

高效除臭菌的筛选及其降解特性研究

余海晨, 张清敏, 侯树宇, 张 杨, 白 晔

(南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071)

摘要: 采用室内培养实验方法, 讨论了从垃圾渗滤液中驯化分离出能够耐受并利用二甲基亚砜(DMSO)作为营养物质的有效菌群, 并以含巯基的半胱氨酸模拟自然界中恶臭物质 H_2S 的产生和 H_2S 被氧化的过程。研究表明, 在半胱氨酸浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 能够在培养的第 2 d 大部分被该菌群分解成 H_2S , 在培养的第 5 d 所产生的 H_2S 有 82% 被氧化为高价态的硫化物, 达到了很好的除臭效果。经过多次平板划线筛选, 分离出 8 株有效菌 C1 ~ C8, 经生理生化性能测定, 初步鉴定这 8 株均为化能异养的芽孢杆菌, 好氧或兼性厌氧。

关键词: 恶臭; DMSO; H_2S ; 半胱氨酸; 除臭菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 1672 - 2043(2004)02 - 0300 - 04

Optimized Cultivation of Highly - Efficient Deodorizing Bacterial Consortia and their Degradation Ability towards Pyrene

YU Hai-chen, ZHANG Qing-min, HOU Shu-yu, ZHANG Yang, BAI Ye

(College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Highly - efficient deodorizing bacterial consortia capable of tolerance and utilizing high concentration of dimethyl sulfoxide(DMSO) were isolated and cultivation was optimized from a landfill leachate. We studied degradation process and used products of cysteine(Cys) as source of H_2S and simulated generation and oxidation process of H_2S as a main malodorous gas from nature in the present study. The results showed that maximum conversion rate of Cys could reach up to 78.75% at the second day of cultivation under a condition that the concentration of Cys was $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and further oxidation rate of H_2S could reach up to 82% at the fifth day of cultivation, exhibiting a highly - efficient deodorization. Eight bacterial consortia C1 ~ C8 were isolated in our repetitious optimized cultivations process. All of the eight available strains were proved to be heterotrophic bacillus, either aerobes or facultative aerobes.

Keywords: malodor; DMSO; H_2S ; cysteine; deodorizing bacteria

随着经济的发展和人们生活水平的逐步提高, 对环境的要求也日趋强烈, 由生活垃圾、污水和畜禽粪便等所产生的恶臭越来越受到人们的关注^[1]。这些恶臭物质不仅使人产生不快和厌恶感, 还危害着人们的健康甚至生命。因此实施恶臭污染控制和管理, 研究去除恶臭物质的技术具有积极的实际意义。

研究表明, 被公认的恶臭物质多达万种, 按化学组分可分为 5 类, 包括: ①含氮化合物: 如氨气, 吡啶和胺类等; ②含硫化合物: 如硫化氢、硫醇、硫醚; ③卤

素及其衍生物; ④烃类; ⑤含氧有机化合物^[2]。其中含硫的恶臭物质占有相当大的比例, 我们从天津市双口垃圾场的污泥中驯化、筛选、分离得到 8 株对含硫化物有高效降解作用的微生物菌种 C1 ~ C8, 并且研究了它们的降解特性^[3]。

1 实验材料

1.1 原始菌种富集

采集天津市双口垃圾填埋场的垃圾渗滤液和污泥样品作为原始菌种, 进行富集培养。

1.2 培养基

(1) 改良型固体高氏一号培养基(简称 G1): 可溶性淀粉 20 g, 琼脂 20 g, KNO_3 1g, $NaCl$ 0.5 g, K_2HPO_4

收稿日期: 2003 - 06 - 18

基金项目: 河北省省校科技合作开发基金

作者简介: 余海晨(1978—), 男, 南开大学环境科学与工程学院在读硕士生, 研究方向为环境生物技术。E-mail: yuhaichen@163.net

0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, MgCl_2 0.5 g, NH_4Cl 0.5 g, 加水至 1 000 mL, 调节 pH 至 7.0 ~ 7.2;

(2) 液体 G1 培养基: G1 培养基不加琼脂;

(3) 高氏一号—半胱氨酸培养基(G1 - Cys): 在液体 G1 培养基中减少淀粉的量, 并加入一定量的 Cys;

(4) 普通牛肉膏蛋白胨培养基;

(5) 各种生理生化性能测定时所用培养基(参见文献[5]);

(6) L-半胱氨酸(Cys)、二甲基亚砷(DMSO)。

以上各试剂皆为 AR 级。

1.3 仪器

HH. B11 - 500 型电热恒温培养箱: 天津市中环实验电炉有限公司;

ZDX - 35BI 型座式自动电热压力蒸汽灭菌锅: 上海申安医疗器械厂;

THZ - 22 型台式恒温振荡器: 江苏太仓市实验设备厂;

体视显微镜: 日本奥林巴斯(OLYMPUS) 光学工业株式会社;

TN - 100B 型托盘式扭力天平: 上海第二天平仪器厂;

GT2A 型精密天平: 北京光学仪器厂;

DX - 120 型离子色谱: 美国德安公司

2 实验方法

2.1 菌种的富集和驯化

将采集的垃圾渗滤液样品 10 mL 和污泥样品 1 g 混悬于 100 mL 无菌水中, 再转接入盛有 100 mL G1 液体培养基中。

在培养基中加入 DMSO, 一开始使其浓度达到总碳源的 25% (淀粉占 75%)。用灭菌的橡胶塞将锥形瓶密封, 30 ℃, $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 5 d 后, 取出 10 mL 培养液转接入 100 mL 新培养基中, 同时 DMSO 的浓度增加到 50%。同样, 第 5 d 再转换一次新培养基, 将 DMSO 浓度逐步增加至 75%。在 75% 的 DMSO 浓度条件下, 每隔 5 d 再将菌转接到新培养基中继续驯化 1 个月, 作为初步富集、驯化的混合菌种^[4]。

2.2 有效菌群除臭效能测定

2.2.1 锥形瓶中 H_2S 含量的测定方法

在 80 ℃ 条件下, 酸化后用氮气吹出, 用 2 个装有定量乙酸 - 乙酸锌溶液吸收后碘量法测定^[5]。

2.2.2 半胱氨酸用量的确定

为模拟自然界恶臭物质 H_2S 的产生和被氧化过

程中最佳 Cys 浓度, 取 6 个分别含不同量 Cys 和含 2 g 淀粉的 200 mL G1 培养基的锥形瓶 (Cys 的浓度见表 1), 分别接入 10 mL 菌液, 用灭菌橡胶塞密封, 30 ℃ 条件下 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 2 d 后, 用碘量法测定 H_2S 的产生量。计算各浓度 Cys 被分解成 H_2S 的转化率, 选取最高转化率的 Cys 浓度值作为最佳使用浓度。

2.2.3 H_2S 的产生与降解曲线

分别取 5 份 200 mL 液体 G1 - Cys 培养基, 其中淀粉 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Cys $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。接菌并分别振荡培养 1 d, 2 d, 3 d, ……5 d 后, 取出 1 mL 平板稀释法计菌落数, 然后将剩余菌液用酸化 - 吹气法将瓶中残余的所有 H_2S 气体分离出, 并用乙酸 - 乙酸锌溶液吸收, 碘量法测定, 作出时间 - H_2S 含量曲线。

同样取 5 份灭菌的 200 mL 液体 G1 - Cys 培养基, 将淀粉含量升高到 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Cys 用量不变, 同上接菌培养, 测定 1 d, 2 d, 3 d, ……5 d 后的菌落数和 H_2S 含量。

2.2.4 H_2S 氧化产物的测定

离子色谱法测定。

2.3 单一菌种生理生化性能分析

2.3.1 单一菌的分离与保存

取 1 mL 培养液适当稀释接种到牛肉膏蛋白胨平板培养基上, 30 ℃ 培养, 反复划线纯化, 根据各菌落特征和镜检观察结果确定单一菌株。将所得菌株分别接种于牛肉膏蛋白胨斜面上, 4 ℃ 冰箱保存。

2.3.2 单一菌的生理生化性能测定

详见参考文献[6]。

3 结果与分析

3.1 初筛结果与分析

把初步富集筛选混合菌群再经过含有 DMSO 的 G1 培养基振荡培养 2 d, 等到培养液的上层气体能使醋酸铅试纸明显变黑, 说明该混合菌群已经能够将 C - S 键打开, 经过一系列中间过程生成了 H_2S 。因为硫是以 C - S 键的形式存在于 DMSO 中, 由此可以推断出该混合菌群能够降解 C - S 键结合的含硫有机物。

3.2 有效菌群除臭效能测定

3.2.1 半胱氨酸的浓度对降解率的影响

$\text{Cys 转化率} = \frac{\text{产生的 } \text{H}_2\text{S 量}}{\text{总 Cys 量}} \text{ (Cys 与 } \text{H}_2\text{S 是 1:1 的转换关系)}$

由表 1 和图 1 中可以看出, 半胱氨酸在 G1 培养基中的转化率最高可达 78.75%, 这一转化率是在

表 1 不同浓度半胱氨酸及其在培养第 2 d 的转化率

Table 1 Transform rates of Cys with various concentrations at the second day

Cys /mg · mL ⁻¹	瓶 1 消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ /mL	瓶 2 消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ /mL	空白消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ /mL	Na ₂ S ₂ O ₃ /mol · L ⁻¹	H ₂ S 的量 /mol	Cys 的转化率 /%
0.05	8.70	9.20	10.05	0.052	5.72 × 10 ⁻⁵	69.30
0.1	5.80	9.20	10.00	0.052	13.00 × 10 ⁻⁵	78.75
0.25	6.35	9.85	10.10	0.051	10.4 × 10 ⁻⁵	25.20
0.5	5.12	9.90	10.10	0.051	13.47 × 10 ⁻⁵	16.32
1.5	4.90	9.40	10.15	0.051	15.3 × 10 ⁻⁵	6.18
2.5	4.80	9.20	10.10	0.051	15.8 × 10 ⁻⁵	3.83

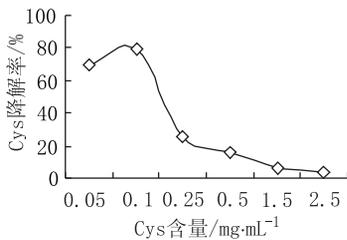


图 1 Cys 的浓度对降解率的影响曲线

Figure 1 The effects of Cys concentrations on the degradation rates

0.1 mg · mL⁻¹ Cys 的浓度下实现的。如再增加 Cys 的浓度, H₂S 的生成量会稍有增加, 但是转化率显著降低。这是因为在选定的培养条件下 Cys 的转化率受培养基的有效成分和菌群生长密度的影响。因此, 根据上面的结果选用 0.1 mg · mL⁻¹ 作为测定 H₂S 产生和转化实验的 Cys 浓度。

3.2.2 H₂S 的产生与转化

在每个锥形瓶中含有 200 mL 培养液, 其中 Cys 为 20 mg, 淀粉含量分别为 10 mg · mL⁻¹ 和 20 mg · mL⁻¹, 锥形瓶中 H₂S 含量和微生物生长情况随培养时

间的变化如表 2、表 3 以及图 2、图 3 所示:

其中: H₂S 产生率 = H₂S 的量 (10⁻⁵ mol) / 菌落数 (个 · mL⁻¹)

由图 2 可以看出, H₂S 的含量在 2 个淀粉浓度下, 均在第 2 d 出现一个最大值。这说明在封闭的锥形瓶中 Cys 先被细菌降解为小分子的 H₂S, 而这些生成的 H₂S 又很快被转化为其他物质而减少。在第 2 d 之前, H₂S 的产生速率大于转化速率, 含量增加; 在第 2 d, H₂S 的转化速率大于产生速率, 含量逐渐减少。到第 5 d 的时候, H₂S 的量已由 13.13 × 10⁻⁵ mol 减少到

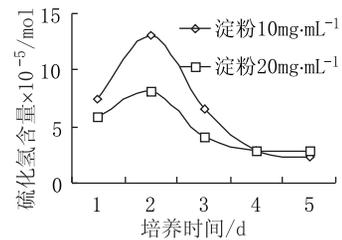


图 2 时间 - 硫化氢含量曲线

Figure 2 Curve of incubation periods vs. H₂S concentrations表 2 H₂S 含量随培养时间的变化 (淀粉含量 10 mg · mL⁻¹)Table 2 Change of H₂S contents with incubation periods (amylogen 10 mg · mL⁻¹)

天数	瓶 1 消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ /mL	瓶 1 消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ /mL	空白消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ /mL	Na ₂ S ₂ O ₃ /mol · L ⁻¹	H ₂ S 的量 10 ⁻⁵ mol	菌落数 /个 · mL ⁻¹	产生率 /mol · mL ⁻¹ · 个 ⁻¹
1	7.20	9.80	10.00	0.050	7.50	5 × 10 ¹⁰	1.5 × 10 ⁻¹⁵
2	5.40	9.85	10.15	0.050	13.13	4 × 10 ¹¹	3.3 × 10 ⁻¹⁶
3	7.90	9.60	10.05	0.050	6.50	1.2 × 10 ¹²	5.4 × 10 ⁻¹⁷
4	9.40	9.70	10.10	0.050	2.75	1.5 × 10 ¹²	1.8 × 10 ⁻¹⁷
5	9.50	9.75	10.10	0.050	2.38	1.2 × 10 ¹²	2.0 × 10 ⁻¹⁷

表 3 H₂S 含量随培养时间的变化 (可溶性淀粉含量 20 mg · mL⁻¹)Table 3 Change of H₂S contents with culture periods (amylogen 20 mg · mL⁻¹)

天数	瓶 1 消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ /mL	瓶 1 消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ /mL	空白消耗 Na ₂ S ₂ O ₃ /mL	Na ₂ S ₂ O ₃ /mol · L ⁻¹	H ₂ S 的量 10 ⁻⁵ mol	菌落数 /个 · mL ⁻¹	产生率 /mol · mL ⁻¹ · 个 ⁻¹
1	7.90	9.80	10.00	0.050	5.75	9 × 10 ¹⁰	6.4 × 10 ⁻¹⁶
2	7.20	9.85	10.15	0.050	8.13	6 × 10 ¹¹	1.4 × 10 ⁻¹⁶
3	8.85	9.60	10.05	0.050	4.13	3 × 10 ¹²	1.4 × 10 ⁻¹⁷
4	9.40	9.70	10.10	0.050	2.75	1.8 × 10 ¹²	1.5 × 10 ⁻¹⁷
5	9.40	9.75	10.10	0.050	2.75	2 × 10 ¹²	1.4 × 10 ⁻¹⁷

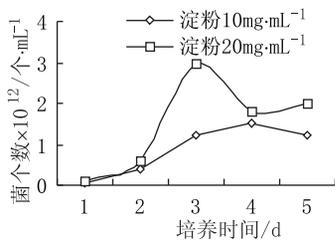


图 3 混合菌在 G1-Cys 培养基中培养 1~5 d 的生长曲线

Figure 3 Growing curve of the bacterial strains in G1-Cys culture medium during the period of day 1~5 day

2. 38×10^{-5} mol(表 2), 转化率达到 82%。

当淀粉浓度增加为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, Cys 的降解率明显降低, 见表 3, 这可能是 Cys 的降解率受到培养

表 4 单菌株的生理生化性能

Table 4 Biochemical and biophysical attributes of the single isolated strain

特性	V-P 反应	过氧化氢酶	氧化酶	淀粉水解	酪蛋白分解	硝酸盐还原	β 半乳糖苷酶	氨基酸脱羧酶	细胞色素氧化酶	尿素酶
C1	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
C2	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
C3	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
C4	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
C5	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
C6	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
C7	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
C8	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+

厌氧, 能分泌多种氧化酶。

4 结论

(1) 恶臭污染的产生是一个复杂的生化反应过程, 决不是一二种有效菌就能够彻底去除的。必须要有多种菌互营共同作用, 形成优势混合菌群, 改变原菌群结构, 抑制恶臭物质的产生, 或者将产生的 H_2S 等尽快氧化成无臭物质。为此选择了以垃圾渗滤液和污泥为原始混合菌种, 经富集和 DMSO 驯化后再进一步筛选分离的技术路线。这样分离出的单一菌能够适应诸如垃圾渗滤液和污泥这样的环境条件, 菌与菌之间能够互营共生, 容易形成优势混合菌群, 高效降解含硫有机物, 降低 COD。其混合菌制剂能够应用于垃圾、垃圾渗滤液、污泥和畜禽粪便等的除臭处理, 市场前景广阔。

(2) 筛选出 C1~C8 单一菌, 通过镜检和生理生化性能测定, 初步确定这 8 株菌均为芽孢杆菌, 好氧或者兼性厌氧, 能分泌多种氧化酶。

(3) C1~C8 组成的混合菌群, 能够把难降解的 DMSO 中的 C-S 键打开, 降解为 H_2S , 并且能够再进一步地把 H_2S 氧化成无臭的 SO_3^{2-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 及 SO_4^{2-}

基中共代谢物的影响^[7]。

3.2.3 H_2S 的氧化产物

把第 5 d 的培养液, 在 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下, 离心 10 min, 用离子色谱测定^[8], 证实培养液中含有 SO_4^{2-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 及 SO_3^{2-} 。这说明在培养过程中 Cys 降解生成的 H_2S 经过混合菌群的作用而被进一步氧化生成多价态的无恶臭的硫化物, 从而达到除臭的目的。

3.2.4 单菌株的生理生化性能

结果见表 4。根据镜检和各种生理生化性能的测定结果, 初步确定混合菌中分离出的 8 株菌均为芽孢杆菌, 他们的共同特征是化能异养菌, 好氧或兼性

等。C1~C8 混合菌群对 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的半胱氨酸降解率可达 78.75%, 对其所产生的 H_2S 转化率则达到 82%。

对于这些混合菌把 DMSO 降解为 H_2S 并把 H_2S 的转化为无臭物质的机理有待进一步实验研究。

参考文献:

- [1] 吴希文, 李秀荣, 黄国强, 等. 恶臭污染影响评价概论[J]. 环境科学动态, 2002, 2: 21-23.
- [2] 林琳. 生物法去除含甲硫醇恶臭气体的机理[J]. 辽宁城乡环境科技, 2000, 20(4): 6-8.
- [3] 谢冰, 史家梁. 微生物法脱臭及其应用[J]. 上海环境科学, 1997, 16(3): 14-16.
- [4] Christian Griebler. Dimethylsulfoxide(DMSO) reduction: a new approach to determine microbial activity in freshwater sediments[J]. *JMicrobiological Methods*, 1997(29): 31-40.
- [5] 国家环保局. 水和废水监测分析方法(第三版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- [6] 杜连洋, 等. 工业微生物学实验技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1992.
- [7] 王爱杰, 任南琪, 黄志, 等. 产酸脱硫反应器中 $\text{COD}/\text{SO}_4^{2-}$ 比制约的群落生态演替规律[J]. 环境科学, 2002, 23(2): 34-38.
- [8] Neil ASmith, Don PKelly. Mechanism of Oxidation of Dimethyl Disulphide by *Thiobacillus thioiparus* Strain E6[J]. *Journal of General Microbiology*, 1988(134): 3031-3039.