

研究报告

一株耐盐菌 *Halomonas* sp. A20 的分离及降解糖精钠废水的特性周佳¹, 陈研¹, 屈建航¹, 王宇坤¹, 李培龙¹, 徐伟龙¹, 黄英杰¹, 买文宁^{*2}

1 河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450000

2 郑州大学生态与环境学院, 河南 郑州 450000

周佳, 陈研, 屈建航, 王宇坤, 李培龙, 徐伟龙, 黄英杰, 买文宁. 一株耐盐菌 *Halomonas* sp. A20 的分离及降解糖精钠废水的特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 942-955

Zhou Jia, Chen Yan, Qu Jianhang, Wang Yukun, Li Peilong, Xu Weilong, Huang Yingjie, Mai Wenning. Isolation of the salt-tolerant bacterium *Halomonas* sp. A20 and its degradation of saccharin sodium wastewater[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 942-955

摘要:【背景】糖精钠废水是一种难处理的高盐有机工业废水。【目的】为了提高糖精钠废水的生物降解效果, 需要研究糖精钠废水降解菌的特性。【方法】采用纯培养技术从处理糖精钠废水的多级生物接触氧化系统内的活性污泥中分离筛选糖精钠废水降解菌, 对分离菌株的形态特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列进行分析, 利用单因素实验和响应面法考察分离菌株降解糖精钠废水的最佳条件。【结果】筛选获得一株糖精钠废水降解菌 A20, 归属于盐单胞菌属(*Halomonas*), 当糖精钠废水的盐分为 5%, 菌接种量为 15%, pH 值为 8.0, 温度为 30 °C 时, 菌株 A20 对糖精钠废水中的化学需氧量(chemical oxygen demand, COD_{Cr})去除率在 60%以上; 通过响应面法优化, 菌株 A20 降解糖精钠废水的最佳条件为: pH 8.0, 温度为 30.3 °C, 接种量为 14.1%, 其 COD_{Cr} 去除率为 65.4%。【结论】分离到一株能高效降解糖精钠废水中有机物的耐盐菌 *Halomonas* sp. A20, 可为高盐、高浓度糖精钠废水的处理提供优良的微生物菌种资源。

关键词: 糖精钠废水; 盐度; 降解菌; 降解特性; 菌种资源

基金项目: 国家自然科学基金(42107139); 河南工业大学高层次人才科研启动基金项目(2019BS046); 河南省重点研发与推广专项项目(212102311158); 河南省高等学校重点科研项目(20A180009, 22A180014)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (42107139); Doctoral Scientific Research Start-Up Foundation from Henan University of Technology (2019BS046); Key Research and Development and Promotion Special Projects of Henan Province (212102311158); Key Scientific Research Projects in Henan Higher Education Institutions (20A180009, 22A180014)

***Corresponding author:** E-mail: wen1991@zzu.edu.cn

Received: 2021-06-09; **Accepted:** 2021-08-26; **Published online:** 2021-12-15

Isolation of the salt-tolerant bacterium *Halomonas* sp. A20 and its degradation of saccharin sodium wastewater

ZHOU Jia¹, CHEN Yan¹, QU Jianhang¹, WANG Yukun¹, LI Peilong¹, XU Weilong¹, HUANG Yingjie¹, MAI Wenning^{*2}

¹ College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450000, Henan, China

² School of Ecology and Environment, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan, China

Abstract: [Background] Saccharin sodium wastewater, one type of organic industrial wastewater with high salt, is difficult to be treated. [Objective] To improve the biodegradation of this wastewater, it is in urgent need to study the characteristics of the saccharin sodium wastewater degrading bacteria. [Methods] A bacterial strain A20 capable of degrading saccharin sodium wastewater was isolated by pure culture technology from the activated sludge in the multistage biological contact oxidation system. It was identified based on morphological characteristics, physiological and biochemical properties, and 16S rRNA gene sequence analysis. The optimum conditions for strain A20 to degrade saccharin sodium wastewater were investigated by single factor experiment and response surface method. [Results] The strain A20 belonged to *Halomonas*. When the salinity of saccharin sodium wastewater in 5%, pH 8.0, and the temperature of 30 °C, inoculum ratio at 15%, the chemical oxygen demand (COD_{Cr}) removal efficiency was more than 60%. Through the optimization with response surface method, the optimum conditions for *Halomonas* sp. A20 to degrade the saccharin sodium wastewater: pH 8.0, temperature of 30.3 °C, and inoculum ratio of 14.1%. Under this optimum condition, the COD_{Cr} removal efficiency was 65.4%. [Conclusion] The salt-tolerant strain A20 obtained in this study can efficiently degrade the organic matter in saccharin sodium wastewater, which can provide excellent microbial strain resources for the treatment of high-salt and high-concentration saccharin sodium wastewater.

Keywords: saccharin sodium wastewater; salinity; degrading bacteria; degradation characteristics; strain resources

糖精钠(邻苯甲酰磺酰亚胺钠)是一种广泛应用的人工甜味剂,其生产工艺主要采用苯酐法,而在此过程中会产生大量难以降解的糖精钠废水^[1-2]。糖精钠废水中含有有机化合物,如醇、甲苯、苯系物(邻氨基苯甲酸钠、苯酐、邻氨基苯甲酸甲酯、邻甲酰苯磺酰亚胺)等^[3],并且无机盐含量较高(>10 g/L),属于典型的高盐难降解工业废水。糖精钠废水的成分复杂且难以降解,如不妥善处理就排放到生态环境会对水体造成污染^[4],进一步影响农业用水和生活用水的安全。

目前,糖精钠废水的处理主要采用物理和化学法,但处理成本较高,而且需要二次耗能^[5],因此迫切需要切实可行的处理方法。生物法因绿色、高效、环保等优势也应用于糖精钠废水的处理中^[6]。糖精钠废水中盐度较高,会破坏微生物的细胞膜和生物酶,抑制微生物的生长和繁殖,从而无法达到理想的处理效果。耐/嗜盐菌的存在为糖精钠废水的处理提供了可能,将这些菌株投加到生物反应器中^[7],可大幅提高生物降解糖精钠废水中有机污染物的效率^[8]。刘亚楼^[9]从危险废物填埋场渗滤

液中筛选出一株耐盐菌 WS-1, 其在 3% 盐度下对高盐废水中化学需氧量(chemical oxygen demand, COD_{cr})的去除率(84.7%)高于对照组(79.3%)。廖焰焰等^[10]从处理医药废水的活性污泥中驯化、筛选并分离出一株高耐盐菌株 W2 (耐受 18% NaCl), W2 处理高盐医药废水时, COD_{cr} 去除率可达 73.0%。Piubeli 等^[11]从含有 100 g/L NaCl 的高盐废水中筛选出一株盐单胞菌(*Halomonas*), 其能够有效提高 COD_{cr} 去除效果(从 20% 增加到 65%–80%)。耐盐菌在高盐废水的处理过程中发挥重要作用, 耐盐菌的筛选已成为生物处理高盐废水的关键步骤^[12], 而且近年来已大量报道了对耐盐菌的分离和鉴定^[9,13], 但目前利用耐盐菌去除糖精钠废水中有机污染物的研究尚未见报道。因此, 本研究通过初筛和复筛从多级生物接触氧化反应器处理糖精钠废水系统的活性污泥中分离出一株高效耐盐菌, 通过形态特征观察和 16S rRNA 基因序列分析进行菌种鉴定, 利用单因素实验和响应面法考察其降解糖精钠废水的特性, 以期微生物处理糖精钠废水提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

水样取自河南省开封市某糖精钠生产厂, 其水质特性如表 1 所示。活性污泥样品收集于多级生物接触氧化反应器处理糖精钠废水系统^[6]运行第 45 天(3.5% 盐分)时氧化池 1 内填料上的活性污泥。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

DNA Marker, 生工生物工程(上海)股份有限公司; GoldView I 型核酸染料和琼脂糖, 北京索莱宝科技有限公司; Premix Taq 酶, 宝生物工程(大连)有限公司。标准 COD 消解器, 泰

表 1 糖精钠废水水质

Table 1 Quality of saccharin sodium wastewater

Item	Result
COD _{cr} (mg/L)	9 600.0–14 000.0
TN (mg/L)	168.0
TP (mg/L)	2.1
Salinity (%)	12.1–13.9
TOC (mg/L)	4 515.0
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	77.8
Cl ⁻ (mg/L)	46 085.0–63 526.4
pH	9.2–10.3

州市华晨仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

无机盐液体培养基^[14]: 考察分离菌株的降解性能。

筛选培养基: 蛋白胨 10.0 g, 牛肉膏 3.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 糖精钠废水 1 L。培养基 pH 7.0–7.2, 7×10⁴ Pa 灭菌 15 min。通过添加糖精钠废水, 培养并筛选具有降解糖精钠能力的菌株。

牛肉膏蛋白胨固体培养基^[10]: 用于分离菌株的富集培养。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与筛选

(1) 初筛: 称取 10 g 活性污泥于 90 mL 无机盐液体培养基中, 加入 2.5 g 玻璃珠(1×10⁵ Pa 灭菌 30 min), 在 30 °C、150 r/min 条件下振荡培养 24 h, 静置 1 h。吸取上层悬浮液 0.5 mL 于 4.5 mL 的生理盐水(1×10⁵ Pa 灭菌 30 min)中, 依次梯度稀释成 10⁻¹–10⁻⁹ 的菌悬液。然后分别吸取不同浓度的菌悬液 0.1 mL 涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 在 28 °C 条件下培养 2–3 d (各梯度设置 3 个平行), 以不接菌的牛肉膏蛋白胨固体培养基作为空白对照。依据三区划线对筛选到的菌株进行纯化, 并根据《细菌

分子遗传学分类鉴定法》和《常见细菌系统鉴定手册》对其进行生理生化测定^[15-16]。利用蒸馏水将糖精钠废水的全盐量(HJ/T 51—1999)^[17]从 138.7 g/L 分别稀释至 10、30、50、70、100 和 130 g/L, 即盐分分别为 1%、3%、5%、7%、10%和 13%。将上述筛选到的细菌分别接种于不同盐分的糖精钠筛选培养基上, 30 °C 条件下培养 3 d, 考察菌株在筛选培养基上的生长情况。

(2) 复筛: 挑取适量初筛菌株的菌落, 分别接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 30 °C、120 r/min 培养 24 h, 然后 5 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 利用无菌蒸馏水反复重悬 3 次, 并利用无菌水将其 OD_{600} 值调节至 0.5, 分别接种到 7×10^4 Pa 灭菌 15 min 的糖精钠废水中(盐分 5%), 30 °C、120 r/min 振荡培养 18 h, 培养液 8 000 r/min 离心 5 min, 测定上清液中 COD_{Cr} 值, 考察不同菌株对糖精钠废水中有机污染物的降解效果。

1.2.2 细菌的系统发育分析

复筛得到的细菌利用碱裂解法制备 DNA 模板, 采用细菌通用引物 1492R (5'-CTACGG CTACCTTGTTACGA-3')和 27F (5'-GAGAGTT TGATCCTGGCTCAG-3')对其 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增^[18], 将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 并与 GenBank 数据库中的已有序列进行 BLAST 比对。

1.2.3 耐盐菌的生长和降解特性研究

(1) 生长曲线的测定。挑取复筛得到的 A20 菌落于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 30 °C、120 r/min 条件下培养。以未接菌的培养基作为空白对照, 以 2 h 间隔周期测定其 OD_{600} 值, 绘制其生长曲线。

(2) 单因素实验。挑取适量 A20 菌落于牛

肉膏蛋白胨液体培养基中, 30 °C、120 r/min 培养 18 h, 然后 5 000 r/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 利用无菌蒸馏水反复重悬 3 次, 并调节 OD_{600} 值至 0.5, 分别接种到 7×10^4 Pa 灭菌 15 min 的糖精钠废水中, 30 °C、150 r/min 培养 10 d, 8 000 r/min 离心 5 min, 测定上清液中 COD_{Cr} 值, 分别考察糖精钠废水中不同初始盐分、接种量、pH、温度、外加碳源等条件对菌株 A20 去除糖精钠废水中 COD_{Cr} 值的影响。

单因素条件依次设置为:

盐分: 分别利用无菌蒸馏水将糖精钠废水的盐分从原始的 13.9%稀释至 3%、5%、7%、10%和 13%; 接种量: 将上述 OD_{600} 值为 0.5 的 A20 菌悬液分别以 1%、5%、10%、15%和 20% 体积分数接种于糖精钠废水中; pH 值: 分别将糖精钠废水的 pH 值调节至 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0; 温度: 分别将上述发酵液在 20、25、30、35 和 40 °C 条件下振荡培养; 碳源: 在糖精钠废水中分别添加 0.1%的葡萄糖、蔗糖、淀粉和乳糖。

(3) 响应面试验设计

基于单因素试验结果, 设计三因素三水平的响应面试验(Design Expert 7.0 软件), 分别考察菌株 A20 的接种量、糖精钠废水的 pH 值、培养温度交互作用对菌株 A20 去除糖精钠废水 COD_{Cr} 值的影响(表 2), 以随机次序进行试验, 并获得响应值(设置 3 个平行)。利用响应

表 2 响应面分析因素和编码水平

Table 2 Factors and coding level of response surface analysis

代码 Code	因素 Factor	编码水平 Coding level		
		-1	0	+1
A	pH	7.0	8.0	9.0
B	Temperature (°C)	25	30	35
C	Inoculation volume (%)	10	15	20

曲面模型对菌株 A20 去除糖精钠废水 COD_{Cr} 值进行优化, 确定最佳条件。

2 结果与分析

2.1 菌株 A20 的分离筛选

利用纯培养技术从处理糖精钠废水的多级生物接触氧化系统的活性污泥中共获得 18 株细菌, 经过初筛, 共有 6 株细菌(A6、A20、A26、A29、A31 和 A32)能在 7%及以下盐分的筛选培养基上生长良好(表 3)。

选取上述 6 株菌接种到糖精钠废水中培养 5 d, 测定其对糖精钠废水中 COD_{Cr} 的去除率, 结果表明(图 1), 相较于其他菌株, 菌株

A20 对糖精钠废水中的 COD_{Cr} 去除率相对较高, 而且在废水中的生长速率较快。因此, 本研究选取菌株 A20 作为后续的研究对象。

2.2 耐盐菌 A20 的形态及生理生化特性

菌株 A20 在牛肉膏蛋白胨培养基上于 28 °C 培养 2–3 d 后, 菌落呈圆形、白色, 菌体呈长杆状, 直径约 3 μm, 革兰氏染色阴性, 其他生理生化特性^[19]见表 4。

2.3 菌株 A20 的系统进化分析

菌株 A20 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 441 bp。在 GenBank 中进行同源性分析 (BLAST 软件), 采用 neighbor-joining 法(MEGA 软件)构建菌株 A20 的系统发育树, 结果表明(图 2), 该菌株与 *Halomonas zhaodongensis* 的相似性高达 99.65%, 并与其在系统发育树上亲缘

表 3 耐盐菌的初筛

Table 3 Primary screening of salt-tolerant bacteria

Classification	Strain	Salinity of the screening medium					
		1%	3%	5%	7%	10%	13%
1	A6	+++	+++	+++	+++	–	–
2	A20	+++	+++	+++	+++	++	+
3	A26	+++	+++	+++	+++	+	–
4	A29	+++	+++	+++	+++	++	++
5	A31	+++	+++	+++	+++	+	+
6	A32	+++	+++	+++	+++	++	++

注: –: 不生长; +: 少量生长; ++: 生长一般; +++: 生长良好

Note: –: No growth; +: A small amount of growth; ++: General growth; +++: Good growth.

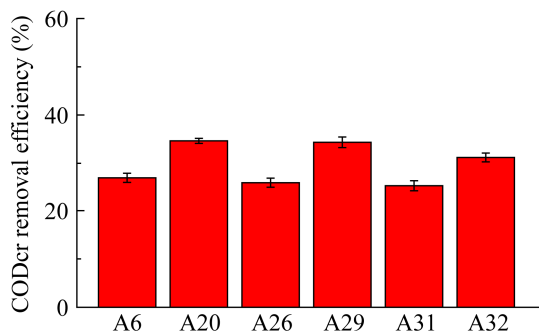


图 1 复筛的 6 株菌对糖精钠废水中 COD_{Cr} 去除率
Figure 1 COD_{Cr} removal efficiency in saccharin sodium wastewater by the six re-screened strains.

表 4 菌株 A20 的主要生理生化特性

Table 4 Main physiological and biochemical characteristics of strain A20

Experimental items	A20
Gram staining	–
Spore staining	–
Hydrogen peroxidase	+
Oxidase	+
Gelatin liquefaction test	–
Starch hydrolysis test	+
Methyl Red test	–
V-P test	–
Hydrogen sulfide gas production test	+
Indole test	–
Nitrate reduction test	+
Carbon source utilization	
Glucose	+
Lactose	+
Sucrose	+
Galactose	–
Citrate	+
Propionate	+

注: +: 阳性; –: 阴性

Note: +: Positive; –: Negative.

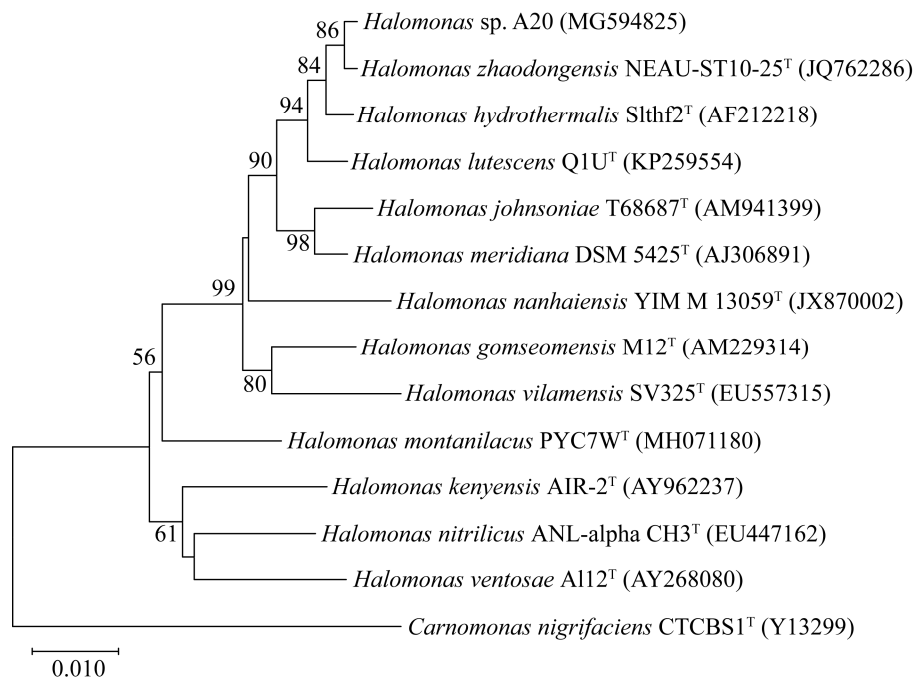


图 2 菌株 A20 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内表示 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支处数值表示 bootstrap 值; 标尺表示进化距离

Figure 2 Phylogenetic tree of strain A20 based on 16S rRNA gene sequence. Parentheses indicate the login number of 16S rRNA gene sequence in GenBank; The value at the branch represents the bootstrap value; The ruler represents the evolutionary distance.

关系最近。综合菌株 A20 的菌落和菌体形态、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列比对结果, 鉴定菌株 A20 为 *Halomonas* 属。

2.4 菌株 A20 的生长曲线

菌株 A20 的生长曲线(图 3)显示, 其总体生长较缓, 10 h 进入指数期, 维持 12 h, 于 22 h 后进入稳定期, 停滞期相对较长(10 h)。

2.5 盐分对菌株 A20 的 COD_{Cr} 去除率的影响

高盐环境对微生物生长具有抑制作用, 影响细胞内酶活性, 进一步影响代谢活动使生物量增长缓慢。若环境中含盐量超过微生物的耐受范围, 会降低废水的处理效率, 影响生物膜的形成和运转, 使反应器的处理效果恶化, 甚至崩溃^[16]。因此, 进一步考察了盐分对菌株 A20

去除糖精钠废水中 COD_{Cr} 的影响。

由图 4 可知, 当糖精钠废水的盐分为 3% 时, 菌株 A20 的 COD_{Cr} 去除率最高, 为 58.1%。随着盐分的增加, 其 COD_{Cr} 去除率逐渐降低。

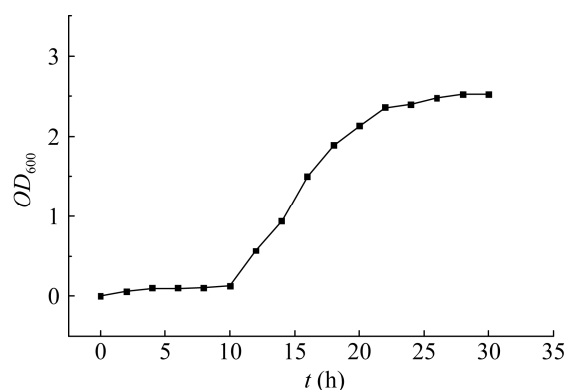


图 3 菌株 A20 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of strain A20.

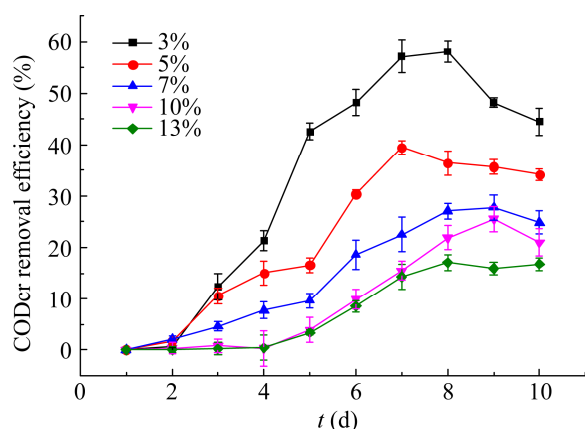


图4 盐分对菌株 A20 的 CODcr 去除率的影响

Figure 4 Effect of salinity on CODcr removal efficiency of strain A20.

当盐分为 5% 时, 提高盐浓度的同时对菌体生长的抑制作用影响相对较小, CODcr 去除率的下降幅度不大, 该菌株可适应高盐废水环境。当盐分增加到 7%–13% 时, 对 CODcr 去除率影响较大, 尤其是在 13% 盐分下, CODcr 去除率降至 20% 以下。这可能是因为这株菌虽然能够耐受一定范围的盐分, 但是当糖精钠废水中盐分过高时(如 13%), 会通过抑制微生物的呼吸系统及酶系统对微生物的生命活动产生不利影响。再者糖精钠废水中可提供生命活动的营养物质较少, 微生物在不良环境下生存, 其代谢较为缓慢, 对 CODcr 去除率会产生一定影响。因此, 采用 5% 盐分的糖精钠废水进行后续研究。

2.6 接种量对菌株 A20 的 CODcr 去除率的影响

微生物接种量是影响废水处理效果的重要因素, 增加接种量可以在一定程度上强化有机污染物的去除效率。如图 5 所示, 当接种量介于 1%–15% 之间, 随着接种量的增加, 菌株 A20 对糖精钠废水的 CODcr 去除率也逐渐增加。当接种量为 15% 时, CODcr 的去除率最高, 达到 63.6%。当接种量为 20% 时, CODcr 去除率反而呈下降趋势, 这可能与糖精钠废水

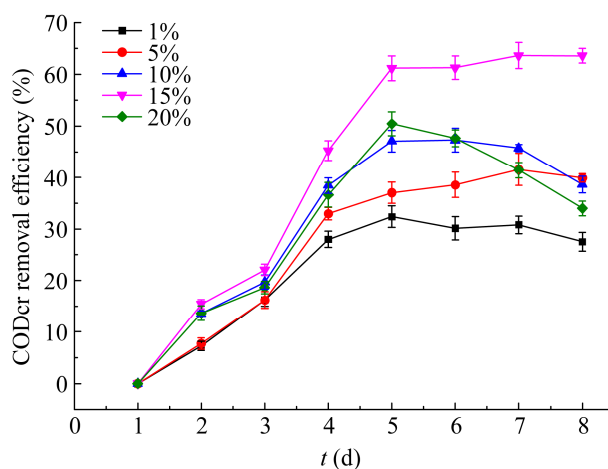


图5 接种量对菌株 A20 的 CODcr 去除率的影响

Figure 5 Effect of inoculation volume on CODcr removal efficiency of strain A20.

中有限的营养物质和溶解氧有关, 加之代谢产物过多对微生物区系的毒性作用, 细胞浓度过高限制了糖精钠废水中有机污染物的微生物代谢。在一定范围内菌株 A20 接种量越大, CODcr 去除率值越高, 接种量超过此范围反而会产生负面影响。因此, 本实验中菌株 A20 最佳接种量为 15%。

2.7 pH 值对菌株 A20 的 CODcr 去除率的影响

微生物在适宜的 pH 范围内才能进行正常的生长代谢活动, 并有效降解废水中的污染物。从图 6 可以看出, 当糖精钠废水中 pH 值调节至 5.0 时, 菌株 A20 对该废水中的 CODcr 去除率最低(小于 40%)。当 pH 值在 7.0–8.0 时, 菌株 A20 的 CODcr 去除率最高, 为 65.1%。综上所述, 选择 pH 8.0 糖精钠废水进行后续研究。

2.8 温度对菌株 A20 的 CODcr 去除率的影响

微生物的生长繁殖及合成代谢离不开酶的催化, 酶发挥作用和维持都需要合适的温度。如图 7 所示, 在 20–40 °C 的温度范围内, 该菌株

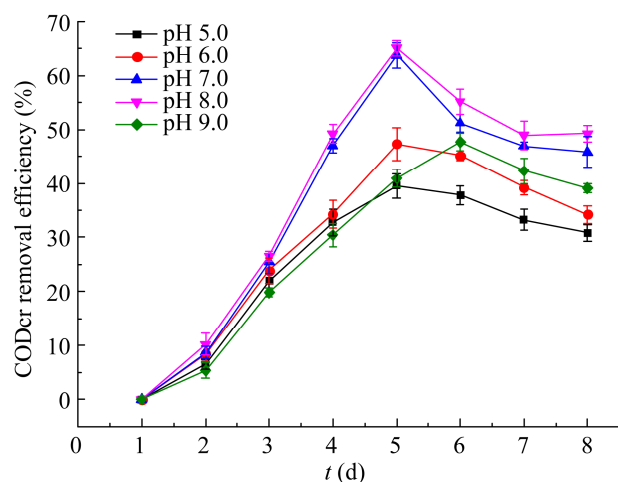


图 6 pH 值对菌株 A20 的 CODcr 去除率的影响
Figure 6 Effect of pH value on CODcr removal efficiency of strain A20.

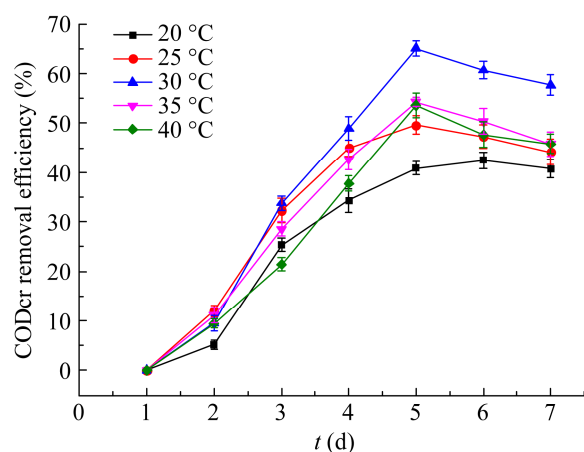


图 7 温度对菌株 A20 的 CODcr 去除率的影响
Figure 7 Effect of temperature on CODcr removal efficiency of strain A20.

对 CODcr 的去除率可达 40% 以上。其中, 温度为 30 °C 时, 菌株 A20 的去除率最高, 为 65.1%。当温度为 20 °C 时, 菌株 A20 对糖精钠废水的 CODcr 去除率最低(40% 左右), 这可能是由于温度过低抑制了微生物的酶活性。综上所述, 菌株 A20 在 25–35 °C 的温度范围内对糖精钠废水的净化效果较好, 最佳温度为 30 °C。

2.9 碳源对菌株 A20 的 CODcr 去除率的影响

碳源对微生物生长代谢的作用主要是为其提供细胞的碳架, 提供细胞生命活动所需的能量, 是最基本的营养物质。糖精钠废水的盐分高达 13.9% (表 1), 利用蒸馏水将其盐分稀释至 5% 后投加葡萄糖、淀粉、蔗糖和乳糖作为外加碳源, 不同的碳源导致其起始 CODcr 值存在一定的差异(图 8)。当外加碳源是蔗糖时, 抛开外加蔗糖贡献的 CODcr 值, 菌株 A20 去除糖精钠废水本身贡献的 CODcr 值相对较高, 去除率为 52%; 当外加碳源是葡萄糖和淀粉时, 去除糖精钠废水本身贡献的 CODcr 值较低, 去除率仅 33% 左右。相较于糖精钠废水中的原始有机物, 外加碳源对微生物来说是简单营养物质, 更易优先被微生物利用, 导致其对糖精钠废水本身的利用率降低。

研究表明, 在 0%–24% NaCl 浓度范围, 盐单胞菌属(*Halomonas*)能够进行生长繁殖, 最佳 NaCl 浓度介于 1%–4%^[20-21], 最适生长温度介于 25–30 °C^[22-23], 最佳 pH 值介于 7.0–9.0^[24], 可利用葡萄糖、淀粉、蔗糖和乳糖作为碳源, 尤

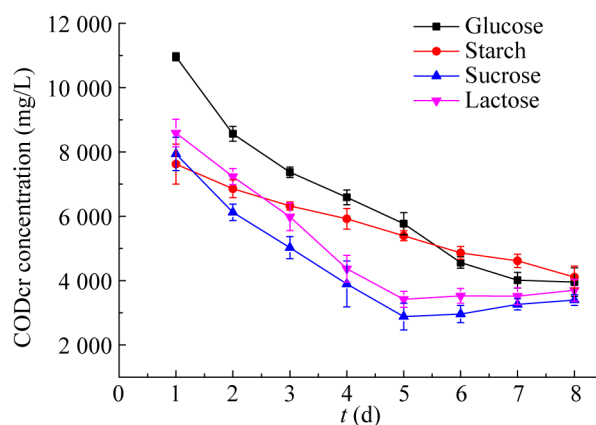


图 8 碳源对菌株 A20 的 CODcr 去除率的影响
Figure 8 Effect of carbon sources on CODcr removal efficiency of strain A20.

其是对蔗糖的利用率较高^[25]。然而菌株 A20 在处理盐度为 5% 的糖精钠废水时, 最适接种量为 15%, 最适 pH 值范围为 7.0–8.0, 最适温度为 30 °C, 在外加蔗糖时对糖精钠废水中 COD_{Cr} 的去除率较高。

2.10 响应面法优化菌株 A20 的 COD_{Cr} 去除率

由单因素实验结果可知, 对菌株 A20 的 COD_{Cr} 去除率影响较大的 3 个因素是接种量、pH 值和温度, 选取这 3 个因素进一步进行响应面试验。通过 Box-Behnken 试验拟合, 得到 COD_{Cr} 去除率(Y)对 pH 值(A)、温度(B)和接种量(C)这 3 个因素的二次多项回归方程: $Y=65.98-0.25A+0.73B-2.48C-0.49AB-2.96AC+1.01BC-14.37A^2-5.79B^2-9.25C^2$ 。

通过对模型进行回归分析, 表 5 结果表明, 该模型的显著性检验 $P=0.000\ 7<0.01$, 二

次方程拟合差异极显著, 具有统计学意义, 可以用来预测各因素对菌株 A20 降解糖精钠废水 COD_{Cr} 值的影响。3 个因素对 COD_{Cr} 去除率的影响顺序依次为: 接种量>温度>pH 值。

图 9A 和 9B 是糖精钠废水中起始 pH 值和培养温度对菌株 A20 去除糖精钠废水 COD_{Cr} 值的影响, COD_{Cr} 去除率随着 pH 值和温度的变化呈现抛物线形式。当 pH 值为 8.0, 温度为 30 °C 时, 菌株 A20 去除糖精钠废水 COD_{Cr} 值的效果最好。与图 9A 和 9B 结果类似, 图 9C 和 9D 中随着糖精钠废水中起始 pH 值和菌株 A20 接种量的增加, 以及图 9E 和 9F 中随着菌株 A20 接种量和培养温度的增加, COD_{Cr} 去除率均呈现先增加后减小的趋势。

响应面模型预测, 当糖精钠废水起始 pH 值、培养温度和菌株 A20 接种量分别为 8.0、30.3 °C 和 14.1% 时, 菌株 A20 对糖精钠废水中 COD_{Cr} 去除率最高为 66.1%。经实验验证, 在此最佳条件下的实际 COD_{Cr} 去除率为 65.4%, 与预测值比较接近, 这说明该模型具有指导意义。

3 讨论

糖精钠废水不仅含有高浓度的有机物, 而且具有高浓度的盐分, 给该废水的处理带来了很大的挑战。目前, 该废水的处理主要采用物理和化学法, 但处理成本较高, 而且需要二次耗能。与物化法相比, 生物法具有高效、经济和环保等优点。有研究采用生物接触氧化法处理糖精酯化废水(COD_{Cr} 3 952 mg/L), 当 HRT 为 48 h 时, COD_{Cr} 去除率最高, 为 86.0%^[26]; 采用厌氧膨胀床处理糖精钠生产废水(COD_{Cr}<3 500 mg/L), COD_{Cr} 去除率在 80.0% 以上^[27]; 应用人工湿地从城市污水中去除糖精钠(87 mg/L), 去除率仅为 42.4%^[28]; 鉴于这些去

表 5 菌株 A20 的回归方程的方差分析

Table 5 Analysis of variance of regression equation of A20 strain

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
Models	1600.52	9	177.84	16.080	0.000 7
A-pH	0.49	1	0.49	0.044	0.839 5
B-T	4.27	1	4.27	0.390	0.553 9
C-inoculum volume	49.23	1	49.23	4.450	0.072 8
AB	0.98	1	0.98	0.088	0.775 0
AC	35.15	1	35.15	3.180	0.117 8
BC	4.07	1	4.07	0.370	0.563 2
A ²	870.02	1	870.02	78.690	<0.000 1
B ²	141.16	1	141.16	12.770	0.009 1
C ²	360.16	1	360.16	32.570	0.000 7
Residual	77.40	7	11.06		
Lack of fit	77.40	3	25.80		
Pure error	0.000	4	0.000		
Cor total	1 677.92	16			

注: $P<0.01$ 为极显著; $P<0.05$ 为显著

Note: $P<0.01$ is extremely significant, $P<0.05$ is significant.

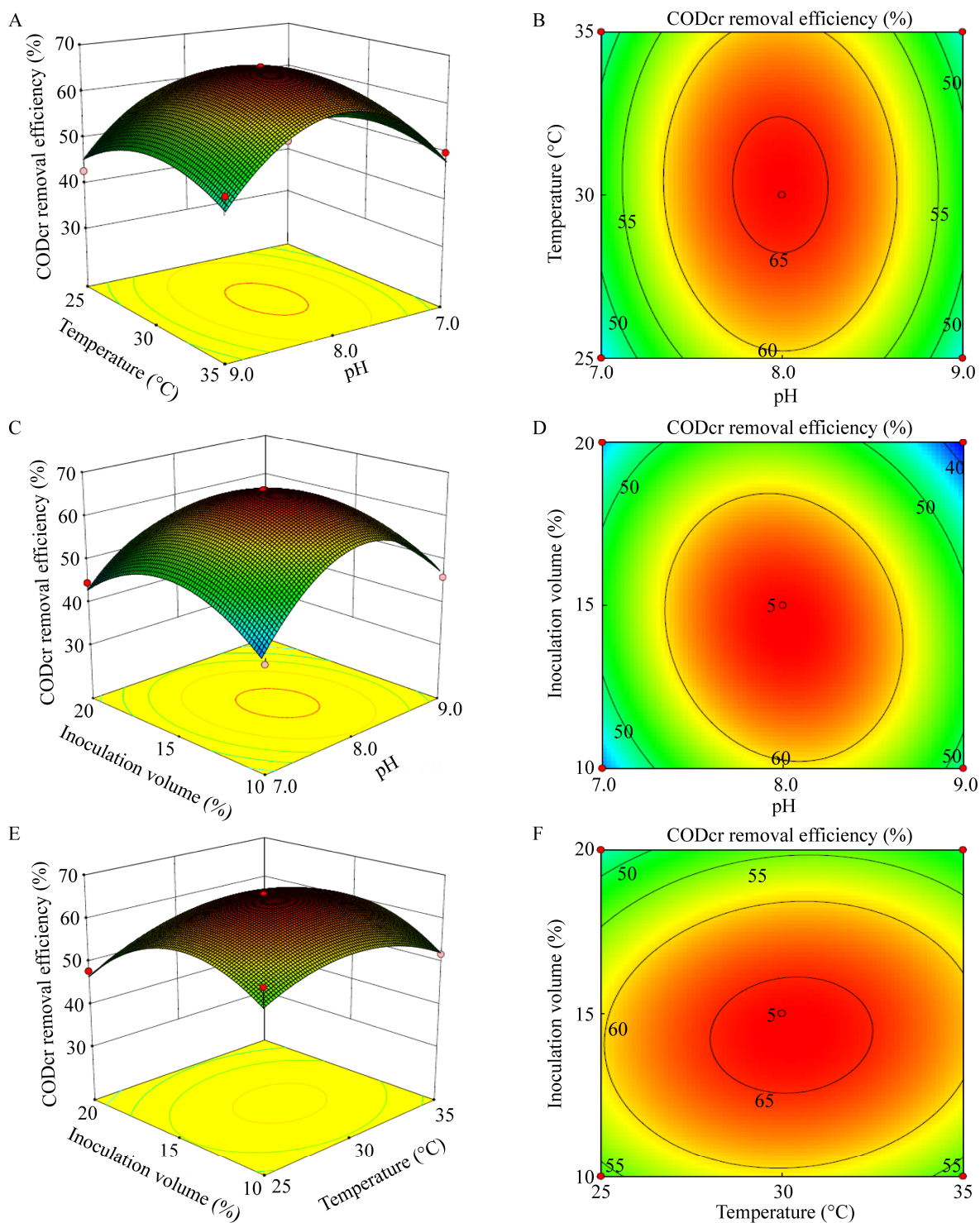


图9 温度和pH值(A和B)、接种量和pH值(C和D)、接种量和温度(E和F)对菌株A20降解糖精钠废水中的化学需氧量(CODcr)去除率的等高线及响应面

Figure 9 Contour and response surface of removal efficiency of chemical oxygen demand (CODcr) of A20 strain affected by the temperature and pH (A and B), inoculum volume and pH (C and D), inoculum volume and temperature (E and F).

除效果, 课题组利用活性污泥法处理糖精钠废水, 当进水盐分低于 3.0% 时, COD_{Cr} 和 NH₄⁺-N 去除率分别为 84.7% 和 92.7%, 继而应用多级生物接触氧化反应器处理糖精钠废水, 当进水盐分不超过 4.5% 时, 可有效去除该废水中的有机污染物, COD_{Cr} 和 NH₄⁺-N 去除效率分别高达 91.5% 和 92.7%^[29]。该系统内的微生物对反应器的稳定运行性能发挥了至关重要的作用, 进一步采用高通量测序技术解析了处理过程中微生物的群落演替, 结果表明, 盐单胞菌属(*Halomonas*)随着系统中盐分的增加逐渐富集^[29], 可能参与了糖精钠废水的降解。因此, 具有有机物降解性能且能够耐受糖精钠废水中盐分的微生物开发显得尤为重要, 而以往以实际的糖精钠废水进行微生物驯化和分离筛选的研究尚未见报道。为了获取这些重要的微生物资源, 本研究利用纯培养技术从处理糖精钠废水的多级生物接触氧化系统的活性污泥中分离筛选到 18 株细菌, 经过初筛, A6、A26、A29、A31、A20、A32 这 6 株细菌能够以糖精钠废水为唯一碳源进行生长繁殖, 其中菌株 A20 对 5% 盐分的糖精钠废水中 COD_{Cr} 去除率相对较高, 而且生长速率较快; 利用单因素实验考察接种量、糖精钠废水的盐分和 pH 值、培养温度及外加碳源对菌株 A20 降解该废水效果的影响, 其中菌株 A20 对 5% 盐分的糖精钠废水中 COD_{Cr} 去除率在 60% 以上; 进一步通过响应面法分析接种量、pH 值、温度这 3 个因素及其相互作用对菌株 A20 去除糖精钠废水中 COD_{Cr} 的影响, 当 pH 值为 8.0, 温度为 30.3 °C, 接种量为 14.1% 时, 菌株 A20 对 5% 盐分的糖精钠废水中 COD_{Cr} 去除率最高达到 65.4%, 为高盐、高浓度糖精钠废水的处理提供了优良的微生物资源。

基于以往的研究从海水、盐碱地、海堤

等^[30]环境下分离筛选出的耐盐菌最适生长 NaCl 浓度, 耐盐菌分为轻度耐盐菌(20–50 g/L)、中度耐盐菌(50–200 g/L)和极端耐盐菌(200–300 g/L)这三大类, 而本研究分离筛选的糖精钠废水降解菌菌株 A20 是中度耐盐菌的典型代表。盐单胞菌属(*Halomonas*)能够产生渗透压补偿溶质, 如四氢嘧啶, 以抵抗高盐胁迫。盐单胞菌不仅具有较强的环境适应能力, 可在高盐或高盐碱环境中生存, 而且能够降解多种物质, 具有高效降解苯酚^[31]、石油^[32]的能力, 而且能够脱氮除磷^[33–34]。虽然已有大量研究报道了对盐单胞菌属(*Halomonas*)的分离和鉴定, 但截至目前利用盐单胞菌降解糖精钠废水的研究尚未见报道。本研究筛选到的菌株 A20 具有以实际的高盐、高 COD 浓度的糖精钠废水为唯一基质进行生长代谢, 而且能够有效降解糖精钠废水中有机物的独特潜质, 是一种切实可行又具有实际应用价值的生物强化剂。虽然单一菌株 A20 的 COD_{Cr} 去除效果低于上述部分生物法, 但可联合其他微生物或活性污泥中的复合生态, 同时基于固定化技术^[35]、复苏促进因子^[36]、群体感应^[37]等, 为微生物降解系统的耐盐强化提供新的技术策略和方法, 进一步提高废水的处理效率。综上所述, 糖精钠废水中含有大量苯系物, 而盐单胞菌属(*Halomonas*)具有高效降解苯酚的功能, 菌株 A20 能够将糖精钠废水中的有害物质降解成低害或无害的物质, 从而降低该废水中的 COD_{Cr} 值, 而且具有较高的耐盐能力和环境适应性, 在高盐、高浓度糖精钠废水及其他复杂废水净化领域具有研究与应用价值。

4 结论

(1) 本研究从处理糖精钠废水的多级生物接触氧化系统的活性污泥中筛选到 18 株细

菌, 经过初筛和复筛, 菌株 A20 对 5%盐分的糖精钠废水降解效果较好, 根据对菌株 A20 的形态特征、生理生化特性的描述与建立的系统发育树所得的结果表明菌株 A20 是盐单胞菌属 (*Halomonas*)。

(2) 当糖精钠废水的盐分为 5%, 接种量为 15%, pH 值为 8.0, 温度为 30 °C 时, 菌株 A20 对糖精钠废水中的 COD_{Cr} 去除率在 60%以上。

(3) 通过响应面法优化, 菌株 A20 的最佳降解条件为: pH 8.0, 温度为 30.3 °C, 接种量为 14.1%。在此条件下, 菌株 A20 对糖精钠废水的 COD_{Cr} 去除率为 65.4%。菌株 A20 不仅能够以高盐高浓度的糖精钠废水作为唯一生长基质进行繁殖, 而且能够独立、高效地降解该废水, 可作为一种良好的菌种资源进行开发利用。

REFERENCES

- [1] Lefebvre O, Moletta R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review[J]. *Water Research*, 2006, 40(20): 3671-3682
- [2] Maharaja P, Magthalin CJ, Mahesh M, Sunkapur LK, Swarnalatha S, Sekaran G. Treatment of tannery saline wastewater by using effective immobilized protease catalyst produced from salt tolerant *Enterococcus faecalis*[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2017, 5(2): 2042-2055
- [3] 李美菊, 蒲帅天, 张万青, 苏鸿钧. 糖精钠生产工艺评述[J]. *广东化工*, 2007, 34(1): 70-72
Li MJ, Pu ST, Zhang WQ, Su HJ. Discussing about the production technics of saccharin sodium[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2007, 34(1): 70-72 (in Chinese)
- [4] 赵佳倚, 李聪. 高盐工业废水的处理技术研究进展[J]. *资源节约与环保*, 2021(3): 100-101
Zhao JY, Li C. Research progress of high salt industrial wastewater treatment technology[J]. *Resources Economization & Environmental Protection*, 2021(3): 100-101 (in Chinese)
- [5] 朱利杰. 人工甜味剂糖精钠生产废水处理实验研究[D]. 天津: 天津工业大学硕士学位论文, 2020
Zhu LJ. Experimental study on the treatment of saccharin sodium production wastewater by artificial sweetener[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin Polytechnic University, 2020 (in Chinese)
- [6] 周佳. 多级接触氧化技术处理高盐有机废水及微生物学特性研究[D]. 郑州: 郑州大学博士学位论文, 2019
Zhou J. Study on the multistage contact oxidation technology treatment of hypersaline organic wastewater and its microbiological characteristics[D]. Zhengzhou: Doctoral Dissertation of Zhengzhou University, 2019 (in Chinese)
- [7] 石娟, 周攀, 陈意超, 刘晓风, 李东. 一株耐盐嗜热菌 *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H7 的分离及其油脂降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2021, 27(1): 214-219
Shi J, Zhou P, Chen YC, Liu XF, Li D. Isolation and oil degrading characterization of a halotolerant thermophile *Aneurinibacillus thermoaerophilus* H7[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2021, 27(1): 214-219 (in Chinese)
- [8] 刘亚珍. 几种高级氧化技术在糖精钠废水中的应用[D]. 开封: 河南大学硕士学位论文, 2018
Liu YZ. Study on several advanced oxidation techniques for degradation of saccharine sodium wastewater[D]. Kaifeng: Master's Thesis of Henan University, 2018 (in Chinese)
- [9] 刘亚楼. 耐盐菌 *Staphylococcus* sp. WS-1 及其在高盐废水生物处理中的应用[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2020
Liu YL. Salt-tolerant bacteria *Staphylococcus* sp. WS-1 and its application in biological treatment of high-salt wastewater[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [10] 廖焰焰, 王帅, 杨林, 施文杰, 王筱兰. 一株高效耐盐菌的筛选鉴定及污水处理特性研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(9): 3867-3873
Liao YY, Wang S, Yang L, Shi WJ, Wang XL. Screening and identification of a high efficient salt-tolerant strain and study on its characteristics of sewage treatment[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(9): 3867-3873 (in Chinese)
- [11] Piubeli F, Grossman MJ, Fantinatti-Garboggini F, Durrant LR. Enhanced reduction of COD and aromatics in petroleum-produced water using indigenous microorganisms and nutrient addition[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 68: 78-84
- [12] 刘亚楼, 樊霆, 刘如, 潘丹丹, 郭艺慧, 罗娜, 叶文玲, 陈海燕, 何冰. 一株耐盐菌的筛选、鉴定及对苯酚和镉耐性特征[J]. *安徽农业大学学报*, 2020, 47(3): 402-408

- Liu YL, Fan T, Liu R, Pan DD, Guo YH, Luo N, Ye WL, Chen HY, He B. Screening, identification and tolerance to phenol and cadmium of a salt-tolerant strain[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2020, 47(3): 402-408 (in Chinese)
- [13] 廖焰焰. 高盐医药化工废水中优势功能菌的筛选及其耐盐分子机制研究[D]. 南昌: 江西师范大学硕士学位论文, 2019
- Liao YY. Screening and its molecular mechanism of salt tolerance of dominant functional bacteria in high-salt medicine chemical wastewater[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Normal University, 2019 (in Chinese)
- [14] 金艳, 张永红, 宋兴福, 连伟, 何化, 于建国. 一株降解页岩气采出水耐盐菌的分离鉴定与特性[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2020, 46(6): 722-729
- Jin Y, Zhang YH, Song XF, Lian W, He H, Yu JG. Identification and characteristics of a salt-tolerant bacteria for shale gas produced water treatment[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2020, 46(6): 722-729 (in Chinese)
- [15] Yu B, Zhou Y, Huang ZW, Chen L. Effect of hydraulic retention time on pollutant removal performance of biological contact oxidation process treating hospital wastewater[J]. Applied Mechanics and Materials, 2014, 507: 725-729
- [16] Shi YJ, Huang CK, Gamal El-Din M, Liu Y. Optimization of moving bed biofilm reactors for oil sands process-affected water treatment: the effect of HRT and ammonia concentrations[J]. Science of the Total Environment, 2017, 598: 690-696
- [17] 国家环境保护总局. 水质 全盐量的测定 重量法: HJ/T 51—1999[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2004
- State Environmental Protection Administration Water quality: Determination of total salt: Gravimetric method: HJ/T 51—1999[S]. Beijing: China Environment Science Press, 2004 (in Chinese)
- [18] 杨霞, 陈陆, 王川庆. 16S rRNA 基因序列分析技术在细菌分类中应用的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(2): 55-60
- Yang X, Chen L, Wang CQ. Advance in application of 16S rRNA gene in bacteriology[J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2008, 36(2): 55-60 (in Chinese)
- [19] 王丽娟, 钱子雯, 沈海波, 朱君, 吴彦霏, 陈孟君, 王利群. 一株耐盐菌的分离及其降解特性[J]. 化工进展, 2017, 36(3): 1047-1051
- Wang LJ, Qian ZW, Shen HB, Zhu J, Wu YF, Chen MJ, Wang LQ. Separation and biodegradation characteristics of a halotolerant strain[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2017, 36(3): 1047-1051 (in Chinese)
- [20] Kaye JZ, Baross JA. Synchronous effects of temperature, hydrostatic pressure, and salinity on growth, phospholipid profiles, and protein patterns of four *Halomonas* species isolated from deep-sea hydrothermal-vent and sea surface environments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 6220-6229
- [21] Yoon JH, Choi SH, Lee KC, Kho YH, Kang KH, Park YH. *Halomonas marisflavae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the Yellow Sea in Korea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 3): 1171-1177
- [22] Guadie A, Gessesse A, Xia SQ. *Halomonas* sp. strain A55, a novel dye decolorizing bacterium from dye-uncontaminated Rift Valley Soda Lake[J]. Chemosphere, 2018, 206: 59-69
- [23] Mulet M, Sánchez D, Rodríguez AC, Nogales B, Bosch R, Busquets A, Gomila M, Lalucat J, García-Valdés E. *Pseudomonas gallaeciensis* sp. nov., isolated from crude-oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2018, 41(4): 340-347
- [24] Gaboyer F, Vandenabeele-Trambouze O, Cao JW, Ciobanu MC, Jebbar M, Le Romancer M, Alain K. Physiological features of *Halomonas lionensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from a Mediterranean Sea sediment[J]. Research in Microbiology, 2014, 165(7): 490-500
- [25] Ilham M, Nakanomori S, Kihara T, Hokamura A, Matsusaki H, Tsuge T, Mizuno K. Characterization of polyhydroxyalkanoate synthases from *Halomonas* sp. O-1 and *Halomonas* Elongata DSM2581: site-directed mutagenesis and recombinant expression[J]. Polymer Degradation and Stability, 2014, 109: 416-423
- [26] 曹微寰, 周琪. 糖精酯化废水生物处理的试验研究[J]. 中国环境科学, 2000, 20(3): 263-267
- Cao WH, Zhou Q. Study on biotreatment of esterification wastewater from saccharin production[J]. China Environmental Science, 2000, 20(3): 263-267 (in Chinese)
- [27] 王世和, 吴慧芳. 糖精钠生产废水的综合处理技术[J]. 水处理技术, 2002, 28(4): 235-238
- Wang SH, Wu HF. Study on comprehensive treatment technology of saccharin sodium produced wastewater[J].

- Technology of Water Treatment, 2002, 28(4): 235-238 (in Chinese)
- [28] Vymazal J, Dvořáková Březinová T. Removal of saccharin from municipal sewage: the first results from constructed wetlands[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 306: 1067-1070
- [29] Qu JH, Chen XL, Zhou J, Li HS, Mai WN. Treatment of real sodium saccharin wastewater using multistage contact oxidation reactor and microbial community analysis[J]. Bioresource Technology, 2019, 289: 121714
- [30] 成钰, 李秋芬, 费聿涛, 张艳. 海水异养硝化-好氧反硝化芽孢杆菌 SLWX₂ 的筛选及脱氮特性[J]. 环境科学, 2016, 37(7): 2681-2688
- Cheng Y, Li QF, Fei YT, Zhang Y. Screening and nitrogen removing characteristics of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria SLWX₂ from sea water[J]. Environmental Science, 2016, 37(7): 2681-2688 (in Chinese)
- [31] 赵娜娜, 许继飞, 宋晓雪, 田鹏, 丁舒心, 赵吉. 嗜盐高效降酚菌株 *Halomonas* sp. H17 的筛选及降解苯酚特性[J]. 环境科学学报, 2019, 39(2): 318-324
- Zhao NN, Xu JF, Song XX, Tian P, Ding SX, Zhao J. Screening and phenol-degrading characteristics of a highly efficient phenol-degrading halophilic bacterial strain *Halomonas* sp. H17[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, 39(2): 318-324 (in Chinese)
- [32] 张徐畅, 陈超, 刘秋. 5 株海洋石油降解菌 *Halomonas* spp. 的降解特性分析[J]. 大连民族大学学报, 2021, 23(1): 16-20
- Zhang XC, Chen C, Liu Q. Analysis of degradation characteristics of 5 marine petroleum degrading bacteria of *Halomonas* spp.[J]. Journal of Dalian Minzu University, 2021, 23(1): 16-20 (in Chinese)
- [33] 王特. *Halomonas* sp. B01 SND 脱氮特性及其耐盐脱氮机理研究[D]. 大连: 大连海事大学博士学位论文, 2020
- Wang T. Nitrogen removal characteristics and salt-tolerant nitrogen removal mechanism of *Halomonas* sp. B01 SND[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of Dalian Maritime University, 2020 (in Chinese)
- [34] 任世英. 海洋聚磷菌 *Halomonas* YSR-3 的除磷特性研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士学位论文, 2008
- Ren SY. Phosphate-absorbing characterization of a marine polyphosphate-accumulating bacterium, *Halomonas* YSR-3[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2008 (in Chinese)
- [35] 杨宗政, 许文帅, 吴志国, 曹井国, 武莉娅, 王春虎, 赵晓宇. 微生物固定化及其在环境污染治理中的应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4278-4292
- Yang ZZ, Xu WS, Wu ZG, Cao JG, Wu LY, Wang CH, Zhao XY. Microbial immobilization in environmental pollution treatment: a review[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4278-4292 (in Chinese)
- [36] Su XM, Li S, Xie MQ, Tao LQ, Zhou Y, Xiao YY, Lin HJ, Chen JR, Sun FQ. Enhancement of polychlorinated biphenyl biodegradation by resuscitation promoting factor (Rpf) and Rpf-responsive bacterial community[J]. Chemosphere, 2021, 263: 128283
- [37] Sun JM, Sun HP, Lyu WZ, Zhang QD, Wan PF, Jiang L, Zhong YY. Quorum sensing mediates yeast cell morphology to improve settleability: implication for wastewater treatment[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(5): 105817