

## 研究报告

## 一株油脂降解菌的分离筛选及固定化

司春灿\*, 林英, 殷俊

景德镇学院 生物与环境工程学院, 江西 景德镇 333400

司春灿, 林英, 殷俊. 一株油脂降解菌的分离筛选及固定化[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 186-198.

SI Chuncan, LIN Ying, YIN Jun. Screening and immobilization of a strain capable of degrading oil[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 186-198.

**摘要:** 【背景】高效菌株是影响生物法降解油脂污染物效率的关键因素之一。【目的】筛选高效的油脂降解菌, 对其固定化条件进行优化, 并评估固定化菌降解油脂效率。【方法】通过油脂降解平板筛选, 从萍乡传统腊肉中分离到一株降解油脂能力较强的菌株; 以 16S rRNA 基因鉴定了其分类地位, 并采用 3 项致病性指标检测了其安全性。通过单因素试验和正交试验优化了固定化条件, 对比了固定化菌和游离菌对大豆油油脂的降解效果, 评估了固定化菌的重复使用效果及对实际污水中油脂的降解效果。【结果】筛选菌株为葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.), 无致病性。最佳固定化条件为: 海藻酸钠浓度 4.0%, CaCl<sub>2</sub> 浓度 2.0%, 海藻酸钠溶液与菌液的体积比为 1:1, 交联时间 8.0 h。固定化菌在 pH 7.0、30.0 °C、180.0 r/min 培养 3.0 d 的情况下, 对大豆油的油脂降解率最高可达 65.7%, 比游离菌高 14.1%, 比游离菌具有更宽的 pH 适应范围和更强的冷热稳定性, 重复使用 4 次仍具有较好的油脂降解效果。【结论】固定化菌对食堂下水道污水油脂的降解率达到了 41.6%, 该固定化菌球对大豆油和实际污水都具有一定的油脂降解效果。

**关键词:** 传统腊肉; 油脂降解菌; 分离筛选; 固定化

## Screening and immobilization of a strain capable of degrading oil

SI Chuncan\*, LIN Ying, YIN Jun

School of Biological and Environmental Engineering, Jingdezhen University, Jingdezhen 333400, Jiangxi, China

**Abstract:** [Background] Efficient strains are the key to the biodegradation of oil pollutants. [Objective] To screen an efficient oil-degrading strain, optimize its immobilization conditions,

资助项目: 国家自然科学基金(22265015); 江西省教育厅科学技术研究资助项目(GJJ191162, GJJ151277)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22265015), and the Science and Technology Research Support Project of Jiangxi Provincial Department of Education (GJJ191162, GJJ151277).

\*Corresponding author. E-mail: sichuncan@163.com

Received: 2024-04-20; Accepted: 2024-09-15; Published online: 2024-11-08

and evaluate the oil degradation efficiency of the immobilized strain. **[Methods]** A highly efficient oil-degrading strain was isolated from traditional bacon in Pingxiang by the plate culture method and identified by 16S rRNA gene sequencing. The safety of the strain was evaluated based on three pathogenic indicators. The immobilization conditions of the strain were optimized by single factor tests and an orthogonal design. The degradation effects of the immobilized strain and free strain on soybean oil were compared. Furthermore, the reuse effect and the degradation effect of the immobilized strain on the oil in sewage were evaluated. **[Results]** The strain was identified as *Staphylococcus* sp., and it was not pathogenic. The optimal immobilization conditions for the strain were 4.0% sodium alginate, 2.0% CaCl<sub>2</sub>, sodium alginate solution:strain suspension volume ratio of 1:1, and crosslinking for 8 h. In the case of degrading soybean oil at pH 7.0, 30.0 °C, and 180.0 r/min for 3 days, the immobilized strain achieved the highest degradation rate of 65.7%, which was 14.1% higher than that of the free strain. Moreover, the immobilized strain had tolerance to a wider pH range and stronger thermal stability than the free strain, and it demonstrated high oil-degrading ability after being repeatedly used for 4 times. **[Conclusion]** The degradation rate of the immobilized strain reached 41.6% for the oil in sewage. The immobilized strain can degrade both soybean oil and sewage oil, demonstrating a broad application prospect.

**Keywords:** traditional bacon; oil-degrading strain; screening; immobilization

餐饮废水油脂含量较高, 直接排放不仅会对水生生态系统造成破坏, 而且长期暴露在高温下, 还会导致致癌副产物的形成<sup>[1-2]</sup>。处理含油废水常用的方法有化学法、物理法和生物法。其中, 生物法是指利用具有降解功能的微生物或微生物所产生的脂肪酶系将油脂水解为甘油和脂肪酸的方法<sup>[3]</sup>。该方法具有简便、能耗低、效果持久、无二次污染等优点, 是深度处理有机物的重要手段之一<sup>[4-5]</sup>。

油脂降解菌的筛选和分离逐渐成为研究热点, 越来越多的研究者尝试分离筛选出具有较强油脂降解效果的微生物, 如易蒲红等<sup>[6]</sup>从餐厨垃圾中分离出了可高效降解油脂废水的酯香微杆菌(*Microbacterium esteraromaticum*); 王亚军等<sup>[7]</sup>从污泥中分离的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)对油脂和实际污水中的有机物都具有较好的降解效果。Gao 等<sup>[8]</sup>从污泥中分离的 3 株

油脂降解菌, 在植物油含量为 2.0%–4.0%时, 对油脂的降解率都达到了 85.0%以上。在实验室条件下, 这些分离菌株都表现出了较好的油脂降解能力。但是, 由于游离菌易分散, 加之废水不断冲刷和废水中有害物质会对菌体细胞带来毒害等, 直接采用游离菌处理废水, 往往达不到理想的效果<sup>[9-10]</sup>。固定化技术可为菌体细胞在恶劣环境下提供一定的保护屏障, 并且可循环使用, 常被用于实际污水处理<sup>[11-12]</sup>。海藻酸钠具有渗透性能好、对微生物毒性小、价格低廉、可回收等优点, 是固定化微生物常用的载体<sup>[13]</sup>。

本研究拟从萍乡传统腊肉中筛选高效的油脂降解菌, 并以海藻酸钠为载体材料, 探究其最佳固定化条件, 评估固定化菌对大豆油油脂的降解效果、重复使用效果及对实际污水中油脂的降解效果, 以期为油脂废水处理提供一定的参考价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样 品

传统腊肉购自江西省萍乡市上栗县农贸市场, 使用无菌封口袋带回实验室进行后续试验; 测试用生活污水取自景德镇学院第一食堂下水道。

### 1.2 培 养 基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; 富集培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, 大豆油 5.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.0; 油脂中性红培养基(g/L): NaCl 5.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0, 琼脂 15.0, Tween-80 20 mL, 大豆油 10.0 mL, 1.6%中性红水溶液 1.0 mL; 三丁酸甘油酯培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15.0, 三丁酸甘油 11.0 mL, pH 7.0; 油脂降解测定培养基(g/L): 蛋白胨 1.0, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, 大豆油 3.0 mL, pH 7.2。

### 1.3 主要试剂和仪器

PCR 扩增试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 紫外可见分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; pH 计, 杭州奥立龙仪器有限公司; 台式高速离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; 冷场发射扫描电镜, 日立科学仪器公司; 气浴恒温振荡培养箱, 厦门金河源科技有限公司。

### 1.4 油脂降解菌的分离与筛选

用无菌手术刀片从腊肉表面采取样品, 切碎后加入到富集培养基中, 180.0 r/min、30.0 °C 培养 3.0 d, 进行富集驯化<sup>[14]</sup>。采用油脂中性红固体培养基和三丁酸甘油酯固体培养基进行初筛, 选取  $D/d$  比值大于 1.5 的菌株( $D$  为水解圈直径,  $d$  为菌落直径), 接种于以大豆油为唯一

碳源的油脂降解测定培养基中进行复筛<sup>[6]</sup>。

### 1.5 菌株的鉴定及安全性检测

复筛后选取降解油脂效果最好的菌株, 参照易蒲红等<sup>[6]</sup>的方法, 挑取其单菌落进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增。PCR 反应体系(25.0 μL): 引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (10.0 μmol/L) 1.0 μL, 引物 1492R (5'-TACGGT TACCTTGTTACGACTT-3') (10.0 μmol/L) 1.0 μL, DNA 模板 1.0 μL, 10×PCR Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 5.0 μL, dNTPs (10.0 mmol/L) 1.0 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 无菌水补足 25.0 μL。PCR 反应条件: 94.0 °C 10.0 min; 94.0 °C 1.0 min, 56.0 °C 45.0 s, 72.0 °C 1.0 min, 共 35 个循环; 72.0 °C 7.0 min。将 PCR 产物纯化回收后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序后使用 IQ-Tree 1.6 软件采用最大似然法构建系统发育树, 确定分离菌株的分类地位。菌株的形态特征采用冷场发射扫描电镜测定, 菌株的安全性检测参照王海燕等<sup>[15]</sup>的方法进行。

### 1.6 固定化菌球的制备及条件优化

固定化菌球的制备: 将菌株接种于 LB 培养基中, 25.0 °C、160.0 r/min 培养 24.0 h, 采用比浊法将其稀释为 1.0×10<sup>7</sup> CFU/mL 的菌液。用无菌注射器吸取 1.0 mL 含有菌液的海藻酸钠溶液注入 CaCl<sub>2</sub> 溶液中, 常温下交联 24.0 h, 制成固定化菌球, 将固定化菌球用生理盐水冲洗 3 遍备用。

固定化菌球油脂降解率的测定: 将 2.0 g 固定化菌球接种于 50.0 mL 以大豆油为唯一碳源的培养基中, 参照易蒲红等<sup>[6]</sup>的方法, 30.0 °C、180 r/min 培养 3.0 d, 测定油脂降解率。

$$\text{油脂降解率} = (C_1 - C_2) / C_1 \times 100\%$$

其中:  $C_1$  为初始培养时油脂浓度,  $C_2$  为培养结束时油脂浓度。

固定化菌球制备条件的优化: 先采用单因素考察不同海藻酸钠浓度(2.0%、3.0%、4.0%、

5.0%、6.0%、7.0%)，CaCl<sub>2</sub> 浓度(1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%)，海藻酸钠溶液与菌液体积比(1:0.5、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3)，交联时间(4.0、8.0、12.0、16.0、20.0、24.0 h)对固定化菌球成球性、机械强度和油脂降解率的影响。菌球机械强度的测定参照戴云飞等<sup>[6]</sup>的方法进行。在单因素的基础上，利用 SPSS AU 在线分析软件设计正交试验并进行极差分析，根据极差分析的结果确定固定化菌球的最佳制备条件。

### 1.7 固定化菌球降解油脂条件的优化

**pH:** 将 2.0 g 固定化菌球(游离菌试验为 1.0 mL 菌液)投入 50.0 mL 不同 pH (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)的油脂降解测定培养基中，30.0 °C、180.0 r/min 培养 3.0 d 测定油脂降解率。

**温度:** 将 2.0 g 固定化菌球(游离菌试验为 1.0 mL 菌液)投入 pH 7.0 的 50.0 mL 油脂降解测定培养基中，分别置于不同温度的摇床中(20.0、25.0、30.0、35.0、40.0 °C)培养 3.0 d，测定油脂降解率<sup>[6]</sup>。由于本实验中 1.0 mL 菌液按海藻酸钠溶液:菌液为 1:1 的量可制备 2.0 g 左右菌球，因此游离菌试验菌液的添加量为 1.0 mL。

### 1.8 固定化菌球的重复利用

为检测固定化菌球的重复使用性能，对固定化菌球回收并进行连续的油脂降解试验。在完成步骤 1.6 和步骤 1.7 后，按照确定固定化菌球的最佳制备条件和最优反应条件，对同一批次的固定化菌球进行连续降解试验。每次完成试验后，将固定化菌球回收，用生理盐水洗涤后重复使用，30.0 °C、180.0 r/min 培养 3.0 d，按照相同步骤重复 4 次，测定每次重复后的油脂降解率。

### 1.9 固定化菌球对实际污水的降解

将最优条件下制备的 2.0 g 固定化菌球投入装有 50.0 mL 来自食堂下水道生活污水(油脂含量约 20.0 mL/L，调 pH 至 7.0)的三角瓶中，

30.0 °C、180.0 r/min 培养 3.0 d，测定培养前后污水中油脂的含量，并计算油脂降解率。

### 1.10 数据分析

采用 Origin Pro 2021 软件的 ANOVA 进行最小显著差数(least significant difference, LSD)法多重比较，检验组间的差异显著性。采用 SPSSAU 在线分析软件设计正交试验和进行极差分析。采用 SigmaPlot (12.5)作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 油脂降解菌的分离及筛选结果

在油脂中性红固体培养基上培养 3.0 d 后发现部分菌落明显变红，初步筛选出 6 株具有油脂降解能力的菌株，将这 6 株菌依次编号为 LR1-LR6。在三丁酸甘油酯固体培养基上获得 6 株菌的水解圈直径  $D$ 、菌落直径  $d$  及两者的比值(表 1)。从表 1 可知，LR1、LR2、LR5、LR6 这 4 株菌在三丁酸甘油酯固体培养基上均表现出了较好的油脂降解能力， $D/d$  值都到达了 1.5 以上，其中菌株 LR2 的  $D/d$  值最大，达到了  $2.2 \pm 0.4$ 。菌株 LR2 在三丁酸甘油酯固体培养基上产生的水解圈和扫描电镜的形态如图 1 所示。

表 1 六株解油菌在三丁酸甘油酯平板上的水解能力

Table 1 Hydrolysis ability of six oil-degrading bacteria on glycerol tributyratate plat

菌株 Strain	水解圈直径 Diameter of hydrolysis circle ( $D$ , cm)	菌落直径 Diameter of colony ( $d$ , cm)	$D/d$
LR1	0.7±0.1B	0.4±0.1D	1.9±0.2AB
LR2	1.2±0.1A	0.4±0.1C	2.2±0.4A
LR3	0.8±0.1B	0.5±0.1C	1.4±0.1C
LR4	0.7±0.2B	0.5±0.0C	1.3±0.3C
LR5	1.2±0.1A	0.7±0.0B	1.7±0.0BC
LR6	1.2±0.1A	0.8±0.0A	1.6±0.2BC

同一列不同的英文字母代表不同菌株之间存在显著性差异。The different letters indicate significant differences between the different strains.

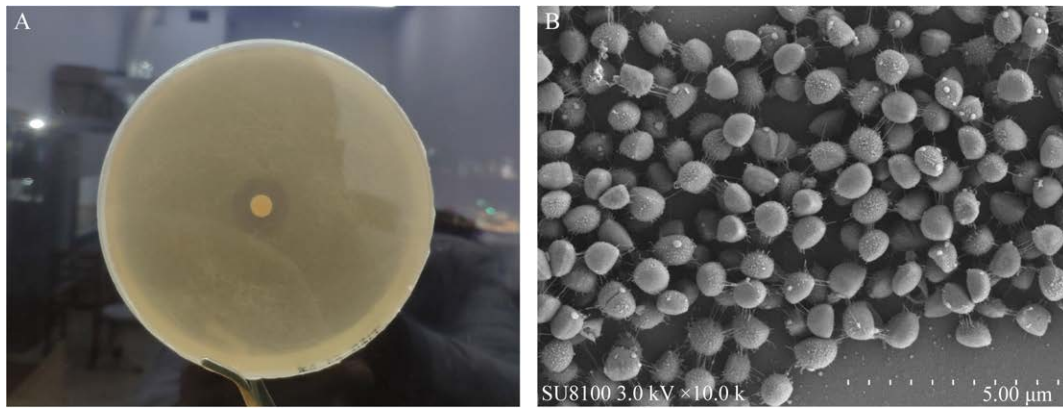


图1 菌株 LR2 在三丁酸甘油酯培养基上产生的水解圈(A)和在扫描电镜下的形态(B)

Figure 1 The hydrolysis circle produced by strain LR2 on glycerol tributyrat plate (A) and the morphology of strain LR2 under scanning electron microscope (B).

选取  $D/d$  值为 1.5 以上的 4 株菌株 LR1、LR2、LR5 和 LR6, 在以大豆油为唯一碳源的培养基上, 进一步测定其油脂降解能力。结果表明, 菌株 LR2 具有最强的油脂降解能力, 其油脂降解率达到了 54.9%, 明显高于其他 3 株菌(图 2)。因此, 选取菌株 LR2 作进一步的菌株鉴定和固定化研究。

## 2.2 油脂降解菌的鉴定及安全性检测结果

菌株 LR2 的 16S rRNA 基因经生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序结果与 NCBI 数据库进行同源性比较, 比对结果显示, 该菌株与葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)具有很高的同源性, 相似度 100%。系统发育树的结果表明, 该菌株与葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.) YUC11-2MCC3055 聚为一支(图 3), 因而将菌株 LR2 初步归属为葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)。扫描电镜下观察到该菌呈球形、葡萄串状排列, 表面光滑, 无鞭毛, 菌体直径约 0.5–1.0  $\mu\text{m}$ (图 1B)。菌株的安全性检测显示: 溶血性试验、血浆凝固酶试验、耐热核酸酶试验结果均为阴性(表 2), 因此可初步判断菌株 LR2 是安全的, 可以用于含油脂污水的处理。

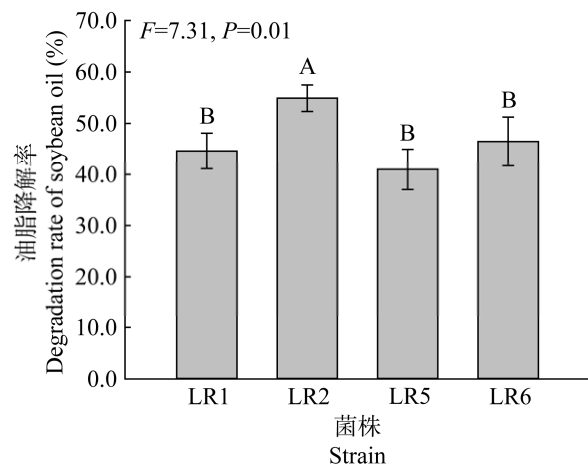


图2 菌株 LR1、LR2、LR5、LR6 对大豆油脂的降解率 不同的英文字母代表不同菌株之间存在显著性差异。

Figure 2 Degradation rate of soybean oil by strains LR1, LR2, LR5, and LR6. The different letters indicate significant differences between the different strains.

## 2.3 海藻酸钠固定化菌球制备条件优化

### 2.3.1 不同海藻酸钠浓度对固定化菌球的影响

由表 3 可知, 当海藻酸钠浓度为 4.0% 时, 成球效果较佳, 菌球形状规则且破碎率较低。当海藻酸钠浓度低于 4.0% 时或高于 4.0% 时, 形

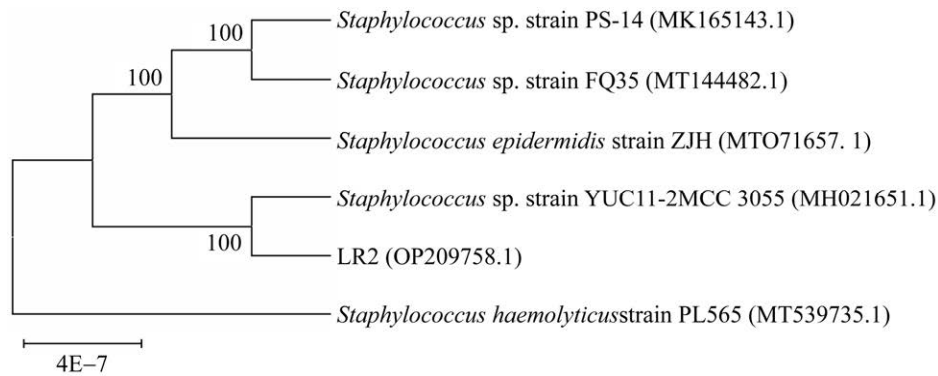


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 LR2 的系统发育树 括号内为菌株的 GenBank 登录号；分支点上的数字代表自展值；标尺代表序列差异的分支长度。

Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain LR2. The serial number in brackets is the GenBank accession number. The number on the node show bootstrap values. The bar shows the branch length represented by sequence differences.

表 2 菌株 LR2 致病性指标测定结果

Table 2 Results of three pathogenicity indexes of strain LR2

指标 Index	结果 Result
溶血性试验 Hemolytic test	阴性 Negative
血浆凝固酶试验 Plasma coagulase test	阴性 Negative
耐热核酸酶试验 Heat resistant nuclease test	阴性 Negative

成的菌球不规则或不完整或有明显的拖尾现象 (图 4)。

这说明，海藻酸钠的浓度过高或者过低都无法形成规则菌球，这与苏增建等<sup>[17]</sup>的研究结果一致。单因素方差分析的结果显示，不同海藻酸钠浓度对油脂降解率存在显著性差异( $F=5.71$ ,  $P<0.01$ )。当海藻酸钠为 4.0%时，固定化菌球油脂降解率达到最大为 52.8%。在海藻酸钠浓度过低时，形成的菌球结构松散，包埋的菌体数量偏少，导致油脂降解率偏低；而海藻酸钠浓度较大时，因菌球较为致密，影响底物扩散，从而影响底物降解。

### 2.3.2 不同 CaCl<sub>2</sub> 浓度对固定化菌球的影响

由表 4 可知，当 CaCl<sub>2</sub> 浓度小于 3.0%时，

表 3 不同海藻酸钠浓度对固定化菌球性能的影响  
Table 3 Effect of different sodium alginate concentrations on the immobilized beads

海藻酸钠浓度 Sodium alginate concentrations (%)	成球形状 Microsphere shape	破碎率 Fragmentation rate (%)	降解率 Degradation rate (%)
2.0	不形成完整球形 Incomplete globule formation	48.0	46.1±6.8A
3.0	球形不规则 Irregular ball	21.0	43.2±4.3AB
4.0	完整小球 Complete sphere	8.0	52.8±4.5A
5.0	拖尾明显 Apparent tailing	5.0	44.8±6.6AB
6.0	拖尾严重 Severe tailing	6.0	35.6±6.2BC
7.0	拖尾严重 Severe tailing	3.0	30.6±5.6C

不同的英文字母代表不同菌株之间存在显著性差异。The different letters indicate significant differences between the different strains.

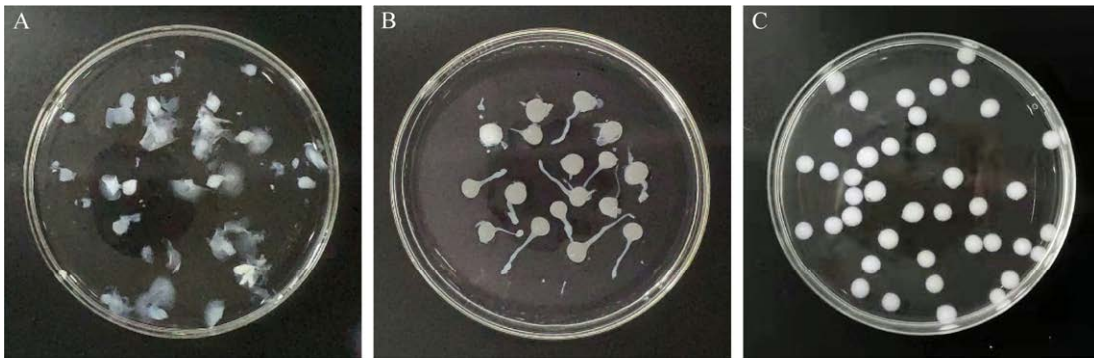


图4 不同形态的固定化菌球 A: 絮状不规则小球; B: 拖尾严重小球; C: 完整规则小球。

Figure 4 Fixed bacterial balls of different forms. A: Flocculent irregular ball; B: Severe tailing ball; C: Spherical regular ball.

表4 不同CaCl<sub>2</sub>浓度对菌球性能的影响

Table 4 Effect of different CaCl<sub>2</sub> concentrations on the immobilized beads

CaCl <sub>2</sub> 浓度 CaCl <sub>2</sub> concentrations (%)	成球形状 Microsphere shape	破碎率 Fragmentation rate (%)	降解率 Degradation rate (%)
1.0	球形不规则, 结构松散 Irregular ball, loose structure	26.0	50.6±4.6AB
2.0	规则小球, 结构较松散 Regular ball, loose structure	14.0	56.1±5.8A
3.0	规则小球 Regular ball	6.0	48.7±5.2AB
4.0	规则小球 Regular ball	5.0	42.1±6.0B
5.0	规则小球 Regular ball	2.0	27.7±5.5C
6.0	规则小球 Regular ball	1.0	28.0±5.9C

不同的英文字母代表不同菌株之间存在显著性差异。

The different letters indicate significant differences between the different strains.

形成的菌球结构松散, 破碎率较高, 说明菌球机械强度低。单因素方差分析的结果显示, 不同CaCl<sub>2</sub>浓度对油脂降解率存在极显著性差异( $F=14.14, P<0.001$ )。当CaCl<sub>2</sub>浓度为2.0%时, 油脂降解率最高达到56.1%。CaCl<sub>2</sub>浓度增加到4.0%后, 油脂降解率明显下降。分析其可能的原因是CaCl<sub>2</sub>浓度过高, 会使凝胶内部孔隙减小, 影响底物扩散, 从而影响底物降解<sup>[18]</sup>。

### 2.3.3 海藻酸钠溶液与菌液体积比对固定化菌球的影响

由图5可知, 随着海藻酸钠溶液与菌液体积比的减小, 菌球的破碎率增加。说明随着海藻酸钠溶液的增加, 菌球的机械强度增加。单

因素方差分析的结果显示, 海藻酸钠溶液与菌液体积比对油脂降解率具有显著影响( $F=3.13, P<0.01$ )。当海藻酸钠溶液与菌液体积比为1时, 油脂降解率最高, 达到了52.2%。当两者比值达到最小(1:3)和最大时(1:0.5)时, 油脂降解率都明显低于其他组(图5)。分析其可能的原因是当添加的菌液体积小小时, 微生物数量少, 降解率下降。当菌液接种量过大时, 由于含油培养基中营养物质和溶解氧是一定的, 会导致固定化菌处于缺氧和贫营养状态, 降解率也随之下降。

### 2.3.4 交联时间对固定化菌球的影响

由图6可知, 交联时间为4.0 h时, 菌球破碎率较高, 达到12.0%, 交联时间为8.0 h时,

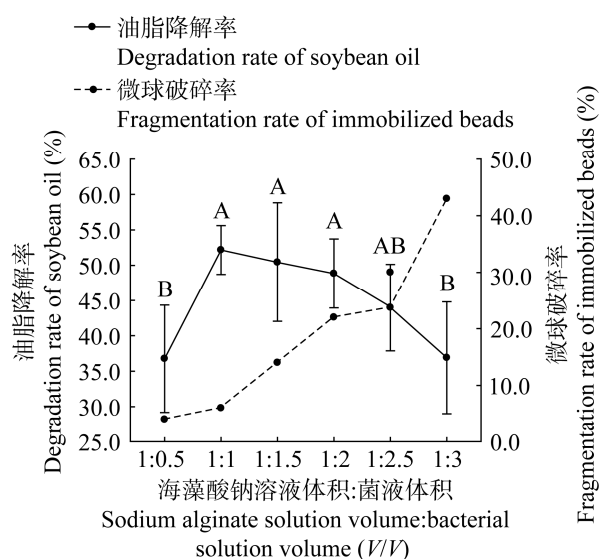


图 5 海藻酸钠溶液与菌液体积比对油脂降解率和菌球破碎率的影响 不同大写字母代表不同处理之间存在显著性差异。

Figure 5 The influence of the volume ratio of sodium alginate solution to bacterial solution on the oil degradation rate and immobilized beads fragmentation rate. The different capital letters indicate significant differences between the different treatments.

菌球破碎率达到 4.0%。交联时间大于 8.0 h 时，菌球破碎率呈下降趋势，在交联时间为 16.0 h 和 24.0 h 时，菌球破碎率都为 0%。单因素方差分析的结果显示，交联时间对油脂降解率存在显著性影响( $F=4.02$ ,  $P<0.05$ )。在交联时间为 4.0 h 时，油脂降解率最低为 30.7%。随交联时间的延长，油脂降解率呈现先增加而后逐渐减少的趋势(图 6)。分析其可能的原因是交联时间过短，海藻酸钠凝胶未得到完全交联，菌球机械强度和微生物活性较低，导致固定化菌降解率低；交联时间过长，会降低海藻酸钠载体的传质性能，从而降低固定化微生物的活性，导致固定化菌降解率降低<sup>[16,19]</sup>。

## 2.4 海藻酸钠固定化菌球的油脂降解效果优化

根据单因素试验的结果，本试验采用正交

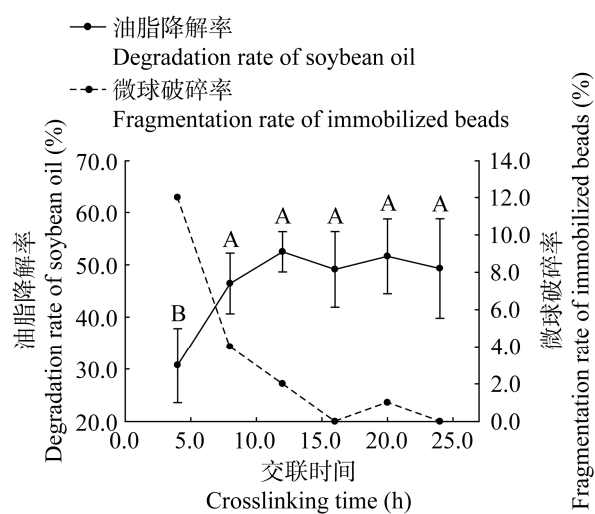


图 6 交联时间对油脂降解率和菌球破碎率的影响 不同大写字母代表不同处理之间存在显著性差异。

Figure 6 The influence of crosslinking time on the degradation rate of oil and fragmentation rate of immobilized beads. The different capital letters indicate significant differences between the different treatments.

试验进一步优化海藻酸钠固定化菌球的油脂降解效果。其中海藻酸钠浓度(因素 A)设为 3.0%、4.0%、5.0%， $\text{CaCl}_2$  浓度(因素 B)设为 1.0%、2.0%、3.0%，海藻酸钠溶液体积:菌液体积(因素 C)设为 1:0.5、1:1、1:1.5，交联时间(因素 D)设为 4.0、8.0 和 12.0 h。采用 SPSSAU 设计的四因素三水平正交表及极差分析结果如表 5 所示。根据表 5 中极差 R 值，可知影响降解效率的各因素主次顺序为： $B(\text{CaCl}_2 \text{ 浓度}) > A(\text{海藻酸钠浓度}) > D(\text{交联时间}) > C(\text{海藻酸钠溶液与菌液体积比})$ 。方差分析的结果显示  $\text{CaCl}_2$  浓度(因素 B)和交联时间(因素 D)对油脂降解率存在显著影响，其他因素在此试验范围内无显著差异，对测定结果的影响较小(表 6)。综合极差分析、方差分析结果，最终确定固定化菌球最佳包埋方案是： $A_2B_2C_2D_2$ ，即海藻酸浓度为 4.0%， $\text{CaCl}_2$  浓度为 2.0%，海藻酸钠溶液体积:菌液体积为 1:1，交联时间为 8.0 h。



表 5 四个固定化因素的正交试验水平及结果

Table 5 Orthogonal experimental level and results of four immobilized factors

实验号 Experiment number	A 海藻酸钠浓度 Sodium alginate concentration (%)	B CaCl <sub>2</sub> 浓度 CaCl <sub>2</sub> concentration (%)	C 海藻酸钠:菌液 Sodium alginate: bacterial solution	D 交联时间 Crosslinking time (h)	油脂降解率 Oil degradation rate (%)
1	A1 (3.0)	B1 (1.0)	C1 (1:0.5)	D1 (4.0)	53.9
2	A1 (3.0)	B2 (2.0)	C3 (1:1.5)	D2 (8.0)	61.3
3	A1 (3.0)	B3 (3.0)	C2 (1:1)	D3 (12.0)	54.7
4	A2 (4.0)	B1 (1.0)	C3 (1:1.5)	D3 (12.0)	55.7
5	A2 (4.0)	B2 (2.0)	C2 (1:1)	D1 (4.0)	64.6
6	A2 (4.0)	B3 (3.0)	C1 (1:0.5)	D2 (8.0)	58.4
7	A3 (5.0)	B1 (1.0)	C2 (1:1)	D2 (8.0)	56.7
8	A3 (5.0)	B2 (2.0)	C1 (1:0.5)	D3 (12.0)	57.3
9	A3 (5.0)	B3 (3.0)	C3 (1:1.5)	D1 (4.0)	55.2
K1	169.9	166.3	169.6	173.7	
K2	178.7	183.2	176.0	176.4	
K3	169.2	168.3	172.2	167.7	
R	3.1	5.6	2.1	2.9	
最佳水平 Optimal level	A2	B2	C2	D2	

表 6 正交试验的方差分析

Table 6 Analysis of variance in orthogonal experiments

方差来源 Source of variance	离差平方和 Sum of squares of deviation	均方 Mean square	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	P 值 P value
A	0.3	0.3	1	0.08	>0.05
B	172.4	86.2	2	23.53	<0.01
C	7.1	7.1	1	1.94	>0.05
D	18.2	18.2	1	4.97	<0.05

## 2.5 不同 pH 和温度对海藻酸钠菌球油脂降解效果的影响

由表 7 可知, 固定化菌较为合适的 pH 范围为 6.0–9.0, 而游离菌较为合适的 pH 范围为 6.0–8.0。在 pH 7.0 时, 固定化菌和游离菌的降解率都达到最高, 分别为 62.5%和 51.8%, 固定化菌比游离菌的降解率高 10.7%。温度被认为是影响微生物增殖和代谢的一个极其重要的环境因子。在温度为 30.0 °C 时, 固定化菌和游离

菌的降解率都达到最高, 分别为 65.7%和 51.6%, 固定化菌比游离菌的降解率高 14.1%。当温度为 25.0 °C 时, 固定化菌和游离菌的降解率分别下降了 10.4%和 13.3%。当温度为 40.0 °C 时, 固定化菌和游离菌的降解率分别下降了 10.0%和 11.1%。可能的原因是温度过低或过高, 导致溶血葡萄球菌分泌脂肪酶的能力或者是脂肪酶的活性受到影响, 从而导致油脂降解率下降。

总之, 固定化菌比游离菌具有更宽的 pH 适应范围和更高的冷热稳定性, 相较于游离菌, 固定化菌球的油脂降解效果更好, 这与屈瑾等<sup>[9]</sup>、马淑雯等<sup>[20]</sup>、Wu 等<sup>[21]</sup>的研究结果一致。分析其原因, 可能是由于更多的菌株在海藻酸钠球体内和表面富集生长, 有利于处在开放体系中的微生物富集与定殖, 从而显著提高了油脂降解效果, 同时包埋材料对营养物质的吸附和富集作用也可能促进了油脂的去除<sup>[9]</sup>。

表 7 不同 pH 和温度条件下固定化菌和游离菌对油脂降解效果的比较

Table 7 Comparison of oil-degradation efficiency between immobilized and free bacteria under different pH and temperature conditions

Item	固定菌降解率 Degradation rate of immobilized bacteria (%)	游离菌降解率 Degradation rate of free bacteria (%)
pH		
5.0	46.3±4.1C	35.5±2.2C
6.0	52.8±2.2B	48.5±1.4B
7.0	62.5±1.9A	51.8±1.3A
8.0	55.8±2.8B	47.2±2.3B
9.0	52.2±0.9B	36.3±0.9C
Temperature (°C)		
20.0	32.3±2.0C	25.4±1.6C
25.0	55.3±1.4B	38.3±1.2B
30.0	65.7±1.9A	51.6±2.1A
35.0	63.4±2.1A	50.2±1.9A
40.0	55.7±0.8B	40.5±1.8B

不同的英文字母代表不同处理之间存在显著性差异。

The different letters indicate significant differences between the different treatments.

## 2.6 固定化菌球的重复利用效果

在测定固定化菌球对降解大豆油的重复利用性能时,共重复使用 5 次,重复使用效果如图 7 所示。在第 1 到第 3 次重复使用期间,油脂降解率不存在显著性差异,固定化菌球能对大豆油保持较高的降解率。第 4 次重复使用时,菌球的降解率呈下降趋势,重复使用第 5 次时,油脂降解率下降明显,与前 4 次的油脂降解率存在显著性差异。重复使用次数较多时,固定化小球的机械强度有所下降,同时由于使用时间较长,可能菌体出现老化,导致降解率下降。固定化菌球在重复使用 4 次的情况下,能保持较强的机械强度和降解效果。

## 2.7 固定化菌球对实际污水的降解效果

由表 8 可知,以正交试验得出的最优条件即海藻酸浓度为 4.0%,CaCl<sub>2</sub>浓度为 2.0%,海

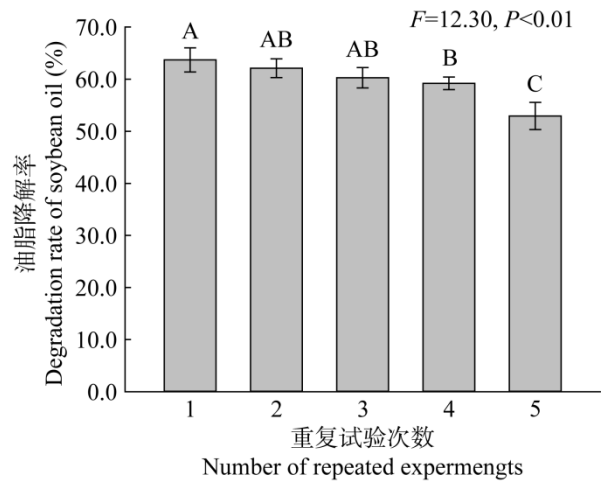


图 7 固定化菌球不同重复使用次数的油脂降解效果 不同的英文字母代表不同处理之间存在显著性差异。

Figure 7 The degradation effect of immobilized beads with different reuse times. The different letters indicate significant differences between the different treatments

表 8 固定化菌球对实际污水的降解效果

Table 8 The oil-degradation efficiency on actual wastewater by immobilized bacterial

项目名称 Project name	参数值 Parameter value
处理前油脂含量 Oil content before treatment (mg/L)	3.6
处理后油脂含量 Oil content after treatment (mg/L)	2.1
油脂降解率 Oil degradation rate (%)	41.6

藻酸钠溶液体积:菌液体积为 1:1,交联时间为 8.0 h 制备的固定化菌球,在 pH 7.0、温度为 30.0 °C 条件下对食堂下水道污水油脂的降解率达到了 41.6%。

## 3 讨论

随着经济的发展,含油脂生活废水的排放量日益增加,利用具有油脂降解功能的微生物处理含油废水逐渐成为研究热点,寻找和筛选

高效菌株是关键。易蒲红等<sup>[6]</sup>分离筛选的酯香微杆菌(*Microbacterium esteraromaticum*)在油脂含量 1.0%时,对油脂降解率高达 98.8%,并且在高温反应时具有较大酶活力;史红玲等<sup>[22]</sup>筛选出的奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)经条件优化后对油脂的降解率可达 92.0%,并且具有较好的环境适应性;王亚军等<sup>[7]</sup>从污泥中分离的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)在最优的条件下对油脂的降解率高达 64.1%。本试验筛选出的菌株 LR2 在游离状态下对大豆油的油脂降解率最高可达 54.9%,因最佳碳源、氮源等尚未进行探索,所以该菌株的油脂降解性能尚有一定的提升空间。

经 16S rRNA 基因序列分析,菌株 LR2 与葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.)具有很高的同源性,因此菌株 LR2 隶属于葡萄球菌。葡萄球菌是发酵肉制品中的优势种群,大多数葡萄球菌都具有产脂肪酶、蛋白酶和肽酶的能力,可促进风味物质的产生,常被用作肉品发酵剂<sup>[23-24]</sup>。具有产脂肪酶能力的葡萄球菌也被用于废水处理, Affes 等<sup>[25]</sup>用木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylosus*)处理宰场废水,6.0 d 后发现废水中脂质含量从 17.0 g/L 降到了 1.1 g/L。葡萄球菌也是临床常见致病菌及食源性致病菌,而本研究发现菌株 LR2 的溶血性试验、血浆凝固酶试验、耐热核酸酶试验结果均为阴性,所以该菌株安全性较好,可以用于含油脂污水的处理。

鉴于游离菌在处理废水时具有菌株易分散、重复利用率低、易受环境有害物质影响等特点,试验选用渗透性好、价格低廉、可回收的海藻酸钠作为固定化载体,对不同 pH 和温度、海藻酸钠浓度和交联时间等因素进行优化。菌株 LR2 固定化菌球与游离菌相比具有更好的油脂降解效果,与屈瑾等<sup>[9]</sup>、马淑雯等<sup>[20]</sup>、Wu 等<sup>[21]</sup>的研究结果一致。菌株 LR2 在固定化状态

下对大豆油的降解率可达 65.7%,并且在重复使用 4 次的情况下,能保持较强的机械强度和降解效果,并且固定化菌球对食堂下水道污水油脂的降解率达到了 41.6%,具有一定的实际污水的降解效果。

## 4 结论

(1) 从萍乡传统腊肉中分离到了一株具有油脂降解能力的菌株,经 16S rRNA 基因序列分析,该菌株隶属于葡萄球菌(*Staphylococcus* sp.),3 项致病性指标检测显示该菌株无致病性。

(2) 该菌株最佳的固定化条件为:海藻酸浓度 4.0%, CaCl<sub>2</sub> 浓度 2.0%,海藻酸钠溶液与菌液体积比为 1:1,交联时间 8.0 h。

(3) 在 pH 7.0、温度为 30.0 °C、180.0 r/min 培养 3.0 d,固定化菌和游离菌对大豆油的油脂降解率都达到最高,分别为 65.7%和 51.6%,固定菌比游离菌的降解率高 14.1%。固定菌具有更宽的 pH 适应范围和更强的冷热稳定性,重复使用 4 次仍具有较好的油脂降解效果。

(4) 固定化葡萄球菌对食堂下水道污水油脂的降解率达到了 41.6%,该固定化菌球对大豆油和实际污水都具有一定的油脂降解效果。

## REFERENCES

- [1] NIMKANDE VD, BAFANA A. A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment[J]. Journal of Water Process Engineering, 2022, 46: 102591.
- [2] SUTAR VP, MALI GV, UPADHYE V, SINGH VK, SINHA RP. Purification of lipase from *Pseudomonas aeruginosa* VSJK R-9 and its application in combination with the lipolytic consortium for bioremediation of restaurant wastewater[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2023, 195(3): 1888-1903.
- [3] 徐伟芳,黄涛杨,周敏,方翔,王飞,刘凤丹,谢洁.一株脂肪酶产生菌的筛选鉴定及其酶学性质研究[J].西南大学学报(自然科学版),2017,39(5):62-69.  
XU WF, HUANG TY, ZHOU M, FANG X, WANG F, LIU FD, XIE J. Research on screening and identification of a lipase-producing bacterial strain and its enzymatic properties[J]. Journal of Southwest

- University (Natural Science Edition), 2017, 39(5): 62-69 (in Chinese).
- [4] 孙先锋, 柴晓蝶, 赵敏, 任鹏, 吴蔓莉, 肖宇婷. 固定化菌剂制备及对油田措施废液残渣的处理[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(9): 1077-1082, 1088.  
SUN XF, CAI XD, ZHAO M, REN P, WU ML, XIAO YT. Preparation of immobilized bacteria agent and disposal of residues from oil field waste liquied treatments[J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(9): 1077-1082, 1088 (in Chinese).
- [5] 杨智博, 李晓红, 张丹丹, 辛蕊, 翟訢宇, 肖慧. 高效油脂降解混合菌株筛选及降解条件的优化[J]. 水处理技术, 2021, 47(7): 36-41.  
YANG ZB, LI XH, ZHANG DD, XIN R, ZHAI XY, XIAO H. Screening of high-efficiency oil-degrading mixed strains and optimization of degradation conditions[J]. Technology of Water Treatment, 2021, 47(7): 36-41 (in Chinese).
- [6] 易蒲红, 李琴萍, 赵彩虹, 丁晓艳, 王宁, 朱廷恒, 李季. 餐厨垃圾中油脂高效降解菌酯香微杆菌 (*Microbacterium esteraromaticum*) 的分离及其应用[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(17): 143-149.  
YI PH, LI QP, ZHAO CH, DING XY, WANG N, ZHU YH, LI J. Isolation and application of a high-efficiency lipid-degrading *Microbacterium esteraromaticum* from kitchen food waste[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(17): 143-149 (in Chinese).
- [7] 王亚军, 蔡文娟, 耿冲冲, 王惠, 张蓉, 陈甜靖, 李金守. 一株油脂降解菌的筛选及其降解条件优化[J]. 生态环境学报, 2020, 29(5): 1031-1038.  
WANG YJ, CAI WJ, GENG CC, WANG H, ZHANG R, CHEN TJ, LI JS. Screening of a oil-degrading strain and optimization of its degradation conditions[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2020, 29(5): 1031-1038 (in Chinese).
- [8] GAO LL, LU YC, ZHANG JL, LI J, ZHANG JD. Biotreatment of restaurant wastewater with an oily high concentration by newly isolated bacteria from oily sludge[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2019, 35(11): 179.
- [9] 屈瑾, 陈银燕, 赵若瑾, 李依依, 金鹏, 郑展望. 壳聚糖固定化气单胞菌处理餐厨高油脂废水[J]. 生物工程学报, 2021, 37(2): 615-624.  
QU J, CHEN YY, ZHAO RJ, LI YY, JIN P, ZHENG ZW. *Aeromonas* immobilized on chitosan for treating high-oil wastewater from kitchens[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(2): 615-624 (in Chinese).
- [10] WANG J, FAN YC, CHEN YP. Nitrogen removal performance and characteristics of gel beads immobilized anammox bacteria under different PVA: SA ratios[J]. Water Environment Research, 2021, 93(9): 1627-1639.
- [11] HUANG X, ZHOU T, CHEN X, BAI J, ZHAO YG. Enhanced biodegradation of high-salinity and low-temperature crude-oil wastewater by immobilized crude-oil biodegrading microbiota[J]. Journal of Ocean University of China, 2022, 21(1): 141-151.
- [12] NHI-CONG LT, LIEN DT, MAI CTN, LINH NV, LICH NQ, HA HP, van QUYEN D, TANG DYY, SHOW PL. Advanced materials for immobilization of purple phototrophic bacteria in bioremediation of oil-polluted wastewater[J]. Chemosphere, 2021, 278: 130464.
- [13] 何蕊, 康志超, 朱国鹏, 王琪荣, 于洪文. 海藻酸钠固定硫酸盐还原菌、镍-铁纳米粒子生物微球对污水中 Cd<sup>2+</sup> 的去除[J]. 环境工程学报, 2022, 16(5): 1480-1489.  
HE R, KANG ZC, ZHU GP, WANG QR, YU HW. Removal of Cd<sup>2+</sup> in sewage by sodium alginate immobilized sulfate-reducing bacteria and nickel-iron nanoparticle biological microspheres[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(5): 1480-1489 (in Chinese).
- [14] 孟卓妮. 油脂降解菌的筛选及生物法降解油脂的初步研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士毕业论文, 2019.  
MENG ZN. Screening of oil-degradation strains and preliminary study on biodegradation of oil wastewater[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2019 (in Chinese).
- [15] 王海燕, 马长伟, 李平兰. 传统湖南腊肉中产香葡萄球菌的筛选及鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 45-49.  
WANG HY, MA CW, LI PL. Selection and identification of aroma producing staphylococci from Hunan traditional bacon[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(5): 45-49 (in Chinese).
- [16] 戴云飞, 杨泽玉, 陈颖, 叶杰旭, 陈建孟, 陈东之. 聚乙烯醇-海藻酸钠-活性炭固定化菌球处理二氯甲烷的研究[J]. 环境科学学报, 2021, 41(2): 430-439.  
DAI YF, YANG ZY, CHEN Y, YE JX, CHEN JM, CHEN DZ. Removal of DCM by microorganism cells immobilized into polyvinyl alcohol-alginate-activated carbon beads[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2021, 41(2): 430-439 (in Chinese).
- [17] 苏增建, 张玉秀, 胡维薇, 李敏, 文少白. 海藻酸钠固定石油降解菌条件优化及辅助效应[J]. 海洋环境科学, 2018, 37(6): 947-952, 960.  
SU ZJ, ZHANG YX, HU WW, LI M, WEN SB. Optimization and auxiliary effects of sodium alginate immobilized petroleum degrading bacteria[J]. Marine Environmental Science, 2018, 37(6): 947-952, 960 (in Chinese).
- [18] 包木太, 田艳敏, 陈庆国. 海藻酸钠包埋固定化微生物处理含油废水研究[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(2): 167-172.  
BAO MT, TIAN YM, CHEN QG. Application of alginate embedded immobilized microbes in oil

- wastewater treatment[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 35(2): 167-172 (in Chinese).
- [19] XUE JL, WU YN, SHI K, XIAO XF, GAO Y, LI L, QIAO YL. Study on the degradation performance and kinetics of immobilized cells in straw-alginate beads in marine environment[J]. Bioresource Technology, 2019, 280: 88-94.
- [20] 马淑雯, 刘鑫, 周小琴, 方晓波, 郑华宝, 毛浩楠, 杨雨, 孟祺绅, 张成. 海绵热解炭固定化微生物吸附-降解餐饮废水中油脂的研究[J]. 浙江农林大学学报, 2023, 40(2): 293-303.
- MA SW, LIU X, ZHOU XQ, FANG XB, ZHENG HB, MAO HN, YANG Y, MENG QS, ZHANG C. Adsorption-degradation of oil in catering wastewater by the microorganism immobilized on sponge pyrolytic carbon[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2023, 40(2): 293-303 (in Chinese).
- [21] WU L, GE G, WAN JB. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(2): 237-242.
- [22] 史红玲, 陈梦言, 刘飞, 唐存多, 刘钺, 姚伦广, 阚云超. 生活废弃油脂高效降解菌的筛选、鉴定及应用[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(17): 48-53.
- SHI HL, CHEN MY, LIU F, TANG CD, LIU Y, YAO LG, KAN YC. Screening, identification and application of highly efficient waste oil degrading microorganisms[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(17): 48-53 (in Chinese).
- [23] 冯秀娟, 刘成国, 娄爱华, 黄天柱. 湖南腊肉中优势菌种的筛选及初步鉴定[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 127-130.
- FENG XJ, LIU CG, LOU AH, HUANG TZ. Isolation and primary identification of dominant bacteria in human cured pork[J]. China Brewing, 2012, 31(5): 127-130 (in Chinese).
- [24] JU M, PIAO CX, ZHANG J, MU BD, LI GH, ZHANG WG. Hydrolysis of pork sarcoplasmic protein extracts by unique staphylococci isolated from low-salt dry-cured ham[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 164: 113639.
- [25] AFFES M, ALOUI F, HADRICH F, LOUKIL S, SAYADI S. Effect of bacterial lipase on anaerobic co-digestion of slaughterhouse wastewater and grease in batch condition and continuous fixed-bed reactor[J]. Lipids in Health and Disease, 2017, 16(1): 195.