染料脱色菌的筛选及固定化脱色试验*

梁沈平 王菊思 赵丽辉

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085 E-mail: jswang @ mail.rcees.ac.cn)

摘要 从印染厂污水中筛选到7株高效脱色菌, 其中 Pse4、Pse29两菌在非固定化条件下, 分别对10mg/L 阳离子桃红 FG、活性艳红 K-2BP 溶液在染料为唯一碳源、能源时, 12d 脱色80% 以上. 这2菌都属于假单胞菌属. 将各菌等量混合进行脱色, 没有协同作用. 采用凹凸棒粘土颗粒或塑料环为载体固定化脱色菌, 能大大缩短反应时间, 提高脱色率. 凹凸棒颗粒固定化柱在6h 即对60mg/L 混合染料脱色91%, 是一种具有较高实用价值的固定化技术.

关键词 脱色菌, 筛选, 固定化, 凹凸棒, 染料.

Isolation and Immobilization of Bacteria for Decoloring of Dying Wastewater

Liang Shenping Wang Jusi Zhao Lihui

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085

E-mail: jswang @ mail.rcees.ac.cn)

Abstract Seven strains were isolated from the drainage of wastewater treatment plant of a textile factory. Each of these strains can decolor different dye in dye containing water. For example, Pse 4 and Pse29 could decolor more than 80% of the dye Basic Red 13 and the Reactive Red respectively in 12 days when 10mg/L dye in solution was used as sole source of carbon and energy for bacteria. These two strains belong to *Pseudomonas*. There were no conjunctive function when 7 strains were simply mixed for decolor of mixed dyes in water. However, these strains seem to cooperate effectively when they were immobilized on Attapulgus or plastic rings. Immobilized microbe on Attapulgus can decolor 91% of 60mg/L mixed dyes in 6h. It is supposed to be a good immobilization technology for practical use.

Keywords decoloring bacteria, isolation of bacteria, immobilization of bacteria, Attapulgus.

利用微生物对染料废水进行脱色一直被研究并力求发展为实用的水处理技术. 酵母菌对偶氮染料有还原作用[1], 假单胞菌、芽孢杆菌[1]、白腐担子菌 *Phanerochaete chroysosporium*[2] 及 *Streptomyces chroyngfuscus*[3,4] 等都被发现有脱色作用. 利用微生物的脱色作用对染料废水进行生物治理具有费用低、易操作的特点, 本试验进行了脱色菌的筛选及固定化脱色的实验.

1 试剂与材料

1.1 染料来源

5种染料为: 阳离子桃红 FG、活性艳红 K-2BP、直接耐晒翠蓝 GL、阳离子黄 X-5GL、活性黄 KD-3G, 分别属于半菁类、酞菁类、单偶氮类、半菁类、双偶氮类染料, 来自某针织厂化验室.

菌种来源: 从某印染厂混合污水中分离.

1.2 固定化载体

凹凸棒: 是一种含水镁铝硅酸盐粘土矿物, 试验采用3—5mm 粒状、经高温灼烧具有一定强度的凹凸棒, 比表面积103m^2/g, 颗粒空隙率

* 中国科学院环境水化学国家重点实验室开放基金资助 (Project Supported by The State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Chinese Academy of Sciences)
梁沈平: 男, 29岁, 理学硕士
收稿日期: 1997-11-13

58.3%, 堆积间隙率40%, 为本研究室开发* .

塑料环: 聚乙烯材料, 带叶齿环状, 表面较为光滑. 环直径10cm, 环之间通过塑料线连成环串.

1.3 培养基成分

富集培养基成分(g/L): 蛋白胨2, 牛肉膏3, 葡萄糖5, 染料0.5, 以及无机盐[5].

基本培养基成分(g/L): NaH_2PO_4 3.5, K_2HPO_4 5.0, $(NH_4)_2SO_4$ 2.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 0.1, 以及微量元素[6].

2 实验方法

2.1 菌种的驯化筛选

菌种驯化: 将含菌种的废水分别接入含不同染料的富集培养基中, 于28℃摇床培养, 每次至接近全褪色时转至下一瓶, 共筛选5代, 在平板上划线分离, 2次筛选共得到17株菌.

脱色菌筛选: 将分离出的17株菌分别对染料进行脱色试验, 筛选出7株活性较高的菌株.

2.2 非固定化细胞脱色试验

在基本培养基中加入染料, 制成人工染料配水, 脱色试验在这种以染料为唯一碳源和能源的培养基中进行, 用722型分光光度计测定试验前后反应液的吸光值, 计算脱色率.

用富集培养基摇床培养菌种24h, 将培养液在1000r/min 下离心10min, 倾去上清液, 再用0.2mol/L pH7.0磷酸缓冲液将菌体清洗2遍, 同样条件下离心, 最后用缓冲液制成菌悬液. 取一定量菌悬液加入灭过菌的染料废水中, 废水中细菌浓度与培养24h 的生长培养基中细菌浓度一致, 于28℃、100r/min 摇动培养12d 后取样、比色, 计算各菌对染料的脱色率.

(1) 单一菌种降解单一染料 采用7种菌分别对5种染料进行脱色, 染料浓度均为10mg/L.

(2) 混合菌种降解单一染料 将各菌分别培养、离心、制菌悬液, 再将菌悬液混合, 用混合菌种对各种单一染料脱色.

2.3 固定化细胞脱色试验

(1) 固定化柱脱色试验 在高100cm, 内径6.8cm 的有机玻璃柱内, 装填3—5mm 的凹凸棒颗粒3000ml, 填充高度80cm. 连接蠕动泵、流量计及空气泵等设施, 组装成一套固定化生物柱系统, 见图1.

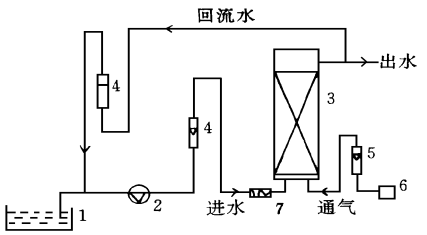

图1 固定化运行系统装置示意图

1. 贮水池 2. 蠕动泵 3. 固定化柱 4. 液体流量计 5. 空气 流量计 6. 空气泵 7. 预热器

将7株菌的菌悬液等量混合, 倒入柱内, 启动系统, 循环固定化3d. 在运行初期, 用富集培养基制成染料配水, 以利于细菌在载体上生长繁殖, 并进行反复固定化操作. 2个月后, 固定化柱稳定运行, 用基本培养基配制染料配水进行脱色试验.

分别对单一染料及混合染料脱色, 3种单一染料阳离子桃红 FG、活性艳红 K-2BP、直接耐晒翠蓝 GL, 浓度均为10mg/L. 运行参数: 水流量10ml/min, 通气4L/min, HRT 2h(指实际水力停留时间, 因凹凸棒填料堆积间隙率为40%, 所以空柱 HRT 为5h), 温度为室温17—21℃. 出水全部回流. 混合染料由浓度各20mg/L 的3种染料组成, 总浓度60mg/L. 出水排放2ml/min, 回流8ml/min.

(2) 氧化槽系统脱色试验 系统装置示意图如图2所示.

废水借重力流动, 流量10ml/min, 由流量计调节. HRT 12h, 温度为室温17—21℃. 氧化槽由有机玻璃制成, 容积为28cm × 16.5cm × 16cm = 7400ml. 槽内装填塑料环作为细菌生长的载体.

用7株菌进行生物膜培养, 2个月后进行3种染料及混合染料的脱色试验. 各染料浓度同固定化生物柱试验所用浓度.

---

* 王菊思等. 石化地区污水回用成套技术专题研究报告. 1995

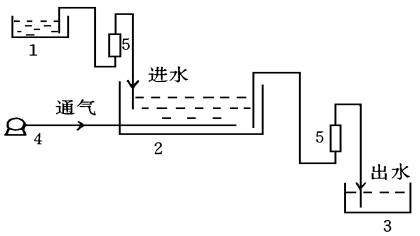

图2　氧化槽生物膜系统

1. 高位槽 2. 氧化槽 3. 出水贮存池 4. 曝气泵 5. 液体流量计

2.4　菌种初步鉴定

根据7株菌的形态、生理生化特征, 对照检索表[8]将这7株菌初步鉴定到属.

3　结果与讨论

3.1　非固定化单一菌种降解单一染料

从表1可以看出:

(1) Pse4对阳离子桃红 FG, Pse29对活性艳红 K-2BP, 均有80%左右的脱色率. 这2株菌都属于假单胞菌属.

表**1**　单一菌种降解单一染料脱色率(第**12d**)

染料名称	各菌株脱色率/%						
	Xan3菌株	Pse4菌株	Zoo7菌株	Pse21菌株	Pse29菌株	Ser210菌株	Bac213菌株
阳离子桃红 FG	50.68	85.39	54.34	49.32	38.36	45.21	39.27
活性艳红 K-2BP	32.29	12.56	18.39	57.85	80.27	55.61	12.56
直接耐晒翠蓝 GL	7.86	24.84	8.49	30.82	28.30	16.98	17.92
阳离子黄 X-5GL	16.83	18.16	14.73	24.33	19.53	14.17	14.17
活性黄 KD-3G	43.63	11.97	10.81	74.52	54.44	16.99	34.36

(2) 直接耐晒翠蓝 GL、阳离子黄 X-5GL 对以上各菌均呈抗性, 脱色率低, 而其余3种染料均能被某种菌较好地脱色, 说明染料结构对其生物脱色性能的影响很大.

(3) Pse4对阳离子桃红 FG、Pse29对活性艳红 K-2BP 均能高效脱色, 驯化 Pse4、Pse29所用染料分别为阳离子桃红 FG、活性艳红 K-2BP. 可以认为, 为了筛选某种染料的脱色菌, 应该选用该染料为目标化合物.

3.2　非固定化混合菌种降解单一染料

实验结果见表2.

表**2**　混合菌种对各种染料的脱色率

染　料	阳离子桃红 FG	直接耐晒翠蓝 GL	活性艳红 K-2BP	阳离子黄 X-5GL	活性黄 KD-3G
脱色率/%	88.92	23.11	75	16.79	48

结果与单一菌降解相似, 即对阳离子桃红 FG、活性艳红 K-2BP 有较高的脱色率, 活性黄 KD-3G 居中, 对直接耐晒翠蓝 GL、阳离子黄 X-5GL 较差. 从实验结果看不出多个菌种共存时有协同效应, 仍是以特效的单一菌种起主要作用, 这说明简单地将各菌等量混合, 难以提高脱色效率.

3.3　固定化柱脱色试验结果

实验结果见表3.

表**3**　固定化柱对单一染料及混合染料的脱色率/%

染　料	处理时间/h					
	6	12	24	36	48	72
FG	97.1	97.5	100	100	100	100
K-2BP	51.8	49.5	47.6	49.2	49.9	53.4
GL	98.9	94.2	97.4	96.3	95.6	98.2
混合染料	91.1	92	91.1	88.1	88.1	85.3

可以看出, 固定化柱对染料废水具有很好的脱色效果. 在染料为唯一碳源和能源时, 对60mg/L 的混合染料6h 能脱色91%.

3.4　氧化槽系统脱色试验结果

结果见表4.

表**4**　氧化槽对单一染料及混合染料的脱色率/%

染　料	处理时间/h						
	12	24	36	48	60	72	84
FG	63.2	61.2	71.4	70.8	74.9	70.1	75.5
K-2BP	76.5	79.5	86.1	86.4	89.4	87.1	87.9
GL	33.5	34.1	41.2	43.2	47.4	51.1	49.7
混合染料	24.3	23.9	23.3	28.6	30.1	34.4	36.4

从表4看出, 氧化槽对阳离子桃红 FG、活

性艳红 K-2BP 的脱色率较高, 对直接耐晒翠蓝 GL 脱色较差. 在进行自由细胞的脱色时, 已发现各菌对直接耐晒翠蓝 GL 最难脱除, 不过, 固定化柱对该染料有较高的脱色率. 因此, 在实际运行时, 可以考虑将各个单元组合, 将能对含各种染料的废水有效地脱色.

3.5 各种脱色方式的脱色效果比较

非固定化细胞脱色的细菌浓度为生长对数期浓度, 比较稳定, 而固定化柱、氧化槽脱色试验也是在2个月试运行的稳定状态下进行. 可在废水中染料种类、浓度、pH 及运行温度相同的条件下, 比较各种处理方式的效果.

(1) 非固定化细胞和固定化细胞脱色比较

非固定化细胞脱色时间12d 时降解最快的染料也只能达到85%的脱色率, 而固定化柱在16h 能对60ml/L 混合染料脱色91%, 氧化槽能在12h 对10mg/L 阳离子桃红 FG、活性艳红 K-2BP 分别脱色63.2%、76.5%, 说明采用固定化方式可大大缩短脱色时间.

从表1、表2看出, 将非固定化细胞简单等量混合没有协同作用. 而采用固定化方式, 尤其是凹凸棒颗粒固定化柱, 可充分提高各种菌的脱色活性, 各菌对自己的特征染料高效脱色, 表现出固定化柱对各种单一染料及混合染料良好的脱色作用.

(2) 固定化柱、氧化槽脱色效率比较 结果见表5.

由表5看出, 固定化柱、氧化槽对混合染料废水的脱色效果相差巨大, 说明固定化柱能更有效地处理含各种染料的废水, 是一种具有较高实用价值的固定化技术.

表5 固定化柱、氧化槽对染料的脱色率比较/%

染 料	浓度 /mg·L^{-1}	处理时间 /h	固定化方式	
			固定化柱	氧化槽
阳离子桃红 FG	10	12	97.5	63.2
		72	100	70.1
活性艳红 K-2BP	10	12	49.5	76.5
		72	53.4	87.1
直接耐晒翠蓝 GL	10	12	94.2	33.5
		72	98.2	51.1
混合染料	60	12	92	24.3
		72	85.3	34.4

单一染料的脱色率比较: 对阳离子桃红 FG、直接耐晒翠蓝 GL 的脱色率, 固定化柱远远高于氧化槽, 原因是固定化柱所提供的生物量远比氧化槽多, 凹凸棒吸附对脱色作用起了很大贡献. 固定化柱对阳离子桃红 FG 及直接耐晒翠蓝 GL 的脱色率均高于氧化槽, 而对活性艳红 K-2BP 的脱色率低于氧化槽, 其原因有待进一步研究.

氧化槽内单位体积生物量少, 不仅导致脱色率远远低于固定化柱, 而且在运行过程中, 不能保证所需要的脱色菌能抑制杂菌的生长. 杂菌的生长不仅占据填料空间, 还浪费营养物质. 本试验的氧化槽内生长了大量丝状真菌及原生动物, 这些丝状真菌对脱色菌在塑料环上附着、固定化是有益的, 但对脱色是否有利则有待进一步研究.

3.6 菌种初步鉴定结果

结果见表6.

表6 细菌初步鉴定结果

菌株	Xan3	Pse4	Zoo7	Pse21	Pse29	Ser210	Bac213
鉴定结果	黄单孢菌属	假单孢菌属	动胶菌属	假单孢菌属	假单孢菌属	沙雷铁氏菌属	芽孢杆菌属

脱色效果好的 Pse4、Pse29两菌均属于假单孢菌属.

4 结论

(1) 从印染厂污水中筛选到对染料脱色的7株高效脱色菌, 一些菌株对某种染料具有特效. 如 Pse4对阳离子桃红 FG, Pse29对活性艳红 K-2BP, 在非固定化条件下, 于28℃处理浓度为10mg/L 的染料废水, 12d 后均有80% 以上的脱色率. 这2菌都属于假单孢菌属.

(2) 为筛选出对某种染料特效的脱色菌, 应该选用该染料为目标化合物进行驯化.

(3) 单一菌种脱色染料废水反应时间长, 简单地将各脱色菌等量混合, 没有协同作用. 采用混合固定化脱色菌方式可充分提高各菌的活性, 大大缩短反应时间, 对各种染料废水及混合染料废水具有很高的脱色率. 在染料为唯一碳源和能源时, 固定化柱能在6h 对60mg/L 混合染料废水脱色91%, 氧化槽能对10mg/L 阳离子桃红 FG、活性艳红 K-2BP 分别脱色63. 2%、76. 5% .

(4) 采用凹凸棒颗粒固定化脱色菌, 不仅可以保持各菌的高浓度和高活性, 而且凹凸棒颗粒本身对染料具有吸附作用, 可以在短时间内得到很高的脱色率.

(5) 本试验着重观察研究微生物对染料的脱色作用, 对整个工艺过程及最佳工艺参数的选择欠考虑, 例如固定化柱气水比为400 ∶1, 显然比值太高, 实际应用时可选择高压气泵降低比值.

参 考 文 献

1 刘志培等. 偶氮染料的微生物降解, 环境污染与防治, 1987, **9**(2): 2—5

2 Jack T Spadaro et al.. Degradation of dyes by the lingin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 1992, **58**(8): 2397—2401

3 Andrzej paszynskj et al.. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscust*. Applied and Environmental Microbiology, 1992, **58**(11): 3598—3604

4 Maria B. Pasti-Grifsby et al.. Transformation of azo dyes isomers by *Streptomyces chromofuscust* All. Applied and Environmental Microbiology, 1996, **62**(5): 1814—1817

5 鲜海军等. 多种染料的微生物脱色研究. 环境科学学报, 1988, **8**(3): 266—273

6 鲜海军等. 用高效染料脱色菌和 PVA 降解菌混合培养液处理印染废水. 环境科学学报, 1993, **13**(4): 420—427

7 中国科学院微生物所细菌分类组编. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978

1996年美国《CA》千名表中的中国科技期刊

(据《CA》1995年7月—1996年6月统计)

千名表的位次	期刊名称	《CA》中的名称
105	高等学校化学学报	GAODENG XUEXIAO HUAXUE XUEBAO
173	分析化学	FENXI HUAXUE
193	功能材料	GONGNENG CAILIAO
214	中国化学快报	CHIN CHEM LETT
289	物理学报	WULI XUEBAO
307	科学通报(英文版)	CHIN SCI BULL
351	化学世界	HUAXUE SHIJIEC
378	材料保护	CAILIAO BAOHU
391	物理化学学报	WULI HUAXUE XUEBAO
426	中国药理学通报	ZHONGGUO YAOLIXUE TONGBAO
479	应用化学	YINGYONG HUAXUE
484	化学通报	HUAXUE TONGBAO
506	金属学报	JINSHU XUEBAO
508	分析试验室	FENXI SHIYANSHI
599	石油化工	SHIYOU HUAGONG
610	高分子材料科学与工程	GAOFENZI CAILIAO KEXUE YU GONGCHENG
623	中国物理快报	CHIN PHYS LETT
625	理化检验(化学分册)	LIHUA JIANYAN HUAXUE FENCE
643	核技术	HEJISHU
646	色谱	SEPU
656	化学试剂	HUAXUE SHIJI
667	冶金分析	YEJIN FENXI
668	光学学报	GUANGXUE XUEBAO
673	半导体学报	BANDAOTI XUEBAO
678	生物化学杂志	SHENGWU HUAXUE ZAZHI
679	涂料工业	TULIAO GONGYE
710	中国免疫学杂志	ZHONGGUO MIANYIXUE ZAZHI
744	中国胶粘剂	ZHONGGUO JIAONIANJI
758	环境科学	**HUANJING KEXUE**
821	药学学报	YAOXUE XUEBAO
822	中国激光	ZHONGGUO JIGUANG
828	厦门大学学报(自然科学版)	XIAMEN DAXUE XUEBAO (ZIRAN KEXUE BAN)
832	光谱学与光谱分析	GUANGPU XUE YU GUANGPU FENXI
835	石油炼制与化工	SHIYOU LIANZHI YU HUAGONG
852	中国皮革	ZHONGGUO PIGE
865	生物化学与生物物理进展	SHENGWU HUAXUE YU SHENGWU WULI JINZHAN
874	中国药学杂志	ZHONGGUO YAOXUE ZAZHI
882	中国中药杂志	ZHONGGUO ZHONG YAO ZAZHI
901	分析科学学报	FENXI KEXUE XUEBAO
909	分析测试学报	FENXI CESHI XUEBAO
918	中国科学B	SCI CHINA, SER. B
935	高分子学报	GAOFENZI XUEBAO
938	催化学报	CUIHUA XUEBAO
945	有机化学	YOUJI HUAXUE
954	华东理工大学学报	HUADONG LIGONG DAXUE XUEBAO
962	华中理工大学学报	HUAZHONG LIGONG DAXUE XUEBAO
963	上海环境科学	SHANGHAI HUANJING KEXUE
975	化工学报	HUAGONG XUEBAO
990	中国药理学报	ZHONGGUO YAOLI XUEBAO
996	武汉工业大学学报(材料科学版)	J. WUHAN UNIV. TECHNOL., MATER SCI ED.
999	物理	WULI

1) 中国科技信息研究所一九九六年中国科技论文统计与分析(年度报告), 第88—89页