

固定化梭形气芽孢杆菌在降解废水时微观形态的观察和比较

张永明¹, 张悦², 施汉昌², 王建龙², 钱易² (1. 上海师范大学城市与旅游学院环境工程系, 上海 200234; 2. 清华大学环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 针对含有油墨的废水, 筛选到 1 株微生物菌种, 经鉴定为梭形气芽孢杆菌 (*Aerobacillus fusiformis*)。分别用海藻酸钙、聚乙烯醇 (PVA) 和多孔陶瓷作为载体固定化梭形气芽孢杆菌, 比较其在处理油墨废水时微观形态的变化情况。通过扫描电子显微镜 (SEM) 对固定化梭形气芽孢杆菌的微观形态进行观察, 发现海藻酸钙在处理含油墨废水时容易溶解, 用 PVA 作为载体时, 由于细胞被包埋在 PVA 内部, 和底物的接触时扩散阻力较大, 因而废水中 COD 的去除效率较低。而用多孔陶瓷固定化细胞, 不仅简便易行, 固定牢固, 而且对废水 COD 的去除效果也较好。

关键词: 固定化细胞; 废水处理; 海藻酸钙; 聚乙烯醇; 多孔陶瓷

中图分类号: X796 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2003)03-04-0070

Observation and Comparison on Microstructure of Immobilized *Aerobacillus fusiformis* under Wastewater Treatment

Zhang Yongming¹, Zhang Yue², Shi Hanchang², Wang Jianlong², Qian Yi² (1. Department of Environmental Engineering, College of Urban Science and Tourism, Shanghai Teachers University, Shanghai 200234, China; 2. State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Aiming at printing ink wastewater, a strain of bacterium was isolated from activated sludge, and identified as *Aerobacillus fusiformis*. The *Aerobacillus fusiformis* was respectively immobilized in calcium alginate gel, polyvinyl alcohol (PVA) and microporous ceramics and their microstructure were observed by scanning electron microscope (SEM). It was found that calcium alginate gel might dissolve in the wastewater, and the activity was restricted as cells wrapped in PVA, so the COD removal ratio was low. The method of immobilized cells using microporous ceramics is simple and COD removal efficiency can be achieved. In addition, the immobilized bacterium could not be separated easily from the ceramics in the wastewater.

Key words: immobilized cells; wastewater treatment; calcium alginate gel; polyvinyl alcohol; microporous ceramics

利用固定化细胞处理有机废水具有高效、稳定以及易于实现连续化、设备化处理的特点。因而已成为一个重要的研究领域^[1,2], 并在水处理方面得到一定程度的应用^[3,4]。细胞固定化方法有多种, 这些方法按固定化的物理机制不同可分为 4 种^[1], 即吸附、多孔介质包藏、包埋法以及细胞自身聚合方法。

来自印钞过程中的擦版废液在经过超滤处理后, 主要含有印刷油墨, 同时还含有一些颜料、石蜡、磺化蓖麻油等难以生物降解的物质, 此外磺化蓖麻油等物质对微生物活性还具有抑

制作用。该种废水的 COD 通常高达 3000 ~ 9000 mg/L, 而 BOD 相对较低, 很难用一般的生物方法进行处理。针对该废水的特点, 笔者从污泥中筛选到一株微生物菌种, 分别用海藻酸钙包埋、聚乙烯醇 (PVA) 包埋和多孔陶瓷吸附等方法进行细胞的固定化, 并用这 3 种固定化细胞处理含油墨的废水, 比较这 3 种固定化方法对废水 COD 去除效率的影响。另一方面, 通过扫描电

基金项目: 教育部高校重点实验室访问学者基金资助项目
作者简介: 张永明 (1958 ~), 博士, 教授, 主要从事固定化细胞技术, 生物处理废水及生物反应器的研究。
收稿日期: 2002-06-14; 修订日期: 2002-10-21

子显微镜对这 3 种固定化细胞在处理废水时其微观结构的变化情况进行观察,从微观结构的角度,比较研究了这 3 种固定化细胞在废水处理过程中的变化情况。

1 材料与方法

(1) 菌种 从污泥中筛选出 1 株微生物菌种,其形态为杆状。由透射电镜(TEM)可以观察到该细菌有鞭毛,能运动,有芽孢,芽孢长椭圆形,中生。革兰氏染色阳性;细胞壁化学组分含有 meso DAP 和 glycine(胞壁 II 型);无特征性糖(糖型 C)。经 16S rRNA 基因部分序列分析确定该菌株为梭形气芽孢杆菌(*Aerobacillus fusiformis*)。

(2) 培养基 培养基为肉汤培养基,每 1000 mL 中含有胰蛋白胍(Tryptone) 10g,葡萄糖(α -D-Glucose) 5g,NaCl(sodium chloride) 5g,牛肉浸膏(Beer extract) 5g,酵母浸膏(Yeast extract) 2g,pH 控制在 7~7.2。

(3) 菌种培养 将一定体积的培养基置于锥形瓶中,经灭菌、冷却后,接入少量梭形气芽孢杆菌于其中,放入摇床,在 30℃,转速 165 r/min 条件下培养 48 h。

(4) 固定化梭形气芽孢杆菌 ①海藻酸钙凝胶包埋:细胞湿重 5g,悬浮于 5 mL 0.9% NaCl 中,与 12.5 mL 2% 的海藻酸钠溶液混合;用内径为 0.40 mm 的注射器滴加到 1% 的 CaCl_2 溶液中,使其形成 2 mm 直径的乳白色小球,然后用生理盐水洗涤。由于磷酸盐会破坏凝胶的结构,因而在使用海藻酸钙凝胶时应尽量防止磷酸盐的加入。②聚乙烯醇凝胶包埋:细胞湿重 5g,悬浮于 5 mL 0.9% NaCl 中,与 12.5 mL 10% 的聚乙烯醇和 1% 的海藻酸钠混合溶液相混合;同样用内径为 0.40 mm 的注射器滴加到冷却的饱和硼酸与 1% CaCl_2 的混合溶液中,使其形成 2 mm 直径的白色小球,并在其中浸泡 24 h,然后用生理盐水洗涤。③多孔陶瓷吸附:将干燥灭菌后的多孔陶瓷放入培养好的菌液中,经过简单吸附后即完成细胞的固定化。

(5) 废水与废水处理 含有油墨的废水来自凹版印刷过程中的擦版废液的后处理废水,

即用中空纤维超滤膜对擦版废液进行超滤处理后的废水。其 COD 仍高达 3000~9000 mg/L,而 BOD/COD 约为 0.2,该废水在室温条件下静置 1 年后,其 COD 也几乎没有降低。研究固定化微生物细胞对油墨废水的处理效果时,分别在每个 250 mL 的锥形瓶中加入 100 mL 油墨废水,每瓶中加入 0.2g 固定化细胞,然后放入摇床,在 30℃,转速 165 r/min 条件下对废水进行生物处理试验,分别在 40h,60h 和 88h 取样测定废水的 COD。

(6) 废水分析 废水 COD 的测定,采用重铬酸钾法^[5]。

(7) 固定化细胞微观形态观察 在废水处理前后,分别对 3 种固定化细胞的微观形态,用扫描电子显微镜进行观察,以研究固定化细胞及固定化载体的结构在处理废水过程中的变化情况。

2 实验结果与分析

2.1 固定化细胞的微观形态

(1) 海藻酸钙固定化细胞的形态观察 图 1 是海藻酸钙固定化梭形气芽孢杆菌小球的剖面,从中可以看到其内部的形态,还可以看出,虽然内部的微生物较多,但大部分都被海藻酸钙所包裹,这将会导致传质情况差。

(2) PVA 固定化梭形气芽孢杆菌的形态

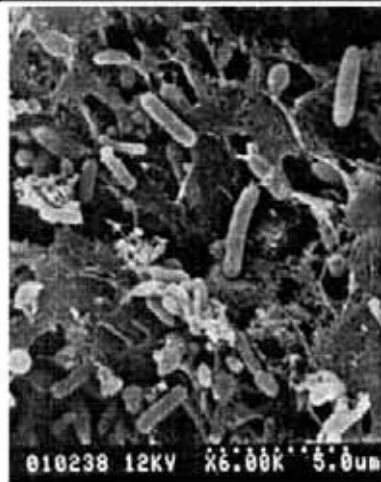


图 1 海藻酸钙固定化梭形气芽孢杆菌的内部形态

Fig.1 Internal part of *Aerobacillus fusiformis* immobilized in calcium alginate gel

图 2 所示是 PVA 固定化小球的剖面,从中可以看到其内部的形态.从图中可以看出,在梭形气芽孢杆菌的周围,细胞都被 PVA 凝胶网络包裹的很严密,这可能会限制细胞的增殖或代谢,进而导致活性降低.



图 2 PVA 固定化梭形气芽孢杆菌的内部形态
Fig.2 Internal part of *Aerobacillus fusiformis* immobilized in PVA

(3) 多孔陶瓷固定化梭形气芽孢杆菌的形态 图 3 所示是还没有吸附微生物的多孔陶瓷的内部结构,从图 3 可以看出,该载体内拥有许多孔隙,很适合微生物的生长.图 4 显示,经过简单地吸附,多孔陶瓷载体上就附着了大量的



图 3 多孔陶瓷载体的微孔结构
Fig.3 Microporous structure of the ceramics

梭形气芽孢杆菌.



图 4 多孔陶瓷固定化梭形气芽孢杆菌的内部形态
Fig.4 Internal part of *Aerobacillus fusiformis* immobilized in microporous ceramics

2.2 固定化梭形气芽孢杆菌处理废水的效果

图 5 显示了 3 种固定化梭形气芽孢杆菌处理油墨废水的情况.从中可以看出,海藻酸钙固定化梭形气芽孢杆菌在去除 COD 的过程中,在前 40h,COD 去除得最多,随后则出现了 COD 升高现象,分析认为,这是因为随着处理时间的延长,海藻酸钙出现了溶解现象,此时基本上是游离细胞在起作用.图 6 所示为海藻酸钙在处理废水的过程中,表面出现的溶洞.由于海藻酸钙的溶解,导致了水中有机的增加,从而引起了废水 COD 的升高.从实验结果可以看出,经过长时间的处理,海藻酸钙最后几乎全部溶解于废水中.

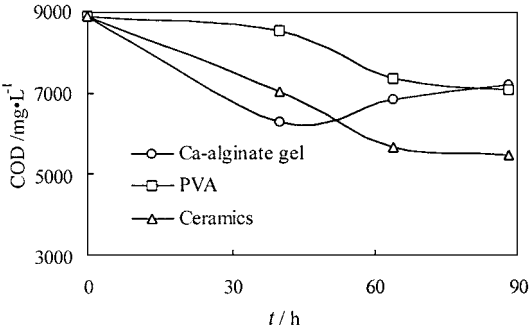


图 5 3 种固定化细胞对废水中 COD 的去除情况
Fig.5 The removal of COD by three kinds of immobilized cells

从图 5 中还可以看到,用 PVA 固定化梭形气芽孢杆菌在处理废水时,其 COD 的去除效果较差.但从实验过程中没有发现 PVA 有溶解现象的出现.



图 6 溶解海藻酸钙表面出现的溶洞

Fig. 6 A hole appeared in the surface of calcium alginate gel as dissolution

和上面 2 种固定化方法相比,用陶瓷载体固定化梭形气芽孢杆菌在去除 COD 方面效果较好.由图 7 所示,经过一定时间的废水处理,在陶瓷载体内部的微孔中,梭形气芽孢杆菌生长得很好.此外,在陶瓷载体内的细胞,没有受到任何限制,细胞和底物可以直接接触.有机物和无机盐结晶还会沉积在陶瓷载体内的细胞表面上,这有利于有机物的降解.从图 7 中可以清楚地看到许多沉积物(Deposits),这主要是废水中的一些有机物和无机盐以及微生物的代谢产物.

3 结 论

分别用海藻酸钙凝胶,聚乙烯醇凝胶和多孔陶瓷载体固定化梭形气芽孢杆菌,对油墨废水进行处理,从微观结构的角度,观察了它们在废水处理前后的形态,比较了 3 种细胞的固定化方法对废水 COD 的去除效果.试验结果发现,用海藻酸钙和 PVA 固定化细胞时,操作烦

琐,在处理废水的过程中,海藻酸钙会出现溶解现象,从而导致 COD 的升高,影响废水处理效果.而用 PVA 固定化细胞降解废水时,虽然 PVA 凝胶不会溶解,但由于细胞是被 PVA 紧密地包裹在其内,在一定的程度上限制了细胞的活性和底物的传质,使得废水中 COD 降解得较慢.而用多孔陶瓷固定化细胞,属于物理吸附,操作简便易行,固定化细胞的效果较好.并且对废水中的 COD 去除效果较好.此外由于陶瓷的特点,其载体自身在废水中不会出现溶解现象.



图 7 梭形气芽孢杆菌在陶瓷载体内的生长情况

Fig. 7 *Aerobacillus fusiformis* grew well inside microporous ceramics

参考文献:

- 1 Karel S F, Libicki S B, Robertson C R. The Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles. Chemical Engineering Science, 1985, 40: 1321 ~ 1339.
- 2 Chibata I, Wingard L B, Jr (Eds). Immobilized Microbial Cells (Applied Biochemistry and Bioengineering Vol. 4). New York: Academic Press, 1983.
- 3 Lens P N L, Visser A, Janssen A J H, Pol L W H, Lettinga G. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 1998, 28(1): 41 ~ 47.
- 4 黄晓维等.利用多孔陶珠固定化微生物细胞处理印染废水的研究.环境科学学报, 1990, 10(4): 471 ~ 476.
- 5 国家环保局水和废水监测分析方法编委会.水和废水监测分析方法(第 3 版).北京:中国环境科学出版社, 1998. 354 ~ 356.