

研究简报

用聚丙烯酰胺凝胶固定化微生物细胞清除
合成洗涤剂污水中 LAS 的初步研究

蒋立锐 任维栋 张继功

(山东昌潍医学院生化教研室)

近十年来,国外用固定化微生物细胞的方法,生产氨基酸和抗菌素,取得了显著经济效果,理论研究也逐渐深入。近几年来,用固定微生物细胞处理工业污水做了不少尝试,认为是一种效果好、简单易行的办法。

我们选用假单孢杆菌 (*Pseudomonas. S. P.*) B₃ 菌株,以聚丙烯酰胺凝胶包埋,用来清除模拟合成洗涤剂污水中的 LAS,确有一定效果。

一、材料与方法

(一) 菌株:系山东潍坊合成洗涤剂厂分离的一种假单孢杆菌 (*Pseudomonas. S. P.*) B₃ 菌株。平板培养,培养基成分: LAS 0.2%; 蛋白胨 1%; NaCl 0.5%; (NH₄)₂SO₄ 0.01%; 琼脂粉 1.5%; pH 7.2—7.4。

(二) 材料: LAS 系直链烷基苯磺酸钠的缩写。丙烯酰胺(国产工业品,氯仿提纯),双丙烯酰胺(国产工业品,丙酮提纯),过硫酸铵——三乙醇胺(化学聚合)。做标准曲线和酶活力测定用。实验用的合成洗涤剂中含 20% LAS。

(三) 固定化细菌的制备方法: 15% 聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体,取菌体 2.5 克,用生理盐水稀释至 10 毫升,混匀,加入 10 毫升含 30% 的丙烯酰胺, 3.6% 双丙烯酰胺溶液,混匀后,加入少量过硫酸铵——三乙醇胺,温度

为 10℃。固定后置冰箱过夜。用尼龙筛做成 50 目 15% 聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体颗粒。用生理盐水平衡。

10% 和 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体的制备,同上法,也取 2.5 克菌体,调节适当水量做成。

用同样方法,做无菌的 15% 空白聚丙烯酰胺凝胶颗粒柱。

(四) 上柱: 玻璃管 16 × 400 毫米,加入凝胶颗粒后,用生理盐水平衡 12—24 小时,加入模拟污水,控制流速 8—9 滴/分,每天工作 14 小时,温度保持 37℃。

(五) 模拟污水的配制: 0.15 克 % 合成洗涤剂; 0.01 克 % (NH₄)₂SO₄, pH 7.2—7.4。

(六) 分解 LAS 酶活力测定: 参照 I. Chibata et al. 法。取 250 毫克菌于 100 毫升三角瓶内,加入 40 毫升 0.1 克 % LAS 溶液。

取 250 毫克菌,做成 15% 聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体颗粒,放在另一支 100 毫升三角瓶内,加入 40 毫升 0.1 克 % LAS 溶液。

以上两种三角瓶都在 37℃ 温箱中反应 48 小时后取出,测剩余 LAS 量 (LAS 的测定采用甲烯蓝法),计算自然菌体分解 LAS 的酶活力和包埋菌体分解 LAS 的酶活力。

二、结 果

(一) 假单孢杆菌 B₃ 菌株分解 LAS 的

酶活力:测得的结果列于表 1。

表 1 自然菌体与包埋菌体分解 LAS 酶的活力

	毫克/克菌体/24 小时	活力单位/克 菌体/24 小时
自然菌体酶活力	4.15—4.32(4.21)*	415—432(421)*
包埋菌体酶活力	7.63—7.91(7.82)*	763—791(782)*

* 平均值。

由表 1 可以看到,自然菌体分解 LAS 的酶活力平均值为 421 活力单位/克菌体/24 小时,包埋菌体平均值为 782 活力单位/克菌体/24 小时,凝胶包埋菌体酶活力几乎为自然菌体的 2 倍。

(二) 三种不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体上柱后的存活时间及清除率结果,列于表 2、3、4。

表 2 15% 聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体上柱后的存活时间及对 LAS 的清除率

存活 天数	1	2	3	5	7	9	12	15	18	22
清除 LAS 毫克数	4.61	7.01	7.11	6.80	8.81	9.00	9.22	8.33	6.52	4.81
清除率 %	30.7	46.7	47.7	45.3	58.7	60.0	61.3	55.3	43.3	32.0

15% 聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体上柱后,对 LAS 的清除率最高达 60%,半寿期约 20 天左右。

表 3 10% 聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体上柱后的存活时间及对 LAS 的清除率

存活 天数	1	2	3	5	7	9	12	15	18	22
清除 LAS 毫克数	5.21	6.01	5.00	8.00	8.00	9.01	9.41	5.92	5.51	4.82
清除率 %	34.7	40.0	33.3	53.3	53.3	62.9	62.7	39.3	36.7	32.0

10% 聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体上柱后,对 LAS 清除率最高达 62.9%,半寿期 20 天左右。

由表 4 可以看出,7.5% 聚丙烯酰胺凝胶包埋的菌体上柱后,活力很快消失,最大清除

表 4 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶包埋菌体上柱后存活时间及对 LAS 的清除率

存活天数	1	3	5	7	9
清除 LAS (毫克数)	8.80	8.21	7.5	7.43	4.62
清除率(%)	58.7	54.7	50.0	49.3	30.7

率为 58.7%,半衰期为 10 天。

(三) 空白柱对 LAS 的滞留能力测定:测定结果表明,空白柱对 LAS 没有滞留作用。将标准 LAS 溶液通过空白柱后,流出液中 LAS 浓度与标准液完全一致。

三、讨 论

本文对固定化假单孢杆菌(*Pseudomonas. S. P.*) B₃ 菌株清除模拟合成洗涤剂污水中 LAS 的作用进行了初步探讨。

1. 选用的假单孢杆菌 B₃ 菌株,用 15%,10%,7.5% 三种不同浓度的丙烯酰胺单体包埋,结果表明,10% 和 15% 聚丙烯酰胺凝胶包埋的菌体存活时间较长;7.5% 聚丙烯酰胺凝胶包埋的菌体存活时间较短。可见,用凝胶包埋活细胞时所使用的丙烯酰胺单体的浓度对所包埋细胞的酶活力有较大的影响。但 15% 凝胶制成的包埋菌体颗粒硬度较大,上柱后透水性不如 10% 凝胶,因此选用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶包埋 B₃ 菌株是较理想的。

2. 测定了固定化的和自然的假单孢杆菌 B₃ 菌株清除 LAS 的酶活力。自然菌体酶活力是 4.21 毫克/克菌体/24 小时;固定化细菌的酶活力是 7.82 毫克/克菌体/24 小时,固定化细菌酶活力大约为自然菌体酶活力的两倍。估计是由于未固定的细菌分泌的粘液阻碍自身与氧气接触,从而影响了细菌分解 LAS 的活力。固定化的细菌虽然吸收氧的细胞表面积减少,但呈颗粒状态存在,分泌的粘液少,仍然保持一定量的氧气供应和分解 LAS 的能力。

3. 实验结果表明,细菌经固定化上柱后,半衰期 20 天左右。上柱后最初几天对 LAS

的清除率较低,仅 30% 左右。这可能是细菌固定后,由于环境改变,代谢活动也跟着改变。而后清除率逐渐升高,高达 60%,这可能是因为细菌适应了新的环境。随后又逐渐降低,这时清除率的降低是与细菌存活数逐渐减少有关。如何延长固定化细菌的存留时

间和增加其稳定性有待今后探讨。

山东潍坊合成洗涤剂厂曹孝全同志提供菌种,本学院微生物学教研室徐长霞同志协助工作,特此致谢。

二硝基重氮酚对淡水鱼类的毒性试验

曲年受 林 影 车平川 王天祥

(山东省烟台地区环境保护研究所)

崔可铎

(中国科学院海洋研究所)

二硝基重氮酚 (DDNP) 对海洋动物的毒性效应,我们已做过研究。为了确定 DDNP 对生物的安全浓度,为制定排放标准提供科学依据,我们对淡水鱼类做了毒性试验。

材 料 和 方 法

试验用药为二硝基重氮酚 (dinitro-diazo-phenol), 简称为 DDNP。先配成 1000ppm 的母液,放置 24 小时后再配成不同浓度的试验用液。

试验用鱼为体长 3—4cm 的白鲢鱼和草鱼,先在实验室驯养使其生活正常,再选择大小均匀行动活泼健康的个体进行毒性试验。

试验用水为地下井水,验证实验采用曝气除氯的自来水。试验前测定井水和自来水的溶解氧、pH、氯度、碱度、硬度、耗氧量等化学项目,试验用液的溶解氧在 4 毫克/升以上。

试验容器为 3000 毫升的搪瓷缸和 2000 毫升的玻璃培养缸。

试验浓度是在进行三次预实验后,确定最高和最低的浓度界限,再按 0.1 的对数间距配成试验浓度。每个浓度放鱼 10 尾,24 小时换液一次,定时观察记录鱼的形态变化,行

为、死亡时间和数量。数据进行统计处理,取平均值,在半对数纸上用直线内插法求出 24、48、96 小时的 TL_m 值,以 96 小时 TL_m 值乘以经验系数 0.1 计算生物安全浓度。

结 果 和 讨 论

试验结果如表 1。

表 1、2 表明,白鲢在 15.0ppm 中能正常生活,22.1ppm 24 小时即发生死亡,96 小时出现身体变形,烂尾、掉鳍的现象,55.0 ppm 24 小时死亡 80%。

表 3 表明,草鱼的死亡率随致毒时间的延长而有规律的增加。18.9 ppm 96 小时尚能正常生活,37.8 ppm 24 小时死亡达 50%。

试验中发现,鱼类死亡前的行为发生异常,首先浮头,游泳时快时慢,忽上忽下,逐渐游动急促,死亡前急剧跳跃,死亡后体表粘液增多,与贺锡勤所分的四个阶段类似。

DDNP 对白鲢鱼和草鱼的致死浓度如表 4,两种鱼对 DDNP 的反应基本上是一样的。

白鲢鱼 96 小时的安全浓度为 $33.0 \times 0.1 = 3.3\text{ppm}$ 。

草鱼 96 小时的安全浓度为 $25.3 \times 0.1 = 2.5\text{ppm}$ 。