

一株光合细菌的鉴定及其处理大豆加工废水试验

卢海凤,张光明,何春华

(哈尔滨工业大学 市政环境工程学院,150090 哈尔滨,zgm200@126.com)

摘要:为进一步明晰从土壤中提取的一株光合细菌的生理生化特性,并实现利用其处理污水、达到资源化的目标,对此株光合细菌进行了菌种、形态以及生理生化鉴定,并考察了其在不同条件下降解人工配制的大豆加工废水的效果.结果表明,此株菌为球形红假单胞菌(*Rhodopseudomonas sphaeroides*,命名为Z08).在初始COD质量浓度为8 000~12 000 mg·L⁻¹、温度为26~28℃条件下,菌种最佳投量为160~400 mg·L⁻¹,经过72 h的处理,COD去除率达85%以上.比较多种光照氧气条件发现在自然光微氧的条件下,经过72 h处理,Z08对大豆废水COD的去除率达73.5%,菌体产量达2 125 mg·L⁻¹.由此确定了Z08处理大豆加工废水的最佳处理条件为自然光微氧,投菌量为160~400 mg·L⁻¹,处理时间为72 h.

关键词:光合细菌;Z08;菌种鉴定;大豆加工废水;处理条件

中图分类号: X703.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2011)12-0072-05

The identification of a strain of photosynthetic bacteria and its effect in treating soybean wastewater

LU Hai-feng, ZHANG Guang-ming, HE Chun-hua

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China, zgm200@126.com)

Abstract: This paper studied the physiological and biochemical characteristics of a new strain of photosynthetic bacteria isolated from soil in details, identified its belonging, and used it to treat artificial soybean wastewater and reclaim resources. Results showed that the strain belonged to *Rhodopseudomonas sphaeroides*, and was named Z08. For treating wastewater with COD of 8 000–12 000 mg·L⁻¹ under 26–28℃, the optimal dose of PSB was 160–400 mg·L⁻¹; COD removal reached 85% after 72 h. Various oxygen–light conditions were examined, and the best one was found to be natural light–micro oxygen condition. Under this condition, COD removal reached 73.5% and biomass reached 2 125 mg·L⁻¹ after 72 h treatment. The optimal condition of Z08 treating soybean wastewater was as follows: natural light and micro oxygen condition, Z08 dose of 160–400 mg·L⁻¹, and hydraulic retention time of 72 h.

Key words: photosynthetic bacteria; Z08; strain identification; soybean wastewater; treatment condition

自20世纪60年代日本科学家M.Kobayashi等发现光合细菌(PSB)具有能够净化水质的作用以来,光合细菌就一直受到关注^[1].光合细菌是一大类在厌氧条件下进行不放氧的光合作用细菌

的总称,其分布广泛,种类繁多.文献[2–3]将其划分为绿硫细菌、红硫细菌、红螺菌3科.其中红螺菌能在厌氧光照的条件下以低级脂肪酸、多种二羧酸、醇类、糖类、芳香族化合物等低分子有机物及二氧化碳等作为光合作用的电子供体进行光能异养生长,而且能在微氧黑暗条件下,以上述有机物为呼吸基质,进行好氧异养生长.另外,光合细菌还具有繁殖速度快(优于厌氧法)、能耗低(优于好氧法)和无需污泥处置^[3]等优点在污水

收稿日期:2010-07-21.

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项课题(2009ZX07424-005).

作者简介:卢海凤(1983—),女,博士研究生;

张光明(1973—),女,教授,博士生导师.

治理领域逐步得到推广应用^[4-10]。光合细菌菌体无毒、含有多种营养物质,如蛋白质、多种 B 族维生素、泛酸、辅酶 Q 等生理活性物质以及菌绿素、类胡萝卜素等天然色素,具有很强的回收价值^[11-16]。基于光合细菌在水处理和资源回收等方面的优势,对从土壤中富集分离出的一株新型光合细菌进行了生理生化以及菌种鉴定,并初步探讨了其对大豆加工废水的处理效果,发现在自然光微氧条件下,该菌株对大豆加工废水的 COD 具有较好的降解作用,比传统的光照厌氧及黑暗好氧条件下利用 PSB 处理高浓度有机废水在工程上的应用更具有现实意义。

1 实验

1.1 实验设备

主要实验设备见表 1。

表 1 主要实验设备

仪器名称	型号	仪器名称	型号
紫外可见分光光度计 T6 新世纪		1/10000 电子天平 ALC-110.4	
COD 快速测定仪	5B-1	不锈钢手提式灭菌锅 DSX-2808B	
台式离心机	TGL-16G	立式透明冷藏柜	SC-230
空气浴振荡器	HZQ-C	超净工作台	DL-CJ-IND
海尔冷藏柜	BC-117FC	原子力显微镜	BioScope
电热恒温培养箱	DH3600AB	电热烘干箱	101-1AB
溶解氧测定仪	YSI200		

1.2 实验方法

1.2.1 菌种形态及生理生化性质鉴定实验

1) 菌种单、复染色试验:参考文献[17];

2) 原子力显微镜扫描:将原始菌液 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清沉淀部分加入 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液 2 mL,洗涤离心 10 min,如上洗涤 3~5 次即可。将洗涤好的菌体加入磷酸盐缓冲液少许并稀释到合适的质量浓度进行原子力显微拍照;

3) 菌种的碳源利用试验:参考文献[17];

4) 菌种吸收峰点试验:将菌液用无菌水稀释至 OD₆₆₀ = 1.000 左右,将该菌液在紫外分光光度计上 100~1 000 nm 波长内进行扫描,记录峰点;

5) Sherlock MIS 鉴定试验:详见 sherlock MIS 系统操作说明书;

6) 光密度 OD₆₆₀:国标法,详见文献[18]。

1.2.2 处理大豆加工废水条件及效果实验

1) 废水:采用人工配水方式,用豆浆配制初始 COD 为 8 000~12 000 mg · L⁻¹ 的污水;处理温度为 26~28 ℃;

2) 投菌量:采用称重法设置投菌量(干质量)为 8、40、160、400、960、1 920 mg · L⁻¹ 的 6 个处理;

3) 光照及氧气条件:光照厌氧(光强为 1 000 lx)、自然光微氧(保持溶解氧 DO < 0.5 mg · L⁻¹)以及黑暗好氧(保持 DO 介于 2.0~4.0 mg · L⁻¹)3 个处理,投菌量为 120 mg/L;

4) COD:国标法,详见文献[18];

5) 生物量采用烘干法,即 MLSS 测定方法,详见文献[18]。

2 结果与讨论

2.1 菌种及生理生化性质鉴定

2.1.1 光合细菌 Z08 单染色试验及原子力扫描镜试验

由图 1,2 可知,该菌的细菌菌体为球状,单个细菌的直径约为 0.3~1.0 μm。光合细菌 Z08 复染色过程中的颜色变化为:紫色→红色→无色→紫色,故 Z08 为 G⁻。

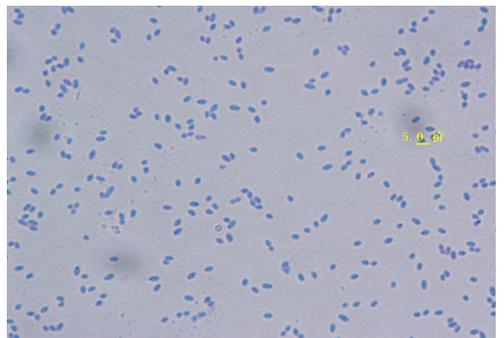


图 1 100 倍光学显微镜下 Z08 菌体图像

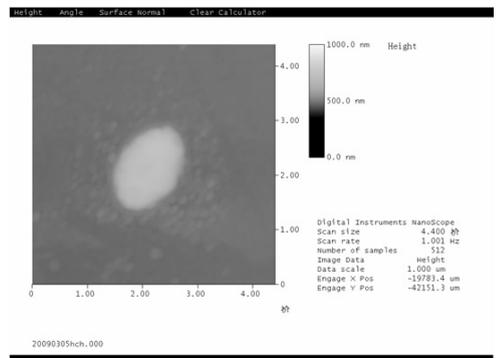


图 2 光合细菌 Z08 的原子力镜扫描照片

2.1.2 光合细菌 Z08 的碳源利用试验

由表 2 可知,该菌能够在以乙醇、果糖、葡萄糖、甘油、甘露糖、甘露醇、山梨醇等小分子有机物为碳源的培养基中生长,说明该菌能够利用此类有机物进行新陈代谢;而不能利用丙酸钠、硫代硫酸钠、甲基纤维素、油酸钠及蛋白质作为碳源进行

代谢.

2.1.3 光合细菌 Z08 的菌液特征吸收峰点试验

由表 3 可知,该菌在 340、370、450、570、850、980 nm 均有吸收峰,其中 370、850 nm 是菌绿素 a 特征吸收峰,980 nm 是菌绿素 b 的特征吸收峰,450、570 nm 是类胡萝卜素的特征吸收峰^[2].由此可知,该菌体内含有菌绿素 a、菌绿素 b 以及类胡萝卜素.

表 2 Z08 的碳源利用情况

有机物	乙醇	果糖	甲基纤维素	油酸钠	蛋白粉	葡萄糖	甘油	甘露糖	丙酸钠	甘露醇	山梨醇	硫代硫酸钠
利用情况	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-

表 3 菌液特征吸收峰点

序号	波长/nm								
	210	245	260	340	370	450	570	850	980
1	3.152	3.145	3.124	0.829	0.741	0.502	0.318	0.241	0.438
2	3.110	3.117	3.062	-	0.747	0.505	0.316	0.241	0.436
3	3.197	3.156	3.054	0.745	0.745	0.503	0.314	0.240	0.435

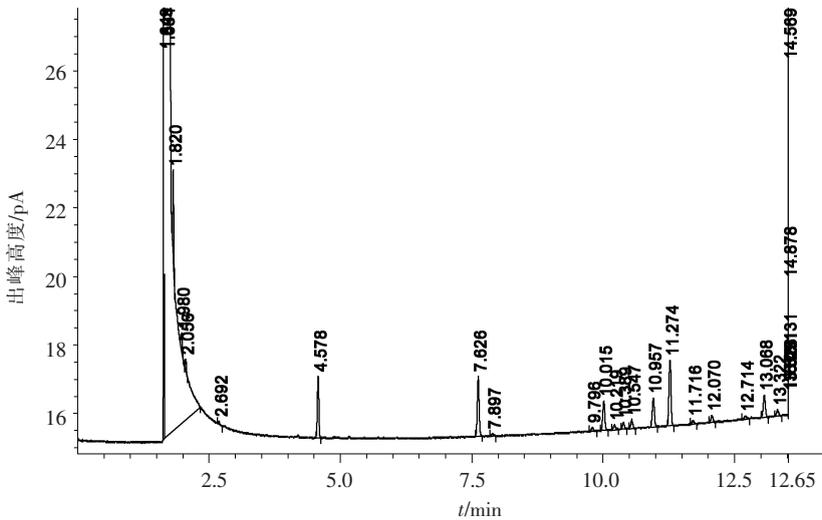


图 3 GH-1 脂肪酸-IC 法鉴定图谱

图 4 为该菌株 16srDNA 序列鉴定结果,根据测序结果分析:该菌株 16S rDNA 序列与 *Rhodobacter sphaeroides* KD131 (CP001151)、*Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17029 (CP00578)、*Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203 (D16425) 等相似性为 100%. 可以确定其分类地位属于 *Rhodobacter sphaeroides*.

2.2 处理大豆加工废水条件优化及效果

2.2.1 投菌量

如图 5 所示,各处理组的 COD 去除率随处理时间的增加逐渐升高,前 72 h 增加最快,72 h 后数值变化趋于平缓,逐渐达极限值.投菌量为 160 与 400 mg · L⁻¹ 的处理组在第 72 小时时,COD 的

2.1.4 光合细菌菌种鉴定

经微生物鉴定自动化系统 Sherlock Microbial Identification System (MIS) 鉴定,该菌种为球形红单假单胞菌: *Rhodobacter sphaeroides* (*Rhodopseudomonas sphaeroides*), MIS 图谱见图 3,对照的标准图谱来源于美国 MIDI 公司,相似度为 0.838 (相似度 > 0.7 鉴定可靠).

降解率分别达 86.8% 与 81.9%,在 96 h 时,上述数值分别达 93.7% 与 90.5%;菌种添加量为 960 与 1 920 mg · L⁻¹ 的处理组中,前 96 h 时的 COD 去除率均小于菌种投加量为 160 与 400 mg · L⁻¹ 的组合,而在第 96 小时以后,其去除率数值与 160 和 400 mg · L⁻¹ 的处理组相差不大;菌种添加量为 8,40 与 80 mg · L⁻¹ 的处理组 COD 去除率在每个时间点上均小于其他菌种添加量 ≥ 160 mg · L⁻¹ 的 4 个处理组.综合考虑每个处理组的 COD 降解效果、菌种添加量的经济性与处理时间的长短可以得出,利用 Z08 处理大豆加工废水最佳的投菌量为 160 ~ 400 mg · L⁻¹,处理时间为 72 h.

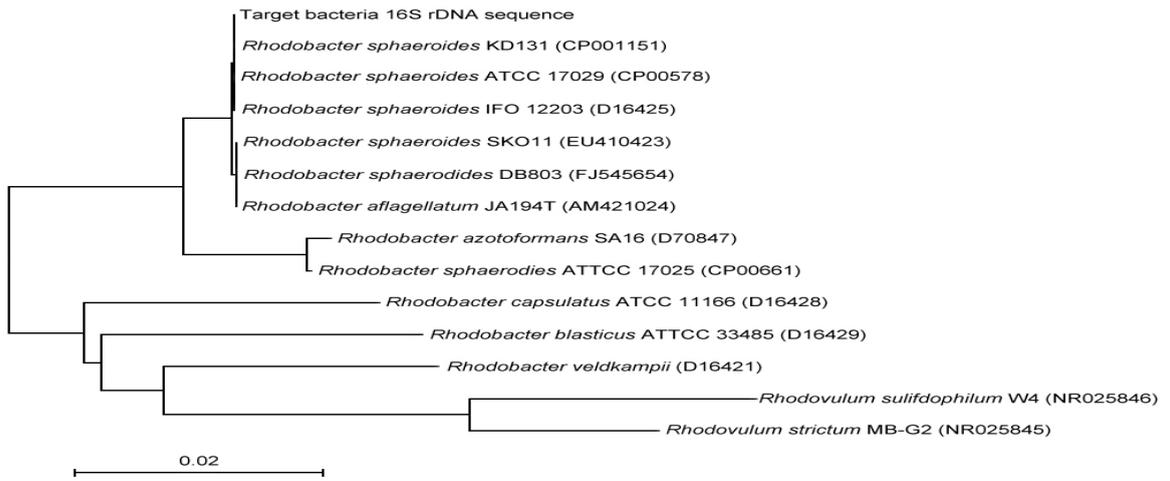


图 4 球形红假单胞菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 进化树

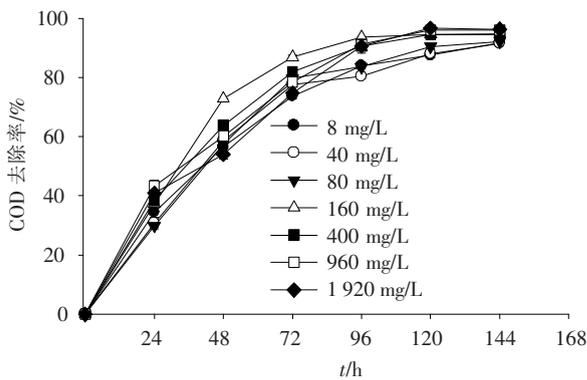


图 5 大豆加工废水中 COD 去除率随投菌量变化

2.2.2 光照氧气

从图 6 中可以看出,各处理组的 COD 值随处理时间的增加呈下降趋势,且同一时间点上,各组 COD 去除率的趋势为黑暗好氧>自然光微氧>光照厌氧;在前 72 h 内,各组 COD 值下降最快,72 h 后各组 COD 值变化相对平缓,逐渐达到处理极限值;在第 72 小时时,各组 COD 去除率相差不大,而在第 168 小时时,各组对 COD 的去除率为:黑暗好氧(95.1%)>自然光微氧(91.9%)>光照厌氧(83.4%)。另外,在第 72 小时时,各处理组的菌体产量分别为:自然光微氧($2\ 125\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)>光照厌氧($1\ 350\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)>黑暗好氧($862.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),综合处理效果、经济节能性以及菌体产量,自然光微氧为最佳处理条件。从 COD 去除效果的角度考虑,自然光微氧条件下对污水中 COD 的去除效果与黑暗好氧条件下的相差不大,且优于光照厌氧条件。而高浓度有机废水由于透光性差,氧气传质差,需要通过设置高光强的照明器以及高强度的曝气来分别控制污水处理过程中的严格光照厌氧与黑暗好氧条件,因此,相比之下,在自然

光微氧条件下的 PSB 处理高浓度有机废水工艺在工程上的应用更具有现实意义。

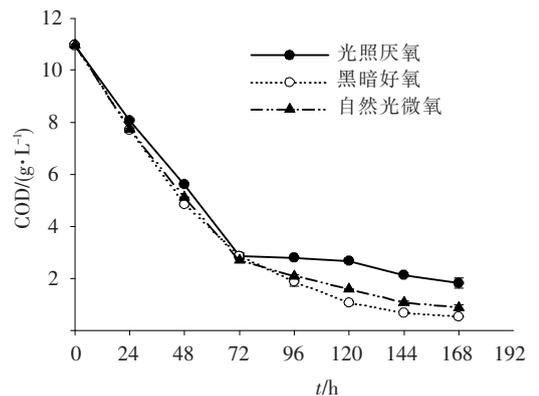


图 6 大豆废水中 COD 质量浓度随光照氧气组合变化

3 结 论

1) 从土壤中富集分离的菌株 Z08 经 Sherlock MIS 系统鉴定及 16S rDNA 序列测定,判断其为 *Rhodospirillum rubrum*, 菌体为球状,单个细菌的直径约为 $0.3 \sim 1.0\ \mu\text{m}$,属于革兰氏阴性菌。Z08 能够在以乙醇、果糖、葡萄糖、甘油、甘露糖、甘露醇、山梨醇等小分子有机物为碳源的培养基中生长,而不能利用丙酸钠、硫代硫酸钠、甲基纤维素、油酸钠及蛋白质作为碳源进行代谢。

2) 处理温度为 $26 \sim 28\ ^\circ\text{C}$ 条件下,投菌量为 $160 \sim 400\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,Z08 对大豆加工废水 COD 的去除率最佳。

3) 在不同的光照氧气组合条件中,自然光微氧组合处理条件最佳,第 72 小时时对 COD 的去除率达 73.5%,菌体产量与光照厌氧及黑暗好氧两个处理组相比达到最大,为 $2\ 125\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 小林正泰(日). 光合细菌处理高浓度有机废水[J]. 发酵与工业, 1978, 36(9): 753-760.
- [2] R. E 希坎南. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 北京科学出版社, 1984.
- [3] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [4] BAI H, ZHANG Z, YANG G, *et al.* Bioremediation of cadmium by growing *Rhodobacter sphaeroides*: kinetic characteristic and mechanism studies [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(16): 7716-7722.
- [5] EROGLU E, GUNDUZ U, YUCEL M, *et al.* Photosynthetic bacterial growth and productivity under continuous illumination or diurnal cycles with olive mill wastewater as feedstock [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2010, 35: 5293-5300.
- [6] KAEWSUK J, THORASAMPAN W, THANUTTAMAVONG M, *et al.* Kinetic development and evaluation of membrane sequencing batch reactor (MSBR) with mixed cultures photosynthetic bacteria for dairy wastewater treatment [J]. *Journal of Environmental Management*, 2010, 91: 1161-1168.
- [7] LU H F, ZHANG G M, DAI X, *et al.* Photosynthetic bacteria treatment of synthetic soybean wastewater: direct degradation of macromolecules [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 7672-7674.
- [8] MYUNG K K, CHOI K M, YIN C R, *et al.* Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodospseudomonas pulustris*, isolated from eutrophicated ponds [J]. *Biotechnology Letter*, 2004, 26: 819-822.
- [9] PONSANO E H G, PAULINO C Z, PINTO M F. Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(9): 3836-3842.
- [10] SIRIANUNTAPIBOON S, SRIKU M. Reducing red color intensity of seafood wastewater in facultative pond [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(14): 1612-1617.
- [11] TIANA Y, YUEA T, YUANA Y, *et al.* Improvement of cultivation medium for enhanced production of coenzyme Q10 by photosynthetic *Rhodospirillum rubrum* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 51: 160-166.
- [12] 秦娟. 光合细菌成分的研究及光合细菌制剂降血脂药效学初步筛选[D]. 太原: 山西医科大学, 2009.
- [13] 李福枝, 刘飞, 曾晓希, 等. 光合细菌(PSB)应用的研究进展 [J]. *食品与机械*, 2009, 24(1): 152-156, 158.
- [14] 王剑秋, 管云涛, 腾飞. 光合细菌法降解淀粉废水积累菌体蛋白的研究 [J]. *清华大学学报: 自然科学版*, 2007, 47(3): 348-351.
- [15] 李福枝, 刘飞, 邓靖. 沼泽红假单胞菌中类胡萝卜素的提取与分析 [J]. *生物技术*, 2007, 11(1): 51-53.
- [16] LORRUNGRUANG C, MARTTHONG J, SASAKI K, *et al.* Selection of photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 14F for polyhydroxyalkanoate production with two-stage aerobic dark cultivation [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 102(2): 128-131.
- [17] 吕春梅. 环境污染微生物学实验指导 [M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2006.
- [18] 国家环保局水和废水分析方法编写组. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境出版社, 1989.

(编辑 刘 彤)