

唐志远,王雪玲,刘可星. 高效油脂降解的复合菌剂构建及降解性能优化[J]. 江苏农业科学,2020,48(7):269-272.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.052

高效油脂降解的复合菌剂构建及降解性能优化

唐志远¹, 王雪玲², 刘可星²

(1. 佛山新城园林绿化工程有限公司, 广东佛山 528300; 2. 华南农业大学资源环境学院, 广东广州 501642)

摘要:为构建一种具有高效降解油脂能力的复合菌剂,以大豆油为唯一碳源,通过单因素试验,研究接种量、初始 pH 值、温度、初始大豆油含量等因素对复合菌剂降解油脂性能的影响。结果表明,以 3% 的接种量为最佳接种量,复合菌剂能耐较大范围的 pH 值变化,复合菌剂降解油脂的最佳温度为 30 ℃,初始含油量为 0.10% 时,油脂降解效率最高。因此,复合菌剂降解油脂的最佳条件是:接种量为 3%、温度为 30 ℃、pH 值为 7.0、初始含油量为 0.1%,在此条件下,油脂降解率为 96.43%。

关键词:复合菌剂;生物降解;油脂;接种量;含油量;优化

中图分类号: X703;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)07-0269-04

在我国居民生活与消费水平日益提高的背景下,肉类、牛奶加工业及餐饮业快速发展,但这类产业引发的环境问题不容忽视,油性废水排放是其中较为突出的问题。油性废水的危害主要有直接排放油性废水会引发油脂在水表面上形成一层膜,降低水体的复氧能力及自净能力,危害水体生态环境^[1-2];油性废水易产生刺激性味道,容易堵塞管

道^[3];传统活性污泥法处理含油废水效果差,主要是由于污泥被油脂包裹,降低了传质效率,进而影响对废水的处理效果^[4-6]。目前,有效解决这一技术性问题的有效途径是采用除油器将废水中的大部分油脂分离出来,进行微生物处理。

微生物可将油脂作为碳源与能源物质,通过自身的生长繁殖消除油脂污染,且利用微生物处理油性废水具有操作简便、成本低和不产生二次污染等优点^[7]。相关研究表明,目前用来研究微生物处理油性废水的菌株主要是铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、酵母菌和芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[8-10]。目前,国内外多采用单一菌株研究微生物降解油性废水的性能,而关于复合菌剂降解油性废水的研究较少。相关研究表明,复合菌剂中的菌株之间具有较好的协同作用,对成分复杂的油脂具有较强的降

收稿日期:2019-03-09

基金项目:广东省省级科技计划(编号:2016B020205002、2015B020237001)。

作者简介:唐志远(1992—),男,广东佛山人,硕士研究生,主要研究方向为固体废弃物资源化利用。E-mail:tzys2018@163.com。

通信作者:刘可星,博士,副教授,主要从事土壤肥料、工农业废物的农业资源化、农业生态环境等领域的研究。E-mail:kxliu@scau.edu.cn。

(3):695-700.

[18] Oros-Sichler M, Gomes N C M, Neuber G, et al. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 65(1): 63-75.

[19] 李百元. 新疆盐碱地黏细菌的分离及多样性的研究[D]. 北京:中国科学院大学, 2013.

[20] 徐秋芳. 森林土壤活性有机碳库的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2004.

[21] Spröer C, Reichenbach H, Stackebrandt E. The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(3): 1255-1262.

[22] Reichenbach H. The Myxococcales[M]//Garrity G M. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Part 3: The alpha-, beta-, delta-, and epsilon-proteobacteria*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2005: 1059-1143.

[23] Reichenbach H, Dworkin M. The Myxobacteria[M]//Balous A, Trüper H G, Dworkin M, et al. *The prokaryotes*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1992: 3416-3487.

[24] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 403-427.

[25] Li B Y, Yao Q, Zhu H H. Approach to analyze the diversity of myxobacteria in soil by semi-nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) based on taxon-specific gene[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e108877.

解能力^[11]。本研究以大豆油为唯一碳源,构建对油脂具有较强降解能力的复合菌剂,并优化其降解条件,皆在为复合菌剂在微生物处理油脂废水中的应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

试验用菌种为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、假丝酵母菌(*Candida tropicalis*)、解脲假丝酵母菌(*Candida famata*),保藏于华南农业大学资源环境学院。

1.2 培养基

LB 液体培养基:酵母提取物 5 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 10 g、pH 值 7.0、蒸馏水 1 000 mL,121 ℃下湿热灭菌 20 min。

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)液体培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、pH 值自然、蒸馏水 1 000 mL,121 ℃下湿热灭菌 20 min。

降解培养基:(NH₄)₂SO₄ 0.2 g、K₂HPO₄ 2.0 g、KH₂PO₄ 2.0 g、NaCl 2.0 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.1 g、豆油 1.0 mL、pH 值 7.0、蒸馏水 1 000 mL,121 ℃下湿热灭菌 20 min。

1.3 种子液培养

分别挑取枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌,接种到 LB 培养基中,分别挑取假丝酵母菌、解脲假丝酵母菌,接种到 PDA 培养基中,在温度为 30 ℃、转速为 150 r/min 的摇床中培养 24 h。培养 24 h 后,各发酵液中菌种数量均高于 1 × 10⁷ CFU/mL。

1.4 单一菌种油脂降解能力试验

分别将种子液以 1% 的接种量接种至降解培养基中,以不加种子液的降解培养基作为空白对照,在温度为 30 ℃、转速为 150 r/min 摇床中培养 72 h 后,测定油脂浓度并计算降解率。

1.5 复合菌剂的构建

用平板测定法测定上述 4 种菌株间的拮抗作用^[12]。

1.6 优化复合菌剂降解油脂的条件

将“1.3”节中的 4 种种子液等比例混合制成复合菌剂。按以下条件进行油脂降解性能优化试验:将复合菌剂按 0.5%、1.0%、3.0%、5.0%、7.0% 的接种量接种至降解培养基中,置于 30 ℃、150 r/min 摇床中培养 72 h 后,测定油脂浓度并计算降解率;将复合菌剂以最佳接种量接种至初始 pH 值分别为

5、6、7、8、9 的降解培养基中,置于温度为 30 ℃、150 r/min 摇床中培养 72 h 后,测定油脂浓度并计算降解率;将复合菌剂以最佳接种量接种至降解培养基中,分别置于温度为 20、25、30、35、40 ℃,转速为 150 r/min 摇床中培养 72 h 后,测定油脂浓度并计算降解率;将复合菌剂以最佳接种量接种至具有最佳初始 pH 值的降解培养基中,分别添加 0.01%、0.05%、0.10%、0.15%、0.20% 大豆油作为唯一碳源,在最佳培养温度下 150 r/min 培养 72 h 后,测定油脂浓度并计算降解率。

1.7 测定方法

采用紫外分光光度法^[13]测定油脂含量,并计算油脂降解率。以大豆油为溶质,经纯化的石油醚为溶剂,准确地配制浓度依次为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μL/mL 的系列标准样品,用紫外分光光度计,在 225 nm 处,依次测定上述系列标准样品的吸光度,并绘制标准曲线。通过以下公式计算油脂降解率。

$$\text{油脂降解率} = (C_0 - C) / C_0 \times 100\%$$

式中: C_0 为培养基的原始含油量; C 为油脂降解后的培养基含油量。

1.8 数据分析

试验数据采用 Excel 2010 进行处理,采用 SPSS 19.0 进行 Duncan's 多重比较分析,并采用 Origin 8.0 作图。

2 结果与分析

2.1 单一菌种油脂降解能力

分别将 4 个菌种的种子液接种至降解培养基中培养 72 h,测定含油量,计算油脂降解率。大豆油标准曲线见图 1,回归方程为 $y = 0.442x + 0.006$, $r^2 = 0.9993$ 。大豆油标准曲线的回归方程满足检测要求,因此可定量测定废水中油脂的含量。不同菌种间对大豆油的降解能力有差异(表 1)。与对照(CK)相比,4 个菌种的油脂降解率达到显著性差异

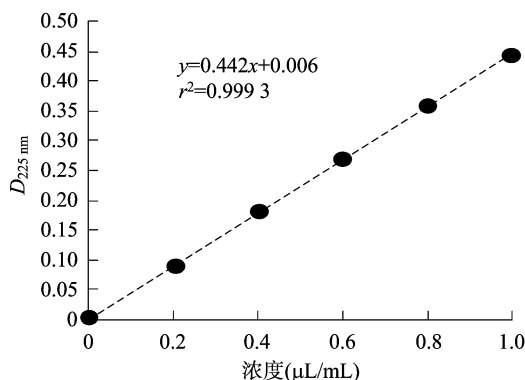


图1 油脂标准曲线

表 1 不同菌处理的油脂降解率比较

处理	油脂降解率(%)
CK	5.12 ± 1.07d
枯草芽孢杆菌	75.34 ± 1.52a
地衣芽孢杆菌	79.12 ± 1.21a
假丝酵母菌	63.45 ± 1.26c
解阮假丝酵母菌	69.78 ± 1.42b

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

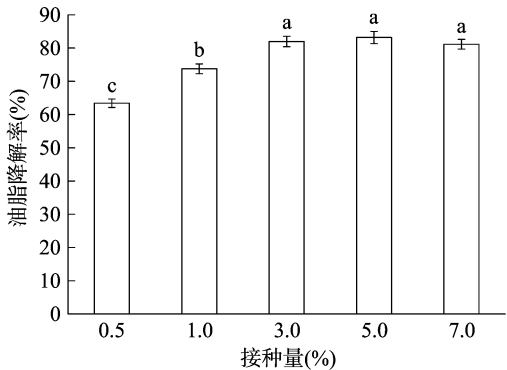
表 2 菌种间的拮抗情况

菌种	拮抗圈直径			
	枯草芽孢杆菌	地衣芽孢杆菌	假丝酵母菌	解阮假丝酵母菌
枯草芽孢杆菌	—	—	—	—
地衣芽孢杆菌	—	—	—	—
假丝酵母菌	—	—	—	—
解阮假丝酵母菌	—	—	—	—

注:“—”表示菌种间未出现拮抗圈。

2.3 不同接种量对油脂降解的影响

合适的菌剂投加量,可在节省资源的同时,提高对油脂的降解效率和降解能力。从图 2 可以看出,在一定范围内接种量与油脂的降解率呈显著性相关关系,表明油脂降能力与接种量有关。在 0.5% 接种量处理条件下,复合菌剂降解油脂的效率比较缓慢,随着接种量的增加,油脂降解率显著增加,但当接种量超过 3% 后,油脂降解率没有显著增加。由此可见,最优接种量为 3%,此时油脂降解率为 81.97%。



图中不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。图 4 同

图 2 不同接种量的油脂降解效果比较

2.4 培养基初始 pH 值对油脂降解的影响

微生物的生长对环境的 pH 值有一定的要求,偏酸或偏碱都会对微生物的生长繁殖产生影响。不同初始 pH 值对复合菌剂降解油脂的影响见图 3,可以看出,pH 值变化对复合菌剂降解油脂的能力影响较弱,在不同 pH 值条件下,复合菌剂的油脂降解

水平,降解率均在 60% 以上,表明 4 个菌种均对大豆油具有降解能力。

2.2 复合菌剂的构建

拮抗试验结果(表 2)表明,4 个菌种间无明显拮抗作用。在实际应用中,复合菌剂的抗干扰能力较强,可以在环境中形成优势菌群,提高对油脂的降解能力。因此本试验利用 4 个菌种构建复合菌剂。

率均在 81% ~ 83% 之间,且差异较小,表明复合菌剂能耐受较大范围的 pH 值变化,因此降解培养基的初始 pH 值选择 7.0。

2.5 温度对复合菌剂降解油脂的影响

温度是影响微生物生长繁殖的主要因素之一,在合适的条件下,微生物生长繁殖的速度能够加快。从图 4 可以看出,在不同温度条件下,复合菌剂降解油脂的能力具有显著性差异。当温度为 30 ℃ 时,复合菌剂降解油脂的能力最强,油脂降解率为 82.57%,表明该温度是复合菌剂生长繁殖的最适温度,因此选择最适温度为 30 ℃。

2.6 初始含油量对复合菌剂降解油脂的影响

合适的碳氮比能加快微生物的生长,提高微生物利用碳源的能力。从图 5 可以看出,当初始含油量高于 0.10% 时,油脂降解率出现下降的趋势,表明初始含油量为 0.10% 时,复合菌剂利用碳源的能力最强,对应油脂降解率为 96.43%,因此选择合适初始含油量为 0.10%。

3 结论与讨论

本研究通过单一菌种的油脂降解与拮抗试验成功构建出一种复合菌剂,并以大豆油为唯一碳源进行单因素试验,试验结果表明,复合菌剂的最佳降解油脂的最佳条件是:接种量为 3%、温度为 30 ℃、pH 值为 7.0、初始含油量为 0.10%,在此条件下,油脂降解率为 96.43%。

目前,对油性废水采用的处理方法主要有物理

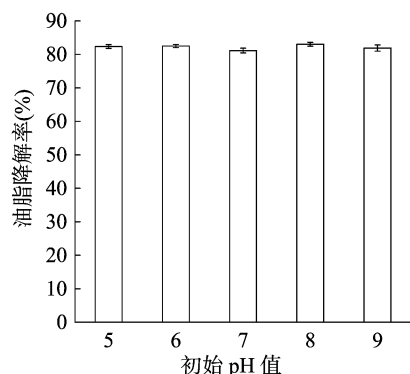


图3 不同初始 pH 值的油脂降解效果比较

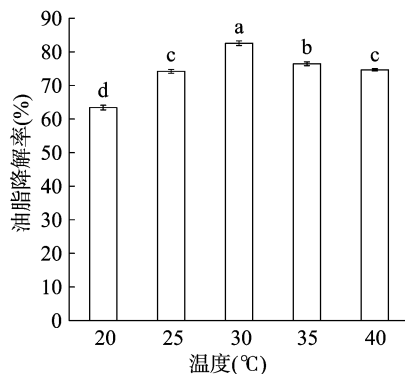


图4 不同温度的油脂降解效果比较

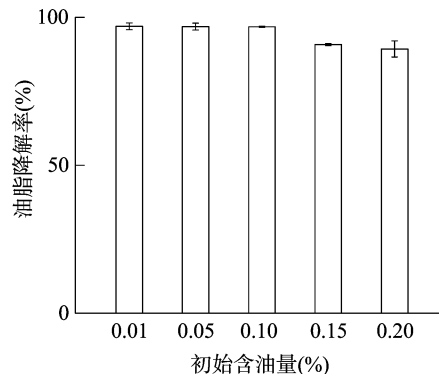


图5 不同初始含油量的油脂降解效果比较

法、化学法、物理化学法和生物方法。微生物菌剂处理是一种高效处理油性废水的工艺,通过直接向油性废水中投加微生物来降解油脂。油性废水水质复杂,水质变化较大,因此投加的菌剂需要有较强的耐受能力。与单一菌剂相比,投加复合菌剂在油性废水中具有更好的优势。复合菌剂能够提高自身竞争力,成为优势菌群,且可通过不同微生物的协调作用,提高对油脂的降解能力^[14-15]。但油性废水理化性质复杂,不同环境条件可对复合菌剂降解油脂的能力造成影响。

本研究构建的复合菌剂具有高效的油脂降解能力,在最佳降解条件下培养 72 h 后油脂降解率高于 90%。不同单一菌种降解油脂的能力有较大区别,游游等筛选得到的菌株,在一定条件下的油脂降解率为 87.55%^[6]。张印等筛选得到的菌种,在一定条件下对油脂的降解率仅为 68.2%^[16]。李文君等筛选得到的菌株 JZZ2 对不同类型的油脂表现出不同的降解能力^[17]。在污水处理中投加单一菌种具有较大的局限性,而投加复合菌剂在污水处理中具有更好的处理效果。

参考文献:

- [1] 吴 兰,葛 刚,罗玉萍. 油脂废水的生物处理研究进展[J]. 江西科学,2003,21(4):317-320,350.
- [2] Mongkolthanaruk W, Dharmstithi S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium [J]. International Biodeterioration & Biodegradation,2002,50(2):101-105.
- [3] 吴 兰,葛 刚,万金保. 固定化解脂耶氏酵母处理油脂废水研究[J]. 环境工程学报,2008,2(11):1465-1468.
- [4] 胡玉洁,郭兴要,杨 鹏,等. 假丝酵母菌对高浓度油脂废水的降解性能[J]. 工业水处理,2004,24(8):46-51.
- [5] Cammarota M C, Freire D M. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content [J]. Bioresource Technology,2006,97(17):2195-2210.
- [6] 游 游,朱 琳,张 艳,等. 含油废水中一株高效油脂降解菌的筛选和鉴定[J]. 生态环境学报,2010,26(6):1378-1382.
- [7] 秦华明,尹 华,张 娜,等. *Burkholderia cepacia* X₄ 降解油脂特性研究[J]. 微生物学通报,2007,34(3):500-503.
- [8] Canler J P, Royer C, Duchène P. Aerobic biological treatment of grease from urban wastewater treatment plants [J]. Water Science and Technology,2001,44(2/3):219-226.
- [9] 沈齐英. 微生物处理含油废水的实验研究[J]. 环境科学与技术,2007,30(2):71-73.
- [10] Hasanuzzaman M, Umadhay - Briones K M, Zsiros S M, et al. Isolation, identification, and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1 [J]. Current Microbiology,2004,49(2):108-114.
- [11] 刘国防,梁志伟,杨尚源,等. 油脂废水生物处理研究进展[J]. 应用生态学报,2011,22(8):2219-2226.
- [12] 谭兆赞,林 捷,刘可星,等. 抗番茄青枯病复合菌剂的筛选构建及其防效[J]. 安全与环境学报,2006,6(4):27-30.
- [13] 沈叔平,汪小梅. 废水中动植物油脂的紫外分光光度测定法[J]. 中国环境监测,1994(3):4-7.
- [14] Affandi I E, Suratman N H, Abdullah S, et al. Degradation of oil and grease from high-strength industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria [J]. International Biodeterioration & Biodegradation,2014,95:33-40.
- [15] Ágnes K, Krisztián L, Szilvia Z, et al. Biodegradation of animal fats and vegetable oils by *Rhodococcus erythropolis* PR₄ [J]. International Biodeterioration & Biodegradation,2015(105):114-119.
- [16] 张 印,薛永常. 油脂降解菌种的鉴定及降解条件优化[J]. 微生物学杂志,2015,35(2):90-94.
- [17] 李文君,郭 勇,侯思琰,等. 以生活污水中油脂为复合碳源的特性菌株筛选与降解效率研究[J]. 农业环境科学学报,2012,31(3):580-586.