

文章编号:1674-2869(2018)04-0382-04

煤气化废水降解菌的分离筛选与鉴定

朱丽娜,张佑红*,卢育兵,钱泽栋

武汉工程大学环境生态与生物工程学院,湖北 武汉 430205

摘要:以苯酚为唯一碳源,从宁夏某煤气化工厂生化反应池活性污泥中分离筛选得到3株煤气化废水降解菌,分别命名为R、X和Y。考察发现3株菌株均对煤气化废水有降解作用,其中菌株R降解性能最优,在30℃、160 r/min下降解72 h,废水中化学需氧量(COD)和氨氮降解率分别为50%和46%。研究菌株R的降解性能与时间的关系,发现其对COD的降解在18 h后趋于稳定,对氨氮的降解在36 h后趋于稳定。对菌株R进行形态特征和分子生物学鉴定,结果显示菌株R与枯草芽孢杆菌的同源性达到99%。本研究筛选得到了具有应用潜力的优势菌株,为煤化工产业的污染治理问题提供了参考。

关键词:煤气化废水;生物降解;菌;分离筛选

中图分类号:Q93 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2018.04.006

Isolation Screening and Identification of Strains for Degradation of Coal Gasification Wastewater

ZHU Lina, ZHANG Youhong*, LU Yubing, QIAN Zedong

School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

Abstract: Three kinds of bacteria for coal gasification wastewater degradation, named R, X and Y, were isolated and screened from the activated sludge of a factory in Ningxia with phenol as the only carbon source. The results showed that these three strains could degrade the coal gasification wastewater with the best degradation performance over the strain R. The degradation rates of chemical oxygen demand (COD) and NH₃-N by the strain R reached 50% and 46% respectively after 72 h at 30℃ and 160 r/min. The relationship between degradation rates and time over the strain R showed that the degradation rates of COD and NH₃-N tended to be stable after 18 h and 36 h, respectively. The morphological characteristics and molecular biological identification of the strain R showed that the homology between the strain R and bacillus subtilis reached 99%. This study screened out the superior strains with potential application, which provided a reference for the pollution control in the coal chemical industry.

Keywords: coal gasification wastewater; biodegradation; strains; isolation and screening

我国是煤炭大国,煤炭在我国能源结构中占据相当重要的地位^[1-3]。近年来我国煤化工产业得到了迅速发展,然而煤化工污染治理问题成为了亟需解决的重点问题^[4]。煤气化是煤炭高效洁净利用的关键技术,气化过程中会产生大量高浓度、

高污染、有毒、难降解的工业有机废水,其水质因所使用的原料煤的成分和煤气化工艺的不同而有一定的差异^[5-9]。大量的煤气化废水如果不经处理直接排放,会对生态环境和人类健康造成巨大的危害^[10]。目前,我国对煤气化废水的处理采用三

收稿日期:2018-04-25

作者简介:朱丽娜,硕士研究生。E-mail:58689094@qq.com

*通讯作者:张佑红,博士,教授,博士研究生导师。E-mail:youhong@aliyun.com

引文格式:朱丽娜,张佑红,卢育兵,等.煤气化废水降解菌的分离筛选与鉴定[J].武汉工程大学学报,2018,40(4):382-385,390.

级处理工艺,即“物化预处理→生物处理→物化深度处理”,生物处理因处理费用低、操作简单、不易造成二次污染等特点,受到了广泛的关注^[11-16]。为了研究利用微生物方法解决煤气化废水中化学需氧量(chemical oxygen demand ,COD)和氨氮的污染问题,本研究以苯酚为唯一碳源,从宁夏某煤气化工厂生化反应池排放的活性污泥中分离筛选出煤气化废水降解菌,对其降解性能进行研究,并选择优势降解菌进行鉴定。

1 实验部分

1.1 原 料

1.1.1 菌种的来源 宁夏某煤气化工厂生化反应池排放的活性污泥。

1.1.2 废水的来源 由于实际废水的水质波动比较大,不利于实验室进行理论研究。综合考虑试验精度和实际工业应用要求,查阅文献后采用模拟废水进行理论研究。1 000 mL模拟废水的成分为:葡萄糖 10.0 g,七水合硫酸亚铁 0.01 g,硫酸铵 0.21 g,磷酸二氢钾 1.0 g,硫酸镁 0.2 g,磷酸氢二钾 1.0 g,氯化钙 0.1 g,原始煤气化废水 50 mL,超纯水 950 mL。原始煤气化废水取自宁夏某煤气化工厂未经处理的实际废水。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 BS124S分析天平,PB-10 pH计,Sartorius; YXQ-LS-75S 立式蒸汽压力灭菌锅,DZF-6050 真空干燥箱,SPX-250B-D 振荡培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司);MFS-II 多功能三维旋混仪(深圳潘西诺生物科技有限公司);TDZ5-WS 台式多管低速离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);AIR TECH 超净工作台(苏净集团安泰公司)。

1.2.2 实验耗材 100 μL、200 μL、1 000 μL 的移液枪头(Corning 公司);移液枪(Nichiryo 公司);COD 检测试剂盒,氨氮专用检测试纸(杭州陆恒生物科技有限公司)。

1.2.3 实验试剂 牛肉膏、大豆蛋白胨、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、硫酸镁、硝酸铵、氯化钙、浓盐酸、氢氧化钠、七水合硫酸亚铁、氯化钠、琼脂粉、苯酚,其中牛肉膏、大豆蛋白胨、琼脂粉为生化试剂;其他试剂均为分析纯。

1.3 培养基配制

富集培养基:蒸馏水 1 L,蛋白胨质量分数 1.0%,氯化钠质量分数 0.5%,牛肉膏质量分数 0.5%;调节 pH 至 7.0~7.2。

无机盐培养基:蒸馏水 1 L,硫酸亚铁(硫酸亚铁铵)0.01 g,硝酸铵 1 g、磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁 0.2 g,磷酸氢二钾 1.0 g,氯化钙 0.1 g;调节 pH 至 7.0~7.2。

驯化培养基:1 L 无机盐培养基中添加 100 mL 的模拟废水和 0.1 g 苯酚。

筛选培养基:1 L 无机盐培养基中添加 100 mL 的模拟废水和 0.1 g 苯酚。

固体培养基:驯化培养基中加入质量分数 1% 的琼脂粉。

纯化培养基:富集培养基中加入质量分数 1% 的琼脂粉。

灭菌方法:培养基、玻璃平板、移液枪枪头通过高压蒸汽灭菌锅,在 0.103 MPa 下,121 ℃灭菌 20 min;超净工作台、涂布棒、接种环通过紫外灯照射,灭菌 30 min。

1.4 实验方法

1.4.1 菌株的驯化与富集 取一定量的活性污泥至 500 mL 的烧杯中,加入 100 mL 驯化培养基,于 30 ℃下培养 15 d。在培养的过程中,驯化培养基会逐渐被微生物分解利用,水分也会被蒸发一部分,因此每天应观察污泥的状态并适当的搅拌,及时补充适量的驯化培养基和超纯水,以保证污泥被驯化培养基浸没达到驯化与富集的效果。

1.4.2 菌株的分离与纯化 由于煤气化废水中一般含有较高浓度的酚类物质,因此在筛选平板中加入酚类物质,一方面能使适应酚环境并利用酚类物质的菌株快速生长,另一方面还能抑制不适应酚环境的菌株的生长。本实验选用以苯酚为唯一碳源的筛选培养基,通过平板划线分离纯化。具体步骤如下:在超净工作台中,吸取 100 μL 驯化后的富集菌液,然后吸取 900 μL 的灭菌超纯水,将菌株稀释 10 倍,同样步骤将稀释液再分别稀释 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 倍,然后吸取 100 μL 稀释了 10⁻³ 倍和 10⁻⁴ 倍的菌液,加入到筛选培养基平板当中,用涂布棒分别均匀涂开稀释液,然后将平板倒置在 30 ℃ 的恒温培养箱中连续培养 48 h,挑选比较大一点或不同颜色特征的菌落分别进行平板划线。为了得到单一的菌株,反复使用纯化培养基平板转接,分离多次,直到完全的分离,对分离得到的菌株进行编号。

1.4.3 菌株降解效果的测定 在 100 mL 的富集培养基中分别接种上述筛选分离纯化后的菌株,于 30 ℃、160 r/min 下培养 24 h。吸取 5 mL 富集后的菌液,接种于 100 mL 的模拟废水中,同时设置空白

对照组,空白对照组为5 mL的灭菌模拟废水。设置菌株降解条件为:温度30℃、转速160 r/min,72 h后吸取5 mL溶液,5 000 r/min离心10 min,取上清液,使用COD检测试剂盒和氨氮专用检测试纸测定废水中COD和氨氮的含量,根据菌株对废水中COD和氨氮的降解效果挑选出一株降解能力较强的菌株。

1.4.4 优势降解菌降解性能的测定 对筛选出的优势降解菌富集培养24 h后,接种到400 mL废水中,接种量为5%,转速160 r/min,温度30℃,分别在0 h,4 h,8 h,12 h,18 h,36 h,72 h取样5 mL,使用COD检测试剂盒和氨氮专用检测试纸,测定废水中的COD和氨氮含量,并计算降解率。

1.4.5 煤气化废水优势降解菌的分子生物学鉴定

本实验通过形态学观察和分子生物学鉴定,最终确定菌株种属。其鉴定过程具体如下:

1) 细菌总DNA的提取

将平板上分离纯化得到的单菌落R接种到富集培养基中,30℃、160 r/min下培养24 h,取10 mL菌液,用细菌基因组DNA快速抽提试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)进行提取。

2) PCR(polymerase chain reaction,PCR)引物

PCR扩增的DNA片段引物采用16S rDNA通用引物。

27F:5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3';

1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

3) PCR扩增体系

用PCR扩增仪进行扩增反应。

DNA模板(基因组DNA 20 ng/ μ L~50 ng/ μ L) 2 μ L,10 \times Buffer(with Mg^{2+})5 μ L,dNTP 4 μ L,Taq酶为0.25 μ L,上游引物27F(10 μ mol/L)2.5 μ L,下游引物1 492R(10 μ mol/L)2.5 μ L,dd H₂O 33.75 μ L,体系总体积为50 μ L。

循环条件:94℃预变性5 min,94℃变性45 s,55℃复性45 s,72℃延伸60 s,30个循环后再在72℃修复延伸10 min。用质量分数1%琼脂糖电泳,150 V、100 mA,20 min电泳观察。

4) 16S rDNA测序和同源性分析

16S rDNA测序工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。测序结果利用美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)上的BLAST程序进行相似性比对分析,然后从GenBank数据库中选取同源性较高的10株菌株,利用Mega5.0 N-J软件构建系统发育树,进行同源性分析。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选结果及降解性能的研究

以苯酚为唯一碳源从宁夏某煤气化工厂生化池的活性污泥中筛选得到3株菌株,分别命名为R,X,Y。分别测定3株菌株对煤气化废水中的COD和氨氮的降解效果,结果如图1(a)所示。从图1(a)中可以发现,3株菌株对废水中COD和氨氮均具有一定的降解效果。对于COD的降解:菌株R>X>Y,菌株R的降解效果最好,废水中COD含量降到了500 mg/L,降解率为50%;对于氨氮的降解:菌株R>X>Y,菌株R的降解效果最好,废水中氨氮含量降为270 mg/L,降解率为46%。与菌株X和Y相比,菌株R有明显的优势,所以确定菌株R为优势菌株,将做进一步降解性能的研究和鉴定。

对菌株R降解性能的测定,得到的结果如图1(b)。从COD的降解率曲线可以看出,在0 h~18 h时,COD降解率明显提高,18 h~72 h时,COD降解率趋于稳定,达到了50%;从氨氮的降解率曲线可以看出,在0 h~8 h时,氨氮的降解率较缓慢地提高;在8 h~18 h时,氨氮的降解率较明显地提高;在18 h~36 h时,氨氮的降解率提高逐渐减慢;在36 h~72 h时,氨氮的降解率趋于稳定,达到了46%。

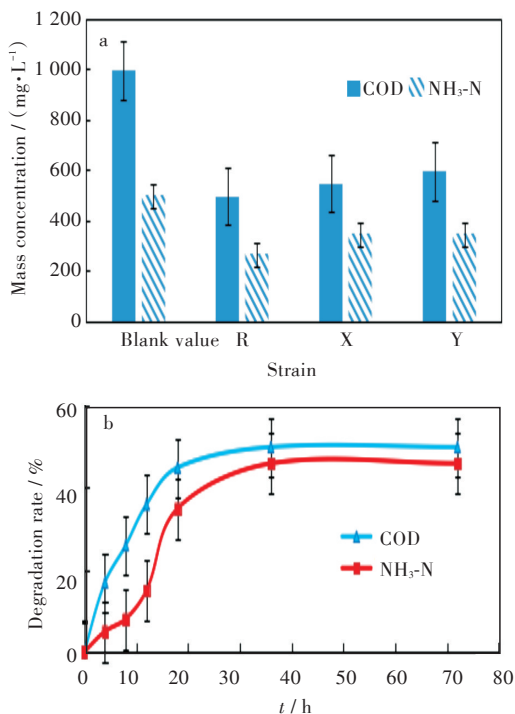


图1 (a)菌株的筛选结果,(b)菌株R的降解性能
Fig. 1 (a) Screening results of strains, (b) degradation performance of strain R

2.2 菌株R的形态特征及分子生物学鉴定

将菌株R接种在纯化培养基中,涂布平板,在30℃下培养48h得到图2(a)。从图2(a)可以看到:R菌菌落较大,呈乳白色规则的圆形,表面凸起且光滑,挑取时带有黏性。

菌株R的16S rDNA片段PCR扩增产物的电泳条带如图2(b)所示,其条带长度约为1 200 bp。利用BLAST程序将菌株R的16S rDNA序列在NCBI数据库中进行比对分析,结果显示菌株R与枯草芽孢杆菌的相似性达99%。构建的系统发育树如图2(c)所示,系统发育树可以清晰反映菌株的亲缘关系,由图2(c)可见,菌株R与芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)的亲缘关系最近,同源性达99%。再结合菌落形态特征,菌株R鉴定为枯草芽孢杆菌。

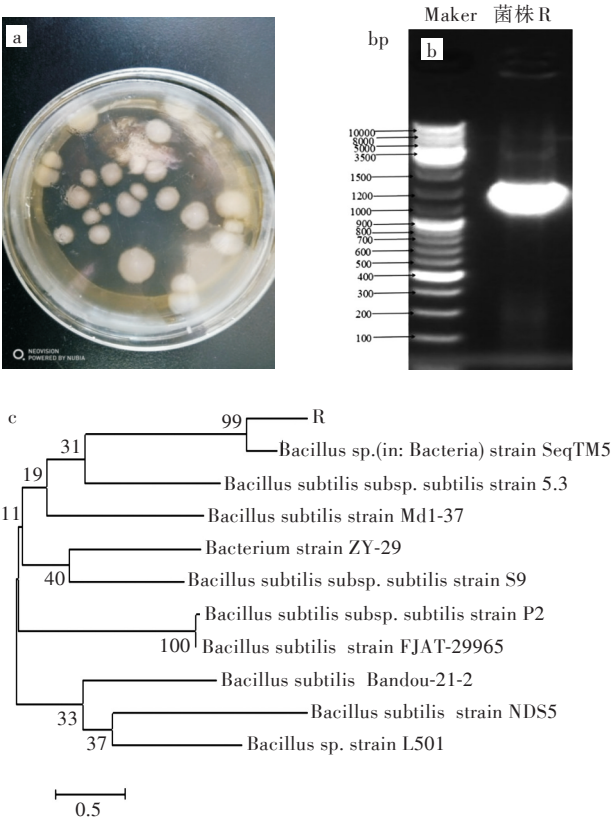


图2 菌株R:(a)菌落形态,(b)PCR扩增产物的电泳图谱,(c)16S rDNA序列系统发育树

Fig. 2 Strain R:(a)colony morphology, (b)electrophoretogram of PCR amplification products, (c)phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

3 结 语

近年来,由于我国煤化工产业的快速发展和人们环保意识的不断提高,煤气化废水的处理问题引起了社会的高度重视。本研究分离筛选出了1株对煤气化废水中COD和氨氮降解效果较优的

菌株R,其在30℃、160 r/min的条件下降解废水72 h,废水中COD降解率为50%,氨氮降解率为46%。对菌株R进行形态特征和分子生物学鉴定,结果显示菌株R为枯草芽孢杆菌。

废水的生物处理法是利用微生物自身的生化作用和代谢过程来氧化分解废水中的污染物质,因此后续可对菌株R进行诱变,优选出生长代谢、繁殖能力强的菌株,从而提高废水处理的效果,同时可尝试固定化等处理方法,为实际废水治污工程提供理论支撑。

参考文献:

[1] 王基铭. 中国现代煤化工产业现状与展望[J]. 当代石油石化,2012,20(8):1-6.

[2] 赵婧,孙体昌,李雪梅,等. 煤气化废水处理工艺的现状 & 发展方向[J]. 工业用水与废水,2012,43(4):1-6.

[3] 柯体竹. 世界煤化工产业发展现状及趋势[J]. 中国石油和化工经济分析,2011(12):28-29.

[4] 郑彭生,郭中权. 国内煤气化废水处理关键问题分析[J]. 水处理技术,2018,44(3):17-20.

[5] 温艳芳. 厌氧-好氧-臭氧-流化床组合工艺处理煤气化废水研究[D]. 沈阳:沈阳建筑大学,2013.

[6] WANG Z X, XU X C, CHEN J. Treatment of lurgi coal gasification wastewater in pre-denitrification anaerobic and aerobic biofilm process [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2013, 1 (4) : 899-905.

[7] LIU W W, TU X Y, WANG X P, et al. Pretreatment of coking wastewater by acid out, micro-electrolysis process with in situ electrochemical peroxidation reaction[J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 200/201/202 (16):720-728.

[8] LI H, HAN H, DU M, et al. Inhibition and recovery of nitrification in treating real coal gasification wastewater with moving bed biofilm reactor [J]. Journal of Environment Science (China), 2011, 23(4):568-574.

[9] LI H Q, HAN H J, DU M, et al. Removal of phenols, thiocyanate and ammonium from coal gasification wastewater using moving bed biofilm reactor [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(7):4667-4673.

[10] 何玉玲,褚春风,张振家. 高浓度煤气化废水处理技术研究进展[J]. 工业水处理,2016,36(9):16-20.

[11] 贾永强,李伟,王丽梅,等. 新型组合工艺对高浓度煤气化废水处理的试验研究[J]. 工业水处理,2013, 33(11):64-67.

[12] 杨雄强. 生化组合工艺处理煤气化废水试验[J]. 能源环境保护,2017,31(1):34-37.

[4] 化学工业部化肥司, 中国磷肥工业协会编写组. 磷酸磷铵的生产工艺[M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1991.

[5] 中国资源综合利用年度报告(2012)[J]. 中国资源综合利用, 2013, 31(4):6-12.

[6] 王雪, 唐云, 朱文婷. 高镁磷尾矿提镁浮选试验研究[J]. 化工矿物与加工, 2014 (3): 9-11.

[7] 黄芳, 李军旗, 陈义, 等. 高镁磷尾矿酸解反应行为研究[J]. 贵州科学, 2010, 28(3):63-67.

[8] 黄芳, 王华, 李军旗. 磷尾矿酸解过程介微观反应机理[J]. 昆明理工大学学报(理工版), 2010, 35(3): 1-5, 50.

[9] 赵琦. 高镁磷尾矿浮选回收镁的研究[J]. 化工矿物与加工, 2017, 46(8):19-22.

[10] 吴梦. 磷尾矿制备原位改性氢氧化镁及其填充聚丙烯的性能研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2016.

[11] 马会娟, 杨成, 潘志权, 等. 磷尾矿制备硫酸镁试验研究[J]. 非金属矿, 2017, 40(1):93-95.

[12] 马会娟, 杨成, 吴汉军, 等. 高镁磷尾矿循环酸浸制备磷酸二铵试验研究[J]. 非金属矿, 2017, 40(2): 88-90.

[13] 高金锋, 高伦, 安子博, 等. 铁矿尾矿的活化及蒸养砖的制备[J]. 武汉工程大学学报, 2016, 38(2): 158-162.

[14] 罗力, 张一敏, 包申旭. 利用铁尾矿制备硅酸盐水泥熟料[J]. 非金属矿, 2016, 39(3):50-52.

[15] OBINNA O, ÖZGUR E. Reusing copper tailings in concrete : corrosion performance and socioeconomic implications for the Lefke-Xeros area of Cyprus [J] . Journal of Cleaner Production, 2016, 112 (11) : 420-429.

[16] SHETTIMA A U, HUSSIN M W, AHMAO Y, et al. Evaluation of iron ore tailings as replacement for fine aggregate in concrete [J] . Construction and Building Materials, 2016, 120(5) :72-79.

[17] 张龙, 薛振华, 李正兰. 响应面法优化粉煤灰基多孔陶瓷的制备工艺[J]. 中国陶瓷, 2016, 52(3) : 53-58.

[18] 吴汉军. 磷尾矿综合利用研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2015.

本文编辑: 张 瑞



(上接第 385 页)

[13] 张博, 刘立考. 气化废水综合治理的措施及成效[J]. 西部煤化工, 2013(2):12-14.

[14] FANG F, WU G, HAN H J, et al. Improvement effect of bioaugmentation with phenol degrading bacteria on lurgi coal gasification wastewater treatment [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2017, 24 (6):52-59.

[15] 付强强. 煤气化废水水质分析及深度处理工艺研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2016.

[16] 王伟, 韩洪军, 张静, 等. 煤制气废水处理技术研究进展[J]. 化工进展, 2013, 32(3):681-686.

本文编辑: 张 瑞