

固定化光合细菌处理含氯酚废水的特性研究

付玲玲¹, 胡筱敏², 黄佳丽³

(1. 鞍山市千山区环境保护局, 辽宁 鞍山 114000; 2. 东北大学资源与土木工程学院, 辽宁 沈阳 110819;
3. 沈阳市康平县环保局, 辽宁 沈阳 110500)

摘要: 通过比较研究不同包埋法制备的固定化颗粒的活性、降解氯酚性能、抗分解能力、传质性能、机械强度、制备成本、制备难易等方面, 以期寻找最优的包埋材料。结果表明: 海藻酸钠添加粉末活性炭作为包埋材料时, 固定化颗粒的各种性能最好。利用正交试验优化包埋条件, 结果表明, 最佳包埋条件为: 粉末活性炭含量为1%, 海藻酸钠含量为3%, 包埋细菌生物量为0.5 g/10 g包埋材料。

关键词: 光合细菌; 生物降解; 氯酚类化合物; 固定化

中图分类号: X703

文献标志码: A

Study of the features of Chlorophenols-contained Wastewater Treatment by Immobilized Photosynthetic Bacteria

Fu Lingling¹, Hu Xiaomin², Huang Jiali³

(1.Environmental Protection Bureau of Qianshan District, Anshan City, Anshan 114000, China; 2.Collage of Resource and Civil Engineering, Northeast University, Shenyang 110819, China; 3.Kangping Environmental Protection Bureau, Shenyang 110500, China)

Abstract: Immobilization technology is one of the effective measures for application of microorganism in practical engineering and the embedding method of chlorophenols-contained wastewater treatment has good comprehensive properties with higher cell activity retention and viability and flexible application. In this paper, the properties of immobilized photosynthetic bacteria prepared by various embedded methods, chlorophenols degradation, resistance to decomposition capacity, mass transfer efficiency, mechanical strength, preparation cost, level of preparation difficulty, etc. were compared to find out the best embedded material. The result showed that all the properties of immobilized photosynthetic bacteria were the best when sodium alginate containing powdered activated carbon was selected as the embedded material. By use of orthogonal experiment for condition optimization, the result showed that the best embedding condition was that the content of powdered activated carbon and sodium alginate was 1% and 3% respectively, and the ratio of the concentration of embedded bacteria to the embedding material was 0.5 g/10 g.

Keywords: Photosynthetic Bacteria; Biodegradation; Chlorophenols; Immobilization

CLC number: X703

氯酚类化合物是应用广泛、具有环境毒性的难降解有机物, 主要通过造纸废水、染料和涂料工业废水、医药废水等途径排放到自然界中, 有很强的致畸、致癌和致突变的作用^[1], 也是美国EPA筛选出的65类129种优先控制污染物中的有机物的主要物质^[2]。因此, 对含氯酚废水的治理具有重大的意义。处理氯酚类废水的主要方法为物化法、生物法和化学法^[3-4], 用固定化微生物降

解氯酚的方法是一种经济有效且无二次污染的方法, 许多学者在这方面进行了大量研究^[5-7]。文章采用不同的包埋材料固定化光合细菌处理含氯酚废水, 从固定化颗粒的制作成本、操作难易、活性、降解氯酚性能、抗分解能力、传质性能等方面确定最佳包埋材料, 并利用正交试验优化包埋条件, 期望能为微生物处理含氯酚类污染物的废水提供借鉴。

收稿日期: 2015-02-19

通信作者: 付玲玲(1984-), 女, 硕士。研究方向: 环境管理。E-mail: fuling_841210@163.com

1 材料与方法

1.1 菌种来源

试验所用的以2-氯酚(2-CP)为底物的菌种是从沈阳市某农药厂排污口下游水体浅层底泥富集、筛选、分离得到的,初步鉴定为光合细菌(Photosynthetic bacteria, PSB)中的红假单胞菌(*Rhodospseudomonas*.)。

1.2 培养基

1.2.1 固体培养基 葡萄糖2.5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2 g/L, MgSO_4 0.126 g/L, CaSO_4 0.123 g/L, KH_2PO_4 0.6 g/L, K_2HPO_4 0.4 g/L, 酵母膏0.1 g/L, pH=7.0~7.2, 琼脂粉2%, 微量元素溶液1%。

1.2.2 微量元素的配制 H_3BO_3 1.5 g/L, MnSO_4 0.8 g/L, ZnSO_4 0.06 g/L, CuSO_4 0.1 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 0.2 g/L, CoSO_4 0.01 g/L。

1.3 测定方法

1.3.1 2-CP降解性能的测定 采用高效液相色谱(HPLC)分析方法,配制一定接种量,含有一定质量浓度2-CP的光合细菌培养液,同时配制不接种菌株的相同浓度的空白培养液作为对照,在相同的培养条件下,将培养液在10000 r/min下离心5 min, 0.22 μm 膜过滤后取样测定2-CP浓度,并计算降解率。

1.3.2 微生物生长量的测定 采用比浊法测定菌体浓度,利用UNICO UV-2102 Pc型紫外可见分光光度计,在菌液最大吸收波长为560 nm处测定OD560^[8]。

1.4 固定化方法

1.4.1 海藻酸钠法 配置4%的海藻酸钠溶液,水浴加热溶解,冷却至40 $^{\circ}\text{C}$,海藻酸钠溶液和湿菌体按质量比为20:1混合,用10 mL注射器于20 cm高处滴入不断搅拌的2% CaCl_2 溶液中,海藻酸钠与 Ca^{2+} 交联成球,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固化交联24 h。

1.4.2 海藻酸钠+活性炭法 海藻酸钠2 g,粉状活性炭0.5 g,加入48 mL水中,水浴加热溶解,冷却至40 $^{\circ}\text{C}$,配制的胶体悬液和湿菌体按质量比为20:1混合,用10 mL注射器于20 cm高处滴入不断搅拌的2% CaCl_2 溶液中成球,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱

中固化交联24 h。固化后用蒸馏水清洗两次,即得固定化小球^[9]。

1.4.3 海藻酸钠+壳聚糖法 海藻酸钠和壳聚糖以质量比4:1配制。以下操作方法同1.4.2。

1.4.4 海藻酸钠+明胶法 海藻酸钠和明胶以质量比4:1配制。以下操作方法同1.4.2。

1.4.5 海藻酸钠包埋与戊二醛交联结合法 配制4%海藻酸钠溶液,水浴加热溶解,冷却至40 $^{\circ}\text{C}$,海藻酸钠溶液和湿菌体按质量比为20:1混合,用10 mL注射器于20 cm高处滴入不断搅拌的2% CaCl_2 溶液中成球,弃去多余 CaCl_2 溶液,用1.0%戊二醛溶液(pH=6.0)处理1.0~1.5 h,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固化24 h,再用戊二醛溶液处理一次^[9]。

1.5 固定化方法小球性能测定

固定化小球性能的测定包括机械强度、孔隙率、传质性能、弹性、抗分解性能、活性^[10-11],降解2-CP性能的测定是取不同方法制作的固定化小球,各称取5 g分别加入含50 mg/L 2-CP的培养液中振荡培养7 d,然后测其2-CP降解率。

2 结果与讨论

2.1 固定化光合细菌包埋载体选择

分别采用PVA(聚乙烯醇)法、PVA+海藻酸钠法、琼脂法、海藻酸钠法^[11]制作固定化小球。实验结果表明琼脂法制备成本很高,而且不能成球,不宜采用。PVA法和PVA+海藻酸钠法操作较困难,PVA粘性太大,形成的小球体积比较大,而且小球在硼酸中粘成一团,需要较大面积的培养皿固定。PVA是一种人工合成的高分子试剂,它和硼酸具有一定毒性,对光合细菌的活性有一定抑制作用,影响处理效果,不宜采用。由于海藻酸钠是由海洋中植物做成的天然试剂, CaCl_2 也无毒,故对胶体内光合细菌的活性不会有很大影响,且操作容易,海藻酸钠和光合细菌结合较好,可以长期反复使用,所以试验采用海藻酸钠法包埋光合细菌。

2.2 固定化载体中添加材料选择

为了改善固定化颗粒的机械强度、传质等性能,选定粉末活性炭、壳聚糖、明胶、戊二醛为

海藻酸钠包埋法中的添加材料固定光合细菌。各种固定化小球活性比较结果见图1, 各种固定化小球性能比较见表1。

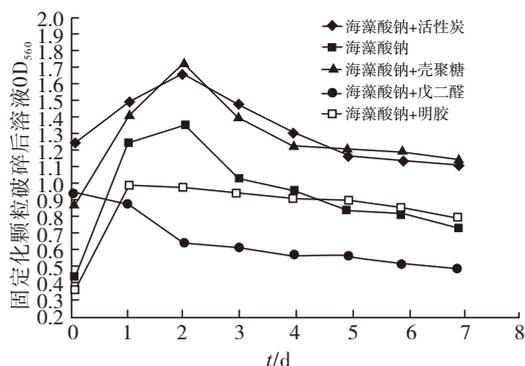


图1 各种固定化小球活性分析

由图1可见, 与海藻酸钠法相比较, 海藻酸钠+活性炭法和海藻酸钠+壳聚糖法光合细菌活性提高, 包埋载体内的光合细菌维持较高的 OD_{560} , 最大 OD_{560} 分别为1.695和1.758, 而海藻酸

钠法最大 OD_{560} 为1.385。原因与活性炭和壳聚糖的结构有关系, 粉末活性炭具有巨大的比表面积, 是多孔性的疏水性吸附剂, 它与海藻酸钠的表面作用大大增加。壳聚糖属于天然高聚物, 分子结构特别, 具有良好的吸附能力, 所以添加到海藻酸钠中可以改善固定化小球的传质性能以及不影响细菌生长。海藻酸钠包埋与戊二醛交联法光合细菌活性明显大大降低, 原因可能是戊二醛有毒, 具有刺激性臭味, 对细菌、芽孢、真菌和病毒均有杀灭作用, 属于高效消毒灭菌剂, 最低有效浓度为1%。图1中每条曲线的误差线是根据3个平行实验计算出相应的标准差数值所得, 标准差值范围在0.012~0.02之间, 实验测量光合细菌 OD_{560} 的仪器精密度高, 平行实验数据误差相对较小, 在合理的误差范围内。

表1 各种固定化小球的性能比较

载体	海藻酸钠	海藻酸钠+壳聚糖	海藻酸钠+活性炭	海藻酸钠+明胶	海藻酸钠+戊二醛
制备难易	容易	容易	容易	容易	比较繁琐
制备成本	较低	较高	廉价	廉价	较低
小球活性	较好	很好	很好	较好	有毒, 较差
2-CP 降解率/%	59.74	74.68	70.44	67.50	54.90
抗分解能力	一般	较强	较强	较差	较差
机械强度/g	50	100	100	80	80
传质性能	较弱	最强	—	较弱	较强
孔隙率/ $g \cdot cm^{-3}$	0.000 253	0.000 179	0.000 263	0.000 235	0.000 203
弹性	很好	很好	一般	较好	较好

注: 活性炭作为添加材料时, 固定化小球呈黑色, 传质性能难以确定。

由表1可知, 海藻酸钠包埋与戊二醛交联法制备比较繁琐, 且由于戊二醛有毒, 影响包埋载体内光合细菌活性, 从而影响2-CP降解率, 短期使用就出现固定化小球变软膨胀的现象, 不宜采用。海藻酸钠+明胶法虽然固定化小球活性和2-CP降解率较海藻酸钠法有所提高, 但明胶价格较贵, 且小球抗分解能力较差, 短期使用就出现固定化小球变软膨胀的现象, 不宜采用。与海藻酸钠法相比, 海藻酸钠+活性炭法和海藻酸钠+壳聚糖法固定化小球的机械强度、2-CP降解率、小球活性、抗分解能力等都较好, 可见活性炭和壳聚糖作为添加材料都很合适。但是考虑到

活性炭价格比壳聚糖更低廉, 从固定化小球性能和成本综合考虑, 选择海藻酸钠中最佳添加材料为活性炭。

2.3 不同培养状态对2-CP降解效果的影响

采用两组同时进行, 将一定量的固定化光合细菌分别加入到含50 mg/L 2-CP的好氧培养基和厌氧培养基中, 一组置于摇床中黑暗振荡培养, 一组置于光照培养箱中厌氧光照静止培养。7 d后测定两组培养液中2-CP含量, 比较两组2-CP降解效果。每一组做3个平行样, 并以不加菌体的样本作为对照。结果见图2。

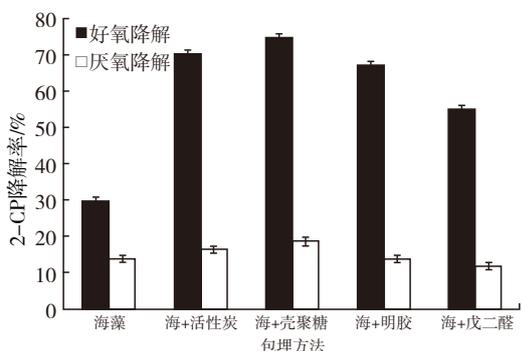


图2 不同培养条件对2-CP降解效果的影响

由图2可见，好氧振荡条件下2-CP降解效果比较好。这可能是由于摇床在振荡过程中培养液中2-CP与固定化颗粒充分接触，增大了固定化细菌和降解底物的接触面积，利于降解2-CP。在光照厌氧条件下，由于固定化颗粒处于静止状态，而细菌被包埋于海藻酸钠中，不像游离细菌均匀分散于培养液中，所以降解2-CP效果不是很好。因此在动态条件下固定化光合细菌处理2-CP降解效果较好。根据标准差添加误差线，实验误差主要是实验设备的精密度以及实验人员操作等存在误差，通过计算得出不同包埋方法的2-CP降解率的实验标准差值范围在0.6~1.2之间，说明实验数据误差较小，在合理的误差范围内。

2.4 固定化细菌和游离细菌降解性能比较研究

含有2-CP 50 mg/LPSB培养液中，分别加入固定化细菌、相同包埋量的游离细菌和同等量包埋材料制成的小球，比较研究固定化光合细菌和游离光合细菌降解2-CP效果，同时定性反映海藻酸钠和添加的粉末活性炭对2-CP的吸附情况。其中以不加菌体的样本作为对照。实验结果见图3。

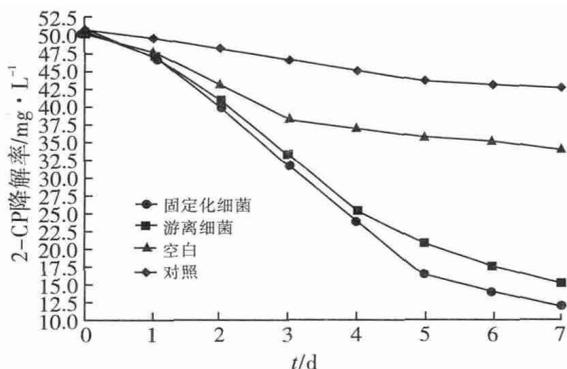


图3 游离细菌和固定化细菌的比较试验

由图3可见，2-CP具有一定挥发性。包埋材料对2-CP有一定吸附作用，但是经过一段时间后，包埋材料的吸附作用不是很明显。固定化细菌对2-CP的降解效果比游离细菌要好一些，但可能是海藻酸钠和包埋菌体的影响，固定化细菌比游离细菌生物活性提高不多，所以对2-CP的降解效率提高也不多。初期由于降解底物和基质不能达到固定化小球内部，只有表层的光合细菌参与降解2-CP，延缓2-CP去除效果。初期，固定化细菌对2-CP降解效果不是很明显，包埋材料吸附去除较快，可能是由于固定化小球所包埋的光合细菌对降解底物和基质的利用受到传质效率等因素的限制。虽然存在上述问题，但是考虑到反应器内游离细菌会产生菌体流失和固液分离等问题，所以研究固定化光合细菌处理2-CP还是有一定价值的。根据标准差添加误差线，标准差值范围在0.5~1.3之间，说明平行实验数据相差较小，在合理的误差范围内。

2.5 正交试验确定最佳包埋条件

利用正交试验来优化海藻酸钠+活性炭法固定光合细菌的包埋条件。试验分别采用因素A、B、C代表活性炭添加量、海藻酸钠含量、菌体生物量3种不同的包埋条件，具体见因素水平表2。并采用L₉(3³)正交表，以2-CP降解率为指标，对3种包埋条件进行了科学的考察，探讨最优的包埋条件，正交试验结果见表3。L表示正交表，9是正交表的行数，表示需要做的试验次数；3是因素水平数，表示此表可以安排3水平的试验；上标3是正交表的列数，表示因素的个数。同时，结合表2和表3的正交试验结果，绘制不同因素的水平值对应2-CP降解率的因素水平趋势，见图4。

表2 因素水平数据表

水平	因素 A	因素 B	因素 C
	活性炭浓度/%	海藻酸钠/%	菌体生物量 /10 g包埋材料
1	0.2	2.0	0.5 g
2	0.5	3.0	2.0 g
3	1.0	4.0	5.0 g

表3 各组降解2-CP情况

试验号	因素			2-CP 降解率/%
	A	B	C	
1	1	1	1	50.19
2	1	2	2	64.16
3	1	3	3	54.28
4	2	1	2	58.43
5	2	2	3	67.05
6	2	3	1	70.67
7	3	1	3	68.20
8	3	2	1	72.57
9	3	3	2	67.00
K1	168.63	196.15	207.77	
K2	176.82	203.78	191.95	
K3	193.43	189.59	189.53	
R1	56.21	65.38	69.26	
R2	58.94	67.93	63.98	
R3	64.48	63.20	63.18	
R	8.27	4.73	6.08	

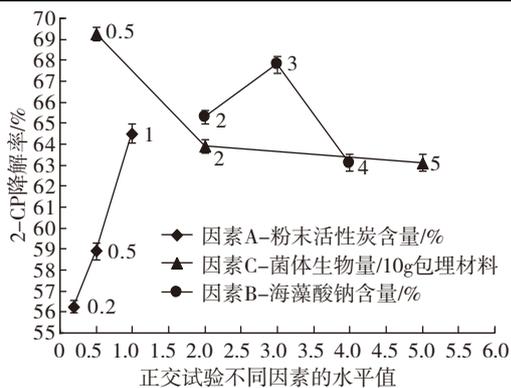


图4 因素水平趋势图

结合表2的因素水平数据表,从表3可知,RA为8.27, RB为4.73, RC为6.08,则 $RA > RC > RB$,粉末活性炭添加量对2-CP去除效果影响最大,其次是菌体生物量,海藻酸钠浓度对2-CP降解有一定影响,但是影响较小。2-CP降解率随着粉末活性炭添加量的增加而增加,海藻酸钠浓度居中时2-CP降解率最高,包埋载体内菌体生物量越多2-CP降解率反而降低。结合因素水平趋势图4和材料成本综合分析,分别在因素A的3水平、因素B的2水平、因素C的1水平对应的2-CP降解率最大,确定最优包埋条件为A3B2C1,即最佳包埋条件为粉末活性炭含量为1.0%,海藻酸钠含量为3.0%,光合细菌生物量为0.5 g/10g的包埋材料。分析其原因可能是随着海藻酸钠浓度升高,增加了基质和产物的传质阻力,2-CP去除效果反而变差;当包埋颗粒内的光合细菌生物量未达到限制光合细菌繁殖的浓度时,包埋生物量提高,不仅2-CP降解率下降,

而且增加制备成本,并且影响固定化小球本身的通透性和含水量。根据图4中误差线显示,标准差值范围在0.3~0.6之间,说明平行实验数据相差较小,在合理的误差范围内。

3 结论

(1)采用琼脂、PVA、PVA+海藻酸钠、海藻酸钠作为包埋材料固定光合细菌,从制作成本、操作难易、颗粒成形等方面可确定最佳包埋材料为海藻酸钠。

(2)选定粉末活性炭、壳聚糖、明胶、戊二醛作为海藻酸钠包埋法中的添加材料固定光合细菌,从不同添加材料制备的固定化小球制备成本、活性、2-CP降解效果、抗分解能力、机械强度等方面综合考虑,确定最佳固定化添加材料为粉末活性炭。

(3)对比好氧振荡培养和光照厌氧静止条件下培养固定化光合细菌,好氧振荡培养可以使固定化颗粒与培养液充分接触,其2-CP降解率明显优于光照厌氧静止培养。因此,确定选用好氧振荡条件培养固定化光合细菌。

(4)将固定化细菌和游离细菌进行比较可知,固定化细菌对2-CP的降解效果比游离细菌要好一些,并考虑到反应器内游离细菌会产生菌体流失和固液分离等问题,最终确定选用固定化光合细菌处理2-CP。

(5)利用正交试验来确定添加粉末活性炭的海藻酸钠法包埋固定化光合细菌的最佳条件为粉末活性炭浓度为1.0%,海藻酸钠浓度为3.0%,包埋生物量为0.5 g/10g包埋材料。

参考文献

- [1]王晓东,张光辉,顾平,等.水体中氯酚类污染物的生物降解性研究进展[J].中国给水排水,2008,24(16):16-22.
- [2]陈晓秋.水体环境优先控制有机污染物的筛选方法探讨[J].福建分析测试,2006,15(1):15-17.
- [3]Hong H C, Zhou H Y, Luan T G, et al. Residue of pentachlorophenol in freshwater sediments and human breast milk collected from the Pearl River Delta, China[J]. Environment International, 2005, 31(5):643-649.
- [4]Czaplicka, M. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment[J]. Science of The Total Environment, 2004, 322(1-3): 21-39.
- [5]Jeong SK, Cho JS, Kong IS, et al. Purification of aquarium water by PVA gel-immobilized photosynthetic bacteria during goldfish rearing[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 14(2):238-247.
- [6]刘建红. 混凝吸附-固定化光合细菌处理垃圾渗滤液的研究[D].山西:山西大学环境学院,2004.
- [7]Sala-trepat JM, Evans WC. The meta cleavage of catechol by Azotobacterspecies[J]. European Journal of Biochemistry, 1971, 20(3):400-413.
- [8]巴淑丽. 光合细菌固定化包埋颗粒产氢特性实验研究[D].重庆:重庆大学资源与环境科学学院,2007.
- [9]章鸣. 光合细菌处理染料废水[D].江苏:南京理工大学环境与生物工程学院,2004.
- [10]张杰,郭妮妮,张代佳,等. 复相乳化法制备海藻酸钙微球及其释行为[J]. 过程工程学报, 2006, 6(6):964-968.
- [11]刘影. 光合细菌的增殖培养及其处理城市污水中氮磷的研究[D].山东:中国海洋大学环境科学与工程学院,2006.