

耐酸性异养菌的分离及其在制革污泥重金属生物淋滤中的作用

王世梅, 周立祥*, 黄峰源, 方迪

(南京农业大学资源与环境学院环境工程系, 南京 210095)

摘要:从制革污泥中分离出一株异养微生物, 经鉴定属于红酵母菌属(*Rhodotorula* sp.) R30, 测定菌株 R30 的适宜生长 pH 范围为 3~7, 但能耐受 pH 2.5 至 1.5 的酸性环境, 最适生长温度 28℃. 酵母 R30 在污泥水溶性有机物(DOM)中培养 96h, 水溶性有机碳(DOC)从 1485 mg/L 降至 345 mg/L, 菌数达 4.8×10^7 mL⁻¹. 将污泥预酸化至 pH 6.5, 在进行污泥的生物淋滤过程中, 添加酵母处理与不添加酵母处理的对照相比, 淋滤时间减少了 4d, 淋滤周期显著缩短, 在 7d 的淋滤时间内, 重金属 Cr 的溶出率提高 39%.

关键词:酵母菌; 生物淋滤; 制革污泥; 铬; 硫杆菌

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)05-0153-05

Isolation of Heterotrophic Microorganism and Its Role in Bioleaching of Heavy Metals from Tannery Sludge

WANG Shi mei, ZHOU Li xiang, HUANG Feng yuan, FANG Di

(Department of Environmental Engineering, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A heterotrophic microorganism was isolated from sewage sludge, it was identified as *Rhodotorula* sp. R30. Its optimum pH for growth was 3~7, but it can stand the acidity of pH 2.5~1.5. The optimum temperature was 28℃. When R30 was inoculated in the medium containing dissolved organic matter derived from sewage sludge and incubated for 96 h, dissolved organic carbon in the medium declined from 1485 mg/L to 345 mg/L, and the yeast number was 4.8×10^7 mL⁻¹. It was found through the batch trial that the period of bioleaching could be apparently shortened to 4 days if R30 was inoculated in the bioleaching system. Furthermore, the removal efficiency of Cr in sewage sludge could be enhanced by 39% with compared to the control without inoculating R30.

Key words: *Rhodotorula* sp. R30; bioleaching; tannery sludge; chromium; *Thiobacillus* sp.

污泥是污水处理厂在处理污水过程中产生的沉淀物. 市政污泥和工矿企业污泥中 Cu, Zn, Pb, Cr, Ni 等重金属含量达数千至数万 mg·kg⁻¹[1,2]. 去除或回收污泥中重金属使污泥能再生利用, 化“害”为“利”是彻底解决污泥出路的一个急需解决的课题. 利用嗜酸性微生物——硫杆菌溶解去除污泥中重金属, 是近 10 年来才兴起的一种净化污泥的生物淋滤 Bioleaching 新技术, 其原理是通过硫杆菌的生物氧化作用及其产生的低 pH 环境, 使重金属溶出进入水相, 再通过固液分离而去除[3]. 本实验室前期曾从污泥中分离出氧化亚铁硫杆菌和氧化硫硫杆菌菌株, 进行生物淋滤去除重金属的研究[4,5], 然而这些硫杆菌是严格好氧的化能自养菌, 对溶解性有机物(DOM)十分敏感, 只接种自养菌的生物淋滤处理, 周期相对较长. Gemmell 和 Knowles 等(2000)在酸性富铁的某河流底泥中发现一株与嗜酸性能自养的硫杆菌共存的异养菌[6]. 有研究者进一步发现,

嗜酸性异养菌的存在可使纯培养基中氧化亚铁硫杆菌的平板效率提高 1~3 倍[7]. 为此, 本研究从污泥中分离出若干株以 DOM 为碳源和能源的耐酸性异养微生物, 研究其配合自养菌共同作用, 缩短污泥生物淋滤的时间, 提高重金属的溶出率. 本文以效果特别显著的酵母 R30 为材料, 报道其分离过程、生物学特性及其在制革污泥生物淋滤中的作用效果.

1 材料与方法

1.1 供试污泥和硫杆菌菌株

污泥采自浙江某制革污水处理厂的污泥浓缩池. 该厂采用氧化沟法二级处理工艺处理制革污水,

收稿日期: 2003-10-18; 修订日期: 2004-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20377023, 20177016); 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2002AA245031)

作者简介: 王世梅(1965~), 女, 副教授, 在职博士生, 主要从事环境微生物和固体废物处理方面的研究.

* 通讯联系人(lxzhou@njau.edu.cn)

日处理污水 3000 m³,日排出污泥约 15t.污泥基本特性见表 1.污泥采回后,保存于聚乙烯塑料桶中并置

于 4℃冰箱备用.
用于污泥重金属生物淋滤的嗜酸性化能自养型

表 1 供试制革污泥基本特性(干物质计)/ mg·kg⁻¹

Table 1 The primary physico-chemical properties of the selected sewage sludge/ mg·kg ⁻¹								
pH	含固率/ %	全氮/ %	全磷/ %	有机质/ %	总 Cr	总 Cu	总 Pb	总 Zn
7.92	4.72	1.55	0.50	43.1	14519	24	20	80

硫杆菌菌株,为本实验室分离出的氧化亚铁硫杆菌 LX5 和氧化硫硫杆菌 TS6,现被国家专利局指定的微生物保存中心保藏.

1.2 耐酸性异养菌酵母 R30 的分离、纯化及初步鉴定

用于分离耐酸性异养菌的样品为本实验室先前完成的制革污泥生物淋滤处理后的污泥液^[8].用接种环取淋滤处理 8d 后的酸化污泥液一环(pH = 1.52),在 PDA 平板^[9]上划线分离,将上述接种污泥悬液的平板于 28℃下倒置培养,至长出菌落为止(培养 3~4d).在平板上选择分离较好的有代表性的单菌落做涂片镜检,若有不纯,则进一步挑取此菌落划线分离,直至获得目的菌株的纯培养,并转斜面保存备用.

按《微生物分类学》^[10]、《酵母菌的特征与鉴定手册》^[11]的方法对目的菌株进行形态和生理生化特征观测,包括对糖的发酵状况,对碳源的要求等等.

1.3 耐酸性异养菌酵母 R30 最适生长条件 pH 和温度的测定

pH 对酵母 R30 生长的影响:取 50 mL PDA 液体培养基装于 250 mL 三角瓶中,将 pH 分别调节为 1.5,2.0,2.5,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,8.5 等一系列梯度,121℃下,灭菌 15 min.分别取一环酵母 R30 斜面菌苔接种于上述培养基中,置于 28℃,转速为 180r/min 的摇床中培养 32h.测定培养液在 600nm 处的吸光度(OD 值).

温度对酵母 R30 生长的影响:据上述实验结果,调节 PDA 培养基的 pH 为最适,按上法接种酵母 R30,将三角瓶分别置于 20℃、25℃、28℃、30℃、35℃,转速为 180r/min 的摇床中培养 32 h,测定培养液在 600 nm 处的 OD 值,以获得其最适生长温度.

1.4 耐酸性异养菌酵母 R30 对污泥 DOM 的利用

取供试制革污泥,于 4℃和 12 000r/min 下,离心 10 min,上清液用 0.22μm 滤膜过滤,滤液即为 DOM 溶液.

取 50 mL 污泥 DOM 液于 250 mL 三角瓶中,调

节 DOM 的 pH 为 6.5,于 121℃下灭菌 15 min.冷却后,接种酵母 R30 菌苔一环,于 28℃下,在转速为 180r/min 的摇床上培养 96h.并设置不接种 DOM 的对照处理,其他条件完全相同.测定培养前后 DOM 浓度变化及菌体数量.DOM 浓度的变化用水溶性有机碳(DOC)含量的变化表示,DOC 含量用 TOC 仪(TOC-5000A)测定,培养后菌体数量采用常规显微镜计数法计数^[9].

1.5 耐酸性异养菌酵母 R30 对灭菌和不灭菌污泥生物淋滤进程的影响

(1)酵母 R30 的扩大培养 50 mL PDA 液体培养基装于 250 mL 三角瓶中,将 pH 调节为最适(pH = 4.0),于 121℃下灭菌 15 min.接一环酵母 R30 菌苔于培养基中,置 28℃摇床上培养 32h,备用.

(2)酵母 R30 在灭菌污泥淋滤中的作用 利用特异嗜酸性硫杆菌 LX5 和 TS6,按参考文献[8]的方法,制备制革污泥生物淋滤接种物.取 135 mL 制革污泥于 250 mL 三角瓶,调节污泥 pH 为 6.5,121℃,灭菌 15 min.冷却后,添加接种物 10 mL,酵母 R30 菌液 5 mL,及硫粉 0.6g,置 28℃摇床中培养.同时设置不接种酵母 R30(用灭菌的去离子水代替)但其他条件完全相同的对照处理.定期测定 pH 值的变化及重金属 Cr 的含量,根据试验前后样品中重金属含量的差值,计算污泥中重金属 Cr 的溶出率.

(3)酵母 R30 在不灭菌污泥淋滤中的作用 处理方法同上,只是污泥不灭菌.

1.6 金属离子 Cr 含量的测定

生物淋滤反应结束后,取污泥于 6 000r/min 下离心 10 min,取上清液,用 Australia VARIAN 原子吸收仪测定金属离子 Cr 的含量.

2 结果与讨论

2.1 菌株 R30 的初步鉴定

从图 1 可见,菌株 R30 的单细胞呈卵圆形,直径 4.5~5.5μm,芽殖.不产生子囊孢子.菌落呈粘质样,产生粉红色色素,形成荚膜.其理化特征见表 2.实验测定 R30 不发酵糖,不能利用肌醇作唯一碳

源,不形成类淀粉化合物,能同化 KNO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.根据文献^[10,11]鉴定菌株 R30 属于红酵母属(*Rhodotorula* sp.).



图 1 R30 菌体形态(10×100)
Fig.1 Unicell morphology of R30

表 2 菌株 R30 的生理生化特征

Table 2 Physiological properties of <i>Rhodotorula</i> sp. R30		
糖发酵 Fermentation of saccharide	葡萄糖 Glucose	-
	乳糖 Lactose	-
	蔗糖 Sucrose	-
氮源利用 Utilization of nitrogen	KNO_3	+
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+
同化醇 Assimilation of alcohol	肌醇 Inositol	-
	甘露醇 Mannose	+
	丙三醇 Triglycerides	+
类淀粉化合物形成 Formation of starch-like substance		-

2.2 酵母 R30 的最适生长条件

温度和 pH 是影响微生物生长的重要因素,实验测定了酵母 R30 在不同温度 and 不同 pH 条件下的生长情况,结果见图 2 和图 3.从图 2 可见酵母 R30

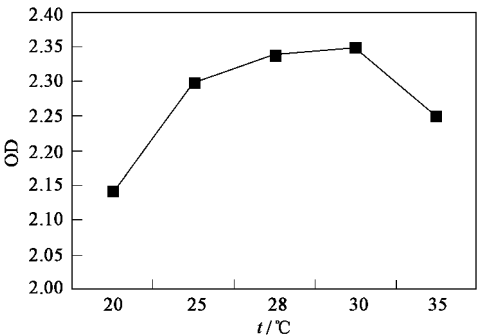


图 2 酵母 R30 在不同温度条件下的生长情况
Fig.2 The growth of *Rhodotorula* sp. R30 in different temperatures

在 28℃~30℃条件下生长良好,在 25℃生长时略微受到一点影响,但温度高于 35℃和低于 25℃时生长受到一定的影响,说明酵母 R30 是一个中温型的微生物,易于常温下培养.

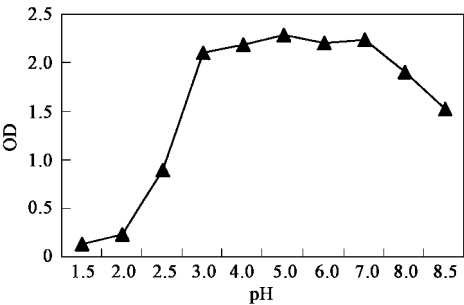


图 3 酵母 R30 在不同 pH 条件下的生长情况
Fig.3 The growth of *Rhodotorula* sp. R30 in different pH

从图 3 中可以看出酵母 R30 在 pH 3~7 时,生长良好,当 pH<3.0 时,生长受到一定的影响,但仍然能耐受 pH 2.5 至 1.5 的酸性环境.实验发现在生物淋滤的后期 pH 达 2.0 至 1.5 时,仍能检测到大量的酵母菌体,说明酵母 R30 对酸性环境的耐受能力很强.一般的微生物生长要求中性的环境,这种能耐受如此低 pH 条件的异养菌不多见.这为后期添加该酵母菌进行生物淋滤实验提供了最基本的条件.

2.3 酵母 R30 对污泥中 DOM 的利用

在生物淋滤中起重要作用的嗜酸性化能自养型硫杆菌对 DOM 十分敏感,特别是一些低分子量有机物对其有较大的毒害作用,严重影响生物淋滤的效果.为了解决这一难题,尝试在污泥水溶性有机物中,接种酵母 R30,以期酵母 R30 能消耗这些水溶性有机物,达到去除对自养菌的毒害作用.

结果发现,在污泥 DOM 中接种酵母 R30 菌苔一环,于 28℃在摇床上培养 96h,污泥 DOM 中 DOC 的量从 1485 mg/L 降至 345 mg/L,DOM 减少了 77%,见图 4.且酵母菌数达 $4.8 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$.而不接酵母菌对照的 DOM 的量基本不变.该酵母菌菌体大,生物量高,易于培养,在不加任何外在营养的条件下,就可以利用污泥中水溶性有机物生长,说明 R30 对营养的要求不高,污泥中的水溶性有机物可以基本满足其营养要求,这为以后在生物淋滤过程中添加该酵母菌,配合自养菌共同作用奠定了基础.

2.4 酵母 R30 在生物淋滤中的作用

为了探索酵母 R30 在生物淋滤中是否有作用,将酵母 R30 分别接种在灭菌污泥和不灭菌污泥中,

配合自养菌共同作用,检测其对污泥生物淋滤进程的影响,分别测定淋滤过程 pH 的变化及淋滤结束

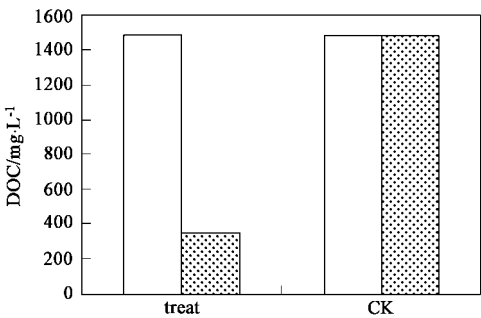


图 4 酵母 R30 对污泥中水溶性有机物的利用
Fig.4 Utilization of dissolved organic matter in sewage sludge by *Rhodotorula* sp. R30

后金属离子 Cr 溶出率,实验结果列于图 5 和表 3. 在灭菌污泥处理中,接种自养菌和异养菌,第

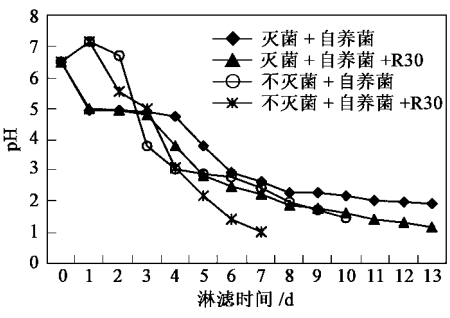


图 5 酵母 R30 在灭菌污泥和不灭菌污泥淋滤中的作用
Fig.5 The effect of *Rhodotorula* sp. R30 on bioleaching in sterilized and nonsterilized sewage sludge

表 3 重金属 Cr 的溶出率¹⁾/ %
Table 3 The removal efficiency of Cr/ %

处理 Treat ment	t/ d	pH	Cr ²⁾ / mg· L ⁻¹	溶出率 Re moval efficiency
灭菌污泥 + 自养菌 Sterilized CK	13	1.9	577.3	77
灭菌污泥 + 自养菌 + R30 Sterilized treat	13	1.17	750	100
不灭菌污泥 + 自养菌 Nonsterilized CK	7	2.40	461.2	61
不灭菌污泥 + 自养菌 + R30 Nonsterilized treat	7	1.00	750	100

1) 原污泥含总 Cr 量为 750 mg/ L 2) 指处理后的污泥液相中 Cr 含量

11 d, pH 从 6.5 降至 1.41, 第 13 d, 降至 1.17; 而在灭菌污泥处理对照中, 只接自养菌, 第 11 d, pH 从 6.5 降至 2.01, 第 13 d, pH 才降至 1.9.

在不灭菌污泥处理中, 接种自养菌和异养菌, 在 7 天的淋滤时间内, pH 从 6.5 降至 1.0, 在第 6 d, pH 降至 1.4, 而在不灭菌污泥处理对照中, 只接自养菌, 在第 6 d, pH 从 6.5 只降至 2.75, 在第 7 d, pH 降至 2.4, 第 10 d pH 降至 1.46. 实验测定, 在 pH 降至 1.5 左右时, 金属离子 Cr 的溶出率可达 100 %, 可见加入异养菌酵母 R30, 在不灭菌污泥淋滤中, 淋滤时间较不加入异养菌的对照缩短了 4 d.

前期实验曾观察到, 酵母 R30 在有氧条件下生长并不产酸, 介质的 pH 不降, 结合上述酵母 R30 对污泥中 DOC 的利用情况, 探索其在污泥淋滤中起作用的原因, 应是酵母利用了污泥中低分子量的有机物生长, 消除或减轻了污泥中水溶性有机物对自养菌的抑制作用. 同时酵母菌在有氧条件下, 呼吸代谢, 释放出大量的 CO₂, 增加了污泥中 CO₂ 的含量, 为自养菌的生长提供了大量的碳源, 这也是一个重要因素. 有文献报道^[12,13]在贫矿湿法冶金中已经发现, CO₂ 浓度在 0.03 % ~ 7.92 % 范围内随 CO₂ 浓度的提高, ZnS 中 Zn 的溶出率随之大幅度提高. 耐酸

性异养菌在污泥生物淋滤中的这些作用及其机理应与贫矿湿法冶金原理相似.

在不灭菌污泥但同时接种自养菌和异养菌的处理中, pH 降至 1.4 只需 6 d, 在灭菌污泥相应处理中, pH 降至 1.4 要 11 d, 不灭菌污泥的淋滤时间比灭菌污泥淋滤时间明显减少. 究其原因, 可能是在不灭菌污泥中微生物种群丰富, 在淋滤过程中和加入的自养菌、异养菌共同作用, 加快了 pH 的下降, 缩短了淋滤的周期.

淋滤结束后金属离子 Cr 溶出情况, 见表 3. 在灭菌污泥中, 在第 13 d 结束淋滤反应时, 加酵母 R30 的处理中 Cr 的溶出率 100 %, 而不加酵母 R30 的处理中 Cr 的溶出率只有 77 %. 同样, 在不灭菌污泥中, 在第 7 d 结束淋滤反应时, 加酵母 R30 的处理中 Cr 的溶出率 100 %, 而不加酵母 R30 的处理中 Cr 的溶出率只有 61 %. 由此可见, 加入酵母 R30 的处理, 显著地提高了 Cr 的溶出率.

以往的文献报道^[14]经生物淋滤处理, Cr 的最高溶出率达 80 %. 笔者研究发现, 经自养菌和异养菌的共同作用, 控制好淋滤的条件, 在 6 ~ 7 d 的时间内可将 Cr 的溶出率提高到 100 %.

3 小结

(1) 从酸化污泥中分离出一株异养微生物 R30,初步鉴定其属于红酵母菌属(*Rhodotorula* sp.) .

(2) 酵母 R30 能利用污泥中水溶性有机物 (DOM) 营养生长,降低了污泥中 DOM 的浓度,减少了 DOM 对自养菌的毒害作用.在生物淋滤过程中,接种异养菌酵母 R30 和自养菌共同作用,可显著减少淋滤时间,缩短淋滤周期,提高重金属的溶出率.

参考文献:

- [1] 周立祥,沈其荣,陈同斌,章申. 重金属及养分元素在城市污泥主要成分中的分配及其化学形态[J]. 环境科学学报, 2000 , **20**(3) : 269 ~ 275 .
- [2] McBride M B, Richards B K, Steenhuis T, Russo J J, Sauve S. Mobility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application[J]. Soil Sci. , 1997 , **162** : 487 ~ 500 .
- [3] Lombardi A T, S Garcia Jr. An evaluation into the potential of biological processing for the removal of metals from sewage sludge. Critical Reviews in Microbiolog , 1999 , **25**(4) : 275 ~ 288 .
- [4] 周立祥,周顺桂. 氧化亚铁硫杆菌及其去除污水污泥重金属的方法[P]. 中国发明专利 : CNI 389564 A, 2002-10-23 .
- [5] 周立祥,周顺桂. 氧化硫硫杆菌及制革污泥中铬的生物脱除方法. 中国,中国发明专利公报,公开号 CNI 375553 A. 2003-01-08 .
- [6] Gemmell R T, Knowles C J. Utilization of aliphatic compounds by acidophilic heterotrophic bacteria: The potential for bioremediation of acidic wastewaters contaminated with toxic organic compounds and heavy metals[J]. FEMS Microbiology Letters , 2000 , **192** : 185 ~ 190 .
- [7] Diane F, Real L, Denis C. Essential interactions between *Thiobacillus ferrooxidans* and heterotrophic microorganisms during a waste water sludge bioleaching process[J]. Environmental pollution , 1998 , **101** : 303 ~ 309 .
- [8] 周立祥,方迪,周顺桂,王电站,王世梅. 利用嗜酸性硫杆菌去除制革污泥中铬的研究[J]. 环境科学, 2004 , **25**(1) : 62 ~ 66 .
- [9] 李顺鹏. 微生物学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003 . 111 ~ 115 .
- [10] 张纪中. 微生物分类学[M]. 上海: 上海复旦大学出版社, 1990 . 368 ~ 425 .
- [11] J. A. 巴尼特. 酵母菌的特征与鉴定手册[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991 . 33 ~ 52 .
- [12] Torma A E, Walden E C, Duncan D C, *et al.* The effect CO₂ and particle surface area on the microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate[J]. Biotechnol. Bioeng. , 1972 , **14** : 777 ~ 786 .
- [13] Holugue L, Herrera L, Phillips O M, *et al.* CO₂ fixation by mineral leaching bacteria: characteristics of the ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry , 1987 , **9** : 497 ~ 505 .
- [14] 周顺桂,王世梅,余素萍,周立祥. 污泥中氧化亚铁硫杆菌的分离及其应用效果[J]. 环境科学, 2003 , **24**(3) : 61 ~ 66 .