

文章编号:1673-5005(2009)05-0140-04

降解菌 HJ-1 降解石油动力学

张秀霞, 单宝来, 张剑杰, 吴伟林, 赵朝成

(中国石油大学 化学化工学院, 山东 青岛 266555)

摘要:通过富集培养的方法从被石油污染的土壤中筛选得到 1 株以石油为唯一碳源芽孢杆菌(*Bacillus*) HJ-1。将菌株 HJ-1 的发酵液投加到自制的好氧发酵处理装置中(通风量为 $0.2 \text{ m}^3/\text{h}$), 添加木屑和稻草作为膨松剂, 鸡粪为氮源, 在 pH 值为 7~8、含水率为 68.51%、菌源 HJ-1 添加量为 4.4% 的条件下, 进行好氧发酵实验。结果表明:经过 24 d 的好氧发酵实验, 含油污泥的含油率从 18.77% 降为 8.87%, 油降解率达到 52.7%; 发酵过程中石油的降解可以用一级反应动力学模型表示。

关键词:菌株 HJ-1; 好氧发酵; 含油污泥; 动力学

中图分类号: X 74

文献标识码: A

Kinetics on strain HJ-1 degrading petroleum

ZHANG Xiu-xia, SHAN Bao-lai, ZHANG Jian-jie, WU Wei-lin, ZHAO Chao-cheng

(College of Chemistry and Chemical Engineering in China University of Petroleum, Qingdao 266555, China)

Abstract: A bacterium HJ-1 was isolated from petroleum contaminated soil by enrichment using petroleum as sole source of carbon and identified as *Bacillus*. The aerobic fermentation experiment was carried out through throwing the fermentation fluid of HJ-1 into self-made aerobic fermentation treatment device in the condition of ventilation of $0.2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, adding sawdust and straw as raising agent, swab as nitrogen source, pH of 7~8, water-cut of 68.51%, bacterium HJ-1 as bacterium source with the content of 4.4%. The experimental results show that the oil-cut rate of oily sludge declined from 18.77% to 8.87% and the degradation rate of oil could reach 52.7% through 24 days' aerobic fermentation experiment. The degradation of petroleum may be expressed using first-order kinetic model.

Key words: strain HJ-1; aerobic fermentation; oily sludge; kinetics

含油污泥属于危险废物, 因其处理费用较高而成为一个难题^[1-3]。含油污泥的处理方法有焚烧法、氯化法、臭氧化法和燃烧法等, 这些处理方法的费用高且对设备有较高的要求^[4]。生物处理法是一种经济和环境友好的处理方法^[5]。在生物处理法中, 影响石油烃类降解的因素有污染物化学生物特征^[6]、微生物周边生活环境^[6-8]及微生物自身^[9-11]。从石油污染的土壤中筛选出来的混合菌对原油中饱和分的降解率达到 28%~51%, 芳香烃的降解率可达 18%^[12]; 营养物质的添加对有机物的降解也被广泛研究^[13]。笔者利用筛选出来的石油降解菌 HJ-1 进行含油污泥好氧发酵实验, 研究菌株 HJ-1 在好氧发酵处理装置中的动力学问题。

1 实验

1.1 石油降解菌的筛选

取被石油污染的土壤, 通过富集培养, 分离纯化, 得到 1 株以石油为唯一碳源的菌株 HJ-1。根据菌株形态及生理生化特征, 初步鉴定菌株 HJ-1 为芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[14]。

1.2 培养基及发酵液

(1) 葡萄糖培养基。基础无机盐溶液 100 mL, 酵母膏 0.1 g, 20% 葡萄糖溶液 5.0 mL, 自然 pH 值, 121 °C 灭菌 20 min。

(2) 肉膏蛋白胨固体培养基。蛋白胨 1.0 g, 牛肉膏 0.5 g, NaCl 0.5 g, 蒸馏水 100 mL, 琼脂 1.5

收稿日期: 2009-04-10

基金项目: 中国石油天然气集团公司中青年创新基金项目(06E1023)

作者简介: 张秀霞(1966-), 女(汉族), 河北枣强人, 副教授, 博士, 从事生物修复石油污染及固体废物资源化研究。

g, pH 值 7.2, 121 ℃ 灭菌 20 min。

(3) HJ-1 发酵液。葡萄糖浓度为 25 g/L, 无机盐浓度分别为 NaCl 3.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, NaNO₃ 1.0 g/L, KH₂PO₄ 4.0 g/L, K₂HPO₄ · 3H₂O 4.0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.25 g/L, pH 值 9.0。最佳 HJ-1 菌液接种量为 4%, 温度 25 ℃, 转速 160 r/min, 摇床培养 16 h 后使用。

1.3 实验装置

好氧发酵工艺过程包括通风、温度控制、水分控制、翻堆、无害化控制等几个方面, 实验采用简单的圆筒式发酵装置, 见图 1。

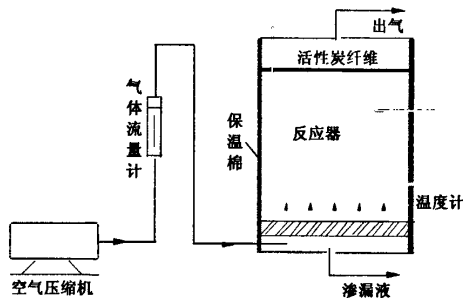


图 1 一次好氧发酵反应装置

Fig.1 Primary aerobic fermentation reaction equipment

1.4 发酵系统的物料组成及运行条件

发酵系统的物料组成及运行条件见表 1。

表 1 发酵系统的物料组成及运行条件

Table 1 Material composition and operating conditions of fermentation system

发酵物料	含水率 $f_w/\%$	碳氮 比	发酵 时间 t/d	通风量 $V_m/(m^3 \cdot h^{-1})$	氮源	pH 值	含油 率 $f_o/\%$
7.5 L 含油污 泥, 8.5 L 木屑 稻草, 800 mL HJ-1 发酵液, 1.5 L 鸡粪	68.51	156	24	0.2	鸡粪	7~8	18.77

发酵开始时将含油污泥、木屑稻草、鸡粪全部在 121 ℃ 灭菌 20 min 后, 混合均匀装入图 1 所示的一次好氧发酵装置进行发酵处理。发酵开始后, 每天取样测定含油污泥的油含量, 以考察菌株 HJ-1 对含油污泥中油的降解效果。

1.5 分析方法

1.5.1 含油量的测定及计算

(1) 污泥中含油率的测定。称取一定量的含油污泥 w_0 , 采用索氏抽提法, 以三氯甲烷为萃取剂进行萃取, 萃取 8 h 后的萃取液放到水浴锅中浓缩至干, 再放入烘箱中烘 4 h, 然后放入干燥器中冷却半小时后称重, 经恒重后萃取油的质量记为 w_1 。

(2) 含油率的计算。

$$f_o = w_1 / w_0$$

式中, w_0 为污泥的质量, g; w_1 为萃取出来的油的质量, g。

1.5.2 石油降解率的计算

石油降解的计算公式如下:

$$\eta = \frac{f_0 - f_1}{f_0}$$

式中, η 为石油的降解率, %; f_0 为起始时间污泥含油率, %; f_1 为处理后污泥含油率, %。

2 结果分析

2.1 菌株 HJ-1 生长曲线

将筛选出的菌株由斜面用接种针挑一环到肉膏蛋白胨液体培养基中, 30 ℃, 160 r/min, 摇床培养 24 h。将同一瓶的菌液 2.5 mL 接种到灭菌后的 50 mL 葡萄糖培养基中, 30 ℃, 160 r/min, 摇床培养。从接种开始计时, 在生长过程中每 2~4 h 取样一次, 用分光光度法测量菌体生长的 OD₆₀₀ 值。绘制菌株 HJ-1 的 58 h 内的生长曲线, 见图 2。

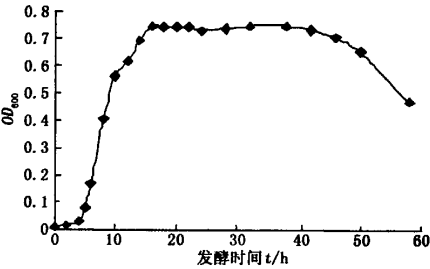


图 2 菌株 HJ-1 的生长曲线

Fig.2 Growth curve of strain HJ-1

微生物生长过程分为 4 个时期^[15]: 迟缓期、对数增长期、平稳期、衰亡期。从图 2 可以看出:

(1) 在 0~4 h, 该菌株处于迟缓期。菌体生长繁殖缓慢, 这是因为当菌种接到新鲜的培养基中后, 要经过一段时间的调整 and 适应, 如合成多种酶、完善体内的酶系统及其他的细胞成分。

(2) 在 4~16 h, 该菌株处于对数生长期。菌体大量繁殖, 生长速度逐渐增加, 接近最大值后保持相当长的时间。细胞的数目呈几何级数增加。细胞的化学组成与生理学性质稳定, 代谢极其旺盛。

(3) 在 16~42 h, 该菌株处于稳定期。随着微生物的迅速生长繁殖, 营养物质被大量消耗, 抑制菌体代谢活性的产物不断产生积累, 菌体的生长速率下降, 细胞数量达到最高峰, 细胞的生长速率与死亡

速率达到动态平衡,总菌数不变或稍有增加。

(4)在 42 h 后,菌体的生长进入衰亡期。营养物质基本被耗竭,而且抑制细胞生长的毒物浓度愈来愈大,细胞死亡速率大于生长速率,细菌总数减少。

因此,当细菌处于对数增长长期或稳定期时,菌体数量较多,而且细菌的繁殖能力较强。

2.2 发酵系统中油的去除效果

在油泥的好氧发酵系统中,随着时间的延长油泥的含油率有明显下降趋势,实验期间发酵系统含油率及油降解率的变化见图 3。

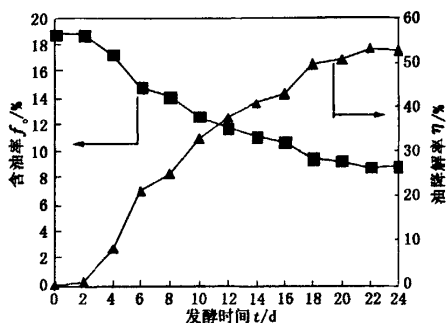


图 3 发酵系统含油率及油降解率的变化

Fig.3 Change of oil content and oil degradation ratio of fermentation system

由图 3 看出,含油率的降低主要发生在好氧发酵的高温阶段,所以此阶段的油去除率变化较大,去除效率较高。随着时间的推移,发酵进行到降温阶段后堆料中营养物质的缺乏以及微生物新陈代谢的中间产物的积累使得微生物活性降低,逐渐停止对石油烃类的降解,含油率变化缓慢。待发酵结束后,含油率从 18.77 % 降到了 8.87 %,油降解率达到 52.7 %。

2.3 HJ-1 降解石油的动力学

对于一般生化反应速率可表示为^[16]

$$v = v_m c / (K + c). \quad (1)$$

式中, v 为反应速率; v_m 为最大反应速率; c 为底物浓度; K 为半饱和和速率常数。当 $c \ll K$ 时,方程(1)可写成

$$V = v_m c / K. \quad (2)$$

降解过程遵循一级反应动力学,反应速率常数为

$$k_1 = v_m / K. \quad (3)$$

当 $c \gg K$ 时,方程(1)可写为

$$v = v_m. \quad (4)$$

降解过程为零级反应,其降解速率常数为

$$k_0 = v_m. \quad (5)$$

根据式(2)和式(4)求得底物浓度与时间的关系式为

$$\ln c = a + k_1 t, \text{ 一级反应}, \quad (6)$$

$$c = b + k_0 t, \text{ 零级反应}. \quad (7)$$

本实验体系是固态发酵体系,石油处于非溶解状态,可溶的部分浓度很低,而且不易测量,以石油添加量作为方程中的底物浓度。在固态发酵体系对 HJ-1 降解石油进行动力学分析和研究,以考察其与米门方程的符合情况。

对图 3 的数据分别按一级反应和零级反应方程式拟合。结果表明,在发酵系统中石油的降解曲线符合一级反应(图 4)。

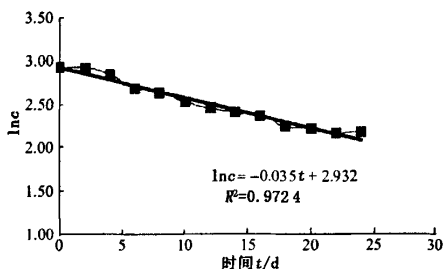


图 4 HJ-1 在发酵系统中降解石油动力学曲线

Fig.4 Oil degrading kinetics curve of HJ-1 in fermentation system

由图 4 可以看出,在物料中含油率为 18.77% 时,石油的降解能够较好地用米门公式一级反应形式表示。HJ-1 降解菌的降解速率常数为 0.035 d^{-1} ,说明在含油污泥的好氧发酵过程中,在添加木屑和稻草作为膨松剂,鸡粪为氮源,菌种 HJ-1 为菌源的情况下,含油污泥中的石油可以很好地被菌株 HJ-1 降解,达到一定的处理含油污泥的效果,但处理后的含油污泥中仍含有 8.87% 的油。以实验中得到的动力学方程预测,如果达到含油率 0.3% 的农用污泥标准,需要 249 d 的时间。解决此问题的方法有:①延长处理时间;②进一步优化发酵条件,提高含油污泥中油的降解速率;③优化菌种组合,采用高效的微生物菌落进行处理;④改变菌种的存在方式^[17];⑤应用表面活性剂。

3 结 论

(1)通过富集培养的方法从石油污染的土壤中筛选出的高效石油降解菌 HJ-1 处于对数增长长期或稳定期时,菌体数量较多,而且细菌的繁殖能力较强。

(2)在自制的含油污泥好氧发酵系统中处理含

油污泥,添加木屑和稻草作为膨松剂,鸡粪为氮源,在 pH 值 7~8,含水率 68.51%,通风量 $0.2 \text{ m}^3/\text{h}$,菌种 HJ-1 为菌源,添加量为 4.4% 的条件下,经过 24 d 的好氧发酵,含油率由 18.77% 降为 8.87%,油降解率达到 52.7%。

(3) 石油的降解可以用一级反应动力学模型表示,动力学方程为 $\ln c = -0.035t + 2.932$ 。

参考文献:

- [1] VASUDEVAN N, RAJARAM P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil [J]. *Environ Int*, 2001, 26: 409-411.
- [2] FERRARI M D, NEIROTTI E, ALBORNOZ C, et al. Bio-treatment of hydrocarbons from petroleum tank bottom sludge's in soil slurries [J]. *Biotechnol Lett*, 1999, 18: 1241-1246.
- [3] 田鲁兴. 含油污泥处理工艺试验[J]. 西南民族大学学报:自然科学版, 2005, 31(4): 588-591.
TIAN Lu-xing. Experiment of oil sludge treatment technique[J]. *Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2005, 31(4): 588-591.
- [4] KLEIN J. Possibilities, limits, and future developments of soil bioremediation[C]//REHM H J, REED G. *Environmental processes II. Soil Decontamination, Biotechnology*, Wiley—VCH, 2nd ed. Weinheim, FRG, 2000, 11b: 465-476.
- [5] BASSAM Mrayyan, MOHAMMED N Battikhi. Biodegradation of total organic carbons (TOC) in Jordanian petroleum sludge [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2005, B120: 127-134.
- [6] 张清敏, 陈卫平, 胡国臣, 等. 污泥有效利用研究进展[J]. 农业环境保护, 2000, 19(1): 58-61.
ZHANG Qing-min, CHEN Wei-ping, HU Guo-chen, et al. State and development for treatment and disposal of sewage sludge in city[J]. *Agro-environmental Protection*, 2000, 19(1): 58-61.
- [7] 丁克强, 骆永明. 生物修复石油污染土壤[J]. 土壤, 2001, 33(4): 179-184.
DING Ke-qiang, LUO Yong-ming. Bioremediation of petroleum polluted soil[J]. *Soils*, 2001, 33(4): 179-184.
- [8] 王俊锋, 完颜华. 污泥处理及其资源化[J]. 甘肃环境研究与监测, 2002, 15(4): 287-290.
WANG Jun-feng, WAN Yan-hua. Sludge treatment and resource[J]. *Gansu Environmental Study and Monitoring*, 2002, 15(4): 287-290.
- [9] BOOPATHY R. Factors limiting bioremediation technologies [J]. *Bioresour Technol*, 2000, 74: 63-67.
- [10] BHARATHI S, VASUDEVAN N. Utilization of petroleum hydrocarbons by pseudomon fluorescens isolated from petroleum contaminated soil [J]. *Environ Int*, 2001, 26: 413.
- [11] RAHMAN K S M, THAHIRA-RAHMAN J, LAKSHMANAPERUMALSAMY P, et al. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium [J]. *Bioresour Technol*, 2002, 85: 256-257.
- [12] VASUDEVAN V, RAJANAM P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil [J]. *Environ Int*, 2001, 26: 409-411.
- [13] FERGUSON S H, FRANZMANN P D, REVILL A T, et al. The effects of nitrogen and water on mineralisation on hydrocarbon in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soil [J]. *Cold Region Sci Technol*, 2003, 37: 197-212.
- [14] 张秀霞, 王基成, 耿春香, 等. 含油污泥生物处理的烃类降解菌发酵条件的优化[J]. 中国石油大学学报: 自然科学版, 2008, 32(3): 155-159.
ZHANG Xiu-xia, WANG Ji-cheng, GENG Chun-xiang, et al. Optimization of fermentation condition of hydrocarbon degrading strain in oily sludge bio-treatment [J]. *Journal of China University of Petroleum (Edition of Natural Science)*, 2008, 32(3): 155-159.
- [15] 顾夏声, 李献文, 竺建荣. 水处理微生物学[M]. 3 版. 北京: 中国建筑工业出版社, 1998: 13-38.
- [16] 全向春, 韩力平, 王建龙, 等. 固定化皮式伯克霍尔德氏菌降解喹啉的研究[J]. 环境科学, 2000, 21(3): 74-76.
QUAN Xiang-chun, HAN Li-ping, WANG Jian-long, et al. Biodegradation of quinoline by immobilized burkholderia pickettii sp[J]. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2000, 21(3): 74-76.
- [17] 张秀霞, 耿春香, 房苗苗, 等. 固定化微生物应用于生物修复石油污染土壤的研究[J]. 石油学报: 石油加工, 2008, 24(4): 409-414.
ZHANG Xiu-xia, GENG Chun-xiang, FANG Miao-miao, et al. Bioremediation of petroleum contaminated soil by immobilized microorganisms [J]. *Acta Petrolei Sinica (Petroleum Processing Section)*, 2008, 24(4): 409-414.

(编辑 刘为清)