

## 除油好氧降解菌的筛选与除油效果初探

朱文芳<sup>1</sup>, 李伟光<sup>2</sup>

(1. 浙江科技学院 建筑工程学院, 杭州 310023; 2. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

**摘要:** 为筛选降解含油废水中石油烃的好氧降解菌株, 选用炼油厂石油废水处理站曝气池活性污泥作为菌源, 采用平板分离, 得到39株菌。利用得到的菌株对含油废水中的COD<sub>C</sub>和油进行降解效果试验, 并进行混合菌的联合试验, 确定出混合菌中假单胞菌(*Pseudomonas* sp)和芽孢杆菌(*Bacillus* sp)为优势菌属。通过单株菌与混合菌降解试验的比较, 结果表明全混合菌的降解效果明显优于单株菌, 从而说明共代谢作用增强了微生物的降解能力。试验表明, 经过驯化后的混合菌, 其降解效率稳定。

**关键词:** 筛选; 含油废水; 除油; 好氧降解菌

中图分类号: X703.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-8798(2007)02-0121-04

## Acclimatation and Screening of Aeration Bacteria for Degradation of Oily Wastewater

ZHU Wen-fang<sup>1</sup>, LI Wei-guang<sup>2</sup>

(1. School of Architecture and Civil Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China;

2. School of Municipal & Environment Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

**Abstract:** In order to screen the aeration bacteria for degrading petroleum compounds in oily wastewater, the activated sludge from aeration pond of Refinery works is selected as the source of bacteria. 39 strains of bacteria are isolated by the plane-table method. Single bacteria and groups of mixed culture are used respectively to degrade oily wastewater. According to the removal ratios of the COD<sub>C</sub> and oil, the dominant bacteria (*Pseudomonas*, *Bacillus*) are obtained. The removal ratios of mixed culture are much higher than that of the single strain. It shows that co-metabolism can greatly enhance the degradation role of microbe and it can be still enhanced after being acclimatized.

**Key words:** screen; oily wastewater; degradation of oil; aeration bacteria

目前,应用高效微生物技术处理工业废水已经成为废水治理的重要发展方向,特别是在印染、石化、农药和制药等难以生物降解的工业废水的治理

中<sup>[1-4]</sup>。生物降解有机物的研究多在厌氧条件进行预处理,然后在好氧条件下进一步对有机物进行生物降解。陆军等<sup>[5]</sup>研究了苯系化合物在好氧降解菌

收稿日期: 2007-04-03

基金项目: 浙江省自然科学基金重大项目(Z504107);黑龙江省科技攻关项目(G99G7-4)

作者简介: 朱文芳(1975—),女,河南沈丘人,讲师,博士,主要从事污水生物处理和回用、工业废水处理的研究。

作用下的降解情况;洛阳杨宏建等<sup>[6]</sup>研究了复合菌在石化废水处理中的应用,将该复合菌投入复合 SBR 工艺中,提高了工艺的去油效果。

构造高效遗传工程菌株,使一种微生物同时具有降解多种底物的能力,已经成为国内外新的研究方向。石化含油废水属于较难生物降解的工业废水,  $BOD_5/COD$  比值较低。本研究从某石油化工废水处理厂的活性污泥中驯化、筛选和分离到能以石油作为生长碳源和能源的微生物,并检验了这些菌株对石油化工含油废水的降解能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品的采集

选取某石化废水处理站曝气池作为采样点,用 500 mL 无菌广口瓶采集水样,带回实验室。筛选分离之前,取适量样品加入带有玻璃珠的无菌三角瓶中,摇床振荡 1 h,转速为 80 r/min,以释放出游离细菌,再将这些处理后的活性污泥接种于新鲜的培养基上培养。本试验采用的培养基为:

石油琼脂基础培养基:葡萄糖 2 g,蛋白胨 5 g,酵母膏 1 g,煤油 10 mL,琼脂 20 g,水 1 000 mL, pH7.0, NaCl 5 g。

斜面保存加富培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,琼脂 20 g, NaCl 5 g,水 1 000 mL, pH7.0。

驯化培养基:两组平行驯化培养基(同石油琼脂基础培养基)。I 组以 5 mL 速度逐渐增加培养基中的煤油含量(至 45 mL),然后逐步减少葡萄糖、蛋白胨、酵母膏含量到培养基中没有营养物,培养基中只有煤油作为微生物的碳源。II 组逐渐减少营养物,微生物经驯化后再增加煤油含量,最终的培养基中只有煤油。

### 1.2 菌株平板分离及驯化

1.2.1 平板稀释分离 取采集好的污泥样 10 mL,接入已灭菌装有 90 mL 无菌水并装有玻璃珠的三角瓶中振荡,将均胶团打散,使细菌呈单细胞状态分散于水中。从三角瓶内的污泥菌悬浮液中取 1 mL、1 mL、2 mL、2 mL 悬液接入 4 支装有 9 mL、9 mL、8 mL、8 mL 无菌水的试管中,然后用 4 支 1 mL 移液管分别取 1 mL 水样放入平皿,倒入培养基(50 °C 的石油基础培养基)后,缓慢摇两下,待培养基凝固后,放入 30 °C 恒温培养箱中。从培养 24 h 的平皿中挑出典型菌落 14 个,标记并转接到准备好的试管斜面上培养备用。把原平皿再放置培养 12 h,观察

后长出的典型菌落有 4 个,再按前叙述步骤进行斜面培养。

1.2.2 平板划线分离 将稀释分离后的菌种斜面培养菌苔,再用平板划线法进一步纯化。从 24 h 培养的斜面上挑取少量菌苔,在已经配置好的平板上划线(不要划破培养基表面),将培养后得到的不同典型菌落转管,再进行下一次分离,直到得到的菌落特征一致的单菌落共 39 株。转接于试管中保存备用。

1.2.3 驯化培养 同上操作,斜面培养试管倒入 10~15 mL 融化的琼脂含油培养基,划线后 30 °C 培养 24 h,挑选单一且生长良好的菌落,接种于加富培养基斜面上,30 °C 培养 24 h 后于 4 °C 冰箱内保存。将筛选的菌种接种于驯化培养基上(两组同时进行),进行驯化培养 48 h,逐一转管保存。需要转管驯化 24 次后,完成驯化。

### 1.3 菌种的观察与鉴别

观察菌株的生长情况、菌落特征、菌体形态,并从中选出具有典型菌落特征(包括:形态、大小、颜色、光泽、透明度以及边缘状况),生长良好的菌株用于废水的生理生态试验和油类降解试验。

### 1.4 生物降解试验

1.4.1 废水来源及水质 含油废水取自某石化行业含油废水,源水  $COD_{Cr}$  为 80~476 mg/L;油的质量浓度为 5~150 mg/L;

1.4.2 单一菌株的降解试验 于 500 mL 三角瓶中加入 250 mL 废水(因废水中含有 N、P)配成试验废水,取生长良好的菌株接种于废水中,水中生物量为  $10^7$  个/mL 水。采用液体摇床培养法,保证供应充足的氧量。

1.4.3 混合菌的降解能力比较 试验同 1.4.2。

### 1.5 分析方法

$COD_{Cr}$  测量方法:密封法<sup>[7]</sup>测  $COD_{Cr}$ 。

油测定方法:采用石油醚萃取,紫外分光光度法(260 nm)测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的筛选与分离

经过筛选分离试验,在基础固体培养基上筛出 39 株以石油为唯一碳源的高效降解油的细菌。对这 39 株菌进行了革兰氏染色、芽孢染色及镜检并作鉴定<sup>[8]</sup>,39 株菌中属于假单胞菌属的 10 株,芽孢杆菌属 4 株,微球菌属 3 株,短杆菌属 3 株,产碱杆菌属 2 株,气单胞菌属、黄杆菌属各 1 株列于表 1 中。

表1 菌属特性概况

菌株编号	菌落特征	革兰氏染色	菌体形态	大小/nm	芽孢染色	菌属
J <sub>1</sub>	淡黄、光滑	—	杆状	1.4~2.0×0.8	—	假单胞菌属
J <sub>2</sub>	淡黄、光滑	—	杆状	1.4~2.0×0.5	—	假单胞菌属
J <sub>3</sub>	淡黄、不透明	—	杆状	1.4~2.0×0.5	—	假单胞菌属
J <sub>4</sub>	淡黄、光滑	—	杆状	1.2~2.2×0.7	—	假单胞菌属
J <sub>5</sub>	淡黄、光滑	—	杆状	1.2~2.2×0.6	—	假单胞菌属
J <sub>6</sub>	淡黄、不透明	—	长杆状	1.4~2.0×0.5	—	假单胞菌属
J <sub>7</sub>	淡黄、光滑	—	杆状	1.4~2.0×0.5	—	假单胞菌属
J <sub>8</sub>	淡黄、不透明	—	杆状	1.2~2.0×0.4	—	假单胞菌属
J <sub>9</sub>	淡黄、光滑、不透明	—	长杆状	2.0~3.2×0.8	—	假单胞菌属
J <sub>10</sub>	淡黄、规则	—	杆状	1.0~2.2×0.5	—	假单胞菌属
Y <sub>1</sub>	乳白、干燥、不规则	+	杆状	2.0×1.5	+	芽孢杆菌
Y <sub>2</sub>	乳白、不规则	+	杆状	2.0~3.2×1.2	+	芽孢杆菌
Y <sub>3</sub>	乳白、不透明	+	杆状	1.2~2.2×0.4	+	芽孢杆菌
Y <sub>4</sub>	乳白、干燥、不透明	+	杆状	2.2~2.6×1.5	+	芽孢杆菌
W <sub>1</sub>	乳白、不规则	+	球杆状	0.2~0.3×0.5	—	微球菌属
W <sub>2</sub>	乳白、不透明	+	球杆状	0.4×0.5	—	微球菌属
W <sub>3</sub>	乳白、粘稠	+	球杆状	0.2~0.5×0.4	—	微球菌属
DG <sub>1</sub>	淡黄、透明、干燥	+	短杆状	2.0×0.5	—	短杆菌属
DG <sub>2</sub>	淡黄、透明、不规则	+	短杆状	1.2×0.5	—	短杆菌属
DG <sub>3</sub>	乳白、干燥、不规则	+	短杆状	0.8×0.5	—	短杆菌属
C <sub>1</sub>	浅黄、干燥	—	杆状	2.0×0.5	—	色杆菌属
C <sub>2</sub>	淡黄、粘稠	—	杆状	2.0×0.5	—	色杆菌属
C <sub>3</sub>	透明、荧光	—	杆状	1.0×0.5	—	产碱杆菌属
C <sub>4</sub>	透明、荧光	—	杆状	1.0×0.5	—	产碱杆菌属
Q <sub>1</sub>	浅黄、干燥	—	杆状	3.0×1.0	—	气单胞菌属
H <sub>1</sub>	浅黄、不透明	—	杆状	1.5×0.5	—	黄杆菌属

## 2.2 生物降解试验

2.2.1 单一菌株降解试验 在驯化分离的过程中,观察各菌在培养基上的生长状况,发现 J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub>, J<sub>4</sub>, J<sub>6</sub>, J<sub>7</sub>, Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, DG<sub>1</sub>, DG<sub>2</sub>, W<sub>1</sub>, H<sub>1</sub> 生长状况比较好。选取这几株菌做除油试验,试验结果见图1。将各单一菌株接种于含油质量浓度为 40~60 mg/L 的培养液中,经 30℃ 摇床振荡培养 24 h,用紫外分光光度法测定各菌株对油的降解率。

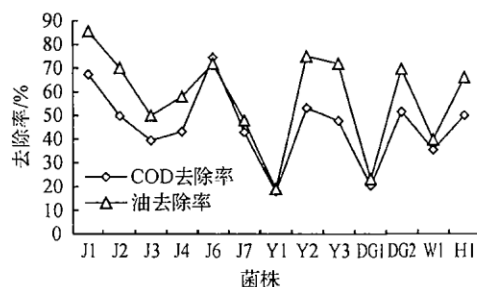


图1 单菌株降解效率

图1给出部分单一菌株的降解试验结果,处理废水含:COD<sub>Cr</sub> 80~320 mg/L、油 40~60 mg/L。试验结果表明 COD<sub>Cr</sub> 的去除率范围为 20.4%~

74.5%; J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, J<sub>6</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, DG<sub>1</sub>, H<sub>1</sub> 的除油效率较好,在 65%以上。由单一菌株试验确定处理含油废水的优势菌属为假单胞菌和好氧芽孢杆菌。其中 J<sub>1</sub> 的除油率可达 85.5%。

2.2.2 混合菌株降解试验 为了考察不同菌株的相互作用关系以及混合菌对 COD<sub>Cr</sub>、油的降解效率,将优势菌株的假单胞菌和其他菌以 2 株、3 株和多株的形式进行混合,然后用于混合菌的降解试验。试验结果见表 2。

从表 2 可以看出,有些混合菌对油的降解能力较单一菌株有不同程度的提高,但是有些混合菌的降解效果反而下降。一方面系统中各种微生物相互作用之间存在多种关系,它们在系统中进行空间和营养竞争。当它们之间为共生互惠关系时,降解率就提高;当表现为拮抗作用时降解率就降低。另一方面,从微生物对污染物的降解和转化的共代谢作用可知,微生物在可以作为碳源和能源的基质中生长时,会伴随着一种非生长基质不完全转化。在混合培养时,这种培养可以为其他微生物所进行的共

表 2 混合菌对 COD<sub>Cr</sub>、油的降解效率

菌组编号	COD <sub>Cr</sub>			油		
	降解前/ (mg · L <sup>-1</sup> )	降解后/ (mg · L <sup>-1</sup> )	降解率/ %	降解前/ (mg · L <sup>-1</sup> )	降解后/ (mg · L <sup>-1</sup> )	降解率/ %
一 J <sub>1</sub> + J <sub>6</sub>	231.6	59.5	74.3	39.6	5.8	85.2
二 J <sub>1</sub> + Y <sub>2</sub>	231.6	89.9	61.2	39.6	5.4	86.4
三 J <sub>1</sub> + DG <sub>2</sub> + Y <sub>3</sub>	231.6	47.7	79.4	39.6	4.87	87.7
四 J <sub>1</sub> + H <sub>1</sub> + Y <sub>2</sub> + Y <sub>3</sub>	231.6	98.2	57.6	39.6	9.78	75.2
五 全混菌(39 株)	231.6	40.8	82.4	39.6	3.21	91.1

代谢作用或其他微生物的降解提供中间代谢产物,使共代谢产物可以继续降解。若微生物不能依靠某种有机污染物生长,并不意味着这种污染物抗微生物攻击。在适合的底物和环境条件下,该污染物可通过共代谢作用而得到降解<sup>[9]</sup>。这也进一步说明对于含油废水中复杂的有机污染物,利用单一菌株的降解作用是无法完全去除的,而在混合好氧菌的共代谢酶的作用下,烃类污染物质可以得到进一步的降解。

### 3 结 论

1) 筛选得到 39 株含油废水好氧降解菌,能以油烃为唯一碳源和能源,经过 24 h 培养,单菌对油的降解率最高为 85.5%。确定出对油烃降解的优势菌属为假单胞菌和芽孢杆菌。

2) 通过对单一菌株和混合菌株降解的试验研究,结果表明混合菌的共代谢作用大大增强了微生物的降解能力,在底物浓度较高时,仍然表现出较好的降解能力。全混菌的除油率可达 90% 以上。

3) 在连续运行实验中驯化后 39 株菌对油的降解效率稳定。但是各菌株之间的生态关系以及菌株之间的组合模式须进一步的研究。

### 参考文献:

- [1] ZHOU Ping, SU Chengyi, LI Binwei, et al. Treatment of high-strength pharmaceutical wastewater and removal of antibiotics in anaerobic and aerobic biological treatment processes[J]. J Envir Engrg, 2006, 132(1): 129-136.
- [2] 钦濂, 孟建平, 周欣. 预处理—水解酸化—AO 工艺处理印染废水[J]. 环境工程, 2005, 23(3): 32-35.
- [3] VAN LIER J B, TILCHE A, AHRING B K, et al. New perspective in anaerobic digestion[J]. Wat Sci & Tech, 2001, 43(1): 1-18.
- [4] MOSCHE M, MEYER U. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate in anaerobic digestion influence of exposure time[J]. Water Res, 2002, 36: 3253-3260.
- [5] 陆军. 苯系化合物好氧降解菌的驯化和筛选[J]. 环境科学, 1996, 17(6): 1-5.
- [6] 杨宏建. 高效菌在石化废水处理中的应用[J]. 污染防治技术, 2000, 13(1): 37-40.
- [7] 黄君礼. 水分析化学[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1997: 54.
- [8] 布坎南. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1987.
- [9] 马文漪, 杨柳燕. 环境微生物工程[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 127.