

固定化解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*) 处理油脂废水的性能研究

吴 兰^{1,2} 万金保^{2*}

(1. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330047;

2. 南昌大学环境科学与工程学院, 教育部鄱阳湖湖泊生态暨生物资源利用实验室, 南昌 330047)

摘 要 以海藻酸钠为固定化载体材料, 以氯化钙作为交联剂, 将高效降解油脂菌——解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)包埋制备成固定化微生物小球, 用以处理油脂废水, 考察了最佳处理条件。结果表明, 解脂耶氏酵母经固定化包埋后处理色拉油废水的最适条件为: 温度 25 ~ 35 ℃、pH 4 ~ 8、摇床转速 100 ~ 200 r/min, 处理初始油浓度在 2 000 mg/L, 包埋菌浓度 6.65×10^6 个/mL, 包埋量为 4 mL/150 L。与悬浮状态相比, 固定化微生物温度适应范围增大、热适应性增强、pH 值往酸性方向偏移。将固定化解脂耶氏酵母投入 YPD 液体培养基内驯化 30 h 再处理色拉油废水, 结果显示: 驯化后的固定化微生物在同样条件下对色拉油的降解率达到 82%, 比未驯化状态高 20%, 且驯化后的机械强度、稳定性和重复使用性都有明显改善。

关键词 固定化 海藻酸钙 解脂耶氏酵母 油脂废水

中图分类号 X703 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2008)04-0482-05

Investigation on capability of disposing grease wastewater with immobilized *Yarrowia lipolytica*

Wu Lan^{1,2} Wan Jinbao²

(1. College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330047;

2. Key Laboratory of Poyang Lake Ecology and Bio-resource Utilization, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract The optimal conditions have been studied in disposing grease wastewater with predominant disposing oil bacteria——immobilized *Yarrowia lipolytica* embedded into microorganisms when using sodium alginate as immobilized carrier and calcium chloride as crosslinker. The results show that the optimal conditions of disposing salad oil for immobilized *Yarrowia lipolytica* are: temperature 25 ~ 30 ℃, pH 4 ~ 8, the shaking speed 100 ~ 200 r/min, primary oil concentration 2 000 mg/L, embedded bacteria concentration 6.65×10^6 entries/mL, embedding quantity 4 mL/150 L. In contrast with suspended bacteria, the embedded microorganisms represent more adaptable capability of a larger range of temperature and an enhancement of heat resistance, a pH aversion to acidity. The result of plunging the immobilized *Yarrowia lipolytica* into YPD liquid substrate to domesticate for 30 h before disposing salad oil shows that: after domestication, disposing rate of salad oil for the immobilized microorganisms can be 82%, with an increase of 20% compared with the ones that haven't been domesticated with the same condition, furthermore, the mechanical strength, the stability and the repetition for utilization are promoted obviously.

Key words immobilization; sodium alginate; *Yarrowia lipolytica*; rease wastewater

油脂废水是工业生产中污染较为严重的一类废水, 具有量大且面广的排放特点。为此许多国家制定了限制油脂废水排放的政策, 并发展了多种降低油脂废水污染的技术方法, 其中从自然界中筛选分离能高效降解油脂的微生物, 培养后投加到污水处理系统中进行油脂废水的处理成为研究热点。但投

加的菌量容易流失, 性质不稳定, 废水中的其他物质

基金项目: 江西省教育厅科研项目资助(2007-41)

收稿日期: 2007-08-24; 修订日期: 2007-09-30

作者简介: 吴兰(1969~), 女, 副教授, 博士研究生, 主要从事环境微生物研究工作。E-mail: wl690902@hotmail.com

* 通讯联系人

对菌体细胞具有毒性等限制了生物降解法在油脂废水中的广泛应用。固定化微生物技术因其具有降解废物效率高、可循环使用、稳定性强、固液分离容易、占地面积小等优点,越来越受到人们重视^[1]。

解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是一株高效降解油脂菌,其降解油脂的性能、工艺条件均得到了较好的研究^[2,3]。为进一步拓展该菌株在油脂废水处理系统中的运用,本实验拟将该菌固定化,摸索固定化解脂耶氏酵母处理油脂废水的工艺条件,通过对固定化微生物的降油脂性能进行测试与研究来探讨该技术目前存在的问题及解决的途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌种

解脂耶氏酵母 W₂₉ 由本研究室保藏。

1.1.2 化学试剂

海藻酸钠、无水氯化钙、石油醚(沸程 30 ~ 60 ℃)、无水硫酸钠、无水乙醇等均为分析纯,上海化学试剂有限公司生产。

1.1.3 培养基

YPD 液体培养基,配方如下:1% 酵母膏、2% 蛋白胨、2% 葡萄糖、pH 自然。

1.1.4 废水来源

实验室自配废水,将色拉油(市场购买)配置成不同浓度的经灭菌处理的油脂废水。

1.2 实验方法

1.2.1 解脂耶氏酵母的活化与培养

将保存的解脂耶氏酵母接种于 YPD 液体培养基中,在温度 30 ℃、转速 160 r/min 摇床上培养 18 h,传代使之活化,4 ℃ 保藏备实验用。

1.2.2 固定化微生物的制备

以海藻酸钠为载体采用包埋法制备固定化微生物。具体过程:将一定量的已活化的菌悬液加入到 4% 的海藻酸钠溶液中,充分搅拌滴加到 4% 的氯化钙交联剂中,4 ℃ 交联 24 h 后待用^[4]。

1.2.3 油含量的测定

采用重量法测定(国标 CJ/T 57-1999)。

1.2.4 降解率的计算

降解率 = (起始油含量 - 最终油含量) / 起始油含量 × 100%

1.2.5 接种菌浓度记数

采用血球记数板记数法。

2 结果与讨论

2.1 解脂耶氏酵母菌的生长曲线

在最佳条件下^[2],将活化的解脂耶氏酵母菌培养在 2 000 mg/L 的色拉油废水中,解脂耶氏酵母菌的生长特征以 600 nm 波长处测得的 OD 值来描述^[5],实验每隔 5 h 取样测定,结果见图 1。

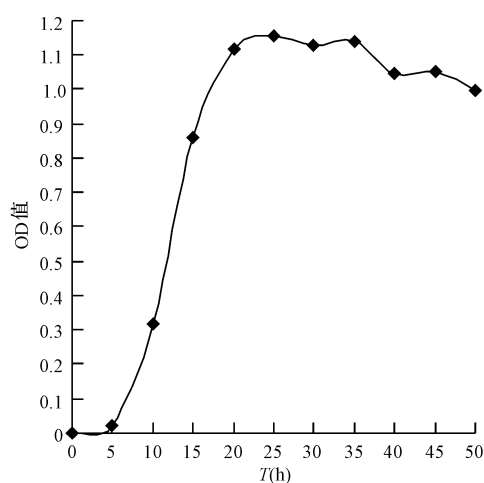


图1 解脂耶氏酵母菌的生长曲线

Fig. 1 Growth of *Yarrowia lipolytica*

结果表明:解脂耶氏酵母菌能以色拉油为唯一碳源进行生长,且生长分为 4 个时期。从 0 到 5 h 时为延迟期,OD 值仅为 0.0225;5 h 至 20 h 是解脂耶氏酵母菌的对数生长期,OD 值从 0.0225 迅速增加到了 1.119;20 h 至 35 h 为生长的稳定期;自 35 h 后细胞进入了衰亡期,OD 值减少,但前期细胞的衰亡速度较慢,从 35 h 到 50 h,OD 值仅从 1.137 变化为 0.996,通过对解脂耶氏酵母菌生长周期的了解,在对微生物进行固定化时,采用其对数生长期的菌液加以包埋以保证细胞的最大活性。

2.2 温度对固定化解脂耶氏酵母菌降解油脂废水的影响

将包埋菌量为 4 mL 的固定化解脂耶氏酵母和等量的菌悬液分别投入 2 000 mg/L、5 000 mg/L 的 150 mL 色拉油废水处理 50 h,在 pH 自然、摇床转速为 150 r/min 的条件下,考察不同的温度对油脂降解率的影响,结果见图 2。

结果显示:固定化和游离的解脂耶氏酵母菌对色拉油的降解效率在 30 ℃ 时均达到最大,表明固定化和游离的解脂耶氏酵母菌处理色拉油废水的最适温度相同,结果与张建辉等^[6]的研究相一致。但游

离菌株处理色拉油的适宜温度范围为 25 ~ 30 ℃, 而固定化微生物降解色拉油的适宜温度范围为 25 ~ 35 ℃, 表明固定化菌株处理油脂废水的适宜温度范围更广。当温度大于 30 ℃ 时, 固定化与游离菌株对色拉油的降解效率均随着温度的升高而降低, 但游离菌的降解效率下降速率更快, 温度从 30 ℃ 变化为 40 ℃ 时, 游离菌对色拉油废水的降解率下降了 38%, 而固定化菌株对色拉油的降解率仅下降了 7%, 暗示固定化解脂耶氏酵母菌比游离细胞有着更好的热适应性。

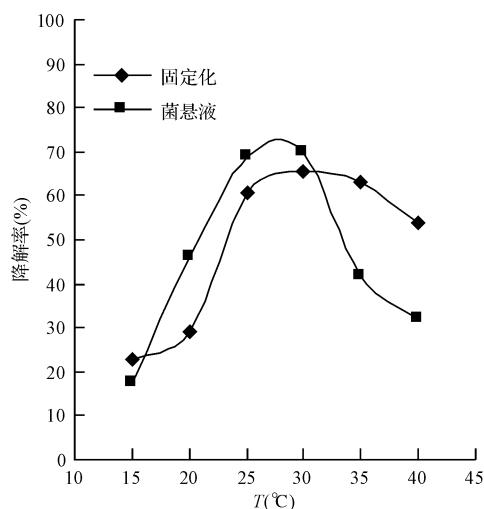


图2 温度对固定化解脂耶氏酵母降解含油废水的影响

Fig. 2 Effect of temperature on degradation of immobilized *Yarrowia lipolytica*

2.3 初始 pH 对固定化菌株降解油脂废水的影响

将等量的固定化和游离解脂耶氏酵母菌分别处理浓度为 2 000 mg/L、5 000 mg/L 的 150 mL 色拉油废水 50 h, 在温度为 30 ℃, 摇床转速为 150 r/min, 改变实验的初始 pH, 结果见图 3。

实验结果显示: pH 6 ~ 8 是固定化和游离解脂耶氏酵母处理色拉油废水的最适 pH 范围, 在这个 pH 范围内固定化和游离细胞对色拉油的降解率均达到最大, 研究表明虽然起始废水的 pH 不同, 但废水经固定化和游离细胞处理后, 其 pH 最终均达到 4 左右, 但游离菌比固定化菌对色拉油的降解率高 13% 左右。图 2 显示游离解脂耶氏酵母在初始 pH 6 ~ 10 范围内对色拉油都有着较好的降解效果, 降解率维持在 60% 以上, 表明解脂耶氏酵母能很好地适应中性偏碱的环境; 细胞经固定化后, 其适宜 pH 范围为 4 ~ 8, 往酸性环境偏移, 表明细胞被固定后,

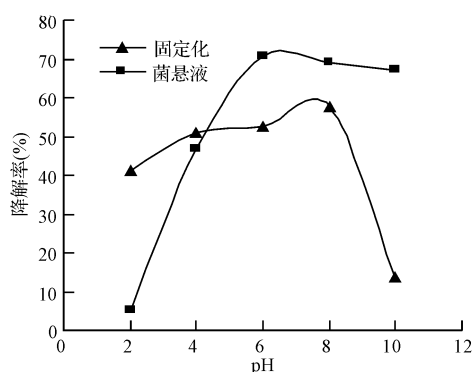


图3 pH 对固定化解脂耶氏酵母降解含油废水的影响

Fig. 3 Effect of pH on degradation of immobilized *Yarrowia lipolytica*

它的抗酸性能力提高。当 pH > 8 时, 固定化微生物的除油率迅速降低, 到 pH = 10 时, 固定化微生物对色拉油的降解率仅为 13.7%, 表明极端的碱性环境不利于固定化解脂耶氏酵母降解油脂。

2.4 摇床转速对固定化菌株降解油脂废水的影响

摇床转速的大小影响水相的溶解氧浓度, 影响水相的传质系数, 还关系到细胞是否破碎、固定化颗粒是否粉化等, 从而影响处理效果。实验中, 将等量固定化和游离菌株分别处理油浓度为 2 000 mg/L、5 000 mg/L 的 150 mL 色拉油废水 50 h, 温度为 30 ℃, pH 6, 改变摇床转速, 实验结果见图 4。

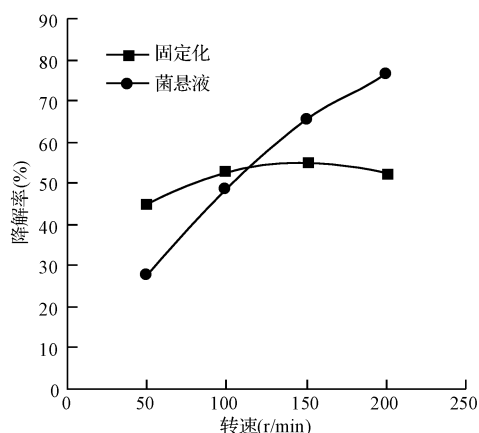


图4 摇床转速对固定化解脂耶氏酵母降解含油废水的影响

Fig. 4 Effect of rotary velocity on degradation of immobilized *Yarrowia lipolytica*

图 4 表明: 随着摇床转速的提高, 固定化和游离解脂耶氏酵母对色拉油的降解率均有提高, 但摇床转速对游离菌降解色拉油的效率影响明显大于其对

固定化微生物处理色拉油的效率影响。实验显示当摇床转速从 50 r/min 提高至 200 r/min 时,游离细胞对色拉油的降解率从 27.47% 上升到 76.45%;而固定化微生物对色拉油的降解率从 44.67% 变化为 52.38%。说明提高摇床转速有利于提高降解率,但随着摇床转速的提高,被固定化和游离细胞处理的废水样品均更加浑浊,可能的原因是剧烈震荡时剪切力增大,游离细胞容易破碎,而固定化载体物质更容易渗漏,表明高转速易导致载体的使用寿命减短,因此在随后的实验中固定化和游离细胞处理色拉油废水均在 150 r/min 下进行。

2.5 油浓度对固定化菌株降解油脂废水的影响

在最佳条件下,将接种量相等的固定化和游离细胞分别处理油浓度为 1 000 mg/L、2 000 mg/L、3 000 mg/L、4 000 mg/L 和 5 000 mg/L 的色拉油废水 50 h,结果见图 5。

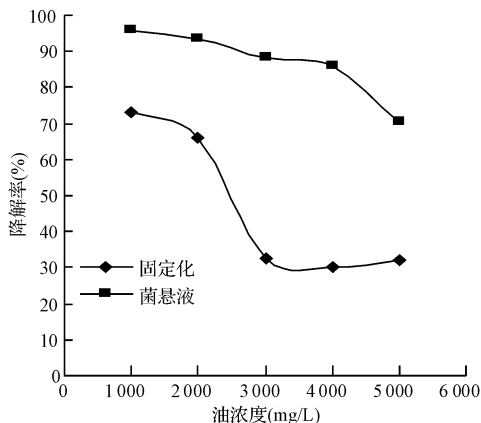


图 5 起始油浓度对固定化解脂耶氏酵母降解含油废水的影响

Fig. 5 Effect of oil concentration on degradation of immobilized *Yarrowia lipolytica*

实验结果表明:在上述 5 个初始底物浓度下,固定化和游离菌对色拉油的降解趋势相同,都是随着油浓度的提高菌体细胞对色拉油的降解率降低。但在各个油浓度下,固定化微生物对色拉油的降解效率明显低于游离细胞的降解率,当油浓度为 1 000 mg/L 时,固定化微生物对色拉油的降解率最大为 70% 左右,而游离菌在油浓度为 5 000 mg/L 时对色拉油的降解率仍保持了 70%。尤其是当油浓度从 2 000 mg/L 变化为 3 000 mg/L 时,固定化微生物对色拉油的降解率从 66% 下降至 32%,此后降解率维持在 30% 左右一直到油浓度增加至 5 000 mg/L,实

验提示固定化解脂耶氏酵母不适宜高浓度油脂废水的降解,显示需进一步摸索实验条件来提高固定化微生物对色拉油的降解效率。图 5 表明:当油浓度为 2 000 mg/L 时,固定化和游离细胞均对色拉油具有较高的降解率,所以我们将废水浓度配制成 2 000 mg/L 来进行随后的实验。

2.6 包埋菌量对固定化菌株降解油脂废水的影响

在最佳处理条件下,分别将菌浓度平均值为 6.65×10^6 个/mL 的解脂耶氏酵母 2、4、6、8、10 和 12 mL 包埋制备成固定化微生物,处理 2 000 mg/L 的 150 mL 色拉油废水 50 h,结果见图 6。

实验表明:随着包埋量的增加,固定化解脂耶氏酵母降解色拉油废水的效率增加。当包埋量 ≤ 4 mL 时,固定化微生物对色拉油的降解率随着包埋量的增加呈直线上升,随后当包埋量进一步增加时,固定化微生物对色拉油的降解效率略有增加但不明显,包埋量从 4 mL 增加到 12 mL 时,固定化微生物对色拉油的降解率仅增加 8% 左右。实验结果与接种量对游离细胞处理色拉油废水影响效果相一致^[2]。揭示固定化菌株的最佳包埋菌量为 4 mL/150 mL(即 2.5%),增加投菌量不能够显著增加固定化微生物降解色拉油废水的效率。

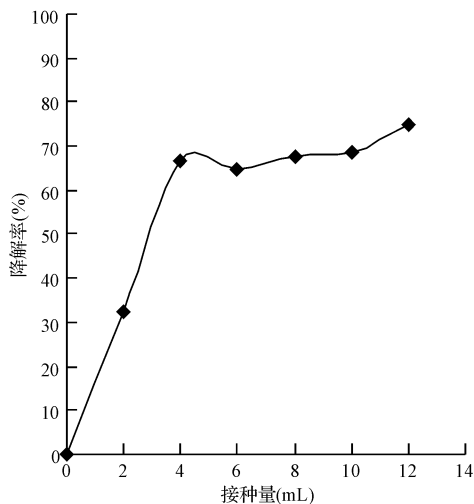


图 6 接种量对固定化解脂耶氏酵母降解含油废水的影响

Fig. 6 Effect of quantity cells on degradation of immobilized *Yarrowia lipolytica*

2.7 菌种驯化对底物降解的影响

为进一步增加固定化微生物对色拉油废水的处理效率,本研究室将包埋好的解脂耶氏酵母培养在 YPD 液体培养基中,在温度 30 ℃、转速 160 r/min

摇床上培养 30 h 进行驯化,将驯化后的固定化微生物处理油浓度为 2 000 mg/L 的色拉油废水,处理条件同上。结果见图 7。

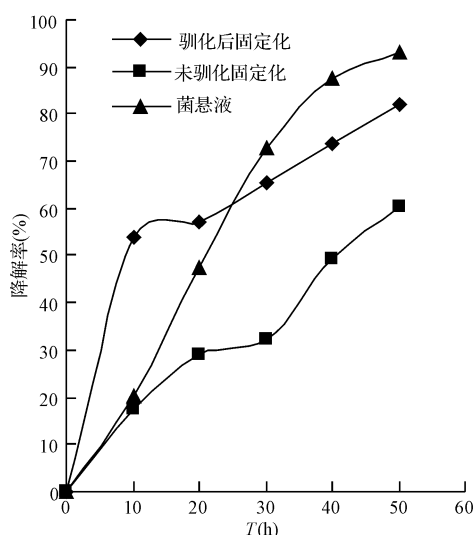


图7 菌种驯化对底物降解的影响

Fig. 7 Effect of acclimation on degradation

实验结果表明:将驯化、未驯化固定化微生物和菌悬液分别处理油脂废水时,三者都随着处理时间的延长,对色拉油废水的降解率增加。尤其在处理前期 20 h,驯化固定化微生物对色拉油废水的降解率比游离细胞的降解率高 10%,比未驯化固定化微生物的降解率高 20% 左右,降解效率明显高于游离细胞和未驯化固定化菌,实验提示:细胞被包埋后有一个逐渐适应包埋载体新环境的过程,细胞驯化使得解脂耶氏酵母对海藻酸钙的耐受性增强,从而提高的细胞本身的生物活性。处理 50 h 时经驯化的固定化微生物对色拉油的降解率达到 82%,降解率仍比未驯化细胞高 20%,但比游离细胞降解率低 10% 左右,可能的原因是细胞被包埋后,由于载体导致的传质阻力,使得细胞产生的解脂酶不能很好地与底物结合,导致细胞不能够很好地利用底物。由于驯化后的固定化微生物在机械强度、稳定性和重复使用性等方面均优于未驯化细胞,在同样的条件

下,驯化固定化微生物重复处理色拉油废水 12 次降解率仍然维持在 70% 以上,且在这 12 次的处理过程中,包埋细胞颗粒保持完好,未出现溶胀破碎和黏连现象(实验数据另文发表)。因此与游离解脂耶氏酵母相比,海藻酸钙包埋的细胞经驯化后处理油脂废水具有较好的应用价值。

3 小 结

(1)以海藻酸钠为载体,利用包埋法固定解脂耶氏酵母来处理油脂废水,实验结果表明:微生物固定后生物活性相对稳定,可以认为海藻酸钠是一种较好的固定化包埋载体。

(2)固定化解脂耶氏酵母处理色拉油废水适宜条件为:温度 25 ~ 35 ℃、pH 4 ~ 8、摇床转速 100 ~ 200 r/min,处理初始油浓度在 2 000 mg/L,包埋菌浓度 6.65×10^6 个/mL,包埋量为 4 mL/150 L。与悬浮态相比,其温度适应范围增大、热适应性增强、pH 往酸性方向偏移。

(3)将固定化微生物先行在 YPD 培养基中驯化再处理油脂废水是一个能大幅度提高油脂废水降解率的较好的方法。

参 考 文 献

- [1] 杨麒,李小明,曾光明,等. 同步硝化反硝化的形成机理及影响因素. 环境科学与技术, 2004, 27(3): 102 ~ 104
- [2] 吴兰,罗玉萍,李思光,等. 解脂耶氏酵母处理含油废水的工艺条件. 南昌大学学报(理科版), 2006, 30(4): 379 ~ 382
- [3] 吴兰,罗玉萍,万金保,等. 解脂耶氏酵母菌处理含油废水的研究. 环境科学研究, 2006, 19(5): 122 ~ 125
- [4] 翟晓萌,李道棠. 海藻酸钠固定化包埋微生物处理有机微污染源水. 环境科学, 2000, 21(6): 80 ~ 84
- [5] 赵斌,何绍江. 微生物学实验. 北京:科学出版社, 2002. 75 ~ 77
- [6] 张建辉,孔瑛,侯影飞,等. 聚乙烯醇包埋石油脱硫菌 UP-2 的研究. 中国环境科学, 2006, 26(suppl.): 92 ~ 96