

三聚甲醛强降解菌的筛选鉴定及其对聚甲醛废水的生物强化

叶姜瑜¹, 李大荣², 陆榆丰¹, 李媛¹, 窦建军¹

(1. 重庆大学 城市建设与环境工程学院, 重庆 400045; 2. 重庆融极环保有限公司, 重庆 400000)

摘要: 从某煤化工企业聚甲醛污水厂调节池底泥中分离出一株对三聚甲醛(s-Trioxane, TOX)有代谢作用的细菌, 经 16S rDNA 基因序列分析为甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*)。该菌最适生长和降解条件为培养基起始 pH 为 7, 最佳温度为 30 ℃, 耐受 NaCl 和 TOX 质量浓度分别为 3 g/L 和 1 200 mg/L。将该菌与麦芽糖假丝酵母 (*Candida maltosa*) 和恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 等甲醛降解菌共同组成复合菌剂, 对聚甲醛污水进行协同处理, 最终出水的效果优劣顺序为: D 组 (TOX 降解菌+甲醛降解菌) > C 组 (甲醛降解菌) > B 组 (TOX 降解菌) > A 组 (对照组)。其中 D 组出水 COD、甲醛和 TOX 的降解率分别为 92.80%、96.52% 和 95.88%, 均远优于其他组合。证明降解菌组合对甲醛和 TOX 降解的有效性, 可作为聚甲醛污水处理的复合菌剂。

关键词: 聚甲醛废水; 三聚甲醛; 甲基营养型芽孢杆菌; 生物强化

中图分类号: X 52 文章编号: 1673-1689(2019)04-0078-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.012

Screening and Identification of Trioxane (TOX) Degradation Bacteria and Bioaugment on Polyoxymethylene (POM) Wastewater

YE Jiangyu¹, LI Darong², LU Yufeng¹, LI Yuan¹, DOU Jiangjun¹

(1. Faculty of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China; 2. Chongqing Rongji Environmental Technology Co., Ltd, Chongqing 400000, China)

Abstract: A strain of s-Trioxane degrading bacterium was isolated from the sediment of Polyoxymethylene wastewater treatment plant, and identified to be *Bacillus methylotrophicus* by 16S rDNA sequence analysis. The optimum culture conditions of the strain were at about pH 7 and 30 ℃, and the thresholds of maximal tolerable concentrations for NaCl and TOX were 3% and 1 200 mg/L, respectively. In order to detect its degradation characteristics, the strain was mixed together with formaldehyde degrading bacteria, *Candida maltosa* and *Pseudomonas putida*, to form multiple strains to treat POM wastewater at the laboratory scale. The treatment results according the order of final effluent quality were: single strain + formaldehyde degradation group > formaldehyde

收稿日期: 2016-07-17

基金项目: 国家科技重大专项 (2013ZX07104-004-01)。

作者简介: 叶姜瑜 (1963—), 博士, 副教授, 博士研究生导师, 从事环境工程微生物学研究。E-mail: yejy8888@163.com

引用本文: 叶姜瑜, 李大荣, 陆榆丰, 等. 三聚甲醛强降解菌的筛选鉴定及其对聚甲醛废水的生物强化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38 (04): 78-83.

degradation group > single strain group > control group. In single strain + formaldehyde degradation group, the degradation rates of COD, formaldehyde and TOX were 92.80%, 96.52 and 95.88%, respectively, which had much better consequences than other groups. There is a synergistic effect of the degrading bacteria combination, which could be used as multiple strains for bioaugmentation treatment of POM sewage.

Keywords: POM wastewater, Trioxane (TOX), *Bacillus methylotrophicus*, bioaugmentation

聚甲醛 (Polyoxymethylene) 是世界五大通用塑料之一, 由于硬度大、刚度好、耐疲劳度高且自带润滑性, 有“超钢、夺钢”之称^[1], 被广泛应用于日用轻工、汽车、建材、农业、医疗器械等领域^[2-4]。中国煤化工企业近年来发展迅速, 很多煤化工企业建立了聚甲醛生产项目。不过, 聚甲醛生产中产生的废水含有甲醛、三聚甲醛 (s-Trioxane, TOX)、二氧五环、甲缩醛和酚类等有害物质, 具有盐分高、化学需要量 (COD) 高等特征, 很难生物处理至达标排放, 对环境和人体有极大的危害, 成为亟待解决的问题。目前针对聚甲醛废水常见的处理方法有石灰法, 高级氧化法如 Fenton 氧化法、湿式氧化法、臭氧催化氧化法, 复合工艺法等^[5]。但这些方法将产生大量化学污泥、条件要求苛刻、运行成本较高、工艺管理困难, 因此应用受限。普通生物法虽然能克服以上缺点, 但由于甲醛、TOX 等有毒物质的抑制作用, 许多微生物活性丧失, 无法实现有效生物降解。

目前针对聚甲醛废水中甲醛成分降解研究较多, 且已分离出对甲醛具有代谢作用菌株, 如产青霉素菌 *Penicillium chrysogenum*^[6]、蒙氏假单胞菌 *Pseudomonas monteilii*^[7]、红串球菌 *Rhodococcus erythropolis*^[8]、恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*^[9] 等。不过, 对聚甲醛废水主要污染物之一 TOX 的生物降解研究仍较少, 到目前为止仍少见 TOX 降解菌株的报道。我们驯化分离了一株以 TOX 为碳源的细菌, 将其与甲醛降解菌群复合后进行了聚甲醛废水的生物强化研究, 结果表明其对聚甲醛类污水有良好的处理效果, 可作为复合菌剂的组成成分。

1 材料与方法

1.1 菌源和水样

菌株分离于某化工厂聚甲醛污水厂调节池底泥; 活性污泥取自曝气池; 聚甲醛废水取自于调节池。污水水质为: COD 3 413 mg/L, HCOONa 3 000~

3 500 mg/L, 甲醛 135~250 mg/L, TOX 130~240 mg/L, DOX 37 mg/L, CH₃OH 110 mg/L。

1.2 培养基

基本无机盐培养基 (g/L): KH₂PO₄ 0.7, K₂HPO₄ 0.85, (NH₄)₂SO₄ 1.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, CaCl₂ 0.01, FeSO₄ · 7H₂O 0.001, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min。

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 氯化钠 10, 酵母浸出粉 5, 于 pH 7.0, 1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min。用于菌株富集扩培。

TOX 降解菌培养基: 基本无机盐培养基高压灭菌后加入一定量 0.2 μm 滤膜灭菌的 TOX 溶液。

1.3 菌株来源

TOX 降解菌的分离纯化: 取 10 mL 底泥与污水混合物, 加至 LB 培养基, 于恒温摇床 30 °C 培养 24 h; 取 5 mL 所得扩培菌液, 加至 100 mL 含 TOX 浓度为 100 mg/L 的 LB 培养基中, 恒温摇床 30 °C 培养 48 h, 取菌液 5 mL, 如此反复接种所得菌液 4~5 次, 每次接种 LB 培养基按梯度降低 100 mg/L 酵母粉, 同时增加 100 mg/L TOX, 最后一次 TOX 浓度达 500 mg/L; 选择最终菌液样品于含 400 mg/L TOX 的 LB 固体培养基上稀释涂布, 并挑取所得菌落划平板, 培养 48 h; 反复划平板得到纯菌株, -20 °C 下甘油保种备用。

甲醛降解菌: 重庆大学城市建设与环境工程学院微生物分子生态学实验室保存菌株麦芽糖假丝酵母 (*Candida maltosa*) 和恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)^[10]。

1.4 菌株鉴定

形态学观察: 观察菌株在 LB 固体培养基上形成的单菌落形态特征, 包括菌落颜色、边缘平整度和表面湿润性等。用解剖针挑取少许培养皿上的菌落, 混合于载玻片的无菌水滴中, 光学显微镜下观察其个体形态特征。

革兰染色: 对细菌进行革兰染色: 包括初染、媒

染、脱色、复染等4个步骤,于光学显微镜下进行鉴别。

分子生物学鉴定:对单菌株进行基因组提取(参照细菌DNA提取试剂盒步骤);对所得基因组采用细菌16S rDNA通用引物27F(5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-CGGYTAC-CTTGTACGACTT-3')[11]进行扩增,将所得产物送与南京金斯瑞生物科技有限公司测序;利用NCBI软件中的BLAST对实验菌株的16S rDNA序列与GenBank数据库中的已知序列进行同源性比较[12]。

1.5 环境因子对微生物生长影响的测定

菌株生长曲线测定:将活化后的分离菌株按体积分数1%接种于TOX质量浓度为100 mg/L的LB液体培养基;定时取样测定菌液OD₆₀₀值。

pH值对菌株生长的影响:恒温培养30℃,分别配制pH值梯度为4、5、6、7、8和9,TOX质量浓度为100 mg/L的LB培养基,按1%接种菌液,定时取样测定OD₆₀₀值。以时间为横坐标,OD₆₀₀为纵坐标,绘制菌株生长曲线。

温度对菌株降解TOX的影响:设置20、25、30、35℃和40℃5个温度梯度,于TOX浓度为400 mg/L的基本无机盐培养基中加入体积分数为5%离心后的纯菌体,24 h后取样测定TOX降解率。

NaCl浓度对菌株生长的影响:以TOX质量浓度为100 mg/L的LB培养基为基质,分别配制NaCl质量浓度为1、1.5、2、3 g/L和4 g/L的培养基,按体积分数1%接种菌株,定时取样测定OD₆₀₀值,以时间为横坐标,OD₆₀₀为纵坐标,绘制菌株生长曲线。

菌株对不同质量浓度TOX的降解实验:以前期实验最优条件为基础,配制TOX质量浓度分别为100、200、400、600、800、1 100 mg/L和1 500 mg/L不同梯度基本无机盐培养基,菌液按体积分数2%离心(10 000 r/min)并接种,以时间为横坐标,TOX降解率为纵坐标绘制曲线。

以上均使用250 mL三角锥形瓶,摇床转速为180 r/min。

1.6 指标测定

COD测定:HACH消解法[13];甲醛测定:乙酰丙酮分光光度法;TOX测定:参照侯丽等[14]的顶空色谱毛细柱法方法。

1.7 聚甲醛废水生物强化实验

建立A、B、C和D共4组平行小试反应器。各

反应器有效容积为3.5 L,启动前均加入等量经该污水驯化后的活性污泥。A组:未加其他菌剂;B组:加入TOX降解菌;C组:加入甲醛降解菌;D组:同时加入TOX降解菌与甲醛降解菌。统一进水,曝气,定时取样测定各出水COD_{Cr}、甲醛和TOX。其中TOX降解菌和甲醛降解菌分别由TOX质量浓度为100 mg/L的LB培养基和甲醛质量浓度为100 mg/L的LB培养基摇床培养16 h后所得;各系统菌液按体积分数2%离心(10 000 r/min)后投加;D组单菌与甲醛降解菌投加比例为1:1。

2 结果与讨论

2.1 TOX强降解菌的分离鉴定及生长曲线

通过底泥富集驯化、分离,获得几株TOX降解菌株。其中一株Q1优势菌生长良好,其菌落形态米白色,表面干燥,边缘光滑齐整,中间凹陷,菌落较厚(图1);显微镜形态呈杆状;革兰染色阳性(G⁺)。对该菌株进行16S rDNA基因测序,其结果与GenBank数据库比对,该菌被确定为与最高同源性98%的甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)相同。对其进行生长曲线测定,结果表明,接种4 h内,OD₆₀₀值上升较为平缓,为该菌适应期;随后进入对数期,菌株呈现快速增长;16 h进入稳定期初期,此时活性较好,被确定为接种期。

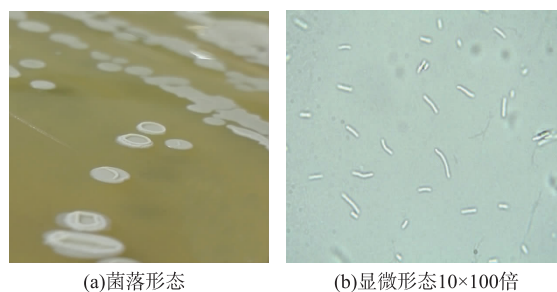
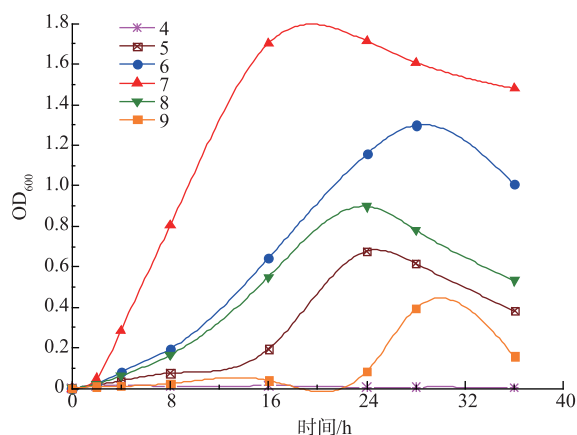
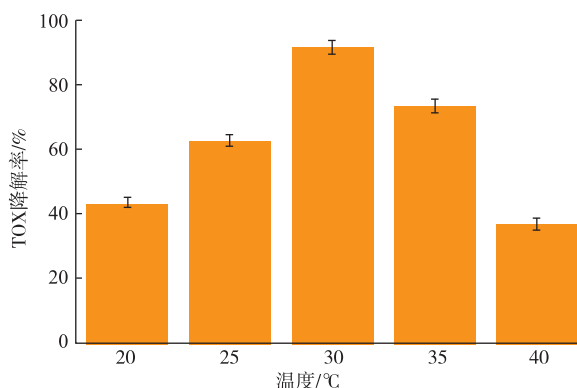
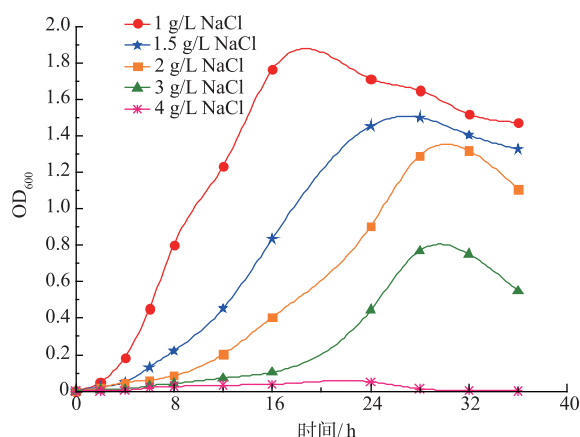


图1 菌株 *B. methylotrophicus* 的形态学特征

Fig. 1 Morphological identification of *B. methylotrophicus*

2.2 环境因子对 *B. methylotrophicus* 生长的影响

聚甲醛污水中污染物质(如TOX、二氧五环等)组分及含量都有很大的不确定性,COD变化大,且正常生产情况下水质偏酸性、工段投加大量NaOH等原因,使得聚甲醛废水含盐质量分数为1.5~2.5 g/L,属于高盐类工艺废水。环境因子pH值、温度和离子浓度等对菌株 *B. methylotrophicus* 生长的影响见图2~4。

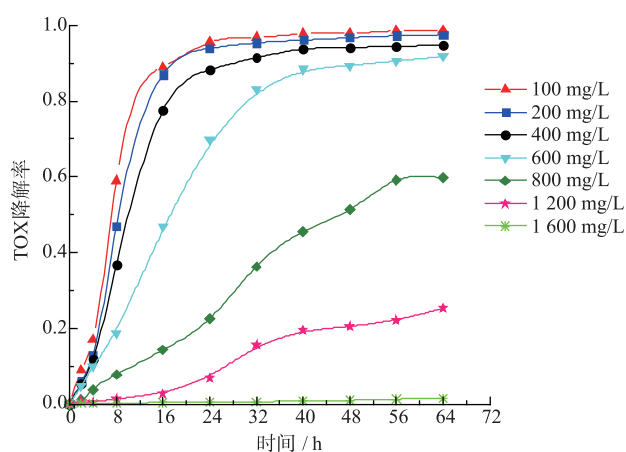
图2 pH值对菌株 *B. methylotrophicus* 生长的影响Fig. 2 Effects of pH on activities of *B. methylotrophicus*图3 温度对 *B. methylotrophicus* 降解 TOX 的影响Fig. 3 Effects of temperature on degradation of *B. methylotrophicus* to TOX图4 NaCl 质量浓度对菌株 *B. methylotrophicus* 生长的影响Fig. 4 Effects of NaCl concentration on activities of *B. methylotrophicus*

由图2可知,菌株对pH变化较敏感,酸碱对该菌的影响都较大。培养基pH值为7时,菌株进入稳

定期时间提前至16 h,此时 OD_{600} 峰值相对最高,确定其最佳生长pH为7。而当温度为30℃时,该菌有最高的TOX降解率91.63%(图3),表明该菌株属于中温微生物类型。由图4可看出,盐离子浓度对该菌的影响较大,随着NaCl质量浓度的提高,菌株适应期逐渐加长、稳定期种群数量下降。当NaCl质量浓度为1、1.5 g/L和2 g/L时,生长曲线表明该菌有较好的适应性;NaCl质量浓度超过3 g/L以后,菌株生长受到较明显抑制,稳定期时种群数量明显下降。生产性聚甲醛废水的盐浓度应在该菌耐受范围内。

2.3 菌株 *B. methylotrophicus* 对不同浓度 TOX 的降解

B. methylotrophicus 对TOX的降解效率见图5。当TOX质量浓度为100~400 mg/L时,菌株能迅速适应底物,并以TOX作为碳源实现快速降解,在24 h内TOX降解率可达90%左右;随着底物浓度的逐步提高,菌株适应期随之变长,但600 mg/L以下都有较好的降解率;当TOX质量浓度提升至1 200 mg/L时,在40 h内TOX降解率仅为21.84%,表明TOX对该菌已表现出明显的抑制性,对菌株表现出极大毒性,初步判定菌株 *B. methylotrophicus* 对TOX降解的耐受浓度为1 200 mg/L。

图5 不同TOX质量浓度下菌株 *B. methylotrophicus* 的降解率Fig. 5 Degradation of *B. methylotrophicus* to different TOX concentration

2.4 聚甲醛废水的生物强化处理

聚甲醛废水COD的主要构成为HCOONa、甲醛、TOX和醇类等,其中甲醛与TOX为主要有毒物质。对该污水生物强化处理后反应系统最终出水水质及降解率见表1,其降解趋势见图6。

表 1 各系统出水污染物浓度及其降解率(60 h)

Table 1 Concentration of pollutants in effluents and its degrading efficiency (60 h)

编号	COD(mg/L)/ 降解率(%)	甲醛(mg/L)/ 降解率(%)	TOX(mg/L)/ 降解率(%)
A	848/75.16	145/54.12	152/30.28
B	527/84.56	88/72.16	96/55.97
C	486/85.77	19/94.89	132/30.45
D	246/92.80	11/96.52	9/95.88

注:A: 对照组;B:TOX 降解菌组;C: 甲醛降解菌组;D:TOX 降解菌+甲醛降解菌组

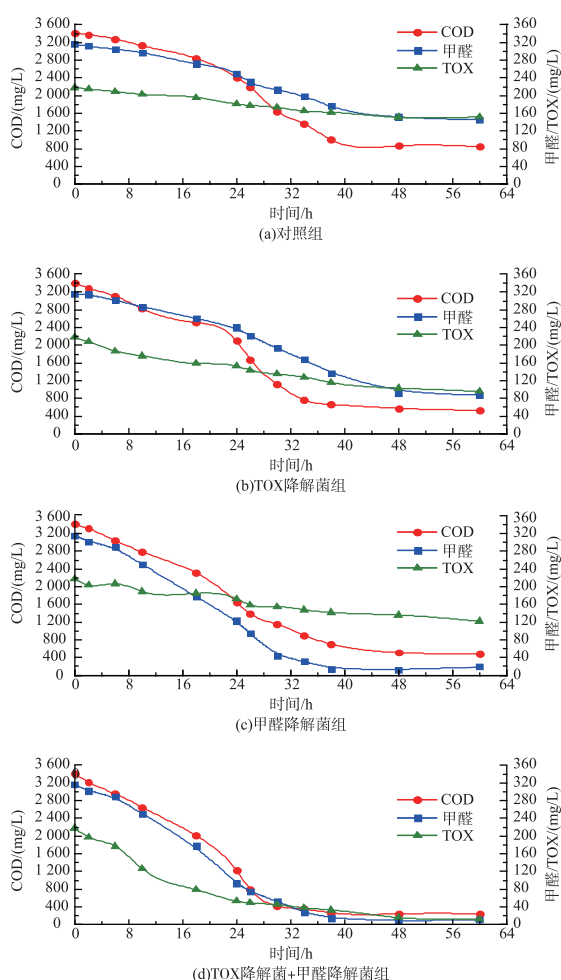


图 6 反应系统中 COD 降解时的甲醛、TOX 浓度变化

Fig. 6 Variation of formaldehyde, TOX and COD in Systems

由图 6 可知,系统启动后,各组 COD 均呈下降趋势,其中 A 组较为平缓,B、C 组次之,D 组最快;A 组最终出水的 COD 降解率仅为 75.16%,而 D 组最终降解率达 92.80%(表 3)。此外,各系统 COD 均随

甲醛、TOX 的降低而降低,对照组 A 的甲醛和 TOX 降速都极为缓慢,而 B 组的甲醛、TOX 降解速率与降解率均有一定提高,其降解率分别为 72.16%和 55.97%,但 TOX 相对 A 组降解率仅提高了 25.69%。C 组的甲醛降解率高达 94.89%,但对 TOX 降解率仍极低为 30.45%,相对 A 组变化也不大。而 D 组由于同时加入了甲醛降解菌与 TOX 降解菌 *B. methylotrophicus*,其甲醛和 TOX 的降解率都有明显提高,达 96.52%和 95.88%,同时 COD 降解率也提高至 92.80%,其各项指标均远优于 A、B、C 组。

本研究显示,当仅加入 *B. methylotrophicus* 时,由于受到其他如甲醛等物质的抑制作用,并不能发挥其最佳活性将 TOX 完全降解(如图 6 B);仅加入降甲醛混合菌时,虽甲醛去除率高,但缺少 TOX 的降解菌,TOX 的质量浓度较高,仍然抑制了活性污泥中的其他微生物群落,致使其 COD 降解相对 B 组变化不大(如图 6(c));当同时加入 TOX 降解菌与甲醛降解菌时,菌株之间展示出良好的协同作用,实现了甲醛、TOX 的同步快速降解,消除了抑制微生物的毒性物质,从而其他 COD 降解菌种群逐渐增强,COD 随之大大降低。总体看来,各处理组出水水质优劣为:D 组 (TOX 降解菌+甲醛降解菌)>C 组 (甲醛降解菌)>B 组 (TOX 降解菌)>A 组 (对照组)。因此,无论是 *B. methylotrophicus*,还是甲醛降解菌单独的生物强化,均只能实现单一有毒物质的部分降解,只有多菌株生物强化后协同降解聚甲醛废水的有毒底物,才能真正有效地实现聚甲醛废水的生物处理。

3 结 语

本研究以 TOX 作为单一碳源分离了一株编号为 Q1 的 TOX 降解菌,经形态与分子生物学鉴定为甲基营养型芽孢杆菌 (*B. methylotrophicus*),其在 100 mg/L TOX 的 LB 培养基中培养 16 h 进入稳定期,最佳生长 pH 和温度分别为 7 ℃和 30 ℃,NaCl 耐受度低于 3%,TOX 耐受度低于 1 200 mg/L。在对聚甲醛废水的生物强化处理中,该菌和甲醛降解菌同时加入的处理效果要优于其他组合,表明该生物强化剂消除了抑制微生物群落的主要毒性物质,促进了聚甲醛降解微生物种群的增殖和对有毒废水 COD 的有效降解,对聚甲醛废水的处理工程具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] NIU Lei, FAN Juanjuan, HUANG Maohui. Production process and domestic development status of POM[J]. **Chemical Engineer**, 2012, 26(2): 47-49. (in Chinese)
- [2] HAN Jinliang, ZHANG Xindang, XU Zexi, et al. Discussion on some suggestions of POM industry[J]. **Guangzhou Chemical Industry**, 2013, 41(20): 27-29. (in Chinese)
- [3] KU Xiaona, XIAO Dongmin. Discussion on the development and application of engineering plastics[J]. **Silicon Valley**, 2013(1): 2-3. (in Chinese)
- [4] LIANG J Z, WANG F. Tensile properties of polyformaldehyde blends and nanocomposites[J]. **Journal of Polymer Engineering**, 2015, 35(5): 417-422.
- [5] XU Xiaoyu, ZHANG Jun, WEI Jinliang. Study on treatment technology of wastewater from Coal-to-Polyformaldehyde[J]. **Water & Wastewater Engineering**, 2013, 39(S1): 324-326. (in Chinese)
- [6] LUO J J, DING J F, LI G W, et al. Characterization of a formaldehyde degrading fungus *Penicillium chrysogenum* DY-F2 isolated from deep sea sediment[C]. 福建省海洋学会 2014 年学术年会暨福建省科协第十四届学术年会分会场论文集, 2014.
- [7] YANG L, CHEN X, BLOM J, et al. Draft genome of formaldehyde-degrading strain, *Pseudomonas monteilii* IOFA19[J]. **Marine Genomics**, 2014, 15(1): 1-2.
- [8] HABIBI A, VAHABZADEH F. Degradation of formaldehyde at high concentrations by phenol-adapted *Ralstonia eutropha* closely related to pink-pigmented facultative methylotrophs. J Environ Sci Health A[J]. **Journal of Environmental Science & Health Part A Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering**, 2013, 48(3): 279-292.
- [9] ADROER N, CASAS C, DE MAS C, et al. Mechanism of formaldehyde biodegradation by *Pseudomonas putida*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1990, 33(2): 217-220.
- [10] 李媛. 甲醛降解菌的筛选及其生物强化研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2015.
- [11] STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics[M]. Chichester: Wiley, 1991: 329.
- [12] JIANG Hairong, NI Yongqing, SONG Lijun, et al. Identification and phylogenesis analysis of cultivable microorganism[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(3): 426-431. (in Chinese)
- [13] JI Fangying, YANG Qin, LUO Guyuan. Laboratory prepared substitutes for HACH-COD meter[J]. **Water & Wastewater Engineering**, 2003, 29(1): 17-20. (in Chinese)
- [14] HOU Li, XIN Dewang, HAI Fang. China petroleum and chemical standard and quality[J]. 2013(16): 19. (in Chinese)

会议消息

会议名称: 第八届 DNA 纳米技术国际研讨会

会议地点: 无锡湖滨饭店

会议时间: 2019 年 7 月 24 日-27 日

会议承办单位: 江南大学

会议主席: 刘冬生, 樊春海, 王树, 颜颢, 毛诚德

会议承办方代表: 胥传来

会议秘书: 匡华(kuangh@jiangnan.edu.cn), 徐丽广(xuliguang2006@126.com)

会议介绍: 近年来, DNA 纳米技术获得了飞速发展, 已经成为一个汇聚了物理、化学、材料、生物医学以及信息科学的国际前沿热点领域。DNA 纳米技术国际研讨会的目标是为本领域的研究者提供一个交流、讨论的平台, 促进研究者之间的合作, 共同推动领域的发展。自 2009 年起, DNA 纳米技术国际研讨会已经成功地在北京、上海、苏州、西安、南京、北京、重庆举办了 7 届, 吸引了世界各地从事相关研究的顶尖科学家积极参与, 为促进国内 DNA 纳米技术研究的蓬勃发展起到了重要作用。第八届 DNA 纳米技术国际研讨会江南大学承办, 将于 2019 年 7 月 24 日至 27 日在无锡举办, 工作语言为英语。会议交流形式包括大会报告、邀请报告以及墙报。欢迎本领域的研究者, 特别是青年学生积极参加。会议交通和住宿费用自理。