

文章编号:1671-1513(2012)01-0051-06

水处理中特种菌株的包埋与保存方法研究

岳建伟, 汪 苹, 张艳萍, 酒卫敬

(北京工商大学 食品学院, 北京 100048)

摘 要: 采用聚乙烯醇-硼酸法对 WXZ-2、WXZ-8 两株菌进行了包埋固定化, 通过正交试验优选出较佳包埋条件, 即包菌量 4%、PVA 质量浓度 5%、交联时间 12 h、小球直径 2.5 mm. 通过对冷冻干燥、40 ℃ 干燥两种保存方式下小球的外观表现、机械强度、微生物活性以及吸附性的测试与比较得出, 40 ℃ 干燥保存的包埋小球有着更好的活性、机械强度与吸附性能, 是一种更理想的干燥保存方式.

关键词: 包埋固定化; 异养硝化; 好氧反硝化; 正交试验; 干燥保存

中图分类号: TS208; X792

文献标志码: A

异养硝化-好氧反硝化菌的存在, 突破了传统的理论认识, 简化了废水处理过程^[1-5]. 如今, 利用硝化-好氧反硝化来实现含氮废水的高效脱氮已成为国内外研究的热点.

水处理高效菌株筛选出以后, 受到运输和保存条件的限制, 难以广泛使用, 固定化微生物技术可以很好地解决这一问题. 黄川^[6]等用海藻酸钠固定化活性污泥制成颗粒小球, 以流化床反应器对甲醇废水进行处理. 在一定条件下, 当进水 COD < 722.2 mg/L, 进水甲醇质量浓度 < 307.4 mg/L 时, 对 COD 的去除率大于 85%, 对甲醇的去除率可达到 90% 左右. 耿振香^[7]等采用 PVA-H₃BO₃ 包埋固定化活性污泥中筛选的硝化菌和反硝化菌, 对生活污水进行硝化反硝化工艺处理, 当废水中氨氮质量浓度为 45 mg/L, pH 值为 7.5, DO 为 2.0 mg/L, 水力停留时间为 18 h, 氨氮去除率可达 96%. Furukawa K, Kazuichi Isaka, 张爽^[8-10]等众多学者在固定化硝化细菌对硝化效率的提高方面进行了一定的研究. 冯雅男等^[11]对将硝化菌和反硝化菌混合包埋实现同时硝化反硝化的生物脱氮技术进行了研究. 王磊^[12]等对固定化异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮能力进行了研究, 优选出理想的包埋材料. 酒卫敬^[13]等对海藻酸钠做包埋剂固定化异养硝化-好氧反硝化菌

WXZ-8 进行了研究, 优选出了较佳包埋条件. 固定化微生物技术目前已广泛应用于废水处理, 并取得了一定成果, 但目前对固定化产品保存的研究很少.

本研究选择能对食品发酵废水的脱氮处理有特效的异养硝化好氧反硝化菌进行包埋固定化, 并采用正交试验选出较佳包埋条件, 对冷冻干燥和 40 ℃ 干燥处理后包埋小球的性能进行对照和比较.

1 实验材料与方法

1.1 材料与菌种

药品: 聚乙烯醇(PVA)、琼脂粉、硼酸、无水氯化钙均为分析纯. 海藻酸钠(SA)为化学纯.

实验菌株属性如表 1.

两株菌株均为实验室自己筛选的, 通过鉴定证明具有异养硝化-好氧反硝化性能.

1.2 菌种培养基

异养硝化富集培养基: (NH₄)₂SO₄ 0.47 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, FeCl₂·6H₂O 0.25 g/L, CaCl₂·7H₂O 0.2 g/L, MgSO₄·7H₂O 1 g/L, 碳源用量依据正交试验设计 COD/N 调节.

收稿日期: 2011-06-08

作者简介: 岳建伟, 男, 硕士研究生, 研究方向为水污染控制;

汪 苹, 女, 教授, 主要从事水污染控制方面的研究. 通讯作者.

表 1 菌株属性^[14]
Tab.1 Strains attributes list

菌株编号	革兰氏染色	细菌形态	菌种学名	NH ₄ ⁺ -N 去除率/%	TN 去除率/%
WXZ-2	阴性	杆菌	戴尔福特菌	94.87	95.27
WXZ-8	阴性	杆菌	蜡状芽孢杆菌	96.30	93.81

异养硝化测定培养基:(NH₄)₂SO₄ 0.47 g/L, 维氏盐溶液 50 mL, 碳源用量依正交试验设计 COD/N 及碳源种类调节.

维氏盐溶液: K₂HPO₄ 5.0 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.05 g/L, NaCl 2.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 2.5 g/L, MnSO₄·4H₂O 0.05 g/L.

1.3 实验方法

1.3.1 包埋方法

聚乙烯醇(PVA)-H₃BO₃ 包埋法: 配置定量 PVA+2% 琼脂+0.1% 海藻酸钠(SA)(PVA 为主要包埋剂, 琼脂与海藻酸钠为添加剂)混合液, 加热使其充分混匀. 并配置 4% 硼酸+2% 氯化钙的交联液, 将混合液与交联液一起放入灭菌锅中在 121℃ 下灭菌 20 min, 后取出, 放进无菌操作台.

称取一定质量离心后(8 000 r/min, 5 min)的目标菌, 在灭过菌的烧杯中加少量蒸馏水混均, 然后加入 PVA 混合液中摇匀, 用 5 mL 移液枪滴入降至室温的交联液中成球, 再放入 4℃ 恒温冰箱内交联适当时间, 取出用蒸馏水冲洗, 保存.

1.3.2 干燥方法

1) 冷冻干燥. 将小球转移到灭过菌的空培养皿中, 用封口膜封住, 膜上扎孔透气, 放进冷冻干燥器中连续冷冻干燥 24 h, 然后取出倒入自封袋中, 在 4℃ 恒温冰箱内保存.

2) 40℃ 干燥. 将小球转移到灭过菌的空培养皿中, 放入烘箱中, 在 40℃ 下连续干燥 36 h, 然后取出倒入自封袋中, 在 4℃ 恒温冰箱内保存.

1.3.3 包埋小球活性的测定

以氨氮和总氮的去除率来反应包埋小球的活性. 按照 1.3.1 中聚乙烯醇包埋法制作包埋小球, 按照 1.2 配置异养硝化测定培养基, 调至最适 pH 值, 用量筒量取 200 mL 分装到 250 mL 锥形瓶中, 在 121℃ 下灭菌 20 min 空冷至室温. 然后称取 10 g 湿小球, 放入培养基中, 在恒温震荡器中连续培养 4 d, 每 24 h 取样一次, 离心后取上清液测定 NH₄⁺-N 和 TN 的浓度, 与空白样比较并分别计算二者的去除率, 理论上, 去除率随时间的延长而增大, 达到一定

值后便保持稳定不再发生变化, 因此取其最大值为测定结果.

测定液中无有机氮, 故浓度 $\rho(TN) = \rho(NH_4^+-N) + \rho(NO_3^--N) + \rho(NO_2^--N)$. 测定方法^[15]:

- 1) NH₄⁺-N: 纳氏试剂分光光度法;
- 2) NO₃⁻-N: 紫外分光光度法;
- 3) NO₂⁻-N: N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法.

1.3.4 机械强度测定

1) 抗压强度. 用 brook field CT3-4500 型质构仪测定. 测试速度: 0.5 mm/s, 压缩率: 4%, 探头: TA 11/1000(圆柱形, 直径=25.4 mm).

2) 剪切强度^[16]. 将 60 个小球放入 250 mL 锥形瓶, 加入 200 mL 去离子水, 在恒温振荡器上 220 r/min 振荡 15 h, 完好的小球与原小球总数的比表示小球的强度系数.

1.3.5 吸附性能^[17]

将定量凝胶小球放入稀释的墨水中, 恒温 24 h 后取出. 采用美国 VARIAN CARY-50 型紫外-可见分光光度计扫描测试墨水溶液在波段 450~700 nm 的透过率, 以此反映包埋小球吸附性能.

2 实验结果与分析

2.1 正交试验结果分析

通过查阅相关文献^[13,18], 并结合小球实际制作经验, 拟考察 4 个因素: A 包菌量、B PVA 浓度、C 交联时间、D 小球直径, 各因素的水平取值如表 2. 以 NH₄⁺-N 和 TN 的去除率为试验指标.

表 2 正交试验因素水平表
Tab.2 Factor levels of orthogonal tests

包埋剂	水平	因素			
		A	B	C	D
		包菌量/%	PVA 质量分数/%	交联时间/h	小球直径/mm
PVA	1	2	4	4	2.5
	2	4	5	8	3.5
	3	6	6	12	4.5

按照 1.3.3 测定包埋菌株的活性,摇床培养条件为:转速为 180 r/min、COD/N 为 25、初始 pH 值为 8,温度为 30 ℃. 氮源为硝酸钾和硫酸铵,初始质量浓度约为 $\rho(\text{NO}_3\text{-N}) = 10 \text{ mg/L}$ 和 $\rho(\text{NH}_4^+\text{-N}) = 100 \text{ mg/L}$,碳源为柠檬酸三钠^[19]. 结果见表 3.

表 3 WXZ-2 PVA 正交试验分析结果
Tab.3 Result analysis of orthogonal tests on PVA of WXZ-2

实验号		A	B	C	D	NH ₄ ⁺ -N	TN 去除率/
		包菌量/%	PVA 浓度/%	交联时间/h	小球直径/mm	去除率/%	%
1		1(2)	1(4)	1(4)	1(2)	82.62	87.13
2		1(2)	2(5)	2(8)	2(3)	81.01	84.91
3		1(2)	3(6)	3(12)	3(4)	82.90	87.32
4		2(4)	1(4)	2(8)	3(4)	80.41	86.04
5		2(4)	2(5)	3(12)	1(2)	93.31	94.68
6		2(4)	3(6)	1(4)	2(3)	86.34	89.89
7		3(6)	1(4)	3(12)	2(3)	77.67	83.31
8		3(6)	2(5)	1(4)	3(4)	72.90	78.40
9		3(6)	3(6)	2(8)	1(2)	85.79	89.80
氨氮去除率	I _j	82.177	80.233	80.620	87.240		
	II _j	86.687	82.407	82.403	81.673		
	III _j	78.787	85.010	84.627	78.737		
	R _j	7.900	4.777	4.007	8.503		
总氮去除率	I _j	86.453	85.493	85.140	90.537		
	II _j	90.203	85.997	86.917	86.037		
	III _j	83.837	89.003	88.437	83.920		
	R _j	6.366	3.510	3.297	6.617		

由正交试验结果可知:

1) 氨氮和总氮的分析结果比较一致,实验 5 的去 除效果最好.

2) 各因素理论较优水平为: $A_2B_3C_3D_1$,即:包菌 量为 4%,PVA 质量分数为 6%,交联时间为 12 h,小 球直径为 2.5 mm.

3) 由极差大小可以看出影响氨氮和总氮处理 效果的各因素作用的顺序是:小球直径 > 加菌量 > PVA 浓度 > 交联时间.

从结果可以看出,小球直径是处理效果的主要 影响因素,小球直径太小,滴制时枪头易发生堵塞, 不利于小球制作,因此小球直径最小定为 2.5 mm. PVA 浓度为第三影响因素,PVA 浓度不宜太高,浓 度太高导致小球制作中拖尾严重,易粘连,成球性不 好. 交联时间对处理效果也有一定的影响,故补充 单因素实验,结果如图 1.

由图 1 分析,氨氮和总氮去除率随着交联时间 的延长而增高. 但达到一定水平后,去除率趋于平

图 1 单因素实验结果
Fig.1 Experiment results on single factor

缓,甚至呈下降趋势. 这是因为交联时间越长,小球 表面越致密,其传质阻力就会越大,通透性越差,同 时硼酸对细胞有一定毒性,交联时间过长会影响菌 株的活性. 因此,12 h 是一个比较理想的交联时间. 最终确定 WXZ-2 的较佳包埋条件是:包菌量

为 4%、PVA 质量分数为 5%、交联时间为 12 h、小球直径为 2.5 mm.

同样的方法,对 WXZ-8 菌进行正交试验,优选出较佳包埋条件也是:加菌量为 4%、PVA 质量分数为 5%、交联时间为 12 h、小球直径为 2.5 mm.

对比游离菌与包埋菌的菌株活性,结果见表 4.包埋菌株的脱氮性能与其游离菌相比没有明显降低,说明此方法比较适合两株菌的固定化.

表 4 包埋菌与游离菌活性对比
Tab.4 Activity contrast between entrapped
and free bacteria %

菌株	游离菌		包埋菌	
	NH ₄ ⁺ -N	TN 去除率	NH ₄ ⁺ -N	TN 去除率
	去除率		去除率	
WXZ-2	94.87	95.27	93.31	94.68
WXZ-8	96.3	93.81	95.40	96.73

2.2 保存方法的研究

通过查阅文献,发现对小球保存进行研究的很少,一种好的保存方法可以有效保持菌株的活性^[12,20],而干燥保存比蒸馏水浸泡、生理盐水浸泡等保存方式,更方便小球的运输与应用,下边对冷冻干燥与 40℃干燥两种不同保存方式进行对照分析.

在较优包埋条件下分别制作大量 WXZ-2 和 WXZ-8 两种菌株的包埋小球,分成两批,一批进行冷冻干燥,一批进行 40℃干燥,待用.

2.2.1 保存时间

按照 1.3.3 测定包埋菌株的活性,每隔 7 d 测定一次,研究包埋固定化菌株 WXZ-2 和 WXZ-8 的活性随保存时间的变化,实验结果如图 2.

从图中可以看出,经过 1 个月的保存,40℃干燥保存的包埋小球比冷冻干燥保存的小球具有较好的氨氮和总氮去除率,但相差不多,仅有 1%~5%,经过 1 个月后,包埋小球的氨氮和总氮去除率均维持在 90%左右,没有明显降低,由此看来,两种方式均对两株菌起到了很好的保存作用.

2.2.2 外观对照

两种干燥条件下,小球外观图片见图 3. 冷冻干燥小球的表面光滑,有光泽,个体分开. 40℃干燥小球发暗,部分易粘附在一起. 前者比后者有更好的外观表现.

2.2.3 机械强度

1) 抗压强度测试结果. 使用质构仪按照 1.3.4

图 2 氨氮和总氮的去除率

Fig.2 Removal rate of NH₄⁺-N and TN

图 3 小球外观图

Fig.3 Appearance of the balls

中的测试条件进行测试,结果如表 5.

表5 硬度测试结果
Tab.5 Results of hardness testing

包埋菌株	干燥方式	硬度/g
WXZ-2	冷冻干燥	3 493.2
WXZ-2	40℃干燥	>5 000
WXZ-8	冷冻干燥	2 347.2
WXZ-8	40℃干燥	>5 000

2)剪切强度测试结果.按照1.3.4中的方法进行测试,小球破碎率如表6.

表6 破碎率测试结果
Tab.6 Results of breakage rate

包埋菌株	干燥方式	破碎率/%
WXZ-2	冷冻干燥	95
WXZ-2	40℃干燥	54
WXZ-8	冷冻干燥	92
WXZ-8	40℃干燥	50

从对强度的测试结果来看,40℃干燥后的小球的抗压力和抗剪切力的强度都要大于冷冻干燥的小球,这就有利于小球在运输过程中不被压碎,同时也有利于小球在反应器中较好的保持形态.如果对机械强度要求不是太高的情况下,两种干燥方式基本都能满足.

2.2.4 吸附性能测试结果

按照1.3.5的方法进行实验,结果如图4.干燥去除包埋小球表面与内部的水分,干燥方式不同,处理后小球的表面积不同,而表面积直接影响到小球的吸附性,较好的吸附性可以使包埋小球在水处理中获得更好的效果.由图4中可以看出,WXZ-8, WXZ-2在40℃条件下干燥保存的小球比冷冻干燥保存小球的吸附性能要好.

1. WXZ-8 40℃干燥; 2. WXZ-8 冷冻干燥; 3. WXZ-2 40℃干燥; 4. WXZ-2 冷冻干燥; 5. 空白.

图4 包埋小球在干燥保存后的紫外光谱

Fig.4 UV spectrums of embedding balls after drying

3 结 论

1)优选出了WXZ-2, WXZ-8两株好氧反硝化菌的较佳包埋条件,即包菌量为4%、PVA质量分数为5%、交联时间为12 h、小球直径为2.5 mm.包埋后的菌株NH₄⁺-N、TN去除率都在90%以上,与游离菌相比降低很少.

2)通过对比冷冻干燥与40℃干燥,得出40℃干燥的包埋小球具有更高的活性,更大的硬度和更好的吸附性能,因此,对WXZ-2和WXZ-8而言,40℃干燥是一种更理想的保存方式.

参考文献:

[1] Roberson L A, Kuenen J G. Aerobic denitrification: a controversy revived [J]. Archives of Microbiology, 1984, 139:351-354.

[2] Castignetti D, Hollocher T C. Heterotrophic nitrification among denitrifiers [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 47(4): 620-623.

[3] Ding Aizhong, Fu Jiamo, Sheng Guoying. Experimental evidence for aerobic bio-denitrification [J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(3):2779-2782.

[4] Muller E B, Stouthamer A H, Vao Verseveld H W. Simultaneous NH₃ oxidation and N₂ production at reduced O₂ tensions by sewage sludge subcultured with chemolithotrophic medium [J]. Biodegradation, 1995(6): 339-349.

[5] 卫江敬,汪苹,岳建伟. 好氧反硝化菌处理高浓度氨氮废水研究 [J]. 环境工程技术学报, 2011, 2(1): 111-117.

[6] 黄川,王里奥,崔志强,等. 采用海藻酸钠固定化微生物技术处理甲醇废水 [J]. 中国给水排水, 2008, 24(7): 78-81.

[7] 耿振香,邱新发. 固定化微生物法处理含氨氮废水 [J]. 应用化工, 2007, 36(9): 933-935.

[8] Furukawa K, Ike A, Fujita M. Preparation of marine nitrifying sludge [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993, 76: 134-139.

[9] Kazuichi Isaka, Sachiko Yoshie, Tatsuo Sumino. Nitrification of landfill leachate using immobilized nitrifying bacteria at low temperatures [J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 37:49-55.

[10] 张爽,姜蔚,徐桂芹,等. 固定化硝化菌在不同温度下对氨氮的去除效能研究 [J]. 环境科学与管理, 2008, 33(5):36-39.

[11] 冯雅男,李军,王立军,等. 包埋固定化技术去除水体

- 中氨氮的研究进展[J]. 辽宁化工, 2010, 39(2): 164-167.
- [12] 王磊, 汪苹, 刘建楠, 等. 固定异养硝化-好氧反硝化菌脱氮能力的研究[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2010, 28(1): 18-23.
- [13] 酒卫敬, 汪苹, 李栗博, 等. 海藻酸钠作为固定化细胞包埋剂的研究[J]. 科技创新导报, 2011(2): 12-13.
- [14] 尹明锐. 优选高效脱氮功能菌株及复合脱氮菌群构建研究[D]. 北京: 北京工商大学, 2010: 33-38.
- [15] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [16] 刘巍, 胡中华, 刘亚菲, 等. 新型固定化生物小球的研制及其处理模拟苯胺废水的特性[J]. 环境科学学报, 2009, 29(6): 1195-1202.
- [17] 李贤玉, 叶林. 污水处理用聚乙烯醇凝胶的制备及结构与性能[J]. 环境化学, 2010, 29(2): 305-308.
- [18] 冯本秀, 赖子尼, 余煜棉, 等. 固定化微生物去除水体中氨氮的正交试验优化技术[J]. 安徽化工, 2006, 1: 54-55.
- [19] 王磊. 水处理菌株的包埋方法研究[D]. 北京: 北京工商大学, 2010: 32-38.
- [20] 李峰, 吕锡武, 严伟, 等. 聚乙烯醇作为固定化细胞包埋剂的研究[J]. 中国给水排水, 2000, 16(12): 14-17.

Study on Entrapped Immobilization and Preservation of Heterophic Nitrification Aerobic Denitrifying Bacteria

YUE Jian-wei, WANG Ping, ZHANG Yan-ping, JIU Wei-jing

(School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Two heterotrophic nitrification aerobic denitrifying bacteria strains, WXZ-2 and WXZ-8, were immobilized by PVA-boric acid method. The optimal embedding conditions were obtained by orthogonal test method. The Quantity of entrapped bacteria was 4%. The concentration of PVA was 5%. The crosslinking time was 12 h. And the diameter of the immobilized beads was 2.5 mm. Two different drying methods, freeze-drying and drying at 40°C, were compared to keep the beads. It was proved that the beads dried at 40°C showed much better activity, mechanical strength and adsorption performance.

Key words: entrapped immobilization; heterotrophic nitrification; aerobic denitrification; orthogonal test; preservation after drying

(责任编辑: 叶红波)