

降解造纸废水木质素菌种的筛选鉴定及应用

林 海 陆 钢 张庆娜 吕绿洲 贾秀明

北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083

摘 要 为了提高造纸废水生化处理效果,进行了降解造纸废水木质素菌种的筛选鉴定和应用实验.对从市政污水处理厂采集的活性污泥样品进行培养、驯化、分离和鉴定等一系列实验,得到了能够降解木质素的生物降解菌.通过研究其生理生化特性,确定该菌为白腐菌,属于短杆状、好氧型产碱菌.经革兰氏染色鉴定为革兰氏阳性菌.进一步驯化从中挑选出有较强降解能力的菌种并进行实际废水环境下的应用实验,结果显示该菌对造纸废水 COD_{Cr} 的去除率可达到 80.9%.

关键词 废水处理; 造纸废水; 木质素; 白腐菌; 筛选; 驯化

分类号 X172, X506

造纸行业是我国的一个支柱产业,目前年总产值超过 3 000 万 t,仅次于美、日两国,居世界第三位.据 1998 年统计,全国制浆造纸工业年排废水量为 $2.4 \times 10^9 \text{ m}^3$,约占全国工业废水排放总量的 11%,其中 COD_{Cr} 排放总量为 321.4 万 t,为全国第一污染行业^[1-2].造纸废水中含有大量木质素^[3].木质素降解微生物在工程实际应用中有着广阔的前景.孙先锋、张志杰等^[4]经反复驯化培养和划线分离,获得了 6 株能在以木质素为唯一碳源的培养基上生长的菌种.6 株菌均能不同程度降解木质素,其中一种的木质素去除率达到了 23.4%.郭鹏、陈敏等^[5]从自然筛选、紫外诱变筛选两个角度,对取自 SBR 处理系统中的活性污泥进行驯化筛选. Joyce 等^[6]采用白腐菌为优势微生物的新型生物转盘 MyCoR 反应器处理纸厂漂白废水,同时去除 COD_{Cr} 和 BOD,并使氯化木素脱氯.

本文研究了木质素降解微生物白腐菌的生理生化特性,通过对目标微生物的分离鉴定及生理生化特性研究,得出其对木质素降解的一系列参数,并将其用于造纸废水的初步处理.

1 材料与方法

1.1 菌种来源

北京城市排水集团高碑店污水处理厂二沉池回流污泥.

收稿日期: 2006-06-14 修回日期: 2006-10-11

基金项目: 北京市教育委员会共建项目建设计划 (No. XK100080432); 北京科技大学校基金 (NBIC) 重点资助课题 (No. NBIC-4)

作者简介: 林 海 (1966—), 男, 教授, 博士生导师

1.2 培养基

肉膏蛋白胨培养基^[7]; 专项培养基 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)^[8]: KH_2PO_4 1.0, NaH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, VB 1×10^{-3} , CaCl_2 1×10^{-4} , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1×10^{-5} , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2×10^{-4} , 葡萄糖 1.0, 洒石酸铵 0.1; 造纸废水培养基: 成分为液体专项培养基 + 造纸废水 (取自河南淇县造纸厂).

1.3 菌种驯化、分离及鉴定

驯化初期投加营养液,而后逐步剔除营养物,提高目标降解物的比例,直至营养基质全部为目标降解物.

分离方法采用稀释倒平板法和平板划线分离法^[9].

鉴定方法采用 Bavendamm 反应和革兰氏染色法^[9].

1.4 评价指标

生物相采用镜检; COD_{Cr} 测定采用标准重铬酸钾滴定法^[9];生长量测定采用比浊法^[9].

2 结果与分析

2.1 菌种驯化

250 mL 三角瓶装 50 mL 营养液 (C、N 和 P 的质量比为 100 5 1, COD_{Cr} 为 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 为 7.2), 接入污泥,摇床转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 32℃ 下 (若无特殊说明,下文基础条件均为为此) 培养.经过三个周期 (6 d) 后,经显微镜观察,瓶内微生物生长良好,钟虫、累枝虫大量繁殖,后生动物轮虫、线虫活性较高,出水 COD_{Cr} 的去除率稳定在 90%,表明微生物已经适应了现有的培养环境.

此时开始逐步加入造纸废水对活性污泥进行驯化. 在利用造纸废水逐步替代营养液对污泥驯化的阶段, 每个原水比例条件下均做了换水周期为 1 d 和 2 d 的两个测试以寻求适合目标微生物的培养条件, 结果见表 1.

表 1 驯化期间 COD_{Cr} 去除率

Table 1 Removal rate of COD_{Cr} in the domestication period

原水比例/ %	COD_{Cr} 去除率/ %	
	换水周期 1 d	换水周期 2 d
10	85.5	88.6
20	80.8	86.5
40	76.5	80.4
60	79.5	75.7
80	69.2	73.2
100	70.5	74.0

在驯化的末期, 原水比例提至 100 % 后, 测得换水周期为 2 d 时出水 COD_{Cr} 去除率达到了 74 %, 镜检瓶内微生物活性良好, 轮虫、线虫等后生动物大量繁殖, 钟虫、累枝虫等固着型纤毛虫虽数量不及培养期间但个体活性较好, 以此可间接反映出目标微生物生长良好, 对造纸废水的降解效果明显.

2.2 菌种分离

菌种分离结果见图 1. 图中, A 种菌落内圈为绿色绒粒, 中圈为绿色与白色混杂, 最外圈为乳白色绒粒; B 种菌落大部分为白色茸状, 边缘有少量黄绿色菌生长; C 种菌落大部分为淡黄色绒粒状, 镜检均有少量菌丝孢子.

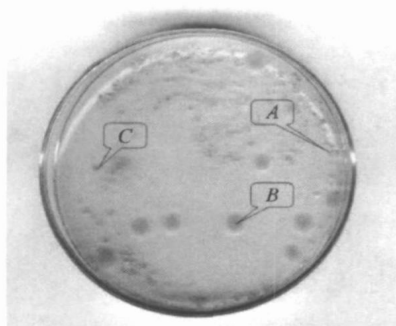


图 1 杂菌接种普通培养基 3 d 后照片

Fig. 1 Photo of mixed-bacteria inoculation ordinary culture medium after 3 d

培养 5 d 后, 培养基上菌落蔓延至整个培养皿中. A 菌落外圈为白绒状, 内圈全变绿; B 几乎全为白色; C 仍为淡黄色绒粒, 镜检菌丝不发达.

2.3 菌种鉴定

培养 1 d 后 A、B 两菌种在原水滴周围有生长菌落出现, C 菌种没有在原水滴周围生长的情况; 培养 2 d 后 A、B 两菌种在培养皿内都生长, 并且均能在原水周围生长出菌落, C 菌种仍没有出现在原水周围的菌落(培养 1 周后, 仍没有出现).

实验证实经驯化后的杂菌中含有两种可适应造纸废水的单一性状菌种, 它们都有可能是目标菌种——白腐菌.

经两次连续分离后主要获得两种菌: 一种为绿色绒粒状菌, 初步认为是绿色木霉, 镜检为丝状; 另一种为白色绒状, 初步认为是白腐菌, 镜检为长丝菌.

在培养皿中接种白色绒状菌落, 用加入琼脂及少量单宁酸的专项培养基培养, 温度控制在 32 °C, 经 2 d 培养后, 在菌落外侧形成了肉眼可见的褐色轮环, 可见接种的白色绒状菌是白腐菌.

对已鉴别出的目标菌种——白腐菌——进行革兰氏染色后, 在显微镜下观察发现, 目标菌种为紫色. 根据革兰氏染色原理, 可判定该菌种为革兰氏阳性菌. 菌种的形状为短杆状. 见图 2 和图 3.

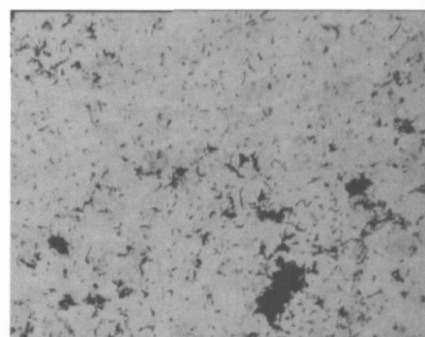


图 2 普通显微镜下菌种革兰氏染色照片

Fig. 2 Microscope photo of Gram-stained bacteria

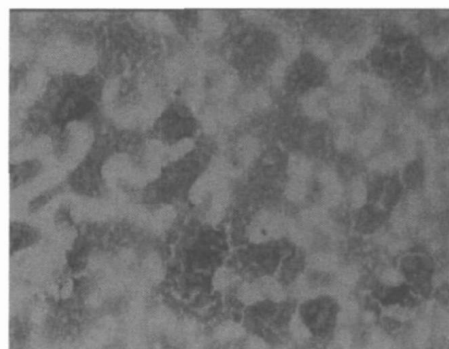


图 3 油镜下菌种革兰氏染色照片

Fig. 3 Oil lens photo of Gram-stained bacteria

2.4 菌种理化性质鉴定

2.4.1 生长曲线

采用原菌水,用可见分光光度计测定,最佳波长确定如图 4 所示. 由不同波长时菌液的吸光度曲线可知,520 nm 为菌液测定时的最佳波长. 白腐菌的生长曲线见图 5.

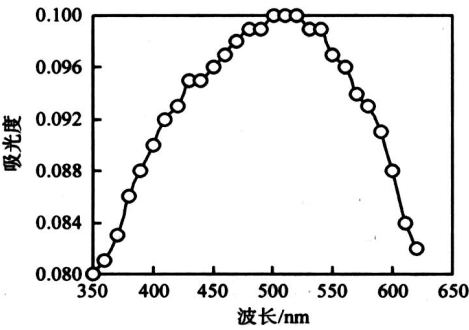


图 4 不同波长时菌液的吸光度

Fig.4 Absorptivity of bacteria-contained liquid at different wave lengths

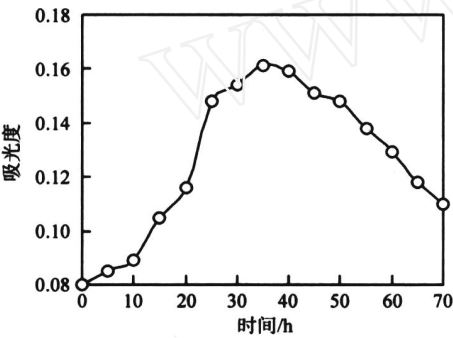


图 5 白腐菌的生长曲线

Fig.5 Growth curve of white-rot fungi

参照白腐菌生长曲线可以看出,菌种在经过大约 10 h 的停滞期后,吸光度值开始明显增大,进入对数生长期,这一阶段持续了 15 h. 此后吸光度值增至最大并基本保持稳定,菌种开始稳定生长期. 从第 45 h 后,吸光度值缓慢下降,菌体走向衰亡. 至 70 h 菌种完成一个生长周期.

2.4.2 生长类型

判断白腐菌的代谢类型,进行了溶解氧测试,见图 6. 由图可见:停滞期溶解氧迅速增至 3.3 mg L^{-1} 左右,低于同条件下空白实验溶解氧值,表明在菌种生长初期即需微量溶解氧的参与;15 h 后菌种在对数生长期和稳定生长期阶段溶解氧由最大值 3.5 mg L^{-1} 开始下降至 45 h 的 2.3 mg L^{-1} ,接种活菌的实验结果表明,该菌种的生长时需要氧气参与的,同时当瓶内溶解氧开始降低时,也是吸光度曲线上菌种数量增长的时间点;此后溶解氧值保持

稳定,菌种进入衰亡期. 故白腐菌为好氧菌.

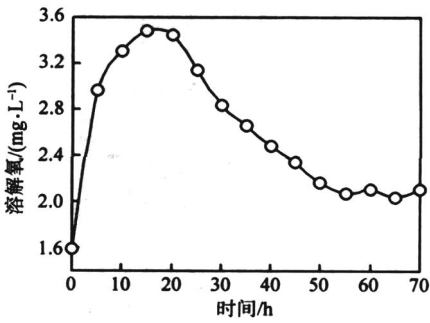


图 6 菌种溶解氧随时间变化曲线

Fig.6 Curve of the dissolved oxygen of white-rot fungi-contained solution with time

2.4.3 产酸碱性

图 7 表示了在不同污染负荷条件下 pH 值随时间的变化规律. 可以看出,原水比例为 20 %及 50 % 的两组曲线在整个实验过程中均呈偏碱性,变化比较平稳,pH 值略有升高. 70 %和 100 % 的两组曲线在 0~12 h 范围 pH 值有微小下降,24 h 后 pH 值明显增大,由偏酸性升至弱碱性. 48 h 后 pH 值保持稳定. 由此可以看出该菌种应为产碱菌.

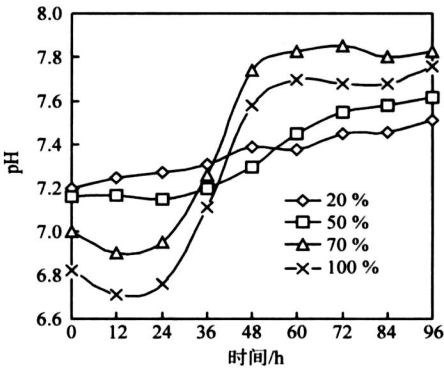


图 7 不同污染负荷条件下 pH 值的变化曲线

Fig.7 Changes of pH value under different pollution loadings

2.5 菌种处理废水

2.5.1 单菌种进一步驯化

将已经保藏的菌种取少量孢子(挖块)转接于含 10 %造纸废水的平板上培养,如果菌种在平板上有生长,则将平板上的优势菌种按同样方式依次转接于含 20 %和 40 %造纸废水的平板上培养,并从中挑选生长速度快的菌种. 经过上述选育后,得到了可在含 40 %造纸废水的平板上生长良好的菌种.

进一步驯化过程中,经镜检可以发现当菌种逐步从培养基过渡到一定含量实际造纸废水的营养源过程中,其部分生长过程是下降的,同时菌丝有所减少(平均长度约为原来的 50 %,造纸废水 40 %下测

得),如图 8 所示.

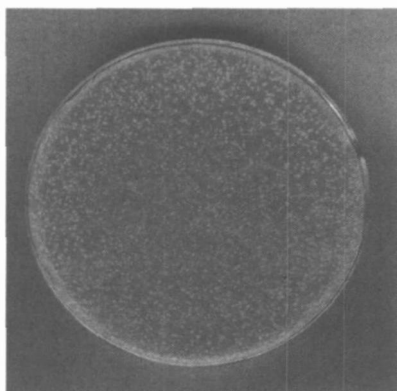


图 8 进一步驯化后菌种照片

Fig. 8 Photo of white-rot fungi after further domestication

2.5.2 污染物负荷的影响

从图 9 可以看出,原水比例为 100 % 的曲线较为特殊,在初期 COD_{Cr} 反常的有所升高,从 24 h 开始, COD_{Cr} 的变化才与其他曲线趋于一致. 导致这一现象的原因可能是因为在这一污染负荷下,白腐菌先对木质素进行吸附,木质素被解吸出来使测得的 COD_{Cr} 增大,之后白腐菌开始对木质素的降解, COD_{Cr} 降低.

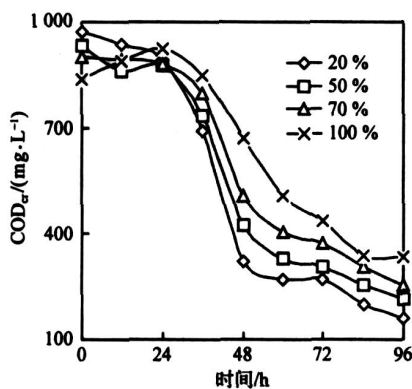


图 9 不同污染负荷条件下 COD_{Cr} 的变化曲线

Fig. 9 Change curves of COD_{Cr} under different pollution loadings

分析曲线还可发现,菌种对污染物的降解速率并不与前面得出的生长曲线中粗分出的生长时期保持一致,这是由于环境的影响所致,污染物的浓度改变了菌种所处的生长时期.

2.5.3 pH 值的影响

微生物必须在一定条件下生长,如光合细菌^[10],废水 pH 值的影响结果见图 10.

由 COD_{Cr} 变化曲线可以看出,初始 pH 值为 5, 6 和 7 的三条曲线变化趋势较为一致,在 0 ~ 24 h COD_{Cr} 下降相对缓慢,24 ~ 48 h COD_{Cr} 迅速减小,去除率分别达到 67.4 %, 56.8 % 和 43.4 %,此后

COD_{Cr} 缓慢下降,曲线相对平稳.

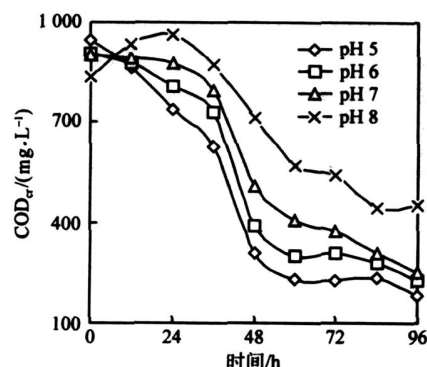


图 10 不同初始 pH 值条件下 COD_{Cr} 的变化曲线

Fig. 10 Change of COD_{Cr} at different initial pH values

初始 pH 值为 8 的曲线在 0 ~ 24 h 内 COD_{Cr} 先增大,此后曲线的变化趋势与其他三组保持一致. 但本条件下的 COD_{Cr} 去除效果较差,考虑这是因为菌种不适合在初始呈碱性的环境中生长. 分析 COD_{Cr} 增大的原因是在此初始条件下,菌种先进行木质素的吸附作用,木质素被解吸出来导致 COD_{Cr} 增大,此后菌种开始对其进行降解. 由曲线还可得出初始 pH 值为 5 时 COD_{Cr} 的去除效果最佳,表明菌种适宜在初始呈酸性的环境中生存.

2.5.4 溶解氧的影响

图 11 显示了在不同初始溶解氧条件下,各曲线的变化趋势基本一致. 所不同的是,溶解氧初始值为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的两条曲线在 0 ~ 24 h 内 COD_{Cr} 变化较小,此后 COD_{Cr} 迅速降低. 60 h 后变化又趋于平缓. 初始值为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的两条曲线则从培养初期开始 COD_{Cr} 的下降就很明显,60 h 后的 COD_{Cr} 基本稳定,保持不变. 在此前的实验阶段,已初步判定目标菌种为好氧型,因而初始溶解氧为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件提供了菌种生

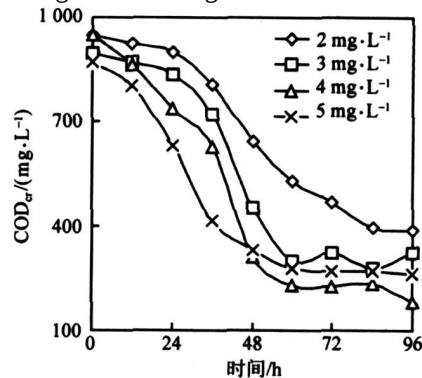


图 11 不同初始溶解氧条件下 COD_{Cr} 的变化曲线

Fig. 11 Changes of COD_{Cr} at different initial dissolved oxygen contents

长所需足够的氧,大大提高了其适应环境的能力,在培养初期即表现出良好的降解效果。

3 结论

(1) 通过采样、驯化、分离和鉴定等一系列实验,培养出能够降解木质素的生物降解菌——白腐菌。

(2) 采样的原水为河南省淇县造纸厂造纸废水,驯化用污泥为高碑店污水处理厂二沉池回流污泥,待原水比例提至 100 %降解 2 d 后出水 COD_{Cr} 去除率达到 74 %。

(3) 采用稀释倒平板法从驯化后的污泥中分离出三种菌,经平板划线法纯化得到三种纯菌。通过白腐菌的特征反应——*Bavendamm* 反应——证实菌落为白腐菌。对白腐菌进行革兰氏染色实验,判定该菌种为革兰氏阳性菌,菌种形态为短杆状。菌种生长周期为 70 h,并初步判定其为好氧型的产碱菌。

(4) 在原水比例 70 %,pH 初始值为 5 以及初始溶解氧浓度为 4 mg L^{-1} 条件下,最终 COD_{Cr} 去除率为 80.9 %。

参 考 文 献

- [1] 庾晋,周洁. 我国造纸业发展现状和趋势. 黑龙江造纸,2001,4:10
- [2] 林云琴,周少奇. 白腐菌降解纤维素和木质素的研究进展. 环境技术,2003,4:29
- [3] 韦朝海,任源. 淮河流域酿造业生产与环境污染的损益分析. 食品与发酵工业,1998,24(5):64
- [4] Michael G, Gold M H. Molecular biology of three lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol Rev*, 1993, 57(3): 605
- [5] Glenn J K, Gold M H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 45: 1741
- [6] Crawford R L. *Lignin Biodegradation and Transformation*. New York: John Wiley & Sons Inc, 1981: 42
- [7] 孙先锋,张志杰,崔红军. 造纸黑液木质素降解微生物的分离和降解特性研究. 环境工程,2002,20(3):78
- [8] 林刚,文湘华,钱易. 应用白腐真菌技术处理难降解有机物的研究进展. 环境污染治理技术与设备,2001,2(4):1
- [9] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京:北京大学出版社,1999:58
- [10] 钱大益,朱益丹,宋存义,等. 光合细菌的生长条件. 北京科技大学学报,2005,27(2):156

Screening and identification of strain degrading lignin and its application in paper-making wastewater treatment

LIN Hai, LU Gang, ZHANG Qingna, LV Lvzhou, JIA Xiuming

Civil and Environmental Engineering School, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

ABSTRACT To improve the biological treatment effect of paper-making wastewater, the screening and identification of strain degrading lignin and its application were carried out. The strain able to degrading lignin was obtained after a series of experiments including sampling, domesticating, separating and identifying etc, and it was defined as a white-rot fungi, short-rod, aerobic alkali-producing bacteria based on investigations on its physiological and biochemical prosperities. After Gram's stain, the strain was identified as a Gram-positive bacterium. In further research, the strain strongly capable of degrading was selected to apply in wastewater treatment experiment and the results showed that this bacterium possessed a removal rate of 80.9 % for COD_{Cr} in wastewater from paper mills, which displayed good prospects of application.

KEY WORDS wastewater treatment; paper-making wastewater; lignin; white-rot fungi; screening; domestication