

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2014.06.003

光合细菌固定化及其对铜绿微囊藻的抑制

吴珊^{1,2},任丽艳^{1,2},厉智成^{1,2}

(1. 北京工业大学建筑工程学院, 北京 100124; 2. 北京市水质科学与水环境恢复工程重点实验室, 北京 100124)

摘要: 为探讨光合细菌固定化后对铜绿微囊藻的抑制作用, 比较了光合细菌的5种不同固定化方法及其特性, 确定了最佳的固定化方法; 在实验室条件下进行菌藻共同培养, 通过试验研究了固定化后的光合细菌与游离光合细菌对铜绿微囊藻生长的影响差异并确定了固定化光合细菌的最佳投加量。结果表明: 采用沸石、碳酸钙和海藻酸钠混合包埋光合细菌的固定化方法最佳; 固定化光合细菌对铜绿微囊藻抑制作用显著, 为83.55%, 而相同量的游离光合细菌的抑制作用只有26.81%; 最佳固定化光合细菌投加量为36 g/L。

关键词: 细菌固定化技术; 光合细菌; 铜绿微囊藻; 抑制效应

中图分类号: TU992.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-1980(2014)06-0481-05

Inhibiting effect of immobilized photosynthetic bacteria on *Microcystis aeruginosa*

WU Shan^{1,2}, REN Liyan^{1,2}, LI Zhicheng^{1,2}

(1. College of Architecture and Civil Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China;
2. Key Laboratory of Beijing for Water Quality Science and Water Environment Restoration Engineering, Beijing 100124, China)

Abstract: The inhibiting effects of immobilized photosynthetic bacteria on *Microcystis aeruginosa* were investigated in this study. First, through comparison of five immobilization methods and their features, the optimal immobilization method was determined. Then, photosynthetic bacteria and *Microcystis aeruginosa* were co-cultured through laboratory experiments. After the experiments, the impacts of immobilized photosynthetic bacteria and mobile photosynthetic bacteria on the growth of *Microcystis aeruginosa* were studied, and the optimal dosage of immobilized photosynthetic bacteria was determined. The study results show that the optimal method for immobilization of photosynthetic bacteria was to mix zeolites, calcium carbonate, and sodium alginate. The immobilized photosynthetic bacteria had a significant inhibiting effect on *Microcystis aeruginosa*, with an inhibition rate of 83.55%, while the mobile photosynthetic bacteria, at the same amount, had an inhibition rate of only 26.81%. The optimal dosage of immobilized photosynthetic bacteria was 36 g/L.

Key words: bacteria immobilization technology; photosynthetic bacteria; *Microcystis aeruginosa*; inhibiting effect

随着含氮(N)、磷(P)等营养物质的污水大量排入水体, 水中藻类暴发性增长, 造成水体严重富营养化, 给水体质量、用水安全、景观环境甚至人类健康各方面都带来不利影响, 为此有效控制藻类过度生长成为环境保护领域的研究热点, 其中向水中投加微生物、借助菌藻相互作用来控制藻类繁殖的绿色技术开始受到关注^[1]。研究显示, 假单胞菌、黄杆菌、中性柠檬酸菌、光合细菌等通过释放有毒物质或通过 与藻类竞争营养物质可抑制藻类的生长^[2-6], 其中, 光合细菌(Photosynthetic bacteria)适应性强, 在厌氧和好氧条件下都能生长, 其紫色非硫细菌属在水产养殖、有机废水处理等净化污染水体方面具有其他微生物无法替代的优势^[7-10]。

利用光合细菌以游离细胞的形式处理富营养化水体时, 光合细菌在流水条件下易被冲走, 静水条件下易被

其他生物所食用,且在缺乏吸附和繁殖载体时难以稳定地长期发挥功能。近年来光合细菌固定化技术开始受到重视,但如何获取高活性的固定化光合细菌及其对藻类抑制作用的效果还未见系统报道。本文通过试验分析比较了几种用于光合细菌固定化的载体,通过测定固定后光合细菌颗粒的各项理化指标,确定最佳的固定方法;并对比研究了游离光合细菌和固定化光合细菌对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

沼泽红假单胞菌(*Rhodospirillum rubrum*)购自中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心;铜绿微囊藻购自中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库。

在透光密闭瓶中装入光合细菌培养基^[8],接种20%~30%的光合细菌菌液,在30℃、光照为5000 lux条件下培养。试验前将培养5d的光合细菌悬液在无菌条件下10000 r/min离心10 min,沉淀后用生理盐水洗净再离心,重复3次。用BG11培养基配成OD680(OD为光密度,680指测定波长为680 nm)为2.6菌悬液用于试验。

1.2 方法

1.2.1 包埋固定化方法

固定化光合细菌的载体最常用的是海藻酸钠(SA)、聚乙烯醇(PVA)、沸石等。根据光合细菌的特点,试验选择了5种方法,分别为海藻酸钠基本固定化方法、4种凝胶剂(沸石、活性炭、碳酸钙、沸石和碳酸钙)分别与2%的海藻酸钠混合制成包埋剂溶液的改进方法。具体操作为:将采用包埋比为20%的浓缩光合细菌菌液加入包埋剂溶液中,用12号针头的无菌注射器从10 cm高处滴入质量分数为2%的CaCl₂饱和硼酸溶液中,放入冰箱中固定1 h形成均匀的小球,然后将pH调到8再继续固定化24 h。

1.2.2 固定化光合细菌颗粒的抑藻试验

无菌条件下将扩大培养10 d的铜绿微囊藻混匀后分装入500 mL的三角瓶中,每瓶装250 mL的等浓度藻液(初始藻细胞浓度为8.0×10⁵个/mL)。按浓度梯度分别加入0 g、9 g、18 g、27 g、36 g的固定化光合细菌颗粒、5 mL游离浓缩光合细菌菌液(相当于18 g固定化光合细菌颗粒的量)和等量的未包埋固定化光合细菌的颗粒作为空白对照组。每组设3个平行样,摇匀后置于光照培养箱中,培养条件为(25±1)℃,光暗比(光照时间与无光照时间之比)为12:12,光照强度为2000 lux。每天定时摇动2~3次,随机改变三角瓶的位置。自试验开始,每天定时测定藻液浓度。

1.2.3 固定化光合细菌颗粒的理化性质

a. 细胞活性的测定:用总有机碳(TOC)去除率表示。取一定数量的固定化光合细菌颗粒放入装有光合细菌培养基稀释液的250 mL三角瓶中,在光照培养箱中培养,5 d后测定三角瓶内的总有机碳浓度。总有机碳去除率=(初始TOC浓度-剩余TOC浓度)/初始TOC浓度×100%。

b. 机械强度测定:取固定后的光合细菌颗粒,通过施加砝码观察其被破坏情况,以所加砝码的质量来判断固定化光合细菌的相对强度。

c. 含水率测定:取一定数量固定化光合细菌颗粒,分别测定其含水状态下的湿重和经烘干后的干重(烘干至恒重)。含水率=(湿重-干重)/干重×100%。

d. 传质性的测定:通过固定化光合细菌颗粒的亚甲基蓝吸附百分比表示。取一定数量大小均匀的固定化光合细菌颗粒,放入滴有0.2%亚甲基蓝溶液的蒸馏水三角瓶中,分别测定初始和24 h后瓶内溶液在波长665 nm下的OD值。亚甲基蓝吸附百分比=(初始OD₆₆₅值-24 h后OD₆₆₅值)/初始OD₆₆₅值×100%。

e. 固定化光合细菌颗粒内部结构观察。采用扫描电镜观察,其步骤为:(a)用2.5%戊二醛固定液将固定化光合细菌颗粒固定1 h,用磷酸缓冲液处理;(b)依次用不同比例乙醇脱水各15 min;(c)用100%乙醇脱水60 min;(d)用醋酸异戊醋置换30 min;(e)用CO₂临界点干燥器干燥颗粒;(f)在真空下喷金;(g)在电镜下观察、拍照。

1.2.4 其他测定方法

总有机碳浓度采用耶拿 multi N/C 3100 型快速测定仪,用直接法测定。

藻细胞浓度采用XB-K-25型血颗粒计数板,在Olympus显微镜下以视野法计数。试验期间定时取样,

每个样品计数 2 次,取平均值。

藻类的相对抑制率根据藻细胞密度计算。计算公式为^[11]

$$I = \left(\frac{N_0 - N}{N_0} \right) \times 100\%$$

式中: I ——相对抑制率; N ——加入光合细菌试验组的藻细胞密度,个/mL; N_0 ——对照组藻细胞密度,个/mL。

2 结果与讨论

2.1 固定化颗粒的理化性质比较

2.1.1 不同包埋固定化方法光合细菌颗粒活性比较

陈光等^[12]研究表明,水中总有机碳含量与 COD 存在一定的相关关系,故以总有机碳去除率表征细胞的活性。图 1 是试验 5 d 后,5 种固定化方法总有机碳去除率的结果。由图 1 可见,添加剂的加入对固定化光合细菌颗粒总有机碳去除率有不同的提升效果。加入活性炭的总有机碳去除率最高,缘于活性炭本身多孔结构对有机物的吸附作用较强。加入沸石和碳酸钙对总有机碳去除率的影响次于活性炭,原因是沸石颗粒表面凹凸不平,有很多孔穴,且内部有碱金属和碱土金属的含水铝硅酸盐类^[13],有利于进入颗粒内的细菌生长;碳酸钙的加入使颗粒内部微环境变为微碱性,适宜光合细菌生长^[14]。

2.1.2 不同包埋固定化方法光合细菌颗粒机械强度比较

施加 20 g 砝码时,以海藻酸钠为包埋剂的光合细菌颗粒被压扁,以活性炭为包埋剂的光合细菌颗粒少许变形,仍保持椭圆形,未破碎,其他包埋剂颗粒保持良好球状;施加 30 g 砝码,以活性炭为包埋剂的光合细菌颗粒破碎,其他包埋剂颗粒保持良好球状;施加 50 g 砝码,以沸石或碳酸钙为包埋剂的光合细菌颗粒破碎,以沸石和碳酸钙为包埋剂的光合细菌颗粒略变形;增至 70 g 砝码,以沸石和碳酸钙为包埋剂的光合细菌颗粒破碎。可见,以沸石和碳酸钙固定的光合细菌颗粒机械强度最好,具有很高的坚韧性。

2.1.3 不同包埋固定化方法光合细菌颗粒含水率和传质性的比较

含水率和传质性指标可以用来表征固定化光合细菌颗粒内部成孔情况及营养物质的传递效果,且两者有一定的相关性。在成孔均匀的条件下,含水率越高,其传质性越好^[15]。图 2 是 5 种固定化方法对固定化光合细菌颗粒含水率和传质性的影响。添加剂的加入对固定化光合细菌颗粒含水率和传质性有不同的提升作用,说明加入添加剂形成的孔隙结构使水分子更易进入光合细菌颗粒内部。添加沸石和碳酸钙的光合细菌颗粒吸水性最强,5 d 后达到 1 875%,但如图 3 所示,较其他包埋固定化方法,其内部存在致密层,成孔不均匀,传质效果不及活性炭。而添加活性炭的光合细菌颗粒吸水性较弱,只有 1 290%,缘于活性炭的位阻现象^[16];但其疏松的孔隙结构使其传质性效果良好,高达 50.75%。

2.1.4 固定化光合细菌颗粒的包埋载体选择

加入活性炭虽能在一定程度上改善传质性,但制出的颗粒呈黑色,严重影响透光性,不利于光合细菌的长期生长;而加入沸石和碳酸钙,一方面沸石孔隙结构相对发达,另外碳酸钙的加入使颗粒内部构成微碱环境,会减少钙离子的流失,相对增加了交联剂的浓度。因此,最终选择沸石和碳酸钙为凝胶剂。

2.2 固定化光合细菌颗粒与游离光合细菌对铜绿微囊藻生长的影响比较

由图 4 可见,空白组和游离光合细菌组在试验后的第 3 天进入对数生长期,但由图 5 可知第 6 天铜绿微

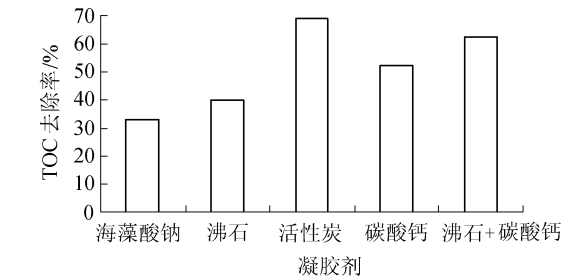


图 1 不同凝胶剂对固定化光合细菌颗粒活性的影响
Fig. 1 Impacts of different gels on activity of immobilized photosynthetic bacteria

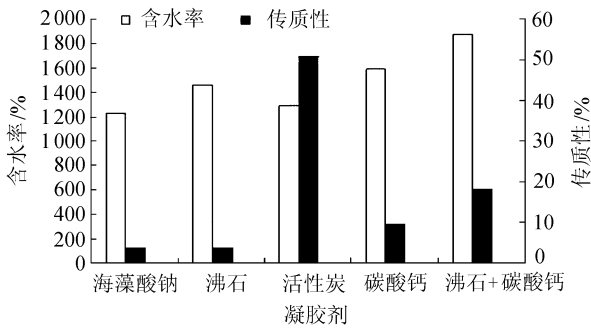


图 2 凝胶剂对固定化光合细菌颗粒含水率和传质性的影响
Fig. 2 Impacts of gels on moisture content and mass transfer of immobilized photosynthetic bacteria

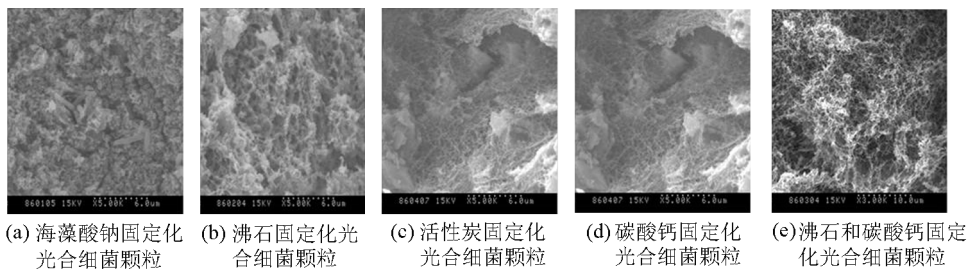


图3 固定化光合细菌颗粒扫描电镜图

Fig. 3 Immobilized photosynthetic bacteria particles observed under SEM

囊藻的相对抑制率为80.62%,第12天的相对抑制率仍能达到83.55%,而此时游离光合细菌组的相对抑制率为-2.38%。经海藻酸钠、沸石和碳酸钙固定化后的光合细菌,一方面由于载体的特性,即沸石具有发达的孔隙结构,孔隙中阳离子的存在使其具有静电吸引力,将营养物质吸附到孔隙中,同时碳酸钙形成的微碱环境有利于光合细菌的生长繁殖,提高了光合细菌的抑藻效果;另一方面包埋作用有效阻隔了氧气与菌体的接触,形成厌氧环境,使细菌能够保持活力,并能够自动更替菌膜,提高了菌体的作用时效,使其能稳定发挥抑藻作用。

2.3 固定化光合细菌颗粒投加量对铜绿微囊藻生长的影响

由图6可见,试验前3天固定化光合细菌颗粒组与空白组藻细胞密度差异小,因为铜绿微囊藻遇到逆境胁迫时具有自我修复机能而表现出一定的耐受性。另外铜绿微囊藻具有利用有机底物进行异养生长的能力^[17],因此,固定化光合细菌颗粒对铜绿微囊藻的抑制作用表现出一定的滞后效应。从图5可以看出,试验6d后,不同投加量的固定化光合细菌颗粒对铜绿微囊藻的抑制作用均能达到80%左右;试验12d后,9g组的抑制率仍能达到55.38%,抑藻效果具有一定的持续性。为保持水体的水生生态平衡,实际并不需要将水体的藻类控制到零水平,且固定化光合细菌颗粒投加量也直接影响处理技术成本。建议选择9g固定化光合细菌颗粒的投加量,即36g/L。

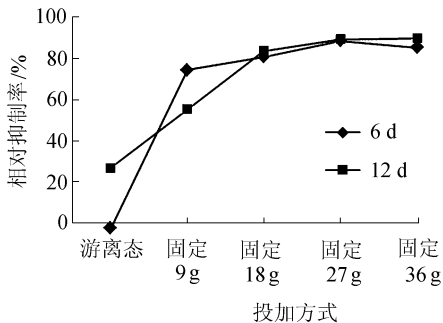


图5 光合细菌投加方式对铜绿微囊藻的抑制率

Fig. 5 Rate of inhibition of dosing methods of photosynthetic bacteria on *Microcystis aeruginosa*

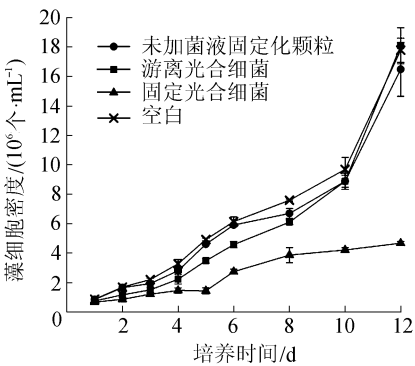


图4 固定化光合细菌颗粒和游离光合细菌对铜绿微囊藻生长的影响

Fig. 4 Impacts of immobilized photosynthetic bacteria particles and mobile photosynthetic bacteria particles on growth of *Microcystis aeruginosa*

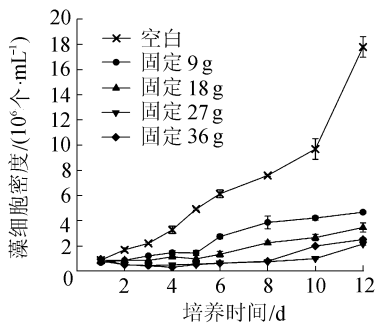


图6 固定化光合细菌颗粒投加量对铜绿微囊藻生长的影响

Fig. 6 Impact of immobilized photosynthetic bacteria dosage on growth of *Microcystis aeruginosa*

3 结 论

a. 通过5种不同载体的固定化光合细菌颗粒的理化指标比较,采用沸石和碳酸钙加质量分数为2%的

以海藻酸钠为包埋剂的光合细菌颗粒机械强度高、含水率高、孔隙结构均匀疏松,但细胞活性和传质性不及以活性炭为包埋剂的光合细菌颗粒,而活性炭的加入使所制出的颗粒呈黑色,影响透光性,不利于光合细菌的持续生长。最佳的固定化方法为质量分数分别为 1% 的沸石和碳酸钙加上 2% 的海藻酸钠。

b. 在菌藻共同培养下,相比游离细菌,固定化光合细菌能显著提高其对铜绿微囊藻的抑制作用,相对抑制率可高达 85%。

c. 随着固定化光合细菌投加量的增加,抑制作用并没有显著增强。综合考虑技术经济性,建议采用 36 g/L 的投加量。

综上所述,采用固定化技术,使光合细菌实现固着生长,可以有效提高光合细菌对藻类的抑制效率,为利用光合细菌控制相对开放的水域中水体富营养化现象提供了理论依据。

参考文献:

[1] 朱亮,苗伟红,严莹. 河流湖泊水体生物-生态修复技术述评[J]. 河海大学学报:自然科学版,2005,33(1):59-62. (ZHU Liang,MIAO Weihong,YAN Ying. Comments on biologic-ecological rehabilitation techniques for rivers and lakes[J]. Journal of Hohai University:Natural Sciences,2005,33(1):59-62. (in Chinese))

[2] DAKHAMA A. Isolation and identification of antialgal substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Appl Phycol,1993,5(9):297-306.

[3] 袁峻峰,孟智芳,陈德辉,等. 中性柠檬酸菌对几种常见藻类生长的他感作用[J]. 淡水渔业,1999,29(4):12-15. (YUAN Junfeng,MENG Zhifang,CHEN Dehui,et al. Alleopathy of *Citrobacter intermedium* on growth of several common algae[J]. Freshwater Fisheries,1999,29(4):12-15. (in Chinese))

[4] 高杨. 硝化细菌制剂对水华藻类的影响[D]. 青岛:青岛理工大学,2010.

[5] 牛丹丹,郑青松,刘兆普. 溶藻细菌 YZ 对铜绿微囊藻的溶藻特性研究[J]. 中国环境科学,2011,31(2):321-326. (NIU Dandan,ZHENG Qingsong,LIU Zhaopu. Algicidal effect of an algae-lysing bacterium YZ on *Microcystis aeruginosa*[J]. China Environmental Science,2011,31(2):321-326. (in Chinese))

[6] 李保珍,冯佳,谢树莲. 光合细菌对铜绿微囊藻生长的抑制效应[J]. 生态环境学报,2009,18(5):1736-1740. (LI Baozhen,FENG Jia,XIE Shulian. Inhibiting effect of Photosynthetic bacteria on *Microcystis aeruginosa*[J]. Ecology and Environmental Sciences,2009,18(5):1736-1740. (in Chinese))

[7] 方明成,吴珊,李桂枝. 光合细菌处理制药废水可行性研究[J]. 水利水电科技进展,1998, 18(5):36-38. (FANG Mingcheng,WU Shan,LI Guizhi. Pharmaceutical wastewater treatment by Photosynthetic bacteria feasibility studies[J]. Advances in Science and Technology of Water Resources,1998,18(5):36-38. (in Chinese))

[8] 常会庆,王世华,寇太记. 固定化光合细菌对水体富营养化的去除效果[J]. 水资源保护,2010,26(3):64-67. (CHANG Huiqing,WANG Shihua,KOU Taiji. Effects of immobilized photosynthetic bacteria on eutrophic water[J]. Water Resources Protection,2010,26(3):64-67. (in Chinese))

[9] LIANG C M,HUNG C H,HSU S C,et al. Purple nonsulfur bacteria diversity in activated sludge and its potential phosphorus accumulating ability under different cultivation conditions[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2010,86:709-719.

[10] NAGADOMI H,KITAMURA T,WATANABE M,et al. Simultaneous removal of chemical oxygen demand (COD),phosphate, nitrate and H₂S in the synthetic sewage wastewater using porous ceramic immobilized photosynthetic bacteria[J]. Biotechnology Letters,2000,22:1369-1374.

[11] 李锋民,胡洪营. 芦苇抑藻化感物质的分离及其抑制蛋白核颗粒藻效果研究[J]. 环境科学,2004,25(5):89-92. (LI Fengmin,HU Hongying. Isolation and effects on green alga *Chlorella pyrenoidosa* of Algal-Inhibiting allelochemicals in the macrophyte, *Phragmites communis* tris[J]. Environment Science,2004,25(5):89-92. (in Chinese))

[12] 陈光,刘廷良,孙宗光. 水体中 TOC 与 COD 相关性研究[J]. 中国环境监测,2005, 21(5):10-12. (CHEN Guang,LIU Yanliang,SUN Zongguang. Research of the correlation between TOC and COD in water[J]. Environmental Monitoring in China,2005, 21(5):10-12. (in Chinese))

[13] CLAUDE E S,BOYD S. Effects of zeolite,formalin,bacterial auglnentation,and aeration on total ammonia nitrogen concentrations [J]. Aquaculture,1993,11(6):3-6.

[14] 钱大益,朱益丹,宋存义,等. 光合细菌的生长条件[J]. 北京科技大学学报,2005,27(4):156-158. (QIAN Dayi,ZHU Yidan,SONG Cunyi,et al. Growth conditions of Photosynthetic bacteria[J]. Journal of University of Science and Technology Beijing,2005,27(4):156-158. (in Chinese))

[15] 张长利,杨宏,王景晶,等. 聚乙烯醇固定锰氧化细菌的试验研究[J]. 安全与环境工程,2013,20(1):49-52. (ZHANG Changli,YANG Hong,WANG Jingjing,et al. Experimental study on the immobilization of manganese-oxidizing bacteria by polyvinyl alcohol[J]. Safety and Environmental Engineering,2013,20(1):49-52. (in Chinese))

[16] CHANG I S,KIM C I,NAM B U. The influence of poly-vinyl-alcohol (PVA) characteristics on the physical stability of encapsulated immobilization media for advanced wastewater treatment[J]. Process Biochemistry,2005,40:3050-3054.

[17] BURKHOLDER J M,GLIBERT P M,MIXOTROPHY S H M. A major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters[J]. Harmful Algae,2008,8(1):77-93.