有差别。

降解速率常数及半衰期比较:

$$\frac{k_{\text{四种组份}}}{k_{\text{单一}}} = \frac{5.16 \times 10^{-3}}{3.46 \times 10^{-3}} \approx 1.5; \quad t_{1/2(\text{单一})} - t_{1/2(\text{四种组份})} = 209 - 118 = 91 \text{ 天}$$

即与三种氯代苯共存时,苯乙烯在水田中的微生物降解速率约为单一组份的 1.5 倍,半衰期短约 3 个月。

实验结果说明,土壤中有的微生物虽不能利用苯乙烯为碳源降解苯乙烯,但在土壤环境中存在三种氯代苯时,可以对苯乙烯进行协同代谢,从而使苯乙烯降解速率加快。

由此可见,含苯乙烯的工业废水处理或排放时,在经过实验的基础上可以有选择地将数种工业废水按一定配比混合处理、排放,以加快化合物的微生物降解。

**(三) 纯培养微生物对苯乙烯的降解**

1. 降解实验 Higgins<sup>[9]</sup> 认为:“最终证实土壤细菌对农药降解起主要作用是将有关细菌从土壤中分离出来,使其利用农药作为碳或氮的唯一来源,进行纯培养生长,并证实农药降解”。

作者在研究纯培养微生物降解苯乙烯时,用土壤环流<sup>[4]</sup>的方法,从供试土壤中分离到 4 株以苯乙烯为唯一碳源的细菌,编号为 1003 号、1004 号、1005 号、10010 号。

经实验,4 株菌均可降解苯乙烯,但降解速率均不快。其中 1003 号作用 3 天,对苯乙烯的去除率为 17.0%,1004 号为 17.7%,1005 号为 12.1%,10010 号为 20.3%。

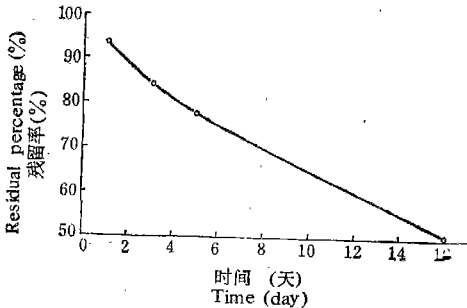


图 3 1004 号菌对苯乙烯的降解  
Fig. 3. Degradation of styrene by strain No. 1004

为考察苯乙烯减少的原因是由于细菌降解还是菌体吸附,取两瓶培养基,灭菌前加入菌液,以后实验步骤与实验组、对照组相同。实验结果,苯乙烯未减少,这就排除了菌体吸附的可能性。

进一步做了 1004 号菌对苯乙烯的降解实验,结果如图 3。

由图 3 可以看出,1004 号与其他 3 株菌一样,降解速率也不快,估计原因是供氧不够。因 4 株菌都是用土壤环流方法筛选出,这样筛选出的菌是严格好气的。苯乙烯易挥发,实验中锥形瓶

加了磨口塞,供氧不够,限制了好氧降解菌的生命活动,因而未获得好的降解效果。

2. 菌株鉴定<sup>[6]</sup> 根据菌落形态,生理生化实验以及光学显微镜、电子显微镜观察,4 株菌鉴定如下:

1003 号菌:革兰氏染色阴性。细胞杆状,无芽孢。极毛运动;单毛。无荚膜,胞内无

### 类脂粒。

菌落无萤光色素, 无扩散性色素。葡萄糖氧化产酸。氧化酶阳性。穿刺接种于酪素水解物培养基中, 生长于洋菜表面上。接触酶阳性; MR 阴性; VP 阴性; 吡啶阳性。硝酸盐还原阴性。生长温度试验: 41°C 不生长。生长速度较慢, 延迟期约 1.5 小时。不水解淀粉。经鉴定, 为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) (图版 I, 照片 1)。

1004 号菌: 革兰氏染色阴性。细胞杆状, 无芽孢, 无荚膜, 胞内无类脂粒。极毛运动; 单毛。

菌落无萤光色素, 无扩散性色素。葡萄糖氧化产酸。氧化酶阳性。穿刺接种于酪素水解物培养基中, 生长于洋菜表面上。接触酶阳性, MR 阴性; VP 阴性; 吡啶阴性。硝酸盐还原阳性。生长温度试验: 41°C 生长。生长速度较快, 延至期约 30 分钟。不水解淀粉。经鉴定, 为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) (图版 I, 照片 2)。

1005 号菌: 革兰氏染色着色不均匀, 阳性。用美兰染色, 异染粒着兰紫色。细胞杆状, 两端大小不一。细胞排列特殊, 6—8 小时几乎多是 V 字形排列。无芽孢, 不运动, 对葡萄糖不作用。液体培养基表面有菌膜。氧化酶阳性, 接触酶阳性, MR 阳性, VP 阳性, 吡啶阳性。经鉴定, 为棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.) (图版 I, 照片 3)。

10010 号菌: 革兰氏染色不定, 阳性。12—16 小时细胞杆状, 48 小时后呈球状, 接入新鲜培养基又成小杆状。氧化代谢。接触酶阳性, 硝酸盐还原阴性, 不水解淀粉, 不分解纤维素。固体培养基上有点粘; 液体培养基中生长较差, 无菌膜。生长温度试验: 该菌对温度要求严格, 37°C 不生长。在脱脂牛奶中, 于 63°C 加热 30 分钟不再存活。经鉴定, 为节细菌 (*Arthrobacter* sp.) (图版 I, 照片 4)。

## 三、小 结

1. 30°C 条件下苯乙烯在供试的水田及旱地两种农田土壤中均可被土壤微生物降解。在旱地中的降解速率比水田中快。

2. 30°C 条件下, 同时存在氯苯、对-二氯苯、间-二氯苯时, 水田土壤中微生物对苯乙烯的降解速率比土壤中仅有苯乙烯一种组份时快。

3. 从供试土壤中分离 4 株以苯乙烯为唯一碳源的降解菌。经鉴定, 其中两株为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 一株为棒状杆菌 (*Corynebacterium* sp.), 一株为节细菌 (*Arthrobacter* sp.)。进一步确证了土壤微生物可以降解苯乙烯。

4. 苯乙烯的化学结构为苯环加共轭双键, 化学性质稳定, 除微生物降解外, 在环境中不易非生物降解。由于渍水条件下微生物对苯乙烯降解慢, 因此对含苯乙烯的工业废水应加以控制, 限制较高浓度的废水排放入水田、河流、湖泊等, 以免其中的苯乙烯在渍水土壤或河流、湖泊的底泥中累积, 引起相应的环境问题。

## 参 考 文 献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著, 1978: 一般细菌常用鉴定方法。科学出版社。
- [2] 中国科学院数学研究所数理统计组编, 1975: 回归分析方法。科学出版社。

- [3] 张水铭、安琼、顾宗濂、马杏法, 1982: 六六六在土壤中的降解。环境科学, 第3期, 1—3页。
- [4] [B] 土壤微生物研究会编(叶维青等译, 1983) 1977: 土壤微生物实验法。科学出版社。
- [5] I. J. 希金斯, R. G. 伯恩斯(武汉医学院环境卫生学教研室、环境保护毒理研究室译, 1981) 1975: 污染的化学和微生物学。化学工业出版社。
- [6] Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., 1974: Bergry's manual of determinative bacteriology. 8ed. The Williams and Wikins Company, Baltimore.
- [7] EPA-600/6-82-004a, 1982: Water quality assessment: A screen procedure for toxic and conventional pollutants Part I, 106—114.
- [8] Goring, C. A. I. et al., 1972: Organic Chemicals in the Soil Environment. Marcel Dekker, New York.
- [9] Morrill, L. G. and Others, 1982: Organic compounds in soil: Sorption, Degradation and Persistence. Ann Arbor: Ann Arbor Science.
- [10] Sielicki M., Focht, D. D. and Martin, P., 1978: Applied and Environmental Microbiology.

## DEGRADATION OF STYRENE BY SOIL MICROBES

Ye Dingyi and Cao Youqin

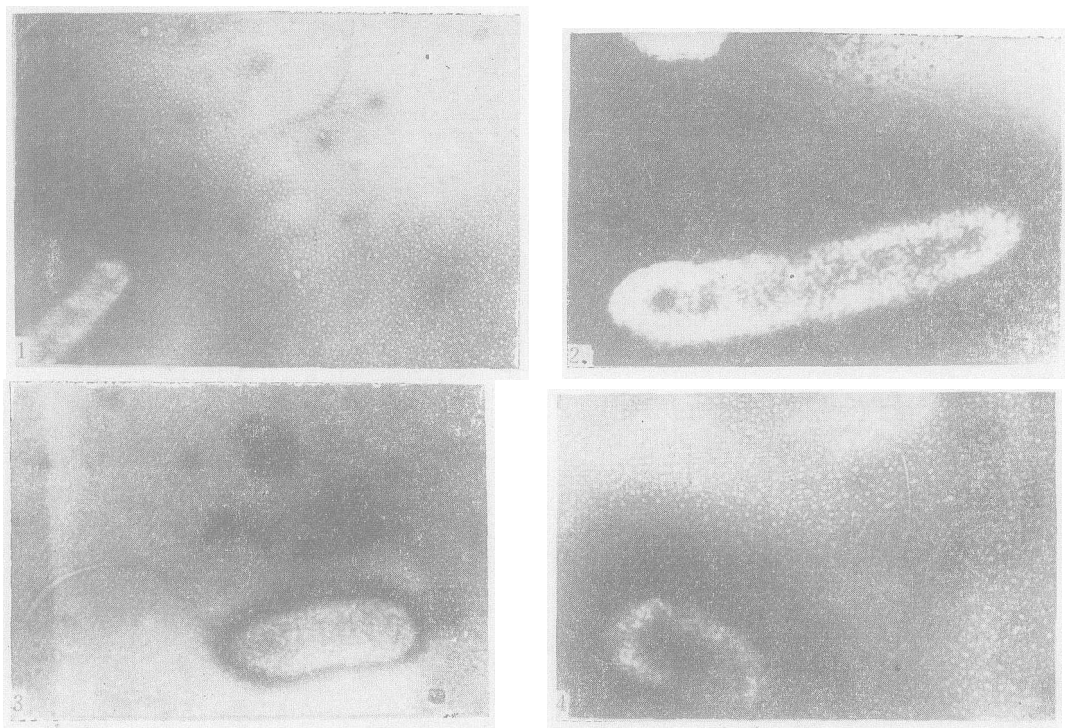
(Nanjing University)

### Summary

Degradation of styrene by soil microbes in Changzhou region, Jiangsu Province was studied. Experiments were carried out under conditions simulated to those of submerged and upland soils. Styrene was added at concentration of 800 ppm. The amount of residual styrene was determined by gas chromatography.

The styrene could be degraded by microbes at 30°C in both soils mentioned above. The kinetic equation of degradation was of the first order. In submerged soil the kinetic regression equation was  $\hat{C} = 1.03C_0e^{-3.46 \times 10^{-2}t}$  while in upland soil  $\hat{C} = 0.99C_0e^{-2.33 \times 10^{-2}t}$ , where  $C_0$  is the original concentration of styrene in the soil,  $\hat{C}$  residual concentration calculated,  $t$  degradation time (day). The degradation rate in both soils were compared statistically with each other. In upland soil it was 6.7 times higher than that in submerged soil. When styrene coexisted with chlorobenzene, *P*-dichlorobenzene and *m*-dichlorobenzene, its degradation rate was accelerated.

Four bacteria strains capable of degrading styrene and using it as a sole source of carbon were isolated from the experimented soil. Identification indicated that two of them were *Pseudomonas* sp., the other two were *Corynebacterium* sp. and *Arthrobacter* sp.



照片 1 1003 号菌照片 (19409×)

Photo 1 Electron micrograph of *Pseudomonas* sp. No. 1003 (19409×)

照片 2 1004 号菌照片 (29409×)

Photo 2 Electron micrograph of *Pseudomonas* sp. No. 1004 (29409×)

照片 3 1005 号菌照片 (19409×)

Photo 3 Electron micrograph of *Corynebacterium* sp. No. 1005 (19409×)

照片 4 10010 号菌照片 (29409×)

Photo 4 Electron micrograph of *Arthrobacter* sp. No. 10010 (29409×)