

污水库底泥微生物对六六六降解的研究*

施国涵 马瑞霞 陈兴吴 孙安强

(中国科学院环境化学研究所)

摘 要

污水库底泥对六六六具有自然净化能力,其中微生物起着重要作用。在嫌气条件下(25—30℃)对六六六降解较快,20天可降解所加18—20ppm六六六的90%。从底泥筛选出30多株可以降解六六六的细菌,其中一株短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)可将丙体六六六降解为间二氯苯和转化成少量甲体六六六,在25—30℃条件和增加适当营养物质、中性和微碱性以及驯化均可加速污水库底泥微生物对六六六的降解。以上结果为了解六六六在环境中的消失和利用污水库降解六六六,净化水质提供了依据。

我国使用有机氯农药六六六造成了环境污染,现用量已逐年减少,近来提出禁止生产和使用,但它在环境中的归宿(包括降解转化),以及对有关生物的影响等,均需进一步研究了解。同时亦可为研究其它有机氯农药时作对比参考。一般认为有机氯农药六六六在旱地土壤中比较稳定,不易为土壤微生物所降解,但自六十年代发现在渍水条件下可以降解以后,对于了解其在环境中的归宿及清除污染,提供了启示,国际上对此问题的研究也随之渐增(Hill等, 1967; Haider, 1980; Sethunathan 等, 1978)。国内近几年来也开展了一些研究(顾宗廉等, 1981; 张甬元等, 1981; 张水铭等, 1982;)。

天津汉沽地区排放的工业废水,严重污染了蓟运河水域,废水中有天津化工厂生产的有机氯农药六六六等;为此建立了排污工程,将工业废水经过管道排放入污水库。此库位于天津汉沽区以南约10公里,紧靠蓟运河边,其面积为4,600亩,蓄水量为560万立方米,平均水深2米,每日排入量约2万立方米。于库内蓄存,每年汛期开闸放水,流入渤海。

根据微生物在嫌氧条件下可以降解的原理,在生产上把污水库作为净化水质的氧化塘,同时充分利用水域开展水产的养殖。本研究的目的是:试图查明在污水库的自然条件,以及室内模拟条件下底泥微生物对六六六的降解;不同环境条件对底泥微生物降解六六六的影响;以及从底泥中分离筛选出降解六六六的微生物,并测试菌株降解六六六的能力。

一、实 验 方 法

1. 自然条件下底泥中降解六六六的调查

1981年7月至1982年9月在天津汉沽区污水库内不同地点(进水口,出水口)以多点平均

* 此项工作是在戴广茂教授领导下进行的,并对文稿提出修改意见,特此致谢。

本工作在采集样品中得到中国科学院动物所滕德兴、赵忠宪、仪垂贵;汉沽监测站李润兴等同志大力协助,特此致谢。

采集的方法, 用挖泥器采集底泥, 风干后测定其中六六六的含量。

2. 室内模拟条件下底泥微生物对六六六的降解试验

将各点采集的底泥样品置一容器内混匀后, 在嫌气条件下, 从中任意取出样品, 称取60克湿泥于200毫升三角瓶内, 分别加入一定量的工业六六六丙酮溶液(折合干土重为20ppm), 再加入120毫升自来水混匀后, 充 N_2 盖紧, 在37℃下静置培养, 于不同时间内取出样品, 分别测定六六六含量的变化。以灭菌土壤为对照。

3. 降解菌的筛选

将底泥10克(折干土重4克)放入无菌培养液¹⁾的三角瓶内, 加入工业六六六丙酮溶液(相当于浓度为66.4ppm), 加盖, 置于37℃下富集培养, 每隔10天富集培养一次, 三次后, 取菌液1毫升稀释成 10^{-4} , 置于克氏并内(培养液内加入一定量六六六)加盖, 置37℃恒温条件下培养, 菌落长成后依次接入试管内保存备用。

4. 降解菌对丙体-六六六降解能力的试验

将上述菌株分别接入培养液中, 加入2.3—2.7ppm丙体-六六六, 定期测定培养液中丙体-六六六的含量, 以不加菌株为对照样品。

5. 样品中六六六的萃取和含量的测定

含水底泥样品的萃取, 是将上层水抽滤出来, 取其40毫升(为加入水量的1/3), 用10毫升石油醚直接萃取。又从60克底泥中任意取出20克, 加入无水硫酸钠, 置索氏提取器内用石油醚, 丙酮(1:1)混合溶剂浸泡过夜, 翌日提取4小时。将水相提取液与底泥提取液合并一起用浓硫酸纯化, 再通过无水硫酸钠柱脱水、定容。若样品中含有干扰六六六测定的元素硫, 则采用四丁基铵离子脱硫法(Jensen 等, 1977)予以去除。含量是以烘干土重计算。菌的处理液的萃取是用石油醚: 丙酮2/1混合溶剂直接萃取。所有样品中六六六的含量的测定, 均采用SP-501型气相色谱仪按常规测定。代谢产物间二氯苯的气相色谱条件, 柱温为140—150℃。其它条件与六六六同。间二氯苯的分子量用JMS-D300S型色谱质谱联用仪, 按常规方法测定。

6. 底泥样品的理化性质(见表1)

表 1 底泥的理化性质

采样地点	有机质含量 (%)	pH	N (%)	细砂粒 (%)	粉粒 (%)	粘粒 (%)
进水口处	6.45	7.15	0.61	23.75	55.03	21.22
库中部	4.16	7.68	0.40	31.09	49.68	19.03
出水口处	3.07	7.70	0.35	8.88	52.26	38.86

二、实 验 结 果

1. 在自然条件下污水库底泥内六六六的降解

于1981年7月到1982年9月间, 在野外多次采集样品, 于室内分析, 结果列于表2。

1) 培养液成分为: 蛋白胨10克, 葡萄糖1克, KH_2PO_4 1克, $NaCl$ 1克, 自来水1,000毫升, pH7.2—7.4。

表 2 自然条件下污水库底泥中六六六含量的变化

采 样 时 间 (年.月.日)	进 水 口 处		出 水 口 处	
	含量 (毫克/公斤)	消 失 率 (%)	含量 (毫克/公斤)	消 失 率 (%)
1981. 7. 10	2.23		1.21	
9. 9	1.31		0.78	
1982. 4. 10	10.60		5.47	
5. 18	3.57	66	1.56	71
6. 19	3.95	63	2.28	58
9. 14	2.45	77	0.23	96

由表 2 结果看出, 底泥内六六六在自然条件下, 每间隔 1 月, 不论污水库的进水口处或出水口处均不断减少。4 月份由于气温低, 生物活动能力弱, 降解少, 因此含量最高, 5 月份以后气温逐渐上升, 微生物活动能力加强, 因此降解能力亦增强, 在所测各月中, 9 月份底泥中六六六含量最低, 消失率平均为 66—75%。

将 1982 年 4 月份采集的底泥样品置于室内变温 (25—30℃) 模拟条件下, 即排除在野外自然条件下污水不断增加的因素, 于 1982 年 4—6 月, 每月一次, 测得六六六含量为 5—10 毫克/公斤水平下, 消失率为 93—95% (表 3)。

表 3 实验室条件下污水库底泥中六六六含量的变化 (25—30℃)

间 隔 时 间	进 水 口 处		出 水 口 处	
	含量 (毫克/公斤)	消 失 率 (%)	含量 (毫克/公斤)	消 失 率 (%)
4 月 16 日	10.6		5.47	
5 月 24 日	0.74	93	0.35	93
6 月 23 日	0.53	95	0.16	95

注: 1 毫克/公斤 = 1 ppm, 下同。

2. 嫌气条件下底泥微生物对六六六的降解作用

一般来说有机氯杀虫剂在需氧条件下比嫌气条件下分解快而完全, 但对六六六降解来说, 嫌气微生物则起着重要作用。

我们将底泥置于 37℃ 恒温嫌气条件下进行模拟试验, 由间隔不同时间, 测定其底泥与上层水中六六六各异构体的含量得知, 底泥 (进水口、库中部、出水口处) 各点的底泥内六六六含量均不断减少, 至 20 天, 六六六含量降低得最快, 使 18—19 ppm 降解了 90%, 1 月以后降解速率平缓, 85 天降解 97% 以上, 而对照的底泥样品中六六六含量一直变化不大 (表 4)。

3. 短芽孢杆菌 (*Bacillus brevis*)¹⁾ 等菌体对丙体-六六六的降解

底泥中微生物种类繁多, 究竟是哪些微生物对丙体-六六六在起降解作用呢? 据 Audus 1951 的观点: 微生物对农药降解的过程是微生物适应农药而生长的过程。就污水库底泥论,

1) 中国科学院微生物所协助菌种鉴定, 特此致谢。

表 4 污水库底泥中微生物对六六六的降解作用 (嫌气条件下)

测定时间 (天)	进 水 口 处		库 中 部		出 水 口 处		灭菌对照
	含量 (毫克/公斤)	降解 (%)	含量 (毫克/公斤)	降解 (%)	含量 (毫克/公斤)	降解 (%)	含量 (毫克/公斤)
当 日	18.23		19.39		19.68		16.98
5	14.38	21.12	17.58	9.23	12.49	36.48	16.70
10	8.32	54.63	9.81	49.40	9.29	52.79	16.44
20	1.96	89.50	1.29	93.35	2.64	86.75	16.35
35	1.72	90.56	1.77	90.89	1.36	91.06	16.15
85	0.53	97.08	0.32	97.48	0.49	97.52	15.70

因其不断接受六六六等有机氯农药,一般应含有适应该农药而生长的微生物。为了进一步了解微生物的作用,又从底泥中分离能降解六六六的细菌。

运用工业六六六以及不同浓度丙体-六六六富集培养,一共分离筛选出31株菌可以降解丙体-六六六,其降解能力大小各异,可降解丙体六六六60%以上者有10株(表5、6)其中

表 5 单株菌对丙体-六六六的降解能力

降解 30% 以下的	降解30—60%的	降解60% 以上的
123, 131, 132, 134, 213, 331, 332, 333, 336, 337, 433, 435, 1314	122, 135, 136, 137, 335, 431, 436, H ₁₀	1310, 138, 139, 437, H ₂₋₁ , H ₂₋₂ H ₄₋₁ , H ₄₋₂ , H ₁₅ , H ₂₀

注:“123”“H₄₋₀”等为菌株代号。

表 6 不同菌株对丙体-六六六的降解

间隔时间 (天)	H ₂₀		H ₁₅		H ₄₋₁		H ₄₋₂		H ₂₋₁		H ₂₋₂		对照
	浓度 (ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)
0	2.36		2.70		2.40		2.60		2.56		2.70		1.44
10	1.06	55	1.10	60	0.89	63	0.45	82	0.81	66	1.20	57	1.40
20	0.85	63	0.79	70	0.38	84			0.73	71	0.76	72	1.44

有一株(1310),经鉴定为短芽孢杆菌,7天可降解所加2.36ppm丙体-六六六的82%(表7)。通过色、质谱鉴定(图1、2)证明降解产物中有间二氯苯,同时还转化成少量甲体-六六六(图3)。通过从底泥中分离出可降解六六六的菌株,从而进一步证明了底泥微生物对六六六的降解作用。

污水库底泥中由于动植物残体分解后,而含有大量的有机质(表1),有机质中含有丰富

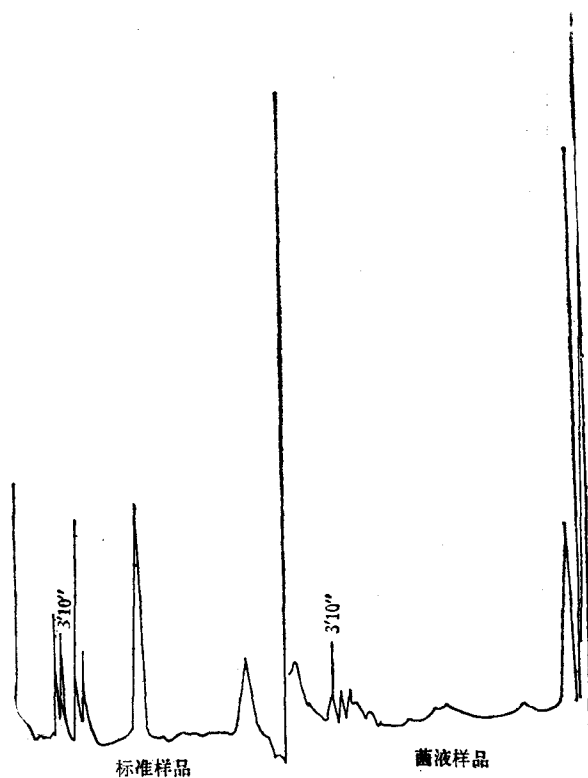


图1 短芽孢杆菌降解 p,p' -六六六的产物——二氯苯的气相色谱 3'10"为二氯苯出峰时间

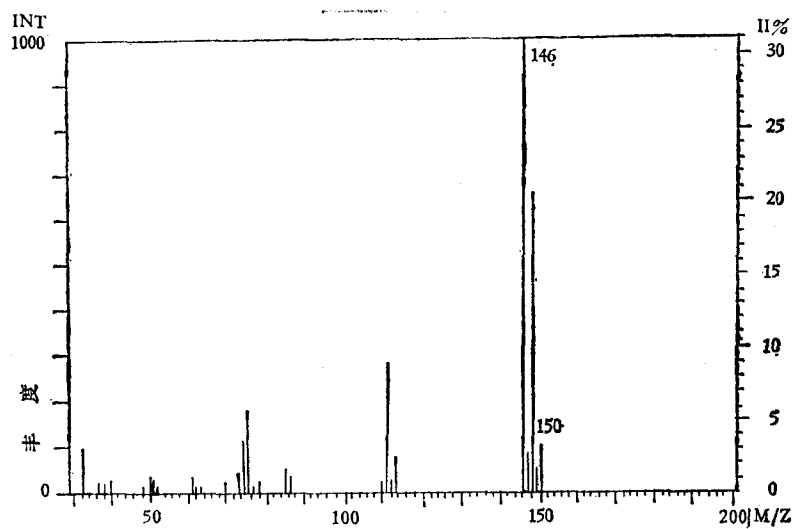


图2 短芽孢杆菌降解 p,p' -六六六的产物——间二氯苯的质谱¹⁾

1) 质谱测定由中国科学院环境化学研究所王相明等同志协助，特此致谢。

表 7 短芽孢杆菌对丙体-六六六的降解代谢

间隔时间 (天)	丙体-六六六		间二氯苯	甲体-六六六
	浓度(ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)	浓度 (ppm)
0	2.36			
3	1.18	49.3	1.33	
7	0.43	81.3	0.95	0.015
15	0.44	81.3	0.33	0.19

的碳水化合物、蛋白质和Ca、Mg无机盐分等，它是微生物的营养丰富的天然培养基。此外，污水库底泥通常为嫌气条件，适于嫌气细菌生长发育，因而有利于微生物对六六六的降解。

关于丙体-六六六的降解产物，国外已经研究得较多，如Macrae (1969) 从淹水土壤中分离出一株嫌气细菌*Clostridium* sp., 可以降解林丹并生成 γ -四氯环己烯。Ohisa (1978) 从水稻土中分离一株 *Clostridium rectum* 亦可降解林丹生成 γ -四氯环己烯。Mathur (1975) 等用林丹处理渍水土壤，从分解产物中测出主要是 γ -五氯环己烯，此外还有四氯苯、五氯苯、四氯环己烯和少量二氯苯。这些报道与本实验结果有所异同。

4. 不同环境条件对底泥微生物降解六六六的影响

微生物生长繁殖过程中，温度、pH、营养元素、C/N等条件的变化，均会对微生物降解六六六的活性有影响。依污水库的环境状况，我们试验了温度、pH、营养元素以及驯化等对底泥微生物降解六六六的影响。

1) 温度 试验证明(图4)，在设计温度范围内，随着温度升高，底泥微生物活性增强，六六六降解率增高。这种趋势与yoshida等(1970)对渍水土壤微生物群体所做试验结果一致。在本试验最高设计温度为30℃，六六六降解率最高，10天内降解了所加 11.53ppm 六六六的70%，25℃次之，15℃下最低。据此，我们建议：污水库中蓄积的污水，宜经过

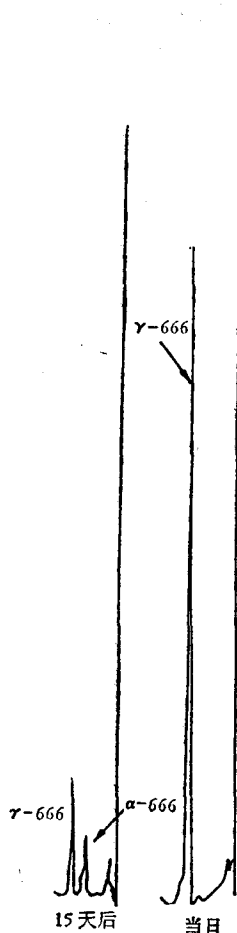


图3 短芽孢杆菌转化 γ -六六六为 α -六六六的气相色谱

夏季高温季节再排出，以使微生物充分活动，达到较好的净化作用。

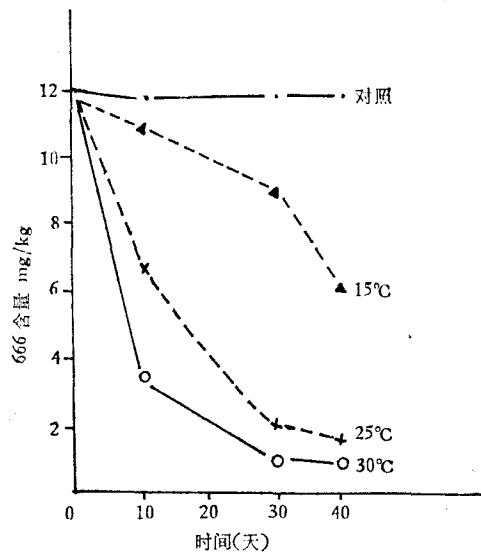


图4 不同温度条件对底泥微生物群体降解六六六的影响

2) 营养条件 在底泥中施加含 N、P、K 等养分的营养液可提高六六六的降解速率 (表 8), 10 天将约 11 ppm 六六六降解了约 82.7%, 而不加营养液的底泥仅降解了 70% (表 8)。

表 8 不同营养条件对底泥微生物降解六六六的影响

间隔时间 (天)	加营养的底泥内		不加营养的底泥内	
	六六六含量 (毫克/公斤)	降解 (%)	六六六含量 (毫克/公斤)	降解 (%)
本底	11.62		11.53	
10	2.01	82.1	3.35	70.9

注: 营养液为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.5g, MgSO_4 0.2g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001g, K_2HPO_4 0.1g, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01g, 酵母膏 0.5g, 于 1,000 毫升水中。取该液 120 毫升, 另取水 120 毫升分别加于底泥, 作对比试验。

这与 Edwards 等所报道土壤有机质含量愈高, 六六六降解速率愈快的研究结果一致。这就说明污水库的肥力直接影响微生物对六六六的降解。若采取增加库内底泥肥力的措施 (如适量引入生活污水以及植树造林以增加枯枝落叶等), 则可进一步提高降解六六六等的效率。

3) pH 各种微生物生长繁殖要求不同 pH 值, 从降解甲体-六六六的微生物来看, 在 pH 7—8 时降解较快, 表明此 pH 下菌的活性较强 (表 9)。污水库中底泥的 pH 值为 7.15—7.70, 正适于这类嫌气细菌生长繁殖。pH 8 以上降解率高则属于六六六在碱性条件下的化学水解作用。

表 9 pH 值对甲体-六六六降解的影响

间隔日期 (天)	pH	α -666		
		初始浓度 (ppm)	残留浓度 (ppm)	降解 (%)
7	4.0	0.178	0.088	52.28
	5.0		0.086	51.69
	6.0		0.096	46.07
	7.0		0.051	71.35
	8.0		0.049	72.47
	9.0		0.048	73.03

4) 底泥微生物的驯化 将底泥微生物群体不断以工业六六六加富培养, 驯化 6 个月, 取底泥悬液作微生物群体降解六六六能力的试验, 与未经驯化处理者对照。发现经驯化的底泥微生物群体要比未驯化的底泥微生物群体降解六六六速度快, 且经驯化的底泥微生物群体降解高浓度六六六, 10 天降解了 772.3 ppm 六六六的 24.3%; 未经驯化的则不能降解 (表 10), 这是在驯化过程中底泥中诱变产生了具高度降解六六六能力的突变菌株的结果。

表 10 驯化后底泥微生物与未驯化的对六六六降解作用

处理天数	驯 化 后				未 驯 化			
	浓度 (ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)	降解 (%)	浓度 (ppm)	降解 (%)
当日	94.8		772.3		86.3		788.3	
10	24.5	74.2	584.5	24.3	64.7	25	788.0	0

三、结 语

1. 六六六在污泥库底泥内主要为底泥中能利用六六六为碳源的微生物所降解。该类专性微生物嫌气培养20天可降解所加18—20ppm六六六的90%左右。

2. 从底泥中筛选选出了30多株细菌, 对六六六具有不同程度的降解作用。其中以短芽孢杆菌对丙体六六六降解力最强, 15天可使2.36ppm丙体-六六六降解81%。

3. 环境条件可影响底泥微生物的活性, 从而影响对六六六的降解。在试验设计的15—30℃范围内, 以30℃最适合污水库底泥微生物对六六六的降解, 因此建议在实践中蓄积的污水要经过夏季再排出, 以达较好的净化效果。增加微生物养分、维持pH 7—8可提高降解效率。因此, 可通过添加生活污水、库边植树造林并蓄积枯枝落叶层等方法来增加底泥肥力, 以提高降解效率。

4. 通过驯化底泥微生物可提高其降解六六六的能力。

上述实验结果, 证明污水库底泥是可以降解六六六的, 从而为利用天然污水库净化水质提供依据。

参 考 文 献

- 张甬元、孙美娟、谭渝云 1981 水环境中六六六的转移和归趋。环境科学学报 1(3):242—249。
- 张水铭、安琼、顾宗藻、马杏法 1982 六六六在土壤中的降解。环境科学3(3):1—3。
- 顾宗藻、谢思琴、张水铭 1981 旱地加水可促进微生物对Y-666的降解。土壤学报 18(3)。
- Audus, L.T. 1951 The biological detoxification of harmore herbicides in soil, *Plant soil* 3:170.
- Haider, K. 1980 Degradation of chlorinated aliphatic and aromatic compounds by aerobic and anaerobic soil microorganisms, *Environ. Res. Programme* p.200—204.
- Hill, D.W. and P.L. McCarty 1967 Anaerobic degradation of selected chlorinated hydrocarbon pesticides. *Journal of the Water Pollution control Federation* 39:1259—1277.
- Jensen, S.L. Renberg and L. Reutergårdh 1977 Residue analysis of sediment and sewage sludge for organochlorines in the presence of elemental sulfur. *Anal. chem.* 49:316—318.
- MacRae, I.C., K. Raghu and E.M. Bautista 1969 Anaerobic degradation of the insecticide lindane by *Clostridium* sp. *Nature* 221: march 1 859—860.
- Mathur, S.P. and J.G. Saha 1975 Microbial degradation of ¹⁴C-lindane in a flooded sandy loam soil. *Soil sci.* 120(4):301—307.
- Newland, L.W., G. Chesters and B.L. Gerhard 1969 Degradation of LBHC in simulated lake impoundments as affected by aeration, *Journal of the Water Pollution Control Federation* 41(5): R175—188.

- Ohisa, N. and M. Yamaguchi 1978 Gamma-BHC degradation accompanied by the growth of *Clostridium rectum* isolated from paddy field soil. *Agri. Biol. chem.* 42(10)1819—1823.
- Sethunathan, N. et al. 1978 Microbial degradation of pesticides in rice, soils. *Soil and Rice IRRI* 479—497.
- Yashida, T. and T. F. Castora 1970 Degradation of γ -BHC in rice soils, *Soil science society of America proceedings* 34:440—448.

STUDY ON DEGRADATION OF BHC BY MICROORGANISMS IN THE SEWAGE SLUDGE OF WASTEWATER RESERVOIR

Shi Guohan Ma Ruixia Chen Xingwu Sun Anqiong

(Institute of Environmental Chemistry, Academia Sinica)

In our study, the BHC could be degraded in the sewage sludge of wastewater reservoir. The microorganisms played a very important part in degradation.

The rate of BHC degradation under anaerobic conditions was more rapid than at 25—30°C. After 20 days beginning the experiment approximately 90% BHC were degraded. γ -BHC can be decomposed by above 30 strains of bacteria which were anaerobically isolated from the sewage sludge. A γ -BHC decomposer was identified to be *Bacillus brevis*.

A small amount of α -BHC and a degradation intermediate—*m*-dichlorobenzene from γ -BHC were identified by gas chromatography.

These conditions, such as temperature from 25°C to 30°C, increase adequately nutrient, pH 7—8 and domestication and the degradation of BHC could speed up. The results indicated that BHC could be degraded in environment, and provided a scientific basis for the cleaning of water by means of microorganisms.