

固定化微生物修复氯苯污染地下水实验

洪梅,王冬,李迎全,王爱民,庄辉

吉林大学地下水资源与环境教育部重点实验室,长春 130026

摘要 采用静态因素选择实验与动态模拟实验相结合的方法,证实聚乙烯醇-海藻酸钠(PVA-SA)复合凝胶固定的微生物在氯苯污染地下水中对污染物的降解效果优于游离微生物和土著微生物,并且证明了含水层介质粒径与小球粒径比值越大,越有利于固定化微生物对氯苯的迁移的观点,含水层介质粒径与小球粒径比在2—5之间时,15d后氯苯降解率高达78.16%;小球粒径越小,越有利于降解效率的提高。同时得到最佳氯苯降解效果的PVA-SA复合凝胶固定化条件为:PVA浓度80g/L,CaCl₂浓度10g/L,包埋剂与菌液体积比30:1,SA质量分数1.0%。

关键词 聚乙烯醇-海藻酸钠;氯苯;地下水

中图分类号 X523

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.13.001

Experiment on the Remediation Chlorobenzene-contaminated Groundwater by Using Immobilized Microorganisms

HONG Mei, WANG Dong, LI Yingquan, WANG Aimin, ZHUANG Hui

Key Laboratory of Groundwater Resources and Environment, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130026, China

Abstract Chlorobenzene is a synthetic organic compound. It is widely used in the industrial and agricultural productions. It is difficult to be degraded by indigenous microorganisms in the groundwater environment. Immobilization microbial technology is widely used in the water treatment in recent years. Microorganism is immobilized in polymeric gel. It forms an isolated environment for the microorganism. The activity of microorganism and the efficiency of pollutants degradation are improved. The effect of bioaugmentation is enhanced. By using static factors—choosing experiment and dynamic simulation experiment, it is confirmed that PVA-SA composite gel fixed microbial degrade chlorobenzene-contaminated groundwater is more effective than free microorganisms and indigenous microorganisms do. And it is concluded that the bigger ratio of the aquifer medium size to gel size, the more conducive to PVA-SA composite gel migration in groundwater is. It is also concluded that the smaller the gel size is, the higher chlorobenzene degradation efficiency is. For the best degradation effect, PVA-SA composite gel immobilized conditions are PVA concentration of 80g/L, CaCl₂ concentration of 10g/L, the ratio of embedding medium to the broth volume is 30:1, and SA mass fraction is 1.0%.

Keywords PVA-SA; chlorobenzene; groundwater

0 引言

氯苯是一种难溶于水且毒性较大的挥发性有机物,存在于很多工业废水中。由于氯苯中的氯原子电负性较高,苯环上的电子受到强烈吸引,使苯结构成为一个疏电子环,从而氯苯的化学性质十分稳定^[1]。因此,存在于环境中的氯苯很难降解,对水体、土壤和大气会造成严重污染,同时对地下水系统也会产生严重威胁。

生物强化技术能够提高微生物的有效浓度,增强对难降

解污染物的降解能力,提高降解速率,并改善原有生物处理系统对目标污染物的去除能力^[2]。但生物强化技术处理地下水系统最主要的障碍是注入的微生物通过土壤多孔介质时损失量大^[3-4]。这是由于悬浮的微生物细胞通过注水井时附着在土壤颗粒上,表层受到外界刺激合成胞外聚合物,造成土壤渗透性降低、注水井堵塞,最终导致生物修复过程的失败^[5-6]。固定化微生物技术解决了生物强化技术带来的这些难题。该技术将微生物包埋在聚合凝胶微球内,不仅提高了微

收稿日期:2012-03-14;修回日期:2012-04-23

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2008AA06A410);吉林大学科学前沿与交叉学科创新项目(200903150)

作者简介:洪梅(中国科协所属学会个人会员登记号:S100700320M),教授,研究方向为水土环境污染控制与治理,电子信箱:hongmeizhangbo@163.com

生物的迁移距离,还为微生物提供了一个与外界隔绝的环境,防止其附着在土壤颗粒上,同时也保护微生物免受外部生物和非生物造成的压力^[7]。目前,将固定化微生物技术应用于地下水污染生物修复的研究,多为添加固定化微生物到生物渗透反应墙中^[8],而这种生物渗透反应墙由于受开挖深度的限制,对地下水中污染修复的范围受到限制^[9]。而采用将固定化微生物直接注入到地下水中形成生物反应带的方法,可以避免生物渗透反应墙修复地下水范围受限的问题,Peyman等^[10]、Manikandan等^[11]利用此技术修复污染的地下水均取得较好的实验效果,但国内的相关研究比较少见。

本文采用静态因素选择实验与动态模拟实验相结合的方法,对比研究聚乙烯醇-海藻酸钠(PVA-SA)复合凝胶固定的微生物、游离微生物和土著微生物对氯苯污染地下水的修复作用,以及含水层介质粒径与小球粒径比对固定化微生物在地下水中的迁移能力和降解效率的影响。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

氯苯(C_6H_5Cl),广州化学试剂厂,分析纯;聚乙烯醇(PVA) 1750±50,国药集团化学试剂有限公司;海藻酸钠(SA),天津市光复精细化工研究所,化学纯;硼酸(H_3BO_3),开原化学试剂厂,分析纯;无水氯化钙($CaCl_2$),广东汕头市西陇化工厂,分析纯;过氧化钙(CaO_2),北京康普汇维科技有限公司,分析纯;无水硫酸钠(Na_2SO_4),廊坊天科生物科技有限公司,分析纯;二硫化碳(CS_2),广州化学试剂厂,分析纯。

1.2 实验配水

实验配水为人工模拟地下水,成分配比为:NaCl(0.2g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2g), $CaCl_2$ (0.1g), $MnSO_4 \cdot H_2O$ 痕量, $FeCl_2$ 痕量,蒸馏水定容至 1000mL。调节 pH=7。

1.3 菌种来源

从长春南湖公园土壤表层 3cm 以下取土壤 1kg,经阴干、过筛后人工添加少量氯苯,模拟污染环境,从土壤中筛选出能够降解氯苯的好氧微生物,再将菌种以 5d 为一个周期,氯苯浓度梯度为 10mg/L,从氯苯浓度 10mg/L 富集到 100mg/L,最终得到对氯苯具有高效降解能力的菌种。

1.4 实验方法

先采用静态因素选择实验,确定 PVA-SA 复合载体固定氯苯降解菌的最佳包埋条件,得出最佳氯苯降解效果的固定化小球制备方法,将此小球应用到动态模拟实验中。

1.4.1 静态因素选择实验

通过氯苯降解效果的对比实验,对聚乙烯醇-硼酸(PVA- H_3BO_3)法固定氯苯降解菌中的 PVA 浓度,交联剂 $CaCl_2$ 的浓度,包埋菌液量等影响固定化小球的活性因素进行选择^[12],并在 PVA- H_3BO_3 法基础上加入 SA,与 PVA 复合,改善 PVA 成球困难的问题^[13]。通过实验选择氯苯降解效果较好的小球粒径,并应用于后续动态土柱模拟实验。

1.4.2 动态模拟实验

实验设置 5 个相同的有机玻璃柱,柱高 60cm,内径 12cm,编号分别为 A、B、C、D、E。利用 A、B、C 柱子对比固定化微生物、游离微生物和未添加微生物对地下水中氯苯的修复效果。利用 C、D、E 柱子对比在添加相同粒径小球的情况下,不同粒径含水层介质对固定化微生物修复氯苯污染地下水效果的影响。其中 A、B、C 柱均填装粒径 0.5—1mm 的砂粒,D、E 柱分别填装粒径 1—2mm 和 2—5mm 的砂粒。A 柱不添加微生物,B 柱添加游离微生物。由于实验室条件下制备大量 0.5mm 粒径的固定化小球比较困难,因此选用 1mm 粒径的固定化小球投加到 C、D、E 柱中,制备 C、D、E 柱投加的固定化小球时,在载体内包埋的菌液量与 B 柱添加的菌液量等同。5 个模拟柱在填装时均添加 CaO_2 ,为微生物提供氧气。将装有氯苯浓度为 80mg/L 的实验配水以升流式注入模拟柱,并静置 24h 使实验用砂对氯苯吸附饱和。24h 后开始采集水样进行分析,每 24h 取水样测试氯苯浓度。

1.5 分析方法

实验中样品的氯苯浓度采用气相色谱仪进行检测分析,色谱条件:气化室温度 200℃,柱温初始 40℃,程序升温至 60℃,升温速率 2℃/min,检测器温度 220℃,空气流量为 400mL/min, H_2 流量 43mL/min, N_2 载气流量 3mL/min,分流比为 2:1。

2 结果分析与讨论

2.1 固定化条件的选择

2.1.1 PVA 浓度对固定化小球活性的影响

从图 1 可以看出,PVA 的最佳浓度为 80g/L,随着 PVA 浓度的增加,固定化小球对氯苯的降解率呈现先升高后降低的趋势。当 PVA 溶液浓度小于 80g/L 时,包埋剂浓度较低,形成的固定化小球密度较低,沉降速度较慢,漂浮在液面上并粘连在一起,形成无定形的凝胶,微生物极易从凝胶中泄漏。当 PVA 溶液浓度大于 80g/L 时,随着包埋剂浓度的增加,增加了氧气与底物的扩散阻力,影响了外界环境对好氧微生物的供氧,进而影响固定化微生物的生长和增殖。

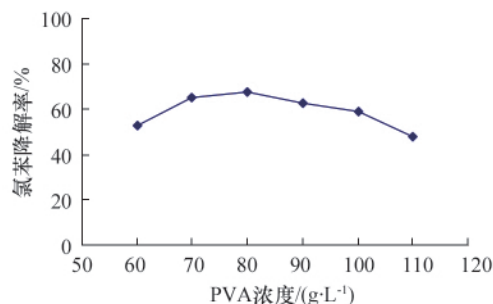


图 1 PVA 浓度对固定化小球活性的影响

Fig. 1 Effect of PVA concentration on the activity of immobilized gel

2.1.2 交联剂 CaCl_2 的浓度对固定化小球活性的影响

图2为交联剂 CaCl_2 的浓度对固定化小球活性的影响。可以看出,交联剂 CaCl_2 的最佳浓度为 10g/L ,随着交联剂浓度的增加,固定化小球对氯苯的降解率呈现先升高后降低的趋势。当交联剂 CaCl_2 浓度小于 10g/L 时, Ca^{2+} 浓度较低, Ca^{2+} 与包埋剂的交联程度较低,形成的固定化小球机械强度较低,容易破碎,对包埋微生物起不到很好的保护作用。当交联剂 CaCl_2 浓度大于 10g/L 时,随着 Ca^{2+} 浓度的增加,小球的机械强度虽然增加,但小球外面一层膜的致密性加强,传质性能降低,影响了氯苯向小球内部的传递。

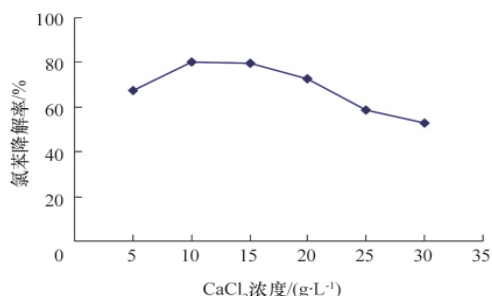


图2 交联剂 CaCl_2 的浓度对固定化小球活性的影响
Fig. 2 Effect of CaCl_2 concentration on the activity of immobilized gel

2.1.3 包埋菌量对固定化小球活性的影响

图3为包埋菌量对固定化小球活性的影响。可以看出,包埋剂溶液与菌液最佳体积比为 $30:1$,随着包埋菌液量的增加,氯苯的降解率呈现先升高后降低的趋势。当PVA溶液与菌液的体积比小于 $30:1$ 时,固定化小球的降解性能随着包埋菌液量的增加而升高,原因是包埋量越大,单位个体小球内的活性菌数越大。当PVA溶液与菌液的体积比大于 $30:1$,固定化小球的降解性能随着菌液量的增加而降低,原因是从外部传递到小球内部的氯苯量一定,包埋菌液量越大,单位个体小球内的菌数也越大,能够提供给单位菌体生长所需的碳源(氯苯)越少,菌体的生长受到抑制。

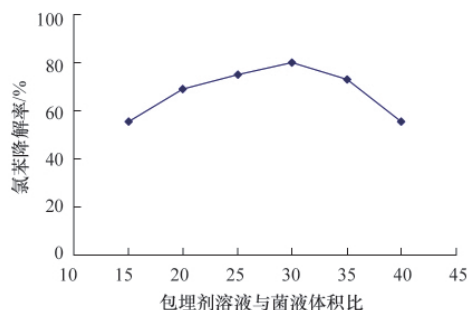


图3 包埋菌量对固定化小球活性的影响
Fig. 3 Effect of embedded bacteria volume on the activity of immobilized gel

2.1.4 SA 浓度对固定化小球活性的影响

利用 $\text{PVA-H}_3\text{BO}_3$ 法固定的氯苯降解菌传质性和机械强

度虽然较好,但成球困难。将PVA与SA复合后,削弱PVA分子链中的氢键作用,降低了PVA的黏稠度,使制备过程更加容易,传质性和机械强度也更好^[19]。图4给出了SA浓度对固定化小球活性的影响。可以看出,SA最佳质量分数为 1% 。当SA浓度小于 1% 时,对PVA的性能影响较小,随着SA浓度增大,PVA-SA复合凝胶的性能逐渐明显。当SA浓度大于 1% ,随着SA浓度增大,PVA-SA复合凝胶的高分子网络结构越紧密,传质性受到影响。

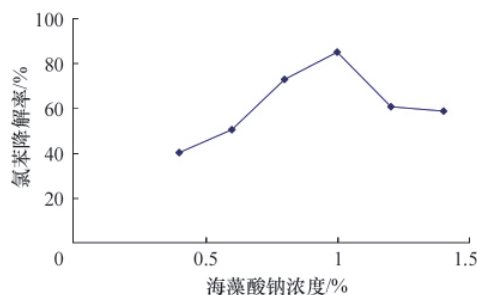


图4 SA浓度对固定化小球活性的影响
Fig. 4 Effect of SA concentration on the activity of immobilized gel

2.1.5 固定化小球的粒径对固定化小球活性的影响

图5给出了固定化小球粒径对固定化小球活性的影响。可以看出,随着小球粒径的减小,氯苯降解率增加。降解效率最高的为 0.5mm 的固定化小球,为 80.11% 。原因是固定化小球的粒径越小,单位体积的固定化小球与污染物接触面积也越大,越利于污染物向固定化小球内部的传递,越有利于载体固定化细胞的生长,提高了氯苯的降解率。

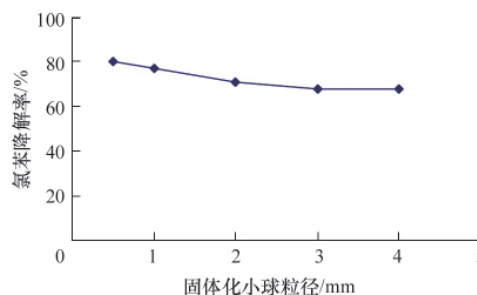


图5 固定化小球粒径对固定化小球活性的影响
Fig. 5 Effect of the diameter of immobilized gel on the activity of immobilized gel

2.2 固定化小球修复氯苯污染地下水的模拟实验结果

2.2.1 固定化微生物、游离微生物与未添加微生物对氯苯污染地下水的修复效果

图6给出了A、B、C柱氯苯降解率随时间的变化情况。可以看出,在整个实验运行期A、B、C模拟柱子中取样口的氯苯降解率高低顺序一直是C柱>B柱>A柱,在第15天时A、B、C柱子的氯苯降解率分别是 3.68% 、 59.25% 、 66.34% 。说明PVA-SA复合凝胶固定的微生物降解能力要强于游离微生物和土著微生物。A柱前12d氯苯的降解率几乎为零,12d后A

柱中氯苯的降解率提高,是因为部分土著微生物逐渐适应外界环境,开始利用少量氯苯作为碳源进行生长和增殖。C、B柱分别在5d、9d后降解率提升速度加快,这是由于PVA-SA复合载体对微生物起到一定的保护作用,减少了周围环境对微生物的毒害,使固定化微生物与游离微生物相比活性较高,增强了微生物适应环境的能力,所以固定化微生物与游离微生物相比能够较快处于活性较高的状态。

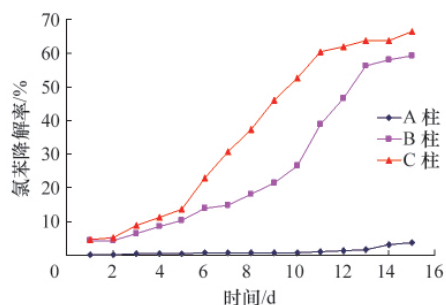


图6 A、B、C柱的氯苯降解率随时间的变化

Fig. 6 Curve of chlorobenzene degradation rate in A, B and C laboratory columns with the time change

2.2.2 含水层介质粒径与小球粒径比对固定化微生物修复氯苯污染地下水效果的影响

在整个运行期,C、D、E模拟柱子中均投加1mm粒径的固定化小球,介质粒径与小球粒径比值分别为0.5—1、1—2、2—5,大小顺序是E柱>D柱>C柱,由图7所示,氯苯降解率高低顺序是E柱>D柱>C柱,其中介质粒径与小球粒径比值在2—5之间时,氯苯降解率高达78.16%,介质粒径与小球粒径比值在1—2之间时氯苯的降解率为74.28%,比值在0.5—1.0之间时,氯苯的降解率为66.34%。这说明含水层介质粒径与小球粒径的比值越大,介质颗粒之间的空隙越大,越有利于小球在含水层介质中的迁移,从而有利于固定化微生物与污染物的接触传递,所以E柱的氯苯降解率最大,C柱最小。

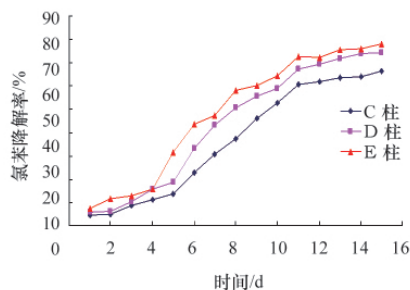


图7 C、D、E柱的氯苯降解率随时间的变化

Fig. 7 Curve of chlorobenzene degradation rate in C, D and E laboratory columns with the time change

3 结论

通过静态因素选择实验,确定PVA-SA复合凝胶固定氯苯降解菌的最佳包埋条件为PVA浓度80g/L,CaCl₂浓度为

10g/L,包埋剂与菌液体积比30:1,SA质量分数1.0%。通过控制单一变量实验,采用不同粒径小球对氯苯进行降解,结果表明,小球粒径越小,越有利于降解效率的提高。

动态模拟实验结果表明,固定化小球对氯苯污染地下水中的污染物的降解率要高于游离微生物和土著微生物。在投加固定化小球粒径为1mm的情况下,含水层介质粒径与小球粒径比越大,越有利于固定化小球在含水层介质中的迁移,从而越有利于氯苯降解效率的提高。含水层介质粒径与小球粒径比在2—5之间时,15d后氯苯降解率高达78.16%。

参考文献 (References)

- [1] 王玉芬, 张肇铭, 胡筱敏, 等. 含氯苯类化合物废水处理技术研究进展[J]. 工业安全与环保, 2006, 32(3): 37-40.
Wang Yufen, Zhang Zhaoming, Hu Xiaomin, et al. *Industrial Safety and Environmental Protection*, 2006, 32(3): 37-40.
- [2] 王建龙, 周定, 柳萍. 固定化生物催化剂技术新进展: 联合固定化技术及其应用[J]. 生物工程进展, 1994, 14(2): 35-39.
Wang Jianlong, Zhou Ding, Liu Ping. *Progress in Biotechnology*, 1994, 14(2): 35-39.
- [3] Vogel T M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1996, 7(3): 311-316.
- [4] Vandevivere P, Kirchman D L. Attachment simulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(10): 3280-3286.
- [5] Haley J L, Hanson B, Enfield C, et al. Evaluating the effectiveness of groundwater extraction systems [J]. *Ground Water Monitor Rev*, 1991, 11 (1): 119-124.
- [6] Skeen R S, Luttrell S P, Brouns T M, et al. In-situ bioremediation of hanford groundwater[J]. *Remediation Journal*, 1993, 3(3): 353-367.
- [7] Harvey R W, George L H, Smith R L, et al. Transport of microspheres and indigenous bacteria through a sandy aquifer: Results of natural-and forced-gradient tracer experiments[J]. *Environmental Science and Technology*, 1989, 23(1): 51-56.
- [8] 马会强, 张兰英, 张洪林, 等. 新型生物反应墙原位修复石油烃污染地下水[J]. 重庆大学学报, 2011, 34(5): 99-104.
Ma Huiqiang, Zhang Lanying, Zhang Honglin, et al. *Journal of Chongqing University*, 2011, 34(5): 99-104.
- [9] 郑西来. 地下水污染控制[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2009.
Zheng Xilai. *Groundwater pollution control* [M]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press, 2009.
- [10] Peyman M, Ronald J N, Denis M, et al. Transport of gellan gum microbeads through sand: An experimental evaluation for encapsulated cell bioaugmentation [J]. *Journal of Environmental Management*, 2003, 69(1): 249-259.
- [11] Manikandan R, Prabhu H J. Biodegradation of chlorbenzene using immobilized crude extracts in packed bed column [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(19): 2259-2266.
- [12] 洪梅, 毛霞飞, 王冬, 等. 固定化微生物去除地下水中氯苯研究[J]. 科技导报, 2011, 29(6): 43-47.
Hong Mei, Mao Xiafei, Wang Dong, et al. *Science & Technology Review*, 2011, 29(6): 43-47.
- [13] 毕海涛, 张兰英, 刘娜, 等. 无机材料对PVA-H₃BO₃包埋固定化方法的改进[J]. 吉林大学学报: 地球科学版, 2011, 41(1): 241-245.
Bi Haitao, Zhang Lanying, Liu Na, et al. *Journal of Jilin University: Earth Science Edition*, 2011, 41(1): 241-245.

(责任编辑 岳臣)