

异养硝化苯酚降解菌的筛选及性能研究

武文丽, 颜家保*, 陈佩, 霍晓琼

(武汉科技大学化学工程与技术学院, 湖北武汉430081)

摘要:从武汉市某石油化工厂的活性污泥中筛选出1株能降解苯酚的异养硝化菌Y10,通过生理生化试验及16S rDNA测序鉴定其为*Pseudomonas* sp. 属细菌。该菌生长和降解苯酚的适宜条件为:温度为35℃,培养基初始pH为9.0,摇床转速为200 r/min。在该条件下,质量浓度为837 mg/L及1 254 mg/L的苯酚分别在7 h和20 h时被完全降解,降解速率分别为119.6 mg/(L·h)和62.7 mg/(L·h)。以苯酚为唯一碳源且碳源充足时,Y10能将初始质量浓度为114 mg/L的氨氮在12 h时全部降解,该过程产生的亚硝酸盐氮 ≤ 1.5 mg/L,表明该菌可实现同步硝化反硝化。

关键词:炼油废水;苯酚;氨氮;异养硝化;同步硝化反硝化

中图分类号:X172

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2016)02-0109-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2016.02.028

Screening of heterotrophic nitrifying phenol-degrading strain and its characteristics

WU Wen-li, YAN Jia-bao*, CHEN Pei, HUO Xiao-qiong

(College of Chemical Engineering and Technology, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

Abstract: A phenol heterotrophic nitrifier Y10 is isolated from the activated sludge of a petrochemical refinery. It is identified as a member of the genus *Pseudomonas* sp. according to its morphological and physiological properties and the analysis of its 16S rDNA gene sequence. The optimal conditions for its growth and phenol removing are as follows: 35°C of temperature, 9.0 of initial pH of growth medium and 200 r/min of shaking speed. Under this condition, the phenol can be completely decomposed at 7 hours and 12 hours with the corresponding degradation rate of 119.6 mg/(L·h) and 62.7 mg/(L·h), when phenol concentration are 837 mg/L and 1254 mg/L, respectively. When phenol is used as the sole carbon source, this strain can degrade 114 mg/L of ammonia nitrogen completely within 12 hours. In this process, the production of nitrite nitrogen was below 1.5 mg/L. The results show that the strain can achieve simultaneous nitrification and denitrification.

Key words: refinery wastewater; phenol; ammonia nitrogen; heterotrophic nitrification; simultaneous nitrification and denitrification

苯酚是一种原型质毒物,对一切生活个体都有毒杀作用,具有“三致”效应,主要来自石油化工、炼焦、煤气等制造业的废水中^[1],排放到水体中会与水中的氯作用产生毒性更强的有机污染物——氯代酚^[2]。含酚废水的处理主要有萃取、吸附、氧化、膜分离及生物降解等技术^[3],其中生物降解因成本低、污染少而被广泛采纳^[4]。研究表明,能降解苯酚的菌属有:假单胞菌属、芽孢杆菌属、酵母菌属、不动杆菌属等,其中研究最多的是假单胞杆菌属^[5]。

炼油废水含有烃类、酚类以及NH₃-N等多种污染物,废水量大,COD含量高,硝化率低,NH₃-N脱除不稳定,主要原因是某些有毒有机物对自养硝化菌产生了抑制,而异养硝化菌能利用有机碳源,可消除有机物的抑制,从而提高硝化效果,达到同时脱碳脱氮的目的^[6]。笔者从炼油废水生化处理池的活

性污泥中筛选出1株能降解苯酚的异养硝化高效菌,并进行了种属鉴定,考察了温度、pH、摇床转速及底物质量浓度对菌株生长及苯酚降解性能的影响,同时对NH₃-N的去除和NO₂⁻-N的产生进行了考察,为含酚的氨氮废水的脱碳脱氮技术提供了依据。

1 实验材料和方法

1.1 材料

活性污泥:取自武汉市某石油化工厂废水生物处理系统;LB培养基:酵母浸出粉5 g/L,氯化钠10 g/L,蛋白胨10 g/L,自然pH;异养硝化培养基:(NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 7.9 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ 0.1 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L,微量元素储备液2 mL, pH = 7.0;微量元

收稿日期:2015-07-20

基金项目:武汉科技大学研究生创新创业基金重点项目(JCX0006);武汉科技大学国家级大学生创新创业训练计划项目(201310488009)

作者简介:武文丽(1990-),女,硕士生,主要研究方向为环境微生物及水处理,121135637@qq.com;颜家保(1964-),男,硕士,教授,主要研究方向为废水处理新技术,通讯联系人,yanjb9198@126.com。

素储备液: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.1 g/L, H_3BO_3 0.07 g/L, $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ 0.04 g/L, $CoCl_2$ 0.04 g/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02 g/L, pH = 8.0。培养基均需在 0.1 MPa、121.5℃ 条件下灭菌 20 ~ 30 min, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 苯酚为易挥发性试剂, 在培养基灭菌并冷却后再加入。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株富集及筛选

将新鲜的活性污泥在 LB 培养基中活化 2 次后, 转接至含有苯酚的异养硝化培养基中进行驯化, 驯化时 ρ (苯酚) 从 200 ~ 1 000 mg/L 梯度增加, 之后采用稀释涂平板和平板划线的方法得到若干株能降解苯酚的异养硝化菌; 对各菌株进行苯酚降解及硝化性能测试, 将性能最好的 1 株保种, 并进行后续实验。

1.2.2 菌种鉴定

菌株形态学的观察和生理生化试验依据《常见细菌系统鉴定手册》进行^[7]; DNA 提取、PCR 产物纯化使用试剂盒完成; 16S rDNA 测序分析委托武汉擎科生物技术有限公司进行。

1.2.3 菌株生长及苯酚降解条件的选择

在异养硝化培养基中将菌株活化至对数期, 按接种量 $\varphi(A) = 3\%$ 接种至以苯酚为唯一碳源、 NH_3-N 为唯一氮源的异养硝化培养基中, ρ (苯酚) = 600 mg/L, 分别考察培养温度、初始 pH、摇床

转速及底物质量浓度对菌株生长及苯酚降解性能的影响。

1.2.4 菌株同时脱碳脱氮、同步硝化反硝化能力的研究

将活化后的种子液接种至苯酚质量浓度分别为 600 mg/L 和 800 mg/L 的异养硝化培养基中, 定期取样测 OD_{600} 、苯酚、 NH_3-N 及 $NO_2^- -N$ 的质量浓度, 考察菌株 Y10 同时脱碳脱氮及同步硝化反硝化的能力。

1.3 分析方法

采用 4-氨基安替比林法测定苯酚的质量浓度^[8]; 采用纳氏试剂法测定 $NH_4^+ -N$ 质量浓度^[8]; 采用 $N-(1-萘基)-乙二胺$ 光度法测定 $NO_2^- -N$ 质量浓度^[8]; 采用比浊法测定菌体浓度^[9]。

2 结果与讨论

2.1 菌种鉴定

经分离纯化获得 19 株能降解苯酚的异养硝化菌, 选取硝化和苯酚降解性能最好的一株命名为 Y10。Y10 的菌落形态及革兰氏染色后的照片如图 1 所示。由图 1 可以看出, 菌落呈圆形, 乳白色, 隆起, 边缘整齐, 表面光滑, 有荧光色素产生, 革兰氏染色呈阴性。生理生化试验结果表明: 淀粉水解试验、糖酵解试验、甲基红试验呈阳性, 而 V-P 试验、吡啶试验呈阴性。

(上接第 108 页)

[2] Ren Junping, Ma Biao, Si Wei, *et al.* Preparation and analysis of composite phase change material used in asphalt mixture by sol-gel method[J]. Construction and Building Materials, 2014, 71: 53 - 62.

[3] Jin Xiaoming, Li Jianli, Xue Ping, *et al.* Preparation and characterization of PVC-based form-stable phase change materials[J]. Solar Energy Materials & Solar Cells, 2014, 130: 435 - 441.

[4] Sara Tahan Latibari, Mohammad Mehrali, Mehdi Mehrali, *et al.* Synthesis, characterization and thermal properties of nanoencapsulated phase change materials via solegel method[J]. Energy, 2013, 61: 664 - 672.

[5] Tommaso Toppi, Livio Mazzarella. Gypsum based composite materials with micro-encapsulated PCM: Experimental correlations for thermal properties estimation on the basis of the composition[J]. Energy and Buildings, 2013, 57: 227 - 236.

[6] Mohamed Lachheb, Mustapha Karkri, Fethi Albouchi. Thermophysical properties estimation of paraffin/graphite composite phase change material using an inverse method[J]. Energy Conversion and Management, 2014, 82: 229 - 237.

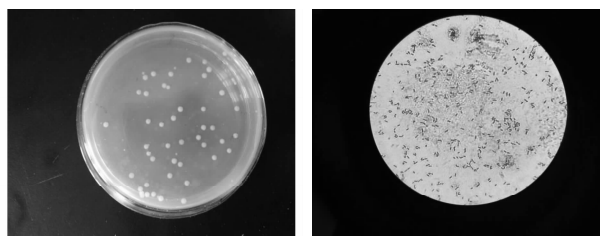
[7] Amar M Khudhair, Mohammed M Farid. A review on energy conservation in building applications with thermal storage by latent heat using phase change materials[J]. Energy Conversion and Management, 2004, 45: 263 - 275.

[8] Cai Yibing, Xu Xiaolin, Gao Chuntao. Structural morphology and thermal performance of composite phase change materials consisting of capric acid series fatty acid eutectics and electrospun polyamide6 nanofibers for thermal energy storage[J]. Materials Letters, 2012, 89: 43 - 46.

[9] Zhang Huanzhi, Xu Qingyang, Zhao Ziming. Preparation and thermal performance of gypsum boards incorporated with microencapsulated phase change materials for thermal regulation[J]. Solar Energy Materials & Solar Cells, 2012, 102: 93 - 102.

[10] Lv Shilei, Zhu Neng, Feng Guohui. Eutectic mixtures of capric acid and lauric acid applied in building wallboards for heat energy storage[J]. Energy and Buildings, 2006, 38: 708 - 711.

[11] Xu Biwan, Li Zongjin. Paraffin/diatomite composite phase change material incorporated cement-based composite for thermal energy storage[J]. Applied Energy, 2013, 105: 229 - 237. ■



(a) 菌落形态

(b) 革兰氏染色图片

图1 Y10 菌落形态和革兰氏染色后照片

将 PCR 扩增产物的碱基序列输入到 GenBank 中进行 Blast 比对,与 Y10 同源性较高的部分菌株如表 1 所示。从表 1 中可以看出,与 Y10 同源性达 99% 以上的均为假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.), 结合其形态学及生理学特征,将其鉴定为假单胞菌属。

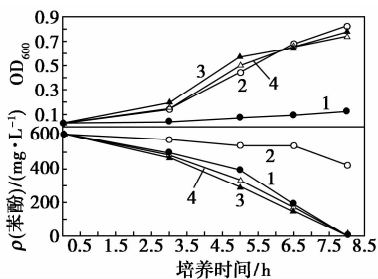
表 1 菌株 Y10 的 16S rDNA 序列部分比对结果

菌株名称	GenBank 登录号	相似度/%
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> R19	DQ095883	99
<i>Pseudomonas</i> sp. NBUS9	KF765785	99
<i>Pseudomonas</i> sp. D61	EU729354	99
<i>Pseudomonas</i> sp. N1	HQ840771	99
<i>Pseudomonas</i> sp. S7	JN828801	99
<i>Pseudomonas</i> sp. BS4	KR063184	99
<i>Pseudomonas monteilii</i> EU45	JF681286	99
<i>Pseudomonas putida</i> JC186	KJ534476	99

2.2 Y10 生长及苯酚降解培养条件的选择

2.2.1 培养温度的选择

在培养基 pH = 7.0, 摇床转速为 200 r/min 条件下,培养温度对菌株生长及苯酚降解的影响如图 2 所示。由图 2 可见,当培养温度低于 25℃ 时,菌株生长及苯酚降解均比较缓慢;当温度高于 30℃ 时,苯酚去除效果明显加强,且 30、35、40℃ 条件下菌株的生长及苯酚降解效果相当,8 h 的降解率均达 100%,因而适宜 Y10 生长及苯酚降解的温度为 30 ~ 40℃。

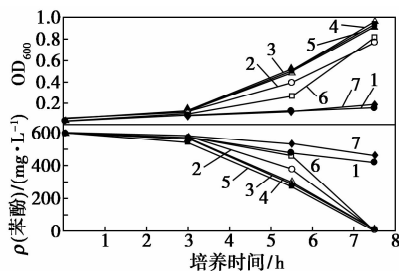


1—25℃; 2—30℃; 3—35℃; 4—40℃

图2 温度对菌体生长及苯酚降解的影响

2.2.2 初始 pH 的选择

在温度为 35℃, 摇床转速为 200 r/min 条件下,培养基初始 pH 对菌株生长及苯酚降解的影响如图 3 所示。从图 3 可以看出, Y10 对培养基 pH 适应范围较广, pH = 6.0 ~ 10.0, 菌株培养至 7.5 h 时, 苯酚均被完全降解; pH = 7.0 ~ 9.0 条件下, 菌株 Y10 的生长曲线和苯酚降解曲线几乎各自重合, 且较其他条件都好, 说明中性及偏碱性环境更利于 Y10 的生长及代谢。

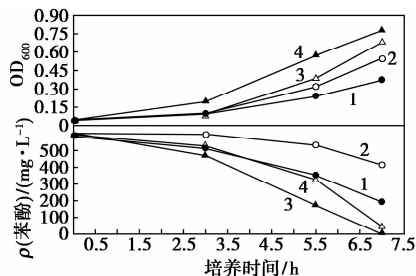


1—pH 5.0; 2—pH 6.0; 3—pH 7.0; 4—pH 8.0; 5—pH 9.0; 6—pH 10.0; 7—pH 11.0

图3 pH 对菌体生长及苯酚降解的影响

2.2.3 摇床转速的选择

溶解氧是影响好氧微生物生长及代谢的重要因素^[10], 在 35℃、pH = 9.0 条件下, 不同摇床转速对菌体生长及苯酚降解的影响如图 4 所示。由图 4 可以看出, 菌株生长与苯酚降解呈正相关, 生长速率快所对应的苯酚降解率高; 当摇床转速为 200 r/min 时, Y10 生长和苯酚降解效果为最佳, 在 7 h 时对 600 mg/L 苯酚的降解率为 100%。



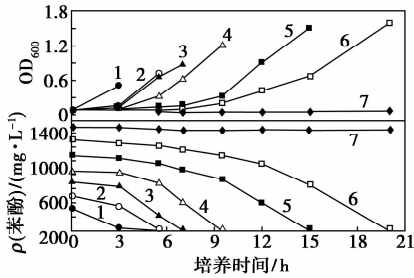
1—100 r/min; 2—150 r/min; 3—200 r/min; 4—250 r/min

图3 摇床转速对菌体生长及苯酚降解的影响

2.2.4 底物质量浓度的影响

将 Y10 接种于 pH = 9.0 的异养硝化培养基中, 在 35℃、200 r/min 条件下, 不同底物质量浓度对菌体生长及苯酚降解的影响如图 4 所示。从图 4 可以看出, 在低质量浓度范围内, OD₆₀₀ 随苯酚质量浓度的增加而迅速增大, 同时苯酚质量浓度越低, 完全降解所需的时间越短。当质量浓度 ≤ 1 300 mg/L 时,

苯酚均能被完全降解,降解能力远高于大部分已发现的苯酚降解菌^[5];当质量浓度 $\geq 1\ 500\ \text{mg/L}$ 时,菌体停止生长,说明高质量浓度的苯酚对菌株的生长产生抑制,且培养基中苯酚未挥发,说明底物的降解都是因微生物的代谢作用所引起。

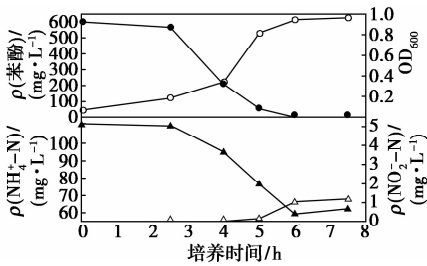


1—300 mg/L;2—500 mg/L;3—700 mg/L;4—900 mg/L;
5—1 100 mg/L;6—1 300 mg/L;7—1 500 mg/L

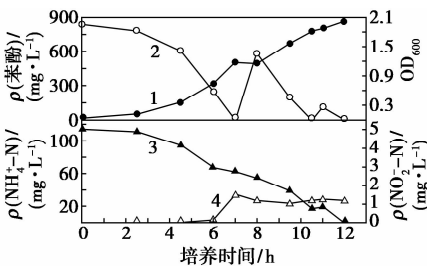
图 4 底物质量浓度对苯酚降解性能的影响

2.2.5 菌株脱碳脱氮及同步硝化反硝化性能研究

将 Y10 接种于 $\rho(\text{苯酚}) = 600\ \text{mg/L}$ 、 $\rho(\text{NH}_3\text{-N}) = 111\ \text{mg/L}$ 异养硝化培养基中,在最佳培养条件下,苯酚及 $\text{NH}_3\text{-N}$ 降解、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 产生及菌株生长曲线如图 5(a) 所示。从图 5(a) 中可以看出,在碳源充足的情况下,菌株生长与氨氮、苯酚降解同步,6 h 苯酚降为零时, $\text{NH}_3\text{-N}$ 降解率为 46.8%,继续培养发现,当碳源不足时,菌株生长进入稳定期,同时 $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度开始反增。



(a) 苯酚消耗完后未加苯酚



(b) 苯酚消耗完后继续补加苯酚

1—苯酚;2— OD_{600} ;3— $\text{NH}_4^+ \text{-N}$;4— $\text{NO}_2^- \text{-N}$

图 5 苯酚/ $\text{NH}_3\text{-N}$ 降解、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 产生及菌株生长曲线

除 $\rho(\text{苯酚}) = 837\ \text{mg/L}$ 、 $\rho(\text{NH}_3\text{-N}) = 114\ \text{mg/L}$ 外,图 5(b) 的其他条件同图 5(a)。待培养基中苯酚降解完后,以相同的 $m(\text{C}):m(\text{N})$ 向其中分别补加苯酚 576.6、110.9 mg/L。对比图 5(a)、图 5(b) 可以看出,当碳源充足时,菌株将持续生长,同时 $\text{NH}_3\text{-N}$ 也不断降解,12 h 时被完全降解。图(a)、图 5(b) 中,检测到的 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ 质量浓度均较低 ($\leq 1.5\ \text{mg/L}$),这说明菌株 Y10 可实现同步硝化反硝化。

3 结论

(1) 通过分离纯化从石油化工厂的活性污泥中筛选出 1 株异养硝化苯酚降解菌 Y10, 鉴定为假单胞杆菌。

(2) 菌株 Y10 适宜的培养条件为:温度为 35°C , 培养基初始 $\text{pH} = 9.0$, 摇床转速为 $200\ \text{r/min}$ 。在此条件下,质量浓度为 $837\ \text{mg/L}$ 及 $1\ 254\ \text{mg/L}$ 的苯酚分别在 7 h 和 20 h 时均被完全降解,降解率分别为 $119.6\ \text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 和 $62.7\ \text{mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。

(3) 在碳源充足的条件下, Y10 可使 $\rho(\text{NH}_3\text{-N}) = 114\ \text{mg/L}$ 在 12 h 时全部降解,且产生的 $\rho(\text{NO}_2^- \text{-N}) \leq 1.5\ \text{mg/L}$,表明该菌可实现同步硝化反硝化。

参考文献

- [1] 葛启隆,岳秀萍,王国英,等.好氧反硝化苯酚降解菌的分离鉴定及动力学[J].环境工程学报,2014,8(6):2605-2610.
- [2] 吕荣湖,付强.高浓度酚降解菌的选育及其降酚性能[J].环境科学,2005,26(5):147-152.
- [3] 高超,王启山,夏海燕.国内外高级氧化技术降解含酚废水的研究进展[J].工业水处理,2011,31(5):9-12.
- [4] 葛启隆,岳秀萍,王国英.一株苯酚降解菌的分离鉴定及响应面法优化其固定化[J].中国环境科学,2014,34(2):518-525.
- [5] 陈焕,方雅瑜,尹晓辉,等.苯酚降解菌的研究进展[J].安徽农业科学,2015,43(5):201-205.
- [6] 武文丽,颜家保,纪南南,等.炼油废水中异养硝化-好氧反硝化菌的筛选[J].化工环保,2015,35(4):354-358.
- [7] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:180-181.
- [8] 原国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法[M].北京:中国环境科学出版社,2000:279-281.
- [9] 林海.环境工程微生物学[M].北京:冶金工业出版社,2008:73-74.
- [10] 刘桂萍,刘长风,全桂静,等.一株苯酚降解菌的分离及降解特性[J].化工进展,2008,27(2):279-283. ■