

# 低温高效油脂降解菌的分离筛选驯化

王继华\* 李凤敏 彭丽杰 修玉萍

(哈尔滨师范大学生命科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150025)

**摘要:** 在我国北方地区冬季水温偏低, 低温是造成寒冷地区冬季含油脂污水处理效果差的主要原因。当温度降低至 4°C 左右时, 污水的生物处理普遍存在着处理效果差, 出水难以达标的问题。而微生物法是处理油脂污染物的一种最有效、最安全和最彻底的方法。因此本文从微生物学角度对此进行了研究, 从自然界中分离、筛选到了 8 株能在 5°C 下生长并能降解生活污水中油脂的低温菌。

**关键词:** 低温, 油脂降解, 分离, 筛选, 驯化

## High-performance Low-temperature Oil-degrading Bacteria Isolated in Domesticated

WANG Ji-Hua\* LI Feng-Min PENG Li-Jie XIU Yu-Ping

(Life Science and Technology College, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang, 150025, China)

**Abstract:** When it is cold winter in the northern China, the temperature of water is very low. Low temperature is the main reason of the worse treatment of oil wastewater. In cold winter when the temperature is lowered to around 4°C, the effect of biological treatment of sewage is poor and hard to target the problem of reach a set standard of outing water. Use of microbiology to deal with oil pollution is one of the most effective, the most secure and the most thorough method. So the article from the microbiological point of view to study, isolated from nature world, screening to eight low-temperature grease which can grow under 5°C and degradation of sewage bacteria.

**Keywords:** Low-temperature, Resolve of oil, Separation, Selection, Domestication

近来动植物类油脂的消费以惊人的数字增长, 由此而产生的含油脂污水, 特别是含高浓度油脂的污水大幅度增长, 已成为城市生活污水的重要组成部分。进入城市污水处理厂的油类物质包覆在填料外层, 令氧的传质受阻, 导致好氧微生物代谢紊乱<sup>[1]</sup>。若油类物质进入水体, 则漂浮于水体的表面, 影响水体的复氧及其自然净化过程, 危害水体生态

系统<sup>[2]</sup>。因此, 油类化合物是城市污水中需预先处理的污染物。油类化合物不但对水资源造成了极大的污染和危害, 而且也给污染物的处理带来了巨大的负担。而低温则是造成寒冷地区冬季含油脂污水处理效果差的主要原因。当温度降低至 4°C 左右时, 污水中大多微生物的生长受到抑制, 只有少数的耐冷微生物可以存活下来并保持一定的活性<sup>[3]</sup>。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(No. C2007-24); 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(No. 1154G31)

\* 通讯作者: Tel: 86-451-86628070; E-mail: wangjihua333@hotmail.com

收稿日期: 2009-08-04; 接受日期: 2009-09-15

如何经济、快速、合理的处理含油脂污水, 解决油类环境污染问题, 已成为一个亟待解决的社会问题。目前对于这种污水的处理方法主要有悬浮法、磁吸附分离法、粗粒化法、化学絮凝法、化学氧化法等物理化学方法, 由于这些方法对 COD、BOD 的去除能力较低, 而且投资大、占地广, 流程复杂又需要特殊设备, 其结果大都是对污染物的稀释、聚集或在不同环境中的迁移, 还有产生二次污染的可能, 而实际应用较少。因此, 目前最主要的是找到一种简便、快速、高效的方法来处理餐饮废水中的油脂, 以解决这一刻不容缓的环境问题<sup>[4]</sup>。由于生物学方法处理污水成本低、无二次污染, 因此广泛受到国内外学者的重视, 但近几十年来, 国内外学者对于含有废水的处理主要集中于石油类的研究, 食用油脂污水相对较少<sup>[5]</sup>。

在我国北方地区冬季寒冷漫长、水温偏低, 因此污水的生物处理普遍存在着处理效果差, 出水难以达标的问题。而微生物法是处理油脂污染物的一种最有效、最安全和最彻底的方法。因此本文从微生物学角度对此进行了研究, 从自然界中分离、筛选到了 8 株能在 5°C 下生长并能降解生活污水中油脂的低温菌。低温微生物由于长期生活在寒冷的环境中, 在自然选择的作用下形成一套独特的与低温环境相适应的分子机制, 所以利用低温微生物可提高低温生活污水的处理效果<sup>[6]</sup>。在低温下具有高生长速率、高酶活力及高催化效率的微生物, 在处理生活污水方面可大大缩短处理过程的时间并节省昂贵的加热冷却系统, 可在节能方面有相当大的进步<sup>[7]</sup>。而且兼性嗜冷菌与专性嗜冷菌相比, 对温度的要求较为宽松, 除了低温外, 在常温下也可正常进行生理活动, 但是嗜/耐低温微生物在我们生活的环境中要比中温微生物少, 靠自然选择很难形成优势菌群, 人工筛选、培育嗜/耐低温优势菌是最佳途径<sup>[8]</sup>。

本文从生活污水中经分离驯化后得到具有在低温下能够高效降解油脂的菌株并对其进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

冬季低温时, 从哈尔滨市某居民生活小区冬季的下水道取样, 用灭菌蒸馏水振荡清洗, 沉淀后取

上清液以稀释法涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 在 10°C 条件下培养, 进行划线分离单菌落<sup>[9]</sup>。纯化培养并进行初步生理生化鉴定。从其中分离纯化出能在 10°C 条件下生长旺盛的 24 株菌株。

### 1.2 仪器

HZQ-F160 振荡培养箱、GL-88B 型旋涡混合器、DK-98-1 型电热恒温水浴锅、压力蒸汽灭菌锅、光照培养箱、电热鼓风干燥箱、电子天平、752 型紫外分光光度计、超净工作台、显微镜等。

### 1.3 培养基

**1.3.1 细菌基础培养基(g/L):** 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.2~7.4。

**1.3.2 细菌保藏培养基(g/L):** 基础培养基, 琼脂 20.0, 分装入试管灭菌, 制成斜面。

**1.3.3 驯化培养基(g/L):** NaCl 5.0, 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 5.0, pH 7.0~7.2, 用蒸馏水定容至 1000 mL。

**1.3.4 斜面培养基(g/L):** NaCl 5.0, 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 5.0, pH 7.0~7.2, 用蒸馏水定容至 1000 mL。

**1.3.5 油脂中性红培养基(g/L):** NaCl 5.0, 蛋白胨 10.0, 花生油 10.0, 牛肉膏 5.0, 琼脂 20.0, 蒸馏水定容至 1000 mL, 中性红(1.6%中性红水溶液) 1 mL, pH 7.2。

**1.3.6 复筛培养基(g/L):** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, NaCl 2.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0, 花生油 20.0, pH 自然, 蒸馏水定容至 1000 mL。

本研究中, 培养基除特别注明外, 均采用 1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 菌种的驯化:** 将各菌株的菌种首先接种于细菌基础培养基中, 经过活化后接种于驯化培养基中, 4 d 为一个驯化周期, 每结束一个驯化周期后取一环菌采取划线的方法接种于新鲜的驯化平板培养基中<sup>[10]</sup>。与此同时环境温度由 10°C 逐渐降到 5°C 进行变温驯化培养, 最后停留在 5°C 反复接种培养两个月左右。据生长情况选择 5°C 下能够生长的菌株, 将能够生长的菌株接入到斜面培养基中。

**1.4.2 油脂降解菌的初筛:** 将 1~24 株菌分别接种于油脂中性红培养基中, 置于 5°C 的恒温培养箱中, 进行平板培养, 3 d 后观察培养基中菌落生长情况, 根据其菌落生长情况以及产生的代谢产物是否能够使中性红颜色产生变化的差异来判断该菌株能否降

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

解油脂。观察在相同培养条件下(5°C 下油脂中性红培养基)生长的 24 株菌,单菌落生长的比较大而且颜色鲜红则证明该菌株能在低温条件下良好的生长,且具有降解油脂的能力,从而初步测定出各菌株对油脂的降解情况,并以此来判断待测菌株对油脂的降解能力。

**1.4.3 油脂降解菌的复筛:**将初筛入选的菌株分别接种于以花生油为唯一碳源的无碳源培养基中,对其进行驯化<sup>[11]</sup>。驯化周期为 4 d,驯化数周后,分别接种于复筛摇瓶培养基中(花生油为唯一碳源),置于摇床中,5°C 下 160 r/min 培养,在这 4 d 中每隔 8 h 观察其生长情况,4 d 后用 752 型紫外分光光度计在波长 580 nm 处测初筛入选的菌株的光密度值,筛选出生长较好的菌株,通过具体的实验数据确定了其中的 8 株菌为优势菌。

**1.4.4 生长曲线测定:**将复筛入选的 8 株菌株以相同的接种量接入 100 mL 液体牛肉膏蛋白胨培养基中,置于 HZQ-F160 振荡培养箱中,5°C 下 160 r/min 摇床培养 24 h 左右为种子培养液。移取 10 mL 种子培养液于 150 mL 液体牛肉膏蛋白胨培养基中摇床培养<sup>[7]</sup>。接种结束后,每隔 4 h 取样并分别测定在 580 nm 波长处 8 株菌的吸光度值,在 5°C 下 160 r/min 连续培养 80 h 并绘出该细菌的生长曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌的驯化结果

低温 5°C 下细菌的生长情况:将 24 株菌种,在 10°C~5°C 条件下进行变温驯化培养,最后将温度停留在 5°C 进行培养,观察各菌株生长情况,结果见表 1。驯化培养的主要目的是观察 24 株菌株是否能够适应 5°C 的生长环境并能旺盛生长。由表 1 可以看出,在低温 5°C 条件下 1<sup>#</sup>、3<sup>#</sup>、5<sup>#</sup>、8<sup>#</sup>、9<sup>#</sup>、10<sup>#</sup>、11<sup>#</sup>、13<sup>#</sup>、14<sup>#</sup>、19<sup>#</sup>、20<sup>#</sup>、21<sup>#</sup>、22<sup>#</sup>、23<sup>#</sup>、24<sup>#</sup> 生长良好,说明其适宜低温条件生长。而 2<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>、6<sup>#</sup>、7<sup>#</sup>、12<sup>#</sup>、15<sup>#</sup>、16<sup>#</sup>、17<sup>#</sup>、18<sup>#</sup> 菌种虽然生长缓慢但还可以在低温下生长。

### 2.2 细菌菌种的分离初筛

将经驯化后的 24 株菌株接种于油脂中性红培养基中 5°C 下进行培养,培养 3 d 后观察菌落情况及中性红培养基的颜色变化。接种 7<sup>#</sup>、10<sup>#</sup>、11<sup>#</sup>、13<sup>#</sup>、

表 1 低温 5°C 条件下菌株的生长情况  
Table 1 Under 5°C the growth consideration of sewage bacteria

细菌菌株 Bacteriums	时间 Time (1 d)	时间 Time (2 d)	时间 Time (3 d)	生长描述 Description of growing
1 <sup>#</sup>	-	+	+	生长良好
2 <sup>#</sup>	-	-	+	生长缓慢,但能生长
3 <sup>#</sup>	+	+	+	生长良好
4 <sup>#</sup>	-	-	+	生长缓慢,但能生长
5 <sup>#</sup>	+	+	+	生长良好
6 <sup>#</sup>	-	-	+	生长缓慢,但能生长
7 <sup>#</sup>	-	-	+	生长缓慢,但能生长
8 <sup>#</sup>	-	+	+	生长良好
9 <sup>#</sup>	+	+	+	生长良好
10 <sup>#</sup>	-	+	+	生长良好
11 <sup>#</sup>	-	+	+	生长良好
12 <sup>#</sup>	-	-	+	生长缓慢,但能生长
13 <sup>#</sup>	-	+	+	生长良好
14 <sup>#</sup>	+	+	+	生长良好
15 <sup>#</sup>	-	-	+	生长缓慢,但能生长
16 <sup>#</sup>	-	-	+	生长缓慢,但能生长
17 <sup>#</sup>	-	-	+	生长缓慢,但能生长
18 <sup>#</sup>	-	-	+	生长缓慢,但能生长
19 <sup>#</sup>	-	+	+	生长良好
20 <sup>#</sup>	+	+	+	生长良好
21 <sup>#</sup>	+	+	+	生长良好
22 <sup>#</sup>	+	+	+	生长良好
23 <sup>#</sup>	-	+	+	生长良好
24 <sup>#</sup>	-	+	+	生长良好

注: +: 生长; -: 不生长。

Note: +: Can grow; -: Can not grow.

15<sup>#</sup>、20<sup>#</sup> 菌株的油脂中性红培养基 3 d 后菌落没有颜色变化,而接种 1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>、3<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>、5<sup>#</sup>、6<sup>#</sup>、8<sup>#</sup>、9<sup>#</sup>、12<sup>#</sup>、14<sup>#</sup>、16<sup>#</sup>、17<sup>#</sup>、18<sup>#</sup>、19<sup>#</sup>、21<sup>#</sup>、22<sup>#</sup>、23<sup>#</sup>、24<sup>#</sup> 菌株的油脂中性红培养基 3 d 后菌落颜色鲜红,表明这十几株菌在低温条件下能良好的生长且具有降解油脂的能力。

### 2.3 菌种的复筛

将初筛入选的菌株经驯化后接种于以花生油为唯一碳源的复筛培养基中进行摇床培养,在 5°C、

160 r/min 的条件下, 4 d 后用 752 型紫外分光光度计检测波长为 580 nm 下的光密度值, 测出 8 株降解油脂较强的优势菌株, 结果如图 1 所示。

#### 2.4 菌种生长曲线的测定

将 1<sup>#</sup>、3<sup>#</sup>、5<sup>#</sup>、9<sup>#</sup>、14<sup>#</sup>、20<sup>#</sup>、21<sup>#</sup>、22<sup>#</sup> 菌株置于液体牛肉膏蛋白胨培养基中摇床培养, 接种结束后, 每隔 4 h 取样并分别测定 8 株菌在 580 nm 波长处的吸光度值, 在 5°C 下 160 r/min 连续培养 80 h 描绘生长曲线。1<sup>#</sup>、3<sup>#</sup>、5<sup>#</sup>、9<sup>#</sup>、14<sup>#</sup>、20<sup>#</sup>、21<sup>#</sup>、22<sup>#</sup> 菌株的生长曲线如图 2 所示。

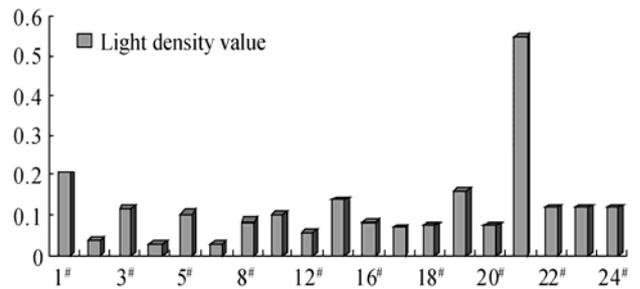


图 1 8 株降解油脂较强的优势菌株

Fig. 1 Eight bacteria of better oil-degarding

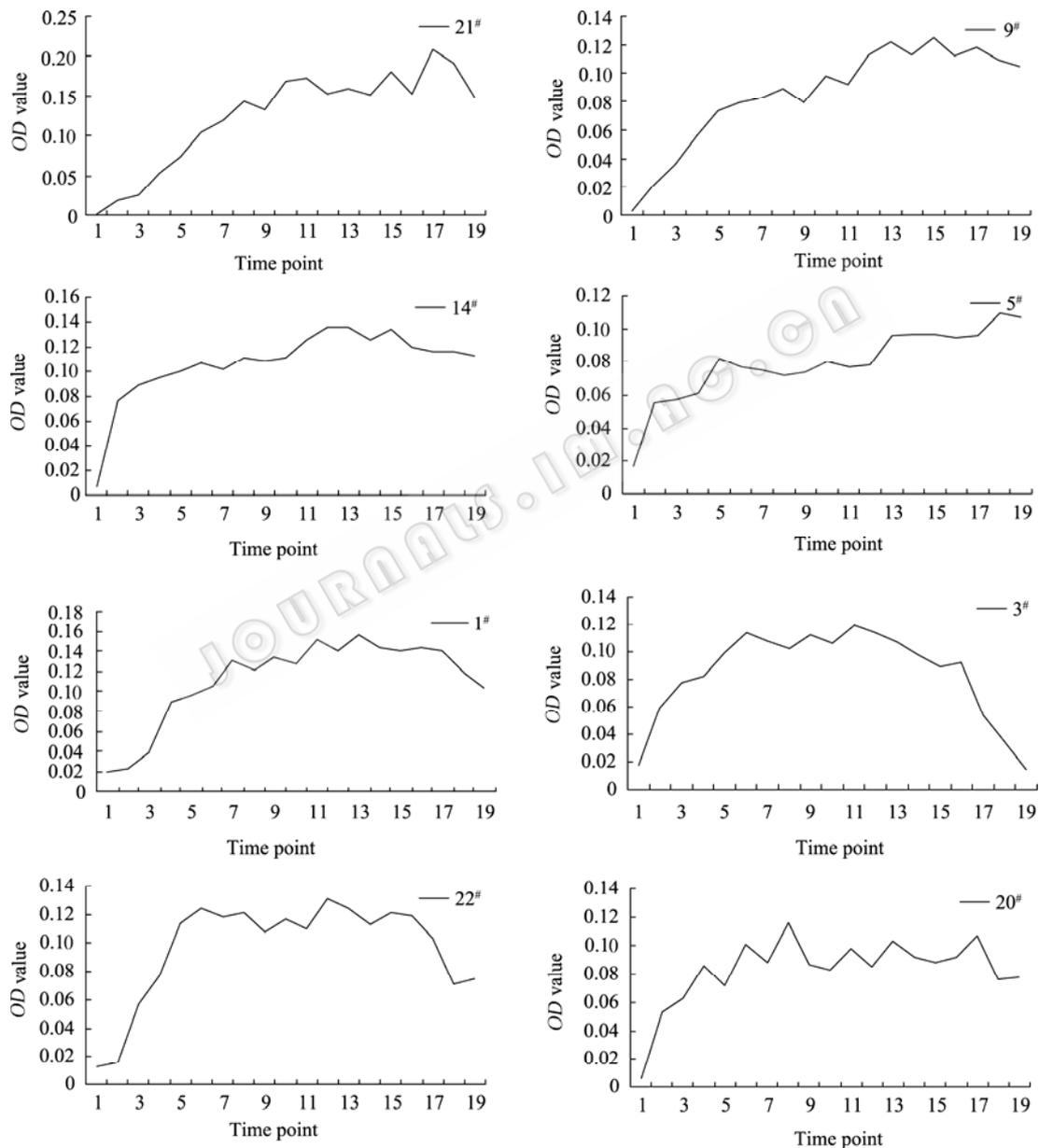


图 2 8 株菌的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of eight sewage bacteria

### 3 小结

对从北方冬季生活小区生活污水中所获得的 24 株菌种经变温驯化后使其适应 5°C 的温度培养一段时间后进行初筛, 确定了 18 株能够降解油脂的细菌。进一步采用以花生油为唯一碳源的复筛培养基进行复筛, 通过测定其光密度值得到了降解油脂能力较强且在低温下能够生长良好的 8 株低温降解油脂细菌, 这 8 株菌分别为 1<sup>#</sup>、3<sup>#</sup>、5<sup>#</sup>、9<sup>#</sup>、14<sup>#</sup>、20<sup>#</sup>、21<sup>#</sup>、22<sup>#</sup>。若进行进一步的研究有利于将其应用到生活污水的处理, 以进一步提高低温微生物降解油脂的效率<sup>[12]</sup>。油脂降解菌不但可用于生活污水的处理, 又是自然界中广泛存在的非致病细菌, 对人畜无害, 不污染环境。所以低温高效降解油脂菌具有良好的研究和应用前景<sup>[13]</sup>。

### 4 展望

我国北方寒冷地区冬季漫长, 水温过低, 致使污水中的微生物代谢能力下降, 有机物去除效果差, 这是长久以来难以解决的问题<sup>[14]</sup>。为了提高寒冷地区冬季污水的处理效果, 筛选、驯化高活性、耐低温的微生物势在必行。低温菌在低温环境条件下所拥有的这种普通微生物无法替代的活性优势为未来低温菌的开发和工程应用提供了广阔的前景<sup>[15]</sup>。并且可利用现代分子生物技术, 构建出具有特殊降解功能的基因工程菌。利用遗传学原理采用转化育种、原生质体融合、细菌质粒育种等技术培养, 定向构建高效降解的基因工程菌并应用于生活污水处理<sup>[16]</sup>, 以便进一步提高低温微生物降解油脂的效率, 并最终为寒冷地区污水处理事业的发展起到巨大的推动作用。

### 参 考 文 献

[1] 韦朝海, 梁世中, 吴超飞. 废水处理生物流化床中 O<sub>2</sub> 传递特性的研究. 环境科学与技术, 1996, 1: 13-16.

- [2] Cooney JJ. Hydrocarbonusing Microorganisms in Three of Reshwater Ecosystem. Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium London: Applied Science Publishers, 1976, 141-155.
- [3] 李军红, 田胜尼, 彭少麟, 等. 一株高效油脂降解菌株的筛选及其降解特性研究. 生态环境, 2006, 15(2): 224-227.
- [4] 慎义勇, 黄志立. 油脂高效降解菌处理含油污水的试验研究. 环境科学研究, 2000, 13(5): 4-7.
- [5] 闫亚娟, 李宗伟, 李宗义, 等. 油脂降解菌的选育与鉴定. 食品工业科技, 2007, 12: 57-60.
- [6] 孟雪征, 姜安玺, 赵汝毅, 等. 用耐低温酵母菌处理寒冷地区生活污水的研究. 哈尔滨建筑大学学报, 2000, 22(6): 70-73.
- [7] 缪锦来, 郑 洲, 刘芳明, 等. 南极微生物对低温生活污水处理效果的初步研究. 海岸工程, 2008, 27(4): 42-47.
- [8] 蔡苏兰, 马晓楠, 梁莉丽. 耐低温菌株 C3 对污水 COD 降解性能的试验研究. 环境科学与管理, 2007, 32(10): 81-89.
- [9] 孟雪征, 曹相生, 姜安玺, 等. 利用耐冷菌处理低温污水的研究. 山东建筑工程学院学报, 2001, 16(2): 53-57.
- [10] 张 英, 秦华明, 朱明军, 等. 高效油脂降解菌株的筛选及特性研究. 工业用水与废水, 2003, 34(2): 5-7.
- [11] 金建云, 李 芳, 林开春, 等. 高效油脂降解菌的筛选及其降解影响因素的初步研究. 华中农业大学学报, 2006, 14(4): 400-403.
- [12] 闫亚娟. 高效油脂降解菌株的选育及其降解条件的初步研究. 西北大学硕士学位论文, 2007.
- [13] 黄 钧, 白 威, 李毅军, 等. 3 株油脂化工废水降解菌的分离鉴定. 应用与环境生物学报, 1999, 5(S1): 74-76.
- [14] 韩萍萍, 朱 虎, 魏东芝, 等. 石油降解菌的筛选、鉴定及降解石油的初步研究. 化学与生物工程, 2008, 25(6): 34-40.
- [15] 李 田, 刘 光, 安黎哲. 低温微生物的适冷特性研究进展及其应用前景. 冰川冻土, 2006, 22(3): 450-455.
- [16] 何爱翠. 微生物降解法处理工业含油废水的研究. 中南大学硕士学位论文, 2007.