

粪产碱菌 JQBF100 降解酚氰废水的研究

张宇铸, 李青云*, 刘幽燕

(广西大学化学化工学院, 广西南宁 530004)

摘要:焦化废水中含有大量酚类与氰化物, 由于成分复杂使得污水修复处理难度提高。利用广西北部湾海泥的粪产碱菌 JQBF100 进行降解氰化物和苯酚的研究, 结果表明, JQBF100 单独降解苯酚存在停滞期; 在酚氰混合体系中, 菌株可在无其他 C、N 源的无机盐溶液中降解初始酚氰质量浓度比为 1 000:100 和 500:500 的体系; 无机氰化物优先被降解且不受苯酚影响, 且氰化物的存在可缩短菌株降解苯酚的停滞期。苯酚与 CN⁻产物甲酸的降解相互有抑制作用, 但苯酚随着甲酸的降解开始降解。

关键词:粪产碱菌; 氰化物; 苯酚; 生物降解; 污水处理

中图分类号: X52; Q81

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2019)01-0158-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2019.01.033

A study on degradation of phenol cyanide wastewater by *Alcaligenes faecalis* JQBF100

ZHANG Yu-zhu, LI Qing-yun*, LIU You-yan

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: Typical coking wastewater contains plenty of phenols and cyanides, and is difficult to treat due to complicate containments. A study on the degradation of cyanides and phenol is carried out by using an *Alcaligenes faecalis* JQBF100 from Beibu Gulf, Guangxi Region, China. According to the study, the degradation of phenol by JQBF100 has a lag phase. In a phenol-cyanide mixing system without any other C and N based inorganic salts, JQBF100 can degrade a system with initial concentration ratios of phenol to cyanide of 1 000:100 and 500:500. Inorganic cyanides are degraded preferentially and unaffected by phenol, and the existence of inorganic cyanides can shorten the lag phase of phenol degradation. Further studies suggest that the degradations of phenol and CN-product formic acid can inhibit each other. But the degradation of phenol follows the degradation of formic acid.

Key words: *Alcaligenes faecalis*; cyanide; phenol; biodegradation; sewage treatment

焦化废水主要来自于煤炭焦化处理过程, 含有大量的酚类和氰化物。由于含有酚类、氰类等环境污染剧毒物质, 使得这类废水处理更为复杂与困难。目前常用的处理手段是物理化学法。生物处理有着经济效益高和二次污染小等优点。最近 10 年, 生物法降解酚氰废水的相关研究主要围绕着多底物降解的动力学、微生物与物化法联用降解混合底物及其动力学以及降解过程中底物之间的影响。在 Naresh 等^[1] 研究中, 分别培养缺氧活性污泥和厌氧活性污泥来降解实验室模拟废水, 指出在氰化物存在条件 (≥ 2.5 mg/L) 下, 有机污染物较氰化物优先被降解, 且在厌氧条件下降解速率更快。而该课题组之前的研究发现^[2], 在耗氧条件下, 其制得耗氧活性污泥在氰化物存在下难以降解其他有机类物质, 如苯酚、邻二苯酚等。Ludmila 等^[3] 通过先后加入氰

水合酶和酪氨酸酶促进酚氰废水的氰化物、苯酚和甲酚降解, 研究发现, 酪氨酸酶 TYR 降酚活性会被氰化物抑制, 但氰水合酶 CHT 的降氰性能可以减少氰化物对 TYR 的抑制, 从而达到共同降解的作用。目前酚氰废水的治理仍需联立多种方法和诸多步骤才能勉强完成治理, 开发新的超强菌种仍是生物法处理酚氰废水的主要研究方向。

笔者从广西北部湾海泥中自主筛选获得 1 株海洋细菌 *Alcaligenes faecalis*, 经初步实验研究发现, 该菌株对苯酚、氰化物都具有良好的降解效果, 为进一步研究实际酚氰污水的生物处理奠定了基础。

1 材料与试剂

1.1 菌种来源和培养基

实验菌种从广西北部湾海泥中自行筛选获得,

收稿日期: 2018-05-09; 修回日期: 2018-11-15

基金项目: 广西大学科研基金项目 (XJZ130360)

作者简介: 张宇铸 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为环境生物工程, 604042292@qq.com; 李青云 (1978-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为污染控制技术及理论, 通讯联系人, qyli@gxu.edu.cn。

经生物工程(上海)股份有限公司鉴定为粪产碱杆菌 *Alcaligenes faecalis*, 命名 JQBF100, 实验室保藏。

无机盐溶液(MSM): 0.4 g/L 磷酸氢二钾、0.2 g/L 磷酸二氢钾、0.1 g/L 氯化钠、0.1 g/L 硫酸镁、0.01 g/L 一水合硫酸锰、0.01 g/L 一水合硫酸铁、0.01 g/L 二水合钼酸钠, 调节 pH=7.1, 该培养基用于苯酚和酚氰的降解。

基础培养基: 牛肉膏 5 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、海水晶 30 g, 调节 pH=7.0~7.2, 该培养基用于富集培养菌株和菌种保藏。

1.2 仪器

超净工作台, YJ-VS 型, 无锡一净净化设备有限公司生产; 恒温摇床, ZHWY-2102 型, 上海智诚分析制造有限公司生产; BOD 培养箱, TS-606-G/4-i 型, 上海跃进医疗器械厂生产; 台式高速冷冻离心机, Allegra 64R, 美国贝克曼库尔特有限公司生产; 可见分光光度计, 723 型, 上海光谱仪器有限公司生产; 高压蒸汽灭菌锅, ZEALWAY G180T 型, 美国 ZEALWAY 公司生产; 高效液相色谱仪, UltiMate 3000 型, 美国赛默飞世尔科技公司生产; 高效液相色谱柱, Shodex Rspak KC-811 型, 日本 Shodex 公司生产。

2 实验方法

2.1 菌体培养

将配制好的基础培养基分装于 250 mL 锥形瓶中, 放入高温灭菌锅内 121℃ 灭菌 20 min, 取出放入超净台紫外照射冷却。从 4℃ 冰箱拿出斜管, 挑取 JQBF100 冷藏菌株接种至装有基础培养基的 250 mL 锥形瓶中, 放入 30℃、160 r/min 摇床中震荡培养 30 h, 置于冰箱 4℃ 冷藏。用时取出分装至 50 mL 离心管, 放入离心机(9 500 r/min、4℃、15 min) 离心, 用 MSM 溶液洗涤 2 次, 配制得菌悬液, 待用。

2.2 菌株 JQBF100 对苯酚的降解

在 MSM 培养基中添加硫酸铵作氮源, 灭菌后用注射器过滤头滴入一定浓度的苯酚溶液于 MSM 中, 用移液枪吸取之前配制好的菌液于含有 MSM 的锥形瓶中, 混匀后用 5 mL 移液枪取 2.5 mL, 置于 30 mL 样品瓶中, 160 r/min、30℃ 震荡培养一定时间取出检测, 测定苯酚质量浓度、氨氮质量浓度和菌体浓度 OD_{600} 。

2.3 菌株 JQBF100 同时降解苯酚和 CN^-

分别设定底物 CN^- /苯酚质量浓度比为 100:

250、100:500、100:750、100:1 000 共 4 组进行实验, 考察氰化物存在时, 菌株对苯酚的降解情况。分别设定底物 CN^- /苯酚质量浓度比为 50:500、100:500、200:500、350:500、500:500 共 5 组进行实验, 考察不同氰化物质量浓度对苯酚降解的影响。酚氰体系中不添加硫酸铵, 实验方法参照 2.2。

2.4 分析方法

CN^- 浓度的测定采用国际标准通用的异烟酸—吡唑啉酮比色法。苯酚浓度的测定采用国际通用标准 4-氨基安替比林比色法。氨氮浓度的测定采用国际通用的纳氏试剂分光光度法。微生物菌体浓度采用 723 型可见分光光度计于 600 nm 处测定其吸光度值即 OD_{600} 。

甲酸与甲酰胺的定量检测采用高效液相色谱法。检测条件如下: 紫外检测设置波长为 200 nm; 色谱柱的型号为 Shodex Rspak KC-811 (8 mm×300 mm) H 型阳离子交换柱; 流动相为用去离子水配制的 pH=2.0 的磷酸水溶液; 流速为 0.5 mL/min; 进样量为 20 μ L; 柱温为 30℃。甲酸甲酰胺浓度的定量计算采用外标法

3 结果与分析

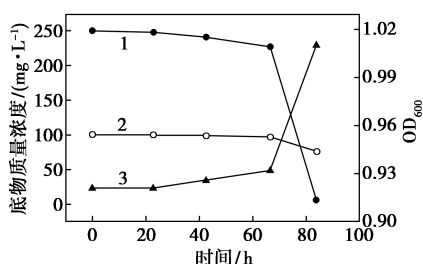
3.1 菌株 JQBF100 降解苯酚的进程曲线

不同初始质量浓度的苯酚降解进程如图 1 所示。苯酚质量浓度为 200、500、750、1 000 mg/L 的降解停滞期分别为 66.5、112、307、>360 h, 降解期耗时分别为 17、40、 \approx 150、>70 h。由此可见, 苯酚质量浓度增大将导致细胞受到一定毒害, 影响细胞质膜的性能, 导致降解效率降低^[4]。在采用 *Alcaligenes faecalis* 菌株降解高质量浓度苯酚方面, Yan Jiang 等^[6]报道的菌株可在 76 h 内 100% 降解 1 600 mg/L 的苯酚; 而 Wang^[5]将菌株吸附在聚苯乙烯极性树脂 CAD-40 上, 可完全降解 6 000 mg/L 苯酚和 384 mg/L 的 NH_4^+ 。本实验中, 菌株 JQBF100 筛选自海洋环境, 能耐受高达 4% 的盐度, 对苯酚的降解效果较好。

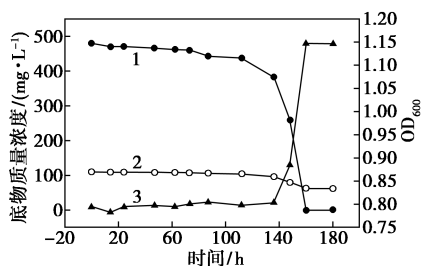
3.2 菌株 JQBF100 同时降解苯酚和 CN^-

3.2.1 氰化物对不同质量浓度苯酚降解的影响

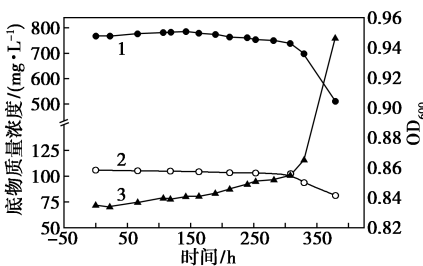
氰化物存在时, 菌株对不同质量浓度苯酚的降解情况如图 2 所示。由图 2 可以看出, 在酚氰浓度比为 250:100、500:100、750:100、1 000:100 的体系中, CN^- 优先在 15 min 内被完全降解, 但其体系中的苯酚的降解停滞期时长分别为 0、0.21、94 h, 与酚铵体系相比, 相同质量浓度苯酚降解的停滞期随着浓



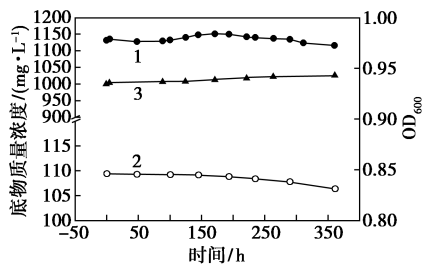
(a) 250 mg/L



(b) 500 mg/L



(c) 750 mg/L



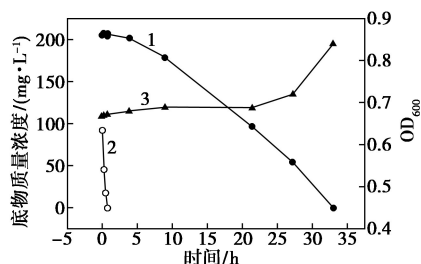
(d) 1 000 mg/L

1—苯酚; 2— NH_4^+ ; 3— OD_{600}

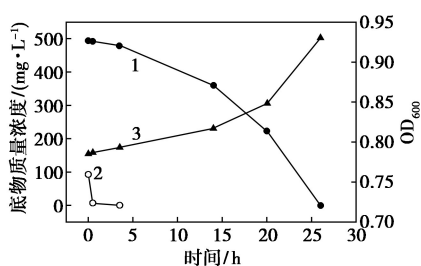
图 1 不同苯酚初始质量浓度的酚- NH_4^+ 体系降解情况

度的增大呈指数缩短,且在酚铵体系中无法降解的 1 000 mg/L 苯酚在酚氰体系也能完全降解,如图 2(d)所示,停滞期时长仍然随着苯酚质量浓度升高而增加。综上所述,酚氰体系中苯酚停滞期得到大大缩短,甚至苯酚质量浓度 ≤ 500 mg/L 时无停滞期,说明酚氰体系中 CN^- 对苯酚的降解有促进作用。

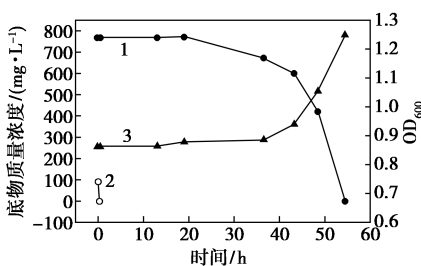
在以前的研究中^[7-8],酚氰生物降解体系均加入葡萄糖、醋酸钠、 NH_4^+ 或 NO_3^- 等 C、N 源来共代谢,其中苯酚和 CN^- 都是作为 C 源被消耗,且优先顺序为其他 C 源-苯酚- CN^- ,而 JQBF100 可以直接在



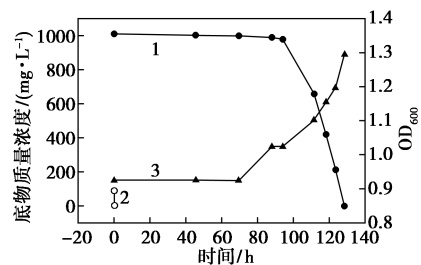
(a) 250:100



(b) 500:100



(c) 750:100



(d) 1 000:100

1—苯酚; 2— CN^- ; 3— OD_{600}

图 2 氰化物对不同质量浓度苯酚的降解情况

含有丰富的无机盐水溶液中降解酚氰体系,其中氰化物优先被降解,且降解速率不受苯酚质量浓度大小的影响。大量的文献报道采用活性污泥或多种菌株协同多步处理酚氰废水体系^[8-9],而 JQBF100 降解酚氰体系仅为单一菌株、单一步骤。如在 Naresh 的研究中指出^[2], CN^- 会抑制耗氧活性污泥降解苯酚,而不同的是在 Young 等^[10]的研究中,不管是厌氧还是耗氧, CN^- 都对其降解苯酚无抑制作用,而 JQBF100 降解酚氰体系中, CN^- 可促进 JQBF100 降解苯酚,使其有极大地潜力应用于实际酚氰废水的降解。

3.2.2 不同浓度氰化物对苯酚降解的影响

不同浓度 CN^- 对苯酚降解的影响如图 3 所示。不同酚氰质量浓度比体系中,氰化物均在 15 min 左右被降解完全,可见 JQBF100 降氰性能良好,而苯酚分别在 122、26、31、37.6、46.3 h 被完全降解,与

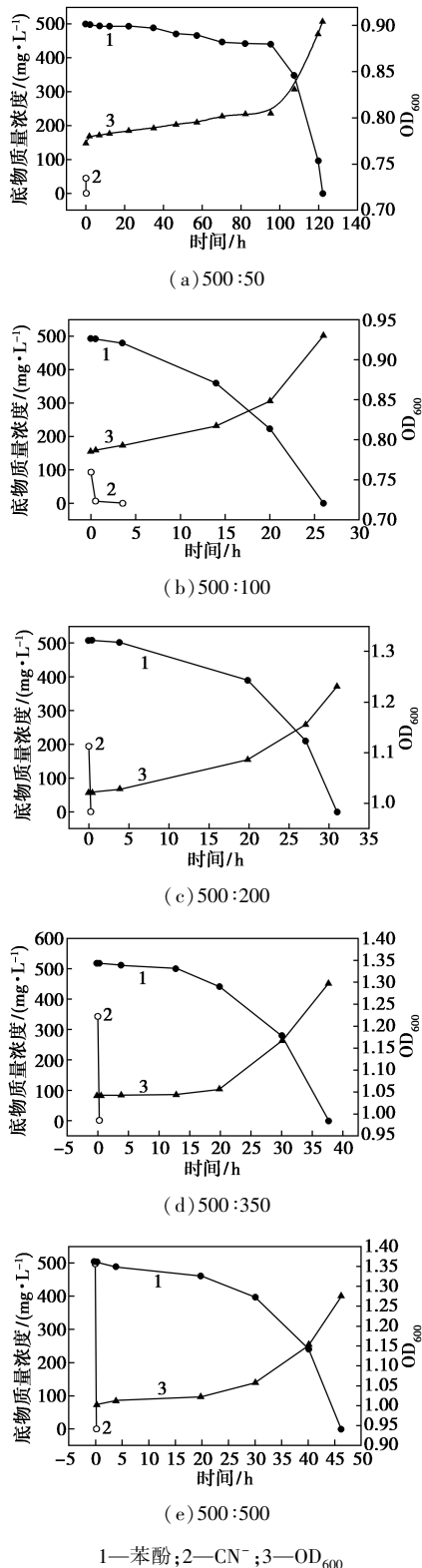


图 3 不同浓度氰化物对苯酚降解的影响

图 1(b) 比较可知,无论氰化物浓度多少都对苯酚的降解有促进作用。其中,图 3(a) 酚氰浓度比为 500:50 的总反应时间最长,这是因为氰化物较少,促进效果低;而最快的酚氰浓度比为 500:100,无停滞期且反应在 26 h 时结束;图 3(c)、图 3(d)、图 3(e) 中苯酚降解耗时分别为 31、37.6、46.3 h。总反应时间随 CN^- 初始浓度增大而先缩短后增大,当酚氰浓度比为 500:100 时反应最快。但各浓度比降解期耗时均为 26 h, CN^- 促进苯酚降解的实质是缩短停滞期,降解期耗时相同且与 CN^- 的初始浓度无关。

3.3 氰产物对菌株降解酚、氰的影响

综合酚氰体系降解情况来看, CN^- 在反应前 0.01% 时间内被降解完全,反应时间基本可以忽略,此时体系中存在甲酸、 NH_4^+ 和苯酚,为此进一步分析甲酸与苯酚之间的关系,结果如图 4 所示。酚氰体系中 CN^- 的中间产物为甲酸和甲酰胺,从图 4(a) 中可以看出,甲酸、甲酰胺于 150 min 前被完全降解。而从图 4(b) 中可以看出,含有苯酚的甲酸在 163 min 时还未降解,且甲酰胺也只降解了 70%。所以由于苯酚的存在 JQBF100 对甲酸甲酰胺的进一步降解有抑制作用。苯酚与 CN^- 的降解无相互抑制,但对其产物甲酸、甲酰胺有抑制作用。

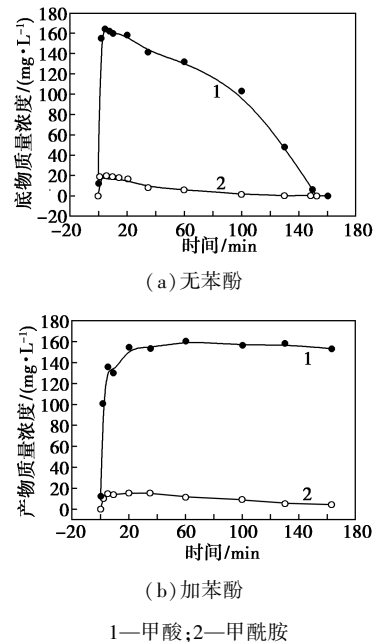


图 4 JQBF100 降解 CN^- 产物进程图

进一步分析图 3(d)、图 3(e) 酚氰体系中产物甲酸与苯酚的降解进程,如图 5 所示。由图 5(a)、图 5(b) 可以看出,甲酸与苯酚降解有相互抑制作用,且两者反应停滞期相同,分别为 12.5 h 和 20 h,随后甲酸与苯酚均开始降解。酚氰体系中 JQBF100

优先快速降解 CN^- , 转化生成的甲酸虽和苯酚相互抑制, 但抑制作用较低, 依然可以在较短的停滞期后降解, 而根据文献 [11-12] 推测, 甲酸降解提供 NADH, 为菌体代谢苯酚提供能源, 从而促进 JQBF100 降解苯酚, 但随着氰化物浓度的增大, 甲酸含量过多, 致使相互抑制作用增大, 反而使促进作用降低。

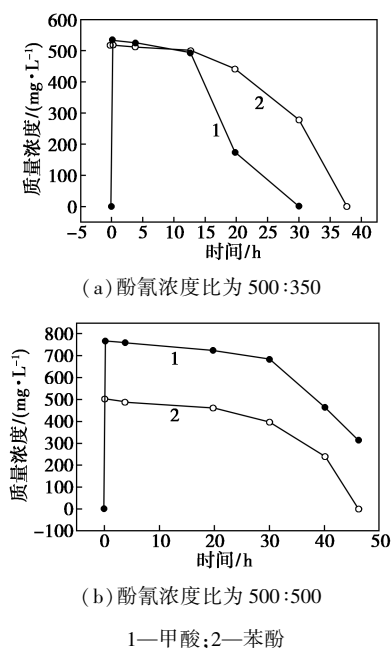


图 5 酚氰浓度比为 500:350、500:500 的产物甲酸与苯酚的降解进程图

4 结论

(1) JQBF100 对酚铵体系的降解需要长时间的停滞期, 随后降解速率逐渐加快至反应结束, JQBF100 可以苯酚为唯一 C 源生长。

(2) 在 JQBF100 降解酚氰体系中, JQBF100 可在无其他 C、N 源的条件下降解酚氰, 且降解顺序为氰化物-苯酚; 与酚铵降解对比发现, 酚氰体系中的同等浓度苯酚降解的更快、更完全, 停滞期也得到极大地缩短, 说明 CN^- 能促进 JQBF100 降解苯酚。

(3) CN^- 在酚氰体系中的降解产物为甲酸甲酰胺, 且苯酚与甲酸甲酰胺的降解相互有抑制作用, 但从反应进程上看, 苯酚随着甲酸的降解而降解, 由于甲酸进一步被降解生成 NADH, 给 JQBF100 降解苯酚提供能量, 从而起到促进作用。

参考文献

- [1] Sharma N K, Philip L. Effect of cyanide on phenolics and aromatic hydrocarbons biodegradation under anaerobic and anoxic conditions [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 256(6): 255-267.
- [2] Sharma N K, Philip L, Murty B S. Aerobic degradation of phenolics and aromatic hydrocarbons in presence of cyanide [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 121(1): 263-273.
- [3] Martínková L, Chmátal M. The integration of cyanide hydratase and tyrosinase catalysts enables effective degradation of cyanide and phenol in coking wastewaters [J]. *Water Research*, 2016, 102: 90-95.
- [4] Heipieper H J, Keweloh H, Rehm H J. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli* [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1991, 57(4): 12-13.
- [5] Wang Y, Chen H, Liu Y X, et al. An adsorption-release-biodegradation system for simultaneous biodegradation of phenol and ammonium in phenol-rich wastewater [J]. *Bioresour Technol*, 2016, 211: 711-719.
- [6] Jiang Y, Wen J, Bai J, et al. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 147(1-2): 672-676.
- [7] Papadimitriou C A, Samaras P, Sakellariopoulos G P. Comparative study of phenol and cyanide containing wastewater in CSTR and SBR activated sludge reactors [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 31-37.
- [8] Kowalska M, Bodzek M, Bohdziewicz J. Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms [J]. *Process Biochemistry*, 1998, 33(2): 189-197.
- [9] Singh U, Arora N K, Sachan P. Simultaneous biodegradation of phenol and cyanide present in coke-oven effluent using immobilized *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018, 49(1): 38-44.
- [10] Kim Y M, Lee D S, Park C, et al. Effects of free cyanide on microbial communities and biological carbon and nitrogen removal performance in the industrial activated sludge process [J]. *Water Research*, 2011, 45(3): 1267-1279.
- [11] Dash R R, Balomajumder C, Kumar A. Treatment of metal cyanide bearing wastewater by simultaneous adsorption and biodegradation (SAB) [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 152(1): 387-396.
- [12] Barclay M, Tett V A, Knowles C J. Metabolism and enzymology of cyanide/metalocyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 1998, 23(5): 321-330. ■