

# 石油烃降解细菌应用于中试反应器 处理油污压舱水的研究

魏 婷<sup>1</sup> 何敬愉<sup>2</sup> 何彩云<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

<sup>2</sup>(广州中国科学院先进技术研究所 广州 511458)

**摘 要** 石油污染压舱水盐度高、成分复杂且常含有毒物质,因此对这种污水的处理,尤其是在较大体积的情况下十分困难。针对这一问题,该文通过利用海洋来源的石油烃降解菌株构建人工菌群的方法,进行生物强化,从而提高油污压舱水的处理效率。先后分别在简单的 500 L 金属槽和特殊设计的 600 L 中试生物反应器中进行了预实验和正式处理实验,处理过程中持续检测总石油烃含量,并通过变性梯度凝胶电泳和 Illumina 高通量测序仪对处理体系中的菌群结构变化进行监测。两次试验中总石油烃降解效率分别达 70%、90% 以上,且初始的人工菌群结构发生了重组,最终形成以 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (除烃海杆菌)、*Acinetobacter venetianus* (威尼斯不动杆菌) 和 *Alcanivorax dieselolei* (柴油食烷菌) 为优势种的新菌群。综上,该文提出的采用海洋石油烃降解细菌构建人工菌群用于生物强化,是一种潜在的能够有效提高大体积石油污染压舱水处理效率的方法。

**关键词** 人工菌群; 生物强化; 石油污水; 石油烃降解; 中试反应器

中图分类号 TG 156 文献标志码 A

## Application of Hydrocarbon-Degrading Bacterial Strains in Pilot-Scale Treatment of Oil-Polluted Ballast Bilge Water

WEI Ting<sup>1</sup> HE Jingyu<sup>2</sup> HE Caiyun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

<sup>2</sup>(Guangzhou Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 511458, China)

**Abstract** Oil-polluted bilge water is difficult to treat, especially in large scale, due to its high salinity, complicated composition and toxicity. To improve the efficacy of ballast bilge water treatment, an artificial bacterial consortium including nine petroleum degrading strains previously screened from petroleum-polluted ocean waters was applied as bioaugmentation agent. A trial run was firstly completed in a 500 L tank, following which a second run was carried out in a specially designed 600 L bioreactor. The total petroleum hydrocarbons were analyzed to evaluate the efficacy of treatment. Moreover, potential changes in the structure

收稿日期: 2018-04-15 修回日期: 2018-04-24

基金项目: 深圳市科创委基础研究项目 (JCYJ20150521144320992、JCYJ20170307163830109); 国家自然科学基金项目 (31500104); 广东省自然科学基金项目 (2015A030313745、2015A030310123、2015A03030310471); 广州南沙区科技计划技术开发项目 (2016KF022)

作者简介: 魏婷 (通讯作者), 博士, 研究方向为合成生物学, E-mail: ting.wei@siat.ac.cn; 何敬愉, 博士, 研究方向为分析化学与中药学; 何彩云, 硕士, 研究方向为合成生物学。

of bacterial consortia during treatment were monitored with denaturing gradient gel electrophoresis and Illumina HiSeq 2000 sequencing. In the first trial run, the oil-removal efficiency was approximately 70%, while in the second run performed in specially designed bioreactor, the efficiency of oil degradation was increased to over 90%. In both runs, the artificial bacterial consortium was reconstituted during the acclimation process immediately before the treatment, and then stabilized and predominated by three strains, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Acinetobacter venetianus*, and *Alcanivorax dieselolei*, throughout the following several months of treatment. Overall, this work suggests that bioaugmentation with the artificial bacterial consortium composed of hydrocarbon-degrading strains could provide a promising solution to the treatment of oil-polluted ballast bilge water in large scale.

**Keywords** artificial bacterial consortium; bioaugmentation; oil sewage; petroleum degradation; pilot-scale bioreactor

## 1 引 言

海洋石油污染主要来自海上溢油、漏油事故和船舶油污水的排放。其中,船舶油污水主要由船舶压舱水、含油洗舱水和机舱水构成。海上船舶油污水通常由油污接驳船与油轮、油气船直接接洽收集,转移至陆地后集中进行原油回收和油污处理。虽然部分原油被回收,但船舶油污水中残留的石油烃浓度依然远远超过排放标准的要求,这些残留在高盐度船舶油污水中的石油烃,正是各船舶石油污水处理企业亟待解决的难题<sup>[1]</sup>。与物理或化学的原位处理相比,采用微生物菌剂处理海洋石油污水,具有多个方面的优势<sup>[2]</sup>:(1)石油污染物降解彻底,且不会造成二次污染;(2)无可燃性,使用安全、方便,操作简单;(3)成本低廉、无腐蚀性;(4)环境适应性强,可适用于不同的温度条件,并可耐受高盐环境;(5)适用范围广。微生物处理石油污水,其核心在于石油烃微生物降解菌剂,开发高效、稳定的降解菌剂是海洋石油污水处理的基础和关键。

目前,分离鉴定的石油烃降解微生物已有 100 余属 200 多种以上。其中,细菌主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、节杆菌属

(*Arthrobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、微球菌属(*Micrococcus*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)等<sup>[3,4]</sup>。这些细菌能够以石油烃为碳源进行生长代谢,有些还可以产生生物表面活性剂,将疏水性油污成分分散开来,促进其降解<sup>[4,5]</sup>。国内对海洋石油污水处理及高盐环境下石油烃降解微生物的筛选已做了一定的工作。郑洲等<sup>[6]</sup>从 385 株南极海洋细菌中筛选出 1 株假交替单胞菌和 1 株科尔韦尔氏菌,二者在 15℃ 时对柴油的降解率分别达 43.95%、62.47%。林学政等<sup>[7]</sup>从中国第二次北极科考采集的海洋沉积物中分离筛选了 26 株石油降解菌,结果表明其中 3 株对原油的降解率可达 30%~50%,分离到的石油烃降解菌以假交替单胞菌属为优势菌群,占 42%。然而,这些研究都只停留在菌种筛选的实验室研究阶段,离技术产业化尚有不小的距离。

石油烃成分非常复杂,尚没有任何一种已知微生物能降解石油中的所有组分。国际上有研究表明,与单菌株降解相比,复合菌群能降解更宽范围的石油烃。Deppe 等<sup>[8]</sup>研究了北极海域中分

离的 9 株细菌的共生体对原油的降解潜力, 结果表明细菌共生体可以降解不同的烷烃, 包括直链烷烃、支链烷烃和芳烃, 原油总降解率达 77%。Sathishkumar 等<sup>[9]</sup>从加油站附近被石油产品污染的环境中分离出 57 株石油烃降解菌, 并比较了复合菌群和单菌株对原油的降解效果发现, 复合菌群的降解率可达 77%, 而单菌株最高的仅达 69%。因此, 复合菌群是石油烃污染物处理的理想工具。国际上, 对于海洋石油污水处理复合菌剂的研发已取得了巨大突破, Bio-Green、Microlife 等公司成功研发出了石油降解菌剂产品, 并在石油污水及海洋石油污水处理中得以应用。国外的产品不仅价格高昂, 而且菌剂产品在本地使用存在适应性问题, 与本地含油污水中土著微生物菌种之间很有可能会发生拮抗。由此可见, 在中国巨大的石油污水处理市场上, 亟待在高效处理菌剂的设计与构建技术方面寻求突破。目前报道过的研究大部分局限在实验室规模, 且多采用陆地来源的菌种或仅使用原油中的某些组分化合物进行降解实验, 对实际的大规模海洋石油污水处理指导意义有限。本文通过利用海洋石油烃降解细菌构建人工菌群用于生物强化, 在中试规模下对来源于污水处理企业的原油污染压舱水进行处理, 以期获得更加接近实际工厂处理的效果。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 菌株

应用于本文的石油烃降解菌株(如表 1 所示)均来自中国沿海及太平洋海域被石油污染的海水和深海泥样, 经筛选及鉴定后, 保存于国家海洋局第三海洋研究所及中国海洋微生物菌种保藏中心(MCCC)。这些菌种来源于受石油污染的海洋污水环境, 能够以石油烃为碳源进行生长和代谢。前期研究已表明, 这些菌种具有较好的石油烃降解能力或生产生物表面活性剂的能力, 且具有一定的嗜盐性, 能够耐受浓度为 0.5%~3.0% 的盐度变化<sup>[10-18]</sup>, 因此被应用于本文中高盐、高石油烃含量的污水处理。

#### 2.1.2 培养基与培养条件

(1)M2 培养基(用于培养菌株 HD1、HD5、HD9): 5.0 g 醋酸钠(CH<sub>3</sub>COONa), 0.5 g 胰蛋白胨, 0.5 g 酵母提取物, 0.5 g 葡萄糖, 0.5 g 蔗糖, 0.05 g 柠檬酸钠, 0.05 g 苹果酸, 1.0 g 硝酸铵(NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), 0.2 g 氯化铵(NH<sub>4</sub>Cl), 0.5 g 磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 为 7.8。人工海水配制如下: 24 g 氯化钠(NaCl), 11 g 六水合氯化镁(MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), 4 g 硫酸钠(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2 g 二水合氯化钙(CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O), 0.7 g 氯化钾(KCl), 0.1 g

表 1 本文中用于石油污水处理的菌株

Table 1 The bacterial strains applied to oil sewage treatment in this study

编号	菌株号	MCCC 保藏号	菌种	来源
HD1	B5	1A08177	<i>Alcanivorax dieselolei</i> (柴油食烷菌)	大西洋 (中国分离)
HD2	S13-9	1A08173	<i>Alcanivorax jadensis</i> (亚德食烷菌)	大西洋 (中国分离)
HD3	S19-9	1A00001	<i>Alcanivorax dieselolei</i> (柴油食烷菌)	中国
HD4	S19-12	1A08174	<i>Alcanivorax venustensis</i> (优雅食烷菌)	大西洋 (中国分离)
HD5	DLFJ3-6	1A03971	<i>Alcanivorax borkumensis</i> (泊库岛食烷菌)	中国
HD6	AS-3	1A00102	<i>Pseudomonas pachastrellae</i> (海绵假单胞菌)	中国
HD7	Wp02421	1A00294	<i>Acinetobacter venetianus</i> (威尼斯不动杆菌)	太平洋 (中国分离)
HD8	S13-6	1A08617	<i>Alteromonas macleodii</i> (麦氏交替单胞菌)	大西洋 (中国分离)
HD9	DLFJ7-4	1A03982	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> (除烃海杆菌)	中国

溴化钾(KBr), 0.03 g 硼酸( $H_3BO_3$ ), 5.0 mg 偏硅酸钠九水合物( $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ ), 0.04 g 六水合氯化锶( $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ ), 3.0 mg 氟化钠(NaF), 2.0 mg  $NH_4NO_3$ , 1.0 mg 二水合磷酸铁( $FePO_4 \cdot 2H_2O$ ), 1 000 mL 去离子水, pH 为 7.8。

(2) 2216L 培养基(用于培养菌株 HD2、HD7): 1.0 g  $CH_3COONa$ , 10 g 胰蛋白胨, 2 g 酵母提取物, 0.5 g 柠檬酸钠, 0.2 g  $NH_4NO_3$ , 0.5 g  $KH_2PO_4$ , 1 000 mL 人工海水, pH 调整为 7.4~7.6。

(3) HLB 培养基(用于培养菌株 HD6): 5.0 g 酵母提取物, 10 g 胰蛋白胨, 30 g NaCl, 1 000 mL 去离子水, pH 为 7.8。

(4) LB 培养基(用于培养菌株 HD3、HD4、HD8): 5.0 g 酵母提取物, 10 g 胰蛋白胨, 10 g NaCl, 1 000 mL 去离子水, pH 为 7.8。

石油烃降解菌株在上述培养基中于 30℃ 过夜培养至稳定期后用于污水处理实验。

### 2.1.3 高盐含油污水

本文所采用的高盐船舶油污水来自广东省深圳市从事海洋船舶油污水回收的企业——龙善环保实业科技有限公司。相关污染物含量测定参照国家相关标准(GB8978-1996)进行。

## 2.2 方法

### 2.2.1 含油污水处理实验

预实验采用体积为 500 L 的简易金属桶进行。首先, 将来自龙善环保公司污水池中的活性污泥(5 L)接种到金属桶中, 同时加入 30 L 海水, 并进行连续曝气一周。在此期间, 每 2 天加入营养物质, 包括 100 g  $NH_4NO_3$ , 10 g  $KH_2PO_4$ , 0.4 g 氯化亚铁( $FeCl_2$ )和 100 g 小麦面粉, 以改善污泥活性。然后, 将上述 9 种石油烃降解菌接种至曝气桶中, 持续驯化 1 个月以保证菌群充分生长之后加入高盐船舶油污水, 将体系扩大至 200 L 再次驯化。在此期间, 连续曝气, 并每 2 天加入上述同样的营养物质, 驯化约 1 周。最

后, 相同体积的 9 种细菌过夜培养物被再次接种至曝气桶中, 并继续添加高盐船舶油污水至总体积达 500 L, 重复驯化过程且每 2 天加入上述同样的营养物质, 持续 1 周。驯化基本完成后开始正式处理, 高盐船舶油污水被连续泵入系统中进行处理, 在处理系统中的保留时间不低于 6 天。在驯化和处理过程中, 适时取样约 1.5 L 并检测水质情况。

为了获得更好的处理效果, 在上述 500 L 金属桶处理结果的基础上, 我们设计了一个总体积为 600 L 的连续流石油污水处理反应器。该反应器由曝气沉砂池、间隙式曝气池、沉淀池 3 个主要部分组成, 分别用于气浮沉沙、石油污染降解和污泥沉降。首先, 石油污水被持续泵入后, 相继流过曝气沉砂池、好氧曝气池和污泥沉淀池。在曝气沉砂池中, 从池底持续通入空气, 污水中的部分细小油滴持续被气泡带到隔油沉砂池表面后, 通过机械刮取收集并进行回收。与此同时, 污水中的沙粒与其他固体污染物沉淀至沉砂池底部, 并通过底部的阀门定期排出。然后, 石油污水进入好氧曝气池中, 进行间歇性曝气, 实现好氧和厌氧的交替处理, 石油污染物的生物降解主要在该部分进行。最后, 污水同活性污泥一起流入污泥沉淀池中, 经过一定的停留时间, 活性污泥在沉淀池中沉降, 上层处理水则流出反应器。该反应器由不锈钢框架、耐腐蚀的有机板材、管道和阀门组成。反应器安装完毕后, 首先取 50 L 来自污水处理公司的活性污泥, 接种到含 200 L 高盐船舶油污水中, 同时加入 2.2.1 节预实验中提及的营养物质(100 g  $NH_4NO_3$ 、10 g  $KH_2PO_4$ 、0.4 g  $FeCl_2$  和 100 g 小麦面粉), 并连续进行曝气。1 周后, 加入等体积的 9 种石油烃降解菌过夜培养物, 每株菌 2 L。2 天后, 将约 250 L 的高盐船舶油污水加入处理系统中, 将系统放大至 600 L, 并将污水流入速度调至 15~18 L/h, 污水在系统中的保留时间约 6 天。在菌种接种后的

前 2 周驯化期间, 每 2 天加入上述提及的营养物质, 并连续曝气确保菌群充分生长, 此后为正式处理。在驯化期和处理期内, 对间歇式曝气池和沉淀池中的水进行取样分析, 并对进出水取样进行水质分析。

### 2.2.2 脱氧核糖核酸提取与 16S rRNA 扩增

首先, 采用 PowerSoil 脱氧核糖核酸(DNA)提取试剂盒(MOBIO, 美国)对污泥样品的基因组 DNA 进行提取, 并以此为模板, 对细菌 16S rRNA(核糖核酸)基因 V3 区进行扩增。引物为 338F(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')和 518R(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'), 带有一段 GC 链(GC338F, 5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGG CGG GGC GGG GGC GCG GGG GG CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')。然后, 采用琼脂糖凝胶检测聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)产物, 并用变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)分析 PCR 克隆产物, 制胶流程参照厂家说明书。其中, 电泳温度为 60℃, 起始电压为 30 V, 30 min 后, 调整为 100 V, 电泳过夜。最后, 采用溴乙啶染色后, 紫外成像分析电泳结果。

### 2.2.3 菌群结构分析

将收集的污水样品采用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 采用干冰冷冻处理过滤截留的样品, 并迅速研磨样品。加入 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)-STE(SDS-STE)缓冲液后沸水浴处理。经过乙酸钠、乙醇沉淀及酚氯仿洗涤离心处理后, 获取 DNA 沉淀。由华大基因采用 Illumina 测序仪(HiSeq 2000, Illumina)进行高通量基因测序; 使用软件 MOTHUR v.1.33.3 进行生物信息学分析。进行序列比对时, 将匹配度差的序列, 即 99% 以上的碱基无法进行匹配的序列进行了排除, 再将余留序列中存在嵌合的序列进行排除后, 将相似性在 97% 以上的序列聚集为一个分类单元。每一个分类单元通过比对已有的 16S rRNA 数据

库 SILVA v.102, 以相似性 ≥80% 为基准分入特定分类项。此后, 一些在二代次序中经常出现的被认为是污染物的分类单元也被去除。通过使用 MOTHUR 程序内置的“summary”或“single”命令分析基于每个样本的均匀度指数、多样性以及丰度等指数。其中, 均匀度指数通过使用辛普森(Simpson)均匀度指数方法来计算; 多样性由逆辛普森指数及香农(Shannon)指数计算得出; 丰度值由 Chao 丰度指数计算方法求得。本文中所得到的 Illumina 序列已提交到美国国立生物技术信息中心(NCBI)高通量测序数据库中保存, 登记号为 SRP093444。

### 2.2.4 反应器中污水样品水质分析方法

水样品中的化学需氧量(Chemical Oxygen Demand, COD)和总石油烃(Total Petroleum Hydrocarbons, TPH)的分析参照相关国家标准(GB8978-1996)执行。其中, COD 的分析采用碘化钾/碱性高锰酸钾法测定, 该方法可以避免污水中大量氯离子的干扰。将样品在高锰酸钾溶液中沸水浴处理 30 min, 残留的高锰酸根则用等体积的碘化钾还原, 未反应的碘离子则用硫代硫酸钠溶液平衡滴定。总石油烃的浓度则采用红外分光光度法分析, 测定波长分别为: 2 930 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>2</sub>-基团中的 C-H 键)、2 960 cm<sup>-1</sup> (-CH<sub>3</sub>基团中的 C-H 键)和 3 030 cm<sup>-1</sup> (芳香环中的 C-H 键)。

## 3 实验结果

### 3.1 石油污水生物处理预实验

预处理污水流程图如图 1(a)所示。驯化完成后, 取样分析了水样中的 COD 和 TPH 含量。结果显示, 经过处理后, 石油污水中的总石油烃含量从 480.4 mg/L 降至 147.3 mg/L, 石油烃降解率约 70%, 与此前提供该污水样品的企业的处理效率(40%)相比有了显著提高。另外, 对上层浮油

和上层处理水样品中的细菌基因组进行了提取,并对基因组 16S rRNA 序列 V3 区进行扩增和变性梯度凝胶电泳分析,结果如图 1(b)、(c)所示。其中,中层水和上层浮油中的菌群结构如图 1(b)中泳道 5 和 6 所示。阳性对照(来自所接种菌种的纯培养物)分别在泳道 1~4 和 7~11 中。代表细菌 *Pseudomonas pachastrellae* (HD6)、*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (HD9)、*Acinetobacter venetianus* (HD7) 和 *Alcanivorax dieselolei* (HD1) 的 4 个阳性对照条带 3、7、8、9,相应的 PCR 产物条带也能在泳道 5 和 6 中比对得到。在驯化完成后的 2 周内,我们对中层水样品

的菌群结构做了持续分析,结果显示在持续分析的 2 周内,中层水样中菌群结构基本维持不变。

### 3.2 连续流生物反应器的设计及其石油污水生物处理效果

基于过去对连续流生物反应器的相关研究成果,我们设计了一台连续流生物反应器,试图利用已有的石油烃降解菌进行高盐石油烃污水的处理。该反应器的结构及处理流程如图 2(a)所示。驯化持续 2 周后,随机取样反应器流入水和排出水,并连续监测 3 个月。图 2(b)显示,进水中的 COD 含量在 1 800~3 000 mg/L 波动,而出水中的 COD 含量则降低至 508~112 mg/L。此外,

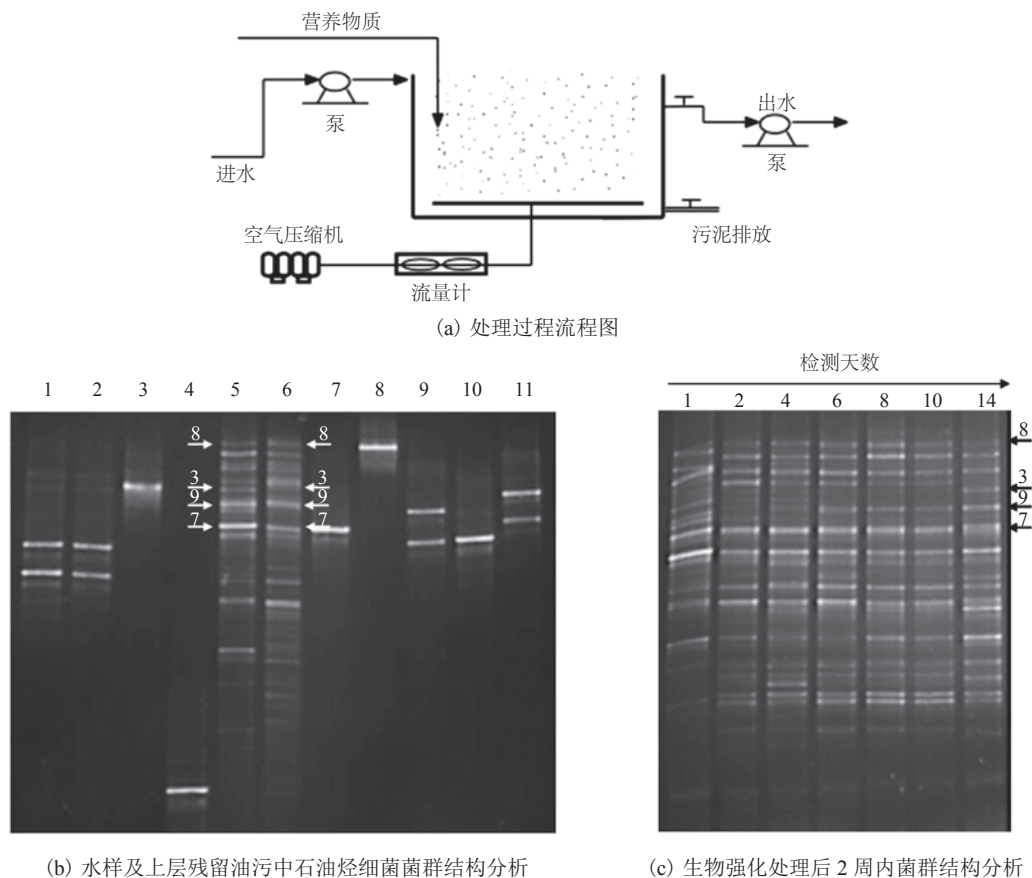


图 1(b) 中泳道 1~11 分别表示: 1. *Alcanivorax venustensis* (优雅食烷菌); 2. *Alcanivorax jadensis* (亚德食烷菌); 3. *Pseudomonas pachastrellae* (海绵假单胞菌); 4. *Fabibacter halotolerans* (耐盐豆杆菌); 5. 中层水样中的菌群; 6. 上层油样中的菌群; 7. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (除烃海杆菌); 8. *Acinetobacter venetianus* (威尼斯不动杆菌); 9. *Alcanivorax dieselolei* B5 (柴油食烷菌); 10. *Polaribacter dokdonensis* (极地杆菌); 11. *Alcanivorax borkumensis* (泊库岛食烷菌); 图 1(c) 中右侧箭头及相应数字指示的条带对应于图 1(b) 中相应泳道中的条带

图 1 500 L 槽中污水处理实验水质及微生物菌群分析

Fig. 1 Analysis of the wastewater and the microbial consortium during wastewater bioaugmentation in a 500 L tank

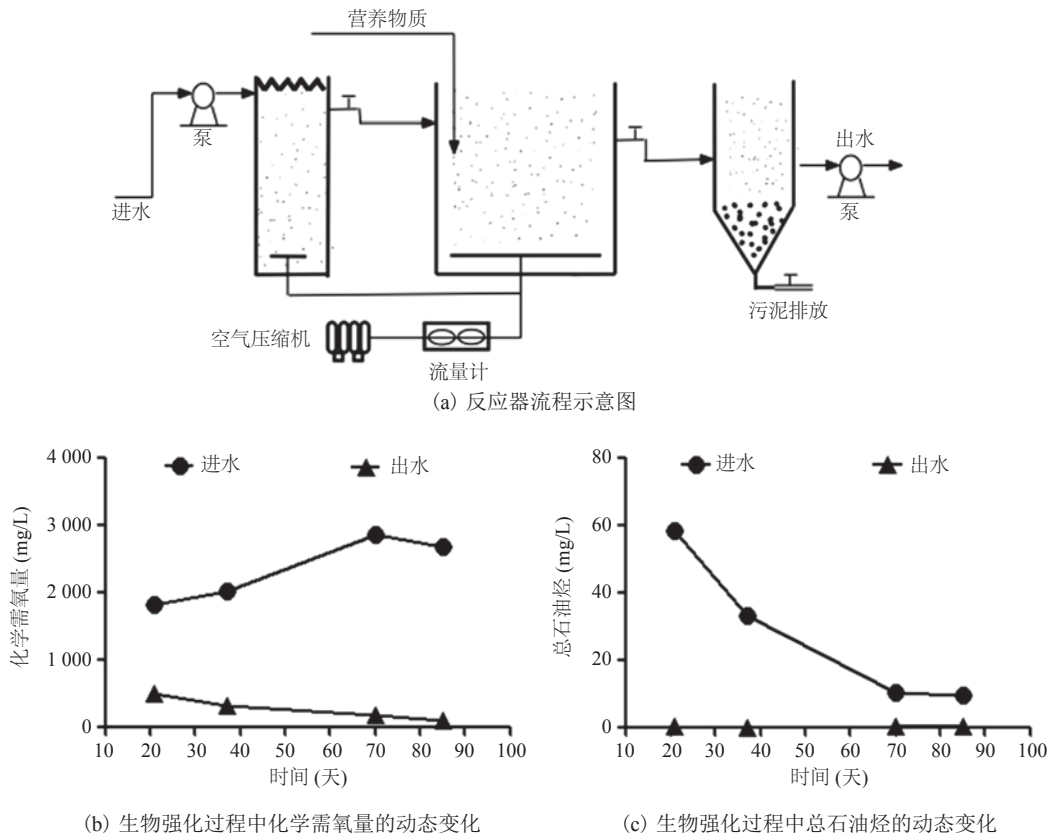


图2 600 L 连续流生物反应器生物强化处理污水示意图及其进出水质分析

Fig. 2 Analysis of the effluent during wastewater bioaugmentation in the 600 L continuous-flow bioreactor

COD 含量在菌群定植 2 个月后, 降低了 95% 左右。由图 2(c)可以看出, 进水中的 TPH 含量为 58.39~9.52 mg/L, 经处理后, TPH 含量显著降低, 出水中的 TPH 含量均低于 2.0 mg/L, 低于广东省地方排放标准对石油烃含量的规定 (8.0 mg/L)。该反应器对石油烃的降解率超过 90%。

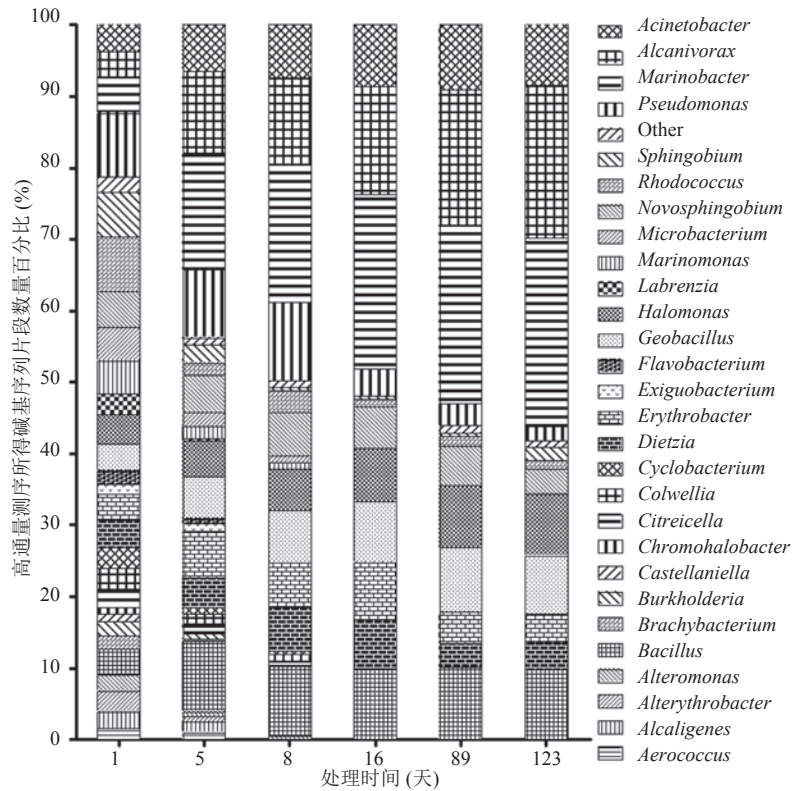
### 3.3 菌群结构分析

通过高通量测序, 对正式处理实验中, 驯化后第 1、5、8、16、89 和 123 天反应器中的菌群结构进行了详细分析, 结果如图 3 所示。反应器中的细菌菌群多样性随着时间的推移逐渐降低。能够检测到的分类单元数量从第 1 天的 682 降低至第 16 天的 286, 并在随后几个月内降低至 186。该结果表明, 在初始的几周内, 反应器中的菌群结构发生着显著的重构, 且随着时间的推移, 后续人工添加的菌种所在的属逐渐替代了反

应器中的其他细菌属, 在菌群中占据主导地位。

### 3.4 人工菌群的定植分析

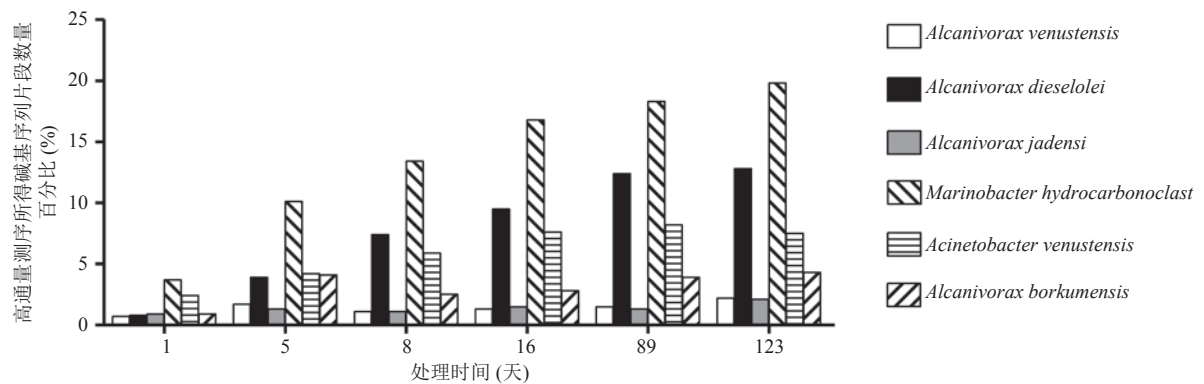
将高通量测序分析所得的序列 (Read) 与人工添加的石油烃降解细菌 16S rRNA 基因全长序列进行了比对, 匹配的序列比例如图 4 所示。在 4 个月的实验中, *Alcanivorax venustensis*、*Alcanivorax jadensis*、*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*、*Acinetobacter venetianus*、*Alcanivorax Dieselolei* 及 *Alcanivorax Borkumensis* 始终存在于反应器中且比例逐渐升高, 表明这些添加的菌种能够适应反应器中的生存环境并稳定定植。其中, 在整个菌群中, 与 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* 和 *Alcanivorax dieselolei* 的 16S rRNA 基因匹配度达 100% 的 Read 比例最终分别为 19.8%、12.8%, 表明这两种细菌在整个菌群中占主导地位。



*Acinetobacter*: 不动杆菌属; *Alcanivorax*: 食烷菌属; *Marinobacter*: 海杆菌属; *Pseudomonas*: 假单胞菌属; *Sphingobium*: 鞘脂菌属; *Rhodococcus*: 红球菌属; *Novosphingobium*: 新鞘氨醇杆菌属; *Microbacterium*: 细杆菌属; *Marinomonas*: 海单胞菌属; *Labrenzia*: 拉布伦茨氏菌; *Halomonas*: 盐单胞菌属; *Geobacillus*: 土芽孢杆菌属; *Flavobacterium*: 黄质菌属; *Exiguobacterium*: 微小杆菌属; *Erythrobacter*: 赤细菌属; *Dietzia*: 迪茨氏菌属; *Cyclobacterium*: 圆杆菌属; *Colwellia*: 科尔韦尔氏菌属; *Citricella*: 柠檬胞菌属; *Chromohalobacter*: 色盐杆菌属; *Castellaniella*: 卡斯特兰尼氏菌属; *Burkholderia*: 伯克氏菌属; *Brachybacterium*: 短状杆菌属; *Bacillus*: 芽孢杆菌属; *Alteromonas*: 交替单胞菌属; *Alcaligenes*: 产碱杆菌属; *Aerococcus*: 气球菌属; Other: 其他未分类细菌; 驯化完成后为第1天

图3 600 L连续流生物反应器生物强化处理污水过程中菌群结构的动态变化

Fig. 3 Dynamic microbial community during wastewater augmentation in the 600 L continuous-flow bioreactor



*Alcanivorax venustensis*: 优雅食烷菌; *Alcanivorax dieselolei*: 柴油食烷菌; *Alcanivorax jadensi*: 亚德食烷菌; *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*: 除烃海杆菌; *Acinetobacter venetianus*: 威尼斯不动杆菌; *Alcanivorax borkumensis*: 泊库岛食烷菌; 驯化完成后为第1天

图4 600 L连续流生物反应器生物强化处理污水过程中高通量测序与人工添加石油烃降解菌序列相关度分析

Fig. 4 Abundance of high-throughput sequencing reads closely related to the artificially supplied hydrocarbon-degrading bacterial strains during wastewater augmentation in the 600 L continuous-flow bioreactor



## 4 讨论

在预实验中, 石油烃降解率约为 70%, 与无菌种添加时相比有大幅提升。但此前已有研究对石化废水的连续流反应器活性污泥处理效果进行了评价, 该活性污泥法能够实现最大 89% 的 COD 清除率和最大 80% 的 TPH 清除率<sup>[19]</sup>。而在预实验的基础上, 结合其他团队已有的研究设计的连续流生物反应器, 在处理过程中, 压缩空气被连续泵入隔油沉沙池中, 污水中细小的油滴持续被气泡带到隔油沉沙池表面, 后通过机械刮取收集去除。与此同时, 污水中的沙粒和其他固体污染物沉淀至沉砂池底部, 并通过底部的阀门定期排出。之后, 石油污水进入好氧曝气池中, 进行间歇性曝气, 实现好氧和厌氧的交替处理。最后, 污水同活性污泥一起流入污泥沉淀池中, 活性污泥在沉淀池中沉降, 而上层处理水则流出反应器。该设计促进了污水中石油组分的更进一步回收利用, 同时将污染物去除率提高到 90% 以上, COD 去除率达 95% 左右。该反应器的处理效果优于采用传统活性污泥处理配合固定化生物过滤池的方法 (COD 去除率 76%)<sup>[20]</sup>, 利用生物过滤池配合气升式好氧处理的方法 (油污去除率 71.1%、COD 去除率 75%)<sup>[21]</sup>, 前述的利用连续流生物反应器<sup>[19]</sup>处理陆地油田中产生油污水的研究及基于填料支撑的菌群生物降解处理海洋石油污水的研究 (油污去除率 53.3%)<sup>[22]</sup>。由于本文中使用的菌种来源于中国沿海及附近太平洋海域, 能够耐受海洋石油污水的高盐度和复杂成分, 更加适用于我国沿海地区海洋石油污水的处理。相较于本文中的预实验, 在新设计的反应器中, 由于添加了隔油沉沙步骤, 将相当一部分石油污染物清除掉, 既减轻了后续生物处理的压力, 也减弱了后续步骤中石油烃对微生物的毒害。此外, 新的生物反应器中良好的处理效果也得益于更具适应性和降解能力的细菌群体的构成, 因而具有

更高的 TPH 降解效率。

菌群结构分析表明, 本文中构建的石油烃降解菌群经过一段时间的驯化和重组后具有较好的系统稳定性。结合人工菌种定植分析结果, 发现预实验与正式处理实验的过程中, 最终的菌群都以 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*、*Alcanivorax dieselolei* 和 *Acinetobacter venetianus* 为优势种, 表明在今后的海洋石油污水处理菌剂设计开发中, 可以这几种菌株为主要组成成分。本文为高盐船舶油污水的生物强化处理提供了良好的理论基础。此外, 本文的实际处理效果显著, 也为此类菌群的构建与未来市场应用奠定了良好的基础。

## 5 结 论

本文旨在利用来源于我国沿海及附近太平洋海域石油烃降解菌, 构建适用于高盐船舶油污水处理的人工菌群。通过采用金属桶预实验和自行设计的连续流生物反应器, 对污水处理企业现场提供的原油污染船舶压舱水进行处理, 得到了良好的效果。其中, 在采用自行设计的生物反应器时, 总石油烃 (TPH) 去除率最高可达 90%, COD 去除率可达 95%。本文对于今后油污水处理实验的进一步放大具有指导意义, 以 *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*、*Alcanivorax dieselolei* 和 *Acinetobacter venetianus* 为优势种的菌群结构为基础, 将有望开发针对我国沿海地区海洋油污水处理的高效石油烃降解菌剂。

## 参 考 文 献

- [1] 于洋. 石油化工污水处理技术的现状与发展趋势 [J]. 科技创新导报, 2017, 14(17): 136-137.
- [2] 邱清华, 哈尼帕, 邓绍云. 微生物降解石油烃类污染物的研究进展 [J]. 资源开发与市场, 2012, 10(2): 48-51.

- [3] Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 223: 277-286.
- [4] Mapelli F, Scoma A, Michoud G, et al. Biotechnologies for marine oil spill cleanup: indissoluble ties with microorganisms [J]. *Trends in Biotechnology*, 2017, 35(9): 860-870.
- [5] Varjani SJ, Upasani VN. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2017, 120: 71-83.
- [6] 郑洲, 刘芳明, 张波涛, 等. 南极石油烃降解嗜冷菌的筛选及其降解特性的研究 [J]. *海洋通报(英文版)*, 2008, 10(2): 311-316.
- [7] 林学政, 沈继红, 杜宁, 等. 北极海洋沉积物石油降解菌的筛选及系统发育分析 [J]. *环境科学学报*, 2009, 29(3): 536-541.
- [8] Deppe U, Richnow HH, Michaelis W, et al. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium [J]. *Extremophiles*, 2005, 9(6): 461-470.
- [9] Sathishkumar M, Binupriya AR, Baik SH, et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas [J]. *CLEAN -Soil, Air, Water*, 2008, 36(1): 92-96.
- [10] Fernandez-Martinez J, Pujalte MJ, Garcia-Martinez J, et al. Description of *Alcanivorax venustensis* sp. nov. and reclassification of *Fundibacter jadensis* DSM 12178<sup>T</sup> (Bruns and Berthe-Corti 1999) as *Alcanivorax jadensis* comb. nov., members of the emended genus *Alcanivorax* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 331-338.
- [11] Manilla-Perez E, Reers C, Baumgart M, et al. Analysis of lipid export in hydrocarbonoclastic bacteria of the genus *Alcanivorax*: identification of lipid export-negative mutants of *Alcanivorax borkumensis* SK2 and *Alcanivorax jadensis* T9 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(3): 643-656.
- [12] Romanenko LA, Uchino M, Falsen E, et al. *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov. isolated from a marine sponge [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(2): 919-924.
- [13] Lau SC, Tsoi MM, Li X, et al. Description of *Fabibacter halotolerans* gen. nov. sp. nov. and *Roseivirga spongicola* sp. nov. and reclassification of [*Marinicola*] *seohaensis* as *Roseivirga seohaensis* comb. nov [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(5): 1059-1065.
- [14] Wang WP, Wang LP, Shao ZZ. Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (alkB) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island [J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(2): 429-439.
- [15] Vaneechoutte M, Nemeč A, Musilek M, et al. Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(6): 1376-1381.
- [16] Liu C, Shao Z. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov. a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1181-1186.
- [17] Lee YS, Lee DH, Kahng HY, et al. *Polaribacter dokdonensis* sp. nov., isolated from seawater [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(6): 1425-1429.
- [18] Matturro B, Frascadore E, Cappello S, et al. *In situ* detection of alkB2 gene involved in *Alcanivorax borkumensis* SK2<sup>T</sup> hydrocarbon biodegradation [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 110(1): 378-382.
- [19] Shokrollahzadeh S, Azizmohseni F, Golmohammad F, et al. Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(14): 6127-6133.
- [20] Tong K, Zhang YH, Liu GH, et al. Treatment of heavy oil wastewater by a conventional activated sludge process coupled with an immobilized biological filter [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 84(5): 65-71.
- [21] Zhang M, Wang JM, Zhang ZZ, et al. A field pilot-scale study of biological treatment of heavy oil-produced water by biological filter with airlift aeration and hydrolytic acidification system [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(5): 4919-4930.
- [22] Sheppard PJ, Simons KL, Adetutu EM, et al. The application of a carrier-based bioremediation strategy for marine oil spills [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 84(1-2): 339-346.