

DOI:10.3880/j.issn.1004-6933.2015.03.005

苯酚降解菌筛选及降解特性研究

李鲜珠, 沈玉冰, 马溪平, 王闻烨, 李万龙, 张宏亮, 徐成斌

(辽宁大学环境学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘要:针对焦化废水生物难降解有机物含量高、实际生产过程中的水质和水量变化大的特点,开展了高效菌株处理含酚废水的试验研究。从某焦化厂水处理车间生物处理装置曝气池活性污泥中驯化、分离和筛选得到4株以苯酚为唯一碳源的高效降解菌,并对其进行鉴定及降解特性研究。结果表明:初步鉴定 h32a2、b31B、h31A 和 b41a 为假单胞菌属(*Pseudomonas sp.*);通过溴化容量法测定苯酚含量,确定了菌株的最佳降解条件为:温度 32℃, pH 值 7.5, 培养时间 16 h, 接种密度 1%, 且单一菌株 h32a2 的苯酚最大降解率可达 90.55%。通过单一和组合高效菌株对苯酚的降解特性可知,4 株高效菌混合的降解效果最佳。因此,混合高效苯酚降解菌处理含酚废水具有一定的可行性。

关键词:焦化废水;苯酚;菌株;降解特性

中图分类号:X703

文献标志码:A

文章编号:1004-6933(2015)03-0022-05

Screening of phenol-degradation bacteria and study of its degradation characteristics

LI Xianzhu, SHEN Yubing, MA Xiping, WANG Wenye,

LI Wanlong, ZHANG Hongliang, XU Chengbin

(School of Environment Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: According to the characteristics that there are high content of bio-refractory organic matters in the coking wastewater and the changes of water quality and water quantity during actual production are great, the authors of this paper mainly studied the treatment of wastewater containing phenol by high efficient strains. four highly efficient degradation bacteria strains which take phenol as the sole carbon source were obtained by means of domestication, isolation and screening to the activated sludge in the aeration tank, a biological treatment device, of the water treatment plant in a coking factory. Those four highly efficient degradation bacteria strains were identified and its degradation characteristics were studied. The results show that the strain h32a2, b31B, h31A and b41a are identified as *Pseudomonas sp.*; Phenol content was measured by brominating volumetric method. The best condition of strain degradation was determined as follows: the degradation temperature was 32℃, the pH value is 7.5, the strain incubation time was 16h, the inoculation density was 1%, and the maximum phenol degradation rate of the strain h32a2 reached 90.55%. We can know that the degradation effect of combined four highly efficient degradation bacteria strains is the best from the degradation characteristics of single and combined strain. The treatment of wastewater containing phenol by mixed high efficient phenol-degradation bacteria was feasible.

Key words: coking wastewater; phenol; strain; degradation characteristics

焦化废水是煤制焦炭、煤气净化及焦化产品生产回收过程中产生的废水,属难生化降解的高浓度

有机工业废水,其有机污染物以酚类化合物为主^[1]。焦化废水的处理方法有物理法、化学法和生

基金项目:国家“十二五”科技重大专项子课题(2012ZX07202003-05);辽宁大学本科教学改革研究项目(JG2013ZD0010);辽宁大学环境学院重点学科资助项目

作者简介:李鲜珠(1991—),女(朝鲜族),硕士研究生,研究方向环境工程微生物学。E-mail:senzuu@163.com

通信作者:徐成斌,副教授。E-mail:xuchengbin80@163.com

物法。微生物对有毒有害化合物的降解有着重要的作用,特别是微生物生态降解系统具有温和、有效和不产生二次污染等特性,越来越引起科学家的重视^[2-3]。关于微生物降解苯酚的研究已有许多报道,近几十年的研究^[4]表明,许多微生物参与了此类有机毒物的具有重要环保意义的生物降解反应,有机物可以被菌群利用和分解,直至为无害的最终产物,如 CO₂、H₂O 和 N₂ 等。

焦化废水中所含的污染物是一个十分复杂的混合体系,用单一的菌种,往往难以达到预期的效果和实际应用的需要,而且利用纯菌种来分解难降解有机物,可能会停在某一个中间阶段,如果没有其他菌种继续分解残余的中间产物,则废水处理无法进行到底^[5-7]。对微生物进行筛选、驯化,得到高效微生物,而通过合理组合多种高降解能力的微生物菌群来分解有机物,其效率比单一的纯菌种更好,因为这样可以发挥不同种类微生物的协同代谢优势,实现多种难降解污染物的同时降解^[8]。

高效优势菌技术在现代废水治理中的应用日益引起人们的兴趣与关注,这一技术与传统的生物治理技术相结合,已成为生物治理废水发展的一种趋势。

1 试验材料与方法

1.1 菌种来源

菌种取自本溪钢铁集团公司焦化厂水处理车间生物处理装置曝气池活性污泥。

1.2 培养基

固体培养基:牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、琼脂 15 ~ 20 g、蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2 ~ 7.4,121℃ 灭菌 30 min(含酚溶液)。

液体培养基:蛋白胨 0.5 g、K₂HPO₄ 0.1 g、MgSO₄ 0.05 g、蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2 ~ 7.4,121℃ 灭菌 30 min(含酚溶液)。

1.3 菌种的分离与筛选

将被制成不同稀释倍数的活性污泥加入含酚固体培养基,于 32℃ 培养箱中培养 24 h 后,观察菌落的生长情况,挑选出生长速度快、荧光明亮的菌落。将分离出的菌落分别多次划线平板培养,得到单个菌落。为了分离出对酚有高效降解能力的菌株,对上述菌株进行进一步的筛选。利用摇床进行连续培养,对单一菌株进行酚降解能力的测试。本试验选用溴化容量法,测试条件:温度 32℃、酚质量浓度 100 ~ 400 mg/L。

1.4 菌种鉴定

根据细菌的个体特征、群落形态,革兰氏染色反应和生理生化反应将菌种鉴定到属^[9-10]。

1.5 不同菌株组合对苯酚的降解率

制备液体培养基,分装于 500 mL 锥形瓶中,每瓶 100 mL,121℃ 灭菌 30 min。将菌种排列组合后进行降解实验,组合分别为:①h32a2+b31B、②h32a2+h31A、③h32a2+b41a、④b31B+h31A、⑤b31B+b41a、⑥h31A+b41a、⑦h32a2+b31B+h31A、⑧h32a2+b31B+b41a、⑨h32a2+h31A+b41a、⑩b31B+h31A+b41a、⑪h32a2+b31B+h31A+b41a。将不同组合的菌悬液无菌操作分别接种于液体培养基中,置于摇床上恒温振荡培养 24 h,再无菌操作加入苯酚标准液,使培养基中的苯酚质量浓度为 400 mg/L,摇床恒温振荡培养 24 h,取出后分别测定苯酚的降解率。

1.6 苯酚降解试验

将处于对数生长期的菌液(单一菌株和混合菌株的菌悬液)接到液体培养基中,以苯酚作为唯一碳源,按表 1 的梯度分别考察温度、pH、苯酚质量浓度、接种量和菌株的培养时间对苯酚降解率的影响。

表 1 苯酚降解各影响因素的试验梯度

温度/℃	pH	苯酚质量浓度/ (mg · L ⁻¹)	接种量/%	菌株的培养 时间/h
24	5.5	100	0.1	8
28	6.5	200	0.5	16
32	7.5	300	1	24
36	8.5	400	3	32
40	9.5	500	5	
			7	
			9	

2 结果与讨论

2.1 苯酚降解菌的筛选

a. 初始苯酚质量浓度为 200 mg/L。摇床振荡培养 24 h 后,进行苯酚降解试验,结果如表 2 所示。

表 2 各菌株对初始质量浓度为 200 mg/L 的苯酚降解率

菌株	苯酚降解 率/%	降解能力	菌株	苯酚降解 率/%	降解能力
h42B	7.72	-	b31A	45.39	-
h31A	97.10	+	b32A1	40.68	-
h32a2	98.87	++	b12a1	89.08	+
h41b'	32.20	-	b31B	97.93	+
h12a2	9.60	-	b41a	94.35	+

注:“++”代表降解能力最强;“+”代表降解能力较强;“-”代表降解能力弱。

在初始苯酚质量浓度为 200 mg/L 时,整理数据后得知,苯酚降解率大于 70% 有 5 株菌。5 株菌分别为 h31A、h32a2、b12a1、b31B、b41a,其中 h32a2 的降解率最高,为 98.87%。

b. 初始苯酚质量浓度为 300 mg/L。摇床振荡培养 24 h 后,进行苯酚降解试验。

在初始苯酚质量浓度为 300 mg/L 时,进行苯酚降解试验,整理数据可知,苯酚降解率大于 70% 有 5

株菌。5 株菌分别为 h31A、h32a2、b31B、b41a、b12a1，其中 h32a2 的降解率最高，为 95.02%（表 3）。

表 3 5 种菌株对初始质量浓度为 300 mg/L 的苯酚降解率

菌株	苯酚降解率/%	降解能力	菌株	苯酚降解率/%	降解能力
h31A	89.34	+	b31B	92.71	+
h32a2	95.02	++	b41a	86.90	+
b12a1	75.41	+			

注：“++”代表降解能力最强；“+”代表降解能力较强。

c. 初始苯酚质量浓度为 400 mg/L。摇床振荡培养 24 h 后。在初始苯酚质量浓度为 400 mg/L 时,进行苯酚降解试验,整理数据可知,苯酚降解率大于 70% 的有 4 株菌。4 株菌分别为 h31A、h32a2、b31B、b41a,其中 h32a2 的降解率最高,为 90.55%（表 4）。

表 4 5 种菌株对初始质量浓度为 400 mg/L 的苯酚降解率

菌株	苯酚降解率/%	降解能力	菌株	苯酚降解率/%	降解能力
h31A	82.16	+	b31B	88.34	+
h32a2	90.55	++	b41a	79.80	+
b12a1	64.32	-			

注：“++”代表降解能力最强；“+”代表降解能力较强；“-”代表降解能力弱。

根据以上试验,最后筛选出 4 株高效苯酚降解菌:h32a2、b31B、h31A 和 b41a,其降解能力分别为（苯酚质量浓度为 400 mg/L 时）：90.55%、88.34%、82.16% 和 9.80%。

2.2 降解菌的鉴定

根据细菌的个体特征、群落形态,通过革兰氏染色反应和生理生化反应将菌种鉴定到属,试验结果见表 5。

表 5 苯酚优势降解菌的基本特征

菌株	革兰氏染色	菌落特征	菌落直径/mm	最高耐酚能力/(mg·L ⁻¹)
h32a2	G ⁻	菌群圆形,乳白色,半透明,平滑的凸面,边缘不十分规则,蓝绿色荧光	1.3	3000
b31B	G ⁻	菌群圆形,乳白色,半透明,稍有隆起,边缘光滑,蓝绿色荧光	2.1	3000
h31A	G ⁻	菌群圆形,乳白色,半透明,平滑的凸面,边缘光滑,蓝绿色荧光	1.5	2500
b41a	G ⁻	菌群圆形,乳白色,半透明,平滑的凸面,边缘不十分规则,蓝绿色荧光	2.0	2500

注：“G⁻”表示革兰氏为阴性。

根据此试验结果,结合文献[10],可以认为菌株 h32a2、b31B、h31A、b41a 为假单胞菌属（*Pseudomonas sp.*）。

2.3 不同菌种组合对苯酚降解率的影响

选取苯酚质量浓度为 400 mg/L,将以上试验筛选出的 4 株菌种排列组合后进行降解试验,测定苯酚降解率,图 1（图 1 中横坐标序号分别对应本文

1.5 中不同组别）。

表 6 h32a2、b31B、h31A、b41a 菌株的生理生化试验结果

试验项目	菌株			
	h32a2	b31B	h31A	b41a
淀粉水解试验	-	-	+	-
乙酰甲基醇试验	-	-	-	-
甲基红试验	-	-	-	-
硝酸盐还原试验	+	+	+	+
氧化酶试验	-	-	-	-
产硫化氢试验	-	-	-	-
柠檬酸盐利用试验	+	+	+	+
葡萄糖氧化发酵试验	+	+	+	+
接触酶试验	+	+	+	+
明胶液化试验	+	+	-	-

注：“+”代表阳性；“-”代表阴性。

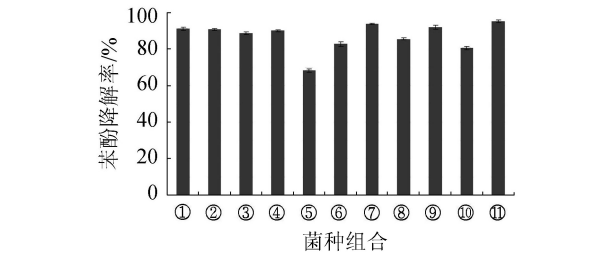


图 1 不同菌种组合苯酚降解率的变化

试验发现,菌种组合对苯酚的降解效果各不相同,有些菌种组合的苯酚降解率比单株菌的效率高低,有的菌种组合降解效果则恰恰相反,这可能是菌种间协同或拮抗作用造成的。由图 1 可见,b31B 和 b41a 组合的苯酚降解率最低,而 4 株菌株混合的组合降解效果是最好的,并且菌株 h32a2 所在的菌株组合苯酚降解率都较高。这可能是由于 b31B 和 b41a 共存时拮抗作用表现明显,而当 4 株菌株共存时协同作用大于拮抗作用,且在混合菌株降解过程中极有可能是菌株 h32a2 起着主导作用。试验结果表明,采用混合高效苯酚降解菌处理含酚废水是可行的。

2.4 温度对高效菌降解苯酚的影响

以温度为横坐标,苯酚降解率为纵坐标,温度与混合菌株、单一菌株的苯酚降解率之间的关系如图 2 所示。

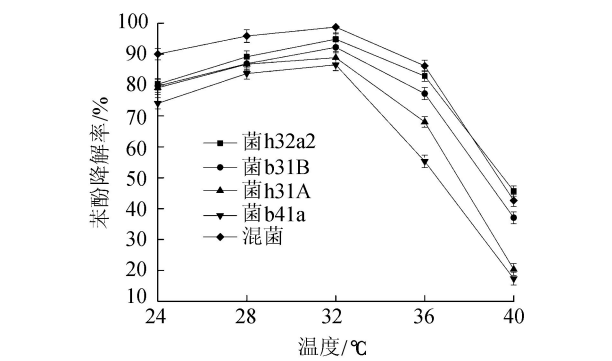


图 2 温度对苯酚降解率的影响

从图 2 可见,培养温度不同,混合菌株和单一菌株对苯酚的降解效率明显不同。温度在 32℃ 时,混

合菌株的苯酚降解率最高,达 98% 以上,单一菌株较混合菌株低,但菌株 h32a2 的苯酚降解率最高为 94.83%。在最低温度 24℃ 时,单一菌株和混合菌株的苯酚降解率均有所降低,在最高温度 40℃ 时苯酚降解率普遍都较低,混合菌株的降解率为 42.63%,菌株 h32a2 降解率也仅为 45.68%。从图 2 还可以看出,混合菌株和单一菌株苯酚降解率随温度的变化曲线基本上遵循正态分布。苯酚降解率由最低温度 24℃ 为开始,随着温度的变化曲线升高,苯酚降解率开始上升,32℃ 达到最大。此后随温度的升高苯酚降解率不再上升,反而下降,到 40℃ 时苯酚降解率降至最低。

从本试验可以看出高效菌降解苯酚的最适宜温度是 32℃,在这个温度时环境条件能更好地发挥菌株的降解性,但温度的高低影响它们降解率大小的幅度不同,这跟菌株对温度的反应程度有关。促使各种降解过程的生物酶,其反应温度一般不同,它们对温度变化的敏感性影响到反应速率及反应程度,宏观上表现为影响菌株对苯酚的降解率。

2.5 pH 值对高效菌降解苯酚的影响

以 pH 为横坐标,苯酚降解率为纵坐标,pH 与混合菌株、单一菌株的苯酚降解率之间的关系如图 3 所示。

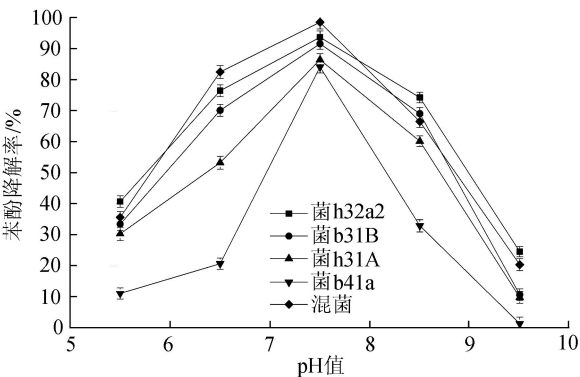


图 3 pH 值对苯酚降解率的影响

由图 3 可见,当苯酚质量浓度一定、其他培养条件完全相同时,不同 pH 值对混合菌株、单一菌株降解苯酚的能力也明显不同。混合菌株在 pH 值为 7.5 时对苯酚降解率最高,达到 98% 以上,pH 值为 6.5、8.5 时苯酚降解率较高,在 pH 值为 5.5、9.5 时苯酚降解率很低;单一菌株在 pH 值 7.5 时苯酚降解率均较高,其中菌株 h32a2 的降解率最高,达到 93.62%。总体看来:规律与温度类似。苯酚降解率随 pH 值变化的曲线呈正态分布。

2.6 苯酚质量浓度对高效菌降解苯酚的影响

以苯酚质量浓度为横坐标,苯酚降解率为纵坐标,苯酚质量浓度与混合菌株、单一菌株的苯酚降解

率之间的关系如图 4 所示。

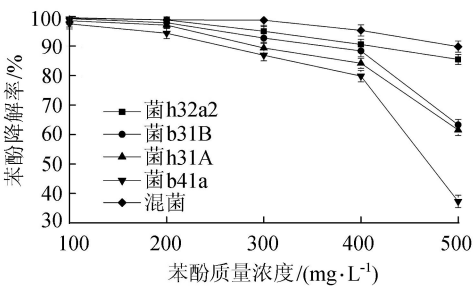


图 4 苯酚质量浓度对苯酚降解率的影响

由图 4 可见,随着苯酚质量浓度的增大,混合菌株及单一菌株对苯酚的降解能力降低。试验用的 4 株菌是经过逐级在不同苯酚质量浓度下筛选、驯化出来的,有一定的耐酚性,除菌 b41a 外,其余菌株在苯酚质量浓度逐渐升高时降解率降低的幅度不大。当苯酚质量浓度小于 400 mg/L 时,4 株菌的苯酚降解率均在 75% 以上;当苯酚质量浓度为 500 mg/L 时,只有菌 h32a2 苯酚降解率高于 75%。混合菌株与单一菌株苯酚降解率的对比表明:在相同的初始质量浓度下,菌株联合作用的降解酚的能力较单一菌株效果好。

2.7 接种量对高效菌降解苯酚的影响

以接种量为横坐标,苯酚降解率为纵坐标,接种量与混合菌株、单一菌株的苯酚降解率之间的关系如图 5 所示。

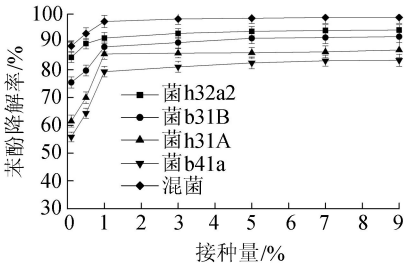


图 5 接种量对苯酚降解率的影响

由图 5 可见,相同接种量下,混合菌株苯酚降解率高于单一菌株。同时以接种量为 9% 时各菌株的苯酚降解率最高,其中混合菌株与菌株 h32a2 苯酚降解率分别达到 98.80% 和 94.25%,但与接种量为 1%、3%、5%、7% 时相比较,各菌株的苯酚降解率并无太大的提高,这可能与细菌对于苯酚的适应能力有关。如果初始接菌量太少,很少的菌量不能分泌足够的降解酶以快速适应较高浓度的苯酚压力,当接种量增加时,由于细菌数量增加,在相同苯酚质量浓度下,细菌分泌的酶量增加,对于较高的苯酚质量浓度具有较好的适应性,能较好地降解利用苯酚。如果接种量再提高,由于没有相对更强的压力,细菌可以很好生长,所以在试验中,选择 1% 作为接菌量,其他接种量需菌量大,也不经济。

2.8 菌株的培养时间对高效菌降解苯酚的影响

以菌株的培养时间为横坐标,苯酚降解率为纵坐标,培养时间与混合菌株、单一菌株的苯酚降解率之间的关系如图 6 所示。

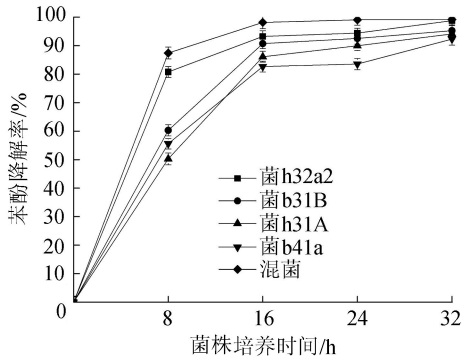


图 6 菌株培养时间对苯酚降解率的影响

由图 6 可见,在其他条件一样的情况下,同样的培养时间,混合菌株的苯酚降解率高于单一菌株。随着菌培养时间的延长,菌的苯酚降解率逐渐升高,32 h 时,混合菌株和菌株 h32a2 的苯酚降解率均为最高值,分别为 99.14% 和 98.77%,但与培养时间为 16 h 和 24 h 比较,苯酚降解率的上升幅度并不大,因此,细菌的培养时间最佳值为 16 h。

3 结 论

- a. 以本钢焦化厂曝气池中的污泥为菌种来源,经过分离、筛选和驯化,最终挑选出 4 株菌落,分别命名为 h32a2、b31B、h31A、b41a,该 4 株菌都能够以苯酚为唯一碳源的培养基上良好生长,苯酚降解率分别为 90.55%、88.34%、82.16% 和 79.80%。
- b. 根据高效菌菌株个体特征、群落形态,革兰氏染色反应和生理生化反应,检索文献[10],将菌株 h32a2、b31B、h31A 和 b41a 初步鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas sp.*)。
- c. 研究单一和组合条件下高效菌株对苯酚的降解特性,结果表明,b31B 和 b41a 组合的苯酚降解率最低,而 4 株菌混合的降解效果是最好的。这可能是由于 b31B 和 b41a 共存的时候拮抗作用表现明显,而当 4 株菌共存时协同作用优于两株菌的拮抗作用,因此利用混合高效苯酚降解菌处理含酚废水是可行的。
- d. 对单一菌株和混合菌株进行了温度、pH 值、培养时间、接种量的试验研究,结果表明,各单因素试验中混合菌株的苯酚降解率均高于单一菌株,降解的最佳条件为:温度 32℃,pH 值 7.5,菌株的培养时间 16 h,接种密度 1%。其中,菌株 h32a2 在各项降解试验中都表现出较好的降解效果,一般条件下降解率已达到 90.55%,而且还具有耐高浓度的特

性,以后应进一步对其进行降解特性研究。

参考文献:

[1] 钱城,田沈,杨秀山. 焦化废水的微生物降解研究进展[J]. 上海环境科学,2003,22(2): 129-132. (QIAN Cheng, TIAN Shen, YANG Xiushan. Study progress on coke plant wastewater treatment by microbial biodegradation [J]. Shanghai Environmental Sciences, 2003,22(2): 129-132. (in Chinese))

[2] 周静,李素芹,裴琦. 新物化法深度处理焦化废水[J]. 环境污染与防治,2009,31(9): 64-67. (ZHOU Jing, LI Suqin, PEI Qi. Advanced treatment of coking-plant wastewater by novel physicochemical method [J]. Environmental Pollution & Control,2009,31(9): 64-67. (in Chinese))

[3] LOH Kaichee, CHUNG Taishun, ANG Weifern, et al. Immobilized-cell membrane bioreactor for high-strength phenol wastewater [J]. Journal of Environmental Engineering,2000,126(1): 75-79.

[4] 林如亮,齐水冰. 焦化废水菌种筛选及降解研究[J]. 广东化工,2004,2(1): 51-54. (LIN Ruliang, Qi Shuibing. Screen tamed bacteria and degrade coke-plant wastewater experiments [J]. Guangdong Chemical Industry, 2004, 2(1): 51-54. (in Chinese))

[5] 姜立春,阮期平,袁利娟,等. 高效降酚菌株 JY03 的筛选及其降解特性研究[J]. 环境工程学报,2011,5(8): 1912-1916. (JIANG Lichun, RUAN Qiping, YUAN Lijuan, et al. Study on screening and characteristics of a phenol-degrading bacterium strain JY03 [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering,2011,5(8): 1912-1916. (in Chinese))

[6] 丁军委,陈丰秋,吴素芳,等. 超临界水氧化方法处理含酚废水[J]. 环境污染与防治,2000,22(1): 1-3. (DING Junwei, CHEN Fengqiu, WU Sufang, et al. Treatment of phenol-containing wastewater by supercritical water oxidation process [J]. Environmental Pollution & Control,2000,22(1): 1-3. (in Chinese))

[7] 周集体,关晓燕,曲媛媛,等. 苯酚降解菌株 GXY-1 分离鉴定降解及其粗酶特性研究[J]. 大连理工大学学报,2010(3): 340-345. (ZHOU Jiti, GUAN Xiaoyan, QU Yuanyuan, et al. Research on isolation, identification of a phenol-degrading strain GXY-1 and characteristics of its degradation and crude enzyme [J]. Journal of Dalian University of Technology, 2010 (3): 340-345. (in Chinese))

[8] 刘兴平. 苯酚降解菌的分离及降解特性研究[J]. 环境保护科学,2008,34(2): 38-40. (LIU Xingping. Selection and screening of phenol degrading microorganism under aerobic conditions and its degrading characteristics [J]. Environmental Protection Science, 2008, 34(2): 38-40. (in Chinese))

[9] 马放,任南琪,杨基先. 污染控制微生物学实验[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2002: 48-84.

[10] 布坎南·吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 北京:科学技术出版社,1984.

(收稿日期:2014-12-10 编辑:徐 娟)