

固定化微生物柱处理染料废水试验中细菌的存活^{*}

梁沈平 王菊思 姜兆春

(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 以凹凸棒粘土颗粒为载体, 混合固定化 7 株高效脱色菌, 组装成固定化生物反应柱, 进行各种染料废水的脱色试验. 在试验各阶段, 从柱体取出凹凸棒颗粒进行细菌存活检查. 经过半年多的运行, 最后能检测到初始固定化 7 种菌中的 6 种菌, 说明本试验采用的固定化混合菌种及强制固定化优良菌株的方式是可行的. 电镜检查表明, 凹凸棒颗粒表面粗糙, 具有孔洞、缝隙, 是微生物生长的良好载体. 固定化细菌主要在凹凸棒表面生长繁殖, 也可在颗粒缝隙 200 μm 深处生长, 但由于氧气、养分的不足, 颗粒缝隙由外至内, 细菌数量逐渐减少, 并发生变形.

关键词 固定化微生物, 凹凸棒颗粒, 染料废水, 脱色试验.

Survival of Immobilized Microbe on Attapulugus for Decoloring of Dying Wastewater

Liang Shenping Wang Jusi Jiang Zhaochun

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

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

Abstract A experimental system was set up for decoloring of dying wastewater. The key element of the system was the immobilized microbe column packed with granulated Attapulugus clay (3—5mm) on which 7 strains were immobilized. Bacteria survival was checked during the different period of the experiment. At the beginning seven strains were immobilized on Attapulugus, six of them were found alive after six months of running. That means the method of immobilization in this work is effective and feasible for practical use. The test by electron micrograph showed that Attapulugus with big specific surface area is good carrier for immobilized microbe and bacteria lived mainly on surface of Attapulugus. They could survive even in depth of 200 μm inside the holes or gaps in Attapulugus, but change of bacteria in shape was found and the population was gradually decreasing from surface to inside the holes due to deficiency of oxygen and nutriment.

Keywords immobilized microbe, granulated Attapulugus, dying wastewater, decoloring test.

80 年代初, 国内外开始研究并将固定化微生物技术用于有机工业废水处理^[1]. 菌种固定化的方式有固定化单一菌种^[2—4]、混合菌种^[5, 6]及固定化活性污泥^[7, 8]. 试验以本研究室开发出的凹凸棒粘土颗粒^{*}为载体, 对所筛选出的 7 株纯菌株进行混合固定化, 对各种染料废水进行脱色处理, 取得了良好的脱色效果^[9]. 为了较深入地了解固定化细菌的脱色作用和机理, 在试验的各个阶段对所固定化的菌种存活的种类及数量进行检查, 并对凹凸棒颗粒进行电镜扫描, 观察固定化细菌在凹凸棒颗粒上的分布. 从而可以看出筛选出的脱色优势菌经长时间运行

后在固定化柱这种开放系统中能否继续存活、是否发生形态上的变化以及继续保持脱色功能.

1 材料和方法

1.1 固定化装置与细菌固定化

脱色试验在一套固定化生物柱系统进

^{*} 中国科学院环境水化学国家重点实验室开放基金资助课题 (Project Supported by The State Key Lab. of Environ. Aquatic Chemistry, Chinese Academy of Sciences)

^{**} 王菊思等. 石化地区污水回用成套技术专题研究报告. 1995

梁沈平: 男, 29 岁, 理学硕士

收稿日期: 1997-11-13

行^[9]. 生物柱由高 100cm, 内径 6.8cm 的有机玻璃柱内装填 3—5mm 的凹凸棒粘土颗粒 3000ml 构成, 培养筛选出的 7 株高效脱色菌^[9]菌悬液, 将各菌悬液等量混合, 倒入柱内, 启动整个固定化系统, 循环固定化 3d^[6]. 为确保固定化效果, 用脱色试验进行检验, 并进行重复固定化, 第 3 次专门将生长缓慢但脱色效果好的 Pse4 菌株强制固定化.

1.2 菌株来源及特征

7 株菌均从某印染厂污水处理场筛选分离, 已根据其形态及生理生化特征初步鉴定到属^[9]. 其菌落特征见表 1.

表 1 7 株脱色菌的菌落特征

菌株	菌落特征(圆形, ϕ mm)	属名
Xan3	油黄色, 边缘整齐, 表面凸起, 2	黄单胞菌属
Pse4	桔红色, 边缘整齐, 表面凸起, 1	假单胞菌属
Ser7	白色, 边缘整齐, 表面凸起, 2	动胶菌属
Pse21	浅黄色, 边缘整齐, 表面凸起, 4	假单胞菌属
Pse29	半透明, 生长丰满, 表面凸起, 5	假单胞菌属
Ser210	鲜红色, 边缘整齐, 表面凸起, 2	沙雷氏铁菌属
Bac213	白色, 边缘不整齐, 表面扁平, 5	芽孢杆菌属

2 细菌存活检查

整个脱色试验可分为以下 3 个阶段:

(1) 细菌固定化及固定化柱调试运行阶段
先进行细菌的固定化, 然后用富集培养基^[9]配制含阳离子、直接、活性染料的废水进行脱色试验. 经过近 2 个月的运行, 固定化载体凹凸棒上已有大量细菌生长繁殖.

(2) 脱色人工配制染料废水阶段
用基本培养基^[9]配制浓度为 10—60mg/L 含阳离子、直接、活性染料的废水进行脱色试验, 运行 3 个月.

(3) 脱色实际废水阶段
从印染厂取得含分散、阳离子、直接、活性染料的废水进行脱色试验. 废水 COD 2020—3900mg/L, 色度 2500—4000. 共运行 1 个月.

在各阶段从柱体内取样进行细菌存活检查.

2.1 细菌检查方法

从柱顶部取 1ml 凹凸棒颗粒, 加入带玻璃

珠的 250ml 三角瓶中(内装 50ml 蒸馏水, 预先灭菌), 剧烈振荡 10min, 以尽可能使细菌全部从凹凸棒颗粒上脱落下来. 将上述带菌液稀释至 10^{-6} , 取各个稀释度涂平皿, 于 28℃ 培养 2d, 根据各菌的菌落特征, 检查存活的细菌种类及各菌的相对数量.

为了检查出每一种存在的细菌, 必须将每个稀释度取样、涂平皿. 因为有些菌数量少, 稀释度过高, 检查不出, 稀释度过低, 有可能被其它优势菌抑制, 同样检查不出.

共进行了 7 次检查. 除第 1 次外, 均按以上方法进行. 第 1 次检查时, 因为担心细菌数量太少, 对取出的凹凸棒颗粒又进行了培养. 前 6 次均从柱顶出水端取样, 第 7 次同时从柱顶及柱底进水端取样检查.

2.2 电镜检查

为了更直接地观察细菌在凹凸棒颗粒上的存在状况, 分别于固定化柱运行 3 个月及 6 个月进行了 2 次凹凸棒颗粒的扫描电镜检查.

检查内容: 空白凹凸棒颗粒; 5 种纯菌种个体形态; 柱顶出水端凹凸棒颗粒(分别在固定化 3d、90d、190d 时取样检查); 柱底部取凹凸棒颗粒; 凹凸棒颗粒缝隙.

3 结果和讨论

3.1 细菌存活检查结果

结果见表 2.

第 2 次到第 7 次的检查柱顶凹凸棒颗粒中出现的 4 种优势菌的数量变化表示在图 1.

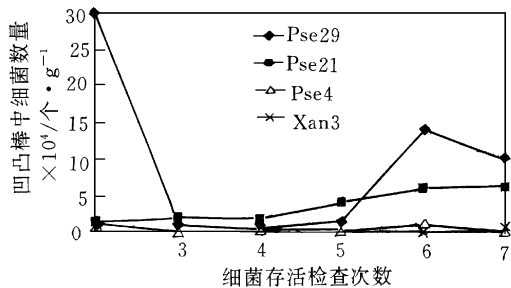


图 1 细菌数量变化曲线

从表 2 与图 1 可以看出:

(1) 经驯化筛选的脱色优势菌, 在固定化柱

表 2 固定化柱各种存活菌的相对数量

检查次数	Xan3	Pse4	Ser 7	Pse21	Pse29	Ser210	Bac213	距固定化的时间/d	检查日期/年-月-日
第 1 次								24	1996-11-18
第 2 次		8.0×10^3		1.5×10^4	3.0×10^5		1.1×10^5	40	1996-12-04
第 3 次		1.0×10^2		2.0×10^4	1.0×10^4		2.0×10^2	47	1996-12-11
第 4 次	5.0×10^3	1.0×10^3		2.0×10^4	5.0×10^3		2.0×10^3	56	1996-12-20
第 5 次	5.0×10^3	1.0×10^3		4.0×10^4	1.6×10^4			92	1997-01-16
第 6 次	1.0×10^3	9.0×10^3		6.0×10^4	1.4×10^5			148	1997-03-10
第 7 次(顶端取样)	4.0×10^4	1.0×10^3		6.0×10^4	1.0×10^5			196	1997-04-28
第 7 次(底部取样)	5.0×10^6	4.0×10^6	5.0×10^6	1.6×10^6	6.0×10^7	1.2×10^5		196	1997-04-28

中长时间处理废水运行后,菌种依然生长良好,表明筛选出的脱色优势菌可以用于含染料废水的实际处理中.

(2)第 7 次从柱底部取样检查,共检出初始固定化 7 种菌中的 6 种菌.采用高效菌株混合固定化,各菌可以同时繁衍生长,各菌之间保持平衡,既可发挥各菌各自的特点(能优先脱除某种特定染料),又可抑制杂菌生长,说明采用这种固定化方式是可行的. Pse4 生长缓慢,但脱色效果好,第 3 次固定化时即专门固定化该菌,此后每次都能检查到该菌的存在,说明采用强制固定化高效脱色菌的方式是有效的.

(3)比较第 7 次从柱底部进水端、顶部出水端取样的检查结果.从菌的种类上看,柱底端检出 6 种菌,而柱顶端只检出 4 种菌.柱底单位重量凹凸棒所含菌数,与柱顶相比,各菌数量高出 1—3 个数量级, Pse4 高出 4000 倍.证明柱底部营养丰富,更利于各菌生长.

(4)固定化柱中占绝对优势的菌种是 Pse21、Pse29 两菌,这 2 种菌在整个试验周期内,在柱顶端可检出较稳定的浓度,说明这 2 种菌的适应环境能力较强.这 2 菌都属假单胞菌. Pse4 在柱底端与顶端检出的数量相差极大,这是因为 Pse4 是阳离子桃红 FG 的特效脱色菌,而该种染料很容易被凹凸棒填料吸附,所以染料多被吸附在柱底端,顶端残留很少,这样造成 Pse4 在柱底部大量生长、繁殖. Bac213 对各种染料的平均脱色率低,在固定化柱对染料废水的长期运行中,该菌逐渐被淘汰,以致最后检查不出.

3.2 固定化柱凹凸棒颗粒中细菌的电镜检查

结果

(1)固定化载体空白凹凸棒颗粒的表面形态.空白凹凸棒颗粒表面高低不平,还具有孔洞、缝隙,这是比表面积大的原因,因此该种材料是微生物固定化的良好载体.

表 3 5 个纯菌种电镜检查的个体形态特征

菌号	个体形态特征	电镜照片
Xan 3	细长杆状	图 2
Pse4	菌体大,长杆状	图 3
Pse21	小球状	图 4
Pse29	短杆状	图 5
Ser210	较细、长杆状	图 6

(2)5 种纯菌种个体形态.将固定化细胞检查出现的 5 种菌,进行了纯菌种的菌落电镜检查,结果见图 2—6.

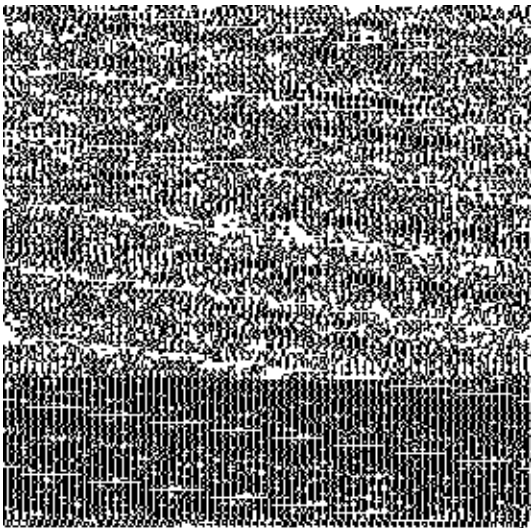


图 2 Xan3 菌株电镜图(4000 ×)

(3)柱顶出水端凹凸棒颗粒中的细菌.固定化 3d 的凹凸棒颗粒,细菌种类较多.固定化 90d 的凹凸棒颗粒,细菌种类也较多,优势菌为

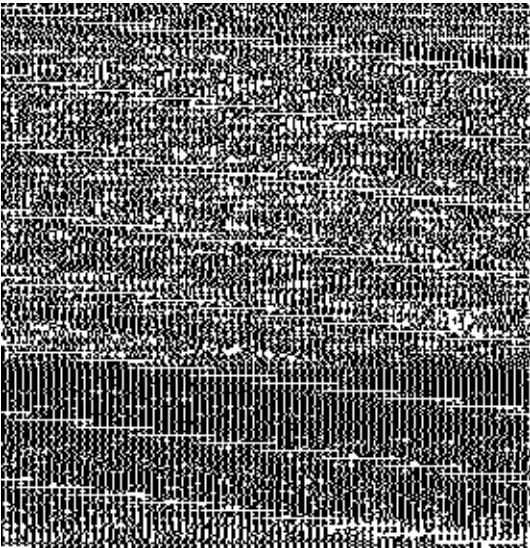


图 3 Pse4 菌株电镜图(4000 ×)

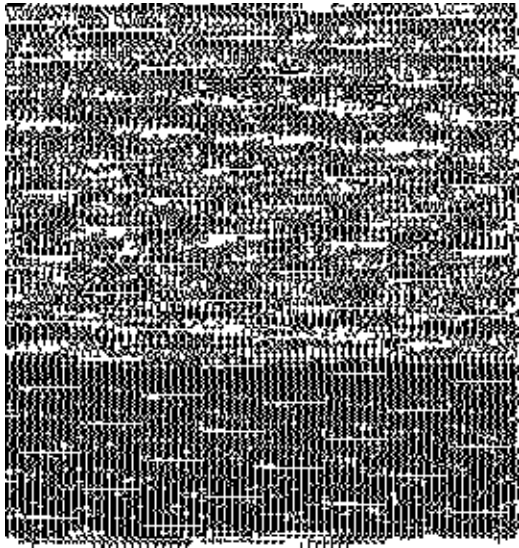


图 5 Pse29 菌株电镜图(4000 ×)

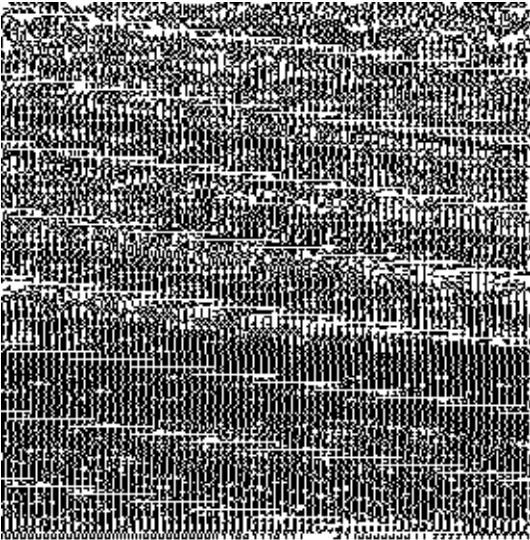


图 4 Pse21 菌株电镜图(4000 ×)

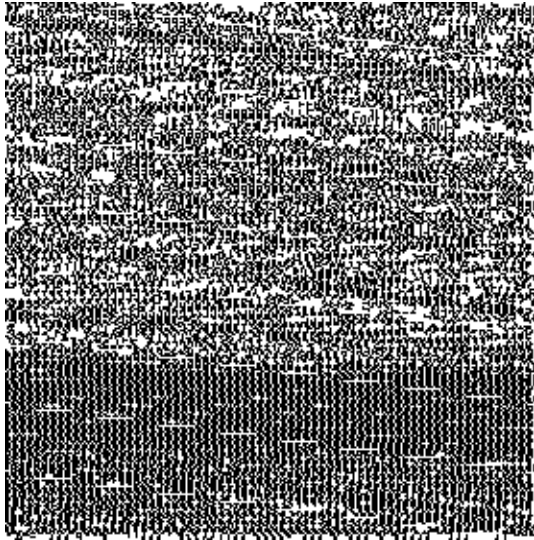


图 6 Pse210 菌株电镜图(4000 ×)

Pse21、Pse29、Pse4. 细菌生长旺盛, 有许多分泌物, 形成菌团. 固定化 190d 的凹凸棒颗粒, 由于固定化柱长期运行, 并多数时间是在贫营养条件下进行脱色试验, 因此柱顶出水端凹凸棒颗粒中细菌数量极少, Pse21、Pse29 两菌优势明显.

(4) 柱底部取凹凸棒颗粒(固定化 190d) 细菌生长极旺盛, 数量多.

(5) 凹凸棒颗粒缝隙由内至外细菌生长情况 缝隙最深处(有菌、无菌的界线), 细菌已变形. 缝隙内部, 部分细菌变形, 靠外的部分细菌

没有变形, 看出是 Pse29 菌, 见图 7. 缝隙口部, 细菌数量多, Pse29 号菌占绝对优势, 见图 8. 缝隙表面, 菌数量极多, 几种菌均可见, 分泌物粘结形成菌团.

缝隙至 200 μm 处, 都有细菌生长, 但由外至内, 细菌数量减少, 形态发生变化. 缝隙内以 Pse29 号菌占绝对优势.

4 结论

(1) 固定化柱对染料为唯一碳、能源的废水经半年多的运行, 初始固定化的 7 种菌中, 最后

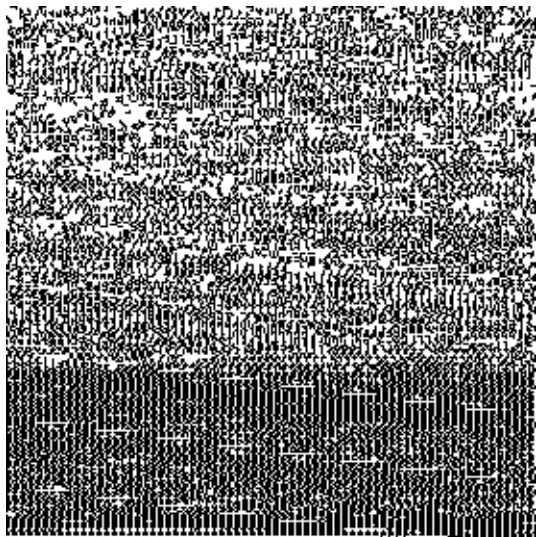


图 7 缝隙内部(4000 $\times$, 部分细菌变形)

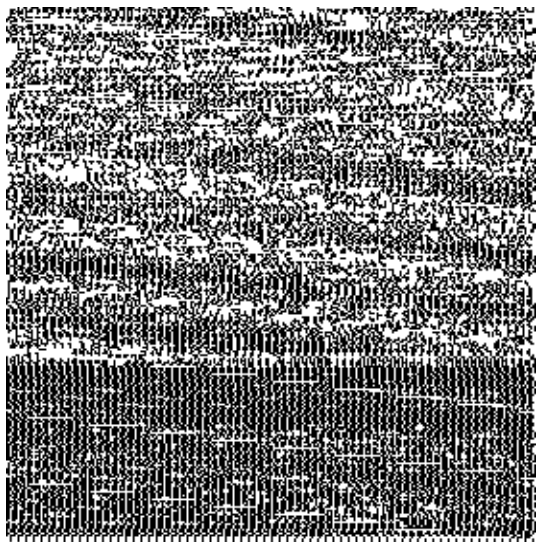


图 8 缝隙口(3500 $\times$, 细菌数量多)

能检测到 6 种菌, 说明本试验采用的固定化混合菌及强制固定化优势菌的方式是可行的。

(2) 在固定化柱运行初期, 染料废水由生长培养基配制, 含有大量易为微生物所利用的碳、氮源, 因此, 运行 90d 后, 柱出水端凹凸棒颗粒中检查到大量细菌。在此后的运行中, 由基本培养基配制染料废水, 染料为唯一碳源、能源, 运

行 190d 后电镜检查看到, 柱顶出水端细菌种类、数量都很少, 而柱底由于凹凸棒从进水中吸附较多的营养, 细菌种类多、生长旺盛。

(3) 凹凸棒颗粒比表面积大, 具有孔洞、缝隙, 是微生物固定化的良好载体。

(4) 固定化脱色菌主要在凹凸棒颗粒表面生长繁殖。颗粒缝隙至 200 μm 深处, 细菌能生长, 缝隙由外至内, 由于养分、氧气不足, 细菌数量逐渐减少, 并发生形态上的变化。

(5) 从细菌菌落及电镜照片看出, 固定化脱色菌在半年多的运行中, 菌落形态和个体形态没有发生变化, 并且脱色效果好, 说明细菌在固定化状态能良好运行。至于脱色菌的生理生化特征是否发生变化, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 赵兴利等. 固定化微生物流化床反应器的研究进展. 环境科学, 1997, 18(1): 83—85
- 2 周定等. 固定化微生物法处理含酚废水的研究. 环境科学, 1990, 11(1): 2—5
- 3 Keisuke Hanaki et al.. Protection of methanogenic bacteria from low pH and toxic materials by immobilization using polyvinyl alcohol. Wat. Res., 1994, 28(4): 877—885
- 4 Stephen rothenburger et al.. Hydroxylation and biodegradation of 6-methylquinoline by *Pseudomonas* in aqueous and nonaqueous immobilized-cell bioreactors. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(7): 2139—2144
- 5 牛志卿等. 固定化紫色非硫光合细菌降解活性艳红 X-3B 的研究. 环境科学, 1994, 15(5): 49—52
- 6 Michael A Heitkamp et al. Biodegradation of p-nitrophenol in an aqueous waste stream by immobilized bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(10): 2967—2973
- 7 葛文准等. 固定化微生物法处理氨氮废水. 上海环境科学, 1995, 14(1): 10—13
- 8 王蕾等. 固定化细胞厌氧-好氧工艺处理四环素结晶母液的实验研究. 环境科学, 1995, 16(1): 29—31, 77
- 9 梁沈平等. 固定化微生物柱对染料废水的脱色试验. 环境科学, 1998, 19(5): 10—14