

# 用于青霉素废水处理的高效菌株的分离及特性研究

韩磊 纪树兰\* 任海燕 张国俊

(北京工业大学环境与能源工程学院,北京 100022)

**摘要** 从某制药厂污水处理站的活性污泥中筛选出两株能以青霉素废水中有机物为惟一碳源和能源的高效降解菌 k1 和 k2。通过形态及生理生化特征分析,初步鉴定 2 株菌为芽孢菌,其中 k2 为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。2 株菌的最适 pH 值分别为 8 和 7,温度均为 35℃,当废水含量 50% 时,菌株 k1 和 k2 对青霉素废水的 COD 去除率分别为 79% 和 81%。单菌株与混合菌株对废水的降解特性试验表明,前 48 h 混菌对废水的去除率不及单菌株,而 48 h 后混合菌株去除率高于单菌株,60 h 时达到最高为 85%。

**关键词** 青霉素废水 高效降解菌 芽孢菌

中图分类号 X172 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2007)07-0051-04

## Study on isolation and characteristics of high efficiency degrading bacterium for penicillin wastewater treatment

Han Lei Ji Shulan Ren Haiyan Zhang Guojun

(College of Environment and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022)

**Abstract** Two high efficiently degrading bacterium strains(k1,k2) which could grow on the organic substrates of penicillin wastewater as sole carbon and energy sources were isolated from the sludge of pharmacy wastewater treatment plant. Based on the analysis of morphological and physio-biochemical characteristics, the two strains were identified as *Bacillus*, k2 was *Bacillus pumilus*. The optimal pH for k1 and k2 was 8 and 7, respectively, The optimal temperature was 35℃ for both of them. When the content of wastewater was 50%, the degradation rate of COD could reach 79% and 80% respectively within 36 h. Experimental results showed that the mixture of the two strains caused lower degradation rate within 48 h. But the degradation rate of COD by the mixed strains was higher than the single strain after 48 h, which could reach 85% within 60 h.

**Key words** penicillin wastewater; high efficiency degrading bacterium; *Bacillus*

青霉素(benzyl penicillin)是一类重要的β-内酰胺类抗生素,具有很强的抗氧化、抗降解性能,其生产废水成分复杂,有机污染物种类多、浓度高,带有较深的色度,具有强烈刺激性气味,生物毒性很大,对微生物生长有极强的抑制作用<sup>[1]</sup>。目前青霉素废水处理以好氧、厌氧和组合生物工艺为主,但生物降解效果并不理想,废水实际处理率较低。某些微生物经过驯化后可以增强对青霉素废水的处理能力,达到生物强化的目的,提高生物法处理青霉素废水的效果。从自然环境中分离出具有显著降解功能的菌株,经过特殊的筛选和驯化,获得纯培养物,这些具有不同降解功能的菌株相互组合成菌群用于废水处理,称为生物强化技术,是当前国内外研究的热点<sup>[2]</sup>。目前,国内外对青霉素废水处理工艺的研究较多,但对用于青霉素废水处理的高效降解菌的研究报道较少。据蔡东升等报道<sup>[3]</sup>,降解抗生素废水的优势菌种多为气单胞菌属、假单胞菌属和红螺菌属,其对 COD 的去除率可达 52% 以上。本研究从某制药厂污水处理站活性污泥中筛选出对青霉素废水中 COD 有较高去除能力的优势菌 2 株,并对其进行初步鉴定和生长及降解特性研究。

点<sup>[2]</sup>。目前,国内外对青霉素废水处理工艺的研究较多,但对用于青霉素废水处理的高效降解菌的研究报道较少。据蔡东升等报道<sup>[3]</sup>,降解抗生素废水的优势菌种多为气单胞菌属、假单胞菌属和红螺菌属,其对 COD 的去除率可达 52% 以上。本研究从某制药厂污水处理站活性污泥中筛选出对青霉素废水中 COD 有较高去除能力的优势菌 2 株,并对其进行初步鉴定和生长及降解特性研究。

收稿日期:2006-03-02; 修订日期:2007-06-19

作者简介:韩磊(1981~),男,硕士研究生,主要从事环境微生物及水污染控制的研究工作。E-mail:hanlei 726@126.com

\* 通讯联系人,E-mail:jshl@bjut.edu.cn

## 1 实验

### 1.1 样品和培养基

泥样取自某制药厂污水处理站的二沉池和水解酸化池,水样取自青霉素生产车间的废水排放口。无碳源的无机盐培养基组成为每升蒸馏水中含  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g, 酵母浸粉 0.05 g, 微量元素 5 mL<sup>[4]</sup>, pH 7。固体培养基中加入 1.5% 的琼脂粉。

### 1.2 富集和分离

泥样沉淀后,分别取其上清液 1 mL 接种到装液量为 100 mL (废水含量 5%、10%、15% 和 20%) 的三角瓶中,于 30℃, 120 r/min 的恒温摇床上培养。5 d 为 1 个周期,每周结束后,取生长较好的菌液移至同样废水含量的培养基中继续培养,共富集培养 8 次。然后在平板上反复划线分离得到 6 株纯菌落。

### 1.3 筛选和驯化

将纯化的菌株分别接种到废水含量为 30% 的无机盐培养基中,在 30℃、120 r/min 的恒温摇床中振荡培养 2 d,再逐渐提高废水含量(每次提高 10%),以 2 d 为 1 个周期,共驯化 5 个周期。同时测定菌株生物量和废水的 COD 去除率,最终筛选出 2 株生长好、降解率高的高效菌。

### 1.4 菌株鉴定

对纯培养菌株的菌落特征、菌体形态和生理生化反应进行观察与鉴定<sup>[5]</sup>,同时对菌株进行常规固定、染色、制片,采用透射电镜进行观察。

### 1.5 生物量与 COD 测定

生物量用光密度  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  表示, COD 的测定用重铬酸钾法<sup>[6]</sup>。

### 1.6 生长与降解实验

实验采用以青霉素废水中有机物为惟一碳源的无机盐培养基,分别考察不同的 pH、温度、废水含量以及降解时间对废水中 COD 去除率的影响。在实验过程中摇床转速为 120 r/min,接种量为 1 mL,改变一个环境因子,固定其他 3 个因子,确定菌株的最佳生长条件。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的筛选和鉴定

经过多次富集、分离,筛选出以青霉素废水中有

有机物为惟一碳源和能源的高效降解菌 2 株,命名为 k1 和 k2。菌株 k1 在 LB 平板培养基上生长时菌落呈圆形,  $\phi 1 \sim 1.5$  mm, 白色,透明,表面光滑,湿润,高凸起,边缘光滑;革兰氏染阳性。K2 的菌落呈圆形,  $\phi 2 \sim 3$  mm, 扁平,表面粗糙湿润,边缘成锯齿状;革兰氏染色阳性。电镜下 k2 呈短小杆状,有鞭毛,大小约为  $(0.8 \sim 0.9) \mu\text{m} \times (1.3 \sim 2.6) \mu\text{m}$ 。图 1 为菌株 k2 的透射电镜照片。表 1 为 k1 和 k2 的生理生化反应特征。根据菌落特征和菌体形态并结合菌株的生理生化特征鉴定 k1、k2 均为芽孢菌属,其中 k2 为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*), k1 需要进一步作 16S rDNA 测序定种。

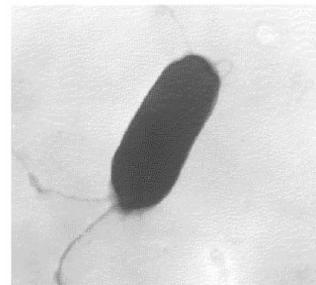


图 1 菌株 k2 的透射电镜照片

Fig. 1 Transmission electron micrograph of strain k2 (350 000 ×)

表 1 菌株 k1 和 k2 的生理生化特征  
Table 1 Physio-biochemical characteristics of strains k1 and k2

生理生化特征	k1	k2	生理生化特征	k1	k2
氧化酶	+	+	MR	+	+
接触酶	+	+	硝酸盐还原	+	+
革兰氏染色	+	+	pH 5.7	+	+
细胞形状芽	杆	短杆	7% NaCl	+	+
孢形成	+	+	50℃	-	+
芽孢圆形	-	-	淀粉水解	+	-
芽孢位置	中间	中间	酪素水解	+	+
芽孢膨大	-	-	葡萄糖	+	+
芽孢直径 > 1 μm	-	-	L-阿拉伯糖	-	+
伴孢晶体	-	-	木糖	-	+
厌氧生长	+	-	甘露醇	-	+
VP	+	+	葡萄糖产气	-	-
pH < 6	+	+	柠檬酸盐利用	-	+
pH > 7	-	-	丙酸盐利用	-	-

### 2.2 菌株生长曲线

取 k1 和 k2 菌悬液各 1 mL 接种于废水含量为

50% 的培养基中,以青霉素废水中有机物为唯一碳源,在 35℃、120 r/min 的条件下培养 72 h,每隔 12 h 取样测菌体生长情况,结果如图 2 所示。

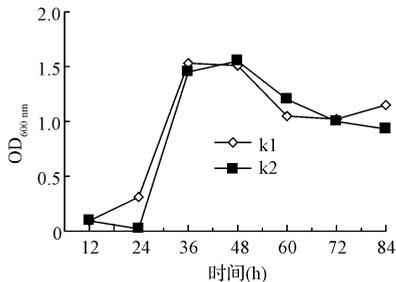


图 2 菌株生长曲线

Fig. 2 Growth curve of strains k1 and k2

从 2 株菌的生长曲线可以看出 0~24 h 是生长的适应期,24~36 h 是对数增长期,36~48 h 是生长的稳定期,48 h 后微生物进入衰减期。

### 2.3 菌株降解特性

#### 2.3.1 酸碱度和温度的影响

环境的酸碱度会影响到细胞所带电荷,从而影响细胞对营养物质的吸收。由图 3 可知,菌株 k1、k2 对酸碱度很敏感,在 pH 6.5~8.5 之间菌株有较高的活性,k1、k2 生长所需的最佳 pH 值分别为 8 和 7。

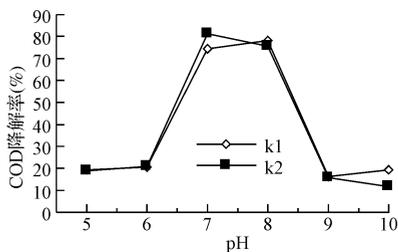


图 3 pH 对 COD 去除率的影响

Fig. 3 Effect of pH on COD degradation by strains k1 and k2

温度能影响微生物代谢酶的反应速度,对微生物生长产生促进或抑制作用。图 4 表明,菌株 k1、k2 的温度适宜范围较广,在 25~45℃ 范围内,去除率均可达到 50% 以上,35℃ 时两者的去除率达到最高,接近 80%。由图 4 还可以看出,这 2 株菌降解青霉素废水的最佳温度均为 35℃。

#### 2.3.2 底物浓度和降解时间的影响

微生物生长所需的碳源是制约其生长的主要因素,过低或过高的底物浓度都会对其生长带来不利

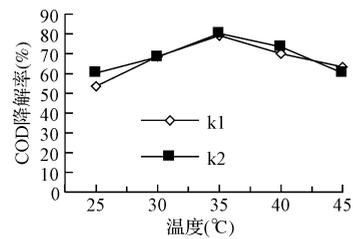


图 4 温度对 COD 去除率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on COD degradation by strains k1 and k2

的影响。由图 5 可知,废水含量低于 50% 时,COD 去除率随底物的增加而提高,高于 50% 时,两者的去除率都呈缓慢下降的趋势。低底物含量造成微生物生长所需碳源不足,高底物含量对微生物又有毒害作用,抑制微生物的生长。因此,废水含量 40%~60% 时为宜,最佳废水含量为 50%。

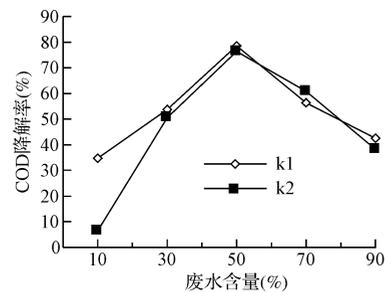


图 5 底物含量对 COD 去除率的影响

Fig. 5 Effect of the content of wastewater on COD degradation by strains k1 and k2

微生物的生长阶段一般分为适应期、对数增长期、稳定期和衰减期 4 个阶段,只有处于对数增长期和稳定期的微生物具有较高的活性。图 6 表明菌株对废水的适应能力较强,适应期较短。24~36 h 微生物进入对数增长期,COD 去除率迅速提高。而 36 h 后,COD 的去除率又缓慢降低。因为初始阶段,微生物处于适应期,去除率相对较低,随着微生物量的增加,COD 去除率逐渐提高,而当微生物进入衰减期后,微生物量及生物活性降低,COD 去除率逐渐下降。

#### 2.3.3 混合菌的降解特性

分别取 0.5 mL k1 和 k2 菌悬液接种于废水含量为 50% 的培养基中,同时各取 1 mL 菌悬液接种于废水含量为 50% 的培养基中,35℃、120 r/min 的摇床条件下培养 3 d,每隔 12 h 测定 COD 去除率,

结果如图7所示。

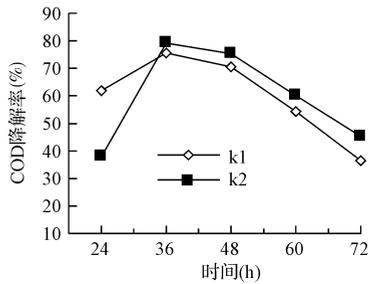


图6 时间对 COD 去除率的影响

Fig. 6 Effect of time on COD degradation by strains k1 and k2

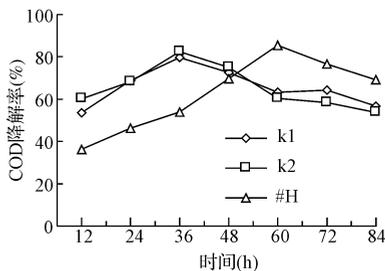


图7 单菌株与混合菌株的降解特性

Fig. 7 Comparison of the COD degradation through single and composed bacterial strains

从图7可知,经36 h单菌株k1和k2对COD去除率最高分别达到79%和81%。前48 h无论是k1还是k2单菌株的降解效率一直高于混合菌株,48 h后混合菌株的降解效率开始高于单菌株,60 h后混合菌对COD的去除率最高达到85%。

### 3 结论

(1)从某制药厂污水处理站的活性污泥中筛选出了2株处理青霉素废水的高效降解菌k1和k2,对COD去除率分别达78%和81%,经鉴定2株菌均为芽孢菌,其中k2为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。

(2)实验表明,菌株k1、k2生长的最佳pH值分别为8和7,温度均为35℃,当废水含量为50%时,达到最佳降解效果的时间为36 h。

(3)最适条件下单菌株k1和k2对COD去除率分别为79%和81%,混合菌株经过60 h去除率最高增至85%。

### 参考文献

- [1] 王春平,马子川. Fenton试剂处理青霉素废水实验研究. 重庆环境科学, 2003, 12(25): 25~26
- [2] 韩力平,王建龙,施汉昌,等. 生物强化技术在难降解有机物处理中的应用. 环境科学, 1999, 20(6): 100~102
- [3] 蔡东升,王琨,赵请. 抑菌性制药废水的治理方法探讨. 江西农业大学学报, 2002, 24(6): 904~905
- [4] Kaminski U., Janke D., Prauser H., et al. Degradation of aniline and monochloroanilines by *Rhodococcus* sp. An117 and a *Pseudomonad*: A comparative study. Z. Allg. Mikrobiol., 1983, 23: 235~246
- [5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001
- [6] 国家环保总局水和废水检测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 2001