

蒽的高效降解菌的固定化小球的制备及其降解特性

唐玉斌¹ 梁林林¹ 陈芳艳¹ 毛莉¹ 何军²

(1. 江苏科技大学生物与环境工程学院, 镇江 212018;

2. 乌鲁木齐石油化工公司研究所, 乌鲁木齐 830019)

摘要 旨在利用固定化高效降解菌小球去除水中蒽, 充分发挥累托石的吸附和生物降解的协同作用, 以累托石、聚乙烯醇(PVA)、海藻酸钠(SA)作为固定化载体材料, 硼酸和氯化钙作为交联剂, 将蒽的高效降解菌包埋制备固定化微生物小球。考察了累托石用量、PVA投加量、海藻酸钠用量、氯化钙用量、微生物包埋量和交联时间等因素对微生物小球活性的影响, 通过正交实验确定了微生物小球的最佳制备条件。结果表明, 制备固定化微生物小球的最佳条件为: 累托石 2.5%, PVA 12%, SA 0.3%, CaCl_2 4%, 交联时间 28 h, 微生物包埋量 10%。对 40 mg/L 的蒽溶液, 游离微生物在 50 h 后开始发挥明显的降解作用, 经过 68 h 蒽的去除率达到 35.65%; 而固定化微生物小球经过 9 h 即可使蒽的去除率达到 81.8%, 23 h 后蒽的去除率可达 100%。固定化微生物小球对水中蒽的去除机理与吸附-降解工艺的机理类似, 即固定化微生物小球类似于一个一体化的微型反应器, 经过迟滞期后, 在该反应器内同时发生吸附和降解作用。

关键词 固定化微生物 蒽的高效降解菌 正交实验 制备

中图分类号 X172 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2007)05-0031-05

Preparation of immobilized microorganisms degrading anthracene and its degradation characteristics

Tang Yubin¹ Liang Linlin¹ Chen Fangyan¹ Mao Li¹ He Jun²

(1. College of Biology & Environmental Engineering, Jiangsu University of Science & Technology, Zhenjiang 212018;

2. Research Institute, Wulumuqi Petrochemical Corporation, Wulumuqi 830019)

Abstract Aiming at removing anthracene from water by immobilized predominant microorganisms and giving full play to synergistic effect of adsorption and biodegradation, rectorite, polyvinyl alcohol (PVA) and sodium alginate (SA) were used as immobilized carrier; boracic acid and calcium chloride were used as crosslinker to prepare immobilized microorganisms. The effects of dosage of rectorite, PVA, SA, CaCl_2 , microorganisms' amount wrapped and cross linking time on activity of the immobilized microorganisms were investigated. The optimal conditions to prepare immobilized microorganisms were determined through orthogonal tests. The results show that the optimal conditions are: rectorite 2.5%, PVA 12%, SA 0.3%, CaCl_2 4%, microorganisms' amount wrapped 10% and cross linking time 28 h, respectively. The free microorganisms can obviously degrade anthracene after 50 hours to solutions of 40 mg/L; the removal rate reaches 35.65% after 68 hours. The removal rate of anthracene by immobilized microorganisms reaches 81.8% and 100% after 9 hours and 23 hours, respectively. The immobilized microorganisms is similar to a integrate micro-reactor in which the adsorption is simultaneous with biodegradation after a lag phase.

Key words immobilized microorganisms; predominant microorganisms degrading anthracene; orthogonal test; preparation

近年来,石油工业得到迅速发展,随之而来的环境问题不断出现。石油污染物通过工业废水排放、船舶排水以及油船泄漏等途径进入水体,引起愈来愈严重的水体污染和生态破坏。在石油污染物中,多环芳烃由于具有致癌、致畸、致突变特性^[1],因而

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2005057)

收稿日期:2006-11-16; 修订日期:2007-03-29

作者简介:唐玉斌(1964~),男,工学博士,副教授,主要从事环境生物技术和水污染控制技术研究工作。

E-mail:ybbill@163.com

引起科学家的高度重视。从石油污染环境中分离筛选多环芳烃高效降解菌,用于多环芳烃污染水体的生物修复的研究已经成为环境科学领域研究的热点。如哈里德(KHALID MASKAOUI)从多环芳烃污染严重的厦门东渡码头和员当湖口的沉积物中,富集驯化了以多环芳烃作为惟一碳源和能源的降解菌株,这些菌株对多环芳烃菲和萤蒽的降解率均达到90%以上^[2]。也有人^[3,4]分离出门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)并用其降解多环芳烃,获得了理想的降解效果。但是,从应用的角度看,游离态的高效降解菌株容易从水中流失,也容易被其他水体微生物吞噬,因此将筛选的菌种固定化是一种理想的选择。目前,微生物的固定化方法主要有吸附法、包埋法、交联法和共价结合法,其中包埋法和吸附法因固定化成本较低、细胞活性损失较小和稳定性高而最为常用^[5],将吸附剂和包埋载体混合使用可取得很好的固定效果。本研究首次利用累托石的吸附特性^[6],将累托石和聚乙烯醇混合使用作为固定化载体材料,用于固定本实验室自行选育的蒽的高效降解菌(有关该菌种的分离、鉴定和降解特性的研究结果将另文发表),考察制备固定化微生物小球的最优化条件,同时考察固定化微生物小球对水中多环芳烃蒽的降解特性,为多环芳烃污染水体的生物修复提供参考。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

聚乙烯醇(PVA),化学纯,国药集团化学试剂有限公司生产;

海藻酸钠(SA),化学纯,国药集团化学试剂有限公司生产;

硼酸,分析纯,天津市北方天一化学试剂厂生产;

氯化钙,分析纯,上海化学试剂有限公司生产;

蒽,分析纯,美国 Aldrich Co. Ld 公司生产;

累托石,购自湖北省矿产科学研究院,产地湖北钟祥。经漂洗、烘干,过80目筛处理。

蒽的高效降解菌,本实验室选育。

1.2 主要仪器

SKW-3型微量呼吸检压仪(上海大学机电厂生产);

GC-14C气相色谱仪(日本岛津公司生产)。

1.3 实验方法

1.3.1 固定化微生物小球的制备

将PVA和SA混合后在水浴(80℃左右)中加热,连续搅拌,防止PVA粘聚。待混合物完全溶解后,加入累托石粉末,搅拌均匀后冷却至30℃,再加入一定量的细菌悬浊液,搅拌均匀后,用注射器将其滴加到含氯化钙的饱和硼酸溶液(交联剂)中,交联固化成球,固化一段时间后,为了提高小球的机械强度,将固定化小球置于己二胺溶液中进行表面硬化处理1h^[7]。

1.3.2 固定化微生物活性的测定

固定化微生物活性采用瓦勃氏呼吸仪进行测定^[8]。

1.3.3 分析方法

采用气相色谱法测定水中蒽含量,使用毛细管色谱柱,柱温180℃,进样器280℃,检测器300℃。

2 结果与讨论

2.1 累托石用量对小球活性的影响

累托石用量对固定化微生物小球活性的影响如图1所示。

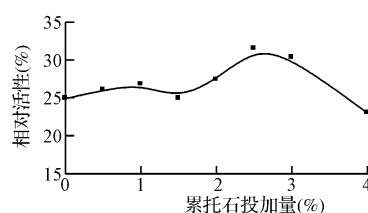


图1 累托石用量对小球活性的影响

Fig. 1 Effect of rectorite dose on activity of the immobilized microorganisms (PVA 10%, SA 0.2%, CaCl_2 2%, 微生物包埋量10%(体积比))

从图1可知,累托石含量过低或过高都会影响小球的活性,在累托石投加量为2.5%时,小球的活性最高。在固定化微生物的制备过程中,适量添加累托石,可以起到支撑空间骨架的作用,有助于增加小球的孔隙率,增加小球的通透性,降低内扩散阻力,增强小球的吸附能力,提高小球孔隙内部蒽的浓度,从而提高微生物的相对活性。但若添加过量的累托石,可能反而会堵塞固定化微生物小球中的孔道,使包埋的微生物没有足够的空间增殖,影响微生物的活性。

2.2 PVA 投加量对小球活性的影响

PVA 投加量对小球活性的影响如图 2 所示。

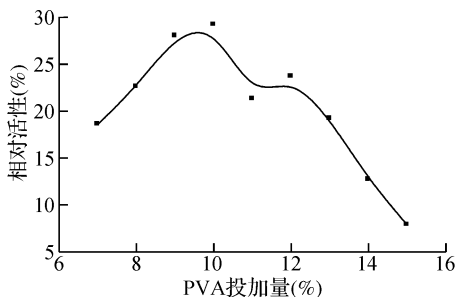


图2 PVA 投加量对小球活性的影响

Fig.2 Effect of PVA dose on activity of immobilized microorganisms
(累托石 2.5%, SA 0.2%, CaCl_2 2%, 微生物包埋量 10% (体积比))

由图 2 可知, PVA 含量以 9% ~ 10% 为宜。适度增加 PVA 含量, 虽然可使小球的机械强度得到改善, 但 PVA 含量过高时, 小球内部过于致密, 增大了基质和产物的传质阻力, 使得微生物小球的活性明显下降。在实验中还观察到, PVA 含量太低时, 交联成球较为困难, 小球强度不够, 容易破碎; 当 PVA 含量过高时, 由于 PVA 凝胶过于紧密, 小球有拖尾现象。

2.3 SA 投加量对小球活性的影响

SA 投加量对小球活性的影响如图 3 所示。

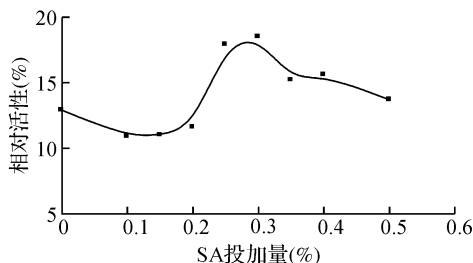


图3 SA 对小球活性的影响

Fig.3 Effect of SA on activity of immobilized microorganisms
(累托石 2.5%, PVA 10%, CaCl_2 2%, 微生物包埋量 10% (体积比))

从图 3 可知, SA 的投加量在 0.25% ~ 0.3% 范围时, 微生物小球的活性较高。SA 固化、成形方便, 对微生物的毒性小, 对微生物细胞有一定的保护作用, 适量添加有利于提高固定化微生物的活性。

2.4 氯化钙投加量对小球活性的影响

CaCl_2 的投加量对微生物小球活性的影响如图 4 所示。

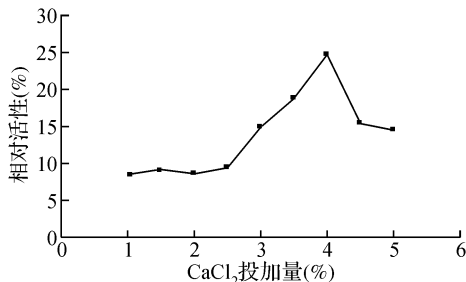


图4 氯化钙投加量对小球活性的影响

Fig.4 Effect of CaCl_2 on activity of immobilized microorganisms
(累托石 2.5%, PVA 10%, SA 0.3%, 微生物包埋量 10% (体积比))

由图 4 可知, 在起始阶段, 微生物小球的活性随 CaCl_2 浓度的增加变化不大, 当 CaCl_2 浓度大于 2.5% 时, 小球活性随着 CaCl_2 浓度的增大而升高, 当 CaCl_2 浓度在 4% 时, 微生物小球的活性达最大值。此后再增大 CaCl_2 浓度, 小球活性则下降, 这与高浓度 CaCl_2 盐的渗析作用使微生物细胞脱水有关。本实验确定其投加量为 4%。

2.5 交联时间对小球活性的影响

交联时间对小球活性的影响如图 5 所示。

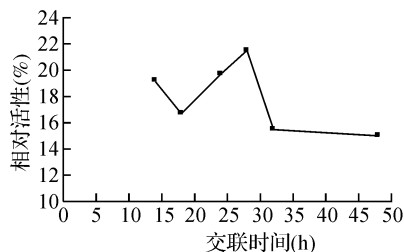


图5 交联时间对小球活性的影响

Fig.5 Effect of cross-linking time on activity of immobilized microorganisms
(累托石 2.5%, PVA 10%, SA 0.3%, CaCl_2 4%, 微生物包埋量 10% (体积比))

由图 5 可知, 交联时间较短, 小球活性较高, 但交联时间过短, 固定化不彻底, 小球的强度不够, 微生物小球寿命降低; 但如果交联时间过长, 硼酸对微生物有毒害作用, 会降低微生物的活性, 而且交联时

间越长,固定化微生物小球内部孔隙越小,凝胶越紧密,越不利于传质,也会影响小球活性。本研究确定的最佳交联时间为 28 h。

2.6 微生物包埋量对小球活性的影响

微生物包埋量对小球活性的影响如图 6 所示。

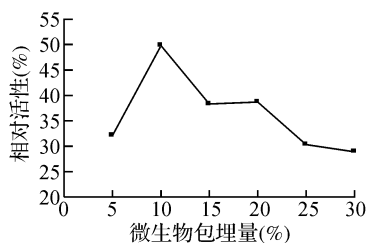


图 6 微生物包埋量对小球活性的影响

Fig. 6 Effect of microbial mass on activity of the immobilized microorganisms
(累托石 2.5%, PVA 10%, SA 0.3%,
CaCl₂ 4%, 交联时间 28 h)

由图 6 可知,微生物包埋量过低或过高都会使小球活性降低,微生物包埋量为 10% 比较理想。在

实验中发现,微生物包埋量 > 15% 时,小球强度降低,结构松散,在测定活性时小球明显溶胀并且有微生物溶出,这与郭召海等^[9]的研究结果相一致。其原因是接种量过大,微生物会大量增殖而使小球胀裂。

2.7 固定化微生物小球最佳制备条件的确定

在以上单因素影响实验的基础上,选取 4 个主要影响因素(累托石用量、PVA 用量、SA 用量和 CaCl₂ 用量)进行四因素三水平(表 1)的正交实验,以固定化小球的相对活性高低确定最佳制备条件。根据表 1 的不同因子和水平,分 9 组进行实验,正交实验条件为:水温 30℃,接种微生物量 10% (体积比),饱和硼酸 3%,用 Na₂CO₃ 调 pH 值 6.5 ~ 7.0 左右,交联时间均为 28 h。称取 1 g 小球进行微生物呼吸率的测定,计算出微生物小球的相对活性。以小球的相对活性为指标进行评价,所得数据见表 2。

通过对表 2 进行统计分析,优选出了该固定化微生物小球的最佳制备条件为 A2B3C2D3,即累托石投加量为 2.5%,PVA 加量为 12%,SA 加量为 0.3%,氯化钙加量为 4%。

表 1 四因素三水平正交表

Table 1 Orthogonal test of four factors and three levels

序 号	因子 A	因子 B	因子 C	因子 D
	累托石质量分数 (%)	PVA 质量分数 (%)	SA 质量分数 (%)	CaCl ₂ 质量分数 (%)
1	1.0	8	0.2	2
2	2.5	10	0.3	3
3	4.0	12	0.4	4

表 2 正交试验结果

Table 2 Results from orthogonal tests

序 号	A	B	C	D	相对活性 (%)	小球特征
1	1	1	1	1	24.52	
2	1	2	2	2	29.09	
3	1	3	3	3	30.49	硬度低,表面黑
4	2	1	2	3	41.55	
5	2	2	3	1	33.12	硬度低,表面黑
6	2	3	1	2	34.06	
7	3	1	3	2	18.99	表面圆滑
8	3	2	1	3	37.33	硬度很低,表面黑
9	3	3	2	1	41.02	硬度高,表面较黑
K1	84.10	85.06	95.91	99.60		
K2	108.73	99.54	111.66	81.20		
K3	97.34	105.75	82.60	109.37		
k1	28.03	28.35	31.97	33.20		
k2	36.24	33.18	37.22	27.07		
k3	32.45	35.25	27.53	36.46		
R	8.21	6.9	9.69	9.39		
最优水平	A2	B3	C2	D3		
最优方案	A2B3C2D3					

2.8 固定化微生物对水中蒽的降解特性

取 25 mL 蒽的浓度为 40 mg/L 的液体培养基,向其中加入 0.5 mL 蒽降解菌的悬浊液,在恒温(30℃)条件下连续振荡,摇床转速为 180 r/min,在不同反应时间取样测定蒽的去除率。又取包埋了等量微生物的固定化小球 5 g,对同样体积和浓度的蒽溶液进行降解,测定不同时间蒽的去除率,降解曲线如图 7 所示。

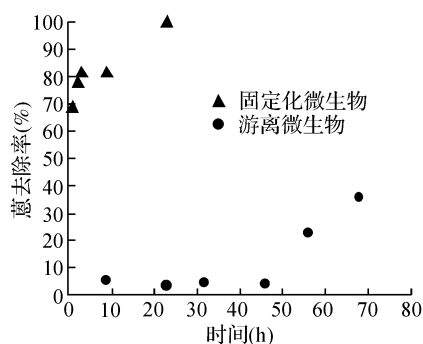


图7 固定化微生物和游离微生物对蒽的降解

Fig.7 Biodegradation of anthracene by free and immobilized microorganisms

从图 7 可知,游离微生物在 50 h 后开始对蒽有明显的降解作用,经过 68 h 左右蒽的去除率达到 35.65%。而包埋了等量微生物的固定化小球对蒽有快速净化效果,经过 9 h 即可使蒽的去除率达到 81.8%,23 h 后溶液中残留的蒽已不能检测出,这与固定化载体材料对蒽的吸附有关^[6]。结合图 7 的结果不难看出,在短时间内,固定化微生物小球对水中蒽的去除以固定化微生物载体和微生物有机体的吸附作用为主,经过一段时间以后,则依靠吸附和生物氧化两者的协同作用。这种修复机理类似于吸附-降解工艺,而固定化微生物小球类似于一个一体化的微型反应器,在该反应器内,同时发生吸附和降解作用。

3 结 论

(1)制备固定化微生物小球的最佳条件为:累托石投加量 2.5%,PVA 加量 12%,SA 加量 0.3%,CaCl₂ 加量 4%,交联时间为 28 h,微生物包埋量为 10%。

(2)去除水中 40 mg/L 的蒽,游离微生物 50 h 后发挥明显的降解作用,经过 68 h 蒽的去除率达到 35.65%。固定化微生物小球经过 9 h 可使蒽的去除率达到 81.8%,23 h 后蒽的去除率可达 100%。

(3)固定化微生物小球对水中蒽的去除机理与吸附-降解工艺的机理类似。该小球类似于一个一体化的微型反应器,在该反应器内,同时发生吸附和降解作用。

参 考 文 献

- [1] Sorrel R. K. Review of occurrences and treatment of polynuclear aromatic hydrocarbons in water. *Environment International*, **1990**, 4(10): 6~11
- [2] 哈里德(Khalid Maskaoui). 海岸带痕量有机污染物与细菌的生物修复作用研究. 厦门大学博士学位论文, **2000**
- [3] 田雷,马沛,钟建江. 一株新的菲降解菌株及外来碳源对其降解特性的影响. *华东理工大学学报*, **2002**, 28(1): 32~35
- [4] Meyer S., Moser R., Neef A., et al. Differential detection of key enzymes of polynuclear aromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiol.*, **1999**, (145): 1731~1741
- [5] 任南琪,马放. 污染控制微生物学原理与应用. 北京:化学工业出版社, **2003**
- [6] 张立娟,孙家寿. 累托石交换吸附特征研究进展. *化学工业与工程技术*, **2002**, 23(6): 30~32
- [7] 雷乐成. 污水厌氧处理微生物的固定化方法及硬化处理. *水处理技术*, **1992**, 18(1): 46~51
- [8] 马放,任南琪,杨基先. 污染控制微生物学实验. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社, **2002**
- [9] 郭召海,孙阳昭,张昱. 包埋固定化微生物法处理含油废水研究. *环境污染治理技术与设备*, **2006**, 7(1): 89~93