



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105695445 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 22

(21) 申请号 201610182777. 3

C12R 1/38(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 03. 28

C12R 1/01(2006. 01)

C02F 101/32(2006. 01)

(71) 申请人 舟山光大检测研究院有限公司

地址 316021 浙江省舟山市定海区临城街道  
百川道9号1009室

(72) 发明人 曹国忠

(74) 专利代理机构 宁波诚源专利事务所有限公  
司 33102

代理人 袁忠卫 陈蕾

(51) Int. Cl.

C12N 11/14(2006. 01)

C12N 11/10(2006. 01)

C12N 11/04(2006. 01)

C02F 3/34(2006. 01)

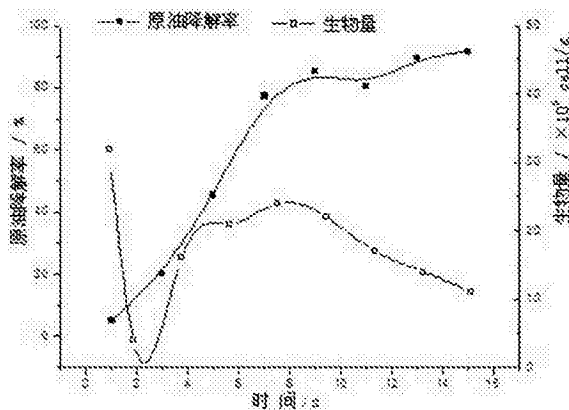
权利要求书2页 说明书9页 附图7页

(54) 发明名称

一种用于含油污水处理的固定化微生物菌剂及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于含油污水处理的固定化微生物菌剂,其特征在于,包括嗜盐石油烃降解菌体和固定化材料,该固定化材料包括海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>、纳米二氧化硅以及低聚木糖,且海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>及纳米二氧化硅以及低聚木糖的质量比为1:0.75~0.8:0.1~0.2:0.2~0.3;还涉及该固定化微生物菌剂的制备方法和其在含油污水处理中的应用。本发明中制备方法简便,操作易控,制成的固定化菌剂易于保存和再利用,并且固定化能使微生物的生境条件由单纯好氧转变成好氧、缺氧、厌氧并存,丰富了其生物化学反应的途径,从而提升其对复杂有机污染物的降解能力,对船舶修造废水中油类污染物的降解率可达80~92%,与游离的微生物相比,其降解率提高了36~45%,且对环境的耐受性增强。



1. 一种用于含油污水处理的固定化微生物菌剂,其特征在于,包括嗜盐石油烃降解菌体和固定化材料,该固定化材料包括海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>、纳米二氧化硅以及低聚木糖,且海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>及纳米二氧化硅以及低聚木糖的质量比为1:0.75~0.8:0.1~0.2:0.2~0.3。

2. 如权利要求1所示的固定化微生物菌剂,其特征在于,所述菌剂呈微球状,其中嗜盐石油烃降解菌体的含量为 $3\sim 4\times 10^9$  cell/g。

3. 如权利要求2所述的固定化微生物菌剂,其特征在于,所述嗜盐石油烃降解菌体由假单胞菌属*Pseudomonas*、脂肪杆菌属*Pimelobacter*、海球菌属*Marinococcus*、微杆菌属*Microbacterium*以及动性球菌属*Planococcus*组成,质量比为3~5:1~3:2~3:1~2:1~2。

4. 如权利要求3所述的固定化微生物菌剂,其特征在于,所述假单胞菌属为B-1,所述脂肪杆菌属、海球菌属、微杆菌属及动性球菌属的细菌分别为N1、N2、N3以及N4,且均通过以下步骤获得:将含菌源水样接入富集培养基中25℃活化,将活化后的菌液注入原油培养基中,25℃、180r/min培养驯化,最后用油平板进行反复分离、纯化得到N1~N4系列和B-1系列;

其中,N1~N4系列以含菌源的海水为水样,以蒸馏水1L计,上述N1~N4系列的富集培养基为:牛肉膏3~4g,蛋白胨9~10g,NaCl 4.5~5g,pH为7.2~7.4;

以蒸馏水1L计,上述N1~N4系列的原油培养基为:原油1.5~2g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3~4g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3~4g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4~5g,NaCl 4~5g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5~0.7g,CaCl<sub>2</sub> 0.02~0.03g,pH为7.2~7.4;

B-1系列以含菌源的含油污水为水样,以蒸馏水1L计,上述B-1系列的富集培养基为:葡萄糖18~20g,酵母粉1~1.2g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3~4g,NaCl 4.5~5g,尿素2~3g,pH为7.2~7.4;

以蒸馏水1L计,上述B-1系列的原油培养基为:原油1.5~2g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3~4g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3~4g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4~5g,NaCl 4~5g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5~0.7g,CaCl<sub>2</sub> 0.02~0.03g,pH为7.2~7.4。

5. 如权利要求3所述的固定化微生物菌剂,其特征在于,所述假单胞菌属为铜绿假单胞菌*Aeruginosa*或红苍白假单胞菌*Rubrisubalbicans*中的至少一种,所述脂肪杆菌为简单脂肪杆菌*Pimerobacter simplex*,所述海球菌属为嗜盐海球菌*Marinococcus halophilus*,所述微杆菌属为嗜氨微杆菌ATCC15354*Microbacterium ammoniophilum* ATCC15354或娥微杆菌*Microbacterium imperiale*中的至少一种,所述动性球菌属为柠檬色动性球菌*Planococcus citreus*。

6. 一种如权利要求1~5中任一项所述的固定化微生物菌剂的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)将培养后的嗜盐石油烃降解菌体菌液3000rpm下离心4~5min,去除上层清液,收集底部浓缩菌液,用无菌水将其调节至OD<sub>600</sub>为1,即得嗜盐石油烃降解菌体浓缩液;

(2)将一定量的海藻酸钠、纳米二氧化硅以及低聚木糖加入上述嗜盐石油烃降解菌体浓缩液中,混合均匀,用注射器吸取混合液,该混合液中海藻酸钠的浓度为5~6%,逐滴滴入到3.5~4.0%CaCl<sub>2</sub>溶液中,得固定化微球,交联12~14h后,用无菌水洗净得所需的固定化微生物菌剂,该固定化微生物菌剂中嗜盐石油烃降解菌体的含量为 $3\sim 4\times 10^9$  cell/g。

7. 一种如权利要求1~5中任一项所述的固定化微生物菌剂的应用,其特征在于,所述固定化微生物菌剂在含油污水处理中的应用,且100ml待处理污水中加入其体积2~4%的所述固定化微生物菌剂。

8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述含油污水中原油浓度为5~7g/L,盐度小于1.5%。

9. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述含油污水的处理温度为25~35℃,pH为5~9。

## 一种用于含油污水处理的固定化微生物菌剂及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种用于含油处理的固定化微生物菌剂及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 世界港口业、海运业的迅猛发展,促进了船舶修造业的进一步繁荣,随着世界船舶修理产业的东移,给中国船舶工业的发展提供了良好的发展机遇。在船舶修造业等海洋经济和临港产业发展的同时,船舶洗舱及修理过程将产生大量的修造污水,修造污水包括含油废水和生活污水,其中含油废水又包括机舱含油废水、压舱水、坞底含油废水等。修造污水严重影响当地海洋生态环境安全,区域修造污水合理处理、综合利用已成为发展海洋经济和临港产业、保护海洋生态环境的重大环保问题。

[0003] 对船舶修造产生的含盐及含有油污的废水进行生物处理是目前修造污水处理的发展方向,修造污水生物处理中除了通过污泥驯化获得能够耐受一定盐度范围的活性污泥从而进行生物处理外,从周围高盐环境中富集培养筛选嗜盐石油烃降解菌并用于船舶修造废水的生物处理,也是一种快速有效的方法。

[0004] 该方法可为船舶修造业海盐油污水的高效处理提供了较好的菌种资源,但是在菌种使用过程中传统使用方式都是液态微生物制剂,而液态微生物制剂在水流流动状态下存在容易被洗出反应器而造成时效短等问题。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的第一个技术问题是针对现有技术而提供一种用于含油污水处理的固定化微生物菌剂。

[0006] 本发明所要解决的第二个技术问题是提供一种上述固定化微生物菌剂的制备方法。

[0007] 本发明所要解决的第三个技术问题是提供一种上述固定化微生物菌剂在含油污水处理中的应用。

[0008] 本发明解决第一个技术问题所采用的技术方案为:一种用于含油污水处理的固定化微生物菌剂,其特征在于,包括嗜盐石油烃降解菌体和固定化材料,该固定化材料包括海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>、纳米二氧化硅以及低聚木糖,且海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>及纳米二氧化硅以及低聚木糖的质量比为1:0.75~0.8:0.1~0.2:0.2~0.3。

[0009] 作为优选,所述菌剂呈微球状,其中嗜盐石油烃降解菌体的含量为3~4×10<sup>9</sup>cell/g。

[0010] 所述嗜盐石油烃降解菌体由假单胞菌属Pseudomonas、脂肪杆菌属Pimelobacter、海球菌属Marinococcus、微杆菌属Microbacterium以及动性球菌属Planococcus组成,质量比为3~5:1~3:2~3:1~2:1~2。

[0011] 作为优选,假单胞菌属为B-1,而脂肪杆菌属、海球菌属、微杆菌属及动性球菌属分别为N1、N2、N3以及N4,且均通过以下步骤获得:将含菌源水样接入富集培养基中25℃活化,将活化后的菌液注入原油培养基中,25℃、180r/min培养驯化,最后用油平板进行反复分离、纯化得到N1~N4系列和B-1系列;

[0012] 其中,N1~N4系列以含菌源的海水为水样,以蒸馏水1L计,上述N1~N4系列的富集培养基为:牛肉膏3~4g,蛋白胨9~10g,NaCl4.5~5g,pH为7.2~7.4;

[0013] 以蒸馏水1L计,上述N1~N4系列的原油培养基为:原油1.5~2g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3~4g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3~4g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4~5g,NaCl4~5g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5~0.7g,CaCl<sub>2</sub>0.02~0.03g,pH为7.2~7.4;

[0014] B-1系列以含菌源的含油污水为水样,以蒸馏水1L计,上述B-1系列的富集培养基为:葡萄糖18~20g,酵母粉1~1.2g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>3~4g,NaCl4.5~5g,尿素2~3g,pH为7.2~7.4;

[0015] 以蒸馏水1L计,上述B-1系列的原油培养基为:原油1.5~2g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3~4g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3~4g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4~5g,NaCl4~5g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5~0.7g,CaCl<sub>2</sub> 0.02~0.03g,pH为7.2~7.4。

[0016] 作为优选,所述假单胞菌属为铜绿假单胞菌*Aeruginosa*或红苍白假单胞菌*Rubrisubalbicans*中的至少一种,所述脂肪杆菌为简单脂肪杆菌*Pimerobacter simplex*,所述海球菌属为嗜盐海球菌*Marinococcus halophilus*,所述微杆菌属为嗜氨微杆菌ATCC15354*Microbacterium ammoniophilum* ATCC15354或娥微杆菌*Microbacterium imperiale*中的至少一种,所述动性球菌属为柠檬色动性球菌*Planococcus citreus*。

[0017] 本发明解决第二个技术问题所采用的技术方案为:上述固定化微生物菌剂的制备过程包括以下步骤:

[0018] (1)将培养后的嗜盐石油烃降解菌体菌液3000rpm下离心4~5min,去除上层清液,收集底部浓缩菌液,用无菌水将其调节至OD<sub>600</sub>为1,即得嗜盐石油烃降解菌体浓缩液;

[0019] (2)将一定量的海藻酸钠和纳米二氧化硅加入上述嗜盐石油烃降解菌体浓缩液中,混合均匀,用注射器吸取混合液,该混合液中海藻酸钠的浓度为5~6%,逐滴滴入到3.5~4.0%CaCl<sub>2</sub>溶液中,得固定化微球,交联12~14h后,用无菌水洗净得所需的固定化微生物菌剂,该固定化微生物菌剂中嗜盐石油烃降解菌体的含量为3~4×10<sup>9</sup>cell/g。

[0020] 本发明解决第三个技术问题所采用的技术方案为:所述固定化微生物菌剂在含油污水处理中的应用,且100ml待处理污水中加入其体积2~4%的固定化微生物菌剂。

[0021] 为使该固定化微生物菌剂对含油污水的净化效果较好,所述含油污水中原油浓度为5~7g/L,盐度小于1.5%。

[0022] 进一步,所述含油污水的处理温度为25~35℃,pH为5~9。

[0023] 与现有技术相比,本发明的优点在于:本发明中固定化微生物菌剂的固定化材料包括海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>、纳米二氧化硅、复合磷酸盐以及低聚木糖,海藻酸钠的生物兼容性好、无毒、容易固定,纳米二氧化硅可避免搅拌过程中产生气泡,提高传质性能,低聚木糖可使细菌细胞壁上的肽聚糖与水分子之间形成的氢键减少,并分布在细菌表面,通过静电和范德华力作用,提高细菌与海藻酸钠的相互作用,从而细菌的固定更加稳固。本发明中固定化微生物菌剂制备方法简便,操作易控,制成的固定化菌剂易于保存和再利用,并且固定化能使微生物的生境条件由单纯好氧转变成好氧、缺氧、厌氧并存,丰富了其生物化学反应的

途径,从而提升其对复杂有机污染物的降解能力,对船舶修造废水中油类污染物的降解率可达80~92%,与游离的微生物相比,其降解率提高了36~45%,且对环境的耐受性增强。

### 附图说明

- [0024] 图1为本发明实施例中N1菌的革兰氏染色照片图;
- [0025] 图2为本发明实施例中N2菌的革兰氏染色照片图;
- [0026] 图3为本发明实施例中N3菌的革兰氏染色照片图;
- [0027] 图4为本发明实施例中N4菌的革兰氏染色照片图;
- [0028] 图5为本发明实施例中B-1菌的革兰氏染色照片图;
- [0029] 图6为本发明实施例中初始pH对N1-N4系列菌生长的影响;
- [0030] 图7为本发明实施例中盐度对N1-N4系列菌生长的影响;
- [0031] 图8为本发明实施例中温度对N1-N4系列菌生长的影响;
- [0032] 图9为本发明实施例中初始pH对B-1菌生长的影响;
- [0033] 图10为本发明实施例中盐度对B-1菌生长的影响;
- [0034] 图11为本发明实施例中温度对B-1菌生长的影响;
- [0035] 图12为本发明实施例中固定化生物菌剂对原油降解率及菌剂生物量随降解时间的变化;
- [0036] 图13为本发明实施例中原油浓度对固定化生物菌剂降解效率的影响;
- [0037] 图14为本发明实施例中pH对固定化生物菌剂降解效率的影响;
- [0038] 图15为本发明实施例中温度对固定化生物菌剂降解效率的影响;
- [0039] 图16为本发明实施例中盐度对固定化生物菌剂降解效率的影响。

### 具体实施方式

- [0040] 以下结合附图实施例对本发明作进一步详细描述。
- [0041] 实施例1:嗜盐石油烃降解菌体的获取
- [0042] 1嗜盐石油烃降解菌的筛选与鉴定
- [0043] (1)菌种来源:本发明中的由假单胞菌属*Pseudomonas*、脂肪杆菌属*Pimelobacter*、海球菌属*Marinococcus*、微杆菌属*Microbacterium*以及动性球菌属*Planococcus*组成,其中属于假单胞菌属的细菌记为B-1,而属于脂肪杆菌属、海球菌属、微杆菌属及动性球菌属的细菌分别记为N1、N2、N3以及N4,其中N1-N4系列来源于海水(水样采集于扬帆集团鲁家峙船舶修造基地附近海域),而B-1系列来源于含油污水(水样采集于扬帆集团鲁家峙船舶修造基地)。
- [0044] (2)采用的培养基如下:
- [0045] N1-N4系列:
- [0046] 富集培养基:牛肉膏3.00g,蛋白胨10.00g,NaCl5.00g,蒸馏水1000mL,pH为7.20-7.40;
- [0047] 原油培养基:原油2.00g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.00g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.00g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.00g,NaCl5.00g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50g,CaCl<sub>2</sub> 0.02g,蒸馏水1000mL,pH为7.20-7.40。
- [0048] B-1系列:

[0049] 富集培养基:葡萄糖20.00g,酵母粉1.00g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.00g,NaCl 5.00g,尿素3.00g,蒸馏水1000mL,pH为7.20-7.40;

[0050] 原油培养基:原油2.00g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.00g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.00g,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.00g,NaCl 5.00g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50g,CaCl<sub>2</sub> 0.02g,蒸馏水1000mL,pH为7.20-7.40

[0051] (3)实验方法

[0052] 实验参照《简明第八版伯杰细菌鉴定手册》、《常见细菌系统鉴定手册》对筛选的细菌进行生理生化性质测定,将细菌初步鉴定到属。鉴定方法主要有革兰氏染色法、芽孢染色法、V-P实验、淀粉水解试验、甲基红试验、接触酶试验、明胶液化、半固体琼脂穿刺、细菌的运动性观察、硫化氢反应等。

[0053] (3.1)革兰氏染色:挑取少量菌苔涂布在载玻片上,风干,在火焰上固定涂片,滴加结晶紫染色1~2min,水洗,滴加碘液冲去残水,并用碘液覆盖约1min,水洗。用滤纸吸去载玻片上的残水,将玻片倾斜,在白色背景下,用95%的乙醇脱色,直至流出的乙醇无紫色时,立即水洗。用番红液复染约2min,水洗。干燥后,用油镜观察。菌体被染成蓝紫色的为革兰氏阳性菌,被染成红色的为革兰氏阴性菌。

[0054] (3.2)芽孢染色:加1~2滴水于小试管中,用接种环挑取2~3环菌苔于试管中,搅拌均匀,制成浓的菌悬液。加孔雀绿染液2~3滴于小试管中,并使其与菌液混合均匀,然后将试管置于沸水浴的烧杯中,加热染色15~20min。用接种环挑取试管底部菌液数环于洁净载玻片上,涂成薄膜,然后将涂片通过火焰3次温热固定。水洗,直至流出的水无绿色为止。用番红染液染色2~3min,倾去染液并用滤纸吸干残液。干燥后用油镜观察。芽孢呈绿色,芽孢囊及营养体为红色。

[0055] (3.3)接触酶实验:将24h培养的斜面接种,以玻璃棒沾取少许涂在3%过氧化氢的玻片上,如有气泡产生则为阳性,无气泡为阴性。

[0056] (3.4)甲基红实验:培养基:蛋白胨,5g;葡萄糖,5g;K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,5g。在培养液中加入一滴甲基红试剂,红色为甲基红试验阳性反应,黄色为阴性反应。

[0057] (3.5)V-P试验:培养基同甲基红试验。取培养液和40%氢氧化钠等量相混。加少许肌酸,10min如培养液出现红色,即为试验阳性反应。

[0058] (3.6)淀粉水解:在肉汁胨中加0.2%可溶性淀粉,制成平板。培养2-5天,形成明显菌落后,在平板上滴加碘液平板呈蓝黑色,菌落周围如有不变色透明圈,表示淀粉水解阳性,仍是蓝黑色为阴性。

[0059] (3.7)纤维素水解:培养基:蛋白胨,5g;NaCl,5g。将培养基分装试管,在培养基中浸泡一条优质滤纸,能将滤纸条分解成一团纤维或将纸条折断或变薄者为阳性,无变化者为阴性。

[0060] (3.8)明胶液化:培养基:蛋白胨,5g;明胶,100-150g。分装试管,取18-24h的斜面培养物穿刺接种,做空白,于20℃温箱中培养,在20℃以下的室温观察明胶是否液化,如菌已生长,明胶表面无凹陷且为稳定的凝块,则为明胶水解阴性。如明胶凝块部分或全部在20℃以下为可流动的液体,则为明胶水解阳性。

[0061] (4)菌种筛选结果

[0062] 将上述水样分别接入富集培养基25℃活化,然后将活化后的菌液后注入油培养基中,培养瓶置于摇床25℃,180r/min培养驯化,最后用油平板进行反复分离、纯化得到N1-N4

系列(图1、图2、图3及图4)、B-1系列(图5)。

[0063] 其中B-1菌为产表面活性剂菌,将B-1在培养基中发酵培养后过滤、离心除菌体,取一定上清液调pH=2,放置冰箱过夜,无沉淀产生,所以将B-1菌产生物表面活性剂初步鉴定为糖脂类。

[0064] (5)菌种的鉴定结果

[0065] 对N1、N2、N3、N4菌进行菌落表面形态的观察和生理生化性质的测定,将上述5株菌初步鉴定到属,其中B-1为假单胞菌属,N1为脂肪杆菌属,N2为海球菌属,N3为微杆菌属,N4为动性球菌属,各种菌的表面形态特征和生理生化特征如表1所述。

[0066] 表1菌体的表面形态特征和生理生化特征

[0067]

鉴定特征	B-1	N1	N2	N3	N4
菌落颜色	白色	乳白色	乳白色	黄色	乳白色

[0068]

菌落表面	光滑、湿润	光滑、湿润	光滑、湿润	光滑、湿润	光滑、湿润
菌落边缘形态	规则,无晕环	规则,无晕环	规则,有晕环	不规则,有晕环	规则,无晕环
菌体形态	杆状	短杆状	球状	杆状	球状
革兰氏染色	-	+	+	+	+
芽孢染色	-	-	-	-	-
接触酶	-	+	-	-	+
甲基红试验	-	+	-	-	+
V-P 试验	-	+	-	-	-
明胶液化	-	+	-	+	+
淀粉水解	-	-	+	-	+
纤维素水解	-	+	+	-	+

[0069] 2菌剂开发

[0070] (1)菌剂开发中所用的培养基:

[0071] N1-N4系列:

[0072] 第一富集培养基:牛肉膏3.00g,蛋白胨10.00g,NaCl5.00g,蒸馏水1000ml,pH为7.20-7.40。

[0073] B-1系列:

[0074] 第二富集培养基:葡萄糖20.00g,酵母粉1.00g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.00g,NaCl5.00g,尿素3.00g,蒸馏水1000ml,pH为7.20-7.40。

[0075] (2)实验方法

[0076] 菌种的评价分别以培养基OD<sub>600</sub>值或表面张力降低值代表菌种在不同条件下生长



的状况。

[0077] (3)分别考察pH、盐度和温度对石油降解菌N1-N4系列和B-1生长的影响。

[0078] (3.1)N1-N4系列

[0079] (3.1.1)初始pH对烃降解菌N1-N4生长的影响

[0080] 调节入富集培养基的pH分别为5、6、7、8和9,将4株菌以相同的接种量接种中,25℃,180r/min培养3d后,测定培养液的OD<sub>600</sub>值。从图6可以看出,4株菌在中性偏碱性环境中生长良好,由于实际海水的pH在7.6~8.5,沿海船舶修造企业采用海水进行清洗等作业,产生的含海水废水的pH一般偏碱性,因此筛选到的菌株可以用于实际治理。

[0081] (3.1.2)盐度对烃降解菌N1-N4生长的影响

[0082] 将4株菌以相同的接种量接入NaCl的质量分数分别为1%、3%、5%、7%和9%的富集培养基中,25℃,180r/min培养3d,测定培养液的OD<sub>600</sub>值。从图7中可以看出,4株菌在NaCl%为3%时生长良好,适合船舶修造废水的盐度环境,且N1和N4具有较好的耐盐性,因此菌株完全可以满足实际使用要求。

[0083] (3.1.3)温度对烃降解菌N1-N4生长的影响

[0084] 将4株菌以相同的接种量接入温度分别为15℃、20℃、25℃、30℃和35℃的富集培养基中,180r/min培养3d,测定培养液的OD<sub>600</sub>值。从图8可以看出,这4株菌在20~30℃时生长良好,且都具有较好的耐冷性。

[0085] (3.2)B-1菌

[0086] (3.2.1)初始pH对B-1生长的影响

[0087] 在250mL三角瓶中装入100mL富集培养基,调节培养液的pH分别为5、6、7、8、9、10,将B-1菌接入富集培养基中,25℃,180r/min培养3d后,测定培养液的表面张力值。由图9可以看出B-1在pH7-9范围内长势良好,产表面活性剂较多。

[0088] (3.2.2)盐度对B-1生长的影响

[0089] 将4株菌以相同的接种量接入NaCl的质量分数分别为1%、3%、5%、7%和9%的富集培养基中,25℃,180r/min培养3d,测定培养液的OD<sub>600</sub>值。由图10可以看出B-1在盐度为3-5范围内生长良好,具有较强的耐盐性。

[0090] (3.2.3)温度对B-1生长的影响

[0091] 将B-1菌以相同的接种量接入温度分别为5℃、15℃、25℃和35℃的富集培养基中,180r/min培养3d,测定培养液的OD<sub>600</sub>值。从图11可以看出,菌株在15-35℃时生长良好,且具有较好的耐冷性。

[0092] 嗜盐石油烃降解菌体由假单胞菌属Pseudomonas、脂肪杆菌属Pimelobacter、海球菌属Marinococcus、微杆菌属Microbacterium以及动性球菌属Planococcus组成,质量比为3~5:1~3:2~3:1~2:1~2。利用实施例1中获取的N1~N4系列菌株和B-1系列菌株或者采用市售的菌株来构成上述嗜盐石油烃降解菌体,进而制备用于船舶修造污水处理的固定化微生物菌剂,该固定化微生物菌剂的固定化材料包括海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>、纳米二氧化硅以及低聚木糖。以下通过实施例2~6对该固定化微生物菌剂的制备过程进行详述。

[0093] 实施例2:用于船舶修造污水处理的固定化微生物菌剂的制备

[0094] 本实施例中,海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>及纳米二氧化硅以及低聚木糖的质量比为1:0.75:0.1:0.2。嗜盐石油烃降解菌体中假单胞菌属为B-1,脂肪杆菌属、海球菌属、微杆菌属及动

性球菌属分别为N1、N2、N3以及N4,且B-1、N1、N2、N3以及N4的质量比为3:1:2:1:1,制备过程包括以下步骤:

[0095] (1)将培养后的嗜盐石油烃降解菌体菌液3000rpm下离心4min,去除上层清液,收集底部浓缩菌液,用无菌水将其调节至OD<sub>600</sub>为1,即得嗜盐石油烃降解菌体浓缩液;

[0096] (2)将一定量的海藻酸钠和纳米二氧化硅加入上述嗜盐石油烃降解菌体浓缩液中,混合均匀,用注射器吸取混合液,该混合液中海藻酸钠的浓度为5%,逐滴滴入到3.5% CaCl<sub>2</sub>溶液中,得固定化微球,交联12h后,用无菌水洗净得所需的固定化微生物菌剂,该固定化微生物菌剂中嗜盐石油烃降解菌体的含量为 $3 \times 10^9$  cell/g。

[0097] 实施例3:用于船舶修造污水处理的固定化微生物菌剂的制备

[0098] 本实施例中,海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>及纳米二氧化硅以及低聚木糖的质量比为1:0.8:0.2:0.3。嗜盐石油烃降解菌体中假单胞菌属为B-1,脂肪杆菌属、海球菌属、微杆菌属及动性球菌属分别为N1、N2、N3以及N4,且B-1、N1、N2、N3以及N4的质量比为4:3:3:2:2。制备过程包括以下步骤:

[0099] (1)将培养后的嗜盐石油烃降解菌体菌液3000rpm下离心5min,去除上层清液,收集底部浓缩菌液,用无菌水将其调节至OD<sub>600</sub>为1,即得嗜盐石油烃降解菌体浓缩液;

[0100] (2)将一定量的海藻酸钠和纳米二氧化硅加入上述嗜盐石油烃降解菌体浓缩液中,混合均匀,用注射器吸取混合液,该混合液中海藻酸钠的浓度为6%,逐滴滴入到4.0% CaCl<sub>2</sub>溶液中,得固定化微球,交联14h后,用无菌水洗净得所需的固定化微生物菌剂,该固定化微生物菌剂中嗜盐石油烃降解菌体的含量为 $4 \times 10^9$  cell/g。

[0101] 实施例4:用于船舶修造污水处理的固定化微生物菌剂的制备

[0102] 本实施例中,海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>及纳米二氧化硅以及低聚木糖的质量比为1:0.8:0.1:0.2。嗜盐石油烃降解菌体中假单胞菌属为B-1,脂肪杆菌属、海球菌属、微杆菌属及动性球菌属分别为N1、N2、N3以及N4,且B-1、N1、N2、N3以及N4的质量比为5:2:2:1:2。制备过程包括以下步骤:

[0103] (1)将培养后的嗜盐石油烃降解菌体菌液3000rpm下离心4min,去除上层清液,收集底部浓缩菌液,用无菌水将其调节至OD<sub>600</sub>为1,即得嗜盐石油烃降解菌体浓缩液;

[0104] (2)将一定量的海藻酸钠和纳米二氧化硅加入上述嗜盐石油烃降解菌体浓缩液中,混合均匀,用注射器吸取混合液,该混合液中海藻酸钠的浓度为6%,逐滴滴入到3.5% CaCl<sub>2</sub>溶液中,得固定化微球,交联12h后,用无菌水洗净得所需的固定化微生物菌剂,该固定化微生物菌剂中嗜盐石油烃降解菌体的含量为 $3 \times 10^9$  cell/g。

[0105] 实施例5:用于船舶修造污水处理的固定化微生物菌剂的制备

[0106] 本实施例中,海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>及纳米二氧化硅以及低聚木糖的质量比为1:0.75:0.1:0.2。嗜盐石油烃降解菌体中假单胞菌属为铜绿假单胞菌*Aeruginosa*,脂肪杆菌属、海球菌属、微杆菌属及动性球菌属的细菌分别为简单脂肪杆菌*Pimerobacter simplex*、嗜盐海球菌*Marinococcus halophilus*、嗜氨微杆菌ATCC15354*Microbacterium ammoniophilum* ATCC15354以及柠檬色动性球菌*Planococcus citreus*,均购于上海富众(亚平宁)生物科技发展有限公司,且质量比为5:1:2:2:2。制备过程包括以下步骤:

[0107] (1)将培养后的嗜盐石油烃降解菌体菌液3000rpm下离心4min,去除上层清液,收集底部浓缩菌液,用无菌水将其调节至OD<sub>600</sub>为1,即得嗜盐石油烃降解菌体浓缩液;

[0108] (2)将一定量的海藻酸钠和纳米二氧化硅加入上述嗜盐石油烃降解菌体浓缩液中,混合均匀,用注射器吸取混合液,该混合液中海藻酸钠的浓度为5%,逐滴滴入到3.5% CaCl<sub>2</sub>溶液中,得固定化微球,交联12h后,用无菌水洗净得所需的固定化微生物菌剂,该固定化微生物菌剂中嗜盐石油烃降解菌体的含量为4×10<sup>9</sup>cell/g。

[0109] 实施例6:用于船舶修造污水处理的固定化微生物菌剂的制备

[0110] 本实施例中,海藻酸钠、CaCl<sub>2</sub>及纳米二氧化硅以及低聚木糖的质量比为1:0.8:0.1:0.2。嗜盐石油烃降解菌体中假单胞菌属为红苍白假单胞菌*Rubrisubalbicans*,脂肪杆菌属、海球菌属、微杆菌属及动性球菌属的细菌分别为简单脂肪杆菌*Pimerobacter simplex*、嗜盐海球菌*Marinococcus halophilus*、娥微杆菌*Microbacterium imperiale*以及柠檬色动性球菌*Planococcus citreus*,均购于上海富众(亚平宁)生物科技发展有限公司,且质量比为3:3:3:2:2。制备过程包括以下步骤:

[0111] (1)将培养后的嗜盐石油烃降解菌体菌液3000rpm下离心4min,去除上层清液,收集底部浓缩菌液,用无菌水将其调节至OD<sub>600</sub>为1,即得嗜盐石油烃降解菌体浓缩液;

[0112] (2)将一定量的海藻酸钠和纳米二氧化硅加入上述嗜盐石油烃降解菌体浓缩液中,混合均匀,用注射器吸取混合液,该混合液中海藻酸钠的浓度为6%,逐滴滴入到3.5% CaCl<sub>2</sub>溶液中,得固定化微球,交联12h后,用无菌水洗净得所需的固定化微生物菌剂,该固定化微生物菌剂中嗜盐石油烃降解菌体的含量为3×10<sup>9</sup>cell/g。

[0113] 实施例7:固定化微生物菌体对含油污水的降解试验

[0114] 将固定化菌剂微球按照体积比为2%接种于配制好的已灭菌的100mL含油污水中,放在恒温振荡摇床中25℃降解,摇床转速为150r/min。

[0115] (1)原油降解效率的测定

[0116] 样品中原油含量的测定按照国家标准方法分光光度法SY/T 0530-2011进行,测定波长选择420nm,并按下式计算原油的降解效率( $\eta$ ):

$$[0117] \quad \eta = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

[0118] 式中:

[0119] C<sub>0</sub>—空白含油污水中原油的浓度(mg/L);

[0120] C<sub>1</sub>—降解后含油污水中原油的浓度(mg/L)。

[0121] (2)菌剂生物量的测定

[0122] 样品测定时,将含油污水中的微球取出清洗后,先称出微球的质量,然后对其破碎加入25mL无菌水振荡后,取1mL上清液用血球计数板镜检测定生物量,表示为cell/g(微球)。

[0123] 在原油浓度为3g/L时对含油污水连续降解15d,测定了原油去除率与菌剂生物量的变化。如图12所示,经过15d的降解,固定化菌剂对原油的降解率可达91.8%。虽然随着降解时间延长,固定化菌剂对原油的降解效率逐渐增加,当降解时间达到7d后,降解速率趋于平缓,对3g/L的原油的降解率可达77.3%。而生物量则呈现先减少后增加的再减少的趋势。这是由于微生物在固定化初期因对环境的不适宜导致生物量的减少,随着时间延长,逐渐适应后生物量开始回升,在7d左右达到最大,为2.4×10<sup>9</sup>cell/g,但在降解后期由于营养物质的减少,生物量又开始下降。

[0124] (3)原油浓度对降解效果的影响

[0125] 将含油污水中原油的浓度按照0.5g/L、1g/L、3g/L、5g/L、7g/L、10g/L、15g/L分别添加,降解一段时间后,考察原油浓度对固定化菌剂的生物量及降解原油效能的影响。

[0126] 为考察固定化菌剂对原油的耐受性,将含油污水中原油由0.5g/L增加到15g/L,25℃降解7d后,测定原油的降解率及菌剂生物量,结果见图13。由图13可以看出,在原油浓度为1-7g/L时,固定化菌剂对原油具有较高的降解率,均在80%以上,原油浓度过高,原油对微生物的毒害作用增强,降解效率显著下降,对应的生物量也明显下降,而当原油浓度过低时,由于碳源受限,生物量也受到限制,当原油浓度为5-7g/L时,生物量达到最大。

[0127] (4)pH对降解效果的影响

[0128] 为考察在固定化菌剂对含油污水的pH的适应性。用1mol/L的HCl或NaOH调节含油污水的pH,使含油污水的pH为5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9,考察pH的变化对固定化菌剂的生物量及降解原油效能的影响。

[0129] 在pH5-9范围内考察了pH对固定化菌剂降解性能的影响,结果见图14。由图14可以看出在pH5-9的弱酸弱碱范围内,由于固定化载体对pH环境具有较强的缓冲作用,pH对原油降解效率的影响不大,特别是pH6-8时,固定化菌剂对原油的降解率维持在80%以上。

[0130] (5)温度对降解效果的影响

[0131] 在温度为5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃的条件下,考察温度的变化对固定化菌剂的生物量及降解原油效能的影响。

[0132] 为考察在固定化菌剂对含油污水的温度的适应性,改变含油污水温度(5-45℃),降解7d后测定了生物量与原油的降解率,实验结果见图15。如图15所示,随着温度的升高,固定化菌剂对原油的降解效率与生物量呈现先升高后降低的趋势,在温度为25-35℃时,固定化菌剂具有较高的降解效率与生物量。

[0133] (6)盐度对降解效果的影响

[0134] 为考察在固定化菌剂对含油污水的盐度的适应性。以添加NaCl的量作为盐度的改变量,在NaCl添加量为0.0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3%、3.5%的条件下,考察盐度的变化对固定化菌剂的生物量及降解原油效能的影响。

[0135] 由图16可以看出,高盐度对于固定化菌剂降解石油烃的影响较大,当NaCl浓度>1.5%时,固定化菌剂对原油的降解效率与生物量均显著下降。盐度显著增加会对微生物细胞产生毒害,使其脱水,直至死亡,NaCl浓度<1.5%时,固定化菌剂对原油具有较高的利用效率。

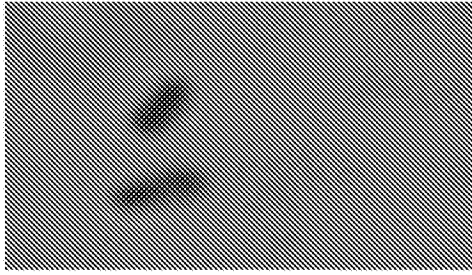


图1

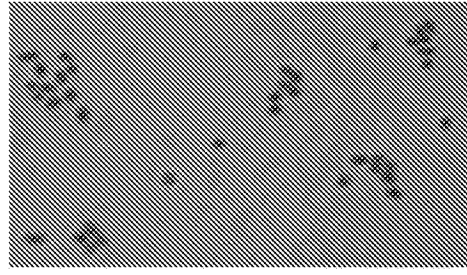


图2

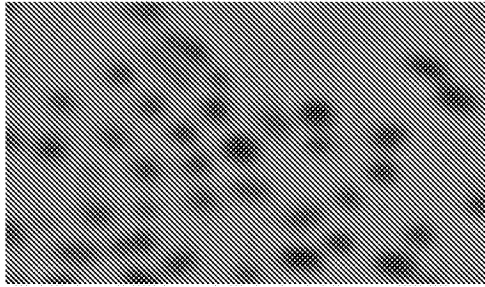


图3

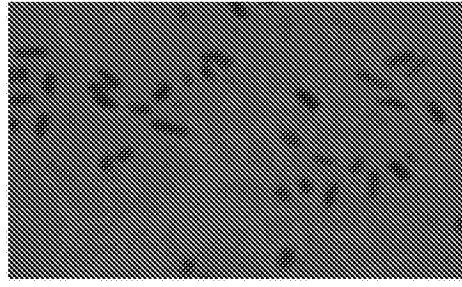


图4

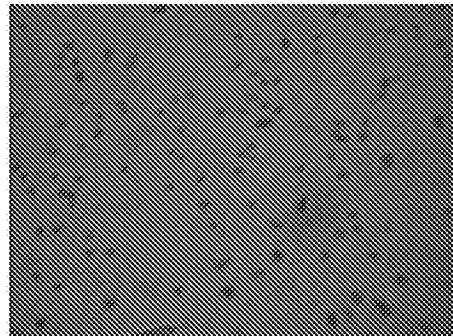


图5

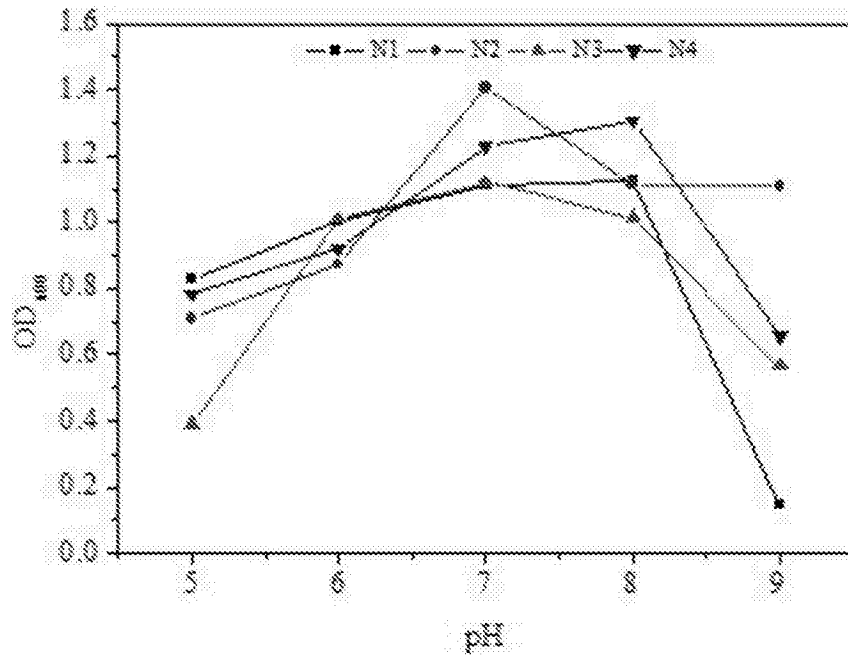


图6

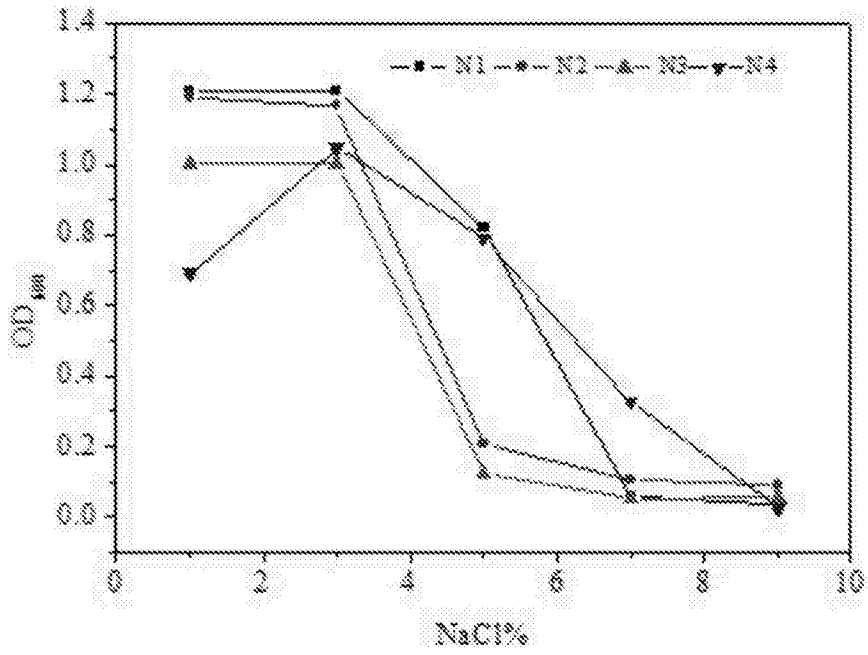


图7

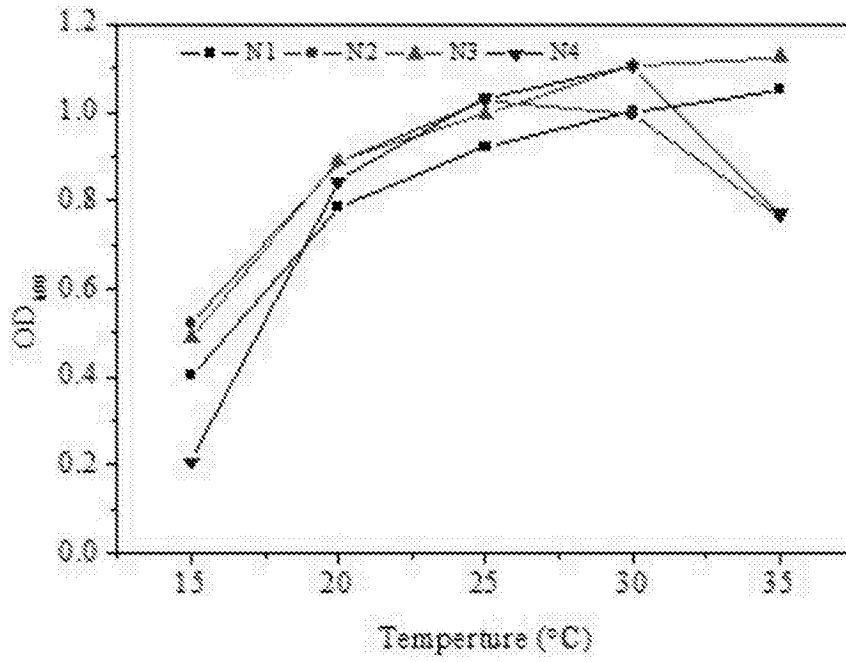


图8

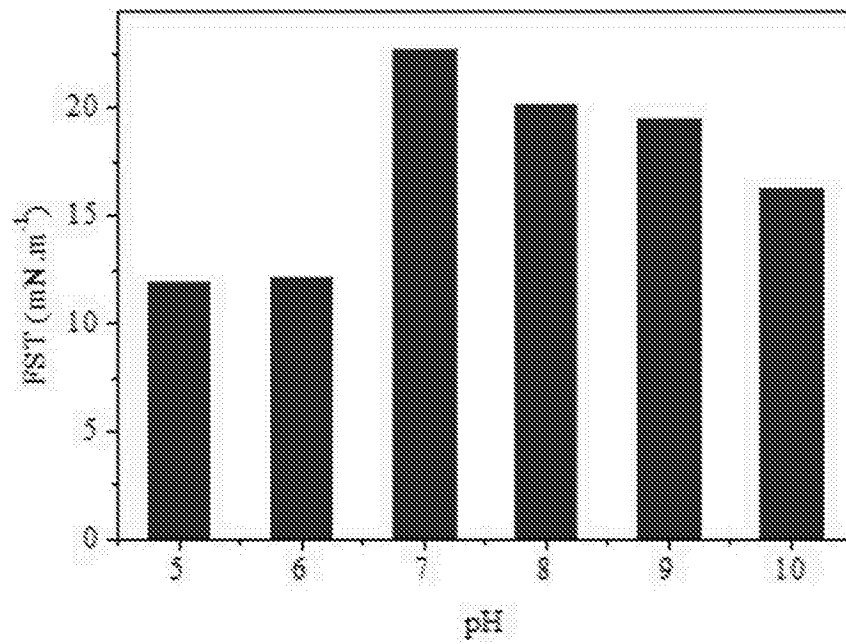


图9

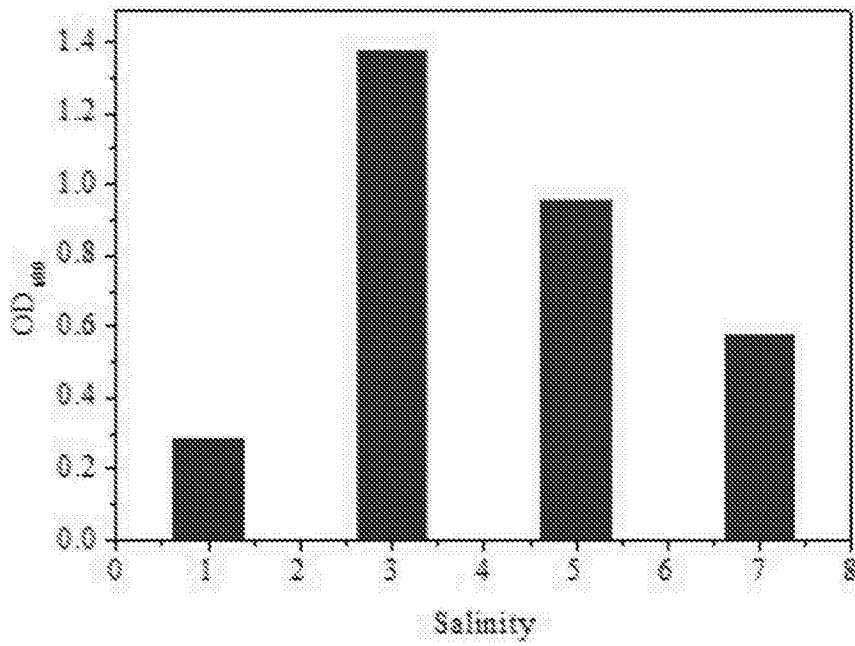


图10

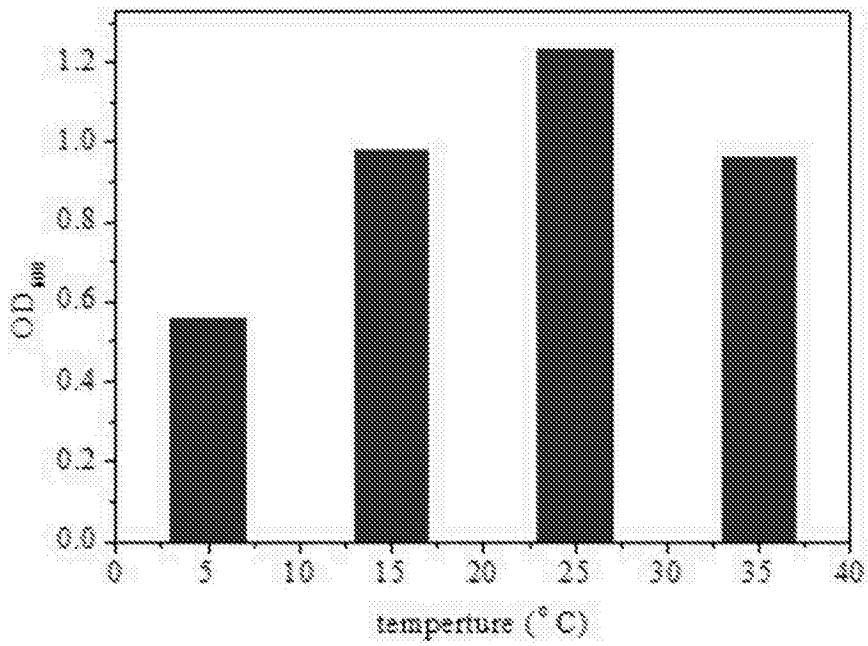


图11



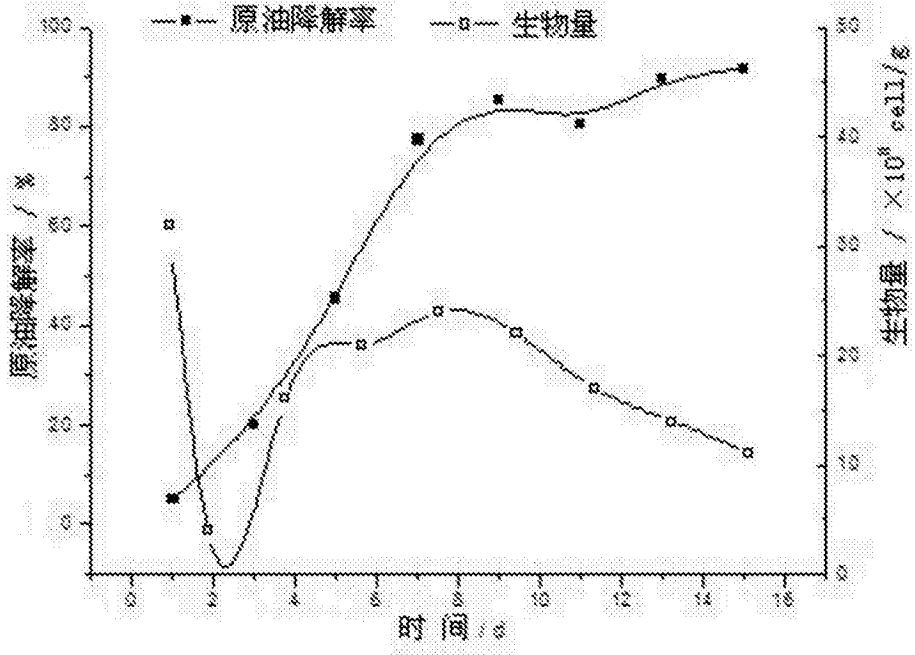


图12

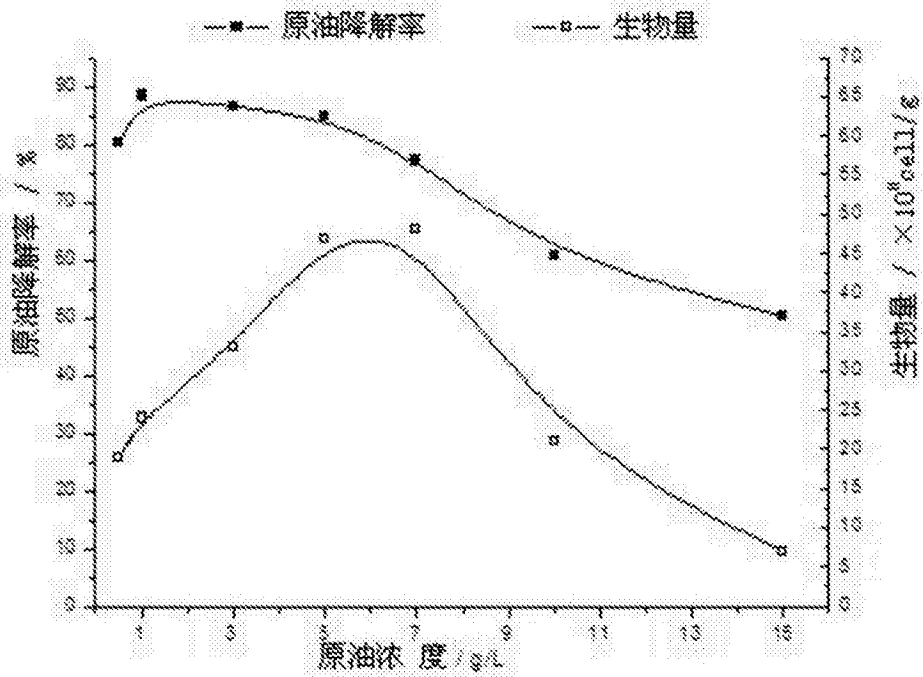


图13

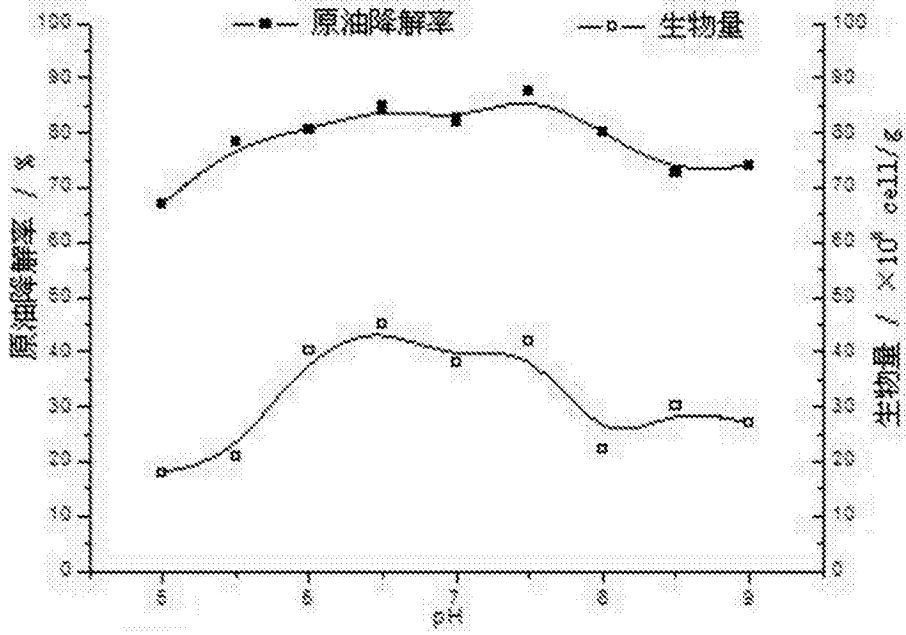


图14

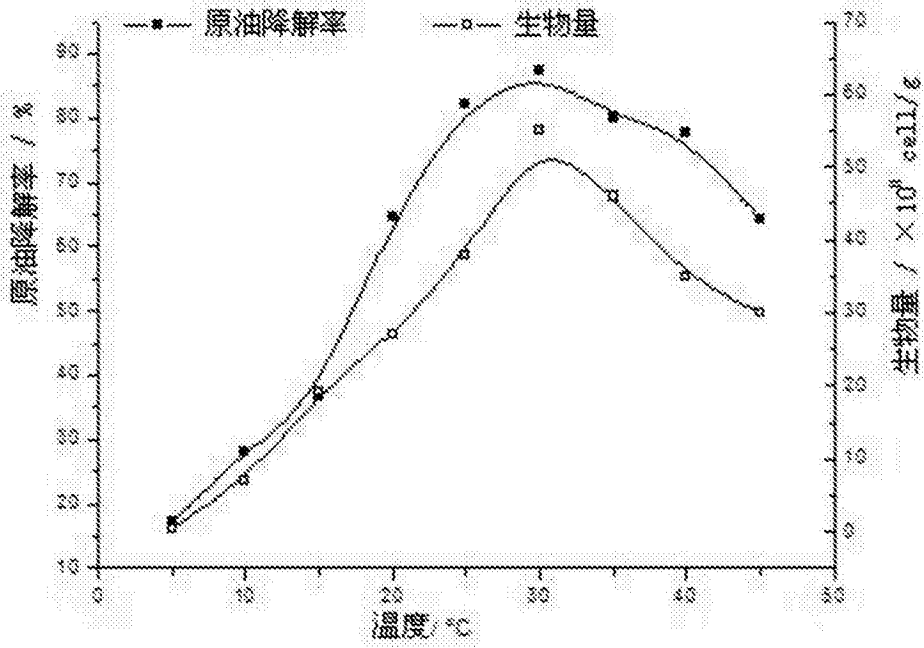


图15

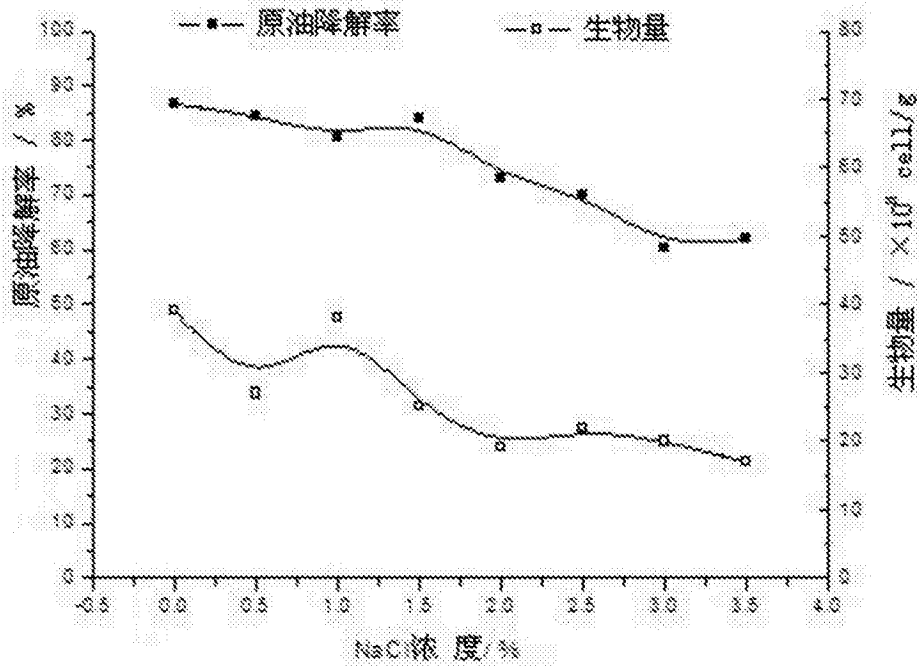


图16