

高效原油降解菌的筛选及其在生物活性炭中的应用*

冯晋阳 吴小宁

(西安工业大学材料与化工学院, 陕西 西安 710032)

摘要 以原油为唯一碳源,采用升高原油浓度的方法从长期被石油污染土壤中驯化、筛选出 6 株高效原油降解菌 SY1~SY6,其油降解率均高于 55%。经初步鉴定,SY1 为微杆菌属(*Microbacterium* sp.),SY2 为诺卡氏菌属(*Nocardia* sp.),SY3 和 SY5 为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),SY4 和 SY6 为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。从得到的高效原油降解菌中选用 SY2、SY4、SY5 和 SY6 构建原油降解菌群 SY,并将 SY 菌群接种到生物活性炭(BAC)反应器中,BAC 反应器运行稳定后,COD 去除率达 75%以上,油降解率在 80%以上,处理效果良好。

关键词 石油污染土壤 原油降解菌 筛选 生物活性炭

Screening of high efficient oil-degrading strains and their application in biological activated carbon FENG Jinyang, WU Xiaoning. (School of Material and Chemical Engineering, Xi'an Technological University, Xi'an Shaanxi 710032)

Abstract: Six oil degrading strains (named SY1 to SY6) were isolated and screened from oil-polluted soil with crude oil as single carbon source. The oil degrading rate of the six strains were all higher than 55%. Six strains were identified base on their physiological characteristics and morphology observation. results showed that SY1 belonged to *Microbacterium* sp., SY2 belonged to *Nocardia* sp., SY3 and SY5 belonged to *Pseudomonas* sp., SY4 and SY6 belonged to *Bacillus* sp.. SY2, SY4, SY5 and SY6 were selected for the construction of oil degradation bacterial community SY. The bacterial community SY was inoculated into the biological activated carbon (BAC) reactor for treatment of oil containing wastewater. BAC reactor presented perfect treatment performance after the stable operation, the removal rate of oil and COD were up go 80% and 75%, respectively.

Keywords: oil-polluted soil; oil degradation bacterium; screening; biological carbon

随着工业的发展,特别是石油化学工业的发展,含油废水的排放量与日俱增,其对环境的污染也日益严重^[1]。含油废水的来源很广,在采油、炼油、贮油、运输过程及石油化学工业的生产过程中都会产生大量含油废水^[2-4]。含油废水进入水体后,影响饮用水资源和地下水资源,危害水产资源。同时还危害人体健康和农作物生产,并引起大气污染,甚至还有可能因为聚结的油品燃烧而产生安全问题^[5,6]。鉴于含油废水的污染性,我国规定含油废水最高允许排放质量浓度为 10 mg/L。因此,对石油和石化等行业产生的含油废水进行有效处理是极其必要的。

进入环境的石油可通过自然界的净化作用得到降解,而在石油自然降解过程中,微生物起着重要的作用^[7]。在长期被石油污染的土壤中,存在着大量可降解原油的微生物,它们是土壤和水体生物修复的主角。同时,由于含油废水成分的复杂性,单一方

法不能满足达标处理的要求。而且随着水资源的短缺,对含油废水的排水标准不断提高,以期能达到回用的目的。生物活性炭(BAC)技术具有活性炭吸附和微生物降解双重作用,能有效去除水中有毒有害物质,包括一些其他方法难以去除的物质,是废水回用的一个重要方法。李伟光等^[8]和李安婕等^[9]采用 BAC 技术处理含油废水,处理效果显著。

本课题组从长期被石油污染的土壤中分离、筛选出高效原油降解菌,并将其应用于 BAC 工艺中,对含油废水进行处理,取得良好的效果,为含油废水的回用提供参考。

1 材料和方法

1.1 原油降解菌的筛选

1.1.1 菌源及原油

取兰州西固区某炼油厂储油罐附近的土壤 2.5 kg,用灭过菌的蒸馏水浸泡并曝气 24 h,静止沉淀 2 h

第一作者:冯晋阳,女,1973 年生,博士研究生,研究方向为水污染控制。

* 陕西省教育厅专项基金资助项目(No. 07JK290)。

后,上清液外观为棕褐色,以上清液作为菌源。

分离、筛选菌种所用的石油碳源为长庆油田的脱水原油,为黑色粘稠液体。以石油醚(沸程 60~90 ℃)为溶剂,将该脱水原油溶解,配制成油质量浓度为 100 mg/mL 的原油溶液备用。

1.1.2 原油降解菌的驯化和分离

无机盐培养基: NaCl 10 g, NH₄Cl 0.50 g, KH₂PO₄ 0.50 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.50 g, CaCl₂ 0.02 g, KCl 0.10 g, FeCl₂ · 4H₂O 0.02 g, 蒸馏水 1 000 mL, 微量元素溶液 1 mL, pH=7.2。

驯化筛选培养基: 无机盐培养基+原油溶液。

分离培养基: 无机盐培养基 1 000 mL, 脱水原油 3 g, 琼脂 18 g。高压蒸汽灭菌后, 制成平板备用。

保存培养基: 牛肉膏 1 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 原油 3 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。高压蒸汽灭菌后, 制成斜面备用。

取无机盐培养基 100 mL, 放入 250 mL 的三角烧瓶内, 高压蒸汽灭菌后, 加入菌源 10 mL, 以转速 200 r/min, 30 ℃ 恒温培养, 观察其中的变化以确定菌体的生长情况。取上述培养 3 d 后混合培养液进行接种驯化。驯化采用原油浓度升高的方法, 30 ℃ 恒温振荡培养 5 d 为一个周期, 驯化 5 个周期。最后一个周期的驯化液用于菌种的划线分离。将典型菌落在分离培养基的平板上反复划线纯化后得到单一菌落, 再将纯化后的单一菌落接种至保存培养基的斜面上, 4 ℃ 保存。

1.1.3 原油降解菌的筛选

将菌种配成一定浓度的菌悬液备用。

配制油质量浓度为 500 mg/L 的含油废水, 将分离出的菌种分别接种到盛有 50 mL 含油废水的 200 mL 的三角瓶中, 在 30 ℃、200 r/min 的恒温摇床上进行振荡培养, 根据各菌株的生物量(测光密度(OD)值)和其对原油的降解率(测含油量), 筛选出生长快、生长量大, 且对原油降解率高的活性菌种作为高效菌种。

1.1.4 菌种的鉴定

本研究应用一般分类方法, 根据菌株的形态特征和生理生化特征, 参照细菌分类手册及文献[10, 11], 对筛选到的菌株进行鉴定, 初步鉴定到属。

1.2 BAC 对含油废水的处理

1.2.1 原油降解菌的接种

将筛选后的菌种进行混合菌降解实验, 得出降解效果最好的一组混合菌群, 并以此构建原油降解

菌群 SY。将原油降解菌群 SY 接种到 BAC 反应器中对含油废水进行处理。

1.2.2 实验用水

实验进水采用某化工厂二级处理出水, 水质见表 1。

表 1 进水水质
Table 1 Characteristics of raw water

水质指标	COD /(mg · L ⁻¹)	石油类 /(mg · L ⁻¹)	pH
数值	100~120	10~15	7~9

1.2.3 降解反应体系

为研究原油降解菌在 BAC 中降解原油的效果, 设置平行对照实验, 实验设计见表 2。

表 2 平行对照实验组
Table 2 Parallel control group

实验组	空白组	菌群 SY 组	活性炭组	BAC 组
菌群 SY	无	有	无	有
活性炭	无	无	有	有

在降解实验中, 每个反应瓶中加入 75 mL 人工配制的含油废水, 油质量浓度为 100 mg/L, 根据实验设计加入菌群 SY 菌悬液(5 mL)和活性炭(20 mL), 在温度为 30 ℃, pH 7~8 条件下置于摇床中进行降解反应。反应 5 d 后, 测定出水的含油量, 以确定原油降解菌的降解效果。降解实验重复 3 次, 以保证实验数据的重现性。

1.2.4 实验装置

实验装置见图 1。BAC 反应器的生物活性炭柱直径为 15 cm, 炭层高度 57 cm。BAC 反应器采用上向流, 废水通过底部的布水器进入炭柱。实验用活性炭颗粒平均粒径 0.9~1.1 mm。反应器温度控制在 30 ℃, pH 为 7~8。

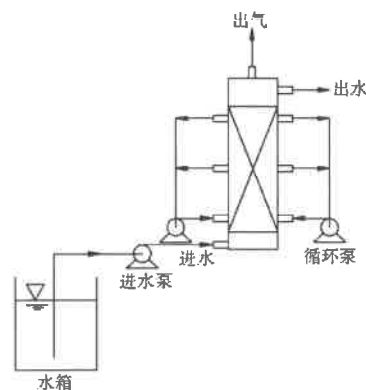


图 1 实验装置

Fig. 1 Schematic diagram of experiment apparatus

1.3 分析方法

用 751G 紫外分光光度计测定实验出水在波长 227 nm 处的吸光度(A_{227}), 然后根据标准曲线计算

出含油量(c , mg/L),再计算油降解率(η , %):

$$\eta = (c_0 - c) / c_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: c_0 为初始含油量,mg/L。

采用722光栅分光光度计在波长460 nm处,以不接种的培养液为参比,用光电比浊法测定溶液的OD值来间接表示细菌的生物量^[12]。

COD采用重铬酸钾法测定。

2 结果与讨论

2.1 高效原油降解菌筛选结果

2.1.1 菌种筛选分离结果

经过驯化分离纯化后得到典型菌株13种(编号1[#]~13[#]),均具有一定降解原油的能力。将纯化后的13种菌株进行筛选。筛选时将盛有含油废水的三角瓶在摇床(30℃)上进行振荡培养5 d后,测其OD值和原油的降解率,结果见表3。

表3 各菌株的生物量及其对原油的降解率

Table 3 The growth of strains and their oil degradation capacity

菌株	生物量 (OD值)	降解率 /%	菌株	生物量 (OD值)	降解率 /%
1 [#]	0.059	22.3	8 [#]	0.095	59.9
2 [#]	0.072	33.1	9 [#]	0.099	67.6
3 [#]	0.070	30.9	10 [#]	0.079	38.3
4 [#]	0.120	66.1	11 [#]	0.051	12.5
5 [#]	0.083	55.6	12 [#]	0.128	76.2
6 [#]	0.091	57.1	13 [#]	0.056	19.7
7 [#]	0.065	16.7	空白	0.005	2.8

表4 6株高效原油降解菌的鉴定特征

Table 4 The identifying characteristics of the six oil degradation strains

菌株编号	SY1	SY2	SY3	SY4	SY5	SY6
牛肉膏蛋白胨培养基上的菌落特征	菌落圆形,黄白色,边缘波状,扁平状	菌落圆形,橙红色,边缘裂叶状,扁平状	菌落圆形,黄白色,边缘波状,脐状隆起状	菌落不规则,黄白色,边缘光滑,隆起状	菌落圆形,黄白色,边缘锯齿状,扁平状	菌落圆形,黄白色,边缘锯齿状,扁平状
菌体形态	短杆状	长杆状	短杆状	长杆状	长杆状	长杆状
菌体大小/ μm	$(0.1 \sim 0.2) \times (0.4 \sim 0.6)$	$(0.5 \sim 0.6) \times (2.0 \sim 2.5)$	$(0.2 \sim 0.3) \times (1.0 \sim 1.5)$	$(0.5 \sim 0.6) \times (1.0 \sim 1.2)$	$(0.3 \sim 0.5) \times (1.2 \sim 1.5)$	$(0.5 \sim 0.6) \times (0.9 \sim 1.3)$
革兰氏染色	阳性	阳性	阴性	阳性	阴性	阴性
芽孢染色	无	无	无	有	无	有
鞭毛染色	有	有	有	有	有	有
琼脂斜面上的生长特征	刺毛状	丝状	树状	念珠状	刺毛状	扩展状
液体培养基中的生长特征	表层形成薄膜	表层形成薄膜	均匀生长	表层形成薄膜	表层形成薄膜	表层形成薄膜
半固体琼脂穿刺接种	囊形	囊形	层状	茺菁形	囊形	茺菁形
明胶穿刺接种	液化	液化	不液化	液化	不液化	液化
淀粉水解	阳性	阴性	阴性	阴性	阳性	阴性
葡萄糖发酵	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
需氧性	好氧	好氧	兼性厌氧	好氧	好氧	好氧
菌属名称	微杆菌属 <i>Microbacterium</i> sp.	诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i> sp.	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> sp.	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> sp.	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> sp.	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> sp.

由表3可知,共有9种菌株的原油降解率在30%以上,其中9[#]和12[#]的生物量(OD值)大,且降解率也高,达67%以上。筛选能利用原油为唯一碳源,并且生长良好,降解率高于55%的6株菌(4[#]、5[#]、6[#]、8[#]、9[#]、12[#],分别记为SY1~SY6)作为降解原油的高效菌,并对筛选得到的6株菌进行鉴定和下一步的研究。

2.1.2 细菌鉴定结果

按一般分类方法,根据细菌分类手册及相关文献,对筛选到的6株菌进行形态学观察和生理生化特征研究,鉴定结果见表4。

2.2 高效原油降解菌对含油废水的处理结果

选用SY2、SY4、SY5和SY6构建原油降解菌群SY^[13]。

2.2.1 平行对照实验结果

通过平行对照实验分析原油降解菌在BAC中的生物降解作用,结果如图2所示。

由图2可以看出,在反应的初期,菌群SY还没有适应反应体系,活性较弱,几乎没有生物降解作用。由于活性炭的吸附作用,活性炭组含油量下降较快,而反应初期在BAC组中发挥主要作用的也是活性炭的吸附作用,因此开始时BAC组含油量与活性炭组的含油量相近。随着反应的进行,菌群SY活性增强,油降解效果显著,菌群SY组2 d后含油量降到45.0 mg/L,活性炭组含油量降到62.0 mg/L,而BAC组同时发挥菌群SY的生物降解作用和活性

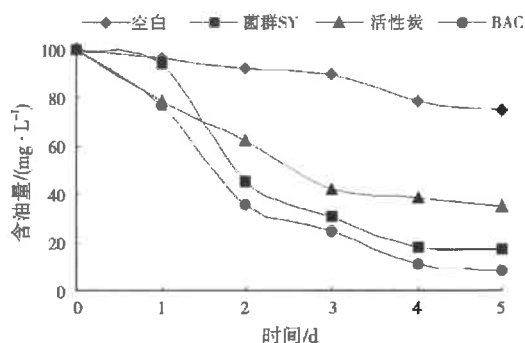


图2 平行对照实验结果

Fig. 2 The results of parallel control group experimental results. The adsorption effect of activated carbon, oil content decreased to 36.0 mg/L, oil removal effect was best. 3 d after, activated carbon adsorption tended to saturation, oil content of activated carbon group changed little; while in SY bacteria group and BAC group, SY bacteria still played a biological degradation role, oil content continued to decrease. At the same time, BAC group oil content was significantly lower than SY bacteria group oil content, this indicates that in BAC, SY bacteria can utilize substrate in activated carbon as carbon source, making activated carbon regenerated, continuing to play its adsorption role.

5 d after, oil removal rates were: Blank group 25.0%, SY bacteria group 83.1%, Activated Carbon group 65.0%, BAC group 91.5%. BAC has the best oil removal effect.

2.2.2 石油类污染物的去除

BAC for petroleum pollutants removal situation is shown in Figure 3. From Figure 3 it can be seen, BAC for oil removal process is divided into 3 stages. The first stage from inoculation, effluent oil content first decreased, then increased to 6.5 mg/L on the 2nd day. This stage, in BAC reactor, there was no obvious biological growth, oil content curve similar to breakthrough curve, that is, this stage BAC for oil removal mainly for activated carbon adsorption. Biological film formation initial, crude oil degradation bacteria gradually formed biological film, will use a part of oil substances as its growth carbon source, at the same time crude oil degradation bacteria will also be adsorbed on activated carbon. The second stage from the 2nd day to the 6th day, adsorption on activated carbon degradation bacteria and suspended degradation bacteria

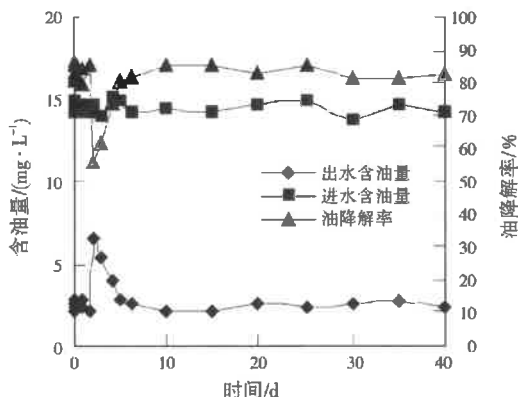


图3 含油量及油降解率随时间的变化

Fig. 3 The variety of oil content and oil removal rate

• 42 •

begin to use oil substances, biological degradation, at this time oil content rapidly decreased, biological film rapidly grew and gradually matured, forming a stable biological film. After entering the third stage (6th day to 40th day), effluent oil content stabilized at 2.5 mg/L, oil removal rate reached 80% above.

2.2.3 COD的去除

COD removal situation is shown in Figure 4. From Figure 4 it can be seen, COD change is similar to oil content change. BAC biological film formation initial, effluent COD decreased to 30 mg/L on the 2nd day, activated carbon adsorption dominated. After effluent COD increased and then returned, from the 6th day began to stabilize, after maintaining at 25 mg/L. This is because with the increase of biomass, biological degradation began to dominate, effluent COD returned. Biological film matured, effluent COD concentration also tended to stabilize, removal rate reached 75% above.

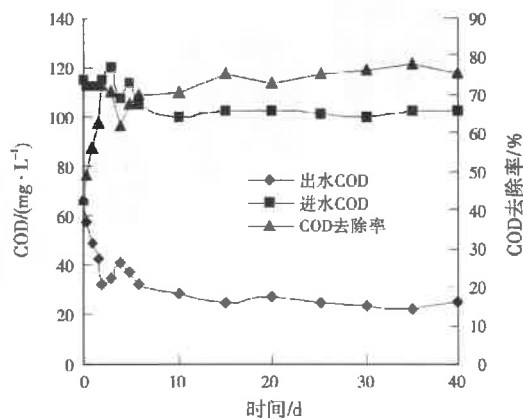


图4 COD及其去除率随时间的变化

Fig. 4 The variety of COD and COD removal rate

2.2.4 生物量的变化

Biomass change is shown in Figure 5. From Figure 5 it can be seen, after high efficiency bacteria inoculation, bacteria began to grow in the reactor, 1 d after began to reproduce, bacteria were very active, 5th day reached maximum, then began to decrease, with the maturity of biological film, bacterial biomass gradually

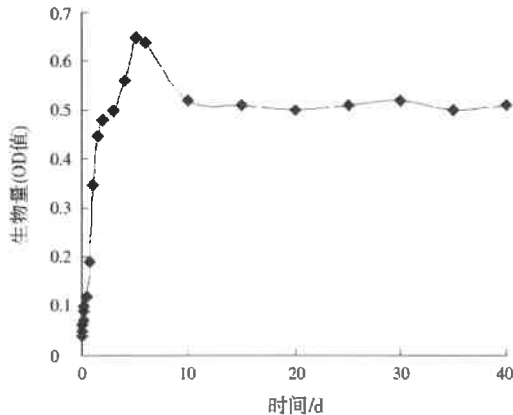


图5 生物量随时间的变化

Fig. 5 The variety of biomass

降低并趋于稳定。悬浮生物量达到最大值后趋于稳定,这时生物膜的生长厚度也会达到其最大值后趋于稳定,出水污染物浓度相对稳定。

在监测悬浮生物量的同时,对生物膜中的生物进行了镜检。在挂膜初期,生物相中主要为游离细菌,随着生物膜的生长,高效菌适应了水质条件,形成了较密实的菌胶团,同时生物膜中出现变形虫等原生动物。随着反应器的稳定运行,生物膜中的原生动物和后生动物活跃,出现草履虫等原生动物和后生动物,标志着生物膜已成熟,同时反应器出水水质趋于稳定,说明 BAC 反应器运行良好。

3 结 论

(1) 从长期被石油污染的土壤中分离筛选出 6 株(SY1~SY6)降解原油的高效菌,其油降解率均高于 55%。经初步鉴定,SY1 为微杆菌属、SY2 为诺卡氏菌属、SY3 和 SY5 为假单胞菌属、SY4 和 SY6 为芽孢杆菌属。

(2) 采用 BAC 工艺对某化工厂二级出水进行处理时,加入原油降解菌群 SY。在接种初期,主要是活性炭吸附起主要作用,生物膜成熟后,生物降解和活性炭吸附协同作用去除水中污染物。BAC 系统稳定后,油降解率达 80% 以上,COD 去除率达 75% 以上,处理效果良好。

参考文献:

- [1] 刘国强,沈竞为,高从增,等. 筛选高效原油降解菌处理含油废水研究[J]. 水处理技术, 2008, 34(10): 26-29.
- [2] AL FUTAISI A, JAMRAH A, YAGHI B, et al. Assessment of alternative management techniques of tank bottom petroleum sludge in Oman[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 141(3): 557-564.
- [3] MACHÍN RAMÍREZ C, OKOH A I, MORALES D, et al. Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste[J]. Chemosphere, 2008, 70(4): 737-744.
- [4] 张翼,于婷,毕永慧,等. 含油废水处理方法研究进展[J]. 化工进展, 2008, 27(8): 1155-1161.
- [5] 沈齐英. 含油废水处理概况[J]. 北京石油化工学院学报, 2006, 14(3): 34-38.
- [6] POULOPOULOS S G, VOUTSAS E C, GRIGOROPOULOU H P, et al. Stripping as a pretreatment process of industrial oily wastewater[J]. Journal of Hazardous Materials, 2005, 117(2/3): 135-139.
- [7] 杨雪莲,李凤梅. 高效原油降解菌的筛选及其降解特性[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(1): 230-233.
- [8] 李伟光,李欣,宋文芳,等. 固定化生物活性炭处理含油废水的试验研究[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2004, 20(2): 187-190.
- [9] 李安婕,刘红,王文燕,等. 生物活性炭流化床净化采油废水的效能及特性[J]. 环境科学, 2006, 27(5): 918-923.
- [10] 王春艳,丁永生. 石油降解菌的筛选及其降解特性[J]. 大连海

事大学学报, 2008, 34(3): 9-12.

- [11] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [12] 林力,杨惠芳,贾省芬. 石油污染土壤的生物整治研究[J]. 上海环境科学, 2006, 19(7): 325-329.
- [13] 冯晋阳,吴小宇. 共基质对优势菌降解原油的作用研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(3): 57-61.

编辑: 陈泽军 (修改稿收到日期: 2010-12-23)

(上接第 38 页)

敏感性不同, Al^{3+} 添加量升至 0.8 g/kg 时, 真菌、放线菌有一定的忍耐性, 细菌数量呈快速下降趋势, 而亚硝化细菌几乎不能成活; 此后随 Al^{3+} 添加量的进一步升高, 放线菌数量呈快速下降趋势, 细菌数量则下降趋缓, 而真菌相对能耐受较高浓度的 Al^{3+} 。

(2) 在茶园酸性土壤中的微生物的绝大多数种类都面临低 pH 和 Al^{3+} 的双重毒害。

(3) 提高茶园土壤 pH 有利于活性 Al^{3+} 向固定态转化, 既能缓解低 pH 的不利影响, 也解除了 Al^{3+} 的毒害。改良茶园土壤酸性环境是提高茶园土壤土著微生物数量和活性的较好方法之一。

参考文献:

- [1] 廖万有. 我国茶园土壤的酸化及其防治[J]. 农业环境保护, 1998, 17(4): 178-180.
- [2] 谢国生, 帅瑞红, 庞贞武, 等. 铝胁迫下水稻幼苗根系的生理特性[J]. 应用生态学报, 2009, 20(7): 1698-1704.
- [3] 尤江峰, 杨振明. 铝胁迫下植物根系的有机酸分泌及其解毒机理[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(2): 111-118.
- [4] 林郑和, 陈荣冰. 植物铝毒及其耐铝机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(13): 94-98.
- [5] HAMEL R D, APPANNA V D. Modulation of TCA cycle enzymes and aluminum stress in *Pseudomonas fluorescens*[J]. J. Inorg. Biochem., 2001, 87(1/2): 1-8.
- [6] CHENIER D, BERIAULT R, MAILLOUX R, et al. Involvement of fumarate C and NADH oxidase in metabolic adaptation of *Pseudomonas fluorescens* cells evoked by aluminum and gallium toxicity[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2008, 74(13): 3977-3984.
- [7] PINA R G, CERVANTES C. Microbial interactions with aluminium[J]. BioMetals, 1996, 9(3).
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 30-86, 106-163.
- [9] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986: 102-125.
- [10] 罗虹, 刘鹏, 李丽仙. 铝胁迫对大豆根际土壤微生物区系的影响[J]. 土壤通报, 2005, 36(5): 735-738.
- [11] 阮建云, 王国庆, 石元值, 等. 茶园土壤铝动态及茶树铝吸收特性[J]. 茶叶科学, 2003, 23(增): 16-20.
- [12] 毛佳, 徐仁扣, 黎星辉. 氮形态转化对豆科植物物料改良茶园土壤酸度的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2009, 25(5): 42-45.

编辑: 卜岩枫 (修改稿收到日期: 2011-03-23)

