

文章编号:1008-1542(2011)01-0098-05

## 固定化真菌处理土霉素废水的研究

罗 晓<sup>1,2</sup>, 王 婷<sup>1,2</sup>

(1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018; 2. 河北省污染防治生物技术重点实验室, 河北石家庄 050018)

**摘 要:**以自行分离培育的毛霉 BFL-5 优势菌株为试验菌种, 采用海藻酸盐包埋法制备固定化真菌, 经活化处理后, 进行处理土霉素废水的试验, 其 COD 去除率可稳定在 80% 以上, 土霉素的降解率可达 95% 以上。显微镜观察结果说明了海藻酸盐包埋法制备的固定化真菌属固定化活细胞, 包埋的孢子经活化后成长为菌丝体, 因而降解活力显著增大。

**关键词:**固定化真菌; 土霉素; 废水处理; 优势菌株

中图分类号: X703 文献标志码: A

## Treatment of oxytetracycline wastewater by immobilized fungus

LUO Xiao<sup>1,2</sup>, WANG Ting<sup>1,2</sup>

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018, China; 2. Hebei Key Laboratory of Biological Technique for Pollution Control, Shijiazhuang Hebei 050018, China)

**Abstract:** One dominant strain of *Mucor* BFL-5 was separated and cultivated, and used as test organism. Alginate embedding method was used to immobilize fungi, which was activated before Terramycin wastewater treatment test. The COD removal rate is more than 80%, and oxytetracycline degradation rate is up to 95%. Microscopic observation results show the fungi embedded in alginate are immobilized living cells. Embedded spores grow into mycelia by activating, thus their oxytetracycline degradation ability is significantly increased.

**Key words:** immobilized fungi; oxytetracycline; wastewater treatment; dominant strain

固定化真菌技术在促进菌体生长和产酶方面比悬浮培养有明显的优势, 主要是由于载体有利于营养物质的传递以及菌丝体的充分伸展, 进而促进菌体的次生代谢, 提高产酶量<sup>[1]</sup>。近年来这一技术在废水生物处理中的应用研究与日俱增<sup>[2]</sup>, 但是用于处理抗生素废水方面的研究报道较少, 笔者以土霉素废水为处理对象, 研究固定化真菌的制备条件及对土霉素废水的处理效果。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种来源

试验菌种为 BFL-5 菌株, 该菌种是由河北省污染防治生物技术重点实验室在采集腐朽树木上生长的真菌样品的基础上, 通过反复分离、筛选获得的具有对废水脱色能力强并可降解多种有机污染物的优势菌株,

经鉴定该菌株属毛霉属(*actinomucor elegans*)。

## 1.2 主要试剂

氢氧化钠、盐酸、海藻酸钠、氯化钙、葡萄糖、酒石酸钠、琥珀酸钠、磷酸等,均为分析纯;甲醇为色谱纯,土霉素对照品来自中国药品生物制品检定所,质量分数为88.2%。

## 1.3 设备与仪器

试验所用主要设备与仪器见表1。

## 1.4 培养基

### 1.4.1 固体培养基

1) 制备土豆液:新鲜土豆洗净去皮后称取100 g,切成小块,置于烧杯中,加入500 mL水,加热至70℃,放置30 min,冷却后用双层纱布过滤取其滤液,再定容到500 mL。

2) 在上述土豆汁滤液中加入10 g的葡萄糖,1.5 g的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.75 g的 $\text{MgSO}_4$ ,10 g的琼脂,加热搅拌溶解,pH值调节为4.5左右。

3) 上述培养基分装于锥形瓶或试管后放入立式压力蒸汽灭菌器,在压力1.14 kPa下,灭菌20 min。灭菌后将锥形瓶内的培养基趁热分装于平皿中制备固体平板培养基。

### 1.4.2 液体培养基

按上述方法制备1.0 L土豆液加入烧杯中,然后依次加入0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,0.05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.01 g的 $\text{CaCl}_2$ ,10 g的葡萄糖,0.2 g的氯化铵,0.5 mL体积分数为3%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,0.28 g的酒石酸钠,0.54 g的琥珀酸钠,用玻璃棒搅拌使其溶解,分装于锥形瓶中放入立式压力蒸汽灭菌器中在压力为1.14 kPa个灭菌20 min。

### 1.4.3 菌种驯化液体培养基

在1 L液体培养基加入50 mg的土霉素配制成菌种驯化液体培养基,用于菌种驯化,使其适应降解土霉素<sup>[3-5]</sup>。

## 1.5 菌体培养及孢子悬浮液的制备

将试管保存的菌种接种于菌种驯化液体培养基上,30℃恒温驯化培养48 h,然后转接到平皿固体培养基上,于30℃下培养48 h,待孢子形成后用无菌生理盐水洗脱孢子,倒入带有玻璃珠的三角瓶中,充分振荡使孢子悬浮液均匀,然后在显微镜下用血球计数板计数测定出悬浮液孢子浓度,调节用水量可以获得试验所需的浓度的孢子悬浮液。

## 1.6 固定化方法<sup>[6]</sup>

取100 mL质量分数为4%的无菌海藻酸钠溶液与100 mL孢子浓度为 $10^6$ 个/mL的孢子悬浮液混合均匀,用注射器将混合液滴入质量分数为4%的 $\text{CaCl}_2$ 溶液中,形成均匀规则粒径为3 mm的小球,静止固化8 h后,用无菌去离子水清洗3次,即制得固定化真菌,收集备用。同时制备不含真菌的海藻酸钙小球,做空白对比试验。

## 1.7 土霉素含量的测定方法

采用高效液相色谱法来测定土霉素含量具有快速、准确、省时的特点。本试验所用仪器为日本岛津LA-10A高效液相色谱仪;SPD-M10AVP二极管检测器;Shimadzu ODS C18色谱柱(150 mm×6.0 mm,5 μm)。测定土霉素废水中土霉素含量时的色谱条件:流动相为0.1%(体积分数)磷酸与甲醇(其体积比为40:60);检测波长为254 nm;进样量为20 μL;流量为0.7 mL/min;柱温为35℃。用此方法土霉素可得到很好地分离,出峰时间大约为4.9 min,操作简单。在此色谱条件下进行精密度试验,重复进样5次,RSD值为1.12%;废水中土霉素质量浓度为5~50 μg/mL时,与峰面积大小成良好的线性关系。回归方程为 $y = 5 \times 10^7 x + 102\ 846$ , $R^2 = 0.999\ 7$ 。

表1 试验设备与仪器

Tab.1 Instruments and equipments of experiment

仪器名称	型号	生产厂家
立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-30SI型	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
超净工作台	SW-CJ-1BU型	苏净集团安泰公司
生化培养箱	250B	江苏省金坛市宏华仪器厂
恒温振荡培养箱	BS-1E	江苏省金坛市宏华仪器厂
可见分光光度计	722E	上海光谱仪器有限公司
照相显微镜	BHB-3A	奥林巴斯光学有限公司
高效液相色谱仪	LA-10A	岛津公司

## 2 结果与讨论

### 2.1 固定化真菌的活化与显微观察

以孢子悬浮液为材料制备出来的固定化真菌需要经过活化处理才能具有较高的生物活性,方可用于降解废水的试验。活化处理的过程是将制备出来的固定化真菌小球于滤纸上吸去外表水分,量取 30 mL 表观体积的固定化真菌小球放入装有 100 mL 土霉素废水的锥形瓶中,在 30 ℃,转速为 140 rad/min 的恒温振荡培养箱中进行活化培养 24 h,使固定化真菌小球内部的孢子萌发,菌丝充分生长。用照相显微镜观察活化培养前后的固定化真菌小球切片并拍摄图片。图 1 所示为包埋物内的孢子,图 2 可见固定化真菌小球内部生长着茂密的真菌菌丝(左侧黑色部分)及小球表面的菌丝(右侧)。观察证明海藻酸盐固定化真菌属固定化活细胞,经过活化处理后真菌菌丝生长良好。

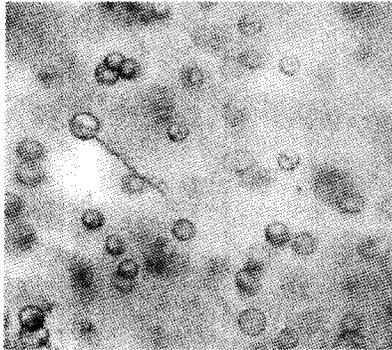


图 1 固定化真菌小球内部的孢子显微照片

Fig.1 Micrograph of spores in fungi embedded globule

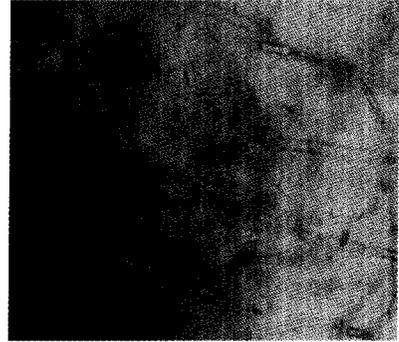


图 2 固定化真菌小球表面菌丝显微照片

Fig.2 Micrograph of mycelia on surface of fungi embedded globule

### 2.2 固定化真菌处理土霉素废水的降解特性

本研究以石家庄市某制药厂的土霉素废水为处理对象,试验废水的水质为  $\rho(\text{COD}_{\text{Cr}}) = 3\ 674\ \text{mg/L}$ ,土霉素的质量浓度为  $50.00\ \mu\text{g/mL}$ ,pH 值为 5.6。在锥形瓶中加入土霉素废水,再加入表观体积为 20% 的经活化处理的固定化真菌小球,放入恒温振荡培养箱振荡处理,定时取样分析。

#### 2.2.1 固定化真菌对土霉素废水处理的 $\text{COD}_{\text{Cr}}$ 去除规律

上述试验废水经固定化真菌处理后,每隔 8 h 取样测定废水  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  的质量浓度,并计算  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  的去除率,以分析固定化真菌对土霉素废水处理的  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  去除规律<sup>[7-9]</sup>。 $\text{COD}_{\text{Cr}}$  的测定结果及其去除率随处理时间的变化见图 3。

由图 3 可知,经固定化真菌降解后,土霉素废水的  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  质量浓度值显著下降,由原水的  $3\ 674\ \text{mg/L}$  降低到  $621\ \text{mg/L}$ ;去除率稳步上升,24 h 时  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  的去除率为 45.4%,48 h 时  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  的去除率为 74.33%,56 h 时  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  去除率达到 80.23%,此后  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  去除率维持在 80% 以上。

#### 2.2.2 固定化真菌的土霉素降解特性

上述试验废水经固定化真菌处理后,每 6 h 取一次样,测定废水中土霉素的含量<sup>[10]</sup>。废水中土霉素的质量浓度及其去除率的整理数据见表 2。

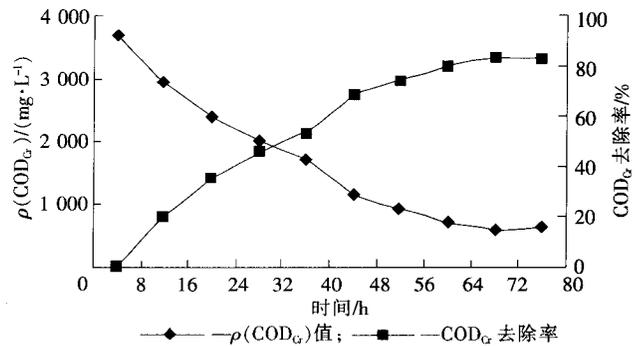


图 3  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  含量变化曲线

Fig.3 Change of  $\text{COD}_{\text{Cr}}$  content curve

表 2 土霉素含量测定结果

Tab.2 Result content of oxytetracycline

时间/h	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54
土霉素质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	50.00	42.97	34.79	29.37	18.81	8.02	2.97	2.04	0.62	0.60
去除率/%	0	14.06	30.42	41.27	62.39	83.96	94.06	95.93	98.77	98.80

土霉素质量浓度随处理时间的变化曲线见图4。

由图4可知,土霉素废水经固定化真菌处理后,废水中土霉素质量浓度显著下降,降解30 h时土霉素质量浓度由原水的50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  降为8.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,降解率达到83.96%;36 h时土霉素含量降为2.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,降解率达到94.06%,此后土霉素降解率保持稳定,维持在95%以上,表明固定化真菌能有效降解土霉素。

### 2.3 pH值对降解土霉素的影响

废水pH值影响生物的活性,因而也影响降解土霉素的效果。试验设计一系列不同的pH值来找出降解土霉素的最佳pH值。将土霉素废水的pH值调至4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,7.0。控制其他条件不变,处理36 h后取样过滤,测定剩余质量浓度,计算土霉素降解率。结果表明pH值在4.5~5.0降解率最大,达94.06%。在pH值为4.0和7.0时,降解率分别为90.50%和87.46%。但总体上pH值的变化没有引起降解率的强烈波动,而在生产实际中废水的pH值经常会有变动,在一定范围内pH值对降解土霉素的影响较小,有利于实际应用。土霉素降解率随pH值变化曲线见图5。

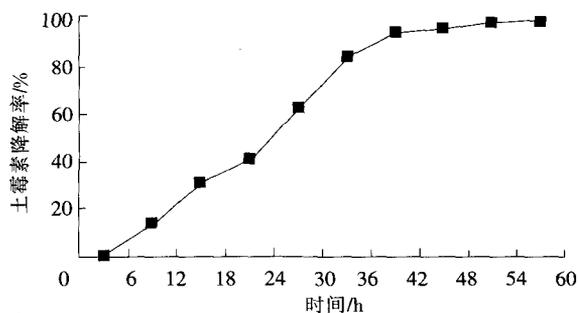


图4 土霉素质量浓度变化曲线

Fig. 4 Change curve of oxytetracycline content

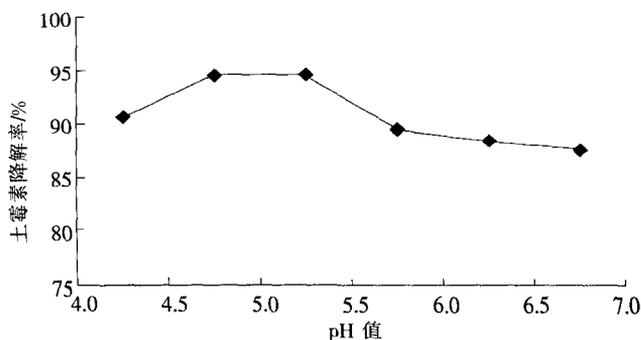


图5 pH值对土霉素降解率的影响曲线

Fig. 5 Curve of influence of pH to oxytetracycline decrease rate

## 3 结 论

1) 本研究采用海藻酸盐包埋法制备固定化真菌的最佳包埋条件:包埋剂海藻酸钠的质量分数为4%、固化剂 $\text{CaCl}_2$ 的质量分数为4%、交联时间为18 h、悬液孢子浓度约为 $5.0 \times 10^5$  个/ $\text{mL}$ ;制备的固定化真菌经活化后具有良好的降解性能。

2) 以照相显微镜观察活化培养前后的固定化真菌小球切片,观察证明海藻酸盐固定化真菌经过活化处理后小球内部孢子发育为真菌菌丝,固定化真菌属固定化活细胞。

3) 以固定化真菌BFL-5菌株处理土霉素废水,对土霉素的降解率可达95%以上, $\text{COD}_\text{Cr}$ 去除率可以达到80%。

4) 以固定化真菌BFL-5菌株处理土霉素废水,其降解土霉素最佳的pH值在4.5~5.0。

### 参考文献:

- [1] 曾永刚,高大文. 白腐真菌固定化技术及其影响因素的研究进展[J]. 哈尔滨工业大学学报(Journal of Harbin Institute of Technology), 2008,40(1):141-146.
- [2] 林 刚,文湘华,钱 易. 应用白腐真菌技术处理难降解有机物的研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备(Techniques and Equipment for Enviro Poll Cont), 2001, 2(4): 1-8.
- [3] 沈耀良,黄 勇,赵 丹,等. 固定化微生物污水处理技术[M]. 北京:化学工业出版社,2002.
- [4] 谢东海,韩 奇,唐文浩. 微生物固定化技术在污水处理中的应用[J]. 环境与可持续发展(Environmental and Sustainable Development), 2006(4): 48-50.
- [5] 刘宝友,罗湘南,刑质贤,等. 微生物降解含煤油废水的研究[J]. 河北科技大学学报(Journal of Hebei University of Science and Technology),2007,28(4):314-316.
- [6] 庞胜华,刘德明. 固定化微生物处理抗生素废水[J]. 江苏环境科技(Jiangsu Environmental Science and Technology), 2006, 19(1):

14-16.

- [7] 吴军见, 朱延美, 王 栋, 等. 固定化细胞技术在废水治理中的应用及降解动力学研究进展[J]. 辽宁化工(Liaoning Chemical Industry), 2002, 31(1): 20-25.
- [8] 吴 莎. 光合细菌处理 VB<sub>12</sub> 废水降解动力学研究[J]. 河北科技大学学报(Journal of Hebei University of Science and Technology), 2008, 29(2): 242-245.
- [9] 吴 莎. 光合细菌-膜生物反应器处理 VB<sub>12</sub> 废水的研究[J]. 河北科技大学学报(Journal of Hebei University of Science and Technology), 2008, 29(1): 23-26.
- [10] 刘 瑛, 陈运峰. 高效液相色谱法测定土霉素片的含量[J]. 中国药事(Chinese Pharmaceutical Affairs), 2004, 18(5): 300-301.

(上接第 10 页)

$$\begin{aligned}\bar{\lambda}(\tilde{\otimes}) &= \lambda p_0(\tilde{\otimes}) \left(1 + \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\rho^k}{(\tilde{\otimes}+1)(2\tilde{\otimes}+1)\cdots[(k-1)\tilde{\otimes}+1](k\tilde{\otimes}+1)}\right); \\ \bar{N}(\tilde{\otimes}) &= \sum_{k=1}^{\infty} k p_k(\tilde{\otimes}) = \sum_{k=1}^{\infty} k \frac{\rho^k}{(\tilde{\otimes}+1)(2\tilde{\otimes}+1)\cdots[(k-1)\tilde{\otimes}+1]} p_0(\tilde{\otimes}); \\ \bar{N}_q(\tilde{\otimes}) &= \sum_{k=1}^{\infty} k p_{k+1}(\tilde{\otimes}) = \sum_{k=1}^{\infty} k \frac{\rho^{k+1}}{(\tilde{\otimes}+1)(2\tilde{\otimes}+1)\cdots[(k-1)\tilde{\otimes}+1][k\tilde{\otimes}+1]} p_0(\tilde{\otimes}); \\ p_{损}(\tilde{\otimes}) &= \sum_{k=1}^{\infty} p_k(\tilde{\otimes})(1 - \alpha_k(\tilde{\otimes})) = 1 - p_0(\tilde{\otimes}) \left(1 + \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\rho^k}{(\tilde{\otimes}+1)(2\tilde{\otimes}+1)\cdots[(k-1)\tilde{\otimes}+1](k\tilde{\otimes}+1)}\right).\end{aligned}$$

例: 列车售票厅只有 1 个售票窗口, 假定顾客到达后加入队列的概率为  $\alpha_k(\otimes) = \frac{1}{k\otimes+1}$  ( $k \in \mathbf{N}$ ,  $\otimes$  为正实数), 即  $\alpha_k$  不只依赖队长  $k$ , 还依赖灰参数  $\otimes$  的取值, 本模型假定  $\otimes \in [0.5, 3]$  ( $\otimes$  的区间范围是通过抽样调查进行估计的),  $\lambda = 0.4$ ,  $\mu = 0.5$ . 试求相应指标。

可见  $\rho = \frac{0.4}{0.5} = 0.8$ , 当顾客数  $k = 50$  时, 顾客留下等待服务的概率为  $\alpha_k(\otimes) \in [0.0066, 0.0385]$ , 概率很小, 所以可以把顾客数  $k = 50$  近似为该售票口接待顾客的上限. 又因为  $\otimes \in [0.5, 3]$ , 所以  $\otimes$  的白化值为  $\tilde{\otimes} = a + \theta(b - a)$ ,  $\theta \in [0, 1]$ . 当求出各灰色指标值后, 再给出一个  $\theta$  值对其进行白化。

$p_0(\otimes) = \left\{1 + \rho + \frac{\rho^2}{\otimes+1} + \frac{\rho^3}{(\otimes+1)(2\otimes+1)} + \cdots + \frac{\rho^{50}}{(\otimes+1)(2\otimes+1)\cdots[49\otimes+1]} + \cdots\right\}^{-1}$ . 因为  $\otimes \in [0.5, 3]$ , 将其带入  $p_0(\otimes)$ , 得  $p_0(\otimes) \in [0.405, 0.505]$ .

同理:

$$\bar{\lambda}(\otimes) \in [0.200, 0.371]; \bar{N}(\otimes) \in [0.672, 1.254]; \bar{N}_q(\otimes) \in [0.538, 1.003]; p_{损}(\otimes) \in [0.072, 0.501].$$

通过调研, 笔者给出  $\theta$  值, 使  $\theta = 0.4$ , 则  $p_0(\tilde{\otimes}) \approx 0.445$ ;  $\bar{N}(\tilde{\otimes}) \approx 0.905$ ;  $\bar{N}_q(\tilde{\otimes}) \approx 0.724$ ;  $p_{损}(\tilde{\otimes}) \approx 0.244$ .

## 5 结 论

在 M/M/1 排队系统中, 笔者引入了灰参数使到达的顾客以概率  $\alpha_k(\otimes) = \frac{1}{k\otimes+1}$  加入队列排队等候服务, 示例结果表明该方法较符合实际, 丰富了 M/M/1 排队系统理论。

### 参考文献:

- [1] 陆传贵. 排队论[M]. 北京: 北京邮电学院出版社, 1993.
- [2] 台文志, 高世泽. 一类具有可变输入率的排队模型[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版)(Journal of Chongqing Normal University(Natural Science edition)), 2009, 26(1): 69-72.
- [3] 台文志, 敖 娜. 具有可变输入率的 M/M/1 排队模型的一个注解[J]. 西南民族大学学报(自然科学版)(Journal of Southwest University for Nationalities(Natural Science edition)), 2009, 35(3): 485-488.
- [4] 邓聚龙. 灰色预测与灰色决策[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2000.
- [5] 唐应辉, 唐小我. 排队论基础与分析技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [6] 刘思峰, 党耀国, 方志耕. 灰色系统理论及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2004.