

## 高效处理草甘膦废水菌株的筛选\*

王晓星 张丽萍 邹雪熊 俊 黄应平\*\*

(三峡大学生态环境研究中心, 宜昌, 443002)

**摘 要** 通过选择性富集、驯化培养、划线分离纯化, 从三峡大学求索溪及宜昌某化工集团污水处理厂次生池、终生池和排污口 4 处活性污泥中分离得到菌株 XF100, 其中排污口的活性污泥中菌株 XF100 含量最大, 其降解能力最强。经 AP 鉴定, 菌株 XF100 为水生棒状杆菌 (*Corynebacterium aquaticum*)。由单因子优化法实验得出菌株 XF100 降解草甘膦废水的最适条件: 温度为 30℃, pH 为 9.0, 底物浓度为 300 mg · L<sup>-1</sup>。最适条件下草甘膦废水降解率可达 79.46%, 其矿化程度较高。

**关键词** 草甘膦废水, 物理处理与生物降解结合法, 活性污泥。

草甘膦<sup>[1]</sup>的化学名称为 N-膦羧甲基甘氨酸, 属于氨基甲撑膦类含有羧酸基的化合物。草甘膦废水具有浓度高、污染严重的特点, 废水所含的污染物主要有甲醇、甲醛、草甘膦以及盐类等<sup>[1-3]</sup>。如何有效地处理草甘膦废水是一个亟待解决的问题。目前, 国内外已研究出一系列能高效处理草甘膦废水的方法, 如活性炭处理<sup>[2]</sup>、活性氧化铝吸附法<sup>[3]</sup>等物理处理技术及 Fenton<sup>[4, 5]</sup>氧化、镁盐沉淀法、铁炭微电解法和盐单胞菌属 *V. variabilis*<sup>[6]</sup>降解草甘膦法。上述方法, 其施工量大, 设备成本高, 处理结果不理想, 易造成二次污染, 应用有一定局限性。

本文从自然界的活性污泥中筛选到一株能降解草甘膦废水的好氧微生物<sup>[7]</sup>, 经过选择性富集、驯化培养、筛选和纯化的过程, 最终分离筛选出能高效降解废水中高浓度有机物的菌株, 并研究该菌株降解草甘膦废水的最佳降解条件。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种来源

2007 年 11 月, 采集三峡大学求索溪的池塘污泥; 宜昌某化工集团污水处理厂次生池、终生池、排污口污泥作为原始的菌液。废水和 4 处污泥曝气静置 24h 将宜昌某化工集团草甘膦废水 (COD: 95800.00 mg · L<sup>-1</sup>) 稀释 5 倍 (COD: 19160.00 mg · L<sup>-1</sup>) 并在废水中加入一定量的 CaCl<sub>2</sub> (浓度为 634 g · L<sup>-1</sup>)<sup>[8]</sup>, 使得草甘膦沉淀, 充分反应后过滤, 取处理后的草甘膦废水 (COD: 6113.63 mg · L<sup>-1</sup>) 进行生物降解。处理后的草甘膦废水主要理化性质为: 乳白色、无刺激性气味、碱性、BOD: 73.2 mg · L<sup>-1</sup>、COD: 6113.63 mg · L<sup>-1</sup>。

### 1.2 培养基组成

富集培养基 (g · L<sup>-1</sup>)<sup>[9]</sup>: 蛋白胨, 1.0; 葡萄糖, 5.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; NaCl, 2.5; pH 7.0—7.2

无机盐培养基 (g · L<sup>-1</sup>)<sup>[9]</sup>: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2; CaCl<sub>2</sub>, 0.1; NaCl, 0.2; MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 痕量; 质量分数 10% 的 FeSO<sub>4</sub> 溶液 1 滴; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1.0g; 处理后的草甘膦废水按一定体积 (10、15、30ml) 加入作为微生物生长的惟一碳源; 用质量分数为 10% 的 NaOH 溶液调节 pH 为 7.0; 固体培养基加质量分数为 1.5%—2.0% 的琼脂。

牛肉膏蛋白胨培养基 (g · L<sup>-1</sup>)<sup>[9]</sup>: 牛肉膏, 5.0; 蛋白胨, 10; NaCl, 2.5; pH 7.0; 琼脂

2009 年 4 月 9 日收稿。

\*湖北省优秀中青年团队研究项目 (T200703)、湖北省青年杰出人才基金 (2005ABB030) 及湖北省教育厅自然科学重大资助项目 (2004x001) 资助。

\*\*通讯作者, Tel: 0717-6397488; E-mail: huangyp@ctgu.edu.cn

1.5%—2.0%.

### 1.3 菌株的富集驯化

菌株的富集：在 4 个 250ml 的锥形瓶中，每个都加入 30ml 富集培养基，处理后的草甘膦废水 10ml，分别再加入四处污泥各 10ml (共计 50ml)，置于摇床中，30℃ 恒温振荡培养 3d

菌株的驯化：在 250ml 的锥形瓶中加入已灭菌的无机盐培养液 (30、25、10ml)，再分别加入培养液 10ml，4d 为一个驯化周期。处理后的草甘膦废水 + 三峡大学求索溪的池塘污泥；处理后的草甘膦废水 + 次生池污泥；处理后的草甘膦废水 + 终生池污泥；处理后的草甘膦废水 + 排污口污泥。在无菌条件下加入处理后的草甘膦废水，体积由 10ml、15ml 逐渐递增到 30ml，置于摇床中 30℃ 恒温振荡培养，进行三个周期的驯化。每个驯化周期结束后，测定每瓶培养液的 COD 值，计算降解率。每组取平行样中处理后的草甘膦废水降解率最高的培养液作为下一次驯化的接种源。

经过了三个周期的驯化，在无菌条件下，取处理后的草甘膦废水降解率最高的培养液在无机盐平板 (处理后的草甘膦废水与无机盐培养液体积比为 3:2) 上涂布，30℃ 恒温培养，挑取单菌落，反复划线分离纯化，得到单一菌落。将所得到的菌株接种于牛肉膏蛋白胨斜面上，4℃ 冰箱保存。

### 1.4 菌株降解处理后的草甘膦废水的最佳条件实验

挑取菌落，制成菌悬液，无菌条件下接种于含处理后的草甘膦废水的无机盐培养液中 (总体积为 50ml)，每次确定一个因子为变量 (温度、pH、底物浓度)，其它因素不变，摇床中恒温振荡培养 4d 后，测定培养液 COD，确定菌株最佳降解条件。

在菌株最佳降解条件下，以 10% 的接种量接入含处理后的草甘膦废水的无机盐培养液中，恒温振荡培养。每隔一定的时间取培养液，测定培养液中残留的 COD，计算其降解率，得到降解曲线。

### 1.5 菌株降解能力的测定

测定菌株培养过程中草甘膦废水的 COD，以草甘膦废水的降解率表示菌株的降解能力。降解率 (%) =  $(A - B) / A \times 100\%$ 。A: 菌株培养前的废水 COD; B: 菌株培养一定时间后的废水 COD。

## 2 结果与讨论

### 2.1 驯化

由图 1 可以看出，第二次驯化排污口污泥中的微生物降解处理后的草甘膦废水效果最好，降解率达 84.41%。利用该培养液进行多次平板分离，筛选出单一菌株。研究此菌株对处理后的草甘膦废水的耐受浓度和其降解废水的最佳降解条件。

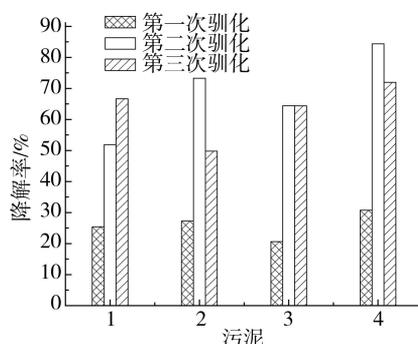


图 1 驯化结果

(1 三峡大学求索溪的池塘污泥; 2 宜昌某化工集团污水处理厂次生池污泥; 3 终生池污泥; 4 排污口污泥)

Fig. 1 The results of domestication

### 2.2 菌株降解处理后的草甘膦废水的最佳条件实验

#### 2.2.1 温度对菌株降解处理后的草甘膦废水的影响

在不同的培养温度 (15、20、25、30、35、40) 下恒温振荡培养，得出在不同温度条件下菌株降

解处理后的草甘膦废水的降解曲线。6组不同温度下菌株降解处理后的草甘膦废水的情况见图2。从图2可以看出，随着温度的增高，降解率随之增大，30℃时降解率达到最大，之后开始下降；因此30℃是最佳降解温度。这是因为生物细胞所有生化反应都是有酶催化完成的，酶的活性是随着温度的增大而升高的。当温度超过最适温度范围后，酶就逐渐失活、变性，在相同时间内降解率就下降。

### 2.2.2 pH对菌株降解处理后的草甘膦废水的影响

在不同的pH(4、5、6、7、8、9、10、11)下恒温振荡培养，测定培养液的COD，得出在不同pH条件下菌株降解处理后的草甘膦废水的降解曲线。8组不同pH条件对应菌株降解处理后的草甘膦废水的情况见图3。从图3可以看出，pH为9.0时降解率达到最大，降解率为86.53%，因此最佳降解pH为9.0。这说明该菌株较适应于碱性环境，过酸或者中性都不适合于生长。

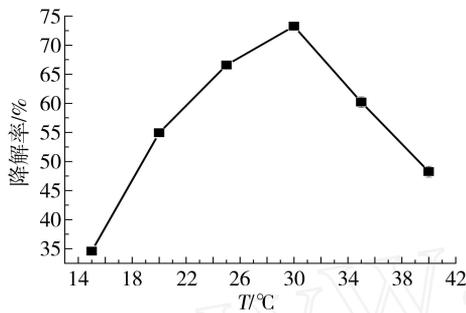


图2 温度对菌株降解处理后的草甘膦废水的影响

Fig. 2 Effect of temperature on degradation of glyphosate strains

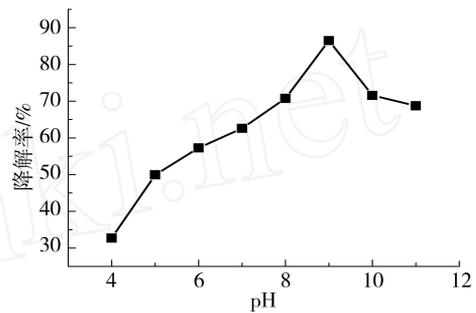


图3 pH对菌株降解处理后的草甘膦废水的影响

Fig. 3 Effect of pH on degradation of glyphosate strains

### 2.2.3 底物浓度对菌株降解处理后的草甘膦废水的影响

将菌悬液10ml加入不同体积(5、10、15、20、25、30、35、40ml)的滤液中，测定培养液的COD，得出在加入不同底物浓度下菌株降解处理后的草甘膦废水的降解曲线。8组不同底物浓度对菌株降解处理后的草甘膦废水的情况见图4。从图4可以看出，当处理后的草甘膦废水为15ml(培养液总体积为50ml)，降解比较完全，降解率达80.43%。说明在此浓度范围内该菌株能够较完全地利用处理后的草甘膦废水来进行自身的繁殖，因为培养液的惟一碳源和能源是处理后的草甘膦废水，在此浓度范围内菌株并没有受到毒害作用；当处理后的草甘膦废水超过15ml时，降解率逐渐下降。

### 2.3 处理后的草甘膦废水的降解曲线

由上述实验可知，菌株XF100降解处理后的草甘膦废水的最佳降解条件为：温度30℃、pH为9.0、当底物浓度为300ml·l<sup>-1</sup>时，降解比较完全。在菌株XF100最佳生长条件下，测定处理后的草甘膦废水的降解曲线。每隔10h测定培养液COD。处理后的草甘膦废水降解率随时间的变化见图5。

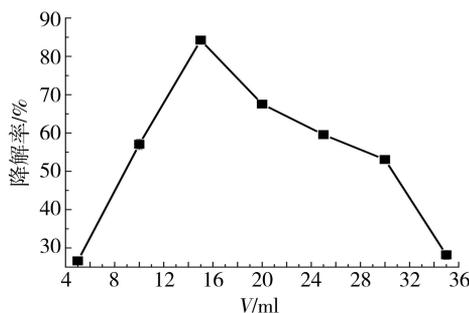


图4 底物浓度对菌株降解处理后的草甘膦废水的影响

Fig. 4 Effect of substrate concentration on degradation of glyphosate strains

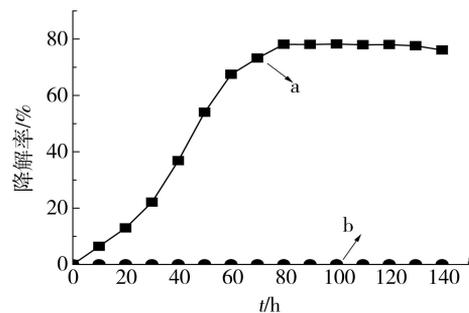


图5 处理后的草甘膦废水降解曲线(a)和空白实验(b)

Fig. 5 The degradation of glyphosate wastewater on optimal conditions(a) and a blank experiment(b)

从图5可看出，在前80h内，菌株XF100对处理后的草甘膦废水的降解效果明显，菌株处于迅速

繁殖增长的阶段, 即是微生物的对数生长期. 在 80h 的时候, 处理后的草甘膦废水降解率达到 78.14%, 而后随着降解时间的延长, 降解率增长缓慢, 菌株 XF100 处于稳定的生长期. 由于过长的降解时间不但增加处理成本, 而且不利于实际应用. 所以, 选取菌株 XF100 降解处理后的草甘膦废水的最佳时间为 80h. 空白实验证明了处理后的草甘膦废水的降解完全是微生物利用消耗的结果.

#### 2.4 菌株的鉴定结果

XF100 菌株镜检形态为杆状, 革兰氏染色阴性. 为了确定其分类利用 API 细菌鉴定系统, XF100 菌株用 API Coryne 试条鉴定为水生棒状杆菌 (*Corynebacterium aquaticum*).

### 3 结论

经过选择性富集、驯化培养、分离纯化得到了一株在好氧条件下对处理后的草甘膦废水有较强降解能力的菌株 XF100, 能以处理后的草甘膦废水为惟一碳源. 从形态和生理生化特征上初步鉴定属于水生棒状杆菌属. 由单因子优化法实验得出菌株 XF100 降解处理后的草甘膦废水的最适条件为: 温度为 30, pH 为 9.0, 底物浓度为  $300\text{ml} \cdot \text{l}^{-1}$ . 最适条件下处理后的草甘膦废水降解率可达 79.46%, 菌株 XF100 能将废水中的有机物进行矿化.

#### 参 考 文 献

- [1] Romina C P, Rosa M T S, María D S A, Glyphosate Behavior at Soil and Mineral-Water Interfaces [J]. *Environmental Pollution*, 2008, 153 (1) 53—59
- [2] 沈丽静, 乐清华, 杨毓智等, 活性炭处理草甘膦废水的静态吸附研究 [J]. *化学工程师*, 2006, 133 (10) 47—49
- [3] 彭波, 王黎之, 李艳荣, 活性氧化铝吸附法处理草甘膦废水的研究 [J]. *化学工业与工程技术*, 2007, 28 (1) 44—47
- [4] Zhao Chao, Huang Ying-Ping, Fang Yan-Fen et al., Visible Light-Induced Degradation of Organic Pollutants Using Fe( ) Supported on Silica Gel as an Effective Catalyst [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2008, 53 (10) 1497—1502
- [5] 赵超, 黄应平, 方艳芬等, 异相 Fenton 光催化对有毒有机污染物的降解 [J]. *分析科学学报*, 2007, 23 (3) 273—276
- [6] Amoro I, Alonso J L, Romaguera S et al., Assessment of Toxicity of a Glyphosate-Based Formulation Using Bacterial Systems in Lake Water [J]. *Chemosphere*, 2007, 67 (11) 2221—2228
- [7] 黄应平, 方艳芬, 杜小春等, 高效降解苯酚和苯胺菌株的选育 [J]. *武汉大学学报 (理学版)*, 2007, 53 (6) 748—752
- [8] 徐明礼, 崔世海, 王玉萍等, 草甘膦废水的预处理与综合利用 [J]. *南京师范大学学报 (工程技术版)*, 2007, 7 (1) 51—53
- [9] 张艺, 李义勇, 李瑞萍等, 微生物降解麻醉药品生产废水的实验研究 [J]. *环境工程学报*, 2008, 2 (6) 780—784

## SELECTON OF STRAIN TREATING GLYPHOSATE WASTEWATER EFFICIENTLY

WANG Xiao-xing    ZHANG Li-ping    ZOU Xue    XIONG Jun    HUANG Ying-ping

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, China Three Gorges University, Yichang, 443002, China)

#### ABSTRACT

Glyphosate wastewater adding a certain concentration of  $\text{CaCl}_2$  for pretreatment, treated wastewater for biodegradation. Strain XF100 was isolated from the activated sludge of Qiusuo River in Three Gorges University, secondary pool, final pool and outfall of sewage treatment works in the Chemical Group through selective enrichment, domestication, crossed separation and purification. It have the largest content in outfall of sewage treatment works in the Chemical Group and the best degradation. It is preliminary identified as *Corynebacterium aquaticum* through API. The optimum conditions of strain XF100 degradation: temperature 30, pH9.0, wastewater concentration  $300\text{ml} \cdot \text{l}^{-1}$  by the single factor experimental. In this condition, glyphosate wastewater degradation rate reaches up to 79.46%. The mineralization degree is the highest.

**Keywords:** glyphosate wastewater, physical treatment and biodegradation, activated sludge.